

# 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

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)

**摘要:**目的 探讨中国人群瘢痕疙瘩家系易感基因位点是否与 7p11 存在连锁关系。方法 从 1 个 5 代发病的中国人群瘢痕疙瘩大家系中选出 32 名具有较高遗传学研究意义的成员作为研究对象, 采集他们的外周静脉血样, 提取基因组 DNA, 参照国外最近相似研究的方法, 在染色体 7p11 上选取已知的 4 个最大两点 LOD 值的微卫星为遗传标记, 经 PCR 扩增, 产物基因分型, 再进行连锁分析。结果 在重组率  $\theta=0\sim 0.1$  时, 这些微卫星标记的两点 LOD 值都小于 -2, 排除这些标记与染色体 7p11 的连锁关系。结论 首次发现了中国人群瘢痕疙瘩家系的易感基因位点不在染色体 7p11 上的遗传学证据, 说明瘢痕疙瘩易感基因位点存在异质性。

**关键词:** 瘢痕疙瘩家系; 连锁分析; 微卫星标记; 易感基因位点; 异质性

中图分类号: R596.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)05-0623-03

## Linkage analysis of keloid susceptibility loci on chromosome 7p11 in a Chinese pedigree

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:** **Objective** To investigate whether the keloid susceptibility loci occur on chromosome 7p11 in a Chinese pedigree. **Methods** Peripheral venous blood samples from 32 members significant for hereditary investigation from a large Chinese keloid pedigree (with 5 affected generations) were collected for extracting genomic DNA. Four microsatellites on chromosome 7p11 with known maximal two-point LOD scores were selected as the genetic markers according to the method described in a recent report of the similar study. These markers were subsequently amplified by PCR, and all the PCR products were genotyped and linkage analyses were conducted. **Results** With the  $\theta$  value of 0-0.1, the two-point LOD scores for these markers were all less than -2, which excluded the linkages of these markers to chromosome 7p11. **Conclusion** This study provides the first genetic evidence that keloid susceptibility loci in Chinese pedigree do not locate on chromosome 7p11, suggesting the heterogeneity of familial keloid susceptibility loci.

**Key words:** keloid pedigree; linkage analysis; microsatellite marker; susceptibility loci; heterogeneity

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<sup>[1,2]</sup>。Cosman 等<sup>[3]</sup>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<sup>[4,5]</sup>。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<sup>[6]</sup>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<sup>[5]</sup>, 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。

收稿日期: 2005-10-30

基金项目: 广东省名医工程研究项目(2004199)

Supported by Famous Doctor Project of Guangdong Province (2004199)

作者简介: 陈阳(1966-), 男, 博士研究生, 副主任医师, 电话: 020-61365768, E-mail: cy\_chen03@126.com

通讯作者: 高建华, 电话: 020-61641861, E-mail: gaopsnf@pub.guangzhou.gd.cn

## 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<sup>[7]</sup>(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。

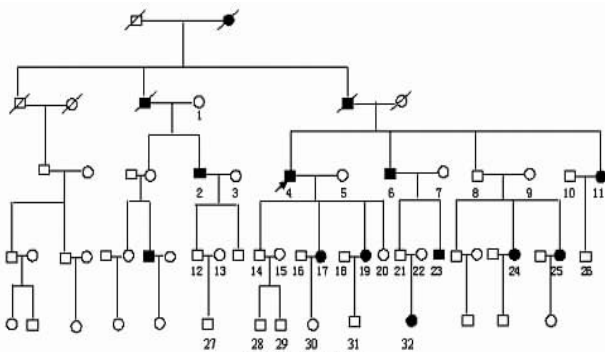


图 1 瘢痕疙瘩家系系谱  
Fig.1. The pedigree of keloid

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 ddH<sub>2</sub>O 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<sub>ZMAX</sub>=1.77)、D7S499 (LOD<sub>ZMAX</sub>=3.16)、D7S494 (LOD<sub>ZMAX</sub>=2.38) 和 D7S3046 (LOD<sub>ZMAX</sub>=2.72),通过 UCSC Genome(<http://genome.ucsc.edu>) 和 Ensembl([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/mark-er-view](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mark-er-view))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 "CACGACGTTGTAAAACGAC"。

1.2.3 微卫星标记 PCR 扩增 根据上述各自的上、下

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:CCTAAGTTGGGATTATCTGTG	236-252
D7S494	57292183-57292363	F:CCTGGGTGACAGAGATTCTT R:AATCTGTTGTTATTAACCTGGTTT	173-191
D7S3046	67996973-67997309	F:ACATACGGATGAATGGATGG R:TATAACCTCTCTCCCTATCTCCC	114-346

F: Forward; R: Reverse

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 (Mg<sup>2+</sup> 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。

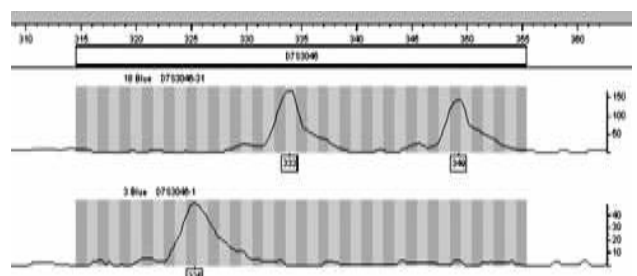


图 2 经 Genescan 软件处理后转换成基因分型位图图像  
Fig.2 Bitmap images processed by Genescan software for genotyping

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  $\theta=0\sim 0.4$ ;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 0%,群体疾病基因型频率 1/1000<sup>[5,6]</sup>;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( $\theta$ )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 $\geq 1$ 支持连锁,LOD 值 $\geq 3$ 肯定连锁,LOD 值 $\leq -2$ 否定连锁。

## 2 结果

连锁分析结果如表 2 所示,在重组率  $\theta=0\sim 0.1$  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。

表 2 采用两点分析法计算家系微卫星标记不同  $\theta$  值的 LOD 值  
Tab.2 LOD<sub>s</sub> for microsatellite markers at different  $\theta$  values in the keloid pedigree

Microsatellite marker	LOD with different $\theta$					
	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

连锁分析结果表明,在重组率  $\theta=0\sim 0.1$  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,说明该癩痕疙瘩家系的易感基因位点不在染色体 7p11 上。

## 3 讨论

由于癩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,尚未达到癩痕疙瘩的好发年龄(好发于 10~30 岁),随着他们年龄的增加,可能出现癩痕疙瘩临床表型<sup>[5]</sup>,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,能较好满足癩痕疙瘩家系易感基因的定位要求。

该癩痕疙瘩家系规模大、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,对中国人群癩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癩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<sup>[6]</sup>发现了 1 个日本家系癩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癩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癩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。这些发现表明癩痕疙瘩易感基因位点存在异质性,即癩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,癩痕疙瘩好发于深肤色人种,癩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%,而且深肤色人种的癩痕疙瘩临床表型更典型、病情更重<sup>[4]</sup>。这说明癩痕疙瘩的发病存在显著的种族差异性,因此笔者推测癩痕疙瘩的致病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。

虽然单个基因的突变可以导致对癩痕疙瘩产生特异的易感性,但是不同人群癩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癩痕疙瘩的发病与发展。例如,癩痕疙瘩多发于 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)可能是癩痕疙瘩发病的一个重要诱发因素,并影响癩痕疙瘩的病情发展<sup>[5]</sup>。由此可见,癩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癩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。

(下转 637 页)

鉴定)和痰标本(5月20日鉴定)分离出的,此病人临床诊断有MRSA院内肺炎,仅从时间上推断有可能或不能排除存在鼻前庭的细菌下行至肺部引起的感染。(4)IV型4株是由两位患者的鼻前庭和痰标本中分离出的,一位患者分别于4月15日痰标本和5月9日鼻前庭分离出MRSA,另一位患者分别于5月26日的痰标本中和6月7日的鼻前庭分离出MRSA,存在着MRSA的肺部感染形成其鼻前庭携带的可能,同时也存在两位患者之间的交叉感染。(5)I型3株菌中,是两位患者的鼻前庭携带3株,其中2株分别于5月和7月由一位患者的鼻前庭采样检出,这两位患者住在同一个病室,说明可能存在同一病室内的MRSA传播。总之,MRSA在医患鼻前庭能够较长时间的定植或携带,存在病室内、病室间、医患之间的传播。

金黄色葡萄球菌是引起医院感染的重要病原菌,特别是MRSA的感染是临床治疗的难题,金葡菌医院感染源主要为感染的患者或携带者、污染的环境、污染的医疗器械和带菌的工作人员,据报道,金葡菌感染者或携带者,易引起医院感染的爆发流行<sup>[2-6]</sup>。鼻前庭为葡萄球菌的主要储存所,通过手将葡萄球菌带到人体其他部位引起感染已有报道<sup>[7]</sup>,医护人员鼻前庭金葡菌经手传给病人,或再将病人身上的金葡菌经手寄居鼻腔,形成细菌定植或交叉感染,医务人员和病人鼻前庭金葡菌的定植,有造成医院感染的潜在威胁。因此预防工作非常重要,(1)定期检测医患鼻前庭金葡菌特别是MRSA的携带情况,并对带菌医务人

员和病人的鼻前庭进行清洁或局部使用百多邦软膏等方法减少带菌率。(2)强调医护人员的洗手观念减少接触传播。(3)对MRSA感染者进行床边隔离,有条件的医院对感染的病人单独病房。(4)合理应用广谱抗生素,减少耐药菌株的产生。从而有效控制其医院感染的流行。

#### 参考文献:

- [1] 苏关关,俞云松,林洁,等. 19株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的同源性分析[J]. 中华流行病学杂志(Chin J Epidemiol), 2004, 25(12): 1084-5.
- [2] 舒雪琴,方晔,石娜,等. 医院环境中葡萄球菌监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7): 771-2.
- [3] 孙宏莉,王辉,陈民钧. 甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学调查[J]. 中华微生物学和免疫学杂志(Chin J Microbiol Immunol), 2005, 25(2): 137-141.
- [4] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette* chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 1549-1555.
- [5] Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, et al. Comparative molecular analysis of community or hospital-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents Chemother, 2003, 47(1): 196-203.
- [6] 侯晓娜,丁雪松,付炜昕,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因多态性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(10): 919-21.
- [7] Hud IRB. The Efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections;a review of recent experience[J]. J Hosp Infect, 1994, (27): 81-98.

(责任编辑:吴锦雅)

(上接 625 页)

#### 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 Reconstr 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.