· 论　　著 · Original Article ·

中国现代普通外科进展
Chin J Curr Adv Gen Surg

2025年7月　第28卷　第7期　Jul. 2025　Vol. 28　No. 7

结合机器学习和转录组学分析筛选与氨死亡相关的肝癌预后基因

贾立焱[1]　郑百红[1]　王国豪[2]　郭修文[2]　王莹[1]

山东大学第二医院　[1]第二手术部　[2]肝胆胰外科　（山东　济南　250033）

【摘要】目的：系统评估氨死亡相关基因在HCC中的分子特征及其预后价值。**方法：**基于共识无监督聚类方法对HCC样本进行氨死亡分子分型。通过加权基因共表达网络分析（WGCNA）筛选氨死亡相关基因模块，结合支持向量机（SVM）与LASSO算法识别4个氨死亡核心基因，并基于LASSO-Cox回归模型构建风险评分体系。进一步分析风险模型与HCC患者生存、肿瘤微环境及免疫治疗反应性的关联性。**结果：**共识聚类分析识别出两类显著不同的氨死亡分子亚型（P<0.05）。构建的风险评分模型对HCC患者的生存预后具有良好的预测性能，且风险评分与肿瘤微环境免疫浸润特征及免疫治疗反应性密切相关（P<0.05）。**结论：**氨死亡相关风险评分模型可作为HCC新的预后标志，并有望为免疫治疗策略提供潜在的参考依据。

【关键词】氨死亡•肝细胞癌•机器学习•预后标志物

【中图分类号】R737.7

【文献标识码】A　DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2025.07.007

【文章编号】1009-9905（2025）07-0545-07

Identification of ammonia death-related prognostic genes in hepatocellular carcinoma through integrated machine learning and transcriptomic analysis

JIA Li-yan[1], ZHENG Bai-hong[1], WANG Guo-hao[2], GUO Xiu-wen[2], WANG Ying[1]

[1]Second Department of Surgery, [2]Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Second Hospital of Shandong University(Jinan 250033, China)

【ABSTRACT】*Objective:* To systematically evaluate the molecular characteristics and prognostic value of ammonia death-related genes in hepatocellular carcinoma (HCC). ***Methods:*** Consensus unsupervised clustering was used to identify ammonia death-related molecular subtypes in HCC samples. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was applied to identify gene modules associated with ammonia death. Support vector machine (SVM) and LASSO algorithms were used to screen four hub genes, and a risk score system was constructed based on a LASSO-Cox regression model. The association between the risk model and patient survival, tumor microenvironment, and response to immunotherapy was further analyzed. ***Results:*** Consensus clustering identified two distinct ammonia death-related molecular subtypes (P<0.05). The constructed risk score model showed good predictive performance for overall survival in HCC patients and was closely associated with immune infiltration characteristics of the tumor microenvironment and immunotherapy responsiveness (P<0.05). ***Conclusion:*** The ammonia death-related risk score model may serve as a novel prognostic biomarker for HCC and provide potential guidance for immunotherapy strategies.

【KEY WORDS】Ammonia-induced cell death•Hepatocellular carcinoma•Machine learning•Prognostic biomarker

［通信作者］王莹，E-mail: 2543748403@qq.com

免疫疗法，特别是应用免疫检查点抑制剂（Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs），已经成为治疗恶性肿瘤的一种变革性方法[1-3]。ICIs通过阻断T细胞活性的抑制途径发挥作用，从而增强免疫系统识别和根除癌细胞的能力[4]。在肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）的治疗中，纳武利尤单抗和帕博利珠单抗等几种药物已获得临床使用批准[5]。然而，ICIs的疗效在不同患者之间差异很大，这在很大程度上与肿瘤微环境（tumor microenviroment, TME）有关[6-7]。TME由肿瘤细胞、免疫细胞、间质细胞及多种非细胞成分构成，具有动态性和高度异质性。$CD8^+$ T细胞是主要抗肿瘤效应细胞，但多种抑制性组分可削弱其功能，导致免疫逃逸，促进肿瘤进展并降低免疫治疗效果[6]。传统观点认为，T细胞功能障碍主要与凋亡和衰竭有关[7]，2024年，Zhang等[8]报道了一种新型T细胞死亡方式——氨死亡，其机制为：激活的T细胞谷氨酰胺代谢活动的增强导致细胞内过量的氨积累，氨破坏溶酶体和线粒体，破坏细胞平衡，导致细胞死亡。因此，靶向$CD8^+$ T细胞氨死亡有望成为抗肿瘤免疫治疗新策略。鉴于该机制尚缺乏相关研究，本研究拟基于TCGA和GEO数据库，识别HCC中与氨死亡相关的分子分型，构建风险评分模型，并评估其临床指导价值。

1　资料与方法

1.1　数据获取与无监督聚类分析　从TCGA数据库（https://portal. gdc. cancer. gov）下载了HCC的STAR-counts数据和相应的临床信息，接着提取出TPM格式的数据，并进行了$\log_2$(TPM+1)的归一化处理，最后保留同时具有RNAseq数据和临床信息的样本后，共有376个样本进行后续的分析。此外，在GSEA数据库中获取氨代谢相关基因，采用R包“ConsensusClusterPlus”进行共识无监督聚类分析，根据其表达情况将患者分为不同的分子亚型。聚类基于以下准则：（1）累积分布函数（cumulative distribution function, CDF）曲线逐渐平稳增长；（2）聚类后，组内相关性强而组间相关弱。

1.2　加权基因共表达网络分析　根据氨死亡分型，基于先前描述的方案[9]，本研究进行了加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA），其过程大致如下，分别选择绝对中位数偏差（median absolute deviation, MAD）前5000的基因进行分层聚类分析。使用Pearson相关系数来评估每个基因之间的距离。然后，基于无标度拓扑网络准则识别软阈值（β），并将表达式矩阵转换为邻接矩阵。其次，根据拓扑重叠度量和不相似性度量，对邻接矩阵进行进一步聚类，形成拓扑矩阵。采用动态树切算法确定基因模块。每个模块的最小基因数设置为30个。最后，通过Pearson相关分析估计每个模块中特征基因与分型及其他肝癌临床特征的相关性，选取相关程度最高的模块作为核心基因模块。

1.3　机器学习　使用SVM-RFE和LASSO两种机器学习算法筛选肝癌氨死亡核心基因。LASSO回归分析通过10倍交叉验证（cross validation, CV），以最小的偏似然偏差确定最合适的调谐参数λ，以减少不同变量之间的过拟合效应。RF算法基于最小误差确定森林树木的数量。采用基尼系数法估计各变量的重要值。SVM-RFE也采用10倍CV，筛选出CV误差最小、准确度最高的基因。分析过程分别使用R包“glmnet”和“e1071”实现。

1.4　预后模型的构建和验证　本研究将TCGA数据库中的肝癌患者队列按1∶1分为训练集和验证集，通过LASSO-Cox回归分析在训练集中挑选出最优模型，LASSO-Cox模型输出的风险评分不是简单的线性相加，而是通过predict函数计算，线性预测或指数转换的风险比取决于type参数。风险评分的计算公式：风险评分=$Exp_1\times Coef_1+Exp_2\times Coef_2+\ldots+Exp_x\times Coef_x$，其中Coef表示各基因的LASSO-Cox回归系数，Exp为基因表达量，随后在验证集对模型进行验证。使用“survminer”R包绘制生存曲线，比较高低风险组在总生存期（overall survival, OS）上的差异，此外，使用“timeROC”R包在训练集及验证集中分别绘制时间依赖性的受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线，并计算曲线下面积（area under curve, AUC），以评估预后模型对不同时间点生存率的预测效能。

1.5　功能富集分析和免疫细胞浸润分析　使用“clusterprofiler”R包对差异基因执行GO富集分析，并通过“GSEA”R包对不同的氨死亡分型开展GSEA分析。免疫细胞浸润方面，本研究使用ssGSEA算法计算TME中不同免疫细胞的含量和免疫功能，相关基因集获取自Charoentong等[10]的研究。

1.6　统计学处理　采用R4.4.1软件。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　氨死亡相关亚型的构建　本研究在GSE19665及GSE60502数据集中筛选HCC与正常肝组织间的差异基因，共获得1041个差异基因（$P<0.05$，FDR>1，图1A）。GO富集分析表明，这些基因主要与氨基酸特别是谷氨酰胺的代谢过程相关（图1B），提示氨

死亡可能参与HCC的发病过程。根据HCC患者的氨死亡相关基因表达情况开展无监督一致性聚类分析，当聚类数k=2时，分型效果最好，因此，HCC患者被划分为CS1与CS2 2个氨死亡分子亚型（图2A~C）。随后筛选两亚型间的差异基因并进行富集分析（P<0.05，FDR>1，图2D），结果显示物质代谢相关通路有显著的富集（图2E）。此外，GSEA分析表明，CS1在若干细胞增殖及周期相关的条目有较高程度的富集（图2F），提示该亚型患者更高的疾病恶性程度。

2.2　氨死亡相关基因模块的筛选　本研究通过WGCNA方法确定与氨死亡分子分型相关性最强的基因模块，当β值设为4时，无标度拓扑网络的稳定性最好（图3A、B）。随后的动态树切割算法获得2000个基因模块（图3C）。根据Pearson相关分析，青色模块与氨死亡分子分型的相关性最强（图3D），因而被选作氨死亡相关基因模块。根据KEGG富集分析，这些基因显著富集于细胞增殖和周期、物质代谢以及免疫反应相关的通路（P<0.05，图3E、F）。

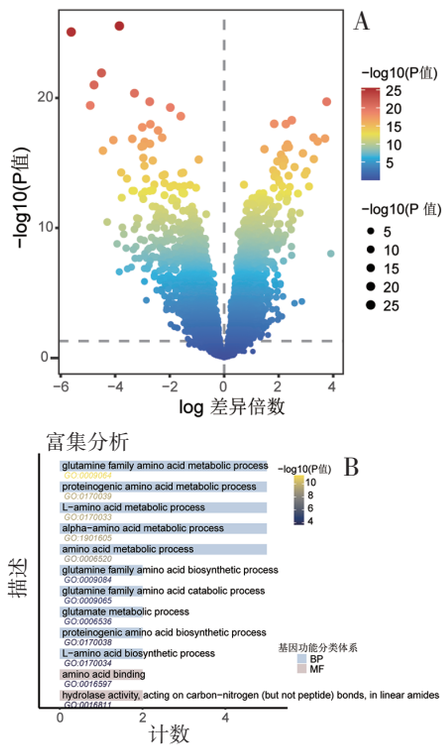

图1　HCC转录组数据的差异分析

A：HCC组织和正常肝组织转录组数据的差异分析；B：HCC和正常组织的差异基因的功能富集分析

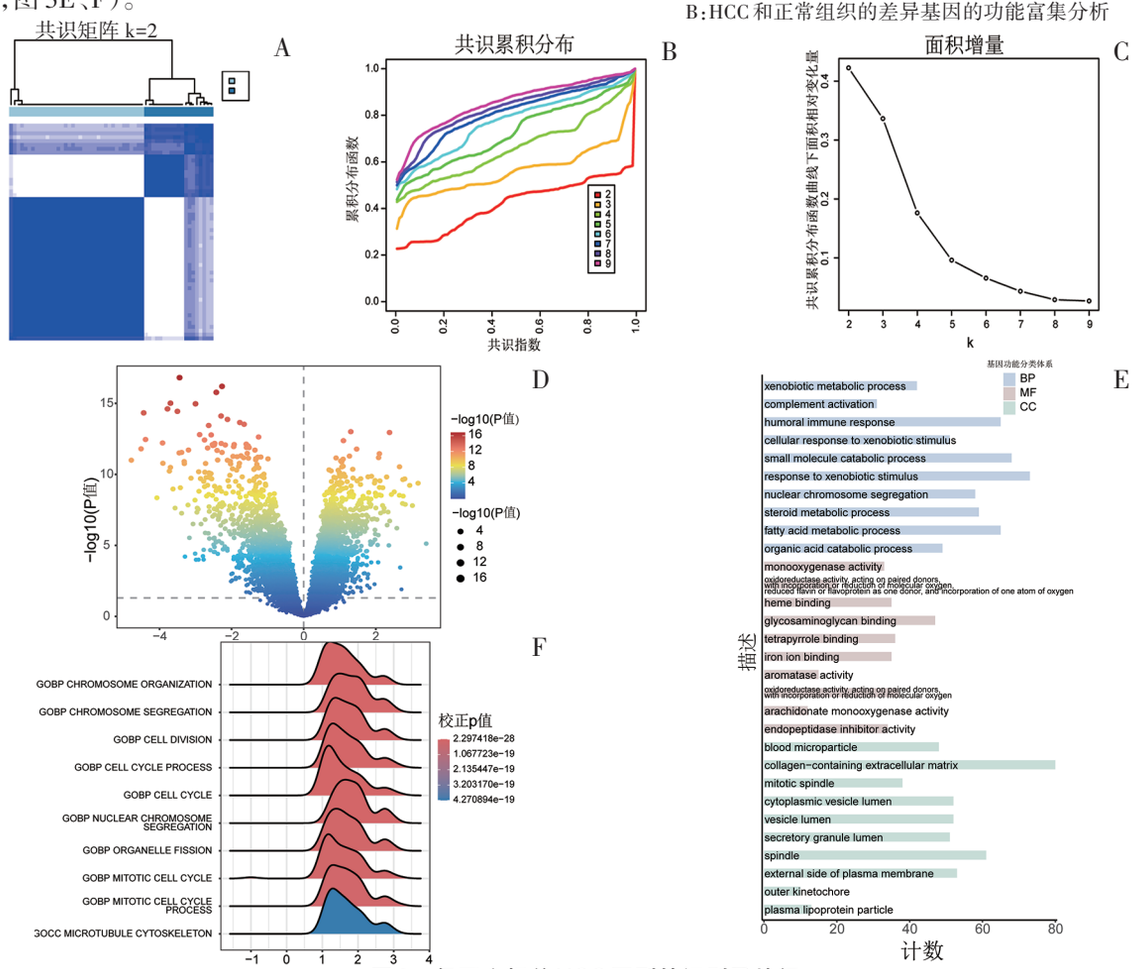

图2　氨死亡相关HCC亚型的识别及特征

A：根据氨死亡相关基因集，将HCC分为2个亚型；B、C：CDF曲线确定了最佳的聚类个数；D：C1和C2亚型之间的差异基因；E：HCC亚型间差异基因的功能富集分析；F：C1和C2亚型间的GSEA分析

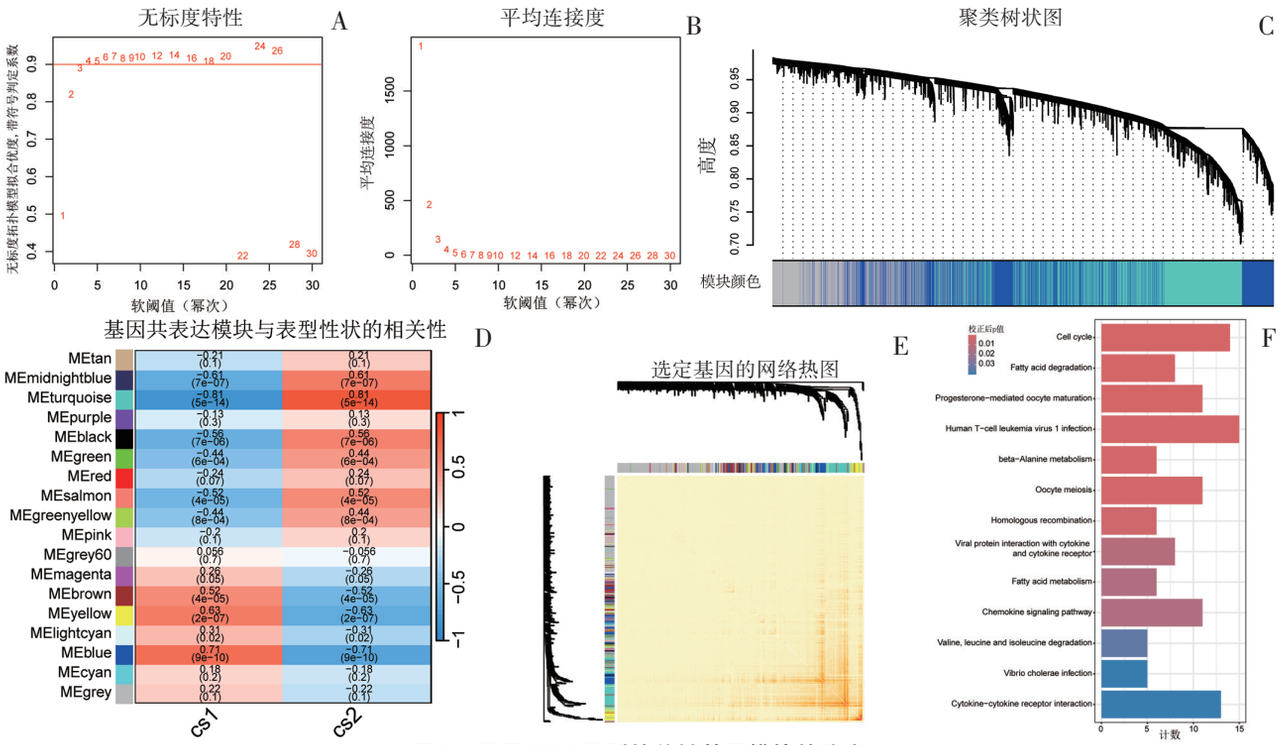

图3　不同HCC亚型的关键基因模块的确定

A：无尺度拓扑拟合度分析展示了加权基因共表达网络的最佳阈值；B：平均连接度分析辅助确定k=4为加权基因共表达网络的最佳阈值；C：基因聚类树状图展示了基因的层次聚类；D：模块-性状关系热图揭示了共表达基因模块与临床表型之间的相关性；E：网络热图展示了部分代表性基因之间的拓扑重叠关系热图；F：MEturquoise基因模块的KEGG富集分析

2.3　机器学习筛选氨死亡核心基因　对2个氨死亡分子分型间的差异基因、氨死亡基因模块及HCC与正常肝组织间的差异基因取交集，获得了427个基因（图4A）。运用LASSO和SVM机器学习算法评价交集基因对氨死亡分子分型的区分能力，2种算法分别识别出7个和15个目的基因（图4B～E），取交集后筛选到4个基因（图4F），并将其定义为氨死亡核心基因用于后续分析。

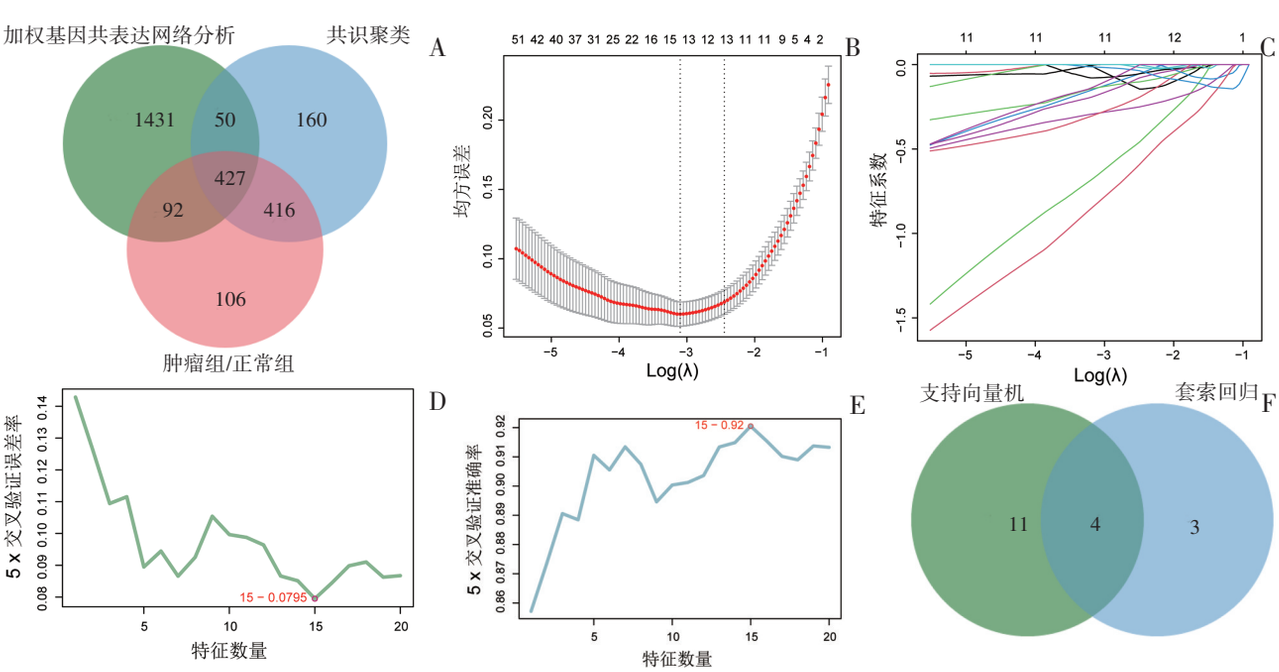

图4　通过机器学习筛选HCC氨死亡核心基因

A：对肝癌分型间的差异基因、分型相关的基因模块以及肝细胞癌与正常肝组织间的差异基因取交集，共得到427个基因；B：LASSO回归的交叉验证的误差曲线确定了最佳λ值；C：LASSO回归路径图显示了在不同的log(λ)值下，回归趋势的变化趋势；D：支持向量机递归特征的特征选择的5折交叉验证误差曲线；E：支持向量机递归特征的特征选择的5折交叉验证准确率曲线；F：通过2种机器学习算法共同筛选得到核心基因

2.4　氨死亡风险评分预后模型的构建和验证　本研究针对以上4个氨死亡核心基因构建风险评分预后模型，用于对HCC患者的预后进行分层。通过LASSO回归分析筛选得到PROZ、IL-13 2个基因用于构建预后模型（图5A、B），风险评分的计算公式：风险评分=−0.106×IL-33+−0.110×PROZ。在验证集中，风险评分的计算采用相同的公式。根据训练集的中位值（0.471）将训练集和验证集的患者分别分为高低风险两组。根据生存曲线，在训练集和验证集中，低风险组在OS上更有优势（P<0.01，图5C、E），同时根据ROC曲线，风险评分对1、3、5年生存率具有良好的预测效能（图5D、F）。

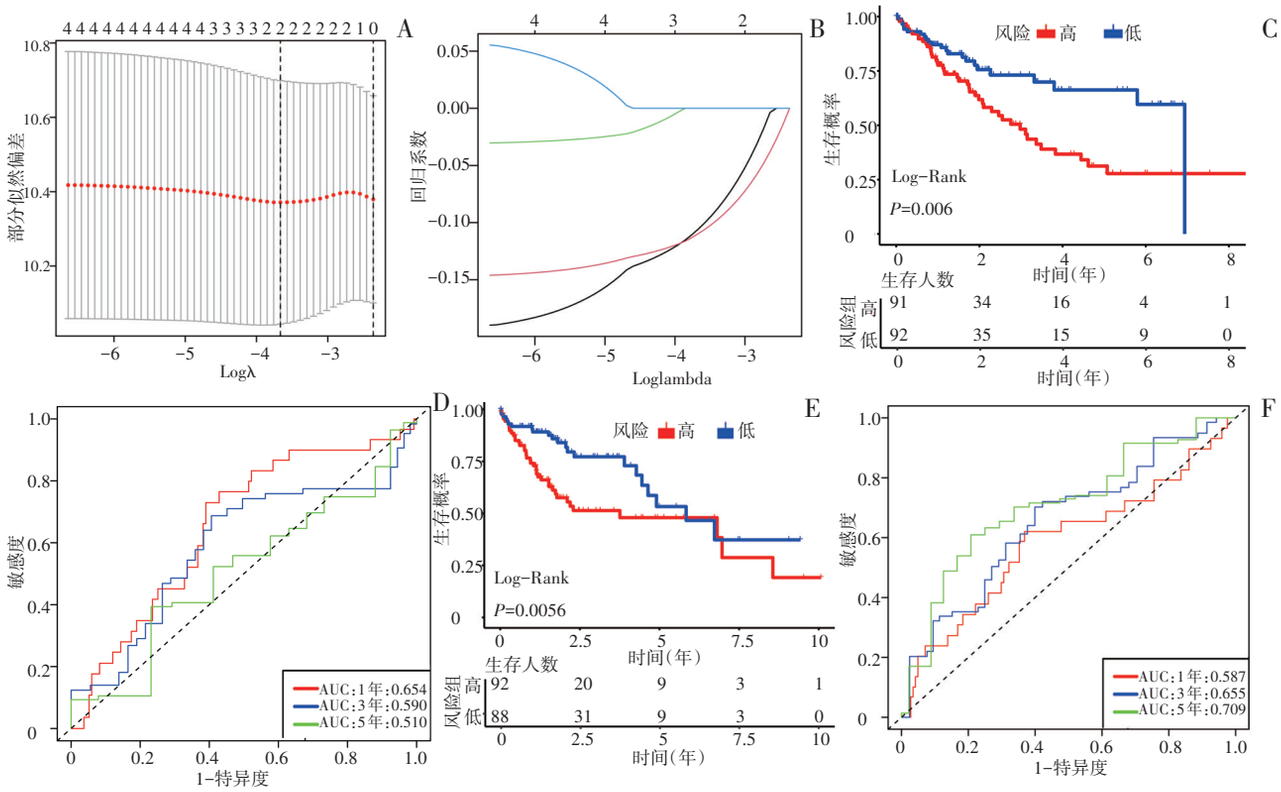

图5　HCC氨死亡相关核心基因预后模型的构建

A：LASSO回归的交叉验证的误差曲线确定了最佳λ值；B：LASSO回归路径图显示了在不同的log（λ）值下，回归趋势的变化趋势；C：训练集中高风险组及低风险组的预后差异；D：训练集的预测效能；E：验证集中高风险组及低风险组的预后差异；F：验证集的预测效能

2.5　预后模型与TME的相关性分析　通过ssGSEA方法量化HCC患者TME中的免疫细胞浸润程度和免疫功能并比较高低风险组间的差异（图6A），整体而言，低风险组各类免疫细胞的丰度更高，其中不乏γδT细胞、Th1型辅助T细胞及NK细胞等抗肿瘤淋巴细胞（P<0.05）；免疫功能方面，低风险组在“Ⅱ型干扰素反应”上的得分更高，提示该组更强的抗肿瘤免疫活性（P<0.05，图6B）。此外，若干免疫检查点分子在高低风险组中的表达程度差异有统计学意义（P<0.05，图6C），提示该预后模型在预测HCC免疫治疗反应性上的潜在应用价值。

3　讨论

随着研究的深入，科学界已发现自噬、铁死亡、焦亡、坏死性凋亡、失巢凋亡和铜死亡等新型程序性细胞死亡（programmed cell death, PCD）形式，这些细胞死亡模式不仅参与TME的动态调控，更为抗肿瘤治疗策略的优化提供了潜在干预靶点[11-12]。值得关注的是，基于生物信息学对HCC转录组数据的系统分析表明，多种PCD相关基因表达模式在预后评估和治疗方案制定中展现出较好的临床应用价值[13-18]。最新研究进展显示，Zhang等[19]于2024年率先报道了氨死亡这一全新PCD模式，本研究在HCC中识别氨死亡分子分型并构建风险评分预后模型，旨在为HCC患者的预后预测和综合管理提供新的见解。

首先，本研究在GSE19665数据集根据患者氨死亡相关基因的表达情况，识别出CS1与CS2 2个氨死亡分型，随后，通过WGCNA算法确定了氨死亡相关的基因模块，接下来，为增强分型及基因模块的临床应用价值，本研究运用LASSO和SVM 2种机器学习算法进一步筛选氨死亡核心基因，并通过多因素Cox分析在TCGA队列中构建了预后模型，生存曲线表明该模型能够有效实现HCC患者的生存预后分层；通过ROC曲线评估证实，风险评分在预测HCC患者1、3及5年生存状态时均展现出良好的

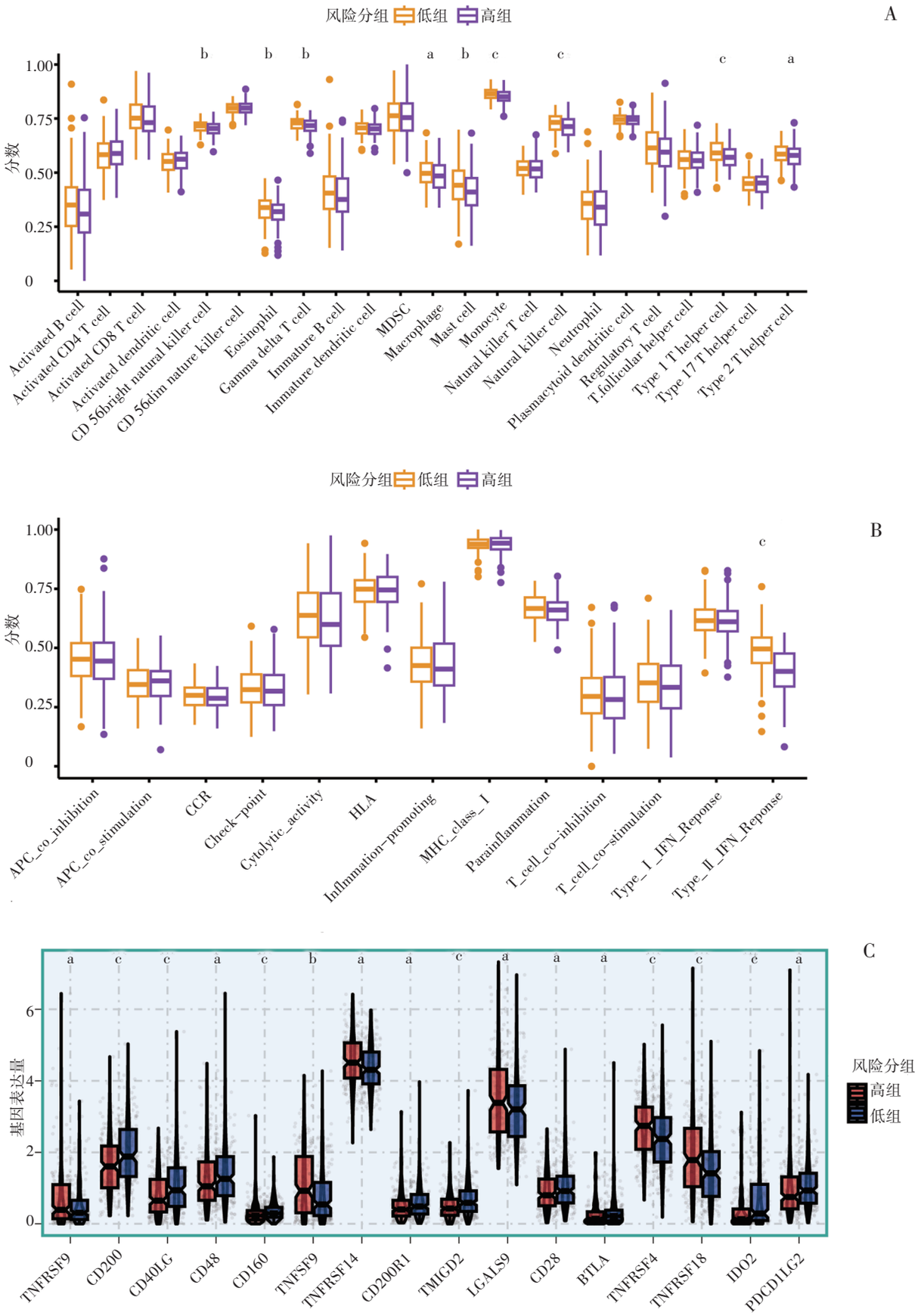

图 6　高低风险组间的免疫特征差异

A：高风险组及低风险组的免疫细胞浸润差异；B：高风险组及低风险组的免疫功能差异；C：高风险组及低风险组与免疫检查点的相关性；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，c：$P<0.001$。

区分效能，因而展现出较好的临床应用前景。

鉴于氨死亡与免疫细胞的密切关联，本研究进一步通过ssGSEA方法分析不同风险组HCC患者在TME免疫细胞浸润和免疫功能上的差异，结果表明低风险组各类抗肿瘤淋巴细胞的浸润程度明显高于高风险组，提示其具备“热肿瘤”的特征，在表现出更好的预后的同时，也更有可能从免疫治疗中获益；而高风险组免疫细胞整体浸润程度较低，具备“冷肿瘤”的特征，在对预后造成不良影响的同时，也削弱了免疫治疗疗效。

本研究有以下的局限性：首先，鉴于氨死亡仍属新兴研究领域，当前选取的氨死亡相关基因可能存在潜在遗漏和缺陷，后续研究需整合新发现的调控基因以建立动态更新机制；其次，虽然采用多队列生物信息学验证策略，但受限于回顾性研究设计，仍需通过多中心、大样本的前瞻性队列研究构建多层次证据链，特别是需要结合实验生物学手段建立分子-表型关联的因果验证体系，从而增强研究结论的临床转化价值。

总之，本研究在HCC患者中识别出两类氨死亡分子亚型，并构建了一个由2个基因组成的风险评分预后模型，系统的生物信息学分析证实，该模型可较为准确地预测HCC患者的预后，并与患者TME中免疫细胞浸润情况有一定的相关性，提示该模型也可能作为HCC免疫治疗敏感性的生物标志。

参 考 文 献

[1] Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(8): 807-821. DOI: 10.1038/s41423-020-0488-6.

[2] Kang YK, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2017, 390(10111): 2461-2471. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31827-5.

[3] 王浩，周铭，史颢瑜，等.PD-1单抗治疗对微卫星不稳定型直肠癌免疫微环境的影响[J].中国现代普通外科进展，2024，27(10)：766-772.

[4] Guo X, Wang H, Zhou J, et al. Clinical manifestation and management of immune checkpoint inhibitor-associated cardiotoxicity [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(2): 475-480. DOI: 10.1111/1759-7714.13250.

[5] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2020, 382(20): 1894-905. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745.

[6] Duan Q, Zhang H, Zheng J, et al. Turning cold into hot: Firing up the tumor microenvironment[J]. Trends Cancer, 2020, 6(7): 605-618. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.02.022.

[7] Rehman U, Gupta G, Sahebkar A, et al. Ammonia-Induced cell death: A novel frontier to enhance cancer immunotherapy[J]. Immunology, 2025, 175(1): 16-20. DOI: 10.1111/imm.13918.

[8] 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. DOI: 10.1038/s41556-024-01503-x.

[9] Zheng H, Liu H, Li H, et al. Weighted gene co-expression network analysis identifies a cancer-associated fibroblast signature for predicting prognosis and therapeutic responses in gastric cancer[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 744677. DOI: 10.3389/fmolb.2021.744677.

[10] 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): 248-62. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.019.

[11] Tang R, Xu J, Zhang B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 110. DOI: 10.1186/s13045-020-00946-7.

[12] Xie Y, Zhou Y, Wang J, et al. Ferroptosis, autophagy, tumor and immunity[J]. Heliyon, 2023, 9(9): e19799. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e19799.

[13] Liang JY, Wang DS, Lin HC, et al. A novel ferroptosis-related gene signature for overall survival prediction in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(13): 2430-2341. DOI: 10.7150/ijbs.45050.

[14] Wang H, Zhang B, Shang Y, et al. A novel risk score model based on pyroptosis-related genes for predicting survival and immunogenic landscape in hepatocellular carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2023, 15(5): 1412-1444. DOI: 10.18632/aging.204544.

[15] Li Z, Fang J, Chen S, et al. A risk model developed based on necroptosis predicts overall survival for hepatocellular carcinoma and identification of possible therapeutic drugs[J]. Front Immunol, 2022, 13: 870264. DOI: 10.3389/fimmu.2022.870264.

[16] Zhang J, Zhao J, Wei S, et al. Developing and validating an autophagy gene-set-based prognostic signature in hepatocellular carcinoma patients[J]. Int J Gen Med, 2022, 15: 8399-8415. DOI: 10.2147/IJGM.S388592.

[17] Zhang Z, Zeng X, Wu Y, et al. Cuproptosis-related risk score predicts prognosis and characterizes the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 925618. DOI: 10.3389/fimmu.2022.925618.

[18] Chen Y, Huang W, Ouyang J, et al. Identification of anoikis-related subgroups and prognosis model in liver hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2862. DOI: 10.3390/ijms24032862.

[19] Zhang H, Liu J, Yuan W, et al. Ammonia-induced lysosomal and mitochondrial damage causes cell death of effector CD8$^+$ T cells[J]. Nature cell biology, 2024, 26(11): 1892-1902. DOI: 10.1038/s41556-024-01503-x.

（收稿日期：2025-06-04）