

论著·临床研究

NKX2.5 基因和 TBX5 基因在先天性心脏病试管婴儿中的突变检测

杨景晖^{1,2} 许小艳^{1,2} 米弘璞^{1,2} 姜艳^{1,2} 麻新梅^{1,2} 李利^{1,2}

(1. 云南省第一人民医院儿科, 云南 昆明 650032; 2. 昆明理工大学附属昆华医院儿科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨患先天性心脏病的试管婴儿与自然受孕儿间是否存在 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变差异。**方法** 应用聚合酶链反应结合 DNA 测序技术, 对 68 例试管婴儿先天性心脏病患儿和 98 例自然受孕先天性心脏病患儿的 NKX2.5 基因编码区 1、2 和 TBX5 基因编码区 4、5、8 进行突变检测。**结果** 在患先天性心脏病的试管婴儿与自然受孕儿中, 均发现 NKX2.5 基因编码区 1 中第 63 位碱基发生突变 (c.63A>G), 该位点基因型及等位基因频率的分布在两组间差异无统计学意义。NKX2.5 基因编码区 2 和 TBX5 基因编码区 4、5、8 未检测到突变。**结论** 先天性心脏病的试管婴儿与自然受孕儿间 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变无差异, 推测辅助生殖技术并未引起 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 652-657]

[关键词] 先天性心脏病; NKX2.5 基因; TBX5 基因; 基因突变; 辅助生殖技术; 婴儿

NKX2.5 and TBX5 gene mutations in *in vitro* fertilization children with congenital heart disease

YANG Jing-Hui, XU Xiao-Yan, MI Hong-Ying, JIANG Yan, MA Xin-Mei, LI Li. Department of Pediatrics, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China (Li L, Email: erklili@sina.com)

Abstract: Objective To explore the differences of NKX2.5 and TBX5 gene mutations between *in vitro* fertilization (IVF) children with congenital heart disease (CHD) and naturally conceived children with CHD. **Methods** Blood samples from 68 IVF children with CHD and 98 naturally conceived children with CHD were collected. The mutations in coding regions 1 and 2 of the NKX2.5 gene, and coding regions 4, 5, and 8 of the TBX5 gene were examined by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. **Results** An A-to-G mutation at nucleotide 63 (c.63A>G) in coding region 1 of the NKX2.5 gene was found in both IVF and naturally conceived children with CHD. There were no significant differences in genotype and allele frequencies at c.63A>G locus of the NKX2.5 gene between the two groups. No mutations were detected in coding region 2 of the NKX2.5 gene and coding regions 4, 5 and 8 of the TBX5 gene. **Conclusions** There is no difference in NKX2.5 and TBX5 gene mutations between IVF and naturally conceived children with CHD. Therefore, it is presumed that assisted reproductive technology may not lead to mutations in the NKX2.5 and TBX5 genes. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(6): 652-657]

Key words: Congenital heart disease; NKX2.5 gene; TBX5 gene; Gene mutation; Assisted reproductive technology; Child

先天性心脏病是胎儿期心脏及大血管发育异常而导致的先天畸形, 是小儿最常见的心脏病^[1]。本课题组前期对 2010 年 10 月至 2012 年 10 月在我院行体外受精-胚胎移植术成功并分娩、生后入住我科 NICU 的试管婴儿先天性心脏病发病情况

进行调查, 结果显示 150 例试管婴儿中患先天性心脏病者 33 例 (22%)^[2], 而自然受孕的活产婴儿中先天性心脏病的发病率仅为 6%~10%^[1,3]。心脏的发育是一个复杂的过程, 涉及多种基因在不同时间和空间上的顺次精确表达, 并受多种转录

[收稿日期] 2017-02-06; [接受日期] 2017-03-28
[基金项目] 云南省自然科学基金 (2010ZC213)。
[作者简介] 杨景晖, 女, 博士, 主治医师。
[通信作者] 李利, 女, 主任医师。

因子的调控。心脏特异性同源盒基因 NKX2.5 是心脏发育过程中重要的转录因子，是所有脊椎动物心脏发生中最早表达的转录因子之一^[4]，研究发现，该基因突变导致基因产物的转录活性下降，并影响其他心脏发育相关因子发挥作用，从而影响心脏发育，导致先天性心脏病^[5-6]。转录因子 T-同源盒基因 5 (T-box 5, TBX5) 已被确认为心手综合征 (Holt-Oram syndrome, HOS) 的致病基因^[7]，2004 年首次在非 HOS 的散发性先天性心脏病患者中检测到 TBX5 基因的突变^[8]。本研究对确诊为先天性心脏病的试管婴儿和自然受孕儿进行 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变筛查，旨在探讨试管婴儿和自然受孕儿间是否存在 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变差异，现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2010 年 10 月至 2013 年 11 月在云南省第一人民医院经临床体检和心脏彩超检查诊断为先天性心脏病的试管婴儿 68 例和自然受孕儿 98 例为研究对象，均为汉族。68 例试管婴儿组中，男 36 例，女 32 例；中位年龄 1 岁 2 个月 (范围：3 d 至 3 岁 2 个月)。98 例自然受孕组中，男 52 例，女 46 例；中位年龄 1 岁 11 个月 (范围：7 d 至 5 岁)。两组间年龄、性别的比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

两组患儿均为散发性单纯性先天性心脏病病例，其中室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 74 例，房间隔缺损 (atrial septal defect, ASD) 59 例，动脉导管未闭 (patent ductus arteriosus, PDA) 27 例，肺动脉狭窄 (pulmonary stenosis, PS) 4 例，主动脉狭窄 (aortic stenosis, AS) 2 例，见表 1。

表 1 试管婴儿组和自然受孕组先天性心脏病类型

[n (%)]

组别	例数	VSD	ASD	PDA	PS	AS
自然受孕儿组	98	48(49)	32(33)	15(15)	1(1)	2(2)
试管婴儿组	68	26(38)	27(40)	12(18)	3(4)	0(0)

注：[VSD] 室间隔缺损；[ASD] 房间隔缺损；[PDA] 动脉导管未闭；[PS] 肺动脉狭窄；[AS] 主动脉狭窄。

另选取非先天性心脏病儿童 39 例作参照研究，均为汉族。其中试管婴儿 18 例，男 9 例，女 9 例；中位年龄 1 岁 (范围：6 d 至 2 岁 2 个月)；自然受孕儿 21 例，男 11 例，女 10 例；中位年龄 1 岁 4 个月 (范围：8 d 至 3 岁)。两组间年龄、性别的比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

本研究经云南省第一人民医院伦理委员会批准，并征得患儿监护人的知情同意。

1.2 基因突变检测

抽取外周血 2 mL，以 EDTA 溶液抗凝，采用常规酚-氯仿法提取 DNA。参考文献^[9-10]或根据基因序列设计引物，引物序列见表 2~3，由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 2 NKX2.5 基因编码区 1 和 2 引物序列

编码区	上游引物	引物位置	片段长度 (bp)
1F	CTTGTGCTCAGCGCTACCTGCT	77	549
1R	CTGAGTTTCTTGGGGACGAAAGC	604	
2F	CCACGAGGATCCCTTACCATTAC	2012	859
2R	GGTCTCCGCAGGAGTGAATG	2871	

表 3 TBX5 基因编码区 4、5、8 引物序列

编码区	上游引物	引物位置	片段长度 (bp)
4F	GAACGGGGCTAGTTTCCGCTTC	8684	307
4R	CTTTTTGGGAGAAGGTTCCACTTTTC	8966	
5F	GATACCTAAGGGAGACGGGAGAGC	9574	335
5R	GAGGGAGACAAGCGGGGAATC	9888	
8F	CTTTTCTGGTGGATTCTCTCAC	41958	512
8R	GTAGGAACATGTCAAGGGAAC	42450	

PCR 扩增：反应体系 50 μ L，基因组 DNA 0.25 ng，上下游引物各 1 μ L，10 \times Taq Buffer 5 μ L，dNTP 3 μ L，Taq DNA Polymerase 2.5 u。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外灯下鉴定产物并照相保存。

NKX2.5 基因编码区 1 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，55 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s，35 个循环，72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min；编码区 2 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，50 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s，35 个循环，72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。

TBX5 基因编码区 4 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 5 min; 编码区 5 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 25 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 5 min; 编码区 8 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 35 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 5 min。

DNA 测序: PCR 产物用 DNA 胶回收试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit) 纯化后, 送华大基因公司测序。测序结果与 GenBank 中人 NKX2.5 基因 (ID: 1482) 和人 TBX5 基因 (ID: 6910) 的标准序列比对。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计数资料以百分率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Hardy-Weinberg 平衡检验基因型频率的代表性。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NKX2.5 基因检测结果

PCR 结果: PCR 扩增产物经琼脂糖电泳验证,

以 DNA Marker 作为对照, PCR 反应产物的长度与设计各片段大小与预期值符合 (图 1)。

DNA 测序结果: 患先天性心脏病的试管婴儿组和自然受孕儿组中, 在 NKX2.5 基因编码区 1 均发现第 63 位碱基发生突变 (c.63A>G), 有 3 种类型, 分别为 A/G、G/G、A/A (图 2)。编码区 2 中, 两组均未发现突变。

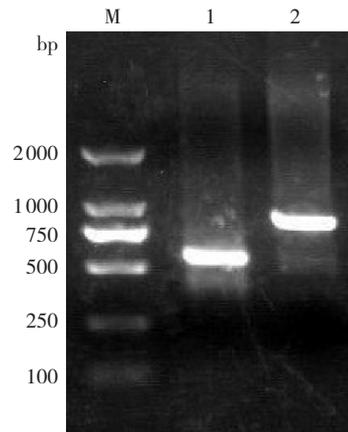


图 1 NKX2.5 编码区 1 和 2 的 PCR 产物电泳图
M: 2000 bp DNA ladder Marker; 1: NKX2.5 编码区 1, 549 bp;
2: NKX2.5 编码区 2, 859 bp。

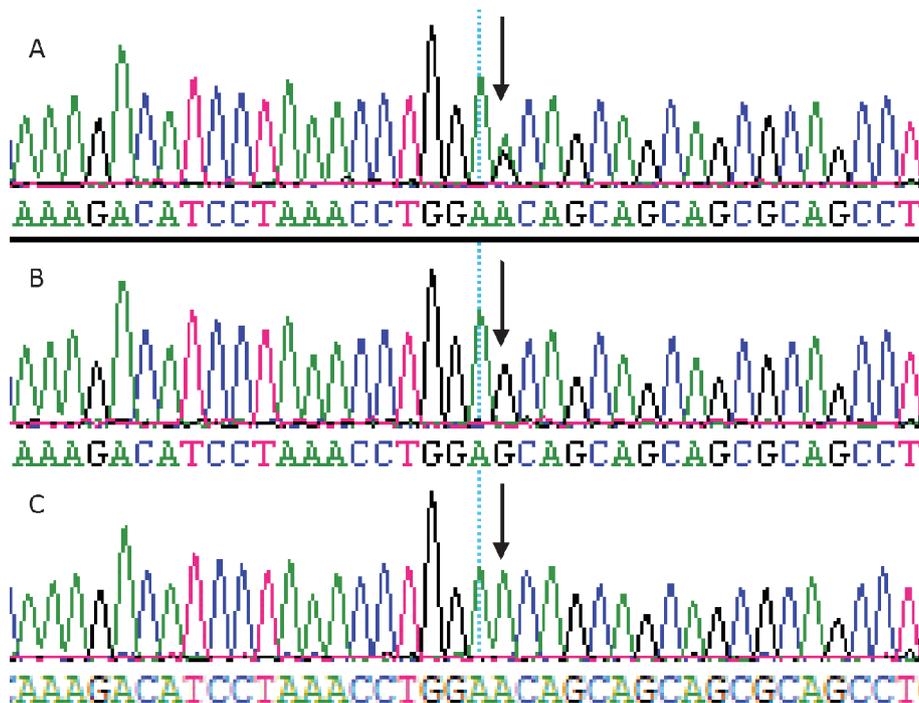


图 2 NKX2.5 基因突变测序结果 在 NKX2.5 基因编码区 1 发现第 63 位碱基发生突变 (c.63A>G)。A: A/G 杂合子; B: G/G 纯合子; C: A/A 纯合子。箭头所指为突变位点。

NKX2.5 基因编码区 1 多态性位点在自然受孕儿组和试管婴儿组的等位基因与基因型频率：在 NKX2.5 基因编码区 1 中，c.63A>G 位点的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 定律 ($P>0.05$)。表 4

显示试管婴儿组和自然受孕儿组 c.63A>G 位点的基因型及等位基因频率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 两组先天性心脏病患儿 c.63A>G 位点的基因型分布及等位基因频率 [n (%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
自然受孕儿组	98	62(63)	28(29)	8(8)	152(78)	44(22)
试管婴儿组	68	41(60)	21(31)	6(9)	103(76)	33(24)
OR(95%CI)		0.882(0.467~1.666)	1.117(0.568~2.196)	1.089(0.360~3.293)	0.904(0.539~1.514)	1.107(0.661~1.854)
χ^2 值		0.150	0.103	0.023	0.149	0.149
P 值		0.698	0.748	0.880	0.700	0.700

本研究同时选取经心脏彩超检查排外先天性心脏病的自然受孕儿 21 例和试管婴儿 18 例作参照研究。NKX2.5 基因编码区 1 c.63A>G 位点的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 定律 ($P>0.05$)。

两组婴儿在 c.63A>G 位点仅发现杂合突变，均未发现纯合突变，其基因型及等位基因频率两组比较差异无统计学意义，见表 5。

表 5 非先天性心脏病儿童 c.63A>G 位点的基因型分布及等位基因频率 [n (%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
自然受孕儿组	21	20 (95)	1 (5)	0 (0)	41 (98)	1 (2)
试管婴儿组	18	16 (89)	2 (11)	0 (0)	34 (94)	2 (6)
OR(95%CI)		0.400(0.033~4.819)	2.500(0.208~30.118)	-	0.415(0.036~4.772)	2.412(0.210~27.757)
χ^2 值		0.550	0.550	-	0.528	0.528
P 值		0.458	0.458	-	0.467	0.467

2.2 TBX5 基因检测结果

PCR 结果：以 DNA Marker 作为对照，PCR 反应产物的长度与所设计的各片段大小与预期值符合 (图 3)。

DNA 测序结果：在先天性心脏病自然受孕儿组和试管婴儿组中，均未发现 TBX5 基因编码区 4、5、8 突变。

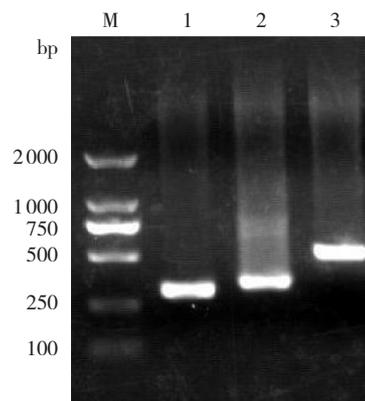


图 3 TBX5 编码区 4、5、8 的 PCR 产物电泳图

M: 2000 bp DNA ladder Marker; 1: TBX5 编码区 4, 307 bp; 2: TBX5 编码区 5, 335 bp; 3: TBX5 编码区 8, 512 bp。

3 讨论

美国 Dott 等^[11]研究发现试管婴儿存在先天缺陷的可能性是普通婴儿的 2~4 倍,其中先天性心脏缺陷较多见,其发生率是自然受孕儿的 2~3 倍。Koivurova 等^[12]通过随机选择多重配对研究,证实了上述观点。但需进一步多中心、大样本的研究方能更准确地反映试管婴儿先天性心脏缺陷的发病情况。

先天性心脏病是一种多基因遗传病,主要是由于胚胎期遗传因素和环境因素共同作用导致心脏血管异常发育引起,遗传度为 55%~65%^[13]。基因的表达受转录因子调控,心脏发育过程中有大量转录因子参与,转录因子突变是多种先天性心脏病遗传学方面的主要病因,经动物模型和人类研究证实,NKX2.5、TBX5、GATA4、PTPN11、TFAP2B、EVC/EVC2、ZIC3 基因与先天性心脏病有关^[14-16],目前认为 NKX2.5、TBX5、GATA4 基因影响心脏发育最为重要。

人类心脏的发育要经历一系列复杂的过程。NKX2.5 基因是心脏前体细胞最早的标志物,参与心脏发育的各个过程,在心肌分化前即开始表达,正常表达对心房及心室发育、动脉干分隔、房室瓣形成及房室传导的维持均起重要作用,且对成熟心脏发挥正常功能亦必不可少。人类 NKX2.5 基因定位于 5q35.1,包含 2 个外显子,编码 324 个氨基酸。1998 年 Schott 等^[4]首次在 4 个单纯性先天性心脏病家系中检出 NKX2.5 同源盒结构域的 3 种点突变,证实其与先天性心脏病相关。这些先天性心脏病包括 ASD、VSD、法洛四联症、右室双出口、三尖瓣畸形等,在已经找到的约 40 种突变中,包括 6 种缺失突变、2 种插入突变,其余为转换与颠换(包含 7 种无义突变)^[17-20]。本研究检测了自然受孕儿组和试管婴儿组共 166 例先天性心脏病患者的 NKX2.5 基因,结果显示第 63 位碱基腺嘌呤(A)突变为鸟嘌呤(G),其所编码的 21 位氨基酸密码子分别为 GAA 和 GAG,均编码谷氨酸,属于同义突变,并没有改变蛋白质的构成,是一个单核苷酸多态性位点。国内研究亦报道,在先天性心脏病患者中检测到 c.63A>G 这一多态位点^[21-24]。韩增强等^[25]对 81 例单纯性先天性心脏病患者的 NKX 2.5 基因进行突变检测,亦发现

c.63A>G,并提出这一位点与 ASD 之间可能存在相关性。石琳等^[26]研究发现,VSD 和法洛四联症 NKX2.5 基因第一外显子的 c.63A>G 的 G 基因型频率和等位基因频率显著高于健康对照组,这一多态性与中国先天性心脏病有明显的相关性,具有 G 等位基因的人发生 VSD 和法洛四联症的危险性相对增高。NKX2.5 基因 c.63A>G 多态性位点主要见于国内研究报道,可能是中国先天性心脏病的潜在分子机制之一。本研究未发现 c.63A>G 基因型频率和等位基因频率在试管婴儿组和自然受孕组中的分布有显著性差异,推测可能是该位点主要与先天性心脏病患病有关。本研究还选取经心脏彩超检查排外先天性心脏病的 39 例自然受孕儿和试管婴儿作参照研究,结果显示在 c.63A>G 位点仅发现杂合突变,未发现纯合突变。因此,本研究提示辅助生殖技术可能未引起 NKX2.5 基因突变。

人类 TBX5 基因定位于 12q24.1, cDNA 全长 2133 bp, 8 个外显子,编码 518 个氨基酸。TBX5 被确认为 HOS 的致病基因,HOS 属常染色体显性遗传病,病人表现为以 ASD 为主的心脏异常和上肢不同部位、不同程度的畸形,也可出现 VSD、二尖瓣脱垂、肺动脉狭窄(包括外周动脉)等畸形^[27]。Reamon-Buettner 等^[8]首次在 ASD、房室间隔缺损患者中检测到了 TBX5 基因的突变。本研究在自然受孕儿组和试管婴儿组共 166 例先天性心脏病患儿中,均未检测到 TBX5 基因突变,与王佼等^[28]的研究结果一致。当然,此研究结果可能与样本量较少有关,这也是本研究的局限,今后将继续收集样本进行后续检测。

2013 年, Tararbit 等^[29]报道,除法洛四联症外,试管婴儿与自然受孕儿的其他类型先天性心脏病发生率无差异。Bahtiyar 等^[30]研究指出,试管婴儿先天性心脏病患病率增高可能主要与双胎试管婴儿有关。这提示,将双胎纳入影响因素进行下一步研究,也许会有新的发现。本研究检测了患先天性心脏病的 68 例试管婴儿和 98 例自然受孕儿,均检测到 NKX2.5 基因 c.63A>G 多态性位点,但两组间该位点基因型及等位基因分布无明显差异;另外,均未检测到 TBX5 基因突变,提示辅助生殖技术可能未引起 NKX2.5 基因和 TBX5 基因突变。表观遗传调控(DNA 甲基化、翻译后组蛋白

修饰和非编码 RNA 调控等) 在心肌的分化和发育中的作用日益受到关注^[15], NKX2.5 基因和 TBX5 基因的表观遗传学改变与先天性心脏病的关系值得进一步探究。

[参 考 文 献]

- [1] 桂永浩. 先天性心脏病概述 [M]// 王卫平. 儿科学. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 292-293.
- [2] 许小艳, 杨景晖, 麻新梅, 等. 试管婴儿新生儿期并发症及出生缺陷分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(4): 350-355.
- [3] 宁寿葆. 先天性心血管畸形 [M]// 江载芳, 申昆玲, 沈颖. 诸福棠实用儿科学 (下册). 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1535.
- [4] Schott JJ, Benson DW, Basson CT, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5[J]. Science, 1998, 281(5373): 108-111.
- [5] McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, et al. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(9): 1650-1655.
- [6] Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spanel-Borowski K, et al. Novel NKX2-5 mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations[J]. Am J Pathol, 2004, 164(6): 2117-2125.
- [7] Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-Box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease[J]. Cell, 2001, 106(6): 709-721.
- [8] Reamon-Buettner SM, Borlak J. TBX5 mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts[J]. Hum Mutat, 2004, 24(1): 104.
- [9] Zhang WM, Li XF, Ma ZY, et al. GATA4 and NKX2.5 gene analysis in Chinese Uygur patients with congenital heart disease[J]. Chin Med J, 2009, 122(4): 416-419.
- [10] Pabst S, Wollnik B, Rohmann E, et al. A novel stop mutation truncating critical regions of the cardiac transcription factor NKX2-5 in a large family with autosomal-dominant inherited congenital heart disease[J]. Clin Res Cardiol, 2008, 97(1): 39-42.
- [11] Dott M, Rasmussen SA, Hogue CJ, et al. Association between pregnancy intention and reproductive-health related behaviors before and after pregnancy recognition, National Birth Defects Prevention Study, 1997-2002[J]. Matern Child Health J, 2010, 14(3): 373-381.
- [12] Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, et al. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in-vitro fertilization[J]. Hum Reprod, 2002, 17(5): 1391-1398.
- [13] Hoffman JJ, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [14] He A, Kong SW, Ma Q, et al. Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart[J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108(14): 5632-5637.
- [15] Clark CD, Zhang B, Lee B, et al. Evolutionary conservation of Nkx2.5 autoregulation in the second heart field[J]. Dev Biol, 2013, 374(1): 198-209.
- [16] Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(2): 212-222.
- [17] Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, et al. NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease[J]. Int J Cardiol, 2009, 138(3): 261-265.
- [18] Stallmeyer B, Fenge H, Nowak-Göttl U, et al. Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease[J]. Clin Genet, 2010, 78(6): 533-540.
- [19] Reamon-Buettner SM, Borlak J. NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD)[J]. Hum Mutat, 2010, 31(11): 1185-1194.
- [20] Hatemi AC, Güleç C, Cine N, et al. Sequence variations of NKX2-5 and HAND1 genes in patients with atrial isomerism[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2011, 11(4): 319-328.
- [21] 陈萍, 黄国英, 常才, 等. Csx/Nkx2.5 基因在胚胎心脏的表达及在先天性心脏病中的突变检测 [J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(4): 230-233.
- [22] 刘兴元, 杨奕清, 杨颖, 等. NKX2-5 基因与先天性心脏病的关系 [J]. 国际心血管病杂志, 2009, 36(4): 232-235.
- [23] 许耘红, 何穗谔, 李丽青. 心脏发育相关基因 NKX2.5 和 GATA4 突变与先天性心脏病的相关性 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(22): 2111-2113.
- [24] Wang Z, Zou L, Zhong R, et al. Associations between two genetic variants in NKX2-5 and risk of congenital heart disease in Chinese population: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70979.
- [25] 韩增强, 唐胤, 陈彧, 等. 81 例单纯性先天性心脏病患者 NKx 2.5 基因突变筛查及关联研究 [J]. 中国循环杂志, 2011, 26(6): 461-464.
- [26] 石琳, 申阿东, 李晓峰, 等. 中国先天性心脏病 Nkx2.5 基因突变筛查及关联研究 [J]. 首都医科大学学报, 2005, 26(5): 525-528.
- [27] Holt M, Oram S. Familial heart disease with skeletal malformations[J]. Br Heart J, 1960, 22: 236-242.
- [28] 王佼, 朱善良, 杨世伟, 等. NKX2.5、GATA4、TBX5 基因突变与散发性先天性心脏病的相关性研究 [J]. 中国循环杂志, 2014, 29(1): 33-34.
- [29] Tararbit K, Lelong N, Thieulin AC, et al. The risk for four specific congenital heart defects associated with assisted reproductive techniques: a population-based evaluation[J]. Hum Reprod, 2013, 28(2): 367-374.
- [30] Bahtiyar MO, Campbell K, Dulay AT, et al. Is the rate of congenital heart defects detected by fetal echocardiography among pregnancies conceived by in vitro fertilization really increased?: a case-historical control study[J]. J Ultrasound Med, 2010, 29(6): 917-922.

(本文编辑: 邓芳明)