

·基础研究·

癫痫患者血清高迁移率族蛋白1与TOLL样受体4的表达及影响因素

叶嘉颖, 杨炼红

(中山大学孙逸仙纪念医院神经科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】通过检测癫痫患者血清中高迁移率族蛋白1(HMGB1)与TOLL样受体4(TLR4)的水平并对其进行影响因素分析,探究HMGB1、TLR4在癫痫中的作用和意义,以及影响HMGB1、TLR4表达的因素。【方法】本研究为前瞻性观察性临床研究,选取2016年9月至2017年9月期间我院确诊原发性癫痫患者72例为实验组,并分为药物难治组(19例)、药物有效组(32例)、分类不明组(21例)三个亚组;选取同时期我院体检的健康者43例为对照组。采集实验组及对照组研究对象2 mL外周血,留取血清,采用流式荧光检测技术检测血清中HMGB1水平、酶联免疫吸附测定法检测血清中TLR4水平。比较实验组与对照组、实验组亚组间的血清HMGB1、TLR4水平的差异,分析实验组血清HMGB1、TLR4水平的相关性,并对实验组血清HMGB1、TLR4水平与临床因素进行相关性分析。【结果】实验组血清HMGB1、TLR4水平分别为(370±211) pg/mL和(36.0±3.8) ng/mL,显著高于对照组的(284±158) pg/mL和(34.4±4.1) ng/mL,差异有统计学意义($P<0.05$);药物难治组血清TLR4、HMGB1水平分别为(498±214) pg/mL和(38.4±3.2) ng/mL,显著高于药物有效组的(301±182) pg/mL和(34.5±3.8) ng/mL,差异有统计学意义($P<0.05$);实验组血清HMGB1与TLR4的水平呈正相关线性关系,决定系数 $R^2=0.479$, $P<0.05$;实验组血清HMGB1的水平与癫痫发作频率($F=6.71$, $P=0.012$)、病程时长($F=6.55$, $P=0.013$)、药物反应性($F=3.96$, $P=0.024$)相关,实验组血清TLR4的水平与癫痫发作频率($F=4.68$, $P=0.034$)、药物反应性($F=3.80$, $P=0.027$)相关。【结论】癫痫患者血清HMGB1、TLR4水平高于非癫痫患者;难治性癫痫(IE)患者血清HMGB1、TLR4水平高于非难治性癫痫患者;癫痫患者血清HMGB1与TLR4水平呈正相关关系;癫痫患者血清中HMGB1水平与癫痫发作频率、病程时长、药物反应性相关,癫痫患者血清中TLR4水平与癫痫发作频率、药物反应性相关。

关键词:癫痫;高迁移率族蛋白1;TOLL样受体4;难治性癫痫

中图分类号:R74

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)06-0839-07

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0606

Expression of High-mobility Group Box 1, Toll-like Receptor 4 in Epileptic Patients and Analysis of Their Influencing Factors

YE Jia-ying, YANG Lian-hong

(Department of Neurology, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: YANG Lian-hong; E-mail: docylh@163.com

Abstract:【Purposes】To explore the effect of HMGB1 and TLR4 in epilepsy as well as the influencing factors affecting the expression of HMGB1 and TLR4, we detected the levels of High-mobility group box 1 (HMGB1) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in serum of epileptic patients and analyzed their influencing factors.【Methods】In this prospective observational clinical research, a total of 72 patients who were diagnosed as primary epilepsy in our Hospital from September

收稿日期:2021-05-18

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313085)

作者简介:叶嘉颖,硕士生,研究方向:癫痫与老年神经疾病,E-mail:229524990@qq.com;杨炼红,通信作者,教授,研究方向:癫痫与老年神经疾病,E-mail:docylh@163.com

2016 to September 2017 were selected as the experimental group and divided into three experimental subgroups: drug-resistant group (19 cases), drug-effective group (32 cases) and unidentified group (21 cases). A total of 43 healthy people in our hospital were selected as the control group. We collected 2 mL of blood from each person in the experimental group and the control group, and separated the serum from blood. The level of HMGB1 in serum was measured by flow fluorescence technology and the level of TLR4 in serum was measured by ELISA. Then, we analyzed the differences of the levels of serum HMGB1 and TLR4 among the experimental group, control group and experimental subgroups, the correlation between the levels of serum HMGB1 and TLR4 of the experimental group, as well as the correlation between the clinical influencing factors and HMGB1 and TLR4.【Results】The levels of serum HMGB1 and TLR4 in the experimental group were (370 ± 211) pg/mL and (36.0 ± 3.8) ng/mL, which were significantly higher than (284 ± 158) pg/mL and (34.4 ± 4.1) ng/mL in the control group; and those in the drug-resistant group were (498 ± 214) pg/mL and (38.4 ± 3.2) ng/mL, which were significantly higher than (301 ± 182) pg/mL and (34.5 ± 3.8) ng/mL in the drug-effective group ($P < 0.05$). There was a positive linear correlation between HMGB1 and TLR4 in the experimental group ($R^2=0.479$). The level of serum HMGB1 in the experimental group was related to seizure frequency ($F=6.71$, $P=0.012$), the duration of disease ($F=6.55$, $P=0.013$) and drug reactivity ($F=3.96$, $P=0.024$). The level of serum TLR4 in the experimental group was related to seizure frequency ($F=4.68$, $P=0.034$) and drug reactivity ($F=3.80$, $P=0.027$).【Conclusions】The levels of serum HMGB1 and TLR4 in epileptic patients are higher than those of non-epileptic patients. The levels of serum HMGB1 and TLR4 in patients with intractable epilepsy (IE) are higher than those in patients with non-intractable epilepsy. There is a positive correlation between HMGB1 and TLR4. The level of serum HMGB1 in epileptic patients is related to seizure frequency, the duration of disease and drug reactivity. The level of serum TLR4 in epileptic patients is related to seizure frequency and drug reactivity.

Key words: epilepsy; high-mobility group box 1; toll-like receptor 4; intractable epilepsy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(6): 839-845]

目前,癫痫(epilepsy)的病因和病理生理机制尚不明确,越来越多的学者提出癫痫与免疫应答、炎症反应相关^[1],近期有研究发现动物癫痫模型和体外模型中TOLL样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)与高迁移率族蛋白1(high-mobility group box 1, HMGB1)等免疫炎症标志物异常表达^[2-4],但临床癫痫患者中是否存在类似的免疫学改变,少有报道。因此,本研究采用前瞻性观察性临床研究方法,检测癫痫患者血清中HMGB1与TLR4的水平并对其进行影响因素分析,探究HMGB1、TLR4在癫痫中的作用和意义,以及影响HMGB1、TLR4表达的因素,增加对癫痫及难治性癫痫(intractable epilepsy, IE)分子机制的了解。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

选取2016年9月-2017年9月期间于我院确诊的原发性癫痫患者74例作为实验组。依据实验组患者对AEDs治疗的反应性,将实验组分为药物难治组(19例)、药物有效组(31例)、分类不明组(24例)三个亚组。记录实验组患者年龄、性别、临床表

现(起病年龄、发作类型、发作频率、末次发作时间、用药情况)、脑电图、头颅MRI等临床资料。选取同时期来我院体检的健康者43例作为对照组。2组在性别、年龄方面无明显差异, $P>0.05$,具有可比性。

1.2 实验组入排标准

实验组入组标准:①参考国际抗癫痫联盟(ILAE)及国际癫痫局(IBE)制定指南^[5-6],结合临床表现、脑电图、头颅影像学检查、家族史诊断为原发性癫痫。②病史资料完整,已获家属知情同意,经过伦理委员会的批准。

实验组排除标准:①颅内肿瘤、颅脑感染、头颅外伤或手术后、缺血缺氧性脑病、神经系统发育异常、神经系统退行性疾病等神经系统疾病。②急慢性感染、肿瘤、风湿免疫性疾病等全身系统疾病;近1月内重大创伤或手术治疗。③过去6个月糖皮质激素、免疫抑制剂使用史。④病史资料不全,或无家属知情同意,或违反伦理学标准。

1.3 实验组亚组分组标准

药物难治组:参考ILAE对耐药性癫痫的定义^[7],达到以下条件后1年内仍有大于1次以上的癫痫发作的患者:①至少经2种抗癫痫药物单药或

联合治疗,且每种药物达有效治疗剂量后至少使用1年(具体用药情况详见表1)。^②药物使用需达到有效治疗剂量:达到有效血药浓度或说明书最大可耐受剂量。^③依据患者癫痫发作类型选用正确的抗癫痫药物。

药物有效组:使用抗癫痫药物治疗后至少1年内癫痫发作次数小于等于1次者。

分类不明组:对于不符合药物难治组纳入标准及药物有效组纳入标准的患者,归入分类不明组,其中主要包括:经抗癫痫药物治疗无发作但未满1年者;因抗癫痫治疗药物选用错误、用药未达有效治疗剂量等原因癫痫发作仍未控制者等。

表1 药物有效组及药物难治组的用药情况
Table 1 Medication of drug-resistant group and drug-effective group

Drug-effective group	<i>n</i>	Drug-resistant group	<i>n</i>
VAP	21	VAP + LTG	4
LTG	3	VAP + LEV	3
LEV	4	VAP + OXC	1
OXC	1	VAP + CBZ	1
CBZ	1	VAP + PHT	1
VAP+ TPM + CBZ	1	LEV + PHT	1
VAP+ LEV	1	LEV + LTG	1
		LEV + OXC	1
		TPM + PHT	1
		VAP + LEV + TPM	1
		VAP + LEV + OXC	1
		VAP + LEV + PHT	1
		LEV + LTG + OXC	1
		LEV + OXC + PHT	1

VAP: sodium vedproate; LTG: lamotrigine; LEV: levetiracetam; OXC: oxcarbazepine; CBZ: carbamazepine; PHT: phenytoin; TPM: topiramate

1.4 血清高迁移率族蛋白1与TOLL样受体4的检测

实验组及对照组研究对象各抽取2 mL外周血,室温条件下静置30 min后,持续离心10 min,分离并留取血清,保存至-80 °C冰箱内,用于血清HMGB1、TLR4的检测。

利用流式荧光检测技术检测血清中HMGB1水平。实验步骤:准备试剂、样品、标准品,样品用稀

释液1:4稀释,微孔板上加入样本、质控品或标准品,依次加入微球液、检测抗体(Millipore品牌生产的抗HMGB1抗体试剂盒)、藻红蛋白标记的链霉亲和素,置入Luminex X-200仪器检测,记录数据,分析MFI结果,计算样品中HMGB1浓度。

采用酶联免疫吸附测定法(ELISA法)检测血清中TLR4水平。实验步骤:准备试剂、样品、标准品,样品用稀释液1:20稀释,96孔板上包被捕获抗体,加入样品或标准品,依次每孔加入酶标抗体(Biomatik品牌生产的TLR4配体试剂盒)、辣根过氧化物酶(HRP)、显色液,避光室温下静置20 min,每孔加入终止液终止反应,放入分光光度计(Thermo品牌的MULTISKAN FC型酶标仪),450 nm波长下检测,560 nm波长下校正,记录数据,绘制Logistic曲线,计算样品中TLR4浓度。

1.5 统计学方法

采用SPSS 25统计学软件对数据进行处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。实验组、对照组TLR4、HMGB1水平的比较采用*t*检验;实验组亚组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;实验组、对照组TLR4与HMGB1的相关性分析采用pearson相关系数分析;TLR4、HMGB1的影响因素的研究采用相关性分析和多因素方差分析。本研究采用双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组、对照组比较

实验组血清TLR4、HMGB1的水平高于对照组, $t_{\text{HMGB1}}=2.66$, $t_{\text{TLR4}}=2.26$, $P<0.05$,差异有统计学意义(表2)。

表2 实验组、对照组血清TLR4、HMGB1水平的比较
Table 2 Comparison of the levels of serum TLR4 and HMGB1 between experimental group and control group

Groups	<i>n</i>	HMGB1 (pg/mL)	TLR4 (ng/mL)
Experimental group	72	370±211	36.0±3.8
Control group	43	284±158	34.5±4.1
<i>t</i>		2.66	2.26
<i>P</i>		0.023	0.040

2.2 实验组亚组间比较

药物难治组、药物有效组、分类不明组三个实验组亚组间的血清TLR4、HMGB1水平有差异, $F_{\text{HMGB1}}=6.01$, $F_{\text{TLR4}}=7.50$, $P<0.05$, 差异有统计学意义。亚组间两两比较发现, 药物难治组血清TLR4、HMGB1水平高于药物有效组, $P_{\text{HMGB1}}=0.001<0.05$, $P_{\text{TLR4}}=0.010<0.05$, 差异有统计学意义; 药物难治组与分类不明组、药物有效组与分类不明组的组间差异无统计学意义(表3)。

表3 实验组亚组间血清TLR4、HMGB1水平比较
Table 3 Comparison of the levels of serum TLR4 and HMGB1 between experimental subgroups

Groups	<i>n</i>	HMGB1 (pg/mL)	TLR4 (ng/mL)
Drug-resistant group	19	498±214	38.4±3.2
Drug-effective group	32	301±182	34.5±3.8
Unidentified group	21	359±204	36.2±3.3
<i>F</i>		6.01	7.50
<i>P</i>		0.004	0.001

Comparison of drug-resistant group and drug-effective group:
 $P_{\text{HMGB1}}=0.001$, $P_{\text{TLR4}}=0.010$.

2.3 高迁移率族蛋白1与TOLL样受体4之间的相关性分析

实验组血清TLR4与HMGB1水平呈正相关线性关系, 决定系数 $R^2=0.479$, $P<0.05$ (图1)。

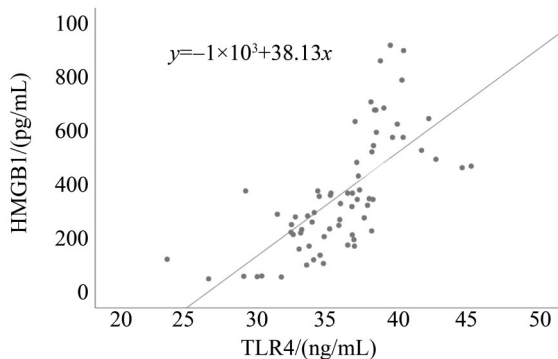


图1 实验组血清TLR4、HMGB1分布散点图

Fig. 1 Scatter map of the levels of serum TLR4 and HMGB1 of experimental group

2.4 高迁移率族蛋白1与TOLL样受体4的相关因素分析

2.4.1 临床因素的单因素方差分析 实验组血清

TLR4、HMGB1水平与性别、年龄、起病年龄、癫痫发作类型、癫痫发作持续时间、脑电图表现等因素无关, 与病程时长、癫痫发作频率、药物反应性相关。其中病程时长 ≥ 10 年的癫痫患者的血清TLR4、HMGB1水平高于病程时长 < 10 年的患者, $F_{\text{HMGB1}}=10.30$, $F_{\text{TLR4}}=4.06$, $P<0.05$, 差异有统计学意义; 癫痫发作频率 ≥ 2 次/月的癫痫患者的血清TLR4、HMGB1水平高于发作频率 < 2 次/月的患者, $F_{\text{HMGB1}}=7.65$, $F_{\text{TLR4}}=10.18$, $P<0.05$, 差异有统计学意义; 药物难治组血清TLR4、HMGB1水平高于药物有效组, $P<0.05$, 差异有统计学意义(表4)。

2.4.2 临床因素的多因素方差分析 在实验组血清HMGB1、TLR4水平与癫痫发作频率、病程时长、药物反应性三个因素的多因素方差分析中, 癫痫发作频率、药物反应性与血清TLR4水平相关, $F_{\text{Seizure frequency}}=4.68$, $F_{\text{Drug reactivity}}=3.80$, $P<0.05$, 差异有统计学意义; 癫痫发作频率、病程时长、药物反应性与血清HMGB1水平相关, $F_{\text{Seizure frequency}}=6.71$, $F_{\text{Duration of disease}}=6.55$, $F_{\text{Drug reactivity}}=3.96$, $P<0.05$, 差异有统计学意义(表5-6)。

3 讨论

TOLL样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类表达于免疫细胞及部分非免疫细胞膜上的天然免疫受体, TLR4是Toll样受体家族的其中一员, 在神经系统中主要表达于小胶质细胞、星形胶质细胞等。HMGB1是TLR4的内源性配体之一, 其在正常情况下, 广泛存在于神经系统、心、肝、脾、肺、肾等组织细胞核中, 参与DNA转录、翻译和修复。

动物癫痫模型中发现, HMGB1在癫痫发作时, 从细胞核释放到细胞外, 胞外游离的HMGB1经氧化成为具有活性的二硫键HMGB1, 可特异性结合膜受体TLR4或晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-product, RAGE), 启动炎症级联反应, 促进癫痫发生发展^[2]。癫痫患者血清中的HMGB1、TLR4水平显著高于非癫痫患者, 提示HMGB1、TLR4在人体中同样与癫痫密切相关。

本研究对癫痫患者血清TLR4、HMGB1水平进行相关因素分析, 在单因素分析中, 我们发现癫痫患者血清TLR4、HMGB1水平与性别、年龄、起病年龄、癫痫发作类型、癫痫发作持续时间、脑电图表现等因素无关, 与癫痫发作频率、病程时长、药物反应性相关, 癫痫发作频率 ≥ 2 次/月的患者血清TLR4与

表4 影响实验组血清TLR4、HMGB1水平的单因素方差分析

Table 4 Univariate analysis of the levels of serum TLR4 and HMGB1 in experimental group ($\bar{x} \pm s$)

Items		<i>n</i>	HMGB1/(pg/mL)	<i>F</i>	<i>P</i>	TLR4/(ng/mL)	<i>F</i>	<i>P</i>
Gender	Male	40	360±201	0.21	0.650	35.9±4.3	0.16	0.691
	Female	32	383±225			36.2±3.2		
Age	≤35	44	365±215	0.06	0.811	36.5±3.8	1.38	0.244
	>35	28	378±209			35.4±3.9		
Onset age	≤25	45	387±216	0.74	0.392	36.7±3.6	3.46	0.067
	>25	27	342±203			35.0±4.0		
Duration of disease	<10 years	43	308±209	10.30	0.002	35.3±4.4	4.06	0.048
	≥10 years	29	461±181			37.1±2.5		
Seizure type	Generalized seizure	43	352±213	0.40	0.673	35.9±4.1	0.32	0.727
	Partial seizure	13	403±199			36.8±4.4		
	Mixed seizure ¹⁾	16	392±221			35.7±2.7		
Seizure frequency	≥Twice a month	34	440±230	7.65	0.007	37.5±3.6	10.18	0.002
	< Twice a month	38	308±173			34.8±3.6		
Seizure duration	≥10 mins	9	325±188	0.47	0.496	36.2±2.9	0.02	0.901
	<10 mins	63	377±215			36.0±3.8		
EEG	Epileptic discharge	43	412±203	2.65	0.109	36.8±3.6	2.19	0.145
	Non epileptic discharge	19	317±229			35.3±3.7		
Drug reactivity	Drug-resistant group	19	498±214	6.01	0.004	38.4±3.2	7.50	0.001
	Drug-effective group	32	301±182			34.5±3.8		
	Unidentified group	21	359±204			36.2±3.3		

¹⁾ Mixed seizure: secondarily generalized seizure or several seizure types in one person.

表5 影响实验组血清TLR4水平的多因素方差分析

Table 5 Multivariate analysis of the levels of serum TLR4 in experimental group

Factors	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	<i>F</i>	<i>P</i>
Seizure frequency	52.2	1	52.2	4.68	0.034
Duration of disease	24.7	1	24.7	2.21	0.142
Drug reactivity	84.9	2	42.4	3.80	0.027

R Squared=0.361 (Adjusted *R* Squared=0.291).

表6 影响实验组血清HMGB1水平的多因素方差分析

Table 6 Multivariate analysis of the levels of serum HMGB1 in experimental group

Factors	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	<i>F</i>	<i>P</i>
Seizure frequency	211 717	1	211 717	6.71	0.012
Duration of disease	206 517	1	206 517	6.55	0.013
Drug reactivity	250 011	2	125 005	3.96	0.024

R Squared=0.297 (Adjusted *R* Squared=0.210).

HMGB1水平显著高于发作频率<2次/月的患者,病程时长≥10年的患者血清TLR4与HMGB1水平显著高于病程时长<10年的患者,IE患者中的血清TLR4与HMGB1水平显著高于非IE患者。在多因素分析中,癫痫发作频率、药物反应性与血清TLR4、HMGB1水平均显著相关,但病程时长与血清HMGB1水平显著相关、与TLR4无相关性。

癫痫患者血清TLR4、HMGB1高于非癫痫患者,且癫痫发作频率≥2次/月的患者血清TLR4、HMGB1水平高于发作频率<2次/月的患者,提示癫痫发作频率与血清TLR4、HMGB1水平可能呈正相关关系。一方面, HMGB1、TLR4水平升高可诱导癫痫发作, Maroso等^[8]发现,向小鼠癫痫模型的侧脑室注射HMGB1,可加速急性癫痫的发作、增加癫痫发作的数量和严重程度,而使用HMGB1、TLR4拮抗剂可抑制小鼠癫痫模型的癫痫发作。另一方面,癫痫发作本身可诱导HMGB1、TLR4水平的升高,有研究者发现使用海人酸(KA)诱导小鼠癫痫发作,1-3 h后海马区HMGB1、TLR4表达增多^[8],运用免疫组化技术对HMGB1进行细胞内定位,可观察到癫痫发作后HMGB1从细胞核移位到细胞质、释放到细胞外的过程^[9]。因此, HMGB1、TLR4水平升高可促进癫痫发作,而反复的癫痫发作又促使HMGB1、TLR4水平升高, HMGB1、TLR4水平升高与癫痫发作增加之间可能存在相互促进的关系,形成癫痫发展的恶性循环。

HMGB1、TLR4促癫痫作用的具体病理机制尚未完全明确,本研究中癫痫患者血清HMGB1、TLR4水平升高,且二者之间具有正相关线性关系,提示HMGB1、TLR4在促癫痫过程中可能具有协同作用。研究发现^[8, 10],向小鼠癫痫模型的侧脑室注射HMGB1可出现促癫痫作用,而向C3H/HeJ小鼠癫痫模型(TLR4基因变异失活的小鼠)注射HMGB1,未出现HMGB1的促癫痫作用。结合以上研究结果分析,癫痫患者中的HMGB1可能通过激活TLR4发挥促癫痫作用。HMGB1-TLR4通路激活、启动炎症级联反应后主要通过以下途径介导癫痫发生发展:①调节离子通道,改变神经元兴奋性, HMGB1-TLR4通路激活可促进N-甲基-d-天冬氨酸受体(NMDAR)的NR2B亚基的磷酸化,增强了NMDA诱导的神经元细胞Ca²⁺内流,提高神经细胞的兴奋毒性^[11];②促进炎症因子的分泌,如白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6

(interleukin-6, IL-6)等,而IL-1β、TNF-α等已有研究证明其具有促癫痫作用^[1];③调控相关基因的转录及蛋白的表达,比如HMGB1的增加可下调谷氨酸脱羧酶67(GAD67)和谷氨酸脱氢酶(GLUD1/2)的表达,增加细胞内谷氨酸浓度和主要组织相容性复合体II(MHC II)的水平,从而改变神经细胞兴奋性^[9];上调脑内P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的表达^[12-13],增加对AEDs的抵抗性、参与IE的形成;④损伤血脑屏障(Blood Brain Barrier, BBB),受损的BBB无法拦截外周血中活化的淋巴细胞、抗体、炎症因子、白蛋白、免疫球蛋白等物质进入中枢,加重脑内炎症反应,促进癫痫发作^[14-16]。

病程时长≥10年的癫痫患者的血清HMGB1水平高于病程时长<10年的患者,提示HMGB1水平可能与癫痫慢性病程相关。癫痫患者脑内持续存在的慢性炎症环境可能是癫痫的病理生理基础, HMGB1可能作为重要炎症介质促进癫痫慢性病理损伤,据研究, HMGB1与神经元程序性死亡、认知功能障碍相关, HMGB1可诱导大鼠海马CA1区神经元线粒体发生变构、并启动细胞凋亡,影响大鼠的学习能力、记忆能力^[17-18]。本研究发现病程时长与血清HMGB1显著相关,但与TLR4水平不相关,这可能提示HMGB1并不完全依赖TLR4起促癫痫作用, HMGB1除激活TLR4启动炎症反应,也可激活RAGE/NF-κB通路^[10, 13, 19], HMGB1-TLR4通路并非HMGB1发挥促癫痫作用的唯一途径。另外,研究纳入样本量不足、存在影响血清HMGB1、TLR4水平的未知且未控制的混杂因素,也同样可能导致以上实验结果的产生。

本研究发现IE患者血清HMGB1、TLR4水平显著高于非IE患者,提示HMGB1、TLR4可能增加癫痫患者对AEDs的抵抗性。HMGB1-TLR4通路可能通过调节脑内P-gp的表达参与IE的形成^[12]:大鼠癫痫模型中的HMGB1及P-gp水平显著增加,而额外地注射HMGB1可使P-gp表达进一步上调,使用HMGB1拮抗剂预处理后P-gp的表达则取消了上调。依据IE发生机制的转运体假说, AEDs耐药性产生是因为大脑中的AEDs外排转运体异常过量表达,使AEDs在BBB渗透不足或过量外排,中枢神经系统AEDs有效血药浓度不足,癫痫发作难以控制。P-gp是大脑中一种常见的外排转运蛋白, P-gp表达增加被认为与IE密切相关^[20]。

综上, HMGB1、TLR4作为免疫应答和炎症反应中的重要炎症标记物与癫痫密切相关, HMGB1、

TLR4可能增加癫痫患者对AEDs的抵抗性;癫痫发作频率、病程时长可影响HMGB1的表达,癫痫发作频率可影响TLR4的表达。但本研究样本量较小,

未检测IL-1 β 、TNF- α 等下游炎症因子,未排除不同药物类型对HMGB1、TLR4的影响, HMGB1、TLR4在癫痫中的作用仍需要进一步的探究。

参考文献

- [1] Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy[J]. *Handb Clin Neurol*, 2012, 107: 163-175.
- [2] Ravizza T, Terrone G, Salamone A, et al. High-mobility group box 1 is a novel pathogenic factor and a mechanistic biomarker for epilepsy[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 72: 14-21.
- [3] Paudel YN, Angelopoulou E, Akyuz E, et al. Role of innate immune receptor TLR4 and its endogenous ligands in epileptogenesis[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105172.
- [4] 叶洁梅, 黄国雄, 蔡志玲, 等. TLR4/MyD88介导的炎症反应在体外培养癫痫海马组织中的作用[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2019, 45(4): 232-234.
Ye JM, Huang GX, Cai ZL, et al. Role of TLR4/MyD88 mediated inflammatory response in epileptic hippocampus in vitro[J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2019, 45(4): 232-234.
- [5] Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE commission for classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2017, 58(4): 512-521.
- [6] Fisher RS, Cross JH, French JA, et al. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: position paper of the ILAE commission for classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2017, 58(4): 522-530.
- [7] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE commission on therapeutic strategies[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(6): 1069-1077.
- [8] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 413-419.
- [9] Kaneko Y, Pappas C, Malapira T, et al. Extracellular HMGB1 modulates glutamate metabolism associated with kainic acid-induced epilepsy-like hyperactivity in primary rat neural cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3): 947-959.
- [10] Iori V, Maroso M, Rizzi M, et al. Receptor for advanced glycation endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 58: 102-114.
- [11] Balosso S, Liu J, Bianchi ME, et al. Disulfide-containing high mobility group box-1 promotes N-methyl-D-aspartate receptor function and excitotoxicity by activating Toll-like receptor 4-dependent signaling in hippocampal neurons[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(12): 1726-1740.
- [12] Chen Y, Huang XJ, Yu N, et al. HMGB1 contributes to the expression of P-glycoprotein in mouse epileptic brain through Toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e140918.
- [13] Xie Y, Yu N, Chen Y, et al. HMGB1 regulates P-glycoprotein expression in status epilepticus rat brains via the RAGE/NF- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1691-1700.
- [14] Rigau V, Morin M, Rousset M, et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy[J]. *Brain*, 2007, 130(7): 1942-1956.
- [15] Ivens S, Kaufer D, Flores LP, et al. TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis[J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 2): 535-547.
- [16] Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2006, 47(11): 1761-1774.
- [17] Hyun H, Ko A, Kang T. Mitochondrial translocation of high mobility group box 1 facilitates LIM kinase 2-mediated programmed necrotic neuronal death[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10: 99.
- [18] Kim J, Kang T. Differential roles of mitochondrial translocation of active caspase-3 and HMGB1 in neuronal death induced by status epilepticus[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 301.
- [19] Zurolo E, Iyer A, Maroso M, et al. Activation of toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development[J]. *Brain*, 2011, 134(Part 4): 1015-1032.
- [20] Wang G, Wang D, Liu Y, et al. Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(5): 385-392.