

# 基于蛋白的宫颈癌相关基因生物信息学分析\*

程灵婧<sup>1</sup> 李贺同<sup>2</sup> 张升校<sup>3</sup> 刘鸿齐<sup>4</sup> 于琦<sup>1,5</sup> 郑超越<sup>1</sup> 冯爽<sup>6</sup> 孔腾<sup>1</sup>  
孙翔飞<sup>1</sup> 贺培凤<sup>5</sup> 吕小萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山西医科大学管理学院 太原 030001    <sup>2</sup> 山西医科大学第二医院妇产科 太原 030001

<sup>3</sup> 山西医科大学第二医院风湿免疫科 太原 030001    <sup>4</sup> 山西医科大学第二医院信息管理处 太原 030001

<sup>5</sup> 山西医科大学医学数据科学研究院 太原 030001    <sup>6</sup> 山西医科大学人文学院 太原 030001)

〔摘要〕 目的/意义 运用生物信息学方法挖掘与宫颈癌相关的基因,探讨与 HPV E6/E7 密切相关差异表达基因的特征及临床意义。方法/过程 以 UCSC 的 TCGA 和 GTEx 中宫颈癌的宫颈组织及临床信息作为训练集。以 GEO 中与宫颈癌相关的表达谱芯片 GSE63514 作为验证集。首先,使用 R 软件 limma 包筛选肿瘤和正常样本的 DEGs,制作与 MigDB 中 E6/E7 蛋白相关基因的韦恩图。利用 survival 包进行生存分析,通过 ROC 和蛋白表达水平进行验证。其次,通过拷贝数变异和甲基化相关性得到关键基因。最后,构建特异性共表达网络并进行富集分析和免疫浸润分析。结果/结论 与 HPV E6/E7 蛋白相关的差异表达基因有 101 个,经筛选有 3 个基因意义显著,分别是 E2F1、MCM4 和 PCNA。同时,经通路分析后发现特异性共表达网络中的基因显著富集在 DNA 复制、染色体组织等通路。通过免疫相关性分析发现关键基因与 CD4 T 细胞、B 细胞和中性粒细胞显著相关。DNA 复制、染色体组织等为宫颈鳞癌发生发展以及 HPV E6/E7 编码蛋白显著相关的分子机制和关键基因。

〔关键词〕 宫颈癌;宫颈组织;差异基因;HPV E6/E7 编码蛋白

〔中图分类号〕 R-058    〔文献标识码〕 A    〔DOI〕 10.3969/j.issn.1673-6036.2023.12.008

## Protein-based Bioinformatics Analysis of Cervical Cancer Related Genes

CHENG Lingjing<sup>1</sup>, LI Hetong<sup>2</sup>, ZHANG Shengxiao<sup>3</sup>, LIU Hongqi<sup>4</sup>, YU Qi<sup>1,5</sup>, ZHENG Chaoyue<sup>1</sup>, FENG Shuang<sup>6</sup>, KONG Teng<sup>1</sup>,  
SUN Xiangfei<sup>1</sup>, HE Peifeng<sup>5</sup>, LYU Xiaoping<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Management, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>3</sup> Department of Rheumatology and Immunology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>4</sup> Department of Information Management, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>5</sup> Institute of Medical Data Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>6</sup> College of Humanities, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

〔Abstract〕 **Purpose/Significance** To explore the characteristics and clinical significance of differentially expressed genes closely related to HPV E6/E7 by using bioinformatics. **Method/Process** The cervical tissue and clinical information of cervical cancer in TCGA

〔修回日期〕 2023-06-21

〔作者简介〕 程灵婧,硕士研究生;通信作者:于琦,博士,教授。

〔基金项目〕 山西省重点研发计划(社会发展领域)重点项目(项目编号:201903D311011);山西省重点研发计划(项目编号:202102130501003)。

and GTEx of UCSC are used as the training set. The expression profile chip GSE63514 related to cervical cancer in GEO is used as the validation set. Firstly, the limma package of R software is used to screen DEGs of tumor and normal samples, and Venn map of genes related to E6/E7 protein in MigDB is made. Survival analysis is performed by survival kit and verified by ROC and protein expression levels. Secondly, key genes are obtained by copy number variation and methylation correlation. Finally, the specific co-expression network is constructed and enrichment analysis and immune infiltration analysis are performed. **Result/Conclusion** There are 101 differentially expressed genes related to HPV E6/E7 protein, and three genes are found to have significance after screening, namely E2F1, MCM4 and PCNA. At the same time, it is found that the genes in the specific coexpression network are significantly enriched in the DNA replication and chromosome organization pathways. Immune correlation analysis shows that key genes are significantly associated with CD4 T cells, B cells and neutrophils. DNA replication, chromosome organization, etc., are the molecular mechanisms and key genes significantly related to the development of cervical squamous cell carcinoma and HPV E6/E7 encoded proteins.

[**Keywords**] cervical cancer; cervical tissue; differentially expressed genes; HPV E6/E7 encoded protein

## 1 引言

宫颈癌 (cervical cancer) 是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 持续感染是宫颈癌进展的主要危险因素<sup>[1]</sup>。高危型 HPV 具有潜在致癌性, 编码 E6/E7 蛋白分别与宿主的 p53 等蛋白结合并导致其失活, 是 HPV 感染诱导癌症的重要机制<sup>[2]</sup>。尽管大部分宫颈癌可以通过常规筛查和治疗癌前病变进行预防, 但多数宫颈癌患者确诊时已达晚期, 治疗效果及预后并不理想。目前, 生物信息学方法对宫颈癌的研究大多仅通过基因芯片进行鉴定。本研究主要针对宫颈鳞癌 (cervical squamous cell carcinoma, CESC) 和腺癌 HPV E6/E7 编码蛋白通路相关基因的发生和发展机制进行挖掘, 并从预后、蛋白、脱氧核糖核酸 (deoxyribo nucleic acid, DNA) 甲基化等多个方面进行验证, 以找到更加精准的靶基因。

## 2 资料与方法

### 2.1 数据来源

通过 UCSC Xena 下载基因型-组织表达数据库 (genotype-tissue expression, GTEx)、肿瘤基因组数据库 (the cancer genome atlas, TCGA) 中的临床信息和宫颈癌组织测序数据。TCGA-CESC

中包含 306 例宫颈癌组织和 3 例正常组织, GTEx 包含 10 例正常组织。验证集来自基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO), 系列号为 GSE 63514<sup>[3]</sup>, 数据来源于 GPL 570 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array), 包括 104 例 CESC 和 24 例健康对照 (healthy controls, HC)。HPV E6/E7 编码蛋白相关的 170 个基因来自分子签名数据库 (the molecular signatures database, MSigDB)。

### 2.2 与 CESC 相关的差异表达基因筛选

调用 R 包 limma 对取自 GTEx 和 TCGA 的数据集进行差异分析, 以  $|\log_2 \text{FC}| > 2$ <sup>[4]</sup> 和  $\text{FDR} < 0.05$ <sup>[5]</sup> (即校正后  $P$  值) 为筛选条件获得差异基因 (differentially expressed genes, DEGs)。并利用 Readxl 包和 VennDiagram 包制作韦恩图, 筛选 HPV E6/E7 相关的 DEGs。

### 2.3 预后相关的促癌基因筛选及 ROC 分析

结合患者临床信息和 DEGs, 以基因表达量分为高低两组, 利用 R 包 survival 分析 CESC 患者的总生存期 (overall survival, OS)。使用 pROC 包, 输入 GSE 63514 基因表达矩阵进行验证。

### 2.4 免疫组化分析

将人类蛋白质表达图谱 (the human protein atlas, HPA) 用于正常和肿瘤组织蛋白差异表达分析。

引用基于预后基因的组化抗体对 HC 和 CESC 组织的免疫组化进行分析，由于在数据库中无法获得患者除年龄外的其他详细信息，为保证对照，在进行切片选择时尽量选择年龄相仿的患者。根据蛋白表达情况观察患者的预后意义 ( $P < 0.05$ )<sup>[6]</sup>。

2.5 甲基化位点及拷贝数相关性分析

利用免疫组化验证得到 CESC 相关基因，运用 cBioPortal 分析拷贝数变异 (copy number variations, CNV) 相关性。基于 MEXPRESS 数据库分析 DNA 甲基化和表达量的相关性，采用 Spearman 和 Pearson 进行相关分析，相关系数绝对值大于 0.1， $P$  小于  $10^{-5}$  被认为有显著意义<sup>[7]</sup>。

2.6 特异性表达网络及免疫细胞表达丰度分析

采用组织和癌症特异性生物网络数据库 (tissue and cancer specific biological networks, TCSBN) 和 Cytoscape 构建关键基因的特异性共表达网络。运用 Metascape 分析网络中共表达基因的潜在功能。另外，采用 TIMER 数据库分析关键基因表达与免疫浸润水平的相关性 ( $P < 0.05$ )<sup>[8]</sup>。

3 结果

3.1 CESC 患者 HPV E6/E7 蛋白相关的 DEGs 筛选

利用 R 包 limma，通过 TCGA 和 GTEx 数据集进行差异分析，以  $|\log_2FC| > 2$ <sup>[7]</sup> 和  $FDR < 0.05$ <sup>[8]</sup> (即校正后  $P$  值) 为筛选条件，得到 1 266 个 DEGs，其中 620 个下调 (down-regulated)，646 个上调 (up-regulated)，见图 1。与 MSigDB 合并得到 101 个 E6/E7 蛋白相关 DEGs，98 个上调，3 个下调，见图 2。

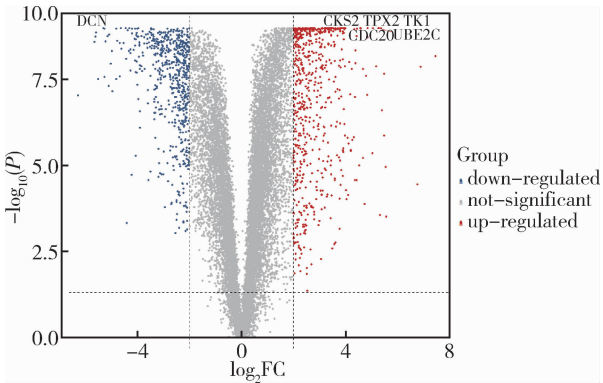


图 1 CESC 差异表达基因 CESC 与 HC 对照的基因表达水平及分布火山

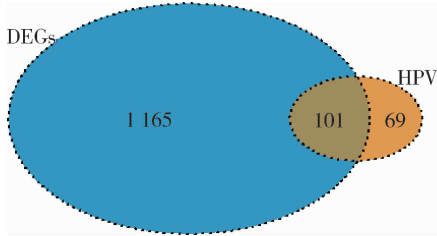


图 2 与 HPV E6/E7 蛋白相关的 DEGs

3.2 生存分析及验证

利用 R 包 survival 对筛选出的 101 个 DEGs 进行生存分析。共 13 个 DEGs 对患者预后有影响，桥粒芯糖蛋白 2 (desmoglein 2, DSG2) 高表达对患者预后不利；载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化亚基 3B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B, APOBEC3B) 高表达相对低表达在前 11 年对 OS 有利，在 11 年后生存率趋于平稳且略不利；其余 11 个基因的高表达均对患者的预后有利 ( $P < 0.05$ )<sup>[9]</sup>。

使用验证集对预后相关基因进行 ROC 分析，其中  $AUC > 0.8$  且  $P < 0.05$  的基因有 8 个 (APOBEC3B、CHAF1B、E2F1、MCM2、MCM4、PCLAF、PCNA、TYMS)，被认为是具有诊断意义的基因，见图 3。

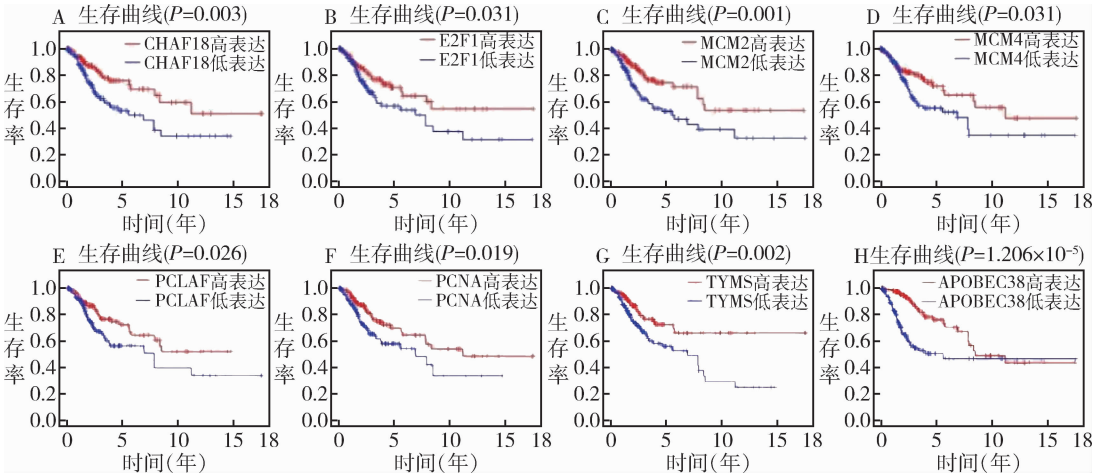


图3 与CESC总生存期预后相关8个基因的生存分析

3.3 蛋白组化分析

在 HPA 数据库中针对 8 个预后相关基因（在 CESC 均上调）进行检索，MCM 4 和 TYMS 在蛋白水平上没有预后意义；4 个基因（ $P < 0.05$ ）在 CESC 中均上调，且通过免疫组化切片发现其在癌症细胞中均强表达，见图 4；剩余基因在数据库中无记录。

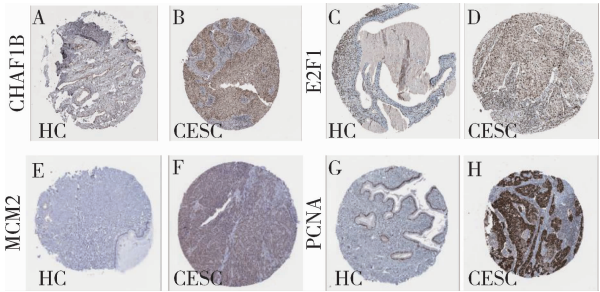


图4 免疫染色蛋白组化分析

注：图 A、B 为抗体 CHAF1B（编号 HPA021679），图 C、D 为抗体 E2F1（编号 HPA008003），图 E、F 为抗体 MCM2（编号 HPA031495），图 G、H 为抗体 PCNA（编号 HPA030522），CESC 的抗体染色程度明显高于 HC。

3.4 拷贝数变异和甲基化对 CHAF1B、E2F1、MCM2 和 PCNA 表达的影响

将基因名输入 cBioPortal，其表达量在 CESC 中与拷贝数值呈正相关，见图 5。通过 MEXPRESS 分

析，E2F1 的表达与 cg00509772 位点的甲基化呈负相关，MCM2 与 cg08889930 位点呈显著负相关。增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）的表达与 cg01199328 和 cg01511104 均呈正相关（相关系数绝对值大于 0.1， $P < 10^{-5}$ ）<sup>[10]</sup>，见表 1。

表1 E2F1、MCM2、PCNA 的表达与甲基化值的相关性

| 基因   | CpG 位点          | CESC             |                             |
|------|-----------------|------------------|-----------------------------|
|      |                 | Pearson <i>r</i> | <i>P</i>                    |
| E2F1 | cg21868801      | 0.185 985 809    | 0.001 021 292               |
|      | cg02899870      | -0.137 195 148   | 0.015 809 681               |
|      | cg19033983      | -0.147 031 292   | 0.009 649 815               |
|      | cg09838070      | -0.112 858 943   | 0.047 461 597               |
|      | cg26165815      | -0.132 343 871   | 0.019 955 934               |
|      | cg00509772      | -0.326 073 3     | 5.40 × 10 <sup>-9</sup>     |
|      | cg06138505      | 0.112 021 19     | 0.049 142 769               |
|      | cg20687038      | 0.162 887 335    | 0.004 094 127               |
| MCM2 | cg08889930      | -0.490 340 03    | 3.60 × 10 <sup>-18</sup>    |
|      | cg04348250      | -0.225 600 511   | 6.334 92 × 10 <sup>-5</sup> |
|      | cg17899198      | -0.146 115 904   | 0.010 239 221               |
|      | cg16713732      | -0.140 296 824   | 0.013 572 75                |
|      | cg02620015      | -0.187 625 753   | 0.000 919 501               |
|      | PCNA cg25045098 | 0.196 887 586    | 0.000 500 028               |
|      | cg01199328      | 0.289 104 466    | 2.49 × 10 <sup>-7</sup>     |
|      | cg01511104      | 0.286 797 401    | 3.11 × 10 <sup>-7</sup>     |
| PCNA | cg26596863      | -0.183 246 879   | 0.001 214 713               |

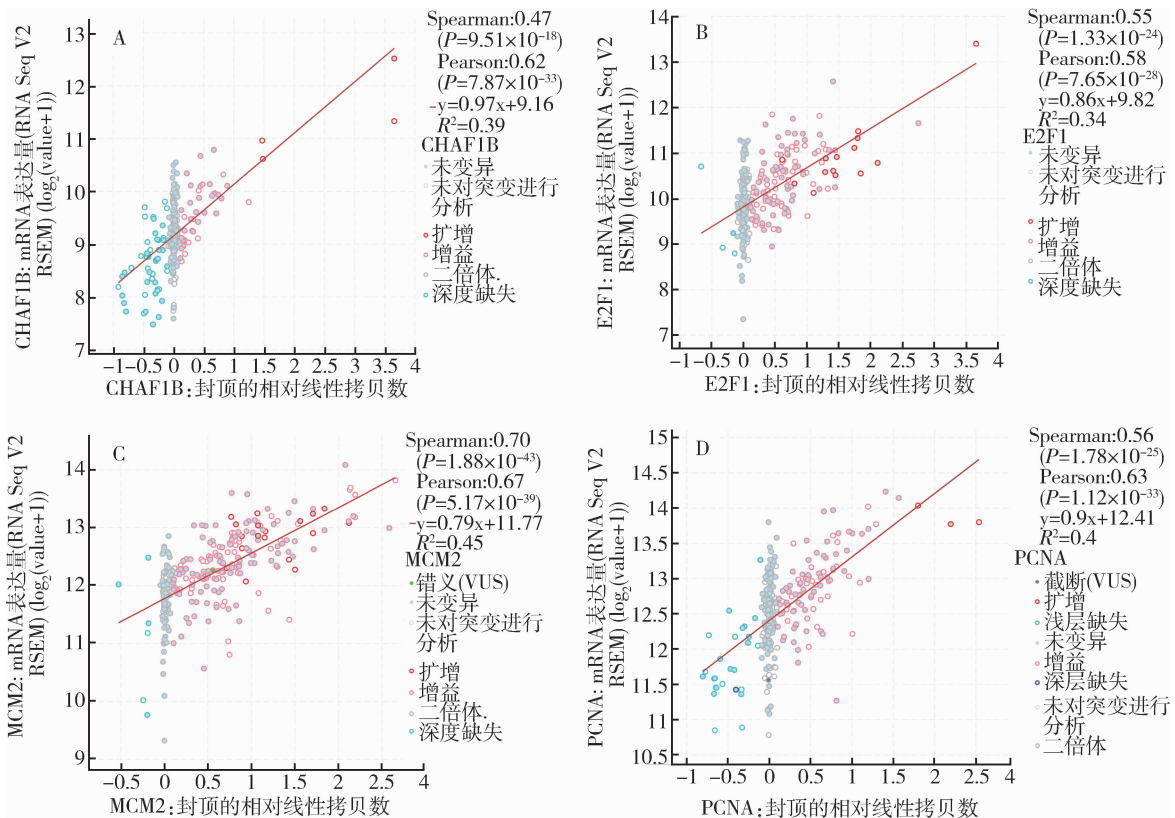


图5 CHAF1B、E2F1、MCM2 和 PCNA 的表达与拷贝数均显著正相关

3.5 特异性网络的潜在功能及其免疫调节

通过 TCSBN 确定关键基因的共表达基因和相互作用，导入 Cytoscape 中，构建共表达网络，共 74 个节点和 75 条边，分别代表基因及其共表达关系。利用 Metascape 进行富集分析，发现特异性网

络的基因集显著富集于 DNA 复制、染色体组织等通路，见图 6。通过 TIMER 分析，E2F2 和 PCNA 的表达与 CESC 中免疫浸润纯度显著正相关，见表 2。值得注意的是 3 个基因都与 CD4 T 细胞呈正相关，并且 E2F1 和 PCNA 与中性粒细胞和 B 细胞均呈正相关。

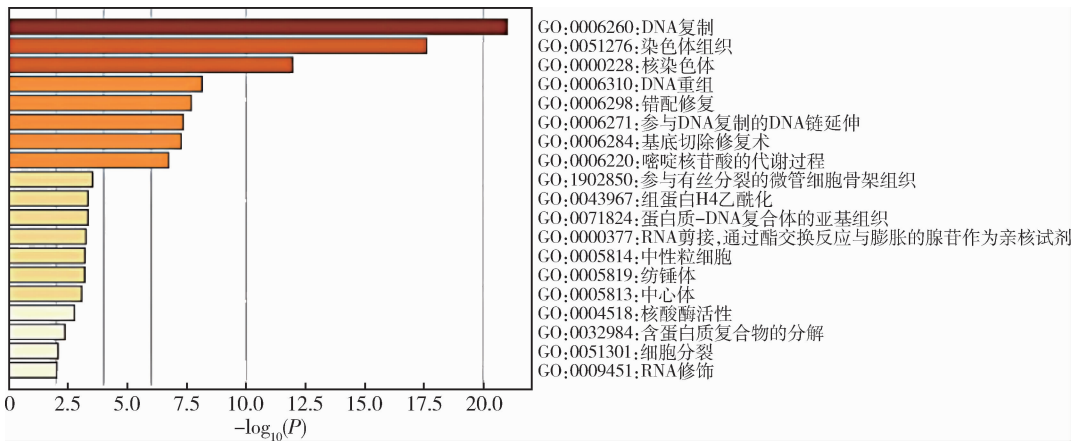


图6 功能富集分析

表 2 免疫浸润相关性

| 基因   | 变量                      | CESC                    |                |
|------|-------------------------|-------------------------|----------------|
|      |                         | P                       | 偏相关            |
| E2F1 | Purity                  | 2.83 × 10 <sup>-5</sup> | 0.248 265 087  |
|      | B Cell                  | 0.020 512 537           | 0.139 156 634  |
|      | CD8 <sup>+</sup> T Cell | 0.766 159 947           | 0.018 047 73   |
|      | CD4 <sup>+</sup> T Cell | 0.027 010 363           | 0.132 879 373  |
|      | Macrophage              | 0.212 892 68            | 0.075 077 724  |
|      | Neutrophil              | 0.990 788 21            | 0.000 696 854  |
|      | Dendritic Cell          | 0.070 576 847           | -0.109 010 449 |
| MCM2 | Purity                  | 0.078 744               | 0.105 62       |
|      | B Cell                  | 0.128 323               | 0.091 595      |
|      | CD8 <sup>+</sup> T Cell | 0.669 154               | 0.025 929      |
|      | CD4 <sup>+</sup> T Cell | 0.004 955               | 0.168 388      |
|      | Macrophage              | 0.442 309               | -0.046 35      |
|      | Neutrophil              | 0.016 656               | 0.143 756      |
|      | Dendritic Cell          | 0.123 438               | 0.092 948      |
| PCNA | Purity                  | 0.000 986               | 0.196 541      |
|      | B Cell                  | 0.003 326               | 0.175 817      |
|      | CD8 <sup>+</sup> T Cell | 0.162 115               | 0.084 691      |
|      | CD4 <sup>+</sup> T Cell | 0.002 133               | 0.183 777      |
|      | Macrophage              | 0.331 643               | -0.058 54      |
|      | Neutrophil              | 0.009 829               | 0.154 888      |
|      | Dendritic Cell          | 0.068 506               | 0.109 818      |

4 讨论

许多研究证明 HPV 阳性癌细胞的生长取决于持续的病毒 E6/E7 编码蛋白的表达<sup>[9]</sup>，E6/E7 已成为该疾病的标志和治疗目标<sup>[10]</sup>。E6/E7 参与 CESC 发病机制的研究对临床医学发展有重要意义。本研究鉴定了与 CESC E6/E7 编码蛋白相关的 101 个基因。其中，E2F1、MCM2 和 PCNA 由于在信使 RNA（messenger RNA，mRNA）水平和蛋白水平上的上调、预后效应，与拷贝数变异的相关性、DNA 甲基化位点、与免疫浸润的相关性几方面有显著意义而受到重视。

E2F1 是 E2F 家族成员，是调节 S 期细胞周期蛋白和 DNA 复制、DNA 修复和凋亡所需基因的转

录因子<sup>[11]</sup>。Arvanitis D A 等<sup>[12]</sup>证实高表达的 E2F1 在 G1/S 检查点标记阵列可用于诊断。而且，宫颈癌中 E2F1 表达的增加提供了更高的组织学分级，且 E2F1 的上调是患者 OS 的独立预后因素，这与生存分析的结果完全一致。Peng X 等<sup>[13]</sup>发现 E2F1 表达的增加削弱了对细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响。已有研究<sup>[14]</sup>证明，用于治疗 HPV 16 阳性宫颈癌的 HPV16E7 affibody（ZHPV16E7384）通过靶向 E2F1，最终抑制靶细胞增殖。另外，HPV E7 癌蛋白通过上调因子 E2F1 来增加 BIRC5 和 TOP2A 的表达<sup>[13]</sup>，进而刺激宫颈癌生长所必需的 MELK<sup>[16]</sup>，导致宫颈癌细胞的增殖和迁移。然而，在本研究的生存分析中发现 E2F1 高表达，宫颈癌患者的预后更好，所以 E2F1 的预后作用还有待进一步分析。

MCM2 是参与真核基因组复制启动的高度保守的 MCM 家族成员。MCM2 的过表达在许多癌症类型中被发现，与癌症的进展呈正相关，甚至作为诊断、预后和反应预测的敏感生物标志物<sup>[17]</sup>。在免疫组化切片中，Kaur G 等<sup>[18]</sup>发现鳞状上皮内病变和鳞状细胞癌抗原中，发育不良细胞和癌细胞的细胞核分别被显著染色，且宫颈癌变中细胞周期失调在上皮细胞中很突出<sup>[19]</sup>，这与本研究使用 HPA 数据库关于宫颈癌中 MCM2 蛋白表达的发现一致。同时，体外功能研究中，发现 MCM2 敲低抑制了 He-La 和 SiHa 细胞增殖，这表明 MCM2 可能在宫颈癌进展中具有致癌作用<sup>[20]</sup>。在拷贝数相关性研究中，宫颈癌与其呈正相关，且 Amaro Filho S M 等<sup>[21]</sup>研究证明 MCM2 阳性细胞与原位杂交（in situ hybridization，ISH）检测到的 HPV DNA 之间存在很强的相关性，这表明 HPV 感染的细胞也能够表达 MCM2。Lin C Y 等<sup>[22]</sup>发现一种基于呋喃萘醌的小分子 AS4583，可通过泛素化诱导 MCM2 的降解，但其抗肿瘤机制、安全性和有效性尚未见报道。已有研究<sup>[23]</sup>表明使用 Hph-1-gp70 和多柔比星可有效治疗 MCM2 高表达的癌症。然而，MCM2 在部分患有透明细胞癌的卵巢癌患者的细胞质中表达，当手术样本被取出时，这些肿瘤细胞在肿瘤中表现出很高的凋亡频率，这可能与 MCM2 介导的 DNA 损伤诱导细胞凋亡有关<sup>[24]</sup>。本文从 mRNA 表达水平



观察, MCM2 高表达的患者预后效果更好, 所以, 未来研究应根据 HPV 感染、肿瘤分期等临床特征对患者进行分层, 以进一步确认 MCM2 的预后作用。同时, 针对 MCM2 的靶向治疗尚有待进一步研究。

PCNA 是 DNA 复制和修复的重要因素, 作为一种增殖标志物, 仅在增殖癌细胞中表达, 可促进癌细胞 (包括宫颈癌细胞) 的增殖和肿瘤发生<sup>[25]</sup>。有研究<sup>[26]</sup>指出, PCNA 与肿瘤的分化、浸润、复发以及淋巴结或器官的转移相关。在正常和炎症性宫颈病例中观察到阴性 PCNA 表达, 但在宫颈上皮内病变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 组 (63.2%) 和鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) (100%) 组中分别表达增加<sup>[27]</sup>。Zhou N 等<sup>[28]</sup>发现地拉罗司通过调节宫颈癌细胞系中 PCNA 的表达来促进细胞周期停滞, 对宫颈癌具有抑制作用, 并提供了潜在治疗剂。同时, 芦荟大黄素以剂量依赖性方式抑制 HeLa 细胞生长, 并伴有 PCNA 表达抑制, 为人类宫颈癌细胞生长的可能机制提供了解释<sup>[29]</sup>。Kim T H 等<sup>[30]</sup>发现在免疫染色中结合 PCNA 可降低假阳性率, 提高诊断准确性。但是, 本研究经过公共数据库筛选后发现, PCNA 的高表达预示着预后良好, 因此, 未来临床研究有必要进一步分析 PCNA 与临床信息的相关性。

## 5 结语

本研究采用生物信息学方法在 TCGA 和 GTEx 两个数据库的基础上, 结合 HPV E6/E7 编码蛋白相关基因进行分析, 同时, 根据诊断、预后、蛋白组学、拷贝数及甲基化相关性分析、免疫相关性分析得到了 E2F1、MCM2 和 PCNA 这 3 个关键基因, 并发现其在 CESC 的临床应用中取得了初步成效。该研究方法有助于了解疾病发病机制及治疗的潜在靶点, 为 CESC 诊治提供新思路。然而, 由于缺乏相关细胞实验和临床队列研究验证, 本研究存在一定局限性。随着生物信息学的发展, 未来可通过分析患者组学数据, 对患者的生存、复发、耐药作出预警, 使临床治疗更具针对性、更加精准。

## 参考文献

- 1 HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications [J]. *Cancer medicine*, 2018, 7 (10): 5217-5236.
- 2 齐朝阳, 陈艳, 曾鸿, 等. 宫颈上皮内肿瘤 P16、P53、Ki67、P63 的表达与 HPV 感染及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (20): 3638-3640.
- 3 DEN BOON J A, PYEON D, WANG S S, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: role of stromal estrogen receptor signaling [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2015, 112 (25): e3255-e3264.
- 4 MUTCH D M, BERGER A, MANSOURIAN R, et al. The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data [EB/OL]. [2023-03-20]. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-3-17>.
- 5 VAN DEN BERGE K, SONESON C, ROBINSON M D, et al. StageR: a general stage-wise method for controlling the gene-level false discovery rate in differential expression and differential transcript usage [J]. *Genome biology*, 2017, 18 (1): 151.
- 6 TSUSHIMA E. Interpreting results from statistical hypothesis testing: understanding the appropriate P-value [J]. *Physical therapy & rehabilitation journal*, 2022, 25 (2): 49-55.
- 7 PRIPP A H. Pearsons eller Spearmans korrelasjonskoeffisienter [Pearson's or Spearman's correlation coefficients] [EB/OL]. [2023-03-20]. <https://tidsskriftet.no/2018/05/medisin-og-tall/pearsons-eller-spearmans-korrelasjonskoeffisienter>.
- 8 MARTINEZ PEREZ J A, PEREZ MARTIN P S. ROC curve [J]. *Semergen*, 2023, 49 (1): 101821.
- 9 HOPPE-SEYLER K, BOSSLER F, BRAUN J A, et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets [J]. *Trends microbiol*, 2018, 26 (2): 158-168.
- 10 PAL A, KUNDU R. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy [EB/OL]. [2023-03-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6985034/>.
- 11 FOUAD S, HAUTON D, D'ANGIOLELLA V. E2F1: cause and consequence of DNA replication stress [EB/OL].

- [ 2023 - 03 - 20 ]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.599332/full>.
- 12 ARVANITIS D A, SPANDIDOS D A. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: a case control study [J]. *Oncology reports*, 2008, 20 (4): 751 - 760.
- 13 PENG X, ZHANG Y, GAO J, et al. MiR - 1258 promotes the apoptosis of cervical cancer cells by regulating the E2F1/P53 signaling pathway [EB/OL]. [ 2023 - 03 - 20 ]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480019307191?via%3Dihub>.
- 14 ZHANG Q, ZHU H, CUI Z, et al. The HPV16E7 affibody as a novel potential therapeutic agent for treating cervical cancer is likely internalized through dynamin - 1 dependent endocytosis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (8): 1114.
- 15 TIAN S, ZHANG L, LI Y, et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein promotes proliferation and migration through the transcription factor E2F1 in cervical cancer cells [J]. *Anti - cancer agents in medicinal chemistry*, 2021, 21 (13): 1689 - 1696.
- 16 SUN H, MA H, ZHANG H, et al. Up - regulation of MELK by E2F1 promotes the proliferation in cervical cancer cells [J]. *International journal of biological sciences*, 2021, 17 (14): 3875 - 3888.
- 17 SUN Y, CHENG Z, LIU S. MCM2 in human cancer: functions, mechanisms, and clinical significance [J]. *Molecular medicine*, 2022, 28 (1): 128.
- 18 KAUR G, BALASUBRAMANIAM S D, LEE Y J, et al. Minichromosome maintenance complex (MCM) genes profiling and MCM2 protein expression in cervical cancer development [J]. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2019, 20 (10): 3043 - 3049.
- 19 FREEMAN A, MORRIS L S, MILLS A D, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy [J]. *Clinical cancer research*, 1999, 5 (8): 2121 - 2132.
- 20 XUE H, SUN Z, WU W, et al. Identification of hub genes as potential prognostic biomarkers in cervical cancer using comprehensive bioinformatics analysis and validation studies [EB/OL]. [ 2023 - 03 - 20 ]. <https://www.dovepress.com/identification-of-hub-genes-as-potential-prognostic-biomarkers-in-cerv-peer-reviewed-fulltext-article-CMAR>.
- 21 AMARO FILHO S M, NUOVO G J, CUNHA C B, et al. Correlation of MCM2 detection with stage and virology of cervical cancer [J]. *International journal of biological markers*, 2014, 29 (4): e363 - e371.
- 22 LIN C Y, WU H Y, HSU Y L, et al. Suppression of drug - resistant non - small - cell lung cancer with inhibitors targeting minichromosomal maintenance protein [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2020, 63 (6): 3172 - 3187.
- 23 ABE S, YAMAMOTO K, KURATA M, et al. Targeting MCM2 function as a novel strategy for the treatment of highly malignant breast tumors [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (33): 34892 - 34909.
- 24 HAN H Y, MOU J T, JIANG W P, et al. Five candidate biomarkers associated with the diagnosis and prognosis of cervical cancer [J]. *Bioscience reports*, 2021, 41 (3): 1 - 14.
- 25 YANG M, ZHAI X, XIA B, et al. Long noncoding RNA CCHL1 promotes cervical cancer cell proliferation via upregulating PCNA [J]. *Tumor biology*, 2015, 36 (10): 7615 - 7622.
- 26 JURIKOVA M, DANIHEL L, POLAK S, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. *Acta histochemica*, 2016, 118 (5): 544 - 552.
- 27 GOEL M M, MEHROTRA A. Immunohistochemical expression of MIB - 1 and PCNA in precancerous and cancerous lesions of uterine cervix [J]. *Indian journal of cancer*, 2013, 50 (3): 200 - 205.
- 28 ZHOU N, CUI Y, ZHU R, et al. Deferasirox shows inhibition activity against cervical cancer in vitro and in vivo [J]. *Gynecologic oncology*, 2022, 166 (1): 126 - 137.
- 29 GUO J M, XIAO B X, LIU Q, et al. Anticancer effect of aloe - emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation [J]. *Acta pharmacologica sinica*, 2007, 28 (12): 1991 - 1995.
- 30 KIM T H, HAN J H, SHIN E, et al. Clinical implication of p16, Ki - 67, and proliferating cell nuclear antigen expression in cervical neoplasia: improvement of diagnostic accuracy for high - grade squamous intraepithelial lesion and prediction of resection margin involvement on conization specimen [J]. *Journal of cancer prevention*, 2015, 20 (1): 70 - 77.