



中国人群瘢痕疙瘩家系易感基因位点与染色体7p11的连锁分析

瘢痕疙瘩是人类特有的一种创伤后病理性瘢痕愈合现象，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]证明家族性发病率约为3%，深肤色人种好发。目前国内外的研究一致认为遗传是瘢痕疙瘩发病的主要因素，其遗传模式为常染色体显性遗传伴外显不完全，且临床表型存在个体差异[4], [5]。定位和克隆瘢痕疙瘩的易感基因已成为瘢痕疙瘩病因研究的最新热点和主要方向，只有明确了瘢痕疙瘩的致病基因，才能准确诊断和从根本上治疗瘢痕疙瘩。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。由于瘢痕疙瘩的发病存在显著的种族差异，有关中国人群瘢痕疙瘩易感基因的定位至今仍未见报道，为此，我们收集了6个分别来自我国不同地区的瘢痕疙瘩家系，首先开展瘢痕疙瘩家系临床遗传学研究，确定了这些家系的临床表型和遗传模式[5]，在此基础上相继进行了瘢痕疙瘩易感基因的定位研究。按照课题研究分工，由另一位研究生首先选择其中1个5代发病和1个4代发病的家系作为研究对象，也采用微卫星标记，通过连锁分析，结果否定了这两个中国人群瘢痕疙瘩家系易感基因位点与染色体2q23的连锁关系(相关论文正在等待发表)。因此，本研究又选取上述那个5代发病家系中的32位具有较高遗传学研究意义的成员作为研究对象，在Marneros等的研究发现基础上，于染色体7p11上选取已知的4个最大两点LOD值的微卫星标记，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与染色体7p11存在连锁关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

该瘢痕疙瘩家系来自我国东北汉族人群，共5代63人，其中男33人，女30人；发病5代14人，其中男7人，女7人。从中选择具有较高遗传学研究意义的32位成员作为研究对象如图1所示(即系谱图中标号者)。本研究事先得到南方医院相关审核部门的同意，所有研究对象签署知情同意书。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，填写个人临床资料登记表，并严格遵照赫尔辛基宣言的规定采集他们的外周静脉血样各5 ml。

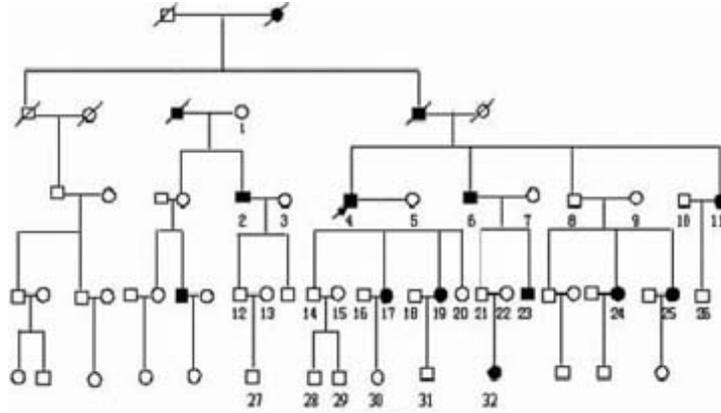


图1瘢痕疙瘩家系系谱
Fig1. The pedigree of keloid

1.2 实验方法

1.2.1 全血基因组DNA提取 采用经典的酚/氯仿抽提法提取全血基因组DNA，即抽取这32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 °C保存以备后用。

1.2.2 选择微卫星标记 根据文献[6]，在染色体7p11及其周围选取已知的4个最大两点LOD值的微卫星标记D7S1818 (LOD_{ZMAX}=1.77)、D7S499 (LOD_{ZMAX}=3.16)、D7S494 (LOD_{ZMAX}=2.38) 和D7S3046 (LOD_{ZMAX}=2.72)，通过UCSC Genome (<http://genome.ucsc.edu>) 和Ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mark-eriew) 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)。引物设计时在for-ward或reverse引物5'端加M13forward引物，以利荧光检测，M13forward引物序列为“CACGACGTT GTAAAACGAC”。

表1 微卫星标记名称、位置、引物序列及产物大小
Tab.1 Name, location, sequence of primer and size of the product for microsatellite marker

Microsatellite marker	Location (bp)	Sequence of primer	Size of product(bp)
D7S1818	49166136-49166321	F:CCCTAACTCCCATGTTGATG R:ACCCAGGATTGTGCTAACCT	171-199
D7S499	55381663-55381906	F:GCAGGCTCAGTAAGTGGTTG R:CCTAAGTTGGGATTATCTGTC	236-252
D7S494	57292183-57292363	F:CCTGGGTGACAGAGATTCTT R:AATCCTGTTGTTATTAACCTGGTTT	173-191
D7S3046	67996973-67997309	F:ACATACGGATGAATGGATGG R:TATAACCTCTCTCCCTATCTCCC	114-346

F: Forward; R: Reverse

1.2.3 微卫星标记PCR扩增 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 1 μl，上、下游引物各10 μmol/L(1 μl)，GeneAmp dNTP 1 μl，TaKaRa Ex Taq DNA聚合酶2 U(0.4 μl)，10×Ex Tag Buffer(Mg²⁺ Plus)1 μl，加双蒸去离子水5.6 μl。PCR反应条件：95 °C预变性5 min后，94 °C变性30 s，55~57 °C退火30 s，72 °C延伸30 s，38次循环后，72 °C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。

1.2.4 PCR产物检测和基因型分型 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 °C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 °C下, 电泳28 min。电泳数据经 Genescan软件(Ver. 3. 11)、Genotyper(Ver. 3. 7)处理后得到检测片段大小和基因型(图2)。以上仪器、试剂及软件由美国Perkin Elmer公司提供。

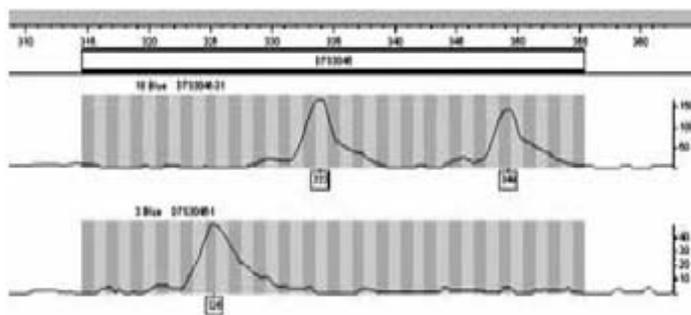


图 2 经Genescan软件处理后转换成基因分型位图图像
Fig.2 Bitmap images processed by Genescan software for genotyping

1. 2. 5 数据处理 基因分型数据经家系和人工校对后, 用连锁分析软件LINKAGE(Ver. 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 $\theta=0\sim0.4$; 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0%, 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。

2 结果

连锁分析结果如表2所示, 在重组率 $\theta=0\sim0.1$ 时, 这4个微卫星标记的两点LOD值均小于-2, 否定这些微卫星标记与7p11的连锁关系。

连锁分析结果表明, 在重组率 $\theta=0\sim0.1$ 时, D7S1818、D7S499、D7S494和D7S3046这4个微卫星标记的两点LOD值均 < -2 , 否定这些微卫星标记与7p11的连锁关系, 说明该瘢痕疙瘩家系的易感基因位点不在染色体7p11上。

表 2 采用两点分析法计算家系微卫星标记不同 θ 值的 LOD 值
Tab.2 LOD_s for microsatellite markers at different θ values in the keloid pedigree

Microsatellite marker	LOD with different θ					
	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D7S1818	-11.30	-4.97	-3.19	-1.47	-0.63	-0.20
D7S499	-12.33	-5.38	-3.51	-1.76	-0.88	-0.36
D7S494	-14.48	-5.55	-3.67	-1.87	-0.93	-0.34
D7S3046	-15.05	-5.19	-3.46	-1.79	-0.89	-0.33

3 讨论

由于瘢痕疙瘩的发病存在显著的种族差异，中国人与日本人同属蒙古人种，而非洲裔美国人属尼格罗人种，兼顾研究目的和资源节约，本研究仅选取家系中32位成员作为研究对象，他们涵盖了该家系目前健在的4代家庭和11个健在患者中的10个，较其他成员具有较高的遗传学研究意义，能较好反应出该家系的遗传学规律。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；其次，家系中出现双亲未发病而子女发病的现象也可能是由于出现了新的变异所致。再次，因为家系中第5代成员绝大部分年龄在10岁以下，尚未达到瘢痕疙瘩的好发年龄(好发于10~30岁)，随着他们年龄的增加，可能出现瘢痕疙瘩临床表型[5]，即表现出延迟显性遗传特征。

考虑本研究的目的和成本节约，我们认为微卫星标记是本研究的首选遗传多态标记，能较好满足瘢痕疙瘩家系易感基因的定位要求。

该瘢痕疙瘩家系规模大、发病人数和代数多，能较好地满足遗传病研究对家系的要求，对中国人群瘢痕疙瘩致病基因等相关研究具有较好的代表性，因此该结果提示中国人群瘢痕疙瘩的易感基因位点可能在7p11以外的染色体带上。虽然Marneros等[6]发现了1个日本家系瘢痕疙瘩易感基因位点与染色体2q23连锁和1个非洲裔美国人家系瘢痕疙瘩易感基因位点与染色体7p11连锁的遗传学证据，但他们对另外一个有10人发病的非洲裔美国人中等大小的瘢痕疙瘩家系进行同样的研究，却没发现易感基因位点与染色体2q23和7p11存在连锁关系。这些发现表明瘢痕疙瘩易感基因位点存在异质性，即瘢痕疙瘩临床表型可能由多个不同的基因控制。流行病学调查发现，瘢痕疙瘩好发于深肤色人种，瘢痕疙瘩的发病率在扎伊尔成人中高达16%，而在英格兰成人中却低至0.09%，而且深肤色人种的瘢痕疙瘩临床表型更典型、病情更重[4]。这说明瘢痕疙瘩的发病存在显著的种族差异性，因此笔者推测瘢痕疙瘩的致病基因可能存在种族特异性，即不同种族瘢痕疙瘩的形成可能由不同的致病基因调控。

虽然单个基因的突变可以导致对瘢痕疙瘩产生特异的易感性，但是不同人群瘢痕疙瘩的发病率不同，而且在发病年龄、发病部位、临床表型和对不同治疗的反应等方面也存在较大的差异，说明有多个因素参与和影响瘢痕疙瘩的发病与发展。例如，瘢痕疙瘩多发于10~30岁，中国人群尤其多发于16~25岁的青春期，且病情发展迅速，30岁以后病情发展减缓，10岁以下和50岁以上很少发病，这提示青春期人体内激素水平的变化(如性激素水平的升高)可能是瘢痕疙瘩发病的一个重要诱发因素，并影响瘢痕疙瘩的病情发展[5]。由此可见，瘢痕疙瘩是一种复杂的遗传性疾病，要明确其发病原因和机制需要进一步开展瘢痕疙瘩的流行病学调查研究，并收集数量更多、质量更高和种族来源更广的家系，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作为遗传标记对候选基因进行定位研究，为早日找到致病基因并进行致病基因的克隆、表达产物的结构和功能测定奠定基础。

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): 564-70.

[2]Dustan HP. Does keloid Pathogenesis hold the key to understanding black/white differences in hypertension severity [J]. *Hypertension*, 1995, 26(6): 858-62.

[3]Cosman B, Crikelair GF, Ju DM, et al. The surgical treatment of keloids[J]. *Plast Reconst Surg*, 1961, 27(6): 335-8.

[4]Marneros AG, Norris JE, Olsen BR, et al. Clinical genetics of familial keloids[J]. *Arch Dermatol*, 2001, 137(11): 1429-34.

[5]陈阳, 高建华, 刘晓军, 等. 瘢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 JE, Watanabe S, et al. Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11 [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(5): 1126-33.

[7] Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW. Skin scarring [J]. Br Med J, 2003, 326 (7380): 88-92.

[回结果列表](#)