

SHISAL1基因真核表达质粒构建及其在肝癌细胞中表达

吴文昊, 周莉莉, 石静, 严辉, 陈帅, 孙达权*

贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年7月27日; 录用日期: 2022年8月3日; 发布日期: 2022年8月15日

摘要

本文的目的是克隆人SHISAL1基因和构建其真核表达载体, 并在肝细胞癌细胞中表达和分析。以人肝细胞THLE-3总RNA为模板, 用RT-PCR获得SHISAL1基因蛋白编码区, 通过基因克隆和重组获得真核表达载体pDsRed1-SHISAL1; 用脂质体介导法将pDsRed1-SHISAL1导入肝癌细胞HuH-7中, 用荧光显微镜和激光共聚焦扫描显微镜观察细胞内红色荧光, 用蛋白免疫印迹和免疫荧光染色分析细胞内FZD3的表达情况。结果显示成功克隆人SHISAL1基因蛋白编码区并获得了真核表达质粒pDsRed1-SHISAL1; 荧光显微镜和蛋白免疫印迹结果显示外源SHISAL1融合蛋白, 即SHISAL1-RFP蛋白, 在肝癌细胞HuH-7中表达; 激光共聚焦扫描显微镜和蛋白免疫印迹结果显示SHISAL1可以抑制肝癌细胞HuH-7内源性FZD3表达。本研究成功克隆了SHISAL1基因并在肝癌细胞中表达, 并证明SHISAL1影响肝癌细胞内源性FZD3表达。

关键词

SHISAL1基因, 基因克隆, 真核表达, 肝癌细胞

Construction of Eukaryotic Expressional Plasmid of SHISAL1 Gene and Its Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells

Wenhao Wu, Lili Zhou, Jing Shi, Hui Yan, Shuai Chen, Daquan Sun*

College of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

Received: Jul. 27th, 2022; accepted: Aug. 3rd, 2022; published: Aug. 15th, 2022

Abstract

The aims are to clone human SHISAL1 gene and construct its eukaryotic expressional vector, and
*通讯作者。

then to express and analyze the protein in hepatocellular carcinoma cells. Using THLE-3 total RNA as a template, the protein coding region of *SHISAL1* gene was obtained by RT-PCR, and the eukaryotic expressional vector pDsRed1-*SHISAL1* was obtained by gene cloning and recombination. The recombinant plasmid was introduced into hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 by liposome method. The intracellular red fluorescence was observed by fluorescence microscopy and laser confocal scanning microscopy, and the expression of endogenous FZD3 was analyzed by western blot and immunofluorescence staining. The results showed that the protein coding region of human *SHISAL1* gene was cloned successfully and the eukaryotic expression plasmid pDsRed1-*SHISAL1* was obtained. Fluorescence microscopy and western blot showed that *SHISAL1* fusion protein, namely *SHISAL1*-RFP fusion protein, was expressed in HuH-7 cells. Laser confocal scanning microscopy and western blot showed that overexpression of *SHISAL1* could inhibit the endogenous expression of FZD3 in HuH-7 cells. Collectively, *SHISAL1* gene was successfully cloned and expressed in hepatocellular carcinoma cells, and then it was proved that *SHISAL1* could affect the expression of endogenous FZD3 in hepatocellular carcinoma cells.

Keywords

SHISAL1 Gene, Gene Cloning, Eukaryotic Expression, Hepatocellular Carcinoma Cell

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人 *SHISAL1* 基因全名为 Shisa like 1, 也叫 KIAA1644, 已确定定位于人 22 号常染色体短臂的 q13.31 上。与许多传统发现的基因相比, 它的发现是通过生物信息学数据库搜索和比对获得的, 现已证实 *SHISAL1* 基因编码的蛋白质且属于 SHISA 超家族成员之一, 推测其可能是一种跨膜适配器并可能具备多种生物学功能[1] [2]。生物信息学分析发现 *SHISAL1* 的 N-末端是一个长约 25 个氨基酸的信号肽序列, 其后是一段富含 6 个半胱氨酸的保守结构域(C * C * CC * CC), 在整个蛋白结构的中间是一段跨膜结构域, 其后带有含正电荷的精氨酸/赖氨酸残基, C-末端含有一段富含脯氨酸的结构域[1]。本组前期生物信息学分析发现 *SHISAL1* 可能与多种肿瘤进程密切相关。因此, 在此之前本组已通过大肠杆菌原核表达系统获取了 *SHISAL1* 全蛋白, 并通过小鼠免疫制备了 *SHISAL1* 多克隆抗体, 准备研究 *SHISAL1* 蛋白表达、定位及生物学功能研究[2]。为揭示 *SHISAL1* 在肝癌发生、发展和浸润中的具体生物学功能及作用途径, 本组在此先克隆重组了 *SHISAL1* 基因的真核表达质粒, 通过脂质体介导法导入并获得了表达外源 *SHISAL1* 的肝细胞癌细胞, 并分析发现外源 *SHISAL1* 可以抑制肝细胞癌细胞内源性 FZD3 的表达, 为揭示 *SHISAL1* 在肝癌进程中的作用奠定一定的前期基础。

2. 实验材料和方法

2.1. 实验材料

肝细胞癌细胞 HuH-7 来源于中科院上海细胞库, SV40 转化的肝上皮细胞系 THLE-3 来源于上海冠导生物工程技术有限公司, 两株细胞均经过 STR 鉴定。脂质体 Lipofectamine™ 2000、细胞培养液、TRIzol 试剂购买于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。胎牛血清来源于 Gemini 公司。限制性核酸内切酶、cDNA 第一链合成试剂盒、高保真 Taq DNA 聚合酶、3'末端加“A”试剂盒、DNA 胶纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶来源于宝日医生物技术(北京)有限公司。引物合成和 DNA 测序由上海生工生物科技有限公司完成。RFP 标签鼠单抗、

FZD3 多克隆兔抗、GAPDH 多克隆兔抗来源于 Bioworld。SHISAL1 多克隆鼠抗由本实验室自行制备。

2.2. 细胞培养

SV40 转化的肝上皮细胞系 THLE-3 细胞和肝细胞癌细胞系 HuH-7 细胞用分别用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液和 DMEM 培养液进行培养, 细胞培养的条件为 37°C、5.0% CO₂。当细胞生长融合至 80%~90%时用 0.25%胰酶液进行消化传代和收集。

2.3. RNA 抽提和 RT-PCR

将细胞 THLE-3 播种于直径 6 cm 的细胞培养皿上, 待细胞生长融合至 80%时, 弃去培养液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 然后在培养皿中直接加入 1 mL 的 TRIzol 试剂, 反复吹打裂解细胞, 按照 TRIzol 说明书的操作程序提取细胞总 RNA。测定 RNA 溶液浓度, 用反转录试剂盒在 42°C 反转录合成 cDNAs。

2.4. SHISAL1 基因引物设计和克隆

根据 GeneBank 中 SHISAL1 基因序列号(NM_001099294)设计人 SHISAL1 基因蛋白编码区两端的 PCR 引物, 并在两端末端引入下游操作所需的特异性限制性核酸内切酶的酶切位点, 引物序列如表 1 所示。

Table 1. PCR primers for human SHISAL1 gene coding region

表 1. 人 SHISAL1 基因蛋白编码区的 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'-3')
SHISAL1 上游引物	<u>CTCGAGCCACCATGACCAGTTGTGGCCAGCAGTCCTTG</u> (下划线区为引入的 <i>Xho</i> I 酶切位点)
SHISAL1 下游引物	<u>GAATTCGGTGGTGGTGGTGGTGGATCCGCGAGGC</u> ACCAGGGCAGACGAAGGTCATCAGCGGT (斜体区为引入的 <i>Eco</i> RI 酶切位点)

2.5. 真核表达载体构建

以人 SHISAL1 基因 PCR 为引物, 以 THLE-3 细胞的 cDNAs 为模板, 用高保真 PCR 法扩增 SHISAL1 基因的蛋白编码区, 其中设置退火温度为 62°C, 延伸时间为 30 s。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定和纯化。纯化的 DNA 片段通过加末端加“A”试剂盒对 DNA 片段 3'末端加“A”, 加“A”产物与 T-载体 pMD18-T 连接, 形成重组质粒 pMD18T-SHISAL1。连接产物用热激法转化感受态细菌 DH5 α , 通过含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选培养转化的细菌。挑取单克隆菌落并在 LB 细菌培养液中扩大培养, 抽提质粒和双酶切鉴定, 鉴定符合预期效果的质粒进行 DNA 测序分析。

测序正确的重组质粒 pMD18T-SHISAL1 和真核表达载体 pDsRed1-N1 用 *Eco*R I/*Xho* I 进行双酶切, 酶切产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离纯化 SHISAL1 DNA 片段和线性化骨架载体, 胶回收试剂盒回收并纯化目的片段并用 T4 DNA 连接酶连接, 产物转化感受态细菌 DH5 α , 用含有卡那霉素的 LB 固体培养基筛选培养转化的细菌, 挑取单克隆菌落并扩大培养, 经抽提质粒、双酶切鉴定和 DNA 测序, 正确重组的真核表达质粒命名为 pDsRed1-SHISAL1。

2.6. 细胞转染

将 HuH-7 细胞在转染前 12 h 按 30%~40%的融合率铺板于 6 孔板中。转染前将细胞培养液更换为无血清的 DMEM, 转染过程和转染试剂用量按 LipofectamineTM 2000 说明书进行。实验设置对照组(空载体 pDsRed1-N1)和实验组(目的基因质粒 pDsRed1-SHISAL1)。转染后 6 h 更换为新鲜的含 10% FBS 的细胞培

养液继续培养, 转染后 72 h 将细胞放置在倒置荧光显微镜下观察转染效果。

2.7. 蛋白免疫印迹

用 0.25% 的胰酶消化培养的靶细胞, 离心收集后用 PBS 清洗 2 次。用高效细胞裂解液快速裂解细胞并进行 BCA 定量, $5 \times$ SDS 上样缓冲液制备样品后进行变性胶电泳, 将蛋白通过电转移印至 PVDF 膜上, 5% BSA 室温封闭 PVDF 膜 30 min, TBST 清洗 3 次, 4°C 一抗孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 二抗室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次, ECL 显色和成像。

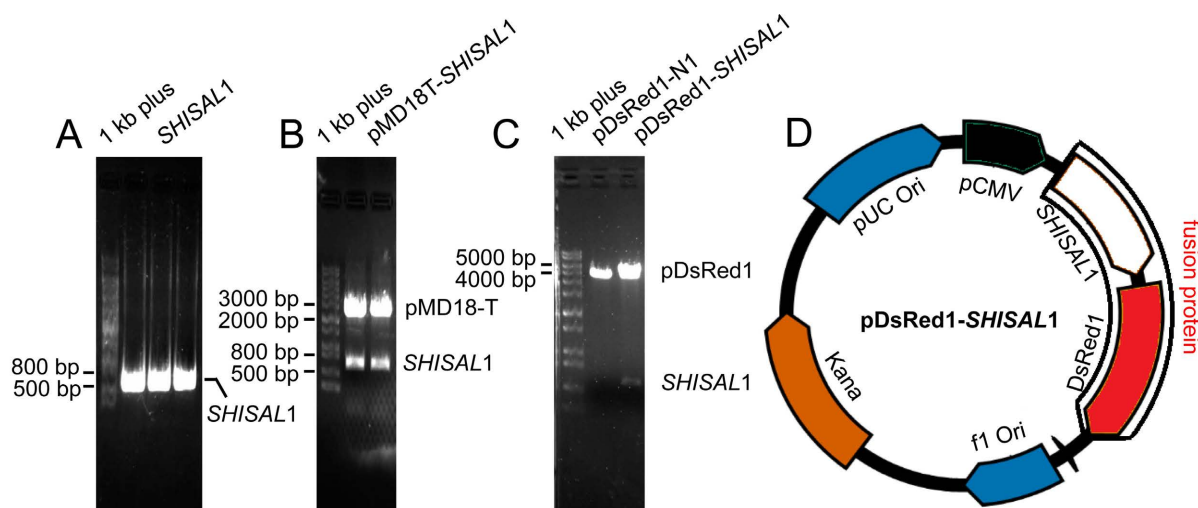
2.8. 免疫荧光染色

用 0.25% 的胰酶消化细胞, 重新铺板于底层垫有盖玻片(多聚赖氨酸包被)的 24 孔板中, 当靶细胞贴壁并显示正常的细胞形态后, 弃去细胞培养液, PBS 清洗盖玻片 3 次, 用 4% 的多聚甲醛 4°C 固定过夜, 用 0.5% Triton X-100 室温通透细胞 10 min, 5% BSA 室温封闭 30 min, 一抗 4°C 孵育过夜、二抗室温孵育 2 h、DAPI 染色和封片, 激光扫描共聚焦显微镜分析细胞内的蛋白质分布与表达。

3. 结果

3.1. 成功克隆人 *SHISAL1* 基因和建立其真核表达载体 pDsRed1-*SHISAL1*

如图 1 所示, 通过 RT-PCR 和高保真 PCR 扩增获得人 *SHISAL1* 基因的蛋白编码区 cDNA 片段(图 1A), 将该片段插入克隆载体 pMD18-T 中, 经 *EcoR I/Xho I* 双酶切鉴定(图 1B)和 DNA 测序, 结果显示 *SHISAL1* 蛋白编码区无任何氨基酸突变。将此编码区 DNA 片段插入到真核表达载体 pDsRed1-N1 中, 构建的重组质粒 pDsRed1-*SHISAL1* 先后进行双酶切鉴定(图 1C)和 DNA 测序, 结果显示成功构建重组真核表达质粒, 在细胞中可以表达 *SHISAL1* 融合蛋白(*SHISAL1*-RFP), 其重组质粒结构示意图如图 1D 所示。



注: (A) *SHISAL1* 基因蛋白编码区 cDNA。 (B) *EcoR I/Xho I* 酶切分析 pMD18T-*SHISAL1*。 (C) *EcoR I/Xho I* 酶切分析重组质粒 pDsRed1-*SHISAL1*。 (D) 真核表达载体 pDsRed1-*SHISAL1* 结构示意图。

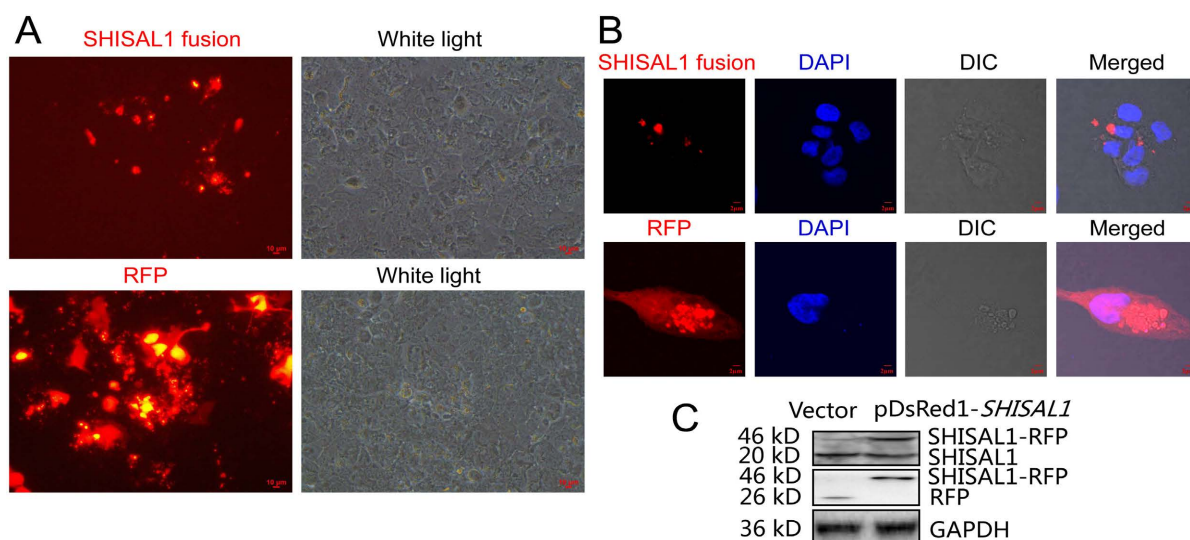
Figure 1. Gene coding region of *SHISAL1* and its eukaryotic expressional plasmid

图 1. *SHISAL1* 基因蛋白编码区及其真核表达载体

3.2. 外源 *SHISAL1* 在肝癌细胞 HuH-7 中表达

如图 2A 所示, 用脂质体将重组质粒 pDsRed1-*SHISAL1* 导入肝癌细胞 HuH-7 中 72 小时后, 细胞在

荧光显微镜下开始出现红色荧光。对细胞进行爬片、固定和激光共聚焦扫描分析,发现细胞内红色荧光呈局部和区域性分布(图 2B)。对细胞进行蛋白免疫印迹分析,发现用 SHISAL1 抗体孵育后,对照细胞仅出现内源性 SHISAL1 一条条带,而转染组细胞出现了 2 条条带;用 RFP 标签抗体进行孵育,对照细胞出现了红色荧光蛋白(RFP)一条条带,而转染组细胞出现了一条分子量较大的 RFP 融合蛋白(SHISAL1-RFP)(图 C),上述结果证明外源 SHISAL1 蛋白在肝癌细胞 HuH-7 中表达。



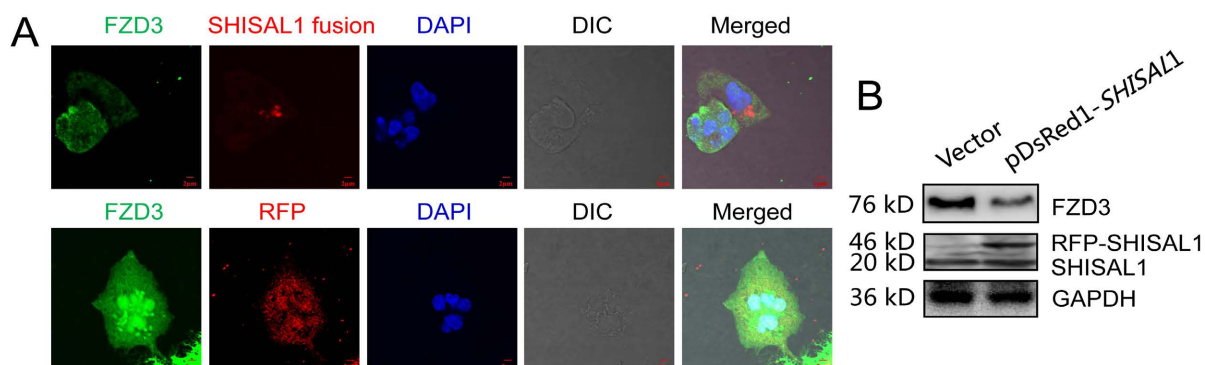
注: (A) 外源 SHISAL1 蛋白在荧光显微镜下呈红色。(B) 外源 SHISAL1 蛋白在激光共聚焦扫描显微镜下呈红色荧光。(C) Western blot 显示外源 SHISAL1 蛋白在 HuH-7 中表达。

Figure 2. Expression of SHISAL1 protein in HuH-7 cells of hepatocellular carcinoma

图 2. 外源蛋白 SHISAL1 在肝癌细胞 HuH-7 中表达

3.3. 表达外源 SHISAL1 蛋白抑制肝癌细胞 HuH-7 中 FZD3 蛋白的表达

当肝癌细胞 HuH-7 中表达外源 SHISAL1 后,对细胞用 FZD3 多克隆抗体进行细胞免疫荧光染色分析,结果发现肝癌细胞表达外源 SHISAL1 后,细胞内 FZD3 表达下降(图 3A)。用蛋白免疫印迹对细胞内全蛋白进行分析,同样发现过表达外源 SHISAL1 后,细胞内源性 FZD3 表达下降(图 3B),证明 SHISAL1 可能会抑制肝癌细胞 HuH-7 中内源性 FZD3 的表达。



注: (A) 激光共聚焦扫描显微术显示 SHISAL1 抑制细胞内 FZD3 表达。(B) 蛋白免疫印迹显示 SHISAL1 抑制 FZD3 的表达。

Figure 3. Suppression of expression of FZD3 in HuH-7 cells by SHISAL1

图 3. SHISAL1 抑制细胞 HuH-7 中 FZD3 的表达

4. 讨论

目前已发现的 Shisa 超家族包括 Shisa 家族、Shisa like 家族两大类,前者成员包括 SHISA 1~9,后者包括 Shisa 的远缘同源基因 Shisa like 1 (SHISAL1)、Shisa like 2a (SHISAL2a)和 Shisa like 2b (SHISAL2b),其共同特征是含有一段富含半胱氨酸的保守的序列[1] [3]。Shisa 超家族成员广泛存在于脊椎动物中,与胚胎发育[4]、成体心肌细胞重编程[5]、肌肉细胞融合[6]、糖尿病[7]、细胞凋亡[8]、神经发育与传导[9] [10]、神经疾病[11] [12]、细胞干性维持[13]和肿瘤病变[14] [15]等均有密切联系。但是,目前尚缺乏对 Shisa like 家族的探索和研究,作为 Shisa like 家族中的 SHISAL1,科研工作者对其了解也仅停留在转录和翻译水平上。最新研究发现在年轻的乳腺癌患者或正常乳腺组织中,若包括 SHISAL1 基因在内的 5 个基因集表达过高就会导致总体生存率和无病生存率显著下降[16];可是在子宫内膜癌中呈现相反的趋势,即当子宫内膜癌患者组织中高表达包括 SHISAL1 基因在内的 7 个差异表达基因集,其预后效果显著提高[17]。本组通过 Ualcan 网站对 TCGA 数据库中的 35 种肿瘤进行分析,发现有数据的 26 种原发性肿瘤中,10 种肿瘤中 SHISAL1 表达中位值升高(其中 7 种差异显著),16 种肿瘤中 SHISAL1 表达中位值下降(其中 9 种差异显著) [18]。这些结果暗示 SHISAL1 生物学功能的复杂性,它可能在不同的组织癌变中起着不同的调控作用,也显示当前我们对 SHISAL1 缺乏系统和全面的认识。但是在蛋白水平上,目前仅了解 SHISAL1 基因可以翻译成蛋白质并定位于高尔基体上,其他具体的生物学功能知之甚少[2]。

为研究 SHISAL1 在肝癌发生、发展、转移和浸润中的相关作用以及其所扮演的角色,本课题组以肝细胞癌细胞 HuH-7 为研究对象,通过体外克隆和构建 SHISAL1 基因的红色荧光蛋白融合的真核表达载体,将其导入肝癌细胞中,使其在肝癌细胞中可以定位、追踪和分析蛋白生物学功能,发现其过表达后可以抑制肝癌细胞内源性 FZD3 表达,目前已知 FZD3 是一个典型的与胚胎发育和肿瘤发生发展密切相关的原癌基因,其表达升高会导致多种肿瘤发生、发展和转移[19] [20] [21]。因此,本组推测 SHISAL1 在肝癌进程中可能会通过抑制 FZD3 表达而抑制细胞癌变,但其中涉及的作用机制和途径有待进一步研究和探索。

致 谢

本项目所使用的大型仪器设备均由贵州医科大学基础医学科学研究中心提供。

基金项目

本研究由国家自然科学基金(项目编号:81560390)和 2020 年贵州省大学生创新创业训练计划项目(项目编号:S202010660004 和 342)提供资助。

参考文献

- [1] Pei, J. and Grishin, N.V. (2012) Unexpected Diversity in Shisa-Like Proteins Suggests the Importance of Their Roles as Transmembrane Adaptors. *Cell Signal*, **24**, 758-769. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.11.011>
- [2] 周莉莉, 陈相屹, 余畅, 湛钊, 雷霆雯, 孙达权. 小鼠样人 SHisa 样蛋白 1 (SSL1)多克隆抗体制备及其亚细胞定位[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(9): 843-848.
- [3] Abdollahi Nejat, M., Klaassen, R.V., Spijker, S. and Smit, A.B. (2021) Auxiliary Subunits of the AMPA Receptor: The Shisa Family of Proteins. *Current Opinion in Pharmacology*, **58**, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.03.001>
- [4] Onishi, K. and Zou, Y. (2017) Sonic Hedgehog Switches on Wnt/Planar Cell Polarity Signaling in Commissural Axon Growth Cones by Reducing Levels of Shisa2. *Elife*, **6**, e25269. <https://doi.org/10.7554/eLife.25269>
- [5] Noack, C., Iyer, L.M., Liaw, N.Y., Schoger, E., Khadjeh, S., Wagner, E., Woelfer, M., Zafiriou, M.P., Milting, H., Sossalla, S., Streckfuss-Boemeke, K., Hasenfuß, G., Zimmermann, W.H. and Zelarayán, L.C. (2019) KLF15-Wnt-Dependent Cardiac Reprogramming Up-Regulates SHISA3 in the Mammalian Heart. *JACC: Journal of the American College of Cardiology*, **74**, 1804-1819. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.076>

- [6] Liu, Z., Wang, C., Liu, X. and Kuang, S. (2018) Shisa2 Regulates the Fusion of Muscle Progenitors. *Stem Cell Research*, **31**, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.07.004>
- [7] Kumar, P., Traurig, M. and Baier, L.J. (2020) Identification and Functional Validation of Genetic Variants in Potential miRNA Target Sites of Established BMI Genes. *International Journal of Obesity (London)*, **44**, 1191-1195. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0488-8>
- [8] Kim, N., Kim, M.J., Sung, P.S., Bae, Y.C., Shin, E.C. and Yoo, J.Y. (2016) Interferon-Inducible Protein SCOTIN Interferes with HCV Replication through the Autolysosomal Degradation of NS5A. *Nature Communications*, **7**, Article No. 10631. <https://doi.org/10.1038/ncomms10631>
- [9] Schmitz, L.J.M., Klaassen, R.V., Ruiperez-Alonso, M., Zamri, A.E., Stroeder, J., Rao-Ruiz, P., Lodder, J.C., van der Loo, R.J., Mansvelter, H.D., Smit, A.B. and Spijker, S. (2017) The AMPA Receptor-Associated Protein Shisa7 Regulates Hippocampal Synaptic Function and Contextual Memory. *Elife*, **6**, e24192. <https://doi.org/10.7554/eLife.24192.030>
- [10] Klaassen, R.V., Stroeder, J., Coussen, F., Hafner, A.S., Petersen, J.D., Renancio, C., Schmitz, L.J., Normand, E., Lodder, J.C., Rotaru, D.C., Rao-Ruiz, P., Spijker, S., Mansvelter, H.D., Choquet, D. and Smit, A.B. (2016) Shisa6 Traps AMPA Receptors at Postsynaptic Sites and Prevents Their Desensitization during Synaptic Activity. *Nature Communications*, **7**, Article No. 10682. <https://doi.org/10.1038/ncomms10682>
- [11] Sabaie, H., Talebi, M., Gharesouarn, J., Asadi, M.R., Jalaie, A., Arsang-Jang, S., Hussen, B.M., Taheri, M., Jalili Khoshnoud, R. and Rezazadeh, M. (2022) Identification and Analysis of BCAS4/hsa-miR-185-5p/SHISA7 Competing Endogenous RNA Axis in Late-Onset Alzheimer's Disease Using Bioinformatic and Experimental Approaches. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **14**, Article ID: 812169. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.812169>
- [12] Sabaie, H., Gharesouran, J., Asadi, M.R., Farhang, S., Ahangar, N.K., Brand, S., Arsang-Jang, S., Dastar, S., Taheri, M. and Rezazadeh, M. (2022) Downregulation of miR-185 Is a Common Pathogenic Event in 22q11.2 Deletion Syndrome-Related And Idiopathic Schizophrenia. *Metabolic Brain Disease*, **37**, 1175-1184. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-00918-5>
- [13] Tokue, M., Ikami, K., Mizuno, S., Takagi, C., Miyagi, A., Takada, R., Noda, C., Kitadate, Y., Hara, K., Mizuguchi, H., Sato, T., Taketo, M.M., Sugiyama, F., Ogawa, T., Kobayashi, S., Ueno, N., Takahashi, S., Takada, S. and Yoshida, S. (2017) SHISA6 Confers Resistance to Differentiation-Promoting Wnt/ β -Catenin Signaling in Mouse Spermatogenic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, **8**, 561-575. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.006>
- [14] Maffei, R., Fiorcari, S., Martinelli, S., Benatti, S., Bulgarelli, J., Rizzotto, L., Debbia, G., Santachiara, R., Rigolin, G.M., Forconi, F., Rossi, D., Laurenti, L., Palumbo, G.A., Vallisa, D., Cuneo, A., Gaidano, G., Luppi, M. and Marasca, R. (2018) Increased SHISA3 Expression Characterizes Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Sensitive to Lenalidomide. *Leukemia & Lymphoma*, **59**, 423-433. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1339872>
- [15] Tamura, K., Furihata, M., Satake, H., Hashida, H., Kawada, C., Osakabe, H., Fukuhara, H., Kumagai, N., Iiyama, T., Shuin, T. and Inoue, K. (2017) SHISA2 Enhances the Aggressive Phenotype in Prostate Cancer through the Regulation of WNT5A Expression. *Oncology Letters*, **14**, 6650-6658. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7099>
- [16] Paul, A.M., George, B., Saini, S., Pillai, M.R., Toi, M., Costa, L. and Kumar, R. (2022) Delineation of Pathogenomic Insights of Breast Cancer in Young Women. *Cells*, **11**, 1927. <https://doi.org/10.3390/cells11121927>
- [17] Liu, L., Lin, J. and He, H. (2019) Identification of Potential Crucial Genes Associated with the Pathogenesis and Prognosis of Endometrial Cancer. *Frontiers in Genetics*, **10**, Article No. 373. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00373>
- [18] Chandrashekar, D.S., Bashel, B., Balasubramanya, S.A.H., Creighton, C.J., Rodriguez, I.P., Chakravarthi, B.V.S.K. and Varambally, S. (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, **19**, 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- [19] Zhu, G.Q., Wang, Y., Wang, B., Liu, W.R., Dong, S.S., Chen, E.B., Cai, J.L., Wan, J.L., Du, J.X., Song, L.N., Chen, S.P., Yu, L., Zhou, Z.J., Wang, Z., Zhou, J., Shi, Y.H., Fan, J. and Dai, Z. (2022) Targeting HNRNPM Inhibits Cancer Stemness and Enhances Antitumor Immunity in Wnt-Activated Hepatocellular Carcinoma. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **13**, 1413-1447. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.02.006>
- [20] Li, C., Nguyen, V., Clark, K.N., Zahed, T., Sharkas, S., Philipp, F.V. and Boiko, A.D. (2019) Down-Regulation of FZD3 Receptor Suppresses Growth and Metastasis of Human Melanoma Independently of Canonical WNT Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 4548-4557. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813802116>
- [21] Wang, A., Wang, Y., Zhan, J. and Chen, J. (2021) MicroRNA-186-5p Inhibits the Metastasis of Cervical Cancer by Targeting FZD3. *Journal of BUON*, **26**, 677-683.