论著·基础医学

鼻咽癌增殖转录程序的跨队列鉴定及eIF4A相关翻译调控的定位:274个基因增殖候选集构建与Silvestrol体外验证

徐 磊,黄茂凌,钟 诚 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院耳鼻咽喉科,重庆

[摘要] **目的** 鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)具有显著地域聚集性、EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)相关性和生物学异质性,局部复发、远处转移及获得性耐药仍是制约长期获益的关键瓶颈,且单基因差异表达易受队列和检测平台影响。为此,本研究识别NPC中具有跨队列可重复性并与疾病进展相关的转录程序,构建具有独立表达支持的增殖候选集,并评估其与真核翻译起始因子4A(eukaryotic translation initiation factor 4A, eIF4A)相关翻译调控及Silvestrol体外药理反应的关系。**方法** ①公共数据库生信分析:整合GSE12452、GSE53819、GSE102349、GSE68799和GSE150430公共转录组数据。在GSE12452和GSE53819中开展不预设候选通路的基因集富集分析,筛选跨队列方向一致且均满足错误发现率(false discovery rate,FDR)<0.05的通路;在GSE102349中采用加权基因共表达网络分析构建模块,并通过分期分层Cox模型探索模块与疾病进展的关系。基于跨队列差异表达和模块成员关系,构建274基因增殖候选集,并以Top50、Top100和Top150三个嵌套基因子集,在开展整合网络细胞特征库(library of integrated network-based cellular signatures,LINCS)开展连接性及作用机制分析。进一步评价翻译相关程序及eIF4A相关转录本的样本内相关性,并在GSE68799中进行外部评价。采用scTenifoldKnk模拟恶性细胞中EIF4A1功能缺失,分析其网络扰动特征。②体外细胞实验:采用CCK-8、细胞杀伤、克隆形成和划痕实验评价Silvestrol对5-8F和CNE-2Z培养细胞的体外作用。**结果** GSE12452和GSE53819队列中共同可评价的5 124条通路归一化富集分数(normalized enrichment score,NES)呈正相关(Spearman r_s=0.55,P<2.2×10^{-16}),共识别314条一致激活通路和21条一致抑制通路,分别以细胞周期、DNA复制和染色体调控增强,以及纤毛和轴丝相关过程降低为主要特征。GSE102349中共识别15个非grey模块;在68例临床资料完整的患者中,共记录14个疾病进展事件,Turquoise、Tan、Blue和Pink模块达到名义P<0.05。结合Turquoise模块归属及2个外部队列中的一致上调,获得274个跨队列表达支持的增殖候选基因,主要富集于E2F、G2/M、MYC、DNA代谢和染色体分离程序。LINCS分析中,8 140个化合物在3种查询规模下的连接性排序高度相关(r_s=0.909~0.955);蛋白质合成抑制剂在Top50和Top100查询中呈显著负向连接(FDR分别为0.016和0.040)。翻译程序分析显示,NPC中的改变具有环节选择性,而非整个翻译系统同步激活。GSE68799外部评价中,EIF4B与一般翻译起始、PDCD4与mRNA监控/NMD的增殖校正相关分别为r_s=0.510和0.505,FDR均为0.012,经典*EIF4A1*与部分程序的关联具有模型敏感性。GSE150430单细胞分析显示,*EIF4A1*在95.81%的恶性细胞中可检测;其虚拟扰动信号主要集中于RPL/RPS核糖体蛋白及线粒体编码转录本,且完整增殖候选集未富集

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0676);重庆市教育委员会2024年度科技研究重点项目(KJZD-K202412806);2024年陆军军医大学第一附属医院百青学术人才支持计划(2025BQCX-4)

[通信作者] 钟 诚,E-mail:agm95zc@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:徐磊,黄茂凌,钟诚. 鼻咽癌增殖转录程序的跨队列鉴定及eIF4A相关翻译调控的定位:274个基因增殖候选集构建与Silvestrol体外验证[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(19):2755-2769. DOI:10.16016/j.2097-0927.202607110.

Citation: Xu L, Huang M L, Zhong C. Cross-cohort identification of proliferative transcriptional programs in nasopharyngeal carcinoma and mapping of eIF4A-related translational regulation: construction of a 274-gene proliferation candidate set and *in vitro* validation with Silvestrol[J]. J Army Med Univ, 2026, 48(19):2755-2769. DOI:10.16016/j.2097-0927.202607110.

于高扰动端(FDR=1.000)。Silvestrol对5-8F和CNE-2Z细胞的半数抑制浓度分别为26和12 nmol/L,并降低细胞存留、克隆形成及划痕闭合。**结论** NPC存在以增殖激活为特征的跨队列可重复转录状态,eIF4A相关翻译调控被多层级分析优先定位为候选干预机制;Silvestrol在NPC细胞中表现出纳摩尔级体外抑制活性。

[**关键词**] 鼻咽癌;转录组学;翻译起始;eIF4A;Silvestrol

[**中图法分类号**] R318.04;R394.3;R739.63 [**文献标志码**] A

Cross-cohort identification of proliferative transcriptional programs in nasopharyngeal carcinoma and mapping of eIF4A-related translational regulation: construction of a 274-gene proliferation candidate set and *in vitro* validation with Silvestrol

Xu Lei, Huang Maoling, Zhong Cheng Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is characterized by marked geographic aggregation, Epstein-Barr virus (EBV) association, and biological heterogeneity; local recurrence, distant metastasis, and acquired resistance remain major obstacles to long-term benefit, while single-gene differential expression is vulnerable to cohort and platform effects. This study aims to identify transcriptional programs in NPC with cross-cohort reproducibility and relevance to disease progression, construct a proliferation candidate gene set supported by independent expression data, and evaluate its relationship with eukaryotic translation initiation factor 4A (eIF4A)-associated translational regulation and the *in vitro* pharmacological effects of Silvestrol. Methods ① Bioinformatic analyses of public datasets: Public transcriptomic datasets (GSE12452, GSE53819, GSE102349, GSE68799, and GSE150430) were integrated. Unbiased gene set enrichment analysis was performed in GSE12452 and GSE53819 to identify pathways showing concordant enrichment directions and a false discovery rate (FDR) <0.05 in both cohorts. Weighted gene co-expression network analysis was conducted in GSE102349, and stage-stratified Cox models were applied to explore the associations between module eigengenes and disease progression. A 274-gene proliferation candidate set was constructed by integrating cross-cohort differential expression with module membership, and Top50, Top100, and Top150 nested gene sets were then used for Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) connectivity and mechanism-of-action analyses. Within-sample associations between translation-related programs and eIF4A-related transcripts were further evaluated and externally assessed in GSE68799. EIF4A1 functional loss was simulated in malignant cells using scTenifoldKnk to characterize network perturbation patterns. ② *In vitro* experiments: CCK-8, cell-killing, colony formation, and wound-healing assays were used to determine the effects of Silvestrol on cultured 5-8F and CNE-2Z cells. Results The normalized enrichment score (NES) of 5 124 commonly evaluable pathways exhibited a positive Spearman-rank correlation between the GSE12452 and GSE53819 cohorts (Spearman ρ, $P<2.2\times10^{-16}$). A total of 314 concordantly activated and 21 concordantly suppressed pathways were identified, characterized mainly by enhanced cell cycle, DNA replication, and chromosome regulation programs and reduced cilium- and axoneme-related processes, respectively. Fifteen non-grey modules were identified in GSE102349. Among 68 patients with complete clinical data, 14 disease progression events were recorded, and the Turquoise, Tan, Blue, and Pink modules reached nominal $P<0.05$. Integration of Turquoise-module membership with concordant upregulation in the 2 external cohorts yielded 274 proliferation candidate genes with cross-cohort expression support, which were enriched mainly in E2F, G2/M, MYC, DNA metabolism, and chromosome segregation programs. In the LINCS analysis, connectivity rankings for 8 140 compounds were highly correlated (r=0.909

to 0.955). Protein-synthesis inhibitors showed significant negative connectivity in the Top50 and Top100 analyses, with FDR values of 0.016 and 0.040, respectively. Translation program analysis indicated process-selective alterations in NPC rather than coordinated activation of the entire translation system. In the external GSE68799 cohort, the proliferation-adjusted correlations of EIF4B with general translation initiation and of PDCD4 with mRNA surveillance/NMD were r=0.510 and 0.505, respectively, with FDR=0.012 for both; associations between canonical *EIF4A1* and selected programs were model-sensitive. Single-cell analysis of GSE150430 showed that *EIF4A1* was detectable in 95.81% of malignant cells. Virtual perturbation signals were concentrated mainly in RPL/RPS ribosomal-protein genes and mitochondrially encoded transcripts, whereas the complete proliferation candidate set was not enriched at the high-perturbation end of the ranking (FDR=1.000). The half-maximal inhibitory concentrations of Silvestrol were 26 and 12 nmol/L in 5-8F and CNE-2Z cells, respectively, and Silvestrol reduced cell retention, colony formation, and wound closure. **Conclusion** NPC exhibits a cross-cohort reproducible transcriptional state characterized by enhanced proliferative programs, with eIF4A-associated translational regulation prioritized by multi-level analyses as a candidate intervention mechanism; Silvestrol exhibits nanomolar in vitro inhibitory activity in NPC cells.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; transcriptomics; translation initiation; eIF4A; Silvestrol

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0676), the Key Project of 2024 Science and Technology Research Program of Chongqing Education Commission (KJZD-K202412806), and the 100 Young Academic Talent Support Program of the First Affiliated Hospital of Army Medical University (2025BQCX-4). Corresponding author: Zhong Cheng, E-mail: agm95zc@tmmu.edu.cn

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是一类具有显著地域聚集性、EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)相关性和生物学异质性的头颈部恶性肿瘤。近年来,调强放疗、含铂同步放化疗与诱导化疗的规范化应用显著改善了局部晚期NPC的疾病控制[1-2],抗EGFR治疗和免疫检查点抑制剂等策略也拓展了复发/转移性患者的治疗选择[3-4]。然而,局部复发、远处转移和获得性耐药仍是制约患者长期获益的关键瓶颈[5],不同患者对放化疗、靶向治疗及免疫治疗的反应亦存在显著差异[6]。单基因结果易受队列和平台影响,因此需要跨队列验证多基因程序;识别具有跨队列可重复性且与进展相关的分子状态,并据此优先筛选潜在可干预机制,已成为NPC转化研究中的重要问题。

多组学与单细胞研究表明,NPC的发生发展由EBV-宿主互作、细胞周期失衡、DNA复制与损伤修复增强、蛋白稳态重塑以及肿瘤免疫微环境异质性共同塑造[7-10]。在这一背景下,单个基因的差异表达往往容易受样本构成、平台差异和统计阈值影响;相比之下,能够在独立队列中重复出现、并能在患者样本中形成稳定共表达结构的通路活动与多基因程序,更可能反映可重复的群体层面转录特征。由此,研究重点需要从“是否存在差异”进一步推进到“哪些功能程序跨队列稳定、与进展相关且具备潜在药理可干预性”。

在这些跨层级分子程序中,蛋白质翻译处于转录重编程向功能蛋白输出和肿瘤表型转化的关键界面。肿瘤细胞能否将增殖、存活和应激相关的转录信号转化为持续的蛋白质表达,不仅取决于mRNA丰度,也受到翻译起始效率和转录本结构特征的调控。eIF4F复合体由eIF4E、eIF4G和ATP依赖性RNA解旋酶eIF4A组成,其中eIF4A负责解开mRNA 5′非翻译区(5′ untranslated region,5′ UTR)中的稳定二级结构[11],从而促进起始密码子的识别,因此,起始区域结构较复杂、较难被翻译起始复合物识别的mRNA,通常更依赖eIF4A的RNA解旋功能[12-13]。既往研究提示,eIF4A依赖性翻译可选择性维持细胞周期推进、存活和侵袭相关蛋白的表达[11],而rocaglate类化合物可通过稳定eIF4A与特定RNA序列的结合,选择性干扰相关mRNA的翻译[14]。既往研究已揭示NPC存在由MYC/E2F驱动[15]、PI3K-AKT-mTOR信号[16]、DNA损伤修复[17]、蛋白稳态[18]、自噬及代谢适应[19]共同构成的多层级分子重编程。由于上述增殖、应激和代谢程序均依赖蛋白质合成实现其功能输出,翻译起始可能成为多类上游信号的潜在干预节点。

已有研究显示,eIF4A抑制剂Silvestrol可抑制NPC细胞生长,并在联合抑制核糖体生物发生时表现出增强的抗肿瘤效应[20]。然而,现有证据仍较为分散:翻译异常在独立NPC队列中的可重复性尚未得到系统验证,通路层面的翻译重编程、eIF4F轴分子改变与eIF4A药理敏感性之间亦缺乏层级清晰的关联。目前,NPC进展相关的多基因状态、药物连接性预测、翻

译调控机制与实验验证尚未得到系统整合。基于此,本研究在2个独立公共转录组队列中开展无偏全局通路分析,并结合样本层面功能评分、eIF4F相关分子比较、单细胞网络虚拟扰动及Silvestrol细胞实验,系统评估EIF4A1相关翻译起始网络在NPC中的表达特征、功能关联及可干预性,旨在为NPC中eIF4A相关翻译脆弱性的判定提供更严格的证据基础。

1 材料与方法

1.1 主要细胞

人NPC细胞系5-8F、CNE-2Z均来自武汉大学人民医院陈始明课题组[21],培养在RPMI Medium 1640(Gibco™,C11875500BT)中,含有10%胎牛血清(Procell,164210-500,中国武汉)和1%青霉素-链霉素双抗生素(Beyotime,C0222,中国上海)。在37 ℃和5%CO_2的细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂

本研究中RPMI Medium 1640(C11875500BT)购自赛默飞世尔科技公司;胎牛血清(164210-500)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;1%青霉素-链霉素双抗生素(C0222)购自上海碧云天生物技术公司;Silvestrol购自MCE公司(目录号HY-13251,纯度99.96%),配制为1 mmol/L储备液,-80 ℃避光保存。

1.3 主要方法

1.3.1 公共数据来源、队列性质与分析任务分配

本研究使用的NPC公共转录组数据均来源于GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/),包括GSE12452、GSE53819、GSE102349、GSE68799和GSE150430。5个数据集均与人NPC相关,但在检测平台、研究设计、样本构成和可用临床信息方面存在差异,因此依据各数据集的数据结构及其与具体研究问题的适配性预先分配分析任务,而非随机选择数据集开展不同分析。各数据集的详细特征及本研究用途见Supplementary Table S1。为保证不同数据来源的分析可比性,本研究优先使用GEO提供的标准化或处理后表达矩阵,并依据相应平台完成表达矩阵整理、基因注释及重复探针合并。数据集的分析适用性主要依据原始研究设计、样本分组、表达数据完整性、临床注释可用性以及研究目的进行评价,不对不同平台的数据集进行主观的整体"质量高低"分级。对于具有特定分析限制的数据集,在相应分析中进一步采用预设的样本纳入标准并在结果及讨论中明确其局限。

1.3.2 生物信息学分析

1.3.2.1 跨队列通路富集及一致性分析 对GSE12452和GSE53819分别进行表达矩阵整理、基因注释及重复探针合并,并采用预排序GSEA比较NPC与正常或非肿瘤组织的通路改变[22]。基因集来源于MSigDB的Hallmark、Reactome和Gene Ontology Biological Process集合[23]。两个队列中富集方向一致且均满足FDR<0.05的通路定义为跨队列一致改变通路,并依据基因重叠进行功能去冗余和网络分析。

1.3.2.2 共表达网络构建及疾病进展关联分析 在GSE102349中选取10 000个高变基因,采用加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis,WGCNA)构建共表达模块[24]。在68例临床资料完整的患者中,以Stage Ⅰ~Ⅲ和Stage Ⅳ为分层因素建立Cox比例风险模型,评价标准化模块特征向量与疾病进展的关系。采用Schoenfeld残差检验比例风险假设[25],并根据Cox分析结果及模块功能特征确定后续探索性候选模块。

1.3.2.3 增殖候选基因筛选及整合网络细胞特征库(library of integrated network-based cellular signatures,LINCS)连接性分析 对呈较高进展风险方向的Tan和Turquoise探索性候选模块采用统一标准进行跨队列筛选。基因在GSE12452和GSE53819中均$\log_2FC>0$且FDR<0.05,同时模块成员关系满足|kME|≥0.60。符合上述条件的基因纳入增殖候选集,并依据两个队列中较大的$\log_2FC$、较小的FDR及较高的|kME|构建综合证据评分用于排序;根据综合证据评分构建Top50、Top100和Top150三个嵌套上调查询集,并基于LINCS L1000 Connectivity Map扰动表达资源开展化合物连接性及作用机制(mechanism of action,MOA)分析;查询通过Bioconductor signature Search/signature Search Data框架完成[26]。

1.3.2.4 翻译相关程序及eIF4A相关转录共变分析 为评价翻译相关程序,预先设定11类翻译及相关稳态功能类别,并从上述全局GSEA结果中依据数据库注释匹配相应通路。在GSE102349中评价eIF4A相关转录本与翻译程序的样本内相关性,并进一步控制Hallmark E2F targets和G2/M checkpoint评分;相关模式在GSE68799的42例NPC样本中采用相同流程进行外部评价。未校正模型和增殖校正模型分别进行多重检验校正。

1.3.2.5 单细胞网络构建及EIF4A1虚拟扰动分析 在GSE150430中提取NPC恶性细胞,并采用患者层面的细胞数限额抽样降低不同患者细胞数量差异的影响。整合2 000个高变基因、可检测的增殖候选基因及预设eIF4相关因子构建单细胞网络,采用

scTenifoldKnk 1.0.3模拟EIF4A1功能缺失[27]。根据带方向的网络扰动Z统计量对基因排序,并采用fgsea 1.38.0进行单侧预排序富集分析;进一步依次去除RPL/RPS及MRPL/MRPS基因后重复分析,以评价主要富集结果对核糖体蛋白基因的依赖性。除另有说明外,多重检验均采用Benjamini-Hochberg方法校正[28],FDR<0.05视为具有统计学意义。

1.3.3 细胞活力检测与半数抑制浓度测定 用CCK-8(Beyotime,C0038,中国上海)检测Silvestrol对鼻咽癌细胞活力的影响。将处于对数生长期的5-8F和CNE-2Z细胞消化、计数后,以每孔5 000个细胞接种于96孔板。孵育24 h后,分别加入不同浓度的Silvestrol;vehicle对照组加入等体积溶剂,并保证各组溶剂终浓度一致。同时设置不含细胞的培养基空白孔。药物处理24 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂,于37 ℃、5%CO_2条件下避光孵育1 h后检测450 nm波长处的吸光度。

1.3.4 细胞杀伤实验 将5-8F和CNE-2Z细胞接种于96孔板,贴壁后按实验分组给予不同浓度Silvestrol处理。处理48 h后,以4%多聚甲醛固定并采用0.1%结晶紫染色。以结晶紫染色所显示的贴壁细胞存留情况作为终点指标,通过整孔图像展示Silvestrol处理后细胞生长和存留的变化。

1.3.5 克隆形成实验 将5-8F和CNE-2Z细胞按照分组分别以1 000个/孔接种于6孔板,贴壁后给予相应浓度Silvestrol处理。连续培养14 d,其间每2 d更换含相应浓度药物的培养基。培养结束后固定并采用0.1%结晶紫染色,将含≥50个细胞的细胞团定义为一个克隆,以克隆形成情况评价长期增殖能力。

1.3.6 细胞划痕实验 将5-8F和CNE-2Z细胞培养至约90%融合度后建立线性划痕,并在无血清培养条件下给予Silvestrol处理。5-8F细胞设置0、5和26 nmol/L组,CNE-2Z细胞设置0、2.5和12 nmol/L组。分别于0、48和72 h采集划痕图像,并采用Image J 1.54 g测定划痕空白区域面积。划痕闭合率按(S_0h-S_t)/S_0h×100%计算,其中S_0h和S_t分别表示0 h及相应时间点的划痕空白面积。以划痕闭合率作为终点指标评价Silvestrol处理后的划痕闭合表型。

1.4 统计学分析

所有统计分析采用R4.6.1、GraphPad Prism 9.0.2.161软件完成。除特别说明外,检验均为双侧检验;涉及多重比较的生物信息学分析采用Benjamini-Hochberg方法控制FDR。细胞实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,每项实验至少包含3次独立生物学重复。两组独立比较采用Student's t检验或Mann-Whitney U检验,依据实际数据分布;多剂量单时间点比较采用单因素方差分析并进行Dunnett多重比较;剂量-反应曲线采用四参数非线性回归拟合。P<0.05显示具有统计学意义。

2 结果

2.1 无偏跨队列通路分析揭示NPC中稳定的增殖激活与纤毛相关程序抑制

在GSE12452和GSE53819两个包含肿瘤与配对非肿瘤组织的患者队列中开展全局通路比较。在两个队列均可评估的5 124条匹配通路中,归一化富集分数(normalized enrichment score, NES)呈中等程度正相关(Spearman r_s=0.55,名义P<2.2×10^{-16}),表明主要的功能改变在不同队列之间具有一定的可重复性(图1A)。

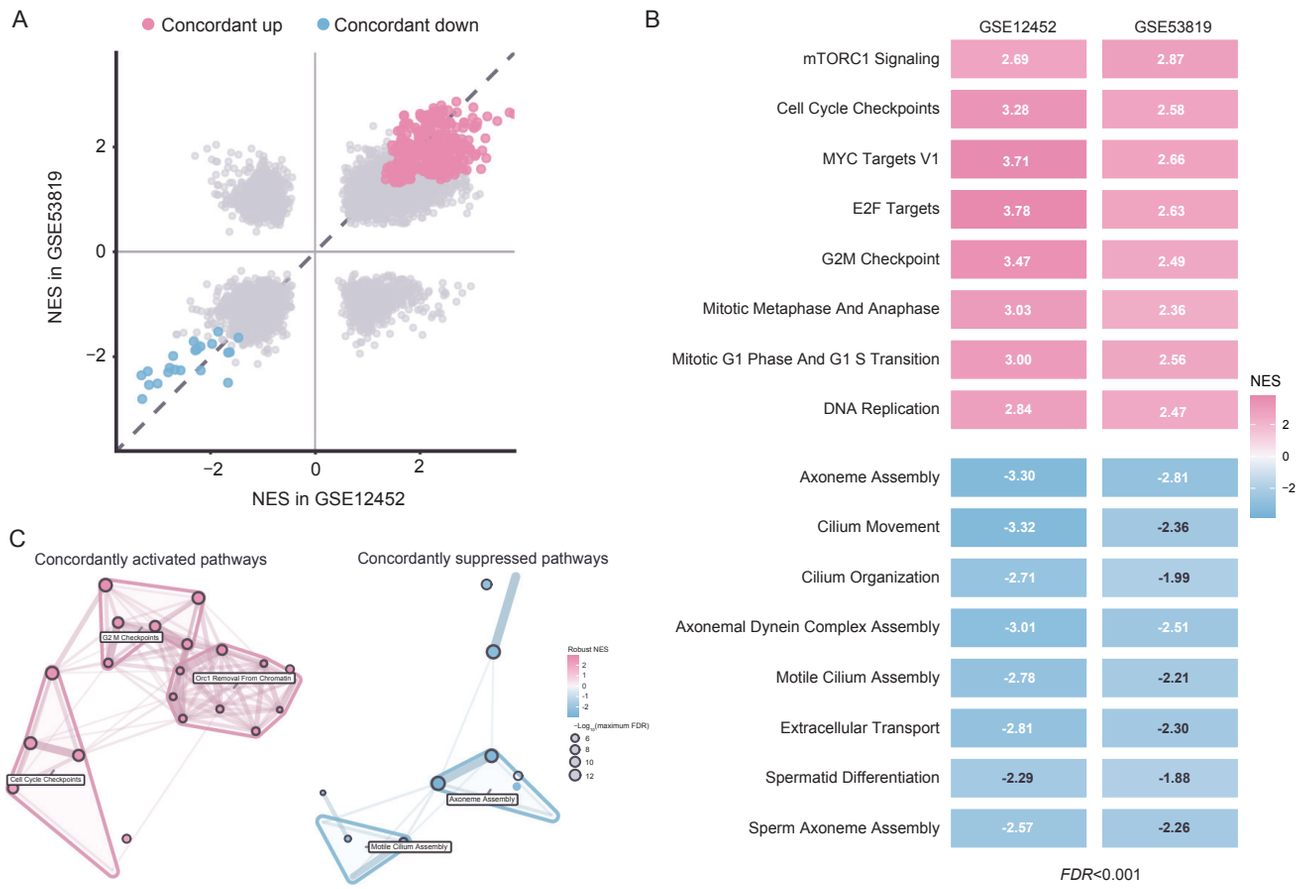
按照两个队列中富集方向一致且均满足FDR<0.001的预设标准,共鉴定出314条一致激活通路和21条一致抑制通路。其中,激活通路主要涉及MYC targets V1、E2F targets、细胞周期、DNA复制及有丝分裂等相关程序;受抑制通路则多与纤毛装配、轴丝结构和运动纤毛功能有关(图1B)。

基于通路间基因重叠构建功能网络后,一致激活通路形成连接较为紧密的功能群落,主要包括G2/M checkpoint、cell-cycle checkpoints、染色单体分离及蛋白酶体相关过程;相比之下,一致抑制通路构成的纤毛—轴丝功能群落规模较小,内部连接也较为稀疏(图1C)。总体而言,两个独立队列均支持NPC中增殖、DNA复制和染色体调控程序增强,同时伴有纤毛与轴丝相关功能程序的下调。

2.2 共表达网络与探索性生存分析揭示功能特征不同的进展相关模块

在GSE102349中对10 000个高变基因进行WGCNA后,共识别15个非grey共表达模块,另有2 328个基因未归入稳定模块(图2A)。

113例患者中,68例同时具有完整随访时间、事件状态和临床分期信息,共记录14例疾病进展事件;其余45例因至少缺失一项相关临床信息未纳入Cox分析。分期分层Cox分析显示,Turquoise模块与较高进展风险相关(*HR*=2.51,95% *CI*:1.21~5.20),Tan模块亦呈较高风险方向(*HR*=1.78,95% *CI*:1.11~2.86);Blue和Pink模块则呈较低风险方向,HR分别为0.33(95%*CI*:0.14~0.74)和0.42(95%*CI*:0.20~0.88)。4个模块名义P值均<0.05,且模块特征向量均满足比例风险假设;但15个模块经Benjamini-Hochberg校正后



A: Comparison of normalized enrichment score (NES) values for 5 124 pathways jointly evaluable in GSE12452 and GSE53819. Pink and blue indicate pathways concordantly activated and suppressed, respectively, with a false discovery rate (FDR) <0.05 in both cohorts; B: Representative pathways selected after gene-overlap-based redundancy reduction; C: Functional networks of concordantly altered pathways

图1 跨队列通路分析揭示NPC中可重复的功能改变

Figure 1 Cross-cohort pathway analysis identifies reproducible functional alterations in nasopharyngeal carcinoma (NPC)

均未达到FDR<0.05,最低BH-FDR为0.078,因此将上述四个模块作为探索性候选模块(图2B)。

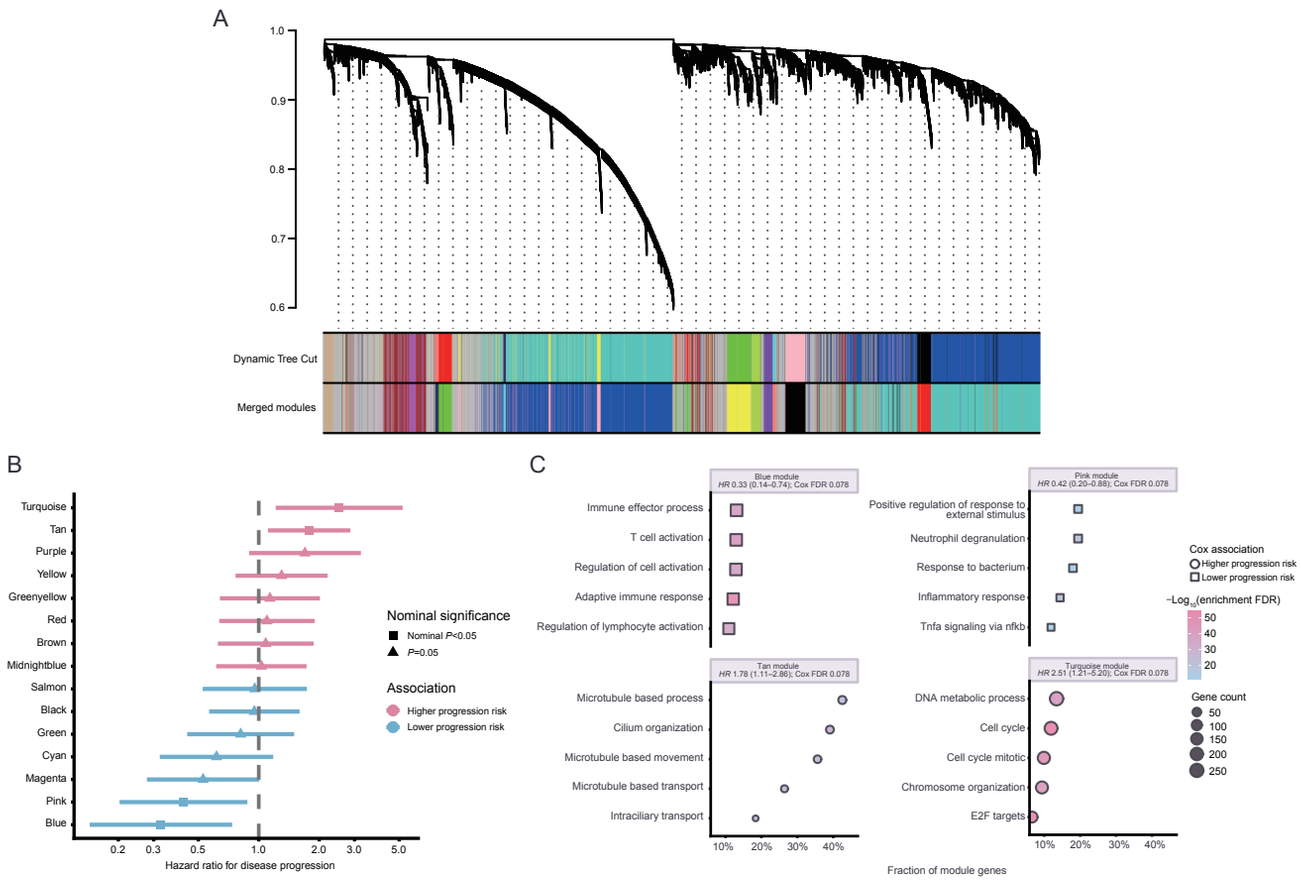
四个候选模块的功能特征明显不同:Blue主要涉及T细胞活化、适应性免疫应答及淋巴细胞活化;Pink主要涉及炎症反应、中性粒细胞脱颗粒及TNFα/NF-κB信号;Tan以纤毛组织、微管运动及纤毛内运输为主要特征;Turquoise则主要富集DNA代谢、细胞周期、染色体组织及E2F靶基因等增殖相关程序(图2C)。

2.3 跨队列整合筛选以细胞周期程序为核心的进展相关候选基因

为评估呈较高进展风险方向的候选模块是否具有跨队列表达支持,对Tan和Turquoise模块采用相同标准进行筛选。Tan模块的基因中有93个在GSE12452和GSE53819中具有可比较的差异表达结果;41个基因在两个队列中均呈下调且均满足FDR<0.05,但没有基因达到|kME|≥0.60。Turquoise模块基因中有520个基因在2个队列中均呈上调且均满足FDR<0.05,718个基因达到|kME|≥0.60,两项标准取交集后,共获得274个基因(图3A、B)。由于Turquoise模块在探索性Cox分析中呈较高进展风险方向,同时其功能特征主要涉及细胞周期与增殖过程,我们将这274个基因界定为具有跨队列表达支持的增殖候选基因集。

为同时纳入跨队列表达效应、模块归属强度及统计学证据,进一步构建综合证据评分。按照综合得分排序,位居前列的基因包括*DTL*、*RCN1*、*CENPF*、*NFE2L3*、*PUS7*、*GINS1*、*ECT2*、*BRIP1*、*ANLN*、*PBK*和*CDC6*等。排名前30位的基因均在2个队列中一致上调,同时满足|kME|≥0.60(图3C)。

274个候选基因中266个可用于功能富集分析,以WGCNA输入的7 858个映射基因为背景,对合计



A: Hierarchical clustering dendrogram and module assignments for 10 000 highly variable genes in GSE102349; B: Stage-stratified Cox analysis of the association between module eigengenes and disease progression; C: Representative functional enrichment of the 4 exploratory candidate modules

图2 共表达网络与探索性分期分层Cox分析识别功能不同的候选模块

Figure 2 Co-expression network and exploratory stage-stratified Cox analyses identify functionally distinct candidate modules

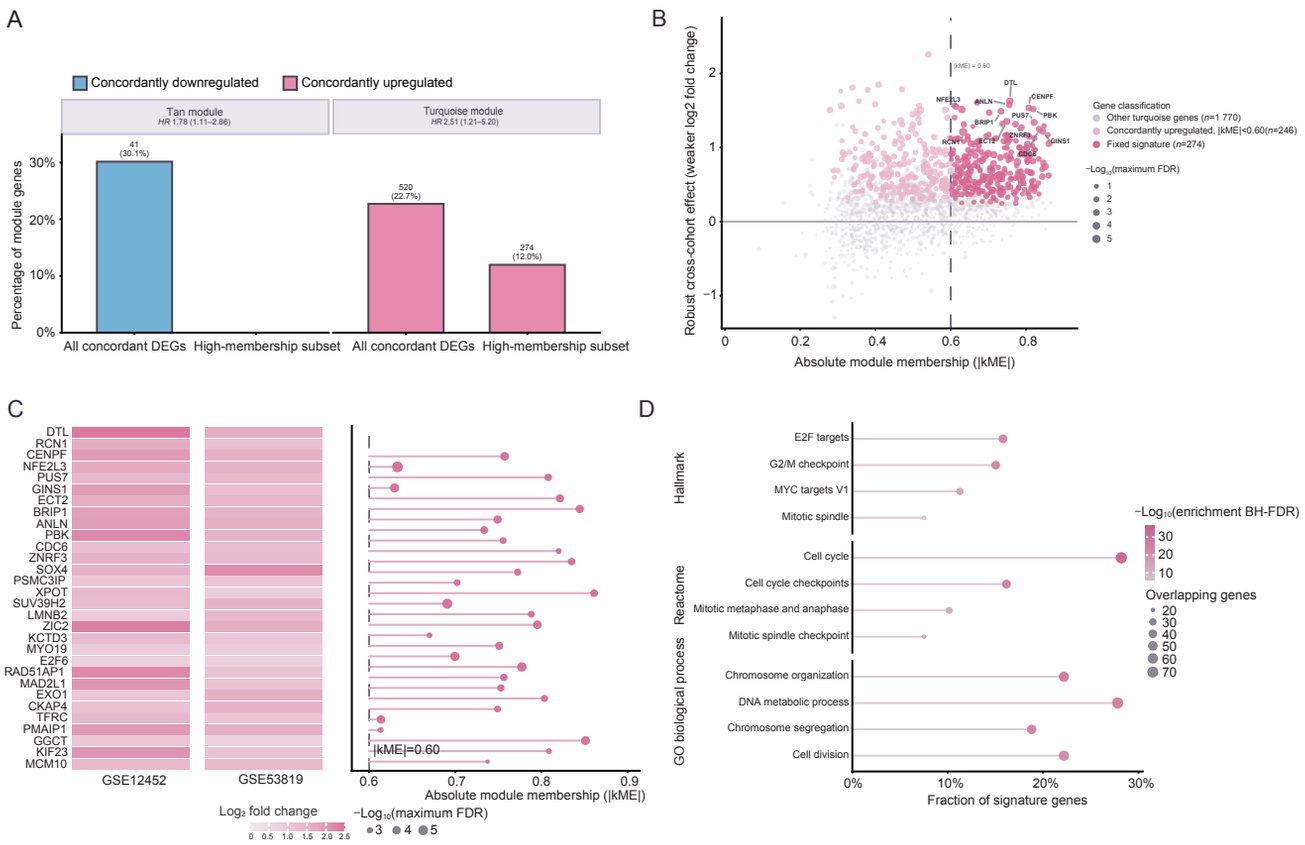
2 502条Hallmark、Reactome及GO-BP条目进行富集分析。校正后分别有9、131和231个条目满足FDR<0.05;去除冗余后,代表性通路为E2F targets、G2/M checkpoint、MYC targets V1、cell cycle、DNA metabolic process、chromosome organization、chromosome segregation、cell division(图3D),提示该候选基因集主要反映细胞增殖、DNA复制及有丝分裂相关转录程序。

2.4 LINCS连接性分析优先识别与NPC增殖候选集呈反向转录关联的化合物及作用机制

为评估查询基因数量对LINCS连接性分析结果的影响,基于274个NPC增殖候选基因的综合评分构建Top50、Top100和Top150三个嵌套查询集。3种分析所得8 140个化合物的细胞汇总标准化连接分数(cell-summarized normalized connectivity score, NCSct)之间具有较高相关性,其Spearman r_s分别为0.925、0.909和0.955(图4A)。共识排序显示,排名前20位化合物均呈负向连接,其中NVP-BEZ235、IKK-16、cerivastatin、pitavastatin、BMS-754807及actinomycin D等在3种查询中均保持负值。

进一步MOA聚合分析共识别240类机制,其中15类机制在3种查询中均显著富集(FDR<0.05),主要涉及mTOR、PI3K/AKT、HDAC、HMGCR、MAPK/MEK、Aurora kinase、拓扑异构酶、微管及蛋白酶体等通路(图4B),覆盖细胞生长、周期调控和蛋白质稳态等过程。

值得注意的是,蛋白质合成抑制剂在3种查询中均表现为显著负向连接。该类别17种化合物的中位NCSct在Top50、Top100和Top150分析中分别为−1.228、−1.164和−1.030,均低于其他化合物;组间差异在Top50和Top100中经多重校正后仍显著(图4C)。代表性化合物如anisomycin、emetine、cephaeline、



A: Cross-cohort validation of tan and turquoise modules; B: Gene-level integration of turquoise-module membership and robust cross-cohort expression effects; C: Cross-cohort expression effects and module membership of the 30 highest-ranked proliferation-related candidate gene set; D: Representative functional enrichment of the complete 274-gene candidate set

图3 跨队列构建并解析进展相关候选基因

Figure 3 Cross-cohort construction and functional characterization of a proliferation candidate gene set

homoharringtonine、puromycin 和 cycloheximide 均持续呈负向连接,其中 anisomycin 表现最强(NCSct=−1.47~−1.67,图4D)。

综合来看,LINCS 分析在不同查询规模下表现出较高一致性,并提示蛋白质合成抑制相关机制可能与 NPC 增殖候选转录程序存在稳定反向关联,为后续探索 eIF4A 介导的翻译调控提供候选方向。

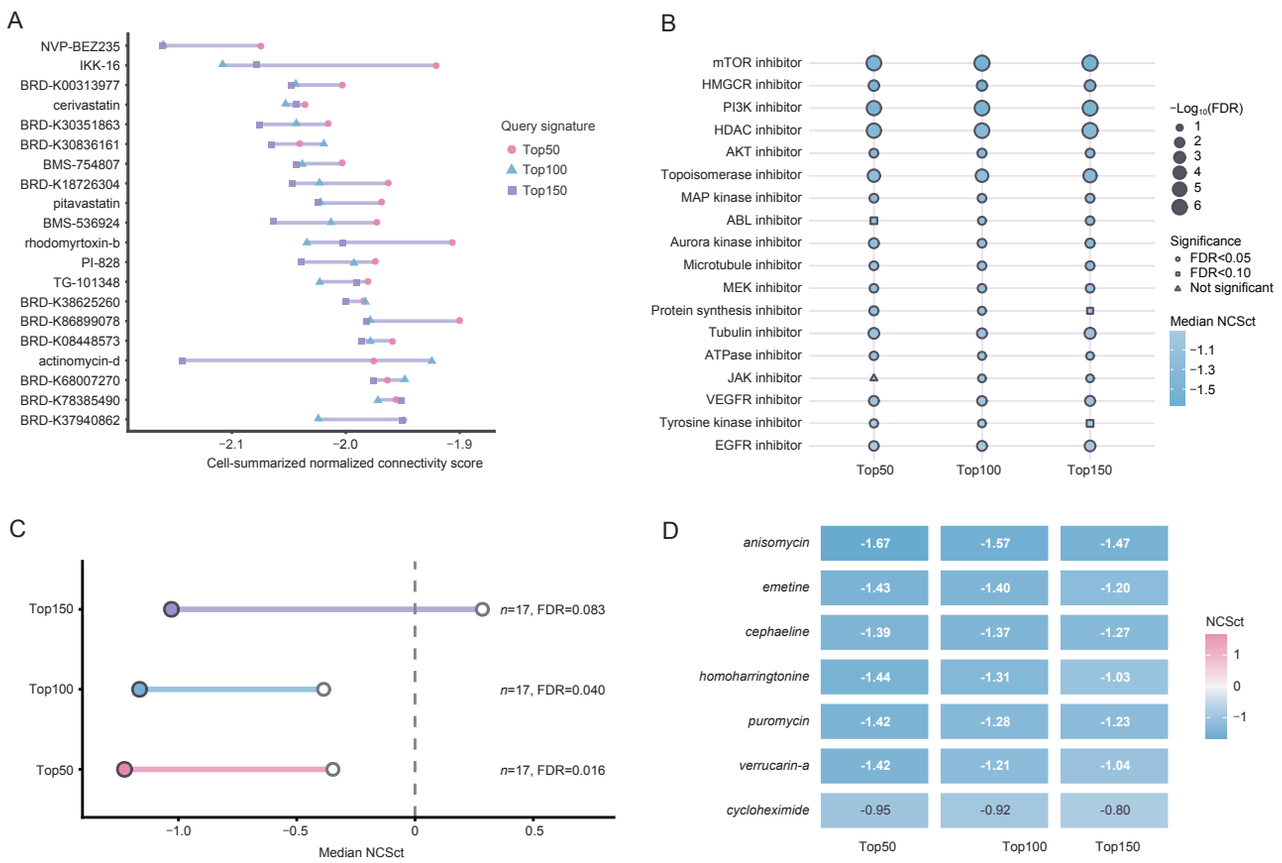
2.5 公共数据整合揭示 NPC 中翻译程序的环节选择性改变及 eIF4A 相关转录共变

为进一步解析 LINCS 提示的蛋白质合成抑制机制,我们根据蛋白质翻译及相关稳态过程的主要功能环节,预先划分了 11 类功能类别,并在 GSE12452 和 GSE53819 中进行通路匹配。得到 9 类共 42 条通路进入跨队列分析。结果显示,NPC 中翻译异常具有一定重复性,但不同环节呈现选择性变化。其中,核糖体生物发生、rRNA 加工及线粒体翻译在 GSE12452 中表现为显著正向富集;eIF2/ISR 相关起始和线粒体翻译在两个队列中均保持正向富集,提示应激相关翻译调控和线粒体翻译可能是主要改变环节,而一般翻译起始和翻译延伸呈现队列间差异(图5A)。

进一步分析 eIF4A 相关因子发现,*EIF4A1* 在 2 个队列中均上调,PDCD4 均下调,但仅部分队列达到统计学显著性。*EIF4G1*、*EIF4H* 和 *EIF4A3* 整体呈正向变化,其中 *EIF4A3* 在 GSE53819 中显著上调;其余因子存在一定队列差异(图5B)。

GSE102349 中,未校正模型下 *EIF4A2*、*EIF4B* 和 *SENP3-EIF4A1* 均与全部 9 类翻译程序显著正相关。校正 E2F targets 和 G2/M checkpoint 评分后,EIF4B 仍与 7 类程序显著正相关,EIF4A2 和 SENP3-EIF4A1 分别与 6 类程序显著正相关;PDCD4 的相关方向在增殖校正前后发生改变(图5C)。

在 GSE68799 的 42 例 NPC 样本中进行外部评价后,增殖校正模型显示 *EIF4B* 与一般翻译起始的正相关得到重复(r_s=0.510,FDR=0.012),PDCD4 与 mRNA



A: Representative compounds showing consistently negative connectivity across the Top50, Top100 and Top150 queries; B: Representative mechanisms of action recurrently prioritized across the 3 query sizes; C: Comparison of median NCSct values between protein-synthesis inhibitors and all other compounds; D: NCSct values of 7 representative translation-inhibiting compounds across the 3 query sizes

图4 连接性分析识别与NPC增殖候选集呈反向转录关联的化合物及作用机制

Figure 4 Connectivity analysis identifies compounds and mechanisms showing inverse transcriptional associations with the NPC proliferation candidate set

监控/NMD亦呈显著正相关(r_s=0.505, FDR=0.012)。*EIF4A1*和*EIF4A2*的关联在不同模型中存在一定敏感性(图5D)。

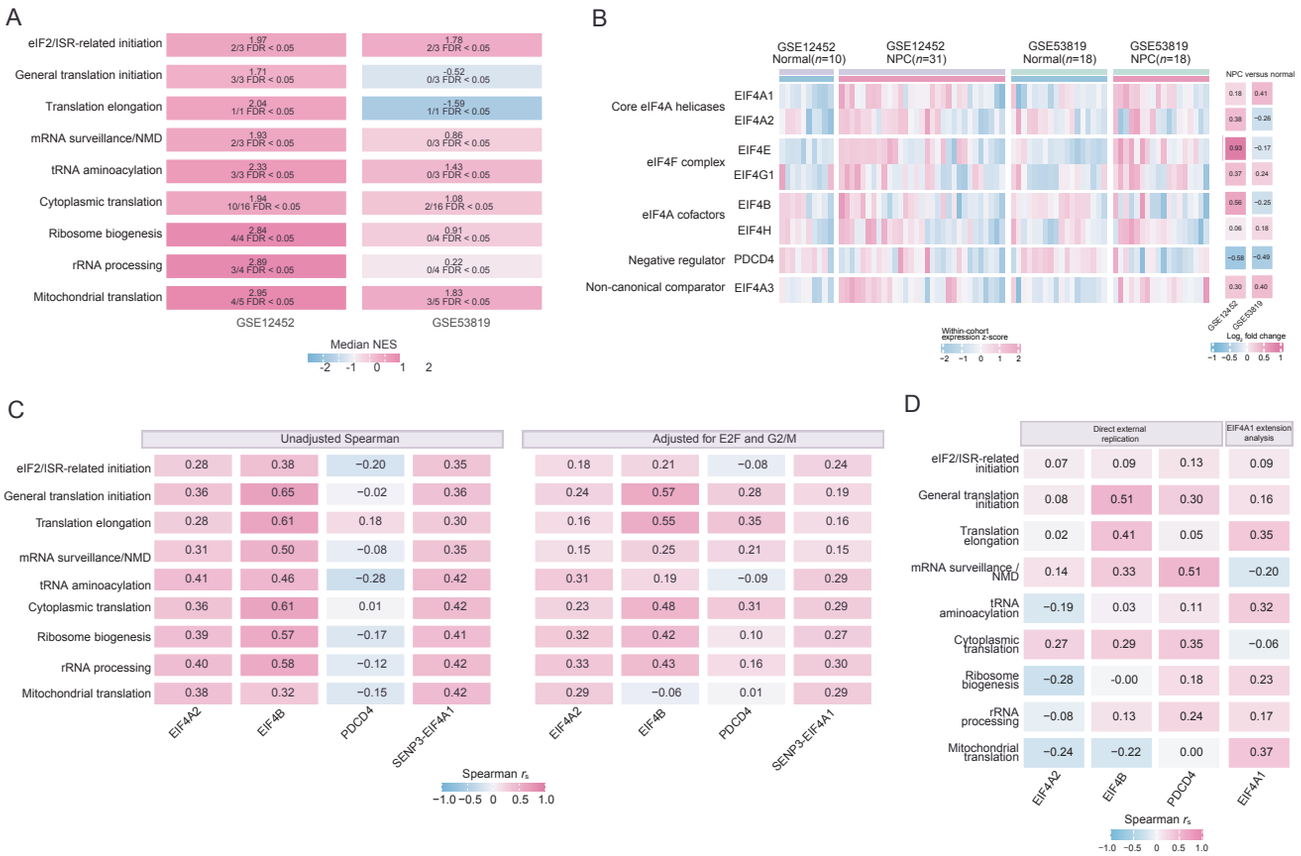
2.6 单细胞网络虚拟干扰提示*EIF4A1*相关信号主要集中于核糖体及线粒体编码基因

为进一步区分翻译重塑是否来源于恶性细胞内在状态,在单细胞数据集GSE150430中开展*EIF4A1*虚拟扰动网络分析。研究纳入11例NPC肿瘤样本,共获得7 581个恶性细胞;为降低患者间细胞数量差异带来的影响,每例最多随机抽取150个恶性细胞,最终形成包含1 485个细胞的分析集。EIF4A1在95.81%的恶性细胞中表达(图6A)。

在274个增殖候选基因中,272个满足网络分析标准。结合2 000个高变基因及eIF4A相关因子,构建包含2 186个基因的扩展网络,并利用scTenifoldKnk模拟*EIF4A1*功能缺失。扰动排序显示,MALAT1、线粒体基因MT-ND3/MT-ND4L以及大量RPL/RPS核糖体蛋白基因位于高扰动区域(图6B)。排名前50位基因中,37个属于RPL/RPS家族,提示EIF4A1扰动主要影响核糖体相关网络。

基于完整扰动预排序GSEA进一步显示,*EIF4A1*扰动显著富集于真核翻译延伸、GCN2介导的氨基酸缺乏反应、真核翻译起始及rRNA加工等过程(NES=4.90~5.43, FDR<0.05),同时伴随核糖体生物发生和MYC靶基因富集。相比之下,NPC增殖候选基因集未表现出高扰动富集(NES=0.0036, FDR=1.000)(图6C)。

去除RPL/RPS基因后,翻译起始及核糖体相关富集显著减弱,提示这些信号主要由细胞质核糖体基因驱动(图6D)。进一步去除MRPL/MRPS基因后,线粒体翻译仍保持显著富集(NES=3.71, FDR=0.0136),其leading-edge基因主要由线粒体基因组编码转录本构成。



A: Cross-cohort summary of 9 prespecified translation-related categories in GSE12452 and GSE53819; B: Expression patterns of eIF4A-related factors in GSE12452 and GSE53819; C: Within-sample associations between eIF4A-related transcripts and 9 translation programs in GSE102349; D: External evaluation in GSE68799

图5 多队列转录组分析揭示NPC中eIF4A相关因子与翻译程序的成员及环节选择性关联

Figure 5 Multi-cohort transcriptomic analyses reveal factor- and process-selective associations between eIF4A-related components and translation programs in nasopharyngeal carcinoma

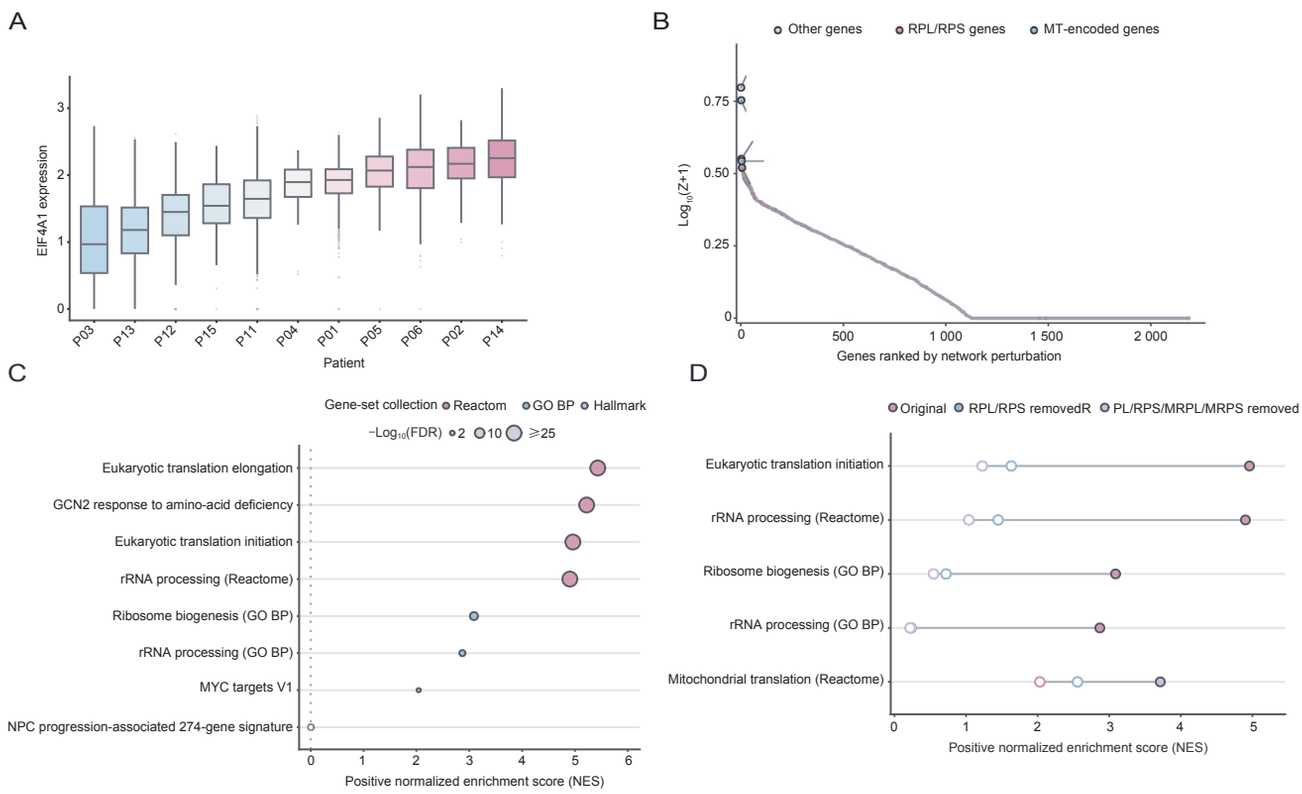
综上,单细胞虚拟扰动结果表明,*EIF4A1*相关网络变化主要集中于核糖体组成、翻译起始及线粒体翻译过程,而非直接作用于NPC增殖候选基因程序,提示*EIF4A1*可能通过调控翻译基础设施影响恶性细胞状态。

2.7 Silvestrol抑制鼻咽癌细胞活力、克隆形成及划痕闭合

综合多队列分析所揭示的翻译程序异常、eIF4A相关起始调控获得的部分跨队列证据,以及*EIF4A1*单细胞网络虚拟干扰提示的翻译装置相关效应,进一步选用eIF4A靶向药物Silvestrol,考察抑制eIF4A对鼻咽癌细胞表型的影响。采用不同浓度的Silvestrol处理5-8F和CNE-2Z细胞,并分别评价细胞活力、长期增殖能力及迁移表型。剂量-反应分析显示,随着Silvestrol浓度升高,2种NPC细胞的存活率均持续下降。5-8F和CNE-2Z细胞的IC_{50}分别为26 nmol/L和12 nmol/L,表明2种细胞均对Silvestrol呈纳摩尔级药理敏感性,其中CNE-2Z细胞相对更为敏感(图7A)。

细胞杀伤实验进一步表明,Silvestrol处理后,2种细胞的整体生长与存留均明显减少,并且高浓度处理产生了更强的抑制效应(图7B)。在克隆形成实验中,5 nmol/L Silvestrol已能削弱5-8F细胞的克隆形成能力,浓度升至26 nmol/L后,克隆数量进一步下降。CNE-2Z细胞对该药物的反应更为明显:2.5 nmol/L处理即可显著抑制克隆形成,而在12 nmol/L条件下,克隆形成几乎完全受阻(图7C)。由此可见,Silvestrol的作用并不限于降低NPC细胞的短期存活,还会明显影响其长期增殖及克隆扩增能力。

划痕实验中,NC组细胞随培养时间延长逐步完成划痕闭合,而Silvestrol处理则明显延缓了5-8F和CNE-2Z细胞的划痕修复过程。对于5-8F细胞,5和26 nmol/L Silvestrol均显著降低了48 h和72 h时的划痕闭合率;在CNE-2Z细胞中,2.5和12 nmol/L处理同样表现出一致的抑制趋势,且高浓度组的效应更为突出(P<0.0001,图7D)。



A: EIF4A1 expression across 7 581 malignant cells from 11 patients with NPC in GSE150430; B: Network-perturbation ranking of 2 185 non-EIF4A1 genes in an expanded network constructed from a patient-level cell-count-capped set of 1 485 malignant cells; C: One-sided positive pre-ranked GSEA based on the complete directed perturbation ranking; D: Sensitivity analyses after sequential removal of cytosolic RPL/RPS and mitochondrial MRPL/MRPS genes

图6 EIF4A1单细胞网络虚拟扰动主要涉及核糖体蛋白及线粒体编码转录本

Figure 6 Single-cell network virtual perturbation of EIF4A1 primarily involves ribosomal-protein and mitochondrially encoded transcripts

3 讨论

本研究通过跨队列无偏分析识别NPC稳定的增殖激活与纤毛程序抑制,并构建274个基因增殖候选集。连接性分析优先识别出蛋白质合成抑制机制,单细胞虚拟敲除与Silvestrol实验共同支持NPC存在以核糖体和线粒体稳态依赖为特征的eIF4A翻译脆弱性。本研究实现了从疾病功能状态识别、进展程序提炼、药物机制预测到实验验证的连续整合,为NPC翻译依赖的机制解析及靶向干预提供了整合分析框架。

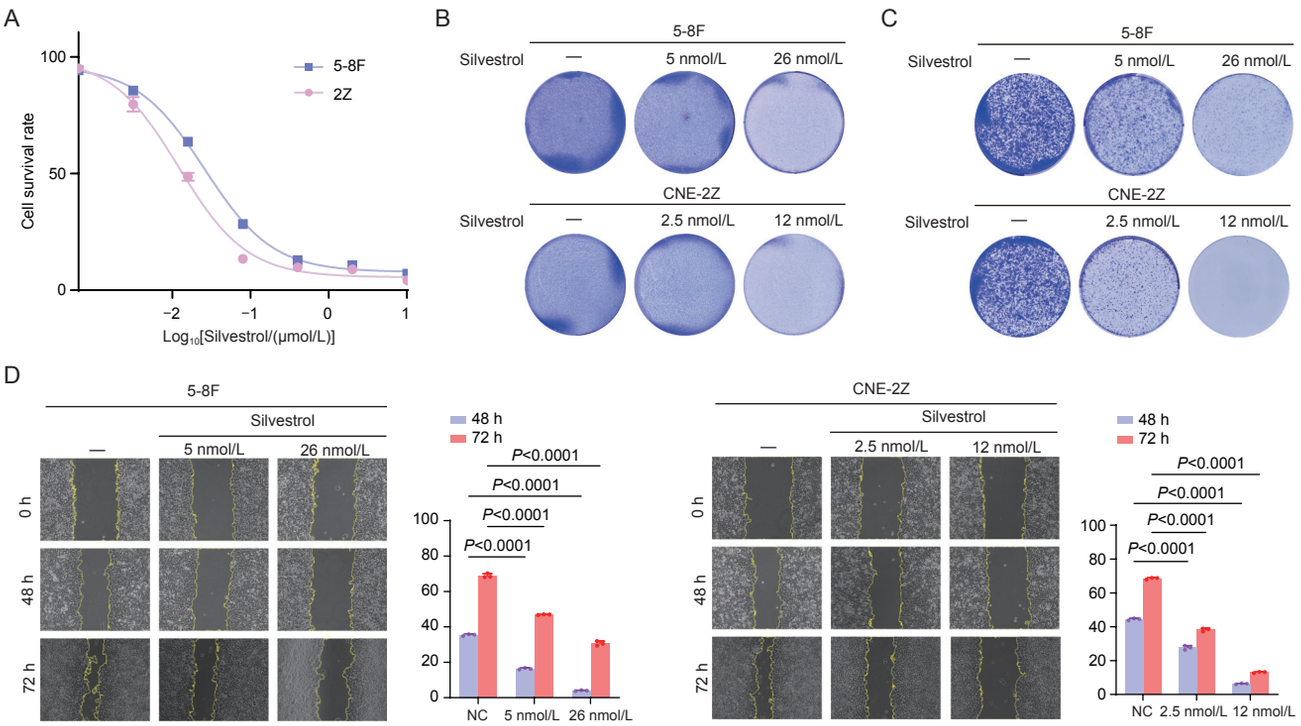
3.1 增殖增强与纤毛程序减弱共同构成NPC的可重复功能状态

既往研究已提示,NPC不同分子亚型可分别呈现细胞周期、纺锤体检查点及侵袭相关依赖[4],CCND1扩增或CDKN2A缺失的NPC模型也可对CDK4/6抑制表现出敏感性[29]。本研究进一步表明,E2F、MYC、G2/M checkpoint、DNA复制和染色体调控并非局限于特定亚型,而是在2个独立队列中稳定重复的共同功能状态。这种在2个独立队列及不同微阵列平台间均可重复观察到的一致性提示,增殖重编程可能构成NPC较为稳定的群体层面转录特征,并为Turquoise模块与较高进展风险的关联提供了生物学依据。

NPC的临床行为同时受到肿瘤微环境影响。单细胞研究揭示了NPC恶性细胞和免疫细胞状态的显著异质性[30],并提示特定免疫和基质生态与患者结局相关。本研究中免疫活化模块呈较低进展风险方向,与上述观察相呼应,说明NPC进展可能取决于恶性细胞增殖驱动与宿主免疫约束之间的平衡。另一方面,纤毛和轴丝程序在两个队列中一致降低,为NPC分子图景补充了上皮结构或分化状态丢失的维度;但Tan模块的临床关联尚未获得稳定的跨队列基因支持,因此其意义仍应作为探索性线索理解。

3.2 增殖候选基因集为药物连接性分析提供查询基础

既往NPC药物研究多从已知基因组异常、信号通



A: Dose-response curves of 5-8F and CNE-2Z cells treated with Silvestrol; B: Representative crystal-violet staining showing concentration-dependent suppression of cell growth following Silvestrol treatment; C: Colony-formation assay showing reduced long-term clonogenic capacity of 5-8F and CNE-2Z cells; D: Representative wound-healing images and quantitative analysis showing delayed wound closure at 0, 48 and 72 h

图7 Silvestrol抑制鼻咽癌细胞活力、克隆形成及划痕闭合

Figure 7 Silvestrol suppresses cell viability, clonogenic growth and wound closure in NPC cells

路或分子亚型出发[4, 29, 31]。本研究采用疾病状态优先的整合分析策略,针对274个候选基因,同步结合其共表达模块特征、疾病进展风险趋势以及两个外部验证队列的一致上调表达规律,将原本零散的细胞周期与染色体调控相关分子变化,凝练为一组可重复、特征稳定的肿瘤多基因表达状态。其主要价值并非现阶段直接用于预后预测,而是为药物扰动分析提供一个预先固定、功能连贯的查询对象,减少由单一基因或单一队列驱动候选机制选择的风险。

LINCS分析识别出的PI3K/AKT/mTOR、细胞周期和微管抑制机制,与既往NPC靶向研究和药物基因组学结果相一致[4, 31],也与CDK4/6抑制在NPC模型中的活性相呼应[29]。更重要的是,蛋白质合成抑制并未被预先设定,却在3种查询规模中持续呈负向连接,提示高增殖NPC状态可能依赖翻译和蛋白稳态系统的持续支持;这一方向也与NPC中蛋白稳态异常具有潜在治疗价值的报道形成联系[32]。因此,本研究的优势在于从跨队列进展程序出发独立收敛至翻译抑制,而非在预设EIF4A靶点后进行事后论证。需要强调的是,该候选基因集仍属于进展相关候选状态,LINCS负向连接仅表示药物扰动转录特征与候选程序之间的反向连接关系,其药理效应仍需后续实验验证。

3.3 NPC中eIF4A异常呈现选择性翻译依赖特征

eIF4A承担ATP依赖的RNA重塑功能,并受到eIF4G和eIF4B等因子的协同调控[33, 34],因此其功能状态不能由单一转录本丰度完整反映。本研究发现,NPC中翻译相关程序具有跨队列重复性,但不同翻译环节并未同步增强;eIF4A1上调和PDCD4下调虽方向一致,统计学证据却存在队列差异,其他eIF4F成员亦表现出明显异质性。由此,现有结果更支持特定翻译调控环节发生重塑,而不足以证明整个eIF4F复合体在NPC中普遍激活。

PDCD4作为eIF4A负调控因子,其作用还受到蛋白稳定性及上游信号调节[35-36]。本研究中PDCD4与翻译程序的相关方向在增殖校正后发生变化,进一步说明mRNA水平不能直接替代其功能状态。同样,SENP3-EIF4A1属于独立的转录读穿本,不能作为经典EIF4A1转录本表达或蛋白活性的替代指标。

已有研究表明,具有复杂5′非翻译区、稳定二级结构通常对eIF4A解旋活性具有更高需求[37-38];

rocaglates还可通过稳定eIF4A-RNA复合物产生序列和转录本选择性的翻译抑制,而非均匀降低所有蛋白质合成[39]。因此,本研究所提出的eIF4A相关脆弱性应被视为一种选择性翻译依赖假设,更可能反映高增殖NPC细胞对特定翻译程序的依赖,而不是总体蛋白质合成的简单升高。

3.4 单细胞网络扰动与Silvestrol药效共同限定EIF4A1的作用范围

单细胞虚拟敲除将分析限制在NPC恶性细胞内部,并通过患者均衡抽样降低样本构成差异。*EIF4A1*扰动主要集中于RPL/RPS核糖体蛋白及MT编码转录本,相关富集在去除核糖体蛋白基因后明显衰减,提示该网络效应主要依赖核糖体和线粒体稳态,而非形成广泛、独立的转录重编程。

完整274基因候选集未富集于*EIF4A1*虚拟敲除的高扰动端,这一结果对机制解释具有重要限定意义。EIF4A1可能是增殖型NPC维持翻译稳态的敏感节点,但并非控制全部细胞周期和染色体程序的单一上游因子。因此,LINCS所识别的蛋白质合成抑制,更可能通过削弱进展型细胞所依赖的翻译支持系统发挥作用,而不是直接逆转整个进展签名。

Silvestrol在2种NPC细胞中均表现出纳摩尔级活性,并抑制克隆形成及划痕闭合,与既往研究的结论一致[40]。本研究的增量在于,该药理效应并非从预设药物出发,而是由跨队列疾病程序和连接性分析逐步收敛而来。需要注意的是,划痕闭合同时受到增殖与迁移影响,且现有实验尚不能证明Silvestrol的全部表型均由EIF4A1特异性依赖介导。

3.5 研究局限性与未来方向

本研究仍存在若干局限。①公共队列在检测平台、样本处理及组织构成方面存在差异,尽管跨队列一致性增强了主要发现的稳健性,仍无法完全排除技术和临床异质性的影响;②进展分析受限于完整随访病例和事件数量,相关模块未通过多重检验校正,因此274个基因候选集目前应被视为经过跨队列表达验证的进展相关候选状态,而非成熟的预后模型;③LINCS连接性反映药物扰动与疾病签名之间的转录方向关系,不能直接等同于体内疗效或治疗窗口;④单细胞虚拟敲除基于转录网络,也难以完整模拟EIF4A1主要发生于翻译和转录后层面的生物学作用;⑤本研究尚未进行EIF4A1直接遗传学敲低及救援实验,因此现有证据不能建立EIF4A1依赖性与Silvestrol表型之间的直接因果关系。后续研究需结合EIF4A1 siRNA/shRNA、翻译效率测定及过表达救援进一步验证。未来研究的重点应由单一分子表达转向“翻译依赖状态”的识别,并明确其与药物反应、疾病进展及治疗联合策略之间的关系。综上所述,本研究将eIF4A相关翻译调控优先定位为NPC中的候选干预方向,这一发现为翻译脆弱性的机制解析、潜在患者分层及后续转化研究提供了研究依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Cai M Y, Wang Y F, Ma H R, *et al*. Advances and challenges in immunotherapy for locally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2024, 131: 102840. DOI:10.1016/j.ctrv.2024.102840.

[2] Xu C, Zhou G Q, Li W F, *et al*. Nivolumab combined with induction chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: a multicenter phase 2 PLATINUM trial[J]. Cancer Cell, 2025, 43(5): 925-936.e4. DOI: 10.1016/j.ccell.2025.01.014.

[3] Lee A W M, Ng W T, Chan J Y W, *et al*. Management of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2019, 79: 101890. DOI:10.1016/j.ctrv.2019.101890.

[4] Ding R B, Chen P, Rajendran B K, *et al*. Molecular landscape and subtype-specific therapeutic response of nasopharyngeal carcinoma revealed by integrative pharmacogenomics[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3046. DOI:10.1038/s41467-021-23379-3.

[5] Chen Y P, Lv J W, Mao Y P, *et al*. Unraveling tumour microenvironment heterogeneity in nasopharyngeal carcinoma identifies biologically distinct immune subtypes predicting prognosis and immunotherapy responses[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 14. DOI:10.1186/s12943-020-01292-5.

[6] Yeo E L L, Hong B H, Tay S H, *et al*. Tumor immune microenvironment delineates progression trajectories of distinct nasopharyngeal carcinoma phenotypes[J]. Cell Rep Med, 2025, 6(6): 102143. DOI: 10.1016/j.xcrm.2025.102143.

[7] You B, Xia T, Gu M, *et al*. AMPK-mTOR-mediated activation of autophagy promotes formation of dormant polyploid giant cancer cells[J]. Cancer Res, 2022, 82(5): 846-858. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-21-2342.

[8] Gong L Q, Kwong D L, Dai W, *et al*. Comprehensive single-cell sequencing reveals the stromal dynamics and tumor-specific characteristics in the microenvironment of nasopharyngeal carcinoma[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1540. DOI:10.1038/s41467-021-21795-z.

[9] Feng P, Wang Y, Liu N, *et al*. High expression of PPP1CC promotes NHEJ-mediated DNA repair leading to

radioresistance and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Death Differ, 2024, 31(5): 683-696. DOI:10.1038/s41418-024-01287-5.

[10] Wang B R, Han J B, Jiang Y, *et al*. CENPN suppresses autophagy and increases paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting the CREB-VAMP8 signaling axis[J]. Autophagy, 2024, 20(2): 329-348. DOI:10.1080/15548627.2023.2258052.

[11] Brito Querido J, Sokabe M, Díaz-López I, *et al*. The structure of a human translation initiation complex reveals two independent roles for the helicase eIF4A[J]. Nat Struct Mol Biol, 2024, 31(3): 455-464. DOI: 10.1038/s41594-023-01196-0.

[12] Pelletier J, Graff J, Ruggero D, *et al*. Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development[J]. Cancer Res, 2015, 75(2): 250-263. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2789.

[13] Raza F, Waldron J A, Quesne J L. Translational dysregulation in cancer: eIF4A isoforms and sequence determinants of eIF4A dependence[J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(6): 1227-1233. DOI:10.1042/BST20150163.

[14] Naineni S K, Bhatt G, Jiramongkolsiri E, *et al*. Protein-RNA interactions mediated by silvestrol: insight into a unique molecular clamp[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(20): 12701-12711. DOI:10.1093/nar/gkae824.

[15] Han P, Xiao Z W, Xia T L, *et al*. The M6A reader YTHDF1 facilitates nasopharyngeal carcinoma proliferation and migration *via* c-MYC[J]. J Biol Chem, 2025, 301(12): 110833. DOI:10.1016/j.jbc.2025.110833.

[16] Xiang T, Lin Y X, Ma W L, *et al*. Vasculogenic mimicry formation in EBV-associated epithelial malignancies[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5009. DOI: 10.1038/s41467-018-07308-5.

[17] Qiu S F, Zhang Q Z, Wu Z Y, *et al*. Establishment and validation of circulating cell-free DNA signatures for nasopharyngeal carcinoma detection[J]. EBioMedicine, 2024, 108: 105321. DOI:10.1016/j.ebiom.2024.105321.

[18] Xiang P J, Tang L, Zhang Y, *et al*. circSETD3 confers radiotherapy resistance in nasopharyngeal carcinoma by attenuating ER stress-induced autophagy and apoptosis *via* PDIA6 upregulation[J]. Oncogene, 2026, 45(3): 368-382. DOI:10.1038/s41388-025-03652-1.

[19] Zhu Q W, Zhang Q C, Gu M, *et al*. *Mir106a-5p* upregulation suppresses autophagy and accelerates malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma[J]. Autophagy, 2021, 17(7): 1667-1683. DOI: 10.1080/15548627.2020.1781368.

[20] Daker M, Ahmad M, Khoo A S, *et al*. Silvestrol inhibits nasopharyngeal carcinoma cells and synergizes with CX-5461: Insights from a proteomics study[J]. Mol Clin Oncol, 2025, 23(5): 95. DOI:10.3892/mco.2025.2890.

[21] Qi C L, Huang M L, Zou Y, *et al*. The IRF2/CENP-N/AKT signaling axis promotes proliferation, cell cycling and apoptosis resistance in nasopharyngeal carcinoma cells by increasing aerobic glycolysis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 390. DOI:10.1186/s13046-021-02191-3.

[22] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, *et al*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.

[23] Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, *et al*. The molecular signatures database hallmark gene set collection[J]. Cell Syst, 2015, 1(6): 417-425. DOI: 10.1016/j.cels.2015.12.004.

[24] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 559. DOI: 10.1186/1471-2105-9-559.

[25] Grambsch P M, Therneau T M. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals[J]. Biometrika, 1994, 81(3): 515-526. DOI:10.1093/biomet/81.3.515.

[26] Duan Y Z, Evans D S, Miller R A, *et al*. *signatureSearch*: environment for gene expression signature searching and functional interpretation[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(21): e124. DOI:10.1093/nar/gkaa878.

[27] Osorio D, Zhong Y, Li G X, *et al*. scTenifoldKnk: an efficient virtual knockout tool for gene function predictions *via* single-cell gene regulatory network perturbation[J]. Patterns, 2022, 3(3): 100434. DOI: 10.1016/j.patter.2022.100434.

[28] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing[J]. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol, 1995, 57(1): 289-300. DOI:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

[29] Hsu C L, Lui K W, Chi L M, *et al*. Integrated genomic analyses in PDX model reveal a cyclin-dependent kinase inhibitor Palbociclib as a novel candidate drug for nasopharyngeal carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 233. DOI:10.1186/s13046-018-0873-5.

[30] Jin S Z, Li R Y, Chen M Y, *et al*. Single-cell transcriptomic analysis defines the interplay between tumor cells, viral infection, and the microenvironment in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Res, 2020, 30(11): 950-965. DOI: 10.1038/s41422-020-00402-8.

[31] Kang Y B, He W H, Ren C P, *et al*. Advances in targeted therapy mainly based on signal pathways for nasopharyngeal carcinoma[J]. Sig Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 245. DOI:10.1038/s41392-020-00340-2.

[32] Yarza R, Bover M, Agulló-Ortuño M T, *et al*. Current approach and novel perspectives in nasopharyngeal carcinoma: the role of targeting proteasome dysregulation as a molecular landmark in nasopharyngeal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 202. DOI:10.1186/s13046-021-02010-9.

[33] Pause A, Sonenberg N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A[J]. EMBO J, 1992, 11(7): 2643-2654. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05330.x.

[34] Zhou X Q, Yuan G J, Wu Y J, *et al*. EIF4A3-induced circFIP1L1 represses miR-1253 and promotes radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(7): 357. DOI: 10.1007/s00018-022-04350-x.

[35] Waters L C, Veverka V, Böhm M, *et al*. Structure of the C-terminal MA-3 domain of the tumour suppressor protein Pdcd4 and characterization of its interaction with eIF4A[J]. Oncogene, 2007, 26(34): 4941-4950. DOI: 10.1038/sj.onc.1210305.

[36] Matsuhashi S, Manirujjaman M, Hamajima H, *et al*. Control mechanisms of the tumor suppressor PDCD4: expression and functions[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2304. DOI:10.3390/ijms20092304.

[37] Hashimoto S, Furukawa S, Hashimoto A, *et al*. ARF6 and AMAP1 are major targets of *KRAS* and *TP53* mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(35): 17450-17459. DOI:10.1073/pnas.1901765116.

[38] Chen M M, Asanuma M, Takahashi M, *et al*. Dual targeting of DDX3 and eIF4A by the translation inhibitor rocaglamide A[J]. Cell Chem Biol, 2021, 28(4): 475-486.e8. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.11.008.

[39] Chu J, Zhang W H, Cencic R, *et al*. Rocaglates induce gain-of-function alterations to eIF4A and eIF4F[J]. Cell Rep, 2020, 30(8): 2481-2488.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.02.002.

[40] Yu L R, Han X Z, Tang Y Z, *et al*. Activation of the MEK/ERK pathway mediates the inhibitory effects of silvestrol on nasopharyngeal carcinoma cells *via* RAP1A, HK2, and GADD45A[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2024, 29(4): 160. DOI:10.31083/j.fbl2904160.

(**收稿**:2026-07-28;**修回**:2026-08-18)

(编辑 汤锦波)