

• 论 著 •

RNA 测序联合生物信息学识别口腔鳞状细胞癌的关键基因*

李锦存¹, 罗 庆¹, 翟 堃², 胡 晨², 马 坚^{2,3△}

(1. 宁夏医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 宁夏 银川 750003; 2. 宁夏医科大学总医院口腔颌面外科, 宁夏 银川 750004; 3. 宁夏医科大学口腔医学院颌面畸形重点实验室, 宁夏 银川 750001)

[摘 要] **目的** 采用 RNA 测序联合生物信息学分析寻找与口腔鳞状细胞癌(OSCC)预后相关的基因。**方法** 收集 2019 年 2—10 月宁夏医科大学总医院口腔颌面外科收治的 3 例 OSCC 患者的癌及癌旁组织, 分别提取 RNA 并构建 DNA 文库, 进行 Illumina 高通量测序, 整合数据筛选出差异表达基因(DEGs)。对其进行生物学过程、信号通路及互作网络分析, 进行可视化和模块分析。利用 TCGA 数据库对得分最高的模块基因生存分析鉴定出候选基因, 进一步采用 GSE41613 数据集对候选基因生存分析筛选出关键基因; 人类蛋白质图谱数据库评估关键基因在 OSCC 中的蛋白表达。用基因集富集分析(GSEA 网站)预测关键基因在 OSCC 中可能调控的信号通路。**结果** 通过 3 对 OSCC 组织 RNA 测序数据识别出 1 818 个 DEGs, 其中上调基因 824 个, 下调基因 994 个, 其主要富集有丝分裂核分裂、细胞外区域、钙信号通路等。TCGA 数据鉴定出 3 个候选基因 ASPM、CENPF 和 KIF15; 通过对 GSE41613 数据生存分析确定 CENPF 作为 OSCC 的关键基因。CENPF 在 OSCC 组织中表达量明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。CENPF 表达量较高的 OSCC 预后较差, 差异有统计学意义($P<0.05$); OSCC 中 CENPF 蛋白表达较高, CENPF 高表达者存在基础转录因子和细胞周期等多个通路基因集的富集, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 转录测序共鉴定出 1 818 个 DEGs, 其中 CENPF 在 OSCC 中表达量较高时其预后较差, 其可能与 OSCC 的发生、发展及预后相关。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 计算生物学; 差异表达基因; RNA 测序; CENPF

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.15.002 **中图法分类号:**R739.8

文章编号:1009-5519(2023)15-2530-09 **文献标识码:**A

RNA sequencing integrated bioinformatics to identify key genes in oral squamous cell carcinoma*

LI Jincun¹, LUO Qing¹, ZHAI Kun², HU Chen², MA Jian^{2,3△}

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750003, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 3. Key Laboratory of Craniomaxillofacial Deformities, School of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

[Abstract] **Objective** To identify key genes associated with the prognosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by RNA sequencing integrated bioinformatics. **Methods** Carcinoma and adjacent tissues of 3 OSCC patients admitted to the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University from February to October 2019 were collected. RNA was extracted and DNA libraries were constructed, and Illumina high-throughput sequencing was performed to screen out differentially expressed genes (DEGs) by integrating the data. The biological processes, signal pathways and interaction network of DEGs were analyzed, and the visualization and module analysis of DEGs were conducted. Candidate genes were identified by survival analysis of TCGA database of the module gene with the highest score, and key genes

* 基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2020AAC03413、2021AAC0336、2021AAC03357、2022AAC03473); 宁夏医科大学口腔医学院一流学科二期建设项目(0019110104)。

作者简介: 李锦存(1995—), 硕士研究生在读, 住院医师, 主要从事口腔临床及肿瘤基础研究。△ 通信作者, E-mail: majianhs310@163.com。

were further screened by GSE41613 data set for survival analysis of candidate genes. The human Protein Atlas database was used to verify the protein expression of key genes in OSCC. Gene set enrichment analysis (GSEA website) was used to predict the possible signaling pathways of key genes in OSCC. **Results** According to the sequencing data from the three pairs of OSCC, a total of 1 818 DEGs were screened out, including 824 upregulated and 994 downregulated genes. They were mainly enriched in mitotic nuclear division, extracellular regions and calcium signaling pathways. TCGA data identified three candidate genes, including ASPM, CENPF and KIF15. The survival analysis of GSE41613 data identified CENPF as the key gene of OSCC. Its expression in OSCC tissues was higher ($P < 0.05$). OSCC with higher CENPF expression had worse prognosis ($P < 0.05$). The protein expression of CENPF in OSCC was higher. The samples with high expression of CENPF were enriched in gene sets of multiple pathways such as basic transcription factors and cell cycle ($P < 0.05$). **Conclusion** A total of 1 818 DEGs are screened by transcriptional sequencing, among which the prognosis is worse when CENPF is higher in OSCC, which may be related to the occurrence, development and prognosis of OSCC.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma; Computational biology; Differentially expressed genes; RNA sequencing; CENPF

头颈部癌症(HNSC)在全球恶性肿瘤中位居第 7 位,2018 年全球报道约有 89 万新发病例,死亡 45 万^[1]。其中口腔鳞状细胞癌(OSCC)全球每年大约有 30 万例新发病例和 14.5 万例死亡^[2]。OSCC 主要特点为具有高度侵袭性,易局部复发、转移,且生存率较低^[3-4]。OSCC 早期症状较轻,与口腔潜在恶性疾病相似,不易鉴别,OSCC 确诊时已进展至中晚期。因口腔颌面部结构的特殊性,手术治疗后影响进食及吞咽功能、美观和心理,严重影响了患者的生存。大量研究表明,OSCC 的发生、发展与基因异常表达密切相关^[5-6]。通过利用蛋白组学对 OSCC 发病机制的研究表明,许多差异表达蛋白与癌症的发生、发展有关^[7-8]。尽管从多方面对 OSCC 发病机制进行了研究,但仍没有达成公认的观点。因此,迫切需要寻找有效的生物标志物用于 OSCC 的早期诊断、预后评估和治疗。

RNA 测序高通量技术结合生物信息学的方法开始广泛用于肿瘤的研究,其在寻找肿瘤诊治的新型标志物方面的有效性和可靠性已得到证明。本研究收集 3 例 OSCC 患者的癌及癌旁组织,通过 RNA 测序分析筛选差异表达基因(DEGs),应用生物信息学对 DEGs 进行功能分析并进一步筛选关键基因,旨在为研究 OSCC 的发生、发展提供新的生物标志物用于筛查和诊治。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 2—10 月宁夏医科大学总医院口腔颌面外科收治的原发 OSCC 患者 3 例,病例 1:男,56 岁;病例 2:男,77 岁;病例 3:女,71 岁;

TNM 分期分别为Ⅱ、Ⅱ、Ⅲ期。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会审批,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 术中收集 3 例 OSCC 患者的癌及癌旁组织(距肿瘤边缘至少 0.5 cm),术后立即液氮中保存冷冻新鲜组织标本,−80 ℃保存。患者在术前未接受过化疗、放疗或任何其他抗癌治疗。癌及癌旁组织由宁夏医科大学总医院病理诊断科病理专家确认为鳞状细胞癌和正常组织。

1.2.2 高通量 RNA-seq 使用 Trizol Reagent 提取 3 对组织样本中的总 RNA,其质量要求通过生物芯片分析仪检测结果 RNA 完整值大于或等于 7。去除总 RNA 中的核糖体 RNA 并进行 RNA 片段化处理,按 NEBNext Ultra RNA 文库准备试剂盒说明书将片段 mRNA 反转录合成第一链 cDNA 并合成第二链 cDNA,修复 cDNA 尾端,加 dA 尾,然后将接头连接,聚合酶链反应扩增文库。经 Agilent2100 TapeStation 和 Qubit2.0 检测纯化后的文库,合格后的文库在北京博奥晶典生物技术有限公司使用 Illumina 平台进行测序。

1.2.3 数据处理及 DEGs 的筛选 利用 RNA 测序数据中肿瘤组织与相邻正常组织间的基因表达值以确定 DEGs。利用“DEseq”包,调整 $P < 0.05$, $|\log FC| \geq 2$,获得具有统计学意义的 DEGs。使用 R 软件包“Enhanced Volcano”对 DEGs 进行可视化绘制火山图。

1.2.4 基因富集分析 利用基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路

分析 DEGs 的生物学过程和相关信号通路,通过注释、可视化和发现集成数据库——DAVID 数据库 (version 6.8, <https://david.ncifcrf.gov/>) 确定 DEGs 的功能。设置错误发现率 (FDR) < 0.05 作为富集分析的纳入标准。以调节后 $P < 0.01$ 为临界值,确定相关信号通路。GO 富集分析包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF)。

1.2.5 蛋白质互作网络 (PPI)、模块构建及关键基因筛选 将 DEGs 输入 STRING (<https://string-db.org/>) 在线数据库,设置 PPI 分析种类为人,以交互得分大于或等于 0.9 分为阈值,导出 tsv 格式数据文件,使用 Cytoscape 3.9.0 软件对 PPI 进行可视化。采用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件对 PPI 中的关键网络进行辨别,并从中挖掘出关键调控基因,设置参数: Degree Cutoff = 2, Node Score Cutoff = 0.2, Max. Depth = 100, K-Core = 2, 进行模块分析,并对得分较高的模块进行 KEGG 富集分析。

1.2.6 基于 TCGA 数据库筛选候选基因 结合 TCGA 数据库中 HNSC 的数据,提取 MCODE 插件分析后的模块中得分最高的基因在各个样本中的表达数据,筛选原发性肿瘤的样本对这些基因的表达值进行 $\log_2(x + 0.001)$ 变换。使用 R 软件计算正常样本和肿瘤样本的表达差异,使用非配对的 t 检验进行分析;绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线。此外获得预后数据集^[9],并剔除随访时间短于 30 d 的样本,最终获得 HNSC 的表达数据及对应样本的总生存期数据。使用 R 软件包 survival (version 3.2-7) 的 coxph 函数建立分析得分最高的模块基因表达与 HNSC 的预后关系,使用 log-rank 进行统计检验, R 软件包 maxstat (version 0.7-25) 计算每个基因的最佳截断值,设置最小分组样本数大于 25%,最大分组样本数小于 75%,基于此,将患者分为高、低组,进一步使用 R 软件包 survival 的 survfit 函数分析 2 组患者预后的差异,利用 log-rank 方法评估不同组患者预后差异的显著性,设置 log-rang $P < 0.05$ 为候选基因筛选标准并进一步验证。

1.2.7 利用 GEO 数据库筛选关键基因并进行免疫组织化学 (免疫组化) 验证 从 GEO 数据库中下载 GSE41613 数据集的表达谱及生存数据,包含 97 例患者的表达谱及临床信息,提取出候选基因的表达谱,采用生存 R 软件包进行 Kaplan-Meier 分析和 log-rank 检验,验证候选基因表达对预后的影响。候选基因 (log-rank $P < 0.05$) 被认为是关键基因。通过 GSE41613 数据集验证关键基因表达对患者预后的影

响。利用人类蛋白质图谱数据 (<http://www.proteinatlas.org/>) 输入关键基因,进入正常组织及病理组织栏目中选取 OSCC 的免疫组织切片,根据染色强度、染色密度、定量分析关键基因蛋白质表达情况。

1.2.8 关键基因 GSEA 富集分析 从 GSEA 网站 (<https://www.gsea-msigdb.org/>) 下载 GSEA 软件 (version 3.0),根据关键基因的平均表达情况分为高表达组和低表达组,并从分子特征数据库 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/downloads.jsp>) 下载 c2.cp.kegg.v7.4.symbols.gmt 子集合,以评估相关途径和分子机制,分析过程中以 $P < 0.01$ 、FDR < 0.05 为截断值,表示差异有统计学意义。

2 结 果

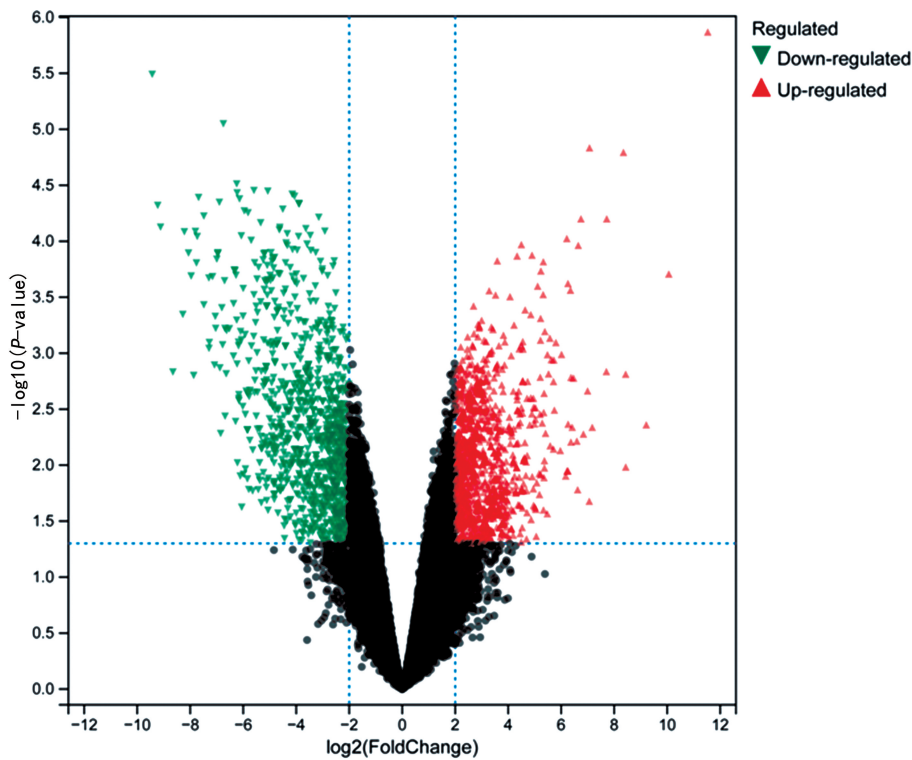
2.1 DEGs 的筛选 3 对 OSCC 组织和相邻正常组织共识别出 1 818 个 DEGs,其中上调基因 824 个,下调基因 994 个。见图 1。

2.2 DEGs 功能富集 OSCC 的 DEGs 在 BP 中主要富集在肌肉收缩、有丝分裂核分裂;在 CC 中主要富集在细胞外区域、细胞外间隙;在 MF 中主要富集在蛋白质异二聚体活性、肌动蛋白结合。见图 2A。这些基因在人类疾病中的通路有癌症中的转录失调、在新陈代谢方面有酪氨酸代谢、细胞过程中在细胞周期等方面显著富集。见图 2B。

2.3 PPI 构建及模块聚类 1 818 个 DEGs 进行可视化显示 543 个节点,2 059 条蛋白相互作用边所构成的网络。有 2 个得分较高的模块,模块 1 得分为 34.811 分,由 38 个节点和 644 边组成。见图 3A。模块 2 得分为 12.800 分,由 16 个节点 96 边组成。见图 3B。2 个模块中 DEGs 的 KEGG 主要富集在细胞周期、酗酒、p53 信号通路、细胞衰老、病毒致癌作用等信号通路。见表 1、2。

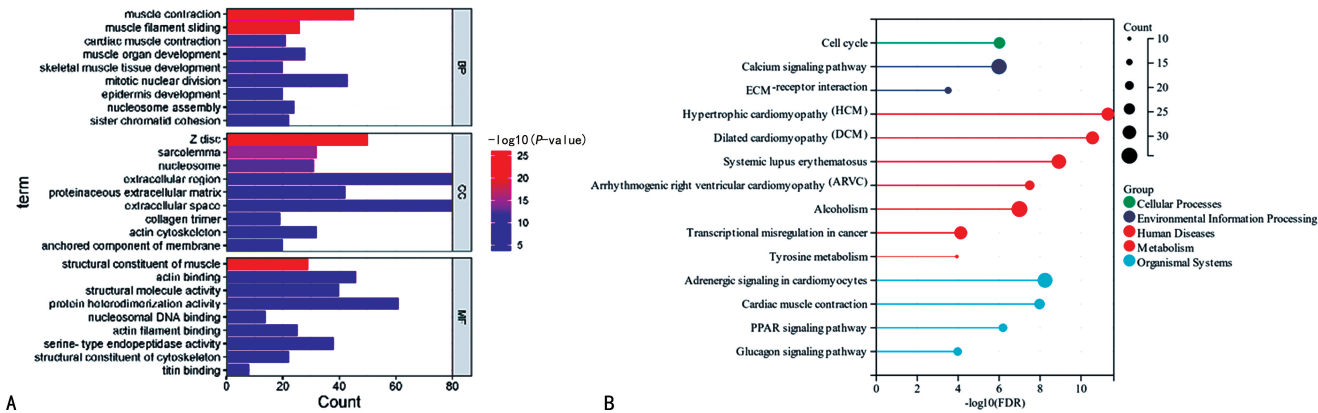
表 1 模块 1 的 KEGG 富集

条目	信号通路名称	<i>P</i>	数目	富集类型
hsa04110	细胞周期	<0.001	11	细胞增殖和凋亡
hsa04114	卵细胞成熟	<0.001	8	细胞增殖和凋亡
hsa04115	p53 信号通路	<0.001	4	细胞增殖和凋亡
hsa04218	细胞衰老	<0.001	4	细胞增殖和凋亡
hsa05166	T 细胞白血病病毒 1 感染	<0.001	6	病毒传染性疾病
hsa05170	人类免疫缺陷病毒 1 型感染	0.008	3	病毒传染性疾病
hsa04914	孕酮介导卵母细胞成熟	<0.001	6	内分泌系统
hsa04068	FoxO 信号通路	0.002	3	信号传导
hsa05203	病毒致癌作用	0.007	3	癌症概述
hsa01524	铂耐药	0.009	2	抗肿瘤药耐药性



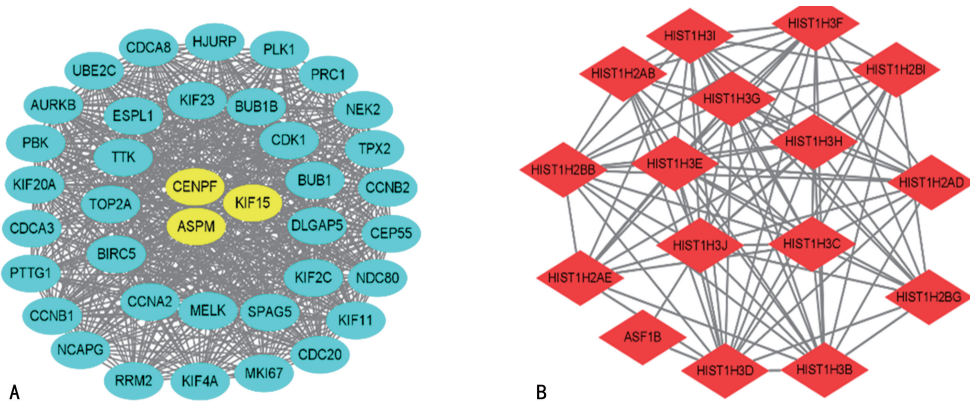
注:红色为上调基因;绿色为下调基因。

图 1 RNA 测序 DEGs 火山图



注:A. DEGs 的 GO 富集图;B. DEGs 的 KEGG 信号通路富集图。

图 2 DEGs 的 GO、KEGG 富集图



注:A. 模块 1;B. 模块 2。

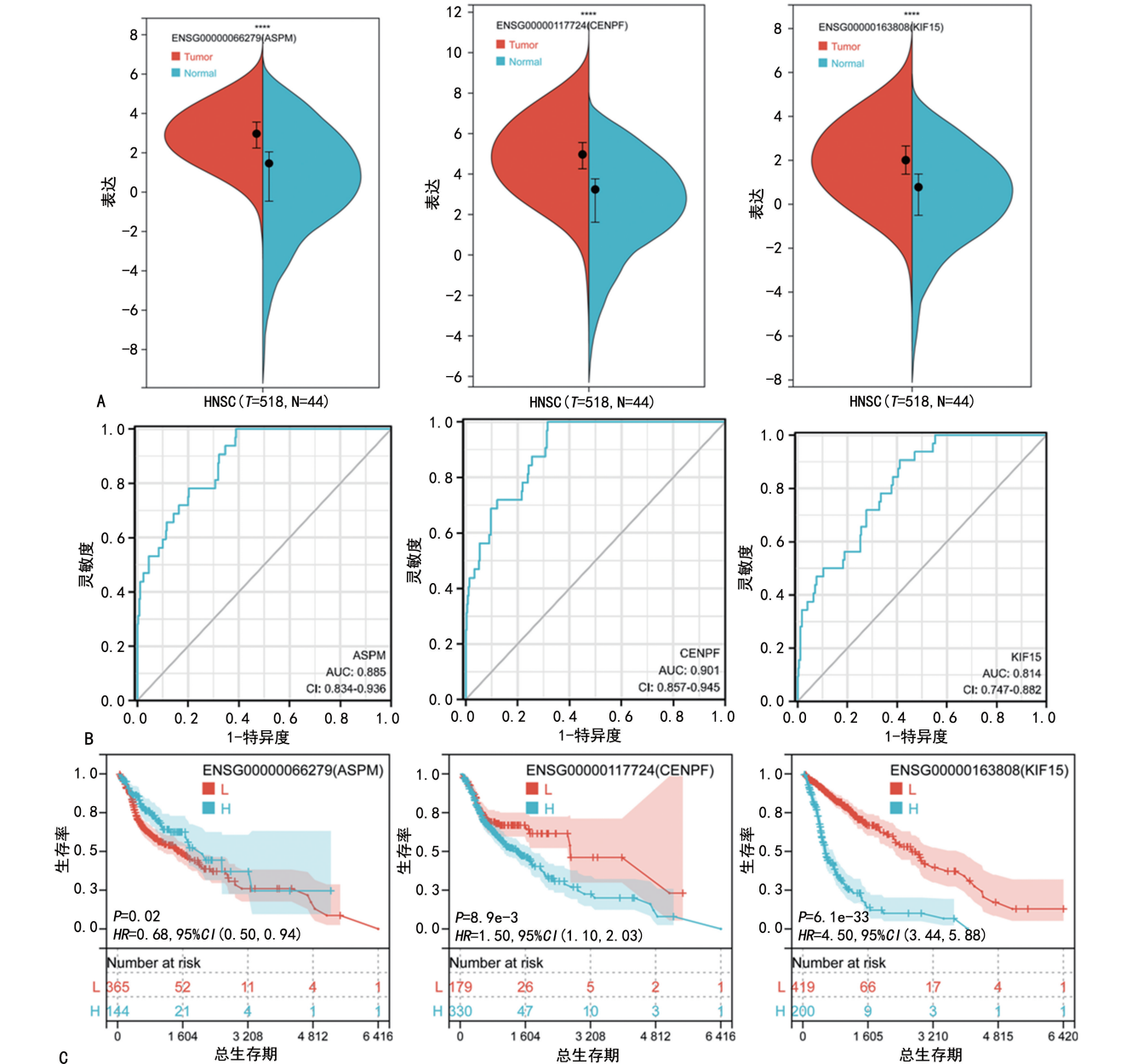
图 3 候选基因的核心模块图

表 2 模块 2 的 KEGG 富集

条目	信号通路名称	P	数目	通路富集类型
hsa05322	系统性红斑狼疮	<0.001	15	免疫性疾病
hsa05034	酗酒	<0.001	15	物质依赖
hsa05202	癌症中的转录失调	<0.001	9	癌症概述
hsa05203	病毒致癌作用	0.006	3	癌症概述
hsa04217	凋亡	0.003	3	细胞增殖和凋亡

2.4 基于 TCGA 数据库生存分析筛选候选基因 将

得分最高的模块 1 中的 38 个基因进行生存及表达分析,确定 ASPM、CENPF、KIF15 作为 OSCC 的候选基因。3 个候选基因在 OSCC 组织中的表达水平均高于正常组织,差异均有统计学意义($P<0.0001$)。见图 4A。ROC 曲线下面积分别为 0.885、0.901、0.814。见图 4B。ASPM、CENPF、KIF15 均与总生存期相关,差异均有统计学意义($P=0.020、0.009、0.040$)。见图 4C。



注: A. 3 个候选基因 ASPM、CENPF、KIF15 在 OSCC 组织中的表达均较正常组织增高; B. 3 个候选基因 ASPM、CENPF、KIF15 在 OSCC 组织中的 ROC 曲线; C. 3 个候选基因 ASPM、CENPF、KIF15 与 OSCC 的总生存期相关。

图 4 候选基因在 OSCC 组织及正常组织中的表达、ROC 曲线及生存分析

2.5 关键基因的 GEO 数据库生存分析及免疫组化验证 3 个候选基因 ASPM、CENPF、KIF15 中只有 CENPF 高表达时 OSCC 预后较差,差异有统计学意义($P=0.03$)。见图 5A。肿瘤组织中染色:高;强度:强;数量:75%~25%;正常组织中染色:低;强度:中;

数量:<25%。见图 5B。

2.6 CENPF 基因的 GSEA 富集分析 CENPF 基因主要富集在相关信号通路基础转录因子、细胞周期、黄体酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂等信号通路,其与模块 1 中基因富集的通路是一致的。见图 6。

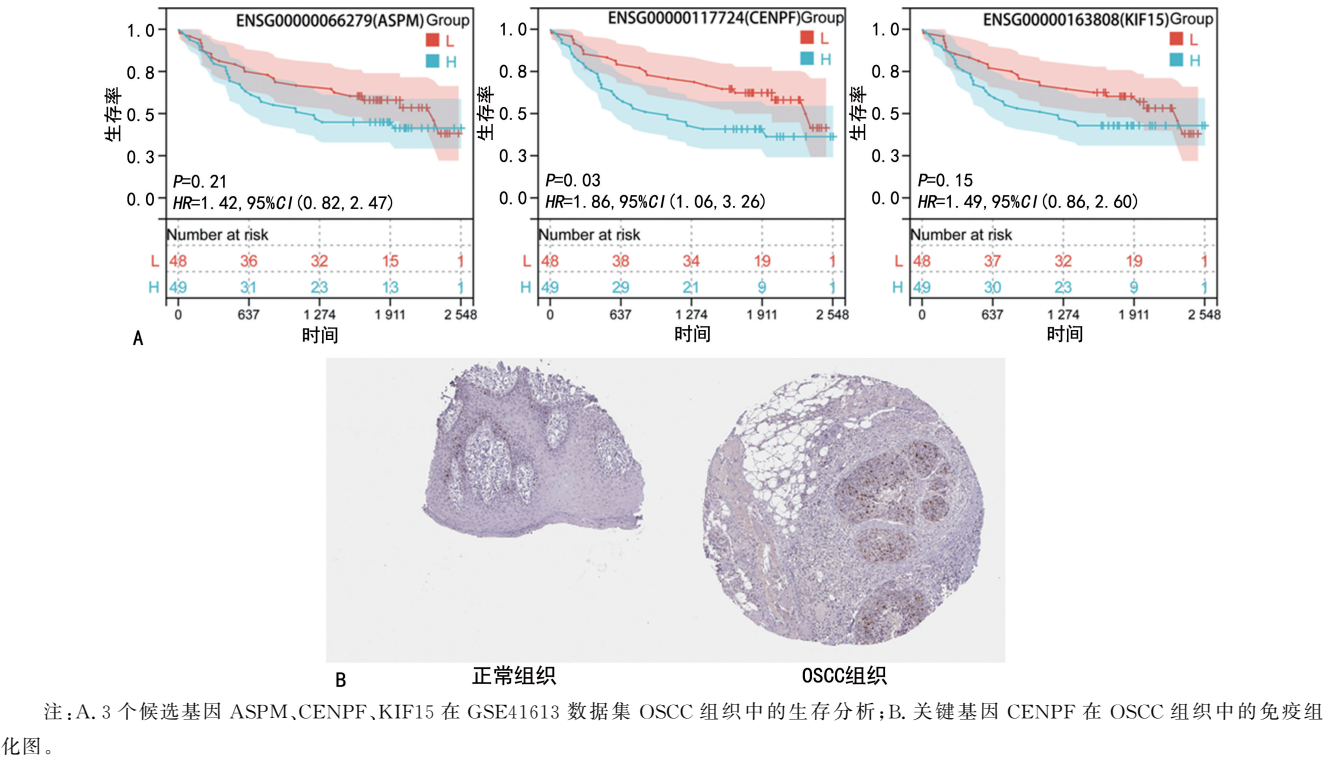


图 5 候选基因在 GSE41613 数据集生存分析及关键基因 CENPF 在 OSCC 组织中的免疫组化图

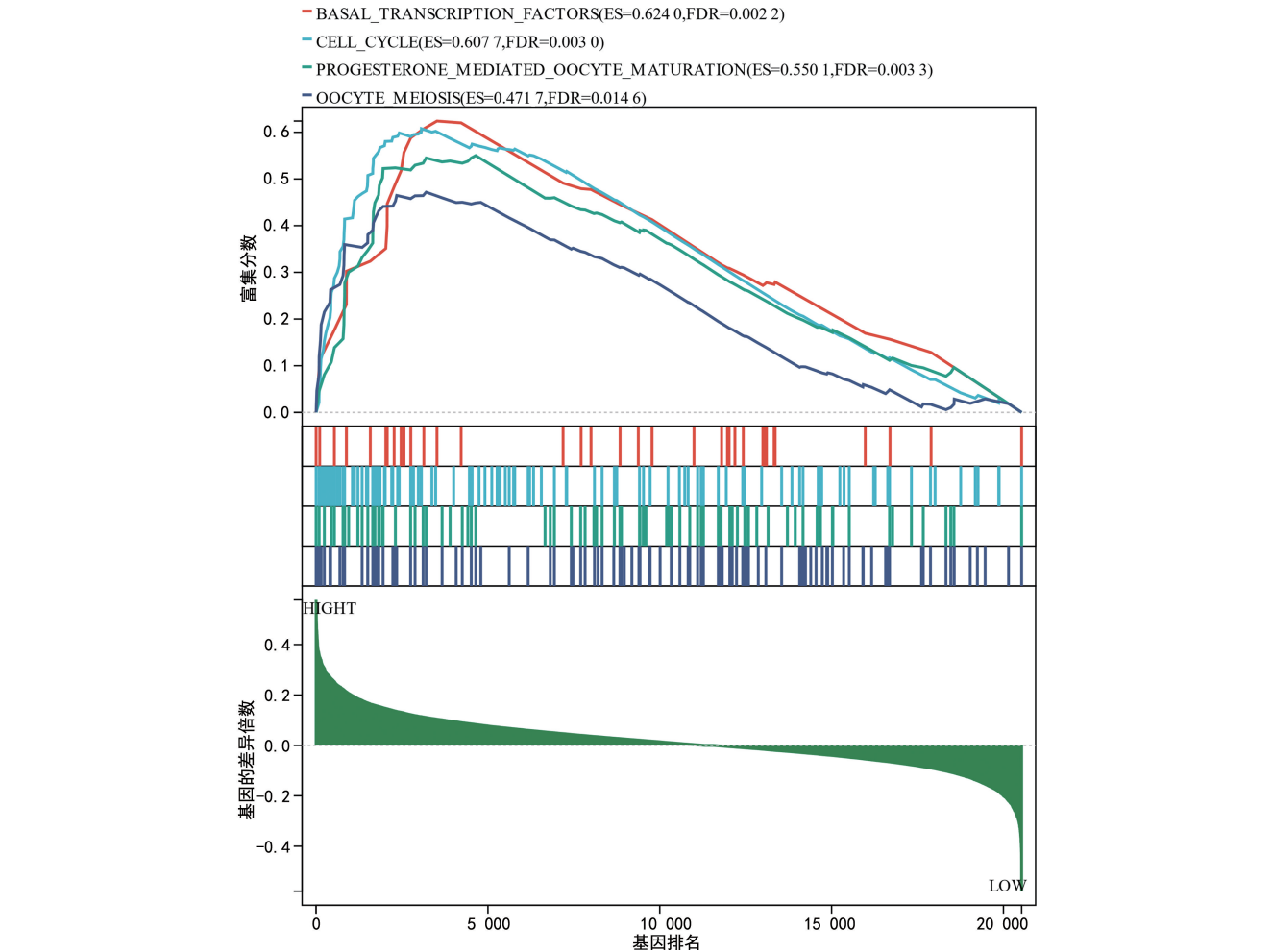


图 6 CENPF 功能富集分析

3 讨 论

OSCC 是最常见的 HNSC 之一, 约占有新诊断的临床癌症患者的 3%^[10]。OSCC 发生的主要危险因素有香烟、酒精和槟榔的摄入, 其他原因如遗传易感性、饮食和致癌病毒感染也是 OSCC 的潜在促进因素^[11]。其中致癌病毒, 如人类乳头瘤病毒较为明显, 约占人类癌症的 20%^[12]。口腔癌还与致癌物代谢、DNA 修复和细胞周期控制障碍引起的基因畸变有关^[13]。由于 OSCC 的发病机制尚不明确且术后易复发, 所以, 5 年生存率较低^[14]。因此, 寻找更有效的方法改善 OSCC 患者的预后是很重要的。近年来, 许多研究通过生物信息学对数据进行深部挖掘寻找生物标志物在多种癌症包括 OSCC 中得到证实, 其在 OSCC 的发生和进展中发挥着关键作用。ZHANG 等^[15]从胃癌患者中收集 6 对样本进行 RNA 测序, 通过生物信息学分析发现了 14 个代谢基因被确定为胃癌患者的潜在靶点, 并与免疫细胞浸润相关。其中支链氨基酸转氨酶 2 的失调与胃癌患者的总生存期相关。YE 等^[16]通过生物信息学联合分析 GEO 和 TCGA 数据库确定 CEACAM5、CEACAM6、CLCA4 与头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)预后相关, 并通过实时荧光定量聚合酶链反应和免疫组化证实其在 HNSCC 组织中低表达。YANG 等^[17]通过生物信息学与体外实验结合的方法证实了 AUNIP 过表达预示着 OSCC 患者预后不良。本研究通过 RNA 测序结合生物信息学基于 TCGA 和 GEO 数据库分析表明 CENPF 与 OSCC 预后相关。

本研究通过 RNA 鉴定出 1 818 个 DEGs, 其中上调基因 824 个, 下调基因 994 个。随后用 DAVID 数据库对 DEGs 进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析中 BP 参与肌肉收缩、有丝分裂核分裂; MF 主要分布于蛋白质异二聚体活性、肌动蛋白结合; CC 分布在细胞外区域、蛋白质的细胞外基质(ECM)。KEGG 同样富集在 ECM 受体。其中 ECM 构成组织器官的支架。肿瘤诱导 ECM 改变, 如增加组织刚度和结缔组织, 以及破坏基底膜是恶性肿瘤的标志, 并在诊断和组织学上被利用。在实体恶性肿瘤中基质和周围组织 ECM 的降解和重建是增殖、侵袭和转移的必要条件^[18]。

本研究构建 PPI 获得 2 个模块。同时, 通过分析 TCGA 数据库中 HNSC 患者的癌及正常组织中表达和生存数据分析模块 1 中的 38 个基因, 确定了与总生存期密切相关的 3 个候选基因 ASPM、CENPF 和 KIF15。其在 OSCC 组织中表达水平均高于癌旁组织, 差异均有统计学意义($P < 0.0001$); ASPM、CENPF、KIF15 均与总生存期相关, 差异均有统计学

意义($P = 0.020, 0.009, 0.040$)。另外, 本研究分别将 2 个模块进行 KEGG 分析表明, 主要富集在细胞周期、p53 信号通路、细胞衰老、酗酒、病毒致癌作用等。其中 p53 信号通路已在各种癌症中得到证实, 如胰腺癌^[19]、食管鳞状细胞癌^[20]和肺癌^[21]。此外, 酗酒和病毒致癌作用已在 OSCC 中得到证实^[22-23]。

大量研究表明, ASPM、KIF15 作为致癌因子均在多种癌症中发挥着重要作用, 如 ASPM 在结直肠癌^[24]、膀胱癌^[25]中过表达, 促进肿瘤细胞增殖。KINNA 等^[26]结合 TCGA 数据库分析证明 ASPM 突变在中低分化 HNSCC 中明显富集。据文献报道, KIF15 过表达促进癌细胞增殖并且可能成为很多肿瘤诊断或治疗的新靶点, 包括肺癌^[27]、胃癌^[28]和其他肿瘤^[29]。本研究基于 TCGA 数据库中 HNSC 样本 ASPM、KIF15 在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织, 但生存分析结果显示, KIF15、ASPM 高表达的 OSCC 患者表现出更好的生存预后。与大多数研究不相符合。所以, 本研究从 GEO 数据集中下载了 GSE41613 数据集对 3 个候选基因 ASPM、CENPF 和 KIF15 进行进一步生存分析, 结果显示, CENPF 高表达的 OSCC 预后较差, 差异有统计学意义($P = 0.03$), 但候选基因 ASPM、KIF15 在 GSE41613 数据集的 OSCC 患者中生存分析无明显差异。最终确定 CENPF 为 OSCC 的关键基因。

为探索 CENPF 基因调控 OSCC 进展的分子机制, 本研究进行富集分析结果显示, CENPF 主要富集在相关信号通路基础转录因子、细胞周期等信号通路, 其细胞周期通路在本研究测序数据中的 DEGs 和模块 1 中的基因均有富集。同时, 也有研究表明, CENPF 在细胞周期方面具有重要影响^[30-31]。CENPF 人类蛋白质图谱数据库中的免疫组化结果表明其在 OSCC 组织中高表达。先前有大量研究表明, CENPF 作为多种恶性肿瘤的生物标志物促进了肿瘤的发生、发展, 包括甲状腺癌^[32]和黑色素瘤^[33]等。SUN 等^[34]发现, CENPF 过表达与乳腺癌不良预后及肿瘤骨转移相关。DE LA GUARDIA 等^[35]研究表明, CENPF 基因在 HNSCC 中过表达且与淋巴结转移相关, 均与本研究结果相同。但 CENPF 在 OSCC 中的体内研究较少见, 其作用机制尚不清楚, 其在 OSCC 中的作用尚有待于进一步探索。

综上所述, 本研究转录组测序鉴定出 1 818 个 DEGs, 其中 CENPF 表达水平较高的 OSCC 预后较差, 其可能与 OSCC 的发生、发展及预后有关。

参考文献

[1] BRAY F, FERLA Y, SOERJOMATARAM I,

- et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.
- [2] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-E386.
- [3] ZHENG M, JIANG Y, CHEN W, et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9):6797-6810.
- [4] KESSLER P, GRABENBAUER G, LEHER A, et al. Neoadjuvant and adjuvant therapy in patients with oral squamous cell carcinoma Long-term survival in a prospective, non-randomized study[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 46(1):1-5.
- [5] LIU L, WU Y, LI Q, et al. METTL3 promotes tumorigenesis and metastasis through BMI1 m(6)A methylation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(10):2177-2190.
- [6] PEREIRA C M, DE CARVALHO A C, DE SILVA F R, et al. In vitro and in silico validation of CA3 and FHL1 downregulation in oral cancer[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):193.
- [7] WONG Y L, RAMANATHAN A, YUEN K M, et al. Comparative sera proteomics analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma[J]. *Peer J*, 2021, 9:e11548.
- [8] CHEN X, HU Q, WU T, et al. Proteomics-based investigation of multiple stages of OSCC development indicates that the inhibition of Trx-1 delays oral malignant transformation[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3):733-742.
- [9] LIU J, LICHTENBERG T, HOADLEY K A, et al. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics[J]. *Cell*, 2018, 173(2):400-416.
- [10] CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: An update[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(5):401-421.
- [11] METGUD R, ASKEKAR M, VERMA M, et al. Role of viruses in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rev*, 2012, 6(2):e21.
- [12] LUO G G, OU J H. Oncogenic viruses and cancer[J]. *Viol Sin*, 2015, 30(2):83-84.
- [13] SCULLY C, FIELD J K, TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(3):256-263.
- [14] WECKX A, GROCHAU K J, GRANDOCH A, et al. Survival outcomes after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Dis*, 2020, 26(7):1432-1439.
- [15] ZHANG Y, LIU W, FENG W, et al. Identification of 14 differentially-expressed metabolism-related genes as potential targets of gastric cancer by integrated proteomics and transcriptomics [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:816249.
- [16] YE Y, WANG J, LIANG F, et al. Identification of key genes for HNSCC from public databases using bioinformatics analysis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):549.
- [17] YANG Z, LIANG X, FU Y, et al. Identification of AUNIP as a candidate diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2019, 47:44-57.
- [18] EBLE J A, NILAND S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2019, 36(3):171-198.
- [19] ZHANG H, ZHANG X, LI X, et al. Effect of CCNB1 silencing on cell cycle, senescence, and apoptosis through the p53 signaling pathway in pancreatic cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1):619-631.
- [20] YAN S, XU J, LIU B, et al. Long non-coding RNA BCAR4 aggravated proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma by negatively regulating p53/p21 signaling pathway[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):682-696.
- [21] HAO X L, HAN F, ZHANG N, et al. TC2N, a novel oncogene, accelerates tumor progression by suppressing p53 signaling pathway in lung cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(7):1235-

1250.

[22] ZIL E R, BAIG S, ZAMAN U, et al. Human papilloma virus 16/18: Fabricator of trouble in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Infect Dis, 2018, 69:115-119.

[23] LIU B, SHEN M, XIONG J, et al. Synergistic effects of betel quid chewing, tobacco use (in the form of cigarette smoking), and alcohol consumption on the risk of malignant transformation of oral submucous fibrosis (OSF): A case-control study in Hunan Province, China [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2015, 120(3):337-345.

[24] YANG Q, QI M, CHEN Y, et al. ASPM is a novel candidate gene associated with colorectal cancer cell growth[J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(7):921-935.

[25] GAO Z Y, YU F, JIA H X, et al. ASPM predicts poor prognosis and regulates cell proliferation in bladder cancer[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36(12):1021-1029.

[26] KINA S, KAWABATA-IWAKAWA R, MIYAMOTO S, et al. A molecular signature of well-differentiated oral squamous cell carcinoma reveals a resistance mechanism to metronomic chemotherapy and novel therapeutic candidates[J]. J Drug Target, 2021, 29(10):1118-1127.

[27] LUO Y, ZHANG B, XU L, et al. Downregulation of KIF15 inhibits the tumorigenesis of non-small-cell lung cancer via inactivating Raf/MEK/ERK signaling[J]. Histol Histopathol, 2021, 37(3):269-285.

[28] TAO J, SUN G, LI Q, et al. KIF15 promotes the evolution of gastric cancer cells through inhibition of reactive oxygen species-mediated apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12):9388-9398.

[29] WANG Z, CHEN M, FANG X, et al. KIF15 is involved in development and progression of Burkitt lymphoma[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1):261.

[30] LI X, LI Y, XU A, et al. Apoptosis-induced translocation of centromere protein F in its corresponding autoantibody production in hepatocellular carcinoma [J]. Oncoimmunology, 2021, 10(1):1992104.

[31] HUANG Y G, LI D, WANG L, et al. CENPF/CDK1 signaling pathway enhances the progression of adrenocortical carcinoma by regulating the G₂/M-phase cell cycle[J]. J Transl Med, 2022, 20(1):78.

[32] HAN Y, XU S, CHENG K, et al. CENPF promotes papillary thyroid cancer progression by mediating cell proliferation and apoptosis[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4):401.

[33] LI M, ZHAO J, YANG R, et al. CENPF as an independent prognostic and metastasis biomarker corresponding to CD4⁺ memory T cells in cutaneous melanoma[J]. Cancer Sci, 2022, 113(4):1220-1234.

[34] SUN J, HUANG J, LAN J, et al. Overexpression of CENPF correlates with poor prognosis and tumor bone metastasis in breast cancer[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19:264.

[35] DE LA GUARDIA C, CASIANO C A, TRINIDAD-PINEDO J, et al. CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Head Neck, 2001, 23(2):104-112.

(收稿日期:2022-11-20 修回日期:2023-02-26)