

# 创伤愈合及压力治疗过程中瘢痕动物模型 转录组水平的变化研究

柳柏梅<sup>1</sup>, 刘阳<sup>1</sup>, 王立<sup>1</sup>, 侯春胜<sup>2</sup>, 陈凌峰<sup>1</sup>, 吕营<sup>1</sup>, 安美文<sup>1</sup>

(1. 太原理工大学 生物医学工程学院, 太原 030024; 2. 太钢总医院(山西省烧伤救治中心) 整形科, 太原 030009)

**摘要:**目的 利用 RNA 测序技术(RNA-seq)研究创伤愈合及压力治疗过程中巴马小型猪瘢痕动物模型转录组水平的变化。方法 通过背部取皮建立巴马小型猪瘢痕模型,取皮第 60 d 开始加压(3.4 kPa)治疗,在取皮第 0、14、30、60 和 90 d 分别提取瘢痕组织总 RNA 进行测序。将所得序列映射到猪参考基因组并进行转录组重建,寻找差异表达基因(DEGs),利用生物信息学方法进一步对所得 DEGs 进行 GO 分析和 KEGG 通路富集性分析,同时挑选部分基因用 qRT-PCR 进行验证。结果 测序数据经过预处理,各组均有 78% 以上的读段能准确比对到参考序列。DEGs 鉴定结果表明,压力治疗前后有 568 个基因差异表达,其中上调 289 个,下调 279 个。GO 富集分析发现,各组 DEGs 主要与细胞外基质、组织发展和皮肤发展相关。KEGG 富集分析表明,创伤愈合过程中各组 DEGs 主要富集于细胞外基质-受体相互作用、黏着斑和凋亡通路;压力治疗前后的 DEGs 除了富集于以上通路,还富集于 MAPK 和 PI3K 信号通路。qRT-PCR 检测表明,6 个 DEGs 的表达模式与 RNA-Seq 分析结果一致,证实 RNA-seq 结果的可靠性。结论 RNA-seq 分析鉴定出创伤愈合及压力治疗过程中瘢痕动物模型的差异表达基因,为临床瘢痕的治疗研究提供实验依据。

**关键词:**巴马小型猪; 瘢痕; 压力治疗; RNA 测序; 动物模型

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.04.008

## Transcriptome Level Changes in Animal Model of Scars During Wound Healing and Pressure Therapy

LIU Baimei<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, HOU Chunsheng<sup>2</sup>, CHEN Lingfeng<sup>1</sup>, LÜ Ying<sup>1</sup>, AN Meiwen<sup>1</sup>

(1. College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China;

2. Department of Burns and Plastic Surgery, Taigang General Hospital, Taiyuan 030009, China)

**Abstract: Objective** To study the changes of transcriptome levels in a Bama minipig model of hypertrophic scar during wound healing and pressure therapy by using RNA sequencing (RNA-seq) technique. **Methods** The Bama minipig model was established by skin wounds from the back and pressure (3.4 kPa) was initiated at 60 days after skin injury. Total RNA was extracted from scar tissues at 0, 14, 30, 60, and 90 days after skin injury and then sequenced. The resulting sequences were mapped to porcine reference genomes and transcriptomes were reconstructed to search for differentially expressed genes (DEGs). The DEGs were further subjected to GO and KEGG analysis using bioinformatics method, while part of the genes were selected for verification using qRT-

**PCR. Results** After preprocessing, more than 78% reads in each group were accurately aligned to the reference sequence. The DEGs identification result showed that 568 genes were differentially expressed after pressure treatment, with 289 up-regulated and 279 down-regulated. GO enrichment analysis revealed that DEGs in each group were mainly associated with extracellular matrix, tissue development and skin development. KEGG analysis showed that the DEGs in each group during wound healing were mainly enriched in extracellular matrix-receptor interactions, focal adhesion and apoptosis pathways; while the DEGs after pressure treatment were mainly enriched in PI3K-Akt and MAPK signaling pathway except the pathways mentioned. qRT-PCR showed that the expression patterns of 6 DEGs were consistent with RNA-seq analysis, confirming the reliability of RNA-seq result.

**Conclusions** RNA-Seq analysis identified differentially expressed genes in animal model of scars during wound healing and pressure therapy, which provided experimental evidence for clinical scar treatment.

**Key words:** Bama minipig; scar; pressure therapy; RNA sequencing; animal model

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤损伤后出现的一种常见病理组织,影响美观甚至可导致严重的功能障碍<sup>[1]</sup>。HS形成是一个复杂的生物学过程,并受特定基因的严格控制。压力疗法通常被认为是预防和治疗烧伤后HS最好的非侵入性技术之一,合理地使用压力疗法可以减轻瘢痕引起的疼痛和瘙痒,减少胶原蛋白的产生,并能防止严重的瘢痕挛缩<sup>[2]</sup>。研究表明,当压力达到1.33~2.00 kPa时,瘢痕增生就会受到限制,其可能机制是机械压力可以通过激活细胞信号通路影响细胞增殖和凋亡,导致组织缺血和缺氧。在低氧环境中,纤维母细胞被抑制,进而降低其合成胶原纤维的能力。局部缺血可导致 $\alpha$ -巨球蛋白的减少和胶原酶浓度的增加,减少细胞外基质沉积<sup>[3-4]</sup>。然而,这些研究并不能完全反映由压力治疗引起的复杂生物过程。

理想动物模型中的HS应在外观、组织学、生物化学、免疫学、分子生物学和临床行为方面与人类相匹配<sup>[5]</sup>。Morris等<sup>[6]</sup>报道了在兔耳上建立HS模型,然而这种模型是一种小面积的全层皮肤创伤,与深度真皮未受损、大面积烧伤伤口完全不同。研究表明,巴马小型猪的皮肤与人类皮肤非常相似,包括胶原蛋白、弹性纤维和网状纤维,且猪表皮或真皮的厚度与成人没有显著差异<sup>[7]</sup>。此外,猪对创伤的反应与人类相似,主要通过重新上皮化进行修复;而在啮齿动物中,伤口主要以收缩形式开始修复<sup>[8]</sup>。因此,巴马小型猪作为一种中国小型猪品种,可以用作伤口修复及瘢痕研究的模型。

转录组测序技术是一种用于测量在某段时间内或特定时刻样本RNA表达的技术,已经被证明是一种有效的转录组分析方法,可以提供组织样本的定性、定量表达信息<sup>[9]</sup>。基于其深度测序、高通量和低成本的特点,RNA测序技术(RNA-seq)已被广泛用于许多复杂疾病发病机理等领域的研究。然而,目前还鲜有关于高通量RNA-seq技术从转录组水平分析动物模型创伤愈合和压力治疗过程中基因表达变化,从而揭示压力治疗瘢痕分子机制的报道。

本文建立了巴马小型猪瘢痕动物模型,并在皮肤损伤60 d后施加压力治疗,使用RNA测序技术评估创伤愈合过程和压力治疗前后瘢痕样本转录组水平的变化,探索压力疗法的潜在分子机制,为临床上瘢痕的预防及治疗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

3头雌性巴马小型猪,2~3月龄,体质量21~23 kg。购自北京实创世纪小型猪养殖基地,经实验动物育种筛选,符合北京市小型实验猪地方标准,遗传稳定性高。室内单笼饲养,自由饮水及摄食。实验开始前适应环境2周。

### 1.2 皮肤创伤及取样

实验前禁食12 h。背部剃毛,碘酒消毒,75%酒精冲洗干净。通过肌肉注射Zoletil(15 mg/kg)麻醉后,用电动取皮刀(Tyler Research公司,英国)在每头猪背部脊柱两侧共创建4个(2行2列)深度1.8 mm、涉及真皮层的创面,面积为8 cm × 8 cm,

同侧创面前后间隔 12 cm。创面不作任何处理,任其自然愈合。在取皮第 60 d 时,利用自制的弹性绷带装置对每头猪的 2 个头侧伤口施加约 3.4 kPa 压力,每天 24 h,持续加压 30 d。使用压力传感器每周测量 1 次压力大小并作适当调整。在创伤后不同时间点,分别在每个创面 1/4 位置提取大小为 1.0 cm × 1.5 cm 瘢痕组织,未治疗组定义为 0、14、30、60 和 90 d 组,加压治疗组定义为 90 d+P 组。取皮与加压位置如图 1 所示。



图 1 创伤及加压位置示意图

Fig.1 Diagram of trauma and pressure position

### 1.3 RNA 提取与测序

采用 mirVana™ miRNA 分离试剂盒 (AM1561, Ambion 公司, 美国) 提取瘢痕组织总 RNA, 使用 RNAClean XP 试剂盒 (Cat A63987, Beckman 公司, 美国) 进一步纯化 RNA。RNA 纯化后随机打断成小片段, 使用 SuperScript II 逆转录酶和随机引物合成 cDNA, 对其进行末端修复并连接测序接头, PCR 扩增产生最终的 cDNA 文库。使用 cBot 产生 Cluster, 在 Illumina HiSeq 2500 (Illumina 公司, 美国) 上测序。转录组测序及数据分析均由上海伯豪生物技术有限公司完成。

表 1 qRT-PCR 鉴定引物

Tab.1 Primers used for qRT-PCR

基因名称	基因描述	基因编号	引物序列
TGF-β1	转化生长因子 β1	397078	5' 端
			3' 端
Smad-2	SMAD 家族成员 2	100155304	5' 端
			3' 端
Smad-3	SMAD 家族成员 3	397260	5' 端
			3' 端
COL1A2	I 型胶原	100626716	5' 端
			3' 端
COL3A1	III 型胶原	100152001	5' 端
			3' 端
α-SMA	α-平滑肌肌动蛋白	733615	5' 端
			3' 端
SDHA	琥珀酸脱氢酶 A	780433	5' 端
			3' 端

### 1.4 差异表达基因的鉴定及生物信息学分析

通过对测序文库的原始读段 (raw reads) 预处理, 产生由干净读段 (clean reads) 组成的数据集。使用 Tophat 2.1.0 将干净读段映射到猪 (*sus scrofa*) 参考基因组 (NCBI 参考序列: GCA\_000003025.6)。Cufflinks 软件分析所有转录本的表达量, 以每  $10^6$  个 map 上的 reads 中比对到外显子的每  $10^3$  个碱基上的片段数 (fragments per kilobase of exon per million mapped reads, FPKM) 标准化计算基因表达水平。根据每个样本中基因的 FPKM 值计算差异表达的倍数。使用 Cufflinks 软件的 Cuffdiff 模块鉴定差异表达基因 (DEGs), 筛选条件为  $q \leq 0.05$  和差异倍数  $\geq 2$ 。分别对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 注释与富集分析。

### 1.5 PCR 验证

选择与瘢痕形成相关的 6 个基因通过 qRT-PCR 方法验证测序数据的准确性。使用 Power SYBR® Green PCR Master Mix (ABI 公司, 美国)、模板和引物以 10 μL 总反应体积进行 PCR 实验。反应条件为: 95 °C, 10 min (1 个循环); 95 °C, 15 s 60 °C, 1 min (40 个循环); 65~95 °C 获得熔解曲线。每个试验设 3 次重复。选择琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase A, SDHA) 作为内参, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达量。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计和合成 (见表 1)。

## 2 结果

### 2.1 RNA 测序质量评估

在对测序进行严格的质量评估之后,每个样品获得了超过  $3.3 \times 10^7$  原始读段,质量值大于 20

( $Q_{20}$ )的碱基比例均超过 96%。经过筛选之后,干净读段百分比均超过 94%,为高质量的后续信息分析奠定了基础。使用 Tophat 软件将获得的干净读段映射到参考基因组,映射比例在 78% 以上(见表 2)。

表 2 RNA-seq 序列与参考基因组的比对

Tab.2 Summary of RNA-seq reads mapping to the reference genome

样本	$Q_{20}/\%$	原始读段	干净读段	干净比例/ $\%$	比对读段	唯一位点对读段	映射比例/ $\%$
0 d	96.3	37,273,590	35,200,015	94.4	27,685,082	26,619,130	78.7
14 d	96.4	33,314,868	31,502,723	94.6	25,272,134	23,734,221	80.3
30 d	96.4	40,326,237	38,110,746	94.5	30,157,833	28,339,781	79.2
60 d	96.9	38,395,240	36,469,856	95.0	28,605,651	27,135,673	78.4
90 d	97.1	35,165,052	33,526,198	95.4	26,290,851	24,802,330	78.3
90 d+P	96.6	34,565,854	32,780,576	94.8	25,862,635	24,748,103	78.9

### 2.2 差异表达基因鉴定

利用 Tophat-Cufflinks-Cuffmerge-Cuffdiff 分析流程,以正常皮肤(0 d)为对照,分析不同时间点瘢痕组织的差异表达基因(见图 2)。从基因表达水平分布可以看出,6 个样本的表达水平均呈正态分布, $\log_{10}$ (FPKM)波峰均位于 0~1,表明 FPKM 值主要分布于 1~10。少数高表达基因 FPKM 值可以达到

$10^4$ ,低表达基因 FPKM 值仅有  $10^{-3}$ 左右,高低表达基因数量级差达到  $10^7$ ,说明检测灵敏度很高,有利于 DEGs 筛选。根据筛选标准,各组与正常皮肤之间以及压力治疗前后的 DEGs 数量如图 3 所示。伤后 90 d 时,压力治疗后 568 个基因显著差异表达。其中,289 个基因(50.9%)上调,279 个基因(49.1%)下调。

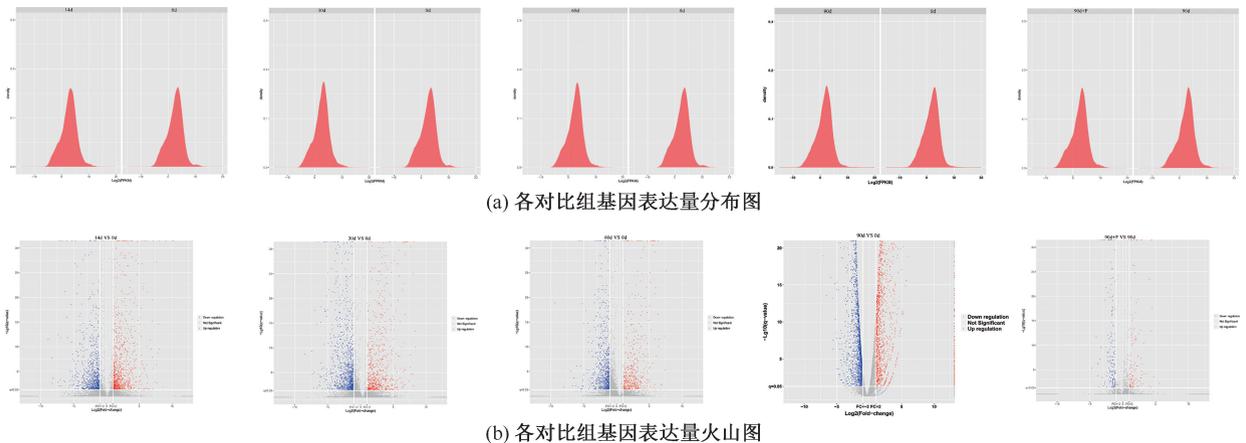


图 2 各对比组差异表达基因的鉴定

Fig.2 Identification of differentially expressed genes in different groups (a) Density of all genes in different groups, (b) Volcano plot of gene expression in different groups

### 2.3 差异表达基因的 GO 分类与富集分析

为了进一步阐明所有 DEGs 的功能,对各组 DEGs 进行 GO 注释,注释包括生物过程、细胞组分和分子功能 3 类。利用 WEGO 将差异表达基因的 GO 二级词条进行比较,发现各组差异表达基因均倾向于在细胞过程、代谢过程、细胞部分以及分子功

能中的结合等部位显著富集,但是各组富集的基因数不同(见图 4)。以校正后的  $p$  值( $q$  值)进行统计检验,各组最显著富集的前 5 个 GO 分类词条如表 3 所示,差异表达基因主要与细胞外区域(GO:0005576)、细胞外基质(GO:0031012)和细胞外分泌体(GO:0070062)相关。

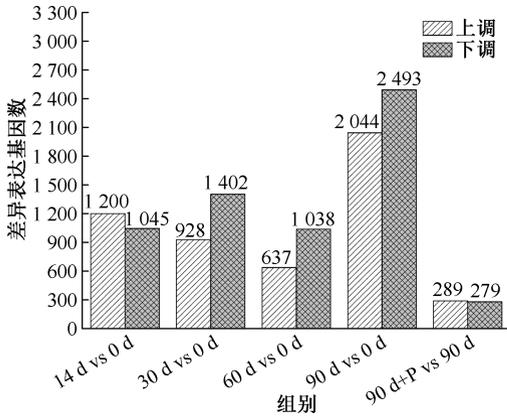


图3 各对比组差异表达基因数量

Fig.3 Number of DEGs in different groups

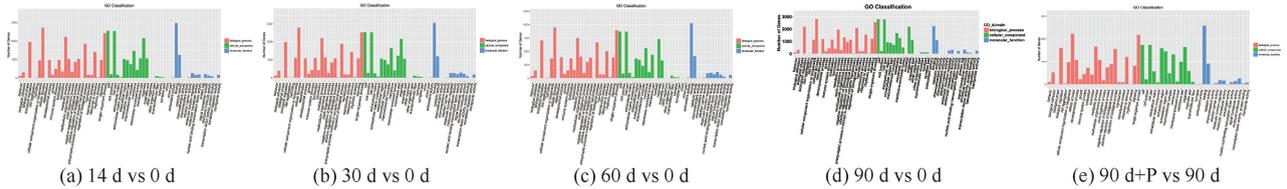


图4 各对比组差异表达基因的GO分类

Fig.4 GO categories of DEGs in different groups (a) 14 d vs 0 d, (b) 30 d vs 0 d, (c) 60 d vs 0 d, (d) 90 d vs 0 d, (e) 90 d+P vs 90 d

表3 各对比组差异表达基因富集的前5个GO分类

Tab.3 5 most enriched GO terms of DEGs in different groups

组别	GO 术语	GO 编号	上调基因数	下调基因数	q 值
14 d vs 0 d	细胞外区域	GO:0005576	375	139	5.31E-26
	细胞外囊泡	GO:1903561	273	84	2.03E-22
	细胞外分泌体	GO:0070062	272	81	4.79E-22
	囊泡	GO:0031982	294	96	2.99E-17
	细胞外空间	GO:0005615	129	51	2.31E-12
30 d vs 0 d	细胞外区域	GO:0005576	301	234	2.89E-27
	细胞外基质	GO:0031012	99	24	5.97E-27
	细胞外分泌体	GO:0070062	193	168	1.27E-21
	细胞外囊泡	GO:1903561	194	169	1.57E-21
	囊泡	GO:0031982	211	202	1.02E-19
60 d vs 0 d	细胞外基质	GO:0031012	84	18	1.61E-28
	细胞外区域	GO:0005576	204	165	1.54E-19
	组织发展	GO:0009888	90	99	6.15E-16
	细胞外囊泡	GO:1903561	134	110	8.03E-14
	细胞外分泌体	GO:0070062	133	110	8.62E-14
90 d vs 0 d	细胞外基质	GO:0031012	138	56	5.24E-11
	系统发展	GO:0048731	500	467	5.81E-10
	细胞黏附	GO:0007155	189	131	6.68E-09
	多细胞生物发展	GO:0007275	526	495	7.45E-09
	解剖结构发展	GO:0048856	574	550	1.71E-08
90 d+P vs 90 d	细胞外基质	GO:0031012	5	51	2.29E-32
	细胞外区域	GO:0005576	65	93	6.66E-29
	细胞外间隙	GO:0005615	22	48	5.34E-20
	蛋白质的细胞外基质	GO:0005578	3	33	1.44E-19
	钙离子结合	GO:0005509	24	28	2.56E-16

## 2.4 差异表达基因的 KEGG 分类与富集分析

为了进一步了解所有 DEGs 的生物学功能, 本文对其进行 KEGG 通路分类, 主要包括细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、代谢和生物系统 5 类 (见图 5)。各组 DEGs 主要富集在免疫系统、信号转导、转运和分解代谢信号通路, 但各组富集的基因数不同。此外, 以  $q$  值进行统计检验, 各组最显著富集的前 5 个 KEGG 信号通路如表 4 所示。压力治疗组中 DEGs 主要富集在细胞外基质-受体相互作用、黏着斑和光传导等信号通路。

## 2.5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

通过实时荧光定量 PCR 技术, 比较分析 6 个

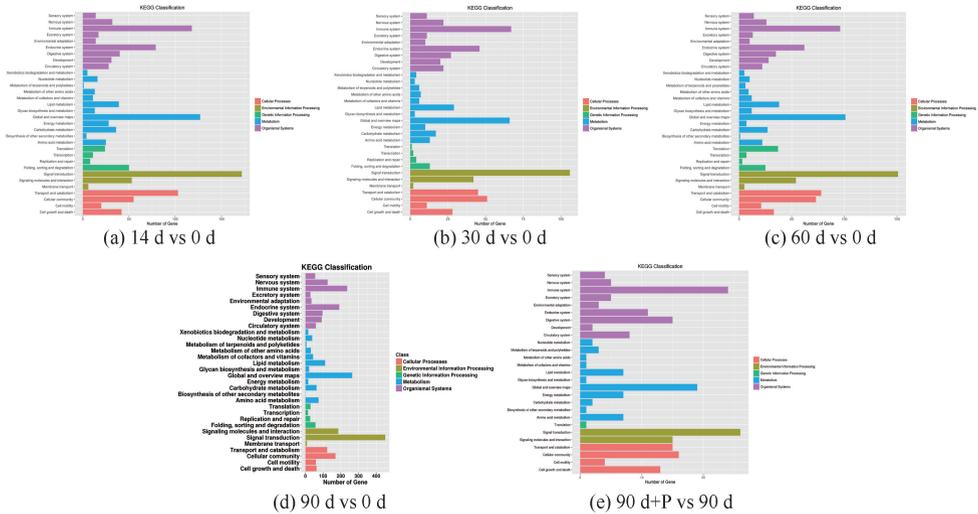


图 5 各对比组差异表达基因的 KEGG 分类

Fig.5 KEGG categories of DEGs in different groups (a) 14 d vs 0 d, (b) 30 d vs 0 d, (c) 60 d vs 0 d, (d) 90 d vs 0 d, (e) 90 d+P vs 90 d

表 4 各对比组差异表达基因富集的前 5 个 KEGG 分类

Tab.4 5 most enriched KEGG terms of DEGs in different groups

组别	KEGG 术语	KEGG 编号	上调基因数	下调基因数	q 值
14 d vs 0 d	细胞外基质-受体相互作用	ssc04512	16	3	0.000 185
	黏着斑	ssc04510	25	2	0.025 934
	蛋白质消化和吸收	ssc04974	14	2	0.033 152
	趋化因子信号通路	ssc04062	20	6	0.051 785
	PI3K-Akt 信号通路	ssc04151	31	8	0.071 348
30 d vs 0 d	细胞外基质-受体相互作用	ssc04512	18	4	2.49×10 <sup>-6</sup>
	黏着斑	ssc04510	26	5	0.000 674
	补体系统	ssc04610	14	2	0.010 715
	TGF-beta 信号通路	ssc04350	7	7	0.034 790
	蛋白质消化和吸收	ssc04974	12	2	0.051 266
60 d vs 0 d	细胞外基质-受体相互作用	ssc04512	14	1	0.000 153
	黏着斑	ssc04510	21	2	0.000 543
	白血球跨内皮迁移	ssc04670	12	6	0.001 018
	蛋白质消化和吸收	ssc04974	10	1	0.034 712
	凋亡	ssc04210	11	4	0.068 185
90 d vs 0 d	细胞黏附分子	ssc04514	37	23	1.43×10 <sup>-6</sup>
	细胞外基质-受体相互作用	ssc04512	26	8	0.000 774
	金黄色葡萄球菌感染	ssc05150	15	7	0.003 013
	MAPK 信号通路	ssc04010	46	46	0.004 279
	PI3K-Akt 信号通路	ssc04151	63	37	0.004 215
90 d+P vs 90 d	细胞外基质-受体相互作用	ssc04512	1	8	0.000 038
	蛋白质消化和吸收	ssc04974	0	8	0.000 719
	补体系统	ssc04610	1	7	0.000 945
	黏着斑	ssc04510	1	8	0.012 923
	光传导	ssc04744	3	0	0.014 376

( TGF-β1、Smad2、Smad3、COL1A2、COL3A1、α-SMA)与瘢痕形成密切相关的差异表达基因在不同时间点皮肤组织中的表达量。结果表明,这 6 个

基因的表达趋势与 RNA-seq 分析结果基本一致,说明 RNA-seq 的分析结果具有较高的可靠性(见图 6)。

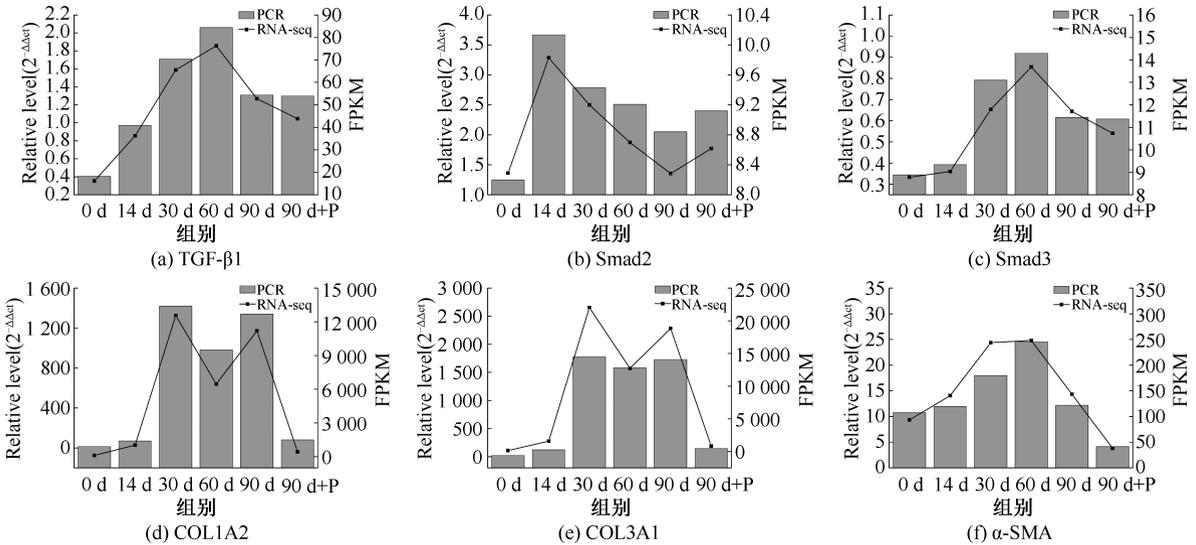


图6 DEGs的qRT-PCR验证

Fig.6 Validation of DEGs using qRT-PCR (a) TGF-β1, (b) Smad2, (c) Smad3, (d) COL1A2, (e) COL3A1, (f) α-SMA

### 3 讨论

HS是一种皮肤损伤后发病率高且难治愈的纤维化疾病。临床上,压力疗法已经被证明是一种有效治疗HS的方法,可以通过抑制成纤维细胞增殖、加速成纤维细胞凋亡和减少细胞外基质沉积而减缓瘢痕增生<sup>[10-11]</sup>。然而,压力治疗的确切分子机制尚不清楚。本课题组建立了巴马小型猪瘢痕动物模型,观察到取皮第60d时形成的瘢痕具有致密、纤维化的外观,而且在原始损伤边缘范围内,明显比周围正常皮肤更坚硬,中心呈深红色。经过临床医生鉴定,属于HS,选择头侧位置进行加压治疗,采用RNA-seq方法检测不同时间点皮肤组织中转录组的变化,并进行qRT-PCR验证。

转录组包括某一时间点样本内所有转录产物的集合,故会在特定发育阶段或特定生理条件下改变。分析转录组的能力对于查询基因组的功能元件、揭示细胞和组织的分子机制以及了解疾病的发生发展至关重要<sup>[12]</sup>。在本研究中,每个时间点的样本产生大约 $3.3 \times 10^7$ 原始读段,经过对原始读段的预处理得到干净读段,78%以上的干净读段成功定位到猪参考基因组的序列上。以目前的采样水平, RNA-seq方法的灵敏度允许精确鉴定差异表达基因(DEGs)。结果表明,在创伤后14、30、60、90d时,与正常皮肤对比分别有2 245、2 330、1 675和4 537

个差异表达基因;在90d时,加压治疗组与未治疗组相比有568个差异表达基因,表明这些基因可能参与压力治疗HS的早期过程。

差异表达基因的GO功能分析结果表明,无论创伤愈合还是加压治疗过程,每组的DEGs均涉及超过50个功能类别。虽然各组GO功能类别中富集的基因数不同,但是DEGs富集的GO 2级分类基本相同,包括生物过程部分的细胞过程、单一生物过程和代谢过程;细胞组部分的细胞、细胞部分、细胞器;分子功能部分的结合、催化活性、分子功能活性和信号转导活性。此外,本研究发现,90d+P和90d组的GO 3级分类富集在细胞外基质、钙离子结合和蛋白质的细胞外基质。这一发现与Huang等<sup>[13]</sup>的研究结果一致,他们证实压力疗法可上调基质金属蛋白酶的表达,并下调HS组织中的胶原蛋白表达。许多研究已经证实,大量信号转导途径参与HS的形成和发展。据报道,PI3K/Akt信号通路的激活可以抑制HS中成纤维细胞的凋亡<sup>[14-16]</sup>。MAPK信号转导途径也被普遍研究。通常认为,ERK、JNK和p38在HS发病机制中发挥重要的作用<sup>[17]</sup>。在本研究中,通过对压力处理与未处理瘢痕组织中的DEGs进行KEGG通路分析发现,ECM-受体相互作用途径、蛋白质消化和吸收、补体系统、黏着斑和光传导通路富含更多的DEGs。研究表明,了解HS病理生理学中关键生长因子作用途径的分

子知识,可以解释发病机制并提供治疗基础<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,压力治疗也可以通过细胞因子-细胞因子受体相互作用途径(如 IGF-1/IGF-1R 途径)介导治疗效果。这些研究结果提示,与上述信号转导途径相关的基因对压力疗法的临床效果起重要作用。然而,鉴于目前可获得的信息,压力治疗机制与 ECM-受体相互作用途径或黏着斑之间的关联可参考信号网路预测<sup>[19]</sup>作进一步研究。

为确定 RNA-seq 结果的准确性,本课题组选择了 6 个被证明与 HS 病理学相关的基因进行验证。研究表明,TGF- $\beta$ /Smad 信号通路通过介导细胞生长、细胞功能和 ECM 沉积等过程在纤维化疾病的发病机制中发挥作用<sup>[20-21]</sup>。TGF- $\beta$ 1 在瘢痕疙瘩组织中表达上调,并促进真皮成纤维细胞的增殖分化以及胶原形成。Sato<sup>[22]</sup> 研究认为,TGF- $\beta$  信号通路与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路之间的协同作用可能与 HS 和瘢痕疙瘩的发病机制有关。因此,本文通过 qRT-PCR 研究 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的表达模式。结果显示, RNA-seq 结果中 3 种基因(TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3)的表达趋势与 PCR 结果一致,说明 RNA-seq 数据准确可靠。通常认为,HS 形成是细胞外基质过度沉积和降解失衡的结果,而胶原蛋白作为细胞外基质的主要成分,在瘢痕形成和发展过程中起着重要的作用。因此,本文同时验证了 I、III 型胶原的表达模式。此外, $\alpha$ -SMA 是导致细胞收缩、伤口过度愈合和瘢痕挛缩的关键因素<sup>[23]</sup>。本研究发现,压力治疗 1 个月后,I、III 型胶原和  $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表达均显著降低,表明压力治疗可能通过减少 ECM 沉积而抑制瘢痕增生。

## 4 结语

创伤愈合及压力治疗瘢痕过程往往由多基因控制,涉及一系列基因的差异表达。虽然本文对差异表达基因进行了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,但是它们差异表达的原因及作用机制还不清楚,有待开展深入的探讨。更进一步的研究将有助于掌握压力治疗瘢痕过程中的信号传导途径,构建相关基因调控网络,从而更全面地了解压力疗法的调控机制,对未临床前研究 HS 的治疗具有重要的指导意义。

## 参考文献:

- [1] KWAN PO, TREDGET EE. Biological principles of scar and contracture [J]. *Hand Clin*, 2017, 33(2): 277-292.
- [2] EDRISS AS, SMRCKA V. Therapy of keloid and hypertrophic scars: A review [J]. *Eur J Plast Surg*, 2011, 34(6): 425-436.
- [3] COSTA AM, PEYROL S, PARTO LC, et al. Mechanical forces induce scar remodeling. Study in non-pressure-treated versus pressure-treated hypertrophic scars [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1671-1679.
- [4] RENO F, GRAZIANETTI P, CANNAS M. Effects of mechanical compression on hypertrophic scars: Prostaglandin E<sub>2</sub> release [J]. *Burns*, 2001, 27(3): 215-218.
- [5] RAMOS ML, GRAGNANI A, FERREIRA LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? [J]. *J Burn Care Res*, 2008, 29(2): 363-368.
- [6] MORRIS DE, WU L, ZHAO LL, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: Quantitative studies [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1997, 100(3): 674-681.
- [7] MEYER W, SCHWARZ R, NEURAND K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig [J]. *Curr Probl Dermatol*, 1978, 7(7): 39-52.
- [8] GALLANT CL, OLSON ME, HART DA. Molecular, histologic, and gross phenotype of skin wound healing in red Duroc pigs reveals an abnormal healing phenotype of hypercontracted, hyperpigmented scarring [J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12(3): 305-319.
- [9] LIU XY, LI J, LIU MM, et al. Transcriptome profiling to understand the effect of citrus rootstocks on the growth of 'shatangju' mandarin [J]. *PloS One*, 2017, 12(1): e0169897.
- [10] CHANG LW, DENG WP, YEONG EK, et al. Pressure effects on the growth of human scar fibroblasts [J]. *J Burn Care Res*, 2008, 29(5): 835-841.
- [11] FILIPPO R, MAURIZIO S, FRANCESCA L, et al. *In vitro* mechanical compression induces apoptosis and regulates cytokines release in hypertrophic scars [J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(5): 331-336.
- [12] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [13] HUANG D, SHEN KH, WANG HG. Pressure therapy up-regulates matrix metalloproteinase expression and down-regulates collagen expression in hypertrophic scar tissue [J]. *Chin Med J*, 2013, 126(17): 3321-3324.
- [14] PATERNO J, VIAL IN, WONG VW, et al. Akt-mediated mechanotransduction in murine fibroblasts during hypertrophic scar formation [J]. *Wound Repair Regen*, 2011,

- 19(1): 49-58.
- [15] AKASAKA Y, FUJITA K, ISHIKAWA Y, *et al.* Detection of apoptosis in keloids and a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma [J]. *Wound Repair Regen*, 2001, 9(6): 501-506.
- [16] AN G, LIANG SZ, SHENG CH, *et al.* Upregulation of microRNA-205 suppresses vascular endothelial growth factor expression-mediated PI3K/Akt signaling transduction in human keloid fibroblasts [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242(3): 275-285.
- [17] HE S, LIU X, YANG Y, *et al.* Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts [J]. *Brit J Dermatol*, 2010, 162(3): 538-546.
- [18] METZKER ML. Sequencing technologies: The next generation [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 31-46.
- [19] 张晓盼, 宋婕, 焦雄. 整合素黏附体信号转导通路预测研究 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(3): 213-217.
- ZHANG XP, SONG J, JIAO X. Prediction study on signal transduction pathways of integrin adhesome [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(3): 213-217.
- [20] LIU Y, LI Y, LI N, *et al.* TGF- $\beta$ 1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via up-regulating MicroRNA 21 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32231.
- [21] 张冲, 李莉. TGF- $\beta$ 1 对大鼠肩袖损伤修复术后腱-骨愈合的影响 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(2): 167-170.
- ZHANG C, LI L. Effects of TGF- $\beta$ 1 on early tendon-bone healing after reconstruction of rotator cuff tears in rats [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(2): 167-170.
- [22] SATO M. Upregulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway induced by transforming growth factor- $\beta$  in hypertrophic scars and keloids [J]. *Acta Derm Venereol*, 2006, 86(4): 300-307.
- [23] HSIEH SC, WU CC, HSU SL, *et al.* Gallic acid attenuates TGF- $\beta$ 1-stimulated collagen gel contraction via suppression of RhoA/Rho-kinase pathway in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *Life Sci*, 2016, 161: 19-26.