

· 论著 · 罕见病研究 ·

脊髓性肌萎缩症新生儿筛查探索及结果分析*

令狐丹丹¹ 姜盼盼² 苏力¹ 蒋雷圆¹ 徐佳¹ 王一雯¹ 张芬霞¹ 何红琴^{1,*}

1.运城市妇幼保健院医学遗传实验室(山西运城 044000)

2.深圳爱湾医学检验实验室(广东深圳 518107)

【摘要】目的 探索SMA新生儿筛查及诊断的临床意义。**方法** 基于干血斑滤纸片,采用qPCR技术进行SMN1基因7号外显子(E7)拷贝数缺失检测,回溯新生儿干血斑滤纸片样本确诊可疑SMA患儿并指导二胎生育。**结果** 7143例新生儿检出携带者170例,携带率约为2.38%(170/7143),与已报道的携带者筛查数据相比,处于正常水平。发现1对夫妇一胎5月龄时疑似SMA死亡,再生育行基因检测均为SMN1基因E7-E8杂合缺失,一胎为SMN1基因E7纯合缺失,遗传咨询后二胎行产前诊断,未检测到SMN1基因E7-E8纯合缺失。**结论** SMA新生儿筛查可以及早发现疑似患儿,及早诊断并干预能够显著提升SMA存活率和改善运动功能发育。

【关键词】脊髓性肌萎缩症；新生儿筛查；纯合缺失

【中图分类号】R746

【文献标识码】A

【基金项目】运城市科技计划项目(YCKJ-2022081)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.9.005

Exploration and Result Analysis of Neonatal Screening for Spinal Muscular Atrophy*

LINGHU Dan-dan¹, JIANG Pan-pan², SU Li¹, JIANG Lei-yuan¹, XU Jia¹, Wang Yi-wen¹, ZHANG Fen-xia¹, HE Hong-qin^{1,*}.

1. Department of Genetics, Yuncheng Maternity and Child Health Care Hospital, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China

2. Shenzhen Aone Medical Laboratory Co., Ltd., Shenzhen 518107, Guangdong Province, China

Abstract: **Objective** To explore the clinical significance of neonatal screening and diagnosis for spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** Based on dried blood spot filter paper, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technology was used to detect the deletion of exon 7 (E7) of the SMN1 gene. Retrospective analysis was performed on dried blood spot filter paper samples from newborns to confirm suspected SMA cases and provide guidance for second-child fertility. **Results** Among 7143 newborns, 170 carriers were identified, with a carrier rate of approximately 2.38% (170/7143), which is within the normal range compared to reported carrier screening data. A couple with a suspected SMA death in their first child at 5 months of age was identified. Genetic testing of their subsequent pregnancy revealed heterozygous deletions of exons 7-8 (E7-E8) of the SMN1 gene in both parents. The first child had a homozygous deletion of exon 7 (E7) of the SMN1 gene. After genetic counseling, prenatal diagnosis was performed for the second child, and no homozygous deletion of exons 7-8 (E7-E8) of the SMN1 gene was detected. **Conclusion** Neonatal screening for SMA can enable early detection of suspected cases. Early diagnosis and intervention can significantly improve the survival rate and motor function development of SMA patients.

Keywords: Spinal Muscular Atrophy; Newborn Screening; Homozygous Deletion

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)作为2岁以内儿童首位致死性遗传病,致病基因是位于5q13.2区域的运动神经元存活基因1(SMN1, Survival Motor Neuron, NG_008691.1, OMIM 600354),该基因编码的全长SMN蛋白(NP000335.1)参与剪接体蛋白复合体的组装,是真核细胞生物生存所必需的管家蛋白,病理生理学表现为脊髓前角 α -运动神经元退行性病变和神经肌肉接头发育异常^[1-3]。其中约95%的SMA患者由于SMN1基因7号外显子纯合缺失,3~5%由于SMN1基因7号外显子杂合缺失合并另一等位基因微小突变导致^[4]。

近年来,即使筛查诊断方法(qPCR, MLPA等)和治疗药物(诺西那生钠,利司普兰,索伐瑞韦)已上市,国内外SMA诊断延迟现象依然存在,鉴于SMA自然史进展较快,诊断延迟会加重患者的疾病和经济负担,特别是SMA 1型患者^[5-6]。新生儿筛查被认为是当今国际上早期发现罕见遗传病患儿的有效措施,在降低出生缺陷的三级预防措施中,是目前预防效果

显著,成本效益最佳措施之一^[7]。本研究基于干血斑滤纸片样本,探索荧光定量PCR技术开展新生儿SMN1基因第7外显子拷贝数变异检测的技术体系,为本地区建立SMA早期识别、精准诊治到长程管理的全病程诊疗生态环境奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2023年4月至2024年5月在运城市妇幼保健院进行疾病筛查的新生儿及1对可疑SMA异常生育史的夫妇,且夫妻双方二胎已孕13周+。受检对象均获得监护人或本人知情同意,研究已获得医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 人运动神经元存活基因1(SMN1)检测试剂盒(PCR-荧光探针法,深圳会众生物技术有限公司),恒温混匀仪(加热型)(MB-102,杭州瑞诚仪器有限公司),核酸提取试剂(SMA-V-F,深圳会众生物技术有限公司),全自动核酸提取仪(HZ-96Z,深圳会众生物技术有限公司),全自动医用PCR分析

【第一作者】令狐丹丹,女,副主任医师,主要研究方向:遗传代谢病、产前诊断。E-mail: 593746365@qq.com

姜盼盼,男,助理研究员,主要研究方向:罕见病分子遗传。E-mail: jiangpanpan@aonebio.com.cn

14 · 【通讯作者】何红琴,女,主任医师,主要研究方向:遗传代谢病、遗传咨询。E-mail: ycsxszx@163.com

系统(SLAN-96S, 上海宏石), 枪头、离心管、八联管、离心管架、75%消毒酒精、一次性滤纸等。

1.3 方法

1.3.1 样本收集及检测类型 新生儿受检者使用干血斑标本行SMA新生儿筛查。可疑SMA患儿生育史夫妻双方使用外周血行SMA携带者筛查。胎儿羊水穿刺样本, 排除母源污染后, 对胎儿行SMA产前诊断。

1.3.2 核酸提取及检测 使用核酸提取试剂盒及全自动核酸提取仪从干血斑样本中提取高质量DNA, 操作严格按照试剂盒说明书进行。参照说明书使用超微量分光光度计检测DNA浓度和纯度。SMN1检测试剂盒基因组DNA要求浓度为2~180ng/ul, 纯度(A260/A280)为1.7~2.0。

1.3.3 实时荧光定量PCR检测 采用SMN1检测试剂盒对SMN1基因第7外显子(E7)拷贝数进行检测, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行, 其中报告基因为VIC、CY5;淬灭基因为NFQ-MGB、BHQ3, 内控为 β -actin基因, 参比荧光为ROX, 参比样本为A对照品。PCR扩增条件为: UNG酶反应1min(循环数1); 95°C预变性5min(循环数1); 95°C变性15s, 60°C退火延伸及荧光信号收集35s(循环数40)。

1.3.4 MLPA检测 采用SALSA[®]MLPA[®] Probemix P060-B2 SMA Carrier 试剂盒进行羊水/绒毛基因组DNA实验分析, 验证SMN1基因拷贝数变异。按照MLPA试剂盒检测流程进行操作: 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 RQ值计算方法及参考区间: 待检样本(或对照样本)目的基因 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参比基因}}$; 待检样本目的基因 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{待检样本}} - \Delta Ct_{\text{对照样本}}$; 待检样本目的基因RQ值(Expression值) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。当基因存在0个拷贝(即SMA纯合缺失型)其RQ值(Expression值)参考区间<0.25或无RQ值(Expression值), 当基因存在1个拷贝(即SMA杂合缺失型)其RQ

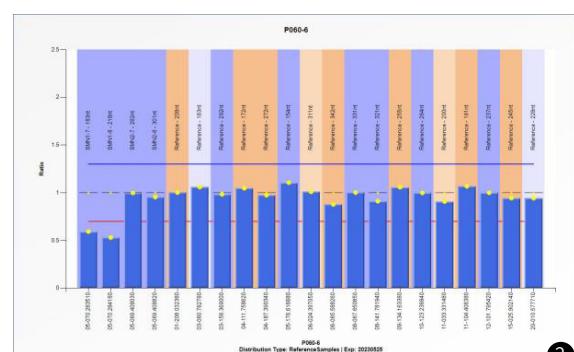
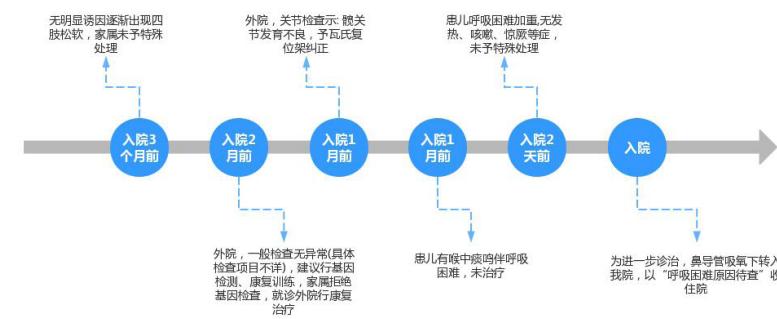
值(Expression值)参考区间为0.25~0.75, 当基因存在2个拷贝(即正常型)其RQ值(Expression值)参考区间为0.75~1.25。

2 结果

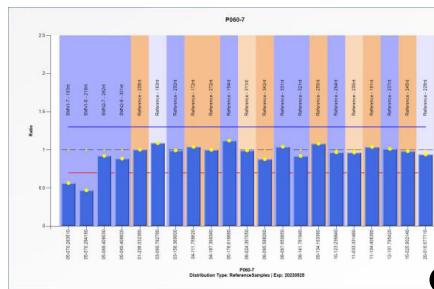
2.1 新生儿筛查结果 7143名新生儿筛出SMN1基因E7拷贝数杂合缺失170例, 携带频率约为2.38%(170/7143), 各县市筛查结果如表1所示。与国内已报到的携带者筛查数据相比较, 运城地区携带率处于正常范围。见表2。

2.2 干血斑滤纸片标本确诊1例SMA可疑患儿 患儿, 女, 2019年6月23日出生, 出生史正常(40周顺产), 出生体重2.9kg。因“四肢松软3月, 呼吸困难1月, 加重2天”于2019年11月14日11:15入院, 入院时4月龄。患儿于2019年11月24日因呼吸困难, 患儿死亡。喂养史为混合喂养, 发育史明显落后于正常同龄儿, 预防接种史:乙肝疫苗、卡介苗。既往史:平素较差, 易呛奶, 不能抬头, 无乙肝、结核等传染病接触史, 无过敏史, 无外伤, 无手术史, 无输血史。家族史:父母非近亲结婚, 父母体健, 无遗传病(图1)。

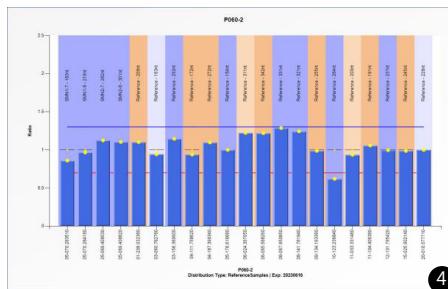
实验室qPCR检测提示第1胎为SMA(图5), 且夫妻双方二胎已孕13周+, 多重连接探针扩增反应技术(MLPA)结合毛细管电泳方法检测发现夫妻双方均为SMN1基因E7-E8杂合缺失型携带者, 见表3, 图2和图3, 有25%的几率生出SMA患儿。遗传咨询后行产前诊断, 羊水检测结果显示胎儿SMN基因E7-E8未见异常, 见表3, 图4, 将来发展为SMN1基因E7-E8纯合缺失型SMA患者的可能性小, 为SMN1基因E7-E8杂合缺失型SMA携带者的可能性小但不排除为[2+0]型SMA携带者的可能。至此, 依据夫妻双方二胎家族史, 建议行SMA携带者检测, 发现二者均为SMN1杂合缺失型, 使用留存干血斑滤纸片标本确诊一胎为SMA患儿, 遗传咨询后行产前诊断, 排除二胎SMA高风险。



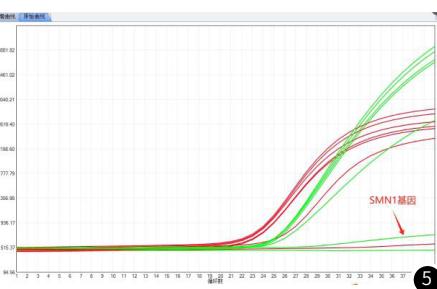
1



3



4



2

3

4

5

图1 一胎患儿病史。图2 母亲MLPA检测。图3 父亲MLPA检测。图4 二胎羊水MLPA检测。图5 一胎qPCR检测。

表1 各地区杂合缺失携带情况

2023年04月至2024年5月

区县	筛查总人数	正常型人数	杂合缺失型人数	携带率
市妇幼	277	273	4	1.44%
盐湖区	393	378	15	3.82%
永济	819	798	21	2.56%
临猗	1089	1063	25	2.30%
万荣	519	508	11	2.12%
垣曲	280	275	5	1.79%
芮城	540	526	14	2.59%
夏县	209	204	5	2.39%
平陆	35	35	0	0.00%
绛县	405	395	9	2.22%
闻喜	1510	1477	33	2.19%
新绛	892	866	26	2.91%
稷山	98	97	1	1.02%
河津	77	76	1	1.30%
合计	7143	6971	170	2.38%

表3 父母双方及产前诊断检测

检测位点	母亲	父亲	二胎胎儿
	实际/正常拷贝数	实际/正常拷贝数	实际/正常拷贝数
SMN1基因E7	杂合缺失(1/2)	杂合缺失(1/2)	未见异常(2/2)
SMN1基因E8	杂合缺失(1/2)	杂合缺失(1/2)	未见异常(2/2)
SMN2基因E7	未见异常(2/2)	未见异常(2/2)	未见异常(2/2)
SMN2基因E8	未见异常(2/2)	未见异常(2/2)	未见异常(2/2)

表2 国内已报道SMA携带率

地区	筛查人群	筛查时间范围	筛查		
			总人数	携带人数	携带率(%)
甘肃	育龄妇女	2020年1月至2023年3月	39647	726	1.83%
甘肃	孕妇	2020年6月至2022年6月	13022	236	1.81%
广东东莞	育龄人群	2020年3月至2022年8月	35145	635	1.81%
广东佛山	孕妇	2020年1月至2021年6月	19297	286	1.48%
广东江门	育龄妇女	2016年12月至2021年8月	14378	251	1.75%
广东茂名	育龄妇女	2020年5月至2021年8月	1898	49	2.58%
广东深圳	育龄妇女	2019年至2022年	22913	389	1.70%
广东深圳	育龄妇女	2018年4月至2022年3月	3162	66	2.09%
广西柳州	孕妇	2013年至2014年	4931	61	1.24%
贵州贵阳	孕妇	2018年1月至2018年12月	524	12	2.29%
河北	孕妇	2018年1月至2019年12月	4568	126	2.76%
湖北武汉	育龄妇女	2018年3月至2022年2月	18818	336	1.79%
江苏常州	育龄妇女	2019年7月至2021年6月	5302	89	1.68%
江苏连云港	孕妇	2020年1月至2022年6月	1266	25	1.97%
江苏南京	孕妇	2017年7月至2019年6月	13069	231	1.77%
江苏南京	孕妇	2019年8月至2020年7月	5776	100	1.73%
江苏盐城	孕妇	2020年10月至2022年12月	8185	127	1.55%
江苏盐城	孕妇	2020年10月至2022年2月	4429	73	1.65%
江西萍乡	孕妇	2022年1月至2023年5月	1741	46	2.64%
内蒙呼和浩特	新生儿	2021年全年	3233	37	1.14%
陕西西安	孕妇	2017年2月至2019年2月	6616	126	1.90%
上海	孕妇	/	1741	45	2.58%
四川南充	育龄人群	2019年12月至2022年10月	4508	70	1.55%
台湾	孕妇	2005年1月至2009年6月	107611	2262	2.10%
新疆	孕妇	2020年4月至2023年2月	3302	58	1.76%
新疆乌鲁木齐	育龄妇女	2020年1月至2023年7月	7158	117	1.63%
云南	育龄人群	2015年5月至2016年5月	3049	62	2.03%
浙江金华	育龄妇女	2016年10月至2020年9月	742	18	2.43%

注: 文献复习近年来已发表的携带者筛查文献, 例如^[8-9]。

3 讨 论

开展SMA新生儿筛查可促使患儿治疗窗口期提前,早发现、早诊断、早治疗对改善患儿预后具有积极的作用^[10]。但针对我国分娩新生儿开展SMA疾病筛查还存在较多问题。

新生儿疾病筛查项目增加,采血压力也随之增大。新生儿疾病筛查一般要求在新生儿分娩后24~72小时内完成血液样本采集,并制成干血片送往实验室进行检测,但刚分娩新生儿作为特殊群体,血管细小,采血困难,目前已经开展的新生儿遗传代谢病需要采集4个直径8mm干血片、新生儿耳聋基因筛查需要采集3个直径8mm干血片,已经给医护人员的采血工作带来一定困难,再增加采血项目势必让采血工作更加艰难,同时也可能降低新生儿家属对SMA筛查的接受度。我国有实验室研究结果表明,1个直径4mm的滤纸干血片即可用于SMA基因筛查,这在很大程度上减轻了新生儿筛查样本采集的压力^[11]。

采用滤纸干血片样本开展SMA基因检测,新生儿筛查质量控制面临新的挑战。干血斑样本在核酸提取和基因拷贝数定量分析方面,相比全血样本都存在更多的问题和困难,为了解目前我国实验室SMA基因检测的开展情况,评价实验室基于干血斑样本进行新生儿SMA基因检测水平和能力,并为建立全国新生儿SMA基因检测室间质量评价(external quality assessment, EQA)提供参考数据及前期准备,NCCL于2022年组织开展了两次新生儿SMA基因检测室间质量调查活动^[12]。我国逐步开展SMA新生儿筛查后,室间质量评价项目也亟待实施。

SMN2基因不同拷贝数的患儿临床决策意见不一致。SMN2是SMA修饰基因,患者携带SMN2拷贝数越多,表型通常也越轻,因此SMN2拷贝数在临幊上被用于临床分型和治疗策略的评估。在早期的专家共识中,专家组在SMN2基因4拷贝患者是否应当马上治疗的问题上存在争议,但一致建议对于超过4拷贝的患者不应立即进行治疗,而应在首次出现症状时进行仔细筛查^[13]。基于以上共识,澳大利亚早期新生儿SMA筛查流程中,满足SMN1基因7号外显子纯合缺失且SMN2基因拷贝数≤3条件的新生儿为才会报告为SMA筛查阳性^[14];加拿大则对4拷贝的患者采取延迟治疗的策略,同时将SMN1基因7号外显子拷贝数为0且携带5或更多SMN2基因拷贝的新生儿划分为SMA阴性^[15]。2020年,专家组根据临幊实践达成了新的共识,建议对4拷贝的患者立刻进行治疗^[16]。目前,针对SMN1基因7号外显子拷贝数为0但SMN2基因不同拷贝数的患儿临幊决策意见存在不一致,需要进一步深入研究。

尽管新生儿SMA筛查在美国、澳大利亚、法国等国家已经实施,并证实了其技术可行性,但这些国家经济发达,基因检测技术起步较早,在实施SMA筛查方面具有一定的优势。我国作为人口大国,面临人口分布分散,公众对SMA认知程度

不一,医疗资源相对紧张,专家资源分布不均,以及基因检测技术起步较晚等挑战。这些因素使得在我国大规模推广新生儿SMA筛查项目存在一定的困难。如何基于我国国情来建立切实可行的SMA新生儿筛查模式有待进一步探讨。

参考文献

- [1]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.
- [2]叶文宏,汪苍,于根建,等.儿童进行性肌营养不良的临床及MRI表现特征[J].中国CT和MRI杂志,2017,15(3):141-144.
- [3]应伟峰,陈穹,张莹,等.BOLD-MRI时间信号强度曲线评估肌肉萎缩侧索硬化症的感觉神经损害[J].中国CT和MRI杂志,2022,20(6):8-11.
- [4]中国研究型医院学会神经科学专业委员会,中国出生缺陷干预救助基金会神经与肌肉疾病防控专项基金组织专家组.脊髓性肌萎缩症新生儿筛查专家共识(2023版)[J].中华医学杂志,2023(27).
- [5]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.
- [6]吴莉萍,高玲亮,杨江涛,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.
- [7]吴莉萍,高玲亮,杨江涛,等.滤纸干血斑用于脊髓性肌萎缩症基因筛查方法的建立[J].罕少疾病杂志,2022(9):029.
- [8]Wang W, Wu L, Hui Y, et al. Results of a pilot external quality assessment scheme for genetic testing of newborns with spinal muscular atrophy[J]. Clin Lab, 2024, 70(5).
- [9]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.
- [10]吴莉萍,高玲亮,杨江涛,等.滤纸干血斑用于脊髓性肌萎缩症基因筛查方法的建立[J].罕少疾病杂志,2022(9):029.
- [11]Glascock J, Sampson J, Connolly AM, et al. Revised recommendations for the treatment of infants diagnosed with spinal muscular atrophy via newborn screening who have 4 copies of SMN2[J/OL]. Journal of Neuromuscular Diseases, 2020, 7(2): 97-100.
- [12]Kariyawasam D S T, Russell J S, Wiley V, et al. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience[J]. Genetics in Medicine, 2020, 22(3):557-565.
- [13]McMillan H J, Kernohan K D, Yeh E, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy: ontario testing and follow-up recommendations[J]. Canadian Journal of Neurological Sciences, 2020: 1-8.
- [14]Kraszewski J N, Kay DM, Stevens CF, 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.
- [15]北京医学会罕见病分会,北京医学会医学遗传学分会,北京医学会神经病学分会神经肌肉病学组,等.脊髓性肌萎缩症多学科管理专家共识[J].中华医学杂志,2019,99(19):1460-1467.
- [16]Kraszewski J N, Kay DM, Stevens CF, 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: 2024-06-29)

(校对编辑: 翁佳鸿、赵望淇)