

云南省部分聋生线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 的突变

李雪涛¹⁾, 刘德胜²⁾, 撒亚莲³⁾, 左荣霞³⁾, 贺军栋³⁾, 严新民³⁾, 孙俊¹⁾

(1) 昆明医科大学基础医学院; 2) 研究生院, 云南昆明 650031; 3) 云南省第一人民医院临床基础医学研究所, 云南省出生缺陷与遗传病研究重点实验室, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨云南省部分特教学校聋生携带氨基糖甙类抗生素致聋相关基因线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 12S rRNA A1555G 和 C1494T 的突变率. **方法** 采集 413 名耳聋学生及 232 名健康人群的外周静脉血, 提取基因组 DNA, PCR 扩增含 mtDNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 的基因片段, 扩增产物经直接测序进行基因突变位点的鉴定. **结果** 在 413 名耳聋学生中有 10 例携带 mtDNA 12S rRNA A1555G 均质突变, 携带率为 2.42%. 对照组中未检测到该位点的突变. 2 组人群中均未检测到 mtDNA 12S rRNA C1494T 突变. **结论** 云南省部分特教学校聋生携带 mtDNA 12S rRNA A1555G 的突变率与全国平均水平一致, 本研究为明确该地区耳聋的病因、防治及干预提供科学依据.

[关键词] 耳聋; 线粒体 DNA; 12S rRNA 基因; 基因突变

[中图分类号] R764.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0004 - 04

Mutation of mtDNA 12S rRNA A1555G and C1494T in Deafness Students from Yunnan Special Educational Schools

LI Xue - tao¹⁾, LIU De - sheng²⁾, SA Ya - lian³⁾, ZUO Rong - xia³⁾, HE Jun - dong³⁾, YAN Xin - min³⁾, SUN Jun¹⁾

(1) School of Basic Medical Science; 2) The Graduate School, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 3) Institute of Clinical and Basic Medical Sciences, The First People's Hospital of Yunnan Province, Yunnan Provincial Key Laboratory for Birth Defects and Genetic Diseases, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To determine the gene mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) 12S rRNA A1555G and C1494T that responsible for aminoglycoside ototoxicity with hearing impairment students in Yunnan special educational schools. **Methods** Genomic DNA was isolated from peripheral blood of 413 students with hearing impairment and 232 healthy controls. The subject's DNA fragments including 12S rRNA A1555G and C1494T was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and subsequently analyzed by direct sequencing to identify deafness-associated mutations. **Results** Ten cases were found to have mtDNA 12S rRNA A1555G homozygous mutation with 2.42% variable frequencies. We didn't find the A1555G mutation in the control group. On the other hand, there were no mutation of mtDNA 12S rRNA C1494T in all individuals. **Conclusions** The mutation rate of mtDNA 12S rRNA A1555G with deafness students in Yunnan special educational schools is close to the average level of the general Chinese deaf population. The results can help us to elucidate the genetic etiology, and provide scientific data for the prevention, treatment as well as intervention of deafness.

[Key words] Deafness; mtDNA; 12S rRNA gene; DNA mutation

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31060155)

[作者简介] 李雪涛 (1981~), 女, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主要从事临床应用解剖的研究工作. 刘德胜和李雪涛对本文有同等贡献.

[通讯作者] 撒亚莲. E-mail:sayalian@126.com

耳聋又名听觉障碍或听力丧失, 是由遗传因素和/或环境因素引起的严重影响人类生活质量的常见遗传病之一, 其中约 50%~60% 为遗传性聋. 在线粒体遗传缺陷的病人中有 42%~70% 为感音神经性耳聋. 已有研究表明, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 12S rRNA 突变是氨基糖苷类抗生素耳毒性的分子基础之一, 具有母系遗传特点. 其中, mtDNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 是常见的致聋突变位点^[1]. 但在不同地区、不同民族中, 其突变率不同. 戴朴等人检测 194 名乌鲁木齐特殊教育学校耳聋学生 A1555G 和 C1494T 突变携带率分别为 9.28% (18/194)、1.03% (2/194)^[2]. 王秋菊等报道, 来自云南某县的一个呈母系遗传的耳聋家系中有 9 人携带 C1494T 突变 (9/17), 而 mtDNA 12S rRNA 1555 位点的碱基序列正常^[3]. 薛希均等对云南省 10 个非综合征性聋家系中的 96 人 (听力正常 36 例, 感音神经性聋患者 60 例) 检测 mtDNA 12S rRNA A1555G, 发现 92 例 (95.8%) 有 A1555G 位点突变. 其中 7 例为异质性突变, 85 例为均质性突变^[4]. 本研究以云南省部分特殊教育学校聋生为研究对象, 通过 PCR 产物直接测序法来检测 413 名聋生携带 mtDNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 位点的突变率, 为明确该地区散发性耳聋的病因及较全面的了解中国人群致聋基因的突变类型和突变频率提供重要信息, 为该地区建立和完善临床聋病靶标基因的筛查流程及因地制宜地开展遗传咨询和预防干预提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组为德宏州特教学校、腾冲特教学校、保山特教学校、丽江特教学校、普洱特教学校等的耳聋学生, 对照组 232 例为听力正常的人群. 实验组 413 名, 包括女 179 例, 男 234 例, 平均年龄为 13.27 岁; 对照组为 232 名, 男 139 例, 女 93 例, 平均年龄为 17.13 岁. 在知情同意后, 采集 1~2 mL 外周静脉血 (EDTA 抗凝).

1.2 试剂

全血 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂 (2X Taq PCR MasterMix) 和电泳所需试剂购自北京百泰克生物技术有限公司.

1.3 主要仪器设备

离心机 (Hitachi, CR22G); PCR 仪 (Applied

Biosystems 2720 Thermal Cycler); 电泳槽和电泳仪 (BG-Power 600i); 凝胶电泳成像分析系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS); 低温冰箱 (RECVO 公司, 572L 型); 电热恒温三用水箱 (北京市永光明医疗仪器厂, HH-W21 600 型).

1.4 方法

1.4.1 模板 DNA 的提取 依照试剂盒说明书逐步抽提 DNA, 取 1 μ L 用琼脂糖凝胶电泳检测, 其余保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用.

1.4.2 引物设计与合成 从 Genbank 下载 mtDNA 基因序列 (NC_001807.4, gi:17981852), 采用 GeneTool 软件设计引物, 上游引物为 5'-CCAGAACACTACGAGCCACAGC-3'; 下游引物为 5'-TGC GCCAGGTTTCAATTTCTATC-3', 扩增片段为 637 bp.

1.4.3 mtDNA 12S rRNA 基因片段的聚合酶链反应 (pPolymerase chain reaction, PCR) PCR 扩增体系为 20 μ L, 含 2X Taq PCR MasterMix 10 μ L, 25 μ mol/L 上游、下游引物各 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L. 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存.

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 取 1 μ L PCR 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物.

1.4.5 PCR 产物直接测序 测序引物与 PCR 扩增引物相同. 对 PCR 产物用酒精沉淀法纯化, 经 Bigdye 测序反应, 用 ABI 3730XL 测序仪进行测序. 测序结果采用 GeneTool 软件分析.

2 结果

2.1 mtDNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增产物

对 413 名耳聋学生和 232 例健康人的外周血 DNA 样本进行 PCR 扩增, 均扩增到特异性条带, 其片段大小与预期结果相符合 (图 1).

2.2 mtDNA 12S rRNA 基因片段扩增测序分析

将全部样本的 PCR 扩增产物直接测序, 将其与 mtDNA 基因的标准序列 (NC_001807.4; gi:17981852) 比对, 在耳聋组中检测到 10 例 (2.42%) 携带 A1555G 均质突变 (图 2). 对照组中未检测到该突变. 2 组人群中未发现 C1494T 位点的突变.

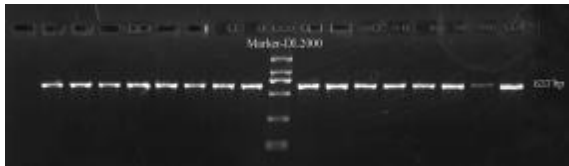


图1 含 mtDNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 位点的 PCR 扩增产物

Fig. 1 The PCR products of mtDNA 12S rRNA at A1555G and A1555G sites

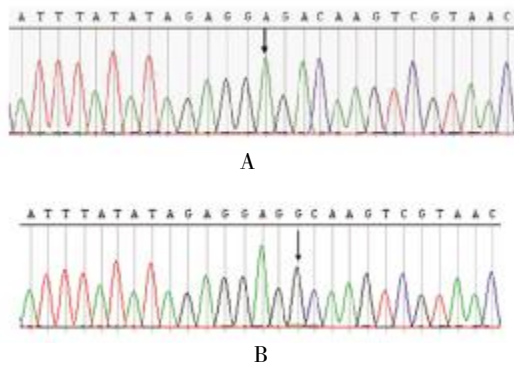


图2 mtDNA 12S rRNA A1555G 位点的测序

Fig. 2 The sequencing of mtDNA 12S rRNA at A1555G site

A:为野生型; B:为 A1555G 均质突变。

3 讨论

1993年 Prezant 等报道氨基糖苷类抗生素致聋 (aminoglycoside antibiotic induced deafness, AAD) 与母系遗传的线粒体基因突变有关^[6], 以 mtDNA 12S rRNA A1555G 突变最为常见. 随后相继在不同国家、不同民族中得到验证, 但其突变率存在较大差异. 除种族、地域和环境因素外, 可能与研究样本量的大小纳入标准不一致有关, 是散发病例, 还是有母系家族史, 有用氨基糖苷类抗生素病史, 按照统计学抽样调查最少样本量的估计公式计算, 检测 mtDNA 12S rRNA A1555G 突变率的样本量为 169 人^[6]. 本研究采集到 413 份云南西部部分地区特教学校聋生的标本, 学生主要来自当地城镇及村寨.

解放军总医院开展全国聋病分子流行病学调查结果提示 mtDNA 12S rRNA A1555G 位点的突变率为 1.0% ~ 3.0%^[7]. 王秋菊等在散发耳聋患者中检测出 mtDNA 12S rRNA A1555G 突变率为 5.0%, 在聋生中的检出率高达 12.0%. 王国建等用基因芯片检测 712 名双耳重度以上感音神经性耳聋患者 mtDNA 12S rRNA A1555G 及 C1494T 位点, 发现

15 名携带者, 突变率为 2.11% (15/712)^[8]. 而在温州、福州、武汉等地聋生中的携带率分别为 2.9%, 0.67%, 2.27%^[9,10], 而欧启水对来自福建省聋生及门诊的 325 例非综合征型耳聋患者检测 A1555G 突变, 发现 47 名阳性者, 其中 28 例为 mtDNA A1555G 均质性突变 (携带率为 8.62%), 19 例为异质性突变 (携带率为 5.85%)^[11]. 笔者在 413 例聋生中检测到 10 名学生携带 mtDNA 12S rRNA A1555G 突变, 携带率为 2.42% (10/413), 与全国平均水平一致. 对于 mtDNA 12S rRNA A1555G 突变个体, 笔者对其发放药物预警卡, 并进一步联系家人, 指导母系亲属避免使用氨基糖苷类抗生素.

2004 年, 赵辉等报道另外一个与母系遗传性耳聋相关的位点 mtDNA 12S rRNA C1494T^[12]. 2008 年, 王秋菊等发现 C1494T 突变是两个耳聋家系的分子病因^[3]. 2010 年, 李琦等在 125 名新疆聋生中检测到 2 名汉族学生携带 (突变率 1.60%, 2/125)^[13]. 李海峰等报道 2 个氨基糖甙类药物性耳聋及非综合征型耳聋家系的 7 名母系成员均存在 mtDNA 12S rRNA C1494T 同质性突变^[14]. 但 Li 等在 128 名来自温州特殊教育学校的聋生中没检测到 C1494T 突变, 而 A1555G 的突变率为 2.9%^[10]. 戴大春等在 261 名南京聋生中也没发现 C1494T 突变^[15]. 笔者在 413 例聋生中也没检测到上述研究表明该突变位点需进一步在不同种族、不同地区进行大样本验证.

目前认识到的致聋基因是有限的, 且基因型与表型 (听力) 不完全等同以及 mtDNA 受核基因等多因素调控. 因此, 对于遗传性耳聋患者仅靠检测 mtDNA 12S rRNA A1555G 和 C1494T 位点是远远不够的, 尚需进一步探讨致聋基因以及考虑与其他致聋相关突变位点的检测结合起来查找聋病分子病因^[16].

(致谢: 感谢德宏州特教学校、腾冲特教学校、保山特教学校、丽江特教学校、普洱特教学校等职业学校所有教职员工和学生在本课题研究中给予的支持和帮助)

[参考文献]

- [1] 管敏鑫, 赵立东. 与氨基糖甙类抗生素耳毒性相关的线粒体 12S rRNA 突变的流行病学特征[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(2): 98 - 105.
- [2] 张劲, 李琦, 戴朴, 等. 乌鲁木齐市特教学校重度感音神经性聋 GJB2 和线粒体基因常见突变调查[J]. 中华耳

- 科学杂志, 2007, 5(1): 60-63.
- [3] 王秋菊, 韩明鲲, 刘晓雯, 等. 值得关注的线粒体 12SrRNA C1494T 突变-药物敏感致聋靶点[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2008, 16(6): 446-450.
- [4] 马涛, 薛希均, 戴朴, 等. 云南省10个非综合征性聋家系mtDNA12S rRNA A1555G突变流行病学调查及分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26(13): 581-585.
- [5] PREZANT T R, AGAP IAN J V, BOHLMAN M C, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non syndromic deafness [J]. Nat Genet, 1993, 4: 289-294.
- [6] 朱一鸣, 郭玉芬, 刘晓雯, 等. 陕西省部分聋哑学生聋病易感基因分子流行病学研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(3): 225-228.
- [7] 戴朴, 刘新, 于飞, 等. 18个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究(I)-GJB2 235delC和线粒体DNA 12SrRNA A1555G突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(1): 1-5.
- [8] 王国建, 袁永一, 韩冰, 等. 不同年龄的重度耳聋患者常见耳聋基因突变的阳性率分析[J]. 中华耳科学杂志, 2010, 8(4): 392-396.
- [9] 纪育斌, 王秋菊, 兰兰, 等. 国内线粒体DNA12SrRNA A1555G 突变的流行病学文献分析 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(1): 6-10.
- [10] LI Z, LI R, CHEN J, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss [J]. Hum Genet, 2005, 117(1): 9-15.
- [11] 欧启水, 程祖建, 陈静, 等. 中国人非综合征型耳聋患者线粒体DNA A1555G突变分析[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(3): 273-275.
- [12] ZHAO H, LI R, WANG Q, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family [J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(1): 139-152.
- [13] 李琦, 方如平, 黄德亮, 等. 新疆地区汉族和维吾尔族耳聋基因突变的比较研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(1): 11-15.
- [14] 李海峰, 陈智斌, 邢光前. 两个线粒体 12S rRNA C1494T 突变及药物性耳聋家系的分子遗传学研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(5): 720-726.
- [15] 戴大春, 程洪波, 陈智斌, 等. 非综合征型耳聋患者线粒体DNA 12S rRNA及tRNASer (UCN) 基因序列分析 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(1): 67-70.
- [16] 刘德胜, 王金丽, 撒亚莲, 等. 傣族、汉族非综合征型耳聋患者的GJB2基因分析 [J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(10): 49-52.

(2013-02-06 收稿)