



王美林, 南京医科大学教授, 博士生导师。生殖医学与子代健康全国重点实验室PI。国家优秀青年科学基金获得者, 主要从事复杂疾病的环境及遗传学的机制研究。近年来研究成果先后发表在*Nat Genet*、*Nat Commun*、*Nucleic Acids Res*和*Environ Int*等期刊上。获国家自然科学基金优青项目1项, 主持国家自然科学基金面上项目4项、青年基金项目1项, 江苏省杰青项目1项, 作为主要成员参与国家重点研发计划2项、国家自然科学基金重点项目2项。获教育部高校自然科学二等奖、中华医学科技奖二等奖、江苏省科学技术奖一等奖、教育部霍英东青年教师奖等奖励。

<https://sklrm.njmu.edu.cn/1905/list.htm>

非综合征型唇腭裂病因学研究进展: 遗传与环境 及遗传-环境交互作用

娄姝^{1,2,3,4} 马兰^{2,4} 潘永初^{1,2,3,4} 王美林^{1,2,5*}

(¹南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166; ²南京医科大学口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点, 南京 210029; ³南京医科大学附属口腔医院正畸科, 南京 210029; ⁴江苏省口腔转化医学工程研究中心, 南京 210029; ⁵南京医科大学公共卫生学院, 南京 211166)

摘要 非综合征型唇腭裂(non-syndromic oral cleft, NSOC)是一种常见的口腔颌面部出生缺陷, 其发病机制复杂, 受遗传和环境因素共同作用的影响。该文全面综述了NSOC的病因学研究现状, 并展望了未来的研究方向。在遗传学方面探究了候选基因和通路研究的发现, 揭示了基因组关联研究的最新发现以及全外显子测序和全基因组测序的突破。在环境危险因素方面回顾了营养不足、母体药物暴露、辐射、环境污染和孕期感染等对NSOC的影响, 强调了这些因素与颌面部发育的紧密联系。更进一步, 该文详细论述了遗传与环境的交互作用, 并展望了NSOC病因学未来研究的可能方向, 这些展望将提供更全面、精准的NSOC治疗和预防策略。

关键词 非综合征型唇腭裂; 病因学; 遗传因素; 环境因素; 遗传-环境交互作用

Advancements in the Etiology of Non-Syndromic Oral Cleft: Insights into Genetics, Environment, and Gene-Environment Interactions

LOU Shu^{1,2,3,4}, MA Lan^{2,4}, PAN Yongchu^{1,2,3,4}, WANG Meilin^{1,2,5*}

(¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; ²State Key Laboratory of Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ³Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ⁴Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029, China; ⁵School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

收稿日期: 2024-01-04

接受日期: 2024-03-05

国家自然科学基金(批准号: 82301014、82270496)和江苏省自然科学基金(批准号: BK20220309)资助的课题

*通信作者。Tel: 025-86868448, E-mail: mwang@njmu.edu.cn

Received: January 4, 2024

Accepted: March 5, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82301014, 82270496), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK20220309)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86868448, E-mail: mwang@njmu.edu.cn

Abstract NSOC (non-syndromic oral cleft) is a common craniofacial birth defect with a complex etiology influenced by both genetic and environmental factors. This article presents a thorough review of the current landscape in NSOC etiology research and outlines prospective directions for future investigations. In the realm of genetics, the exploration extends to candidate gene and pathway studies, unveiling the latest discoveries from genome-wide association studies, along with breakthroughs in whole exome sequencing and whole genome sequencing. Environmental risk factors, such as malnutrition, maternal drug exposure, radiation, environmental pollution, and prenatal infections, are scrutinized for their impact on NSOC, underscoring their intimate associations with craniofacial development. Additionally, this review delves into the intricate interplay between genetic and environmental factors and outlines potential directions for future research in NSOC etiology. These prospects hold the potential to furnish more comprehensive and precise strategies for the treatment and prevention of NSOC.

Keywords non-syndromic oral cleft; etiology; genetic factors; environmental factors; gene-environment interaction

非综合征型唇腭裂(non-syndromic oral cleft, NSOC)是人类颅颌面最常见的出生缺陷之一,根据其发生部位可分为非综合征型单纯唇裂(non-syndromic cleft lip only, NSCLO)、非综合征型唇腭裂(non-syndromic cleft lip and palate, NSCLP)和非综合征型单纯腭裂(non-syndromic cleft palate only, NSCPO)^[1]。NSCLO和NSCLP合并称非综合征型唇裂伴/不伴腭裂(non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P),是指不伴有其他器官、系统畸形,伴或不伴腭裂的出生缺陷,通常认为其和NSCPO是不同类型的先天性畸形,具有特定的胚胎学起源和发病风险^[2]。

在全球范围内,平均每700名新生儿中大约有1名患有NSOC。其发生受种族和地域的影响很大,在亚洲和美洲原住民中发生率最高,为1/500,在欧洲人群中发生率为1/1 000,非洲人群最低^[3]。NSOC的发生给患儿带来了相当大的生理和心理问题,并给家庭带来了巨大的经济风险,同时带来了社会负担^[4]。

NSOC是一种多因素疾病,受胚胎唇、腭发育过程中遗传和环境因素的影响^[5]。此外,吸烟、饮酒、补充叶酸等母亲孕期环境暴露因素也可能在NSOC的发生中起作用^[6]。因此,理解颌面部发育的生物学机制,明确NSOC发病危险因素,以及遗传因素如何与环境因素相互作用具有重要的临床意义和社会效益。本文将详述并探讨NSOC的病因学,涵盖遗传因素、环境危险因素以及二者之间的复杂交互作用。通过深入剖析最新的研究进展,我们旨在为未来预防、干预和治疗NSOC提供有力的支持,以改善患者的生活质量并降低这一先天性畸形的发生率。

1 唇部及腭部组织发生胚胎学概述

人面部的发育发生在胚胎第四周至第十二周之间,起源于第一和第二咽弓^[7]。源自外胚层的神经嵴细胞(neural crest cells, NCCs)增殖并形成神经管^[8]。神经嵴细胞的迅速增长导致胚胎发育第四周颅骨区域的扩张、神经管的伸长和折叠,以及从五个原基或面部突起发育成为面部^[9]。面部发育是一个复杂的过程,一系列的细胞生长、分化、迁移和凋亡以高度协调的方式发生^[10],这一系列事件的缺陷可能导致唇裂、腭裂或两者的发展,尽管唇裂和腭裂一起发生,它们的胚胎起源不尽相同。

唇的发生发育在妊娠第四周至第八周之间,上颌突与侧鼻突融合形成上唇的外侧部分,而侧鼻突形成鼻翼^[11]。上颌突向内侧持续生长,最终与侧鼻突融合形成鼻孔。侧鼻突融合形成鼻和人中的结构。上颌突和侧鼻突出之间融合也形成大量间质组织,该结构继续生长,将上唇与鼻孔分开,在第七周形成原发腭^[12]。一侧上颌突和侧鼻突之间融合失败会导致单侧唇裂,这两个突起之间的双侧融合失败则会导致双侧唇裂^[13-14]。

腭的发育始于妊娠第五周,持续至妊娠第十二周。上腭发育最关键的时期是妊娠第六周至第九周。在胚胎第六周时,双侧上颌突向口腔侧凸起形成侧腭突,此时由于舌体较大,侧腭突垂直向下生长,形成腭架^[12]。在第八周时,随着舌体的发育和舌体位置的下降,最初在垂直位置生长的腭架抬升至舌体上方,达到水平的位置,随后融合形成腭部。腭架在腭突中嵴上皮连接处沿前后方向相互接触并融合,后部未骨化部分形成软腭和悬雍垂,至第十二周全部完

成^[15]。腭架的抬升、接触或融合失败可能导致腭裂。

2 病因学

2.1 遗传危险因素

NSOC是由多种遗传和环境暴露以及它们之间的交互作用引起的。家族连锁分析和双生子研究证实遗传因素在唇腭裂发生发展中起着十分重要的作用,有研究表明非综合征型唇腭裂遗传度为40%~90%^[16-18]。

2.1.1 候选基因研究 候选基因研究是一种经典的遗传学方法,旨在通过深入研究特定基因来揭示其在NSOC发病机制中的作用。这一研究方向已经鉴定出多个可能与NSOC发生相关的候选基因。

干扰素调节因子6基因(interferon regulatory factor 6, *IRF6*)上的遗传变异与NSOC存在显著关联,特别是多态性rs2235371(820G>A),其在*IRF6*上第274位氨基酸(V274I)上的缬氨酸突变成异亮氨酸^[19]。ZUCCHERO等^[20]对来自1 968个多种族家庭的8 003名个体进行了传递不平衡测试(transmission/disequilibrium test, TDT)和病例对照关联分析,发现*IRF6*上的V274I是与NSOC相关的风险遗传变异。据报道,*IRF6*与有唇腭裂表型的范德伍德综合征(Van der Woude Syndrome, VWS)发生相关^[21]。

Msh同源盒基因1(msh homeobox 1, *MSX1*)位于4q16上,是肌节同源盒基因家族的成员,在颅面发育、肢体发育和肿瘤生长抑制中发挥着重要作用^[19]。研究发现*MSX1*基因的遗传变异可能导致NSOC的发生^[22]。在不同人群中,*MSX1*上的遗传变异与NSCL/P和NSCPO之间均存在显著关联^[23-24]。*MSX1* rs12532-AG和rs12532-GG基因型与NSCL/P发生风险显著相关^[25]。此外,*MSX1*基因突变导致间充质细胞增殖缺陷,也可能导致颅面突起融合失败^[19,26]。

亚甲基四氢叶酸还原酶基因(methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)是一个关键的编码叶酸代谢酶的基因,参与甲基化过程。多个研究发现*MTHFR*基因的遗传变异与NSOC的风险升高相关^[27]。不同的荟萃分析研究报道了*MTHFR*多态性rs1801133(C677T)与NSOC的发生显著相关^[28]。据报道,女性携带C677 TT或TC是NSCL/P的重要危险因素^[19]。然而,这些研究结果需要在更大的队列中重复,以增加其意义。近期的研究还发现*MTHFR*基因与其他代谢途径相关基因之间存在复杂的相互作用,

这为进一步解析其在NSOC发生中的作用提供了新的线索^[29]。

叉头盒E1基因(forkhead box E1, *FOXE1*)表达于融合过程中的继发腭上皮,并调控正常腭形成所需的*MSX1*和*TGFB3*^[30]。*FOXE1*与NSOC的显著关联在多个人群中均得到了验证^[31-33]。VENZA等^[34]在11例意大利NSCPO病例的*FOXE1*启动子中发现了一个新的非编码变异c.-1204C>G,并通过实验证明该突变可阻止MYF-5与*FOXE1*启动子结合并影响*FOXE1*表达。

配对盒蛋白7基因(paired box 7, *PAX7*)对于神经嵴诱导至关重要^[35]。*Pax7*调节胚胎干细胞和小鼠胚胎成纤维细胞的细胞周期^[36]。在小鼠体内已被证明*Pax7*通过调节神经嵴标记Slug、Sox9和Sox10的表达在神经嵴发育中发挥作用^[37]。在对欧洲人群进行的基于家系的关联研究中发现*PAX7*与NSOC显著相关^[38]。随后在中国和非洲等国家人群中证实了*PAX7*与NSOC发生关联^[39-41]。

配对盒蛋白9基因(paired box 9, *PAX9*)是*PAX*基因家族中的一个成员,已经被确认与NSOC的发生密切相关^[42]。此外,*PAX9*被认为是腭发育的重要调节因子,*Pax9*缺陷的小鼠腭架表现出伸长不足、抬高延迟和融合失败。*PAX9*与间充质中的众多分子和通路成员(例如*FGF10*、*MSX1*、BMP等)相互作用,并充当关键介质与FGF8和SHH(Sonic Hedgehog)等通路的上皮间充质通讯^[43]。在人群遗传学研究方面,一项针对中国人群的研究发现,*PAX9* rs12885612和rs12881248多态性与NSOC的风险显著相关^[44]。SONG等^[45]也发现*PAX9*基因的多态性与NSOC的发生密切相关。

突触结合蛋白14基因(synaptotagmin 14, *SYT14*)在NSOC的遗传学中起着重要作用。一项来自DUAN等^[40]的研究发现,*SYT14* rs2485893 G等位基因与NSCPO的发生显著相关($P=3.6\times10^{-3}$)。另一项由MA等^[46]进行的研究也证实了*SYT14* rs227227和rs12561877的多态性与中国汉族人群中NSCL/P的易感性之间存在显著关联($P=5.02\times10^{-13}$ 和 $P=2.80\times10^{-11}$)。这些研究结果表明,*SYT14*基因可能是NSOC发病机制的一个重要组成部分,进一步的研究有助于揭示其具体作用机制。

肿瘤蛋白p63基因(tumor protein p63, *TP63*)属于p53家族,编码的TP63蛋白是表皮形态发生的主要调节因子,其对于上皮细胞的增殖、分化和凋亡

具有关键作用。转录因子 TP63 的主要靶标是 *IRF6* 基因。据报道在一个家族中, 位于 *IRF6* 上游的 *TP63* 结合位点的突变是 VWS 的一个易感因素^[47]。XU 等^[48]研究表明, 在一个中国 NSCL/P 的家系中, *TP63* 基因 1324C>T 是其发生 NSCL/P 的可能原因, 为 *TP63* 引起 NSCL/P 的分子机制提供了一定的临床证据。一项中国人群两阶段病例-对照研究发现 *TP63* rs1345186 与右侧唇裂的发生显著相关 ($P=0.017$), 这将为今后的研究和遗传咨询提供新的参考^[49]。

粒状头状转录因子 3 基因 (grainyhead like transcription factor 3, *GRHL3*) 编码一个广泛参与神经管闭合和颅面发育过程的转录因子。研究表明, 在 *IRF6* 基因未发生突变的家系中, *GRHL3* 被发现似乎是 VWS 的第二个候选基因^[50]。在欧洲人群中, MANGOLD 等^[51]对 *GRHL3* 编码区进行测序, 对常见和低频/罕见变异进行了关联分析, 证实了 *GRHL3* 上非同义突变 rs41268753 与 NSCPO 易感性显著相关 ($P=2.73 \times 10^{-9}$), 值得注意的是, 该遗传变异的突变与 NSCL/P 的发生并不相关 ($P=0.45$)。随后, HE 等^[52]在对中国汉族人群 NSCPO 病例-对照人群中对 *GRHL3* 上两个错义突变进行基因分型和关联分析, 结果并未检测到其与中国汉族人群 NSCPO 风险之间的关联。HUANG 等^[53]对 1 名中国 NSCPO 患者进行全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 并通过动物模型实验鉴定并验证出 *GRHL3* 上的罕见变异 (p.Arg391His) 在 NSCPO 发病中的关键作用。ESH-ETE 等^[54]在来自非洲的 NSCPO 核心家系、病例-对照中对 *GRHL3* 进行外显子靶向测序, 并鉴定出 5 个新生突变、2 个错义突变、1 个剪切位点突变、1 个移码突变和 1 个同义突变。一项对南非人群的 100 个 NSCPO 病例及父母进行外显子测序的研究鉴定出 *GRHL3* 上 5 个遗传变异, 可能增加南非人群 NSCPO 的发病风险^[55]。

已鉴定出染色体 1p22 区域多个遗传变异与 NSCL/P 发生存在显著关联, 其中 Rho GTP 酶激活蛋白 29 (Rho GTPase activating protein 29, *ARHGAP29*) 是主要的候选基因^[56]。LIU 等^[57]发现该区域遗传变异会影响 NSCL/P 相关转录因子的结合和染色质构象, 这些结果将统计学上风险关联转化为了潜在的发病机制。此外, LIU 等^[58]在 NSCPO 家系中对 *ARHGAP29* 区域进行外显子测序, 证实了 *ARHGAP29* 上可能的有害突变 (GenBank: NM_004815.3,

NP_004806.3; c.1654T>C[p.Ser552Pro])。

2.1.2 候选通路研究 颅颌面组织器官的发育受到多种信号通路的调控, 这些通路在胚胎发育过程中发挥着关键作用。其中, WNT、TGF- β 、BMP、HH (Hedgehog) 和 FGF 等信号通路被认为是颅颌面组织器官发育的重要调节因素^[14]。WNT 信号通路在胚胎发育中起着多种作用, 包括细胞命运的决定、组织形态的建立以及干细胞的维持^[13]。TGF- β 信号通路通过调节细胞增殖、分化和基质合成, 对颌面部的形态发育起着关键调控作用^[59]。BMP 信号通路则参与了颅颌面骨骼和软组织的形成, 对上颌和下颌骨的发育至关重要^[60]。HH 信号通路在颅颌面器官的形成和发展中也发挥着重要作用, 特别是在神经系统和软骨的发育中^[61]。FGF 信号通路通过调节细胞增殖、迁移和分化来影响颅颌面组织的发育^[62]。这些信号通路之间相互作用复杂, 共同调控着颅颌面组织器官的形成和发育, 其信号通路调节失衡会导致唇腭裂等发育畸形的发生, 因此, 从这些信号通路入手, 深入研究这些信号通路及其分子机制, 可以更好地理解颅颌面组织器官发育的过程, 也是研究 NSOC 的重要提示。

WNT 通路如下。研究表明, WNT 信号通路包括经典和非经典的信号转导模式, 通过调节唇腭部发育的关键过程, 如细胞增殖、迁移和分化等, 在面部形态发生中发挥关键作用, 同时其还与唇腭部发育其他通路发生交互作用^[13]。经典的 WNT 信号转导涉及细胞内介质 β -连环蛋白, 它通过与细胞核中的辅因子结合来控制转录变化。非经典 WNT 信号转导独立于 β -连环蛋白, 控制细胞极性和运动。大多数颅面结构显示出持续的 WNT 信号转导活性, 经常观察到 β -连环蛋白依赖/独立信号转导之间的相互作用^[63]。该通路的破坏会致使正常发育通路失调, 导致 NSOC 的发生^[14]。研究发现携带 *WNT3* 风险等位基因的个体 NSCL/P 的风险增加^[64]。此外, WNT 通路涉及的基因 (例如 *Wnt3A* 基因) 的致病性变异与 NSCL/P 相关^[65], 并且还可能影响神经嵴的发育和形态发生, 导致 NSCL/P 的发生。研究表明 *WNT3* 与 *WNT9B* 上遗传变异也与 NSCLP 易感性显著相关^[32,66]。2 号染色体 2q35 区域 *WNT6-WNT10A* 簇附近的几个 SNP 与 NSOC 相关^[67]。此外, 在中国人群中发现了 *WNT10A* 内的错义突变与 NSCLP 发生显著相关^[68]。含有错义突变的 *WNT7A* 也被鉴定为多病例家族的

NSCLP的易感基因^[69]。

TGF- β 信号通路如下。TGF- β 信号通路在调节细胞生长、免疫反应、胚胎发育和其他过程的各种生物和细胞过程中发挥着至关重要的作用^[70]。在面部形态发生过程中, TGF- β 信号通路与WNT、FGF和BMP等其他信号通路相互作用, 对腭融合至关重要。TGF- β 参与上皮间充质转化, 这是腭骨成功迁移和融合的关键步骤^[71]。TGF- β 信号通路涉及多个基因, 其中一些基因的致病变异已被证明与唇腭裂的发生有关, 如与范德伍德综合征发生相关的*IRF6*基因上的变异^[72]; *SMAD*基因家族也与BMP信号通路有相互作用; 这些基因的变异与NSCPO发生风险的增加有关^[71]。此外, 该通路中的多个成员, 如*TGFB3*、*TGFBR1*和*TGFBR2*, 与NSCL/P的发病紧密相关^[73]。这提示TGF- β 通路的异常可能是NSOC发生的一个重要因素。

BMP信号通路如下。BMP信号通路调节细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡, 这是面部形态发生的关键步骤^[59,74]。BMP信号通路影响某些参与腭融合的基因的调控, 并与SHH信号通路等其他细胞通路相互作用, 后者对颅面发育也很重要^[75]。经典信号转导涉及向细胞核的SMAD依赖性信号转导。非SMAD信号转导涉及细胞增殖、迁移和极性等多种生物学过程。BMP信号转导在颅神经嵴细胞和颅面骨骼的形态发生中发挥着关键作用, 例如神经嵴诱导、迁移以及通过细胞凋亡协调细胞增殖和细胞死亡^[74,76]。*BMP2*和*BMP4*是BMP家族的成员, 研究发现*BMP2* rs235768A>T和*BMP4* rs17563T>C被认为是伊朗人群NSCL/P的危险因素^[77]。*BMP2*对面部的发育至关重要, 而*BMP4*则对组织分化和面部突起的形成非常重要, 这些过程的失调会导致唇裂或腭裂^[78]。

Hedgehog信号通路如下。HH信号转导对于胚胎颅面发育过程中颅神经嵴细胞到达颅面突起后的存活、增殖和分化非常重要^[79]。研究表明, 在胚胎发育阶段HH信号通路的抑制和激活均能导致NSOC的发生。对不同发育阶段的小鼠胚胎使用HH通路拮抗剂可诱导包括NSCL/P在内的颅面发育缺陷特异性表型^[80-81]。在继发腭的发育过程中, 上皮间充质SHH信号转导也是腭架增殖生长所必需的, 其破坏也会产生腭裂^[82]。在腭融合过程中HH信号通路的激活导致左右腭突之间的上皮缝持续存在, 最终抑制其完全融合并导致胚胎生长时出现腭裂^[83]。

KUROSAKA等^[84]和HAMMOND等^[75]均提出增强的SHH信号转导可能通过对也参与胚胎颅面发育的经典WNT和BMP通路产生拮抗作用而导致唇腭裂。

FGF信号通路如下。FGF是一类与细胞外基质中的硫酸肝素具有亲和力的分泌分子, 它们通过四种保守的FGF受体(FGFR)之一发出信号, 因此通常认为FGF信号转导与细胞外基质功能是联系在一起的^[85]。此外, FGF信号转导是参与颅面发育的其他几种信号转导途径和因子的关键介质, 并且许多重要的与NSOC发生相关基因受FGF信号转导调节。FGF信号转导在经典WNT通路的下游被激活。*Fgf8*是唇和腭发育过程中WNT/ β -catenin信号转导的直接转录靶标, 并且在*Ctnnb1*(β -catenin)突变小鼠胚胎的面部外胚层和神经嵴中失调, 并伴有细胞凋亡增加。研究表明*Fgf10*^{-/-}可导致腭裂并伴有腭架生长受限^[86], 其受体*Fgfr2b*的上皮特异性缺失也会导致腭裂^[87], 在这些基因敲除的小鼠胚胎中观察到的腭间充质细胞增殖减少可能是由于SHH表达量减少所致^[86]。SHH信号转导与FGF信号转导通过正反馈环路协同作用, 调控腭上皮和间质细胞增殖^[82]。*Fgf10*在维持腭上皮中的SHH表达方面发挥作用, 而FGF家族成员*Fgf7*通过抑制腭上皮中的SHH表达而具有相反的作用^[88]。这两种信号通路和转录因子共同确保唇腭的形成以及通过激活间充质信号来形成口腔和鼻腔。

这些候选基因和通路的研究为我们提供了深入了解唇腭裂遗传机制的突破口。然而, 这些研究的结果仍需要通过更广泛、更多样化的研究验证, 并与其他遗传和环境因素相互整合, 以更全面地理解NSOC的复杂发病机制。

2.1.3 全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS) 全基因组关联研究代表了揭示疾病遗传基础的前沿方法, 通过分析大规模人群的基因组数据, 识别与疾病风险相关的遗传变异。目前全基因组关联研究已累计鉴定出50多个达到全基因组显著性的严格P值阈值的相关基因/区域^[89-90]。这些基因/区域已经在多个独立的NSCL/P-GWAS^[91-98]、NSCPO-GWAS^[29,41,99], 以及独立研究的荟萃分析^[100-103]中被鉴定出来。总体来说, 这些基因/区域解释了20%~25%的NSOC的遗传度^[19,104]。尽管这些结果显示全基因组分析方法在研究NSOC遗传学方面取得了巨大的成功, 但仍需要更多的工作来全面分析影响NSOC发生风险的遗传变异。

基于NSOC的GWAS已经取得了一系列重要的发现(表1)。2009年, BIRNBAUM等^[92]在欧洲人群的队列中进行了首次NSCL/P GWAS分析, 表明位于8q24.21区域的rs987525是NSCL/P的显著易感位点。随后, 其他的GWAS研究也发现了与NSCL/P显著相关的遗传变异^[29,91,95,97,105]。2015年, SUN等^[98]在中国人群中首次开展NSCL/P GWAS研究, 发现16p13.3(rs8049367, 介于*CREBBP*和*ADCY9*之间)是与NSCL/P发生相关新的易感位点, 并在研究中证实了已报道的1q32.2、10q25.3、17p13.1和20q12区域上的位点。随后, 一项针对中国人群的全基因组研究和荟萃分析报道了一系列已知和新发现的遗传变异与NSCL/P发生显著相关^[106]。这些基因座的发现为我们提供了新的候选基因, 并丰富了对NSCL/P发生机制的认识。

对于NSCPO的GWAS相对欠缺, BEATY等^[29]对欧洲和亚洲550个核心家系开展了GWAS研究, 没有SNP达到全基因组关联水平。SHI等^[107]对核心家系进行GWAS研究, 未发现显著关联位点。LESLIE等^[99]对欧洲人群NSCPO开展GWAS研究, 发现*GRHL3*中错义突变与NSCPO发生显著相关(p.Thr454Met [c.1361C>T]; rs41268753; $P=4.08 \times 10^{-9}$)。在2017年, LUDWIG等^[108]发现4个新的易感区域与NSCL/P发生在全基因组水平相关, 但这些易感遗传变异均为未在NSCPO中发现统计学关联。BUTALI等^[41]对非洲NSCPO和对照人群开展GWAS研究, 并在2号和19号染色体上确定了新的NSCPO易感基因座。2019年HUANG等^[109]对NSCL/P和NSCPO开展GWAS研究, 发现9个易感遗传变异与NSCPO发生相关, PAX9是NSCPO发生中的关键转录因子。

2.1.4 全外显子测序/全基因组测序 全外显子测序(WES)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)等高通量测序技术为深入解析疾病的遗传基础提供了全面、系统的方法^[110]。这些方法不仅能够帮助鉴定已知基因的突变, 还能够发现新的候选基因和功能变异, 从而为理解NSOC的遗传机制提供更全面的认识。

WES聚焦于人类基因组中编码蛋白质的区域, 即外显子。通过对这些区域进行深入测序, 研究者可以识别出患者与正常对照组之间的遗传变异。这种下一代测序技术已被应用于多个人群的NSOC研究^[69,111-113]。有多个患病亲属的多谱系家族为鉴定出生

缺陷或性状的遗传风险提供了巨大的机会^[114]。未受影响的亲属可作为更准确的对照, 因此需要对家系中的所有个体进行深入的表型分析, 并使用适当的遗传模型进行遗传筛选。这种测序策略也可用于病例对照研究设计, 同时在遗传筛选中应用不同的遗传模式。尽管WES有助于研究可能的致病突变, 但它仅限于发现整个人类基因组(也被称为基因组的蛋白质编码区)中1%~2%的限制性蛋白质改变突变。然而, 这个微小的区域却包含着85%的致病突变^[115]。尽管如此, 在非编码区(约占人类基因组的99%)中还可能隐藏着15%的致病突变。然而, 通过使用WGS方法, 可以对这一未研究区域进行更精确、更准确的研究^[116]。与传统的GWAS不同, 该研究策略不需要填补, 并可提供更深入、更可靠的序列。

这种新一代测序技术已应用于跨多个人群的NSOC研究。PENGELLY^[69]等对7个NSCLP家系进行WES, 鉴定出28个非同义单核苷酸突变。最近的一项研究针对巴西人群NSCPO的WES研究表明鉴定的基因中最显著的生物学过程和通路于叶酸代谢相关^[117]。LIU等^[58]对一个NSCPO家系成员进行WES, 发现了*ARHGAP29*中的新型错义变体(c.1654T>C[p.Ser552Pro])。随后利用斑马鱼胚胎模型进行功能测定, 结果表明*ARHGAP29*突变组的角质形成细胞迁移得更快。BASHA等^[113]对家系中84名NSCL/P的患者进行WES, 在*TP63*、*TBX1*、*LRP6*和*GRHL3* 4个基因中发现了罕见的破坏性变异。一项研究使用WES方法在NSCLP家族中鉴定出*ADH7*、*AHR*和*CRYZ* 3个拷贝数变异, 为NSOC的遗传学价值提供了重要线索^[112]。另外一项针对洪都拉斯家庭成员的WES结果表明*ACSS2*和*PHYH*上罕见变异可能与NSCLP发生相关^[111]。

MUKHOPADHYAY等^[118]最近报道了一项基于WGS策略来识别多种族人群中与NSOC相关的新风险位点。据报道, WGS检测出的新生突变(*de novo mutation*, DNM)会增加先天性缺陷的风险^[119], 但针对NSOC的研究有限。大多数唇腭裂病例是散发的, 因此解释了DNM在发病机制中的作用。一项在NSOC患儿-父母核心家系(Trios)研究设计中使用WGS筛选DNM的研究发现, 参与颅面发育的基因(*IRF6*、*TFAP2A*和*ZFHX4*)中存在功能丧失DNM, 并将*ZFHX4*确定为一种新的NSCL/P的候选基因^[120]。

利用全基因组测序数据和强大的研究设计, 我们可以识别更多的NSOC遗传风险的结构变异、常

表1 全基因组关联研究鉴定与NSOC显著相关的遗传变异

Table 1 Genetic variations significantly associated with NSOC identified by genome-wide association studies

第一作者 First author	发表时间 Published time	种族 Ethnicity	遗传变异 Genetic variations	基因 Gene	文献编号 PMID
AVASTHI	2021	Indian	rs36019844, rs74146603, rs7680206, rs10254958, rs113361480	-	34941638
CURTIS	2021	European, Asian	rs72728734, rs36047638, rs12682181, rs4312693, rs5980526, etc.	-	33817668
RAY	2021	European, Asian, Latin America	rs1339063, rs72741048, rs12632559, rs9291207, rs4422437, etc.	-	34242216
ZHANG	2021	European, Asian	rs2186801, rs8031462, rs4646022, rs41117, rs68079474, etc.	<i>MUSK, SLC3A1, CASP9, RETREG1, ANTXR1, etc.</i>	33937227
MUKHOPAD-HYAY	2021	African, Asian, European, American	rs9439714, rs6745357, rs16957821, rs7216951, rs1588366, etc.	<i>PAX7, FAM49A, NTN1, WNT3, TANC2, etc.</i>	33898419
CURTIS	2021	European, Asian	rs35631978, rs4069861, rs113551946, rs5003950, rs16837723, etc.	-	34130359
HE	2020	Chinese	rs7928246, rs3765115, rs2479824, rs11119394, rs34937	<i>ELMOD1, SCAPER, HSD17B3, SYT14, CLN3</i>	32758111
YANG	2020	European, Asian, African	rs2235370, rs7552, rs11273201, rs12600562, rs3845903, etc.	<i>TRAF3IP3, FAM49A, NTN1, LRRC37A2, LRIG1, etc.</i>	33137956
DARDANI	2020	European	rs742071, rs8071332, rs12543318, rs987525, rs8076457	-	32373937
HAALAND	2019	European, Asian	rs7964474, rs2294035, rs10763707, rs3793861, rs814518, etc.	<i>ANO2, ARHGEF10, LYZL1, ANK3, SHKBP1, etc.</i>	31372216
HUANG	2019	Chinese	rs12405750, rs7552, rs17820943, rs730570, rs765366	<i>IRF6, MYCN, MAFB, DLK1, ALX1</i>	31609978
HOWE	2018	European	rs7078160, rs227731, rs742071, rs7590268, rs8001641, etc.	-	30067744
CARLSON	2018	African, Asian, Latin American and North American	rs11142081, rs72804706, rs77590619	<i>SPATA31C2, IPMK, NBEA</i>	30277614
HAALAND	2018	European, Asian	rs1339221, rs13027140, rs1316471, rs16970288, rs13022580, etc.	<i>ESRRG, FLJ30838, COBL, EEF1A1P7, RPL19P4, etc.</i>	29535761
BUTALI	2018	African	rs80004662, rs113691307, rs62529857, rs143238378, rs150382487, etc.	<i>CTNNA2, SULT2A1, OPALIN, SULT2A1, LINC02476, etc.</i>	30452639
YU	2017	Chinese	rs10462065, rs7017252, rs2064163, rs481931, rs1038294, etc.	<i>FGF10, MYC, IRF6, ABCA4, COL8A1, etc.</i>	28232668
LUDWIG	2017	European, Asian	rs6740960, rs112800917, rs2963482, rs151137431, rs1265158, etc.	<i>C2orf91, PKDCC</i>	28087736
LESLIE	2017	European, Asian, African, American	rs75477785, rs12944377, rs66515264, rs9439713, rs6072081, etc.	<i>IRF6, NTN1, ARHGAP29, PAX7, MAFB, etc.</i>	28054174
LESLIE	2016	European, Asian, African, American	rs41268753, rs12065278, rs10009620, rs12718385, rs11992342, etc.	<i>GRHL3, PCMI, VIRMA, PUDP, YAP1, etc.</i>	27018472
SUN	2015	Chinese	rs2235371, rs7078160, rs8049367, rs4791774, rs13041247, etc.	<i>IRF6, VAX1, CREBBP, ADCY9, NTN1, MAFB, etc.</i>	25775280
WU	2014	European, Asian	rs3733585	<i>WDR1, SLC2A9</i>	24516586
BEATY	2011	European, Asian, African	rs2294426, rs1536895	<i>C6orf105, SMC2</i>	21618603
BEATY	2010	European, Asian	rs987525, rs10863790	<i>IRF6</i>	20436469
MANGOLD	2010	European	rs7590268, rs1258763, rs17760296, rs227731, rs7078160	<i>THADA, GREM1, NOG, KIAA1598, SPRY2</i>	20023658
GRANT	2009	European	rs17085106, rs987525	-	19656524
BIRNBAUM	2009	European	rs642961, rs987525	<i>IRF6, GSDMC, PVT1</i>	19270707

-: 不清楚。

-: unclear.

见和低频/罕见遗传变异。虽然WES和WGS在研究中的应用仍面临一些挑战,如数据分析的复杂性和高昂的成本,但它们无疑为深入探究NSOC等复杂疾病的遗传基础提供了有力的工具。

2.1.5 基因-基因交互作用 在探讨NSOC的遗传基础时,个体易感性不仅受到独立基因的影响,更受到多个基因之间错综复杂交互作用的调控。基因-基因交互作用成为研究的焦点,它不仅仅是基因之间简单的相加效应,这些效应可能增强或减弱一个基因对疾病的影响。

LIU等^[121]在亚洲1 038个NSCL/P Trios中对*SUMO1*、*MSX1*和*TP63*进行了基因-基因交互作用分析,结果显示*MSX1*和*TP63*附近的遗传变异之间存在基因-基因交互作用的信号(rs884690和rs9290890, $P=9.34\times 10^{-5}$; rs1022136和rs4687098, $P=2.41\times 10^{-4}$; rs6819546和rs9681004, $P=5.15\times 10^{-4}$)。一项基于806个中国NSCL/P trios进行的*FGF*基因家族中常见变异交互作用研究发现,*FGF10*中的rs2330542和*TBX5*中的rs1946295之间存在最显著的交互作用,在Bonferroni校正后仍然显著($P=9.63\times 10^{-6}$),MOSSEY等^[122]对NSOC病例对照人群中*TGFA*和*MTHFR*的交互作用进行了研究,发现在欧洲人群中,*TGFA*与*MTHFR*的交互作用在女性患儿中具有显著意义。DUAN等^[40]对中国人群NSCPO病例对照进行基因-基因交互作用分析,发现rs4844913和rs11119388之间($P=1.80\times 10^{-8}$)以及rs6072081和rs6102085之间($P=3.60\times 10^{-4}$)存在基因-基因交互作用。

通过深入探讨这些基因之间的交互作用,我们或许能够更全面地理解NSOC的发病机制,从而为未来的治疗和预防提供更为精准和个体化的方案。

2.2 环境危险因素

除遗传因素外,NSOC的复杂病因还与复杂可变的环境因素密切相关(图1)。母体内环境与外环境接触,如健康/疾病状态、孕期营养、母体使用药物和暴露于化学物质、生活方式等,以及与基因的交互作用等都可能影响胚胎发育,本节将深入研究环境危险因素,以探讨它们对胚胎面部发育的影响。

2.2.1 吸烟/酗酒 母亲吸烟和酗酒是公认的NSOC发生的危险因素。LITTLE等^[123]的荟萃分析强调了吸烟与NSOC相关的关键性发现。在中国进行的一项病例对照研究中,ZHANG等^[124]证实了孕妇吸烟与NSOC发生的显著关联。此外,JIA等^[125]

的工作也加深了我们对孕期被动吸烟对NSOC发生的认识[男性和孕早期母亲被动吸烟分别的比值比(odds ratio, OR)=1.86, 11.42; 95%置信区间(confidence interval, CI)[2.28, 2.69; 6.87, 19.00]。近年来的一项荟萃分析也发现被动吸烟暴露与NSOC风险增加两倍显著相关(OR=2.05, 95% CI[1.27, 3.30])^[126]。但研究之间存在明显的异质性,烟草致畸的剂量反应效应仍存在争议。

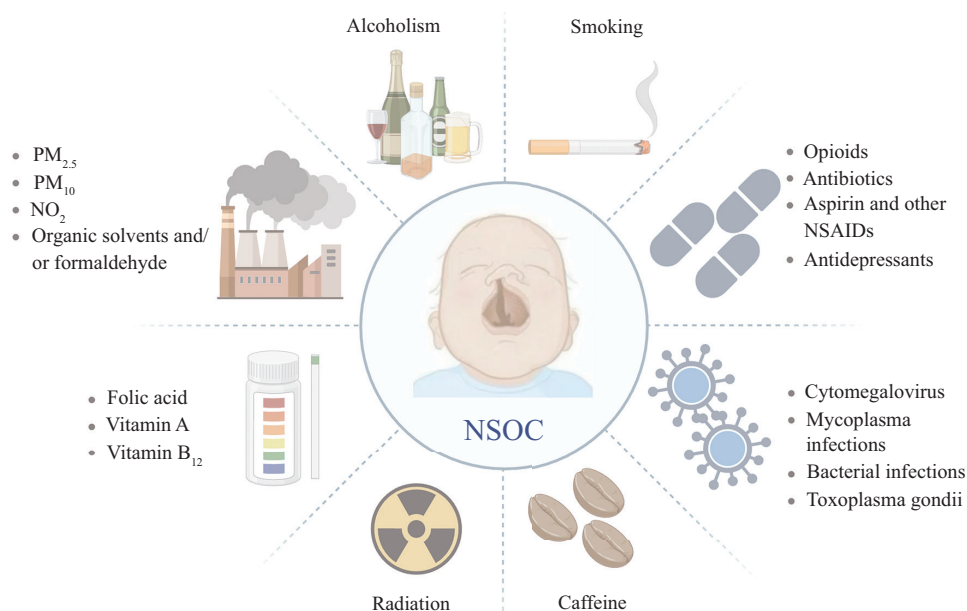
一些研究发现,在中国(OR=1.79, 95% CI[1.03, 3.12])^[127]、刚果民主共和国(OR=19.30, 95% CI[1.03, 3.12])^[128]和墨西哥(OR=1.90, 95% CI[1.17, 3.08])^[129]人群中存在酗酒与NSCL/P的发生风险显著相关。DEROO等^[130]的一项荟萃分析观察到与不饮酒者相比,平均每次酒精摄入5杯以上的母亲更有可能生下NSCLO的婴儿(OR=1.48, 95% CI[1.01, 2.18])。巴西的另一项研究发现,相对于NSCPO,酗酒导致NSCL/P的风险增加相对风险比(relative ratio, RR)=1.54, 95% CI[1.07, 2.38]^[131]。

这些研究为吸烟酗酒与NSOC发生之间的复杂关系提供了多层面的证据,强调了环境因素在NSOC病因学中的关键作用。未来的研究将需要更深入地探讨吸烟和酗酒对胚胎发育的分子机制,以更好地了解这一问题并为预防策略提供更为精准的指导。

2.2.2 孕期营养/咖啡因摄入 孕期营养不足是NSOC发生的一个重要环境危险因素。适当的营养对于正常胚胎发育至关重要,而缺乏特定营养元素可能增加NSOC的风险^[132]。研究发现,孕期营养不足可能导致胚胎面部骨骼和软组织的异常发育。缺乏关键营养元素,如叶酸、维生素B₁₂和维生素A,与NSOC的发生显著相关^[133]。这些元素在胚胎发育的早期阶段扮演着细胞增殖、分化和组织形成的关键角色。

特定营养因子的缺乏与NSOC的关系逐渐受到关注。叶酸在孕期被认为是一种重要的营养素,其缺乏与神经管缺陷和NSOC的发生增加相关^[134]。WILCOX等^[135]研究发现,叶酸补充剂的摄入与NSOC发生的风险降低相关。一项中国人群前瞻性队列研究发现,在末次月经之前开始每日服用400 μg叶酸(不含其他维生素)可降低NSOC风险(RR=0.69, 95% CI[0.55, 0.87])^[136]。

研究还发现,维生素B₁₂的不足也可能与口腔面部畸形有关^[135]。最近的一项荟萃分析发现围孕



包括吸烟、饮酒、环境污染(包括 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 、 NO_2 、有机溶剂和/或甲醛)、营养补充(包括叶酸、维生素A、维生素B₁₂)、辐射、咖啡因、感染(包括巨细胞病毒、支原体感染、细菌感染、弓形虫)、药物摄入(包括阿片类药物、抗生素、阿司匹林和其他非甾体抗炎药、抗抑郁药)。These include smoking, alcoholism, environmental pollution (including $PM_{2.5}$, PM_{10} , NO_2 , organic solvents, and/or formaldehyde), nutritional supplements (including folic acid, vitamin A, vitamin B₁₂), radiation, caffeine, infections (including cytomegalovirus, mycoplasma infections, bacterial infections, toxoplasma gondii), and medication intake (including opioids, antibiotics, aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antidepressants).

图1 与NSOC发生显著相关的环境危险因素

Fig.1 Environmental risk factors significantly associated with NSOC

期使用维生素A可能对NSOC风险具有保护作用(OR=0.87, 95% CI[0.77, 0.99], $P=0.03$)^[137]。ZHANG等^[138]对NSCLP患儿及对照进行高效液相色谱鉴定出NSCLP患儿的血清维生素A水平显著降低($P<0.01$), 结果提示在围孕期补充维生素A的重要性。LIU等^[139]发现母亲在围孕期补充微量营养素可以降低后代NSCL/P的风险。这些研究强调了在孕期保持足够的营养水平对于口腔面部正常发育的至关重要性。但是, 最近一项基于日本人群的前瞻性全国队列研究发现在受孕前或妊娠前三个月摄入多种维生素补充剂与NSOC发生率增加有关(孕前复合维生素摄入量(RR=1.71, 95% CI[1.06, 2.77]) and孕早期(RR=2.00, 95% CI[1.18, 3.37])^[140]。

咖啡因是一种广泛存在于食物和饮料中的神经刺激物, 其摄入与NSOC的发生可能存在关联。多项研究探讨了咖啡因对胎儿发育的潜在影响, HARRIS等^[141]研究发现咖啡因的摄入可能与婴儿先天性畸形, 包括NSOC有关。近期的一项回顾性病例对照研究发现每周摄入总量为560 mg的咖啡因与NSOC的发生显著相关(OR=7.59, 95% CI[2.48, 23.23], $P<0.001$)^[142]。然而, BROWNE等^[143]、COLLIER等^[144]

和JOHANSEN等^[145]的研究均未发现咖啡因对NSOC的作用。这些研究结果表明, 咖啡因的摄入可能在NSOC的发生中发挥一定的作用, 但需要更多的研究来全面理解这一关联。未来的研究应该注重考虑不同咖啡因来源和摄入量, 并结合其他潜在因素, 以更全面地解析咖啡因与NSOC之间的关系。

2.2.3 药物和化学物质 孕妇在孕期使用药物和暴露于化学物质可能对胎儿面部发育产生潜在危害。一些药物和化学物质的暴露已被发现与NSOC的风险增加相关。例如, 一项最新的研究发现, 产前阿片类药物暴露可能是导致NSCL/P发生的关键环境风险因素之一^[146]。此外, 针对抗生素使用的研究也引起了关注, 有研究表明, 孕妇在妊娠早期使用阿莫西林可能会增加NSOC发生的风险^[147]。这可能是由于阿莫西林可以穿过胎盘, 并影响胎儿器官的发生所致^[148]。在药物类别中, 阿司匹林和其他非甾体抗炎药也备受关注。HERNANDEZ等^[149]研究发现, 阿司匹林或其他非甾体抗炎药的使用可能与NSOC的发生有关。此外, 一些药物, 如抗癫痫药物和利尿药物, 也可能与NSOC的发生相关。研究表明暴露于拉莫三嗪的婴儿患有NSOC比未接触拉

莫三嗪的婴儿患有NSOC的发生率增加了10.4倍(95% CI[4.3, 24.9])^[150]。研究发现妊娠早期接受托吡酯单药治疗与总体主要先天畸形风险增加无关(OR=1.01; 95% CI[0.37, 3.22]), 但与NSCL/P风险升高相关(OR=5.36; 95% CI[1.49, 20.07])^[151]。研究人员对特定药物进行了深入的研究, 以揭示其对口腔发育的潜在影响。例如, 近期的研究发现, 抗抑郁药物的使用可能与NSOC的风险增加相关。这可能是由于抑郁症与大脑中血清素水平的下调有关, 然而颅面部区域对血清素信号的变化特别敏感, 这种失调会导致骨骼发育、软骨成熟、牙胚和腭形成缺陷^[152]。

此外, 一些工业化学物质, 如二恶英, 也被发现可能是造成先天性颅面缺陷如NSOC形成的主要因素^[153]。二恶英在腭发育的过程中抑制腭架细胞增殖, 扰乱腭中缝上皮细胞的程序性死亡, 从而导致唇腭裂的发生^[154]。BRENDER等^[155]研究发现孕妇氯化溶剂暴露可能与子代NSOC等出生缺陷存在显著关联。PI等^[156]对胎盘组织中的钡和铝浓度与子代NSOC的风险的相关性进行研究, 发现胎盘钡剂浓度与NSCL/P风险之间存在正剂量反应关系(OR=2.42, 95% CI[1.34, 4.40]), 提示母亲接触钡可能会增加后代患NSOC的风险。近期一项研究观察到母亲职业砷暴露与NSCPO以及母亲膳食砷暴露与NSCL/P呈正相关。一些潜在的机制包括*MSX1*的下调、糖皮质激素通路信号转导的改变、氧化应激以及胎盘DNA甲基化的改变^[157]。这些发现提示了在孕期谨慎使用药物和避免接触有害化学物质的重要性。

2.2.4 辐射暴露/环境污染 医疗放射治疗是一种重要的辐射暴露来源, 特别是在孕妇需要接受放射治疗的情况下。一些研究指出, 胚胎在特定时期接受的辐射剂量与口腔面部畸形的发生可能存在关联^[158]。然而, 需要注意的是, 医疗放射治疗的潜在风险通常与治疗的必要性和效果平衡。

除了医疗应用外, 环境中污染暴露也可能对唇腭裂的发生产生影响。近年来, 随着工业化和城市化的加速发展, 生活环境中的污染问题逐渐凸显。空气污染作为其中一个主要问题, 已经引起了广泛的关注。一些研究表明, 生活环境中的空气污染可能与NSOC的发生存在一定的关联^[159]。研究发现, 孕妇在怀孕期间暴露于空气中的有害物质, 特别是细颗粒物(PM_{2.5})和一氧化氮(NO₂)等污染物, 可能

会增加胎儿口腔面部发育异常的风险^[160]。一项对南非妊娠妇女的研究发现, 孕期暴露于PM₁₀、PM_{2.5}等空气污染物的女性, 其子女患NSOC的风险相对较高^[161]。类似的研究还在其他地区得到了验证, 支持了空气污染与NSOC之间的关联性^[162]。近期一项研究表明, 母亲孕前3个月期间以及妊娠早期PM₁₀暴露与NSOC风险增加呈正相关(每10 μg/m³增量: OR=1.04, 95% CI[1.01, 1.07]; 每10 μg/m³增量: OR=1.05, 95% CI[1.02, 1.08])^[163]。

此外, 日本的一系列全国性出生队列研究结果显示怀孕期间使用有机溶剂和/或甲醛、药物促排卵史、母亲糖尿病/妊娠糖尿病、妊娠高血压疾病与NSOC等先天性畸形风险增加存在显著相关性^[164]。REQUIA等^[165]研究结果表明, 母亲在怀孕期间接触野火烟雾可能会增加婴儿出生时患有NSOC的风险(OR=1.01, 95% CI[1.00, 1.01]), 这对公共卫生和环境提出了严重的挑战。然而, 日本的一项巢式病例对照研究使用了日本环境与儿童研究的数据集, 研究者对192名NSCL/P的儿童和1 920名匹配的对照儿童进行回归分析, 发现怀孕期间母亲血液中四种重金属的水平与后代NSCL/P风险无关^[166]。需要注意的是, 不同地区的污染程度、具体的污染物质成分等因素可能导致研究结果的差异。这些结果扩大了妊娠期间环境污染暴露与儿童颅颌面发育异常之间关联的证据, 它们值得进一步研究, 其中还应关注可能的潜在机制。

综合而言, 现代生活环境中的污染可能是NSOC发生的潜在因素之一。然而, 需要注意的是, 不同地区的污染程度、具体的污染物质成分等因素可能导致研究结果的差异。因此, 进一步的研究仍然需要深入挖掘环境污染与NSOC之间的确切关系, 并制定相应的环境保护政策以降低这一风险。

2.2.5 孕期感染 孕期感染被认为是另一个可能影响胚胎颅颌面发育的因素。研究表明, 母体在怀孕期间受到感染, 特别是在怀孕早期, 可能会增加NSOC的发生风险^[167]。JUGESSUR等^[168]指出, 感染可能通过影响神经嵴等发育过程, 导致NSOC的形成。此外, 一项大规模队列研究也支持了感染在NSOC发生中的潜在角色。他们发现, 患有NSOC的个体的亲属中感染的发生率相对较高, 揭示了孕期感染可能通过家族遗传的方式增加NSOC发生的风险, 这一研究支持了NSOC病因的多因素阈值模型^[18]。孕妇巨细

胞病毒感染是一种已知的致畸危险, DIVYA等^[169]报道, 巨细胞病毒可能是NSCL/P、精神残疾和耳聋的诱因。动物模型表明, 巨细胞病毒会损害间质发育, 由于其对上皮-间质相互作用的影响, 使得颌面部发育特别容易受到巨细胞病毒感染的影响^[170]。与病毒感染类似, 细菌感染引起的免疫反应可能导致胚胎中的炎症, 影响口腔面部结构的正常发育^[171]。一项来自斯洛伐克的研究指出, 患有NSOC的新生儿及其母亲的支原体抗体患病率很高, 尽管如此, NSOC与细菌感染之间的关系仍有待阐明。研究表明, 弓形虫从母亲传播给胎儿可能会导致严重的出生缺陷, 包括颅面畸形, 如NSOC、小头畸形和脑积水等^[172]。

总体而言, 孕期感染与NSOC的关系涉及多个层面, 包括感染的种类、时期以及与其他环境和遗传因素的相互作用。关于具体感染种类和发生时期与NSOC关系的研究尚处于初步阶段。此外, MOSSEY等^[2]在其综述中指出, 感染的复杂性和多样性使得准确评估感染与NSOC之间关系的挑战重重。虽然已有研究进展, 但更多工作仍需展开, 以深入了解感染在NSOC发生中的具体机制, 为相关的预防和治疗提供更为精准的指导。

2.3 环境与遗传的交互作用

环境与遗传因素在NSOC的病因学中扮演着复杂而密切相互关联的角色, 近年来关于NSOC病因学的探究逐渐聚焦于基因与环境间的交互作用, 环境因素的不同暴露可能对不同基因型的个体产生截然不同的影响, 进而影响NSOC的易感性, 这将有助于更好地理解导致复杂出生缺陷发展的生物机制和病理过程。

研究发现, 单纯依赖遗传或环境因素无法全面解释唇腭裂的发生。相反, 环境与遗传的交互作用产生了更复杂的效应。个体的遗传基因与孕期环境因素的相互作用, 可能增加或减少NSOC发生的风险^[91]。这种相互作用的复杂性使得唇腭裂的发病机制研究变得更加丰富和深入。

母亲吸烟是公认的NSOC的危险因素, 一项研究表明母亲吸烟与*GSTT1*缺失的胎儿遗传之间存在交互作用($P<0.001$), 经过多重校正后仍然显著^[173]。一项NSOC基因-环境交互作用的研究发现转化生长因子 α (TGFA)中Taq1标记基因型与母亲吸烟之间基因-环境交互作用有提示性证据($OR_{\text{smokers}}=1.95$,

95% CI[1.22, 3.10])^[174]。ZHOU等^[175]在806中国NSCL/P Trios中对*SPRY*基因进行全基因组基因-环境交互作用, 确定了*SPRY2*基因与母亲环境烟草烟雾或母亲复合维生素补充剂具有显著交互作用($q=2.6\times 10^{-4}$), 强调了在NSOC遗传病因学研究中考虑环境暴露的重要性。一项对欧洲人群NSOC病例-对照进行了全基因组基因-环境交互作用研究, 表明*VGLL2*附近6q22的遗传变异与酒精的交互作用($P=4.62\times 10^{-6}$)以及*PRL*附近6p22.3的遗传变异与吸烟的交互作用($P=1.96\times 10^{-5}$)。这些交互作用可以为NSCL/P的病因学提供新的见解, 并提供通过行为改变来降低风险的新机会^[176]。

此外, HAALAND等^[177]在1 908个欧亚NSCL/P Trios中进行全基因组基因-环境交互作用分析, 发现维生素摄入与*ESRRG*基因上rs1339221($q=0.011$)、rs11117745($q=0.011$)、rs2099557($q=0.037$)之间有显著交互作用。对于孕期叶酸摄入不足的孕妇, 与*MTHFR*基因多态性相关的个体可能具有更高的NSCL/P风险^[178]。这种关联凸显了不同基因型对环境因素的敏感性, 对于制定针对特定人群的预防措施具有重要意义。ZHANG等^[179]在多种族人群中对3 382个NSOC Trios进行全基因组基因-环境交互作用分析, 揭示了1p36上*CASP9*的基因-维生素交互作用的提示性证据($P=9.06\times 10^{-7}$)。对于基因-吸烟交互作用, 荟萃分析结果提示9q31.3上的*MUSK*中存在提示性意义($P=1.68\times 10^{-7}$)。*SLCO3A1*附近的位点也在基因-酒精交互作用中显示出提示性证据($P=3.99\times 10^{-7}$), *RETREG1*附近的rs41117也在基因-维生素交互作用中给出了提示性意义($P=3.87\times 10^{-7}$)。

最近的一项基因-空气污染之间的交互作用分析发现NSCLO风险增加与暴露于高PM₁₀和*CYP*基因上遗传变异有关, 这些探索性结果表明, 一些特定遗传背景的个体可能更容易受到空气污染的不利影响^[180]。CHUNG等^[181]研究指出, 阳光、氮氧化物与其他因素之间的相互作用导致了NSOC发病率的改变。

分子水平上的研究尝试解析环境与遗传相互作用的具体机制。例如, 一些研究表明, 特定环境暴露可能影响基因的表达方式, 导致关键发育途径的异常, 从而增加了口腔面部畸形的风险^[182]。这种影响可能是通过DNA甲基化、组蛋白修饰、miRNA调控等分子机制实现的。例如, 环境因素可能引起基因的甲基化状态发生变化, 进而影响基因的转录

水平, 从而影响口腔面部结构的正常发育。通过深入研究分子水平上的交互作用, 我们能够更全面地理解环境与遗传之间的复杂联系。近期的研究表明, 某些环境因素可能通过改变特定基因的表达, 影响口腔面部结构发育所需的信号通路, 从而导致唇腭裂的发生^[183]。这种深入的分子解析为制定更有针对性的治疗和预防策略提供了基础。

3 总结与展望

NSOC病因学研究的不断深入取得了一系列重要的发现和突破。通过遗传学机制的探索, 基因组关联研究、全基因组测序和全外显子测序等技术的应用, 研究者们成功地鉴定出了一系列与NSOC发生相关的关键基因、遗传变异和通路。这些发现为理解NSOC的病因奠定了基础, 从分子水平揭示了口腔面部发育异常的机制^[29,184]。此外, 环境危险因素的研究也逐渐揭示了孕期营养、药物暴露、辐射、感染和环境污染等因素对口腔面部发育的影响。这种综合的遗传和环境角度有助于全面理解NSOC的发病机制, 为未来的预防和治疗提供了更为全面的认识^[135]。

尽管NSOC的病因学研究已取得丰硕的成果, 但与多数复杂性疾病病因学研究面临一样的困境, 即不能有效地解析遗传变异如何调控效应蛋白表达, 效应蛋白分子又如何对细胞、组织产生影响, 进而导致疾病的发生和发展。数据整合技术的应用使得研究人员能够更全面地理解这些交互作用^[101]。

从当前的研究进展来看, 未来的NSOC研究将更加注重技术的创新和综合分析。新技术的应用, 例如单细胞测序、更全面的全基因组测序、环境因素暴露和代谢分析有望为研究提供更高的分辨率和更全面的遗传信息, 将NSOC的遗传易感性跟分子病理机制紧密联接, 为NSOC的病因学研究开拓新的局面。同时, 大规模队列研究和跨国合作将为不同地域和人群的研究提供更多的样本和数据, 进一步丰富我们对NSOC发病机制的认识^[185-186]。

作者贡献

娄姝负责整理文献、起草论文、修改论文, 马兰负责提供论文思路、修改论文, 潘永初负责指导、修改论文, 王美林负责指导、修改论文以及提供相关支持与资助。

参考文献 (References)

- [1] DIXON M J, MARAZITA M L, BEATY T H, et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(3): 167-78.
- [2] MOSSEY P A, LITTLE J, MUNGER R G, et al. Cleft lip and palate [J]. *Lancet*, 2009, 374(9703): 1773-85.
- [3] MOSSEY P. Epidemiology underpinning research in the aetiology of orofacial clefts [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2007, 10(3): 114-20.
- [4] WEHBY G L, CASSELL C H. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs [J]. *Oral Dis*, 2010, 16(1): 3-10.
- [5] GRITLI-LINDE A. The etiopathogenesis of cleft lip and cleft palate: usefulness and caveats of mouse models [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 84: 37-138.
- [6] MURRAY J C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate [J]. *Clin Genet*, 2002, 61(4): 248-56.
- [7] NASREDDINE G, EL HAJJ J, GHASSIBE-SABBAGH M. Orofacial clefts embryology, classification, epidemiology, and genetics [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2021, 787: 108373.
- [8] JI Y, GARLAND M A, SUN B, et al. Cellular and developmental basis of orofacial clefts [J]. *Birth Defects Res*, 2020, 112(19): 1558-87.
- [9] SOM P M, NAIDICH T P. Illustrated review of the embryology and development of the facial region, part 2: late development of the fetal face and changes in the face from the newborn to adulthood [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2014, 35(1): 10-8.
- [10] COMPAGNUCCI C, MARTINUS K, GRIFFIN J, et al. Programmed cell death not as sledgehammer but as chisel: apoptosis in normal and abnormal craniofacial patterning and development [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 717404.
- [11] JIANG R, BUSH J O, LIDRAL A C. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(5): 1152-66.
- [12] EPPLEY B L, VAN AALST J A, ROBEY A, et al. The spectrum of orofacial clefting [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 115(7): 101e-14e.
- [13] REYNOLDS K, KUMARI P, SEPULVEDA RINCON L, et al. Wnt signaling in orofacial clefts: crosstalk, pathogenesis and models [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(2): dmm037051.
- [14] REYNOLDS K, ZHANG S, SUN B, et al. Genetics and signaling mechanisms of orofacial clefts [J]. *Birth Defects Res*, 2020, 112(19): 1588-634.
- [15] BUSH J O, JIANG R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development [J]. *Development*, 2012, 139(2): 231-43.
- [16] SIVERTSEN A, WILCOX A J, SKJAERVEN R, et al. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives [J]. *BMJ*, 2008, 336(7641): 432-4.
- [17] GROSEN D, BILLE C, PETERSEN I, et al. Risk of oral clefts in twins [J]. *Epidemiology*, 2011, 22(3): 313-9.
- [18] GROSEN D, CHEVRIER C, SKYTTE A, et al. A cohort study of recurrence patterns among more than 54 000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance [J]. *J Med Genet*, 2010, 47(3): 162-8.
- [19] SALEEM K, ZAIB T, SUN W, et al. Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate [J].

- Heliyon, 2019, 5(12): e03019.
- [20] ZUCCHERO T M, COOPER M E, MAHER B S, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 769-80.
 - [21] KONDO S, SCHUTTE B C, RICHARDSON R J, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(2): 285-9.
 - [22] TASANARONG P, PABALAN N, THARABENJASIN P, et al. MSX1 gene polymorphisms and non-syndromic cleft lip with or without palate (NSCL/P): a meta-analysis [J]. *Oral Dis*, 2019, 25(6): 1492-501.
 - [23] LIDRAL A C, ROMITTI P A, BASART A M, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2): 557-68.
 - [24] SUZUKI Y, JEZEWSKI P A, MACHIDA J, et al. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate [J]. *Genet Med*, 2004, 6(3): 117-25.
 - [25] RAFIGHDOOST H, HASHEMI M, NAROEI A, et al. Association between CDH1 and MSX1 gene polymorphisms and the risk of nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a southeast Iranian population [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2013, 50(5): e98-e104.
 - [26] GREEN R M, FENG W, PHANG T, et al. Tfp2a-dependent changes in mouse facial morphology result in clefting that can be ameliorated by a reduction in Fgf8 gene dosage [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(1): 31-43.
 - [27] VIEIRA A R, COOPER M E, MARAZITA M L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America [J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(17): 2075-8.
 - [28] DE AGUIAR P K, COLETTA R D, DE OLIVEIRA A M, et al. rs1801133C>T polymorphism in MTHFR is a risk factor for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2015, 103(4): 292-8.
 - [29] BEATY T H, RUCZINSKI I, MURRAY J C, et al. Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate [J]. *Genet Epidemiol*, 2011, 35(6): 469-78.
 - [30] VENZA I, VISALLI M, PARRILLO L, et al. MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(5): 1016-25.
 - [31] MORENO L M, MANSILLA M A, BULLARD S A, et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4879-96.
 - [32] NIKOPENSUS T, KEMPA I, AMBROZAITYTE L, et al. Variation in FGF1, FOXE1, and TIMP2 genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011, 91(4): 218-25.
 - [33] LAMMER E J, MOHAMMED N, IOVANNISCI D M, et al. Genetic variation of FOXE1 and risk for orofacial clefts in a California population [J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(11): 2770-6.
 - [34] VENZA M, VISALLI M, VENZA I, et al. Altered binding of MYF-5 to FOXE1 promoter in non-syndromic and CHARGE-associated cleft palate [J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38(1): 18-23.
 - [35] MONSORO-BURQ A H. PAX transcription factors in neural crest development [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 44: 87-96.
 - [36] CZERWINSKA A M, NOWACKA J, ASZER M, et al. Cell cycle regulation of embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts lacking functional Pax7 [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(21): 2931-42.
 - [37] BASCH M L, BRONNER-FRASER M, GARCIA-CASTRO M I. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7 [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 218-22.
 - [38] BOHMER A C, MANGOLD E, TESSMANN P, et al. Analysis of susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(10): 2545-9.
 - [39] SULL J W, LIANG K Y, HETMANSKI J B, et al. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case-parent Trios from four populations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(6): 831-9.
 - [40] DUAN S J, HUANG N, ZHANG B H, et al. New insights from GWAS for the cleft palate among han Chinese population [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2017, 22(2): e219-e27.
 - [41] BUTALI A, MOSSEY P A, ADEYEMO W L, et al. Genomic analyses in African populations identify novel risk loci for cleft palate [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(6): 1038-51.
 - [42] LIDRAL A C, MORENO L M, BULLARD S A. Genetic factors and orofacial clefting [J]. *Semin Orthod*, 2008, 14(2): 103-14.
 - [43] LI R, CHEN Z, YU Q, et al. The function and regulatory network of Pax9 gene in palate development [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(3): 277-87.
 - [44] YANG C W, SHI J Y, YIN B, et al. Mutation at paired box gene 9 is associated with non-syndromic cleft lip only from Western Han Chinese population [J]. *Arch Oral Biol*, 2020, 117: 104829.
 - [45] SONG T, WU D, WANG Y, et al. SNPs and interaction analyses of IRF6, MSX1 and PAX9 genes in patients with non-syndromic cleft lip with or without palate [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(4): 1228-34.
 - [46] MA L, LOU S, MIAO Z, et al. Identification of novel susceptibility loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 13669-78.
 - [47] FAKHOURI W D, RAHIMOV F, ATTANASIO C, et al. An etiological regulatory mutation in IRF6 with loss- and gain-of-function effects [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(10): 2711-20.
 - [48] XU T, DU M, BU X, et al. Identification of a novel TP63 mutation causing nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *BMC Med Genomics*, 2021, 14(1): 53.
 - [49] YIN B, SHI J Y, LIN Y S, et al. SNPs at TP63 gene was specifically associated with right-side cleft lip in Han Chinese population [J]. *Oral Dis*, 2021, 27(3): 559-66.
 - [50] PEYRARD-JANVID M, LESLIE E J, KOUSA Y A, et al. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude syndrome and disrupt oral periderm development [J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(1): 23-32.
 - [51] MANGOLD E, BOHMER A C, ISHORST N, et al. Sequencing the GRHL3 coding region reveals rare truncating mutations and a common susceptibility variant for nonsyndromic cleft palate [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(4): 755-62.
 - [52] HE M, BIAN Z. Lack of association between missense variants in GRHL3 (rs2486668 and rs545809) and Susceptibility to non-syndromic orofacial clefts in a Han Chinese population [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159940.
 - [53] HUANG W, HE Q, LI M, et al. Two rare variants reveal the significance of Grainyhead-like 3 Arginine 391 underlying non-syndromic cleft palate only [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(4): 1632-43.
 - [54] ESHETE M A, LIU H, LI M, et al. Loss-of-function GRHL3

- variants detected in african patients with isolated cleft palate [J]. *J Dent Res*, 2018, 97(1): 41-8.
- [55] NAICKER T, ADELEKE C C, ALADE A, et al. Novel GRHL3 variants in a south African cohort with cleft lip and palate [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2022, 59(9): 1125-30.
- [56] LESLIE E J, MANSILLA M A, BIGGS L C, et al. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22 [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2012, 94(11): 934-42.
- [57] LIU H, LESLIE E J, CARLSON J C, et al. Identification of common non-coding variants at 1p22 that are functional for non-syndromic orofacial clefting [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14759.
- [58] LIU H, BUSCH T, ELIASON S, et al. Exome sequencing provides additional evidence for the involvement of ARHGAP29 in Mendelian orofacial clefting and extends the phenotypic spectrum to isolated cleft palate [J]. *Birth Defects Res*, 2017, 109(1): 27-37.
- [59] LIU W, SUN X, BRAUT A, et al. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice [J]. *Development*, 2005, 132(6): 1453-61.
- [60] NIE X, LUUKKO K, KETTUNEN P. BMP signalling in craniofacial development [J]. *Int J Dev Biol*, 2006, 50(6): 511-21.
- [61] COBOURNE M T, XAVIER G M, DEPEW M, et al. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome [J]. *Dev Biol*, 2009, 331(1): 38-49.
- [62] TRUMPP A, DEPEW M J, RUBENSTEIN J L, et al. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(23): 3136-48.
- [63] MANI P, JARRELL A, MYERS J, et al. Visualizing canonical Wnt signaling during mouse craniofacial development [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(1): 354-63.
- [64] MENEZES R, LETRA A, KIM A H, et al. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88(11): 995-1000.
- [65] YAO T, YANG L, LI P Q, et al. Association of Wnt3A gene variants with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese population [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(1): 73-8.
- [66] FONTOURA C, SILVA R M, GRANJEIRO J M, et al. Association of WNT9B gene polymorphisms with nonsyndromic cleft Lip with or without cleft palate in Brazilian nuclear families [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2015, 52(1): 44-8.
- [67] BEATY T H, HETMANSKI J B, FALLIN M D, et al. Analysis of candidate genes on chromosome 2 in oral cleft case-parent Trios from three populations [J]. *Hum Genet*, 2006, 120(4): 501-18.
- [68] FENG C, DUAN W, ZHANG D, et al. C392T polymorphism of the Wnt10a gene in non-syndromic oral cleft in a northeastern Chinese population [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 52(8): 751-5.
- [69] PENGELLY R J, ARIAS L, MARTINEZ J, et al. Deleterious coding variants in multi-case families with non-syndromic cleft lip and/or palate phenotypes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30457.
- [70] NAKAJIMA A, C F S, GULKA A O D, et al. TGF-beta signaling and the epithelial-mesenchymal transition during palatal fusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11).
- [71] IWATA J, PARADA C, CHAI Y. The mechanism of TGF-beta signaling during palate development [J]. *Oral Dis*, 2011, 17(8): 733-44.
- [72] DESHPANDE A S, GOUDY S L. Cellular and molecular mechanisms of cleft palate development [J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2019, 4(1): 160-4.
- [73] RILEY B M, MURRAY J C. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases [J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(24): 3228-34.
- [74] UEHARU H, MISHINA Y. BMP signaling during craniofacial development: new insights into pathological mechanisms leading to craniofacial anomalies [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1170511.
- [75] HAMMOND N L, BROOKES K J, DIXON M J. Ectopic Hedgehog signaling causes cleft palate and defective osteogenesis [J]. *J Dent Res*, 2018, 97(13): 1485-93.
- [76] GRAF D, MALIK Z, HAYANO S, et al. Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 27: 129-39.
- [77] SAKET M, SALIMINEJAD K, KAMALI K, et al. BMP2 and BMP4 variations and risk of non-syndromic cleft lip and palate [J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 72: 134-7.
- [78] PARADA C, CHAI Y. Roles of BMP signaling pathway in lip and palate development [J]. *Front Oral Biol*, 2012, 16: 60-70.
- [79] JEONG J, MAO J, TENZEN T, et al. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(8): 937-51.
- [80] LIPINSKI R J, SONG C, SULIK K K, et al. Cleft lip and palate results from Hedgehog signaling antagonism in the mouse: phenotypic characterization and clinical implications [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2010, 88(4): 232-40.
- [81] HEYNE G W, MELBERG C G, DOROODCHI P, et al. Definition of critical periods for Hedgehog pathway antagonist-induced holoprosencephaly, cleft lip, and cleft palate [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120517.
- [82] LAN Y, JIANG R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth [J]. *Development*, 2009, 136(8): 1387-96.
- [83] LI J, YUAN Y, HE J, et al. Constitutive activation of hedgehog signaling adversely affects epithelial cell fate during palatal fusion [J]. *Dev Biol*, 2018, 441(1): 191-203.
- [84] KUROSAKA H, IULIANELLA A, WILLIAMS T, et al. Disrupting hedgehog and WNT signaling interactions promotes cleft lip pathogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(4): 1660-71.
- [85] LONAI P. Fibroblast growth factor signaling and the function and assembly of basement membranes [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 66: 37-64.
- [86] RICE R, SPENCER-DENE B, CONNOR E C, et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(12): 1692-700.
- [87] HOSOKAWA R, DENG X, TAKAMORI K, et al. Epithelial-specific requirement of FGFR2 signaling during tooth and palate development [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2009, 312B(4): 343-50.
- [88] HAN J, MAYO J, XU X, et al. Indirect modulation of Shh signaling by Dlx5 affects the oral-nasal patterning of palate and rescues cleft palate in Msx1-null mice [J]. *Development*, 2009, 136(24): 4225-33.

- [89] BEATY T H, MARAZITA M L, LESLIE E J. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities [J]. *F1000Res*, 2016, 5: 2800.
- [90] MUKHOPADHYAY N, FEINGOLD E, MORENO-URIBE L, et al. Genome-wide association study of non-syndromic orofacial clefts in a multiethnic sample of families and controls identifies novel regions [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 621482.
- [91] BEATY T H, MURRAY J C, MARAZITA M L, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4 [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 525-9.
- [92] BIRNBAUM S, LUDWIG K U, REUTTER H, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 473-7.
- [93] CAMARGO M, RIVERA D, MORENO L, et al. GWAS reveals new recessive loci associated with non-syndromic facial clefting [J]. *Eur J Med Genet*, 2012, 55(10): 510-4.
- [94] GOWANS L J, ADEYEMO W L, ESHETE M, et al. Association studies and direct DNA sequencing implicate genetic susceptibility loci in the etiology of nonsyndromic orofacial clefts in sub-Saharan African populations [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(11): 1245-56.
- [95] GRANT S F, WANG K, ZHANG H, et al. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24 [J]. *J Pediatr*, 2009, 155(6): 909-13.
- [96] LESLIE E J, CARLSON J C, SHAFFER J R, et al. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13 [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(13): 2862-72.
- [97] MANGOLD E, LUDWIG K U, BIRNBAUM S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(1): 24-6.
- [98] SUN Y, HUANG Y, YIN A, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6414.
- [99] LESLIE E J, LIU H, CARLSON J C, et al. A genome-wide association study of nonsyndromic cleft palate identifies an etiologic missense variant in GRHL3 [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(4): 744-54.
- [100] CARLSON J C, ANAND D, BUTALI A, et al. A systematic genetic analysis and visualization of phenotypic heterogeneity among orofacial cleft GWAS signals [J]. *Genet Epidemiol*, 2019, 43(6): 704-16.
- [101] LESLIE E J, CARLSON J C, SHAFFER J R, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(3): 275-86.
- [102] LESLIE E J, CARLSON J C, SHAFFER J R, et al. Association studies of low-frequency coding variants in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. *Am J Med Genet A*, 2017, 173(6): 1531-8.
- [103] LUDWIG K U, MANGOLD E, HERMS S, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(9): 968-71.
- [104] MORRIS V E, HASHMI S S, ZHU L, et al. Evidence for cranio-facial enhancer variation underlying nonsyndromic cleft lip and palate [J]. *Hum Genet*, 2020, 139(10): 1261-72.
- [105] MARAZITA M L, MURRAY J C, LIDRAL A C, et al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35 [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(2): 161-73.
- [106] YU Y, ZUO X, HE M, et al. Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14364.
- [107] SHI M, MURRAY J C, MARAZITA M L, et al. Genome wide study of maternal and parent-of-origin effects on the etiology of orofacial clefts [J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(4): 784-94.
- [108] LUDWIG K U, BOHMER A C, BOWES J, et al. Imputation of orofacial clefting data identifies novel risk loci and sheds light on the genetic background of cleft lip^{+/−} cleft palate and cleft palate only [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(4): 829-42.
- [109] HUANG L, JIA Z, SHI Y, et al. Genetic factors define CPO and CLO subtypes of nonsyndromic orofacial cleft [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(10): e1008357.
- [110] YU T W, CHAHROUR M H, COULTER M E, et al. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism [J]. *Neuron*, 2013, 77(2): 259-73.
- [111] AYLWARD A, CAI Y, LEE A, et al. Using whole exome sequencing to identify candidate genes with rare variants in non-syndromic cleft lip and palate [J]. *Genet Epidemiol*, 2016, 40(5): 432-41.
- [112] CAI Y, PATTERSON K E, REINIER F, et al. Copy number changes identified using whole exome sequencing in nonsyndromic cleft lip and palate in a honduran population [J]. *Birth Defects Res*, 2017, 109(16): 1257-67.
- [113] BASHA M, DEMEER B, REVENCU N, et al. Whole exome sequencing identifies mutations in 10% of patients with familial non-syndromic cleft lip and/or palate in genes mutated in well-known syndromes [J]. *J Med Genet*, 2018, 55(7): 449-58.
- [114] BUREAU A, BEGUM F, TAUB M A, et al. Inferring disease risk genes from sequencing data in multiplex pedigrees through sharing of rare variants [J]. *Genet Epidemiol*, 2019, 43(1): 37-49.
- [115] MAJEWSKI J, SCHWARTZENTRUBER J, LALONDE E, et al. What can exome sequencing do for you [J]? *J Med Genet*, 2011, 48(9): 580-9.
- [116] BELKADI A, BOLZE A, ITAN Y, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(17): 5473-8.
- [117] MACHADO R A, MARTELLI-JUNIOR H, REIS S R A, et al. Identification of novel variants in cleft palate-associated genes in Brazilian patients with non-syndromic cleft palate only [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 638522.
- [118] MUKHOPADHYAY N, BISHOP M, MORTILLO M, et al. Whole genome sequencing of orofacial cleft Trios from the Gabriella Miller Kids First Pediatric Research Consortium identifies a new locus on chromosome 21 [J]. *Hum Genet*, 2020, 139(2): 215-26.
- [119] JI W, FERDMAN D, COPEL J, et al. *De novo* damaging variants associated with congenital heart diseases contribute to the connectome [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7046.
- [120] BISHOP M R, DIAZ PEREZ K K, SUN M, et al. Genome-wide enrichment of *de novo* coding mutations in orofacial cleft Trios [J].

- Am J Hum Genet, 2020, 107(1): 124-36.
- [121] LIU D, SCHWENDER H, WANG M, et al. Gene-gene interaction between MSX1 and TP63 in Asian case-parent Trios with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate [J]. Birth Defects Res, 2018, 110(4): 317-24.
- [122] MOSSEY P A, LITTLE J, STEEGERS-THEUNISSEN R, et al. Genetic interactions in nonsyndromic orofacial clefts in Europe-EUROCRAN Study [J]. Cleft Palate Craniofac J, 2017, 54(6): 623-30.
- [123] LITTLE J, CARDY A, MUNGER R G. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82(3): 213-8.
- [124] ZHANG B, JIAO X, MAO L, et al. Maternal cigarette smoking and the associated risk of having a child with orofacial clefts in China: a case-control study [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2011, 39(5): 313-8.
- [125] JIA Z L, SHI B, CHEN C H, et al. Maternal malnutrition, environmental exposure during pregnancy and the risk of non-syndromic orofacial clefts [J]. Oral Dis, 2011, 17(6): 584-9.
- [126] SABBAGH H J, HASSAN M H, INNES N P, et al. Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0116963.
- [127] XU D P, QU W D, SUN C, et al. A study on environmental factors for nonsyndromic cleft lip and/or palate [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2018, 29(2): 364-7.
- [128] MBUYI-MUSANZAYI S, KAYEMBE T J, KASHAL M K, et al. Non-syndromic cleft lip and/or cleft palate: epidemiology and risk factors in Lubumbashi (DR Congo), a case-control study [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2018, 46(7): 1051-8.
- [129] ANGULO-CASTRO E, ACOSTA-ALFARO L F, GUADRON-LLANOS A M, et al. Maternal risk factors associated with the development of cleft lip and cleft palate in Mexico: a case-control study [J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2017, 29(93): 189-95.
- [130] DEROO L A, WILCOX A J, LIE R T, et al. Maternal alcohol binge-drinking in the first trimester and the risk of orofacial clefts in offspring: a large population-based pooling study [J]. Eur J Epidemiol, 2016, 31(10): 1021-34.
- [131] MARANHAO S C, SA J, CANGUSSU M C T, et al. Nonsyndromic oral clefts and associated risk factors in the state of Bahia, Brazil [J]. Eur Arch Paediatr Dent, 2021, 22(2): 121-7.
- [132] CZEIZEL A E, DUDAS I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation [J]. N Engl J Med, 1992, 327(26): 1832-5.
- [133] DE-REGIL L M, FERNANDEZ-GAXIOLA A C, DOWSWELL T, et al. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, (10): CD007950.
- [134] BADOVINAC R L, WERLER M M, WILLIAMS P L, et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2007, 79(1): 8-15.
- [135] WILCOX A J, LIE R T, SOLVOLL K, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study [J]. BMJ, 2007, 334(7591): 464.
- [136] LI S, CHAO A, LI Z, et al. Folic acid use and nonsyndromic orofacial clefts in China: a prospective cohort study [J]. Epidemiology, 2012, 23(3): 423-32.
- [137] ALADE A, ISMAIL W, NAIR R, et al. Periconceptional use of vitamin A and the risk of giving birth to a child with nonsyndromic orofacial clefts-A meta-analysis [J]. Birth Defects Res, 2022, 114(10): 467-77.
- [138] ZHANG J, ZHOU S, ZHANG Q, et al. Proteomic analysis of RBP4/vitamin A in children with cleft lip and/or palate [J]. J Dent Res, 2014, 93(6): 547-52.
- [139] LIU C, WANG D, JIN L, et al. The relationship between maternal periconceptional micronutrient supplementation and non-syndromic cleft lip/palate in offspring [J]. Birth Defects Res, 2023, 115(5): 545-54.
- [140] YOSHIDA S, TAKEUCHI M, KAWAKAMI C, et al. Maternal multivitamin intake and orofacial clefts in offspring: Japan Environment and Children's Study (JECS) cohort study [J]. BMJ Open, 2020, 10(3): e035817.
- [141] HARRIS J, KALLEN B, ROBERT E. The epidemiology of anotia and microtia [J]. J Med Genet, 1996, 33(10): 809-13.
- [142] CHAROENVICHA C, WONGKAWINWOOT K, SIRIKUL W, et al. Predisposing factors of non-syndromic cleft lip and cleft palate in the northern Thai population: a 10-year retrospective case-control study [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2023, 63(5): 147-53.
- [143] BROWNE M L. Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies: a systematic review [J]. Epidemiology, 2006, 17(3): 324-31.
- [144] COLLIER S A, BROWNE M L, RASMUSSEN S A, et al. Maternal caffeine intake during pregnancy and orofacial clefts [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(10): 842-9.
- [145] JOHANSEN A M, WILCOX A J, LIE R T, et al. Maternal consumption of coffee and caffeine-containing beverages and oral clefts: a population-based case-control study in Norway [J]. Am J Epidemiol, 2009, 169(10): 1216-22.
- [146] PROCTOR-WILLIAMS K, LOUW B. Cleft lip and/or palate in infants prenatally exposed to opioids [J]. Cleft Palate Craniofac J, 2022, 59(4): 513-21.
- [147] LIN K J, MITCHELL A A, YAU W P, et al. Maternal exposure to amoxicillin and the risk of oral clefts [J]. Epidemiology, 2012, 23(5): 699-705.
- [148] NATHANSON S, MOREAU E, MERLET-BENICHO C, et al. In utero and *in vitro* exposure to beta-lactams impair kidney development in the rat [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(5): 874-84.
- [149] HERNANDEZ R K, WERLER M M, ROMITTI P, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug use among women and the risk of birth defects [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 206(3): 228.e1-8.
- [150] HOLMES L B, BALDWIN E J, SMITH C R, et al. Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy [J]. Neurology, 2008, 70(22 Pt 2): 2152-8.
- [151] MARGULIS A V, MITCHELL A A, GILBOA S M, et al. Use of topiramate in pregnancy and risk of oral clefts [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 207(5): 405.e1-7.
- [152] SANCHEZ N, JUAREZ-BALAREZO J, OLHABERRY M, et al. Depression and antidepressants during pregnancy: craniofacial defects due to stem/progenitor cell deregulation mediated by serotonin [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 632766.
- [153] LESKOW A, NAWROCKA M, LATKOWSKA M, et al. Can contamination of the environment by dioxins cause craniofacial defects [J]? Hum Exp Toxicol, 2019, 38(9): 1014-23.
- [154] YOSHIOKA W, TOHYAMA C. Mechanisms of developmental toxicity of dioxins and related compounds [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 617.

- [155] BRENDER J D, SHINDE M U, ZHAN F B, et al. Maternal residential proximity to chlorinated solvent emissions and birth defects in offspring: a case-control study [J]. *Environ Health*, 2014, 13: 96.
- [156] PI X, JIN L, LI Z, et al. Association between concentrations of barium and aluminum in placental tissues and risk for orofacial clefts [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 652: 406-12.
- [157] SUHL J, LEONARD S, WEYER P, et al. Maternal arsenic exposure and nonsyndromic orofacial clefts [J]. *Birth Defects Res*, 2018, 110(19): 1455-67.
- [158] BRENT R L. Radiation teratogenesis [J]. *Teratology*, 1980, 21(3): 281-98.
- [159] RAO A, AHMED M K, TAUB P J, et al. The correlation between maternal exposure to air pollution and the risk of orofacial clefts in infants: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Oral Maxillofac Res*, 2016, 7(1): e2.
- [160] ZHU Y, ZHANG C, LIU D, et al. Maternal ambient air pollution exposure preconception and during early gestation and offspring congenital orofacial defects [J]. *Environ Res*, 2015, 140: 714-20.
- [161] WRIGHT C Y, KAPWATA T, WERNECKE B, et al. The risk of orofacial cleft lip/palate due to maternal ambient air pollution exposure: a call for further research in south Africa [J]. *Ann Glob Health*, 2023, 89(1): 6.
- [162] TANNER J P, SALEMI J L, STUART A L, et al. Associations between exposure to ambient benzene and PM_{2.5} during pregnancy and the risk of selected birth defects in offspring [J]. *Environ Res*, 2015, 142: 345-53.
- [163] LIU F H, DAI H X, GONG T T, et al. Maternal preconception and first trimester exposure to PM₁₀ and the risk of oral clefts in offspring: a population-based, case-control study [J]. *Occup Environ Med*, 2020, 77(10): 721-7.
- [164] MOTOKI N, INABA Y, SHIBAZAKI T, et al. Maternal exposure to housing renovation during pregnancy and risk of offspring with congenital malformation: the Japan Environment and Children's Study [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11564.
- [165] REQUIA W J, KILL E, PAPATHEODOROU S, et al. Prenatal exposure to wildfire-related air pollution and birth defects in Brazil [J]. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2022, 32(4): 596-603.
- [166] TAKEUCHI M, YOSHIDA S, KAWAKAMI C, et al. Association of maternal heavy metal exposure during pregnancy with isolated cleft lip and palate in offspring: Japan Environment and Children's Study (JECS) cohort study [J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0265648.
- [167] ACS N, BANHIDY F, PUHO E, et al. Maternal influenza during pregnancy and risk of congenital abnormalities in offspring [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2005, 73(12): 989-96.
- [168] JUGESSUR A, MURRAY J C. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(3): 270-8.
- [169] DIVYA D V, PRASAD M G S, RADHAKRISHNA A N, et al. The serological evidence of cytomegalovirus infection as a potent aetiological factor for cleft lip/palate, mental retardation and deafness [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(6): ZC51-ZC4.
- [170] WEICHERT A, VOGT M, DUDENHAUSEN J W, et al. Evidence in a human fetus of micrognathia and cleft lip as potential effects of early cytomegalovirus infection [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2010, 28(4): 225-8.
- [171] ACUNA-GONZALEZ G, MEDINA-SOLIS C E, MAUPOME G, et al. Family history and socioeconomic risk factors for non-syndromic cleft lip and palate: a matched case-control study in a less developed country [J]. *Biomedica*, 2011, 31(3): 381-91.
- [172] JONES J, LOPEZ A, WILSON M. Congenital toxoplasmosis [J]. *Am Fam Physician*, 2003, 67(10): 2131-8.
- [173] SHI M, CHRISTENSEN K, WEINBERG C R, et al. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(1): 76-90.
- [174] ZEIGER J S, BEATY T H, LIANG K Y. Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2005, 42(1): 58-63.
- [175] ZHOU R, WANG M, LI W, et al. Haplotype and haplotype-environment interaction analysis revealed roles of SPRY2 for NSCL/P among Chinese populations [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(4): 557.
- [176] CARLSON J C, SHAFFER J R, DELEYIANNIS F, et al. Genome-wide interaction study implicates VGLL2 and alcohol exposure and PRL and smoking in orofacial cleft risk [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 621261.
- [177] HAALAND O A, LIE R T, ROMANOWSKA J, et al. A genome-wide search for gene-environment effects in isolated cleft lip with or without cleft palate triads points to an interaction between maternal periconceptional vitamin use and variants in ESRG [J]. *Front Genet*, 2018, 9: 60.
- [178] JUGESSUR A, SHI M, GJESSING H K, et al. Maternal genes and facial clefts in offspring: a comprehensive search for genetic associations in two population-based cleft studies from Scandinavia [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11493.
- [179] ZHANG W, VENKATARAGHAVAN S, HETMANSKI J B, et al. Detecting gene-environment interaction for maternal exposures using case-parent Trios ascertained through a case with non-syndromic orofacial cleft [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 621018.
- [180] PADULA A M, YANG W, SCHULTZ K, et al. Gene-environment interactions between air pollution and biotransformation enzymes and risk of birth defects [J]. *Birth Defects Res*, 2021, 113(9): 676-86.
- [181] CHUNG M K, LAO T T, TING Y H, et al. Environmental factors in the first trimester and risk of oral-facial clefts in the offspring [J]. *Reprod Sci*, 2013, 20(7): 797-803.
- [182] LIE R T, WILCOX A J, TAYLOR J, et al. Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes [J]. *Epidemiology*, 2008, 19(4): 606-15.
- [183] SHI M, MOSTOWSKA A, JUGESSUR A, et al. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009, 85(1): 42-51.
- [184] LESLIE E J, MARAZITA M L. Genetics of cleft lip and cleft palate [J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2013, 163C(4): 246-58.
- [185] AUSTIN C P, CUTILLO C M, LAU L P L, et al. Future of rare diseases research 2017-2027: an IRDiRC perspective [J]. *Clin Transl Sci*, 2018, 11(1): 21-7.
- [186] MANOLIO T A, ABRAMOWICZ M, AL-MULLA F, et al. Global implementation of genomic medicine: we are not alone [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(290): 290ps13.