

黑皮质素受体基因多态性与婴儿痉挛症及促肾上腺皮质激素反应性的相关性研究

石秀玉 丁瑛雪 刘占利 石凯丽 邹丽萍

【摘要】 目的 探讨黑皮质素受体(*MC2R*~*MC4R*)基因变异及单核苷酸多态性与婴儿痉挛症发病及促肾上腺皮质激素治疗反应性的关系,并对研究中发现的最具意义的单核苷酸多态性进行深入的功能学研究。**方法** 采用DNA直接测序法检测*MC2R*~*MC4R*基因编码区及启动子区基因突变及多态性;SHEsis和Haploview3.32程序构建单体型,分析不同多态性基因型、等位基因及所构建单体型在婴儿痉挛症患者和正常对照受试儿童中的分布频率,并观察其与促肾上腺皮质激素治疗反应的相关性。**结果** 测序显示,*MC2R*基因启动子区共存在4个单核苷酸多态性位点,其中-2T>C为新发现位点,3个单核苷酸多态性位点(rs1893220、rs2186944和-2T>C)组间分布频率差异具有统计学意义($P=0.04, 0.02, 0.01$)。常见单体型TCCT对婴儿痉挛症的发生具有保护作用($P=0.00$),且TCCT携带者比非携带者对促肾上腺皮质激素治疗更为敏感($P=0.00$)。体外功能学研究证实,*MC2R*基因TCCT型启动子转录效率是TCCC的4倍($P=0.00$),经促肾上腺皮质激素刺激后含TCCT单体型启动子*MC2R* mRNA表达水平上调5倍($P=0.00$),而含TCCC单体型启动子仅上调1.50倍($P>0.05$)。*MC4R*基因启动子区单核苷酸多态性位点rs11872992与婴儿痉挛症的发生有关,婴儿痉挛症组患儿TC型频率低于正常对照组($P=0.00$);T型等位基因携带者对促肾上腺皮质激素治疗效果优于非T型等位基因携带者($P=0.01$)。但*MC3R*单核苷酸多态性组间分布频率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 黑皮质素受体单核苷酸多态性与婴儿痉挛症的发生有一定关系,并可影响促肾上腺皮质激素治疗的反应性。这一发现有助于理解婴儿痉挛症的发病机制,并为临床早期预测促肾上腺皮质激素治疗反应提供一定线索。

【关键词】 受体,黑皮质素; 多态现象,遗传; 基因; 痉挛,婴儿; 促肾上腺皮质激素

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.05.012

Correlation study between genetic polymorphisms of melanocortin receptors and adrenocorticotrophic hormone responsiveness in infantile spasms

SHI Xiu-yu¹, DING Ying-xue², LIU Zhan-li³, SHI Kai-li⁴, ZOU Li-ping^{1,5}

¹Department of Pediatrics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

²Department of Pediatrics, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

³Department of Pediatrics, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

⁴Pediatric Department of Internal Medicine, Children's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030013, Shanxi, China

⁵Department of Neurology, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China

Corresponding author: ZOU Li-ping (Email: zouliping21@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To explore the possible correlation between the genetic variations of the melanocortin receptors (*MCRs*, including *MC2R*, *MC3R* and *MC4R*) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) responsiveness in patients with infantile spasms, and to investigate the function of single nucleotide polymorphism (SNP) found in this study. **Methods** Direct sequencing method was used to test variations and polymorphisms in the promoter and coding regions of the *MC2R*, *MC3R* and *MC4R* gene. Haplotypes

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(项目编号:2012CB517903);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81211140048);国家自然科学基金资助项目(项目编号:30770747);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81071036);北京市自然科学基金资助项目(项目编号:7081002);北京首发基金资助项目(项目编号:2003-2037);国家卫生行业专项科研基金资助项目(项目编号:200802074);中国博士后科学基金资助项目(项目编号:

201150M1529)

作者单位:100853 北京,解放军总医院儿童医学中心(石秀玉,邹丽萍);100045 首都医科大学附属北京儿童医院神经内科(邹丽萍);100050 首都医科大学附属北京友谊医院儿科(丁瑛雪);310006 浙江省杭州市第一人民医院儿科(刘占利);030013 太原,山西省儿童医院儿内科(石凯丽)

通讯作者:邹丽萍(Email:zouliping21@hotmail.com)

were structured by using SHEsis and Haploview3.32 programs to analyze the distribution frequencies of polymorphism genotypes, alleles and structured haplotypes in Chinese patients with infantile spasms and normal controls. The association between ACTH responsiveness and genetic variations was also assessed. **Results** Four SNPs were identified in the *MC2R* promoter region, **one of which was new-found locus named -2T>C**. Three SNPs (rs1893220, rs2186944 and -2T>C) showed a significant difference between the cases and controls ($P=0.04, 0.02, 0.01$). The common haplotype TCCT may give protection against the development of infantile spasms ($P=0.00$). Besides, TCCT carriers were more sensitive to ACTH therapy than non-carriers ($P=0.00$). The in vitro study proved that the translational efficiency of TCCT promoter in *MC2R* gene was four times higher than that of TCCC promoter ($P=0.00$). *MC2R* expression assay showed a 5-fold increase in the TCCT promoter in presence of ACTH, compared with that in absence of ACTH ($P=0.00$). However, responsiveness to ACTH in expression by TCCC promoter showed only 1.50-fold increase after ACTH stimulation ($P>0.05$). The SNP rs11872992 in *MC4R* gene was related to the development of infantile spasms, as the efficiency of *TC* genotype in cases was lower than that of normal controls ($P=0.00$). The ACTH therapy results of *T*-allele-carriers were better than that of non-*T*-allele-carriers ($P=0.01$). The difference of SNP distribution frequencies in *MC3R* gene was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** The study revealed an association between polymorphism in *MCRs* (*MC2R* and *MC4R*) promoter and the development of infantile spasms, and ACTH responsiveness in patients with infantile spasms. These findings may provide a clue for clinicians to find an early predictive marker for the responsiveness to ACTH and improve the understanding of pathogenesis in infantile spasms.

【Key words】 Receptors, melanocortin; Polymorphism, genetic; Genes; Spasms, infantile; Adrenocorticotrophic hormone

Fund Project: National Program of Basic Research of China (973, No. 2012CB517903); National Natural Science Foundation of China (No. 81211140048); National Natural Science Foundation of China (No. 30770747); National Natural Science Foundation of China (No. 81071036); Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 7081002); Capital Development Foundation of Beijing (No. 2003-2037); Hygiene Industry-specific Research Projects of China (No. 200802074) and China Postdoctoral Science Foundation (No. 201150M1529)

婴儿痉挛症(IS)又称West综合征,是一种特发于婴儿时期的年龄依赖性癫痫综合征,以痉挛成簇发作、脑电图高峰失律和精神发育迟滞三联征为主要表现^[1]。该病对传统抗癫痫药物(AEDs)反应欠佳,目前认为促肾上腺皮质激素(ACTH)是最为有效的治疗药物。有实验资料表明,促肾上腺皮质激素可有效降低促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)在杏仁核神经元的表达^[2]。促肾上腺皮质激素能够抑制促肾上腺皮质激素释放激素的分泌和释放^[3],而且不被实验性阻断类固醇或其受体所抑制;选择性阻断黑皮质素受体(MCRs)阻断促肾上腺皮质激素诱导的促肾上腺皮质激素释放激素表达的下调,表明黑皮质素受体可能参与了促肾上腺皮质激素的药物作用机制。目前已发现5种黑皮质素受体(MC1R~MC5R),其中MC1R主要分布于皮肤黑色素细胞,与皮肤和毛发颜色有关;MC2R特异性分布在肾上腺皮质,其中以球状带和束状带分布最为广泛,与促肾上腺皮质激素结合后可以介导糖皮质激素与盐皮质激素的合成和分泌;MC3R存在于大脑皮质、丘脑、下丘脑、海马,可能与学习和记忆有关;

MC4R分布在丘脑、下丘脑、海马(CA1和CA2区)、脑干、脊髓等部位,与饮食和体质量调节有关^[4];MC5R主要分布于多种腺体组织,与外分泌功能的调节有关。总之,MC1R和MC5R主要介导黑皮质素肽类的外周作用,而MC2R、MC3R和MC4R则与促肾上腺皮质激素肽类的中枢作用有关。虽然促肾上腺皮质激素是目前治疗婴儿痉挛症的首选药物,但是我们的前期研究结果发现,约有30%的婴儿痉挛症患者接受促肾上腺皮质激素联合硫酸镁(MgSO₄)治疗后痉挛发作并未得到缓解^[5]。此外,婴儿痉挛症的病因约有200余种,但无一种仅见于该病,这些结果均提示患儿可能存在不同的药物敏感性及其发病易感性。其中原因之一可能即是基因多态性(polymorphism),致病基因的多态性可使不同个体对同一疾病的易感性不同^[6],同时使其体内生物活性物质的功能及效应出现差异,影响药物代谢过程及清除率,导致治疗反应性不同,从而影响治疗效果^[7-8]。加上选择性阻断黑皮质素受体可抑制促肾上腺皮质激素诱导的促肾上腺皮质激素释放激素表达水平下调,故而推测MC2R、MC3R和

MC4R 基因的多态性可能与婴儿痉挛症的发生相关, *MCR* 基因编码区的突变或重要功能区的单核苷酸多态性(SNP)可以影响促肾上腺皮质激素受体的分子构象, 从而进一步影响其受体分子的表达水平、与配体促肾上腺皮质激素的结合效率及细胞内信号转导途径, 从而导致不同患儿对促肾上腺皮质激素治疗的反应性有所不同。因此, 本研究通过病例-对照研究探讨 *MC2R*、*MC3R* 和 *MC4R* 基因多态性与婴儿痉挛症之间的遗传相关性, 以及与促肾上腺皮质激素疗效反应性的相关关系, 并进一步对上述研究中发现的最具意义的多态性进行深入的功能学研究; 以为预测婴儿痉挛症患病风险提供遗传学背景证据, 为进一步研制治疗婴儿痉挛症的特异性药物提供筛选靶目标和体外筛选模型奠定基础。

对象与方法

一、研究对象

1. 婴儿痉挛症组(IS组) 选择首都医科大学附属北京儿童医院神经康复中心和解放军总医院儿童医学中心 2004 年 1 月-2010 年 5 月住院治疗且无亲缘关系的中国北方汉族婴儿痉挛症患者。(1) 纳入标准: 依据 2001 年国际抗癫痫联盟(ILAE)提出的癫痫及癫痫综合征分类诊断标准, 分别选择隐源性和症状性婴儿痉挛症患者入组。①隐源性婴儿痉挛症诊断标准为, 婴儿痉挛症诊断明确; 缺乏明确的病因; 既往发育正常; 头部 CT 或 MRI 检查及代谢筛查指标无异常。②症状性婴儿痉挛症诊断标准, 具有明确的出生前、围生期、出生后导致脑损伤的病因; 痉挛发作前有明确的精神发育迟滞; 头部影像学检查及代谢筛查指标异常。(2) 排除标准: 入组前 28 d 内曾接受过糖皮质激素类药物; 存在糖皮质激素治疗禁忌证。所有入组患儿均经详细的临床病史询问、神经系统和发育程度评价, 发作间期及发作期接受普通脑电图或 24 h 动态脑电图或视频脑电图检查, 头部 CT 或 MRI 检查, 以及血清氨、乳酸及尿代谢筛查等项实验室检查。患儿父母或其合法监护人签署知情同意书。

2. 正常对照组(对照组) 来自与婴儿痉挛症组同一时期无亲缘关系的中国北方汉族儿童, 无神经系统疾病尤其是癫痫病史及癫痫家族史; 受试儿童父母或其合法监护人签署知情同意书。

二、研究方法

1. 促肾上腺皮质激素治疗反应性评价 根据

Lux 等^[9]和 Baram 等^[10]推荐的促肾上腺皮质激素疗效评价标准, 观察以下内容: (1) 临床反应, 包括促肾上腺皮质激素治疗 14 d 后痉挛发作完全停止或从观察到的最后一次发作开始, 连续 28 d 无痉挛发作。(2) 脑电图反应, 包括清醒及睡眠时高峰失律消失。对婴儿患者来说, 临床反应和脑电图反应对于评价促肾上腺皮质激素治疗的有效性二者缺一不可, 否则视为治疗无效。为了排除主观影响因素, 脑电图检测结果将由对治疗情况一无所知的脑电图技师评判。患儿对促肾上腺皮质激素治疗无效或复发时将选择其他治疗方法。

2. DNA 提取及引物设计 采用盐析法, 参照 DNA 提取试剂盒操作说明书提取婴儿痉挛症患者外周血 DNA。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 HapMap 数据库获得 *MC2R*、*MC3R* 和 *MC4R* 基因序列信息以及单核苷酸多态性的相关信息, 利用 Primer 5 在线软件设计聚合酶链反应(PCR)扩增引物(表 1)。

3. 基因多态性检测 PCR 反应在 0.20 ml Axygen PCR 管中进行。总反应体系为 15 μ l, 其中含基因组 DNA 100 ng, Mg^{2+} 终浓度为 5 mmol/L, 4 种 dNTPs 终浓度为 200 μ mol/L, 正反向引物终浓度为 0.30 μ mol/L, 2 U TaqDNA 聚合酶。于 MJ Research PTC-200 PCR 检测仪上进行 PCR 热循环, 反应条件依据不同引物设定不同参数。反应结束后在 10 μ l PCR 扩增产物中加入 1 U 血清淀粉样物质 P(SAP) 酶和 1 U Exonuclease I 酶, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h、75 $^{\circ}$ C 灭活 15 min, 然后进行延伸反应。10 μ l 延伸反应体系包括 5 μ l SNaPshot Multiplex 试剂盒(ABI)、2 μ l 纯化后的多重 PCR 产物、1 μ l 延伸引物混合物和 2 μ l 超纯水, 于延伸产物中加入 1 U 血清淀粉样物质 P 酶, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h、75 $^{\circ}$ C 灭活 15 min 后进行延伸产物纯化。取 0.50 μ l 纯化后的延伸产物, 与 0.50 μ l LIZ120 SIZE STANDARD、9 μ l Hi-Di 混匀, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, ABI3130XL 测序仪进行测序, 通过 GeneMapper 4.0 软件(美国 Applied Biosystems 公司)收集原始数据。

4. 促肾上腺皮质激素受体启动子多态性对婴儿痉挛症患者 *MC2R* 表达水平以及促肾上腺皮质激素反应性的调控 (1) 载体构建: 采用双荧光报告系统 pGL3-Basic 设计引物扩增启动子胸腺嘧啶-胞嘧啶-胞嘧啶-胸腺嘧啶(TCCT)和胸腺嘧啶-胞嘧啶-胞

表 1 MC2R~4R 引物序列

Table 1. Sequencing of the human MC2R, MC3R, MC4R

基因	数目	引物序列	基因	数目	引物序列
MC2R	1	5'-CATGTGCGGAGGCACAC-3' 5'-TGCTTCTCCGTCCAAAACT-3'	MC4R	4	5'-CCTGCAGAGGGCACTAGTCT-3' 5'-AAGGATGGGAGGGTAGAGA-3'
	2	5'-AGAAACAGCCACTGGTTGG-3' 5'-TGGAATTGTCATCTTGCTCTTTT-3'		5	5'-CTCCTCCTGGAACAGCAAAG-3' 5'-TCACGTGGATGGAAGTCAA-3'
	3	5'-TGGGGCTATTCCCTTCTCT-3' 5'-CAGCTCTGAAGCAGGAACCTT-3'		1	5'-TTTCTGACTTCACTGTAAGCA-3' 5'-TCCCTAGAGGCCATTCTGTG-3'
	4	5'-TCCAGCAAGTGCTACAAGAAGA-3' 5'-ATGTCATCGGCTGTGGTTTC-3'		2	5'-CCACTACTGGCTGGTCTTCT-3' 5'-CTTCTGTTCCAGCCTGAGC-3'
	5	5'-CCAGGCCACCCATGTAACCTT-3' 5'-GCCCAGCAGAAGATGAAGAC-3'		3	5'-CTCACAGACTCCCATTGCAT-3' 5'-GGTCAGGGAGTCTCTCAGTT-3'
	6	5'-GGTGTGCTTACGGTCACTCT-3' 5'-AGTGAGGAGCACTGGCATTTC-3'		4	5'-TGAAGCCCAAGATTTAAAGTGA-3' 5'-CACCAGCATATCAGCCACAG-3'
MC3R	1	5'-TGACCACCCTCCAAGTCTTC-3' 5'-GGATCTGGAGATCCCATTTG-3'	5	5'-CTGATGGAGGGTCTACGAG-3' 5'-GAACATGGTATGAGGCAGA-3'	
	2	5'-GCACTTCAAAAAGCCAAAGA-3' 5'-TCTCTGCTGACTGCAGGAAA-3'	6	5'-GTAGCTCCTTCTGCTGATCC-3' 5'-TAAAGTGAGACATGAAGCACAC-3'	
	3	5'-CCACCCCAAACCTGGATATGA-3' 5'-CCAAGGGCAAACAACCTCTA-3'	7	5'-CCAAGGTGCCAATATGAAGG-3' 5'-GCATGACATTGGAATAATACAGA-3'	

嘧啶-胞嘧啶(TCCC)纯合子片段。双酶切质粒和目的片段,回收酶切片段,将目的片段与载体 DNA 连接(pGL3-Basic-TCCT)。连接产物转染大肠杆菌,过夜培养,挑选阳性菌落行 PCR 扩增,加预选的 5 ml 液体溶菌肉汤培养基(LB),37℃ 恒温摇床振摇过夜。通过 QuikChange II Site-Directed Mutagenesis 试剂盒将构建的 pGL3-Basic-TCCT 质粒以 PCR 一步法定点突变成为 pGL3-Basic-TCCC,并对提取的质粒进行鉴定。(2)细胞培养与转染:选择人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)和人胚肾细胞(HEK293)细胞株置于含有体积分数为 10%胎牛血清、100 IU/ml 青霉素和 100 g/ml 链霉素的 DMEM 培养基,约 3~4 d 换一次培养基,直至细胞爬满整个培养基并存活后以质量分数为 0.25%胰蛋白酶和 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化、离心,无抗生素 DMEM 培养基重悬细胞,按照操作说明进行质粒转染。转染 24~48 h 间断于荧光倒置相差显微镜下观察绿色荧光蛋白表达变化,估算转染效率、评价转录活性。以空启动子 pGL3-Basic 作为阴性对照、pGL3-Control 质粒作为阳性对照。(3)促肾上腺皮质激素处理:SH-SY5Y 和 HEK293 细胞接种于 96 孔无菌培养板,每孔接种密度为 100 μl (含 50 × 10³ 个细胞)。以不加细胞仅加培养液的孔作为空白对照孔(空白对照组),最后比色时以空白对照孔调零;仅加细胞但不加其他待测样本者为阴性对照孔(阴性对照组),以考察待测样本对细胞的毒性作用和组织相容性。细胞株转染 8 h 后给予促肾上腺皮质激素,根据 MTT 法定选

的最佳刺激浓度为 0.10 × 10⁻⁹ mol/L,刺激 24 h 后收集细胞,检测其相对荧光素酶活性。(4)相对荧光素酶活性分析:转染后的细胞继续培养 48 h,然后以 200 μl 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,40 μl 双荧光报告分析系统中细胞裂解液(passive lysis)裂解,室温下轻振摇 15 min,加入 100 μl LAR II,TD-20/20 荧光分析仪检测萤火虫荧光素酶活性(LAF);滴加 100 μl Stop&Glo Reagent,TD-20/20 荧光分析仪检测海肾荧光素酶活性(LAR)。再计算相对荧光素酶活性(RLA, RLA = LAF / LAR),各组 RLA 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。(5)实时定量反转录 PCR(Q-PCR)检测携带单体型 TCCT/TCCC 启动子 MC2R mRNA 水平:按照 TRIzol 法提取 SD 幼鼠肾上腺组织总 RNA。设计引物扩增其 MC2R-cDNA 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),pGL3-TCCT/pGL3-TCCC 载体中荧光素酶 cDNA 基因由幼鼠 MC2R-cDNA 代替,然后再重新连接。根据 SYBR Green 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)说明书,采用 ABI PRISM 7700 序列检测系统进行实时定量逆转录 PCR 检测,通过每次循环荧光信号提供实时定量逆转录 PCR 信息。

三、统计分析方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据计算与分析,Alquein 3.0 统计软件检验婴儿痉挛症组与正常对照组单核苷酸多态性位点的基因型分布频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,采用 χ^2 检验。SHEsis^[11] 和 Haploview3.32^[12] 程序构建单体型,并以单体型为标记进行病例-对照相关分析,即利用 Haploview 程序

构建婴儿痉挛症组和相应对照组预计的单体型,并产生 1000 种排列用于多重检验校正;Fisher 确切概率法检验单体型携带者和非携带者促肾上腺皮质激素疗效反应性的差异;Fisher 确切概率法检验转录活性及其 mRNA 表达水平。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、黑皮质素受体 2

1. 社会人口学资料 (1) 婴儿痉挛症组:根据上述纳入与排除标准,共有 91 例婴儿痉挛症患者符合入组条件,男性 57 例,女性 34 例;发病年龄 4~8 个月,平均 (6.06 ± 2.66) 个月。其中 73 例(80.22%)为症状性、18 例(19.78%)为隐源性。23 例曾经接受过其他抗癫痫药物治疗,分别为托吡酯(8 例)、托吡酯联合苯巴比妥(3 例)、托吡酯联合硝基安定(7 例),以及托吡酯、苯巴比妥联合硝基安定(5 例);68 例接受过促肾上腺皮质激素治疗,其中治疗有效者 37 例(54.41%)、无效者 31 例(45.59%)。观察不同病因患儿对促肾上腺皮质激素治疗的反应性显示,52 例症状性婴儿痉挛症患儿中 30 例(57.69%)治疗有效,16 例隐源性婴儿痉挛症患儿中 7 例(43.75%)治疗有效;二者之间比较差异无统计学意义($P=0.33$)。(2) 正常对照组:94 例正常对照儿童,男性 61 例,女性 33 例;年龄 4~10 个月,平均 (7.00 ± 3.83) 个月。正常对照组与婴儿痉挛症组患儿性别构成比($\chi^2=0.10, P>0.05$)和年龄($t=1.73, P>0.05$)之间,差异均无统计学意义。

2. MC2R 单核苷酸多态性分布 两组受试儿童均接受 MC2R 基因检测,结果显示:MC2R 编码区无突变及多态性。由 MC2R 上游启动子至转录开始部位腺嘌呤-胸腺嘧啶-胸腺嘧啶(ATT)1 kb 区域可发现 4 种单核苷酸多态性,分别位于主要转录起始点上游-853、-759、-7 和-2 碱基处;检索单核苷酸多态性数据库,检出其中 3 种单核苷酸多态性(-853C>T、-759A>C 和-7C>T)已有记录,其序列号分别为

表 2 婴儿痉挛症组与正常对照组受试儿童 MC2R 单核苷酸多态性基因型分布频率的比较^[12] 例(%)

Table 2. Genotype frequencies of the SNP in the MC2R gene in cases and controls

组别	例数	rs1893219			rs1893220		
		TT	TC	CC	CC	AC	AA
对照组	94	58(61.70)	32(34.04)	4(4.26)	59(62.77)	31(32.98)	4(4.26)
IS 组	91	46(50.55)	38(41.76)	7(7.69)	41(45.05)	42(46.15)	8(8.79)
P 值		0.26			0.04		

组别	例数	rs2186944			-2T>C		
		CC	TC	TT	TT	TC	CC
对照组	94	63(67.02)	27(28.72)	4(4.26)	69(73.40)	23(24.47)	2(2.13)
IS 组	91	42(46.15)	41(45.05)	8(8.79)	47(51.65)	40(43.96)	4(4.39)
P 值		0.02			0.01		

表 3 婴儿痉挛症组与正常对照组受试儿童外周血 MC2R 单核苷酸多态性等位基因分布频率的比较^[12] 例(%)

Table 3. Alleles frequencies of the SNP in peripheral blood MC2R gene in cases and controls

组别	样本例数	rs1893219		rs1893220	
		T	C	C	A
对照组	188	148(78.72)	40(21.28)	149(79.26)	39(20.74)
IS 组	182	130(71.43)	52(28.57)	124(68.13)	58(31.87)
P 值		0.11		0.02	
OR 值		1.48		1.79	

组别	样本例数	rs2186944		-2T>C	
		T	C	C	A
对照组	188	153(81.38)	35(18.62)	161(85.64)	27(14.36)
IS 组	182	125(68.68)	57(31.32)	134(73.63)	48(26.37)
P 值		0.01		0.00	
OR 值		1.99		2.14	

rs1893219、rs1893220 和 rs2186944。-2T>C 为新发现的单核苷酸多态性位点。正常对照组受试儿童上述 4 种单核苷酸多态性基因型分布未发现明显偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$;表 2,3)。婴儿痉挛症组的 3 种单核苷酸多态性(rs1893220、rs2186944 和-2T>C)分布频率与正常对照组之间差异具有统计学意义($P=0.04,0.02,0.01$;表 2,3)。

3. MC2R 单体型分布 利用 SHEsis 和 Haploview 程序构建 MC2R 单体型,在 16 种可能的单体型中仅 8 种分布频率 > 2%(表 4)。婴儿痉挛症组患儿 MC2R 单体型(CATC)携带 4 种高风险等位基因的频率仅为 2.20%,正常对照组为 0.53% ($P=0.84$)。-2T>C 中高风险等位基因 C 与两种单体型(CACC 和 TCCC)构成有关,但两组间差异无统计学

表 4 16 种可能的单体型中频率 > 2% 的 8 种 *MC2R* 单体型在婴儿痉挛症组和正常及对照组之间分布频率的比较 例(%)
Table 4. Distribution frequencies (> 2%) of 8 *MC2R* haplotypes in 16 possible haplotypes in cases and controls

单体型	样本例数	TCCT	TCTT	CACC	CACT	CATT	TCCC	TCTC	CATC
对照组	188	112(59.57)	31(16.49)	23(12.23)	13(6.91)	2(1.06)	1(0.53)	1(0.53)	1(0.53)
IS 组	182	71(39.01)	40(21.98)	29(15.93)	12(6.59)	7(3.85)	6(3.30)	6(3.30)	4(2.20)
RR 值		0.43	1.43	1.36	0.95	3.70	3.20	6.37	4.20
P 值		0.00	0.19	0.37	1.00	0.10	0.17	0.06	0.21
重新 P 值排序		0.00	0.76	0.95	1.00	0.15	0.41	0.16	0.84

注: 对照组中的另 4 例及 IS 组中的另 7 例为频率 < 2% 的 *MC2R* 单体型

表 5 婴儿痉挛症组 TCCT 携带者与非携带者对促肾上腺皮质激素治疗有效率的比较 例(%)

Table 5. The responses of ACTH therapy in TCCT carriers and non-TCCT carriers of patients with infantile spasms

组别	样本例数	ACTH 治疗		统计量值	P 值	组别	样本例数	ACTH 治疗		统计量值	P 值
		有效	无效					有效	无效		
携带者 TCCT/TCCT	11	10(90.91)	1(9.09)	0.25		携带者 TCCT/0	35	25(71.43)	10(28.57)	12.85	0.00
携带者 TCCT/0	35	25(71.43)	10(28.57)			非携带者 0/0	22	5(22.73)	17(77.27)		
组别	样本例数	ACTH 治疗		统计量值	P 值	组别	样本例数	ACTH 治疗		统计量值	P 值
		有效	无效					有效	无效		
携带者 TCCT/TCCT	11	10(90.91)	1(9.09)	13.75	0.00	携带者 TCCT	46	35(76.09)	11(23.91)	17.49	0.00
非携带者 0/0	22	5(22.73)	17(77.27)			非携带者 0/0	22	5(22.73)	17(77.27)		

注: ACTH, 促肾上腺皮质激素; 携带者 TCCT/TCCT 与携带者 TCCT/0 的比较为 Fisher 确切概率法, 余均为 χ^2 检验

意义 ($P = 0.95, 0.41$); 而常见单体型 (TCCT) 的分布, 婴儿痉挛症组 (39.01%) 与正常对照组 (59.57%) 之间差异具有统计学意义 ($P = 0.00$, 表 4)^[13]。

4. 婴儿痉挛症患儿 TCCT 携带者与非携带者对促肾上腺皮质激素治疗的反应性 对 68 例接受促肾上腺皮质激素治疗患儿的临床资料及药物反应性进行回顾分析, 发现 TCCT 单体型携带者促肾上腺皮质激素治疗有效率明显高于非携带者 ($\chi^2 = 17.49, P = 0.00$)。单体型拷贝数目对促肾上腺皮质激素治疗反应性的影响分析结果显示, 约 90% 以上的 TCCT 纯合携带者 (2 个拷贝) 对促肾上腺皮质激素治疗有效, 与非携带者相比差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 13.75, P = 0.00$); TCCT 杂合携带者约 71.43% 有效, 与非携带者之间差异亦有统计学意义 ($\chi^2 = 12.85, P = 0.00$; 表 5)^[13]。

二、黑皮质素受体 3

1. 社会人口学资料 (1) 婴儿痉挛症组: 共计纳入 107 例婴儿痉挛症患儿, 男性 66 例, 女性 41 例; 发病年龄为 3~8 个月, 平均 (6.54 ± 2.36) 个月。其中, 85 例 (79.44%) 为症状性、22 例 (20.56%) 为隐源性。(2) 正常对照组: 正常对照组受试儿童 105 例, 男性 67 例, 女性 38 例; 年龄 3~10 个月, 平均 (6.70 ±

3.43) 个月。两组受试儿童性别构成比 ($\chi^2 = 0.10, P > 0.05$) 和年龄 ($t = 0.35, P > 0.05$) 比较, 差异无统计学意义。

2. *MC3R* 单核苷酸多态性分布 对 107 例婴儿痉挛症患儿和 105 例正常对照受试儿童 *MC3R* 基因单核苷酸多态性进行检测, 共发现 6 个单核苷酸多态性位点, 其中 4 个位点位于 *MC3R* 基因上游启动子距离转录开始部位腺嘌呤-胞嘧啶-腺嘌呤 (ACA) 1.50 kb 区域内, 序列号分别为 rs6014649、rs11697509、rs11699733 和 rs6127698; 其余 2 个单核苷酸多态性位点 (rs3746619 和 rs3827103) 位于编码区。105 例正常对照受试儿童的 6 个单核苷酸多态性基因型分布均未明显偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。6 个单核苷酸多态性分布频率在婴儿痉挛症组和正常对照组受试儿童中的分布, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 6, 7)。

三、黑皮质素受体 4

1. 社会人口学资料 (1) 婴儿痉挛症组: 96 例婴儿痉挛症患儿, 男性 59 例, 女性 37 例; 发病年龄为 3~12 个月, 平均 (6.16 ± 2.26) 个月。其中, 75 例 (78.13%) 为症状性、21 例 (21.87%) 呈隐源性; 两亚组对促肾上腺皮质激素治疗有效例数分别为症状

表 6 婴儿痉挛症组与正常对照组受试儿童外周血 *MC3R* 各单核苷酸多态性基因型分布频率的比较 例(%)

Table 6. Genotype frequencies of the SNP in peripheral blood *MC3R* gene in cases and controls

组别	样本例数	rs6014649			rs11697509			rs11699733		
		GG	AG	AA	CC	GC	GG	TT	CT	CC
对照组	105	68(64.76)	32(30.48)	5(4.76)	69(65.71)	31(29.52)	5(4.76)	69(65.71)	31(29.52)	5(4.76)
IS 组	107	65(60.75)	37(34.58)	5(4.67)	65(60.75)	37(34.58)	5(4.67)	65(60.75)	37(34.58)	5(4.67)
<i>P</i> 值		0.81			0.73			0.73		

组别	样本例数	rs6127698			rs3746619			rs3827103		
		TT	GT	GG	CC	AC	AA	GG	AG	AA
对照组	105	59(56.19)	37(35.24)	9(8.57)	68(64.76)	32(30.48)	5(4.76)	67(63.81)	33(31.43)	5(4.76)
IS 组	107	50(46.73)	43(40.19)	14(13.08)	60(56.07)	43(40.19)	4(3.74)	62(57.94)	41(38.32)	4(3.74)
<i>P</i> 值		0.32			0.33			0.51		

表 7 婴儿痉挛症组与正常对照组受试儿童外周血 *MC3R* 各单核苷酸多态性等位基因分布频率的比较 例(%)

Table 7. Alleles frequencies of the SNP in peripheral blood *MC3R* gene in cases and controls

组别	样本例数	rs6014649		rs1169750		rs1169973	
		G	A	C	G	T	C
对照组	210	168(80.00)	42(20.00)	169(80.48)	41(19.52)	169(80.48)	41(19.52)
IS 组	214	167(78.04)	47(21.96)	167(78.04)	47(21.96)	167(78.04)	47(21.96)
<i>P</i> 值		0.62		0.54		0.54	

组别	样本例数	rs6127698		rs3746619		rs3827103	
		T	G	C	A	G	A
对照组	210	155(73.81)	55(26.19)	168(80.00)	42(20.00)	167(79.52)	43(20.48)
IS 组	214	143(66.82)	71(33.18)	163(76.17)	51(23.83)	165(77.10)	49(22.90)
<i>P</i> 值		0.12		0.34		0.55	

性 33 例(44.00%)、隐源性 12 例(57.14%)，不同亚组之间比较，差异无统计学意义($\chi^2 = 1.18, P = 0.29$)。

(2) 正常对照组: 118 例正常受试儿童, 男性 73 例, 女性 45 例; 年龄 3 ~ 11 个月, 平均(6.30 ± 3.53) 个月。两组受试儿童性别构成比($\chi^2 = 0.00, P > 0.05$)和年龄($t = 0.32, P > 0.05$)之间, 差异无统计学意义。

2. *MC4R* 单核苷酸多态性分布 对婴儿痉挛症组 96 例和正常对照组 118 例受试儿童进行 *MC4R* 基因编码区及启动子区检测, 结果婴儿痉挛症组编码区未发现基因突变或单核苷酸多态性, 于上游启动子距离转录起始部位 ACA 1 kb 区域内共检出 3 个单核苷酸多态性, 分别为 rs17066842、rs11872992 和 rs8087522; 正常对照组 3 个单核苷酸多态性的分布未明显偏离 Hardy - Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。rs17066842 和 rs8087522 各基因型及等位基因分布频率, 两组之间差异无统计学意义 ($P = 0.55, 0.40$)。进一步分析显示, 症状性和隐源性婴儿痉挛症患儿上述 3 个单核苷酸多态性基因型及等位基因分布频率比较, 差异亦无统计学意义 ($P = 0.29,$

0.30); rs11872992 基因型胸腺嘧啶-胞嘧啶 (TC)、胞嘧啶-胞嘧啶 (CC) 基因型分布频率, 组间差异存在统计学意义 ($P = 0.00$), 婴儿痉挛症组患儿 TC 和 CC 基因型分布频率分别为 10.41% 和 89.58%。

3. rs11872992 不同基因型和等位基因分布频率与促肾上腺皮质激素治疗反应之间的相关分析 婴儿痉挛症组 96 例患儿均接受促肾上腺皮质激素治疗, 治疗有效者与无效者的 rs11872992 基因型分布频率差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 7.32, 95\% \text{ CI}: 0.03 \sim 0.69; P = 0.01$)。其中, 促肾上腺皮质激素治疗有效的患儿 TC 基因型分布频率较高, 而 CC 基因型分布频率较低^[14], 携带 T 等位基因的患儿对促肾上腺皮质激素治疗有效率较高 ($P = 0.01$, 表 8)。

四、*MC2R* 启动子多态性对其表达及促肾上腺皮质激素治疗反应性的调控

1. 荧光素酶活性分析 经分析显示, HEK293 细胞系 pGL3-TCCT 相对荧光素酶活性基线水平为 12.63 ± 6.53, pGL3-TCCC 为 3.63 ± 2.39 ($t = 5.53, P = 0.00$); SH-SY5Y 细胞系 pGL3-TCCT 相对荧光素酶活

表 8 *MC4R* rs11872992 各基因型及等位基因在促肾上腺皮质激素治疗有效及无效患者中的分布情况 例(%)

Table 8. ACTH responses in patients carrying different genotypes and alleles of rs11872992 in the *MC4R* gene

组别	例数	基因型		等位基因	
		CC	TC	C	T
ACTH 反应有效组	45	35(77.78)	10(22.22)	80(88.89)	10(11.11)
ACTH 反应无效组	51	49(96.08)	2(3.92)	100(98.04)	2(1.96)

注:ACTH,促肾上腺皮质激素。两组基因型的比较, $\chi^2=7.32$, $OR=0.14$,95%CI:0.03~0.69; $P=0.01$;等位基因型的比较, $\chi^2=6.83$, $OR=0.16$,95%CI:0.03~0.75; $P=0.01$

性基线水平为 6.95 ± 3.50 , pGL3-TCCC 为 1.74 ± 0.66 ($t=3.87$, $P=0.00$; 图 1)。检测结果显示,婴儿痉挛症组患儿保护型启动子 pGL3-TCCT 转录活性是 pGL3-TCCC 的 4 倍 ($P<0.05$)。HEK293 细胞系经促肾上腺皮质激素刺激后,与基线水平相比 2 个单体型的转录活性均明显增强, pGL3-TCCT_{ACTH} 相对荧光素酶活性约为基线水平的 8 倍,二者之间差异有统计学意义 ($t=2.15$, $P=0.04$); pGL3-TCCT_{ACTH} 相对荧光素酶活性较基线水平也明显升高,二者之间差异具有统计学意义 ($t=6.93$, $P=0.00$)。HEK293 细胞系携带 TCCT 单体型的启动子对促肾上腺皮质激素刺激的敏感性高于 TCCC 单体型,差异有统计学意义 ($t=3.13$, $P=0.00$; 图 2)^[15]。

2. 经小鼠 *MC2R*-cDNA 转染的 HEK293 细胞系 mRNA 表达变化 以 HEK293 细胞系 pGL3-Control 相对荧光素酶活性作为内参照物,对相对荧光素酶活性转录效率进行比较, pGL3-TCCT 与 pGL3-TCCC 的转录效率差异无统计学意义 ($P>0.05$),有可比性。含有 TCCT 单体型的启动子 mRNA 基线水平为 $2^{-\Delta\Delta CT}=2.93$ (平均数),经促肾上腺皮质激素刺激后,其 $2^{-\Delta\Delta CT}=15.97$,增至基线水平的 5 倍,刺激前后差异具有统计学意义 ($P=0.00$); 而 TCCC 单体型于促肾上腺皮质激素刺激后 $2^{-\Delta\Delta CT}=3.01$,仅呈轻度升高,与基线水平 $2^{-\Delta\Delta CT}=2.17$ 相比,刺激前后差异无统计学意义 ($P>0.05$)^[15]。

讨 论

婴儿痉挛症是婴儿时期较常见的难治性癫痫综合征之一,其病因十分复杂,发病机制至今不明,而且几乎对所有传统抗癫痫药物均反应欠佳。1958 年, Sorel 和 Dusaucy-Bauloye 首次报告促肾上腺皮质激素可阻止痉挛发作,因此半个世纪以来,尽

管该药存在许多不良反应,但至今仍是治疗婴儿痉挛症的一线药物^[16]。美国神经病学学会(AAN)和儿童神经病协会(CNS)总结:促肾上腺皮质激素很可能、氨乙酰胺有可能对初发婴儿痉挛症有效,而其他药物尚缺乏有力的临床证据^[17]。虽然,促肾上腺皮质激素是目前治疗婴儿痉挛症的主导药物,但超过 30% 的患儿对该药无效,其作用机制及耐药机制已成为儿科神经病学专家所关注的焦点之一。

促肾上腺皮质激素在中枢具有多种生理功能,包括学习记忆与动机行为、修饰行为、体温调节、心血管功能调节、神经损伤恢复与再生等。它与黑色素细胞刺激素(MSH)及阿片肽之一的 β -内啡肽共同起源于同一前体,即前阿黑皮素(POMC)。其中促肾上腺皮质激素和黑色素细胞刺激素具有部分同源氨基酸序列,有某些相似的中枢功能,因此促肾上腺皮质激素和黑色素细胞刺激素相关肽类被统称为黑皮质素(MC)。近年发现,促肾上腺皮质激素和黑色素细胞刺激素能够与共同的受体黑皮质素受体相结合。黑皮质素受体是 G 蛋白耦联受体超家族(GPCR)成员之一,现已发现 5 种类型黑皮质素受体,其中 *MC2R*、*MC3R* 和 *MC4R* 与黑皮质素肽类的中枢作用有关。

大量研究表明,促肾上腺皮质激素可以通过以下两种途径下调脑内某些区域促肾上腺皮质激素释放激素的过度分泌和释放,从而降低婴儿痉挛症患儿的神经元兴奋性,发挥临床抗惊厥效应^[2-3,18]: (1)与 *MC2R* 结合,促进糖皮质激素分泌,使血浆中的皮质醇水平稳定和持续升高。(2)通过直接刺激中枢杏仁核 *MC4R* 发挥独立于皮质激素外的直接效应。这两种途径均可通过长、短负反馈机制最终抑制脑内致惊厥剂促肾上腺皮质激素释放激素的合成和分泌,从而有效地控制痉挛发作和缓解高峰失律的脑电图表现。

本项研究结果显示, *MC2R* 基因启动子区常见单体型 TCCT 对婴儿痉挛症具有保护作用, TCCT 携带者比非携带者对促肾上腺皮质激素治疗敏感。进一步的体外功能学研究证实, *MC2R* 基因启动子区 TCCT 单体型可明显提高 *MC2R* 启动子的转录效率,且经促肾上腺皮质激素刺激后, *MC2R* 转录效率及 *MC2R* mRNA 表达水平明显上调,提示该单体型与婴儿痉挛症促肾上腺皮质激素疗效反应性高度相关。 *MC4R* 基因启动子单核苷酸多态性 rs11872992 与婴儿痉挛症关系密切,婴儿痉挛症组

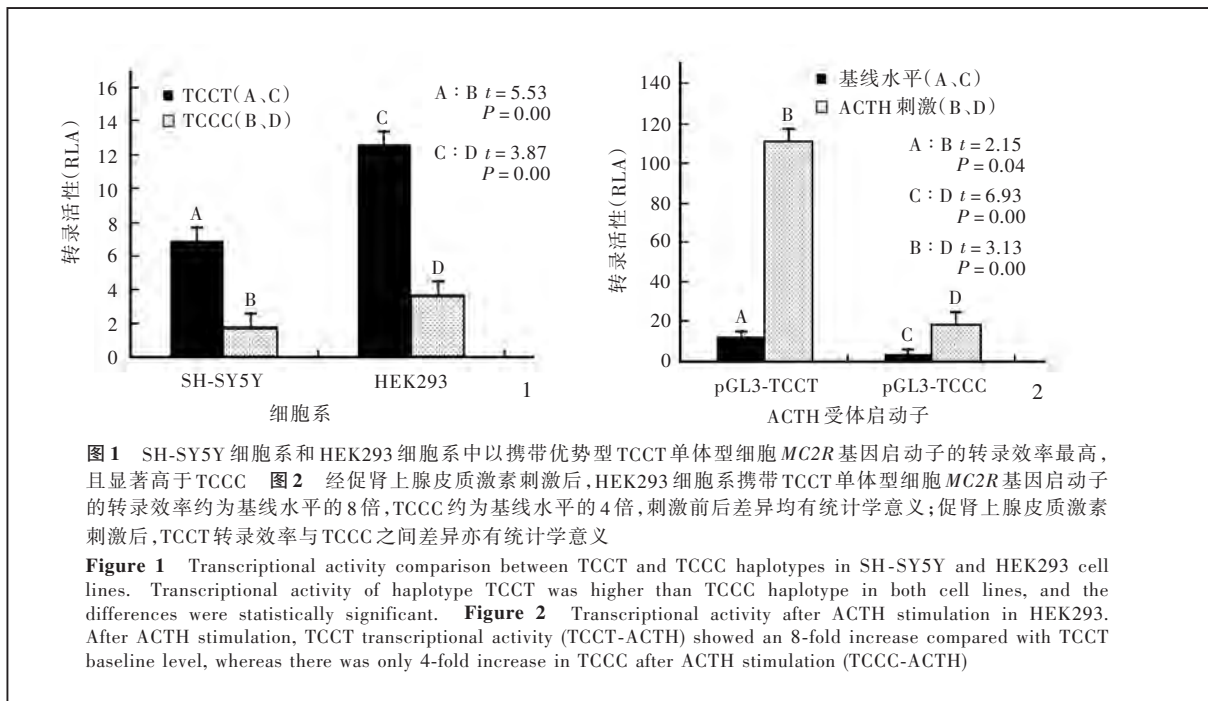


图1 SH-SY5Y细胞系和HEK293细胞系中以携带优势型TCCT单体型细胞MC2R基因启动子的转录效率最高,且显著高于TCCC图2经促肾上腺皮质激素刺激后,HEK293细胞系携带TCCT单体型细胞MC2R基因启动子的转录效率约为基线水平的8倍,TCCC约为基线水平的4倍,刺激前后差异均有统计学意义;促肾上腺皮质激素刺激后,TCCT转录效率与TCCC之间差异亦有统计学意义

Figure 1 Transcriptional activity comparison between TCCT and TCCC haplotypes in SH-SY5Y and HEK293 cell lines. Transcriptional activity of haplotype TCCT was higher than TCCC haplotype in both cell lines, and the differences were statistically significant. Figure 2 Transcriptional activity after ACTH stimulation in HEK293. After ACTH stimulation, TCCT transcriptional activity (TCCT-ACTH) showed an 8-fold increase compared with TCCT baseline level, whereas there was only 4-fold increase in TCCC after ACTH stimulation (TCCC-ACTH)

患儿TC型个体频率明显低于正常对照组;T型等位基因携带者对促肾上腺皮质激素治疗效果显著优于非T型等位基因携带者。然而MC3R的几种单核苷酸多态性在婴儿痉挛症组与正常对照组之间的分布无统计学差异($P > 0.05$)。

癫痫药物遗传学研究结果表明,某些药物受体基因常见突变,尤其是单核苷酸多态性的改变在很大程度上与癫痫的发生、惊厥结果、抗癫痫药物的敏感性和耐药性等密切相关^[19]。单核苷酸多态性是人类基因组最常见的遗传学变异,出现在1%以上的人群中,业已发现某些单核苷酸多态性与某些基因功能改变和某些疾病的易感性存在一定的关联性。基因多态性改变已成为许多疾病的危险因素和易感因素之一,如参与阿尔茨海默病、难治性颞叶癫痫和某些药物抵抗型癫痫的发病及耐药机制^[20-21]。以上结果提示,黑皮素受体基因单核苷酸多态性的改变可能很大程度参与了婴儿痉挛症的发病机制和促肾上腺皮质激素治疗的耐药性。这些研究结果可为预测婴儿痉挛症患儿促肾上腺皮质激素疗效提供一定的分子生物学线索。

促肾上腺皮质激素主要与MC2R结合发挥作用,MC2R启动子区有3个结合元件,分别为SF-1、CRE和AP-1^[22]。促肾上腺皮质激素对MC2R表达的影响是通过cAMP信号转导途径发挥作用,这一效应可通过forskolin或cAMP处理后模拟^[23]。与促

肾上腺皮质激素治疗反应性相关的MC2R基因TCCT单体型跨越启动子区上游的-2到-853区域,该区域恰好包括影响促肾上腺皮质激素疗效发挥的CREs区域。利用双荧光报告基因系统评价与婴儿痉挛症相关的MC2R基因启动子区不同单体型对转录活性的调控作用,结果表明携带TCCT单型型的MC2R启动子比携带TCCC单型型的启动子有较高的转录活性及较强的促肾上腺皮质激素反应性。推测与TCCT和某些特异性转录因子,如cAMP有较强的亲和力有关。我们采用促肾上腺皮质激素刺激转染的HEK293细胞系而不是通过forskolin提高cAMP水平,发现经促肾上腺皮质激素刺激后报告基因有强反应,表明内源性MC2R主要表达于HEK293细胞系。而且还发现,转染鼠MC2R基因后的HEK293细胞系对促肾上腺皮质激素刺激有较强的荧光反应性。在某种程度上,我们所使用的方法比其他研究更接近真实的人体环境^[24]。我们的体外实验研究结果将有助于进一步理解促肾上腺皮质激素治疗婴儿痉挛症的有效性。此外,MC4R基因启动子rs11872992可能与婴儿痉挛症的发生有关,且T型等位基因携带者对促肾上腺皮质激素治疗效果优于非T型等位基因携带者。与MC2R的分布不同,MC4R主要在各种脑组织表达,在杏仁核,黑皮素受体可能与促肾上腺皮质激素促进记忆及学习有关^[25]。MC4R在海马也有表达,并且可与促

肾上腺皮质激素紧密连接^[26]。给予幼鼠腹腔注射促肾上腺皮质激素能够明显降低杏仁核 *CRH* 基因的表达水平。切除双侧肾上腺或应用糖皮质激素受体阻断药 RU38486 去除皮质激素影响后,促肾上腺皮质激素仍能使下丘脑、杏仁核及海马 *CRH* 基因表达水平明显下降。脑室内注射微量促肾上腺皮质激素即可使杏仁核 *CRH* 基因表达水平明显下降,但是应用 SHU9119 选择性阻滞 *MC4R*,促肾上腺皮质激素对 *CRH* 基因表达的下调作用消失^[3]。提示促肾上腺皮质激素可同时通过外周和中枢两种途径发挥药理作用,同时也解释了 *MC2R* 和 *MC4R* 基因变异均能够影响婴儿痉挛症的发生及促肾上腺皮质激素治疗有效性的问题。

总之,我们的研究表明,*MC2R* 常见单体型 TCCT 不仅对婴儿痉挛症具有保护作用,而且对促肾上腺皮质激素治疗亦有较高的反应性;体外实验证实,TCCT 可明显提高 *MC2R* 基因启动子的转录效率,且经促肾上腺皮质激素刺激后,*MC2R* 转录效率及 *MC2R* mRNA 表达水平明显上调。此外,*MC4R* 的 rs11872992 的基因型 *TC* 在婴儿痉挛症组的分布频率明显低于正常对照组;*T* 型等位基因携带者对促肾上腺皮质激素的疗效优于非 *T* 型等位基因携带者。提示:黑皮质素受体多态性与婴儿痉挛症的发生有一定关系,并可影响患儿对促肾上腺皮质激素的反应性。这些发现将有助于理解婴儿痉挛症的发病机制,并为早期预测促肾上腺皮质激素疗效提供一定的分子标志,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lux AL, Osborne JP. A proposal for case definitions and outcome measures in studies of infantile spasms and West syndrome: consensus statement of the West Delphi group. *Epilepsia*, 2004, 45: 1416-1428.
- [2] Brunson KL, Khan N, Eghbal-Ahmadi M, et al. Corticotropin (ACTH) acts directly on amygdala neurons to down-regulate corticotropin-releasing hormone gene expression. *Ann Neurol*, 2001, 49:304-312.
- [3] Wang W, Murphy B, Dow KE, et al. Systemic adrenocorticotrophic hormone administration down-regulates the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-binding protein in infant rat hippocampus. *Pediatr Res*, 2004, 55:604-610.
- [4] Markison S, Foster AC. Targeting melanocortin receptors for the treatment of obesity. *Drug Discov Today*, 2006, 3:569-576.
- [5] Zou LP, Wang X, Dong CH, et al. Three-week combination treatment with ACTH + magnesium sulfate versus ACTH monotherapy for infantile spasms: a 24-week, randomized, open-label, follow-up study in China. *Clin Ther*, 2010, 32:692-700.
- [6] Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 2003, 60:560-563.
- [7] Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*, 2005, 46:858-877.
- [8] Metherell LA, Chan LF, Clark AJ. The genetics of ACTH resistance syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006, 20:547-560.
- [9] Lux AL, Edwards SW, Hancock E, et al. The United Kingdom Infantile Spasms Study comparing vigabatrin with prednisolone or tetracosactide at 14 days: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*, 2004, 364:1773-1778.
- [10] Baram TZ, Mitchell WG, Tournay A, et al. High-dose corticotropin (ACTH) versus prednisone for infantile spasms: a prospective, randomized, blinded study. *Pediatrics*, 1996, 97:375-379.
- [11] Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, 2005, 15:97-98.
- [12] Halperin E, Eskin E. Haplotype reconstruction from genotype data using imperfect phylogeny. *Bioinformatics*, 2004, 20:1842-1849.
- [13] Liu ZL, He B, Fang F, et al. Genetic polymorphisms of *MC2R* gene associated with responsiveness to adrenocorticotrophic hormone therapy in infantile spasms. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121:1627-1632.
- [14] Liu ZL, He B, Tang CY, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the melanocortin-4 receptor promoter in infantile spasms. *Neuropediatrics*, 2007, 38:304-309.
- [15] Ding YX, Zou LP, He B, et al. ACTH Receptor (*MC2R*) promoter variants associated with infantile spasms modulate *MC2R* expression and responsiveness to ACTH. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20:71-76.
- [16] Kossoff EH. Infantile Spasms. *Neurologist*, 2010, 16:69-75.
- [17] Mackay MT, Weiss SK, Adams-Webber T, et al. Practice parameter: medical treatment of infantile spasms. Report of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology*, 2004, 62:1668-1681.
- [18] Baram TZ. Treatment of infantile spasms: the ideal and the mundane. *Epilepsia*, 2003, 44:993-994.
- [19] Sisodiya SM. Genetics of drug resistance. *Epilepsia*, 2005, 46 Suppl 10:33-38.
- [20] Kanemoto K, Kawasaki J, Yuasa S, et al. Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsion. *Epilepsia*, 2003, 44:796-799.
- [21] Chao S, Roberts JS, Marteau TM, et al. Health behavior changes after genetic risk assessment for Alzheimer disease: the REVEAL study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2008, 22:94-97.
- [22] Zwermann O, Braun AC, Lalli E, et al. Regulation of human *MC2-R* gene expression by CREB, CREM, and ICER in the adrenocortical cell line Y1. *Horm Metab Res*, 2007, 39:560-566.
- [23] Sarkar D, Kambe F, Hayashi Y, et al. Involvement of AP-1 and steroidogenic factor (SF)-1 in the cAMP-dependent induction of human adrenocorticotrophic hormone receptor (ACTHR) promoter. *Endocr J*, 2000, 47:63-75.
- [24] Slawik M, Reisch N, Zwermann O, et al. Characterization of an adrenocorticotropin (ACTH) receptor promoter polymorphism leading to decreased adrenal responsiveness to ACTH. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89:3131-3137.
- [25] Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, et al. Localization of the melanocortin-4 receptor (*MC4-R*) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*, 1994, 8:1298-1308.
- [26] Adan RA, Gispén WH. Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol*, 2000, 405:13-24.

(收稿日期:2012-08-10)