

木香桉内酯诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡作用机制的研究

王桂明 史栋栋 彭章晓 鲁阳芳 谷雪 王彦* 闫超*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘 要 研究了木香桉内酯诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞凋亡的作用机制。采用流式细胞仪测定不同浓度木香桉内酯(0, 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 MCF-7 细胞后细胞凋亡、活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 含量及线粒体跨膜电位(Mitochondrial transmembrane potential, MTP) 的变化, 气相色谱-质谱联用(GC-TOF/MS) 技术分析加药组与未加药组的代谢差异物。结果表明, 木香桉内酯能诱导 MCF-7 细胞凋亡, 并具有浓度依赖性, 能够促使 ROS 含量升高; MTP 在 2 $\mu\text{g/mL}$ 木香桉内酯作用时升高, 在 4 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 时显著下降; 基于 GC-TOF/MS 的细胞代谢组学研究, 最终发现 15 种代谢差异物。基于上述结果, 推测木香桉内酯通过引起 ROS 含量升高、MTP 降低, 扰乱线粒体的正常功能, 进一步阻碍 TCA 循环, 抑制 ATP 合成, 扰乱了细胞内代谢物的平衡, 并引起位于膜间隙的凋亡相关蛋白释放, 最终导致 MCF-7 细胞的凋亡。

关键词 MCF-7 细胞; 细胞凋亡; 细胞代谢组学; 活性氧; 线粒体跨膜电位

1 引 言

乳腺癌严重威胁着女性健康, 居于女性肿瘤患者致死率的第 2 位, 发病率在发展中国家呈逐年上升趋势^[1]。木香桉内酯是从中药木香中提取的倍半萜内酯, 研究发现其具有抗炎等生物活性^[2~4], 可诱导早幼粒白血病 HL-60 细胞及 U937 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡^[5~7], 对正常细胞无毒性。它可以通过引起 ROS 的升高、MTP 的崩溃诱导膀胱癌细胞的凋亡^[8], 研究表明, 其通过与微管蛋白作用、抑制端粒酶活性等抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖^[9, 10]。肿瘤细胞内 ROS 的含量比正常细胞高, 在以 ROS 为靶点的药物作用下肿瘤细胞内 ROS 首先达到氧化应激状态, 因此可有选择性地杀死癌细胞^[11]。MTP 的降低可以引起肿瘤细胞的凋亡, ROS 含量升高可以引起线粒体通透性转运孔的打开而引起 MTP 降低, 最终促进细胞凋亡^[12]。因此, ROS 升高、MTP 的降低与细胞凋亡之间存在密切联系。

代谢组学被称为“基因型和表型之间的桥梁”^[13], 不仅可以测定药物本身的代谢及药代动力学变化, 还可以测定药物作用引起的内源性代谢产物的变化^[14, 15]。因此, 将代谢组学与传统生物学研究方法相结合, 对于深入探究药物作用机制有重要的意义。

目前, 代谢组学结合传统生物学的方法考察药物抑制肿瘤细胞增殖作用的研究已有文献报道^[16], 但是将此方法用于细胞凋亡作用机制方面的研究仍未见报道。本研究以木香桉内酯作用于 MCF-7 细胞, 基于细胞内 ROS 含量以及 MTP 的变化, 结合气相色谱-质谱联用(GC-TOF/MS) 技术分析药物作用前后细胞内代谢产物的变化, 探讨了木香桉内酯诱导 MCF-7 细胞凋亡作用的机制。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CO₂ 培养箱(氮吹仪(Thermo, USA); 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); LSRFortessa 流式细胞仪、FACSCalibur 流式细胞仪(BD, USA); GC $\times$ GC-TOF/MS (LECO, USA); FS-150PV 超声细胞破碎仪(上海生析超声仪器有限公司)。木香桉内酯(纯度 > 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 胎牛血清、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶(美国赛默飞世尔科技有限公司); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck); 吡啶(分析纯)、二甲基亚砜(DMSO, 分析纯) 均购于国药集团化学试剂有限公司; N, O-双(三

2014-10-08 收稿; 2015-01-07 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 21175092, 21105064)、国家重大科学仪器设备开发专项(Nos. 2011YQ150072)、上海市自然科学基金项目(No. 12ZR1413600) 资助

* E-mail: chaoyan@unimirotech.com; wangyan11@sjtu.edu.cn

甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA,含1%三甲基氯硅烷)、甲氧胺、2-氯-苯丙氨酸均购于美国Sigma公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、罗丹明 123(Rhodamine123)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)均购于碧云天生物技术研究。

2.2 细胞凋亡分析

用DMSO配制10 mg/mL木香烃内酯储备液,用培养基逐步稀释至8,4和2 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO终浓度<0.1%)。用Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡情况。试剂盒中具有Annexin V-FITC与碘化丙啶(PI)两种染料。磷脂酰丝氨酸(PS)主要分布在细胞膜内侧,凋亡细胞的PS外翻,Annexin V与PS结合;凋亡晚期及坏死细胞的细胞膜完整性受到破坏,PI可以进入细胞内进行标记,Annexin V-FITC可以进入坏死细胞内与位于内侧的PS结合而标记。

指数生长期的MCF-7细胞接种在六孔板上(2×10^5 /孔),培养12 h后,随机分4组,每组3个平行,分别加入以下各组药物:Control(0 $\mu\text{g/mL}$),2,4和8 $\mu\text{g/mL}$ 。培养24 h后,收集细胞,用冷PBS缓冲溶液清洗2遍,加入200 μL 凋亡结合液后用移液枪轻轻吹散细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI避光孵育15 min, FACSCalibur流式细胞仪检测10000个细胞。

2.3 细胞内ROS含量的测定

用荧光探针DCFH-DA测定ROS的含量。DCFH-DA本身没有荧光,进入细胞后可最终被ROS氧化为有荧光的2',7'-二氯荧光黄(DCF),其荧光强度代表细胞内ROS的水平。将处于指数生长期的MCF-7细胞接种在六孔板上(2×10^5 /孔),培养12 h后,随机分4组,每组3个平行,分别加入木香烃内酯2,4和8 $\mu\text{g/mL}$ 和空白培养基。培养24 h后,弃去培养基,用含8 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA无血清培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min, PBS清洗2遍以除去未标记的DCFH-DA探针,收集细胞用LSRFortessa流式细胞仪分析,检测10000个细胞。

2.4 线粒体跨膜电位(MTP)的测定

Rhodamine123是一种携带正电荷的阳离子染料,可依赖较高的负线粒体跨膜电位有选择性的进入线粒体,其荧光强度高说明线粒体内电负性强,MTP高,反之则MTP低。将处于指数生长期的MCF-7细胞接种在六孔板上(2×10^5 /孔),培养12 h后,随机分4组,每组3个平行,加入木香烃内酯(2,4和8 $\mu\text{g/mL}$)、空白培养基。培养24 h后, Rhodamine123(0.2 $\mu\text{mol/L}$)避光染色30 min,用冷PBS缓冲溶液清洗2遍,收集细胞,LSRFortessa流式细胞仪测定其荧光强度。

2.5 基于GC-TOF/MS的细胞代谢组学研究

2.5.1 细胞代谢物的提取及衍生化 将处于指数生长期的细胞接种在100 mm $\times$ 20 mm的培养皿中(3×10^6 /皿),培养12 h后加入木香烃内酯(6 $\mu\text{g/mL}$)、含等量DMSO的培养基,设6个平行。细胞的提取及衍生化过程如下^[17]:培养24 h后,弃去培养基,用生理盐水清洗3遍,液氮迅速猝灭。每个培养皿加入1000 μL 甲醇-水(4:1, V/V)溶液,刮取细胞至样品瓶中,为更充分提取细胞,每个样品加入200 μL 氯仿。每一样品加入10 μL 2-氯-苯丙氨酸(内标0.3 mg/mL),涡旋,超声破碎(3 min 5 s 开 5 s 关 4 $^{\circ}\text{C}$)细胞提取代谢物。

将提取后的细胞样品4000 r/min离心10 min,取1000 μL 上清液至GC进样瓶中,室温真空干燥,用氮气再次吹干后,加入80 μL 甲氧胺(15 mg/mL,吡啶配制),混合1 min,30 $^{\circ}\text{C}$ 反应90 min后,加入80 μL BSTFA和40 μL 正己烷,70 $^{\circ}\text{C}$ 下反应90 min。

2.5.2 GC-TOF/MS条件 DB-5 MS色谱柱(30 m $\times$ 250 μm I.D., J&W Scientific, Folsom, CA);载气:高纯氦气,流速1.0 mL/min。程序升温:起始温度80 $^{\circ}\text{C}$,保持0.2 min;以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至180 $^{\circ}\text{C}$,以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至240 $^{\circ}\text{C}$,以20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至290 $^{\circ}\text{C}$,保持11 min。进样口温度280 $^{\circ}\text{C}$,接口温度270 $^{\circ}\text{C}$,EI源温度220 $^{\circ}\text{C}$,电子碰撞能量70 eV。

质量扫描范围: m/z 30~600全扫描,质谱图采集速度:每秒20幅。

2.5.3 GC-TOF/MS数据分析 GC-TOF/MS得到的原始数据经ChromaTOF(v 4.50, LECO, St Joseph, MI, USA)软件进行预处理,得到包括样品信息、保留时间及峰面积等信息的CSV三维数据矩阵,扣除已知的假峰后对数据进行峰面积归一化,然后导入SIMCA-P 11.5软件进行多维统计分析。本

实验主要进行无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)。PCA分析主要观察样本的总体分布,OPLS-DA来区分加药组与对照组之间的代谢差异物。变量权重值(Variable importance in the projection, VIP) > 1 的代谢物被认为是差异代谢物,同时结合 t 检验及 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验验证差异性代谢物,最后将得到的代谢差异物进行 NIST 库搜索。

3 结果与讨论

3.1 木香烃内酯对 MCF-7 细胞凋亡的影响

研究木香烃内酯对 MCF-7 细胞的凋亡作用,流式细胞仪检测各组凋亡率,图 1A 是其中一组凋亡实验的散点图,①②③和④分别代表细胞碎片、后期凋亡细胞、活细胞、前期凋亡细胞;图 1B 是对 3 次平行实验进行分析的结果,从图可以看出随着药物作用浓度的升高,MCF-7 细胞的前期凋亡、后期凋亡及总凋亡率逐渐升高(在 2 $\mu\text{g/mL}$ 处前期凋亡率略降低,但是与对照组没有显著性差异)。由此可知,

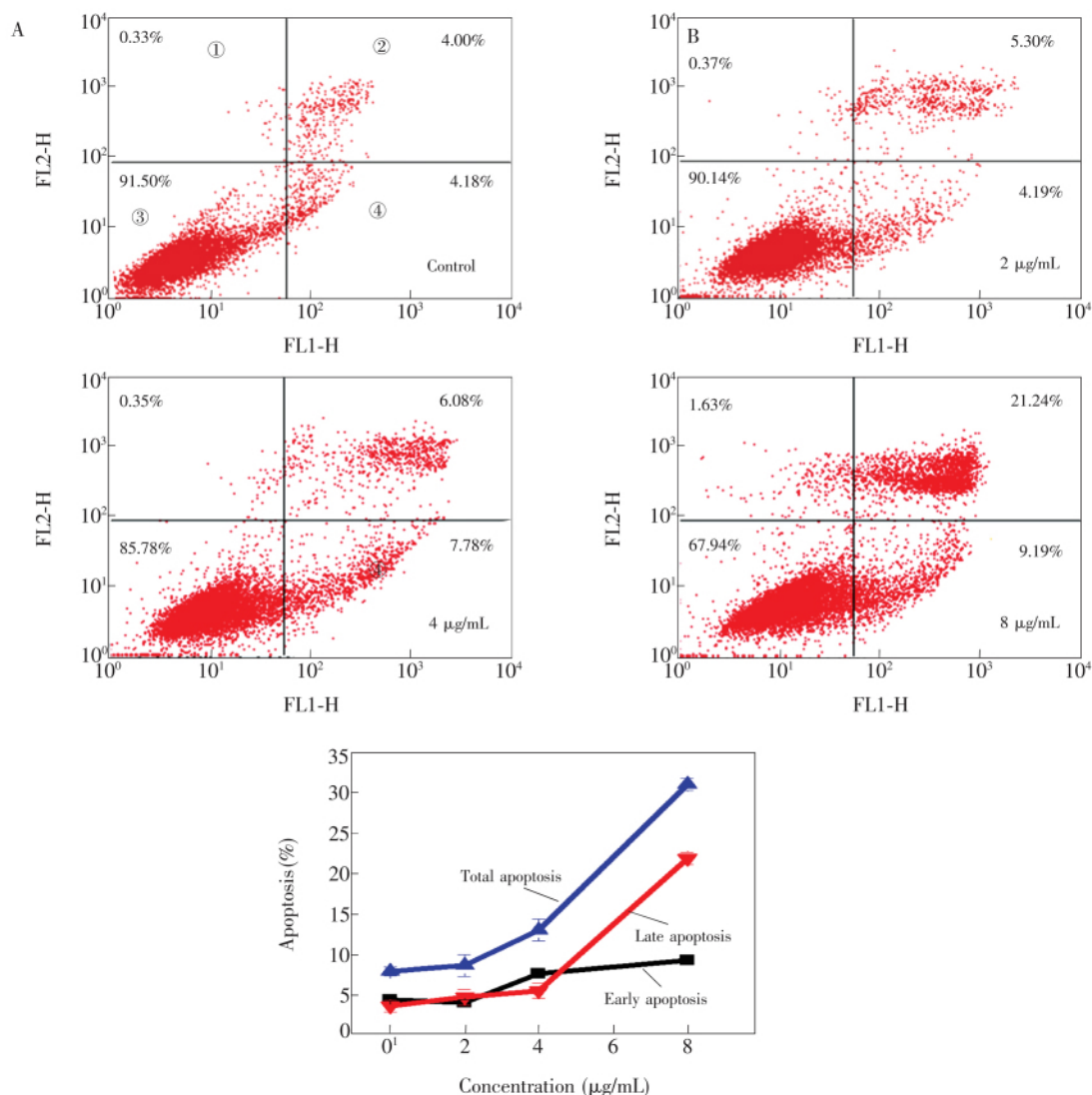


图 1 不同浓度木香烃内酯对 MCF-7 细胞的凋亡影响(作用时间 24 h)

Fig. 1 Effects of different concentrations of costunolide on apoptosis in MCF-7 cells incubated for 24 h

A, 流式细胞仪测定的散点图, ①~④分别代表细胞碎片、后期凋亡细胞、活细胞、前期凋亡细胞。B, 木香烃内酯作用下前期凋亡、后期凋亡与总凋亡率的对比分析。

A, Cell apoptosis detected by flowcytometry. 1-4 represent the cell debris, cell in early apoptosis, living cell and cell in late apoptosis respectively; B, Comparison of early apoptosis, late apoptosis and total apoptosis of MCF-7 cells treated with costunolide.

木香烃内酯具有诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用。

3.2 木香烃内酯对 MCF-7 细胞线粒体跨膜电位(MTP)的影响

MTP 的崩溃能引起细胞凋亡^[18]。为探究木香烃内酯诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用机制,本研究考察了其 MCF-7 细胞 MTP 的影响。由图 2 可见,与对照组相比,在 2 $\mu\text{g/mL}$ 木香烃内酯作用下 MTP 升高,在 4 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 时显著下降,且随着浓度的升高而下降。文献[19]报道药物诱导细胞凋亡早期首先抑制了 ATP 的跨膜转运使 MTP 升高;随后,足够多的线粒体通透性转运孔打开,MTP 降低,线粒体膨胀,细胞色素 c 释放,进而促进了细胞的凋亡。因此推测,MTP 的降低是木香烃内酯引起 MCF-7 细胞凋亡的因素,其中,在 2 $\mu\text{g/mL}$ 时由于其抑制了 ATP 跨膜转运而引起的 MTP 升高的作用大于其对 MTP 降低的作用,因而引起 MTP 升高。

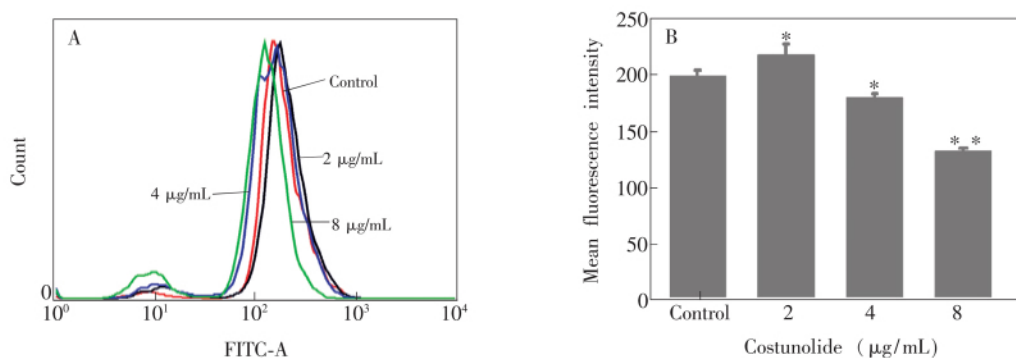


图2 木香烃内酯对 MCF-7 细胞线粒体跨膜电位的影响(作用时间为 24 h)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig.2 Effects of costunolide on mitochondrial transmembrane potential of MCF-7 cells after incubation for 24 h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

A 不同浓度时的荧光直方图叠加图; B, 不同浓度时的平均荧光强度柱状图。

A, Overlay map of fluorescence histogram at different concentrations; B, Histogram of mean fluorescence intensity at different concentrations.

3.3 木香烃内酯对 MCF-7 细胞内 ROS 含量的影响

ROS 的产生与 MTP 的降低及细胞凋亡密切相关^[20]。由图 3 可见,随着木香烃内酯作用浓度的增加,DCF 荧光强度逐渐增强,ROS 的含量逐渐升高,具有一定的浓度依赖性。其中在 4 和 8 $\mu\text{g/mL}$ 作用水平 ROS 含量与对照组相比显著提高。

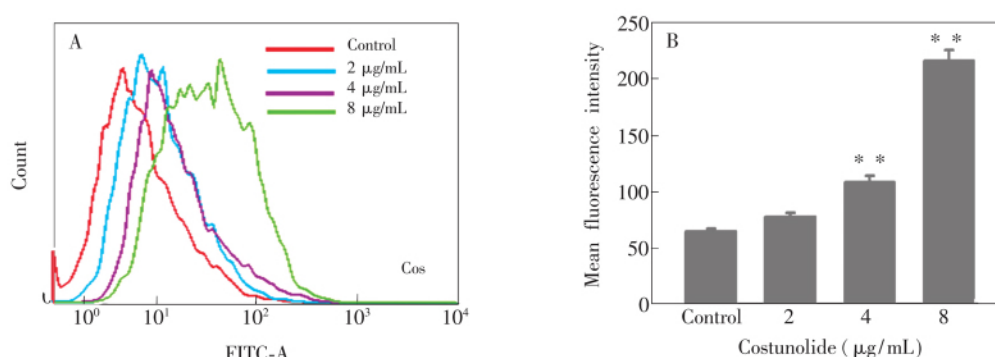


图3 木香烃内酯对 MCF-7 细胞内 ROS 含量的影响(作用时间 24 h)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig.3 Effects of costunolide on the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels of MCF-7 cells after incubation for 24 h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

A 各浓度处的荧光直方图叠加图; B, 各浓度处的平均荧光强度柱状图。

A, Overlay map of fluorescence histogram at different concentrations; B, Histogram of mean fluorescence intensity at different concentrations.

3.4 木香烃内酯作用于 MCF-7 细胞后的细胞代谢组学分析

细胞代谢组学研究的主要为活细胞的代谢产物^[14], 因此选择木香烃内酯的浓度时既要考虑其对 MCF-7 细胞的作用效果, 还要将 MCF-7 细胞的死亡率控制在一定范围内, 因此最终选择木香烃内酯的作用浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 4 为对照 (Control)、木香烃内酯 (Cos) 及质控样本 (QC) 的 PCA 得分图, QC 为加入 6 $\mu\text{g/mL}$ Cos 作用下的一个细胞样品, 每间隔 5 个样品检测 1 次。从图 4 可见, QC 样本在 PCA 得分图中聚集较好, 说明整个分析系统稳定可靠。在 PCA 得分图中, Control 与 Cos 组呈现一定的分离趋势。从 OPLS-DA 模型图 (图 5) 可见, Cos 组和 Control 能明显区分。同时, 该模型参数为 $R^2Y = 0.995$, $Q^2Y = 0.96$, 充分说明该模型的稳定性和可靠性。选择 OPLS-DA 分析中 $VIP > 1$ 的差异变量, 并结合单维统计分析 (t 检验和 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验), 将 $VIP > 1$ 且 $p < 0.05$ 的代谢产物作为 Cos 组和对照组的差异代谢物, 这些差异代谢物通过 NIST 库检索进行结构鉴定和命名, 最终获得 15 种代谢差异物 (见表 1)。

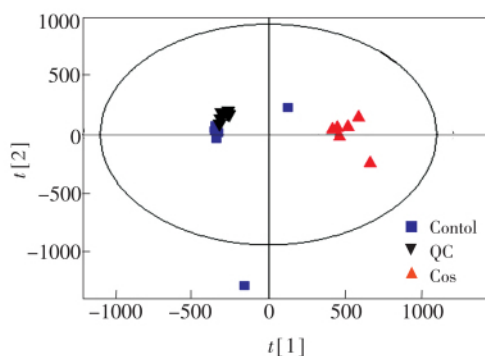


图 4 基于质谱数据的对照 (control)、木香烃内酯 (Cos) 及质控样本 (QC) 的主成分分析得分图

Fig. 4 Principal component analysis (PCA) score plots of subjects from control, costunolide (Cos) and quality control (QC) groups

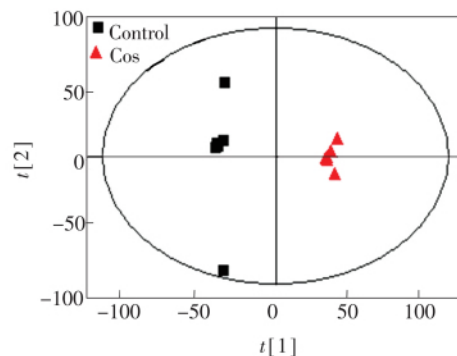


图 5 木香烃内酯 (Cos) 组与对照 (Control) 组的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 Orthogonal partial least squares-discrimination analysis (OPLS-DA) score plots of subjects from costunolide (Cos) and control group

表 1 基于 GC-TOF/MS 数据的 MCF-7 细胞木香烃内酯组与对照组对比的代谢差异物

Table 1 Representative differential metabolites of the costunolide treated MCF-7 cells and the controls derived from GC-TOF/MS

代谢物 Metabolite	保留时间 Retention time (min)	VIP ^a	$p (< 0.05)$ ^b	$p (< 0.05)$ ^c	Fc ^d
甘氨酸 Glycine	7.76	4.63	2.51×10^{-2}	3.74×10^{-2}	1.33
琥珀酸 Butanedioic acid	7.83	1.69	1.28×10^{-2}	5.00×10^{-2}	1.20
嘧啶 Pyrimidine	8.14	1.20	9.12×10^{-4}	3.95×10^{-3}	2.16
丝氨酸 Serine	8.41	3.83	1.18×10^{-3}	3.95×10^{-3}	1.99
谷氨酸 Glutamic acid	11.78	4.40	1.79×10^{-4}	3.95×10^{-3}	-1.94
苯丙氨酸 Phenylalanine	11.91	3.07	4.45×10^{-4}	3.95×10^{-3}	-1.44
丁二胺 1,4-Butanediamine	13.47	1.44	2.98×10^{-5}	3.95×10^{-3}	1.62
丙酸 Propanoic acid	14.45	1.03	3.23×10^{-8}	3.95×10^{-3}	2.04
柠檬酸 Citric acid	14.66	1.72	3.30×10^{-3}	1.04×10^{-2}	-1.28
山梨糖 L-(+)-Sorbitol	15.46	1.29	1.04×10^{-6}	3.95×10^{-3}	8.77
核糖醇 Ribitol	15.83	5.81	8.19×10^{-5}	3.88×10^{-3}	7.14
葡萄糖 d-Glucose	16.21	5.08	1.94×10^{-5}	3.95×10^{-3}	13.13
酪氨酸 L-Tyrosine	16.62	4.02	9.32×10^{-4}	3.95×10^{-3}	-1.83
核糖酸 Ribonic acid	17.58	9.02	1.62×10^{-7}	3.95×10^{-3}	5.31
丁酸 Butanoic acid	20.40	1.49	4.42×10^{-6}	3.88×10^{-3}	-5.28

注: ^aOPLS-DA 多维统计分析得到的代谢物重要性参数 ($VIP > 1$); ^b t -检验得到的 p 值; ^c Wilcoxon-Mann-Whitney 检验得到的 p 值; ^d Fc 值为 Cos 组与 Control 组代谢物比较得到的倍数。

Note: ^aVIP was obtained from OPLS-DA with a threshold of 1.0 and indicates the relative influence of each metabolites to the grouping;

^b p values were calculated from student's t test ($p < 0.05$); ^c p values were calculated from Wilcoxon-Mann-Whitney test ($p < 0.05$);

^dFold change (Fc) is the ratio of the mean value of Cos treatment group to that of the control group.

代谢差异物中,柠檬酸含量下降、琥珀酸含量上升,可能是由于细胞内 ROS 含量的升高及 MTP 的降低破坏了三羧酸循环(TCA)而造成的。已有研究表明,氧化应激与 TCA 循环功能性障碍相关,ROS 可促使 α -酮戊二酸转化为琥珀酸^[21]。琥珀酸脱氢酶可催化琥珀酸转化为延胡索酸,是 TCA 循环中唯一与线粒体内膜结合的酶。在上述研究中,MTP 降低,琥珀酸脱氢酶活性可能受到抑制,使琥珀酸的含量升高。

线粒体是 ATP 合成的主要场所,MTP 的降低,使氧化磷酸化过程解耦联,ATP 水解大于合成,破坏了离子和代谢物平衡^[22]。TCA 循环是糖类、脂肪和蛋白质最终氧化的重要酶促循环反应系统。在正常情况下,糖酵解、TCA 循环的速度以及氧化磷酸化的速度是相互协调的^[23]。在上述研究中,MTP 降低,使氧化磷酸化过程解耦联,抑制了 ATP 的合成。因此,推测 TCA 循环受到抑制,进而抑制了糖酵解过程,使葡萄糖、山梨糖的含量升高。核糖醇是组成核黄素的成分之一,核黄素在生物体内以黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的形式参与氧化呼吸链、TCA 循环。因此推测,氧化呼吸链以及 TCA 循环受到抑制后,引起核糖醇的含量升高。氨基酸可通过脱氨基作用生成 α -酮酸参与到 TCA 循环中,其中苯丙氨酸、酪氨酸可转化为延胡索酸,谷氨酸可转化为 α -酮戊二酸,丝氨酸、甘氨酸可转化为丙酮酸^[23],谷氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸含量下降,丝氨酸、甘氨酸含量升高可能是由木香烃内酯抑制了 TCA 循环进而引起了氨基酸代谢的紊乱而造成的。

4 结 论

以细胞代谢组学和传统生物学方法为基础,探究了木香烃内酯作用于 MCF-7 细胞后,细胞内 ROS 含量、MTP 及细胞内代谢产物的变化。结果表明,木香烃内酯作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后,使 ROS 含量升高,MTP 降低,导致线粒体的结构受到破坏,可能进一步阻碍了 TCA 循环,抑制了 ATP 合成,扰乱了细胞内代谢物的平衡,并引起位于膜间隙的凋亡相关信号的释放,最终导致 MCF-7 细胞的凋亡。本研究不仅从代谢组学的角度为研究木香烃内酯抗肿瘤的作用机制提供了新线索,而且进一步表明基于 GC-TOF/MS 的细胞代谢组学方法可以作为研究药物作用机制的有效分析工具。

References

- 1 Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. *CA Cancer J. Clin.*, **2014**, 64(1): 52-62
- 2 Park H J, Jung W T, Basnet P, Kadota S, Namba T. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59(12): 1128-1130
- 3 Wedge D E, Galindo J C, Macias F A. *Phytochem.*, **2000**, 53(7): 747-757
- 4 Chen H C, Chou C K, Lee S D, Wang J C, Yeh S F. *Antivir. Res.*, **1995**, 27(1-2): 99-109
- 5 Choi J H, Ha J H, Park H H, Lee J Y, Park H J, Choi J W, Masuda Y, Nakaya K, Lee K T. *Jpn. J. Cancer Res.*, **2002**, 93(12): 1327-1333
- 6 Hibasami H, Yamada Y, Moteki H, Katsuzaki H, Imai K, Yoshioka K, Komiya T. *Int. J. Mol. Med.*, **2003**, 12(2): 147-151
- 7 Pitchai D, Roy A, Banu S. *Phytother Res.*, **2014**, 28: 1499-1505
- 8 Rasul A, Bao R, Malhi M, Zhao B, Tsuji I, Li J, Li X. *Molecules.*, **2013**, 18(2): 1418-1433
- 9 Bocca C, Gabriel L, Bozzo F, Miglietta A. *Chem. Biol. Interact.*, **2004**, 147(1): 79-86
- 10 Choi S H, Im E, Kang H K, Lee J H, Kwak H S, Bae Y T, Park H J, Kim N D. *Cancer Lett.*, **2005**, 227(2): 153-162
- 11 Schumacker P T. *Cancer Cell*, **2006**, 10(3): 175-176
- 12 Sinha K, Das J, Pal P B, Sil P C. *Arch. Toxicol.*, **2013**, 87(7): 1157-1180
- 13 Fiehn O. *Plant Mol. Biol.*, **2002**, 48(1-2): 155-171
- 14 SHIDong-Dong, KUANG Yuang-Yuan, WANG Gui-Ming, PENG Zhang-Xiao, WANG Yan, YAN Chao. *Chinese Journal of Chromatography*, **2014**, 32(3): 278-283
- 史栋栋,况媛媛,王桂明,彭章晓,王彦,闫超. *色谱*, **2014**, 32(3): 278-283
- 15 GU Jin-Ning, NIU Jun, PI Zi-Feng, YUE Hao, WU Sui-Sheng, LIU Shu-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(3): 371-376
- 谷金宁,牛俊,皮子凤,赵皓,吴绥生,刘淑莹. *分析化学*, **2013**, 41(3): 371-376

