

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

章印红^{1,2} 张云茜³ 朱宝生^{1,2} 贺静^{1,2} 王蕾^{1,2} 唐新华^{1,2}
郭晶晶^{1,2} 靳焯焯^{1,2} 陈红^{1,2} 张杰^{1,2} 章锦曼^{1,2} 李利^{1,4}

(1. 昆明理工大学附属昆华医院遗传诊断中心, 云南 昆明 650032;

2. 云南省第一人民医院遗传诊断中心, 云南 昆明 650032;

3. 云南省第二人民医院神经内科, 云南 昆明 650021; 4. 云南省第一人民医院儿科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 对脊髓性肌萎缩症(SMA)患儿的运动神经元存活基因1(SMN1)和SMN2拷贝数与临床表型之间的关系进行分析,提高对SMA患儿的早期诊断和临床干预水平。**方法** 选取45例SMA患儿,应用多重连接依赖性探针扩增技术对SMN1和SMN2基因拷贝数进行检测,分析SMN基因拷贝数同临床表型之间的关系。**结果** 45例SMA患儿中,SMN1第7和8外显子纯合缺失者为42例,占93%(42/45);仅有第7外显子缺失者为3例,占7%(3/45)。SMA不同临床分型和SMN1基因第7、8外显子缺失类型间无相关性($P>0.05$);SMA患儿和健康儿童的SMN2基因拷贝数分布差异有统计学意义($P<0.05$),前者以2和3拷贝者居多,后者以1和2拷贝者居多;不同SMA临床分型间SMN2拷贝数分布差异有统计学意义($P<0.05$),SMN2基因为2拷贝者发病年龄明显小于3和4拷贝者。I型SMA患儿中SMN2拷贝数以2或3拷贝者居多,II型以3拷贝者居多,III型以3或4拷贝者居多。随着SMN2拷贝数增加,患儿发病年龄越大,保有的运动功能和临床结局越好,SMN2基因拷贝数同临床结局间的关系存在显著性差异($P<0.05$)。**结论** SMN2基因通过剂量补偿效应减轻SMA疾病严重程度,SMN2拷贝数同SMA临床表型具有相关性,可将其作为预测疾病严重程度的依据之一。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 239-243]

[关键词] 脊髓性肌萎缩症;运动神经元存活基因;拷贝数;临床表型;儿童

Association of copy number of SMN1 and SMN2 with clinical phenotypes in children with spinal muscular atrophy

ZHANG Yin-Hong, ZHANG Yun-Qian, ZHU Bao-Sheng, HE Jing, WANG Lei, TANG Xin-Hua, GUO Jing-Jing, JIN Chan-Chan, CHEN Hong, ZHANG Jie, ZHANG Jin-Man, LI Li. Genetic Diagnosis Center, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, China (Li L, Email: erklili@sina.com)

Abstract: Objective To study the association of copy number of SMN1 and SMN2 with clinical phenotypes in children with spinal muscular atrophy (SMA). **Methods** A total of 45 children with SMA were enrolled. Multiplex ligation-dependent probe amplification was used to measure the gene copy numbers of SMN1 and SMN2. The association of copy number of SMN1 and SMN2 with clinical phenotypes was analyzed. **Results** Of the 45 children with SMA, 42 (93%) had a homozygous deletion of SMN1 exons 7 and 8, and 3 (7%) had a deletion of SMN1 exon 7 alone. No association was found between SMA clinical types and the deletion types of SMN1 exons 7 and 8 ($P>0.05$). There was a significant difference in the distribution of SMN2 gene copy numbers between the children with SMA and the healthy children ($P<0.05$). The children with SMA usually had two or three copies of SMN2 gene, while the healthy children usually had one or two copies of SMN2 gene. There was a significant difference in the distribution of SMN2 copy numbers among the children with different SMA clinical types ($P<0.05$). The children with two copies of SMN2 gene had

[收稿日期] 2018-11-30; **[接受日期]** 2019-01-10

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项资金项目(2015FB096);云南省医学学科带头人资助项目(D-201643);云南省医学后备人才资助项目(H-201617)。

[作者简介] 章印红,男,硕士,主治医师。

[通信作者] 李利,女,教授,主任医师。Email: erklili@sina.com。

a significantly lower age of onset than those with three or four copies. Most of the children with type I SMA had two or three copies of SMN2 gene. Most of the children with type II SMA had three copies of SMN2 gene. Most of the children with type III SMA had three or four copies of SMN2 gene. Children with a higher copy number of SMN2 gene tended to have an older age of onset and better motor function and clinical outcome, and there was a significant association between SMN2 gene copy number and clinical outcome ($P<0.05$). **Conclusions** The SMN2 gene can reduce the severity of SMA via the dosage compensation effect. SMN2 copy number is associated with the phenotype of SMA, and therefore, it can be used to predict disease severity.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(3): 239-243]

Key words: Spinal muscular atrophy; Survival motor neuron gene; Copy number; Clinical phenotype; Child

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是一类由脊髓前角运动神经元变性导致肌无力、肌萎缩的常染色体隐性遗传病。其共同特点是脊髓前角细胞变性, 临床表现为进行性、对称性、肢体近端为主的广泛性弛缓性麻痹与肌萎缩, 智力发育及感觉均正常。SMA 在活产婴儿中的发生率是 1/6000~1/10000, 人群携带率在 1/40~1/60 之间^[1]。据报道, 中国人中 SMA 携带者频率大概为 1/42~1/52^[2-3]。根据发病年龄、肌无力严重程度和达到的运动功能, SMA 可分为 4 种常见临床类型, 分别为 SMA-I 型、SMA-II 型、SMA-III 型和 SMA-IV 型, 即婴儿型、中间型、少年型和成年型^[4-5]。

SMA 的主要致病基因为运动神经元存活基因 1 (survival motor neuron 1, SMN1), 定位于 5q11.2-q13.3, 约 95% 的 I~III 型 SMA 患者存在着 SMN1 基因第 7 外显子的纯合缺失, 且大部分是外显子 7、8 同时缺失, 只有少部分仅缺失外显子 7^[6]。位于着丝粒侧的 SMN2 基因与端粒侧 SMN1 基因具有高度同源性, 仅在各自的 3' 端有 5 个单核苷酸的差别^[2]。SMN2 基因的缺失虽不致病, 但却是 SMN1 基因的修饰基因, 在 SMN1 基因缺失的情况下起着剂量补偿作用, SMN2 拷贝数与 SMA 表型严重程度相关^[7]。目前该病的一般治疗手段包括预防肺部感染、改善通气状况和脊柱侧凸外科矫形手术等, 特别是发生呼吸窘迫后无创通气成为延长患儿寿命的重要手段^[8]。受云南省经济和医疗发展水平的客观限制, 很多患儿家庭没有条件选择夜间无创辅助通气设备来改善患儿呼吸状况, 治疗手段相对单一, 患儿的疾病进展更接近 SMA 的自然进程, 更有利于客观分析 SMN2 拷贝数同临床表型的关系。

本研究中, 我们通过分析 SMA 患儿临床表型, 同时检测 SMN 基因拷贝数, 探讨本地不同临床分型 SMA 患儿的临床特点和 SMN 拷贝数特点, 为 SMA 临床分型、治疗策略、预后评估和遗传咨询

提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在云南省第一人民医院儿科、遗传诊断中心和云南省第二人民医院神经内科就诊的 SMA 患儿共 45 例。其诊断符合 1992 年国际 SMA 协会定义的诊断标准及分型标准^[9]。选取既往保存的 50 例无 SMA 家族史的健康儿童样本作为对照, 其中男 25 例, 女 25 例, 年龄范围 5~12 岁, 中位年龄为 7 岁 5 个月。本研究遵循的程序符合本院医学伦理审查委员会所制定的伦理学标准, 得到该委员会批准 (2014YXLH055), 征得受试对象本人的知情同意, 并为之签署临床研究知情同意书。

1.2 试剂与仪器

QIAamp DNA Blood Mini 基因组 DNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司), ABI 2720PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), SALSA MLPA probemix P021-A2 SMA 试剂盒 (荷兰 MRC-Holland 公司), ABI-3130 Genetic Analyzer (美国 ABI 公司), POP4 凝胶 (美国 ABI 公司), 引物合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.3 基因组 DNA 的提取

抽取受检者静脉血 2 mL, EDTA-K2 抗凝。用 QIAamp DNA Blood Mini 试剂提取基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 用灭菌双蒸水调整 DNA 浓度为 100 ng/μL, -20℃ 保存。

1.4 多重连接依赖性探针扩增技术检测分析

采用多重连接依赖性探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 进行检测, 严格按照 SALSA MLPA probemix P021-A2 SMA 试剂盒 (MRC-Holland) 说明操作。Coffalyser.NET 软件 (MRC-Holland, www.mlpa.com-MLPA) 分

析实验结果。

1.5 患儿生存状况随访

通过门诊随访观察的方式对患儿生存状况进行追踪,内容包括生长发育状况,坐、站、行走等运动功能,肌张力,肌肉萎缩,步态异常,呼吸状况,死亡时年龄等。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行数据处理。非正态分布计量资料用中位数和四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$]表示,计数资料以例数和百分率(%)表示,组间比较采用Fisher精确检验。 $P<0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 45例SMA患儿临床特征分析

45例SMA患儿中,男24例,女21例,男女之比1.1:1,总的发病年龄为12.0(7.0, 18.0)个月。以肌无力为首发症状就诊者占比最高,为58%(26/45);其次为呼吸窘迫,占16%(7/45);最后为步态异常和生长发育迟缓,各占13%(6/45)。见表1。

表1 SMA患儿的临床特征 [例(%)或 $M(P_{25}, P_{75})$]

分型	例数	性别 (男:女)	发病年龄(月)	首发症状			
				肌无力	呼吸窘迫	步态异常	生长发育迟缓
I型	10	6:4	4.5(3.8, 6.0)	6(60)	3(30)	0	1(10)
II型	26	12:14	12.0(9.0, 14.0)	15(58)	4(15)	4(15)	3(12)
III型	9	6:3	40.0(30.0, 75.0)	5(56)	0	2(22)	2(22)
合计	45	24:21	12.0(7.0, 18.0)	26(58)	7(16)	6(13)	6(13)

2.2 MLPA检测SMN1基因拷贝数情况

45例SMA患儿经MLPA检测,发现SMN1第7和8外显子纯合缺失者为42例,占93%(42/45);仅有第7外显子缺失者为3例,占7%(3/45)。SMA不同临床分型和SMN1基因第7、8外显子缺失类型间无相关性($P=0.56$)。见表2。

表2 SMN1基因第7和8外显子缺失类型结果

分型	例数	SMN1基因[例(%)]	
		第7和8外显子均缺失	仅第7外显子缺失
I型	10	10(100)	0
II型	26	23(88)	3(12)
III型	9	9(100)	0
合计	45	42(93)	3(7)

2.3 SMA患儿和健康儿童SMN2拷贝数分布情况比较

50例健康儿童的SMN基因中,SMN1基因均为2拷贝,SMN2基因可见0、1、2和3拷贝,未检出SMN2基因4拷贝者。45例SMA患儿和50例健康儿童的SMN2基因拷贝数分布差异有统计学意义($P<0.001$),前者以2和3拷贝者居多,

后者以1和2拷贝者居多。见表3。

表3 SMA患儿和健康儿童SMN2拷贝数分布情况比较

[例(%)]

SMN2拷贝数	SMA患儿	健康儿童	P值
0	0	3(6)	
1	0	18(36)	
2	11(24)	28(56)	<0.001
3	26(58)	1(2)	
4	8(18)	0	
合计	45(100)	50(100)	

2.4 SMN2拷贝数同SMA临床分型及预后之间的关系

SMN2基因拷贝数在SMA不同临床分型间的分布存在显著性差异($P=0.04$),I型SMA患儿的SMN2拷贝数以2或3拷贝者居多,II型以3拷贝者居多,III型以3或4拷贝者居多。从临床结局来看,SMN2为2拷贝者死亡6例,占55%(6/11),存活者基本丧失行动能力;SMN2为3拷贝者死亡2例,占8%(2/26),出现呼吸窘迫者5例,占19%(5/26),仅有4例保留独立行走能力,占

15% (4/26) ; SMN2 为 4 拷贝者, 无死亡和呼吸窘迫病例, 仍保留独立行走能力者占 38% (3/8) 。

患儿 SMN2 基因拷贝数同临床结局间的关系存在显著性差异 ($P=0.009$)。见表 4。

表 4 SMN2 拷贝数同患儿临床分型及预后之间的关系 [例 (%) 或 $M(P_{25}, P_{75})$]

SMN2 拷贝数	例数	临床分型			临床结局				
		I 型	II 型	III 型	无需借助工具可行走	需要借助工具站立, 不能行走	完全需要借助轮椅	出现呼吸窘迫	死亡
2	11	5(50)	6(23)	0(0)	0(0)	0(0)	4(36)	1(9)	6(55)
3	26	4(40)	17(65)	5(56)	4(15)	6(23)	9(35)	5(19)	2(8)
4	8	1(10)	3(12)	4(44)	3(38)	3(38)	2(25)	0(0)	0(0)
P 值		0.04			0.009				

3 讨论

在遗传性疾病中, SMA 是婴幼儿较常见的死因。2016 年 12 月美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准 Nusinersen 注射液上市用于治疗儿童和成人 SMA, 其安全性和有效性也得到证实^[10-11]。但由于该药国内尚未获批上市且治疗费用昂贵, 短期内还不能让所有患者受益。SMA 的治疗仍限于为患者提供呼吸支持和其它物理治疗手段, 重型 SMA 患者最终死于呼吸肌瘫痪或全身功能衰竭, 而这些依然是当前经济欠发达地区患儿群体需要面临的问题。对 SMA 患儿进行分型和预后判断, 对于指导患儿家庭选择治疗方案, 客观预测疾病结局具有重要意义。

SMA 是由 SMN 基因功能异常引起的, SMN1 基因是其主要致病基因。本研究中, 我们利用 MLPA 技术对 45 例 SMA 患儿进行 SMN1 基因缺失分析, 检出 SMN1 第 7 和第 8 外显子同时缺失者占 93%, 另 7% 仅第 7 外显子缺失, SMA 不同临床分型和 SMN1 基因第 7、8 外显子缺失类型间无相关性, 该结论同多数学者报道结果一致^[12-14]。

在健康人群中 SMN2 拷贝数的变化是从 0 至 4, 但各型 SMA 患者至少有 1 个拷贝的 SMN2 基因, 因为 SMN 基因全部丢失会导致早期胚胎死亡^[15]。SMA 患儿和健康儿童的 SMN2 基因拷贝数分布差异有统计学意义, SMA 患儿中 SMN2 拷贝数为 2 或 3 的比例较高, 而健康儿童的 SMN2 拷贝数则以 1 或 2 的比例较高, 这一发现同 Fang^[13] 和 Qu^[16] 报道结果一致, 进一步说明 SMN1 向 SMN2 基因转换可能是 SMA 患儿生存的一种自我保护途径^[2,8,13,17]。此外, SMN2 基因是对 SMA 疾病进展有影响的诸

多重要修饰基因之一, SMN2 基因产生 10% 全长转录产物, 基因拷贝数越多, 产生全长转录产物也增多, 可部分补偿 SMN 蛋白的不足, 减轻 SMA 表型严重程度, 也可预测 SMA 急性或慢性病程^[16]。大部分 SMA I 型有 2 个拷贝, II 型通常有 3 个拷贝, III 型通常有 3 或 4 个拷贝^[17-19], 与本研究结果相符。本研究中 SMA I 型患儿携带 3 拷贝 SMN2 者亦较高, 为 40%, 可能和本组患儿发病年龄相对较晚, 期望寿命较长有关。本研究对 45 例 SMA 患儿进行随访后发现, 11 例 SMN2 为 2 拷贝者有 6 例死亡, 占 55% (6/11), 而 8 例 SMN2 为 4 拷贝者没有出现死亡和呼吸窘迫病例, 仍保留独立行走能力者占 38% (3/8)。患儿 SMN2 基因拷贝数同临床结局间的关系存在显著性差异。上述结果再次说明, SMN2 拷贝数同疾病分型有密切的关系, SMN2 拷贝数越多, 临床分型相对较轻, 疾病预后较好。

综上所述, SMN1 基因第 7 外显子缺失造成 SMA 表型, 但与疾病分型和严重程度无关, SMN2 拷贝数可以用于预测 SMA 患儿疾病严重程度。对 SMA 患儿进行临床表型和 SMN 基因拷贝数特点进行分析, 将有助于本地区 SMA 患儿的早期诊断、辅助治疗和遗传咨询, 特别是对预防先证者家庭再次生育 SMA 患儿具有重要意义。

受实验条件的客观限制, 我们没有对除 SMN2 以外的修饰基因进行研究, 虽然 SMN2 拷贝数可以用于预测 SMA 患儿疾病严重程度, 但影响 SMA 疾病严重程度和预后的因素还有很多。有文献报道, 极少数 SMN2 拷贝为 3 或 4 的 SMN1 纯合缺失者没有任何临床表现^[20], 这进一步说明 SMN2 基因绝非是 SMA 的唯一修饰基因。除了在 SMN1 基

因附近还存在若干个具有修饰 SMA 表型的作用的基因外^[12-13,16,21]，近年来关于 PLS3、CORO1C 和 NCALD 基因对 SMA 严重程度的影响逐渐得到体内或体外实验证实。通过上调 PLS3 和 CORO1C 基因的表达，抑制 NCALD 基因的表达，可以修复因为 SMN 基因缺陷而损伤的细胞内吞作用，重建神经突触功能，进而影响 SMA 预后^[22-25]。发现并阐明这些修饰基因的功能，为今后 SMA 的治疗提供了潜在的手段。我们在分析 SMA 患儿表型，预测患儿预后，提供产前诊断咨询服务时也应该充分考虑这些修饰基因的共同作用。

[参 考 文 献]

- [1] Prior TW, Snyder PJ, Rink BD, et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy[J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(7): 1608-1616.
- [2] Sheng-Yuan Z, Xiong F, Chen YJ, et al. Molecular characterization of SMN copy number derived from carrier screening and from core families with SMA in a Chinese population[J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(9): 978-984.
- [3] 杨兰, 宋昉. 脊髓性肌萎缩症的治疗研究进展[J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(8): 634-637.
- [4] Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, 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.
- [5] Faravelli I, Nizzardo M, Comi GP, et al. Spinal muscular atrophy--recent therapeutic advances for an old challenge[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(6): 351-359.
- [6] Arnold WD, Kassir D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era[J]. *Muscle Nerve*, 2015, 51(2): 157-167.
- [7] Farrar MA, Park SB, Vucic S, et al. Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy[J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(3): 355-368.
- [8] 张蕾, 颜小玲, 李娟, 等. 脊髓性肌萎缩症遗传学及治疗研究进展[J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(8): 632-635.
- [9] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany) [J]. *Neuromuscul Disord*, 1992, 2(5-6): 423-428.
- [10] Haché M, Swoboda KJ, Sethna N, et al. Intrathecal injections in children with spinal muscular atrophy: nusinersen clinical trial experience[J]. *J Child Neurol*, 2016, 31(7): 899-906.
- [11] Pechmann A, Langer T, Wider S, et al. Single-center experience with intrathecal administration of Nusinersen in children with spinal muscular atrophy type 1[J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2018, 22(1): 122-127.
- [12] He J, Zhang QJ, Lin QF, et al. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy[J]. *Gene*, 2013, 518(2): 325-329.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 卢丽萍, 麻宏伟, 姜俊, 等. 脊髓性肌萎缩临床表型与 SMN2 基因拷贝数变化的相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(2): 144-147.
- [16] Qu YJ, Ge XS, Bai JL, et al. Association of copy numbers of survival motor neuron gene 2 and neuronal apoptosis inhibitory protein gene with the natural history in a Chinese spinal muscular atrophy cohort[J]. *J Child Neurol*, 2015, 30(4): 429-436.
- [17] Butchbach ME. Copy number variations in the survival motor neuron genes: implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases[J]. *Front Mol Biosci*, 2016, 3: 7.
- [18] 王喆, 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): 216-219.
- [19] Glascock J, Sampson J, Haidet-Phillips A, et al. Treatment algorithm for infants diagnosed with spinal muscular atrophy through newborn screening[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2018, 5(2): 145-158.
- [20] Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, et al. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2[J]. *Am J Med Genet A*, 2004, 130A(3): 307-310.
- [21] Ahn EJ, Yum MS, Kim EH, et al. Genotype-phenotype correlation of SMN1 and NAIP deletions in Korean patients with spinal muscular atrophy[J]. *J Clin Neurol*, 2017, 13(1): 27-31.
- [22] Nishio H. PLS3 expression and SMA phenotype: a commentary on correlation of PLS3 expression with disease severity in children with spinal muscular atrophy[J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(2): 64-65.
- [23] Strathmann EA, Peters M, Hosseinibarkooie S, et al. Evaluation of potential effects of Plastin 3 overexpression and low-dose SMN-antisense oligonucleotides on putative biomarkers in spinal muscular atrophy mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203398.
- [24] Hosseinibarkooie S, Peters M, Torres-Benito L, et al. The power of human protective modifiers: PLS3 and CORO1C unravel impaired endocytosis in spinal muscular atrophy and rescue SMA phenotype[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 99(3): 647-665.
- [25] Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, et al. Neurocalcin delta suppression protects against spinal muscular atrophy in humans and across species by restoring impaired endocytosis[J]. *Am J Hum Genet*, 2017, 100(2): 297-315.

(本文编辑: 王颖)