

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00705

非综合征性耳聋(NSHL)患者 Cx26 基因突变分析及两种突变体的亚细胞定位

李景之¹, 胡艺俏¹, 王树辉², 陈红胜², 潘乾¹, 夏昆¹, 胡正茂¹, 冯永²

1. 中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078;

2. 中南大学湘雅医院耳鼻喉科, 长沙 410008

摘要: 为分析中国人非综合征性耳聋(Nonsyndromic hearing loss, NSHL)患者 Cx26 基因的突变情况和特性, 研究其中两种突变的亚细胞定位情况, 文章运用 PCR 直接测序的方法对 139 例无亲缘关系的 NSHL 患者进行突变筛查, 将两种突变 p.F115C 和 p.V37I 构建到 pEGFP 表达载体, 并转染 HeLa 细胞, 研究其细胞表达和定位情况。在 139 例无亲缘关系的 NSHL 患者中, 31 例患者检测到 Cx26 基因突变, 检出率为 22.3%。一共检测到 10 种不同类型的碱基变异, 包括 6 种突变和 4 种多态, 其中包括 1 种未见报道的新变异 p.F115C。p.F115C 和 p.V37I 两种突变体转染 HeLa 细胞后, 亚细胞定位情况与野生型无差异, 初步研究表明这两种突变不影响该蛋白形成细胞间隙连接通道。

关键词: Cx26 基因; 听力损伤; 间隙连接

Mutations of Cx26 gene in patients with NSHL and intracellular distribution of two mutants

LI Jing-Zhi¹, HU Yi-Qiao¹, WANG Shu-Hui², CHENG Hong-Sheng², PAN Qian¹,
XIA Kun¹, HU Zheng-Mao¹, FENG Yong²

1. State Key Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078, China;

2. Department of Otorhinolaryngology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: To analyze the frequencies and characteristics of Cx26 gene mutations in Chinese patients with nonsyndromic hearing loss (NSHL) and investigate the intracellular localization of two mutants, 139 unrelated familial cases with non-syndromic hearing loss were screened for mutation in Cx26 gene by direct sequencing. Two mutants, p.F115C and p.V37I, were structured into pEGFP vectors and transfected into HeLa cells to detect their expression and fluorescent localization in cells. Cx26 variations were detected in 31 patients, with a detection rate of 22.3%. The 10 variations included 6 types of mutations and 4 types of polymorphisms. A novel variation p.F115C was found. The fluorescent localization assay of the two mutants p.F115C and p.V37I showed no difference from the wild-type, indicating that both mutants did not im-

收稿日期: 2008-11-20; 修回日期: 2009-01-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2004CB518601), 国家自然科学基金项目(编号: 0630062, 30600247)资助

作者简介: 李景之(1984-), 女, 在读硕士生, 研究方向: 疾病基因定位与克隆。Tel: 13517475935; E-mail: lijingzhi@sklmg.edu.cn

胡艺俏(1980-), 女, 在读硕士生, 研究方向: 疾病基因定位与克隆。Tel: 13787214589; E-mail: huyiqiao@sklmg.edu.cn

李景之、胡艺俏为并列第一作者。

通讯作者: 胡正茂(1972-), 男, 博士, 研究方向: 疾病基因定位与克隆。Tel: 13687399460; Email: huzhengmao@sklmg.edu.cn

冯永(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 耳鼻喉。Tel: 13574803857; Email: fyong@xysm.net

pair the formation of the gap junctions.

Keywords: Cx26 gene; hearing impairment; gap junction

耳聋是一种最常见的人类感觉系统缺陷。在世界范围内,新生儿中听力丧失发生率约为 1/1 000^[1],其中一半以上系遗传因素所致。遗传性听力丧失根据是否伴有耳外组织的异常或病变可将其分为综合征性听力丧失(Syndromic hearing loss, SHL)和非综合征性听力丧失(Nonsyndromic hearing loss, NSHL),NSHL占遗传性耳聋的 70%^[2]。常见的遗传性耳聋的遗传形式有常染色体隐性(DFNB)、常染色体显性(DFNA)、X连锁遗传、线粒体遗传^[1,3]。NSHL具有高度的遗传异质性,目前已定位了 122 个NSHL相关位点,克隆了 52 个致病基因(<http://webh01.ua.ac.be/hhh/>)。GJB2 即间隙连接蛋白Connexin 26(Cx26)基因定位于 13q11-q12 上,DNA全长 4 804 bp,含两个外显子,其中编码区位于第二外显子,长 678 bp,编码 226 个氨基酸。该基因是第一个被克隆和鉴定的遗传性耳聋致病基因,也是导致NSHL最常见的基因,可为常染色体隐性和常染色体显性遗传。在散发性耳聋患者中突变频率在 1%~37%之间^[4]。目前为止,该基因共发现 186 种突变(<http://webh01.ua.ac.be/hhh/>),且不同人种中Cx26 基因突变类型及发生频率不同。Cx26 是跨膜蛋白家族的成员之一,介导细胞间通讯^[5,6]。Cx26 在内耳组织中呈高水平表达,正常人耳蜗内的Cx26 蛋白在声音接受和传导过程中允许钾离子从毛细胞到支持细胞、纤维细胞的循环,再回到内淋巴液中^[7],靶脱落实验证明Cx26 在耳蜗功能和细胞存活中起着重要作用^[8]。为了分析NSHL患者的Cx26 基因的突变频率和特性,本研究对 139 例无亲缘关系的NSHL患者的Cx26 基因进行了突变筛查,并观察了其中两种突变体的细胞表达和定位情况。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本室于 2007 年共收集长沙和益阳两所耳聋学校样本共 139 人。患者来自全国各省,均在中南大

学湘雅医院耳鼻喉科进行了专科检查、纯音测听或听性脑干诱发电位检查,并结合病史排除感染、耳毒性药物、肿瘤、外伤所导致的听力损害和综合征性耳聋后被诊断为 NSHL。104 例正常对照样本来自本室样本库。

1.2 突变检测

患者或其家属签署知情同意后,抽取外周血 10 mL,常规酚-氯仿法抽提 gDNA。

根据 UCSC 数据库 Cx26 基因序列(NM_004004)设计 Cx26A 和 Cx26B 两对引物,对患者的 Cx26 基因进行扩增,扩增目的片段包括编码区及其上游的 105 bp 和下游的 83 bp,引物序列见表 1。所有引物由上海博亚生物工程公司合成。

表 1 Cx26 基因扩增引物

扩增子	引物序列(5' 3')	片段大小 (bp)
Cx26A	TGCTTGCTTACCCAGACTCAG	476
	TGGGTTTGTATCTCCTCGATG	
Cx26B	GCCTACCGGAGACATGAGAAG	479
	GCGACTGAGCCTTGACAGCT	

PCR反应体系为 10 μ L,含基因组DNA 30 ng,dNTP 200 μ mol/L,10 \times PCR Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂),Q Buffer,HotStar Taq (Qiagen)酶 0.05 U。PCR反应在 2720 型基因扩增仪(ABI公司)上进行,采用Touchdown PCR: 95 $^{\circ}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}$ 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ 复性 30 s,每循环降 0.5 $^{\circ}$, 72 $^{\circ}$ 延伸 40 s, 12 个循环; 95 $^{\circ}$ 变性 30 s, 56.5 $^{\circ}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ 延伸 40 s, 22 个循环; 72 $^{\circ}$ 充分延伸 10 min, 10 $^{\circ}$ 保存。PCR产物经 6%PAGE胶检测具有较高的产量及特异性以后,用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理,处理完后的产物用ABI3100 自动测序仪进行测序。测序结果用DNASTAR软件中的EditSeq、SeqMan程序分析,以NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中Cx26 基因标准序列为参照,进行序列比对,以检测基因的变异情况。

1.3 表达载体的构建

根据真核表达载体 pEGFP-N1 上的多克隆位点, 选定 *EcoR* 和 *BamH* 两个酶切位点。设计扩增 *Cx26* 全长基因的引物, 在其起始密码子前加入 Kozak 序列和酶切位点, 通过 PCR 直接从 gDNA 扩增获得野生型(WT-*Cx26*)和突变型(F115C, V37I)的 *Cx26* 基因全长片段, 将扩增的全长基因通过两个酶切位点重组至真核表达载体 pEGFP-N1 中。*Cx26* 的真核细胞表达载体构建完成。*Cx26* 引物序列设计如下: F: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGGATTGGGGCACGCTG-3', R: 5'-CGCGGATCCCGAACTGGCTTTTGTACTTCCCA-3'。经酶切及 DNA 测序分析鉴定突变。

1.4 细胞转染

用含 100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 10% PBS/DMEM 培养 HeLa 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。转染前一天, 将 HeLa 细胞用胰酶消化后接种在加有洁净灭菌圆形盖玻片的 12 孔板中(约 1×10^5 cells/孔), 用不含抗生素的 DMEM 培养细胞。脂质体法转染细胞, 参考脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Carlsbad, USA) 说明书进行, 质粒与 lipofectamine 2000 的转染比例为 1 μg : 2 μL , 转染 24 h 后, 收获细胞。用甲醇固定, DAPI 染核。封片后即可在荧光显微镜上观察 *Cx26* 的表达情况, 激光共聚焦显微镜扫描和照相。在荧光显微镜下观察 250 对以上同时表达 WT-*Cx26* 或 *Cx26* 突变体的相邻细胞, 计数它们中间形成间隙连接通道的细胞数目, 分别进行 3 次独立实验, 结果用 InStat 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 突变筛查

我们对 139 例 NSHL 患者进行了 *Cx26* 基因突变检测。共在 31 例患者中检测到了 *Cx26* 基因突变, 检出率为 22.3%, 其中 22 例携带 *Cx26* 的两个等位基因突变, 另外 9 例只携带一个等位基因突变。一共发现了 10 种不同类型的碱基变异, 包括 5 种已报道的致病突变, 1 种未见报道的变异, 以及 4 种多态, 各类变异在患者的检测情况见表 2。5 种致病突变包括: 2 种移码突变 c. 235delC、c. 176_191del16, 2 种错义突变 c. 550C>T、c. 571T>C 以及 1 种无义突变

c. 139G>T。c. 235delC 是最常见的突变类型, 其中 20 例患者为纯合缺失(14.4%), 7 例患者为杂合缺失(5.0%)。分别在 1 例患者中检测到复合突变 c. 139G>T/c. 235delC 和 c. 550C>T/c. 235delC。移码突变 c. 176_191del16 和杂合突变 c. 571T>C 各检测到 1 例。c. 344T>G 是一种未见报道的错义突变, 同时在两例患者中检测到(图 1), 且均为杂合子。本研究中 c. 79G>A 和 c. 341A>G 是两种最常见的多态。

表 2 *Cx26* 基因在 139 例患者中的突变情况

碱基改变	突变类型	患者等位基因数 (共 278 个等位基因)
c.79G>A	多态	57
c.109G>A	多态	32
c.139G>T	无义突变	1
c.176_191del16	移码突变	1
c.235delC	移码突变	47
c.341A>G	多态	35
c.344T>G	错义突变	2
c.550C>T	错义突变	1
c.571T>C	错义突变	1
c.608T>C	多态	14

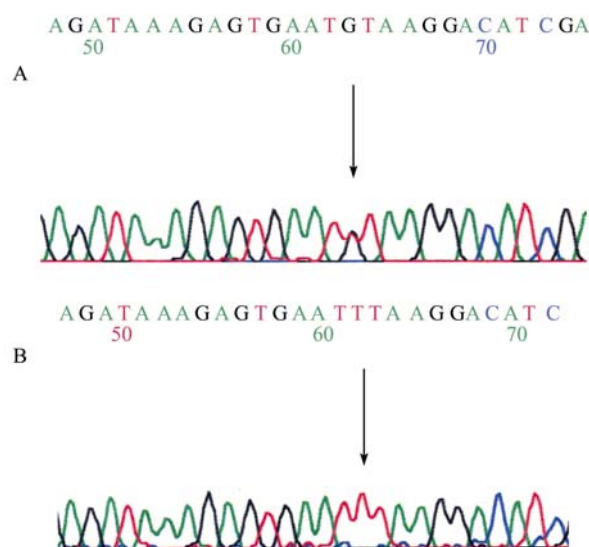


图 1 患者和正常人 *Cx26* 基因 c. 344T 位点测序结果分析 A: 示患者杂合突变 c. 344T>G; B: 示对照 c. 344T。箭头示突变位点(只显示包含突变位点的部分序列)。

为验证 c. 344T>G 是否为致病突变, 针对该位点设计了一对错配引物: F: 5'-GATCTTCGTGTCCACGCCAG-3', R: 5'-GGTTTTGATCTCCTCGATGTCTTT-3', 扩增产物长度为 126 bp。其中位于点突变附

近的F向引物中一个碱基由G→T(错配位点用下划线标记), 则在正常序列内引进了一个*Dra* I(TTT↓AAA)的酶切位点。由此, 正常人序列可被*Dra* I切开, PAGE胶检测可见一条 102 bp大小的条带。突变位点不能被切开, 可见一条 126 bp大小的条带。因c. 344T>G在患者中是杂合突变, 因此酶切后分别可见 102 bp和 126 bp两条带。一共进行了 104 例对照的酶切检测(图 2), 酶切检测没有发现与突变体相同的酶切结果。

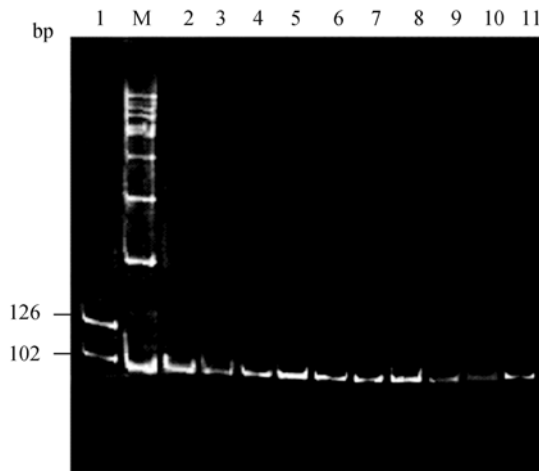


图 2 c.344T 位点的 *Dra* I 酶切检测图

1: 患者 c. 344T>G 位点的杂合突变, 酶切后分别可见 102 bp 和 126 bp 两条带; M: 示 100 bp ladder marker; 2~11: 104 人对照其中 10 位的酶切结果, 可见 102 bp 一条带。

2.2 构建表达载体

直接从正常人和患者的 gDNA 中扩增 *Cx26* 的编码区序列, 将 *Cx26* 全长基因克隆至 pEGFP-N1 载体的 *Eco*R 和 *Bam*H 两酶切位点间, 构建 *Cx26* 的真核细胞表达载体。经酶切及 DNA 序列分析鉴定排除含有其他突变的情况(图 3)。

2.3 *Cx26* 突变体的表达与检测

运用实验室已构建的 p.R32C 表达载体作为对照, 转染 Hela 细胞。图 4 是 WT-*Cx26* 和 3 种 *Cx26* 突变体 (p.R32C、p.V37I、p.F115C) 转染 24 h 后的亚细胞定位情况。WT-*Cx26* 在细胞膜上显示有斑块状染色和聚集现象即间隙连接斑, 特别是在细胞和细胞连接的区域(图 4A); 对照 p.R32C 是已被证实的会导致耳聋的突变^[9], 该突变可以形成六聚体, 但是不能运输至细胞质膜, 因而不能形成间隙连接, 其蛋白停留在细胞质内, 主要分布在内质网和高尔基体。p.R32C 转染的细胞在质膜上却未显示间隙连接斑(图 4B), 它们表达的 *Cx26* 蛋白分布在细胞质内, 主要在内质网和高尔基体上; 但对于 p.F115C 和 p.V37I 突变, 转染的细胞和 WT-*Cx26* 一样, 在质膜上有斑块状染色和聚集现象即可有效形成间隙连接斑(图 4C, D)。

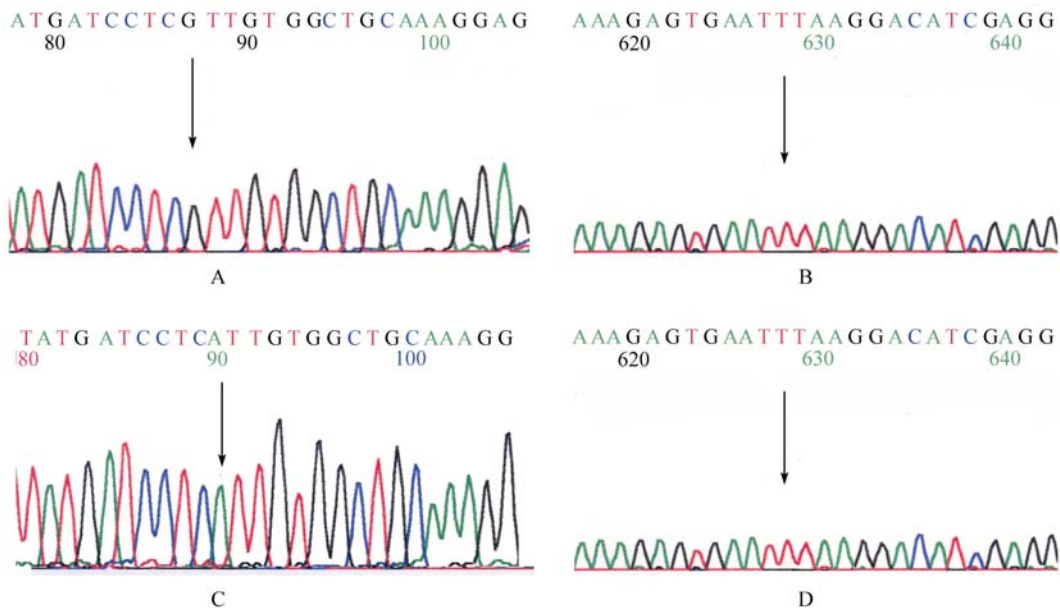


图 3 表达载体测序结果

A、B: WT-*Cx26* 测序图; C: p.V37I 突变体测序图; D: p.F115C 突变体测序图(只显示包含突变位点的部分序列)。

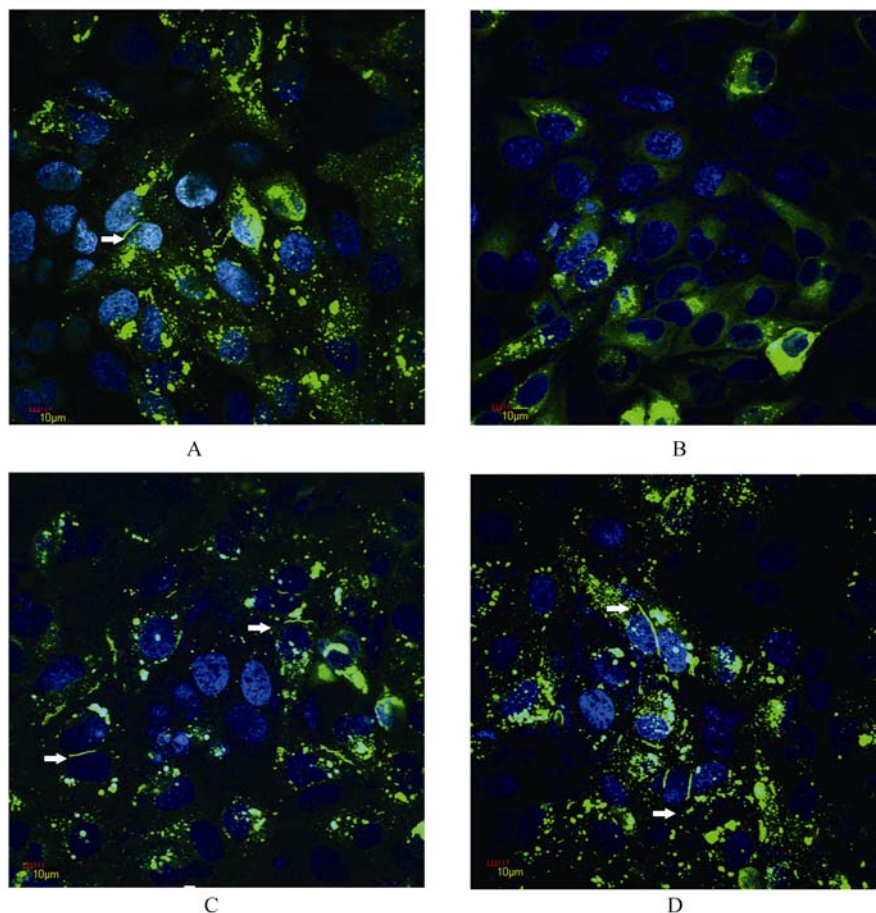


图 4 WT-*Cx26*, p.R32C, p.V37I 和 p.F115C 转染 HeLa 细胞的结果

A: WT-*Cx26*; B: p.R32C; C: p.V37I; D: p.F115C。绿色为 *Cx26* 与 EGFP 的融合蛋白, 野生型和构建的两种突变体(C-D)均可在细胞膜上显示有斑块状染色和聚集现象, 特别是在细胞和细胞连接的区域(用箭头指示); 对照 p.R32C, 表达的 *Cx26* 蛋白分布在细胞质内, 主要在内质网和高尔基体上。放大倍数 600 \times 。

为研究两种突变体形成间隙连接斑的能力是否受影响, 记数 250 对以上同时表达 *Cx26* 的相邻细胞中形成间隙连接通道的细胞数目, 通过 Instat 软件分析 3 次独立实验的结果, 结果显示两种突变体与 WT-*Cx26* 形成通道的细胞数目并没有明显的差异 ($P>0.05$)(图 5)。

通过观察 250 对以上同时表达 WT-*Cx26* 或 *Cx26* 突变体的相邻细胞并计数中间形成间隙连接通道的细胞数目, 进行三次独立实验。结果显示为 mean \pm SD($n=3$)。

3 讨论

间隙连接通道是 2 个相邻细胞间的通道, 由相邻细胞膜上的半通道或称连接子(Connexon)对接组

成, 每个半通道是由 6 个连接蛋白(Connexin, Cx)组

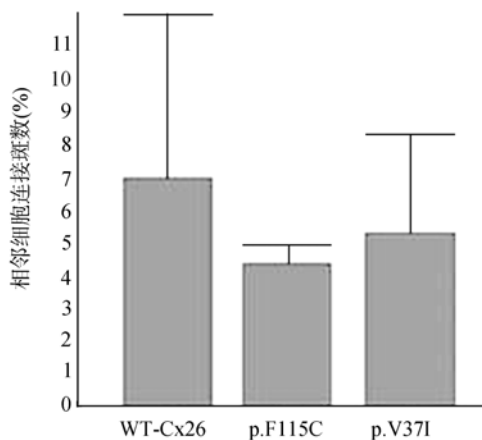


图 5 WT-*Cx26* 和两种突变形成间隙连接通道的细胞数的统计学分析

成的六聚体。间隙连接通道允许相邻细胞的离子、代谢物质和小于 1kDa 的信使分子直接转运, 为细胞群的协调活动提供机制^[10]。间隙连接蛋白(Connexin)是一类结构相对保守的跨膜蛋白家族, connexin 基因的结构具有相似性, 每个基因都有两个外显子, 中间由较大的内含子隔开, 完整的编码区存在于第 2 外显子中^[11]。Cx 具有共同的结构特点(图 6)^[12]: 它们 4 次跨越胞膜, 包括 1 个氨基端(N 末端)、4 个跨膜段(M1, M2, M3, M4)、2 个胞外段(E1, E2)、1 个胞浆连接段(CL)和 1 个羧基端(C 末端)。拓扑学研究显示, 在各 Connexin 中, 跨膜区和胞外环是高度保守的, 而胞内环和 C-端差异较大, Connexin 的 4 个跨膜区都有可能参与 Connexon 的组装过程。Cx26 是内耳连接蛋白中最主要的一种。它对内耳的形态发育、成熟和功能维持具有重要作用。它存在于耳蜗所有细胞的间隙连接中, 是耳蜗的 Corti 氏器中表达最强的连接蛋白, 在耳蜗的血管纹、基底膜和螺旋缘凸中都有表达, 是钾离子通道循环通路的一部分。Cx26 突变导致 Cx26 表达下降, 间隙连接缺失, 从细胞间隙连接网络中进入耳蜗内淋巴循环的钾离子减少, 以至耳蜗内的 Corti 氏器钾离子中毒, 最终引起耳聋。

Cx26 基因突变是导致 NSHL 最常见的原因, 在本研究中, 共发现 31 例 NSHL 患者携带有 Cx26 突变, 检出率为 22.3%, 其中 22 例患者两个等位基因均发生突变。尽管 Cx26 基因共已发现 186 种突变, 但不同人种中 Cx26 基因突变类型及发生频率不同。本研究发现的 5 种致病突变及新变异 c.344T>G 被标记于 Cx26 的拓扑结构图 6 中。其中 c.235delC 为最常见的突变形式, 占有致病性等位基因的 88.7%(47/53 等位基因), 与已知中国人群中的报道一致^[17], 说明在中国人群中 c.235delC 是 Cx26 最常见的突变类型^[18]。c.235delC 移码突变导致翻译提前终止于 81 号密码子, 比野生型的 Cx26 截短 145 个氨基酸。移码突变 c.176_191del16 导致 175 位后 16 个碱基丢失, 从 59 位密码子开始移码, 使得终止密码提前至 75 位, 产生无功能的蛋白质。c.139G>T 突变导致 47 位密码子由编码谷氨酸的 GAG 变为终止密码子 TAG, 产生无功能的蛋白质。3 种错义突变的拓扑学位置如下: 新发现的错义突变 p.F115C 位于该蛋白的胞浆连接段, p.R184P 位于第二胞外段, p.F191L 位于第四跨膜段。另外, c.79G>A 是本研究中最常见的多态, 其次为 c.341A>G。

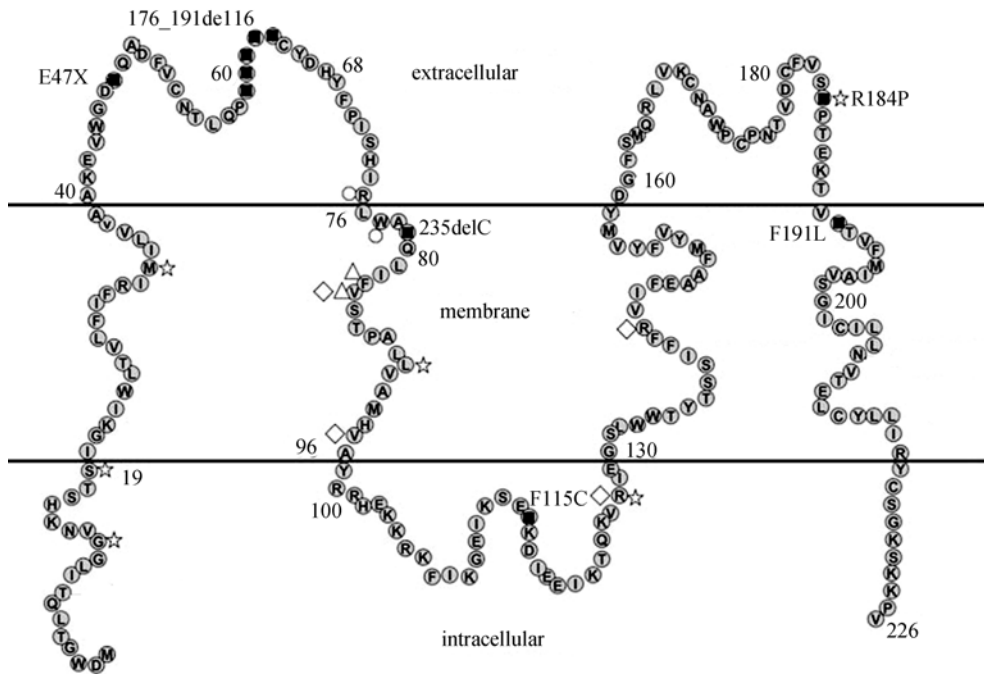


图 6 Cx26 基因的拓扑学结构

本研究中筛查到的 Cx26 突变分别用黑点标记于 Cx26 基因的拓扑学结构图中, 分别是 p.E47X, c.176_191del16, c.235delC, p.R184P, p.F191L 以及新突变 p.F115C; \square 表示(Richard 等, 1998)^[13]总结的 Cx26 突变; \diamond 表示(D Andrea 等, 2002)^[14]总结的 Cx26 突变; \circ 表示(Bruzzone 等, 2003)^[15]总

结的Cx26突变; 表示(Wang等, 2003)^[16]总结的Cx26突变。

p.V37I首次被检测到时因该突变在对照组中的频率有 0.5%, 因而被认为是一种多态^[19], 且相继有报道证实p.V37I在患者和对照中都存在^[20, 21]。但也有学者认为该突变在患者中的频率远远高于对照组, 而认为是一个隐性遗传致病基因^[19, 22-26], 并有该突变的相关功能研究支持这种观点。Bruzzone *et al*和Palmada *et al*将p.V37I突变的cRNA注射到非洲蟾蜍卵细胞中, 结果间隙连接功能完全缺失。在Palmada *et al*的共表达试验中, p.V37I突变产生明显的抑制效应^[15, 27]。在本研究中检出该变异的纯合子 7 例, 杂合子 18 例, 是频率仅次于多态c.79G>A和c.341A>G的变异类型。本实验室Wu等在过去检测的 255 例患者和 115 例对照中p.V37I均较常见, 且在对照组中检测到了 1 例纯合突变。因此, Wu等认为p.V37I在中国人群中是常见多态, 但在其他人群中较为罕见^[28]。由于p.V37I位于跨膜区段, 很可能参与Connexon的组装过程。因此, 我们将p.V37I构建表达载体并转染Hela细胞, 结果该突变体转染的细胞和WT-Cx26一样, 在质膜上有斑块状染色和聚集现象, 特别是在细胞和细胞连接的区域, 说明该突变体能被运输到质膜形成间隙连接斑。同时我们计数 250 对以上同时表达Cx26的相邻细胞中形成间隙连接通道的细胞数目, 该突变体与WT-Cx26形成通道的细胞数目也没有明显的差异($P>0.05$), 表明p.V37I并不影响形成间隙连接通道。分析原因可能存在以下几点: 该突变体可能在蛋白合成、组装、胞内运输等环节均正常, 因此可以组装成间隙连接通道, 但可能在形成通讯、选择通透性等环节中出现故障而导致Cx26不能正常发挥其功能。因此有待对其通道活性和调节情况做进一步的研究。本研究中p.V37I是次于常见多态c.79G>A和c.341A>G的变异类型, 且本室过去筛查结果显示p.V37I在患者和对照中均较常见, 并在对照组中检测到 1 例p.V37I纯合变异。因此本研究也认为p.V37I为多态的可能性极大。

p.F115C是一种未见报道的Cx26新变异类型。我们在 139 例 NSHL 患者中检测到 2 例携带该杂合变异, 且在 104 例对照中没有检出, 遗传学上提示该变异可能是一种致病突变。同时, 该变异在两例患者中均为杂合突变, 亦不排除该变异为隐性致病

的可能。但由于样本数量有限, 也不排除其为一种罕见多态的可能。为进一步研究这一新的变异, 我们对该位点进行了保守性分析, 在 UCSC 数据库中搜索人以及猩猩、猪、牛、狗、马、大鼠、小鼠、猴、鸡的Cx26基因编码的蛋白质序列, 利用分析软件DNASTAR的MegAlign中Clustal W方法进行同源性比对分析。结果发现Cx26基因115位氨基酸保守性较高, 除鸡之外, 在其他9种动物中均编码成苯丙氨酸, 说明该位点的变异有可能影响Cx26编码正常的功能蛋白。因此我们进行了该位点的结构预测, 根据在线软件“Swiss-Model”预测, 该突变不导致明显空间结构的改变, 而“磷酸化”和“糖基化”预测结果显示115位氨基酸附近无“磷酸化”和“糖基化”位点, 该突变不会导致磷酸化、糖基化修饰的改变。因此, 研究该变异是否改变Cx26正常的细胞内分布及生理功能有助于鉴定其性质。但瞬时转染实验证明其仍然可以形成间隙连接通道, 且形成通道的细胞数目与野生型并没有明显的差异, 其形成通道的活性尚需通过其他方法才能鉴定。因此, p.F115C是否为致病突变, 有待于将来在更大的患者样本中得到验证; 此外, 也可以开展进一步的连接通道的通透性或电生理学等研究, 以从其生理功能探讨其是否为致病突变及其分子致病机制。

参考文献(References):

- [1] Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4): 758-764.
- [2] 徐悦凡, 任鲁风, 杨宇. 非综合征型遗传性耳聋基因得研究进展及相关网络资源. *遗传*, 2002, 24(1): 65-71.
- [3] Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 630: 16-31. [\[DOI\]](#)
- [4] Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet*, 1999, 36(11): 829-32.
- [5] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996, 84(3): 381-388. [\[DOI\]](#)
- [6] Lee MJ, Rhee SK. Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in which the expression of connexin26 is induced. *Mol Cells*, 1998, 8(3): 295-300.
- [7] Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC.

- Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 32(1): 163–166. [\[DOI\]](#)
- [8] Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K, Petit C. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol*, 2002, 12(13): 1106–1111. [\[DOI\]](#)
- [9] Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJ. Genetic testing for hereditary hearing loss: Connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mutat*, 2000, 16(6): 502–508. [\[DOI\]](#)
- [10] Gerido DA, White TW. Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662(1–2): 159–170. [\[DOI\]](#)
- [11] Hennemann H, Kozjek G, Dahl E, Nicholson B, Willecke K. Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: Similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur J Cell Biol*, 1992, 58(1): 81–9.
- [12] Krutovskikh V, Yamasaki H. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res*, 2000, 462(2–3): 197–207. [\[DOI\]](#)
- [13] Richard G, White TW, Smith LE, Bailey RA, Compton JG, Paul DL, Bale SJ. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet*, 1998, 103(4): 393–399. [\[DOI\]](#)
- [14] D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, Gasparini P. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(3): 685–691. [\[DOI\]](#)
- [15] Bruzzone R, Veronesi V, Gomès D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'Andrea P, White TW. Loss-of-function and residual channel activity of connexin 26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Lett*, 2003, 533(1–3): 79–88. [\[DOI\]](#)
- [16] Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH, Wu CY, Chen MS, Huang PC. Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem*, 2003, 84(4): 735–742. [\[DOI\]](#)
- [17] Dai P, Yu F, Han B, Yuan Y, Li Q, Wang G, Liu X, He J, Huang D, Kang D, Zhang X, Yuan H, Schmitt E, Han D, Wong LJ. The prevalence of the 235delC GJB2 mutation in a Chinese deaf population. *Genet Med*, 2007, 9(5): 283–289.
- [18] Yan D, Park HJ, Ouyang XM, Pandya A, Doi K, Erdene-tungalag R, Du LL, Matsushiro N, Nance WE, Griffith AJ, Liu XZ. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet*, 2003, 114(1): 44–50. [\[DOI\]](#)
- [19] Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 6 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 792–799. [\[DOI\]](#)
- [20] Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugère V, Templin C, Leprevost D, Artières F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Med Genet*, 2004, 5: 5. [\[DOI\]](#)
- [21] Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet*, 2000, 37(1): 41–43. [\[DOI\]](#)
- [22] Marlin S, Garabédian EN, Roger G, Moatti L, Matha N, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. Connexin 26 Gene mutations in congenitally deaf children: Pitfalls for genetic counseling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(8): 927–933.
- [23] Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127(9): 1037–1042.
- [24] Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH. High frequency hearing loss correlated with mutations in the *GJB2* gene. *Human Genet*, 2000, 106(4): 399–405. [\[DOI\]](#)
- [25] Bason L, Dudley T, Lewis K, Shah U, Potsic W, Ferraris A, Fortina P, Rappaport E, Krantz ID. Homozygosity for the V37I Connexin 26 mutation in three unrelated children with sensorineural hearing loss. *Clin Genet*, 2002, 61(6): 459–464. [\[DOI\]](#)
- [26] Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat*, 2000, 16(3): 190–202. [\[DOI\]](#)
- [27] Palmada M, Schmalisch K, Böhmer C, Schug N, Pfister M, Lang F, Blin N. Loss of function mutations of the *GJB2* gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(1): 112–118. [\[DOI\]](#)
- [28] 吴伟峰, 冯永, 胡浩, 潘乾, 梁德生, 龙志高, 戴和平, 蔡芳, 邬玲仟, 夏昆, 夏家辉. 运用变性高效液相色谱 (DHPLC) 对中国人非综合征性耳聋进行 GJB2 基因突变分析. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2006, 12(4):

241-247.