

超声引导羊膜腔穿刺产前基因诊断脊髓性肌萎缩症

刘新秀^{1*} 陈万金² 叶真¹ 林珉婷² 陈玲¹ 甘玲¹ 陈树强¹ 曾锦树¹ 黄秀烟¹

- (1. 福建医科大学附属第一医院超声影像科;
2. 福建医科大学附属第一医院神经病学研究所, 福建 福州 350005)

【摘要】 目的 采用超声引导羊膜腔穿刺抽取羊水产前基因诊断脊髓性肌萎缩症(SMA)。方法 对 21 例孕 17~20 周,均有生产过一胎以上经临床病史,基因诊断确诊为脊髓性肌萎缩症患儿的孕妇,经系统超声检查排除明显的胎儿结构异常,在超声引导下用一次性 20G 或 22G 的 PTCD 针行羊膜腔穿刺术,抽取澄清的羊水 40ml,进行 DNA 系列测定,运用限制性片段长度多态性(RFLP)技术检测羊水 DNA 中运动神经元生存 1 基因(SMN1)是否有缺失,并用短串联重复系列连锁分析(STR 连锁分析)排除母血的污染、检测是否为基因携带者。结果 21 例羊膜腔穿刺均一次穿刺成功,术后无一例出现羊膜破裂、自然流产、感染、羊水栓塞、胎儿损伤等并发症。21 例中均排除母血的污染,其中 6 例提示 SMN1 基因缺失,行人工流产术;15 例提示 SMN1 基因未见缺失,其中 3 例为 SMA 基因携带者,另 12 例为完全正常个体,15 例足月产后随访至出生后情况良好,引产及出生后的胎儿均经再次基因分析,结果与产前诊断完全一致。结论 超声引导行羊膜腔穿刺抽取羊水是产前基因诊断脊髓性肌萎缩症获取标本的安全有效途径,联合运用限制性片段长度多态性(RFLP)技术、短串联重复系列连锁分析(STR 连锁分析)法检测不但可产前基因诊断 SMA,还可排除母血的污染,且可产前诊断是否为 SMA 基因携带者,进一步完善了 SMA 产前诊断体系。

【关键词】 超声引导; 羊膜腔穿刺; 脊髓性肌萎缩症; 产前; 基因诊断

The Application of Amniocentesis in Prenatal Gene Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy by Ultrasonic Guidance

Liu Xin-xiu^{1*}, Chen Wan-jin², Ye Zhen¹, Lin Min-ting², Chen Ling¹, Gan Ling¹, Chen Shu-qiang¹, Zeng Jin-shu¹, Huang Xiu-yan¹.

- (1. Department of Ultrasound, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University;
2. Institute of Neurology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

【Abstract】 Objective To study amniocentesis in prenatal gene diagnosis of spinal muscular atrophy by ultrasonic guidance. **Methods** Amniocentesis was performed by ultrasonic guidance on a total of 21 pregnant women who had given birth to children with a clinical diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA). Forty milliliters of amniotic fluid was obtained to extract DNA. Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism(RFLP), and short tandem repeat(STR) linkage analysis were used to detect the deletion of the telomeric copy of survival motor neuron gene (SMN1). **Results** None of the 21 cases had complications of amniorrhaxis, spontaneous abortion, infection, amniotic fluid embolism or fetal damage. Of 21 fetues, six fetuses had the SMN1 deletion and were aborted. The other 15 fetuses, 3 carriers and 15 normal individuals were born. The 15 born babies were all normal, Induction and the fetus after birth were confirmed by further genetic analysis, the results fully consistent with the prenatal

* 通讯作者:刘新秀. E-mail: lyx99090@163.com

diagnosis. **Conclusion** Amniocentesis under ultrasonic guidance is a safe and effective way of prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA). Not only prenatal diagnosis SMA and exclude maternal blood contamination, But also prenatal diagnosis gene carriers and perfect the system of prenatal diagnosis of SMA by combined with the technique of PCR-RFLP and STR linkage analysis.

【Key words】 Ultrasonic guidance; Amniocentesis; Spinal muscular atrophy; Antepartum; Gene diagnosis

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体隐性遗传性疾病,也是婴儿期最常见的遗传性疾病之一,存活的患者晚期严重致残,目前尚无肯定有效的治疗方法,基因诊断、携带者筛查及产前诊断是预防本疾病的有效方法,因此进行遗传咨询、准确的产前基因诊断以防止患儿出生尤为重要。笔者采用超声引导羊膜腔穿刺抽取羊水进行产前基因诊断脊髓性肌萎缩症,现报告如下:

1 资料与方法

1.1 研究对象 21例均为2004年1月至2009年10月本院门诊患者,均有生产过一胎以上经临床病史、基因诊断确诊为脊髓性肌萎缩症患者,部分患儿还经肌电图及肌肉活检组织化学染色检查证实,再次怀孕17~20周要求行产前基因诊断的孕妇,年龄29~40岁,平均年龄32.5岁。基因检测时选取正常个体及SMA患者各1例作为对照。

1.2 仪器与方法

1.2.1 超声仪器和设备 采用美国Acuson Aspen彩色多普勒超声诊断仪(V4探头,配套穿刺架),带针蕊的20G或22G一次性PTCD针。

1.2.2 超声引导下羊膜腔穿刺 对21例孕妇于羊膜腔穿刺术前行产科检查及系统产科超声检查,排除无脑儿、开放性脊柱裂、致死性侏儒、严重胸腹裂畸形、软骨发育不全、单心室等致死性畸形及作出明显的胎儿结构异常。在超声引导下选择避开腹壁较大血管、胎盘组织和胎儿颜面部周围且紧贴腹前壁的羊水池为穿刺径路,用20G或22G一次性PTCD针行羊膜腔穿刺术,均一次穿刺成功,抽取澄清的羊水40ml作基因诊断用。术后用超声观察胎心胎动,测量胎心率和心律。术后孕妇在急诊室观察一晚,次日经产科医生检查未发现异常后孕妇离院回

家,随访至出生后。

1.2.3 基因检测 在产前基因分析之前,对先证者及其父母进行SMN1基因缺失分析^[1],并采用实时荧光定量PCR技术对先证者父母进行携带者检测^[2]。对于羊水标本,2000rpm离心10分钟收集羊水沉淀组织,用GFX™DNA抽提试剂盒抽提基因组DNA。运用限制性片段长度多态性(RFLP)技术检测羊水DNA中运动神经元生存1基因(Survival Motor Neurone, SMN1)是否有缺失,并用短串联重复系列连锁分析(STR连锁分析)排除母血的污染并判别胎儿是否为基因携带者^[3-5]。具体方法如下:

1.2.3.1 PCR-限制性酶切 PCR扩增SMN基因7、8号外显子,50μl反应体系包括200ng基因组DNA,200μmol/L dNTP,2mmol/L MgCl₂,上下游引物各0.20μmol/L, Taq酶2.5单位及相应的10×PCR缓冲液5μl,引物序列参见文献^[4]。采用美国ABI公司9700型扩增仪扩增,PCR反应条件为:95℃变性2分钟;94℃45秒,56℃45秒,72℃1分钟,共30个循环;72℃延伸5分钟。PCR扩增产物长度均为188bp。取7号外显子的PCR产物15μL,加入限制性内切酶Dra I 5U及相应的缓冲液,反应总体积为30μL。取8号外显子PCR产物15μL,加入限制性内切酶Dde I 3.6U及相应的酶切缓冲液,反应体积亦为30μL,37℃孵育3小时。酶切产物用2.5%普通琼脂糖凝胶、0.5×TBE、5V/cm电压电泳4小时,观察结果,以pGEM-3Zf(+)DNA/Hae III作为分子量标记。

1.2.3.2 短串联重复系列连锁分析 用聚合酶链反应(PCR)扩增与SMN基因紧密连锁的3个STR位点(D5S435, D5F149, D5S351),引物序列及反应条件参见文献^[5]。PCR产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测,银染法显色分析结果。

2 结果

2.1 21 例先证者均为本院 1997 年 1 月~2007 年 12 月门诊及住院患者。男 11 例,女 10 例。完全符合 1992 年 SMA 国际协作会议制定的临床诊断及分型标准^[6],其中 I 型 6 例、II 型 10 例、III 型 5 例。所有先证者经 PCR-限制性酶切分析后,均提示 SMN1 基因 7、8 号外显子同时缺失。所有先证者的父母经实时荧光定量 PCR 检测后均证实其 SMN1 基因拷贝数为 1^[2],提示为 SMA 携带者。

2.2 21 例超声引导下羊膜腔穿刺术后无一例出现羊膜破裂、自然流产、感染、羊水栓塞、胎儿损伤等并发症。经短串联重复系列连锁分析,21 例羊水均排除母血污染。经 PCR-限制性酶切分析,正常对照其 SMN1 基因 7 号外显子的 PCR 产物经限制性酶切消化后,均同时出现 188 bp 和 164 bp 2 条带; SMA 患者缺失代表 SMN1 的 188 bp 条带,仅有 164 bp 条带。在 8 号外显子,正常对照具有 188 bp、120 bp、68 bp 3 条带; SMA 患者缺失代表 SMN1 的 188 bp 条带,仅有 120 bp、68 bp 2 条带存在(如图 1)。21 例羊水标本经 PCR-限制性酶切检测有 6 例显示 SMN1 基因缺失,提示为 SMA 患者,另 15 例显示无 SMN1 基因缺失,进一步经连锁分析提示 3 例为基因携带者,另 12 例为完全正常个体。6 例 SMN1 缺失的胎儿选择终止妊娠,15 例无 SMN1 缺失的胎儿均继续妊娠直至分娩,引产及出生后的胎儿均经再次基因分析,结果与产前诊断完全一致。

3 讨论

SMA 是一种较常见的常染色体隐性遗传性疾病,由脊髓前角运动神经元细胞变性所致肌无力、肌肉萎缩疾病,临床主要表现为进行性、对称性肢体近端肌无力及萎缩、运动丧失。根据发病年龄和病情轻重将本病分为四型^[6]。I 型 SMA,于出生后 6 个月内起病,为严重型 SMA,是婴儿期最常见的致死性遗传病;II 型 SMA,常于 6~18 个月起病;III 型在 18 个月以后起病,18 岁以前起病的即 I~III 型又统称儿童型 SMA,均为常染色体隐性遗传,群体发病率为 1/6 000~1/10 000,基因携带者频率为 1/40~1/60;20~30 岁以上起病的归为第 IV 型,可呈常染

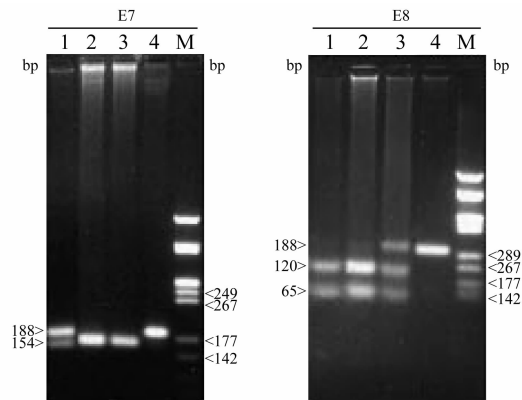


图 1 SMA 患者及正常人 SMN 基因 7、8 号外显子 PCR-限制性酶切电泳图

注:左侧为 7 号外显子;1 为正常人,2、3 为患者,4 为 7 号外显子 PCR 产物,M 为 pGEM-3Zf(+)/Hae III Markers;右侧为 8 号外显子;3 为正常人,1、2 为患者,4 为 PCR 产物,M 为 pGEM-3Zf(+)/Hae III Markers

色体隐性、显性和 X-连锁遗传等不同遗传方式。SMA 临床表现和分类复杂,既往主要依靠临床病史体征、肌电图及肌肉活检组织化学染色检查进行诊断,无特异性诊断方法,容易误诊。1995 年儿童型 SMA 基因被定位于 5q13.1,并被克隆,运动神经元生存基因(survival motor neuron gene, SMN)被认为是 SMA 的确定基因。外国学者应用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)技术发现 98.6% 的 SMA 患者端粒 SMN 基因(SMNt, SMN1)缺失^[7],并应用于临床进行基因诊断儿童型 SMA。国内吴志英等^[8]发现国人 SMA 患者 SMNt(SMN1)基因缺失频率高达 95% 以上,因此也适用于国人儿童型 SMA 的基因诊断。诊断方法除了应用 SSCP 技术,还可用聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态(PCR-RFLP)技术、变性高效液相色谱(DHPLC)^[9]、高分辨溶解分析(HRM)^[10]、短串联重复系列连锁分析(STR 连锁分析)等。对临床可疑 SMA 患者首先进行 SMN1 基因缺失分析,如有缺失则可确诊 SMA,无缺失者根据临床病史体征、肌电图及肌肉活检组织化学染色检查传统方法进行诊断。

SMA 目前无有效治疗方法,遗传咨询、产前诊断及阻止患儿的出生是预防本病的有效方法。根据 SMA 家族遗传规律,夫妻双方家族皆有 SMA 病史,则应于怀孕前进行基因筛查以确定两人是否为基因携带者;夫妻两人确诊为 SMA 基因携带者或

曾经生过 SMA 患儿,则需进行胎儿 SMA 产前基因诊断。

SMA 产前基因诊断获取标本的方法有绒毛活检和羊膜腔穿刺术。绒毛活检在 $11^{+0} \sim 13^{+6}$ 孕周早孕期完成,羊膜腔穿刺则在孕中期(16~20 周)检查。当胎盘位于后壁无法进行绒毛活检取样时,羊膜腔穿刺则成为获取标本的惟一途径。Caughey AB 等^[11]认为 $11^{+0} \sim 13^{+6}$ 孕周绒毛活检术与羊膜腔穿刺术胎儿损失情况无显著性差异。而 Csaba A 等^[12]在比较羊膜腔穿刺术、经腹绒毛活检术和经宫颈绒毛活检术的疼痛程度后得出孕妇均能承受上述 3 种检查方法引起的疼痛,而经腹绒毛活检术最终,经宫颈绒毛活检术疼痛最轻。我们采用超声引导下羊膜腔穿刺 21 例孕 17~20 周的孕妇,均可选择避开腹壁较大的血管、胎盘及胎儿颜面部周围的羊水池作为进针路线,一次穿刺成功,抽取的羊水均为澄清的羊水,21 例羊膜腔穿刺术后无一例出现羊膜破裂、自然流产、感染、羊水栓塞、急性羊水过少、胎儿损伤等并发症,获取的标本无一例出现母血污染,且我们所采用的基因诊断方法是联合运用限制性片段长度多态(RFLP)技术和短串联重复系列连锁分析(STR 连锁分析)法检测羊水 DNA 中运动神经元生存 1 基因(SMN1)是否有缺失,并用 STR 连锁分析法排除母血的污染。在 SMA 产前诊断中限制性片段长度多态性(RFLP)技术使结果清晰可靠^[4],但该技术无法排除母血的污染,也无法检测出基因携带者,STR 连锁分析不但可以排除母血污染、还可产前检测出基因携带者^[5],对胎儿携带者的判定将为 SMA 家系提供更全面的遗传咨询。本组病例检出 3 例 SMA 基因携带者,对其成人后婚配中必须避免与 SMA 基因携带者结婚具有重要的指导意义。目前携带者的检测除了应用 STR 连锁分析外还可用一种名为多重连接探针扩增法(multiple ligation-dependent probe amplification,MLPA)进行检测^[13]。

综上所述,超声引导行羊膜腔穿刺抽取羊水是产前基因诊断脊髓性肌萎缩症获取标本的安全有效途径。联合运用限制性片段长度多态性(RFLP)技术和短串联重复系列连锁分析(STR 连锁分析)法检测不但可产前基因诊断 SMA,还可排除母血的污染,且可产前诊断是否为 SMA 基因携带者,进一步完善了 SMA 产前诊断体系。这一技术的开展和应

用对优生优育、提高人口素质有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Chen WJ, Wu ZY, Lin MT, et al. Molecular analysis and prenatal prediction of spinal muscular atrophy in Chinese patients by the combination of restriction fragment length polymorphism analysis, denaturing high-performance liquid chromatography, and linkage analysis [J]. Archives of Neurology, 2007,64(2):225-231.
- [2] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Quantitative studies on SMN1 gene and carrier testing of spinal muscular atrophy[J]. 中华医学遗传学杂志,2005,22(6):559-602.
- [3] 王阳,麻宏伟,宓真,等.一种脊髓性肌萎缩症快速、简便的基因诊断方法[J].中华医学遗传学杂志,1997,14(6):384.
- [4] 王柠,吴志英,慕容慎行,等.脊髓性肌萎缩症的快速基因诊断研究[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,1999,6(2):124-126.
- [5] 苏峻峰,陈万金,吴志英,等.短串联重复系列位点的优选及其在脊髓性肌萎缩症产前诊断中的应用[J].中华神经科杂志,2007,40(7):460-464.
- [6] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium Meeting[J]. Neuromuscul Disord,1992,2:423-428.
- [7] Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene[J]. Cell,1995,80:155-165.
- [8] 吴志英,王柠,慕容慎行,等.单链构象多态技术检测脊髓性肌萎缩症基因缺失[J].中华神经科杂志,1998,31(5):289-291.
- [9] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using denaturing high-performance liquid chromatography[J]. 中华医学遗传学杂志. 2005,22(3):291-293.
- [10] Chen WJ, Dong WJ, Lin XZ, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using High-Resolution Melting Analysis [J]. BMC Med Genet,2009,29(10):45.
- [11] Caughey AB, Hopkins LM, Norton ME. Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss[J]. Obstet gynecol,2006,108(3):612-616.
- [12] Csaba A, Bush MC, Saphier C, et al. How painful are amniocentesis and chorionic villus sampling [J]? Prenatal Diagnosis,2006(1):35-38.
- [13] Zeng J, Lan F, Deng X, et al. Evaluation of in-house protocol for prenatal molecular diagnosis of SMA in Chinese [J]. Clinica Chimica Acta,2008,398:78-81.

编辑:陈立斌

(收稿日期:2011-03-09)