

研究论文

基于综合生物信息学鉴定宫颈癌潜在的生物学标志物SYNGR3

罗 勇, 古扎丽努尔·阿不力孜*

(新疆医科大学第三临床医学院妇外五科, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 本研究基于加权基因共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)联合基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)鉴定共表达基因, 经癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)验证共表达基因在宫颈癌中的表达并确定关键基因。结果显示, 突触蛋白3 (synaptogyrin 3, *SYNGR3*)为宫颈癌的关键基因, 受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)的曲线下的面积显示*SYNGR3*预测宫颈癌的准确性为99.1%。Cox回归结果显示, 高表达*SYNGR3*的宫颈癌患者生存周期延长。免疫浸润显示, 高表达*SYNGR3*和Th1细胞的免疫浸润相关。人类蛋白质图谱数据库中免疫组织化学染色结果显示, *SYNGR3*在宫颈腺癌中表达。蛋白免疫印迹和实时定量荧光PCR实验结果显示, *SYNGR3*在人宫颈癌细胞C-33a、人宫颈癌细胞HeLa及人宫颈鳞状细胞癌细胞Siha中高表达。本实验结果显示, *SYNGR3*可以作为为宫颈癌潜在的生物标志物且与宫颈癌患者的总生存期相关。

关键词: 突触蛋白3; 生物标志物; 总生存期

Identification of *SYNGR3* as a potential biomarker for cervical cancer based on comprehensive bioinformatics

LUO Yong, GUZALINUR Abulizi*

(Department of Gynecologic Surgery Five, Third Clinical Medical College of
Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: This research bases on weighted correlation network analysis (WGCNA) in combination with the gene expression omnibus (GEO) to identify co-expressed genes. The expression of the co-expressed genes in cervical cancer was then verified through the cancer genome atlas (TCGA), and the key genes were determined. The results indicated that synaptogyrin 3 (*SYNGR3*) is a crucial gene in cervical cancer. The area under the receiver operating characteristic curve (ROC) demonstrated that the accuracy of *SYNGR3* in predicting cervical cancer was 99.1%. The results of Cox regression demonstrated that cervical cancer patients with high expression of *SYNGR3* had a prolonged survival period. Immunoinfiltration analysis exhibited that high *SYNGR3* expression was correlated with the immunoinfiltration of Th1 cells. The immunohistochemical staining results in the Human Protein Atlas database showed that *SYNGR3* was expressed in cervical adenocarcinoma. The results of Western blot and real-time quantitative fluorescence PCR experiments indicated that *SYNGR3* was highly expressed in human cervical cancer cell line C-33a, human cervical cancer

收稿日期: 2024-10-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2022B03019-2)

第一作者: E-mail: 1062992503@qq.com

*通信作者: E-mail: Guzali119@sohu.com

cell line HeLa, and human cervical squamous cell carcinoma cell line SiHa. *SYNGR3* is a potential biomarker for cervical cancer and is associated with the overall survival of cervical cancer patients.

Key Words: SYNGR3; biomarker; overall survival

宫颈癌(cervical cancer, CC)是全球女性发病率和死亡率排名第四的恶性肿瘤^[1]。在中国, 2022年的统计数据显示, 宫颈癌新发病例已达每年109 700, 年死亡人数达59 100, 严重危害女性健康。特别是晚期、复发性和转移性宫颈癌的预后较差, 生存率仅为17%^[2]。目前, 手术是早期宫颈癌的主要治疗方法^[3]。宫颈癌患者的存活率及总生存期在很大程度上取决于早期诊断和干预, 深入探究宫颈癌发生发展的相关分子机制, 为宫颈癌新型治疗策略的开创提供了全新视角^[4]。

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的持续感染是CC发展的主要原因, 由于宫颈癌发病机制复杂, 还存在其他因素, 如遗传因素、宫颈阴道微生物群、营养因素、免疫反应合并症、吸烟以及使用激素避孕药等^[5]。基因表达失控是许多癌症发生的内在因素, 在宫颈癌的发生发展中起重要作用^[6]。

筛选鉴定宫颈癌表达的差异基因, 可以为宫颈癌的诊断提供新的基因靶点。新的生物学标志物还可以为宫颈癌的早发现、早治疗、延长宫颈癌患者的生命周期提供可靠的保障。目前, 随着高通量检测和分析技术的快速发展, 生物信息学技术可对海量的肿瘤数据进行收集和整理, 综合运用生物信息学数据库及相应方法有助于肿瘤诊断标志物的发现, 为众多恶性肿瘤如宫颈癌、胰腺癌、乳腺癌等癌症诊断提供了新方向, 奠定了理论基础。Ma等^[7]利用生物信息学分析显示, 微小染色体维持复合物成分3(minichromosome maintenance complex component 3, *MCM3*)可作为宫颈癌预后评估的生物学指标。Yang等^[8]通过生物信息学分析筛选的DNA拓扑异构酶Ⅱα(DNA topoisomerase Ⅱ alpha, *TOP2A*)、极光激酶A(aurora kinase A, *AURKA*)、细胞周期蛋白A2(cyclin A2, *CCNA2*)和胰岛素样生长因子结合蛋白5基因(insulin-like growth factor binding protein 5 gene, *IGFBP5*)在宫颈癌样本中的表达与正常

样本相比存在显著差异, 可能是宫颈癌的生物学标志物。

宫颈癌的诊断方法多种多样, 宫颈肿瘤标志物联合宫颈液基细胞学筛查是常用方法之一。近些年来, 宫颈癌肿瘤标志物的研究取得了飞速进展, 但较为理想的高敏感性及高特异性的用于宫颈癌早期诊断及预后评估的标志物尚未被发现。单一指标容易受炎症、出血等影响; 同时联合几种特异性或灵敏性较高的标志物检测, 可互相补充, 以提高诊断的灵敏度和特异性^[9]。本研究联合加权基因共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA)与基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)鉴定宫颈癌潜在的生物学标志物, 为宫颈癌的早期诊断与治疗提供新的思路与视角。

1 材料与方法

1.1 细胞信息

HUVEC(人正常宫颈上皮细胞)购自上海雅吉生物科技有限公司(产品编号: YS1079C)。HeLa S3(人宫颈癌细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(产品编号: CL-0350)。C-33a(人子宫颈癌细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(产品编号: CL-0045)。SiHa(人子宫颈鳞癌细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(产品编号: CL-0210)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HUVEC细胞采用完全培养基: 89% 1640+10% FBS+1%双抗。HeLa S3细胞采用生长培养基: Ham's F-12K+10% FBS+1%双抗。C-33a细胞采用生长培养基: MEM(含NEAA)+10% FBS+1%双抗。SiHa细胞采用生长培养基: MEM(含NEAA)+10% FBS+1%双抗。以上细胞均为贴壁细胞, 待密度达到80%时可用胰酶进行细胞传代。细胞培养条件为, 95%空气、5%CO₂的37℃的细胞培养箱中。

1.2.2 细胞系总RNA提取

TRIzol试剂(Invitrogen公司)提取HUCEC细胞、HeLa S3细胞、C-33a细胞和SiHa细胞中总RNA。检测RNA浓度和纯度，并置于液氮或-80℃冰箱中冻存。

1.2.3 RNA的提取与转录

反转录试剂盒(TaKaRa公司，RR037A)聚合酶链反应将提取的mRNA转化为cDNA，相关的引物序列详列于表1中。

1.2.4 蛋白质印迹实验

使用RIPA(北京索莱宝科技有限公司)裂解细胞提取总蛋白，BCA法(赛默飞世尔科技有限公司)检测细胞的蛋白质含量，在10%~12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)技术下实现蛋白质的分离，随后进行PVDF膜转移。膜样品用5%脱脂奶粉溶液进行1.5 h的封闭处理。随后，膜与一抗在4℃下孵育过夜(兔抗人SYNGR3一抗1:1 000)，膜与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下进行2 h的孵育。利用ECL体系显现蛋白质条带，并借助Image Lab软件进行条带定性和定量分析。

1.2.5 WGCNA分析识别宫颈癌相关模块

本研究利用WGCNA鉴定了宫颈癌相关的核心模块和关键基因。基因表达谱从GEO数据库(GSE63514)获得。基于 $R^2>0.85$ 计算软阈值b(范围从1到20)以实现无标度拓扑。

1.2.6 筛选差异表达基因

使用R(4.2.1)版本软件的R包：GEOquery[2642]、limma[3522]、ggplot2[336]分析GSE9705数据集，对宫颈癌组和正常对照组进行差异表达分析。以校正后的 $|\text{LogFC}|>2$ & $p.\text{adj}<0.05$ 为差异基因筛选条件。

1.2.7 TCGA验证共表达基因

癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载并整理TCGA-CESC(宫颈鳞癌和腺癌)的RNAseq数

据，用ggplot2包对数据进行可视化。

1.2.8 ROC曲线下面积分析关键基因诊断宫颈癌准确性

下载并整合来自TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)的TCGA-CESC的RNAseq数据，运用pROC包执行受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析，以ggplot2进行图片可视化。

1.2.9 分析关键基因与总生存时间之间的关系

下载并整合来自TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)的TCGA-CESC的RNAseq数据，应用survival包进行比例风险假设检验，并通过survminer包及ggplot2包实现可视化。

1.2.10 分析关键基因与免疫细胞浸润的关系

下载并整合来自TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)的TCGA-CESC的RNAseq数据，使用R包GSVA[1460]中的ssGSEA算法分析24种免疫细胞浸润情况。

1.2.11 人类蛋白质图谱数据库

人类蛋白质图谱数据库(www.proteinatlas.org)旨在通过整合多组学技术描绘细胞、组织与器官中的人类全部蛋白质。使用人类蛋白质图谱数据库探索关键基因在宫颈癌患者组织中的表达情况。

1.3 统计分析

数据统计分析均采用R(4.2.1)版本及相应的R包进行，主要包含t检验、Wilcoxon秩和检验比较组间差异。Spearman秩相关检验进行相关性分析。细胞实验相关统计数据均使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。根据变量分布，对两组计数资料使用t检验， $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选宫颈癌的差异表达基因

使用GSE9705数据集(共纳入33例宫颈癌患者病变组织和24例正常宫颈上皮组织)分析宫颈癌患

表1 RT-qPCR引物信息

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	PCR片段大小(bp)
SYNGR3	ACG AGG GCT ACG TGA ACA C	CGG TGG CGA AGA GTG ACA T	220
GAPDH	CAT CCA CTG GTG CTG CCA AGG CTG T	ACA ACC TGG TCC TCA GTG TAG CCC A	206

者的差异表达基因, 用箱式图绘制每个样本对应的数据情况。经过数据校正后各个样本中位数的线在同一个水平线(图1A), PCA图对高维度数据进行降维后查看样本间差异情况, 其降维后两个主成分差异如图1B所示。以 $|\text{LogFC}| > 2$ & $p.\text{adj} < 0.05$ 为差异基因筛选条件共筛选出224个上调表达基因、579个下调表达基因, 火山图进行可视化(图1C)。

2.2 WGCNA分析筛选与宫颈癌相关枢纽模块

GSE63514数据集(共纳入28例宫颈癌患者病变组织和24例正常宫颈上皮组织)预处理后获得16374个基因, 基于($R^2=0.85$)软阈值, 功率 $b=12$ 以实现无标度拓扑(图2A、图2B), 通过层次聚类(图2C)绘制特征基因邻接热图(图2D), 识别模块合并了距离小于0.25的模块, 最终获得了8个表达模块。基于其中MEblue模块与宫颈癌高度相关(图2E), 维恩图将GSE9705数据集的上调表达基因和MEblue模块中的关键基因取交集, 共鉴定出3个共表达基因, 分别是突触蛋白3(synaptogyrin 3, SYNGR3)、间皮素基因(mesothelin, MSLN)和载脂蛋白L1基因

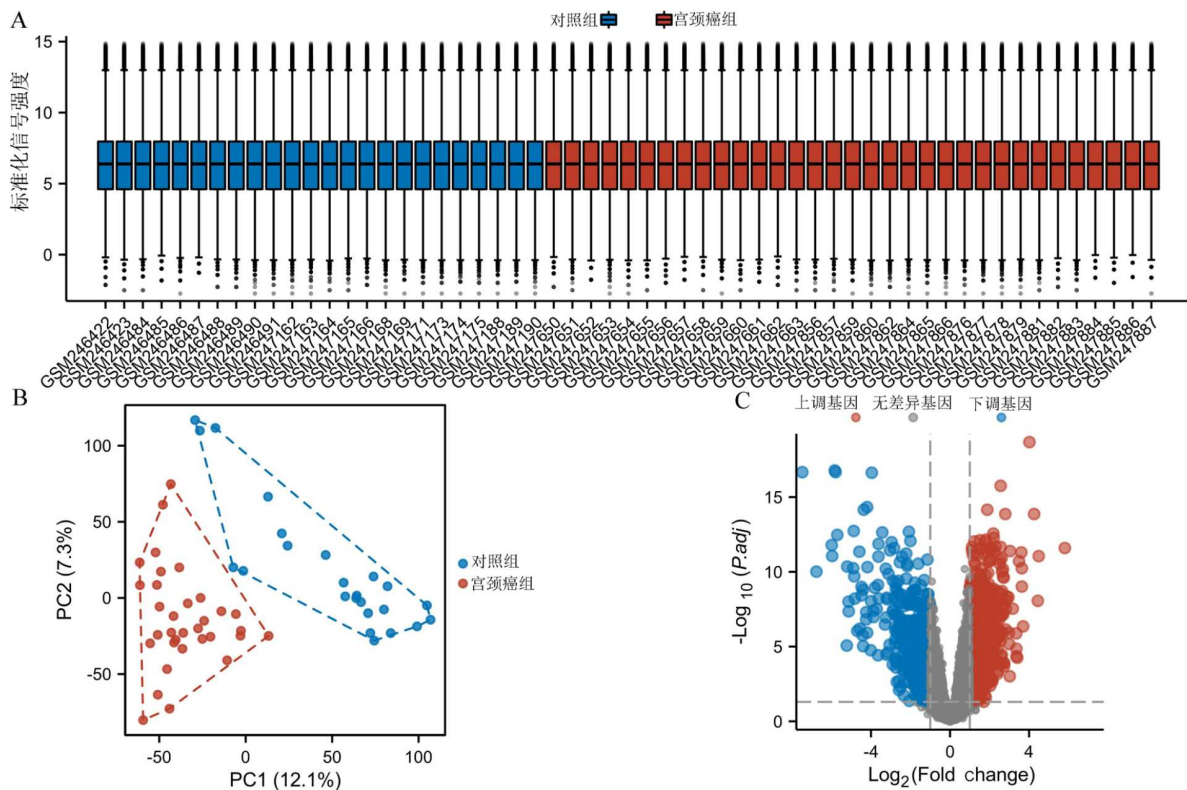
(apolipoprotein L1 gene, *APOLI*)。

2.3 TCGA验证共表达基因在宫颈癌中的表达

验证3个共表达基因SYNGR3、MSLN和APOLI在TCGA数据库中与宫颈癌的表达情况发现, SYNGR3和MSLN在宫颈癌患者中高表达($P < 0.01$), APOLI无统计学意义。

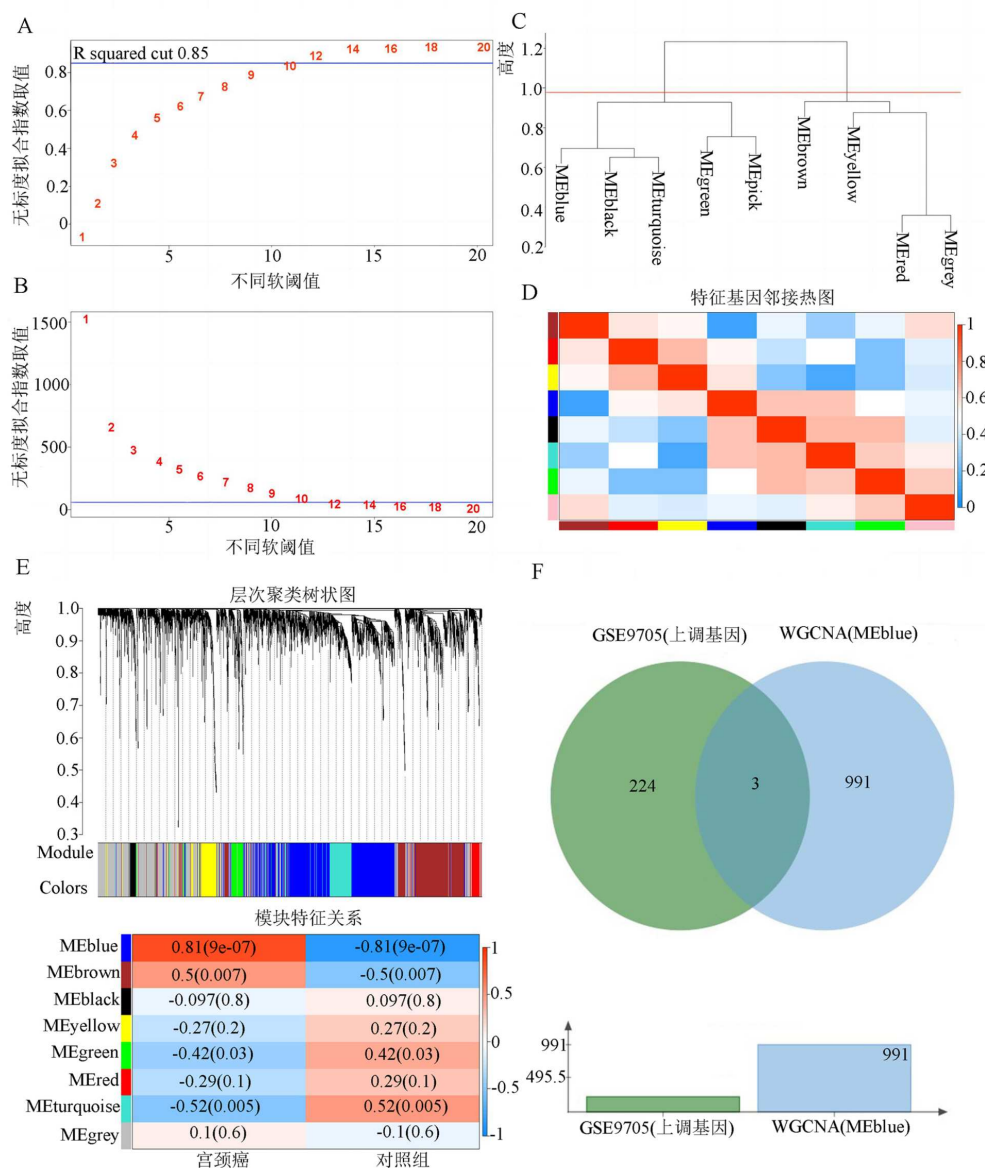
2.4 高表达SYNGR3的宫颈癌患者总生存期延长

以ROC曲线下面积对SYNGR3和MSLN与宫颈癌患者诊断的准确性进行评估, 结果显示, SYNGR3 ROC曲线下面积为0.991, 诊断宫颈癌准确性较高, 而MSLN ROC曲线下面积仅为0.465, 诊断宫颈癌准确性较低, 故SYNGR3可能是宫颈癌潜在的生物学标志物(图4A)。进一步研究发现, SYNGR3表达水平与宫颈癌患者生存率有统计学差异($P < 0.01$), 使用TCGA数据库中291例宫颈癌患者临床数据进行验证, 结果显示, SYNGR3高表达宫颈癌患者生存率高于SYNGR3低表达宫颈癌患者, 风险比(hazard ratio, HR)为0.42(图4C、图4D)。根据TCGA数据库中宫颈癌的表达数据, 利用



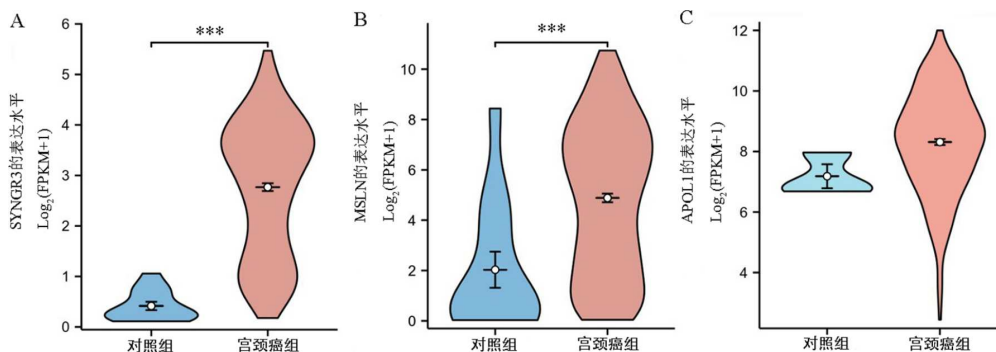
A: 箱式图; B: PCA图; C: 差异分析火山图

图1 筛选差异表达基因



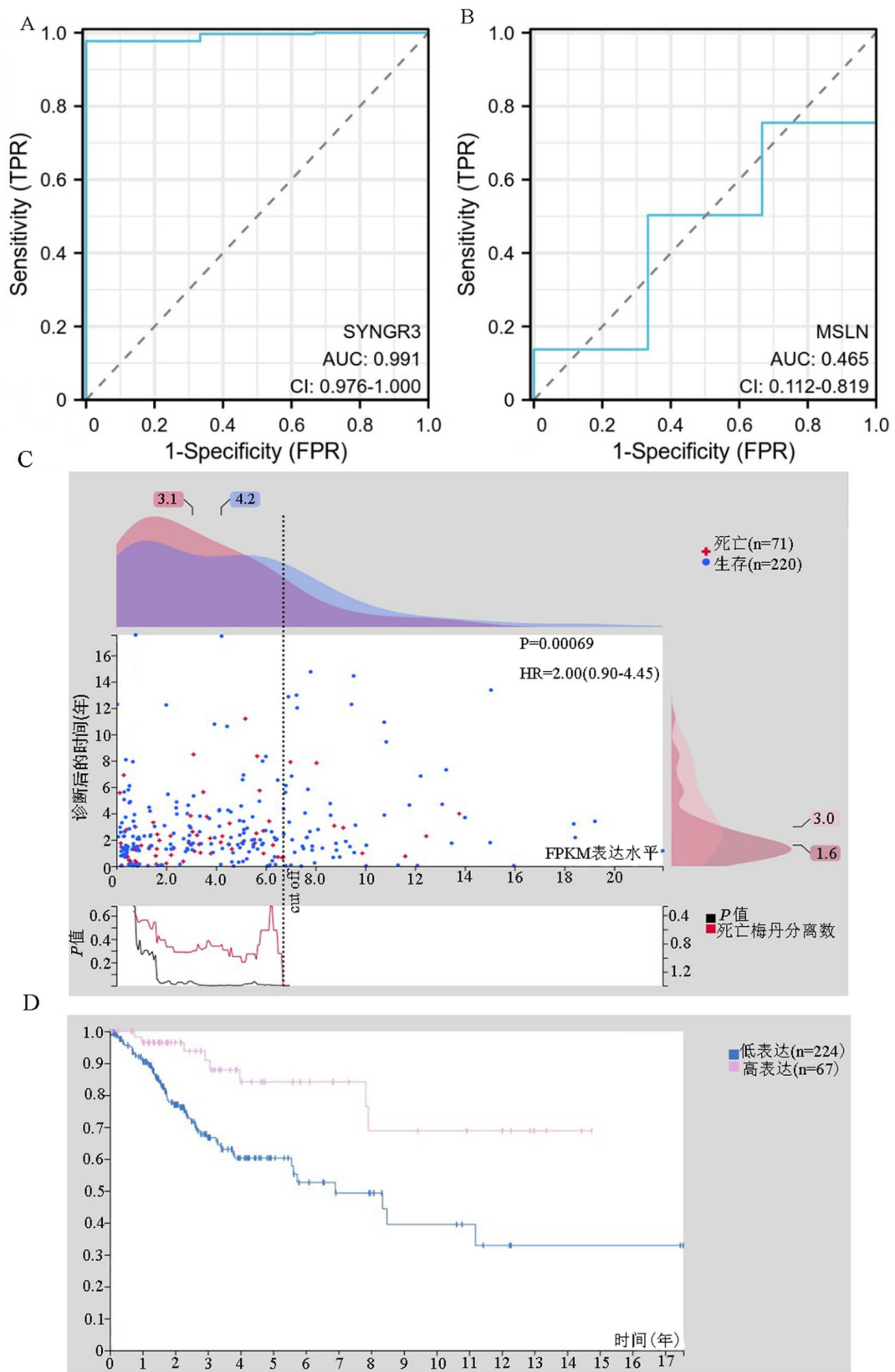
A: 估计软阈值功效表独立性指数; B: 确定软阈值功率的平均连通性; C、D: 鉴定分层聚类中基因表达模块; E: 模块特征基因与宫颈癌的关系; F: 维恩图鉴定共表达基因

图2 WGCNA识别宫颈癌关键模块



*** $P < 0.001$

图3 TCGA数据库验证共表达基因



A、B: SYNGR3和MSLN ROC曲线下面积; C、D: SYNGR3总生存期K-M曲线

图4 SYNGR3与宫颈癌患者总生存期关系

*SYNGR3*的中位表达值将宫颈癌患者分为*SYNGR3*高表达组和低表达组。分析*SYNGR3*的表达与患者临床病理特征的关系,结果表明,*SYNGR3*与宫颈癌的病理组织相关,更易在宫颈细胞鳞癌中检出($P<0.001$)(表2)。

2.5 高表达*SYNGR3*与Th1细胞免疫浸润相关

基于TCGA数据库,分析*SYNGR3*表达的中位数分组间免疫浸润的差异,叠加柱状图来展示数据分布情况(图5A),细胞免疫浸润结果显示,高表达*SYNGR3*与Th1细胞免疫浸润相关($P<0.001$)(图5B)。

2.6 *SYNGR3*在宫颈癌细胞中高表达

人类蛋白质图谱数据库中,免疫组织化学染色

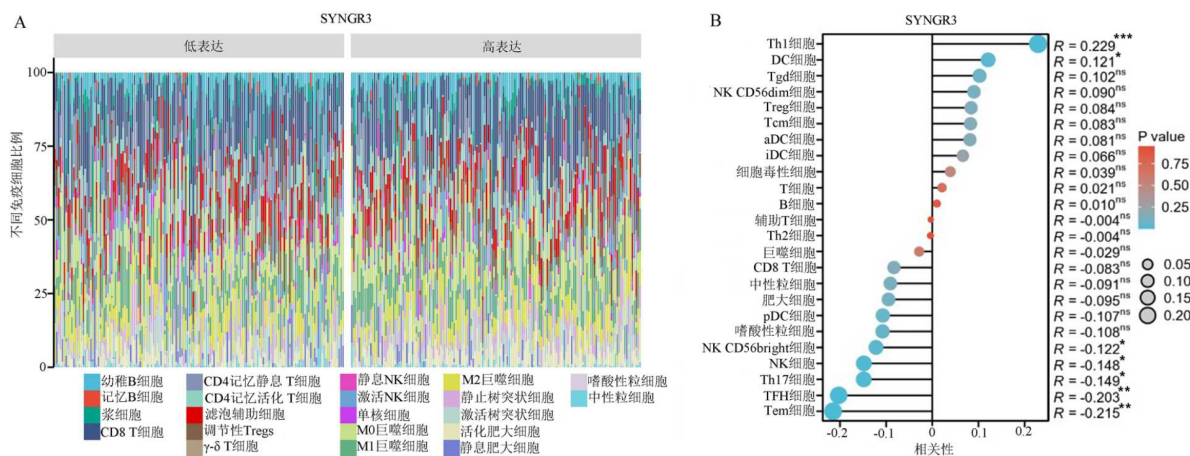
结果显示,*SYNGR3*在宫颈腺癌中表达(图6A、图6B)。人正常宫颈上皮细胞HUCEC、人宫颈癌细胞C-33a、人宫颈癌细胞HeLa及人宫颈鳞状细胞癌细胞Siha的细胞形态如图6C、图6D、图6E、图6F所示。

蛋白免疫印迹和实时定量荧光PCR实验结果显示,*SYNGR3*在人宫颈癌细胞C-33a、人宫颈癌细胞HeLa及人宫颈鳞状细胞癌细胞Siha中高表达($P<0.01$)(图6G、图6H、图6I)。

3 讨论

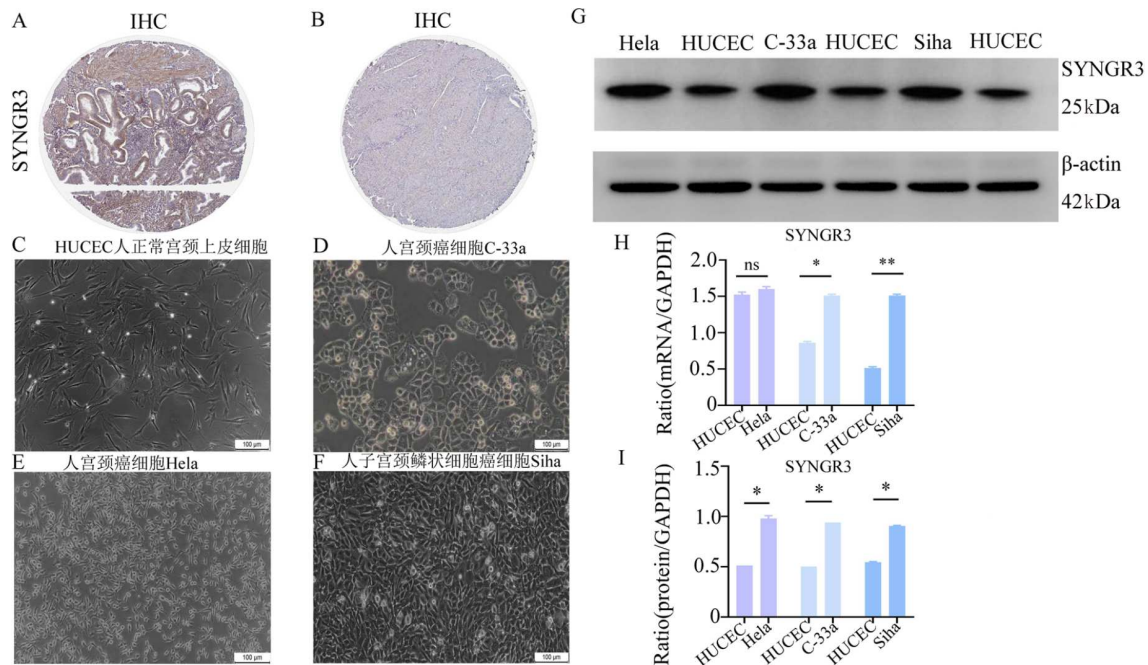
宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率和死亡率较高。宫颈癌很大程度上是一种可以预防的疾病,早期发现可以显著提高患者的总生存期。事实上,在已建立疫苗接种和筛查计划的高收入国家,这是一种罕见疾病。然而,宫颈癌对低收入和中等收入国家的女性来说是一个杀手,由于资源有限,她们往往表现为晚期发现并无法治愈,主要的治疗手段包括手术干预与化疗/放疗的联合^[10]。寻找潜在的宫颈癌诊断及生存生物标志物,对于提升患者生存率至关重要。

本研究联合WGCNA及GEO数据集综合分析鉴定出3个共表达基因,紧接着使用TCGA数据库对共表达基因进行验证,发现*APOL1*在宫颈癌组织和正常宫颈上皮组织中未显示出统计学差异,而*MSLN* ROC曲线下面积不具备准确的诊断宫颈癌的能力,而*SYNGR3*可能为宫颈癌潜在的生物学标记物。



A: *SYNGR3*免疫浸润热图; B: *SYNGR3*免疫浸润棒棒糖图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图5 *SYNGR3*与免疫细胞浸润的关系



A、B: SYNGR3在宫颈腺癌组织中表达; C-F: 细胞形态图; G: SYNGR3蛋白在宫颈癌细胞中高表达; H: 蛋白免疫印迹实验柱形统计图; I: 实时定量荧光PCR实验柱形统计图, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

图6 SYNGR3在宫颈癌细胞中高表达

SYNGR3主要被描述为神经元突触基因, 该基因编码一种完整突触小泡蛋白膜, 可能在受调节的胞吐中发挥作用^[11]。一些研究记录了癌症背景下SYNGR3表达的改变, 如SYNGR3在嫌色肾细胞癌中高度表达^[12]、SYNGR3作为头颈癌潜在的生物学标志物影响患者的总生存期、高表达SYNGR3会延长头颈癌患者的生存周期^[13]等。在本研究中, TCGA数据库验证SYNGR3在宫颈癌组织中高表达且ROC曲线下面积达到0.991, 与头颈癌研究结果相一致——SYNGR3高表达会延长宫颈癌患者的总生存期。有趣的是, 进行免疫浸润分析时发现, 高表达SYNGR3与Th1细胞免疫浸润相关, Th1细胞产生细胞因子, 如干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)。同时, Th1细胞被认为是参与抗肿瘤免疫反应的辅助性T细胞的主要亚群^[14-16]。Th1和Th2细胞是辅助性T细胞的两个关键亚群, 它们通过分泌抑制各自免疫反应的细胞因子而相对平衡地存在, 当肿瘤微环境中的细胞因子类型发生改变时, 这种平衡可能会打破, 导致从Th1到Th2免疫反应的转变,

Th1/Th2失衡是恶性肿瘤发展的决定因素之一^[17-19]。有研究显示, 在宫颈癌患者中观察到Th1/Th2失衡会涉及宫颈癌的发生和发展, 纠正Th1与Th2细胞之间的平衡可能是宫颈癌治疗的新靶点^[20]。在本研究中, 高表达SYNGR3与Th1细胞免疫浸润相关, 推测可能是高表达SYNGR3造成Th1与Th2细胞失衡, 最终导致宫颈癌的发生, 具体机制可在未来进一步探究。最后, 本研究在3种宫颈癌细胞中进行的验证和生物信息学分析结果互相印证, SYNGR3在3种宫颈癌细胞系中均高表达。

综上所述, 本研究结果初步证明SYNGR3可能是宫颈癌潜在的生物学标记物且与宫颈癌患者总生存期密切相关。但鉴于研究方法限于生物信息学分析和简单的细胞实验验证, 研究结果可能有一定的局限性, 因此, 需进一步的基础和临床试验探讨SYNGR3在宫颈癌中的确切作用机制。

作者贡献声明:

罗 勇: 设计论文框架, 起草论文; 实验操作, 研究过程的实施; 数据收集, 分析/解释数据, 绘制图表;

古扎丽努尔·阿布力孜: 论文修改; 拟定写作思

路, 指导撰写文章并定稿。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Migliorini F, Cuozzo F, Oliva F, et al. CT-based navigation for total hip arthroplasty: a meta-analysis. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 443-447
- [2] Sharma A, Chakdar H, Vaishnav A, et al. Multifarious plant growth-promoting *Rhizobacterium enterobacter* sp. CM94-mediated systemic tolerance and growth promotion of chickpea (*cicer arietinum* L.) under salinity stress. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(10): 241-245
- [3] Lizano M, Carrillo-García A, De La Cruz-Hernández E, et al. Promising predictive molecular biomarkers for cervical cancer (Review). *Int J Mol Med*, 2024, 53(6): 42-50
- [4] García E, Ayoub N, Tewari KS. Recent breakthroughs in the management of locally advanced and recurrent/metastatic cervical cancer. *J Gynecol Oncol*, 2024, 35(1): e30
- [5] Simms KT, Keane A, Nguyen DTN, et al. Benefits, harms and cost-effectiveness of cervical screening, triage and treatment strategies for women in the general population. *Nat Med*, 2023, 29(12): 3050-3058
- [6] Rader JS, Tsaih SW, Fullin D, et al. Genetic variations in human papillomavirus and cervical cancer outcomes. *Intl J Cancer*, 2019, 144(9): 2206-2214
- [7] Ma H, Liu Z, Li H, et al. Bioinformatics analysis reveals MCM3 as an important prognostic marker in cervical cancer. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 1-10
- [8] Yang X, Zhou M, Luan Y, et al. Identification of key genes associated with cervical cancer based on bioinformatics analysis. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 897
- [9] 张超飞, 钱延玲, 张慧萍, 等. 宫颈癌相关肿瘤标志物研究进展. *临床医学进展*, 2021, 11(1): 213-219
- [10] Monk BJ, Enomoto T, Kast WM, et al. Integration of immunotherapy into treatment of cervical cancer: recent data and ongoing trials. *Cancer Treat Rev*, 2022, 106: 102385
- [11] Murphy RM, Tasoulas J, Porrello A, et al. Tumor cell extrinsic synaptogyrin 3 expression as a diagnostic and prognostic biomarker in head and neck cancer. *Cancer Res Commun*, 2022, 2(9): 987-1004
- [12] Thewes V, Orso F, Jäger R, et al. Interference with activator protein-2 transcription factors leads to induction of apoptosis and an increase in chemo- and radiation-sensitivity in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 192-196
- [13] Lopes-Santos G, Bernabé DG, Miyahara GI, et al. Beta-adrenergic pathway activation enhances aggressiveness and inhibits stemness in head and neck cancer. *Transl Oncol*, 2021, 14(8): 101117
- [14] Giannasi C, Della Morte E, Cadelano F, et al. Boosting the therapeutic potential of cell secretome against osteoarthritis: comparison of cytokine-based priming strategies. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 115970-115976
- [15] Rogozynski NP, Dixon B. The Th1/Th2 paradigm: a misrepresentation of helper T cell plasticity. *Immunol Lett*, 2024, 268: 106870
- [16] Bisig B, Savage KJ, De Leval L. Pathobiology of nodal peripheral T-cell lymphomas: current understanding and future directions. *Haematologica*, 2023, 108(12): 3227-3243
- [17] Haller SD, Essani K. Oncolytic tanapoxvirus variants expressing mIL-2 and mCCL-2 regress human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Biomedicines*, 2024, 12(8): 1834-1844
- [18] Hokello J, Tyagi K, Owor RO, et al. New insights into HIV life cycle, Th1/Th2 shift during HIV infection and preferential virus infection of Th2 cells: implications of early HIV treatment initiation and care. *Life*, 2024, 14(1): 104
- [19] Tang YY, Wang DC, Chen YY, et al. Th1-related transcription factors and cytokines in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*, 2023, 14: 1305590
- [20] Lin W, Niu Z, Zhang H, et al. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9): 3604-3612