

Application News

No. B94

MALDI-TOF 质量分析法

利用 MALDI-7090 采集的实验鼠肝脏组织切片的 MS 成像分析

为了讨论疾病的原因及进展情况，在明确病变组织的基础上，搞清病变组织中存在的分子数量变化及分布。根据 LC-MS 或 GC-MS 进行的代谢分析可有效获得代谢产物及脂质定量变化，但由于分析方法的性质，无法知道什么分子在病变组织的什么位置。因此，很难看到病理发展中出现的分子分布变化。近年来，MS 成像分析成为解决这一问题的方法。此次将要介绍的实验对象为患有非酒精性脂肪肝 (NASH) 实验鼠的肝脏，MS 成像分析与 LC-MS 或 GC-MS 的数据组合起来解析疾病状态中的分子动态。

K. Waki

MS 成像分析样本制备

有些非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 发展后会变化为非酒精性脂肪肝 (NASH)，也有些会发展为肝硬化以及肝细胞癌。通过 LC-MS 及 GC-MS 对肝脏内的生化物质进行定量分析，事先检测代谢物的变化。本实验中使用 MALDI-7090 进行 MS 成像，分析观察了病理结果与分子分布之间的关系。

让实验鼠摄取高脂肪食物或者正常的食物，第 4 周、第 8 周、以及第 16 周取出实验鼠的肝脏制作干燥切片。对肝脏切片进行病理学染色 (偶氮卡红染色)，作为病理结果观察用的样本。将摄取高脂肪食物的鼠群和摄取正常食物的鼠群的各个染色切片放在同一 ITO 涂层玻璃载玻片上，利用 MS 成像分析比较切片间的信号强度。

利用基质气相沉积系统 iMLayer™，蒸镀基质后进行再结晶化处理，随后进行测定。

纤维化组织中分子分布的可视化

对实验鼠肝脏的切片的纤维化组织进行偶氮卡红染色，将其染成蓝色。与摄取正常食物的实验鼠的肝脏相比，摄取高脂肪食物的实验鼠在投食后 8 周、16 周肝脏的纤维化组织呈现增加状态。(图 2 左；蓝色部分)

随后，通过 MALDI-7090 进行成像分析，比较偶氮卡红染色切片。分析成像的目标分子作为从 LCMS 或 GC-MS 定量解析的代谢物数据中选出的脂质 m/z 833.58 和 m/z 788.54，二者叠加后如图 2 右侧所示。观察两个目标分子的分布后，摄取正常食物的实验鼠的肝脏组织中只存在 m/z 833.58。由此可知，摄取高脂肪食物的鼠群由于 NAFLD 发展为 NASH，纤维化区域中存在很多 m/z 788.54。

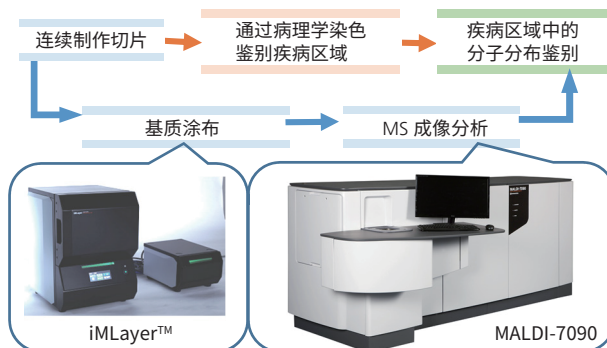


图 1 利用 MALDI-7090 的 MS 成像分析流程

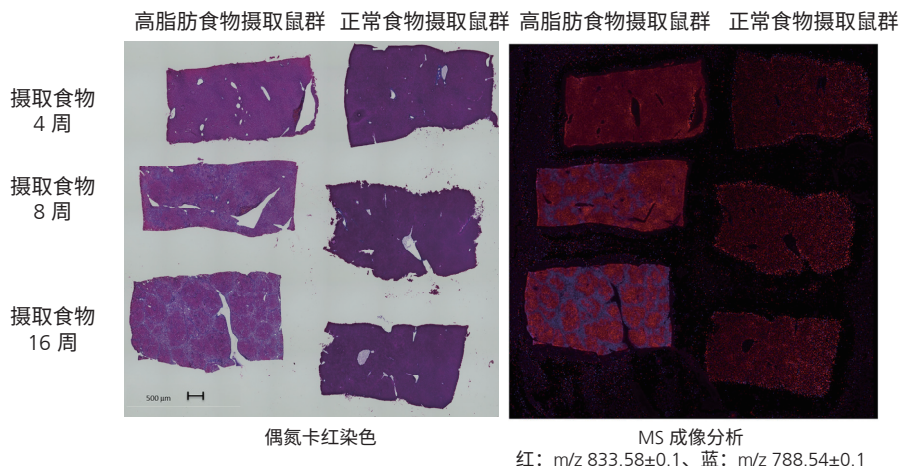


图 2 正常组织及病变组织中的目标分子分布差异

胆汁酸的成像分析

之前在非酒精性脂肪性肝病样本制备中也讲过了，脂肪性肝病发展后有可能变成非酒精性脂肪肝，但只是进行了病理学染色区别这两者的状态。但是，仅通过显微镜光学成像识别病态仍有不准确性，在药物开发中作为模型是难以取信的。为了解决这个问题，此次质谱成像是针对胆汁酸进行的，胆汁酸可能根据 LCMS 或 GC-MS 的结果而波动（图 3）。图 3 右侧摄取正常食物的实验鼠肝脏中主要存在初级胆汁酸 m/z 498.24（红）和 m/z 514.23（绿）。相反，摄取高脂肪食物的实验鼠纤维化部分中存在初级胆汁酸 m/z 405.27（蓝）。

IMAGEREVEAL MS 进行平均化比较

图 3 中对摄取高脂肪食物鼠群的数据进行时间上的比较，摄取高脂肪食物 8 周的肝脏切片较摄取 16 周的肝脏切片存在更多的 m/z 405.27。但是，根据切片状态得到的质谱信号具有强弱变化。因此，原始数据及总离子流（Total Ion Current; TIC）校正数据之间的比较有时候也比较困难。这种情况下，将别的物质作为基准进行标准化，就可以有效修正信号强度并进行补充。

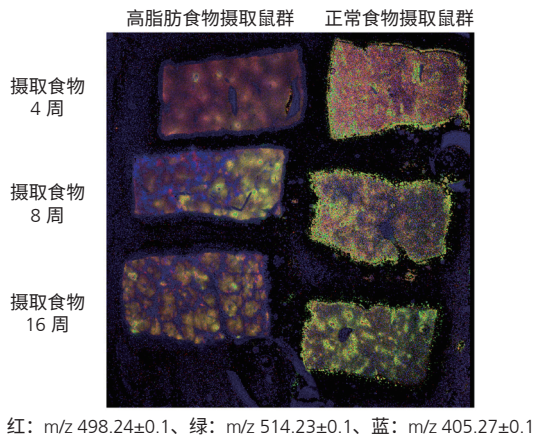


图 3 胆汁酸的MS成像分析

通过解析软件 IMAGEREVEAL MS，利用 m/z 405.27 代谢路径包含的 m/z 498.24 和 m/z 514.23，校正图 3 中所得数据，结果如图 4 所示。与 TIC 校正的图像（图 4 右）相比，非酒精性脂肪肝状态下的摄取高脂肪食物的实验鼠肝脏纤维化区域中，摄取高脂肪食物 8 周及 16 周后 m/z 405.27 的表达量没有明显差异。而且，非酒精性脂肪肝状态下的实验鼠摄取高脂肪食物 16 周后肝脏组织，同一切片进行苏木精 - 伊红（HE）染色后与连续切片经天狼星红染色后进行比较可知， m/z 405.27 在纤维化组织中大量存在（图 5）。由结果可知， m/z 405.27 在肝脏纤维化区域中更多地存在，但在鼠群高脂肪食物摄取 8 周后非酒精性脂肪肝发展过程中伴随的存在量就几乎没有变化了。

因此，MS 成像分析可以同时测量 / 观察同一切片上的多个物质，利用这一优势，可以通过 IMAGEREVEAL MS 解析所得数据，得到反映目标分子实际情况的 MS 图像，能够更准确地了解病理过程与目标分子分布位置的关系。此外，将 LC-MS 和 GC-MS 数据与 MS 成像相结合，有望通过寻找治疗疾病药物的靶向分子，为新药的研发做出贡献。

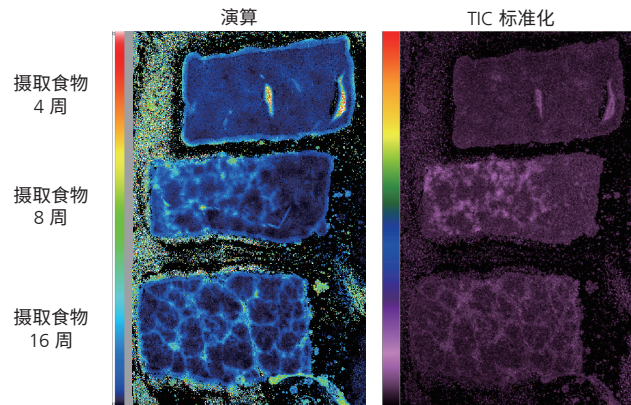


图4 IMAGEREVEAL MS处理数据（演算）效果（ m/z 405.27、高脂肪食物摄取鼠群）

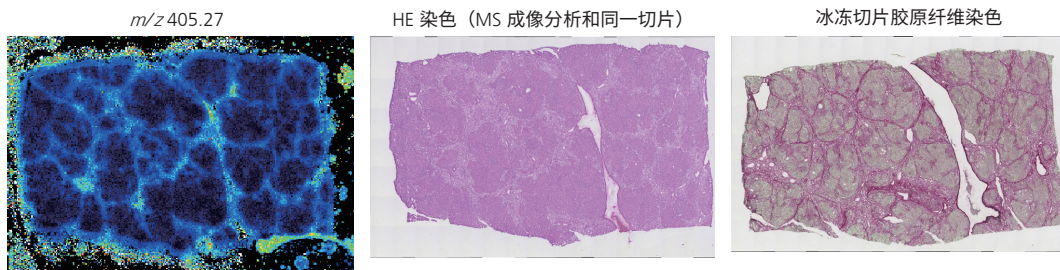


图 5 摄取高脂肪食物 16 周的实验鼠的肝脏组织中 m/z 405.27 的分布以及病理组织学的染色结果间的比较

致谢

本报告为九州大学尖端融合医疗研究点共同研究报告中的一环。在此特别感谢田辺三菱制药株式会社 山崎 真为研究提供的样本及宝贵的意见。

本产品仅限研究使用，本产品尚未作为医疗器械得到医药品医疗器械法的批准和认证。

不能用于医疗检查和治疗或相关程序。。

iMLayer 及 IMAGEREVEAL MS 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日: 2019 年 5 月