

## 应用全外显子组测序发现儿童罕见综合征耳聋

曲春燕<sup>1</sup>, 周 怡<sup>2</sup>, 陈 敏<sup>2</sup>, 郝津生<sup>2</sup>, 倪 鑫<sup>2</sup>, 刘海红<sup>3</sup>

国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院<sup>1</sup> 保健中心<sup>2</sup> 耳鼻咽喉头颈外科<sup>3</sup>北京市儿科研究所, 北京 100045

通信作者: 倪 鑫, E-mail: nixin@bch.com.cn

刘海红, E-mail: liuhaihong@bch.com.cn

**【摘要】目的** 探讨全外显子组测序方法对诊断儿童罕见综合征耳聋的意义。**方法** 采用全外显子组测序技术对34例诊断为感音神经性听力损失患儿小家系进行分子病因学的检测和分析。**结果** 19例患儿明确了分子病因, 包括罕见的综合征耳聋4例, 致病基因分别是 *HARS2*、*USH2A*、*GATA3* 和 *MITF*; 非综合征耳聋15例, 包括 *GJB2* 基因突变8例, *SLC26A4* 基因突变5例, *MYO15A* 基因突变2例。*HARS2* 基因的 c. 435\_437del (p. K147del) 和 c. 1403G>C (p. G468A) 突变、*USH2A* 基因的 c. 11389+1del 突变、*GATA3* 基因的 c. 1327delA (p. M443Wfs \* 33) 突变、*MITF* 基因的 c. 627C>A (p. C209X) 突变和 *MYO15A* 基因的 c. 8033\_8057delinsG (p. N2678\_D2686delinsS) 突变均为首次报道。**结论** 全外显子组测序技术有助于明确耳聋的致聋基因和突变, 发现临床表型不明显的罕见综合征耳聋, 并提示进一步完善相关系统或器官结构和功能的检查, 对于临床诊断的准确性具有重要意义。

**【关键词】** 全外显子组测序; 综合征耳聋; *HARS2*; *USH2A*; *GATA3*; *MITF*; *MYO15A*

**【中图分类号】** R764.04 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2097-0501(2022)03-0278-05

**DOI:** 10.12376/j. issn. 2097-0501. 2022. 03. 008

## Whole-Exome Sequencing Reveals Pediatric Rare Syndromic Hearing Loss

QU Chunyan<sup>1</sup>, ZHOU Yi<sup>2</sup>, CHEN Min<sup>2</sup>, HAO Jinsheng<sup>2</sup>, NI Xin<sup>2</sup>, LIU Haihong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Children's Health Care Center, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery,

<sup>3</sup>Beijing Pediatric Research Institute, National Center for Children's Health, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China

Corresponding authors: NI Xin, E-mail: nixin@bch.com.cn

LIU Haihong, E-mail: liuhaihong@bch.com.cn

**【Abstract】 Objective** To discuss the significance of genetic diagnosis of children with syndromic hearing loss by using whole-exome sequencing. **Methods** The clinical data of 34 children with sensorineural hearing loss were collected and the whole exons of genome of the children and their parents were sequenced and analyzed. **Results** Genetic causative gene and mutations have been identified in 19 children, including 4 genes (*HARS2*, *USH2A*, *GATA3*, *MITF*) related to rare syndromic hearing loss. Fifteen children were diagnosed with non-syndromic hearing loss related gene, including 8 cases with *GJB2* mutation, 5 cases with *SLC26A4* mutation and 2 cases with *MYO15A* mutation. Mutations of c. 435\_437del (p. K147del) and c. 1403G>C

基金项目: 高层次公共卫生技术人才培养计划 (2022-3-016); 首都卫生发展科研专项项目重点攻关研究项目 (首发 2022-1-2023)

用本文: 曲春燕, 周怡, 陈敏, 等. 应用全外显子组测序发现儿童罕见综合征耳聋 [J]. 罕见病研究, 2022, 1 (3): 278-282. doi: 10.12376/j. issn. 2097-0501. 2022. 03. 008.

(p. G468A) in gene *HARS2*, c. 11389+1del in gene *USH2A*, c. 1327delA (p. M443Wfs \* 33) in gene *GATA3*, c. 627C>A (p. C209X) in gene *MITF* and c. 8033\_8057delinsG (p. N2678\_D2686delinsS) in gene *MYO15A* were first reported. **Conclusions** Whole-exome sequencing helps the accurate diagnosis of causes of hearing loss, especially for the rare syndromic hearing loss with atypical clinical manifestations. Information from genetic testing may highlight further recommended exams of structure and functions of related organs.

**【Key words】** whole-exome sequencing; syndromic hearing loss; *HARS2*; *USH2A*; *GATA3*; *MITF*; *MYO15A*

**Funding:** Talent Development Program for High-level Public Health Professionals (2022-3-016); Capital's Funds for Health Improvement and Research (No. 2022-1-2023)

*J Rare Dis*, 2022,1(3):278-282

听力损失是常见的出生缺陷之一，发病率为1%~3%，致病因素中遗传因素约占60%。根据是否伴有其他症状，遗传性耳聋可分为非综合征耳聋和综合征耳聋，其中综合征耳聋属于罕见病，约占耳聋的30%，且存在遗传异质性，既有常染色体显性遗传和常染色体隐性遗传，也有伴性遗传和线粒体母系遗传，还具有不完全外显和外显不全的特点，临床表型不定，家族内成员和家系之间呈现的表型差异导致临床诊断难度增加，非常容易误诊和漏诊<sup>[1-2]</sup>。

目前已经发现超过400个综合征伴有耳聋的表现<sup>[3]</sup>，相对比较常见的11个综合征耳聋的致病基因有48种<sup>[4]</sup>。这些基因编码的蛋白质包括离子通道蛋白、膜蛋白、转录因子和结构蛋白等。一部分相对常见的致病基因已经包含在耳聋Panel的临床检测中，但是还有很多综合征病因复杂、无明确的致病基因。罕见综合征耳聋的研究多为临床散发病例，伴耳聋的综合征罕见病例的分子遗传学还未见详细和系统的报道。本研究利用全外显子家系组(“trio”)测序方法分析致聋基因并探讨其在罕见综合征聋病诊疗中的应用，为罕见聋病综合征患者提供病因学分析及遗传学诊断与咨询。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

对2021年1—12月间在首都医科大学附属北京儿童医院就诊的34例耳聋患儿的临床资料进行回顾性分析。所有研究对象均经过详细病史询问和一般体格检查，并完成系统听力学评估、内耳CT平扫和冠状位薄层CT检查，排除单侧耳聋及中耳炎、脑膜炎、占位性病变、外伤导致的听力损失。经上述综合评估，纳入研究对象均诊断为双耳感音神经性听力损失。本研究

经首都医科大学附属北京儿童医院医学伦理委员会审核通过(审批号:[2021]-E-013-Y)，临床资料收集及标本采集均获得患儿家长的知情同意，并签署知情同意书。

### 1.2 听力学评估

听力学评估遵循测试组合、交叉验证的原则进行。测试涵盖听觉生理和行为听力测试，具体包括：听性脑干诱发反应(auditory brainstem response, ABR)、稳态听觉诱发反应(auditory steady state response, ASSR)、畸变产物耳声发射(distort production of acoustic emission, DPOAE)、声导抗和行为测听。听力评估结束后对结果进行交叉验证，受试儿童各测试结果间具有良好的一致性。听力损失程度的判断基于以下原则：2岁以下儿童以气导ABR的波V反应阈判定听力损失程度，≤30 dB nHL为正常，31~50 dB nHL为轻度听力损失，51~70 dB nHL为中度听力损失，71~90 dB nHL为重度听力损失，>90 dB nHL为极重度听力损失。2岁及以上儿童以行为听力测试4个频率(500 Hz、1000 Hz、2000 Hz、4000 Hz)听阈平均值判定听力损失程度，25~40 dB HL为轻度听力损失，41~60 dB HL为中度听力损失，61~80 dB HL为重度听力损失，>80 dB HL为极重度听力损失。

### 1.3 基因检测方法及流程

提取患儿及其父母外周静脉血的基因组DNA，利用Illumina NovaSeq6000测序平台完成全外显子高通量测序，对人类基因组中约2万个基因的外显子区及临近剪切区的DNA利用安捷伦V6芯片进行捕获和富集，测序模式为150 PE，每个样品产生不低于10~12 Gb数据，数据质量平均Q30>85%，数据平均覆盖100 X。本次检测基于患儿及其父母的临床表型，利用Human Gene Mutation Database (HGMD)、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)以及Gene4HL等数据库中收

录的相关致病基因与变异, 根据美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 遗传变异分类标准与指南, 对比中国人基因变异数据库进行生物信息学分析与医学解读, 筛选致病的 (pathogenic)、可能致病的 (likely pathogenic) 和临床意义未明的 (uncertain) 变异。同时对数据库中无记载的突变使用 SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://sift.jcvi.org>)、Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 等软件对变异致病性进行预测分析。

## 2 结果

借助全外显子组测序对 34 例诊断为感音神经性听力损失患儿进行基因检测, 其中男 20 例, 女 14 例, 年龄 4 月龄至 11 岁, 受试者基本情况和检出情况见表 1。确诊了 15 例为常染色体隐性遗传的非综合征耳聋, 包括 *GJB2* 基因突变 8 例, *SLC26A4* 基因突变 5 例, *MYO15A* 基因突变 2 例, 检出的突变位点见表 2。令人意外的发现 4 例患儿为综合征耳聋, 包括 *HARS2* 基因突变导致的 Perrault 综合征 2 型 1 例、*USH2A* 基因突变导致的 Usher 综合征 II A 型 1 例、*GATA3* 基因突变导致的甲状旁腺功能减退-感音神经性耳聋-肾发育不良 (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal dysplasia, HDR) 综合征 1 例、*MITF* 基因突变导致的 Waardenburg 综合征 I 型 1 例 (表 3)。*HARS2* 和 *USH2A* 基因突变导致的综合征为常染色体隐性遗传, 患儿父母分别为突变携带者。*GATA3* 和 *MITF* 基因突变导致的综合征为常染色体显性遗传, 家系分析证实 *GATA3* 基因的 c.1327delA 突变为新发突变, 患儿父母均正常; *MITF* 基因的 c.627C>A 突变来自患儿父亲, 但其父没有耳聋等临床症状。本组患者耳聋的分子病因确诊率达到 56% (19/34), 其中综合征耳聋占 21% (4/19), 其余 15 例经家系分析未发现明确的致病基因。

## 3 讨论

在实施人类基因组计划之前, 罕见病的诊断是极其困难的。最近 10 年中, 全外显子组和基因组测序技术逐渐成熟并在临床广泛应用, 显著提高了诊断率, 拓宽了与遗传变异相关的疾病谱, 为罕见病的诊断提供了新的选择和希望, 从而为潜在的治疗方法提

表 1 34 例儿童基本情况及听力损失分级

Tab. 1 Basic information and degree of hearing loss of 34 children

指标	检出致病变异例数 [n (%)]	未检出致病变异人数 [n (%)]
年龄 (岁)		
<1	5 (14.71)	3 (8.82)
1~3	9 (26.47)	4 (11.76)
4~6	3 (8.82)	6 (17.65)
>6	2 (5.88)	2 (5.88)
性别		
男	12 (35.29)	7 (20.59)
女	7 (20.59)	8 (23.53)
听力损失程度		
轻度	1 (2.94)	0
中度	6 (17.65)	3 (8.82)
重度	5 (14.71)	4 (11.76)
极重度	5 (14.71)	5 (14.71)
双耳不对称	2 (5.88)	3 (8.82)
影像学检查		
内耳及听神经异常	8 (23.53)	8 (23.53)
未见异常	11 (32.35)	7 (20.59)

表 2 全外显子组测序确诊的非综合征耳聋致病基因和例数

Tab. 2 The genes and cases of non-syndromic hearing loss diagnosed by whole-exome sequencing

致病基因 (转录本)	突变位点	检出例数
<i>GJB2</i> (NM_004004)	c.235delC/c.235delC	2
	c.235delC/c.35dupG	2
	c.235delC/c.299_300delAT	1
	c.299_300delAT/c.257C>G	1
	c.299_300delAT/c.427C>T	1
<i>SLC26A4</i> (NM_000441)	c.235delC/c.109G>A	1
	IVS7-2A>G/IVS7-2A>G	4
<i>MYO15A</i> (NM_016239)	IVS7-2A>G/c.2168A>G	1
	c.855dupT/c.8033_8057delinsG	1
	c.3505C>T/c.8158G>A	1
合计		15

供了可能性。罕见病的罕有或非常少见的特点造成了临床病例的稀缺性, 相关文献资料多数是病案报道, 不同专业人员的观察重点不同导致报道的数据偏差, 影响报道的全面性和客观性。对于罕见病的临床判断是非常困难的, 特别是在基层, 经常出现“当面不识君”的情况。

本组 34 例感音神经性听力损失患儿, 基因检测前均未发现或报告其他异常体征。借助全外显子组测

表 3 全外显子组测序确诊的综合征耳聋遗传学和临床特征 (n=4)

Tab. 3 The genetic and clinical features of syndromic hearing loss diagnosed by whole-exome sequencing (n=4)

编号	性别	年龄	致病基因 (转录本)	遗传方式	突变位点	ACMG 变异致病性分级	综合征	听力损失程度	干预方式	累及系统
13	男	3岁	<i>HARS2</i> (NM_012208)	AR	c.435_437del/c.1403G>C	LP/Unc	Perrault 综合征 2 型	中度	助听器	中枢和外周神经
15	女	11岁	<i>USH2A</i> (NM_206933)	AR	c.8559-2A>G/c.11389+1del	P/P	Usher 综合征 II A 型	中度	助听器	眼 (视网膜)
16	女	8岁	<i>GATA3</i> (NM_001002295)	AD	c.1327delA/- (新发突变)	LP	甲状旁腺功能减退-感音神经性耳聋-肾发育不良 (HDR) 综合征	中度	助听器	甲状旁腺/肾脏/骨骼/牙齿
22	女	8个月	<i>MITF</i> (NM_198159)	AD	c.627C>A/- (来自父亲)	LP	Waardenburg 综合征 I 型	极重度	人工耳蜗	皮肤/虹膜/头发色素

AR: 常染色体隐性遗传; AD: 常染色体显性遗传; HDR: 甲状旁腺功能减退—感音神经性耳聋—肾发育不良; P: 致病的; LP: 可能致病的; Unc: 临床意义未明的

序确诊了 19 例中的 4 例由综合征耳聋相关基因突变导致, 这个发现具有重要的临床意义: ①明确了临床诊断、分型和分子病因; ②为遗传咨询和婚育指导提供了依据; ③提示进一步相关器官和功能检查的必要性; ④为疾病的自然发展和干预提供了信息; ⑤丰富了罕见基因病的表型谱。这 4 例患者分别为 *HARS2* 基因突变导致的 Perrault 综合征 2 型 1 例、*USH2A* 基因突变导致的 Usher 综合征 II A 型 1 例、*GATA3* 基因突变导致的 HDR 综合征 1 例、*MITF* 基因突变导致的 Waardenburg 综合征 I 型 1 例。前 2 例为常染色体隐性遗传; 后 2 例为常染色体显性遗传, 其中 1 例为新发突变, 另外 1 例的突变虽然来自父亲, 但其父亲没有耳聋, 所以这 4 例均表现为散发病例。

由于外显不全、临床症状不明显、性别和年龄等原因, 儿童的综合征耳聋很容易误判为非综合征耳聋。本研究中 13 号病例是 *HARS2* 基因突变导致的 Perrault 综合征 2 型, 患儿为男性, 其哥哥也是耳聋, 该综合征主要临床表现为耳聋及女性卵巢发育不全<sup>[5-7]</sup>, 目前关于男性的表型报道很少。*USH2A* 基因突变导致的 Usher 综合征 II A 型主要表现为耳聋和视网膜色素变性<sup>[8]</sup>, 视网膜色素变性多发生在 10 多岁, 主要表现为渐进性的视野缺失和视力障碍。本研究中 15 号病例是 *USH2A* 基因突变导致的 Usher 综合征 II A 型, 年龄 11 岁, 虽然目前没有相关视野的异常, 但基因的结果提醒家长完善眼部的检查, 有助于及时发现和干预。*GATA3* 基因突变导致的 HDR 综合征, 除了耳聋之外, 还有甲状旁腺激素分泌不足导致的钙代谢异常和肾脏的发育或功能异常<sup>[9]</sup>。本研究中 16 号病例是 *GATA3* 基因突变导致的 HDR 综合征, 年龄 8 岁, 表型除了额头大之

外, 无明显的钙代谢异常, 也未做过肾脏的 B 超和功能检查。基因的结果提示需要进一步检查甲状旁腺激素水平和血钙浓度、腹部 B 超和肾功能。Waardenburg 综合征 I 型主要表现为耳聋和色素异常, 包括虹膜、头发和皮肤的颜色异常。本研究中 22 号病例是 *MITF* 基因突变导致的 Waardenburg 综合征 I 型, 但是除了面色白皙, 无其他明显色素异常, 其父亲也携带该基因突变, 回顾性问诊和查体证实其父亲有少白头和皮肤白皙, 但最初问诊时因这两个表征在正常人群中比较常见, 没有考虑到可能相关的综合征。由此可见, 仅依靠临床表现和特征诊断综合征耳聋非常困难, 极易漏诊, 基因诊断对明确耳聋的病因不可或缺, 检测结果是患儿及其家庭进行遗传咨询的重要依据, 特别是对婚育和再生育的指导, 并为产前诊断或第三代试管婴儿胚胎移植前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术提供了目标基因。

耳聋最常见致病基因是 *GJB2* 和 *SLC26A4*, 这两个基因已经包含在新生儿耳聋基因筛查范围内, 也是耳聋基因检测的候选目标基因, 本组 34 例患者中有 13 例是这两个基因突变导致, 占 38% (13/34)。因此, 在耳聋的基因检测方案中, 可以先做这两个基因的检测, 然后再进行 Panel 或全外显子基因检测寻找少见或罕见的致病基因, 这样分步骤的检测流程与本文的直接全外显子组测序相比, 其性价比会更高一些。*MYO15A* 基因突变在本组病例中发现了 2 例, 是导致遗传性耳聋的第 3 个常见耳聋基因<sup>[10]</sup>, 但目前尚未纳入新生儿耳聋基因筛查项目中<sup>[11]</sup>。Fu 等<sup>[12]</sup>对中国 81 例 *MYO15A* 基因致聋患者的基因型和表型进行了分析, 发现双等位基因非截短突变所占比例较少 (12/81),

但多数 (10/12) 表现为极重度耳聋。本文中的 2 例 *MYO15A* 基因突变致聋患儿都是携带一个截短突变和一个非截短突变, 其中一例患儿携带 *MYO15A* 基因 c. 855dupT (p. P286Sfs\*15) /c. 8033\_8057delinsG (p. N2678\_D2686delinsS) 复合杂合突变, 表现为双耳中度耳聋; 另外一例患儿携带 *MYO15A* 基因 c. 3505C>T (p. R1169X) /c. 8158G>A (p. D2720N), 表现为左耳重度耳聋, 右耳极重度耳聋。本研究发现的 *MYO15A* 基因 c. 8033\_8057delinsG (p. N2678\_D2686delinsS) 突变为首次报道, 丰富了该基因的突变谱。

全外显子基因检测的最佳实践方案是家系检测 (“trio”), 即包括先证者及其父母, 比较 3 人的测序结果有助于分析罕见变异的背景和来源。本组中有 15 例虽然基因测序结果提示了可能致病基因, 但经家系分析否定了其致病相关性, 如果没有父母的基因结果, 测序结果的分析更加困难, 不确定性也会明显增加。全外显子基因检测对于确诊罕见的综合征和非综合征耳聋都非常有意义, 检测效率高, 该检测的优势还包括应用范围广, 数据可以长期保留, 在今后需要时再进行分析, 但也有一定的局限性, 如只能检测有限的拷贝数变异, 不能检测内含子变异 (除了目标外显子的侧翼), 也不能检测三核苷酸重复扩增、甲基化异常。因此, 对于检测结果阴性的病例, 结合临床表现, 还可以选择相应的检测, 进一步完善遗传学分析和诊断。

**作者贡献:** 曲春燕: 数据分析, 稿件撰写及修改; 周怡: 听力学评估、临床资料收集、标本采集、基因结果咨询; 陈敏: 听力损失诊断、基因结果咨询; 郝津生: 听力损失诊断、基因结果咨询; 倪鑫: 项目实施资源配置与协调; 刘海红: 项目质控、听力学及基因检测结果审核、基因结果咨询、稿件修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

[1] Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U. S. school-age population [J]. *Am J Med Genet*, 1993, 46:

486-491.

- [2] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a silent revolution [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354: 2151-2164.
- [3] Alford RL, Arnos KS, Fox M, et al. American college of medical genetics and genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss [J]. *Genet Med*, 2014, 16: 347-355.
- [4] Van Camp G, Smith RJH. Hereditary hearing loss homepage. Available online: <https://hereditaryhearingloss.org> (accessed on 15 April 2022).
- [5] Yu J, Jiang W, Cao L, et al. Two novel likely pathogenic variants of *HARS2* identified in a Chinese family with sensorineural hearing loss [J]. *Hereditas*, 2020, 157: 47.
- [6] Demain LAM, Gerkes EH, Smith RJH, et al. A recurrent missense variant in *HARS2* results in variable sensorineural hearing loss in three unrelated families [J]. *J Hum Genet*, 2020, 65: 305-311.
- [7] Pierce SB, Chisholm KM, Lynch ED, et al. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase *HARS2* cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 6543-6548.
- [8] Weston MD, Eudy JD, Fujita S, et al. Genomic structure and identification of novel mutations in *usherin*, the gene responsible for Usher syndrome type IIa [J]. *Am J Med Genet*, 2000, 66: 1199-1210.
- [9] Muroya K, Hasegawa T, Ito Y, et al. *GATA3* abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome [J]. *J Med Genet*, 2001, 38: 374-380.
- [10] Farjami M, Assadi R, Javan FA, et al. The worldwide frequency of *MYO15A* gene mutations in patients with non-syndromic hearing loss: A meta-analysis [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23: 841-848.
- [11] Dai P, Huang LH, Wang GJ, et al. Concurrent hearing and genetic screening of 180, 469 neonates with follow-up in Beijing, China [J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105: 803-812.
- [12] Fu Y, Huang S, Gao X, et al. Analysis of the genotype-phenotype correlation of *MYO15A* variants in Chinese non-syndromic hearing loss patients [J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15: 71.

(收稿: 2022-05-07 录用: 2022-06-02)

(本文编辑: 唐牧云)