

儿童脊肌萎缩症的基因诊断

孙婧婧¹, 杨永臣², 陆燕芬³, 许全梅³, 王超³, 成鸿毅³, 魏东¹, 奚佳铭³

上海市儿童医院 上海交通大学附属儿童医院新生儿科¹、检验科²、神经内科³, 上海 200062

【摘要】 目的 对临床诊断疑似为脊肌萎缩症(SMA)的患儿进行运动神经元生存基因(SMN)缺失分析,通过基因诊断对SMA进行确诊。**方法** 收集2015年1月至2016年12月上海市儿童医院新生儿科及神经内科就诊的疑似SMA患儿29例,患儿就诊年龄11 d~14岁。采用多重连接探针扩增(MLPA)技术对上述患儿外周血DNA样本进行基因诊断。**结果** 15例存在SMA致病突变,疑似患儿的SMA基因诊断率为51.7% (15/29)。其中8例为SMN1基因外显子7和外显子8纯合缺失;3例为SMN1基因外显子7和外显子8纯合缺失,SMN2基因外显子7拷贝数增加;4例为SMN1基因外显子7纯合缺失,外显子8杂合缺失。另外14例存在不直接致病的突变。按照SMA国际诊断标准,15例确诊患者中I型5例,II型5例,III型5例,均占33.3%。其中I型的5例患儿均为SMN1基因外显子7、8纯合缺失,仅有1例存在SMN2基因外显子7拷贝的轻度增加。**结论** MLPA技术灵敏度较高,可作为SMA疑似患者首选的诊断方法,为SMA的明确诊断提供依据。

【关键词】 脊肌萎缩症;运动神经元生存基因;多重连接探针扩增;基因诊断

【中图分类号】 R746.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)04-413-04

Gene diagnosis of spinal muscular atrophy in children. SUN Jing-jing¹, YANG Yong-chen², LU Yan-fen³, XU Quan-mei³, WANG Chao³, CHENG Hong-yi³, WEI Dong¹, XI Jia-ming³. Department of Neonatology¹, Department of Clinical Laboratory², Department of Neurology³, Shanghai Children's Hospital, Children's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200062, CHINA

【Abstract】 Objective To analyze the deletion of survival motor neuron (SMN) gene in children suspected of spinal muscular atrophy (SMA), and to diagnose SMA by gene diagnosis. **Methods** A total of 29 patients suspected of SMA were recruited from January 2015 to December 2016 in the Department of Neonatology or Neurology of Shanghai Children's Hospital. The age of these patients ranged from 11 days to 14 years old. Gene diagnosis of SMN1 and SMN2 were performed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in these peripheral DNA samples. **Results** Pathological mutations were identified in 15 cases, and the diagnosis rate in suspected cases was 51.7% (15/29). Among them, 8 cases had homozygous deletion in exon 7 and exon 8 of SMN1 gene, 3 cases had homozygous deletion in exon 7 and exon 8 of SMN1 gene combined with copy number increase in exon 7 of SMN2 gene, and 4 cases had homozygous deletion in exon 7 and heterozygous deletion in exon 8 of SMN1 gene. In other 14 cases, some non-pathogenic mutations were identified. According to the international diagnostic criteria of SMA, 5 cases of type I, 5 cases of type II, and 5 cases of type III were diagnosed, accounting for 33.3%, 33.3%, 33.3%, respectively. Homozygous deletion in exon 7 and exon 8 of SMN1 gene were identified in all of the cases of type I, while slight copy number increase in exon 7 of SMN2 gene were only found in one case. **Conclusion** MLPA is a high sensitive method for SMA diagnosis, which can be considered as the preferred genetic test for the suspected SMA patients. It would provide basis for a definitive diagnosis of SMA.

【Key words】 Children; Spinal muscular atrophy; Survival motor neuron (SMN) gene; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA); Gene diagnosis

脊肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)又称进行性近端型脊髓性肌肉萎缩症,由于前角细胞变性引起的慢性进行性肌无力是其临床特征。SMA最早是在1891年由Guido Werdnig报道的^[1],临床上可以通过肌电图检测是否存在广泛神经源性损害改变来进行初步的诊断。SMA在临床上可分为4种不同的类型,其中I型、II型和III型为儿童型,IV型为成人型^[2]。SMA在症状上可能与其他肌肉萎缩症有相似之处,因此明确的诊断还需要在分子层面进行。

SMA是常染色体隐性遗传病,发病率为1/6 000~1/10 000,是婴幼儿期最常见的致死性遗传病。研究发现,位于染色体5q13上的运动神经元生存基因(survival

motor neuron, SMN)缺失是SMA致病的根本原因^[3-4]。

SMN基因有2个拷贝,即SMN1(又称为SMNt)和SMN2(又称为SMNc),它们的序列高度同源,两者的外显子仅有2个碱基的差异,分别位于外显子7和外显子8上^[5]。有研究认为,SMN1具有全部的活性,约95%的SMA患者是由SMN1基因外显子7和外显子8的纯合缺失所致^[6]。因此,对该区域进行基因诊断可以对绝大部分的SMA患者进行确诊,将对患者的临床诊治带来极大的便利。

本研究对近年来上海市儿童医院新生儿科及神经内科临床疑诊SMA患者的基因诊断结果进行总结,探讨SMN1基因缺失分析对SMA患儿诊断的临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 收集 2015 年 1 月至 2016 年 12 月上海市儿童医院新生儿科及神经内科就诊的疑似 SMA 患儿 29 例。患儿就诊年龄 11 d~14 岁, 其中男性 16 例, 女性 13 例。其中一部分患儿发病年龄、临床肌无力或肌萎缩表现及疾病进程、肌电图检查结果符合 SMA 国际诊断标准^[7]。另一部分患儿因运动发育迟缓将 SMN 基因缺失分析作为排除性诊断。

1.1.2 试剂与仪器 QIAamp DNA Blood Mini 基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen, 德国), P021-A1 SMA MLPA 试剂盒(SALSA, 荷兰), ABI 3500DX 基因分析仪(ABI, 美国), ABI 9700PCR 扩增仪(ABI, 美国), Nanodrop2100 核酸微量定量仪(Thermo 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与 DNA 提取 采集患儿及其父母的外周血 2 mL, 加入到含 EDTA 抗凝剂的采血管中。使用基因组 DNA 提取试剂盒抽提外周血基因组 DNA, 测定 DNA 浓度后 -20℃ 保存。

1.2.2 SMN 基因缺失分析 MLPA 检测按试剂盒说明操作。取 300 ng DNA 进行多重连接探针扩增。1 μL 扩增产物, 采用 3500 测序仪进行扩增片段分离、峰高和峰

面积的检测, 使用 GeneMaker 软件进行数据分析。分析每个待测样品中相关探针的比值, 根据试剂盒的说明计算 SMN1 基因和 SMN2 基因外显子 7 和外显子 8 的拷贝数。当测定值在 0.45~0.70 时定义为 1 个拷贝, 测定值在 0.70~1.30 时定义为 2 个拷贝, 测定值在 1.30~1.55 定义为 3 个拷贝, 无检测峰信号定义为该片段缺失。

2 结果

2.1 疑似 SMA 患儿的基因诊断结果 29 例临床疑似 SMA 的患儿经实验室 MLPA 检测发现, 15 例存在 SMA 致病突变, 疑似患儿的 SMA 基因诊断率为 51.7%(15/29)。其中 8 例为 SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 纯合缺失(图 1A); 3 例为 SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 纯合缺失, SMN2 基因外显子 7 拷贝数增加(图 1B); 4 例为 SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失(图 1C), 见表 1。余 14 例存在不直接致病的突变。其中 5 例为 SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 杂合缺失(图 1D); 1 例为 SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 杂合缺失, SMN2 基因外显子 7 杂合缺失(图 1E); 1 例为 SMN1 基因外显子 7 杂合缺失; 1 例为 SMN1 基因外显子 8 杂合缺失; 1 例为 SMN2 基因外显子 7 纯合缺失; 4 例为 SMN2 基因外显子 7 杂合缺失; 1 例为 SMN2 基因外显子 7 拷贝数增加(图 1F)。

表 1 SMA 患儿临床及基因诊断信息

编号	性别	发病年龄	SMA 分型	检测结果
N1	男	18 天	I 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
N2	男	11 天	I 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
N3	男	1 个月	I 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
N4	男	4 个月	I 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
N5	男	6 个月	I 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失, SMN2 基因外显子 7 拷贝增加
M1	男	8 个月	II 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
M2	女	8 个月	II 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失, SMN2 基因外显子 7 拷贝增加
M3	女	9 个月	II 型	SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失
M4	女	1 岁	II 型	SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失
M5	男	1 岁	II 型	SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失
P1	男	21 个月	III 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
P2	女	2 岁	III 型	SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失
P3	男	3 岁	III 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失, SMN2 基因外显子 7 拷贝增加
P4	女	4 岁	III 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失
P5	男	4 岁	III 型	SMN1 基因外显子 7、8 纯合缺失

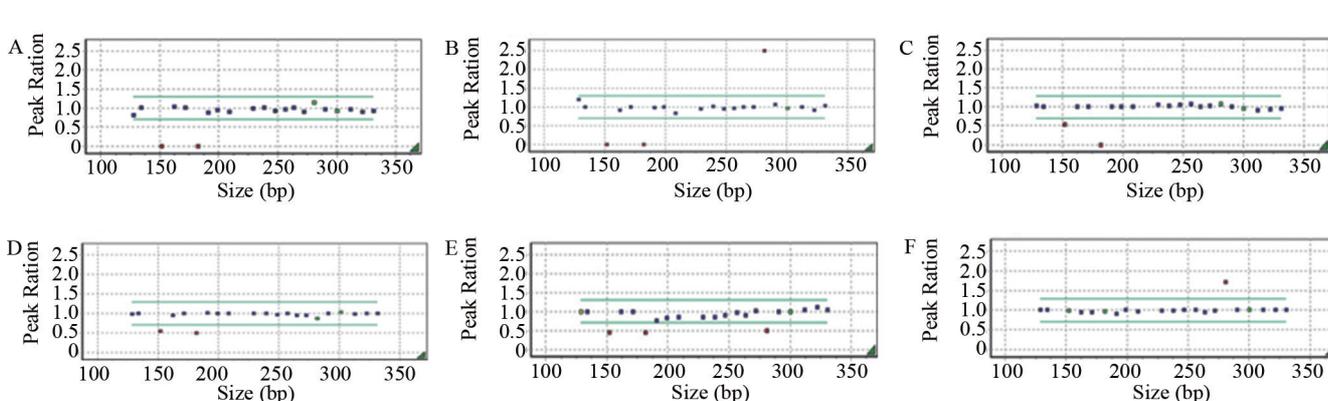


图 1 疑似 SMA 患儿 MLPA 检测结果

注: A, SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 纯合缺失; B, SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 纯合缺失, SMN2 基因外显子 7 拷贝数增加; C, SMN1 基因外显子 7 纯合缺失, 外显子 8 杂合缺失; D, SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 杂合缺失; E, SMN1 基因外显子 7 和外显子 8 杂合缺失, SMN2 基因外显子 7 杂合缺失; F, SMN2 基因外显子 7 拷贝数增加。

2.2 确诊患儿情况 按照SMA国际诊断标准,15例确诊患者中I型5例,II型5例,III型5例,均占33.3%。其中I型的5例患儿均为SMN1基因外显子7、8纯合缺失,仅有1例存在SMN2基因外显子7拷贝的轻度增加;II型的5例患儿中1例为SMN1基因外显子7、8纯合缺失,另1例为SMN1基因外显子7、8纯合缺失及SMN2基因外显子7拷贝的轻度增加,还有3例为SMN1基因外显子7纯合缺失,外显子8杂合缺失;而III型的5例患儿中有3例为SMN1基因外显子7、8纯合缺失,1例为SMN1基因外显子7、8纯合缺失,SMN2基因外显子7拷贝增加,另1例为SMN1基因外显子7纯合缺失,外显子8杂合缺失。

3 讨论

SMA是一种常染色体隐性遗传病,临床上主要表现为进行性、对称性肌无力和肌萎缩,其临床表现变异较大,发病年龄从出生至数十岁不等。SMA在新生儿中的发病率大约是万分之一。据统计,中国近10年来每年有1600万左右的新生儿诞生,这就意味着,其中将包括1600例左右的SMA患儿。SMA患儿尤其是新生儿的临床症状常会与其他神经系统疾病混淆,可能导致部分患儿的误诊和漏诊。因此,对疑似SMA的患儿进行基因诊断就显得十分必要。

1995年,LEFEBVRE等^[8]克隆了位于染色体5q11-5q13上的SMN基因,并证实98.7%的SMA患儿SMN1基因存在缺失,且缺失主要发生在外显子7和外显子8上。研究发现,SMN1与SMN2的序列差异很小,外显子7和外显子8上各有1个碱基变异,其中编码序列中仅在外显子7的第840位存在C(SMN1)>T(SMN2)的变异。该变异使得SMN2基因外显子7处的剪接发生了改变,从而产生截断型的转录产物(SMN7),该转录产物的稳定性较差,且功能不全,因此目前普遍认为SMN2基因的缺失并不会直接导致SMA的发生^[9]。

由于SMN1基因外显子7和外显子8的缺失突变是SMA最主要的突变类型,因此与其他遗传病相比,SMA的基因诊断相对比较方便。多重连接探针扩增技术(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA)是SCHOUTEN等^[10]于2002年发明的一项基因诊断新技术,主要用于外显子的缺失/重复、染色体非整倍体、染色体微缺失/微重复等基因组大片段拷贝数改变的检测。与其他拷贝数分析技术相比,MLPA具有操作简单、检测快速、通量高、费用较低等优势,目前已有200余种商品化试剂盒可用于各种不同疾病的基因诊断。本研究中笔者采用了荷兰SALSA公司的P021-A1 SMA MLPA检测试剂盒,可对SMN1和SMN2基因进行全面的检测。

本研究结果显示,在29例疑似SMA的患儿样本中共有15例得到确认,检测阳性率与国内先前的报道类似^[11]。其中I型、II型和III型各为5例,其中I型除了1例SMN1基因外显子7、8纯合缺失合并SMN2基

因外显子7拷贝增加外,其余4例均为单纯性的SMN1基因外显子7、8纯合缺失。II型有3例为SMN1基因外显子7纯合缺失,外显子8杂合缺失,其余1例为SMN1基因外显子7、8纯合缺失合并SMN2基因外显子7拷贝增加,另1例为单纯性的SMN1基因外显子7、8纯合缺失。III型有3例单纯性的SMN1基因外显子7、8纯合缺失,1例SMN1基因外显子7纯合缺失,外显子8杂合缺失,另1例则是SMN1基因外显子7、8纯合缺失合并SMN2基因外显子7拷贝增加。有意思的是,该例患儿的SMN2基因外显子7拷贝数为5个,远远大于正常人的2个拷贝,也大于2例I型和II型患儿中SMN2基因外显子7拷贝增加的病例(该2例患儿的SMN2基因外显子7拷贝数仅为3个)。已有的研究表明,SMN2与SMN1的同源性很高,虽然序列的变化造成SMN2的功能远远不及SMN1,但是SMN2拷贝数的增加可能会降低SMA的临床症状。本研究结果同样表明,SMN1基因外显子7的纯合缺失是SMA最主要的致病因素,SMN1基因外显子8的拷贝数和SMN2的拷贝数会对患儿临床症状的严重程度有一定的影响^[9]。

SMN2基因的上述特性为SMA的治疗带来了曙光。2003年,LUCA CARTEGNI等^[12]通过体外培养改变了SMN2基因的表达,使其合成了正常的SMN蛋白。在此基础上,经过十多年的努力,人们终于研制成功了首个治疗SMA的新药Spinraza,并于2016年12月23日在美国上市,该药的II期临床研究结果表明,20例患儿接受了药物治疗,在脊髓周围的脑脊液里注射Spinraza的重症SMA患儿SMN蛋白浓度增加,生命得以显著的延长,而且这些患儿的运动能力也得到明显的改善^[13]。本研究中,笔者通过基因诊断明确诊断了15例SMA的患儿,其中I型的5例患儿均不到6个月。这些得到确诊的患儿如果能够及时使用上述药物治疗,改变SMN蛋白的表达水平,有可能改善其运动机能。因此,SMA患儿的基因诊断和特异性的药物治疗将给上述家庭带来福音。

参考文献

- [1] IANNACONE ST. Spinal muscular atrophy [J]. *Semin Neurol*, 1998, 18(1): 19-26.
- [2] MUNSAT TL, DAVIES KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany) [J]. *Neuromuscul Disord*, 1992, 2(5-6): 423-428.
- [3] DARRAS BT. Spinal muscular atrophies[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2015, 62(3): 743-766.
- [4] BURLET P, BÜRGLEN L, CLERMONT O, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease [J]. *J Med Genet*, 1996, 33(4): 281-283.
- [5] MONANI UR, LORSON CL, PARSONS DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2 [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7): 1177-1183.
- [6] D'AMICO A, MERCURI E, TIZIANO FD, et al. Spinal muscular at-

甘油三酯葡萄糖乘积指数与甘油三酯高密度脂蛋白胆固醇比值评价代谢综合征的价值

陈海静, 孙海燕, 刘红丹

北京市房山区第一医院内分泌科, 北京 102400

【摘要】 **目的** 比较甘油三酯葡萄糖乘积指数(TyG index)与甘油三酯高密度脂蛋白胆固醇比值(TG/HDL-C)对代谢综合征(MS)的评价作用,选择筛查MS的简易指标。**方法** 选取2015年1~12月于北京市房山区第一医院门诊体检人员349例(年龄20~66)岁,分别进行询问病史、体格检查、生化检查,并计算TyG index、TG/HDL-C。依据中华医学会糖尿病学分会(CDS)诊断标准诊断MS患者125例。对MS组与非MS组受试者的TyG index、TG/HDL-C数据进行比较。采用SPSS18.0统计软件绘制TyG index、TG/HDL-C评价MS受试者的工作特征(ROC)曲线,计算曲线下面积(AUC),并采用MedCalc16.8软件对AUC进行分析。**结果** 349例受试者中男性134例,MS 51例;女性215例,MS 74例;MS组患者的TyG index和TG/HDL-C均值分别为(9.3±0.6)、(2.4±2.1),均明显高于非MS组的(8.5±0.5)和(1.2±1.2),差异均有统计学意义($P<0.05$);男性TyG index、TG/HDL-C评价MS的AUC分别为0.88、0.81,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$);女性TyG index、TG/HDL-C评价MS的AUC分别为0.85、0.83,两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);总体TyG index、TG/HDL-C评价MS的AUC分别为0.86、0.82,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$);TyG index评价MS风险切点,男性8.83,女性8.72,总体8.80;TG/HDL-C评价MS风险切点,男性1.48,女性1.21,总体1.21。**结论** TyG index及TG/HDL-C均与MS密切相关;TyG index在男性及总体人群中对MS风险的评价作用优于TG/HDL-C,适于作为MS的筛查指标。

【关键词】 甘油三酯葡萄糖乘积指数;甘油三酯;高密度脂蛋白胆固醇;代谢综合征;胰岛素抵抗

【中图分类号】 R442.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)04-416-04

Value of triglyceride-glucose product index and Triglyceride-to-high density lipoprotein cholesterol ratio in the evaluation of metabolic syndrome. CHEN Hai-jing, SUN Hai-yan, LIU Hong-dan. Department of Endocrinology, Beijing Fangshan First Hospital, Beijing 102400, CHINA

【Abstract】 Objective To compare the function of triglyceride-glucose product (TyG index) and triglyceride-to-high density lipoprotein cholesterol ratio (TG/HDL-C) in the evaluation of metabolic syndrome (MS), and to determine the screening indicator of MS. **Methods** A total of 349 subjects (aged 20 to 66) who had a medical examination at Beijing Fangshan First Hospital during Jan. 2015 to Dec. 2015 were included in this analysis. The subjects were asked about their medical history, and all underwent physical examination and biochemical examination. The value of TyG index and TG/HDL-C were calculated. A total of 125 patients were diagnosed as MS according to the Chinese Diabetes Society (CDS) criteria. TyG index and TG/HDL-C mean values were compared between MS patients and non-MS patients. SPSS18.0 was used to draw the ROC curve of TyG index and TG/HDL-C for the diagnosis MS and to calculate the area under the curve (AUC). The AUC was compared and analyzed with MedCalc16.8 software. **Results** Among the 349 subjects, there were 134 males (including 51 MS patients) and 215 females (including 74 MS patients). The mean

通讯作者:陈海静, E-mail:chw7802@sina.com

rophy [J]. Orphanet J Rare Dis, 2011, 6: 71.

[7] ROWLAND LP, MCLEOD JG. Classification of neuromuscular disorders [J]. J Neurol Sci, 1994, 124(Suppl): 109-130.

[8] LEFEBVRE S, BÜRGLER L, REBOULLET S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene [J]. Cell, 1995, 80(1): 155-165.

[9] FARRAR MA, KIERNAN MC. The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges [J]. Neurotherapeutics, 2015, 12(2): 290-302.

[10] SCHOUTEN JP, MCELGUNN CJ, WAAIJER R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(12): e57.

[11] 章印红, 贺静, 张云茜, 等. 154例脊肌萎缩症疑似患者的基因诊断及其临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(12): 833-837.

[12] CARTEGNI L, KRÄINER AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators [J]. Nat Struct Biol, 2003, 10(2): 120-125.

[13] FINKEL RS, CHIRIBOGA CA, VAJSAR J, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study [J]. Lancet, 2016, 388(10063): 3017-3026.

[14] FINKEL RS, CHIRIBOGA CA, VAJSAR J, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study [J]. Orphanet J Rare Dis, 2011, 6: 71.

(收稿日期:2018-12-30)