

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)11-1031-03

中国人群瘢痕疙瘩家系易感基因的定位研究

陈 阳, 高建华, 刘晓军, 严 欣, 宋 玫 (南方医科大学南方医院整形外科, 广东 广州 510515)

Study on location for keloid susceptible locus in Chinese pedigrees

CHEN Yang, GAO Jian-Hua, LIU Xiao-Jun, YAN Xin, SONG Mei

Department of Plastic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 AIM: To locate keloid susceptible locus in Chinese pedigrees. METHODS: Peripheral venous blood samples from 51 members in 2 large keloid pedigrees were collected for extracting genomic DNA. Six markers on chromosome 2q23 were selected as microsatellite markers according to recent foreign literatures on the similar study. Subsequently, these markers were amplified by PCR, and all PCR products were genotyped and the linkage analyses were performed. RESULTS: Most of the two-point LOD scores for these markers at $\theta = 0$ were less than -2 , which excluded the linkage. CONCLUSION: The keloid susceptible locus in Chinese pedigrees were not on chromosome 2q23.

【Keywords】 keloid pedigree; linkage analysis; microsatellite marker; susceptibility genes; heterogeneity

【摘要】 目的: 定位中国人群瘢痕疙瘩家系的易感基因。方法: 选择2个中国人群瘢痕疙瘩大家系, 从中选出51名成员, 采集其外周静脉血样, 提取基因组DNA; 参照国外最近相似研究的文献报道, 采集其外周静脉血样, 提取基因组DNA; 参照国外最近相似研究的文献报道, 在染色体2q23上选取6个微卫星标记, 经PCR扩增, 产物片断基因分型, 再进行连锁分析。结果: 在重组率 $\theta = 0$ 时, 这些微卫星标记的两点LOD值绝大部分 < -2 , 排除连锁关系存在。结论: 中国人群瘢痕疙瘩家系的易感基因位点不在染色体2q23上。

【关键词】 瘢痕疙瘩家系; 连锁分析; 微卫星标记; 易感基因; 异质性

【中图分类号】 R596.2 **【文献标识码】** A

收稿日期 2005-12-30; 接受日期 2006-03-20

基金项目 广东省名医工程研究项目(2004199)

通讯作者: 高建华, Tel (020) 61641861 Email: gaopsnf@pub.guangzhou.gd.cn

作者简介 陈 阳, 博士生(导师高建华), 副主任医师, Tel (020) 61365768 Email: cy_chen03@126.com

0 引言

瘢痕疙瘩(keloid)是人体皮肤损伤后的一种病理性瘢痕愈合, 其病因及发病机制目前尚不清楚。流行病学调查表明, 瘢痕疙瘩大多散发发病, 但具有一定的家族遗传倾向, 且存在显著的种族差异性^[1-2]。Cosman等^[3]证明其家族性发病率约为3%, 深肤色人种好发。国内外的研究一致认为, 瘢痕疙瘩的遗传模式为常染色体显性遗传, 伴外显不完全, 其临床表型存在个体差异^[4-5]。最近, Marneros等^[6]的研究首次发现了1个日本家系和1个非洲裔美国人家系瘢痕疙瘩易感基因位点分别与染色体2q23和7p11连锁的遗传学证据, 对进一步寻找瘢痕疙瘩发病的相关基因具有指导意义。但是, 有关中国人群瘢痕疙瘩易感基因的定位至今仍未见报道, 由于中国汉族人种与日本人种同属蒙古人种, 而非洲裔美国人属尼格罗人种, 为此, 我们收集了来自我国不同地区的1个5代发病和1个4代发病的中国汉族人群瘢痕疙瘩大家系, 从中分别选取32位和19位具有较高遗传病研究意义的成员作为研究对象, 在上述研究发现的基础上, 在染色体2q23及其周围选择已知的两点LOD值 >1 的6个微卫星作为遗传标记, 通过连锁分析以验证中国人群瘢痕疙瘩家系易感基因位点是否也在染色体2q23上。

1 对象和方法

1.1 对象 1个5代发病的NM(内蒙)家系和1个4代发病的LN(辽宁)家系(图1, 2)。遵照赫尔辛基宣言的准则采集血样和病理组织标本。指定2名对瘢痕疙瘩诊断和治疗有相当临床经验的整形外科医师, 根据瘢痕疙瘩诊断标准^[7](即瘢痕超过原有损伤范围并向周围正常皮肤侵犯, 或瘢痕病程超过1年仍无自发消退征象, 或术后瘢痕复发者)对所有研究对象进行全面的体格检查、详细的病史询问和准确的临床诊断, 并对部分患者的瘢痕疙瘩组织取活检行组织病理学检查以确诊。我们从NM和LN家系中分别选出32位和19位成员作为研究对象(即系谱图中标号者), 采集他们的外周静脉血样。

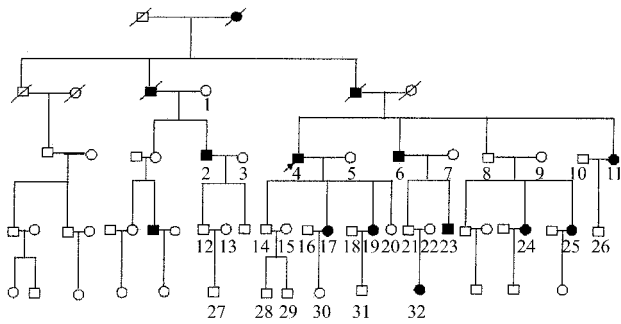


图1 瘢痕疙瘩家系系谱

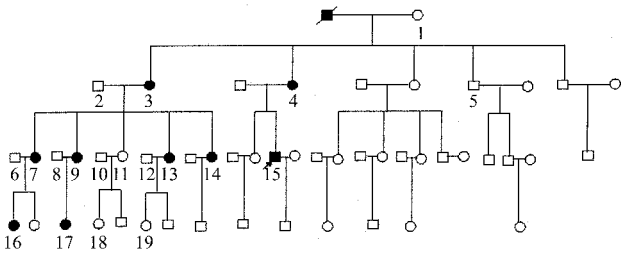


图2 LN 瘢痕疙瘩家系系谱

1.2 方法 抽取这 51 名家系成员的外周静脉血各 2 mL (EDTA 抗凝), 经 SDS 裂解, 蛋白酶 K 消化, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀基因组 DNA 后, 用 ddH₂O 溶解, 放置 -20℃ 保存以备后用。根据参考文献 [6] 在染色体 2q23 及其周围共约 33.4 Mbp 区域内选取已知的 6 个两点 LOD 值 > 1 的微卫星标记 D2S1328 (LOD_{ZMAX} = 2.01), D2S349 (LOD_{ZMAX} = 2.84), D2S1399 (LOD_{ZMAX} = 2.86), D2S356 (LOD_{ZMAX} = 2.84), D2S2275 (LOD_{ZMAX} = 2.29) 和 D2S1353 (LOD_{ZMAX} = 0.89), 通过 UCSC Genome (<http://genome.ucsc.edu>) 和 Ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/markerview) 遗传学数据库, 查找出这些微卫星标记的上下游引物序列 (表 1), 再合成相应的引物。根据上述各自的上、下游引物序列设计合成相应的 PCR 引物, PCR 扩增在 PE9700 型 PCR 反应仪中进行。PCR 反应体系: 基因组 DNA 50 ~ 100 ng, 上、下游引物各 10 μmol/L (1 μL), GeneAmp dNTP 1 μL, Takaka Ex Taq DNA 聚合酶 33.34 nkat, 10 × Ex Tag Buffer (Mg²⁺ Plus) 1 μL, 加双蒸去离子水至总体积 10 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min 后 94℃ 变性 30 s, 55℃ ~ 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 38 次循环后 72℃ 延伸 10 min。荧光标记引物由上海基康生物技术有限公司提供, PCR 扩增试剂由 Applied Biosystems 公司提供。将 Hi-Di Formamide 1 mL 和 GeneScan-500 LIZ Size Standard 50 μL 混合后, 取 9.5 μL 同 PCR 产物 (20 倍稀释后) 0.5 μL 混合, 95℃ 变性 5 min 后迅速冰浴冷却 5 min, 再在 ABI

Prism™ 310 Genetic Analyzer 上用 PE 公司的 POP-4 胶, 15 kV, 60℃ 下, 电泳 28 min。电泳数据经 Genescan 软件 (V3.11), Genotyper (V.3.7) 处理后得到检测片段大小和基因型。以上仪器、试剂及软件由美国 Perkin Elmer 公司提供。基因分型数据经家系和人工校对后, 用连锁分析软件 Linkage (V.5.11) 的 Mlink 程序计算每个标记位点的两点 LOD (log of the odds, Lod) 值, 其中重组率 $\theta = 0 \sim 0.4$, 遗传模式为常染色体显性遗传伴不完全显性, 外显率 90%, 拟表型 1%, 群体疾病基因型频率 1/1000 [5-6]; 根据算出的两点 LOD 值判断连锁关系。LOD 值表示在不同重组率 (θ) 的条件下, 两位点连锁的可能性与不连锁的可能性之间概率比值的对数。LOD 值 ≥ 1 支持连锁, LOD 值 ≥ 3 肯定连锁, LOD 值 ≤ -2 否定连锁。

表 1 微卫星标记名称、位置、引物序列及产物大小

微卫星标记名称	位置 (bp)	引物序列及荧光标记	产物大小 (bp)
D2S1328	125902959 - 125903111	F: GTGCCTTTGGAGGAA-CACTA R: TGGCACATGTACAC-CAGAAC	157
D2S349	142226304 - 142226426	F: GAATTTGGATTTGACCG-CA R: CAGGGTTGAGGTGCTTTG	129 - 135
D2S1399	148043841 - 148043992	F: CATTGGTCCAGGTAACCT-GC R: TTCACAAGGTTCCA-CAAGGT	137 - 173
D2S356	151586600 - 151586785	F: CTGGACCAGGGACTGAC R: GGCTTATGCTAAGGG-TAGTG	184 - 190
D2S2275	151646682 - 151646806	F: ATCTCAAATGAATGG-TAGCAGGCA R: TGGTTGGGCTTAGCT-TCAACA	125 - 152
D2S1353	159384438 - 159384589	F: CCAGGGACATTGCTTAA-CAT R: GAGCAGGATTTGTAAC-CCTG	138 - 159

F Forward; R Reverse.

2 结果

连锁分析结果表明, 在重组率 $\theta = 0$ 时, 两点 LOD 值除 NM 家系中 D2S1399 的为 0.71 和 LN 家系 D2S349 的为 -0.12 外, 其余微卫星标记的均 < -2 (表 2, 3)。

3 讨论

我们所选择的瘢痕疙瘩家系中共有 3 个肯定携带者, 可以解释为外显不完全, 也可以认为是不规则

表2 NM家系微卫星标记不同 θ 值的LOD值

微卫星标记	不同 θ 值的LOD值					
	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D2S1328	-4.43	-1.99	-1.26	-0.56	-0.21	-0.05
D2S349	-2.46	-0.04	0.18	0.25	0.16	0.05
D2S1399	0.71	0.63	0.55	0.39	0.24	0.10
D2S356	-2.99	-1.28	-0.70	-0.31	-0.25	-0.19
D2S2275	-4.30	-1.44	-0.69	-0.03	0.18	0.16
D2S1353	-4.68	-1.01	-0.50	-0.04	0.12	0.11

表3 LN家系微卫星标记不同 θ 值的LOD值

微卫星标记	不同 θ 值的LOD值					
	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D2S1328	-5.40	-1.47	-0.81	-0.23	-0.01	0.05
D2S349	-0.12	-0.10	-0.08	-0.04	-0.02	0.00
D2S1399	-4.92	-1.30	-0.84	-0.36	-0.13	-0.02
D2S356	-9.82	-2.34	-1.33	-0.47	-0.12	0.00
D2S2275	-9.61	-1.24	-0.67	-0.20	-0.04	-0.01
D2S1353	-8.42	-1.52	-0.91	-0.37	-0.12	-0.03

显性遗传,即杂合子的显性由于某种原因而不表现出相应的性状,但他们却可以生出具有该性状的后代,因此在系谱中可以出现隔代遗传现象,目前认为机体的内外环境对基因表达所产生的影响和不同个体所具有的不同遗传背景可能是引起不规则显性的重要因素^[8],而LN家系性状遗传表现为完全外显,遵循典型的常染色体显性遗传规律.家系中出现双亲未发病而子女发病的现象,提示相关基因可能出现了新的变异.经文献检索,本研究所选择的这2个家系是至今所报道的中国人羣癩痕疙瘩家系中最大和最多的,其中NM家系5代63人,健在成员4代56人,发病5代14人,健在患者3代11人;LN家系4代49人,健在成员4代48人,发病4代10人,健在患者3代9人.它们都能较好地满足遗传病研究对家系的要求,对中国人羣癩痕疙瘩致病基因等相关研究具有较好的代表性.Marneros等^[6]发现,癩痕疙瘩日本家系与染色体2q23连锁,并认为位于染色体2q23的153cM(152 Mbp)处的坏死因子- α 抑制蛋白6(TNFAIP6)基因是癩痕疙瘩的一个候选基因,但是对这个候选基因的外显子、内含子与外显子的拼接点及启动子序列进行测序,并未发现突变存在.因此,认为在该候选基因位点附近可能存在其它基因突变,才导致癩痕疙瘩的形成.另外,他们还报道了对一个有10人发病的非洲裔美国人中等大小的癩痕疙瘩家系进

行同样的研究,却未发现与2q23和7p11存在连锁关系,说明癩痕疙瘩易感基因位点存在异质性.Marneros等^[6]的研究首次发现了存在癩痕疙瘩易感基因位点的遗传学证据,对进一步寻找癩痕疙瘩的致病基因具有重要的指导意义.

由于癩痕疙瘩的发病存在显著的种族差异性,为了验证中国人羣癩痕疙瘩家系易感基因位点是否也分布在上述染色体区域,为此,我们选取了这2个中国人羣癩痕疙瘩家系,以同样的方法进行的研究,其连锁分析结果显示可以排除该癩痕疙瘩家系与2q23的连锁关系,再次证明了癩痕疙瘩易感基因位点存在异质性,提示癩痕疙瘩易感基因可能存在种族特异性,即不同种族癩痕疙瘩的形成可能由不同的致病基因调控,这与流行病学调查发现癩痕疙瘩好发于有色人种尤其多发于深肤色人种的现象相一致.最近,张刚等^[9]采用比较基因组杂交方法检测了6例癩痕疙瘩患者的染色体后发现染色体1p,16p,20q和22p存在部分缺失,推测这种缺失导致抑制性基因的丢失,造成癩痕疙瘩的发生和发展,从而认为癩痕疙瘩的发病可能与染色体的结构畸变有关.由此可见,癩痕疙瘩是一种复杂的遗传性疾病,要准确定位和明确癩痕疙瘩的致病基因,需要收集数量更多质量更高种族来源更广的家系,并应用更先进的研究方法,如全基因组扫描、选择多态性更高的SNP作为遗传标记和对候选基因进行测序检测基因突变等.

【参考文献】

- [1] Alhady SM, Sivanantharajah K. Keloids in various races: A review of 175 cases [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1969 44(7): 564-570.
- [2] Dustan HP. Does keloid pathogenesis hold the key to understanding black/white differences in hypertension severity? [J]. *Hypertension*, 1995 26(6): 858-862.
- [3] Cosman B, Crikelair GF, Ju DM, et al. The surgical treatment of keloid [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1961 27(6): 335-338.
- [4] Marneros AG, Norris JE, Olsen BR, et al. Clinical genetics of familial keloid [J]. *Arch Dermatol*, 2001 137(11): 1429-1434.
- [5] 陈阳, 高建华, 刘晓军, 等. 癩痕疙瘩中国家系的发病特点 [J]. *中国美容医学*, 2006 15(1): 6-10.
- [6] Marneros AG, Norris JEC, Watanabe S, et al. Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11 [J]. *J Invest Dermatol*, 2004 122(5): 1126-1133.
- [7] Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW. Skin scarring [J]. *Br Med J*, 2003 326(7380): 88-92.
- [8] 陈竺, 傅继梁, 陆振虞. *医学遗传学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 98.
- [9] 张刚, 罗少军, 汤少明, 等. 比较基因组杂交研究癩痕疙瘩遗传变异 [J]. *中华整形外科杂志*, 2005, 21(1): 29-31.

编辑 许昌泰