

血小板线粒体 DNA 甲基化对创伤性颅脑损伤大鼠远期高血压的影响

王爱田¹ 林慧姝² 高景利¹ 李晓岚¹ 陈朔华³ 郭丽琼² 侯世科²

¹ 开滦总医院重症医学科, 河北唐山 063000; ² 天津大学应急医学研究院, 天津 300072; ³ 开滦总医院心血管实验室, 河北唐山 063000

通信作者: 高景利, Email: tsgaojingli@163.com

【摘要】 目的 观察创伤性颅脑损伤(TBI)模型大鼠伤后不同时间点血压、细胞因子及血小板线粒体DNA(mtDNA)甲基化水平的变化,探讨血小板mtDNA甲基化对TBI后高血压的潜在影响。**方法** 将24只Wistar大鼠按随机数字表法分为对照组、轻型TBI组和重型TBI组,每组8只。采用受控皮质撞击(CCI)方法复制TBI大鼠模型,打击速率分别为轻型TBI组4 m/s,重型TBI组6 m/s,打击时间为0.2 s,深度为2 mm;对照组仅开骨窗不行撞击。观察TBI前后各组大鼠平均动脉压(MAP)、心率(HR)和血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-6、IL-1 β)、 γ 干扰素(IFN- γ),以及血小板mtDNA关键基因甲基化水平的变化;采用Spearman相关性分析法分析MAP、炎症细胞因子与血小板mtDNA关键基因甲基化间的相关性。**结果** TBI前后3组大鼠MAP、HR比较差异均无统计学意义。TBI后不同时间点各组大鼠TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及IFN- γ 水平比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),TBI后21 d重型TBI组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 均明显高于轻型TBI组[TNF- α (ng/L): 341.57 ± 23.56 比 285.51 ± 24.59 ,IL-6(ng/L): 114.83 ± 8.39 比 113.38 ± 9.74 ,IL-1 β (ng/L): 30.08 ± 1.33 比 28.37 ± 3.31 ,IFN- γ (ng/L): $2\,210.63\pm48.16$ 比 $1\,917.16\pm212.69$,均 $P<0.05$]。TBI后1、7、21 d轻型和重型TBI组血浆细胞色素氧化酶1(mtco1)基因呈去甲基化表现,在3组实验大鼠甲基化变化中,仅在TBI后1 d、7 d重型TBI组血小板mtDNA的mtco1甲基化率明显低于轻型TBI组[(7.99 ± 0.39)%比(10.61 ± 0.41)%、(6.89 ± 0.84)%比(10.82 ± 1.57)%,均 $P<0.05$]。TBI后1 d、21 d重型TBI组mtDNA基因mtco1在Pos.1、Pos.2位点去甲基化现象较对照组更明显[Pos.1:1 d为(4.07 ± 0.23)%比(5.37 ± 0.67)%,21 d为(4.97 ± 0.92)%比(5.09 ± 0.38)%;Pos.2:1 d为(11.09 ± 1.68)%比(20.13 ± 2.73)%,21 d为(15.50 ± 3.10)%比(17.95 ± 3.49)%,均 $P<0.05$]。TBI后21 d大鼠脑组织在mtco1、mtco2、mtco3不同位点与对照组比较,轻型TBI组脑组织mtco1-Pos.1、mtco1-Pos.2、mtco2-Pos.1、mtco2-Pos.2、mtco3-Pos.3均呈过甲基化表现[mtco1-Pos.1:(4.30 ± 0.50)%比(2.72 ± 0.52)%,mtco1-Pos.2:(13.55 ± 1.54)%比(7.34 ± 2.53)%,mtco2-Pos.1:(8.40 ± 0.82)%比(6.49 ± 0.67)%,mtco2-Pos.2:(12.05 ± 2.09)%比(9.44 ± 0.70)%,mtco3-Pos.3:(5.56 ± 0.98)%比(4.36 ± 0.14)%,均 $P<0.05$]。重型TBI组mtco2-Pos.1、mtco2-Pos.2位点和mtco3-Pos.3位点均呈过甲基化表现[mtco2-Pos.1:(9.14 ± 1.87)%比(6.49 ± 0.67)%,mtco2-Pos.2:(13.37 ± 2.54)%比(9.44 ± 0.70)%,mtco3-Pos.3:(6.98 ± 1.52)%比(4.36 ± 0.14)%,均 $P<0.05$]。与轻型TBI组比较,重型TBI组mtco1-Pos.2呈去甲基化表现[(8.45 ± 1.55)%比(13.55 ± 1.54)%, $P<0.05$]。mtco3-Pos.3位点呈过甲基化表现[(6.98 ± 1.52)%比(5.56 ± 0.98)%, $P<0.05$]。相关性分析显示:MAP与TNF- α 、IL-6均呈正相关(r 值分别为0.236和0.272,均 $P<0.05$)。大鼠血浆mtDNA基因mtco1与MAP、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 均呈负相关(r 值分别为-0.273、-0.330、-0.330、-0.352,均 $P<0.05$)。**结论** 在实验期间并未观测到TBI大鼠高血压的出现;但TBI后炎症细胞因子升高,通过炎症反应途径使血小板mtDNA的mtco1基因呈去甲基化,从而对机体产生不良影响,其确切机制需要进行更深入的研究。

【关键词】 创伤性脑损伤; 炎症; 线粒体DNA甲基化; 血小板

基金项目: 河北省医学科研课题(20211476)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.06.006

Effect of platelet mitochondrial DNA methylation on long-term hypertension in rats with traumatic brain injury

Wang Aitian¹, Lin Huizhu², Gao Jingli¹, Li Xiaolan¹, Chen Shuohua³, Guo Liqiong², Hou Shike²

¹Department of Intensive Care Unit, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China; ²Institute of Emergency Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ³Laboratory of Cardiovascular Diseases, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China

Corresponding author: Gao Jingli, Email: Tsgaojingli@163.com

【Abstract】 Objective To observe the changes in blood pressure, cytokines, and level of platelet mitochondrial DNA (mtDNA) methylation at different times after injury in rats with traumatic brain injury (TBI) model and to explore the potential impact of platelet mtDNA methylation on the health outcomes of hypertension after TBI.

Methods Twenty-four Wistar rats were divided into control, light TBI, and severe TBI groups according to the random number table method, with 8 rats in each group. The rat model of TBI was replicated by the controlled cortical impact (CCI) method, and the striking rate was 4 m/s in the light TBI group and 6 m/s in the severe TBI group, with a striking time of 0.2 seconds and a depth of 2 mm, respectively; the control group only had a bone window without impact. The levels of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-6, IL-1 β), and γ interferon (IFN- γ), and methylation levels of key genes of platelet mtDNA were observed in each group of rats before and after TBI. Correlation between MAP, cytokines, and platelet mtDNA key methylation was analyzed by Spearman correlation analysis. **Results** The differences in MAP and HR between the three groups of rats before and after TBI were not statistically significant. The differences in the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IFN- γ were statistically significant in all groups of rats compared at different time points after TBI (all $P < 0.01$). TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IFN- γ were significantly higher in the severe TBI group 21 days after TBI than those in the light TBI group [TNF- α (ng/L): 341.57 ± 23.56 vs. 285.51 ± 24.59 , IL-6 (ng/L): 114.83 ± 8.39 vs. 113.38 ± 9.74 , IL-1 β (ng/L): 30.08 ± 1.33 vs. 28.37 ± 3.31 , IFN- γ (ng/L): $2\ 210.63 \pm 48.16$ vs. $1\ 917.16 \pm 212.69$, all $P < 0.05$]. The plasma cytochrome oxidase 1 (mtco1) gene showed demethylation in the light and severe TBI groups at 1, 7, and 21 days after TBI, among the methylation changes in the three experimental groups of rats, the mtco1 rate of platelet mtDNA in the severe TBI group was significantly lower than that in the light TBI group only at 1 day and 7 days after TBI [(7.99 $\pm$ 0.39)% vs. (10.61 $\pm$ 0.41)%, (6.89 $\pm$ 0.84)% vs. (10.82 $\pm$ 1.57)%, both $P < 0.05$]. The mtDNA gene mtco1 was more significantly demethylated at Pos.1, Pos.2 sites in the severe TBI group 1 day and 21 days after TBI than that in the control group [Pos.1: 1 day after TBI was (4.07 $\pm$ 0.23)% vs. (5.37 $\pm$ 0.67)% and 21 days after TBI was (4.97 $\pm$ 0.92)% vs. (5.09 $\pm$ 0.38)%; Pos.2: 1 day after TBI was (11.09 $\pm$ 1.68)% vs. (20.13 $\pm$ 2.73)% and 21 days after TBI was (15.50 $\pm$ 3.10)% vs. (17.95 $\pm$ 3.49)%, all $P < 0.05$]. When comparing different loci of mtco1, mtco2, and mtco3 in brain tissue of rats 21 days after TBI with the control group, mtco1-Pos.1 and mtco1-Pos.2, mtco2-Pos.1, mtco2-Pos.2 and mtco3-Pos.3 in the light TBI group showed hypermethylation [mtco1-Pos.1: (4.30 $\pm$ 0.50)% vs. (2.72 $\pm$ 0.52)%, mtco1-Pos.2: (13.55 $\pm$ 1.54)% vs. (7.34 $\pm$ 2.53)%, mtco2-Pos.1: (8.40 $\pm$ 0.82)% vs. (6.49 $\pm$ 0.67)%, mtco2-Pos.2: (12.05 $\pm$ 2.09)% vs. (9.44 $\pm$ 0.70)%, mtco3-Pos.3: (5.56 $\pm$ 0.98)% vs. (4.36 $\pm$ 0.14)%, all $P < 0.05$]; the mtco2-Pos.1 and mtco2-Pos.2 sites and mtco3-Pos.3 site in the severe TBI group showed hypermethylation [mtco2-Pos.1: (9.14 $\pm$ 1.87)% vs. (6.49 $\pm$ 0.67)%, mtco2-Pos.1: (13.37 $\pm$ 2.54)% vs. (9.44 $\pm$ 0.70)%, mtco3-Pos.3: (6.98 $\pm$ 1.52)% vs. (4.36 $\pm$ 0.14)%, all $P < 0.05$]; Compared with light TBI group, mtco1-Pos.2 in severe TBI group showed demethylation [(8.45 $\pm$ 1.55)% vs. (13.55 $\pm$ 1.54)%, $P < 0.05$], and mtco3-Pos.3 site showed hypermethylation [(6.98 $\pm$ 1.52)% vs. (5.56 $\pm$ 0.98)%, $P < 0.05$]. Correlation analysis shows that MAP and TNF- α , IL-6 showed significant positive correlation (r values were 0.236 and 0.272, respectively, both $P < 0.05$); mtco1 were significantly negatively correlated with MAP, TNF- α , IL-6, and IFN- γ (r values were -0.273, -0.330, -0.330, and -0.352, respectively, all $P < 0.05$). **Conclusions** The appearance of hypertension in TBI rats was not observed during the experimental period. However, the exact mechanism of elevated inflammatory cytokines after TBI, which causes the mtco1 gene of platelet mtDNA to be demethylated through the inflammatory response pathway and thus has adverse effects on the organism, needs to be further studied.

【Key words】 Traumatic brain injury; Inflammation; Mitochondrial DNA methylation; Platelet

Fund program: Hebei Province Medical Science Research Project (20211476)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.06.006

近年来创伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 的发病率持续升高^[1-3], 全球每年约新增 TBI 病例 5 000 万例^[4], 对人类健康造成严重威胁。TBI 的远期预后如认知缺陷、情绪问题、行为改变、轻度认知障碍及慢性神经退行性疾病等问题正越来越多地受到研究人员的关注^[5-6]。在 TBI 非神经精神相关的健康结局中, 高血压发病率的显著增高值得关注^[7-8]。高血压是心血管事件的危险因素, 然而其发病机制复杂并受到多种因素的影响。因此, 探讨 TBI 通过何种机制引起高血压不良结局极具研究价值。线粒体 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 很容易受到来自细胞、器官、机体、环境等影响因素的攻击。已有研究证明, 空气污染物^[9-10]、化学物质^[10]、长期饮酒^[11] 均是活性氧 (reactive oxygen species,

ROS) 引起 mtDNA 甲基化的重要因素。此外, 线粒体由于缺乏有保护性的组蛋白更容易受到 ROS 的影响, 在 ROS 暴露下激发炎症反应进而造成多种形式的线粒体损伤。有研究显示, DNA 甲基化在血压调控的分子机制中起重要作用^[12], 血小板 mtDNA 的甲基化可以通过调节血小板活性导致心脑血管事件的发生^[13]。一项小型研究显示, 与同龄对照组比较, TBI 长期存活者其关键 mtDNA 基因缺失的发生率较低, 说明自由基诱导的累积 mtDNA 损伤可能选择性影响线粒体或其宿主的生存^[14]。Meehan 等^[15] 认为, 以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学改变可能是 TBI 长期变化的一种分子机制。因此我们推测, TBI 通过引发 DNA 甲基化率的改变进而导致高血压不良健康结局的出现。本研究旨在通过观察 TBI

对高血压健康结局的影响,以期为探讨 TBI 对远期不良预后的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:选择健康成年雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 24 只(50 日龄左右,体质量 230~260 g),购于北京维通利华实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(京)2016-0006。将大鼠按随机数字表法分为对照组、轻型 TBI 组、重型 TBI 组,每组 8 只。

1.2 模型制备:参照受控皮质撞击(controlled cortical impact, CCI)方法复制 TBI 大鼠模型^[16]。打击速率分别为轻型 TBI 组 4 m/s,重型 TBI 组 6 m/s,打击时间均为 0.2 s,深度为 2 mm;对照组仅开骨窗不行撞击。

1.3 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经本院伦理委员会批准(审批号:2020029)。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 各组大鼠一般情况及 TBI 前后平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)的变化:实验过程中观察各组大鼠一般情况,并于制模前和制模后 1 d,观察各组大鼠 MAP 及 HR 的变化。

1.4.2 炎症细胞因子检测:于 TBI 后 1 d、7 d 取大鼠眼眶内眦动脉血 1 mL,21 d 断头取血 10 mL,置于乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA)抗凝管中,室温离心 15 min,取上清液置于 -80℃ 冰箱保存备检。采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukins, IL-6、IL-1 β)和 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平,操作步骤严格按试剂盒说明书进行,试验结果重复 2 次取平均值。

1.4.3 血浆血小板 mtDNA 关键基因和甲基化序列检测:于不同时间点取各组大鼠静脉血,使用 EZ-96DNA 甲基化试剂盒对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化。转化后的 DNA 在洗脱缓冲液中洗脱,采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和焦磷酸测序定量测定血浆中血小板 mtDNA 细胞色素氧化酶(mtco1、mtco2、mtco3)的甲基化水平,以及血小板 mtDNA 基因不同位点的甲基化情况。

1.4.4 脑组织血小板 mtDNA 甲基化水平检测:制模后 21 d 后,取大鼠脑组织匀浆提取 DNA,置

于 -20℃ 保存备检。采用 PCR 和焦磷酸测序定量测定脑组织血小板 mtDNA 甲基化水平。

1.4.5 相关分析:采用 Spearman 相关性分析法分析 MAP、细胞因子与血小板 mtDNA 关键甲基化间的相关性。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 18.0 统计软件分析数据,符合正态分布的连续变量以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;两组以上组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane T2 法检验;多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis 检验。重复测量的数据采用方差分析进行统计,行夏皮洛-威尔克(S-W)检验,各组数据需服从正态分布及球形检验,不符合球形检验者以一元方差分析校正结果为准。甲基化数据分布采用倾斜度和峰度检验;重复性检验的显著性用 Bonferroni 方法进行校正。计数资料以只(率)表示,组间比较用 χ^2 检验。采用 Spearman 相关性分析法分析不同变量的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况:实验期间重型 TBI 组大鼠伤后 11 d 死亡 4 只,死亡率为 16.67%。

2.2 各组大鼠创伤前后 MAP、HR 变化(表 1):各组大鼠 TBI 前后 MAP、HR 比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 TBI 前后 MAP、HR 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	MAP(mmHg)		HR(次/min)	
		TBI 前	TBI 后 1 d	TBI 前	TBI 后 1 d
对照组	8	81.4 $\pm$ 1.35	87.30 $\pm$ 5.04	340.35 $\pm$ 24.09	310.58 $\pm$ 73.66
轻型 TBI 组	8	75.68 $\pm$ 4.59	87.35 $\pm$ 2.93	368.35 $\pm$ 73.70	402.98 $\pm$ 77.90
重型 TBI 组	8	80.75 $\pm$ 4.65	82.00 $\pm$ 0.85	423.55 $\pm$ 62.87	485.85 $\pm$ 16.62
F 值		2.650	1.549	2.158	4.404
P 值		0.125	0.277	0.172	0.058

注:1mmHg $\approx$ 0.133 kPa

2.3 各组大鼠 TBI 后不同时间点血浆 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平的变化比较(表 2):重复测量的方差分析结果显示, TBI 后 1、7、21 d, 3 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 IFN- γ 水平比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),说明不同时间点组内细胞因子水平变化显著, TBI 后细胞因子水平随时间延长呈升高趋势。各组间 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),重型 TBI 组各炎症细胞因子水平均高于轻型 TBI 组和对照组。但时间与组间无交互作用,两者

的变化趋势不同 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间点血小板 mtDNA 关键基因甲基化水平的变化比较(表 3): 各实验组血小板 mtDNA 细胞色素氧化酶 mtco1、mtco2、mtco3 的甲基化水平分布差异很大, 在 3 组实验大鼠甲基化变化中, 仅在 TBI 后 1 d、7 d 轻型组和重型组血小板 mtDNA mtco1 的甲基化水平与对照组比较差异均有统计学意义, 且重型 TBI 组血小板 mtDNA mtco1 的甲基化水平明显低于轻型 TBI 组(均 $P<0.05$)。

表 3 各组大鼠不同时间点血小板 mtDNA 关键基因甲基化水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	血小板 mtDNA 关键基因的 甲基化水平(%)		
			mtco1	mtco2	mtco3
对照组	TBI 后 1 d	8	12.75±0.79	9.48±1.11	6.55±0.60
	TBI 后 7 d	8	6.31±0.58	7.99±1.50	4.26±0.43
	TBI 后 21 d	8	11.50±0.77	10.38±1.35	6.60±0.22
轻型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	10.61±0.41 ^a	8.04±0.96	5.51±0.33
	TBI 后 7 d	8	10.82±1.57 ^a	11.59±0.83	6.58±0.96
	TBI 后 21 d	8	10.57±0.92	9.86±0.91	6.13±0.36
重型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	7.99±0.39 ^{ab}	9.02±0.22	5.06±0.10
	TBI 后 7 d	8	6.89±0.84 ^b	9.66±0.50	5.92±0.26
	TBI 后 21 d	4	10.23±0.93	10.96±0.95	6.73±0.46

注: 与对照组同期比较, ^a $P<0.05$; 与轻型 TBI 组同期比较, ^b $P<0.05$

2.5 各组大鼠血小板 mtco1 基因不同位点甲基化水平的变化比较(表 4): 与对照组比较, TBI 后 1 d, 轻型 TBI 组和重型 TBI 组血小板 mtDNA mtco1 基因在 Pos.1、Pos.2 位点均呈去甲基化现象, 重型 TBI 组 mtco1 基因的去甲基化现象更明显(均 $P<0.05$)。TBI 后 7 d, 轻型组和重型组 mtco1 基因在 Pos.1 位点均呈过甲基化现象, Pos.1 水平较均对照组明显升高($P<0.05$); 3 组间 Pos.2 位点比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TBI 后 21 d, 轻型 TBI 组和重型

表 2 各组大鼠不同时间点 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IFN- γ (ng/L)
对照组	TBI 后 1 d	8	169.30±16.46	57.41±10.67	10.71±3.95	1 026.68±311.02
	TBI 后 7 d	8	176.65±28.97	47.75±9.87	10.22±3.76	1 116.39±159.85
	TBI 后 21 d	8	195.60±11.73	70.98±8.27	14.68±3.25	1 188.83±43.6
轻型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	226.39±35.10 ^a	84.56±13.28 ^a	21.56±4.22 ^a	1 482.61±128.86 ^a
	TBI 后 7 d	8	248.62±16.60 ^a	106.60±10.07 ^a	23.87±2.66 ^a	1 824.09±282.23 ^a
	TBI 后 21 d	8	285.51±24.59 ^a	113.38±9.74 ^a	28.37±3.31 ^a	1 917.16±212.69 ^a
重型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	265.28±11.95 ^{ab}	86.23±13.71 ^a	18.76±0.16 ^a	1 466.70±53.24 ^a
	TBI 后 7 d	8	322.92±8.62 ^{ab}	117.54±5.50 ^{ab}	27.07±1.44 ^{ab}	2 231.45±114.76 ^{ab}
	TBI 后 21 d	4	341.57±23.56 ^{ab}	114.83±8.39 ^{ab}	30.08±1.33 ^{ab}	2 210.63±48.16 ^{ab}

注: 与对照组同期比较, ^a $P<0.05$; 与轻型 TBI 组同期比较, ^b $P<0.05$

TBI 组 mtDNA 基因 mtco1 在 Pos.1、Pos.2 位点均呈去甲基化现象, 两组 Pos.1、Pos.2 水平均明显低于对照组(均 $P<0.05$); 但与轻型 TBI 组比较, 重型 TBI 组 mtco1 基因在 Pos.1 位点的过甲基化现象明显, Pos.2 位点的去甲基化现象明显。

表 4 各组大鼠血小板 mtDNA 基因 mtco1 不同位点甲基化水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	mtco1 (%)	
			Pos.1	Pos.2
对照组	TBI 后 1 d	8	5.37±0.67	20.13±2.73
	TBI 后 7 d	8	3.12±0.60	9.50±1.83
	TBI 后 21 d	8	5.09±0.38	17.95±4.49
轻型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	4.54±0.18 ^a	16.67±1.50 ^a
	TBI 后 7 d	8	4.81±0.87 ^a	16.82±5.48
	TBI 后 21 d	8	4.83±0.72 ^a	16.31±2.99 ^a
重型 TBI 组	TBI 后 1 d	8	4.07±0.23 ^{ab}	11.90±1.68 ^{ab}
	TBI 后 7 d	8	3.48±0.67 ^{ab}	10.29±2.69
	TBI 后 21 d	4	4.97±0.92 ^{ab}	15.50±3.10 ^{ab}

注: 与对照组同期比较, ^a $P<0.05$; 与轻型 TBI 组同期比较, ^b $P<0.05$

2.6 各组大鼠脑组织血小板 mtDNA 关键基因不同位点的甲基化水平比较(表 5): TBI 后 21 d, 与对照组比较, 轻型 TBI 组与重型 TBI 组脑组织 mtco1-Pos.1、mtco1-Pos.2 和 mtco2-Pos.1、mtco2-Pos.2 及 mtco3-Pos.3 均呈过甲基化表现, 上述指标水平均明显升高(均 $P<0.05$); 与轻型 TBI 组比较, 重型 TBI 组 mtco1-Pos.2 位点呈去甲基化表现, mtco3-Pos.3 呈过甲基化表现。3 组各时间点 mtco2-Pos.3、

表 5 TBI 后 21 d 各组大鼠脑组织血小板 mtDNA 关键基因不同位点的甲基化水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	mtco1 (%)		mtco2 (%)			mtco3 (%)		
		Pos.1	Pos.2	Pos.1	Pos.2	Pos.3	Pos.1	Pos.2	Pos.3
对照组	8	2.72±0.52	7.34±2.53	6.49±0.67	9.44±0.70	7.08±0.73	3.06±0.27	2.26±0.14	4.36±0.14
轻型 TBI 组	8	4.30±0.50	13.55±1.54	8.40±0.82	12.05±2.09	8.65±1.65	4.02±0.41	2.89±0.33	5.56±0.98
重型 TBI 组	4	3.58±0.93	8.45±1.55	9.14±1.87	13.37±2.54	9.88±1.94	4.69±1.43	3.87±1.46	6.98±1.52
F 值		4.947	10.322	4.857	5.082	3.374	3.520	3.486	6.304
P 值		0.036	0.005	0.037	0.033	0.081	0.074	0.076	0.019

mtco3-Pos.1 和 mtco3-Pos.2 比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.7 相关性分析:相关性分析显示, MAP 与 TNF- α 、IL-6 呈正相关(r 值分别 0.236 和 0.272, 均 $P < 0.05$); mtco1 与 MAP、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 呈负相关(r 值分别为 -0.273、-0.330、-0.330、-0.352, 均 $P < 0.05$), 但两两变量的相关性均较弱。

3 讨论

本研究通过测定血浆 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 水平和血浆血小板 mtDNA、脑组织基因组 DNA 3 个区域(mtco1、mtco2 和 mtco3)中 CpG 位点的甲基化水平; 并对 TBI 暴露后炎症因子、DNA 甲基化率、血压 3 者的相关性进行了分析, 以期探讨 TBI 对远期高血压不良结局影响的潜在机制。

以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学变化的作用在 TBI 相关病理损伤中被广泛研究。Haghighi 等^[17]通过建立 TBI 暴露后神经元甲基化分析谱, 发现脑创伤后发生甲基化水平改变的基因位点与细胞的死亡、生长、增殖和神经系统发育有关。针对创伤暴露后观察到的星形胶质细胞持续性增生现象, 有学者认为是由胞质 DNA 甲基化转移酶-1(DNA methylation transferase-1, DNMT-1) 减少后信号转导与转录激活因子结合原件去甲基化引发的^[18]。DNMT-1 的免疫反应性改变对神经胶质和神经元 DNA 甲基化状态的改变被认为在创伤暴露的表观遗传学机制中起核心作用^[15]。本研究显示, TBI 后血浆 mtco1 基因在 Pos.1、Pos.2 位点发生去甲基化现象, 而脑组织 mtDNA 基因不同位点呈现过甲基化现象, 且 mtco1、mtco2、mtco3 的不同位点均发生改变, 以重型 TBI 组的变化更显著。说明血小板 mtDNA 关键基因的甲基化在血浆及脑组织中有组织特异性。

在两项针对 TBI 5 年预后的研究中均报告了 TBI 患者高血压的患病率显著增高^[7-8], 然而均未对潜在的发病机制进行分析。有研究显示, TBI 大鼠脑皮质水通道蛋白 1(aquaporin1, AQP1) 的 mRNA 和蛋白表达水平均上调, 可能参与了 TBI 后脑水肿的病理生理过程^[19]。表明高血压发病率的升高与 DNA 甲基化率的改变有关。mtDNA 的低甲基化率已被证实与心血管疾病直接相关^[13], α -内收蛋白基因启动子的低甲基化也增加了原发性高血压发病的风险^[20]; 胎儿期肾脏 DNA 的高甲基化与雄性小鼠成年后应激性高血压的发病有关^[21]。因此,

本研究于 TBI 后 1、7、21 d 对大鼠进行采血并检测血小板 mtDNA 的甲基化水平。结果显示, 与对照组比较, TBI 后 1 d 和后 21 d, 轻型和重型 TBI 组 mtco1 基因在 Pos.1、Pos.2 位点均呈去甲基化现象, 以重型 TBI 组 mtco1-Pos.2 基因去甲基化更明显。相关性分析显示, mtco1 甲基化率与 MAP 呈明显负相关。

一项 Meta 分析显示, 创伤暴露人群血中促炎细胞因子及 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP) 显著增加, 创伤暴露与 CRP、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平呈正相关性^[22]。研究表明, 成人颅脑外伤后动态监测 CRP/前白蛋白比值, 对患者伤后病情进展有预测价值^[23]。炎症因子水平和高血压也密切相关, 炎症被认为既是高血压发生的原因也是高血压导致的结果^[24]。尿酸激活肾脏炎症小体/IL-1 β 信号通路引发肾性高血压^[25], 同时 IL-1 β 激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt) 途径产生 IL-6 协同升高血压^[26]。Alexander 等^[27]对血压健康人群和高血压患者的单核细胞进行了 mRNA 测序, 发现高血压上调表达的 60 个基因中有 21 个与 IL-1 β 通路相关。高血压患者体内单核细胞呈现出一种重分布状态, 即 CD14⁺/CD16⁺ 的中间表型单核细胞比例升高, 这种单核细胞在 mRNA 水平上调 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-23 的表达^[24]。本研究选择 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 用于探讨由 TBI 引发的炎症是否会对血压产生影响, 并分析细胞因子水平与 MAP 的相关性, 结果显示, MAP 与血浆 TNF- α 、IL-6 水平呈正相关。

DNA 甲基化等表观遗传学改变在骨关节炎^[28]、类风湿性关节炎^[29]及炎症的产生发展过程中相互作用。血小板是炎症发生中重要的介质^[22], 可作用于循环中的内皮细胞和免疫细胞, 调节炎症刺激和血管损伤。血小板能够激活内皮细胞, 使其渗透性增加并介导白细胞运输到发炎的内皮^[30-32]。推测 TBI 暴露后大量炎症因子的释放可能影响血小板的功能。因此本研究进一步探讨了血小板 mtDNA 甲基化水平与炎症的关系, 结果显示, mtco1 甲基化水平与血浆 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 均呈负相关。

本研究创新性使用表观遗传学手段衡量血小板功能, 并将 mtDNA 甲基化率作为中间因素, 探讨 TBI 后炎症细胞因子水平增加对 mtDNA 甲基化的影响以及血小板 mtDNA 甲基化对高血压不良健康

结局的影响。然而本研究仅观察到了 TBI 后炎症通过降低 mtDNA 甲基化率对血压产生正性影响,并未观察到大鼠高血压的出现。这可能是由于本研究观察时间设置不当。在环境污染物六氯苯诱发的高血压大鼠模型中,大鼠高血压在 35 d 后显著增高^[31];另一项对大鼠饮食对 MAP 影响的实验则持续了 20 周^[33]。而本研究观察了 21 d,时间相对较短,存在最终健康结局出现之前结束实验的可能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hsia RY, Markowitz AJ, Lin F, et al. Ten-year trends in traumatic brain injury: a retrospective cohort study of California emergency department and hospital revisits and readmissions [J]. *BMJ Open*, 2018, 8 (12): e022297. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-022297.
- [2] Coronado VG, McGuire LC, Sarmiento K, et al. Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995–2009 [J]. *J Safety Res*, 2012, 43 (4): 299–307. DOI: 10.1016/j.jsr.2012.08.011.
- [3] Marin JR, Weaver MD, Yealy DM, et al. Trends in visits for traumatic brain injury to emergency departments in the United States [J]. *JAMA*, 2014, 311 (18): 1917–1919. DOI: 10.1001/jama.2014.3979.
- [4] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16 (12): 987–1048. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30371-X.
- [5] Wilson L, Stewart W, Dams-O'Connor K, et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16 (10): 813–825. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30279-X.
- [6] McKee AC, Abdolmohammadi B, Stein TD. The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy [J]. *Handb Clin Neurol*, 2018, 158: 297–307. DOI: 10.1016/B978-0-444-63954-7.00028-8.
- [7] Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, et al. Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease [J]. *Ann Neurol*, 2015, 77 (6): 987–995. DOI: 10.1002/ana.24396.
- [8] Chen YH, Kang JH, Lin HC. Patients with traumatic brain injury: population-based study suggests increased risk of stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42 (10): 2733–2739. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.620112.
- [9] Rider CF, Carlsten C. Air pollution and DNA methylation: effects of exposure in humans [J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11 (1): 131. DOI: 10.1186/s13148-019-0713-2.
- [10] Meehan RR, Thomson JP, Lentini A, et al. DNA methylation as a genomic marker of exposure to chemical and environmental agents [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 45: 48–56. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.02.006.
- [11] Thomas PD, Kahn M. Kat3 coactivators in somatic stem cells and cancer stem cells: biological roles, evolution, and pharmacologic manipulation [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32 (1): 61–81. DOI: 10.1007/s10565-016-9318-0.
- [12] Kato N, Loh M, Takeuchi F, et al. Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation [J]. *Nat Genet*, 2015, 47 (11): 1282–1293. DOI: 10.1038/ng.3405.
- [13] Gonzalez-Jaramillo V, Portilla-Fernandez E, Glisic M, et al. The role of DNA methylation and histone modifications in blood pressure: a systematic review [J]. *J Hum Hypertens*, 2019, 33 (10): 703–715. DOI: 10.1038/s41371-019-0218-7.
- [14] McDonald RP, Horsburgh KJ, Graham DI, et al. Mitochondrial DNA deletions in acute brain injury [J]. *Neuroreport*, 1999, 10 (9): 1875–1878. DOI: 10.1097/00001756-199906230-00014.
- [15] Mateen BA, Hill CS, Biddie SC, et al. DNA Methylation: basic biology and application to traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34 (16): 2379–2388. DOI: 10.1089/neu.2017.5007.
- [16] Schober ME, Requena DF, Block B, et al. Erythropoietin improved cognitive function and decreased hippocampal caspase activity in rat pups after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31 (4): 358–369. DOI: 10.1089/neu.2013.2922.
- [17] Haghighi F, Ge Y, Chen S, et al. Neuronal DNA methylation profiling of blast-related traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32 (16): 1200–1209. DOI: 10.1089/neu.2014.3640.
- [18] Fan G, Martinowich K, Chin MH, et al. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK–STAT signaling [J]. *Development*, 2005, 132 (15): 3345–3356. DOI: 10.1242/dev.01912.
- [19] 陈先俊, 王迪芬, 刘颖, 等. 富氢液对创伤性颅脑损伤大鼠大脑皮质水通道蛋白 1 表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (5): 460–464. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.016.
- [20] Bayoumy NMK, El-Shabrawi MM, Leheta OF, et al. α -Adducin gene promoter DNA methylation and the risk of essential hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2017, 39 (8): 764–768. DOI: 10.1080/10641963.2017.1324481.
- [21] DuPriest E, Hebert J, Morita M, et al. Fetal renal DNA methylation and developmental programming of stress-induced hypertension in growth-restricted male mice [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27 (5): 1110–1120. DOI: 10.1007/s43032-019-00121-5.
- [22] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2003, 107 (3): 499–511. DOI: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45.
- [23] 徐文鹏, 葛梓, 曹隽, 等. 血清 C-反应蛋白与前白蛋白比值在颅脑外伤患者中的测定意义 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (8): 965–969. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200428-00347.
- [24] Xiao L, Harrison DG. Inflammation in hypertension [J]. *Can J Cardiol*, 2020, 36 (5): 635–647. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.01.013.
- [25] Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173 (4): 752–765. DOI: 10.1111/bph.13230.
- [26] Cahill CM, Rogers JT. Interleukin (IL) 1 beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha pathway targeting activator protein-1 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (38): 25900–25912. DOI: 10.1074/jbc.M707692200.
- [27] Alexander MR, Norlander AE, Elijovich F, et al. Human monocyte transcriptional profiling identifies IL-18 receptor accessory protein and lactoferrin as novel immune targets in hypertension [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176 (12): 2015–2027. DOI: 10.1111/bph.14364.
- [28] Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, et al. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis [J]. *Connect Tissue Res*, 2017, 58 (1): 49–63. DOI: 10.1080/03008207.2016.1208655.
- [29] Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2019, 8 (9): DOI: 10.3390/cells8090953.
- [30] Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, et al. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122 (2): 337–351. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795.
- [31] Castilla R, Asuaje A, Riviere S, et al. Environmental pollutant hexachlorobenzene induces hypertension in a rat model [J]. *Chemosphere*, 2018, 195: 576–584. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.117.
- [32] 郑贵军, 武子霞, 李银平, 等. 脓毒症大鼠血小板膜糖蛋白的表达变化及血必净的干预作用 [J]. *中国危重病急救医学*, 2008, 20 (12): 758–760. DOI: 10.3321/j.issn:1003-0603.2008.12.020.
- [33] Gamede M, Mabuza L, Ngubane P, et al. Plant-derived oleanolic acid (OA) ameliorates risk factors of cardiovascular diseases in a diet-induced pre-diabetic rat model: effects on selected cardiovascular risk factors [J]. *Molecules*, 2019, 24 (2): 340. DOI: 10.3390/molecules24020340.

(收稿日期: 2022-01-27)