

EYA1 基因变异的综合征家系临床表型和基因分析

邵华¹ 李勇桦¹ 赵恒¹ 林垦¹ 高燕¹ 明澄¹ 马静^{1,2}

[摘要] **目的:** 研究一个鳃耳综合征(branchio-oto syndrome)家系临床表型,探寻该家系的遗传学病因。**方法:** 收集 1 例诊断为鳃耳综合征的患儿及家系成员的临床资料,提取先证者及其家系成员的外周血基因组 DNA,进行全外显子组测序,并对突变位点进行 Sanger 测序验证分析。**结果:** 该家系包括 2 代 4 人,其中 3 人有表型,2 人听力下降,并且有双侧耳前瘘管,双侧鳃裂瘘,1 人双侧耳前瘘,双侧鳃裂瘘,均符合鳃耳综合征的临床诊断,该家系遗传方式为常染色体显性遗传,基因检测显示该家系所有发病成员 EYA1 基因均有 c. 1744delC(p. L592Cfs * 47)变异,表型正常成员该位点为野生型,家系内符合基因型与表型共分离。该突变为移码突变,导致终止密码子提前出现,该突变目前尚未见报道。根据美国医学遗传学与基因组学学会指南,该变异初步判定为疑似致病性变异。**结论:** 该家系新发现的 EYA1c. 1744delC(p. L592Cfs * 47)突变为该家系患者的致病突变基因,进一步拓展了 EYA1 基因的突变谱,使我们对于该病有了更新的认识,为临床诊断和遗传咨询提供了重要参考。

[关键词] 鳃耳综合征; EYA1 基因; 耳聋; DNA 突变分析

DOI: 10. 13201/j. issn. 2096-7993. 2024. 07. 015

[中图分类号] R764. 43 **[文献标志码]** A

Clinical phenotypic and genetic analysis of syndrome families with EYA1 gene variants

SHAO Hua¹ LI Yonghua¹ ZHAO Heng¹ LIN Ken¹ GAO Yan¹
MING Cheng¹ MA Jing^{1, 2}

¹Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Kunming Children's Hospital [Children's Hospital Affiliated to Kunming Medical University], Kunming, 650228, China;

²Kunming Key Laboratory for Prevention and Control of Congenital Birth Defects of Children)

Corresponding author: MA Jing, E-mail: 1186617452@qq.com

Abstract Objective: To investigate the clinical phenotype of a family with branchio-oto syndrome (BOS) and to explore the genetic etiology of the syndrome in this family. **Methods:** Clinical data were collected from a child diagnosed with BOS and his family members. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of the proband and his family members. Whole-exome sequencing was performed, and the mutation sites were verified and analyzed by Sanger sequencing. **Results:** The family consists of two generations with four members, three of whom exhibit the phenotype. Two members have hearing loss and bilateral preauricular fistulas and bilateral branchial cleft fistulas. One member has bilateral preauricular fistulas and bilateral branchial cleft fistulas. All of which were in line with the clinical diagnosis of gill ear syndrome, the inheritance mode of the family was autosomal dominant inheritance, genetic testing showed that all members of the family had c. 1744delC(p. L592Cfs * 47) mutation in the EYA1 gene, while unaffected members have the wild-type allele at this locus. This mutation is a frameshift mutation, which results in the early appearance of the stop codon, and has not been reported so far. According to ACMG guidelines, the variant was preliminarily determined to be suspected pathogenic. **Conclusion:** The newly discovered EYA1c. 1744delC(p. L592Cfs * 47) mutation in this family is the pathogenic mutant gene of the patients in this family, which further expands the mutation spectrum of EYA1 gene, gives us a new understanding of the disease, and provides an important reference for clinical diagnosis and genetic counseling.

Key words branchio-oto syndrome; EYA1 gene; deafness; DNA mutation analysis

遗传性聋可根据是否存在其他系统的病变分为综合征性耳聋(30%)和非综合征性耳聋

(70%)^[1]。鳃耳综合征(branchio-oto syndrome, BOS)是一种罕见的常染色体显性遗传性疾病,临床特点是听力障碍、耳部畸形、鳃裂异常^[2]。鳃耳综合征是鳃耳肾综合征(branchio-oto-renal syndrome, BOR)的一种, BOS 比较 BOR 仅在肾脏方面缺乏表现,其余情况相同。BOR 最早于 1975 年

¹昆明市儿童医院(昆明医科大学附属儿童医院)耳鼻咽喉头颈外科(昆明,650228)

²昆明市儿童先天出生缺陷防控重点实验室
通信作者:马静, E-mail: 1186617452@qq.com

由 Melnick 等^[3]报道,该病发病率为 1/40 000,在重度及以上新生儿中的发病率为 2%^[4]。目前研究表明 BOR 综合征相关致病基因为 *EYA1* (8q13.3)、*SIX1* (14q23.1) 和 *SIX5* (19q13.2),其中约 40% 的 BORS 综合征患者可以检测到 *EYA1* 基因突变,因此, *EYA1* 被认为是最常见的致病基因^[5-7]。

本研究通过对一个 BOS 家系进行高通量测序和 Sanger 测序,首次检测出中国人群中 *EYA1* 基因 c.1744delC(p. L592Cfs * 47) 位点的致病性突变,并对分子病因及遗传学进行了分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究对象来自中国云南,先证者男,2岁6个月,因“重度听力损失”就诊于我院。采集患儿和家系成员的临床资料,包括家族史、应用氨基糖苷类药物及噪音暴露史、耳鼻喉科体格检查、声导抗、听性脑干反应(ABR)、颞骨 CT 及头颅 MRI、肾脏超声及肾功能结果。该研究符合《赫尔辛基宣言》的伦理原则,经昆明市儿童医院医学伦理委员会批准(No:2020-01-009-H01),并征得患者及其家属的同意。签署了《基因诊断知情同意书》(患儿由监护人代签)。

1.2 方法

1.2.1 基因检测方法 抽取 2 例患者及家系成员静脉血 3~5 mL,使用 Qiagen DNA Mini Kit 试剂盒提取基因组 DNA,经 S220 Focused-ultrasonicator 仪器检验合格。检验过程:将 1~3 μg 的基因组 DNA 片段化至 150 bp 平均大小制备样本 DNA 文库,在目标区域捕获测序和生物信息分析后得到候选变异位点,从而得到所有可用家族成员的基因组 DNA。利用 PCR 扩增和 Sanger 测序,将所有经 DNBSEQ-T7 测序鉴定的突变进行确认。根据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)指南对变异的基因进行致病性分析进行解读,通过千人基因组、ESP6500、dbSNP、EXAC、内部数据库(Mygenetics)、HGMD,并用 REVEL、SIFT、PolyPhen-2、MutationTaster、GERP++ 进行变异有害性预测。

1.2.2 听力检查方法 所有检查均在本院听力中心标准隔声室完成,本底噪声不大于 30 dB(A),符合国家及行业标准。ABR 测试刺激声为 click(短声),给声刺激重复率为 21.1 次/s,扫描时间 20 ms,滤波 100~1 500 Hz,平均叠加 1 100 次,记录电极放置于前额,接地电极放置于鼻根处,双侧乳突分别为参考电极,每一刺激强度根据需要重复测试,特别是在接近反应阈值处,应重复 2 次以上进行比较,取刚能分辨出 ABR 的 V 波最低刺激声

强度作为 ABR 阈值,单位为 dB nHL^[8]。

1.2.3 影像检查方法 颞骨高分辨率 CT(High Resolution Computed Tomograph, HRCT),采取薄层扫描及高分辨率骨算法重建图像的影像学检查技术,了解患儿外、中、内耳的解剖情况。阅片内容主要包括:①内耳:解剖结构是否完整;②耳蜗:大小、圈数、分隔是否正常;③内听道:是否存在扩大或者狭窄的情况;④前庭导水管:是否有扩大;⑤前庭和耳蜗:形态是否正常;⑥半规管和蜗管:是否存在毛玻璃样改变;⑦面神经:位置和形态是否正常。

2 结果

2.1 患儿及家系成员的临床表现及特征

本家系共计 3 代,9 人,家系图谱见图 1。先证者(II-1)自幼年起双耳全聋,言语障碍。体检:双侧耳前瘘管合并双侧鳃裂瘘管,双耳轻度招风耳畸形(图 2)。ABR 检测:ABR 检查(图 3)显示 95 dB nHL 刺激强度下,双耳 click-ABR 均未诱发出 V 波。颞骨 CT 示(图 4):双耳耳廓轻度招风耳畸形,右侧乳突小房、乳突窦、鼓室、鼓室窦气化不佳,两侧听骨链形态较大,右侧听骨链位置异常、右侧镫骨缺如可能、右侧前庭窗骨化可能,两侧耳蜗顶转、中转融合成囊腔,两侧水平半规管、前半规管缺如,两侧前庭导水管增宽,左右宽分别约 2.6 mm, 3.2 mm,两侧内听道狭窄可能,考虑 mondini 畸形。

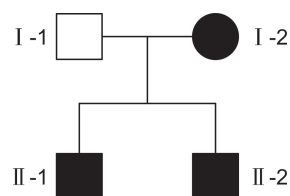


图 1 BOS 家系图谱



上方箭头所示为耳前瘘管,下方箭头所示为鳃裂瘘;双侧轻度招风耳畸形。

图 2 先证者(II-1)临床表型特征

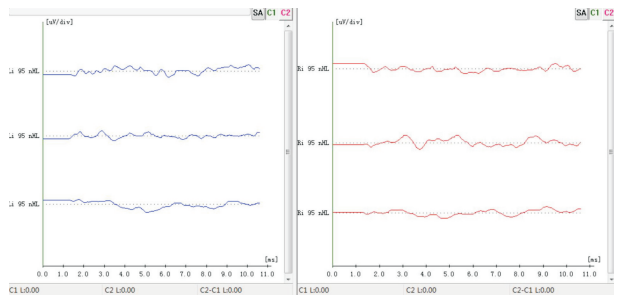
先证者母亲(I-2)自幼听力稍差,随年龄增长听力障碍的情况没有明显改变;体检:双侧耳前瘘管合并双侧鳃裂瘘管;纯音测听检查(图 5):右耳气导平均听阈 35 dB HL;左耳气导平均听阈 38 dB

HL;颞骨 CT 未见明显异常。先证者弟弟(Ⅱ-2) 双侧耳前瘘管合并双侧鳃裂瘘管;无听力下降;考虑年龄原因未行颞骨 CT 检查。该家系中 3 人出现 BOS 临床表征,分别是先证者(Ⅱ-1)、母亲(Ⅰ-2)、弟弟(Ⅱ-2)。先证者父亲、外公外婆以及舅舅均听力正常,无耳前瘘与鳃裂瘘管。所有家系成员肾脏超声及血生化检查均未见明显异常。家系成员均无耳毒性药物史及噪声接触史。

2.2 高通量测序及 Sanger 测序校验结果

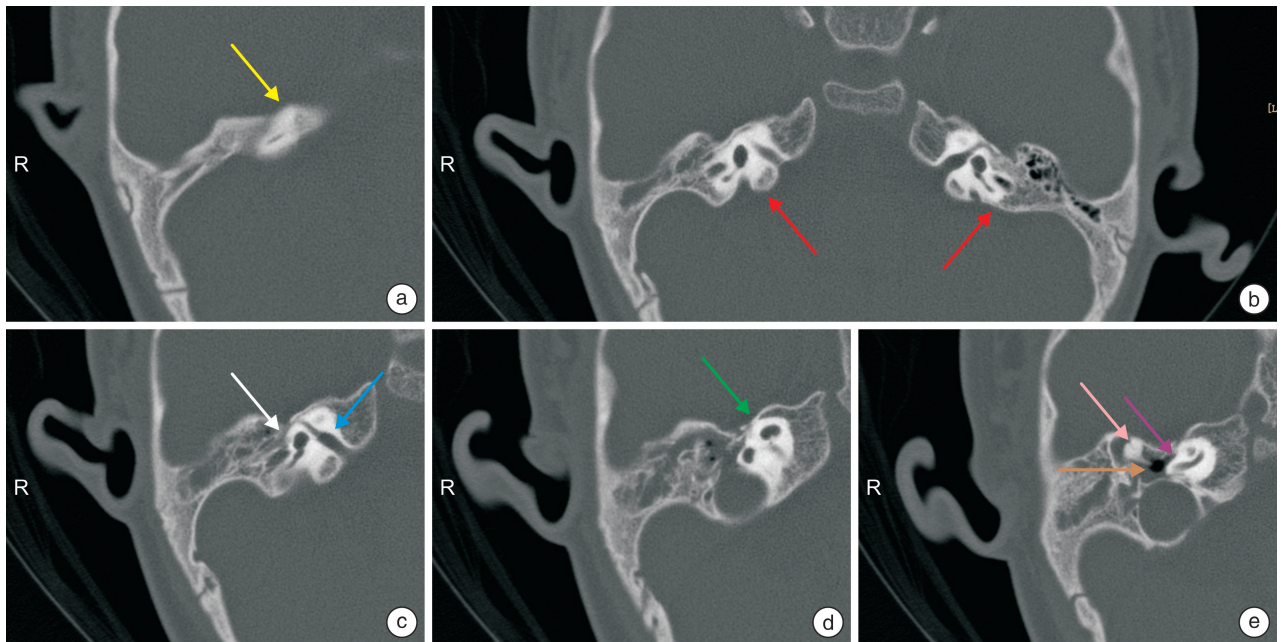
二代测序检出先证者 *EYAI* 基因 c. 1744delC (p. L592Cfs * 47) 发生杂合突变, Sanger 测序检出先证者的母亲(Ⅰ-2)和弟弟(Ⅱ-2)基因突变位点相同(图 6),先证者父亲(Ⅰ-1)在该位点为野生型。

家系内符合基因型与表型共分离。



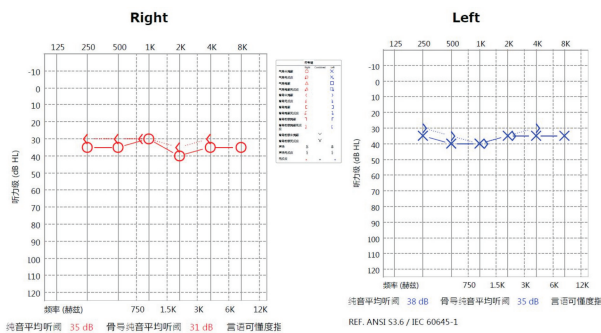
95 dB nHL 刺激强度下,双耳 click-ABR 均未诱发出 V 波。

图 3 先证者(Ⅱ-1) ABR 检查



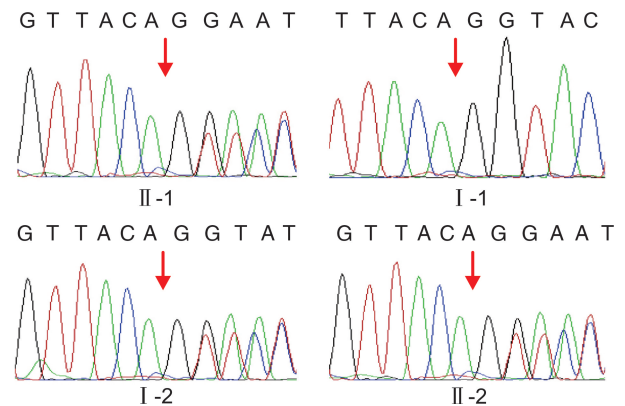
a:前半规管缺如(黄色箭头);b:双侧前庭导水管扩大(红色箭头);c:水平半规管缺如(白色箭头)、内听道狭窄(蓝色箭头);d:耳蜗顶转、中转融合成囊腔(绿色箭头);e:前庭窗骨化可能(紫色箭头)、镫骨缺如可能(棕色箭头)、听骨链位置及形态异常(粉色箭头)。

图 4 先证者(Ⅱ-1)颞骨 CT



右耳气导平均听阈 35 dB HL;左耳气导平均听阈 38 dB HL。

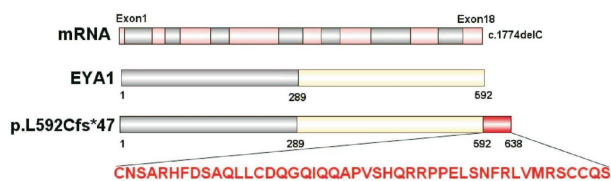
图 5 先证者母亲(Ⅰ-2)纯音测听检查



Ⅰ-2、Ⅱ-1、Ⅱ-2 检出 *EYAI* 基因 c. 1744delC 杂合突变。

图 6 BOS 患者家系基因测序结果

为初步探讨本家系致病的分子病因我们对先证者进行了基因全外显子及剪切位点的测序,并对可疑位点进行 Sanger 验证,最终发现家系所有患者的 *EYA1* 基因第 18 号外显子 *EYA1c. 1744delC* (p. L592Cfs * 47) 杂合突变,导致第 592 号氨基酸由亮氨酸变异为半胱氨酸,提前出现了终止密码子。致眼缺失同源物 1 (Eyes absent homolog 1, *EYA1*) 蛋白 592 位以后的氨基酸序列从 L 改变 CNSARHFDSAQLLCDQGQIQQAPVSHQRRPPELSNFRLVMRSCQS* (* 表示终止密码子),导致 592~638 位的氨基酸序列发生改变,终止密码子提前出现,造成 *EYA1* 蛋白包括 *EYA* 结构域 (图 7) 在内的大段截断。根据 ACMG 指南,该突变被判定为极疑似致病性变异 (PVS1+PM2)。在 ExAC、ExAC 东亚、千人基因组等数据库正常人群中均未检测到该突变,且变异频率为低频变异,符合 PVS 和 PS 证据链,因此可初步判断该基因在本家族中的变异为致病性变异。



该位点位于 *EYA* 结构域,导致产生截断蛋白。

图 7 家系中 3 例患者均发生 *c. 1744delC* 杂合突变

3 讨论

BOS 诊断需要临床诊断和分子诊断相结合。Chang 等^[9] 2004 年提出诊断标准,临床表现为鳃裂瘻管或囊肿、听力障碍、耳前瘻管、肾脏畸形;次要临床表现为:外耳畸形、中耳畸形、内耳畸形;其他:不对称面部或味觉异常等。患者必须满足以下 3 个条件之一的临床表现方可诊断为 BOR:主要表现至少 3 个;具有主要表现 2 项,并同时有次要表现至少 2 项;具有主要表现 1 项,且有至少 1 个一级亲属中有 BOR 谱系患者。对于这 2 种疾病的鉴别,肾脏异常是唯一有帮助的临床特点。如无肾脏结构及功能异常,则可诊断为 BOS。听力障碍是一种近乎恒定的临床特征 (98.5%)^[10],可表现为传导性、感音神经性或混合性,或多或少可能是渐进性的^[11],最常见的是混合性听力损失^[9],先证者及母亲均有不同程度的听力损失。既往报道中,耳聋、耳前瘻管、鳃裂发育异常成为最常见的 3 种临床表现,本家系与报道相似^[12]。根据上述标准,本家系有 3 人可临床诊断为 BOS。其中先证者及母亲有听力减退、双侧耳前瘻,双侧鳃裂瘻等 3 项主要表现,先证者还存在外耳、中耳、内耳不同程度畸形,而先证者弟弟无听力减退,临床检查仅见双侧

耳前瘻、双侧鳃裂瘻,根据其结合家族史也可诊断为 BOS。本家系中所有患者个体肾功能及肾脏 B 超检测都没有发现异常,所以本家系是典型的 BOS 家系。

遗传疾病的复杂性致使临床医生需要基因检测来确认临床诊断^[13]。在 BOS 中,诊断性检查通常从直接测序 *EYA1*、*SIX1* 和 *SIX5* 基因或包含这些相同基因的多基因 panel 开始。这种方法可以对近一半的病例进行遗传确认,并降低检测到意义不确定变异的可能性。在本病例中除对数据库进行比较外,通过对致病基因检测,家系中的患者并未发现其他致聋基因变异,故 *EYA1 c. 1744delC* (p. L592Cfs * 47) 突变与患者表型共分离,可确定本突变为本家系表型相关的主要分子基础。

即使在同一家系中,BOS 表型异质性较大,如本项研究中患病个体间临床表型各不相同,亦使诊断变得困难。本研究患者携带相同的遗传改变,并证实了相关表型的可变表达性。但是到目前为止,BOR 的基因型-表型相关性还未非常明确^[14-15]。

EYA1 与其他 *EYA* 家族成员相似,具有高度保守的 C 端结构域和蛋白相互作用发散的 N-末端反激活结构域,编码 271 个氨基酸。众所周知,*EYA1* 蛋白不仅作为蛋白磷酸酶发挥作用,而且作为转录共激活因子在胚胎发生中发挥重要作用。*EYA1* 在发育过程中至关重要,是哺乳动物发生变异导致多器官畸形的关键基因^[12]。自 1997 年 Abdelha 等^[16] 发现 *EYA1* 基因突变是 BOR 的致病基因之一以来,全球已经发现 280 多种不同的 *EYA1* 基因突变可导致 BOS (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>,截至 2023 年 10 月),而在我国人群中发现 30 多种不同变异。本研究在中国 BOS 家系中发现 *EYA1 c. 1744delC* (p. L592Cfs * 47) 新变异,扩展了中国 BOS 基因谱,可作为 *EYA1* 基因在中国人群 BOS 中新的相关突变。在本病的临床表现中,婴幼儿时期可发现听力下降、耳前瘻、鳃裂瘻等,多数病例中成年后才会发现肾脏病变,若延误诊断或漏诊会导致严重后果^[17]。这提示在临床工作中尽早对 BOR 进行诊断的重要性。

随着分子生物学技术的不断进步,耳聋的基因检测成为疾病诊断的重要手段,但并非所有 BOS 患者都能检测到基因突变^[18]。据报道,BOR 或 BOS 患者携带 *EYA1* 基因致病突变为 40%,已是最常见突变基因^[19]。目前近一半的受影响者未发现致病性变异^[20],可能还存在诸多新基因的变异或者目前已发现基因的未知区域,也可能是由于缺乏家族史,而不能被检测出。鉴于本病临床表型变异较大,故在诊断此病时应将临床表现与基因诊断结果相互印证以降低本病漏诊率。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘梦婷, 张天虹. 综合征性耳聋的诊断与治疗策略[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 35(3): 285-288.
- [2] Chen AH, Ling J, Peng X, et al. A novel EYA1 mutation causing alternative RNA splicing in a Chinese family with branchio-oto syndrome: implications for molecular diagnosis and clinical application[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2023, 16(4): 342-358.
- [3] Melnick M, Bixler D, Nance WE, et al. Familial branchio-oto-renal dysplasia: a new addition to the branchial arch syndromes [J]. Clin Genet, 1976, 9(1): 25-34.
- [4] Fraser FC, Sproule JR, Halal F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss[J]. Am J Med Genet, 1980, 7(3): 341-349.
- [5] 温莹莹, 孙宇, 孔维佳. 重视基因诊断在鳃耳肾综合征中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 32(16): 1226-1231.
- [6] Zheng H, Xu J, Wang Y, et al. Identification and characterization of a cryptic genomic deletion-insertion in EYA1 associated with branchio-otic syndrome [J]. Neural Plast, 2021, 2021: 5524381.
- [7] 刘梦婷, 孟琦, 叶祎菁, 等. 鳃耳综合征家系 EYA1 基因一个新的无义突变[J]. 中华耳科学杂志, 2020, 18(5): 922-926.
- [8] 李果, 林晔, 王翔, 等. 婴幼儿听性脑干反应、听性稳态反应、行为测听的相关性分析[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2020, 18(4): 295-298.
- [9] Chang EH, Menezes M, Meyer NC, et al. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences [J]. Hum Mutat, 2004, 23(6): 582-589.
- [10] Feng HF, Xu HE, Chen B, et al. Genetic and phenotypic variability in Chinese patients with branchio-oto-renal or branchio-oto syndrome [J]. Front Genet, 2021, 12: 765433.
- [11] Kemperman MH, Koch SM, Kumar S, et al. Evidence of progression and fluctuation of hearing impairment in branchio-oto-renal syndrome [J]. Int J Audiol, 2004, 43(9): 523-532.
- [12] Buller C, Xu X, Marquis V, et al. Molecular effects of Eya1 domain mutations causing organ defects in BOR syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(24): 2775-2781.
- [13] Han R, Xia Y, Liu ZJ, et al. A mutation of EYA1 gene in a Chinese Han family with Branchio-Oto syndrome [J]. Medicine, 2021, 100(25): e24691.
- [14] Masuda M, Kanno A, Nara K, et al. Phenotype-genotype correlation in patients with typical and atypical branchio-oto-renal syndrome [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 969.
- [15] Li J, Zhao P, Xia Z, et al. Novel duplication mutation of EYA1 causes branchio-oto-renal syndrome in a Chinese family[J]. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2021, 35(7): 607-612.
- [16] Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, et al. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family[J]. Nat Genet, 1997, 15(2): 157-164.
- [17] Lin ZL, Li J, Pei YX, et al. Misdiagnosed Branchio-Oto-Renal syndrome presenting as proteinuria and renal insufficiency with insidious signs since early childhood: a report of three cases[J]. BMC Nephrol, 2023, 24(1): 248.
- [18] 张致恺, 张燕梅, 宗亚静, 等. 耳聋相关基因诊断与遗传咨询的临床实践[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 33(1): 58-62, 66.
- [19] Masuda M, Kanno A, Nara K, et al. Phenotype-genotype correlation in patients with typical and atypical branchio-oto-renal syndrome [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 969.
- [20] Klingbeil KD, Greenland CM, Arslan S, et al. Novel EYA1 variants causing Branchio-oto-renal syndrome [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2017, 98: 59-63.

(收稿日期: 2024-01-11)

(上接第 635 页)

- [12] 方勤, 周文雯, 刘艳玲, 等. 锥形束 CT 观察中内耳细微结构的应用价值[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 7(9): 788-795.
- [13] 宋跃帅, 龚树生. 应用锥形束 CT 评估人工耳蜗植入后电极形态的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 32(18): 1371-1373.
- [14] Ahmad AG, Awadalkreem F, Osman M, et al. Does the protrusion of corticobasal implants in the maxillary sinuses affect sinus health? A retrospective study [J]. J Contemp Dent Pract, 2023, 24(6): 357-363.
- [15] Veldhoen S, Schöllchen M, Hanken H, et al. Performance of cone-beam computed tomography and multidetector computed tomography in diagnostic imaging of the midface: a comparative study on Phantom and cadaver head scans[J]. Eur Radiol, 2017, 27(2): 790-800.

(收稿日期: 2023-11-11 修回日期: 2024-01-07)