



瘢痕疙瘩的差异表达基因谱研究

瘢痕疙瘩是临床上常见的病理性瘢痕，是创伤过度愈合的结果。虽然经过长期、大量的研究，但积累的资料零碎而不系统，其发病机制仍不清楚，寻找异常瘢痕形成中的相关特异性基因已显得十分迫切。本实验应用含有8064个人类靶基因的表达谱芯片，研究比较瘢痕疙瘩与正常皮肤组织的基因差异表达情况，较全面反映瘢痕疙瘩形成的相关基因表达谱，为进一步分析筛选出特异性的相关基因提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源及制备

瘢痕疙瘩组3例，正常皮肤组10例。瘢痕疙瘩标本来源于南方医院整形外科手术病人，正常皮肤组织来源于无瘢痕体质趋势及无免疫性疾病的包皮手术标本，这些正常皮肤样品提取的mRNA混合为正常对照组。术中留取新鲜组织标本，液氮冻存备用。

1.2 表达谱芯片

含有8064个人类靶基因的基因表达谱芯片，由深圳微芯生物公司提供，产品编号为CSC-GE-80。其中包括120个外参照标准基因和132个内参照标准基因以及其他阴性和阳性对照基因共384个基因。

1.3 探针制备

按Trizol一步法提取瘢痕疙瘩和正常皮肤组织的总RNA，经紫外分析和琼脂糖凝胶电泳确认RNA质量合格后，逆转录标记并纯化cDNA，用Cy3-dUTP标记瘢痕疙瘩组的cDNA，用Cy5-dUTP标记正常皮肤组的cDNA。乙醇沉淀后将两组已标记的探针等量混合溶解于杂交液中。

1.4 芯片杂交

将芯片和杂交探针分别在95℃水浴中变性5 min后，立即将探针加在芯片上。用盖玻片封片，用杂交密封舱予以密闭。恒温杂交箱内60℃杂交16 h，严格洗涤后，室温晾干。

1.5 荧光扫描和结果分析

玻片完全干燥后，放入扫描片夹中。ScanArray3000扫描仪扫描芯片，获得荧光图像，提取杂交信号，以看家基因为内参照对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值，经转换后以数据形式输出。

1.6 数据处理和统计学分析

对数据进行标准化处理与统计学分析。按照以芯片中密度值在 5×10^8 以上的数据点为有效数据，同时比值大于2或小于0.5的数据点为存在显著性差异表达的基因点这一数据筛选标准，筛选出差异表达基因。

1.7 生物信息学分析

用专用生物信息学软件将差异表达基因按照不同的基因功能分类进行生物信息学归类和分析。

1.8 应用半定量RT-PCR检测结缔组织生长因子(CTGF)基因表达

为验证芯片的结果是否为假阳性，选取在芯片检测中为表达增高的CTGF为目的基因，对照基因采用

ACTG, 应用半定量RT-PCR方法检测其在瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中的差异表达情况。根据CTGF和ACTG的cDNA序列, 按照引物设计原则设计引物, CTGF引物序列为: 正向5'-CCA CAG AAC CAC CAC CCT-3', 反向 5'-ACC CTC CCA CTG CTC CTA-3', 产物长度为446 bp; ACTG引物序列为: 正向5'-GCC GCA TCC TCC TCT TCT-3', 反向5'-GCA TCT GCT GAG TCC GTT T-3', 产物长度为425 bp。PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察结果, 并以凝胶成像仪拍照。图像经密度扫描, 生成原始的灰度数据, 以各自样品的ACTG表达水平为基准校正目的基因的相对表达水平, 然后将实验样品与对照样品的相对表达水平进行比较, 以表达变化的比值来表示目的基因的相对表达量。

2 结果

2.1 基因芯片杂交体系验证

芯片杂交图像显示荧光信号强度较高, 背景均一, 所有阳性对照信号清晰, 阴性对照的杂交信号很弱, 没有明显缺陷; 通过对芯片中的内参照和外参照基因进行综合评估, 符合重复性和可靠性的要求和分析标准; 有效信号点少可能与皮肤组织表达的基因类型偏少有关。

2.2 数据统计学分析

按照设定的数据筛选标准, 密度值在 5×10^8 以上的有效数据点共有1096个, 与正常皮肤组织相比, 瘢痕疙瘩组织中发生差异表达变化的基因有277个, 其中上调163个、下调114个, 构成了瘢痕疙瘩形成相关的基因表达谱(表1、2)。

表 1 瘢痕疙瘩和正常皮肤组织间差异表达的基因列表(下调基因)

Tab.1 Differentially expressed genes in keloids in comparison with normal skin (down-regulated genes)

GenBank No.	GeneTag	Ratio	GenBank No.	GeneTag	Ratio
W60057	KRT13	-32.26	AA458849	SPINT2	-2.55
W92134	SPINK5	-13.33	AA022561	SATB 1	-2.54
AI923984	SPRK	-13.33	AA487526	EST	-2.54
AA399674	SPRR2C	-12.20	AA490920	MHC2TA	-2.54
AA936757	HBP17	-11.36	H77597	MT1H	-2.50
AA055486	ATDC	-10.99	AA598513	PTPRF	-2.49
AA424996	TYRP1	-10.20	AI345611	EST	-2.48
W72207	CSTA	-8.93	AA683073	SY T1	-2.48
AA160507	KRT5	-8.93	AA436389	HSPC025	-2.46
W95595	CDSN	-8.77	AA434115	CSDA	-2.45
AA706022	KRT1	-8.70	N70463	BTG1	-2.43
AA454810	TACSTD2	-8.40	AA774638	CSNK2B	-2.43
AI703487	PPL	-7.87	AA634166	QARS	-2.39
AA477283	KLK11	-7.75	AA418900	MSL3L1	-2.38
W48713	EGFR	-7.41			
AA458884	S100A2	-6.80	AA629641	RPS13	-2.36
AA283090	CD44	-6.02	AA156342	RENT1	-2.34
AA479882	KRT10	-5.43	AA485749	YWHAZ	-2.33
T72877	IL1RN	-5.13	H53340	MT1G	-2.31
AA126009	FXVD3	-4.90	AA664240	PRKAR2A	-2.30
AA683520	SLPI	-4.61	H44051	EST	-2.30
AA464250	KRT19	-4.41	H15456	CAPN1	-2.29
AI924385	E48	-4.26	AA668301	RPS16	-2.27

A1924585	E48	-4.20	AA008501	RPS10	-2.27
AA456975	APOD	-4.18	AA598874	KIAA0106	-2.26
H03504	PTPN21	-4.13	R22188	SKP2	-2.25
AA464528	PLP2	-4.02	N49204	HSSA2	-2.24
H61758	ELK4	-3.91	H22919	CSTB	-2.24
AA479609	C4.4A	-3.77	H45618	EST	-2.24
AA664219	NR3C1	-3.75	AA485944	DDX17	-2.22
N68399	EST	-3.68	R43483	ITGA6	-2.22
AA394236	TFAP2C	-3.41	AA989515	MGC2479	-2.21
AA598517	KRT8	-3.34	AI633226	RBBP5	-2.21
H90899	DSP	-3.32	T69164	EST	-2.21
AA115076	CITED2	-3.24	AA481438	SERPING1	-2.19
W72895	CST6	-3.18	AI890849	ALDH2	-2.19
AA452933	H2AFL	-3.11	AA235002	ANXA8	-2.19
AA404486	SLC25A5	-3.07	H54393	TCCCA00427	-2.16
AA130584	CEACAM5	-3.04	AA702487	G5C	-2.12
N25352	CXADR	-2.99	W93544	EIF4G2	-2.11
N80129	MT1L	-2.88	R24266	GRB14	-2.11
AA412053	CD9	-2.84	AA453749	HDGF	-2.11
H62473	TGFBR3	-2.84	H85355	ATP2A2	-2.07
AI174641	HSDFF40	-2.81	AW072880	RPS15	-2.07
H95792	ACADSB	-2.79	AA620580	PSMB3	-2.06
T54662	PCASE	-2.78	AA477514	TSNAX	-2.05
T88721	EMP2	-2.78	AA158244	EST	-2.04
AA666234	PNMA2	-2.76	AA149579	PCANAP1	-2.04
AA035637	JUP	-2.75	AA012882	RAB1F	-2.04
N63770	TFAP2A	-2.75	AA775249	GPR56	-2.03
AA406601	ABLIM	-2.72	AA282196	HIPK3	-2.03
R15785	KIAA0436	-2.69	AA872383	MT1E	-2.03
N47717	FABP5	-2.66	N53664	C5	-2.02
AA026609	EST	-2.62	AI000677	SIAT4A	-2.02
AA679352	FDFT1	-2.60	H37774	TSC2	-2.02
AW028467	AQP3	-2.58	AA778392	BENE	-2.01
T52830	IGFBP5	-2.58	AA013268	EST	-2.00
H72723	EST	-2.55			

表 2 瘢痕疙瘩和正常皮肤组间差异表达的基因列表(上调基因)

Tab.2 Differentially expressed genes in keloid in comparison with normal skin (up-regulated genes)

GenBank No.	GeneTag	Ratio	GenBank No.	GeneTag	Ratio
AA452148	HSY5A	2.00	AA486085	EST	3.43
AA600173	UBE2A	2.01	AA504327	PTP4A2	3.48
T55560	NIFU	2.01	AA486533	EGR1	3.50
AA988615	HLA-F	2.03	AA520978	UBE2H	3.50
R47979	HLA-DRA	2.03	AA487623	GJA1	3.51
AA862371	IFITM2	2.05	AA600217	ATF4	3.53
AA425217	CDH3	2.06	N69689	RAB1	3.58
AA430524	CAPZB	2.06	AA442092	EST	3.58
N94468	JUNB	2.07	H44032	GJA4	3.61
AA865469	TUBA3	2.08	R02085	MGST3	3.65
AA663910	GOLGA3	2.09	H16591	VCAM1	3.73
W96058	HNRPH1	2.10	AA626867	KDEL2	3.80
H86755	EST	2.12	AA598830	NBL1	3.81
W55964	ARPC5	2.13	AA598978	FLNA	3.83
AA630507	PRKAR1A	2.13	AA477400	TPM2	3.83
AA488055	LOC51017	2.13	AA490996	IFI16	3.88
AA449440	IFNGR2	2.13	H05768	ATP6C	3.96
R78608	DOC1	2.15	AA188179	ARPC1B	4.05
AA446453	PFDN5	2.15	T71316	ARF4	4.06
AA991856	RPN2	2.15	AA456147	GTF3A	4.09
AI688090	RPL22	2.15	T53298	IGFBP7	4.24
AI401379	PIK3C2A	2.17	AA457671	P4HA1	4.32
AA425687	DDX1	2.18	W96187	SCN8A	4.46
AA034213	ITM3	2.20	H64138	EST	4.53
AA457725	GABARAP	2.20	AA421230	SF3B1	4.61
AA425008	KDEL2	2.21	AA464526	IL1R1	4.65
AA465242	FLJ22696	2.22	AA418825	H63	4.90
R43360	SRP9	2.22	T96083	RAB31	4.95
AA425664	COMT	2.25	AA452840	FBLN2	5.01
H60549	CD59	2.26			
AA680300	EPAS1	2.28	AA485911	KDEL2	5.24
AA633993	CDC10	2.31	AA001745	DC2	5.29
AI936972	DJ-1	2.31	AA451895	ANXA5	5.62
W02761	TNFRSF1A	2.32	AA481543	PEPD	5.78
T69603	C1R	2.35	R41787	CDH13	5.93
R91550	ARMET	2.35	AA134871	FBLN1	6.24
AA598863	EIF3S8	2.36	AA481464	PPIB	6.32
R70685	JAG1	2.36	AA634261	CLIC4	6.40
AA937895	MIC2	2.37	R48303	DPT	6.56
W96107	SEC61G	2.40	AA434397	ITGB5	7.01
R63543	DXS6984E	2.41	H62387	ISLR	7.72
AA912448	FLJ22425	2.41	AA482231	MACS	7.81
H99479	P125	2.42	AA418674	FBN1	8.12
AA495802	ADNP	2.44	R66310	PAM	8.14

AA496784	SEC13L1	2.44	H80685	P311	8.23
AA486728	VCL	2.45	AA453789	PTK7	8.52
T53792	COPB2	2.48	AA676404	PPIC	9.46
AA490843	EST	2.49	AA427725	CPZ	10.30
AA664009	SCP2	2.51	H63077	ANXA1	11.03
AA634103	TMSB4X	2.53	AA497002	MCAM	11.61
AA486261	SSR4	2.55	N74623	IGF2	11.80
N64741	EST	2.58	H51404	LIMK1	12.45
T50498	EST	2.61	AA459663	AOE372	12.57
AA504477	CKAP1	2.63	AA457719	RCN1	12.64
AA149095	DUSP1	2.63	AI927284	LGALS1	13.06
AA669758	NPM1	2.63	AA862999	CASR	13.25
AA450360	SSR1	2.67	AA167223	COL14A1	13.36
AA460727	AP3S1	2.70	AA936799	MMP2	14.36
AA102454	CAPN2	2.73	AA670200	PCOLCE	14.74
AW087220	EST	2.75	AA461456	COL5A2	16.30
W02101	HNRPA2B1	2.78	W67174	ITGB1	17.88
AA446820	OAT	2.79	R71093	SERPINH2	19.13
N22889	TCTEL1	2.80	AA497002	MCAM	20.26
AA670134	TTC3	2.81	R45941	PTPRN	20.88

2.3 生物信息学分析

对差异表达谱的277个基因按照不同的基因功能分类并进行生物信息学分析，大致分为26类(表3)。

2.4 RT-PCR检测结果

RT-PCR产物经电泳后，结果显示目的基因有特异性的扩增产物，CTGF和ACTG分别在446 bp和425 bp处出现明显条带，与预定条带大小相一致。作为内参照的ACTG基因在两组中都有表达，且条带亮度基本相同。数据分析显示CTGF在瘢痕疙瘩中的表达为正常皮肤组织的9.85倍，与芯片检测结果提示的基因表达量为8.97倍相比，基因表达变化趋势有很好的一致性。

3 讨论

以基因序列为分析对象的cDNA芯片以其高通量、简便、缩微、多参数、集约化、平行化等优点，能大规模平行检测不同样品的基因表达差异，广泛用于基因表达谱的研究[1]。本实验应用8064个人类靶基因点制的基因表达谱芯片研究比较瘢痕疙瘩与正常皮肤组织的基因差异表达情况，筛选和分析两者的差异表达基因，建立与瘢痕疙瘩形成相关的基因表达谱，并应用半定量RT-PCR法验证了芯片结果的可靠性。从实验结果看，基因表达谱的变化与瘢痕疙瘩临床研究结论的一致性较好。

本研究结果显示，瘢痕疙瘩与正常皮肤组织比较，有277个基因发生了差异表达变化，共同构成了瘢痕疙瘩的差异表达基因谱，与瘢痕疙瘩的形成密切相关。从分子生物学角度再次证实创伤过度愈合最终形成病理性瘢痕是一个复杂的病理生理过程。从总体上看，与正常皮肤组织相比，在瘢痕疙瘩组织中存在明显的组织和细胞结构变化，同时涉及到各种信号传递及基因调控的改变，可以发现具有明显的功能类型特征的基因，包括细胞外基质类基因、细胞信号和传递类基因、细胞骨架蛋白基因、细胞周期相关基因、癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因，以及转录、翻译及细胞受体、细胞代谢等相关基因。瘢痕疙瘩在组织学上表现为以胶原为主的细胞外基质的过度沉积[2]。本研究结果表明，细胞外基质类基因有15个在瘢痕疙瘩中差异表达，其中胶原合成代谢的相关基因均有稳定的表达。这些基因的表达变化与其组织学特征是一致的，在瘢痕疙瘩的形成通路中

起着效应器的作用。在创伤修复过程中，有很多生长因子可以促进成纤维细胞的生长、趋化、合成与分泌细胞外基质成分，它们在创面微环境中作为炎性细胞与修复细胞之间的信号载体，在创伤愈合及瘢痕形成过程中发挥着重要作用。这类基因在生物信息学分类上归属于细胞信号和传递相关蛋白基因。本研究结果表明，细胞信号和传递相关蛋白类基因有11个在瘢痕疙瘩中差异表达，如CTGF表达明显上调，在病理性瘢痕的形成中起重要作用。CTGF基因在瘢痕疙瘩中的表达为正常皮肤组织的8.97倍，其差异表达经RT-PCR验证，与芯片的结果呈一致性趋势，结果说明CTGF在瘢痕疙瘩中过度表达。人CTGF 定位于染色体6q23.1，CTGF 蛋白为肝素结合型，含349个氨基酸，富含半胱氨酸，相对分子质量为38 000，可由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞合成分泌。CTGF属即刻早期基因，编码的蛋白具明显的丝裂原性和趋化性，可诱导成纤维细胞增殖和分泌细胞外基质，参与调节细胞增生、分化，胚胎发育以及伤口愈合[3]。在纤维化过程中，CTGF由成纤维细胞在转化生长因子- β (TGF- β)的选择性刺激下而产生，至少部分介导TGF- β 的生物效应，具有强烈的促成纤维细胞增殖和胶原沉积的作用，被视为TGF- β 的下游介质。Mori[4]指出：TGF- β 诱导皮肤纤维化的发生，而CTGF的作用则在于维持纤维化过程。其在小鼠纤维化模型中研究发现，即使连续注射，单用外源性TGF- β 仅能产生短暂的肉芽组织，单用CTGF 亦仅引起轻度的肉芽形成。而同时使用TGF- β 和CTGF，或前3 d注射TGF- β ，4~6 d注射CTGF，均导致持久的组织纤维化。陈晓栋等[5]研究发现，CTGF在正常人皮肤中几乎不表达，而在瘢痕疙瘩组织和瘢痕疙瘩边缘的正常皮肤中的表达均明显高于正常人皮肤，而且瘢痕疙瘩中CTGF mRNA 的表达量并不随病程长短而改变。本研究结果证实了CTGF在瘢痕疙瘩中的过度表达，支持上述理论，揭示CTGF与异常瘢痕形成的密切关系。

上接表 2

AA598526	HIF1A	2.81	R39239	HXB	21.11
T52894	MYL1	2.82	AA777187	CYR61	21.95
AA430540	COL4A2	2.82	H99676	COL6A1	23.06
AA486080	ATP6L	2.86	AA683077	DKFZ	23.09
AA629567	HSPA8	2.87	AA663309	PMBP	26.21
AA598601	IGFBP3	2.89	N54596	IGF2	27.87
AA775447	A2M	2.90	AA464748	COL6A2	28.52
AA127100	RPN1	2.93	R62603	COL6A3	31.48
AA418414	SARCOSIN	2.94	N95418	FKBP8	34.45
AA486321	VIM	3.01	H95960	SPARC	40.35
AA487034	TGFBR2	3.06	H38240	THBS2	43.48
N89671	RPL26	3.15	AA001449	PTN	51.81
AA155913	MGP	3.17	AA490172	COL1A2	56.09
AA629909	GARS	3.21	H09111	13CDNA73	57.53
H85464	DSS1	3.27	AI684973	SPON2	59.57
AI979199	MRG15	3.30	H09066	BAP1	62.07
AA670434	BRI3	3.30	T98612	COL3A1	81.21
N79484	ECM1	3.32	AA598653	OSF-2	131.41

表 3 差异表达基因大致的功能分类

Tab.3 Functional classification of the differentially expressed genes

Classification	Classified function	Total gene	Both consistent
FA	cell surface antigens	158	6
FB	transcription	707	15
FC	cell cycle	116	4
FD	cell adhesion receptors/proteins	191	12
FE	immune system proteins	41	4
FF	extracellular transport/carrier proteins	136	9
FG	oncogenes and tumor suppressors	144	7
FH	stress response proteins	76	6
FI	membrane channels and transporters	286	9
FJ	extracellular matrix proteins	95	15
FK	trafficking/targeting proteins	292	16
FL	metabolism	796	12
FM	post-translational modify-cation/ protein folding	215	15
FN	translation	144	10
FO	apoptosis associated proteins	110	3
FP	RNA processing, turnover, and transport	210	6
FQ	DNA binding and chromatin proteins	135	1
FR	cell receptors (by ligands)	306	9
FS	cell signaling, extracellular communication proteins	252	11
FT	intracellular transducers/ effectors/ modulators	861	25
FU	protein turnover	302	17
FV	cell receptors (by activities)	60	2
FW	cytoskeleton/motility proteins	253	17
FY	DNA synthesis, recombination, and repair	142	1
FX	functionally unclassified	1148	28
	else (control genes, EST <i>et al</i>)	888	17

病理性瘢痕的形成过程中存在细胞凋亡现象在许多实验中得到证实,近年来与病理性瘢痕相关的凋亡基因的研究已有多报道[6]。本研究结果表明,在芯片所含的110个细胞凋亡基因中仅3个基因达到差异基因筛选标准,说明在瘢痕疙瘩组织中差异表达的细胞凋亡基因很少。据此作者认为,瘢痕疙瘩形成中虽然存在细胞凋亡现象,但可能不是瘢痕疙瘩形成中的重要途径。

近年来癌基因和抑癌基因与病理性瘢痕形成的关系也颇受关注。研究发现并证实了部分癌基因的异常表达与瘢痕增生有关[7][8]。本研究结果显示,在芯片所含的144个癌基因和抑癌基因中有7个基因差异表达,如JunB基因,在瘢痕疙瘩中的表达为正常皮肤组织的2.07倍,其过度表达可能促进了瘢痕疙瘩的形成。

总之,本研究应用基因芯片技术建立了瘢痕疙瘩的差异基因表达谱,在转录水平上较全面地揭示了瘢痕疙瘩发生的分子生物学概貌,有益于我们从宏观角度全面理解和探讨影响瘢痕疙瘩形成的相关基因及其相互作用,同时也为进一步寻找病理性瘢痕特异性的诊断和治疗基因提供了有力的实验依据,避免了盲目性。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(1): 27-31.
- [2] Haverstock BD. Hypertrophic scars and keloids[J]. Clin Pediatr Med Surg, 2001, 18(1): 147-59.
- [3] Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection [J]. Exp Cell Res, 1999, 248 (1): 44-57.
- [4] Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis : A mouse fibrosis model[J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 153-9.
- [5] 陈晓栋, 吴信峰, 王焱, 等. 结缔组织生长因子在瘢痕疙瘩中表达的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(7): 380-3.
- Chen XD, Wu XF, Wang Y, et al. A preliminary study on the expression of connective tissue growth factor in keloids[J]. Chin J Dermatol, 2003, 36(7): 380-3.
- [6] Sayah DN, Soo C, Shaw WW, et al. Down regulation of apoptosis-related genes in keloid tissue[J]. J Surg Res, 1999, 87(3): 209- 16.
- [7] 胡振富, 罗力生. 病理性瘢痕中c-myc原癌基因的表达[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(3): 215-6.
- Hu ZF, Luo LS. Expression of c-myc proto-oncogene in pathological keloid[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(3): 215-6.
- [8] 胡振富, 罗力生, 蔡俊杰. 病理性瘢痕中ras原癌基因的表达[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(6): 447-8.
- Hu ZF, Luo LS, Cai JJ. Experimental study of expression of ras proto-oncogene in hypertrophic scars and keloid[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(6): 447-8.