文章编号:1000-5404(2013)02-0153-04

论著

癫痫儿童外周血 p-糖蛋白水平在预测儿童抗癫痫药物疗效中的作用

孔 敏,蒋 莉,洪思琪,胡 君,叶园珍 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院神经内科)

[摘要] **目的** 检测癫痫儿童外周血 p-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达的动态变化,探讨其与癫痫耐药的关系及在预测儿童抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)疗效中的价值。**方法** 选取难治性癫痫患儿30例、初诊癫痫患儿40例及健康体检儿童30例,分别于入组前和治疗后6、12、18个月,用流式细胞仪检测 P-gp 的表达,分析 P-gp 表达水平与癫痫发作频率和应用 AEDs 抗癫痫疗效的关系。**结果** 难治性癫痫组、初诊癫痫组在各个观察时间点 P-gp 表达较健康对照组均显著增高($P<0.01$);难治性癫痫组各个观察时间点 P-gp 表达较初诊癫痫组显著增高($P<0.05$);难治性癫痫组各个观察时间点 P-gp 的表达比较差异有显著性($P<0.01$,$P<0.05$),初诊癫痫组各个观察时间点 P-gp 的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。难治性癫痫组入组前 P-gp 表达阳性19例中16例(84.2%)经换药或加药治疗无效,表达阴性11例中3例(27.3%)无效,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$);初诊癫痫组入组前 P-gp 表达阳性13例中9例(69.2%)转化为难治性癫痫,表达阴性27例中2例(7.4%)转化为难治性癫痫,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。发作频繁患儿 P-gp 水平明显高于发作较少患儿($P<0.01$);使用4种 AEDs 患儿 P-gp 水平明显高于使用2种及3种 AEDs($P<0.01$)。**结论** 癫痫患儿外周血 P-gp 表达升高,难治性癫痫升高更明显,可能是临床耐药的原因,可作为评价抗癫痫药物疗效的预测指标。

[关键词] 癫痫;抗癫痫药物;p-糖蛋白;外周血;儿童
[中图法分类号] R446.112;R742.1;R969.4 [文献标志码] A

Role of peripheral P-glycoprotein in predicting efficacy of antiepileptic drugs in epilepsy children

Kong Min, Jiang Li, Hong Siqi, Hu Jun, Ye Yuanzhen (Department of Pediatric Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the dynamic changes of the expression of P-glycoprotein (P-gp) in peripheral blood in children with epilepsy, and to explore the relationship between P-gp and epileptic resistance and its value of predicting efficacy of antiepileptic drugs (AEDs). **Methods** A total of 70 inpatients and outpatients in our department from January 2011 to July 2012 were subjected in this study. These children were divided into refractory epilepsy (group A, $n=30$, age ranging from 13 months to 15 years), and newly diagnosed epilepsy (group B, $n=40$, age ranging from 2 months to 14 years). Another 30 sex- and age-matched healthy children (group C) served as normal control. The expression of P-gp in peripheral blood was detected by flow cytometry before treatment, and in 6, 12 and 18 months after treatment, respectively. The expression of P-gp and its relationship with epileptic frequency and therapeutic effect of AEDs were analyzed. **Results** The expression of P-gp in group A and group B at every time point were all significantly higher than that in group C ($P<0.01$), and that in group A were all significantly higher than that in group B ($P<0.01$). Significant difference was also found in the expression of the P-gp in group A at difference time points ($P<0.01$, $P<0.05$), but was not found in group B. Among the 19 cases with positive P-gp before treatment in group A, 16 out of them (84.2%) were invalid after changing or adding AEDs, but only 3 out of 11 cases (27.3%) with no P-gp expression became invalid, and there was a significant difference between them ($P<0.01$). In group B, 9 out of 13 cases (69.2%) with P-gp expression before treatment became intractable, but only 2 out of 27 (7.4%) with no P-gp expression became intractable, there was a significant difference between them ($P<$

[基金项目] 重庆市卫生局资助项目(2010-2-170)
[通信作者] 蒋 莉,电话:(023)63621892, E-mail:dr_jiangli@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121106.1905.020.html(2012-11-06)

0.01). P-gp expression was stronger in the patients with high frequent epilepsy than those with low frequency ($P<0.01$). P-gp expression was also stronger in patients administered with 4 kinds of AEDs than those with 2 or 3 kinds of AEDs ($P<0.01$). **Conclusion** The high level of P-gp increase in peripheral blood of children with epilepsy predicts refractory epilepsy. The increased expression of P-gp may play an important role in clinical drug resistance. It also can be used as a predictable marker of evaluating efficacy of AEDs.

[**Key words**] epilepsy; antiepileptic drugs; P-glycoprotein; peripheral blood; children

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-170). Corresponding author: Jiang Li, Tel: 86-23-63621892, E-mail: dr_jiangli@126.com

与成人一样,20%~30%儿童癫痫对正规抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)治疗无效呈难治性癫痫(耐药性癫痫)。遗传背景是造成机体对抗癫痫药物敏感性差异的最重要影响因素,目前研究[1-2]认为多药耐药基因1(multidrug resistance gene 1, MDR1)编码的p-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)过度表达与耐药性癫痫密切相关。目前关于预测儿童难治性癫痫的客观指标报道较少,我们通过长期随访40例初诊癫痫患儿与30例难治性癫痫患儿,观察患儿外周血P-gp的动态变化,探讨癫痫耐药与P-gp之间的关系,预测儿童AEDs的疗效,以期指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2011年1月至2012年7月来我院神经内科门诊和病房就诊的癫痫患儿70例,其中难治性癫痫组30例,均符合我国儿童难治性癫痫的诊断标准[3]:已正确诊断的癫痫患儿,应用正规的AEDs(2种以上)合理治疗6个月到1年,发作仍未能减少50%;初诊癫痫组40例,均有典型癫痫发作史及脑电图痫性放电表现,未用AEDs治疗。对照组30例,为同期无癫痫和其他重大疾病的健康体检儿童。各组儿童具体资料见表1。本研究通过重庆医科大学附属儿童伦理委员会审核,患儿家属均知情同意。

1.2 实验方法

P-gp的检测参照国际通用方法[4],抽取外周静脉血1 mL(EDTA抗凝),取100 μL置流式管,分别加入荧光标记鼠抗人单克隆抗体P-gp-PE(美国eBioscience公司)、IgG2a-PE(北京四正柏生物科技公司)阴性对照20 μL,混匀后室温避光孵育20 min,加入红细胞裂解液2 mL静止裂解10 min,1 000 r/min离心5 min弃上清液,加入2 mL PBS,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入0.5 mL PBS混匀,应用FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)进行测定,收集10 000个白细胞,用CELL Quest统计软件分析计算P-gp阳性细胞表达率(>0.1%为阳性)。

1.3 治疗方法和疗效判定

在首次完成各组儿童外周血P-gp检测后,初诊癫痫组根据患儿年龄、发作类型分别予以AEDs治疗,根据治疗效果调整用药,40例患儿均随访12个月,其中31例患儿随访18个月;难治性癫痫组改用未用过的AEDs或在原治疗基础上添加新的AEDs治疗,30例患儿均随访12个月,其中22例随访18个月。所有患儿每6个月检测1次P-gp。AEDs治疗效果判断为:癫痫发作频率减少≥50%为有效,<50%为无效。

1.4 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用完全随机设计的单因素方差分析(各组间比较)和LSD-t检验(组间的两两比较)进行检验分析,率的比较用χ^2检验。

表1 3组儿童临床资料特点

组别	n	男/女	年龄(中位年龄)	病因	发作类型	发作次数
难治性癫痫组	30	19/11	13个月至15岁(6岁)	症状性:20例 隐源性:10例	全身性强直和(或)阵挛发作:7例 局灶性发作和(或)继发全身性发作:13例 肌阵挛发作:6例 Lennox-Gastaut综合征:1例 West综合征:3例	1年内9次至1 d内11次 <1次/月:15例 1~4次/月:7例 >4次/月:6例 >1次/d:2例
初诊癫痫组	40	24/16	2个月至14岁(5岁8个月)	症状性:25例 隐源性:15例	全身性强直和(或)阵挛发作:10例 局灶性发作和(或)继发全身性发作:18例 肌阵挛发作:7例 West综合征:5例	仅1次至1 d内8次1次:4例 <1次/月:25例 1~4次/月:6例 >4次/月:4例 >1次/d:1例
健康对照组	30	15/15	5个月至12岁(5岁9个月)	–	–	–

2 结果

2.1 3组儿童外周血P-gp的表达

难治性癫痫组、初诊癫痫组入组前和治疗后6、12、18个月4个观察时间点外周血P-gp水平与健康对照组同时间点比较显著增高($P<0.01$),难治性癫痫组4个观察时间点P-gp水平与初诊癫痫组同时间点比较显著增高($P<0.01$),难治性癫痫组4个观察时间点P-gp水平两两比较治疗18个月较入组前显著增高($P<0.01$),治疗12个月较入组前及治疗6个月、治疗18个月较治疗6个月及12个月均增高($P<0.05$),初诊癫痫组4个时间点P-gp水平两两比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 3组儿童不同时间点外周血P-gp阳性细胞表达率(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	入组前	治疗6个月	治疗12个月	治疗18个月	F值	P值
难治性癫痫组	30	10.19 ± 2.06^{ab}	12.75 ± 2.71^{ab}	15.15 ± 3.67^{ab}	17.77 ± 4.19^{ab} ($n=22$)	4.87	<0.01
初诊癫痫组	40	1.31 ± 0.44^{a}	1.38 ± 0.28^{a}	1.49 ± 0.23^{a}	1.62 ± 0.32^{a} ($n=31$)	0.82	>0.05
健康对照组	30	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.28	>0.05
F值		19.79	75.16	78.52	81.59		
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		

a:$P<0.01$,与健康对照组同时间点比较;b:$P<0.01$,与初诊癫痫组同时间点比较

2.2 癫痫患儿外周血P-gp表达与临床疗效的关系

随访12个月,难治性癫痫组入组前P-gp表达阳性19例中16例(84.2%)经换药或加药治疗无效,3例(15.8%)治疗有效;表达阴性11例中3例(27.3%)无效,8例(72.7%)有效,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=8.22$,$P<0.01$);初诊癫痫组入组前P-gp表达阳性13例中9例(69.2%)转化为难治性癫痫,4例(30.8%)治疗有效;表达阴性27例中2例(7.4%)转化为难治性癫痫,25例(92.6%)治疗有效,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=17.07$,$P<0.01$)。

2.3 不同发作频率难治性癫痫组患儿外周血P-gp水平

发作频繁患儿外周血P-gp水平明显高于发作较少患儿,差异有统计学意义($P<0.01$),见表3。

表3 不同发作次数难治性癫痫组患儿外周血P-gp阳性细胞表达率(%,$\bar{x}\pm s$)

癫痫发作	12个月随访		18个月随访	
	n	P-gp	n	P-gp
<1次/月	12	10.05 ± 0.71^{ab}	8	10.40 ± 0.49^{ab}
1~4次/月	9	13.32 ± 0.60^{a}	7	13.88 ± 0.72^{a}
>4次/月	6	17.73 ± 1.06	4	18.59 ± 1.45
>1次/d	3	19.22 ± 1.70	3	20.25 ± 2.32

a:$P<0.01$,与>4次/月及>1次/d比较;b:$P<0.01$,与1~4次/月比较

2.4 使用不同AEDs种数难治性癫痫组患儿外周血P-gp水平

使用AEDs种数越多,患儿外周血P-gp水平越高,差异有统计学意义($P<0.01$),见表4。

表4 不同用药情况难治性癫痫组患儿外周血P-gp阳性细胞表达率(%,$\bar{x}\pm s$)

AEDs种数	12个月随访		18个月随访	
	n	P-gp	n	P-gp
2种	5	10.44 ± 0.84	3	10.98 ± 1.06
3种	14	12.79 ± 0.98	11	13.40 ± 0.94
4种	11	18.01 ± 1.46^{a}	8	19.03 ± 1.93^{a}

a:$P<0.01$,与同时间点使用2种或3种AEDs比较

3 讨论

癫痫耐药机制非常复杂,至今尚未完全明确,被认为是多种机制、多种因素、多种途径、多个环节共同作用的结果[5]。目前研究重点集中在多药耐药机制上,并提出多药转运蛋白学说(multidrug transporter hypothesis),认为难治性癫痫患者脑组织病灶局灶区域存在MDR1编码的P-gp高表达,进而使病灶区域抗癫痫药物浓度过低,导致耐药[6]。

人类MDR基因家族由MDR1、MDR2组成,MDR1起主导作用,其编码产物为相对分子质量为170×10^3的P-gp。P-gp是一种糖基化和磷酸化的能量依赖性跨膜外向转运糖蛋白,在生理状态下参与药物的吸收、分布和代谢,保护正常组织免受药物或毒物的侵害;病理状态下表达过度,可将达到或进入细胞内的多种药物泵出,交叉抵抗结构和作用机制不相关的亲脂类药物,使细胞内药物浓度下降,产生耐药[7]。研究[8]证实大部分AEDs具有亲脂性,是P-gp的底物。目前MDR1和P-gp与癫痫耐药的关系备受关注,研究重点主要在成人脑组织。Tisher等[9]首先发现难治性癫痫患者脑组织MDR1高表达,Kannan等[10]研究发现难治性癫痫患者活检标本病灶周围组织细胞P-gp较邻近正常组织明显升高,李建等[11]研究亦与上述结果一致。但仅少数难治性癫痫患儿适合手术[12],脑组织取材困难,重复取材更是不可能。王学峰等[13]研究发现成人外周白细胞中P-gp表达可同步反映其脑组织中P-gp表达水平,且外周血取材方便、可重复性强,更适合儿童临床研究、指导诊治。耿丽娟等[14]研究发现婴儿痉挛症患儿外周血P-gp表达增高。

本研究通过对患儿外周血标本在不同时间点进行P-gp检测,动态观察其变化,发现P-gp在初诊癫痫组、难治性癫痫组和正常对照组儿童均有表达,说明MDR1基因是人类体内正常基因,经诱发因子刺激活化,细胞内mRNA水平升高,致细胞膜P-gp表达亦同步升高。入组前,与健康对照组比较,初诊癫痫组40例中有13例P-gp表达阳性,说明某些癫痫患儿可能存在先天耐药,亦说明痫性发作可能是诱导P-gp表达水平升高的刺激因子,Kwan等[15]认为癫痫耐药的

形成与药物治疗前发作的次数与频率直接相关;难治性癫痫组30例中有19例P-gp表达阳性,且表达水平明显升高,说明P-gp参与了耐药的形成,反复的痫性发作和(或)AEDs的长期使用亦可能是导致其升高的后天因素,景欣悦等[16]认为痫性发作和AEDs诱导协同上调大鼠脑组织P-gp表达,导致耐药。

在治疗过程中我们发现,初诊癫痫组13例P-gp表达阳性者,日后转化为难治性癫痫9例,其中8例为症状性癫痫,年龄<1岁4例,提示初诊的幼年症状性癫痫转化为难治性癫痫的可能性大,外周血P-gp的表达可作为其预测预后的客观指标;13例中另外4例经治疗,P-gp的表达水平下降,患儿临床发作得到有效控制,提示治疗过程中P-gp表达逆转是预后好转的迹象,亦说明单纯AEDs的应用可能不会诱导P-gp表达,Schmidt等[17]发现难治性癫痫患者P-gp表达增高是痫性发作诱导而非AEDs作用所致;27例初诊癫痫患儿入组前P-gp表达阴性者,治疗过程中有2例出现逐渐上升的趋势,临床发作控制亦不理想,提示P-gp表达水平的逐渐升高是预后不良的表现。我们还发现,难治性癫痫组19例P-gp表达阳性者,经换药或加药治疗,16例患儿临床仍有频繁发作,治疗无效,且随病程延长、发作次数及AEDs种类增多,P-gp表达水平逐渐升高;11例P-gp表达阴性者,经换药或加药治疗,3例治疗无效,且这3例患儿P-gp表达水平均有升高趋势,说明难治性癫痫患儿P-gp表达阳性治疗无效率明显高于P-gp表达阴性者,3例治疗无效亦说明多药耐药机制只是癫痫耐药的机制之一,有其他机制参与其中,如药物靶点的改变[18]、海马硬化致神经网络和环路的重组[19]等。

综上所述,癫痫患儿外周血P-gp的高表达与癫痫耐药密切相关,反复痫性发作和(或)长期AEDs应用可能是其表达增高的诱发因素,可作为评估癫痫预后的客观指标。定时定量检测外周血P-gp的动态变化,可评估AEDs的疗效,指导用药,尽量减少难治性癫痫的可能:如发病即有高表达,提示内源性耐药,可能需要早期足量、联合用药;如治疗过程中出现高表达,提示可能存在获得性耐药,需要换药,联合或加用P-gp抑制剂;如治疗过程中表达下降且癫痫发作控制,提示可以适时减量,减轻抗癫痫药物的副作用,改善患儿预后。

参考文献:

[1] Tate S K, Sisodiya S M. Multidrug resistance in epilepsy: a pharmacogenomic update[J]. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(10): 1441-1449.

[2] Hughes J R. One of the hottest topics in epileptology: ABC proteins. Their inhibition may be the future for patients with intractable seizures[J]. Neurol Res, 2008, 30(9): 920-925.

[3] 吴家骅. 难治性癫痫的诊断与治疗[J]. 中华儿科杂志,2005, 43(5): 386-389.

[4] Aronica E, Gorter J A, Ramkema M, *et al*. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsia, 2004, 45(5): 441-451.

[5] Baltes S, Gastens A M, Fedrowitz M, *et al*. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein[J]. Neuropharmacology, 2007, 52(2): 333-346.

[6] Bankstahl J P, Hoffmann K, Bethmann K, *et al*. Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain[J]. Neuropharmacology, 2008, 54(6): 1006-1016.

[7] Choong E, Dobrinas M, Carrupt P A, *et al*. The permeability P-glycoprotein: a focus on enantioselectivity and brain distribution[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010, 6(8): 953-965.

[8] West C L, Mealey K L. Assessment of antiepileptic drugs as substrates for canine P-glycoprotein[J]. Am J Vet Res, 2007, 68(10): 1106-1110.

[9] Tisher D M, Weinberg K J, Hinton D R, *et al*. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy[J]. Epilepsia, 1995, 36(1): 1-6.

[10] Kannan P, John C, Zoghbi S S, *et al*. Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and *in vivo* applications[J]. Clin Pharmacol Ther, 2009, 86(4): 368-377.

[11] 李建, 姜德春, 张国君, 等. 难治性癫痫患者脑组织内致痫灶与其周围组织P糖蛋白表达量的比较[J]. 中国药物依赖性杂志, 2008, 17(3): 182-186.

[12] Jobst B C. Treatment algorithms in refractory partial epilepsy[J]. Epilepsia, 2009, 50(Suppl 8): 51-56.

[13] 王学峰, 吕洋, 黄蕾, 等. 癫痫病人血细胞多药耐受基因表达产物细胞膜糖蛋白的检测[J]. 中华神经科杂志, 2002, 35(6): 348-350.

[14] 耿丽娟, 戴园园, 袁宝强, 等. 抗癫痫药对婴儿痉挛症患儿外周血P-糖蛋白170表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2012, 27(2): 127-128.

[15] Kwan P, Brodie M J. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy[J]. Epilepsia, 2005, 46(2): 224-235.

[16] 景欣悦,刘晓东. 癫痫发作和药物诱导协同上调癫痫模型大鼠脑内P-糖蛋白的功能和表达[C]. 武汉: 第九届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集, 2009: 157-163.

[17] Schmidt D, Loscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms[J]. Epilepsia, 2005, 46(6): 858-877.

[18] Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy[J]. Epilepsia, 2006, 47(11): 1761-1774.

[19] Lasson W. Mechanisms of drug resistance in epilepsy[J]. Przegl Lek, 2006, 63(11): 1218-1220.

(**收稿**:2012-08-17;**修回**:2012-10-23)

(编辑 王 红)