

# 甲型血友病的遗传咨询与产前诊断

张燕 综述 王谢桐\* 审校

(山东大学附属省立医院妇产科, 山东 济南 250021)

甲型血友病是由于凝血因子Ⅷ (coagulation factor Ⅷ, FⅧ)的遗传性缺陷或缺乏,以致凝血活酶生成障碍的一种常见X连锁隐性遗传性疾病,约占先天性出血性疾病的85%,是目前已经明确的单基因遗传性疾病。男性患病率约为1/5 000,约60%患者有遗传病家族史。目前本病尚无根治性措施,只能由凝血因子Ⅷ制品或新鲜全血预防和替代治疗,但输注血制品极有可能传播传染病;而且随着使用FⅧ制品的时间延长,约2.4%~50%的患者会产生抗FⅧ的同种抗体<sup>[1,2]</sup>,大大降低了FⅧ的促凝血活性,使FⅧ的替代效果减低甚至无效,为家庭和社会带来沉重的负担。所以血友病携带者的检测及早期诊断是有效控制致病基因传递,防止患儿出生,降低发病率的主要措施。血友病的产前诊断对于血友病家系的遗传咨询,减轻血友病家庭的经济和心理负担,具有重要的应用价值和社会效益。

## 1 甲型血友病的遗传咨询

甲型血友病是一种常见的X连锁隐性遗传性疾病,该病主要是女性传递,男性发病,多见隔代遗传:①甲型血友病男性患者与正常女性结婚,其儿子100%正常,其女儿100%为携带者,无甲型血友病患者出现;②正常男性与甲型血友病女性携带者结婚,其儿子50%正常,50%为患者;其女儿50%正常,50%为携带者;③甲型血友病男性患者与甲型血友病女性携带者结婚,其儿子50%正常,50%发病;其女儿50%为携带者,50%发病;④正常男性与甲型血友病女性患者结婚,其儿子100%为患者,其

女儿100%为携带者。

在甲型血友病的诊断中判断女性携带者很重要,一般判断女性携带者的方法有3种:①肯定携带者:甲型血友病患者的女儿;生育2个或更多甲型血友病患者的母亲;生育1个甲型血友病患者的母亲,其家系中常有1个以上的甲型血友病患者。②可能携带者:某女性的母系成员中有甲型血友病患者,而她自己所生的儿子中无甲型血友病患者,或未生儿子;血友病患者的姊妹和她们所生的女儿;血友病甲患者的姨母和她们的女儿;1个儿子有血友病,而没有其他家庭成员患有血友病的女性。③甲型血友病患者中,有近40%为散发病例,其母系中无他人患甲型血友病,但可检测家系的基因情况,以发现携带者。

以前,血友病携带者是通过系谱分析和FⅧ活性(FⅧ:C)/血管性血友病因子抗原(vWF:Ag)的测定诊断的<sup>[3]</sup>,然而,仅能诊断出55%~60%的携带者。FⅧ基因是1个比较庞大的基因,其突变的异质性非常丰富,突变类型众多,相互异质,且不存在种族和群体的特异性,甚至每1个甲型血友病家庭都有可能携带1种新的突变类型,使得该疾病的直接基因诊断难度较大。

## 2 甲型血友病的产前诊断

### 2.1 甲型血友病的基因突变位点

目前世界血友病网站、血友病A数据库HAMSTeRS已报道的突变有1 900多种,包括倒位、点突变、插入和缺失,而重型甲型血友病中22内含子倒位约占40%~50%<sup>[4]</sup>,其次为小片段缺失/插入(10.2%)和无义突变(9.3%),而大片段缺失(3%)、剪接位点有关的突变(2.6%)则较少见。最近

\* 通讯作者:王谢桐. E-mail: wx65@vip.163.com

基金项目:山东省科技厅科研基金(2004GG3202025);山东省计生委科技项目(2010-3)

Bagnall<sup>[5]</sup>报道, FⅧ基因内含子一断裂引起的倒位, 占重型甲型血友病的 5%。中型和轻型血友病中, 86%为错义突变, 此外还有 5.8%患者未找到任何突变位点<sup>[6]</sup>。多数这些突变的发病机制尚不完全清楚。极少数患者即不存在内含子 1 或 22 倒位, 也没有点突变或插入和缺失, 甚至对整个 F8 基因外显子和与其相邻的内含子序列测序后仍找不到基因突变位点, 只能解释为相应基因产物活性的缺失或减少, 推测 F8 基因的不表达或表达不均衡及 mRNA 的快速降解是导致此类患者发病的病因<sup>[7-8]</sup>。

## 2.2 甲型血友病的产前诊断取材方法

### 2.2.1 脐带穿刺术(cordocentesis) 妊娠中晚期(20~35周)B超引导下经腹抽取胎儿脐静脉血, 成功率高, 也较安全<sup>[9,10]</sup>, 使用此方法较多, 优点是可直接检测 FⅧ活性, 不需要较高的实验室技术, 20世纪国外有报道用此法进行产前诊断, 抽取胎儿血后提取 DNA 做基因诊断。

### 2.2.2 羊膜腔穿刺术(amniocentesis) 抽取羊水最佳时间是妊娠 16~23 周。此时羊水量多、胎儿浮动, 穿刺容易, 不易伤及胎儿。可以直接从羊水中胎儿的脱落细胞内提取 DNA 作基因诊断。国内已有医院开始使用此类方法对血友病进行产前诊断<sup>[11]</sup>。国外已有较多应用。

### 2.2.3 绒毛吸取术(chorionic villi aspiration sampling) 妊娠 9~11 周在 B 超监视下经宫颈取绒毛组织, 绒毛枝与蜕膜严格分离后直接抽取 DNA 进行基因分析<sup>[12,13]</sup>。此方法的优点是若诊断为患者即可在孕早期终止妊娠, 但流产风险稍高。

### 2.2.4 利用流式细胞术、梯度分离法、免疫磁珠分离技术等方法从孕妇外周血中分离胎儿细胞, 这是 1 项非创伤性产前诊断技术, 目前已成为研究热点<sup>[14,15]</sup>。孕妇外周血中的胎儿细胞至少有 3 种, 即滋养叶细胞、有核红细胞和淋巴细胞, 数量虽然不多, 但已有用单克隆抗体或以滋养叶细胞表面特异性抗原的抗体作为标记等来识别胎儿细胞。目前这项技术正成为国内外研究的热点, 尚无临床应用。

### 2.2.5 植入前诊断(preimplantation diagnosis)<sup>[16,17]</sup> 胚胎植入前, 利用微操作技术和 DNA 扩增技术进行检测。目前已有用 PCR 技术作甲型血友病的产

前诊断, 虽然仅有个别成功先例, 而且操作难度大, 还不能用于临床, 但前景是可观的。

## 2.3 脐带血 FⅧ活性检测应用于甲型血友病产前诊断

胎儿期肝脏可以生成凝血因子, 妊娠 19 周的胎儿血中已可测到 FⅧ抗原。林琳华等<sup>[18,19]</sup>对 264 例 19~36 周胎龄的脐带血进行了凝血因子活性测定, 结果显示妊娠中晚期正常胎儿的 FⅧ活性为 45%~80%, 高于甲型血友病的诊断标准, 提示了中晚期妊娠胎儿的脐带血 FⅧ活性测定可以作为甲型血友病高危胎儿产前筛查的可行性指标。由于 FⅧ活性随着胎龄的增长而升高, 个别 FⅧ活性低于 30%的胎儿可能只是凝血因子合成器官发育不健全而已, 容易被误诊, 但其误诊率低于 5%<sup>[19]</sup>, 显示出明显的优越性。另 Panigrahi 等<sup>[9]</sup>在 18~23 周间应用脐带穿刺术抽取脐带血, 用于血友病和地中海贫血的产前诊断, 结果表明脐带血检验结果和分娩后复查结果没有偏差。15 年来本院一直采用妊娠 20~35 周的胎儿脐带血检测 FⅧ:C 和 vWF:Ag, 筛查血友病患者, 结果和分娩后复查结果一致, 生后至今随访结果无偏差。故认为妊娠 20 周以后的胎儿脐带血可以用于血友病的产前诊断。北京朝阳医院赵耘等<sup>[20]</sup>报道在他们医院曾有 1 例胎儿血 FⅧ:C 为 2%, 但基因诊断为正常胎儿并随访 1 年 FⅧ水平正常, 但有无检测的误差尚不清楚。到目前为止尚未有明确的甲型血友病胎儿血 FⅧ:C 的诊断标准, 还需要大样本的试验来证实。

## 2.4 基因检测用于甲型血友病产前诊断

甲型血友病的产前基因诊断分为直接诊断和间接诊断。直接检测法直接揭示遗传缺陷, 在无法获得甲型血友病先证者 DNA 样本及某些连锁分析未能提供诊断信息时也能完成诊断, 提高了诊断的可靠性。以往检测内含子 22 倒位通常采用 Southern 印迹杂交技术, 但此技术操作步骤繁多, 流程长, 出结果慢, 难度大, 且要操作放射性同位素标记的探针等, 而 LD-PCR 技术则能简便快速地检测出 FⅧ基因内含子 22 倒位, 并能检出携带者, 进行产前诊断<sup>[21]</sup>。Bagnall 等<sup>[5]</sup>建立了检测内含子 1 倒位的双管多重 PCR 的方法。对于较大的缺失、插入(>50

bp),以及影响限制性内切酶识别位点的突变,一般用 Southern 印迹杂交方法检测。对于单个碱基置换、小缺失或插入,则需对 FⅧ基因的所有编码区、侧翼内含子序列及 5'端和 3'端 UTR 进行全面分析,设计 37 对引物扩增所有外显子及其侧翼内含子序列。随着 PCR 的广泛应用,单链构象多态性分析、异源双链分析、变形梯度凝胶电泳、化学错配切割、构象敏感凝胶电泳等结合 DNA 测序已被广泛用于 FⅧ基因突变的筛查。常用直接诊断方法有:

2.4.1 长距离 PCR 目前国内外均有学者报道应用 LD-PCR 技术对内含子 22 进行诊断并取得满意的结果,成为扩增内含子 22 倒位的首选方法。

长距离 PCR(LD-PCR)引物设计及检测 FⅧ基因倒位的原理:22 内含子含有两个巢式基因(FⅧA 和 FⅧB),FⅧA 在 FⅧ基因上游约 400 kb 及 500 kb 有 2 个同源拷贝(A2 和 A3),由于 FⅧA1 与 FⅧA2、FⅧA3 的高度同源序列长达 9.5 kb,倒位可发生在该 9.5 kb 范围内的任何位置,无法确定,因此必须把引物设计在 9.5 kb 序列以外的非同源序列区。引物 P、Q 是只特异于 IVS-22(22 内含子倒位)中 FⅧA1 的两侧各约 1.2 kb 处的序列。引物 A、B 则是特异于 FⅧA2、FⅧA3 的两侧各约 100~200 bp 处的序列。当同时使用 4 个引物,即 P、Q、A、B 进行 LD-PCR 时,如果模板基因组 DNA 没有 FⅧ基因倒位,那么将引物 PQ 及野生型 FⅧ基因得到 12 kb 的扩增带,从 FⅧA2、FⅧA3 及引物 AB 得到 10 kb 的扩增带。如果模板基因组 DNA 是这种基因倒位的重型甲型血友病患者的 DNA,从引物 P 和 B 将会得到 11 kb 扩增带,引物 A 与 Q 也将发挥作用而产生同样长度即 11 kb 的扩增带;同时,由于该基因倒位只改变了 FⅧA2 及 FⅧA3 中 1 个基因的结构,而另 1 个仍然保持野生型,因此 A、B 引物对仍能从这一野生型 FⅧA 模板扩增出 10 kb 的产物,但无法得到 12 kb 产物。如果模板 DNA 是来自 1 位女性携带者,则其 LD PCR 产物中将有 11 kb,12 kb 及 10 kb 条带。这 3 种扩增产物能够用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳很好地分开。也有学者用 P、Q、B 及 P、Q、A 3 个引物的系统进行了一些研究,取得了满意的结果。

2.4.2 直接测序法(direct sequencing,DS) 通过 DNA 自动测序仪对 FⅧ基因直接进行测序,找出突变的确切位置,可提供最为准确的信息。目前,测序模板主要来源于 PCR 产物,将双链 PCR 产物转化为单链测序模板。DS 是最直接、最准确的基因诊断方法,但是,由于是对整段基因进行测序,工作量大、时间长、限制了其在甲型血友病产前诊断上的广泛应用<sup>[22]</sup>。

2.4.3 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis,DGGE) DGGE 是 1 种根据 DNA 解链特性分离鉴定 DNA 片段的技术,利用野生型和突变型 DNA 在变性梯度凝胶电泳过程中迁移率不同来检测基因突变。PCR/DGGE 法很适合于大基因点突变的筛选,将 PCR 产生的双链 DNA 在含浓度递增的变性剂(尿素和甲酰胺)的凝胶上电泳。随着 DNA 的迁移,具有序列依赖性的低解链温度区的双链渐渐打开,这部分的解链导致迁移率下降。发生突变的片段形成的异二聚体在较低的变性温度下就发生变性,从而与正常条带分离,实验证明仅有 1 个碱基的替换即可用此法检测出来,检出泳动部位后行 DNA 测序。与 SSCP 相比,DGGE 较可靠、精确,无同位素污染,且检测的 DNA 长度增加。

2.4.4 单链构象多态性(single strand conformation polymorphism,SSCP) 近年常用 PCR-单链构象多态性分析法(PCR-SSCP)。PCR 产物变性后得到 2 条互补的单链,若其中任 1 条存在基因突变,其构象即改变,在非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)中电泳的迁移率亦改变,借此找到突变位点。异源双链分析法(heteroduplex analysis,HA)同 SSCP 方法相似,此法对于小片段 DNA(小于 300 bp)的敏感性同 SSCP。SSCP 的优点是简便易行,亦较敏感,只要基因突变影响了单链构象,小至单个碱基的改变即可被检出。但其敏感性随 DNA 长度增加而降低,受检片段最适长度约为 300 bp,不超过 350 bp。

2.4.5 构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gel electrophoresis,CSGE) 原理是用多重 PCR 方法分别扩增 FⅧ的各外显子及其侧翼和 5'、3'区,然后与正常的 PCR 产物混和,发生突变的 DNA 片段形成异二聚体,在轻度变性的凝胶上电泳。插入、缺

失和单碱基改变都会引起二聚体构象的改变,从而阻滞或促进异二聚体的电泳速度,与正常对照相比其电泳条带发生改变。插入或缺失的片段越大,其条带与正常条带分开的距离越大。

2.4.6 变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC)是1种新的高效的突变检测技术,对FⅧ基因内突变的检测率达96%。利用高效液相色谱原理,通过1个DNASep分离柱进行核苷酸片段的分离和分析。该法快速高效,易于自动化。正如SSCP、DGGE一样,dHPLC不能确定突变的具体位置,但被检片段的长度可达1500 bp以上。

2.4.7 化学错配裂解法(chemical mismatch cleavage, CMC)其原理是将同位素标记的野生型DNA分子和突变型的DNA(或RNA)片段混合变性,复性时可形成DNA-DNA或DNA-RNA异源双链,然后对突变部位的错配碱基进行化学修饰,氮杂环己烷在修饰位点可裂解标记的DNA片段,通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影即可确定有无突变。

应用直接基因诊断方法虽然可检测出大多数甲型血友病患者的基因突变,但一部分病例需要应用基因内外多态位点进行连锁分析<sup>[23]</sup>,通过间接基因诊断寻找突变位点。间接诊断可适用的情况包括:①曾做过多态性位点的连锁分析,但未能找到突变位点的家系;②不能确定或找不到基因的致病突变;③基因大部分缺失导致突变的家系。对于散发的血友病A家系,连锁分析仅能在女性成员的多态性位点不同于先证者时,可以对女性成员排除其为携带者的诊断。常用的间接诊断方法:

①限制性片段长度多态性法(restriction fragment length polymorphisms, RFLP)利用致病基因内外的限制性片段长度多态性(RFLP)作为特异分子遗传标志物,通过家系成员间的连锁关系确定血友病基因的遗传情况,进行DNA多态性分析的遗传学诊断方法<sup>[24]</sup>。RFLP通过与疾病基因的连锁关系而直接分析,不需要分析基因产物,大大拓宽了基因定位范围。但是,RFLP应用也有其局限性:首先必须具有先证者的标本;其次母亲要求是该

多态位点的杂合子;最后必须联合多个RFLP才可诊断。FⅧ基因内共有四个基因内多态性位点:Bcl I/内含子18、Hind III/内含子19、Xba I/内含子22和Bgl I/内含子25,和两个基因外的多态性变异:Taq I/位点DXS52(St14DNA检验)和Bgl II/位点DXS15(DX13DNA检验)。其中最有多态性位点为FⅧ基因Bcl I和Xba I、Taq I/St14。随着PCR技术的日趋完善,现已使用PCR结合酶解进行限制性内切酶片段长度多态性分析(PCR-RFLP)取代了RFLP,成为临床的对非倒位轻、中型甲型血友病的产前诊断的经典方法之一<sup>[25,26]</sup>。PCR从方法上解决了RFLP的困难,但理论上仍无法提高RFLP多态位点的杂合性。

②可变数目的串联重复序列(variable number of tandem repeat, VNTR)又称小卫星DNA,是人类基因组中种类多、分布广又具有高度多态性的小片段重复序列,其长度多为60~70 bp,是人类基因组中常见的1种多态标记,其应用十分广泛,已报道2种VNTR:int13和st14-1(DXS52)。其中St14位点内含VNTR多态序列,与FⅧ基因紧密连锁,因此以此为遗传标记可进行甲型血友病的基因诊断。DXS52(ST14)位点<sup>[27]</sup>是1个具有多个等位基因的可变数目串联重复顺序(variable number tandem repeat, VNTR)位点,女性的杂合频率高,而且PCR扩增后可直接进行琼脂糖电泳,简便快速,但在进行结果分析和遗传咨询分析时不能忽视St14位点VNTR与FⅧ基因存在的重组率。

对于不存在内含子22倒位的家系进行携带者或产前诊断,利用基因多态性进行遗传连锁分析则成为重要手段。二核苷酸重复序列属于微卫星的1种,作为第2代遗传标记,广泛地运用于遗传性疾病的基因诊断和个体识别<sup>[28,29]</sup>。

间接诊断存在的问题主要有:①缺乏家族史时,由于产生新的突变及嵌合体现象的存在,间接诊断可能是不正确的;②家系中的先证者去世,不能提供有效依据的信息,连锁分析往往不能进行;③当关键的家系女性成员如先证者母亲在选择的多态性位点上表现为纯合子时,不能为连锁分析提供有效信息,给连锁分析带来困难;④选择的多态性位点

可能与基因发生重组,会造成误诊。

血友病携带者诊断的目的是区别携带者及正常女性,使后者可以正常婚育及对携带者的胎儿进行基因检测,以避免患儿出生。由于导致甲型血友病的 FⅧ基因突变主要为内含子 22 倒位和异质性极强的点突变,因此,对于 HA 可疑携带者作基因诊断及产前诊断的方案,是比较合理的:先用 LD-PCR、多重 PCR 的方法检测是否有倒位突变,这使近 30% 的患者得到直接诊断,对于对非倒位的重型甲型血友病患者和轻、中型甲型血友病的家系可用连锁分析方法,最后对仍未能诊断的病例采取基因测序的方法,以便发现新突变。对于无家族史的或无先证者的,排除倒位后直接进行基因测序以求寻找突变位点。产前诊断的取材技术应根据孕妇的孕龄,家属的要求,接受程度及经济基础等情况来选择,做到因人而异,因孕周而异。

目前,本院主要是通过通过对妊娠 20~35 周血友病高危且怀有男性胎儿的孕妇进行产前诊断。于妊娠 20~35 周,在 B 超引导下行胎儿脐静脉血穿刺术,血液离心后血浆测 FⅧ:C,根据血浆 FⅧ:C 结果判断胎儿是否为血友病高危儿。血细胞用于基因诊断,来验证血浆 FⅧ:C 检测结果的准确性,虽然实验室基因诊断已较为成熟,但由于各种因素,本院尚未正式进行血友病的临床基因诊断工作。

行产前诊断后的孕妇,根据产前诊断的不同结果给予不同的意见。FⅧ:C 过低,及基因诊断结果异常的胎儿给予引产;FⅧ:C 达到正常成人范围的,及基因诊断结果正常的胎儿继续妊娠。对于携带者,待其妊娠 19 周时先行 B 超检查,如为女性胎儿则继续妊娠,出生后行携带者诊断或妊娠后产前诊断,如为男性胎儿则进行胎儿血 FⅧ:C 检测和基因诊断。

由于 FⅧ基因分子量较大,目前仅了解其部分的基因序列,基因诊断仍会漏诊部分患儿。血友病是 1 个终生疾病,现在尚无治愈方法,替代治疗又给血友病患者带来严重的并发症,给家庭和社会带来了沉重的经济和心理负担。因此认为有必要对血友病高危人群的孕妇进行积极的遗传筛查和产前诊断,以减少血友病患儿的出生并减轻血友病家庭的经济和心理负担。

### 参考文献

- [1] McMillan CW, Shapiro SS, Whitehurst D, et al. The Natural History of Factor VⅢ:C Inhibitors in Patients With Hemophilia A: A National Cooperative Study. II. Observations on the initial Development of Factor VⅢ:C Inhibitors[J]. *Blood*, 1988, 71: 344-348.
- [2] Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, et al. Incidence of Development of Factor VⅢ and Factor Ⅸ Inhibitors in Haemophiliacs[J]. *Lancet*, 1992, 339: 594-598.
- [3] Ahmed R, Gupta PK, Kannan M, et al. Hemophilia A: role of FVⅢC/VWF Ag in assisting linkage analysis for carrier detection[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2004, 10: 127-131.
- [4] Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, et al. Inversions disrupting the factor VⅢ gene are a common cause of severe haemophilia A[J]. *Nat Genet*, 1993, 3: 236-241.
- [5] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VⅢ gene is a frequent cause of severe hemophilia A[J]. *Blood*, 2002, 1: 168-174.
- [6] Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: geno type/phenotype relationships and inhibitor development[J]. *Sem in Thromb Hemost*, 2003, 1: 23-30.
- [7] El-Maarri O, Herbiniaux U, Graw J, et al. Detailed RNA analysis in haemophilia A patients with previously undetectable mutations[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3: 332-339.
- [8] Klopp N, Oldenburg J, Uen C, et al. 11 Hemophilia A patients without mutations in the factor VⅢ encoding gene [J]. *Thromb Hemost*, 2002, 88: 357-360.
- [9] Panigrahi I, Ahmed RP, Kannan M, et al. Cord Blood Analysis for Prenatal Diagnosis of Thalassemia major and Hemophilia A[J]. *Indian Pediatr*, 2005, 6: 577-581.
- [10] 王谢桐, 陈延琴, 贾涛, 等. 应用 PTC 针取胎儿血进行产前诊断 49 例临床分析[J]. *中国实用妇科与产科*, 2001, 5: 295-296.
- [11] 陆晔玲, 丁秋兰, 戴菁, 等. 血友病携带者与产前基因诊断 [J]. *中国输血杂志*, 2008, 21: 259-264.
- [12] Acquila M, Bicocchi MP, Bottini F, et al. A rapid prenatal diagnosis of hemophilia A by DNA analysis on crude chorionic villus biopsy[J]. *Haematologica*, 1999, 4: 382-383.
- [13] Ranjan R, Biswas A, Kannan M, et al. Prenatal diagnosis of haemophilia A by chorionic villus sampling and cordocentesis: All India institute of Medical Science experience[J]. *Vox*

Sanguinis, 2007, 92: 79-84.

[14] 黄艳仪, 陈小蔓, 孔舒, 等. 孕妇血浆中胎儿 DNA 检测在产前诊断中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 12: 715-717.

[15] Choe J, Hwang D, Kim KC, et al. gender determination and BclII polymorphism using nucleated erythrocytes in maternal blood[J]. J Histochem Cytochem, 2005, 3: 323-327.

[16] Xu Y, Zhuang G, Shu Y. Preimplantation gender diagnosis by fluorescence in situ hybridization[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 6: 874-877.

[17] 徐艳文, 庄广伦, 李满, 等. 荧光原位杂交技术在胚胎植入前性别诊断中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 8: 465-467

[18] 林琳华, 霍梅, 袁红, 等. 不同胎龄胎儿部分凝血因子水平测定[J]. 中华血液学杂志, 2006, 8: 561-562.

[19] 林琳华, 袁红, 任景慧, 等. 胎儿凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ的生成趋势[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2009, 1(1): 15-18.

[20] 赵耘, 梁燕, 王战勇, 等. 胎儿甲型血友病的基因诊断[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 4: 262-265.

[21] Fang Y, Wang XF, Dai J, et al. A rapid multicolor polymerase chain reaction for genetic counselling in Chinese haemophilia A families[J]. Haemophilia, 2006, 12: 62-67.

[22] Fiorentino F, Magli M C, Podini D, et al. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders[J]. Mol Hum Reprod, 2003, 7: 399-410.

[23] Pandey GS, Mittal B. Molecular Diagnosis in Haemophilia A [J]. J Postgrad Med, 2001, 47: 274-280.

[24] Nuzhat Husain. Carrier analysis for hemophilia A: ideal versus acceptable[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 3: 203-207.

[25] Petkova R, Chakarov S, Kremensky I. Genetic analysis of haemophilia A in Bulgaria [J]. BMC Blood Disord, 2004, 1: 2.

[26] Pandey GS, Mittal B. Molecular diagnosis in haemophilia A [J]. J Postgrad Med, 2001, 4: 274-280.

[27] Hussein IR, EL-Beshlaway A, Salem A, et al. The use of DNA markers for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A in Egyptian families[J]. Haemophilia, 2008, 14: 1082-1087.

[28] B Rabbani, A Rezaeian, H Khanahmad, et al. Analysing two dinucleotide repeats of FV III gene in Iranian population [J]. Haemophilia, 2007, 13: 740-744.

[29] A Vencesla, M Baena, L Farestaie. Application of intron 9 and intron 25 dinucleotide repeats of the factor VIII gene for carrier diagnosis in haemophilia A [J]. Haemophilia, 2008, 14: 489-493.

编辑:孟梦

(收稿日期:2010-1-15)

## 致 谢

谨向以下专家对《中国产前诊断杂志(电子版)》2010 年的审稿工作致以感谢!

李胜利 廖 灿 李 辉 苏放明 胡娅莉 孙丽洲  
 王慧芳 严英榴 王 和 许争峰 陶 炯 潘小英  
 黄以宁 刘俊涛 朱宝生 马润玫 李东至 陈 倩  
 程蔚蔚 陈 敏 陈欣林 边旭明 王谢桐

(排名不分先后)