

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00695

浙江省非综合征型耳聋患者 12S rRNA 突变频谱分析

郑斌娇¹, 彭光华², 陈波蓓³, 方芳¹, 郑静¹, 伍越¹, 梁玲芝¹, 南奔宇³, 唐霄雯¹, 朱翌⁴,
吕建新¹, 管敏鑫^{1,5}

1. 温州医学院, Attardi 线粒体生物医学研究院和浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;
2. 余姚市人民医院耳鼻咽喉科, 宁波 315400;
3. 温州医学院附属第二医院附属育英儿童医院耳鼻喉科, 温州 325027;
4. 温州医学院附属第一医院耳鼻喉科, 温州 325027;
5. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058

摘要: 线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 突变是引起耳聋的重要原因之一。尤其是 12S rRNA 基因是药物性耳聋与非综合征型耳聋相关的突变热点区域。文章收集了浙江省各地区非综合征型及药物性耳聋患者标本 318 例, 对其进行临床和分子遗传学评估。12S rRNA 基因突变分析发现 34 个变异位点, 已知的 1555A>G、1494C>T 和 1095T>C 突变分别占 9.1%、0.6% 和 1.25%。结构和种系发生分析显示, 839A>G 和 1452T>C 突变位于 12S rRNA 基因的高度保守区域且未在 449 例正常对照组中发现, 可能增加了耳毒性药物的敏感性。其他变异位点为多态性位点。文章数据支持了 12S rRNA 基因是耳毒性药物的作用靶点之一这一理论, 为预测个体耳毒性的发生风险, 提高氨基糖甙类药物治疗安全性提供了有价值的信息, 以期降低耳聋的发生。

关键词: 线粒体 12S rRNA 基因; 非综合征型耳聋; 氨基糖甙类药物; 突变频谱; 听力损失,

Spectrum and frequency of mitochondrial 12S rRNA variants in the Chinese subjects with nonsyndromic hearing loss in Zhejiang Province

ZHENG Bin-Jiao¹, PENG Guang-Hua², CHEN Bo-Bei³, FANG Fang¹, ZHENG Jing¹,
WU Yue¹, LIANG Ling-Zhi¹, NAN Ben-Yu³, TANG Xiao-Wen¹, ZHU Yi⁴, LU Jian-Xin¹,
GUAN Min-Xin^{1,5}

1. Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;
2. Department of Otolaryngology, Yuyao People's Hospital, Ningbo 315400, China;
3. Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou

收稿日期: 2011-10-19; 修回日期: 2011-11-28

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2004CCA02200), 国家自然科学基金项目(编号: 81070794), 浙江省重大科技专项社会发展项目(编号: 2007C13021), 浙江省卫生厅项目(编号: 2009A135), 浙江省研究生创新科研项目(编号: YK2010084)和温州市科技局项目(编号: Y20080122)资助

作者简介: 郑斌娇, 在读硕士, 专业方向: 遗传学和线粒体疾病。Tel: 13757757603 E-mail: gusdy13x@gmail.com

通讯作者: 管敏鑫, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类遗传学和线粒体疾病。E-mail: gminxin88@gmail.com

网络出版时间: 2012-4-24 11:44:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120411.1040.003.html>

325027, China;

4. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

5. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are one of the important causes of deafness. In particular, the 12S rRNA gene is the hot spots for mutations associated with both aminoglycoside ototoxicity and nonsyndromic deafness. In this report, a total of 318 Chinese pediatric hearing-impaired subjects were recruited from otology clinics in the Zhejiang Province, China. These subjects underwent clinical, genetic evaluation and molecular analysis of 12S rRNA gene. Mutational analysis identified 34 variants in the 12S rRNA gene in this cohort. The incidences of the known deafness-associated 1555A>G, 1494C>T and 1095T>C mutations were 9.1%, 0.6% and 1.25% in this cohort, respectively. Other mtDNA variants were evaluated by structural and phylogenetic analysis. Of these, the 839A>G and 1452T>C variants could confer increased sensitivity to aminoglycosides or nonsyndromic deafness as they were not present in 449 Chinese controls and localized at highly conserved nucleotides of the 12S rRNA. However, other variants appeared to be polymorphisms. These data further support the idea that mitochondrial 12S rRNA is one of major targets for aminoglycoside ototoxicity. These data have been providing valuable information to predict which individuals are at risk for ototoxicity, to improve the safety of aminoglycoside antibiotic therapy, and eventually to decrease the incidence of deafness.

Keywords: mitochondrial 12S rRNA gene; non-syndromic deafness; aminoglycoside antibiotics; mutation spectrum; hearing loss

耳聋是人类最常见的疾病之一, 严重影响了人们的生活质量。根据是否伴有其他症状, 耳聋可分为综合征型耳聋和非综合征型耳聋, 其中约 70% 的患者为非综合征型耳聋^[1]。耳聋可由遗传因素和(或)环境因素(如耳毒性药物、噪音、外伤等)引起, 其中约 50% 的耳聋患者由遗传因素造成, 遗传方式可表现为常染色体显性、常染色体隐性、X-连锁和母系遗传等^[1~5]。

氨基糖甙类抗生素如庆大霉素和妥布霉素等主要作用于细菌核糖体, 用于治疗由细菌感染所致的肺炎等疾病。这些药物在使用过程中常出现肾脏、听觉及前庭系统等器官的损害^[6,7]。肾损伤通常是可逆的, 而听觉和前庭的损害往往是不可逆的^[4]。在耳毒性患者的家族中, 发现部分母系成员对氨基糖甙类药物超敏感, 提示线粒体DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)突变可能是其发病的分子基础^[6,7]。从进化上看, 人线粒体核糖体结构与细菌胞质核糖体相似。因此, 氨基糖甙类抗生素的主要靶点之一是线粒体核糖体的小rRNA^[3,7]。Prezant等^[8]通过对 3 个母系遗传耳毒性的中国家系和 1 个母系遗传非综合征型耳聋的阿拉伯-以色列大家系的mtDNA突变分析, 发现了 12S rRNA基因 1555A>G致病突变。随后, 在

亚洲人、高加索人以及非洲人等不同种族的人群中相继检测到此突变^[9~14]。在几个母系遗传的中国和西班牙非综合征型耳聋或药物性耳聋家系中, 发现了与耳聋相关的 12S rRNA基因 1494C>T突变^[15~17]。

1555A>G和 1494C>T突变位于 12S rRNA基因高度保守的解码区^[3,18,19], 1555A>G和 1494C>T位点(分别对应*E.coli* 16S rRNA的 1491 位点和 1409 位点)位置相对但并不配对。当发生 1555A>G突变或 1494C>T突变时, 线粒体核糖体A位形成了一个新的 1494-1555G-C或A-U碱基配对, 使得线粒体 12S rRNA基因与 *E.coli* 16S rRNA相应解码区更加相似, 增强了氨基糖甙类药物如巴龙霉素等在 12S rRNA A位的结合力^[20]。因此, 使用氨基糖甙类药物会导致或加重携带 1555A>G或 1494C>T突变个体的听力损害; 当没有接触氨基糖甙类抗生素时, 携带 1555A>G或 1494C>T突变的先证者及母系成员的耳聋表型也存在不同程度的差异, 包括听力损失的严重程度、发病年龄、听力曲线及耳聋外显率等^[8~17]。这提示其他修饰因子如核修饰基因、线粒体单体型等可能调控 1555A>G或 1494C>T突变的耳聋表型表达。

12S rRNA 1555A>G和 1494C>T突变只在部分听力损失的人群中检测到^[2,3,7],推测存在其他与耳聋相关的基因突变。本研究对浙江省 318 例汉族非综合征型耳聋患者的线粒体 12S rRNA基因进行系统的突变筛查,发现了 1555A>G、1494C>T突变和其他 32 种变异。从种系发生、结构-功能相关性及其在正常人群中的发生频率等方面分析并评估这些变异与疾病的相关性。此外,为了评估GJB2基因对耳聋表型的影响,我们还对其开展GJB2基因筛查。通过对 318 例非综合征型耳聋患者线粒体 12S rRNA基因突变的筛查,全面系统地阐述非综合征型耳聋的致病分子机制,绘制汉族人群非综合征型耳聋患者的线粒体 12S rRNA基因突变频谱。

1 对象与方法

1.1 对象和听力学检查

对 318 例来自浙江省余姚市人民医院和温州医学院附属第二医院耳鼻喉科门诊的耳聋家系进行了详细的病史调查和体检,以确定是否有综合征型耳聋的临床表现、是否有氨基糖甙类抗生素的使用史以及是否有其它致聋的遗传因素。听力学检查包括纯音测听(PTA)、听觉脑干反应(ABR)、声阻抗以及畸变产物耳声发射(DPOAE),纯音测听以听力水平的分贝(dB)数为单位进行测量,并以语言频率(500、1 000、2 000、4 000、8 000 Hz)的听阈平均值计算,将听力损失的严重程度分成 5 级,正常<26 dB,轻度聋=26~40 dB,中度聋=41~70 dB,重度聋=71~90 dB,极重度聋>90 dB。参加此项研究的患者及家系成员全部按照温州医学院伦理委员会管理规定签署了知情同意书。

1.2 线粒体 12S rRNA 基因突变检测

首先抽取家系先证者及母系成员静脉外周血 2 mL于EDTA抗凝管中,用Universal DNA分离试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)提取全基因组DNA(内含线粒体DNA),以此为模板进行PCR扩增、产物纯化和测序。其中,引物位于mtDNA 618~635(正向)和 1988~2007(反向)^[21],目的片段包含线粒体 12S rRNA基因。PCR产物纯化后,用Big Dye末端循环测序反应试剂盒在ABI 3700 DNA 自动测序仪上直接测序,将测序结果与经过校正的

桥标准序列(GenBank: NC_012920)进行比对^[22]。

同样,用上述方法检测 449 例正常对照汉族人群 12S rRNA 基因。

1.3 GJB2 基因突变分析

为了评估核基因突变对耳聋表型的影响,利用PCR扩增及产物纯化测序的方法对家系先证者及部分母系成员 GJB2 基因编码区进行突变分析。PCR扩增覆盖 GJB2 基因整个编码区,引物序列为:

上游引物: 5'-TATGACACTCCCCAGCACAG-3';

下游引物: 5'-GGGCAATGCTTAAACTGG C-3'^[23]。

引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。测序结果与野生型 GJB2 基因标准序列(GenBank:M86849)比对,确定是否含有有意义的突变位点。

1.4 二级结构预测和种系发生分析

人类线粒体 12S rRNA二级结构由RnaViz程序预测^[24]。将 14 种灵长类动物的线粒体 12S rRNA序列进行比对和保守性分析。保守性指数(Conservation index, CI),即相应位点核苷酸为野生型的物种个数占 14 种物种数的百分比,如果该值大于 78%说明该位点在进化上是保守的^[25]。14 种灵长类动物分别为:人类(*Homo sapiens*, NC_012920)、大猩猩(*Gorilla gorilla*, NC_001645)、倭黑猩猩(*Pan paniscus*, NC_001644)、黑猩猩(*Pan troglodytes*, NC_001643)、红毛猩猩(*Pongo pygmaeus*, NC_001646)、苏门答腊猩猩(*Pongo abelii*, NC_002083)、白手长臂猿(*Hylobates lar*, NC_002082)、猕猴(*Macaca mulatta*, NC_005943)、巴巴利猕猴(*Macaca sylvanus*, NC_002764)、阿拉伯狒狒(*Papio hamadryas*, NC_001992)、白额卷尾猴(*Cebus albifrons*, NC_002763)、马来跗猴(*Tarsius bancanus*, NC_002811)、蜂猴(*Nycticebus coucang*, NC_002765)、环尾狐猴(*Lemur catta*, NC_004025)。

2 结果与分析

2.1 研究对象临床资料分析

本研究共收集浙江省温州、宁波地区门诊非综合征型耳聋患者 318 例,其中男性 192 例,女性 126 例;最小年龄 1 岁,最大年龄 82 岁,平均年龄 23.2 岁,58 人有氨基糖甙类药物接触史(其中男性 42 例,女性 16 例),占 NSHI 患者的 18.2%。这些患者<10 岁时因感染等疾病使用了常规剂量的氨基糖甙类药

物;使用后 3 天至 3 个月,患者开始出现听力下降甚至耳聋。听力学检查显示,86 人听力损失程度为重度,155 人听力损失程度为极重度。此外,260 名未接触氨基糖甙类药物的患者分别表现不同严重程度的听力损失:126 人为极重度听力损失,70 人为重度听力损失,49 人为中度听力损失。听力损失的发病年龄从 1~10 岁不等。

2.2 线粒体 12S rRNA 基因突变分析

从全基因组DNA中扩增覆盖整个 12S rRNA 基因的片段,PCR产物经纯化后DNA测序分析,测序结果与校正的剑桥标准序列^[22]进行比对。在 318 例非综合征型耳聋患者的 12S rRNA 基因上共发现 34 个位点发生碱基改变(表 1),经双链DNA测序分析,结果均为同质性。其中,2 名极重度听力损失的患者

表 1 318 例中国汉族非综合征型耳聋患者线粒体 12S rRNA 基因变异汇总表

位点	碱基改变	保守指数 CI(%) ^a	W-C 碱基配对 ^b	是否报道 ^c	受累人数	受累比例(%)	对照组(共 449 人)	比例(%)
663	A to G	78.6	A-U	是	9	2.83	5	1.1
681	T to C	85.7	U-A	是	2	0.63	8	1.8
709	G to A	64.3	G-C	是	63	19.81	102	22.7
723	A to G	28.6		是	1	0.31	2	0.4
735	A to G	78.6		是	2	0.63	5	1.1
752	C to T	100		是	13	4.09	17	3.8
789	T to C	85.7		是	1	0.31	1	0.2
813	A to G	28.6		是	2	0.63	0	0
827	A to G	92.9		是	8	2.52	12	2.7
839^d	A to G	78.6	A-U	是	1	0.31	0	0
942	A to G	64.3		是	1	0.31	0	0
951	G to A	92.9	G-C	是	1	0.31	2	0.4
953	T to C	57.1		是	1	0.31	0	0
961	ins C	42.9		是	7	2.20	14	3.1
980	T to C	64.3	U-A	是	2	0.63	0	0
1005	T to C	35.7		是	16	5.03	22	4.9
1009	C to T	21.4		是	2	0.63	8	1.8
1041	A to G	42.9		是	2	0.63	4	0.9
1048	C to T	57.1		是	7	2.20	11	2.4
1095	T to C	92.9	U-A	是	4	1.26	1	0.2
1107	T to C	85.7		是	21	6.60	25	5.6
1119	T to C	50		是	11	3.46	17	3.8
1187	T to C	57.1		是	2	0.63	0	0
1282	G to A	71.4		是	1	0.31	0	0
1382	A to C	92.9	A-U	是	15	4.72	9	2.0
1391	T to C	64.3		是	1	0.31	1	0.2
1442	G to A	42.9		是	1	0.31	0	0
1452	T to C	100	U-A	是	1	0.31	0	0
1462	G to A	50		是	1	0.31	0	0
1494	C to T	78.6	U-A	是	2	0.63	0	0
1503	G to A	50	A-U	是	2	0.63	0	0
1541	T to C	78.6		是	5	1.57	4	0.9
1555	A to G	85.7	A-U	是	29	9.12	0	0
1598	G to A	50		是	10	3.14	9	2.0

注: ^a 保守指数 (Conservation Index, CI) 是指在 14 种灵长类动物中, 该位点同为人类线粒体 12S rRNA 野生型核苷酸的物种所占的比例; ^b 经典 Watson-Crick (WC) 碱基配对: 碱基对产生 (↑) 或碱基对断裂 (↓); ^c 见 <http://www.mitomap.org>; ^d 已知的和已报道的致聋位点由粗体表示。

携带 1494C>T 突变, 且均有氨基糖甙类药物接触史; 携带 1555A>G 突变的 29 例患者中, 19 例患者有氨基糖甙类接触史, 10 例患者没有氨基糖甙类接触史。此外, 有 4 名患者携带与耳聋相关的 1095T>C 突变^[26], 7 名患者携带与耳聋相关的 961ins C 突变^[25]。

除了上述提到的 12S rRNA 基因变异位点, 还发现了 30 个已报道的变异位点^[27]。在 449 例正常对照人群中对这些变异位点进行评估: 13 个变异位点在对照组中未发现; 7 个变异的突变频率<1%, 10 个变异的等位基因频率>1%(表 1)。此外, 利用 12S rRNA 的二级结构来定位这些变异位点, 分析碱基变异是否会改变原有的 Watson-Crick 配对^[28]。如图 1 所示, 25 个在 12S rRNA 基因的环上, 12 个在茎上。其中, 3 个变异位点(1494C>T、1503G>A、1555A>G)形成了新的碱基配对, 而 9 个变异位点(663A>G、681T>C、709G>A、839A>G、951G>A、980T>C、1095T>C、1382A>C、1452T>C)破坏了原有的碱基配对(表 1 和图 1)。这表明发生在环上的变异频率比发生在茎上的频率高。此外, 将人类 12S rRNA 基因核苷酸变异与 13 种灵长类物种进行保守性分析, 如表 1 所示, 这些变异的保守性指数(CI)范围在 21.4%(1009C>T)至 100%(752C>T 和 1452T>C)之间。其中, 包括 1555A>G 和 1494C>T 在内的 15 个变异位点, 其 CI>78%, 另外 12 个 CI 在 50%~78% 之间, 其余 CI<50%。除了 1555A>G 和 1494C>T, 839A>G 和 1452T>C 在 449 例对照组中均未发现且 CI>78%。其他位点如 663A>G、681T>C、735A>G、752C>T、827A>G、1107T>C 以及 1382A>C, 虽然 CI>78%, 但在正常对照组中也有出现, 可能是多态性位点。

2.3 携带 12S rRNA 突变的听力损失患者的临床和遗传学评估

临床资料评估发现, 29 例携带 1555A>G 突变、2 例携带 1494C>T 突变和 4 例携带 1095T>C 突变的患者除了耳聋表型以外, 均没有患其他如糖尿病、肌病、视力损失或退行性疾病。如表 2 所示, 29 例携带 1555A>G 突变的患者听力学评估显示, 有氨基糖甙类药物接触史且听力损失程度为极重度的患者有 11 例、重度的有 4 例、中度的 2 例。没有氨基糖甙类药物接触史的 12 例患者, 听力损失的发病年龄和严重程度存在明显差异。这些患者听力损失的

发病年龄 1~43 岁, 平均年龄 9.7 岁; 听力学检查结果显示, 4 例患者听力损失严重程度为极重度、3 例重度、4 例中度、1 例轻度。此外, 2 例携带 1494C>T 突变的患者分别表现重度和极重度听力损失。4 例携带 1095T>C 变异的患者中, 有氨基糖甙类药物接触史的 2 例患者听力损失严重程度分别为极重度和重度, 无氨基糖甙类药物接触史的 2 例听力损失严重程度分别为极重度和轻度。家系资料显示, 携带 839A>G 突变的 NB005 家系(图 2), 7 位母系成员中有 2 位表现为听力损失, 听力损失严重程度为重度。携带 1452T>C 突变的 FE419 家系, 不仅 11 位母系成员中有 2 位表现为中度听力损失, 先证者父亲也有轻度听力损失。

2.4 GJB2 基因突变分析

为评估 *GJB2* 基因突变对耳聋表型的影响, 我们还对所有携带 12S rRNA 突变位点的患者进行了 *GJB2* 基因突变筛查。结果, 所有患者均未携带 *GJB2* 基因突变, 提示 *GJB2* 基因对这些患者的耳聋表型表达不起作用。

3 讨论

本研究样本来自浙江省宁波、温州地区门诊非综合征型耳聋患者, 其中有氨基糖甙类药物接触史 58 例, 无氨基糖甙类药物接触史 260 例。Lu 等^[26]对中国聋校听障儿童进行大规模筛查, 1555A>G 突变频率为 3.96%。本研究中, 1555A>G 突变的频率在非综合征型耳聋和氨基糖甙类抗生素耳毒性患者中分别为 9.1% 和 32.7%。在不同种族的耳聋患者中, 1555A>G 突变频率存在差异。在亚裔人群药物性耳聋患者中, 1555A>G 突变频率从 5%~33%^[26,29~31], 而在欧美白人患者中的突变频率则为 17% 左右^[9,32]。然而 1555A>G 突变在非综合征型耳聋人群中的突变频率比在有氨基糖甙类药物接触史的人群中则低得多。在白人非综合征型耳聋患者中, 1555A>G 突变频率为 0.3%~2.5%^[23,33], 而在亚裔非综合征型耳聋患者中 1555A>G 突变频率为 0.9%~5.3%^[26,29,30]。本次研究的这组患者 1555A>G 突变频率比已报道的相对高, 可能与该群体的患者 AmAn 药物史的比例过高或遗传背景有关。

其他已报道的耳聋相关突变中, 1494C>T 突变

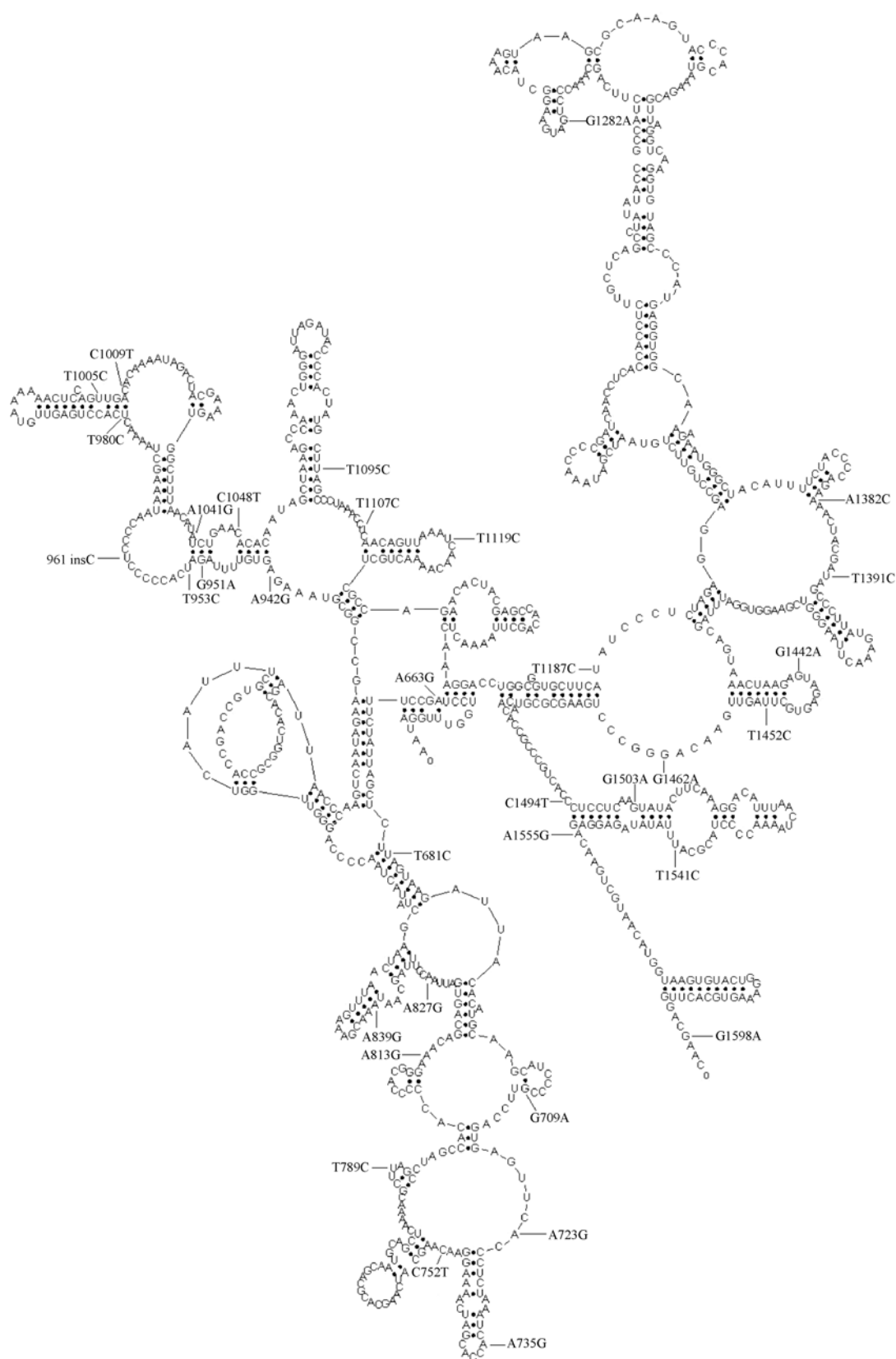


图 1 人类线粒体 12S rRNA 二级结构和序列变异位点突变由横线指示。

表 2 37 例携带 12S rRNA 突变的中国汉族患者的临床资料和分子遗传学数据

12S rRNA 突变	患者	性别	听力曲线类型	发病年龄(岁)	PTA ^a (dB)	PTA (dB)	氨基糖苷类 药物史	听力损失 程度
					右耳	左耳		
1555A>G	FE003	男	斜坡型	1	98	98	有	极重度
1555A>G	FE008	女	斜坡型	10	58	78	否	重度
1555A>G	FE019	女	斜坡型	2	67	82	有	重度
1555A>G	FE020	男	斜坡型	8	81	74	有	重度
1555A>G	FE036	男	斜坡型	10	58	49	否	中度
1555A>G	FE081	男	斜坡型	16	50	56	有	中度
1555A>G	FE122	女	斜坡型	2	71	53	有	中度
1555A>G	FE141	女	斜坡型	2	24	30	否	轻度
1555A>G	FE154	女	斜坡型	18	61	60	否	中度
1555A>G	FE160	女	斜坡型	5	61	74	否	重度
1555A>G	FE163	男	平坦型	2	110	99	有	极重度
1555A>G	FE300	女	斜坡型	3	110	105	有	极重度
1555A>G	FE304	女	斜坡型	3	100	80	有	极重度
1555A>G	FE317	男	斜坡型	4	94	93	有	极重度
1555A>G	FE350	女	平坦型	1	100	100	有	极重度
1555A>G	FE365	女	斜坡型	31	80	100	否	极重度
1555A>G	FE370	女	斜坡型	43	52	50	否	中度
1555A>G	FE381	男	斜坡型	19	50	54	否	中度
1555A>G	FE386	男	斜坡型	37	72	73	有	重度
1555A>G	NB038	男	平坦型	1	90	87	否	极重度
1555A>G	NB048	女	斜坡型	1	78	81	否	重度
1555A>G	NB052	女	平坦型	1	120	120	有	极重度
1555A>G	NB076	男	平坦型	1	118	118	有	极重度
1555A>G	NB078	女	平坦型	6	110	117	有	极重度
1555A>G	NB079	男	平坦型	1	102	102	有	极重度
1555A>G	NB094	女	平坦型	1	117	117	有	极重度
1555A>G	NB111	女	斜坡型	3	83	86	有	重度
1555A>G	NB126	女	斜坡型	2	84	92	否	极重度
1555A>G	NB137	女	斜坡型	2	111	115	否	极重度
1494C>T	FE247	男	平坦型	3	100	100	有	极重度
1494C>T	NB133	男	斜坡型	2	86	88	有	重度
1095T>C	FE312	女	斜坡型	9	82	80	有	重度
1095T>C	NB021	男	斜坡型	10	36	37	否	轻度
1095T>C	NB067	男	平坦型	1	93	93	否	极重度
1095T>C	NB100	女	平坦型	5	100	95	有	极重度
839A>G	NB005	女	平坦型	1	78	81	有	重度
1452T>C	FE419	男	斜坡型	10	60	68	否	中度

注：^aPTA: 纯音听阈测试; dB: 分贝。

频率在本研究的这组患者中占 0.6%，与已报道的几组患者的突变频率接近。1095T>C突变频率为 1.3%，而在 449 例正常对照中该突变的频率为 0.2%。1095T>C突变在几个遗传不相关的氨基糖甙类抗生

素耳毒性和非综合征型耳聋家系中均有发现^[25,26,30,34]。1095T>C突变改变了 12S rRNA第 25 个螺旋茎环上进化保守的碱基配对^[35]，它位于核糖体的P位，提示是线粒体蛋白合成起始的重要组成部分^[34]。此外，

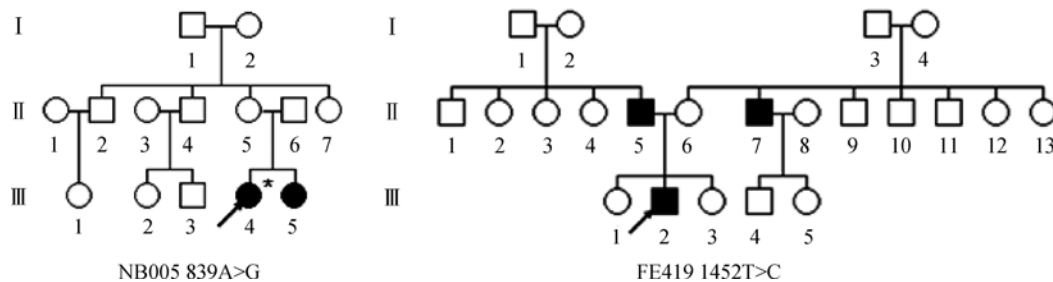


图 2 2 个携带 12S rRNA 基因突变的非综合征型耳聋患者家系图
黑色填充表示耳聋患者, 箭头指示为先证者, 星号标记表示患者曾有氨基糖甙类药物接触史。

961insC 突变占 2.2%, 虽然该位点在很多不同种族人群中被认为与听力损失有关^[26,30,32,36], 但其低保守性(42.9%)以及在正常对照组中 4% 的突变频率, 提示该突变可能是多态性。

本研究筛选到 12S rRNA 基因上 34 个突变位点中, 可分成 3 类: 中性突变、适应性突变和有害突变^[28]。鉴定是否为有害突变需符合以下 3 个标准: (1) 在 449 例正常对照中未出现的突变; (2) 根据 Ruiz-Pesini 和 Wallace^[28]报道, 保守性指数 CI 需 >78%; (3) 潜在的结构和功能改变^[26]。这些变异中, 在 449 例正常对照中没有发现的变异有 13 种, 出现的 21 种突变, 其突变频率为 0.2%(789T>C)~22.7%(709G>A)。特别是在对照组和患者中发生率很高的变异位点是线粒体单体的标记性位点^[37]。如: 单体型 A 的 663A>G, 单体型 B4 的 827A>G 和 1119T>C, 单体型 B5 的 709G>A 和 1598G>A, 单体型 D4 的 1382A>C, 单体型 D5 的 681T>C、752C>T、1048C>T 和 1107T>C, 单体型 F2 的 1005T>C 和单体型 R5b 的 1541T>C 等^[38]。显然这些单体型特异性标记位点是适应性的或中性的, 而不是有害的。

种系发生学分析显示 15 个变异位点的保守性指数均 >78%, 尽管保守性很高, 但其中 11 个变异位点如 663A>G、681T>C、752C>T、735A>G、827A>G、1107T>C、1382A>C 和 1438A>G 在对照组中也存在。而其他 4 个变异位点: 839A>G、1452T>C、1555A>G 和 1494C>T 突变的 CI >78% 且在对照组中未检测到。基于预测的 12S rRNA 二级结构^[28], 25 种变异位于 12S rRNA 的环上, 12 种变异位于茎上。其中 9 种变异如 1095T>C 突变打破了 12S rRNA 的 Watson-Crick 配对, 3 种变异如 1555A>G 突变或 1494C>T 突变形成了新的 Watson-Crick 配对^[39]。事实上, 1555A>G 或

1494C>T 突变使得线粒体核糖体结构与细菌的核糖体更加相似^[8,15,20], 因此携带上述突变的个体对氨基糖甙类药物超敏感^[15,40~42], 从而造成耳聋。839A>G 和 1452T>C 突变均位于 12S rRNA 二级结构的茎上, CI >78%, 且没有在 449 例对照组中检测到, 符合致病突变的上述 3 个标准, 因此可能是耳聋相关的致病突变, 但需进一步的功能验证。此外, 本研究中其他患者使用氨基糖甙类抗生素但未检测到上述突变, 可能是由其他基因变异引起的。

本研究数据进一步支持了线粒体 12S rRNA 是氨基糖甙类抗生素导致的非综合征型耳聋的一个突变热点区域这一理论。同时这些数据也为氨基糖甙类药物使用的安全性, 预测个体发生耳毒性的风险及降低耳聋的发生率提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(10): 1229–1240. DOI
- [2] 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. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(2): 98–105. DOI
- [3] Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*, 2011, 11(2): 237–245. DOI
- [4] Xing G, Chen Z, Cao X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell Res*, 2007, 17(3): 227–239. DOI
- [5] Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics*, 2005, 6(1): 27–36. DOI
- [6] 杨爱芬, 郑静, 吕建新, 管敏鑫. 修饰因子对线粒体 DNA 突变致聋的影响. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 28(2): 165–171. DOI
- [7] Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. A mole-

- cular basis for human hypersensitivity of aminoglycoside antibiotics. *Nuclear Acids Res*, 1993, 21(18): 4174–4179. DOI
- [8] Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu XD, Öztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genet*, 1993, 4: 289–294. DOI
- [9] Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzari R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(1): 27–35. DOI
- [10] Matthijs G, Claes S, Longo-Bbenza B, Cassiman JJ. Non-syndromic deafness associated with a mutation and a polymorphism in the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene in a large Zairean pedigree. *Eur J Hum Genet*, 1996, 4(1): 46–51. DOI
- [11] Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, Baulande S, Pierron D, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Mom T, Journal H, Catros H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Dollfus H, Eliot MM, Faivre L, Duvillard C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Feldmann D, Denoyelle F. Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(11): 1145–1155. DOI
- [12] 张婷, 陈波蓓, 郑静, 龚莎莎, 张初琴, 吕建新, 管敏鑫. 五个母系遗传非综合征性耳聋和药物性耳聋的中国汉族家系. *中华医学遗传学*, 2011, 28(4): 367–373. DOI
- [13] Chen BB, Sun DM, Yang L, Zhang CQ, Yang AF, Zhu Y, Zhao JY, Chen YY, Guan MQ, Wang XJ, Li RH, Tang XW, Wang JD, Tao ZH, Lu JX, Guan MX. Mitochondrial ND5 T12338C, tRNACys T5802C, and tRNAThr G15927A variants may have a modifying role in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese pedigrees. *Am J Med Genet*, 2008, 146A(10): 1248–1258. DOI
- [14] Lu JX, Qian YP, Li ZY, Yang AF, Zhu Y, Li RH, Yang L, Tang XW, Chen BB, Ding Y, Li YY, You JY, Zheng J, Tao ZH, Zhao FX, Wang JD, Sun DM, Zhao JY, Meng YZ, Guan MX. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A > G mutation. *Mitochondrion*, 2010, 10(1): 69–81. DOI
- [15] Zhao H, Li RH, Wang QJ, Yan QF, Deng JH, Han DY, Bai YD, Young WY, Guan MX. 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. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(1): 139–152. DOI
- [16] Rodriguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galán F, Galán R, Vallejo LA, Navas C, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C → T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet*, 2006, 43(11): e54. DOI
- [17] Chen J, Yang L, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Sun D, Tao Z, Tang X, Wang J, Wang X, Tsushima A, Lan J, Li W, Wu F, Yuan Q, Ji J, Feng J, Wu C, Liao Z, Li Z, Greinwald JH, Lu J, Guan MX. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss is associated with the 12S rRNA C1494T mutation in three Han Chinese pedigrees. *Gene*, 2007, 401(1–2): 4–11. DOI
- [18] Purohit P, Stern S. Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature*, 1994, 370(6491): 659–662. DOI
- [19] Fourmy D, Recht MI, Puglisi JD. Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16S rRNA. *J Mol Biol*, 1998, 277(2): 347–362. DOI
- [20] Qian YP, Guan MX. Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4612–4618. DOI
- [21] Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(4): 967–973. DOI
- [22] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147. DOI
- [23] Li R, Greinwald JH, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser(UCN)} genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 2004, 41(8): 615–620. DOI
- [24] De Rijk P, De Wachter R. RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(22): 4679–4684. DOI
- [25] Lu JX, Li ZY, Zhu Y, Yang AF, Li RH, Zheng J, Cai Q,

- Peng GH, Zheng WW, Tang XW, Chen BB, Chen JF, Liao ZS, Yang LY, Li YY, You JY, Ding Y, Yu H, Wang JD, Sun DM, Zhao JY, Xue L, Wang JY, Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA variants in 1642 Han Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Mitochondrion*, 2010, 10(4): 380–390. [DOI](#)
- [26] Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mtDNA. *Eur J Hum Genet*, 2002, 9(2): 147–149. [DOI](#)
- [27] Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, Yi C, Kreuziger J, Baldi P, Wallace DC. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D823–D828. [DOI](#)
- [28] Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum Mutat*, 2006, 27(11): 1072–1081. [DOI](#)
- [29] Usami SI, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, Iwasaki S, Hoshino T, Ito J, Doi K, Kubo T, Nakagawa T, Komiyama S, Tono T, Komune S. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet*, 2000, 37(1): 38–40. [DOI](#)
- [30] Li ZY, Li RH, Chen JF, Liao ZS, Zhu Y, Qian YP, Xiong SD, Heman-Ackah S, Wu JB, Choo DI, Guan MX. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet*, 2005, 117(1): 9–15. [DOI](#)
- [31] Malik SG, Pieter N, Sudoyo H, Kadir A, Marzuki S. Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia. *J Hum Genet*, 2003, 48(9): 480–483. [DOI](#)
- [32] Casano RAMS, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol*, 1999, 20(3): 151–156. [DOI](#)
- [33] Jacobs HT, Hutchin TP, Käppi T, Gillies G, Minkinen K, Walker J, Thompson K, Rovio AT, Carella M, Melchionda S, Zelante L, Gasparini P, Pyykkö I, Shah ZH, Zeviani M, Mueller RF. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13(1): 26–33. [DOI](#)
- [34] Thyagarajan D, Bressman S, Bruno C, Przedborski S, Shanske S, Lynch T, Fahn S, DiMauro S. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Ann Neurol*, 2002, 48(5): 730–736. [DOI](#)
- [35] Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijik P, Goris A, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(Suppl): 1987–2018. [DOI](#)
- [36] Bacino C, Prezant TR, Bu XD, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(3): 165–172. [DOI](#)
- [37] Yuan YY, You YW, Huang DL, Cui JH, Wang Y, Wang Q, Yu F, Kang DY, Yuan HJ, Han DJ, Dai P. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. *J Transl Med*, 2009, 7: 79. [DOI](#)
- [38] Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(13): 2076–2086. [DOI](#)
- [39] Springer MS, Douzery E. Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. *J Mol Evol*, 1996, 43(4): 357–373. [DOI](#)
- [40] Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(7): 963–971. [DOI](#)
- [41] Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(12): 1787–1793. [DOI](#)
- [42] Zhao H, Young WY, Yan QF, Li RH, Cao JY, Wang QJ, Li XM, Peters JL, Han DY, Guan MX. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acid Res*, 2005, 33(3): 1132–1139. [DOI](#)