

· 临床研究 ·

羊水直接扩增快速诊断骨骼发育异常类单基因遗传病

黄欢*, 卢守莲, 王珏, 孙丽洲

南京医科大学第一附属医院产前诊断中心, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:以最原始的羊水样本为起始模板直接进行PCR扩增,建立一种快速、简便的骨骼发育异常单基因遗传病的产前基因诊断方法。方法:对2013年4月—2018年1月于南京医科大学第一附属医院就诊的超声提示骨骼发育异常的38例胎儿行羊膜腔穿刺并进行软骨发育不全、软骨发育低下、致死性发育不全及成骨发育不全4种单基因遗传病诊断,抽取孕妇羊水后不经过胎儿细胞培养,也不经过羊水中胎儿细胞DNA的提取,加入中性盐等物质作为PCR缓冲液,控制缓冲液pH值为8~10,扩增FGFR3及COL1A2基因上的靶标片段,直接在反应体系中加入8 μ L羊水进行PCR扩增测序,行产前基因诊断;考察扩增体系中的成分及含量对羊水直接扩增方法的影响。结果:38例胎儿样本中检出单基因遗传病致死性发育不全3例,分别为I型1例,II型2例;软骨发育不全3例,软骨发育低下1例。中性盐缓冲液、0.20 U/ μ L Promega Taq DNA聚合酶、每条引物1.2 pmol/ μ L用于羊水直接扩增效率最佳。结论:本方法省略了羊水细胞培养和羊水中胎儿DNA核酸提取这两步繁琐步骤,无需浓缩羊水即可直接扩增,缩短了诊断时间,节约了诊断成本,可以减少PCR过程中可能出现的样本交叉污染,是一种很有前景的快速产前基因诊断新方法。

[关键词] 骨骼发育异常;FGFR3;COL1A2;产前诊断;基因分析

[中图分类号] R714.53

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)03-409-06

doi:10.7655/NYDXBNS20200319

Direct amplification of amniotic fluid for rapid diagnosis of monogenic genetic diseases of skeletal dysplasia

HUANG Huan*, LU Shoulian, WANG Jue, SUN Lizhou

Center of Prenatal Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to establish a rapid and simple method for prenatal diagnosis of single gene disorders related to skeletal dysplasia by PCR amplification using amniotic fluid. **Methods:** Thirty eight fetuses with bone dysplasia diagnosed by ultrasound from April 2013 to January 2018 were carried out amniocentesis combined with diagnosis of single gene disorders of achondroplasia, hypochondroplasia, thanatophoric dysplasia and osteogenesis imperfecta in First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University. Amniotic fluid extracted from pregnant women was added to PCR buffer containing neutral salt and other substances without fetal cell culture or extraction of DNA. The pH value of buffer was controlled at 8-10. The target fragments of FGFR3 and COL1A2 genes was amplified by directly adding 8 μ L of amniotic fluid to the reaction mixture of PCR amplification and followed by sequencing to perform prenatal diagnosis. The effect of components in reaction mixture on amplification efficiency in the method was investigated. **Results:** In 38 cases of fetal samples, 3 cases of thanatophoric dysplasia (including 1 case of type I and 2 cases of type II), 3 cases of achondroplasia and 1 case of hypochondroplasia were detected. The best amplification efficiency was obtained by using neutral salt buffer, 0.20 U/ μ L Promega Taq DNA polymerase and 1.2 pmol/ μ L each primer. **Conclusion:** This method omits the two tedious steps, which were amniotic fluid cell culture and extraction of fetal DNA from amniotic fluid. Furthermore, amplification can be carried out directly without concentration of amniotic fluid. The method shortens the time of diagnosis, saves the cost of diagnosis, and further reduces the possible cross contamination of samples in PCR processes. It will be a promising, rapid, and efficient tool for prenatal gene diagnosis.

[Key words] bone dysplasia; FGFR3; COL1A2; prenatal diagnosis; gene analysis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03):409-413, 420]

[基金项目] 江苏省妇幼健康重点人才(FRC201744),;江苏省青年医学重点人才(QNRC2016618);江苏省医学重点学科(实验室)(ZDXKA2016002)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: huanghuan@njmu.edu.com

骨骼发育异常,又可称作侏儒症(Dwarfism)^[1-3],是一群因骨骼或软骨异常而导致身材矮小的疾病总称,此类患者虽然大多数智力正常,但是这类疾病会影响骨骼与软骨组织的正常发展,还会造成骨骼变形,甚至影响身体的其他系统。目前报告已有200多种的骨骼发育异常,但目前临床上,尤其是胎儿期可以通过超声提示或诊断的主要有以下4种:软骨发育不全^[4-6]、软骨发育低下^[7-8]、致死性发育不全^[9-10]、成骨发育不全^[11-13]。由于单基因遗传病一旦发生就无法治疗,给社会和家庭带来了沉重的负担,唯一的措施是及早诊断,知情选择。因此建立骨骼发育异常的基因诊断方法,进行产前基因诊断,避免该类患儿的出生,对减少社会 and 患者家庭的负担,实现优生优育,提高我国人口素质有着极其重要的意义。

产前基因诊断的方法大多先取胎儿的细胞样本(如羊水),提取胎儿DNA或经过细胞培养后提取胎儿DNA,再进行PCR扩增,最后对扩增产物进行分析。如不经细胞培养和DNA提取,直接利用羊水扩增,可大大节约实验时间和检测成本,也可避免样本间的交叉污染。本研究小组报道过自制HpH缓冲液(高pH值缓冲液)^[14],用于羊水直接PCR^[15],但是仍然需要对羊水进行离心去上清的前处理步骤,开盖易造成污染。本研究研制了一种新型中性盐缓冲液,能够直接对羊水标本进行扩增,不需要提取羊水样本,也不需要离心富集,加入后可直接扩增最原始的羊水样本。应用研制的缓冲液可以直接对羊水样本中FGFR3基因和COL1A2基因上与骨骼发育异常相关的位点进行扩增,产前快速诊断4种单基因遗传病:软骨发育不全、软骨发育低下、致死性发育不全及成骨发育不全。本方法提高了检测效率,节约了检测成本和时间。

1 材料和方法

1.1 材料

38例羊水样本来自2013年4月—2018年1月于南京医科大学第一附属医院就诊的超声提示胎儿骨骼发育异常的孕妇。其中32例超声提示股骨长偏短,行软骨发育不全及软骨发育低下单基因遗传病诊断;5例超声提示致死性骨骼畸形可能,行致死性发育不全的基因诊断;1例胎儿超声提示双下肢长骨均呈“听筒状”,长骨弯曲,双下肢外形整体呈“O”形,行成骨发育不全的基因诊断。所有病例于孕18~23周在南京医科大学第一附属医院产前诊断中心行羊膜腔穿刺术取得羊水样本。正常对照为产前筛查无骨发育异常家族史且超声未发现异常的孕妇羊水,染色体核型分析为正常。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者知情同意。

Taq DNA聚合酶(Promega公司,美国);dNTP混合物(大连TaKaRa公司);琼脂糖(Biowest公司,上海YITO公司分装);溴化乙锭(Promega公司,美国);DNA marker II(100~1 000 bp,北京天根公司);试剂配制均使用去离子水,所有试剂均为分析纯。PCR仪(T100™ Thermal Cycler)、凝胶成像系统(Gel Doc XR, Bio-Rad公司,美国);电泳仪(DYC33B,北京六一仪器厂),垂直单向流洁净工作台(VD-650-U,苏州安泰空气技术有限公司)。所有引物均由上海英骏公司合成,并经PAGE纯化。4种单基因遗传病的引物序列见表1。

1.2 方法

1.2.1 羊水标本采集

孕妇排空膀胱,晃动腰部后取仰卧位,超声常规观察胎儿发育并核对孕周,寻找合适的羊膜腔穿

表1 4种单基因遗传病扩增引物

Table 1 PCR primers used to amplify the fragments of four kinds of single gene disorders

单病名称	PCR引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	片段大小(bp)
软骨发育不全	F: AGGAGCTGGTGGAGGCTG	57.8	164
	R: GGAGATCTTGTGCACGGTGG	60.8	
软骨发育低下	F: ACTGACAAGGACCTGTCGGACC	62.6	286
	R: TTGCAGGTGTCGAAGGAGTAGTC	61.1	
致死性发育不全 I 型	F: CTGGACGTGCTGGGTGAGG	61.7	449
	R: CTGGATGTGGGGCTGTGC	59.7	
致死性发育不全 II 型	F: CCCTGCCCTGAGATGCTG	59.2	268
	R: TGGGAAGGCGGTGTTGG	60.2	
成骨发育不全	F: CTCTACAGCCCATCACCTCC	56.7	200
	R: GGCAGAGGTGGTATTTTCAGG	57.0	

刺部位后,在超声引导下进针,用一次性注射器抽取羊水,弃去前2 mL,取后抽取的羊水10 mL留样,插入穿刺针的针芯后拔出穿刺针,超声观察穿刺部位有无出血及胎心情况后,用无菌纱布覆盖针孔。抽取的羊水10 mL于4℃保存备用。

1.2.2 骨发育异常单基因遗传病检测

羊水直接PCR:取1 mL羊水于管中备用;另取5 mL羊水使用Chelex法提取羊水中胎儿DNA对照用。取上述备用的羊水8.0 μL或胎儿DNA 3.0 μL,加入自制的缓冲液(含中性盐,pH9.3)5.4 μL,dNTP混合物2 mmol/L,Taq DNA聚合酶5 U,正反向引物各1.2 μmol/L,灭菌蒸馏水加至50.0 μL。放入PCR仪中:94℃ 3 min;94℃ 25 s,52~60℃ 25 s,72℃ 15 s,35个循环;72℃ 7 min;4℃保存。

电泳和测序分析:2%琼脂糖电泳后凝胶成像仪检测,加入Marker判定片段大小,单一条带且片段大小符合的样本进行Sanger测序,判定位点是否发生突变。

2 结果

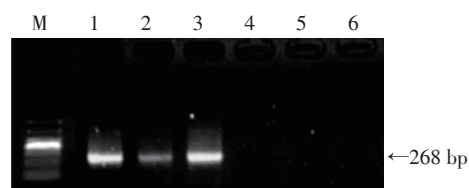
2.1 羊水直接扩增实验

为了考察自制的缓冲液对羊水样本的扩增效果,考察了不同扩增体系对羊水直接PCR扩增效果的影响。加入中性盐的羊水扩增缓冲液能够对羊水直接有效地扩增,条带单一且清晰(图1),验证了羊水直接扩增方法的可行性。与用羊水提取的DNA为扩增模板对比,羊水直接PCR的扩增效率没有明显降低(图2),在高扩增效率情况下,本方法省略了对羊水胎儿细胞中DNA提取的步骤,实现了短时间内高效检测羊水样本。另外,本研究考察了酶的不同加入量以及引物的不同加入量对扩增效率的影响(图3),发现增加酶的加入量和引物的加入量均可以增加扩增效率,最终确定在扩增体系中加入0.10 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,1.2 pmol/μL每条引物进行羊水直接扩增测序。

2.2 骨发育异常单基因遗传病检测结果

本文共检测了32例股骨长偏短的胎儿羊水,诊断4例侏儒症,其中3例为软骨发育不全,1例为软骨发育低下。图4显示了2例股骨长偏短的胎儿单基因病诊断结果,1例发生了FGFR3基因1138位核苷酸G→A的突变,诊断为软骨发育不全;另1例发现了FGFR3基因1620位核苷酸G→T突变,诊断为软骨发育低下。

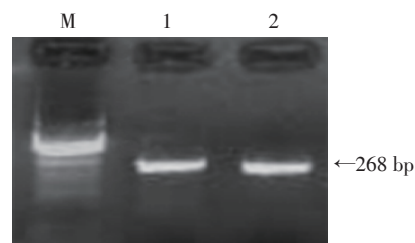
本文检测了5例提示致死性骨骼畸形可能的



1:自制羊水扩增体系,2.0 μL高温浓缩处理后的羊水;2:自制羊水扩增体系中去掉中性盐,8.0 μL羊水原液;3:自制羊水扩增体系,8.0 μL羊水原液;4:自制H9.3扩增体系,8.0 μL羊水原液;5:Promega Taq DNA聚合酶体系,8.0 μL羊水原液;6:TaKaRa rTaq DNA聚合酶扩增体系,8.0 μL羊水原液;M:Marker。

图1 不同扩增体系对羊水直接扩增效果的比较

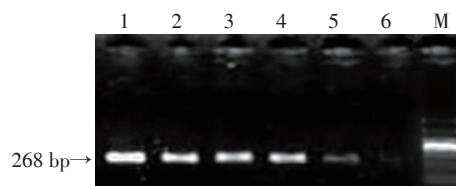
Figure 1 Comparison of direct amplification of amniotic fluid by various amplification systems



1:羊水直接扩增;2:羊水提取DNA后扩增;M:Marker。

图2 羊水提取DNA扩增与羊水直接扩增效果的比较

Figure 2 Comparison of amplification of DNA extracted from amniotic fluid and raw amniotic fluid



1:0.10 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,1.2 pmol/μL每条引物;2:0.10 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,0.8 pmol/μL每条引物;3:0.20 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,0.4 pmol/μL每条引物;4:0.15 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,0.4 pmol/μL每条引物;5:0.10 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,0.4 pmol/μL每条引物;6:0.05 U/μL Promega Taq DNA聚合酶,0.4 pmol/μL每条引物;M:Marker。

图3 酶的不同加入量及引物的不同加入量对扩增效率的影响

Figure 3 The effect of amounts of enzymes and primers on amplification efficiency

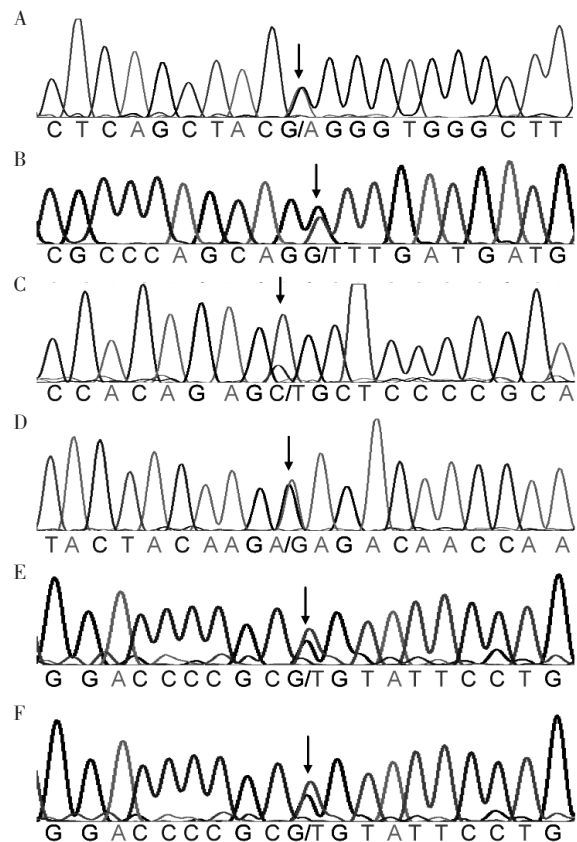
胎儿,诊断出2例致死性发育不全II型胎儿。其中1例超声提示孕23周胎儿重度脑室扩张(右侧16.5 mm,左侧11 mm,第三脑室宽9 mm),胎儿小脑结构不清,颅后窝消失,胎儿颅骨光环形态异常,胎儿窄胸;另1例超声提示脑积水,胎儿四肢长骨发育明显短小,窄胸。诊断出1例致死性发育不全I型胎儿,超声提示胎儿肢体短小,胸廓狭窄,头颅畸形,孕妇选择引产后行X射线检测(图5A),诊断结

果与超声一致。两种类型的典型产前诊断羊水直接扩增后测序结果见图4。

本研究检测了1例孕妇本人已明确诊断为成骨发育不全症(图5),羊水直接扩增诊断胎儿与母亲基因型一致(图4E、F),孕妇自愿选择引产后,X线检查死胎结果与超声提示一致(图5B)。

3 讨论

在产前诊断中,对高危、高龄及具有不良孕产史、遗传病家族史的孕妇,羊膜腔穿刺结合胎儿染色体核型分析是全世界最经典的诊断方法,但该方法需经过细胞培养富集特定的胎儿细胞,非常耗时耗力,患者等待报告的周期长。因此,临床上需要不经过细胞培养直接进行遗传病诊断的方法,如全基因组测序技术、比较基因组杂交技术(arrayCGH)等,但相对于检测方法所需样本量来说,原始生物样本中胎儿遗传物质较少,需要对遗传物质进行放大。聚合酶链式反应(PCR)技术是一种有效的体外扩增目的基因的技术,它能在短时间内将少量的胎儿遗传物质进行扩增放大,即将靶DNA扩增百万倍,直接或者与其他技术结合后用于基因诊断和染色体病诊断^[16]。但一般步骤是从10~20 mL羊水样本中提取DNA后,再进行PCR扩增,DNA提取的方法有酚氯仿法、尿素法、柱提取法等,提取过程中通常要用到一些特定的试剂,步骤复杂,尽管现在一些商品化的DNA纯化试剂盒大大简化了这个过程,但仍然费时、费力,难于自动化,费用也增高,同时也容易产生核酸之间的交叉污染。当孕妇由于多种原因,如羊水量少、脐带位置不好或胎儿不配合,导致获取的脐血或羊水样本量少,或者由于新生儿抽血困难获得血量较少时,这种提取DNA后再扩增的方法更是不方便或不可行。如不经DNA提取直接利用羊水进行扩增,可大大节约实验时间和检测成本,也可避免样本间的交叉污染。



A: 软骨发育不全胎儿(FGFR3基因1138位核苷酸G→A突变); B: 软骨发育低下胎儿(FGFR3基因1620位核苷酸G→T突变); C: 致死性发育不全I型胎儿(FGFR3基因第7外显子742位核苷酸C→T突变); D: 致死性发育不全II型胎儿(FGFR3基因1948位核苷酸A→G突变); E: 成骨发育不全胎儿(COL1A2基因c.982位G→T突变); F: 成骨发育不全孕妇(COL1A2基因c.982位G→T突变)。箭头代表突变位点。

图4 5个骨发育异常胎儿羊水样本(A~E)及1个成骨发育不全孕妇外周血样本(F)的诊断结果

Figure 4 Diagnosis results of five amniotic fluid samples (A - E) from the pregnancies all diagnosed as skeletal dysplasia and one blood sample from a pregnant woman with osteogenesis imperfecta

由于体液中存在一些成分干扰了细胞的裂解,抑制了DNA聚合酶的活性,因此给直接运用羊水进



A: 致死性发育不全I型死胎X线检查结果; B: 成骨发育不全死胎X线检查结果; C: 成骨发育不全孕妇腿部照片; D: 成骨发育不全死胎下肢照片。

图5 骨发育异常孕妇及其胎儿的检查结果

Figure 5 Examination results of pregnant women with bone dysplasia and her stillborn fetuses

行PCR扩增带来了难度。抑制剂与基因组DNA之间的相互作用,阻止了DNA聚合酶与DNA模板之间的结合和延伸反应的发生,影响了PCR的扩增。本研究小组曾提出不经过核酸提取,直接对羊水进行高温处理后加入HpH缓冲液进行扩增的方法,用于快速诊断,其中HpH缓冲液的成分为高pH值的Tris-HCl溶液(pH 8.81~9.90)。羊水中含有的蛋白质样本经过高温变性,空间结构发生变化而导致溶解度降低而沉淀,另外,高温处理羊水使得羊水水中的胎儿细胞破裂,DNA释放入溶液中参与PCR扩增。但该方法也存在一些缺点,如需在PCR扩增前对羊水进行开盖离心,去上清后,高温处理,之后再开盖取处理后的羊水样本加入HpH缓冲液中,虽然与羊水DNA提取相比,简化了扩增前处理步骤,节省了成本,但仍然存在反复开盖产生污染的风险,也同样存在一些扩增前处理的操作步骤。然而,羊水不经过高温处理直接加入全血扩增缓冲液中却无法实现有效扩增。

本方法在缓冲液中加入了中性盐,羊水中含有蛋白质类物质,在羊水直接PCR中会成为抑制剂,而中性盐与水分子的亲和力大于蛋白质,导致蛋白质分子周围的水化层减弱乃至消失。另外,中性盐加入反应液后,由于离子强度发生改变,蛋白质表面的大量电荷被中和,使得蛋白质溶解度进一步降低,蛋白质分子之间聚集而沉淀,消除蛋白质对PCR扩增的抑制。本方法在加入中性盐的基础上,进一步调整了缓冲液成分和比例,实现了羊水直接扩增诊断骨发育异常类单基因遗传病,包括先天性软骨发育不全、致死性发育不全及成骨发育不全。

先天性软骨发育不全是一种常染色体显性遗传病,发病率为1/15 000~1/26 000,散发病例占80%~90%,在侏儒症中最常见,主要影响长骨。临床表现为患儿的躯干与四肢不成比例,头颅大而四肢短小,躯干长度正常,智力及体力发育良好。先天性软骨发育不全是由于FGFR3基因突变所致,95%以上的患者是由于FGFR3基因跨膜区1138位核苷酸G→A的突变,少数为G→C的颠换,导致380位密码子的错义突变,即精氨酸替代了甘氨酸而致病。而先天性软骨发育低下也为常染色体显性遗传病,也表现为身材不成比例的矮小,虽然症状较先天性软骨发育不全轻,但二者仅存在细微的表型差异。先天性软骨发育低下是由于FGFR3基因突变所致,60%~65%的软骨发育低下患者被检测到FGFR3基因的N540K突变(c.1620G>T以及c.1620G>C)。临

床超声检测骨骼发育异常类遗传病主要依据股骨长偏短,但是有些胎盘功能低下的情况也会导致股骨长变短,因此通过遗传诊断可以排除本文所提到的最常见的侏儒症类型。

致死性发育不全,又叫致死性侏儒症,常染色体显性遗传病,也为FGFR3基因突变引起,是新生儿致死性头颅发育不良的最常见原因,在新生儿中的发病率约为1/20 000,尚无有效治疗措施,预后不良,大多数患儿围产期死亡,存活者的生存期亦不会超过6个月。致死性发育不全分为I型和II型,两种类型的基因突变位点不同,I型由FGFR3不同突变引起,常见为R248C的氨基酸替换;II型有FGFR3的K650的氨基酸改变引起。患儿特征为头颅增大,前额突出;鼻梁下陷及突眼,肢体短小,长骨弯曲,腹部膨隆,躯干长,肋骨短不成比例;手足常呈外旋或外展状态,肌张力降低,皮肤呈褶叠状。I型通常以长骨弯曲,椎体扁平为特征,多无三叶草样颅骨畸形;II型无长骨弯曲但有三叶草样头颅畸形。

成骨发育不全,是一种少见的先天性骨骼发育障碍性疾病,又称脆骨病,瓷娃娃,或脆骨-蓝巩膜-耳聋综合征。特征为骨质脆弱、蓝巩膜、耳聋、关节松弛,是一种由于间充质组织发育不全,胶原形成障碍而造成的先天性遗传性疾病。患儿易发骨折,轻微的碰撞也会造成严重骨折,本病具有遗传性和家族性,但也有少数为单发病例。发病率约3/10万,男女的发病比例大约相同。成骨发育不全主要是由于组成I型胶原的 $\alpha 1$ 或 $\alpha 2$ 前胶原(Pro- α 或Pro- $\alpha 2$)链的基因(即COL1A1和COL1A2)的突变,导致I型胶原合成障碍,结缔组织中胶原量尤其是I型胶原含量下降,胶原是骨骼、皮肤、巩膜及牙本质等组织的主要成分,因而这些部位的病变更明显。

对超声提示胎儿骨骼系统可能存在问题的孕妇,进行产前诊断十分重要,在实际产前诊断中,本方法降低了羊水样本的需要量,在较短检测时间内获得了与羊水提取DNA再扩增相同的扩增效率,成功实现了诊断,能够在收样当天完成检测并出具报告。该扩增技术不但可以用于骨骼发育异常类单基因遗传病的诊断,同样也可以用于其他各类单基因遗传病的诊断,因此该技术有广阔的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] REYNOLDS J J, BICKNELL L S, CARROLL P, et al. Mutations in DONSON disrupt replication fork stability and (下转第420页)

- [18] ANGELIERI F, FRANCHI L, CEVIDANES L H, et al. Cone beam computed tomography evaluation of midpalatal suture maturation in adults [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 46(12):1557-1561
- [19] ANGELIERI F, FRANCHI L, CEVIDANES L H, et al. Diagnostic performance of skeletal maturity for the assessment of midpalatal suture maturation [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2015, 148(6):1010-1016
- [20] LADEWIG V D, CAPELOZZA-FILHO L, ALMEIDA-PE-DRIN R R, et al. Tomographic evaluation of the maturation stage of the midpalatal suture in postadolescents [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2018, 153(6):818-824
- [21] LIMA SM, DE MORAES M, ASPRINO L. Photoelastic analysis of stress distribution of surgically assisted rapid maxillary expansion with and without separation of the pterygomaxillary suture [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 69(6):1771-1775
- [收稿日期] 2019-04-06

(上接第413页)

- cause microcephalic dwarfism [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(4):537-549
- [2] BOEGHEIM I J, LEEGWATER P A, VAN LITH H A, et al. Current insights into the molecular genetic basis of dwarfism in livestock [J]. *Vet J*, 2017, 224:64-75
- [3] METZGER J, GAST A C, SCHRIMPF R, et al. Whole-genome sequencing reveals a potential causal mutation for dwarfism in the Miniature Shetland pony [J]. *Mamm Genome*, 2017, 28(3/4):143-151
- [4] CHEN J, YU C, ZHAO Y, et al. A novel non-invasive detection method for the FGFR3 gene mutation in maternal plasma for a fetal achondroplasia diagnosis based on signal amplification by hemin-MOFs/PtNPs [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91:892-899
- [5] 顾海斌, 唐文伟. 假性软骨发育不全的临床影像学分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(9):1372-1374
- [6] VIVANTI A J, COSTA J M, ROSEFORT A, et al. Optimal non-invasive diagnosis of fetal achondroplasia combining ultrasonography with circulating cell-free fetal DNA analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019, 53(1):87-94
- [7] OKAZAKI T, SAITO Y, UEDA R, et al. Epileptic phenotype of FGFR3-related bilateral medial temporal lobe dysgenesis [J]. *Brain Dev*, 2017, 39(1):67-71
- [8] KOTYSOVA L, MATTOSOVA S, CHANDOGA J. Improvement of molecular-genetic diagnostics of the most common skeletal dysplasias [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2015, 116(8):465-468
- [9] ITOH K, POOH R, KANEMURA Y, et al. Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I [J]. *Neuropathology*, 2013, 33(6):663-666
- [10] WEBSTER M K, D'AVIS P Y, ROBERTSON S C, et al. Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(8):4081-4087
- [11] WU Q, WANG W, CAO L, et al. Diagnosis of fetal osteogenesis imperfecta by multidisciplinary assessment: a retrospective study of 10 cases [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2015, 34(1):57-64
- [12] JONES G N, MOSCHIDOU D, ABDULRAZZAK H, et al. Potential of human fetal chorionic stem cells for the treatment of osteogenesis imperfecta [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(3):262-276
- [13] AKIZAWA Y, NISHIMURA G, HASEGAWA T, et al. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type II by three-dimensional computed tomography: the current state of fetal computed tomography [J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2012, 52(4):203-206
- [14] 黄欢, 王珏, 洪蕾, 等. X连锁迟发性脊椎骨骺发育不良家系的基因检测及其产前诊断 [J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(8):614-616
- [15] HUANG H, LI S, LU S, et al. Prenatal diagnosis of single gene disorders using amniotic fluid as the starting material for PCR [J]. *Analyst*, 2016, 141(1):285-290
- [16] 吴江平, 黄欢, 瞿琳, 等. 基于 FOKI 酶体系的 PCR 防污染法及在产前诊断中的应用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(9):1336-1340
- [收稿日期] 2018-12-27