

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2023.08.009

• 综述 •

环境因素诱导的DNA甲基化修饰在唇腭裂发病中的作用研究进展

吕明敏, 唐璟, 宋庆高

遵义医科大学附属医院口腔医院, 贵州 遵义(563000)

【摘要】 先天性唇腭裂(cleft lip with /without palate, CL/P)作为常见的颌面部发育畸形,其病因目前认为主要是遗传因素和环境因素共同作用的结果。研究发现,环境因素诱发的表观遗传学变化可能是胎儿先天畸形发生的关键因素,而DNA甲基化作为重要的表观遗传修饰之一,在众多领域已有广泛而深入的研究,但其作为联系个体与环境的纽带,在唇腭裂中的研究报道有限。现有研究表明,DNA甲基化与唇腭裂的发生密切相关,叶酸缺乏、吸烟、污染物暴露等不良环境因素的刺激可诱导DNA甲基化状态发生改变,从而影响唇腭发育的基因表达,导致畸形的发生。

【关键词】 唇腭裂; 表观遗传修饰; DNA甲基化; 环境因素; 叶酸; 吸烟; 环境污染物; 2, 3, 7, 8-四氯二苯二噁英; 维A酸; 母体生理状态

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)08-0592-06

【引用著录格式】 吕明敏,唐璟,宋庆高.环境因素诱导的DNA甲基化修饰在唇腭裂发病中的作用研究进展[J].口腔疾病防治,2023,31(8):592-597. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.08.009.

Research progress on the role of environmentally induced DNA methylation in congenital cleft lip and/or palate LV Mingmin, TANG Jing, SONG Qinggao. Stomatological Hospital Affiliated to Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Corresponding author: SONG Qinggao, Email: 814641639@qq.com, Tel: 86-13984284497

【Abstract】 Congenital cleft lip and/or palate (CL/P) is a common malformation of maxillofacial development. At present, it is believed that the etiology of congenital cleft lip and palate mainly results from genetic factors and environmental factors. Epigenetic changes induced by environmental factors may be the key factor in the occurrence of fetal congenital malformations. As one of the important epigenetic modifications, DNA methylation has been widely and deeply studied in many fields, but as a link between the individual and the environment, its application in CL/P is limited. Existing studies have shown that DNA methylation is closely related to the occurrence of cleft lip and palate. Stimulation of folate deficiency, smoking, pollutant exposure and other environmental factors can induce changes in the state of DNA methylation, thus affecting gene expression in the development of lip and palate and leading to the occurrence of deformities.

【Key words】 congenital cleft lip and/or palate; epigenetic modification; DNA methylation; environmental factors; folate; smoke; environmental pollutants; 2, 3, 7, 8-tetrachlorodiphenyl dioxins; retinoic acid; maternal physiological state

J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(8): 592-597.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China(No. 81860191).

【收稿日期】 2022-07-15; **【修回日期】** 2022-12-29

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81860191)

【作者简介】 吕明敏, 硕士研究生, Email: 1102191553@qq.com

【通信作者】 宋庆高, 主任医师, 博士, Email: 814641639@qq.com, Tel: 86-13984284497



微信公众号

唇腭裂(cleft lip with /without palate, CL/P)是一种常见的因唇腭发育和融合障碍而导致的出生缺陷,临床上约有70%为非综合征型唇腭裂(non-syndromic cleft lip with/without palate, NSCL/P),其病因及发病机制尚不清楚,目前认为是多基因遗传因素和环境因素共同作用的结果^[1]。近年来,随着对表观遗传学研究的逐渐深入,发现表观遗传修饰在唇腭裂的发生中扮演着重要角色^[2]。表观遗传学是指在不改变DNA序列的基础上影响基因表达的遗传机制,其主要研究环境与基因的交互作用,揭示环境对生物遗传的影响。研究表明,DNA甲基化作为表观遗传修饰的主要机制之一,不仅能够引起染色体结构和DNA构象改变,还能影响DNA与蛋白质相互作用方式的改变,由此影响基因表达^[3]。目前,越来越多的研究报道,NSCL/P的发生与叶酸水平、吸烟、污染物暴露等环境因素密切相关。而环境因素可诱导DNA甲基化状态发生变化,不同环境下DNA甲基化的不同将引起基因表达产生差异,从而增加先天畸形的发生风险^[4]。DNA甲基化异常在NSCL/P的形成中发挥重要作用,唇腭裂相关遗传位点变异可通过DNA甲基化的基因调控途径增加NSCL/P的易感性^[5-6]。本文在现有研究的基础上对环境因素诱导DNA甲基化对唇腭裂发生的影响作一综述,旨在为研究NSCL/P的发病机制提供一定参考。

1 DNA甲基化概述

DNA甲基化是最具特征的表观遗传修饰之一,指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下将S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)提供的甲基转移到胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸中胞嘧啶的第5位碳原子上的过程^[7]。DNA甲基化通过建立、维持和去甲基化使甲基化谱处于精确的平衡状态。然而,其易受环境因素的影响,甲基化状态的改变影响基因的转录调节,进而改变基因的表达水平。通常情况下,DNA甲基化在CpG序列上发生,富集CpG序列的区域称为CpG岛,多数位于基因启动子区,与人类编码基因相关。因此,基因启动子区CpG岛的甲基化状态显得十分重要。CpG岛大多处于非甲基化状态,基因启动子区的异常甲基化可使转录抑制,从而导致基因沉默和疾病的发生,反之,当具有去甲基化功能的蛋白发生作用或DNMTs活性被抑制而浓度过低时,使得特定基因序列发生

去甲基化引起的DNA甲基化程度降低,导致基因表达水平上升,但其具体机制仍有争议^[3]。

在生物发育的关键时期,任何有害的刺激都可能会导致生物发育的结构不良或功能障碍。唇腭裂的形成主要在胚胎发育的前12周,因此在孕早期任何影响胚胎发育的不良环境因素都可能导致唇腭的发育异常。研究表明,胚胎发育过程中的环境刺激可以改变表观遗传调控水平,而DNA甲基化可调节与唇腭发育相关的重要基因,异常的DNA甲基化会导致先天性唇腭裂的发生^[8]。

2 环境因素诱导DNA甲基化对唇腭裂发生的影响

2.1 叶酸

叶酸作为B族维生素的一员,是胚胎生长发育不可缺少的营养元素,其可参与核苷酸的生物合成和DNA甲基化。若控制叶酸代谢的相关酶基因,如5-甲基四氢叶酸-高半胱氨酸甲基转移酶(5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase, MTR)、亚甲基四氢叶酸还原酶(methylene tetrahydrofolate reductase, MTHFR)等基因突变,其在同型半胱氨酸向蛋氨酸转化过程将会受阻,而蛋氨酸在腺苷转移酶作用下可转变成SAM, SAM是体内主要的甲基供体^[9]。因此,叶酸的缺乏可导致DNA甲基化异常,促使疾病的发生。

叶酸代谢MTHFR是DNA生物合成和DNA甲基化表观过程中必不可少的酶。研究显示,MTHFR C677T和A1298C多态性与NSCL/P的发生相关,尤其是母体携带MTHFR C677T与A1298C基因型的情况下,在孕早期摄入叶酸不足会影响DNA的合成及甲基化的改变,增加子代患CL/P的风险^[10]。而在孕早期补充叶酸可使唇腭裂畸形儿的出生减少1/3^[11]。近年研究发现,LINE-1和IRF6的异常甲基化可能促进NSCL/P的形成^[12],LINE-1甲基化水平与孕期叶酸摄入相关,其可能受到了MTHFR C677T与A1298C基因变异影响,增加了NSCL/P的罹患风险^[13]。此外,Khan等学者发现唇裂内侧组织的LINE-1甲基化水平明显高于外侧组织,他们认为MTHFR c.677C>T基因型在形成这种差异中可能起重要作用^[14-15]。

MTR在叶酸代谢过程中起着关键作用。MTR是一种蛋氨酸合酶,在对波兰人群的研究发现,MTR突变可能影响DNA甲基化,从而导致NSCL/P的发生^[16]。MTR基因rs10925239、rs10925254和

rs3768142的突变可使MTR酶活性降低,导致同型半胱氨酸水平升高,SAM水平下降,从而DNA异常甲基化,增加NSCL/P的发生风险^[17]。另有研究表明,同型半胱氨酸与胚胎发育畸形有着密切关系,叶酸的缺乏易使母体血液中依赖叶酸的同型半胱氨酸水平升高,从而影响DNA甲基化的水平,而在妊娠期补充叶酸可以降低淋巴液中已升高的半胱氨酸含量,从而减少胎儿NSCL/P的形成^[18]。有学者通过确定DNA甲基化变化是否与NSCL/P相关来检验叶酸的预防作用是通过表观遗传修饰来表现,结果发现NSCL/P病例表现出显著的表现基因组的低甲基化水平。其中与NSCL/P相关的最显著差异甲基化区域包括VTRNA2-1基因,该区域被认为是一个与母体营养状况敏感的亚稳态表观等位基因区域,与唇腭裂相关的甲基化改变通常在假定的亚稳态等位基因区域或在其附近更大^[19]。由上可见,叶酸是胎儿发育过程中的关键营养元素,可直接影响DNA甲基化水平增加唇腭裂的发生风险,其中叶酸代谢酶基因发挥着重要作用。

2.2 吸烟

香烟烟雾中含有大量的有毒物质,当毒性物质被母体吸入后,可透过胎盘屏障直接损害胎儿,或通过损伤子宫胎盘结构影响胎盘发育,从而导致胎儿先天畸形的发生。母体孕期吸烟是唇腭裂发生的已知病因,其可能通过影响DNA甲基化在唇腭发育中发挥作用^[20]。此外,作为有机物燃烧的产物,香烟烟雾含有芳香烃受体(aromatic hydrocarbon receptor, AHR)的致畸配体,称为多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)。已有多项研究表明,CL/P的高发可能与多环芳烃的高暴露水平相关^[21]。但多环芳烃是否可以通过AHR或表观遗传机制诱导CL/P仍有待实验确定。

目前大量研究认为,无论是母体孕期的主动或被动吸烟,都与NSCL/P的发生显著相关^[22]。Meta分析证明了妊娠期吸烟的母亲后代患唇腭裂是不吸烟母亲的1.3倍,同时发现有超过6 000个CpG在全基因组统计意义上与母亲吸烟有关,并且其中许多差异甲基化的CpG与唇腭裂的基因表达相关^[23]。研究发现,尽管IRF6基因突变单独就可增加NSCL/P的患病风险,但在母亲孕早期的吸烟作用下,IRF6基因对NSCL/P的发生产生更强的促进作用^[24],而IRF6基因的异常甲基化同样可促进NSCL/P的发生^[12],由此猜测,吸烟可能在其中发挥重要作用。此外,另有文献报道^[25],香烟烟雾成分

可能改变了整体DNA甲基化或DNMT和各种甲基CpG结合蛋白的表达,通过原代培养的颌面部1-BA细胞暴露于80μg/mL香烟烟雾提取物24 h后,发现DNA甲基化水平下降超过13%,并引发蛋白酶体介导的DNMT-1/3a、甲基CpG结合蛋白2和甲基CpG结合结构域蛋白3的降解,而用蛋白酶体抑制剂MG-132预处理1-BA细胞则可完全逆转这种降解。显然,母体孕期吸烟导致的胎儿唇腭裂存在DNA甲基化机制的作用。

2.3 环境污染物

随着工业的发展,环境中出现众多污染物,不仅对环境造成威胁,更是对人体产生损害,导致子代先天畸形发生率的上升。其中常见的重金属污染,如镉、铅、汞、砷等暴露与DNA甲基化水平密切相关,具有较强的致畸作用。其作为DNMT抑制剂主要通过DNA氧化损伤干扰DNMT与DNA的相互作用,进而影响DNA甲基化状态^[26]。此外,环境中的PAH、2,3,7,8-四氯二苯二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)等污染物也可导致DNA甲基化异常^[27-28]。

已有研究显示,母体子宫内暴露较高水平的重金属钼、砷、镉、铅和镍与CL/P的风险增加密切相关,而锌和硒的暴露可降低CL/P的发生风险^[29-30]。研究报道,Yang等^[31]评估了WNT3A基因甲基化在铅暴露与NSCL/P风险之间的潜在中介作用,发现脐带血铅浓度与WNT3A基因甲基化水平显著相关,WNT3A基因高甲基化可使患NSCL/P的风险增加1.90倍。同时,该研究观察到WNT3A基因甲基化与NSCL/P的性别相关,其在男性胎儿的中介效应的百分比增加到14.28%。他们认为WNT3A基因高甲基化可能是铅暴露与NSCL/P发病风险相关的部分原因。此外,另有研究表明,胎儿脐带血中FGFR2基因甲基化水平的升高与NSCL/P的发生风险增加存在关联,而镍浓度与成纤维生长因子受体2(fibroblast growth factor receptor2, FGFR2)甲基化水平也呈正相关^[32]。可见,环境金属污染可通过影响基因甲基化水平增加NSCL/P的发生风险。

环境污染物TCDD是毒性最强的环境污染物之一,其主要来源于汽车尾气、农药应用及垃圾焚烧等。二噁英可污染土壤,并通过呼吸道、消化道及皮肤等多种方式富集于机体,有较强的致癌致畸作用,可导致后代出现腭裂等发育缺陷。Wang等^[33]研究发现,在TCDD诱导的小鼠腭裂中,异常

的甲基化状态出现在小鼠胚胎 13.5 d,且 DNA 甲基化转移酶 3B (DNA methyltransferase 3 beta, DNMT3A)基因表现出过表达,这种表达增加可能与自身启动子区域 CpG2 甲基化水平降低有关。此外,Zhang 等^[34]也证明了 DNMT 和甲基 CpG 结合域蛋白甲基结合蛋白(methyl binding domain proteins, MBDS)的表达水平在 TCDD 诱导的小鼠腭裂中显著增加,而 DNMT 和 MBDS 被认为与 DNA 甲基化作用密切相关。由此进一步说明了 TCDD 导致的腭裂可能是通过表观遗传机制介导。另一项研究也在 TCDD 诱导的腭裂小鼠研究中发现,lncRNA H19 和 IGF2 的甲基化状态发生了改变,其异常表达抑制了胚胎腭突间充质细胞(embryo palatal mesenchymal cell, EPMC)的增殖延缓腭架的生长,从而导致腭裂的发生^[35]。此外,TCDD 的致畸性与 AHR 的结合相关。AHR 蛋白可通过 TCDD 介导的 AHR 途径调节 EPMC 的分化增殖,导致其 DNA 甲基化位点发生变化,从而影响腭部的发育融合,形成腭裂^[20]。综上,DNA 甲基化水平在环境污染物诱导的先天发育疾病中发挥重要作用。

2.4 维 A 酸

维 A 酸(retinoic acid, RA)是维生素 A 的衍生物,其作为化妆品添加剂以及治疗皮肤病、癌症等疾病药物,在日常生活中常见。而摄入过量的维 A 酸,已被证明是唇腭裂发生的重要环境因素之一^[36]。在啮齿动物发育过程中,使用全反式维 A 酸的外源性 RA 会产生高外显性的腭裂,这使其成为建立化学诱导的腭裂模型的理想方法。在全反式维 A 酸(atRA)诱导的小鼠腭裂全基因组甲基化研究中发现,组蛋白去乙酰化酶 4(histone deacetylase 4, HDAC4)和果蝇抗同源序列蛋白 3(mothers-againstdecapentaplegichomolog-3, SMAD3)的增强子甲基化增加,中线蛋白 1(Midline-1, MID1)的启动子甲基化增加,两者都与各自基因表达的降低有关,从而在腭突发育融合过程中发挥作用^[37]。此外,在 atRA 处理的 EPMC 中,lncRNA Meg3 启动子中特定的 CpG 位点去甲基化,使得 lncRNA Meg3 表达上调,通过负调控 Smad2 蛋白信号的表达,从而抑制 EPMC 的分化增殖影响腭突的生长^[38]。表明在 atRA 的暴露下,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路的信息传导减少。此外,Shu 等^[39]认为维 A 酸导致的腭裂形成可能是重组人成纤维细胞生长因子 16(fibroblast growth factor 16, FGF16)和 T-box 转录因子 22(T-

box transcription factor 22, TBX22)基因的高甲基化与基因表达降低有关,通过抑制 EPMC 的分化增殖导致腭部的融合失败。有研究证实,在 atRA 诱导的腭裂小鼠胚胎中,TBX22 外显子 5 在胚胎 13.5 d 和 14.5 d 的腭部发育融合关键时期的位点发生高甲基化,而 TBX22 外显子 5 表达水平的改变与其甲基化水平呈负相关。结果表明 TBX22 外显子 5 甲基化的改变可能在腭突融合过程中起着重要的调节作用,并可能为今后开发新的表观遗传生物标志物用于腭裂的治疗提供启示^[40]。

2.5 母体生理状态

影响唇腭裂畸形发生的环境因素还有很多,如母体孕期的病毒感染、药物因素、内分泌、物理因素等。研究报道,母亲孕早期过高或过低的雌激素水平会导致子代颅面骨的发育畸形^[41]。此外,孕前或孕期患有糖尿病或受细菌、病毒感染,也会增加子代唇腭裂的罹患风险^[42]。通过生物信息分析发现,雌激素信号通路、I 型糖尿病信号通路以及吞噬小体、单纯疱疹感染信号通路的基因异常甲基化与 NSCL/P 的发生密切相关,而其潜在机制还需进一步实验探究。由上可知,母体不良的生理状态也可能通过 DNA 甲基化途径介导唇腭裂的发生。

3 总结与展望

近年来,环境与基因的交互作用在先天畸形领域的研究已成为热点趋势。其中,表观遗传学的兴起为基因与环境改变之间建立了紧密的联系。过低的叶酸水平、吸烟、污染物暴露等不良环境因素与 DNA 甲基化及唇腭裂的发生密切相关。DNA 甲基化是联系个体与环境的纽带,母体所处的早期环境可影响基因的甲基化修饰,进而调控胎儿唇腭发育的相关基因表达,最终影响唇腭裂的发生发展。然而,DNA 甲基化作为表观遗传学的重要调节机制,目前在 NSCL/P 中的研究仍然较少,其可作为唇腭裂病因学研究的又一切入口,深入了解 DNA 甲基化在唇腭裂中的作用有助于更好地认识唇腭裂疾病的发生机制,为唇腭裂的早期预防和治疗提供新思路。

【Author contributions】 Lv MM wrote the article. Tang J and Song QG revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, et al. Cleft lip and palate: un-

- derstanding genetic and environmental influences[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(3): 167-178. doi: 10.1038/nrg2933.
- [2] Garland MA, Sun B, Zhang S, et al. Role of epigenetics and miRNAs in orofacial clefts[J]. *Birth Defects Res*, 2020, 112(19): 1635-1659. doi: 10.1002/bdr2.1802.
 - [3] Nasrullah, Hussain A, Ahmed S, et al. DNA methylation across the tree of life, from micro to macro-organism[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1666-1685. doi: 10.1080/21655979.2021.2014387.
 - [4] Law PP, Holland ML. DNA methylation at the crossroads of gene and environment interactions[J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6): 717-726. doi: 10.1042/EBC20190031.
 - [5] Shi X, Wang Q, Sun C, et al. Study on the role of methylation in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate using a monozygotic twin model[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2021, 143: 110659. doi: 10.1016/j.ijporl.2021.110659.
 - [6] Howe LJ, Richardson TG, Arathimos R, et al. Evidence for DNA methylation mediating genetic liability to non-syndromic cleft lip/palate[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(2): 133-145. doi: 10.2217/epi-2018-0091.
 - [7] Masevičius V, Nainytė M, Klimašauskas S. Synthesis of S-adenosyl-L-methionine analogs with extended transferable groups for methyltransferase-directed labeling of DNA and RNA[J]. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2016, 64: 1.36.1-1.36.13. doi: 10.1002/0471142700.nc0136s64.
 - [8] Sharp GC, Stergiakouli E, Sandy J, et al. Epigenetics and orofacial clefts: a brief introduction[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2018, 55(6): 795-797. doi: 10.1597/16-124.
 - [9] Liu HY, Liu SM, Zhang YZ. Maternal folic acid supplementation mediates offspring health via DNA methylation[J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(4): 963-976. doi: 10.1007/s43032-020-00161-2.
 - [10] Rai V. Strong association of C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene with nonsyndromic cleft lip/palate (nsCL/P)[J]. *Ind J Clin Biochem*, 2018, 33(1): 5-15. doi: 10.1007/s12291-017-0673-2.
 - [11] Rao LK, Francis AM, Wilcox U, et al. Pre-operative vitamin B infusion and prevention of nitrous oxide-induced homocysteine increase[J]. *Anaesthesia*, 2010, 65(7): 710-715. doi: 10.1111/j.1365-2044.2010.06375.x.
 - [12] Li Y, Deng Y, Deng C, et al. Association of long interspersed nucleotide element-1 and interferon regulatory factor 6 methylation changes with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(1): 215-222. doi: 10.1111/odi.12965.
 - [13] Cáceres-Rojas G, Salamanca C, Krause BJ, et al. Nonsyndromic orofacial clefts in Chile: line-1 methylation and MTHFR variants [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(20): 1783-1791. doi: 10.2217/epi-2020-0021.
 - [14] Khan MFJ, Little J, Mossey PA, et al. Evaluating LINE-1 methylation in cleft lip tissues and its association with early pregnancy exposures[J]. *Epigenomics*, 2018, 10(1): 105-113. doi: 10.2217/epi-2017-0081.
 - [15] Khan MFJ, Little J, Aleotti V, et al. LINE-1 methylation in cleft lip tissues: influence of infant MTHFR c.677C>T genotype[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(6): 1668-1671. doi: 10.1111/odi.13136.
 - [16] Dong Y, Xu S, Liu J, et al. Non-coding RNA-linked epigenetic regulation in cardiac hypertrophy[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(9): 1133-1141. doi: 10.7150/ijbs.26215.
 - [17] Salamanca C, González-Hormazábal P, Recabarren AS, et al. Genetic variants in S-adenosyl-methionine synthesis pathway and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile[J]. *Pediatr Res*, 2021, 89(4): 1020-1025. doi: 10.1038/s41390-020-0994-3.
 - [18] Tabrizi R, Lankarani KB, Akbari M, et al. The effects of folate supplementation on lipid profiles among patients with metabolic diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*, 2018, 12(3): 423-430. doi: 10.1016/j.dsx.2017.12.022.
 - [19] Gonseth S, Shaw GM, Roy R, et al. Epigenomic profiling of newborns with isolated orofacial clefts reveals widespread DNA methylation changes and implicates metastable epiallele regions in disease risk[J]. *Epigenetics*, 2019, 14(2): 198-213. doi: 10.1080/15592294.2019.1581591.
 - [20] LinnenkampBDW, Raskin S, EspositoSE, et al. A comprehensive analysis of AHR gene as a candidate for cleft lip with or without cleft palate[J]. *Mutat Res Mutat Res*, 2020, 785: 108319. doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108319.
 - [21] Ni W, Yang W, Jin L, et al. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord and risk of orofacial clefts[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 678: 123-132. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.404.
 - [22] Yang L, Wang H, Yang L, et al. Maternal cigarette smoking before or during pregnancy increases the risk of birth congenital anomalies: a population-based retrospective cohort study of 12 million mother-infant pairs[J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 4. doi: 10.1186/s12916-021-02196-x.
 - [23] Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, et al. DNA methylation in newborns and maternal smoking in pregnancy: genome-wide consortium meta-analysis[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(4): 680-696. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.02.019.
 - [24] Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate[J]. *Hum Genet*, 2010, 128(4): 401-410. doi: 10.1007/s00439-010-0863-y.
 - [25] Mukhopadhyay P, Greene RM, Pisano MM. Cigarette smoke induces proteasomal-mediated degradation of DNA methyltransferases and methyl CpG-/CpG domain-binding proteins in embryonic orofacial cells[J]. *Reprod Toxicol*, 2015, 58: 140-148. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.10.009.
 - [26] Freydenzon A, Nabais MF, Lin T, et al. Association between DNA methylation variability and self-reported exposure to heavy metals [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 10582. doi: 10.1038/s41598-022-13892-w.
 - [27] Rytel MR, Butler R, Eliot M, et al. DNA methylation in the adipose tissue and whole blood of agent orange-exposed operation ranch hand veterans: a pilot study[J]. *Environ Health*, 2021, 20(1):

43. doi: 10.1186/s12940-021-00717-y.
- [28] Das DN, Ravi N. Influences of polycyclic aromatic hydrocarbon on the epigenome toxicity and its applicability in human health risk assessment[J]. *Environ Res*, 2022, 213: 113677. doi: 10.1016/j.envres.2022.113677.
- [29] Ni W, Yang W, Yu J, et al. Association between selected essential trace element concentrations in umbilical cord and risk for cleft lip with or without cleft palate: a case-control study[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 661: 196 - 202. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.171.
- [30] Ni W, Yang W, Yu J, et al. Umbilical cord concentrations of selected heavy metals and risk for orofacial clefts[J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(18): 10787 - 10795. doi: 10.1021/acs.est.8b02404.
- [31] Yang W, Guo Y, Ni W, et al. Hypermethylation of WNT3A gene and non-syndromic cleft lip and/or palate in association with in utero exposure to lead: a mediation analysis[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: 111415. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111415.
- [32] 潘亚权, 倪文丽, 杨文蕾, 等. FGFR2 基因异常甲基化在镍暴露与非综合征唇腭裂关联中的作用[J]. *中国生育健康杂志*, 2021, 32(5): 442 - 446. doi: 10.3969/j.issn.1671 - 878X.2021.05.009.
- Pan YQ, Ni WL, Yang WL, et al. The role of abnormal methylation of FGFR2 in the association between nickel exposure and non-syndromic cleft lip and/or palate[J]. *Chin J Reproductive Health*, 2021, 32(5): 442 - 446. doi: 10.3969/j.issn.1671 - 878X.2021.05.009.
- [33] Wang C, Yuan XG, Liu CP, et al. Preliminary research on DNA methylation changes during murine palatogenesis induced by TCDD[J]. *J Cranio Maxillofac Surg*, 2017, 45(5): 678 - 684. doi: 10.1016/j.jcms.2017.02.004.
- [34] Zhang W, Zhou S, Gao Y, et al. Alterations in DNA methyltransferases and methyl-CpG binding domain proteins during cleft palate formation as induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5396 - 5401. doi: 10.3892/mmr.2018.8521.
- [35] Gao LY, Zhang FQ, Zhao WH, et al. LncRNA H19 and target gene-mediated cleft palate induced by TCDD[J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(9): 676-680. doi: 10.3967/bes2017.090.
- [36] Krutzen CLJM, Roa LA, Bloemen M, et al. Excess vitamin A might contribute to submucous clefting by inhibiting WNT-mediated bone formation[J]. *Orthod Craniofac Res*, 2022. doi: 10.1111/ocr.12594.
- [37] Shu X, Shu S, Zhai Y, et al. Genome-wide DNA methylation profile of gene cis-acting element methylations in all-trans retinoic acid-induced mouse cleft palate[J]. *DNA Cell Biol*, 2018. doi: 10.1089/dna.2018.4369.
- [38] Liu X, Zhang Y, Shen L, et al. LncRNA Meg3-mediated regulation of the Smad pathway in atRA-induced cleft palate[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 341: 51-58. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.01.017.
- [39] Shu X, Dong Z, Cheng L, et al. DNA hypermethylation of Fgf16 and Tbx22 associated with cleft palate during palatal fusion[J]. *J Appl Oral Sci*, 2019, 27: e20180649. doi: 10.1590/1678 - 7757 - 2018-0649.
- [40] Li KE, Shu X, Gong H, et al. Position-dependent correlation between TBX22 exon 5 methylation and palatal shelf fusion in the development of cleft palate[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2019, 91(2): e20180945. doi: 10.1590/0001-3765201920180945.
- [41] Morthorst JE, Korsgaard B, Bjerregaard P. Severe malformations of eelpout (*Zoarces viviparus*) fry are induced by maternal estrogenic exposure during early embryogenesis[J]. *Mar Environ Res*, 2016, 113: 80-87. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.11.007.
- [42] Trindade-Suedam IK, Kostrisch LM, Pimenta LA, et al. Diabetes mellitus and drug abuse during pregnancy and the risk for orofacial clefts and related abnormalities[J]. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2016, 24: e2701. doi: 10.1590/1518-8345.0815.2701.

(编辑 周春华)



官网