



DLL3 基因遗传多态性与先天性巨结肠易感性的相关性分析

傅润熹 王阳 蔡威

上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科 上海市儿科医学研究所 上海市小儿消化与营养重点实验室, 上海 200092

傅润熹和王阳对本文有同等贡献

通信作者: 蔡威, Email: caiw204@sjtu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨 *DLL3* 基因多态性与先天性巨结肠 (hirschsprung's disease, HSCR) 易感性之间的关系。**方法** 采用病例对照研究方法, 选取 2009—2012 年上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科收治的 104 例 HSCR 病例 (HSCR 组) 和 151 例就诊于小儿外科而无慢性便秘病史的对照病例 (对照组) 作为研究对象。采用 MassARRAY 的方法检测 *DLL3* 基因 5 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点的多态性分布, 统计分析不同等位基因、基因型以及单倍型与 HSCR 易感性之间的相关性。**结果** HSCR 组 5 个 SNP 位点 rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931 基因型、等位基因频率与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931 组遗传标记具有强 LD (linkage disequilibrium) ($D' > 0.7$)。HSCR 组 GGTAC 单倍型携带频率为 11.9%, 高于对照组的 6.4%, 该单倍型与 HSCR 的发生显著相关 (rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931, $P = 0.049$, $OR = 1.87$, 95% CI 0.99 ~ 3.50)。**结论** *DLL3* 基因中, 由 5 个 SNP 位点 rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931 构成的 GGTAC 单倍型与 HSCR 易感性相关, 单个 SNP 位点与 HSCR 之间无显著相关性。

【关键词】 Hirschsprung 病; 病因学; 基因

基金项目: 上海市自然科学基金 (22ZR1451500); 上海市小儿消化与营养重点实验室 (17DZ2272000)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202203030-010

Association study of delta-ligand 3 (*DLL3*) gene with Hirschsprung's disease susceptibility

Fu Runxi, Wang Yang, Cai Wei

Department of Pediatric Surgery, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute for Pediatric Researches, Shanghai Key Laboratory of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, Shanghai 200092, China

Fu Runxi and Wang Yang contributed equally to this work

Corresponding author: Cai Wei, Email: caiw204@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in delta-ligand 3 (*DLL3*) gene and examine the susceptibility to Hirschsprung's Disease (HSCR). **Methods** For this case-control study, 104 cases of HSCR were recruited and 151 cases without a history of chronic constipation as control group. MassARRAY was performed for examining the five SNPs' polymorphism in *DLL3*. The relationship between the risk of HSCR and different genotypes, allelic genes and haplotypes were compared. **Results** There were no statistical differences of 5 SNPs rs3786951/rs958728/rs2304214/rs3212276/rs10412931 genotype and allelic gene frequencies between HSCR and control group ($P > 0.05$). Estimation of linkage disequilibrium for each pair of SNPs revealed strong linkage disequilibrium ($D' > 0.7$) for one group of markers (rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931). The frequency of GGTAC haplotypes was higher in HSCR group than that in control group (11.9% vs. 6.4%). Significant differences existed in susceptibility to HSCR (rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931, $P = 0.049$, $OR = 1.87$, 95% CI 0.99 -

3.50)。 **Conclusion** The GGTAC haplotypes of 5SNPs rs3786951, rs958728, rs2304214, rs3212276 and rs10412931 in *DLL3* gene are associated with susceptibility to HSCR. However, no significant correlation exists between single SNP and HSCR.

【Key words】 Hirschsprung Disease; Etiology; Genes

Fund program: Shanghai Key Laboratory of Pediatric Digestion & Nutrition (17DZ2272000); Shanghai Natural Science Foundation (22ZR1451500)
DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202203030-010

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 是一种常见的儿童消化道发育畸形, 其发病机制尚不完全清楚^[1]。HSCR 在全球范围内的发病率约为 1/5000, 男性多见, 男女发病比例约为 4 : 1^[2-3]。Delta 样配体 3 (Delta-ligand 3, *DLL3*) 是一种抑制性 Notch 通路配体, 可与 Notch 受体结合从而抑制 Notch 信号通路的激活^[4]。国外研究发现, *DLL3* 可能作为 HSCR 的易感基因, 通过调节 Notch 信号通路, 进而影响肠神经系统的发育过程^[5]。本研究以来自上海地区的中国汉族人群为研究对象, 选取 *DLL3* 基因的 5 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931 进行连锁不平衡分析, 研究其与 HSCR 之间的相关性。

资料与方法

一、研究对象

选取 2009—2012 年上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科收治并进行先天性巨结肠根治术的 104 例 HSCR 患儿为研究对象; 选取同时期就诊于小儿外科而无慢性便秘病史的 151 例病例为对照组, 包括无肛、肠套叠或嵌顿绞窄性腹股沟疝等^[6]。所有血液标本均为术前取得。每一个 HSCR 病例经病理活检手术切除肠段组织, 确定无肠神经细胞; 病变严重程度按神经节病变的长度进行分类, 104 例 HSCR 患儿中包括短段型 86 例、长段型 15 例、全结肠型 3 例。本研究已通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查同意 (XHEC-C-2016-263), 家长均知情同意并签署知情同意书。

二、研究方法

(一) 血液标本采集及基因组 DNA 的提取

入选的全部 HSCR 病例和对照组病例均采集外周静脉血 4 mL, 使用 QIAamp DNA blood midi kit (QIAGEN, Valencia, CA) 提取基因组 DNA, 并测定

其浓度, 于 -80℃ 保存备用。

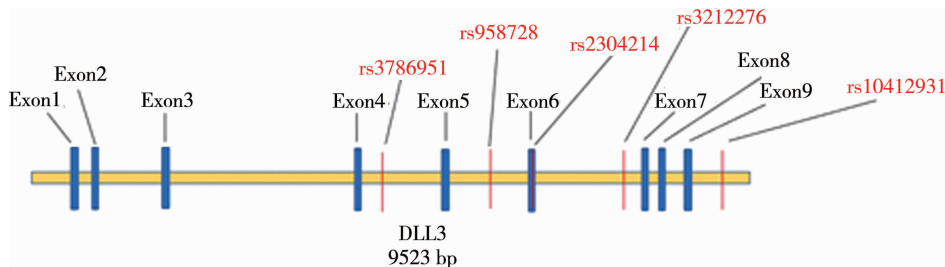
(二) SNP 选择和基因分型

SNP 位点选择方法: ①所有纳入选取范围的 SNP 位点均来自 HapMap HCB (Han Chinese in Beijing) 数据库; ②以 Genome Variation Server 分析平台及 Haploview 软件 (4.1), 结合 HapMap HCB 数据库, 选取 tagSNP; ③对所有候选 tagSNP, 必须满足其最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) $\geq 20\%$, 且 $r^2 \geq 0.8$; ④优先选择位于编码区及 UTR 区的 tagSNP。同时由于在 HCB 群体中, 诸多遗传变异的等位基因频率均不可获得, 因此本研究 tagSNP 选择空间被进一步压缩。在上述 SNP 选择策略及原则的基础上, 本研究共选取 4 个 tagSNPs, 包括 rs3786951、rs958728、rs2304214、rs10412931; 另外由于 rs3212276 与其他 4 个 tagSNPs 均处于较强的连锁不平衡状态, 因此也被纳入本研究中。

本研究选取了 5 个 SNP 位点 rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931。5 个 SNP 位点跨越 *DLL3* 基因约 6052kb 的区域, 平均间隔约 1210kb。rs3786951、rs958728 和 rs3212276 位于内含子, rs2304214 位于外显子 6, rs10412931 位于 3'UTR 区, 见图 1。根据产品说明进行多重反应, 包括 PCR 扩增、SAP 和引物延伸反应。反应产物转移至 384-Spectro CHIP 上, 通过 MassARRAY 平台进行检测。采用 MALDI-TOF MS 检测对应于不同等位基因的信号。使用 Typer Version 4.0 处理获得的原始数据。

(三) 基因分型质量控制

本研究比较了每个 384 孔板和总体研究中的基因型检出率和重复率, 并分析实验的污染概率和可靠性。以下标准被用作可接受基因分型的衡量标准: ①每 384 孔板的检出率 $>95\%$; ②按标记物和个体划分的总检出率 $>95\%$; ③重复率 $\geq 99.7\%$; ④MAF $>3\%$; ⑤384 孔板的空白对照检出率 $<5\%$ 。不符合上述标准的数据均被排除。



注 红线表示 SNP 位点;蓝线表示外显子

图1 先天性巨结肠患儿 *DLL3* 基因组区段 5 个 SNP 位点分布

Fig.1 Location of 5 SNPs in *DLL3* genome in HSCR children

三、统计学处理

使用 SHEsis (<http://analysis2.bio-x.cn/myAnalysis.php>) 计算 Hardy-Weinberg 平衡、等位基因和基因型频率、OR 值和 95% CI 置信区间。采用 Haploview 4.1 计算 SNP 位点之间的连锁不平衡程度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、一般情况

HSCR 组 104 例(男 84 例,女 20 例),平均年龄 (1.14 ± 1.83) 岁;短段型先天性巨结肠 86 例 (86/104, 82.7%),长段型先天性巨结肠 15 例 (15/104, 14.4%),全结肠型先天性巨结肠 3 例 (3/104, 2.9%)。对照组 151 例(男 86 例,女 65 例),平均年龄 (1.66 ± 1.05) 岁。

二、*DLL3* 基因 SNP 位点基因型确定及频率分布

HSCR 组和对照组的基因型分布均符合 Hardy-Weinburg 平衡($P > 0.05$)。5 个 SNP 位点(rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931)的等位基因和基因型频率见表 1。5 个 SNP 位点均未发现与先天性巨结肠有显著相关性($P > 0.05$)。

三、*DLL3* 基因 SNP 位点连锁不平衡分析

对于 rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931 进行标记,各 SNP 之间都呈现出强的连锁不平衡关系($D' > 0.7$),见图 2。

四、*DLL3* 基因 SNP 位点单倍型分析

在 HSCR 组中,GGTAC 单倍型显著高于对照组,提示该单倍型与 HSCR 的发生显著相关(rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931, $P = 0.049$, $OR = 1.87$, 95% CI 0.99 ~ 3.50)。HSCR 组和对照组中的 AACGC 单倍型和 AGCGT 单倍型频率差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。此外,对单倍型的全局性分析结果显示无具有统计学意义的结果($P > 0.05$)。

表1 HSCR 组和对照组 SNP 位点基因型、等位基因频率分布

Table 1 Comparison of SNP genotypes and allelic gene frequency between HSCR and control groups

SNP 位点	基因型频率(%)			哈温平衡 P^*	P^*	等位基因频率(%)		χ^2	P^*	OR (95% CI)
rs3786951	AA	AG	GG			A	G			
HSCR 组	79(78.2)	19(18.8)	3(3.0)	0.182	0.718	177(87.6)	25(12.4)	0.743	0.389	0.78(0.44 ~ 1.37)
对照组	124(82.1)	24(15.9)	3(2.0)	0.170		272(90.1)	30(9.9)			
rs958728	AA	AG	GG			A	G			
HSCR 组	19(18.8)	53(52.5)	29(28.7)	0.547	0.282	91(45.0)	111(55.0)	0.527	0.468	0.88(0.61 ~ 1.25)
对照组	40(26.5)	66(43.7)	45(29.8)	0.125		146(48.3)	156(51.7)			
rs2304214	CC	CT	TT			C	T			
HSCR 组	81(77.9)	21(20.2)	2(1.9)	0.645	0.603	183(88.0)	25(12.0)	0.716	0.398	0.78(0.44 ~ 1.38)
对照组	124(82.7)	23(15.3)	3(2.0)	0.135		271(90.3)	29(9.7)			
rs3212276	AA	AG	GG			A	G			
HSCR 组	2(1.9)	21(20.2)	81(77.9)	0.645	0.676	25(12.0)	183(88.0)	0.557	0.456	1.24(0.71 ~ 2.17)
对照组	3(2.0)	24(15.9)	124(82.1)	0.170		30(9.9)	272(90.1)			
rs10412931	CC	CT	TT			C	T			
HSCR 组	37(35.6)	47(45.2)	20(19.2)	0.467	0.825	121(58.2)	87(41.8)	0.414	0.520	1.12(0.79 ~ 1.61)
对照组	49(32.5)	69(45.7)	33(21.9)	0.352		167(55.3)	135(44.7)			

注 HSCR:先天性巨结肠;SNP:单核苷酸多态性;* :Pearson's p value;(该 P 值为 Pearson 相关 P 值);CI:置信区间

表 2 HSCR 组和对照组单倍型频率

Table 2 Comparing haplotypic frequency between HSCR and control groups

单倍型					单倍型频率(%)		χ^2	P^*	OR(95% CI)
rs3786951	rs958728	rs2304214	rs3212276	rs10412931	HSCR 组	对照组			
A	A	C	G	C	90.00(44.6)	141.58(47.2)	1.196	0.27422	0.82 (0.57 ~ 1.17)
A	G	C	G	T	86.00(42.6)	122.04(40.7)	0.001	0.9755	0.99 (0.69 ~ 1.43)
G	G	T	A	C	24.00(11.9)	19.27(6.4)	3.865	0.04936	1.87 (0.99 ~ 3.50)

注 HSCR:先天性巨结肠; *:Fisher's p value(该 P 值为 Fisher 相关 P 值);CI:置信区间



图 2 先天性巨结肠患儿 5 个 SNP 位点之间的连锁不平衡分析
Fig.2 Linkage disequilibrium analysis among 5 SNPs in HSCR children

讨论

HSCR 是一种儿童常见的消化道发育畸形,发病机制为病变肠管肠神经缺如^[7-9]。其主要临床表现为便秘。HSCR 的发病受到遗传因子、胚胎发育环境等多因素的影响^[10],目前已发现 *RET*、*NOTCH*、*GDNF*、*EDNRB*、*SOX10* 等多个与 HSCR 相关的易感基因^[11-16]。

Notch 信号在胚胎发育过程中参与肠神经嵴细胞神经发生的各个方面^[17-18]。Notch 信号的激活可以调控神经祖细胞分化为神经细胞和神经胶质细胞^[19-21]。因此,Notch 信号在胚胎发育过程中适当时间的激活与关闭对于神经元和神经胶质细胞的分化至关重要^[5,22]。*DLL3* 作为 Notch 受体的配体,可以通过调控 Notch 信号通路的激活与关闭,从而影响胚胎肠神经系统的发育^[23]。

本研究结果首次探究了 *DLL3* 基因 5 个 SNP 位点 (rs3786951、rs958728、rs2304214、rs3212276、rs10412931) 的常见遗传变异与汉族人群 HSCR 易感性之间的关系。本研究纳入了 104 例 HSCR 病例

和 151 例就诊于小儿外科而无慢性便秘病史的病例对照,选取了 *DLL3* 基因的 5 个 SNP 位点进行基因分型,发现 HSCR 组的等位基因和基因型频率与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明汉族人群中 *DLL3* 基因的 SNP 位点与 HSCR 的易感性之间无显著相关性。

由于 SNP 位点之间的遗传存在连锁不平衡现象,因此与单个 SNP 位点分析相比,由几个处于强连锁不平衡的 SNP 位点构成的单倍型可以帮助我们更好地理解与疾病发生相关的遗传因素。在本研究中,我们进一步对 *DLL3* 基因的遗传标记进行了连锁不平衡分析,发现 rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931 组遗传标记具有强 LD ($D' > 0.7$)。此外,对 rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931 组遗传标记进行单倍型分析,发现 HSCR 组 GGTAC 单倍型携带频率为 11.9%,高于对照组的 6.4%,提示该单倍型与 HSCR 的发生显著相关 ($P = 0.049$, $OR = 1.87$, 95% CI 0.99 ~ 3.50),表明 GGTAC 可能是 HSCR 的风险单倍型。

综上所述,本研究首次证实 *DLL3* 基因中 5 个 SNP 位点 rs3786951-rs958728-rs2304214-rs3212276-rs10412931 构成的 GGTAC 单倍型与 HSCR 的发生显著相关。同时,本研究还存在样本量不足等局限性,未来可联合多中心研究,招募不同区域的患者,通过扩大样本量并结合体内模型等研究策略,进一步深入挖掘 *DLL3* 基因与 HSCR 之间的相关性,为解释 HSCR 的发生机制提供更多的理论依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 傅润熹、王阳负责研究的设计、实施和起草文章、数据收集及分析;蔡威负责研究实施、并对文章知识性内容进行审阅

参考文献

- [1] 陈宏坤,张大森.先天性巨结肠患者血清 miR-223 与炎症因子水平及其临床意义研究[J].临床小儿外科杂志,2021,20(4):359-364. DOI:10.12260/lcxewkzz.2021.04.011.
Chen HK, Zhang DS. Clinical significance of serum levels of miR-223 and inflammatory factors in children with Hirschsprung's disease[J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20(4): 359-

364. DOI:10.12260/lcxewkzz.2021.04.011.
- [2] Nagy N, Goldstein AM. Enteric nervous system development; a crest cell's journey from neural tube to colon[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 66: 94–106. DOI: 10.1016/j.semdcb.2017.01.006.
- [3] 张彦, 夏慧敏. 先天性巨结肠的遗传发病机制及前瞻性队列研究进展[J]. *临床小儿外科杂志*, 2018, 7(2): 90–93. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.02.003.
Zhang Y, Xia HM. Hirschsprung disease: research advances of genetic pathogenesis and prospective cohort study[J]. *J Clin Ped Sur*, 2018, 17(2): 90–93. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.02.003.
- [4] Liu MT, Huang WS, Guo YJ, et al. CAR NK-92 cells targeting DLL3 kill effectively small cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112(4): 901–911. DOI: 10.1002/JLB.5MA0122-467R.
- [5] Ngan ESW, Garcia-Barceló MM, Yip BHK, et al. Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3467–3478. DOI: 10.1172/JCI43737.
- [6] Wang Y, Wang J, Pan WH, et al. Common genetic variations in *Patched1* (*PTCH1*) gene and risk of Hirschsprung disease in the Han Chinese population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75407. DOI:10.1371/journal.pone.0075407.
- [7] Kuil LE, MacKenzie KC, Tang CS, et al. Size matters: large copy number losses in Hirschsprung disease patients reveal genes involved in enteric nervous system development[J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(8): e1009698. DOI:10.1371/journal.pgen.1009698.
- [8] Stavely R, Bhawe S, Ho WLN, et al. Enteric mesenchymal cells support the growth of postnatal enteric neural stem cells[J]. *Stem Cells*, 2021, 39(9): 1236–1252. DOI: 10.1002/stem.3388.
- [9] 童玲, 臧婧羽, 袁小建, 等. RhoA/ROCK 信号通路在先天性巨结肠病变肠段的变化研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2018, 17(3): 226–230. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.03.014.
Tong L, Zang JY, Yuan XJ, et al. Variation of RhoA/ROCK signaling pathway in colon of Hirschsprung's disease[J]. *J Clin Ped Sur*, 2018, 17(3): 226–230. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2018.03.014.
- [10] Karim A, Tang CSM, Tam PKH. The emerging genetic landscape of Hirschsprung disease and its potential clinical applications[J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 638093. DOI: 10.3389/fped.2021.638093.
- [11] Jiang Q, Wang Y, Li Q, et al. Sequence characterization of RET in 117 Chinese Hirschsprung disease families identifies a large burden of de novo and parental mosaic mutations[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 237. DOI: 10.1186/s13023-019-1194-2.
- [12] Kapoor A, Nandakumar P, Auer DR, et al. Multiple, independent, common variants at RET, SEMA3 and NRG1 gut enhancers specify Hirschsprung disease risk in European ancestry subjects[J]. *J Pediatr Surg*, 2021, 56(12): 2286–2294. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2021.04.010.
- [13] Okamoto M, Uesaka T, Ito K, et al. Increased RET activity coupled with a reduction in the RET gene dosage causes intestinal aganglionosis in mice[J]. *eNeuro*, 2021, 8(3): ENEURO.0534-ENEURO.2021. DOI:10.1523/ENEURO.0534-20.2021.
- [14] Soret R, Schneider S, Bernas G, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor induces enteric neurogenesis and improves colon structure and function in mouse models of Hirschsprung disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(5): 1824–1838. e17. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.07.018.
- [15] Chatterjee S, Karasaki KM, Fries LE, et al. A multi-enhancer RET regulatory code is disrupted in Hirschsprung disease[J]. *Genome Res*, 2021, 31(12): 2199–2208. DOI: 10.1101/gr.275667.121.
- [16] Chatterjee S, Chakravarti A. A gene regulatory network explains RET-EDNRB epistasis in Hirschsprung disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(18): 3137–3147. DOI: 10.1093/hmg/ddz149.
- [17] McCallum S, Obata Y, Fourli E, et al. Enteric glia as a source of neural progenitors in adult zebrafish[J]. *Elife*, 2020, 9: e56086. DOI: 10.7554/eLife.56086.
- [18] Pawolski V, Schmidt MHH. Neuron-glia interaction in the developing and adult enteric nervous system[J]. *Cells*, 2020, 10(1): 47. DOI: 10.3390/cells10010047.
- [19] Jia HM, Zhang KR, Chen QJ, et al. Down-regulation of Notch-1/Jagged-2 in human colon tissues from Hirschsprung disease patients[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2012, 27(1): 37–41. DOI: 10.1007/s00384-011-1295-4.
- [20] Faure S, McKey J, Sagnol S, et al. Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation[J]. *Development*, 2015, 142(2): 331–342. DOI: 10.1242/dev.118422.
- [21] Theocharatos S, Wilkinson DJ, Darling S, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and neuronal differentiation in enteric nervous system neurospheres[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54809. DOI: 10.1371/journal.pone.0054809.
- [22] Liu JAJ, Ngan ESW. Hedgehog and Notch signaling in enteric nervous system development[J]. *Neurosignals*, 2014, 22(1): 1–13. DOI: 10.1159/000356305.
- [23] Noor H, Whittaker S, McDonald KL. DLL3 expression and methylation are associated with lower-grade glioma immune microenvironment and prognosis[J]. *Genomics*, 2022, 114(2): 110289. DOI: 10.1016/j.ygeno.2022.110289.

(收稿日期: 2022-03-11)

本文引用格式: 傅润熹, 王阳, 蔡威. *DLL3* 基因遗传多态性与先天性巨结肠易感性的相关性分析[J]. *临床小儿外科杂志*, 2023, 22(4): 351–355. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202203030-010.

Citing this article as: Fu RX, Wang Y, Cai W. Association study of *delta-ligand 3* (*DLL3*) gene with Hirschsprung's disease susceptibility[J]. *J Clin Ped Sur*, 2023, 22(4): 351–355. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202203030-010.