

脑脊液中 Na⁺-K⁺-Cl⁻ 协同转运蛋白 1 启动子甲基化对重型颅脑损伤患者预后评估价值

李晓庆^{1*} 嘉志雄² 赵勇³

广州市第一人民医院¹ 检验科; ² 神经外科, 广东广州 510180

³ 武汉市第三医院检验科, 湖北武汉 430074

摘要 目的:探讨重型颅脑损伤(sTBI)患者脑脊液中 Na⁺-K⁺-Cl⁻ 协同转运蛋白 1(NKCC1)基因启动子甲基化的临床意义。方法:招募 92 例 sTBI 患者,根据格拉斯哥预后量表(GOS)将患者分为预后良好组(GOS > 3 分)63 例与预后不良组(GOS ≤ 3 分)29 例,选取同一时间段行腰椎内固定术后脑脊液漏的 51 例患者作为对照组。收集 2 组脑脊液样本,采用亚硫酸氢盐测序法(BSP)测定 NKCC1 启动子区域 CpG 位点的甲基化状态。采用 Logistic 回归分析影响 sTBI 患者预后的风险因素。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估启动子甲基化的预测价值。采用定量反转录聚合酶链式反应法检测 NKCC1 在 sTBI 患者脑脊液中 mRNA 的表达水平。采用 Pearson 相关系数对启动子甲基化水平与其 mRNA 表达水平进行相关性分析。结果:预后不良组患者 NKCC1 的 CpG_{30.31}、CpG_{39.40.41} 位点的甲基化水平低于预后良好组(P 均 < 0.05)。Logistic 回归分析显示 CpG_{30.31}、CpG_{39.40.41} 位点甲基化水平是影响 sTBI 患者预后的独立风险因素(P 均 < 0.05)。ROC 曲线分析结果显示 CpG_{30.31}、CpG_{39.40.41} 位点甲基化水平预测 sTBI 患者预后的曲线下面积(AUC)为 0.7085、0.7315($P = 0.0014, 0.0004$)。NKCC1 的 CpG_{30.31}、CpG_{39.40.41} 位点甲基化水平与 NKCC1 的 mRNA 水平呈负相关($r = -0.2574, -0.1328, P = 0.0138, 0.0325$)。结论: NKCC1 启动子甲基化状态对评估 sTBI 患者预后有价值。

关键词 重型颅脑损伤; Na⁺-K⁺-Cl⁻ 协同转运蛋白 1; 甲基化状态; 预后

中图分类号 R651.1⁺5 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20230413

Methylation status of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 1 promoter in cerebrospinal fluid is valuable in the prognosis of patients with severe traumatic brain injury LI Xiao-qing^{1*}, JIA Zhi-xiong², ZHAO Yong³. ¹Department of Clinical Laboratory; ²Department of Neurosurgery, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510180, China. ³Department of Clinical Laboratory, Wuhan Third Hospital, Wuhan, Hubei 430074, China
Corresponding author: LI Xiao-qing, E-mail: Leexiaoqing0307@163.com

Abstract Objective: To investigate the methylation status and clinical significance of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 1 (NKCC1) gene promoter in cerebrospinal fluid of patients with severe traumatic brain injury (sTBI). Methods: A total of 92 patients with sTBI were recruited and divided into the favorable prognosis group (GOS > 3 points) and poor prognosis group (GOS ≤ 3 points) according to Glasgow Outcome Scale (GOS). A total of 51 patients with cerebrospinal fluid leakage after lumbar internal fixation were collected as controls. Cerebrospinal fluid samples from each group were collected. The methylation status of CpG sites in the promoter region of NKCC1 was determined by bisulfite sequencing (BSP). Logistic regression was used to analyze the risk factors affecting the prognosis of sTBI patients. The predictive value of promoter methylation was evaluated by using receiver operating characteristic (ROC) curves. The mRNA expression of NKCC1 in cerebrospinal fluid of sTBI patients was detected by qRT-PCR. The correlation between the methylation status of NKCC1 gene promoter and mRNA expression level was analyzed by Pearson correlation coefficient. Results: As compared with the good prognosis group, methylation levels of CpG_{30.31} and CpG_{39.40.41} in NKCC1 in the poor prognosis group were decreased (both $P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that methylation levels at CpG_{30.31} and CpG_{39.40.41} were independent risk factors affecting the prognosis of sTBI patients (both $P < 0.05$). The ROC curves analysis showed that methylation levels at CpG_{30.31} and CpG_{39.40.41} could be used as diagnostic indicators to predict the prognosis of sTBI patients (AUC = 0.7085, 0.7315, $P = 0.0014, 0.0004$). Methylation levels at CpG_{30.31} and CpG_{39.40.41} sites of NKCC1 were negatively correlated with mRNA levels of NKCC1 ($r = -0.2574, -0.1328, P = 0.0138, 0.0325$). Conclusion: NKCC1 promoter methylation status can be used as an effective predictor of prognosis in patients with sTBI.

Key words Severe traumatic brain injury; NKCC1; Methylation status; Prognosis

重型颅脑损伤(severe traumatic brain injury, sTBI)具有极高的残死率,是永久性残疾的常见原因之一^[1]。格拉斯哥昏迷评分法(Glasgow coma scale, GCS)和 CT 是诊断和评估 sTBI 的重要手段^[2],但对于 sTBI 的创伤严重程度和预后判断仍有较多欠缺。

颅脑损伤可直接导致 DNA 甲基化水平的改变^[3]。Na⁺-K⁺-Cl⁻ 协同转运蛋白 1(NKCC1)作为 SLC12 基因家族的一员,在中枢神经系统内大量表达^[4]。研究发现在颅脑损伤或缺血性中风后,NKCC1 的表达显著上调^[5]。本研究检测 sTBI 中 NKCC1 启动子

* 通信作者:李晓庆,E-mail:Leexiaoqing0307@163.com,广东省广州市越秀区盘福路1号

甲基化情况,并探讨其临床意义。

资料与方法

一般资料 选取2019年12月-2021年12月在广州市第一人民医院和武汉市第三医院接受治疗的sTBI患者92例(男55,女37),年龄18~65岁,平均(41.3±7.4)岁,体质指数(body mass index, BMI) 18~27 kg/m²,平均(21.44±2.54) kg/m²。纳入标准:①年龄≥18岁;②有头颅外伤史;③GCS评分≤8分;④无其他脊髓或脏器等损伤。排除标准:①入院前心脏或呼吸骤停;②患恶性肿瘤;③合并重要脏器(心、肝、肾)病变或神经系统疾病以及脑外伤病史。选取同时间段行腰椎内固定术后脑脊液漏的51例患者作为对照组,其中男32例,女19例,年龄18~65岁,平均(42.6±8.6)岁, BMI 18~26 kg/m²,平均(21.35±2.43) kg/m²。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。STBI患者治疗结束后随访6个月,根据格拉斯哥预后量表(Glasgow outcome scale, GOS)评分分为预后良好组(GOS>3分)6例与预后不良组(GOS≤3分)29例^[6]。

仪器与试剂 Epi Tect Fast DNA Bisulfite 试剂盒(59826)购自深圳子科生物科技有限公司。Trizol 试剂(XG-S63664)购自上海西格生物科技有限公司。2×Taq Plus 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) MasterMix (PC 1220) 购自北京索莱宝科技有限公司。DNA 提取试剂盒(Qiagen 51304)购自北京诺博莱德科技有限公司。逆转录试剂盒(K1622)购自北京智杰方远科技有限公司。

样本采集 所有患者均在入院24 h后通过脑室置管引流进行脑脊液取样约2 mL,对照组患者取2 mL 脑脊液,均以3 000 转/min 离心5 min,保存在-80℃条件下。

确定候选 CpG 位点 在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库确定NKCC1 转录起始位点(TSS)上游2 000 bp 的CpG 位点。使用EMBOSS 软件(https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/)预测发现该片段中可能存在1个CpG 岛,位于1498-1947bp。

DNA 提取及甲基化水平检测 按照DNA 提取试剂盒操作步骤提取DNA,使用Epi Tect Fast DNA Bisulfite 试剂盒对1 μg DNA 进行亚硫酸氢盐修饰处理,未发生甲基化的胞嘧啶被转变为尿嘧啶,发生甲基化的胞嘧啶不变。NKCC1 基因甲基化引物序列

为上游:5'-GAGAGGAGTTTAT-3',下游:5'-AAC-CCTACACTAACCAACCTC-3'。PCR 扩增总体系包括DNA 模板2 μL,2×PCR buffer 25 μL,上下游引物各1 μL,使用双蒸水将最终体积调节至50 μL。PCR 反应条件为:95℃预加热4 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸50 s,循环30次。72℃保持60 s 结束反应,在4℃保存。采用EpiTYPE 软件分析每个CpG 位点的甲基化水平,β 值=甲基化信号/甲基化和非甲基化信号之和^[7]。

定量反转录聚合酶链式反应 采用Trizol 试剂提取脑脊液中的总RNA,使用逆转录试剂盒合成互补DNA(cDNA)。使用2×Taq Plus PCR MasterMix 进行实时定量PCR,总反应体系包括2 μL cDNA 模板,上下游引物各1 μL,2×MasterMix 12.5 μL,使用双蒸水将最终体积调节至25 μL。反应循环设置为94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,30个循环;72℃ 5 min。使用2^{-ΔΔCT}法定量NKCC1 的相对表达水平。NKCC1 顺向:5'-GACACCCACACCAACACCTA-3';反向:5'-GTACGCTCCTCCTCC-3'。GAPDH 上游引物:5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3';下游引物:5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'。

统计学分析 采用SPSS 23.0 统计学软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较,采用t 检验,多组间比较采用单因素方差分析配合Turkey 检验。采用单因素和多因素logistic 回归模型分析影响sTBI 预后的因素。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线获取曲线下面积(area under curve, AUC),评估预测价值。采用Pearson 相关系数分析法对sTBI 组中的NKCC1 基因启动子区域的甲基化水平与其mRNA 表达水平进行相关性分析。以P<0.05 为差异有统计学意义。

结果

一般资料 sTBI 患者与对照组在性别、年龄、吸烟和饮酒史方面比较,差异无统计学意义(P 均>0.05),见表1,STBI 患者临床资料见表2。

表1 一般资料[例(%)/($\bar{x} \pm s$)]

项目	对照组(n=51)	sTBI(n=92)
男性	32(62.75)	55(59.78)
年龄(岁)	42.57±8.63	41.25±7.39
有吸烟史	29(56.86)	48(52.17)
有饮酒史	34(66.67)	49(53.26)
BMI(kg/m ²)	21.35±2.43	21.44±2.54
GCS(分)		5.33±1.54

表2 sTBI患者临床资料 $[(\bar{x} \pm s)/\text{例}(\%)]$

项目	数值(n=92)
住ICU时间(d)	8.7±4.3
住院时间(d)	16.3±15.6
蛛网膜下腔出血	30(32.61)
硬膜下出血	23(25.00)
硬膜外出血	12(13.04)
脑室内出血	17(18.48)
脑实质内出血	29(31.52)
弥漫性轴索损伤	37(40.22)
中线移位	14(15.22)
扁桃体疝	7(7.61)
脑挫伤	47(51.09)
脑水肿	13(14.13)
颅底骨折	38(41.30)
脑积水	5(5.43)
颅腔积气	13(14.13)

sTBI患者脑脊液中NKCC1的启动子甲基化水平 NKCC1上游2000 bp的片段中存在1个CpG岛(1498~1947 bp),其中包含25个位点(相近的CpG位点组合在一起)。sTBI患者CpG位点的 β 值普遍低于对照组(P 均 <0.05)。预后良好组和预后不良组患者的CpG_30.31和CpG_39.40.41位点的甲基化状态存在差异(P 均 <0.05),见表3。

影响sTBI患者预后的logistic回归分析 甲基化水平可能受性别、年龄或BMI的影响,将这些因素纳入逻辑回归模型,结果显示,CpG_30.31和CpG_39.40.41在预后不良的sTBI患者脑脊液中的甲基化水平显著低于预后良好组,见表3,对性别、年龄、BMI、CpG_30.31和CpG_39.40.41与sTBI患者预后关系进行分析,结果显示CpG_30.31和CpG_39.40.41是影响sTBI患者预后的独立风险因素(P 均 <0.05),见表4。

表3 sTBI患者与对照组NKCC1的甲基化状态 $(\bar{x} \pm s)$

CpGs	对照组 (n=51)	预后良好组 (n=63)	预后不良组 (n=29)	P值	Adj. P值	Adj. P值	Adj. P值
					(对照组/ 预后良好组)	(对照组/ 预后不良组)	(预后良好组/ 预后不良组)
CpG_1	2.53±0.29	2.41±0.25	2.31±0.32	0.001	0.0458	0.0009	0.1653
CpG_2.3.4	4.02±0.51	3.99±0.48	4.03±0.49	0.9178	-	-	-
CpG_5	1.02±0.31	0.99±0.21	0.94±0.33	0.5560	-	-	-
CpG_6	1.01±0.80	0.74±0.23	0.95±0.62	0.0382	0.0382	0.8967	0.2415
CpG_7	0.73±0.10	0.68±0.23	0.74±0.19	0.2245	-	-	-
CpG_8.9	4.17±0.57	3.96±0.62	4.21±0.47	0.0687	-	-	-
CpG_10.11.12	3.52±0.55	3.46±0.69	3.32±0.77	0.4293	-	-	-
CpG_13.14	0.86±0.33	0.94±0.28	0.91±0.31	0.3795	-	-	-
CpG_15.16	1.56±0.52	1.64±0.32	1.43±0.55	0.1170	-	-	-
CpG_17	2.27±0.48	2.39±0.24	2.34±0.33	0.2119	-	-	-
CpG_18	3.26±0.24	3.11±0.34	3.03±0.30	0.00291	0.0268	0.0048	0.6072
CpG_19.20.21.22	3.38±0.65	2.96±0.59	2.74±0.51	<0.001	0.0009	<0.001	0.2385
CpG_23	4.04±0.37	3.86±0.58	4.07±0.26	0.0491	0.0987	0.9575	0.1074
CpG_24.25.26	3.67±0.52	3.79±0.39	3.91±0.29	0.0504	-	-	-
CpG_27.28	1.62±0.38	1.65±0.08	1.49±0.48	0.0780	-	-	-
CpG_29	3.04±0.44	2.85±0.64	3.13±0.36	0.0357	0.1387	0.7434	0.0502
CpG_30.31	4.54±0.86	4.24±0.37	3.76±0.75	<0.001	0.0488	<0.001	0.0052
CpG_32.33.34	1.31±0.42	1.23±0.54	1.21±0.49	0.1995	-	-	-
CpG_35	1.28±0.32	1.34±0.06	1.29±0.18	0.2831	-	-	-
CpG_36	1.57±0.31	1.55±0.24	1.44±0.36	0.1435	-	-	-
CpG_37	1.59±0.34	1.67±0.21	1.56±0.26	0.1027	-	-	-
CpG_38	1.42±0.39	1.36±0.14	1.49±0.17	0.0837	-	-	-
CpG_39.40.41	7.04±1.21	6.23±0.55	5.78±0.47	<0.001	<0.001	<0.001	0.0490
CpG_42.43	0.59±0.24	0.53±0.17	0.51±0.12	0.1264	-	-	-
CpG_44.45.46	6.36±0.78	5.96±1.01	5.83±0.45	0.0113	0.0367	0.0226	0.7753

表4 Logistic 回归分析确定影响 sTBI 患者预后的风险因素

变量	单因素分析 OR(95% CI)	P 值	多因素分析 OR(95% CI)	P 值
性别	0.7574(0.3100 ~ 1.862)	0.5411	1.552(0.4825 ~ 5.423)	0.4711
年龄	0.9529(0.8914 ~ 1.015)	0.1419	0.9312(0.8482 ~ 1.232)	0.1062
BMI	1.067(0.8959 ~ 1.281)	0.4721	1.007(0.8247 ~ 1.232)	0.9437
CpG_30.31	0.1397(0.03268 ~ 0.4257)	0.0027	0.1479(0.03048 ~ 0.4857)	0.0053
CpG_39.40.41	0.1836(0.06233 ~ 0.4667)	0.0009	0.2084(0.06772 ~ 0.5507)	0.0030

ROC 曲线 通过 ROC 曲线分析发现 CpG_30.31 和 CpG_39.40.41 的 AUC 分别为 0.7085 ($P = 0.0014$) 和 0.7315 ($P = 0.0004$), 两者联合检测的 AUC 为 0.8046 ($P < 0.001$), 见图 1。

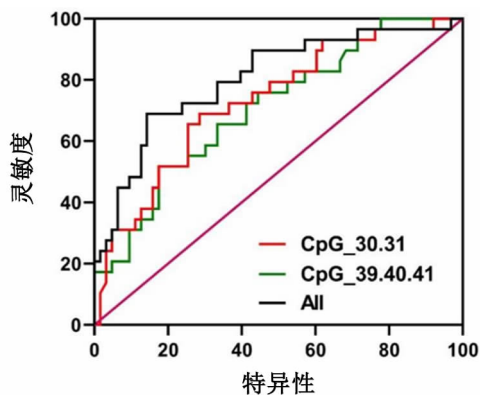


图1 CpG 位点甲基化水平的 ROC 曲线分析

甲基化水平与 NKCC1 mRNA 表达的关系 预后不良组 NKCC1 的 mRNA 表达较预后良好组显著升高 ($P < 0.01$)。NKCC1 的 CpG_30.31 位点、CpG_39.40.41 位点甲基化水平与其 mRNA 表达呈负相关 ($r = -0.2574$ 、 -0.1328 , $P = 0.0138$ 、 0.0325)。

讨论

NKCC1 是一种阳离子氯离子共转运蛋白,在脑损伤如创伤性损伤和缺血性中风后上调^[5]。也有研究显示启动子低甲基化导致高血压大鼠 NKCC1 的 mRNA 和蛋白表达上调^[8]。

DNA 甲基化可发生在 CpG 位点和非 CpG 位点,但在 CpG 位点更为频繁^[9]。研究表明脑脊液中的标志物水平可反映 sTBI 严重程度,并具有较高的准确性^[10]。本研究发现 sTBI 患者脑脊液 NKCC1 启动子区域 CpG 位点的甲基化水平与对照组存在差异。多因素 logistic 回归分析显示,CpG_30.31 和 CpG_39.40.41 是影响 sTBI 患者预后的独立风险因素。ROC 曲线分析证实 CpG_30.31 和 CpG_39.40.41 对评估 sTBI 患者预后的价值。

启动子区域的 DNA 甲基化通常使基因沉默^[11]。研究表明动脉闭塞引起的局灶性缺血损伤

患者大脑皮层中 NKCC1 mRNA 和蛋白高表达与 NKCC1 启动子区域的甲基化水平降低有关^[12]。本研究发现 NKCC1 在 sTBI 患者脑脊液中的 mRNA 表达与 CpG_19.20.21.22 和 CpG_39.40.41 位点的甲基化水平呈负相关。

综上所述,sTBI 患者脑脊液中 NKCC1 启动子区域 CpG 位点甲基化水平与 sTBI 患者预后有关。

参考文献

- 唐璐,姜波涛,张丹,等. PSH-AM 量表可用于重度颅脑损伤所致阵发性交感神经过度兴奋综合征的诊断[J]. 内科急危重症杂志,2021,27(4):290-293,319.
- Murray M, Wolman DN, Mlynash M, et al. Early head computed tomography abnormalities associated with elevated intracranial pressure in severe traumatic brain injury[J]. J Neuroimaging,2021,31(1): 199-208.
- Lv Y, Zhang C, Jian H, et al. Regulating DNA methylation could reduce neuronal ischemia response and apoptosis after ischemia-reperfusion injury[J]. Gene,2022,837: 146689.
- Savardi A, Borgogno M, Narducci R, et al. Discovery of a small molecule drug candidate for selective NKCC1 inhibition in brain disorders [J]. Chem,2020,6(8): 2073-2096.
- Wilkinson CM, Fedor BA, Aziz JR, et al. Failure of bumetanide to improve outcome after intracerebral hemorrhage in rat [J]. PLoS One, 2019,14(1): e0210660.
- 刘中平,吴德模,管义祥,等. 血清 ET-1、NFκB、PCT 对重症颅脑外伤患者预后的预测价值[J]. 临床神经外科杂志,2020,17(5): 569-573.
- Yamada Y, Horibe H, Oguri M, et al. Identification of novel hyper- or hypomethylated CpG sites and genes associated with atherosclerotic plaque using an epigenome-wide association study [J]. Int J Mol Med,2018,41(5): 2724-2732.
- Cho HM, Lee HA, Kim HY, et al. Recruitment of specificity protein 1 by CpG hypomethylation upregulates Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in hypertensive rats[J]. J Hypertens,2013,31(7): 1406-1413.
- Devall M, Soanes DM, Smith AR, et al. Genome-wide characterization of mitochondrial DNA methylation in human brain[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2022,13: 1059120.
- 罗靖,侯珍珠,洪国耀. 外伤性脑损伤患者脑脊液和血浆淀粉样蛋白 A1 水平的变化及临床意义[J]. 华南国防医学杂志,2021,35(12):861-865.
- 贾明珠,黄祯,蒋鹏,等. 类固醇生成因子-1 启动子甲基化状态及其基因表达在子宫内腺癌中的临床意义[J]. 实用妇产科杂志,2021,37(7):517-521.
- Lee HA, Hong SH, Kim JW, et al. Possible involvement of DNA methylation in NKCC1 gene expression during postnatal development and in response to ischemia[J]. J Neurochem,2010,114(2): 520-529.