

· 论著 ·

脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断结果分析

李 毅* 曾宪琪 周 慧 龙嘉欣 伍丽婷

韶关市妇幼保健院检验与遗传中心 (广东 韶关 512026)

【摘要】目的 探索SMA携带者筛查及产前诊断的临床意义。方法 运用实时荧光定量PCR技术进行SMN1基因7号外显子(E7)拷贝数缺失检测,并对结果为阳性的孕妇及其配偶进行检测,夫妇均为携带者对胎儿行产前诊断。结果 2472例孕妇共检出SMN1基因E7纯合缺失1例,携带者34例,携带率约为1.4%。SMA患者女儿诊断为杂合缺失携带者。召回配偶18例,其中1对夫妇检出均为SMN1基因E7杂合缺失,对其胎儿进行产前诊断未检测到明确致病变异。1例SMA先证者家庭再生育发现:先证者为SMN1基因E7纯合缺失,先证者母亲及父亲为SMN1基因杂合缺失,二胎进行SMA产前诊断,未检测到明确致病变异。结论 本研究通过开展孕妇携带者筛查,可为当地SMA的遗传咨询和产前诊断提供理论依据,并对高风险胎儿使用多技术平台进行产前诊断,可有效避免SMA患儿的出生,对出生缺陷防控具有重要临床指导意义。

【关键词】脊髓性肌萎缩症;携带者筛查;产前诊断;SMN1基因;杂合缺失

【中图分类号】R746

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.6.003

Analysis of Screening and Prenatal Diagnosis Results of Spinal Muscular Atrophy Carriers

LI Yi*, ZENG Xian-qi, ZHOU Hui, LONG Jia-xin, WU Li-ting.

Center for Testing and Genetics, Shaoguan Maternal and Child Health Care Hospital, Shaoguan 512026, Guangdong Province, China

Abstract: Objective To explore the clinical significance of screening and prenatal diagnosis of SMA carriers. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect copy number deletion of exon 7 (E7) of SMN1 gene, and the spouses of pregnant women with positive results were detected, and the couple were both carriers for prenatal diagnosis of the fetus. **Results** Among 2472 pregnant women, there were 1 homozygous deletion of SMN1 gene E7 copy number, 34 heterozygous deletion (carriers), with a carrying rate of about 1.4%. Daughter of SMA patients was diagnosed as carriers of heterozygosity loss. 18 spouses were recalled, among which 1 couple was found to be heterozygotic deletion of SMN1 gene E7, and no definite pathogenic variation was detected in the prenatal diagnosis of their fetuses. The family rebirth of one SMA proband found that the proband had a homozygous deletion of the SMN1 gene E7, and the mother and father of the proband had a heterozygous deletion of the SMN1 gene. The second child underwent SMA Prenatal testing, and no clear pathogenic variation was detected. **Conclusion** This study can provide theoretical basis for Genetic counseling and Prenatal testing of local SMA by carrying out carrier screening of pregnant women, and use multi technology platforms for Prenatal testing of high-risk fetuses, which can effectively avoid the birth of SMA children, and has important clinical significance for the prevention and control of birth defects.

Keywords: Spinal Muscular Atrophy, SMA Carrier Screening, Prenatal Diagnosis, SMN1 Gene, Heterozygosity Deletion

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA),一种由常染色体隐性遗传引起的神经肌肉功能障碍,主要由于运动神经元生存关键基因(survival motor neuron 1, SMN1)的缺失或变异造成^[1],该病症的显著临床表现为由脊髓前角细胞的退行性变化导致的逐步加剧的肌力减退和肌肉萎缩,这种病变常影响胸部和近端肢体,进而导致全身多系统功能障碍,严重时可能导致呼吸衰竭,最终危及生命。在中国, SMA的携带者频率大约在1/40至1/50之间^[2-3],而活产婴儿的发病率则在1/6000至1/10000的范围内,这种疾病在儿童致死性遗传病中占据首位,尤其是在两岁以下的儿童中^[4-5]。SMA是由位于5q11.2-q13.3的SMN1基因突变引起,大多数SMA患者(超过95%)的病因是SMN1基因的外显子7纯合子缺失,剩下不足5%的患者是SMN1基因微小变异^[6]。SMA的临床表现严重,根据发病年龄、肌力减退的严重程度以及患者能够实现的最大运动能力,可将其分为四个主要的临床亚型:SMA-I型(婴儿型)、SMA-II型(中间型)、SMA-III型(青少年型)和SMA-IV型(成年型)。其中,I型为最严重,通常在6个月前就会出现显著的肌力衰弱,且预期寿命中位数大约为24个月^[7-8]。

根据2012年发布的《中国出生缺陷防治报告》,每年大约有900,000例新的出生缺陷病例,我国出生缺陷的发生率为5.6%,约百分之四十的出生缺陷儿最终发展为终身残疾^[9]。鉴于此,控制和降低出生缺陷的发生率已成为“健康中国2030”计划的关键目标之一。SMA属于严重的致残致死性出生缺陷疾病, SMA

携带者无任何疾病表征,夫妻双方均为SMA携带者或有SMA先证者家庭,生育患儿风险明显增高,通过产前携带者筛查可以发现高风险妊娠并对胎儿进一步行产前诊断;在已知患有SMA的家族中,由于涉及的基因变异多样,为了确定具体的致病基因变异,进行产前诊断之前,需要对已知患者及其双亲进行遗传学预分析,以确认患者的SMN1基因变异类型。这一步骤对于制定针对性的产前诊断方案和策略至关重要,它在预防SMA患儿的出生方面发挥着关键的临床作用^[10]。

广东韶关地区暂未见发表大规模SMA筛查流调数据,包括SMA携带率、发病率及产前诊断情况,为了填补这一空白,本项研究采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术,对韶关市的2472名孕妇进行了SMN1基因第七外显子的拷贝数变异检测,旨在确立该地区人群的SMA携带率。此外,通过应用多重连接探针扩增(MLPA)技术,对双方均为SMA携带者的家庭以及已知SMA患者的家系进行了验证,以便为这些家庭提供遗传咨询和生育建议。这不仅涉及对产前诊断的指导,也包括对计划二胎家庭的遗传风险评估,从而有助于降低SMA患儿的出生风险。本研究的结果将为韶关地区的遗传咨询、遗传风险评估及优生优育实践提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 对象 2022年1月至2022年12月在韶关市妇幼保健院进行常规产检表型正常的孕妇2472例,孕周约8~22周,均无SMA生育史

【第一作者】李 毅,男,主管检验师,主要研究方向:遗传病检测。E-mail: 664249347@qq.com

【通讯作者】李 毅

和家族史。对于夫妇双方均为SMN1 E7杂合缺失的高风险妊娠,则对其胎儿进行产前诊断分析。同时,对纳入1例SMA家族史家系,其再生育胎儿使用多平台技术进行产前诊断。本研究获得医院伦理委员会批准,所有育龄人群及家属均知情同意。

1.2 试剂与仪器 见表1。

1.3 方法

1.3.1 样本收集及检测指标 所有受检者使用紫色抗凝管(EDTA-K2)采集不少于0.4mL外周静脉血,用于提取血液基因组DNA,夫妻双方均为携带者需获取胎儿绒毛/羊水穿刺样本。排除母源污染后,对胎儿行SMA产前诊断分析。

1.3.2 基因组DNA的提取 采用DNA核酸试剂提取试剂提取外周血DNA基因组。PCR扩增前,采用紫外分光光度计或核酸定量仪对模板DNA纯度和浓度进行测定。本试剂盒要求待检测基因组DNA浓度为2~180ng/ μ L,纯度(A260/A280)为1.7~2.0。

1.3.3 实时荧光定量PCR检测 采用深圳会众生物人运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒对目标基因SMN1第7外显子(E7)进行拷贝数检测。具体操作(如下表2):实时收集目标基因及内参基因的荧光信号。

1.3.4 MLPA检测 采用SALSA P060-B2 SMA MLPA KIT进行羊水/绒毛基因组DNA实验分析,验证SMN1基因E7拷贝数变异。实验步骤遵循了MLPA试剂盒的标准操作程序:DNA变性与探针杂交;连接反应;扩增;毛细管电泳;获取检测结果。

1.3.5 结果判读 通过比较 Δ Ct法进行计算及判读:SMN1为目的基因,用VIC标记探针, β -actin基因为参比基因,用CY5标记探针,ROX为参比荧光,对照样本为A对照品。按试剂说明计算SMN1拷贝数:待检样本(或对照样本)目的基因 Δ Ct=Ct目的基因-Ct参比基因;待检样本目的基因 $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct待检样本- Δ Ct对

照样本;待检样本目的基因RQ值(Expression值)= $2^{-\Delta\Delta$ Ct}。通过采用临床样本对参考区间的研究,RQ值<0.25或无RQ值为纯合缺失,RQ值为0.25~0.75为杂合缺失,RQ值参为0.75~1.25为正常。

2 结果

2.1 携带者筛查结果 纳入2472名产检孕妇中,共检出SMN1基因E7拷贝数纯合缺失1例(1/2472,0.04%),该孕妇暂无临床症状,体健。杂合缺失34例,携带频率约为1.4%(34/2472),携带者筛查和产前诊断流程及结果如图1所示。

2.2 SMA患者及其女儿验证结果 初筛到SMA患者1例,该孕妇无任何疾病临床表征,其配偶拒绝做检测,孕妇进行通过MLPA技术检测发现,SMN1基因E7纯合缺失型,SMN2基因E7拷贝数为3(图2),对已出生的女儿行MLPA技术检测和SMN1基因测序,女儿MLPA结果为SMN1基因E7杂合缺失型(图3),同时SMN1测序没有发现微小变异,目前随访显示母女身体状况正常,该患者腹中二胎未行产前诊断,继续妊娠。

2.3 SMA携带者产前诊断 在本研究中,为34名SMA携带者提供了专业的遗传咨询,其中有18例配偶自愿接受SMA筛查,召回率为52.9%。结果发现有1对夫妇同为SMA携带者,通过对其胎儿羊水行产前诊断分析,排除母源污染后,SMA分析未检测到明确致病变异(图4~图5),经遗传咨询,继续妊娠。

2.4 SMA家族史家系产前诊断 本研究纳入了1例SMA先证者家系(遗传图谱见图6),再生育指导时,取胎儿绒毛样本,经分析:先证者基因型为SMN1基因外显子7纯合缺失,夫妻双方均为SMN1基因外显子7杂合缺失。胎儿绒毛结果显示未检测到明确致病变异(图7~图8),经遗传咨询,继续妊娠。

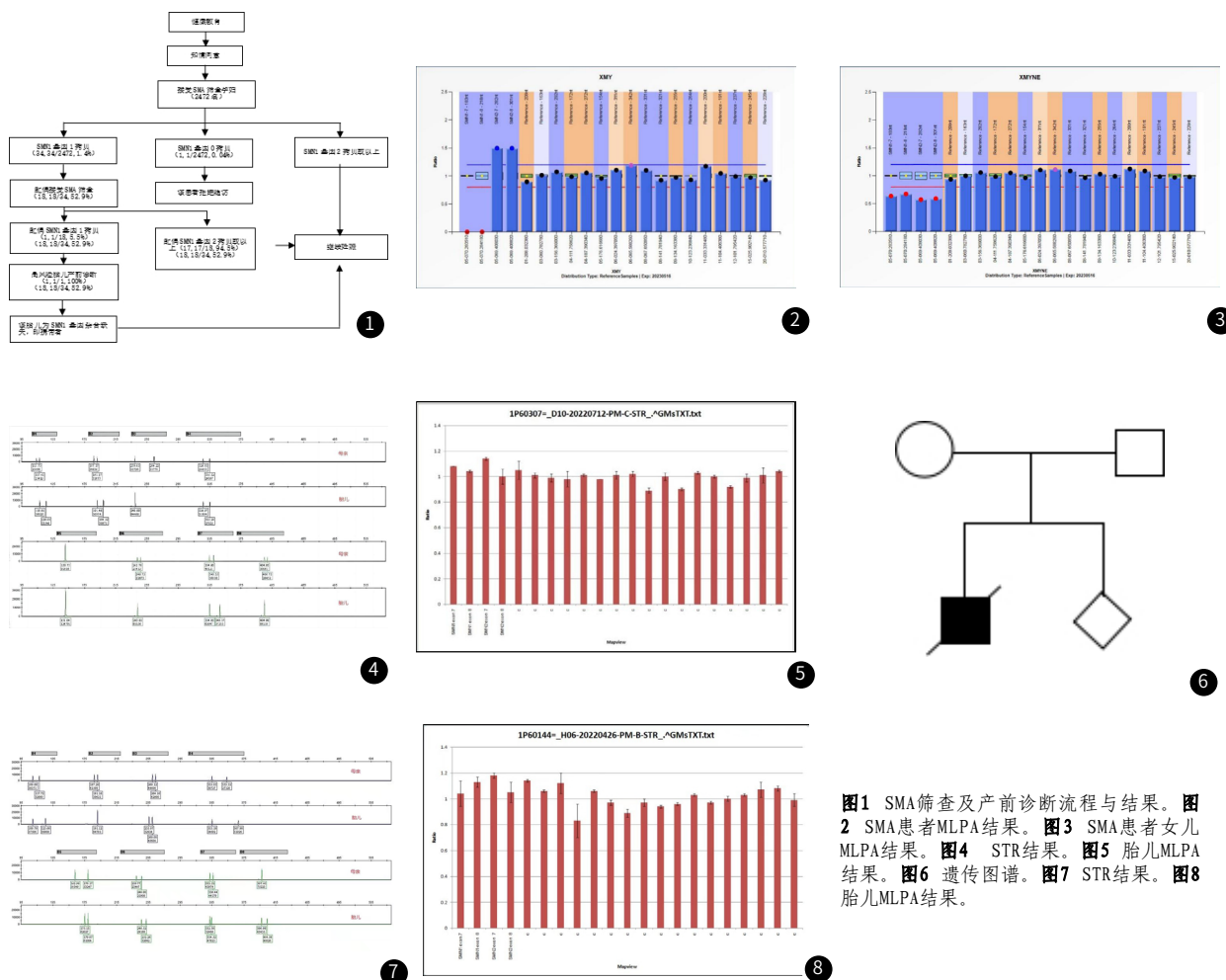


图1 SMA筛查及产前诊断流程与结果。图2 SMA患者MLPA结果。图3 SMA患者女儿MLPA结果。图4 STR结果。图5 胎儿MLPA结果。图6 遗传图谱。图7 STR结果。图8 胎儿MLPA结果。

表1

试剂与仪器	型号/备案号	生产厂家
人运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒	国械注准20223400080	深圳会众生物技术有限公司
全血基因组 DNA 提取试剂	凯普提取试剂DNA-L	凯普生物
DNA提取仪	粤潮械备20140035号	/
全自动荧光定量PCR仪	SLAN-96S	上海宏石

表2

程序	运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒(会众)		
	温度	时间	循环数
预变性	95℃	5 min	1
变性	95℃	15 s	40
退火、延时及荧光检测	60℃	35 s	40

3 讨论

孕妇进行标准的产前染色体筛查，有助于显著降低由染色体变异引起的先天性缺陷风险。尽管如此，针对脊髓性肌萎缩症(SMA)的产前检测在当前的医疗实践中并不普遍。SMA致病机理明确且人群携带频率非常高，其发病年龄早，进展快，严重致残，目前主要是通过基因修正治疗和支持治疗延缓疾病进程但无法治愈，目前临床有两款有效治疗药物(诺西那生钠，利司扑兰)，因需终生用药且十分昂贵尚不能广泛使用^[11]。因此，对产检孕妇进行SMA携带者筛查及高风险人群其胎儿行产前诊断显得尤为重要。本研究通过荧光定量PCR技术对韶关地区2472例产检孕妇进行SMN1基因外显子7拷贝数筛查，共检出SMN1基因 E7杂合缺失携带者34例，其召回配偶中杂合缺失1例，结果显示：广东韶关地区SMA的携带率为1.4%，低于中国台湾地区携带率(2.2%)^[12]、接近佛山地区携带率(1.48%)^[13]，高于广西柳州地区的携带率(1.2%)^[14]。目前SMA携带者筛查在美国、以色列及中国台湾省均列入常规筛查项目，我国大陆地区开展大规模SMA携带者筛查具备可行性，对于出生缺陷一级、二级预防具有重大的临床意义。

SMA的致病基因为SMN1，95%的SMA患者是由SMN1基因外显子 E7纯合缺失而引起的，对于SMN1基因E7拷贝数检测是关键。美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)关于SMA携带者筛查实践指南及共识均提出携带者筛查主要检测SMN1外显子7拷贝数^[15]，ACMG认为SMA满足基于人群进行遗传病筛查的要求：临床表型严重；人群携带率高；高灵敏度和特异性的检测方法；可提供产前诊断；可获取遗传咨询。因此建议进行SMA携带者筛查在备孕和已孕的女性中的推广。2020年国内专家共识^[16]指出：SMA携带者筛查目标基因针对SMN1外显子7拷贝数，在知情的条件下，首先针对育龄女性开展SMA携带者筛查；如果女性是携带者，则对其配偶进行SMA携带者筛查，或夫妻双方同时进行检测，可有效预防SMA患儿出生。多个大样本数据结果表明：通过对SMA携带者筛查对于减少SMA患儿出生几率发挥很好的临床效用^[17]。

SMN1为SMA的致病基因，其同源基因SMN2，为SMA的修饰基因，与SMN1仅5个碱基的差异。SMN1可表达100%全长有功能的SMN蛋白，而SMN2由于外显子7被选择性剪接，仅能表达10%全长有功能的SMN蛋白。SMN2是目前SMA的公认修饰基因，一般情况下，患者的SMN2拷贝数越多表型越轻，虽然其与表型的相关性不完全一致，在国内外专家指南及共识中仍将SMN2拷贝数作为SMA诊断的重要指标。本研究在携带者筛查中检出外显子7纯合缺失1例，但该孕妇暂未出现SMA临床症状，进行SMN2拷贝数检测，结果为3拷贝，其对应表型多数为II型或III型SMA，一般在幼儿或青少年时期发病，与该受检者表型存在不

符，因此仍需要继续挖掘相关原因。

对于夫妻双方均为携带者或存在SMA先证者家庭来说，在遗传咨询过程中进行细致的风险评估显得至关重要。产前检测是避免该疾病发生的关键预防措施。对胎儿进行SMN1基因的拷贝数变异分析，不仅能够促进对胎儿的早期医学诊断，而且对于遗传咨询具有重要价值。特别是对于那些有SMA患者家庭，对于防止他们再次生育出患有SMA的孩子极为关键。本项研究在促进韶关地区将SMA筛查纳入标准孕期检查流程中扮演了关键角色，能早期发现隐性基因携带者及高风险胎儿，为遗传咨询提供了坚实的科学基础，并为产前诊断工作奠定了重要前提，帮助完善本地区SMA疾病的预防体系，从而降低SMA人群的发病率。

参考文献

[1] Nicolau S, Waldrop M A, Connolly A M, et al. Spinal muscular atrophy[J]. Semin Pediatr Neurol, 2021, 37: 100878.

[2] Sheng-Yuan Z, Xiong F, Chen Y J, et al. Molecular characterization of SMN copy number derived from carrier screening and from core families with SMA in a Chinese population[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18 (9): 978-984.

[3] Feng Y, Ge X, Meng L, et al. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing[J]. Genet Med, 2017, 19 (8): 936-944.

[4] Cao Y, Qu Y, Bai J, et al. Transmission characteristics of SMN from 227 spinal muscular atrophy core families in China[J]. J Hum Genet, 2020, 65 (5): 469-473.

[5] Fang P, Li L, Zeng J, et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16 (1): 11.

[6] Arnold W D, Kassari D, Kissel J T, et al. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era[J]. Muscle Nerve, 2015, 51 (2): 157-167.

[7] Verhaart I E C, Robertson A, Wilson I J, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review[J]. Orphanet J Rare Dis, 2017, 12 (1): 124.

[8] Prior T W, Nagan N, Sugarman E A, et al. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing[J]. Genet Med, 2011, 13 (7): 686-694.

[9] 卫生部发布《中国出生缺陷防治报告(2012)》[J]. 中国药房, 2012, 23 (39): 3693.

[10] 潘建廷, 谭虎, 邹玲仟, 等. 脊髓性肌萎缩症的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020 (3): 263-268.

[11] Wurster C D, Ludolph A C, Nusinersen for spinal muscular atrophy[J]. Ther Adv Neurol Disord, 2018, 11: 1756285618754459.

[12] Su Y N, Hung C C, Lin S Y, et al. Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study[J]. PLoS One, 2011, 6 (2): e17067.

[13] 周成, 宋春林, 黄湘, 等. 广东佛山地区19297名孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30 (2): 241-245.

[14] 谭建强, 张旭, 王远流, 等. 广西柳州地区4931例孕妇脊髓性肌萎缩症突变携带者的筛查及产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35 (4): 467-470.

[15] Sasongko T H, Zilfalil B A, Zabidi-Hussin Z, et al. Deletion analysis of SMN1 exon 7 alone may be necessary and sufficient for the diagnosis of spinal muscular atrophy[J]. J Neurogenet, 2011, 25 (1-2): 15-16.

[16] 北京医学会医学遗传学分会, 北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. 中华医学杂志, 2020, 100 (40): 3130-3140.

[17] Kraszewski J N, Kay D M, Stevens C F, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state[J]. Genet Med, 2018, 20 (6): 608-613.

(收稿日期: 2023-07-25)
(校对编辑: 韩敏求)