

NEDD4 基因多态性 rs2271289 与中国汉族人瘢痕疙瘩表型的相关性研究

赵俊¹, 陆孟珠^{2,3}, 张祥^{2,3}, 陆闻生^{2,3}

摘要 **目的** 探讨 NEDD4 基因多态性 rs2271289 与汉族人瘢痕疙瘩相关临床表型的相关性。**方法** 结合课题组前期瘢痕疙瘩关联分析数据, 选取 309 例瘢痕疙瘩患者 1 080 例正常对照者的 NEDD4 基因多态性 rs2271289 基因分型资料, PLINK 1.07 软件对选取数据资料进行分析。**结果** 在瘢痕疙瘩患者和正常对照者比较显示 NEDD4 基因多态性 rs2271289 基因频率存在差异有统计学意义 ($OR = 1.62$, 95% CI : 1.24 ~ 2.10, $P = 3.28E - 04$); 通过分层分析显示严重瘢痕疙瘩患者与正常对照者等位基因频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 多发患者等位基因频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但家族史阳性患者和阴性患者差异无统计学意义。**结论** NEDD4 基因多态性 rs2271289 与汉族人瘢痕疙瘩发病易感性相关, 此外与瘢痕疙瘩发病严重程度相关, 与家族史无关。

关键词 瘢痕疙瘩; 单核苷酸多态性; 表型; NEDD4 基因

中图分类号 R 758.69

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1244-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.032

瘢痕疙瘩是皮肤损伤后引发的胶原异常积累所致的过度瘢痕化, 是皮肤科领域的常见病^[1]。瘢痕疙瘩好发于胸骨区, 亦可见于肩部、面部、颈部和耳垂部等处, 病程慢性迁延, 严重影响患者的容貌、形象及自我评价, 进而在很大程度上影响患者的心理健康, 给家庭和社会带来沉重的负担^[2-4]。瘢痕疙瘩由于发病机制迄今不明, 无法根治, 已成为国内外皮肤科领域工作者关注的热点。我国对瘢痕疙瘩的研究较其它常见、复杂性皮肤病明显滞后, 在发病机制研究及诊疗技术等方面还有许多空白。最近课题组通过关联分析研究验证了 NEDD4 基因为中国汉

族人瘢痕疙瘩的易感基因。该研究主要通过前期研究, 基础上对收集的 309 例瘢痕疙瘩患者和 1 080 例正常对照者的 NEDD4 基因分型资料与临床特征资料进一步分析, 探讨 NEDD4 基因多态性与汉族人瘢痕疙瘩的相关临床表型(家族史、严重程度及单/多发皮损)的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 309 例瘢痕疙瘩病例来自六安市人民医院、安徽省立医院等全国多家三甲医院皮肤科门诊就诊的患者, 由副主任以上皮肤科医师依据瘢痕疙瘩的诊断标准确诊, 肥厚性瘢痕和其他伴有瘢痕疙瘩的综合征患者均被排除在外。研究人群包括男 115 例, 女 194 例, 年龄 2 ~ 79 (28.72 ± 12.78) 岁; 1 080 例正常对照者来自六安市人民医院、安徽省立医院等多家医院体检中心或者在皮肤科门诊就诊的非瘢痕疙瘩患者, 同时要求其无瘢痕疙瘩家族史。所有研究对象之间无血缘关系且均为汉族人群, 包括男 462 例, 女 618 例, 年龄 5 ~ 80 (29.38 ± 8.63) 岁, 病例组与对照组在性别 ($P = 0.08$) 与年龄上 ($P = 0.29$) 相匹配。该项研究征得六安市人民医院、安徽省立医院伦理委员会等各个医院伦理委员会的批准。

1.2 临床表型的定义 瘢痕疙瘩患者及正常对照组资料信息收集, 采用统一设计的遗传流行病学调查表, 调查内容包括收集对象的姓名、性别、年龄、手机号及住址等一般情况, 初期发病年龄、临床特征(疾病的皮损类型、发病部位及家族史等)。资料经过专门培训的皮肤科医师询问患者和对照后进行填写, 签写知情同意书后的患者及正常对照抽取外周血 5 ml, EDTA 抗凝, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。阳性家族史是指其一、二或三级亲属中至少有一位瘢痕疙瘩患者。瘢痕疙瘩患者皮损类型分为: 单发型(同一部位一块或多块皮损)和多发型(不同部位存在皮损)^[5]。瘢痕疙瘩严重程度通过颜色、高度、质地、瘙痒和疼痛指标作为病情轻重程度评判的指标。每项指标根据临床表现赋予 0 ~ 3 分, 分数越高代

2017-05-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH175)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属六安市人民医院皮肤科, 六安 237005

² 安徽医科大学附属省立医院皮肤科, 合肥 230001

³ 皖南医学院第一附属医院皮肤科, 芜湖 241000

作者简介: 赵俊, 女, 副主任医师, 硕士;

陆闻生, 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luws2004@sina.com

表病情越重。综合评分为 0~15 分,再将其分为 0~10 分(轻中度)组和 10~15 分(重度)组^[6]。

1.3 DNA 提取和 SNP 分型 试剂盒(Qiagen Hilden Germany DNA Kit)从采集的外周血中分离 DNA,运用 Sequenomi Plex 平台对 rs2271289 进行基因分型。

1.4 功能注释 NEDD4 基因 rs2271289 的蛋白序列在 NCBI 网站查找,并通过 fasta 文件格式,将 NEDD4 的蛋白序列导入到 KOBAS2.0 网站进行功能注释。

1.5 统计学处理 通过 PLINK 1.07 软件分析比较病例组和对照组的等位基因频率,等位基因频率比较采用直接计数法计算出 P 值、相对危险度用优势比(OR 值)、95% 置信区间(95% CI),分析 NEDD4(rs2271289)在病例组间与对照间的等位基因的关联性时,以 $P < 0.05$ 为判断计算结果是否有意义的标准。

2 结果

2.1 NEDD4 基因多态性 rs2271289 等位基因频率比较 经统计学检验,病例组与对照组之间 rs2271289 等位基因频率分布差异有统计学意义($OR = 1.62$, 95% CI : 1.24 ~ 2.10, $P = 3.28E - 04$)。

2.2 NEDD4 基因多态性 rs2271289 与临床表型相关性

2.2.1 家族史 有家族史患者组和无家族史患者组分别与对照组比较,rs2271289 等位基因频率分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2.2 严重度 严重度组和中度组分别与对照组比较,rs2271289 等位基因频率分布差异在严重度组差异有统计学意义($OR = 1.77$, 95% CI : 1.31 ~ 2.40, $P = 1.95E - 04$),见表 2。

2.2.3 临床皮损类型(单发/多发) 单发型患者组和多发型患者组分别与对照组比较,则 rs2271289 等位基因频率分布差异在多发组患者差异有统计学意义($OR = 1.73$, 95% CI : 1.23 ~ 2.44, $P = 1.52E - 03$)。见表 3。

2.2.4 功能注释结果 研究预测 NEDD4 基因变异通过影响蛋白功能而导致瘢痕疙瘩发病的,通过 KOBAS2.0 网站测出了 NEDD4 部分功能验证猜想,同时也得出了 NEDD4 与瘢痕疙瘩发病相关的信号通路: ErbB4 信号通路。通过 DNAMAN 软件和 swiss-pdbviewer 4.1.0 里绘制 NEDD4 的一级、三级结构图^[7]。见图 1。

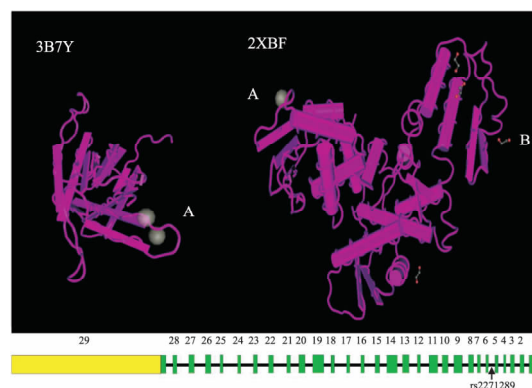


图 1 NEDD4 的一级结构和三级结构图

表 1 单核苷酸多态性 rs2271289 在对照组及阳性家族史患者组、阴性家族史患者组间分布情况

组别	单核苷酸	等位基因(危险)	模式	OR 值(95% CI)	P 值
阳性家族史 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	2.55(0.77~8.39)	0.11
			隐性模式	1.92(0.95~3.86)	0.06
			等位基因	1.78(1.05~3.02)	3.15 E-02
阴性家族史 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	3.39(1.56~7.35)	1 E-03
			隐性模式	1.40(0.93~2.12)	0.11
			等位基因	1.57(1.16~2.12)	3.27 E-03

表 2 单核苷酸多态性 rs2271289 在对照组及不同严重度患者组间分布情况

组别	单核苷酸	等位基因(危险)	模式	OR 值(95% CI)	P 值
轻-中度瘢痕疙瘩组 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	1.71(0.60~4.93)	0.31
			隐性模式	1.09(0.51~2.33)	0.83
			等位基因	1.21(0.72~2.04)	0.47
严重瘢痕疙瘩组 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	4.09(1.78~9.37)	3.25E-04
			隐性模式	1.67(1.11~2.50)	1.20E-02
			等位基因	1.77(1.31~2.40)	1.95-04

表3 单核苷酸多态性 rs2271289 在对照组及不同临床皮损患者组间分布情况

组别	单核苷酸	等位基因(危险)	模式	OR 值(95% CI)	P 值
多发瘢痕疙瘩组 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	3. 80(1. 53 ~ 9. 44)	2 E -03
			隐性模式	1. 63(1. 03 ~ 2. 58)	0. 04
			等位基因	1. 73(1. 23 ~ 2. 44)	1. 52 E -03
单发瘢痕疙瘩组 vs 正常对照	rs2271289	T/C(C)	显性模式	2. 48(0. 98 ~ 6. 26)	0. 05
			隐性模式	1. 36(0. 77 ~ 2. 39)	0. 28
			等位基因	1. 46(0. 98 ~ 2. 19)	0. 06

3 讨论

瘢痕疙瘩的病因复杂,其发病机制尚未完全阐明,目前普遍认为该病是一种多基因复杂性疾病,研究者关注点是瘢痕疙瘩相关易感基因单核苷酸多态性(SNP)。全基因组关联研究是目前寻找复杂疾病易感基因的最有效方法之一^[8],瘢痕疙瘩的遗传易感基因研究随着这项技术的发展取得了重大成果,已经发现了多个与瘢痕疙瘩相关的遗传变异。2010年 Nakashima et al^[9]在全基因关联研究中显示 NEDD4 基因多态性 SNP rs8032158 与日本人瘢痕疙瘩易感基因相关联,第一次将 NEDD4 基因多态性引入瘢痕疙瘩的研究中。在关联分析数据基础上显示 NEDD4 基因多态性 rs2271289 与中国汉族人瘢痕疙瘩易感性相关。通过分层分析显示 NEDD4 基因多态性 rs2271289 与瘢痕疙瘩的严重程度及多发型临床皮损类型相关。NEDD4 基因由 C2 结构域、WW 结构区域及 HECT 结构域组成,表达的蛋白广泛分布于皮肤、骨骼肌、肝脏、膀胱、胎盘及肿瘤细胞^[10]。SNP rs2271289 位于 NEDD4 基因第 5 与第 6 外显子之间,对应编码 NEDD4 蛋白位于 WW 结构区域,而 WW 结构区域在 NEDD4 蛋白的主要作用是识别特异性底物^[11-13]。当 WW 结构区域处的氨基酸类型发生变异后所对应所编码的 NEDD4 蛋白的构象空间会发生变化。通过 KOBAS2.0 显示 NEDD4 基因与 ErbB4 信号通路调节密切相关,NEDD4 通过 PIK3R1 结合 ERBB4-jmAcylt1s80,调节 ERBB4-jmAcylt1s80 泛酸化,然后通过降低 ERBB4-jmAcylt1s80 到达细胞核数目,最终下调这个信号通路。人表皮生长因子受体 4(human epidermal growth factor receptor ErbB4/Her4),通过参与调节细胞的发育、凋亡和分化。相关研究^[14]已表明 ErbB 蛋白与肿瘤的发生发展相关,因此 SNP rs2271289 可能通过影响 NEDD4 蛋白,进一步影响 ErbB4 信号通路,最终导致纤维细胞过度增殖,也可以解释 NEDD4 基因多态性 rs2271289 影响瘢痕疙瘩临床严

重程度,具体影响还需进一步进行 rs2271289 功能实验证实。另外,有关研究^[15]推测通过抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中 NEDD4 表达,B-Catenin 的水平下降,从而负调节 TGF-β 信号,而 TGF-β 可以促进 I 型胶原合成和抑制胶原酶的转录。异常增生的瘢痕疙瘩在伤口愈合过程中可能涉及上述信号通路^[16]。药物干预这些通路有助于预防和治疗瘢痕疙瘩。

参考文献

- [1] Velez Edwards D R, Tsosie K S, Williams S M, et al. Admixture mapping identifies a locus at 15q21.2-22.3 associated with keloid formation in african Americans [J]. Hum Genet, 2014, 133 (12): 1513 - 23.
- [2] Balci D D, Inandi T, Dogramaci C A, et al. DLQI scores in patients with keloids and hypertrophic scars: a prospective case control study [J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2009, 7 (8): 688 - 92.
- [3] Brown B C, McKenna S P, Siddhi K, et al. The hidden cost of skin scars: quality of life after skin scarring [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2008, 61 (9): 1049 - 58.
- [4] Olaitan P B. Keloids: Assessment of effects and psychosocial-impacts on subjects in a black African population [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2009, 75 (4): 368 - 72.
- [5] Park T H, Park J H, Tirgan M H, et al. Clinical implications of single-versus multiple-site keloid disorder: a retrospective study in an asian population [J]. Ann Plast Surg, 2015, 74 (2): 248 - 51.
- [6] Idriss N, Maibach H I. Scar assessment scales: a dermatologic overview [J]. Skin Res Technol, 2009, 15 (1): 1 - 5.
- [7] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18 (15): 2714 - 23.
- [8] McNamara D M, London B. GWAS applied to heart failure: bigger will be better eventually [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3 (3): 226 - 8.
- [9] Nakashima M, Chung S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population [J]. Nat Genet, 2010, 42 (9): 768 - 71.
- [10] Fotia A B, Cook D I, Kumar S. The ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2 show similar ubiquitin-conjugatingenzyme specificities [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38 (3): 472 - 9.

(下转第 1250 页)

Phantom quantitative study on metal artifacts in two different cone beam CT

Zhou Yang, Liu Honghong, Zhang Zhihong, et al

(Dept of Oral Medical, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract To quantitatively evaluate the artifacts appearance of different cone beam computed tomography. The anterior region, premolar area, molar region were marked on the plaster models. 3.3 mm diameter titanium cylinder into anterior region, 4.1 mm and 4.8 mm diameter titanium cylinder were placed into molar region. One titanium cylinder was placed in each model. Models were scanned by CBCT under the same external conditions and measured with Matlab software then analyzed the results. Two cone-beam CTs had the ring artifacts and scattering artifacts. The difference was considered statistically significant ($P < 0.05$). This showed that cone-beam CT would produce different artifacts if it has different internal exposure conditions ($P < 0.05$).

Key words cone-beam computed tomography; artifacts; dental implants

(上接第 1246 页)

- [11] Ingham R J, Gish G, Pawson T. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity with in a common modular architecture [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (11): 1972-84.
- [12] Chung S, Nakashima M, Zembutsu H, et al. Possible involvement of NEDD4 in keloid formation; its critical role in fibroblast proliferation and collagen production [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2011, 87 (8): 563-73.
- [13] Kumar S, Harvey K F, Kinoshita M, et al. C DNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse Nedd4 gene [J]. *Genomics*, 1997, 40 (3): 435-43.
- [14] Marmor M D, Skaria K B, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58 (3): 903-13.
- [15] Wu Y, Peng Y, Gao D, et al. Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF- β 3-dependent activation [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2015, 14(1): 50-62.
- [16] Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2010, 125 (2): 557-68.

Study on association of rs2271289 polymorphism within NEDD4 gene with some clinical phenotypes of keloids in Chinese Han population

Zhao Jun¹, Lu Mengzhu^{2,3}, Zhang Xiang^{2,3}, et al

¹Dept of Dermatology, Lu'an Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Lu'an 237005;

²Dept of Dermatology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

³Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Wan Nan Medical College, Wuhu 241000)

Abstract Objective To investigate the association of rs2271289 polymorphism with NEDD4 gene and some clinical phenotypes of keloids in Chinese Han population. **Methods** Based on the results of association study of keloids which were performed by our team. Genotyping data and clinical data of 309 cases and 1 080 controls were selected, Plink1.07 software was for comparing genotype or allele frequency distribution among the groups. **Results**

There was a statistical difference in the distribution of allelic frequencies of rs2271289 between cases and controls ($OR = 1.62$, 95% CI : 1.24 ~ 2.10, $P = 3.28E - 04$). The cases were stratified from family history, severity and lesion type, there were significant differences between clinical subgroups and controls. Significant associations were found for rs2271289 of NEDD4 with multiple site and severity ($P < 0.05$), However, there was no statistical difference in family history. **Conclusion** The results indicate that the rs2271289 polymorphism within NEDD4 gene is associated with susceptibility of keloids in Chinese Han population, also it is associated with severity.

Key words keloids; single nucleotide polymorphism; phenotype; NEDD4 gene