# 基于转录组学的川芎嗪改善增生性瘢痕机制研究

王婷<sup>1</sup>,吴东芝<sup>2</sup>,武雪<sup>2</sup>\* (1.陕西中医药大学药学院,陕西咸阳 712000;2.陕西中医药大学,陕西咸阳 712000)

摘要 [目的]基于转录组学分析川芎嗪治疗增生性瘢痕的分子机制。[方法]获取临床手术的增生性瘢痕组织,利用组织块培养法培养 分离瘢痕成纤维细胞,分为对照组和川芎嗪组(10 mg/mL)。采用转录组学测序技术及 GO、KEGG 通路富集分析,研究增生性瘢痕成纤 维细胞各基因的表达。[结果]转录组学分析结果得到川芎嗪参与调控2783 个差异基因,GO及 KEGG 通路富集分析显示以上基因主 要富集于 DNA 复制,细胞周期,类固醇生物合成错配修复,p53 信号通路,蛋白质的消化吸收,不饱和脂肪酸的生物合成等通路。[结论] 该研究揭示调控成纤维细胞的相关调控蛋白,对阐明川芎嗪防治增生性瘢痕的具体作用机制提供了重要信息。

关键词 川芎嗪;转录组;高通量测序;增生性瘢痕

中图分类号 R 285 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0133-04 **doi**:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.036

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

#### The Mechanism of Tetramethylpyrazine in Improving Hypertrophic Scar Based on Transcriptomics

**WANG Ting<sup>1</sup>**, **WU Dong-zhi<sup>2</sup>**, **WU Xue<sup>2</sup>** (1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000)

**Abstract** [Objective] The molecular mechanism of tetramethylpyrazine in the treatment of hypertrophic scar was analyzed based on transcriptomics. [Method] Hypertrophic scar tissue from clinical operation was obtained, and scar fibroblasts were cultured and separated by tissue block culture method, and divided into control group and tetramethylpyrazine group (10 mg/mL). Transcriptome sequencing technology and GO KEGG pathway enrichment analysis were used to study the gene expression of hypertrophic scar fibroblasts. [Result] Transcriptome analysis showed that tetramethylpyrazine was involved in the regulation of 2 783 differential genes, and enrichment analysis of GO and KEGG pathways showed that the above genes were mainly concentrated in DNA replication, cell cycle, steroid biosynthesis mismatch repair, p53 signaling pathway, protein digestion and absorption, unsaturated fatty acid biosynthesis and other pathways. [Conclusion] This study reveals the related regulatory proteins that regulate fibroblasts and provides important information for clarifying the specific mechanism of tetramethylpyrazine in preventing and treating hypertrophic scar.

Key words Tetramethylpyrazine; Transcriptomics; High-throughput sequencing; Hypertrophic scar

增生性瘢痕是皮肤烧伤、创伤、手术后最常见的并发症 之一,每年新增患者达数百万<sup>[1]</sup>。作为一种严重的皮肤纤维 化疾病,不仅影响美观,危害患者的生理和心理健康,甚至会 引起严重的功能障碍,给家庭和社会带来沉重的负担<sup>[2]</sup>。尽 管临床上有多种治疗方案,但因增生性瘢痕的发病率、复发 率高及治疗周期长等特点,加之目前缺乏预防瘢痕形成及改 善瘢痕的特效药物。因此,增生性瘢痕是临床治疗面临的一 大难题,成为国内外学者研究的重点和难点。目前认为增生 性瘢痕的形成主要与遗传因素、创面炎症反应、细胞因子的 作用、胶原代谢失衡和成纤维细胞的功能失调密切相关<sup>[2]</sup>。 其中,成纤维细胞的作用至关重要。成纤维细胞和由其表型 转化而来的肌成纤维细胞直接参与皮肤损伤后创面愈合,是 多种细胞因子、炎性反应作用的靶细胞,更是导致胶原代谢 失衡和瘢痕形成的关键效应细胞<sup>[2-3]</sup>。

川芎嗪(Tetramethylpyrazine,TMP)是从中药川芎中提取 得到的活性单体,研究表明川芎嗪可明显改善心肌、肺和肝 纤维化等纤维化疾病<sup>[4]</sup>。Wu等<sup>[5]</sup>已经证实了川芎嗪通过调 节胶原的表达和细胞的增殖与凋亡,从而抑制瘢痕成纤维细 胞纤维化,拮抗瘢痕的增生。鉴于中药复方成分多以及作用 的复杂性,川芎嗪拮抗瘢痕成纤维细胞纤维化的其余机制研 究尚不明确,有待深入研究。该研究采用转录组测序(RNA-

基金项目 教育厅专项科研计划项目(18JK0212)。

作者简介 王婷(1996—),女,重庆人,硕士研究生,研究方向:抗结肠 癌药物。\*通信作者,实验师,硕士,从事增生性瘢痕的防 治和发生机制研究。 收稿日期 2021-06-01 Seq) 技术分析川芎嗪干预瘢痕成纤维细胞的差异表达基因,从转录组学水平进一步揭示调控成纤维细胞的相关调控 蛋白,以期阐明川芎嗪防治增生性瘢痕的具体作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 样本** 增生性瘢痕组织均来自空军军医大学烧伤与皮肤外科即将接受手术的成年患者(20~44岁)。在试验前,所有患者均有知情同意书,所有方案均由空军军医大学第一附属西京医院伦理委员会批准。

**1.2 瘢痕成纤维细胞的分离与培养** 组织块经消毒、清洗, 置于0.25% Dispase 中,4℃消化12 h,分离真皮层,洗涤后剪 切成0.1~1.0 mm的组织块,接种于培养瓶中,传至2~4代 的成纤维细胞冻存于液氮罐中保存,试验用5~8代细胞。

**1.3 分组及给药** 将体外培养的瘢痕成纤维细胞接种于培养皿,待细胞 80%融合时用无血清培养基孵育 12 h 后,加入 川芎嗪(40 μmol/L)处理 24 h 后收集细胞样本用于后续 检测。

川芎嗪购自上海源业生物科技有限公司,纯度 98%。取 10 mg TMP 溶液称重,溶解于 1 mL DMSO 中,制成 10 mg/mL 川芎嗪溶液。

1.4 转录组学检测 收集瘢痕成纤维细胞和川芎嗪处理后的瘢痕成纤维细胞样本,使用 RNAprep 试剂盒提取细胞中总 RNA,用含有寡糖(dT)的小球从总 RNA 中分离 poly mRNA, 去除 rRNA。采用 illumina Hiseq 测序平台的双端测序模式对 多个样本进行高通量测序,去除单细胞 SMARTER 建库接 头,根据 illumina 测序数据的低质量分数集中于末端的分布

特点,利用 Skewer 软件对测序数据从 3′端动态去除和接头序 列片段和低质量片段,利用 FastQC 软件对预处理数据进行 质量控制分析,利用 FastQC 软件对预处理数据进行质量控 制分析以及 Q20、Q30 碱基比例统计。

**1.5 差异基因筛选及分析**利用 DESeq2 软件对不同样本 组之间筛选差异表达的已知基因,满足 llog2FC l≥1 和 P≤ 0.05 差异表达范围,筛选 2 组之间的差异基因。

1.6 GO和 KEGG 功能分析和富集分析 针对目的基因 集采用 TopGO软件进行 GO 功能分析,GO 功能富积分析的 方法:将全部基因作为背景列表,目的基因列表作为从背景 列表中筛选出来的候选列表,利用 Fisher 精确检验计算代表 GO 功能集在目的基因列表中是否显著富积的 P 值,再对 P 值经 Benjamini & Hochberg 多重检验纠正后得到 FDR。 KEGG pathway 功能分析是针对这些基因进行 KEGG 数据库 中 Pathway 的功能注释和归类,KEGG pathway 功能富积分析 方法与 GO 功能富积分析类似。

2 结果与分析

2.1 基因表达差异 将对照组与川芎嗪处理组的各基因表达情况进行对比,结果表明,川芎嗪组共致使2783个基因表

达水平存在显著变化,其中使表达水平显著上调的基因有 1285个,显著下调的基因有1498个(P<0.01)。

用 R 语言 ggplots2 软件包绘制差异表达基因的火山图, 火山图展示 2 分组之间基因表达倍数差异和显著性程度(图 1),绿色是相对对照组显著性下调的基因(即 P ≤ 0.05,foldchange ≥ 2),红色点则为上调基因。查阅相关文献,得到川芎 嗪处理后修复增生性瘢痕密切相关的基因,分别列举了处理 组与对照组高表达和低表达的 5 个基因(表 1)。



## 图1 差异表达基因的火山图

Fig. 1 Volcano diagram of differentially expressed genes

Table 1	Differentially exp	ressed genes betwee	n xetramethylpyrazine	and control group
---------	--------------------	---------------------	-----------------------	-------------------

基因 symbal 名 Gene symbal name	基因 Description	差异倍数 Fold change	<i>P</i> 值
KRT16	keratin 16	1.493 033 011	0.003 362 460
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	2.395 199 230	1.74E-07
FGF18	fibroblast growth factor 18	1.527 677 188	0.030 107 501
IL15	interleukin 15	-1.104 311 548	0.011 692 507
IL20RA	interleukin 20 receptor subunit alpha	-1.119 206 166	0.046 099 290

2.2 GO 富集 Gene Ontology 数据库是用专业术语对基因 产物的属性进行定义。GO 包括 3 个本体,用来描述细胞学 组分、分子功能和参与的生物学过程(图 2)。差异表达基因 的 GO 分析结果显示,这些差异基因分别涉及 20 条生物学过 程,主要影响细胞周期、染色体分离、有丝分裂、核分裂、细胞 器裂变、DNA 代谢过程、DNA 复制等,20 条细胞学组分为染 色体分离,染色体着丝粒区域等相关组分,20 条分子功能主 要涉及单链 DNA 依赖的 ATP 酶活性,DNA 二级结构结合以 及细胞骨架的结构组成成分等。

2.3 KEGG 富集 该研究通过 KEGG pathway 显著性富集 分析来筛选对照组和川芎嗪干预组间的差异基因参与的主 要生化代谢途径和信号转导途径,以 KEGG pathway 为单位, 通过超几何检验,筛选出与整个基因组相比后差异表达基因 显著富集的 pathway,以 Q<0.05 的 pathway 定义为各组差异 表达基因显著富集的 pathway。从复杂调控网络的角度,找 出与增生性瘢痕相关的 KEGG 通路,从而提取出相关 KEGG 通路中的差异表达基因。KEGG 富集结果见图 3,这些差异 基因被富集于 DNA 复制、细胞周期、类固醇生物合成错配修 复、p53 信号通路、蛋白质的消化吸收、不饱和脂肪酸的生物 白 16(keratin 16)数量极少或不存在,该研究发现与对照组

### 合成等通路上。

## 3 讨论

增生性瘢痕是烧伤、创伤等皮肤损伤后的严重并发症之一。瘢痕与正常皮肤相比,表面呈红色,局部增厚变硬,严重 影响患者外观并引发功能性障碍,给患者心理、生理带来巨 大的困扰<sup>[6-7]</sup>。增生性瘢痕的主要病理特征包括成纤维细胞 过度增殖、毛细血管增生以及细胞外基质过度沉积。其发生 的诱因主要有烫伤、烧伤及创伤等皮肤深度损伤,创面愈合 时间延长,过度的炎症反应及遗传因素等。因此,抑制成纤 维细胞的过度增殖、激活成纤维细胞凋亡、减少基于胶原的 ECM 沉积对增生性瘢痕治疗至关重要。其中,成纤维细胞被 赋予完整的机制,允许 ECM 的沉积和吸收,在稳态条件下不 断更新<sup>[8]</sup>。

该研究通过转录组学测序技术分析了川芎嗪治疗组与 对照组瘢痕成纤维细胞的差异表达基因,随后对差异表达基 因进行了 GO 分析和富集分析。研究结果表明,川芎嗪治疗 后增生性瘢痕成纤维细胞的基因发生了明显改变,统计分析 有 2 783 个基因发生明显变化,其中显著上调的基因有 1 285 个,显著下调的基因有 1 498 个。研究表明<sup>[9]</sup>,在疤痕中角蛋 相比,川芎嗪处理组中的 keratin 16 表达明显上调。当 kera-









tin 16的表达异常时,病变部位的皮肤屏障功能会受到不同 程度的破坏,未受累皮肤的屏障功能也会受到影响,不仅皮 肤渗透屏障功能受到影响,还会引起皮肤炎症反应和免疫反 应,导致机体受到进一步损害<sup>[10]</sup>。Meyer等<sup>[11]</sup>研究表明,角 质形成细胞中的成纤维细胞生长因子 3 型受体(FGFR3)对 于小鼠皮肤发育、稳态和伤口修复不可或缺,经川芎嗪处理

后的瘢痕成纤维细胞与对照组相比 FGFR3 表达量上调 2.39 倍(P≤0.05)。进一步发现 FGFR1、FGFR2 和 FGFR3 共同作 用,能维持表皮完整性和皮肤稳态。Joannes 等<sup>[12]</sup>研究发现, FGF18 可抑制成纤维细胞的细胞生长,结果显示川芎嗪处理 组瘢痕成纤维细胞中 FGF18 与对照组相比上调了 1.52 倍 (P≤0.05)。白细胞介素 15(IL-15) 为一种细胞生长因子, 也可以作为一种化学引诱因子,并具有促炎特性。Teich-Alasia 等<sup>[13]</sup>研究证明,从活跃期增生性瘢痕到缓解期增生性 瘢痕的进展是由 IL-15 的减少而引起的活化浸润性 T 细胞 的活性或被动细胞凋亡的结果。IL-15 可富集、激活和防止 活跃期增生性瘢痕中激活的 T 淋巴细胞凋亡,因此抑制 IL-15 的表达可缓解疤痕角质层增厚。临床前试验证明,抗 IL-20RA 单克隆抗体<sup>[14]</sup>具有抑制化学药物(四氯化碳)或机械 胆管结扎诱导的小鼠模型中 TGF-β 产生或 ECM 成分过度 积累的效果,故下调 IL-20RA 表达可减少 ECM 积累。

该研究从整体上揭示了差异基因的功能、代谢途径和信 号通路,阐明了川芎嗪通过调控成纤维细胞增殖的相关基因 表达水平来改善增生性瘢痕,为临床治疗增生性瘢痕提供了 新思路。

#### 参考文献

- [1] SINGER A J, CLARK R A. Cutaneous wound healing[J]. N Engl J Med, 1999,341(10):738-746.
- [2] VAN DER VEER W M, BLOEMEN M C T, ULRICH M M W. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar[J]. Burns, 2009, 35(1): 15–29.
- [3] SARRAZY V, BILLET F, MICALLEF L, et al. Mechanisms of pathological scarring; Role of myofibroblasts and current developments [J]. Wound Repair Regen, 2011, 19:s10-s15.
- [4] 鲍永霞,王晶,孙冰,等. 川芎嗪对肺间质纤维化患者运动心肺功能改善的研究[J]. 中国现代医学杂志,2011,21(27):3410-3412.

\*\*\*\*\*\*

(上接第96页)

>13~36 km 缓冲区内,土地利用变化相对较少,2012—2017 年土地利用转变面积增加,主要是农地、林地和草地的转变。

土地利用程度变化主要在 0~1 km 和>1~13 km 缓冲区 内。0~1 km 缓冲区内土地利用程度持续降低,土地开发利 用减弱;>1~13 km 缓冲区内土地利用程度持续增长,土地开 发利用逐渐增大。

## 参考文献

- [1] 赵俊三,袁磊,张萌.土地利用变化空间多尺度驱动力耦合模型构建
  [J].中国土地科学,2015,29(6):57-66.
- [2] VADREVU K P, OHARA T. Focus on land use cover changes and environmental impacts in South/Southeast Asia [J]. Environmental research letters, 2020, 15(10):1-4.
- [3] DEVANAND A, HUANG M Y, LAW RENCE D M, et al. Land use and land cover change strongly modulates land-atmosphere coupling and warmseason precipitation over the central United States in CESM2-VR[J]. Journal of advances in modeling earth systems, 2020, 12(9):1942-2466.
- [4] ABDU H A. Classification accuracy and trend assessments of land coverland use changes from principal components of land satellite images[J]. International journal of remote sensing,2019,40(4):1275-1300.
- [5] FERNANDES M M, FERNANDES M R D M, GARCIA J R, et al. Assessment of land use and land cover changes and valuation of carbon stocks in the Sergipe semiarid region, Brazil;1992–2030[J/OL]. Landuse policy,

- [5] WU X, WANG Z, WU G F, et al. Tetramethylpyrazine induces apoptosis and inhibits proliferation of hypertrophic scar-derived fibroblasts via inhibiting the phosphorylation of AKT[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:1–8.
- [6] GAUGLITZ G G, KORTING H C, PAVICIC T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: Pathomechanisms and current and emerging treatment strategies [J]. Mol Med, 2011, 17(1/2):113-125.
- [7] BLOEMEN M C T, VAN DER VEER W M, ULRICH M M W, et al. Prevention and curative management of hypertrophic scar formation [J]. Burns, 2009, 35(4):463–475.
- [8] DISTLER J H W, GYÖRFI A H, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(12):705-730.
- [9] LIMANDJAJA G C, VAN DEN BROEK L J, WAAIJMAN T, et al. Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars[J]. Br J Dermatol, 2017, 176(1):116–126.
- [10] 李帅,张建忠,栗玉珍. 角蛋白 16 在皮肤屏障功能中的作用[J]. 国际 皮肤性病学杂志,2016,42(1):50-53.
- [11] MEYER M, BEN-YEHUDA GREENWALD M, RAUSCHENDORFER T, et al. Mouse genetics identifies unique and overlapping functions of fibroblast growth factor receptors in keratinocytes[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24 (2):1774-1785.
- [12] JOANNES A, BRAYER S, BESNARD V, et al. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts in vitro [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 310(7) :L615–L629.
- [13] TEICH-ALASIA S, CASTAGNOLI C, TROMBOTTO C, et al. Expression and role of IL-15 in post-burn hypertrophic scars[J]. J Invest Dermatol, 1999,113(2):238-245.
- [14] CHIU Y S, WEI C C, LIN Y J, et al. IL-20 and IL-20R1 antibodies protect against liver fibrosis[J]. Hepatology, 2014,60(3):1003–1014.

2020,99[2020-11-05]. https://doi.org/10.1016/j.land usepol. 2020. 104795.

- [6] XU X M, SHRESTHA S, GILANI H, et al. Dynamics and drivers of land use and land cover changes in Bangladesh [J]. Regional environmental change, 2020, 20(2):1-11.
- [7] ASIBEY M O, AGYEMAN K O, AMPONSAH O, et al. Patterns of land use, crop and forest cover change in the Ashanti region, Ghana [J]. Journal of sustainable forestry, 2020, 39(1):35-60.
- [8] 简萍,李阳兵,王权.基于地形梯度的典型峰丛洼地区土地利用空间分 布格局分析[J].长江流域资源与环境,2020,29(5);1128-1139.
- [9] 李睿康,黄勇,李阳兵,等. 三峡库区腹地土地功能演变及其驱动机制 分析[J]. 长江流域资源与环境,2018,27(3):594-604.
- [10] 王少华.郑州沿黄旅游区土地利用空间格局演变[J].地域研究与开发,2017,36(6):115-118,130.
- [11] 高凤杰,马泉来,单培明,等.黑龙江省穆棱市土地利用/覆被变化及 热点分析[J]. 地域研究与开发,2016,35(4):126-130.
- [12] 胡学东,邹利林. 生态优先导向下长江经济带土地利用景观格局演变及其驱动机制研究:以武汉市为例[J]. 地域研究与开发,2020,39(3): 138-143,149.
- [13] 苑韶峰,唐奕钰,申屠楚宁.土地利用转型时空演变及其生态环境效应:基于长江经济带127个地级市的实证研究[J].经济地理,2019,39(9):174-181.
- [14] 李煜东,臧传富,陈相龙.淮河流域 1990—2015 年间土地利用时空变 化特征及驱动机制研究[J]. 生态科学, 2020, 39(2):104-113.
- [15] 刘纪远.中国资源环境遥感宏观调查与动态研究[M].北京:中国科学技术出版社,1996.