

视网膜母细胞瘤基因表达谱的生物信息学分析

陈靖¹, 许诺^{1,2}, 崔乙³, 牟宁⁴, 简天明², 吉玲⁴

引用: 陈靖, 许诺, 崔乙, 等. 视网膜母细胞瘤基因表达谱的生物信息学分析. 国际眼科杂志 2023; 23(3): 449-455

基金项目: 福建省自然科学基金 (No. 2021J01360); 福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目 (No. 2020GGB003); 福建省卫生健康青年科研课题 (No. 2020QNA002); 福建医科大学启航基金 (No. 2019QH1149); 天津市视网膜功能与疾病重点实验室自主与开放课题 (No. 2021tjswmm003)

作者单位: ¹(350001) 中国福建省福州市, 福建省立医院 福建医科大学省立临床医学院; ²(300384) 中国天津市, 天津医科大学眼科医院眼眶病与眼肿瘤科; ³(350001) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院眼科; ⁴(221000) 中国江苏省徐州市, 徐州医科大学附属医院眼科

作者简介: 陈靖, 毕业于首都医科大学, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 屈光近视矫正与眼肿瘤。

通讯作者: 吉玲, 毕业于徐州医科大学, 本科, 副主任医师, 研究方向: 眼睑整形、泪道、眼眶病的诊治. 13952269365@126.com

收稿日期: 2022-07-29 修回日期: 2023-02-15

摘要

目的: 通过生物信息学方法探寻促进视网膜母细胞瘤发生的关键基因与分子标记。

方法: 检索 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库中的视网膜母细胞瘤表达谱芯片对肿瘤组织与正常视网膜组织的差异基因进行 GO 与 KEGG 聚类分析, 构建蛋白-蛋白相互作用网络并筛选关键节点, 利用受试者工作曲线 (ROC) 评估临床诊断效能。应用 qRT-PCR 在正常 RPE 细胞系与视网膜母细胞瘤细胞系中验证枢纽基因的 RNA 表达情况

结果: 在视网膜母细胞瘤数据集 GSE97508 与 GSE110811 中获得二者差异表达基因的交集共 121 个, KEGG 分析显示差异基因富集于光传导通路、细胞周期与 p53 通路上, PPI 网络筛选并与上述两个数据集中差异最大的 30 个基因取交集得到 MCM6、DTL、UBE2T、TOP2A、NUSAP1、CENPK、RRM2、RLBP1、RHO 共 9 个关键基因。在独立验证数据集 GSE24673 中确认以上 9 个基因的表达差异。利用 ROC 曲线发现 UBE2T、RRM2 与 RHO 的 AUC \geq 80% 且具有统计学意义 ($P > 0.05$)。在视网膜母细胞瘤细胞系中确认 UBE2T 与 RRM2 的 mRNA 水平均显著高于对照 ARPE-19 细胞系, 而 RHO 的 mRNA 水平显著低于对照 ARPE-19 细胞系。

结论: 本研究筛选发现 UBE2T、RRM2 与 RHO 是视网膜母细胞瘤发生的关键基因, 可能成为视网膜母细胞瘤的潜在治疗靶点。

关键词: 视网膜母细胞瘤; 转录组; 生物信息学

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.20

Bioinformatics analysis of gene expression profiles of retinoblastoma

Jing Chen¹, Nuo Xu^{1,2}, Yi Cui³, Ning Mou⁴, Tian-Ming Jian², Ling Ji⁴

Foundation items: Natural Science Foundation of Fujian (No. 2021J01360); Health and Talent Training Project of Fujian (No. 2020GGB003); Health Youth Scientific Research Project of Fujian (No. 2020QNA002); The Startup Fund for Scientific Research of Fujian Medical University (No. 2019QH1149); Open Project of Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases (No. 2021tjswmm003)

¹Fujian Provincial Hospital; Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China;

²Department of Orbital Diseases and Eye Neoplasm, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China; ³Department of Ophthalmology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ling Ji. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. 13952269365@126.com

Received: 2022-07-29 Accepted: 2023-02-15

Abstract

• **AIM:** To explore the key genes and molecular markers involved in the retinoblastoma development through bioinformatics.

• **METHODS:** The mRNA microarray datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database were obtained, and the differentially expressed gene (DEG) between retinoblastoma cell lines and normal retinal pigment epithelial (RPE) cell lines were analyzed through gene ontology (GO) and KEGG enrichment analysis. To screen key genes, establish protein-protein interaction (PPI) network, and use receiver operating characteristic (ROC) curve to assess clinical diagnostic efficacy. The RNA expressions of key genes in retinoblastoma cell lines and normal RPE cell lines were compared by qRT-PCR.

• **RESULTS:** A total of 121 DEGs were obtained from the retinoblastoma dataset of GSE97508 and GSE110811. KEGG pathway analysis showed that DEG were enriched in phototransduction, cell cycle, and p53 signaling pathways. A total of 9 key genes, including MCM6, DTL, UBE2T, TOP2A, NUSAP1, CENPK, RRM2, RLBP1, and RHO, were obtained from the intersection of PPI network analysis and the top 30 DEG from each dataset. The differentially expressed 9 key genes were verified in

GSE24673. ROC analysis showed that the area under the curve (AUC) for UBE2T, RRM2, and RHO was $\geq 80\%$, and there was a statistical significance ($P > 0.05$). The mRNA level of UBE2T and RRM2 in retinoblastoma was significantly higher than ARPE-19 cell line, while the mRNA level of RHO was significantly lower than that of ARPE-19 cell line.

• **CONCLUSION:** UBE2T, RRM2, and RHO may be served as potential molecular markers and potential therapeutic targets for retinoblastoma.

• **KEYWORDS:** retinoblastoma; transcriptome; bioinformatics

Citation: Chen J, Xu N, Cui Y, et al. Bioinformatics analysis of gene expression profiles of retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(3):449-455

0 引言

视网膜母细胞瘤是一种婴幼儿最常见的眼内发育性恶性肿瘤^[1-3]。随着临床医生对视网膜母细胞瘤认识的逐渐深入,在不影响生存率的前提下出现了全身静脉、眼动脉化学治疗,局部激光凝治疗、玻璃体腔化疗、冷冻治疗、巩膜敷贴外放射治疗、经瞳孔温热治疗等保眼与保视力的治疗方式^[4]。然而,尽管视网膜母细胞瘤在发达国家的生存率大于95%,但在中低收入国家由于诊断不及时等原因其总体生存率仅为25%~65%^[5]。因此深入了解视网膜母细胞瘤发生发展的关键分子,寻找患者早期诊断与治疗新靶点仍具有重要的基础与临床意义。

随着基因芯片的转录组数据与生物信息学分析算法的发展,学者们可以利用全世界范围内的高通量数据进行整合分析并筛选出差异表达的基因,并能够提供更敏感和更特异的靶点来预测肿瘤预后并辅助治疗。然而目前基于公共数据库中视网膜母细胞瘤数据进行诊断与治疗靶点筛选的研究报道较为稀缺。因此本研究拟通过生物信息学方法对视网膜母细胞瘤患者与正常视网膜的转录组芯片数据进行挖掘并筛选出候选关键基因,并在视网膜母细胞瘤细胞系中进行表达水平验证,为进一步明确视网膜母细胞瘤的发病机制提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 材料 从 Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库下载基因芯片 GSE97508 与 GSE110811。数据集 GSE97508 于 2017-04 提交并于 2018-08 更新。该数据集所用实验平台为 Affymetrix 公司提供的人类基因表达芯片平台 GPL15207, 总共包含 9 个样本,其中 3 例为正常成年人视网膜组织,6 例为视网膜母细胞瘤组织。数据集 GSE110811 于 2018-02 提交并于 2019-05 更新。该数据集所用实验平台为 Affymetrix 公司提供的人类基因转录检测 2.0 ST 平台 GPL16686, 总共包含 34 个样本,其中 3 例为正常成年人视网膜组织,3 例为良性视网膜细胞瘤组织,28 例为视网膜母细胞瘤组织。

1.2 方法

1.2.1 数据预处理与差异表达基因的获取 使用 R 语言中的 affy 软件包读取基因表达芯片数据 (CEL 格式数据),处理成表达矩阵,用 RMA (robust multi-array average)

算法对数据进行归一化处理,用 Sva 包 ComBat 函数校正批次效应,并利用各自平台注释文件进行探针注释,去除未匹配的基因探针信息。进一步使用 limma 软件包对 GSE97508 与 GSE110811 中视网膜母细胞瘤肿瘤样本和正常视网膜样本进行差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 分析。选取 $|\text{Log}_2(\text{Fold Change})| > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 作为筛选 DEG 的标准。将以上两个数据集获取的 DEG 取交集得到本研究的目标 DEG。

1.2.2 DEG 的功能富集分析 使用在线分析工具包括 DAVID, KEGG 对 DEG 进行生物学功能与通路分析并用 R 进行可视化。DAVID 是一个用于功能注释和集成发现基因所代表的生物学意义的在线数据库^[6]。KEGG 是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库,本研究使用 KEGG 的 PATHWAY 数据库整合当前 DEG 涉及的通路信息^[7]。基因本体论 (gene ontology, GO) 分析包括细胞组分 (cellular component, CC),用于描述基因产物在细胞中的位置;分子功能 (molecular function, MF),用于描述单个基因产物的功能;生物学过程 (biological process, BP),用于描述具有多个步骤的有序的生物过程。以 $P < 0.05$ 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) 阈值设置在 < 0.01 。

1.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络与子网络模块分析获取枢纽基因 使用在线分析工具 STRING (<http://string-db.org>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建^[8]。为进一步获得 PPI 中的枢纽基因,使用 Cytoscape 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 中的 CytoHubba 与 Molecular Complex Detection (MCODE) 两个插件筛选枢纽基因^[9]。MCODE 模块用以发现 PPI 网络中紧密联系的基因,参数设置:网络分数阈值:2;节点分数阈值:0.2;K-score:2;最大深度:100。CytoHubba 采用 11 种拓扑分析方法对 PPI 网络数据节点进行排名以推测在基因调控,细胞路径和信号转导中的枢纽基因。本研究采用 Degree 法纳入值 ≥ 10 的基因。

1.2.4 验证枢纽基因及诊断效能评估 本研究纳入一个独立的验证数据集 GSE24673 对筛选到的枢纽基因进行验证。数据集 GSE24673 于 2010-10 提交并于 2019-08 更新,所用实验平台为 Affymetrix 公司提供的人类基因转录检测 1.0 ST 平台 GPL6244, 总共包含 11 个样本,其中 2 例为正常成年人视网膜组织,9 例为视网膜母细胞瘤组织。并在 GSE110811 中采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线从基因表达量与诊断效能方面验证枢纽基因。采用 ROC 曲线下的面积 (area under ROC curve, AUC) 作为判断诊断效能的评价指标。

1.2.5 细胞培养 本研究采用视网膜母细胞瘤细胞系 Y79、Weri-Rb1 与 HXO-Rb44,对照细胞系采用人 RPE 细胞系 ARPE-19。Y79、Weri-Rb1 与 HXO-Rb44 细胞系采用 90% RPMI-1640+10% FBS 条件培养;ARPE-19 细胞系采用 90% DMEM+10% FBS 条件培养。置于 37°C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中,隔天换液。显微镜下观察细胞生长至 80%~90% 进行细胞传代。

1.2.6 qRT-PCR 验证枢纽基因 按照 RNA 逆转录试剂盒步骤将提取的 RNA 逆转录合成 cDNA。将获取的 cDNA 分别加入各引物的反应体系中进行实时荧光定量 PCR。扩增后进行熔解曲线分析,以 β -actin 为内参照,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

统计学分析:应用 R v. 3.4.3 进行上述生物信息学分析可视化。应用 GraphPad Prism v. 8.01 进行枢纽基因在验证数据集的表达差异验证。两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜母细胞瘤的差异表达基因与功能富集分析
数据集 GSE97508 筛选出 DEG 共 715 个,包括上调基因 192 个,下调基因 523 个。数据集 GSE110811 筛选出 DEG 共 273 个,包括上调基因 104 个,下调基因 169 个。两者

取交集共获得 DEG 121 个。对 DEG 的富集分析中 KEGG 通路富集分析结果发现差异基因主要富集于细胞周期、光传导通路与 p53 信号通路上(图 1),GO 分析结果发现 DEG 的生物学过程(GO-BP)主要富集于可见光接收、视紫红质信号传导通路、有丝分裂细胞核分裂、染色体分离与视紫红质信号传导调节通路上(图 2A);细胞组分(GO-CC)主要富集于凝缩的染色体中心粒、纺锤体微管与极点、光感受器内外节膜与光感受器外节等上(图 2B);分子功能(GO-MF)主要富集于 G 蛋白偶连光感受器活性、蛋白结合、微管结合、蛋白激酶活性、ATP 结合等功能上(图 2C)。

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
UBE2T	5'-ATGTTAGCCACAGAGCCACC-3'	5'-TGGCTCCACCTAATATTTCTACGA-3'
RRM2	5'-ACTATGCTCTCCCTCCGTGT-3'	5'-GCTGCTTTAGTTTTCCGGCTCC-3'
RHO	5'-TTTGGAGGGCTTCTTTGCCA-3'	5'-CCTCGGGGATGTACCTGGAC-3'
β-actin	5'-CAGCCAGCCATGGATGATGA-3'	5'-CATACCAACCATCACACCCTGA-3'

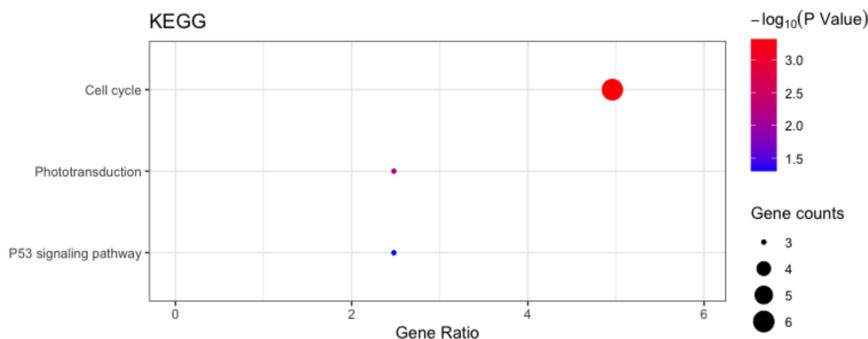


图 1 视网膜母细胞瘤 DEG 的 KEGG 分析结果。

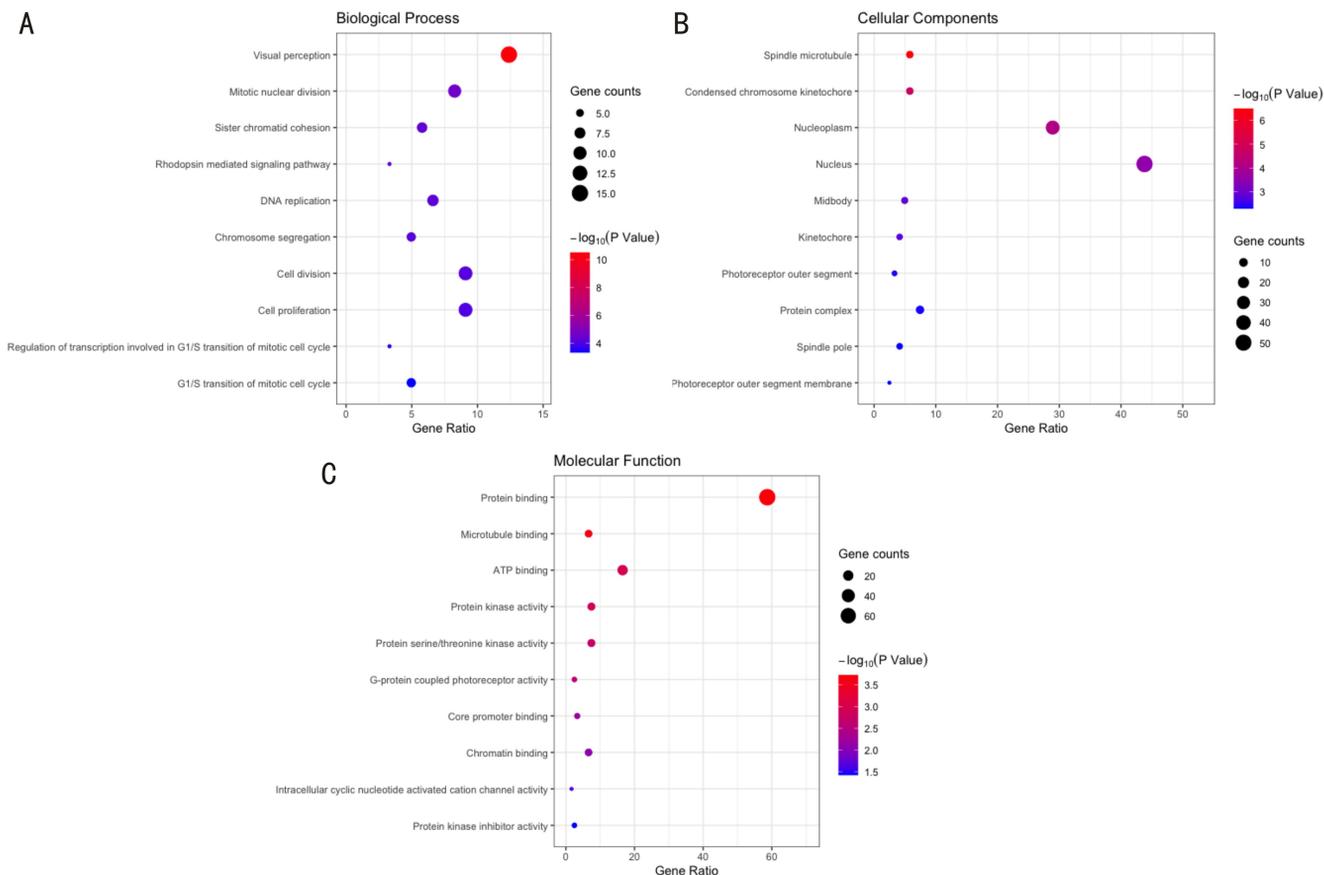


图 2 视网膜母细胞瘤 DEG 的 GO 分析结果 A:生物学过程;B:细胞组分;C:分子功能。

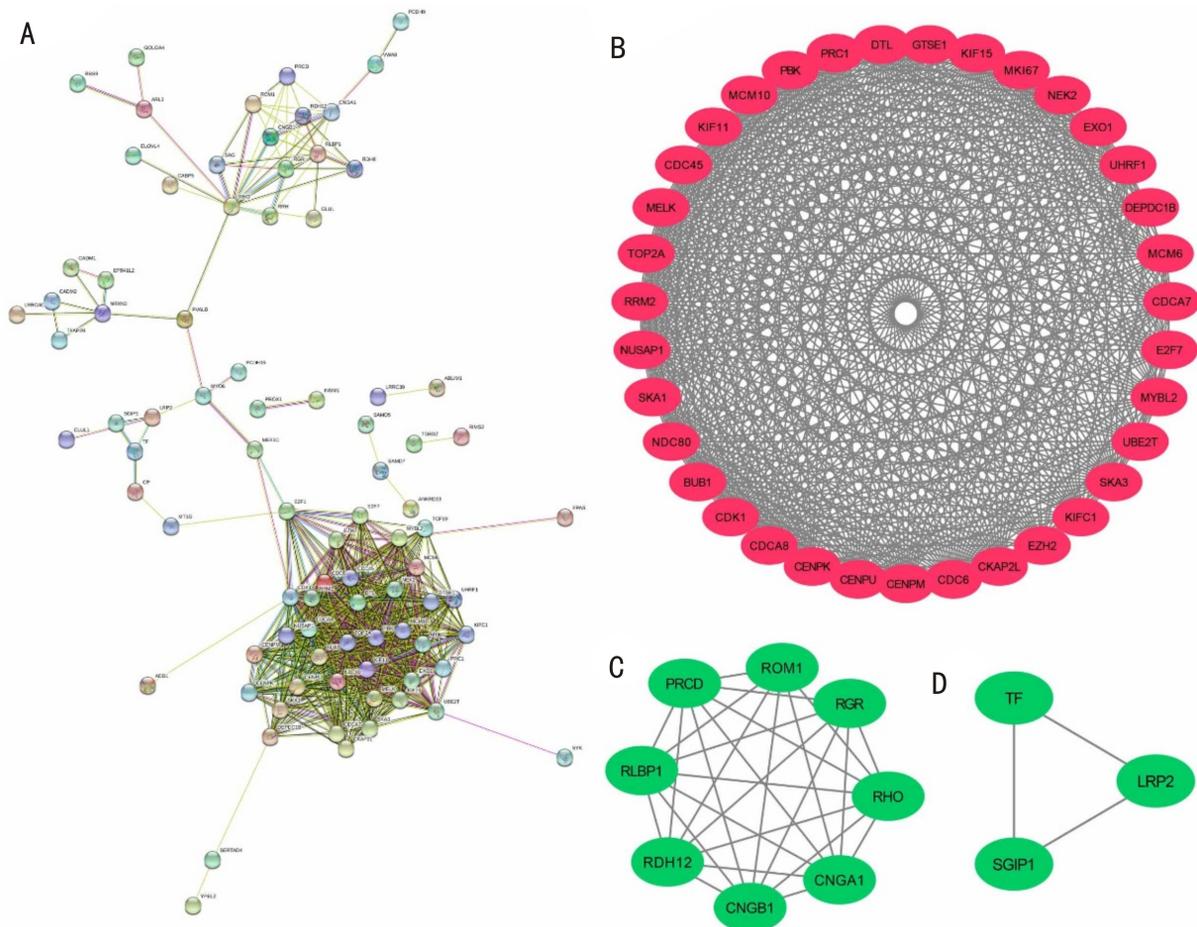


图3 PPI网络构建与子网络模块图 A:PPI网络图;B: MCODE子模块1;C: MCODE子模块2;D: MCODE子模块3;红色:上调基因;绿色:下调基因。

2.2 PPI网络构建及子网络模块分析视网膜母细胞瘤DEG 为进一步了解上述差异基因的蛋白互作网络,我们通过构建DEG的PPI网络(图3A)并利用MCODE插件发现3个子模块,包括子模块1包含的35个上调枢纽基因(图3B);子模块2包含的8个下调枢纽基因(图3C);子模块3包含的3个下调枢纽基因(图3D)。采用CytoHubba插件共得到39个枢纽基因,采用MCODE插件共富集得到46个枢纽基因,两者分别与GSE97508与GSE110811数据集中差异最大的30个基因取交集最终得到MCM6、DTL、UBE2T、TOP2A、NUSAP1、CENPK、RRM2、RLBP1、RHO共9个枢纽基因(表2,图4)。

2.3 验证数据集与ROC曲线验证视网膜母细胞瘤的枢纽基因 为验证上述9个枢纽基因是否在视网膜母细胞瘤发生发展中起到作用,我们纳入一个独立数据集GSE24673验证他们的表达量。结果显示:9个枢纽基因在GSE24673中的表达趋势与上述测试数据集的表达结果一致,差异均有统计学意义($P < 0.001$,图5)。进一步利用ROC曲线在GSE110811中对上述9个枢纽基因的表达量对视网膜母细胞瘤的诊断价值进行验证。结果显示:上调基因中UBE2T、RRM2与下调基因中的RHO共3个基因有统计学意义且曲线下面积(AUC) $\geq 80\%$ (图6)。

2.4 qRT-PCR验证视网膜母细胞瘤的枢纽基因 利用qRT-PCR验证上述3个枢纽基因在视网膜母细胞瘤细胞系Y79、Weri-Rb1、HXO-Rb44与视网膜色素上皮细胞系ARPE-19中表达情况。结果确认UBE2T与RRM2在3

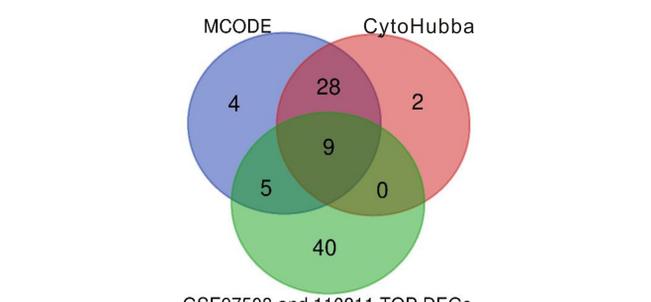


图4 MCODE和CytoHubba及Top DEG韦恩图。

表2 视网膜母细胞瘤枢纽基因

基因名	表达趋势	CytoHubba Degree值	MCODE 富集分数
MCM6	高表达	28	21.486
DTL	高表达	35	21.318
UBE2T	高表达	25	19.333
TOP2A	高表达	36	21.145
NUSAP1	高表达	35	21.145
CENPK	高表达	24	19.764
RRM2	高表达	36	21.145
RLBP1	低表达	11	5.5
RHO	低表达	15	5.5

种视网膜母细胞瘤细胞系中mRNA表达量均显著高于细胞系ARPE-19,而RHO的mRNA表达量显著低于细胞系ARPE-19,差异均有统计学意义($P < 0.001$,表3,图7)。

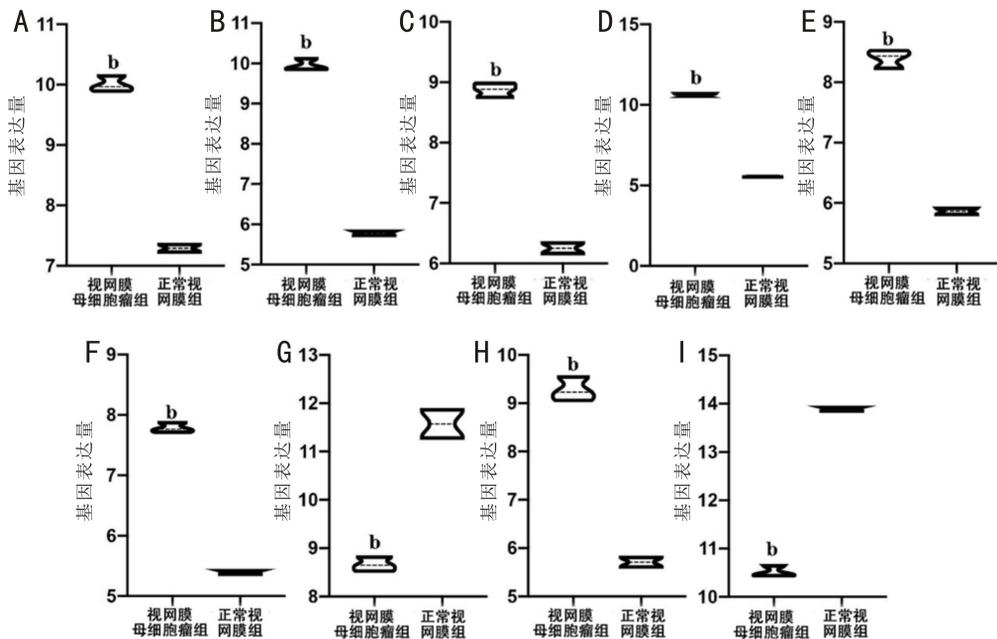


图5 数据集 GSE24673 中 9 个枢纽基因表达量 A: MCM6; B: DTL; C: UBE2T; D: TOP2A; E: NUSAP1; F: CENPK; G: RLBP1; H: RRM2; I: RHO; ^b*P*<0.001 vs 正常视网膜组。

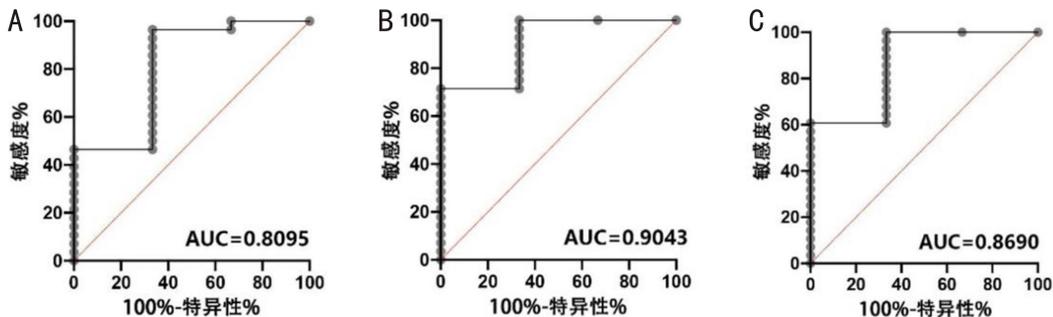


图6 AUC 大于 80% 的枢纽基因 ROC 曲线 A: UBE2T; B: RRM2; C: RHO。

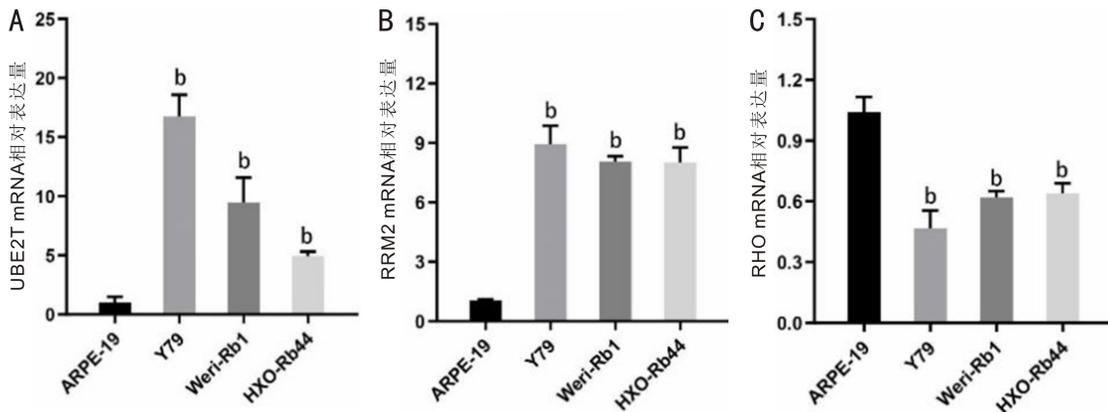


图7 qRT-PCR 验证视网膜母细胞瘤枢纽基因表达水平 A: UBE2T; B: RRM2; C: RHO; ^b*P*<0.001 vs ARPE-19。

表3 qRT-PCR 验证视网膜母细胞瘤枢纽基因表达水平

细胞系	UBE2T	RRM2	RHO
ARPE-19	1.003±0.181	1.000±0.073	1.000±0.008
Y79	16.769±1.797 ^b	8.936±1.298 ^b	0.458±0.091 ^b
Wer1-Rb1	9.464±2.102 ^b	8.515±0.573 ^b	0.609±0.020 ^b
HXO-Rb44	4.931±0.383 ^b	8.697±0.918 ^b	0.617±0.031 ^b
<i>F</i>	69.998	65.880	80.231
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^b*P*<0.001 vs ARPE-19。

3 讨论

生物信息学已被广泛运用于各类疾病关键致病基因和信号通路的筛选。在视网膜母细胞瘤发病机制的相关研究中,生物信息学方法的使用也越来越多^[10-11]。Zhao 等^[10]利用 GEO 数据库对罹患单侧与双侧视网膜母细胞瘤的患者进行差异表达基因与功能富集分析,但该研究缺少肿瘤组织与正常视网膜组织的比较。Huang 等^[11]也利用公共数据库进行视网膜母细胞瘤关键致病基因的筛选,但未进行细胞实验验证预测结果的可靠性。本研究通过生物信息学方法筛选并在细胞水平验证视网膜母细胞瘤与正常视网膜的关键差异基因,为进一步明确视网膜母细胞

瘤的发病机制提供重要信息。

本研究发现视网膜母细胞瘤的 DEG 除了富集于细胞周期以外,光传导与 p53 通路也参与了视网膜母细胞瘤的发病。光传导通路包括一系列的生化反应,可将光子转化为视锥与视杆细胞中的神经冲动。本研究结果中光传导通路涉及的基因均为下调基因,说明视网膜光感受器去分化是视网膜母细胞瘤进展的重要原因之一。既往对视网膜母细胞瘤光传导通路相关基因的研究提示该肿瘤为视锥细胞来源,且该通路基因与视网膜母细胞瘤的进展相关^[12]。p53 通路在众多肿瘤的发病中起到关键作用。相关研究已经证实 p53 基因敲除的小鼠可发展成双侧视网膜母细胞瘤。然而视网膜母细胞瘤基因组中 p53 基因并未产生突变。文献报道其可能的激活机制为:Rb1 基因失活导致 Arf、MDM2 与 MDMX 激活,磷酸化的 MDM2 或 MDMX 转位到细胞核与 p53 结合,通过增加 p53 蛋白的降解而影响细胞存活,促进视网膜母细胞瘤的进展^[13]。本研究从生物信息学的角度再次证实了 p53 通路失活在视网膜母细胞瘤发病机制中的作用。

本研究发现 UBE2T、RRM2 与 RHO 为视网膜母细胞瘤的关键基因。其中 RRM2 是核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase, RNR)的一个亚基。它是细胞周期中维持 DNA 合成与修复的重要蛋白,并且早有研究发现其存在恶性潜能^[14]。Nie 等^[15]应用 RNA-seq 技术对比视网膜母细胞瘤与正常视网膜转录组差异基因同样发现了 RRM2 是视网膜母细胞瘤发生发展中的关键基因。既往研究表明 RRM2 可促进胶质母细胞瘤的增殖、迁移和侵袭,并抑制癌细胞凋亡,靶向抑制 RRM2 可抑制 DNA 复制,导致包括胰腺癌、卵巢癌与结肠癌等癌细胞的凋亡^[16]。Rahman 等^[17]也报道利用纳米颗粒靶向抑制 RRM2 可调节 Bcl2 抑制头颈部肿瘤与肺癌的生长。RHO 编码视紫红质,它属于 G 蛋白偶联受体,是视杆细胞的特异性标记物。作为成熟视网膜标记物,RHO 在既往视网膜母细胞瘤高通量表达谱芯片数据中均证明为低表达状态^[18]。对视网膜母细胞瘤的组织病理学研究也确定光感受器的低分化与视网膜母细胞瘤的恶性程度呈正相关^[19]。有研究同样利用全基因组表达谱芯片分析发现视网膜母细胞瘤中包括 RHO 在内的光感受器标志物的丧失可导致视网膜母细胞瘤恶性程度增高^[20]。UBE2T 编码的功能蛋白属于泛素结合酶 E2 家族。它的功能最早发现于范可尼贫血综合征中^[21]。而近年来 UBE2T 被认为是促癌基因在不同肿瘤的发生发展中发挥重要作用。已经证明 UBE2T 在包括乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、前列腺癌、鼻咽癌与骨肉瘤中表达量均较对照组升高,并且其表达量在其中大多数肿瘤中可作为预测不良预后的独立危险因素^[22-24]。本团队成员也进一步对 UBE2T 在视网膜母细胞瘤发生发展中的功能进行深入研究,确认了在蛋白层面 UBE2T 在视网膜母细胞瘤中高表达,其表达量与视网膜母细胞瘤的恶性程度相关,并通过激活 STAT3 通路促进肿瘤的形成^[25]。

本文也存在一些局限性,如使用的数据集均来源于视网膜母细胞瘤的大体肿瘤,且更新于 2019-05,而近年来有学者采用单细胞测序技术对视网膜母细胞瘤的分子亚型进行分类,为其精准治疗提供方向^[26]。另外,本研究纳

入的基因均属于功能基因,而目前认为包括 miRNA、lncRNA 与 circRNA 在内的众多非编码 RNA 也参与了视网膜母细胞瘤的发生与发展^[27]。因此需要多组学测序技术对其治疗新靶点进行探讨,为视网膜母细胞瘤的生物信息学分析提供新方向^[28]。

综上,本研究通过生物信息学综合分析视网膜母细胞瘤数据集筛选出 UBE2T、RRM2 与 RHO 这三个关键基因未来可能成为视网膜母细胞瘤的潜在治疗靶点。

参考文献

- 1 Jabir AR, Zaheer HA, Zaheer MA, et al. Detection and diagnosis of retinoblastoma: can mobile devices be the next step toward early intervention? *Cureus* 2022;14(10):e3007
- 2 钱诚,张成娟,王炜,等.视网膜母细胞瘤的遗传学特征及临床筛查与治疗. *国际眼科杂志* 2019;19(7):1134-1137
- 3 唐芳政,刘智屏,张朝霞,等.血清肿瘤标志物在视网膜母细胞瘤诊断中的研究. *国际眼科杂志* 2021;21(4):715-717
- 4 Chronopoulos A, Babst N, Schiemenz C, et al. A narrative review - therapy options and therapy failure in retinoblastoma. *Neurosignals* 2022;30(S1):39-58
- 5 Dean M, Bendfeldt G, Lou H, et al. Increased incidence and disparity of diagnosis of retinoblastoma patients in Guatemala. *Cancer Lett* 2014;351(1):59-63
- 6 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37(1):1-13
- 7 Tanabe M, Kanehisa M. Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinformatics* 2012;Chapter(1):1.12.1-1.12.43
- 8 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015;43(Database issue):D447-D452
- 9 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13(11):2498-2504
- 10 Zhao XM, Li YB, Sun P, et al. Bioinformatics analysis of key biomarkers for retinoblastoma. *J Int Med Res* 2021;49(6):3000605211022210
- 11 Huang J, Zhang LR, Li ZM, et al. Screening and identification of key biomarkers for retinoblastoma: evidence from bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020;99(20):e19952
- 12 Gómez-Romero L, Alvarez-Suarez DE, Hernández-Lemus E, et al. The regulatory landscape of retinoblastoma: a pathway analysis perspective. *R Soc Open Sci* 2022;9(5):22003
- 13 Romani A, Zauli E, Zauli G, et al. MDM2 inhibitors - mediated disruption of mitochondrial metabolism: a novel therapeutic strategy for retinoblastoma. *Front Oncol* 2022;12:1000677
- 14 Aye Y, Li M, Long MC, et al. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene* 2015;34(16):2011-2021
- 15 Nie C, Ma H, Gao Y, et al. RNA sequencing and bioinformatic analysis on retinoblastoma revealing that cell cycle deregulation is a key process in retinoblastoma tumorigenesis. *Ophthalmologica* 2021;244(1):51-59
- 16 Li C, Zheng JF, Chen S, et al. RRM2 promotes the progression of human glioblastoma. *J Cell Physiol* 2018;233(10):6759-6767
- 17 Rahman MA, Amin AR, Wang D, et al. RRM2 regulates Bcl-2 in head and neck and lung cancers: a potential target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3416-3428

18 Kapatai G, Brundler MA, Jenkinson H, *et al.* Gene expression profiling identifies different sub-types of retinoblastoma. *Br J Cancer* 2013;109(2):512-525

19 Eagle RC Jr. High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma; a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(8):1203-1209

20 Kooi IE, Mol BM, Moll AC, *et al.* Loss of photoreceptor and gain of genomic alterations in retinoblastoma reveal tumor progression. *EBioMedicine* 2015;2(7):660-670

21 Alpi AF, Chaugule V, Walden H. Mechanism and disease association of E2-conjugating enzymes: lessons from UBE2T and UBE2L3. *Biochem J* 2016;473(20):3401-3419

22 Tu HB, Wu MH, Huang WL, *et al.* Screening of potential biomarkers and their predictive value in early stage non-small cell lung cancer: a bioinformatics analysis. *Transl Lung Cancer Res* 2019;8(6):797-807

23 Guo J, Wang M, Wang JP, *et al.* Ubiquitin-conjugating enzyme E2T knockdown suppresses hepatocellular tumorigenesis *via* inducing cell

cycle arrest and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2019; 25 (43): 6386-6403

24 Luo CJ, Yao YY, Yu ZY, *et al.* UBE2T knockdown inhibits gastric cancer progression. *Oncotarget* 2017;8(20):32639-32654

25 Xu N, Cui Y, Shi H, *et al.* UBE2T/STAT3 signaling promotes the proliferation and tumorigenesis in retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2022;63(9):20

26 Collin J, Queen R, Zerti D, *et al.* Dissecting the transcriptional and chromatin accessibility heterogeneity of proliferating cone precursors in human retinoblastoma tumors by single cell sequencing-opening pathways to new therapeutic strategies? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021;62(6):18

27 李晖, 汪明红, 廖风玲, 等. 沉默 LncRNA DLGAP1-AS2 对人视网膜母细胞瘤增殖和迁移及侵袭的影响. *国际眼科杂志* 2022;22(6):904-910

28 Liu J, Ottaviani D, Sefta M, *et al.* A high-risk retinoblastoma subtype with stemness features, dedifferentiated cone states and neuronal/ganglion cell gene expression. *Nat Commun* 2021;12(1):5578