

P-糖蛋白在健康猪肝脏、肾脏和肠组织中的分布及其 mRNA 相对转录水平

董玲玲¹, 郭荔¹, 戴小华^{1,2}, 孙勇¹, 王丽平^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 本研究旨在探讨 P-糖蛋白(P-gp)在健康仔猪肝脏、肾脏和肠组织中的分布及 mRNA 相对转录水平的差异。选用 5 头 60 日龄健康三元杂交仔猪, 采用免疫组织化学方法对猪肠道、肝脏和肾脏中的 P-gp 定位; *gapdh* 为看家基因, 采用 Real-time RT-PCR 方法检测 *mdr1* 基因在健康仔猪十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、肝脏和肾脏中的 mRNA 转录水平。结果表明: P-gp 在肝脏主要分布于肝细胞间的胆小管膜; 在肾脏主要分布于近端小管和远端小管细胞膜上; 在小肠主要位于肠绒毛上皮细胞顶端及小肠腺腔面上皮细胞顶端; 在大肠中主要分布于黏膜上皮细胞顶端和大肠腺上皮细胞顶端。*mdr1* 在检测组织中均有转录, 其转录量由高到低依次为回肠、结肠、肝脏、空肠、十二指肠、直肠、盲肠和肾脏。其中回肠转录量最高, 且与十二指肠、直肠相比差异显著($P=0.017$ 、 $P=0.014$), 与盲肠和肾脏相比差异极显著($P=0.005$ 、 $P=0.001$); *mdr1* 在空肠、结肠和肝脏中的相对转录量与肾脏相比差异显著($P=0.046$ 、 $P=0.018$ 、 $P=0.030$)。结果提示 P-gp 在健康仔猪肝脏、肾脏和小肠组织中的分布和表达可能对一些口服药物的体内过程产生影响, 因此猪临床用药时应充分考虑 P-gp 介导的药物间相互作用及对口服药物生物利用度的影响。

关键词: 仔猪; P-gp; *mdr1*; 免疫组化; real-time RT-PCR

中图分类号: R969; S859.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)09-1454-08

Distribution and Relative mRNA Transcription Level of P-gp in Liver, Kidney and Intestines of Piglet

DONG Ling-ling¹, GUO Li¹, DAI Xiao-hua^{1,2}, SUN Yong¹, WANG Li-ping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the distribution of P-gp and the transcription level of *mdr1* mRNA in liver, kidney and intestines of healthy piglets. Five crossbred pigs (Large white × Landrace × Duroc) of approximately 9 weeks of age with an average body weight of 20 kg were used. The localization of P-gp in healthy piglets was studied by immunohistochemistry method. And real-time RT-PCR method was used with *gapdh* as house-keeping gene to detect the transcription level of *mdr1* mRNA. Immunocytochemical method using specific monoclonal and polyclonal antibodies against P-gp confirm high expression in liver, intestines and kidney of the porcine. In the porcine liver, only the apical membrane of the epithelial cells in the bile ducts was positive. In the kidney, immunoreactivity is obvious in the proximal and distal tubules. In

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(30972220); 国家大学生创新性实验计划(111030738); 江苏省自然科学基金(BK2012771); 中央高校基本科研业务费资助项目(KYZ201105)

作者简介: 董玲玲(1988-), 女, 山东临沂人, 硕士, 主要从事兽医药理学与毒理学研究, E-mail: donglingling20062008@126.com

* 通信作者: 王丽平, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医药理及毒理学研究, E-mail: wlp71@163.com

the intestines, P-gp was localized in the apical membranes of the enterocytes and the epithelial cells of intestinal gland. The transcription level of *mdr1* mRNA ranked from high to low in all tissues was ileum, colon, liver, jejunum, duodenum, rectum, cecum and kidney. The *mdr1* mRNA transcription level of ileum was obviously higher than those of cecum and kidney ($P=0.005$, $P=0.001$) and significantly higher than those of duodenum and rectum ($P=0.017$, $P=0.014$). Also the transcription level of *mdr1* mRNA of kidney was significantly lower than those of jejunum, colon and liver respectively ($P=0.046$, $P=0.018$, $P=0.030$). The results indicate that P-gp could be detected in all test tissues, but the *mdr1* transcription level is different. The high expression level of P-gp in ileum and liver could play an important role in drug disposition in body and induce drug-drug interaction in clinic.

Key words: piglets; P-gp; *mdr1*; immunohistochemistry; real-time RT-PCR

P-糖蛋白(p-glycoprotein, P-gp)由 *mdr1* 基因编码^[1],首次在耐药的中國仓鼠卵巢细胞中发现^[2],是 ABC 转运家族中第 1 个被发现的与肿瘤细胞多药耐药相关的蛋白。P-gp 除了在癌细胞中高表达介导肿瘤细胞的耐药外,在机体正常的器官和组织中也有分布。人和鼠的研究结果显示 P-gp 主要定位于具有分泌和排泄功能的细胞上皮,如人肝脏的胆总管、肾脏的肾小管、胃肠道黏膜上皮细胞、肾上腺上皮细胞、心脏内皮细胞、血脑屏障和血脑屏障的毛细血管内皮以及妊娠子宫内胎膜滋养层细胞等^[3-4],可对内源性或是外源性底物化合物的吸收、分布、代谢及排泄产生影响。P-gp 能识别和转运许多化学结构与相对分子质量差别很大的物质,包括抗菌药物、抗病毒药、抗癌药物、免疫抑制剂、抗心律失常药等^[5-6]。P-gp 不仅是介导肿瘤细胞对化疗药产生耐药的关键因子,同时对一些口服药物的吸收和分布起重要调节作用,是决定一些底物药物口服生物利用度至关重要的因素。故在临床药物治疗学中,研究机体肠道 P-gp 的表达和功能是非常必要的。

关于 P-gp 的研究主要集中在人类和啮齿类动物,结果显示 P-gp 在人和啮齿类动物中的表达量及调控存在物种差异。目前食品动物的相关研究较少,缺乏对 P-gp 较全面的认识,尤其猪组织中 P-gp 的分布、表达、功能以及调控的数据非常有限,而猪体内的 P-gp 在药物的药动学过程中扮演着重要的角色,对猪临床用药及新药开发具有一定的指导作用。因此,本文拟采用免疫组化和 real-time RT-PCR 方法研究猪主要吸收和代谢器官中 P-gp 的分布和 mRNA 转录情况,该结果可为食品动物组织中 P-gp 的进一步研究提供数据,同时可为兽医临床合理用药及兽药新剂型的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验动物

5 头 60 日龄健康三元仔猪,体重为 19~21 kg,购于青龙山动物繁殖基地,以无抗生素全价饲料饲养,自由饮水。

1.2 主要试剂与药品

SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒和生物素标记羊抗鼠 IgG(博士德,武汉),Rabbit anti-MDR1 多克隆抗体(博奥森,北京),Purified Monoclonal Antibody against P-glycoprotein (C219)(Covance,美国),苏木素染液(鼎国,南京),RNAiso™ Plus 总 RNA 提取试剂(Takara,大连),M-MLV(Promega,美国),PCR Master Mix(天根,南京),SYBY Green real-time PCR Master Mix(东洋纺,日本)等。

1.3 样本采集及处理

动物处死后,迅速采集十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、肝脏及肾脏,用生理盐水冲洗,一部分样品修剪后固定于 10% 中性甲醛,用石蜡包埋;剩余样品置液氮速冻后转入 -70 ℃ 冰箱长期保存,用于提取总 RNA。

1.4 免疫组织化学方法检测 P-gp 在猪组织中的定位

常规法制备组织石蜡切片,厚度为 5 μm,免疫组织化学反应步骤参照博士德 SABC 试剂盒产品说明书进行,试验同时设阴性对照,用 PBS 代替一抗。肝脏和肾脏切片一抗为单抗(C219),二抗为山羊抗鼠 IgG,肠组织切片一抗为博奥森兔抗 MDR1 多克隆抗体,二抗为山羊抗兔 IgG,其余步骤相同。

1.5 肝脏、肾脏和肠道中 *mdr1* mRNA 相对转录量的测定

1.5.1 组织总 RNA 的提取 按照 RNAiso 说明书的步骤提取总 RNA, 运用微量分光光度计测量其浓度及纯度 ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0)。取 2 μg RNA 以 1% 变性琼脂糖电泳, 若条带清晰, 28S : 18S 为 2 : 1, 且无拖尾, 表明 RNA 无降解, 可进行反转录。

1.5.2 样品 cDNA 的合成 25 μL 反转录反应体系: 4 μL 总 RNA (2 μg)、2 μL 随机引物 (0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、2 μL DEPC 水、2 μL dNTP (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。75 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰浴冷却, 然后加入 0.5 μL M-MLV (200 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、0.2 μL Inhibitor (40 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、5 μL 5 \times buffer、9.3 μL DEPC 水, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。cDNA 合成后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.5.3 *mdr1* mRNA 在猪不同组织中的相对转录定量 参照文献^[7]合成内参基因 *gapdh* 引物, F: 5'-GAAGGTCGGAGTGAACGGAT-3', R: 5'-CATGGGTAGAATCATACTGGAACA-3', 产物长度为 149 bp。根据 GenBank 中猪 *mdr1* (序列号: AY825267) 核苷酸序列, 设计 *mdr1* 的荧光定量的引物, F: 5'-AAACACCACGGGAGCAT-3', R: 5'-AGTGTTAGTTGCCAGCCAT-3', 产物长度为

153 bp, 由上海皓嘉公司合成。

采用 SYBR Green 法对健康仔猪肝脏、肾脏和肠组织中的 *mdr1* mRNA 的转录进行相对定量。反应体系 (25 μL): SYBY Green real-time PCR Master Mix 12.5 μL , 灭菌三蒸水 8.5 μL , 上、下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), cDNA 模板 2 μL 。PCR 扩增采用两步法: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 31 s, 40 个循环。每个样品均 3 次重复, 同时设置空白对照。反应结束后, 运行程序绘制荧光扩增曲线和熔解曲线, 相对定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[8]进行计算。

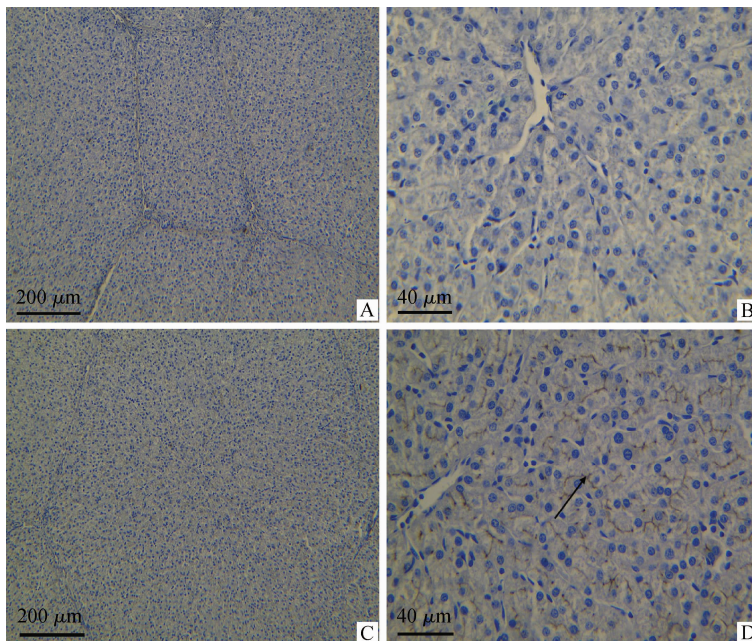
1.6 数据统计与分析

应用 SPSS 16.0 软件对均数进行单因素方差分析 (one way ANOVA, LSD), 结果以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。

2 结果

2.1 P-gp 在健康仔猪组织中的分布

2.1.1 P-gp 在仔猪肝脏中的分布 低倍镜下观察, 猪肝脏的肝小叶分界明显, 呈不规则的多边形, 高倍镜下能清楚地观察到肝小叶中间的中央静脉及中央静脉周围呈放射状排列的肝细胞板。用单克隆抗体 C219 与猪肝脏的 P-gp 进行反应, 发现 P-gp 的阳性反应主要发生在肝细胞间的胆小管膜 (图 1)。



A 和 B. 猪肝脏阴性对照; C 和 D. P-gp 的阳性反应。箭头所示为阳性

A and B. Negative control; C and D. Positive reaction of P-gp in liver; Arrow shows the positive reaction of P-gp

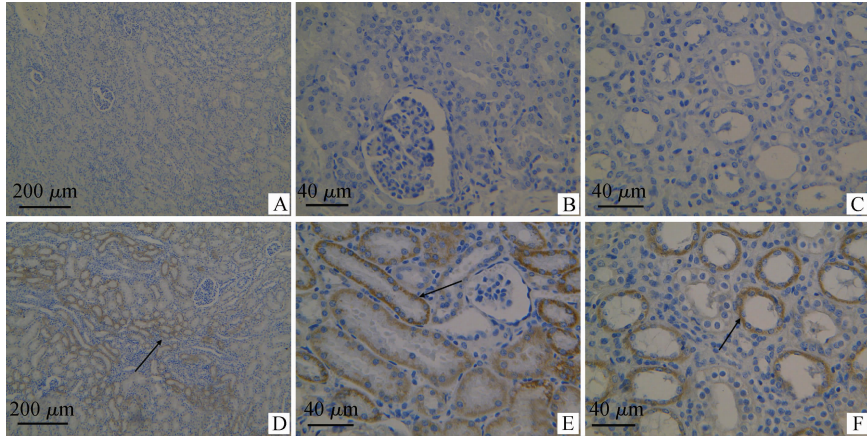
图 1 P-gp 在健康仔猪肝脏中的分布

Fig. 1 Immunohistochemistry detection of P-gp in the liver of piglet

2.1.2 P-gp 在仔猪肾脏中的分布 肾脏切片在低倍镜下观察可见完整性良好。高倍镜下可见近端小管的细胞核多呈圆形,偏于细胞基底部,管腔很小或呈封闭状态;远端小管管腔相对较大且规则,细胞核成圆形靠近细胞腔面。运用免疫组织化学的方法对 P-gp 进行定位发现,P-gp 在肾脏主要定位于近端小管和远端小管细胞膜(图 2)。

2.1.3 P-gp 在仔猪小肠中的分布 P-gp 在十二指肠主要分布于肠绒毛上皮柱状细胞顶端及肠腺

腔面细胞顶端(图 3)。在空肠,低倍镜下可见 P-gp 主要定位于空肠绒毛上皮,在肠腺中也有弱阳性反应;高倍镜下可见 P-gp 主要定位于空肠绒毛上皮细胞顶端,在肠腺主要定位于靠近腔面的细胞顶端(图 4)。在回肠,低倍镜下可见 P-gp 在肠绒毛和肠腺均有定位,并且呈现出强烈的阳性反应,表达量高于肠段其它部位;高倍镜下观察,P-gp 在小肠绒毛主要定位于上皮细胞顶端及细胞核下方的胞膜上,在小肠腺主要定位于腔面细胞的顶端(图 5)。

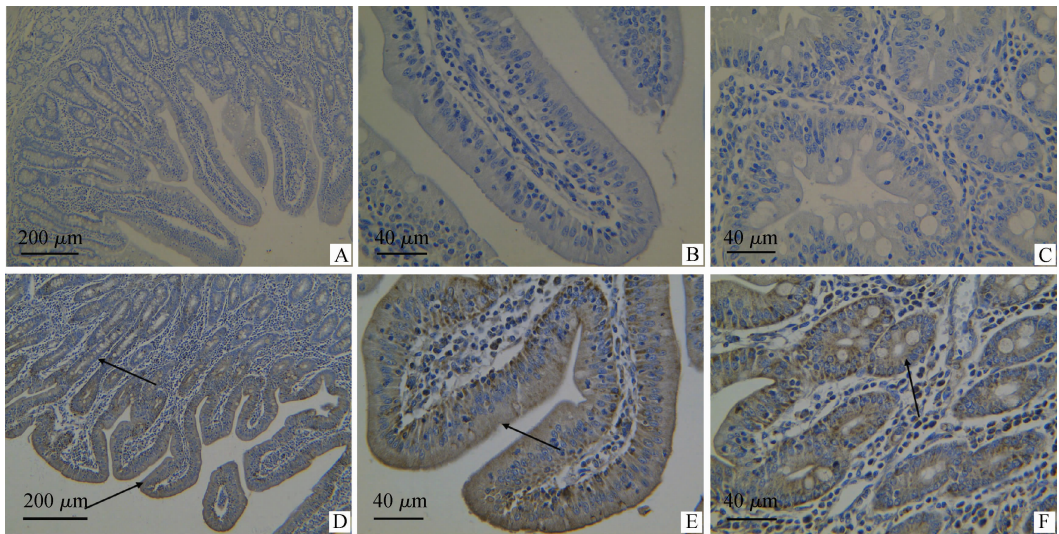


A 和 B(近端小管)、C(远端小管). 猪肾脏阴性对照;D 和 E(近端小管)、F(远端小管). P-gp 的阳性反应,箭头所示为阳性

A and B (proximal tubule), C (distal tubule). Negative control; D and E (proximal tubule), F (distal tubule). Positive reaction of P-gp, arrow shows the positive reaction of P-gp

图 2 P-gp 在健康仔猪肾脏中的分布

Fig. 2 Immunohistochemistry detection of P-gp in the kidney of piglet

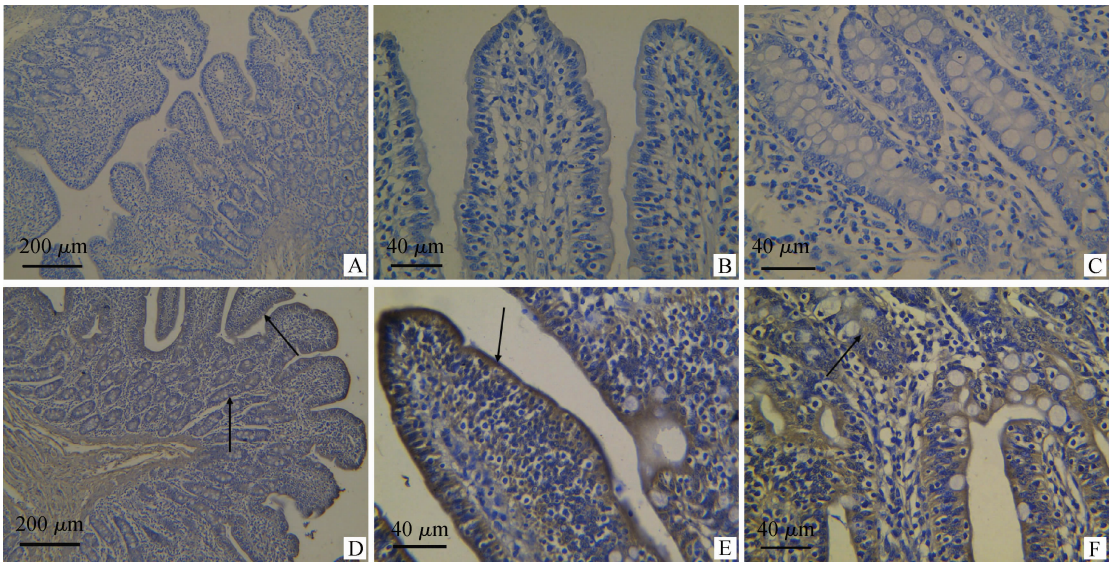


A 和 B(小肠绒毛)、C(小肠腺). 猪十二指肠阴性对照;D 和 E(小肠绒毛)、F(小肠腺). P-gp 的阳性反应,箭头所示为阳性

A and B (intestinal villi), C (intestinal gland). Negative control; D and E (intestinal villi), F (intestinal gland). Positive reaction of P-gp. Arrow shows the positive reaction of P-gp

图 3 P-gp 在健康仔猪十二指肠中的分布

Fig. 3 Immunohistochemistry detection of P-gp in the duodenum of piglet

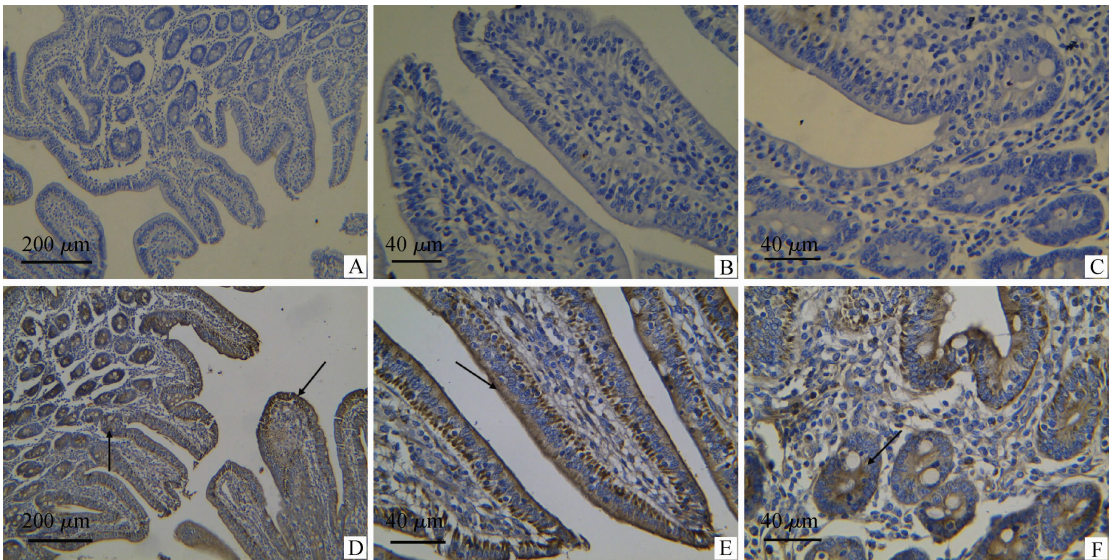


A 和 B(小肠绒毛)、C(小肠腺). 猪空肠阴性对照;D 和 E(小肠绒毛)、F(小肠腺), P-gp 的阳性反应。箭头所示为阳性

A and B (intestinal villi), C (intestinal gland). Negative control; D and E (intestinal villi), F (intestinal gland). Positive reaction of P-gp, arrow shows the positive reaction of P-gp

图 4 P-gp 在健康仔猪空肠中的分布

Fig. 4 Immunohistochemistry detection of P-gp in the jejunum of piglet



A 和 B(小肠绒毛)、C(小肠腺). 猪回肠阴性对照;D 和 E(小肠绒毛)、F(小肠腺). P-gp 的阳性反应,箭头所示为阳性

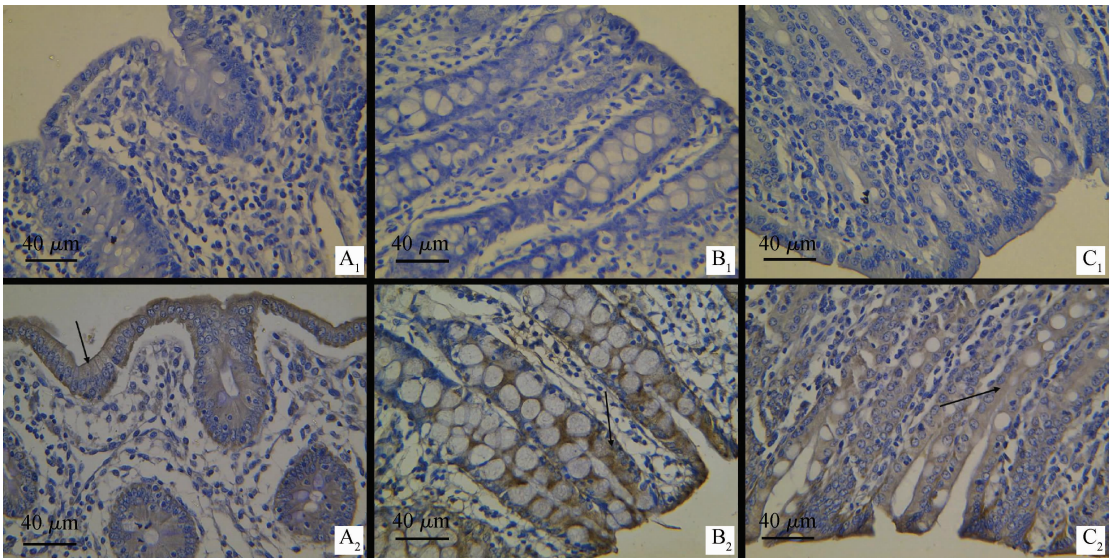
A and B (intestinal villi), C (intestinal gland). Negative control; D and E (intestinal villi), F (intestinal gland). Positive reaction of P-gp, arrow shows the positive reaction of P-gp

图 5 P-gp 在健康仔猪回肠中的分布

Fig. 5 Immunohistochemistry detection of P-gp in the ileum of piglet

2.1.4 P-gp 在猪大肠中的分布 P-gp 在盲肠主要定位于黏膜上皮细胞顶端和盲肠腺腔面细胞顶端;在结肠, P-gp 阳性反应主要见于结肠上皮细胞顶端和结肠腺上皮细胞顶端,且阳性反应比较强烈;

在直肠,高倍镜下可见 P-gp 主要定位于上皮细胞顶端和直肠腺上皮细胞顶端,阳性反应相对较弱(图 6)。



A₁. 猪盲肠阴性; B₁. 猪结肠阴性; C₁. 猪直肠阴性; A₂. 猪盲肠 P-gp 阳性反应; B₂. 猪结肠 p-gp 阳性反应; C₂. 猪直肠 P-gp 阳性反应

A₁. Negative control of cecum; B₁. Negative control of colon; C₁. Negative control of rectum; A₂. Positive reaction of P-gp in cecum; B₂. Positive reaction of P-gp in colon; C₂. Positive reaction of P-gp in rectum

图 6 P-gp 在健康仔猪大肠中的分布

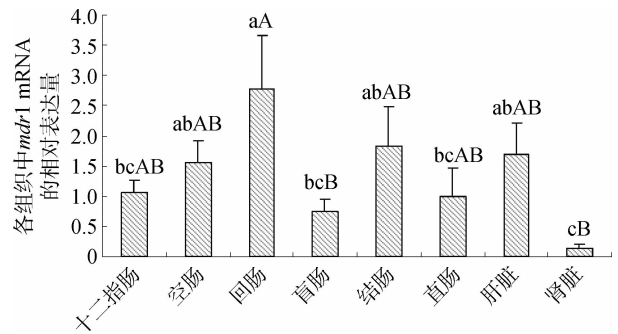
Fig. 6 Immunohistochemistry detection of P-gp in the large intestines of piglet

2.2 *mdr1* mRNA 在正常猪肝脏、肾脏和肠组织中的相对转录水平

mdr1 在健康仔猪肝脏、肾脏和肠组织中均有转录,但转录量存在组织差异性。*mdr1* mRNA 的转录量在各组织中从高到低依次为回肠、结肠、肝脏、空肠、十二指肠、直肠、盲肠和肾脏,其中 *mdr1* 在回肠中的相对转录量与十二指肠、直肠相比差异显著 ($P=0.017$ 、 $P=0.014$),与盲肠和肾脏中 *mdr1* 的相对转录量相比差异极显著 ($P=0.005$ 、 $P=0.001$);空肠、结肠和肝脏中 *mdr1* mRNA 的转录量显著高于在肾脏中的表达水平 ($P=0.046$ 、 $P=0.018$ 、 $P=0.030$)(图 7)。

3 讨论

P-gp 在兽药临床方面 also 具有重要作用,许多应用广泛的兽医临床批准的兽药已证明是 P-gp 的底物,如伊维菌素^[9]、大环内酯类药物和氟喹诺酮类药物^[10]等。P-gp 可以减少细胞对药物的吸收,促进细胞对药物的外排,当有 2 种或 2 种以上 P-gp 的底物或调节剂联用时,还会引起药物相互作用。另外,P-gp 在机体内的分布和表达存在动物种属差异和组织差异,是引起药物种属差异和个体差异的主要因素。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)

Different small letters mean significant differences ($P<0.05$), and different capital letters mean extremely significant differences ($P<0.01$)

图 7 *mdr1* mRNA 在正常猪肝脏、肾脏和各个肠段的相对转录量

Fig. 7 *mdr1* mRNA transcription level in liver, kidney and intestines in health piglets

A. M. Haritova 等^[11]研究了鸡不同组织中 *mdr1* 表达情况,发现 *mdr1* 在鸡的小肠中高表达,其次是结肠,在喙囊、腺胃和盲肠中表达水平较低,在代谢和排泄器官肝脏、肾脏和肺脏中的表达量也很高。J. M. Brady 等^[12]对大鼠 *mdr1a* 的研究发现其在肠道的表达量普遍较高,并且从十二指肠到回肠依次升高,其中回肠表达量最高,大肠其次,而

在肝脏和肾脏中的表达量很低。S. Mouly 等^[13]的研究显示人小肠中 P-gp 表达量从十二指肠到回肠依次提高。E. Tyden 等^[14]采用 RT-PCR 和免疫印迹技术对马 P-gp 进行研究,结果显示 *mdr1* 和 P-gp 在肝脏表达量最高,其次是十二指肠和近端空肠,在回肠、结肠和盲肠表达量迅速降低,肾脏表达量中等。S. Conrad 等^[15]对犬的研究发现:P-gp 在肝脏和肾脏高表达,在空肠中度表达,在十二指肠和结肠低表达。以上数据显示不同种属动物的 P-gp 表达具有明显差异,因此有必要对猪 P-gp 的分布表达进行研究。

本试验中免疫组化结果显示 P-gp 在猪肝脏、肾脏和肠组织中均有分布,并且主要定位于具有分泌和排泄作用的组织上皮细胞顶端,且在各个组织中的阳性反应强度不一,存在组织差异性。这与之前已经报道的关于人^[16]、哺乳动物^[14, 17]及鱼类^[18-19]的研究结果相一致。而 RT-qPCR 结果显示 *mdr1* mRNA 在各个组织中均有转录,同样各组织中的相对转录水平存在差异,其中在小肠、结肠和肝脏中的转录量相对较高,与免疫组化的结果基本一致。组织中表达的 P-gp 在发挥其生理功能的同时会影响到治疗药物的吸收、分布、代谢及排泄过程,进而影响药物的药效。当药物进入胆总管后,定位在胆总管上皮细胞的 P-gp 可将其排入胆汁,促进药物的排泄。定位于小肠的 P-gp 会限制小肠对其底物的吸收,促进对底物的分泌及外排,而猪小肠占腹腔的大部分,长度为体长的 9.5~12.4 倍,平均为 11.5 倍^[20],从侧面反映出 P-gp 在肠道的分布量是巨大的,并且 P-gp 和主要的药物代谢酶 CYP3A4 的底物具有广泛的重叠,二者在药物代谢方面发挥协同作用^[21]。因此推测猪肠道 P-gp 在限制底物药物的吸收方面具有重要的作用,且肝脏及肾脏表达的 P-gp 对底物的排泄也会产生一定作用。

参考文献:

- [1] CHEN C J, CHIN J E, UEDA K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells [J]. *Cell*, 1986, 47(3): 381-389.
- [2] JULIANO R L, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455(1): 152-162.
- [3] GRUBE M, MEYER ZU SCHWABEDISSEN H E, PRAGER D, et al. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart; expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) [J]. *Circulation*, 2006, 113(8): 1114-1122.
- [4] CONSTABLE P A, LAWRENSEN J G, DOLMAN D E, et al. P-Glycoprotein expression in human retinal pigment epithelium cell lines [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(1): 24-30.
- [5] MARZOLINI C, PAUS E, BUCLIN T, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(1): 13-33.
- [6] MULLER F, FROMM M F. Transporter-mediated drug-drug interactions [J]. *Pharmacogenomics*, 2011, 12(7): 1017-1037.
- [7] ZHANG M, XIN L, BAO E, et al. Variation in the expression of Hsp27, alphaB-crystallin mRNA and protein in heart and liver of pigs exposed to different transport times [J]. *Res Vet Sci*, 2011, 90(3): 432-438.
- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] WESTPHAL K, WEINBRENNER A, ZSCHIESCHE M, et al. Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings; a new type of drug/drug interaction [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 68(4): 345-355.
- [10] SCHINKEL A H, WAGENAAR E, MOL C A, et al. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(11): 2517-2524.
- [11] HARITOVA A M, SCHRICKX J, FINK-GREMELS J. Expression of drug efflux transporters in poultry tissues [J]. *Res Vet Sci*, 2010, 89(1): 104-107.
- [12] BRADY J M, CHERRINGTON N J, HARTLEY D P, et al. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(7): 838-844.
- [13] MOULY S, PAINE M F. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine [J]. *Pharm Res*, 2003, 20(10): 1595-1599.

- [14] TYDEN E, TALLKVIST J, TJALVE H, et al. P-glycoprotein in intestines, liver, kidney and lymphocytes in horse [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2009, 32(2): 167-176.
- [15] CONRAD S, VIERTELHAUS A, ORZECOWSKI A, et al. Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1 [J]. *Toxicology*, 2001, 156(2-3): 81-91.
- [16] THIEBAUT F, TSURUO T, HAMADA H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(21): 7735-7738.
- [17] GINN P E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues [J]. *Vet Pathol*, 1996, 33(5): 533-541.
- [18] HEMMER M J, COURTNEY L A, ORTEGO L S. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies [J]. *J Exp Zool*, 1995, 272(1): 69-77.
- [19] KLEINOW K M, DOI A M, SMITH A A. Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish; immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal [J]. *Mar Environ Res*, 2000, 50(1-5): 313-317.
- [20] 闫朝岐, 邹小明, 袁友萍, 等. 猪小肠血管在小肠移植中的解剖研究 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2006, 9(3): 257-259.
- [21] KIRBY B, KHARASCH E D, THUMMEL K T, et al. Simultaneous measurement of in vivo P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activities [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(11): 1313-1319.

(编辑 白永平)