

· 论 著 ·

基于 GEO 数据库分析黄褐斑基因表达的差异性*

张 迁¹, 刘 娟¹, 丁洪青¹, 徐蕴杰², 张 博¹, 陈丽梅³, 赵 娜⁴

1. 河北省沧州中西医结合医院中药房, 河北沧州 061000; 2. 河北省廊坊市中医医院中药房, 河北廊坊 065000; 3. 河北省沧州中西医结合医院中医科, 河北沧州 061000; 4. 河北省沧州中西医结合医院皮肤科, 河北沧州 061000

摘要:目的 探讨基于 GEO 数据库分析黄褐斑基因表达的差异性, 并对差异表达基因调控的功能通路进行分析。方法 将 2021 年 4 月作为时间截点, 基于 GEO 数据库筛选黄褐斑相关基因表达谱, 选择“chloasma”为筛选条件, “human”为物种类型。使用 GEO2R 对黄褐斑差异基因表达情况进行分析, 并对通路富集情况做 KEGG 分析。使用蛋白间相互作用 (PPI) 找出关键基因及蛋白靶标, 分析差异基因表达情况。结果 根据 GEO 数据库共筛选出差异基因 34 个, 其中上调基因 16 个、下调基因 18 个。KEGG 显示黄褐斑有 13 条显著差异性富集信号通路 ($P < 0.05$), 主要与黑色素生成、多种信号通路、Gap 连接等有关。GO 功能分析显示前 30 个显著富集条目中, 生物过程包括酶联受体蛋白信号通路、膜受体酪氨酸激酶信号通路等, 细胞组分包括核内腔、核仁、细胞器内腔等, 分子功能包括结合酶、依赖 DNA 的转录正调节等。STRING 分析显示, 在 PPI 网络中提取包含 2 453 种基因的核心网络中排名前 5 的基因为 TYRP1、GDF15、MITF、NRF2 和 Beclin1, 以上 5 个基因是黄褐斑患者表达的最关键基因, 与黄褐斑的发病有关。结论 TYRP1、GDF15、MITF、NRF2、Beclin1 是影响黄褐斑形成的主要基因, 可能通过多种信号通路、受体结合、DNA 转录调节等途径影响黑色素的代谢与沉积, 导致了黄褐斑的发生发展。

关键词: 黄褐斑; GEO 数据库; 基因; 信号通路

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.06.013

中图法分类号: R758.42

文章编号: 1673-4130(2023)06-0704-04

文献标志码: A

Differences of gene expression in chloasma based on GEO database*

ZHANG Qian¹, LIU Juan¹, DING Hongqing¹, XU Yunjie², ZANG Bo¹, CHEN Limei³, ZHAO Na⁴

1. Chinese Pharmacy, Hebei Cangzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China; 2. Chinese Pharmacy, Hebei Langfang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Langfang, Hebei 065000, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Hebei Cangzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China; 4. Department of Dermatology, Hebei Cangzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China

Abstract: Objective To explore the differences of gene expression in chloasma based on GEO database and to analyze the functional pathways regulated by differentially expressed genes. **Methods** April 2021 was taken as the time cut-off point, chloasma related gene expression profiles were screened based on GEO database, "chloasma" was selected as the screening condition, "human" as species type. GEO2R was used to analyze the differential gene expression of chloasma, and KEGG analysis was performed for pathway enrichment. Key genes and protein targets were identified by protein-protein interaction (PPI), and differential gene expression was analyzed. **Results** According to the GEO database, a total of 34 differential genes were screened, including 16 up-regulated genes and 18 down-regulated genes. KEGG showed that there were 13 significantly enriched signaling pathways in chloasma ($P < 0.05$), mainly related to melanin generation, a variety of signal pathways, Gap connection and so on. GO functional analysis showed that among the top 30 significantly enriched entries, biological processes included enzyme-linked receptor protein signaling pathway, membrane receptor tyrosine kinase signaling pathway, cell components included nuclear lumen, nucleolus, organelle lumen, and molecular functions included binding enzymes and DNA-dependent transcriptional upregulation, and the like. STRING analysis showed that the top 5 genes in the core network containing 2 453 genes extracted from

* 基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2021332)。

作者简介: 张迁, 女, 主管中药师, 主要从事中药鉴别实验相关研究。

the PPI network were TYRP1, GDF15, MITF, NRF2 and Beclin1, the above five genes were the most critical genes expressed in patients with chloasma and were related to the pathogenesis of chloasma.

Conclusion TYRP1, GDF15, MITF, NRF2, and Beclin1 are the main genes that affect the formation of chloasma, which may affect the metabolism and deposition of melanin through various signaling pathways, receptor binding, DNA transcription regulation and other pathways, leading to the occurrence and development of chloasma.

Key words: chloasma; GEO database; gene; signal path

黄褐斑是由于色素过度沉着所导致的一种常见皮肤病,好发于面部,目前患病率在 1%~50%,给人们的生活带来很大困扰^[1]。黄褐斑的特征之一是光老化,其组织学特征与光老化患者的皮肤特征相重叠,如基底膜改变、浸润的肥大细胞数增加及血管形成数增加等^[2]。目前黄褐斑的发病机制尚未完全阐明,紫外线照射、雌激素等代谢紊乱和基因易感性均是引起黄褐斑的主要因素^[3]。有研究发现,约有一半以上的黄褐斑患者均有黄褐斑的家族史^[4]。有证据表明黄褐斑的形成主要与黑色素的代谢有关,而体内有多组基因的表达通过调节相关信号分子和通路来调节黑色素代谢^[5]。因此,了解基因表达差异在黄褐斑的发病中有重要意义,这为基因治疗黄褐斑提供了新理论依据和方向。GEO 数据库是一个基因表达数据库,收录了全世界各研究机构提交的基因表达数据,为研究黄褐斑基因提供了较好的数据支持^[6]。基于不同基因表达的差异在黄褐斑发病中所起的作用越来越受到临床研究的重视,河北省沧州中西医结合医院基于 GEO 数据库筛选出黄褐斑的关键基因,并对差异表达基因调控的功能通路进行分析,旨在为黄褐斑的基因靶向治疗提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所需基因均通过搜索关键词“chloasma”检索 STRING、GEO 及 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)选取,筛选以“人类”为物种的研究对象。分析数据选择 GSE32591 数据集,枢纽基因验证数据集则选用 GSE99339 数据。下载 GSE32591 及 GSE99339 数据集的矩阵数据和平台注释信息。GSE32591 数据集是基于 GPL14663 平台生成的,内含 45 例黄褐斑患者和 20 例健康人对照的黄褐斑基因表达信息。而 GSE99339 数据集是基于 GPL19184 平台生成的,内含 40 例黄褐斑患者和 10 例健康人对照的黑色素在皮肤组织中基因表达信息。

1.2 表达基因差异筛选 以 2021 年 4 月为时间截点,筛选谱芯片数据集(基于 GEO 数据库),以“chloasma”筛选条件选择,物种“human”。将 GEO2R 数据库中黄褐斑的相关基因表达谱数据表达强度采用 R 语言(4.0.2 版)进行归一化,包括了标准化数据和筛选差异基因。筛选标准以 $|\log_2FC| > 2$ (即差异倍数 > 2 倍)及校正后 $P < 0.05$ 为阈值,确保具有相似分布后筛选基因。用 Venny2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.htm>)做韦

恩图对数据差异表达基因(DEGs)取交集,以降低结果的假阳率。然后用 R 语言的 ggpubr 和 pheatmap 对差异基因绘制火山图和热图。

1.3 KEGG 信号通路分析 用 GO 分析确定出关键基因的生物过程、分子功能属性和细胞成分,采用在线分析网站(DAVID 6.8, <https://david.ncifcrf.gov/>)筛选出参与 KEGG 信号通路基因及前 10 信号表达通路,确定其通路功能。应用 DAVID6.8 在线工具进行 GO 和 KEGG 分析筛选出的差异表达的关键基因,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,用 R 语言 ggplot 包绘制气泡图和柱状图。

1.4 发展关键调控基因筛选 将基于 STRING 网站筛选出的 DEGs 导入到 STRING 在线工具中,设置筛选条件(综合评分 > 0.9 的互作蛋白)后,构建可视化蛋白间相互作用(PPI)网络图,将得到的 PPI 结果导入到 Cytoscape3.6.1 软件,通过分子复合物检测,采用标准为 degree cutoff = 2、k-core = 2、node score cutoff = 0.2 及 max. depth = 100,把 PPI 中最显著的模块筛选处理。在 Cytohubba 插件中处理最显著模块筛选出差异表达基因,按 degree 算法计算出评分排名在前 10 位的关键基因。

1.5 统计学处理 基于 R 软件筛选出黄褐斑处皮肤与正常皮肤组织之间差异表达基因,利用 GEO2R 软件进行 GO 和 KEGG 分析,绘制 PPI 网络图。采用 SPSS22.0 软件分析处理所有数据,组间比较采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄褐斑差异基因表达分析 根据 GEO 数据库,对比黄褐斑患者和健康人基因表达数据,共筛选出黄褐斑相关差异基因 25 262 个,设置筛选条件为组间表达量的比值 $|\log_2FC| > 2$ 且 $P < 0.05$,共筛选出差异基因 34 个,其中在黄褐斑中发生上调表达的基因 16 个,包括 TYRP1、GDF15、NRF2、JUN、RB1、MAPK1、PTGS2、VEGF、WNT5A、TYR、WIF-1、TLR2、TLR4、MYD88、Keap1、p300HAT,发生下调表达的基因 18 个,包括 Beclin1、AKT1、RXRA、MITF、JNK、RAC1、Nrf2、TRP、TRP-1、TRP-2、K6、HMB45、S100、Loricrin、ASAH1、SCF、TLR4、CD34。

2.2 KEGG 通路分析 KEGG 显示,黄褐斑有 13 条显著差异性富集信号通路($P < 0.05$),分包括黑色素生成、cAMP 信号通路、Rap1 信号通路等。见图 1。

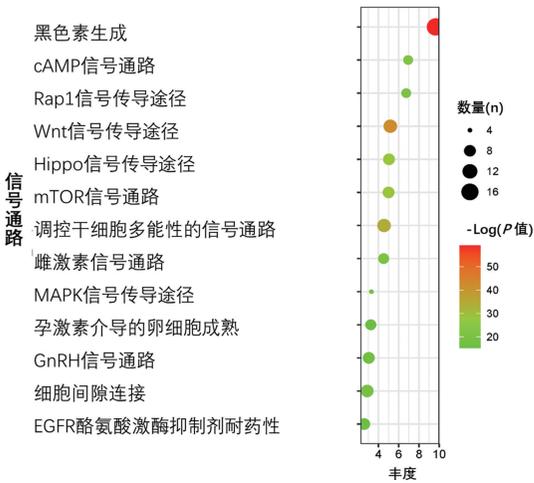
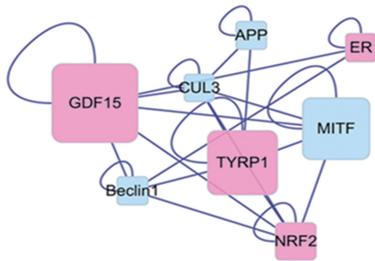


图 1 黄褐斑差异基因表达 KEGG 通路分析

2.3 黄褐斑差异基因表达 GO 功能分析 GO 功能分析显示在黄褐斑患者中前 30 个显著富集条目,其中生物过程包括酶联受体蛋白信号通路、膜受体酪氨酸激酶信号通路、激酶活性的调节等;细胞组分包括核内腔、核仁、细胞器内腔等;分子功能包括结合酶、依赖 DNA 的转录正调节、受体结合等。

2.4 黄褐斑差异基因表达 PPI 分析 通过 STRING 分析及筛选进行蛋白相互作用分析,并导入 Cytoscape3.6.1 软件中,完成 PPI 网络图绘制。包含 2 453 种基因的核心网络图中总共包含有 5 个模块,共 96 个节点,923 条边。由拓扑学分析中的度值表示各靶点在拓扑学分析中的重要性,度值越大则节点越大,而不同的模块中的蛋白质包含有不同的保守率。在 PPI 网络中排名前 5 的基因为 TYRP1(高表达)、GDF15(高表达)、MITF(低表达)、NRF2(高表达)和 Beclin1(低表达),以上 5 个基因是黄褐斑患者表达的最关键基因,与黄褐斑的发病有关。见图 2。



注:粉色方格表示高表达基因,蓝色方格表示低表达基因。

图 2 黄褐斑差异基因表达 PPI 分析

3 讨论

目前研究发现黄褐斑的病因复杂多样,主要与紫外线长时间照射、遗传基因的易感性、雌激素等有关^[3]。临床上对其发病机制研究发现,涉及 Rap1、Wnt、Hippo、mTOR、iNOs、MSH/cAMP、KIT 等分子或信号通路在诱导黑色素的生成或沉积中起着至关重要的作用^[7-8]。随着智能芯片等技术的成熟和人类基因工程的完成,不少研究者用该技术从基因角度研究黄褐斑的发生发展,使人们对黄褐斑形成认识更

加具体化^[8]。在 WU 等^[9]的研究中发现多种基因的高表达在黄褐斑发病过程中起重要作用。而在 TAWFIC 等^[10]研究中发现 Rap1、Wnt 等多种信号通路导致一氧化氮(NO)生成增加,可激活鸟嘌呤环化酶,刺激 TYR 和 TYRP1 表达量和活性增加,增加黑色素生成。不同基因的表达差异与黄褐斑发生明显相关,了解这些差异基因为治疗黄褐斑提供了新思路。GEO 数据库是常用的研究基因表达的数据库,利用它可检索到各大型机构上传的各项实验测序数据,是研究黄褐斑的基础^[11]。

本研究结果显示,共筛选出关键差异基因 34 个,有 16 个上调基因和 18 个下调基因,主要包括了 TYRP1、GDF15、Beclin1、AKT1 等。氧化应激反应是导致黄褐斑发生的主要病理生理机制之一,这些基因在黄褐斑患者体内出现与健康人体内不同的差异性表达,通过各种信号通路及细胞间信号传递等影响了体内的氧化应激反应,使得黑色素的生成和沉积增加,使患者发生黄褐斑。因此,了解这些基因的差异性表达对治疗黄褐斑有重要意义。

KEGG 显示有 13 条显著差异性富集信号通路与黄褐斑有关,包括了杀菌、多种信号通路、Gap 连接等。人的肤色主要受黑素细胞影响,黑素细胞中含有大量黑素小体。人毛发皮肤的颜色主要取决于黑素小体的数量、大小、分布及其内黑色素活性、合成速率等特性的影响。杀菌过程主要是机体内细胞吞噬消化了各种微生物,使得细胞内黑色素沉积增加及体内的氧化应激反应增加,黑素小体生成增多,发生黄褐斑^[12]。而临床上可见长时间的照射紫外线或接触消毒水等的人较其他人更容易出现黄褐斑,黄褐斑的产生主要与色素细胞沉积有关,皮肤中的黑素细胞内的氧化应激水平与其色素积累密切相关。黑色素是由 L-苯丙氨酸羟基化为 L-酪氨酸或直接由 L-酪氨酸产生合成的^[13]。cAMP 信号通路可直接激活蛋白激酶 A,其转移到黑素细胞核内会发生磷酸化,上调 cAMP 结合蛋白表达,使 TYRP 基因发生转录,然后上调 TYR 表达,刺激 TYR 和 TYRP1 表达量和活性增加,直接增加黑色素生成使黑色素合成增加,同时还会导致氧化性碱基损伤和相关 DNA 链断裂,使得黑素分解减弱,使得过多的黑素沉积于皮肤细胞,导致黄褐斑生成^[14]。

GO 功能分析显示生物过程有酶联受体蛋白信号通路、膜受体酪氨酸激酶信号通路等,细胞组分有核内腔、核仁、细胞器内腔等,分子功能有结合酶、依赖 DNA 的转录正调节等。在黑素细胞中,包括酶联受体蛋白信号通路和膜受体酪氨酸激酶信号通路在内的各种细胞通路可与 KIT 胞外结构域结合,引起 KIT 二聚化,导致蛋白激酶结构域激活。活化的 KIT 发生磷酸化后可结合 SHC 同源性 2 结构域,激活下游 RAS 等,使得 MAPK 发生级联反应,通过 MAPK 或 Wnt 等信号通路调控 MITF 基因表达,控制了与黑色

素合成有关的部分关键酶的转录,调控黑色素生成、分解和沉积^[15]。当这些差异性基因表达过度或不足时,影响了 cAMP、mTOR 等多种信号通路,影响了酶受体和各种酶的合成,使得黑色素生成和沉积增加,导致黄褐斑发生。

STRING 分析显示,在黄褐斑 PPI 网络中,排名前 5 的核心基因是 TYRP1、GDF15、MITF、NRF2 和 Beclin1。近年来研究发现,NO 是诱导体内黑色素生成和沉积的一种重要物质,而 P2X7Rs 基因、POMC 基因、TYRP1 基因、GDF15 基因等的表达增加可以诱导 NO、环状鸟苷单磷酸等物质产生,刺激 TYR 和 TYRP1 活性增加,减弱体内氧化应激反应的同时刺激黑色素生成,引起黑色素过度沉着,导致黄褐斑发生^[10]。而酪氨酸相关酶 1 还可通过卟啉、黄素、蝶呤等内源性发色团诱导 ROS 产生,导致 p53 靶基因表达增加,促黑素皮质激素基因表达,可编码 α -黑素细胞刺激激素的前体肽,紫外线照射后,可刺激其表达量上升,使得黑色素合成增加。GDF15 和 MITF 可通过 cAMP 及 Rap1 等信号通路调控酪氨酸酶表达,催化酪氨酸分解,增加黑色素合成,促进黑色素沉积^[16]。而 MAPK 等部分通路可与淋巴增强结合因子-1 等结合后形成转录活化复合物的形式进入细胞核,调节 NRF2 和 Beclin1 基因表达,导致黑色素合成增加。还能够促进神经嵴细胞向黑素细胞分化,增加黑素细胞数量,导致黑色素过度沉积和黑素细胞不规则分布,导致黄褐斑形成。因此猜测发生黄褐斑的患者体内 TYRP1、GDF15、MITF 表达较健康人有一定差异性,当受到紫外线、化学因素等因素刺激时,体内各基因的差异性表达更明显,通过 cAMP、Rap1 等信号通路的调控,使得黑色素合成和沉积增加,导致黄褐斑的发生。如果可以通过药物截断这些信号通路,则可减少黑色素的生成、沉积等,达到临床治愈黄褐斑的目的。

本研究主要是基于 GEO 数据库研究的黄褐斑基因差异性,虽然包含了世界各大研究机构的研究成果,但基因库并不全面,部分基因未能研究,因此需要基于更多数据库进行更全面的研究以提高研究的准确性和全面性。综上所述,黄褐斑的形成是一个复杂的生理学过程, TYRP1、GDF15、MITF、NRF2、Beclin1 是影响黄褐斑形成的主要基因,可能通过多种信号通路、受体结合、DNA 转录调节等途径影响黑色素的代谢与沉积,导致了黄褐斑的发生、发展。

参考文献

[1] PARK J, CHOI H, PARK T, et al. Inhibitory effect of avenanthramides (Avn) on tyrosinase activity and melanogenesis in α -MSH-activated SK-MEL-2 cells; in vitro and in silico analysis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 233-246.

- [2] VASANOP V, WIMOLSIRI I, NONGSAK C, et al. A study of efficacy and safety of high-intensity focused ultrasound for the treatment of melasma in Asians: a single-blinded, randomized, split-face, pilot study[J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19(2): 375-381.
- [3] HUANG W L. The treatment of chloasma in traditional Chinese medicine[J]. J Glycomics Lipidomics, 2020, 8(1): 1-2.
- [4] 何慧, 张世科, 彭丽敏, 等. 电针治疗中青年女性黄褐斑的临床疗效观察[J]. 世界针灸杂志(英文版), 2021, 31(2): 110-114.
- [5] EL-SINBAWY Z G, ABDELNABI N M, SARHAN N E, et al. Clinical & ultrastructural evaluation of the effect of fractional CO₂ laser on facial melasma[J]. Ultrastruct Pathol, 2019, 43(4/5): 135-144.
- [6] 刘音, 杨涛, 谢裕赛, 等. 基于 GEO 数据库筛选狼疮性肾炎的关键基因和信号通路[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(6): 749-755.
- [7] BECKER S, SCHIEKOFER C, VOGT T, et al. Melasma: an update on the clinical picture, treatment, and prevention[J]. Hautarzt, 2017, 68(2): 120-126.
- [8] 陈圆圆, 马志红. 光电技术治疗黄褐斑的研究进展[J]. 中国医疗美容, 2021, 11(5): 94-98.
- [9] WU D C, GOLDMAN M P, WAT H, et al. A systematic review of picosecond laser in dermatology: evidence and recommendations[J]. Lasers Surg Med, 2021, 53(1): 9-49.
- [10] TAWFIC S, ABDEL H, ALBARBARY A, et al. Assessment of combined fractional CO₂ and tranexamic acid in melasma treatment[J]. Lasers Surg Med, 2019, 51(1): 27-33.
- [11] 严静, 黄益玲, 黄利鸣. 基于 GEO 数据库预测分析卵巢癌顺铂耐药相关基因及意义[J]. 巴楚医学, 2021, 4(2): 85-90.
- [12] 何梅, 李晓娟, 李晓庆, 等. 女性黄褐斑病因、加重因素及皮肤类型的横断面研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(4): 499-502.
- [13] KURMUŞ G, TATLIPARMAK A, AKSOY B, et al. Efficacy and safety of 1927 nm fractional Thulium fiber laser for the treatment of melasma: a retrospective study of 100 patients. [J]. J Cosmet Laser Ther, 2019, 21(7/8): 408-411.
- [14] 李嘉萍, 任英云, 李其林. 抗氧化治疗在黄褐斑中的应用[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2021, 28(1): 78-80.
- [15] LAOTHAWORN V, JUNTONGJIN P. Topical 3% tranexamic acid enhances the efficacy of 1064-nm Q-switched neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser in the treatment of melasma[J]. J Cosmet Laser Ther, 2018, 20(6): 320-325.
- [16] 顾汉江, 曾维惠. 黄褐斑发病机制中黑色素相关的信号分子及通路[J]. 中国美容医学, 2019, 28(5): 19-22.