

iMScope QT 分析正常和菊三七致肝损伤小鼠中差异脂质及其空间分布变化

IMSCope-010

摘要： 本文展示了应用成像质谱显微镜 iMScope QT 对正常组和菊三七致肝损伤组小鼠肝脏中脂质成分代谢变化进行研究的应用案例。使用 iMScope QT 结合数据分析软件 IMAGEREVEAL MS 对正常小鼠和肝损伤小鼠肝脏组织切片中的脂质类物质进行检测和数据分析，利用该软件的多元统计分析（PCA）功能及变化倍率比、P 值等功能，最终筛选出 20 个上调脂质化合物、8 个下调脂质化合物，为研究空间脂质组学提供相应案例。

关键词： 成像质谱显微镜 iMScope QT IMAGEREVEAL MS 小鼠肝脏组织 脂质化合物

技术特点：

- ❖ 基于空间脂质组学角度对正常和肝损伤小鼠肝脏组织进行差异脂质空间分布研究。
- ❖ 使用 IMAGEREVEAL MS 数据处理软件多元统计分析功能进行差异物筛选。

菊三七为植物菊叶三七的根或全草，具有活血散瘀，消肿止血等功效，为我国传统民间用药。因其含有吡咯里西啶类生物碱（pyrrolizidine alkaloids, PAs），在使用不当时可造成不同程度的肝脏损伤。中华医学会消化病分会肝胆疾病协作组的报告曾指出，在我国以 PAs 导致肝窦阻塞综合征的患者中，因误食菊三七而导致的患者约占 50.0%~88.6%，应引起临床高度重视。研究正常组织与菊三七致肝损伤组织中脂质代谢变化的影响，对肝毒性中药和肝脏损伤机制的研究有极其重要的意义。

目前脂质组学研究一般是通过色谱质谱联用系统来对目标物进行定量和定性的测定，这种传统

的方法无法观察到目标物在器官水平的空间分布信息以及动态转移过程。成像质谱分析技术（mass spectrometry imaging）可以直接测定生物体分子和代谢物，能够直观反映组织器官中分子水平化合物的空间分布与变化。再结合数据分析软件 IMAGEREVEAL MS 丰富的统计功能，为组学数据分析提供了有力工具。

本文应用岛津成像质谱显微镜 iMScope QT 对正常组和肝损伤组小鼠肝脏中脂质成分进行检测和多元统计分析，筛选出多个差异表达的脂质类物质，为研究空间脂质组学提供相应参考案例。

■ 实验部分

1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT



图 1 岛津成像质谱显微镜 iMScope QT

1.2 仪器参数

分析模式：	正 / 负模式	激光器：	355 nm YAG 激光器
像素间距：	20 μm × 20 μm	激光照射直径：	10 μm
激光能量：	70	激光照射次数：	200 shots
扫描频率：	5000 Hz	扫描范围：	m/z 100-1000
检测器电压：	2.40 kV		

1.3 试剂与样品

基质：9-氨基吡啶（9-AA）。

样品：2组小鼠的肝脏组织。A组：C57 正常小鼠；B组：肝损伤小鼠，取 C57 小鼠灌胃给药（提取菊三七总生物碱）24 h 后取材。

1.4 样品前处理

将两组小鼠肝脏组织样本用冰冻切片机制作组织切片，切片厚度为 10 μm ，将切片转移到导电载玻片上，真空干燥处理。将载玻片送入成像质谱显微镜拍摄光学图像后取出，使用基质升华仪 iMLayer 和手动喷雾仪，在导电载玻片上涂敷 9-AA 基质。涂敷基质后，将载玻片送入成像质谱显微镜进行数据采集。使用数据分析软件 IMAGEREVEAL MS 进行数据分析。质谱成像上机分析流程如图 2 所示。

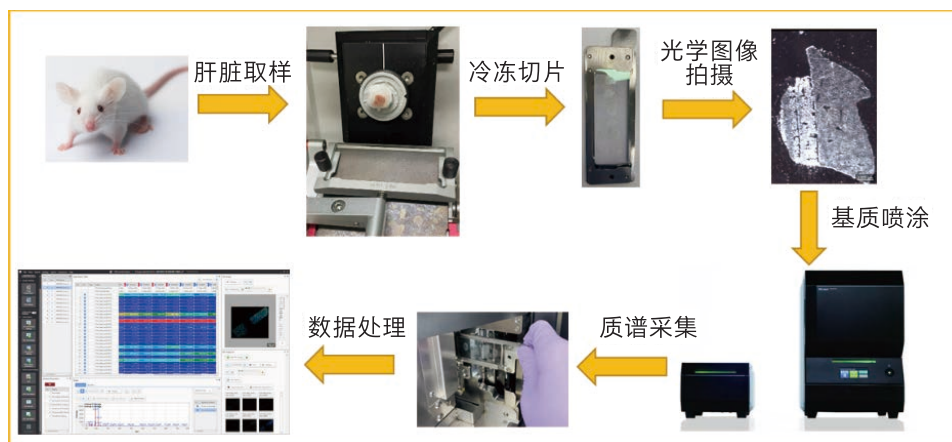


图 2 质谱成像上机分析流程图

1.5 质谱成像数据处理

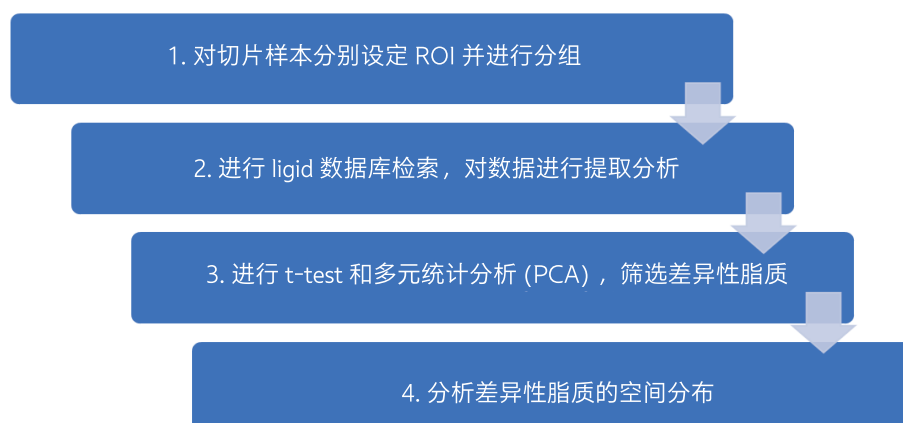


图 3 质谱成像数据分析流程图

■ 结果与讨论

2.1 组织的光学图像、ROI 设定

以 9-AA 为基质，在正和负离子模式下进行正常组和肝损伤组小鼠肝脏切片 m/z 100-1000 的质谱采集。正和负离子模式下 2 组样品的平均质谱图见图 5-6。分别对正常组和肝损伤组小鼠肝脏组织的光学图像进行 ROI (感兴趣区域) 设定和分组，每组划分 5 个不同 ROI 区域 (如图 4)。使用 IMAGEREVEAL MS 软件对质谱数据进行分析，分析误差设定为 10 ppm。

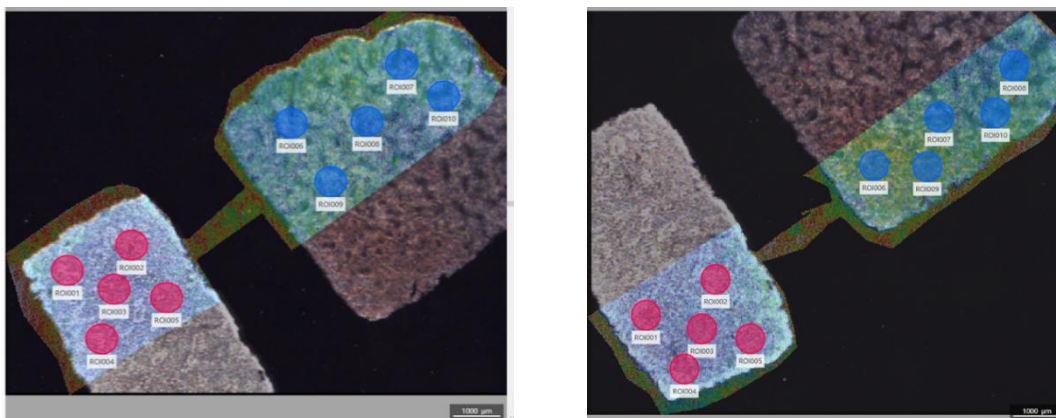


图 4 小鼠肝脏组织切片的 ROI 设定 (左: 正模式, 右: 负模式; 红色: 正常组, 蓝色: 肝损伤组)

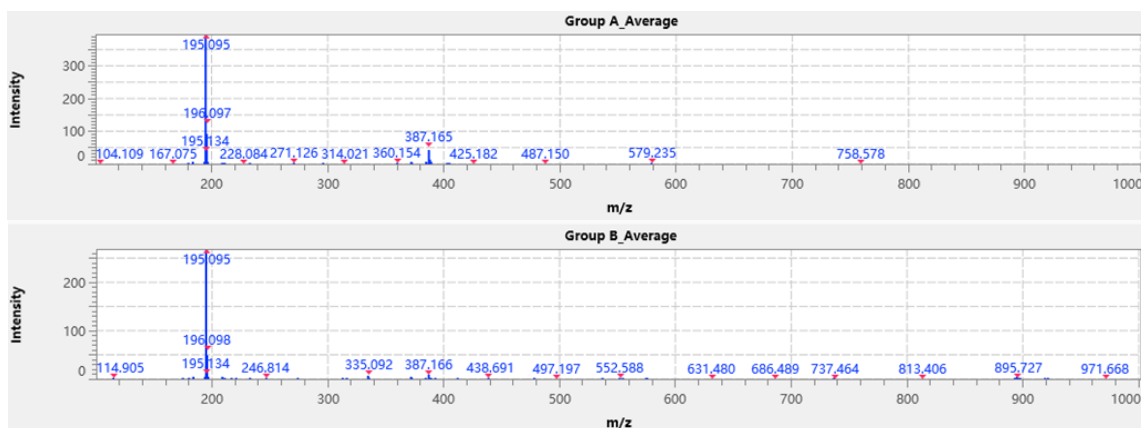
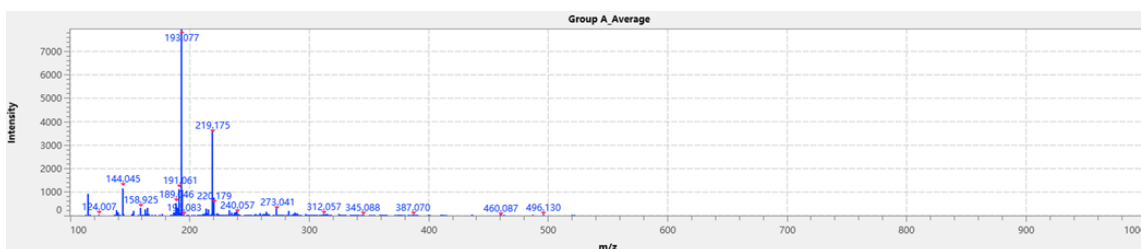


图 5 正常组 (Group A) 与疾病组 (Group B) 的平均质谱图 (正模式)



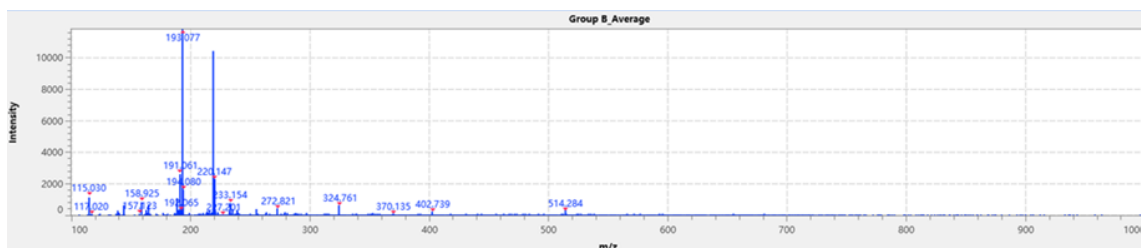


图 6 正常组 (Group A) 与疾病组 (Group B) 的平均质谱图 (负模式)

2.2 质谱成像数据分析

将质谱数据导入数据分析软件 IMAGEREVEAL MS 中进行分析。对数据进行 TIC 归一化, 用软件自带数据包 Lipids(一级质谱峰列表) 进行提取分析, 结果显示约 240 个脂质化合物有响应。随后进行 t 检验分析, 软件自动计算两组的平均值、倍率比、P 值等信息, 得到单因素分析结果。图中颜色显示亮度代表目标物离子响应强弱, 例如亮红色表示响应强度高, 弱蓝色表示响应强度低。如图 7 所示。

Nr.	Label	Group A-Mean	Group B-Mean	Ratio(Group A)	P Value (t)	ROI001	ROI002	ROI003	ROI004	ROI005	ROI006	ROI007	ROI008	ROI009	ROI010
	PCA-Horizontal Axis	-----	-----	-----	-----	7.920e+001	7.990e+001	9.060e+001	8.762e+001	8.576e+001	-8.123e+001	-6.611e+001	-8.504e+001	-1.115e+002	-7.917e+001
	PCA-Vertical Axis	-----	-----	-----	-----	-2.058e+000	2.303e+000	1.267e+000	3.533e+000	1.735e+000	2.185e+000	-3.109e+001	9.120e+000	2.061e+001	-7.606e+000
517	Phosphatidylcholine(44:6)	1.356	185.849	0.008	0.000e+000	1.839	0.723	1.441	1.636	1.140	185.839	99.433	205.149	223.437	151.491
520	Phosphatidylcholine(44:6)	1.649	206.433	0.008	0.000e+000	3.175	0.203	1.928	0.926	1.997	205.724	122.399	236.838	264.531	205.104
490	Phosphatidylcholine(42:1)	1.400	127.616	0.011	1.016e-291	1.799	0.752	1.436	1.873	1.142	117.680	76.533	160.362	172.167	117.018
945	Diacylglycerol(38:6)	2.341	75.423	0.031	5.019e-163	3.640	2.594	1.379	1.484	2.396	68.566	47.628	76.367	105.580	76.850
918	Diacylglycerol(36:3)	2.212	67.934	0.033	2.293e-160	3.346	2.606	1.355	1.507	2.234	64.185	43.367	70.214	92.335	66.667
774	Phosphatidylcholine(40:6)	8.615	26.045	0.297	3.400e-030	9.849	18.145	7.648	6.714	5.704	71.263	26.000	29.623	42.115	22.237
915	Diacylglycerol(36:2)	3.283	113.449	0.029	2.270e-244	1.198	5.077	3.185	3.855	3.016	104.696	82.295	132.859	138.624	108.836
493	Phosphatidylcholine(42:2)	1.331	52.122	0.026	1.067e-124	2.330	0.712	0.780	1.325	1.503	51.685	32.798	38.742	66.809	50.851
935	Diacylglycerol(38:3)	2.438	23.935	0.102	1.450e-051	1.885	2.815	1.304	3.401	2.755	21.853	15.585	23.501	37.590	21.460
974	Diacylglycerol(40:8)	3.060	33.918	0.090	1.336e-073	5.956	1.557	2.244	3.003	3.057	33.879	24.278	41.755	45.023	24.997
816	Phosphatidylcholine(42:1)	4.259	36.562	0.116	4.417e-070	2.455	6.465	3.835	3.148	3.584	34.633	28.441	42.360	50.642	28.518
855	Phosphatidylcholine(38:7)	9.930	33.796	0.294	4.034e-037	10.321	12.432	6.493	10.939	9.467	40.489	28.222	32.170	44.557	25.552
496	Phosphatidylcholine(42:2)	1.164	78.151	0.015	4.763e-107	3.271	0.499	0.899	0.869	0.869	80.389	57.653	102.865	92.516	73.931
524	Phosphatidylcholine(44:5)	1.130	36.552	0.031	4.199e-101	1.483	1.722	0.454	0.426	1.555	37.077	24.514	40.717	47.285	33.204
694	Phosphatidylcholine(32:1)	6.872	18.017	0.381	5.524e-016	7.847	8.777	5.990	4.752	7.264	29.614	12.557	15.967	25.834	16.039
854	Phosphatidylcholine(38:7)	8.987	30.511	0.295	3.746e-034	12.813	11.114	6.510	8.028	6.443	42.531	21.698	36.214	33.180	18.973
902	Diacylglycerol(34:3)	2.069	42.904	0.049	5.077e-063	1.939	1.416	2.448	1.865	2.834	41.837	27.935	51.178	50.077	42.751
544	Phosphatidylcholine(42:1)	4.421	27.553	0.160	1.977e-048	7.434	3.027	2.592	3.991	4.244	38.663	21.366	29.987	38.013	18.727
754	Phosphatidylcholine(38:8)	10.302	39.155	0.263	9.612e-045	11.452	13.082	9.413	8.947	7.802	45.145	30.630	35.499	51.901	32.634
923	Diacylglycerol(36:4)	5.060	143.270	0.035	5.291e-291	5.183	7.195	3.179	4.158	5.579	135.075	108.657	147.430	174.808	150.537

图 7 软件 IMAGEREVEAL MS 部分目标物数据分析结果

采用主成分分析多变量模式识别方法, 对正常组和肝损组小鼠肝脏组织样品的最小二乘数据进行降维处理。对 2 组小鼠肝脏组织样品的正和负离子模式质谱数据进行 PCA 分析, 通过得分图 (Score Plot) 直观地观察正常组、疾病组小鼠肝脏组织样品的分布情况。图 8 显示了主成分分析模型两个主成分的得分图 (PC1 vs PC2), 正常组、疾病组小鼠肝脏组织样品分别聚为 2 类, 且组内样品点集中, 说明二者内源代谢物存在较大差异。

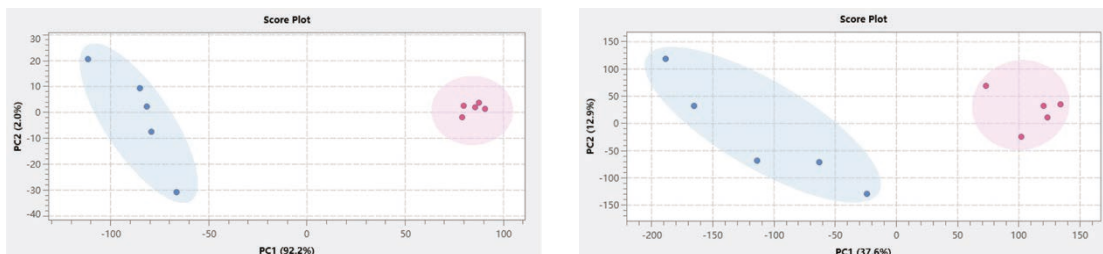


图 8 PCA 主成分分析得分图 (左: 正模式, 右: 负模式; 红色: 正常组, 蓝色: 疾病组)

为进一步确定造成差异的主要内源代谢物 (生物标志物), 通过载荷图 (Loading Plot) 初步筛选差异物质, 在载荷图中化合物投影点距离原点越远表明该化合物对分类的贡献越大, 结果如下图所示, 紫色标记的目标物为主要差异物。从图 9-10 可以筛选出造成差异的主要化合物, 并采用 t 检验进一步对差异代谢产物进行比较, 确定了 28 种差异脂质 (表 1)。其中, 甘油二酯类 (DG)、游离脂肪酸 (FFA)、磷脂酰胆碱类 (PC) 和脂肪酰肉碱 (FAC) 等在正常和肝损伤小鼠中均有显著差异。

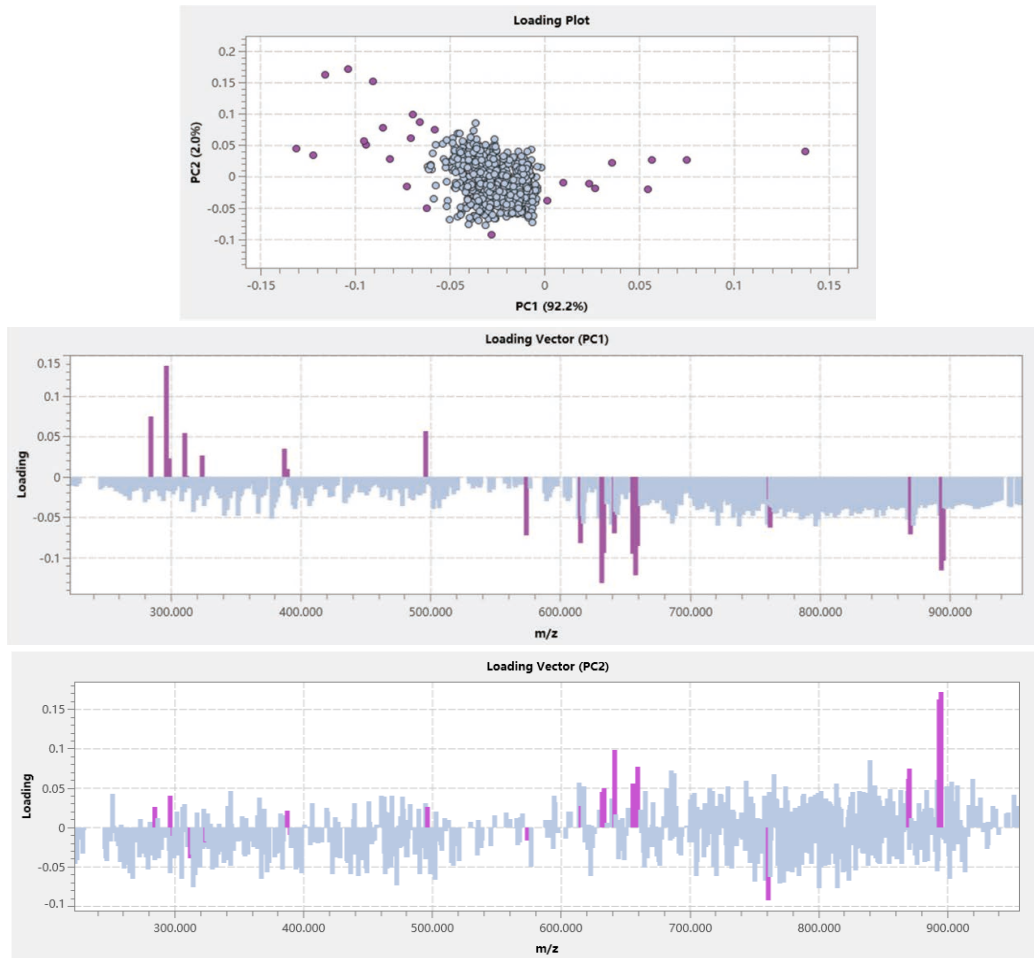
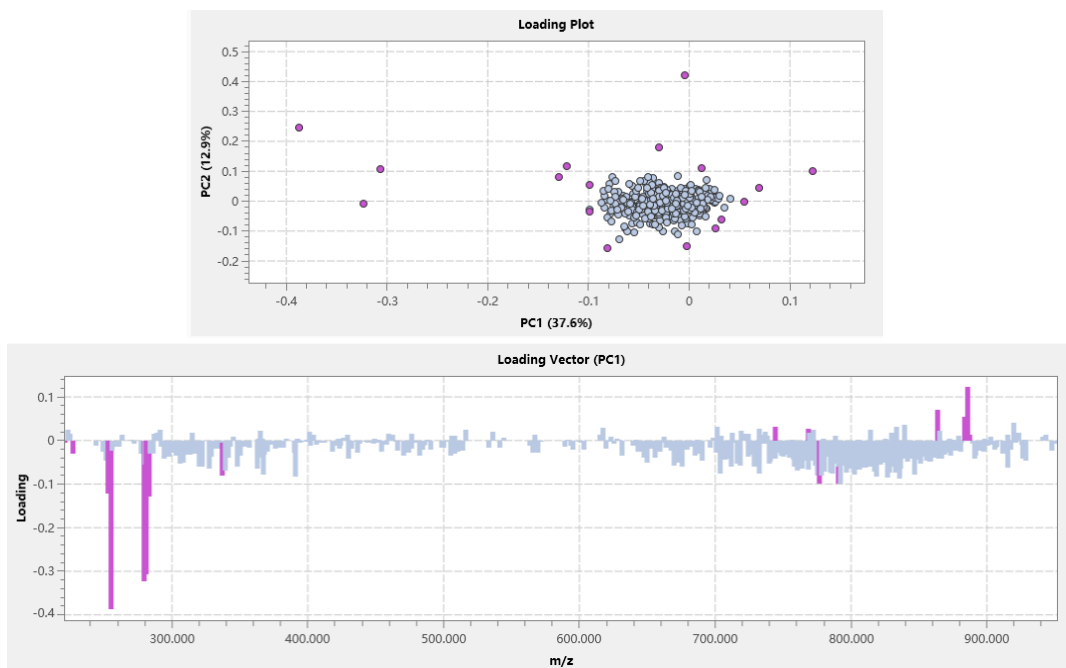


图9 正常组与肝损伤疾病组 PCA 载荷图（正模式）



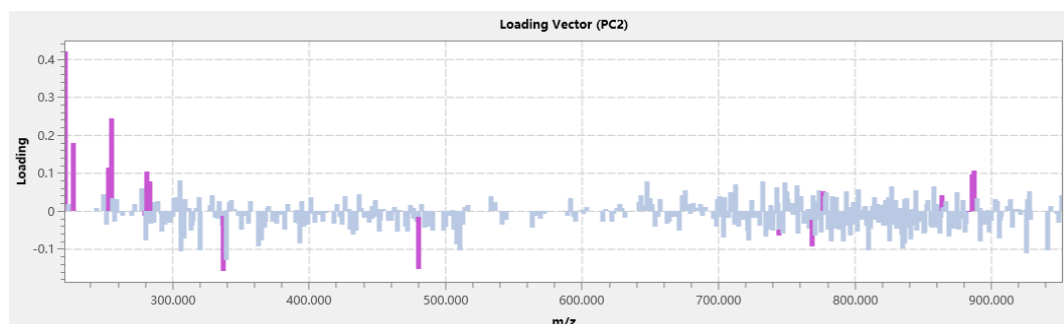


图 10 正常组与肝损伤组 PCA 载荷图 (负模式)

表 1 20 个上调脂质化合物的信号强度结果 (上调倍数大于 1.5)

No.	Compounds	m/z	Formula	Adduct Ion	Group A-Mean	Group B-Mean	Ratio (B/A)
1	Phosphatidylcholine(44:4)	894.6946	C ₅₂ H ₉₆ O ₈ NP	M+H	1.356	165.849	125.0
2	Phosphatidylcholine(42:1)	894.6922	C ₅₀ H ₉₈ O ₈ NP	M+Na	1.4	127.616	90.9
3	Diacylglycerol(36:3)	657.486	C ₃₉ H ₇₀ O ₅	M+K	3.459	229.928	66.7
4	Diacylglycerol(34:1)	633.486	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	M+K	3.022	137.897	45.5
5	Diacylglycerol(34:2)	631.4704	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	M+K	6.75	269.072	40.0
6	Phosphatidylcholine(42:2)	870.6946	C ₅₀ H ₉₆ O ₈ NP	M+H	1.331	52.122	38.5
7	Diacylglycerol(36:2)	659.5017	C ₃₉ H ₇₂ O ₅	M+K	3.263	113.449	34.5
8	Free fatty acid(36:1)	573.5013	C ₃₆ H ₇₀ O ₂	M+K	2.551	85.623	33.3
9	Diacylglycerol(38:6)	641.514	C ₄₁ H ₆₈ O ₅	M+H	2.341	75.423	32.3
10	Diacylglycerol(36:4)	655.4704	C ₃₉ H ₆₈ O ₅	M+K	5.06	143.27	28.6
11	Phosphatidylglycerol(32:0)	761.4735	C ₃₈ H ₇₅ O ₁₀ P	M+K	14.014	73.696	5.3
12	Phosphatidylcholine(34:3)	790.5159	C ₄₂ H ₇₈ O ₈ NP	M+Cl	140.618	463.785	3.3
13	Free fatty acid(20:5)	337.194	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	M+Cl	201.198	622.729	3.1
14	Phosphatidylcholine(36:6)	776.5236	C ₄₄ H ₇₆ O ₈ NP	M-H	178.379	466.908	2.6
15	Free fatty acid(18:2)	279.233	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	M-H	2128.922	5162.842	2.4
16	Free fatty acid(18:1)	281.2486	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	M-H	1849.36	4328.495	2.3
17	Free fatty acid(16:1)	253.2173	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	M-H	320.289	741.75	2.3
18	Phosphatidylcholine(34:1)	760.5851	C ₄₂ H ₈₂ O ₈ NP	M+H	22.767	37.191	1.6
19	Free fatty acid(16:0)	255.233	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	M-H	7967.587	11865.387	1.5
20	Fatty acylcarnitines (24:5)	480.2886	C ₂₇ H ₄₃ O ₄ N	M+Cl	234.978	347.237	1.5

表 2 8 个下调脂质化合物 (下调倍数大于 1.5)

No.	Compounds	m/z	Formula	Adduct Ion	Group A-Mean	Group B-Mean	Ratio (B/A)
1	Free fatty acid(24:2)	387.3234	C ₂₄ H ₄₄ O ₂	M+Na	26.794	6.376	0.2
2	Fatty acylcarnitines (10:1)	296.1264	C ₁₃ H ₂₃ O ₄ N	M+K	396.727	99.58	0.3

3	Phosphatidylinositol(36:1)	863.5655	$C_{45}H_{85}O_{13}P$	M-H	279.299	91.173	0.3
4	Fatty acylcarnitines (26:5)	496.3397	$C_{29}H_{47}O_4N$	M+Na	75.538	25.163	0.3
5	Fatty acylcarnitines (9:0)	284.1264	$C_{12}H_{23}O_4N$	M+K	147.14	51.623	0.4
6	Phosphatidylinositol(38:4)	885.5499	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	M-H	1021.935	376.512	0.4
7	Fatty acylcarnitines (11:1)	310.1421	$C_{14}H_{25}O_4N$	M+K	106.306	54.125	0.5
8	Free fatty acid(24:1)	389.339	$C_{24}H_{46}O_2$	M+Na	4.429	2.579	0.6

下图展示了正常小鼠和肝损伤小鼠中差异表达脂质化合物的代表性质谱成像结果。图 11 展示了 6 个代表性上调脂质化合物的质谱成像图；图 12 展示了 3 个代表性下调脂质化合物的质谱成像图。

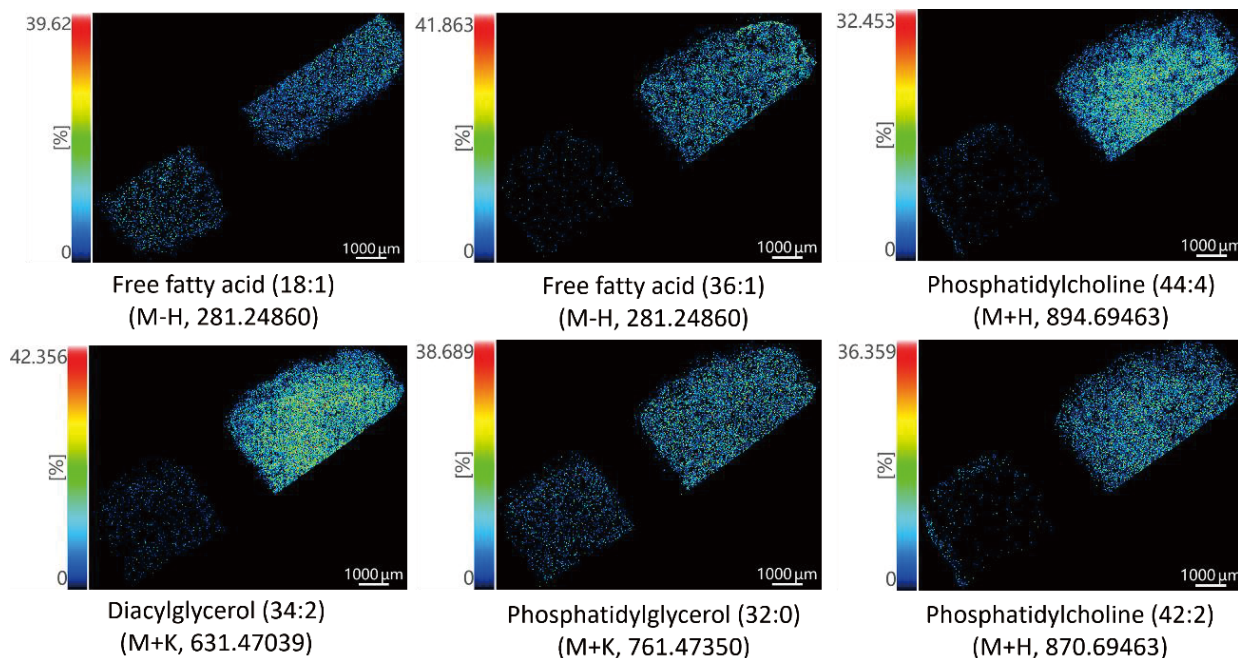


图 11 代表性上调脂质化合物的质谱成像图

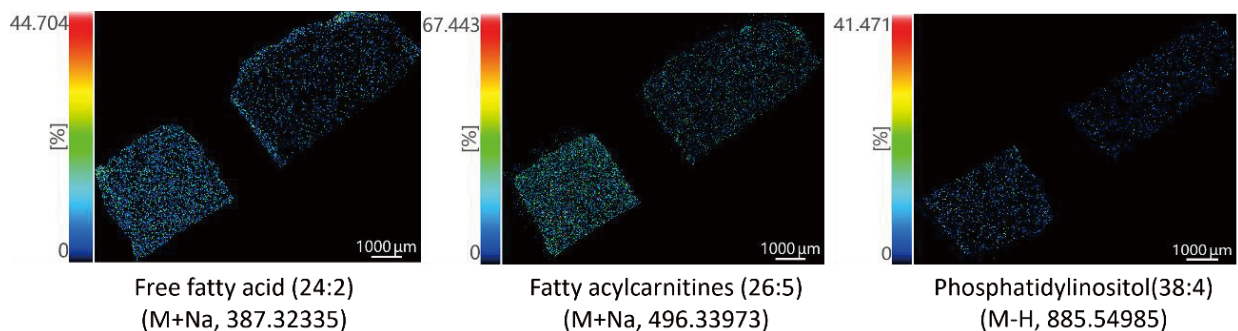


图 12 代表性下调脂质化合物的质谱成像图

■ 结论

本文使用岛津成像质谱显微镜 iMSScope QT 和 IMAGEREVEAL MS 软件研究正常和肝损伤小鼠中脂质化合物的组间差异，经过质谱检测和对数据进行多元统计分析，发现油二酯类（DG）、游离脂肪酸（FFA）磷脂酰胆碱类（PC）和脂肪酰肉碱（FAC）等在正常和肝损伤小鼠中均有显著差异，最终筛选出 28 个差异脂质化合物。IMAGEREVEAL MS 成像数据处理软件不仅可以完成目标物的可视化空间分布成像，而且内含多元统计分析和 T 检验等功能，从多角度分析数据，简化了数据分析过程，适合分析大量数据或同时分析多组数据，为研究空间脂质组学提供相应参考案例。

岛津应用云

