

液相色谱-串联质谱法检测肝癌细胞 N⁶-甲基腺嘌呤核苷甲基化水平

李盛建¹, 王 慧², 吕 磊², 李群英¹, 须秋萍¹, 周艳卿¹, 张国庆², 赵 亮¹

(1. 上海宝山区罗店医院药剂科, 上海 201908; 2. 上海东方肝胆外科医院药剂科, 上海 200438)

摘要:目的 建立同时测定 N⁶-甲基腺嘌呤核苷(m⁶A)和腺嘌呤核苷(A)的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS), 检测肝癌细胞 m⁶A 甲基化水平。方法 HepG₂ 和 L₀₂ 细胞 mRNA 经分离、消化为核苷, 再经含对乙酰氨基酚为内标的甲醇沉淀处理。色谱柱为 Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱, 流动相为 0.1 g/dl 甲酸水-甲醇(82:18), 流速 0.4 ml/min, 柱温为 30 ℃。质谱检测模式为多反应监测(DMRM)模式, 测定 m⁶A 和 A 的浓度, 计算细胞 m⁶A 甲基化水平。结果 建立的 LC-MS/MS 法检测 m⁶A 和 A 的浓度分别在 0.15 ~ 50.00 ng/ml 和 1.50 ~ 500.00 ng/ml 浓度范围内线性关系良好($r > 0.999$), 日内、日间精密度均小于 15.00%, 准确度为 93.67% ~ 101.10%, 回收率为 91.46% ~ 97.60%, 基质效应为 90.26% ~ 99.27%, 样品稳定性良好。HepG₂ 和 L₀₂ 细胞 m⁶A 甲基化水平分别为 $(0.73 \pm 0.11)\%$ 和 $(1.26 \pm 0.22)\%$ 。结论 该方法准确、快速、稳定和灵敏, 可用于检测肝癌细胞 m⁶A 甲基化水平。

关键词:液相色谱-串联质谱; N⁶-甲基腺嘌呤核苷甲基化; 肝癌细胞

中图分类号: R735.7; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2020)01-020-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.006

Determination of N⁶-Methyladenosine Level in Hepatoma Cell Line by LC-MS/MS

LI Sheng-jian¹, WANG Hui², LÜ Lei², LI Qun-ying¹, XU Qiu-ping¹,
ZHOU Yang-qing¹, ZHANG Guo-qing², ZHAO Liang¹

(1. Department of Pharmacy, Shanghai Baoshan Luodian Hospital, Shanghai 201908, China;

2. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To establish a LC-MS/MS method for simultaneous determination of N⁶-methyladenine nucleoside (m⁶A) and adenosine (A) for the analysis of m⁶A level in hepatocellular carcinoma cells. **Methods** mRNA of HepG₂ and L₀₂ cell lines were separated and digested into nucleosides, precipitated by methanol including acetaminophen as internal standard. The separation was achieved on a Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column using a mobile phase system of 0.1% formic acid-methanol(82:18) at a flow rate of 0.4 ml/min. The temperature of column was 30℃ and the MS detection was DMRM mode for quantifying adenine and N⁶-methyladenine to calculate N⁶-methylation level to calculated the of level m⁶A methylation. **Results**

Both of m⁶A and A possessed good linear relationship in the linear range of 0.15 ~ 50.00 ng/ml and 1.50 ~ 500.00 ng/ml, respectively ($r > 0.999$). Intra- and inter-day precisions were less than 15%, the accuracy were ranged from 93.67% ~ 101.10%, and the recovery were ranged from 91.46% ~ 101.10%. The matrix effect were about 90.26% ~ 99.27% and samples remained stable during analysis. The percentages of N⁶-methylation in HepG₂ and L₀₂ cells were $(0.73 \pm 0.11)\%$ and $(1.26 \pm 0.22)\%$ respectively. **Conclusion** The method is accurate, fast, stable and sensitive. It is suitable for determination of N⁶-methylation level in cell.

Keywords: LC-MS/MS; N⁶-methyladenosine; hepatocellular carcinoma cells

表观遗传,是指在 DNA 碱基序列不发生变化,其表型或基因表达发生了可稳定遗传的变化,包括 DNA 甲基化修饰、RNA 甲基化修饰及非编码 RNA 等。目前研究中, DNA 甲基化修饰为较清楚的表现

遗传学修饰,其影响基因表达、蛋白功能等重要生命过程;同时,转录后多达 100 多种 RNA 修饰被认为丰富了 RNA 功能和遗传多样性, N⁶-甲基腺嘌呤核苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 和 5-甲基胞嘧啶核苷是其

作者简介:李盛建(1988-),男,药理学硕士,主管药师,研究方向:体内药物分析, E-mail: punk8@163.com。

通讯作者:赵亮,副主任药师,研究方向:体内药物分析, E-mail: zhaoliangphar@163.com。

中最具有代表性的甲基化修饰,而 m^6A 更为普遍,在RNA甲基化修饰中超过80%^[1]。近年来, m^6A 相关的研究涉及RNA翻译效率^[2]、DNA损伤修复^[3]、生长发育^[4]、肿瘤形成^[5]等等,可见其重要性。

由于液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)具有快速、灵敏、准确性高、检测限低等特点,其应用在表观遗传领域中渐渐崭露头角,如基因组羟甲基胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶修饰等研究^[6-7],但 m^6A 甲基化修饰的LC-MS/MS分析方法国内外鲜有报道。本研究通过建立一种稳定可靠的LC-MS/MS法测定腺嘌呤核苷(adenosine, A)和 m^6A 含量,分析肝癌细胞株HepG₂的 m^6A 甲基化水平,并与正常肝细胞株L₀₂进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 本研究采用的细胞为人源肝癌细胞株HepG₂和正常肝组织细胞株L₀₂,均由上海东方肝胆外科医院信号转导实验室惠赠。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器:Agilent 1290 UPLC 二元液相色谱系统, Agilent 6470 Triple Quad 质谱仪(美国 Agilent); METTLER AE 240 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO);低温离心机(美国 Thermo Fisher);Millipore 超纯水仪(美国 Millipore)。

1.2.2 试剂:对照品腺嘌呤核苷和对乙酰氨基酚(中国食品药品检定研究院), N^6 -甲基腺嘌呤核苷(美国 SELLECK CHEMICALS), Trizol, Ambion[®] Dynabeads mRNA Purification Kit, mRNA RiboMinus[™] Human Transcriptome Isolation Kit(美国 Thermo Fisher), 甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Honeywell), 甲酸为色谱纯(美国 SIGMA), 水为超纯去离子水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 mRNA的提取和酶解:取对数期生长的HepG₂和L₀₂细胞,细胞数量 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个;按TRI Reagent[®]试剂说明书步骤,采用Trizol法提取总RNA;按照Ambion[®] Dynabeads mRNA Purification Kit和RiboMinus[™] Human Transcriptome Isolation Kit试剂盒说明书中的步骤从总RNA中分离纯化mRNA及去除rRNA;用Nanodrop测定mRNA浓度。取200 ng mRNA, 2.5 μ l 缓冲盐溶液($10 \times$, 20 mmol/L ZnCl₂, 100 mmol/L NaCl)和1 μ l 核酸酶至EP管,加双蒸水补齐至25 μ l, 37 $^{\circ}$ C下反应2h;反应体系中再加入2.5 μ l 酶缓冲溶液和1 μ l 碱性去磷酸酶, 37 $^{\circ}$ C下反应2h;在反应体系中加入去离子水稀释至200 μ l, -

80 $^{\circ}$ C冰箱保存待检测。

1.3.2 溶液的配制:分别精密称A, m^6A 及对乙酰氨基酚对照品10 mg,置于10 ml容量瓶中,加甲醇溶解,配成1.00 mg/ml对照品储备液;用甲醇按比例逐级稀释配制不同浓度工作液,其中A, m^6A 混合对照品溶液浓度分别为30.00, 100.00, 200.00, 400.00, 2 000.00, 10 000.00 ng/ml和3.00, 10.00, 20.00, 40.00, 200.00, 1 000.00 ng/ml,质控储备液浓度分别为40.00, 4 000.00, 8 000.00 ng/ml和4.00, 400.00, 800.00 ng/ml,对乙酰氨基酚内标溶液浓度为20.00 ng/ml。上述对照品储备液置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

分别取10 μ l上述对照品工作液,加到190 μ l含有酶及酶解缓冲液的空白水基质中,配成 m^6A 与A系列浓度工作液样品。A的质量浓度为1.50, 5.00, 10.00, 20.00, 100.00和500.00 ng/ml,随行质控样品低、中、高质量浓度分别为2.00, 200.00和400.00 ng/ml; m^6A 的质量浓度为0.15, 0.50, 1.00, 2.00, 10.00, 和50.00 ng/ml;低、中、高质量浓度质控样品分别为0.20, 20.00和40.00 ng/ml。

1.3.3 色谱及质谱条件:色谱条件:色谱柱为美国Agilent Proshell 120 EC-C₁₈(3.0 \times 100 mm, 2.7 μ m), 预柱:Agilent UPLC Guard SB C₁₈(3.0 \times 5 mm, 2.7 μ m)柱温:30 $^{\circ}$ C。流动相系统:水(0.1% FA):甲醇=82:18(v/v)等度洗脱,分析时间3 min,进样量2 μ l。质谱条件:采用AJS ESI正离子模式,ESI源参数设置:干燥气温350 $^{\circ}$ C;干燥气流速10 L/min;雾化器压力40 psi;鞘气温度350 $^{\circ}$ C;鞘气流速11 L/min;毛细管电压4 000 V;喷嘴电压2 000 V。动态多反应监测模式参数设置:A检测参数268.0 \rightarrow 136.0, 碎片电压90V, 碰撞能量15 eV; m^6A 检测参数282.0 \rightarrow 150.0, 碎片电压70V, 碰撞能量15 eV;内标检测参数152.3 \rightarrow 110.0, 碎片电压110V, 碰撞能量17 eV。

1.3.4 待测样品前处理:取待测细胞样品30 μ l于1.5 ml EP管中,加入60 μ l对乙酰氨基酚内标(10 ng/ml),涡旋30 s, 4 $^{\circ}$ C条件下12 000 g离心5 min;取上清液于进样瓶中,用于LC-MS/MS检测。

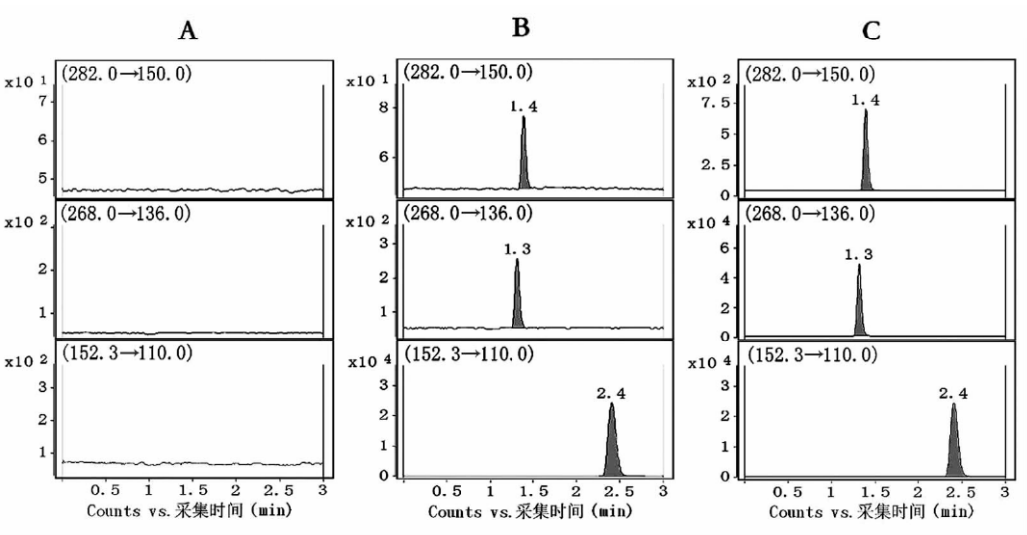
1.4 统计学分析 应用SPSS 19.0软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对HepG₂和L₀₂的 m^6A %结果进行 t 检验分析,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 LC-MS/MS方法学验证

2.1.1 方法专属性:分别取30 μ l空白基质、对照品溶液和待测细胞样品,按“1.3.4”项步骤处理(处理空白基质时,内标用甲醇代替),按“1.3.3”项条件下进样分析(见图1),A保留时间为1.3min, m^6A 保留

时间为 1.4 min,内标保留时间为 2.4 min,对照品溶液和待测细胞样品中待测分析物出峰时间一致,无杂质干扰峰,峰形良好。结果表明,该方法具有良好的专属性。



A. 空白基质, B. 低浓度质控样品, C. 待测样品

图1 待测物与内标多反应监测色谱图

2.1.2 标准曲线范围与定量下限: 分别取“1.3.2”项中配制好的对照品溶液 30 μ l,按“1.3.4”项操作,分别配成 6 个浓度的标准样品,每浓度点配制 5 份样品,连续进样分析,记录色谱图,以浓度 (X) 为横坐标,各待测物的峰面积与内标的比值 (Y) 为纵坐标进行回归计算,权重系数 $1/x^2$,求得回归方程 A: $Y = 0.0406X - 0.0359$, $r = 0.9999$,线性范围为 1.50 ~ 500.00 ng/ml; m^6A : $Y = 0.0103X - 0.0009$, $r = 0.9999$,线性范围为 0.15 ~ 50.00 ng/ml。A 和 m^6A 分别在 1.50 ~ 500.00 ng/ml 和 0.15 ~ 50.00 ng/ml 范围内具有良好的线性关系,定量限分别为 1.50 ng/ml 和 0.15 ng/ml。

2.1.3 精密度和准确度实验: 按“1.3.2”和

“1.3.4”项中的方法制备低、中、高三种浓度的质控样品,每个浓度平行操作 5 份,进样分析,连续 3 天,将被测物和内标的峰面积比值代入标准曲线方程计算实际样品浓度,精密度用相对标准偏差 (RSD) 表示,结果见表 1。 m^6A 日内精密度 $RSD < 13.77\%$,日间精密度 $RSD < 11.50\%$ 。A 日内精密度 $RSD < 7.84\%$,日间精密度 $RSD < 5.78\%$ 。准确度以相对回收率表示,实测浓度与理论加入浓度的比值即为相对回收率,结果 m^6A 日内、日间准确度范围在 93.67% ~ 101.07%。A 日间、日内准确度范围 98.58% ~ 101.10%。提示该方法的精密度和准确度均能达到检测要求。

表1 待测物日间、日内的精密度和准确度 (n=5)

项目	加入浓度 (ng/ml)	日内精密度 (%)	日内准确度 (%)	日间精密度 (%)	日间准确度 (%)
m^6A	0.20	13.77	94.00	11.50	93.67
	20.00	9.72	101.07	9.04	100.08
	40.00	6.86	99.27	5.11	100.21
A	2.00	7.84	100.60	5.78	100.23
	200.00	8.62	101.10	5.22	98.58
	400.00	1.75	99.99	1.38	100.49

2.1.4 基质效应和提取回收率:按“1.3.2”和“1.3.4”项中的方法制备含待测物低、中、高浓度的质控样品;按“1.3.5”项方法处理空白基质(内标用甲醇代替),取上清溶液,加入一定量质控浓度对照品储备溶液,使其最终浓度分别与质控样品的进样浓度一致;配制待测物的

甲醇溶液,其最终浓度分别与质控样品的进样浓度一致。进样得峰面积,计算含基质与不含基质样品的峰面积之比,得到相应物质的基质效应;计算基质存在下,前处理和后处理加标样本的峰面积比值,得到待测物的提取回收率。考察内标的基质效应和提取回收率与上述

操作一致。结果低、中、高三种浓度待测物及内标提取回收率均在 91.46 % ~ 97.60 % 之间,基质效应均在 90.26 % ~ 99.27 % 之间(见表2)。结果表明回收率满足定量要求,基质效应对待测物的定量不产生明显的影响。

2.1.5 稳定性考查:按“1.3.2”和“1.3.4”项中的方法制备含待测物低、中、高浓度的质控样品,考察按以下方式处理后样品的稳定性:室温放置 6 h 后处理;处理后室温放置 24 h;三个冻融循环;-80℃保存 30 天。测定样品实际浓度并计算 RSD 和相对偏差(RE),计算公式:RE % = (实测值-真实值)/真实值 × 100 %。结果 RSD% 均小于 15.0 %, RE 的范围为 0.4 % ~ 6.9 %,表明样品在上述处理状态下稳定性良好。

表2 待测物及内标提取的回收率和基质效应 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	加入浓度 (ng/ml)	提取回收率(%)	基质效应(%)
m ⁶ A	0.20	95.74 ± 2.22	91.18 ± 3.55
	20.00	97.60 ± 5.88	90.26 ± 3.39
	40.00	94.66 ± 2.70	92.14 ± 2.51
A	2.00	91.46 ± 8.58	99.27 ± 3.58
	200.00	94.58 ± 5.32	97.00 ± 3.81
	400.00	97.06 ± 2.11	96.28 ± 2.48
IS	20.00	95.95 ± 5.13	96.52 ± 4.35

注:IS: Internal Standard

2.2 样品分析 取“1.3.1”项的 HepG₂ 和 L₀₂ 待测样品,按“1.3.4”项处理进样分析。按内标法计算样品中 m⁶A 和 A 的浓度,并根据下列公式计算 mRNA 中 m⁶A 甲基化百分比: $m^6A \% = (C_{m^6A} / M_{m^6A}) / (C_A / M_A + C_{m^6A} / M_{m^6A})$, M_{m^6A} 和 M_A 分别为 m⁶A 和 A 的摩尔质量, C_{m^6A} 和 C_A 分别为 m⁶A 和 A 的样品实测浓度。对 m⁶A 甲基化水平进行统计分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明肝癌细胞株 HepG₂ 的 m⁶A 甲基化水平高于正常肝细胞株 L₀₂。

表3 细胞株 HepG₂ 和 L₀₂ 的 m⁶A 甲基化水平 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	HepG ₂ 组	L ₀₂ 组	P
m ⁶ A 浓度(ng/ml)	1.79 ± 0.21	3.53 ± 0.33	0.0000
A 浓度(ng/ml)	246.99 ± 28.03	284.94 ± 29.49	0.0455
m ⁶ A 甲基化水平(%)	0.73 ± 0.11	1.26 ± 0.22	0.0003

3 讨论

目前传统的 m⁶A 甲基化分析技术主要有斑点杂交法^[8]、酶联免疫吸附法^[9]和免疫共沉淀法^[10]等,但这些分析方法存在半定量或定量效率不高等问题,LC-MS/MS 法与之相比,分析方法稳定、灵敏度高、选

择性好、操作简便等优点^[11]。

本方法首先从细胞中提取 mRNA,并使用酶解法将 mRNA 消化为核苷,最后通过 LC-MS/MS 法检测样品中 m⁶A 和 A 的相对浓度,从而计算 m⁶A 甲基化水平。该方法直接测定核苷的相对浓度,需要核酸酶和碱性去磷酸酶将 RNA 水解为单个核苷,但由于酶活性和消化时间等因素可能存在 RNA 酶解不完全导致测定误差。为了消除这一问题,我们在预实验中考察了核酸酶和碱性去磷酸酶的反应浓度和反应时间,最终确定“1.3.1”项下 RNA 消化条件最为合适。为提高目标化合物的响应,对质谱参数进行了优化。ESI 离子源中,在正、负离子模式下, m/z 50 ~ 400 范围内进行全扫描,选取响应较强、干扰较小的作为定量离子对,以确定合适的母离子和子离子。在多反应离子监测模式下,优化了 m⁶A、A 和内标的碰撞能量,提高其响应度。最终采用 m/z 282/180, m/z 268/136 和 m/z 152/110 分别作为 m⁶A、A 和内标的定量离子对。本研究中待测物为细胞中的内源性化合物,难以获取空白基质,定量分析内源性化合物主要有代替物分析法和代替基质分析法。代替物分析法指选择合适的待测物替代分析物(如同位素等)加入真实的生物基质中配置标准曲线;代替基质分析法指待测物在替代基质(水、纯有机溶剂等)中配置标准曲线^[12]。在预实验中,我们考察了同位素代替物与待测物响应值的等效性,发现两者之间有一定的差异,代替物分析法无法应用于本研究;经纯化后的待测样品基质组成较简单,主要由少量盐与蛋白酶组成,因此本研究采用了含酶和酶缓冲液的水作为代替基质测定 m⁶A 与 A 的浓度。在肝癌疾病中 m⁶A 是一种抑癌因子,甲基转移酶 METTL-14 的下调导致 m⁶A 甲基化水平降低,进而促进肿瘤细胞的转移^[8,13]。采用本方法测得的肝癌细胞株 HepG₂ 的 m⁶A 甲基化水平低于正常肝细胞 L₀₂,结果与上述研究相符,提示该方法测试结果的准确性。

总之,本研究建立的 LC-MS/MS 法,具有快速、灵敏、准确性高、检测限低等特点,能进一步应用于 m⁶A 甲基化的生物学功能研究中。

参考文献:

- [1] 张笑,贾桂芳. RNA 表观遗传修饰: N⁶-甲基腺嘌呤[J]. 遗传, 2016, 38(4): 275-288.
- [2] ZHANG Xiao, JIA Guifang. RNA epigenetic modification: N⁶-methyladenosine[J]. Hereditas, 2016, 38(4): 275-288.
- [3] YANG Yun, FAN Xiaojuan, MAO Miaowei, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N⁶-methyladenosine[J]. Cell Research, 2017, 27(5): 626-641.
- [4] XIANG Yang, LAURENT B, HSU C H, et al. RNA m⁶A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage

- response[J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 573-576.
- [4] ZHANG Chunxia, CHEN Yusheng, SUN Baofa, et al. m⁶A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification[J]. *Nature*, 2017, 549(7671): 273-276.
- [5] WANG Siwei, SUN Chunxiao, LI Jianhua, et al. Roles of RNA methylation by means of N⁶-methyladenosine (m⁶A) in human cancers [J]. *Cancer Letters*, 2017, 408: 112-120.
- [6] 木晓丽,张洁,彭思远,等.液相色谱-串联质谱法同时测定生物组织全基因组 DNA 甲基化和羟甲基化水平[J].*色谱*,2014,32(7):682-686.
- MU Xiaoli, ZHANG Jie, PENG Siyuan, et al. Simultaneous analysis of global DNA methylation and hydroxymethylation in tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(7):682-686.
- [7] 何国东,杨翔宇,李晓红,等.超高效液相色谱-串联质谱法分析骨髓间充质干细胞衰老过程中的全基因组 DNA 甲基化水平变化[J].*中国药理学通报*,2017,33(9):1298-1303.
- HE Guodong, YANG Xiangyu, LI Xiaohong, et al. Analysis of methylation level of bone marrow mesenchymal stem cells during senescence by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*,2017,33(9):1298-1303.
- [8] MA Jinzhao, YANG Fu, ZHOU Chuanchuan, et al. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N⁶-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing[J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2017, 65(2): 529-543.
- [9] LEWINSKA A, ADAMCZYK-GROCHALA J, DEREGOWSKA A A. Sulforaphane-induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells[J]. *Theranostics*, 2017, 7(14): 3461-3477.
- [10] ZHANG Chuanchao, SAMANTA D, LU Haiquan, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(14): E2047-E2056.
- [11] 王磊,刘红星,孙文利. HPLC-MS/MS 法在骨髓移植患者他克莫司血药浓度测定中的应用[J]. *现代检验医学杂志*,2017,32(2):126-130.
- WANG Lei, LIU Hongxing, SUN Wenli, et al. Application of HPLC-MS/MS method in the determination of whole blood concentration of tacrolimus in bone marrow transplant patient [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(2):126-130.
- [12] 李文彬,董江锴,孟爽,等.基于替代分析物的亲水作用色谱串联质谱法定量检测细胞培养液中酪氨酸含量[J].*上海交通大学学报(医学版)*,2016,36(7):949-955.
- LI Wenbin, DONG Jiangkai, MENG Shuang, et al. Surrogate analyte-based quantitative measurement of the tyrosine level in cell culture media by HILIC-MS/MS [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2016, 36(7): 949-955.
- [13] CHEN Mengnuo, WEI Lai, LAW C T, et al. RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase METTL3 promotes liver cancer progression through YTHDF2 dependent post-transcriptional silencing of SOCS2 [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2254-2270.

收稿日期:2019-05-15

修回日期:2019-08-07

(上接15页)

- [6] WU Chenchi, TSAI C H, HUNG C C, et al. Newborn genetic screening for hearing impairment: a population-based longitudinal study [J]. *Genetics in Medicine*, 2017, 19(1): 6-12.
- [7] LI Lei, LU Jingrong, TAO Zheng, et al. The p. V37I exclusive genotype of GJB2: a genetic risk-indicator of postnatal permanent childhood hearing impairment[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36621.
- [8] ZOU Yu, DAI Qiqiang, TAO Weijing, et al. Suspension array-based deafness genetic screening in 53033 Chinese newborns identifies high prevalence of 109 G > A in GJB2 [J]. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2019, 126: 109630.
- [9] DAI Pu, YU Fei, HAN Bing, et al. GJB2 mutation spectrum in 2 063 Chinese patients with nonsyndromic hearingimpairment. [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2009, 7(1): 26.
- [10] HWA H L, KO T M, HSU C J, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness [J]. *Genetics in Medicine*, 2003, 5(3): 161-165.
- [11] BARASHKOV N A, PSHENNIKOVA V G, POSUKH O L, et al. Spectrum and frequency of the GJB2 gene pathogenic variants in a large cohort of patients with hearing impairment living in a subarctic region of Russia (the sakha republic) [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156300.
- [12] 郭伟,周永安,张全斌,等.临汾地区特教学校非综合性耳聋 GJB2,PDS 及线粒体 A155G 基因突变分析[J].*中国优生与遗传杂志*,2014,22(9):14-15.
- GUO Wei,ZHOU Yong'an,ZHANG Quanbin, et al. The mutation analysis of GJB2, PDS and mitochondrial A1555G gene for non syndromic deafness of special education school in Linfen area[J].*Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2014,22(9):14-15.

收稿日期:2019-10-10

修回日期:2019-11-26