

血脑屏障上的 *P*-糖蛋白和 乳腺癌耐药蛋白及其研究方法^{*}

王晓宇, 陈啸飞, 柴逸峰, 洪战英^{**}

(第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433)

摘要: 血脑屏障上存在的药物转运体 *P*-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白可以将包括药物在内的小分子等排出大脑, 发挥保护作用, 但是也给脑部疾病的治疗带来困扰, 药物很难在脑内达到有效的浓度, 从而无法发挥应有的药效, 是导致治疗失败的主要原因。本文主要对血脑屏障上的 *P*-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白的功能特点、研究方法和蛋白定量分析进行了综述。

关键词: 血脑屏障; *P*-糖蛋白; 乳腺癌耐药蛋白; 细胞模型; 基因敲除动物模型; 蛋白质定量

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)09-1557-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2016.09.02

P-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier and their research methods^{*}

WANG Xiao-yu, CHEN Xiao-fei, CHAI Yi-feng, HONG Zhan-ying^{**}

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical (Chinese Materia Medica) Metabolites Research, Shanghai 200433, China)

Abstract: *P*-glycoprotein (*P*-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP), drug transporters at the blood-brain barrier (BBB), can protect the brain from exogenous small molecules, such as drugs. However, it is also a major challenge for the treatment of central nervous system diseases since drugs cannot cross the BBB essentially to reach an effective concentration. In this paper, the functional characteristics, research methods and quantitative analysis of *P*-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood brain barrier were reviewed.

Keywords: blood-brain barrier; *P*-glycoprotein; breast cancer resistance protein; cell model; gene knockout animal model; protein quantification

血脑屏障可以阻止许多化合物进入大脑, 但这也包括发挥治疗作用的药物小分子, 从而阻碍了它们发挥应有的药效, 是导致脑部疾病治疗失败的主要原因。因此, 为了提高药物在脑内的累积量, 达到有

效的治疗浓度, 人们对血脑屏障上发挥屏障作用的主要转运蛋白从不同角度进行了研究。本文根据近年来国内外发表的相关文献, 对血脑屏障上的 *P*-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白的研究概况进行了综述, 主要包

* 国家自然科学基金 (No.81173020, NO.81373376)

** 通信作者 Tel:(021)81871261; E-mail:hongzhy001@163.com

第一作者 Tel:(021)81871261; E-mail:wxy1558345819@163.com

括 2 种转运蛋白的基本功能特点、体内外研究方法和蛋白定量分析方法等。

1 血脑屏障上的 *P*-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白

血脑屏障是由无窗孔的毛细血管内皮细胞(脑微血管内皮细胞)及其细胞间紧密连接、基膜(毛细血管基底膜)及嵌入其中的周细胞、星形胶质细胞足突和极狭小的细胞外隙共同组成的一个细胞复合体,是存在于脑和脊髓内的毛细血管与神经组织之间的一个调节中枢神经系统内环境的细胞屏障,能够维持脑内离子、激素和递质等的动态平衡,其中脑的毛细血管内皮细胞及其紧密连接是血脑屏障的主要形态学基础^[1]。血脑屏障可以阻止 100% 大分子和超过 98% 的小分子药物进入脑中,使其远离循环系统中的毒素和有害化学物质,从而起到保护大脑的作用^[2]。血脑屏障中主要发挥屏障作用的是 ATP 结合盒(adenosine triphosphate-binding cassette, ABC)转运蛋白,例如 *P*-糖蛋白(*P*-glycoprotein, *P*-gp, ABCB1, MDR1)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2)^[3]。

1.1 *P*-gp 的基本特点

P-gp 是与多药耐药密切相关的糖蛋白。编码 *P*-gp 的基因在人体中为 MDR 1, *P*-gp 基因定位于染色体 7q21-1^[4],蛋白质分子量为 170 KD,由 1 280 个氨基酸组成。*P*-gp 以单体形式发挥功能,由 2 个胞浆核苷酸结合域(也称为 ATP 结合区)(cytosolic nucleotide binding domains, NBDS)和 2 个跨膜结构域(transmembrane domains, TMDS)构成。NBDS 可以结合并水解 ATP,该区域为亲水区,与能量供应有关;TMDS 为疏水区,作为药物转运的通道,每个区域又由 6 个跨膜 α -螺旋构成,从而形成基底膜交叉通路,在这里用由 ATP 水解产生的能量来对底物进行跨膜转运^[5]。ATP 结合区是 *P*-gp 外排功能所必须的,它是 ATP 依赖性的药物外排泵^[6],能将细胞内的药物泵出细胞膜外,从而使细胞内的药物浓度降低。

1.2 BCRP 的基本特点

BCRP 是一个 ABC 半转运蛋白,BCRP 的基因位于染色体 4q22 上^[7]。其 mRNA 大小为 2.4 kb,编码 655 个氨基酸,72.6 KD 的蛋白质^[8]。BCRP 是一种半转运体,只有一个 NBD 和一个 TMD,同时以二聚体形式发挥功能。也有人提出 BCRP 是以同源四聚体的形式发挥它的功能的^[9]。ABC 转运蛋白家族中

的半转运子一般定位于胞内,全转运子定位于胞膜,但与其他半转运子不同的是 BCRP 虽属半转运子却定位于细胞膜^[7]。

1.3 *P*-gp 和 BCRP 在血脑屏障上的定位和功能

P-gp 和 BCRP 在血脑屏障上呈现高表达的状态^[10],其中 *P*-gp 主要表达于脑毛细血管内皮的管腔侧,脑实质、神经元和神经胶质细胞中表达较少^[11],同样地,BCRP 也主要存在于脑毛细血管内皮管腔侧,位置和 *P*-gp 相近^[12]。这 2 个转运蛋白可以阻止底物分子渗透入大脑,并且向外定向转运,主要负责外排许多亲脂性、两亲性的有毒物质或药物,且它们之间结构没有相关性,包括抗炎药、免疫抑制剂、抗感染药、抗肿瘤药、抗癫痫药、抗抑郁药和精神药等^[10]。*P*-gp 和 BCRP 的底物有一定的重叠性,在药物入脑的过程中起到协同屏障作用。有研究显示,*P*-gp 和 BCRP 可以限制吉非替尼、达沙替尼和索拉菲尼等抗癌药物进入大脑,且存在协同限制现象^[13-16]。相应的也有对 *P*-gp 和 BCRP 2 个蛋白同时产生抑制作用的双抑制剂,例如:依克立达。血脑屏障上的 *P*-gp 还具有多种生理功能,包括外排、分泌、脂质转运和 Cl⁻ 通道功能^[17]。

1.4 *P*-gp 和 BCRP 的区别与联系

综上所述,*P*-gp 和 BCRP 同属于 ABC 转运蛋白,是 ATP 依赖性转运蛋白,基本结构都是由 NBD 和 TMD 组成,*P*-gp 是全转运子,而 BCRP 是半转运子。它们发挥功能的形式不同,*P*-gp 是单体,而 BCRP 是二聚体或四聚体。它们在血脑屏障上表达位置相近,都在脑毛细血管内皮的管腔侧。这 2 个转运蛋白在血脑屏障上一起发挥着阻止外来物质进入大脑的功能,且转运底物有重叠性。表 1 中列举了常见 *P*-gp 和 BCRP 的底物、抑制剂及双底物和双抑制剂。

目前,许多小分子药物都是 *P*-gp 和 BCRP 的底物,不能有效地穿过血脑屏障,因此,人们提出这 2 个转运蛋白的双抑制可能是一种提高底物药物大脑渗透率的有效方法^[18]。对于 *P*-gp 和 BCRP 的双底物来说,在缺失一个转运蛋白的情况下,药物进入大脑的转运并没有显著增加,但是当血脑屏障上 2 个转运蛋白同时缺失或被抑制时,药物的脑内渗透率达到最高水平;无论是单独抑制 *P*-gp 还是 BCRP,它们都可以由另一个转运蛋白进行补偿性转运,由此可见,这 2 个转运蛋白以“合作”的形式阻止化疗药物进入大脑,详见图 1^[15],从图 1 中可看出,血脑屏障上 *P*-gp 和 BCRP 以合作的形式阻止双底物进入大脑。无论

表 1 常见 P-gp 和 BCRP 的底物、抑制剂及双底物和双抑制剂

Tab. 1 Common P-gp and BCRP substrates, inhibitors, and dual substrates, dual inhibitors

底物或抑制剂 (substrates or inhibitors)	化合物举例 (examples of compounds)
P-gp 底物 (P-gp substrates)	长春新碱、环孢素 A、洛伐他汀、吗啡、哌替啶、西酞普兰、曲米帕明、醛固酮、地塞米松、氢化可的松、印地那韦、那非那韦、地高辛、奎尼丁、洛哌丁胺、秋水仙碱、红霉素 (vincristine, cyclosporin A, lovastatin, morphine, pethidine, citalopram, trimipramine, aldosterone, dexamethasone, hydrocortisone, indinavir, nelfinavir, digoxin, quinindium, loperamide, colchicin, erythromycin)
P-gp 抑制剂 (inhibitor of P-gp)	维拉帕米、硝苯地平、环孢素 A、三氟拉嗪、氯丙嗪、粉防己碱、蝙蝠葛碱、长春新碱、奎尼丁、伐司朴达、zosuquida (verapamil, nifedipine, cyclosporin A, trifluoperazine, chlorpromazine, tetrandrine, dauricine, daunorubicin, quinindium, valsopodar, zosuquidar)
BCRP 底物 (BCRP substrates)	柔红霉素、阿霉素、表柔比星、蒽比唑、拓扑替康、9-氨基喜树碱、伊立替康、甲氨喋呤、叠氮胸苷、拉米夫定、哌唑嗪、甲磺酸伊马替尼、丝氨酸磷脂 (daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, anthracycline, topotecan hydrochloride, 9-aminocamptothecin, irinotecan, methotrexate, azidothymidine, lamivudine, prazosin, imatinib mesylate, serinephosphatide)
BCRP 抑制剂 (inhibitor of BCRP)	烟曲霉素 C、tryprostatin A、新生霉素 (fumitremorgin C, tryprostatin A, novobiocin)
双底物 (dual P-gp and BCRP substrates)	拓扑替康、达沙替尼、吉非替尼、索拉非尼、厄洛替尼、伊马替尼、坦度替尼、拉帕替尼、米托蒽醌、flavoperidol (topotecan, dasatinib, gefitinib, sorafenib, erlotinib, imatinib, tandutinib, lapatinib, mitoxantrone, flavoperidol)
双抑制剂 (dual inhibitors of P-gp and BCRP)	依克立达、tariquidar (elacridar, tariquidar)

是单独抑制或敲除 P-gp 和 BCRP 两者之一,都不会使双底物的大脑渗透率显著增加。在 BCRP 基因敲除小鼠 (P-gp 存在), P-gp 足以阻止药物进入大脑。同样,在 P-gp 基因敲除小鼠 (BCRP 存在), BCRP 也足以阻止药物进入大脑。双底物的大脑渗透增强最显著的效果总是出现在 P-gp/BCRP 双基因敲除的小鼠身上,即 P-gp 和 BCRP 都缺失的条件下。

2 研究方法

2.1 体外研究方法

目前血脑屏障上的 P-gp 和 BCRP 的体外研究方法主要是采用细胞模型。体外模拟血脑屏障功能的单细胞系有: 脑微血管内皮细胞 (Brain microvascular endothelial cells, BMECs)、C6 胶质瘤细胞系 (C6 glioma cell lines) 和人脐静脉内皮细胞

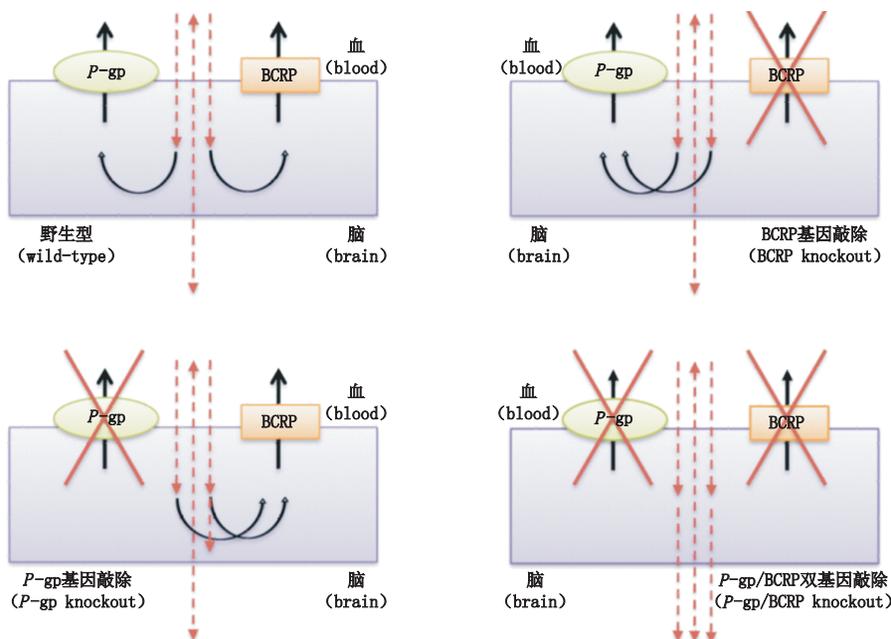


图 1 血脑屏障上 P-gp 和 BCRP 的合作

Fig. 1 Cooperation of P-gp and BCRP at the blood-brain barrier

(the umbilical vein endothelial, ECV-304), 可进行细胞摄取/外排实验、转运实验和 ATP 酶检测、评价药物与 *P*-gp 和 BCRP 相互作用等。血脑屏障是由 BMECs 构成的, 所以紧凑的 BMECs 单细胞层是一种常见的细胞模型^[19]。Ji 等^[20]研究一种洛美利嗪衍生物 CJZ3 对 *P*-gp 功能的影响, 结果表明 CJZ3 和大鼠脑微血管内皮细胞 (rat brain microvessel endothelial cells, RBMEC) 孵育后细胞内罗丹明 123 (Rh123) 的累积呈现浓度依赖性, 但是在人脐静脉内皮细胞则没有该现象。Decleves 等^[21]用大鼠 C6 胶质瘤细胞 (rat C6 glioma cells) 研究 ABC 转运蛋白对伊马替尼及其活性代谢产物的药代动力学影响, 结果表明, 随着细胞外的伊马替尼浓度从 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 大鼠 C6 胶质瘤细胞中该药物的浓度呈线性增加, 但是并没有因为加入 Zosuquidar (选择性 *P*-gp 抑制剂) 或依克立达 (Elacridar, *P*-gp 和 BCRP 双抑制剂) 而增加。

早期的细胞模型多为单细胞培养, 近年来逐渐出现 2 种细胞共培养和 3 种细胞共培养模型。脑微血管内皮细胞单独培养可导致 *P*-gp 的表达减弱、细胞间紧密联结丧失, 无法适应药物转运的研究; 将脑微血管内皮细胞或内皮细胞株与神经胶质细胞共培养建立起的离体血脑屏障模型能较好地模拟的血脑屏障生理状态, 为研究血脑屏障上 *P*-gp 药物外排功能提供了较理想的工具^[22]。Wang 等^[23]用人脐静脉内皮细胞和星形胶质细胞共培养研究麝香酮在体外血脑屏障模型上对 *P*-gp 的作用, 结果表明, 当给予细胞模型不同浓度 ($4, 8, 16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 麝香酮刺激 24 h 后, *P*-gp 的表达量显著下降。Nakagawa 等^[24]又研究出一种新的自体血脑屏障模型, 采用脑血管内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞, 进行原代共培养, 用以模拟体内的血脑屏障生理状态, 在新模型中的脑血管内皮细胞表达葡萄糖转运蛋白、*P*-gp 和多药耐药蛋白⁻¹, 同时表现出对 *P*-gp 底物罗丹明 123 外排作用。共培养的细胞可以形成紧密连接, 表达细胞表面的受体, 且具有细胞转运功能, 因此比永生的内皮细胞系能更好的模拟血脑屏障在体内的实际状态^[25]。

采用细胞模型对血脑屏障上的转运蛋白进行体外研究, 具有实验材料容易获得^[26], 给药剂量小, 药物分析方法简单、快速, 实验条件易控制, 可模拟体内复杂的生理条件, 从分子水平研究药物相互作用发生的机制等优点, 可以预测药物在体内血脑屏障处的

渗透性, 并在一定程度上可以取代实验动物。但是细胞模型作为一种体外研究模型存在一定局限性, 如细胞的培养条件、传代次数不同, *P*-gp 表达水平不同; 体外细胞模型 *P*-gp 表达水平与人体内血脑屏障实际的 *P*-gp 表达水平可能具有差异, 并不能完全还原体内血脑屏障^[27]; 且生物体是一个复杂的系统, 有很多因素会影响药物的渗透过程, 所以想明确药物与 *P*-gp 相互作用还要借助体内研究方法^[17]。

2.2 体内研究方法

2.2.1 基因敲除动物模型

目前已发现的人类 *P*-gp 基因家族有 2 个成员: MDR1 和 MDR3 基因; 啮齿类 *P*-gp 基因家族包括 3 种: *mdr1a*、*mdr1b* 和 *mdr2*。MDR1 与 *mdr1a*/*mdr1b* 编码的 *P*-gp 可作为药物载体将药物排出细胞; 而 MDR3 与 *mdr2* 编码的 *P*-gp 则为磷脂的转载体^[28]。人们用转基因技术建立了 *mdr1a* (类似于人 MDR1) 基因缺失小鼠, 这种小鼠没有明显的生理缺陷, 并可以繁殖, 称为 *mdr1a*^(-/-) 基因敲除 (KO) 小鼠; 目前一共有 3 种可获得的目标小鼠: *mdr1a* (*abcb1a*)^(-/-) KO 小鼠、*mdr1b* (*abcb1b*)^(-/-) KO 小鼠和 *mdr1a*/*mdr1b*^(-/-) 双基因敲除小鼠。在血脑屏障上只有 *mdr1a* *P*-gp 基因表达, 而 *mdr1b* *P*-gp 基因并不表达; 因此 *mdr1a*^(-/-) 和 *mdr1a*/*mdr1b*^(-/-) KO 小鼠都是研究血脑屏障上 *P*-gp 的合适模型; *P*-gp 的基因敲除的小鼠表型正常, 但对 *P*-gp 底物的毒性更敏感^[29]。而 BCRP 在鼠类中命名为 *Bcrp1*, 已有 *Bcrp1*^(-/-) KO 的小鼠以及 *P*-gp 和 *Bcrp1* 双基因敲除小鼠^[30]。基因敲除小鼠是研究 *P*-gp 和 BCRP 转运蛋白的重要工具, 但目前由于模型较少、供货渠道单一和价格较高等问题, 限制了其广泛的使用^[28]。

Agarwal 等^[18]用雄性 FVB 小鼠的野生型, *Mdr1a*/*b*^(-/-), *Bcrp1*^(-/-) 和 *Mdr1a*/*b*^(-/-) *Bcrp1*^(-/-) 基因敲除型进行试验, 研究厄洛替尼的稳态脑内分布; 结果表明在血脑屏障上, *P*-gp 和 BCRP 可以将厄洛替尼排出大脑, 当这 2 个基因敲除即转运蛋白不存在时, 厄洛替尼在脑内的分布显著增加。Li 等^[31]用 *Bcrp1*^(-/-) 敲除的小鼠对培美曲塞和甲氨蝶呤在血脑屏障上的转运状况进行研究; 结果显示, BCRP 对培美曲塞转运的影响很小, 但是对甲氨蝶呤外排作用很显著。

体外研究表明, 曲美替尼是 *P*-gp 和 BCRP 底物, 在血脑屏障处发现其对曲美替尼有外排转运作用。Vaidhyanathan 等^[32]在基因敲除小鼠模型上证实, *P*-gp 对限制曲美替尼的脑内分布起着重要的作

用;与野生型和 *Bcrp1*^(-/-) 小鼠相比, *Mdr1a/b*^(-/-) 和 *Mdr1a/b*^(-/-) *Bcrp1*^(-/-) 小鼠的脑血分配系数 ($AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}}$) 约为前者的 5 倍;曲美替尼在野生型和 *BCRP* 基因敲除小鼠大脑中分布相似;这些结果表明, *P-gp* 是限制曲美替尼在脑中分布的重要因素;在曲美替尼单药或联合用药治疗黑色素瘤脑转移时, *P-gp* 也发挥着重要作用。

有研究用基因敲除小鼠证明, *Abcb1a* 和 *Abcg2* 共同作用于限制双 *ABCB1/ABCG2* 蛋白底物的脑内分布;当只有一个 *Abcb1a* 或 *Abcg2* 基因被敲除时,另一个转运蛋白仍然会抑制该双蛋白底物向脑内转运,所以只有当 2 个基因同时被敲除时,双蛋白底物才能顺利地进入大脑,该类底物包括:米托蒽醌、厄洛替尼、拉帕替尼和拓扑替康^[33-35]。

2.2.2 原位脑灌注技术 原位脑灌注技术 (*in situ brain perfusion*) 主要应用于研究药物在血脑屏障上的转运,它可用于测量几个转运参数,包括分布体积和在摄取初期 (15~120 s) 内脑对目标分子的摄取清除率 (*brain uptake clearance, Cl_{up}*), 其中 *Cl_{up}* 是综合了血脑屏障上的转运蛋白的增强或者限制因素的结果。该技术可以让我们用转运的抑制剂或者转运蛋白基因敲除小鼠来判断某一个转运蛋白的作用。如果当加入一个转运蛋白抑制剂或者该蛋白的基因被敲除,而目标分子的 *Cl_{up}* 升高,那么我们得出该转运蛋白是目标分子在血脑屏障上的外排转运蛋白;如果目标分子的 *Cl_{up}* 降低,则证明该转运蛋白是目标分子的内排转运蛋白^[36]。*Mdr1a*^(-/-) 小鼠在体原位脑灌注技术目前已用于研究 *P-gp* 对药物脑内分布的影响,此方法可排除药物体内蛋白结合、代谢等因素的影响,单独研究 *P-gp* 对药物脑通透性的作用^[37]。*Seleman* 等^[38] 用原位脑灌注技术研究小鼠的血脑屏障对海洛因及其代谢产物 6-单乙酰吗啡的转运过程,结果显示 *P-gp* 的抑制剂显著增加大脑对吗啡的摄取,但是并没有增加大脑对海洛因及 6-单乙酰吗啡的摄取。*Chapy* 等^[39] 以 *P-gp/Bcrp* 基因敲除小鼠或者抑制剂为条件,用原位脑灌注的方法检测 *ABC* 转运蛋白底物的脑内分布,结果表明, *P-gp* 的缺失或者是化学抑制剂的加入,可以提高 [³H]-维拉帕米在脑内的分布 10 倍左右。

2.2.3 正电子发射断层扫描术 正电子发射断层扫描术 (*positron emission tomography, PET*) 是一种非侵入性的核成像技术,可以评估标记正电子发射放射性

核素的药物在人体内脑的分布情况^[40]。当 PET 的观测重点从人转向临床前各个种属动物,如大鼠、小鼠、犬、猴等时则被称为 *Micro-PET*。*Micro-PET* 显像原理和人体 PET 相同,将放射性核素标记到能够参与组织血流、蛋白合成或代谢过程的化合物或者底物或药物上,然后将其注射到动物体内。该方法通常采用具有超短半衰期的发射正电子的核素 (如 [¹¹C]、[¹³N]、[¹⁵O]、[¹⁸F]) 作为标记物,在药动学研究中又以 [¹¹C] 标记底物/药物最为常见。然后让整体动物或者其靶器官在 *Micro-PET* 的有效视野范围内进行动态定量显像,之后在获得 *Micro-PET* 示踪剂在体内的空间、数量分布后通过影像定量分析软件 (如 *PMOD* 等) 获取各组织器官 (横断面、冠状断面和矢状断面) 动态变化图像以及相关定性定量数据 (如浓度经时曲线或动力学参数等)。*Micro-PET* 作为一种非伤害性的活体生化显像技术,可以通过显像从体内无创伤、定量、动态地观察机体的生理、生化变化,观察标记药物体内的动力学过程,揭示药物转运、分布以及药物相互作用、药效靶点甚至产生毒性的分子机制,进而从分子和整体水平上为药物研发提供有力理论支撑^[41]。

Toth 等^[42] 应用 PET 分别检测给予 [¹¹C] *AZ10419369* 的小鼠、大鼠和豚鼠在基态条件下的吸收,并与动物提前给 *ABC* 转运蛋白抑制剂环孢菌素 A 后脑内 [¹¹C] *AZ10419369* 的吸收进行比较,结果表明, [¹¹C] *AZ10419369* 是小鼠、大鼠和豚鼠的 *ABC* 转运蛋白底物,该实验同时可以证明同一种药物的脑内浓度存在种间差异。*Bauer* 等^[43] 以 [¹¹C] *Elacridar* 和 [¹¹C] *Tariquidar* 为 2 个模型药物,用 PET 检测健康志愿者血脑屏障上 *ABCB1* 和 *ABCG2* 的功能之间的相互关系,结果表明需要同时抑制 *ABCB1* 和 *ABCG2*, 才能大幅增加双蛋白底物的脑内分布。

3 转运蛋白的定量测定

3.1 蛋白质印迹法 (Western Blot)

目前有几种不同的方法可以用来对生物样品中的蛋白质进行定量。最常用的半定量分析蛋白表达仍然是标准的 *SDS-PAGE/Western blot* 法,先用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (*denaturing SDS-PAGE*) 根据分子量不同对蛋白质进行一维分离,用特异性的一抗标记目标蛋白,然后用二抗可视化相应的条带,最后测其光密度值 (*optical density, OD* 值) 表示蛋白的量,该法被用于研究目标蛋白在对照状态和实验条件下的表达变化^[44]。

Hu 等^[45]给 MDCK-MDR1 细胞不同浓度的川芎内酯 (ligustilide, LIG)、芎藭交脂 I (Senkyunolide I, SENI) 和洋川芎内酯 A (Senkyunolide A, SENA), 然后用 Western blot 法测细胞内的 *P-gp* 表达含量, 结果表明, MDCK-MDR1 细胞中的 *P-gp* 表达含量都显著下降, 从而证明了 LIG、SENI 和 SENA 是通过下调 MDCK-MDR1 细胞中 *P-gp* 表达, 从而增加芍药苷 (Paeoniflorin, PF) 在血脑屏障上的转运。Darby 等^[46]用 Western Blot 方法分析 Pim1 激酶抑制剂对 MCF7FLV1000 细胞系中 ABCG2 的表达影响; MCF7FLV1000 细胞在有或无 Pim1 抑制剂 K00486 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的条件下, 培养 8 d 后, Western Blot 法检测细胞中 ABCG2 的表达; 结果显示, 对照组 MCF7FLV1000 细胞中 ABCG2 的表达增加了 5 倍; 相反, 在 Pim1 激酶抑制剂存在下, ABCG2 的表达没有显著变化, 第 8 天的表达含量和第 0 天的相似。

原则上来说, 任何生物样品都可以采用 Western blot 检测, 细胞、组织提取物和体液, 例如血浆、血清或尿液。该法操作简单, 价格相对便宜, 得到的数据相对容易解释, 从理论上说结果的重现性较好。但是它也有固有的缺点, 此法的特异性受到抗体选择性的影响, 常常难以区别相同家族不同亚型的蛋白; 且此法仅仅是相对定量, 而非绝对定量; 由于药物代谢酶和转运体具有高度的序列同源性, 因此现有免疫印迹法缺乏专属性, 伴有一定的抗原-抗体交叉反应, 导致定量准确性差^[44]。

3.2 定量蛋白质组学

近年来基于物质谱的蛋白定量研究能够精确测定在不同状态下生物体内的蛋白表达及其翻译后的修饰水平, 实现蛋白质的相对或绝对定量, 已逐渐应用于药物代谢酶、转运体以及多肽生物药物的定量分析^[47]。绝对目标定量蛋白质组学 (quantitative targeted absolute proteomics, QTAP) 是用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式下的液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-linked tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 分离和定量消化后的目标蛋白, 从而得出目标蛋白的绝对含量^[48]。

基于物质谱的蛋白质组学定量方法主要步骤如下: ①将来自于生物样本 (组织、细胞培养液、体液) 中的目标蛋白进行提取溶解; ②通过电泳、液相色谱或等电聚焦方法对目标蛋白进行分离纯化; ③在蛋白酶的作用下, 将目标蛋白进行消化酶解, 得到相应的特征肽段; ④通过质谱对目标蛋白的特

征肽段的分析, 实现对蛋白的相对或绝对定量^[49]。LC-MS/MS 方法已经用于药物等小分子化合物的定量分析, 但是由于蛋白质的分子量太大, 质量超出了常规质谱定量分析的范围, 因此蛋白质必须先用蛋白酶 (例如, 胰蛋白酶) 消化, 然后目标蛋白的特征肽段才能用 LC-MS/MS 法进行定量分析; 胰蛋白酶消化对于膜蛋白定量十分重要, 因为膜蛋白由于有疏水区而表现出低溶解度和高聚集性; 膜蛋白被胰蛋白酶消化后, 可以产生来源于不同区域的肽段, 从而我们可以选择一个具有适当的疏水性的肽段进行 LC-MS/MS 定量分析; 为了实现高选择性的定量分析, 目标肽段用三重四极杆串联质谱多反应监测模式进行定量分析; 此外, 内标对于准确定量是十分重要的, 对于肽段定量, 选择和目标肽段氨基酸序列相同的稳定同位素标记肽段 (stable isotope-labeled peptide) 作为内标; 内标肽段和目标肽段可以同时被洗脱, 但是在 MS 中可以根据分子量不同而被区分; 最后, 可以根据色谱图中目标肽段和内标肽段之间的峰比值 (peak ratio) 得出目标肽段的绝对量^[50]。

Agarwal 等^[26]用该法定量地检测 *P-gp* 和 *Bcrp* 及其他相关蛋白在基因敲除小鼠模型脑毛细血管内皮细胞的表达情况; 在野生型和 *Bcrp1*^(-/-) 小鼠之间, *P-gp* 表达量的差异没有统计学意义; 同样的, 在野生型和 *Mdr1a/b*^(-/-) 小鼠之间, *Bcrp* 表达量差异也不显著; 除了缺失 *P-gp* 和 *Bcrp* 基因的小鼠不表达相应的蛋白外, 不同基因型的小鼠脑内毛细血管内皮细胞中的蛋白质的表达量都无显著性差异; 使用定量蛋白质组学的方法表明, 从单、双基因敲除小鼠中分离的脑毛细血管内皮细胞中几个相关转运蛋白的表达量没有变化; 这些数据表明, *P-gp* 和 *BCRP* 在血脑屏障上的相互作用机制并不是蛋白表达量代偿性变化。

Ramzi 等^[51]用定量 RT-PCR 和 LC-MS/MS 法检测从 12 位病人大脑皮质灰质分离出来的脑微血管样品, 这些病人患癫痫或者有神经胶质瘤, 对 ABC 转运体中的 *BCRP*、*P-gp*、*ABCA2* 和 *ABCA8* 进行了定量, 结果显示, *BCRP* 是表达量最高的 ABC 转运蛋白, 且表达量是 *P-gp* 的 1.6 倍。Ohtsuki 等^[52]基于 LC-MS/MS 靶向定量蛋白质组学的技术检测 hCME C/D3 细胞系表达的蛋白, 以评价该细胞系作为模拟血脑屏障功能模型的可行性和局限性; 结果显示, 在 hCMEC/D3 细胞表达 91 个目标分子、12 个转运体、2 个受体、1 连接蛋白和 1 膜标记物; hCMEC/D3 细胞系上 *P-gp* 的表达量最高, *BCRP*

的表达量是它的 56.3%; 用 Na⁺-K⁺-ATP 酶表达量标准化后, hCMEC/D3 细胞系和人脑微血管细胞相比, P-gp 和 BCRP 的表达量都相差 4 倍以内。

和传统的免疫印迹定量法相比, 基于 LC-MS/MS 在多反应监测模式下的靶向蛋白质组学具有选择性

好、精度好、准确度高、分析速度快等优点; 此外, LC-MS/MS 蛋白质组学具有更广泛的适用性, 它不需要对个别蛋白质的选择性抗体, 表 2 中列举了传统的半定量免疫定量法和 LC-MS/MS 蛋白质组学的区别和差异^[53]。

表 2 免疫印迹法定量与基于 LC-MS/MS 定量分析的比较

Tab. 2 Comparison of antibody and LC-MS/MS-Based quantitative analysis

特点 (characteristic)	免疫印迹法定量 (antibody-based analysis)	比较 (contrast)	基于 LC-MS/MS 定量分析 (LC-MS/MS-based analysis)
定量原理 (quantification)	抗原抗体特异性结合 (binding assay using antibody)		直接定量多肽 (direct quantification of peptide)
方法可行性 (method availability)	需要抗体 (antibody needs to be available)		需要目标肽段 (target peptide need to be available)
方法建立 (method development)	方法建立需要较长时间, 包括抗原的制备、免疫和特异性验证 (takes long time for development, including antigen preparation, immunization, and specificity validation)	<<	方法建立约需 1 个月, 包括目标肽的选择, 肽合成质谱条件优化 (about 1 month for development, including target peptide selection, peptide synthesis, and ms optimization)
	必须有抗原蛋白或肽 (antigen protein or peptide is necessary)	<<	从序列信息中选择目标肽段 (target peptide is selected from sequence information)
特异性 (specificity)	特异性取决于抗体, 并难以验证其特异性 (depending on antibody, and difficult to validate specificity)	<<	质谱有高特异性, 且能用数据库证实其特异性 (high specificity by mass filter, and specificity is confirmed by database)
	难以制备修饰或突变蛋白质的特异性抗体 (difficult to prepare specific antibodies for modification and mutation in proteins)	<	MS 容易区分修饰或突变的蛋白 (easy to distinguish modification and mutation by mass)
仪器 (instrument)	仪器简单 (simple instrumentation)	>	昂贵且高科技仪器 (expensive and high-tech instrumentation)

注: “<” 或 “<<” 表示 LC MS/MS 分析的优势, “>” 表示抗体为基础的分析的优点

Note: “<” or “<<” indicates advantages of LC-MS/MS-based analysis, and “>” indicates advantages of antibody-based analysis

4 小结

血脑屏障上的转运蛋白 P-gp 和 BCRP 对阻止外源性和有害物质入脑起着重要的作用。目前对血脑屏障上的转运蛋白研究主要包括体外的细胞实验和体内的动物实验, 其中体外的研究方法主要有细胞模型, 从单细胞培养、2 种细胞共培养到 3 种细胞共培养; 而体内的研究方法主要有应用基因敲除小鼠、脑原位灌注技术、正电子扫描断层技术等。体外细胞模型实验条件易控制, 可模拟体内复杂的生理条件, 但是并不能完全还原体内血脑屏障, 所以仍需要做体内的实验来验证细胞模型的实验结果。对 P-gp 和 BCRP 的定量有蛋白质印迹法的相对定量法, 也有绝对目标定量蛋白质组学的绝对定量法, 尽管基于生物质谱的蛋白定量技术目前还处于初步阶段, 但随着该

技术的日趋完善, 有望成为蛋白质定量的主要方法。

参考文献

- [1] 董小平, 喻斌, 金路, 等. 血脑屏障细胞组成研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 281
DONG XP, YU B, JIN L, *et al.* Advance in study of cells of blood-brain barrier [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(8): 281
- [2] PARDRIDGE WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development [J]. *NeuroRx*, 2005, 2(1): 3
- [3] SCHINKEL AH, JONKER JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(1): 3
- [4] MOLNAR J, KARS MD, GUNDUZ U, *et al.* Interaction of tomato lectin with ABC transporter in cancer cells: glycosylation confers functional conformation of P-gp [J]. *Acta Histochem*, 2009, 111(4): 329
- [5] LI C, SUN BQ, GAI XD. Compounds from Chinese herbal medicines

- as reversal agents for *P*-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumours [J]. *Clin Transl Oncol*, 2014, 16(7): 593
- [6] HOOSAIN FG, CHOONARA YE, TOMAR LK, *et al.* Bypassing *P*-glycoprotein drug efflux mechanisms: possible applications in pharmacoresistant schizophrenia therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2015; 2015: 484963. doi: 10.1155/2015/484963. Epub 2015 Sep 27
- [7] 赵亚超, 张志培, 陈鹏, 等. 乳腺癌耐药蛋白的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(2): 369
ZHAO YC, ZHANG ZP, CHEN P, *et al.* Research advance of breast cancer resistance protein [J]. *Prog Mod Biomed*, 2010, 10(2): 369
- [8] ROCCHI E, KHODJAKOV A, VOLK EL, *et al.* The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(1): 42
- [9] XU Y, EGIDO E, LI-BLATTER X, *et al.* Allocrite sensing and binding by the breast cancer resistance protein (ABCG2) and *P*-glycoprotein (ABCB1) [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(40): 6195
- [10] STRAZIELLE N, GHERSI-EGEA JF. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9(21): 1
- [11] QOSA H, MILLER DS, PASINELLI P, *et al.* Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders [J]. *Brain Res*, 2015, 1628 (Pt B): 298
- [12] 陆榕, 孙进, 赵春顺, 等. 转运蛋白在药物血脑屏障转运中的重要作用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2007, 26(1): 64
LU R, SUN J, ZHAO CS, *et al.* Transporters: significant role in drug blood-brain barrier transport [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2007, 26(1): 64
- [13] CHEN Y, AGARWAL S, SHAIK NM, *et al.* *P*-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(3): 956
- [14] AGARWAL S, SANE R, GALLARDO JL, *et al.* Distribution of gefitinib to the brain is limited by *P*-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(1): 147
- [15] AGARWAL S, HARTZ AM, ELMQUIST WF, *et al.* Breast cancer resistance protein and *P*-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(26): 2793
- [16] AGARWAL S, SANE R, OHLFEST JR, *et al.* The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336(1): 223
- [17] 吴云娟, 方晓玲. *P*-糖蛋白在药物脑部转运中作用的研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 13(6): 382
WU YJ, FANG XL. Research advancement of *P*-glycoprotein in drug brain transport [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2004, 13(6): 382
- [18] AGARWAL S, MANCHANDA P, VOGELBAUM MA, *et al.* Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(1): 33
- [19] WANG Y, WANG N. *In vitro* model of the blood-brain barrier established by co-culture of primary cerebral microvascular endothelial and astrocyte cells [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(12): 2011
- [20] JI BS, HE L, LI XQ, *et al.* CJZ3, a lomerizine derivative, modulates *P*-glycoprotein function in rat brain microvessel endothelial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(4): 414
- [21] DECLEVES X, BIHOREL S, DEBRAY M, *et al.* ABC transporters and the accumulation of imatinib and its active metabolite CGP74588 in rat C6 glioma cells [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57(3): 214
- [22] GAILLARD PJ, VOORWINDEN LH, NIELSEN JL, *et al.* Establishment and functional characterization of an *in vitro* model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 12(3): 215
- [23] WANG GY, WANG N, LIAO HN. Effects of muscone on the expression of *P*-gp, MMP-9 on blood-brain barrier model *in vitro* [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(8): 1105
- [24] NAKAGAWA S, DELI MA, KAWAGUCHI H, *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3-4): 253
- [25] KAFA H, WANG JT, RUBIO N, *et al.* The interaction of carbon nanotubes with an *in vitro* blood-brain barrier model and mouse brain *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2015, 53: 437
- [26] AGARWAL S, UCHIDA Y, MITTAPALLI RK, *et al.* Quantitative proteomics of transporter expression in brain capillary endothelial cells isolated from *P*-glycoprotein (*P*-gp), breast cancer resistance protein (Bcrp), and *P*-gp/Bcrp knockout mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(6): 1164
- [27] 宋娟, 刘晓磊, 彭文兴. *P*-糖蛋白介导药物相互作用的细胞模型研究概况 [J]. *中国药房*, 2006, 17(15): 1183
SONG J, LIU XL, PENG WX. Research advancement of the cell model of *P*-glycoprotein mediated drug interactions [J]. *J China Pharm*, 2006, 17(15): 1183
- [28] 何卉, 陈西敬, 王广基. 基因敲除与基因突变动物模型在药物跨膜转运研究中的应用 [J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(6): 483
HE H, CHEN XJ, WANG GJ. Application of gene knockout and gene mutation animal model in the study of transmembrane transport of drugs [J]. *J China Pharm Univ*, 2005, 36(6): 483
- [29] LINNET K, EJSING TB. A review on the impact of *P*-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2008, 18(3): 157
- [30] SANE R, AGARWAL S, MITTAPALLI RK, *et al.* Saturable active efflux by *P*-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier leads to nonlinear distribution of elacridar to the central nervous system [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345

- (1): 111
- [31] LI L, AGARWAL S, ELMQUIST WF. Brain efflux index to investigate the influence of active efflux on brain distribution of pemetrexed and methotrexate [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41 (3): 659
- [32] VAIDHYANATHAN S, MITTAPALLI RK, SARKARIA JN, *et al*. Factors influencing the CNS distribution of a novel MEK-1/2 inhibitor: implications for combination therapy for melanoma brain metastases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42 (8): 1292
- [33] KODAIRA H, KUSUHARA H, USHIKI J, *et al*. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333 (3): 788
- [34] POLLI JW, OLSON KL, CHISM JP, *et al*. An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-[3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl]-6-[5-({2-(methylsulfonyl)ethyl}amino)methyl]-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016) [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37 (2): 439
- [35] de VRIES NA, ZHAO J, KROON E, *et al*. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (21): 6440
- [36] DO TM, NOEL-HUDSON MS, RIBES S, *et al*. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid-beta peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 30 (1): 155
- [37] 姬沛生. 血脑屏障上 P-糖蛋白及其转运功能研究进展 [J]. *河南大学学报 (医学版)*, 2008, 27 (1): 8
JI BS. Current views of transporting role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier [J]. *J Henan Univ (Med Sci)*, 2008, 27 (1): 8
- [38] SELEMAN M, CHAPY H, CISTERMINO S, *et al*. Impact of P-glycoprotein at the blood-brain barrier on the uptake of heroin and its main metabolites: behavioral effects and consequences on the transcriptional responses and reinforcing properties [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014, 231 (16): 3139
- [39] CHAPY H, SAUBAMEA B, TOURNIER N, *et al*. Blood-brain and retinal barriers show dissimilar ABC transporter impacts and concealed effect of P-glycoprotein on a novel verapamil influx carrier [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173 (3): 497
- [40] WULKERSDORFER B, WANEK T, BAUER M, *et al*. Using positron emission tomography to study transporter-mediated drug-drug interactions in tissues [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96 (2): 206
- [41] 于洋, 何佳珂, 熊爱珍, 等. 小动物正电子发射计算机断层扫描技术在药理学研究中的应用 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24 (11): 1242
YU Y, HE JK, XIONG AZ, *et al*. Micro-PET imaging used in pharmacokinetic study [J]. *Chin New Drugs J*, 2015, 24 (11): 1242
- [42] TOTH M, HAGGKVIST J, VARRONE A, *et al*. ABC transporter-dependent brain uptake of the 5-HT_{1B} receptor radioligand [(11) C] AZ10419369: a comparative PET study in mouse, rat, and guinea pig [J]. *EJNMMI Res*, 2014, 4 (1): 64
- [43] BAUER M, ROMERMANN K, KARCH R, *et al*. A pilot PET study to assess the functional interplay between ABCB1 and ABCG2 at the human blood-brain barrier [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 100 (2): 131
- [44] GORR TA, VOGEL J. Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9 (3-4): 396
- [45] HU PY, LIU D, ZHENG Q, *et al*. Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through Mdrk-Mdr1 cells as blood-brain barrier *in vitro* model [J]. *Molecules*, 2016, 21 (3): 300
- [46] DARBY RA, UNSWORTH A, KNAPP S, *et al*. Overcoming ABCG2-mediated drug resistance with imidazo-[1,2-b]-pyridazine-based Pim1 kinase inhibitors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76 (4): 853
- [47] 吴梦秋, 陆高远, 邵畅, 等. 基于生物质谱的蛋白质定量技术及其在药代动力学研究中的应用 [J]. *中国药科大学学报*, 2015, 46 (2): 129
WU MQ, LU GY, SHAO C. Mass spectrometry-based protein quantification and its application in pharmacokinetic research [J]. *J China Pharm Univ*, 2015, 46 (2): 129
- [48] UCHIDA Y, TACHIKAWA M, OBUCHI W, *et al*. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application to inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2013, 10 (1): 21
- [49] LANGENFELD E, MEYER H E, MARCUS K. Quantitative analysis of highly homologous proteins: the challenge of assaying the "CYP-ome" by mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392 (6): 1123
- [50] OHTSUKI S, UCHIDA Y, KUBO Y, *et al*. Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100 (9): 3547
- [51] SHAWAHNA R, UCHIDA Y, DECLEVES X, *et al*. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8 (4): 1332
- [52] OHTSUKI S, IKEDA C, UCHIDA Y, *et al*. Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10 (1): 289
- [53] PRASAD B, UNADKAT JD. Optimized approaches for quantification of drug transporters in tissues and cells by MRM proteomics [J]. *AAPS J*, 2014, 16 (4): 634

(本文于 2016 年 7 月 21 日收到)