

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.05.020

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221109.1313.006.html\(2022-11-09\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221109.1313.006.html(2022-11-09))

盐城地区 4 429 例孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断*

张庆娥^{1,2}, 郑建丽², 李敏², 董晶晶², 周月云², 刘建兵², 胡苏玮^{3△}

(1. 扬州大学, 江苏扬州 225002; 2. 江苏省盐城市妇幼保健院产前诊断中心 224001;

3. 扬州大学医学院附属扬州市妇幼保健院医学遗传中心, 江苏扬州 225002)

[摘要] **目的** 对盐城地区孕妇进行脊髓性肌萎缩症(SMA)携带者筛查,并对携带者夫妇的胎儿行产前诊断,探讨该地区 SMA 携带者的携带频率及临床意义。**方法** 选取 2020 年 10 月至 2022 年 2 月盐城市妇幼保健院产前诊断中心就诊的 33 560 例表型正常的孕妇为研究对象。运用荧光定量 PCR 检测运动神经元存活基因 1(SMN1)第 7、8 外显子(E7、E8)拷贝数,筛出 SMA 携带者夫妇。然后通过多重连接依赖探针扩增技术(MLPA)对其胎儿进行产前诊断。**结果** 33 560 例孕妇中 4 429 例自愿接受携带者筛查,接受率约为 13.2%。4 429 例孕妇中共筛查到携带 SMN1 基因 E7 单拷贝或 E7 和 E8 单拷贝 73 例,其中 67 例 E7 和 E8 单拷贝,6 例单纯 E7 单拷贝,携带频率 1/61。73 例携带者经过遗传咨询,60 例配偶接受 SMA 筛查,结果提示 2 对夫妇同时为 SMA 携带者,并对 2 例高风险胎儿行产前诊断,最终提示 SMN1 基因 E7 和 E8 双拷贝胎儿 1 例(正常),继续妊娠;SMN1 基因 E7 和 E8 零拷贝胎儿 1 例(SMA 患儿),终止妊娠。**结论** 通过筛查明确了盐城地区人群的 SMA 突变的携带频率,联合运用 MLPA 对高危胎儿行产前诊断,可避免 SMA 患儿出生。

[关键词] 脊髓性肌萎缩症;荧光定量 PCR;SMN1 基因;携带者筛查;产前诊断**[中图分类号]** R715.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)05-0734-03

Carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy of 4 429 pregnant women in Yancheng area*

ZHANG Qing'e^{1,2}, ZHENG Jianli², LI Min², DONG Jingjing²,
ZHOU Yueyun², LIU Jianbing², HU Suwei^{3△}

(1. Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225002, China; 2. Department of Prenatal Diagnosis, Yancheng Maternal and Child Health Hospital, Yancheng, Jiangsu 224001, China; 3. Department of Medical Genetic, Yangzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated Yangzhou University Medical College, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

[Abstract] **Objective** To screen the carriers of spinal muscular atrophy (SMA) of 4 429 pregnant women in Yancheng area, and prenatal diagnosis was performed on the fetus of the carrier couple, so as to explore the carrying frequency of SMA and the clinical significance. **Methods** A total of 33 560 pregnant women with normal phenotype were selected from Prenatal Diagnosis Department of Yancheng Maternal and Child Health Hospital from October 2020 to February 2022. The copy numbers of exons seven and eight (E7 and E8) in motor neuron survival gene 1 (SMN1) were detected by fluorescence quantitative PCR, and couples of SMA carriers were screened out. Fetuses of both carriers were performed on prenatal diagnose by multiple connection dependent probe amplification (MLPA). **Results** There were 33 560 pregnant women received SMA carrier screening education, of whom 4 429 pregnant women accepted carrier screening voluntarily, and the acceptance rate was about 13.2%. Of the 4 429 pregnant women, 73 cases were screened to carry E7 single copy or E7 and E8 single copy of SMN1 gene, including 67 cases with E7 and E8 single copy and six cases with E7 single copy only. The carrier rate was 1/61. After genetic counseling, 60 spouses accepted the screen for SMA. The results showed that two couples were both SMA carriers, and prenatal diagnosis was implemented on the two high-risk fetuses. Finally, it was suggested that one fetus with double copies of SMN1 gene E7 and E8 (normal) continued the pregnancy. One case of fetus with zero copies of SMN1 gene E7 and E8 (child with

* 基金项目:江苏省盐城市医学科技发展计划项目(YK2021054)。 作者简介:张庆娥(1986—),主治医师,在读硕士,主要从事产前筛查和产前诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: husuwei2004@126.com。

SMA), termination of pregnancy. **Conclusion** The frequency of SMA mutation in Yancheng population was determined by screening, and combining use of MLPA for prenatal diagnosis in high-risk fetuses can avoid the birth of SMA children.

[Key words] spinal muscular atrophy; fluorescence quantitative PCR; SMN1 gene; carrier screening; prenatal diagnosis

脊髓性肌萎缩症(SMA)是一种常染色体隐性遗传性疾病,其特征是脊髓前角细胞和脑干运动性脑神经核的运动神经元进行性退变。该病的临床表现主要为进行性对称性肌无力和肌肉萎缩。临床症状在近端比远端更严重,下肢比上肢更严重^[1]。该病可分为4型:急性婴儿I型、慢性婴儿II型、青少年III型和成人IV型。该病在人群中的发病率为1/6 000~1/10 000,致病性突变的携带频率为1/60~1/40^[2]。SMA在儿童致死性常染色体遗传病中排名第二,约80%的患儿在4岁前死亡。

据研究,SMA是由位于5号染色体上的运动神经元存活基因1(SMN1)突变引起的。95%~98%为SMN1第7、8外显子(E7、E8)缺失,包括E7、E8杂合缺失或仅E7纯合缺失,SMN1点突变比例为2%~5%^[3-4]。因此,针对SMN1基因E7和E8的拷贝数检测已成为目前筛查SMA携带者的常用方法。鉴于该病致死率极高,致病基因明确,且人群中携带者频率比较高,2008年美国医学遗传学会就提倡对所有育龄夫妇提供SMA筛查。若夫妻双方均为携带者,可进行产前诊断判断胎儿是否为SMA患儿。本研究采用荧光定量PCR技术对盐城地区孕妇进行SMA携带者筛查,对于高危胎儿,结合多重连接依赖探针扩增技术(MLPA)进行产前诊断,可以有效阻止SMA患儿的出生,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年10月至2022年2月盐城市妇幼保健院产前诊断中心就诊的33 560例表型正常的孕妇为研究对象。所有孕妇进行SMA携带者筛查的宣教,其中自愿接受SMA携带者筛查4 429例,接受率约13.2%。孕妇年龄18~45岁,平均(27.9±4.7)岁;孕周11~20周,平均(15.5±2.9)周,且否认SMA家族史和生育史。本研究获得医院伦理委员会审查和批准,且接受携带者筛查的孕妇均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取

参与筛查的孕妇用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集外周静脉血2 mL,应用DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取外周血DNA,测定浓度调整至10~20 ng/ μ L。参加产前诊断的孕妇采集羊

水10 mL,应用微量DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取羊水基因组DNA。

1.2.2 荧光定量PCR检测

本研究应用SMN1外显子缺失检测试剂盒(上海五色石医学科技有限公司)采用化学阻断法阻断SMN2,对提取到的基因组DNA先进行SMN1基因E7/E8扩增,再对拷贝数进行分析计算。按照试剂盒套组说明书操作:取出试剂盒,将试剂盒平衡至室温,根据当次实验所进行的反应数(标本DNA、1个空白对照、1个缺失对照及3个梯度正常对照)计算并移取相应试剂,按照试剂盒方案配制反应体系,按照以下条件进行PCR扩增,实时收集荧光信号,记录并计算实验结果。

1.2.3 MLPA

应用MLPA P460试剂盒(荷兰MRC公司)来验证SMN1的E7和E8拷贝数变异的情况。MLPA P460试剂盒中探针包括SMN1和SMN2基因E7和E8。按操作流程DNA经过变性、探针杂交、连接反应和扩增后,得到的扩增产物通过ABI3500毛细管电泳,所得数据用Coffalyser V8.0软件分析。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数或百分率表示。

2 结果

2.1 SMA携带者筛查结果

盐城地区孕产妇的SMA携带频率为1/61,即61例孕妇中有1例SMA携带者。73例携带者接受了遗传咨询,60例配偶(82.2%)接受了SMA筛查,结果显示2对夫妇同时为SMA携带者,见表1。

表1 SMA携带者筛查结果(n)

SMN1 E7 拷贝数	SMN1 E8 拷贝数		
	单拷贝	双拷贝	合计
单拷贝	67	6	73
双拷贝	21	4 335	4 356
合计	88	4 341	4 429

2.2 产前诊断结果

2例高风险孕妇运用MLPA行产前诊断,最终提示1例胎儿为SMN1基因E7/E8双拷贝,即正常,孕妇继续妊娠;另1例胎儿为SMN1基因E7/E8零拷贝,即SMA患者,孕妇终止妊娠。

3 讨 论

SMA 是一种致死性神经系统性疾病,主要表现为对称性肌无力和肌萎缩,患者最终将死于呼吸衰竭和严重的肺部感染。治疗 SMA 的药物目前只有诺西那生钠、索伐瑞韦和利司扑兰 3 种。虽然这些药物的上市给 SMA 患者带来了希望,但价格非常昂贵,普通家庭无法承受。因此,通过携带者筛查和产前诊断技术来避免 SMA 患儿的出生,是一种经济有效的预防该病的方法。

2007 年,美国部分州即开始对新生儿和产前遗传咨询的妇女提供 SMA 筛查。2017 年,美国妇产科学会便倡导对所有计划妊娠或者已经妊娠者进行 SMA 筛查^[5-6]。在中东,以色列于 2008 年引入 SMA 筛查,于 2013 年扩大到全部人口^[7-8]。2005—2009 年,我国台湾地区有超过 10 万例孕妇进行了 SMA 携带者筛查^[9]。本研究对 33 560 例孕妇进行 SMA 筛查的宣教,其中 4 429 例孕妇自愿接受 SMA 筛查,接受率约 13.2%。而张菁菁等^[10]报道南京地区 16 549 例孕妇有 34.9%进行了筛查。分析盐城地区人群接受程度较低的原因主要与人们对于 SMA 不了解和经济条件相关。因此,需要加强对孕妇进行 SMA 筛查知识的宣教,借助政府机构的相关政策的支持,将会提高接受 SMA 筛查的人群比例。

研究表明,SMA 的携带频率为 1/60~1/40。本研究通过对盐城地区 4 429 例孕妇进行 SMA 携带者筛查,共发现 73 例为 SMA 携带者,携带者频率为 1/61。据报道,以色列和澳大利亚的携带率分别为 1/60 和 1/50^[8,11],我国上海地区的携带者频率为 1/52^[12],云南地区的携带者频率为 1/49^[13],本研究与前述报道较一致。此外,虽然 SMN1 基因 E7/E8 的缺失突变占 SMN1 的 95%~98%,但当检测阴性时,只能排除 SMN1 基因 E7 和 E8 的缺失突变,不能排除 SMN1 基因其他区域的点突变,以及一条 5 号染色体上有 2 个 SMN1 基因、另一条 5 号染色体上的 SMN1 基因 E7 和(或)E8 缺失^[14]。故本地区 SMA 的携带率应略高于 1/61,该项研究为本地区进行此项筛查提供了数据支撑,便于临床医生对孕妇进行宣教和遗传咨询。

SMA 属于单基因遗传病,具有亲代向子代传递的特性,对于既往有过 SMA 患儿生育史的妇女或 SMA 基因携带者夫妇,其妊娠的胎儿患 SMA 的风险为 25%,应进行 SMA 的产前诊断。目前,SMA 的产前诊断方法主要对绒毛、羊水或脐血等标本运用限制性片段长度 PCR、MLPA、荧光定量 PCR、变性高效液相色谱和测序等分子生物学技术进行检测。张柳娟等^[15]于 2016 年通过 MLPA 诊断出 3 例胎儿均为

SMN1 E7 和 E8 杂合缺失。徐晨阳等^[16]于 2017 年对 14 个 SMA 家系进行 MLPA 检测,发现正常胎儿 6 例,携带者 7 例,SMA 患者 3 例。本研究 73 例孕妇携带者中 60 例配偶接受 SMA 筛查,2 对夫妇同时为 SMA 携带者,并对 2 例高风险孕妇采集羊水通过 MLPA 行产前诊断,最终提示 1 例胎儿为 SMN1 基因 E7/E8 双拷贝(正常),另 1 例胎儿为 SMN1 基因 E7/E8 零拷贝(SMA 患儿)。此外,因为 SMN2 基因为 SMN1 调节基因,其拷贝数与 SMA 的病情严重程度呈反比,所以在检测羊水时都检测了 SMN2 基因作为参考。本研究中 1 例胎儿为 SMA 患者,SMN2 基因的 E7/E8 均为 3 拷贝,但预测其出生后的临床表型介于 II 型和 III 型之间,仍然非常严重。该夫妇经遗传咨询后选择终止妊娠。

综上所述,鉴于 SMA 疾病的严重程度、人群的高携带频率和治疗费用昂贵的现状,针对育龄人群的携带者筛查显得尤为重要。在临床工作和科普活动中需要加大对育龄人群的宣教,进行规范化的遗传咨询及必要的生育指导,从而避免 SMA 患儿的出生,为社会和家庭减轻负担,从而提高出生人口质量。

参考文献

- [1] QU Y J, BAI J L, CAO Y Y, et al. Mutation spectrum of the survival of motor neuron 1 and functional analysis of variants in Chinese Spinal Muscular Atrophy[J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(5):741-752.
- [2] 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.
- [3] ROSS L F, KWON J M. Spinal muscular atrophy: past, present, and future[J]. *Neo Reviews*, 2019, 20(8):e437-451.
- [4] ARNOLD E S, FISCHBECK K H. Spinal muscular atrophy[J]. *Handb Clin Neurol*, 2018, 148:591-601.
- [5] ROUZIER C, CHAUSSENOT A, PAQUIS-FLUCKLINGER V. Molecular diagnosis and genetic counseling for spinal muscular atrophy (SMA)[J]. *Arch Pediatr*, 2020, 27(7S):9-14.
- [6] Committee opinion No. 691: carrier screening for genetic conditions[J]. *Obstet Gynecol*, 2017, 129(3):e41-55. (下转第 741 页)

tol, 2019, 50(2):91-103.

- [13] WANG S M, LIU G Q, XIAN H B, et al. Lnc RNA NEAT1 alleviates sepsis-induced myocardial injury by regulating the TLR2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11):4898-4907.
- [14] BI C F, LIU J, YANG L S, et al. Research progress on the mechanism of sepsis induced myocardial injury [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15:4275-4290.
- [15] KHALID N, PATEL P D, ALGHAREEB R, et al. The effect of sepsis on myocardial function: a review of pathophysiology, diagnostic criteria, and treatment [J]. *Cureus*, 2022, 14(6):e26178.
- [16] BELMADANI S, MATROUGUI K. Role of high mobility group box 1 in cardiovascular diseases [J]. *Inflammation*, 2022, 45(5):1864-1874.
- [17] 江文科, 程卓, 李锦良, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清 HMGB1、cTn I、BNP、hs-CRP 表达及其诊断价值 [J]. *海南医学*, 2020, 31(12):1530-1533.
- [18] 谭红梅, 谭春梅, 冯晓丽, 等. 重症呼吸衰竭患者

血清 NT-proBNP、HMGB1、IL-17 水平与心肌损伤的相关性 [J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2021, 22(3):358-362.

- [19] 蔡莉芬, 侯桂英, 董建霞, 等. 心肌损伤标志物水平变化与脓毒症心肌病患者的预后质量分析 [J]. *河北医药*, 2017, 39(19):2971-2973.
- [20] 谢胜, 王国标. 肌钙蛋白 I、N 末端脑钠肽前体检测对脓毒症心肌损伤早期诊断及预后评估的价值 [J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(22):3123-3124.
- [21] 陈杰勇, 石星媛, 李文启, 等. 心肌损伤标志物与脓毒症合并心肌病患者预后的相关性研究 [J]. *实用中西医结合临床*, 2018, 18(12):1-3.
- [22] DENG H L, ZHANG Y F, LI Y P, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels associated with severe hand, foot and mouth disease [J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16:585.
- [23] 于斌, 陈华, 秦皓, 等. 血 cTn I、NT-proBNP 水平对脓毒症心肌损伤患者 28 d 存活率的预测价值 [J]. *河北医药*, 2020, 42(24):3708-3712.

(收稿日期:2022-06-02 修回日期:2022-10-12)

(上接第 736 页)

- [7] AHARONI S, NEVO Y, ORENSTEIN N, et al. Impact of a national population-based carrier-screening program on spinal muscular atrophy births [J]. *Neuromuscul Disord*, 2020, 30(12):970-974.
- [8] JOËL Z, ITAMAR G, EHUD K, et al. The Israeli national population program of genetic carrier screening for reproductive purposes [J]. *Genet Med*, 2016, 18(2):203-236.
- [9] DANGOULOFF T, VRŠČAJ E, SERVAIS L, et al. Newborn screening programs for spinal muscular atrophy worldwide: Where we stand and where to go [J]. *Neuromuscul Disord*, 2021, 31(6):574-582.
- [10] 张菁菁, 王玉国, 马定远, 等. 江苏地区 5 776 例孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断 [J]. *现代妇产科进展*, 2021, 30(6):434-437.
- [11] ARCHIBALD A D, MELANIE J S, TRENT B, et al. Reproductive genetic carrier screening for cystic fibrosis, fragile X syndrome, and spinal muscular atrophy in Australia: outcomes of 12 000 tests [J]. *Genet Med*, 2018, 20(5):513-

523.

- [12] 龚波, 章莉, 侯雅萍, 等. 中国上海地区 4 719 名孕妇脊髓性肌萎缩症携带者筛查 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(6):670-672.
- [13] 章印红, 王蕾, 贺静, 等. 云南地区 3 049 名育龄人群脊髓性肌萎缩症携带者筛查结果分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(4):384-388.
- [14] WEI X, TAN H, YANG P, et al. Notable carrier risks for individuals having two copies of SMN1 in Spinal muscular atrophy families with 2-copy alleles: estimation based on Chinese meta-analysis data [J]. *J Genet Couns*, 2017, 26(1):72-78.
- [15] 张柳娟, 庞丽红, 黎萍, 等. 多重连接依赖性探针扩增技术在脊髓性肌萎缩症产前诊断中的应用 [J]. *生殖与避孕*, 2016, 36(4):323-327.
- [16] 徐晨阳, 项延包, 卢金芳, 等. 温州地区 14 个脊髓性肌萎缩症家系临床表型与基因分析及产前诊断 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(10):21-24.

(收稿日期:2022-05-08 修回日期:2022-09-22)