具核梭杆菌具核亚种蛋白质组及其在癌症 pH 环境下的差异蛋白质组分析

殷薛飞^{a,b} 刘晓慧^{a,b} 申华莉^{*,a,b} 金红^{*,a,b} 杨芃原^{a,b}

(^a 复旦大学化学系 上海 200433)

(^b 复旦大学生物医学研究院 上海 200032)

摘要 利用 LC-MS/MS 对 *F. nucleatum* 的蛋白质表达谱进行了深入研究, 共鉴定到 1198 个蛋白质的表达, 占基因组 58% 的编码基因。通过在 pH 6.5 (癌症组织 pH 环境) 和 pH 7.5 (正常组织 pH 环境) 两种条件下 *F. nucleatum* 蛋白质表达的定量蛋白质组学分析, 发现处于癌症微环境 pH 条件下蛋白质表达的变化明显集中于金属离子转运, 硫胺素代谢, 糖代谢等过程和功能。产丁酸发酵的能量代谢通路中的七个代谢酶在蛋白质组数据中找到, 其中有五个在癌症 pH 条件下显著下调, 这五个酶包含了丁酸盐代谢的整个过程, 这为结直肠癌患者肠道丁酸盐含量降低提供了新的证明。此外, 癌症 pH 条件下 *F. nucleatum* 的丁酸代谢受到抑制, 造成产丁酸能力下降, 可能是其促进结直肠癌发展在代谢水平上的原因之一。

关键词 具核梭杆菌; 蛋白质组; 非标定量; pH 环境; 丁酸代谢

Whole Proteome of *Fusobacterium nucleatum* and Quantitative Analysis of Proteomic Change in Cancer Environment

Yin, Xuefei^{a,b} Liu, Xiaohui^{a,b} Shen, Huali^{*,a,b} Jin, Hong^{*,a,b} Yang, Pengyuan^{a,b}

(^a Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

(^b Institute of Biomedical Science, Fudan University, Shanghai 200032)

Abstract In this paper, we systematically analyzed the proteome of *F. nucleatum* by using liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and label free quantification in different culturing pH conditions. We identified over 950 proteins in each LC-MS/MS run. Totally 1198 proteins were identified in two different pH conditions, which correspond to 58% of the protein coding genes among the whole genome of *F. nucleatum*. The three replicates of pH 6.5 (pH condition of cancer tissue) and pH 7.5 (pH condition of normal tissue) coincide for more than 70% of all the identified peptides and more than 90% of the identified proteins, which indicates the stability and reproducibility of the experiments. By label-free quantitative analysis of the proteome, 1001 proteins have quantitative information. We found that 263 proteins were shown significant expression changed between pH 6.5 and pH 7.5. According to the gene ontology analysis, the significant expression changed proteins were focused on several metabolism processes and functions, such as metal ions transport, thiamin metabolic and carbohydrate metabolism and so on. Butyric acid fermentation is one of the important metabolism pathway in *F. nucleatum* which also have relationship with colorectal cancer. Butyric acid fermentation pathway including five categories of metabolic enzymes which contains eight protein coding genes. We have found five metabolic enzyme (acetyl-CoA acetyltransferase, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, crotonase, butyryl-CoA dehydrogenase and acetoacetate:butyrate/acetate CoA transferase) significant down regulation in pH condition of cancer tissue. Therefore, the butyric acid fermentation pathway were inhibited in *F. nucleatum* when it is living in colorectal cancer micro-environment. As the decrease of the butyric acid production is one of the phenomenon in colorectal cancer patient and *F. nucleatum* could promote colorectal cancer development, we verified *F. nucleatum* have contribution to this phenomenon. And the inhibition of butyric acid fermentation may give evidence that *F. nucleatum* could promote the colorectal cancer development in metabolism level.

Keywords *Fusobacterium nucleatum*; proteome; label free quantification; pH condition; butyric acid fermentation

1 引言

微生物与人类生活密切相关, 其中有约 1/3 与人体

共生的微生物生活在人类消化道中, 这些微生物构成了消化道的微生物组^[1]。整个微生物组对于肠道的正常功能具有十分重要的意义, 包括维持能量代谢, 防止病原

* E-mail: jinhong@fudan.edu.cn; shenghuali@fudan.edu.cn; Fax: 021-54237535

Received January 6, 2015; published January 29, 2015.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by MOST 863 Program (No. 2012AA020201) and CERS-1-66 (CERS-China Equipment and Education Resources System) and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20130071140007).

项目受 863 计划 (No. 2012AA020201), 国家“211 工程”项目高等学校仪器设备和优质资源共享系统 (cers-1-66), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20130071140007) 资助。

菌繁殖等。然而,人类在得益于这些正常菌群的同时也可能受到其危害,包括肥胖^[2],心血管疾病^[3],代谢性疾病等都发现与肠道微生物相关^[4]。

具核梭杆菌具核亚种(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*)是胃肠道中存在的一种革兰氏阴性兼性厌氧菌,属于拟杆菌科,其在口腔中被发现并且研究较多,已经证明 *F. nucleatum* 在牙周病及其他感染性疾病中具有重要作用^[5,6]。*F. nucleatum* 的典型培养物 ATCC25586 目前被广泛用于研究。2002 年,该菌株完成了全基因组的测序。测序结果显示,该培养物基因组由 2174500 个碱基组成,其中 GC 占 27%,经过分析发现 1952810 个碱基是编码序列,共有 2067 个开放阅读框^[7]。2010 年, Kostic 和 Castellarin 等^[8,9]通过对结直肠癌病人和正常人的肠道菌群的基因组学测序和 16S rRNA 测序结果发现,肠道中的具核梭杆菌与结直肠癌的发展具有密切的关系。2013 年 Rubinstein 等^[10]首次通过对 FadA 蛋白的功能研究证实 *F. nucleatum* 对结直肠癌发展的促进作用可以依赖于 E-Cadherin/beta-Catenin 信号通路。

肠道 pH 是维持肠道微生物生活和人体消化吸收营养物质的重要生理条件。通过对正常人肠道 pH 的测定发现肠道 pH 通常维持在 pH 6.5~7.5 的范围内^[11]。而在癌症组织中由于癌症造成的微环境改变,癌症组织的外部 pH 会降低,通常在 pH 6.2~6.9^[12,13]。蛋白质组学的技术能够大规模筛选在 pH 条件变化时, *F. nucleatum* 表达发生差异的蛋白。传统的蛋白质组学分析方法使用 2D-Gel 进行分离^[14,15],但是 2D-Gel 分离效率不高,蛋白质组覆盖度相对较低。基于 LC-MS/MS 的蛋白质组学技术,具有分离效率高,蛋白质鉴定量大,分析速度快等优势,成为近年来蛋白质组学研究中最常用的手段和工具^[16,17]。

在本文中,我们对 *F. nucleatum* 的蛋白质表达谱进行了深入研究,利用基于 LC-MS/MS 的蛋白质组学技术对蛋白质组进行鉴定。通过在 pH 6.5(癌症 pH 环境)和 pH 7.5(正常 pH 环境)两种条件下 *F. nucleatum* 蛋白质表达的定量蛋白质组学分析,模拟了生活在结直肠癌患者肠道中生活的 *F. nucleatum* 受到癌症微环境 pH 变化引起的代谢功能相关蛋白质的表达变化。

2 结果与讨论

2.1 *F. nucleatum* 蛋白质组鉴定

蛋白质组学对基因编码的蛋白质进行系统的分析可以为注释基因组信息和了解生物学过程提供参考。基于质谱的蛋白质组学具有高通量和高灵敏度的特点。利用 LC-MS/MS 中肽段的流出峰强度和保留时间作图,可以得到每一次实验的二维图,两组样品的三次技术重复试验共形成六张二维图(见附录),从图上可以看出整个图像的分布相似性较高,任意两次重复之间的相关系数在 80%以上,显示了良好的实验的重复性。

pH 7.5 条件下,单次可鉴定到两万张以上谱图对应七千条以上肽段和一千个以上蛋白,三次重复共鉴定到 1166 个蛋白质的表达,其中 901 个蛋白质在三次重复中均被鉴定到(图 1a~1b);在 pH 6.5 条件下,单次也可鉴定到两万张以上谱图对应六千条以上肽段和 950 个以上蛋白,三次重复共鉴定到 1115 个蛋白质的表达(图 1c~1d)。其中 1083 个蛋白和 6338 条肽段在不同条件下均被鉴定到(图 1e~1f)。*F. nucleatum* 全基因组测序发现共有 2067 个蛋白编码基因,本文中共有 1198 个蛋白通过基于质谱的蛋白质组学的方法被鉴定到,占到了编码基因的 58%。由于部分编码基因表达的瞬时性,我们可以认为通过基于 LC-MS/MS 的蛋白质组学方法可以快速的完成细菌全蛋白质组的测定,并具有较高的覆盖度。基于此,对该细菌全蛋白质组的定性定量分析也能得到更加可靠的结果,减少了因为鉴定量不足造成的系统生物学分析结果的以偏概全^[18]。

图1 不同 pH 条件下的 *F. nucleatum* 蛋白质鉴定和肽段鉴定
Figure 1 Venn diagrams illustrate the overlap of identified proteins and peptides from *F. nucleatum*

2.2 *F. nucleatum* 蛋白质组分析

通过 *F. nucleatum* 蛋白质组鉴定结果,我们分析发现对其蛋白质组鉴定具有很高的动态范围,可以更加完整和全面地观察蛋白质表达量的整体分布。通过每一个鉴定到蛋白的所有肽段的强度的总和计算可知 *F. nucleatum* 被鉴定的蛋白质表达量在质谱信号上有大于五个数量级的动态范围(图 2)。

细菌培养至对数期进行收集,因为处于对数期的细菌的生长旺盛,相对有更丰富的蛋白表达。通过 GO 分析可以看到主要的蛋白质分子参与转录翻译相关的生物过程,如 translation(翻译), amino acid activation(氨基酸激活), tRNA aminoacylation (tRNA 氨酰化), 相关的

分子功能也集中于和微生物生长密切相关的功能(图 3). GO 分析的结果可以看到我们所鉴定到的蛋白也是聚集到了转录翻译等相关的功能上, 说明了通过蛋白质组学的分析结果能够反映 *F. nucleatum* 实时的生理状态.

图 2 *F. nucleatum* 蛋白质组动态范围
Figure 2 Dynamic range of the identified proteome

2.3 *F. nucleatum* 蛋白质组的非标定量

F. nucleatum 蛋白质组的非标定量分析选择了正常肠道的 pH 和癌症微环境的 pH 来模拟正常和癌症病人肠道的不同 pH 条件, 通过差异蛋白质组学的手段来找到在不同条件下表达变化的蛋白质, 并分析这些差异可

能对细菌自身和肠道造成的影响. 我们使用 Progenesis 对不同 pH 条件下生长的 *F. nucleatum* 蛋白质表达进行非标定量, 经过保留时间对齐和校正, 相同流出 m/z 在不同的重复之间保留时间误差在 1 min 以内(图 4).

鉴定的 1198 个蛋白质中共有 1001 个蛋白在 Progenesis 中具有定量信息, 其中 121 个蛋白在 pH 6.5 条件(癌症 pH 环境)下表达上调, 144 个蛋白在 pH 6.5 条件(癌症 pH 环境)下表达下调. 对表达量有显著性差异(大于 1.5 倍)的 265 个蛋白质分子进行 GO 分析可以得到富集的生物过程和分子功能(表 1), 其中红色的过程和功能在 pH 6.5 条件下上调. 在癌症 pH 环境下生长的 *F. nucleatum* 变化的生物过程除了转录, 还包含了 ncRNA 代谢和大量代谢相关的功能如硫胺素代谢, 糖代谢等. 在分子功能方面包含核糖体形成, 金属离子转运等. 与正常肠道 pH 相比, 我们可以看到处于癌症微环境 pH 条件下蛋白质表达的变化明显集中于与能量代谢相关的功能和过程. 因此, 我们将关注的生物功能集中于 *F. nucleatum* 在两种条件下能量代谢的变化.

2.4 *F. nucleatum* 的丁酸盐代谢

丁酸盐发酵是 *F. nucleatum* 重要的能量代谢过程, 在对 *F. nucleatum* 基因组进行注释和分析过程中, 产丁

图 3 *F. nucleatum* 蛋白质组的生物过程和分子功能 GO 注释
Figure 3 Gene Ontology analysis of biological processes and molecular functions annotations in *F. nucleatum* proteome

图4 校准前后保留时间的误差范围

Figure 4 Retention time variance before and after alignment

表1 差异蛋白质富集的生物过程(A)和分子功能(B)

Table 1 Enriched biological processes and molecular functions of the significant expression different proteins

(A)	
Biological processes	$-\log(p\text{-Value})$
sulfur compound biosynthetic process	1.009782
thiamin metabolic process	1.02047
thiamin and derivative biosynthetic process	1.02047
thiamin and derivative metabolic process	1.02047
response to extracellular stimulus	1.113148
cellular response to extracellular stimulus	1.113148
thiamin biosynthetic process	1.113148
phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	1.282357
ncRNA metabolic process	1.338941
ncRNA processing	1.351019
iron ion transport	1.351054
iron ion transmembrane transport	1.510454
high-affinity iron ion transport	1.510454
translation	2.498055
(B)	
Molecular functions	$-\log(p\text{-Value})$
cation binding	1.096386
ion binding	1.096386
zinc ion binding	1.208525
metallopeptidase activity	1.277128
iron ion transmembrane transporter activity	1.396889
oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors	1.396889
transition metal ion binding	1.470774
oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors, NAD or NADP as acceptor	1.557169
rRNA binding	1.673001
carboxy-lyase activity	1.698073
RNA binding	1.84451
structural molecule activity	2.378564
structural constituent of ribosome	2.378564

酸发酵代谢通路的绘制中所涉及到五类关键酶全部被找到, 包括乙酰辅酶 A-乙酰转移酶, 3-羟基丁酸酰基辅酶 A 脱氢酶, 烯酰水合酶, 酰基辅酶 A-脱氢酶, 乙酰乙酸钠:丁酰/乙酰辅酶 A 转移酶. 这些酶相关的编码基因共有八个(FN0495, FN1019, FN1020, FN0271, FN1535, FN1424, FN0272, FN0273), 其中包含三对同工酶. 最后共有七个代谢酶在此次实验条件下被鉴定到(图 5), 其中有五个在 pH 6.5 条件下表达下调(四个显著下调, 表达量变化 50%), 这五个酶包含了丁酸盐代谢的整个过程. 此外, 有两个代谢酶在 pH 6.5 条件下表达上调, 分别是 3-羟基丁酸酰基辅酶 A 脱氢酶和酰基辅酶 A-脱氢酶两种同工酶中的一种. 因此, 通过差异蛋白质组分析我们可以得到产丁酸代谢通路在 pH 6.5 条件下有显著下调.

图5 *F. nucleatum* 中产丁酸代谢通路相关蛋白的定量值Figure 5 The fold change of proteins involved in butyric acid fermentation pathway in *F. nucleatum*

丁酸代谢在癌症 pH 环境下受到抑制也与文献中报道的排泄物 pH 升高^[19]相关. 丁酸除了是肠黏膜细胞的主要能量来源^[20]之外, 丁酸盐对于维持肠道健康还有其他重要功能, 包括调节宿主免疫反应, 降低肠道上皮细胞的 DNA 氧化损伤、诱导遭受 DNA 损伤的细胞发生分化凋亡等^[21]. 因此, 从丁酸盐代谢的角度上看, 在正常肠道 pH 条件下更有利于维持肠道的健康, 而在癌症微环境的 pH 的条件下丁酸盐代谢水平下降是不利于肠道健康的. 因此, *F. nucleatum* 作为一种条件致病菌, 在正常条件下处于平衡的状态, 而在引起炎症或者

加速结直肠癌的进展过程时不仅可通过已知的 E-Cadherin/beta-Catenin 信号通路促进癌症的进展, 在自身的生活过程中, 也可能受到肠道 pH 变化从其他方面比如丁酸代谢的生物过程协同炎症的癌症的发展。

3 结论

基于 LC-MS/MS 的蛋白质组学技术可以快速的对单一微生物的培养物进行蛋白质组定性和定量的测定, 在对 *F. nucleatum* 蛋白质组的测定中可实现约 58% 的蛋白质组覆盖度, 蛋白质丰度分布有五个数量级的动态范围。通过在正常组织和癌症组织不同的 pH 条件下的差异蛋白质组分析, 我们发现癌症 pH 条件下 *F. nucleatum* 的丁酸代谢受到抑制, 造成产丁酸能力下降, 从生理过程中解释了癌症病人的排泄物中丁酸盐含量减少的一种原因。此外, *F. nucleatum* 已经被证明能够促进癌症, 发现 *F. nucleatum* 在癌症 pH 环境下产丁酸能力下降可能是其在代谢水平上促进结直肠癌发展的原因之一。

4 实验部分

4.1 菌种和培养条件

哥伦比亚肉汤培养基分别调至 pH 7.5 和 pH 6.5, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。待培养基温度降至室温将所有培养基和保存菌种的甘油置于三菱的厌氧产气袋 24 h 以排除其中含有的溶解氧。*F. nucleatum* 培养于三菱的厌氧产气袋系统, 在 37 °C 下生长, 每次打开密封盒重新更换新的厌氧产气袋^[22]。培养至菌液 OD₆₀₀~0.7, 离心收集菌体, 并用 PBS 清洗菌体三次, 冻存于一 80 °C 或直接用于蛋白提取。

4.2 蛋白提取

菌体重新悬浮于含 4% SDS, 100 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 和蛋白酶抑制剂的裂解液中, 在冰上 200 W 超声破碎菌体 30 min (3 s 工作, 5 s 休息)。超声后蛋白溶液在 99 °C 加热 5 min, 14000xg 离心 15 min, 弃底部沉淀。得到的上清液进行蛋白定量后 1 mg/管分装。每管中加入终浓度 10 mmol/L 的 DTT 56 °C 下反应 30 min 后, 加入终浓度 20 mmol/L IAA 于暗处室温反应 30 min。向蛋白溶液中加入三倍体积的预冷丙酮, -20 °C 放置过夜, 离心, 弃上清。得到的沉淀用预冷的丙酮洗涤一次, 离心, 弃上清。蛋白沉淀重悬于 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.8), 混悬溶解, 使用 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液稀释至尿素浓度至 1 mol/L。按照 1:50 加入胰蛋白酶, 于 37 °C 酶解过夜。酶解结束后使用 10% 的 TFA 将酶解液调至酸性, 终止酶解。酶解液使用 Sep-pak C18 固相萃取柱除盐, 真空浓缩。肽段重悬于 0.1% 的甲酸溶液, 置于 4 °C 保存。

4.3 LC-MS/MS

高效液相色谱仪使用 Eksigent 1D plus, 色谱柱

75 μm i.d. $\times$ 15 cm, C18 填料 3 μm i.d., 120 Å 孔径。流动相 A: 0.1% 甲酸的水溶液; 流动相 B: 0.1% 甲酸的乙腈溶液; 色谱梯度: 5%~7% (1 min), 7%~30% (89 min), 30%~40% (15 min), 40%~80% (1 min), 80% (2 min), 80%~5% (1 min), 5% (11 min)。质谱使用 Triple TOF 5600, 质谱参数如下: Gas1 (5), Curtain Gas (30), IHT (150), ISVF (2300); 质谱采集串联选择高灵敏度模式, 每个一级扫描最多接 30 个串联扫描; 动态排除 18 s。

4.4 数据处理

质谱数据使用 AB MS Converter 将 .wiff 文件转换成 .mgf 文件, 导入 mascot 搜库。Mascot 搜库参数——数据库: Swiss-Prot; 酶: Trypsin; 最大漏切位点: 2; 母离子质量偏差: 25 ppm; 碎片离子质量偏差: 0.1 Da; 固定修饰: 半胱氨酸烷基化 (+57 Da); 可变修饰: 甲硫氨酸氧化 (+16 Da) 和蛋白质 N 端乙酰化 (+42 Da)。搜库结果 .dat 文件通过 Scaffold 整合。不同 pH 条件下蛋白质组的表达变化通过 Progenesis LC-MS 进行定量。鉴定到的蛋白质组和差异蛋白所富集的生物过程和分子功能的 GO 注释分析使用的是 DAVID (<http://david.abcc.ncicrf.gov>)^[23]。

References

- [1] Group, N. H. W.; Peterson, J.; Garges, S.; Giovanni, M.; McInnes, P.; Wang, L.; Schloss, J. A.; Bonazzi, V.; McEwen, J. E.; Wetterstrand, K. A.; Deal, C.; Baker, C. C.; Di Francesco, V.; Howcroft, T. K.; Karp, R. W.; Lunsford, R. D.; Wellington, C. R.; Belachew, T.; Wright, M.; Giblin, C.; David, H.; Mills, M.; Salomon, R.; Mullins, C.; Akolkar, B.; Begg, L.; Davis, C.; Grandison, L.; Humble, M.; Khalsa, J.; Little, A. R.; Peavy, H.; Pontzer, C.; Portnoy, M.; Sayre, M. H.; Starke-Reed, P.; Zakhari, S.; Read, J.; Watson, B.; Guyer, M. *Genome Res.* **2009**, *19*, 2317.
- [2] Backhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L. V.; Koh, G. Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C. F.; Gordon, J. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15718.
- [3] Sjöström, L.; Lindroos, A. K.; Peltonen, M.; Torgerson, J.; Bouchard, C.; Carlsson, B.; Dahlgren, S.; Larsson, B.; Narbro, K.; Sjöström, C. D.; Sullivan, M.; Wedel, H.; Swedish Obese Subjects Study Scientific, G. N. *Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 2683.
- [4] Tremaroli, V.; Backhed, F. *Nature* **2012**, *489*, 242.
- [5] Bolstad, A. I.; Jensen, H. B.; Bakken, V. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 55.
- [6] Bennett, K. W.; Eley, A. J. *Med. Microbiol.* **1993**, *39*, 246.
- [7] Kapatal, V.; Anderson, I.; Ivanova, N.; Reznik, G.; Los, T.; Lykidis, A.; Bhattacharyya, A.; Bartman, A.; Gardner, W.; Grechkin, G.; Zhu, L.; Vasieva, O.; Chu, L.; Kogan, Y.; Chaga, O.; Goltsman, E.; Bernal, A.; Larsen, N.; D'Souza, M.; Walunas, T.; Pusch, G.; Haselkorn, R.; Fonstein, M.; Kyripides, N.; Overbeek, R. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2005.
- [8] Kostic, A. D.; Gevers, D.; Pedamallu, C. S.; Michaud, M.; Duke, F.; Earl, A. M.; Ojesina, A. I.; Jung, J.; Bass, A. J.; Tabernero, J.; Baselga, J.; Liu, C.; Shivdasani, R. A.; Ogino, S.; Birren, B. W.; Huttenhower, C.; Garrett, W. S.; Meyerson, M. *Genome Res.* **2012**, *22*, 292.
- [9] Castellarin, M.; Warren, R. L.; Freeman, J. D.; Dreolini, L.; Krzywinski, M.; Strauss, J.; Barnes, R.; Watson, P.; Allen-Vercoe, E.; Moore, R. A.; Holt, R. A. *Genome Res.* **2012**, *22*, 299.
- [10] Rubinstein, M. R.; Wang, X.; Liu, W.; Hao, Y.; Cai, G.; Han, Y. W. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 195.
- [11] Nugent, S. G.; Kumar, D.; Rampton, D. S.; Evans, D. F. *Gut* **2001**, *48*, 571.
- [12] Navratilova, J.; Hankeova, T.; Benes, P.; Smarda, J. *Chemotherapy* **2013**, *59*, 112.
- [13] Cardone, R. A.; Casavola, V.; Reshkin, S. J. *Nat. Rev. Cancer* **2005**,

- 5, 786.
- [14] Zheng, J. F.; Sun, C. Y.; Sun, L. C.; Yang, X. M.; Wang, X. Z.; Huang, Y.; Li, Y.; He, J. Q. *Acta Chim. Sinica* **2010**, *68*, 996. (郑君芳, 孙超渊, 孙丽翠, 杨晓梅, 王小柱, 黄艳, 李洋, 贺俊崎, 化学学报, **2010**, *68*, 996.)
- [15] Xu, F. F.; Sun, S.; Liu, X. H. *Acta Chim. Sinica* **2006**, *64*, 543. (徐菲菲, 孙胜, 刘秀华, 化学学报, **2006**, *64*, 543.)
- [16] Liu, X. H.; Yin, X. F.; Shen, H. L.; Lu, H. J.; Yang, P. Y. *Sci. Sinica (Chimica)* **2014**, *44*, 739. (刘晓慧, 殷薛飞, 申华莉, 陆豪杰, 杨芃原, 中国科学, **2014**, *44*, 739.)
- [17] Hebert, A. S.; Richards, A. L.; Bailey, D. J.; Ulbrich, A.; Coughlin, E. E.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 339.
- [18] Beck, M.; Schmidt, A.; Malmstroem, J.; Claassen, M.; Ori, A.; Szymborska, A.; Herzog, F.; Rinner, O.; Ellenberg, J.; Aebersold, R. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 549.
- [19] Ohigashi, S.; Sudo, K.; Kobayashi, D.; Takahashi, O.; Takahashi, T.; Asahara, T.; Nomoto, K.; Onodera, H. *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 1717.
- [20] Pryde, S. E.; Duncan, S. H.; Hold, G. L.; Stewart, C. S.; Flint, H. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *217*, 133.
- [21] Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Gleis, M. *Mutat. Res.* **2009**, *682*, 39.
- [22] Han, Y. W. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2006**, Chapter 13, Unit 13A 1.
- [23] Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. *Nature Protoc.* **2009**, *4*, 44.

(Zhao, X.)