

# 共同性外斜视内直肌的氧化应激相关基因表达差异

李芳, 邓斯元, 罗符榕, 曾明兵, 何宏

引用: 李芳, 邓斯元, 罗符榕, 等. 共同性外斜视内直肌的氧化应激相关基因表达差异. 国际眼科杂志, 2026, 26(6): 1028-1035.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82060176); 海南省自然科学基金资助项目 (No.820QN415)

作者单位: (570311) 中国海南省海口市, 中山大学中山眼科中心海南眼科医院 海南省眼科医院 海南省眼科学重点实验室

作者简介: 李芳, 女, 硕士, 副主任医师, 斜弱视专科副主任, 研究方向: 斜视、弱视、眼视光学。

通讯作者: 何宏, 女, 博士, 主任医师, 角膜病专科主任, 研究方向: 角膜病、眼视光学. irisheh@foxmail.com

收稿日期: 2026-01-13 修回日期: 2026-04-27

## 摘要

目的: 揭示共同性外斜视 (XT) 内直肌中关键的氧化应激相关基因和通路。

方法: 对 XT 患者和正常对照者的内直肌标本进行 RNA 测序, 应用包括差异表达基因的鉴定、功能富集分析、蛋白质互作网络构建和受试者工作特征曲线评估的生物信息学分析氧化应激相关的差异表达基因和通路。关键枢纽基因通过逆转录定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 进行验证。

结果: 本研究纳入 XT 患者 24 例 [男 6 例, 女 18 例, 年龄 29.5 (21.5, 42.5) 岁], 正常对照组 14 例 [男 4 例, 女 10 例, 年龄 42.0 (28.0, 55.0) 岁]。共鉴定出 319 个氧化应激相关差异基因, 功能富集分析显示其与活性氧代谢过程、对氧化应激的反应以及 p53 信号通路等显著相关。蛋白质-蛋白质互作网络分析确定了 5 个枢纽基因 (*IL6*, *TNF*, *CD4*, *PTPRC*, *ITGAM*)。受试者工作特征曲线评估表明, *CD4*, *PTPRC* 和 *ITGAM* 的表达水平对 XT 组和正常对照组的分类具有较高的准确性 ( $AUC > 0.9$ ); *IL6* 和 *TNF* 的表达水平对 XT 组和对对照组的分类呈现一定的准确性 ( $0.7 < AUC < 0.9$ )。RT-qPCR 验证证实了 *TNF*、*CD4* 和 *IL6* 在 XT 内直肌的显著差异表达 (均  $P < 0.05$ )。

结论: 氧化应激可能在 XT 的发病机制中发挥重要作用, 枢纽基因的发现为研究 XT 发病的分子机制提供了新的方向。

关键词: 共同性外斜视; 氧化应激; 内直肌; 差异表达基因

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2026.6.17

## Differential expression of oxidative stress-related genes in the medial rectus muscle of concomitant exotropia

Li Fang, Deng Siyuan, Luo Furong, Zeng Mingbing, He Hong

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.82060176); Natural Science Foundation of Hainan Province

(No.820QN415)

Hainan Eye Hospital; Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: He Hong. Hainan Eye Hospital; Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570311, Hainan Province, China. irisheh@foxmail.com

Received: 2026-01-13 Accepted: 2026-04-27

## Abstract

• AIM: To identify key oxidative stress-related genes and pathways in the medial rectus (MR) muscle of patients with concomitant exotropia (XT).

• METHODS: RNA sequencing was performed on MR muscle specimens obtained from XT patients and healthy controls. Comprehensive bioinformatics, including the identification of oxidative stress-related differentially expressed genes (OSRDEGs), functional enrichment analysis, protein-protein interaction (PPI) network construction, and receiver operating characteristic (ROC) curve were used to analyze OSRDEGs and signaling pathways. Key hub genes were validated using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

• RESULTS: A total of 24 XT patients [6 males, 18 females, age 29.5 (21.5, 42.5) y] and 14 healthy controls [4 males, 10 females, age 42.0 (28.0, 55.0) y] were enrolled. A total of 319 OSRDEGs were identified. Functional enrichment analysis revealed significant associations with the reactive oxygen species metabolic process, response to oxidative stress, and the p53 signaling pathway. PPI network analysis identified five hub genes (*IL6*, *TNF*, *CD4*, *PTPRC*, and *ITGAM*). ROC curve analysis demonstrated high diagnostic accuracy of *CD4*, *PTPRC*, and *ITGAM* ( $AUC > 0.9$ ) in distinguishing XT patients from healthy controls, while *IL6* and *TNF* showed moderate diagnostic accuracy ( $0.7 < AUC < 0.9$ ). RT-qPCR validation confirmed the significant differential expression of *TNF*, *CD4*, and *IL6* (all  $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Oxidative stress may play a vital role in the pathogenesis of XT. The identified hub genes provide new directions for investigating the molecular mechanisms underlying XT.

• KEYWORDS: concomitant exotropia; oxidative stress; medial rectus muscle; differentially expressed genes

Citation: Li F, Deng SY, Luo FR, et al. Differential expression of oxidative stress-related genes in the medial rectus muscle of concomitant exotropia. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026, 26(6): 1028-1035.

## 0 引言

共同性外斜视(concomitant exotropia, XT)是最常见的斜视亚型,不仅损害视觉发育和双眼视觉功能,还可能因眼位异常而引发焦虑和抑郁等心理疾病,显著影响 XT 患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。然而,XT 的发病机制较为复杂,目前仍不十分明确。既往研究表明 XT 内直肌出现不同程度的病理改变,如肌卫星细胞数量减少,肌小节破坏,肌纤维数量减少等<sup>[3-4]</sup>。此外,研究发现,间歇性外斜视患者的内直肌中不仅存在细胞骨架中间丝组分的表达下降,还观察到细胞外基质相关蛋白的表达亦显著下调<sup>[5-6]</sup>。氧化应激是由氧化剂与抗氧化剂之间的不平衡导致。氧化应激会产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和/或活性氮(reactive nitrogen species, RNS),破坏细胞蛋白质、脂质和 DNA,产生细胞损伤。眼外肌的收缩活动、高耗氧量和代谢率使其持续产生 ROS/RNS,当氧化产物超过抗氧化防御能力时,眼外肌就会进入氧化应激状态。有研究表明,外斜视患者的内直肌抗氧化能力下降,表现为过氧化氢酶表达减少和脂褐素积累增加<sup>[7]</sup>。基于既往研究,我们假设氧化应激相关基因可能在 XT 眼外肌中表达异常,从而导致其功能障碍。本研究采用生物信息学分析和逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)验证方法揭示 XT 内直肌中与氧化应激相关的差异表达的关键基因和通路,识别与 XT 氧化应激相关的潜在生物标志物,从而为 XT 发病的分子机制提供新的研究方向。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 本研究纳入 XT 患者,包括间歇性外斜视和恒定性外斜视,为 XT 组。纳入的正常对照组为非斜视器官捐献者。XT 组的内直肌来源于斜视矫正术中截取的内直肌,正常对照组内直肌样本在死亡后 1-2.5 h 内采集。所有的内直肌样本都是在离肌止线后至少 2 mm 处获取,长度为 4-6 mm。样本均保存于-80 °C 冰箱。本研究已取得海南省眼科医院医学伦理委员会审查批准(批准号:2020-007),所有参与者均签署知情同意书。

**1.1.1 XT 组的纳入及排除标准** 纳入标准:参照中华医学会眼科学分会斜视与小兒眼科学组<sup>[8]</sup>对于 XT 的定义,确诊为 XT(包括间歇性和恒定性外斜视)。排除标准:(1)合并其他类型的斜视;(2)有 XT 以外的其他眼部疾病及影响眼外肌的全身系统性疾病;(3)有眼部外伤史或手术史。

**1.1.2 正常对照组的纳入及排除标准** 纳入标准:自愿并签署捐献器官同意书者。排除标准:(1)有包括斜视在内的眼部疾病及影响眼外肌的全身系统性疾病;(2)有眼部外伤史或手术史。

**1.1.3 实验仪器与试剂** Agilent 2100 Bioanalyzer 及 Agilent 4200 TapeStation 系统(美国 Agilent 公司);Illumina NovaSeq 6000 测序平台(美国 Illumina 公司);Qubit 2.0 荧光计、NanoDrop ND-2000 分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司);ViiA 7 实时荧光定量 PCR 系统(美国 ABI 公司);RNA 提取试剂盒(中国 Majorivd 公司);RNAClean XP 试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司);RNase-Free DNase 试剂盒(德国 QIAGEN 公司);TRIzol 试剂(美国 Thermo Fisher 公司);Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(美国 Vazyme 公司);Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)反转录试剂盒(美国 TAKARA 公司);基因特异性引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取和文库构建及转录组测序** 选取 20 例 XT 和 10 例器官捐献者的内直肌样本,使用 RNA 提取试剂盒并根据生产厂商提供的标准操作流程进行总 RNA 的提取,使用 RNAClean XP 试剂盒和 RNase-Free DNase 试剂盒进行纯化。采用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性,所有样本的 RNA 完整性数值(RNA Integrity Number, RIN)≥7.0,并使用 Qubit 2.0 荧光计和 NanoDrop ND-2000 分光光度计检测 RNA 纯度与浓度,OD260/OD280 比值处于 1.8-2.1,OD260/OD230 比值≥2.0,且总 RNA 浓度不低于 750 ng/μg、总量不低于 40 μg。随后根据 Illumina 标准操作流程进行文库构建,文库构建完成后,使用 Qubit2.0 荧光定量仪检测文库浓度,Agilent 4200 TapeStation 系统检测文库片段分布,确保文库片段大小在 200-500 bp、无明显杂带,文库浓度≥10 ng/μL,且无接头污染。高通量测序实验全程严格遵循生产商(Illumina)提供的标准操作规程。原始测序读数经 Seqtk 过滤后,使用 Hisat2(V2.0.4)比对至参考基因组。基因片段计数通过 StringTie(V1.3.3b)完成,并随后进行修剪后的 M 值平均值(trimmed mean of M values, TMM)归一化处理。最后利用 perl 脚本计算出每个基因的每千碱基外显子每百万片段读数(fragments per kilobase of exon model per million mapped reads, FPKM)。

## 1.2.2 生物信息学分析

**1.2.2.1 数据下载与整理** 从自测数据 gene\_expression 表格中拆分出外斜视数据集的基因测序片段计数和 FPKM 表达谱。其中,外斜视数据集包含 20 例 XT 样本和 10 例正常对照样本,分别为 XT 组和正常对照组。通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)以“Oxidative Stress”一词作为搜索关键词,仅保留“Protein Coding”和“Relevance Score>1”的基因,共获得 2 922 个氧化应激相关基因(oxidative stress-related genes, OSRGs)。此外,以“Oxidative Stress”作为关键词在 PubMed 网站(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)得到已发表文献中的氧化应激相关基因集<sup>[9]</sup>,共 467 个 OSRGs。经过合并去重后共获得 3 065 个 OSRGs。

**1.2.2.2 氧化应激相关差异表达基因筛选** 使用 R 包 limma(V3.58.1)对 XT 组和正常对照组中的基因进行差异分析。设定  $|\log_{2}FC| > 1.0$  且  $\text{adj.}p < 0.05$  为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的阈值。其中,  $\log_{2}FC > 1.0$  且  $\text{adj.}p < 0.05$  的基因为上调的差异表达基因(up-regulated genes),  $\log_{2}FC < -1.0$  且  $\text{adj.}p < 0.05$  的基因为下调的差异表达基因(down-regulated genes)。P 值矫正方法为 Benjamini-Hochberg。差异分析的结果通过 R 包 ggplot2(V3.4.4)绘制火山图。取 DEGs 与 OSRGs 交集并绘制韦恩图,得到氧化应激相关差异表达基因(oxidative stress-related differentially expressed genes, OSRDEGs),通过 R 包 pheatmap(Version 1.0.12)绘制热图。

**1.2.2.3 基因本体和通路富集分析** 使用 R 包 clusterProfiler<sup>[10]</sup>(V4.10.0)对 OSRDEGs 进行基因本体(gene ontology, GO)和通路(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,条目筛选标准为  $\text{adj.}p < 0.05$  且 FDR 值(q value) < 0.25, P 值矫正方法为 Benjamini-Hochberg。

**1.2.2.4 蛋白质-蛋白质互作网络和枢纽基因筛选** 基于

STRING 数据库构建 OSRDEGs 的蛋白质-蛋白质互作网络 (protein-protein interaction network, PPI Network), 物种设定为人类 (*Homo sapiens*), 最低互作得分阈值 (minimum required interaction score) 设定为 0.700 (high confidence), 并隐藏未形成互作关系的节点。网络连线代表综合实验数据、数据库注释及预测分析支持的蛋白互作关系。应用 Cytoscape 软件<sup>[11]</sup> (V3.10.3) 的 cytoHubba 插件<sup>[12]</sup> 中的 5 种算法: maximal clique centrality (MCC), Maximum Neighborhood Component (MNC), Degree, Edge Percolated Component (EPC), Closeness<sup>[13]</sup>。在 PPI Network 中, 先计算 OSRDEGs 的得分, 再根据得分依次排列并选择前 10 名 OSRDEGs。最后将五种不同算法的所得基因取交集并绘制韦恩图进行分析, 算法交集基因为氧化应激相关枢纽基因 (hub genes)。

### 1.2.2.5 枢纽基因的表达差异和受试者工作特征曲线评估

为进一步探究氧化应激相关枢纽基因在外斜视数据集的 XT 组和正常对照组中的表达差异, 基于枢纽基因的表达量绘制分组比较图。使用 R 包 pROC<sup>[14]</sup> (V1.18.5) 绘制枢纽基因的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线并计算 ROC 曲线下的面积值 (area under the curve, AUC)。0.5 < AUC ≤ 0.7 时准确性较低, 0.7 < AUC ≤ 0.9 时具有一定准确性, AUC > 0.9 时具有较高准确性。

**1.2.3 RT-qPCR** 选取另外 4 例 XT 和 4 例器官捐献者的内直肌样本, 采用 Trizol 法提取内直肌组织总 RNA, 逆转录反应参照 M-MLV 反转录酶 (RNase H-) 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 Taq Pro 通用型 SYBR qPCR 预混液, 在 Applied Biosystems ViiA 7 系统上进行。将制备好的 qPCR 体系置于 PCR 仪中, 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s 和 60 °C 退火 30 s, 共 45 个循环; 最后进行熔解曲线分析。基因相对表达量采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算, 以 GAPDH 作为内参基因进行标准化。所用引物序列如下: *IL6* 上游引物为 5'-GTAGTGAGGAACAAGCCAGAG-3', 下游引物为 5'-GCATTTGTGGTTGGGTCAGG-3'; *TNF* 上游引物为 5'-CCGAGTGACAAGCCTGTAGC-3', 下游引物为 5'-CTCTCAGCTCCACGCCATTG-3'; *CD4* 上游引物为 5'-GGCTAGGCATCTTCTTCTGTGT-3', 下游引物为 5'-ACTGGCAGTCTTCTTCTCACT-3'; *PTPRC* 上游引物为 5'-GCCGAAACAGAAGAGGTAAGTGG-3', 下游引物为 5'-GGTAGGTGCTGGCAATGACG-3'; *ITGAM* 上游引物为 5'-TGCCAGAGAATCCAGTGTGACA-3', 下游引物为 5'-CAGGAGGTGTTATGCCAGGT-3'。

统计学分析: 所有数据处理与分析皆基于 R 软件 (V4.3.0), 如无特别说明, 采用 Shapiro-Wilk 检验对连续变量进行正态性检验。符合正态分布的数据以均数 ± 标准差表示, 采用独立样本 *t* 检验进行比较; 不符合正态分布的数据以中位数 (四分位数) 表示, 采用 Mann-Whitney *U* 检验进行分析。通过卡方检验比较两组的分类变量。三组及以上的比较则使用 Kruskal-Wallis *H* 检验方法。结果均是通过 Spearman 相关性分析计算不同分子之间的相关系数。所有的统计 *P* 值均为双侧检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料比较** 本研究纳入 XT 患者 24 例 24 眼, 包

括间歇性外斜视 12 例 12 眼和恒定性外斜视 12 例 12 眼, 为 XT 组, 其中男 6 例, 女 18 例, 年龄 29.5 (21.5, 42.5) 岁, 斜视度为 73.5<sup>Δ</sup> ± 19.9<sup>Δ</sup>。纳入正常对照组 14 例 14 眼, 其中男 4 例, 女 10 例, 年龄 42.0 (28.0, 55.0) 岁。XT 组与正常对照组年龄、性别相比差异均无统计学意义 (*P* = 0.076、1.000)。

**2.2 外斜视相关氧化应激差异表达基因分析** 在外斜视数据集中, 共鉴定出 2 653 个 DEGs, 包括 1 762 个上调基因和 891 个下调基因 (图 1A)。DEGs 与 OSRDEGs 取交集得到 319 个 OSRDEGs (图 1B), XT 组和正常对照组组间差异表达排序前 20 的 OSRDEGs, 见图 1C。

**2.3 GO 和 KEGG 富集分析** OSRDEGs 主要富集在: 活性氧代谢过程 (reactive oxygen species metabolic process)、氧化应激反应 (response to oxidative stress)、炎症反应调节 (regulation of inflammatory response)、外源刺激反应 (response to xenobiotic stimulus) 以及盐胁迫反应 (response to salt) 等生物学过程 (biological processes, BP); 含胶原的细胞外基质 (collagen-containing extracellular matrix), 膜筏/膜微域 (membrane raft, membrane microdomain), 内质网腔 (endoplasmic reticulum lumen), 血红蛋白复合物 (hemoglobin complex) 等细胞成分 (cellular components, CC); 氧结合能力 (oxygen binding)、蛋白酶结合活性 (protease binding)、激素活性 (hormone activity)、结合珠蛋白结合能力 (haptoglobin binding) 以及抗氧化活性 (antioxidant activity) 等分子功能 (molecular functions, MF)。同时, 还富集在糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、中性粒细胞胞外诱捕网形成 (neutrophil extracellular trap formation)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway) 以及酒精中毒 (alcoholism) 等生物学通路 (KEGG) 中 (图 2A)。BP、CC、MF 和 KEGG 的网络图见图 2B-E。

**2.4 PPI 网络分析与枢纽基因筛选** PPI 网络基于高置信度互作 (互作得分 > 0.700) 构建, 共有 234 个 OSRDEGs 形成有效互作关系 (图 3A)。节点之间的连线表示达到高置信度标准的蛋白互作, 提示相关分子在氧化应激调控网络中可能存在紧密的功能关联。分别将 Cytoscape 软件的 5 种算法排序前 10 的 OSRDEGs 绘制 PPI 互作网络 (图 3B-F)。五种算法的基因取交集并绘制韦恩图 (图 3G) 进行分析, 获得 5 个 hub 基因分别是: *IL6*、*TNF*、*CD4*、*PTPRC*、*ITGAM*。

**2.5 枢纽基因的差异表达验证与 ROC 曲线分析** 差异表达分析显示, XT 组与正常对照组之间 5 个枢纽基因 (*IL6*、*TNF*、*CD4*、*PTPRC* 和 *ITGAM*) 的表达水平具有高度统计学显著性 (均 *P* < 0.01), 图 4A。基于枢纽基因表达进行的 ROC 曲线分析表明, *CD4*、*PTPRC* 和 *ITGAM* 的表达水平对 XT 组和正常对照组的分类具有较高的准确性 (AUC > 0.9); *IL6* 和 *TNF* 的表达水平对 XT 组和正常对照组的分类呈现一定的准确性 (0.7 < AUC < 0.9), 见图 4B-F。

**2.6 RT-qPCR 验证枢纽基因** RT-qPCR 结果证实, XT 组内直肌中 *TNF* 和 *CD4* 的表达水平显著高于正常对照组 (均 *P* < 0.05), 而 *IL6* 的表达水平显著低于正常对照组 (*P* < 0.05)。PTPRC 和 ITGAM 的表达量在两组间差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05), 见表 1。

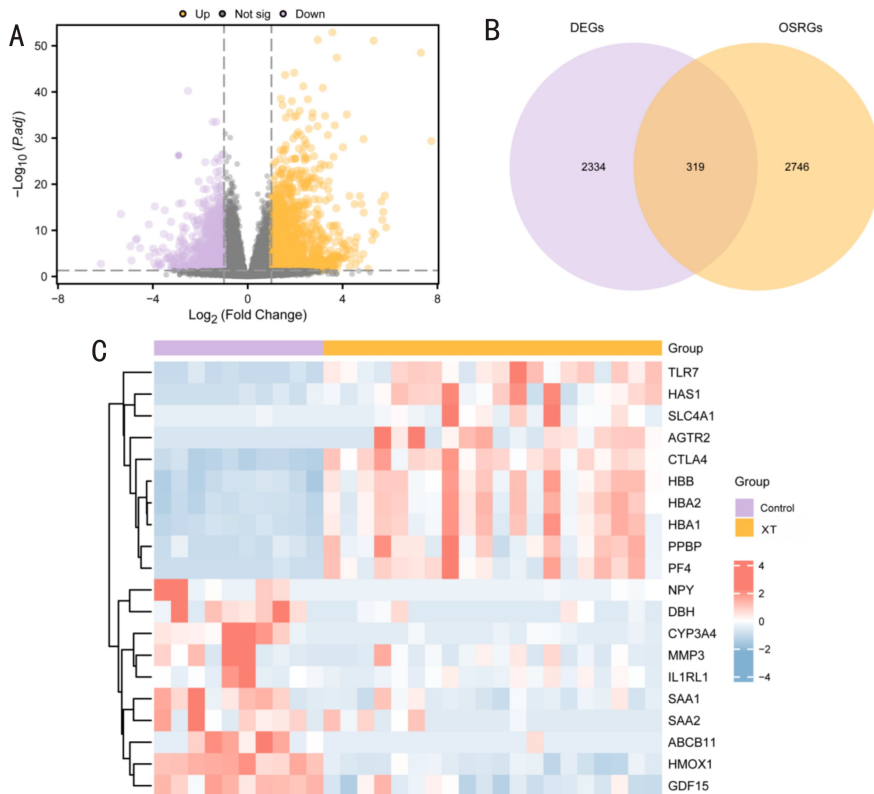


图 1 差异基因表达分析 A:XT 组和正常对照组的差异表达基因分析火山图;B:DEGs 和 OSRGs 韦恩图;C:外斜视数据集中 |logFC| 排序前 20 的 OSRDEGs 热图,红色代表高表达,蓝色代表低表达。

### 3 讨论

近年来,氧化应激在眼科疾病中的作用日益受到关注。王伟等<sup>[15]</sup>发现 ATP 结合盒转运蛋白 A4 (ABCA4) 功能缺失可加剧氧化应激,诱导视网膜色素上皮细胞凋亡,参与干性年龄相关性黄斑变性的病理进程。然而,氧化应激是否参与眼外肌疾病——尤其是 XT 的发病,此前尚属空白。本研究首次系统分析了 XT 患者内直肌中氧化应激相关基因的表达差异,通过多种生物信息学方法整合筛选出潜在枢纽基因,探讨氧化应激在 XT 发病机制中的作用,为理解斜视的分子机制提供了新的视角,同时也拓展了氧化应激研究的疾病谱系,为后续功能研究提供了明确靶点。

Jung 等<sup>[7]</sup>发现外斜视患者内直肌中过氧化氢酶表达显著下降,脂褐素累积增加,提示其抗氧化能力受损。本研究进一步在转录组层面发现,XT 相关的 OSRDEGs 显著富集于活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、炎症反应调节等生物学过程,与 Jung 等<sup>[7]</sup>的发现具有良好的一致性。Jung 等<sup>[7]</sup>未发现超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 表达变化,而本研究鉴定的枢纽基因中亦未见 SOD1,提示 XT 内直肌的抗氧化失衡可能主要涉及其他抗氧化通路,而非 SOD1 介导的防御机制。此外,Sandbach 等<sup>[16]</sup>在超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 缺陷小鼠中观察到眼外肌线粒体形态异常,表现为线粒体肿胀、嵴排列紊乱,并伴随视网膜结构变薄,进一步证实线粒体来源的活性氧在眼外肌及眼组织病理中的核心作用。本研究虽然未直接观察线粒体形态,但 KEGG 富集分析显示 OSRDEGs 在 p53 信号通路、HIF-1 信号通路等与线粒体功能密切相关的通路中显著富集,提示线粒体氧化应激可能同样参与 XT 内直肌的病理改变。需要说明的是,部分通路如“酒精中毒”虽然在命名上指

向特定疾病背景,但其通路注释中实质上包含氧化应激反应、转录调控及细胞凋亡等核心生物学过程。因此,本研究更关注这些通路所反映的氧化还原失衡及信号转导异常,而非其外在的疾病标签。对于目前缺乏直接证据支持其与 XT 发病机制相关性的通路,仅提示其可能涉及的分子网络背景,其具体作用仍有待进一步验证。

研究表明,IL6 参与调节氧化应激反应。Marasco 等<sup>[17]</sup>发现,IL6 可以快速激活胰腺 β 细胞中的抗氧化因子 NRF2,减少 ROS 积累,缓解氧化应激。β 细胞中缺乏 IL6 受体会使小鼠更容易受到氧化应激损伤,从而导致糖尿病发生。研究还表明,IL6 促进 *Nrf2* 的表达和核转位,从而增强抗氧化基因的表达,维持心肌细胞的氧化还原稳态<sup>[18]</sup>。缺乏 IL6 的小鼠表现出显著增加的心肌氧化应激和心律受损,而补充 IL6 可以缓解心肌细胞的氧化应激<sup>[18]</sup>。本研究 ROC 分析发现内直肌中 IL6 的表达水平对 XT 组和正常对照组的分类呈现一定的准确性,且 RT-qPCR 证实 XT 组内直肌的 IL6 表达水平显著低于正常对照组,这提示 XT 患者内直肌中 IL6 表达的下调可能导致肌细胞内 ROS 积累,引起细胞功能障碍,从而促进 XT 的发生。然而,一些研究却得出相反的结果。IL6 信号通路抑制剂 sgp130Fct 可以降低糖尿病小鼠视网膜中 ROS 和 8-OHdG (一种氧化性 DNA 损伤标志物) 的水平<sup>[19]</sup>。此外,抑制 IL6 的反式信号传导通路可以恢复糖尿病小鼠视网膜中抗氧化酶 (过氧化氢酶和内皮型一氧化氮合酶) 的正常表达<sup>[19]</sup>。因此,IL6 在眼外肌细胞中的作用仍需要进行进一步的实验研究。

TNF 是参与免疫和炎症反应的关键细胞因子,能够诱导多种细胞反应,包括氧化应激、凋亡和坏死。经 TNF 处理的成肌细胞在分化早期表现出线粒体内膜中 ROS 水平

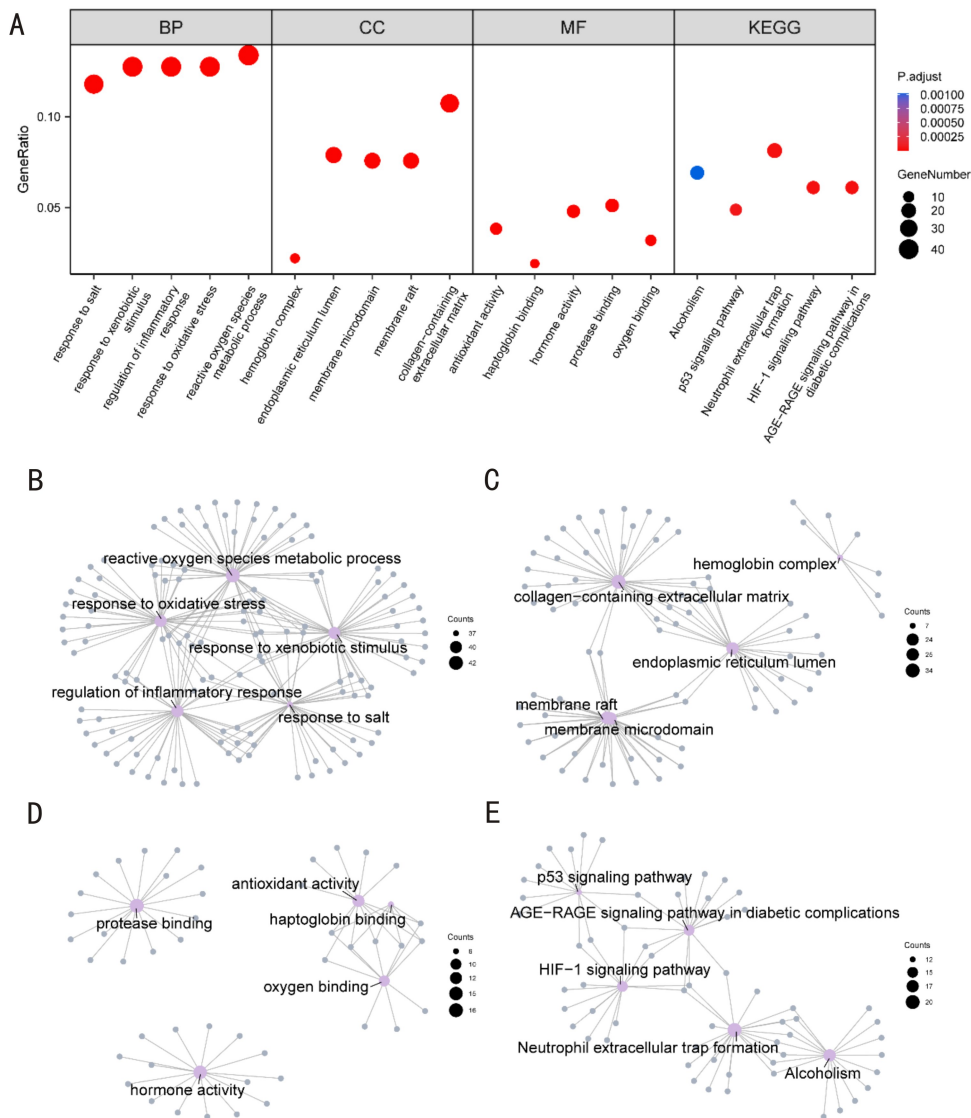


图2 OSRDEGs的GO和KEGG富集分析 A:OSRDEGs的GO和KEGG富集分析结果气泡图;BP,CC,MF和KEGG。横坐标为GO terms和KEGG terms;B-E:OSRDEGs的GO和KEGG富集分析结果网络图展示;BP(B),CC(C),MF(D)和KEGG(E),紫节点代表条目,灰色节点代表分子,连线代表条目和分子的关系,连线说明对应的分子和对应条目的注释,节点越大则条目包含的分子数越多。

增加、磷脂过氧化和线粒体自噬,显著降低了肌细胞分化成熟程度和肌球蛋白重链2合成<sup>[20]</sup>。抑制TNF- $\alpha$ 可以减少骨骼肌肌管的氧化应激和炎症反应,防止肌肉损失<sup>[20]</sup>。此外,TNF参与凋亡调节。当其与受体TNFR1结合后,TNF形成TNF-R1信号复合体,激活NF- $\kappa$ B信号通路,促进炎症反应并启动凋亡<sup>[21]</sup>。Chung等<sup>[22]</sup>在上斜肌麻痹所致继发性下斜肌亢进患者中发现,抗氧化蛋白硫氧还蛋白显著下降,p27表达亦降低,提示持续过度收缩的眼外肌处于氧化应激状态。本研究同样在XT内直肌中鉴定出TNF等与炎症和氧化应激密切相关的枢纽基因,且TNF在独立样本中得到验证,与Chung等<sup>[22]</sup>研究中炎症与抗氧化失衡并存的结论具有一致性。然而,两项研究在受累肌肉的性质上存在差异:Chung等<sup>[22]</sup>的研究对象为亢进的下斜肌,属于“强侧肌”,因拮抗肌麻痹而长期处于过度收缩状态;而本研究中的XT内直肌属于“弱侧肌”,在外斜视时其主动收缩功能相对不足。尽管两者均表现为炎症相关基因表达上调及抗氧化能力下降,但其背后的病理生理机制可能不同。在强侧肌中,持续高负荷收缩可

直接导致机械应力相关的氧化应激和炎症反应;而在弱侧肌中,TNF表达的升高可能更多反映慢性低度炎症状态和肌纤维重塑过程,而非直接的收缩负荷过载。因此,本研究推测TNF表达的升高可能是诱导内直肌细胞发生氧化应激和/或凋亡的因素之一,导致细胞损伤,从而参与XT的发病,但其具体作用方式可能与强侧肌存在差异。

CD4编码的CD4分子是T淋巴细胞表面的关键共受体,在免疫应答调控中发挥核心作用。研究发现,CD4阳性T细胞及其亚群(如调节性T细胞)在骨骼肌损伤后大量浸润,调控巨噬细胞向M2型极化,促进肌卫星细胞增殖与分化,从而介导肌肉修复<sup>[23-24]</sup>。本研究显示,XT内直肌中CD4的mRNA表达水平显著高于正常对照组,提示局部可能存在T细胞介导的免疫浸润和炎症反应。与TNF类似,CD4的表达上调进一步支持XT内直肌存在炎症与氧化应激交互激活的病理状态。此外,CD4阳性T细胞本身亦可通过产生细胞因子间接调控局部氧化应激水平,而氧化应激又可反过来影响T细胞的分化与功能。因此,XT内直肌中CD4表达上调的意义可能不仅在于反映炎

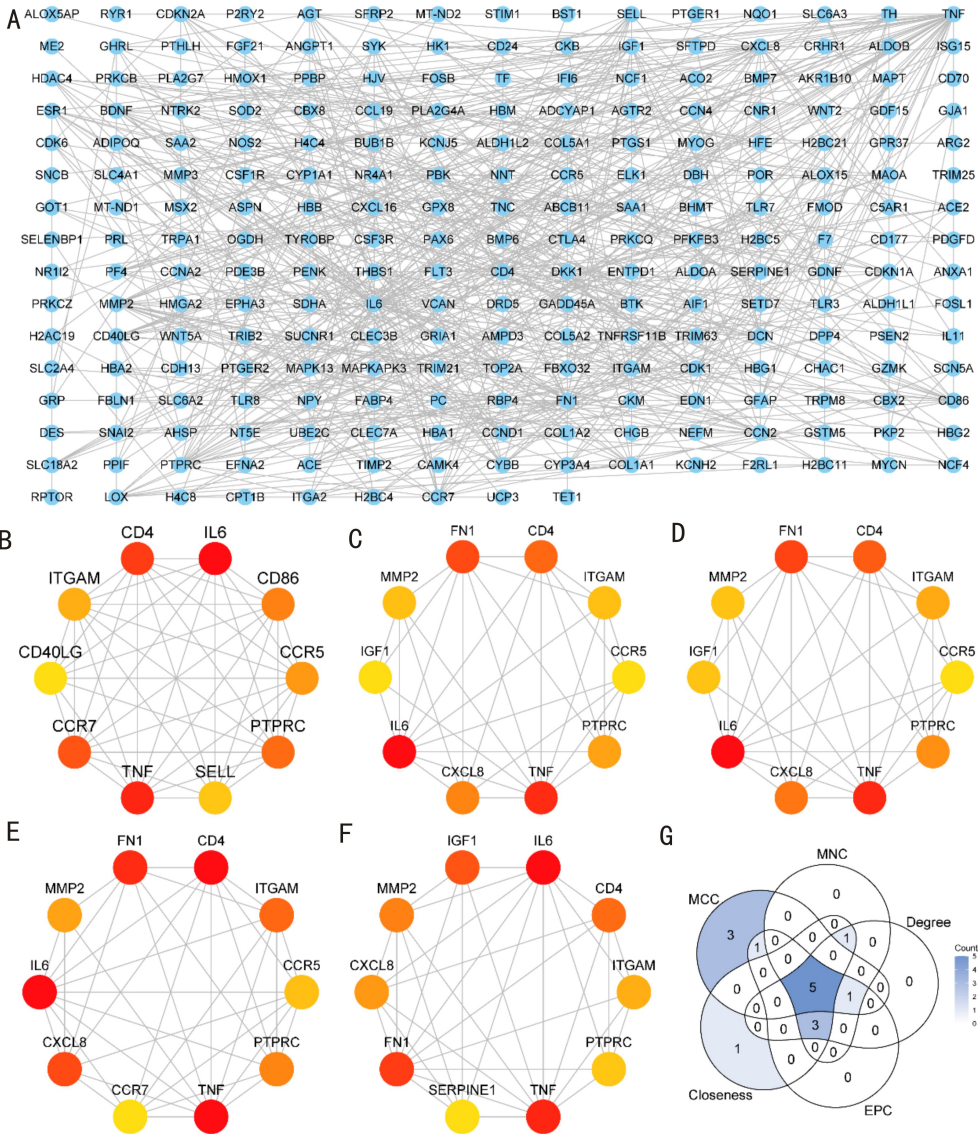


图3 PPI 交互网络和枢纽基因筛选 PPI 网络基于 STRING 数据库构建,最低互作得分阈值 (minimum required interaction score) 设定为 0.700 (high confidence),连线表示具有较高置信度支持的蛋白互作关系。A:OSRDEGs 的 PPI 交互网络;B-F:5 种算法计算得出的排序前 10 的 OSRDEGs 的 PPI 交互网络,包括 MCC (B),MNC (C),Degree (D),EPC (E) 和 Closeness (F);G:5 种算法计算得出的排序前 10 的 OSRDEGs 的韦恩图。

症存在,更可能提示局部免疫微环境的改变参与了氧化应激的调控。未来可通过免疫组织化学等方法进一步明确 XT 内直肌中 CD4 阳性细胞的来源、分布及其与氧化应激标志物的空间关系,以深入解析其在 XT 发病中的具体作用。

除 *IL6*、*TNF* 和 *CD4* 外,本研究还鉴定出 *PTPRC* 和 *ITGAM* 作为潜在的枢纽基因。尽管在 *RNA-seq* 数据中这两个基因均表现出较高的 AUC 值 ( $AUC > 0.9$ ),提示其在原始队列中具有较好的区分能力,但在独立样本的 RT-qPCR 验证中,*PTPRC* 和 *ITGAM* 未呈现显著表达差异。这种不完全一致可能与验证样本量较小及个体间生物学异质性有关,从而影响统计功效和表达稳定性。此外,ROC 分析基于原始转录组数据进行内部评估,其结果并不等同于外部独立验证。因此,相关基因的潜在诊断价值仍需在更大样本及多中心研究中进一步确认。

另外,本研究正常对照组内直肌样本来源于器官捐献者,而 XT 组来源于活体组织。尸体组织在脑死亡后到样本采集前,经历了缺血、缺氧等全身性病理生理变化,这可

能影响其氧化应激状态,使二者在基线水平上存在固有差异。为尽量减小这一潜在偏倚,本研究严格控制了尸体样本的采集时间并迅速在低温下保存,最大限度地减少了死后组织自溶和氧化应激相关蛋白降解;同时,所有样本均通过 RNA 完整性检测,确保纳入分析的样本质量一致,并在差异分析中采用统一的标准流程,以减少技术层面的系统误差。需要强调的是,如果活体与尸体内直肌样本间确实存在氧化应激状态的差异,这种差异只会使我们的检测结果 (即 XT 组与正常对照组的差异) 偏向于零假设 (即更不容易观察到真实差异)。因为病理状态的活体组织本身可能处于高氧化应激状态,而尸体组织由于缺血缺氧等过程也可能诱发了继发性的氧化应激或抗氧化系统耗竭。即使在这种“双重干扰”下,我们仍然观察到了显著的组间差异,这证明了 XT 组内直肌确实存在较为显著的氧化应激失衡。当然,未来仍需通过动物模型或细胞实验对这一结论进行深入验证。

本研究存在一定局限性:(1) 由于正常人内直肌组织主要来源于符合严格纳入标准的器官捐献者,样本获取存

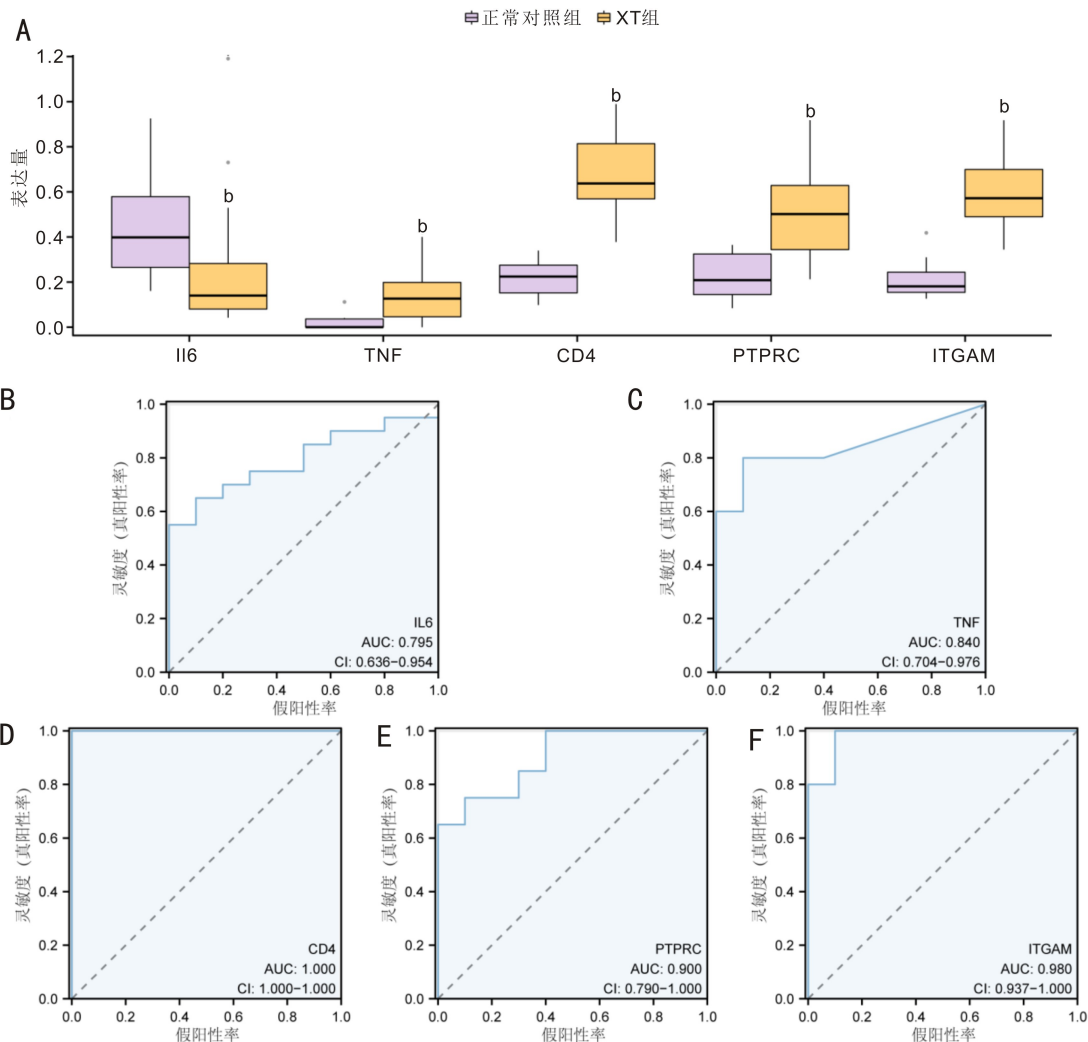


图4 枢纽基因在XT组和正常对照组的差异表达分析和ROC曲线分析 A:枢纽基因在XT组和正常对照组的表达量的比较图。B-F:IL6(B),TNF(C),CD4(D),PTPRC(E)和ITGAM(F)的ROC曲线。<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组。

表1 XT组和正常对照组枢纽基因的表达量差异分析

| 分组       | <i>n</i> | <i>IL6</i>        | <i>CD4</i>        | <i>TNF</i>        | <i>ITGAM</i>      | <i>PTPRC</i>      | <i>M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>)</i> |
|----------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| XT组      | 4        | 0.85 (0.75, 1.04) | 1.54 (1.32, 1.77) | 2.25 (1.89, 2.40) | 1.03 (0.86, 1.15) | 1.32 (0.22, 6.12) |  |
| 正常对照组    | 4        | 1.65 (1.20, 1.95) | 0.93 (0.78, 1.08) | 1.15 (0.91, 1.54) | 1.66 (1.22, 1.93) | 1.66 (0.55, 2.46) |  |
| <i>P</i> |          | 0.029             | 0.029             | 0.029             | 0.057             | 1.000             |  |

注:正常对照组为非斜视器官捐献者。

在客观限制,使得本研究样本量相对有限,可能在一定程度上影响统计功效,并增加 I 类或 II 类错误的风险。为提高结果的可靠性,本研究在差异分析中采用了较为严格的筛选标准,并结合多算法 PPI 网络分析、功能富集分析及独立样本验证进行交叉支持。未来仍需扩大样本量并结合功能实验进一步验证相关基因在 XT 中的作用。(2) 本研究仅通过 RT-qPCR 在 mRNA 水平验证了枢纽基因的表达差异,尚缺乏体内及体外功能实验进一步验证这些枢纽基因在 XT 内直肌氧化应激调控中的作用及机制。特别是对于 CD4 等免疫相关基因,其表达上调是否直接参与氧化应激反应,还是仅作为局部炎症的伴随标志,仍需通过细胞共培养、基因敲除或抗体中和等实验手段加以阐明。(3) 本研究仅关注了内直肌,而未对 XT 患者的其他眼外肌进行同步分析,因此无法全面评估氧化应激改变是 XT 的普遍特征还是内直肌的特异性病理表现。未来研究

需要通过扩大样本量、利用体外细胞模型或动物实验进行功能与机制验证,并纳入配对的多种眼外肌样本进行综合分析,以进一步证实和深化本研究的发现。

综上所述,本研究通过对 XT 患者内直肌进行转录组测序及多层次生物学整合分析,首次系统揭示了氧化应激相关基因在 XT 发病中的潜在作用,将氧化应激与斜视的分子机制研究紧密关联。本研究鉴定的 TNF、CD4 及 IL6 为深入解析 XT 内直肌病理改变的分子基础提供了新的候选靶点。另外,这些免疫-氧化应激相关基因不仅可能作为评估内直肌功能状态的生物标志物,也为未来探索免疫调节策略干预斜视提供了初步理论依据。后续研究需在扩大样本量的基础上,结合细胞与动物模型开展功能验证,以期对 XT 的精准诊疗开辟新途径。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

**作者贡献声明:**李芳论文选题与修改,初稿撰写;邓斯元标本收集,PCR实验;罗符榕文献检索,数据分析;曾明兵标本收集,数据分析;何宏选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

#### 参考文献

[1] Morita Y, Hiraoka T, Oshika T. Influence of intermittent exotropia surgery on general health-related quality of life: different perception by children and parents. *Jpn J Ophthalmol*, 2021,65(3):326-330.

[2] Mao DY, Lin J, Chen LN, et al. Health-related quality of life and anxiety associated with childhood intermittent exotropia before and after surgical correction. *BMC Ophthalmol*, 2021,21(1):270.

[3] Kim CZ, Lee SJ. Increased myofiber size and reduced satellite cell numbers in medial rectus muscle of patients with intermittent exotropia. *Strabismus*, 2020,28(4):201-207.

[4] Yao J, Wang X, Ren H, et al. Ultrastructure of medial rectus muscles in patients with intermittent exotropia. *Eye*, 2016,30(1):146-151.

[5] Shen T, Lin J, Li XL, et al. Intermediate filaments in the medial rectus muscles in patients with concomitant exotropia. *Int Ophthalmol*, 2020,40(2):403-410.

[6] Yu XN, Shi SL, Cui YL, et al. Clinical significance of CTGF and Cry61 protein in extraocular muscles of strabismic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2023,261(10):2845-2851.

[7] Jung SK, Choi JS, Shin SY. Change in the antioxidative capacity of extraocular muscles in patients with exotropia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015,253(4):551-556.

[8] 中华医学会眼科学分会斜视与小儿眼科学组. 我国斜视分类专家共识(2015年). *中华眼科杂志*, 2015,51(6):408-410.

[9] Zheng MJ, Hu YX, Liu OX, et al. Oxidative stress response biomarkers of ovarian cancer based on single-cell and bulk RNA sequencing. *Oxid Med Cell Longev*, 2023,2023:1261039.

[10] Yu GC, Wang LG, Han YY, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A J Integr Biol*, 2012,16(5):284-287.

[11] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003,13(11):2498-2504.

[12] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*, 2014,8(4):S11.

[13] Yang X, Li YH, Lv RL, et al. Study on the multitarget mechanism and key active ingredients of herba siegesbeckiae and volatile oil against rheumatoid arthritis based on network pharmacology. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2019,2019:8957245.

[14] Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinform*, 2011,12(1):77.

[15] 王伟, 栗小丽, 李娟, 等. ABCA4 缺失促进干性年龄相关性黄斑变性氧化应激模型中 ARPE-19 细胞凋亡的机制研究. *国际眼科杂志*, 2026,26(2):208-215.

[16] Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, et al. Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (Sod2)-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001,42(10):2173-2178.

[17] Marasco MR, Conteh AM, Reissaus CA, et al. Interleukin-6 reduces  $\beta$ -cell oxidative stress by linking autophagy with the antioxidant response. *Diabetes*, 2018,67(8):1576-1588.

[18] Peng Y, Yang QC, Gao SY, et al. IL-6 protects cardiomyocytes from oxidative stress at the early stage of LPS-induced sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022,603:144-152.

[19] Robinson R, Srinivasan M, Shanmugam A, et al. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biol*, 2020,34:101574.

[20] Chernyavskij DA, Pletjushkina OY, Kashtanova AV, et al. Mitochondrial oxidative stress and mitophagy activation contribute to TNF-dependent impairment of myogenesis. *Antioxidants*, 2023,12(3):602.

[21] van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2023,23(5):289-303.

[22] Chung YW, Choi JS, Shin SY. Expression of MyoD, insulin like growth factor binding protein, thioredoxin and p27 in secondarily overacting inferior oblique muscles with superior oblique palsy. *BMC Ophthalmol*, 2018,18(1):128.

[23] Wu JH, Ren BW, Wang DC, et al. Regulatory T cells in skeletal muscle repair and regeneration: recent insights. *Cell Death Dis*, 2022,13(8):680.

[24] Ziemkiewicz N, Hilliard G, Pullen NA, et al. The role of innate and adaptive immune cells in skeletal muscle regeneration. *Int J Mol Sci*, 2021,22(6):3265.