

文章编号 1006-8147(2023)06-0609-08

论 著

多囊卵巢综合征关键基因的筛选及其与疾病进展和预后的相关性分析

孙奎奎¹,杨微微²,王文靖²,郝颖新²,郭波²,任晨春²,鞠明艳²

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津市中心妇产科医院检验科,天津 300100)

摘要 目的:通过生物信息学方法筛选多囊卵巢综合征(PCOS)的关键基因并分析其与PCOS进展和预后的相关性。方法:在GEO数据库中下载GSE34526数据集的表达谱,利用R软件筛选数据集中PCOS患者卵巢颗粒细胞($n=7$)和正常颗粒细胞($n=3$)的差异表达基因(DEGs),对DEGs进行基因本体论(GO)和京都百科全书基因和基因组(KEGG)富集分析,识别关键基因。使用单样本基因富集分析(ssGSEA)评分量化每个PCOS样本中的免疫信号的富集水平,进行抗肿瘤免疫和促肿瘤抑制评分。利用人类蛋白质图谱数据库(HPA)分析关键基因在卵巢癌(OC)、乳腺癌(BRCA)和子宫内膜癌(UCEC)中的蛋白表达水平,绘制ROC曲线分析3年、5年和10年癌症生存率。结果:本研究共筛选出16个DEGs,GO和KEGG分析结果显示DEGs在PCOS患者的细胞黏附分子(CAMs)、补体和凝血级联、上皮细胞迁移和炎症反应的正向调控等通路中富集,进一步筛选出2个关键基因,*ITGAM*和*HMOX1*。二者与促炎免疫细胞(如巨噬细胞、MDSCs、中性粒细胞、浆细胞样树突状细胞、调节性T细胞)的相关性分析显示,*ITGAM*(P 分别为0.001、 <0.001 、0.051、0.04、 <0.001)和*HMOX1*(P 分别为 <0.001 、0.001、 <0.001 、 <0.001 、0.001)与以上促炎免疫细胞呈正相关,即发挥促炎作用。在OC、BRCA和UCEC组织中,*ITGAM*和*HMOX1*蛋白水平较高,而对对照组无表达。作为不良预后因素,*ITGAM*显著影响PCOS继发的OC患者的生存($P=0.0046$),*ITGAM*在OC中3、5、10年生存预测率ROC曲线下面积(AUC)均 >0.5 ,其中10年AUC >0.59 。*HMOX1*在BRCA、OC和UCEC中的3年AUC >0.5 ,在BRCA中的10年AUC >0.6 ,均有较好的预测效能。*ITGAM+HMOX1*联合预测在BRCA中的3、5、10年AUC分别为0.51、0.498、0.606,在OC中分别为0.563、0.537、0.481,在UCEC中分别为0.556、0.479、0.472。结论:*ITGAM*和*HMOX1*可以作为PCOS的潜在诊断和治疗靶点,其表达水平可以评价PCOS病情发展及预后。

关键词 多囊卵巢综合征;生物信息学分析;*ITGAM*;*HMOX1*

中图分类号 R711

文献标志码 A

Screening of key genes in polycystic ovary syndrome and analysis of their correlation with disease progression and prognosis

SUN Kui-kui¹, YANG Wei-wei², WANG Wen-jing², HAO Ying-xin², GUO Bo², REN Chen-chun², JU Ming-yan²

(1. School of Graduate, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Central Hospital of Obstetrics and Gynecology, Tianjin 300100, China)

Abstract **Objective:** To screen key genes of polycystic ovary syndrome (PCOS) using bioinformatic analysis, and to explore their predictive effects on the progression and prognosis of PCOS. **Methods:** The expression profile of the GSE34526 dataset was downloaded from the GEO database, and the differential expression genes (DEGs) of ovarian granulosa cells ($n=7$) and normal granulosa cells ($n=3$) of PCOS patients in the dataset were screened using R software. Genetic Ontological (GO) and Kyoto Encyclopedia Gene and Genome (KEGG) enrichment analyses were performed on DEGs to identify key genes. A single-sample geneset enrichment analysis (ssGSEA) score was used to quantify the level of immune signal enrichment in each PCOS sample to perform anti-tumor immunity and pro-tumor inhibition scores. The Human Protein Profile Database (HPA) was used to analyze the protein expression levels of key genes in ovarian cancer (OC), breast cancer (BRCA) and uterine corpus endometrial cancer (UCEC). ROC curves were plotted to analyze the 3-year, 5-year and 10-year cancer survival rates. **Results:** In this study, a total of 16 DEGs were screened. The results of GO and KEGG analysis showed that DEGs was enriched in the pathways of cell adhesion molecules (CAMs), complement and coagulation cascade, epithelial cell migration and positive regulation of inflammatory response in PCOS patients. Two key genes, *ITGAM* and *HMOX1*, were further screened. Correlation analysis between the two genes and pro-inflammatory immune cells (such as macrophages, MDSCs, neutrophils, plasmacytoid dendritic cells, regula

基金项目 天津市卫生健康委员会科技项目(ZC20117);天津市医学重点学科(专科)建设项目(妇产科学 TJYXZDXK-043A);天津市科技计划项目(21JCQNJC01860);天津市北辰区科技计划项目(SHGY-2022015)

作者简介 孙奎奎(1982-),女,主治医师,硕士在读,研究方向:女性不孕及围绝经期疾病的相关研究;通信作者:鞠明艳, E-mail: jumingyan@outlook.com, 任晨春, E-mail: rccxqy@163.com。

tory T cells) showed that *ITGAM* (P values 0.001, <0.001, 0.051, 0.04, <0.001, respectively) and *HMOX1* (P values <0.001, 0.001, <0.001, <0.001, 0.001, respectively) were positively correlated with the above pro-inflammatory immune cells, that was, they played a pro-inflammatory role. The levels of *ITGAM* and *HMOX1* proteins were higher in OC, BRCA and UCEC tissues, but not in the control. As an adverse prognostic factor, *ITGAM* significantly affected the survival of OC patients secondary to PCOS ($P=0.0046$). The area under ROC curve (AUC) of *ITGAM* in OC with 3-, 5- and 10-year survival prediction rates were >0.5, and the AUC at 10-year was >0.59. The 3-year AUC of *HMOX1* in BRCA, OC and UCEC were >0.5, and the 10-year AUC in BRCA were >0.6, which showed good predictive efficiency. The combined *ITGAM*+*HMOX1* forecast for the 3-year, 5-year and 10-year AUC in BRCA were 0.51, 0.498 and 0.606, respectively. In OC, the values were 0.563, 0.537 and 0.481, respectively. In UCEC, they were 0.556, 0.479 and 0.472, respectively. **Conclusion:** *ITGAM* and *HMOX1* can be used as potential diagnostic and therapeutic targets for PCOS, and their expression levels can be used to evaluate the development and prognosis of PCOS.

Key words polycystic ovary syndrome; bioinformatic analysis; *ITGAM*; *HMOX1*

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是育龄妇女最常见的妇科内分泌疾病之一, 临床表现多为排卵障碍/无排卵、多囊卵巢、高雄激素血症^[1], 临床发病率可达 4%~21%^[2]。PCOS 不仅影响生殖内分泌功能, 还可能增加代谢综合征、糖尿病、心血管疾病等并发症的长期风险, 严重威胁女性健康^[3]。此外, 伴随严重的月经减少、闭经而发生的雌激素水平的破坏也会增加子宫内膜增生和子宫内膜癌 (UCEC) 的发生风险^[4]。PCOS 是由遗传、内分泌、环境等多种因素引起的^[5], 然而, PCOS 的发病和进展机制尚不清楚^[6]。因此, 临床医生必须及时掌握预测、诊断和评估 PCOS 患者康复状态的方法, 以控制病情进展, 改善预后。

近几年, 生物信息学分析和公共数据库的蓬勃发展^[7], 为发现 PCOS 潜在的分子靶点和制定新的诊断治疗策略提供了基础。在本研究中, 笔者使用生物信息学工具分析了基因表达综合 (gene expression omnibus, GEO) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中的数据, 以确定 PCOS 患者和匹配对照组之间的差异表达基因, 为进一步的临床应用和实验研究提供客观依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 从 GEO 数据库^[7]中检索和下载 GSE34526 数据, 从 TCGA 数据库中下载卵巢癌 (ovarian cancer, OC)、乳腺癌 (breast cancer, BRCA)、子宫内膜癌 UCEC 的临床和表达数据^[8], 分析差异基因对女性肿瘤的影响。

1.2 研究方法

1.2.1 差异基因分析 使用 R/Bioconductor 的软件及 Limma 包分析基因表达数据^[9]。对 GSE34526 数据集中的 7 例 PCOS 患者和 3 例对照样本的基因表达进行 limma 归一化, 分析差异表达基因, 校正后 $P<0.05$ 和 $|\log_2 FC|>1$ 被认为差异有统计学意义。使

用 ggplot2 包绘制火山图, pheatmap 包绘制热图。

1.2.2 KEGG 和 GO 富集分析 使用 R 软件中的 clusterProfiler 4.4.4 包^[10]对差异基因进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG, <http://www.kegg.jp/>) 和基因本体论 (GO, 富集分析 <http://www.geneontology.org/>)^[11-12], 校正 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。并将结果可视化, 利用 ggplot2 包绘制 KEGG 气泡图和 GO 条形图。

1.2.3 单样本基因富集分析 (single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 为了进一步研究 PCOS 的炎症微环境, 从表达数据推断免疫细胞浸润的相对水平, 本研究整合了免疫相关变量的方法进行计算。使用这种方法, 将 PCOS 表达数据转换为标准化分数, 以表示特定免疫细胞类型的相对丰度。为了在免疫图谱上可视化免疫表型, 将来自 PCOS 患者和对照组的 10 个样本分类为免疫“热”和“冷”位点, 根据其评分进行比较。使用 ssGSEA 评分^[13]量化每个 PCOS 样品中 29 个免疫信号的富集水平, 收集免疫细胞基因集, 进行抗肿瘤免疫和促肿瘤抑制评分^[14]。免疫评分通过 R 包 gsva 的“ssgsea”方法进行富集, 热图和线性图由 pheatmap 和 ggplot2 包绘制。

1.2.4 人类蛋白质图谱 利用人类蛋白质图谱数据库在 (The Human Protein Atlas, HPA) (<https://www.proteinatlas.org/>) 收集肿瘤组织和正常组织的蛋白表达谱^[15], 分析差异基因在 BRCA、OC 和 UCEC 中的蛋白表达水平。

1.2.5 生存分析 采用 Kaplan-Meier 图分析差异基因在 BRCA、OC 及 UCEC 预后中的表达, 利用 survival 和 survivalROC 软件包, 基于受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 3 年、5 年和 10 年癌症生存率。

2 结果

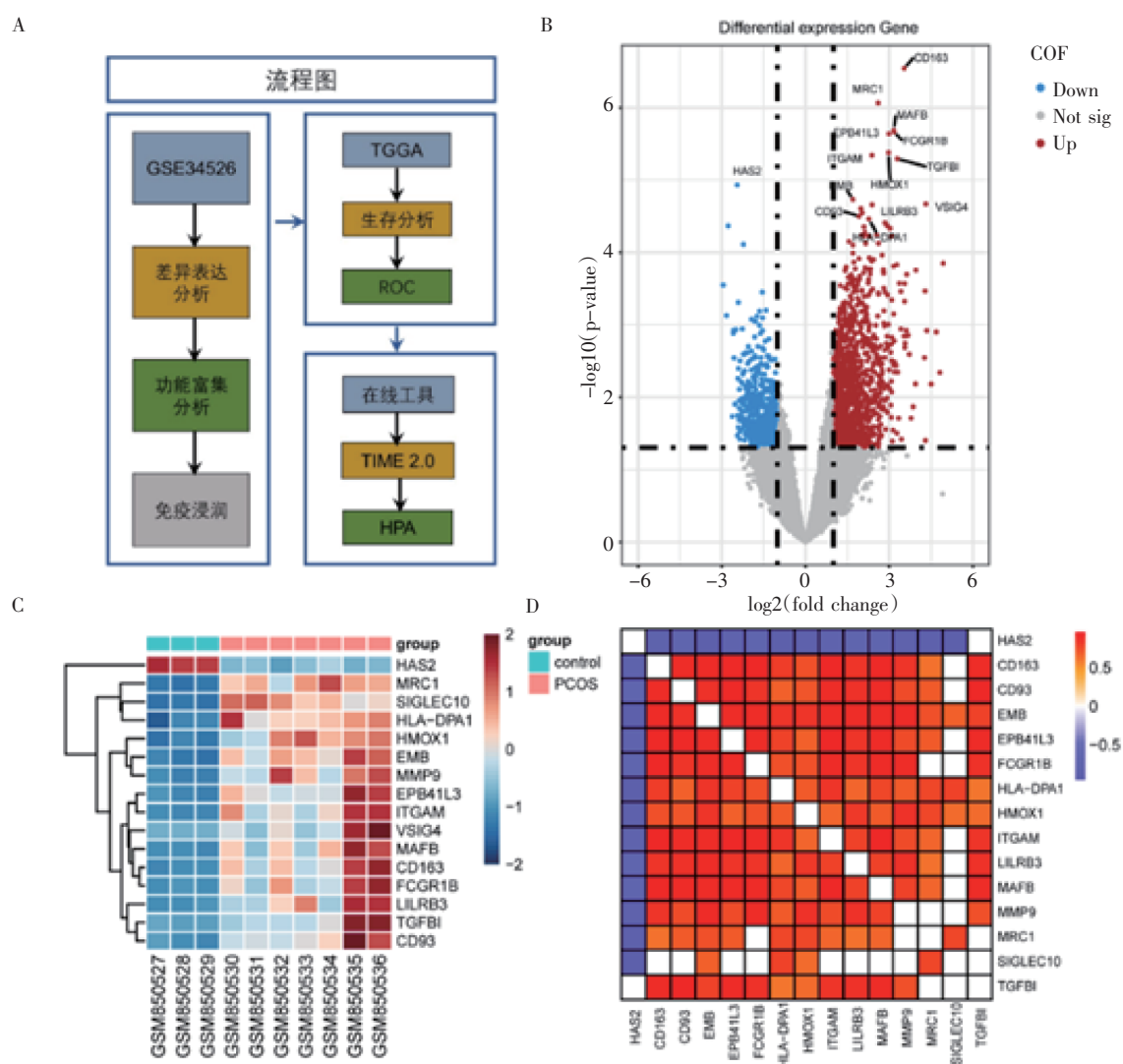
2.1 与 PCOS 患者相关的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的鉴定 结合 TCGA

女性癌症临床数据和 GEO 数据库 RNA 阵列数据的分析,筛选 PCOS 潜在标志物(图 1A)。最终共筛选出 16 个校正 P 值有显著差异的基因,分别为 *CD163*、*MRC1*、*MAFB*、*EPB41L3*、*ITGAM*、*FCGR1B*、*TGFB1*、*EMB*、*HMOX1*、*CD93*、*LILRB3*、*VSIG4*、*HLA-DPA1*、*SIGLEC10*、*HAS2*、*MMP9*(图 1B)。其中,*HAS2* 在对照组中表达,而在 PCOS 患者中不表达;与 PCOS 进展高度相关的基因 *MMP9* 在 PCOS 组中高表达;在 PCOS 组中,巨噬细胞标志物 *MRC1* 高表达(图 1C)。差异表达基因的相关性分析表明,*ITGAM* 和 *HMOX1* 与其他基因具有强相关性($P<0.05$,图 1D)。

2.2 *ITGAM* 和 *HMOX1* 是与 PCOS 患者疾病进展相关的关键基因 对上述 16 个 DEGs 分别进行 GO 和 KEGG 富集分析。KEGG 通路富集结果显示细胞

黏附分子(cell adhesion molecules,CAMs)、补体和凝血级联与 PCOS 的进展相关(图 2A)。GO 富集结果显示为生物学进程中上皮细胞迁移和创面炎症反应的正向调控(图 2B),尤其是 MHC II 类受体活性和免疫受体活性在 GO 功能分析中富集。这些失调的信号通路可能导致 PCOS 患者卵巢功能受损。最终在这些通路中富集得到 *ITGAM* 和 *HMOX1* 两基因,二者在本研究中被定义为与 PCOS 进展高度相关的基因。

2.3 *ITGAM*、*HMOX1* 与 PCOS 患者免疫浸润异质性的相关性 在 PCOS 患者中,免疫抑制细胞类型如骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)、中性粒细胞、巨噬细胞、浆细胞样树突状细胞和调节性 T 细胞评分较高(图 3A)。免



注:A:工作流程图;B:数据集 GSE34526 火山图,红色代表上调基因,蓝色代表下调基因,校正 $P<0.05$ 和 $|\log_2 \text{FC}|>1$ 表示差异有统计学意义;C:10 个样本中的 DEGs 表达热图,对数据进行 Z-score 标准化,红色表示高表达,蓝色表示低表达;D:DEGs 之间的相关性热图,红色到白色表示强相关性($P<0.05$)到弱相关性($P>0.05$);PCOS:多囊卵巢综合征;DEGs:差异表达基因

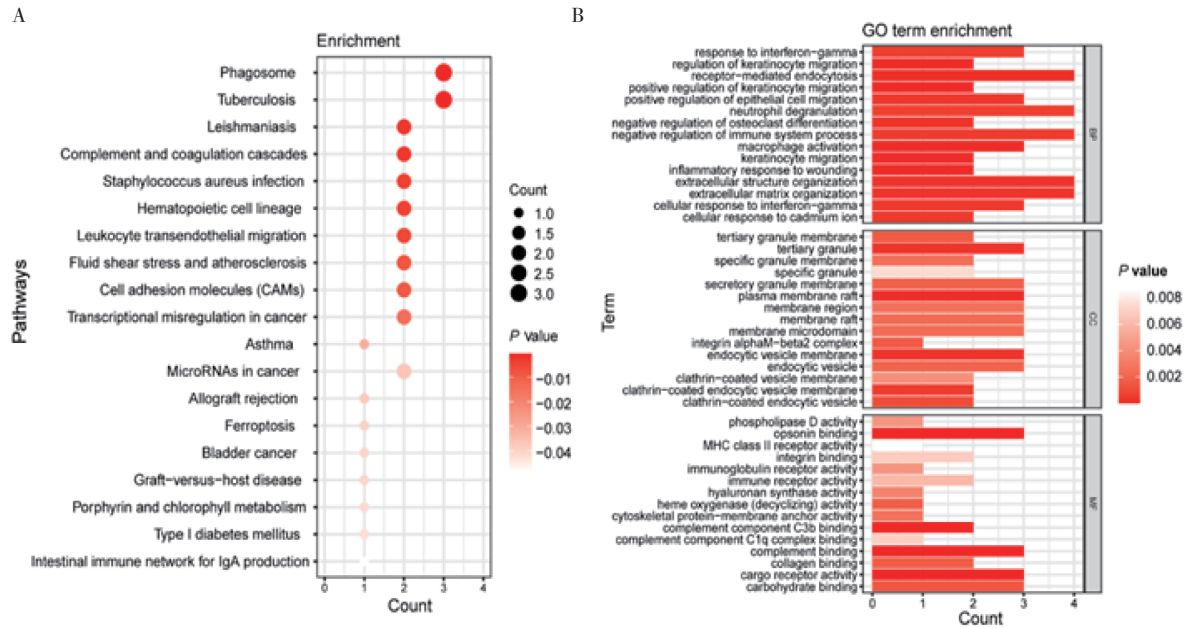
图 1 PCOS 患者与对照组 DEGs 的鉴定

Fig 1 Identification of DEGs in PCOS patients and control group

疫细胞分为促肿瘤抑制和抗肿瘤免疫,PCOS 组的样本更接近于促肿瘤抑制(图 3B)。 *ITGAM* 和 *HMOX1* 基因的表达相关性分析显示, *ITGAM* 与 *HMOX1* 表

达呈正相关($r=0.69, P=0.028$, 图 3C)。

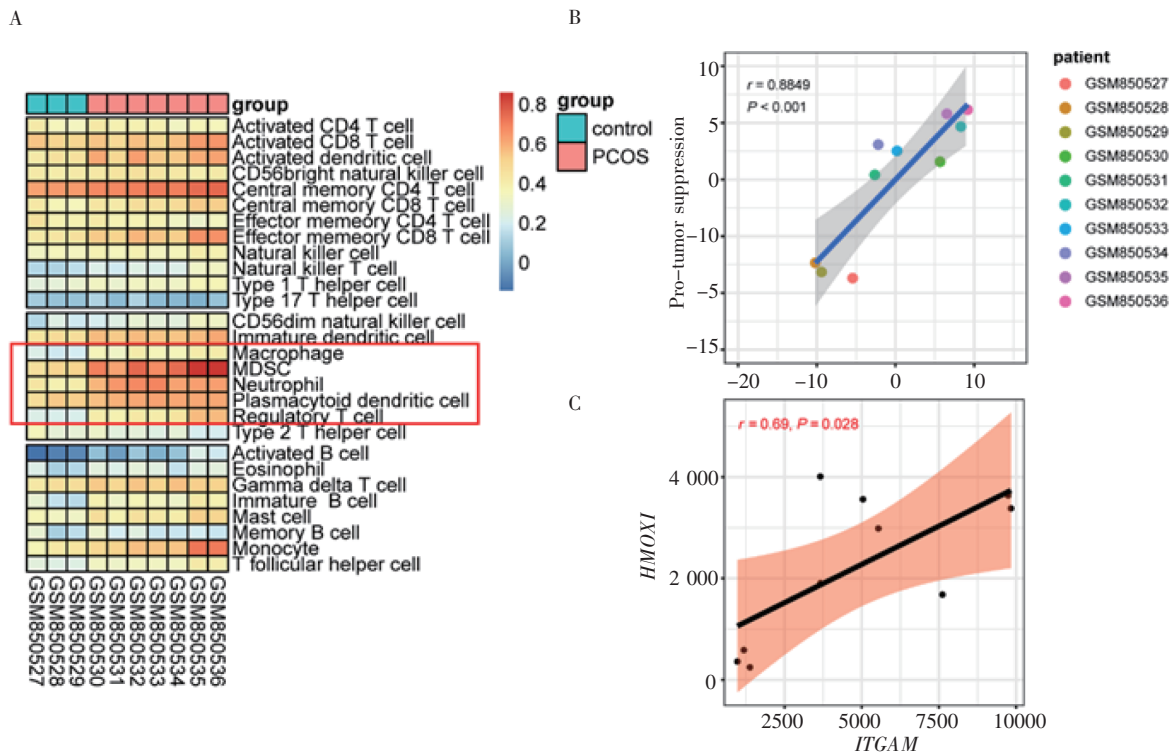
ITGAM、*HMOX1* 与促炎免疫细胞的相关性分析显示, *ITGAM* 与巨噬细胞($r=0.86, P=0.001$)、MD-



注:A:KEGG 富集分析气泡图;B:GO 富集条形图,校正 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义

图 2 DEGs 的功能和通路富集情况

Fig 2 Functional and pathway enrichment of DEGs



注:A:利用 ssGSEA 鉴定 GSE34526 数据集中 10 个样本免疫细胞群的相对浸润;B:发挥抗肿瘤免疫功能的细胞类型与发挥促肿瘤免疫抑制功能的细胞类型的浸润之间的相关性,执行抗肿瘤免疫的细胞类型(ActCD4、ActCD8、TcmCD4、TcmCD8、TemCD4、TemCD8、Th1、Th17、Act-DC、CD56brNK、NK、NKT)与执行促肿瘤免疫抑制功能的细胞类型(Treg、Th2、CD56dimNK、imDC、TAM、MDSCs、Neutrophil、pDC)与浸润之间的相关性分析,线性关系使用 Pearson 相关系数 r 表示,阴影区域代表 95%置信区间;C:*ITGAM*(X 轴)和 *HMOX1*(Y 轴)的相关性分析

图 3 *ITGAM*、*HMOX1* 与 PCOS 免疫细胞的相关性分析

Fig 3 Correlation analysis of *ITGAM*, *HMOX1* and immune cells in PCOS

SCs($r=0.93, P<0.001$)、中性粒细胞($r=0.63, P=0.051$)、浆细胞样树突状细胞($r=0.65, P=0.04$)、调节性T细胞($r=0.94, P<0.001$)呈正相关。*HMOX1*与巨噬细胞($r=0.92, P<0.001$)、MDSCs($r=0.87, P=0.001$)、中性粒细胞($r=0.91, P<0.001$)、浆细胞样树突状细胞($r=0.92, P<0.001$)、调节性T细胞($r=0.86, P=0.001$)呈正相关(图4)。

2.4 差异基因在BRCA、OC和UCEC中的蛋白表达水平 免疫组织化学结果显示,在BRCA、OC和UCEC中,*ITGAM*和*HMOX1*蛋白水平较高,而正常对照组中无表达(图5)。

2.5 *ITGAM*和*HMOX1*在女性肿瘤患者中的预后分析 对TCGA数据库分析表明,作为不良预后因素,*ITGAM*显著影响OC患者的生存($P=0.004$),而在BRCA和UCEC中影响不显著,*HMOX1*对

3种肿瘤的预后无明显影响,但有不良预后因素的趋势(图6A)。*ITGAM*与*HMOX1*对肿瘤患者3、5、10年生存率的影响的分析结果表明,*ITGAM*在OC中生存预测率ROC曲线下面积(AUC)均 >0.5 ,其中10年AUC >0.59 。*HMOX1*在BRCA、OC和UCEC中的3年AUC >0.5 ,其中在BRCA中的10年AUC >0.6 (图6B)。

在BRCA中,*ITGAM*+*HMOX1*在3、5、10年联合预测的ROC曲线下AUC分别为0.51、0.498、0.606,在OC中分别为0.563、0.537、0.481,在UCEC中分别为0.556、0.479、0.472(图7A)。用TIME2.0可视化预测MDSCs+*ITGAM*+*HMOX1*对肿瘤患者生存的影响,分析结果显示,在大多数肿瘤中,MDSCs是预后不良的因素(图7B),其中BRCA和UCEC中为显著不良预后($P<0.05$),OC不显著($P>0.05$)。

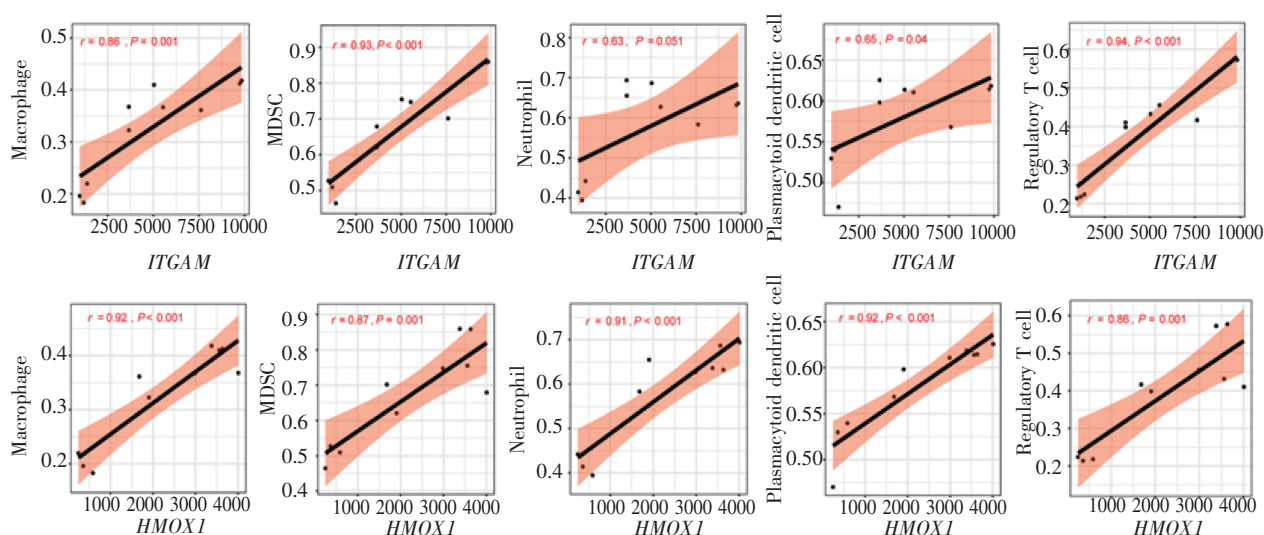


图4 *ITGAM*、*HMOX1*与促炎免疫细胞的相关性分析

Fig 4 Correlation analysis of *ITGAM*, *HMOX1* and pro-inflammatory immune cells

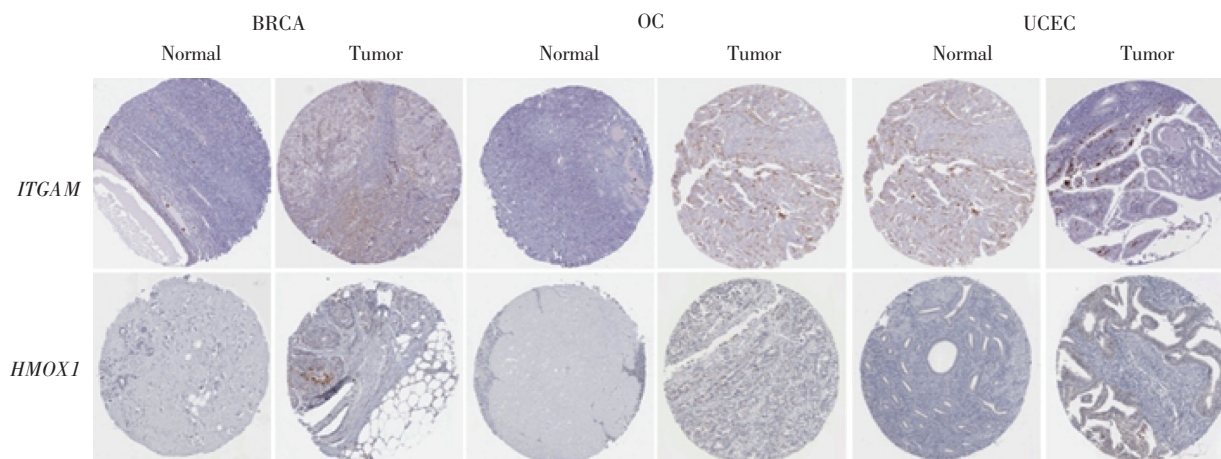
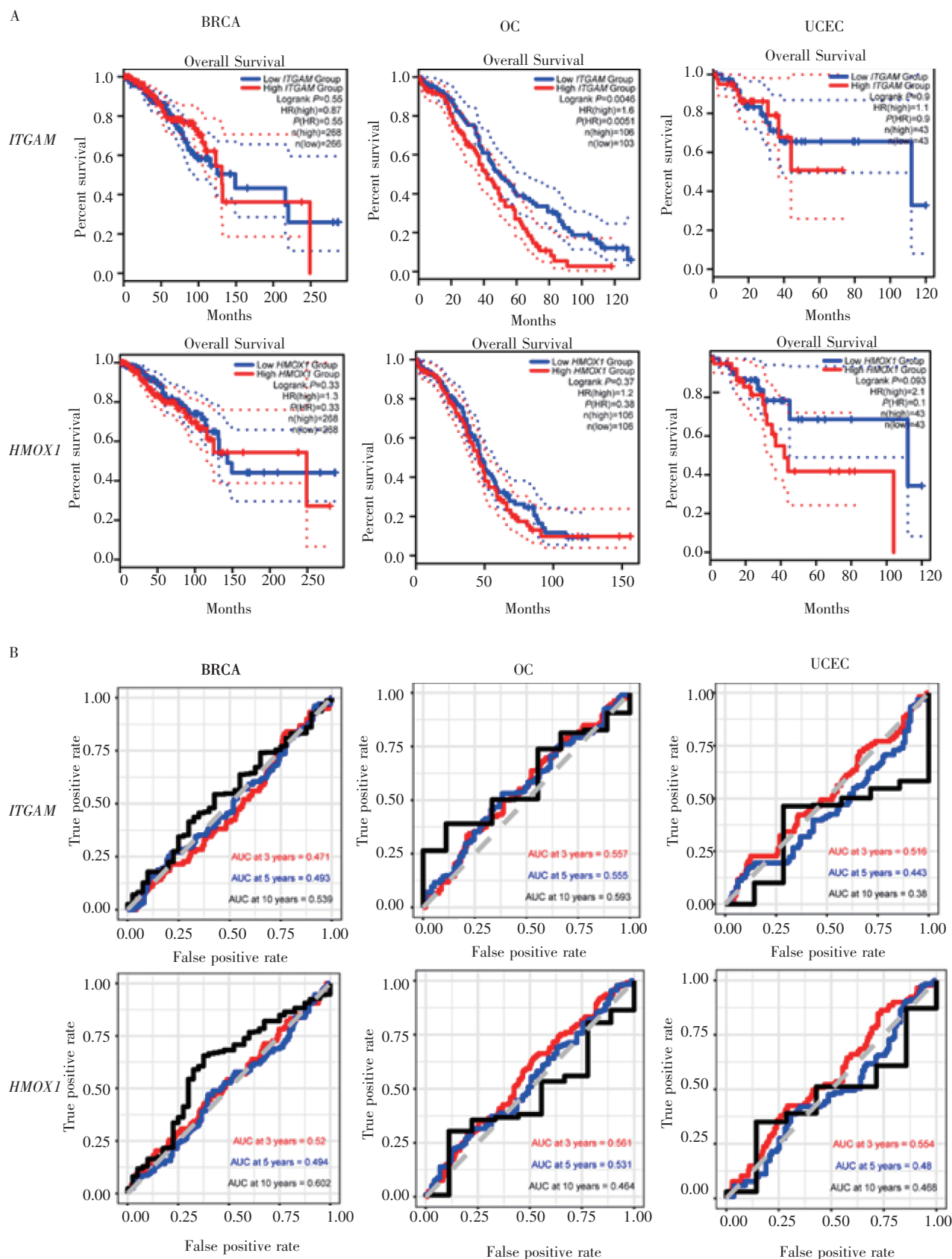


图5 BRCA、OC和UCEC 3种肿瘤中*ITGAM*和*HMOX1*蛋白表达情况

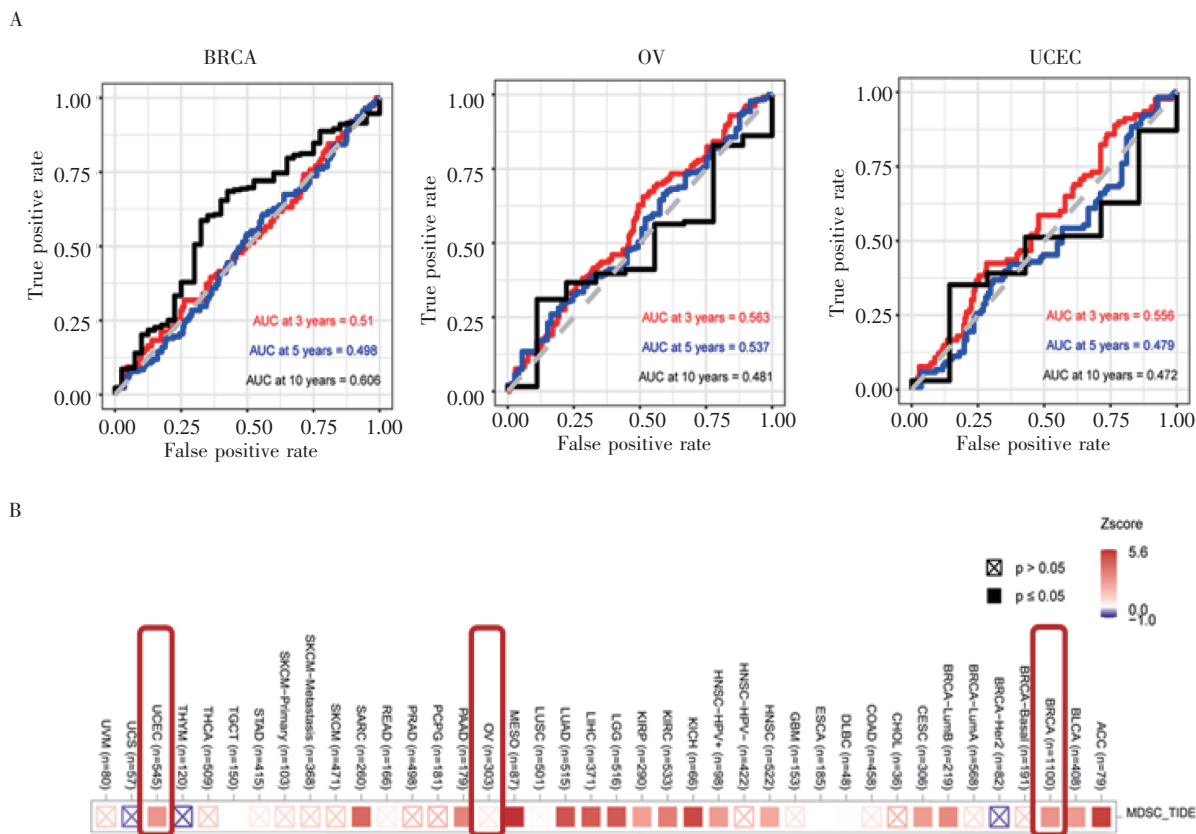
Fig 5 *ITGAM* and *HMOX1* protein expression in BRCA, OC and UCEC tumors



注:A:ITGAM 和 HMOX1 的表达在 BRCA、OC 和 UCEC 中的生存分析;B:根据 ITGAM 和 HMOX1 的表达预测肿瘤患者 3、5、10 年生存率的 ROC 分析

图 6 ITGAM 和 HMOX1 在女性肿瘤患者中的预后分析

Fig 6 Prognostic analysis of ITGAM and HMOX1 in female patients with tumor



注:A:根据 *ITGAM*+*HMOX1* 表达预测肿瘤患者 3、5、10 年生存率的 ROC 分析;B:*COX* 风险回归模型预测 MDSCs+*ITGAM*+*HMOX1* 对肿瘤患者生存的影响

图 7 *ITGAM*+*HMOX1* 联合预测对肿瘤患者生存率的影响

Fig 7 The impact of combined *ITGAM* + *HMOX1* prediction on survival of patients with tumor

3 讨论

近年来,多项研究报道了 PCOS 患者的潜在标志物和核心通路^[16-18]。然而到目前为止,还没有明确的生物标志物有效评价 PCOS 的进展和预后。在本研究中,笔者使用生物信息学分析来识别 PCOS 的诊断标志物,通过 GSE34526 队列筛选出 16 个 DEGs,GO 和 KEGG 分析发现 *ITGAM* 和 *HMOX1* 在 CAMs、补体和凝血级联、上皮细胞迁移和炎症反应的正向调控相关通路中显著富集,是与 PCOS 患者进展高度相关的关键基因。

慢性炎症在 PCOS 的发病过程中具有重要作用,慢性炎症导致内皮功能障碍和氧化应激增加^[19],抗炎治疗已被证实可有效减轻颗粒细胞凋亡,改善卵巢功能^[20]。本研究鉴定的关键基因 *ITGAM* 编码 CD11b 蛋白,属于整合素家族,是介导细胞间和细胞外基质黏附的重要跨膜蛋白家族^[21]。研究证实,*ITGAM* 可促进白细胞跨内皮细胞迁移,破坏内皮屏障功能^[22]。*HMOX1* 是血红素分解代谢的关键酶,其分解代谢产物 CO 可调节 AMPK、VEGF、NF- κ B 等炎症信号通路,影响多种细胞因子的产生^[23]。为了研

究 PCOS 中的炎症微环境,本研究通过 ssGSEA 分析数据集 GSE34526 的免疫细胞浸润,*ITGAM* 和 *HMOX1* 的表达符合显著协同共表达的特征,且二者的表达与促炎免疫细胞亚型评分呈正相关,说明在 PCOS 的进展中,*ITGAM* 和 *HMOX1* 的高表达可能起到促进炎症发生的作用。

既往研究显示,由于 PCOS 患者存在代谢和内分泌异常,容易发展成为某些肿瘤,如 BRCA、OC 和 UCEC^[16,24]。多项研究发现,高水平的 *HMOX1* 与多种妇科肿瘤相关^[25-26]。MDSCs 可以抑制机体免疫细胞发挥正常的稳态和适应性免疫功能,既往对 MDSCs 的研究阐明了它与肿瘤发生和发展的密切关系。例如,Sun 等^[27]分析了结肠癌患者肿瘤组织中 MDSCs 促进远处转移的作用。本研究结果显示,*ITGAM* 和 *HMOX1* 基因的水平与免疫抑制细胞(如 MDSCs)的评分有更强的相关性。在 PCOS 组中,促炎细胞较对照组高表达,这意味着在 PCOS 的发生、发展中,免疫细胞可能发挥着促炎,而不是抑炎作用,存在一些机制待探索。对促肿瘤抑制和抗肿瘤免疫分析结果显示,对照组的 3 个样本更相关于抗肿瘤免疫,

而 PCOS 组的 7 个样本更相关于促肿瘤抑制,即促炎症反应,表明 PCOS 患者的卵巢颗粒细胞可能处于免疫紊乱的微环境中,反过来加速 PCOS 向多种肿瘤的演变。此外,*ITGAM* 和 *HMOX1* 激活异常与肿瘤患者预后不良有关。联合 *ITGAM+HMOX1* 的表达对 3 种肿瘤 3 年总体生存率有较好的预测准确性 ($AUC>0.5$),这对 PCOS 不良进展的早期筛查具有一定的指导作用。因此推测,*ITGAM* 和 *HMOX1* 可能是 PCOS 发展为肿瘤的新的风险标志物,但这一假设尚需要进一步的研究来验证。

综上所述,*ITGAM* 和 *HMOX1* 在 PCOS 中的表达升高可能代表炎症异常状态或机体的代偿性保护机制,对疾病的早期筛查具有一定的指导作用。当发生失代偿时,高水平的 *ITGAM* 和 *HMOX1* 可能意味着不良结果,发展为肿瘤的风险更大。有针对性的治疗方案有望降低 *ITGAM* 和 *HMOX1* 的表达,二者的水平可作为治疗效果的评价因素。本研究对 PCOS 的诊断和治疗可能有一定的临床意义。

参考文献:

- [1] HOEGER K M, DOKRAS A, PILTONEN T. Update on PCOS: consequences, challenges, and guiding treatment [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(3): 1071–1083.
- [2] LIZNEVA D, KIRUBAKARAN R, MYKHALCHENKO K, et al. Phenotypes and body mass in women with polycystic ovary syndrome identified in referral versus unselected populations: systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(6): 1510–1520.
- [3] COONEY L G, DOKRAS A. Beyond fertility: polycystic ovary syndrome and long-term health [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(5): 794–809.
- [4] SCHINDLER A E. Progestational effects of dydrogesterone *in vitro*, *in vivo* and on the human endometrium [J]. *Maturitas*, 2009, 65(Suppl 1): S3–S11.
- [5] MORGANTE G, MASSARO M G, DI SABATINO A, et al. Therapeutic approach for metabolic disorders and infertility in women with PCOS [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(1): 4–9.
- [6] MARCH W A, MOORE V M, WILLSON K J, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(2): 544–551.
- [7] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics datasets—update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): 991–995.
- [8] TOMCZAK K, CZERWINSKA P, WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(1A): 68–77.
- [9] RITCHIE ME, PHIPSON B, WU D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [10] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284–287.
- [11] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): 353–361.
- [12] GENE ONTOLOGY C. Gene Ontology Consortium: going forward [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 1049–1056.
- [13] BARBIE D A, TAMAYO P, BOEHM J S, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1 [J]. *Nature*, 2009, 462(7269): 108–112.
- [14] CHAROENTONG P, FINOTELLO F, ANGELOVA M, et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(1): 248–262.
- [15] PONTEN F, JIRSTROM K, UHLEN M. The Human Protein Atlas: a tool for pathology [J]. *J Pathol*, 2008, 216(4): 387–393.
- [16] ZOU J, LI Y, LIAO N, et al. Identification of key genes associated with polycystic ovary syndrome (PCOS) and ovarian cancer using an integrated bioinformatics analysis [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 30.
- [17] WANG W, JIANG Q, NIU Y, et al. Proteomics and bioinformatics analysis of follicular fluid from patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 956406.
- [18] YAO X, WANG X. Bioinformatics searching of diagnostic markers and immune infiltration in polycystic ovary syndrome [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 937309.
- [19] DULEBA A J, DOKRAS A. Is PCOS an inflammatory process? [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(1): 7–12.
- [20] JI X, YE Y, WANG L, et al. PDE4 inhibitor Roflumilast modulates inflammation and lipid accumulation in PCOS mice to improve ovarian function and reduce DHEA-induced granulosa cell apoptosis *in vitro* [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84(2): 226–237.
- [21] ZHANG Y, WANG H. Integrin signalling and function in immune cells [J]. *Immunology*, 2012, 135(4): 268–275.
- [22] FAGERHOLM S C, VARIS M, STEFANIDAKIS M, et al. alpha-Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation [J]. *Blood*, 2006, 108(10): 3379–3386.
- [23] CHIANG S K, CHEN S E, CHANG L C. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 39.
- [24] YUMICEBA V, LOPEZ-CORTES A, PEREZ-VILLA A, et al. Oncology and pharmacogenomics insights in polycystic ovary syndrome: an integrative analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 585130.
- [25] ZHAO Z, XU Y, LU J, et al. High expression of HO-1 predicts poor prognosis of ovarian cancer patients and promotes proliferation and aggressiveness of ovarian cancer cells [J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20(4): 491–499.
- [26] GOMEZ-LOMELI P, BRAVO-CUELLAR A, HERNANDEZ-FLORES G, et al. Increase of IFN-gamma and TNF-alpha production in CD107a⁺ NK-92 cells co-cultured with cervical cancer cell lines pre-treated with the HO-1 inhibitor [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14(1): 100.
- [27] SUN H L, ZHOU X, XUE Y F, et al. Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25): 3303–3309.