质谱分子成像的研究进展

杨芃原^{1,2,3*}, 刘颖超², 赵和玉², 李顺祥¹

1 复旦大学化学系, 上海 200433;

2 复旦大学上海医学院, 基础医学院和生物医学研究院, 上海200032;

3 闵行中心医院和复旦大学附属闵行医院, 上海 201199

* 联系人, E-mail: pyyang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2020-07-30; 接受日期: 2020-09-25; 网络版发表日期: 2020-10-19

国家重大科研仪器研制项目(批准号: 81827901)、国家卫健委精准医学专项项目(批准号: YS2017YFSF090099)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 21874026)资助

摘要 质谱分子成像是发展迅速的研究领域, 特别是在生命科学和医学领域, 生物组织的各类生物小分子、大分子目前已经可以由先进的质谱技术予以成像。这些生物分子和生物体的生理和病理状态有着密切的联系, 因此, 质谱分子成像是光学类形态成像的很好补充。目前常用的分子质谱成像技术有三类: 近几年发展起来的基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)质谱成像、二次离子质谱(secondary ion MS, SIMS)成像以及解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionization, DESI)质谱成像。本文评述了这三种质谱成像的原理、技术及其在科学研究和临床研究中的应用。三种质谱成像的特点可总结为: 空间分辨率分别在100, 10, 0.1~1 μm 数量级左右; 工作介质分别为大气压、真空/低气压、真空; 分析对象分别为小分子、肽/蛋白/核酸、小分子或无机元素; 应用领域大致为环境/生物医学、生物医学、环境/材料科学。

关键词 质谱成像, 基质辅助激光解吸电离, 二次离子质谱, 解吸电喷雾电离

质谱成像作为一种映射分子空间分布的新手段在分子成像领域得到了越来越广泛的应用。由于其不需要对感兴趣的分子进行预先标记, 且能同时探测到多种离子, 故其特别适用于探索性的研究分析, 如生物医学、材料、环境等方面。

本文总结了目前常用的三种质谱成像方式: 基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)质谱成像、二次离子质谱(secondary ion MS, SIMS)成像以及解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionization, DESI)质谱成像的基本原理、

技术特点及其在生物临床研究中的应用。同时, 也讨论了目前成像方式的优势和局限, 并对未来发展方向进行了展望。

1 质谱分子成像的原理和技术

分子成像是指在组织水平、细胞及亚细胞水平对特定分子空间分布的成像。目前应用广泛的各种分子成像技术, 例如光学成像、放射化学成像和正电子发射计算机断层成像等, 都要求事先了解所感兴趣的分子

引用格式: 杨芃原, 刘颖超, 赵和玉, 等. 质谱分子成像的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1237–1255

Yang P Y, Liu Y C, Zhao H Y, et al. Recent progress in mass spectrometry based molecular imaging (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1237–1255, doi: 10.1360/SSV-2020-0153

子物理或化学性质,再来设计各种标记的分子探针,如放射性同位素标记、荧光标记、化学发光物标记或化学染色物标记。这些技术都只能一次监测一种分子的表达情况,且共存的其他结构相似的分子容易导致假阳性结果。

生物组织质谱分子成像技术(mass spectrometry imaging, IMS或MSI)的出现有助于解决上述问题。IMS通过将质谱离子扫描技术与专业图像处理软件相结合,直接分析生物组织切片,产生任意指定质荷比(m/z)化合物的二维离子密度图,从而可以对组织中化合物的组成、相对丰度及空间分布情况进行分析和研究^[1]。Caprioli等人^[2]在1997年首次将质谱成像技术应用于组织样品中多种蛋白质和多肽的分子成像研究。质谱成像技术已广泛用于组织切片中各类生物分子,如蛋白质、多肽、类脂或药物代谢物等的分析研究,从而得到潜在的生物标志物的空间分布,并且与其他分子成像技术相结合,可以用于组织病理特征、疾病诊断及生物标志物发现等。

根据成像原理及其离子化技术的不同,IMS技术可以分为探针型和面阵型,其中面阵型对检测器硬件的要求高,尚未有可靠的商业化面阵型IMS装置,目前发展的主要是探针型IMS技术。探针型IMS技术按照离子化方式进行分类,主要包括以下三大类型(图1)^[3]:需要在真空或大气压条件下进行离子化的MALDI-MS^[4~6]成像、SIMS^[7]成像以及近几年发展起来的以DESI^[8,9]为代表的常压敞开式离子化质谱成像技术等。

质谱分子成像的技术和应用已经被总结在最近的一些文献综述中,包括细胞^[10,11]和亚细胞^[11,12]成像分析、脂质^[13]和蛋白^[14,15]成像分析、神经^[16]和皮肤^[17]以及高空间分辨率质谱成像分析^[18],有兴趣的读者可以阅读相应的篇章。

1.1 MALDI-IMS质谱成像

MALDI-IMS是基于分析物分子与基质分子混合(混合比约为1:5000),在溶剂蒸发后形成分析物与基质分子的共结晶,当采用脉冲激光(一般为紫外激光)照射晶体时,由基质分子经辐射所吸收的能量传递给分析物分子并使其离子化,继而在质量分析器中得到检测^[19,20]。MALDI质谱成像技术通过将MALDI质谱离子扫描技术与专业图像处理软件结合,直接分析生物组织切片,产生任意指定质荷比化合物的二维离子密度

图,从而对组织中化合物的组成、相对丰度及分布情况进行分析。一般来说,MALDI-IMS方法可以分为组织切片、基质覆盖、质谱分析和图像处理四部分(图2)。

Nature Methods 2017年接连发表了4篇前沿论文,凸显了MALDI-IMS的特殊地位^[21]。其中一个工作报道了大气压MALDI质谱成像装置^[22],横向分辨率为1.4 μm ,质量分辨率大于100000,精度低于62 ppm。通过改善图像对比度、横向分辨率以及单位面积的离子产率,证明该装置可以用于检测代谢物、脂质和小肽,也可以在1.5 μm^2 采用区域内进行串联质谱分析。为了突出这种方法未来的应用前景,研究人员采用直径为1.4 μm 的激光聚焦研究了小鼠大脑和肾脏切片中磷脂的横向分布。与最新的MSI系统对比,该方法的单位面积离子产量和图像对比度分别提高1.3和9倍。另外一个工作报道了一种同时获取化学和三维表面图像的自动聚焦大气压MALDI质谱成像技术^[23]。潜在的应用领域从化学、生物学、医学和生命科学到不规则三维样品的靶向和非靶向化学分析。通过该方法的自动对焦能力,标准组织切片质谱成像分析得到显著改善,从而提供高横向分辨率高精度化学制图。这种自动对焦的方法可以在各种质谱成像装置中实现。

(1) 组织样品制备。组织样品切片是MALDI-IMS分析的基础,因此标准化的组织样品处理过程是方法的可靠性和重复性的重要保证。在组织切片前,得到的新鲜组织需要立即置液氮中冷冻2~3 min,如果冷冻后的样品不立即用于下一步实验,则需保存于 -80°C 。快速冷冻组织样品有助于维持分析物的空间分布和防止分析物的降解。

冷冻后的组织在恒温冷冻切片机上进行切割,切割平台的温度根据组织类型保持在 $-5\sim-25^\circ\text{C}$ 之间。切片厚度一般在5~20 μm ,以保证质谱分析时足够的组分浓度。此外,在切片过程中,要注意防止形成冰晶,避免切片打卷或起皱褶,以及避免切片表面受到冷冻切片机用于控制温度的高分子材料的污染。

得到的组织切片迅速置于冷的MALDI靶板上,然后在真空干燥条件下处理约10 min,除去切片中可能的水分。最近的研究表明,采用适当的有机溶剂,如乙醇或异丙醇,洗涤组织切片,可以在不破坏蛋白质空间分布的前提下,除去干扰MALDI分析的许多有机盐小分子和脂质分子,从而极大地提高组织切片中蛋白质

图 1 离子源MALDI, SIMS和DESI的离子化机制^[3]

Figure 1 Ionizing mechanism of ion source MALDI, SIMS and DESI^[3] (with permission)

图 2 MALDI-IMS方法步骤示意图(图片取自PPT文件: AB SCIEX TOF/TOF在组织成像中的应用, 郭立海, AB SCIEX, 2010)

Figure 2 Schematic diagram of MALDI imaging procedure (Image taken from PPT: Application of AB SCIEX TOF/TOF in tissue imaging, GUO LiHai, AB SCIEX, 2010)

的检测灵敏度^[24].

(2) 基质覆盖. 基质的选择和覆盖过程是得到高质量和重现性好的质谱图的关键所在. 基质覆盖方法主要有两类: 点样法和喷雾法^[4-6]. 最简单点样法是用手工操作的方法将基质溶液直接点于样品表面, 其缺陷在于会得到相对比较大的样品点(直径1~2 mm)和方法重现性较差. 目前广泛应用的是自动化的超声点样法(acoustic deposition)和打印点样法(inkjet printing). 这两种点样方法都可以让每个基质样品点排列紧密而

且相互分散, 并且样品点的直径比较小(80~200 μm). 而喷雾法则是将基质溶液均匀地喷在组织切片的表面, 这样得到基质样品点与基质的本身形成的晶体大小相关, 一般直径为1~20 μm . 图像分辨率更多地取决于所采用的激光在样品表面上产生的光斑大小, 故喷雾法能产生比点样法更高质量的图像.

不同种类的基质和溶剂的选择对分析对象的离子化有决定性的影响, 因为不同的基质都有相对应的适合检测的化合物分子. 常用的基质化合物有3,5-二乙

氧基-4-羟基肉桂酸(又称芥子酸, 3,5-diethoxy-4-hydroxy cinnamic acid, SA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid, CHCA)和2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB). 其中, 溶于50%~60%乙腈SA溶液适用于高分子量的蛋白(大于5000 D), 具有比较高的灵敏度和质量分辨率; 而对多肽分析则采用CHCA或DHB的50%乙腈溶液; DHB的60%~70%乙醇溶液适用于脂质化合物分子的分析研究.

离子液体(ionic liquid)基质是目前MALDI基质研究的热点之一. 由于它自身在室温下为液体, 易与样品分子形成均相溶液, 重现性和真空稳定性好. 离子液体作为基质不仅可以提高质谱信号强度, 而且具有更好的重现性. 目前已有报道将离子液体基质成功用于小鼠脑组织不同结构神经节苷脂(gangliosides)的分布质谱成像研究^[25].

(3) 质谱谱图的获得. 由于MALDI质谱成像技术所采集的信号是由激光轰击基质后激发样品分子后产生的, 而当基质晶体的尺寸比较小时, 质谱的成像分辨率取决于激光光束的尺寸大小. 通常激光产生的光斑直径大小为100~150 μm , 此时得到的质谱成像空间分辨率比较低. 研究人员通过对 N_2 激光和YAG(Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet)激光进行技术改造和软件控制, 获得了质量较好和重复性较高的质谱谱图, 将空间分辨率提高到10 μm 左右^[1].

目前所报道的MALDI质谱成像技术研究针对不同的研究对象和目的采用了多种质量分析器, 例如飞行时间质谱(time of flight, TOF)、串联飞行时间质谱(TOF-TOF)、四极杆-飞行时间质谱(quadropole TOF, Q-TOF)、离子淌度-飞行时间联用质谱(ion mobility-TOF, IM-TOF)和傅里叶变换离子回旋共振质谱(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR MS). 目前, 质谱成像中最为常用的质量分析器是飞行时间质谱, 串联的质谱分析仪则用于鉴定所测定的未知分子的结构.

在进行质谱扫描之前, 按所需要测定组织切片的大小, 首先定义质谱扫描区域的尺寸, 然后根据尺寸大小和实验所需要图像分辨率将所检测的区域均分为若干点组成的二维点阵. 在质谱仪中, 激光束按前面设定好的自动扫描参数在软件控制下对组织切片进行连续扫描, 软件控制采集质谱数据, 组织样品在激光束的激发下释放出的分子被质谱仪鉴定, 从而获得样品上

每个点的质荷比信息.

(4) 质谱图像处理. 在每个样品点上, 所有质谱数据经平均化处理获得一幅代表该区域内化合物分布情况的完整质谱图. 仪器逐步采集组织切片的质谱数据, 最后得到具有空间信息的整套组织切片的质谱数据. 这样就可以完成对组织样品的“分子成像”. 设定 m/z 的范围, 并选定峰高或者峰面积来代表生物分子的相对丰度, 即可形成该组织样品中各种生物分子相对应的空间分布质谱图像.

与一般光学成像类似, 图像中的彩色斑点代表化合物的定位, 每个斑点颜色的深浅与每一个点或像素上检测到的相应化学物分子质谱信号大小相关. 选择组织图像上的任意一个斑点, 图像都能够给出一个质谱谱图以代表在组织中这一部位中各种生物分子的分布信息. 质谱分子成像技术是一种半定量或相对定量技术, 图像上颜色深的部分表明有更多的生物分子聚集在组织的这个部分, 并不能确定生物分子在组织的不同部位的实际绝对含量.

1.2 SIMS质谱成像

SIMS是通过用一次离子(primary ion)激发样品表面, 打出极其微量的二次离子(secondary ion), 然后通过四极杆质谱或飞行时间质谱对二次离子进行质量分析^[6]. SIMS是当前材料科学中应用最广泛的分析技术之一, 在半导体材料的表面分析中起重要的作用. 随着SIMS技术的进步, 其应用范围也扩展到生物组织样品的成像研究. 除了采用不同离子源而导致的样品处理过程不同外, SIMS成像原理与方法与MALDI-IMS基本相似.

(1) 离子化源的选择. 早期SIMS采用的离子化源为 Ga^+ 和 In^+ 液态金属场发射源, 由于它们的高激发能量会导致有机大分子的离解, 因此只能局限于分子量小于200 D的化合物测定. 团簇金属离子(metal cluster ion)和多原子离子(polyatomic ion)的引入则使较大有机分子的检测成为可能^[6]. 团簇金属离子有 Au_x^+ 和 Bi_x^+ ($x=1\sim7$), 它们可以在保持亚微米图像分辨率的情况下较大地提高有机大分子的检测灵敏度. 多原子离子束则有 SF_5^+ 和 C_{60}^+ , 与团簇金属离子相比, 它们同样对有机大分子有好的灵敏度, 但其图像分辨率相对较差. 在SIMS生物组织样品成像分析中, 一般要根据实际的需求选择合适的离子束, 目前应用较为广泛的离

子束为团簇铋离子(Bi_3^+)束。

(2) 组织样品的制备与处理. 组织样品切片与MALDI质谱成像样品处理过程一致, 均需要冷冻样品切片; 不同的是, 所得到的组织样品切片可直接用于SIMS分析, 不用额外处理. 当然, 目前也有研究表明, 如果将样品表面覆盖厚度为纳米级的金或银薄膜, 可以提高SIMS的检测灵敏度^[1].

1.3 DESI质谱成像

MALDI和SIMS质谱成像技术一般需在真空环境下进行, 使用不太方便, 为此, Cooks等人^[9]发展了DESI以应用于常压下的质谱成像研究. DESI通过喷射溶剂, 将溶剂覆盖在未经处理的组织表面上, 溶解表面的分子; 然后再继续往上滴溶剂, 以使溶解物溅到质谱仪上, 进行电离和分析. 因此, 该技术可以用在活体样本上, 甚至可以在患者身上进行操作, 目前该技术已成功应用于人类癌症和健康组织的临床分类研究^[26].

(1) DESI原理. DESI是ESI和解吸附作用的综合体现, 其基本原理是液滴携带机制. 所用的喷雾溶剂先被加以一定的电压, 从雾化器的内套管中喷出, 并被雾化器外套管喷出的高速氮气迅速雾化并加速, 使带电的液滴撞击到样品表面. 样品在被高速液滴撞击后发生溅射进入气相; 同时由于氮气的吹扫和干燥作用, 含有样品的带电液滴发生去溶剂化, 并沿大气压下的离子传输管迁移, 进入质谱前端的毛细管, 之后被质谱仪的检测器检测. DESI与SIMS有些相似, 只是前者能在大气压下游离化. DESI技术发明人Cooks认为, 该方法其实就是一种抽取方法(droplet pickup), 即一种利用快速带电可溶微粒(如水或者乙腈)进行离子化, 然后冲击样品获得分析物的方法^[9].

(2) DESI实验条件的选择. DESI质谱成像的质量与效果极大地依赖于所用溶剂, 并且通过改变不同的溶剂系统可以得到样品表面的不同化合物的分布信息. 此外, DESI喷嘴与样品表面、质谱进口之间的距离

和角度对成像谱图的分辨率及信号强度有极大的影响.

1.4 三种质谱成像方法比较

三种质谱成像方法具有各自的优缺点, 在适用的检测对象、样品处理方式、图谱的空间分辨率上具有不同的特点, 如表1所示.

(1) 检测对象. MALDI是一种软电离技术, 不产生或产生较少的碎片离子, 并且其检测分子量范围大, 可以从几百到十几万道尔顿. MALDI-MS离子化过程的特点使其适合应用于生物组织样品IMS中. 与基于软电离技术的MALDI质谱成像技术相比, SIMS在生物组织样品分析的最大问题在于其对分子量大于1000 D的化合物的检测灵敏度极低, 此外SIMS的离子化过程存在样品歧视, 适合测定疏水性的化合物分子. 尽管DESI也是基于电喷雾的软电离技术, 但是在常压下多电荷离子不稳定, 因此也只适合测定分子量不超过2000 D的化合物.

(2) 样品处理. MALDI-MS是一种基于基质分子吸收激光能量后激发分析物分子, 使其离子化得到检测的方法. 基质分子覆盖的质量与效率是影响质谱成像结果的重要因素之一, 因此合适的基质覆盖方法是当前MALDI质谱成像的研究重点及难点之一. 而SIMS和DESI成像技术能直接分析组织样品表面, 避免了样品处理过程中可能导致的样品分子迁移与样品污染.

(3) 图像分辨率. MALDI-MS质谱图像的分辨率取决于激光光斑大小以及基质分子与样品分子的共结晶晶体的大小. 由于仪器条件的限制, MALDI质谱成像的分辨率在10~100 μm 之间. 而相比激光束, 离子束所产生的更小的样品斑点使SIMS质谱图像的分辨率小于100 nm, 可用于单细胞水平的成像分析. DESI成像的分辨率受其喷雾空间分辨率的限制, 一般约为200 μm . 虽有报道可以通过优化实验条件将分辨率提

表 1 三种质谱成像方法的对比

Table 1 Comparison of three methods of imaging mass spectrometry

成像方法	检测对象	样品处理	空间分辨率
MALDI-MS	适用于各类生物组织样本, 无分子量大小限制	需要借助基质离子化	一般在10~100 μm
SIMS	分子量不超过1000 D的疏水性化合物	可直接对样品进行分析	一般在1 μm ~100 nm
DESI	分子量不超过2000 D的化合物	可直接对样品进行分析	一般在40~200 μm

高至40 μm 左右, 但与SIMS和MALDI-MS成像技术相比, 分辨率仍较低。

Niehaus等人^[27]发展的透射模式MALDI成像(transmission-mode MALDI-IMS, t-MALDI-IMS)可以提供像素大小为1 μm 和更小的分子信息, 从而使这种无标记法在亚细胞水平上表征组织和细胞的化学成分非常有趣。通过使用激光诱导的位置化(MALDI-2)信息和高分辨质谱来提高成像的空间分辨率, 他们实现了在脑组织中成像的像素大小仅为600 nm, 因此, 该方法有望成为细胞生物学和生物医学研究的一种有价值的新工具。

1.5 面阵型IMS成像技术

面阵型IMS成像技术虽然很早就有报道^[28,29], 但一直发展缓慢, 主要的原因是面阵式的检出器技术一直没有得到突破^[30]。近几年, 欧洲和日本的研究团队在面阵式检出器技术方面有了较大的进展, 已经有商品化的面阵式检出器出售^[31]。质谱面阵式检出器的信号特征是被检出离子在样品表面的位置信息(位置戳)和该离子的飞行时间信息(时间戳)。

新型像素级阵列探测器是由欧洲原子能中心(European Organization for Nuclear Research, CERN)研发的Medipix和Timepix芯片(<https://medipix.web.cern.ch/>), 其应用涉及从高能粒子物理学到医学X射线成像

等多个领域, 由20多个机构和实验室联合开发, 迄今为止已发展了3代Medipix和Timepix芯片。Timepix3芯片的主要技术参数包括: 14.1 mm $\times$ 14.1 mm的感光面积、256像素 $\times$ 256像素的分辨率、1.6 ns的时间分辨率、大于500 MHz的有效帧速率等。荷兰马斯特里赫特大学的Hereen等人是最早将Medipix/Timepix芯片用于质谱成像领域的, 其中负责该芯片在质谱成像、速度映射成像等领域商品化的是荷兰阿姆斯特丹仪器科学公司(Amsterdam Scientific Instruments, ASI)。该公司基于Timepix3研发的新一代Tpx3Cam超快速光学照相机^[32](图3), 采用光子时间戳的方法, 结合了Timepix3 ASIC和读出器, 适用于需要高时间分辨率的电子、离子或单光子成像^[33]。

利用新的面阵式检出器, 有关面阵型成像的实验结果也逐步有了报道^[28,29,34](图4)。CERN在研的下一代像素级阵列探测器, 即TimePix4, 其时间分辨率有望达到皮秒级, 这将极大提升基于像素级阵列探测器相关的质谱成像技术的性能。

2 质谱成像的应用

2.1 蛋白质和多肽

由于MALDI-IMS检测的分子量范围可以从几百到几万道尔顿, 因此它最大的优点是扫描范围很广, 可

图3 采用Tpx3Cam超快速光速相机的VMI设备示意图。MCP与P47磷光体耦合, 该磷光体会响应离子对MCP的撞击而产生闪光。Tpx3Cam可放置在真空外部, 通过检测荧光粉发出的闪光, 而有效记录撞击在MCP上的离子^[32]

Figure 3 Schematic diagram of the VMI device using Tpx3Cam ultrafast light speed camera. MCP coupled with P47 phosphors, P47 will flash in response to ions impact on MCP. Tpx3Cam could be placed outside the vacuum to effectively record the ions impinging on the MCP by detecting the flash emitted by the phosphor^[32] (with permission)

图4 面阵型IMS成像示意图。组织样本上的面阵离子源产生的离子束经环状TOF分离后被MCP检测,再将离子信号转换成电子信号,再成像到面阵TimePix检出器上^[28,29]。离子束成像的分辨率取决于激光照射面积的大小以及面阵检出器在成像时像素对应的像素面积(网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of the IMS imaging on the planar array. The ion beam generated by the surface array ion source on the tissue sample is detected after separation by the ring TOF. Then the ion signal is converted into an electronic signal and imaged onto the surface array TimePix detector (figure was reproduced courtesy of Amsterdam Scientific Instruments-TPX-MS brochure and adapted from Ref. [28,29], with permission). The imaging resolution of ion beam depends on the size of the laser irradiation area and the pixel area corresponding to the pixel of the surface array detector when imaging (color online)

以同时检测小分子量的药物、多肽片段及大分子量的蛋白质分子^[35]。串联质谱则可以方便地检测所测定的分子结构,同时根据蛋白/肽指纹图谱鉴定成百上千的蛋白质,并观测感兴趣的目标蛋白在组织和细胞中的分布。质谱成像技术能同时测定几百个蛋白质分子及多肽分子的空间分布信息,因此广泛应用于各种病理组织样品的分析^[36]。

Chaurand等人^[37]将GL261脑部癌细胞感染小鼠的左脑,然后对其脑部组织切片进染色光学成像。其中染色结果表明肿瘤生长在脑部的左侧脑室,并且可以观测到肿瘤转移到右脑室。而质谱成像可以明显观测到正常组织与癌组织的质谱信号差异,例如,在正常组织中可以观测到分子量为4965 D、6719D、8565 D和12134 D等分子的强质谱信号,而在癌组织中强的质谱峰则为 m/z 9737、 m/z 9910、 m/z 11641和 m/z 12372。

国家生物医学分析中心张学敏团队^[38]也报道了将质谱成像方法用于高功率微波辐射后大鼠海马的蛋白组分析,获得了正常情况下和微波辐射后大鼠海马组织质谱图像。采用累加平均谱的统计分析,得到正常与微波辐射处理的样品中的差异分子199个,其中上调194个、下调5个。这些表达差异分子有助于进一步了解微波辐射致伤效应和致伤机制。

研究认为,引起阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的真正原因不应该是脑损伤,而应该是 β 淀粉样蛋白对脑细胞的破坏。传统的检测方法,如酶联免疫或刚果红染色法,只能提供淀粉样斑的分析信息,而不能区分组成淀粉样斑的 β -淀粉样蛋白种类。Rohner等人^[39]对AD模型的小鼠脑组织进行质谱成像分析,鉴定了5种不同长度的 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)多肽以及它们的空间分布信息。结果表明,A β -(1-40)多肽(m/z 4330.9)与其他 β -淀粉样蛋白多肽相比含量最高,主要分布在颅顶骨、枕骨的皮质突出部和侧脑沟下部,与正常组织成像相比具有明显的空间特异性分布(图5)。这些质谱成像研究结果进一步证实了阿尔茨海默病的A β 发病机制。

Moon等人^[40]报道了利用金属氧化物纳米粒子(metal oxide nanoparticles, MONP)结合抗体在低离子剂量下具有小于300 nm空间分辨率的SIMS多重蛋白质成像。MONPS的高二次离子产率有助于同时成像几种蛋白质,特别是来自细胞膜的蛋白质。这一新成像技术应用于对照组和AD模型小鼠海马组织样本的研究,海马CA1区蛋白团簇的接近对衰老和AD进展表现出耐人寻味的依赖性,提示蛋白质簇的接近可能有助于了解微观细胞水平的病理途径。

图 5 阿尔茨海默病模型的小鼠脑组织光学图像和质谱图像^[39]. A: 小鼠脑部组织切片的光学图像; B: A β -(1-42) 分子图像(m/z 4515.1); C: A β -(1-40)分子图像(m/z 4330.9); D: A β -(1-39)分子图像(m/z 4231.7); E: A β -(1-38)分子图像(m/z 4132.6); F: A β -(1-37)分子图像(m/z 4075.5)(网络版彩图)

Figure 5 Optical image and mass spectrometry image of mouse brain tissue in Alzheimer's disease model^[39] (with permission). A: Optical images of mouse brain tissue sections; B: molecular image of A β -(1-42) (m/z 4515.1); C: molecular image of A β -(1-40) (m/z 4330.9); D: molecular image of A β -(1-39) (m/z 4231.7); E: molecular image of A β -(1-38) (m/z 4132.6); F: molecular image of A β -(1-37) (m/z 4075.5) (color online)

Groseclose等人^[41]优化了原位胰蛋白酶水解蛋白质分子,使得易于检测小分子量多肽的样品处理方法应用于质谱成像研究.对所测到的多肽分子进行串联质谱分析和数据库检索,可得到对应的蛋白质分子信息.尽管原位酶解过程会导致组织中分析物分子的扩散从而影响分析结果的准确性,但是通过优化实验条件,其图像分辨率可达到150 μm ,从而鉴定了大鼠脑部组织的四个大分子量蛋白质分子的空间分布情况.最近,Seeley和Caprioli^[42]采用这一方法对100年前经过甲醛固定化处理的淀粉化病人脑部组织的血清淀粉蛋白A进行了质谱成像分析,所得到的结果与免疫染色和氨基酸分析的结果一致. Garza等人^[43]成功地优化了DESI-IMS方法,直接检测组织切片中完整的蛋白质.采用优化的DESI-IMS参数对小鼠肾脏、小鼠脑、人卵巢和乳腺组织样品进行成像,分别检测11、16、14和16种蛋白质.研究人员通过Top-down的紫外光解离(ultraviolet photolysis desorption, UVPD)和碰撞诱导离解(collision induce dissociation, CID)以及Bottom-up的CID对组织提取物进行了DESI-MS检测的蛋白质种类鉴定.

2.2 脂质分子

脂质(lipid)是生物膜的主要组成成分,用于维持细胞正常结构与功能.脂质分子包括磷脂、糖鞘脂和胆固醇三大类.磷脂是含有磷酸的脂质,包括由甘油构成的甘油磷脂和由鞘氨醇构成的鞘磷脂.脂质分子的常规分析往往需要化学或生物提取方法,这样会破坏它们的空间分布信息.由于脂质化合物的分子结构中通常带有磷酸基团,因此在质谱成像时通常采用负离子模式进行检测^[44,45]. Boskamp和Soltwisch^[46]在正离子和负离子模式下用MALDI-IMS对不同脂型的甘油磷脂(glycerophospholipids, GPLs)进行分析,系统地研究了不同类别GPLs在MALDI-IMS条件下的电荷分布,消除了离子抑制效应.通常情况下,应用于磷脂质分子成像研究的MALDI基质为DHB. Astigarraga等人^[47]首次将2-巯基苯并噻唑作为基质分子用于脂质分子的质谱成像研究.相比DHB, 2-巯基苯并噻唑具有低蒸气压、中性和可形成更小结晶等优点,能提高磷脂质谱检测的灵敏度和质谱成像的图像分辨率.优化后的方法用于小鼠的肝部和脑部组织脂质分子的测定,其质

谱的精确度可以达到80 ppm, 并且具有良好的重现性.

神经节苷脂是一系列含有唾液酸的鞘糖脂的总称, 广泛存在于哺乳动物组织中, 并尤其富含于神经系统. 质谱成像技术被用于小鼠脑部的神经节苷脂分布研究^[25,48]. 当采用DHB为基质时, 神经节苷脂分子会发生唾液酸的离解, 影响MALDI-TOF分析的准确性和灵敏度. 为了克服这一问题, Chan等人^[25]的离子液体基质(ImCHCA)被引入神经节苷脂的成像研究. 离子液体基质的应用不仅可以提高检测灵敏度, 而且还可以提高质谱图像的分辨率. 相比传统的单克隆抗体免疫光学成像, 质谱成像可以观察到带有相同寡糖基团和不同长度脂肪链的神经节苷脂(GM1)在小鼠脑部海马区组织的不同分布情况. 例如, 带有 N -C18脂肪链修饰的GM1分子主要分布在CA1区, 而带有 N -C20则主要富集在海马齿状回区(图6). Burnum等人^[49]对植

入胚胎后的小鼠子宫组织中磷脂质分子的分布进行质谱成像分析, 发现磷脂在子宫的空间分布于胚胎移植前后有很大的改变, 并且通过与液相色谱质谱联用技术结合确定了多种带有亚油酸、花生酸、二十二碳六烯酸等脂肪酸结构的磷脂分子.

尽管SIMS的离子化方式使其应用局限于生物组织样品中脂质及其相关小分子的成像研究, 但由于其相比MALDI质谱成像可获得更高的图像分辨率, SIMS质谱成像主要用于组织样品中单细胞水平上的成像分析, 特别是细胞膜上的脂质分子的成像^[50,51]. 由于SIMS在成像上具有高空间分辨率, Ostrowski等人^[52]对单细胞的细胞膜上的胆固醇分子进行了质谱成像研究, 发现在不同的药物刺激或培养条件下, 胆固醇含量会发生明显的变化, 其变化幅度可以达到两倍以上.

Richter等人^[53]采用团簇铋离子对小鼠的小脑和肠

图6 小鼠脑部组织的不同结构的GM1分子质谱图像^[25]. A: GM1 (C18:1/C18:0) m/z 1546; B: GM1 (C18:1/C20:0), m/z 1574; R1和R2区域的质谱图如右图所示(网络版彩图)

Figure 6 GM1 molecular mass spectrometry images of different mouse brain tissue structures^[25] (with permission). A: GM1 (C18:1/C18:0) m/z 1546; B: GM1 (C18:1/C20:0), m/z 1574; mass spectra of R1 and R2 regions are shown in the right (color online)

部组织中不同长度的脂肪酸(fat acid, FA)进行了质谱成像分析. 实验结果表明, 硬脂酸(C18:0)主要分布于小脑组织中蒲金耶氏细胞(purkinje cell)内部, 在细胞核中没有分布, 同时其在肠部组织中广泛分布, 没有定位性; 而棕榈酸(C16:0)则聚集于肠下细胞中, 与之相反; 亚油酸(C18:2)与油酸(C18:1)在肠下细胞含量低, 而在肠绒毛细胞中含量高. 这一结果有助于人们了解脂肪酸在分化细胞中的生理功能. 同样采用团簇离子束, Tahallah等人^[54]对来自正常人和肌营养不良症儿童的横纹肌组织中脂质分子的分布进行了研究. 质谱成像结果表明, 维生素E和磷脂酰肌醇富集于细胞内, 但是未修饰的磷脂酰胆碱分子和胆固醇分子则主要在营养不良的肌细胞中, 并且不同长度的脂肪链修饰与肌细胞的损害程度相关. Touboul等人^[55]利用团簇金子束为离子源分析来自小鼠肌营养不良症的组织样品, 也得到了相似的结果.

MALDI-TOF-SIMS成像质谱技术能够以非靶向方式揭示组织中的全景脂质分布. Angerer等人^[56]以扁平虫为模型系统, 证明成像气体团簇离子束(gas cluster ion beam, GCIB)-TOF-SIMS具有独特的能力, 能够同时检测和识别组织切片图像中具有亚细胞分辨率的脂质分子. 通过对脂质提取物进行液相色谱串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)定性分析和超高质量分辨率MALDI-TOF成像分析, 证实了从TOF-SIMS数据中收集到的脂质分配、各自的片段身份及其相应的位置, 从而允许分子注释和确定脂质分子在生物样本中的位置. Hua等人^[57]用TOF-SIMS研究了银纳米粒子(silver nanoparticles, AgNPS)在单个巨噬细胞表面诱导的脂质变化, 获得了高质量的质谱分辨率和高空间分辨率的单细胞化学成像. 用高剂量或低剂量AgNPS处理的细胞组之间存在明显差异, 负荷图显示, 分离主要是由于胆固醇和二酰甘油(diacylglycerol, DAG)以及单酰甘油(monoacylglycerol, MAG)的变化. 同时, 单细胞组分的化学图谱表明, 高剂量AgNPS处理后, 胆固醇和DAG倾向于迁移到细胞周围.

纳米DESI电离质谱技术可使复杂样品在其固有状态下非标成像, 可以做到少量甚至无需制备样品. Zhang等人^[58]将小鼠肺组织纳米DESI-IMS的脂质覆盖深度与LC-MS/MS脂质组学分析相比较, 纳米DESI-IMS在20个脂质亚类和19种代谢物(共284种)中鉴定出

265种独特的脂质. 除了三酰甘油(triacylglycerol, TG)分子外, nano-DESI-IMS提供了与使用甲醇/水组织提取物进行的LC-MS/MS实验相当的覆盖范围, 并且与基于叶酸提取的全肺脂质组学分析相比, 覆盖范围高达50%. Yin等人^[59]开发了一种用剪切力显微镜精确控制样品与纳米DESI探针之间距离的恒定距离模式IMS方法, 可以在胰岛成像中实现高空间分辨率($\sim 11\ \mu\text{m}$). 利用纳米DESI-IMS研究了磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、鞘磷脂(sphingomyelin, SM)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)及脂肪酸及其代谢产物(如前列腺素)在单个胰岛和周围组织中的空间定位. 几种脂质被发现胰岛中明显增强, 表明这些脂质可能参与胰岛素分泌, 脂肪酸链长度和饱和度的微小变化对胰岛PC和溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine, LPC)分子的定位有明显的影响.

van Smaalen等人^[60]在猪模型中应用MALDI-IMS评估了急性缺血性肾组织中脂质的空间分布和组成. 组织病理学检查显示, 肾脏之间没有显著性差异, 而MALDI-IMS能够通过2 h内分析在整个组织中差异表达特征性的脂质降解产物来详细鉴别严重和轻微缺血, 特别是在严重缺血后, 溶脂, 包括溶酶体脂、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰肌醇显著升高, 可用于评估急性缺血性肾损伤. Ellis等人^[61]报道了一种使脂质串联质谱数据的自动数据依赖获取与高分辨率质谱成像平行实验的方法.

脂质代谢在癌症中经常受到干扰, 且其潜在机制尚不清楚. 综合研究表明, 癌基因myc与转录因子甾醇调节的元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins 1, SREBP1)协同调节脂肪生成以促进肿瘤发生. Gouw等人^[62]应用DESI-IMS观察到体内脂质组学的变化, 在不同的癌症中诱导myc, 甘油磷甘油酯普遍增加. 在抑制脂肪酸合成后, 肿瘤发生被阻断, 肿瘤在异种移植和原代转基因小鼠模型中均发生逆转, 揭示了myc诱导的肿瘤对抑制脂肪生成的脆弱性.

2.3 药物分子及其代谢产物

质谱在药物代谢动力学研究起着重要的作用, 在药物开发过程中, 一个重要的问题是药物分子能否正确地分布于靶点部位. 放射自显影法作为常规手段被

用于药物分子及其代谢物分子在组织中的定位研究,但是带有放射性元素标记的药物比较难获得,这限制了放射自显影法的应用.质谱成像技术不需要额外标记所需测定的分子就能提供化合物的空间分布信息,其在药物代谢动力学的研究成为当前的热点之一^[63].

Hsieh等人^[64]应用MALDI质谱分子成像技术研究氯扎平(clozapine)在大鼠脑组织中的分布和含量水平.结果表明,用³H标记的氯扎平的放射自显影技术可发现该药分布于大鼠的全脑中,尤其在外侧脑室,而质谱分子成像技术也发现了同样的结果,表明质谱分子成像能够很好地将药物及其代谢物进行明确的区分.Khatib-Shahidi等人^[65]应用MALDI-IMS研究大鼠全身组织中奥氮平(olanzapine)的分布.该技术能够明确区分奥氮平(m/z 313→256)及其两个一级代谢物N-去甲基-奥氮平(N-desmethyl-olanzapine, m/z 299→256)和2-羟甲基-奥氮平(2-hydroxymethyl-olanzapine, m/z 329→272).在给予大鼠口服奥氮平(8 mg/kg)后,在大鼠全身组织中均可观察到奥氮平的分布,但是主要富集于脑和脊髓组织中.然而,6 h后其在脑和脊髓中的水平则显著降低,信号可至少降低66%.从实验开始到结束,N-去甲基-奥氮平和2-羟甲基-奥氮平均没有在脑和脊髓中出现,而是在肝脏和膀胱中以高水平出现,这证实了奥氮平在大鼠中的代谢途径.

Zeper Abliz等人提出了基于DESI的空气动力辅助离子化(air flow assisted ionization, AFAI)技术,成功实现了整体大鼠体内药物的成像分析,并且将其应用于与药物作用机制直接相关的内源性功能小分子及其分布特征的成像代谢组学分析^[66,67].与DESI相似,AFAI不需要真空也不需要复杂的样品前处理.AFAI的最显著特点是可实现较远距离或较大体积样品的高灵敏分析,扩展了待测样品的空间和操作灵活性.Kamata等人^[68]实现了高空间分辨率串联质谱(MS/MS)成像,以描述药物在头发中的纵向和横向分布,这可以为正确解释头发测试结果提供不可或缺的信息,包括药物掺入头发的机制,从内源性掺入摄入的药物中辨别不想要的表面污染,以及精确阐明药物使用历史.

2.4 肿瘤标志物成像分析

Saudemont等人^[69]发展了在线采样的MALDI技术.该技术通过光纤将激光束送入到要分析的组织样本处,当基质和分析物分子被解析出时,用一特制的

吸管装置将分析物吸入管内,并传递到质谱仪入口进行分析.研究人员用该技术分析了组织样本的正常区、癌区和癌变区水溶性小分子.结果表明,这些分子可以非常好地区分癌变的三种状态(图7).

治疗性阻断PD-1(programmed cell death protein 1)与其配体PD-L1(programmed death-ligand 1)(免疫检查点)之间的相互作用是恢复抗肿瘤免疫反应的一种很有前途的方法.Berghmans等人^[70]利用MALDI-IMS发现,加入中性粒细胞防御素1、2和3作为预处理生物标志物可以更准确地预测非小细胞肺癌免疫治疗的结果.另外,研究发现,中性粒细胞防御素有助于机体激活对癌细胞的免疫反应,这可能为抗癌治疗提供新线索.Yanagisawa等人^[71]利用质谱成像技术得到小细胞与正常肺癌组织中近1600个蛋白质分子的质谱峰信号,通过比较得到特定的蛋白质分析信号的差异,有助于对正常人和患有腺癌、鳞状上皮细胞癌或大细胞癌病人的肺组织进行分类.双盲实验结果表明,该分类方法平均准确率超过95%.此外,通过分析癌组织中特异表达的蛋白质分子,可探讨它们作为肺癌早期诊断生物标志物的可能性.陆豪杰团队^[72]通过优化组织切片制备,基质覆盖和质谱检测等质谱成像技术条件,也对来自3位患者的10对非小细胞肺癌组织切片及癌旁组织切片进行了质谱成像研究,结果表明,癌组织中有 m/z 3000~3500范围内的特征性簇峰出现,可直观地在分子水平上反映出癌组织和正常组织间的差异.

DESI已广泛应用于多种不同来源的生物组织样品质谱成像研究,特别是用于区分病理组织及正常组织样品.目前DESI在质谱成像领域已有诸多应用,如生物组织成像、天然产物成像、法医鉴定及三维组织成像分析等^[35].Dill等人利用DESI质谱成像区分狗膀胱癌组织及癌旁组织.在分别采用正离子和负离子检测模式下,发现有9种不同的甘油磷酸酯和3种不同的脂肪酸在癌症组织中的含量上调^[73].该结果也适用于区分人膀胱癌组织及癌旁组织^[74].但是通过对胰腺组织的分析发现,甘油磷酸酯和脂肪酸很难用于区分胰腺癌组织与正常组织样品,而胆甾醇硫酸盐可用于区分胰腺癌组织及癌前期病变组织^[75].

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的肿瘤间和瘤内异质性是GBM的显著病理特征之一.Gularyan等人^[76]应用TOF-SIMS对57例患者的单细胞石蜡和冷冻

图7 上图为在线采样MALDI的装置和操作示意图, 中图为组织正常区域、癌区和癌变区的质谱图, 下图为三个区域质谱结果的分形图^[69]

Figure 7 The top figure shows schematic diagram of the device and operation about the on-line MALDI sampling, the middle figure is a mass spectrum diagram of the normal tissue region, the cancer region and the cancerous region, and the bottom figure is a fractal diagram of the mass spectrum of the three regions^[69] (with permission)

肿瘤切片等临床标本进行了成像分析, 胶质瘤样本可细分为临床相关组和正常脑组织区。通过用金结合抗体染色GBM切片, 能够可视化坏死区和细胞肿瘤区之间的边界, 并将胶质瘤样本细分为以患者不同生存期为特征的组。该方法证明GBM含有高水平的caveolin-1蛋白和胆固醇。这些高表达caveolin-1和胆固醇的

GBM细胞可能部分代表胶质瘤干细胞。

Erich等人^[77]用MALDI-MS成像探索了组织中内源性蛋白酶活性。他们以p底物作为示踪剂, 以不同的时间过程剖面酶解这种肽, 发现来自p底物的不同裂解产物是瞬时产生的, 蛋白水解可通过蛋白酶抑制剂以浓度依赖性的方式减弱; 分析了胃癌在小鼠体内的蛋

白酶活性, 揭示了蛋白酶活性的差异分布, 同时在小鼠肿瘤组织中观察到最强的活性. Sun等人^[78]利用MALDI-IMS在代谢组学水平上对72acc的福尔马林固定石蜡包埋组织样品进行了表型分析. 用肿瘤相关性激素及其在体液中的硫酸化代谢物作为肿瘤标志物, 研究类固醇硫酸化在肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma, ACC)中的作用. Santoro等人^[79]用DESI-IMS对乳腺癌分子亚型的化学组成进行了表征, 对感兴趣的区域进行了鉴定, 包括浸润性乳腺癌(invasive breast cancer, IBC)、导管原位癌(ductal carcinoma *in situ*, DCIS)和邻近良性组织(adjacent benign tissue, ABT), 对200 mm的代谢组学剖面进行了研究. 乳腺癌分子亚型之间不同的脂质组成, 对乳腺癌的发病机制有潜在的影响.

透明细胞肾细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, CCRCC)是肾癌最常见、最致命的亚型. Vijayalakshmi等人^[80]对CCRCC的23例正常肿瘤配对肾切除术标本进行了DESI-IMS分析, 获得了小代谢物、脂肪酸和脂质的谱图. 他们从超过27000个代谢特征中选择了57个峰(这些特征跨越37608个像素), 确定了一组区分CCRCC和正常肾脏的代谢物, 准确率分别为94%和76%. DESI-IMS允许快速检测与正常和CCRCC相关的代谢物, 具有较高的准确性. 因为缺乏可以准确地确定良性状况的术前诊断方法, 最常见的良性肾肿瘤-肾癌细胞瘤患者可能会被过度治疗. Zhang等人^[58]采用DESI-IMS成像技术研究了各种类型肾组织的代谢和脂质分布, 包括正常肾、肾癌和肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC). 他们在成像数据的基础上, 对RCC的三种亚型进行了鉴别, 几种小代谢物和脂质被确定为单个组织类型的特征, 并使用串联质谱和高质量精度测量进行了化学表征.

2.5 脑内神经递质质谱成像

神经肽是大脑中重要的信号分子, 其表达水平的改变与帕金森病等神经疾病有关. Hulme等人^[81]开发并评估了一种方法, 通过基质辅助激光解吸电离质谱成像在高侧向分辨率下同时在大鼠和灵长类大脑组织切片中成像多个神经肽. 利用帕金森病单侧6-羟基多巴胺大鼠模型, 在多个脑区成像脑啡肽、强啡肽、速激肽和神经降压素的变化. Shariatgorji等人^[82]提出了一种质谱成像方法来全面映射特定脑区的神经递质网

络, 发展了氟甲基吡啶基的基质. 该基质可促进含有酚羟基和伯胺或仲胺基团的分子的共价电荷标记, 包括多巴胺能和5-羟色胺能神经递质及其相关代谢物. 这些基质改善了基质辅助激光解吸电离质谱成像(MALDI-IMS)检测低丰度神经递质的能力, 并促进了神经递质在大脑精细结构中的同时成像, 横向分辨率为10 μm . 神经递质系统的直接成像为探索各种神经疾病如何通过神经递质调节影响特定脑区提供了一种方法.

Delcourt等人^[83]用MALDI-IMS成像在3个脑区进行组织空间分辨蛋白质组学分析, 表征了123个参考蛋白. 一些蛋白质显示出特定的翻译后修饰剖面或截断, 与大脑区域及其功能有关, 比如基质金属肽酶3裂解C-末端片段-突触核蛋白(AA95~140)的分布图确定了其沿海马齿状回的特异性分布. Li等人^[84]开发了一种基于纳秒的光化学反应(nanosecond photochemical reaction, NSPCR)的Click反应. NSPCR对伯胺基团具有单一可访问性, 累积标记效率大于90%. 用光活性化合物2-硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde, NBA)启动NSPCR, 能够增强小鼠脑组织等复杂组织样本中神经肽的识别和可视化, 从而为蛋白质的结构探测提供检测分子量高达155 kD的可能性.

2.6 临床手术质谱成像应用

IMS是直接利用物质分子及其碎片来构图的成像方法, 能直接看到目标分子或其碎片的空间分布形状与含量水平, 是一种多水平、多参数的物质成像新技术, 对模糊病变组织边界的定位以及外科精准手术(如癌组织切除判别)、医药传送与疗效等具有无法替代的作用. 生物组织或细胞的敞开式DESI质谱成像可指导临床手术. 例如, 普渡大学Cooks等人在手术刀上连接一个进样管线, 刀口切到的位置产生的样品分子被管线引入质谱进样口, 通过质谱分离, 可以清楚地判断这块组织是否是癌变组织(<https://www.antpedia.com/news/58/n-1416458.html>). 由此, 该方法可以指导外科医生尽量将癌变组织切除干净, 在外科手术中起重要作用.

最大范围切除脑胶质瘤而最小程度损害神经功能是显微手术的目标, 但确定脑胶质瘤切除范围一直是手术的难点. 针对该难题, 可使用DESI-MS在切除下来的神经胶质瘤组织切片中检测N-乙酰天冬氨酸及

膜源复合脂质的信号, 其测定结果具有高灵敏度和高特异性, 且在几分钟内即可完成. 除了及时提供诊断和预后的信息外, N-乙酰天冬氨酸及膜源复合脂质的分布与肿瘤组织的大小和边界表现重合. 因此, 将N-乙酰天冬氨酸及膜源复合脂质的信号比对到3D核磁成像图像上可以整合肿瘤特异性代谢物鉴定与影像分析的结果, 从而提高临床诊治水平^[85,86].

2.7 其他质谱成像应用研究

Pessotti等人^[87]用MALDI-IMS来成像细菌微菌落, 通过优化制备样品并与大气压下的MALDI相结合, 实现多达50个细胞的化学成分可视化. 在枯草芽孢杆菌和Coelicolor链霉菌中的研究中, 发现当细胞生长在由紫花苜蓿根产生的生理梯度内时, 微菌和不对称代谢物产生的化学输出具有异质性. Lane等人^[88]分析热带藻类组织表面的抗菌物质分布情况, 发现热带藻类分泌藻胆素(bromophycolides)到其受伤表面来防止细菌感染. Watrous等人^[89]利用DESI-MS对枯草杆菌和链霉菌的二次代谢产物进行成像分析, 为药物开发中天然产物的发现提供了新的有效途径.

Machálková等人^[90]利用MALDI-IMS和激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)对三维细胞培养物(球体)组织切片进行了分析. 他们选择MALDI-IMS检测感兴趣药物的分布, 并利用荧光免疫组织化学(fluorescence immunohistochemistry, IHC)和LSCM定位具有活力、增殖、凋亡和转移特异性标记的细胞. MS和IHC球体图像叠加后, 对MS和IHC信号的准确共定位显示, 在24 h内, 临床测试的药物过氧化物酶在球体中的穿透有限, 揭示了在无硫磷区存在的增殖和促侵袭细胞的比例, 减少了它们在肌肽阳性区的丰度, 并区分了缺氧、营养剥夺和药物暴露引起的凋亡.

Ifa等人^[91]报道了利用DESI-MS进行字迹鉴定以及成像方法的研究, 他们采用逐行扫描的方式对样品数据进行采集, 并利用成像软件将结果分析汇总得出成像结果, 进而利用这一方法进行了笔迹以及犯罪现场指纹的质谱成像研究.

TOF-SIMS成像技术在材料科学研究中有重要的应用, 了解卤化物钙钛矿太阳能电池不均匀性的起源和演变似乎是推进了该技术的发展. Harvey等人^[92]应用TOF-SIMS从卤化物有机-无机钙钛矿光电池的所有

组成部分获得了一维(标准深度剖面)、二维(高分辨率100 nm成像)以及三维(高分辨率成像与深度剖面相结合的层析成像)化学信息. TOF-SIMS成像技术已被用于分析由多种方法制成的钙钛矿光电池, 包括阳离子均匀性(深度和横向)、交替加工时化学的变化、降解时化学的变化(包括在界面上)和钝化添加剂的横向分布; 可以提取有关卤化物钙钛矿形成以及对器件性能至关重要的不均匀性的信息, 为理解降解引起的组成变化提供了最佳的诠释.

3 总结和展望

如上所述, 质谱成像已成功应用于生物组织切片的各种不同类型分子的成像研究. 上述几种质谱成像技术都各有优势: MALDI可用于蛋白质与多肽分子的检测, 但需要相对复杂的样品制备过程; SIMS和DESI则适合样品小分子的原位检测, 尤其DESI更适合现场检测. 质谱离子化的方式对质谱成像的图像分辨率影响很大. 目前应用最为广泛的MALDI和DESI的图像空间分辨率为10~200 μm 左右, 远不能与一般光学成像的分辨率相比, 这限制了质谱成像技术的应用, 因此还需要发展新的离子化技术以提高其图像分辨率.

单细胞质谱研究领域发展了一类结合电生理膜片钳技术的质谱成像方法, 其中超细毛细管同时执行细胞膜上的局部电势配准和分析物抽吸. 这类方法包括扫描膜片钳、扫描离子电导显微镜、基于扫描探针显微镜技术的膜片钳、定量亚细胞二次离子质谱或“离子显微镜”、活细胞单细胞质谱、原位逐细胞成像、单细胞视频质谱法等. 电生理膜片钳电结合质谱为检测细胞间异质性提供了一种新测量方法. 这种方法非常适合于检测细胞, 如星形胶质细胞. 在一定的生理相关的背景下, 该技术可以提供神经元活动与细胞代谢组变化相关的定量信息; 也可分析小鼠脑区单个神经元中的谷氨酰胺(glutamine, Gln)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、GABA等. 作为20世纪90年代末才出现的一种分子成像新技术, 质谱成像技术发展远未达到成熟应用的阶段, 还不能完全满足人们对组织样品的分析要求^[93]. 质谱成像在样品制备、仪器条件和数据处理等诸多技术环节都有待进一步提高. 在提高质谱图像分辨率方面, 对MALDI成像技术来说, 其需要做到基质分子与待分析生物分子形成良好的共结晶, 才能

得到高灵敏度的质谱信号. 基质与待测分子形成的晶体尺寸必须小于质谱成像的分辨率才能得到可靠的分析结果. 此外, 由于基质结晶过程受环境因素影响太大, 会降低方法的重现性和可靠性. 因此, 发展新的基质体系及高效点样系统是提高MALDI质谱图像分辨率和可靠性的重要选择之一.

尽管如此, 随着质谱仪器的改进及其相关技术的完善, 更新的电离方法、更好的算法以及自动化数据统计处理软件的出现, 质谱成像技术进一步迈向高特

异性、高灵敏度和高分辨率. 三维靶向成像、结构信息确认方法和单细胞成像将成为新兴研究领域. 此外, 针对临床应用, 需要开发多功能、小型化、简化的仪器和相应的质谱成像分析方法. 质谱成像技术与其他影像学模型整合也是进一步探索疾病分子机制的关键. 如果质谱成像技术在实践中具备足够的可重复性并改善分子覆盖率和定性, 必将在蛋白组学、临床医学和药物代谢动力学等多个领域发挥越来越重要的作用.

参考文献

- McDonnell L A, Heeren R M A. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26: 606–643
- Caprioli R M, Farmer T B, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*, 1997, 69: 4751–4760
- Watrous J D, Alexandrov T, Dorrestein P C. The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological research. *J Mass Spectrom*, 2011, 46: 209–222
- Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan D E, et al. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med*, 2001, 7: 493–496
- Xu B, Wei K H, Zhang X M, et al. MALDI imaging mass spectrometry on biological tissue sections: the new progress (in Chinese). *Bull Acad Mil Med Sci*, 2006, 30: 288–291 [许彬, 魏开华, 张学敏, 等. 生物组织的基质辅助激光解吸电离质谱成像新进展. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30: 288–291]
- Liu N, Wei K H, Zhang X M, et al. The latest progress in clinical mass spectrometry: mass spectrometry imaging methods and applications (in Chinese). *Sci Instrum Dev*, 2007, 10: 76–80 [刘念, 魏开华, 张学敏, 等. 临床质谱学的最新进展: 质谱成像方法及其应用. *科学仪器与装置*, 2007, 10: 76–80]
- Todd P J, Schaff T G, Chaurand P, et al. Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Mass Spectrom*, 2001, 36: 355–369
- Wiseman J M, Ifa D R, Song Q, et al. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 7188–7192
- Cooks R G, Ouyang Z, Takats Z, et al. Ambient mass spectrometry. *Science*, 2006, 311: 1566–1570
- Gilmore I S, Heiles S, Pieterse C L. Metabolic imaging at the single-cell scale: recent advances in mass spectrometry imaging. *Annu Rev Anal Chem*, 2019, 12: 201–224
- Neumann E K, Do T D, Comi T J, et al. Exploring the fundamental structures of life: non-targeted, chemical analysis of single cells and subcellular structures. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 9348–9364
- Decelle J, Veronesi G, Gallet B, et al. Subcellular chemical imaging: new avenues in cell biology. *Trends Cell Biol*, 2020, 30: 173–188
- Sämfors S, Fletcher J S. Lipid diversity in cells and tissue using imaging SIMS. *Annu Rev Anal Chem*, 2020, 13: 249–271
- Ryan D J, Spraggins J M, Caprioli R M. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 64–72
- Han J, Permentier H, Bischoff R, et al. Imaging of protein distribution in tissues using mass spectrometry: An interdisciplinary challenge. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 112: 13–28
- Agüi-Gonzalez P, Jähne S, Phan N T N. SIMS imaging in neurobiology and cell biology. *J Anal At Spectrom*, 2019, 34: 1355–1368
- Grégoire S, Luengo G S, Hallegot P, et al. Imaging and quantifying drug delivery in skin—Part 1: Autoradiography and mass spectrometry imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 153: 137–146
- Wang T, Cheng X, Xu H, et al. Perspective on advances in laser-based high-resolution mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2019, 92: 543–

- 19 Cornett D S, Reyzer M L, Chaurand P, et al. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nat Methods*, 2007, 4: 828–833
- 20 Maddalo G, Petrucci F, Iezzi M, et al. Analytical assessment of MALDI-TOF imaging mass spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation. *Clin Chim Acta*, 2005, 357: 210–218
- 21 Doerr A. Mass spectrometry imaging takes off. *Nat Methods*, 2018, 15: 32
- 22 Kompauer M, Heiles S, Spengler B. Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- μ m lateral resolution. *Nat Methods*, 2017, 14: 90–96
- 23 Kompauer M, Heiles S, Spengler B. Autofocusing MALDI mass spectrometry imaging of tissue sections and 3D chemical topography of nonflat surfaces. *Nat Methods*, 2017, 14: 1156–1158
- 24 Seeley E H, Oppenheimer S R, Mi D, et al. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 1069–1077
- 25 Chan K, Lanthier P, Liu X, et al. MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides in mouse brain using ionic liquid matrix. *Anal Chim Acta*, 2009, 639: 57–61
- 26 Wu C, Dill A L, Eberlin L S, et al. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrom Rev*, 2013, 32: 218–243
- 27 Niehaus M, Soltwisch J, Belov M E, et al. Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution. *Nat Methods*, 2019, 16: 925–931
- 28 Jungmann J H, MacAleese L, Visser J, et al. High dynamic range bio-molecular ion microscopy with the timepix detector. *Anal Chem*, 2011, 83: 7888–7894
- 29 Jungmann J H, Smith D F, MacAleese L, et al. Biological tissue imaging with a position and time sensitive pixelated detector. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23: 1679–1688
- 30 Halford E, Winter B, Mills M D, et al. Modifications to a commercially available linear mass spectrometer for mass-resolved microscopy with the pixel imaging mass spectrometry (PImMS) camera. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28: 1649–1657
- 31 Nomerotski A. Imaging and time stamping of photons with nanosecond resolution in Timepix based optical cameras. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A*, 2019, 937: 26–30
- 32 Zhao A, van Beuzekom M, Bouwens B, et al. Coincidence velocity map imaging using Tpx3Cam, a time stamping optical camera with 1.5 ns timing resolution. *Rev Sci Instrum*, 2017, 88: 113104
- 33 Fisher-Levine M, Boll R, Ziaee F, et al. Time-resolved ion imaging at free-electron lasers using TimepixCam. *J Synchrotron Rad*, 2018, 25: 336–345
- 34 Jenčič B, Šepec L, Vavpetič P, et al. Stigmatic imaging of secondary ions in MeV-SIMS spectrometry by linear time-of-flight mass spectrometer and the TimePix detector. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B*, 2019, 452: 1–6
- 35 Reyzer M L, Caprioli R M. MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11: 29–35
- 36 Goodwin R J A, Pennington S R, Pitt A R. Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics*, 2008, 8: 3785–3800
- 37 Chaurand P, Schwartz S A, Caprioli R M. Profiling and imaging proteins in tissue sections by MS. *Anal Chem*, 2004, 76: 87A–93A
- 38 Liu N, Liu F, Xu B, et al. Establishment of mass spectrometry imaging method of biological tissues and its proteomic analysis application of rat hippocampus after microwave irradiation (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2008, 36: 421–425 [刘念, 刘锋, 许彬, 等. 生物组织质谱成像方法的建立及其在微波辐射后大鼠海马组织的蛋白组分析中的应用. *分析化学*, 2008, 36: 421–425]
- 39 Rohner T C, Staab D, Stoeckli M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126: 177–185
- 40 Moon D W, Park Y H, Lee S Y, et al. Multiplex protein imaging with secondary ion mass spectrometry using metal oxide nanoparticle-conjugated antibodies. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 18056–18064
- 41 Groseclose M R, Andersson M, Hardesty W M, et al. Identification of proteins directly from tissue: *in situ* tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2007, 42: 254–262
- 42 Seeley E H, Caprioli R M. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18126–18131
- 43 Garza K Y, Feider C L, Klein D R, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging of proteins directly from biological tissue sections. *Anal Chem*, 2018, 90: 7785–7789

- 44 Murphy R C, Hankin J A, Barkley R M. Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009, 50: S317–S322
- 45 Wang Z, Cai Y, Wang Y, et al. Improved MALDI imaging MS analysis of phospholipids using graphene oxide as new matrix. *Sci Rep*, 2017, 7: 44466
- 46 Boskamp M S, Soltwisch J. Charge distribution between different classes of glycerophospholipids in MALDI-MS imaging. *Anal Chem*, 2020, 92: 5222–5230
- 47 Astigarraga E, Barreda-Gomez G, Lombardero L, et al. Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Anal Chem*, 2008, 80: 9105–9114
- 48 Caughlin S, Park D H, Yeung K K C, et al. Sublimation of DAN matrix for the detection and visualization of gangliosides in rat brain tissue for MALDI imaging mass spectrometry. *J Vis Exp*, 2017, doi: 10.3791/55254
- 49 Burnum K E, Cornett D S, Puolitaival S M, et al. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *J Lipid Res*, 2009, 50: 2290–2298
- 50 Fletcher J S, Rabbani S, Henderson A, et al. A new dynamic in mass spectral imaging of single biological cells. *Anal Chem*, 2008, 80: 9058–9064
- 51 Chandra S, Parker D J, Barth R F, et al. Quantitative imaging of magnesium distribution at single-cell resolution in brain tumors and infiltrating tumor cells with secondary ion mass spectrometry (SIMS). *J Neurooncol*, 2016, 127: 33–41
- 52 Ostrowski S G, Kurczy M E, Roddy T P, et al. Secondary ion MS imaging to relatively quantify cholesterol in the membranes of individual cells from differentially treated populations. *Anal Chem*, 2007, 79: 3554–3560
- 53 Richter K, Nygren H, Malmberg P, et al. Localization of fatty acids with selective chain length by imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Microsc Res Tech*, 2007, 70: 640–647
- 54 Tahallah N, Brunelle A, De La Porte S, et al. Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *J Lipid Res*, 2008, 49: 438–454
- 55 Touboul D, Brunelle A, Halgand F, et al. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. *J Lipid Res*, 2005, 46: 1388–1395
- 56 Angerer T B, Velickovic D, Nicora C D, et al. Exploiting the semidestructive nature of gas cluster ion beam time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging for simultaneous localization and confident lipid annotations. *Anal Chem*, 2019, 91: 15073–15080
- 57 Hua X, Li H W, Long Y T. Investigation of silver nanoparticle induced lipids changes on a single cell surface by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem*, 2018, 90: 1072–1076
- 58 Zhang J, Li S Q, Lin J Q, et al. Mass spectrometry imaging enables discrimination of renal oncocytoma from renal cell cancer subtypes and normal kidney tissues. *Cancer Res*, 2020, 80: 689–698
- 59 Yin R, Kyle J, Burnum-Johnson K, et al. High spatial resolution imaging of mouse pancreatic islets using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2018, 90: 6548–6555
- 60 van Smaalen T C, Ellis S R, Mascini N E, et al. Rapid identification of ischemic injury in renal tissue by mass-spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2019, 91: 3575–3581
- 61 Ellis S R, Paine M R L, Eijkel G B, et al. Automated, parallel mass spectrometry imaging and structural identification of lipids. *Nat Methods*, 2018, 15: 515–518
- 62 Gouw A M, Margulis K, Liu N S, et al. The MYC oncogene cooperates with sterol-regulated element-binding protein to regulate lipogenesis essential for neoplastic growth. *Cell Metab*, 2019, 30: 556–572.e5
- 63 Lukowski J K, Weaver E M, Hummon A B. Analyzing liposomal drug delivery systems in three-dimensional cell culture models using MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2017, 89: 8453–8458
- 64 Hsieh Y, Casale R, Fukuda E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 965–972
- 65 Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman J L, et al. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, 78: 6448–6456
- 66 Luo Z, He J, Chen Y, et al. Air flow-assisted ionization imaging mass spectrometry method for easy whole-body molecular imaging under ambient conditions. *Anal Chem*, 2013, 85: 2977–2982
- 67 Song X, Luo Z, Li X, et al. *In situ* hydrogel conditioning of tissue samples to enhance the drug's sensitivity in ambient mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2017, 89: 6318–6323

- 68 Kamata T, Shima N, Miki A, et al. High spatial-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization-ion trap-time-of-flight tandem mass spectrometry imaging for depicting longitudinal and transverse distribution of drugs incorporated into hair. *Anal Chem*, 2020, 92: 5821–5829
- 69 Saudemont P, Quanicco J, Robin Y M, et al. Real-time molecular diagnosis of tumors using water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry technology. *Cancer Cell*, 2018, 34: 840–851.e4
- 70 Berghmans E, Jacobs J, Deben C, et al. Mass spectrometry imaging reveals neutrophil defensins as additional biomarkers for anti-PD-(L)1 immunotherapy response in NSCLC patients. *Cancers*, 2020, 12: 863
- 71 Yanagisawa K, Shyr Y, Xu B J, et al. Proteomic patterns of tumor subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 2003, 362: 433–439
- 72 Zhang Y, Chen G, Lu H J, et al. MALDI profiling MS application to analysis of non-small cell lung cancer (in Chinese). *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2007, 28: 209–213 [张莹, 陈岗, 陆豪杰, 等. MALDI质谱成像技术在非小细胞肺癌中的应用研究. *质谱学报*, 2007, 28: 209–213]
- 73 Dill A L, Ifa D R, Manicke N E, et al. Lipid profiles of canine invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adjacent normal tissue by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2009, 81: 8758–8764
- 74 Dill A L, Eberlin L S, Costa A B, et al. Multivariate statistical identification of human bladder carcinomas using ambient ionization imaging mass spectrometry. *Chem Eur J*, 2011, 17: 2897–2902
- 75 Eberlin L S, Dill A L, Costa A B, et al. Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 3430–3434
- 76 Gularyan S K, Gulin A A, Anufrieva K S, et al. Investigation of inter- and intra-tumoral heterogeneity of glioblastoma using TOF-SIMS. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19: 960–970
- 77 Erich K, Reinle K, Müller T, et al. Spatial distribution of endogenous tissue protease activity in gastric carcinoma mapped by MALDI mass spectrometry imaging. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18: 151–161
- 78 Sun N, Kunzke T, Sbiera S, et al. Prognostic relevance of steroid sulfation in adrenocortical carcinoma revealed by molecular phenotyping using high-resolution mass spectrometry imaging. *Clin Chem*, 2019, 65: 1276–1286
- 79 Santoro A L, Drummond R D, Silva I T, et al. *In situ* DESI-MSI lipidomic profiles of breast cancer molecular subtypes and precursor lesions. *Cancer Res*, 2020, 80: 1246–1257
- 80 Vijayalakshmi K, Shankar V, Bain R M, et al. Identification of diagnostic metabolic signatures in clear cell renal cell carcinoma using mass spectrometry imaging. *Int J Cancer*, 2020, 147: 256–265
- 81 Hulme H, Fridjonsdottir E, Gunnarsdottir H, et al. Simultaneous mass spectrometry imaging of multiple neuropeptides in the brain and alterations induced by experimental parkinsonism and L-DOPA therapy. *Neurobiol Dis*, 2020, 137: 104738
- 82 Shariatgorji M, Nilsson A, Fridjonsdottir E, et al. Comprehensive mapping of neurotransmitter networks by MALDI-MS imaging. *Nat Methods*, 2019, 16: 1021–1028
- 83 Delcourt V, Franck J, Quanicco J, et al. Spatially-resolved top-down proteomics bridged to MALDI MS imaging reveals the molecular physiome of brain regions. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17: 357–372
- 84 Li G, Ma F, Cao Q, et al. Nanosecond photochemically promoted click chemistry for enhanced neuropeptide visualization and rapid protein labeling. *Nat Commun*, 2019, 10: 4697
- 85 Eberlin L S, Norton I, Orringer D, et al. Ambient mass spectrometry for the intraoperative molecular diagnosis of human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 1611–1616
- 86 Pirro V, Alfaro C M, Jarmusch A K, et al. Intraoperative assessment of tumor margins during glioma resection by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 6700–6705
- 87 Pessotti R C, Hansen B L, Zacharia V M, et al. High spatial resolution imaging mass spectrometry reveals chemical heterogeneity across bacterial microcolonies. *Anal Chem*, 2019, 91: 14818–14823
- 88 Lane A L, Nyadong L, Galhena A S, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7314–7319
- 89 Watrous J, Hendricks N, Meehan M, et al. Capturing bacterial metabolic exchange using thin film desorption electrospray ionization-imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2010, 82: 1598–1600
- 90 Machálková M, Pavlatovská B, Michálek J, et al. Drug penetration analysis in 3D cell cultures using fiducial-based semiautomatic coregistration of MALDI MSI and immunofluorescence images. *Anal Chem*, 2019, 91: 13475–13484
- 91 Ifa D R, Gumaels L M, Eberlin L S, et al. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry.

[Analyst](#), 2007, 132: 461–467

- 92 Harvey S P, Li Z, Christians J A, et al. Probing perovskite inhomogeneity beyond the surface: TOF-SIMS analysis of halide perovskite photovoltaic devices. [ACS Appl Mater Interfaces](#), 2018, 10: 28541–28552
- 93 Heeren R M A, Smith D F, Stauber J, et al. Imaging mass spectrometry: hype or hope? [J Am Soc Mass Spectrom](#), 2009, 20: 1006–1014

Recent progress in mass spectrometry based molecular imaging

YANG PengYuan^{1,2,3}, LIU YingChao², ZHAO HeYu² & LI ShunXiang¹

1 Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2 School of Basic Medical Sciences and Institute of Biomedicine, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China;

3 Central Hospital of Minhang District, Minhang Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201199, China;

Imaging mass spectrometry is a rapidly developing research field, especially in the fields of life sciences and medicine. Various types of small and macromolecules in biological tissues can be scanned by imaging mass spectrometry technology. These biomolecules are closely related to the physiological and pathological states of organisms. Therefore, imaging mass spectrometry is a vital supplement to the method of optical morphological imaging. There are three techniques of imaging mass spectrometry: matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry imaging, secondary ion mass spectrometry (SIMS) imaging, and desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry imaging. This review illustrated the principles and techniques of these three techniques and their applications in scientific and clinical research. The characteristics of these three types of mass spectrometry imaging can be summarized as follows: the spatial resolutions are separately 100, 10, and 0.1–1 μm ; the working environments are atmospheric pressure, vacuum or low pressure, and vacuum; the analytes are small molecules, peptides or proteins or nucleic acid, small molecule or inorganic element; the application fields are environment, biomedicine, and material science.

mass spectrometry imaging, MALDI, SIMS, DESI

doi: [10.1360/SSV-2020-0153](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0153)