

脊髓性肌萎缩的基因诊断、筛查及防治现状与前景

赵清¹, 逯军^{2*} (1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院, 海南海口 570208; 2. 广东医科大学附属医院, 广东湛江 524000)

摘要: 随着检测技术的不断更新迭代, 脊髓性肌萎缩症(SMA)基因诊断与筛查技术从定性检测技术逐步发展为以MLPA和qPCR为主的定量检测技术, 治疗手段也从无特效治疗进展为蛋白替代和基因修饰治疗。该文综述了SMA基因诊断、筛查和防治现状, 旨在为SMA诊断、筛查与防治提供新思路。

关键词: 脊髓性肌萎缩; 儿童; 基因诊断

中图分类号: R 725.8

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 06-0691-05

Current situation and prospect of genetic diagnosis, screening and prevention of spinal muscular atrophy

ZHAO Qing¹, LU Jun^{2*} (1. Affiliated Haikou Hospital of Xiangya Medical School, Central South University, Haikou 570208, China; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China)

Abstract: With the continuous update and iteration of the detection techniques, genetic diagnosis and screening technology of spinal muscular atrophy (SMA) have gradually developed from qualitative to quantitative assays (mainly MLPA and qPCR). The treatment methods have also progressed from unspecific treatment to protein replacement and gene modification therapy. This paper reviews the current situation of genetic diagnosis, screening, prevention and treatment of SMA, which provides new ideas for the diagnosis, screening and prevention of SMA.

Key words: spinal muscular atrophy; children; genetic diagnosis

脊髓性肌萎缩症(SMA)是一类常染色体隐性、显性和X连锁隐性遗传病, 病理改变为脊髓前角 α 运动神经元变性, 临床表现为肢体近端进行对称性肌肉容积缩小和肌力下降^[1]。SMA分为儿童型和成人型, 儿童型SMA人群发病率为1/10 000~1/6 000, 成人型SMA人群发病率为32/10万^[2]。1990年学者发现SMA致病基因位于染色体5q11.2-13, 5年后分离出SMA的致病基因, 即运动神经元存活基因(SMN1)。5q13区域存在与SMN1基因同源的SMN2基因, SMN2可以代偿SMN1的部分功能^[3]。近年来SMA治疗进展包括反义核苷酸、SMN2蛋白替代治疗、基因增补修饰和干细胞移植^[4]。本文对SMA的基因诊断、筛查到预防治疗的研究现状作一综述, 旨在为SMA诊断、筛查与防治提供新的思路与前景。

1 SMA相关基因

SMA相关基因包括SMA1致病基因和表型修饰基因, 其中表型修饰基因包括SMN2基因、锌指蛋白1(ZPR1)基因、神经细胞凋亡抑制蛋白(NAIP)基因、网质3(PLS3)基因和神经钙蛋白 δ (NCALD)基因。SMN1位于染色体5q13区, 在其靠近着丝粒侧的SMN2基因在序列上存在5个碱基不同, 其中第7外显子上的单碱基差异(c.840C/T)是关键位点, 其具有外显子剪切增强子活性。95%左右的SMA是由于SMN1基因第7外显子或第7~8外显子双等位基因纯合缺失所致, 另外约5% SMA携带无义突变、移码或错义突变等点突变^[5]。目前国际上报道的SMN1微小变异超过90种, 我国报道近30种, 其中7种为明确致病性变异, 如第1外显子c.22dupA、第5外显子c.683TA

收稿日期: 2023-06-02

基金项目: 广东医科大学附属医院高层次人才科研启动基金(1057Z20230003)

作者简介: 赵清(1994-), 女, 硕士, 住院医师, E-mail: 624061450@qq.com

通信作者: 逯军(1967-), 男, 博士, 主任医师, E-mail: Lu139762@163.com

和第5外显子c.689C>T等^[6]。然而,仅有10%左右的SMN2可表达全长有功能的SMN蛋白,其变异一般不引起临床症状。另外,由于SMN1和SMN2在人体内能相互转换,因而SMN2拷贝数增加可缓解SMA的临床症状,这也是SMA患者临床分型及基因替代治疗的主要参考依据。

1.1 SMN1 基因

SMN1 基因为SMA的致病基因,与其高度同源的SMN2 基因为SMA的修饰基因。所有SMA患者均存在SMN1 双等位基因突变,突变形式主要为第7或第7、8外显子纯合缺失突变,约占96%。在SMA1型患者中多为真正的SMN1 基因纯合缺失,SMA2或3型中可出现SMN1 基因转化为SMN2 基因,使SMN2 基因拷贝数增多。若发生不完全转换时,会出现SMN1/SMN2 融合基因。另一种突变为复合杂合突变,约占4%,即1个SMN1 基因缺失伴随另1个SMN1 基因内的微小突变。国内学者通过改良RT-PCR技术识别SMN1 微小突变,中国人群最常见的SMN1 基因微小突变形式为发生在1号外显子^[7-8]。另外还有一种突变目前仅在近亲婚配家庭中发现,即2个SMN1 基因均发生微小突变^[9]。此外,基因拷贝数在不同种族人群中也有明显差异性^[10]。相比其他种族人群,非裔SMN1 基因拷贝数更多,SMN2 拷贝数更少,且缺失7号和8号外显子SMN1 或SMN2 基因这一变异体的拷贝数与SMN2 拷贝数呈负相关。

1.2 表型修饰基因

1.2.1 SMN2 基因 SMN2 基因拷贝数与SMA病情严重程度呈负相关。根据发病严重程度SMA分为0~IV型,0型中SMN2 拷贝数多为1,1型拷贝数多为2,2型拷贝数多为3,3型拷贝数多为3-4,4型拷贝数多为4^[11]。近期国内关于SMA患儿家庭SMN1 和SMN2 拷贝数的家系研究发现,父母双方SMN2 基因平均拷贝数可在一定程度上预测子代病情严重程度,若亲代SMN2 平均拷贝数为3,则其患病子代均为SMA2或3型^[12]。但是,SMN2 拷贝数与临床分型并非完全对应。一些研究对SMN2 基因进行测序分析发现,SMN2 内c.859G>C突变与较轻病情相关。可能由于该变异体增加了SMN2 外显子7被包含的可能性,使其能产生更多的全长SMN蛋白,出现SMN2 拷贝数少但临床表现高于预期的情况,若该变异体为纯合,病情可能更轻。另外有研究发现SMN2 内含子6中A-44G、A-549G和C-1897T突变或甲基化也有一定修饰疾病的作用^[13]。

1.2.2 锌指蛋白1(ZPR1)基因 ZPR1 基因表达的ZPR1 蛋白存在于细胞质和细胞核中,参与细胞周期调控、pre-mRNA 剪接、髓鞘形成和轴突形成。该蛋白是SMN2 基因转录调节因子,能够增加SMN 蛋白表达水平。研究发现SMA 患者和小鼠模型ZPR1 蛋白表达有下调现象,会导致膈神经的髓鞘增生和轴突变性,加重SMA的呼吸功能障碍,通过SMA小鼠过度表达ZPR1 蛋白,能增加SMN蛋白水平,延长小鼠寿命^[14]。因此,未来在SMA病情的严重程度可能可以通过检测SMN蛋白的表达量来预测。

1.2.3 神经细胞凋亡抑制蛋白(NAIP)基因 NAIP 基因位于常染色体5q13,与SMN1 相邻,是运动神经元凋亡的负调控因子,亦被认为是SMA表型修饰基因,其编码的NAIP 蛋白可抑制细胞凋亡。NAIP 基因全长约70 kb,有16个外显子,多数为外显子5或6功能缺失,对NAIP 蛋白抑制细胞凋亡作用减弱,使得前角运动细胞过度凋亡,导致运动神经元受损,引起继发性肌肉萎缩,加重SMA疾病进展。研究发现SMA患者的NAIP 基因缺失时早期即出现呼吸困难等危及生命的严重症状^[15],表明NAIP 拷贝数与SMA表型严重程度呈负相关。遗传学家进行遗传咨询和预后评估时,需结合基因筛查结果中SMN2 拷贝数和NAIP 拷贝数综合判断。

1.2.4 网质3(PLS3)基因 PLS3 基因定位于X染色体的q23,是SMA的正向调控基因,PLS3 蛋白过度表达能增加运动轴突稳定性,改善内吞作用,改善神经肌肉连接。研究者证明了SMN反意义寡核苷酸治疗和超表达的组合作用在SMA小鼠模型中具有挽救生存和增强运动的能力^[16]。通过对年龄超过3岁的女性SMA患儿外周血PLS3 表达水平的研究发现,表型较轻者该蛋白水平较高,同年龄男性患儿却差异无统计学意义^[17]。研究者发现有两种与PLS3 蛋白相互作用、同样具有SMA修饰作用的蛋白:一种是与PLS3 作用的冠蛋白1C,其与PLS3 的直接结合依赖于钙,过度表达能挽救SMA斑马鱼模型中截断的轴突;另一种是与PLS3 直接作用钙调磷酸酶B同源蛋白1(CHP1),在海马、皮质、小脑和脊髓等神经元组织中表达丰富^[18]。SMA相关小鼠模型研究显示PLS3 蛋白表达水平下调可以改善内吞作用,恢复轴突生长。

1.2.5 神经钙蛋白δ(NCALD)基因 NCALD 基因表达的NCALD 蛋白是钙依赖性内吞负调控因子,参与膜泡介导运输,其表达下调对SMA表型具有保护作用。研究者们通过敲除包括蠕虫、斑马鱼和小鼠SMA

动物模型 NCALD 基因证实其表达下调能改善轴突发育、神经肌肉接头突触功能^[19]。实验发现通过小剂量 SMN-反义寡核苷酸(SMN-ASO)皮下注射和 NCALD-ASO 单次脑室内注射联合治疗 SMA 小鼠,阻断核内不均一核糖核蛋白 A1(hnRNP A1)与 SMN2 的内含子剪接沉默子(ISS)基因序列的结合,促进 SMN2 转录为含 7 号外显子转录本的全长 mRNA,从而上调全长 SMN 蛋白的表达水平,显著改善小鼠神经肌肉连接和肌肉的电生理特征^[20],为联合 SMN 依赖性治疗和非 SMN 依赖性治疗提供基础科研数据。

2 SMA 基因诊断与筛查策略

2.1 SMA 基因诊断策略

SMA 基因检测因特异性强,取材方便,是 SMA 诊断的主要依据,也逐渐被广大临床医生及受检者接受。目前 SMA 基因检测方法众多,如单基因靶向测序技术、多重连接依赖性探针扩增技术(MLPA)、短片段多重定量 PCR、实时荧光定量 PCR、限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术(PCR-RFLP)、变性高效液相色谱法(DHPLC)等分子检测技术。此外,高分辨溶解曲线技术(HRDCT)及液相微珠阵列技术(LPMAT)等也相继面世,有效缩短了 SMA 的诊断周期^[21]。临床诊断或疑似 SMA 的患者应首先进行 SMN1 拷贝数变异检测,SMN1 第 7 外显子或第 7~8 外显子的纯合缺失即可确诊 SMA。如果患者是 SMN1 第 7 或第 7~8 外显子的杂合缺失(1 拷贝),则应进行 SMN1 基因外显子测序,以确定是否还存在微小变异。SMA 携带者可能为[1+0]型(SMN1 第 7 外显子拷贝数是 1,即 1 条染色体 SMN1 功能正常,另 1 条染色体 SMN1 基因缺失或转换)、[2+0]型(SMN1 第 7 外显子拷贝数为 2,两个 SMN1 拷贝位于同 1 条染色体,另 1 条染色体 SMN1 基因缺失或转换),另外还有[1+1]和[2+1]基因型(SMN1 第 7 外显子拷贝数=2。1 条染色体 SMN1 的拷贝数为 1 或 2、功能正常,另 1 条染色体 SMN1 基因微小突变功能异常)。其他基因型,例如[3+0]或[3+1]则较为罕见。临床上还根据临床表型、心肌酶、肌电图及骨骼肌活检进行辅助初步诊断。

2.2 SMA 基因谱筛查策略

SMA 携带者的筛查技术众多,包括 DHPLC、MLPA、荧光定量 PCR 以及数字 PCR 等技术。二代测序技术(mNGS)结合生物信息学分析可以用来检测 SMN1 和 SMN2 的拷贝数变异^[22]。NGS 由于高通量且商业化,检测费用逐年降低,在国内部分地区已成为

单基因遗传代谢性疾病基因诊断的首选技术。mNGS 能作为一级预防 SMA 的筛查手段,但必要时仍需进行 MLPA/sanger 测序验证。此外,基于 mNGS 技术的神经肌肉病 Panel 在检测 SMN1 和 SMN2 拷贝数的同时还可以筛查其他神经肌肉病相关的基因,可以用于 SMA 与其他神经肌肉病的鉴别诊断^[23]。qPCR 方法操作简便,成本低廉,可进行 SMN1 基因拷贝数定量,特异性比 MLPA 方法略逊,适用于人群筛查,且需要另外设计探针进行 SMN2 拷贝检测^[24]。滤纸干血斑用于 SMA 基因筛查还处于研究阶段。

自 2018 年以来,SMA 携带者筛查项目已经在我国和其他国家逐步开展。有研究者开发了一种基于 SMN2 拷贝数的新生儿筛查诊断 SMA 阳性婴儿的治疗算法^[25]。2020 年 1 月在加拿大安大略省启动了一项使用一级 MassARRAY 和二级多配体探针扩增(MLPA)的 SMA NBS 试点试验,创建了一条标准化路径,促进 SMA 的早期诊断和治疗,有助于需要治疗的 SMA 婴儿优化运动功能并延长生存期^[26]。截至 2022 年 6 月,美国有 46 个州定期对新生儿进行 SMA 携带者筛查,检测了 97% 的新生儿。欧洲 SMA 新生儿筛查联盟计划 2025 年在所有欧洲国家普及新生儿筛查项目。

3 治疗现状

临床上用于治疗 SMA 的主效药物可以分为 2 类:一类是根据 SMA 的分子遗传学发病机制,通过 ASO、小分子或腺相关病毒 9(AAV9)载体等增强功能性 SMN 蛋白的合成;另一类是非 SMN 方法,即针对神经肌肉终板的肌肉、轴突和突触前末端等进行治疗,目前国内外临床或实验阶段治疗 SMA 的药物详见表 1。其他治疗如干细胞治疗原理是干细胞和干细胞衍生细胞来替换这些已变性的运动神经元。Corti 等^[27]进行了在 SMA 小鼠模型中注射胚胎干细胞衍生的神经前体细胞和初级神经干细胞等研究,表明这些干细胞可以改善 SMA 小鼠的运动功能和存活率^[28]。营养治疗方面,由于 SMA 患儿易合并吞咽功能障碍、胃肠道功能障碍、喂养困难、骨代谢异常和营养相关问题,患儿需定期进行生长和营养状况的监测与评估,并由临床营养师进行个体化营养计划定制管理。

4 SMA 的防治前景

综上所述,SMA 是全球范围内常见的致病性神经系统遗传性疾病,SMA 基因检测技术从定性检测技术逐步发展为以 MLPA、PCR、real-time PCR、PCR-

表1 国内外临床或实验阶段治疗SMA的药物

药物分类	代表药物	作用原理	参考文献
SMN1 基因替代治疗	索伐瑞韦	利用 scAAV9 为载体,将正确的 SMN1 基因引入神经元细胞以产生全长 SMN 蛋白	[29]
ASO 药物	诺西那生	通过 ASO 增强功能性 SMN 蛋白的合成	[30]
SMN2 剪切修饰剂	利司扑兰	通过与 exon 7 的外显子剪接增强子 2 和内含子 7 剪接位点 5 特异性结合,促进 exon 7 的加入,从而增强了替代基因 SMN 2 产生全长 mRNA 和功能性 SMN 蛋白的能力	[31]
环氧化酶 2 抑制剂	塞来昔布	可增加 SMA 细胞模型和动物模型中的 SMN 蛋白表达水平	[32]
神经营养剂	Olesoxime	胆固醇类化合物,作用于线粒体减少肌肉组织的去神经支配,进而减少肌肉萎缩的发生	[33]
肌肉激活剂	Pyridostigmine	用于治疗重症肌无力的抗乙酰胆碱酯酶药物,该药物激活和增强肌肉的功效可能有益于 SMA 患者	[34]
	沙丁胺醇	显著改善 SMA 患者的肌力、肌容积、用力肺活量和体质量	[35]
	Reldesemtiv	骨骼肌肌钙蛋白激活剂,可增强骨骼肌收缩力	[36]
	Zolgensma	基于 scAAV9 载体持续表达 SMA 蛋白	[37]

RFLP、DHPLC、HRDCT、LPMAT、mNGS 等为代表的定量检测技术。多数定量基因检测报告不仅提供了 SMN1 致病基因的结果,同时也提供了 SMN2 修饰基因的结果,为疾病治疗、预后评估及新生儿和/或携带者基因谱筛查等的开展和相关数据库的建立提供了有效的数据。如今 SMA 致病基因相对明确,存活期短,且突变携带频率较高,因此对产检孕妇进行 SMN1 基因突变筛查和高风险胎儿产前诊断,避免 SMA 患儿的出生有利于优生优育。近年来,随着治疗药物研究取得新的突破,多个临床研究中心的 SMA 患儿接受诸如诺西那生等增强功能性 SMN 蛋白的合成的药物治疗,效果显著,值得进一步推广。因此, SMA 以临床诊断为基础,应用基因筛查、产前诊断等方法,尽早确诊后在经济条件允许的情况下予以新型药物治疗,配合积极的康复锻炼,能有效控制临床症状,延缓病情进展,改善远期生存质量与预后。

参考文献:

- [1] STRAUSS K A, FARRAR M A, MUNTONI F, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: The Phase III SPRINT trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(7): 1390-1397.
- [2] 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.
- [3] CAO Y, QU Y, BAI J, et al. Transmission characteristics of SMN from 227 spinal muscular atrophy core families in China[J]. *J Hum Genet*, 2020, 65(5): 469-473.
- [4] FENG Y, GE X, MENG L, et al. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: Comprehensive panethnic SMN1 copy number and sequence variant analysis by

- massively parallel sequencing[J]. *Genet Med*, 2017, 19(8): 936-944.
- [5] CHEN X, SANCHIS-JUAN A, FRENCH C E, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data[J]. *Genet Med*, 2020, 22(5): 945-953.
- [6] 李媛媛, 罗振元, 胡莉, 等. 贵阳地区孕妇人群脊髓性肌萎缩症携带者筛查及产前诊断[J]. *医学食疗与健康*, 2021, 19(12): 191-192.
- [7] XU Y, XIAO B, LIU Y, et al. Erratum to "Identification of novel SMN1 subtle mutations using an allelic-specific RT-PCR" [J]. *Neuromuscul Disord*, 2021, 31(1): e1.
- [8] 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.
- [9] LUO M, LIU L, PETER I, et al. An Ashkenazi Jewish SMN1 haplotype specific to duplication alleles improves pan-ethnic carrier screening for spinal muscular atrophy[J]. *Genet Med*, 2014, 16(2): 149-156.
- [10] VIJZELAAR R, SNETSELAAR R, CLAUSEN M, et al. The frequency of SMN gene variants lacking exon 7 and 8 is highly population dependent[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0220211.
- [11] RUHNO C, MCGOVERN V L, AVENARIUS M R, et al. Complete sequencing of the SMN2 gene in SMA patients detects SMN gene deletion junctions and variants in SMN2 that modify the SMA phenotype[J]. *Hum Genet*, 2019, 138(3): 241-256.
- [12] KANNAN A, JIANG X, HE L, et al. ZPR1 prevents R-loop accumulation, upregulates SMN2 expression and rescues spinal muscular atrophy[J]. *Brain*, 2020, 143(1): 69-93.
- [13] AHN E J, YUM M S, KIM E H, 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.
- [14] 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.
- [15] ACKERMANN B, KRBER S, TORRES-BENITO L, et al. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(7) : 1328-1347.
- [16] JANZEN E, MENDOZA-FERREIRA N, HOSSEINIBARKOOIE S, et al. CHP1 reduction ameliorates spinal muscular atrophy pathology by restoring calcineurin activity and endocytosis[J]. *Brain*, 2018, 141 (8) : 2343-2361.
- [17] 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.
- [18] TORRES-BENITO L, SCHNEIDER S, ROMBO R, et al. NCALD antisense oligonucleotide therapy in addition to nusinersen further ameliorates spinal muscular atrophy in mice[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105 (1) : 221-230.
- [19] 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.
- [20] THOMSEN G, BURGHESE A H M, HSIEH C, et al. Biodistribution of onasemnogene abeparvovec DNA, mRNA and SMN protein in human tissue[J]. *Nat Med*, 2021, 27(10): 1701-1711.
- [21] SIVARAMAKRISHNAN M, MCCARTHY K D, CAMPAGNE S, et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1) : 1476.
- [22] RATNI H, EBELING M, BAIRD J, et al. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA)[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(15) : 6501-6517.
- [23] KROSSCHELL K J, KISSEL J T, TOWNSEND E L, et al. Project cure SMA investigator's network. Clinical trial of L-Carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy type I [J]. *Muscle Nerve*, 2018, 57(2): 193-199.
- [24] BERTINI E, DESSAUD E, MERCURI E, et al. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or nonambulatory type 3 spinal muscular atrophy: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(7): 513-522.
- [25] WIRTH B, KARAKAYA M, KYE M J, et al. Twenty-five years of spinal muscular atrophy research: From phenotype to genotype to therapy, and what comes next[J]. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2020, 21: 231-261.
- [26] MCMILLAN H J, KERNOHAN K D, YEH E, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy: Ontario testing and follow-up recommendations[J]. *Can J Neurol Sci*, 2021, 48(4): 504-511.
- [27] WADMAN R I, VAN DER POL W L, BOSBOOM W M, et al. Drug treatment for spinal muscular atrophy types II and III [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 1: CD006282.
- [28] CALUCHO M, BERNAL S, ALIAS L, et al. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases[J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(3): 208-215.
- [29] MARKATI T, FISHER G, RAMDAS S, et al. Risdiplam: An investigational survival motor neuron 2 (SMN2) splicing modifier for spinal muscular atrophy (SMA)[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2022, 31(5): 451-461.
- [30] MENDELL J R, ALZAIDY S, SHELL R, et al. Single-dose gene replacement therapy for spinal muscular atrophy[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18): 1713-1722.
- [31] STURM S, GÜNTHER A, JABER B, et al. A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, RO7034067), a SMN2 splicing modifier[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2019, 85(1) : 181-193.
- [32] WADMAN R I, VRANCKEN A F, VAN DEN BERG L H, et al. Dysfunction of the neuromuscular junction in spinal muscular atrophy types 2 and 3[J]. *Neurology*, 2012, 79(20): 2050-2055.
- [33] STAM M, WADMAN R I, WIJNGAARDE C A, et al. Protocol for a phase II, monocentre, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial to assess efficacy of pyridostigmine in patients with spinal muscular atrophy types 2-4 (SPACE trial)[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(7): e019932.
- [34] PANE M, CORATTI G, PERA M C, et al. Nusinersen efficacy data for 24-month in type 2 and 3 spinal muscular atrophy[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2022, 9(3): 404-409.
- [35] MARASCO L E, DUJARDIN G, SOUSA-LUIS R, et al. Counteracting chromatin effects of a splicing-correcting antisense oligonucleotide improves its therapeutic efficacy in spinal muscular atrophy[J]. *Cell*, 2022, 185(12): 2057-2070.
- [36] D' SILVA A M, HOLLAND S, KARIYAWASAM D, et al. Onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy: An Australian experience of safety and efficacy[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2022, 9(3): 339-350.
- [37] CHEN T H. New and developing therapies in spinal muscular atrophy: From genotype to phenotype to treatment and where do we stand?[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): E3297.