

# 脊髓性肌萎缩症携带者产前筛查的几种实用技术

李吉明\* 邢清和

(上海市妇幼保健中心, 上海 200062)

**【摘要】** 脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是仅次于囊性纤维病的第二常见的常染色体遗传病, 中国人群中携带 SMA 致病突变的几率为 1/84~1/54。目前, SMA 仍缺乏有效的治疗手段, 属于致残性疾病, 进行人群中 SMA 致病突变携带者筛查, 通过对高危人群进行产前筛查和遗传咨询, 减少 SMA 患儿的出生, 是目前干预 SMA 行之有效的方法。SMA 突变的检测方法有多种, 各有特点, 本文对最常用的几种 SMA 携带者筛查技术进行综述, 希望能为脊髓性肌萎缩携带者筛查提供帮助。

**【关键词】** 产前筛查; 脊髓性肌萎缩; 单基因

**【中图分类号】** R714.55 **【文献标识码】** A

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是发病率居于第二位的严重染色体隐性遗传病, 仅次于囊性纤维病, 属于遗传运动神经元病, 病理机制主要是通过脊髓前角细胞的变性, 导致对称性近端肌肉无力<sup>[1]</sup>。

SMA 由 Guido Werdnig 首次报道于 1891 年, 具有明显的表型异质性, 根据发病年龄不同, SMA 被分为 5 种亚型<sup>[2]</sup>, 其中 O 型为婴儿型, 呼吸衰竭是早期关注点, 一般存活不超过 6 个月。I 型、II 型和 III 型均为儿童型, I 型为严重型, 也最常见, 占 SMA 患者 45%, 多数由于 SMN1 基因同源缺失引起, 一般患儿在出生后 6 个月内发病, 2 岁前因呼吸衰竭死亡。II 型为中度型, 约占患者中 20%, II 型患者 6~18 个月内患病, 存活在 2 年以上; 大约 30% 患者为 III 型, 轻度型, 18 岁内患病, 预后良好, 可长期存活。II、III 型 SMA 几乎是由于 SMN1 至 SMN2 的基因转化所致, 故轻型 SMA 患者携带有较多的 SMN2 拷贝<sup>[3,4]</sup>。IV 型为成人型, 发病年龄多在 18 岁及以上, 约占 5%, 发病缓慢、肢体近端无

力逐渐加重、肌肉萎缩, 可伴肌束震颤, 本型预后良好, 基本不影响寿命。

遗传流行病学研究显示, 人群中 SMA 致病突变的携带者频率高达 1/54<sup>[5]</sup>~1/40<sup>[6]</sup>。基于我国人群的大样本量研究显示, 我国人群中 SMA 致病突变的携带者频率和世界平均水平近似, 介于 1/54<sup>[7]</sup>和 1/84<sup>[8]</sup>之间, 以此估算, 每 10 000~25 000 新生儿中就有 1 人患病。由于遗传学检测技术的快速发展, 各种 SMA 的检测方法也快速涌现, 基于人群的 SMA 致病突变筛查已在多个国家开展, 本文仅对常用的脊髓性肌萎缩症携带者筛查方法, 希望为后续大规模做筛查提供借鉴。

## 1 SMA 的遗传学机制

1995 年, Lefebvre 等<sup>[9]</sup>确定运动神经元存活基因(SMN)是 SMA 的致病基因, SMN 位于染色体 5q11.2-q13.3, 编码全长 294 个氨基酸、分子量为 38kDa 的蛋白质, 物种间高度保守, 全身组织普遍表达, 在脊髓运动神经元中 SMN 表达丰度最高<sup>[10]</sup>。SMN 基因包含 2 个高度同源的反向基因: 近端粒的 SMN1 或 SMN<sub>t</sub>(OMIM # 600354)和近着丝粒的 SMN2 或 SMN<sub>c</sub>(OMIM # 601627)。SMN1 和 SMN2 序列只有 5 个核苷酸差异, 一个在内含子 6,

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.02.013

基金项目: 上海市妇女儿童健康服务能力规划项目—上海市妇幼保健机构能级提升项目(004041); 上海市妇幼健康协同创新中心筹建项目(004040)

\* 通信作者: 李吉明, E-mail: lijiming@shmchc.cn

一个在外显子7,内含子7中有2个,外显子8中有1个<sup>[11]</sup>。7号外显子840位置的转换(C→T)是一个重要功能突变,该突变是SMN1和SMN2编码序列唯一的突变,携带该突变的SMN2只能产生野生型水平的约10%的完整蛋白,且稳定性较差,功能下调,而SMN1是产生SMN完整功能蛋白的主要基因<sup>[12]</sup>。SMN1突变可导致SMA表型,突变的主要形式是SMN1部分外显子缺失或是基因全长缺失,而SMN2拷贝数数量则和SMA的严重程度有关<sup>[13]</sup>。NAIP的拷贝数与SMA严重性也有一定关联,NAIP基因拷贝数变化可以影响SMA病情严重程度<sup>[14]</sup>。

SMN1基因第7、8外显子(E7、E8)是突变热点,目前认为在超过95%的I~III型<sup>[15]</sup>SMA患者中存在SMN1基因纯合缺失,具体表现为SMN1 E7、E8序列同时缺失,或仅有SMN1 E7序列缺失,只有约5%的患者是由SMN1发生其他微小突变、杂合缺失或SMN1向SMN2转化导致的SMN1缺失<sup>[16,17]</sup>。

## 2 携带者类型

SMN1野生型为双拷贝,但也有人为不同程度的拷贝数重复,拷贝数可从重复一次到几次不等<sup>[18]</sup>。SMA纯合缺失的患者SMN1拷贝数为0。

SMA携带者主要有4种基因型:SMN1基因在一条染色体上的顺式重复和反式缺失的复合体“2+0”型<sup>[19]</sup>;2条同源染色体上,1条染色体上有1拷贝野生型的SMN1基因,另1条缺失SMN1基因的为“1+0”型;1条染色体上有1拷贝SMN1基因,另1条SMN2基因发生微小突变的“1+1m”型;1条染色体上有2拷贝SMN1基因,另1条SMN1基因发生突变的“2+1m”型;“1+0”型携带者最常见,约占95%,其他约占5%<sup>[20]</sup>。因而对SMN1拷贝数进行检测,就可以筛查出大部分SMN1拷贝数为1的携带者和拷贝数为2以上的健康人。因而通过检测SMN1拷贝数可筛查区分健康者和携带者。

SMA携带者没有任何临床表现,如果父亲和母亲均是携带者,则后代有25%的概率获得2个有缺陷的基因拷贝而显示SMA表型。

## 3 脊髓性肌萎缩症携带者常用筛查方法

3.1 多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) MLPA是Schouten等于2002年发明的一项基因诊断新技术,主要用于基因片段缺失/重复、染色体非整倍体等的检测,可检测出基因纯合缺失、杂合缺失和拷贝数增加等基因拷贝数量的变化<sup>[21]</sup>。

MLPA检测包含靶向SMA基因关键区域的多个探针,特异性探针与SMN1、SMN2基因杂交后进行扩增,根据扩增产物和参照序列的比值,评价SMN1和SMN2的拷贝数。无论是SMN1纯合或杂合缺失还是向SMN2的转化都可检测,筛查结果可靠,已被许多国家管理部门批准用于临床检测。MLPA检测基本步骤如下,经过DNA变性、探针杂交、连接和荧光引物PCR扩增,进行片段分离和数据分析,整个过程耗时24h左右。

丁宇等<sup>[22]</sup>通过对3名疑似患者和其父母外周血标本,提取基因组DNA,应用MLPA试剂盒进行分析,MLPA图谱可直观显示SMN1基因与SMN2基因信号峰值的变化。将每个样本中每对探针产物峰的相对峰面积,再除以标准对照样本中相对应的产物峰的中位值,即得到比值,也就是该序列的相对拷贝数,最后校正后得到绝对拷贝数。结果不仅诊断出患儿SMN1基因的7号和8号外显子的拷贝数皆为0,为纯合缺失,同时也检测出3例患儿父母SMN1基因的7号和8号外显子的拷贝数属于1拷贝范围,属于杂合缺失的携带者。

罗福薇等<sup>[23]</sup>使用MLPA方法对15例患者的父母都检测出外显子7和外显子8杂合缺失,同时检测的44例无SMA家族史的健康成人,未发现SMN1基因外显子7和8的缺失,很好地证实了MLPA对SMA携带者的筛查作用。

但MLPA对杂质污染极其敏感,在制备样品和操作该技术时需要非常小心,虽然最低20ng DNA可用于检测,但是100~200ng DNA模板是临床检测推荐的模板量<sup>[24]</sup>。

3.2 PCR-变性高效液相色谱(PCR-denaturing high performance liquid chromatography, PCR-

DHPLC) DHPLC是一种新的高通量筛选DNA序列变异的新技术,这一技术最先由美国Stanford大学Oefner及Underhill等于1995年报道,其特点是高通量、自动化程度高、灵敏度及特异度均较高,更适合大片段DNA的筛查,检测快速,价格相对低廉,检测结果以图表显示,方便判断<sup>[25]</sup>。

PCR-DHPLC已经成为了SMA筛查的主流方法,龚波等<sup>[26]</sup>和谭建强等<sup>[8]</sup>都用此方法做了大规模携带者筛查。主要都是应用多重PCR结合DHPLC进行SMN1和SMN2基因拷贝数的检测,首先通过PCR扩增目标基因,再采用DHPLC半定量方法检测。PCR-DHPLC图形前2个峰是内参峰,后2个峰是SMN2、SMN1,待测样本SMN1、SMN2拷贝数通过和正常对照结果的比较计算得出,筛查出SMN1拷贝数为1的脊髓性肌萎缩症携带者。

3.3 荧光定量PCR 荧光定量PCR又称qPCR,是一项常见分子生物学实验技术。对核酸进行定量分析,应用广泛,用于检测基因的表达量。可对片段的拷贝数变异(copy number variation, CNV)进行分析,对基因进行分型,对DNA要求低,适用于组织、新鲜血液DNA样本和干血斑DNA样本<sup>[27]</sup>。其原理为通过监控反应体系中荧光强度的变化,记录检测荧光达到阈值时的循环数(Ct值)。理论上说,起始模板量和Ct值密切相关,因此我们通过判读Ct值对样本进行定量。

任晨春等<sup>[28]</sup>对临床确诊为SMA的5例患儿及其父母同时用定量荧光聚合酶链反应(quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR)方法检测,4例患儿SMN1的E7、E8均表现为纯合缺失,其父母都表现为SMN1 E7、E8均杂合缺失的携带者。1例检测出SMN1 E7纯合缺失, E8杂合缺失的患者,其母亲检测出基因型为SMN1 E7、E8的杂合缺失,父亲仅表现为SMN1基因E7的杂合缺失, E8无缺失改变。QF-PCR方法与MLPA法检测的结果比对,完全一致。

荧光定量PCR对于SMN1基因的检测,主要是比较标本中SMN1基因与健康对照的相对量以推定其拷贝数,所以采用无需标准品的相对定量方

法。由于缺失1个SMN1基因模板与野生型之间基因的拷贝数差异仅为1倍,体现在Ct值上的变化非常小,所以每次检测标本时一般同时检测3例健康对照标本,通过公式计算得到目的基因相对参比基因的拷贝数。这种目的基因相对定量模式,无需制备标准曲线,可灵敏地检测出基因拷贝数的差异<sup>[29]</sup>。

目前国内已经有几家公司的荧光定量检测试剂盒已经取得了CFDA的证书,检测方便,通过荧光定量PCR扩增就可检测,通过标准化判读,总共2~3h内完成实验,得到结果。

3.4 微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR) 数字PCR(digital PCR, dPCR)是新型分子诊断技术,通过有限稀释将样本分到许多独立的区室,每个区室最多包含1个拷贝的PCR模板,大多数区室并不包含PCR模板分子。PCR反应时,多个区室同时平行独立扩增。扩增完成,通过荧光信号的有无,计数阴性和阳性区室的数量,可实现绝对定量。现已在遗传病分子诊断中使用,可准确检测0~3拷贝的SMN1基因和0~5拷贝的SMN2基因。dPCR方法非特异性扩增多,检测SMN1和SMN2基因拷贝数CV值优于TaqMan探针法qPCR技术检测的CV值<sup>[30]</sup>。

Vidal-Folch等<sup>[4]</sup>用ddPCR方法检测干血斑样本,通过特殊设计的引物和探针,不仅能筛查SMA携带者,还能筛查出一定的SMN1“2+0”基因型。

dPCR对DNA要求低,干血斑就能检测,拷贝数检测准确,不易被PCR反应抑制剂所干扰。同时检测成本和其他方法相当。

## 4 总结

脊髓性肌萎缩作为常染色体隐性遗传病,人群携带率较高,父母双方都是携带者,生育患儿的概率有25%,50%可能会生育携带SMA致病基因的子女。临床上还没有行之有效的治疗方法,支具或矫形器进行干预可延缓疾病进展,相关药物直到2019年2月底,用于治疗5q SMA的反义寡核苷酸药物诺西那生钠注射液(Nusinersen,曾用名IONIS-SMNRX,商品名Spinraza)在我国获批,虽然上市后

国内 SMA 患者无药可用的局面被打破,但普通患者家庭能否承担药物费用仍存疑问,且需反复鞘内注射,终身用药且费用昂贵<sup>[31]</sup>。

产前筛查利用分子遗传筛查技术,可以从源头降低脊髓性肌萎缩的患儿出生,是一种经济有效的出生缺陷控制方法。可行的筛查方式是对备孕妇女进行携带者筛查,如判断为携带者,则对其配偶进行携带者筛查,如果夫妻双方均为携带者,则需在妊娠时进行产前诊断,根据诊断结果配合遗传咨询采取临床干预措施,防止受检者生出 SMA 患儿。

MLPA 分析作为 SMA 分子诊断的金标准技术,诊断性高,但是仪器大型,实验室配置不普遍,且运行易受杂质干扰、操作复杂且耗时长。PCR-DHPLC 技术敏感度高,特异性好,成本低廉,是目前大规模人群样本筛查常用的技术。荧光定量 PCR 检测技术,所需荧光定量 PCR 仪器,实验室配置比较普遍,实验数据判别方便,同时试剂有 CFDA 证书。荧光定量 PCR 技术成本低、灵敏度高、检测结果准确可靠,同时操作简单,实验步骤少,无需开盖检测等特点,可作为新型大规模筛查方法。ddPCR 属于绝对定量,拥有高灵敏度、高准确性,实验过程不易被 PCR 反应抑制剂干扰,对 DNA 要求低,干血斑就能检测,作为携带者筛查,未来有很大的利用空间。

对于不同样本类型检测方面,荧光定量 PCR 和 ddPCR 可以使用干燥血斑 DNA 进行检查,但是有发现干燥血斑 DNA 是单链的、高度碎片化的,并且容易被 RNA 污染,不太可能支持精确测定拷贝数。所以有条件建议用新鲜血液 DNA 进行携带者筛查,以得到更准确的结果<sup>[32]</sup>。

上述的这些筛查技术还存在一些弊端,会漏检约 5% 的特殊突变携带者,如“2+0”型、“2+1m”型、“1+1m”基因型。后续提高筛查准确率,进一步全部筛查出所有携带者还是需要解决的问题。

另外如何宣传和推广 SMA 基因筛查也是个社会问题。只有多方努力,加强宣传力度,提高认知率,同时筛查做到检出率高,结果准确,价格合适,大众才能更好地接受检测,从而让 SMA 携带者筛查得到更大的普及,降低 SMA 的患病率。

## 参 考 文 献

- [1] 贺林. 常见出生缺陷产前诊断的行业规范与指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 83.
- [2] KOLB SJ, KISSEL JT. Spinal Muscular Atrophy[J]. *Neurol Clin*, 2015, 33(4): 832-834.
- [3] DAVID ARNOLD W, KASSAR D, KISSEL JT. Spinal Muscular Atrophy: Diagnosis and Management in a New Therapeutic Era[J]. *Muscle Nerve*, 2015, 51(2): 159-161.
- [4] 张云茜, 章印红. 脊髓性肌萎缩症的研究进展[J]. *重庆医学*, 2014, 43(12): 1521.
- [5] SUGARMAN EA, NAGAN N, ZHU H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72400 specimens [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2012, 20(1): 27-31.
- [6] VIDAL-FOLCH N, GAVRILOV D, RAYMOND K, et al. Multiplex Droplet Digital PCR Method Applicable to Newborn Screening, Carrier Status, and Assessment of Spinal Muscular Atrophy [J]. *Clinical Chemistry*, 2018, 64(12): 1753-1761.
- [7] 徐盈, 黎昱, 宋婷婷, 等. 6616 例脊髓性肌萎缩症携带者筛查及高风险胎儿产前诊断分析[J]. *实用妇产科杂志*, 2020, 36(1): 42-46.
- [8] 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): 467-469.
- [9] LEFEBVRE S, BURGLIN L, REBOULLET S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. *Cell*, 1995, 80: 155-165.
- [10] 卢丽萍, 麻宏伟. 脊髓性肌萎缩临床分型的分子遗传学研究进展[J]. *国外医学遗传学分册*, 2004, 27(4): 215.
- [11] QU YJ, DU J, LI EZ, et al. Subtle mutations in the SMN1 gene in Chinese patients with SMA: p. Arg288Met mutation causing SMN1 transcript exclusion of exon7[J]. *BMC Medical Genetics*, 2012, 13: 86.
- [12] 王倩, 安宇, 周水珍, 等. 脊髓性肌萎缩症 SMN1 和 SMN2 基因拷贝数变异分析[J]. *中国循证儿科杂志*, 2013, 8(3): 216-218.
- [13] 王旻晋, 王军, 白梦鸽, 等. 中国西南地区汉族脊肌萎缩症患者 SMA 相关基因分子特征[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(6): 936-940.
- [14] 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.
- [15] 章印红, 张云茜, 朱宝生, 等. 脊髓性肌萎缩症患儿 SMN1 和 SMN2 基因拷贝数与临床表型的相关性分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(3): 239-243.
- [16] 刘维亮, 李芳, 麻宏伟, 等. 中国脊髓性肌萎缩症患儿的 SMN 基因学研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(7): 539-543.

- [17] 徐燕,陈颖伟. 脊肌萎缩症的产前诊断与干预[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(10): 998.
- [18] 曲晓星,肖冰,季星,等. 应用荧光定量 PCR 开展上海地区脊肌萎缩症携带者的人群筛查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 1-4.
- [19] 黄色新,高选,邹洋,等. 一例 SMN1 基因型疑为“2+0”型脊肌萎缩症家系的确认[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(10): 37-39.
- [20] 曾光群,杨季云,张丁丁,等. 脊髓性肌萎缩症 2 个核心家系 SMN1 基因分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(23): 1-2.
- [21] 孙婧婧,杨永臣,陆燕芬,等. 儿童脊肌萎缩症的基因诊断[J]. 海南医学, 2019, 30(4): 413-415.
- [22] 丁宇,余永国,叶晓来,等. 多重连接依赖性探针扩增方法在脊髓性肌肉萎缩症基因诊断中的应用[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(11): 1001-1005.
- [23] 罗福薇,吴维青,王辉,等. 多重连接依赖性探针扩增技术在脊肌萎缩症诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(7): 14-16.
- [24] STUPPIA L, ANTONUCCI I, PALKA G, et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(3): 3245-3276.
- [25] 李莉,王翀,陈瑶生. DHPLC 系统工作原理及其应用[J]. 生物技术通报, 2006, S1: 120-124.
- [26] 龚波,章莉,侯雅萍,等. 上海地区 4719 名孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(6): 670-672.
- [27] TAYLOR JL, LEE FK, YAZDANPANAHI GK, et al. Newborn blood spot screening test using multiplexed real-time PCR to simultaneously screen for spinal muscular atrophy and severe combined immunodeficiency [J]. Clin Chem, 2015, 61(2): 412-419.
- [28] 任晨春,郭东花,梁玥宏,等. 荧光定量 PCR 检测脊肌萎缩症家系中的 SMN1 基因[J]. 职业与健康, 2019, 35(13): 1765-1769.
- [29] 邓坤仪,彭建明,范汉恭,等. 荧光定量 PCR 快速筛查脊髓性肌肉萎缩症 SMN1 致病基因携带者[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(21): 2983-2984.
- [30] 傅启华,郑昭璟. 数字 PCR 技术在遗传病无创产前诊断中的应用[J]. 中华医学检验杂志, 2016, 39: 145-149.
- [31] 利婧,张成. 脊髓性肌萎缩症治疗临床研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(6): 386-390.
- [32] SHINOHARA M, ROCHMAH MA, NAKANISHI K, et al. New, improved version of the mCOP-PCR screening system for detection of spinal muscular atrophy gene (SMN1) deletion[J]. Kobe J Med Sci, 2017, 30(2): E37-E40.

(收稿日期:2020-09-25)

编辑:宋文颖