

转运体稳定表达的验证方法及其研究进展

沈琦, 胡海红, 曾苏* (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 介绍验证转运体稳定表达的方法和技术, 为转运体细胞模型的应用提供依据。方法 对近年来研究转运体在细胞模型中稳定表达的相关文献进行综述。结果 实时定量 PCR 及 Western blot 是分别验证转运体转录水平和蛋白表达的经典方法。结论 与荧光检测技术相结合的验证方法在转录水平、蛋白表达与功能活性等三方面都显示出广阔的应用前景。

关键词: 转运体; 转录水平; 蛋白表达; 活性验证

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0603-07

Methods and Progress in the Study of Validating the Stable Expression of Drug Transporters

SHEN Qi, HU Haihong, ZENG Su* (*College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce approaches and technologies for validating the stable expression of drug transporters *in vitro*, and provide suggestions for application in cellular models. **METHODS** Review related literatures about the recent research progress on stably expressing transporters in transfected cells. **RESULTS** Real-time polymerase chain reaction and

作者简介: 沈琦, 女, 硕士 Tel: 15990064310
E-mail: zengsu@zju.edu.cn

E-mail: njsq_314500@126.com

*通信作者: 曾苏, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88208407

Western blot were classical methods respectively for detecting the expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein. **CONCLUSION** The combination of real time-PCR, Western blot with fluorescence detection technology have promising applications in verifying the stable expression of transporter in different levels including transcription, protein expression and functional activity.

KEY WORDS: transporters; transcription level; protein expression; activity assessment

转运体是分布于各种生物膜上具有转运内源性和外源性化合物的一类蛋白, 它会改变药物的吸收、分布、排泄过程, 进而影响药物的治疗效果。转运体主要分为 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC)和溶质载体超家族[solute carrier(SLC) superfamilies]。ABC 超家族存在结合 ATP 的核苷酸结合位点(nucleotide binding folds, NBD)和 α -跨膜螺旋片段组成的跨膜位点(transmembrane, TM), 主要包含磷酸糖蛋白(P-gp), 多药耐药相关蛋白(MRPs)和乳腺癌耐药蛋白(BCRP), 胆盐输出泵(BSEP)等等。P-gp 是目前研究最深入的外排转运体, 体内分布广泛, 其底物通常是疏水性的阳离子。P-gp 的活性可以被多种抑制剂或诱导剂调节, 从而影响药物的有效性、安全性及药动学特征^[1-3]。溶质载体超家族分为有机阴离子转运体 OAT, 有机阳离子转运体 OCT, 寡肽转运体 PEPT 和核苷转运体 NT, 该类转运体不能水解 ATP 产生能量, 主要功能是促进摄取或者双向转运药物^[4-6]。目前, 已成功构建稳定表达转运体的体外细胞模型有 MDCK-MDR1 模型^[7-8]、HEK293-OATP 模型^[9]、LLC-PK1-BCRP^[10]模型等, 其中, 应用人源 MDR1 基因稳定转染 MDCK 细胞的模型最为广泛^[11-15]。此外, 多个转运体共表达的细胞模型日益受到重视, 为转运体底物和抑制剂鉴定提供一个更真实的细胞环境, 已经作为研究药物与转运体, 转运体与转运体相互影响的有效工具之一^[16-18]。体外模型虽然可以研究转运蛋白与受试药物的相互作用, 但最终评价转运体对药物吸收、分布、消除的影响仍需要体内环境。体内模型体现了药物代谢酶的影响, 更准确地评价转运体在肠道吸收、胆汁排泄、肾脏分泌和脑部渗透性的作用, 所以基因敲除模型与基因突变动物的研究与应用也不断发展^[19-21]。

目前报道在药物研发和临床应用中, 了解药物和转运体的相互作用及转运体介导的药物相互作用有助于提高药物的安全性、有效性^[22-25]。美国食品药品监督管理局在药物相互作用指导草案中也提到药物研发过程中要重视转运体的作用^[26-27]。随着

转运体研究不断深入, 一般从转录水平、蛋白表达水平和功能水平验证稳定高表达转运体模型的可靠性。考虑到验证手段的多样性同时为应用研究提供前提依据, 本文将对近年来验证体外转运体稳定高表达的技术方法与研究进展进行论述。

1 mRNA 水平验证转运体基因的转录

转运体稳定表达首要前提是基因在细胞内进行转录。Northern 印迹杂交(Northern blot)是定量 RNA 的传统方法, 有研究应用反转录 PCR 和基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)技术高通量地筛选选择性剪接 RNA^[28]。但目前应用最广泛的方法是实时定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR), 其验证思路是分别提取空表达载体的空白细胞和稳定转染的单克隆细胞的总 RNA, 逆转录后由特定引物进行 PCR 扩增, 进行绝对或相对定量。当然, 扩增产物也可应用聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 焦磷酸测序(pyrosequencing, PSQ)或者毛细管电泳-激光诱导荧光(capillary electrophoresis-laser induced fluorescence, CE-LIF)等方法测定^[29]。

Haslam 等^[30]应用琼脂糖凝胶电泳观察正常转染的 T84 细胞 MDR1 目的条带而阴性对照没有说明转运蛋白基因已经开始转录, 之后用利福平和地高辛诱导 MDR1 表达, 以 18S 核糖体 RNA 建立标曲绝对定量其 mRNA 水平, 从而得到诱导倍数。Haritova 等^[31]以定量 PCR 测定的 Ct 值评价禽类脾细胞转运体 P-gp、MRP2、BCRP 的 mRNA 水平, P-gp 的 Ct 值最小由此推测 P-gp 的表达高于其他两个转运体。Wang 等^[32]以 β -globin 为内参基因进行 MDR1 基因的 PCR 扩增, 扩增产物由 PAGE 半定量其在 Caco-2 细胞的转录水平。值得注意的是 RT-PCR 相对定量 mRNA 水平时, 需要选择稳定性好, Ct 值与目标基因接近, 不干扰 cDNA 样品测定的内参基因^[33]。因此, Theile 等^[34]把葡萄糖醛酸苷酶(glucuronidase, GU)作为转染 LS180 细胞管家基因, 其主要因素是 GU 在测定过

程中良好的稳定性。

Schindler 等^[29]能定量测定 *CNBP* 和 *ARS2* 基因在 5 个不同的人体组织中 mRNA 微小突变甚至精确到单核苷酸,从准确度、重现性和耐用性等方面对比了 PAGE-ED, PSQ 和 CE-LIF 三种方法,结果表明 CE-LIF 是最精准但又耗时的方法。

2 转运体蛋白表达验证

转运体转录后翻译加工形成蛋白才可以实现外排或摄取的功能。免疫荧光染色法用于转运蛋白定量主要是 Western blot 和酶联免疫吸附测定,但该类方法应用的抗体对靶标蛋白的特异性差,结果并非完全可靠。此外,流式细胞仪、电化学免疫检测可相对定量转运蛋白,液质联用技术 LC-MS/MS 则能绝对定量转运蛋白。

Shirasaka 等^[35]构建体外动力学模型预测 P-gp 底物在体内吸收情况,一抗 C219 联合辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗相对定量正常表达、高表达 P-gp 及 *mdr1* 基因敲除的 Caco-2 细胞的 P 糖蛋白表达水平。Kim 等^[36]将小檗碱处理的 MCF-7 细胞加入异硫氰酸荧光素与 BCRP 抗体的结合物用流式细胞仪观察,发现小檗碱的给药剂量与 BCRP 的表达呈浓度依赖性,由此推测 BCRP 表达降低是小檗碱抗乳腺癌的机理之一。

有研究利用 LC-MS/MS 测定了转染 MDCK 细胞的 MRP2 蛋白的绝对含量和野生型 MDCK 细胞基底侧的 MRP2 水平,灵敏度明显高于免疫印迹法,说明通过胰酶消化 MRP2 蛋白得到的保守肽段无种属差异且能排除 ABC 家族其他转运蛋白的干扰,所以该肽段非常适合于特异性定量 MRP2^[37]。最新报道,液质联用法测定生物样品中胰酶消化 P-gp 的保守肽段,合成该肽段作为标准品。同时,用稳定同位素标记作为定量的内标,克服基质复杂、缺少纯化蛋白及膜蛋白高亲脂、低表达等的影响^[38]。Mbuna 等^[39]利用毛细管电泳免疫荧光检测方法简单、快速测定 MRP1 在 A549 和 RDES 两种细胞系中的相对含量,并对荧光标记分子与抗体比例、免疫复合物形成时间、多柔比星诱导细胞高表达 MRP1 的时间等各种条件进行考察、优化使之成为相对定量 MRP1 的有效工具,有望广泛应用于 ABC 转运体超家族的其他转运蛋白。

绝对定量转运蛋白的优势是直接、准确,但存在样品基质复杂,缺少纯化的蛋白建立标曲,

转运体表达量低等问题。相对定量方法较多且不需要标准品,但相对定量的各种技术均有缺陷如流式细胞术费用昂贵且需要特异性的荧光染料,Western blot 只能半定量同时实验周期较长。

3 转运体活性验证

3.1 积聚试验

积聚试验是转染或药物诱导高表达特定转运体的细胞悬液、单层细胞或者膜囊中加入常含有荧光或放射性标记的探针底物在有无抑制剂的不同条件下,对比底物在细胞或膜囊内的积聚量从而验证药物转运体的活性。同时,积聚试验中应用荧光或放射性标记的底物可以高通量地筛选候选药物,观察与转运蛋白之间的相互作用,进一步预测药物的吸收、分布和消除状况,判断受试药与已知的转运体底物之间是否有药物药物相互作用。

近年来,荧光底物积聚试验测定转运体活性的方法不断发展。Szabo 等^[40]用 5-(6)-羰基-2',7'-二氯荧光素作为转染细胞膜囊的底物评价 MRP2 转运体活性,解决了 MRP2 荧光底物的选择性低,多位点结合等问题。据报道在 MDCK II -hOCT1 模型中用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)作为荧光底物进行积聚试验,DAPI 较小檗碱等常用探针的优势在于细胞内积聚量稳定,而且细胞间隙不发射荧光可以实时监测摄取过程^[41]。流式细胞仪用于检测活细胞中的转运体活性表达,Lebedva 等^[42]借助该技术证明荧光探针底物 eFluxx-IDTM Green dye 和 eFluxx-IDTM Gold dye 能被快速被摄取、亲和力高,两种染料均能同时检测 P-gp、MRP1 和 BCRP 的多药耐药性,克服了罗丹明 123、钙黄绿素-AM 的有限适用性,也避免了阿霉素、米托蒽醌等染料的低灵敏性。用流式细胞仪通过罗丹明-123 积聚试验确定了哈尔明对 BCRP 转运体的专属抑制作用^[43]。Robey 等^[44]发明了一种具荧光检测功能的自动细胞计数器能快速、便利、廉价地评估 ABC 转运体的功能,与流式细胞仪的数据结果相当,有望成为筛选 ABC 转运体抑制剂的新手段。如果选择的底物含 ³H、¹⁴C 或 ³⁵S 等原子释放低能量的 β 射线粒子,则通过液体闪烁计数器(liquid scintillation counter, LSC)检测从而评价转运蛋白活性。Yasujima 等^[41]以 ³H-LCT4 荧光染料为底物筛选与 MRP2 相互作用的药物。³H-柔红霉素作为 P-gp、MRP、BCRP 的共同底物,各转运蛋白抑制

剂 PSC833、MK571、Ko143 分别存在的情况下测得的积聚量均明显增加,证明这 3 种转运体在鼠脑微血管内皮细胞上分别表达成功^[45]。Sheikh 等^[46]应用 LSC 测定 ³H-甲氨蝶呤放射活性确定摄入膜囊的量,从而证明非甾体抗炎药物抑制 MRP2 及 MRP4 介导甲氨蝶呤的转运,说明这可能是甲氨蝶呤与非甾体抗炎药联用产生相互作用的机制之一。

液质联用技术 LC-MS/MS 作为一种快速、专属、灵敏的分析方法验证体内或体外转运体的活性,有研究用 LC/MS-MS 测定 OATP1A2 经典底物非索非那定的在 HEK293 细胞系的积聚量^[47]。Shukla 等^[48]也通过 LC-MS/MS 定量 MCF7-BCRP 的底物柳氮磺胺吡啶的积聚。由此,说明该技术适于既无荧光又无放射性标记的转运体底物进行积聚试验的检测。

3.2 转运试验

转运试验是在可渗透的膜介质上先形成具有一定汇合度的单层细胞,极化的细胞间紧密连接且能表达功能性的目标转运体。转运试验常用的细胞有 Caco-2、MDCK 及 LLC-PK1,相应的野生型细胞可作为阴性对照。转运试验主要分为双向转运试验和平衡转运试验,前者是在供给室即顶侧(apical, AP)或基底侧(basolateral, BL)加入适量浓度的待测药物,在不同时间点取出接收池的转运缓冲液测定药物浓度同时补充相同体积的孵育液,后者是在顶侧和基底侧均加入等浓度的被测药物间隔一定时间监测药物的再分布。

罗丹明-123 或者地高辛作为 Caco-2 细胞 P-gp 双向转运底物,研究五味子甲素对底物表观渗透率 P_{app} 的影响,阳性对照组的 P_{app} 值验证了转运体的活性,对比实验组和阳性对照组的 P_{app} 值说明五味子甲素对 Caco-2 细胞表达的 P-gp 活性有明显的抑制效应^[49]。Wang 等^[50]在转运试验中 AP 端 pH 值由 7.4 减小至 6.8 发现 S-普奈洛尔 $P_{app(A-B)}$ 显著减小,无论给药于顶侧或基底侧,药物摄取量相似,推断 S-普奈洛尔在 Caco-2 细胞模型上除被动扩散外,未知转运蛋白在其跨膜转运中发挥重要作用。Feng 等^[51]用 $RR_{MDR1}(ER_{MDCK-MDR1}/ER_{MDCK}, ER \text{ 为通透率}) > 1.7$ 作为阈值,判断受试药是否是 P-gp 潜在的底物,后续的 P-gp 外排试验中以 RR_{MDR1} 值分别为 2.0 和 3.3 的中枢药物利哌立酮, 9-羟基利哌立酮作为阳性对照。Yu 等^[52]借助 Caco-2 细胞模型由双向转运试验的 ER 值和浓度依赖性结果

说明佐米曲坦吸收过程有转运体介导和被动扩散两种机制同时存在。He 等^[53]通过手性衍生化试剂乙酰葡萄糖异硫氰酸酯将 R-艾司洛尔或 S-艾司洛尔转化为非对映异构体,液相分离从而测得艾司洛尔在 Caco-2 细胞模型上浓度超过 200 μM 时立体选择性转运差异的消失。有研究利用 Caco-2 细胞模型进行天麻素双向转运试验,结果转运无方向性且 $ER < 2.0$,推测 P-gp 不参与天麻素的肠道吸收和血脑屏障的渗透^[54]。在选择转运体底物考察候选药物的抑制作用时,阳性对照说明了转运体的表达与活性,但转运体如 P-gp 有多个底物结合位点,候选药物与底物作用不同位点的这种抑制作用往往被忽略^[55]。

抗癫痫药巴比妥、苯巴比妥和乙琥胺耐药机制研究采用 MDCK 和 LLC-PK1 细胞模型,由双向转运和平衡转运试验双重验证 P-gp 对上述药物的影响,数据表明平衡转运试验对高渗透性药物的转运判断更灵敏^[56]。

转运试验除应用各种转染细胞模型评价转运体功能外,还可直接测定药物的外排量,已定位多个 MRPs 家族的转运体,能区别底物和抑制剂。转运试验主要通过净通透量比值是否大于 2 或者净外排量是否随受试药浓度增加逐渐饱和来判断是否是转运体的底物, K_i 值或 $[I]/IC_{50}$ 是否大于 0.1 确定受试药物是否是转运体的抑制剂。所以转运试验是目前最直接评价药物与转运蛋白相互作用的方法之一^[57]。

3.3 ATP 酶试验

ABC 转运蛋白外排功能依赖于核苷酸结合位点结合、水解 ATP。定量依据是底物转运时 ATP 会被 ATP 酶水解生成无机磷,磷可以利用灵敏的比色反应定量或者荧光素酶催化荧光素氧化消耗 ATP,发光量与 ATP 含量成线性,反映细胞膜上的 ATP 酶活性间接说明底物与外排转运体之间的相互作用,因此可以衡量转运蛋白的活性。但测定转运体 ATP 酶活性时可能存在 Ca^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶,线粒体 ATP 酶干扰导致磷释放量或 ATP 消耗量不能直接反映转运体 ATP 酶活性。反应体系内加入抑制剂叠氮化钠、乌巴因、EGTA 分别排除上述离子泵的干扰。但目前常用的方法是直接测定原钒酸敏感的 ATP 酶活性,因为原钒酸只需在一个 NBD 位点捕获 ATP 形成反应中间态 ADP.Vi.M^{2+} 则能完全抑制 ATP 酶活性,其他 ATP

酶活性不受影响^[49]。

有研究在外排、膜囊转运和 ATP 酶试验中使用共同底物钙黄绿素-AM 评价 P-gp 介导的药物药物相互作用, 阳性对照组维拉帕米中加入含钼酸铵的显色剂定量游离的磷验证转运体的活性, 结果显示 22 种化合物中只有 3 种会抑制钙黄绿素-AM 刺激的 ATP 酶活性^[58]。同样, 以维拉帕米作阳性对照测定原钒酸敏感的 ATP 酶活性发现 20S-原人参萜二醇未增强 P-gp ATP 酶的活性, 但它能瞬时可逆地抑制钙黄绿素-AM 的外排预测其抑制机制有别于维拉帕米^[59]。Wang 等^[60]通过 650 nm 处测定无机磷吸光度发现黄酮类化合物槲皮素、山奈酚会抑制 P-gp ATP 酶的活性, 但异鼠李素能激活 P-gp ATP 酶的活性。Bell 等^[61]通过荧光减弱测定 NADH 消耗来研究胆固醇增加基底侧 ATP 酶活性是特异性的, 而增加维拉帕米诱导的 ATP 酶活性是非特异性的。表面活性剂 Vitamin E TPGS 抑制外排泵活性的机制是通过改变 ATP 酶的活性和膜的流动性, 在 340 nm 处测 NADH 消耗量定量 ATP 酶活性, 发现当 Vitamin E TPGS 浓度高于完全抑制转运体活性浓度的 100 倍时才观察到膜流动性的变化, 所以推断 ATP 耗竭是外排泵受抑制的主要原因^[62]。

以上 3 种体外检测转运蛋白活性方法各有优劣, 适用于不同的情况。近年来, ATP 酶活性测定所需的细胞膜制备已部分商业化。但 ATP 酶活性测定不能区别受试药是底物还是抑制剂, 常出现假阴性或假阳性结果, 与转运体的功能不一定有良好的相关性。积聚试验和 ATP 酶测试均适合于高通量筛选药物, 但两者不适用于低渗透性的化合物。转运试验需要借助灵敏的分析手段, 能够区别待选药物是底物还是抑制剂, 为药物吸收和组织分布等问题提供详细的信息, 但易低估高渗透性底物的转运活性。

4 展望

随着转运体研究不断深入, 稳定高表达人转运蛋白的体外模型将广泛应用于新药研发和药动学方面的研究, 多个转运体或者转运体与药物代谢酶共转染的体外模型也正在逐步建立, 所以验证模型构建成功与否是至关重要的一步。已构建的模型需要从转录水平、蛋白表达及活性功能三个角度全面衡量, 而与荧光检测技术相结合的方

法在上述 3 个方面都显示了其巨大的价值和潜力, 有望满足快速、灵敏及高通量的需求。

REFERENCES

- [1] ALLER S G, YU J, WARD A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [J]. *Science*, 2009, 323(5922): 1718-1722.
- [2] QUEVEDO M A, NIETO L E, BRINON M C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(3): 151-159.
- [3] MATSSON P, PEDERSEN J M, NORINDER U, et al. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(8): 1816-1831.
- [4] SREEDHARAN S, SHAIK J H A, OLSZEWSKI P K, et al. Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression [J]. *Bmc Genomics*, 2010, 11: 17-28.
- [5] GUPTA S, BURCKHARDT G, HAGOS Y. SLC22 transporter family proteins as targets for cytostatic uptake into tumor cells [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(1/2): 117-124.
- [6] GIACOMINI K M, HUANG S M, TWEEDIE D J, et al. Membrane transporters in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(3): 215-236.
- [7] HORIO M, PASTAN I, GOTTESMAN M, et al. Canine kidney derived MDCK cells transfected with the MDR1 gene show increased multidrug secretory and secrete verapamil [J]. *Clin Res*, 1989, 37(2): A581-A581.
- [8] PASTAN I, GOTTESMAN M M, UEDA K, et al. A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(12): 4486-4490.
- [9] FISCHER A, HOEGER S J, STEMMER K, et al. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK-293 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(1): 9-20.
- [10] TAKADA T, SUZUKI H, SUGIYAMA Y. Characterization of polarized expression of point- or deletion-mutated human BCRP/ABCG2 in LLC-PK1 cells [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(3): 458-464.
- [11] ZAHNER D, ALBER J, PETZINGER E. Cloning and heterologous expression of the ovine (*Ovis aries*) P-glycoprotein (Mdr1) in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2010, 33(3): 304-311.
- [12] LUO S, WANG Z, KANSARA V, et al. Activity of a sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) in MDCK-MDR1 cells and mechanism of ascorbate uptake [J]. *Int J Pharm*, 2008, 358(1/2): 168-176.
- [13] HARIHARAN S, GUNDA S, MISHRA G P, et al. Enhanced corneal absorption of erythromycin by modulating P-glycoprotein and MRP mediated efflux with corticosteroids [J]. *Pharma Res*, 2009, 26(5): 1270-1282.
- [14] BRAYDEN D J, GRIFFIN J. Avermectin transepithelial transport in MDR1- and MRP-transfected canine kidney monolayers [J]. *Vet Res Commun*, 2008, 32(1): 93-106.
- [15] AGARWAL S, JAIN R, PAL D, et al. Functional characterization of peptide transporters in MDCKII-MDR1

- cell line as a model for oral absorption studies [J]. *Int J Pharm*, 2007, 332(1/2): 147-152.
- [16] RIUS M, KELLER D, BROM M, et al. Vectorial transport of nucleoside analogs from the apical to the basolateral membrane in double-transfected cells expressing the human concentrative nucleoside transporter hCNT3 and the export pump ABCC4 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(7): 1054-1063.
 - [17] TSUDA M, TERADA T, UEBA M, et al. Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(1): 185-191.
 - [18] SATO T, MASUDA S, YONEZAWA A, et al. Intracellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(7): 894-903.
 - [19] DE VRIES N A, 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): 6440-6449.
 - [20] DAGENAIS C, AVDEEF A, TSINMAN O, et al. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 38(2): 121-137.
 - [21] WANG J, FIGURSKI M, SHAW L M, et al. The impact of P-glycoprotein and Mrp2 on mycophenolic acid levels in mice [J]. *Transpl Immunol*, 2008, 19(3/4): 192-196.
 - [22] HE Y, LIU Y, ZENG S. Stereoselective and multiple carrier-mediated transport of cetirizine across Caco-2 cell monolayers with potential drug interaction [J]. *Chirality*, 2010, 22(7): 684-692.
 - [23] YU X Y, ZHOU Z W, LIN S G, et al. Role of ATP-binding cassette drug transporters in the intestinal absorption of tanshinone IIB, one of the major active diterpenoids from the root of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Xenobiotica*, 2007, 37(4): 375-415.
 - [24] STUREK J M, CASTLE J D, TRACE A P, et al. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2575-2589.
 - [25] RADU R A, YUAN Q, HU J, et al. Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following vitamin A supplementation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(9): 3821-3829.
 - [26] ZHANG L, ZHANG Y D, STRONG J M, et al. A regulatory viewpoint on transporter-based drug interactions [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(7/8): 709-724.
 - [27] US Food and Drug Administration. Drug Development and Drug Interactions [OL]. US FDA website, 2009, <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm080499.html>
 - [28] MCCULLOUGH R M, CANTOR C R, DING C. High-throughput alternative splicing quantification by primer extension and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(11): e99.
 - [29] SCHINDLER S, HEINER M, PLATZER M, et al. Comparison of methods for quantification of subtle splice variants [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(21): 3674-3681.
 - [30] HASLAM I S, JONES K, COLEMAN T, et al. Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells [J]. *Brit J Pharmacol*, 2008, 154(1): 246-255.
 - [31] HARITOVA A M, SCHRICKX J A, FINK-GREMMEIS J. Functional studies on the activity of efflux transporters in an ex vivo model with chicken splenocytes and evaluation of selected fluoroquinolones in this model [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(6): 752-759.
 - [32] WANG X D, MENG M X, GAO L B, et al. Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp [J]. *Int J Pharm*, 2009, 378(1/2): 1-8.
 - [33] HILGENDORF C, AHLIN G, SEITHEL A, et al. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(8): 1333-1340.
 - [34] THEILE D, STAFFEN B, WEISS J. ATP-binding cassette transporters as pitfalls in selection of transgenic cells [J]. *Anal Biochem*, 2010, 399(2): 246-250.
 - [35] SHIRASAKA Y, SAKANE T, YAMASHITA S. Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(1): 553-565.
 - [36] KIM J B, KO E, HAN W, et al. Berberine diminishes the side population and ABCG2 transporter expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Planta Med*, 2008, 74(14): 1693-1700.
 - [37] LI N, NEMIROVSKIY O V, ZHANG Y Q, et al. Absolute quantification of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2008, 380(2): 211-222.
 - [38] ZHANG Y Q, LI N, BROWN P W, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2011, 25(12): 1715-1724.
 - [39] MBUNA J, KANETA T, IMASAKA T. Rapid determination of multidrug resistance-associated protein in cancer cells by capillary electrophoresis immunoassay [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(25): 3923-3927.
 - [40] HEREDI-SZABO K, KIS E, MOLNAR E, et al. Characterization of 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4 [J]. *J Biomol Screen*, 2008, 13(4): 295-301.
 - [41] YASUJIMA T, OHTA K, INOUE K, et al. Characterization of human OCT1-mediated transport of DAPI as a fluorescent probe substrate [J]. *J Pharma Sci*, 2011, 100(9): 4006-4012.
 - [42] LEBEDEVA I V, PANDE P, PATTON W F. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22429.
 - [43] MA Y, WINK M. The beta-carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse Resistance to the anticancer drugs mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(1): 146-149.
 - [44] ROBEY R W, LIN B, QIU J, et al. Rapid detection of ABC transporter interaction: potential utility in pharmacology [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2011, 63(3): 217-222.
 - [45] PERRIERE N, YOUSIF S, CAZAUBON S, et al. A functional *in vitro* model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters [J]. *Brain Res*, 2007, 1150: 1-13.
 - [46] EL-SHEIKH A A K, VAN DEN HEUVEL J J M W, KOENDERINK J B, et al. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2 and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate

- transport [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(1): 229-235.
- [47] FLYNN C A, ALNOUTI Y, REED G A. Quantification of the transporter substrate fexofenadine in cell lysates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2011, 25(16): 2361-2366.
 - [48] SHUKLA S, ZAHER H, HARTZ A, et al. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(2): 480-487.
 - [49] YOO H H, LEE M, LEE M W, et al. Effects of *Schisandra lignans* on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal Caco-2 cells [J]. *Planta Med*, 2007, 73(5): 444-450.
 - [50] WANG Y, CAO J, WANG X, et al. Stereoselective transport and uptake of propranolol across human intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. *Chirality*, 2010, 22(3): 361-368.
 - [51] FENG B, MILLS J B, DAVIDSON R E, et al. *In vitro* P-glycoprotein assays to predict the *in vivo* interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(2): 268-275.
 - [52] YU L S, ZENG S. Transport characteristics of zolmitriptan in a human intestinal epithelial cell line Caco-2 [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(5): 655-660.
 - [53] HE Y, ZENG S. Determination of the stereoselectivity of chiral drug transport across Caco-2 cell monolayers [J]. *Chirality* 2006, 18(1): 64-69.
 - [54] WANG X D, ZENG S. The transport of gastrodin in Caco-2 cells and uptake in Bcap37 and Bcap37/MDR1 cells [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(12): 1497-1502.
 - [55] MUENSTER U, GRIESHOP B, ICKENROTH K, et al. Characterization of substrates and inhibitors for the *in vitro* assessment of Bcrp mediated drug-drug interactions [J]. *Pharmaceut Res*, 2008, 25(10): 2320-2326.
 - [56] ZHANG C B, KWAN P, ZUO Z, et al. *In vitro* concentration dependent transport of phenytoin and phenobarbital, but not ethosuximide, by human P-glycoprotein [J]. *Life Sci*, 2010, 86(23/24): 899-905.
 - [57] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry. Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling [OL]. US FDA website, 2006, www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072101.pdf
 - [58] SZEREMY P, PAL A, MEHN D, et al. Comparison of 3 assay systems using a common probe substrate, calcein AM, for studying P-gp using a selected set of compounds [J]. *J Biomol Screen*, 2011, 16(1): 112-119.
 - [59] ZHAO Y, BU L, YAN H, et al. 20S-protopanaxadiol inhibits P-glycoprotein in multidrug resistant cancer cells [J]. *Planta Med*, 2009, 75(10): 1124-1128.
 - [60] WANG Y, CAO J, ZENG S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols quercetin, kaempferol, and isorhamnetin [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(6): 751-758.
 - [61] BELLI S, ELSENER P M, WUNDERLI-ALLENSPACH H, et al. Cholesterol-mediated activation of P-glycoprotein: distinct effects on basal and drug-induced atpase activities [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98(5): 1905-1918.
 - [62] COLLNOT E M, BALDES C, WEMPE M F, et al. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(3): 465-474.