

基于 AMPK 通路与线粒体功能的近视巩膜机制研究生信分析方案

核心科学问题

红光治疗后巩膜哪些细胞亚群发生治疗性改变

- 1、巩膜有哪些细胞亚群？
- 2、红光处理后哪些亚群比例/状态改变？
- 3、这些改变与近视抑制的关系？

实验思路:

- 1、文献调研 - 检索现有巩膜单细胞数据集和红光相关研究
- 2、公共数据挖掘 - 利用 GEO 等数据库的已有数据做预实验

分析方案:

(1) 成纤维细胞线粒体相关通路梳理（重点聚焦巩膜）

(2) 公共数据来源

- GEO 数据库：巩膜成纤维细胞+光照/机械刺激/低氧处理的转录组
- 红光/近红外光处理的细胞数据集
- 机械牵拉刺激成纤维细胞的数据

(3) 期望结果

- 线粒体功能相关基因集（用于后续 qPCR 验证）
- 关键通路的基因列表
- 潜在的差异表达基因预测

3、动物实验 - 单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 识别巩膜所有细胞类型，比较处理组 vs 对照组的细胞比例变化。发现响应红光的特定细胞亚群，挖掘关键信号通路和靶基因。

总体目标：利用公开数据库，获取近视模型巩膜组织的转录组数据，通过 R 语言进行标准化生信分析。重点聚焦 AMPK 信号通路及线粒体功能相关基因群的表达变化，探究能量代谢在近视巩膜重塑中的分子机制。

一、数据获取与预处理

(一) 数据集检索与筛选

1. 检索策略: 访问 NCBI GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库
2. 关键词组合: 小鸡、巩膜、近视模型
3. 原始数据下载

(二) 数据清洗与标准化

二、探索性分析

1. 相关性热图
2. 表达分布图

三、差异表达分析

1. 统计分析筛选出差异基因筛选
2. 用火山图或差异热图 (Heatmap) 进行可视化

四、AMPK 通路与线粒体分析

(一) 线粒体功能基因集富集

1. 功能注释: 对 DEGs 进行 GO (Gene Ontology) 分析, 重点关注 Cellular Component (CC) 中的“Mitochondrion”相关条目; 进行 KEGG 通路富集, 锁定“Oxidative phosphorylation”及“AMPK signaling pathway”。
2. GSEA 富集分析: 不局限于差异基因, 使用全基因列表进行 GSEA 分析, 验证线粒体氧化磷酸化 (OXPHOS) 及呼吸链复合体 (Complex I-V) 功能模块在近视组中的整体激活或抑制状态。

(二) 关键基因表达与相关性分析

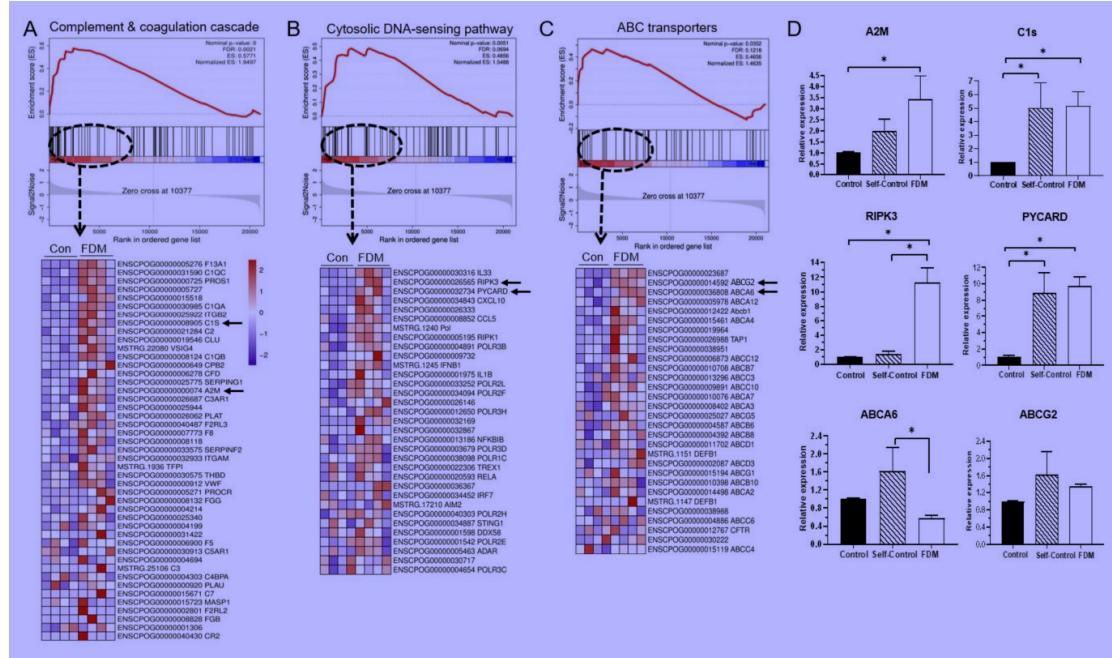
1. 关键基因集提取:
 - o AMPK 核心组件: 提取 *PRKAA1/2* (AMPK), *STK11* (LKB1), *CAMKK2*, *MTOR* 等基因表达数据。
 - o 线粒体生物发生与自噬: 提取 *PPARGC1A* (PGC1), *TFAM*, *PINK1*, *PRKN* 等基因。
 - o OXPHOS 代表基因: 提取呼吸链关键亚基基因。

2. 表达模式可视化: 针对上述特定基因集绘制专项热图或箱线图, 验证其在近视发展过程中的表达改变。
 3. 相关性分析: 计算 AMPK 核心分子与线粒体功能基因之间的相关系数, 绘制相关性散点图或弦图, 评估 AMPK 通路对线粒体功能的潜在调控强度。

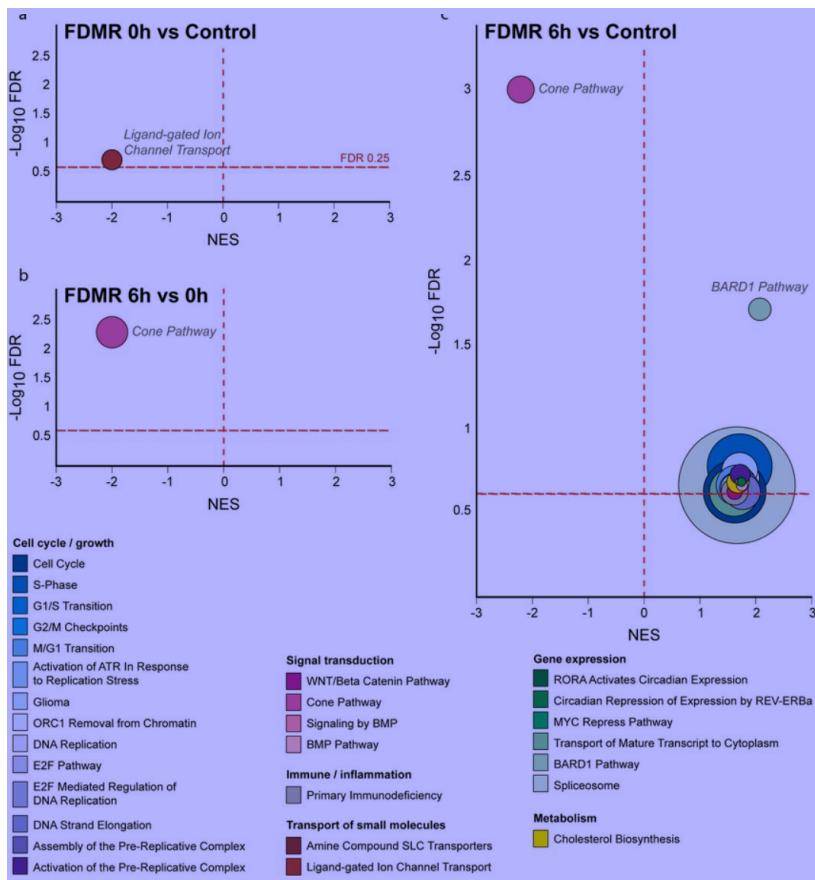
五、图表绘制与结果整合

结果可视化与拼图、结果描述

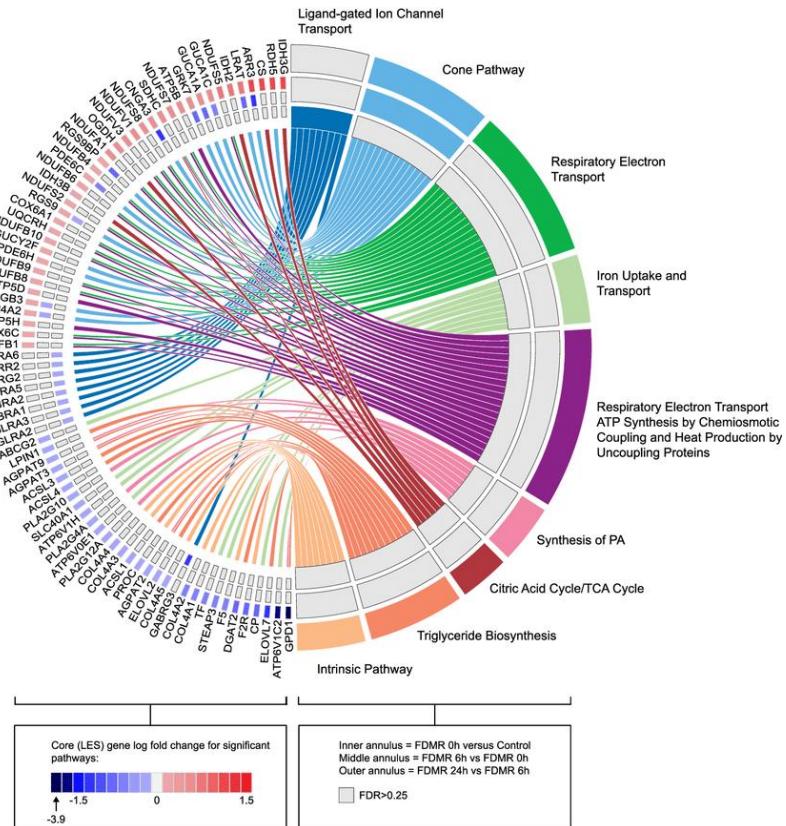
六、参考图



参考图 1: GSEA 富集曲线 + leading-edge 热图



参考图 2: GSEA 结果的气泡图/散点图



参考图 3: 线粒体相关通路“弦图”

GSE58389 数据分析报告

机械牵拉成纤维细胞的线粒体功能相关基因分析

为红光+牵拉实验提供候选基因

一、数据集概述

GSE58389 是一项研究机械牵拉对人原代皮肤成纤维细胞基因表达影响的基因芯片研究。

数据集编号	GSE58389
平台	Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K
细胞类型	原代人皮肤成纤维细胞 (10 个供体)
处理条件	周期性牵拉 (16%拉伸, 0.5Hz)
时间点	5h 和 24h
差异基因数	24h: 64 个显著差异基因 ($ log2FC >0.5$, $p<0.05$)

二、核心发现：与线粒体功能相关的差异基因

2.1 直接参与线粒体功能的基因

基因	变化	功能	研究意义
ME3	↑ FC=0.54	线粒体苹果酸酶 3	NADPH 产生, 支持线粒体还原力
ME1	↓ FC=-0.55	胞质苹果酸酶 1	脂肪酸合成减少, 代谢转换标志
ATP6V1B2	↓ FC=-0.63	V-ATPase B2 亚基	溶酶体酸化, 线粒体自噬相关
TXNIP	↑ FC=0.58	硫氧还蛋白互作蛋白	氧化应激感应器, ROS 调控

关键发现：ME3/ME1 比值变化是 AMPK 激活的典型下游效应，提示机械牵拉可能通过 AMPK 通路调控线粒体代谢。

2.2 胆固醇代谢通路（全面下调）

机械牵拉显著抑制胆固醇合成通路，这是 AMPK 激活→SREBP 磷酸化→胆固醇合成抑制的经典表型：

基因	Log2FC	功能
HMGCR	-0.55	HMG-CoA 还原酶，胆固醇合成限速酶
HMGCS1	-0.52	HMG-CoA 合酶，胆固醇合成关键酶
SQLE	-0.57	角鲨烯环氧酶，胆固醇合成第二限速酶
SCD	-0.72	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶，脂肪酸代谢
IDI1	-0.67	异戊二烯焦磷酸异构酶
INSIG1	-0.59	胰岛素诱导基因 1，SREBP 调控

三、与 AMPK-TFAM 通路的整合分析

GSE58389 的数据为 AMPK-TFAM 通路提供了重要的支持证据：

证据 1：能量代谢重编程

ME3 上调 + ME1 下调 → 线粒体代谢增强，胞质脂肪酸合成减少，这是 AMPK 激活的典型效应

证据 2：胆固醇代谢抑制

HMGCR、SQLE 等胆固醇合成基因全面下调 → AMPK→SREBP 通路激活

证据 3：氧化应激响应

TXNIP 上调 → ROS 感应和代谢调控，这与红光通过线粒体产生 ROS 的机制相呼应

四、红光+牵拉实验推荐检测基因 Panel

4.1 核心线粒体生物合成通路

基因	功能	检测意义
TFAM	线粒体转录因子 A	线粒体生物合成核心指标
PPARGC1A	PGC-1α主调控因子	线粒体生物合成主开关
NRF1	核呼吸因子 1	OXPHOS 基因转录调控
PRKAA1	AMPK α1 亚基	能量感应通路核心
SIRT1	Sirtuin 1	PGC-1α去乙酰化激活

4.2 GSE58389 验证的机械响应基因

基因	牵拉变化	功能	检测意义
ME3	↑	线粒体苹果酸酶	线粒体代谢增强标志
ME1	↓	胞质苹果酸酶	ME3/ME1 比值反映代谢转换
TXNIP	↑	氧化还原感应器	ROS 响应指标
HMGCR	↓	胆固醇合成限速酶	代谢重编程标志

4.3 ECM/细胞骨架（巩膜相关）

基因	牵拉变化	功能与检测意义
COL1A1	-	I 型胶原α1, 巩膜 ECM 主成分
COL8A2	↑	VIII 型胶原α2, 基底膜成分
ADAMTSL4	↑	ECM 组装蛋白, 已知近视相关基因
AHNAK	↑	细胞骨架-膜连接, 机械感应关键蛋白

4.4 红光/光生物调控特异基因

基因	功能	检测意义
COX4I1	细胞色素 c 氧化酶亚基 4	红光直接作用靶点
MT-CO1	线粒体编码 COX 亚基 1	mtDNA 转录指标
MT-ND1	线粒体编码 ND 亚基 1	复合物 I 指标
HIF1A	缺氧诱导因子 1α	缺氧响应 (与近视巩膜相关)

五、实验设计建议

5.1 分组设计

组别	处理	预期变化
Control	无处理	基线状态
Stretch	机械牵拉	ME3↑ ME1↓ TXNIP↑ 胆固醇代谢↓
RedLight	红光照射	TFAM↑ PGC1α↑ COX4↑
R+S	红光+牵拉	协同/拮抗效应待验证

5.2 时间点建议

早期 (6h): 信号通路激活期, 检测 p-AMPK、早期转录因子

中期 (24h): 基因表达变化期, 与 GSE58389 数据直接可比

晚期 (48-72h): 表型效应期, 检测线粒体功能和 ECM 变化

5.3 检测指标

1. qPCR: 上述推荐基因 Panel
2. Western Blot: p-AMPK, TFAM, PGC-1α, COX4
3. 线粒体功能: OCR (Seahorse), ATP 含量, mtDNA 拷贝数, 线粒体膜电位
4. 细胞表型: 增殖、胶原合成、细胞形态

六、核心科学假说 (基金申请参考)

红光通过激活成纤维细胞线粒体 AMPK-TFAM 通路, 在机械应力环境下调控巩膜代谢重编程, 从而影响近视发展。

支撑逻辑:

1. 近视巩膜存在缺氧和代谢异常 [Wu et al. PNAS 2018]
2. 机械牵拉诱导成纤维细胞代谢重编程 [GSE58389 数据]
3. 红光直接作用于线粒体 COX, 增强 OXPHOS [光生物调控机制]
4. AMPK-TFAM 通路是连接能量代谢与线粒体生物合成的核心枢纽

创新点:

1. 首次系统研究红光与机械应力的协同/拮抗效应
2. 从线粒体代谢角度解释红光近视控制机制
3. 结合公共数据和细胞实验的转化研究策略

附录：参考文献

1. Reichenbach M, et al. Gene expression in response to cyclic mechanical stretch in primary human dermal fibroblasts. *Genom Data*. 2014;2:335-339. (GSE58389)
2. Wu H, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control. *PNAS*. 2018;115:E7091-E7100.
3. Decreased scleral Wnt5ah1 fibroblasts exacerbate myopia progression. *Nat Commun*. 2025.
4. Single-Cell RNA Sequencing of Rabbit Sclera at Different Developmental Stages. *IOVS*. 2025.