

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2020.01.010

福尔马林固定石蜡包埋组织切片蛋白质组 分析方法与应用研究进展

翁爽, 王明超, 应万涛*, 钱小红

(中国人民解放军军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206)

摘要: 福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-fixed and paraffin-embedding, FFPE)是最常见的临床组织保存技术, FFPE组织具有标准化的制备流程、易于存储、标本量大、包含较完整的临床回顾性信息等特点, 而成为疾病生物标志物发掘的良好载体。近年来, 基于临床FFPE组织的特点, 发展了系列蛋白质组学研究方法, 包括样本制备、消解、分离到蛋白质质谱鉴定等多个领域, 总体呈现出微量、高灵敏度、高通量的技术特点, 并已成功用于肿瘤精准医学等临床蛋白质组研究。该综述将对FFPE组织切片样本的蛋白质组学方法, 及其在肿瘤研究中的应用进行概述, 从而为临床精准医学蛋白质组学的研究提供借鉴思路。

关键词: 福尔马林固定石蜡包埋(FFPE); 临床蛋白质组学; 交联; 生物标志物

中图分类号: O657.63; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2020)01-0075-07

Advances in Proteomics Techniques and Applications of Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissue Sections

WENG Shuang, WANG Ming-chao, YING Wan-tao*, QIAN Xiao-hong

(Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China)

Abstract: Formalin-fixed and paraffin-embedding(FFPE) is the most commonly used technique for clinical tissue preservation, while FFPE tissues have the characteristics including standardized preparation process, easy to store, large sample quantity and retrospective clinical information, which make them the high quality library for biomarker discovery and verification. In recent years, a series of proteomics approaches have been developed, covering sample preparation, protein digesting, peptide separation and identification by mass spectrometry. The whole processes have the characteristics of micro-scale sample quality, high sensitivity and high throughput. These methods have been successfully used in clinical proteomics researches, for example, the tumor precision medicine. The proteomics methods for FFPE tissue samples and their applications in oncobiology are summarized in this review, providing a valuable reference for proteomics based clinical precision medicine researches.

Key words: formalin-fixed and paraffin-embedding(FFPE); clinical proteomics; cross-linking; biomarker

临床蛋白质组学研究是通过发现不同病患和健康人之间的蛋白质及其修饰水平的表达丰度差异, 以实现疾病人群的分子分型, 发现潜在的药物干预靶标和诊断标志物。除体液外, 常用的临床样本基本来自活检、手术切除等获得的组织。组织样本主要分为两种: 新鲜/冻存和福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-fixed and paraffin-embedding, FFPE)组织样本^[1], 其中FFPE组织在常温下可稳定储存数十年, 是组织病理学分析的金标准^[2-3]。经过一个世纪的发展, 在全世界范围内已经累积了大量的FFPE组织样本。FFPE组织样本的一个重要优势是具备长期的临床随访信息, 包括个体生活史、疾病分期、无病生存期和死亡时间等信息。这些信息对于多组学分析和目标导向的精准医学实践异常重要, 而这往往是新鲜冻存组织难以达到的。基于患者人群的FFPE组织开展差异蛋白质组学研究, 可以充分利

收稿日期: 2019-09-30; 修回日期: 2019-10-28

基金项目: 国家重点研发计划((2017YFC0906600); 法医遗传学公安部重点实验室开放课题(2018FGKFKT01); 国家自然科学基金重点项目(81530021)

* 通讯作者: 应万涛, 博士, 副研究员, 研究方向: 蛋白质组学, E-mail: yingwantao@mail.ncpsb.org

用罕见疾病或肿瘤等样本,发现与疾病诊断、分型、预后及治疗密切相关的靶蛋白。从技术角度,FFPE 组织由于经过甲醛固定、脱水和封蜡等处理,且通常只能获得几个微米厚度的切片,因此针对微量切片的 FFPE 组织蛋白质提取和消化、质谱分析等过程,本身又构成了极大的挑战。本综述将首先概述针对 FFPE 组织切片蛋白质组分析的技术发展,随后概括各种疾病尤其是肿瘤中差异蛋白和候选标志物的发现研究。

1 FFPE 组织切片样本的制备方法

福尔马林固定方法使组织结构和细胞形态得到稳定的保护,且与苏木精和曙红染色程序相容,因此成为病理组织保存的金标准^[3]。其基本流程为:手术获得的组织清洗后立即用 10% 福尔马林溶液(即 40 g/L 甲醛水溶液)固定 24~48 h;取出后切成适当厚度块状(通常为 3 mm),使用不同浓度乙醇水溶液和二甲苯脱水后,包埋在熔融的石蜡中并使其在室温下固化,形成 FFPE 组织^[1]。在组织病理学的研究中,常将 FFPE 组织切成 3~10 μm 的薄片并贴于载玻片上,用于后续分析。临床样本取材过程中的质控和样本固定流程的标准化,是影响 FFPE 组织切片蛋白质表达谱稳定性的两个重要因素。因此在取材时将样本进行清洗以降低来自血液的污染,以及缩短手术后组织常温放置时间,是 FFPE 组织样本制备以及后续分析的关键。

2 FFPE 组织切片样本制备过程中的化学修饰

在组织固定过程中,甲醛可与多种蛋白质氨基酸残基发生反应或交联^[1,4]。Metz 等^[4]基于质谱技术,发现了蛋白质与甲醛的交联规则:第一阶段,蛋白质分子上的伯胺基和甲醛的醛基之间形成胺基-羟甲基加合物(图 1,反应[1]);然后分子内消除 1 个水分子产生席夫碱(图 1,反应[2])。第二阶段,蛋白质中氨基酸(如酪氨酸)上的亲核基团进攻席夫碱的亚甲基碳(=CH₂)产生交联(图 1,反应[3])。此外,在福尔马林溶液中,甲醛可迅速水合形成亚甲基二醇,蛋白质分子中的伯胺基团可与醇羟基反应形成缩醛,或者与芳环形成羟甲基,再进一步参与交联反应^[5]。

上述化学修饰,在不同水平影响着蛋白质的

结构,主要表现为:在一级结构上对单个氨基酸产生影响,使氨基酸修饰发生改变或增加额外修饰;在二级结构上对肽链的 α 螺旋和 β 折叠以及不同片层产生修饰,或产生片层之间的交联;在三级结构上引起蛋白质高级结构的改变(3D 修饰);在四级结构上通过交联聚合产生多种蛋白质的交联复合物。这些影响使肽段的理化性质发生改变,高级结构的交联更会增加蛋白提取以及酶切的难度^[5]。因而,选择提取 FFPE 组织切片时的溶剂显得尤其重要。

3 FFPE 组织切片样本蛋白的提取

FFPE 组织来源的切片可直接进行蛋白质提取^[6],但主要挑战之一是建立标准化高效的提取方案,从而实现微量 FFPE 组织中蛋白质的提取。FFPE 组织切片在蛋白提取前需要进行脱蜡和重水化。常用脱蜡液为二甲苯,为了避免二甲苯的毒性,近年来有研究使用 90~95 °C 的热水替代二甲苯和乙醇进行脱蜡和重水化^[7]。但该新方法目前尚未完全标准化,二甲苯脱蜡和乙醇重水化仍然是 FFPE 组织切片进行蛋白提取的标准操作。

FFPE 组织切片样本裂解和蛋白提取时,裂解液的成分以及样本解交联是关键。商业化的裂解液较多使用酸不稳定表面活性剂 RapiGest(Waters)^[8-10],以及商业试剂盒,如 Liquid Tissue MS protein Prep kit^[11-13]、Qproteome FFPE tissue kit^[14]等。商业化裂解液和试剂盒对蛋白提取的重现性较高,但其具体成分并不知晓,这将影响后续分析方法的建立。自制裂解液的种类较多,中性或碱性 pH 可提高组织

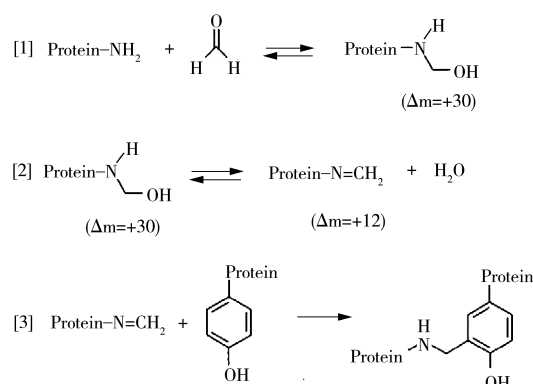


图 1 蛋白质甲醛交联的反应机理^[4]

Fig. 1 Reaction mechanism of protein cross-linking with formaldehyde^[4]

蛋白的产率,此外更高的 pH 在理论上更能促进亚甲基桥的断裂,因此常选用 pH 值 4~9 的 Tris-HCl 和十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液进行组织样本蛋白的提取^[15-16]。Fowler 等^[17]通过大量比对,证明了 SDS 对 FFPE 组织蛋白提取的有效性。Broeckx 等^[18]对比了 8 种不同蛋白裂解液的提取效率,阐明了在提取液中加入 2% SDS 后,蛋白的回收率提高了 15 倍。目前,SDS 已成功应用于结直肠癌、肺腺癌等疾病 FFPE 组织样本的蛋白提取,以及后续的质谱分析^[15,19]。但需要注意的是,过高浓度的 SDS 可能会影响蛋白的溶解以及酶切和分离效率,这种干扰效应可通过后续的肽段消化过程消减^[15-16,20]。

尽管诸多裂解液之间存在差异,但普遍使用加热解交联提高蛋白提取的效率。这种技术基于 Shi 等^[21]1991 年创建的“热诱导抗原修复”(Heat-induced antigen retrieval, HIAR)方法,其基本过程是将 FFPE 组织切片样本用合适的裂解液溶解后,在 90~120 °C 下加热 10 min 至数小时。HIAR 水解亚甲基桥,从而切断蛋白之间的交联。通常情况下,温度越高达到相同质量的解交联所需的时间越少,但目前尚无达到 100% 解交联的实验方案^[22]。

4 FFPE 组织切片蛋白质的消化

利用蛋白酶消化蛋白质提取物,进而产生肽段是蛋白质组样本制备中必不可少的步骤。由于质谱仪与裂解液中部分试剂的不相容性,对于 FFPE 组织切片样本,早期常用的消化方法是胶内酶切和溶液酶切。这两种方法的主要优点是裂解液中的去垢剂(尤其是 SDS)相容,可在质谱上样前将 SDS 等去垢剂去除^[18,23-24]。但胶内酶切的缺点是肽的回收率较低^[16],溶液酶切则需对样本进行脱盐以减小对质谱的影响,而这些对微量样本都是异常严峻的问题。

Wisniewski 等^[25]于 2009 年描述了一种称为过滤器辅助样品制备(Filter aided sample preparation, FASP)的酶切技术,该方法使用膜过滤器进行裂解液中 SDS/尿素的替换。此后,Wisniewski 等^[16]于 2011 年进一步比较了用 FASP 和胶内酶切来处理微量的全细胞裂解液,结果表明 FASP 获得的肽段产率高于 50%,而胶内酶切平均低于 20%;当样本量低于 10 μg 时向裂解液中加入聚乙二醇 20000(PEG20000),使肽段回收率提高了 30%。Tanca 等^[20]于 2014 年对肝脏 FFPE 组织样本进行了溶液酶切、FASP 酶切、直接组织酶切(DT)的比较,发现 FASP 酶切得到的鉴定量最高(3 种方法分别鉴定到 1 616、2 076、1 940 种蛋白)。近年出现了一种提取 FFPE 组织切片中的蛋白质并进行后续酶切的新方法:对单片 FFPE 组织切片进行裂解,在高温加热和超声裂解后,调节 pH 至 7~8,直接酶切(Direct trypsinization, DTR)^[8-10]。该方法的蛋白鉴定量与 FASP 相当,且具有与各种经典组织学染色使用的染料兼容和酶切前的处理步骤较少的优点,比 FASP 更适合大规模样本的处理;但其酶消化的漏切率较高,提取的蛋白偏性较大,非胰蛋白酶消化肽也较多^[8,20]。Taverna 等^[26]于 2019 年提出了一种最新的酶切方法,即直接将微型化的聚合物凝胶置于 FFPE 组织切片区域上进行局部消化,该方法能够区分组织区域,检出区域间的差异表达蛋白。

考虑消化后的肽段与质谱分析具有更好的兼容性,FFPE 组织切片的消化首选胰蛋白酶。Lemaire 等^[27]比较了多种酶消化 FFPE 样本的结果,包括胰蛋白酶、Asp-N 和 Lys-C,发现胰蛋白酶的消化最为成功。Wisniewski 等^[15]于 2013 年将 Lys-C 与胰蛋白酶联用处理人结肠腺癌 FFPE 组织样本,分馏后共鉴定出 $9\,502 \pm 28$ 个蛋白。Gawin 等^[28]在 2018 年将人甲状腺癌的 FFPE 组织样本用单独胰蛋白酶酶切和 Lys-C 与胰蛋白酶联用进行了比较,从多酶联用中鉴定到 4 800 基因(单独胰蛋白酶酶切鉴定到 3700 多种基因)。

综上所述,目前最常用的 FFPE 组织切片消化方法是加入胰蛋白酶进行 FASP 酶切,新型的酶切方法和蛋白酶联用技术也在逐步发展。胰蛋白酶仍是最常使用的蛋白酶^[27],其对 FFPE 组织切片样本的蛋白鉴定最有利,将其与其它种类酶进行联用,可在一定程度上提高蛋白的鉴定量^[15,28]。而 FASP 酶切具备较好的兼容性,在保证肽段产率以及低漏切率的同时,可以获得最高的鉴定量^[8,16,20]。

5 激光捕获显微切割技术

激光捕获显微切割(Laser capture microdissection, LCM)技术是在保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下,直接从组织切片中获取目标细胞。LCM 与染色搭配,可以选择性获取组织块中特定区域^[29]。FFPE 组织的完整结构与 LCM 相结合,可实现局部区域的精确和可重复的空间分离,在一

一定程度上可以消除肿瘤样本的异质性^[30]。通过 LCM 收集 FFPE 组织切片样本, 以获得纯度较高的细胞或细胞外基质组分, 开展更为精准的蛋白质组分析, 已经成为一种发展趋势。Wood^[31]于 2017 年利用 LCM 从快速进展性阿尔茨海默症 (rpAD) 和典型散发性 AD (sAD) FFPE 脑组织切片中分离淀粉样斑块, 确定了两种疾病之间差异表达的 141 种蛋白质。Alrawashdeh 等^[32]于 2019 年用 LCM 收集神经浸润 (PNI) 和非神经浸润的胰腺导管癌上皮细胞, 发现了 PNI 表达改变的蛋白。Eckert 等^[33]通过 LCM 从卵巢癌 FFPE 组织切片中收集约 5 000 个基质细胞, 平均每个样本定量鉴定 4 428 种蛋白。

6 FFPE 组织切片来源肽段生物质谱分析

由于样本量的限制, 针对 FFPE 组织切片蛋白质组分析, 需在微量样本基础上考虑实现高覆盖和高精度定量的技术需求。基于微量样本, 在质谱分析前可以通过 SAX 对肽段样本进行预分馏, Wiśniewsk 等^[15-16]于 2011 年从 FFPE 组织区域选取的 3 000 个细胞中鉴定出 2 055 个蛋白, 2013 年从 110 nL FFPE 组织区域的细胞中鉴定出 10 000 个蛋白; Iglesias - Gato 等^[34]于 2016 年从 28 例前列腺癌 FFPE 组织样本中鉴定出 9 623 种表达的蛋白。

FFPE 切片样本蛋白质组学的发展前期均以数据依赖性采集 (DDA) 模式进行质谱分析, 上述研究皆是样本预分离结合 DDA 方法进行质谱分析。DDA 方法的蛋白鉴定灵敏度高, 但其样本检测时有一定随机性, 会降低蛋白质组学的采样深度^[35-36]。样本预分离结合 DDA 的方法虽可以增加蛋白质组覆盖度, 但也会增加时间和资源的浪费, 以及样本间的变异性。非数据依赖采集 (DIA) 模式则是将特定窗口内所有母离子进行碎裂, 实现了样本中肽段信号的全谱图化记录, 包括各种可能的翻译后修饰形式, 从而实现了 FFPE 组织切片的数字化信息记录^[37]。Wojcik 等^[38]于 2019 年对恶性外周神经鞘膜瘤 (MPNST) FFPE 组织样本和细胞系分别进行 DDA 和 DIA 数据采集, DDA 数据无法可靠区分共洗脱物质, 而细胞 DIA 数据中多梳复合物 2 (PRC2) 与肿瘤中结果高度吻合, 从而发现 PRC2 在发病机制中的作用。Azimi 等^[39]采用 DIA 分析正常皮肤和角质细胞病变 (KSL) 的 FFPE 样品, 从 93 个样本中定量了 3 574 种蛋白质, 并找到了可以区分疾病的差异表达蛋白。Kim 等^[13]则采用 FFPE 肿瘤活检组织的全蛋白质谱, 将两种胃癌样本从结直肠癌样本中分离出来, 并鉴定了特征蛋白 (Signature proteins)。

DDA 方法是目前 FFPE 组织切片样本的主要数据采集方法, DIA 方法的优势在于其一针进样检测, 即可实现蛋白质组的深度定量。由于方法本身的特性, DIA 采集的数据覆盖了更为全面的信息, 对与疾病关联的研究更加有利。因此, 未来 DIA 方法可能会成为 FFPE 组织样本蛋白质组学分析的主流技术。

7 FFPE 样本的翻译后修饰研究

FFPE 组织也可用于蛋白质翻译后修饰的研究。Lai 等^[40]利用小鼠肝脏组织进行了 FFPE 样本和新鲜/冻存样本的比较, 结果显示两种样本中的磷酸化翻译后修饰相似。Hinneburg 等^[41]从少量的 FFPE 样本中释放出 N-和 O-聚糖, 并用于质谱分析, 可得到单个聚糖的详细信息。Wang 等^[19]从肺腺癌患者的 FFPE 组织切片中鉴定出 58 种 N-聚糖成分, 与正常人进行对比, 鉴定出肺腺癌患者中差异表达的糖修饰 (即高甘露糖型 N-聚糖上调, 唾液酸化的 N-聚糖下调)。Holfeld 等^[42]从 FFPE 和最佳温度冷冻切割的膀胱癌样本中各鉴定出 250 和 400 个磷酸化位点, 表明长期储存临床样品仍可用于磷酸化修饰的检测。上述研究表明, FFPE 组织样本处理过程并不影响蛋白质翻译后修饰的研究。

8 基于 FFPE 样本的生物标志物发现研究

临床 FFPE 组织样本库中包括了大量罕见和常见疾病 (如恶性肿瘤患者的组织样本), 是蛋白质生物标志物发现和验证的宝贵资源^[43]。通过比较不同疾病组织与正常组织, 可识别潜在的生物标志物。FFPE 组织样本处理技术及质谱策略目前已用于许多组织器官的疾病研究以及潜在疾病生物标志物的寻找。表 1 列举了部分从 2016 年起通过 FFPE 组织样本在肿瘤中寻找潜在生物标志物和药靶的应用, 包括甲状腺癌^[44]、小细胞肺癌^[12]、卵巢癌^[6,33]、结直肠癌^[45-46]、肾透明细胞癌^[47]、膀胱尿路上皮癌^[48-49]、实体瘤^[50]等疾病。

表1 肿瘤 FFPE 组织样本研究中发现的潜在生物标志物(部分)
Table 1 Potential biomarkers found in cancer FFPE tissue samples(partial)

组织	生物标志物以及疾病预后分子	文献
卵巢癌	NNMT, CTH	[6, 33]
前列腺癌	pro-NPY	[34]
甲状腺癌	FINC, ACTB1, LMNA, HSP7C, KAD1	[44]
异质性角质皮肤病变	FGFR2, Rho GTP	[39]
结直肠癌	Aldolase A, KNG1, OLFM4, Sec24C	[45 - 46]
小细胞肺癌和初级肺癌	MCM2/4/6/7, MSH2, RCC2, CORO1C, CHD4, IPO9, PHGDH, TYMP	[12]
结直肠癌(5-氟尿嘧啶2化疗)	所有响应者: IFIT1, FASTKD2, PIP4K2B, ARID1B, SLC25A33 下降; 无应答者: CALD1, CPA3, B3GALT5, CD1, RIPK1 下降	[24]
肾透明细胞癌	XPNPEP-2, XPNPEP-1	[47]
膀胱尿路上皮癌	AHNAK, EPPK1, MYH14, OLFM4; ANXA1, BGN, IGFBP7, ISLR, MDP1, PLS3	[48 - 49]
恶性外周神经鞘膜瘤	PRC2	[38]
新型肝转移相关蛋白胰腺癌	CNPY2, ANXA6	[11]
实体瘤	LSD1	[50]

9 总结与展望

FFPE 组织切片样本的标准化制备、高存储量、丰富的临床回顾性信息等优势,使其成为疾病生物标志物发现的丰富资源。在过去数十年中,FFPE 组织切片蛋白质组学分析方法获得了系列的发展,随着裂解液的优化以及蛋白提取方法的发展,在样本解交联的同时可以达到更高效的蛋白提取。同时,在保证质谱兼容性的基础上,实现了高效的样本消化。方法的发展推进了 FFPE 蛋白质组学逐步应用于肿瘤等重大疾病的研究,并发现了系列候选标志分子(表1)。随着蛋白质组学技术在速度、灵敏度、通量化水平的更高更快发展,基于 FFPE 组织切片的精准蛋白质组学应用还将继续深入发展。同时,对已经发现的候选标志物,利用丰富的 FFPE 样本库,开展大规模的验证工作,也将是未来一段时间 FFPE 组织样本应用的一个重要内容,并将有利于推进更为精准、高效、实用的生物标志物靶标的发现。

参考文献:

- [1] Fox C H, Johnson F B, Whiting J, Roller P P. *J. Histochem. Cytochem.*, **1985**, 33(8): 845 - 853.
- [2] Balgley B M, Guo T, Zhao K, Fang X, Tavassoli F A, Lee C S. *J. Proteome Res.*, **2009**, 8(2): 917 - 925.
- [3] Chafin D, Theiss A, Roberts E, Borlee G, Otter M, Baird G S. *PLoS One*, **2013**, 8(1): e54138.
- [4] Metz B, Kersten G F, Hoogerhout P, Brugghe H F, Timmermans H A, De Jong A D, Hennink W E, Criommelin D J, Jiskoot W. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(8): 6235 - 6243.
- [5] Matsuda K M, Chung J Y, Hewitt S M. *Expert Rev. Proteom.*, **2010**, 7(2): 227 - 237.
- [6] Hughes C S, Mcconechy M K, Cochrane D R, Nazeran T, Karnezis A N, Huntsman D G, Morin G B. Quantitative Profiling of Single Formalin-fixed Tumour Sections: Proteomics for Translational Research, **2016** [2019 - 08 - 12]. <https://doi.org/10.1038/srep34949>.
- [7] Mansour A G, Khalil P A, Bejjani N, Chatila R, Dagher - Hamalian C, Faour W H. *Histol. Histopathol.*, **2017**, 32(3): 307 - 313.
- [8] Föll M C, Fahrner M, Oria V O, Kühs M, Biniössek M L, Werner M, Bronsert P, Schilling O. Reproducible Proteomics Sample Preparation for Single FFPE Tissue Slices Using Acid-labile Surfactant and Direct Trypsinization, **2018** [2019 - 08 - 12]. <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9188-y>.
- [9] Longuespée R, Baiwir D, Mazzucchelli G, Smargiasso N, De Pauw E. *Methods Mol. Biol.*, **2018**, 1723: 19 - 31.
- [10] Azimi A, Kaufman K L, Ali M, Kossard S, Fernandez - Penas P. *Cancer Genom. Proteom.*, **2016**, 13(6): 453 - 465.
- [11] Shimura M, Mizuma M, Takadate T, Katoh Y, Suzuki T, Iseki M, Hata T, Aodi S, Suzuki Y, Sakata N, Ohtsuka H, Hayashi H, Morikawa T, Nakagawa K, Motoi F, Naitoh T, Igarashi K, Sasano H, Ohtsuka H. *Oncotarget*, **2018**, 9(36): 24291 - 24303.
- [12] Fujii K, Miyata Y, Takahashi I, Koizumi H, Saji H, Hoshikawa M, Takagi M, Nishimura T, Nakamura H. Differential Proteomic Analysis between Small Cell Lung Carcinoma(SCLC) and Pulmonary Carcinoid Tumors Reveals Molecular Signatures for Malignancy in Lung Cancer, **2018** [2019 - 08 - 12]. <https://doi.org/10.1002/prca.201800015>.
- [13] Kim Y J, Sweet S M M, Egerton J D, Sedgewick A J, Woo S, Liao W L, Merrihew G E, Searle B C, Vaske C, Heaton R, MacCoss M J, Hembrough T. *J. Proteome Res.*, **2018**, 18(1): 426 - 435.
- [14] Luebker S A, Wojtkiewicz M, Koepsell S A. *Proteomics*, **2015**, 15(21): 3744 - 3753.

- [15] Wiśniewski J R, Duś K, Mann M. *Prot. Clin. Appl.*, **2013**, 7(3/4): 225 – 233.
- [16] Wiśniewski J R, Ostasiewicz P, Mann M. *J. Proteome Res.*, **2011**, 10(7): 3040 – 3049.
- [17] Fowler C B, Cunningham R E, O’Leary T J, Mason J T. *Lab. Investig.*, **2007**, 87(8): 836 – 846.
- [18] Broeckx V, Boonen K, Pringels L, Sagaert X, Prenen H, Landuyt B, Schoofs L, Maes E. *Mol. Biosyst.*, **2016**, 12(2): 553 – 565.
- [19] Wang X N, Deng Z A, Huang C C, Zhu T, Lou J T, Wang L, Li Y. *J. Proteom.*, **2018**, 172: 1 – 10.
- [20] Tanca A, Abbondio M, Pisanu S, Pagnozzi D, Uzzau S, Addis M F. Critical Comparison of Sample Preparation Strategies for Shotgun Proteomic Analysis of Formalin-fixed, Paraffin-embedded Samples: Insights from Liver Tissue, **2014** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-28>.
- [21] Shi S R, Key M E, Kalra K L. *J. Histochem. Cytochem.*, **1991**, 39(6): 741 – 748.
- [22] Xu H, Yang L, Wang W, Shi S R, Liu C, Liu Y, Fang X P, Taylor C R, Lee C S, Balgley B M. *J. Proteome Res.*, **2008**, 7(3): 1098 – 1108.
- [23] Liu S, Xu F, Yin Y N, Zhang J L, Wang F Q, Li Y C, Xu P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2019**, 33(17): 1381 – 1388.
- [24] Chauvin A, Wang C S, Geha S, Garde – Granger P, Mathieu A A, Lacasse V, Boisvert F M. The Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy with 5-Fluorouracil in Locally Advanced Rectal Cancer Patients: a Predictive Proteomic Signature, **2018** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9192-2>.
- [25] Wisniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. *Nat. Methods*, **2009**, 6(5): 359 – 362.
- [26] Taverna D, Mignogna C, Santise G, Gaspari M, Cuda G. On-tissue Hydrogel-mediated Nondestructive Proteomic Characterization: Application to fr/fr and FFPE Tissues and Insights for Quantitative Proteomics Using a Case of Cardiac Myxoma, **2019** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1002/prca.201700167>.
- [27] Lemaire R, Desmons A, Tabet J C, Day R, Salzet M, Fournier I. *J. Proteome Res.*, **2007**, 6(4): 1295 – 1305.
- [28] Gawin M, Wojakowska A, Pietrowska M, Marczak Ł, Chekan M, Jelonek K, Lange D, Jacsik R, Gruca A, Widłak P. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2018**, 472: 68 – 79.
- [29] Ostasiewicz P, Wiśniewski J R. *Methods Enzymol.*, **2017**, 585: 159 – 176.
- [30] Buczak K, Ori A, Kirkpatrick J M, Holzer K, Dauch D, Roessler S, Endris V, Lasitschka F, Parca L, Schmidt A, Zender L. *Mol. Cell. Proteomics*, **2018**, 17(4): 810 – 825.
- [31] Wood H. Alzheimer Disease: Localized Proteomics Distinguishes AD Subtypes, **2017** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.41>.
- [32] Alrawashdeh W, Jones R, Dumartin L, Radon T P, Cutillas P R, Feakins R M, Dmitrovic B, Demir I E, Ceyhan G O. *Crnogorac – Jurcevic T. Mol. Oncol.*, **2019**, 13(5): 1075 – 1091.
- [33] Eckert M A, Coscia F, Chryplewicz A, Chang J W, Hernandez K M, Pan S, Tienda S M, Nahotko D A, Li G, Blazenovic L, Lastra R R, Curtis M, Yamada D, Perets R, McGregor S M, Andrade J, Fiehn O, Moellering R E, Mann M, Lastra R R. *Nature*, **2019**, 569(7758): 723 – 728.
- [34] Iglesias – Gato D, Wikström P, Tyanova S, Lavallee C, Thysell E, Carlsson J, Hagglo f, Cox J, Andrén O, Stattin P, Egevad L, Anders W, Bjartell A, Colins C C, Bergh A, Geiger T, Mann M, Flores – Morales A. *Eur. Urol.*, **2016**, 69(5): 942 – 952.
- [35] Bruderer R, Bernhardt O M, Gandhi T, Miladinovic S M, Cheng L Y, Messner S, Ehrenberger T, Zanotelli V, Butscheid Y, Escher C, Vitek O, Rinner O, Reiter L. *Mol. Cell. Proteomics*, **2015**, 14(5): 1400 – 1410.
- [36] Meier F, Geyer P E, Virreira Winter S, Cox J, Mann M. *Nat. Methods*, **2018**, 15: 440 – 448.
- [37] Shao W G, Guo T N, Toussaint N C, Xue P, Wagner U, Li L, Charmpi K, Zhu Y, Wu J M, Buljan M, Sun R, Rutishauser D, Hermanns T, Fankhauser C D, Poyet C, Ljubicic J, Rupp N, Rüschoff J H, Zhong Q, Beyer A, Ji J F, Collins B C, Liu Y S, Rättsch G, Wild P J, Aebersold R. Comparative Analysis of mRNA and Protein Degradation in Prostate Tissues Indicates High Stability of Proteins, **2019** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10513-5>.
- [38] Wojcik J B, Marchione D M, Sidoli S, Djedid A, Lisby A, Majewski J, Garcia B A. Epigenomic Reordering Induced by Polycomb Loss Drives Oncogenesis but Leads to Therapeutic Vulnerabilities in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors, **2019** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3704>.
- [39] Azimi A, Yang P, Ali M, Howard V, Mann G J, Kaufman K L, Fernandez – Penas P. Data Independent Acquisition Proteomic Analysis Can Discriminate between Actinic Keratosis, Bowen’s Disease, and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, **2019** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.128>.
- [40] Lai Z W, Weisser J, Nilse L, Costa F, Keller E, Tholen M. *Mol. Cell. Proteom.*, **2016**, 15(6): 2203 – 2213.
- [41] Hinneburg H, Schirmeister F, Korac P, Kolarich D. *High – Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. New York; Humana Press, **2017**: 131 – 145.
- [42] Holfeld A, Valdés A, Malmstrom P U, Segersten U, Lind S B. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(9): 5841 – 5849.

- [43] Hammer E, Ernst F D, Thiele A, Karanam N K, Kujath C, Evert M, Voelker U, Barthlen W. *Clin. Chim. Acta*, **2014**, 433: 235 – 241.
- [44] Galli M, Pagni F, De Sio G, Smith A, Chinello C, Stella M, Mosele N. *Biochim. Biophys. Acta*, **2017**, 1865(7): 817 – 827.
- [45] Yamamoto T, Kudo M, Peng W X, Takata H, Takakura H, Teduka K, Fujii T, Mitamura K, Taga A, Uchida E, Naito Z. *Tumor Biol.*, **2016**, 37(10): 13595 – 13606.
- [46] Quesada – Calvo F, Massot C, Bertrand V, Longuespée R, Blétard N, Somja J, Delvenne P. OLFM4, KNG1 and Sec24C Identified by Proteomics and Immunohistochemistry as Potential Markers of Early Colorectal Cancer Stages, **2017** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9143-3>.
- [47] Drendel V, Heckelmann B, Chen C Y, Weisser J, Espadas G, Schell C, Sabido E, Werner M, Jilg C A, Schilling O. *Oncotarget*, **2017**, 8(59): 100066 – 100078.
- [48] Lee H, Kim K, Woo J, Park J, Kim H, Lee K E, Kim H, Kim Y, Moon K C, Park I A. *Mol. Cell. Proteom.*, **2018**, 17(9): 1788 – 1802.
- [49] De Velasco G, Trilla – Fuertes L, Gamez – Pozo A, Urbanowicz M, Ruiz – Ares G, Sepúlveda J M, Prado – Vazquez G, Arevalillo J M, Zapater – Moros A, Navarro H, Lopez – Vacas R. Urothelial Cancer Proteomics Provides both Prognostic and Functional Information, **2017** [2019 – 08 – 12]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15920-6>.
- [50] Doll S, Kriegmair M C, Santos A, Wierer M, Coscia F, Neil H M, Porubsky S, Geyer P E, Muns A, Nuhn P, Mann M. *Mol. Oncol.*, **2018**, 12(8): 1296 – 1307.

(责任编辑: 龙秀芬)