

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：鉴定和验证食管鳞状细胞癌的自噬相关基因预后模型

姓名：陈睿 学号：21307110436

院系：生命科学学院

专业：生物科学

指导教师：周翰林 职称：青年副研究员

单位：复旦大学人类表型组研究院

完成日期：2025 年 5 月 9 日

鉴定和验证食管鳞状细胞癌的自噬 相关基因预后模型

完成人

陈睿

指导小组成员

周翰林 青年副研究员

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前 言	1
二、材料与方 法	3
2.1 数据收集与预处理	3
2.1.1 数据收集	3
2.1.2 RNA-seq 数据处理	3
2.2 基于自噬相关基因的预后模型构建	3
2.3 候选基因及 4-ARGs 模型的验证	4
2.4 列线图的构建	4
2.5 基因集富集分析	4
2.6 评估 4-ARGs 模型预测免疫检查点抑制剂反应的能力	5
2.7 定量 RT-PCR 检测及临床数据验证	5
2.8 泛癌分析	6
2.9 统计分析	6
三、研究结果	7
3.1 食管鳞状细胞癌中的差异表达自噬相关基因	7
3.2 基于自噬相关基因的预后模型构建	9
3.3 候选基因及 4-ARGs 模型的验证	9
3.4 独立临床预后因素的识别与列线图的构建	11
3.5 高风险组和低风险组富集的通路差异分析	12

3.6 由 4-ARGs 模型定义的高风险组和低风险组的免疫治疗反应	13
3.7 ESCC 患者中候选基因的验证及临床数据分析	15
3.8 4-ARGs 模型和候选基因在泛癌中的预后价值	17
四、讨 论	20
参考文献	23
致 谢	28

摘要

食管鳞状细胞癌是食管癌在中国的主要组织学类型，其发病率和死亡率均高于其他国家。自噬是一种关键且复杂的稳态过程，参与多种生物学过程。自噬通常被认为是肿瘤中的双刃剑。越来越多的研究表明，自噬与食管鳞状细胞癌的发生和发展有关。因此，寻找以自噬为核心的分子生物标志物对于食管鳞状细胞癌的预后预测和治疗具有重要意义。本文通过分析来自 GEO 和 TCGA 数据库的食管鳞状细胞癌转录组数据，并重点挖掘自噬相关基因，鉴定和验证了食管鳞状细胞癌的自噬相关预后标志物并通过机器学习的方法构建了预后模型以预测患者的生存情况。为了进一步增强我们发现的临床应用性，本文构建了一个结合临床特征和自噬相关基因标志物的列线图，以预测食管鳞状细胞癌患者的生存概率。为了探索潜在的生物学机制，本文进行了富集分析并通过 qPCR 验证了候选基因的预后价值。总之，我们基于自噬相关基因构建了一个新的食管鳞状细胞癌预后模型，进一步证明了自噬与食管鳞状细胞癌发生和发展的关联。该模型有潜力提高食管鳞状细胞癌的个体化预后预测能力，这对于食管鳞状细胞癌的个性化治疗具有重要意义。

关键词： 食管鳞状细胞癌，自噬，预后模型，转录组数据，个性化治疗

Abstract

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is the predominant histological type of esophageal cancer in China, with higher incidence and mortality rates compared to other countries. Autophagy is a critical and complex homeostatic process involved in various biological activities and is generally considered a double-edged sword in tumors. An increasing number of studies have shown that autophagy is associated with the occurrence and development of ESCC. Therefore, identifying appropriate molecular biomarkers centered on autophagy is of great significance for the prognosis prediction and treatment of ESCC. In this study, we analyzed the transcriptomic data of ESCC from the GEO and TCGA databases and focused on exploring autophagy-related genes, to identify and validate autophagy-related prognostic biomarkers and construct a prognostic model using machine learning approaches for predicting patients survival. To enhance the clinical applicability of our findings, we developed a nomogram integrating clinical features and autophagy-related gene signatures to predict the survival probability of ESCC patients. We also performed enrichment analysis to explore the underlying biological mechanisms and validated the prognostic value of candidate genes using qPCR. In summary, we constructed a new prognostic model for ESCC based on autophagy-related genes, further demonstrating the association between autophagy and the occurrence and development of ESCC. This model has the potential to improve the individualized prognostic prediction capability for ESCC, which is of significant importance for personalized treatment of ESCC.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma, Autophagy, Prognostic model, Transcriptomic data, Personalized treatment

一、前言

食管癌是消化系统中最常见的恶性肿瘤之一，具有较高的发病率和死亡率，它有两种主要的组织学类型：食管腺癌（EAC）和食管鳞状细胞癌（ESCC）^[1]。根据 2022 年的数据，食管癌是中国癌症死亡的五大主要原因之一（187,500 例死亡）^[2]。在中国，ESCC 是主要的组织学类型，其发病率和死亡率均高于其他国家^[3]。选择 ESCC 作为研究对象可以为中国的 ESCC 治疗提供研究基础。ESCC 的风险因素包括吸烟、亚硝胺暴露和饮酒，而代谢酒精的酶的突变与 ESCC 风险增加有关^[1]。ESCC 通常通过食管钡餐造影和食管胃十二指肠镜检查进行诊断。根据 TNM 分期，治疗方式包括手术切除、化疗放疗、新辅助治疗和内镜治疗^[1]。尽管诊断和治疗技术不断发展，但该疾病仍倾向于预后不良，总体 5 年生存率仅为 15%到 25%^[1, 4]，这是由于这些检测方法具有侵入性和耗时性，早期检测是提高生存率的关键，同时缺乏有效的癌症治疗靶点、肿瘤异质性以及其他原因。更好地理解该疾病的基因相关分子基础是实现 ESCC 患者的早期诊断从而改善预后的关键。

自噬是一种关键且复杂的稳态过程，参与多种生物学过程。在自噬过程中，会形成双层膜结构的囊泡，称为自噬体，它们吞噬细胞内的蛋白质和细胞器，并将其运输至溶酶体进行降解，从而实现细胞成分的基础更新以及能量和大分子前体的供应。自噬过程通常分为不同的阶段：启动、自噬体成核、自噬体膜的扩展和延伸、自噬体的闭合与溶酶体融合，以及最终囊泡内产物的降解，这些过程都涉及自噬相关基因，已知的几条调控关键细胞周期的信号通路与自噬有关^[5]。

自噬通常被认为是肿瘤中的双刃剑^[6]，并且根据肿瘤类型、临床分期、遗传背景或治疗方式的不同，自噬可能会产生相反的效果，即抑制或促进肿瘤的发展^[7]。例如，在癌前病变中，许多证据表明，自噬增强剂可能有助于预防癌症的发生^[8]。相反，在晚期癌症中，增强自噬和抑制自噬都被提出作为治疗策略^[9]。一般来说，自噬可以通过清除致癌蛋白底物、错误折叠的蛋白质和受损的细胞器来预防癌症的发生^[6]。然而，自噬也可以通过回收大分子和细胞器来满足肿瘤生长的需求^[10]。同时，自噬在癌症发展化疗耐药能力方面可能发挥潜在作用。研究表

明，对 BRAF 抑制剂维莫非尼耐药的黑色素瘤患者通过肿瘤的内质网应激反应表现出更高水平的自噬。此外，抑制自噬可以逆转在药物存在下持续培养的黑色素瘤细胞系对维莫非尼获得的耐药性^[11]。自噬途径中的许多步骤都是潜在的药物靶点，为正向和负向调节自噬提供了方法。一些研究结果表明，自噬抑制剂在肿瘤治疗中具有一定的潜力^[12-14]。尽管自噬已被发现在食管鳞状细胞癌中与化疗耐药相关^[15, 16]，但其在 ESCC 患者中的作用和临床价值尚未得到验证。因此，寻找以自噬为核心的分子生物标志物对于 ESCC 的预后预测和治疗具有重要意义。

在以往的研究中，利用机器学习构建癌症预后或诊断模型以及筛选分子标志物已成为一个研究热点。基于多组学数据，筛选与癌症患者生存相关的因素以构建稳健的预后或诊断预测模型、对患者进行分层以及验证模型，为发现分子靶点提供了重要依据，并可能取代传统的基于临床参数的模型，从而推动精准医疗的发展。例如，一项研究提出了一个基于代谢组的胃癌（GC）诊断和预后预测的机器学习模型。该研究对来自多中心参与者的 702 份血浆样本进行了靶向代谢组学分析，并通过 Lasso 和随机森林算法构建了一个基于 10 种代谢物的 10-metabolite GC 诊断模型。该模型在一个外部测试数据集中进行了验证，其灵敏度达到 0.905，优于传统的基于癌症蛋白标志物的方法（灵敏度<0.40）。此外，基于机器学习的预后模型表现优于传统的基于临床参数的模型，并能有效将患者分层至不同的风险组以指导精准干预。总体而言，该研究揭示了 GC 的代谢图谱，并分别识别出两种不同的生物标志物模型，分别用于早期检测和预后预测，从而促进了 GC 的精准医疗^[17]。

同样，许多研究基于自噬相关基因为其他癌症构建了稳健的预后风险模型，这在一定程度上解释了自噬与许多癌症的发生和发展之间的关系。例如，一项基于公共数据库中肺腺癌（LUAD）转录组数据的研究建立了一个由 CCR2、ITGB1 和 DRAM1 这三个自噬相关基因组成的风险模型，能够很好地预测 LUAD 的预后，体外实验表明，抑制 DRAM1 可以抑制 LUAD 细胞的增殖和迁移能力^[18]。然而，与国外相比，食管鳞状细胞癌（ESCC）在中国的影响力和侵袭性更强，且鲜有研究利用自噬相关基因构建 ESCC 的预后模型。因此，本研究基于自噬相关基因构建了 ESCC 的预后模型，以实现早期预测并推动 ESCC 的精准医疗。

二、材料与amp;方法

2.1 数据收集与预处理

2.1.1 数据收集

我们从 Human Autophagy Database (HADb, <http://www.autophagy.lu/index.html>) 中提取了 232 个自噬相关基因, 从 Molecular Signatures Database v7.1 (MSigDB) 的 GOBP_REGULATION_OF_AUTOPHAGY 基因集中提取了 358 个基因^[19], 从 Human Autophagy Moderator Database (HAMdb)^[20] 的自噬信息蛋白基因集中提取了 550 个基因, 从 ncRDeathDB 数据库^[21] 中提取了 587 个基因, 从 Autophagy Database^[22] 中提取了 742 个基因。经过整合后, 我们的自噬相关基因集最终包含 1357 个 ARGs。

食管鳞状细胞癌 (ESCC) 的 RNA-seq 数据以及患者的临床数据均从 Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 数据库和 The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://www.cancer.gov/tcga/>) 数据库中下载。本研究涉及八个已发表的数据集, 包括 TCGA-ESCC (n = 94)、GSE53625 (n = 358)^[23]、GSE53624 (n = 238)^[23]、GSE53622 (n = 120)^[23]、GSE78220 (n = 28)^[24]、GSE67501 (n = 11)^[25] 以及 IMvigor210 队列 (n = 310)^[26]。

2.1.2 RNA-seq 数据处理

对于由多个探针匹配的基因, 我们使用微阵列数据和 Bulk RNA-seq 数据中的基因平均表达水平。这些数据通过对数转换进行标准化。我们排除了生存时间少于一个月的样本数据, 以及缺乏结果状态或生存信息的样本, 有助于消除样本之间的技术差异, 确保数据的可比性, 并避免包含不完整的数据, 从而提高数据分析的准确性和可靠性。

我们使用 GSE53625 (ESCC 转录组数据) 数据集作为训练集训练模型, 并使用三个独立的外部验证集 (GSE53622、GSE53624 和 TCGA-ESCC) 以评估 ESCC 预后模型的准确性。此外, 为了评估模型对免疫治疗敏感性的预测能力, 我们纳入了免疫检查点抑制剂 (ICI) 临床研究的数据。这包括接受抗 PD-L1 治疗的转移性尿路上皮癌患者 (IMvigor210 队列)、接受抗 PD-1 治疗的黑色素瘤患者 (GSE78220) 以及接受抗 PD-L1 治疗的肾细胞癌患者 (GSE67501)。

2.2 基于自噬相关基因的预后模型构建

首先,我们使用 `limma` 软件包^[27]对 GSE53625 数据集中正常组织和肿瘤组织进行差异分析,筛选出 809 个差异表达基因 ($p < 0.05$ 且 $|\logFC| > 1$)。通过取自噬相关基因与差异表达基因的交集获得候选基因,候选基因用来构建 ESCC 的预后模型。接下来,我们使用 R 软件包“`survival`”^[28]进行单因素 Cox 回归分析,筛选出与 ESCC 患者总生存 (OS) 相关的基因 ($p < 0.05$)。随后,我们采用逐步多因素 Cox 回归模型,通过“`bidirectional`”逐步选择过程 (包括向后逐步剔除和向前逐步选择) 构建预后模型 ($p < 0.05$)。该分析通过“`MASS`”软件包^[29]中的“`stepAIC`”函数实现。我们将构建了一个包含自噬相关基因的模式,其计算公式为:

$$\text{Risk score} = \beta_1 \times \text{expr}(\text{Gene1}) + \beta_2 \times \text{expr}(\text{Gene2}) + \beta_3 \times \text{expr}(\text{Gene4}) + \dots$$

式中各系数为逐步多因素 Cox 回归的结果, $\text{expr}(\text{Gene})$ 为各候选基因的表达量。

2.3 候选基因及 4-ARGs 模型的验证

在计算每位患者的风险评分后,我们在 GSE53625 数据集中根据风险评分的中位数将患者划分为高风险组和低风险组。在验证集中,我们根据 R 软件包“`survminer`”^[30]中 `surv_cutpoint` 函数得到的最佳截断点,将患者分为高风险组和低风险组。利用 R 软件包“`survival`”中的 `survfit` 函数拟合高风险组和低风险组患者的 Kaplan-Meier (KM) 生存曲线,并通过 R 软件包“`survminer`”中的 `ggsurvplot` 函数绘制生存曲线图。为了评估预后模型的预测效果,我们使用 R 软件包“`timeROC`”^[31]构建了 1 年、2 年和 3 年的时间依赖性受试者工作特征 (ROC) 曲线,并计算曲线下面积 (AUC)。AUC 值越接近 1,预后模型的预测效果越好。

2.4 列线图的构建

结合临床因素,我们通过单变量和多因素 Cox 回归筛选出与 ESCC 患者总生存 (OS) 显著相关的独立预后因素 ($p < 0.05$)。利用 R 软件包“`rms`”^[32]整合这些独立预后因素,并构建了 1 年、2 年和 3 年的列线图及其对应的校准图。校准图通过校准和区分能力进行验证。将共线性的预期概率绘制为一个可观察指标,以评估列线图的对齐情况。校准曲线越接近参考线 (对角线),列线图的预测效果越好。

2.5 基因集富集分析

利用 R 软件包“`clusterProfiler`”^[33]中的 `enrichGO` 和 `enrichKEGG` 函数,我们对高风险组和低风险组的差异表达基因进行了一系列基因功能富集分析,包括 GO 和 KEGG 分析。我们使用 R 软件包“`enrichplot`” (v1.22.0) ^[34]可视化富集分析的结果。此外,我们还进行了基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA),

使用 KEGG (C2) 和 Hallmark gene sets (H) 基因集, 分析高风险组和低风险组之间的差异信号通路、生物学状态和过程。我们以 FDR 值 < 0.25 、nominal (NOM) $p < 0.05$ 和 $|NES| > 1$ 作为判断标准, 识别与模型基因高度相关的信号通路。

2.6 评估 4-ARGs 模型预测免疫检查点抑制剂反应的能力

肿瘤免疫功能障碍和排斥 (Tumor Immune Dysfunction and Exclusion, TIDE, <http://tide.dfci.harvard.edu/>) 是一个用于预测免疫检查点阻断 (ICB) 反应的网络工具^[35]。该数据库通过整合来自 188 个肿瘤队列的大规模组学数据、12 项已发表的 ICB 临床试验以及 8 项旨在发现调节淋巴细胞介导的癌症杀伤和抗癌免疫反应的 CRISPR 筛选所收集的生物标志物而建立。因此, TIDE 可以通过分析肿瘤的基因表达谱来预测患者对 ICB 的反应。

TIDE 评分的默认阈值为 0, 基于此区分应答者 (TIDE 评分 < 0) 和非应答者 (TIDE 评分 > 0)。此外, TIDE 算法还可以计算 TIDE 评分、Dysfunction 评分和 exclusion 评分。总 TIDE 评分是一个综合评分, 通过整合 Dysfunction 评分和 exclusion 评分来预测肿瘤对免疫检查点抑制剂的反应。较高的总 TIDE 评分通常表明治疗反应较差和预后更差。Dysfunction 评分通过分析基因表达数据来确定肿瘤中 T 细胞功能障碍的程度, 反映了肿瘤微环境中 T 细胞的活性和杀伤能力。exclusion 评分通过分析基因表达数据来评估肿瘤中是否存在免疫排斥, 反映了肿瘤微环境中免疫细胞的排斥程度^[36]。

此外, 我们利用三个独立的免疫治疗试验数据集 (IMvigor210、GSE78220、GSE67501), 研究了根据建立的预后模型所分的高风险组和低风险组之间免疫治疗疗效的差异。免疫治疗的可能结果包括: 完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、疾病进展 (PD) 和病情稳定 (SD)。

2.7 定量 RT-PCR 检测及临床数据验证

从 15 名患者中前瞻性地收集了原发性肿瘤和正常邻近组织的样本, 这些患者被诊断为食管鳞状细胞癌, 并在复旦大学附属肿瘤医院胸外科接受了手术切除。从样本中提取总 RNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳评估其完整性。随后, 使用 NanoDrop 分光光度计精确测量 RNA 浓度。

在 LightCycler 480 II 实时 PCR 系统 (Roche, Rotkreuz, Switzerland) 上, 使用 SGExcel FastSYBR Mix (B532955, Sangon) 进行 qRT-PCR 检测。以 GAPDH 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法量化 4 个候选基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 *NBEA*、*CLOCK*、*MAGEA3* 和 *NLRX1* 的引物序列

基因名称	引物	
	F	R
<i>NBEA</i>	5'-TATTGGCACTTTGCACCAGA-3'	5'-CGCTGATTCCCCATAATTTC-3'
<i>CLOCK</i>	5'-AGAACTTGGCATTGAAGAGTC TC-3'	5'-GTCAGACCCAGAATCTTGGCT-3'
<i>MAGEA3</i>	5'-CGCACCCCTTAGTTTCCACT-3'	5'-TGCTCATTCAACCATCCGTT-3'
<i>NLRX1</i>	5'-CGACCAGATGATCGTATCC-3'	5'-TGCGTCACTGAGGTGTTTCCTGCC-3'

2.8 泛癌分析

为测试 4-AGRs 模型和候选基因对其他癌症类型的预后价值，运用 R 包“TCGAplot”^[37]在 TCGA 中开展泛癌分析。使用“TCGAplot”分析并可视化 33 种癌症患者样本中候选基因的表达情况。同时，整合 TCGA 中的泛癌生存数据和表达数据，借助单因素 Cox 回归分析，探究总生存期（OS）与 4-AGRs 模型及候选基因之间的关系。利用 R 包“ggplot2”^[38]可视化所得的风险比（HR）和 p 值。

2.9 统计分析

所有统计分析均使用 R 软件（版本 4.3.2）完成。两组间的比较采用 Wilcoxon 检验或 t 检验进行，相关性矩阵通过 Spearman 或 Pearson 相关性检验进行评估。Kaplan-Meier（K-M）生存曲线用于评估生存差异，并通过 Log-rank 检验进行统计分析，其中 p 值小于 0.05 被认为具有统计学意义。

三、研究结果

3.1 食管鳞状细胞癌中的差异表达自噬相关基因

本研究的流程图如图 1A 所示。在从 MSigDB、HADb、HAMDb、ncRDeathDB 和自噬数据库中去重重复基因后，我们得到了包含 1357 个基因的自噬相关基因集。在 GSE53625 数据集中从正常和肿瘤样本之间进行差异分析，共鉴定出 3409 个差异表达基因 ($|\log\text{FoldChange}| > 1$ 且 $p < 0.05$)，其中包括 1985 个下调基因和 1424 个上调基因 (图 1B)。通过获得差异基因集与自噬基因集的交集，我们鉴定出 140 个差异表达的自噬相关基因 (图 1C)。

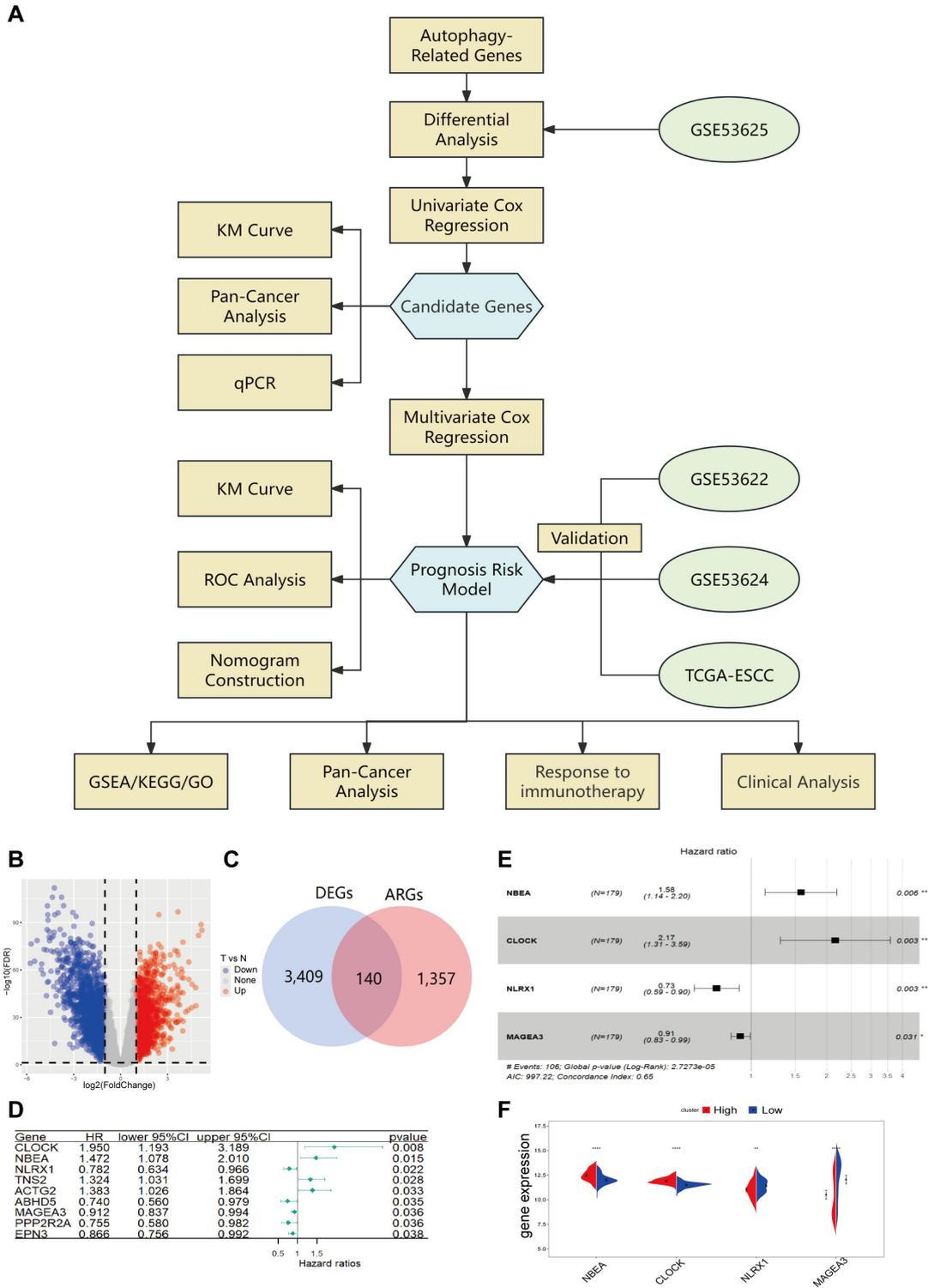


图 1. 本研究的流程图及预后模型的建立

(A) 本研究的流程图；(B) GSE53625 数据集中正常组织与肿瘤组织之间差异表达基因 (DEGs) 的火山图 (n=179)；(C) 自噬相关基因与差异基因的交集；(D) 单因素 Cox 回归分析结果鉴定出与总生存率相关的 9 个自噬相关基因；(E) 逐步多因素 Cox 回归分析结果鉴定出与总生存率相关的 4 个自噬相关基因；(F) GSE53625 中高风险组 (n=89) 和低风险组 (n=90) 中 4 个候选基因的表达水平 (Wilcox 检验, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ns, 无显著性差异)

3.2 基于自噬相关基因的预后模型构建

单因素 Cox 回归分析结果显示，有 9 个差异表达的自噬相关基因与总生存（OS）显著相关（ $p < 0.05$ ）（图 1D）。进一步，我们利用逐步多因素 Cox 回归分析筛选和构建风险模型（图 1E）。最终模型包含 4 个差异表达的自噬相关基因，即 *NBEA*、*CLOCK*、*NLRX1* 和 *MAGEA3*。4-ARGs 模型公式如下：

$$\text{Risk score} = 0.45902 \times \text{expr}(\textit{NBEA}) + 0.77386 \times \text{expr}(\textit{CLOCK}) - 0.31304 \times \text{expr}(\textit{NLRX1}) - 0.09516 \times \text{expr}(\textit{MAGEA3})$$

通过 4-ARGs 模型计算了 ESCC 患者的风险评分。基于风险评分的中位数，ESCC 患者被划分为高风险组（ $n=89$ ）和低风险组（ $n=90$ ）。在该模型中，根据系数的正负，*NBEA* 和 *CLOCK* 被鉴定为风险因素，而 *NLRX1* 和 *MAGEA3* 被鉴定为保护因素。结果显示，高风险组和低风险组中四个候选基因的表达存在显著差异（图 1F），且其趋势与它们对风险评分的贡献相对应。

在 GSE53625 数据集中，4-ARGs 模型能够很好地预测患者的预后。Kaplan-Meier（KM）曲线显示，与低风险组患者相比，高风险组患者的预后更差（Log-rank 检验， $P < 0.0001$ ）。GSE53625 患者风险评分的分布也同样展示在图 3A 中。此外，1 年、2 年和 3 年的 AUC 值分别为 0.72、0.68 和 0.67，表明该模型的预测能力非常优异（图 3E）。对于四个候选基因，KM 曲线也显示它们能够很好地预测 GSE53625 患者的预后（图 2A）。

3.3 候选基因及 4-ARGs 模型的验证

为了验证候选基因和 4-ARGs 模型在外部独立数据集中的预测能力，我们使用了 GSE53622、GSE53624 和 TCGA-ESCC 作为验证集。

KM 曲线显示，在三个验证集中，高风险组的预后情况显著差于低风险组（Log-rank 检验， $P < 0.05$ ），这表明 4-ARGs 模型在预测患者预后方面表现优异。三个验证集中患者的风险评分分布也在图 3B-D 中展示。此外，1 年、2 年和 3 年预测的 AUC 值均大于 0.6，部分接近 0.7，进一步证实了模型的稳健性（图 3E）。

同时，四个候选基因在三个验证集中也表现出良好的预测性能，进一步证明了 4-ARGs 模型的稳健性（图 2B-D）。

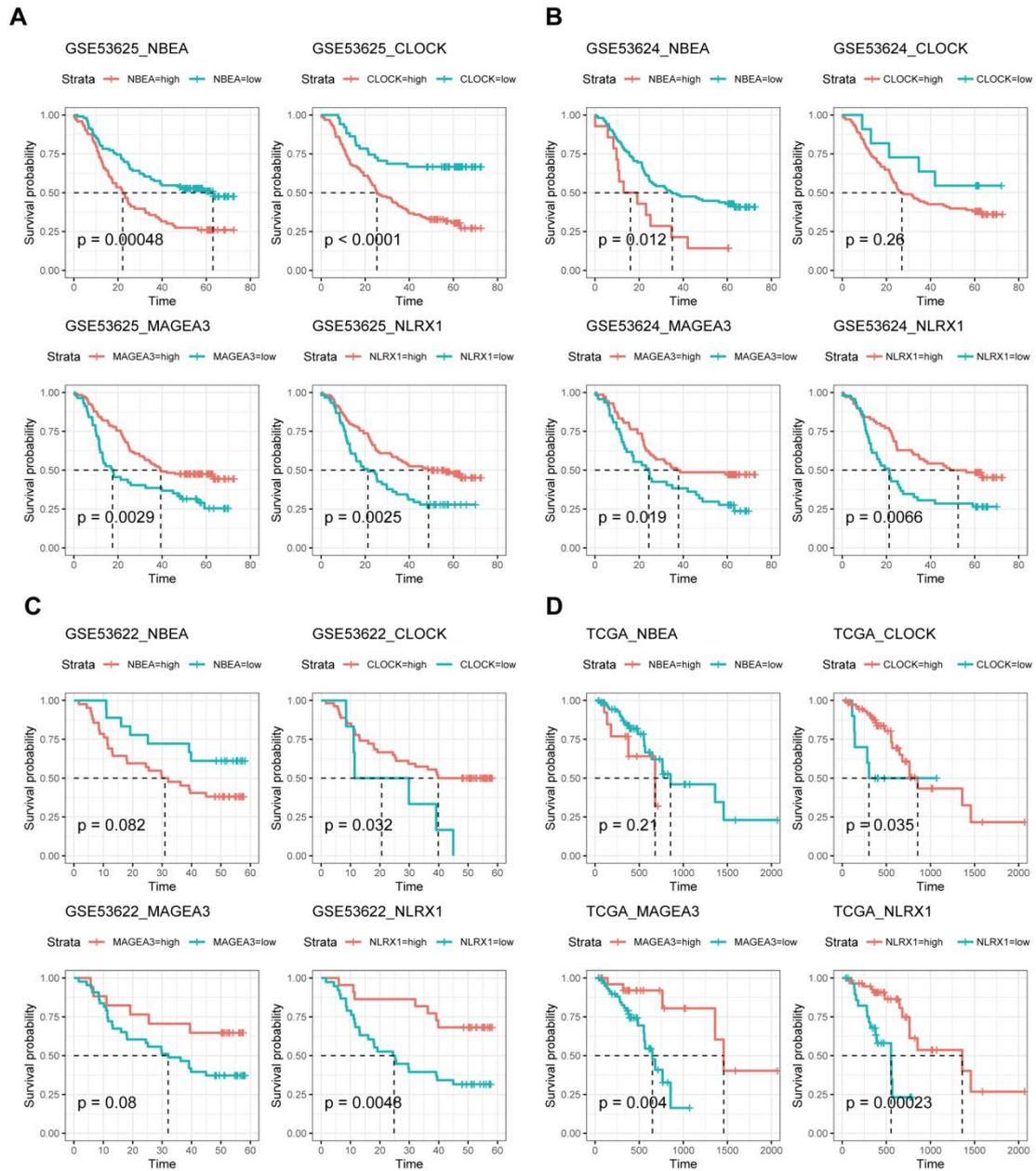


图2. 基于四个候选基因表达水平将患者分为高表达组和低表达组的KM曲线在 GSE53625 (n=358) (A)、GSE53624 (n=238) (B)、GSE53622 (n=120) (C)、TCGA-ESCC (n=94) (D) 四个数据集中的生存曲线

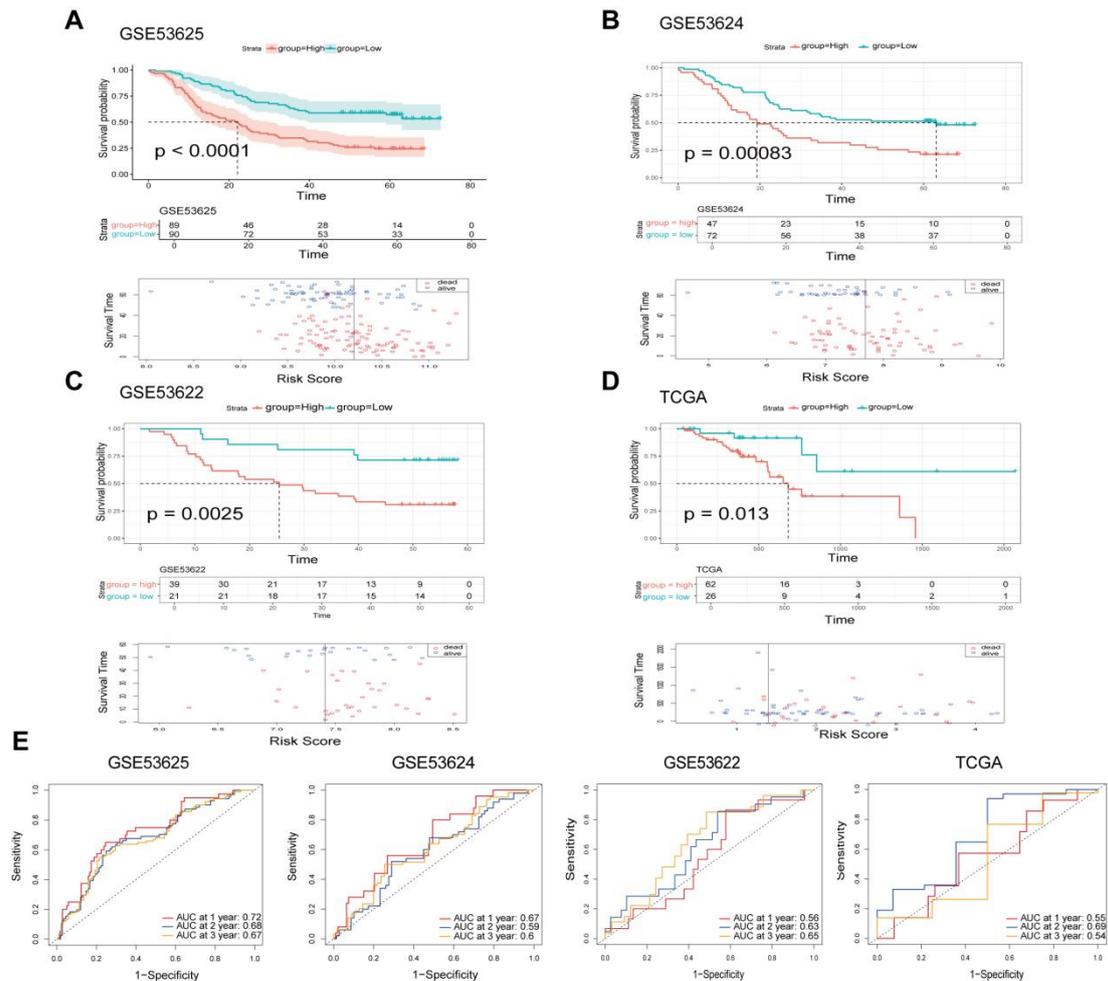


图 3. 4-ARGs 模型的验证

GSE53625(n=179)(A)、GSE53624(n=119)(B)、GSE53622(n=60)(C)、TCGA-ESCC (n=94) (D) 中高风险组和低风险组 ESCC 患者的 Kaplan-Meier 生存分析及散点图; (E) 训练数据集(GSE53625)和验证数据集(GSE53624、GSE53622、TCGA-ESCC) 中 ESCC 患者的时间依赖性 ROC 曲线

3.4 独立临床预后因素的识别与列线图的构建

为了鉴定食管鳞状细胞癌 (ESCC) 的独立临床预后因素, 我们通过多因素 Cox 回归分析整合了临床特征和 4-ARGs 模型。多因素 Cox 回归分析显示, 年龄、肿瘤位置和 4-ARGs 模型等因素与 OS 显著相关, 是独立预后因素。同时, 尽管 TNM 分期的 p 值大于 0.05 ($p=0.059$), 但它仍然是一个重要的预后因素(图 4A)。ROC 曲线和 AUC 值表明, 4-ARG 模型是预测的最佳独立预后因素(图 4B)。为了给 ESCC 患者的生存预测提供一种更直观和准确的方法, 以辅助个体化临床决策, 我们基于多因素 Cox 回归分析的结果, 并整合年龄、肿瘤位置和 TNM 分期等因素, 构建了列线图(图 4C)。

根据列线图中每个因素对患者临床预后的影响程度，我们计算了每个独立预后因素的评分，然后将评分相加得到总分。最后，使用列线图得到的总分来预测 ESCC 患者 1 年、2 年和 3 年的总生存率（OS）。1 年、2 年和 3 年列线图的校准曲线均接近最佳预测曲线，反应预测的生存率与实际值较为接近（图 4D）。

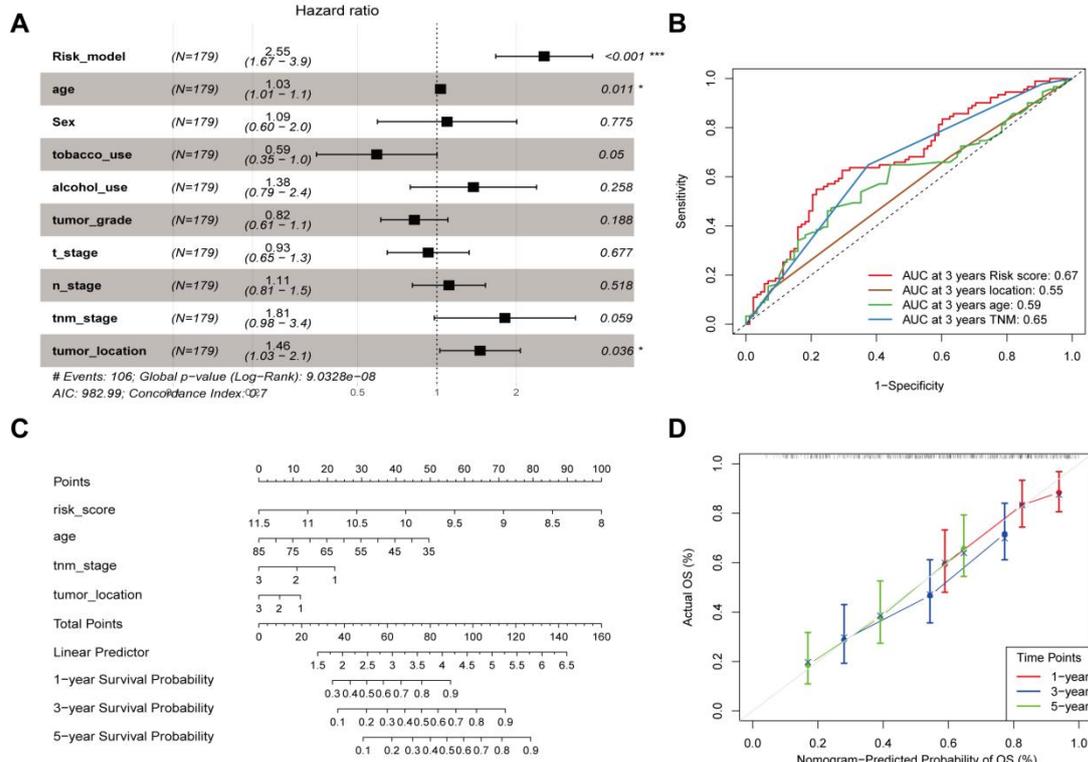


图 4. 独立临床预后因素的识别与列线图的构建

(A) 基于风险评分和临床因素的多因素 Cox 回归分析的森林图 (GSE53625, n=179); (B) 风险评分和独立临床预后因素的 ROC 曲线; (C) 结合临床因素和风险评分构建的列线图。(D) 列线图预测 1 年、2 年和 3 年总生存率 (OS) 的校准曲线

3.5 高风险组和低风险组富集的通路差异分析

通过对高低风险组之间进行差异分析，我们在 GSE53625 数据集中识别出 846 个差异基因，其中 309 个被归类为上调基因，537 个为下调基因 ($p < 0.05$, $|\log_{2}FC| > 1$)。为了探索差异基因在 ESCC 的发生发展中的生物学功能，我们在 GSE53625 数据集中进行了 GSEA、KEGG 和 GO 富集分析 (图 5A-E)。

GSEA 结果显示，包括“碱基切除修复”、“ATP 依赖性染色质重塑”、“范可尼贫血途径”、“细胞周期”和“DNA 复制”在内的多个肿瘤相关信号通路在高风险组中显著上调 (图 5A)。KEGG 分析表明，上调的差异基因显著富集在“细胞周期”、“TGF-beta 信号通路”和“DNA 复制”等肿瘤相关信号通路中 (图 5B)。相反，下

调的差异基因在肿瘤相关通路“癌症中的中心碳代谢”中表现出显著富集（图 5C）。此外，GO 分析结果也显示差异基因与肿瘤相关信号通路有关。上调的差异基因富集在“双链断裂修复”、“DNA 复制”和“细胞周期检查点信号”中，这些过程对肿瘤生物学至关重要（图 5D）。

值得注意的是，GSEA 结果显示“药物代谢-细胞色素 P450”和“外源物质的细胞色素 P450 代谢”通路下调。细胞色素 P450（CYPs）是一个血红蛋白超家族，广泛存在于生物进化谱系中，并催化许多内源性底物和外源物质的 I 相生物转化。这些酶占美国常用处方药物生物转化的约 60%^[39]。许多不同的细胞毒性药物通过 CYP 的作用被灭活，而一些前药则通过 CYP 的作用被激活，使其具有细胞毒性并有效用于癌症化疗^[40]。然而，由于定量和采样技术的差异以及患者群体的异质性，在一些情况下，数据存在冲突，难以得出 CYP 导致抗癌药物失活或前药激活的结论^[41]。基于此，在 4-ARGs 模型中，可以推断高风险组的患者通过下调 CYP450 药物代谢途径影响抗癌药物的疗效，进而影响患者的总生存率。

有趣的是，先前的研究表明自噬与细胞色素 P450 药物代谢途径之间可能存在联系。研究发现，细胞色素 P450（CYP）抑制剂 SKF-525A 在原代大鼠肝细胞中导致 LC3-II 显著积累，表明自噬被破坏。SKF-525A 还可以增加 p62 蛋白的水平，并阻断自噬体与溶酶体的融合，这进一步支持了自噬流被阻断的观点^[42]。

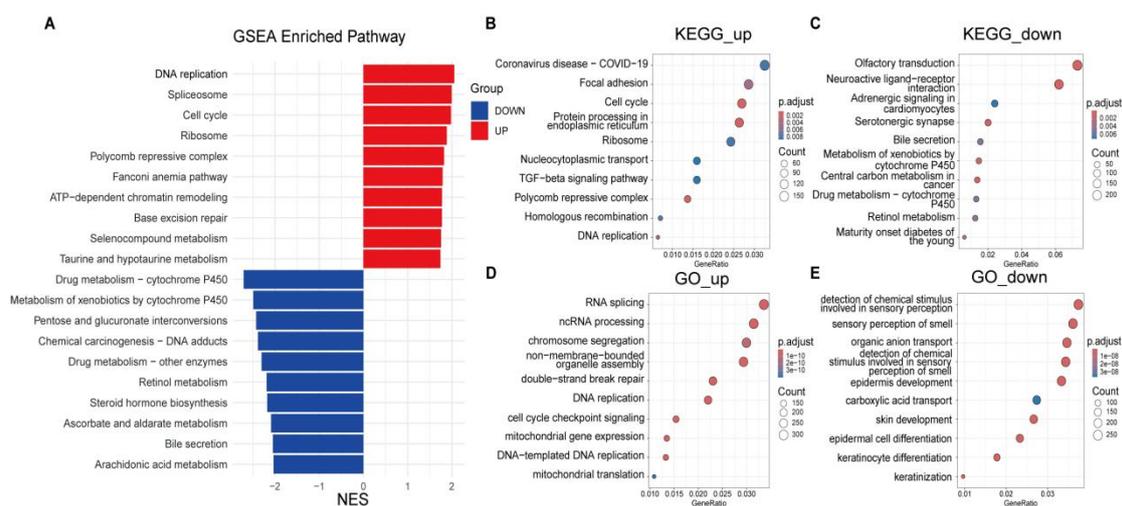


图 5. 基于 4-ARGs 模型的通路富集分析（GSE53625, n=179）

（A）上调和下调基因的基因集富集分析（B）上调基因的 KEGG 气泡图（C）下调基因的 KEGG 气泡图（D）上调基因的 GO 气泡图（E）下调基因的 GO 气泡图

3.6 由 4-ARGs 模型定义的高风险组和低风险组的免疫治疗反应

近年来，免疫治疗取得了巨大的进展和成就。我们应用 Tumor Immune Dysfunction and Exclusion (TIDE) 算法来预测训练集中患者 (GSE53625) 对免疫检查点抑制剂 (Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs) 的反应。通过 TIDE 算法，我们获得了 TIDE 评分、Dysfunction 评分、Exclusion 评分和 MSI 评分。TIDE 算法能够区分应答者 (TIDE 评分 < 0) 和非应答者 (TIDE 评分 > 0) (图 6A)。结果显示，低风险组的应答者比例高于高风险组 (图 6B)，Pearson 相关性分析同样显示风险评分与 TIDE 评分呈正相关，这意味着低风险评分的患者比高风险评分的患者更有可能对 ICIs 产生反应 (图 6C)。图 6D 显示，高风险组的 TIDE 评分和 Exclusion 评分高于低风险组，表明高风险组患者具有更强的免疫逃逸能力，对免疫检查点抑制剂治疗的疗效较差。

我们基于 GSE78220 和 IMvigor210 数据集验证了 4-ARGs 模型预测患者对 ICIs 反应的能力。在这些数据集中，我们识别出对 PD-L1 受体阻断剂的不同反应程度，包括部分缓解 (Partial Response, PR)、完全缓解 (Complete Response, CR)、疾病进展 (Progressive Disease, PD) 和病情稳定 (Stable Disease, SD)。在两个数据集中，高风险组中 PD/SD 的比例更高，表明高风险组中有更大比例的患者对免疫治疗的反应较差 (图 6F-I)，并且在 IMvigor210 数据集中，高风险组患者的预后比低风险组更差 (图 6E)。

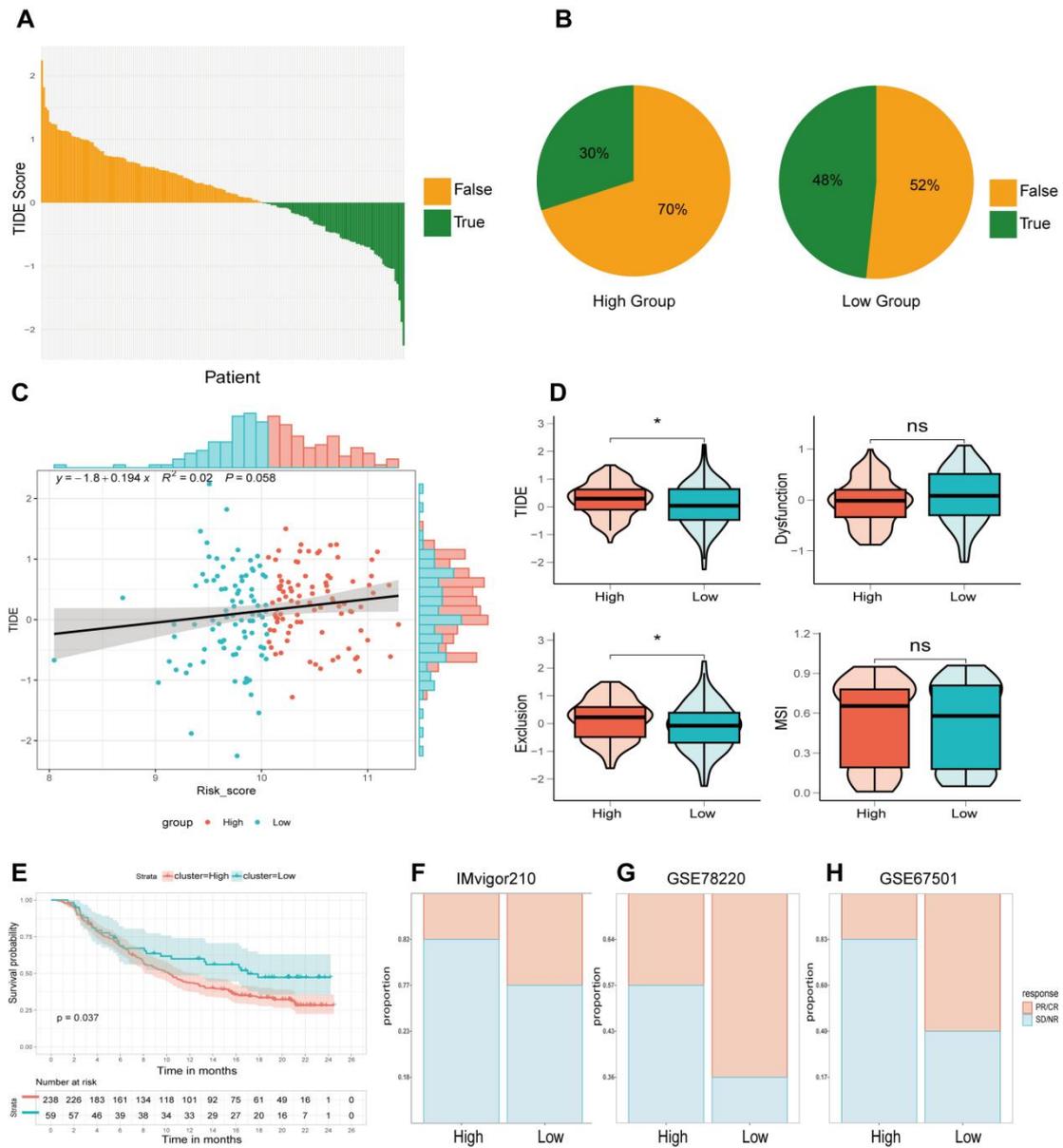


图 6. 基于 4-ARGs 模型的免疫治疗反应预测

(A) 肿瘤免疫功能障碍和排斥 (TIDE) 分析显示了 GSE53625 ($n = 179$) 中对免疫检查点抑制剂 (ICIs) 的应答者和非应答者的分布; (B) 低风险组与高风险组之间对 ICIs 应答者的百分比比较 (C) 风险评分与 TIDE 评分之间的线性回归; (D) 高风险组和低风险组之间 TIDE 评分、Exclusion 评分、Dysfunction 评分和 MSI 评分的比较; (E) IMvigor210 数据集 ($n=310$) 中高风险组和低风险组患者的 KM 曲线; (F) IMvigor210 数据集 ($n = 137$) 中高风险组和低风险组对 PD-L1 治疗的反应比较, GSE78220 ($n = 28$) 和 GSE67501 ($n=11$)

3.7 ESCC 患者中候选基因的验证及临床数据分析

为了进一步验证候选基因和 4-ARGs 模型的预后价值, 我们在 ESCC 患者中对四个候选基因进行了 qPCR 验证。结果显示, *NBEA* 和 *NLRX1* 在正常组织中的表达显著高于肿瘤组织, 而 *MAGEA3* 在正常组织中的表达显著低于肿瘤组织(图

7A-D)。这些发现与我们在四个数据集中发现的结果一致，表明这些基因可能作为 ESCC 的潜在治疗靶点（图 7E）。

此外，我们从 14 个患者样本中获得了临床生存数据。根据 *NLRX1* 的表达水平将患者分为高风险组和低风险组时，高风险组的无病生存率（DFS）显著高于低风险组，这进一步验证了 *NLRX1* 作为 ESCC 生物标志物的潜在价值（图 7F）。其余候选基因的 KM 曲线见图 8。

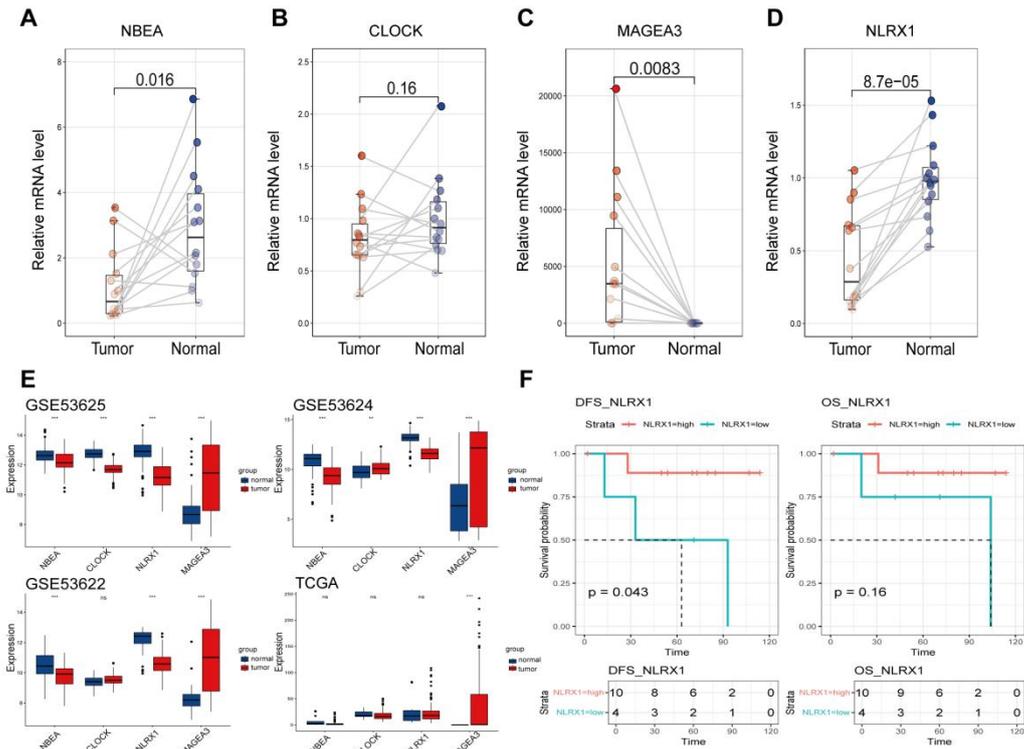


图 7. ESCC 患者中候选基因的验证及临床数据分析

(A-D) 四个候选基因在患者正常食管组织和 ESCC 组织中的表达（配对 t 检验）；(E) 在 GSE53625 (n=179)、GSE53624 (n=119)、GSE53622 (n=60) 和 TCGA-ESCC (n=94) 中，四个候选基因在正常组织和肿瘤组织之间的表达；(F) 根据 *NLRX1* 表达水平分为两组的 KM 曲线

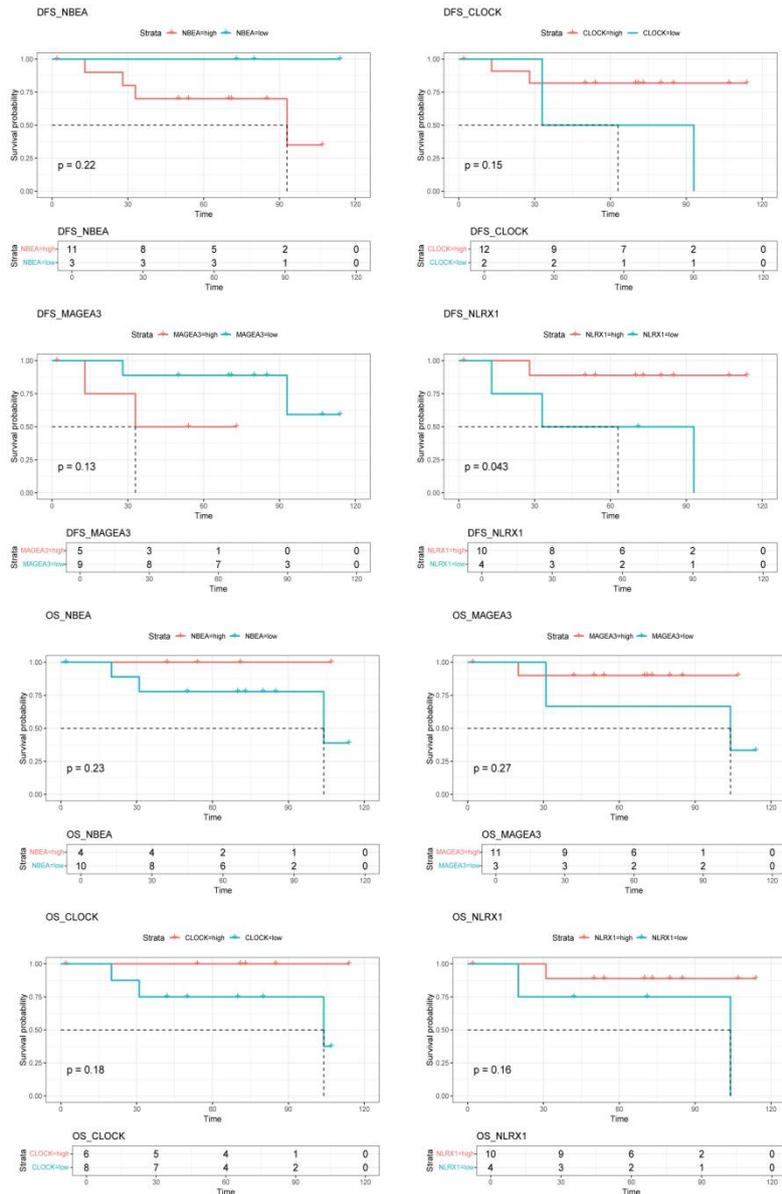


图 8. 根据从 14 名 ESCC 患者收集的样本中四个候选基因的表达水平，将患者分为高表达组和低表达组的 KM 曲线

3.8 4-ARGs 模型和候选基因在泛癌中的预后价值

为探究 4-ARGs 模型和候选基因在多种癌症中的预后价值，我们分析了来自 TCGA 数据库的不同肿瘤患者的总生存期 (OS) 与风险评分以及候选基因表达之间的相关性。随后，我们构建了一个生存热图。如图 9A 展示了基于单因素 Cox 回归的风险比 (HR) 和 KM 曲线的 p 值构成的热图。风险评分在大多数癌症类型中是一个保护因素，风险评分越高，预后越好。这些癌症包括多形性胶质母细胞瘤 (GBM)、胰腺腺癌 (PAAD)、急性髓系白血病 (LAML)、睾丸生殖细胞肿瘤 (TGCT)、直肠腺癌 (READ)、结肠腺癌 (COAD)、食管癌 (ESCA)、子宫癌肉瘤 (UCS) 和肾透明细胞癌 (KIRC)。在候选基因中，NBEA 在胸腺瘤

(THYM)、PAAD、TGCT、间皮瘤 (MESO)、ESCA、UCS 和 KIRC 等癌症中起到保护基因的作用。而 *CLOCK* 在嗜铬细胞瘤(PCPG)、皮肤黑色素瘤(SKCM)、脑低级别胶质瘤 (LGG)、甲状腺癌 (THCA)、乳腺浸润性癌 (BRCA) 和葡萄膜黑色素瘤(UVM)等癌症中表现为风险因素。同时 *CLOCK* 也在 LAML、READ、UCS、MESO、UCS 和 KIRC 中起到保护作用。值得注意的是，在 KIRC 患者中，风险评分和所有四个候选基因与总生存期 (OS) 均显示出显著相关性，期中风险评分以及 *NBEA*、*CLOCK* 和 *NLRX1* 被确定为保护因素，而 *MAGEA3* 则表现为风险因素。

此外，我们还检查了四种候选基因在多种癌症的正常组织和肿瘤组织中的表达情况。结果表明，在多种癌症类型中，这四个基因在正常组织和肿瘤组织中的表达存在显著差异 (图 9B-E)。总体而言，这些发现表明 4-AGRs 模型和候选基因在多种癌症中具有稳健的预后价值。

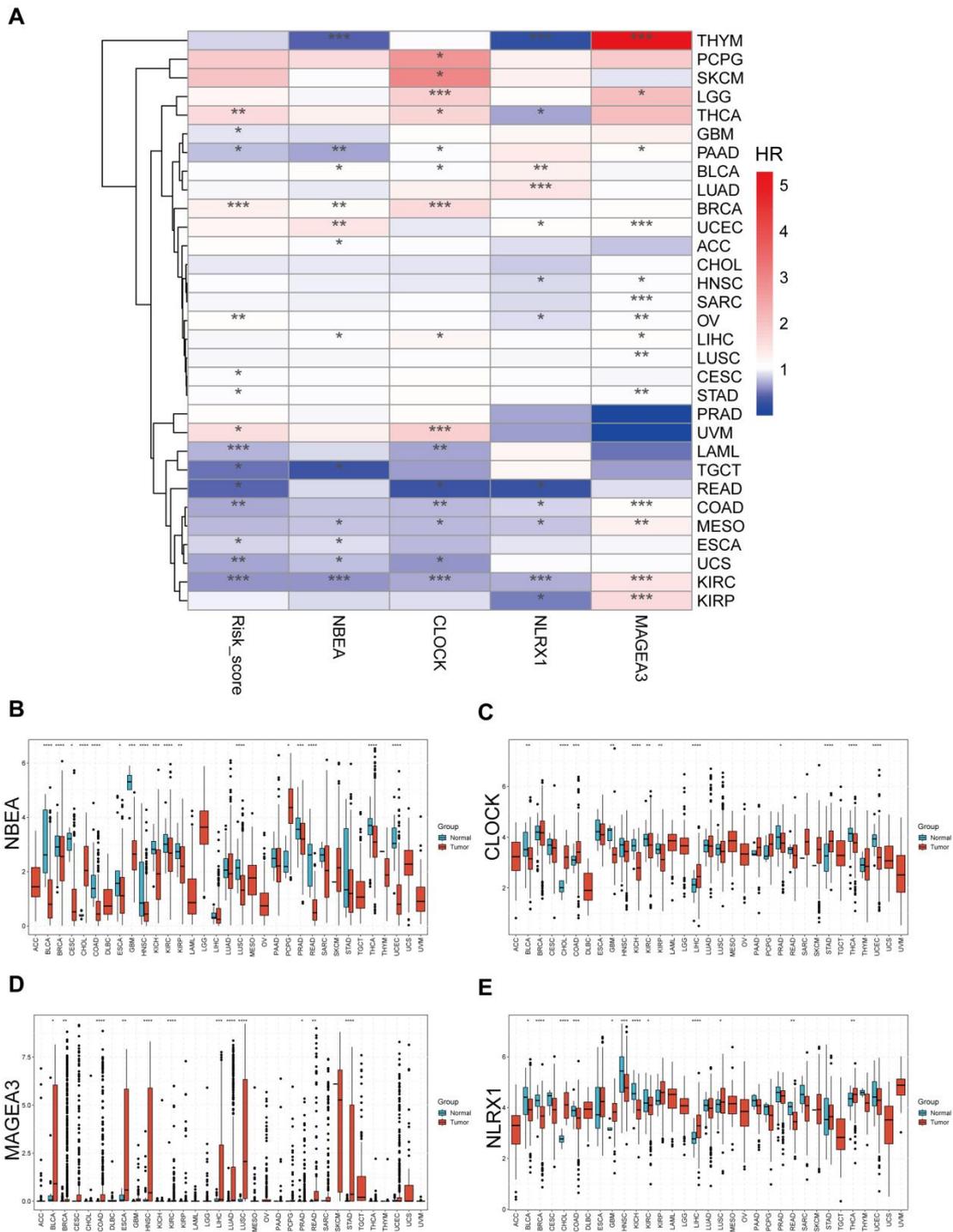


图 9. 4-AGRs 模型和候选基因在泛癌中的预后价值

(A) OS 热图, 展示基于风险评分和候选基因表达的单变量 Cox 回归风险比(HR)以及 KM 曲线的 p 值 (移除了 HR>5 的癌症); (B-E) 候选基因在泛癌正常组织和肿瘤组织中的表达比较

四、讨 论

自噬通过多种途径影响 ESCC 的发生发展。一些研究表明, Drp1 过表达和 TFAM 蛋白减少会诱导 mtDNA 应激, 随后激活 cGAS-STING 通路, 触发自噬并促进 ESCC 的进展^[43, 44]。此外, 有研究证明, 丝裂原活化蛋白激酶 TAOK3 通过增强 IRGM 介导的自噬, 促进 ESCC 的进展和顺铂耐药^[45]。还有报道称, 丁酸亚家族 3 成员 A1 (BTN3A1) 通过调节 ULK1 介导的自噬, 在食管鳞状细胞癌中促进肿瘤进展和放疗耐受^[46]。然而, 这些结果距离临床应用还很遥远。近年来, 高通量技术的应用以及大规模癌症基因表达数据库的出现, 加深了我们对 ESCC 的理解, 并为预测患者生存提供了可能性。因此, 筛选基因预测模型和稳定特异的预后标志物是 ESCC 临床转化研究的研究热点之一。

在本研究中, 我们基于训练集 GSE53625 中的转录组数据, 鉴定出 *NBEA*、*CLOCK*、*NLRX1* 和 *MAGEA3* 这四个自噬相关基因作为 ESCC 的预后因素, 并建立了名为 4-ARGs 模型的预后风险模型。我们在三个独立的外部验证集 (GSE53622、GSE53624 和 TCGA-ESCC) 中验证了候选基因和 4-ARGs 模型的预后价值。结果表明, 4-ARGs 模型能够有效区分预后存在差异的 ESCC 患者, 通过一系列验证分析验证其是一个显著且稳健的预后因素。同时, 我们在收集的 ESCC 患者临床样本中观察到候选基因在肿瘤组织和正常组织之间的差异表达, 结合患者生存信息, *NLRX1* 被验证是一个稳健的预后因素。此外, 基因通路富集分析显示, 自噬和 ESCC 相关基因影响“范可尼贫血途径”、“细胞周期”和“DNA 复制”等肿瘤相关通路, 同时下调“药物代谢-细胞色素 P450”和“外源物质的细胞色素 P450 代谢”通路, 从而降低 ESCC 患者的生存率。我们还鉴定了独立的临床预后因素以构建列线图。TIDE 算法的分析结果说明 4-ARGs 模型对患者免疫治疗反应的具有良好的预测能力。最后我的研究扩展发现 4-ARGs 模型和四个候选基因在泛癌中也有着优异的预后预测能力。

候选基因与自噬密切相关。许多调节巨自噬的自噬基因已被证明在心脏中以昼夜节律依赖的方式受到调节, 而昼夜节律时钟的分子范式包括昼夜节律运动输出周期 *kaput* (*CLOCK*) 基因^[47]。同时, 有研究表明, 在缺血应激期间, 心肌细胞中的昼夜节律 *CLOCK* 基因调节线粒体自噬和细胞存活^[48]。一些研究表明, 黑

色素瘤相关抗原 A3 (*MAGEA3*) 通过降解 5' -腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 抑制自噬, 且患者肿瘤中的自噬水平与 *MAGE* 表达呈负相关^[49]。核苷酸结合和寡聚化结构域样受体 X1 (*NLRX1*) 在线粒体自噬中起着关键作用。在病毒感染期间, *NLRX1* 通过结合线粒体基质蛋白 Tu 翻译延伸因子 (TUFM), 抑制 MEFs 中 RIG-I 诱导的 IFN-1 信号传导, 并增强线粒体自噬^[50]。此外, 在用顺铂处理的 HEI-OC1 听觉细胞的研究中, *NLRX1* 过表达增强了 ROS/JNK 信号, 并同时增加了自噬水平, 导致细胞损伤或死亡, 而抑制 ROS 的产生显著抑制了顺铂处理激活的自噬^[51]。

这四个候选基因与 ESCC 的发生发展直接或间接相关, 已在许多研究中被证实。为了为该模型提供理论支持, 我们讨论了候选基因作为稳定、ESCC 特异性预后标志物的可能性。以下研究支持候选基因与 ESCC 之间的关联。

核苷酸结合和寡聚化结构域 (NOD) 样受体 (NLR) 最初作为细胞质病原体识别受体 (PRR) 进入公众视野, 在先天免疫中发挥重要作用, *NLRX1* 是目前唯一已知位于线粒体的 NLR, 其机制被认为与其特殊的 N 端结构域有关, 它建立了线粒体功能与疾病病理生理学之间的新联系^[52]。最近的一项研究通过生物信息学方法表明, 与正常邻近组织相比, *NLRX1* 在 ESCC 中低表达, 且低表达 *NLRX1* 的患者生存时间更短, *NLRX1* 在 ESCC 中负向调节 PI3K/AKT 信号通路。结果表明, *NLRX1* 是 ESCC 的独立保护性预后因素, 并与肿瘤分级相关, 这与我们的研究结果一致^[53]。*MAGEA3* 是癌胚抗原 (CTA) 家族的成员, 在多种癌症类型中异常表达。*MAGEA3* 已被广泛研究用于癌症免疫治疗。其功能和免疫学方面的最新进展值得深入研究出有效的治疗方法^[54]。几项研究表明, *MAGEA3* 作为 ESCC 预后预测的独立保护因素^[55, 56]。一些研究鉴定了具有潜在诊断价值的抗 *MAGEA* 自身抗体, 包括 *MAGEA3*-IgG 和 *MAGEA3*-IgM^[57]。此外, 有研究报道, 通过上调 *MAGEA3* 表达, Decitabine 增强 T 细胞对食管癌的认识^[58], 这表明 *MAGEA3* 有潜力增强 T 细胞对肿瘤的认识, 从而抑制肿瘤的发展和进展。因此, 它有望成为 ESCC 的保护因素。尽管没有研究直接报告 *NBEA* 和 *CLOCK* 与 ESCC 的关联, 但 *NBEA* 和 *CLOCK* 均与多种肿瘤的发生和发展相关^[59-63]。

尽管有令人兴奋的发现, 但本研究也存在一些局限性。首先, 数据来源相对有限的公共数据库, 不足以证明模型的普遍性。其次, 需要进一步研究来验证自

噬相关基因预后标志物的生物学机制和临床应用。未来的研究将纳入更多数据集，整合更多的临床和病理指标，并进行更多的生物学实验以揭示这些基因的作用机制。这将为 ESCC 的治疗和分子靶点的开发提供坚实的研究基础。

参考文献

- [1] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma [J]. *Lancet*, 2013, 381(9864): 400-12.
- [2] 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.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [4] HSU P K, CHEN H S, WANG B Y, et al. Hospital type- and volume-outcome relationships in esophageal cancer patients receiving non-surgical treatments [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(4): 1234-42.
- [5] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-42.
- [6] LIU Y, WU L, AO H, et al. Prognostic implications of autophagy-associated gene signatures in non-small cell lung cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 11440-62.
- [7] WHITE E. The role for autophagy in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 42-6.
- [8] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SAN PEDRO J M, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. *Embo j*, 2015, 34(7): 856-80.
- [9] LEVY J M, THORBURN A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1): 130-41.
- [10] GUO J Y, WHITE E. Autophagy, Metabolism, and Cancer [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2016, 81: 73-8.
- [11] MA X H, PIAO S F, DEY S, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1406-17.
- [12] MAHALINGAM D, MITA M, SARANTOPOULOS J, et al. Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors [J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1403-14.
- [13] RANGWALA R, LEONE R, CHANG Y C, et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma [J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1369-79.
- [14] VOGL D T, STADTMAUER E A, TAN K S, et al. Combined autophagy and proteasome inhibition: a phase I trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma [J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1380-90.
- [15] KIJIMA T, NAKAGAWA H, SHIMONOSONO M, et al. Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal

- Squamous Cell Carcinoma Cells [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(1): 73-91.
- [16] SAXENA R, KLOCHKOVA A, MURRAY M G, et al. Roles for Autophagy in Esophageal Carcinogenesis: Implications for Improving Patient Outcomes [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11).
- [17] CHEN Y, WANG B, ZHAO Y, et al. Metabolomic machine learning predictor for diagnosis and prognosis of gastric cancer [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1657.
- [18] LI X, DAI Z, WU X, et al. The Comprehensive Analysis Identified an Autophagy Signature for the Prognosis and the Immunotherapy Efficiency Prediction in Lung Adenocarcinoma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 749241.
- [19] LIBERZON A, SUBRAMANIAN A, PINCHBACK R, et al. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0 [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(12): 1739-40.
- [20] WANG N N, DONG J, ZHANG L, et al. HAMdb: a database of human autophagy modulators with specific pathway and disease information [J]. *J Cheminform*, 2018, 10(1): 34.
- [21] WU D, HUANG Y, KANG J, et al. ncRDeathDB: A comprehensive bioinformatics resource for deciphering network organization of the ncRNA-mediated cell death system [J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1917-26.
- [22] HOMMA K, SUZUKI K, SUGAWARA H. The Autophagy Database: an all-inclusive information resource on autophagy that provides nourishment for research [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D986-90.
- [23] LI J, CHEN Z, TIAN L, et al. LncRNA profile study reveals a three-lncRNA signature associated with the survival of patients with oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Gut*, 2014, 63(11): 1700-10.
- [24] HUGO W, ZARETSKY J M, SUN L, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 35-44.
- [25] ASCIERTO M L, MCMILLER T L, BERGER A E, et al. The Intratumoral Balance between Metabolic and Immunologic Gene Expression Is Associated with Anti-PD-1 Response in Patients with Renal Cell Carcinoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(9): 726-33.
- [26] NECCHI A, JOSEPH R W, LORIOT Y, et al. Atezolizumab in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: post-progression outcomes from the phase II IMvigor210 study [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(12): 3044-50.
- [27] RITCHIE M E, 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.
- [28] GRAMBSCH T M T A P M. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model [M]. Springer, 2000.
- [29] KEMP F. Modern Applied Statistics with S [J]. *Journal of the Royal Statistical Society Series D: The Statistician*, 2003, 52(4): 704-5.

- [30] KASSAMBARA A, KOSINSKI M, BIECEK P. Drawing Survival Curves using 'ggplot2' [R package survminer version 0.4.8], F, 2020 [C].
- [31] BLANCHE P, DARTIGUES J F, 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): 5381-97.
- [32] HARRELL F E J. *rms: Regression Modeling Strategies* [M]. 2025.
- [33] 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): 284-7.
- [34] GUANGCHUANG YU. enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result [Z]. 2024.10.18129/B9.bioc.enrichplot
- [35] JIANG P, GU S, PAN D, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1550-8.
- [36] FU J, LI K, ZHANG W, et al. Large-scale public data reuse to model immunotherapy response and resistance [J]. *Genome Med*, 2020, 12(1): 21.
- [37] LIAO C, WANG X. TCGAplot: an R package for integrative pan-cancer analysis and visualization of TCGA multi-omics data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24(1): 483.
- [38] WICKHAM H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* [M]. Springer-Verlag New York, 2016.
- [39] VENKATAKRISHNAN K, VON MOLTKE L L, GREENBLATT D J. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models [J]. *J Clin Pharmacol*, 2001, 41(11): 1149-79.
- [40] MCFADYEN M C, MELVIN W T, MURRAY G I. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3): 363-71.
- [41] RODRIGUEZ-ANTONA C, INGELMAN-SUNDBERG M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25(11): 1679-91.
- [42] LUO Y, YANG X, SHI Q. The cytochrome P450 inhibitor SKF-525A disrupts autophagy in primary rat hepatocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 255: 55-62.
- [43] LI Y, CHEN H, YANG Q, et al. Increased Drp1 promotes autophagy and ESCC progression by mtDNA stress mediated cGAS-STING pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 76.
- [44] LI Y, YANG Q, CHEN H, et al. TFAM downregulation promotes autophagy and ESCC survival through mtDNA stress-mediated STING pathway [J]. *Oncogene*, 2022, 41(30): 3735-46.
- [45] SUN M, LI Z, WANG X, et al. TAOK3 Facilitates Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression and Cisplatin Resistance Through Augmenting Autophagy Mediated by IRGM [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(29): e2300864.
- [46] YANG W, CHENG B, CHEN P, et al. BTN3A1 promotes tumor progression and radiation resistance in esophageal squamous cell carcinoma by regulating ULK1-mediated autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 984.

- [47] RABINOVICH-NIKITIN I, KIRSHENBAUM E, KIRSHENBAUM L A. Autophagy, Clock Genes, and Cardiovascular Disease [J]. *Can J Cardiol*, 2023, 39(12): 1772-80.
- [48] RABINOVICH-NIKITIN I, RASOULI M, REITZ C J, et al. Mitochondrial autophagy and cell survival is regulated by the circadian Clock gene in cardiac myocytes during ischemic stress [J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3794-812.
- [49] RAVICHANDRAN R, KODALI K, PENG J, et al. Regulation of MAGE-A3/6 by the CRL4-DCAF12 ubiquitin ligase and nutrient availability [J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(7): e47352.
- [50] LEI Y, WEN H, YU Y, et al. The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy [J]. *Immunity*, 2012, 36(6): 933-46.
- [51] YIN H, YANG Q, CAO Z, et al. Activation of NLRX1-mediated autophagy accelerates the ototoxic potential of cisplatin in auditory cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 343: 16-28.
- [52] LIU M, LIU K, CHENG D, et al. The regulatory role of NLRX1 in innate immunity and human disease [J]. *Cytokine*, 2022, 160: 156055.
- [53] ZHOU L, GAN L, SUN C, et al. Bioinformatics analysis and experimental verification of NLRX1 as a prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2024, 27(6): 264.
- [54] DAS B, SENAPATI S. Immunological and functional aspects of MAGEA3 cancer/testis antigen [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2021, 125: 121-47.
- [55] LIU S, CHEN H, GE X, et al. MAGEA3 serves as an independent indicator for predicting the prognosis of ESCC [J]. *Panminerva Med*, 2021, 63(3): 382-3.
- [56] XIE J, YANG P, WEI H, et al. Development of a prognostic nomogram based on an eight-gene signature for esophageal squamous cell carcinoma by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2): 88.
- [57] SUN G, CHEN H, XIA J, et al. Diagnostic performance of anti-MAGEA family protein autoantibodies in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(Pt A): 111041.
- [58] SHI X, CHEN X, FANG B, et al. Decitabine enhances tumor recognition by T cells through upregulating the MAGE-A3 expression in esophageal carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108632.
- [59] HOU J Y, WANG Y G, MA S J, et al. Identification of a prognostic 5-Gene expression signature for gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(4): 619-29.
- [60] LIPUNOVA N, WESSELIUS A, CHENG K K, et al. Genome-wide Association Study for Tumour Stage, Grade, Size, and Age at Diagnosis of Non-muscle-invasive Bladder Cancer [J]. *Eur Urol Oncol*, 2019, 2(4): 381-9.
- [61] GAO G, KASPERBAUER J L, TOMBERS N M, et al. Prognostic significance of decreased expression of six large common fragile site genes in

- oropharyngeal squamous cell carcinomas [J]. *Transl Oncol*, 2014, 7(6): 726-31.
- [62] XUAN W, HSU W H, KHAN F, et al. Circadian Regulator CLOCK Drives Immunosuppression in Glioblastoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(6): 770-84.
- [63] LIU T, WANG Z, YE L, et al. Nucleus-exported CLOCK acetylates PRPS to promote de novo nucleotide synthesis and liver tumour growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(2): 273-84.

致 谢

在毕业论文完成之际，我将要向所有给予我帮助的人表示衷心的感谢。首先我要感谢我的指导教师，周翰林老师。在项目的实施过程中，老师给了我无微不至的帮助，从项目的思路到论文的写作落实，每一个环节都凝聚着老师的心血。老师严谨的治学态度，渊源的学识底蕴和对学术的追求让我深受启发，让我在学术的道路上不断成长。同时感谢曦源项目的资金支持。其次感谢课题组的两位同学，在课题的实施过程中，我们互相帮助、相互指导，课题的成果也是我们一起努力的结果。感谢 GEO 和 TCGA 数据库为我的研究提供了关键数据。最后感谢在学习和生活上大力支持我的家人和朋友，感谢自己的做过的工作，让我本科四年在迷茫的同时也有些许成果。