

LC-MS/MS 法测定中国孕妇胎盘中地塞米松 相关代谢酶和转运体蛋白丰度*

李辉^{1,2}, 郭萱^{1,2}, 侯哲^{1,2}, 刘东阳¹, 董静³, 杭太俊^{2**}, 张雷^{1**}

(1. 北京大学第三医院, 北京 100191; 2. 中国药科大学, 南京 210009; 3. 岛津中国创新中心, 北京 100020)

摘要 目的: 建立 LC-MS/MS 方法测定中国孕妇胎盘中地塞米松相关代谢酶和转运体的丰度数据。方法: 采用 Shim-pack GISS-HP C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱, 柱前由 0.2% 甲酸-水 (A) 和 0.2% 甲酸-乙腈 (B) 组成的流动相, 以 0.2 mL · min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱, 柱后以 0.1 mL · min⁻¹ 的流速加入 0.5% 乙二醇-乙腈 (流动相 C), 采用 ESI 源正离子 MRM 模式进行定量分析。对所建立的方法进行方法学考察并对中国孕妇孕晚期胎盘中 11β 羟基类固醇脱氢酶 1 (11β-HSD1)、11β 羟基类固醇脱氢酶 2 (11β-HSD2)、细胞色素 P450 3A4 酶 (CYP3A4) 和 P-糖蛋白 (P-gp) 蛋白表达量进行定量分析。结果: 建立的 LC-MS/MS 分析测定方法的线性范围为 0.1 ~ 100 nmol · L⁻¹ (r > 0.999); 精密度和准确度结果均符合《中华人民共和国药典》对于生物样品分析方法学验证的要求 (RSD ≤ 15%), 稳定性结果显示样品稳定性良好。11β-HSD2、11β-HSD1、CYP3A4 和 P-gp 的蛋白丰度分别为 (84.46 ± 59.97) pmol · g⁻¹、(11.44 ± 3.73) pmol · g⁻¹、(8.83 ± 2.78) pmol · g⁻¹ 和 (7.94 ± 4.10) pmol · g⁻¹。同时研究结果显示相关代谢酶和转运体在胎盘不同部位的分布没有显著差异, 但中国人胎盘 P-gp 的丰度 (7.94 ± 4.10) pmol · g⁻¹ 和白人 (4.41 ± 2.46) pmol · g⁻¹ 相比存在显著性差异。结论: 本研究建立的 LC-MS/MS 方法准确度和灵敏度高, 适用于检测人类胎盘中地塞米松相关代谢酶和转运体的丰度值。

关键词: 液相色谱-二级质谱联用; 细胞色素 P450 3A4 酶; P-糖蛋白; 11β 羟基类固醇脱氢酶; 蛋白丰度; 孕妇胎盘; 地塞米松

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)01-0076-13

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.01.08

Determination of abundance of dexamethasone related metabolic enzymes and transporter proteins in the placenta of Chinese pregnant women by LC-MS/MS method*

LI Hui^{1,2}, GUO Xuan^{1,2}, HOU Zhe^{1,2}, LIU Dong-yang¹,
DONG Jing³, HANG Tai-jun^{2**}, ZHANG Lei^{1**}

(1. Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
3. Shimadzu China Innovation Center, Beijing 100020, China)

Abstract Objective: To establish an LC-MS/MS method for the determination of the abundance data of

* 国家自然科学基金 (No. 82173895)

** 通信作者 张雷 Tel: 15501062316; E-mail: zhanglei_bjmu@163.com

杭太俊 Tel: 13851622961; E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

第一作者 Tel: 13347803260; E-mail: 1961651141@qq.com

dexamethasone - related metabolic enzymes and transporters in the placenta of Chinese pregnant women .

Methods: A Shim - pack GISS - HP C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) chromatographic column was used, and the mobile phases were consisted of 0.2% formic acid - water (phase A) and 0.2% formic acid - acetonitrile (phase B) with gradient elution at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. The post - column phase C consisted of 0.5% ethylene glycol - acetonitrile was added at a flow rate of 0.1 mL · min⁻¹, and the ESI source positive ion MRM mode was used for quantitative analysis. The established method was investigated methodologically and the expression levels of 11β hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11β - HSD1), 11β hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11β - HSD2), cytochrome P450 3A4 enzyme (CYP3A4) and P - glycoprotein protein (P - gp) were quantitatively analyzed in the placenta of Chinese pregnant women in the third trimester. **Results:** The established LC - MS/MS method had a linear range of 0.1 - 100 nmol · L⁻¹ ($r > 0.999$). The precision and accuracy results met the requirements of the biological sample analysis method verification in Chinese Pharmacopoeia (RSD ≤ 15%), and the stability results showed that the samples were stability. The protein abundance of 11β - HSD2, 11β - HSD1, CYP3A4 and P - gp were (84.46 ± 59.97) pmol · g⁻¹, (11.44 ± 3.73) pmol · g⁻¹, (8.83 ± 2.78) pmol · g⁻¹ and (7.94 ± 4.10) pmol · g⁻¹, respectively. Besides, the results of the study also showed that there was no significant difference in the distribution of related metabolic enzymes and transporters in different parts of the placenta. However, there was a significant difference in the abundance of P - gp in the placenta between Chinese people (7.94 ± 4.10) pmol · g⁻¹ and white people (4.41 ± 2.46) pmol · g⁻¹. **Conclusions:** The LC - MS/MS method established in this study has high accuracy and sensitivity and is suitable for detecting the abundance values of dexamethasone - related metabolic enzymes and transporters in human placenta.

Keywords: LC - MS/MS; CYP3A4; P - gp; 11β hydroxysteroid dehydrogenase; protein abundance; placenta of Chinese pregnant women; dexamethasone

新生儿呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome, RDS), 又称新生儿肺透明膜病, 指新生儿出生后不久即出现进行性呼吸困难和呼吸衰竭等症状, 主要是由于缺乏肺泡表面活性物质所引起^[1]。若不及时进行治疗, 患儿于出生后 4 ~ 12 h 会出现进行性呼吸困难、呻吟、发绀等症状, 严重者发生呼吸衰竭。

在对 RDS 治疗指南中, 推荐使用皮质激素对妊娠 28 ~ 34 周存在早产风险的孕妇至少在分娩前 24 h 给予单疗程治疗 (6 mg, 每 12 h 给药 1 次, 共给药 4 次, 肌肉注射)^[2]。地塞米松是一种人工合成的糖皮质激素, 一般用于风湿性疾病、哮喘、严重过敏、慢性阻塞性肺病等疾病, 其在 RDS 实际临床治疗中得到广泛应用^[3]。

虽然地塞米松促进胎肺成熟的疗效确定, 但近年来产前应用糖皮质激素对胎儿生长发育的不良影响越来越受到关注。胎儿过早、过多地接触糖皮质激素可导致胎儿宫内生长受限, 并与成年期某些疾病如糖尿病、高血压等有关^[4]。已有研究表

明^[5-6], 地塞米松浓度在胎儿体内变异大, 目前原因不清, 可能与其经胎盘转运时受到多个酶和转运体的影响有关。有文献研究表明^[7-9], 涉及地塞米松跨胎盘转运的代谢酶和转运体主要包括细胞色素 P450 3A4 酶 (cytochrome P450 3A4 enzyme, CYP3A4)、11β 羟基类固醇脱氢酶 1 (11β - hydroxysteroid dehydrogenase 1, 11β - HSD1)、11β 羟基类固醇脱氢酶 2 (11β - hydroxysteroid dehydrogenase 2, 11β - HSD2) 和 P - 糖蛋白 (P - glycoprotein, P - gp)。但这些代谢酶和转运体在中国孕妇胎盘的丰度信息尚未见报道。

靶向蛋白组学是近些年发展起来的用于蛋白质定量的分析方法, 相比于传统的蛋白质印迹法和酶联免疫吸附测定法等, 具有较高的准确度和灵敏度。为更好地理解地塞米松跨胎盘转运机制, 本研究利用液相色谱 - 质谱联用 (LC - MS/MS) 建立了同时对样品中 CYP3A4、11β - HSD1、11β - HSD2 和 P - gp 进行定量的检测方法, 并对临床试验收集的中国健康孕妇胎盘样品进行测定, 统计分析酶和转运体对

地塞米松跨胎盘的机理。

1 材料与样品

1.1 试剂和主要仪器

色谱级甲酸和乙酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;LC-MS级乙腈、甲醇、乙二醇、异丙醇、碘乙醇胺(IAM),上海易恩化学技术有限公司;分析纯乙醇、氯化钾(KCl)、脱氧胆酸钠,国药集团化学试剂有限公司;甘油、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、二硫苏糖醇(DTT)、蛋白酶抑制剂,北京索莱宝科技有限公司;生理盐水,华润双鹤药业股份有限公司;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、蔗糖,上海源叶生物科技有限公司;碳酸氢铵,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胰蛋白酶,Sigma aldrich公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS),中科迈晨(北京)科技有限公司;BCA试剂盒,Thermo公司;膜蛋白提取试剂,上海碧云天生物有限公司。

SpectraMax iD3 多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; 5424R 高速低温离心机, Eppendorf 公司; QUINTIX125D-1CN 十万分之一电子天平, Sartorius 公司; PB10 PH 计, Sartorius 公司; Comfort II 超纯水仪, Sartorius 公司; Vortex Genie 2 涡旋混匀仪, Scientific Industries 公司; DK-98-IIA 电热恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司; T10 basic ULTRA-TUR-RAX 匀浆机, IKA 公司; D1008 微型离心机, 赛洛捷克公司; 5804R 冷冻高速离心机, Eppendorf 公司; LC-MS 8060NX 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪, 岛津公司。Ultimate 3000-Orbitrap Fusion Lumos 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱串联质谱仪, Thermo 公司。

1.2 样品来源

临床研究为“中国孕妇药物经胎盘转运的体内外体内推模型研究”,经北京大学第三医院医学科学研究伦理委员会审查通过,伦理审查批号为(2020)医伦审第(094-03)号。

在受试者首次产检(第6周 \pm 7 d)时,符合入排标准的健康受试者即入组,在受试者分娩后收集受试者的废弃胎盘样本。生产结束时快速将胎盘放置于医用低温储备箱,用经过75%医用酒精消毒的手术剪分别剪取胎盘边缘处、边缘与脐带中间处和脐带处3个部分组织,分别记为A、B和C。每部分组织大约剪取5~10 g,剪取时注意去除大血管和钙化组织。所有操作均在4℃环境下进行,将取好组织

放置于-80℃冰箱备用。

2 方法与结果

2.1 生物样品处理

2.1.1 代谢酶的样品处理 解冻胎盘并剪取5~10 g左右,用预冷的生理盐水漂洗3~4次,充分洗去血凝块。用眼科手术剪刮除胎盘绒毛,随后将组织剪碎,加入5倍体积预冷的匀浆液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.0, 150 mmol·L⁻¹ KCl, 2 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na 和 0.1 mmol·L⁻¹ PMSF)。具体制备过程:称取 Tris-HCl 1 592.0 mg,加入纯水 200 mL 溶解,用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钾溶液调节 pH 到 7.0,再加入 KCl 2 247.7 mg 和 EDTA-2Na 150.38 mg,到此为不含 PMSF 的预备匀浆液;称取 PMSF 17.420 mg 溶于乙醇 10 mL 中,得到 PMSF 母液,临用前,用不含 PMSF 的预备匀浆液稀释 100 倍,电动匀浆机匀浆 2~3 min。随后 750 g 离心 30 min (4℃),收集上清液;于 15 000 g 离心 30 min (4℃),收集上清液;于 105 000 g 离心 60 min (4℃),收集沉淀重悬于预冷的 0.25 mol·L⁻¹ 的蔗糖-磷酸盐缓冲液(蔗糖 8 557.5 mg 溶解于 PBS 100 mL)中,得到微粒体溶液。为了可以在-80℃中长期保存,可加入20%甘油并分装备用。

2.1.2 转运体的样品处理 称取约胎盘组织 50 mg,剪碎,加入膜蛋白提取试剂 A 1 mL 和混合蛋白酶抑制剂 10 μL 匀浆,轻微振摇,4℃孵育 10 min。随后匀浆液在 4℃,16 000 g 离心 15 min。弃去上清液,沉淀重悬于 400 μL 的 3% 的脱氧胆酸钠溶液中,得到细胞膜蛋白提取液。采用 Bradford 法^[10]测定总膜蛋白的浓度,使用匀浆液调整蛋白浓度至约 2 mg·mL⁻¹。

2.1.3 多肽样品溶液的制备 用 50 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵溶液将微粒体样品蛋白浓度调整到 2 mg·mL⁻¹,移取微粒体蛋白或总膜蛋白 30 μL,加入 50 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵溶液 45 μL 和 200 mmol·L⁻¹ DTT 溶液 10 μL,涡旋后 95℃孵育 10 min。冷却后暗处操作,加入 400 mmol·L⁻¹ IAM 溶液 10 μL,涡旋后室温暗处孵育 20 min。加入 100 ng·μL⁻¹ 胰酶工作液(Sigma aldrich,将胰酶溶解于 50 mmol·L⁻¹ 乙酸制成 1 μg·μL⁻¹ 胰酶储备液,临用前使用 50 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵将胰酶储备液稀释 10 倍) 15 μL,涡旋后 37℃孵育过夜。最后加入含有 0.2% 甲酸的 20% 乙腈溶液(含有 5 nmol·L⁻¹ 混合内标

55 μL , 涡旋混合, 10 000 g 离心 10 min, 取上清即得多肽样品溶液, 用于质谱分析。

2.2 特征肽段选取

根据已有文献^[11], 选取 LQEEIDAVLPNK 作为 CYP3A4 的特征肽段, FYDPLAGK 作为 P-gp 的特征肽段。目前尚未有研究使用蛋白组学的方法对人体组织中 11 β -HSD1 和 11 β -HSD2 酶丰度进行定量分析, 文献中无二者的特征肽段可供参考, 故本研究利用 Ultimate 3000-Orbitrap Fusion Lumos 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱串联质谱仪, 对酶微粒体样品中的蛋白和多肽进行分离鉴定, 数据经 ProteinPilotTM 软件与 UniProt 蛋白数据库对比分析, 筛选 11 β -HSD1 和 11 β -HSD2 潜在的特征肽段。特征肽段的选取需满足以下要求: 肽段长度在 7~22 个氨基酸序列, 相对分子质量在 2 000

以下; 没有翻译后修饰的氨基酸序列; 没有单核苷酸多态性的氨基酸序列; 没有半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)、色氨酸(W)等不稳定的氨基酸; 没有 RR、KK、RK、KR(R: 精氨酸; K: 赖氨酸)等不稳定的序列; 没有跨膜区域^[12]。同时使用加利福尼亚大学旧金山分校(UCSF)所提供的多样性质谱分析工具: MS-Digest 模拟胰蛋白酶对 11 β -HSD1 和 11 β -HSD2 进行酶切的情况, 结果和上述非靶向蛋白组学的数据进行相互验证, 最终选取 VIVTGASK 作为 11 β -HSD1 的特征肽段, ALLQLLR 作为 11 β -HSD2 的特征肽段。

对上述所选择的肽段按照氨基酸序列进行合成作为标准品, 同时合成对应的同位素多肽作为内标。标准品和同位素内标的氨基酸序列信息见表 1。

表 1 各酶和转运体肽段 MRM 检测条件

Tab. 1 MRM detection conditions for each enzyme and transporter peptide

酶和转运体名称 (enzyme and transporter name)	肽段 (peptide)	母离子 (parent ion) m/z	子离子 (daughter ion) m/z	裂解电压 (collision energy)/ V	驻留时间 (dwell time)/ ms
11 β -HSD1	VIVTGASK	387.80	562.35	-15.0	9.0
11 β -HSD1 内标(11 β -HSD1 internal standard)	VIVTGA * SK	391.80	570.35	-15.0	9.0
11 β -HSD2	ALLQLLR	413.70	642.55	-17.0	9.0
11 β -HSD2 内标(11 β -HSD2 internal standard)	ALLQLL * R	417.20	649.50	-17.0	9.0
CYP3A4	LQEEIDAVLPNK	684.90	1 127.20	-24.0	9.0
CYP3A4 内标(CYP3A4 internal standard)	LQEEIDAVLP * NK	688.05	1 133.70	-24.0	9.0
P-gp	FYDPLAGK	455.75	763.10	-18.0	9.0
P-gp 内标(P-gp internal standard)	FYDPLA * GK	457.85	767.40	-17.0	9.0

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 采用 Shim-pack GISS-HP C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱, 流动相 A 为 0.2% 甲酸-水, 流动相 B 为 0.2% 甲酸-乙腈, 流动相 C 为 0.5% 乙二醇-乙腈, 柱前采用流动相 A 和流动相 B, 以 0.2 mL \cdot min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱(详见表 2), 流动相 C 作为质谱信号增强溶剂接入色谱柱后, 以 0.1 mL \cdot min⁻¹ 的流速, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

2.3.2 质谱条件 采用 LC-MS 8060NX 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪, 电喷雾离子源, 正离子模式(ESI⁺), 雾化气流量为 3 L \cdot min⁻¹, 干燥

表 2 梯度洗脱条件

Tab. 2 Gradient elution conditions

时间 (time)/ min	流动相比例(mobile phase ratio)/%	
	流动相 A (mobile phase A)	流动相 B (mobile phase B)
0	98	2
0.2	82	18
4	78	22
5	45	55
6.4	5	95
7.4	5	95
7.5	98	2

气流量为 $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 加热气流量为 $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 接口温度为 $350 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂温度为 $600 \text{ }^\circ\text{C}$, DL 温度为 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 加热块温度为 $400 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.4 溶液的制备

2.4.1 混合标准品工作液及混合内标工作液 精密平行称取 2 份各肽段标准品(表 3)溶于纯化水(浓度及制备过程见表 4)。取各标准品溶液适量

($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品溶液吸取 $2 \text{ } \mu\text{L}$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品溶液吸取 $5 \text{ } \mu\text{L}$), 混合并加入超纯水 $986 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋混匀, 即得 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准品工作液。同时吸取 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液 $2 \text{ } \mu\text{L}$ 及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 混合, 加入超纯水 $986 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋混匀, 即得 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合内标工作液。

表 3 肽段标准品溶液及其内标溶液信息

Tab. 3 Peptide standard solution and its internal standard solution information

肽段标准品及其内标 (peptide standards and their internal standards)	批号 (lot number)	纯度 (purity)/ %	公司 (company)
CYP3A4	GP011227-11-0904	98	北京锐则成科技有限公司(Beijing Ruizecheng Technology Co., Ltd)
CYP3A4 内标 (CYP3A4 internal standard)	GP011227-32	98	北京锐则成科技有限公司(Beijing Ruizecheng Technology Co., Ltd)
11 β -HSD1	PO2101305	98	上海科肽生物科技有限公司(Shanghai Kepeptide Biotechnology Co., Ltd)
11 β -HSD1 内标 (11 β -HSD1 internal standard)	PO2101306	98	上海科肽生物科技有限公司(Shanghai Kepeptide Biotechnology Co., Ltd)
11 β -HSD2	PO2101303	98	上海科肽生物科技有限公司(Shanghai Kepeptide Biotechnology Co., Ltd)
11 β -HSD2 内标 (11 β -HSD2 internal standard)	PO2101304	98	上海科肽生物科技有限公司(Shanghai Kepeptide Biotechnology Co., Ltd)
P-gp	GP011227-13-0904	98	北京锐则成科技有限公司(Beijing Ruizecheng Technology Co., Ltd)
P-gp 内标(P-gp internal standard)	GP011227-34	98	北京锐则成科技有限公司(Beijing Ruizecheng Technology Co., Ltd)

表 4 肽段标准品溶液及其内标溶液制备

Tab. 4 Preparation of peptide standard solution and its internal standard solution

肽段标准品及其内标 (peptide standards and their internal standards)	相对分子质量 (relative molecular mass)	质量 (quality)/ mg	溶剂体积 (solvent volume)/ μL	浓度 (concentration)/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
CYP3A4	1 368.53	3.000	429.66	5.00
CYP3A4 内标(CYP3A4 internal standard)	1 374.53	2.510	358.05	5.00
11 β -HSD1	773.92	1.603	1 036.00	2.00
11 β -HSD1 内标(11 β -HSD1 internal standard)	781.92	1.662	1 063.00	2.00
11 β -HSD2	826.02	1.701	1 030.00	2.00
11 β -HSD2 内标(11 β -HSD2 internal standard)	833.02	1.760	1 056.00	2.00
P-gp	910.02	3.180	685.64	5.00
P-gp 内标(P-gp internal standard)	914.02	3.000	652.97	5.00

2.4.2 混合标准曲线溶液和混合质控溶液 将混合标准品工作液用纯化水稀释成浓度分别为 0.1 、 0.2 、 0.5 、 1 、 3 、 10 、 30 、 50 和 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准曲线溶液 C1 ~ C9(详见表 5)。混合质控溶液制备方法同混合标准曲线溶液制备过程(详见表 6), 得到浓度分别为 0.3 、 8 和 $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合低、中、高浓度质控溶液。移取各混合

标准曲线溶液或混合质控溶液 $30 \text{ } \mu\text{L}$, 加入 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 $45 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAM 溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰酶工作液 $15 \text{ } \mu\text{L}$ 、 0.2% 甲酸的 20% 乙腈水溶液(含 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合内标) $55 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋混合, $10\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min , 取上清进行质谱分析。

表 5 混合标准曲线溶液制备

Tab. 5 Preparation of mixed standard curve solutions

混合标准曲线溶液代号 (mixed standard curve solution code)	溶质 (solute)	溶质体积 (solute volume)/ μL	溶剂体积 (solvent volume)/ μL	终浓度 (final concentration)/ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C9	混合标准品工作液(mixed standard working solution)	10	990	100
C8	C9	300	300	50
C7	C9	300	700	30
C6	C7	300	600	10
C5	C6	300	700	3
C4	C5	300	600	1
C3	C4	300	300	0.5
C2	C3	120	180	0.2
C1	C2	100	100	0.1

表 6 混合质控溶液制备

Tab. 6 Preparation of mixed quality control solution

混合质控溶液 (mixed quality control solution)	溶质 (solute)	溶质体积 (solute volume)/ μL	溶剂体积 (solvent volume)/ μL	终浓度 (final concentration)/ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
高浓度(high concentration)	混合质控工作液(mixed quality control working fluid)	8	992	80
中浓度(medium concentration)	混合高浓度质控液(mixed high concentration quality control solution)	100	900	8
低浓度(low concentration)	混合中浓度质控液(mixed medium concentration quality control solution)	30	770	0.3

2.5 方法学考察

本研究根据 2020 年版《中华人民共和国药典》第四部通则 9012《生物样品定量分析方法验证指导原则》中相关要求方法进行方法验证,包括专属性、线性、准确度与精密度、稳定性。

2.5.1 专属性 分别对空白基质[移取匀浆液 30 μL ,加入 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 溶液 10 μL 、50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 45 μL 、400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAM 溶液 10 μL 、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰酶工作液 15 μL 、0.2% 甲酸的 20% 乙腈水溶液(含 5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合内标)55 μL]和 10 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合标准曲线溶液进行分析,考察方法的专属性。

结果显示,在所建立的色谱和质谱检测条件下,不同肽段能够得到较好的分离,空白基质对各肽段的测定无干扰。见图 1。

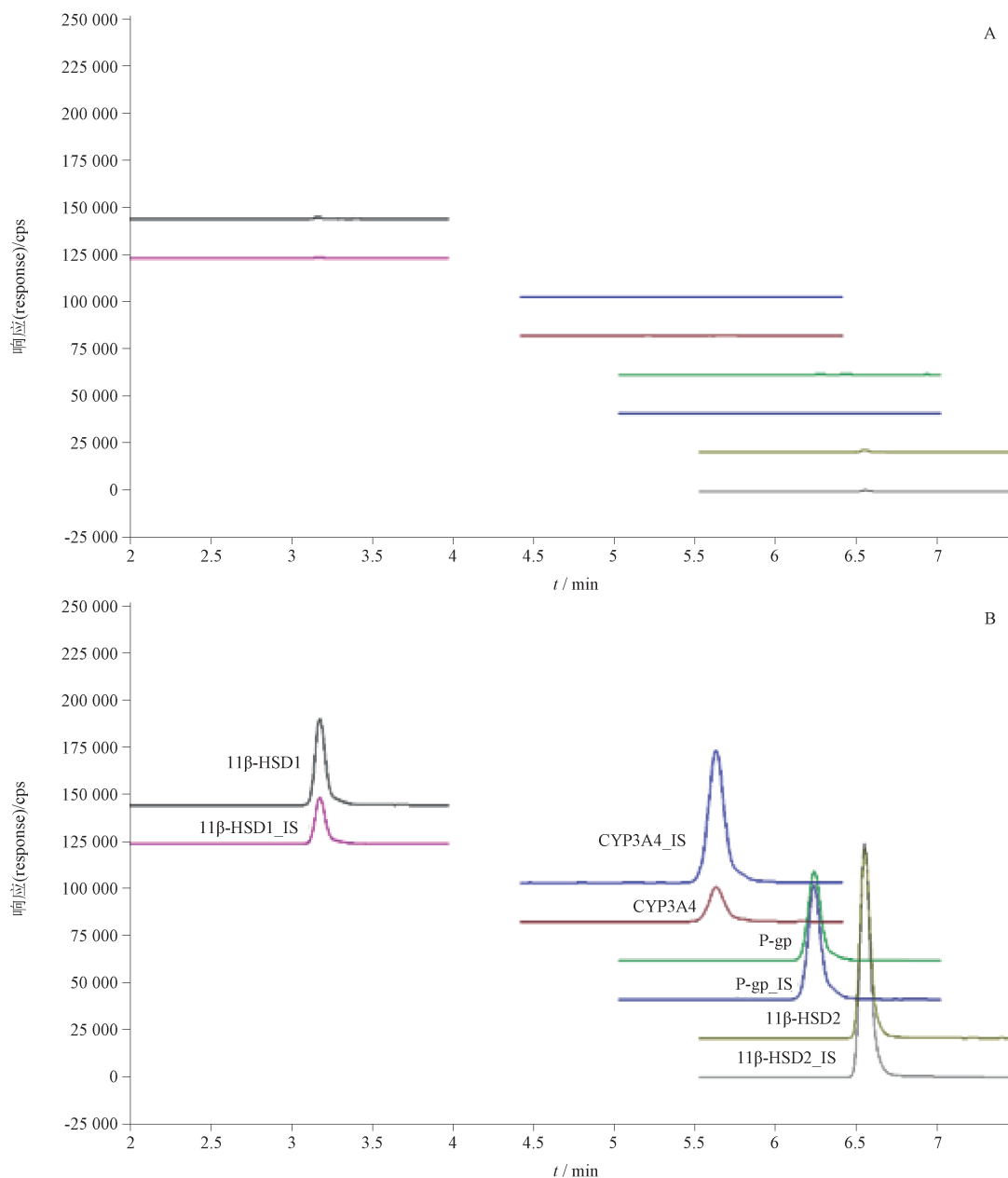
2.5.2 线性 取“2.4.2”项下混合标准曲线溶液,按“2.3”项下条件进样检测,得 2 条标准曲线。利用前后 2 条标准曲线对线性进行评估,可接受标准为至少 75% 的浓度点的回推浓度应在 85%~115%,定量下限应在 80%~120%,且应包含至少 1 个定量下

限浓度点和 1 个定量上限浓度点。相关系数 r 应 ≥ 0.99 。

使用 LabSolutions 对数据进行处理,使用定量处理中校准曲线类型为二次曲线,零截距为未过原点,加权为 $1/C^2$ 的方法对样品峰面积进行计算。结果见图 2,所有目标肽段 r 均 > 0.999 。

2.5.3 精密度和准确度 按照“2.4.2”项下方法配制低、中、高浓度质控溶液,每个浓度平行 6 份。利用随行标准曲线定量,测定 3 个批次混合低、中和高浓度质控溶液的日内和日间精密度和准确度。准确度可接受标准为混合低、中和高浓度质控溶液标示值的 $\pm 15\%$;精密度的可接受标准为混合低、中和高浓度质控溶液的 $\text{RSD} \leq 15\%$ 。

精密度和准确度结果见表 7,日内准确度和日间准确度的混合低、中和高浓度质控溶液都在标示值的 $\pm 15\%$ 以内;日内精密度和日间精密度的混合低、中和高浓度质控溶液的 $\text{RSD}\%$ 均 $\leq 15\%$ 。该分析方法的准确度和精密度符合《中华人民共和国药典》对于生物样品分析方法方法学验证的要求,说明准确度和精密度良好。



V. 11 β -HSD1 A. 11 β -HSD2

A. 空白基质 (blank matrix) B. 10 nmol · L⁻¹ 混合标准曲线溶液 (10 nmol · L⁻¹ mixed standard curve solution)

图 1 代谢酶和转运体丰度的 LC-MS/MS 测定专属结果

Fig. 1 Specific results for LC-MS/MS determination of metabolic enzyme and transporter abundance

2.5.4 稳定性 按照“2.4.2”项下方法配制混合低、中和高浓度质控溶液,每个浓度平行3份。分别于-20℃和室温冻融循环3次后取出,并于室温下保存至少4 h后进样分析;对于短期和长期稳定性,分别于-20℃冷冻保存24 h和30 d,取出后于室温下保存至少4 h后进样分析。溶液稳定的标准为每个浓度水平平均浓度准确性在理论浓度的85%~115%。

结果如表8、9所示,短期稳定性、长期稳定性和冻融稳定性的混合低、中和高浓度质控溶液都在标示值的 $\pm 15\%$ 以内,证明溶液稳定性良好。

2.6 样品检测结果

2.6.1 酶和转运体蛋白丰度测定结果 利用上述分析方法对不同胎盘样品进行检测,样品蛋白丰度($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)采用如下公式进行计算:

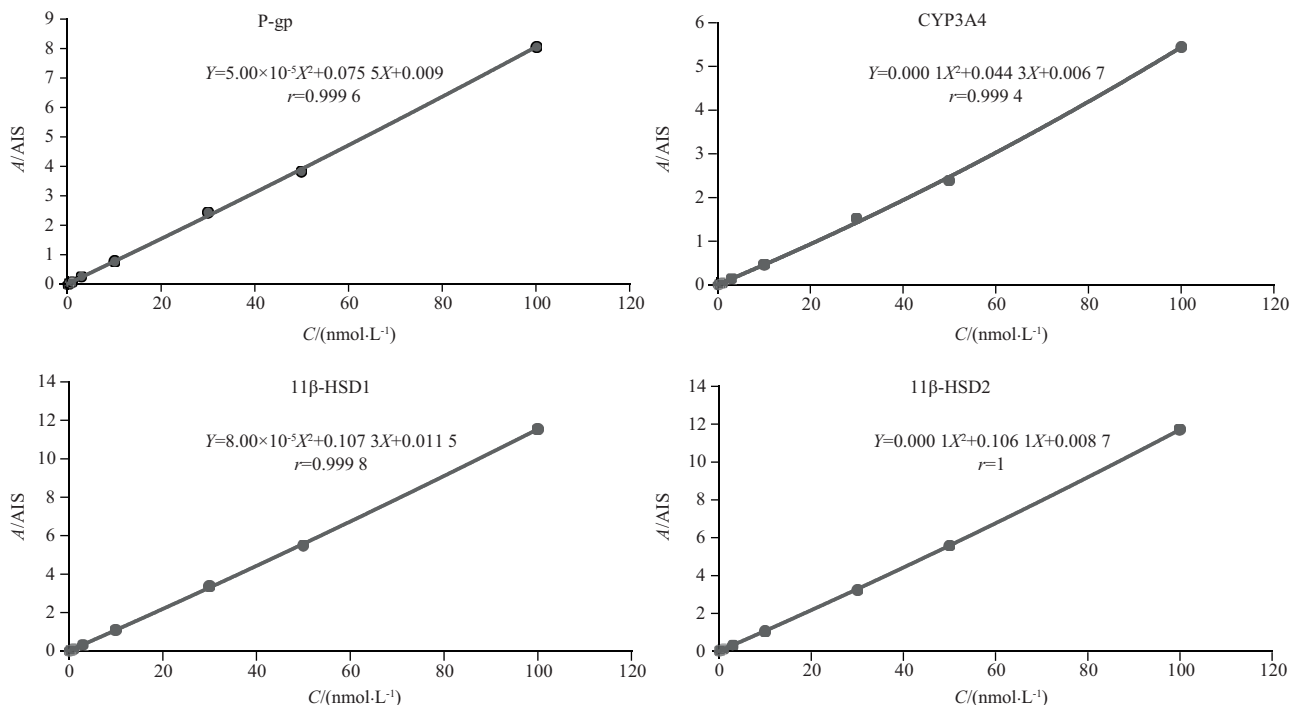


图2 CYP3A4、11β-HSD1、11β-HSD2和P-gp的LC-MS/MS测定标准曲线

Fig. 2 Standard curves of LC-MS/MS determination of CYP3A4, 11β-HSD1, 11β-HSD2 and P-gp

表7 目标肽段日间准确度和精密度结果

Tab. 7 Target peptide inter-day accuracy and precision results

蛋白质 (protein)	准确度 (accuracy) / %			精密度 (precision) / %		
	混合低浓度 质控溶液 (mixed low concentration quality control solution)	混合中浓度 质控溶液 (mixed medium concentration quality control solution)	混合高浓度 质控溶液 (mixed high concentration quality control solution)	混合低浓度 质控溶液 (mixed low concentration quality control solution)	混合中浓度 质控溶液 (mixed medium concentration quality control solution)	混合高浓度 质控溶液 (mixed high concentration quality control solution)
CYP3A4	99.32 ± 5.80	94.44 ± 2.80	105.51 ± 4.04	10.66 ± 1.45	3.46 ± 1.37	2.64 ± 1.11
P-gp	100.67 ± 4.86	94.35 ± 1.74	100.36 ± 4.50	7.66 ± 3.47	2.95 ± 1.12	2.84 ± 1.27
11β-HSD1	103.59 ± 3.00	99.80 ± 3.37	100.55 ± 3.52	11.39 ± 3.36	6.03 ± 6.39	1.93 ± 0.16
11β-HSD2	93.56 ± 7.57	91.04 ± 1.25	102.14 ± 1.39	5.64 ± 0.92	1.51 ± 0.75	2.22 ± 0.31

注 (note): 表中的数据是 3 个批次, 每个批次各 6 个平行的平均值 ± SD 结果 (the data in the table are the average ± SD results of 6 parallel values for each of 3 batches)

样品蛋白丰度 = 测定浓度 × 体积 × 稀释倍数 × 1 000/组织质量

使用 R 语言 (V 4.0.1) 软件对样品检测结果数据进行正态分析、方差齐性分析、非参数检验和事后多重比较等。

对于 CYP3A4 和 11β-HSD1 共检测了 10 个胎盘, 对于 P-gp 和 11β-HSD2 共检测了 12 个胎盘。其中有 7 个胎盘检测了所有酶和转

运体。

通过对样品检测结果的描述性统计分析可知 (表 10), 在中国人足月胎盘中与地塞米松代谢相关的酶和转运体蛋白丰度从高到低分别为 11β-HSD2 (84.46 ± 59.97) pmol · g⁻¹、11β-HSD1 (11.44 ± 3.73) pmol · g⁻¹、CYP3A4 (8.83 ± 2.78) pmol · g⁻¹ 和 P-gp (7.94 ± 4.10) pmol · g⁻¹。图 3 显示了具体的蛋白浓度分布情况。

表 8 短期和长期稳定性结果

Tab. 8 Short – and long – term stability results

蛋白质 (protein)	短期稳定性(short – term stability)/%			长期稳定性(long term stability)/%		
	混合低浓度 质控溶液 (mixed low concentration quality control solution)	混合中浓度 质控溶液 (mixed medium concentration quality control solution)	混合高浓度 质控溶液 (mixed high concentration quality control solution)	混合低浓度 质控溶液 (mixed low concentration quality control solution)	混合中浓度 质控溶液 (mixed medium concentration quality control solution)	混合高浓度 质控溶液 (mixed high concentration quality control solution)
	CYP3A4	87.07 ± 3.83	106.41 ± 4.84	106.59 ± 7.12	88.05 ± 4.66	107.22 ± 5.12
P – gp	107.18 ± 10.69	99.65 ± 2.57	98.87 ± 1.27	113.29 ± 19.90	100.61 ± 4.24	99.54 ± 0.58
11β – HSD1	98.17 ± 2.02	102.25 ± 1.30	101.01 ± 0.68	101.06 ± 2.81	101.75 ± 1.47	100.76 ± 0.79
11β – HSD2	102.68 ± 14.20	102.90 ± 2.29	102.97 ± 0.85	93.56 ± 8.46	102.69 ± 0.25	98.46 ± 0.64

表 9 冻融稳定性结果

Tab. 9 Freeze – thaw stability results

蛋白质 (protein)	冻融稳定性(freeze – thaw stability)/%		
	混合低浓度质控溶液 (mixed low concentration quality control solution)	混合中浓度质控溶液 (mixed medium concentration quality control solution)	混合高浓度质控溶液 (mixed high concentration quality control solution)
CYP3A4	102.74 ± 1.56	113.18 ± 4.91	85.43 ± 3.72
P – gp	112.52 ± 11.77	101.83 ± 1.99	99.45 ± 0.91
11β – HSD1	99.28 ± 4.97	100.41 ± 0.80	101.23 ± 1.38
11β – HSD2	96.27 ± 9.47	101.17 ± 0.31	97.19 ± 1.40

注(note):表中的数据是3个平行的平均值 ± 标准偏差(The data in the table are three parallel mean ± SD)

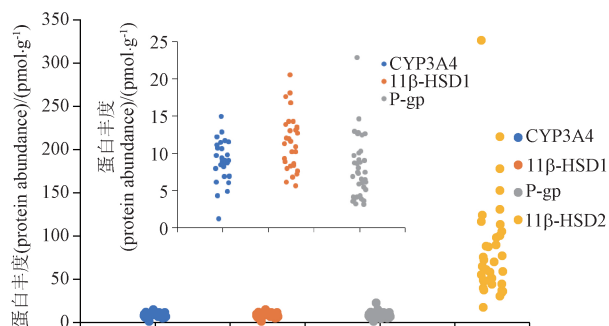


图 3 中国孕妇孕晚期胎盘中 CYP3A4、11β – HSD1、11β – HSD2 和 P – gp 蛋白丰度结果 ($n = 10$)

Fig. 3 Results of protein abundance of CYP3A4, 11β – HSD1, 11β – HSD2 and P – gp in the placenta of Chinese pregnant women in the third trimester

2.6.2 不同取样部位酶和转运体蛋白丰度比对 将胎盘中各个酶和转运体不同取样部位 A、B、C 的蛋白丰度进行比较,考察它们在胎盘不同部位的分布是否有显著性差异。P – gp 的取样部位 C、11β – HSD1 的取样部位 C、11β – HSD2 取样部位 A

和 C 的 $P < 0.05$,是非正态的,其余均符合正态分布。对数值进行 lg 或者 ln 转换后,再进行正态性检验,P – gp 和 11β – HSD1 全部正态,11β – HSD2 非正态;进行方差齐性检验,P – gp、CYP3A4 和 11β – HSD1 3 组方差的 $P > 0.05$,均为齐性;对 P – gp、CYP3A4 和 11β – HSD1 进行事后多重比较,选择常用的 Tukey、LSD 和 Bonferroni 方法,结果显示,P – gp、CYP3A4 和 11β – HSD1 各组内不同取样位置的 A、B、C 检测结果 $P > 0.05$,均无显著性差异(表 11);对 11β – HSD2 进行非参数检验,结果 $P > 0.05$,未见显著性差异(表 12)。

综上所述,P – gp、CYP3A4、11β – HSD1 和 11β – HSD2 在胎盘不同部位的分布无显著性差异,可以不用考虑取样部位对检测结果的影响,这一结果也与白人胎盘的统计结果一致。

2.6.3 国内外胎盘 P – gp 丰度比对 将文献[13] 中白人人群孕晚期胎盘 P – gp 丰度数据与本研究实测的中国孕晚期胎盘丰度数据 ($n = 12$) 进行比较,

表 10 中国孕妇孕晚期胎盘中 P-gp、CYP3A4、11 β -HSD1 和 11 β -HSD2 分析数据
 Tab. 10 Analysis data of P-gp, CYP3A4, 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2 in the placenta of Chinese pregnant women in the third trimester

酶和转运体 (enzymes and transporters)	中位数[25%,75%] (median[Q1,Q3])/ (pmol·g ⁻¹)	平均值±标准差 (mean±SD)/ (pmol·g ⁻¹)	RSD/ %	范围 (range)/ (pmol·g ⁻¹)	样本数 (number of samples)
CYP3A4	8.91[7.17,10.66]	8.83±2.78	31.5	1.12~14.90	10.00
11 β -HSD1	11.41[8.41,13.46]	11.44±3.73	32.6	5.57~20.48	10.00
P-gp	7.32[4.88,9.74]	7.94±4.10	51.7	3.03~22.79	12.00
11 β -HSD2	67.41[47.01,101.66]	84.46±59.97	71.0	17.51~326.41	12.00

表 11 事后多重比较结果
 Tab. 11 Post hoc multiple comparison results

蛋白种类 (protein type)	因变量 (dependent variable)		蛋白(I) [protein(I)]	蛋白(J) [protein(J)]	标准误差 (standard error)	显著性 (signifi- cance)	95% 置信区间 (95% confidence interval)			
							[下限(lower), 上限(upper)]			
P-gp	DVLG	Tukey HSD	A	B	0.088 76	0.801	[-0.161 3,0.274 3]			
				C	0.088 76	0.649	[-0.138 5,0.297 0]			
			B	A	0.088 76	0.801	[-0.274 3,0.161 3]			
				C	0.088 76	0.965	[-0.195 1,0.240 5]			
		LSD	A	B	0.088 76	0.529	[-0.124 0,0.237 1]			
				C	0.088 76	0.378	[-0.101 3,0.259 8]			
			B	A	0.088 76	0.529	[-0.237 1,0.124 0]			
				C	0.088 76	0.800	[-0.157 9,0.203 3]			
	Bonferroni	A	B	0.088 76	1.000	[-0.167 3,0.280 4]				
			C	0.088 76	1.000	[-0.144 6,0.303 1]				
			B	A	0.088 76	1.000	[-0.280 4,0.167 3]			
				C	0.088 76	1.000	[-0.201 2,0.246 6]			
		C	A	0.088 76	1.000	[-0.303 1,0.144 6]				
			B	0.088 76	1.000	[-0.246 6,0.201 2]				
			CYP3A4	DV	Tukey HSD	A	B	1.218 243	0.958	[-2.678 9,3.362 1]
							C	1.218 243	0.232	[-0.977 9,5.063 1]
B	A	1.218 243	0.958			[-3.362 1,2.678 9]				
	C	1.218 243	0.357			[-1.319 5,4.721 5]				
LSD	A	B	1.218 243		0.357	[-4.721 5,1.319 5]				
		C	1.218 243		0.232	[-5.063 1,0.977 9]				
	B	A	1.218 243		0.781	[-2.158 0,2.841 2]				
		C	1.218 243		0.105	[-0.457 0,4.542 2]				
C	A	B	1.218 243	0.781	[-2.841 2,2.158 0]					
		C	1.218 243	0.174	[-0.798 6,4.200 6]					
	A	B	1.218 243	0.105	[-4.542 2,0.457 0]					
		C	1.218 243	0.105	[-4.542 2,0.457 0]					

表 11(续)

蛋白种类 (protein type)	因变量 (dependent variable)		蛋白(I) [protein(I)]	蛋白(J) [protein(J)]	标准误差 (standard error)	显著性 (significance)	95% 置信区间 (95% confidence interval)	
							[下限(lower), 上限(upper)]	
11β-HSD1	DVLG	Bonferroni	A	B	1.218 243	0.174	[-4.200 6, 0.798 6]	
				B	1.218 243	1.000	[-2.767 9, 3.451 1]	
				C	1.218 243	0.315	[-1.066 9, 5.152 1]	
			B	1.218 243	1.000	[-3.451 1, 2.767 9]		
			C	1.218 243	0.522	[-1.408 5, 4.810 5]		
			C	1.218 243	0.315	[-5.152 1, 1.066 9]		
		Tukey HSD	A	B	0.065 03	0.913	[-0.134 8, 0.187 7]	
				C	0.065 03	0.484	[-0.085 5, 0.236 9]	
				B	0.065 03	0.913	[-0.187 7, 0.134 8]	
			C	A	0.065 03	0.732	[-0.111 9, 0.210 5]	
				A	0.065 03	0.484	[-0.236 9, 0.085 5]	
				B	0.065 03	0.732	[-0.210 5, 0.111 9]	
	LSD	A	B	C	0.065 03	0.255	[-0.057 7, 0.209 1]	
				A	0.065 03	0.688	[-0.107 0, 0.159 8]	
				C	0.065 03	0.455	[-0.084 1, 0.182 7]	
			C	A	0.065 03	0.255	[-0.209 1, 0.057 7]	
				B	0.065 03	0.455	[-0.182 7, 0.084 1]	
				A	0.065 03	1.000	[-0.139 6, 0.192 4]	
		Bonferroni	B	C	A	0.065 03	0.764	[-0.090 3, 0.241 7]
					A	0.065 03	1.000	[-0.192 4, 0.139 6]
					C	0.065 03	1.000	[-0.116 7, 0.215 3]
			C	A	B	0.065 03	0.764	[-0.241 7, 0.090 3]
					B	0.065 03	1.000	[-0.215 3, 0.116 7]
					C	25.114	0.621	[-63.621, 38.570]

注 (note): DVLG. 经对数转换后的观测值(log-transformed observations); Tukey HSD. 杜凯氏差距(Tukey's difference); LSD: 最小显著性差异法(least significant difference method); Bonferroni. 一种多重检验矫正方法(a multiple-test correction method)。

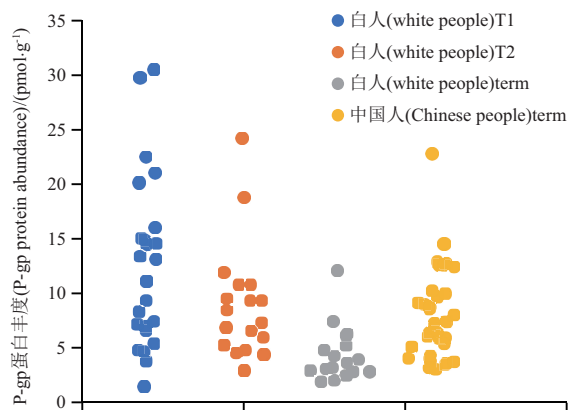
表 12 假设检验总结

Tab. 12 Hypothesis test summary

零假设(null hypothesis)	检验(test)	显著性(significance)	结论(decision)
DV 在胎盘不同部位中的分布是相同的 (the distribution of DV is the same across categories of LC)	独立样本 Kruskal - Wallis 检验 (independent Samples Kruskal - Wallis Test)	0.947	保留零假设 (retain the null hypothesis)

考察二者之间是否有显著性差异(图 4)。白人数据的 $P < 0.05$, 不符合正态, 对其进行对数转换; 对数转换后, 2 组数据 $P > 0.05$, 均符合正态分布; 2 组数据方差 $P > 0.05$, 均为齐性; 用独立样本 T 检验,

$P < 0.05$, 2 组有显著性差异(表 13)。以上数据说明中国人胎盘 P-gp 丰度与白人胎盘 P-gp 丰度存在着显著性差异, 白人胎盘的 P-gp 丰度数据不能直接替代中国人胎盘的 P-gp 丰度数据。



T1. 孕早期 (first trimester) T2. 孕中期 (second trimester) term. 足月期 (term)

图4 白人不同妊娠期 P-gp 蛋白丰度和中国人孕晚期 P-gp 蛋白丰度

Fig. 4 P-gp protein abundance in whites at different gestational stages and Chinese in third trimester

3 讨论

本研究利用靶向蛋白组学方法对中国孕妇胎盘中地塞米松相关代谢酶和转运体的蛋白丰度进行了定量测定,该方法不依赖于蛋白质标准品的可用性。通过本研究表明相关代谢酶和转运体在胎盘的不同部位的分布没有显著差异,但中国人孕晚期胎盘处的 P-gp 丰度和白人胎盘处的 P-gp 丰度存在着显著差异。

本研究中关于流动相的组成最初选用 A 相 (0.2% 甲酸-水) 和 B 相 (0.2% 甲酸-乙腈) 进行梯度洗脱。该条件下低浓度标准曲线样品无法准确定量,因此考虑在流动相中加入促进多肽质谱响应的试剂乙二醇。经过对比分析该方法并不能有效提高目标肽段的响应,随后利用独立液相泵于柱后恒速输入含有乙二醇的乙腈溶液,结果质谱响应有明显

表 13 中外孕妇胎盘 P-gp 蛋白丰度独立样本 T 检验结果

Tab. 13 Post hoc multiple comparison results Independent sample T-test results of placental P-gp protein abundance in Chinese and foreign pregnant women

统计量	方差 (双侧) [variance (2-tailed)]	均值差值 (mean difference)	标准误差值 (standard error difference)	差值的 95% 置信区间
				(95% confidence interval of the difference) [下限 (lower), 上限 (upper)]
DVLG 假设方差相等 (equal variances assumed)	0.000	0.291 19	0.069 10	[0.149 42, 0.432 97]
假设方差不相等 (equal variances not assumed)	0.000	0.291 19	0.063 65	[0.160 49, 0.421 90]

提升,经过不同浓度乙二醇比例的测试,最终确定 0.5% 乙二醇作为 C 相进行目标肽段的分析。

本研究对于代谢酶和转运体蛋白丰度定量方法仍然存在一定局限性,首先本研究假设所有酶和转运体都存在于合体滋养层细胞膜上,且都具有活性^[14],但一些其他类型的胎盘细胞(比如内皮细胞)上也存在一些酶或转运体^[15],因此,本研究检测方法得到的结果可能会高估合体滋养层细胞膜上的酶和转运体。此外,代谢酶或转运体的活性不一定和蛋白表达水平完全一致,因此后期也需要结合多种酶活测定方法对本研究结论进行补充和印证。再有,本研究中胎盘样品都是足月的,缺乏孕早期和孕中期等不同妊娠阶段的胎盘样品,无法考察妊娠发育动力学对胎盘中酶和转运体丰度含量变化的影响。此外,本研究只选取了 1 条肽段进行定量,后续可进一步考察其他特征肽段的选取对样品定量的影响。尽管仍有不足,本研究所建立的

策略和分析方法能够用于 4 种涉及地塞米松转运和代谢相关的酶和转运体蛋白丰度的绝对定量分析,可为类似研究提供参考和依据。

4 结论

本研究建立了人胎盘中 11 β -HSD1、11 β -HSD2、CYP3A4 和 P-gp 靶向蛋白组学定量分析方法,该方法专属性强,灵敏度高,方法学验证结果显示该方法能够用于中国孕妇胎盘中 4 种蛋白绝对丰度的测定。样品测定结果显示中国孕妇孕晚期胎盘样品中各代谢酶和转运体在不同部位的分布没有显著差异,但中国人足月胎盘中 P-gp 的丰度略高于白人足月胎盘中 P-gp 的丰度,且二者存在着显著性差异。

参考文献

- [1] HALLMAN M, GLUMOFF V, RÄMET M. Surfactant in respiratory distress syndrome and lung injury[J]. Comp Biochem Physiol A

- Mol Integr Physiol, 2001, 129(1): 287
- [2] SWEET DG, CARNIELLI V, GREISEN G, *et al.* European Consensus Guidelines on the management of respiratory distress syndrome—2019 update[J]. *Neonatology*, 2019, 115 (4): 432
- [3] EGERMAN RS, MERCER BM, DOSS JL, *et al.* A randomized, controlled trial of oral and intramuscular dexamethasone in the prevention of neonatal respiratory distress syndrome[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 179(5): 1120
- [4] THEOGARAJ E, JOHN CD, CHRISTIAN HC, *et al.* Perinatal glucocorticoid treatment produces molecular, functional, and morphological changes in the anterior pituitary gland of the adult male rat[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11):4804
- [5] CHARNVISES S, FENCL MD, OSATHANONDH R, *et al.* Adrenal steroids in maternal and cord blood after dexamethasone administration at midterm[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 61(6): 1220
- [6] SCHMIDT AF, KEMP MW, MILAD M, *et al.* Oral dosing for antenatal corticosteroids in the Rhesus macaque[J]. *PLoS One*, 2019, 14(9):e0222817
- [7] MARK PJ, WADDELL BJ. P-glycoprotein restricts access of cortisol and dexamethasone to the glucocorticoid receptor in placental BeWo cells[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(11): 5147
- [8] REBUFFAT AG, TAM S, NAWROCKI AR, *et al.* The 11-ketosteroid 11-ketodexamethasone is a glucocorticoid receptor agonist[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 214(1-2): 27
- [9] TOMLINSON ES, LEWIS DF, MAGGS JL, *et al.* *In vitro* metabolism of dexamethasone (DEX) in human liver and kidney: the involvement of CYP3A4 and CYP17 (17, 20 LYASE) and molecular modelling studies[J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54(5): 605
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248
- [11] NAKAMURA K, HIRAYAMA - KUROGI M, ITO S, *et al.* Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM[J]. *Proteomics*, 2016, 16(15-16): 2106
- [12] 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
- [13] ANOSHCHENKO O, PRASAD B, NERADUGOMMA NK, *et al.* Gestational age-dependent abundance of human placental transporters as determined by quantitative targeted proteomics[J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48(9): 735
- [14] JOSHI AA, VAIDYA SS, ST-PIERRE MV, *et al.* Placental ABC transporters: biological impact and pharmaceutical significance[J]. *Pharm Res*, 2016, 33(12): 2847
- [15] LEE N, HEBERT MF, WAGNER DJ, *et al.* Organic cation transporter 3 facilitates fetal exposure to metformin during pregnancy[J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(4): 1125

(本文于2024年1月17日修改回)