

3种蝙蝠听力相关基因 *EYA4* (*eyes absent 4*) 开放阅读框序列的克隆与分析

王力^{①②} 王锦红^② 何贝贝^② 周莹莹^② 叶绍辉^① 李钢^{②*}

(① 云南农业大学动物科技学院 昆明 650201; ② 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: *EYA4* 基因是与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的无眼基因 *eya* 同源的 4 个脊椎动物转录激活因子 *eya* 基因家族 (*EYA1-4*) 的一员。相关研究表明 *EYA4* 基因与非综合征听觉障碍有关。蝙蝠特化的听觉系统在回声定位生理过程中负责回声信息的接收和处理, 并起到重要作用。利用 RT-PCR 技术, 通过克隆测序得到 3 种蝙蝠 (大足鼠耳蝠 *Myotis ricketti*, 黑髯墓蝠 *Taphozous melanopogon*, 棕果蝠 *Rousettus leschenaulti*) *EYA4* 基因的开放阅读框序列。通过比对分析, 发现这 3 种蝙蝠均没有第五外显子, 而在第十一外显子与第十二外显子之间有一个其他哺乳动物所没有的外显子 exon b。此外, 实验结果还显示, 在棕果蝠中没有发现其他已知哺乳动物 *EYA4* 基因的第二十外显子; 在黑髯墓蝠 *EYA4* 基因中缺少第十九外显子, 而且与其他哺乳动物相比, 黑髯墓蝠 *EYA4* 基因具有较短的第十六外显子, 即缺少了 30 个碱基; 大足鼠耳蝠与非蝙蝠哺乳动物一样存在第十九和第二十外显子的可变剪接模式, 且在第二与第三外显子中间存在外显子 exon a。

关键词: 蝙蝠; *EYA4*; 开放阅读框 (ORF); *eyaHR*; *eyaVR*

中图分类号: Q751 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)05-62-07

Cloning and Analysis of Open Reading Frame of Hearing correlated Gene *EYA4* (*Eyes Absent 4*) in Three Species of Bats

WANG Li^{①②} WANG JirHong^② HE Bei Bei^② ZHOU Ying-Ying YE ShaoHui^① LI Gang^{②*}

(① College of Animal Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201;

② School of Life Science, East Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: *EYA4*, homologous to *eyes absent* (*eya*) gene of *Drosophila*, is a member of the four vertebrate transcriptional activators of *eya* gene family. Previous studies have indicated that *EYA4* gene is interrelated with sensorineural hearing loss. The specialized auditory system of bat that receives and processes echo information has an important role in echolocation. Using the RT-PCR method, the open reading frame (ORF) of *EYA4* gene was cloned and sequenced in three species of bats (*Myotis ricketti*, *Taphozous melanopogon*, and *Rousettus leschenaulti*). Sequence alignment indicates that the *EYA4* gene of all these three bats does not have exon 5 but has a unique exon b between exon 11 and exon 12. Compared to the *EYA4* gene of other mammals, *R. leschenaulti* does not have exon 20 and *T. melanopogon* does not have exon 19. Moreover, *T. melanopogon* has a 30 bp deleted exon 16. *M. ricketti* has variable splicing of exon 19, exon 20 and exon a between exon 2 and exon 3.

基金项目 华东师范大学紫江学者资助项目;

* 通讯作者, E-mail: li_gang2004@163.com;

第一作者介绍 王力,男,硕士研究生;研究方向:功能基因进化;E-mail: wangli81201@163.com.

收稿日期: 2008-02-26, 修回日期: 2008-07-10

Key words: Bat; *EYA4*; Open reading frame (ORF); *eyaHR*; *eyaVR*

Eyes absent 4 (*EYA4*) 基因是与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的无眼基因 *eye absent* (*eya*) 同源的 4 个脊椎动物转录激活因子 *eya* 基因家族(*EYA1-4*) 的一员。*eya* 基因家族是一个进化上比较保守的基因家族, 因其特有的 C 端编码 271 个氨基酸的保守性较高的 EYA 结构域而得名, 其普遍存在于从果蝇到人类的各种生物体中^[1]。所有的 *eya* 蛋白家族成员都具有一个由 271 个氨基酸残基组成的、高度保守的 C 末端的 *eya* 同源区域(*eyaHR*) 和 N 末端组成, N 末端是一个富含脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸 (proline-serine-threonine, PST) 的转录活性区域, 叫做 *eya* 可变区域(*eyaVR*)^[2]。虽然缺少 DNA 结合区域, 但作为转录共激活因子 *eya* 蛋白家族仍然能与转录因子 Six 和 Dach 相互作用^[3-5], 这其中 C 末端的 *eyaHR* 能调节 so (*sine oculis*) 蛋白家族成员(Six1- Six6) 之间的相互作用^[6-8], 除此之外, *eyaHR* 的磷酸酶活性还能释放由 Dach-Six 共调节的基因的转录阻遏^[9-11]。

eya 蛋白的结构是与其功能重要性相对应的。*EYA4* 蛋白具有 *eya* 蛋白家族的功能性和结构性特征, *EYA4* 基因突变导致蛋白结构的改变, 从而导致其在相应组织中的功能缺陷, 引发相应的突变病症。对患有听觉障碍遗传病家系的研究发现, 美国某一个家族成员的 *EYA4* 基因的 1 468 位点插入突变 (1468insAA), 比利时某一个家族成员的 *EYA4* 基因 2 200 位点的无义突变 (2200C[→]T)^[12], 匈牙利某一个家族成员在 *EYA4* 基因 1 558 位点的 4 bp 插入突变 (1558insTTTG)^[13], 北美高加索人群某一个家族 LMG265 的 1 490 位点插入突变 (1490insAA)^[14], 美国某一个家族的 *EYA4* 基因出现明显的剪接位点突变 (1282-12T[→]A)^[15], 这些位点的突变导致 *eya* 基因的移码突变, 转录提前终止, 产生缺失了部分或者全部 *eyaHR* 的突变体, 从而产生了临床症状为语后的、进行性的、常染色体显性遗传的非综合征听觉障碍 (sensorineural hearing loss, SNHL)。一个对人 *EYA4* 基因突变的研究

发现, 因突变删除 4 846 bp 的 *EYA4* 转录产物产生了缺失全部 *eyaHR* 和部分 *eyaVR* 的 E193, 导致 SNHL 和扩张性心肌病 (dominant dilated cardiomyopathy, DCM)^[16]。这表明 *EYA4* 蛋白翻译提前终止如果只影响 *eyaHR* 就只产生 SNHL 一种症状, 如果影响到了 *eyaVR* 就会产生 SNHL 和 DCM 两种症状。

蝙蝠是众多哺乳动物中比较特殊的一类, 能够以回声定位捕食和探知环境。蝙蝠独特的回声定位依赖于发声、听觉和运动 3 个系统的协调活动来完成。在这 3 个系统中听觉系统尤其重要, 它在回声信息的接收、处理过程中起着重要的作用。蝙蝠的听觉传导通路与一般的哺乳动物基本相似, 但与其特殊的回声定位功能相适应, 听觉系统的结构还是出现了一些明显的特化现象, 这种特化从外周听觉器官特别是耳蜗基底膜开始贯穿了整个听觉系统。转录激活因子 *eya* 在听觉的生理过程中起到重要作用, 而 *EYA4* 基因突变对听觉的影响也是一个热门研究领域。我们以 3 种蝙蝠, 大足鼠耳蝠 (*Myotis ricketti*)、黑髯墓蝠 (*Taphozous melanopogon*) 和棕果蝠 (*Rousettus leschenaulti*) 的脑组织 RNA 为材料, 通过 RT-PCR 和基因克隆技术, 获得这 3 种蝙蝠 *EYA4* 基因的开放阅读框 (opening reading frame, ORF) 序列。在与 GenBank 已有的数据比对分析后, 得到每种蝙蝠 ORF 的外显子组合情况。利用 Sliding windows 方法, 分析了已知哺乳动物 *EYA4* 基因与蝙蝠 *EYA4* 基因不同区域的进化速率差异。

1 材料与方法

1.1 材料 大足鼠耳蝠雄性成体于 2005 年 12 月采自江西鹰潭, 黑髯墓蝠雄性成体于 2005 年 10 月采自广西桂林, 棕果蝠雌性成体于 2005 年 10 月采自广西桂林, 取上述 3 种蝙蝠 (每种一只) 的全脑组织, - 80 °C 低温保存, 以防 RNA 的降解。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 用大连宝生物工程有限公司的 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒提取所有全脑组织样品的总 RNA。所有操作步骤按试剂盒说明书和 RNA 提取标准操作进行。提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定质量,并用紫外分光光度法测量 OD₂₆₀ 值进行定量。

1.2.2 逆转录 用 StrataScript 5.0 多温度逆转录酶(Stratagene, Germany), 根据说明书用随机引物逆转录得到各个样品的 cDNA。

1.2.3 引物设计 根据 GenBank 已有的哺乳动物 *EYA4* 基因的 UTR 区和编码序列(CDS)的保守区设计引物, 依据序列包括小鼠(*Mus musculus*, NM-010167)、马(*Equus caballus*, XM-001504359)、人(*Homo sapiens*, NM-004100)、黑猩猩(*Pan troglodytes*, XM-001169736)及大鼠(*Rattus norvegicus*, XM-001054306)。引物序列分别为 F1: 5' TCC TGT TTK CAS CAG AGA CAC A 3'; F2: 5' GGC CAA AAC CAG TAT GCA CAG

3'; R1: 5' CAA GTC CCA GAC AAA YAC ACG CTC 3'; R2: 5' GTA AAG CCA GAG GCA TTG AAT CAC 3'。引物由美国英杰生命技术有限公司(Invitrogen)合成。

1.2.4 PCR 扩增 引物 F1 和 R1 组合扩增 *EYA4* 基因的 *eyaHR* 区, 预计扩增得到的目标片段大小为 1 342 bp; 引物 F2 和 R2 组合扩增 *EYA4* 基因 *eyaVR* 区, 预计扩增得到的目标片段大小为 1 181 bp; 引物 F1 和 R2 组合扩增 *EYA4* 基因全序列, 预计扩增得到的目标片段大小为 2 209 bp。扩增条件: 95℃, 5 min; 95℃变性 45 s, 50℃退火 50 s, 72℃延伸 2~3 min, 35 个循环; 最后总延伸 10 min。

1.2.5 克隆和测序 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳(图 1, 2), 回收、纯化后克隆到 PMD-19T 载体(TaKaRa)上, 常规转化, 蓝白斑筛选挑取白斑菌落, 以通用引物 M13 进行 PCR, 鉴定阳性克隆。多克隆测序由美国英杰生命技术有限公司完成。

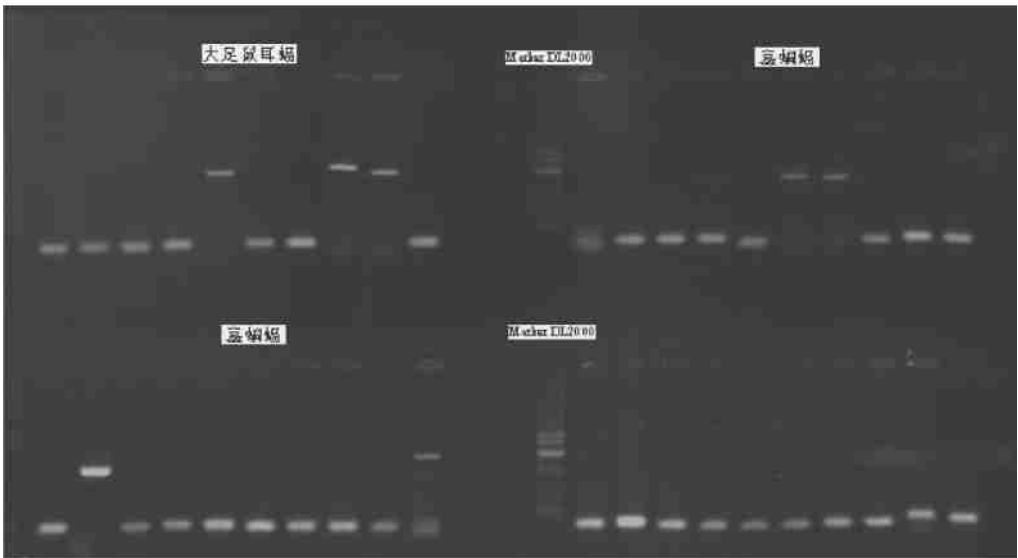


图 1 大足鼠耳蝠和黑髯墓蝠的阳性克隆电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of positive clones of *Myotis ricketti* and *Taphozous melanopogon*

1.3 数据分析 通过 GenBank 搜索和比对, 找到已发表的其他非蝙蝠哺乳动物 *EYA4* 基因的编码区序列, 同时包括不同的转录本。物种及

序列号同 1.2.3 节。

使用 BioEdit^[17] 和 Clastal X^[18] 软件分别比对核苷酸及氨基酸序列并校正, 以获得正确的

表明^[3], 不同的 *EYA4* 基因 mRNA 转录本只选择性剪接其中一个。

通过对这 3 种蝙蝠与其他已知的非蝙蝠哺乳动物(人、黑猩猩、马、大鼠、小鼠)的 *EYA4* 基因的比对分析显示, *EYA4* 基因在哺乳动物中的进化中相当保守。在全长序列 617 个氨基酸中, 保守位点数目为 576, 占到全序列的 93.35%。

序列经比对删除后, 对所有哺乳动物 *EYA4* 基因共同转录区的进化速率进行了估算, 其中共有 1 851 个核苷酸、671 个氨基酸位点参与分

析。应用 sliding windows 方法估算 *EYA4* 基因不同功能区的核苷酸同义替换和非同义替换率的比率(图 4)。分析结果显示, 蝙蝠与其他非蝙蝠哺乳动物一样, Ka/Ks 值在 *eyaVR* 变化比较大, 在 *eyaHR* 变化较小, 蝙蝠 *EYA4* 基因的进化与其他哺乳动物保持一致。 Ka/Ks 最大比值出现在 *eyaVR* 的第十一外显子区域内, 在所有 *EYA4* 基因突变引起的疾病中, 所有的插入突变均发生在这个外显子上面, 成为发病最多的区域^[13-16]。

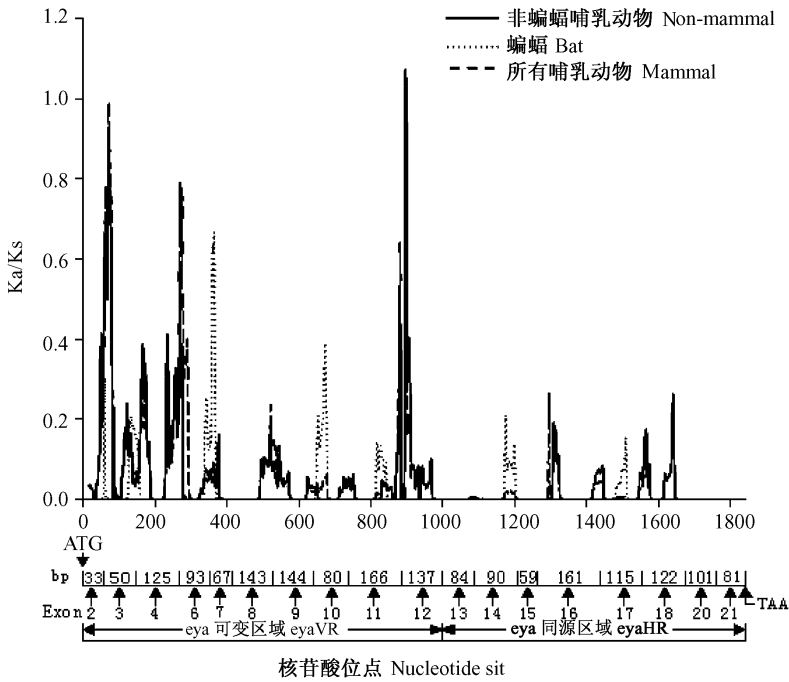


图 4 *EYA4* 基因可变区域和同源区域的进化速率

Fig. 4 Evolutionary rate of *eyaVR* and *eyaHR* in *EYA4* gene

3 讨论

EYA4 的结构包括一个由 271 个氨基酸残基组成的、高度保守的 C 末端的 *eyaHR* 和一个富含脯氨酸丝氨酸苏氨酸 (PST) (34% ~ 41%)、能够激活目的基因转录的 N 末端活性区域 *eyaVR*^[2]。 *EyaVR* 是仅有一个转录活性功能区域的可变区域, 在此区域很容易发生插入突变, 引起听觉障碍和心脏疾病^[13-16]。 GenBank 里已有数据显示哺乳动物之间、同种

个体的不同转录本间的 *eyaVR* 变化很大。在蝙蝠 *EYA4* 基因的 *eyaVR* 中, 本实验发现蝙蝠独有的 2 个外显子 exon a 和 exon b, 二者均位于 *eyaVR*, 而且 exon a 富含丝氨酸(4/14)。

在 3 种蝙蝠 *EYA4* 基因序列中没有发现第五外显子。 Borsani 等人^[3] 对人的骨骼肌和小鼠胚胎 *EYA4* 基因 cDNA 文库的研究也发现没有第五外显子的转录本。 GenBank 已有数据显示人、小鼠、黑猩猩、马都有缺少第五外显子的转录本。 我们所得到的 3 种蝙蝠的 ORF 序列中

均没有发现与其他哺乳动物相对应的第五外显子。对这一现象有两种可能的解释, 一是蝙蝠 *EYA4* 基因的表达具有组织表达差异性, 在脑组织中存在特定的表达模式^[5, 6, 12, 16]; 第二种解释是蝙蝠 *EYA4* 基因的表达模式在脑中具有不同时期的特异性; 相关研究表明 *EYA4* 基因在内耳中的表达组织中会随时间的变化和组织的分化, 在不同组织间发生转移^[12]。

与其他非蝙蝠哺乳动物 *EYA4* 基因的 ORF 序列相比, 黑髯墓蝠的第十六外显子缺少 30 bp。通过对 GenBank 中哺乳动物不同转录本的比对分析, 发现在黑猩猩和马中也有第十六外显子长度与其他哺乳动物不同的转录本。Wayne 等人^[12] 发现可能是第十六外显子存在模糊剪接受体位点导致其刚开始的 68 bp 在转录剪接时丢失, 产生一个编码提前终止的含有 452 个氨基酸残基的转录产物, 导致了人的迟发性耳聋, 可见这个区域的保守性和功能的重要性。我们发现在不同蝙蝠物种中也存在该外显子的长度可变性, 但对这一现象的生物学功能的理解, 还需要对蝙蝠 *EYA4* 基因做进一步的表达和功能方面的研究。

Exon a 位于 *EYA4* 基因包含起始密码子的第二外显子和第三外显子之间。对果蝇 *eya* 基因^[4, 21] 和人 *EYAI* 基因^[2] 的研究也发现有不同起始密码子的可变剪接体转录本。GenBank 转录本资料显示, 不同物种转录本 ATG 起始密码子多数位于第二外显子上, 也有在其他外显子上的, 比如人、黑猩猩和狗 (*Canis familiaris*) 都有起始密码子在第四外显子的转录本。这些说明 *EYA4* 基因不同转录本的起始密码子是不一样的。这样一来, 没有相关蛋白结构和功能的研究支持, 暂时还不能确定 exon a 是否属于蝙蝠 *EYA4* 基因的蛋白编码区序列。

Exon b 位于 *EYA4* 基因第十一外显子与第十二外显子之间。对不同哺乳动物的进化速率估算结果显示, K_a/K_s 值最大比值出现在第十一外显子的 3' 端, 说明第十一外显子的 3' 端区域是碱基替换比较频繁的地方。对第十一外显子 3' 端区域的基因突变研究发现, 该区域的

碱基突变导致非综合征听觉障碍^[13~16]。exon b 位于第十一外显子的 3' 端之后。exon b 的存在使得蝙蝠 *EYA4* 基因的结构与其他非蝙蝠哺乳动物存在差异, 可能对蝙蝠特化的听觉有一定的功能方面的贡献。

与其他哺乳动物相比, 大足鼠耳蝠的 *EYA4* 基因在 *eyaHR* 中存在第十九外显子和第二十外显子的可变剪接模式, 第十九外显子和第二十外显子长度相等, 同源性也高^[3, 12]。大足鼠耳蝠第十九外显子和第二十外显子核苷酸同源性为 69%, 氨基酸同源性为 67%; 大足鼠耳蝠与黑髯墓蝠第十九外显子核苷酸同源性为 99%, 氨基酸同源性为 100%; 大足鼠耳蝠与棕果蝠第二十外显子核苷酸同源性为 99%, 氨基酸同源性为 100%。这表明第十九外显子和第二十外显子的可变剪接尽管发生在 *eyaHR*, 但由于两个外显子的同源性和高保守性, 使得 *eyaHR* 域在整个物种进化过程中仍然保持其高度的保守性。虽然 Borsani 等^[3] 和 Zhang 等^[23] 也发现第十九外显子和第二十外显子的可变剪接体转录本, 但是具有第十九外显子或第二十外显子的不同转录本剪接体的功能仍需更多的实验工作验证。

通过 RT-PCR 技术, 得到了 3 种蝙蝠 *EYA4* 基因的 ORF 序列。Slinding wildows 分析表明, 3 种蝙蝠的 *eyaHR* 和 *eyaVR* 域与其他哺乳动物的进化保持一致。蝙蝠 *EYA4* 基因的 ORF 序列中有其他非蝙蝠哺乳动物所不具有的两个外显子 exon a 和 exon b。与其他非蝙蝠 *EYA4* 基因的 ORF 序列相比, 这 3 种蝙蝠 *EYA4* 基因的外显中均未发现第五外显子; 在棕果蝠中没有发现第二十外显子; 黑髯墓蝠缺少第十九外显子, 而且第十六外显子缺失 30 bp; 第十九外显子和第二十外显子的可变剪接模式在蝙蝠同样存在于大足鼠耳蝠中, 与以前的研究结果一致。总之, 在蝙蝠 *EYA4* 基因 ORF 的序列中发现了两个新的外显子。进化分析表明 3 种蝙蝠的 *eyaHR* 和 *eyaVR* 域与其他哺乳动物的进化速率保持一致。本工作是首次在翼手目类群研究 *EYA4* 基因, 只是研究蝙蝠 *EYA4* 基因的一个开

端,对这个基因在蝙蝠中的深入研究起到一个提示作用。

致谢 华东师范大学紫江学者张树义教授为本研究工作的开展提供了良好的平台,所有研究组成员提供了包括采样在内的诸多帮助,在此一并感谢!

参 考 文 献

- [1] Epstein J A, Neel B G. Signal transduction: an eye on organ development. *Nature*, 2003, **426**(6 964): 238~ 239.
- [2] Zimmeman J E, Bui Q T, Steingrimsón E, *et al.* Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the *Drosophila eyes absent* gene. *Genome Res*, 1997, **7**(2): 128 ~ 141.
- [3] Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, *et al.* *EYA4*, a novel vertebrate gene related to *Drosophila eyes absent*. *Hum Mol Genet*, 1999, **8**(1): 11~ 23.
- [4] Bonini N M, Leiserson W M, Benzer S. The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila eye*. *Cell*, 1993, **72**(3): 379~ 395.
- [5] Heame T A, Reshef R, Davis R J, *et al.* Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila eye* formation. *Genes Dev*, 1999, **13**(24): 3 231~ 3 243.
- [6] Ohto H, Kamada S, Tago K, *et al.* Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(10): 6 815~ 6 824.
- [7] Hanson I M. Mammalian homologues of the *Drosophila eye* specification genes. *Semin Cdl Dev Biol*, 2001, **12**(6): 475 ~ 484.
- [8] Bui Q T, Zimmeman J E, Liu H, *et al.* Molecular analysis of *Drosophila eyes absent* mutants reveals features of the conserved Eya domain. *Genetics*, 2000, **155**(2): 709~ 720.
- [9] Li X, Oghi K A, Zhang J, *et al.* Eya protein phosphatase activity regulates Six/Dach/Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*, 2003, **426**(6 964): 247 ~ 254.
- [10] Rayapureddi J P, Kattamuri C, Steinmetz B D, *et al.* Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature*, 2003, **426**(6 964): 295~ 298.
- [11] Tootle T L, Silver S J, Davies E L, *et al.* The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature*, 2003, **426**(6 964): 299~ 302.
- [12] Wayne S, Robertson N G, DeClau F, *et al.* Mutations in the transcriptional activator *EYA4* cause late onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, 2001, **10**(3): 195~ 200.
- [13] Pfister M, Toth T, Thiele H, *et al.* A 4 bp insertion in the eya homologous region (eyaHR) of *EYA4* causes hearing impairment in a Hungarian family linked to DFNA10. *Mol Med*, 2002, **8**(10): 607~ 611.
- [14] Makishima T, Madeo A C, Brewer C C, *et al.* Nonsyndromic hearing loss DFNA10 and a novel mutation of *EYA4*: Evidence for correlation of normal cardiac phenotype with truncating mutations of the Eya domain. *Am J Med Genet A*, 2007, **143**(14): 1 592~ 1 598.
- [15] Hildebrand M S, Coman D, Yang T, *et al.* A novel splice site mutation in *EYA4* causes DFNA10 hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2007, **143**(14): 1 599~ 1 604.
- [16] Schonberger J, Wang L, Shin J T, *et al.* Mutation in the transcriptional coactivator *EYA4* causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet*, 2005, **37**(4): 418 ~ 422.
- [17] Hall T A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp*, 1999, **4**: 95~ 98.
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(24): 4 876~ 4 882.
- [19] Pride D T. SWAAP Version 1.0.0 Sliding windows alignment analysis program: a tool for analyzing patterns of substitutions and similarity in multiple alignments. Distributed by the author at <http://www.bacterianuseum.org/SWAAP/SwapPage.htm>, 2000.
- [20] Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*, 1986, **3**(5): 418~ 426.
- [21] Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, *et al.* Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of *EYA1*. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**(13): 2 247~ 2 255.
- [22] Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, *et al.* *EYA4*, a novel vertebrate gene related to *Drosophila eyes absent*. *Hum Mol Genet*, 1999, **8**(1): 11~ 23.
- [23] Zhang Y, Knosp B M, Macronechie M, *et al.* A comparative study of Eya1 and Eya4 protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2004, **5**(3): 295~ 304.