

多药耐药相关蛋白 1 基因多态性及蛋白表达与癫痫患者耐药机制关系的研究

贺淑慧, 孙洪英

包头医学院第一附属医院神经内科, 内蒙古 包头 014010

摘要: **目的** 探讨多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 基因 G128C (rs41395947)、C218T (rs41494447)、G2168A (rs4148356)、G3173A (rs41410450) 多态性及 MRP1 蛋白水平与癫痫耐药的关系, 进一步探究 MRP1 基因多态性更易导致癫痫患者对哪种抗癫痫药物 (AED) 耐药。**方法** 对 2017 年 11 月至 2018 年 6 月就诊于包头医学院第一附属医院门诊、病房和包头中心医院癫痫门诊, 且诊断符合 2014 年国际抗癫痫联盟关于癫痫的诊断标准, 均经视频脑电图及头颅 MRI 证实的 31 例耐药性癫痫患者和 67 例药物敏感性癫痫患者进行问卷调查。采用 DNA 测序的方法分别检测 MRP1 基因, 从而分析其多态性分布情况, 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 测定的方法分别检测两组人群中 MRP1 蛋白的浓度, 采用化学发光法检测癫痫患者卡马西平、丙戊酸钠的血药浓度。**结果** 经 DNA 测序发现, AED 耐药组和 AED 敏感组癫痫患者 MRP1 基因中第 128 位和第 3173 位未出现基因突变, 第 218 位、2168 位中存在单核苷酸多态性。MRP1 的 C218T (rs41494447) 突变 5 例, 其中 AED 耐药组 4 例, AED 敏感组 1 例, C218T (rs41494447) 多态性在 AED 耐药组与 AED 敏感组中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MRP1 的 G2168A (rs4148356) 突变 9 例, 其中 AED 耐药组 6 例, AED 敏感组 3 例, G2168A (rs4148356) 多态性在 AED 耐药组与 AED 敏感组中的分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MRP1 的 2168 位 GA 基因型在 AED 耐药组 67% 高于 AED 敏感组 33%。MRP1 蛋白水平测定结果: AED 耐药组高于 AED 敏感组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MRP1 的 2168 位 GA 基因型患者的卡马西平、丙戊酸钠血药浓度低于 GG 基因型患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。比较 MRP1 的 C218T (rs41494447)、G2168A (rs4148356) 不同基因型的 MRP1 浓度, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** MRP1 的 G2168A (rs4148356) 多态性可能是癫痫患者发生 AEDs 耐药的风险位点。MRP1 基因的 G128C (rs41395947)、C218T (rs41494447)、G3173A (rs41410450) 三个位点可能不是癫痫患者发生 AEDs 耐药的风险位点。MRP1 蛋白高表达可能是引起癫痫患者耐药的一个因素。癫痫患者中存在 MRP1 的 G2168A 单核苷酸多态性者更易对卡马西平、丙戊酸钠耐药。耐药性癫痫患者 MRP1 基因 218 位点及 2168 位点突变可能不是引起 MRP1 蛋白高表达的原因。

关键词: 癫痫; 耐药; 多药耐药相关蛋白 1; 基因多态性; 抗癫痫药物

中图分类号: R742.1

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.02.007

Association of polymorphisms and protein expression of the multidrug resistance-associated protein 1 gene with drug resistance in patients with epilepsy

HE Shu-Hui, SUN Hong-Ying. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China

Corresponding author: SUN Hong-Ying, Email: sunhongying2004@sina.com

Abstract: Objective To investigate the association of the polymorphisms of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene-G128C (rs41395947), C218T (rs41494447), G2168A (rs4148356), and G3173A (rs41410450), and serum MRP1 levels

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY17256)

收稿日期: 2019-08-05; **修回日期:** 2019-12-17

作者简介: 贺淑慧, 女, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 癫痫的基础与临床。

通信作者: 孙洪英, 女, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病及癫痫、认知障碍的基础与临床研究。Email: sunhongying2004@sina.com。

with drug resistance in epilepsy, and to further determine which antiepileptic drug (AED) epileptic patients with the polymorphisms tend to be resistant to. **Methods** A questionnaire was conducted among epileptic patients (31 cases resistant to AEDs and 67 cases sensitive to AEDs) who attended the outpatient department and ward of the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College or the Epilepsy Clinic of Baotou Central Hospital from November 2017 to June 2018, and got a diagnosis in accordance with the 2014 diagnostic criteria for epilepsy published by International League Against Epilepsy and confirmed by video electroencephalogram and cranial MRI. DNA sequencing was used to analyze the distribution of MRP1 polymorphisms. Enzyme-linked immunosorbent assay was applied to measure serum MRP1 concentrations. Chemiluminescence was used to determine blood concentrations of carbamazepine and valproate in the epileptic patients. **Results** DNA sequencing showed that single nucleotide polymorphism was not found at 128 bp and 3173 bp of the MRP1 gene, but present at 218 bp and 2168 bp, in the AEDs-resistant patients and AEDs-sensitive patients. Five patients carried a C218T (rs41494447) mutation, with four in the AEDs-resistant group and one in the AEDs-sensitive group, and there was no significant difference in the distribution of C218T (rs41494447) polymorphism between the two groups ($P > 0.05$). Nine cases harbored a G2168A (rs4148356) mutation, with six in the AEDs-resistant group and three in the AEDs-sensitive group, showing a significant difference in the distribution of G2168A (rs4148356) polymorphism between the two groups ($P < 0.05$); the proportion of GA genotype was higher in the AEDs-resistant group (67%) than in the AEDs-sensitive group (33%). The concentration of MRP1 in the AEDs-resistant group was significantly higher than that in the AEDs-sensitive group ($P < 0.05$). No significant difference was observed in MRP1 concentration between patients with different genotypes of C218T (rs41494447) or G2168A (rs4148356) (both $P > 0.05$). The patients carrying GA genotype at 2168 bp of the MRP1 gene had significantly lower plasma concentrations of carbamazepine and valproate than those carrying GG genotype ($P < 0.05$). **Conclusions** The polymorphism of G2168A (rs4148356) of the MRP1 gene may be responsible for AED resistance in epileptic patients, instead of G128C (rs41395947), C218T (rs41494447), and G3173A (rs41410450). The high expression of MRP1 may be one of the factors leading to drug resistance in epileptic patients, and is less likely to be the result of mutation at 218 bp or 2168 bp of the MRP1 gene. The patients with G2168A polymorphism tend to be resistant to carbamazepine and valproate.

Key words: epilepsy; drug resistance; multidrug resistance-associated protein 1; genetic polymorphism; antiepileptic drug

多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) 属于细胞表面转运蛋白的 ATP 结合盒蛋白家族,参与多种内源性和外源性分子的运输,MRP1 蛋白表达的增加可阻碍抗癫痫药物 (anti-epileptic drugs, AED) 通过血脑屏障,这使得 AED 在癫痫灶周围难以达到有效的抗癫痫药物浓度,导致耐药的出现。本研究采用 DNA 测序的方法对癫痫患者的血标本进行 MRP1 基因 G128C (rs41395947)、C218T (rs41494447)、G2168A (rs4148356)、G3173A (rs41410450) 四个位点多态性检测并进行分析,探究上述四个位点是否存在多态性及其在 AED 耐药组和 AED 敏感癫痫患者中分布频率,采用 ELISA 方法分析 MRP1 蛋白表达,采用化学发光法检测 AEDs 血药浓度,探讨 MRP1 基因多态性更易导致哪种 AED 耐药及 MRP1 蛋白表达与癫痫耐药的关系,从而我们从遗传学的角度能够进一步对癫痫的发生完善在分子生物学水平上的探究,更好地早期识别诊断癫痫,对癫痫患者采取个体化的治疗,更加有效的控制癫痫的反复发作,减少其对大脑造成不可逆的损伤。

1 对象与方法

1.1 研究对象

通过癫痫患者调查问卷,收集 2017 年 11 月至 2018 年 6 月就诊于包头医学院第一附属医院门诊和病房以及包头市中心医院癫痫门诊的癫痫患者共 98 例,诊断符合 2014 年国际抗癫痫联盟 (International League Against Epilepsy, ILAE) 关于癫痫的诊断标准^[1,2,11],均经视频脑电图及头颅 MRI 证实。

患者分组如下^[2],AED 耐药组:癫痫患者接受两种或两种以上抗癫痫药物治疗,观察两年后,癫痫发作未见明显改善(12 个月内仍有发作或者发作间期小于三个治疗前发作间期),共 31 例,男 16 例,女 15 例。AED 敏感组:患者服用抗癫痫药物一年后,癫痫发作频率及症状较前有明显改善,共 67 例,男 35 例,女 32 例。

排除标准:①神经学检查或 MRI 检查发现颅脑肿瘤、血管损伤或畸形及癫痫发作相关的脑软化灶;②明确的引发癫痫的致病因素如产伤、感染、头部外伤等;③患有智力障碍、神经系统遗传性或发作性疾病、精神心理障碍等;④直系亲属三代内

与遗传相关的常染色体显性癫痫遗传方式。

该实验经我院伦理委员会及包头市中心医院伦理委员会审查,所有入选患者在入选前均签署知情同意书。

1.2 实验试剂及仪器

氢氧化钠、冰乙酸(acetic acid)、三羟甲基氨基甲烷(tris base)、乙二胺四乙酸(EDTA),购自天津市化学试剂三厂;琼脂糖,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无水乙醇,购自天津华东试剂厂;Eppendorf 管、一次性吸头(0.5~10 μl 、20~200 μl 、200~1 000 μl),购自美国 Axygen 公司;一次性吸管,购自美国 KIRGEN 公司;恒温水浴箱、37℃ 恒温箱,购自上海新苗医疗器械制造有限公司;低温离心机、普通离心机,购自湘仪离心机厂;移液枪,购自 Thermo 公司;Rayto 酶标分析仪,购自雷杜生命科学股份有限公司;Sartorius 电子天平,购自德国赛多利斯公司;-20℃ 冰箱、-80℃ 冰箱、4℃ 冰箱,购自西门子公司。

1.3 方法

1.3.1 一般资料及标本收集 通过问卷调查的方法收集患者的年龄、性别、病程、用药时间等,对两组间上述基本资料进行统计学检验,差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。收集符合标准的癫痫患者空腹 8 h 的肘静脉血 6 ml 于 EDTA 抗凝管中。

1.3.2 MRP1 浓度检测 所有样本血清均用华美生物工程有限公司提供的酶免人多药耐药相关蛋白 1 试剂盒在同等条件下测量 MRP1 浓度。实验前把标准品按倍数稀释备用,在酶标包被板上设立对照孔、标准孔、待测孔,各加样 50 μl ,先将 40 μl 稀释液加入待测样品孔,然后再加稀释 5 倍后的 10 μl 待测样品用封板膜封住板后,小心置于 37℃ 水浴箱恒温温育 30 min;用蒸馏水将浓缩洗涤液稀释 30 倍;静置 30 s 后弃去,重复 5 次;将 50 μl 酶标试剂加入标准孔及待测孔;用封板膜封住板后,小心置于 37℃ 水浴箱恒温温育 30 min;依次向每个空加入着色剂、显色剂,各 50 μl ,震荡,置于 37℃ 恒温箱,黑暗处理 10 min;向三个孔中加入 50 μl 终止液终止反应。在将空白孔调节至零后,通过酶标分析仪在 450 nm 的波长下测量每个孔的吸光度(OD 值),并在此时记录。该步骤在添加终止溶液后 15 min 内完成;根据 OD 值计算各样本的 MRP1 浓度,再乘以五,得出最终样本 MRP1 浓度。

1.3.3 提取样本 DNA 所有 EDTA 抗凝管收集的全血,用 Axyprep 血基因组 DNA 试剂盒根据说明书提取样本 DNA:加 500 μl Buffer AP1 到 1.5 ml 离心管中;将 200 μl 抗凝全血(绿帽管血液)加入缓冲液 AP1 中,来回吸注几次,使残留在尖端的血液完全溶解。盖紧离心管盖子,旋涡振荡 10 s;加 100 μl Buffer AP2,旋涡振荡 10 s;12 000 r/min,离心 10 min。将滤液加入到制备管中,离心 1 min,12 000 r/min。弃滤液后重复步骤 5,加入 700 μl Buffer W1A,室温放置 2 min 后 12 000 $\times g$ 离心 30 s。将制备管置回到原 2 ml 离心管中,加入 500 μl Buffer W2 到制备管中,12 000 $\times g$ 离心 1 min。所有样本均送至北京阅微基因技术有限公司进行 MRP1 基因的 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点测序。

1.3.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 提前配置 50 \times TAE 缓冲液(称量 Tris base 242 g,EDTA 18.612 g 于 1 L 烧杯中;向烧杯中加入约 800 ml 去离子水并充分混合;加入 57.1 ml 的 Acetic acid,充分溶解;用 NaOH 调节 pH 至 8.3,用去离子水稀释至 1 L,并在室温下储存。使用时稀释 50 倍,即 1 \times TAE Buffer)及 6 \times loading Buffer[30 mM EDTA、36% (v/v) Glycerol、0.05% (w/v) Xylene Cyanol FF、0.05% (w/v) Bromophenol Blue]。

配制 1% 琼脂糖凝胶:琼脂糖 0.4 g 加入 40 ml \times TAE 缓冲液,用 EB 染色。点样:5 μl 提取样本 DNA 与 1 μL loading Buffer 混匀后加样,5 μL 100bp Marker,100 V 电压电泳,照相得到凝胶电泳效果图片。

1.3.5 测定卡马西平、丙戊酸钠血药浓度 将血样送至包头医学院第一附属医院核医学科,通过西门子公司生产的 ADVIA Centaur XP 仪器采用化学发光免疫法进行检测卡马西平及丙戊酸钠的血药浓度。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 21.0 统计分析数据。计量资料数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用成组 t 检验;计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用多因素 logistic 回归分析评估耐药的影响因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AED 耐药组和 AED 敏感组一般临床资料比较

本实验一共收集 98 例癫痫患者,AED 耐药组与 AED 敏感组在年龄、性别、病程时间、用药时间上差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 AED 耐药组和 AED 敏感组一般临床资料

组别	例数	性别(男/女,例)	年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	病程($\bar{x} \pm s$,月)	用药时间($\bar{x} \pm s$,月)
AED 耐药组	31	16/15	31.77 \pm 12.27	244.71 \pm 119.38	38.90 \pm 25.93
AED 敏感组	67	32/35	26.31 \pm 11.99	190.70 \pm 108.89	26.81 \pm 24.19
χ^2 值		0.126	2.082	2.215	2.250
P 值		0.723	0.040	0.029	0.027

2.2 受试者 MRP1 基因的 SNP 测序

2.2.1 位点突变图 所有样本 DNA 提取后,均至于 -20℃ 冰箱保存,在保温条件下一同送至北京

阅微基因技术有限公司进行 MRP1 基因的 128 G > C、218 C > T、2168 G > A、3173 G > A 四个位点测序。SNP 测序结果见图 1、图 2、图 3。

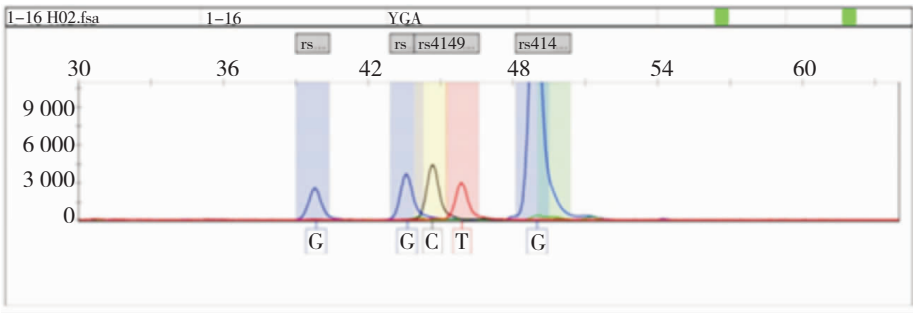


图 1 MRP1 基因 218C > T(rs4149447)位点突变图,仅可见 C→T 转换

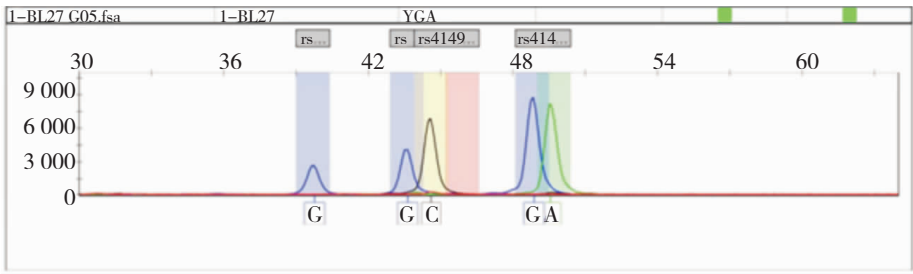


图 2 MRP1 基因 2168G > A(rs4148356)位点突变图,仅可见 G→A 转换

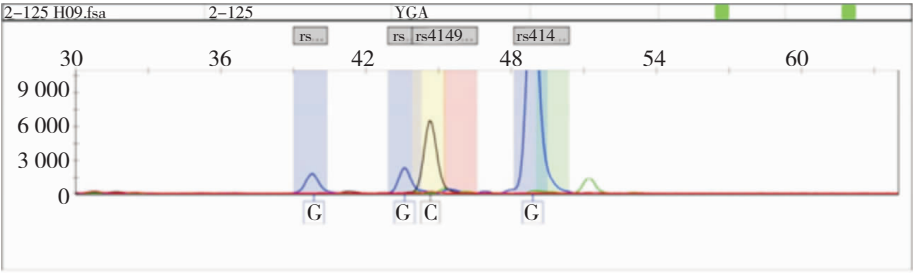


图 3 MRP1 基因 128G > C(rs41395947)、3173G > A(rs41410450)位点突变图,未见突变

2.2.2 测序分析 送检的 98 份 DNA 样本中,所检测 MRP1 基因的 128 G > C (rs41395947)、218 C > T (rs41494447)、2168 G > A (rs4148356)、3173 G > A (rs41410450) 位点序列,其中 128 G > C (rs41395947)、3173 G > A (rs41410450) 位点未

见突变,均以纯合子 GG 型存在; 218 C > T (rs41494447) 位点可见 C→T 转换 5 例;2168 G > A (rs4148356) 位点可见 G→A 转换 9 例。见表 2。
2.2.3 Hardy-Weinberg 平衡定律检验 MRP1 基因 G128C (rs41395947)、C218T (rs41494447)、

G2168A (rs4148356)、G3173A (rs41410450) 四个位点的基因型的观察值和预期值之间的差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 提示四个位点 SNP 分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 群体基因遗传平衡, 样本代表性良好。见表 2。

表 2 MRP1 218、2168 位点测序分析表				
指标	218C > T(rs41494447)		2168G > A(rs4148356)	
基因频数	C	191	G	187
	T	5	A	9
基因型频数	CC	93	GG	89
	CT	5	GA	9
	TT	0	AA	0
Hardy-Weinber 平衡定律检验	χ^2 值	0.067	χ^2 值	0.227
	P 值	0.796	P 值	0.634

表 3 AEDs 耐药组与 AEDs 敏感组样本基因频数及基因型频数的比较 [$n(\%)$]										
分组	218C > T(rs41494447)				TT	2168G > A(rs4148356)				AA
	C	T	CT	CC		G	A	GA	GG	
AED 耐药组	58(93.5)	4(6.5)	4(12.9)	27(87.1)	0	56	6	6(67)	25(28)	0
AED 敏感组	133(99.3)	1(0.7)	1(1.5)	66(98.5)	0	131	3	3(33)	64(72)	0
χ^2 值	5.550		5.699			5.354		5.624		
P 值	0.018		0.017			0.021		0.018		

表 4 MRP1 218 位点 CC、CT 基因型丙戊酸钠、卡马西平血药浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)				
测定指标	CC	CT	t 值	P 值
丙戊酸钠血药浓度	60.56 \pm 20.76	58.17 \pm 18.36	0.217	0.829
卡马西平血药浓度	5.45 \pm 1.55	3.98 \pm 1.65	1.754	0.090

2.5 MRP1 2168 位点 GG、GA 基因型丙戊酸钠、卡马西平血药浓度比较

MRP1 2168 位点基因 GA 型癫痫患者卡马西平、丙戊酸钠血药浓度均值低于 GG 型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 MRP1 2168 位点 GG、GA 基因型丙戊酸钠、卡马西平血药浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)				
测定指标	GG	GA	t 值	P 值
丙戊酸钠血药浓度	60.36 \pm 20.68	40.95 \pm 18.02	2.594	0.012
卡马西平血药浓度	5.23 \pm 1.67	2.98 \pm 0.98	3.906	<0.001

2.6 MRP1 蛋白浓度在 AED 耐药组与 AED 敏感组中差异的比较

AED 耐药组 MRP1 蛋白的浓度与 AEDs 敏感组相比明显增高, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

2.3 AED 耐药组与 AED 敏感组样本基因频数及基因型频数

AED 耐药组 MRP1 218 位 CT 基因型所占比例为 80%, AED 敏感组 MRP1 218 位 CC 基因型所占频率为 20%, 前者高于后者, 两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AED 耐药组 MRP1 2168 位 GA 基因型所占比例为 67%, AED 敏感组 MRP1 2168 位 GA 基因型所占频率为 33%, 前者高于后者, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 MRP1 C218T CC、CT 基因型丙戊酸钠、卡马西平血药浓度的比较

MRP1 218 位点基因 CC 型与 CT 型的卡马西平、丙戊酸钠血药浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 6 AED 耐药组与 AED 敏感组 MRP1 蛋白浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)				
分组	例数	MRP1 浓度	t 值	P 值
AED 敏感组	67	46.64 \pm 29.83	-6.407	<0.001
AED 耐药组	31	92.88 \pm 39.69		

2.7 MRP1 蛋白表达水平与 MRP1 218 位和 2168 位基因多态性的关系

98 例不同基因型癫痫患者血清中 MRP1 蛋白表达水平 (平均光密度, OD) 如下, MRP1 218 位 CC 基因型与 CT 基因型患者 MRP1 蛋白平均光密度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); MRP1 2168 位 GG 基因型和 GA 基因型患者 MRP1 蛋白平均光密度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 7、表 8。

表 7 MRP1 218 位基因 CC 型、CT 型 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)				
基因型	例数(n)	MRP1 OD 值	t 值	P 值
MRP1 218CC	27	0.26 \pm 0.05	0.605	0.550
MRP1 218CT	4	0.24 \pm 0.04		

表 8 MRP1 2168 位基因 GG 型、GA 型 OD 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)				
基因型	例数(n)	MRP1 OD 值	t 值	P 值
MRP1 2168GG	58	0.26 \pm 0.04	0.591	0.557
MRP1 2168GA	9	0.25 \pm 0.06		

2.8 多因素 logistic 回归分析

以患者耐药情况为因变量,以年龄、病程、用药时间、MRP1 浓度和 218 位基因型 5 项单因素分析有统计学意义的指标为自变量,进行多因素 logistic 回归分析。结果显示,MRP1 浓度和 218 位基因型为耐药的独立危险因素,有统计学意义 ($P < 0.05$)。从上述 2 项指标的 OR 值可以看出,MRP1 浓度每升高 1 个单位,患者发生耐药的风险增加 1.049 倍;218 位基因型中 C/T 型发生耐药的风险是 C/C 型的 13.264 倍。见表 9。

表 9 患者耐药影响因素的 logistic 回归分析

影响因素	B	Wald	P	OR	95% CI
年龄	0.037	0.876	0.349	1.038	0.96 ~ 1.122
病程	0.001	0.073	0.787	1.001	0.993 ~ 1.01
用药时间	0.017	1.949	0.163	1.017	0.993 ~ 1.042
MRP1 浓度	0.048	18.078	<0.001	1.049	1.026 ~ 1.073
218 位基因型(与 CC 型比较)	2.585	4.193	0.041	13.264	1.117 ~ 157.463

以患者耐药情况为因变量,以年龄、病程、用药时间、MRP1 浓度和 2168 位基因型 5 项单因素分析有统计学意义的指标为自变量,进行多因素 logistic 回归分析。结果显示,MRP1 浓度和 2168 位基因型为耐药的独立危险因素,有统计学意义 ($P < 0.05$)。从上述 2 项指标的 OR 值可以看出,MRP1 浓度每升高 1 个单位,患者发生耐药的风险增加 1.046 倍;2168 位基因型中 G/A 型发生耐药的风险是 G/G 型的 8.560 倍。见表 10。

表 10 患者耐药影响因素的 logistic 回归分析

影响因素	B	Wald	P	OR	95% CI
年龄	0.039	0.980	0.322	1.040	0.962 ~ 1.124
病程	0.004	0.772	0.380	1.004	0.996 ~ 1.012
用药时间	0.022	2.784	0.095	1.022	0.996 ~ 1.048
MRP1 浓度	0.045	15.346	<0.001	1.046	1.023 ~ 1.069
2168 位基因型与 (与 GG 型比较)	2.147	4.109	0.043	8.560	1.074 ~ 68.236

3 讨论

迄今为止,耐药性癫痫的发病机制主要涉及以下几个方面:①基因突变导致钠通道功能缺陷,进而导致严重肌阵挛等;②先天性脑发育异常导致的神经网络异常;③某些自身抗体的存在;④耐药基因的存在。MRP1 蛋白在血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的血管内皮细胞过度表达^[3],通过消耗

能量将抗癫痫药物从细胞内运输至细胞外,从而降低脑内致痫灶周围抗癫痫药物浓度,大大降低药效,导致耐药的发生^[4]。近年来,人们对 MRP1 基因的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)进行了广泛的研究,研究表明编码区的多个遗传变异能够影响 MRP1 的功能。例如 G2168 A (Arg723 gln) 可以影响卵巢癌患者对化疗的敏感性;G1299 T (Arg 433 ser) 通过减少 HeLa 细胞内药物积累而产生对阿霉素的耐药性;G3173 A (Arg 1058 gln) 的变异增加了 Hek 293 和 cho-K1 细胞对依托泊苷的反应。

据报道,单核苷酸多态性(SNPs)与耐药有关,特别是通过阻断电压门控钠(NA)通道^[5,6]。NA 通道神经元 I 型 α 亚单位(SCN1A)编码 NAV1.1 NA 通道的 α 亚基,被认为与抗癫痫药物耐药有关。本研究在 98 例癫痫患者中探讨了 MRP1 基因 SNPs 与癫痫耐药的关系,AED 耐药组和 AED 敏感组癫痫患者 MRP1 基因 G128 C (rs41395947)、C218 T (rs41494447)、G2168 A (rs4148356)、G3173 A (rs41410450) 四个位点,DNA 测序显示,MRP1 G128 C 和 G3173 A 位点没有基因突变,单核苷酸多态性存在于 MRP1 C218 T 和 G2168 A 的两个位点,但是 AED 耐药组与 AED 敏感组 MRP1 C218 T (rs41494447) 多态性分布无显著差异;而 MRP1 G2168 A (rs4148356) 多态性在 AED 耐药组与 AED 敏感组分布差异有差异。

陈海燕等^[7]通过实验建立了耐药性癫痫大鼠模型,通过 RT-PCR 等技术发现癫痫模型组海马 MRP1 mRNA 及其表达产物明显高于对照组,耐药性癫痫患者 MRP1 基因型的检测可能为新型药物的研发提供有价值的参考。国外学者研究发现,海马硬化相关癫痫患者的海马旁回血管内皮细胞中 MRP1 表达增加^[8,12,4];另外,MRP1 蛋白的含量与癫痫患者病史的长短也存在一定关系,病程越长,该蛋白可能表达越多,预示着病程越长,发生耐药的风险性越高^[7,9,14]。

本研究还发现 MRP1 蛋白在 AED 耐药组的表达高于 AED 敏感组,考虑 MRP1 蛋白高表达可能是引起癫痫患者耐药的一个因素,与学者陈海燕等^[7]的研究结果一致。我们在研究抗癫痫药物卡马西平、丙戊酸钠与 MRP1 基因多态性的关系中,最初的假设是 MRP1 基因多态性的出现可能会引起 MRP1 蛋白表达的增加,阻碍抗癫痫药物进入血

脑屏障,无法有效控制癫痫的发作,从而增加了癫痫的发作频率,发展为耐药性癫痫;但在研究发现卡马西平、丙戊酸钠的血药浓度在 MRP1 基因 2168 位 GG、GA 基因型患者中有显著性差异,GA 基因型患者这两种抗癫痫药物血药浓度低于 GG 基因型,考虑癫痫患者 MRP1 基因在 2168 位点发生 G 到 A 突变者更易出现对卡马西平、丙戊酸钠耐药。我们在研究初期假设 MRP1 多态性的存在与癫痫耐药的发生有关,但在本研究中我们发现 MRP1 218 位基因与 MRP1 2168 基因中不同基因型 MRP1 蛋白平均光密度值的比较,提示 MRP1 基因多态性可能不是导致 MRP1 高表达的原因,可能存在其他导致 MRP1 蛋白高表达的因素。

本研究认为 MRP1 基因 G2168A SNP 的存在可能通过影响 AED 血药浓度,进而导致癫痫耐药的发生。这是首次发现 G2168A (rs4148356) 与卡马西平、丙戊酸钠耐药之间的关系,但具体的机制尚不清楚,国内很多研究发现癫痫耐药患者中存在 MRP1 蛋白的高表达,为什么发生耐药后 MRP1 蛋白浓度会升高,我们发现与 MRP1 2168、218 位点单核苷酸多态性无关,是否由其他基因突变引起,还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fisher RS. Final Comments on the Process: ILAE Definition of Epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2014, 55(4): 492-493.
- [2] Fisher RS, Cross JH, French JA, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology [J]. *Epilepsia* 2017, 58(4): 522-530.
- [3] Jinming JI, Gang LI, Yunxia MA, et al. Expression of Multidrug Resistance Genes in Peripheral Blood of Patients with Refractory Epilepsy and the Reverse Effect of, Oxcarbazepine on Its Expression [J]. *Iran J Public Health*, 2018, 47(1): 40-48.
- [4] Hauser RM, Henshall DC, Lubin FD. The epigenetics of epilepsy and its progression [J]. *Neuroscientist*, 2018, 24: 186-200.
- [5] Abo EFW, Abd ENS, Habib MS, et al. The potential implication of SCN1A and CYP3A5 genetic variants on antiepileptic drug resistance among Egyptian epileptic children [J]. *Seizure*, 2016, 41: 75-80.
- [6] Zhang HL, Lin YH, Qu Y, et al. The effect of miR-146a gene silencing on drug-resistance and expression of protein of P-gp and MRP1 in epilepsy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 2372-2379.
- [7] 陈海燕,黄建敏,李雪斌,等. 耐药性癫痫患者外周血铁调节转运体-1 基因及蛋白表达的研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(6): 513-516.
- [8] Sun Y, Luo X, Yang K, et al. Neural overexpression of multidrug resistance-associated protein 1 and refractory epilepsy: a meta-analysis of nine studies [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126: 308.
- [9] Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15: 1368-1376.
- [10] A Novel Scoring System to Evaluate the Efficacy of Vagus Nerve Stimulation for Pediatric Drug-Resistant Epilepsy [J]. *Child Neurol*, 2019, 12(16): 1-3.
- [11] Hemispherotomy for drug-resistant epilepsy in an Indonesian population [J]. *Epilepsy Behav Rep*, 2019, 12(5): 12-18.
- [12] Surgical treatment of drug-resistant epilepsy caused by gliomas in eloquent areas: experience report [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2019, 77(11): 34-42.
- [13] Potassium citrate supplementation with ketogenic dietary therapy for drug-resistant epilepsy [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2020, 62(1): 25-36.