

· 论 著 ·

基于机器学习的胃癌氨死亡相关预后风险预测模型的构建及其肿瘤微环境研究

钱焱¹, 林青雨¹, 龚智霖², 蔡世荣¹, 陈斯乐^{1*}

1. 中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

2. 中山大学附属第一医院 泌尿外科, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 基于机器学习建立胃癌预后的氨死亡相关风险预测模型,并探讨氨死亡与肿瘤微环境的关系,为胃癌患者的预后分析及治疗提供新的视角。**方法** 通过对癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中胃癌肿瘤组织($n=375$)及正常癌旁组织($n=21$)的转录组比较,鉴定氨死亡相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。通过单因素 Cox 回归分析筛选与总生存相关的 DEGs。通过随机抽样的方式将 TCGA 数据库中具有生存信息的胃癌样本按 7:3 划分为训练集($n=190$)和测试集($n=82$),2 个数据集合并作为总体样本($n=272$)。基于训练集,将筛选得到的 DEGs 纳入机器学习并比较不同算法的预后预测效能,选取预测效能最优的算法建立风险评分模型。根据风险评分模型计算出的中位风险评分,将训练集、测试集、总体样本分别划分为高风险组和低风险组。采用单因素和多因素 Cox 回归分析确定胃癌患者预后的独立影响因素。利用风险分层与年龄、是否 R0 切除、肿瘤分期构建可视化列线图预测胃癌患者预后。通过受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线)和校准曲线进行模型和列线图的验证。通过 ESTIMATE 和 CIBERSORT 等算法对高、低风险组的肿瘤微环境进行分析和评价。**结果** 筛选出 8 个与预后相关的氨死亡相关 DEGs。随机森林模型是预后预测效能最优的模型(C-index: 训练集为 0.891, 测试集为 0.713)。基于该模型的风险分层是胃癌患者预后的独立影响因素($P<0.001$)。构建的列线图能有效预测胃癌患者 1、2、3 年总生存率。高风险组的肿瘤微环境呈现出更为显著的“免疫抑制”和“促肿瘤”特征。**结论** 本研究建立了 1 个基于 8 个氨死亡相关 DEGs 的胃癌预后风险预测模型,并初步探讨了氨死亡与肿瘤微环境的关系,为胃癌的预后评估和免疫治疗提供了新的探究方向。

【关键词】 胃癌; 氨死亡; 风险预测模型; 肿瘤微环境

Construction of a machine learning-based prognostic risk prediction model for gastric cancer related to ammonia-induced cell death and analysis of its tumor microenvironment

Qian Yan¹, Lin Qingyu¹, Gong Zhilin², Cai Shirong¹, Chen Sile^{1*}

1. Gastrointestinal Surgery Center, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

2. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

*Corresponding author: Chen Sile, E-mail: chensle@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a machine learning-based prognostic risk prediction model for gastric cancer associated with ammonia-induced cell death, and to explore the relationship between ammonia-induced cell death and the tumor microenvironment, thereby providing new insights for prognosis analysis and treatment of gastric cancer. **Method** Ammonia-induced cell death related differentially

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82173239); 广东省自然科学基金面上项目(2022A1515011534, 2023A1515011187); 广州市科技计划项目(2024A04J4699)

*通信作者: 陈斯乐, E-mail: chensle@mail.sysu.edu.cn

expressed genes (DEGs) were identified by comparing transcriptome of gastric cancer tissues ($n=375$) and adjacent normal tissues ($n=21$) from the cancer genome atlas (TCGA) database. Univariate Cox regression analysis was used to select DEGs significantly associated with overall survival (OS). By random sampling, gastric cancer samples with survival information from the TCGA database were divided into a training set ($n=190$) and a test set ($n=82$) at a ratio of 7:3, and the two datasets were combined as overall cohort ($n=272$). Based on the training set, the screened DEGs were incorporated into machine learning, and the prognostic prediction performance of different algorithms was compared. The algorithm with the best predictive performance was selected to establish a risk scoring model. Based on the median risk score calculated from the risk scoring model, the training set, test set, and overall cohort were divided into high-risk and low-risk groups. Univariate and multivariate Cox regression analyses were conducted to identify independent influencing factors for prognosis. A visual nomogram was constructed using the risk category, age, R0 resection, and tumor stage to predict the prognosis of patients. The model and nomogram were validated using receiver operating characteristic (ROC) curves and calibration curves. The tumor microenvironment of different risk groups were subsequently analyzed and evaluated using algorithms such as ESTIMATE and CIBERSORT.

Result Eight ammonia-induced cell death related DEGs associated with prognosis were screened. After comparing multiple machine learning algorithms, the random forest algorithm, which demonstrated the optimal predictive performance with the C-index of 0.891 in the training set and 0.713 in the test set, was selected to establish the ammonia-induced cell death-related prognostic risk prediction model. The risk category based on the model was an independent influencing factor for prognosis of gastric cancer patients ($P<0.001$). The constructed nomogram effectively predicted the 1-, 2-, and 3-year OS rates of patients. Analysis of the tumor immune microenvironment revealed that the high-risk group exhibited more significant characteristics of “immunosuppression” and “tumor promotion”. **Conclusion** This study established a prognostic risk prediction model for gastric cancer based on eight ammonia-induced cell death related DEGs and preliminarily explored the relationship between ammonia-induced cell death and the tumor microenvironment, providing a new direction for prognostic assessment and immunotherapy research in gastric cancer.

【Key words】 Gastric cancer; Ammonia-induced cell death; Risk prediction model; Tumor microenvironment

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国尤为高发。2022 年我国胃癌新发病例 35.87 万例,死亡 26.04 万例,分别占全部恶性肿瘤的 7.43%和 10.11%^[1]。虽然近年来胃癌患者的平均生存时间有所延长,但整体预后仍较差。免疫治疗是通过阻断肿瘤细胞的“免疫逃逸”机制发挥抗肿瘤作用的一种疗法。近年来的多项临床研究(KEYNOTE-859、CheckMate-649、ATTRACTION-2、COMPASSION-15 等)证实免疫治疗联合化学治疗(简称化疗)可作为晚期胃癌的一线治疗标准,在程序性死亡受体配体 1(programmed death-ligand 1, PD-L1)综合阳性评分(combined positive score, CPS) ≥ 5 的人群中获益更为明确^[2-5]。T 细胞耗竭,特别是 CD8⁺ T 细胞在消灭抗原提呈的肿瘤细胞后的死亡,是影响免疫治疗疗效的重要因素之一。最近,Zhang 等^[6]发现了一种新的诱导效应 CD8⁺ T 细胞死亡方式——氨死亡。

在线粒体谷氨酰胺代谢过程中产生的氨(NH₃)

在溶酶体中会与 H⁺反应生成 NH₄⁺,导致 pH 升高从而损害溶酶体功能;同时,细胞质中过度累积的氨会被抑制向溶酶体的转运,导致其反向流入线粒体,继而引起线粒体损伤。氨死亡,即氨通过上述机制损害溶酶体和线粒体并引起细胞死亡的一种方式,其发生是由于溶酶体酶的活性被抑制,导致溶酶体酶清除受损线粒体的功能受到削弱,而受损的线粒体不断累积就会最终引起细胞死亡^[6]。胃癌作为一种异质性较强的肿瘤,其对免疫治疗的反应及患者预后差异较大,而当中氨死亡所发挥的作用尚未明确。因此,本研究基于癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库等公开数据库中的基因表达数据图谱,分析胃癌中与氨死亡相关的基因表达情况,探讨氨死亡对胃癌预后的影响,并试图开发氨死亡相关的风险评分模型。此外,本研究也初步探讨了氨死亡相关基因在胃癌肿瘤微环境中的作用,为胃癌的预后评估和治疗提供潜在的生物标志物。

1 资料与方法

1.1 数据收集

本研究从TCGA数据库(<https://cancergenome.nih.gov>)下载了胃癌患者的转录组数据和生存资料,用于差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的分析和构建风险预测模型。通过系统性搜索PubMed数据库(2015—2024年)中关键词为“urea cycle”“nitrogen metabolism”“ammonia induced”及“cancer”的相关文献,并结合MSigDB数据库(<http://gseamisgdb.org>)中与氨死亡相关的基因集(检索关键词为“ammonia”“amino metabolism”“glutamine”“glutamine metabolism”“ammonia metabolism”),筛选出30个核心基因集,经过去重整合后共获得620个氨死亡相关候选基因。

1.2 筛选胃癌中氨死亡相关DEGs

在R语言中使用“DESeq2”包比较胃癌肿瘤组织($n=375$)和正常癌旁组织($n=21$)中的基因表达水平,筛选出DEGs,筛选标准为mRNA表达倍数变化(fold change, FC) $|\log_2FC|>1$,且错误发现率(false discovery rate, FDR) <0.05 ,使用火山图展示DEGs^[7]。将鉴定出的DEGs与上述620个氨死亡相关基因进行比较,通过韦恩图展示与氨死亡相关的DEGs。使用“survival”包,对DEGs基于总生存(overall survival, OS)期进行单因素Cox回归分析,筛选出与预后相关的DEGs($P<0.05$)用于后续分析。使用“clusterProfiler”包对上述DEGs进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析,用棒棒糖图进行展示^[8]。利用基因分析工具STRING数据库(<http://string-db.org>)构建DEGs的蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络并鉴定出其中的关键模块^[9]。

1.3 风险评分模型的建立

从TCGA数据库中收集胃癌肿瘤组织样本信息,剔除生存信息缺失的样本后,共272例样本被纳入后续分析。通过随机抽样的方式,按7:3比例将样本划分为训练集($n=190$)和测试集($n=82$),2个数据集合并作为总体样本($n=272$)。其中,训练集用于后续模型构建,测试集仅用于模型性能的内部验证。基于训练集,将上述1.2中筛选得到的DEGs纳入5种机器学习方法:决策树、梯度提升模型(gradient boosting model, GBM)、K-最近邻算法(K-nearest neighbors, KNN)、随机森林和极限梯

度提升(eXtreme gradient boosting, XGBoost),进行氨死亡相关风险评分模型的构建,根据一致性指数(concordance index, C-index)选出最优模型,并通过校准曲线展示最优模型的预测性能。

1.4 风险评分模型性能验证

利用上述最优氨死亡相关风险评分模型计算患者的风险评分,根据训练集的风险评分中位数(17.473)进行分组:训练集高风险组和低风险组各95例,测试集高风险组和低风险组各41例,总体样本高风险组和低风险组各136例。使用“survival”R包进行Kaplan-Meier生存分析;使用“timeROC”包建立1、2、3年时间依赖性受试者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线)并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)评估所构建风险评分模型的预测准确性^[10]。

1.5 生存预测列线图的建立

将风险分层、肿瘤分期、肿瘤分级、年龄、是否R0切除、性别等进行单因素和多因素Cox回归分析,选取预后的独立影响因素和肿瘤分期,建立可视化的预测患者1、2、3年OS率的列线图。各自变量赋值如下:风险分层(低风险=0,高风险=1),年龄(连续变量,赋值从小到大),性别(男=0,女=1),肿瘤分期(I期=0,II期=1,III期=3,IV期=4),肿瘤分级(G₁级=0,G₂级=1,G₃级=2),是否R0切除(R0切除=0,未R0切除=1)。通过校准曲线展示列线图的预测性能。

1.6 肿瘤微环境分析

基于TCGA数据,采用“estimate”包进行ESTIMATE算法,对胃癌组织的肿瘤微环境进行评估,包括免疫评分、基质评分和总评分(总评分=免疫评分+基质评分),比较总体样本高、低风险组的评分差异^[11]。其结果使用“ggplot2”和“ggpubr”包进行可视化处理,以小提琴图形式呈现。采用CIBERSORT算法计算肿瘤组织中各类免疫细胞的浸润情况并进行比较^[12]。

1.7 统计学方法

使用R软件(4.5.1版本)进行统计分析。计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述,计数资料采用频数或率或构成比(%)描述。胃癌肿瘤组织与正常癌旁组织的基因表达差异采用独立样本 t 检验。组间临床特征差异采用卡方检验或非参数秩和检验。肿瘤微环境评分差异、免疫细胞浸润水平差异采用单因素方差分析。采用Kaplan-Meier生存分析和

Log-rank 检验比较生存率差异。采用单因素和多因素 Cox 回归分析确定预后的影响因素。应用 Cox 比例风险回归模型计算 *HR* 和 95%*CI*。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 和氨死亡相关 DEGs 的鉴定

使用 TCGA-胃癌数据进行 DEGs 分析, 鉴定出 1322 个基因, 其中 569 个为上调基因, 753 个为下调基因 (图 1A)。将 620 个氨死亡相关基因与 DEGs 取交集, 得到 48 个氨死亡相关 DEGs 纳入后续研究 (图 1B)。通过单因素 Cox 回归分析, 得到 8 个影响患者 OS 期的氨死亡相关 DEGs, 均为危险基因 (均 $HR > 1, P > 0.05$), 包括: *ADHFE1*、*ASPA*、*ATP1B2*、*GSTM5*、*NR4A1*、*P4HA3*、*PDK4* 和 *RGS2* (图 1C)。

2.2 风险评分模型的构建和验证

训练集和测试集患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤分级和 R0 切除差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$, 表 1)。模型构建结果显示, 训练集中决策树模型的 C-index 为 0.796, GBM 模型为 0.655, KNN 模型为 0.551, 随机森林模型为 0.891, XGBoost 模型为 0.487。在测试集中, 上述 5 种模型的 C-index 分别为 0.681、0.602、0.605、0.713 和 0.372 (图 2A)。随机森林模型被认为是胃癌预后风险预测效果最优的模型 (图 2B)。

将随机森林模型应用于训练集, 根据患者的风险评分值及生存数据绘制患者的生存状态和风险分布图 (图 2C); Kaplan-Meier 生存分析显示高风险组的生存率低于低风险组 ($P < 0.0001$, 图 2D); 该模型预测患者 1、2、3 年生存率的 AUC 分别为 0.943、0.930、0.938 (图 2E)。将上述模型应用到测试集 (图 2F), Kaplan-Meier 生存分析显示高风险组比低风险组的生存率更低 ($P = 0.025$, 图 2G); 模型预测患者 1、2、3 年生存率的 AUC 分别为 0.747、0.754、0.802 (图 2H), 提示该模型的预测准确性较高, 且随着时间延长, 模型的预测准确性逐渐升高。

2.3 临床特征及氨死亡相关风险评分构建生存预测列线图

将 TCGA-胃癌队列中的临床特征及风险分层进行单因素和多因素 Cox 回归分析 (表 2), 选取预后独立影响因素 (年龄、是否 R0 切除和风险分层, $P < 0.05$) 以及肿瘤分期构建预测 OS 率的列线图 (图 3A), 其 C-index 为 0.799 (95%*CI* 0.779~0.820, $P < 0.05$)。校准曲线显示, 该列线图能有效预测胃癌患者 1、2、3 年 OS 率 (图 3B)。

2.4 氨死亡相关 DEGs 的功能富集分析和 PPI 分析

为了探索氨死亡相关 DEGs 在胃癌中的潜在机制, 对 2.1 中鉴定的 48 个 DEGs 进行了功能富集分析 (图 4A)。GO 细胞成分分析发现这些基因

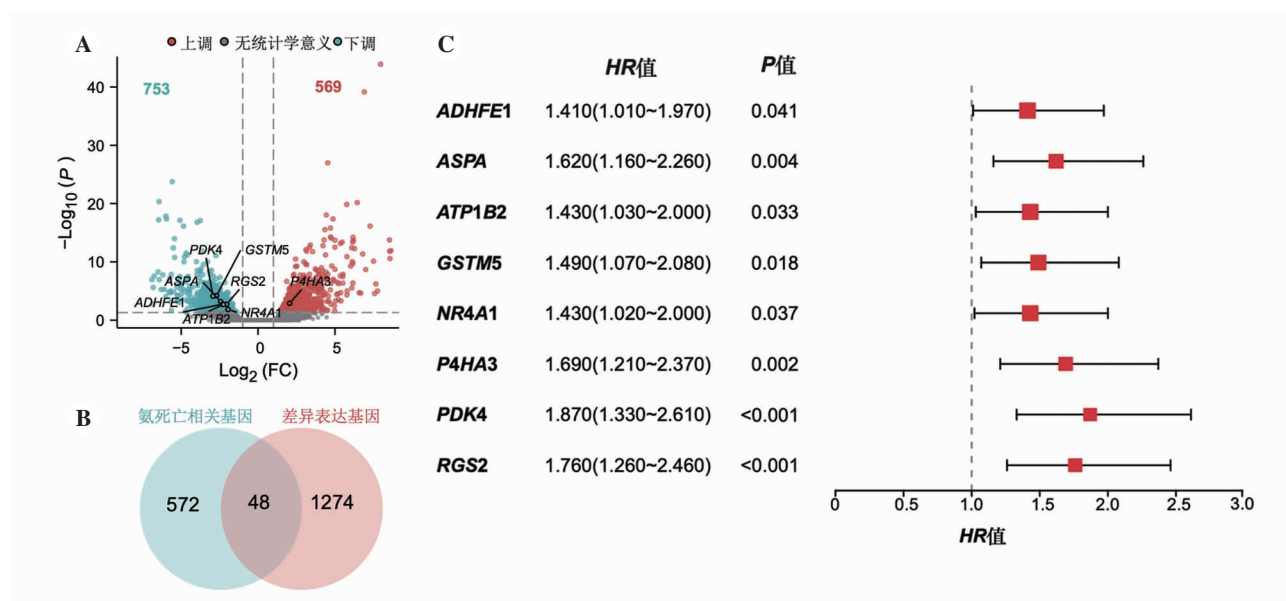


图 1 差异表达基因和氨死亡相关差异表达基因的鉴定

注: A, 火山图显示胃癌肿瘤组织与正常癌旁组织的基因表达差异; B, 韦恩图显示差异表达基因和氨死亡相关基因的交集情况; C, 8 个影响总生存期的氨死亡相关差异表达基因的森林图。

表 1 训练集与测试集患者临床特征比较

临床特征	测试集(<i>n</i> =82)	训练集(<i>n</i> =190)	<i>Z</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄[岁, <i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	67.00 (57.00, 72.00)	65.50 (58.00, 72.00)	0.136	0.891
肿瘤分期[例(%)]			3.594	0.309
I 期	6 (7.3)	30 (15.8)		
II 期	29 (35.4)	61 (32.1)		
III 期	43 (52.4)	90 (47.4)		
IV 期	4 (4.9)	9 (4.7)		
是否 R0 切除[例(%)]			0.064	0.801
否	12 (14.6)	24 (12.6)		
是	70 (85.4)	166 (87.4)		
肿瘤分级[例(%)]			1.315	0.518
G ₁ 级	2 (2.4)	5 (2.6)		
G ₂ 级	24 (29.3)	69 (36.3)		
G ₃ 级	56 (68.3)	116 (61.1)		
性别[例(%)]			0.769	0.380
女	36 (43.9)	71 (37.4)		
男	46 (56.1)	119 (62.6)		

主要富集于线粒体基质。GO 生物过程分析结果显示, 这些基因与细胞氨基酸代谢、有机酸分解代谢、神经递质调控、脂肪酸代谢等生物过程相关。通过 STRING 数据库分析这些 DEGs 之间的关联, 结果显示这些基因主要涉及 3 个模块, 1 个模块是包括 *GSTA1*、*GSTA2*、*GSTA3*、*GSTM2* 和 *GSTM5* 在内的谷胱甘肽 S-转移酶家族, 主要起到催化谷胱甘肽与有毒物质结合反应的作用; 另 1 个模块是与氧化应激密切相关的 *SLC5A5*、*DUOX1* 等; 还有 1 个模块是与氨基酸代谢、脂肪酸代谢相关的基因(图 4B)。

2.5 氨死亡相关风险评分模型与肿瘤微环境的关系探讨

利用 ESTIMATE 算法评估 TCGA-胃癌队列肿瘤微环境的总评分, 结果发现高风险组的总评分高于低风险组 ($P<0.01$), 高风险组的基质评分也高于低风险组 ($P<0.000\ 1$), 但两组的免疫评分差异无统计学意义(图 5A), 提示氨死亡可能在胃癌基质组织中发挥着重要作用。通过 CIBERSORT 算法比较各类免疫细胞在不同风险评分患者胃癌组织中的占比, 结果显示幼稚 B 细胞、M2 型巨噬细胞、单核细胞等在高风险组中的占比升高; 而滤泡辅助性 T 细胞、静息自然杀伤(natural killer, NK) 细胞、M0 型巨噬细胞、激活肥大细胞、中性粒细胞等在高风险组中的占比降低(图 5B), 提示氨死亡可能在不同免疫细胞中发挥着不尽相同的作用,

从而对肿瘤免疫微环境产生影响, 而高风险组的免疫微环境表现出更为显著的“免疫抑制”和“促肿瘤”特征。

3 讨论

近年来, 随着免疫治疗、靶向治疗等药物治疗的不断发展, 胃癌患者的预后有明显改善, 但总体预后仍然较差, 2022 年我国胃癌的死亡率为 18.44/10 万, 5 年生存率仅为 35.1%, 对国家和人民都造成较重的卫生经济负担^[1]。免疫治疗的出现改变了既往恶性肿瘤的治疗理念, 使恶性肿瘤的药物治疗进入到新的时代, 为许多患者带来了更长的生存期。但免疫治疗在发展过程中也遇到很多挑战和瓶颈, 如疗效的异质性、疗效持续时间的差异等。如何抑制肿瘤微环境中的免疫抵抗、改善 T 细胞耗竭等是目前免疫治疗研究的热点^[13]。

氨诱导的 T 细胞死亡由 Zhang 等^[6]首次报道, 他们发现氨代谢失衡导致的高浓度氨聚集是效应 CD8⁺ T 细胞死亡的重要原因之一。在抗肿瘤免疫反应期间, CD8⁺ T 细胞会进行代谢重编程以适应更高的能量需求, 其中谷氨酰胺代谢是提供关键碳和氮的重要一步, 但其反应副产物氨也会在这个过程中逐渐累积而导致细胞死亡, 从而引起效应 T 细胞的过度耗竭, 减弱免疫治疗的疗效。有 2 个重要的细胞器——溶酶体和线粒体, 参与了氨诱导效应 CD8⁺ T 细胞死亡的过程。研究发现, 氨

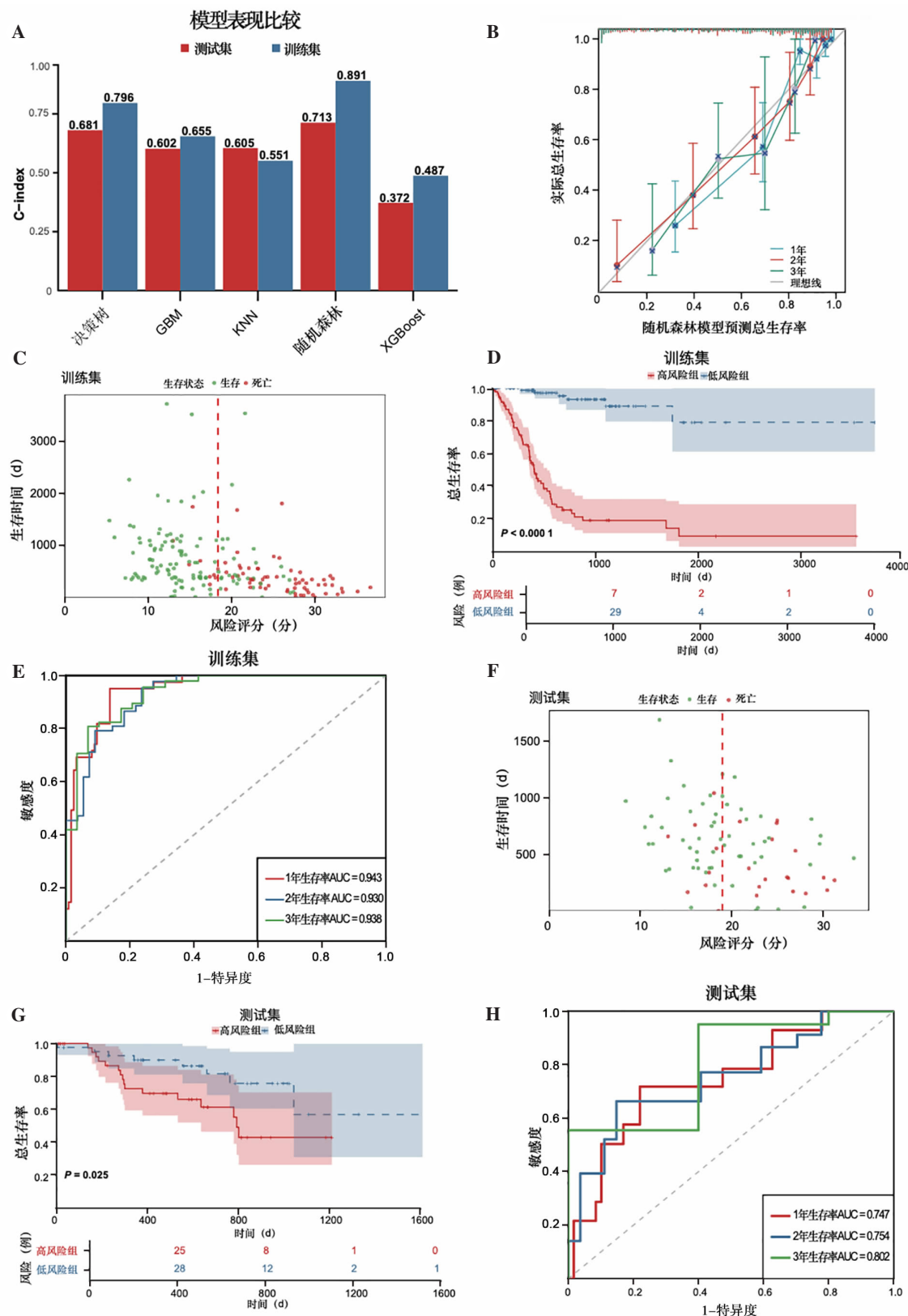


图 2 风险评估模型的构建和验证

注: A, 5 种不同机器学习算法 C-index 的比较; B, 随机森林模型的校准曲线; C, 训练集患者生存状态和风险评估分布图; D, 训练集中高风险组和低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线; E, 训练集中风险评估模型预测 1、2、3 年生存率的 ROC 曲线; F, 测试集患者生存状态和风险评估分布图; G, 测试集中高风险组和低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线; H, 测试集中风险评估模型预测 1、2、3 年生存率的 ROC 曲线。GBM, 梯度提升模型; KNN, K-最近邻算法; XGBoost, 极限梯度提升。

表 2 临床特征及风险分层的单因素和多因素 Cox 回归分析

变量	单因素分析			多因素分析		
	HR 值	95%CI	P 值	HR 值	95%CI	P 值
肿瘤分期						
I 期	参照					
II 期	1.665	0.673~4.116	0.270	1.260	0.499~3.183	0.625
III 期	3.061	1.318~7.109	0.009	1.947	0.819~4.626	0.132
IV 期	2.734	0.833~8.971	0.097	2.024	0.591~6.931	0.262
切除情况						
R0 切除	参照					
非 R0 切除	3.501	2.199~5.571	<0.001	2.929	1.800~4.766	<0.001
肿瘤分级						
G ₁ 级	参照					
G ₂ 级	0.961	0.229~4.031	0.957	—	—	—
G ₃ 级	1.300	0.318~5.320	0.715	—	—	—
年龄	1.026	1.006~1.047	0.012	1.027	1.004~1.049	0.019
性别						
男	参照					
女	0.653	0.422~1.012	0.057	—	—	—
风险分层						
低风险	参照					
高风险	9.133	5.155~16.181	<0.001	8.917	4.987~15.941	<0.001

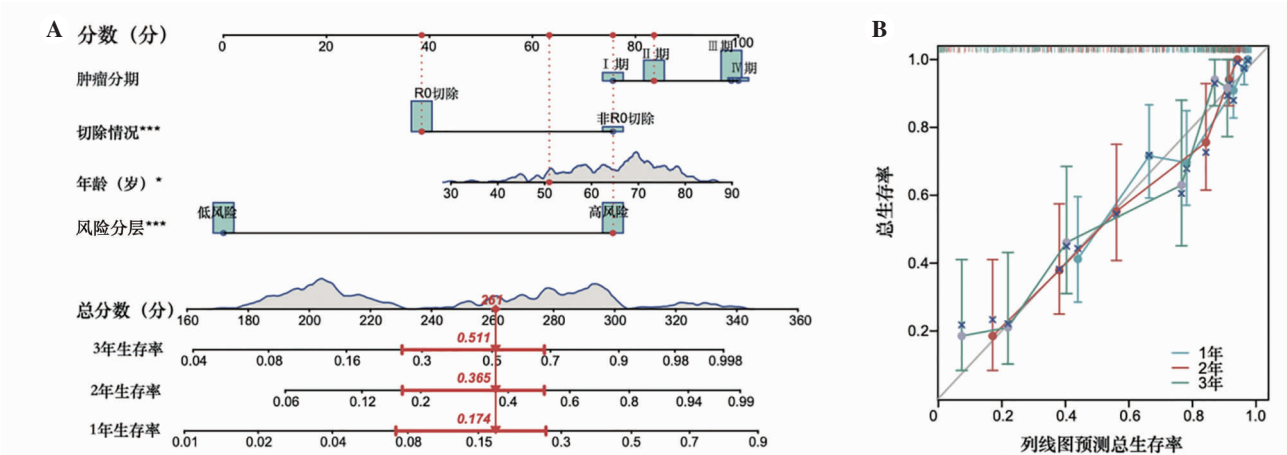


图 3 生存预测列线图的构建

注:A,结合临床特征及风险分层构建胃癌患者生存预测列线图;B,列线图预测1、2、3年总生存率的校准曲线,×表示重抽样校正数值,其中b=1000。* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

可以通过 Rhesus 糖蛋白 C 转运体进入溶酶体破坏细胞膜的稳定性,导致溶酶体内的水解酶释放到细胞质中继而引起细胞自噬^[14]。此外,过多积累的氨会扩散到线粒体中,导致氧化反应,破坏细胞膜并阻碍能量产生,引起细胞死亡^[15]。这种双细胞器的功能障碍发挥着协同产生毒性的作用,溶酶体的功能异常会加剧线粒体的损伤,从而加速 T 细胞的衰退和耗竭。目前的研究发现氨死亡对肾透明细胞癌、头颈部鳞状细胞癌、结直肠癌、肝癌等肿瘤的预后显著影响^[16-20]。改善氨代谢失衡、

抑制氨过多进入溶酶体或减少线粒体中氨相关氧化反应等,是目前改善氨死亡相关免疫治疗疗效的潜在研究方向。

本研究通过机器学习建立了氨死亡相关基因的风险评分模型,并探索其与肿瘤微环境之间的关系。首先,通过对 TCGA 数据库中胃癌肿瘤组织及正常癌旁组织的转录组比较,鉴定了 48 个氨死亡相关 DEGs。采用单因素 Cox 回归分析这 48 个 DEGs 对胃癌患者生存的影响,并找出 8 个对生存预后显著影响的 DEGs。随后,采用机器学习建

OS率进行预测分析后,发现随着生存时间的延长预测效能更好,提示该模型对远期预后的预测更为有效。为了证实风险评分模型对预后的预测效能,本研究将临床特征和基于模型的风险分层相结合,开发了1个可以方便应用的列线图模型,相关的校准曲线等结果显示该列线图模型表现良好,基于氨死亡相关基因风险评分模型的风险分层是胃癌患者预后的独立影响因素。这些结果均提示,氨死亡是影响胃癌患者预后的重要因素之一,为后期深入探索其内在机制以及寻找治疗新靶点奠定了坚实基础。

氨诱导的细胞死亡首先是在效应CD8⁺T细胞中被发现的;也有研究发现降低肿瘤相关的氨水平可以增强结直肠癌抗PD-L1免疫治疗的疗效^[19]。因此,本研究探索了不同风险组患者的肿瘤微环境情况,结果显示高风险组的ESTIMATE总评分和基质评分均高于低风险组,但两组的免疫评分差异无统计学意义,提示氨死亡在胃癌肿瘤微环境的非免疫环境中也可能发挥着重要作用。虽然两组的免疫评分差异无统计学意义,但在高风险组中幼稚B细胞、M2型巨噬细胞、单核细胞等占比明显升高,静息NK细胞、M0型巨噬细胞、激活肥大细胞、中性粒细胞等占比明显下降。幼稚B细胞是未受过抗原刺激的B细胞,过高的比例提示B细胞可能无法被正常激活或分化,存在功能抑制或肿瘤抗原递呈过程的缺陷^[23]。M2型巨噬细胞是最典型的免疫抑制细胞,其升高提示更强的免疫抑制微环境^[24]。而NK细胞比例的下降则提示天然免疫监视功能的降低,免疫逃逸更容易发生^[25]。上述结果提示高风险组的免疫微环境表现出更为显著的“免疫抑制”和“促肿瘤”特征,可能是其预后更差的重要原因。这也提示了氨代谢异常和氨诱导细胞死亡的现象可能不仅存在于T细胞中,其可能在B细胞、巨噬细胞、NK细胞等多种免疫细胞中均发挥一定的作用,但相关分子机制仍有待后续研究深入探索。

本研究存在以下局限。首先,氨死亡相关研究较为新颖,可参考的文献有限,且尚未有数据库对氨代谢或氨死亡相关的基因进行明确归纳,因此对该类基因的筛选可能存在遗漏或缺陷。其次,本研究仅使用TCGA单个数据集的转录组数据和临床数据进行建模及验证,缺乏外部数据的交叉验证,所建风险评分模型的效能还需要通过多中心、

大样本的前瞻性队列研究加以验证。再次,本研究使用的TCGA胃癌数据集缺乏治疗相关数据,特别是免疫治疗相关数据,使该模型对免疫治疗疗效的预测价值较为有限,后续研究将着重收集免疫治疗相关的胃癌队列,验证该模型对胃癌患者免疫治疗疗效的预测价值。而且本研究对肿瘤微环境的探讨是基于生物信息学的推算分析,缺乏实验生物学的验证;对不同类型免疫细胞比例的推算是基于批量样本的转录组数据,后续将应用单细胞转录组测序等高分辨率测序技术探索氨代谢异常/氨死亡在不同类型免疫细胞中的作用机制。最后,本研究找到了8个与胃癌生存预后相关的氨死亡相关基因,后续将探索这些基因在氨死亡过程中的作用机制,为寻找新的治疗靶点提供研究方向。

综上所述,本研究通过机器学习建立了1个基于氨死亡相关基因的胃癌风险评分模型,能够较为准确地预测胃癌患者的生存预后,且与胃癌肿瘤微环境有一定相关性,为胃癌患者个体化预后分析及免疫治疗评估提供一定依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 钱焱,负责数据的主要分析和撰写论文大部分内容;林青雨,负责数据收集和初步分析;龚智霖,参与实验设计和数据分析,并撰写论文的部分章节;蔡世荣,负责实验设计;陈斯乐,负责实验设计和论文的校对工作

人工智能使用声明 本文未使用任何人工智能相关工具对文字及图表进行处理

参考文献

- [1] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] RHA SY, OH DY, YANEZ P, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for HER2-negative advanced gastric cancer (KEYNOTE-859): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2023, 24(11): 1181-1195.
- [3] JANJIGIAN YY, AJANI JA, MOEHLER M, et al. First-Line Nivolumab Plus Chemotherapy for Advanced Gastric, Gastroesophageal Junction, and Esophageal Adenocarcinoma: 3-Year Follow-Up of the Phase III CheckMate 649 Trial [J]. J Clin Oncol, 2024, 42(17): 2012-2020.

- [4] KANG YK, RECK M, NGHIEM P, et al. Assessment of hyperprogression versus the natural course of disease development with nivolumab with or without ipilimumab versus placebo in phase III, randomized, controlled trials [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(4): e004273.
- [5] 林青雨, 戴伟钢, 李引, 等. 中国临床肿瘤学会胃癌诊疗指南(2025 版)更新要点解读[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2025, 17(3): 299–307.
- [6] ZHANG H, LIU J, YUAN W, et al. Ammonia-induced lysosomal and mitochondrial damage causes cell death of effector CD8(+) T cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(11): 1892–1902.
- [7] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [8] WU T, HU E, XU S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation (Camb)*, 2021, 2(3): 100141.
- [9] SZKARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROUL M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638–D646.
- [10] BLANCHE P, DARTIGUES JF, JACQMIN-GADDA H. Estimating and comparing time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks [J]. *Stat Med*, 2013, 32(30): 5381–5397.
- [11] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTINEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
- [12] NEWMAN AM, LIU C, GREEN MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453–457.
- [13] SUNDAR R, NAKAYAMA I, MARKAR SR, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2025, 405 (10494): 2087–2102.
- [14] MING X, ZHANG X, CAO T, et al. RHCG Suppresses Tumorigenicity and Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma via Inhibiting NF- κ B Signaling and MMP1 Expression [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (1): 185–198.
- [15] CHEN D, SHEN F, LIU J, et al. The protective effect of Luteolin on chicken spleen lymphocytes from ammonia poisoning through mitochondria and balancing energy metabolism disorders [J]. *Poult Sci*, 2023, 102 (12): 103093.
- [16] YU P, ZHONG Q, WANG X, et al. Unveiling ammonia-induced cell death: a new frontier in clear cell renal cell carcinoma prognosis [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1636977.
- [17] ZHANG X, YU Z, YIN L, et al. BAX-mediated ammonia-driven cell death: a novel prognostic and therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Hum Genomics*, 2025, 19(1): 57.
- [18] QIAN C, WANG X, FAN Y, et al. Prognostic and immune modulatory effects of ammonia-induced cell death in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 1039.
- [19] BELL HN, HUBER AK, SINGHAL R, et al. Microenvironmental ammonia enhances T cell exhaustion in colorectal cancer [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(1): 134–149.
- [20] LAO Y, CUI X, XU Z, et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase suppresses tumor progression and shapes an anti-tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2024, 81(5): 847–861.
- [21] 王泽朋, 李坤鹏, 周玉, 等. 基于机器学习的胃癌关键基因筛选及预测模型构建 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2024, 41(1): 115–124.
- [22] 刘豹, 王化困. 基于机器学习算法的胃印戒细胞癌生存预测研究 [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2025, 42(1): 5–12.
- [23] DOWNS-CANNER SM, MEIER J, VINCENT BG, et al. B Cell Function in the Tumor Microenvironment [J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 169–193.
- [24] CHEN S, SAEED A, LIU Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 207.
- [25] LASKOWSKI TJ, BIEDERSTADT A, REZVANI K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(10): 557–575.

收稿日期: 2025–09–25