

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.012

小儿听神经病谱系障碍的 DIAPH3 基因突变对听力损伤的影响

李世东¹, 高小娥^{2△}

1. 陕西省人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 陕西西安 710068; 2. 陕西省西安市

雁塔区中医医院耳鼻喉科, 陕西西安 710061

摘 要:目的 探讨小儿听神经病谱系障碍(ANSD)的 DIAPH3 基因突变对听力损伤的影响。方法 采用回顾性研究方法, 选择 80 例携带 DIAPH3 基因突变的 ANSD 患儿作为突变组, 选择同期在陕西省西安市雁塔区中医医院耳鼻喉科进行检查的 80 例耳聋未携带 DIAPH3 基因突变的患儿作为未突变组, 记录两组的临床特征, 分析 DIAPH3 基因突变对听力损伤的影响。结果 两组患儿听力损伤程度差异有统计学意义($P < 0.05$); 突变组中, 听力曲线为低频上升型 56 例, 平坦型 14 例, 高频下降型 10 例, 与未突变组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 突变组所有频率(0.5、1.0、2.0、4.0 kHz)刺激下的听阈都明显高于未突变组($P < 0.05$)。结论 DIAPH3 基因突变可能会影响 ANSD 患儿听力损伤的程度、听力曲线类型分布、听觉稳态反应, DIAPH3 基因突变筛查可为 ANSD 患儿诊治提供参考。

关键词:听神经病谱系障碍; 儿童; DIAPH3 基因; 基因突变; 听力损伤

中图分类号: R764.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)21-3115-04

Influence of DIAPH3 gene mutation in pediatric auditory neuropathy spectrum disorder on hearing impairment

LI Shidong¹, GAO Xiao'e^{2△}

1. Department of Nose, Throat, Head and Neck Surgery, Shaanxi Provincial People's

Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China; 2. Department of Otolaryngology, Yanta District Hospital

of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: **Objective** To investigate the influence of DIAPH3 gene mutation in pediatric auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD) on hearing impairment. **Methods** The retrospective study was adopted. Eighty children patients with ANSD carrying DIAPH3 gene mutation were selected as the mutation group, and other 80 cases of deafness without carrying DIAPH3 gene mutation undergoing the examination in the otolaryngology department of Yanta District Hospital of Traditional Chinese Medicine served as the non-mutation group. The clinical characteristics of the two groups were recorded. The influence of DIAPH3 gene mutation on hearing impairment was analyzed. **Results** There was statistically significant difference in the degree of hearing impairment between the two groups ($P < 0.05$). In the mutation group, 56 cases were the low-frequency ascending type in audiometric curve, 14 cases were the flat type, and 10 cases were the high-frequency descending type, which showed the statistical difference compared with the non-mutation group ($P < 0.05$). All hearing thresholds under the stimulation of all frequencies (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 kHz) in the mutant group were significantly higher than those in the non-mutant group ($P < 0.05$). **Conclusion** DIAPH3 gene mutations may affect the degree of hearing loss, distribution types of audiogram curves and auditory steady state responses. DIAPH3 gene mutation screening can provide reference for the diagnosis and treatment of children with ANSD.

Key words: auditory neuropathy spectrum disorder; children; DIAPH3 gene; genetic mutation; hearing impairment

听神经病谱系障碍(ANSD)也被称为听神经病(AN), ANSD有其特征性的听力学表现, 听力损伤程度不一, 可表现为轻度、中度到重度听力损伤^[1]。ANSD占感音神经性听力损伤患儿的1%左右, 在重度至极重度听力损伤的小儿中占15%左右^[2]。

ANSD的纯音测听听力曲线类型各异, 低频上升型占85%以上, 13%左右为高频下降型、平坦型曲线, 2%左右病例的纯音听力在正常范围内^[3]。ANSD的具体发病机制还不明确, 包括遗传性因素、非遗传性因素(高胆红素血症、自身免疫性疾病、感染性疾病、缺氧)等^[4]。

遗传因素在 ANSD 中发挥重要作用,包括 X-染色体连锁遗传、线粒体遗传、常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传等^[5],其中与 ANSD 相关的基因有 MPZ、NF-L、NDRG1、OTOF、PJKV、DIAPH3、GJB1、GJB3、MTND4 等,其中 DIAPH3 基因是最早发现且已经确定的非综合征型 ANSD 的致病基因^[6]。但是对于该基因上的致病突变筛查在中国人群中的研究很少,因此,在中国人群中对 DIAPH3 基因突变的检测,有利于对 ANSD 患者分型与预防治疗。本文探讨了 DIAPH3 基因对 ANSD 患儿听力损伤的程度、听力曲线类型分布、听觉稳态反应的影响,希望为 ANSD 患儿防治提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用回顾性研究方法,选择 2014 年 6 月至 2018 年 1 月在陕西省西安市雁塔区中医医院耳鼻喉科确诊的 80 例携带 DIAPH3 基因突变的 ANSD 患儿作为突变组,选择同期在陕西省西安市雁塔区中医医院进行检查的 80 例耳聋未携带 DIAPH3 基因突变的患儿作为未突变组。纳入标准:符合 ANSD 的诊断标准(言语识别率差,与纯音听力不成比例;纯音测听表现为以低频听力下降为主的感音神经性聋);年龄 1~8 岁;无耳毒性药物使用史及噪声暴露史;无其他系统疾病。排除标准:耳镜检查发现耳部疾病;有神经系统疾病史。突变组中男 45 例,女 35 例;年龄 2~8 岁,平均(6.44±1.48)岁。未突变组中男 44 例,女 36 例;年龄 1~7 岁,平均(6.51±0.22)岁。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 听力学检查 (1)纯音测听(PTA):采用 GSI-61 型纯音测听仪(生产商:上海麦森医疗科技有限公司,型号:GSI 61),刺激声信号频率为 125 Hz,根据在此频率下的听阈判断患儿的听力损伤程度,听阈 26~40 dBHL 为轻度,听阈 41~55 dBHL 为中度,听阈 56~70 dBHL 为重度。(2)听力曲线:应用 GSI33 型中耳分析仪(生产商:上海萱盛医疗器械有限公司,型号:GSI TymStar)进行声导抗检查,根据纯音测听听力曲线把 ANSD 分为中频 U 型、低频上升型、平坦型及高频下降型等 4 个类别,中频 U 型听力曲线为中间频率最差的听力阈值比低频听阈和高频听阈>15 dBHL,低频上升型听力曲线为低频最差听力的阈值比高频≥15 dBHL,平坦型听力曲线为在 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 kHz 处的听阈位于平均听阈的上下 15 dBHL 以内,高频下降型听力曲线为在 0.5 kHz 和 1.0 kHz 的平均听力阈值与 4.0 kHz 和 8.0 kHz 的平均听力阈值相差≥15 dBHL。(3)听觉稳态反应:应用 IHS Smart ASSR 测试软件对听阈阈值进行客观评定,刺激声信号的频率分别为 0.5、1.0、2.0、

4.0 kHz,每个强度的测试设定为 400 次扫描,每次扫描为 1 s。

1.2.2 DIAPH3 基因检测 采集入选者的空腹外周静脉血 3~5 mL,采用血样 DNA 提取试剂盒(生产商:北京诺博莱德科技有限公司,型号:RT405-11)提取血样 DNA,严格按照产品说明书操作。对提取的 DNA 用紫外分光光度法(生产商:上海仪电分析仪器有限公司,型号:UV759)进行纯度和水平的检测,然后-20℃保存备用。采用聚合酶链反应(PCR)对 DIAPH3 的 DNA 片段进行扩增,DIAPH3 基因编码区的引物设计由北京华大基因科技有限公司合成。PCR 反应体系:2×Taq PCR StarMix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,cDNA 模板 1 μL,加 ddH₂O 至 25 μL,扩增循环数为 40 个循环,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。DIAPH3 基因的测序反应在 ABI3700 测序仪上完成,选用 NCBI 网站已有的正常 DIAPH3 基因序列与测序序列,采用 Sequence Scanner 软件进行比对分析,明确相应位点的突变情况。

1.3 统计学处理 选择 SPSS22.0 软件,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIAPH3 基因突变检测 在突变组 DIAPH3 基因突变位点检测中,发现编码区的单核苷酸多态性(SNP)位点突变出现频率>50%的有 1425G>A、1749T>C、2605A>C 位点;未发现以上几个 SNP 位点出现突变。

2.2 听力损伤程度对比 两组听力损伤程度差异有统计学意义($\chi^2=36.795, P<0.05$),突变组多表现为中、重度的听力损伤,未突变组多表现在轻度听力损伤。见表 1。

表 1 两组患儿听力损伤程度对比[n(%)]					
组别	n	正常	轻度	中度	重度
突变组	80	5(6.3) ^①	11(13.8) ^①	30(37.5) ^①	34(42.5) ^①
未突变组	80	20(25.0)	45(56.3)	15(18.8)	0(0.0)

注:与未突变组比较,^① $P<0.05$

2.3 听力曲线类型分布对比 突变组的听力曲线表现以低频上升型为主,而未突变组以高频下降型和平坦型为主,两组听力曲线类型分布差异有统计学意义($\chi^2=53.161, P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组患儿听力曲线类型分布对比[n(%)]					
组别	n	低频上升型	平坦型	高频下降型	中频 U 型
突变组	80	56(70.0) ^①	14(17.5) ^①	10(12.5) ^①	0(0.0) ^①
未突变组	80	12(15.0)	26(32.5)	34(42.5)	8(10.0)

注:与未突变组比较,^① $P<0.05$

2.4 听觉稳态反应对比 突变组所有频率刺激下的

听阈变化都明显高于未突变组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组患儿听觉稳态反应对比($\bar{x}\pm s$, dBHL)

组别	n	声音频率			
		0.5 kHz	1.0 kHz	2.0 kHz	4.0 kHz
突变组	80	75.02±21.94 ^①	84.20±11.48 ^①	88.20±24.59 ^①	73.50±12.82 ^①
未突变组	80	16.30±2.48	14.20±3.11	15.20±2.88	14.88±2.11

注:与未突变组比较,^① $P<0.05$

3 讨 论

ANSD 是一种内毛细胞、听神经突触、听神经本身功能不良所致的听力障碍,是一种临床表现特殊的感音神经性聋,是导致婴幼儿和青少年言语交流障碍的重要疾病。ANSD 特征性的听力学表现主要是伴有听性脑干反应(ABR)结果缺失或严重异常,也伴有言语识别率与纯音听力严重下降^[7]。已有报道表明,DIAPH3 基因的突变与 ANSD 相关^[8],但是,其影响 ANSD 患者的发病机制还尚未研究清楚。

本研究显示,突变组患儿的听力损伤程度显著高于未突变组($P<0.05$),且该组患儿多表现为中、重度的听力损伤,未突变组多表现在轻度听力损伤,说明带有 DIAPH3 基因突变的 ANSD 患者听力损伤严重。可能是因为 DIAPH3 基因突变导致 DIAPH3 基因和蛋白过表达,产生迟发性的毛细胞功能损伤,影响螺旋神经节树突棘的功能,致使听神经纤维末梢树突形态发生改变,也会使内毛细胞受损,故主要表现为听力损伤,同时也影响听觉通路的信息传递,影响听觉器官的功能,出现中、重度听力损伤^[9]。有研究也显示,DIAPH3 基因突变与 ANSD 的纯音听力损伤程度和伴随症状有显著相关性,伴随症状越多,听力损伤程度越严重^[10-11]。

随着临床听力检测技术的提高,我国 ANSD 的检出率越来越高。不同于典型的感音神经性听力损伤,ANSD 的临床表现多样,听力曲线类型各异,多数为低频上升型曲线,少数为平坦型。本研究显示,突变组的主要听力曲线为低频上升型,显著高于未突变组,说明有 DIAPH3 基因突变的 ANSD 患儿的听力曲线主要以低频上升型为主。轻度听力损伤患儿多表现为低频上升型听力曲线,而听力损伤严重患儿会影响全部频率范围,从而在听力曲线表现为平坦型听力曲线。从机制上分析,正常情况下,不同频率的声音有序地发出,使得神经纤维特异性地兴奋,保证听神经同步化放电。DIAPH3 基因突变后,ANSD 顶转纤维的轴突直径更粗、蜗后部分更长,使得听神经纤维较易受累;并且低频声音的编码依赖于放电速率,对瞬时编码功能的依赖性高,低频神经发放的定时性差,容易表现为低频上升型听力曲线^[12]。本研究也显示,突变组在所有频率刺激下的听阈都显著高于未突

变组,说明突变组发生了频率差异性损伤,对于这种损伤机制,有研究猜想是存在 DIAPH3 基因突变的 ANSD 患儿在病程发展中,出现了耳蜗外毛细胞的损伤,而外毛细胞的损伤进一步导致了听阈阈值的升高^[11]。基础研究显示,DIAPH3 基因突变的小鼠听觉通路的信息传递也会发生障碍,使内毛细胞纤毛的形态和功能发生异常,听阈阈值显著上升^[13]。

本研究显示,DIAPH3 基因突变 SNP 位点有 1425G>A、1749T>C、2605A>C,说明此 SNP 突变位点可能是 ANSD 的有害突变,但是还需要在细胞功能水平进行验证。在突变模式中,1749T>C 为同义突变,推测可能通过改变 mRNA 的构象,影响蛋白三维结构的形成,降低 mRNA 的稳定性和翻译效率,导致蛋白的表达减少,最终影响蛋白质的功能。有研究显示,1749T>C 突变是一个常染色体显性遗传性 ANSD 的致病因素,该位点突变显著上调 DIAPH3 基因的表达,能使内毛细胞的纤毛延长,排列紊乱,进而影响听觉通路的信息传递,引起听力障碍,且与听力下降的时程一致^[12]。1425G>A、2605A>C 也与 ANSD 相关,有研究显示,携带 2605A>C 突变的患儿在 3 岁时发病,临床表现为双耳以低频为主的中度至中重度感音神经性听力损伤;携带 1425G>A 突变的患儿 2 岁时发病,临床表现为双耳以低频为主的中度感音神经性听力损伤^[14]。

总之,小儿 ANSD 的 DIAPH3 基因突变可能会影响听力损伤的程度、听力曲线类型分布、听觉稳态反应,DIAPH3 基因突变筛查可为 ANSD 患儿诊治提供参考。

参考文献

[1] 董瑞娟,王硕,刘博,等.听神经病谱系障碍患者临床听力学特点分析[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2015,22(12):611-615.

[2] XIA H, HUANG X, XU H, et al. An OTOF Frameshift variant associated with auditory neuropathy spectrum disorder[J]. Curr Genomics, 2018, 19(5):370-374.

[3] XIA H, HU P, YUAN L, et al. A homozygous MYO7A mutation associated to Usher syndrome and unilateral auditory neuropathy spectrum disorder[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):4241-4246.

(下转第 3120 页)

- [7] LARIBI S, KANSO J, BORDERIE D, et al. S100B blood level measurement to exclude cerebral lesions after minor head injury: the multicenter STIC-S100 French study[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52: 527-536.
- [8] 黄航斌, 杨松斌, 沈良军, 等. 血浆 S100B 蛋白浓度与重型颅脑损伤患者长期死亡的相关分析[J]. 浙江创伤外科, 2016; 21(6): 1017-1020.
- [9] 刘华桥. 急性创伤性颅脑损伤患者血浆 S100B 蛋白动态变化水平及临床意义[J]. 河北医药, 2015, 37(21): 3209-3211.
- [10] 徐辉, 顾志恺. 血清及脑脊液 S100B、MBP 检测在颅脑损伤中的临床意义[J]. 南通大学学报, 2015, 35(3): 193-195.
- [11] 全振亚, 杨光社. 急性颅脑损伤病人血糖和血清中降钙素原变化及其与预后的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(13): 1661-1665.
- [12] 刘旭, 郑涛, 朱家伟, 等. 颅脑损伤患者血清 S100B、NSE 和 MBP 的变化及其临床意义[J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28(1): 14-16.
- [13] 董广佩. 急性创伤性颅脑损伤患者血浆 S100B 蛋白动态变化水平及临床意义[J]. 中国社区医师, 2017, 33(2): 123-125.
- [14] 方明, 张琳, 章车明, 等. 急性颅脑损伤患者血清细胞因子的变化[J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 10(1): 26-30.
- [15] 庞鑫鑫, 王勋, 张黎明. S100 β 蛋白在脑损伤诊断中应用研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2018, 29(9): 572-574.
- [16] 曹红玲, 郭悦平, 王跃振, 等. 生物标志物在创伤性脑损伤临床鉴别诊断中的应用[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2018, 39(6): 573-578.
- [17] 吴文天, 肖国民. 创伤性脑损伤生物学标志物研究进展[J]. 健康研究, 2018, 38(6): 657-660.
- [18] 吴珊珊, 范宇威, 高静, 等. S100B 蛋白在神经系统疾病中的临床意义及进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(6): 3197-3200.
- [19] 刘东华. 急性颅脑损伤 68 例 S100B 蛋白测定分析[J]. 宁夏医学杂志, 2018, 40(5): 433-434.
- [20] 韩结萍, 凌杰. 异丙酚全凭静脉麻醉对急性颅脑损伤手术患者血清 S100B 蛋白和白介素-1 水平的影响[J]. 中国现代医生, 2014, 52(1): 72-74.
- [21] 肖伟利, 胡建军, 元少鹏, 等. 重型颅脑损伤患者血清 S-100B 蛋白含量检测结果及临床意义[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(2): 248-249.
- [22] 杨珉, 王威, 魏俊, 等. 重型颅脑损伤患者血清 S100 β 、C-反应蛋白动态水平变化及其临床意义研究[J]. 中国医学创新, 2017, 14(5): 77-81.
- [23] 姚海军, 胡锦, 袁强, 等. 3144 例重型颅脑损伤住院患者临床特点分析[J]. 山东医药, 2015, 55(30): 67-69.
- [24] 陈锦景, 张畅, 朱春然, 等. 血清 S100B 和 NSE 联合检测对颅脑损伤患者预后判断的价值[J]. 现代医学, 2016, 44(11): 1602-1604.
- [25] ESLAMI S, TAHERZADEH Z, SCHULTZ M J, et al. Glucose variability measures and their effect on mortality: a systematic review[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(4): 583-593.
- [26] KAVANAGH B P, MCCOWEN K C. Clinical practice Glycemic control in the ICU[J]. N Engl J Med, 2010, 363(26): 2540-2546.

(收稿日期: 2019-06-10 修回日期: 2019-09-13)

(上接第 3117 页)

- [4] 王硕, 董瑞娟, 王媛, 等. 感音神经性听力损失与听神经病谱系障碍患者频率选择特异性研究[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2015, 22(1): 27-31.
- [5] PHAM N S. The management of pediatric hearing loss caused by auditory neuropathy spectrum disorder[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2017, 25(5): 396-399.
- [6] TANG F, MA D, WANG Y, et al. Novel compound heterozygous mutations in the OTOF Gene identified by whole-exome sequencing in auditory neuropathy spectrum disorder[J]. BMC Med Genet, 2017, 18(1): 35-42.
- [7] 袁玲, 王莹, 常玲美, 等. 听神经病谱系障碍诊断技术应用 1 例[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2018, 16(1): 18-21.
- [8] 张娇, 王秋菊. DIAPH3 基因与听神经病谱系障碍[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2013, 21(5): 550-553.
- [9] 张娇, 张秋静, 齐悦, 等. 听神经病谱系障碍患者 DIAPH3 基因临床遗传学特征研究[J]. 中华耳科学杂志, 2015, 13(2): 229-233.
- [10] CHEN M M, OGHALAI J S. Diagnosis and Management of Congenital Sensorineural Hearing Loss[J]. Curr Treat Options Pediatr, 2016, 2(3): 256-265.
- [11] 罗静, 徐涛, 管锐瑞, 等. 听性稳态反应在听神经病谱系障碍患儿中的应用价值[J]. 安徽医学, 2017, 38(11): 1378-1380.
- [12] CARVALHO G M, ZRAMOS P M, CASTILHO A, et al. Relationship between patients with clinical auditory neuropathy spectrum disorder and mutations in Gjb2 gene[J]. Open Neurol J, 2016, 30(10): 127-135.
- [13] 王硕, 董瑞娟, 王媛, 等. 听神经病谱系障碍患者时域间隔感知能力的研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2015, 23(4): 335-337.
- [14] WANG L, GUAN J, WANG H, et al. Understanding auditory neuropathy spectrum disorder: a systematic review in transgenic mouse models[J]. Sci China Life Sci, 2016, 59(5): 480-486.

(收稿日期: 2019-05-30 修回日期: 2019-09-03)