

# 质谱成像技术及其在药学领域的应用

李欣昕, 吴欢, 王晨, 冯芳\*

(中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

**摘要** 质谱成像是一种在组织、细胞或亚细胞水平研究分子或离子种类及分布的新型分析技术, 无需复杂前处理即可实现样本表面多种物质的原位定性、定量分析, 绘制出它们的空间分布图。质谱成像技术在药学领域正崭露出其独特的魅力和优势。本文介绍了该技术的原理、样品制备、离子化技术, 综述了其在药物代谢研究、药效毒理评价、药物蛋白质组学探讨、靶向药物筛选及固体制剂评价等方向的应用。

**关键词** 质谱成像; 样品制备; 离子化技术; 药学研究

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)01-0017-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140103

## Mass spectrometry imaging and its application in pharmaceutical sciences

LI Xinxin, WU Huan, WANG Chen, FENG Fang\*

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Mass spectrometry imaging (MSI) is a new analytical technique to study the composition and distribution of molecules or ions at tissue, cellular or subcellular level. It can detect analytes qualitatively and quantitatively on sample surface *in situ* without complex pre-treatment, mapping their spatial distribution. MSI technique is now emerging with its advantages in pharmaceutical science. Principle, sample preparation and ionization techniques concerning MSI are introduced in this review. Its application in drug metabolism study, pharmacodynamic and toxicological evaluation, pharmacoproteomics exploration, targeted drug screening and solid preparations investigation are also reviewed.

**Key words** mass spectrometry imaging; sample preparation; ionization techniques; applications in pharmaceutical science

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81274063, 30973858); and the National Innovation Experiment Program for University Students (No. J0630858)

质谱成像 (mass spectrometry imaging, MSI) 是一种新型的成像技术, 它将质谱的离子扫描过程与专业图像处理软件结合, 对样本表面分子或离子的化学组成、相对丰度及空间分布情况进行全面、快速分析<sup>[1]</sup>, 目前, MSI 技术已广泛用于蛋白质识别、生物标志物发现、医学诊断等研究<sup>[2]</sup>。该技术可直观反映药物作用部位的内源性生物分子、原型药物及代谢物的种类和浓度等原位信息, 因此正受到越来越多药学研究者的关注, 在新药研发、药物评价和药物临床研究中显示出不可替代的优势。

### 1 MSI 技术的原理

MSI 技术的工作原理见图 1: 首先以适当的方式获取和制备待测样本 (a、b), 质谱仪按照预先设定的采集程序, 利用激光或高能离子束等扫描样本, 使其表面的分子或离子解吸离子化 (c), 再经质量分析器获得样本表面各像素点离子的质荷比和离子强度 (d), 借助质谱成像软件 (如 FlexImaging、BioMap) 在各像素点的质谱数据中搜寻任意指定质荷比离子的质谱峰, 结合其对应离子的信号强

\* 收稿日期 2013-08-15 \* 通信作者 Tel: 025-83271414 E-mail: fengfang1@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81274063, 30973858); 国家大学生创新性实验计划资助项目 (No. J0630858)

度和其在样本表面的位置,绘制出对应分子或离子在样本表面的二维分布图(e);继而采用上述软件

对样本连续切片的二维分布图进行进一步数据处理,获得待测物在样本中的三维空间分布(f)。

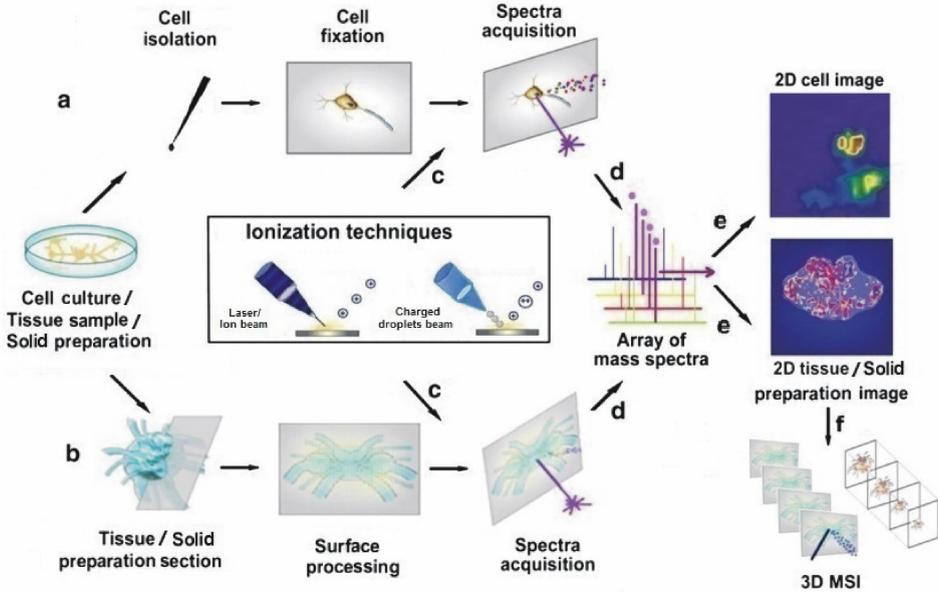


Figure 1 Schematic representation of mass spectrometry imaging (MSI) principle modified from Ref. [3]

## 2 MSI 样本获取与制备

样本制备过程是影响质谱成像结果真实性和准确性的关键环节,其处理方法和技术与待测物自身的性质、所处的样本类型和状态密切相关。通常,MSI 技术用于药学研究多以动物、组织、细胞和固体制剂作为分析对象。

### 2.1 样本的收集与固定

恰当而迅速的样本收集与固定是维持样本中分子或离子的真实空间分布和丰度的保证。一般常用颈椎脱臼、断头、麻醉放血、吸入  $\text{CO}_2$  等方法处死动物以获得整体样本<sup>[4]</sup>,应注意不同处死方法对特定器官中待测物可能产生的影响。器官等组织样本可由活体组织检查或动物解剖获得。细胞样本可以从培养基中分离。

为避免待测物的移位和降解,样本一经收集应迅速固定。器官等组织样本和整体动物样本最常用的固定方法是快速冷冻。组织样本通常冷冻于液氮或干冰预冷的异戊烷中;整体动物样本则多置于干冰-正己烷浴中。经过快速冷冻的样本,在  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  以下储存时间 1 年内可以保持相对稳定,获得的 MSI 结果可靠<sup>[5]</sup>。采用福尔马林固定石蜡包埋保存活检样本时,可通过对样本表面喷涂反应性基质或进行原位酶解来消除福尔马林引起的蛋

白质共价交联<sup>[6]</sup>。快速可控的热处理多用于防止室温下酶因活性恢复而降解待测物,但因热处理可能细微地改变样本的形态结构,因此只适用于脑、肾、移植瘤等细胞排列紧密的组织<sup>[7]</sup>。采用冷冻固定法可以很好地维持细胞的形态和细胞内可扩散离子的空间分布。为固定细胞,需先采用维持细胞渗透压和酸碱平衡的甲酸铵溶液洗去细胞表面的盐类,然后快速冷冻并进一步冷冻干燥,以除去甲酸铵和水<sup>[8]</sup>。当使用化学固定法(如戊二醛作为固定剂)时,应注意其可能引起蛋白质共价交联,从而使膜蛋白丧失维持细胞内外离子浓度梯度的功能,不利于可扩散离子的分布研究<sup>[9]</sup>。

### 2.2 样本表面的制备

组织、整体动物和固体制剂通常需要制成切片。切片前应根据样本性质选择是否需要包埋来维持样本在切片过程中的完整性。对于眼组织等脆弱的组织、整体动物等较大的样本以及不易完整切片的固体制剂常需要作包埋处理:组织样本可用纯水或明胶包埋<sup>[10-11]</sup>;整体动物样本和固体制剂可用羧甲基纤维素包埋<sup>[12-13]</sup>。切片通常采用冰冻切片机,温度控制在  $-16\text{ }^\circ\text{C} \sim -26\text{ }^\circ\text{C}$ ;一般组织密度越大,切片温度越高<sup>[4]</sup>。切片的厚薄也很重要:切片过薄,容易在转移过程中撕裂;切片过厚,则不利于清洗除去一些对离子信号有干扰的物质

且导电性差。组织切片的厚度宜控制在 5 ~ 20  $\mu\text{m}$ ,以暴露大部分细胞的内容物<sup>[14]</sup>。整体动物和固体制剂的切片厚度一般为 20 ~ 50  $\mu\text{m}$ ,且应包含所有待测部位<sup>[12-13]</sup>。细胞样本经冷冻固定或化学固定后可直接用于表面分析<sup>[12]</sup>,或将细胞固定在硅基底上,冰冻断裂,于低温真空环境下获得细胞断裂面的微细结构,这更有利于观察细胞的膜性结构<sup>[15]</sup>。

样本转移至质谱靶主要通过融裱法和胶带法,分别是在室温下直接将冷冻组织切片粘到靶上,或用导电双面胶将样本固定在质谱靶上。固体制剂切片和整体动物切片通常使用胶带法转移。样本转移至质谱靶后,需立即对载有样本的质谱靶进行干燥处理以保持样本稳定。常用的干燥方法有冷冻干燥、真空干燥、溶剂脱水干燥和氮气吹干。

### 2.3 样本表面的处理

干燥后的样本一般可直接进行质谱分析,复杂样本中特定待测物的检测常需采用溶剂清洗、表面酶解和化学衍生化等对分析表面进行适当处理。

研究表明,用适当溶剂清洗载有样本的质谱靶,既能起到脱水固定作用,还能显著改善质谱测定结果。如蛋白组学分析时,常用 70% ~ 100% 乙醇洗去抑制蛋白质离子化的小分子和脂质,以增强多肽、蛋白质的检测灵敏度<sup>[2]</sup>;而分析小分子时,则应尽量避免有机溶剂清洗,除非已明确待测物在所用溶剂不溶或几乎不溶。分析脂质和小分子药物时,使用特定 pH 的缓冲液清洗组织切片,可以除去内源性盐类等抑制离子化的物质,以提高检测信号强度<sup>[16]</sup>。甲酸铵溶液可用于细胞表面盐类的清洗,既维持细胞渗透压和酸碱平衡,又不影响细胞形态<sup>[8]</sup>。

由于 MSI 常用的离子化方式对多肽的检测灵敏度显著高于对完整蛋白质的检测灵敏度,故蛋白质原位分析时,有采用胰蛋白酶先对样本表面的蛋白质进行原位酶解,产生相对分子质量范围在 400 ~ 3 500 的多肽后再检测的报道<sup>[17]</sup>。但因酶解过程中,待测物可能发生移位,内源性酶活性也可能恢复,因此原位酶解方式主要用于内源性蛋白质的鉴定,而非定量分布研究<sup>[4]</sup>。

对于难电离的物质或者存在内源性背景干扰,在样品表面进行化学衍生化将有利于待测物的 MSI 分析。

## 3 MSI 离子化技术

MSI 分析采用解吸离子源,离子化方式的选择与 MSI 的空间分辨率和信号强弱密切相关。常用的离子化方式有:基质辅助激光解吸离子化(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)、二次离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS)离子化和解吸电喷雾离子化(desorption electrospray ionization, DESI)。一些离子化技术,如表面解吸大气压化学离子化(surface desorption atmospheric pressure chemical ionization, SDAPCI)、纳米结构启动质谱(nanostructure-initiator mass spectrometry, NIMS)离子化,因其具有契合 MSI 分析对象的属性,在 MSI 分析中也得到应用。

### 3.1 基质辅助激光解吸离子化(MALDI)

采用不同的基质, MALDI-MSI 可实现对小分子药物到生物大分子的原位分析。经典的 MALDI-MSI 基质,如  $\alpha$ -氰基-4-羟基苯丙烯酸( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)、芥子酸(sinapic acid, SA)和 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB),因自身的质谱响应易对小分子药物分析造成干扰,主要用于生物大分子分析。香豆素类、无机纳米粒等更适于小分子药物分析基质的不断开发,避免了在质谱低质量端的响应造成干扰,增强了待测物的检测信号,实现了体内痕量药物的分布研究<sup>[18-19]</sup>。

### 3.2 二次离子质谱(SIMS)

SIMS 可直接对组织切片进行质谱测定,与 MALDI-MSI 相比, SIMS-MSI 具有更高的空间分辨率(达 1  $\mu\text{m}$ ),可用于亚细胞水平的分析<sup>[20]</sup>。但检测质量范围较窄,超过 1 kD 时灵敏度会显著降低,且常规 SIMS-MSI 的灵敏度不足以对组织中治疗剂量药物和代谢物成像。为了增强 SIMS 产生次级离子的能力,在样本表面喷涂一薄层金属原子(如 Au 或 Ag)或能温和吸收能量的基质,形成金属辅助 SIMS(metal assisted SIMS, MetA-SIMS)或基质增强 SIMS(matrix-enhanced SIMS, ME-SIMS),这两种方法扩展了 SIMS 的检测范围和灵敏度,已用于脂质、多肽等生物分子的研究<sup>[21-23]</sup>。

### 3.3 解吸电喷雾离子化(DESI)

DESI 为 2004 年提出的敞开放式常压离子源,其原理为:电喷雾产生的带电液滴撞击样本表面,溅

射出溶解有多种分子的次级带电液滴;次级液滴的溶剂在空间快速蒸发,电荷转移到待测分子形成气态离子。DESI 具有以下优势:①无需基质,因而避免了质谱低质量端可能的干扰;②在常压下操作,容易保持待测物原有的一些性质;③无需繁杂的样品前处理,可实现固体样品的直接质谱分析。

### 3.4 表面解吸大气压化学离子化(SDAPCI)

在大气压下,利用电晕放电获得高密度的带电液滴,液滴喷射在固体表面,将表面上的可溶性物质快速溶解其中,与电晕放电产生的初级离子发生分子-离子反应,与此同时,溶剂迅速蒸发,形成一些更加微小的液滴和气相离子,从而完成表面待测分子离子化过程。SDAPCI 的另一种工作模式是直接利用空气中的水生成初级离子进行解吸离子化,效率高,且避免了 DESI 中对甲醇等有机试剂的使用,对挥发性物质或者与固体表面结合不牢固的物质。该模式灵敏度特别高,适合药品、食品等快速、无损、无污染检测<sup>[24-25]</sup>。

### 3.5 纳米结构启动质谱(NIMS)

NIMS 采用多孔硅表面上聚集了一种含氟聚合物的特殊纳米结构,将待测物吸附在其表面。当受到激光照射时,多孔表面因蓄积能量,瞬间释放,进而将待测物从纳米尺度的小囊中解吸离子化。NIMS-MSI 可以分析多种类型的小分子,包括在其他离子化方式下离子化效率低的内源性分子,如固醇类、糖类<sup>[26]</sup>。NIMS 能以极高的灵敏度对很小的区域进行质谱成像,从而实现对血液、尿液、单个细胞以及肽阵列的高通量分析<sup>[26-28]</sup>。

## 4 MSI 在药学领域的应用

MSI 技术集定性、定量、定位功能于一体。较之其他已广泛应用的分析技术,具有一次测定可获得数据多维、信息原位、空间分布直观全面的特点,非常有利于药物代谢过程研究、药效和毒理机制探讨、药物蛋白质组学发现、靶向药物筛选及固体制剂的评价,正逐步成为药学研究中不可或缺的分析技术手段。

### 4.1 药物代谢研究

液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)目前是组织中药物及代谢物的常用分析方法,可以定性、定量,但因样品需经匀浆、蛋白沉淀、萃取等前处理,故测定结果无法直接反映待测物的原位信息,更无

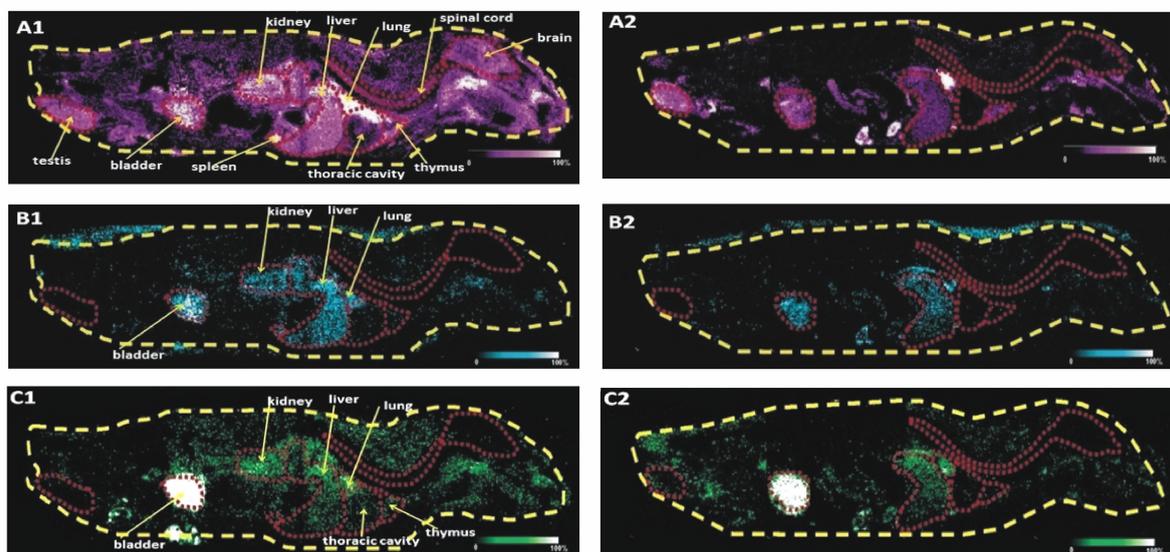
从直观表达其空间分布。定量全身放射自显影或显微放射自显影技术,虽可用于组织中药物作用过程的研究,但其测定的是<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H 等放射性信号,无法区分药物、代谢物、降解产物或杂质。MSI 技术的优势在于:①以质谱为检测器,对原型药物和/或代谢物进行同时、多部位分析<sup>[18-19,27,29]</sup>,无需同位素标记;②提供药物在组织中的定量分布信息,便于药物 ADME 研究的深入开展<sup>[30-31]</sup>。

Khatib-Shahidi 等<sup>[29]</sup>采用经口给药方式,给予小鼠奥氮平(8 mg/kg)。给药后 2, 6 h, 分别将不同组小鼠麻醉处死,制备整体切片(16 cm × 4 cm),采用导电双面胶带将整体切片的各 1/4 部分(4 cm × 4 cm)分别转移到 4 个 MALDI 靶板上。使用 MALDI-QqTOF MS, 在采集程序(oMALDI Server 4.0 software)控制下,激光逐点照射载有切片的质谱靶,使切片表面的待测物解吸电离进入质量分析器,MRM 方式检测,检测离子(*m/z*):奥氮平 313→256, *N*-去甲基奥氮平 299→256, 2-羟甲基奥氮平 329→272。采用 BioMap 软件对检测离子进行图像重构,图 2 显示了 3 个化合物的质谱离子成像结果,其中:A、B、C 分别反映了奥氮平(粉红色)、*N*-去甲基奥氮平(蓝色)、2-羟甲基奥氮平(绿色)在小鼠体内的分布;“1”、“2”分别代表给药后 2, 6 h 样本。由图可见,给药 2 h 后奥氮平在小鼠肺、脾、膀胱、肾、肝、胸腺、脑、脊髓及睾丸等部位都有出现(图 2-A1);奥氮平的主要代谢产物,经定性分析为 *N*-去甲基奥氮平及 2-羟甲基奥氮平,分布于肺、肝、肾、膀胱等部位(图 2-B1, C1)。给药 6 h 后,奥氮平在脑、脊髓中的分布减少了 66%(图 2-A2),*N*-去甲基奥氮平及 2-羟甲基奥氮平占总离子信号的 28%,分布于肺、肝、膀胱等处(图 2-B2, C2)。由此揭示:小鼠经口给予奥氮平(8 mg/kg)后,原型药物对其中枢多巴胺能神经系统的抑制作用 6 h 远小于 2 h,奥氮平在脑、脊髓中蓄积的可能性很小,而奥氮平的两种代谢产物无中枢神经活性。

Shanta 等<sup>[19]</sup>将健康雄性 ICR 小鼠经口给予多奈哌齐,60 min 后处死,取出其脑、肾、肝制备组织切片;以 3-羟基香豆素和 6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶为基质,进行 MALDI-MSI 分析。结果显示,多奈哌齐主要分布于脑组织的皮质区、肝组织的外表面,在肾组织中呈不规则分布。而脑组织的皮质区正

是阿尔茨海默病  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 斑的聚集部位。显然,MSI 测定结果为揭示多奈哌齐治疗阿尔

茨海默病的作用机制提供了有效而直接的科学依据。



**Figure 2** MS/MS ion image of drug and its metabolites in whole rat sagittal tissue sections after olanzapine administration of 2 h (1) and 6 h (2)<sup>[29]</sup>

A; Olanzapine; B; *N*-Desmethyl olanzapine; C; 2-Hydroxymethyl olanzapine

多肽、蛋白质、抗体作为一类创新性的治疗药物,正引起越来越多的药品生产厂家的兴趣。在药物使用的过程中,对其在动物体内的分布开展定量研究,可以促进人们对疗效和毒性的了解。奥曲肽是临床上用于治疗内分泌疾病的生长抑制剂,属肽类激素。Takai 等<sup>[30]</sup>利用 MSI 技术无需放射性标记及可视化监测的特点,通过一次试验,同时获得了大鼠肝、肾部位奥曲肽的定性、定位、定量信息。研究者向大鼠尾静脉注射奥曲肽生理盐水溶液 (3 mg/kg, 10 mL/kg), 15 min 后处死,取肝、肾制备组织切片,经 MALDI-LTQ-MSI 分析,结果显示,肝、肾组织切片中奥曲肽均以原型存在,肾中分布较多,主要分布在肾盂、肾乳头、肾皮质 3 个部位,定量分析的准确度达 76% ~ 127%。

MSI 技术应用过程中,待测物常受名义质量相同的内源性分子或基质干扰。除采用优化样本前处理方式尽量减少干扰外,还可选择 MS/MS 检测产物离子或使用高分辨率仪器,如傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR)、轨道阱质谱仪 (orbitrap) 及其串联组合,提高分析方法的专属性<sup>[10,32-34]</sup>。Shahidi-Latham 等<sup>[10]</sup>使用 MALDI-LTQ-Orbitrap MS,对经口给予利血平 (20 mg/kg) 的小鼠,在给药后 2 h 作全

身 MSI 分析,发现全扫描模式下,尽管获得了各像素点  $m/z$  275 ~ 1 000 范围内解吸离子的精密质量,但数据集非常复杂,名义质量窗口常存在内源性或外源性的相同  $m/z$  离子干扰。针对这种现象,研究者采用多重质量亏损过滤的方法,利用 MS<sup>2</sup> 和 MS<sup>3</sup> 提供的结构信息,从复杂的质谱数据中选择性检测出原型药物利血平及其 2 种已知代谢物、5 种未知代谢物,并获得它们在小鼠体内的组织分布图。

#### 4.2 药效学研究

药效学主要研究药物对机体的作用及其机制,通常以实体动物、离体脏器考察药物对某一部位的作用,也可从细胞、分子水平开展分析研究。MSI 技术能显示药物作用前后组织内分子分布及变化,实现对药效的有效评价<sup>[35-37]</sup>。

Tanaka 等<sup>[35]</sup>对大鼠颈动脉分叉处作单侧颈动脉结扎后,连续给药 4 周,取大鼠结扎及对侧颈动脉作 8  $\mu$ m 厚的纵向切片,经 MALDI-MSI 分析,结果显示,未给药组大鼠结扎侧颈动脉内壁甘油三酯含量是其对侧颈动脉内壁的 3.3 倍,且血红素 B 信号明显降低;西洛他唑给药组结扎颈动脉内壁甘油三酯则维持较低水平且血红素 B 无明显减少,血红素 B 信号大幅降低预示具有发生缺血的风险。

由此可知,大鼠颈动脉单侧结扎后,连续经口给药西洛他唑 4 周, MALDI-MSI 可直观地显示出西洛他唑抑制甘油三酯在动脉血管蓄积及血红素 B 的减少,表明西洛他唑具有促进脂质代谢,改善组织局部缺血的作用。

紫杉醇具有很强的抗肿瘤活性,但直接用药常伴随有骨髓抑制、神经病变等严重不良反应,因此对紫杉醇给药方式、给药剂型的研究受到普遍关注。Yasunaga 等<sup>[36]</sup>对荷瘤小鼠尾静脉分别注射紫杉醇或紫杉醇聚合物胶束纳米粒(NK105),采用 MALDI-MSI 观察游离紫杉醇和 NK105 在实体瘤和坐骨神经中的分布情况。结果表明, NK105 较多地进入实体瘤细胞,而游离紫杉醇则更多地出现在坐骨神经中。提示 NK105 较游离紫杉醇具有更高的肿瘤靶向性,其在增强抗肿瘤活性的同时减少了对正常组织的毒性,显然, MSI 为抗肿瘤药物新剂型的靶向和活性评价提供了直观、有效的分析方法。

O'Brien 等<sup>[37]</sup>对伯基特氏淋巴瘤细胞给予新型大环内酯类免疫抑制剂雷帕霉素,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 30 ~ 90 min 后,将细胞样品分散在 NIMS 基底表面,进行成像分析。结果显示,给药 30, 60, 90 min 后,雷帕霉素在伯基特氏淋巴瘤细胞内浓度逐渐增加;与对照组相比, 60, 90 min 时,细胞内源性代谢产物 *N*-乙酰基谷氨酸、尿苷酸等的水平出现显著失调。NIMS-MSI 实现了对肿瘤细胞内药物及发生治疗反应的内源性分子的同时识别和定量,为揭示药物抗肿瘤作用机制提供了有效的分析测试手段。

### 4.3 毒理学研究

毒理学是研究外源性因素对生物系统有害作用的学科,是药学研究中极其重要的组成部分。MSI 技术对目标成分具有独特的定位功能<sup>[38-39]</sup>,并且可以鉴定药物的有毒代谢产物<sup>[40]</sup>,为研究药物毒性及作用机制提供重要的生物学信息。Desbenoit 等<sup>[38]</sup>向家兔眼中滴入含有防腐剂苯扎氯铵的滴眼液,连续给药 1 个月后,将兔处死,迅速取出眼球,西黄蓍胶包埋,连续冰冻切片,采用 TOF-SIMS-MSI 观察组织切片中的苯扎氯铵的存在及分布。结果表明苯扎氯铵离子在眼球表面及较深眼结构中均能被检测到,显示出潜在的生物毒性风险。Nilsson 等<sup>[40]</sup>对两个化学结构相似的微粒体前

列腺素 E 合酶(mPGES)抑制剂进行毒理学研究,大鼠连续给药 7 d 后,组织病理学发现两种 mPGES 抑制剂均造成肾小管上皮细胞变性/再生并有组织内晶体沉积,采用 MALDI-MSI 对大鼠肾组织切片进行分析,不仅能观察到晶体沉积部位,还鉴定出该晶体的化学成分是上述两种候选药物的共同代谢产物邻苯二磺酰胺。

MSI 技术还能反映出细胞内的化学组成及浓度变化,用于细胞毒理学研究, Chandra<sup>[15]</sup>将顺铂加入猪肾细胞 LLC-PK1 培养基中, 4 h 后冰冻断裂,在断裂面覆盖一薄层 Au/Pd,采用 MetA-SIMS-MSI 对单细胞内化学成分进行亚细胞水平的定量。结果显示,顺铂破坏了细胞内离子平衡, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 浓度比降至正常细胞的 1/4 左右。结合不同膜性细胞器中 Ca<sup>2+</sup> 浓度以及细胞内 K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 浓度的变化,推测出顺铂引起细胞毒性的可能机制。

### 4.4 药物蛋白质组学研究

药物蛋白质组学是通过对比病理状态与健康状态的组织、细胞的蛋白表达差异,研究药物、药物受体、蛋白表达与药物作用关系的一门学科。目前, MSI 技术已广泛用于胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、肠型胃癌、食管癌、阿尔茨海默病等疾病的蛋白质组学研究,其中大部分研究是以寻找肿瘤标记物为目的,关于药物蛋白质组学研究报道较少,说明 MSI 技术在这一领域存在很大的应用空间。

McClure 等<sup>[41]</sup>以尾静脉注射的方式,给予野生小鼠和阿尔茨海默病转基因小鼠异丙嗪(25 mg/kg,分 4 次注入,每次间隔 2 h)。4 h 后,采用 MALDI-MSI 分析两组小鼠的大脑组织切片。研究发现,相对于野生小鼠,转基因小鼠的大脑组织中出现了大量 A $\beta$ <sub>40</sub> 肽信号,且异丙嗪离子信号是野生小鼠脑切片的 3 倍,提示 A $\beta$  是阿尔茨海默病的重要生物标记物;抗组胺药物异丙嗪进入脑组织后,与可造成神经元变性或死亡的 A $\beta$  结合,抑制 A $\beta$  的过量表达与异常聚集,对防治阿尔茨海默病产生积极的作用。

Aichler 等<sup>[42]</sup>采用 MALDI-MSI,观察化疗前后食管腺癌活检组织中蛋白表达差异,将具有明显差异的候选蛋白采用 MS/MS 进行结构鉴定,并进行体外实验研究其功效关联性。发现在抑制了细胞色素 c 氧化酶蛋白表达的情况下,肿瘤细胞对顺铂

的化疗敏感性明显提高。这种以 MSI 作为分析手段,追踪病理状态下蛋白质表达差异与药物作用关系的药物蛋白质组学为肿瘤的临床治疗提供新的思路。

#### 4.5 靶向药物筛选

与荧光示踪、磁性或放射性标记等其他靶向药物筛选方法比较,MSI 技术无需对药物进行修饰,可直接定性靶向药物,揭示药物是否进入靶组织及在靶组织内的具体分布,对评价药物靶向性及揭示靶向药物作用机制具有重要意义<sup>[43-46]</sup>。

MSI 技术在靶向中枢神经系统药物研究方面显示出其不可或缺的优势。由于荧光标记或同位素标记分子不能透过血-脑脊液屏障或易产生检测假阳性、假阴性现象,药物的脑靶向研究需要采用新的研究思路和研究方法。Liu 等<sup>[43]</sup>建立了 MALDI-MSI 方法,观察脑组织切片中血红素的存在状况,借以明确脑血管的空间分布;研究者进一步对小鼠灌胃给予候选药物(BKM120),4 h 后处死小鼠,取脑,制备连续组织切片,MALDI-MSI 分析发现:大部分 BKM120 与血红素分布部位不重叠,该药物已从脑血管渗透进入到脑实质,在侧脑室和小脑分布较多,提示该候选药物能够透过血-脑脊液屏障靶向脑肿瘤。

Fehniger 等<sup>[44]</sup>使用 MALDI-MSI 技术检测支气管活检组织切片中的支气管扩张剂异丙托铵,成像结果表明异丙托铵母离子( $m/z$  332.332)和两个子离子( $m/z$  166.2,290.2)的离子信号均主要集中在支气管黏膜下的支气管平滑肌中。Reyzer 等<sup>[45]</sup>使用 MALDI-Qq-TOF-MSI 对候选药物靶向筛选,分析潜在的成药性,候选药物 SCH412348 设计靶组织为脑纹状体,对小鼠静脉给药后 1 h 断头取脑组织,采集质谱信号并成像,SCH412348 在皮质区域的浓度比纹状体区域高,说明 SCH412348 与小鼠皮质的亲和力强于纹状体,即原靶向错误。

Cole 等<sup>[46]</sup>用考布他汀 A-4-磷酸盐(CA-4-P)治疗纤维肉瘤小鼠,分别于治疗前、治疗后 0.5,6,24 h 处死,切除肿瘤组织、制备切片、原位酶解,MALDI-MSI 分析。由 MSI 结果可知,随着 CA-4-P 有效作用持续时间的延长,血红蛋白降解产生的肽类信号也逐渐增强,提示 CA-4-P 治疗后肿瘤组织中血红蛋白增多、肿瘤血管破裂,为阐明 CA-4-P 对肿瘤血管的靶向作用提供了直观的证据。

#### 4.6 固体制剂评价

药物溶出速率是控制和评定固体制剂质量的重要指标之一,而药物的溶出性质主要取决于固体制剂内部结构及药物与辅料的空间分布情况<sup>[47]</sup>。常规红外和拉曼显微镜可以对固体制剂进行原位表面分析,但空间分辨率不高且缺乏分子特异性<sup>[48]</sup>。X 线光电子能谱和扫描电镜能提供元素信息,但易受辅料干扰。MSI 技术具有足够的灵敏度和空间分辨率,可直接提供制剂内部分子组成及空间分布信息,有助于了解药物释放机制,提高药物制剂工艺。

Kreye 等<sup>[12]</sup>将药物制成脂质植入剂进行控释研究,将植入剂放入释放介质中,通过释放度试验发现药物浓度随时间非匀速下降,使用 MALDI-MSI 对植入剂的内部结构进行观察,发现植入剂横截面的药物空间分布不均匀。Prestidge 等<sup>[48]</sup>利用 TOF-SIMS(time of flight-SIMS) MSI 的高度分子特异性,对控释制剂内部药物的不同存在形式(例如水合和非水合)加以区分,绘制出制剂内部的药物分布图,以指导制剂工艺的优化研究。

### 5 展望

随着生物样品制备技术、质谱离子化方法和质量分析检测技术的不断发展和完善,MSI 技术的分析灵敏度、空间分辨率和检测质量范围将进一步提高;连续组织切片技术和三维重建技术的深入开发研究、小分子药物和蛋白质等靶分子共同定位的实现、标准化定量方法的改进和提高,将赋予 MSI 技术解决更多问题的能力,凸显其在药学领域的应用潜力和应用前景。

#### 参考文献

- [1] Weaver EM, Hummon AB. Imaging mass spectrometry: from tissue sections to cell cultures[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(8):1 039 - 1 055.
- [2] Chughtai K, Heeren RM. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis[J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(5):3 237 - 3 277.
- [3] Ye H, Greer T, Li L. Probing neuropeptide signaling at the organ and cellular domains via imaging mass spectrometry[J]. *J Proteomics*, 2012, **75**(16):5 014 - 5 026.
- [4] Goodwin RJ. Sample preparation for mass spectrometry imaging: small mistakes can lead to big consequences[J]. *J Proteomics*, 2012, **75**(16):4 893 - 4 911.

- [5] Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, *et al.* MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments [J]. *Anal Chem*, 2006, **78** (20): 7 145 – 7 153.
- [6] Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, *et al.* Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections [J]. *J Proteome Res*, 2007, **6**(4): 1 295 – 1 305.
- [7] Goodwin RJ, Lang AM, Allingham H, *et al.* Stopping the clock on proteomic degradation by heat treatment at the point of tissue excision [J]. *Proteomics*, 2010, **10**(9): 1 751 – 1 761.
- [8] Malm J, Giannaras D, Riehle MO, *et al.* Fixation and drying protocols for the preparation of cell samples for time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis [J]. *Anal Chem*, 2009, **81** (17): 7 197 – 7 205.
- [9] Schober Y, Guenther S, Spengler B, *et al.* Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(15): 6 293 – 6 297.
- [10] Shahidi-Latham SK, Dutta SM, Prieto Conaway MC, *et al.* Evaluation of an accurate mass approach for the simultaneous detection of drug and metabolite distributions via whole-body mass spectrometric imaging [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(16): 7 158 – 7 165.
- [11] Chughtai S, Chughtai K, Cillero-Pastor B, *et al.* A multimodal mass spectrometry imaging approach for the study of musculoskeletal tissues [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2012, **325/326/327**: 150 – 160.
- [12] Kreye F, Hamm G, Karrout Y. MALDI-TOF MS imaging of controlled release implants [J]. *J Control Release*, 2012, **166**(1): 98 – 108.
- [13] Prideaux B, Stoeckli M. Mass spectrometry imaging for drug distribution studies [J]. *J Proteomics*, 2012, **75** (16): 4 999 – 5 013.
- [14] Chaurand P, Norris JL, Cornett DS, *et al.* New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2006, **5** (11): 2 889 – 2 900.
- [15] Chandra S. Quantitative imaging of chemical composition in single cells by secondary ion mass spectrometry: cisplatin affects calcium stores in renal epithelial cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, **656**: 113 – 130.
- [16] Shariatgorji M, Köllback 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): 4 603 – 4 607.
- [17] Stauber J, MacAleese L, Franck J, *et al.* On-tissue protein identification and imaging by MALDI-ion mobility mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, **21** (3): 338 – 347.
- [18] 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.
- [19] Shanta SR, Kim TY, Hong JH, *et al.* A new combination MALDI matrix for small molecule analysis; application to imaging mass spectrometry for drugs and metabolites [J]. *Analyst*, 2012, **137** (24): 5 757 – 5 762.
- [20] Boxer SG, Kraft ML, Weber PK. Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples [J]. *Annu Rev Biophys*, 2009, **38**: 53 – 74.
- [21] Becker N, Wirtz T. Reduction of matrix effects in polystyrene/poly (methylene methacrylate) blends by metal-assisted secondary ion mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(14): 5 920 – 5 924.
- [22] Fitzgerald JJ, Kunnath P, Walker AV. Matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry (ME SIMS) using room temperature ionic liquid matrices [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(11): 4 413 – 4 419.
- [23] Piwowar AM, Fletcher JS, Kordys J, *et al.* Effects of cryogenic sample analysis on molecular depth profiles with TOF-secondary ion mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(19): 8 291 – 8 299.
- [24] Yang SP, Chen HY, Yang YL, *et al.* Imaging melamine in egg samples by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, **37**(3): 315 – 318.
- [25] Zhang X, Jia B, Huang K, *et al.* Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(19): 8 060 – 8 070.
- [26] Patti GJ, Woo HK, Yanes O, *et al.* Detection of carbohydrates and steroids by cation-enhanced nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) for biofluid analysis and tissue imaging [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(1): 121 – 128.
- [27] Yanes O, Woo HK, Northen TR, *et al.* Nanostructure initiator mass spectrometry: tissue imaging and direct biofluid analysis [J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(8): 2 969 – 2 975.
- [28] Greving M, Cheng X, Reindl W, *et al.* Acoustic deposition with NIMS as a high-throughput enzyme activity assay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **403**(3): 707 – 711.
- [29] Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman JL, *et al.* Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(18): 6 448 – 6 456.
- [30] Takai N, Tanaka Y, Watanabe A, *et al.* Quantitative imaging of a therapeutic peptide in biological tissue sections by MALDI MS [J]. *Bioanalysis*, 2013, **5**(5): 603 – 612.
- [31] Pirman DA, Reich RF, Kiss A, *et al.* Quantitative MALDI tandem mass spectrometric imaging of cocaine from brain tissue with a deuterated internal standard [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(2): 1 081 – 1 089.
- [32] Lanekoff I, Thomas M, Carson JP, *et al.* Imaging nicotine in rat brain tissue by use of nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(2): 882 – 889.

- [33] Marko-Varga G, Fehniger TE, Rezeli M, *et al.* Drug localization in different lung cancer phenotypes by MALDI mass spectrometry imaging[J]. *J Proteomics*, 2011, **74**(7):982-992.
- [34] Castellino S, Groseclose MR, Wagner D. MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development [J]. *Bioanalysis*, 2011, **3**(21):2 427-2 441.
- [35] Tanaka H, Zaima N, Ito H, *et al.* Cilostazol inhibits accumulation of triglycerides in a rat model of carotid artery ligation[J]. *J Vasc Surg*, 2013, **58**(5):1 366-1 374.
- [36] Yasunaga M, Furuta M, Ogata K, *et al.* The significance of microscopic mass spectrometry with high resolution in the visualisation of drug distribution[J]. *Sci Rep*, 2013, **3**:3050.
- [37] O'Brien PJ, Lee M, Spilker ME, *et al.* Monitoring metabolic responses to chemotherapy in single cells and tumors using nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) imaging[J]. *Cancer Metab*, 2013, **1**(1):4.
- [38] Desbenoit N, Schmitz-Afonso I, Baudouin C, *et al.* Localisation and quantification of benzalkonium chloride in eye tissue by TOF-SIMS imaging and liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, **405**(12):4 039-4 049.
- [39] Yamada Y, Hidefumi K, Shion H, *et al.* Distribution of chloroquine in ocular tissue of pigmented rat using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, **25**(11):1 600-1 608.
- [40] Nilsson A, Forngren B, Bjurström S, *et al.* *In situ* mass spectrometry imaging and *ex vivo* characterization of renal crystalline deposits induced in multiple preclinical drug toxicology studies [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(10):e47353.
- [41] McClure RA, Chumbley CW, Reyzer ML, *et al.* Identification of promethazine as an amyloid-binding molecule using a fluorescence high-throughput assay and MALDI imaging mass spectrometry[J]. *Neuroimage Clin*, 2013, **2**:620-629.
- [42] Aichler M, Elsner M, Ludyga N, *et al.* Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria [J]. *J Pathol*, 2013, **230**(4):410-419.
- [43] Liu X, Ide JL, Norton I, *et al.* Molecular imaging of drug transit through the blood-brain barrier with MALDI mass spectrometry imaging[J]. *Sci Rep*, 2013, **3**:2 859.
- [44] Fehniger TE, Végvári A, Rezeli M, *et al.* Direct demonstration of tissue uptake of an inhaled drug: proof-of-principle study using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging[J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(21):8 329-8 336.
- [45] Reyzer ML, Hsieh Y, Ng K, *et al.* Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2003, **38**(10):1 081-1 092.
- [46] Cole LM, Djidja MC, Bluff J, *et al.* Investigation of protein induction in tumour vascular targeted strategies by MALDI MSI [J]. *Methods*, 2011, **54**(4):442-453.
- [47] Earnshaw CJ, Carolan VA, Richards DS, *et al.* Direct analysis of pharmaceutical tablet formulations using matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, **24**(11):1 665-1 672.
- [48] Prestidge CA, Barnes TJ, Skinner W. Time-of-flight secondary-ion mass spectrometry for the surface characterization of solid-state pharmaceuticals [J]. *Pharm Pharmacol*, 2007, **59**(2):251-259.

## · 本刊讯 ·

### 本刊副主编王广基教授当选中国工程院院士

中国工程院 2013 年院士增选工作已经顺利结束。按照《中国工程院章程》和《中国工程院院士增选工作实施办法》的规定,坚持公平、公正原则,共选举产生了 51 名新院士。其中,本刊副主编王广基教授当选中国工程院院士。王广基教授长期从事药物代谢动力学研究,主持国家重大专项和国家自然科学基金重点项目等多项研究项目,在国内外权威期刊发表论文 300 余篇,在药学界享有较高的学术地位和知名度。

本次增选后,中国工程院院士总数达到 807 人(其中资深院士 258 人),院士队伍的学科覆盖更趋全面,地区分布更加广泛,这将更有利于推动我国工程技术的发展和激励优秀人才的成长。

(本刊编辑部)