

全基因组关联分析显示基因 ANXA8 和 C10orf11 为影响肌少症的候选基因

冉 姝¹, 何 笑¹, 蒋自璇¹, 刘宝林¹, 邓红文²

(1. 上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2. 杜兰大学 公共健康医学院, 美国)

摘要: 为了寻找与瘦体重 (lean body mass, LBM) 相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点及易感基因, 在 1 000 个不相关的白人样本中采用 Affymetix 500K 芯片扫描了 500 000 个 SNPs, 并进行全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS), 显著结果在 1 625 个中国人样本和 2 283 个欧洲白人样本中进行验证, 并将验证结果与研究结果进行荟萃分析。研究发现 SNPs rs7905603, rs9416083, rs4409772, rs2894310 与 LBM 关联, 其中 rs7905603 位于基因 ANXA8, 其他 3 个 SNPs 位于基因 C10orf11。荟萃分析得到的合并 p 值分别为 2.08×10^{-5} , 7.44×10^{-6} , 6.73×10^{-6} , 6.76×10^{-6} 。ANXA8 和 C10orf11 基因是影响 LBM 变异的候选基因, 这对肌少症的认识提供了新的理论依据。

关键词: 肌少症; 单核苷酸多态性; 全基因组关联分析; 瘦体重

中图分类号: S 330.21

文献标志码: A

Genome-wide association analysis identifying that genes ANXA8 and C10orf11 are candidate genes for sarcopenia

RAN Shu¹, HE Xiao¹, JIANG Zixuan¹, LIU Baolin¹, DENG Hongwen²

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. School of Public Health Medicine, Tulane University, America)

Abstract: Sarcopenia is a complex polygenic disease characterized by decreased muscle mass, muscle strength and muscle function. Genetic factors play a crucial role in muscle. However, most of the genetic factors have not been identified. Lean body mass (LBM), mainly composed of skeletal muscle, is an important factor in the diagnosis of sarcopenia, and it is a complex trait influenced by environmental and genetic factors. To find single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci and susceptibility genes associated with LBM, the Affymetrix 500K chip for genotyping was used to scan 500 000 SNPs in 1 000 American Caucasian samples. Genome-wide association study (GWAS) was used to replicate the significant results in 1 625 Chinese samples and 2 283 European white samples, and a meta-analysis of the validation results and GWAS results was performed. The SNPs

收稿日期: 2019-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31571291)

第一作者: 冉 姝 (1973-), 女, 讲师。研究方向: 遗传学流行病学。E-mail: 348711476@qq.com

通信作者: 邓红文 (1966-), 男, 教授。研究方向: 复杂性状与疾病。E-mail: hdeng2@tulane.edu

rs7905603,rs9416083, rs4409772, and rs2894310 were found to be associated with LBM, SNP rs7905603 was located in ANXA8 gene, and the other three SNPs were located in C10orf11 gene. The combined p -values of meta-analysis were 2.08×10^{-5} , 7.44×10^{-6} , 6.73×10^{-6} , and 6.76×10^{-6} , respectively. Our results suggest that ANXA8 and C10orf11 genes are important genes affecting LBM variation, which provides a new theoretical basis for the understanding of sarcopenia.

Keywords: sarcopenia; single nucleotide polymorphisms (SNPs); genome-wide association study (GWAS); lean body mass (LBM)

肌少症(sarcopenia)是以骨骼肌质量和功能随年龄增长而减少为特征的多基因复杂疾病,肌少症还与一系列其他健康问题相关,如跌倒和骨折、运动障碍、感染、代谢紊乱等,这些都是老年人残疾和死亡的主要原因之一^[1-2]。在70岁以下的白人老年人中,有13%~24%的老人患有肌少症,而在80岁以上的老年人中,这一比例则高达50%或更多^[3]。瘦体重(lean body mass, LBM)收缩性的下降也会导致骨骼负荷的下降,使骨骼长期处于闲置状态,容易诱发骨质疏松症^[4]。肌少症是遗传和环境因素共同作用的复杂疾病。遗传因素可分别解释个体间肌肉强度、下肢功能和日常生活能力变异的36%~65%、57%和34%^[5-6];此外,骨骼肌能量代谢中主要酶的活性都具有家族遗传^[7]。LBM是肌少症重要的性状^[8-10]。LBM由骨骼肌(60%)、脏器等结缔组织^[11-12]组成,遗传率50%以上^[13],是预测肌少症的遗传特征。利用双能X射线吸收仪(DXA)可以准确地测量LBM。

既往研究表明,肌少症与骨质疏松症、肥胖症均具有较高的遗传易感性,且具有遗传相关性,可能存在多效性基因影响这两种疾病的发病风险。骨和肌肉在生长过程中都对旁分泌和内分泌刺激有共同的反应^[14]。肌肉收缩的减少导致骨骼负荷的减少,从而导致骨骼完整性的丧失^[15]。在胚胎发育过程中,成骨细胞和肌肉细胞共享一个共同的间充质干细胞。基于骨密度(bone mineral density, BMD)与LBM相互作用的生物学信息,预测两者可能存在共同的遗传背景,即多效性的基因^[16]。此外,肌少症常与体脂增加一起出现,这种情况被称为“骨骼肌减少性肥胖”^[17],它是伴随肌量减少和肥胖增加而出现的一种重要的老年性疾病^[18]。肌少症和肥胖症均具有较高的遗传易感性,可能存在多效位点影响这两种疾病的发病风险。

候选基因连锁分析和关联法是早期鉴定肌少

症遗传因子的两种主要方法。但研究结果并不一致,其中种族、样本大小不同等因素造成试验的可重复性低、所涉及的染色体区域范围较宽可能是其重要原因。全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)通过包括单核苷酸多态性变异(single nucleotide polymorphisms, SNPs)和拷贝数变异(copy number variation, CNV)在内的全基因组高密度遗传标记并分型,已成为鉴定复杂疾病致病基因的热点研究方法之一^[19]。最近的GWAS研究发现许多SNPs与LBM相关。2009年,有研究对1000个无亲缘关系美国白人进行LBM的GWAS分析,发现亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)多个SNP与肌肉量显著关联^[20]。Livshits等^[21]在3180个英国妇女研究中发现,肌量与MTHFR基因所在的染色体1p36位点存在连锁(LOD(log odds score)值为2.17, p 值为0.0016)。Sun等^[22]在中国人群双变量GWAS发现HK2等基因的变异可以同时引起股骨颈骨几何学参数和四肢LBM的变化。Urano等^[23]对1081个日本绝经妇女的研究发现rs12409277位点与LBM显著关联,该位点影响转录调节因子PRDM16的转录活性。Livshits等^[24]对1550例英国孪生子全基因DNA甲基化的研究发现,一些基因DNA甲基化与肌肉量变异相关。Medina-Gomez等^[25]对10414名儿童通过双变量GWAS荟萃分析发现,8个基因位点与LBM和头骨密度关联。

为鉴定与肌少症相关联的基因,本研究对1000个不相关的白人样本进行GWAS分析。验证样本包括中国汉族样本和白人样本。

1 研究方法

1.1 样 本

a. 全基因研究样本。

本研究通过了密苏里堪萨斯大学(University of

Missouri Kansas-City)伦理委员会的审查,并在开展研究前和所有参与者签署了知情同意书。所有研究对象完成了包括各项生理指标、生活习性、疾病史、家族史、运动史等相关内容的调查问卷。本次全基因组关联分析从本实验室建立和正在扩大的遗传资源数据库中的 6 000 多个样本中随机抽取了 1 000 个独立样本。所选择样本均来自具有欧洲血统的美国白种人。

b. 验证样本包含中国汉族样本和美国白人样本。

中国汉族样本是在湖南省长沙市征集的 1 625 个随机样本,包括 823 个女性样本和 802 个男性样本。本研究得到西安交通大学与湖南师范大学审查委员会批准。样本的筛选采取了和堪萨斯独立样本征集相同的标准。美国白人样本包含 2 283 个高加索裔无血缘关系的成年人,包括 556 个男性和 1 727 个女性。所有样本来源于美国中部密苏里州堪萨斯城和内布拉斯加州奥马哈城城区及其周边地区。本研究得到了密苏里大学堪萨斯分校伦理委员会 (Institutional Review Board, IRB) 的批准。验证样本与第一阶段的研究样本没有重复。

1.2 表型测量

采用 Hologic 公司的双能 X 射线 (DXA) 骨密度仪 (Hologic Inc., Bedford, MA, USA) 扫描仪对研究对象进行表型测量。让受测者卧位于测量床上,从头到脚进行扫描。DXA 能够精确测量四肢、全身瘦体重量,以及全身脂肪量。同时测量受试者的身高 (m) 和体重 (kg)。

1.3 基因分型和质量控制

使用商业分离试剂盒 (Gentra systems, Minneapolis, MN, USA, 按说明书步骤操作) 从人体血液中提取基因组 DNA。基因分型采用 Affymetrix 250K_{NSP} 和 Affymetrix 250K, 由美国范德比尔特大学医学中心范德比尔特共享中心完成,过程按标准步骤进行。

在个体和 SNP 水平上,严格执行基因型质量控制 (QC) 步骤。在个体水平上,使用 PLINK 根据 X 染色体上的基因型数据推断出个体的性别,并与问卷中记录的性别作比较,将不明确的以及与报告性别不一致的个体删除。在 SNP 水平上,在最初的 500 568 个 SNP 中,舍弃了 32 961 个成功率小于 95% 的 SNP、36 965 个等位基因频率显著偏离 Hard-Weinberg (HWE) 平衡的 SNPs ($p<0.001$)、51 323 个等位基因频率小于 1% 的 SNPs,同时把具有孟德尔错误的 SNPs 设为缺失值。因此,最后

共有 379 319 个 SNPs 用于关联分析。

用于验证的两个样本分别采用 Affymetrix Gene Chip Human Mapping SNP 6.0 芯片进行基因分型。

1.4 统计分析

采用逐步回归法 (stepwise regression) 检验年龄、年龄的平方、身高、体重是否对全身 LBM 具有显著影响,然后采用 Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA) 来校正身高、体重等因素对 LBM 的影响。GWAS 分析中,为了最大限度地减少因群体分层而导致的假阳性或假阴性结果,采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 法来校正 1 000 个白人样本中潜在的种群分层。首先,在样本中挑选一组无关样本并计算它们的主成分,作为他们的遗传背景信息。然后,选用前 5 个主成分,利用这 5 个主成分值对表型进行校正,再利用校正后的表型进行关联分析。

关联分析使用 Plink 软件 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/summary.shtml>) 的加性遗传模型分析。

为分析 GWAS 和验证研究的整体关联证据,采用 Fisher's 方法^[26]的荟萃分析将研究样本和验证样本的 p 值整合,得到合并 p 值。

2 结 果

研究样本和验证样本的基本信息列于表 1。

在发现样本中,共有 379 319 个 SNPs 用于关联分析。Bonferroni 校正全基因组显著性水平 (GWAS, $0.05/379\,319=1.31\times10^{-7}$),在 GWAS 水平上,没有 SNP 低于这个显著性阈值标准, p 值最低的是 rs7086719 ($p=1.23\times10^{-6}$)。在研究样本中发现了 809 个与 LBM 相关的 SNPs ($p<1\times10^{-3}$, call rate > 90%, 最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.01)。在 1 625 个不相关的中国汉族样本中验证,发现 40 个 SNPs 与 LBM 高度关联。将这 40 个 SNPs 在 2 283 个不相关的白人中进行验证,最终有 4 个 SNPs 得到验证 (rs7905603: $p=9.67\times10^{-4}$; rs9416083: $p=3.17\times10^{-4}$; rs4409772: $p=4.39\times10^{-4}$; rs2894310: $p=4.37\times10^{-4}$),如表 2 所示。

通过其网页门户搜索国际小鼠表现型数据库^[27] (international mouse phenotyping consortium, IMPC) (<http://www.mousephenotype.org/>),发现敲除基因 ANXA8 纯合子的老鼠比对照组老鼠 BMD 增加,同时身体脂肪量也出现异常 ($p<0.05$)。

表 1 研究样本和验证样本的基本信息

Tab.1 Basic information about the study samples and the replication samples

特征	研究样本	验证样本	
	欧洲白人(N=1 000)	欧洲白人(N=2 283)	中国人(N=1 625)
男性/女性	501/499	556/1 727	802/823
年龄/岁	50.65±18.60/50.00±17.60	50.71±16.05/51.95±12.92	31.43±11.93/37.45±13.79
身高/m	1.77±0.07/1.64±0.06	1.71±0.07/1.62±0.03	1.70±0.06/1.58±0.05
体重/kg	89.20±14.90/71.39±16.10	87.08±16.70/71.46±16.00	65.75±9.64/54.63±8.09
全身脂肪量/kg	23.46±8.88/26.92±10.33	20.67±9.30/20.92±13.20	11.86±5.14/16.13±4.87
全身瘦体重/kg	63.67±8.22/43.49±6.69	66.60±9.59/46.85±7.04	52.83±5.95/37.95±4.14

注: 样本信息表示为平均值±标准差。

表 2 在 GWAS 研究中显示和瘦体重相关联的 SNPs

Tab.2 SNPs associated with LBM in GWAS

SNP	染色体	位置	MAF(亚洲)	MAF(欧洲)	基因	p 值			
						研究人群	验证人群 ¹	验证人群 ²	荟萃分析 ³
rs9416083	10	75586487	0.70	0.89	C10orf11	3.17×10 ⁻⁴	7.68×10 ⁻²	1.96×10 ⁻²	7.44×10 ⁻⁶
rs2894310	10	75579561	0.70	0.89	C10orf11	4.37×10 ⁻⁴	8.09×10 ⁻²	1.21×10 ⁻²	6.73×10 ⁻⁶
rs4409772	10	75579524	0.70	0.89	C10orf11	4.39×10 ⁻⁴	8.10×10 ⁻²	1.21×10 ⁻²	6.76×10 ⁻⁶
rs7905603	10	47993370	0.45	0.17	ANXA8	9.67×10 ⁻⁴	1.86×10 ⁻²	7.96×10 ⁻²	2.08×10 ⁻⁵

注: 验证人群¹表示 1 625 个中国人样本; 验证人群²表示 2 283 个白人样本; 荟萃分析³表示研究样本和所有验证样本的 p 值的合并结果。

使用 STRING 蛋白互作网络 (<https://string-db.org/>)对基因 ANXA8 进行注释, 所得到的蛋白质-蛋白质相互作用网络显示基因 ANXA8 与 MYOD, MYOG, MYF6 等调控肌肉表达的基因存在某些联系(见图 1), ANXA8 是膜联蛋白家族中调控 Ca²⁺结合蛋白的一个成员, 它与急性早幼粒细胞白血病(APL)有关^[28]。

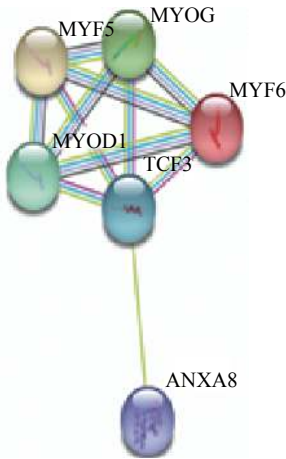


图 1 ANXA8 基因与肌肉代谢蛋白的 STRING 蛋白质互作网络图
Fig. 1 STRING protein interaction network between ANXA8 and muscle metabolic proteins

3 讨论

ANXA8(annexin A8)是在破骨细胞分化后期强烈诱导的基因和调节细胞特有肌动蛋白环形成的蛋白。膜联蛋白家族是多基因蛋白质家族, 最初被称为内酯环^[29]。迄今为止, 已经有几个膜联蛋白家族的成员被发现其表达与骨骼肌有关系。例如在骨骼肌中有膜联蛋白 annexin A8 和 annexin A5 的表达^[30]。annexin A1 通过促进卫星细胞的迁移来促进骨骼肌的分化, 从而调节成肌细胞的分化有助于骨骼肌组织的再生^[31]; 另一个膜联蛋白家族的成员 annexin A6, 它是一种主要的骨骼肌蛋白, 在骨骼肌中高度表达^[32-34]。ANXA8 基因在各种白血病和淋巴细胞中活化^[35-36], ANXA8 在这些细胞的增殖和/或分化中发挥着独特的作用^[37]。此外, STRING 蛋白互作网络还发现基因 ANXA8 与骨骼肌肌肉相关代谢蛋白 TCF3 有着直接的联系。TCF3 蛋白靶基因的表达限于特定的细胞谱系, 通过含有 TCF3和组织限制性螺旋-环-螺旋(bHLH)因子的异二聚体来激活细胞特异性基因表达并促进细胞分化^[37]。

rs9416083, rs2894310 和 rs4409772 均位于基因 C10orf11 (leucine rich melanocyte differentiation associated), 该基因编码是一种富含亮氨酸的重复蛋白^[38]。图 2 中的 haploview 图显示 C10orf11 基因在白人和中国人中的 LD 结构, 运用 Haploview 4.2 软件和从 1 000 个基因组计划中获取的链接数据, 对 C10orf11 基因的 3 个 SNPs (rs9416083, rs2894310 和 rs4409772) 分别在中国人群和欧洲白人中进行连锁不平衡分析。图 2(a) 为中国人的分析结果, 图 2(b) 为欧洲白人的分析结果。图中颜

色的深浅代表对应的两个 SNP 间的 LD 强度(r^2)。红色区域表示 $r^2=1$ 。该区域仅包括一个 LD 块, 由带有黑色线条的三角形表示。所有图均使用 Haploview 软件, 根据 HapMap 国际计划 Phase 1 和 Phase 数据生成。目前, 对基因 C10orf11 的生物学功能仍知之甚少, Wada 等^[39]的研究表明, 人类 C10orf11 的同源基因参与了早期肠胚中的 β -连环蛋白 (MIM 116806) 的信号传导, 并表明了 C10orf11 的功能在 β -连环蛋白的上游或平行于 β -连环蛋白。

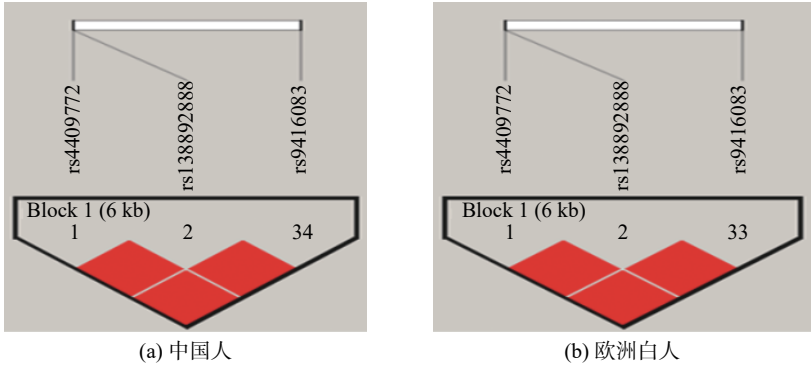


图 2 基因 C10orf11 中国人和欧洲白人中的 LD 结构图

Fig.2 LD structure of the C10orf11 gene in the Chinese and Caucasian sample

采用 GWAS 分析方法, 在 1 000 名不相关的美国高加索人中发现, 位于基因 ANXA8 和 C10orf11 的 4 个 SNPs 与 LBM 有关, 它们可能会影响或者导致肌少症。

参考文献:

[1] KARAKELIDES H, NAIR K S. Sarcopenia of aging and its metabolic impact[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2005, 68: 123–148.

[2] LAURETANI F, BANDINELLI S, BARTALI B, et al. Axonal degeneration affects muscle density in older men and women[J]. *Neurobiology of Aging*, 2006(27): 1145–1154.

[3] BAUMGARTNER R N, KOEHLER K M, GALLAGHER D, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1998, 147(8): 755–763.

[4] BUCKWALTER J A. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies[J]. *Journal of Rheumatology*, 1995, 43: 13–15.

[5] THOMIS M A I, HUYGENS W, HEUNINCKX S, et al. Exploration of myostatin polymorphisms and the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype in responses of human muscle to strength training[J]. *European Journal of Applied Physiology*, 2004, 92(3):

267–274.

[6] ARDEN N K, SPECTOR T D. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study[J]. *Journal of Bone & Mineral Research*, 1997, 12(12): 2076–2081.

[7] RICO-SANZ J, RANKINEN T, JOANISSE D R, et al. Familial resemblance for muscle phenotypes in the HERITAGE family study[J]. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2003, 35(8): 1360–1366.

[8] BARBAT-ARTIGAS S, PLOUFFE S, PION C H, et al. Toward a sex-specific relationship between muscle strength and appendicular lean body mass index?[J]. *Journal of Cachexia, Sarcopenia & Muscle*, 2013, 4(2): 137–144.

[9] SCOTT C A, ROANNE J S, DONALD C M, et al. Impact of resistance and aerobic exercise on sarcopenia and dynapenia in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a multicenter randomized controlled trial[J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2016, 158(3): 497–507.

[10] 厚生労働科学研究補助金に関する予防対策確立のための包括的研究研究班. Japanese translation of "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European Working Group on Sarcopenia in older people" with supplementary explanation by the JGS working group[J]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 2012, 49(6): 788–805.

- [11] VANDEWOUDE M F J, ALISH C J, SAUER A C, et al. Malnutrition-sarcopenia syndrome: is this the future of nutrition screening and assessment for older adults?[J]. *Journal of Aging Research*, 2012, 2012: 651570.
- [12] WOLFE R R. The underappreciated role of muscle in health and disease[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 84(3): 475–482.
- [13] HSU F C, LENCHIK L, NICKLAS B J, et al. Heritability of body composition measured by DXA in the diabetes heart study[J]. *Obesity Research*, 2005, 13(2): 312–319.
- [14] CIANFEROTTI L, BRANDI M L. Muscle-bone interactions: basic and clinical aspects[J]. *Endocrine*, 2014, 45(2): 165–177.
- [15] BLANK R D. Bone and muscle pleiotropy: the genetics of associated traits[J]. *Clinical Reviews in Bone & Mineral Metabolism*, 2014, 12(2): 61–65.
- [16] BROTT M, BONEWALD L. Bone and muscle: interactions beyond mechanical[J]. *Bone*, 2015, 80: 109–114.
- [17] BAUMGARTNER R N. Body composition in healthy aging[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 904: 437–448.
- [18] DENNISON E M, SAYER A A, COOPER C. Epidemiology of sarcopenia and insight into possible therapeutic targets[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2017, 13(6): 340–347.
- [19] NAKATA M, YAMAUCHI A, TANIMOTO J, et al. Dilemma game structure hidden in traffic flow at a bottleneck due to a 2 into 1 lane junction[J]. *Physica A*, 2010, 389(23): 5353–5361.
- [20] LIU X G, TAN L J, LEI S F, et al. Genome-wide association and replication studies identified TRHR as an important gene for lean body mass[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2009, 84(3): 418–423.
- [21] LIVSHITS G, KATO B S, WILSON S G, et al. Linkage of genes to total lean body mass in normal women[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92(8): 3171–3176.
- [22] SUN L, TAN L J, LEI S F, et al. Bivariate genome-wide association analyses of femoral neck bone geometry and appendicular lean mass[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27325.
- [23] URANO T, SHIRAKI M, SASAKI N, et al. Large-scale analysis reveals a functional single-nucleotide polymorphism in the 5'-flanking region of *PRDM16* gene associated with lean body mass[J]. *Aging Cell*, 2014, 13(4): 739–743.
- [24] LIVSHITS G, GAO F, MALKIN I, et al. Contribution of heritability and epigenetic factors to skeletal muscle mass variation in United Kingdom UK twins[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016, 101(6): 2450–2459.
- [25] MEDINA-GOMEZ C, KEMP J P, DIMOU N L, et al. Bivariate genome-wide association meta-analysis of pediatric musculoskeletal traits reveals pleiotropic effects at the *SREBF1/TOMIL2* locus[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 121.
- [26] FISHER K A, MILES R. Modeling the acoustic radiation force in microfluidic chambers[J]. *Journal of the Acoustical Society of America*, 2008, 123(4): 1862–1865.
- [27] DICKINSON M E, FLENNIKEN A M, JI X, et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes[J]. *Nature*, 2016, 537(7621): 508–514.
- [28] GOEBELER V, RUHE D, GERKE V, et al. Annexin A8 displays unique phospholipid and F-actin binding properties[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(10): 2430–2434.
- [29] GEISOW M J, FRITSCH U, HEXHAM J M, et al. A consensus amino-acid sequence repeat in *Torpedo* and mammalian Ca^{2+} -dependent membrane-binding proteins[J]. *Nature*, 1986, 320(6063): 636–638.
- [30] REUTELINGSPERGER C P M, VAN HEERDE W, HAUPTMANN R, et al. Differential tissue expression of Annexin VIII in human[J]. *FEBS Letters*, 1994, 349(1): 120–124.
- [31] BIZZARRO V, PETRELLA A, PARENTE L. Annexin A1: novel roles in skeletal muscle biology[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(8): 3007–3015.
- [32] SCHMITZ-PEIFFER C, BROWNE L C, WALKER H J, et al. Activated protein kinase C α associates with annexin VI from skeletal muscle[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 330(2): 675–681.
- [33] TAGOE C E, BOUSTEAD C M, HIGGINS S J, et al. Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1994, 1192(2): 272–280.
- [34] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [35] CHANG K S, WANG G, FREIREICH E J, et al. Specific expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia[J]. *Blood*, 1992, 79(7): 1802–1810.
- [36] HU Z B, MA W, UPHOFF C C, et al. Modulation of gene expression in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4[J]. *Leukemia*, 1993, 7(11): 1817–1823.
- [37] MASSARI M E, MURRE C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2000, 20(2): 429–440.
- [38] GRØNSKOV K, DOOLEY C M, ØSTERGAARD E, et al. Mutations in *C10orf11*, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2013, 92(3): 415–421.
- [39] WADA S, HAMADA M, KOBAYASHI K, et al. Novel genes involved in canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in early *Ciona intestinalis* embryos[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2008, 50(4): 215–227.