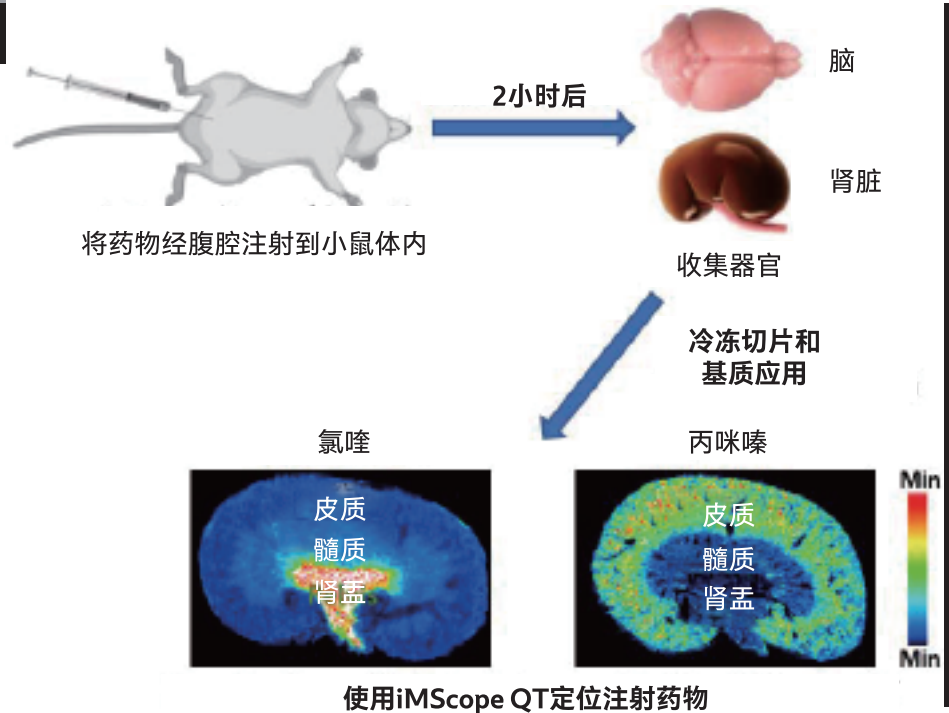


# 使用iMScope™ QT快速绘制小鼠肾脏和大脑中的药物及其代谢物分子影像

Ariful Islam<sup>1</sup>、坂本匠<sup>1</sup>、Qing Zhai<sup>1</sup>、Muedur Rahman<sup>1</sup>、Al Mamun<sup>1</sup>、高桥丰<sup>1,2</sup>、华表友晓<sup>1,2</sup>、山本卓志<sup>3</sup>、瀬藤光利<sup>1,2</sup>



## ■ 摘要

质谱成像 (Mass Spectrometry Imaging: MSI) 是一种众所周知的无需标记即可实现生物样本中成分可视化的技术。在本研究中, 我们使用新开发的大气压基质辅助激光解吸电离-MSI:iMScope QT快速绘制了C57BL/6雄性野生型小鼠的丙咪嗪、氯喹及其代谢物的图谱(32像素/秒)。揭示了小鼠肾脏和大脑中药物及其代谢物的区域特征性定位。本研究中观察到的这些药物及其代谢物的详细定位信息有助于了解这些药物的临床相关特性、有效性和潜在副作用。另外, 本研究证实了iMScope QT快速绘制生物样本中存在的小分子药物及其代谢物图谱的可行性。

## 1. 简介

MSI技术不仅在生物学研究领域受到关注, 还在诸如原研药的制剂研发、体内转运和代谢等多个领域受到广泛关注。MSI仪能够获取广泛的有关样本表面的分子组成和空间分布信息, 从而进行样本表征<sup>1)</sup>。

在各类MSI仪器中, 大气压基质辅助激光/解吸电离MSI (AP-MALDI-MSI)实现的高分辨率成像尤其受到关注。除其他生物分子之外, AP-MALDI-MSI还能以较高的空间分析率分析挥发性成分<sup>2)</sup>。另外, 面对传统MALDI-MSI中高真空下会升华的基质, 也能很好地完成样品成分的可视化分析<sup>3)</sup>。成像质谱显微镜(iMScope)是岛津制作所开发的AP-MALDI-MSI仪器, 内置光学显微镜。得益于其出色的分析速度和高空间分辨率(最高空间分辨率5 μm)而被广泛认可<sup>2)</sup>。最近, 岛津制作所开发了一款名为iMScope QT的AP-MALDI-MSI的仪器, 该款仪器可实现更高速、更高灵敏和更高分辨率的成像。

丙咪嗪是一种用于治疗抑郁症、焦虑症、夜尿症的经典药物。氯喹则常用于治疗疟疾、病毒性疾病、自身免疫性疾病。这些小分子药物目前在医疗保健领域被广泛使用, 但上述药物均有一些副作用<sup>4)5)</sup>。分析目标药物及其代谢物在生物组织中的定位信息对于更好地了解其作用机制和毒理学特性来说至关重要。然而, 关于其在不同器官中的定位数据不详。本研究首次尝试使用iMScope QT对上述药物及其代谢物进行快速成像, 描述了药物在小鼠肾脏和大脑中的分布信息。

1 滨松医科大学细胞分子解剖学教室

2 滨松医科大学国际质谱成像中心

3 株式会社岛津制作所分析计测事业部Solutions COE

## 2. 实验

本研究旨在对丙咪嗪和氯喹及其代谢物在C57BL/6J雄性小鼠（野生型、WT）大脑和肾脏中的分布进行可视化分析。实验方法：小鼠进行腹腔注射丙咪嗪和氯喹（30 mg/kg），2小时后颈椎脱臼处死并解剖，快速采集肾脏和脑组织，使用干冰对组织样品进行速冻，之后于-80°C下保存。根据已有文献方法，使用CM1950低温恒温器（徠卡生物系统）制备小鼠肾脏和大脑的矢状切片<sup>6)</sup>。将厚度10 μm的切片贴附在氧化铟锡（ITO）载玻片（100Ω、松浪硝子工业）上，用于AP-MALDI-MSI分析。

使用图1所示的iMLayer™基质升华仪（岛津制作所）涂覆α-氰基-4-羟基肉桂酸（α-CHCA、西格玛奥德里奇）基质。在基质升华过程中，iMLayer腔室内保持真空状态。涂覆基质后，使用iMScope QT成像质谱显微镜（岛津制作所）采集小鼠肾脏和大脑的MSI数据，将药物标准品滴到对照组小鼠脑切片上（0.3 μL/点）用于质谱参数优化。

iMScope QT成像质谱显微镜结合了大气压基质辅助激光解吸电离（AP-MALDI）源和Q-TOF型质谱仪LCMS-9030（图2）。在测量小鼠样本之前，使用药物标准品以两种不同的分析速度（8像素/秒和20像素/秒）对iMScope QT的参数进行了优化。为了确认在样本中检测到目标药物，同时对药物标准品进行了MS/MS成像，并用iMScope QT分析了小鼠组织样本。对于这两种药物的MS/MS成像，碰撞能量设置为35，所有数据均以8像素/秒的分析速度获取，之后尝试以更高的空间分辨率（25 μm间距）和更快的速度（32像素/秒）对上述药物及其代谢物进行可视化分析。表1列出了通过iMScope QT获取数据时使用的分析参数。



图1 iMLayer™基质升华仪



图2 iMScope™ QT成像质谱显微镜

表1 MSI分析参数

设置	8像素/秒	20像素/秒	32像素/秒
极性	Positive	Positive	Positive
质谱范围	150 - 550	150 - 550	150 - 550
质谱分辨率	32000	32000	32000
空间分辨率(XxY)	50 μm x 50 μm	50 μm x 50 μm	25 μm x 25 μm
激光直径设定值	2	2	2
激光功率	65	65	60
激光照射次数	100	100	20
采样频率(Hz)	1000	10000	10000
检测器电压(kV)	2.4	2.4	2.4
DL温度(°C)	300	300	300

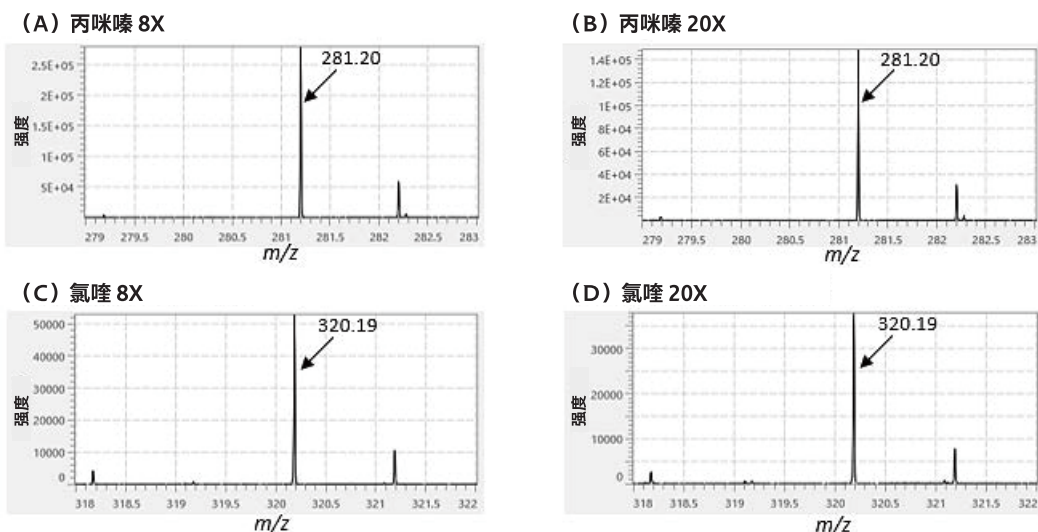


图3 分析速度对iMScope eQT的丙咪嗪(A-B)及氯喹(C-D)检测灵敏度的影响

### 通过iMScope QT在不同采集速度下检测到的药物的离子图像

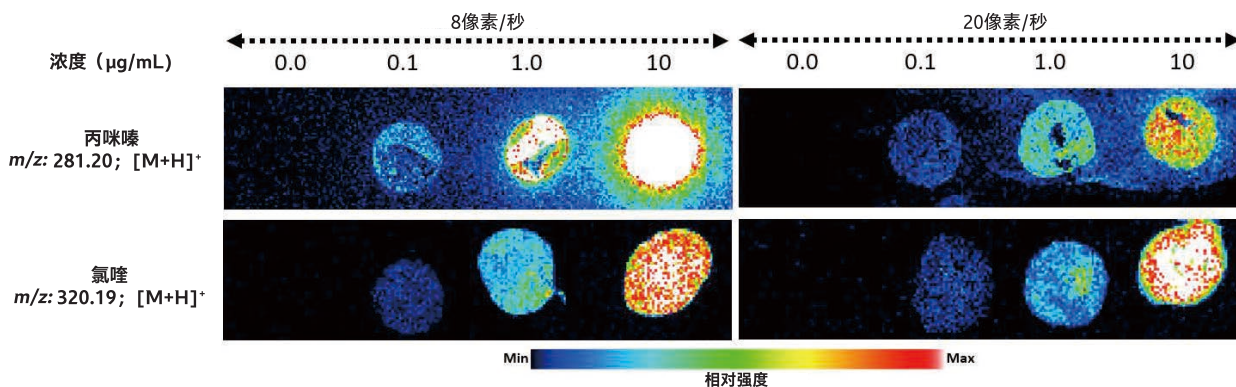


图4 使用iMScope QT在不同分析速度下的丙咪嗪和氯喹的离子图像

## 3. 结果与讨论

本研究对iMScope QT的参数进行了优化，并在8像素/秒和20像素/秒的两种不同的分析速度下，以正离子模式对滴有药物标准液的小鼠大脑对照切片(0.3 µL/点)进行分析，获取了AP-MALDI-MSI数据。使用iMScope QT，以0.1 µg/mL的浓度和两种数据的分析速度检测到两种药物(图3)。如图可知：分析速度对两种药物的信号强度没有显著影响(图3,4)。

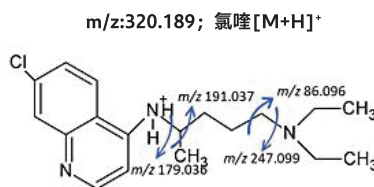
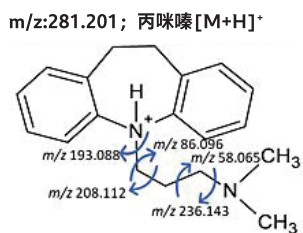
我们在最近的研究中报告了使用解吸电喷雾电离法MSI (DESI-MSI)也可以检测到上述药物，在分析速度2像素/秒的条件下能获得最高灵敏度，但在高分析速度下进行分析时灵敏度会大幅降低<sup>7)</sup>。我们还尝试用7TSolariXFT-ICR在正离子模式下使用三种不同的基质和不同的方法获得MALDI-MSI数据，但该实验未检测到这些药物<sup>7)</sup>。

然后，使用iMScope QT (8像素/秒)获取了小鼠肾脏切片的AP-MALDI-MSI数据。使用iMScope QT时，在给药的小鼠样本中，同时检测到了两种药物的质子化离子。为了确认这些峰为目标药物，我们使用iMScope QT，将源于丙咪嗪和氯喹的峰作为前体离子，进行了串联质谱分析(MS/MS)成像(图5)。

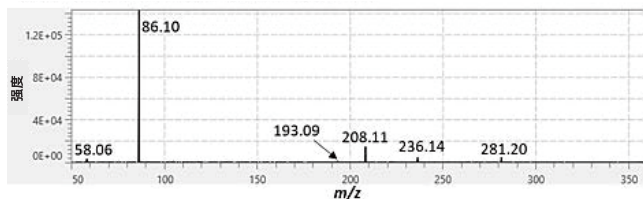
iMScope QT首次阐明了两种药物及其代谢物在给药小鼠肾脏中的分布情况。研究中观察到了丙咪嗪在肾皮质中高浓度蓄积，而其代谢物脱甲丙咪嗪和2-羟基-丙咪嗪则在给药小鼠在肾外髓质和肾盂中蓄积(图6A)。另外，观察到氯喹、去乙酰氯喹及氯喹-M(-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>)主要在肾盂中蓄积，在给药小鼠的肾内髓质中也有少量蓄积(图6B)。肾皮质连接血管和肾小球的密集网络。肾盂从肾锥体收集尿液。肾脏的这些部位均在过滤血液、维持电解质平衡、清除体内废物方面发挥着重要作用。肾脏通常会暴露于血液中的药物及其代谢物之中，因此，药物引起的肾脏毒性是全世界众所周知的<sup>8)</sup>。研究中观察到的肾脏中蓄积的丙咪嗪及其代谢物可诱发肾小球肾炎炎症细胞浸润，表现出毒性作用<sup>9)</sup>。

此外，在本研究中观察到的氯喹及其代谢物可能通过增加脂质过氧化和降低抗氧化酶活性而与肾损伤相关<sup>10)</sup>。但是，还需要通过进一步的研究来确认这些蓄积药物及其代谢物在观察到的特定肾脏区域的具体毒性作用。

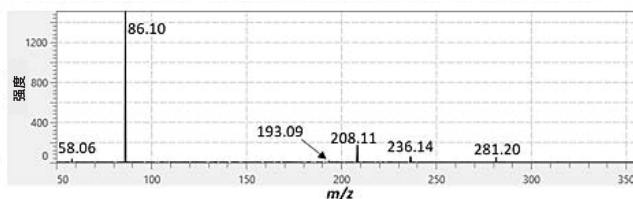
(A) 丙咪嗪、氯喹及其可能的碎片图谱



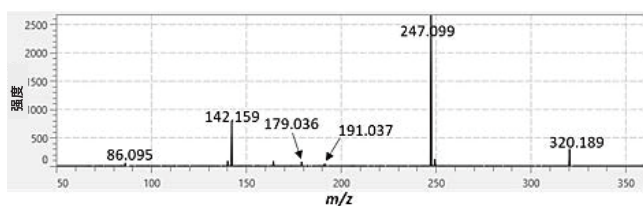
(B) 标准丙咪嗪的MS<sup>2</sup>质谱图



(C) 在小鼠肾脏中检测到的丙咪嗪的MS<sup>2</sup>质谱图



(D) 标准氯喹的MS<sup>2</sup>质谱图



(E) 在小鼠肾脏中检测到的氯喹的MS<sup>2</sup>质谱图

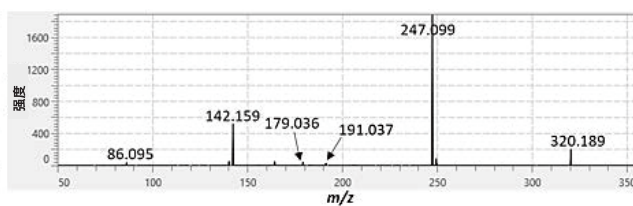
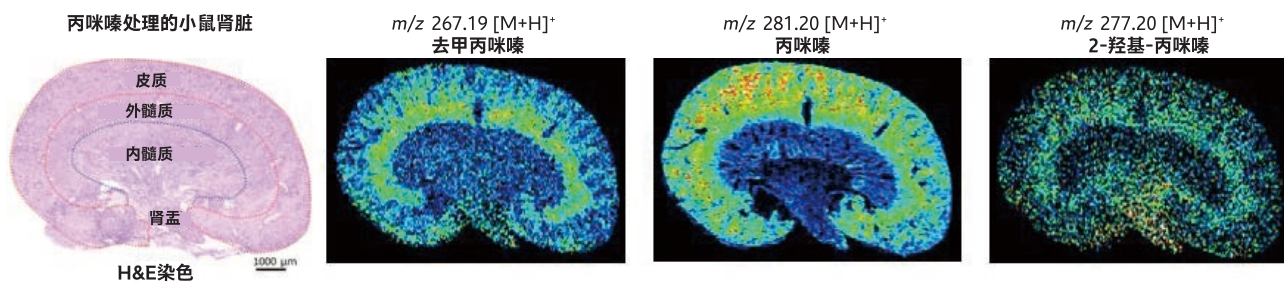


图5 使用iMScope QT在药物标准品及给药小鼠肾脏中检测到的丙咪嗪和氯喹的MS/MS谱图

- (A) 丙咪嗪和氯喹可能的碎片模式
- (B-C) 在药物标准品及给药小鼠肾脏中检测到的丙咪嗪的MS/MS谱图
- (D-E) 在药物标准品及给药小鼠肾脏中检测到的氯喹MS/MS谱图

(A) 在小鼠肾脏中检测到的丙咪嗪及其代谢物



(B) 在小鼠肾脏中检测到的氯喹及其代谢物

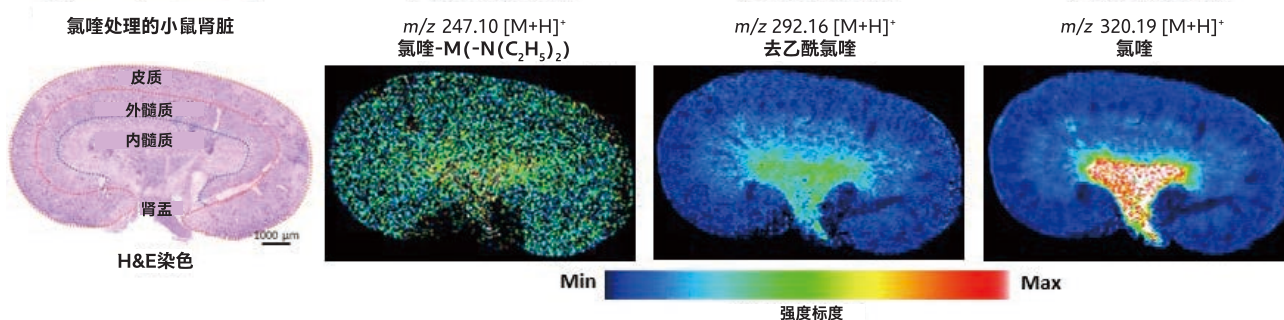
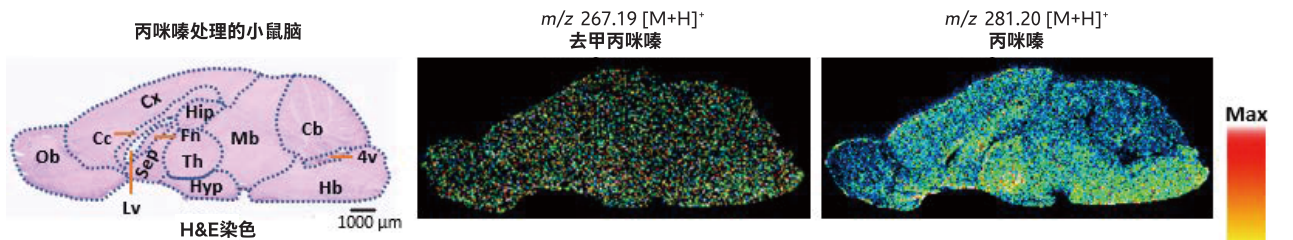


图6 使用iMScope QT分析给药小鼠肾脏中的丙咪嗪、氯喹及其代谢物的分布

- (A) 给药小鼠肾脏中的丙咪嗪及其代谢物的分布
  - (B) 给药小鼠肾脏中的氯喹及其代谢物的分布
- 空间分辨率50 μm、分析速度8像素/秒

(A) 在小鼠脑中检测到的丙咪嗪及其代谢物



(B) 在小鼠脑中检测到的氯喹及其代谢物

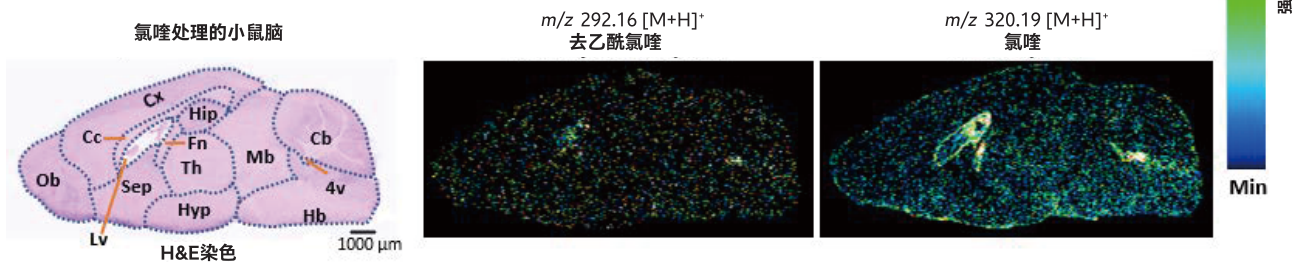


图7 使用iMScope QT分析的给药小鼠大脑中的丙咪嗪、氯喹及其代谢物的分布

(A) 给药小鼠大脑中的丙咪嗪及其代谢物的分布

(B) 给药小鼠大脑中的氯喹及其代谢物的分布

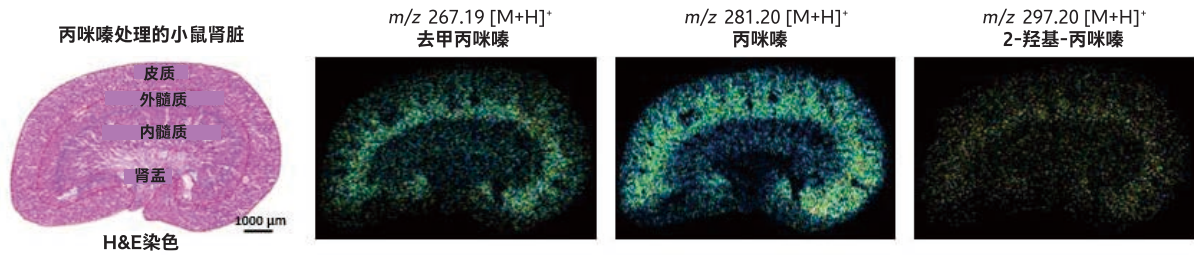
空间分辨率50μm、分析速度8像素/秒

Cb:cerebellum (小脑); Hb:hindbrain (后脑); Mb:midbrain (中脑); Hip:hippocampus (海马体); Cx:cerebralcortex (大脑皮层); Th:thalamus (丘脑); Fn:fornix (穹隆); CC:corpuscallosum (胼胝体); Ob:olfactorybulb (嗅球); Sep:septum (脑中隔); Hyp:hypothalamus (下丘脑); Lv:lateralventricle (侧脑室); 4v:4thventricle (第四脑室)

研究中使用iMScope QT分析了丙咪嗪、氯喹及其代谢物在小鼠大脑中的分布。在整个大脑中均观察到了丙咪嗪及其代谢物，但在给药小鼠的thalamus (丘脑)、hypothalamus (下丘脑)、septum (脑中隔)和hindbrain (后脑)观察到了数量略多的丙咪嗪 (图7A)。丙咪嗪常用于焦虑和抑郁症的治疗。根据此前的报告，这些在脑区蓄积的丙咪嗪可能会抑制5-羟色胺和去甲肾上腺素的再摄取，缓解焦虑和抑郁症状<sup>11)</sup>。研究还证实了氯喹及其代谢物在给药小鼠大脑的lateral ventricle (侧脑室)、4th ventricle (第四脑室)、以及fornix (穹隆)中的大量蓄积 (图7B)。lateral ventricle (侧脑室)和4th ventricle (第四脑室)的脉络丛产生脑脊液，对维持中枢神经系统的平衡中发挥着重要作用<sup>12)</sup>。

调节大脑和颅腔的容积，清除代谢废物和无用物质，并输送蛋白质、营养物质和药物<sup>12)13)</sup>。作为白质纤维束的fornix (穹隆)通过连接大脑边缘回路的几个节点，在认知功能中发挥着重要作用<sup>14)</sup>。丙咪嗪及其代谢物会增加小胶质细胞的炎性细胞因子 (IL1-β及TNF-α)和一氧化氮的产生<sup>5)</sup>。已知氯喹及其代谢物具有精神病发作、定向障碍、幻觉等的神经毒性作用<sup>4)</sup>。丙咪嗪和氯喹均有可能引起神经毒性，因此，本研究中观察到的上述药物及其代谢物在不同脑区的蓄积可能参与了这些区域的神经毒性作用和功能的破坏。今后还需要进一步研究，以探索这些蓄积的药物以及相关的药物代谢产物对脑功能和健康的具体影响。

(A) 在小鼠肾脏中通过iMScope QT快速检测丙咪嗪及其代谢物



(B) 在小鼠肾脏中通过iMScope QT快速检测到的氯喹及其代谢物

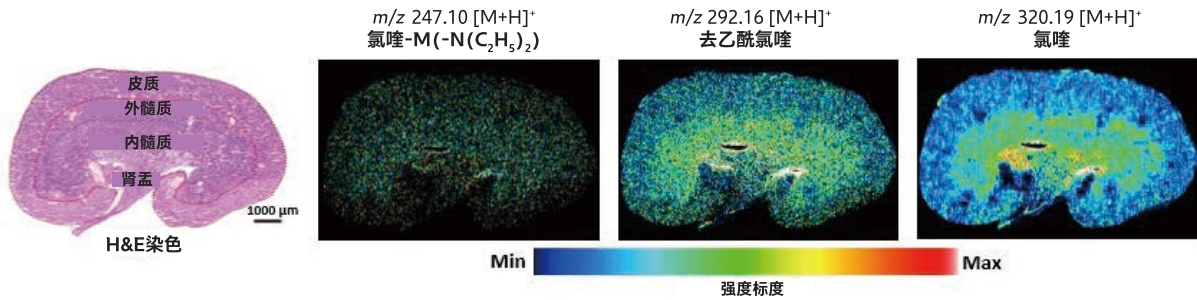


图8 使用iMScope QT分析给药小鼠肾脏中的丙咪嗪、氯喹及其代谢物的高空间分辨率定位分布

(A) 以高分析速度分析的丙咪嗪及其代谢物在小鼠肾脏中的分布

(B) 以高分析速度分析的氯喹及其代谢物在小鼠肾脏中的分布

空间分辨率25 μm、分析速度8像素/秒

本研究还发现，使用新开发的iMScope QT以20像素/秒高速获取数据对灵敏度没有太大影响。因此，我们尝试用iMScope QT，以更高的分析速度（32像素/秒）和高空间分辨率（25 μm × 25 μm）进行丙咪嗪、氯喹及其代谢物的可视化分析。在该分析速度和高空间分辨率下，检测到了大部分药物及其代谢物在给药的鼠肾脏中的清晰分布（图8）。结果表明，这款MSI仪器可以成为对药物、代谢物和其他分析成分进行高空间分辨率快速成像的良好选择。但是，本次实验中只使用了丙咪嗪和氯喹两种药物进行测试，对于某些化合物，MALDI-MSI和DESI-MSI在灵敏度方面可能有所差异。

#### 4. 结论

通过使用名为iMScope QT的AP - MALDI - MSI仪器，首次阐明了丙咪嗪、氯喹及其代谢物在小鼠肾脏及大脑中的分布。研究结果可能有助于探索这些药物的作用机制和毒理学特性。展现了iMScope QT对生物样本中目标成分进行快速成像分析的能力。

#### 致谢

衷心感谢岛津制作所的笠松乡志先生和绪方是嗣先生对iMScope QT的技术支持和指导。

## &lt; 参考文献 &gt;

- 1) Buchberger, A.R.; DeLaney, K.; Johnson, J.; Li, L. Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights. *Analytical chemistry* 2018, 90, 240.
- 2) Harada, T.; Yuba-Kubo, A.; Sugiura, Y.; Zaima, N.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Wakui, M.; Suematsu, M.; Takeshita, K.; Ogawa, K. Visualization of volatile substances in different organelles with an atmospheric-pressure mass microscope. *Analytical chemistry* 2009, 81, 9153-9157.
- 3) Jackson, S.N.; Muller, L.; Roux, A.; Oktem, B.; Moskovets, E.; Doroshenko, V.M.; Woods, A.S. AP-MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides using 2, 6-dihydroxyacetophenone. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 2018, 29, 1463-1472.
- 4) Doyno, C.; Sobieraj, D.M.; Baker, W.L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clinical Toxicology* 2021, 59, 12-23.
- 5) Obuchowicz, E.; Bielecka-Wajdman, A.; Zieliński, M.; Machnik, G.; Golyszny, M.; Ludyga, T. Imipramine and venlafaxine differentially affect primary glial cultures of prenatally stressed rats. *Frontiers in Pharmacology* 2020, 10, 1687.
- 6) Islam, A.; Takeyama, E.; Mamun, M.A.; Sato, T.; Horikawa, M.; Takahashi, Y.; Kikushima, K.; Setou, M. Green nut oil or DHA supplementation restored decreased distribution levels of DHA containing phosphatidylcholines in the brain of a mouse model of dementia. *Metabolites* 2020, 10, 153.
- 7) Islam, A.; Sakamoto, T.; Zhai, Q.; Rahman, M.M.; Mamun, M.A.; Takahashi, Y.; Kahyo, T.; Setou, M. Application of AP-MALDI Imaging Mass Microscope for the Rapid Mapping of Imipramine, Chloroquine, and Their Metabolites in the Kidney and Brain of Wild-Type Mice. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1314.
- 8) Pazhayattil, G.S.; Shirali, A.C. Drug-induced impairment of renal function. *International journal of nephrology and renovascular disease* 2014, 7, 457.
- 9) Chang, G.-R.; Hou, P.-H.; Wang, C.-M.; Lin, J.-W.; Lin, W.-L.; Lin, T.-C.; Liao, H.-J.; Chan, C.-H.; Wang, Y.-C. Imipramine Accelerates Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Renal Impairment, Diabetic Retinopathy, Insulin Resistance, and Urinary Chromium Loss in Obese Mice. *Veterinary sciences* 2021, 8, 189.
- 10) Murugavel, P.; Pari, L. Attenuation of Chloroquine - Induced Renal Damage by  $\alpha$  - Lipoic Acid: Possible Antioxidant Mechanism. *Renal failure* 2004, 26, 517-524.
- 11) Yang, J.; Hellerstein, D.J.; Chen, Y.; McGrath, P.J.; Stewart, J.W.; Peterson, B.S.; Wang, Z. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant effects on regional connectivity of the thalamus in persistent depressive disorder: evidence from two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Brain communications* 2022, 4, fcac100.
- 12) Wichmann, T.O.; Damkier, H.H.; Pedersen, M. A Brief Overview of the Cerebrospinal Fluid System and Its Implications for Brain and Spinal Cord Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience* 2021, 15.
- 13) Matsumae, M.; Sato, O.; Hirayama, A.; Hayashi, N.; Takizawa, K.; Atsumi, H.; Sorimachi, T. Research into the physiology of cerebrospinal fluid reaches a new horizon: intimate exchange between cerebrospinal fluid and interstitial fluid may contribute to maintenance of homeostasis in the central nervous system. *Neurologia medico-chirurgica* 2016, 56, 416-441.
- 14) Senova, S.; Fomenko, A.; Gondard, E.; Lozano, A.M. Anatomy and function of the fornix in the context of its potential as a therapeutic target. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020, 91, 547-559.

岛津应用云



iMLayer、iMScope 和 LCMS 是岛津制作所株式会社或其相关公司在日本及其他国家 / 地区的商标。

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：2023年09月