

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.20.012

# 基于生物信息学探索进行性核上性麻痹生物标志物及 KRAS 的潜在作用机制<sup>\*</sup>

王婵娟<sup>△</sup>, 郝志敏<sup>△</sup>, 张伟兰, 熊三军, 郭美祥

上海市奉贤区中心医院全科医学科, 上海 201400

**摘要:**目的 通过基因表达综合(GEO)数据库对进行性核上性麻痹(PSP)相关基因芯片进行生物信息学分析,获得 PSP 的生物标志物及其调控的关键通路。**方法** 从 GEO2R 分析工具获取 PSP 相关基因芯片的基因表达数据集 GSE6613,筛选出差异常表达基因(DEGs),并借助 DAVID 在线分析平台对这些基因进行基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析。利用生物信息学软件 STRING 构建这些基因的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,找出连接度最高的核心基因。临床标本验证:选取 2016 年 1 月至 2021 年 12 月收治的 9 例 PSP 患者作为试验组,选取 2022 年 1 月至 2022 年 2 月行常规查体的非 PSP 患者作为对照组,留取上述人群血液标本并提取总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测生物信息学分析得出的 DEGs 及 PPI 网络中的核心基因表达水平。**结果** 该研究中所采用的 GSE6613 数据集共包含 6 例 PSP 患者及 23 例健康者。共筛选出 DEGs 98 个,包括 52 个上调基因及 46 个下调基因。其中,差异最大的 5 个上调基因依次为 MYOM2、EMP1、DKK2、FBN1、POLA2;差异最大的 5 个下调基因依次 IVD、TMED7、MSMO1、CASP3 和 DLG1。GO 和 KEGG 结果表明,PSP 发展过程中的 DEGs 主要富集在炎症、免疫紊乱、代谢紊乱等方面。PPI 网络揭示连接度最高的核心基因为 KRAS。临床标本验证显示,与对照组比较,试验组 EMP1 和 DKK2 基因表达上调,DLG1 和 KRAS 基因表达下调,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** PSP 患者的 DEGs 与炎症、免疫紊乱及能量代谢密切相关,EMP1、DKK2 和 DLG1 基因有望成为 PSP 诊断的分子标志物,核心基因 KRAS 有望成为 PSP 潜在治疗靶点。

**关键词:**生物信息学; 进行性核上性麻痹; 标志物

中图法分类号:R742.5 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2022)20-2786-05

## Exploring the biomarkers of progressive supranuclear palsy and the potential mechanism of KRAS based on bioinformatics<sup>\*</sup>

WANG Chanjuan,HAO Zhimin<sup>△</sup>,ZHANG Weilan,XIONG Sanjun,GUO Meixiang

Department of General Medicine,Fengxian District Central Hospital,Shanghai 201400,China

**Abstract: Objective** To obtain biomarkers of progressive supranuclear palsy (PSP) and the key passages of its regulation through bioinformatic analysis of gene microarrays associated with PSP in the Gene Expression Omnibus(GEO) database. **Methods** Gene expression microarrays (GSE6613) of PSP were obtained from the GEO2R database to screen out differentially expressed genes (DEGs) and these genes were subjected to gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway analysis with the help of the DAVID online analysis platform. The protein-protein interaction(PPI) network of these genes was constructed using the bioinformatics software STRING to identify the core genes with the highest connectivity. Clinical specimen validation:9 PSP patients admitted from January 2016 to December 2021 were enrolled as the experimental group,and non-PSP patients who performed routine checkups from January 2022 to February 2022 were enrolled as the control group,blood specimens were retained and total RNA was extracted,the expression levels of differentially expressed genes and core genes in the PPI network derived from bioinformatics analysis were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The microarray GSE6613 used in this study included 6 PSP patients and 23 healthy people. A total of 98 differentially ex-

<sup>\*</sup> 基金项目:上海市奉贤区科技发展基金项目(20201428)。  
作者简介:王婵娟,女,医师,主要从事神经系统疾病的研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:haoinisky@163.com。

pressed genes (DEGs) were found, including 52 up-regulated genes and 46 down-regulated genes. Among them, the five most differentially up-regulated genes were MYOM2, EMP1, DKK2, FBN1, and POLA2 in order; the five most differentially down-regulated genes were IVD, TMED7, MSMD1, CASP3, and DLG1 in order. The GO and KEGG results indicated that DEGs during PSP development were mainly enriched in inflammation, immune disorders, and metabolic disorders. The PPI network revealed that the most highly connected core gene was KRAS. Clinical specimen validation showed that EMP1 and DKK2 gene expression was upregulated and DLG1 and KRAS gene expression was downregulated in the experimental group compared to the control group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** DEGs in PSP patients are closely associated with inflammation, immune disorders and energy metabolism. EMP1, DKK2 and DLG1 genes are expected to be molecular markers for PSP diagnosis, and the core gene KRAS is expected to be a potential therapeutic target for PSP.

**Key words:** bioinformatics; progressive supranuclear paralysis; marker

进行性核上性麻痹(PSP)是一种神经退行性疾病,核心临床症状为眼肌麻痹、姿势不稳、运动减少、认知功能障碍,病理学检查可见 Tau 蛋白异常磷酸化<sup>[1-4]</sup>。PSP 发病较为隐匿,患者在疾病早期往往缺乏典型症状,部分患者临床表现与原发性帕金森病、帕金森综合征相似<sup>[5]</sup>,且无特异的实验室检查,这为 PSP 的早期临床诊断带来了不便,因此找到一种或多种可提示 PSP 发生和发展的生物标志物,对于 PSP 的早发现、早干预具有重要意义。在治疗方面,由于 PSP 的发病机制尚未阐明,故目前没有特异性治疗药物,临床上仅应用左旋多巴和安坦等缓解症状<sup>[6-9]</sup>。寻找 PSP 的潜在发病机制,是开发治疗药物的关键,亦是当前 PSP 研究的重点<sup>[10]</sup>。生物信息学是一门新兴的生命科学与计算科学的前沿交叉学科,其通过对高通量测序结果进行二次分析,可帮助人们更加深刻地认识疾病的本质,更加高效地寻找疾病潜在治疗靶点。为此,本研究拟利用基因表达数据库 2R (GEO2R) 中的数据,对在 PSP 中差异表达基因 (DEGs) 进行分析,探索 PSP 潜在的生物标志物和治疗靶点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 通过在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中查询 PSP 患者基因表达芯片,确定了 GSE6613 芯片数据集(共包含 105 张芯片的数据)为研究目标,其中健康者芯片 23 张,PSP 患者芯片 6 张,帕金森病患者芯片 77 张。本研究仅分析 PSP 患者 (PSP 组,  $n=6$ ) 和健康者 (健康对照组,  $n=23$ ) 的数据。该芯片数据集的建立依托于 GPL96 平台,本课题组在 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库中下载了该数据集的全部矩阵文件,此矩阵文件中包含了所有标本全部被检测基因的表达水平。

### 1.2 方法

**1.2.1 DEGs 筛选** GEO2R 平台 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GEO2R>) 是 GEO 数据库中以 R 语言为基础的交互式分析工具<sup>[11]</sup>。本研究利用 GEO2R 平台对 PSP 患者及健康人群全血细胞的 DEGs 进行筛选。以基因倍数改变 (FC) 取对数值 ( $\log_2 FC$ )  $> 1.5$  作为上调 DEGs 的筛选标准;以  $\log_2 FC < -1.5$  作为下调 DEGs 的筛选标准;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。下载该芯片所有被检测基因原始表达水平数据。

**1.2.2 基因本体论 (GO)** GO 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析能够注释一组基因的多项功能,包括分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 和生物学过程 (BP)。KEGG 本质上是一种获取基因生物学功能甚至高级基因组信息的资源,KEGG 信号通路分析能够提示某些疾病相关基因及药物的生物学通路。本研究通过 DAVID (<http://david.ncifcrf.gov>, 6.7 版) 进行了该芯片的 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**1.2.3 蛋白-蛋白相互作用网络的构建** 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络能够识别健康个体与患者之间的核心 DEGs 和关键基因模块。首先将本芯片中全部的 DEGs 导入 STRING 在线分析软件 (<http://www.stringdb.org/>), 预测这些基因所编码蛋白之间的相互作用;随后,在 STRING 分析的基础上,采用 Cytoscape 软件平台构建基因的 PPI 网络,并根据这些基因的连接度排序,筛选出连接度最高的基因。

**1.2.4 临床标本分组** 选取本院 2016 年 1 月至 2021 年 12 月留存的 9 例 PSP 患者外周血标本作为试验组,其中男 6 例、女 3 例,年龄为  $(70.78 \pm 5.95)$  岁;另外从 2022 年 1—2 月健康查体人群中,随机选取 61~81 岁的男性血标本 6 例、女性血标本 3 例,作

为对照组,年龄(72.11±8.02)岁。两组研究对象在抽血前均已签署知情同意书。纳入标准:(1)试验组患者符合《中国进行性核上性麻痹临床诊断标准》<sup>[4]</sup>;(2)对照组人群无神经系统疾病。排除标准:(1)存在脑血管疾病;(2)患有恶性肿瘤;(3)患者或家属拒绝保存血液标本。

**1.2.5 相关基因转录水平检测** 应用 RNA 提取试剂盒提取血液标本中的总 RNA,并反转录成 cDNA,经实时荧光定量 PCR 试剂盒检测相关 DEGs 及 PPI 网络中连接度最高的 KRAS 基因的相对表达水平,各引物序列见表 1。每个标本设置 3 个重复孔。扩增基因采取两步法:95 ℃、15 min 预变性;95 ℃、10 s,60 ℃、32 s 进行 38 循环。应用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各基因的相对长度。选取 GAPDH 作为内参基因,上游:CTGGGCTACACTGAGCACC,下游:AAGTG-GTCGTTGAGGGCAATG。

| 表 1 各基因引物序列 |                         |        |
|-------------|-------------------------|--------|
| 基因          | 序列(5'-3')               | 长度(bp) |
| MYOM2       |                         |        |
| 上游          | TTCGACCAGTCCTACCGTAAT   | 86     |
| 下游          | GAAGATGCCTGGGTGGAAGC    |        |
| EMP1        |                         |        |
| 上游          | GTGCTGGCTGTGCATTCTTG    | 81     |
| 下游          | CCGTGGTGATACTGCGTTCC    |        |
| DKK2        |                         |        |
| 上游          | TGTACCAAGGACTGGCATTCTG  | 106    |
| 下游          | CTGTGGCAATACCTCCCAACT   |        |
| FBN1        |                         |        |
| 上游          | CAGGACAGGCCCATGTTTTAC   | 90     |
| 下游          | GCACAGCAGAGCGTTTTTGT    |        |
| POLA2       |                         |        |
| 上游          | AGGAGCTAGAGACATTGTTTCCA | 107    |
| 下游          | CTCGCTTCTGAGAACCCTTTG   |        |
| IVD         |                         |        |
| 上游          | CTGGGCGTATTGGGCATCA     | 129    |
| 下游          | GTGGGCACCGTAACTGAGC     |        |
| TMED7       |                         |        |
| 上游          | TCTGGTGGTTAGCATAGGGCA   | 77     |
| 下游          | CAACACGAGTTGTGGTGGTTC   |        |
| MSMO1       |                         |        |
| 上游          | TATGCTGGTTCTCGGCATCAT   | 89     |
| 下游          | CCAAAAATTCGATCCCACCATGT |        |
| CASP3       |                         |        |
| 上游          | AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC  | 81     |
| 下游          | ACAGTCCAGTTCTGTACCACG   |        |

| 续表 1 各基因引物序列 |                       |        |
|--------------|-----------------------|--------|
| 基因           | 序列(5'-3')             | 长度(bp) |
| DLG1         |                       |        |
| 上游           | GCAGGAGGTACGGACAACC   | 105    |
| 下游           | ATTGACCCGCAATCTTCCATC |        |
| KRAS         |                       |        |
| 上游           | ACAGAGAGTGAGGATGCTTT  | 100    |
| 下游           | TTTCACACAGCCAGGAGTCTT |        |

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计学软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立标本的 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 DEGs 的筛选结果** 共筛选出 DEGs 98 个,上调基因 54 个,下调基因 44 个。在 98 个 DEGs 中,差异最大的 5 个上调基因分别为 MYOM2、EMP1、DKK2、FBN1、POLA2;差异最大的 5 个下调基因分别为 IVD、TMED7、MSMO1、CASP3 和 DLG1。见表 2。

| 表 2 DEGs 的基本生物学功能 |                     |                               |
|-------------------|---------------------|-------------------------------|
| 基因                | log <sub>2</sub> FC | 基本生物学功能                       |
| MYOM2             | 1.55                | 肌球蛋白 2                        |
| EMP1              | 1.60                | 上皮膜蛋白 1                       |
| DKK2              | 1.55                | dickkopf WNT 信号通路抑制剂 2        |
| FBN1              | 1.51                | 原纤维蛋白 1                       |
| POLA2             | 1.67                | DNA 聚合酶 α2 的辅助亚基              |
| IVD               | -1.74               | 异戊酰辅酶 A 脱氢酶                   |
| TMED7             | -1.60               | TMED7-TICAM2 通读/跨膜 p24 转运蛋白 7 |
| MSMO1             | -2.05               | 甲基甾醇单加氧酶 1                    |
| CASP3             | -1.54               | 半胱天冬酶 3                       |
| DLG1              | -1.55               | discs large MAGUK 支架蛋白 1      |

注:基本生物学功能是指该基因直接转录、翻译得到的蛋白质。

**2.2 GO 富集分析** 分析本芯片中所有的 DEGs,发现上调 DEGs 的 MF 包括转录因子结合、核酸结合、金属离子结合,而下调 DEGs 的 MF 主要包括蛋白质复合物结合、微管结合、蛋白质结合。

**2.4 PPI 网络的构建及核心基因的筛选** 通过构建 PPI,筛选出连接度最高的基因——KRAS,以及与其相关的 7 个基因:MSH6、LOX、CASP3、AKTIP、KRT20、RECK 和 PBRM1。见表 3。

**2.5 临床标本各基因表达差异** 与对照组比较,试验组 EMP1 和 DKK2 基因表达上调,DLG1 和 KRAS 基因表达下调,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 4。

表 3 DEGs 的 KEGG 富集分析

| 项目       | 信号通路             | P    | 基因                          |
|----------|------------------|------|-----------------------------|
| 下调       |                  |      |                             |
| hsa05203 | 病毒致癌             | 0.01 | DLG1,CASP3,ATF2,MAD1L1,KRAS |
| hsa05166 | 人类嗜 T 细胞病毒 I 型感染 | 0.05 | DLG1,HLA-DRB4,ATF2,KRAS     |
| hsa05161 | 乙型肝炎             | 0.09 | CASP3,ATF2,KRAS             |
| 上调       |                  |      |                             |
| hsa05200 | 癌症通路             | 0.05 | LAMC1,TTGB1,CTBT2,MSH6      |

表 4 临床标本各基因表达差异比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | MYOM2     | EMP1      | DKK2      | FBN1      | POLA2     |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 对照组      | 0.99±0.12 | 0.94±0.09 | 1.01±0.10 | 0.98±0.12 | 0.90±0.09 |
| 试验组      | 0.90±0.06 | 1.18±0.22 | 1.41±0.30 | 0.93±0.09 | 0.97±0.12 |
| <i>t</i> | 1.918     | 3.028     | 3.684     | 0.773     | 1.265     |
| <i>P</i> | 0.072     | 0.008     | 0.002     | 0.449     | 0.223     |

| 组别       | IVD       | TMED7     | MSMO1     | CASP3     | DLG1      | KRAS      |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 对照组      | 0.93±0.11 | 0.94±0.12 | 0.98±0.12 | 1.00±0.10 | 0.94±0.83 | 0.99±0.11 |
| 试验组      | 0.95±0.09 | 0.90±0.09 | 0.91±0.11 | 0.96±0.08 | 0.80±0.17 | 0.69±0.09 |
| <i>t</i> | 0.244     | 0.88      | 1.238     | 0.832     | 2.255     | 5.912     |
| <i>P</i> | 0.811     | 0.391     | 0.233     | 0.417     | 0.038     | <0.001    |

3 讨 论

PSP 是一种较为少见的神经变性疾病,以眼球运动障碍、姿势不稳、运动障碍以及认知功能障碍为核心临床特征<sup>[1-2]</sup>,我国尚无确切的流行病学数据,日本的一项研究显示,PSP 总体患病率约为 18/10 万<sup>[5]</sup>,PSP 的主要病变部位在中脑、苍白球、丘脑底核、桥脑被盖、小脑齿状核和小脑上脚等。目前关于 PSP 的病因和发病机制尚不明确,且缺乏特异性的辅助检查手段,临床上诊断和鉴别困难,较易误诊为其他神经退行性疾病。

本研究通过对 GEO 数据库中的 PSP 患者及健康人群全血细胞的 DEGs 进行筛查,共发现 98 个 DEGs。利用临床血液标本,进一步对差异最大的 5 个上调基和差异最大的 5 个下调基因进行验证发现,EMP1 和 DKK2 基因表达上调,DLG1 基因表达下调。其中 EMP1 编码一种上皮膜蛋白,编码蛋白位于质膜上,其主要参与滤泡聚集和细胞死亡<sup>[11]</sup>。DKK2 可通过抑制 LRP5/6 与 WNT 的相互作用,促进 LRP5/6 内化的跨膜蛋白 KREMEN 形成三元复合物,拮抗典型 WNT 信号。在成年人中,DKK 与骨形成、骨病、癌症和阿尔茨海默病有关<sup>[12]</sup>。DLG1 编码一种正常发育所需的基本多结构域支架蛋白,可在黏附、连接、组装,信号转导、细胞增殖、突触形成和淋巴细胞活化中发挥作用<sup>[13]</sup>。这与生物信息学分析结果不完全一致,可能是由于公共数据库中的数据来源于白种人和黑种人,而临床验证的基因数据来源于黄种

人,基因表达在不同种族之间存在差异,同时标本量过小也可引起结果的不一致。但是 EMP1、DKK2 和 DLG1 基因在两部分实验中表达趋势是一致的,且在 PSP 的既往研究中鲜有报道,这为 PSP 的生物标志物筛选提供了参考。同时,本课题组还根据这些 DEGs 的相互作用关系构建了 PPI,发现 KRAS 基因的连接度最高,临床标本验证亦可发现其表达水平降低。KRAS 基因是哺乳动物 RAS 基因家族的 Kirsten-RAS 基因同源物,编码一种属于鸟苷三磷酸酶(GT-Pase)超家族的蛋白质,其可通过将效应分子直接与 GTP 结合来激活多条信号通路<sup>[14]</sup>。与其相关的 7 个基因中,MSH6 基因编码 DNA 错配修复 MutS 家族中的一个成员,其可在修复错配核苷酸之前识别错配核苷酸<sup>[15]</sup>;LOX 基因编码赖氨酰氧化酶家族的一员,这种酶的铜依赖性胺氧化酶活性在胶原和弹性蛋白的交联中起作用<sup>[16]</sup>;CASP3 基因编码的蛋白质是一种半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,在细胞凋亡的执行阶段起着核心作用,与阿尔茨海默病中的神经元死亡有关<sup>[17]</sup>;AKTIP 基因编码蛋白直接与丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白激酶 B 相互作用,在细胞凋亡中发挥作用<sup>[18]</sup>;KRT20 基因编码的蛋白质是角蛋白家族的一员,调控上皮细胞结构完整性<sup>[19]</sup>;RECK 基因编码的蛋白质是一种富含半胱氨酸的细胞外蛋白,具有蛋白酶抑制剂样结构域,在正常细胞中作为基质金属蛋白酶-9 的负调节因子,基质金属蛋白酶-9 是参与凋亡、肿瘤侵袭等生物学进程的关键酶<sup>[20]</sup>;PBRM1 基因编码 ATP

依赖的染色质重塑复合物的一个亚单位,该蛋白是核激素受体配体依赖性转录激活所必需的复合物的组成部分<sup>[21]</sup>。可见核心基因 KRAS 主要调控遗传物质的复制与细胞凋亡相关生物学进程,是 PSP 的可能发病机制和潜在治疗靶点之一。

综上所述,本研究基于生物信息学首次对 PSP 和健康体检人群全血细胞表达差异基因进行分析,从生物信息学角度提出炎症、免疫紊乱、代谢紊乱等与 PSP 的发病密切相关。结合临床标本验证发现,EMP1、DKK2 和 DLG1 基因差异表达显著,将这些标志物结合临床,有望提高 PSP 诊断准确率。同时,依据 PPI 网络,挑选出了有望成为 PSP 治疗靶点的 KRAS 基因,为 PSP 的进一步研究提供了参考。

## 参考文献

- [1] YOSHIDA K, HATA Y, KINOSHITA K, et al. Incipient progressive supranuclear palsy is more common than expected and may comprise clinicopathological subtypes: a forensic autopsy series[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(5):809-823.
- [2] ALEXOUDI A, PATRIKELIS P, DEFTEREOS S, et al. Effects of anodal transcranial direct current stimulation on cognitive dysfunction in patients with progressive supranuclear palsy[J]. *Psychiatriki*, 2019, 30(6):320-328.
- [3] NOGAMI A, YAMAZAKI M, SAITO Y, et al. Early stage of progressive supranuclear palsy: a neuropathological study of 324 consecutive autopsy cases[J]. *J Nippon Med Sch*, 2017, 82(6):266-273.
- [4] 陈海波, 苏闻, 陈生弟. 中国进行性核上性麻痹临床诊断标准[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(4):272-276.
- [5] WILLIAMS D R, LEES A J. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 8(3):270-279.
- [6] LING H. Clinical approach to progressive supranuclear palsy[J]. *J Mov Disord*, 2016, 9(1):3-13.
- [7] HOGLINGER G U, MELHEM N M, DICKSON D W, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy[J]. *Nat Genet*, 2018, 43(7):699-705.
- [8] HOGLINGER G U, RESPONDEK G, STAMELOU M, et al. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: the movement disorder society criteria[J]. *Movement Disorders*, 2017, 32(6):853-864.
- [9] ARMSTRONG R A. Visual signs and symptoms of progressive supranuclear palsy[J]. *Clin Exp Optom*, 2017, 94(2):150-160.
- [10] BOWER J H, MARAGANORE D M, MCDONNELL S K, et al. Incidence of progressive supranuclear palsy and

multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990[J]. *Neurology*, 1997, 49(5):1284-1288.

- [11] LI X, YAN L, XUE H. Serum epithelial membrane protein 1 serves as a feasible biomarker in extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Int J Biol marker*, 2021, 36(3):33-39.
- [12] MU J, HUI T, SHAO B, et al. Dickkopf-related protein 2 induces G0/G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24):205-218.
- [13] ZHANG S, LI X, LIU W, et al. Whole-exome sequencing identified DLG1 as a candidate gene for familial exudative vitreoretinopathy[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2021, 25(5):309-316.
- [14] NEWBURY L J, WANG J H, HUNG G, et al. Inhibition of Kirsten-Ras reduces fibrosis and protects against renal dysfunction in a mouse model of chronic folic acid nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):14010.
- [15] ZHAN H, MO F, XU Q, et al. An integrative pan-cancer analysis reveals the oncogenic role of mutS homolog 6 (MSH6) in human tumors[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(23):25271-25290.
- [16] STEVENS K E, PRICE J E, MARKO J, et al. Neck masses due to internal jugular vein phlebectasia: frequency in menkes disease and literature review of 85 pediatric subjects[J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(6):1364-1377.
- [17] MA X Y, ZHANG M, FANG G, et al. Ursolic acid reduces hepatocellular apoptosis and alleviates alcohol-induced liver injury via irreversible inhibition of CASP3 in vivo[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(7):1101-1110.
- [18] MERIGLIANO C, BURLA R, LA TORRE M, et al. AKTIP interacts with ESCRT I and is needed for the recruitment of ESCRT III subunits to the midbody[J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(8):e1009757.
- [19] ECKE T H, KIANI A, SCHLOMM T, et al. Prognostic role of survivin and macrophage infiltration quantified on protein and mRNA level in molecular subtypes determined by RT-qPCR of KRT5, KRT20, and ERBB2 in muscle-invasive bladder cancer treated by adjuvant chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19):7420.
- [20] DE MORAES R P, PIMENTA R, MORI F, et al. Tissue expression of MMP-9, TIMP-1, RECK, and miR338-3p in prostate gland: can it predict cancer[J]. *Mol Biol Res Commun*, 2021, 10(4):149-156.
- [21] WILLIAMS E A, WAKIMOTO H, SHANKAR G M, et al. Frequent inactivating mutations of the PBAF complex gene PBRM1 in meningioma with papillary features[J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(1):89-93.