

· 论 著 ·

羊水游离 RNA 中神经发育关键基因分析*

杨树法, 刘 妍, 秦 朗, 闫有圣, 阴赓宏[△]

首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院, 北京 100026

摘要:目的 分析孕中期羊水游离 RNA(AfcfRNA)转录组,筛选神经发育共表达关键基因。方法 利用基因共表达网络分析,建立 AfcfRNA 转录组的基因共表达网络模块。筛选各共表达模块中的神经特异性基因,建立神经系统特异性共表达模块。利用基因间相互作用筛选神经组织特异性共表达模块中的关键基因。**结果** 通过加权基因共表达网络分析共建立 27 个以颜色命名的共表达模块,在 Human Protein Atlas 数据库中筛选到 832 个神经组织特异性基因。在蓝色、棕色、蓝绿色以及黄色模块中富集到前脑发育、神经突触组装和功能、神经递质释放过程、轴突发生以及学习和记忆过程相关的 GO 术语。通过基因间相互作用以及基因在孕中期的平均表达量分析,共发现蓝色模块(SLC18A3、TACR3、SYT2)、棕色模块(SSTR5、STX1A、SNAP25、GHSR、SSTR4、GABBR2)、蓝绿色模块(DRD2、SLC32A1、GNG3、OPN4、PENK)以及黄色模块(RAB3A、HCRT、GRM5)中的 17 个关键基因。**结论** 该研究获得了神经系统发育密切相关的并且具有共表达关系的关键基因,可作为潜在的产前诊断中监测神经系统发育的标志物。

关键词:羊水游离 RNA; 神经发育; 诊断标志物; 基因共表达网络

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.01.002 **中图法分类号:**R714.5

文章编号:1673-4130(2022)01-0007-07

文献标志码:A

Analysis of hub genes of neurodevelopment in amniotic fluid cell free RNA*

YANG Shufa, LIU Yan, QIN Lang, YAN Yousheng, YIN Chenghong[△]

Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University/Beijing
Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100026, China

Abstract: Objective To analyze the transcriptome of amniotic fluid cell free RNA (AfcfRNA) in the second trimester of pregnancy, and to screen the hub genes for co-expression in neurodevelopment. **Methods** The gene co-expression network module of AfcfRNA transcriptome was established by gene co-expression network analysis. The neural specific genes of the co-expression modules were screened, and the specific co-expression module of the nervous system was established. The hub genes in the neural tissue-specific co-expression module were screened by gene interactions. **Results** A total of 27 co-expression modules named by colors were established through weighted gene co-expression network analysis, and 832 neural tissue-specific genes were screened in the Human Protein Atlas database. GO terms related to forebrain development, neurosynaptic assembly and function, neurotransmitter release process, axogenesis, learning and memory process were enriched in blue, brown, blue-green and yellow modules. Through the analysis of gene interactions and the average expression of genes in the second trimester, a total of 17 hub genes were found in the blue module (SLC18A3, TACR3 and SYT2), the brown module (SSTR5, STX1A, SNAP25, GHSR, SSTR4 and GABBR2), the blue-green module (DRD2, SLC32A1, GNG3, OPN4 and PENK) and the yellow module (RAB3A, HCRT and GRM5). **Conclusion** This study has obtained the hub genes closely related to the development of nervous system and co-expression relationship, which can be used as a potential marker for monitoring nervous system development in prenatal diagnosis.

Key words: amniotic fluid cell free RNA; neurodevelopment; prognostic marker; gene co-expression network

* 基金项目:国家重点研发计划(2016YFC1000101)。

作者简介:杨树法,男,副主任技师,主要从事遗传病实验室诊断方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: yinhh@ccmu.edu.cn。

本文引用格式:杨树法,刘妍,秦朗,等.羊水游离 RNA 中神经发育关键基因分析[J].国际检验医学杂志,2022,43(1):7-13.

Rett 综合征、胼胝体发育异常、孤独症以及多动症等神经发育障碍是常见的先天出生缺陷,严重影响患儿及其家庭生活质量,给社会带来了沉重的经济负担^[1-4]。产前诊断是预防神经发育障碍出生缺陷的主要手段。随着分子生物学技术的发展,荧光原位杂交技术、荧光定量 PCR、芯片检测以及二代测序等技术陆续应用于产前诊断,更多类型的染色体微缺失/重复、点突变等基因组变异信息被检出。基因组变异与临床表型间的复杂联系,使得高通量检测报告的临床解读面临巨大挑战,以美国医学遗传学和基因组学学会为代表的多种专业委员会建立了多种遗传变异的评价系统^[5-6],将突变分为致病性、可疑致病性、致病性未明、可疑良性以及良性等。这些评价系统多以儿童和成人的临床资料为基础发展而来。与出生后可以广泛获取患儿临床资料相比,在产前诊断中可获取的胎儿临床信息极其有限;B 超作为最大的获取源,可获取的胎儿资料远远少于成人;另外,实验室检查和物理诊断资料基本缺失。这些都导致了在产前诊断中基因组变异的临床解读更具有挑战性。产前诊断中,存在 1%~2% 的致病性未明突变^[7],因此,获取更多胎儿发育信息,协助判定胎儿发育情况,成为产前诊断中亟待解决的问题。羊水是产前诊断中最易获取的胎儿附属物,先前研究表明,羊水游离 RNA(AfcfRNA)包含与胎儿多种组织发育相关的基因表达信息^[8-10]。但是,AfcfRNA 中基因来源于胎儿多个组织,加之神经系统发育涉及多个过程,这都加大了从 AfcfRNA 中获取神经系统发育信息的难度。因此,本研究分析了孕中期正常 AfcfRNA 转录组,结合基因共表达网络分析和组织特异性基因分析,试图从 AfcfRNA 转录组中提取神经系统发育相关的关键基因,为 AfcfRNA 转录组在产前诊断中应用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以孕中期正常胎儿的羊水为研究对象,从 Gene Expression Omnibus 数据库中下载正常胎儿 AfcfRNA 的芯片检测结果。纳入标准:(1)核型分析结果正常;(2)单胎妊娠;(3)羊水采集时间为孕中期(孕 13~27 周);(4)检测平台为 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 芯片。排除标准:(1)染色体核型结果异常;(2)胎儿 B 超检查结果异常。按照纳入标准和排除标准分别从 GSE101141^[11]、GSE16176^[12]、GSE25634^[13]、GSE33168^[14]、GSE47394^[15]、GSE48521^[16]、GSE49893^[17] 及 GSE58435^[18] 中获取 56 例孕中期 AfcfRNA 转录组的检测结果。

1.2 方法

1.2.1 神经组织特异性基因的定义 正常组织的基因表达量数据来源于 Human Protein Atlas 数据

库^[19],下载基因表达数据表(https://www.protein-atlas.org/download/rna_tissue_consensus.tsv.zip)到本地。统计该数据库所包括的组织 and 基因种类,将基因在神经组织中的表达量高于该基因在所有组织中表达量均值的 10 倍以上者,定义为神经组织特异性基因。

1.2.2 共表达网络分析 使用 Oligo v1.54.1 软件包读取芯片原始结果,并对结果进行背景校正、归一化,获取基因表达量数据^[20]。Oligo 是用于分析寡核苷酸芯片的软件包,可用于处理 Affymetrix 和 NimbleGen 芯片结果。批次效应^[21]的去除借助 SVA 包,SVA 包通过确定和建立代理变量去除高通量数据中的批间差异和其他无关变异。利用加权基因共表达网络分析(WGCNA)软件包^[22]进行基因共表达网络分析,软阈值设为 12,最小类的数量设为 25。筛选得到的基因共表达模块用颜色表示。

1.2.3 基因功能富集分析 编写 R 脚本从共表达模块中选取神经组织特异性基因,建立神经组织特异的共表达模块,利用 ClusterProfiler 软件包分别对每个神经组织特异共表达模块中的基因进行 GO(gene ontology)功能富集分析^[23],ClusterProfiler 软件包可以对基因和基因集进行多种功能富集分析(GO、KEGG 及 GSEA 等)。用 Benjamini-Hochberg 方法对 P 值进行调整,以调整的 P 值(P_{adj}) <0.05 为差异有统计学意义。

1.2.4 蛋白共表达网络分析 共表达模块中的关键基因的筛选,以从 STRING 数据库(<https://string-db-static.org/download/protein.links.v11.0/9606.protein.links.v11.0.txt.gz>)下载的蛋白间相互作用数据为基础^[24],编写 R 语言脚本,建立基因间相互作用关系,将结合力设为 900,统计每个基因的连接度。连接度为基因间相互作用的表示形式,连接度越高表示基因与其他基因存在更多的相互作用关系,其所处的位置越关键,研究中将连接度大于 15(即与 15 个以上的基因存在蛋白间相互作用)的基因作为关键基因。

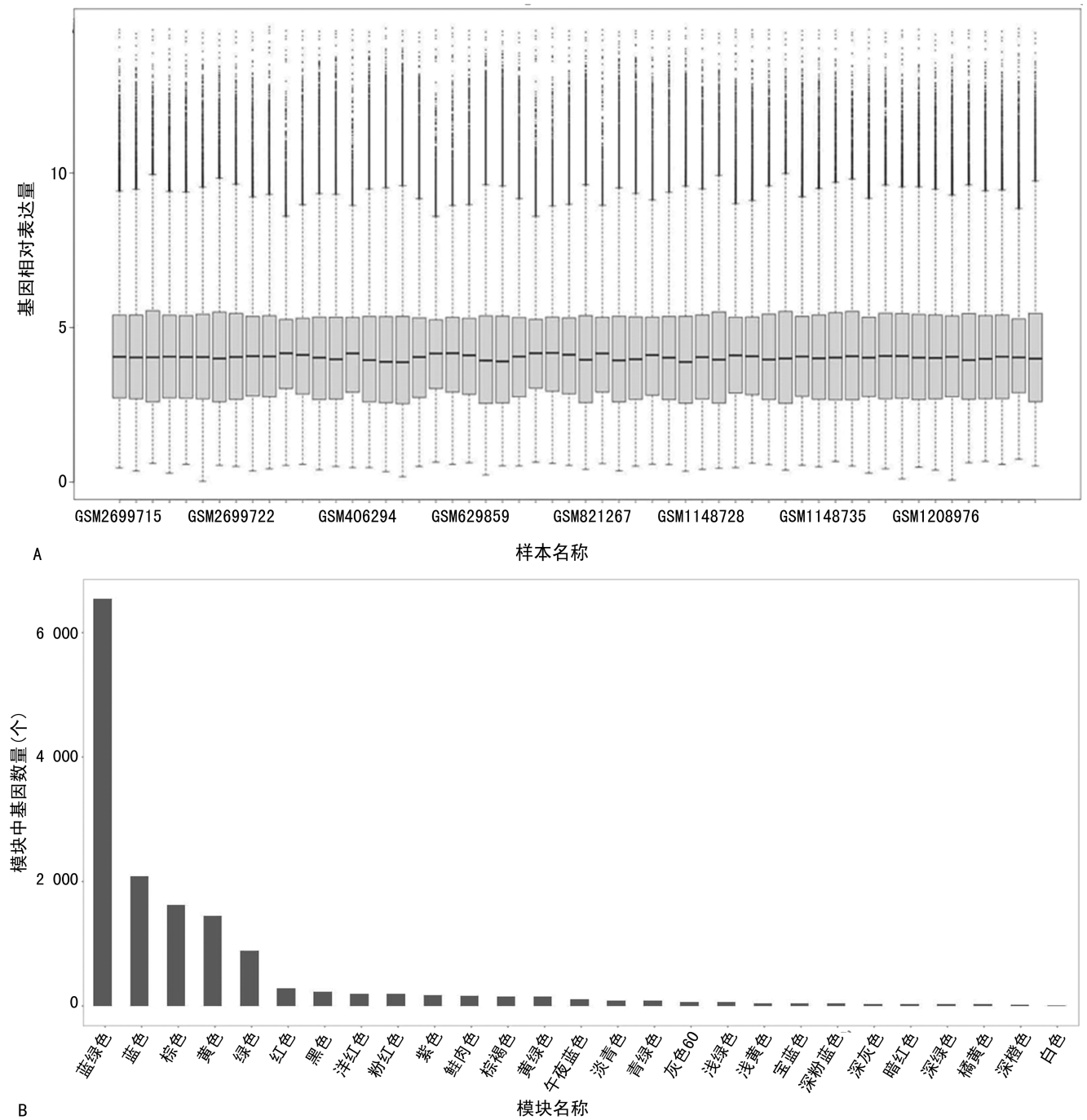
1.3 数据分析软件环境 数据的分析和处理借助 R 语言完成。基因不同命名系统间的转换使用 HGU133Plus2.db 软件包,HGU133Plus2.db 是对 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 进行注释的软件包,包含了探针和不同基因命名系统间的对应关系。蛋白间相互作用数据的制图使用 Igraph 软件包,Igraph 软件具有对网络进行分析和可视化的功能。其他数据绘图借用 Ggplot2 软件包,Ggplot2 是基于图形绘制语法而设计的用于将数据可

视觉化的软件。变异系数(CV) = 正常 AfcfRNA 基因表达量的标准差/正常 AfcfRNA 基因表达量的均值×100%。

2 结果

2.1 正常 AfcfRNA 中基因共表达模块建立 研究中共使用 56 例孕中期 AfcfRNA 芯片检测结果, 芯片检测结果经背景校正、归一化和去除批次效应后, 不同样本间具有相似的均值和标准差, 样本间具有可比性(图 1A)。利用 WGCNA 建立检测基因的共表达关

系, 利用动态树形剪切算法共建立 27 个共表达模块, 模块名称用颜色表示(蓝绿色、蓝色、棕色、黄色、绿色、红色、黑色、洋红色、粉红色、紫色、鲑肉色、棕褐色、黄绿色、午夜蓝色、淡青色、青绿色、灰色 60、浅绿色、浅黄色、宝蓝色、深粉蓝色、深灰色、暗红色、深绿色、橘黄色、深橙色、白色), 各共表达模块中基因的数量如图 1B 所示。不具有共表达关系的基因分类到灰色模块中。

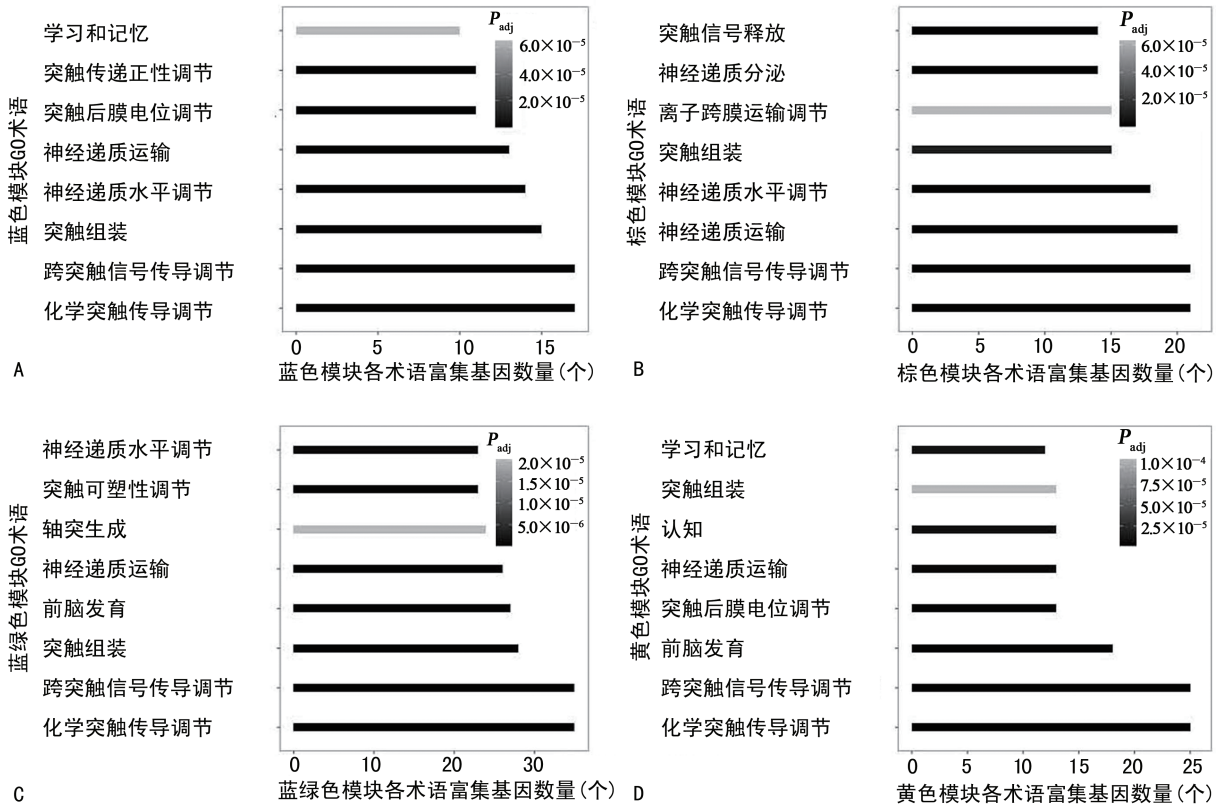


注:A 表示 56 例 AfcfRNA 芯片检测结果背景校正、归一化和批次校正结果;B 表示各共表达模块中基因数量。

图 1 正常 AfcfRNA 基因共表达模块的建立

2.2 神经组织特异性基因共表达模块的功能富集分析 Human Protein Atlas 数据库中神经系统组织包括大脑皮质、胼胝体、海马结构、下丘脑、杏仁核、中脑、嗅觉区、垂体、脑桥和延髓、脊髓、基底神经节、黑质、丘脑以及小脑等组织。利用表达量高于整体表达量 10 倍的标准,共筛选得到 832 个神经组织特异性基因。分别将 27 个共表达模块中的基因与 832 个神经组织特异性基因取交集,获取神经组织特异基因的

共表达模块。在获取神经组织特异性共表达模块的基础上,分别对共表达模块中的基因进行 GO 分析。在蓝色、棕色、蓝绿色以及黄色模块中集中富集到神经功能相关的 GO 术语(GO term),见图 2。这些术语涉及前脑发育、神经突触组装和功能、神经递质释放过程、轴突发生以及学习和记忆过程等神经系统的多个方面。



注:A、B、C、D 分别为蓝色、棕色、蓝绿色以及黄色模块中神经组织特异性共表达模块内基因的 GO 分析结果;横轴为富集到术语的模块内基因的数量,条图颜色深浅表示 P_{adj} 大小($P_{adj} < 0.05$ 为差异有统计学意义),纵轴为富集到的 GO 术语。

图 2 神经组织特异性共表达模块功能富集分析

2.3 神经组织特异性共表达模块的关键基因 将蓝色、棕色、蓝绿色以及黄色共表达模块内的神经组织特异性基因利用 STRING 数据库,分析他们间的相互作用关系,寻找各个模块中具有高连接度的关键基因。共筛选到 27 个关键基因,分析芯片中各基因表达量均值,计算得到 27 个基因表达量的 P_{25} 为 3.09, CV 的 P_{50} 为 14.09%。将基因表达量均值低于 27 个基因表达量 P_{25} 的关键基因删除,共发现 17 个关键基因,蓝色模块中 3 个(SLC18A3、TACR3、SYT2),棕色模块中 6 个(SSTR5、STX1A、SNAP25、GHSR、SSTR4、GABBR2),蓝绿色模块中 5 个(DRD2、SLC32A1、GNG3、OPN4、PENK),黄色模块中 3 个(RAB3A、HCRT、GRM5)。关键基因的模块来源、连

接度、基因平均表达量及 CV 见表 1。

表 1 关键基因信息统计表

基因	模块来源	连接度	基因表达量均值	CV(%)
SLC18A3	蓝色	20	5.16	9.33
TACR3	蓝色	18	4.17	8.66
SYT2	蓝色	18	3.89	11.13
TRH	蓝色	22	2.85*	12.66
SYT1	蓝色	32	1.86*	17.61
TAC1	蓝色	20	1.39*	26.71
SSTR5	棕色	16	5.80	6.42
STX1A	棕色	32	4.71	10.22
SNAP25	棕色	30	4.69	8.92
GHSR	棕色	18	4.57	6.16

续表 1 关键基因信息统计表

基因	模块来源	连接度	基因表达量均值	CV(%)
SSTR4	棕色	16	4.39	8.38
GABBR2	棕色	20	3.91	11.68
GNG13	棕色	52	2.97*	23.96
DRD2	蓝绿色	24	5.13	6.22
SLC32A1	蓝绿色	18	5.09	8.11
GNG3	蓝绿色	52	4.15	12.15
OPN4	蓝绿色	16	3.60	11.84
PENK	蓝绿色	16	3.52	14.25
CHRM1	蓝绿色	20	3.03*	11.98
HRH3	蓝绿色	16	2.89*	15.57
HTR2C	蓝绿色	22	2.82*	16.84
PMCH	蓝绿色	26	2.76*	15.16
OPRK1	蓝绿色	16	2.31*	13.81
GRM1	蓝绿色	26	1.53*	14.11
RAB3A	黄色	20	4.79	7.19
HCRT	黄色	22	4.45	8.24
GRM5	黄色	26	3.55	15.79

注：* 表示该基因表达量均值小于 27 个基因表达量的 $P_{25}(3.09)$ 。

3 讨论

羊水是产前诊断中最安全且最易获取的胎儿附属物, 先前研究表明羊水中含有来源于胎儿多种组织的 AfcfRNA, 这些基因的变化与胎儿发育密切相关^[8-9], 通过分析 AfcfRNA 中基因变化为监测胎儿发育提供了可能。但是, AfcfRNA 中基因来源和各系统发育过程的复杂性, 极大地增加了从 AfcfRNA 中获取各系统发育信息的难度。与单个基因的变化相比, 基因集的变化更具稳定性, 能够降低单基因变化的噪声污染; 同时组织和器官的发育涉及多种基因的相互和共同作用。WGCNA 基于多个样品表达数据, 通过计算基因间的相关性, 利用剪切算法将具有相同表达模式的基因归为同一表达模块。本课题组利用 WGCNA, 将 AfcfRNA 中的基因分为 27 个具有共表达关系的模块(图 1B), 不具有共表达关系的基因被过滤到灰色模块中。

Human Protein Atlas 数据库中包含了已知基因在正常人体大部分组织的表达量数据。在建立基因间共表达关系模块的基础上, 利用 Human Protein Atlas 数据库筛选并建立了神经组织特异的基因共表达网络^[19]。这些神经组织特异的共表达模块内的基因参与神经系统主要的生物学过程(神经递质传递、神经组织发生、学习和认知等)。这些结果表明, 研究中建立的基因共表达网络与神经系统功能密切相关(图 2)。

STRING 数据库中存储了蛋白-蛋白间相互作用的数据, 利用蛋白-蛋白间相互作用数据可以构建筛查

到的基因的相互作用网络。与其他基因具有更多联系的基因是共表达网络的关键基因, 是该网络功能的集中体现。研究中利用 STRING^[24] 数据库对 WGCNA 建立的网络进行了筛选, 选取了每个网络中的关键基因。在蓝色模块中得到 3 个关键基因(SLC18A3、TACR3、SYT2), 通过基因富集分析发现, 该模块中基因主要与突触后膜电位、神经递质传导以及突触组装的突触功能有关(图 2A)。前人研究表明, SLC18A3 囊泡乙酰胆碱通道, 其缺陷可以导致先天性肌无力综合征^[25]; TACR3 编码速激肽受体 3, 广泛表达于神经系统, 并参与情绪障碍、疼痛、学习和记忆缺陷、神经系统发育等神经生理和病理过程^[26]; SYT2 编码突触结合蛋白, SYT2 的缺陷与突触前先天性肌无力综合征有关^[27], 并且在髓母细胞瘤的发生发展中起关键作用^[28]。

棕色模块有 6 个关键基因(SSTR5、STX1A、SNAP25、GHSR、SSTR4、GABBR2)。其中, SSTR5 和 SSTR4 是生长激素抑素受体, 广泛分布在大脑、下丘脑、外周神经系统、胰腺等多种组织^[29], 是实体瘤潜在的药物作用靶点^[30]; STX1A 编码突触结合蛋白 1A, 与儿童多动症^[31] 有关, JNK2 与 STX1A 间相互作用参与 N-甲基-D-天门冬氨酸诱发的谷氨酸释放^[32]; SNAP25 是汉族人孤独症的候选基因^[33], 参与神经信息传递^[34]; GHSR 是生长激素促分泌素受体, 其甲基化状态与肿瘤的发生密切相关^[35]; GABBR2 是 γ -氨基丁酸受体 2, 参与多种神经递质传递过程。这些基因广泛参与了神经信号传导的多个过程。

在蓝绿色模块中得到 5 个关键基因: DRD2、SLC32A1、GNG3、OPN4、PENK。DRD2 是多巴胺受体, 其多态性与精神疾病和药物依赖密切相关^[36-37]; SLC32A1 是囊泡 γ -氨基丁酸转运体成员, 其可能参与了 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱囊泡释放^[38]; GNG3 是多形性成胶质细胞瘤发生和发展过程中的关键基因^[39-40]; OPN4 是黑素蛋白基因, 其功能与睡眠和清醒有关^[41]; PENK 是脑啡肽原, 其水平降低与亨廷顿氏舞蹈病的症状的严重程度密切相关^[42]。

在黄色模块中得到 3 个关键基因: RAB3A、HCRT、GRM5。RAB3A 是 Ras 样 GTP 酶^[43], 参与激素释放、神经递质释放以及细胞膜循环等多个过程^[44]; HCRT 为下丘脑神经肽前体; GRM5 为谷氨酸受体。这些基因与机体的学习和记忆功能密切相关。

胎儿发育是多个基因协同表达的结果, AfcfRNA 中基因的变化是胎儿发育情况的综合表现。胎儿发育异常会导致 AfcfRNA 中的基因表达量变化, AfcfRNA 中存在能够检测胎儿发育情况的标志物。本课题组认为潜在标志物应具备如下 3 个特点: (1) 组织

特异性表达基因。通过选择特异性基因可以在一定程度上排除其他组织发育对基因表达变化的影响。(2)稳定表达基因。对于芯片检测,该稳定性表现为较高的表达量和较低的 CV;本研究中,基因平均表达量的 P_{25} 为 3.09, CV 的 P_{50} 为 14.09%,笔者使用了 3.09 和 14.09% 分别作为二者的临界值,但这是存在争议的,需要更多的实验证实。(3)起关键作用的基因。这些基因能够同多个基因协同作用,在基因调控和组织发育中起到关键作用,组织的异常发育也经常与关键基因的变化密切相关。基于上面的考虑笔者设计了关键基因的挖掘方法:基因组织特异性分析、基因表达量和变异分析以及共表达网络和关键基因分析。同时要说明的是,研究中使用的 56 例正常羊水标本是指核型分析和 B 超检查正常的标本,绝大部分胎儿为发育正常的胎儿,基于这些标本筛选得到的基因通过文献检索证实与神经系统功能和神经发育异常密切相关,但能否作为检测神经发育异常的标志物尚需要进一步实验验证,这些基因表达的变化可能与这些基因突变有关,也可能由于其他基因的表达异常导致。

综上所述,本研究通过对孕中期 AfcfRNA 转录组进行共表达网络分析和组织特异性分析,获得了神经系统发育密切相关的并且具有共表达关系的关键基因。这些关键基因来源的共表达网络模块与神经系统功能密切相关,其异常与神经系统相关疾病密切相关,可作为潜在的产前诊断中监测神经系统发育异常的标志物。

参考文献

- [1] 张亚南,席惠,贾政军,等.神经发育障碍 420 例遗传病因学分析[J].中华实用儿科临床杂志,2019,34(24):1862-1866.
- [2] 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组. Rett 综合征的临床实践指南[J].中华医学遗传学杂志,2020,37(3):308-312.
- [3] 杨李,王宝田,唐久来,等.神经发育障碍患儿致病性拷贝数变异与临床表型分析[J].中华实用儿科临床杂志,2020,35(6):445-449.
- [4] 王彬彬,杨赛赛,吴庆华.胼胝体发育异常的遗传学研究进展[J].中华妇产科杂志,2020,55(1):62-65.
- [5] RIGGS E R, ANDERSEN E F, CHERRY A M, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)[J]. Genet Med, 2020, 22(2):245-257.
- [6] 黄辉,沈亦平,顾卫红,等.临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(1):1-8.
- [7] WANG J, CHEN L, ZHOU C, et al. Prospective chromosome analysis of 3 429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 219(3):287. e1-287. e18.
- [8] 任建宇,杨树法.羊水游离 RNA 研究进展[J].山东医药,2020,60(29):102-104.
- [9] TARCA A L, ROMERO R, PIQUE-REGI R, et al. Amniotic fluid cell-free transcriptome: a glimpse into fetal development and placental cellular dynamics during normal pregnancy[J]. BMC Med Genomics, 2020, 13(1):25.
- [10] 任建宇,司艳梅,刘欣,等.基于 GEO 数据库的胎儿发育异常时羊水游离 RNA 中组织特异性差异表达基因分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(4):426-429.
- [11] TARUI T, KIM A, FLAKE A, et al. Amniotic fluid transcriptomics reflects novel disease mechanisms in fetuses with myelomeningocele[J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 217(5):587. e1-587. e10.
- [12] SLONIM D K, KOIDE K, JOHNSON K L, et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(23):9425-9429.
- [13] KOIDE K, SLONIM D K, JOHNSON K L, et al. Transcriptomic analysis of cell-free fetal RNA suggests a specific molecular phenotype in trisomy 18[J]. Hum Genet, 2011, 129(3):295-305.
- [14] HUI L, SLONIM D K, WICK H C, et al. The amniotic fluid transcriptome: a source of novel information about human fetal development[J]. Obstet Gynecol, 2012, 119(1):111-118.
- [15] HUI L, WICK H C, MOISE K J, et al. Global gene expression analysis of amniotic fluid cell-free RNA from recipient twins with twin-twin transfusion syndrome[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(9):873-883.
- [16] EDLOW A G, VORA N L, HUI L, et al. Maternal obesity affects fetal neurodevelopmental and metabolic gene expression: a pilot study[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e88661.
- [17] ZWEMER L M, HUI L, WICK H C, et al. RNA-Seq and expression microarray highlight different aspects of the fetal amniotic fluid transcriptome[J]. Prenat Diagn, 2014, 34(10):1006-1014.
- [18] MASSINGHAM L J, JOHNSON K L, SCHOLL T M, et al. Amniotic fluid RNA gene expression profiling provides insights into the phenotype of Turner syndrome[J]. Hum Genet, 2014, 133(9):1075-1082.
- [19] THUL P J, AKESSON L, WIKING M, et al. A subcellular map of the human proteome[J]. Science, 2017, 356(6340):eaal3321.
- [20] CARVALHO B S, IRIZARRY R A. A framework for oli-

- gonucleotide microarray preprocessing[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19):2363-2367.
- [21] LEEK J T, JOHNSON W E, PARKER H S, et al. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(6):882-883.
- [22] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9:559.
- [23] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. Clusterprofiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284-287.
- [24] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D607-D613.
- [25] LAMOND A, BUCKLEY D, O'DEA J, et al. Variants of SLC18A3 leading to congenital myasthenic syndrome in two children with varying presentations[J]. *BMJ Case Rep*, 2021, 14(1):e237799.
- [26] ZHANG W W, WANG Y, CHU Y X. Tacr3/NK3R: beyond their roles in reproduction[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(19):2935-2943.
- [27] MASELLI R A, VAN DER LINDEN H J R, FERNS M. Recessive congenital myasthenic syndrome caused by a homozygous mutation in SYT2 altering a highly conserved C-terminal amino acid sequence[J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(7):1744-1749.
- [28] HUANG P, GUO Y D, ZHANG H W. Identification of hub genes in pediatric medulloblastoma by multiple-microarray analysis[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(4):522-531.
- [29] IONOVICI N, CARSON M, TERZEA D C, et al. Somatostatin receptors in normal and acromegalic somatotroph cells; the U-turn of the clinician to immunohistochemistry report; a review[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2020, 61(2):353-359.
- [30] MAAS M, MAYER L, HENNENLOTTER J, et al. Prognostic impact of somatostatin receptor expression in advanced bladder cancer[J]. *Urol Oncol*, 2020, 38(12):935.e17-935.e28.
- [31] WANG M, GU X, HUANG X, et al. STX1A gene variations contribute to the susceptibility of children attention-deficit/hyperactivity disorder; a case-control association study[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2019, 269(6):689-699.
- [32] MARCELLI S, IANNUZZI F, FICULLE E, et al. The selective disruption of presynaptic JNK2/STX1a interaction reduces NMDA receptor-dependent glutamate release[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):7146.
- [33] WANG Z LI J, ZHANG T, et al. Family-based association study identifies SNAP25 as a susceptibility gene for autism in the Han Chinese population[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 105:109985.
- [34] ALTEN B, ZHOU Q, SHIN O H, et al. Role of aberrant spontaneous neurotransmission in SNAP25-associated encephalopathies[J]. *Neuron*, 2021, 109(1):59-72.
- [35] AMINI M, FOROUGHI K, TALEBI F, et al. GHSR DNA hypermethylation is a new epigenetic biomarker for gastric adenocarcinoma and beyond[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9):15320-15329.
- [36] MASIAK J, CHMIELOWIEC J, CHMIELOWIEC K, et al. DRD4, DRD2, DAT1, and ANKK1 genes polymorphisms in patients with dual diagnosis of polysubstance addictions[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(11):3593.
- [37] SUCHANECKA A, CHMIELOWIEC J, CHMIELOWIEC K, et al. Dopamine receptor DRD2 gene rs1076560, personality traits and anxiety in the polysubstance use disorder[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(5):262.
- [38] SAUNDERS A, GRANGER A J, SABATINI B L. Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons[J]. *Elife*, 2015, 4:e06412.
- [39] CHEN X, PAN Y, YAN M, et al. Identification of potential crucial genes and molecular mechanisms in glioblastoma multiforme by bioinformatics analysis[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2):859-869.
- [40] ZHOU Y M, YANG L, ZHANG X X, et al. Identification of potential biomarkers in glioblastoma through bioinformatic analysis and evaluating their prognostic value[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019(4):1-13.
- [41] LEE S I, HIDA A, KITAMURA S, et al. Association between the melanopsin gene polymorphism OPN4 * Ile394Thr and sleep/wake timing in Japanese university students[J]. *J Physiol Anthropol*, 2014, 33(1):9.
- [42] NIEMELA V, LANDTBLOM A M, NYHOLM D, et al. Proenkephalin decreases in cerebrospinal fluid with symptom progression of Huntington's disease[J]. *Mov Disord*, 2021, 36(2):481-491.
- [43] WU W, ZHENG X, WANG J, et al. O-GlcNAcylation on Rab3A attenuates its effects on mitochondrial oxidative phosphorylation and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):970.
- [44] DOLCE L G, OHBAYASHI N, SILVA D, et al. Unveiling the interaction between the molecular motor myosin Vc and the small GTPase Rab3A[J]. *J Proteomics*, 2020, 212:103549.