

基于生物信息学鉴定CCNB2为肾嫌色细胞癌进展的关键基因

谢义腾*, 张元峰, 张荣贵#

重庆医科大学附属第二医院泌尿外科, 重庆

收稿日期: 2024年2月27日; 录用日期: 2024年3月21日; 发布日期: 2024年3月28日

摘要

本研究旨在通过生物信息学方法筛选与肾嫌色细胞癌(Chromophobe renal cell carcinoma, chrcc)相关的生物标志物, 作为预测chrcc预后的关键基因。GSE15641数据集从Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库中获得, 共鉴定出1153个差异表达基因(DEGs)。随后, 检测差异表达基因进行基因本体(GO)注释和京都基因基因组百科全书(KEGG)途径富集分析。此外, 利用Cytoscape软件构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络并可视化鉴定关键基因, 包括KRAS、EGFR、EHHADH和CCNB2, 根据Kaplan-Meier (K-M) 生存分析, CCNB2是唯一重要的核心基因。根据我们的研究结果, CCNB2在The Cancer Genome Atlas(TCGA)-chrcc患者中的表达明显高于正常样本, 并且CCNB2在癌症组织中的高表达与不良的临床病理因素有关。CCNB2高表达组与低表达组相比, 总生存期(OS)和无进展间期(PFI)明显较差。同时, 免疫浸润分析显示CCNB2表达与chrcc患者Th2细胞富集水平呈正相关, CCNB2表达与细胞毒性细胞和DC细胞呈负相关。最后, 根据包括CCNB2基因在内的基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 富集结果, 肝癌(HCC)亚类与乳腺癌(BC)的分类存在显著差异。在目前的工作中, CCNB2可以被认为是chrcc的预测性分子标记物和潜在的治疗靶点。

关键词

嫌色细胞癌, 生物信息学分析, CCNB2, GSE15641

Bioinformatics-Based Identification of CCNB2 as a Key Gene in the Progression of Chromophobe Renal Cell Carcinoma

Yiteng Xie*, Yuanfeng Zhang, Ronggui Zhang#

Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 谢义腾, 张元峰, 张荣贵. 基于生物信息学鉴定 CCNB2 为肾嫌色细胞癌进展的关键基因[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 1620-1631. DOI: 10.12677/acm.2024.143886

Abstract

The present work aimed to screen biomarkers associated with chromophobe renal cell carcinoma (chrcc) by bioinformatics methods as key genes to predict the prognosis of chrcc. The GSE15641 dataset was acquired from Gene Expression Omnibus (GEO) database, and totally of 1153 differentially expressed genes (DEGs) were identified. Thereafter, DEGs were detected to carry out Gene Ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) pathway enrichment analysis. Moreover, the protein-protein interaction (PPI) networks were constructed and visualized using Cytoscape software to identify pivotal genes, including KRAS, EGFR, EHHADH and CCNB2, with CCNB2 being identified as the only significant core gene according to Kaplan-Meier (K-M) survival analysis. According to our results, CCNB2 expression was notably higher in The Cancer Genome Atlas (TCGA)-chrcc patients than in normal samples, and the high CCNB2 expression in cancer tissues was associated with adverse clinicopathological factors. The high CCNB2 expression group had markedly poor overall survival (OS) and progression-free interval (PFI) compared with low expression group. Meanwhile, immune infiltration analysis demonstrated a positive correlation between CCNB2 expression and Th2 cells enrichment levels in chrcc patients, and a negative correlation between CCNB2 expression and Cytotoxic cells as well as DC cells. At last, according to the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) enrichment results including CCNB2 gene, there was a significant difference in the classification of hepatocellular carcinoma (HCC) subclass and breast cancer (BC). In the current work, CCNB2 can be considered as a predictive molecular marker and a potential therapeutic target for chrcc.

Keywords

chrcc, Bioinformatics Analysis, CCNB2, GSE15641

Copyright © 2024 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. 前言

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一，全球大约每年新增超过 43 万例肾癌病人，超过 17 万人因肾癌去世[1]，尽管肾癌有很多的病理类型，嫌色细胞癌是肾癌中第三常见的亚型，大约占据 4%~5% [2]，众所周知，嫌色细胞癌是一种低度恶性的肿瘤，起源于肾集合管上皮，其临床表现多种多样。早期患者(病理 I~III 期)及时手术，也就是部分或者根治性肾切除可以达到治愈的效果[3]，其预后优于肾透明细胞癌，然而对于部分肿瘤复发、分期较晚(病理 IV 期)的患者，往往预后较差，仍需要其他辅助治疗，如免疫治疗和靶向治疗，目前有研究证明舒尼替尼和索拉非尼等药物在晚期肾癌患者中有着显著的效果[4]，即使如此，晚期肿瘤病人存活率仍较低，一线治疗方案仍不明确，因此，临床上更需要进一步挖掘嫌色细胞癌的分子机制，找到有效的生物标志物以及预后相关的基因对疾病的治疗有着重大意义，为实施合理的治疗提供一定的理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 数据收集

通过 GEO 数据库下载高通量测序数据集 GSE15641，基因芯片数据类型为 Expression profiling by array，

种属为 *Homo sapiens*，数据集注释平台为 GPL96，其中包含有 6 个肾嫌色细胞癌、23 个正常肾组织样本。

2.2. DEGs 的提取和分析

在以上样本中，将原始数据分为肾嫌色细胞癌和正常肾组织组，使用 GE02R 在线分析工具分析并筛选出 GSE15641 数据集中的 DEGs，筛选标准为 $p < 0.05$ 并且 $\log(FC)$ 绝对值 > 1.0 。

2.3. 功能富集分析

富集分析包括 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 富集是组学数据分析常用的手段，包括：BP (biological process)，CC (cellular component) 和 MF (molecular function) 三个方面对 DEGs 进行全面的注释。同时，KEGG 数据库可以全面了解富集通路。使用 DAVID 工具对 DEGs 分别进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析，以图形方式进行可视化，以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.4. PPI 网络的构建及 Hub 基因的鉴定

使用 String 在线数据库工具构建了基于 DEGs 的 PPI 网络，并使用 Cytoscape 软件进行可视化，使用 CytoNCA 插件对 PPI 网络上所有 DEGs 进行评分，然后根据 Betweenness、Degree、Network 和 Information 四种算法对识别出的 DEGs 进行排序。

2.5. Hub 基因的预后分析

TCGA，即癌症基因组图谱计划，是一个用来研究癌症中基因组变化的数据库，我们从中选择肾嫌色细胞癌中 TPM 格式，用对获得的 Hub 基因采用 Log-rank 检验进行 K-M 生存分析。

2.6. CCNB2 在 TCGA 数据库中的验证

从 TCGA 数据库中选择肾嫌色细胞癌 89 例 (TPM 数据)，使用 R 语言 ggplot2 包，用 Wilcoxon 秩和检验检测 CCNB2 在 chrcc 患者癌组织和正常组织中以及在配对组织中的表达水平是否有差异。我们同样采用 Kruskal-Wallis test、Wilcoxon 等检验方法，从总体生存期 (OS)、无进展间隔 (PFI)、疾病特异性生存期 (DSS)、病理分期四个方面分析 CCNB2 表达与临床特征的关系。

2.7. 免疫浸润分析

为了探究 CCNB2 基因在 chrcc 中与免疫微环境的 24 种免疫细胞的表达程度的关系，我们基于 R 语言的 GSVA 包和 ssGSEA 算法计算肿瘤组织中免疫细胞的分数情况，以 Spearman 检验方法判断是否有相关性，筛选标准为 $p < 0.05$ 。

2.8. 基因集富集分析 (GSEA)

为了更加深入地寻找 CCNB2 基因富集的通路，我们使用 R 包 “ClusterProfiler” 工具，在 MSigDB collections 集合 (c2.all.v7.0) 中，以 $p < 0.05$ 和 $FDR < 0.25$ 作为筛选标准，确定显著差异的信号通路。

3. 结果

3.1. 差异基因的鉴定

通过分析共检测到 1153 个 DEGs，其中上调基因 469 个，下调基因 684 个，通过绘制箱形图和 PCA 图进行可视化，如图 1 所示。箱形图中每个样本的中位数基本在一个水平上，说明样本之间的归一化程度较好，而 PCA 图上各组样本是分开的，说明两组之间差异明显。此外，DEGs 的热图和火山图如图 2

所示，红色表示上调基因，蓝色表示下调基因。

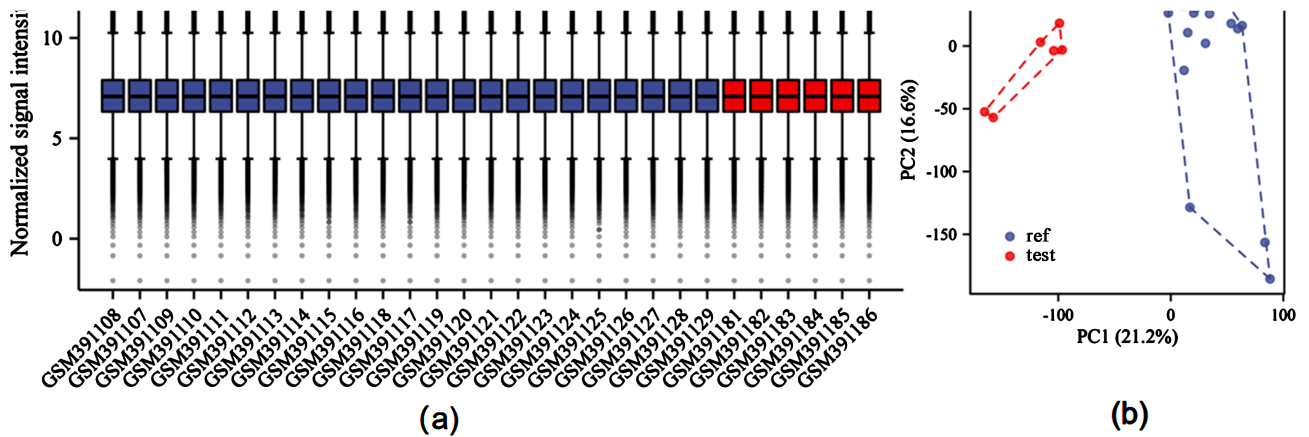


Figure 1. Box plots (a) and PCA plots (b) for the samples of GSE15641 dataset
图 1. GSE15641 数据集样本的箱形图(a)和 PCA 图(b)

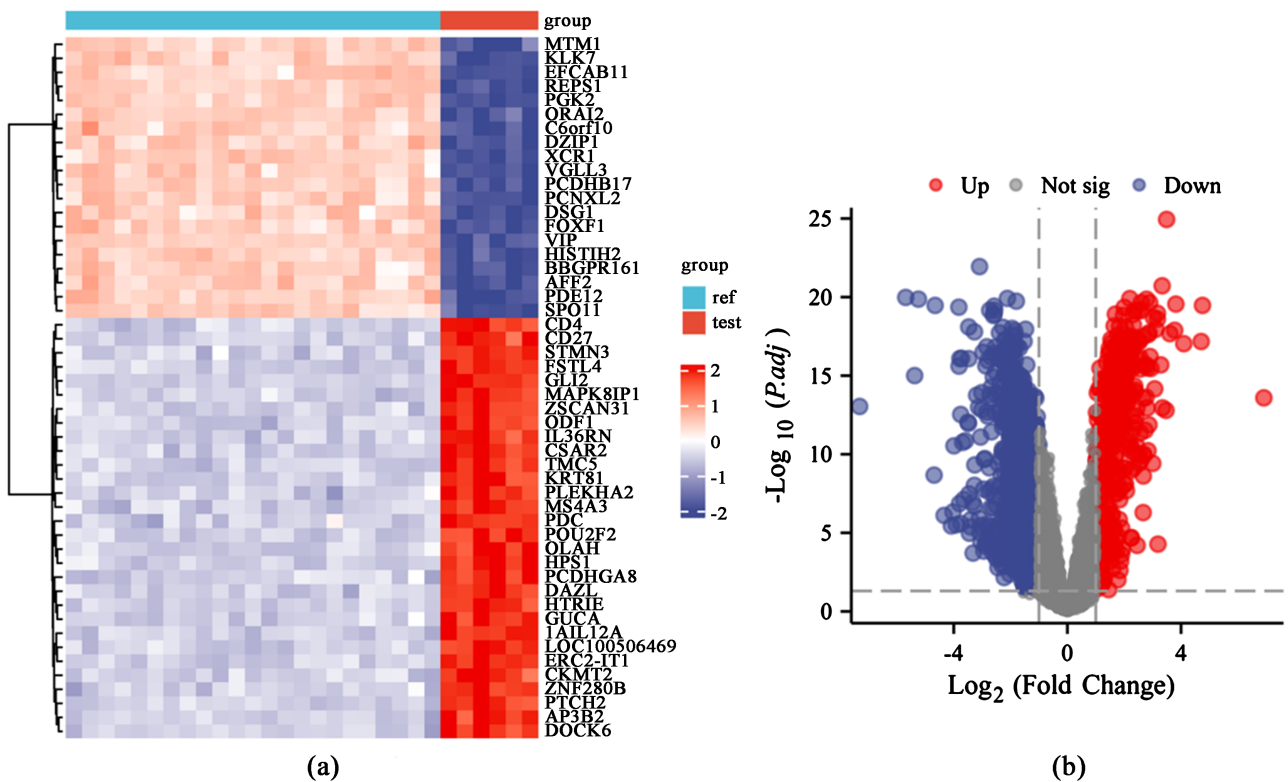


Figure 2. Heat map (a) and volcano map (b) for the samples of GSE15641 dataset
图 2. GSE15641 数据集样本中的热图(a)、火山图(b)

3.2. GO 和 KEGG 富集分析

根据富集结果(图 3)，DEGs 主要富集到 BP 方面，包括有机阴离子转运、糖酵解/糖异生、对金属离子的响应、对肾脏系统发育的响应；CC 如细胞的根尖部分、根尖质膜、含有胶原蛋白的细胞外基质和分

泌颗粒的管腔；而 MF 包括受体配体活性、阴离子跨膜转运蛋白活性、辅酶结合和有机阴离子跨膜转运蛋白活性。KEGG 通路富集表明补体和凝血级联、糖酵解/糖异生、矿物质摄取、精氨酸和脯氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、肾素 - 血管紧张素系统和类固醇生物合成等途径显著富集。

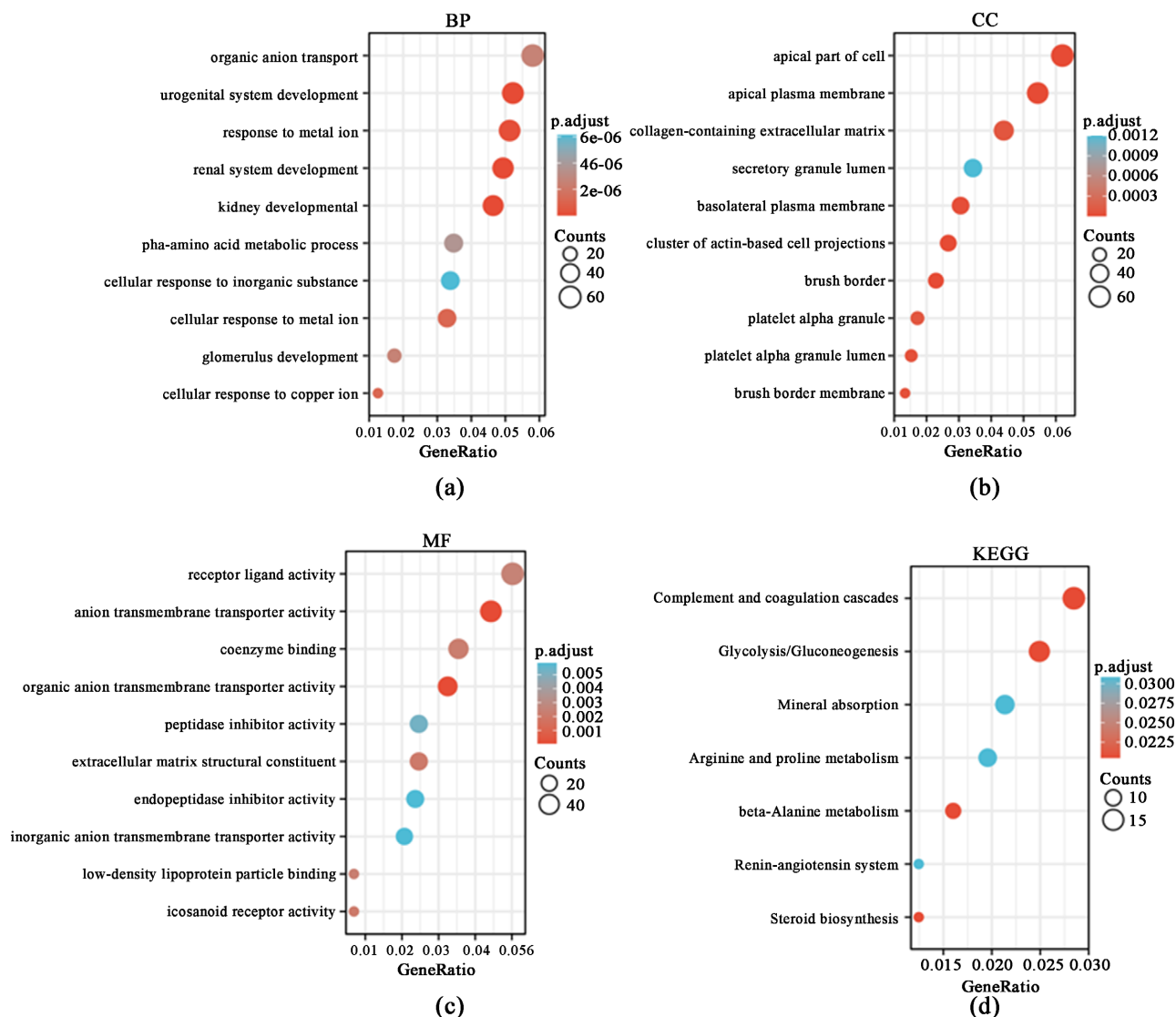


Figure 3. BP (a), CC (b), MF (c) and KEGG (d) enrichment results of DEGs
图 3. DEGs 的 BP (a), CC(b), MF (c) and KEGG (d)富集结果

3.3. PPI 相互作用与枢纽基因鉴定

根据每个标准选出的前 50 个基因如图 4(a)~图 4(d)所示，其中圆圈直径越大，得分越高，预示着关联越强。将得分最高的 15 个 DEGs 作为枢纽基因(表 1)，然后分析相互作用，得到 4 个重叠的枢纽基因，分别是 KRAS、EGFR、EHHADH 和 CCNB2 (图 4(e))。

3.4. K-M 生存分析曲线

从曲线上可以看出，CCNB2 基因低表达比高表达预后更好，两组患者生存时间差异有统计学意义(见

图 5), 因此检测 CCNB2 是 chrcc 中具有临床意义的核心基因。

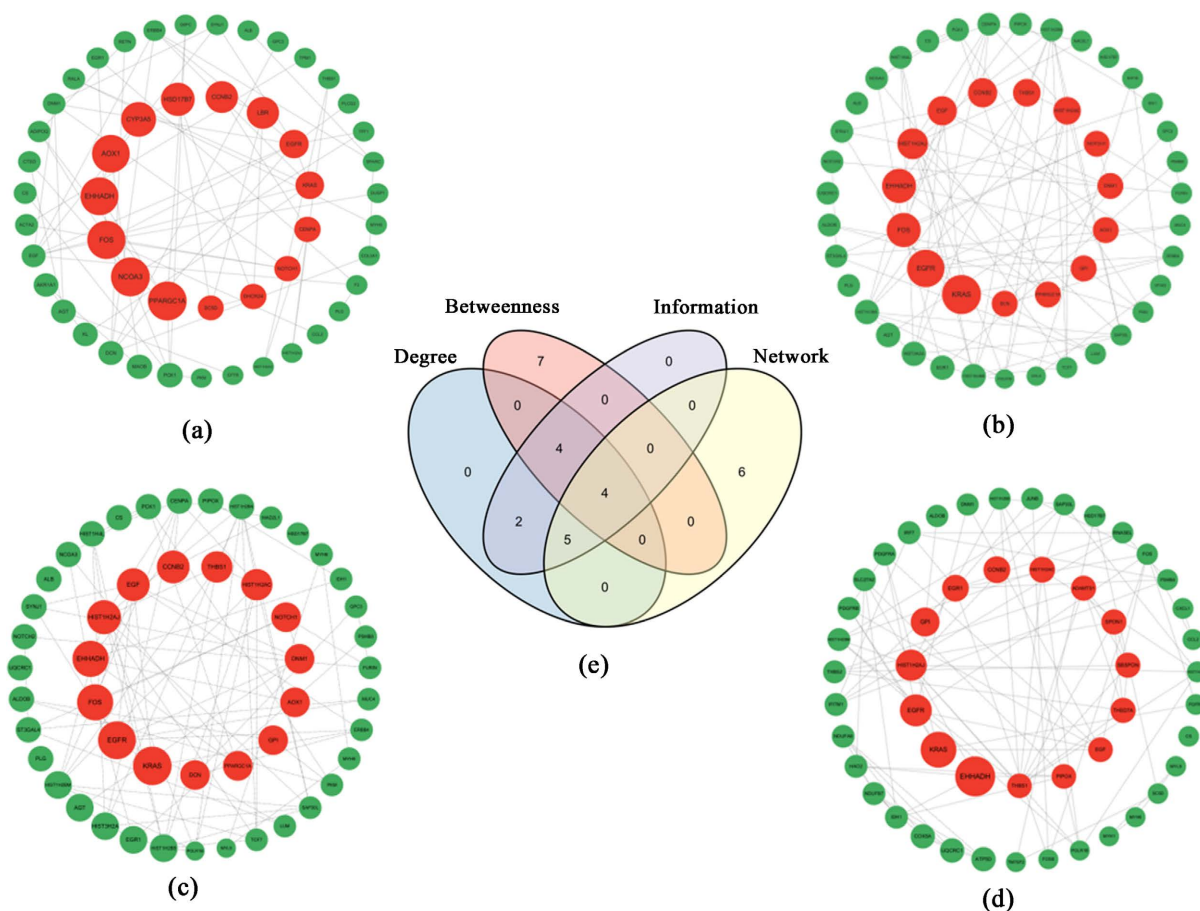


Figure 4. The top 50 Hub genes were screened according to the Betweenness (a), Degree (b), information (c) and Network (d), interaction according to the Betweenness, Degree, Information and Network (e)

图 4. 根据 Betweenness (a)、Degree (b)、information (c)和 Network (d)筛选前 50 个 Hub 基因,根据 Betweenness、Degree、Information and Network 进行交互(e)

Table 1. Top 15 hub genes sorted out according to Betweenness, Degree, Network and Information.

表 1. 根据 Betweenness、Degree、Information and Network 的前 15 个中心基因

Betweenness	Degree	Network	Information
PPARGC1A	KRAS	EHHADH	KRAS
NCOA3	EGFR	KRAS	EGFR
FOS	FOS	EGFR	FOS
EHHADH	EHHADH	HIST1H2AJ	EHHADH
AOX1	HIST1H2AJ	GPI	HIST1H2AJ
CYP3A5	EGF	EGR1	EGF
HSD17B7	CCNB2	CCNB2	CCNB2
CCNB2	THBS1	HIST1H2AC	THBS1
LBR	HIST1H2AC	ADAMTS1	HIST1H2AC

续表

EGFR	NOTCH1	SPON1	NOTCH1
KRAS	DNM1	SBSPON	DNM1
CENPA	AOX1	THSD7A	AOX1
NOTCH1	GPI	EGF	GPI
DHCR24	PPARGC1A	PIPOX	PPARGC1A
SC5D	DCN	THBS1	DCN

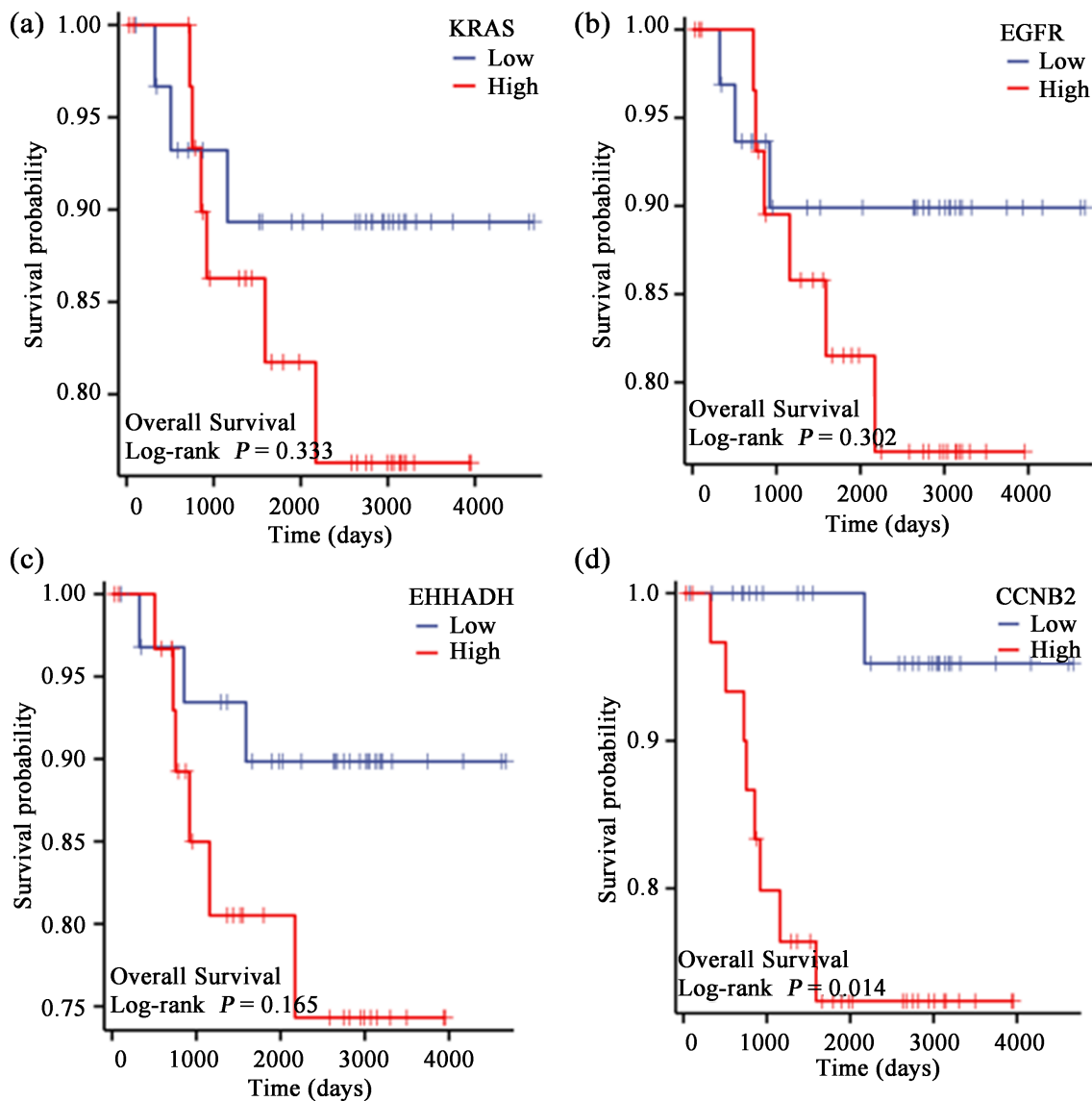


Figure 5. Survival analysis curve of the KRAS (a), EGFR (b), EHHADH (c), and CCNB2 (d)

图 5. KRAS (a)、EGFR (b)、EHHADH (c)、CCNB2 (d)的生存分析曲线

3.5. 数据验证

根据我们的研究结果，相对于 25 个正常组织，65 个 chrcc 肿瘤组织中 CCNB2 明显上调(图 6(a))。此

外, 在 24 对肿瘤组织中也有高表达(图 6(b))。经统计分析, CCNB2 与 OS、PFI、DSS 及病理分期有显著相关性(图 6(c)~图 6(f)) (p 值 < 0.05)。

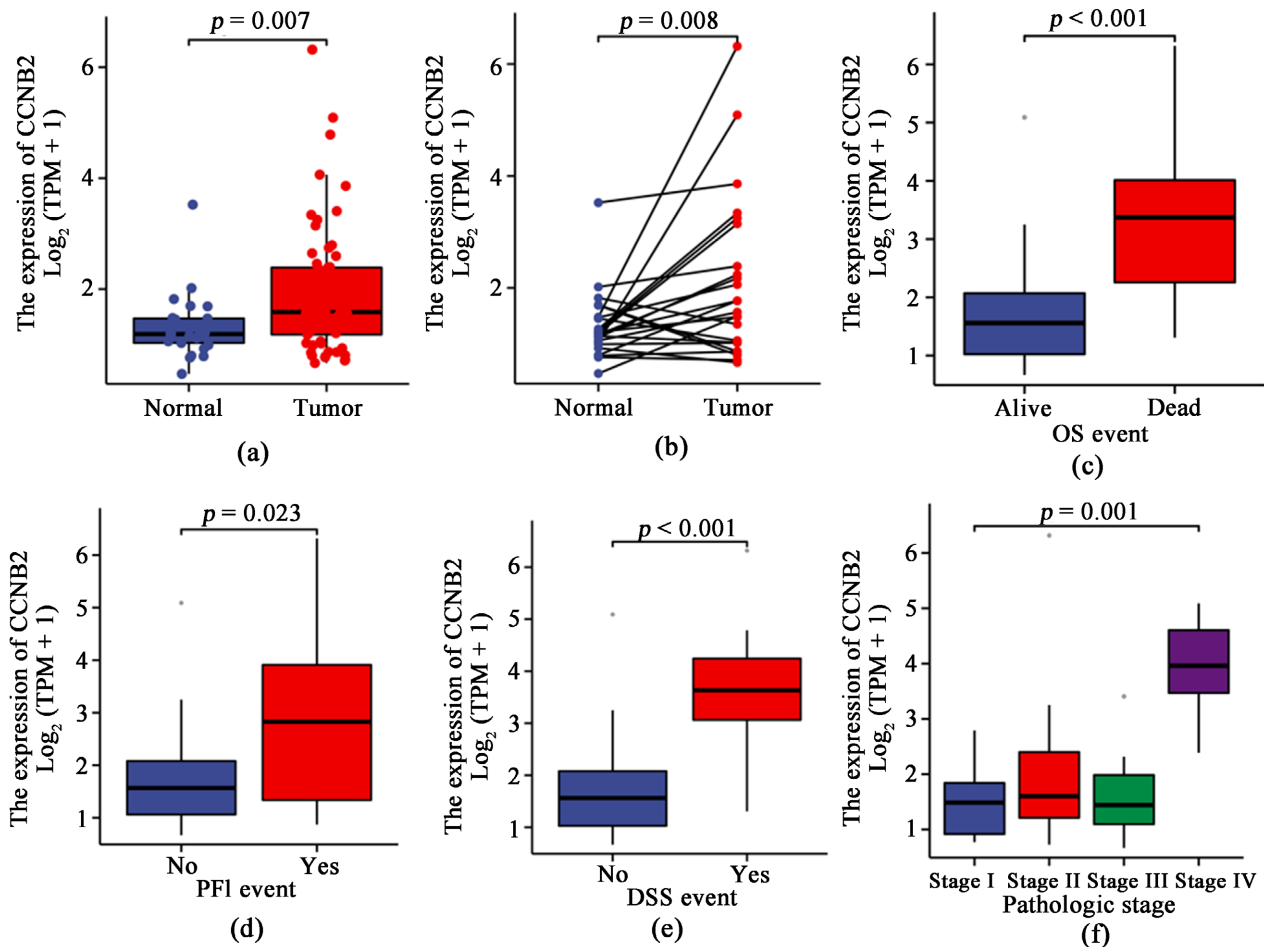


Figure 6. CCNB2 expression levels in chrc and normal tissues (a), CCNB2 expression levels in chrc patients and matched normal tissues (b), association of CCNB2 expression with clinical features containing OS (c), PFI (d), DSS (e), and pathological stage (f)

图 6. CCNB2 在 chrc 和正常组织的表达水平(a), chrc 患者和匹配的正常组织中的 CCNB2 表达水平(b), CCNB2 表达与临床特征的关联: 总生存期(c)、无进展间隔(d)、疾病特异性生存期(e)、病理分期(f)

3.6. 免疫浸润

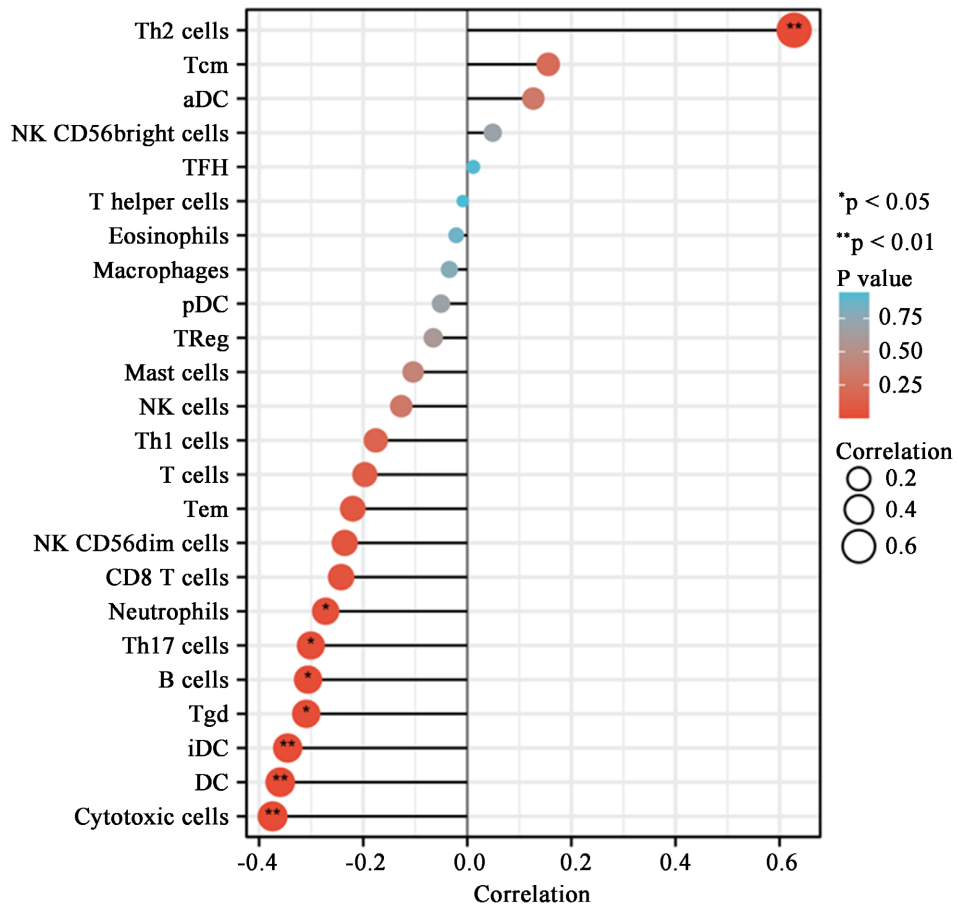
研究发现, 在有统计学意义前提下, CCNB2 水平与 Th2 cells 浓集水平呈正相关。此外, CCNB2 水平与 Cytotoxic cells、DC、iDC、Tgd、B cells、Th17 cells、Neutrophils 等浓集程度呈负相关, 其中图 7(a) 的圆圈的颜色深浅代表 p 值的大小。

3.7. GSEA 富集

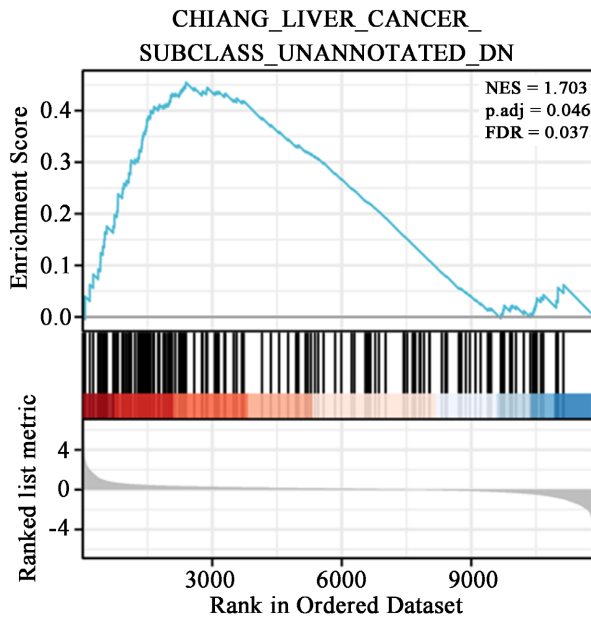
我们共鉴定出 301 条显著通路, 其中只有 2 条含有 CCNB2 基因(表 2), 包括肝癌亚类和乳腺癌分级(图 7(b), 图 7(c))。这表明 CCNB2 基因在 chrc 发病过程中与肝细胞癌和乳腺癌存在关联。

4. 讨论

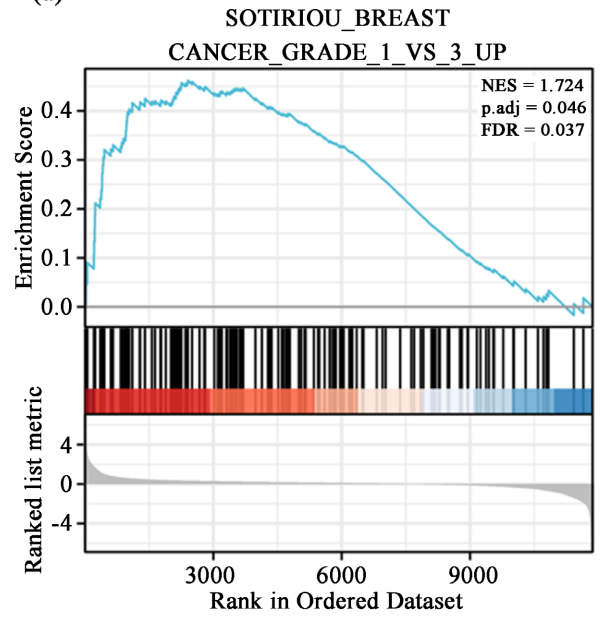
在本次的研究中, 我们选择了数据集 GSE15641, 鉴定了 1153 个 DEGs, 为了研究其相互作用,



(a)



(b)



(c)

Figure 7. Relationship between the CCNB2 gene and infiltration levels of 24 kinds of immune cells (a), GSEA of the CCNB2 gene ((b), (c))

图 7. CCNB2 基因与 24 种免疫细胞浸润水平的关系(a), CCNB2 基因的 GSEA 富集((b), (c))

Table 2. GSEA of the CCNB2 gene
表 2. CCNB2 基因的 GSEA

ID	Set Size	enrichment Score	NES	pvalue	leading_edge	core_enrichment
CHIANG_LIVE R_CANCER_S UBCLASS_UN ANNOTATED_ DN	150	0.454657887	1.702744015	0.00255102	tags = 41%, list = 20%, signal = 33%	MAD2L1/POLE2/MRPS12/ARPC1A/ NUDT21/CCNB2/PSMD8/UQCRFS1/ TMEM251/ALDOA/MRPL42/SLC25A 5/SLC29A1/NEU1/PSMC3/GLUD2/S NRPD1/MANF/RAN/CDKN3/UXT/M RPL13/PGK1/STIP1/RNF141/PPP2R3 C/RCN2/ECT2/IMPA2/PSMD10/GTF2 I/STT3A/CDK4/VBP1/PSMA2/CLNS1 A/E2F5/RHOA/SYPL1/MCTS1/NDUF A4/TPD52L1/PGD/HSP90AB1/ATP6 VOD1/CAPZA2/TM9SF2/DPM1/APO O/ATG3/PRDX4/WDR61/NUP37/PRK AB1/BAX/RFC4/CNN3/MAPRE1/FE N1/SNRPD2/TPX2
SOTIRIOU_BR EAST_CANCE R_GRADE_1_ VS_3_UP	142	0.462162007	1.724342232	0.00257732	tags = 36%, list = 20%, signal = 29%	RACGAP1/MAD2L1/GTSE1/CEP55/S TIL/CENPA/E2F1/CKS2/HMGB3/UB E2S/HCCS/CCNB2/MRPL15/XPOT/P OLR2K/CMC2/COX7B/PSMA7/TUB A1C/CDC8/CDKN3/ORMDL2/GMP S/DSN1/MRPL12/MRPS17/AURKA/S TIP1/ECT2/TIMM10/TOP2A/SLC52A 2/TUBA1B/APOBEC3B/PRC1/DNAJ C9/NUDT1/NME1/CCNB1/MIS18A/ MELK/NUP93/LAGE3/AURKB/SNRP F/E2F8/CDC20/RFC4/FEN1/TPX2/VR K1

我们对 DEGs 进行 GO 富集分析，其中有机阴离子运输、糖酵解/糖异生、细胞顶端部分、顶端质膜、受体配体活性、阴离子跨膜转运蛋白活性富集程度较高。而 KEGG 包括补体和凝血级联、糖酵解/葡萄糖生成、矿物质吸收等 7 条通路途径。基于 DEGs 建立了 PPI 网络，使用 CytoNCA 插件，根据 Betweenness、Degree、Network 和 Information 算法获得 4 个 Hub 基因，即 KRAS、EGFR、EHHADH、CCNB2，而通过 KM 生存分析，我们确定了 CCNB2 为唯一有临床意义的核心基因。更进一步，通过 TCGA 数据库验证 CCNB2 在肿瘤组织中的表达情况，我们发现肿瘤组织的 CCNB2 表达明显高于正常样本，不仅如此，研究还发现癌组织中 CCNB2 的高表达与不好的临床病理因素有密切关系，这表明了 CCNB2 很可能在肿瘤的进展中发挥重要的作用，因此，根据以上的研究，我们合理推测 CCNB2 是 chrcc 有效的生物标志物。

细胞周期蛋白，包括细胞周期蛋白 A、B、C、D、E 等，在有丝分裂的 G1-S 期中与周期蛋白依赖性激酶(CDK)结合形成复合物，并激活相应的蛋白激酶，控制着细胞有序的生长和分裂[5]。根据既往的研究，CDK1/CCNB 形成复合物共同控制细胞周期中 G2/M 期转变，而且 CCNB2 可调节细胞周期 G2/M 期，从而抑制鼻咽癌细胞凋亡[6] [7]，因此，我们推测 CCNB 的表达水平可以影响细胞的增殖及分裂，当细胞分裂不能受到自主控制而无限分裂时，它就倾向转变为癌细胞，故 CCNB 基因家族被认为在肿瘤的进展中扮演重要作用。除此之外，Thomas K Hoffmann 论证了 CCNB1 在头颈部鳞状细胞癌中过表达与肿瘤高分级显著相关[8]。更进一步，CCNB2 在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌等多种肿瘤中都高度表达[9] [10] [11] [12]，这充分表明了 CCNB2 有可能是一个癌基因。通过这项研究，我们可以初步预测 CCNB2 是 chrcc 预后不良的生物标志物，但目前 CCNB2 在 chrcc 的作用机制尚不清楚，我们仍需要大量的标本及实验去探索。

肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)指肿瘤的发生、生长、转移以及肿瘤细胞所处的内外环境, 不仅包括肿瘤细胞, 还有与肿瘤细胞密切相关的炎性细胞和免疫细胞。我们知道, 肿瘤依赖于 TME 的紊乱, 最终损害免疫细胞的代谢功能, 从而更加容易地发生远处转移[13], 肿瘤细胞和 TME 在发展过程中会不断发生相互作用, TME 通过免疫细胞的肿瘤浸润影响肿瘤的发生和发展[14] [15], TME 长期以来就是肿瘤研究方向的热点与核心, 对于肿瘤的认识及治疗有着重要意义, 例如 CCNB1 和 CCNB2 高表达水平可以影响肝细胞癌中的肿瘤微环境的免疫活性, 并且与预后不良相关[16]。根据此次分析, 我们得到了 CCNB2 表达增加与 Th2 cells 浓集水平呈正相关, 此外有研究表明 IL-4 与受体结合导致 TH2 细胞因子分泌, 最终致使肿瘤生长和转移[17] [18], 而且 TH2 细胞的存在与预后不良有关[19] [20]。除此之外, CCNB2 表达增加与 Cytotoxic cells、DC 细胞呈相反的趋势, Cytotoxic CD4 T cells 与 DC 细胞作为免疫系统的关键细胞, 也时刻监视着肿瘤细胞的进展, 其中 CD4 T 细胞产生 IFN- γ 以 GZMB 和 PRF1 方式可以直接杀死肿瘤细胞[21], 而且化疗、放疗、小分子抑制剂、免疫治疗和肠道菌群等癌症疗法都可以依赖于 DC 细胞而发挥作用[22], 因此, 我们推测 CCNB2 基因通过影响肿瘤的免疫微环境去影响 chrcc 的预后。

基于 GSEA 富集分析, 我们得到了 2 条包括 CCNB2 基因的通路: 肝癌亚类和乳腺癌分级, 而在这之前, 有实验表明 CCNB2 基因可能通过增加 JAG1 表达来促进肝癌的增殖和转移[23], 且乳腺癌中 CCNB2 的上调有助于淋巴血管浸润的发展[10], CCNB2 基因已经被证实与肝癌和乳腺癌的不良预后密切相关, 这在一定程度上表明了 CCNB2 在致病方面与肝癌及乳腺癌有一定的关联。通过这次研究, 我们发现 CCNB2 基因高表达意味着 chrcc 患者有不好的临床结局, 但根据已有参考文献, 尚未有研究揭示他们之间的相关性以及作用机制, 简而言之, 我们仍需要大量实验研究去论证这个观点的可靠性。

5. 结论

在 chrcc 患者中, CCNB2 的高表达可能通过调节免疫微环境和免疫细胞的表达水平影响其不良预后。同时, CCNB2 在发病机制上可能与肝细胞癌和乳腺癌存在关联。因此, CCNB2 可作为 chrcc 的预测性分子标记物和潜在的治疗靶点。

基金项目

重庆市自然科学基金项目(cstc2021jcyj-msxmX0484)、国家自然科学基金项目(No. 81801507)和重庆医科大学附属第二医院宽仁人才计划项目(KY2019Y004)资助。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Ljungberg, B., Albiges, L., Abu-Ghanem, Y., Bedke, J., Capitanio, U., *et al.* (2022) European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2022 Update. *European Urology*, **82**, 399-410. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.03.006>
- [3] Garje, R., Elhag, D., Yasin, H.A., Acharya, L., Vaena, D. and Dahmouh, L. (2021) Comprehensive Review of Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **160**, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103287>
- [4] Capitanio, U. and Montorsi, F. (2016) Renal Cancer. *Lancet*, **387**, 894-906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00046-X)
- [5] 王伟玲, 吕明晓, 吉敬. 细胞周期调控蛋白作为抗肿瘤药物潜在靶标的研究进展[C]//南京康复医学会. 第二届全国康复与临床药学学术交流会议论文集(四). 2022: 400-404. <https://doi.org/10.26914/c.cnkihy.2022.080892>
- [6] Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005) Mammalian Cyclin-Dependent Kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, **30**, 630-641. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>

- [7] Qian, D., Zheng, W., Chen, C., Jing, G. and Huang, J. (2020) Roles of *CCNB2* and *NKX3-1* in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **35**, 208-213. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3016>
- [8] Hoffmann, T.K., Trellakis, S., Okulicz, K., Schuler, P., Greve, J., Arnolds, J., *et al.* (2011) Cyclin B1 Expression and P53 Status in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Anticancer Research*, **31**, 3151-3157.
- [9] Niemira, M., Collin, F., Szalkowska, A., Bielska, A., Chwialkowska, K., Reszec, J., Niklinski, J., Kwasniewski, M. and Kretowski, A. (2019) Molecular Signature of Subtypes of Non-Small-Cell Lung Cancer by Large-Scale Transcriptional Profiling: Identification of Key Modules and Genes by Weighted Gene Co-Expression Network Analysis (WGCNA). *Cancers (Basel)*, **12**, 37. <https://doi.org/10.3390/cancers12010037>
- [10] Aljohani, A.I., Toss, M.S., El-Sharawy, K.A., Mirza, S., Ball, G.R., Green, A.R., Rakha, E.A. (2022) Upregulation of Cyclin B2 (*CCNB2*) in Breast Cancer Contributes to the Development of Lymphovascular Invasion. *American Journal of Cancer Research*, **12**, 469-489.
- [11] Yang, D., He, Y., Wu, B., Deng, Y., Wang, N., Li, M. and Liu, Y. (2020) Integrated Bioinformatics Analysis for the Screening of Hub Genes and Therapeutic Drugs in Ovarian Cancer. *Journal of Ovarian Research*, **13**, Article No. 10. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-0613-2>
- [12] Yin, S., Yang, S., Luo, Y., Lu, J., Hu, G., Wang, K., Shao, Y., Zhou, S., Koo, S., Qiu, Y., Wang, T. and Yu, H. (2021) Cyclin-Dependent Kinase 1 as a Potential Target for Lycorine against Hepatocellular Carcinoma. *Biochemical Pharmacology*, **193**, 114806. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114806>
- [13] Wu, F., Yang, J., Liu, J., Wang, Y., Mu, J., Zeng, Q., Deng, S. and Zhou, H. (2021) Signaling Pathways in Cancer-Associated Fibroblasts and Targeted Therapy for Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**, Article No. 218. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00641-0>
- [14] Reina-Campos, M., Moscat, J. and Diaz-Meco, M. (2017) Metabolism Shapes the Tumor Microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, **48**, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.05.006>
- [15] Gajewski, T.F., Schreiber, H. and Fu, Y.X. (2013) Innate and Adaptive Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Nature Immunology*, **14**, 1014-1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
- [16] Zou, Y., Ruan, S., Jin, L., Chen, Z., Han, H., Zhang, Y., Jian, Z., Lin, Y., Shi, N. and Jin, H. (2020) *CDK1*, *CCNB1*, and *CCNB2* Are Prognostic Biomarkers and Correlated with Immune Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *Medical Science Monitor*, **26**, E925289. <https://doi.org/10.12659/MSM.925289>
- [17] Maier, E., Duschl, A. and Horejs-Hoeck, J. (2012) *STAT6*-Dependent and -Independent Mechanisms in Th2 Polarization. *European Journal of Immunology*, **42**, 2827-2833. <https://doi.org/10.1002/eji.201242433>
- [18] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-Related Inflammation. *Nature*, **454**, 436-444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- [19] Lee, H.L., Jang, J.W., Lee, S.W., Yoo, S.H., Kwon, J.H., Nam, S.W., Bae, S.H., Choi, J.Y., Han, N.I. and Yoon, S.K. (2019) Inflammatory Cytokines and Change of Th1/Th2 Balance as Prognostic Indicators for Hepatocellular Carcinoma in Patients Treated with Transarterial Chemoembolization. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 3260. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>
- [20] Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.H., Jia, H.L., He, P., Zanetti, K.A., *et al.* (2006) Prediction of Venous Metastases, Recurrence, and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma Based on a Unique Immune Response Signature of the Liver Microenvironment. *Cancer Cell*, **10**, 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.016>
- [21] Oh, D.Y. and Fong, L. (2021) Cytotoxic *CD4*⁺ T Cells in Cancer: Expanding the Immune Effector Toolbox. *Immunity*, **54**, 2701-2711. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.015>
- [22] Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M., Melero, I., Krummel, M.F. and Sancho, D. (2020) Dendritic Cells in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, **20**, 7-24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
- [23] Xiao, Y., Ma, J., Guo, C., Liu, D., Pan, J. and Huang, X. (2022) Cyclin B2 Overexpression Promotes Tumour Growth by Regulating Jagged 1 in Hepatocellular Carcinoma. *Aging*, **14**, 2855-2867. <https://doi.org/10.18632/aging.203979>