

药物基因组学在难治性癫痫早期诊断和治疗中的应用进展

冯海燕¹, 李筱瑜² 综述 郑乃智² 审校

1. 潍坊医学院, 山东省潍坊市 261053

2. 青岛大学医学院附属青岛市立医院神经科, 山东省青岛市 266011

摘要: 难治性癫痫早期诊断与治疗均存在较大困难。药物基因组学从基因水平揭示个体差异, 通过检测 P450 酶相关基因、ABCB1 基因多态性协助难治性癫痫诊断, 通过检测抗癫痫药相关代谢酶基因多态性指导癫痫治疗, 通过检测 HLA-B*1502 基因预测 Stevens-Johnson 综合征 (SJS)、中毒性表皮坏死松解型药疹等抗癫痫药物严重不良反应。

关键词: 药物基因组学; 难治性癫痫; 诊断; 治疗

癫痫 (epilepsy) 是严重危害人类健康的中枢神经系统常见病和多发病。我国流行病学资料显示, 癫痫患病率 7.0‰, 年发病率为 28.8/10 万人口^[1]。目前国内外对癫痫的病因及遗传、生化、电生理、免疫学发病机制和治疗等诸多方面已进行了较为深入的研究。遗传因素在癫痫发病及治疗中的作用研究得到日渐重视。

尽管癫痫诊断技术提高、早期干预增加和新型抗癫痫药物集中应用于临床, 但研究发现, 癫痫总体治疗和预后没有显著改善。原因是部分癫痫患者 (约占 30%) 对 2 或 3 种一线抗癫痫药物无治疗反应, 这些患者将发展为难治性癫痫 (refractory epilepsy, RE)^[2]。RE 发病机制不清楚, 其形成与癫痫病因、癫痫发作及不恰当的药物治疗等因素有关。

RE 的确切定义学术界尚未达成共识, 主要考虑如下 3 个方面: 曾使用过抗癫痫药物 (anti-epilepsy drugs, AEDs) 种类、癫痫的发作频率以及未能达到有效控制的时间。所谓难治性是指: 对 2 种或 2 种以上一线推荐、可耐受的 AEDs, 采用正确的使用方法、达到有效血药浓度后仍无明显反应的癫痫; 癫痫发作的最低频率或缓解期的最长时间不为患者所接受。国内曾将癫痫发作超过 4 次/月, 癫痫未能控制时间持续 2 年或 2 年以上定义为未能有效控制的标准, 现认为此标准应个体化并强调其对生活质量的影响; RE 诊断标准及治疗方案均应强调患者的个体差异, 遗传因素是产生个体差异的原因之一。

人类基因组学的发展将为 AEDs 的个体化用药提供一种新的指导方案, 它将使我们在基因层面对患者的个体差异有更深入的了解, 从而预测难治性癫痫发生率、某 AEDs 对特定患者的疗效及发生严重不良反应可能性, 使临床诊断、治疗更有针对性, 在癫痫研究中具有极大临床价值。

药物基因组学 (pharmacogenomics) 是分子药理学和功能基因组学结合的产物。从基因水平揭示个体差异的遗传特征、鉴别基因序列的差异, 将基因测序、统计遗传学、基因表达分析等用于药物研究、不良反应监测与合理应用。RE 的病因复杂, 病理改变多样, 随着人类基因图谱和测序的完成, 药物基因组学对于明确 RE 的发病机制及早期诊断、治疗具有十分重要的意义。

1 药物基因组学与 RE 的诊断

传统意义上, RE 根据病史、体格检查及辅助检查进行诊断, Schmidt 分级法将 RE 分为 7 级: 0 级为仅用 1 种非一线药物; I 级为使用 1 种一线药物, 但低于推荐剂量; II 级为 1 种一线药物的剂量在推荐范围内, 但血浆浓度未达到有效酶治疗浓度; III 级为使用 1 种一线药物并血药浓度在有效治疗范围; IV 级为 1 种一线药物达到最大耐受剂量; V 级为使用 1 种以上一线药物并达到最大耐受剂量; VI 级为使用 1 种以上一线药物及数种二线药物, 达到最大耐受剂量。其中 0-II 级为治疗不当所致的医源性 RE, 分级越高, 越趋向真正的 RE^[3]。可见 AEDs 的治疗效果对 RE 的诊断至关重要。

基金项目: 山东省青岛市 2012 年度医药科研指导计划 (2012-WSZD033)

收稿日期: 2014-02-17; 修回日期: 2014-05-27

作者简介: 冯海燕 (1979-), 女, 硕士在读, 主要从事癫痫方面的研究。

通讯作者: 郑乃智 (1963-), 男, 研究生导师, 主任医师, 医学博士, 主要从事癫痫方面研究。E-mail: zhengnaizhi2013@126.com。

AEDs 在体内的代谢主要由细胞色素氧化酶 P450 (CYP450) 酶系以及尿苷三磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 介导。其中 P450 酶的基因多态性是影响 AEDs 体内代谢及治疗效果的重要因素。故通过检测这些基因的存在, 将对 RE 诊断有益。如 CYP3A、CYP2C19、CYP2C9、CYP1A6、UGT1A6 等基因, 其产物分别 CYP3A 酶、CYP2C19 酶、CYP2C9 酶、CYP1A6 酶、UGT1A6 酶, 参与 AEDs 的羟化反应或葡萄糖醛酸途径^[4]。

由于 P450 酶具有遗传多态性, 使药物代谢酶存在着种族和个体差异。在 P450 酶超家族中, CYP2C 是最大的亚家族, 其中 CYP2C9 和 CYP2C19 与 AEDs 代谢关系密切。CYP2C19 又称为 S-美芬妥英羟化酶 (S-mephenytoin hydroxylase), 其活性存在明显的个体差异, 影响许多药物的代谢 (包括临床常用的一线 AEDs, 如苯妥英钠、苯巴比妥、丙戊酸钠等)。

Lakhan 等^[5] 研究表明 CYP2C9 * 1 / * 3 在 RE 患者表达率显著低于非难治性癫痫患者。张青霞等^[6] 采用聚合酶链反应 - 限制性酶切片长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法对 RE 患者 (接受致痫灶切除) 和非难治性癫痫患者 (单药治疗有效) 的 CYP2C19 * 2 基因 (681G→A) 位点进行基因型分析, 结论为 RE 组 CYP2C19 * 2 突变基因型频率高于非难治性癫痫组 (66.7% : 55.4%)。印度的一项关于难治性癫痫与 CYP2C 基因多态性研究证实, 在印度北部, CYP2C9 * 3 基因在诸多 RE 患者中高水平表达, 而 CYP2C19 表达并不高^[5]。可见通过检测癫痫患者相关 P450 酶的基因多态性可协助 RE 的诊断。

大量研究证实 ATP 结合 B 亚家族成员 1 转运蛋白基因 (ATP-binding cassette subfamily B member 1 transporter gene, ABCB1) 多态性与 RE 存在相关性。其表达产物 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 可以降低脑组织中 AEDs 药物浓度, 降低 AEDs 的疗效。血脑屏障上的 P-gp 是影响 AEDs 脑内分布的主要因素之一, 是血脑屏障血管内皮细胞的腔膜面上有外排功能的一种蛋白, 是电化学屏障的重要组成部分。由于 P-gp 阻止 AEDs 进入神经细胞, 被认为是造成癫痫患者耐药的原因之一。因此, ABCB1 基因可通过 P-gp 导致脑内 AEDs 浓度下降, 并促使脑细胞对 AEDs 产生耐受性, 从而影响 AEDs 的临床

疗效。在癫痫患者, P-gp 在神经元、内皮细胞、脑实质和血管周围的星形胶质细胞中表达增高。目前有学者正在研究利用 PET 成像技术分析 P-gp 在个体血脑屏障表达情况^[7]。先天或后天血脑屏障上 P-gp 的过表达显著减少 AEDs 在脑中的药物浓度, 导致 AEDs 耐药^[8]。ABCB1 基因多态性与癫痫耐药相关, 这为 RE 的基因诊断提供了可借鉴方面。

RE 是多基因遗传病, 分析单位点基因多态性往往难于发现基因型与 RE 之间稳定的相关性。通过生物信息学分析癫痫相关芯片数据, 提示癫痫发病是多种基因作用的结果, 对相关基因的进一步分析有利于 RE 的早期诊断^[9]。基因芯片 (gene chip) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一项前沿生物技术, 其机制是碱基互补和分子杂交, 该技术适用于疾病发生机制及临床诊断等方面的研究, 是研究多基因机制疾病最为理想的工具之一^[10,11]。Theilhaber 等^[12] 利用基因芯片研究缺氧引起的小鼠 (产后 10 d) 癫痫发作过程中磷酸肌醇 3-雷帕霉素靶蛋白 (PI3K-mTOR) 信号通路、Wint 信号通路介导癫痫发作的机制。结果发现, 产后 10 d (神经成熟过程) 的小鼠在缺氧导致癫痫发作后, 大脑皮质及海马基因组数量显著高于对照组, 这些基因组可能与 PI3K-mTOR 信号通路、Wint 信号通路激活有关。由此可见 RE 的病因与多种基因多态性有关, 基因芯片将是协助 RE 诊断的理想工具之一。

2 药物基因组学与 RE 的治疗

RE 可以导致患者认知功能减退、心理社会功能障碍, 严重影响患者生活质量。其治疗选择及治疗效果面临许多挑战。近年来药物基因组学的发展为 RE 的治疗提出了崭新的思路, 目前研究较为清晰的与常用 AEDs 有关的代谢酶为: CYP2C9 酶、CYP2C19 酶、UGT 酶等 (与苯妥英钠相关); CYP2C9 酶、CYP2C19 酶、CYP2A6 酶、CYP2B6 酶、UGT 酶等 (与丙戊酸相关); CYP3A4 酶、CYP1A2 酶、CYP2A6 酶、CYP2C8 酶、CYP2C18 酶等 (与卡马西平相关); CYP2C9 酶、CYP2C19 酶、CYP2E1 酶、N-葡萄糖醛酸酶等 (与苯巴比妥相关); 托吡酯 80% 经肾脏以原形排出, 其余由 CYP2C9 酶、CYP2C19 酶代谢; 拉莫三嗪 70% 和 UGT1A4 结合, 10% 以原形排泄^[4]。

台湾学者 Hung 等^[13] 结合群体药代动力学的方法研究 CYP2C19、CYP2C9 基因多态性的不同基因型, 对当地癫痫人群的苯妥英钠剂量和血药浓度的

关系进行分析研究,并建立不同的 CYP2C19 和 CYP2C9 基因型服用苯妥英钠的初始推荐剂量。廖清船等^[14]应用多重 PCR (polymerase chain reaction) 法及 PCR-连接酶检测反应技术对 CYP2A6、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C9 等基因多态性进行检测,并测定丙戊酸钠血药浓度分析后得出结论,CYP2C9 和 CYP2C19 基因多态性会影响丙戊酸钠血药浓度,弱代谢(纯合突变组及 *1/*3 杂合突变组)的患者服用丙戊酸钠应适当减量。但未发现突变型 CYP2A6、CYP2B6 对丙戊酸钠标准化血药浓度的影响。王剑虹等^[15]用连接酶检测反应-聚合酶链反应(ligase detection reaction-polymerase chain reaction, LDR-PCR)测序分型检测 CYP3A5 *3 基因多态性及检测中国汉族癫痫患者的稳态药物浓度分析后得出结论,CYP3A5 *3 基因型影响中国汉族癫痫患者卡马西平校正后的血药浓度,可以作为指导临床个体化应用卡马西平的候选基因。Tan 等^[16]研究证实中国北方汉族癫痫患者丙戊酸钠血药浓度与细胞色素 P450 基因多态性有关,其研究结果表明具有一个或两个 CYP2A6 *4 等位基因的患者血浆丙戊酸钠浓度高于无此等位基因的癫痫患者,具有 CYP2C9 *3 杂合子的癫痫患者比野生型患者丙戊酸钠血药浓度高。

癫痫的基因治疗(gene therapy)在过去十年发展较快,它属于药物基因组学中功能基因组学的范畴,它是指在特定靶细胞中表达特定基因或关闭、抑制异常基因。截止目前,已有超过 1800 项临床试验证明其有效性^[17]。Wykes 等^[18]将破伤风病毒注射到大鼠大脑中央前回运动皮质,用无线脑电图可检测到皮质锥体细胞的癫痫活动。再将经修饰的病毒载体连接到特定染色体的特定位点,再导入检测到癫痫活动的皮质锥体神经元,可通过抑制钾通道有效控制癫痫发作。利用不同病毒载体转染到特定神经元,可对 RE、癫痫持续状态进行基因治疗^[19]。

药物基因组学的兴起与发展是个体化用药的一个重要方向。为 RE 的治疗开辟一条新的途径。

3 药物基因组学与药物不良反应

癫痫属有发作性症状的慢性疾病(chronic disease with paroxysmal attack),患者通常需长期治疗,而且 RE 通常对多种 AEDs 治疗反应差,导致患者频繁更换 AEDs 及联合应用多种 AEDs,所以药物的不良反应会严重影响患者的生活质量,甚至威胁患

者生命。抗癫痫药超敏反应综合征是一种特异质反应综合征,临床表现从轻型的斑丘疹到严重危及生命的 Stevens-Johnson 综合征(SJS)、中毒性表皮坏死松解型药疹(toxic epidermal necrolysis, TEN)。由含苯环的芳香族 AEDs 引起,如苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平及拉莫三嗪等,其发病与药物剂量无关,与患者本身遗传易感性高度相关。随着药物基因组学研究的不断深入,一些 AEDs 所致严重皮肤反应与人类白细胞抗原(HLA)基因的关系得以揭示。Chung 等^[20]对中国台湾汉族 CBZ-SJS/TEN 患者、CBZ 耐受患者、正常对照者(未使用 CBZ)进行基因分型,发现 CBZ-SJS/TEN 患者全部为 HLA-B *1502 基因阳性,而耐受的患者和正常人群中 HLA-B *1502 基因的阳性率仅为 3%~9%,本研究显示 HLA-B *1502 基因与 CBZ-SJS/TEN 存在显著相关性。此后亚洲各国不断有研究证实了此观点。奥卡西平、苯妥英钠、拉莫三嗪、苯巴比妥与卡马西平同属芳香族抗癫痫药,其药物代谢所产生的中间代谢产物相似,这些药物也不宜用于 HLA-B *1502 阳性患者^[21,22]。

4 展望

药物相关基因的多态性及患者某些基因的突变是导致 RE 患者对 AEDs 个体反应差及临床效果不理想的重要原因之一。通过检测患者特定基因位点从而确定 RE 的早期诊断是未来 RE 的诊断及抗癫痫治疗手段之一。明确卡马西平诱发 SJS 的关联基因对规避 AEDs 相关不良反应增加药物治疗依从性和更好的个体化用药有较大临床价值。

综上所述,随着科学技术的发展,人们对癫痫病因以及癫痫与 AEDs 关系的认识正逐步深入。人类基因组学的发展将为 RE 早期诊断和 AEDs 的个体化应用提供一种新的解决方案,它将使我们在基因的层面上对患者的个体差异有更深入的了解,从而预测某一 AEDs 对特定患者的作用,使早期诊断及治疗 RE 成为可能,使临床用药更有针对性,降低不良反应的发生率。

参 考 文 献

- [1] 常琳,王小娜. 中国癫痫流行病学调查研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(2): 161-164.
- [2] Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. Brain, 2006, 129(1): 18-35.
- [3] Rosati A, Aghakhani Y, Bernasconi A, et al. Intractable

temporal lobe epilepsy with rare spike is less severe than with frequent spikes. *Neurology*, 2003, 60(8): 1290-1295.

- [4] 廖清船, 徐康康. 抗癫痫药遗传药理学研究进展. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(12): 1731-1733.
- [5] Lakhan R, Kumari R. Possible role of CYP2C9&CYP2C19 single nucleotide polymorphism in drug refractory epilepsy. *Indian J Med*, 2011, 134(9): 295-301.
- [6] 张青霞, 姜德春, 王育琴, 等. 中国人群难治性癫痫患者 CYP2C19 * 2 基因型对癫痫耐药的影响. *中国药物依赖性杂志*, 2008, 17(2): 115-119.
- [7] Potschka H. Modulating P-glycoprotein regulation: future perspectives for pharmacoresistant epilepsies? *Epilepsia*, 2010, 51(8): 1333-1347.
- [8] Anderson GD. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic targeted therapy of antiepileptic drugs. *Drug Monit*, 2008, 30(2): 173-180.
- [9] 周焯, 石嵘, 鲍勇, 等. 颞叶癫痫相关基因的生物信息学分析. *南方医科大学学报*, 2011, 31(1): 180-183.
- [10] Huang XY, Chao JP. A Previously unknown zinc finger protein DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Gene*, 2009, 23(12): 1805-1817.
- [11] Guo W, Zhang KM, Tu K, et al. Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Res*, 2009, 19(2): 216-223.
- [12] Theilhaber J, Rakhade SN, Sudhalter J, et al. Gene Expression Profiling of a hypoxic seizure model of epilepsy suggests a role for mTOR and Wnt signaling in epileptogenesis. *Plos One*, 2013, 8(9): 1-19.
- [13] Hung CC, Lin CJ, Chen CC, et al. Dosage Recommendation of Phenytoin for Patients with Epilepsy with Different CYP2C9/CYP2C19 Polymorphisms. *Ther Drug Monit*, 2004, 26(5): 534-540.
- [14] 廖清船, 史菁菁, 张永, 等. 细胞色素 P450 酶 2A6、2B6、2C9、2C19 基因多态性对丙戊酸钠血药浓度的影响. *中华神经科杂志*, 2013, 46(2): 82-86.
- [15] 王剑虹, 朱国行, 丁珂, 等. 中国汉族癫痫患者 CYP3A5 * 3 基因多态性与卡马西平药物浓度的相关性研究. *中国临床神经科学*, 2012, 20(6): 638-642.
- [16] Tan L, Yu JT, Sun YP. The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg*, 2010, 112(4): 320-323.
- [17] Ginn SL, Alexander IE, Abedi MR, et al. Gene therapy clinical trial worldwide to 2012-an update. *Gene Med*, 2013, 15(2): 65-77.
- [18] Wykes RC, Heerma JH, Mantoan L, et al. Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Sci Transl Med*, 2012, 4(10): 152-161.
- [19] Walker MC, Schorge S, Kullmann DM. Gene therapy in status epilepticus. *Epilepsia*, 2013, 54(6): 43-45.
- [20] Chung WH, Hung SI, Hong HS, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*, 2004, 428(6982): 486.
- [21] Limpawattana P, Choonhakarn C, Kongbunkiat K. Clinical profiles of Stevens-Johnson syndrome among Thai patients. *J Dermatol*, 2014, 10(5): 1111-1116.
- [22] East-Innis AD, Thompson DS. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis at the university hospital of the west Indies, Jamaica. *West Indian Med J*, 2013, 62(7): 589-592.