

中国迟发性非综合征性耳聋家系 CEACAM16 基因 新突变的鉴定*

张秋静¹ 吴楷文¹ 赵翠¹ 谢林怡¹ 熊芬¹ 兰兰¹ 王秋菊¹

[摘要] 目的:对我国一个常染色体显性遗传性耳聋家系进行临床特征及分子遗传学分析,明确其病因,为今后临床上开展基因诊断奠定基础。方法:通过问卷调查方式采集家系成员的病史,并进行系统的查体和听力学检查。家系成员留取外周静脉血提取 DNA,开展包括 139 个已知耳聋基因的目标区域捕获和测序,同时对 6 个耳聋相关的线粒体 DNA 突变位点进行检测。结果:该家系成员主要表现为 20 岁左右发病的听力进行性下降的常染色体显性遗传性耳聋,听力图主要表现为高频下降型。基因检测结果提示先证者及其母亲和女儿携带 CEACAM16 基因 c. 418A>G /p. Thr140Ala 杂合突变,并且其基因型与临床表型共分离,考虑为新发现的致病突变。结论:本研究在我国的一个常染色体显性遗传性耳聋家系中发现了 CEACAM16 基因的一个新的突变位点,这是我国耳聋人群中检测到的第 2 个可能的致病突变,丰富了我国人群该基因的突变图谱。

[关键词] CEACAM16 基因;耳聋;基因突变

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.09.003

[中图分类号] R 764.43 **[文献标志码]** A

Identification of a novel mutation of CEACAM16 gene in a Chinese family with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss

ZHANG Qiuqing WU Kaiwen ZHAO Cui XIE Linyi XIONG Fen
LAN Lan WANG Qiuju

(College & Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chinese PLA Institute of Otolaryngology, National Clinical Research Center for Otolaryngologic Diseases, Key Lab of Hearing Impairment Science of Ministry of Education, Key Lab of Hearing Impairment Prevention and Treatment of Beijing, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: WANG Qiuju, E-mail: wqcr301@vip.sina.com

Abstract Objective: To explore the genetic cause of a Chinese autosomal dominant nonsyndromic hearing loss family and investigate the clinical features and molecular genetic characteristics of this family. **Method:** Detailed medical history and systematic audiology tests were carried out in the family members, and they were subjected to comprehensive genetic analyses using massively parallel sequencing, which targeted 139 known deafness genes and 6 mitochondrial DNA mutations associated with hearing loss. **Result:** This family's hearing loss was consistent with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. The affected family members appeared to have developed a high-frequency hearing loss with the onset of twenties. We identified a heterozygous missense mutation, c. 418A>G/p. Thr140Ala in the CEACAM16 gene, segregating with the deafness in this family. **Conclusion:** In this study, we identified a new mutation of CEACAM16 gene, which was the second mutation identified in Chinese hearing loss population. It has enriched the mutation spectrum of this gene.

Key words CEACAM16 gene; deafness; mutation

耳聋是导致言语交流障碍的重要原因,WHO 预估全球约有 4.66 亿人面临听力障碍问题,约占全球总人口数量的 6.1% (<https://www.who.int/health-topics/hearing-loss>)。研究显示,在引起耳聋的各种原因中,遗传因素约占 60%;而在遗传性

耳聋中,常染色体显性遗传性耳聋约占 22%^[1],该类患者多表现为迟发性耳聋,听力损失程度渐进性加重,直至发展成为重度或极重度聋;因其发病隐匿,进展缓慢,临床上较难早期发现;因此,开展基因检测,可以对该类患者开展早期预警和早期防治,可有效降低其致残率,提高患者的生存质量。截至目前,共鉴定了 47 个常染色体显性遗传性耳聋相关的基因 (<http://hereditaryhearingloss.org/>)。其中,CEACAM16 基因是与 DFNA4B 相关的致病基因,其最早是由 Zheng 等^[2]于 2011 年首次发现并报道。目前对该基因的研究仍有限,其

*基金项目:国家自然科学基金重点项目(No:81830028、81530032)

¹中国人民解放军总医院第一医学中心耳鼻咽喉头颈外科解放军耳鼻咽喉研究所 国家耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心 聋病教育部重点实验室 聋病防治北京市重点实验室(北京,100853)

通信作者:王秋菊, E-mail: wqcr301@vip.sina.com

功能尚不十分明确,国内王鸿涵团队在 2015 年发现并报道了该基因的一个致病突变^[3]。本研究在一个迟发性耳聋家系中发现了 CEACAM16 基因的一个新的突变位点,进一步丰富了我国人群该基因的突变图谱,也为以后临床上开展基因诊断提供了重要的参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究中的耳聋家系来自解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科门诊,家系成员居住北京,汉族。通过问卷调查方式对家系成员进行了详细的病史采集,主要包括基本信息,现病史、既往史、个人史及家族史,以及围生期和母亲孕期用药史、感染史、外伤史等,特别是耳毒性药物应用史和噪声接触史。家系成员均进行了系统的查体和听力学检查,耳聋患者进一步完善了影像学检查,并排除了综合征型耳聋。听力损失分级采用 1981 年美国言语听力协会的分级标准:正常听力 ≤ 25 dB;轻度聋:26~40 dB;中度聋:41~55 dB;中重度聋:56~70 dB;重度聋:71~90 dB;极重度聋 ≥ 91 dB。

先证者(Ⅲ. 1),男,50 岁,自诉 21 岁时开始出现双耳进行性听力下降,伴双耳耳鸣,无眩晕等不适,不伴有其他系统器官发育异常,无耳毒性药物应用史,无明显噪声接触史;听力检查结果提示双耳高频下降型听力损失,左耳中重度聋,右耳重度聋。其听力学表型与其母亲相似,其母亲(Ⅱ. 1),81 岁,也是 20 岁左右开始出现双耳听力下降,并进行性加重,不伴有其他系统器官发育异常;听力检查提示双耳极重度聋,高频听力下降明显。先证者女儿(Ⅳ. 1),24 岁,自觉无明显听力下降,行听力检查提示双耳高频轻度听力下降。先证者弟弟(Ⅲ. 2)及侄女(Ⅳ. 2)听力正常。其父亲(Ⅱ. 2),82 岁,老年后出现听力下降,其听力损失考虑为老年性聋(图 1)。家系成员留取 10~20 ml 外周静脉血提取 DNA,用于基因检测。所有家系成员均签署知情同意书,本研究获得解放军总医院伦理委员会批准。

1.2 基因学检测

提取家系成员外周血 DNA。对先证者进行 139 个已知耳聋相关基因目标区域捕获和测序,同时对线粒体 DNA 耳聋相关的 6 个位点进行检测。在 ClinVar、OMIM 和 HGMD 3 个主要收录已知或疑似致病变异的数据库中筛选已知的致病变异。对于错义突变,用 SIFT/PolyPhen2/Mutation Taster 工具预测错义变异的致病性。筛选的可能致病突变位点进一步在家系样本 DNA 中进行 Sanger 测序验证。

2 结果

先证者及其母亲和女儿携带 CEACAM16 基因 c. 418A>G /p. Thr140Ala 杂合突变,其父亲及

弟弟未发现该基因突变。CEACAM16 基因是常染色体显性遗传性耳聋基因,单杂合突变致病,可导致常染色体显性遗传性耳聋 4B 型,主要临床表型为进行性的感音神经性耳聋,一般在语后发病(图 1)。CEACAM16 基因 c. 418A>G 突变使得其编码氨基酸 140 位由苏氨酸变成了丙氨酸。该变异暂未出现在大规模人群测序数据库中,亦未有文献报道,并且在本家系中基因型与临床表型共分离。但该变异所在氨基酸位点上的另一变异 c. 418A>C(p. Thr140Pro)曾在 1 个耳聋家系中被报道为致病突变,因此,考虑本研究新发现的突变也为致病突变。

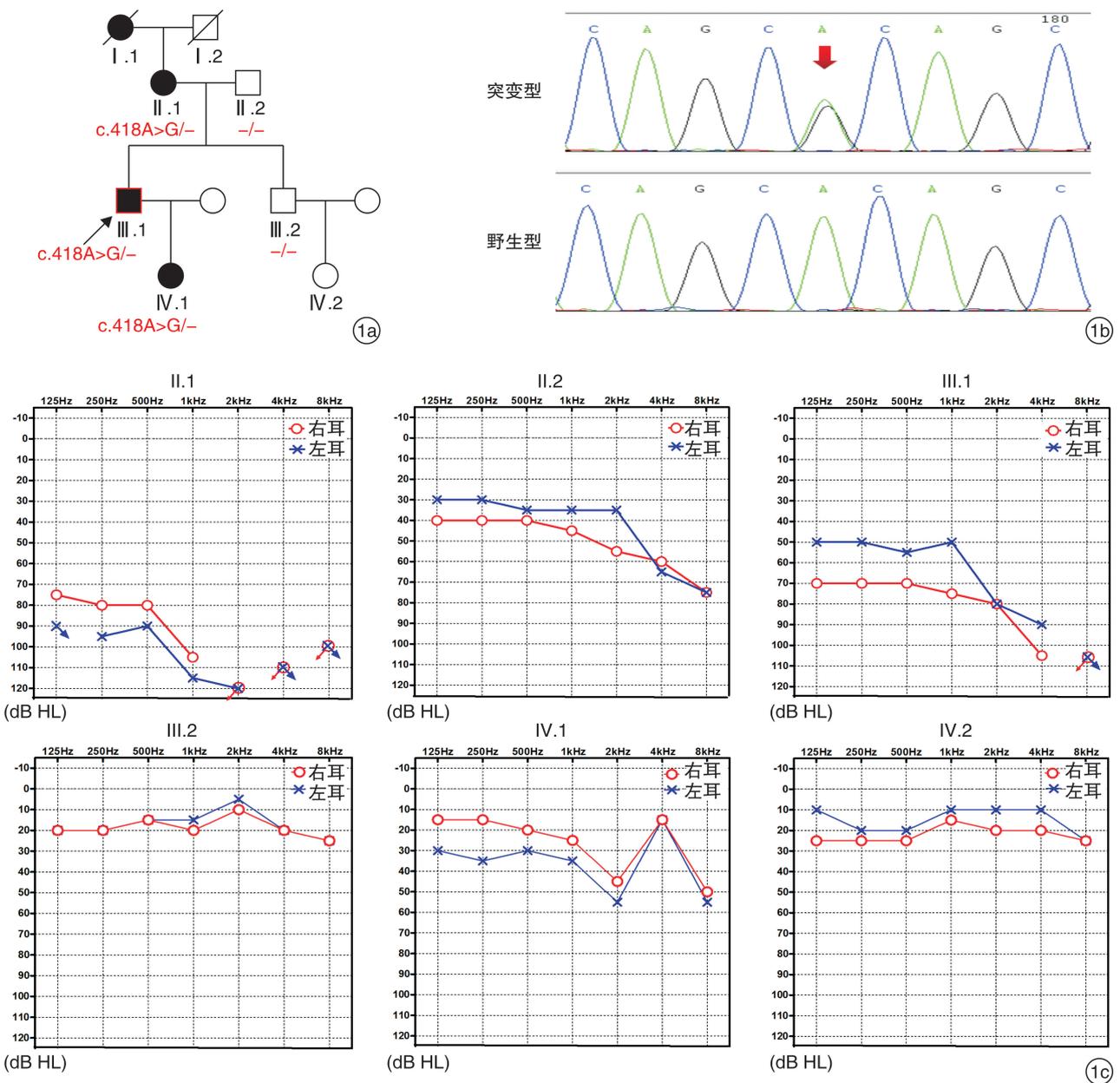
3 讨论

CEACAM16 基因含有 7 个外显子,其中第 1 个外显子不参与编码,编码含有 425 个氨基酸残基的糖蛋白,属于癌胚抗原相关性细胞黏附分子家族(CEACAMs)。与 CEACAMs 家族其他成员不同的是,CEACAM16 蛋白包含 4 个免疫球蛋白样结构域(2 个 Ig-like V-type 结构域和 2 个 Ig-like C2-type 结构域),但是没有跨膜结构域^[4]。Kammerer 等^[5]研究发现,小鼠 CEACAM16 蛋白选择性地表达于内耳组织,由齿间细胞及 Deiter 细胞合成,通过 Deiter 细胞的突出部分分泌至胞外,弥散至盖膜,从而与其他盖膜蛋白如 α -盖膜蛋白、 β -盖膜蛋白相互作用。此外,研究还发现 CEACAM16^{-/-}小鼠的耳蜗盖膜总是处于拉伸状态,而野生型小鼠的盖膜多处于收缩状态,且与外毛细胞分离。这提示 CEACAM16 蛋白对维持盖膜的完整性、弹性及保持盖膜和外毛细胞静纤毛的连接状态发挥重要的作用。

CEACAM16 基因是 DFNA4 基因座上的一个新的致聋基因,DFNA4 定位于 19q13,是常染色体显性遗传性非综合征型耳聋的一个基因座位,患者主要表现为迟发性进行性听力下降。该基因最早是在美国的 1070 耳聋家系中发现的,该家系由 Chen 等^[6]在 1995 年定位于 19q13,并将其命名为 DFNA4;后对该家系进行了 DFNA4 基因座相关的 MYH14 基因检测,未发现致病突变;直到 2011 年,Zheng 等^[2]在该家系中发现 CEACAM16 基因 c. 418A>C 突变,并确定其为该家系的致病突变;从而也确定了 CEACAM16 基因是常染色体显性遗传性非综合征性耳聋 DFNA4 的另一个致聋基因。截至目前,共发现该基因的 6 种致病突变(表 1,图 2)。2015 年,王鸿涵和冯永教授团队报道在我国的一个 5 代 34 人的耳聋大家系中鉴定了 CEACAM16 基因 c. 505G>A /p. G169R 突变,这也是国内报道的首例 CEACAM16 基因突变耳聋家系^[3]。随后,Hofrichter 等^[7]在德国的一个迟发性耳聋的男孩中检测到了 CEACAM16 基因的一

个 de novo 突变, c. 1094T > G/ p. Leu365Arg. 2018 年, Booth 等^[8] 在伊朗的 2 个近亲结婚的轻度到中度进行性听力下降的常染色体隐性遗传性耳聋家系中发现了 CEACAM16 基因 c. 37G > T 和 c. 662-1G > C 突变, 提示 CEACAM16 基因突变也可能导致常染色体隐性遗传性耳聋。2019 年, Dias 等^[9] 在巴西的一个近亲结婚的迟发性进行性常染色体隐性遗传性耳聋家系中鉴定了 CEACAM16 基因的一个新的突变位点, c. 436C > T/p. Arg146Ter, 并确定为该家系的致病突变。本研究在中国的另外一个迟发性进行性听力下降耳聋家系中检测到 CEACAM16 基因的一种新的突变, 该

家系临床表型及遗传学分析考虑为常染色体显性遗传, 本研究新发现的突变 c. 418A > G 与 2011 年 Zheng 等^[2] 发现的突变位点一致 (c. 418A > C), 但是碱基改变不同。本研究新发现的突变使得其编码氨基酸 140 位由苏氨酸变成了丙氨酸 (p. Thr140Ala), 之前研究显示该氨基酸位点在不同物种间高度保守, 并且位于 N-糖基化位点, 相应位点突变的小鼠动物模型证实该氨基酸位点的改变可以导致糖基化异常。此外, 该变异暂未出现在大规模人群测序数据库中, 在本研究的家系中, 其基因型与临床表型共分离, 因此, 考虑本研究新发现的突变也为致病突变。



1a: 患者家系图及其基因型, 箭头所指代表先证者, 该家系遗传方式符合常染色体显性遗传, 基因型与临床表型共分离; 1b: c. 418A > G 突变 sanger 测序图及正常对照; 1c: 家系成员纯音测听检测结果, 所有耳聋患者均为感音神经性耳聋, 图中显示气导听力。

图 1 患者家系图及听力图

表 1 CEACAM16 基因已知致病突变及其临床表型汇总

外显子	碱基改变	氨基酸改变	国家	发病年龄	家系表型	参考文献
Exon2	c. 37G>T		伊朗	12~13 岁	迟发性进行性听力下降的常染色体隐性遗传性耳聋家系	Booth ^[8]
Exon4	c. 418A>C	p. Thr140Pro	美国	10 余岁	迟发性进行性听力下降的常染色体显性遗传性耳聋家系	Zheng ^[2]
Exon4	c. 418A>G	p. Thr140Ala	中国	20~24 岁	迟发性进行性听力下降的常染色体显性遗传性耳聋家系	本研究
Exon4	c. 436C>T	p. Arg146Ter	巴西	10 余岁	迟发性进行性听力下降的常染色体隐性遗传性耳聋家系	Dias ^[9]
Exon4	c. 505G>A	p. Gly169Arg	中国	10~25 岁	迟发性进行性听力下降的常染色体显性遗传性耳聋家系	Wang ^[3]
Exon6	c. 1094T>G	p. Leu365Arg	德国	11 岁	散发患者, de novo 突变	Hofrichter ^[7]
	c. 662-1G>C		伊朗	10~13 岁	迟发性进行性听力下降的常染色体隐性遗传性耳聋家系	Booth ^[8]

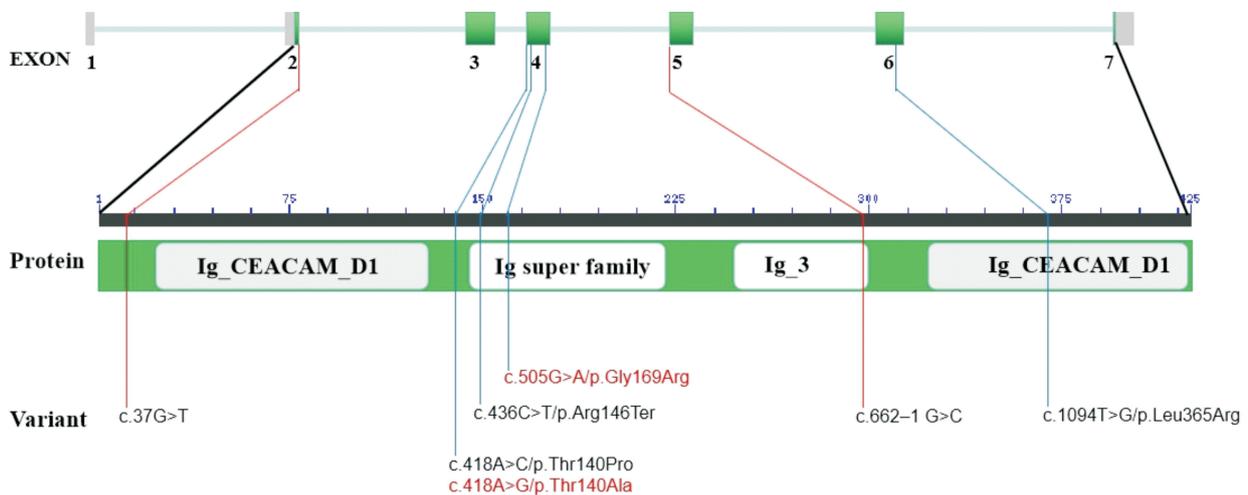


图 2 CEACAM16 基因蛋白结构及突变位点示意图

CEACAM16 基因是一个新近发现的耳聋基因,其临床表型复杂,即可导致常染色体显性遗传性耳聋,也可导致常染色体隐性遗传性耳聋,目前其具体致聋机制,特别是不同突变导致不同遗传方式的耳聋机制,尚有待进一步研究明确。本研究发现的突变,为我国耳聋人群中发现的第 2 个突变,不仅丰富了我国人群该基因的突变图谱,也丰富了该基因突变患者的临床表型,为以后进一步开展该基因的功能研究以及基因型与临床表型的相关性研究奠定了基础。

参考文献

[1] 王秋菊,刘穹. 常染色体显性遗传性耳聋倡(1)[J]. 听力学及言语疾病杂志,2016,24(2):213-216.
 [2] Zheng J, Miller KK, Yang T, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss(DFNA4)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(10):4218-4223.

[3] Wang H, Wang X, He C, et al. Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family[J]. J Hum Genet, 2015, 60(3):119-126.
 [4] 王欣炜. CEACAM16 基因新突变导致遗传性耳聋的分子机制研究[C]. 湖南:中南大学,2014.
 [5] Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberger R, et al. Loss of mammal-specific tectorial membrane component carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies[J]. J Biol Chem, 2012, 287(26):21584-21598.
 [6] Chen AH, Ni L, Fukushima K, et al. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19[J]. Hum Mol Genet, 1995, 4(6):1073-1076.
 [7] Hofrichter MA, Nanda I, Gräf J, et al. A Novel de novo Mutation in CEACAM16 Associated with Postlingual Hearing Impairment[J]. Mol Syndromol, 2015, 6(4):156-163.

不同程度情感障碍的耳鸣患者静息态功能磁共振成像特点的研究

王立志¹ 韩丽燕² 卫来¹ 王志强¹

[摘要] 目的:观察不同程度情感障碍的耳鸣患者与无耳鸣健康志愿者的静息态功能磁共振成像(rs-fMRI)的差异,分析因耳鸣导致的不同程度情感障碍与脑功能变化的相关性。方法:选取曾参与前期研究的耳鸣患者19例,同时选取同期无耳鸣的健康志愿者15例作为对照。根据耳鸣致残量表得分将患者分为轻度组和重度组。耳鸣患者与健康志愿者均采集rs-fMRI,利用DPABI软件对结果分别进行局部一致性(ReHo)分析、低频波动振幅(ALFF)分析和低频波动分数振幅(fALFF)分析获得ReHo值、ALFF值和fALFF值。将轻度组与对照组、重度组与对照组的ReHo值、ALFF值和fALFF值分别行双样本 t 检验。结果:与对照组比较,轻度组左枕中回的fALFF值高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但ALFF值和ReHo值的差异无统计学意义;重度组右额上回、左颞中回、左额下回三角部和左尾状核的ALFF值明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但2组fALFF值和ReHo值差异无统计学意义。结论:耳鸣导致的情感障碍程度不同时,脑功能异常区域不同。轻度情感障碍时可通过fALFF分析检出神经活动增高的脑区为左枕中回。重度情感障碍可通过ALFF分析检出神经活动增高的脑区为左颞中回、右额上回、左额下回三角部、左尾状核。

[关键词] 耳鸣;情感障碍;静息态功能磁共振成像

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.09.004

[中图分类号] R764.45 **[文献标志码]** A

Characteristics of resting state functional magnetic resonance imaging in tinnitus patients with different degrees of affective disorder

WANG Lizhi¹ HAN Liyan² WEI Lai¹ WANG Zhiqiang¹

(¹Department of Otolaryngology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian, 116001, China; ²Department of Otolaryngology, the People's Hospital of Xinzhou)

Corresponding author: WANG Zhiqiang, E-mail: wzqwlzwl@sohu.com

Abstract Objective: To analyze the correlation of the degree of affective disorder and brain function changes by comparing the differences of resting-state functional Magnetic Resonance Imaging (rs-fMRI) between healthy volunteers without tinnitus and patients with tinnitus. **Method:** A analysis of 19 patients with tinnitus and 15 healthy volunteers without tinnitus. The patients were divided into mild group and severe group according to tinnitus handicap inventory (THI). Rs-fMRI was collected and the regional homogeneity (ReHo) analysis, amplitude of low-frequency fluctuation (ALFF) analysis, and fractional amplitude of low frequency fluctuation (fALFF) analysis of rs-fMRI were performed by DPABI software. Two-sample t -test of the ReHo value, ALFF value and fALFF value between the mild group and the control group, the severe group and the control group, were performed respectively. **Result:** The fALFF value of the left occipital gyrus in the mild group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), but there is no statistically significant difference of ALFF value and ReHo value between two groups. The ALFF value of the middle temporal gyrus (left), superior frontal gyrus (right), inferior frontal gyrus pars triangularis (left) and caudate nucleus (left) in the severe group were higher than those of the control group. But there was no significant difference in the fALFF value and the ReHo value. **Conclusion:** Different severity of affective disorder in patients with tinnitus have different areas of brain function abnormalities. Mild group was detected by fALFF analysis and the active brain area was the left middle occipital region. Severe group was detected by ALFF analysis. The active brain regions were left middle

¹大连大学附属中山医院耳鼻喉科(辽宁大连,116001)

²忻州市人民医院耳鼻喉科

通信作者:王志强,E-mail:wzqwlzwl@sohu.com

[8] Booth KT, Kahrizi K, Najmabadi H, et al. Old gene, new phenotype: splice-altering variants in CEACAM16 cause recessive non-syndromic hearing impairment[J]. J Med Genet, 2018, 55(8): 555-560.

for loss-of-function mutations in the CEACAM16 gene causing nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in humans[J]. J Hum Genet, 2019, 64(3): 257-260.

[9] Dias A, Lezirovitz K, Nicastro FS, et al. Further evidence

(收稿日期:2020-03-12)