

## 先天性巨结肠的易感基因及表观遗传调控的研究进展

王泰垚<sup>1</sup>, 郑丽飞<sup>2\*</sup>

首都医科大学 基础医学院 1. 2019级五年制眼视光医学系; 2. 生理学与病理生理学系, 北京 100069

**摘要:**先天性巨结肠(HSCR)是一种由神经嵴细胞衍生的肠神经系统发育障碍性疾病,相关基因异常编码会影响神经嵴细胞在消化道中的迁移、增殖、分化或存活,导致远端肠无神经节细胞症。神经嵴细胞和周围环境的调节涉及各种基因、信号通路、转录因子和表观遗传机制。因此,肠神经系统发育过程中相关基因的突变或基因表达的变化可能参与先天性巨结肠的发病过程。本文综述了参与肠神经系统发育的相关机制,总结了主要的先天性巨结肠相关基因和表观遗传模式,如RET、EDNRB、DNA甲基化等促进神经嵴病变的发展。本文总结了迄今为止先天性巨结肠发病原因的主要机制,为先天性巨结肠相关的研究提供了理论依据,为先天性巨结肠疾病的防治提供了新策略。

**关键词:**先天性巨结肠;肠神经系统;表观遗传学

中图分类号:R333 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.04.0700

## Advance in susceptibility genes and epigenetic regulation in Hirschsprung's disease

WANG Taiyao<sup>1</sup>, ZHENG Lifei<sup>2\*</sup>

1. Department of Grade 2019 Five-year Ophthalmology of Basic Medical College; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, Basic Medical College, Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract:** Hirschsprung's disease(HSCR) is a disease resulted from abnormal enteric nervous system development. The abnormal coding of related genes may affect the migration, proliferation, differentiation or survival of neural crest cells in digestive tract and then result in distal intestinal aganglionosis. The regulation of neural crest cells and surrounding environment involves various genes, signal pathways, transcription factors and epigenetic mechanisms. Therefore, the mutation of related genes and the change of gene expression during the development of intestinal nervous system may be related to the pathogenesis of Hirschsprung's disease. This article reviews the relevant mechanisms involved in the development of enteric nervous system, and summarizes the main genes and epigenetic patterns related to Hirschsprung's disease, such as RET, EDNRB and DNA methylation, which can affect the development of neural crest disease. The review also summarizes the main pathogenesis of Hirschsprung's disease, providing a theoretical basis for the study of Hirschsprung's disease and recommends a new strategy for the prevention and treatment of Hirschsprung's disease.

**Key words:** Hirschsprung's disease; enteric nervous system; epigenetics

收稿日期:2021-11-01 修回日期:2022-04-15

基金项目:北京市自然科学基金(5172006);首都医科大学2021年度第二课堂项目(D2KT2021037)

\*通信作者(corresponding author):13581582937@163.com

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HSCR)是一种神经嵴疾病,其特征是远端肠道肌层和黏膜下层不同程度的肠神经节缺失,导致受累节段肠痉挛性收缩,其近端肠出现扩张和肠梗阻。人的肠道是由内胚层和内脏间充质发育形成的,内胚层形成内层的黏膜,内脏间质分化为肌层。同时,来自神经管迷走神经区的神经嵴细胞(neural crest cell)迁移、增殖并分化为神经元和胶质细胞,并在肌间区域共同形成肌间神经丛,即肠神经系统(enteric nervous system)。肠神经系统在发育过程中,神经嵴细胞必须适应不断变化的肠道环境,而肠道环境的变化可能会严重影响到它们的命运。肠神经系统的发育过程受到严格的调控,造成神经节缺乏的原因是由于肠神经系统祖细胞未能在肠道内正常迁移、增殖和分化引起的。

先天性巨结肠发病率为1/5 000,遗传背景复杂,80%的病例为散发型,其余为家族性遗传。70%的患者仅仅表现出巨结肠扩张这一单一病征,而有12%的患者伴有染色体异常,其中大多数为唐氏综合征。除唐氏综合征外,先天性巨结肠还与多种先天异常和综合征相关,综合征型的先天性巨结肠表现为孟德尔遗传模式,而非综合征型的先天性巨结肠并不表现出孟德尔遗传模式,具有较低的性别依赖外显率和可变表达。这表明先天性巨结肠是一种多基因遗传病,有多个低外显率的基因参与其中,而且越多的先天性巨结肠相关基因发生突变,其表型越严重,比如巨结肠扩张的肠段更长。根据无神经节细胞的肠段长度,患者可分为3种解剖类型:短段型先天性巨结肠(short Hirschsprung's disease, S-HSCR;占80%的病例),长段型先天性巨结肠(long Hirschsprung's disease, L-HSCR;占病例总数的15%~20%)和全结肠无神经节细胞症(total colonic aganglionosis, TCA;占病例总数的5%以下)。

## 1 先天性巨结肠的易感基因

目前已知至少有20个基因与先天性巨结肠的发病机制有关,包括RET基因重排、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、GDNF家族受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$ )、NRTN、EDNRB、EDN3、PHOX2B、SOX10等。这些基因编码的蛋白包括受体、配体和转录因子。

### 1.1 RET 基因

编码酪氨酸激酶受体的RET基因是主要的先天性巨结肠致病基因,其表达对肠神经节的发育至关重要。RET基因编码一个酪氨酸激酶跨膜受体,其在肠道神经嵴细胞中的表达依赖于转录因子SOX10和PHOX2B,其中任何一个因子的缺失都会导致肠神经节缺如。RET蛋白有一个大的胞外结构域,一个跨膜区域和一个胞内激酶结构域。它是一种信号传导受体,有4种配体,即GDNF、NRTN(neurturin)、ARTN(artemin)和PSPN(persephin)。这些配体通过与各自糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的GDNF受体家族(GFR $\alpha 1-4$ )结合来激活RET,形成配体-辅受体复合物,与RET结合并诱导其胞内结构域酪氨酸残基的二聚化和自身磷酸化。这些酪氨酸残基作为信号蛋白的对接位点,可刺激多个下游信号途径,包括RAS/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径、JNK途径、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K-AKT)途径、JAK-STAT途径、ERK和PKC途径,以维持细胞的生存、增殖和分化<sup>[1]</sup>。

RET的另一个作用是调节细胞凋亡。当配体存在时,RET产生正性控制信号(刺激)维持细胞的发育和生存,而当配体缺失时,RET产生负性控制信号(抑制),细胞发生凋亡。GDNF的存在可抑制这种凋亡作用。GDNF蛋白为二聚体的形式,是GPI锚定的共受体GFR- $\alpha$ 的配体,这种复合物与RET结合,调控参与和支持肠神经系统神经元迁移、增殖、分化和存活信号成分。GDNF是肠神经嵴细胞的趋化信号,当肠神经嵴细胞的迁移波前峰到达食管时,GDNF在胃中表达,当肠神经嵴细胞接近远端小肠时,GDNF在盲肠中再次表达。这表明GDNF可将表达RET和GFR $\alpha$ 的肠神经嵴细胞吸引到正确的位置<sup>[2]</sup>。因此,当这些编码基因中的任何一个基因发生突变,导致RET-GFR $\alpha 1$ -GDNF复合物的缺失时,就会发生肠神经节缺如<sup>[3]</sup>。功能测试显示,GDNF或GFR- $\alpha$ 的缺失会降低或消除RET/GDNF信号<sup>[1]</sup>。免疫病理检查结果显示GDNF存在于肌间神经丛和黏膜下神经丛的神经节中。在神经节减少节段GDNF表达减少,而在神经节缺如肠段未检测到GDNF<sup>[4]</sup>,进一步证实GDNF在先天性巨结肠发病过程中发挥了重要作用。总而言之,先天

性巨结肠最主要致病基因 RET 编码一个酪氨酸激酶跨膜受体,是一种信号传导分子,其介导的下游效应可维持神经嵴细胞的生存、增殖和分化,并且具有趋化作用。因而该通路的任何一个基因表达发生改变,将影响神经嵴细胞的进一步增殖分化,都会影响肠神经系统发育,造成肠神经节缺如,导致先天性巨结肠的发生。

最新的研究又提出了新的发病机制:当 RET 基因拷贝数减少到一半时,一种激活 RET 的突变体 RET(C618F)会导致肠道无神经节细胞增多症,这与目前的共识不同,即肠道无神经节细胞增多症是由失活的 RET 突变引起的<sup>[5]</sup>。RET 编码序列(coding sequence, CDS)突变占家族性病例的 50%,占散发病例的 15%~20%,这表明先天性巨结肠的发病还存在其他致病因素<sup>[6]</sup>。

### 1.2 内皮素受体 B 基因

内皮素受体 B(endothelin receptor B, EDNRB)基因编码 7 次跨膜螺旋蛋白,即 G 蛋白耦联受体,有 7 个跨膜结构域。细胞外和跨膜区域参与配体结合,而细胞内区域参与由 G 蛋白介导的细胞内信号通路。内皮素 3(endothelin 3, EDN3)是 EDNRB 的配体,内皮素转换酶 1(endothelin convert enzyme 1, ECE1)将无活性的 EDN3 前体转化为有活性形式。EDNRB/EDN3 信号参与了肠神经嵴细胞的迁移,EDNRB 由迁移的肠神经嵴细胞表达,而 EDN3 在中肠和后肠中胚层表达。约 5% 的先天性巨结肠患者会出现 EDNRB、EDN3 和 ECE1 突变。EDN3 突变小鼠的无神经节细胞区域层黏连蛋白水平升高,可能为内皮素受体 B 通路调节神经嵴细胞迁移的分子机制<sup>[7]</sup>。此外也有研究发现 EDNRB/EDN3 信号在肠神经系统发育过程中发挥作用,EDN3 激活 EDNRB 可诱导肠神经嵴细胞增殖,维持其前体状态,防止过早出现分化<sup>[8]</sup>。由此可见,EDNRB 基因主要介导肠神经嵴细胞的正确迁移和防止其过早分化,并且该基因异常主要引起短段型先天性巨结肠。此外,部分信号素蛋白基因和神经调节蛋白-1(neuregulin 1, NRG1)基因也与先天性巨结肠相关。

### 1.3 信号素基因

信号素(semaphorin)是一类跨膜蛋白或 GPI 锚定蛋白,分为不同的类和亚类,其主要受体是丛状蛋白家族受体。丛状蛋白引起丛状蛋白相关酪氨酸激

酶的激活,可抑制整合素介导的细胞黏附及其下游信号通路。信号素是一种在神经回路的形成中发挥作用的蛋白,可抑制细胞运动,从而干扰肠神经嵴细胞的迁移。信号素 3C(SEMA3C)和 3D(SEMA3D)是分泌型糖蛋白,参与轴突引导和丛状蛋白/神经纤毛蛋白介导的神经元迁移。研究显示 SEMA3C 和 SEMA3D 中罕见的有害变体在先天性巨结肠个体中更为频繁,Ret 和 Sema3c/d 功能丧失对模型系统中神经节缺如具有协同作用<sup>[9]</sup>。在肠神经系统中,信号素蛋白 3A(SEMA3A)为肠间充质细胞分泌的排斥信号,阻碍小鼠骶肠神经前体细胞进入远端后肠。研究指出,信号素蛋白 3A 限制了肠道神经元的轴突延伸和突触形成,发现了先天性巨结肠患者突触蛋白 1 的表达与信号素 3A 的表达水平呈负相关<sup>[10]</sup>。综上所述,信号素这一类蛋白分别参与神经元迁移、增殖、存活、轴突延伸以及突触形成。信号素的表达异常可能是引起先天性巨结肠的危险因素之一。

### 1.4 神经调节蛋白-1 基因

神经调节蛋白-1(NRG1)对有髓和无髓神经施万细胞(神经嵴细胞衍生物)的发育以及髓鞘形成过程至关重要,参与调节神经的增殖和分化。NRG1 也通过与 ErbB 酪氨酸激酶受体结合和相互作用在神经嵴细胞存活和分化中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。NRG1 还作为上游早期信号分子在 mRNA 和蛋白质水平调节黏附分子 L1 表达,L1 作为免疫球蛋白超家族成员,主要表达于分化中的神经元轴突及生长锥,参与神经细胞迁移、存活,以及轴突形成。<sup>[12]</sup>在 NRG1 rs7835688 杂合子存在的情况下,RET rs2435357 风险基因型(TT)增加 2.3 倍至 19.53<sup>[13]</sup>,统计数据表明 NRG1 通路的失调可导致人类先天性巨结肠,并且患先天性巨结肠的外显率可能受到 RET 位点变异的影响。神经调节蛋白-1 不仅影响神经胶质细胞发育、迁移以及髓鞘和轴突形成,并且与 RET 之间存在相互作用,通过多重机制影响先天性巨结肠的发展。

### 1.5 SOX10 基因

SOX10 通过调节肠道神经嵴细胞前体的 NRG1 受体 ErbB3 的表达,对肠神经嵴细胞分化起决定性作用。与 NRG1 类似,SOX10 对于形成和维持发育后期胶质细胞的特性(包括成年人的肠神经系统)

非常重要<sup>[14]</sup>,并且在先天性巨结肠患者的无神经节细胞肠段中观察到 SOX10 的异常表达<sup>[15]</sup>。SOX10 是否与上述人类肠道中 NRG1 的作用有关,以及它们是否能够解释无神经节细胞肠段特征性细胞外基质的异常需要进一步研究。

## 2 表观遗传机制

除了发生先天性巨结肠相关基因的变化,在不改变 DNA 序列的情况下,引起基因表达变化的机制称为表观遗传学,它通过不同的机制调节基因表达,包括胞嘧啶碱基上的 DNA 甲基化和调控非编码 RNA 表达等方式。

### 2.1 DNA 甲基化和去甲基化

DNA 甲基化是在 DNA 链上添加甲基。该过程由甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化进行,并招募甲基结合蛋白,例如 MeCP2。表观遗传通过改变基因组的甲基化程度来调节基因表达、X 染色体失活、基因组转录和基因组稳定性。因此, DNMT 和 MeCP2 对于正常哺乳动物的发育至关重要。DNA 的高甲基化会使基因沉默,而低甲基化则增加转录水平。一些甲基转移酶会建立初始 DNA 甲基化模式(如 DNMT1),而另一些甲基转移酶在细胞子代中维持 DNA 甲基化(如 DNMT2 和 DNMT3)。MeCP2 蛋白是甲基化结合蛋白家族中的主要成员,通过与甲基化 DNA 的特异性结合,抑制其下游靶基因的转录,起到转录调节的作用,是重要的转录抑制因子。因此, DNMT 和 MeCP2 通过参与调控神经发生基因的 DNA 甲基化水平来调节肠神经系统的发育。这表明异常甲基化模式可能导致先天性巨结肠相关基因表达增加或减少,造成肠神经系统发育异常,部分神经节缺失而形成先天性巨结肠。

在胚胎干细胞中, DNMT3B 基因敲除会导致早期神经嵴分化以及神经嵴特异性基因的上调。DNMT3B 在先天性巨结肠发病中的作用已得到证实, DNMT3B 在先天性巨结肠患者的神经嵴细胞中的下调与整体 DNA 甲基化水平的降低有关<sup>[16]</sup>。此外, DNMT3B 和其他先天性巨结肠相关基因突变对先天性巨结肠患者表型的出现具有协同效应<sup>[17]</sup>。表观遗传的改变会导致基因表达模式的改变,并通过激活 P53 和 P21 阻止神经嵴细胞的细胞周期。

因此, DNMT3B 是先天性巨结肠的易感基因, DNA 甲基化在肠神经系统的发育和先天性巨结肠发病中起关键作用。很多研究表明,许多先天性巨结肠易感基因的表达水平异常增加或降低可能在肠神经系统发育和先天性巨结肠发病中起作用,其中包括 RET、GFRA4、EDNRB、SHH、PHOX2B<sup>[16]</sup>。DNA 甲基化水平升高会导致促进肠神经系统增殖、分化和发育的相关基因表达水平降低,或者甲基化水平降低促进凋亡相关基因表达增加均可造成肠神经系统发育异常,而导致先天性巨结肠。

### 2.2 非编码 RNA

有几类非编码 RNA(ncRNA)在调节许多细胞发育过程中起着关键作用,如小 RNA(miRNAs)、长链非编码 RNA(lncRNAs)和环状 RNA(circRNAs)。特别是高度保守的 miRNA,通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区互补结合,通过转录后机制抑制基因表达<sup>[18]</sup>。lncRNAs 被定义为长度超过 200 bp 且不编码蛋白质的 RNA 转录本。非编码 RNA 通过表观遗传机制(染色质重塑、转录和转录后处理)在基因表达中发挥重要的调节作用,决定多种细胞迁移、增殖、分化和凋亡过程<sup>[19]</sup>。circRNA 通过特定的剪接方法形成共价闭合的连续环结构,充当转录调节器或解除 miRNA 的作用<sup>[20]</sup>。

miRNA、lncRNA 和 circRNA 在先天性巨结肠组织中的差异表达,造成其靶基因的异常表达,进而导致神经嵴细胞在发育过程中迁移、增殖和/或凋亡过程发生改变<sup>[21-23]</sup>,表明这些 RNA 与先天性巨结肠的发病过程密切相关。非编码 RNA 在细胞中的潜在作用已经通过使用各种细胞系(如 293T 和 SH-SY5Y)的体外方法进行了分析。目前有大量证据表明 ncRNA 与先天性巨结肠之间存在关系,但这些 ncRNA 在疾病发病中的作用仍需进一步阐明。

## 3 问题与展望

综上所述,相关易感基因中 RET 基因是最主要的先天性巨结肠致病基因。内皮素受体 B 和信号素蛋白参与肠神经嵴细胞迁移、增殖和分化,影响肠神经系统发育。神经调节蛋白-1 能够与 RET 相互作用、影响神经胶质细胞的发育、迁移、参与髓鞘和轴突的形成等不同机制引起先天性巨结肠的形成。现有研究表明,补充外源性 GDNF,能够增加远端结

肠神经元和神经胶质细胞数量,并且结肠运动显著增加,而上皮通透性、肌肉厚度和中性粒细胞密度显著降低<sup>[24]</sup>。根据该研究,补充 GDNF 可以作为治疗先天性巨结肠的方法之一。SOX10 可影响肠神经系统的形成及维持。这些致病相关基因可以作为先天性巨结肠疾病的诊断位点,在临床中进行产前诊断。SOX10 影响肠神经系统是否与神经调节蛋白-1 相互作用有关,以及这些基因是否能够解释无神经节细胞肠段特征性细胞外基质的异常仍需要进一步的研究。

表观遗传机制是在先天性巨结肠易感基因本身并未发生改变的情况下,其表达发生改变而致巨结肠的发生。现已确定了 DNMT3B 在先天性巨

结肠形成中的作用, DNMT3B 敲除会造成 DNA 整体甲基化水平降低,并与先天性巨结肠相关基因突变呈协同作用。除了先天性巨结肠相关基因的表达异常,编码某些 miRNA 基因的甲基化水平改变也在先天性巨结肠发展中起重要作用。另外,非编码 RNA 包括 miRNA、lncRNA 和 circRNA 目前已通过细胞系在体外研究表明与先天性巨结肠的发生相关,但其在先天性巨结肠形成过程中的具体作用机制仍待进一步阐明。由于非编码 RNA 在患者的组织和血液样本中稳定存在且易于测量,所以研究出的相关非编码 RNA 可能会用作诊断 HSCR 患者的潜在生物标志物和/或分子治疗靶点。

## 参考文献:

- [1] Nagy N, Guyer RA, Hotta R, *et al.* RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas [J]. *Development*, 2020, 147: dev190900. doi: 10.1242/dev.190900.
- [2] Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, *et al.* GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells[J]. *Dev Biol*, 2001, 229: 503-516.
- [3] Widowati T, Melhem S, Patria SY, *et al.* RET and EDNRB mutation screening in patients with Hirschsprung disease: functional studies and its implications for genetic counseling[J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24: 823-829.
- [4] Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease[J]. *Transl Res*, 2013, 162: 1-15.
- [5] 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: ENEURO. doi: 10.1523/ENEURO.0534-20.2021.
- [6] Garcia-Barcelo MM, Tang CS, Ngan ES, *et al.* Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 2694-2699.
- [7] Fu M, Barlow-Anacker AJ, Kuruvilla KP, *et al.* 37/67-laminin receptor facilitates neural crest cell migration during enteric nervous system development[J]. *FASEB*, 2020, 34: 10931-10947.
- [8] Lake JI, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305: G1-G24. doi: 10.1152/ajpgi.00452.2012.
- [9] Jiang Q, Arnold S, Heanue T, *et al.* Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96: 581-596.
- [10] Gonzales J, Le Berre-Scoul C, Dariel A, *et al.* Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity and is inversely associated with synapsin 1 expression in Hirschsprung disease[J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 15119. doi: 10.1038/s41598-020-71865-3.
- [11] Jiang M, Li C, Cao G, *et al.* Effects of NRG1 Polymorphisms on Hirschsprung's Disease Susceptibility: A Meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 9913. doi: 10.1038/s41598-017-10477-w.
- [12] 赵炜疆. 神经调节因子 Neuregulin-1 (Nrg1) 调节 U87-MG 细胞的黏附分子 L1 表达及促迁移作用[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33: 829-833.
- [13] Le TL, Galmiche L, Levy J, *et al.* Dysregulation of the NRG1/ERBB pathway causes a developmental disorder with gastrointestinal dysmotility in humans

- [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131: e145837. doi: 10.1172/JCI145837.
- [14] Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, *et al.* Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells [J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 237-250.
- [15] Sham MH, Lui VC, Fu M, *et al.* SOX10 is abnormally expressed in aganglionic bowel of Hirschsprung's disease infants? [J]. *Gut*, 2001, 49: 220-226.
- [16] Torroglosa A, Villalba-Benito L, Luzón-Toro B, *et al.* Epigenetic mechanisms in Hirschsprung disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3123. doi: 10.3390/ijms20133123.
- [17] Torroglosa A, Enguix-Riego MV, Fernández RM, *et al.* Involvement of DNMT3B in the pathogenesis of Hirschsprung disease and its possible role as a regulator of neurogenesis in the human enteric nervous system [J]. *Genet Med*, 2014, 16: 703-710.
- [18] Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 599-612.
- [19] Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics [J]. *Biol Proced Online*, 2014, 16: 11. doi: 10.1186/1480-9222-16-11.
- [20] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495: 384-388.
- [21] Du C, Shen Z, Zang R, *et al.* Negative feedback circuitry between MIR143HG and RBM24 in Hirschsprung disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862: 2127-2136.
- [22] Gunadi, Budi NYP, Kalim AS, *et al.* Aberrant expressions of miRNA-206 target, FN1, in multifactorial Hirschsprung disease [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14: 5. doi: 10.1186/s13023-018-0973-5.
- [23] Li Y, Zhou L, Lu C, *et al.* Long non-coding RNA FAL1 functions as a ceRNA to antagonize the effect of miR-637 on the down-regulation of AKT1 in Hirschsprung's disease [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51: e12489. doi: 10.1111/cpr.12489.
- [24] 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: 1824-1838.e17.