

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.10.015

论著 · 临床研究

## EZH2 对先天性巨结肠结肠组织中 GFR $\alpha$ 1 表达的影响

赵凡 周崇高 许光 马体栋 夏仁鹏 李碧香

(湖南省儿童医院新生儿外科, 湖南长沙 410007)

**[摘要]** **目的** 通过检测先天性巨结肠(HSCR)患儿结肠组织内胶质细胞源性神经营养因子受体 $\alpha$ 1(GFR $\alpha$ 1)及果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2(EZH2)的表达水平,探讨 EZH2 在调控 GFR $\alpha$ 1 基因表达及 HSCR 发病过程中的作用。**方法** 随机选取 24 例行巨结肠根治术的 HSCR 患儿,取痉挛段结肠组织为试验组。以同期 18 例因新生儿坏死性小肠结肠炎而接受手术治疗的患儿,取手术切除的坏死结肠组织作为对照组。利用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测两组结肠组织内 GFR $\alpha$ 1、EZH2 的表达水平。将人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 分为 EZH2 过表达组和阴性对照组, EZH2 过表达组转染 pCMV6-EZH2 质粒,阴性对照组转染 pCMV6 质粒,检测转染后细胞中 GFR $\alpha$ 1、EZH2 的表达水平。**结果** 与对照组相比,试验组 GFR $\alpha$ 1 及 EZH2 mRNA 和蛋白的表达水平降低( $P<0.05$ ),且 EZH2 蛋白表达水平与 GFR $\alpha$ 1 蛋白呈正相关( $r=0.606$ ,  $P=0.002$ )。与阴性对照组相比, EZH2 过表达组 EZH2 及 GFR $\alpha$ 1 表达水平明显上调( $P<0.05$ )。**结论** HSCR 患儿结肠组织中 EZH2 低表达可能是 GFR $\alpha$ 1 表达不足,诱发 HSCR 的原因之一。 [中国当代儿科杂志, 2019, 21(10): 1033-1037]

**[关键词]** 先天性巨结肠; 胶质细胞源性神经营养因子受体 $\alpha$ 1; 果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2; 儿童

### Effect of enhancer of zeste homolog 2 on the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor $\alpha$ -1 in the colon tissue of children with Hirschsprung's disease

ZHAO Fan, ZHOU Chong-Gao, XU Guang, MA Ti-Dong, XIA Ren-Peng, LI Bi-Xiang. Department of Neonatal Surgery, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Li B-X, Email: xinshengerke2@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the expression levels of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ -1 (GFR $\alpha$ 1) and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in the intestinal tissue of children with Hirschsprung's disease (HSCR), as well as the role of EZH2 in the regulation of GFR $\alpha$ 1 gene expression and the pathogenesis of HSCR. **Methods** The samples of colon tissue with spasm from 24 children with HSCR after radical treatment of HSCR were selected as the experimental group, and the samples of necrotized colon tissue from 18 children with neonatal necrotizing enterocolitis after surgical resection were selected as the control group. Real-time PCR and Western blot were used to measure the expression levels of GFR $\alpha$ 1 and EZH2 in colon tissue in both groups. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were divided into an EZH2 over-expression group and a negative control group. The cells in the EZH2 over-expression group were transfected with pCMV6-EZH2 plasmid, and those in the negative control group were transfected with pCMV6 plasmid. The expression levels of EZH2 and GFR $\alpha$ 1 were measured after transfection. **Results** Compared with the control group, the experimental group had significant reductions in the mRNA and protein expression levels of GFR $\alpha$ 1 and EZH2 in colon tissue ( $P<0.05$ ), and the protein expression of EZH2 was positively correlated with that of GFR $\alpha$ 1 ( $r=0.606$ ,  $P=0.002$ ). Compared with the negative control group, the EZH2 over-expression group had significant increases in the expression levels of EZH2 and GFR $\alpha$ 1 after SH-SY5Y cells were transfected with EZH2 over-expression plasmid ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Low expression of EZH2 in the colon tissue of children with HSCR may be one of the causes of inadequate expression of GFR $\alpha$ 1 and onset of HSCR. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(10): 1033-1037]

**Key words:** Hirschsprung's disease; Glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ 1; Enhancer of zeste homolog 2; Child

[收稿日期] 2019-06-05; [接受日期] 2019-08-13

[作者简介] 赵凡, 男, 硕士研究生, 主治医师。

[通信作者] 李碧香, 女, 主任医师, 教授。Email: xinshengerke2@sina.com。

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 是最常见的先天性消化道发育畸形之一。其主要特征是肠神经嵴细胞 (enteric neural crest cell, ENCCs) 在胚胎发育过程中未能侵入、增殖和向下迁移到后肠, 导致结肠黏膜下层和肌肉层中神经节细胞缺乏, 肠管持续痉挛, 粪便淤滞于近端结肠, 继而引起近端结肠肥厚、扩张<sup>[1-3]</sup>。

近年来有研究发现, HSCR 患儿病变结肠组织中胶质细胞源性神经生长因子受体  $\alpha 1$  (glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha 1$ , GFR $\alpha 1$ ) 表达水平显著低于正常结肠组织<sup>[4]</sup>。小鼠模型中敲除 GFR $\alpha 1$  基因后, 新生小鼠出现巨结肠类似症状, 如腹部肿胀、恶病质及呆滞等; 尸体解剖发现, 从回肠远端到中结肠之间有明显的肠扩张<sup>[5]</sup>。可见, GFR $\alpha 1$  表达缺陷是 HSCR 发生的重要原因, 但其分子机制不明。

果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2), 是组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸 (H3K27) 的特异性甲基化转移酶, 通过催化靶基因组蛋白 H3K27 三甲基化 (H3K27me3) 修饰介导其表达沉默<sup>[6-8]</sup>。EZH2 敲除小鼠出现颅颌面软骨形成缺陷、神经嵴发育及迁移障碍, 其肠神经系统中神经节细胞数量也显著减少<sup>[9-12]</sup>。但 HSCR 患儿是否存在 EZH2 表达缺陷目前未见报道。EZH2 与 GFR $\alpha 1$  表达缺陷都会导致巨结肠类似症状的出现, 那么 EZH2 与 GFR $\alpha 1$  之间是否存在调控关系, HSCR 患儿 GFR $\alpha 1$  表达不足是否与 EZH2 低表达有关? 本研究拟通过比较 HSCR 患儿病变结肠组织与新生儿坏死性小肠结肠炎 (neonatal necrotizing enterocolitis, NEC) 患儿结肠组织中 EZH2、GFR $\alpha 1$  表达水平, 及在 SH-SY5Y 神经细胞中过表达 EZH2 后检测 GFR $\alpha 1$  表达变化, 初步证实 EZH2 对 GFR $\alpha 1$  表达的调控作用, 为 HSCR 患儿无神经节结肠组织中 GFR $\alpha 1$  的表达异常提供新的分子机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2016 年 3 月至 2018 年 6 月我院新生儿外科确诊的 24 例 HSCR 患儿为研究对象, 所有患儿均行巨结肠根治术, 取痉挛段结肠组织为试验组。选择同期 18 例确诊为 NEC 而接受手术治疗的患儿, 术中切除坏死结肠组织为对照组。两组一般情况差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 1。

表 1 两组患儿的一般情况比较

组别	例数	性别 (男/女, 例)	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 月)	体重 ( $\bar{x} \pm s$ , kg)	身高 ( $\bar{x} \pm s$ , cm)
对照组	18	13/5	45 $\pm$ 23	4.8 $\pm$ 1.2	58 $\pm$ 4
试验组	24	17/7	48 $\pm$ 20	4.5 $\pm$ 0.9	56 $\pm$ 3
$t/\chi^2$ 值		0.010	0.482	-0.944	-1.412
P 值		0.920	0.632	0.351	0.166

所有采集的新鲜样本在手术处理后立即冷冻, 然后在  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。本研究经湖南省儿童医院伦理委员会审查并批准 (HCHLL-2016-22), 患儿家属均知情同意并签字。

### 1.2 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达

将组织块直接放入研钵中, 加入少量液氮并迅速研磨, 待组织变软, 再次加入液氮后研磨, 重复 3 次。然后将粉碎后组织按每 100 mg 加入 1 mL Trizol (Invitrogen, CA, USA), 转移入离心管并置于冰上, 用电动匀浆器充分匀浆 1~2 min。以  $4^\circ\text{C}$ 、12000 rpm 离心 5 min, 弃沉淀后按每毫升 Trizol 加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿, 振荡 15 s 混匀后室温放置 10 min。后续按常规 Trizol 法抽提取 RNA。使用 SuperScript II reverse transcriptase 试剂盒 (Invitrogen) 将 RNA 逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green 荧光染料法进行实时荧光定量 PCR (ABI Prism 7500, CA, USA), 引物序列见表 2。以人 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因为内参照, 比较 CT 值法 ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法) 测定目的基因的相对表达量。

表 2 实时荧光定量 PCR 的引物序列

基因	上游引物	下游引物	产物长度 (bp)
GFR $\alpha 1$	5'-ACAGGTCGGCGTACATCAC-3'	5'-TTGGGCTTCTCCCTCTCTT-3'	217
EZH2	5'-GACGGCTTCCCAATAACAG-3'	5'-ATTGAGGCTTCAGCACCCAC-3'	250
GAPDH	5'-AAGAGCTACGAGCTGCCTGA-3'	5'-ATGGCCGACGGATGAG-3'	212

注: [GFR $\alpha 1$ ] 胶质细胞源性神经生长因子受体  $\alpha 1$ ; [EZH2] 果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2; [GAPDH] 人 3-磷酸甘油醛脱氢酶。

### 1.3 Western blot 检测蛋白表达

将 100 mg 组织块用干净剪刀尽量剪碎，剪碎后组织置于 2 mL 玻璃匀浆器中，并加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液（强）（碧云天）300 μL，置于冰上进行匀浆。裂解 30 min 后，将裂解液移至 1.5 mL 离心管中，4℃、12000 rpm 离心 5 min，上清分装后置于 -20℃ 保存备用。每个样本取 30 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，电转印法将蛋白从凝胶上转移到 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶作为封闭液室温封闭转印膜 1 h，加入一抗 anti-GFRα1、anti-EZH2 及 anti-GAPDH 抗体（Cell Signaling Technology, MA, USA），4℃ 孵育过夜，1×TBST 洗膜后加入二抗，室温孵育 1 h 后显影。用 ImageJ 分析软件分析显影结果。每组至少包含 3 个平行样本。

### 1.4 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 培养、分组及处理

SH-SY5Y 细胞置于高糖 DMEM 培养基中（含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL、10% FBS），在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。收获对数生长期细胞，并调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup>/mL，细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中继续培养。接种细胞分成 2 组，即 EZH2 过表达组和阴性对照组，每组包含 3 个平行孔。细胞生长达 50%~60% 融合度时，使用 TransFast™ Transfection Reagent（Promega, MI, USA）进行质粒转染。EZH2 过表达组转染 pCMV6-EZH2 质粒，阴性对照组转染 pCMV6 质粒。转染 72 h 后收集细胞，分别抽提总 RNA 及总蛋白并检测。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间比较采用独立样本 *t* 检验；二变量相关分析采用 Pearson 法。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组结肠组织样本中 GFRα1 的表达水平差异

试验组 GFRα1 mRNA 表达水平较对照组降低 ( $0.38 \pm 0.17$  vs  $0.97 \pm 0.36$ ,  $t=-6.397$ ,  $P=0.005$ )；试验组 GFRα1 蛋白表达水平较对照组降低

( $0.55 \pm 0.14$  vs  $0.99 \pm 0.16$ ,  $t=-9.505$ ,  $P=0.003$ )。见图 1。

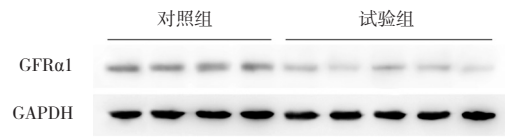


图1 两组结肠组织样本中 GFRα1 蛋白表达的 Western blot 条带图 试验组 GFRα1 蛋白表达水平低于对照组。

### 2.2 两组结肠组织样本中 EZH2 表达水平差异

试验组 EZH2 mRNA 表达水平较对照组降低 ( $0.22 \pm 0.08$  vs  $1.29 \pm 0.38$ ,  $t=-11.293$ ,  $P<0.001$ )。试验组 EZH2 蛋白表达水平较对照组降低 ( $0.28 \pm 0.13$  vs  $0.76 \pm 0.09$ ,  $t=-12.968$ ,  $P<0.001$ )，见图 2。且 EZH2 蛋白与 GFRα1 蛋白表达水平呈正相关 ( $r=0.606$ ,  $P=0.002$ )，见图 3。

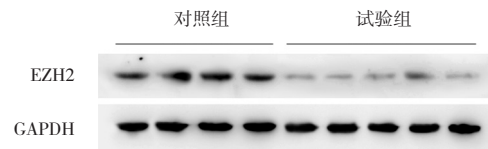


图2 两组结肠组织样本中 EZH2 蛋白表达的 Western blot 条带图 试验组 EZH2 蛋白表达水平低于对照组。

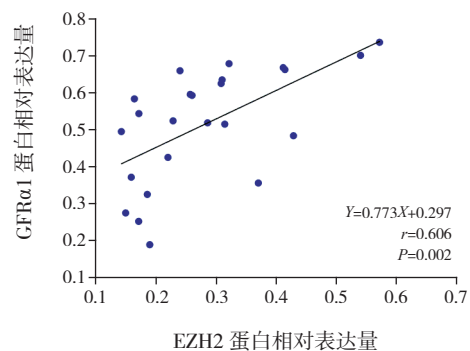


图3 HSCR 患儿病变结肠组织中 EZH2 蛋白与 GFRα1 蛋白表达水平相关性分析

### 2.3 SH-SY5Y 细胞中过表达 EZH2 对 GFRα1 表达的影响

EZH2 过表达组 EZH2、GFRα1 mRNA 和蛋白水平较阴性对照组上调 ( $P<0.05$ )，见表 3、图 4。

表 3 EZH2 过表达组和阴性对照组 EZH2 及 GFR $\alpha$ 1 mRNA 和蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	EZH2		GFR $\alpha$ 1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
阴性对照组	0.990 $\pm$ 0.010	0.44 $\pm$ 0.10	1.02 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.05
EZH2 过表达组	14.300 $\pm$ 1.054	1.00 $\pm$ 0.17	2.41 $\pm$ 0.44	1.11 $\pm$ 0.12
<i>t</i> 值	-21.880	-5.046	-5.333	-5.825
<i>P</i> 值	0.002	0.007	0.006	0.004

注: [EZH2] 果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2; [GFR $\alpha$ 1] 胶质细胞源性神经营养因子受体  $\alpha$ 1。

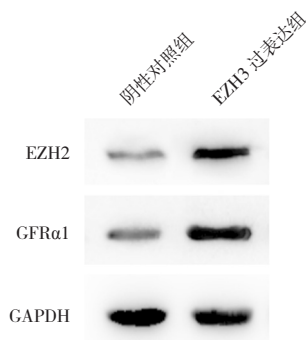


图 4 转染 SH-SY5Y 细胞后 EZH2 及 GFR $\alpha$ 1 蛋白表达的 Western blot 条带图 EZH2 过表达组 EZH2、GFR $\alpha$ 1 蛋白水平高于阴性对照组。

### 3 讨论

胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 及其受体 GFR $\alpha$ 1 和酪氨酸蛋白激酶受体 RET 信号通路是调节 ENCCs 在肠道内发育形成肠神经系统过程中最为关键的因子, 与 HSCR 的发生发展密切相关<sup>[13-15]</sup>。GDNF 能特异性地与 GFR $\alpha$ 1 结合, 然后与 RET 结合形成复合物, 介导 RET 磷酸化, 进而激活 RET 信号通路, 导致一系列胞内途径的激活, 从而发挥 GDNF 神经营养因子的生理功能<sup>[16-19]</sup>。GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET 信号通路缺失是 HSCR 发生的重要原因, 其中 HSCR 患儿 GDNF 及 RET 的表达缺失与其基因突变密切相关<sup>[1]</sup>。约 50% 的家族性 HSCR 及 15%~20% 的散发性 HSCR 发生 RET 基因突变。HSCR 患儿中已检测到约 90 种 RET 基因突变, 包括错义突变、同义突变、小片段插入和缺失。这些突变散在分布于整个基因编码区域, 大部分均影响 RET 蛋白功能<sup>[20-22]</sup>。HSCR 患儿中 GDNF 基因突变率为 0.9%~5.5%, 可单独出现也可与 RET 基因突变并存。

目前已检测到的 GDNF 基因突变有 P21S、R93W、D150N、T154S、I211M, 其中 P21S 位于信号肽水解部位, 其余均位于蛋白功能域。但尚无确切证据证实单纯 GDNF 基因突变会导致 HSCR 发生<sup>[23]</sup>。通过对 HSCR 患儿 GFR $\alpha$ 1 基因进行检测, 并未发现该基因存在突变<sup>[4,24]</sup>。因此, HSCR 患儿 GFR $\alpha$ 1 表达缺失的原因一直未明。本研究发现, HSCR 患儿病变结肠组织中 EZH2 和 GFR $\alpha$ 1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著低于对照组, 且二者蛋白表达水平呈正相关, 即 EZH2 表达越低, GFR $\alpha$ 1 表达缺失越严重。在人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中过表达 EZH2 后能显著上调 GFR $\alpha$ 1 表达。以上结果说明在神经细胞中, EZH2 可能是调节 GFR $\alpha$ 1 表达的重要因子, HSCR 患儿病变结肠组织中 GFR $\alpha$ 1 表达不足, 可能与 EZH2 低表达有关。本研究为 HSCR 患儿 GFR $\alpha$ 1 表达不足提供了一定的解释。

近年来, 越来越多的研究关注到 EZH2 是神经嵴细胞的发育及迁移过程中重要的调节因子<sup>[9]</sup>。EZH2 敲除小鼠出现肠神经系统中神经节细胞的缺乏<sup>[12]</sup>, 但无直接证据显示 HSCR 患儿病变结肠组织中存在 EZH2 表达不足, 而本研究有力的证实了这点。虽然明确了 HSCR 患儿存在 EZH2 表达不足, 但其参与 HSCR 发病的分子机制目前不明。转录因子 Pax3、Zic1、Sox10 是神经嵴细胞生长必不可少的编码转录因子<sup>[25-27]</sup>。在神经系统的发育中, Pax3 和 Zic1 确定神经板的边界, 而 Sox10 能维持神经嵴细胞的多功能性。此外, Sox10 与 Pax3 能相互协作, 激活 RET 转录。但 Pax3、Zic1、Sox10 的异常表达也会引起神经系统的发育异常。有报道发现, 在神经嵴细胞发育后期 Pax3 的异常表达会导致小鼠出现腭裂和成骨异常, 在神经嵴细胞迁移过程中 Zic1 的表达受到抑制。在人类患者和小鼠模型中均发现 Sox10 的异常表达与肠神经节细胞减少有关<sup>[12,27]</sup>。小鼠胚胎发育过程中 EZH2 能上调 Pax3、Zic1、Sox10 基因的启动子区组蛋白 H3K27me3, 抑制其表达。EZH2 敲除小鼠肠道 Pax3、Zic1、Sox10 基因表达显著升高, 神经节细胞数量明显减少<sup>[12]</sup>。以上研究为 EZH2 低表达参与 HSCR 发病的分子机制提供了一定解释。本研究通过证实 EZH2 是 GFR $\alpha$ 1 表达的重要调节因子, 为 HSCR 患儿 GFR $\alpha$ 1 表达不足提供了解释, 也进一步完善了 EZH2 低表达参与 HSCR 发病的分子机制。

鉴于 EZH2 的直接效应是催化组蛋白 H3K27 甲基化, 进而抑制基因转录, 因此, 我们推测 EZH2 是通过下调 GFR $\alpha$ 1 表达相关抑制因子的表达, 进而间接上调 GFR $\alpha$ 1 表达。但 EZH2 直接靶向的 GFR $\alpha$ 1 表达相关抑制因子是什么目前未知, 这也是本研究目前的不足之处。后续我们会通过生物信息学软件对 GFR $\alpha$ 1 启动子进行转录因子结合位点分析, 并与 EZH2 靶基因结果进行交叉分析, 以期找出 EZH2 靶向的 GFR $\alpha$ 1 表达抑制因子, 进一步完善本文提出的 HSCR 新的发病分子机制。

综上所述, 结肠组织中低表达 EZH2 可能是引起 GFR $\alpha$ 1 表达不足, 诱发 HSCR 的重要原因。本研究丰富了 HSCR 的病因学, 为 HSCR 治疗提供了新的功能位点。

#### [参 考 文 献]

- [1] Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review[J]. *J Med Genet*, 2008, 45(1): 1-14.
- [2] Alves MM, Sribudiani Y, Brouwer RW, et al. Contribution of rare and common variants determine complex diseases - Hirschsprung disease as a model[J]. *Dev Biol*, 2013, 382(1): 320-329.
- [3] 甄亚琴, 徐纪荣. 先天性巨结肠的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2015, 22(34): 21-24.
- [4] Lui VC, Samy ET, Sham MH, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors are abnormally expressed in aganglionic bowel of a subpopulation of patients with Hirschsprung's disease[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(6): 703-712.
- [5] Porokuokka LL, Virtanen HT, Lindén J, et al. Gfra1 underexpression causes Hirschsprung's disease and associated enterocolitis in mice[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(3): 655-678.
- [6] Chen J, Zhang YC, Huang C, et al. m<sup>6</sup>A regulates neurogenesis and neuronal development by modulating histone methyltransferase Ezh2[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2019, 17(2): 154-168.
- [7] Wever I, Wagemans CMRJ, Smidt MP. EZH2 is essential for fate determination in the mammalian isthmic area[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 76.
- [8] Zhou J, Huang S, Wang Z, et al. Targeting EZH2 histone methyltransferase activity alleviates experimental intestinal inflammation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2427.
- [9] Schwarz D, Varum S, Zemke M, et al. Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation[J]. *Development*, 2014, 141(4): 867-877.
- [10] Tien CL, Jones A, Wang H, et al. Snail2/Slug cooperates with Polycomb repressive complex 2 (PRC2) to regulate neural crest development[J]. *Development*, 2015, 142(4): 722-731.
- [11] Minoux M, Holwerda S, Vitobello A, et al. Gene bivalency at Polycomb domains regulates cranial neural crest positional identity[J]. *Science*, 2017, 355(6332): pii: eaal2913.
- [12] Kim H, Langohr IM, Faisal M, et al. Ablation of Ezh2 in neural crest cells leads to aberrant enteric nervous system development in mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203391.
- [13] Mwizerwa O, Das P, Nagy N, et al. Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(6): 1402-1411.
- [14] Schriemer D, Sribudiani Y, IJpma A, et al. Regulators of gene expression in Enteric Neural Crest Cells are putative Hirschsprung disease genes[J]. *Dev Biol*, 2016, 416(1): 255-265.
- [15] Lai FP, Lau ST, Wong JK, et al. Correction of Hirschsprung-associated mutations in human induced pluripotent stem cells via clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9, restores neural crest cell function[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(1): 139-153. e8.
- [16] Goodman KM, Kjør S, Beuron F, et al. RET recognition of GDNF-GFR $\alpha$ 1 ligand by a composite binding site promotes membrane-proximal self-association[J]. *Cell Rep*, 2014, 8(6): 1894-1904.
- [17] Meka DP, Müller-Rischart AK, Nidadavolu P, et al. Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 1873-1885.
- [18] Wei R, Qiu X, Wang S, et al. NEDL2 is an essential regulator of enteric neural development and GDNF/Ret signaling[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 578-586.
- [19] 邢晓滨, 张卓伯, 潘春联, 等. GDNF 对神经干细胞增殖、分化的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(33): 6583-6586.
- [20] Wu W, Lu L, Xu W, et al. Whole exome sequencing identifies a novel pathogenic RET variant in Hirschsprung disease[J]. *Front Genet*, 2019, 9: 752.
- [21] Yang D, Yang J, Li S, et al. Effects of RET, NRG1 and NRG3 polymorphisms in a Chinese population with Hirschsprung disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43222.
- [22] Kawano T, Hosomichi K, Inoue I, et al. Identification of a novel variant of the RET proto-oncogene in a novel family with Hirschsprung's disease[J]. *Pediatr Surg Int*, 2017, 33(10): 1041-1046.
- [23] Borghini S, Bocciardi R, Bonardi G, et al. Hirschsprung associated GDNF mutations do not prevent RET activation[J]. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10(3): 183-187.
- [24] Angrist M, Jing S, Bolk S, et al. Human GFRA1: cloning, mapping, genomic structure, and evaluation as a candidate gene for Hirschsprung disease susceptibility[J]. *Genomics*, 1998, 48(3): 354-362.
- [25] Xu M, Li Y, Du J, et al. PAX3 promotes cell migration and CXCR4 gene expression in neural crest cells[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(1): 1-8.
- [26] Sun Rhodes LS, Merzdorf CS. The zic1 gene is expressed in chick somites but not in migratory neural crest[J]. *Gene Expr Patterns*, 2006, 6(5): 539-545.
- [27] Sham MH, Lui VC, Fu M, et al. SOX10 is abnormally expressed in aganglionic bowel of Hirschsprung's disease infants[J]. *Gut*, 2001, 49(2): 220-226.

( 本文编辑: 王颖 )