

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091152951

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

外周血 P 糖蛋白检测
在耐药性癫痫诊断中的应用价值

Predictive Value of P-glycoprotein Expressed in
Peripheral Blood in Drug Resistant Epilepsy

张岱威

指导教师姓名: 郑维红 教授

专 业 名 称: 内科学 (神经病学)

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩时间: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

外周血 P 糖蛋白检测在耐药性癫痫诊断中的应用价值

张岱威

指导教师

郑维红 教授

厦门大学

2012年5月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

外周血C糖蛋白检测在耐药性癫痫诊断中的应用价值

张岱威

指导教师

郑维红
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 通过分析耐药性癫痫患者的临床特点, 探讨耐药性产生的危险因素。检测外周血 P 糖蛋白 (p-glycoprotein, P-gp) 相关指标, 寻找能够预测患者耐药性的实验室指标, 并评价这些指标在筛选耐药性癫痫时的应用价值。

方法: 整理癫痫患者资料 92 例, 耐药性癫痫患者和控制良好癫痫患者各 46 例, 每组男女各 23 例。统计分析两组患者起病年龄、病程、发作类型、是否有病灶、是否有颞叶异常放电、是否有脑炎病史 6 个基本临床指标, 用 Logistic 回归计算这些指标在评估癫痫患者耐药性时的价值。从两组患者中筛选出没有病灶的患者, 统计分析两组无病灶患者之间临床特点的差异, 并计算这些临床指标在评估癫痫患者耐药性时的价值。然后采集患者血样 36 例, 其中耐药性癫痫 15 例, 治疗良好癫痫 11 例, 对照组 10 例, 统计分析这些患者的临床数据, 检测分析 3 组外周血有核细胞中多药耐药基因 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 启动子甲基化水平、MDR1 mRNA 转录水平及 P-gp 在细胞膜上表达水平的差异。最后按有无病灶将 26 例癫痫患者分成两个亚组, 统计分析各组间的差异。

结果: 耐药性癫痫患者与控制良好癫痫患者在病程长短、是否有病灶、发作类型、诊断分型、异常放电是否起源于颞叶以及是否有脑炎病史六个方面差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。有颅内病灶、有颞叶起源异常放电及有脑炎病史三项与患者耐药性正相关 ($P < 0.05$)。无病灶的耐药性癫痫患者和控制良好癫痫患者在是否有颞叶异常放电和病史长短两个方面有差异 ($P < 0.05$), 这两个因素与无病灶患者的耐药性正相关。耐药性癫痫患者、控制良好癫痫患者以及其他人群之间的外周血细胞 P-gp 表达量及 MDR1 mRNA 表达水平没有差异 ($P > 0.05$), MDR1 基因启动子区甲基化水平有差异 ($P < 0.05$)。

结论: 是否有病灶、颞叶起源异常放电和脑炎病史是耐药性癫痫的危险因素。对于没有病灶的癫痫患者, 根据总病程和是否有颞叶起源异常放电, 可以预测患者是否为耐药性癫痫。耐药性癫痫患者外周血 MDR1 基因启动子区甲基化水平降低, 说明耐药性癫痫存在表观遗传学方面的改变。

关键词: 耐药性癫痫; P 糖蛋白; 表观遗传学

Abstract

Purpose: Analysis the clinical characters of drug resistant epilepsy. Investigate the expression of P-glycoprotein (P-gp), which is product of multidrug resistance gene 1 (MDR1), in peripheral blood. And evaluate whether P-gp expression on blood cells is a useful indication in diagnosis of drug resistant epilepsy.

Methods: This study enrolled 46 patients of drug with drug resistance epilepsy and 46 matched controls with well controlled epilepsy. Both male and female are 23 cases in each group. We investigated clinical characters include age, onset age, seizure years, partial seizure, abnormal brain imaging, history of CNS infection and temporal lobe epilepsy. Then we evaluate these indicates by Logistic analysis. After that, we selected patients, who without abnormal brain imaging, from each group and investigated their clinical characters. At last, we collected 36 cases patient's blood, 15 cases from drug resistance epilepsy patients, 11 cases from seizure-free patients, and 10 cases from other patients as control group. We investigate P-gp expression, MDR1 mRNA expression and epigenetic change on MDR1 gene.

Results: We established the differences in 6 clinical characters between drug resistance cases and seizure-free cases. Abnormal brain imagines, history of CNS infection and temporal lobe epilepsy have a closing relation with drug resistance appearance. For those cases with normal imagine temporal lobe epilepsy and seizure years become more vital. We cannot found differences at P-gp expression and MDR1 mRNA expression in three groups in patient's peripheral blood cell. But the epigenetic change is definite.

Conclusions: Abnormal brain imagines, history of CNS infection and temporal lobe epilepsy are risk factors for drug resistant epilepsy. For patients with normal bain imagine, we can predict if his/her will become a drug resistance epilepsy by their clinical indicators. Though P-gp expression in peripheral blood may not be a good indicator for drug resistance, the epigenetic changing can be found in patient's blood cells.

Key words: Drug resistant epilepsy; P-glycoprotein; epigenetic changing

目 录

中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 癫痫概述.....	1
1.2 目前耐药性癫痫的诊断标准.....	1
1.3 P 糖蛋白与耐药性癫痫的关系.....	3
1.3.1 P 糖蛋白概述.....	3
1.3.2 P 糖蛋白在癫痫患者病灶中的表达.....	4
1.3.3 P 糖蛋白过表达与耐药性机制的关系.....	5
1.3.4 P 糖蛋白过表达与 MDR1 基因多态性.....	6
1.3.5 P 糖蛋白过表达与 MDR1 基因表观遗传学改变.....	7
1.4 外周血细胞 P 糖蛋白与癫痫患者耐药性的关系.....	9
1.5 研究目的、意义及内容.....	9
第二章 耐药性癫痫患者临床资料分析.....	11
2.1 实验对象.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 整理分析癫痫患者临床资料.....	11
2.2.2 整理分析无病灶癫痫患者临床资料.....	11
2.3 结果.....	11
2.3.1 癫痫患者基本临床资料.....	11
2.3.2 用 6 个临床指标评价患者耐药性.....	14
2.3.3 无病灶癫痫患者临床资料分析.....	15
2.3.4 用 6 个临床指标评价无病灶癫痫患者耐药性.....	18
2.4 讨论.....	19
第三章 癫痫患者外周血 P 糖蛋白检测.....	21
3.1 实验对象.....	21
3.2 材料与方法.....	21

3.2.1 主要仪器.....	21
3.2.2 主要试剂.....	22
3.2.3 流式细胞计检测 P-gp 表达.....	23
3.2.4 外周血有核细胞提取.....	24
3.2.5 RT-PCR 检测 MDR1 mRNA 转录水平.....	24
3.2.6 MSP 检测 MDR1 DNA 启动子区域甲基化水平.....	27
3.2.7 实验结果统计分析.....	31
3.3 结果.....	33
3.3.13 组患者基本临床资料.....	33
3.3.23 组患者 P-gp 相关指标对.....	34
3.3.3 回归分析 3 项 P-gp 相关指标在估计患者耐药性中的价值.....	35
3.3.4 对有无病灶患者进行亚组分析.....	36
3.3.5 3 对病灶相似患者临床资料对比.....	36
3.4 讨论.....	37
第四章 结论和展望.....	40
附录 缩略语表.....	41
参考文献.....	42
致谢.....	49

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English.....	III
Chapter1 Preface.....	1
1.1 Overview of epilepsy.....	1
1.2 Diagnosis standard of drug resistant epilepsy.....	1
1.3 Association between P-glycoprotein and drug resistant epilepsy.....	3
1.3.1 Overview of P-glycoprotein.....	3
1.3.2 Expression of P-glycoprotein in epileptic focus.....	4
1.3.3 Association between P-glycoprotein and drug resistant mechanism.....	5
1.3.4 Over expression of P-glycoprotein and polymorphism of MDR1 gene.....	6
1.3.5 Over expression of P-glycoprotein and epigenetic changing of MDR1 gene.....	7
1.4 Relationship between P-glycoprotein in peripheral blood and drug resistant epilepsy.....	9
1.5 Purpose, significance and content.....	9
Chapter2 Analyses clinical characters in drug resistant epilepsy.....	11
2.1 Experimental subjects.....	11
2.2 Material and methods.....	11
2.2.1 Analyses clinical characters with epilepsy.....	11
2.2.2 Analyses clinical characters with non-abnormal brain imagines epilepsy.....	11
2.3 Results.....	11
2.3.1 Clinical characters with epilepsy patients.....	11
2.3.2 Evaluation patient's resistant of drug with six clinical indicators.....	14
2.3.3 Analyses clinical characters with non-abnormal brain imagines epilepsy.....	15
2.3.4 Evaluation non-abnormal brain imagines patient's resistant of drug with six clinical indicators.....	18
2.4 Discussion.....	19
Chapter3 Investigate the expression of P-glycoprotein in peripheral blood	21
3.1 Experimental subjects.....	21
3.2 Material and methods.....	21

3.2.1 instrument.....	21
3.2.2 Reagents.....	22
3.2.3 P-glycoprotein expression by flow cytometry.....	23
3.2.4 Extract nucleated cells from peripheral blood.....	24
3.2.5 MDR1 mRNA transcription level by RT-PCR.....	24
3.2.6 MDR1 DNA promoter region methylation level by MSP.....	27
3.2.7 Statistical analysis.....	31
3.3 Results.....	33
3.3.1 Clinical characters with three groups.....	33
3.3.2 Compared between drug resistant epilepsy, well controlled epilepsy and the other.....	34
3.3.3 Evaluation the diagnostic value of P-glycoprotein expression by Regression analysis.....	35
3.3.4 Analyses non-abnormal brain imagines epilepsy.....	36
3.3.5 Compared between three pairs similar cases.....	36
3.4 Discussion.....	37
Chapter4 Conclusion and Prospect.....	40
Symbolic description.....	41
Reference.....	42
Acknowledgment.....	49

第一章 绪论

1.1 癫痫概述

癫痫是指一组由不同病因所引起，脑部神经元高度同步化，且常具自限性的异常放电所导致，以发作性、短暂性、重复性及通常为刻板性的中枢神经系统功能失常为特征的综合征^[1]。每次发作称为痫样发作，反复多次发作所引起的慢性神经系统病症则称为癫痫。是神经系统第二大常见疾病。据 WHO 统计，我国的癫痫人群约 900 万，患病率为 7‰，与发展中国家 7.2‰的发病率接近^[2]。每年还有约 40 万新发患者。抗癫痫药物治疗是目前最主要的治疗方式。近年来，虽然随着新型抗癫痫药物的涌现，癫痫的药物治疗有了长足进步。但是仍有大约三分之一的患者，通过药物治疗不能够减轻其发作的频率和强度。

1.2 目前耐药性癫痫的诊断标准

在临床工作中，这部分用抗癫痫药物治疗难以控制癫痫发作的患者，被称为“难治性癫痫”（Intractable epilepsy, IE）。虽然“难治性癫痫”的概念早已为临床工作者所接受，但“难治性癫痫”的诊断标准并不统一。在国内的临床工作中，常用的诊断标准是“治疗 2 年以上，血药浓度在正常范围之内，每月仍有 4 次以上发作的癫痫患者，称为难治性癫痫”^[3]。王学峰教授还提出过一个难治性癫痫的分型标准，他把发作不易控制的癫痫患者按其难治的程度分为三型：I 型：用 3 种以上一线抗癫痫药物单用，在有效治疗期间，合理治疗，仍有发作或已被实践证实是耐药的癫痫和癫痫综合征；II 型：用 3 种以上一线抗癫痫药物单和联合用药，在有效治疗期间，合理治疗，仍有发作或已被实践所证实是耐药的癫痫或癫痫综合征；III 型：用目前抗癫痫药物，在有效治疗期间，合理用药，仍有发作或已被实践证实是耐药的癫痫和癫痫综合征^[4]。除此之外，国内外其他研究团队，也提出过各自的难治性癫痫诊断标准^[5]。无论在何种定义下，难治性癫痫的一个共同特征就是对不同化学结构、不同作用方式的多种抗癫痫药物都存在不同程度的耐药性^[4]。

诊断标准不统一，既是临床工作中的重要障碍，又不利于学术交流的进行。而且，这些诊断标准在临床应用中，都存在着各种缺陷。以国内原先通用的诊断标准为例^[6]，它存在四个方面的缺陷。首先，它规定了“2 年”的观察期，忽略

了癫痫患者痫性发作频率的差异，对发作十分频繁的患者来说，因为没有及时得到有效的治疗，可能会延误病情，导致长时间的癫痫频繁发作而对中枢神经系统造成不必要的损伤。比如反复的癫痫发作会引起神经组织的损害，会使大脑皮质变薄^[7]。其次，很多发作较为稀少的患者，即使目前药物治疗无效，也会被该标准排除在外，癫痫发作得不到有效的控制。第三，随着人们生活水平的提高，患者对治疗效果的期望也就越高，规定“每月4次”的发作次数，与现在患者要求达到“无发作”的理想目标有差距。最后，这个诊断标准采用“血药浓度”作为观察指标，是由于传统的抗癫痫药物需要监测血药浓度，而新型的抗癫痫药物因药物代谢动力学的改变，不再需要检测血药浓度，因此这个标准不能适应现在的临床需要。所以，临床工作中需要一个更好的诊断标准来把这些药物治疗效果较差的患者筛选出来，以便及时的给予有效的治疗措施。

于是，2009年国际抗癫痫联盟提出了一个最新的“耐药性癫痫”诊断标准来替代原有的“难治性癫痫”的概念。该标准认为，“癫痫患者若在充分接受2种可耐受的、选择合理的抗癫痫药治疗方案后仍无效，无论是单药治疗抑或联合治疗，均应被视为耐药。”^[8]该标准的优点在于，它没有对患者病程本身做一个统一的规定，而是基于治疗方案的疗效进行诊断，因此可以较好的体现出不同癫痫患者的个体化差异。如何评价一种抗癫痫药物治疗方案是否有效，国际抗癫痫联盟也给出了标准，即要达到“患者无发作期长于3倍最长发作间隙，且长于12个月。”^[8]方可认为该治疗方案有效，否则就是无效。试用2个治疗方案无效后，就可以诊断为“耐药性癫痫”。这个标准的提出，改善了临床上耐药性癫痫诊断标准混乱的局面，对临床工作和学术交流都有极大的益处。同时也能看出，这个“耐药性癫痫”的诊断标准较国内原有“难治性癫痫”诊断标准范围更大，一些用药后仍有少量发作的患者也被囊括了进来。这体现出了医学技术的进步，也反映出人们对健康要求的提升。

但是，这个诊断标准在临床应用中仍有一些问题。首先，诊断周期过长的的问题并没有彻底解决。对于痫性发作十分频繁的患者来说，数周时间就能实验完2个治疗方案，并给出诊断，而不用像旧标准要求的一定要治疗2年以上，这是新的标准的进步。但对一些发作较少间隔期较长，发作较为稀少的患者，观察2个治疗方案，可能会需要2年甚至更长的时间^[9]。让患者长期接受无效的治疗措施，既增加了患者的痛苦和经济负担，又浪费了医疗资源，还对患者疾病转归有

负面影响。其次，这个诊断标准仍完全依赖于临床医师的临床观察进行诊断，没有实验室的客观指标做依据。在这个定义中，“合理选药”是指要根据患者的发作类型进行选药，这个要依赖临床医师对患者发作类型的准确认识；“充分有效的治疗”，是指药物要达到有效治疗剂量并持续一段时间，这要依赖于患者对医生的配合，定期的随访。“无发作”，指完全没有临床发作，这也要依赖于临床医师对癫痫发作，特别是一些轻微发作和不典型发作的认识，还要依赖患者及家属对患者发作的观察。这三个方面，受患者及家属配合程度和医师临床工作能力的影响很大，所以这个诊断标准受医患双方各种主观因素影响比较明显。因此，临床工作中希望能够有一种客观指标作为诊断耐药性癫痫的依据。

随着医学技术的进步，对癫痫耐药性产生机制分子生物学水平改变的认识逐渐深入，为寻找客观的实验室指标来对癫痫患者耐药性进行辅助评价提供了理论依据。在一些研究中发现了耐药性癫痫与多药耐药蛋白的异常表达有关^[5-13]，进而发现通过外周血可以检测这些蛋白的表达情况。于是，王学峰教授就率先提出利用癫痫患者外周血 P-gp 检测来协助进行癫痫患者耐药性评估的想法^[62]。

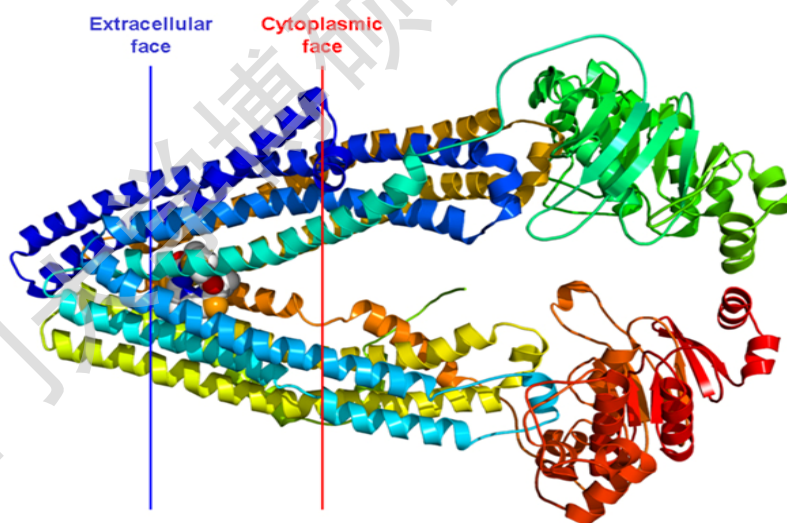


图1 P-Glycoprotein 分子结构图

1.3 P 糖蛋白与耐药性癫痫的关系

1.3.1 P 糖蛋白概述

P 糖蛋白 (p-glycoprotein, P-gp) 是一种膜结合蛋白，分子量为 170KD，它是转运蛋白 ATP 结合物 (ATP-binding cassette transporters, ABCT) 超家族的成

员之一。P-gp 含有 1280 个氨基酸，由人类第 7 号染色体 q21.1 上人类多药耐药基因 1 编码。多药耐药基因 1 (Multidrug resistance gene 1, MDR1) 又称 ATP 结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白基因 (ATP-binding cassette subfamily B member 1 transporter gene, ABCB 1), 全长 4669bp, 由 28 个外显子组成, 可转录得到 4.5kb 的 mRNA, 是一种可调控基因^[10]。

P-gp 由两个相同的亚基组成, 每个亚基都有 1 个亲水的氨基末端和 6 个疏水的跨膜区, 两个亚基之间有链区相连。亲水的氨基末端能够和蛋白作用底物相结合, 完成跨膜转运功能^[11]。P-gp 还具有多个 cAMP 依赖的 PKA 和 PKC 磷酸化位点, 通过这些位点可以调控 P-gp 的生物活性^[12]。

正常人体中的 P-gp 集中在肝脏、消化道和肾脏, 以保护这些重要器官不受有毒性的化学物质损害。在正常脑组织, P-gp 主要表达在脑毛细血管内皮细胞的腔面, 而脑实质如胶质细胞以及神经元难以监测到 P-gp。但是, 各种有害因素, 如感染、缺氧、中毒等, 都可以使 P-gp 在细胞表面的表达量增加, 也会使原本不表达 P-gp 的组织细胞出现表达^[13]。因此在病理情况下, P-gp 可出现在胶质细胞, 甚至神经元细胞表面^[14]。

1.3.2 P 糖蛋白在癫痫患者病灶中的表达

1995 年 Tishler 等人在《Epilepsia》上的报道是关于 P 糖蛋白与耐药性癫痫的关系的最早文献。Tishler 等人对 19 例手术切除的耐药性癫痫患者脑组织和正常脑组织进行了比较, 发现 14 例耐药性癫痫患者脑组织中有 P-gp 过表达, 11 例有 MDR1 mRNA 表达升高^[5]。可惜这个发现当时并没有受到学术界足够的重视, 之后数年都没有进一步的研究报告。直到 2000 年, 这个方面的文献一共也只有 4 篇。2000 年之后, 随着人们对肿瘤性疾病耐药机制认识的深入, 学者们再次开始探讨 MDR1 基因和它所表达的 P-gp 与耐药性癫痫的关系, 并在 P-gp 底物研究和 MDR1 基因调控两个方面取得了大量研究成果。通过 Web of Science 的统计数据可以看到, 仅在 2007 年一年就有 40 余篇相关文献被发表。同时, 被引用次数也节节攀升, 2011 年被引用数量近千, 说明研究者对这个领域的关注仍在不断增加。

血液与脑组织之间存在血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB), 抗癫痫药物 (Antiepileptic drugs, ADEs) 要进入脑内的病灶组织处发挥生物学效应就必须能够穿过它。BBB 主要由微血管内皮细胞构成, 内皮细胞间存在着紧密连接,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库