

## siRNA 干扰 Caco-2 细胞鞘磷脂合酶 2 (SMS2) 基因对药物转运体的影响

靳桂英 杨青<sup>△</sup>

(复旦大学生命科学学院生物化学系 上海 200433)

**【摘要】** 目的 研究鞘磷脂合酶 2 (sphingomyelin synthase 2, SMS2) 缺损对人结肠癌细胞 (colon cancer cell, Caco-2) 中药物转运体 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 及多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) 的表达与功能的影响。方法 SMS2 特异性 siRNA 转染至 Caco-2 细胞。采用 RT-PCR 和 real-time PCR 检测 SMS2-特异性 siRNA 的干扰效率; 采用 Western blot 法检测 siRNA 转染后 P-gp 和 MRP2 蛋白表达的变化; 采用胞内蓄积试验, 通过 HPLC 检测 P-gp 及 MRP2 专一性底物罗丹明 123 及普伐他汀的蓄积含量, 分析下调 SMS2 水平对 Caco-2 细胞中 P-gp 及 MRP2 功能的影响。结果 应用 siRNA 下调 SMS2 水平后, P-gp 和 MRP2 的蛋白质水平均显著下调; 胞内蓄积实验结果显示罗丹明 123 及普伐他汀的蓄积量明显增加, 说明 P-gp 和 MRP2 的外排功能减弱。结论 SMS2 基因表达下调对 Caco-2 细胞中 P-gp 和 MRP2 的表达以及功能均有显著影响。

**【关键词】** siRNA 干扰; 鞘磷脂合酶 2 (SMS2); P-糖蛋白 (P-gp); 多药耐药相关蛋白 2 (MRP2)

**【中图分类号】** Q 241 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.05.001

## Effects of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) interefered by siRNA on drug transporters in Caco-2 cells

JIN Gui-ying, YANG Qing<sup>△</sup>

(Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】 Objective** To study the effect of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) defect on the expression and function of drug transporters P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in human colon cancer (Caco-2) cells. **Methods** SMS2-specific siRNA was transfected into Caco-2 cell. RT-PCR and real-time PCR were employed to detect the efficiency of siRNA. Western blot was used to examine the protein expressions of P-gp and MRP2. Intracellular accumulation experiment was carried out to evaluate the effect of SMS2 down-regulation level on the functions of P-gp and MRP2 in Caco-2 cells. HPLC analysis was used to dectect the accumulation amounts of parvastain and rhodamine 123, the specific substrates of P-gp and MRP2. **Results** The expressions of P-gp and MRP2 were down-regulated in SMS2 knockdown cells treated by siRNA. Cellular accumulation experiments revealed that the excretion function of P-gp and MRP2 in SMS2 deficient cells was decreased, as the accumulation of rhodamine 123 and parvastain was increased significantly. **Conclusions** The down-regulation of SMS2 gene on the expression and function of P-gp, MRP2 in Caco-2 cell.

**【Key words】** siRNA interference; sphingomyelin synthase 2 (SMS2); P-glycoprotein (P-gp); multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)

\* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81373396), the Research Fund for the Doctoral Program of High Education of China (20130071110037) and the Key Research Project of biological medicine of Shanghai Committee of Science and Technology (12431900204).

药物转运体(drug transporter)是细胞膜上介导药物跨膜转运的特殊转运蛋白。在药物的吸收、分布和排泄过程中起着重要的作用,其表达异常增高是造成多药耐药现象的重要原因之一<sup>[1]</sup>,严重影响药物的治疗及肿瘤的化疗效果。

人类基因组术语委员会(human gene nomenclature committee, HGNC)根据药物转运体序列的相似性,将其主要分为两大类:溶质转运蛋白(solute carriers, SLC)家族和ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运体家族。SLC家族由43个亚家族组成,共有298个成员,ABC转运体家族由7个亚家族组成,共有49个成员<sup>[2]</sup>。多药耐药蛋白和多药耐药相关蛋白是ABC转运体两种主要的亚家族,其中多药耐药蛋白中的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)及多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)负责多种药物的外排,在肿瘤治疗的多药耐药中扮演重要角色<sup>[3-4]</sup>。因此,研究影响P-gp和MRP2表达和功能的因素对于药物的吸收和分布具有重要影响。

影响药物转运蛋白表达的因素有很多,如细胞因子、细胞应激以及转录因子等。Blokzijl等<sup>[5]</sup>发现炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 89和IL-1 $\beta$ 共同孵育人肠黏膜活体组织会导致MDR1的mRNA表达下降;由各种化学物质和生理病理条件引起的细胞应激影响药物转运体的表达<sup>[6-8]</sup>;在BSEP/Bsep启动子区域存在IR-1反应元件,是核转录因子FXR/RXR异源二聚体的结合位点,结合后可激活BSEP/Bsep的转录<sup>[9]</sup>。除此以外,药物转运体作为一种重要的膜蛋白,其表达和功能也受到膜脂的调控。药物转运体所处的脂环境可能影响药物转运体的催化活性,并能为其提供装载底物的平台<sup>[10]</sup>;有研究表明,鞘磷脂(sphingomyelin, SM)和胆固醇影响ABC转运体的定位和功能<sup>[11]</sup>;另外,胆固醇的消耗可降低P-gp的功能<sup>[12-14]</sup>;但是SM对P-gp和MRP2的影响的研究尚不多见。

SM是重要的膜组分,占动物细胞膜成分50%以上。由亲水头部(磷酸胆碱)和两条疏水尾巴(鞘胺醇和脂肪酸链)组成。鞘磷脂合酶(sphingomyelin

synthase, SMS)是SM合成途径中的最后一个酶,催化神经酰胺(ceramide, Cer)和卵磷脂(phosphatidylcholine, PC)生成SM和二酰甘油(diacylglycerol, DAG)。哺乳动物SMS有两个亚型,即SMS1和SMS2, SMS1定位于顺面高尔基体,而SMS2定位于细胞膜<sup>[15-16]</sup>。目前对SM和SMS的研究多为SMS异常表达与动脉粥样硬化发生的关系以及对细胞凋亡的影响。有临床研究认为,人血浆SM水平是心血管疾病的危险因子<sup>[17]</sup>;有研究证实SMS1/2 siRNA减少了DAG和SM的水平,从而降低了动脉粥样硬化的风险<sup>[18]</sup>。SMS1和SMS2的过表达增加了CHO细胞的SMS活性和细胞膜SM水平,增强了DAG和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的激活介导的细胞凋亡效能,也增加了TNF- $\alpha$ 诱导的CHO细胞凋亡<sup>[19]</sup>。虽然SM是一种重要的膜组分,但其对药物转运体表达影响的研究尚不多见。在巨噬细胞中, SMS2的缺失可以显著下调ABCA1与ABCG1蛋白的表达<sup>[20]</sup>;在SMS2敲除的小鼠脑中P-gp蛋白表达量显著下调<sup>[21]</sup>。

人结肠癌细胞(colon cancer cell, Caco-2)是研究药物转运体的常用模型。实验证实P-gp和MRP2在该细胞中均有较高表达<sup>[22]</sup>。目前尚无采用该细胞株研究SM水平与药物转运体P-gp和MRP2之间的关系。本文运用RNA干扰技术,研究SMS2缺损对Caco-2细胞中P-gp和MRP2表达与功能的影响,以期寻找增加口服药物吸收摄取的潜在靶标提供新的思路,对于逆转由多药耐药引起的肿瘤治疗失败具有重要意义。

## 材料和方法

**药品和试剂** DMEM培养基、非必需氨基酸、青链霉素和0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA(美国Gibco公司);标准蛋白标记[天根生化科技(北京)有限公司];96孔酶标板(上海精睿生物科技发展有限公司);RT-PCR Kit、Trizol试剂(北京博大泰克生物基因技术有限公司);DNA标记(加拿大Fermentas公司);PCR薄壁管(美国Axygen公

司);GAPDH 一抗、BCA 蛋白定量试剂盒、基因组 DNA 小量抽提试剂盒(碧云天生物技术研究);P-gp 一抗(英国 Abcam 公司);MRP2 一抗(美国 CST 公司);HRP 标记二抗(北京鼎国昌盛生物有限公司);引物(美国 Invitrogen 公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);罗丹明 123(百灵威生物技术有限公司);普伐他汀(贝达医药开发有限公司);SYBR Premix EX Tag(日本 Takara 公司);ECL 显色液(美国 GE Healthcare 公司)。

**仪器和设备** 722 分光光度计(上海分析仪器总厂);垂直平板电泳槽(北京百晶生物技术有限公司);转膜仪、PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);高速离心机、ThermoMuliskan MK3 酶标仪、超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司);SCS-24 恒温摇床(江苏太仓实验设备厂);凝胶成像系统(上海实验设备仪器厂);安捷伦 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Typhoon FLA9000(美国 GE Healthcare 公司)。

**细胞培养和转染** 在含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养 Caco-2 细胞,隔天换液。选取对数生长期细胞,胰酶消化,细胞计数板计数并调整细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL,传代接种至 6 孔板中,待细胞生长至 60%~70% 汇合度,更换培养液(不含血清),进行 siRNA 转染。实验分为空白对照组(即未处理细胞组)、阴性对照组和 SMS2 siRNA 干扰组。转染操作按照 Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司)说明书进行,各组 siRNA 和 Opti-MEM 充分混合,室温放置 20 min。将转染复合物加入相应孔板中,培养 6 h,换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液,转染 48 h 后收集细胞进行相关实验。

**siRNA 制备** 根据 GENE BANK 公布的人 SMS2(NC\_000004.11)全长序列,采用文献中已经公布的有效 siRNA 序列<sup>[23]</sup>,并设计阴性对照,由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。序列如下:SMS2 siRNA 正义链 5'-AGAAGTGACGAGCGAAT-3',反义链 5'-GATACAAGTCAATAGTGGACG-3';阴性对照正义链 5'-UUCUCCGAA-CGUGUCACGUTT-3',反义链 5'-ACGUGACACGUUCGAGAATT-3'。

**RT-PCR 检测** 转染(方法如前)的 Caco-2 细胞(48 h 后)用 Trizol 试剂,按说明书提供操作方法抽提总 RNA 后进行 UV 分光光度准确定量,以 1

μg RNA 进行逆转录,β-actin 作为内参,引物序列如表 1 所示。PCR 反应条件为:96 °C 预变性 5 min;96 °C 变性 1 min,54 °C 退火 1 min,72 °C 延长 1 min,反应循环 25 次(β-actin)或 35 次(SMS2)。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

表 1 RT-PCR 检测的引物序列

Tab 1 Primer sequence of RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
SMS2	F: AGAAGTGACGAGCGAAT
	R: GATACAAGTCAATAGTGGACG
β-actin	F: TCCTGTGGCATCCACGAAACT
	R: GAAGCATTGTGCGGTGGACGAT

**real-time PCR 检测** 取 1 μg 总 RNA 进行反转录,使用 SYBER Green 法对目的基因进行相对定量,β-actin 作为内参,引物序列如表 1 所示。PCR 反应条件:96 °C 预变性 5 min,96 °C 变性 1 min,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,反应循环 38 次。数据分析采用 MyIQ 软件。

**Western blot 检测** 转染的 Caco-2 细胞(48 h 后)提取总蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗为 1:1 000 稀释的 P-gp,1:1 000 稀释的 MRP2 和 GAPDH。经 PBS-Tween (0.3%)洗膜后孵育相应二抗并使用 ECL PLUS 试剂盒显色,杂交信号由 Typhoon FLA9000 扫描,条带密度由 Image Quant 软件分析,以 GAPDH 作为内参,数据处理以目的蛋白/GAPDH 的比值确定。

**罗丹明 123 或普伐他汀的 Caco-2 细胞内蓄积试验** 将转染(方法如前)的 Caco-2 细胞(48 h 后)用 PBS 洗净,每孔加 5 μmol/L 罗丹明 123,或 0.5 mmol/L 普伐他汀。37 °C 放置 1 h,迅速吸走药物溶液,冰冷的 PBS 清洗 3 次。制成 200 μL 细胞悬液,细胞破碎仪超声破碎。3 000 × g 离心 15 min,取上清,加等体积甲醇,4 °C 下放置 30 min 去除蛋白后,17 000 × g 离心 60 min 取上清,用于 HPLC 定量分析。同时每孔取 0.125 mL 的细胞悬液按照 BCA 蛋白浓度测定方法进行蛋白定量。将每孔的细胞内的罗丹明 123 或普伐他汀浓度除以相应的总蛋白含量,用以消除每孔细胞数量带来的误差。

**HPLC 样品测定** 用 HPLC 测定罗丹明 123

和普伐他汀的含量,色谱条件:采用 Agilent C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温为 25 °C;流动相为 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH=3.0):乙腈=67:33;流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL;罗丹明 123 的荧光检测器:激发波长为 485 nm,发射波长为 565 nm;普伐他汀的紫外检测器波长为 239 nm。

**统计学分析** 统计学分析采用 SPSS 11.0 统计软件。从转染到检测的整体试验重复 3 次以上,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组数据间的差异用 *t* 检验分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**Caco-2 细胞中 SMS2、P-gp、MRP2 基因的表达水平** 观察 Caco-2 细胞中是否有 SMS2、P-gp、MRP2 基因的表达,未处理的 Caco-2 细胞汇合度达 90% 后提取 RNA,RT-PCR 结果显示 Caco-2 细胞中 SMS2、P-gp、MRP2 基因均有表达(图 1)。

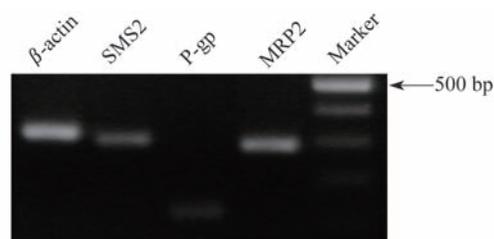


图 1 RT-PCR 检测 Caco-2 细胞中 SMS2、P-gp、MRP2 基因的表达水平

Fig 1 Gene expressions of SMS2, P-gp and MRP2 in Caco-2 cells detected by RT-PCR

**SMS2 siRNA 下调 SMS2 mRNA 的表达水平** 观察 SMS2 敲低后 Caco-2 细胞中 SMS2 mRNA 水平上表达的变化(图 2)。siRNA 转染后,Caco-2 细胞中 SMS2 敲低组 SMS2 的表达水平较空白对照组、阴性对照组表达水平下调 50% 左右,与 RT-PCR 的结果一致。

**SMS2 基因敲低后 P-gp 和 MRP2 蛋白表达水平显著下调** 观察 SMS2 敲低后 Caco-2 细胞中药物转运体 P-gp、MRP2 蛋白水平上表达的变化(图 3)。siRNA 转染后 Caco-2 细胞中 SMS2 敲低组 P-gp 蛋白水平的表达较空白对照组、阴性对照组降低了 40%;SMS2 敲低组 MRP2 蛋白水平的表达较空白对照组、阴性对照组降低了 45%。

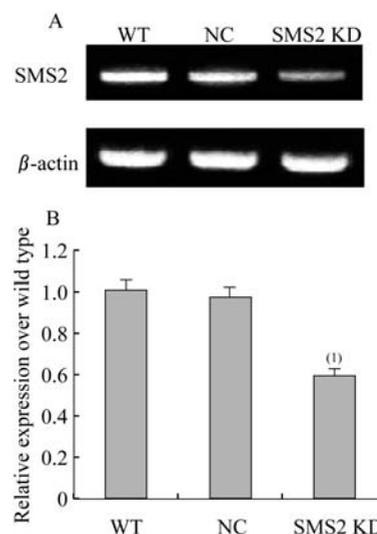


图 2 SMS2 基因敲低后 SMS2 mRNA 水平的变化  
Fig 2 SMS2 RNA level after SMS2 gene knockdown

A: RT-PCR results; B: Real-time PCR results. Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  from 3 independent experiments. WT: Blank control group; NC: Negative control group; SMS2 KD: SMS2 knockdown group. vs. WT, <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ .

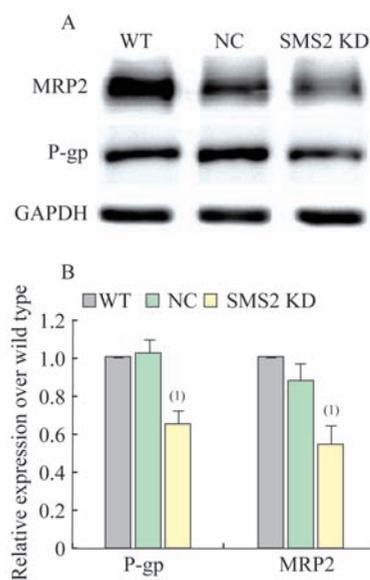


图 3 SMS2 基因敲低后 P-gp 和 MRP2 蛋白的表达变化  
Fig 3 P-gp and MRP2 protein expressions after SMS2 gene knockdown

A: Western blot detection; B: Result of several repeats. Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  from 3 independent experiments. WT: Blank control group; NC: Negative control group; SMS2 KD: SMS2 knockdown group. vs. WT, <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ .

**SMS2 基因敲低后 P-gp 和 MRP2 蛋白的功能明显减弱** 观察 SMS2 敲低后 Caco-2 细胞中药物

转运体 P-gp 和 MRP2 功能变化(图 4)。Caco-2 细胞内 P-gp 和 MRP2 的专一性底物蓄积量能反映其外排功能,蓄积量越小,外排功能越强。绘制标准曲线,得到峰面积与底物浓度的关系曲线(图 4A 和 4B)。siRNA 转染后 Caco-2 细胞中 SMS2 敲低组

胞内罗丹明 123 的蓄积较空白对照组、阴性对照组增加了 45%,即 P-gp 外排功能明显减弱(图 4C); SMS2 敲低组胞内普伐他汀的蓄积较空白对照组、阴性对照组增加了 50%左右,即 MRP2 外排功能明显减弱(图 4D)。

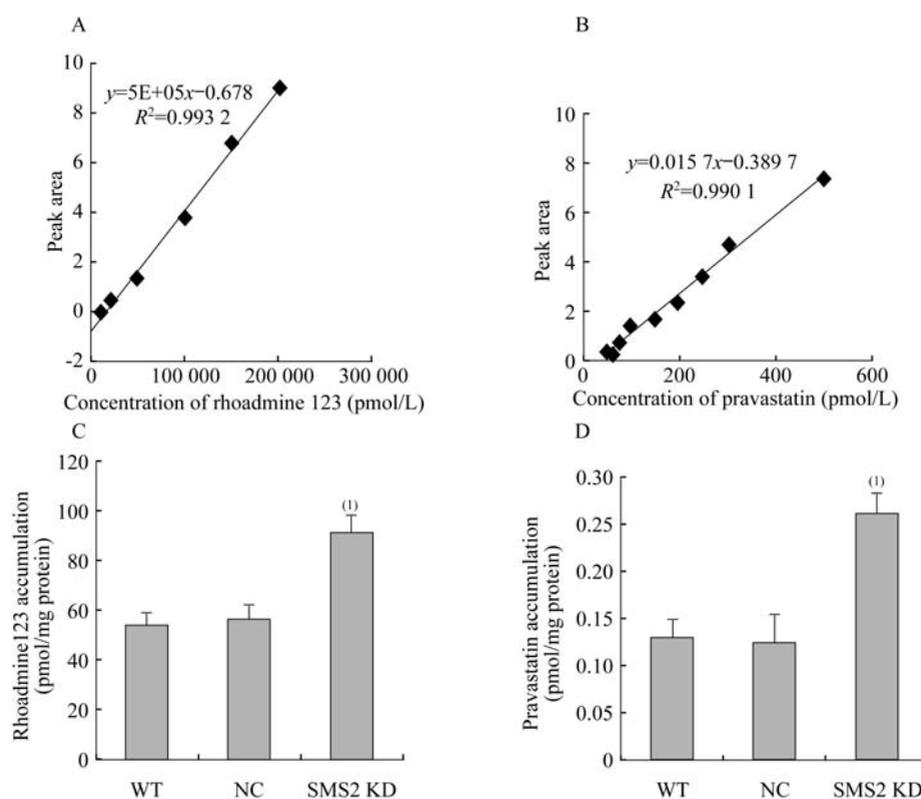


图 4 SMS2 基因敲低后 P-gp 和 MRP2 蛋白的功能变化

Fig 4 Functions of P-gp and MRP2 after SMS2 gene knockdown

A: Standard curve of Rhodamine 123; B: Standard curve of pravastatin; C: Intracellular accumulation of Rhodamine 123 in each group detected by HPLC; D: Intracellular accumulation of pravastatin in each group detected by HPLC. Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  from 3 independent experiments. WT: Blank control group; NC: Negative control group; SMS2 KD: SMS2 knockdown group. vs. WT, <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ .

## 讨 论

由于 Caco-2 细胞形态及生化性质与小肠上皮细胞相似,该细胞已广泛用于药物分子肠吸收的体外模型研究。实验证实,在 Caco-2 细胞中 PEPT1、MDR1、MRP2 和 OATP-B 均有较高水平表达<sup>[22]</sup>。其中 P-gp 和 MRP2 负责多种药物的外排<sup>[4]</sup>,因此其表达和功能的变化对于药物的吸收和分布具有重要影响。

药物转运体作为一种特殊的膜蛋白家族,其表达受其所属脂环境的影响<sup>[11,24]</sup>。SM 是动物细胞膜

的重要组成部分,SMS2 是 SM 合成的关键酶,其表达异常影响细胞中 SM 的含量。

本研究用 SMS2 siRNA 转染 Caco-2 细胞,观察 SMS2 缺损对 Caco-2 细胞中药物转运体 P-gp 及 MRP2 表达与功能的影响。结果显示,应用 SMS2 siRNA 干扰 Caco-2 细胞后,SMS2 mRNA 水平表达显著下降,说明 RNA 干扰是有效的。SMS2 siRNA 干扰 Caco-2 细胞 48 h 后,P-gp 的蛋白表达水平相对于空白对照组、阴性对照组降低了 40%;胞内特异性底物蓄积实验结果显示 P-gp 的外排功能减弱,且减弱水平与蛋白表达下调水平程度相当,推测 P-gp 外排功能的减弱是由其表达水平降低引

起的。在前期研究中,我们发现在 SMS2 基因缺失的小鼠脑中 P-gp 的表达与功能均有显著下调<sup>[21]</sup>,与我们在 Caco-2 细胞中得到的结果一致,再次验证了 SMS2 与 P-gp 之间的关系。

本实验首次发现 SMS2 敲低后 MRP2 的蛋白水平较空白对照组、阴性对照组降低了 45%,且外排功能也相应减弱,说明 SMS2 与 MRP2 的表达及功能密切相关。因此,SMS2 基因缺损对 Caco-2 细胞中 P-gp 和 MRP2 的表达以及功能均有显著作用。预示 SMS2 可能成为增加口服药物吸收摄取的潜在靶标,为逆转肿瘤治疗中出现的多药耐药现象提供了新的思路。

### 参 考 文 献

- [1] Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 596: 47 - 76.
- [2] Terada T, Inui K. Gene expression and regulation of drug transporters in the intestine and kidney [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 7 (3): 440 - 449.
- [3] Nishijima T, Komatsu H, Higasa K, et al. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 associate with tenofovir-induced kidney tubular dysfunction in Japanese patients with HIV-1 infection; a pharmacogenetic study [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55(11): 1558 - 1567.
- [4] Borst P, Evers R, Koel M, et al. The multidrug resistance protein family [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1461 (2): 347 - 357.
- [5] Blokzijl H, Vander BS, Bok LI, et al. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(6): 710 - 720.
- [6] Fouassier L, Beaussier M, Schiffer E, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of rat hepatobiliary transporter genes [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1): G25 - G35.
- [7] McRae MP, Brouwer K, Kashuba A. Cytokine regulation of P-glycoprotein [J]. *Drug Metab Rev*, 2003, 35 (1): 19 - 33.
- [8] Tchenio T, Havard M, Martinez LA, et al. Heat shock-independent induction of multidrug resistance by heat shock factor 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26 (2): 580 - 591.
- [9] Geier A, Wagner M, Dietrich CG, et al. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773 (3): 283 - 308.
- [10] Bacso Z, Nagy H, Goda K, et al. Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter; P-glycoprotein [J]. *Cytometry A*, 2004, 61(2): 105 - 116.
- [11] Klappe K, Hummel I, Hoekstra D, et al. Lipid dependence of ABC transporter localization and function [J]. *Chem Phys Lipids*, 2009, 161(2): 57 - 64.
- [12] Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, et al. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66 (5): 1332 - 1339.
- [13] Yunomae K, Arima H, Hirayama F, et al. Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells [J]. *FEBS Lett*, 2003, 536(1 - 3): 225 - 231.
- [14] Luker GD, Pica CM, Kumar AS, et al. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(26): 7651 - 7661.
- [15] Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, et al. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases [J]. *EMBO J*, 2004, 23(1): 33 - 44.
- [16] Rietveld A, Neutz S, Simons K, et al. Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 12049 - 12054.
- [17] Schlitt A, Blankenberg S, Yan D, et al. Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2006, 3: 5.
- [18] Hailemariam TK, Huan C, Liu J, et al. Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NF- $\kappa$ B activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1519 - 1526.
- [19] Ding T, Li Z, Hailemariam T, et al. SMS overexpression and knockdown; impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49 (2): 376 - 385.
- [20] Liu J, Huan C, Chakraborty M, et al. Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice [J]. *Circ Res*, 2009, 105 (3): 295 - 303.
- [21] Zhang Y, Dong J, Zhu X, et al. The effect of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency on the expression of drug transporters in mouse brain [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(3): 287 - 294.
- [22] Hayashi R, Hilgendorf C, Artursson P, et al. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35(5): 383 - 396.
- [23] Li Z, Hailemariam TK, Zhou H, et al. Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771 (9): 1186 - 1194.
- [24] Callaghan R, Berridge G, Ferry DR, et al. The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1328 (2): 109 - 124.