

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.09.001

❖ 基础研究 ❖

基于加权共表达网络分析对下咽癌枢纽基因 HOXB9 的鉴定

唐进渝¹, 刘康², 钟春燕¹, 黄琴¹, 杜经纬¹

(川北医学院附属南充市中心医院, 1. 耳鼻咽喉头颈外科; 2. 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨基于加权共表达网络分析, 用免疫组织化学法对其结果进行验证, 分析枢纽基因 HOXB9 在下咽癌中的作用。**方法:** 根据 TCGA 的数据, 确定了 3 496 个头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 和正常样本之间差异表达的基因; 选择这些差异基因进行富集分析及加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 确定 HNSCC 患者临床特征相关的基因模块; 随后对其中的枢纽模块进行预后生存分析发现关键基因; 对关键基因进行免疫组织验证。**结果:** 数据分析得出肿瘤中的差异表达基因及关键基因模块; 关键模块基因的预后生存分析发现 11 个关键基因; 通过免疫组化验证 HOXB9, 证实 HOXB9 在下咽癌中表达水平明显上调 ($P < 0.05$)。**结论:** HOXB9 在下咽癌肿瘤中明显高表达, 且可能与肿瘤分期及淋巴结转移相关, 这可能成为下咽癌潜在的预后标志物及治疗靶点。

【关键词】 同源盒 B9; 头颈部鳞状细胞癌; 下咽癌; 数据库分析

【中图分类号】 R766.5 **【文献标志码】** A

Identification of the hypopharyngeal cancer hub gene HOXB9 based on weighted co-expression network analysis

TANG Jin-yu¹, LIU Kang², ZHONG Chun-yan¹, HUANG Qin¹, DU Jing-wei¹

(1. Department of Otolaryngology; 2. Research Institute of Tissue Engineering and Stem Cell, Head and Neck Surgery, Nanchong Central Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore the role of the pivotal gene HOXB9 in hypopharyngeal carcinoma based on weighted co-expression network analysis and validation of the results by immunohistochemistry. **Methods:** 3,496 genes that were expressed differently between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and normal samples were found using data from The Cancer Genome Atlas (TCGA). These differentially expressed genes were chosen for enrichment analysis and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), which aimed to identify gene modules associated with clinical features of HNSCC patients. Additionally, prognostic survival analysis of the pivotal modules identified important genes, and immunohistochemical validation was carried out on the identified key genes. **Results:** 11 essential genes were found using predictive survival analysis of key module genes, and data analysis revealed differentially expressed genes and key gene modules in malignancies. Immunohistochemistry validation of HOXB9 revealed a substantial up-regulation of HOXB9 in hypopharyngeal cancer ($P < 0.05$). **Conclusion:** HOXB9 is significantly overexpressed in hypopharyngeal cancer tumors, and its high expression is significantly correlated with tumor stage and lymph node metastasis, which may be a potential prognostic and therapeutic target for hypopharyngeal cancer.

【Key words】 HOXB9; Head and neck squamous cell carcinoma; Hypopharyngeal carcinoma; Database analysis

在过去的数十年, 虽然对肿瘤研究越来越多, 但是对于导致下咽癌高度恶性和预后差的病理机制尚未能完全阐明。下咽鳞状细胞癌 (hypopharyngeal carcinoma, HSCC) 在头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中占 3% ~ 15%^[1], 下咽癌是头颈部区域中恶性程度较高的一种恶性肿瘤。该病起病隐匿, 早期症状不典型, 且易

发生颈部淋巴结转移, 大多数患者就诊时已处于中晚期^[2]。在过去的数十年, 国内外专家^[3]不断探索下咽癌治疗的新思路和新方法, 但患者的预后并没有得到明显改善, 5 年总体生存率低于 55%。下咽鳞状细胞癌已经是耳鼻咽喉头颈部手术中最常见的恶性肿瘤之一^[4], 故需加强对下咽癌高度恶性和不良预后的分子机制的了解, 继续研究导致下咽癌发生发展及其

基金项目: 四川省南充市市校合作课题 (20SXQT0105)

作者简介: 唐进渝 (1994 -), 男, 硕士研究生, 住院医师。E-mail: tangjinyuyisheng@foxmail.com

通讯作者: 杜经纬, 博士。E-mail: 4730554@qq.com

不良预后的潜在分子机制和识别新的治疗靶点。

高通量测序技术为研究癌症的基因组、转录组和表观基因组特征提供了新的方向。加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 是一种系统生物学方法, 可以描述不同样本中基因表达模式的相关性^[5]。WGCNA 就是广泛多基因分析的一种高效、准确的方法^[6]。WGCNA 是将多基因集成模块化中, 计算基因成对共表达评分的共表达网络。对基因进行分层聚类, 以定义模块及其包含的基因。可以探索不同基因组之间或样本与临床特征之间的相关性^[7]。WGCNA 已被广泛用于鉴定不同类型癌症的相关临床模块和枢纽基因, 使用基因共表达网络可以找到一些新视角, 还有助于理解与候选基因生物标志物相关的分子机制^[8]。

为研究下咽癌的发病机制, 本研究采用了 WGCNA 的分析。首先把 TCGA 下载 HNSCC 样品的 RNA 测序数据进行分析, 并对 HNSCC 与正常组织之间差异表达的基因分析。然后使用 R 包中的基因本体 (GO) 分析差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的功能富集。并使用 WGCNA 的 DEG 矩阵确定了与 HNSCC 患者临床特征相关的模块。通过生物信息学分析鉴定其中的关键模块基因, 得出与预后生存明显相关的枢纽基因。

同源盒 B9 (HOXB9) 作为 HOX 基因编码一组转录因子, HOX 这些转录因子共享一个高度保守的同源盒结构域; 共存在 39 个 HOX 家族基因可分为 4 个簇, 即 HOXA、HOXB、HOXC 和 HOXD。枢纽基因 HOXB9 在癌症高表达; 并且在多种肿瘤的发展中起着关键作用。选择枢纽基因 HOXB9, 在 HSCC 组织进行了免疫组织化学验证。研究结果提供了关于 HSCC 相关基因的可测试假设, 以及潜在的生物标志物和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2020 年 1 月至 2023 年 12 月在南充市中心医院及川北医学院收治的 31 例下咽癌患者为研究对象。病人性别均为男性且全部行手术治疗, 年龄 42 ~ 77 岁。本研究通过学院伦理委员会审核, 患者均签署知情豁免同意书。

1.2 方法

1.2.1 差异基因 登录 (sangerbox.com) 生信分析网站, 对基因数据进行临床分析, 首先通过主成分分析鉴定, 发现主成分分析结果无法区分肿瘤组织和正常组织, 但是可以排除离群样本。使用 R 语言进行 Limma (linear models for microarray data) 基因差异分析, 以获得不同比较组与对照组间的差异基因。

1.2.2 基因富集分析 使用京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) rest API (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>) 获取了最新的京都基因与 KEGG 富集分析的基因注释, 使用 R 软件包进行富集分析, 以获得基因富集的结果。设定 $P < 0.05$ and a FDR < 0.01 。同样把上调基因进行功能富集分析, 也进行基因的 GO 注释。

1.2.3 WGCNA 分析 首先, 利用基因表达谱, 排除了在各个样本中标准差为 0 的基因, 并使用 R 软件包进行 WGCNA 分析, 去除了离群的基因和样本。然后, 将具有相似表达谱的基因划分为基因模块, 采用基于 TOM 的异同度测量法进行平均联系层次聚类, 基因树状图的最小规模 (基因组) 为 30。在设置敏感度为 3 的情况下, 计算了模块特征基因的异同度, 并为模块树状图选择了一条切割线, 合并了一些模块。具体做法是将距离小于 0.25 的模块合并为一个模块, 最终获得了 14 个共表达模块, 其中灰色模块被认为是无法被分配给任何模块的基因集合。

1.2.4 预后生存分析 使用 R 软件包 survival, 整合生存时间、生存状态和基因表达数据, 利用 cox 方法评估每个基因的预后显著性, 确定每个基因的中位表达值。根据给定基因的表达水平高于还是低于中位数, 将样品分配到给定基因的高表达组或低表达组。使用对数秩检验评估高表达组或低表达组之间的生存差异。该测试结果 $P < 0.01$, 认为该基因是经过验证的枢纽基因。

1.2.5 免疫组化验证 把 HOXB9 作为枢纽基因的免疫组织化学验证, 搜集了 31 例下咽癌患者进行肿瘤和配对癌旁组织的免疫组织化学检查。从医院病理科获取相关组织标本, 先对标本烤片, 然后脱蜡, 将切片在柠檬酸钠缓冲液中煮沸以暴露抗原位点, 阻断内源性过氧化氢酶后, 穿膜液孵育 10 min, 然后根据免疫组化试剂盒步骤进行了山羊血清封闭 10 min 以防止非特异性结合; 将切片与 HOXB9 抗体 (1:250 稀释) 在 4 °C 下过夜, 并再滴加二抗与一抗相结合, 切片用苏木精复染, DAB 显色, 盐酸乙醇酸化、流水反蓝, 随后脱水, 封片, 最后使用免疫组化专用显微镜拍照, 并最终对显色结果进行评估。

1.3 主要试剂

PBS 缓冲液购自 biosharp, 柠檬酸组织抗原修复液 MVS-0101, 环保透明液, 免疫显色试剂盒, DAB 染色, 苏木素源购自福州迈新, HOXB9 一抗源自赛默飞世尔科技有限公司。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析。计量资料均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以

[$n(\%)$]表示,组间行独立样本 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异基因火山图、热图的结果

从TCGA数据库获取566个样本并对其进行分析,因临床数据不足或者重复去除35个样本。见表1。分析不同预后患者的临床特征发现,性别与分期结果差异有统计学意义($P < 0.05$),其中肿瘤分期有72个没有具体的分期。基于主成分分析结果从最终数据集中排除了1个肿瘤样本(图1A)。前两个主成分将肿瘤与正常样本区分开来。来自这521个肿瘤样本和44个正常组织样本的基因表达谱被用于随后的分析(图1B)。获取 $P < 0.001$,差异倍数为两倍,并使用FDR进行校正,最终获得HNSCC中差异基因3496个,其中1432个为上调基因,2064个为下调基因。

2.2 HNSCC 样品中 KEGG 和 GO 富集分析

本研究选择HNSCC差异表达基因作为研究目的基因。探索DEGs在HNSCC中的潜在生物学功能,进行了GO富集分析及KEGG富集分析。图2A中DEG在生物过程(biological process, BP)主要参与细胞外组织、胚胎和骨骼发育等过程。图2B中DEG细胞组成(cellular component, CC)主要有细胞

外基质、内质网和染色体等。图2C中DEG分子功能(molecular function, MF)主要参与信号受体结合和金属内肽酶活性。X轴值越大,富集到该通路的差异程度越高。Y轴表示富集出来的GO或者通路名称。图2D中KEGG通路分析发现在受体的相互作用、蛋白质的消化和吸收、PI3K-Akt信号传导途径发挥作用。KEGG富集结果与GO结果类似。

表1 不同结局患者的临床特征比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

临床特征	存活($n=305$)	死亡($n=225$)	t/χ^2 值	P值	FDR
头颈部肿瘤	305(57.55)	225(42.45)			
年龄	59.452 ± 11.062	62.880 ± 12.708	6.253	0.012	0.014
≤60	165(54.10)	97(43.11)			
>60	140(45.90)	128(56.90)			
性别			5.923	0.015	0.017
女	70(22.95)	73(32.44)			
男	235(77.05)	152(67.56)			
肿瘤类型			1.060	0.151	0.183
鳞状细胞癌	297(97.38)	222(98.67)			
鳞癌基底样型	8(2.62)	2(0.90)			
鳞癌梭形细胞变异型	0(0.00)	1(0.44)			
分期			16.476	<0.001	<0.001
I	23(7.54)	4(1.78)			
II	48(15.74)	29(12.90)			
III	53(17.37)	29(12.90)			
IV	137(44.92)	135(60.00)			

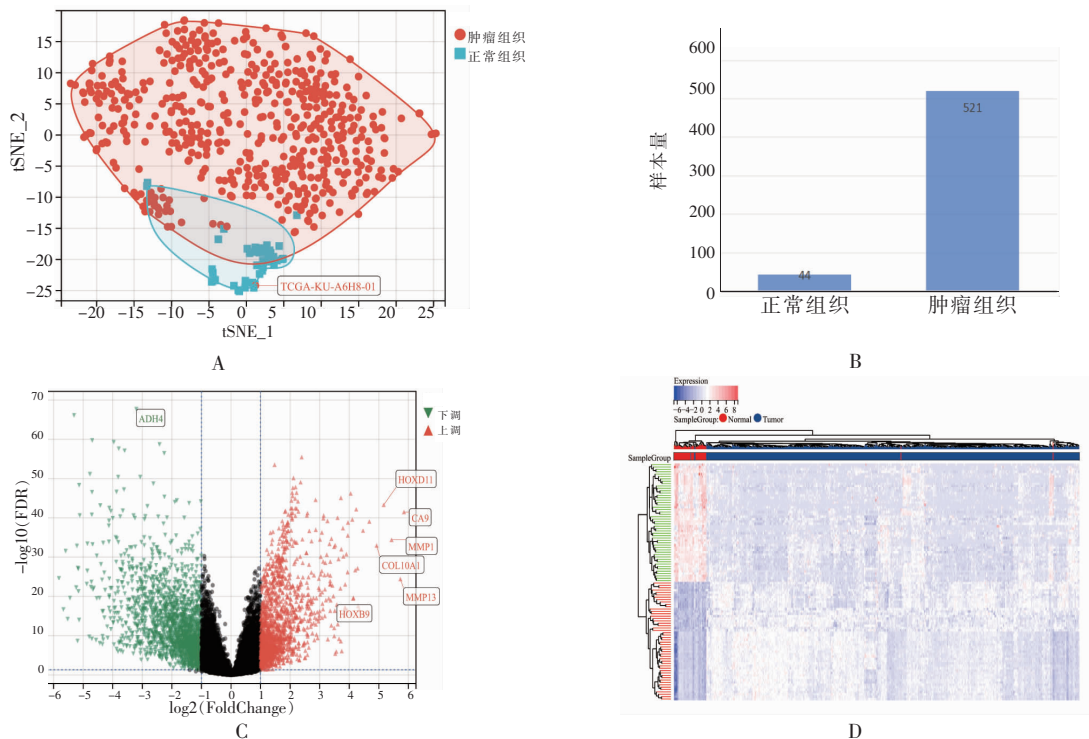


图1 鉴定44个正常样品和521个HNSCC样品之间的DEG

A. 主成分分析;B. 主成分分析样本数量;C. 火山图中绿点代表HNSCC中下调的基因,HNSCC和正常组织之间没有统计学差异的基因为黑点,红点代表HNSCC中上调的基因;D. 差异基因热图,横轴上红色代表正常组织样本,蓝色代表肿瘤组织样本。纵轴上红色代表差异表达明显上调基因,蓝色表述差异表达明显下调基因。

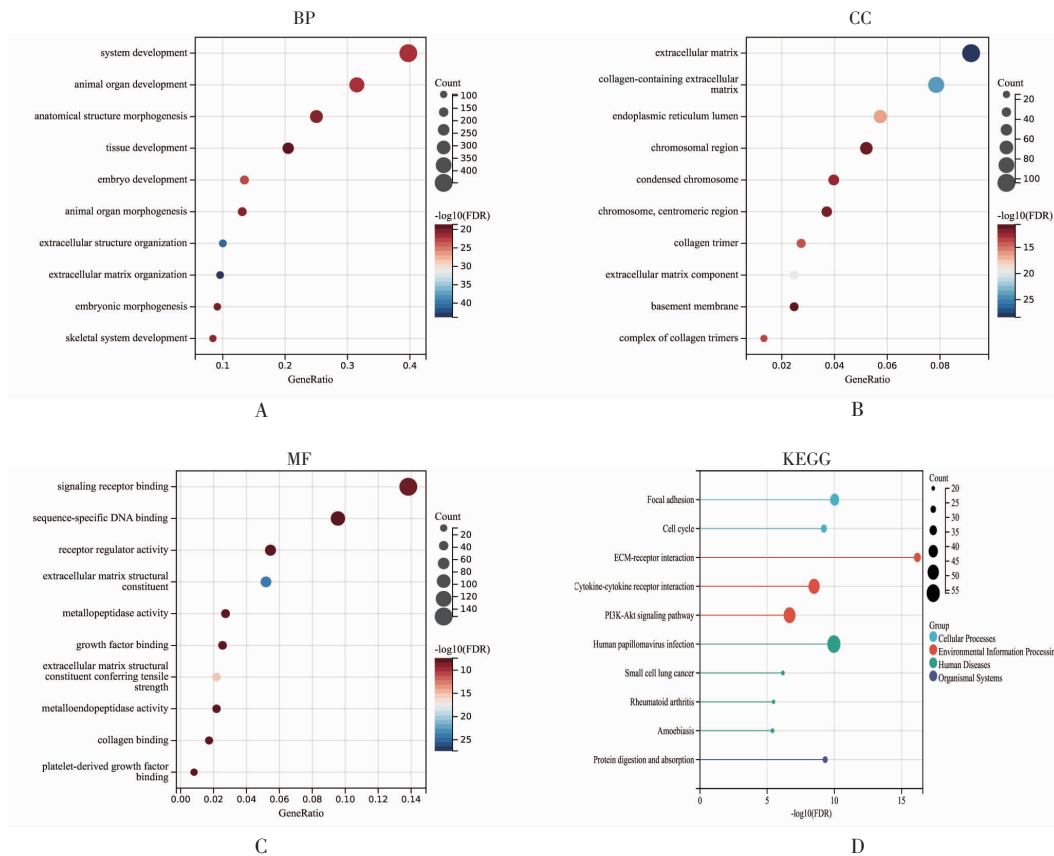


图 2 基因富集分析结果

A. 生物过程(BP); B. 细胞组成(CC); C. 分子功能(MF); D. KEGG 通路分析。

2.3 WGCNA 和关键模块的识别

利用 WGCNA 构建基于 3 496 个 DEG 的表达矩阵和 566 个样本的临床数据的网络。进行了聚类分析,以检查来自 566 个样本的数据质量,所有样本都在聚类中并且在临界阈值(高度 < 200)内,在 WGCNA 中应用了六个临床变量(图 3A):疾病状态(tumor normal),病理分期(pathologic stage),性别(gender),组织学类型(histological type),年龄(Age),生存状况(status)。566 个样本分为两类:肿瘤和正常。形成具有相似表达模式的 DEG 聚集成相同的模块,该过程产生了十四共表达模块(图 3C)。灰色模块包含无法整合到任何其他模块中的基因。黑色模块的特征基因与 HNSCC 正相关($P < 0.05$)。通过对层次聚类、热图和邻接关系的分析证实了这些相关性(图 3D 及图 4A)。这些结果表明,黑色模块可能有助于肿瘤发生,并且黑色模块 MM 和 GS 分数彼此呈强正相关(图 4B)。

2.4 关键模块基因及其与存活率的相关性

基于 566 个 HNSCC 肿瘤样本的表达数据和临床信息,检测黑色模块中鉴定的 588 基因的表达与

患者生存之间的潜在关联。黑色模块基因存在 11 个与预后相关($P < 0.001$)。它们分别是神经肽 B (NPB)、钙粘蛋白 EGF LAG 七经 G 型受体 3 (CELSR3)、组蛋白 1H2BH (HIST1H2BH)、透明质酸介导的运动受体(HMMR)、同源盒 A1 (HOXA1)、HOXB9、长基因间非蛋白编码 RNA 925 (LOC254559)、溶质载体家族 20 成员 1 (SLC20A1)、转录因子 Sp9 (SP9)、基质抗原 3 (STAG3)、锌指蛋白 662 (ZNF662)(图 5)。

2.5 免疫组化验证关键基因 HOXB9

免疫组织化学实验结果如图 6 所示。HOXB9 主要定位在细胞核中,细胞质也少量存在。通过使用 Fiji 软件分析免疫组化癌与癌旁结果图片。结果发现,癌组织中 HOXB9 蛋白表达高于癌旁组织,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。下咽癌组织中 HOXB9 的表达临床分期(TNM 分期)及淋巴结转移明显相关($P < 0.05$);与分化程度无相关性($P > 0.05$)。其中 TNM 分期中 IV 期 HOXB9 表达高于 I、II、III 期;且伴有淋巴结转移的下咽癌肿瘤组织中 HOXB9 表达高于无淋巴结转移患者。见表 2。

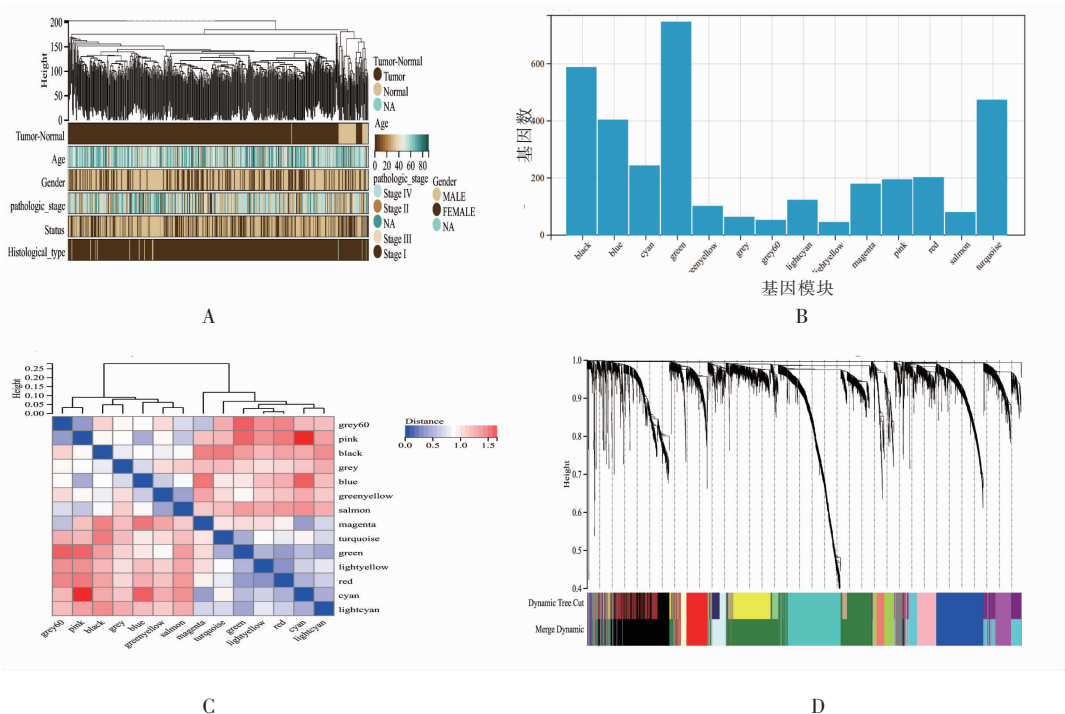


图3 WGCNA 分析结果

A. 临床特征和数据的聚类树状图;B. 14 个模块基因数量;C. 模块特征向量聚类;D. 3 527 DEG 特征的树状图。

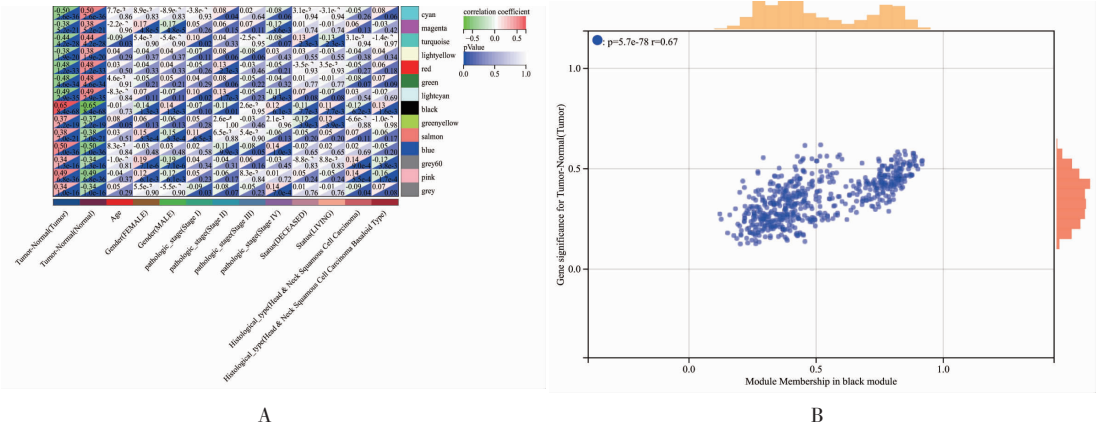
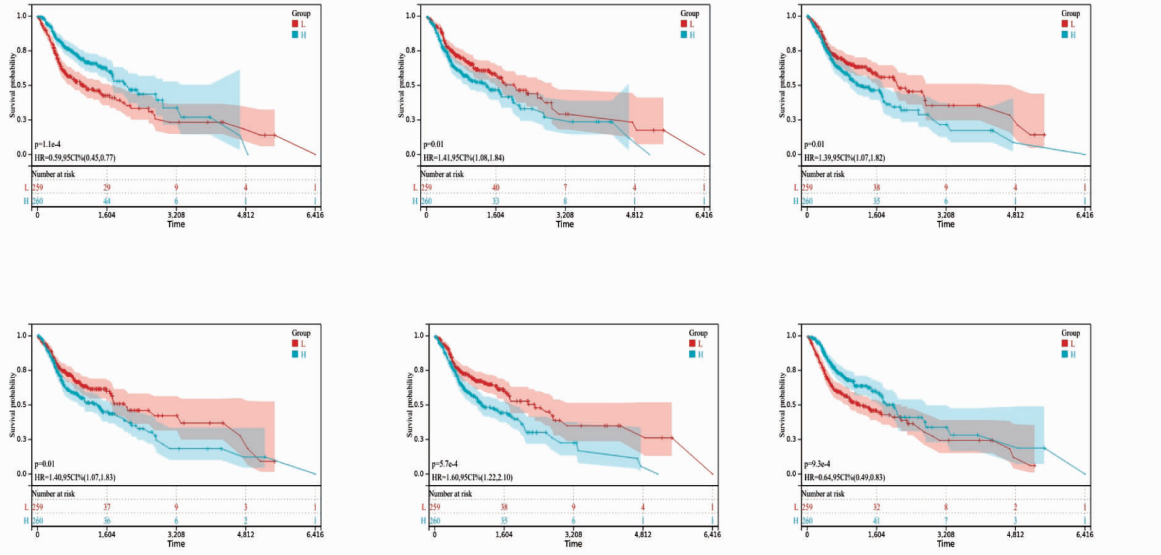


图4 关键基因模块

A. 模块特征基因热图,每个像元都包含相关系数和P值;B. 关键模块 black 基因的 GS 评分和 MM 散点图。



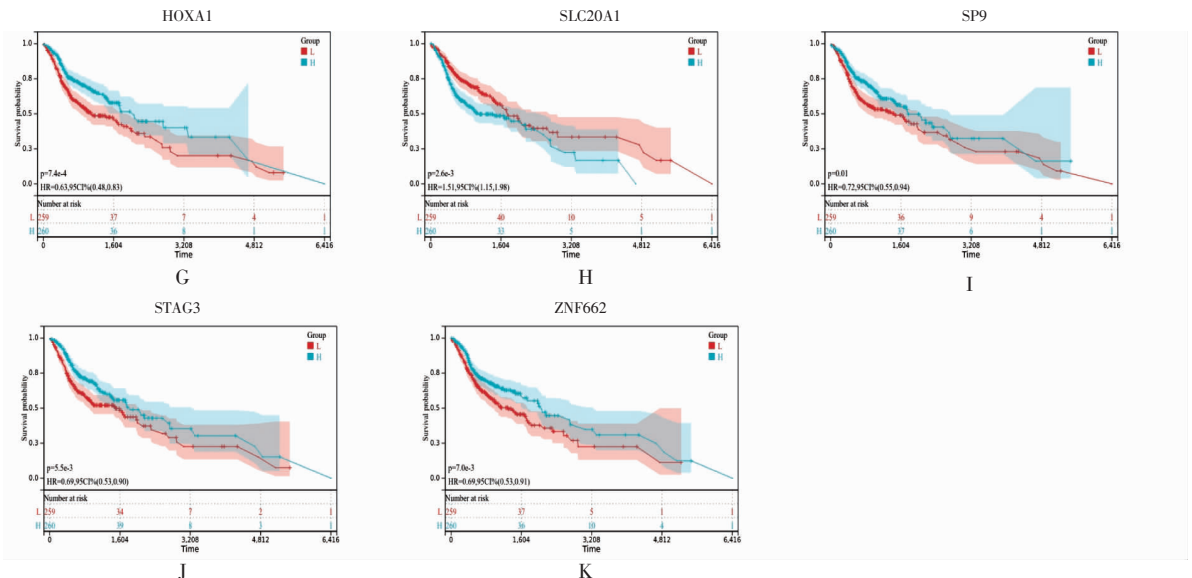


图 5 关键基因预后生存 KM 曲线

A-K:HNSCC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线由 11 个枢纽基因的预后生存曲线组成。

表 2 下咽癌组织结果 (OD 值) 与临床病理特征关系 ($\bar{x} \pm s$)				
临床参数	n	肿瘤表达 (OD 值)	t 值	P 值
部位			2.379	0.020
癌	31	0.12 ± 0.03		
癌旁	31	0.07 ± 0.13		
分期			2.642	0.013
I-III	9	0.14 ± 0.02		
IV	22	0.11 ± 0.03		
分化			0.347	0.720
高分化	8	0.12 ± 0.01		
低中分化	23	0.12 ± 0.01		
有无淋巴结转移			2.338	0.027
有	16	0.13 ± 0.03		
无	15	0.11 ± 0.03		

状不典型,且易发生颈部淋巴结转移,目前手术治疗仍是其主要治疗方式^[9]。但有研究^[10]提出,保留器官的非手术治疗与早期下咽癌手术的生存结局相当。当然也有手术联合放化疗、靶向治疗等方式,目前患者生存率较以前升高,但仍迫切需要更好的治疗方式,有研究^[11]对下咽癌患者进行了全外显子组测序,筛选出一些可能与下咽癌发病机制相关的基因。本研究表明,下咽癌预后不良与 HOXB9 的过表达有关。同时,HOXB9 可能是下咽癌的新型预后标志物。

运用 R 语言分析基因数据,初步筛选出差异常基因,再对差异基因进行富集分析。发现胚胎形成及发育、骨骼发育、生长因子结合、细胞周期、信号传导途径、人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染等过程中发挥重要作用,与之前的研究^[12-13]一致,研究者还发现通过作用于信号通路、细胞周期、结合蛋白等可以影响肿瘤的发生进程。HPV 是口咽癌治疗中最重要的预后因素,21% 的下咽癌患者是 HPV 阳性,可能与生存率的提高有关^[14]。

通过 WGCNA 分析来探索与其发病机制、诊断和预后相关的分子标志物,找到了可能在 HSCC 中重要的模块和枢纽基因。最终确定黑色模块作为关键基因。分析其他模块中的基因也可能在 HSCC 中发挥作用,并且它们构建成了一个复杂的基因网络调节着 HSCC 的发生和发展。11 个枢纽基因与 HSCC 患者的总生存期密切相关,分别是 NPB、CELSR3、HIST1H2BH、HMMR、HOXA1、HOXB9、LOC254559、SLC20A1、SP9、STAG3、ZNF662。目前发现 NPB 在胰腺癌中发挥重要作用^[15]。CELSR3 发现在口腔鳞状细胞癌发挥作用^[16]。HIST1H2BH 与肺癌的发生及预后明显相关^[17]。关于 HMMR 基因的研究^[18-19]已经较多,发现在乳腺癌、胃癌中发

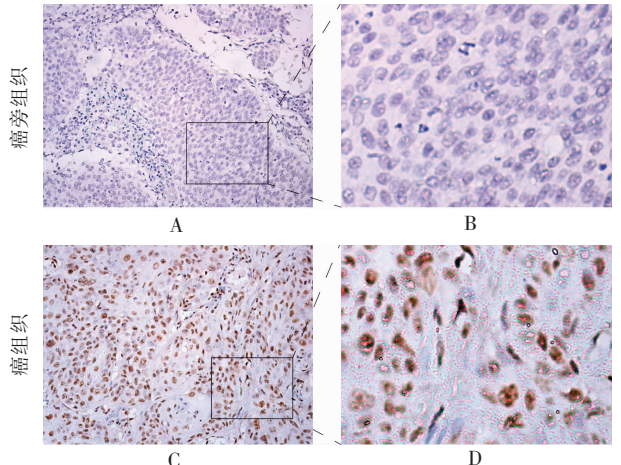


图 6 HOXB9 免疫组化

A. HOXB9 在下咽癌旁组织表达 (200×);B. 癌旁局部放大 (600×);C. HOXB9 下咽癌组织表达 (200×);D. 癌局部放大 (600×)。

3 讨论

下咽癌作为头颈部肿瘤中预后非常差的肿瘤,导致这种情况的原因主要是该病起病隐匿,早期症

挥重要作用。SLC20A1 也发现,可以用于预测口腔鳞状细胞癌、乳腺癌的预后状况^[20-21]。STAG3 在头颈部肿瘤中表达差异明显,且当 HPV 阴性还可作为 HNSCC 的关键预后因素和潜在治疗靶点^[22]。ZNF662、LOC254559、SP9 在肿瘤中的相关报道较少,有待进一步研究。HOXA1、HOXB9 同属于一个基因家族,所以许多功能存在相似之处,目前研究^[23-26]发现,在结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌和肺癌等肿瘤中发挥重要作用。目前与预后相关的 11 个基因,其中 HOX 基因在结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、子宫内膜癌、结直肠癌及乳腺癌等发挥作用。研究^[27]还发现,HOXB9 可能通过破坏免疫景观作为 HNSCC 中的致癌基因发挥作用,是一种有前途的预后生物标志物和治疗靶点;故选择 HOXA1 与 HOXB9 作为目标基因,免疫组化预实验结果表明,HOXA1 实验结果不理想;HOXB9 实验结果较好,遂选择 HOXB9 作为主要研究目标基因。头颈部肿瘤种类较多,但在下咽癌相关研究较少,遂把头颈部肿瘤中下咽癌作为此次主要肿瘤,收集 3 年内的下咽癌 31 例,并收集病理标本,对其进行免疫组化,比较癌与癌旁中 HOXB9 的蛋白表达高低。

HOXB9 属于 HOX 中的一种转录因子,参与细胞增殖和分化,它通过促进细胞增殖、血管生成、侵袭和转移与肿瘤发生和癌症进展有关。研究^[28]发现,HOXB9 是驱动胃癌发生的致癌基因,它和前 B 细胞白血病转录因子 2 (PBX2) 形成异二聚体上调细胞分裂蛋白激酶 6 (CDK6) 以促进细胞周期进程。靶向转录因子 E2F1-HOXB/PBX2-CDK6 轴为 HOXB9 驱动的胃提供了一种新的治疗策略。HOXB9 通过诱导上皮到间充质的过渡使非小细胞肺癌 (NSCLC) 的细胞脱离原发肿瘤,并通过驱动基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的产生和组成血脑屏障 (BBB) 的内皮细胞中细胞间粘附蛋白的降解来促进脑转移,从而促进肿瘤迁移和侵袭^[29]。总之,已经发现 HOXB9 在多种肿瘤中发挥重要作用,但是仍需要对其发挥作用及机制进一步研究。

本研究中,HOXB9 为新型关键基因,其可反映患者的临床病理学特征和所执行分析类型的差异。采用生物信息学分析和实验验证交叉验证相结合的方式研究此关键基因,能为 HSCC 相关机制的研究提供新的思路。并对 HOXB9 进行免疫组织化学研究,结果表明其与下咽癌的临床分期及转移情况相关。HOXB9 与许多肿瘤的发生和发展密切相关,其在下咽癌的临床预后和新的治疗靶点中也扮演着非常重要的角色。有研究^[30]表明,HOXB9 表达水平与癌症患者预后之间存在强烈且一致的相关性,它有可能作为预后生物标志物和免疫治疗反应的预测因子,与本实验结果相似。

综上,HOXB9 在下咽癌中高表达,且表达水平

在 TNM IV 期及伴有淋巴结转移的下咽癌中更高。本实验结果有助于指导进一步的研究,以全面了解参与下咽癌的基因网络,为下咽癌的治疗及预后提供有价值的线索。

参考文献

- [1] Gong Q, Li H, Song J, *et al.* LncRNA LINC01569 promotes M2 macrophage polarization to accelerate hypopharyngeal carcinoma progression through the miR-193a-5p/FADS1 signaling axis [J]. *Journal of Cancer*, 2023, 14 (9) : 1673 - 1688.
- [2] Zhang Y, Liu G, Tao M, *et al.* Integrated transcriptome study of the tumor microenvironment for treatment response prediction in male predominant hypopharyngeal carcinoma [J]. *Nature Communications*, 2023, 14 (1) : 1466.
- [3] Zhu Z, Yu S, Niu K, *et al.* LGR5 promotes invasion and migration by regulating YAP activity in hypopharyngeal squamous cell carcinoma cells under inflammatory condition [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (10) : e0275679.
- [4] Cramer JD, Burtneß B, Le QT, *et al.* The changing therapeutic landscape of head and neck cancer [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2019, 16 (11) : 669 - 683.
- [5] Ling X, Zhang L, Fang C, *et al.* Development of a cuproptosis-related signature for prognosis prediction in lung adenocarcinoma based on WGCNA [J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2023, 12 (4) : 754 - 769.
- [6] Morteza pour M, Tapak L, Bahreini F, *et al.* Identification of key genes in colorectal cancer diagnosis by co-expression analysis weighted gene co-expression network analysis [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2023, 157 : 106779.
- [7] Lemoine GG, Scott-Boyer MP, Ambroise B, *et al.* GWENA: gene co-expression networks analysis and extended modules characterization in a single Bioconductor package [J]. *BMC Bioinformatics*, 2021, 22 (1) : 267.
- [8] Pidò S, Ceddia G, Masseroli M. Computational analysis of fused co-expression networks for the identification of candidate cancer gene biomarkers [J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2021, 7 (1) : 17.
- [9] Tassler AB, Gooding WE, Ferris RL. Hypopharyngeal cancer treatment: does initial surgery confer survival benefit? [J]. *Head & Neck*, 2019, 41 (7) : 2167 - 2173.
- [10] Kwon DI, Miles BA, Education Committee of the American Head and Neck Society (AHNS). Hypopharyngeal carcinoma: do you know your guidelines? [J]. *Head & Neck*, 2019, 41 (3) : 569 - 576.
- [11] Nakazato A, Mochizuki M, Shibuya-Takahashi R, *et al.* RELA is required for CD271 expression and stem-like characteristics in hypopharyngeal cancer [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12 (1) : 17751.
- [12] Gao X, Fan X, Zeng W, *et al.* Overexpression of microRNA-107 suppressed proliferation, migration, invasion, and the PI3K/Akt signaling pathway and induced apoptosis by targeting Nin one binding (NOB1) protein in a hypopharyngeal squamous cell carcinoma cell line (FaDu) [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (3) : 7881 - 7893.
- [13] Sogutlu F, Kayabasi C, Ozmen YB, *et al.* The effect of ICRT-3 on Wnt signaling pathway in head and neck cancer [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120 (1) : 380 - 395.
- [14] Burbure N, Handorf E, Ridge JA, *et al.* Prognostic significance of

- human papillomavirus status and treatment modality in hypopharyngeal cancer[J]. *Head & Neck*, 2021, 43(10):3042–3052.
- [15] Tan YQ, Sun B, Zhang X, *et al.* Concurrent inhibition of pBADS99 synergistically improves MEK inhibitor efficacy in KRAS^{G12D}-mutant pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2024, 15(2):173.
- [16] Zheng K, Lan T, Li GP, *et al.* Evaluated expression of CELSR3 in oral squamous cell carcinoma is associated with perineural invasion and poor prognosis[J]. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2022, 133(5):564–573.
- [17] Wu R, Ma R, Duan X, *et al.* Identification of specific prognostic markers for lung squamous cell carcinoma based on tumor progression, immune infiltration, and stem index[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1236444.
- [18] Mateo F, He Z, Mei L, *et al.* Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by HMMR overexpression[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1):1895.
- [19] Yang M, Chen B, Kong L, *et al.* HMMR promotes peritoneal implantation of gastric cancer by increasing cell-cell interactions[J]. *Discover Oncology*, 2022, 13(1):81.
- [20] Shi C, Liu S, Tian X, *et al.* Prognostic and therapeutic prediction by screening signature combinations from transcriptome-methylome interactions in oral squamous cell carcinoma[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1):11400.
- [21] Onaga C, Tamori S, Matsuoka I, *et al.* High expression of SLC20A1 is less effective for endocrine therapy and predicts late recurrence in ER-positive breast cancer[J]. *PLoS One*, 2022, 17(5):e0268799.
- [22] Tian G, Fu Y, Zhang D, *et al.* Identification of four key prognostic genes and three potential drugs in human papillomavirus negative head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1):167.
- [23] Martinou E, Moller-Levet C, Karamanis D, *et al.* HOXB9 overexpression promotes colorectal cancer progression and is associated with worse survival in liver resection patients for colorectal liver metastases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4):2281.
- [24] Suh DH, Park WH, Kim M, *et al.* HOXB9 overexpression confers chemoresistance to ovarian cancer cells by inducing ERCC-1, MRP-2, and XIAP[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2):1249.
- [25] Yao Y, Liu C, Wang B, *et al.* HOXB9 blocks cell cycle progression to inhibit pancreatic cancer cell proliferation through the DNMT1/RBL2/c-Myc axis[J]. *Cancer Letters*, 2022, 533:215595.
- [26] Wang T, Guo H, Li Q, *et al.* The AMPK-HOXB9-KRAS axis regulates lung adenocarcinoma growth in response to cellular energy alterations[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(8):111210.
- [27] Li J, Ran H, Zeng X, *et al.* Identification of HOXB9 based on comprehensive bioinformatics analysis for predicting prognosis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Medicine*, 2023, 102(35):e35035.
- [28] Zhang J, Chen B, Wang Y, *et al.* The E2F1-HOXB9/PBX2-CDK6 axis drives gastric tumorigenesis and serves as a therapeutic target in gastric cancer[J]. *The Journal of Pathology*, 2023, 260(4):402–416.
- [29] Zheng H, Li C, Li Z, *et al.* HOXB9 enhances the ability of lung cancer cells to penetrate the blood-brain barrier[J]. *Aging*, 2020, 13(4):4999–5019.
- [30] Jin Q, Xu L, Wang J, *et al.* Pan-cancer analysis of Homeobox B9 as a predictor for prognosis and immunotherapy in human tumors[J]. *Aging*, 2023, 15(11):5096–5124.
- (收稿日期:2024-02-27 修回日期:2024-04-05)