

多药耐药相关蛋白与难治性癫痫

赵广健 综述 姚丽芬 审校

哈尔滨医科大学第一临床医学院神经内科,黑龙江省哈尔滨市 150001

摘要: 难治性癫痫的发病机制尚不完全清楚,近年来发现在难治性癫痫患者病灶脑组织可检测出多药耐药相关蛋白(MRP)的过度表达,表明MRP与难治性癫痫耐药关系密切。MRP的过度表达受多种因素影响,其可能通过降低抗癫痫药物在血脑屏障的通透性,减少药物的有效浓度,从而引起抗癫痫药物耐药发生。鉴于MRP在难治性癫痫多药耐药中可能的重要作用,筛选非MRP底物的抗癫痫药物和选用适合长期服用的特异性强、安全性高、毒副作用性小的MRP抑制剂,可能会为今后临床治疗难治性癫痫翻开新的一页。

关键词: 多药耐药相关蛋白;难治性癫痫;抗癫痫药物

癫痫(epilepsy)是神经系统疾病中发病率仅次于脑卒中的常见疾病,人群患病率约在5‰。尽管近年来在抗癫痫药物(anti-epileptic drugs, AEDs)治疗方面有了相当大的进展,经正规AEDs治疗后,仍有20%~30%的患者抽搐发作不能缓解称为难治性癫痫(intractable epilepsy, IE)^[1]。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指由单一药物诱发,同时对其他多种不同作用机制的药物产生交叉耐药的现象。IE表现为对多种AEDs产生耐药,临床治疗效果欠佳。目前癫痫耐药机制主要有两个方面备受关注:①由于药物作用的靶点产生耐药现象,从而使AEDs的敏感性降低或者消失。②药物转运体的过度表达,致使AEDs通过血脑屏障到达癫痫病灶局部的药物浓度降低。其中多药转运体过度表达与IE耐药之间的关系一直是癫痫研究的热点。多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP)是脑内重要的多药转运体,在调节癫痫患者脑细胞内外AEDs浓度时起了重要作用^[2]。

ATP结合盒(ATP-binding cassette transporter, ABC)转运载体超家族是人类最大的转运蛋白基因家族,其编码的跨膜蛋白可以在Mg²⁺参与下水解ATP,以主动运输方式完成对各种分子的跨膜转运^[3]。研究证实ABC转运蛋白过度表达在对药物的多药耐药中起到重要作用。到目前为止ATP结合盒转运载体超家族按照基因结构和氨基酸的排列可分成7个亚家族(ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、

ABCE、ABCF和ABCG),在人类基因组中有49个成员,并且有新成员被不断地发现。与多药耐药相关的蛋白主要P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、MRP、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)和肺耐药相关蛋白(lung resistance related protein, LRP)等。

1 MRP的结构、分布和底物

MRP(ABCC)属于ABC转运载体超家族成员,是有机阴离子转运体。到目前为止MRP家族已有13个成员,其中有9个(包括MRP1-MRP9)与药物转运有关^[4]。Cole等于1992年在小细胞肺癌耐药菌株(H69AR)中首次发现MRP1。根据结构可以将MRP家族分为两大类:一类是长MRP家族,包括MRP1、MRP2、MRP3、MRP6和MRP7,由三个跨膜区域及核苷酸结合区域组成。另一类是短MRP家族,包括MRP4、MRP5、MRP8和MRP9,只有两个跨膜区域及核苷酸结合区域组成。由于其结构的特异性,长MRP家族通常转运一些自然产物片段,而短MRP家族主要转运核苷酸类似物^[5,6]。

MRP1由1531个氨基酸组成,其编码基因位于人类第16号染色体p13.1,长6.5 kB。普遍存在于人类正常组织内,特别是肾、肺和睾丸,在CNS中主要分布在血脑屏障上皮细胞基底外侧面。MRP1是特异性有机阴离子转运体,其大多数底物是葡萄糖醛酸结合物、谷胱甘肽及硫酸盐结合物,如长春新碱、替尼泊苷、阿霉素、柔红霉素、米托蒽醌、亚砷酸盐和甲氨蝶呤等。MRP1的抑制剂有MK571、

收稿日期:2011-04-28;修回日期:2011-07-15

作者简介:赵广健(1986-),男,硕士研究生,主要从事癫痫的研究。

通讯作者:姚丽芬(1966-),女,医学博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,主要从事癫痫及神经变性疾病的研究。E-mail:ylf0431@163.com。

磺吡酮、苯溴马隆、丙磺舒和维拉帕米等^[6]。

MRP2 由 1545 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 10 号染色体 q24,长 5.5 kB。主要分布于肝、小肠上皮细胞、肾近端小管和胎盘合体滋养层细胞,在其他组织表达较低。研究发现 MRP2 在中枢神经系统中主要分布在大脑毛细血管内皮上。MRP2 的底物与 MRP1 相似,还包括顺铂。MRP2 的抑制剂有磺吡酮、MK571、丙磺舒和环孢素。

MRP3 由 1527 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 17 号染色体 q21.3,长 6.5 kB。主要分布在胰腺、肾上腺、肝细胞的基底外侧膜、小肠上皮细胞和大脑等。其底物除谷胱甘肽外,与 MRP1 和 MRP2 相似。MRP3 的抑制剂有丙磺舒、吡喹酮和美辛和苯溴马隆等。

MRP4 由 1325 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 13 号染色体 q32,长 6.5 kB。除在前列腺和肾外,其他组织表达较低。MRP4 的底物有 cAMP、cGMP、PGE1、PGE2、核苷酸类似物 PMEA、嘌呤类似物、齐多夫定、更昔洛韦、甲氨蝶呤^[7]。

MRP5 由 1437 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 3 号染色体 q27,长 6.6 kB。存在于大多数

组织,其中在骨骼肌和大脑中表达最高。其底物有 cAMP、cGMP、核苷酸类似物 PMEA 等。MRP5 的抑制剂有丙磺舒和曲唑酮。

MRP6 由 1503 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 16 号染色体 p13.1,长 6.5 kB。主要存在于肾及肝细胞基底外侧膜。其底物有谷胱甘肽结合物,BQ-123。

MRP7 由 1464 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 6 号染色体 p21,长 5.5 kB。主要分布在结肠、皮肤和睾丸。其底物与 MRP1 类似。

MRP8 由 1382 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 16 号染色体 q12.1,长 4.6 kB。主要分布于肝及乳腺,其底物有 cAMP、cGMP、核苷酸类似物及氟嘧啶。

MRP9 由 1359 个氨基酸组成,其编码基因位于人类第 16 号染色体 q12,长 5 kB。其主要分布于脑、睾丸及早期乳腺肿瘤。MRP9 在阵发性运动性舞蹈手足徐动症发病中其重要作用。

尽管 MRP 家族各亚型功能各不相同,但其中枢神经系统中均有表达,并且在药物和代谢产物的转运中起重要作用(见表 1)。

表 1 MRP 家族相关属性

名称	大小	编码基因及大小	分布	底物	抑制剂
MRP1(ABCC1)	1531	16p13.1 6.5kB	人正常组织内普遍存在,特别是肾、肺、睾丸、肾	多数底物是葡萄糖醛酸结合物、谷胱甘肽及硫酸盐结合物,如长春新碱、替尼泊苷、阿霉素、柔红霉素、米托蒽醌、亚砷酸盐、甲氨蝶呤	MK571、磺吡酮、苯溴马隆、丙磺舒、维拉帕米
MRP2(ABCC2)	1545	10q24 5.5kB	肝、小肠上皮细胞,肾近端小管、胎盘合体滋养层细胞,其他组织表达较低	与 MRP1 相似,还包括顺铂	磺吡酮、MK571、丙磺舒、环孢素
MRP3(ABCC3)	1527	17q21.3 6.5kB	胰腺、肾上腺、肝细胞的基底外侧膜、小肠上皮细胞、大脑	其底物除谷胱甘肽外,与 MRP1 和 MRP2 相似	丙磺舒、吡喹酮、美辛、苯溴马隆
MRP4(ABCC4)	1325	13q32 6.5kB	除在前列腺和肾外,其他组织表达较低	cAMP、cGMP、PGE1、PGE2、核苷酸类似物 PMEA、嘌呤类似物、齐多夫定、更昔洛韦、甲氨蝶呤	
MRP5(ABCC5)	1437	3q27 6.6kB	存在于大多数组织,在骨骼肌和大脑中表达最高	cAMP、cGMP、核苷酸类似物 PMEA 等	丙磺舒、曲唑酮
MRP6(ABCC6)	1503	16p13.1 6.5kB	肾、肝细胞基底外侧膜	谷胱甘肽结合物、BQ-123	
CFTR(ABCC7)	1480	7q31.2 6kB	肺、肠、胆囊		
SUR1(ABCC8)	1581	11p15.1 5kB	胰腺		
SUR2(ABCC9)	1549	12p12.1 5kB	心脏、骨骼肌		
MRP7(ABCC10)	1464	6p21 5.5kB	结肠、皮肤、睾丸	与 MRP1 类似	
MRP8(ABCC11)	1382	16q12.1 6kB	肝、乳腺	cAMP、cGMP、核苷酸类似物、氟嘧啶	
MRP9(ABCC12)	1359	16q12 5kB	脑、睾丸、早期乳腺肿瘤	在阵发性运动性舞蹈手足徐动症发病中其重要作用	
ABCC13	325	21q11.2	胎儿肝脏、骨髓		

2 MRP 与 IE 的关系

2.1 MRP 在 IE 中的表达

IE 的发病机制尚不完全清楚,但研究表明多药转运体过度表达与 IE 耐药关系密切。许多研究证实,在癫痫患者病灶脑组织检测出 MRP 过度表达。Ak 等^[8]应用免疫组化法研究发现在 IE 患者病灶脑组织血管内皮细胞中 MRP1 表达增高。Sisodiya 等^[9]研究发现,在胚胎发育不良性神经上皮肿瘤 (dysembryoplastic neuroepithelial tumors, DNTs)、局部脑皮质发育不良 (focal cortical dysplasia, FCD) 和海马硬化 (hippocampal sclerosis, HS) 等三种主要引起 IE 的患者脑组织中,发现有 MRP1 的过度表达,主要表现在神经元和神经胶质细胞。MRP1 的高表达只发生在癫痫患者病变脑组织中,而不影响毗邻的正常脑区。上述研究表明 MRP 在 IE 患者病灶脑组织中的高表达可能是 AEDs 非特异性耐药的生物学基础。

2.2 MRP 在 IE 耐药中的作用

MRP 在 IE 病灶组织中可能参与了 AEDs 的耐药机制。正常情况下位于血脑屏障内皮细胞顶膜的 MRP 与底物结合后将其转运到细胞外,降低细胞内底物的浓度,阻止有害物质进入细胞内。在某种病理过程中 MRP 过度表达,可能减少药物的有效浓度,从而产生耐药^[10]。Potschka 等^[11]应用基因敲除技术,发现在 *mrp2* 缺陷鼠 (TR-) 大脑细胞外苯妥英钠的浓度比正常鼠有显著的升高,表现出更明显的抗惊厥作用。这表明 MRP2 可能限制苯妥英钠通过血脑屏障进入脑内。由此可以推测 MRP 可以转运 AEDs,其在癫痫灶中的过度表达可能使细胞外 AEDs 的浓度下降,从而产生耐药现象。目前认为在癫痫发作时可能引起血脑屏障的内皮屏障功能发生短暂的破坏,在星形胶质细胞终足部位表达 MRP 等多药耐药蛋白构成“第二屏障”维持血脑屏障的功能。Kubota 等^[12]研究发现 MRP 的表达可能通过改变 AEDs 在血脑屏障的通透性而引起 AEDs 的耐药发生。MRP 可以将脂溶性药物泵出细胞外,减少药物在细胞内的浓度,而大多数 AEDs 都是脂溶性。MRP 减弱了药物通过血脑屏障的能力,降低了皮层细胞外液内药物浓度,可能是引起临床癫痫患者对 AEDs 不敏感,表现 IE 多药耐药的原因。早期的研究曾提示常见 AEDs 可能是 MRP 的底物, Potschka 等^[13]应用微透析技术在 IE 大鼠模型中发现,将 MRP 的抑制剂丙磺舒局部脑组织灌注可提高卡马西平、苯妥英钠在脑组织细胞外液的药物浓度。但最新研究发现并非如此, Luna-Tortós 等^[4]应用浓度平衡转运分析 (concentration

equilibrium transport assay, CETA) 技术发现至少在体外模型研究中就大多数 AEDs (包括卡马西平、左乙拉西坦、苯妥英钠、拉莫三嗪和苯巴比妥) 都不是 MRP1、MRP2 和 MRP5 的底物。近期研究认为^[14, 15],丙戊酸钠和托吡酯也不是 MRP 的底物。由此可见,常见的 AEDs 是否为 MRP 的底物,MRP 在 IE 耐药中的具体作用机制有待进一步的研究。

2.3 MRP 在 IE 中高表达的原因

MRP 在 IE 患者病灶组织中过度表达是由于癫痫反复发作引起,还是长期 AEDs 的应用导致尚不清楚。目前认为 MRP 的高表达是由多种因素引起的,其中多次癫痫发作导致的脑内异常放电活动是诱发 MRP 高表达的主要原因。van Vliet 等^[16]采用电刺激大鼠诱导研究发现癫痫持续状态,显示 MRP1 和 MRP2 在大鼠海马及其周围皮质的血管内皮,星形胶质细胞和神经元表达增高。但 Kuteyken-Teplyakov 等^[17]应用 RT-PCR 技术观察大鼠癫痫持续状态后 MRP1 mRNA 仅在梨状皮层短暂表达,在海马组织无高表达,在杏仁核表达下降。上述研究表明 MRP 的过度表达除癫痫反复发作外,还有其他机制共同作用。长期应用 AEDs 治疗可能使药物通过血脑屏障的通透性下降,从而诱导 MRP 的表达增多导致 AEDs 的耐药,但是此类研究报道较少。Lazarowski 等^[18]研究发现某些脑发育异常例如结节性硬化患者在癫痫发作前或者在服用 AEDs 前已经有 MRP 的高表达。Narang 等^[19]发现地塞米松可以显著增加血脑屏障中 MRP2、P-gp 和 BCRP 的表达和活性,并且其表达具有剂量依赖性和可逆性,从而减少药物有效地通过血脑屏障。研究显示在帕金森病和阿尔茨海默病中也有 MRP 的表达^{[20] [21]}。因此表明 MRP 的高表达可能受遗传及免疫等多种因素影响,机制有待进一步研究。

3 研究展望

尽管 IE 耐药机制尚未完全阐明,但可以肯定的是 MRP 在 IE 多药耐药过程中起着重要作用。近年来一些新技术如正电子发射计算机断层扫描 (positron emission tomography, PET) 和标志物追踪剂等逐步应用,将有助于提供 MRP 参与 AEDs 代谢的直接证据,从而深入研究 IE 多药耐药的具体机制。鉴于 MRP 在 IE 多药耐药中可能的重要作用,筛选非 MRP 底物的 AEDs 和选用适合长期服用的特异性强、安全性高、毒副作用性小的 MRP 抑制剂,可能会为今后临床治疗 IE 翻开新的一页。

参 考 文 献

- [1] Czuczwar P, Kaczmarczyk K, Wierzchowska CE, et al. Drug resistance in epilepsy. *Przegl Lek*, 2009, 66 (11): 963-

966.

- [2] Visweswari G, Siva PK, Lokanatha V. The antiepileptic effect of *Centella asiatica* on the activities of Na^+/K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} -ATPases in rat brain during pentylenetetrazol-induced epilepsy. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42 (2): 82-86.
- [3] He SM, Li R, Kanwar JR. Structural and Functional Properties of Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem*, 2011, 8(3): 439-481.
- [4] Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Loscher W. Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy. *Neuropharmacology*, 2010, 58(7): 1019-1032.
- [5] Kruh GD, Belinsky MG, Gallo JM. Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 5-14.
- [6] Keppler D. Multidrug Resistance Proteins (MRPs, ABCs): Importance for Pathophysiology and Drug Therapy *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 201: 299-323.
- [7] Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System. *Pharmacological Rev*, 2006, 58(2): 140-161.
- [8] Ak H, Ay B, Tanriverdi T, et al. Expression and cellular of multidrug resistance-related proteins in patients in patients with focal cortical dysplasia. *Seizure*, 2007, 16(6): 493-503.
- [9] Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, et al. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*, 2002, 125(1): 22-31.
- [10] Schmidt D, Löscher W. New Developments in Antiepileptic Drug Resistance: An Integrative View. *Epilepsy Curr*, 2009, 9(2): 47-52.
- [11] Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306(1): 124-131.
- [12] Kubota H, Isgihara H, Langmann T, et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 2006, 68(3): 213-228.
- [13] Potschka H, Loscher W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport*, 2001, 12(11): 2387-2389.
- [14] Baltes S, Fedrowitz M, Tortós CL, et al. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(1): 331-343.
- [15] Luna-Tortós C, Rambeck B, Jürgens UH, et al. The antiepileptic drug topiramate is a substrate for human P-glycoprotein but not multidrug resistance proteins. *Pharm Res*, 2009, 26(11): 2464-2470.
- [16] van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, et al. Gorter JA. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia*, 2005, 46(10): 1569-1580.
- [17] Kuteykin-Tepliyakov K, Brandt C, Hoffmann K, et al. Complex time-dependent alterations in the brain expression of different drug efflux transporter genes after status epilepticus. *Epilepsia*, 2009, 50(4): 887-897.
- [18] Lazarowski A, Lubieniecki F, Camarero S. Multidrug resistance proteins in tuberous sclerosis and refractory epilepsy. *Pediatr Neurol*, 2004, 30(2): 102-106.
- [19] Narang VS, Fraga C, Kumar N, et al. Waters Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(2): 440-450.
- [20] Furuno T, Landi MT, Ceroni M, et al. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(7): 529-534.
- [21] Sultana R, Butterfield DA. Oxidatively Modified GST and MRP1 in Alzheimer's Disease Brain: Implications for Accumulation of Reactive Lipid Peroxidation Products. *Neurochem Res*, 2004, 29(12): 2215-2220.