

# 脊髓性肌萎缩症临床诊断研究进展

王柠 何瑾 陈万金

**【摘要】** 脊髓性肌萎缩症系由脊髓前角运动神经元退行性变而导致的进行性、对称性肌无力和肌萎缩的一类常染色体隐性遗传性疾病,其致病基因为运动神经元生存(SMNI)基因。临床上共分为 4 种类型即脊髓性肌萎缩症 I、II、III 和 IV 型,其临床诊断主要依赖于临床表现、家族遗传史、实验室检查及基因检测。目前尚无有效治疗方法,因此产前诊断和对基因携带者的筛查为有效预防措施。

**【关键词】** 肌萎缩, 脊髓性; 基因缺失; 产前诊断; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.005

## The research progress of clinical diagnosis of spinal muscular atrophy

WANG Ning, HE Jin, CHEN Wan-jin

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China

Corresponding author: WANG Ning (Email: nwang63@yahoo.com.cn)

**【Abstract】** Spinal muscular atrophy (SMA) is a common autosomal recessive neuromuscular disease caused by degeneration of anterior horn cell in spinal cord. The clinical feature is characterized by progressive symmetrical myasthenia and amyotrophy. The disease is caused by mutation of survival motor neuron (SMNI) gene. Four clinical types are defined for SMA: type I, II, III and IV. The diagnosis depends on clinical manifestation, inherited history, laboratory test and genetic analysis. To date, there is no effective treatment for SMA, so prenatal diagnosis and carrier screening are important for the prevention of this disease.

**【Key words】** Muscular atrophy, spinal; Gene deletion; Prenatal diagnosis; Review

**Fund Project:** National Natural Science Foundation of China (No. 30900481); Fujian Medical Innovating Program (No. 2009-CXB-25)

脊髓性肌萎缩症(SMA)是一种源于脊髓前角变性引起肌无力和肌萎缩的神经系统常染色体隐性遗传性疾病,发病率为 1/6000~1/10 000<sup>[1]</sup>,为仅次于囊性纤维增生症<sup>[2]</sup>的临床常见常染色体隐性遗传性疾病,其致病基因是位于 5q13 的运动神经元生存(SMN)基因。脊髓性肌萎缩症主要表现为肢体近端和躯干肌肉无力和萎缩,目前尚无有效的治疗方案。脊髓性肌萎缩症的临床诊断主要依赖于临床表现、家族遗传史、实验室检查及基因检测。

### 一、临床诊断

脊髓性肌萎缩症于 1891 年由 Guido Werdnig 首次报告<sup>[1]</sup>,其临床表现变异较大,发病年龄从出生至

数十岁,运动障碍从抬头不能至可独立行走,生存时间从数月至成年。1991 年,脊髓性肌萎缩国际协作会议根据脊髓性肌萎缩症的临床表型共将其分为 4 型<sup>[3]</sup>:脊髓性肌萎缩症 I 型(Werdnig-Hoffman 病),亦称严重型,出生后 6 个月内发病,患儿无法坐立,通常在 2 岁前死亡,是所有临床分型中最严重的一型;脊髓性肌萎缩症 II 型,又称中间型,于出生后 6~18 个月发病,患儿能坐但无法站立和行走,生存期超过 2 岁,主要视呼吸系统并发症发生情况而定;脊髓性肌萎缩症 III 型(Kugelburg-Welander 病),一般于出生 18 个月后发病,患儿能够独立行走,病情进展缓慢,可生存至成年;脊髓性肌萎缩症 IV 型,亦称为成年型,发病年龄 15~60 岁,以 35 岁左右为高发年龄,发病和进展隐匿,生存时间与正常人无异,患者可出现行走困难<sup>[4]</sup>。

脊髓性肌萎缩症的主要临床表现为四肢近端肌肉萎缩,肌张力降低,腱反射减弱,但病理征阴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30900481);福建省医学创新课题资助项目(项目编号:2009-CXB-25)

作者单位:350005 福州,福建医科大学附属第一医院神经内科

通讯作者:王柠(Email:nwang63@yahoo.com.cn)

性。其临床表现难与其他类型运动神经元病及肌营养不良症相鉴别。脊髓性肌萎缩症的辅助检查主要为血清肌酶检测、电生理学检查、肌肉活检病理检查。患者血清肌酸激酶(CK)水平多于正常值范围或仅轻度升高,复旦大学附属华山医院神经内科和福建医科大学附属第一医院神经内科曾对一组脊髓性肌萎缩症患者的血清肌酸激酶水平进行分析,55 例患者平均测值为(244.16 ± 256.63) U/L (39~1388 U/L),呈轻度升高,其中以Ⅲ型患者血清肌酸激酶水平最高<sup>[5]</sup>。脊髓性肌萎缩症患者肌电图主要表现为神经元性损害,可反映 4 种类型脊髓性肌萎缩症的严重程度和进展情况,但其异常改变相似,包括纤颤电位和复合运动单位动作电位波幅、时限增加及干扰相减少<sup>[6]</sup>。肌肉组织活检其病理特征呈现失神经支配和神经再支配现象,存在大组分布的圆形萎缩肌纤维,常累及整个肌束(束性萎缩),亦可见肥大纤维散在分布于萎缩肌纤维之中;ATP 酶染色可见 I 型和 II 型纤维同时受累<sup>[7]</sup>。由于基因检测技术日趋成熟,目前肌肉活检已不作为确诊脊髓性肌萎缩症的常规检查项目。由于该病症的临床表现及辅助检查均无明显特异性,因此,很难与其他神经肌肉疾病相鉴别,近年来对脊髓性肌萎缩症的临床诊断更多依赖于基因检测。

## 二、致病基因

脊髓性肌萎缩症的致病基因为 SMN 基因,于 1995 年由法国学者 Lefebvre 等<sup>[8]</sup>首次克隆成功。该基因定位于 5q13,其区域结构复杂,存在的重复序列及众多假基因簇导致其结构不稳定,易引起基因缺失、转换<sup>[3]</sup>。5q13 区域共包含 SMN 基因、神经元凋亡抑制蛋白(NAIP)、编码基本转录因子 IIH 亚单位 2 号多肽(GTF2H2)和 H4F5 基因,经研究发现,SMN 基因为脊髓性肌萎缩症的致病基因,其余 3 种基因均为修饰基因<sup>[9]</sup>。SMN 基因存在 2 个高同源性拷贝,分别为端粒侧 SMN1(SMN<sub>t</sub>)和着丝粒侧 SMN2(SMN<sub>c</sub>);二者仅存在 5 个碱基差异,其中有 2 个碱基位于第 7 和 8 号外显子。SMN1 缺失是引起脊髓性肌萎缩症的主要原因,约 95% 患者表现为 SMN1 基因缺失,其余可呈 SMN1 基因微小突变<sup>[10]</sup>。有动物实验显示,小鼠仅有 1 条 Smn 基因,Schrank 等<sup>[11]</sup>敲除小鼠 Smn 基因后发现小鼠于胚胎早期即死亡。然而,在敲除 Smn 基因小鼠中插入人类 SMN2 基因,小鼠存活且表现与脊髓性肌萎缩症患者类似的状况<sup>[12]</sup>。目前尚未见 SMN1 和 SMN2 基因同时纯

合缺失的病例报道<sup>[9]</sup>。SMN2 被普遍认为是脊髓性肌萎缩症的修饰基因,其拷贝数与疾病严重程度显著相关,且与脊髓性肌萎缩症 I 型患者生存时间相关<sup>[13]</sup>。临床症状较轻的脊髓性肌萎缩症 II 和 III 型患者通常 SMN2 基因拷贝数较症状严重的脊髓性肌萎缩症 I 型患者多,大多数脊髓性肌萎缩症 I 型患者仅有 1~2 个拷贝 SMN2 基因,大多数脊髓性肌萎缩症 III 型患者有 3~4 个拷贝 SMN2 基因<sup>[2]</sup>。因此近年来有学者根据发病时间、临床表现、病死时间及 SMN2 拷贝数,对脊髓性肌萎缩症进行更为细致的分型(表 1)<sup>[1]</sup>。

表 1 脊髓性肌萎缩症临床分型

Table 1. Classification of spinal muscular atrophy

类型	发病时间	运动能力	病死时间	SMN2 拷贝数
0	胎儿期	呼吸机辅助	<1 个月	1
I 型	0~6 个月	不能独坐	<2 岁	2
II 型	<18 个月	不能站立	>2 岁	3,4
III 型	>18 个月	能独自站立	成年	
III a 型	18 个月~3 岁	能独自站立	成年	3,4
III b 型	>3 岁	能独自站立	成年	4
IV 型	>21 岁	能独自站立	成年	4~8

## 三、基因检测方法及临床应用

1. 连锁分析 连锁分析最早用于脊髓性肌萎缩症的基因诊断<sup>[14]</sup>。5q13 区域内有许多与脊髓性肌萎缩症紧密连锁并具有高度多态性的 DNA 标记,排列顺序从着丝粒侧至端粒侧分别为: D5S679、D5S680、D5S125、D5S681、D5S435、D5S629、D5S823,以及 D5S1556/D5F150、D5S149(SMN1)、D5S557、D5S610、D5S351、5'-MAPIB、3'-MAPIB、D5S112、D5S127 和 D5S539<sup>[15]</sup>。连锁分析凭借着无需知道基因突变性质和位置的技术优势,最早用于脊髓性肌萎缩症的基因诊断,但由于其操作方法繁琐,现已逐渐被其他检测方法所取代。

2. SMN1 纯合缺失检测 SMN1 以纯合突变为 主,约 95% 的脊髓性肌萎缩症患者为 SMN1 纯合缺失或由 SMN1 转化为 SMN2 导致 SMN1 缺失,故临床上常通过检测 SMN1 基因的纯合缺失而诊断脊髓性肌萎缩症。(1)聚合酶链反应-单链构象多态(PCR-SSCP)技术:可用于检测 SMN1 第 7 和 8 号外显子缺失。SMN1 基因和 SMN2 基因在第 7 和 8 号外显子分别有单个碱基的差异,利用 PCR-SSCP 可区别单个

碱基的差异,从而确定 *SMN1* 基因第 7 和 8 号外显子缺失情况。本课题组的前期研究应用 PCR-SSCP 技术对 16 个家系中的 20 例诊断明确的脊髓性肌萎缩症患者及 20 例正常对照者的 *SMN* 基因第 7 和 8 号外显子进行检测,发现第 7 号外显子缺失率达 100%、第 8 号外显子缺失率为 95%<sup>[16]</sup>。PCR-SSCP 技术操作步骤较为繁琐,实验结果易受温度及实验室环境的影响,容易出现假阳性或假阴性结果,因此目前临床检测较少采用此方法。但 PCR-SSCP 技术可用于检测杂合缺失 *SMN1* 患者基因内的微小突变<sup>[13]</sup>。

(2) 聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性 (PCR-RFLP) 检测:是一种用于检测 *SMN1* 基因纯合缺失的基因检测技术。分别对 *SMN* 第 7 和 8 号外显子进行 PCR 扩增,在第 7 号外显子中,限制性内切酶 *Dra* I 消化 PCR 扩增产物,*SMN1* 片段上无该酶切位点,不能被切割;*SMN2* 片段采用错配引物构建了一个 *Dra* I 位点,故能被酶切消化。同样,在第 8 号外显子中,由于 *SMN2* 片段存在 *Dde* I 位点,酶切后可以获得 2 条片段,*SMN1* 无此位点,因此无法被切割<sup>[17]</sup>。当 *SMN1* 呈纯合缺失时,琼脂糖凝胶电泳结果可显示 *SMN1* 电泳条带缺失。PCR-RFLP 操作方法简便,结果清晰可靠,容易判断,因此目前在临床检测中较为常用。PCR-RFLP 的缺点是,由于酶切不完全而产生的假阴性结果,而且无法检测 *SMN1* 杂合缺失患者的微小突变。

3. *SMN1* 基因微小突变的检测 约 5% 的脊髓性肌萎缩症患者为 *SMN1* 杂合缺失,由于 *SMN1* 与 *SMN2* 基因仅有 5 个碱基的差异,分离 *SMN1* 基因的难度较大,因此临床上较少对 *SMN1* 基因微小突变进行检测。对于 *SMN1* 微小突变检测的主要困难是对 *SMN1* 拷贝数目的分析和分离 *SMN1* 基因(*SMN1* 拷贝数分析将在 *SMN1* 基因定量分析中介绍)。分离 *SMN1* 基因主要是利用 *SMN1* 与 *SMN2* 基因序列之间的差异。Clermont 等<sup>[18]</sup>采用全长 PCR (long-range PCR) 技术分离获得 *SMN1* 基因,并对 12 例患者进行了微小突变检测,于该基因第 6 号外显子上发现 5 个微小突变。迄今为止,已报道的 *SMN1* 微小突变已有 50 余种,突变类型包括错义、移码、无义和剪接位点突变等,这些突变较常见于 *SMN1* 基因第 3 和 6 号外显子<sup>[18]</sup>。

4. *SMN* 基因的定量分析 *SMN* 基因定量分析方法常用于患者与携带者 *SMN1* 基因拷贝数分析,以及对患者 *SMN2* 基因拷贝数分析,从而进一步分

析基因型与临床表型之间的关系。(1) 变性高效液相色谱 (DHPLC) 法:作为一种自动、快速、高通量基因突变和多态性筛查技术, DHPLC 近年来在临床广泛应用。检测基因突变和多态性分析的基本原理是 DNA 在变性、逐步降温退火后,杂合型和野生型 PCR 扩增产物在形成同源双链的同时也错配形成异源双链。在部分变性条件下,发生错配的异源双链 DNA 更易解链为单链 DNA,与 DNA 洗脱柱的结合力降低,比同源双链 DNA 分子更易被洗脱剂洗脱,从而与同源双链 DNA 分离<sup>[19]</sup>。应用 DHPLC 技术也可对 *SMN1* 和 *SMN2* 基因拷贝数进行检测,在正常对照者中可见 *SMN1/SMN2* 异源双链、*SMN2* 同源双链、*SMN1* 同源双链 3 个色谱峰,根据峰高和峰面积计算 *SMN1*、*SMN2* 的拷贝数目<sup>[20]</sup>。可通过设计内参照物使 *SMN1* 拷贝数目分析结果更加准确<sup>[21]</sup>。DHPLC 技术的缺点为分辨力受 PCR 引物、反应条件,以及检测时柱温的选择、洗脱剂等诸多因素的影响,结果稳定性欠佳<sup>[19]</sup>。

(2) 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测:系指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测扩增产物的量变情况。在 PCR 扩增反应达到平台期前,靶序列的扩增以相对固定的指数形式增加。起始目的基因拷贝数目越多,达到平台期所需的循环数越少。以循环数为横坐标、以一系列标准 DNA 分子的起始拷贝数的对数为纵坐标绘制坐标图,未知样本中的基因拷贝数通过与这种标准曲线相对照而进行定量分析。本课题组曾先后应用实时荧光定量 PCR 检测技术对 *SMN1* 和 *SMN2* 基因拷贝数目进行分析<sup>[22]</sup>,并探讨 *SMN2* 与临床表型之间的关系<sup>[23]</sup>,取得了较好的效果。实时荧光定量 PCR 检测技术要求对基因组 DNA 精确定量且纯度一致,方可保证扩增效率一致,结果才可靠。

(3) 多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 技术:为 Schouten 等<sup>[24]</sup>在 2002 年建立的一项灵敏度较高的相对定量检测技术,利用简单的杂合 (hybridization)、连接 (ligation) 及 PCR 扩增 (PCR amplification) 反应,于单一反应管内同时检测最多可达 40 种不同的核苷酸序列的拷贝数目变化。荷兰 MRC-Holland 公司生产的脊髓性肌萎缩症检测试剂盒 (SALSA MLPA KIT P021) 可同时检测 *SMN1* 第 7 和 8 号外显子, *SMN2* 第 7 和 8 号外显子, *SMN1* + *SMN2* 的第 1、4、6 和 8 号外显子,所得结果经与参考值比对后,能够分别获得 *SMN1*、*SMN2* 和 *SMN1* + *SMN2* 的拷贝数;另外,可提供 21 种位于不



同染色体上的内参照探针,因此对于拷贝数目的计算更加准确可靠。该检测试剂盒还包含针对 *NAIP* 和 *GTF2H2* 基因的探针,可同时对多种基因进行分析,利于基因型与临床表型之间的关系分析<sup>[25]</sup>。MLPA 法对基因组 DNA 定量的要求不似实时荧光定量 PCR 那样严格,众多内参照物与目的基因均采用同一对引物即可扩增,从而保证了目的基因与内参照基因扩增效率的一致性。(4)其他定量检测方法:Kao 等<sup>[26]</sup>亦选择 *KRIT1* 及 *CYBB* 基因作为内参照物,与目的基因 *SMN* 基因第 7 号外显子进行竞争性 PCR,扩增产物经毛细管电泳(CE)分离后,根据 *SMN* 基因与参照基因峰面积比值计算相对 *SMN* 基因之总拷贝数。PCR 扩增产物经纯化后再以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)法分离 *SMN1* 及 *SMN2*,检测 *SMN1* 和 *SMN2* 占总 *SMN* 基因拷贝数的相对比值,即可得出 *SMN1* 和 *SMN2* 拷贝数。Wang 等<sup>[27]</sup>采用类似方法研究 *SMN* 基因拷贝数。但是他们通过优化毛细管电泳分离的条件,使毛细管电泳能够因一个核苷酸差异而分离获得 *SMN1* 和 *SMN2* 基因,再根据 *SMN1* 和 *SMN2* 与参照峰高比值,计算 *SMN1* 及 *SMN2* 的拷贝数。而 MALDI-TOF MS 及毛细管电泳分离法仅根据单个核苷酸差异而分离 *SMN1* 和 *SMN2*,因此操作难度较大,精确度亦较低。

5. 产前诊断 脊髓性肌萎缩症目前尚无有效的治疗方法,患者生活质量明显下降,给社会和家庭带来沉重负担,因此进行准确的产前诊断尤其重要。目前临床常用的检测方法,是通过采集孕早期或中期羊水、绒毛或宫颈脱落滋养层细胞进行检测。脊髓性肌萎缩症患者产前基因诊断的标本主要为羊水,于超声引导下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安全而有效的途径<sup>[28]</sup>。在羊水采集操作过程中若发生母血污染,可通过羊水细胞培养、短串联重复(STR)位点单体型连锁分析等方法加以排除。本课题组经筛选共获得 11 种与 *SMN* 基因紧密连锁的 STR 位点,通过分析从中优选出 3 个遗传信息量丰富的位点,对 6 个脊髓性肌萎缩症家系(包括父母、先证者和胎儿)进行连锁分析,在快速进行脊髓性肌萎缩症产前基因诊断、有效排除母血污染方面取得了较好的效果<sup>[29]</sup>。传统产前诊断的缺点在于需要进行羊膜腔或绒毛膜穿刺,这些有创性操作有导致医源性流

产的可能,同时,若产前诊断结果提示胎儿存在先天性缺陷,需要通过引产或人工流产来终止妊娠,对孕妇造成的身心创伤较大。植入前遗传学诊断是体外受精后,对受精卵进行基因检测,筛选正常受精卵植入子宫,对孕妇的身心创伤较小。其缺点在于需要借助辅助生殖、单细胞扩增等技术,故较难在临床推广应用。本课题组的前期研究进行了脊髓性肌萎缩症患者单个淋巴细胞的分离、扩增,为植入前基因检测进行了技术储备<sup>[30]</sup>。

6. 携带者筛查 与产前基因诊断相同,携带者的筛查也是预防措施之一,具有重要临床意义。脊髓性肌萎缩症携带者的筛查主要针对有明确或可疑脊髓性肌萎缩症家族史的个体<sup>[2]</sup>。利用实时荧光定量 PCR、MLPA 等定量检测技术可分析携带者 *SMN1* 拷贝数,本课题组对 88 例诊断明确的脊髓性肌萎缩症患者的父母的 *SMN1* 拷贝数进行分析,结果显示,其中 84 例 *SMN1* 基因为 1 个拷贝、4 例 *SMN1* 基因为 2 个拷贝<sup>[22]</sup>。值得注意的是:有 4% 携带者呈杂合状态<sup>[15]</sup>,即携带 2 个拷贝 *SMN1* 基因的受试者也有可能是脊髓性肌萎缩症携带者,其 1 条染色体上存在 2 个拷贝或更多拷贝的 *SMN1* 基因,另 1 条染色体则无 *SMN1* 基因。目前的定量检测技术尚无法对此类携带者进行检测,仅能通过确诊患者父母的 *SMN1* 基因拷贝数结合家族史调查确定。

#### 四、展望

自 1995 年发现脊髓性肌萎缩症致病基因后,给原本无有效治疗方法的患者带来曙光。由于 *SMN* 基因终止密码子位于第 7 号外显子上,其第 8 号外显子不参与编码氨基酸,因此,*SMN1* 和 *SMN2* 编码序列仅存在一个碱基差异,即位于第 7 号外显子上 C>T 的差异。虽然这种差异为同义突变,但仍然影响基因剪接过程,可导致 *SMN2* 基因仅能产生 10%~15% 具有功能的 *SMN* 全长蛋白<sup>[1]</sup>。产生的大部分 *SMN* 截短蛋白结构不稳定,容易降解。*SMN2* 基因拷贝数与疾病严重程度相关,且与脊髓性肌萎缩症 I 型患者的生存时间相关<sup>[12]</sup>。这可能与 *SMN2* 基因能够表达部分功能性 *SMN* 全长蛋白,起到一定的补偿作用有关。目前,脊髓性肌萎缩症治疗思路主要是促使 *SMN2* 基因表达全长 *SMN* 蛋白,进一步研究可能刺激 *SMN2* 基因表达有功能的蛋白质的药物,也许可为今后治疗脊髓性肌萎缩症开辟一条新的途径。

## 参 考 文 献

- [1] Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol*, 2011, 68:979-984.
- [2] Prior TW, Nagan N, Sugarman EA, et al. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genet Med*, 2011, 13:686-694.
- [3] Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*, 1992, 2(5/6):423-428.
- [4] Wang N, Wu ZY, Murong SX. Molecular genetic studies on spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 1999, 32:177-179.[王柠, 吴志英, 慕容慎行. 脊髓性肌萎缩症的分子遗传学研究. *中华神经科杂志*, 1999, 32:177-179.]
- [5] Zhang Y, Huang JJ, Wang ZQ, et al. Value of muscle enzyme measurement in evaluating different neuromuscular diseases. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(3/4):520-524.
- [6] Wang N, Wu ZY, Murong SX. Spinal muscular atrophy. *Lin Chuang Shen Jing Bing Xue Za Zhi*, 1996, 9:60-63.[王柠, 吴志英, 慕容慎行. 脊髓性肌萎缩症. *临床神经病学杂志*, 1996, 9:60-63.]
- [7] Li XG, Guo YP, Liu TC, et al. Clinical and pathological investigation of spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2000, 33:32-35.[李晓光, 郭玉璞, 刘天慈, 等. 脊髓性肌萎缩症临床与肌肉病理学研究. *中华神经科杂志*, 2000, 33:32-35.]
- [8] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80:155-165.
- [9] Long MJ, Song F. Progress of genetic diagnosis of spinal muscular atrophy and quantitative analysis of SMN gene. *Guo Ji Er Ke Xue Za Zhi*, 2008, 35:88-91.[龙美娟, 宋昉. 脊髓性肌萎缩症的基因诊断和SMN基因定量分析研究进展. *国际儿科学杂志*, 2008, 35:88-91.]
- [10] Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10:597-609.
- [11] Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:9920-9925.
- [12] Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn* (-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 2000, 9:333-339.
- [13] Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, 2002, 70:358-368.
- [14] Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet*, 2002, 111:477-500.
- [15] Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G, et al. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9:484-491.
- [16] Wu ZY, Wang N, Murong SX, et al. Using polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism to detect SMN<sup>T</sup> gene deletions and to confirm clinical diagnosis of spinal muscular atrophy in Chinese. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 1998, 31:289-291.[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. *中华神经科杂志*, 1998, 31:289-291.]
- [17] Van der Steege G, Grootsholten PM, Van der vliet P, et al. PCR - based DNA test to confirm the clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet*, 1995, 345:985-986.
- [18] Clermont O, Bulet P, Benit P, et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat*, 2004, 24:417-427.
- [19] Liu MR, Pan KF, Wang Y, et al. Influence of DNA polymerases on mutation screening of denaturing high - perform liquid chromatography. *Ai Zheng*, 2002, 21:1160-1163.[柳满然, 潘凯枫, 王祎, 等. DNA聚合酶对变性高效液相色谱在基因突变检测中的影响. *癌症*, 2002, 21:1160-1163.]
- [20] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using denaturing high - performance liquid chromatography. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2005, 22:291-293.
- [21] Shaw SW, Cheng PJ, Chang SD, et al. Rapid prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by denaturing high - performance liquid chromatography system. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87:960-968.
- [22] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Quantitative studies on SMN1 gene and carrier testing of spinal muscular atrophy. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2005, 22:599-602.[陈万金, 吴志英, 王柠, 等. 脊髓性肌萎缩症SMN1基因定量研究及基因携带者的筛查. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22:599-602.]
- [23] Chen WJ, Wu ZY, Wang N, et al. Relation between copy numbers of SMN2 and clinical phenotype of spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2005, 38:673-676.[陈万金, 吴志英, 王柠, 等. 脊髓性肌萎缩症运动神经元生存基因2拷贝数与临床表型的关系. *中华神经科杂志*, 2005, 38:673-676.]
- [24] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:e57.
- [25] Arkblad E, Tulinius M, Krokmark AK, et al. A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr*, 2009, 98:865-872.
- [26] Kao HY, Su YN, Liao HK, et al. Determination of SMN1/SMN2 gene dosage by a quantitative genotyping platform combining capillary electrophoresis and MALDI - TOF mass spectrometry. *Clin Chem*, 2006, 52:361-369.
- [27] Wang CC, Chang JG, Ferrance J, et al. Quantification of SMN1 and SMN2 genes by capillary electrophoresis for diagnosis of spinal muscular atrophy. *Electrophoresis*, 2008, 29:2904-2911.
- [28] Liu XX, Chen WJ, Ye Z, et al. The application of amniocentesis in prenatal gene diagnosis of spinal muscular atrophy by ultrasonic guidance. *Zhongguo Chan Qian Zhen Duan Za Zhi (Dian Zi Ban)*, 2011, 3:13-16.[刘新秀, 陈万金, 叶真, 等. 超声引导羊膜腔穿刺产前基因诊断脊髓性肌萎缩症. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2011, 3:13-16.]
- [29] Su JF, Chen WJ, Wu ZY, et al. Optimization of short tandem repeats and their application in prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2007, 40:460-464.[苏峻峰, 陈万金, 吴志英, 等. 短串联重复序列位点的优选及其在脊髓性肌萎缩症产前诊断中的应用. *中华神经科杂志*, 2007, 40:460-464.]
- [30] Su JF, Chen WJ, Wu ZY, et al. Establishment and preliminary application of single cell nested polymerase chain reaction technique in spinal muscular atrophy. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2008, 8:129-133.[苏峻峰, 陈万金, 吴志英, 等. 脊髓性肌萎缩症单细胞巢式聚合酶链反应技术的建立及初步应用. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8:129-133.]

(收稿日期:2012-04-30)