

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.11.008

遗传性疾病专题

新生儿先天畸形分子诊断学研究进展

杨琳¹ 王慧君² 综述 黄国英² 周文浩¹ 审校

(复旦大学附属儿科医院 1. 新生儿科; 2. 分子诊断中心, 上海 201102)

[摘要] 在西方国家及中国主要一线城市如北京、上海等, 出生缺陷已成为婴幼儿死亡的主要原因之一。虽然对于出生缺陷筛查的关注不断提升, 但是由于出生缺陷导致的新生儿病死率近20年并没有显著的下降。一方面, 这些疾病的全部表型并不都能在新生儿期被发现, 另一方面, 此类遗传性疾病具有高度的异质性。这都导致在新生儿期对遗传性疾病进行诊断具有很高的难度。近来发展起来的高通量的微阵列比较基因组杂交技术、第二代测序技术, 可以对全基因组进行拷贝数变异和序列的检测。这些新的、强大的科技手段使得遗传性疾病在新生儿期的诊断成为可能, 并能显著缩短检查时间, 指导干预措施、遗传咨询及产前诊断。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(11): 960-964]

[关键词] 遗传性疾病; 拷贝数变异; 序列分析; 新生儿

Advanced molecular technologies for the diagnosis of congenital malformation in neonates

YANG Lin, WANG Hui-Jun, HUANG Guo-Ying, ZHOU Wen-Hao. Department of Neonatology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China (Zhou W-H, Email: zwhchfu@126.com)

Abstract: Congenital malformation is one of the most frequent causes of infant death in western countries and major cities in China. Though genetic screening of newborns remains a hot issue and concern, the mortality rate associated with birth defects has not been significantly reduced over the past 20 years. Many genetic diseases manifest symptoms during the first 28 days of life, but full clinical symptoms might not be evident in newborns. Moreover, genetic aberrations is highly heterogeneous. These complicated factors lead to the establishment of diagnosis based on nonspecific or obscure symptoms. Recently developed array comparative genomic hybridization (CGH) and next generation sequencing (NGS) techniques with efficient high-resolution allow to screening of the entire genome for DNA copy number variants and sequencing respectively. These new and powerful tools can shorten the differential diagnosis process and quicken to movement towards targeted treatment and genetic and prognostic counseling.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(11):960-964]

Key words: Genetic disorder; Copy number variant; Sequencing analysis; Neonate

新生儿死亡率是衡量一个国家或地区经济、文化、医疗保健水平的主要标志。随着社会经济的快速发展和医疗服务水平的提高, 我国新生儿死亡率持续下降, 危害儿童健康的传染性疾病逐步得到有效控制, 出生缺陷问题却日益凸显^[1]。

我国是人口大国, 也是出生缺陷高发国家。根据卫生部发布的最新《中国出生缺陷报告(2012)》, 目前我国出生缺陷发生率在5.6%左右, 近年来出生缺陷的调查资料显示, 先天性心脏病(简称先心病)是我国出生缺陷的首位畸形,

发病率占新生活产婴的6‰~10‰, 如果加上死胎、死产, 则发病率可高达10‰~20‰。先心病严重危害儿童身心健康, 自然病死率高, 其中30%左右未经治疗的先心病患儿在婴儿期因严重缺氧或心力衰竭等并发症而死亡, 是新生儿和婴儿死亡的重要原因。其中, 新生儿先天畸形常合并各种类型的先心病, 在北京和上海地区, 先天畸形已经成为5岁以下儿童死亡的首位死因^[2-3]。美国国家统计报告(Natl Vital Stat Rep, NVSR)显示, 2009年全美新生儿死亡率为6.39/1000, 死因中先

[收稿日期] 2013-09-12; [修回日期] 2013-09-30

[作者简介] 杨琳, 女, 博士研究生, 医师。

天畸形、早产位居前两位。欧洲EUROCAT数据显示,超过2%的新生儿出生时伴有先天畸形,存活<7d的新生儿中25%由于先天畸形导致死亡^[4-5]。并且,这一统计数字在发达国家近20年没有改变,很大原因是由于在儿科,尤其是在新生儿期,这类疾病不能够得到充分的认识,没有给予快速、明确的诊断和适当的干预。先天畸形的发生原因不外遗传因素、环境因素和两者的相互作用。Wilson(1972)综合分析了5次国际出生缺陷讨论会的资料,发现遗传因素引起的出生缺陷占25%,环境因素占10%,遗传因素与环境因素相互作用和原因不明者占65%。

部分遗传性疾病可以在新生儿期出现表型,但并不是所有的表型都能在新生儿期表现出来^[6],这就造成很多遗传性疾病,尤其是伴多发畸形的综合征,在新生儿期的诊断困难。然而,此类疾病的早期诊断,不但可以尽早为患儿后期的干预和临床治疗提供指导,最重要的是可以为遗传咨询、产前诊断提供依据。所以,临床上对于先天畸形、多发畸形综合征的新生儿期诊断的需求越来越迫切。

1 全基因组时代带来的机遇与挑战

从DNA双螺旋结构的发现,到第一代(RFLP, restriction fragment length polymorphism)、第二代(STR, short tandem repeat)、第三代(SNP, single nucleotide polymorphism)遗传标志物的确立及深入研究,再到第一个完整基因组图谱的完成,海量遗传信息开始被破解。而紧随其后的分子遗传学进展更加让人应接不暇。从2004年Sebat等^[7]和Iafrate等^[8]采用不同的技术同时报道了基因组拷贝数的变异,到2005年454推出的基于焦磷酸测序法的高通量基因组测序,开创了二代测序技术(Next Generation Sequencing, NGS)的先河^[9];从Pacific Biosciences公司推出的“Single Molecule Real Time (SMRTM)”第三代测序技术,到千元基因组计划^[10],我们面临的是一个基因组学的时代。

技术的进步,提供了更新、更强大的武器,同时也给原有的理论带来了新的挑战。传统上,医学遗传学将人类的遗传性疾病按照遗传类型分为单基因病和多基因遗传病。单基因病是指一种遗传病的发生只受一对等位基因控制,遗传方式遵循孟德尔定律;多基因遗传病则受两个以上基因的结构或表达调控的影响。仅从研究相对较为透彻的单基因疾病来讲,一些高度异质性的常染

色体隐性遗传疾病,在多基因甚至全基因组测序中发现,其异质性可能来源于通路中其他存在相互作用的基因的突变,比如Bardet-biedle综合征,存在3个不同基因的复合杂合致病突变^[11-13]。同样,对于新生儿期常见的多发畸形综合征,传统的疾病分类、综合征的诊断也面临着新技术带来的冲击和挑战。故而,本文从基因组拷贝数变异、DNA序列改变这两个方面,通过技术的发展、临床应用的进展等层面,对于分子诊断学在新生儿先天畸形领域的前沿研究进行讨论。

2 全基因组拷贝数检测

拷贝数变异(copy number variations, CNV)一般指1 kb以上长度的基因组片段拷贝数的增加或者减少。CNV和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是人类基因组变异的两个重要来源^[14],但CNV位点的突变率远高于SNPs,是人类疾病的重要致病因素之一。比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)为常用的全基因组拷贝数变异检测技术。其原理是将待测DNA和正常DNA(参照DNA)在标记不同的荧光后,等量混合,根据杂交图像每个位点上的两种荧光强度来判断待测DNA拷贝数有无异常^[15]。CGH技术与传统的细胞遗传学技术相比具有明显的优势:①待测DNA来源多样化;②检测周期短;③检测效率高。其他常规细胞遗传学检测技术,如荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)、PCR等均受探针或引物的限制,只能针对目的片段进行检测。全基因组拷贝数变异的检测方法除了CGH外,还有SNP分型芯片,此类芯片还能提供基因型信息,不但可以用于遗传关联性研究,还可以检测杂合性丢失及片段性单亲二倍体^[16]。

Sagoo等^[17]在2009年的一篇关于CGH在先天畸形和智力低下中应用情况的系统综述中提到,与他们之前的综述仅仅间隔了两年时间,但此类疾病采用CGH进行检测的病例数增加了30倍,从462猛增到了13926,平均诊断率为10%(95%CI: 8%~12%)。这与传统的细胞遗传学诊断方法相比,已经有了明显的提升,所以在欧美国家aCGH已经作为先天畸形、发育迟缓的首要检查方法应用于临床^[18-19]。一项针对新生儿先天畸形在内的研究发现,将CGH作为首要检查,在8794个病例中有25%的患者可以检测到致病性的、或在正常人群中未见的CNVs,且这些CNVs中87%是<5 Mb

的不能被G带核型分析所发现的^[20]。

CGH不仅可用于明确诊断,还可以进一步建立表型基因型的关联性。Cri du Chat综合征(CdCS),也就是猫叫综合征,在儿科临床上相对较为常见,是由于5号染色体短臂末端缺失所致。但是由于之前研究的技术所限,定位欠精确,并且在缺失范围内表型基因型关联性尚不清楚。借助CGH这一技术,通过对94例CdCS进行检测,发现特殊哭声的关键区域位于5p15.31区域1.5 Mb的片段;语言发育落后关键区段位于5p15.32-p15.33区域3.2 Mb的片段;特殊面容位于5p15.2-15.31区域2.4 Mb的片段^[21]。近年来,基于寡核苷酸的探针合成、制备技术,探针分布密度及检测更为精细,已经发现在罕见的4q缺失综合征中,4q35.1区段内465 kb的缺失可能为该疾病的关键区段,与口面部裂、先心病相关^[22]。这些发现都为经典综合征的精细关键区域、关键基因的寻找提供了可行的技术方法,为此类罕见疾病的病因学进一步认识提供了平台。

由此可见,在人类基因存在的许多类型的变异中,CNV已成为基因变异研究新的发展方向。CNV图谱与疾病的关联已为人类疾病研究、新药开发提供了方向。同时,伴随着拷贝数变异作用和形成机制研究,及更多疾病相关CNV的发现,有助于理解人类基因组遗传进化,为疾病的治疗和预防提供新的思路。

3 第二代测序技术

第二代测序平台主要包括罗氏的454FLX, Illumina的Solexa Genome Analyzer和AB的SOLiD系统。虽然不同的第二代测序技术平台的测序操作流程有很大的不同,但实际上,它们背后的技术和原理都具有一定的相似性。第二代测序首先是将基因组DNA随机切割成小片段DNA分子,然后在体外给这些小片段分子的末端连接上接头制成文库,也可以使用配对标签(mate-paired tag)制成跨步文库(jumping libraries)。随后可以通过原位polony(in situ polony)、微乳液PCR(emulsion PCR)或桥式PCR(bridge PCR)等方法,获得测序模板。上述方法的共同点,即任何一个小片段DNA分子的PCR扩增产物都在空间上聚集:原位polony法和桥式PCR法,产物都集中在平板的某处,在微乳液PCR法中,产物都集中在微珠的表面。真正的测序反应本身和传统测序法一样,由重复的聚合酶促反应和最后的荧光、电

信号读取分析反应组成^[23]。在新生儿期,明确病因的单基因疾病有3528种^[6]。但其中,大多数疾病不可能在新生儿期出现全部表型,且由于许多遗传性疾病的异质性,使得在新生儿期此类疾病的诊断率非常低。但是,新生儿重症监护室(NICU)的病人却非常需要开展基因组水平的检测及诊断。对于那些已经有了明确治疗方法的遗传性疾病,NICU的快速诊断可以指导临床早期治疗,有效降低伤残率和病死率^[24-25];对于尚无有效治疗方法的遗传性疾病,也可以针对可能出现的并发症进行规范化的治疗、改善预后^[26]。

基于目的基因组合(Panel)的第二代测序检测方法,可以针对新生儿期某类常见、特定的表型,进行相关目的基因的序列分析,此类方法有明确的针对性,其数据分析相对简单、快捷,适合作为常见表型的初步筛查方法。耳聋是新生儿期较为常见的、可辨别的出生缺陷,双侧永久性耳聋在新生儿中发生率约为1/500^[27]。Keulenaer等^[28]选择包括GJB2、SLC26A4、MYO15A在内的15个与耳聋相关的基因作为目的基因,采用PCR扩增的方法,使用Roche 454 Genome Sequencer FLX进行第二代测序检测。共检测5例患者,其中3例患者来自同一家系,发现了CHD23和OTOF两个基因的新突变,在1例患者发现了TMC1的一个已知突变,1例患者未检测到在这15个已知基因中有致病突变。

在实践中发现,全基因组/全外显子组测序技术(Whole Genome sequencing/ Whole Exome sequencing, WGS/WES)为临床上指向性不明确,但高度支持遗传性疾病的病例提供了有效的检测手段。美国Children's Mercy Hospital的儿科基因组学中心及University of Missouri-Kansas City医学院对于NGS在NICU的应用做了深入的研究^[6]。从针对525个常见隐性遗传疾病致病基因的panel,到全外显子测序,再到近期建立的50 h快速全基因组测序分析技术,为NGS应用于儿科临床做出了巨大的推动。该研究团队通过表型-基因型关联数据库(Symptom-and sign-assisted genome analysis correlation tool, SSAGA)、HiSeq 2500测序、基因组序列比对软件、变异快速分析解释工具(Rapid Understanding of Nucleotide variant Effect Software, RUNES),可以在50 h做到从病人血样DNA的提取到WGS数据分析解释工作全部完成。如该团队报道1例新生儿,男,33周,无家族遗传病史,出生后即可见部分侵蚀性皮损,伴色素沉着及部分结痂。后逐渐进展为全身侵蚀性

皮疹,伴脱皮,黏膜、角膜相继受累,并继发感染。疱疹病毒(-),皮肤活检发现皮肤棘层松懈,有空隙形成,表皮层脱落。根据既往经验,首先对KRT5、DSP、JUP、TP63基因全部编码区及KRT14最常出现突变的第1、4、6外显子进行Sanger直接测序,均未检测到致病突变。所以针对这一病例采用快速全基因组测序分析技术,最终总数据量为121 GB,其中高质量片段占88%,在SSAGA检索到的35个候选基因中,平均覆盖倍数为39.8,但未检测到已知候选基因的致病突变。该家系非近亲、无家族史,提示患儿为新发突变或隐性遗传模式。在NGS测序数据中发现3个新发突变,其中包括GJB2基因检测到一个移码突变(NM_004004, c.85_87del, p.Phe29del),可以造成编码蛋白的第一跨膜螺旋上高度保守位置的氨基酸改变。文献提示GJB2基因突变,可以常染色体显性遗传模式,导致新生儿期致死性皮肤损害,如keratitis-ichthyosis-deafness综合征(KIDS, OMIM # 148210)^[29]。

可见,第二代测序技术具有高灵敏度、高通量、高自动化的特点,其应用前景非常广泛。此外,NGS不但能够检测点突变、基因组拷贝数改变和基因重组(染色体移位)等在内的多种基因改变,还在序列未知物种的全基因组从头测序、转录组测序(RNA-Seq)、蛋白质与DNA的相互作用分析(ChIP Sequencing)、全基因组甲基化图谱等方面有存在巨大的优势及潜力^[30-33]。

4 新生儿期最常见的先天畸形—先心病

先心病是最常见的出生缺陷,占先天异常的1/3,是新生儿期最常见的先天畸形^[34]。环境和遗传因素共同参与了先心病的发生,家系研究证实先心病有很高的遗传度^[35]。21三体患儿有约40%患有先心病,而18三体和13三体患儿几乎全部患有先心病,22q11区域微缺失患儿80%患儿伴有各种先心病^[36-37],其中22q11区域微缺失是先心病最常见的染色体拷贝数变异,占法乐三联症的15%^[38]。

最早报道的基因点突变是通过经典的家系连锁分析,进行区域定位,然后再进行基因测序发现的,随着第二代测序的迅速发展,为复杂疾病的基因组研究提供了新的有效工具。最近发表在Nature杂志上的一篇文章,采用深度测序技术对362个严重先心病患儿的核心家系和264个正常核心家系进行基因组序列分析,发现患儿新发突

变(de novo mutation)基因明显集中于H3K4me-H3K27me组蛋白甲基化信号通路上。这些新发突变可以解释10%的先心病病例^[39]。

5 总结与展望

近年来,分子诊断学取得了飞速的发展,其基础理论和相应的技术应用均取得了许多具有划时代意义的成就,但是,不得不承认,在解决人类所面临的具体疾病方面却尚缺乏突破性的成就,如前所述,新生儿因多发畸形导致的死亡率这一统计数字即便在发达国家近20年都没有改变。可见,目前迫切需要的是将分子遗传、诊断学的先进技术迅速转化到临床、并进行广泛的应用。自2003年,National Institutes of Health(NIH)提出转化研究(translational research)的概念,实际上就是要求将科研与临床相结合(bedside to bench)。Lo等^[40]认为,分子诊断学正是处于转化医学的中心位置,分子诊断本身就是基础和临床相结合的产物。故而,借助技术的不断创新、转化医学意识理念的不断深入,势必在不久的将来给遗传学、分子诊断学,甚至整个医学领域带来巨大的变革,使得大多数的遗传疾病,可以在新生儿期得到明确的诊断,指导个体化医疗和遗传咨询,并使基因治疗成为可能。

[参 考 文 献]

- [1] Rudan I, Chan KY, Zhang JS, Theodoratou E, Feng XL, Salomon JA, et al. Causes of deaths in children younger than 5 years in China in 2008[J]. Lancet, 2010, 375(9720): 1083-1089.
- [2] 朱雪娜, 闫淑娟, 李东阳. 2001-2010年北京市5岁以下儿童先天异常死亡状况分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2011, 19(6): 554-557.
- [3] 邱美英, 翟晓蔚. 上海市嘉定区2001~2005年5岁以下儿童死亡原因分析[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(4): 458-459.
- [4] Dolk H, Loane M, Garne E. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005[J]. Circulation, 2011, 123(8): 841-849.
- [5] Dolk H. EUROCAT: 25 years of European surveillance of congenital anomalies[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2005, 90(5): F355-F358.
- [6] Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, Dinwiddie DL, Noll A, Alnadi NA, et al. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(154): 135r-154r.
- [7] Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome[J]. Science, 2004, 305(5683): 525-528.
- [8] Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y,

- et al. Detection of large-scale variation in the human genome[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(9): 949-951.
- [9] Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1117-1124.
- [10] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1135-1145.
- [11] Hjortshøj TD, Gronskov K, Philp AR, Nishimura DY, Riise R, Sheffield VC, et al. Bardet-Biedl syndrome in Denmark-report of 13 novel sequence variations in six genes[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(4): 429-436.
- [12] Eichers ER, Lewis RA, Katsanis N, Lupski JR. Triallelic inheritance: a bridge between Mendelian and multifactorial traits[J]. *Ann Med*, 2004, 36(4): 262-272.
- [13] Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, et al. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5): 1187-1199.
- [14] Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome[J]. *Science*, 2004, 305(5683): 525-528.
- [15] Diaz D ST, Sandgren J, Piotrowski A, Nord H, Andersson R, Menzel U, et al. Profiling of copy number variations (CNVs) in healthy individuals from three ethnic groups using a human genome 32 K BAC-clone-based array[J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(3): 398-408.
- [16] Mccarroll SA, Kuruville FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(10): 1166-1174.
- [17] Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins J P, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects[J]. *Genet Med*, 2009, 11(3): 139-146.
- [18] Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases[J]. *Mol Cytogenet*, 2011, 4: 12.
- [19] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(5): 749-764.
- [20] Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients[J]. *Mol Cytogenet*, 2013, 6(1): 16.
- [21] Zhang X, Snijders A, Segreaves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, et al. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization[J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 76(2): 312-326.
- [22] Strehle EM, Yu L, Rosenfeld JA, Donkervoort S, Zhou Y, Chen TJ, et al. Genotype-phenotype analysis of 4q deletion syndrome: proposal of a critical region[J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(9): 2139-2151.
- [23] Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing[J]. *Nat Methods*, 2010, 7(2): 111-118.
- [24] American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system-executive summary[J]. *Pediatrics*, 2006, 117(5 Pt 2): S296-S307.
- [25] Downing GJ, Zuckerman AE, Coon C, Lloyd-Puryear M A. Enhancing the quality and efficiency of newborn screening programs through the use of health information technology[J]. *Semin Perinatol*, 2010, 34(2): 156-162.
- [26] Singh RH, Rohr F, Splett PL. Bridging evidence and consensus methodology for inherited metabolic disorders: creating nutrition guidelines[J]. *J Eval Clin Pract*, 2013, 19(4): 584-590.
- [27] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening-a silent revolution[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(20): 2151-2164.
- [28] De Keulenaer S, Hellemans J, Lefever S, Renard JP, De Schrijver J, Van de Voorde H, et al. Molecular diagnostics for congenital hearing loss including 15 deafness genes using a next generation sequencing platform[J]. *BMC Med Genomics*, 2012, 5: 17.
- [29] Shidian E, Feldmann D, Bengoa J, Fraita S, Abadie V, de Prost Y, et al. Germline mosaicism in keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: prenatal diagnosis in a familial lethal form[J]. *Clin Genet*, 2010, 77(6): 587-592.
- [30] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [31] Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(1): 16-18.
- [32] Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. *Trends Genet*, 2008, 24(3): 133-141.
- [33] Kaufmann K, Muino JM, Jauregui R, Airolidi CA, Smaczniak C, Krajewski P, et al. Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower[J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(4): e1000090.
- [34] van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(21): 2241-2247.
- [35] Zhu H, Kartiko S, Finnell RH. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects[J]. *Clin Genet*, 2009, 75(5): 409-423.
- [36] Antonarakis SE, Lyle R, Dermatzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(10): 725-738.
- [37] Pont SJ, Robbins JM, Bird TM, Gibson JB, Cleves MA, Tilford JM, et al. Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(16): 1749-1756.
- [38] Goldmuntz E. DiGeorge syndrome: new insights[J]. *Clin Perinatol*, 2005, 32(4): 963-978.
- [39] Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease[J]. *Nature*, 2013, 498(7453): 220-223.
- [40] Lo YM, Wittwer CT. Molecular diagnostics: at the cutting edge of translational research[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 601.

(本文编辑: 邓芳明)