

脱发相关差异表达基因的生物信息学分析

向虹, 阳小胡, 艾亮霞, 潘燕平, 胡勇

中国科学院深圳先进技术研究院, 合成生物研究所, 深圳 518055

摘要: 利用生物信息学方法分析脱发相关差异表达基因, 有望帮助了解脱发发生发展的分子机制。本研究从 NCBI 的子数据库 GEO 中选择基因表达谱 GSE45512 和 GSE45513 数据集, 利用 R 语言 limma 工具包, 筛选出两个物种斑秃样本与正常样本的共同显著差异表达基因。对这部分基因进行功能注释和蛋白互作网络分析, 同时对全部差异表达基因进行基因集富集分析。结果发现, 人头皮斑秃样本共筛选出 225 个差异表达基因; C3H/HeJ 小鼠自发斑秃皮肤样本共筛选出 337 个差异表达基因; 两个物种的共同显著差异表达基因有 23 个。GO 功能富集分析和蛋白互作网络分析显示, 这部分差异基因显著富集于免疫相关功能, 并且彼此间存在蛋白互作关系。基因集富集分析显示两个物种的差异基因都能显著富集到趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用、金黄色葡萄球菌感染及抗原加工与呈递通路; 而且人的下调差异基因不仅映射到了人类表型数据库的脱发表型, 也映射到皮肤附属物病理相关表型。综上所述, 本研究通过生物信息方法分析脱发皮肤组织与正常皮肤组织的差异表达基因, 最终筛选出 23 个在人和小鼠中共同存在的显著差异表达基因; 此外, 分析发现脱发与免疫过程及皮肤附属物病变密切相关, 这些结果为脱发的诊断和治疗提供了新思路。

关键词: 脱发; 斑秃; GEO; 生物信息学

Bioinformatics analysis of differentially expressed genes on alopecia

Hong Xiang, Xiaohu Yang, Liangxia Ai, Yanping Pan, Yong Hu

Institute for Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China

Abstract: The molecular mechanism of alopecia areata (AA) is still elusive and here we utilized bioinformatics methods to analyze AA-related differentially expressed genes. In this study, GSE45512 and GSE45513 were downloaded from the NCBI sub-database Gene Expression Omnibus (GEO). The gene expressions of AA and normal samples were analyzed using the R package limma, which showed significant differences between AA and normal samples in two species. These

收稿日期: 2019-10-02; 修回日期: 2019-12-13

基金项目: 深圳市科技创新委员会基础科学研究基金(编号: JCYJ20180507182250795), 中国博士后科学基金(编号: 2019M663173)和深圳孔雀团队项目(编号: KQTD20170331160605510)资助[Supported by the Shenzhen Science and Technology Innovation Committee Basic Science Research Grant (No. JCYJ20180507182250795), China Postdoctoral Science Foundation Grand (No. 2019M663173) and the Shenzhen Peacock Team Project (No. KQTD20170331160605510)]

作者简介: 向虹, 博士, 研究方向: 基因治疗。E-mail: hong.xiang@siat.ac.cn

通讯作者: 胡勇, 博士, 副教授, 研究方向: 基因治疗。E-mail: yong.hu@siat.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.19-214

网络出版时间: 2019/12/20 9:24:49

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20191218.1712.006.html>

genes were subject to functional annotation and protein interaction networks. At the same time, gene set enrichment analysis was conducted for all differentially expressed genes. The study revealed that a total of 225 differentially expressed genes were screened from human AA samples, and a total of 337 differentially expressed genes were screened from spontaneous AA skin samples in C3H/HeJ mice. There are 23 differentially expressed genes in the two species. GO and protein interaction network analysis shown gene enrichment in immune-related functions, and these proteins interact with each other. Gene set enrichment analysis showed that differential genes from both species were significantly enriched to chemokine signaling pathways, cytokine-cytokine receptor interactions, staphylococcus aureus infection, and antigen processing and presentation. Moreover, the human down-regulated differential gene not only maps to the alopecia in human phenotype ontology, but also maps to the pathologically relevant phenotype of the skin appendage. In brief, 23 significant differentially expressed genes were screened out coexisting in AA human and mouse by bioinformatics methods. In addition, the result demonstrated that AA is closely related to the immune process and skin appendage lesions. These results provide new ideas for the diagnosis and treatment of AA.

Keywords: hair loss; alopecia areata; GEO; bioinformatics

斑秃(alopecia areata, AA)是一种常见的脱发现状, AA患者一般表现为斑秃部位无疤痕、斑片状脱发, 并且头皮附近的毛干变窄。AA作为一种自身免疫性疾病, 具有高度变异的表型和基因型, 是由遗传和环境因素共同决定的复杂遗传病, 终生患病率约为2%^[1]。尽管对AA患者和小鼠模型的遗传学研究表明AA是一种复杂的多基因疾病, 然而毛囊免疫豁免功能的破坏也被认为是AA形成的重要诱因^[2]。AA传统上被分为斑片状斑秃(alopecia patchy)、全秃(alopecia totalis, AT)和普秃(alopecia universalis, AU)^[2]。AA症状最常发生在头皮, 但也可能发生在眉毛和睫毛(AT患者)或体毛(AU患者)。基于疾病的持续时间和斑状秃发的程度, AA还可被分为隐秃(alopecia incognita)、蛇形斑秃(ophiasis)、马蹄形斑秃(saisaipo)和玛丽·安托瓦内特综合征(Marie Antoinette syndrome)^[2]。

AA也是一种对生活质量有重大影响的疾病。AA患者表现出较差的健康相关生活质量(Health-related quality of life, HRQoL)评分, 头皮受累程度越大, HRQoL评分越低^[3]。由于AA的可见性、缺乏治疗和慢性病的性质, AA及其衍生症状可能会给患者造成严重的心理负担, 更会导致包括高度焦虑和抑郁在内的心理疾病, 尤其是青少年患者更易引发社交障碍^[4,5]。此外, 有调查分析显示, 年轻的男性患者具有更高的心理压力和自杀风险^[6]。因此, 有效的治疗方法将会对AA患者的生活质量和身心健

康产生深远和积极的影响。脱发影响着全球数千万人, 但目前缺乏一种安全的、合理的和有针对性的用于治疗头发再生的方法。现代常用的治疗方法包括局部使用米诺地尔(2%和5%), 口服非那雄胺和植发手术等。由于存在药物的副作用、停药后复发、新毛囊存活率和患者个体差异等问题, 对AA的治疗富有挑战性, 并且治疗效果并不令人满意。

生物信息学是生命科学领域前沿交叉学科, 可为脱发或斑秃的形成揭示潜在的分子机制, 从而帮助阐明和理解AA独特的病理生理学。使用生物信息学技术对高通量数据进行联合分析不仅为科学研究提供可行的思路 and 方案, 也为该类疾病的治疗提供更有针对性和合理选择的疗法。本文通过生物信息学相关方法对Xing等^[7]构建的人类AA头皮表达谱芯片和C3H/HeJ小鼠自发AA皮肤表达谱芯片数据进行生物信息学分析, 以探讨影响AA在人和小鼠中保守的差异表达基因以及由脱发引起的一系列生理病理过程的改变, 为AA分子机制的进一步研究提供生物信息学依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的基因表达综

合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)下载 GEO 数据集, 包括 GSE45512 和 GSE45513^[7]。其中, GSE45512 是基于 GPL570 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 的人 AA 皮肤表达谱, 含有 5 例 AA 患者人头皮样本和 5 例健康人头皮样本, 而 GSE45513 是基于 GPL1261 Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array 的 C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤表达谱, 含有 3 例自发小鼠自发 AA 皮肤样本和 3 例正常小鼠皮肤样本。

1.2 基因芯片的处理与差异表达基因的筛选

芯片的处理使用 R 语言 “affy” 包对 GSE45512 和 GSE45513 数据中的每个样本探针表达值进行背景校正归一化处理。通过 “limma” 包对实验组 AA 皮肤和对照组正常皮肤中每个表达值进行 *t* 检验。GSE45512 差异表达基因使用 Bioconductor 的 “hgu-133plus2.db” 进行注释, GSE45513 差异表达基因使用 Bioconductor 的 “mouse4302.db” 进行注释。差异表达基因(differently expressed genes, DEGs)的筛选标准为 $|\log_2FC| \geq 1$ & $P \text{ value} \leq 0.05$ 。利用 venn 图获得两个数据集中共同出现的差异表达基因名称。利用 “pheatmap” 工具包对差异表达基因绘制热图。

1.3 DEGs 的注释和富集分析

采用 Gene Ontology Resource 数据库^[8], 对前面筛选出的两物种中共有的 DEGs 进行 GO (Gene Ontology)富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome)信号通路分析。显著性富集的筛选标准为 $P < 0.01$ 和 $FDR < 0.05$ 。分析的结果利用 R 语言 “REVIGO” 进行可视化呈现。对两物种中单独存在的差异表达基因使用 DAVID 数据库^[9]进行 GO 注释分析、KEGG 通路富集分析和组织表达分析。

1.4 蛋白互作网络的构建

将前面筛选的 DEGs 导入 STRING (version 11.0) 数据库, 得到一个蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction, PPI)图。利用软件参数将免疫相关功能蛋白标注出。

1.5 基因富集分析

基因集富集分析(gene set enrichment analysis,

GSEA)使用 WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit 数据库。对两个物种校正后的基因集进行富集分析, Redundancy reduction 参数设定为 Weighted set cover。

2 结果与分析

2.1 获得 DEGs

对 GSE45512 和 GSE45513 两个数据集进行分析, 分别获得差异倍数在 2 倍以上的显著上、下调差异表达基因。GSE45512 人头皮 AA 样本共筛选出 225 个 DEGs (图 1A), 其中上调基因 79 个, 下调基因 146 个(图 2A)。GSE45513 C3H/HeJ 小鼠自发 AA 皮肤样本共筛选出 337 个 DEGs (图 1B), 其中上调基因 280 个, 下调基因 57 个(图 2A)。两个物种共有的 DEGs 有 23 个(图 2A), 并对这 23 个在人和小鼠中相对保守的 DEGs 进行聚类热图分析(图 2, B 和 C)。可见两类样本基因表达具有显著差异, 上调基因主要包括 *CXCL9*、*CXCL10*、*CCL2* 和 *IRF1* 等 19 个, 下调基因有 *CHAC1*、*FGF18*、*LYPD6* 和 *BMP2* (图 1 和附表 1)。

2.2 DEGs 的注释富集分析和蛋白互作分析

DEGs 的 GO 富集分析可分为生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)3 个方面。对于两物种共有的 DEGs, GO 富集分析图显示, 生物学过程主要富集在免疫相关的一些过程, 包括免疫反应(immune response), 免疫效应过程(immune effector process), 防御反应(defense response), T 细胞活化(T cell activation)和细胞因子介导的信号通路(cytokine-mediated signaling pathway)等(图 3A)。这部分 DEGs 的细胞组分条目较少, 主要涉及一些细胞表面的组分包括质膜外侧面(external side of plasma membrane)、膜侧(side of membrane)、细胞表面(cell surface)、免疫突触(immunological synapse)、细胞外隙(extracellular space)和 BMP 受体复合物(BMP receptor complex) (图 3A)。而分子功能主要富集在细胞因子活性(cytokine activity)、受体结合(receptor binding)和内肽酶活性(endopeptidase activity)等过程(图 3A)。

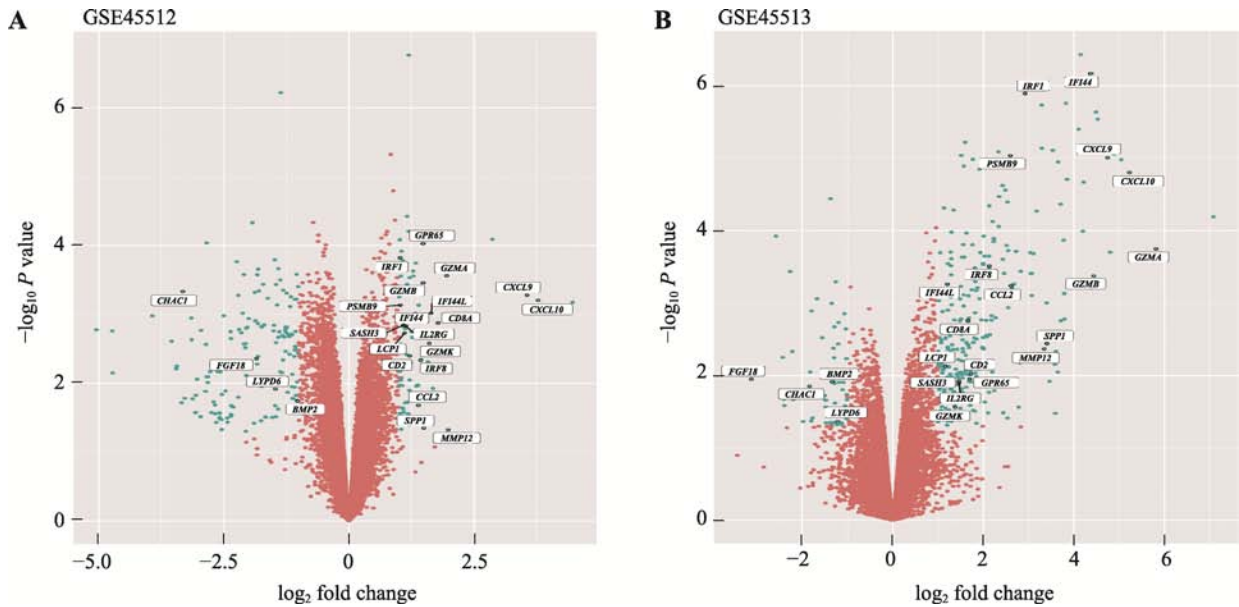


图 1 差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano plots of DEGs

A: GSE45512 人头皮 AA 样本差异表达基因火山图; B: GSE45513 C3H/HeJ 小鼠自发 AA 皮肤样本差异表达基因火山图。火山图横轴表示差异倍数, 数值显示为 \log_2 fold change。纵轴表示 P 值, 数值显示为 $-\log_{10} P$ value。深青色的点代表显著差异表达基因, 玫瑰红色的点代表非显著差异表达基因。人和小鼠中共有的差异表达基因在图中显示基因名称。

对于两物种中单独存在的 DEGs, GO 富集分析显示, 免疫相关的生物学过程仍然是两物种最主要的生物学过程, 并且免疫反应 (immune response) 在人和小鼠中都出现了 (附图 1, A 和 D)。在细胞组分方面, 小鼠的 DEGs 主要富集在膜 (membrane) 和细胞质 (cytoplasm) 范围较广的细胞组分, 而人的 DEGs 主要富集在角蛋白纤维 (keratin filament) 特有的与皮肤附属物相关的组分。此外, 胞外区 (extracellular region) 和细胞外隙 (extracellular space) 在人和小鼠中都出现了 (附图 1, A 和 D), 这与前面提到的两物种共有 DEGs 富集在细胞表面的组分相关联。在分子功能方面, 人的主要富集在结构分子功能相关的条目, 小鼠的主要富集在结合功能相关的条目。在 KEGG 信号通路富集分析中, 人和小鼠都出现了一个免疫相关的条目细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction) (附图 1, B 和 E)。然而, 在组织富集方面, 人的这些非共有 DEGs 主要富集在头皮、头发和发根, 小鼠的主要富集在免疫器官中 (胸腺和骨髓) (附图 1, C 和 F)。

利用 STRING 数据库对在人和小鼠 AA 样本中共有的差异表达基因编码的蛋白分析发现, 除了

CHAC1、LYPD6 和 GPR65, 其他 20 个蛋白之间都存在互作网络。结合之前的 GO 富集分析结果, 发现处于该蛋白网络节点位置的蛋白都多与免疫相关 (如: IRF1、CCL2、CXCL9、GZMA 和 GZMB 等), 如图 3B 所示标记出红色的蛋白表示参与免疫系统过程 (GO:0002376, immune system process), 标记出蓝色的蛋白表示参与免疫反应过程 (GO:0006955, immune response)。说明 AA 症状在人和小鼠中都引起了一系列的免疫响应事件, 如显著地增加了一些免疫相关基因和因子的表达。

2.3 DEGs 的 GSEA 分析

对人头皮 AA 样本 (GSE45512) 的 DEGs 基因集和 C3H/HeJ 小鼠自发 AA 皮肤样本 (GSE45513) 的 DEGs 基因集分别进行信号通路富集分析后, 发现上调或者下调基因都富集在一些信号通路上。如同共同出现在人和小鼠中的 23 个 DEGs 一样, 两个物种的 DEGs 基因集也共同地富集在一些信号通路上 (图 4), 包括: 趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway)、细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction)、金黄色葡萄球菌感染 (*Staphylococcus aureus*)

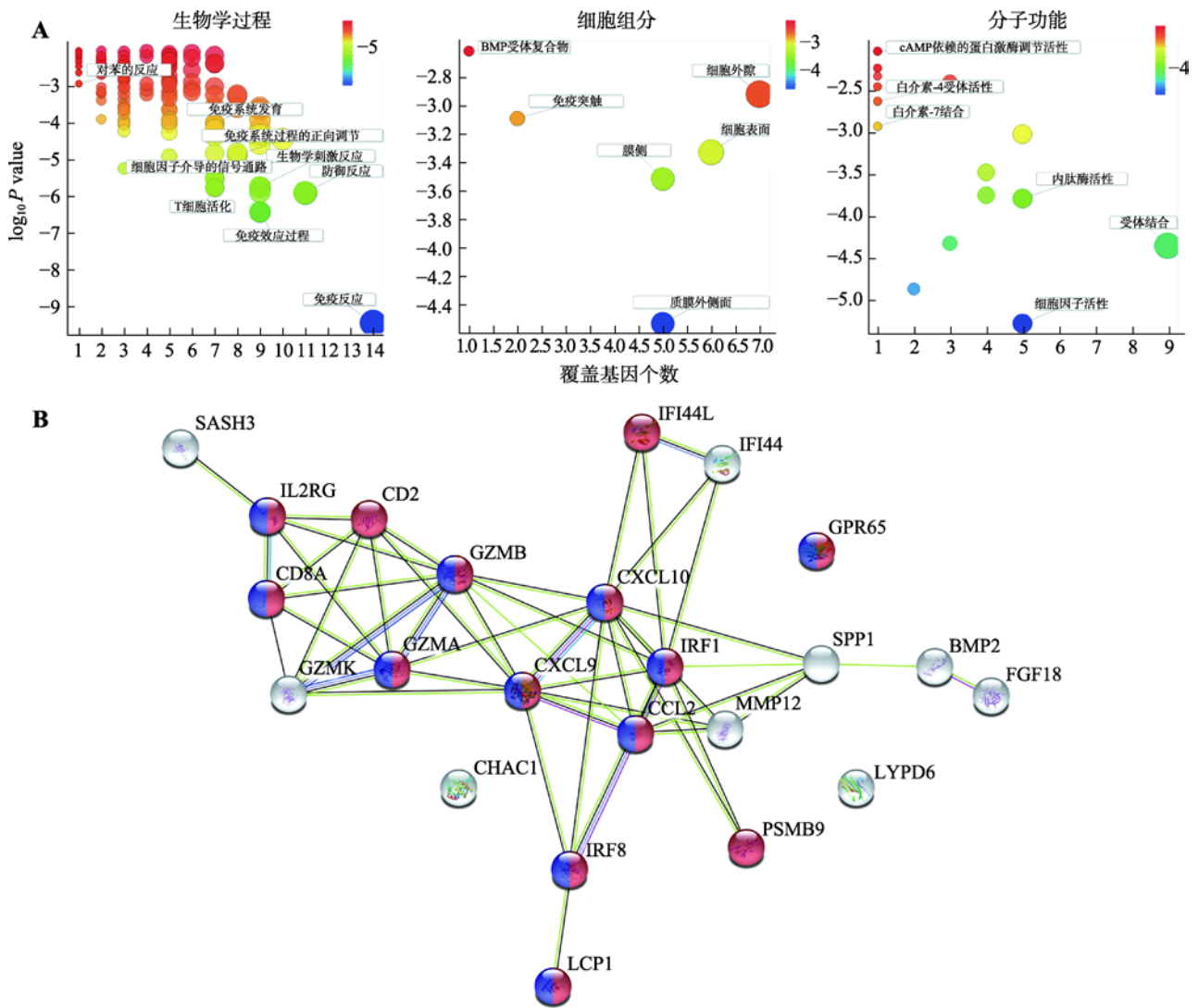


图 3 差异表达基因的 GO 富集分析和蛋白互作分析

Fig. 3 GO enrichment analysis and protein interaction analysis of DEGs

A: 差异表达基因的 GO 富集分析, 包括生物学过程、细胞组分和分子功能。纵坐标代表 P 值, 颜色变化从红色到蓝色代表 P 值从高到低; 横坐标代表包含的基因数, 圆圈越大代表包含的基因数越多。B: 差异表达基因的蛋白互作分析。红色代表参与免疫系统过程 (GO:0002376), 蓝色代表参与免疫反应过程 (GO:0006955)。

身免疫(autoimmunity)、反复细菌感染(recurrent bacterial infections)、中枢神经系统感染(CNS infection)、淋巴细胞形态异常(abnormal lymphocyte morphology)、血管炎(vasculitis)和咯血(hemoptysis)。下调基因集富集的条目有指甲营养不良(nail dystrophy)、发质异常(abnormality of hair texture)、脱发(alopecia)和睫毛稀疏或缺失(sparse or absent eyelashes)。有意思的是, 上调的基因集仍然多富集在免疫、细菌感染和一些炎症表型, 而下调的基因集都富集在脱发和皮肤附属物(指甲和睫毛)发育异常

的表型上, 这与本研究的样本表型相关, 也与预期相符。

3 讨论

脱发影响着全球数千万人。几十年来, 对于脱发的治疗渐渐从广泛和非特异性疗法发展到现在更有针对性和合理选择的疗法。这需要通过临床医生、基础科学家和生物信息学家等多个领域之间的密切合作和交流来实现。关于脱发的治疗方法多种多样,

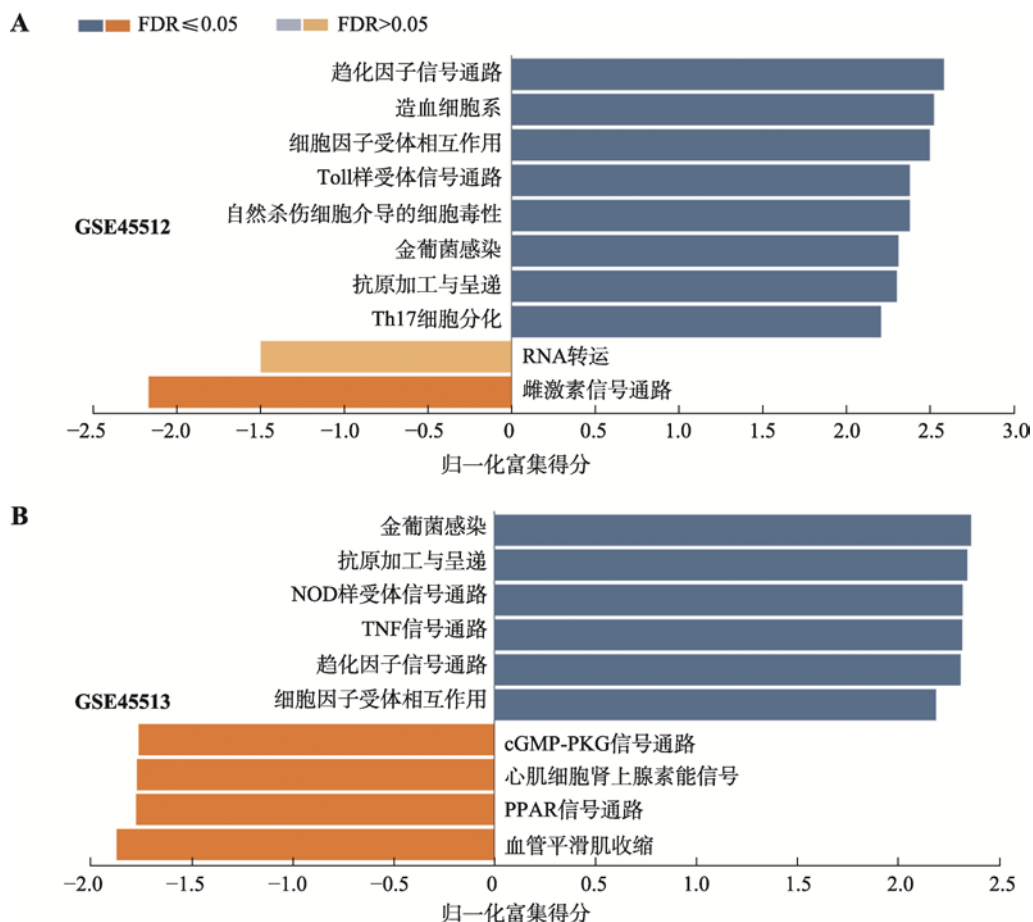


图 4 参与信号通路的基因集富集分析

Fig. 4 Gene set enrichment analysis (GSEA) in signaling pathways

A: 人斑秃样本(GSE45512)的基因集富集结果; B: 小鼠斑秃样本(GSE45513)的基因集富集结果。

包括植发手术^[10]、低能量激光治疗^[11]、光化学疗法(PUVA)^[12]、针灸疗法^[13]和药物治疗^[14~16]等。然而, 目前没有有效的疗法能医治所有受到脱发困扰的患者, 且部分疗法除了具有较大的副作用外也会在停止治疗之后出现严重的复发情况, 这主要与脱发独特的病理生理学和复杂的病因有关。因此, 对于 AA 发生发展机制的研究特别重要, 既可以帮助深入了解 AA 的发病机制, 也有助于 AA 治疗药物的研发和治疗方法的开发。

本研究通过生物信息学方法分析了人头皮 AA 样本和 C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤样本, 筛选出 23 个在两个物种 AA 样本与正常样本中共同显著差异表达基因。并且基于 GO 和 STRING 数据库对 23 个基因进行功能注释分析和蛋白互作网络分析。同时为了对所有数据集有一个全面的了解, 进一步将

校正后的差异表达基因集进行了基因集富集分析。

除了人 AA 头皮样本数据, 本研究也选用了 C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤样本数据。C3H/HeJ 小鼠自发脱发的发展过程和人的 AA 病理特征非常相似^[17], 因而能够作为一种良好、经济的模型用于研究脱发相关的疾病。本研究将两个物种的数据集联合分析, 期望探究出在人和小鼠两个物种中相对保守的 AA 相关基因以及病理学和生理学过程。

人和小鼠中共有的 DEGs 有 23 个, 比较有意思的是, 其中部分基因也曾出现在 AA 相关的其他研究中。在一项关于 AA 的转录组测序研究中, *FGF18* 也是差异表达基因, 并参与细胞增殖的有丝分裂过程^[18]。*FGF18* 在毛囊休止期强表达, 有研究表明, *FGF18* 可以作为辐射诱导脱发的辐射保护剂^[19]。DNA 宏阵列分析显示 *BMP2* 与雄激素性脱发有关^[20]。

BMP 信号参与调控头发的生长周期^[21]。Anti-IL5 能减少嗜酸性粒细胞的数量并导致脱发,加重红斑的严重程度,同时增加 *MMP12* 的表达^[22]。利用免疫组化,在分级毛囊的球茎、小叶、峡部和漏斗部计数 *GZMB* 阳性细胞,发现 AA 小鼠中的阳性细胞显著高于对照组,而膳食维生素 A 可改变 *GZMB* 阳性细胞的数量和定位,从而影响 AA 的发展进程^[23]。*CXCL9*, *CXCL10* 作为 T 淋巴细胞的招募者,在 AA 患者血清中 *CXCL9* 和 *CXCL10* 表达水平明显升高,表明它们可能参与了 T 淋巴细胞募集到发炎组织的过程^[24~26]。此外在 C3H/HeJ 小鼠自发形成 AA 过程中, *CXCL9* 和 *CXCL10* 的表达水平逐渐增加^[27]。另一项芯片和 RT-PCR 表达谱数据分析也显示 *CXCL9* 和 *CXCL10* 在 AA 组显著上调^[28]。此外,通过阻断 ifn 诱导的趋化因子(*CXCL9*和*CXCL10*)可以预防 AA 的发生^[29]。毛囊中 *CXCL10* 能增加 T 细胞的趋化性,而抑制 T 细胞的趋化性可有效治疗 AA^[30]。上述已有研究报道表明了这些在人和小鼠中共有的差异表达基因不仅在本文中显示出显著的差异,而且在脱发相关的其他样本中也显示出类似的差异,并且机制研究显示部分基因参与 AA 发生发展进程。同时,后续也应关注那些挖掘出来尚未报道的 DEGs,对它们深入细致的研究可能有助于丰富 AA 的病理学知识,进而帮助治疗 AA 病症。

GO 富集分析显示两物种共有的 23 个基因主要富集在免疫反应(immune response) 细胞因子介导的信号通路(cytokine-mediated signaling pathway)和 T 细胞活化(T cell activation)等一些免疫相关的过程。比较有意思的是,单独存在于两个物种的非共有 DEGs 的生物学过程也都富集在免疫相关的生物学过程中。而且,对这些非共有 DEGs 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析发现,在人和小鼠中,除了都涉及免疫事件外,小鼠所涉及的生物学过程、细胞组分、分子功能和信号通路的范围更广泛,而上述与人相关的内容则涉及的更具体甚至更直接,如人的某些条目直接显示与皮肤附属物相关(附图 1,头发生长周期(GO:0042633~hair cycle),上皮发育(GO:0008544~ epidermis development),毛囊发育(GO:0001942~hair follicle development),指甲发育(GO:0035878~nail development),角蛋白纤维

(GO:0045095~keratin filament), 上皮的结构组成(GO:0030280~structural constituent of epidermis))。尤其是对这些非共有基因进行组织富集分析,发现这些在人中的非共有基因直接富集在头皮和头发相关的组织(头皮(Scalp),头发(Hair)和发根(Hair root))。这些结果可能表明,虽然在两个物种中,斑秃都与免疫事件相关,然而,在小鼠中斑秃可能是一类全身性的疾病,而在人中,由于毛发分布的原因,斑秃更倾向于是一个局部发生的疾病。当然,这些结果也反应了样品来源的不同,一个来自人类 AA 患者头皮,另一个来自小鼠自发性 AA 皮肤。PPI 网络节点位置的一些差异表达基因编码的蛋白也显示与免疫事件相关。除此之外, GSEA 分析结果显示在人和小鼠中相对保守的信号通路也都集中在免疫相关的过程。这些结果表明斑秃能够引起了一系列的免疫响应相关事件。本研究结果与之前的报道相一致, AA 是一类人类自身免疫性疾病, AA 的发生被认为是毛囊的天然免疫功能崩溃导致的,包括上皮细胞中 MHC I class 异位表达和自身抗原呈递给自身反应性 CD8⁺ T 细胞^[31]。除了毛囊自身的免疫功能丧失,自身免疫会进一步破坏毛囊并引发一系列炎症反应^[32]。近些年来,一类高效的免疫类药物 JAK 抑制剂(Janus kinase inhibitors)用于研究 AA 的治疗,具有比较好的疗效。在使用 C3H/HeJ 小鼠模型进行的临床前试验中,这些药物在局部和口服时均显示出预防和逆转 AA 的效果^[7]。几个病例和个别报告已证明,不同类型斑秃患者在口服 JAK 抑制剂药物后,头发再生,这些药物包括托法替尼(tofacitinib)^[33]、鲁索替尼(ruxolitinib)^[34]和巴瑞克替尼(baricitinib)^[35]。目前,美国 FDA 批准了几种 JAK 抑制剂用于治疗其他疾病,如 ruxolitinib (JAK1/2 抑制剂)用于治疗骨髓纤维化, tofacitinib (pan-JAK 抑制剂)用于治疗类风湿性关节炎。JAK 抑制剂等免疫类药物也提供了一种新的用于研究脱发治疗的策略,不过也应该意识到任何新药潜在副作用。

据报道,在 2%~44% 的 AA 患者中有指甲受累,并且这种情况在儿童(>40%)中比成人(<20%)更常见,此外,越是严重的斑秃患者也越容易出现指甲受累^[36,37]。指甲属于皮肤附属物,尽管 GSEA(图 5)显示上调基因集多富集在免疫相关的表型,然而下

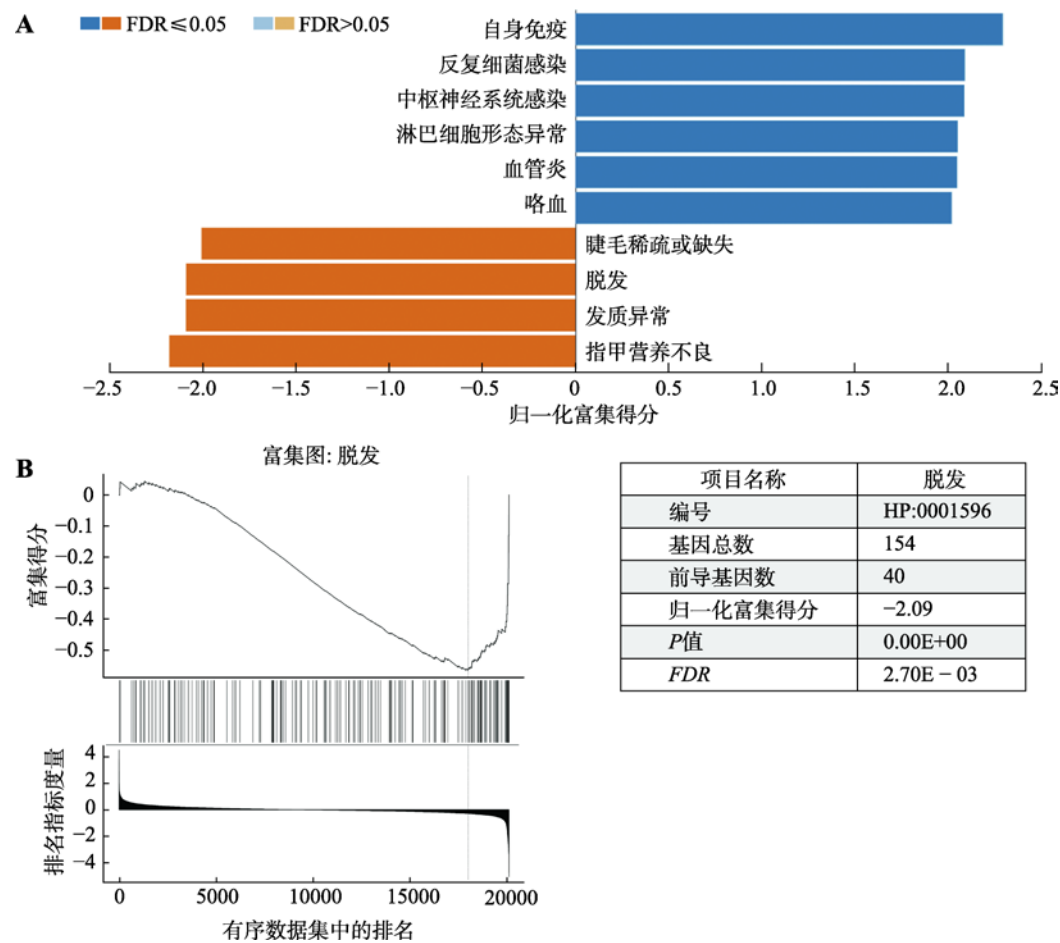


图 5 涉及人类表型的基因集富集分析
Fig. 5 Gene set enrichment analysis in human phenotype ontology
A: 人斑秃样本(GSE45512)基因集在人类表型上的富集结果; B: 人斑秃样本基因集在秃头症中富集的结果。

调基因集富集的条目都在皮肤附属物受损相关的表型,如指甲营养不良(nail dystrophy)、发质异常(abnormality of hair texture)、脱发(alopecia)和睫毛稀疏或缺失(sparse or absent eyelashes)。说明 AA 患者除了引起一些自身免疫相关的症状外,也会伴随出现自身皮肤附属物(如指甲、睫毛和眉毛等)生长异常的症状。

高通量分析技术的发展和测序成本的降低产生了大量与脱发相关的研究数据。本研究通过利用 NCBI 公共数据库中的数据和生物信息学分析工具整合分析了两个物种的 AA 数据,从基因层面分析了 AA 相关的分子机制,并获得了一些可信的结果,为脱发发生发展的机制和治疗提供有价值的参考信息。本文挖掘的 23 个在人和小鼠 AA 样本中共有的 DEGs,其中部分已在 AA 相关的研究报道中得到证

实(*MMP12*^[22], *GZMB*^[23], *CXCL9*^[29], *CXCL10*^[29], *IRF1*^[38], *CD2*^[39], *CCL2*^[40], *IL2RG*^[41], *FGF18*^[19,42]和 *BMP2*^[21,42]),然而,目前关于 AA 病症发生发展的机制以及 AA 与免疫成因的机理还有待完善。基于现有研究,对尚未报道这部分 DEGs 进行深入的分析和研究,有望对未来治疗斑秃提供了新的药物靶点。

附录:

附图 1 和附表 1 详见文章电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

[1] Safavi KH, Muller SA, Suman VJ, Moshell AN, Melton LJ.

- Incidence of alopecia areata in olmsted county, minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clin Proc*, 1995, 70(7): 628–633. [DOI]
- [2] Pratt CH, King LE Jr, Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17011. [DOI]
- [3] Liu LY, King BA, Craiglow BG. Health-related quality of life (HRQoL) among patients with alopecia areata (AA): A systematic review. *J Am Acad Dermatol*, 2016, 75(4): 806–812.e3. [DOI]
- [4] Hunt N, McHale S. The psychological impact of alopecia. *BMJ*, 2005, 331(7522): 951–953. [DOI]
- [5] Singam V, Patel KR, Lee HH, Rastogi S, Silverberg JI. Association of alopecia areata with hospitalization for mental health disorders in US adults. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 80(3): 792–794. [DOI]
- [6] Rencz F, Gulácsi L, Péntek M, Wikonkál N, Baji P, Brodsky V. Alopecia areata and health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*, 2016, 175(3): 561–571. [DOI]
- [7] Xing LZ, Dai ZP, Jabbari A, Cerise JE, Higgins CA, Gong WJ, de Jong A, Harel S, DeStefano GM, Rothman L, Singh P, Petukhova L, Mackay-Wiggan J, Christiano AM, Clynes R. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med*, 2014, 20(9): 1043–1049. [DOI]
- [8] The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D330–d338. [DOI]
- [9] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1–13. [DOI]
- [10] Chen HA, Pan JY, Chiang CH, Jhang AH, Ho WT. New idea for hair transplantation to preserve more donor hair follicles. *Med Hypotheses*, 2019, 128: 83–85. [DOI]
- [11] Afifi L, Maranda EL, Zarei M, Delcanto GM, Falto-Aizpurua L, Kluijfhout WP, Jimenez JJ. Low-level laser therapy as a treatment for androgenetic alopecia. *Lasers Surg Med*, 2017, 49(1): 27–39. [DOI]
- [12] Tekin NS, Tekin IO, Cinar S, Altinyazar HC, Koca R, Esturk E. The PUVA-turban as an alternative treatment of alopecia associated with chronic graft versus host disease. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 53(5): 902–903. [DOI]
- [13] Lee HW, Jun JH, Lee JA, Lim HJ, Lim HS, Lee MS. Acupuncture for treating alopecia areata: a protocol of systematic review of randomised clinical trials. *BMJ Open*, 2015, 5(10): e008841. [DOI]
- [14] Suchonwanit P, Srisuwanwattana P, Chalermroj N, Khunkhet S. A randomized, double-blind controlled study of the efficacy and safety of topical solution of 0.25% finasteride admixed with 3% minoxidil vs. 3% minoxidil solution in the treatment of male androgenetic alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2018, 32(12): 2257–2263. [DOI]
- [15] Durdu M, Özcan D, Baba M, Seçkin D. Efficacy and safety of diphenylcyclopropenone alone or in combination with anthralin in the treatment of chronic extensive alopecia areata: a retrospective case series. *J Am Acad Dermatol*, 2015, 72(4): 640–650. [DOI]
- [16] Rodrigues BL, Montalvão SAL, Cancela RBB, Silva FAR, Urban A, Huber SC, Júnior JLRC, Lana JFSD, Annichinno-Bizzacchi JM. Treatment of male pattern alopecia with platelet-rich plasma: A double-blind controlled study with analysis of platelet number and growth factor levels. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 80(3): 694–700. [DOI]
- [17] Sundberg JP, Boggess D, Montagutelli X, Hogan ME, King LE Jr. C3H/HeJ mouse model for alopecia areata. *J Invest Dermatol*, 1995, 104(5 Suppl): 16s–17s. [DOI]
- [18] Subramanya RD, Coda AB, Sinha AA. Transcriptional profiling in alopecia areata defines immune and cell cycle control related genes within disease-specific signatures. *Genomics*, 2010, 96(3): 146–153. [DOI]
- [19] Kawano M, Umeda S, Yasuda T, Fujita M, Ishikawa A, Imamura T, Imai T, Nakayama F. FGF18 signaling in the hair cycle resting phase determines radioresistance of hair follicles by arresting hair cycling. *Adv Radiat Oncol*, 2016, 1(3): 170–181. [DOI]
- [20] Midorikawa T, Chikazawa T, Yoshino T, Takada K, Arase S. Different gene expression profile observed in dermal papilla cells related to androgenic alopecia by DNA microarray analysis. *J Dermatol Sci*, 2004, 36(1): 25–32. [DOI]
- [21] Plikus MV, Widelitz RB, Maxson R, Chuong CM. Analyses of regenerative wave patterns in adult hair follicle populations reveal macro-environmental regulation of stem cell activity. *Int J Dev Biol*, 2009, 53(5–6): 857–868. [DOI]
- [22] Renninger ML, Seymour RE, Whiteley LO, Sundberg JP, Hogenesch H. Anti-IL5 decreases the number of eosinophils but not the severity of dermatitis in Sharpin-deficient mice. *Exp Dermatol*, 2010, 19(3): 252–258. [DOI]
- [23] Duncan FJ, Silva KA, Johnson CJ, King BL, Szatkiewicz JP, Kamdar SP, Ong DE, Napoli JL, Wang J, King LE Jr, Whiting DA, McElwee KJ, Sundberg JP, Everts HB. Endogenous retinoids in the pathogenesis of alopecia areata. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(2): 334–343. [DOI]

- [24] Zainodini N, Hassanshahi G, Arababadi MK, Khorramdelazad H, Mirzaei A. Differential expression of CXCL1, CXCL9, CXCL10 and CXCL12 chemokines in alopecia areata. *Iran J Immunol*, 2013, 10(1): 40–46. [DOI]
- [25] Maouia A, Sormani L, Youssef M, Helal AN, Kassab A, Passeron T. Differential expression of CXCL9, CXCL10, and IFN- γ in vitiligo and alopecia areata patients. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2017, 30(2): 259–261. [DOI]
- [26] Bilgic O, Sivrikaya A, Unlu A, Altinyazar HC. Serum cytokine and chemokine profiles in patients with alopecia areata. *J Dermatolog Treat*, 2016, 27(3): 260–263. [DOI]
- [27] McPhee CG, Duncan FJ, Silva KA, King LE Jr, Hogenesch H, Roopenian DC, Everts HB, Sundberg JP. Increased expression of Cxcr3 and its ligands, Cxcl9 and Cxcl10, during the development of alopecia areata in the mouse. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(6): 1736–1738. [DOI]
- [28] Suárez-Fariñas M, Ungar B, Noda S, Shroff A, Mansouri Y, Fuentes-Duculan J, Czernik A, Zheng X, Estrada YD, Xu H, Peng X, Shemer A, Krueger JG, Lebwohl MG, Guttman-Yassky E. Alopecia areata profiling shows TH1, TH2, and IL-23 cytokine activation without parallel TH17/TH22 skewing. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(5): 1277–1287. [DOI]
- [29] Dai Z, Xing L, Cerise J, Wang EH, Jabbari A, de Jong A, Petukhova L, Christiano AM, Clynes R. CXCR3 blockade inhibits T Cell migration into the skin and prevents development of alopecia areata. *J Immunol*, 2016, 197(4): 1089–1099. [DOI]
- [30] Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y. CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase. *J Dermatol Sci*, 2013, 69(2): 140–147. [DOI]
- [31] Gilhar A, Schrum AG, Etzioni A, Waldmann H, Paus R. Alopecia areata: Animal models illuminate autoimmune pathogenesis and novel immunotherapeutic strategies. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(7): 726–735. [DOI]
- [32] Strazzulla LC, Wang EHC, Avila L, Lo Sicco K, Brinster N, Christiano AM, Shapiro J. Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*, 2018, 78(1): 1–12. [DOI]
- [33] Liu LY, Craiglow BG, Dai F, King BA. Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 76(1): 22–28. [DOI]
- [34] Mackay-Wiggan J, Jabbari A, Nguyen N, Cerise JE, Clark C, Ulerio G, Furniss M, Vaughan R, Christiano AM, Clynes R. Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata. *JCI Insight*, 2016, 1(15): e89790. [DOI]
- [35] Jabbari A, Dai Z, Xing L, Cerise JE, Ramot Y, Berkun Y, Sanchez GA, Goldbach-Mansky R, Christiano AM, Clynes R, Zlotogorski A. Reversal of alopecia areata following treatment with the JAK1/2 inhibitor baricitinib. *EBioMedicine*, 2015, 2(4): 351–355. [DOI]
- [36] Chelidze K, Lipner SR. Nail changes in alopecia areata: an update and review. *Int J Dermatol*, 2018, 57(7): 776–783. [DOI]
- [37] Kasumagic-Halilovic E, Prohic A. Nail changes in alopecia areata: frequency and clinical presentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009, 23(2): 240–241. [DOI]
- [38] Hamed FN, McDonagh AJG, Almaghrabi S, Bakri Y, Messenger AG, Tazi-Ahnini R. Epigallocatechin-3 gallate inhibits STAT-1/JAK2/IRF-1/HLA-DR/HLA-B and reduces CD8 MKG2D lymphocytes of alopecia areata patients. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(12). [DOI]
- [39] Shi JX, Peng P, Liu WX, Mi P, Xing C, Ning GZ, Feng SQ. Bioinformatics analysis of genes associated with the patchy-type alopecia areata: CD2 may be a new therapeutic target. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2019, 1–7. [DOI]
- [40] Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol*, 2012, 13(8): 744–752. [DOI]
- [41] Ibusuki A, Nishikawa T, Hiraki T, Okano T, Imai K, Kanegane H, Ohnishi H, Kato Z, Fujii K, Tanimoto A, Kawano Y, Kanekura T. Prominent dermal Langerhans cells in an Omenn syndrome patient with a novel mutation in the IL2RG gene. *J Dermatol*, 2019, 46(11): 1019–1023. [DOI]
- [42] Jiang W, Fan YX, Qiao X, Zhang YJ, Liu ZH, Zhao YH, Wang RJ, Wang ZX, Zhang WG, Su R, Li JQ. The transcriptome research progresses of skin hair follicle development. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(6): 528–534. 江玮, 范一星, 乔贤, 张燕军, 刘志红, 赵艳红, 王瑞军, 王志新, 张文广, 苏蕊, 李金泉. 皮肤毛囊发育的转录组研究进展. *遗传*, 2015, 37(6): 528–534. [DOI]

利用 DAVID 功能注释工具分析人和小鼠中非共有差异表达基因。A：C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤非共有差异表达基因的 GO 注释分析,包括生物学过程(biological process),细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)。B：C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤非共有差异表达基因所涉及的信号通路。C：C3H/HeJ 小鼠自发性 AA 皮肤非共有差异表达基因的组织表达。D：人头皮非共有差异表达基因的 GO 注释分析。E：人头皮非共有差异表达基因所涉及的信号通路。F：人头皮非共有差异表达基因的组织表达。左侧 Y 轴代表所涉及的差异基因个数,用柱状图显示。右侧 Y 轴代表所涉及条目的显著性,用五角星显示,数据用 $-\log_{10}(P \text{ value})$ 表示。A、B、D 和 E 图的红色矩形框代表在人和鼠中共同出现的条目。

附表 1 GSE45512 和 GSE45513 中的差异表达基因

Table S1 The differential expression gene of GSE45512 and GSE45513

组别	组内基因数	组内基因名称
GSE45512-up GSE45513-up	19	<i>GPR65 IRF1 GZMA IFI44L SASH3 CXCL9 GZMB GZMK CXCL10 LCP1 CD8A SPP1 CD2 IRF8 CCL2 MMP12 IFI44 PSMB9 IL2RG</i>
GSE45512-down GSE45513-down	4	<i>FGF18 BMP2 CHAC1 LYPD6</i>
GSE45512-up	60	<i>CRTAM GIMAP2 PRKAR2B CD1B PDGFRL C16orf54 PLAAT4 OGN TRIM22 CD33 LPAR4 FCGR2B ZFP14 ADAMDEC1 SELL EVI2A TNFSF13B IGDCC4 XIST MICB HLA-DRA EVI2B LRRK2 GPRI71 MND4 HBB AHR TRAT1 GLYATL2 CA3 SLC19A3 TSLP CD1E CTSS RSAD2 ATP8B4 HLA-DPA1 CMA1 LYZ FDPSP2 FCER1G IL15 TRBC1 AGTR1 GALNT7 SRGN EPSTI1 PLP1 SLC7A10 STMN2 CCDC178 RGS18 IL2RB COL6A6 RNASE4 IL7 CSF2RB DACT1 CD1C CCL13</i>
GSE45512-down	142	<i>DSG4 CAPN8 KRTAP4-12 LOC101928881 ZAR1 CST4 SLC1A6 S100P KRT82 UTY KRTAP9-3 PLA2G2F HOXC13 ADCK1 CSDC2 PADI3 KRTAP1-3 KRTAP4-5 CSNK1E TTTY15 KRT72 KRT73 SP6 LYG2 CALCB KRTAP9-8 KRTAP4-3 GPRC5D KRTAP3-1 DMBT1 KRTAP4-11 KRTAP2-1 MT4 KRTAP5-8 KRTAP4-6 KRTAP7-1 DDX3Y KRTAP19-1 HSPB3 FGG ERP27 PIRT KRTAP11-1 IL1F10 KRTAP3-2 EFHD1 KRTAP4-4 KRT16 CAPN14 PLEKHG4B ANGPTL7 DLX3 COMP BAMBI KRTAP4-9 KRTAP5-9 PINLYP TENM2 CAPN12 SLC10A4 CST1 CRNN KRTAP17-1 OXCT2 PRKY KRTAP3-3 SMTNL2 DLX4 MSX2 C1orf105 TTTY14 ODC1 ABCA4 LOC105374809 TXLNGY KRTAP4-1 FLRT3 KRTAP8-1 LSMEM1 RNF182 CABYR S100A3 EIF1AY PSORSIC2 SLN GLB1L2 FOXN1 LOC100505782 UNC5B-AS1 PCOTH KRTAP4-7 FRMPD1 USP9Y KRTAP1-5 KRT36 FAM49A KRT35 TGM3 LINC00868 KRT33A WNK4 KRT83 KRTAP4-2 KRTAP9-4 SLC05A1 ATP8A2 SPINK7 SPTBN5 LRRC15 KDM5D KRT74 KLK12 KRTAP4-8 KRT84 LINGO1-AS2 SLC7A11 KRTAP9-9 KRT85 SERPINA3 KRT33B KRT31 RPS4Y1 ZFY PRSS53 BPY2 CYFIP2 ZNF503-AS1 CBLN2 KRT40 KRT81 TTTY10 KRTAP19-3 ERVW-1 KRTAP10-11 KRTAP1-1 KRT86 PARM1 FHOD3 KRT75 CREB5 KRT32 LAMP5</i>
GSE45513-up	261	<i>XCL1 KIF26B C1S1 SOX7 CYBA EIF2AK2 IDO1 FLT1 MMP13 GM20559 COTL1 TRAV9D-3 AI467606 PML EXOC3L4 TMEM51 BATF2 IFITM3 SPN AI790276 OAS1B IGSF3 PARP12 GIMAP8 B4GALNT4 IRGM2 PTGER2 BST2 PTPN22 DUSP6 2010309G21RIK RAB19 SP100 HCST IRX4 A730054J21RIK SLFN2 9430051O21RIK ZMYND15 RAC2 SERPINB1A TRIM21 SAMHD1 OASL2 NLRC5 TAP2 LY75 PYY EFHD2 GBP7 TAPBPL AU015263 NPPB SERPINB9 APOBEC1 GM12185 AI662270 5830453J16RIK AI661384 A130071D04RIK TCAF2 UBA7 IIGP1 CLEC7A IFNG LAT IFIT1 TNFSF10 DTX3L GM9706 SELPLG TBC1D10C APOL11B AU020206 D17H6S56E-5 OAS2 TMEM173 CORO1A LIPG MGST2 CTSW NLRP10 CD52 MS4A4B FYB ICAM1 FCGR4 CD40 LGALS9 GBP6 LRRC4 SERPINB6B GM36723 GSTP3 ADGRG5 PMAIP1 ERAPI C2 5930433N17RIK FCGBP 2610528A11RIK ALOX15 CIITA AKNA CCL1 CCL7 LPXN SOCS1 CXCL11 UBE2L6 AI504432 TAPBP BC023105 CD244A GIMAP3 RTP4 MS4A4C ADAR CCL17 SLC15A3 IFI27L2A PARP14 IL18BP ITGAX IRGM1 IFIT2 IGSF8 ITGB7 CD3G APOL7A NKG7 KLRC1 IL7R BCL2L15 SLFN4 HCK NMI IFI35 TFEC ALOX12E GBP8 TBX21 RRAD NDUFA4L2 APOL8 GM38448 PGLYRP2 GBP3 IL13RA2 VCAM1 STAT2 CCL5 ADAM8 ROBO2 MX1 LCK GLIPR1 ANG2 PGAM1 EGR2 4921509J17RIK MS4A6B TNFAIP2 NFKBIE LTB LY6E LGALS3BP PGLYRP1 IRF7 SAMD9L THY1 SLFN10-PS DDX60 H2-K1 DDX58 HELZ2 HERC6 CASP1 MPEG1 CCR5 RASSF10 SLAMF8 XAF1 MLKL MYO1G AA467197 STX11 CYP7B1 IFIH1 EGLN3 ACOD1 LY6A ICOS BCL3 HAS2 GBP2 TRIM30A CHIL1 GZMC CXCR6 CALHM6 IGTP USP18 H2-M3 KRT6B LCN2 LST1 GCH1 PLAC8 GPR68 H2-T24 ITGB8 CD69 LTA ITGB2 ITGAE CD3D PSMB8 KRT42 DHX58 CASP4 UBD IL18R1 CCL3 IRF9 RBP1 PARP9 CXCL16 KRT79 TIMP1 RBM43 PSMB10 KCNN4 TRIM25 ZBP1 AW112010 GM4951 AIF1 THEMIS2 CCL12 CD274 SERPINA3G STFA3 IFI47 CHIL3 GBP2B STAT1 SEMA4C CAR9 KLRD1 TLR3 MGARP JCHAIN SLC2A1 PSME1 CD8B1 ARHGAP8 HCLS1 IFIT3 CYTH4 PTPRC</i>
GSE45513-down	53	<i>ADH1 HOXD8 BB086117 PRG4 PLIN4 TTR NGEF HNMT SCGB1A1 DEFB1 FAM171B HAMP2 CLDN3 GDF10 UPB1 SEMA3E SLC38A3 AKAP12 MLF1 EGFL6 ABCA8A PDZRN4 SNCG IL31RA PCSK6 THSD1 TENT5B TMEM246 IL22RA2 BMP6 LRRC20 SERPINB2 TDRP KRT24 SULT1A1 WFDC3 RHPN2 NPR3 IL20RA ABLIM3 COL8A2 CRIP3 TIMP4 SERPINB6E ERFF11 GREM1 LHX2 PCOLCE2 DEPP1 GPM6A TXNIP CYP4B1 ADCY1</i>

Up : 在该数据集中显著上调表达的基因 ; down : 在该数据集中显著下调表达的基因。