

- sistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15665-15670
- [2] LEE S S, JEONG H E, YI J M, *et al*. Identification and functional assessment of BCRP polymorphisms in a Korean population [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(4): 623-632
- [3] YANASE K, TSUKAHARA S, MITSUHASHI J *et al*. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development [J]. *Cancer Lett*, 2006, 234(1): 73-80
- [4] KAGE K, TSUKAHARA S, SUGIYAMA T, *et al*. Dominant negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 626-630
- [5] YANG C H, SCHNEIDER E, KUO M L, *et al*. BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(6): 831-837.
- [6] KAWABATA S, OKA M, SHIOZAWA K, *et al*. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(5): 1216-1223.
- [7] MALIEPAARD M, SCHEFFER G L, FANEYTE I F, *et al*. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3458-3464
- [8] JONKER J W, SMIT J W, BRINKHUIJSE R F, *et al*. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(20): 1651-1656
- [9] KRUIJZER C M, BEIJEN J H, ROSING H, *et al*. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918 [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(13): 2943-2950
- [10] JONKER J W, MERINO G, MUSTERS S, *et al*. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins in milk [J]. *Nat Med*, 2005, 11(2): 127-129
- [11] MAIY, NAKANEM, KAGE K, *et al*. C421A Polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(8): 611-616
- [12] KOBAYASHI D, ERII H, ROTA T, *et al*. Functional assessment of abcg2 (bcrp) gene polymorphisms to protein expression in human placenta [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(1): 94-101
- [13] MIZUARA I S, AOZASA N, KOTANI H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced ATPase activity in multidrug transporter ABCG2 [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(2): 238-246

(收稿日期: 2011-01-21)

难治性癫痫患者脑组织致痫灶与灶旁组织药物浓度的比较研究

沈江华, 姜德春, 王育琴* (首都医科大学宣武医院药剂科, 北京 100053)

摘要: 目的 通过比较难治性癫痫 (IE) 患者脑内致痫灶、灶旁组织的药物浓度的差异, 促进阐明 IE 的耐药机制。方法 收集自 2007 年 4 月 ~ 2009 年 3 月在首都医科大学宣武医院功能神经外科行“致痫灶切除术”的 IE 患者。用高效液相色谱法 (HPLC) 测定脑组织致痫灶和灶旁组织药物浓度, 比较其差异。所有患者均在术前获得知情同意。结果 ①共收集到 23 例患者的脑组织, 分别服用苯巴比妥 (PB)、苯妥英钠 (HHT)、卡马西平 (CBZ) 和拉莫三嗪 (LTG), 将致痫灶和灶旁组织用电生理的方法进行分离, 用于脑组织药物浓度的测定。剔除 3 例, 剩余 20 例, 包括 PB 4 例, CBZ 16 例。②20 例患者脑组织致痫灶的平均药物浓度为 $(1.83 \pm 0.39) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灶旁组织的平均药物浓度为 $(2.11 \pm 0.45) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 采用配对 *t* 检验的方法, $P = 0.000 < 0.05$, 结果有统计学差异, 致痫灶的药物浓度低于灶旁组织。分别观察 PB 组与 CBZ 组的结果, 得出一致性结论。结论 本试验的前续研究已经证实 P 糖蛋白 (P-gp) 在脑组织的致痫灶中比灶旁组织表达量多, 且本试验所选药物均是 P-gp 的底物, 在 P-gp 表达产物外排泵的作用下, 使致痫灶中的药物浓度低于灶旁组织, 导致了患者的耐药。

关键词: 难治性癫痫; 脑组织; 药物浓度; 高效液相色谱; 耐药机制

中图分类号: R969.11 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)10-0774-04

Comparative Study on Concentrations of Antiepileptic Drugs in Epileptogenic Focus and Adjacent Tissue in Patients with Intractable Epilepsy

SHEN Jiang-hua, JIANG De-chun, WANG Yu-qin* (Pharmacy Department of Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To clarify the mechanism of drug resistance by comparing the antiepileptic drug concentration in epilep-

作者简介: 沈江华, 女, 药师 研究方向: 老年用药、合理用药 * 通讯作者: 王育琴, 女, 主任药师, 硕士生导师 研究方向: 医院药学

Tel/Fax: (010) 83198682 E-mail: sjh_happ@sohu.com

tic foci and lesion adjacent tissue. **METHODS** Patients diagnosed with intractable epilepsy and underwent excision operation of epileptic foci in functional neurosurgery of Xuanwu Hospital of Capital Medical University were collected from April 2007 to March 2009. The drug concentration in the intractable epileptic patients was determined by high performance liquid chromatography. All patients provided informed consent before surgery. **RESULTS** Twenty-three cases who took phenobarbital (PB), phenytoin (PHT), carbamazepine (CBZ) or lamotrigine (LTG) before surgery were collected. All epileptic foci and lesion adjacent tissues were distinguished by nerve electrophysiological method, and used for drug concentration determination. Three cases were excluded. The remaining cases included 4 cases of PB and 16 cases of CBZ. There were 20 patients in this study. The average drug concentration in epileptic foci was $(1.83 \pm 0.39) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The average drug concentration in lesion adjacent tissue was $(2.11 \pm 0.45) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. SPSS statistical analysis result was statistically significant. The drug concentrations in epileptic foci tissue were lower than that in the lesion. The same results were shown in groups of PB and CBZ. **CONCLUSION** Previous study has showed that P-gp expression in epileptic foci is significantly higher than that in lesion adjacent tissue. All the drugs included in this study (PB, CBZ, PHT and LTG) are substrates of P-gp. We conclude that the higher expression of P-gp in epileptic foci results in lower drug concentration than that in lesion adjacent tissue.

KEY WORDS intractable epilepsy; brain tissue; drug concentration; HPLC; drug resistance mechanism

癫痫以药物治疗为主,目前抗癫痫药物有20多种,其中用药物不能控制的顽固性癫痫约占20%左右,最后发展为难治性癫痫(intractable epilepsy, E)或顽固性癫痫(refractory epilepsy, RE)^[1-2]。难治性患者的耐药可能依赖两个主要机制:①药物作用靶点减少;②药物难以到达中枢神经系统,致使在病灶内的浓度达不到有效浓度范围。后者归因于多药耐药相关蛋白(multidrug resistance protein, MRP)将进入中枢神经系统的药物外排^[3]。

本试验将难治性癫痫患者脑组织的致痫灶和灶旁组织药物浓度作比较,为阐明难治性癫痫的耐药机制提供依据。

1 研究对象

收集自2007年4月~2009年3月于首都医科大学宣武医院功能神经外科的患者,服用抗癫痫药物至少5个半衰期,血药浓度达稳态,但是癫痫发作仍未得到有效控制,接受致痫灶切除手术,术中用神经电生理的方法分离致痫灶和灶旁组织,病例检查后将标本冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。入选标准:①诊断为难治性癫痫,并且进行致痫灶切除手术;②术前患者服用抗癫痫药物[苯巴比妥(PB)、苯妥英钠(PHT)、卡马西平(CBZ)和拉莫三嗪(LTG)单用或合用]。排除标准:①未取得知情同意书者;②术前诊断为恶性肿瘤患者;③服用其他药物[奥卡西平、丙戊酸钠、左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)等]的手术患者。剔除标准:①未将脑组织致痫灶和灶旁组织分开者;②致痫灶和灶旁组织取自不同部位者(如致痫灶和灶旁组织分别取于颞叶和额叶)。

本试验通过宣武医院伦理委员会审批,所有患

者均于术前签署知情同意书。

2 方法

2.1 脑组织的处理

用分析天平称取0.3~0.5g冻存的脑组织,先用剪刀充分剪碎,放入10mL的离心管中,按w/v=1:1的比例加入组织裂解液^[4-6],充分震荡,静置6h让脑组织与组织裂解液充分混匀。将离心管放入盛有冰水混合物的烧杯中,用匀浆机将脑组织进行匀浆,以肉眼观察不到成块组织且匀浆液均匀为宜,再用超声粉碎仪对脑组织匀浆液继续粉碎,以达到充分匀浆的目的。

2.2 脑组织药物浓度的测定

采用HPLC取脑组织匀浆液0.2mL到1.5mL的离心管中,加入乙腈0.2mL,漩涡混匀后,置于高速离心机中离心15min,转速为 $13\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,取上清液于另一离心管中,再次离心5min,取上清液经有机相的微孔过滤膜(0.22 μm)过滤后进样^[7]。色谱条件:磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈-丙酮=5S:22:12:11;用NaOH溶液将流动相的pH调至7.0,流速 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。紫外检测波长:210nm;温度:室温^[8]。

2.3 统计学处理

应用SPSS统计学软件,分别计算致痫灶和灶旁组织药物浓度的平均药物浓度及标准差,将致痫灶和灶旁组织的药物浓度进行正态性分布检验,然后做配对t检验。

3 结果

本试验共收集到23例患者的脑组织,分别服用PB、PHT、CBZ和LTG。由于2例服用PHT的患者脑组织药物浓度过低,1例服用PB的患者脑组织药

物浓度过高,故舍去,剩余 20 例的脑组织药物浓度的测量结果均在标准曲线范围内,其中包括 PB 4 例, CBZ 16 例。

难治性癫痫患者脑组织致痫灶和灶旁组织的药物浓度结果见表 1。

20 例患者 (14 名男性, 8 名女性, 年龄为 11~46 岁, 平均年龄 23.13 岁) 脑组织致痫灶平均药物浓度为 $(1.83 \pm 0.39) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灶旁组织的平均药物浓度为 $(2.11 \pm 0.45) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 采用配对 *t* 检验的方法, $P = 0.000 < 0.05 (n = 20)$, 结果有统计学意义, 表明致痫灶的药物浓度低于灶旁组织。

4 例服用 PB 患者致痫灶的平均药物浓度为 $(2.07 \pm 0.55) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灶旁组织的平均药物浓度为 $(3.45 \pm 0.38) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 由于例数较少, 不能进行统计学分析, 但观察其趋势: 致痫灶的药物浓度比灶旁组织的药物浓度低; 16 例 CBZ 的致痫灶平均药物浓度为 $(1.78 \pm 0.34) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灶旁组织的平均药物浓度为 $(2.03 \pm 0.41) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 采用配对 *t* 检验的方法, $P = 0.000 < 0.05 (n = 16)$, 结果有统计学意义, 致痫灶的药物浓度低于灶旁组织。

表 1 难治性癫痫 (IE) 患者脑组织致痫灶与灶旁组织抗癫痫药物浓度结果

Tab 1 Comparatives of antiepileptic drugs in epileptogenic focus and lesion adjacent tissue in 20 patients with intractable epilepsy

Serial number	Drugs	Anatomical of epileptogenic focus	Anatomical of lesion adjacent tissue	Drug concentrations in epileptogenic focus / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Drug concentrations in lesion adjacent tissue / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	PB	Hippocampus	Temporal	1.97	2.73
2	PB	Hippocampus	Temporal	1.94	2.30
3	PB	Hippocampus	Temporal	1.20	1.84
4	PB	Hippocampus	Temporal	3.18	2.92
5	CBZ	Frontal	Frontal	1.90	2.23
6	CBZ	Frontal	Frontal	1.78	1.82
7	CBZ	Parietal	Parietal	2.72	3.11
8	CBZ	Frontal	Frontal	1.81	1.95
9	CBZ	Parietal	Parietal	1.29	1.30
10	CBZ	Hippocampus	Temporal	2.22	2.02
11	CBZ	Frontal	Temporal	2.52	3.66
12	CBZ	Hippocampus	Temporal	1.42	1.56
13	CBZ	Hippocampus	Temporal	1.61	2.16
14	CBZ	Hippocampus	Temporal	1.69	2.06
15	CBZ	Hippocampus	Temporal	2.00	2.26
16	CBZ	Frontal	Frontal	1.60	1.97
17	CBZ	Hippocampus	Temporal	1.82	1.99
18	CBZ	Hippocampus	Temporal	1.46	1.78
19	CBZ	Hippocampus	Temporal	0.64	0.77
20	CBZ	Hippocampus	Frontal	1.92	1.80

注: PB- 苯巴比妥; CBZ- 卡马西平

Note: PB- phenobarbital CBZ- carbamazepine

4 讨论

4.1 目标药物筛选的依据

由于本试验的前期研究^[9]发现: 难治性癫痫的耐药机制可能与 P-糖蛋白 (P-gp) 有关, 故本试验在选择药物时全部选择 P-gp 的底物, PB、CBZ、PHT 和 LTG 都是 P-gp 的底物, 因此选择了此 4 种药物。

4.2 术中致痫灶和灶旁组织的区分

各项术前、术中评估手段都无法精确判断难治性癫痫患者致痫灶的部位, 而对于术前行“深部电极埋置术”的患者, 则可以通过术中脑电图分析确定发作期异常放电的起源点, 定义为致痫灶^[10]。发作起源点即电极点上率先出现持续脑电图变化并伴有相应的临床发作症状, 这种变化要明显区别于发作间期的异常放电, 并与意识不同阶段的变化相鉴别^[11]。

术前致痫灶定位相对明确, 未行“深部电极埋置术”的患者, 可以在术中根据异常放电来判断, 异常放电的集中部位为致痫灶, 周围相对放电不明显或不放电的部位为灶旁组织, 视为正常脑组织。

4.3 取材的定位

癫痫发作起源于脑皮质, 故所有灶旁组织均取材于脑皮质, 有枕叶、顶叶、额叶和颞叶等部位。其中颞叶癫痫中, 将异常放电的集中部位——硬化的海马作为致痫灶, 而将颞叶皮层作为灶旁组织; 其他类型癫痫 (额叶、枕叶等), 致痫灶为术中电生理监测中放电的集中部位, 而灶旁组织为相对远离致痫灶的部位。

4.4 致痫灶在 IE 患者脑组织中的作用

所谓致痫灶是指大脑皮层上引起癫痫发作的区域, 手术切除此区域, 发作将完全消失^[12], 难治性癫痫患者异常放电起源部位和异常放电部位均集中于致痫灶。本试验中直接通过术中电生理的变化区分致痫灶和灶旁组织, 能直接反映 IE 患者的大脑功能状况。

4.5 致痫灶与灶旁组织药物浓度差异的原因

造成致痫灶与灶旁组织药物浓度差异的原因有两个。一是 P-gp 发挥药物外排泵的作用, 将脑组织细胞内的药物泵出细胞外; 二是由于多药耐药相关蛋白的作用。

P-gp 是转运蛋白 ATP 结合物 (ATP-binding cassette transporters ABCT) 超家族的成员之一, MDR1 编码的 P-gp 与耐药相关^[13-15]。本试验的前期结果发现: P-gp 在致痫灶的表达高于灶旁组织^[9], 而很多研究报道大部分 AEDs 是 P-gp 的底物。推测很

可能是由于 P-gp 在致痫灶的高表达改变了 AEDs 在脑组织的药物分布, 导致其在作用靶点部位浓度降低而出现耐药。

目前对致痫灶研究的文献很少。Ak 等^[16]对 28 例局灶性皮质发育不良 (FCD) 病人进行研究, 根据病理变化区分出癫痫致痫灶, 以 10 例尸检脑组织为对照组, 结果 P-gp 在致痫灶脑组织表达高于正常脑组织。而且本试验的前期研究发现了一致性的结果, 即 P-gp 在难治性癫痫患者脑组织致痫灶中表达量高于灶旁组织。有研究发现, P-gp 可以限制抗癫痫药物 HT, CBZ, PB 托吡酯和 LTG 等进入作用位点从而引起耐药^[17]。

本试验的结果发现, 对于 PB 和 CBZ 来说, 致痫灶的药物浓度低于灶旁组织, 但是由于收集的服用 PB 药物的患者例数较少, 不足以作统计学分析, 只能观察出致痫灶的药物浓度低于灶旁组织的趋势, 但是致痫灶中 CBZ 的药物浓度低于灶旁组织是可以肯定。

5 结论与展望

综上所述, 由于抗癫痫药物大部分都为 P-gp 的底物, 而且脑部致痫灶的 P-gp 表达量比灶旁组织要高, 故 AEDs 被吸收入血后不能均匀分布于脑组织, 由于 P-gp 表达产物发挥药物外排泵的作用将药物泵出致痫灶, 导致致痫灶的药物浓度低于灶旁组织, 故而致痫灶脑组织达不到治疗的有效浓度, 进而造成癫痫患者对药物的不敏感。

虽然无直接证据证实 MDR 的过度表达是癫痫难治的主要原因, 但也不会仅仅是一种表象。针对药物外排现象, 将来的突破点是选用最合适的 MDR 抑制剂, 寻找非 MDR 的底物或研制能逃避 MDR 外排作用的药物。目前已发现一种新型的药物 LEV 能有效治疗部分难治性癫痫。大鼠杏仁核点燃制作的 E 模型对众多 AEDs 耐药, 而唯一例外的就是 LEV。它不被 P-gp 的抑制剂维拉帕米及 MRP 的抑制剂丙磺舒抑制, 推测可能不是 P-gp 或 MDPs 的底物^[18]。此结论也验证了这一点, 并为以后发现更多的癫痫药物治疗方案打下了理论基础。

REFERENCES

[1] ZHU Q, YUAN XR, SUN ZD. The epidemiological and sociological analysis—current situation and our strategies of the epilepsy [J]. *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2005, 7 (2): 217-220.

[2] KWAN P, BRODIE J. Refractory epilepsy—a progressive, intractable but preventable condition [J]. *Seizure*, 2002, 11 (2): 77-84.

[3] MARRON IM, ARCH IN, CUCULLO L, *et al*. Vascular and parenchymal mechanisms in multiple drug resistance: a lesson from human epilepsy [J]. *Curr Drug Targets*, 2003, 4 (4): 297-304.

[4] KM K R, BARTLETT M G, ANANDA S S, *et al*. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 834 (1-2): 141-148.

[5] ICHIKAWA N, NAORA K, HIRANO H. Quantitation of acetazolamide in rat plasma, brain tissue and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 17 (8): 1415-1421.

[6] ESPOSITO S, NOVIELLO S, D'ERRICO G, *et al*. Concentration of moxifloxacin in plasma and tonsillar tissue after multiple administration in adult patients [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57 (4): 789-792.

[7] A'LVAREZ-CEDRO'N L, SAYALERO M L, LANA O J M. High performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 721 (2): 271-278.

[8] PATIL K M, BODHANKAR S L. Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39 (1-2): 181-186.

[9] LI J, JIANG D C, WANG Y Q. Advance on the role of P-glycoprotein in the mechanism of drug resistance in epilepsy patients [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2008, 17 (6): 446-449.

[10] LEE S A, SPENCER D D, SPENCER S S. Intracranial EEG seizure-onset patterns in neocortical epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2000, 41 (3): 297-307.

[11] CARRENO M, LUDERS H O. General principles of presurgical evaluation // HO Luders, YG Comair, eds. *Epilepsy surgery* [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 185-199.

[12] RAMACHANDRAN V, SHORVON S D. Clues to the genetic influences of drug responsiveness in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2003, 44 (Suppl 1): 33-37.

[13] LOSCHER W. Drug transporters in the epileptic brain [J]. *Epilepsia*, 2007, 48 (Suppl 1): 8-13.

[14] CHEN LW, KROETZ D L. ABCB1 pharmacogenetics: progress pitfalls and promise [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81 (2): 265-269.

[15] WEST C L, MEALEY K L. Assessment of antiepileptic drugs as substrates for canine P-glycoprotein [J]. *Am J Vet Res*, 2007, 68 (10): 1106-1110.

[16] BIALECKA M, HNATYSZYN G, BIELICKA-CYMERMAN J, *et al*. The effect of MDR1 gene polymorphism in the pathogenesis and the treatment of drug-resistant epilepsy [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2005, 39 (6): 476-481.

[17] POTSCHKA H, VOLKH A, LOSCHER W, *et al*. Pharmacoresistance and expression of multiple transporter P-glycoprotein in kindled rats [J]. *Neuropharmacol Neurotoxicol*, 2004, 15 (10): 1657-1661.

[18] POTSCHKA H, BALTES S, LOSCHER W, *et al*. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats [J]. *Epilepsia Res*, 2004, 58 (2-3): 85-91.

(收稿日期: 2011-01-21)