

# 新疆维吾尔哈萨克族非综合征型遗传性聋患者 GJB2 基因突变与肾虚血瘀型的研究分析

李彦华<sup>1</sup>, 汪常伟<sup>1</sup>, 高东升<sup>1</sup>, 邹广华<sup>1</sup>, 徐红霞<sup>1</sup>, 张新日<sup>1</sup>, 铁玲<sup>1</sup>, 蔡小牛<sup>2</sup>

1. 新疆医科大学附属中医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000

**[摘要]** 目的: 研究新疆维吾尔族与哈萨克族非综合征型遗传性聋患者 GJB2 基因突变的情况与肾虚血瘀型的关系。方法: 调查对象来自新疆地区维吾尔族 185 例, 哈萨克族 193 例, 采用直接测序法对维吾尔族组 (耳聋患者 92 例和健康对照者 93 例) 及哈萨克族组 (耳聋患者 97 例和健康对照者 96 例) 进行 GJB2 基因突变的检测。对耳聋患者中医辨证分为肾虚血瘀型和非肾虚血瘀型, 分析 GJB2 基因突变与种族、地域性及中医分型的相关性。结果: 在编码区 92 例维吾尔族患者中发现 12 例携带 GJB2 致病性突变: 3 例 35delG 突变, 8 例 235delC 突变, 1 例 71G>A 突变; 肾虚血瘀型 49 例。97 例哈萨克族患者中发现 16 例携带 GJB2 致病性突变: 13 例 35delG 突变, 3 例 235delC 突变; 肾虚血瘀型 55 例。结论: 本研究提示新疆维、哈族非综合征型遗传性聋患者 GJB2 基因突变具有种族和地域性特点, GJB2 基因突变率在肾虚血瘀型中分布偏高, 肾虚血瘀可能是致使 GJB2 基因突变产生差异性的原因之一。

**[关键词]** 遗传性聋; 非综合征型; GJB2 基因; 肾虚血瘀; 维吾尔族; 哈萨克族

**[中图分类号]** R764.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 05-0120-04

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2014.05.047

先天性遗传性聋引起的听力障碍在出生时已存在, 是由于患者存在基因或染色体异常改变等遗传缺陷所致。遗传性聋为新生儿高发的遗传性疾病之一, 约 50% 的儿童期耳聋为遗传性聋<sup>[1]</sup>。耳聋严重影响了患儿未来的生活, 给家庭社会亦带来沉重负担。在遗传性聋当中, 约 70% 为非综合征型聋(NSHI), 即仅表现为单一感音神经性聋, 不伴随其他组织器官临床症状; 而其余 30% 为综合征型耳聋(SHI), 除听力损失外还伴有其他组织器官多型症状与体征, 现普遍认为 GJB2 基因突变与常染色体隐性遗传耳聋高度相关<sup>[2]</sup>。

维吾尔族与哈萨克族作为新疆主体少数民族, 其发病不仅受到新疆特异的地理环境影响, 还与本民族的饮食民俗习惯相关。在笔者多年的研究中发现, 新疆地区耳聋患者中大多是以肾虚为基础, 外加各种诱发因素导致的血瘀致聋, 且具有一定遗传性。本研究

旨在通过对新疆地区维、哈族 GJB2 基因突变的检测, 以了解该地区维、哈族非综合征型遗传性聋患者 GJB2 基因突变与肾虚血瘀型的关系, 试图从中医学思维层面探讨新疆地区耳聋的防治思路, 并为我国建立更为完整的少数民族耳聋基因库补充更多资料。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集新疆喀什、和田、阿克苏等维吾尔族聚居地区的耳聋患者 92 例, 健康对照者 93 例; 收集新疆伊犁、木垒、昌吉、阿勒泰等哈萨克族聚居地区的耳聋患者 97 例, 健康对照者 96 例。对耳聋患者进行耳科和全身检查。

**1.2 纳入标准** 纳入标准参照《眼耳鼻喉科疾病诊断标准》<sup>[3]</sup>: 双侧对称性的以高频听力下降为主的感音神经性聋; 听力障碍或伴有耳鸣; 伴有家族史, 家系中至少 2 人耳聋; 除外综合征型耳聋。肾虚血瘀型辨证标准参照《中医诊断学》<sup>[4]</sup>及《中西

**[收稿日期]** 2013-11-16

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (编号: 2011211A096)

**[作者简介]** 李彦华 (1953-), 女, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗耳鼻咽喉科疾病。

医结合耳鼻咽喉科学》<sup>[5]</sup>制定：耳聩，可伴有耳鸣；耳鸣如蝉或伴腰膝酸软，小便清长，头晕目暗，虚烦失眠，男子遗精，女子白淫，发脱齿摇，舌淡胖大或有齿痕，尺脉沉细或细弱；口唇及爪甲色暗，舌质暗红或有瘀斑瘀点，脉涩。

1.3 调查方法 由患者本人填写调查问卷表，同时填写知情同意书。对回答不明确者通过预约家属问询或电话联系的方式完善相关信息。调查表涉及患者的基本信息、耳聋史、出生史、家族史、个人史(聋前传染病、耳毒性药物应用情况)等。以上工作，包括对参选对象的遴选由经过培训的专业人员完成。辨证分型由2名副高级职称以上中医或中西医结合医师完成并对各种证型数量进行统计分析。

1.4 GJB2 基因检测 所有参与实验者均抽取静脉血4~5 mL, EDTA 抗凝, 应用试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA, 提取步骤参照说明书进行。提取物用 1%琼脂糖电泳, 用核酸定量仪进行纯度和浓度鉴定, 分装后 -20℃冻存备用。引物设计及所用试剂均来自上海生工工程技术有限公司, 目的序列被扩增为 2 个片段: A 片段引物序列: GJB2-F1 5'ACGATCACTACTTCCCCATC3', GJB2-R1 5'CTAGCGACTGAGCCTTGAC3', 扩增产物为 574bp; B 片段引物序列: GJB2-F2 5'TCAAGAGGGTTTGGGA ACTA3', GJB2-R2 5'TCTTCTCATGTCTCCG-GTAGG3', 扩增产物为 529bp。PCR 扩增体系的配制: 在 50 μL 的反应体系中加入 2.5 μL 的基因组 DNA, 2Xmix 25 μL, 引物(10 pmol/L)各 1.5 μL, 其余由去离子双蒸水补齐。PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 58℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 反应终止后再 72℃延伸 10 min, 4℃保存。取 5 μL 进行 1%琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 电泳结果见(图 1、图 2)。

1.5 PCR 产物进行测序 PCR 产物进行直接测序, 测序引物与 PCR 扩增引物相同, PCR 产物由上海生

工测序部完成。测序结果应用 DNAMAN 软件进行测定序列与标准序列的比对分析, 发现可疑的突变位点后用 Chromas 软件进行确认或排除, 找出碱基改变的位点, 具体分析突变情况。本研究应用 SPSS17.0 软件进行统计学处理, 对 GJB2 基因突变与肾虚血瘀型关系的分析采用  $\chi^2$  检验。

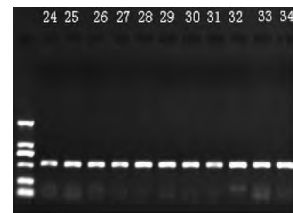


图 1 引物 F1R1 扩增产物电泳图

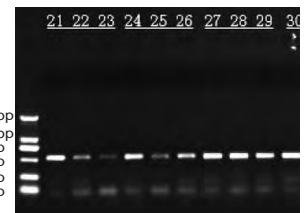


图 2 引物 F2R2 扩增产物电泳图

## 2 结果

2.1 GJB2 基因突变分析 在检测的 92 例维吾尔族耳聋患者中发现 5 种碱基改变, 其中 35delG、235delC 和 71G>A(图 3、图 4、图 5)这 3 种突变被认为是致病性突变, 109G>A(图 6)为未知突变, 380G>A 属多态性改变。93 例对照组中均为多态性改变。在患者组中发现 12 例患者携带 GJB2 基因致病性突变, 其中 3 例 35delG 突变, 8 例 235delC 突变, 1 例 71G>A 突变, 其等位基因检出率分别为 3.3%(6/184), 4.3%(8/184), 1.1%(2/184)。

在检测的 97 例哈萨克族耳聋患者中发现 8 种碱基改变, 其中 35delG 和 235delC 这 2 种突变被认为是致病性突变, 521G>A(图 7)为未知突变, 其余 5 种(79G>A、341A>G、439T>G、457G>A、608T>C)均属多态性改变。96 例对照组中均为多态性改变。在患者组中发现 16 例患者携带 GJB2 基因致病性突变, 其中 13 例 35delG 突变, 3 例 235delC 突变, 其等位基因检出率分别为 13.4%(26/194), 1.5%(3/194)。

2.2 耳聋组 GJB2 基因突变与中医证型的分布情况

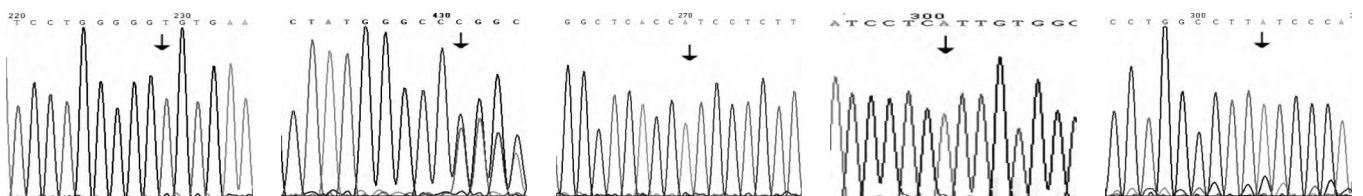


图 3 35delG 纯合测序图

图 4 235delC 杂合测序图

图 5 71 G>A 纯合测序图

图 6 109G>A 纯合测序图

图 7 521G>A 纯合测序图

92例维吾尔族耳聋患者中肾虚血瘀型患者的比例为53.3%(49/92);97例哈萨克族耳聋患者中肾虚血瘀型患者的比例为56.7%(55/97)。GJB2基因测序结果:在维吾尔族耳聋组49例肾虚血瘀型患者中发现携带GJB2基因致病突变10例;43例非肾虚血瘀型患者中发现携带GJB2基因致病突变2例。在哈萨克族耳聋组55例肾虚血瘀型患者中发现携带GJB2基因致病突变13例;42例非肾虚血瘀型患者中发现携带GJB2基因致病突变3例。对GJB2基因突变与维

哈族肾虚血瘀的分布进行分析,通过 $\chi^2$ 检验,结果GJB2基因突变在维、哈族肾虚血瘀型与非肾虚血瘀型患者中的分布差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),维、哈族中肾虚血瘀型耳聋患者的GJB2基因突变率更高,见表1。对GJB2基因突变与不同证型的相关性采用双变量spearman秩相关分析: $r=0.435$ , $P < 0.05$ ,可知肾虚血瘀型与GJB2基因突变存在正相关性。

表1 GJB2基因突变与维哈族肾虚血瘀的分布情况

GJB2 基因	维吾尔族				哈萨克族			
	肾虚血瘀型	非肾虚血瘀型	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	肾虚血瘀型	非肾虚血瘀型	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
突变	10	2	5.01	0.03	13	3	4.70	0.03
非突变	39	41			42	39		

### 3 讨论

研究发现,越来越多的遗传性疾病与连接蛋白基因突变相关,由GJB2基因编码的Connexin26是缝隙连接蛋白大家族的一员。Connexin26分布于内耳耳蜗血管纹的基底细胞、支持细胞、螺旋韧带中的纤维细胞,且发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。GJB2基因的突变导致Connexin26蛋白结构的异常改变,由于连接通道的异常改变,使钾离子回流进入淋巴液的循环受到影响,因此Corti氏器产生钾中毒,从而引起感音神经性聋。本研究结果显示:35delG、235delC、71G>A这3种为致病突变,致病突变携带率为14.8%,对照组中未检测到致病性突变。235delC突变使翻译形成的多肽相比野生型蛋白截短了145个氨基酸,产生无功能的缝隙连接蛋白。35delG突变使其翻译过程提前中止于13号密码子,形成只含有12个氨基酸的小多肽,导致间隙连接蛋白功能的异常。71G>A突变使其编码的氨基酸由色氨酸转变为终止密码子(TAG),从而产生致病突变。

肾与耳的关系,在中医学古籍文献中有丰富的记载,不仅从经络联络方面阐述了耳与肾的生理关系,更从以肾为中心的五脏生化,气血津液运行方面详述了耳部疾病发生的病因病理。现代研究亦发现,肾与耳这两个器官虽相距较远,但在诸如微观结构、酶的分布与含量、电解质的代谢平衡及对某些药物的药理反应上均有许多相似之处。一项针对2564位参加者进行基于人口学的横断面调查显示,慢性肾脏疾病与

听力损失存在相关性<sup>[7]</sup>。一些遗传性耳肾相关性疾病,如Epstein综合征、Alport综合征、鳃裂-耳-肾综合征等亦显示了肾脏与耳存在着关联<sup>[8]</sup>。张大宁<sup>[9]</sup>首先提出了“肾虚血瘀论”的概念,认为肾虚血瘀与耳聋有着密切关系。本课题组以中医学理论为基础,结合现代分子生物学技术,历经多年科研研究及临床实践认识到肾虚血瘀与新疆地区少数民族的耳聋发生关系紧密。新疆地处西北,由于独特的地理形态其冬季持续时间较长且气候寒冷,寒气易侵袭人体。《素问·调经论》云:“寒独留则血凝泣,凝则脉不通。”提示伤于寒邪,寒性凝闭易阻滞经脉气血,致血涩而不行,形成血瘀。寒邪长期留居体内使肾气亏虚,则气对血的固摄推动作用减弱,血行滞缓;甚者导致肾阳亏虚,命门火衰,则元气的温煦功能失司,不能温养血脉,肾阳虚损进一步加重血瘀。新疆维、哈族民众常见有喜食膏粱厚味、嗜酒的习惯,长期的不良生活习惯易使脾胃运化功能失调,易聚湿成痰,流注入血脉,痰湿与瘀血互结,形成有形的病理产物阻碍气血的运行。加之种族差异、多产多育、房劳过度等因素均可耗伤肾之阴阳。由于肾虚所致呈浓、黏、凝聚状态的淤血易阻塞耳部血络,使耳蜗器官发生不同程度缺血、缺氧,进而导致代谢紊乱,细胞变性,听力受损<sup>[10]</sup>。这也符合目前认为内耳微循环障碍可能是突发性耳聋发病的最主要原因的观点。

现代医学认为,遗传性疾病是由于生殖细胞的遗传物质(DNA)发生突变所引起的,通常具有垂直遗传



的特征,一切生物皆依靠遗传物质把它的各种遗传特征传递给下一代<sup>[11]</sup>。这与中医学的传统理念不谋而合,中医学认为,人后天的生长发育依赖于“先天之精”,而“先天之精”禀受于父母的生殖之精,藏于肾中,如果“先天之精”出现问题,势必会影响婴儿后天的发育。从遗传角度看,肾主生殖,可理解为肾主遗传。基因作为生物遗传的物质基础,其表现出的生物学功能与肾主生长发育的内涵有诸多相似之处。《医宗金鉴·幼科心法要诀》记载:“小儿五迟之证,多因父母气血虚弱,先天有亏,致儿生下筋骨软弱,行步艰难,齿不速长,坐不能稳,要皆肾气不足之故。”可见子代如若想身体健康,那么先天肾精需要阴阳平衡,完整充旺。若“久病及肾”,父母肾精受损,就可能造成遗传物质结构及功能的改变,进而可能造成子代的出生缺陷,这便可以从中医学层面上理解为何许多的疾病具有家族遗传倾向。本课题组多年经验总结出,肾虚血瘀型是新疆维、哈族耳聋患者的常见证型,临床发现往往是肾虚为因,血瘀是果,而瘀血一旦形成又构成新的致病因素加重肾虚的程度,且这一“恶果”又可影响患者子代的身体健康,形成恶性循环。近年来,中医药研究多以利用基因芯片技术,通过分析细胞基因表达谱研究中药的作用机理,基因芯片技术成为揭示中药的分子作用机理和分子靶点的有效手段<sup>[12]</sup>。徐绍勤<sup>[13]</sup>研究证实,补肾中药可保护听毛细胞,保护耳蜗结构及功能。结合本院临床多年治疗耳聋的经验,笔者认识到,肾虚同时兼有血瘀证者采用补肾活血药物可降低血液黏稠度,扩张血管改善耳部微循环障碍,且中药具有针对性强且毒副作用小的特点,在治疗耳聋方面有一定优势。

综上所述,新疆地区维、哈族非综合征型遗传性聋 GJB2 基因的突变具有种族特异性,新疆维、哈族非综合征型遗传性聋患者 GJB2 基因的突变率在肾虚血瘀型的分布呈偏高的趋势,肾虚血瘀型可能是导致新疆地区维、哈族 GJB2 基因突变产生差异性的原因之一,且具有一定的地域和民族特点。由于不同地域不同民族,GJB2 基因的主要突变形式、突变频率存在差异性,所以对其基因库资料的积累显得特别重要。既往新疆维吾尔族非综合征型聋的资料有一定的研究,而哈萨克族非综合征型聋的研究资料甚少,为了进一步深入了解新疆地区维、哈族非综合征型聋

GJB2 与肾虚血瘀型之间的关系,还需要扩大样本量进行进一步研究、总结。同时,已观察到中医药在肾虚血瘀型耳聋的治疗中有积极的意义,那么在耳聋患者孕前、孕期进行适当的中医药干预,是否可以阻断耳聋基因的突变表达,进而避免子代耳聋的发生,这或许可以成为我们未来深入研究的切入点。

#### [参考文献]

- [1] Marazita M.L., L.M. Ploughman, B. Rawlings, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population [J]. Am J Med Genet, 1993, 46(5): 486-491.
- [2] Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, et al. First molecular screening of deafness in the Altai Republic Population [J]. BMC Med Genet, 2005, 6: 12-18.
- [3] 贝政平,舒怀,周梁,等.眼耳鼻咽喉科疾病诊断标准[M].2版.北京:科学出版社,2007:201-202.
- [4] 朱文锋.中医诊断学[M].上海:上海科学技术出版社,1995:160.
- [5] 阮岩.中西医结合耳鼻咽喉科学[M].广州:广东高等教育出版社,2007.
- [6] 李莉,杨艳.中医肾与耳的现代医学研究[J].江西中医学院学报,2004,16(3):75-76.
- [7] Vilayur E, Gopinath B, Harris DC, et al. The association between reduced GFR and hearing loss: a cross-sectional population-based study [J]. Am J Kidney Dis, 2010, 56(4): 661-669.
- [8] 肖娟,罗志强.肾脏疾病与耳聋相关性[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,31(6):351-353.
- [9] 张大宁.中医补肾活血法研究[M].北京:中国中医药科技出版社,1997:156-164.
- [10] 李彦华,铁玲,徐红霞,等.新疆哈萨克族耳聋患者 GJB3 基因突变与肾虚血瘀型的研究[J].新中医,2013,45(4):84-87.
- [11] 陈竺.医学遗传学[M].北京:人民卫生出版社,2010:1-2.
- [12] 刘文泰,李丽华,戴军.生物芯片技术与中药作用机制研究的思路与方法[J].中国中医基础医学杂志,2008,14(11):845-847.
- [13] 徐绍勤.补肾药物对庆大霉素致豚鼠耳中毒的保护作用[J].中医杂志,1998,39(7):430.

(责任编辑:冯天保)