

# Application News

## No. B54

成像质量显微镜  
Imaging Mass Microscope

### 通过 iMScope TRIO 进行高分辨率成像 - 小鼠肝脏中槲皮素的分布测定 -

High Spatial Resolution Imaging by iMScope TRIO  
- Imaging of Quercetin Distribution in Mouse Liver -

当前,通过 MS 成像对药物等外源性化合物的分布进行成像的技术备受瞩目。本方法除了能够在不作标记的情况下进行各种物质的分布测定,还能够根据同一切片解析原药及其代谢物的分布。因此有望在药物研发领域取得突破。iMScope TRIO 通过将激光径最小缩小到 5  $\mu\text{m}$  的  $m/z$  图像点和使用显微镜获得的高分辨率光学图像重叠,得到微小范围的药物分布信息,MS/MS 数据确保采集的数据来自目标药物,避免了噪音干扰,从而提高了灵敏度,实现了高空间分辨率的药物成像。

本文为您介绍通过小鼠肝脏内的高分辨率成像,对抗氧化剂类黄酮的一种——槲皮素进行分析的示例。

#### ■ 小鼠肝脏中槲皮素的直接检测

Detection of Quercetin Directly from Mouse Liver

本次分析流程如下所示:

1) 准备样品

2) 拍摄光学图像

3) 涂布基质

4) MS 分析和 MS/MS 分析

- 1) 使用恒冷箱切片将冷冻肝脏(左叶外侧)切割为 10  $\mu\text{m}$  的薄片,并放在 ITO 载玻片上。小鼠肝脏是从小鼠尾部静脉注射 50 mg/kg (按槲皮素换算) 二水槲皮素,15 分钟后用戊巴比妥麻醉小鼠(Crlj: CD1 雄性小鼠),将其放血致死,再从小鼠体内摘出肝脏,处理后用干冰己烷进行浸渍冷冻。
- 2) 将 ITO 载玻片放置在 iMScope 样品架上,通过 Imaging MS Solution 得到光学图像,并对多个范围更改放大倍数进行拍摄。
- 3) 取出样品架,用 iMLayer 对样品涂布 1  $\mu\text{m}$  的基质(CHCA)。
- 4) 将样品架放回 iMScope,根据之前得到的光学图像,设定分析范围(成像分析条件见表 1、2)。

分析步骤为先设定较大范围的区域,再设定 MS (MS/MS) 分析条件进行分析。关于分析所需的时间,可以根据分析点数设定。如果是 100  $\times$  100 点成像,需要 30 分钟左右。此时,可设定以 25  $\mu\text{m}$  的间距分析 2.5 mm 的方形区域,或者设定以 5  $\mu\text{m}$  的间距分析 0.5 mm 的方形区域。

具体分析时以 25  $\mu\text{m}$  为间距(直径为 25  $\mu\text{m}$ )进行了 MS 成像。由图 2 可知,在  $m/z$  269.22 处虽然存在槲皮素代谢物的峰,但是两者的质谱峰未发生重叠。由图 3 可知,组织整体存在某种分布倾向。因此,我们将  $m/z$  269.22 作为前体离子,在相同条件(直径为 25  $\mu\text{m}$ )下进行了 MS/MS 分析(图 4)。由 MS/MS 分析结果得知,来自槲皮素的产物离子  $m/z$  224.97 主要分布在肝脏内,而产物离子  $m/z$  226.07 是随机分布的,由此可确认基质衍生成分的存在(图 4  $m/z$  269.22 > 226.07 的 MS/MS 图像)。综上所述,为了排除给药药剂以外的干扰成分的影响,MS/MS 成像方法非常有效。

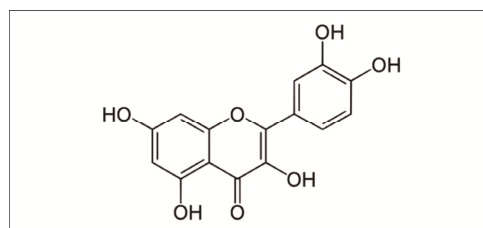


图 1 槲皮素的结构式  
Structure of Quercetin

表 1 分析条件  
Analytical Conditions

样品及预处理条件	
样品	: 服用槲皮素 (50 mg/kg; iv)
基质	: CHCA (蒸镀)
分析条件	
测定模式	: positive mode
测定范围	: $m/z$ 100-500
激光径	: 25 $\mu\text{m}$
测定间距	: 25 $\mu\text{m}$
分析点	: 100 $\times$ 100 (10,000 点)

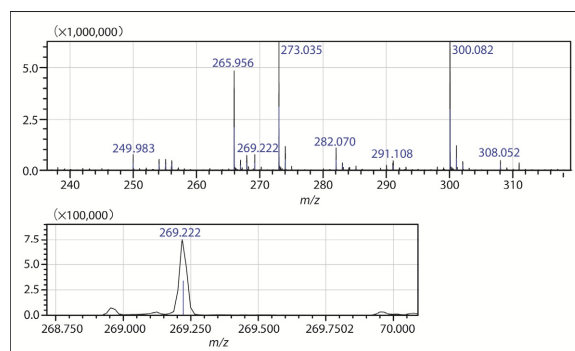
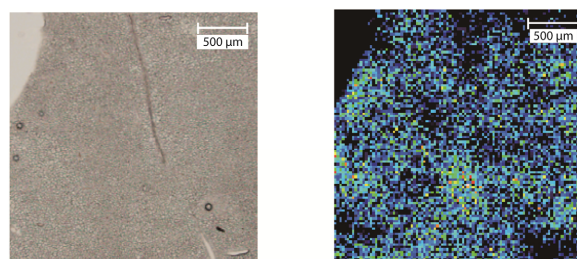


图 2 质谱(下:放大图)  
Averaged Mass Spectrum Acquired from Liver Tissue  
(top: all  $m/z$  range, bottom: target peak magnified)



光学图像

$m/z$  269.22 的 MS 图像

图 3 光学图像和 MS 图像  
MS Imaging of Mouse Liver, Showing the Spatial Distribution of Quercetin ( $m/z$  269.22)

## 肝细胞间槲皮素原药的局部分布解析

Distribution of Intact Quercetin in Mouse Liver

以 5 μm 的空间分辨率进行了 MS/MS 分析 (图 5 左)。由图可知, 与 25 μm 间距 (图 4) 相比, 可以看出检测到的信号有所减少。即使将其与光学图像重叠, 也未能发现明显特征分布 (图 5 右)。

但是, 使用 Imaging MS Solution 的图像放大功能, 可以观察到许多信号存在于细胞外部的狭窄区域, 而不存在于细胞内部 (图 6)。将激光径设定为 25 μm 时, 在单点分析中, 激光点覆盖细胞膜, 实验结果表明槲皮素主要分布在细胞外部或者细胞膜上。但是激光径设定为 5 μm 时, 则不覆盖细胞膜部分。与 25 μm 的激光径相比, 5 μm 激光径检测到的信号也会减少。

在 MS/MS 分析中, 对槲皮素原药 ( $m/z$  269.22) 进行了高分辨率成像。在 MS 分析中, 有意识地降低了检测器的灵敏度, 因此检测到的峰少, 虽然对其他峰没有进行 MS/MS 分析, 但是通过改变条件, 可能在细胞内检测到槲皮素的代谢物。

综上所述, 进行高分辨率的 MS/MS 成像, 可以进行细胞水平上的目标化合物及其代谢产物的分布研究。

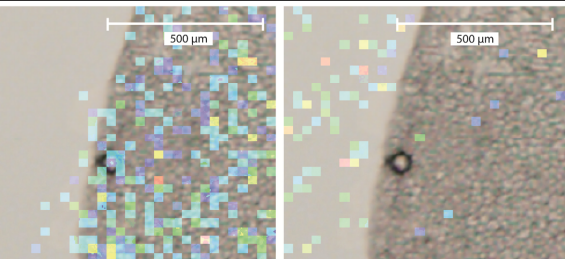
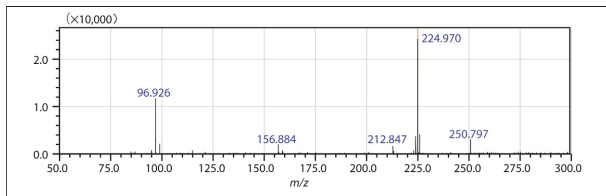
表 2 分析条件  
Analytical Conditions

样品及预处理条件

样品 : 服用槲皮素 (50 mg/kg: iv)  
基质 : CHCA (蒸镀)

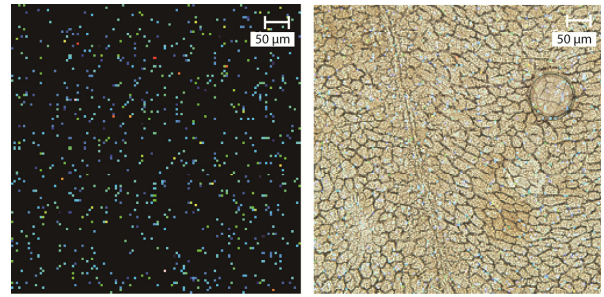
分析条件

测定模式 : positive mode  
前体离子 :  $m/z$  269.22  
测定范围 :  $m/z$  50~300  
激光径 : 25/5 μm  
测定间距 : 30/5 μm  
分析点 : 30 × 30 (900 点) / 120 × 120 (14,400 点)  
: 对应图 4 的条件/图 5、6 的条件



MS/MS图像 ( $m/z$  269.22 > 224.97) (槲皮素衍生)  
MS/MS图像 ( $m/z$  269.22 > 226.07) (基质衍生)

图 4 MS/MS 分析 (质谱和光学图像的重叠图像)  
MS/MS Product ion Spectrum Acquired on Tissue (top)  
and Distribution of Product Ions (bottom)



MS/MS图像 ( $m/z$  269.22 > 224.97) MS/MS图像 ( $m/z$  269.22 > 224.97) 和光学图像重叠

图 5 MS/MS 图像 (5 μm 间距) 和光学图像重叠  
Imaging at 5 μm Spatial Resolution

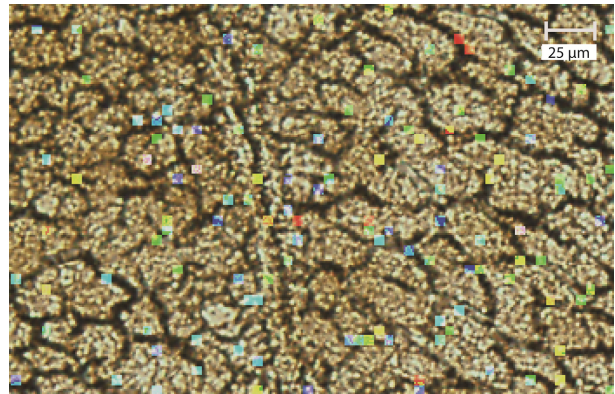


图 6 重叠放大图 (比例尺 25 μm)  
Magnified View of Overlaid Image, Showing the Distribution of Quercetin at Cell-Level Resolution (Scale bar: 25 μm)

## 通过 iMScope TRIO 和 iMLayer 实现高分辨率成像

Conclusion: High-Resolution Imaging by iMScope TRIO and iMLayer

本次分析将给药的小鼠肝脏作为样品, 使用 iMLayer 的蒸镀法涂上基质, 并将激光径设定为最小的 5 μm 进行了 MS/MS 分析, 由此成功地排除了干扰成分, 得到了高分辨率药物成像, 观察到槲皮素主要分布在小鼠肝脏细胞膜或者细胞间质中。只有激光径达到 5 μm 时才能获得这样的实验结果。iMScope TRIO 是唯一配置光学显微镜的 MS 成像专用装置。由于事先使用显微镜放大了涂布基质前的活体组织图像, 所以即使放大光学图像也清晰可见。如果原来的放大倍数小, 不仅可能无法正确设定分析范围, 也可能在详细分析测定结果时存在问题。本次分析通过放大光学图像成功观察到其分布状态, 可以确认本系统中高分辨率 MS 成像和与高倍率显微镜图像重叠功能的有效性。虽然今后有需要对该方法进行深入的研讨, 但是经过蒸镀, 在不使用任何溶剂仅涂布基质的方法, 使组织上的药剂分布不发生变化发挥着一定作用。

本次质谱成像分析中为了尽可能排除干扰峰, 设定了较低的激光能量, 并降低了检测器的灵敏度。在分析的初期阶段, 检测到了槲皮素的质谱峰, 因此进行了以该峰为目标的 MS/MS 分析。今后, 通过设定最合适的分析条件, 预计能够检测槲皮素的代谢物及药物给药导致的细胞内产生的新组分。使用 iMScope TRIO 和 iMLayer 进行高分辨率 MS 成像, 有望取得新的突破。

iMScope 作为医疗器械并未经有关部门批准认可。因此无法用于治疗诊断。仅可用于临床研究。



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: 2014 年 10 月