

基于 MALDI-MS 技术的新基质大黄酸在代谢组学研究中的应用

叶 慧,王 赞,王 琳,徐小为,吴梦秋,曹国秀,梁 艳,王广基*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室,南京 210009)

摘 要 基质辅助激光解析电离质谱(MALDI-MS)是一项快速、高通量检测未知物质的新兴技术。然而,该技术对代谢物的检测分析往往被复杂的基质峰所干扰,限制了其在代谢组学领域的应用。研究发现,大黄酸能作为一种 MALDI 新基质用于阳离子模式下代谢物的检测。首先运用大黄酸分析了生理学浓度下多种强、弱碱性代谢物的标准品,结果表明与传统基质比较,大黄酸能获得基本无基质峰干扰的质谱图。进一步将大黄酸运用于生物样本的分析,选取小鼠内容物作为模型样本,显示该基质可用于复杂生物样本的代谢组分析。最后考察大黄酸的 MALDI 质谱成像能力,表明该基质可成功运用于小鼠肠段切片的代谢组原位成像。研究表明,大黄酸作为一种新型 MALDI 基质,能可靠、高效地完成基于 MALDI-MS 的代谢物检测及原位成像分析,对 MALDI-MS 技术广泛运用于代谢组学研究具有推动作用。

关键词 MALDI-MS;质谱成像;基质;大黄酸;代谢组学

中图分类号 R969 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0727-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160616

引用本文 叶慧,王赞,王琳,等. 基于 MALDI-MS 技术的新基质大黄酸在代谢组学研究中的应用[J]. 中国药科大学学报,2016,47(6): 727-733.

Cite this article as: YE Hui, WANG Yun, WANG Lin, *et al.* Rhein: a novel matrix for profiling and imaging of endogenous metabolites by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(6): 727-733.

Rhein: a novel matrix for profiling and imaging of endogenous metabolites by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry

YE Hui, WANG Yun, WANG Lin, XU Xiaowei, WU Mengqiu, CAO Guoxiu, LIANG Yan, WANG Guangji*

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract MALDI-MS is an emerging technique that enables rapid profiling of endogenous substances in a high throughput. Nevertheless, its application to metabolite analysis is often hindered by the presence of massive matrix background peaks using conventional matrices. Herein rhein was introduced as a novel matrix for MALDI-MS analysis of cation metabolites. Several strong and weak basic metabolites were measured using rhein. Compared to the previously reported ionless matrix NSA and conventional matrix CHCA, clean MALDI-MS spectra were obtained devoid of matrix signals. Subsequently, we applied this matrix to profile a biologically complex sample, mice intestinal contents. In addition, we have validated the applicability of rhein to MALDI-MS imaging, which allows for simultaneous mapping of hundreds of metabolites from single mouse ileum section. In summary, the discovery of rhein as a novel MALDI matrix enables efficient and reliable profiling and imaging of endogenous metabolites from biological samples with no matrix interferences, which will greatly promote the utility of MALDI-MS-based platform for metabolome studies.

Key words MALDI-MS; mass spectrometry imaging; novel matrix; rhein; metabonomics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81403005, No. 81273589) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140667)

收稿日期 2016-06-15 ***通信作者** Tel: 025-83271128 E-mail: guangjiwang@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81403005, No. 81273589); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20140667)

代谢组学技术能定性、定量地实时捕捉生物体内的代谢物及其动态变化,进而反映生物体内的多种生理学、病理学状态及进程^[1]。因此,该技术愈来愈广泛地运用至疾病诊断、分期、预后及合理化用药方案选择等过程中的生物标记物的发现研究^[2]。

传统的代谢组学研究主要依赖于液相色谱-电喷雾质谱的联用,它能有效地发现先天代谢性疾病^[3]、器官移植排斥^[4]及肿瘤^[5]、糖尿病^[6]、肝硬化^[7]等多种疾病的生物标记物,为代谢组学技术在转化医学领域应用的兴起奠定了基础。而新兴的分析手段基质辅助激光诱导解离质谱法(MALDI-MS),与液相色谱电喷雾质谱(LC-ESI-MS)法相比,对样品的含盐量有较高的耐受性,且能够更快速(毫秒级别)、高效地提供生物样本内复杂物质组的“快照”^[8],完成对提取物等生物样本中所含物质进行非靶向性的检测分析。因此,近年来 MALDI-MS 在组学领域的运用发展迅速。除了对液态样品进行检测, MALDI-MS 还可直接对固态的生物切片进行原位成像分析^[9-11]。它通过对覆盖 MALDI 基质的生物组织切片直接进行像素化的 MALDI-MS 扫描,将各点扫描产生的质谱信号通过数据处理技术进行图像重建分析^[12],能够获取切片中所含物质的空间分布图。MALDI 质谱成像技术的优势在于能通过一次实验从样品中非靶向地提供上百种未知物质的分布信息。更吸引人的是,这些信息是无法通过其他传统质谱技术如 LC-ESI-MS 所获取的。

然而, MALDI-MS 在代谢组领域的运用却受到一定限制。这是由于 MALDI 电离法需要基质的辅助促进样品中物质的解析/电离,而 MALDI 基质在低质荷比区域往往形成大量峰簇^[13]。这对待测物的检测造成干扰,极大影响了该技术在药物及代谢物等低分子量物质检测中的应用。因此在本研究中,探索了新 MALDI 基质大黄酸(rhein, Rhe)在低分子量区检测的应用,通过与传统基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)和另一种新型基质 α -萘磺酸(1-naphthalenesulfonic acid, NSA)的比较^[14],基于其检测多种标准品的能力评价了其电离效率,证实了该基质能够解决传统基质在低质荷比区域干扰峰多的问题。进一步,以小鼠内容物为模型生物样本,运用大黄

酸为 MALDI 基质获取了其代谢物质谱;并考察了大黄酸在 MALDI 质谱成像方面的应用,采集了小鼠盲肠肠段代谢物的分布图,为后续基于 MALDI-MS 技术研究内源活性物质的代谢奠定了分析基础。

1 材料

1.1 试剂

甲醇、CHCA、NSA、2,5-羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)及代谢物标准品(美国 Sigma Aldrich 公司);去离子水由 Milli-Q 超纯水系统提供(18.2 M Ω)。

1.2 仪器

Axima Performance™ MALDI-TOF/TOF 质谱仪(日本岛津公司);冷冻组织切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 动物

选取 6 只 C57BL/6J 雌性小鼠(体重约 20 g),自由进食进水适应 7 d 后,给药组灌胃给予 100 mmol/L 的胆碱溶液 200 μ L,空白组给予等量生理盐水。18 h 后脱颈处死,解剖腹腔,取小鼠回盲瓣置于干净的六孔板中(回盲瓣两端留长,避免内容物暴露出来被污染),将六孔板置于冰板上,取好后将六孔板带回。

2 方法

2.1 样品处理

2.1.1 标准品及基质溶液配制 取标准品胆碱、肉碱、小檗碱、精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸及肌酸,配制成 1 mmol/L 的水溶液,放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存,待用前稀释为 1 μ mol/L。测样前取标准品 3 μ L 与基质溶液 3 μ L 混合入样品管,涡旋震荡,离心后取溶液 0.6 μ L 点靶,在室温下置于干燥器中自然挥干。

基质溶液配制需要适量 CHCA 粉末溶于乙腈和水(50:50)的混合溶液中,配制成 5 mg/mL 的溶液。NSA 粉末适量,溶于甲醇和水(50:50)的混合溶液中,配制成 5 mg/mL 的溶液。Rhe 粉末适量,溶于 DMSO-甲醇-水(50:150:50)的混合溶液中,升温后配制成 5 mg/mL 的溶液。另取 DHB 粉末适量,溶于甲醇-水(50:50)的混合溶液中,配制成 10 mg/mL 的溶液。所有基质溶液使用前均需超声

10 min。

2.1.2 生物样本处理 将回盲瓣纵剖,取内容物,按 1:5 的比例加入超纯水研磨成匀浆液。取匀浆液 100 μL ,加入 10% 甲酸 10 μL 酸化样品,加入冰甲醇 400 μL ,振荡 10 min,18 000 r/min 离心 10 min。两次离心后,取上清液 3 μL 与基质溶液 3 μL 混合加入样品管,涡旋振荡,离心后取溶液 0.6 μL 点靶,在室温下置于干燥器中自然挥干。

2.1.3 质谱成像样品处理 将处死后的小鼠回肠及回盲瓣取出,PBS 缓冲液中快速润洗后加入预配好的 100 mg/mL 凝胶溶液中。将凝胶转移至干冰中固定组织,并存放至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存。取出包裹凝胶的回盲瓣组织,修剪后用 OCT 固定,使用冷冻组织切片机将组织切成 12 μm 厚度的切片。将获取的新鲜切片用热吸附的原理直接吸附至常温的 MALDI 样品板上。待其干燥后,用喷雾器将基质溶液(5 mg/mL 大黄酸)均匀的喷洒在样品上 20 次,待样品板上形成均匀的薄层基质晶体后,转移至干燥器中存放。

2.2 质谱检测

2.2.1 代谢物标准品及生物样本代谢谱检测 将点好基质和样品的样品板加载入仪器,通过 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行检测。该仪器配有 60 Hz, 355 nm 的 N_2 激光。使用反射模式分析样品,每个样品点随机采 20 张谱图,每张谱图由 10 次激光脉冲轰击样本所获得的信号所叠加而得。获得的谱图由 MALDI-MS 软件进行分析。

2.2.2 生物样本质谱成像分析 将充分干燥的切片样品通过 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行检测。使用 MALDI-MS 软件控制样品显像区域和步差。获取的图像由 Biomap 软件(Novartis, Switzerland)

进行分析。

3 结果和讨论

MALDI-MS 在代谢物分析领域的运用因为经典 MALDI 基质对内源代谢物检出的干扰受到极大影响。在本研究中,探索了天然产物大黄酸作为一种新的 MALDI 基质在代谢组学领域的应用,通过对其结晶形态、基质干扰、离子化效率及质谱成像效率等方面进行评价,为后续基于 MALDI-MS 技术研究内源活性物质的代谢调控奠定了分析基础。

3.1 MALDI 基质的共性特征

长期以来对于 MALDI 基质的选择多遵循实践及经验的结果。传统的 MALDI 基质如 CHCA 和 DHB 多为具有 UV 吸收基团的小分子有机酸(图 1),在与样品混合点靶后随溶剂挥发逐渐形成包含样品的结晶。晶体在激光的轰击下吸收能量,经过解析、电离的过程,携带待测物进入气相并到达检测器,产生多为 +1 价的直观、简单的 MALDI-TOF 谱图。然而,这些基质分子在低分子量区域电离能力强,且气相反应复杂,极易形成峰簇,影响待测物的检测^[15],阻碍了 MALDI 技术在代谢研究方面的应用。因此,寻找能够在低分子量区域尽可能少的产生基质峰簇,且不影响代谢物的检测效率的基质对推进 MALDI-MS 技术在代谢组学等领域的应用具有重大意义。根据 MALDI 基质的共性特征,发现许多天然产物具有作为 MALDI 基质的潜力。本研究选择了天然产物大黄酸(Rhe)作为测试对象,通过将其与传统基质 CHCA 和非离子型基质 NSA 进行比较(图 1),考察大黄酸作为 MALDI 基质检测小分子物质的能力。

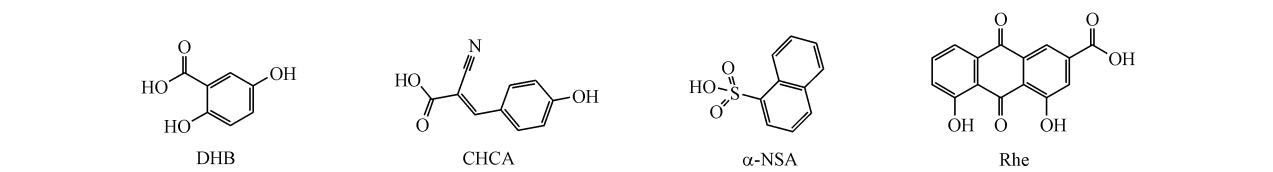


Figure 1 Structures of the conventional matrices 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), the ionless matrix 1-naphthalenesulfonic acid (NSA) and the novel matrix rhein (Rhe)

3.2 结晶形态

常用的 MALDI 基质通常能形成较均匀的晶体。在与样品混匀后、溶剂缓慢挥发的过程中, MALDI 基质形成包裹住待测物的晶体,在激光的轰击下吸收能量,携带待测物进入气相,发挥解析、电离待测物的作用。因此,首先考察了大黄酸的结晶形态。将 2 种经典的基质 CHCA 和 DHB 与新基质大黄酸 Rhe 和 NSA 的结晶形态进行平行比较。

将 4 种基质溶液取相同体积、点靶、干燥后,在显微镜下观察。如图 2 所示,研究发现 CHCA 形成比较均匀、轻薄的结晶,而 DHB 形成典型的针状晶体,且聚集在样品点的外缘。非离子型基质 NSA 也同样形成聚集在样品点外缘的结晶状态,而 Rhe 形成更类似于 CHCA 的均匀的结晶形态,且分布在整个样品区域,提示其作为基质能很好地避免“sweet spot”现象^[16],从而在样品区域提供较均一的离子化效率,适合作为 MALDI 基质。

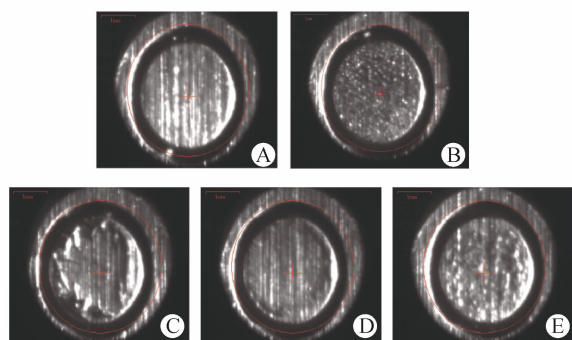


Figure 2 Snapshot images of sample wells with no matrix (A) and wells with crystallized matrices, including CHCA (B), DHB (C), NAS (D) and Rhein (E)

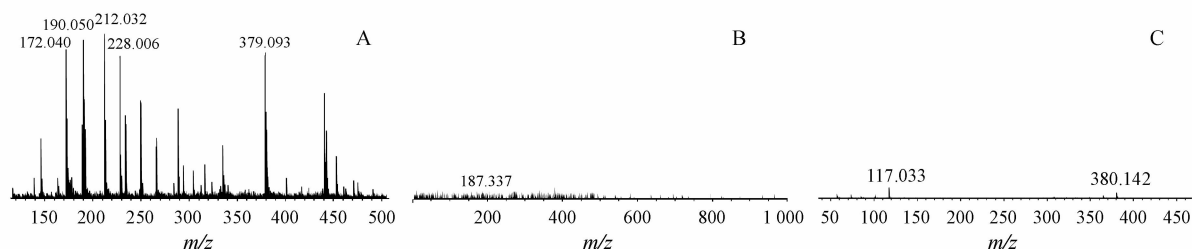


Figure 3 MALDI-TOF spectra of pure matrix solutions, including CHCA (A), NSA (B) and Rhe (C)

3.4 大黄酸离子化性能考察

通过空白基质实验,证实了强酸性小分子大黄酸在低质荷比区几乎不产生干扰峰。因此,以多个标准品为模型化合物,考察大黄酸分析代谢物样品的电离效率。将大黄酸的电离效率和经典基质 CHCA 及非离子型基质 NSA 相比较,如图 4-A ~ H 所示,经典基质 CHCA 展现出了较强的电离效率,标准品如碱性小分子胆碱、肉碱、小檗碱都能被很好地检测,而两性物质如精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸及肌酸等也有较好的响应。然而,除了易电离的胆碱和肉碱外,其余标品的 MALDI-TOF 图谱均在低分子量区域存在较多的基质干扰。这

3.3 MALDI 基质峰的考察

MALDI 检测中多采用相对分子质量在 200 左右的小分子有机酸,如 DHB 和 CHCA。该类小分子在电离后,均会在气相发生断裂,并和 Na、K 等金属离子及水等形成加合物,产生较强的分子离子峰簇^[17]。因此,比较了空白基质溶液 CHCA、NSA 和 Rhe 所产生的 MALDI-MS 谱图。如图 3-A 所示,传统基质 CHCA 在小分子区域产生了 m/z 为 172.040 的脱水峰、 m/z 为 190.050 的加氢峰、 m/z 为 212.032 和 228.006 的加钠、加钾峰及 m/z 为 379.093、对应 $[2M + H]^+$ 离子化形式的基质峰。这些离子峰簇在低分子量区域对待测物质的检测形成极大干扰,往往会遮盖住低丰度内源活性物质的检出。进而考察了近年来根据酸碱理论提出的一种新型非离子型基质 NSA 所产生的 MALDI-MS 谱图,发现 NSA 在正离子模式下几乎不产生干扰峰。接着检测了大黄酸配制的空白基质溶液,发现 Rhe 产生的干扰峰丰度同样几乎可以忽略(图 3-C),显示 Rhe 以不亚于 NSA 基质的表现,展现出应用于代谢物领域研究的潜质。

些干扰峰在小檗碱、精氨酸、脯氨酸的图谱中显得尤为明显。当这些小分子标准品的浓度降低时,极易掩盖在基质干扰峰簇中,影响生物样品中内源性代谢物的检出。同 CHCA 相比,NSA 的基质干扰峰最少,但是其电离效率较弱,某些碱性较弱的化合物,如脯氨酸、苯丙氨酸、肌酸的响应均较低。而新基质 Rhe 自身在正离子检测模式下产生极少的基质峰,对待测物的干扰程度极低。同时,标准品在其辅助下除加氢峰外还有加钠、加钾峰等形式存在,且响应均很高,初步证明可以替代传统 MALDI 基质用于两性及碱性代谢物的分析检测。

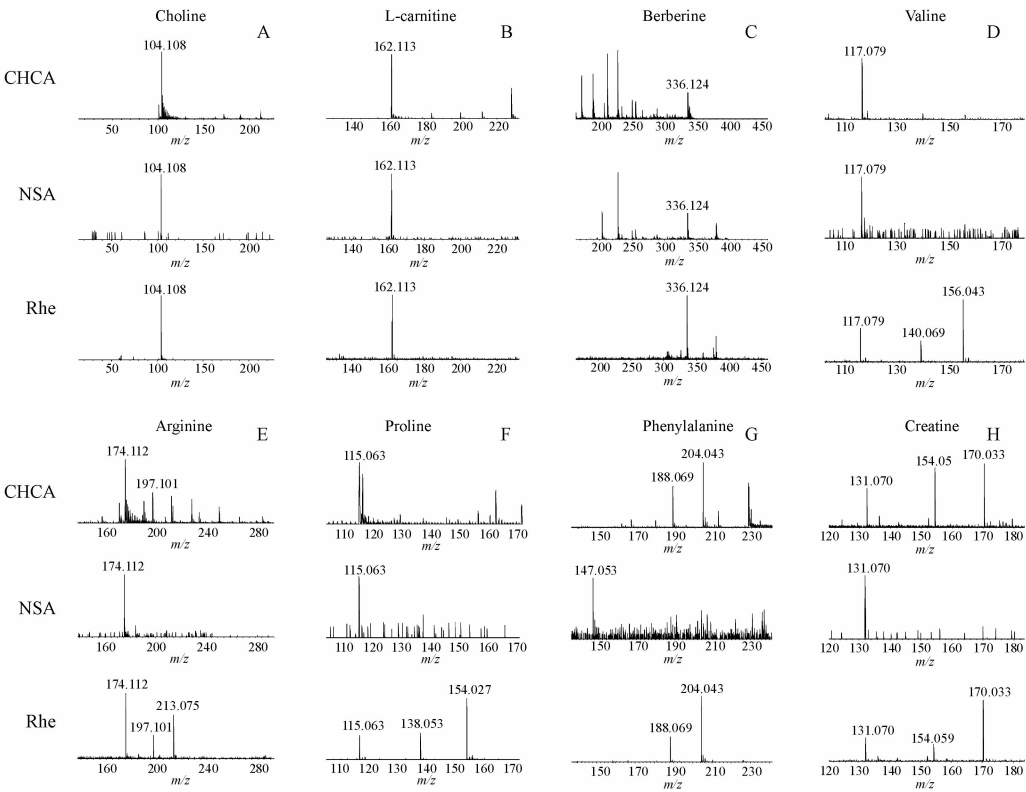


Figure 4 MALDI-TOF spectra of representative metabolite standards,including choline (A),carnitine (B),berberine (C),valine (D),arginine (E),proline (F),phenylalanine (G) and creatine using Rhe as matrix (H)

3.5 大黄酸在复杂生物样本的 MALDI-MS 分析中的应用

本研究接着运用生物样本作为模型待测物验证大黄酸对复杂样品的离子化能力。图 5-A 显示的是在 MALDI-TOF/TOF 仪器上运用正离子反射模式所获得的小鼠肠道内容物的 TOF-MS 质谱图中截取的 m/z 100 ~ 200 的部分。与空白基质 Rhe 相比(基质峰以星号标出),内容物样本展示出了丰富的离子信号。根据其精确分子量及 MS/MS 谱图,从中鉴定出内源化合物如胆碱、亮氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和精氨酸等内源性代谢物。

同时,本研究运用大黄酸对内源性物质代谢研究进行了初探。近期文献表明,饮食中长期过度摄取胆碱会在肠道菌群的作用下形成大量的三甲胺(TMA),该物质经肠道进入血液循环系统后,在肝脏部位经 FMO3 酶的作用进一步形成氧化型三甲胺(TMAO) [18-19]。TMAO 能通过过度活化血小板,增加血栓形成风险,促进心血管疾病的发

生 [20]。这一新机制的提出揭示了肠道菌群与心血管疾病的关联,而对该过程的调控则为预防心血管疾病的发生提供了新的思路。然而,对于该肠道菌群介导的代谢过程的调控应当首先建立在能够对内容物中胆碱及其代谢物进行灵敏、准确检出的基础上。因此,本研究对灌胃给予胆碱后 0 h 及 18 h 的内容物进行了检测,并与未进食的空白组小鼠内容物进行比较。如图 5B-E 所示,基于 MALDI-MS 谱图,发现灌胃给予胆碱后观察到内容物中胆碱(m/z 104. 108)含量较空白组显著升高,且在 18 h 组中观测到内容物中菌群代谢产物三甲胺(m/z 60. 081)的生成;而空白组的 18 h 对照组相应的谱图中无法观察到该代谢产物的离子峰。因此,对于复杂生物样本肠道内容物中胆碱及其菌群代谢产物的检测表明大黄酸是一种具有很好潜力的 MALDI 基质。其对小分子物质的有效电离及无干扰的特性显示出大黄酸在基于 MALDI-MS 技术进行代谢物领域研究的广阔前景。

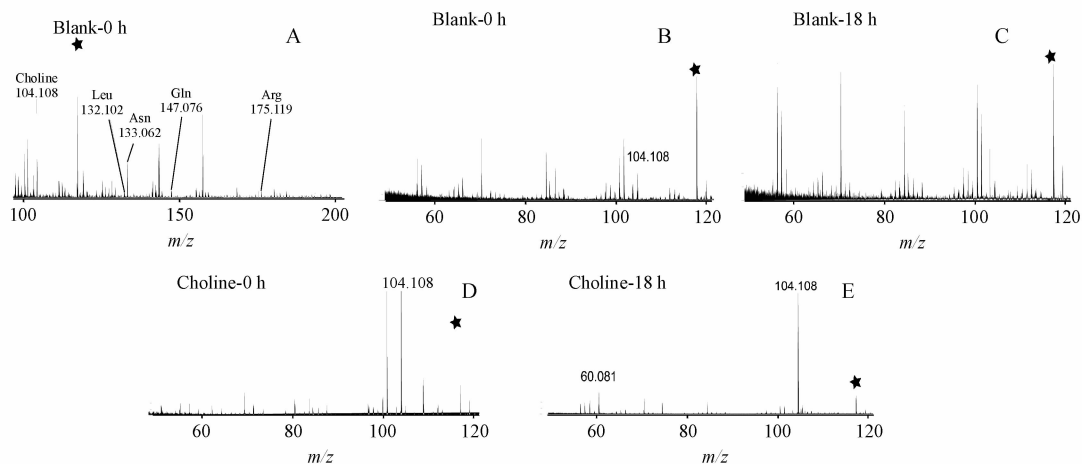


Figure 5 MALDI-MS profiling of (A) C57BL/6J female mice intestinal contents collected at m/z 100-200, (B-C) mice intestinal contents collected from mice challenged with saline at 0 h and 18 h; (D-E) mice intestinal contents collected from mice challenged with choline gastric gavage at 0 h and 18 h. Star (★) denotes a matrix peak belonging to Rhe

3.6 大黄酸在质谱成像领域的应用

MALDI-MS 除了可以快速、有效的获取物质表达谱,其另一广泛应用为质谱成像(MSI)领域。MALDI-MSI 能以非靶向的方式从生物切片中同时获取上百个物质的分布图像,吸引了重多研究者的关注。然而,尽管可用于 MALDI 定性分析,某些 MALDI 基质由于结晶稳定性等原因不适宜用于质谱成像研究。因此,本研究中考察了应用 Rhe 对小鼠回肠-回盲瓣部位的组织切片进行 MALDI 成像分析的可能性。实验结果表明,将 Rhe 运用于 MALDI 质谱成像,能同时获取多个代谢物在小鼠肠道的表达和分布信息,其中代表性代谢物如图 6 所示, m/z 为 104.108 的胆碱在肠道和内容物部分均具有分布,且表达水平较高。而 m/z 为 133.062 和 175.119 的代谢物天冬酰胺和精氨酸的丰度与胆碱相比较弱,且其分布更集中于内容物部分(回肠组织切片的边缘由红色虚线所示)。其余数种测得的氨基酸也展现出了与天冬酰胺和精氨酸类似的分布趋势。这与前期基于 LC-ESI-MS 技术进行的内容物表征结果一致,即胆碱、氨基酸、糖类、短链脂肪酸等物质为内容物中主要的代谢物组成,其来源主要为食物及代谢物、菌群的代谢物及肠道上皮细胞产生的代谢物^[21-22]。后续的实验将采用更高分辨率的采集设定,以求对代谢物在肠道组织和内容物区域的分布进行更精准的定位,并通过抗生素等手段的干预研究代谢物的表达及分布的变化。该实验首次验证了 Rhe 作为 MALDI 基质在质

谱成像应用上的潜质,为后续开展对肠道菌群和内源性代谢调控的研究奠定了分析基础。

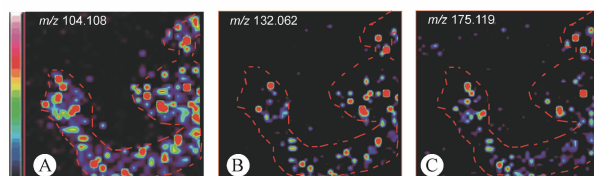


Figure 6 Mass spectrometry imaging of a mice ileum section reveals the localizations of several metabolites, including choline (A), asparagine (B) and arginine (C)

MALDI 质谱成像技术不需要预先获取分析对象的信息,能够以非靶向的形式获取物质的分布信息,具有极高通量。而 MALDI 质谱成像技术在低质荷比领域的应用能够很好地解决小分子化合物难以获取特异性抗体,进而进行免疫组化实验的难题。因此,本研究所发现的天然产物大黄酸对运用 MALDI-MSI 技术原位分析代谢物分布所做出的贡献对推动本领域的发展具有重要作用。

4 结论

本研究创新性地探索了以天然产物为 MALDI 基质的资源,以大黄酸为代表性物质,考察其作为 MALDI-MS 基质快速检测生物样本提取物及原位成像分析生物切片中代谢物的能力。实验表明,大黄酸能有效地获取多种代谢物标准品以及复杂生物样本中的代谢物质谱,并且具有作为 MALDI 基质进行代谢物原位成像分析的能力。更重要的是,

与传统的 MALDI 基质及新型基质 NSA 相比,大黄酸在保持较好电离效率的前提下产生极少的基质峰,从而减少了对内源性代谢物测定的干扰,克服了运用传统 MALDI 基质分析小分子物质的难题,对成功推进 MALDI-MS 技术在代谢组学研究方面的应用具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease[J]. *Cell*, 2008, **134**(5):714–717.
- [2] Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, *et al.* Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments[J]. *Nature*, 2012, **491**(7424):384–392.
- [3] Janečková H, Hron K, Wojtowicz P, *et al.* Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders[J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1226**(4):11–17.
- [4] Girlanda R, Cheema AK, Kaur P, *et al.* Metabolomics of human intestinal transplant rejection[J]. *Am J Transplant*, 2012(12):S18–S26.
- [5] Zhang AH, Sun H, Yan GL, *et al.* Metabolomics study of type 2 diabetes using ultra-performance LC-ESI/quadrupole-TOF high-definition MS coupled with pattern recognition methods[J]. *J Physiol Biochem*, 2014, **70**(1):117–128.
- [6] Duscharla D, Bhumireddy SR, Lakshetti S, *et al.* Prostate cancer associated lipid signatures in serum studied by ESI-tandem mass spectrometry as potential new biomarkers[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(3):e0150253.
- [7] Liu Y, Hong ZY, Tan G, *et al.* NMR and LC/MS-based global metabolomics to identify serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis[J]. *Int J Cancer*, 2014, **135**(3):658–668.
- [8] Buck A, Walch A. *In situ* drug and metabolite analysis in biological and clinical research by MALDI MS imaging[J]. *Bioanalysis*, 2014, **6**(9):1241–1253.
- [9] Ye H, Wang JX, Greer T, *et al.* Visualizing neurotransmitters and metabolites in the central nervous system by high resolution and high accuracy mass spectrometric imaging[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, **4**(7):1049–1056.
- [10] Wang J, Qiu S, Chen S, *et al.* MALDI-TOF MS imaging of metabolites with a *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride matrix and its application to colorectal cancer liver metastasis[J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(1):422–430.
- [11] Römpf A, Spengler B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space[J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, **139**(6):759–783.
- [12] Morosi L, Spinelli P, Zucchetti M, *et al.* Determination of paclitaxel distribution in solid tumors by nano-particle assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(8):e72532.
- [13] Shroff R, Svatos A. Proton sponge: a novel and versatile MALDI matrix for the analysis of metabolites using mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(19):7954–7959.
- [14] Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry[J]. *Int J Mass Spectrom*, 1991, **111**:89–102.
- [15] Shariatgorji M, Källback P, Gustavsson L, *et al.* Controlled-pH tissue cleanup protocol for signal enhancement of small molecule drugs analyzed by MALDI-MS imaging[J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(10):4603–4607.
- [16] Fukuyama Y, Nakajima C, Furuichi K, *et al.* Alkylated trihydroxyacetophenone as a MALDI matrix for hydrophobic peptides[J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(20):9444–9448.
- [17] Shroff R, Rulíšek L, Doubek J, *et al.* Acid-base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(25):10092–10096.
- [18] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, **472**(7341):57–63.
- [19] Tang WH, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease[J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(10):4204–4211.
- [20] Zhu W, Gregory JC, Org E, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. *Cell*, 2016, **165**(1):111–124.
- [21] Tian Y, Zhang L, Wang Y, *et al.* Age-related topographical metabolic signatures for the rat gastrointestinal contents[J]. *J Proteome Res*, 2012, **11**(2):1397–1411.
- [22] Bergen WG, Wu G. Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease[J]. *J Nutr*, 2009, **139**(5):821–825.