

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.06.012

❖ 临床研究 ❖

南充地区脊髓性肌萎缩症携带者筛查及高风险胎儿产前诊断分析

陈丽平¹, 何勇均¹, 蔡燕¹, 石琪²

(川北医学院附属医院, 1. 遗传与产前诊断中心; 2. 妇产科, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 分析南充地区脊髓性肌萎缩症(SMA)携带者筛查及高风险胎儿产前诊断。**方法:** 选取4 325例定期产检且因不良妊娠史就医的育龄期女性及183名配偶为研究对象。采用荧光定量聚合酶链式反应(QF-PCR)法检测运动神经元存活基因1(SMN1)7号外显子(E7)的拷贝数。E7拷贝数1为携带者,对夫妻双方均是SMA携带者应用多重连接探针扩增技术(MLPA)验证胎儿SMN1基因拷贝数变异。**结果:** 共检测到SMA携带者70例,携带率为1/64.4,其中E7和8号外显子(E8)双位点杂合缺失的64例(1/70.4),E7位点杂合缺失6例(1/751.3)。对夫妻双方均为杂合性缺失胎儿基因检测发现,胎儿SMN1基因为0个拷贝数,运动神经元存活基因2(SMN2)为3个拷贝数,最终通过遗传咨询预防了SMA患儿的出生。**结论:** 南充地区SMA的携带率为1/64.4,QF-PCR检测结合MLPA家系验证,并对高风险胎儿进行产前诊断,对减少SMA患儿的出生具有重要诊断价值,对本地区出生缺陷防控有重要的意义。

【关键词】 脊髓性肌萎缩症;SMN1基因;南充地区;基因筛查

【中图分类号】 R394.3 **【文献标志码】** A

Carrier screening of spinal muscular atrophy and prenatal diagnosis of high-risk fetus in Nanchong area

CHEN Li-ping¹, HE Yong-yun¹, CAI Yan¹, SHI Qi²

(1. Center for Genetics and Prenatal Diagnosis; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To analyze the carrying rate of spinal muscular atrophy (SMA) and prenatal diagnosis of high-risk fetus in Nanchong area. **Methods:** 4,325 women of childbearing age who underwent regular prenatal examinations and sought medical attention due to adverse pregnancy history and 183 spouses were selected as the research subjects. The copy number of exon 7 of survival motor neuron (SMN1) gene was detected by real-time fluorescence PCR (QF-PCR), E7 copy number 1 was carrier, the SMN1 gene copy number variation of fetal was verified by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method. **Results:** A total of 70 SMA carriers were detected in this study, with a carrying rate of 1/64.4, among which 64 cases (1/70.4) were heterozygote missing at E7 and E8, and 6 cases (1/751.3) were heterozygote missing at E7. Detection of SMN1 gene in a fetus with loss of heterozygosity in both husband and wife and it was found that the fetus had 0 copies of SMN1 gene and 3 copies of SMN2 gene. Finally, genetic counseling was used to prevent the birth of SMA children. **Conclusion:** The carrying rate of SMA in Nanchong area is 1/64.4, QF-PCR detection combined with MLPA for family verification of SMA patients and prenatal diagnosis of high-risk fetuses have important diagnostic value for reducing the birth of SMA children and for the prevention and control of birth defects in this region.

【Key words】 SMA; SMN1 gene; Nanchong area; Genetic screening

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种严重的常染色体隐性遗传性神经肌肉疾病,主要是位于5q13.2区域的运动神经元存活基因1(survival motor neuron, SMN1)致病性变异所致,当SMN1基因第7或第7、8外显子发生纯合缺失或点突变时引起SMN蛋白表达缺失,造成脊髓前角α运

动神经元变性,导致近端肢体和躯干进行性、对称性肌无力和肌萎缩^[1]。该病在新生儿中的发病率约为1/10 000^[2],携带者频率为1/50~1/40。儿童型SMA(1~3型)的患病率为2.78~6.56人/10万人^[3],其中4型SMA患病率约为0.32人/10万人^[4]。SMA居<2岁儿童致死性遗传病首位,其中

基金项目: 吴阶平医学基金会项目(320.6750.2020-06-53)

作者简介: 陈丽平(1983-),女,硕士,副主任医师。E-mail:465008934@qq.com

通讯作者: 石琪。E-mail: Adastone1975@163.com

累及呼吸系统导致的呼吸衰竭是最常见的致死原因^[5]。中国人群中携带者频率约为 1/42^[6],但是各地区尚无发病率的确切数据。

SMA 临床表现严重,人群中的携带率较高,且致病基因明确,2008 年美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)^[7]建议无论地域种族,应该对所有育龄人群进行 SMA 携带者筛查。目前已报道的 SMA 携带者筛查技术众多,根据 SMA 致病基因的特点,对 SMN1 基因外显子 7、8 缺失进行检测,已经成为 SMA 携带者筛查的首选方法^[8]。目前尚无关于南充地区人群的 SMA 携带率的相关研究,本研究从此角度出发,采用多重连接依赖性探针扩增(MLPA)技术和荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)技术对南充地区 4 325 例因不良妊娠史就医的育龄期女性及 183 名配偶的 SMN1 基因进行检测,调查 SMA 携带率,为本地区的 SMA 的筛查及孕妇的产前诊断提供一定的指导。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 12 月至 2022 年 10 月川北医学院附属医院收治的 4 325 例定期产检且因不良妊娠史就医的育龄期女性及 183 名配偶为研究对象,其中孕妇年龄(29.35 ± 2.17)岁;孕周 9 ~ 20 周。本研究获得医院伦理委员会的批准,所有纳入的研究对象均进行检测前沟通,取得研究对象的知情同意并签署相关知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有受检者均进行外周静脉血采集 2 mL,采集后的血液进行 EDTA 抗凝,于 4 °C 的环境中保存,对采集的血液样本均在 1 周内完成基因检测。

1.2.2 DNA 提取 采用达安基因 NP986-C 系统进行外周血核酸的提取,采用 NanoDropOne 超微量生物检测仪进行 DNA 浓度检测。

1.2.3 基因检测 采用荧光定量 PCR 法对 SMN1 基因进行检测,检测试剂盒购自上海五色石公司,操作方案严格按照试剂盒说明书进行。PCR 扩增条件为:95 °C 预变性(10 min)→95 °C 变性(15 s)→58 °C 退火延伸(60 s),共 40 个循环。采用 FAM 及 VIC 通道进行信号采集。若检测孕妇为 SMA 携带者,则对其配偶进行样本采集及检测,配偶检测方法同上。若配偶检出为 SMA 携带者,则进行胎儿的基因检测,经夫妇双方知情同意后,于妊娠的 16 ~ 22 周进行经腹壁羊膜腔穿刺术(B 超引导下),用一次性无菌注射器缓慢抽取孕妇羊水 10 mL,利用购自

荷兰 MRC-Holland 公司的 MLPA P060 试剂盒(SAL-SA MLPA Kit P060-B2)经变性、杂交、连接以及扩增后,产物通过 ABI3500 基因分析仪(ThermFisher,美国)检测,验证 SMN1 基因拷贝数变异,数据使用 Coffalyser V8.0 软件分析。

2 结果

本研究纳入 4 508 例研究对象(育龄女性 4 325 例及部分女性的配偶 183 例),共检测到 SMA 携带者 70 例,携带率为 1/64.4,其中 E7 和 E8 双位点杂合缺失的 64 例(1/70.4),E7 位点杂合缺失 6 例(1/751.3)。对夫妻双方均为杂合性缺失胎儿的基因检测发现其为 SMN1 基因 E7 位点纯合缺失。基因拷贝数变异检测发现,胎儿 SMN1 基因为 0 个拷贝数,SMN2 基因为 3 个拷贝数。将胎儿预后详细告知胎儿父母后,胎儿父母决定终止妊娠。见图 1。

3 讨论

SMA 是遗传性神经肌肉疾病的一种,主要因为脊髓前角细胞和低位脑干运动神经核团变性,导致不同程度的肌张力降低、肌萎缩,严重时影响呼吸肌危及生命。该病常呈家族性,从胎儿期到成人不同年龄均可发病,且治疗方法有限,预后通常不佳。SMA 治疗的研究领域近年来发展迅速,部分相关治疗药物已经成功获批上市,如索伐瑞韦、利司扑兰、诺西那生等^[9],可从不同方面提高全长 SMN 蛋白水平,其他治疗方式(如神经保护治疗、SMN 修饰基因治疗、肌肉激活治疗、干细胞治疗等)也相继取得了进展。上述治疗给 SMA 患儿带来了希望,但早诊断、早治疗极其重要^[10]。目前药物必须依靠进口,售价高昂,普通家庭难以承担,因此,利用先进的技术对孕妇 SMA 携带率的筛查,预防 SMA 患儿的出生,是一种经济且有效的 SMA 防治方法,对减轻家庭的经济负担和社会的负担均有较好的价值。

对育龄期女性 SMA 携带情况进行筛查属于一级预防,不仅能避免 SMA 患儿的出生,而且还能够提高我国新生儿的人口质量。台湾地区在 2005 至 2009 年共计检测了 10 万余例孕妇,其中共检测出 SMA 携带者 2 262 例,携带率约为 1:48^[11];2013 年我国上海地区同样对 4 719 例孕妇进行了筛查,SMA 携带率约为 1:52^[12];随后相继有广西、云南及陕西地区报道了关于本地区的 SMA 筛查结果,其中以广西地区的携带率较低,约为 1:81^[13]。目前尚无南充市及周边地区关于 SMA 携带率的研究,本研究纳入 4 508 例研究对象(孕妇 4 325 例及部分配偶 183 例),共检测到 SMA 携带者 70 例,携带率为

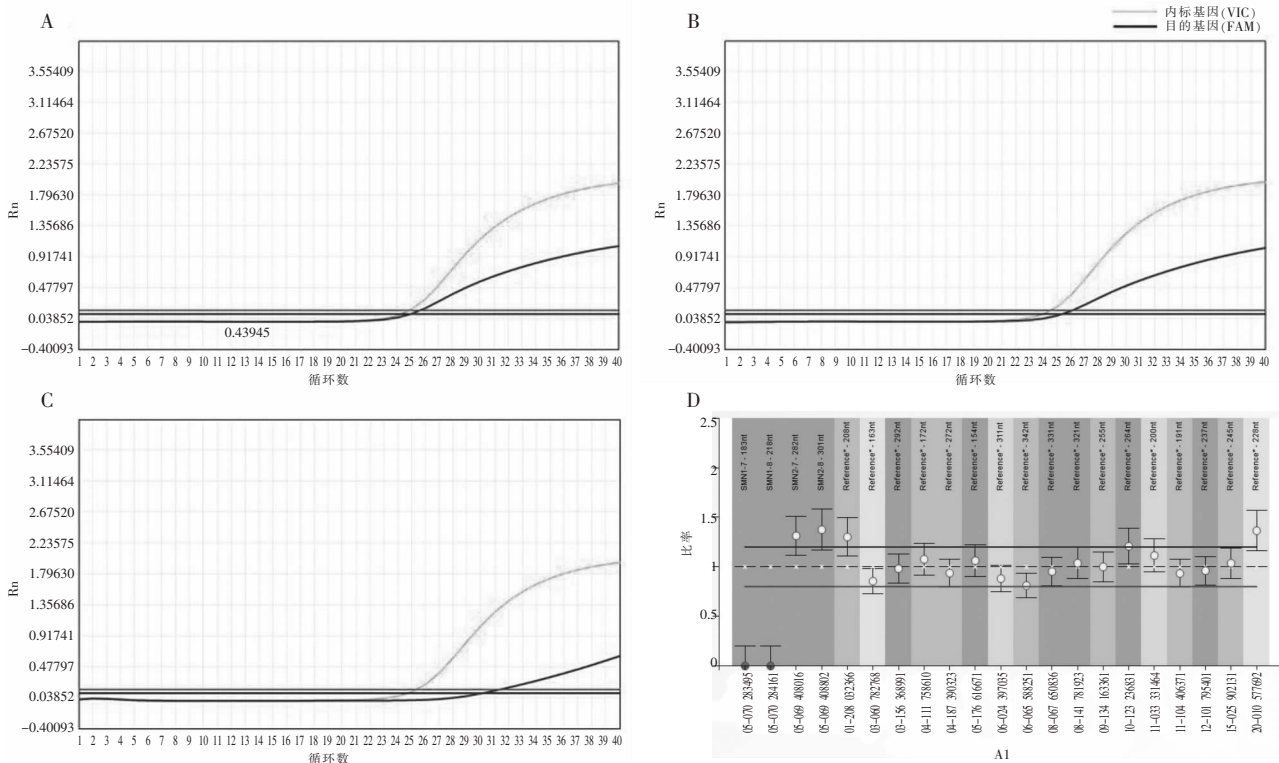


图1 SMN1 基因拷贝数变异检测

A. SMN1 基因 7 号外显子双拷贝;B. SMN1 基因 7 号外显子杂合缺失;C. SMN1 基因 7 号外显子纯合性缺失;D. MLPA 检测 SMN1 基因拷贝数变异。

1/64.4,其中 E7 和 E8 双位点杂合缺失的 64 例(1/70.4),E7 位点杂合缺失 6 例(1/751.3),基本符合当前我国的 SMA 携带者的流行病学调查结果。同时对夫妇均为 SMA 携带者的胎儿基因检测发现其为 SMN1 基因 E7 位点纯合缺失。MLPA 技术检测发现,胎儿 SMN1 基因为 0 拷贝,SMN2 基因为 3 个拷贝数,最终通过遗传咨询预防 SMA 患儿的出生。

SMA 患儿的父母多为 SMN1 单拷贝携带者,但也约有 4% 的 SMA 携带者为两个 SMN1 拷贝位于同一染色体上,这种“2+0”型携带者目前缺少准确的检测技术,需要联合 SMA 患者父母的 SMN1 基因拷贝数和家族史调查来进行诊断评估。同时,现阶段对于家庭中有“2+0”类型携带者的夫妻,其再发风险和产前诊断策略缺少准确的检测技术,对于“2+0”类型携带者进行病例筛查与遗传咨询尤为关键^[14]。目前临床上常用的技术是 MLPA 和荧光定量 PCR,但因各自的缺点限制了其在大规模筛查中的应用。已有大量的研究数据表明,高通量测序(NGS)可以直接计算 SMN1 拷贝数,但筛查或诊断 SMN1 微小变异仍存在很大困难,目前在我国尚未成为 SMA 的常规检测方法。数字 PCR(dPCR)法、高分辨率熔解分析法等新兴技术方法在临床 SMA

携带者筛查中有巨大的潜力。但由于 dPCR 法不能检测出 SMN1 基因内点突变以及沉默的 SMA 携带者(2+0),未来需要研究开发可以检测单核苷酸变化的 dPCR 技术,以适用于大规模的筛查^[15]。

综上,本研究初步确定了南充地区 SMA 的携带率,同时对同为 SMA 携带者夫妻的胎儿进行了 SMN1 基因的检测,最终确定为 SMA 患儿并避免了此例患儿的出生,减轻了家庭及社会的负担。本研究也存在有一定的缺陷,如样本数目少,样本中配偶人数偏少,未进行 SMN2 基因的检测,因此可能会对本研究的结论造成一定的影响,后续有待研究的进一步完善。

参考文献

- [1] Ruhno C, Megovern VL, Avenarius MR, *et al.* Complete sequencing of the SMN2 gene in SMA patients detects SMN gene deletion junctions and variants in SMN2 that modify the SMA phenotype [J]. *Human Genetics*, 2019, 138(3): 241-256.
- [2] Baumbach-Reardon L, Hunter JM, Ahearn ME, *et al.* Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy [J]. *American Journal of Medical Genetics*, 2002, 110(4): 301-307.

(下转第 788 页)