

高效液相色谱-串联质谱同时测定人血浆中8种抗抑郁药的浓度

王玉平

(内蒙古自治区第三医院 医学特检中心, 内蒙古 呼和浩特 010010)

【摘要】目的 建立同时测定血浆中米氮平、舍曲林、帕罗西汀、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、艾司西酞普兰及劳拉西泮8种抗抑郁药物浓度的高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)。**方法** 内标为度洛西汀-d7,使用甲醇将血浆样品进行蛋白沉淀后分析。Waters Cortecs C18(2.1 mm×50.0 mm, 2.7 μm)色谱柱, 0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸甲醇溶液梯度洗脱, 流速0.5 mL/min, 电喷雾阳离子源。通过实验对这一方法的专属性、精密度、回收率等进行考察。**结果** 米氮平、帕罗西汀、艾司西酞普兰在1~200 ng·mL⁻¹;舍曲林、去甲阿米替林、度洛西汀、阿米替林及劳拉西泮在2.5~500 ng·mL⁻¹范围内均表现良好的线性关系, 回收率为94.70%~101.31%, 精密度(RSD)小于15%。**结论** 相较于其他方法, 该方法在临床同时测定服药患者血液中抗抑郁药物的浓度时具有快速、灵敏、准确的特点, 且具有专属性强、重复性好、稳定性高的优点。

【关键词】 高效液相色谱-串联质谱; 抗抑郁药; 治疗药物监测

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)03-0230-05

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF 8 ANTIDEPRESSANTS IN HUMAN PLASMA BY HPLC-MS/MS

WANG Yuping

(Medical Clinical Laboratory, The Third Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010013, China)

【Abstract】 Objective To establish a HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of mirtazapine, sertraline, paroxetine, duloxetine, amitriptyline, nortriptyline, escitalopram and lorazepam in human plasma. **Methods** The plasma sample was precipitated with methanol after the addition of internal standard (duloxetine-d7). The chromatographic separation was performed on Waters Cortecs C18 (2.1 mm × 50.0 mm, 2.7 μm) with the mobile phase of 0.1% formic acid water-0.1% formic acid methanol at a flow rate of 0.5 mL in each minutes, an electrospray ionization ion-trap source(ESI)was used as the detector and operated in the positive ion mode. The specificity, precision and recovery, of the method were investigated. **Results** The liner calibration curves of mirtazapine, paroxetine, escitalopram were obtained in the concentration range of 1~200 ng·mL⁻¹; sertraline, duloxetine, amitriptyline, nortriptyline, lorazepam in the concentration range of 2.5~500 ng·mL⁻¹ respectively. The relative recovery was in the range of 94.70%~101.31%. The RSDs of inter-day and intra-day precision were less than15%. **Conclusions** The method is rapid, sensitive, accurate, with high specificity, good repeatability and high stability, and it is suitable for simultaneous determination of antidepressant drug concentrations in patient blood.

【Keywords】 HPLC-MS/MS; Antidepressants; TDM

抑郁症是常见的一类精神疾病,近年发病率呈上升趋势,临床上主要使用抗抑郁药物进行治疗。抑郁症患者需要长期和联合用药^[1-4]。2017年9月,神经精神药理学与药物精神病学协会(AGNP)重新发布了神经精神药理学治疗药物监测指南,对精神科治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),

临床应用起到规范和指导作用^[5]。药物的疗效和不良反应与其血药浓度密切相关^[6],且患者具有个体差异性,因此需要对服药患者进行血药浓度监测,提供个体化给药方案,达到安全、有效、合理用药的目的^[7,8]。由于抑郁常伴有焦虑、失眠等症状,因此临床上常需要联合应用抗焦虑类镇静催眠药。为

收稿日期: 2022-09-12; 修回日期: 2023-03-14

作者简介: 王玉平(1994—),女,硕士,主管药师。研究方向:临床血药浓度监测。E-mail:654429213@qq.com

为了提高疗效,减少不良反应的发生,本实验开发同时测定多种药物血药浓度的方法^[9-12]。本研究利用HPLC-MS/MS同时测定精神科常用的8种抗抑郁类药物(米氮平、舍曲林、帕罗西汀、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、艾司西酞普兰、劳拉西泮)的血药浓度。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Jasper HPLC型高效液相色谱系统(美国AB SCIEX公司);AB SCIEX TRIPLE QUAD 4500MD型质谱检测器(美国AB SCIEX公司);MultiQuantTM定量软件(美国AB SCIEX公司);AG285型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);BY-R18型低温高速离心机(北京白洋医疗器械有限公司);VM-D型旋涡混合器(上海皓庄仪器有限公司)。

1.2 试剂

米氮平(纯度:99.0%,批号:101016-202002,购自中国食品药品检定研究院)、舍曲林(纯度:98.0%,批号:S280000,购自加拿大TRC公司)、帕罗西汀(纯度:98.0%,批号:P205753,购自加拿大TRC公司)、度洛西汀(纯度:99.0%,批号:D720990,购自加拿大TRC公司)、阿米替林(纯度:≥98.0%,批号:A8404,购自美国Sigma公司)、去甲阿米替林(纯度:≥98.0%,批号:N7261,购自美国Sigma公司)、艾司西酞普兰(纯度:≥98.0%,批号:E4786,购自美国Sigma公司)、劳拉西泮(纯度:≥98.0%,批号:C4X-

1041,购自美国CATO公司)、度洛西汀-d7(纯度:99.0%,批号:D721002,购自加拿大TRC公司)、甲酸(色谱级)、甲酸(色谱级)、蒸馏水(屈臣氏蒸馏制法饮用水)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Cortecs C18柱(2.1 mm × 50.0 mm, 2.7 μm);柱温:45 °C;流速:0.5 mL;进样体积:5 μL;流动相A:0.1%甲酸-水;流动相B:0.1%甲酸-甲醇,梯度洗脱。

2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI);检测方式:正离子模式(Positive);扫描方式:多反应监测(MRM);气帘气(CUR):30psi;离子化电压(IS):5500V;雾化气温度(TEM):500 °C;喷雾气(GS1):55psi;喷雾气(GS2):50psi;碰撞气(CAD):7psi。

2.3 系列溶液配制及线性范围设定

2.3.1 分析物工作液 分别准确称取米氮平、舍曲林、帕罗西汀、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、艾司西酞普兰、劳拉西泮,使用甲醇定容,配制成0.1 mg·mL⁻¹的标准储备液。在上述各药物有效剂量范围内,不高于警戒浓度条件下,用甲醇对各单一标准储备液进行梯度稀释,得到7个分析物的系列单一标准曲线工作液,按比例混合得到7个分析物的系列混合标准曲线工作液,各分析物质量浓度见表1。

表1 系列混合标准曲线工作液中各分析物的质量浓度 (ng·mL⁻¹)
Tab.1 Concentration of analytes in working solution of series mixed standard curve (ng·mL⁻¹)

分析物	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
米氮平、帕罗西汀、艾司西酞普兰	2000	1000	500	200	100	50	20	10
舍曲林、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、劳拉西泮	5000	2500	1250	500	250	125	50	25

2.3.2 内标工作液配制 用甲醇溶解度洛西汀-d7制备1 mg·mL⁻¹的储备液,用甲醇稀释成10 ng·mL⁻¹的内标工作液。

2.4 含药血浆配制

分别取分析物工作液5 μL和空白血浆45 μL充分混合,得到含药血浆。此时,含药血浆中7个分析物的浓度均被稀释10倍,即:设定线性范围米氮平、帕罗西汀、艾司西酞普兰为1~200 ng·mL⁻¹;舍曲林、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林及劳拉西泮为2.5~500 ng·mL⁻¹。

2.5 样本处理方法

准确吸取含药血浆50 μL至1.5 mL离心管中,加入内标工作液400 μL,旋涡混合3 min,低温离心10 min(转速12000 r·min⁻¹),取上清液100 μL置于样品管中,在选定的HPLC-MS条件下进样分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 取6份不同来源的健康者血浆样本混匀,等量吸取3份,依照“2.5”实验方法进行处理,使用预设HPLC-MS条件对样品进行检测;取适量混合工作液加至空白血浆中,依照“2.5”实验方法处理后,使用预设HPLC-MS条件对样品进行检测。结果显示8种分析物峰形分离度好,内源性物无干

表2 8个分析物的线性方程、线性范围、相关系数及定量下限
Tab.2 Linear equation, linear range, correlation coefficient and lower limit of quantitation for 8 analytes

分析物	批次	线性方程	线性范围(ng·mL ⁻¹)	r	定量下限(ng·mL ⁻¹)
米氮平	1	Y=0.02168x+0.00106		0.99987	
	2	Y=0.02106x+0.00613	1-200	0.99909	0.10
	3	Y=0.02011x+3.97764e ⁻⁴		0.99945	
舍曲林	1	Y=0.02205x+0.00594		0.99975	
	2	Y=0.02148x+0.00321	2.5-500	0.99986	0.15
	3	Y=0.02085x+0.00637		0.99961	
帕罗西汀	1	Y=0.00470x+0.00159		0.99927	
	2	Y=0.00488x+0.00106	1-200	0.99968	0.50
	3	Y=0.00441x+0.00154		0.99915	
度洛西汀	1	Y=0.01654x+0.00863		0.99938	
	2	Y=0.01360x+0.00346	2.5-500	0.99906	0.05
	3	Y=0.01390x+0.03482		0.99862	
阿米替林	1	Y=0.03212x+0.02824		0.99940	
	2	Y=0.02664x+0.00610	2.5-500	0.99960	0.15
	3	Y=0.02654x+0.00570		0.99962	
去甲阿米替林	1	Y=0.02944x+0.00301		0.99946	
	2	Y=0.03008x+0.00516	2.5-500	0.99984	0.15
	3	Y=0.03094x+0.00459		0.99934	
艾司西酞普兰	1	Y=0.02808x+0.00313		0.99995	
	2	Y=0.02846x+3.24196e ⁻⁴	1-200	0.99994	0.07
	3	Y=0.02973x+7.73335e ⁻⁴		0.99993	
劳拉西泮	1	Y=0.02589x+2.21000e ⁻⁴		0.99960	
	2	Y=0.02438x+6.02655e ⁻⁴	2.5-500	0.99978	0.40
	3	Y=0.02472x+5.46574e ⁻⁴		0.99974	

扰,保留时间分别为:米氮平1.91 min、舍曲林2.68 min、帕罗西汀2.45 min、度洛西汀2.54 min、阿米替林2.55 min、去甲阿米替林2.59 min、艾司西酞普兰2.09 min、劳拉西泮2.81 min及度洛西汀-d7 2.51 min。

2.6.2 标准曲线和定量下限 按照“2.5”实验方法对系列混合标准曲线进行分析,设定被分析物质量浓度为自变量(x),分析物与内标物峰面积比值为因变量(y),其加权(w=1/x)进行线性回归后,计算回归方程与相关系数(r),平行测定3组。8个分析物的线性方程、线性范围、相关系数及定量下限的结果见表2,由表2可见,血清中各分析物在各自的标准曲线范围内线性关系良好。

2.6.3 精密度和回收率 准确吸取24份空白血浆样本作为空白本底,分为两组,每组分列6份空白和6个待测物。用标准储备液配制低、高两个质量浓度的混合待测物,按照“2.5”实验方法,在预设HPLC-MS条件下进样分析。对24 h内6个时间点采样,共5 d,分析计算各个样本下每个分析物的峰面积(见表3)。以当日测得平均测量值的相对标准偏差计算日内精密度、再计算日间精密度;将分析物测得

的峰面积与空白血浆提取后加入法测得的峰面积相比考察回收率。由表3可见8个分析物的日内、日间精密度均<15%;8个分析物的回收率均>94.70%,内标度洛西汀-d7的相对提取回收率为96.90%

2.6.4 基质效应 采用标准曲线测定法,配制两组标准曲线,A组用有机溶剂配制含系列浓度分析物和内标的标准曲线;B组用先提取后加入与第一组相同系列浓度分析物和内标后制得,依次按照“2.5”项下方法操作,基质效应率(%)=(空白基质中添加混合标准曲线工作液测得峰面积/有机溶剂中添加混合标准曲线工作液测得峰面积)×100%,即基质效应率(%)=B/A×100%,相关数据见表4。比较两组标准曲线各分析物的峰面积并计算相对标准偏差(RSD),即得到8个分析物在8个梯度质量浓度范围下的基质效应值为83.55%~123.52%,RSD均小于15%,内标度洛西汀-d7的基质效应值为(104.34±4.97)%,RSD为4.57%,且两组标准曲线均线性良好(r>0.995),符合生物样品分析要求。

2.6.5 稳定性 分别考察系列混合标准曲线工作液

表3 精密度和回收率试验结果
Tab.3 Results of precision and recovery tests

分析物	加标量 (ng·mL ⁻¹)	5日平均测量值及日内精密密度*										日间精密密度	平均回收率 (%)
		第1天 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)	第2天 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)	第3天 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)	第4天 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)	第5天 (ng·mL ⁻¹)	RSD (%)		
米氮平	20	19.97	4.96	20.78	5.25	19.34	5.43	20.60	4.96	20.35	4.70	2.83	101.04
	100	91.51	3.81	99.37	3.06	96.10	4.53	94.75	5.24	104.64	4.59	5.13	97.27
舍曲林	50	49.70	4.23	47.90	1.93	48.42	2.55	50.53	5.30	50.17	2.29	2.30	98.69
	250	253.60	4.90	247.14	3.14	244.87	2.55	251.92	2.43	258.71	3.35	2.17	100.50
帕罗西汀	20	18.56	6.11	18.39	5.01	18.08	2.77	20.15	8.24	19.56	8.76	4.60	94.70
	100	97.08	5.37	97.23	6.29	98.06	7.49	110.97	3.64	103.36	7.97	5.89	101.30
度洛西汀	50	51.23	5.92	49.64	3.47	50.34	8.21	50.61	9.36	51.46	5.54	1.43	101.31
	250	238.43	4.66	252.10	6.41	231.96	8.73	243.40	6.53	241.22	5.95	3.05	96.57
阿米替林	30	28.19	5.57	28.41	3.97	29.59	6.19	27.97	7.53	28.79	5.82	2.22	95.30
	150	138.32	6.45	143.61	7.63	157.62	5.19	147.30	3.54	143.68	5.35	4.92	97.40
去甲阿米替林	30	28.04	5.94	28.53	4.23	28.96	5.19	28.74	8.75	29.81	5.74	2.26	96.05
	150	136.54	6.23	142.88	6.13	152.63	5.00	143.06	3.77	142.22	7.71	4.03	95.64
艾司西酞普兰	20	19.58	2.56	20.17	3.51	20.29	1.06	20.09	1.71	19.69	2.27	1.56	99.82
	100	97.17	1.71	98.63	1.69	101.57	2.07	99.41	1.57	95.30	2.2	2.40	98.42
劳拉西洋	20	18.97	2.26	19.96	1.82	19.85	4.27	18.36	7.16	18.31	2.63	4.1	95.45
	100	93.80	4.66	97.98	1.32	95.86	4.40	97.85	1.47	88.26	3.12	4.23	94.75

表4 基质效应试验结果 (ng·mL⁻¹)
Tab.4 Results of matrix effect tests (ng·mL⁻¹)

分析物	组别	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	线性方程(相关系数)
米氮平	A	0.96	1.99	5.35	10.28	19.38	47.23	103.56	199.25	$Y=0.03897x+0.00516(r=0.99953)$
	B	0.86	2.18	4.98	10.10	20.12	52.05	100.62	197.09	$Y=0.03651x+0.00688(r=0.99976)$
	B/A	0.90	1.10	0.93	0.98	1.04	1.10	0.97	0.99	
舍曲林	A	2.48	5.53	11.96	22.73	50.23	125.74	260.08	491.24	$Y=0.00843x+-1.81793e-4(r=0.99952)$
	B	1.94*	5.58	13.05	24.31	53.30	129.27	253.81	488.75	$Y=0.02075x+0.00662(r=0.99949)$
	B/A	0.78*	1.01	1.09	1.07	1.06	1.03	0.98	0.99	
帕罗西汀	A	0.98	1.98	4.78	10.24	20.74	49.28	106.23	193.77	$Y=0.02809x+0.00331(r=0.99910)$
	B	1.07	2.12	4.70	9.09	19.44	50.88	106.64	194.07	$Y=0.04303x+6.70424e-5(r=0.99893)$
	B/A	1.09	1.07	0.98	0.89	0.94	1.03	1.00	1.00	
度洛西汀	A	2.43	4.89	12.28	27.79	46.87	131.03	240.99	503.72	$Y=0.00880x+-9.80092e-4(r=0.99935)$
	B	2.86	5.40	12.23	22.52	46.30	118.86	248.57	513.26	$Y=0.01779x+-0.01168(r=0.99928)$
	B/A	1.18	1.10	1.00	0.81	0.99	0.91	1.03	1.02	
阿米替林	A	2.78	4.95	11.39	24.77	50.76	122.81	245.99	506.55	$Y=0.00950x+-0.00333(r=0.99981)$
	B	2.24	4.86	13.14	25.26	52.79	124.66	262.50	484.56	$Y=0.01645x+-0.00200(r=0.99925)$
	B/A	0.81	0.98	1.15	1.02	1.04	1.02	1.07	0.96	
去甲阿米替林	A	2.59	4.90	10.67	25.29	53.00	134.37	252.34	486.84	$Y=0.01007x+-1.56735e-4(r=0.99914)$
	B	2.15	5.29	13.00	24.64	52.21	125.18	256.62	490.89	$Y=0.01878x+2.40942e-4(r=0.99970)$
	B/A	0.83	1.08	1.22	0.97	0.99	0.93	1.02	1.01	
艾司西酞普兰	A	0.97	1.99	4.81	9.96	20.93	51.66	102.39	195.29	$Y=0.05135x+0.00370(r=0.99990)$
	B	0.92	2.23	4.87	9.74	20.01	50.51	101.06	198.66	$Y=0.02870x+0.00256(r=0.99961)$
	B/A	0.95	1.12	1.01	0.98	0.96	0.98	0.99	1.02	
劳拉西洋	A	2.81	5.28	12.15	22.56	47.46	124.58	244.83	510.34	$Y=0.00861x+-0.00248(r=0.99957)$
	B	2.09	5.58	13.20	23.89	52.33	123.13	253.03	496.76	$Y=0.02837x+0.01797(r=0.99976)$
	B/A	0.74	1.06	1.09	1.06	1.10	0.99	1.03	0.97	

注:A代表第一组配制方法;B代表第二组配制方法;“*”代表准确度≥±15%的线性值,可以去除。

Note:A represents the first group of preparation methods;B represents the Second group of preparation methods.“*” represents the accuracy of linear values than or equal to ±15% can be removed

和含药血浆于-20℃冷冻放置7 d、14 d、21 d、28 d的稳定性。根据“2.5”实验方法和HPLC-MS条件下进行分析,计算测得各峰面积的相对标准偏差,RSD均小于15%。实验结果表明系列混合标准曲线工作液和含药血浆于-20℃冷冻放置一个月的稳定性良好。

2.7 临床应用

采用上述建立的HPLC-MS/MS对我院45例抑郁患者连续监测3个月血药浓度,共取188份血样,其中男性18例,平均年龄34岁;女性27例,平均年龄32岁。所有患者按病情规律服药,在达到稳态血药浓度后,晨起服药前空腹采集静脉血4 mL,测其血药浓度。结果显示,166份血样监测结果均在有效血药浓度范围内,8份血样结果高于有效血药浓度(帕罗西汀4例、米氮平3例、艾司西酞普兰1例),占监测血样的4.26%;14份血样结果低于有效血药浓度(劳拉西泮用于辅助睡眠,根据病情给予不同剂量),占监测血样的7.45%,无监测结果达中毒血药浓度。

3 结语

HPLC-MS/MS是将色谱的高效分离能力和质谱的特异、灵敏、多组分检测能力有机结合的定量分析方法。本研究建立了同时测定米氮平、舍曲林、帕罗西汀、度洛西汀、阿米替林、去甲阿米替林、艾司西酞普兰及劳拉西泮8种抗抑郁药物浓度的方法,参考《中华人民共和国药典》^[13](2020年版)四部中“生物样品定量分析方法验证指导原则”对方法进行了验证,该方法操作简便,分析时间短,可以实现大量临床样本的快速分析。

实验结果显示8个样品保留时间在1.91~2.81 min,区分度好、专属性强;基质效应RSD小于15%;在最低有效浓度和警戒浓度范围内,准确度高、精密度好、线性关系良好;样品处理方法简单,且混合样品分析时间均不超过4 min,可以满足临床大样本快速处理分析的要求。采用本方法对临床患者血药浓度进行监测,根据患者血药浓度偏离有效浓度范

围的实际情况,为医师用药的剂量调整提供了依据,有助于实现个体化给药。

参考文献

- [1]王子惠,刘丽宏. 医院门诊抗抑郁药处方点评与应用情况分析[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(11):1583-1585
- [2]于莹,黄海量,张功,等. 常用抗抑郁药的疗效与安全性的网状Meta分析[J]. 中华中医药学刊,2020,38(10):183-189+295
- [3]陈自悦,肖玲,王惠玲,等. 新型抗抑郁药氯胺酮的研究进展[J]. 临床精神医学杂志,2019,29(6):426-428
- [4]王金亮,杨陈晨,杨琪,等. 住院抑郁症患者抗抑郁药联合治疗的影响因素分析[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(20):2081-2085
- [5]Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology [J]. Pharmacopsychiatry,2018,51(1-2): e1
- [6]贾晓妮,张燕,张晓红,等. 204例精神分裂症患者服用利培酮分散片的血药浓度监测及其影响因素分析[J]. 中国药房,2018,29(17):2407-2411
- [7]郭庆合,任方龙. 高效液相色谱-串联质谱方法测定血清中氨磺必利、舒必利、米那普仑、西酞普兰、文拉法辛及O-去甲文拉法辛浓度[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(13):1347-1352
- [8]李好,陈连国,尤玮玮. UPLC-MS/MS同时测定大鼠血浆中美沙酮、文拉法辛及其代谢物浓度与药动学研究[J]. 中国药房,2018,29(11):1505-1509
- [9]王建欣,杨继章,张娜娜,等. HPLC-MS/MS法同时测定精神分裂症患者血浆中奥氮平和阿立哌唑的浓度与应用[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(14):2131-2135
- [10]王伟,丁仁奎,李清艳,等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中卡马西平、文拉法辛、罗格列酮和硝苯地平的浓度[J]. 中国药房,2018,29(2):194-198
- [11]邓晓晴,齐海娟,崔浩亮,等. 在线固相萃取液相色谱-三重四级杆/线性离子阱质谱法同时测定人血浆中4种抗抑郁药的含量[J]. 药物分析杂志,2020,40(5):821-829
- [12]佟志强,吴东媛,张娟,等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中5-FU及其代谢产物5-FUH-2的浓度及应用[J]. 中国药房,2021,32(4):480-484
- [13]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020,321

(上接第229页)

- [14]Wennemers M, Bussink J, Grebenchtchikov N, et al. TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity[J]. Radiother Oncol, 2011, 101(1):198-202.
- [15]Preiss T, Hentze MW. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast[J]. Nature, 1998, 392(6675):516-520
- [16]Lackner DH, Beilharz TH, Marguerat S, et al. A network of

multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast[J]. Mol Cell,2007,26(1):145-155

- [17]Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ. NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif[J]. J Biol Chem, 2004, 279(35):37069-37078
- [18]Rechsteiner M. PEST sequences and regulation by proteolysis[J]. Trends Biochem Sci,1996, 21(7):267-271