

多药耐药基因 1 C3435T 多态性与癫痫耐药的关联性研究

王小燕¹ 林若飞¹ 史道华^{1,2△} 白志峰¹ 杨朋范³

(1 福建医科大学福总临床医学院 福建 福州 350108 ;2 南京军区福州总医院药学科 福建 福州 350025 ;

3 南京军区福州总医院神经外科癫痫中心 福建 福州 350025)

摘要 目的 探讨我国癫痫患者 P-糖蛋白基因多态性(C3435T)与抗癫痫药物反应性的关联性。方法 采用 PCR-RFLP (聚合酶链反应--限制性片段长度多态性分析)的方法对 156 例癫痫患者外周血进行分型。其中,耐药组癫痫患者 85 例,有效组癫痫患者 71 例。结果 耐药组癫痫患者 CC 基因型 21 例,占 24.70%;有效组癫痫患者 CC 基因型 19 例,占 26.76%。两组比较无显著差异性。结论 本研究未发现 P-gp C3435T 基因型与癫痫耐药的关联性。

关键词 P-糖蛋白;癫痫;基因多态性

中图分类号 R742.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)14-2717-03

Association of C3435T Polymorphism in Multidrug Resistance Gene 1 with Refractory Epilepsy

WANG Xiao-yan¹, LIN Ruo-fei¹, SHI Dao-hua^{1,2△}, BAI Zhi-feng¹, YANG Peng-fan³

(1 Fuzhou General Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350108, China;

2 Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian, 350025, China;

3 Department of Neurosurgery Epilepsy Center, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fujian, 350025)

ABSTRACT Objective: To discuss the association between the P-glycoprotein gene polymorphism and the efficacy of epilepsy drug.

Methods: Genotypes of the C3435T polymorphism were determined by the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods in 156 patients, Including refractory epilepsy group (85) and drug-responsive group(71). **Results:** In non responders, 21 patients were CC genotype (24.70%). In responders, 19 patients were CC genotype (26.76%). **Conclusion:** There is no association between the P-gp C3435T gene polymorphism and the response to antiepileptic drug treatment in Chinese patient with epilepsy.

Key words: P-glycoprotein; Epilepsy; Polymorphism

Chinese Library Classification: R742.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)14-2717-03

前言

癫痫是一种脑部慢性疾病,我国患者约 600 万,占全球 1/8。其中约 25%的癫痫患者经合理的抗癫痫药物治疗后仍不能终止其发作,成为耐药性癫痫(Refractory Epilepsy, RE)^[1,2]。而目前耐药机制尚不明确。

近年来,国内外许多学者提出耐药性癫痫与癫痫患者血脑屏障上的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)过度表达有关。P-gp 是一种跨膜 ATP 依赖性糖蛋白,具有外排泵的功能,由 MDR1 基因编码,在胎盘、肠、肝、肾、血脑屏障等组织中表达^[3,4]。研究表明耐药性癫痫患者大脑血脑屏障上 P-gp 表达增高,能够阻止药物进入中枢,导致中枢癫痫药物靶浓度降低。而 3435 位点的 C 突变为 T 可导致 P-gp 表达下降^[5],可能与癫痫耐药相关。关于这方面的研究国内外存在争议^[6],可能与种族差异性有关。因此本研究旨在探讨 P-gp C3435T 基因与中国汉族耐药性癫痫患者的关联性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

156 例患者均来自 2010 年至 2011 年在南京军区福州总医院就诊的癫痫患者。本实验已取得家属或患者的同意。其中耐药组 85 例,治疗控制有效组 71 例。耐药性癫痫患者是指:频繁的癫痫发作,至少每月发作 4 次以上;应用适当的一线抗癫痫药物正规治疗且药物的血药浓度达到有效范围,至少观察 2 年,仍不能控制发作,影响日常生活,无进行性中枢神经系统疾病或占位性病变^[7]。药物治疗有效组是指用现有的抗癫痫单药或多药治疗后,1 年内未再发作^[8]。

1.2 实验方法

1.2.1 血标本的采集、处理和贮存 对癫痫患者抽取静脉血 2~3 mL 置 EDTA 抗凝管中,全血于 -20℃ 低温保存,待样本收集结束后,采用改良 KI 法提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR-RFLP PCR 反应总体积 25ul, DNA buffer 2.5ul, Tap 酶 1.25U, dNTP 2.5mmol/L(均由 TAKARA 公司提供), DNA 模板约 100ng, 引物 10nmol/L (Forward 5'-ACTCTTGTTTTCAGCTGCTT G-3'; Reverse 5'-AGAGACTTACATTAGGCAGT-GACTC-3)(上海生工) PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30 S, 55℃ 复性 30 S, 72℃ 延伸 30 S, 共 35 个

作者简介 王小燕(1986-)女,硕士研究生,主要研究方向 临床医学, Tel: 15980272912 E-Mail: wangxiaoyan@fujian126.com
△通讯作者:史道华, Tel: 0591-83739964 E-mail: Shidh@yeah.net
(收稿日期 2011-02-24 接受日期 2011-03-18)

循环,最后 72℃再延伸 5 min。经 MboI 限制性内切酶酶切 1 h , 表差异有统计学意义。
3.0%琼脂凝胶电泳,溴乙啶染色,紫外灯观察结果。

1.2.3 统计方法 采用 SPSS16.0 版统计软件对基因型频率与等位基因频率进行分析,两组间比较采用双侧检验,以 P<0.05 代

2 结果

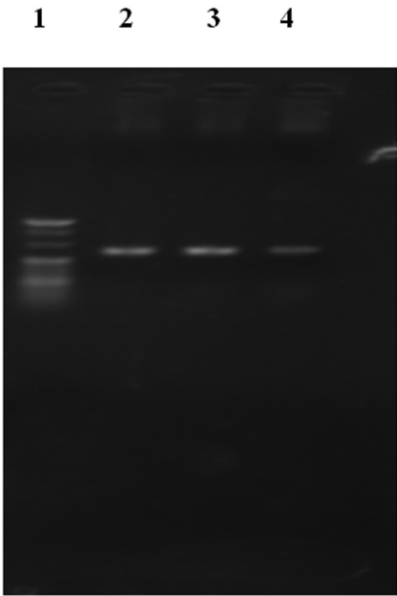


图 1 PCR 反应产物图

1 为 20bp Marker 2、3、4 为 C3435T PCR 产物

Fig.1 Polymerase chain reaction

1:20bp Marker, 2,3, 4:C3435T polymerase chain reaction production

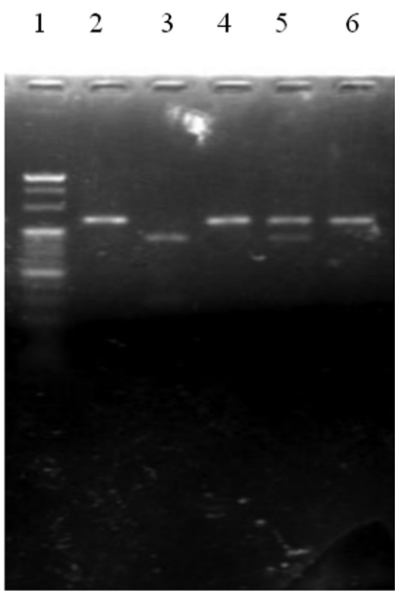


图 2 MDR1 第 3435 位分型

1 为 20bp Marker 2、4、6 泳道为 TT 基因型 3 为 CC 基因型 5 为 CT 基因型；

Fig.2 Genotypes of the C3435T polymorphism

1:20bp Marker 2,4, 6: CC 3:TT 5:CT

表 1 MDR1 基因 C3435T 多态性与药物反应的关系

Table 1 Association between the C3435T polymorphism in MDR1 gene and refractory epilepsy

分组 (Group)	例数 (Number)	基因型(Genotypes)			等位基因频率(Genotypes frequency)	
		CC	CT	TT	C	T
耐药组 IE group	85	21(24.71%)	44(51.76%)	20(23.53%)	86(50.59%)	84(49.01%)
有效组 Drug Responsive group	71	19(26.76%)	38(53.52%)	14(19.71%)	76(53.52%)	66(46.48%)

2.1 C3435T 多态性分析

PCR 扩增产物为 248bp,见图 1。扩增产物经 MboI 限制性内切酶酶切 1 h,用 3%的琼脂糖电泳凝胶分离。野生型等位基因 CC 基因型酶切产物为 172,60,16 三个条带,突变杂合型 CT 基因型酶切产物为 232,172,60,16 四个片段,突变纯合子型酶切产物为 232、16bp 片段。由于 60、16bp 片段太小,电泳图上无法显示。

2.2 耐药组和控制组基因分布

表 1 显示耐药组 CC 基因型 21 例(频率为 24.71%),CT 基因型 44 例(频率为 51.76%),TT 基因 20 例(频率为 23.53%)。有效组 CC 基因型 19 例(频率为 26.76%),CT 基因 38 例(频率为 53.52%),TT 基因型 14 例(频率为 19.71%)。其中有效组 CC 基因型突变频率较高。两组基因型进行 X² 检验, X²=0.344, P 值为 0.842,无统计学意义。

3 讨论

癫痫的耐药机制复杂,至今尚未完全阐明。临床中,人们发现患者一旦对某种抗癫痫药耐药,往往对其他作用机制不同、化学结构不同的药物产生耐药。于是人们猜测可能存在一种共同的机制导致耐药。

P-gp 是一分子量为 170kD 的膜结合蛋白,能将膜内物质转运出细胞外,其底物为脂溶性物质。正常生理情况下,P-gp 在血脑屏障上的毛细血管内皮细胞、星形胶质细胞上低表达,而在耐药性癫痫患者中,P-gp 在脑实质、血管内皮细胞、星形胶质细胞上表达明显增高^[9,10]。Nishimura^[11]等对海人酸诱导的癫痫模型小鼠研究,表明 P-gp 的高表达可导致中枢内卡马西平浓度降低。由此可知,无论人切除的脑组织还是动物实验都表明 P-gp 与癫痫的耐药性呈高度相关性。

目前各国对此基因多态性的研究结论不一。Siddiqui^[8]与Basic^[12]等表明 P-gp 3435 位的 CC 基因型可能与癫痫耐药有关。Lakhan^[13]对印度人重复类似研究,未能得出此相关性。

Haerian^[14]用 meta 分析方法,亦未能得出此相关性。Seo^[15]等对 210 个日本癫痫患者调查,得出与 Siddiqui 相反的结论,即 TT 基因型与癫痫耐药相关。本研究通过对 156 例癫痫患者进行研究,并未发现此基因多态性与癫痫耐药的关联性,但趋势与 Seo 调查的 210 个日本癫痫患者研究相同,即耐药组的 TT 基因型高于药物治疗有效组。

各国结论产生分歧的原因可能在于:(1)种族的差异性 Ameyaw^[16]等认为 C3435T 基因型频率在各种族间存在着明显的差异,即 TT 基因型在非洲黑人和白人中的表达频率分别为 65%~83%和 25%,而亚洲人比率介于两者之间。(2)存在其它基因位点导致 p-gp 表达差异。有学者提出 G2677T/A 和 C1236T、C3435T 三个位点存在连锁不平衡关系^[17]。此外,是否有其它基因位点突变导致 P-gp 表达差异,还有待探讨^[18]。(3)分组标准不同,目前耐药性癫痫尚无国际统一标准。例如, Siddiqui^[8]等许多国外学者的耐药性癫痫诊断标准的发作频率为 4 次/年, Ufer^[19]的诊断标准为对一线抗癫痫药物不耐受的患者。我国学者多采用吴逊^[7]提出的标准。而各国间耐药性癫痫标准的不同,必然导致受试对象选择差异,从而影响最终结果。

总而言之,本研究未能得出 C3435T 位点与癫痫耐药的关联性。但仍不能排除存在其它基因多态性导致 P-GP 过量表达,从而导致耐药性癫痫。本研究的局限性在于:样本量偏小,说服力不够,此外仅做了单个 SNP 分析。面对复杂的癫痫疾病,有必要进行大样本的其它位点基因的深入研究。

参考文献(Reference)

[1] 郑兴珍, 武士京. 难治性癫痫的耐药性与多药耐药基因的研究进展 [J]. 神经疾病与精神卫生, 2008, 8(1):74-76
Zheng Xing-zhen, Wu Shi-jing. Advance on the Multidrug resistance gene1 and drug resistance in refractory epilepsy [J]. Nervous Diseases And Mental Health, 2008, 8(1):74-77

[2] Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, et al. Adult epilepsy [J]. Lancet, 2006, 367(9516): 1087- 1100

[3] Borst P, Evers R, Kool M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92 (16):1295-1302

[4] Brinkmann U, Roots I, Eichelbaum M. Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy [J]. Drug Discov Today, 2001, 6(16): 835-839

[5] Woodahl EL, Ho RJ. The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function [J]. Curr Drug Metab, 2004, 5(1):11-19

[6] Loscher W, Klotz U, Zimprich F, et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy [J]. Epilepsia, 2009, 50(1): 1-23

[7] 吴逊, 沈鼎烈. 难治性癫痫 [J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(1):4-6
Wu Xun, Sheng Ding-lie. refractory epilepsy [J]. Chinese Journal Of Neurology, 1998, 31(1): 4-6

[8] Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1 [J]. N Engl J Med, 2003, 348(15): 1442- 1448

[9] Ak H, Ay B, Tanriverdi T, et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in patients with focal cortical dysplasia [J]. Seizure, 2007, 16(6):493-503

[10] Aronica E, Ozbas-Gerceker F, Redeker S, et al. Expression and cellular distribution of high- and low-affinity neurotrophin receptors in malformations of cortical development [J]. Acta Neuropathol, 2004, 108(5):422-434

[11] Nishimura A, Honda N, Sugioka N, et al. Evaluation of carbamazepine pharmacokinetic profiles in mice with kainic acid-induced acute seizures [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(12): 2302-2308

[12] Basic S, Hajnsek S, Bozina N, et al. The influence of C3435T polymorphism of ABCB1 gene on penetration of phenobarbital across the blood-brain barrier in patients with generalized epilepsy [J]. Seizure, 2008, 17(6):524-530

[13] Lakhan R, Misra UK, Kalita J, et al. No association of ABCB1 polymorphisms with drug-refractory epilepsy in a north Indian population [J]. Epilepsy Behav, 2009, 14(1):78-82

[14] Haerian BS, Roslan H, Raymond AA, et al. ABCB1 C3435T polymorphism and the risk of resistance to antiepileptic drugs in epilepsy: a systematic review and meta-analysis [J]. Seizure, 19(6):339-346

[15] Seo T, Ishitsu T, Ueda N, et al. ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients [J]. Pharmacogenomics, 2006, 7(4):551-561

[16] Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity [J]. Pharmacogenetics, 2001, 11 (3): 217-221

[17] Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, et al. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy [J]. Neurology, 2004, 63(6):1087-1089

[18] Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance [J]. Clin Pharmacol Ther, 2004, 75(1):13-33

[19] Ufer M, Mosyagin I, Muhle H, et al. Non-response to antiepileptic pharmacotherapy is associated with the ABCB2 -24C>T polymorphism in young and adult patients with epilepsy [J]. Pharmacogenet Genomics, 2009, 19(5):353-362