

基质辅助激光解吸电离质谱用于生物组织的质谱成像应用进展

张莹, 陆豪杰, 杨芃原

(复旦大学化学系和生物医学研究院, 上海 200032)

摘要: 基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI MS)用于分析组织切片已成为质谱学的一个新领域。质谱成像技术通过直接对组织切片表面的质谱扫描,可以快速直观地分析组织中的分子,如蛋白质、多肽、药物分子、代谢产物等及其空间分布信息。本工作综述了组织切片的质谱成像原理,方法学和相关应用。

关键词: 质谱成像; 基质辅助激光解吸电离; 质谱; 生物组织

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)04-0250-07

Recent Developments in Profiling and Imaging of Molecules from Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry

ZHANG Ying, LU Hao-jie, YANG Peng-yuan

(Department of Chemistry and Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI MS) for tissue section analysis is a new area in mass spectrometry. Profiling and imaging molecules directly from thin tissue sections by MALDI MS permit sensitive and rapid analysis of compounds including proteins, peptides, drug and metabolic product as well as afford their spatial distribution. This paper reviews the principle of profiling and imaging mass spectrometry, methodology and recent applications.

Key words: imaging mass spectrometry; matrix assisted laser desorption ionization (MALDI); mass spectrometry; tissue section

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的原理是用激光照射样品与基质形成共结晶,基质从激光中吸收能量传递给生物分子,使生物分子电离,离子在电场作用下飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同而被检测,测定离子的质荷比与离子的飞行时间成正比^[1-2]。MALDI-TOF MS 具有灵敏度

高、准确度高及分辨率高等特点,为生命科学,特别是蛋白质组学等领域提供了一种强有力的分析测试手段^[3-4]。

近年来,质谱成像技术作为质谱技术中的一个新领域迅速发展,它通过对生物组织表面直接进行质谱扫描和分析,将扫描产生的离子信号通过数据处理与图像重建技术结合,能够确定病变

收稿日期: 2009-02-12; 修回日期: 2009-05-25

基金项目: 国家自然科学基金(20875016 和 30672394), 上海市重点学科(B109), 上海市青年科技启明星计划(06QA14004), 上海市曙光计划和教育部新世纪优秀人才支持计划资助

作者简介: 张莹(1983~), 女(汉族), 安徽滁州人, 博士研究生, 从事蛋白质组分离分析新技术研究。E-mail: mocca.zh@gmail.com

通信作者: 陆豪杰(1974~), 男(汉族), 江苏南通人, 教授, 从事蛋白质组分离分析新技术研究。E-mail: luhaojie@fudan.edu.cn

组织和正常组织中不同部位的特定分子位置及相对含量,能够跟踪药物及其代谢产物的空间分布等,在了解组织病理特征、疾病诊断、药物疗效及发现生物标志物和疾病预后评估等临床应用中扮演着越来越重要的角色^[5-12]。本工作概述了 MALDI 质谱用于组织成像的原理,方法学以及该技术的应用研究。

1 MALDI 组织成像原理和特点

MALDI 组织成像的一般过程首先在低温环境下,将组织切片粘附于 MALDI 靶板上,基质覆盖于组织表面,基质与组织切片中的被分析物在原位形成共结晶。随后,将靶板直接送入质谱进行检测。质谱仪对被定义的组织表面区域扫描并采集离子信息,包括该信息采集点的坐标、组织表面各组分产生的离子质荷比以及各组分离子的强度信息。这些信息通过专门的图像分析软件处理后,即可获得该区域各个组分的“二维离子分布图”,组分在每个点上的相对量(以峰强度或峰面积定义)可用亮度强弱或不同颜色来表示。根据在被分析区域内取点的不同

可以将质谱成像分为两大类:一是在组织表面选取不连续的点(通常随机选取 10 多个点),对选取的点进行质谱分析,称为 Profiling MS;另一类是对组织切片进行连续分析(通常以 30~150 μm 为直径的连续像素),将获得连续的二维分布图,通过三维重建技术即可获得组分在组织中的空间分布图,称为 Imaging MS^[8]。质谱成像方法流程示于图 1。从 MALDI 质谱组织成像原理和技术流程可以看到, MALDI 质谱成像具有以下特点^[13-14]: 1) 无需事先知道所研究疾病或药物相关生物分子的信息,且不局限于特异的一种或者几种分子,它可在组织切片中找到多种分子,并提供这些分子在组织中空间分布的精确信息; 2) 可对被检测到的分子含量进行简单的定量,为寻找、阐明和鉴定重要分子标记物等提供了更快速的分析结果以及可视化结果; 3) 通过组织样品以扫描的模式捕获谱图并形成图像,获得图像不需要对组织中的生物分子进行体外标记或染色,操作方便、简单; 4) 可直接以组织切片或细胞(细胞团)进行分析,具有较高的兼容性。

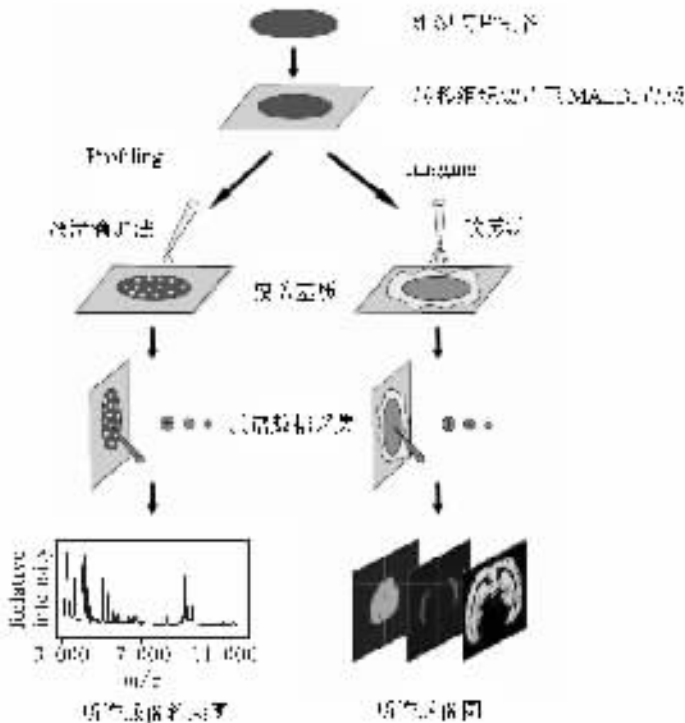


图 1 质谱成像技术的流程图

Fig. 1 Steps involved in profiling and imaging MS of tissue samples

2 MALDI 组织成像中的关键技术

MALDI 组织成像中的关键技术主要包括以下 4 个部分:组织切片的制备,基质的选择和点覆,质谱分析方法,数据统计及处理。能否取得高灵敏度,稳定性好的质谱信号,直接取决于样品的制备和相关质谱技术的发展^[15]。

2.1 组织切片的制备

组织切片制备的过程需要保证切片质量的稳定性和准确性、组织表面分子空间分布的完整性等,不当的操作过程或不合适的组织保存方式会引起组织表面分子的降解或者移位。如获得的组织样本如何保存、切片制备时的温度、切片的厚度和如何将切片转移到质谱靶板上等,都需要通过实验来摸索。通常,从活体获得的组织取出后,迅速的用纯水冲洗掉表面血,立即用铝箔纸轻轻的包裹,放入液氮中保存。如果需要进一步长期保存,则可将其放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。组织在冰冻切片机中进行切片处理,冰冻切片机的操作温度一般控制在 $-5\sim-25\text{ }^{\circ}\text{C}$,此时冷冻组织硬度适宜,对大多数标本来说容易切出满意的切片。但纤维组织多且致密者或富含脂肪组织者,该温度下的组织硬度可能不够,无法切出完整的切片或切出的切片出现皱折,通常需要较低的温度以保证组织原来的形貌,从而保证切片的质量。切片的厚度非常重要,稍厚的切片易于进行切片操作,但覆盖基质后不容易干燥;而较薄的切片尽管容易干燥,但在切片制作过程中却比较难以操作。因此,通常的切片厚度是 $10\sim 20\text{ }\mu\text{m}$,大约是哺乳动物单个细胞的直径,这样既相对容易操作和干燥,也可以保证大多数的细胞被切开,将胞内的主要部分暴露出来。制备好的切片可以用多种方式转移到质谱的靶板上,在转移切片的过程中,需要保证切片本身的形貌,避免不当操作引起的切片划痕、破裂、卷曲等。最常见的是先将 MALDI 靶板在冰冻切片机中预冷,切片一旦切割下来后,立即用刷子转移到预冷好的靶板上;另一种方法是将切片转移到极薄的盖玻片上,然后将盖玻片用导电胶带粘在 MALDI 靶板上。这两种方法在切片过程中产生的细小冰晶可同时被转移到靶板或盖玻片上,不容易引起水溶性蛋白的丢失。此外,由于在传统组织染色过程中,会引入如琼脂或聚合物等易在质谱中产生离子信号的物质,染色过的切片一般不用于组织成像技术。由于石蜡切片也会引入易在质

谱中产生离子信号的物质,且操作过程比较复杂,一般用于组织成像技术的切片是冷冻切片,但近年来也有文献报道,可以将石蜡切片用于组织成像,为组织成像技术开拓了新的领域^[16]。

2.2 基质的选择和覆盖方式

基质的选择是 MALDI 实验成功的关键,在实验中选择何种基质进行样品分析依赖于所分析的样品(如样品的种类、质量大小及性质等等),另外,使用的溶剂也会影响基质的表现行为。选择合适的基质体系对于直接组织分析,获得高质量、高灵敏的图谱显得尤为关键,需要满足的基本条件有:基质能与组织表面分子形成良好的共结晶;能提供目标分子的高效离子化能力。以蛋白质等大分子为分析对象时,常用 Sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, SA)作为基质,而在分析多肽类小分子时,常用 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA),针对组织表面的药物小分子或外源性代谢小分子等的分析,也有研究者选用 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)等作为基质。此外,对基质体系进行优化可以改善结晶状况,使样品有效解吸电离,增强质谱信号,进而提高分析灵敏度、分辨率和重复性等。如 Schwartz 等^[15]对基质体系的溶剂进行考察,以 SA 为基质,改变基质溶剂,使其中的有机溶剂分别为 30%、50% 和 70% 时,发现当溶剂中含 50% 有机相时组织表面的结晶更加均匀;同样以 SA 为基质,改变有机溶剂的组成,如乙醇、甲醇、乙腈等,发现当有机相为乙醇时,可以得到更均匀的结晶和更强的信号。另外,考察基质体系中三氟乙酸(TFA)的浓度发现,TFA 的含量在 0.3%~1.0% 之间,较有利于组织表面分子的离子化。总的来说,基质的选择和优化都需要根据实际要分析的组织和分析的目标分子来进行更进一步的优化和选择。

另一个需要考虑的因素是基质在组织切片表面的覆盖方式,需要保证组织切片上的被分析物分子无扩散或移位现象,合适的基质覆盖方式是直接从组织表面获得高质量图谱的重要保证^[17-18]。通常基质覆盖方式可分为两类,一是在组织表面选定的微小区域上用枪头或者自动点样系统点覆基质,基质上样量约在数十个纳升左右,得到的基质斑点尺寸约在几十个微米左右,这样的基质点覆方式所对应的一般是 Profi-

ling MS,关注的是组织某些特定区域内的物质信号,得到的是低像素的组织成像图,或者说组织成像轮廓图,可以用于快速比较疾病和正常组织间的差异;另一种是在组织表面所有区域均覆盖上基质,通常以喷雾或者化学打印机的方式将基质喷涂在组织切片表面,对应的是 Imaging MS。喷雾法在喷雾和干燥反复循环的条件下操作,每次喷雾达到刚好润湿切片的效果,待干燥后再进行下一轮喷雾,共循环 10 次左右。高质量的组织成像图像需要保证覆盖在组织表面的基质连续均匀一致,这样激光按照软件设定的步长值,以逐行扫描的模式记录下组织表面每个点的信息,并将特定的 m/z 信号在组织表面的分布及强度信息最终以空间成像的方式表现出来。成像的分辨率一般主要受基质结晶的尺寸和激光的光斑尺寸两个因素共同影响,当基质结晶的尺寸大于激光光斑的尺寸时,需要设置相对较大的扫描步长以保证足够多的基质和样品结晶被扫描;当基质结晶的尺寸小于光斑尺寸时,需要设置较小的扫描步长,此时分辨率是由激光光斑的直径决定^[19]。其他的基质点覆技术还有“大液滴滴加法 (large droplet)”、“电喷雾喷涂法 (electrospray deposition)”或“浸润法 (immersing)”等,根据实际的需要采取不同的基质覆盖方法有利于得到需要的分析结果。

2.3 质谱分析方法

质谱分析方法是组织成像技术的核心,对组织表面进行直接的质谱分析不同于常规质谱分析,会遇到更多的挑战。如在组织成像实验中,组织表面的蛋白或者其他分子未经过分离,组织表面生理条件下存在的盐类及其他小分子等会对质谱分析产生干扰;或者随着被测分析物的相对分子质量增加,质谱的灵敏度和精确度会有一定程度的减弱,这要根据实际样品的需要对质谱条件进行优化。另外,离子抑制效应作为一种常见的质谱现象,在组织成像分析中尤其需要注意。当血红蛋白的丰度较高时,常常会抑制其他分子质量与之相近的分子的信号,一般可以通过尽量使组织切片在制备时就避免和体内血液接触,以避免血红蛋白的干扰;但当血红蛋白处于相对低量时,可以用来作为内标对质量数进行校正^[15]。

质谱分析方法的优化主要通过以下几种方式进行:1) 质量扫描范围。将质量扫描范围设

定成较小的区域或者进行分段扫描,或者将反射式模式和线性模式相结合等,可以使得目标分子信号更容易检出且具有较高的分辨率和精确度;2) 栅电压及脉冲延迟时间。如检测高分子质量范围(20 000~100 000)时,可以设定相对较低的栅电压(87%~92%)和较长的脉冲延迟时间(200~800 ns);3) 激光强度。根据被分析对象和所选择的基质,调解合适的激光强度,可以获得相对较高信噪比的信号,且尽量保证在激光辐照下不造成易碎裂的分子碎裂;4) 谱图累积数。在 Profiling MS 中,一般每个谱图由 250~750 个亚谱组成,而在 Imaging MS 中,由于扫描区域的基质较薄及基质和样品的结晶含量较少,一般每个图谱由 30~200 个亚谱组成。5) 扫描步长。在 Imaging MS 中,需要根据实际需要来设定扫描的步长,通过扫描步长的设定将组织切片表面划分成类似于一个个像素的微小区域,通常的扫描步长约为 100~200 μm 左右,较小的扫描步长值容易得到高质量的成像图,但分析时间较长。以上因素需要综合考虑,以获得更高质量的质谱图和成像图。

2.4 数据统计及处理

在质谱分析过程中,首先根据组织切片的大小设定激光的扫描区域并将其均分为二维点阵,然后设置好自动扫描参数,如激光强度、扫描模式等,由质谱系统自动采集数据。这样的质谱成像直接分析组织切片的过程会获得海量数据,需要经过统计学的计算及处理,找到组织的特征峰或者差异峰以鉴定目标分子。统计学分析主要包括:1) 选择组织中重要的差异分子^[20-21],即采用 KW (Kruska-Wallis) 检验、Fisher 精确检验、微矩阵显著性分析 (significance analysis of microarrays, SAM)、基因加权分析 (weighted gene analysis, WGA) 等方法进行显著性分析,需要根据选取的不同算法设置不同的阈值 (cut-off) 确定差异,如对于 KW 检验通常设置的阈值为 $p < 0.000 1$ 。2) 用“多重统计加权复合协变量方法 (weighted flexible compound covariate method, WFCCM)”^[22] 建立分类预测参数和分类预测模型。3) 用 WFCCM 建立的预测参数分析未知组织,对测试标本进行盲法分析和预测;4) 运用“凝聚层次聚类算法 (agglomerative hierarchical clustering algorithm)”^[23] 研究这些显著性差异蛋白质的模式和生物学评价。

数据处理的另一方面是建立三维成像图。所获得的质谱数据均由质谱数据分析处理软件自动标峰,并生成该切片的全部“峰值列表”文件。成像软件读取“峰值列表”文件,给出每个质荷比在全部质谱图中的命中次数(Hits值)。再根据“峰值列表”文件对应的二维点阵坐标绘出该峰的分布图,即组分的二维分布图。对于某一个质谱峰,软件给峰强最强和最弱的区域分别定义不同的颜色(如红色和黑色),其他区域的该峰强度则表现为二维点阵中颜色深浅不同的点,由这些点组成的图像即为质谱图像(mass spectrometry image)。

3 MALDI 组织成像的应用

MALDI 质谱组织成像技术最早于 1997 年由 Vanderbilt 大学医学院质谱研究中心主任 Richard Caprioli 博士和同事率先提出^[24]。质谱成像技术目前已广泛应用于生命科学各个研究领域,在临床蛋白质组学研究中,MALDI 组织成像能够在组织中研究潜在生物标志物的空间分布以及表达的上调或下调,在诊断、癌症病程监控、外科切除有效性评价中具有重要价值。如在药物研发过程中,当药物被用于疾病组织,可跟踪特定药物在组织中的空间分布,揭示化合物是如何在不同组织中发挥作用的。

以差异蛋白质和找寻生物标志物为研究目的开展了大量工作并取得了一定进展。Caprioli 等^[8]研究小组对大鼠脑组织的冠状面切片进行了分析,主要包括大脑皮质、胼胝体以及纹状体,发现 m/z 18 412 的蛋白仅出现在胼胝体区域,而 m/z 6 720 的蛋白在纹状体中丰度最高,实现了从复杂样本中快速找到特异性蛋白并进行空间定位。Yanagisawa 等^[25]研究小组利用质谱成像技术从一块直径 1 mm 的肺组织切片上得到了 1 600 多个蛋白质的质谱峰,并从中找到了 15 个癌症相关特征峰,发现了不同肺癌亚型组织中特定的差异信号,并建立预测模型对盲样肺组织亚型进行分类,平均准确率达到 95%。Chaurand 等^[26]研究小组对小鼠附睾的质谱成像实验在 400 多个蛋白中发现 50 余种蛋白具有空间分布的特征性,并且获得了它们的半定量信息。Schwartz 等^[27]对人的神经胶质瘤组织切片进行质谱成像分析,不但能够与正常人区分开,还能将 IV 型神经胶质瘤同 II 型、III 型有效区分。

Rohner 等^[28]对老年痴呆症患者的脑组织进行质谱成像分析,发现 m/z 4 330.9 的多肽集中分布于颅顶骨、枕骨的皮质突出部; m/z 4 515.1 的多肽集中分布于海马区域,与正常组织成像相比具有明显的空间特异性分布。进一步鉴定这两种蛋白发现,它们都为 β 淀粉样多肽,其中 m/z 4 330.9 为 $A\beta$ -(1-40) 多肽; m/z 4 515.1 为 $A\beta$ -(1-42) 多肽。而老年痴呆症的病理特征之一是在脑内出现老年斑和血管壁上出现 β 淀粉样蛋白的沉积物,该研究结果进一步证实了老年痴呆症的 $A\beta$ 发病机制。Chaurand 等^[29]还利用质谱成像技术监测小鼠前列腺癌的发生发展过程,考察小鼠前列腺癌的发生发展期的不同时间节点,发现前列腺癌的产生会导致 probasin 蛋白和精胺结合蛋白的减少。刘念等^[30]将该技术用于高功率微波辐射后大鼠海马的蛋白组分析,获得了正常和微波辐射后大鼠海马组织质谱图像,统计分析表明,差异分子 199 个,其中上调 194 个,下调 5 个,这些差异分子的发现对于明确微波辐射致伤效应和致伤机理具有重要意义。张莹等^[31]采用质谱成像技术对非小细胞肺癌病人的癌组织和癌旁组织用正离子反射式和线性模式分别进行质谱扫描,发现癌组织在 m/z 3 000~3 500 范围内有特征簇峰出现。除了大部分集中在蛋白质差异方面的研究外,以磷脂或脂类等小分子差异方面为研究目标也开展了部分工作。Jackson 等^[32]以大鼠脑组织为研究对象,得到了在鼠脑组织中大量存在的几种分子卵磷脂(PC 32:0 和 PC 34:1)、神经鞘磷脂(SM 18:0)及空间分布。Jackson 等^[33]以大鼠的小脑为研究对象,发现 15 种磷脂类分子,10 种磺胺类分子和 7 种神经节苷脂分子。

还有部分工作以考察药物小分子等在体内的吸收代谢分析为目的。Bunch 等^[34]利用此技术检测经洗发香波“里素芳”孵育的猪表皮组织中活性成分酮康唑的分布,发现它能有效地穿透入真皮层。同时选用钠加合物作为内标,构建表皮中酮康唑的定量分布谱,为临床控制用药量提供很好的标准。Skold 等^[35]应用 MALDI 质谱分子成像技术在小鼠模型中寻找帕金森病的生物标志物,与对照组小鼠相比,在给予甲基苯基四氢吡啶(MPTP)的小鼠纹状体中,Purkinje 细胞蛋白 4(PCP4)的水平显著降低,为帕金森病生物标志物的发现提供了线索。Hsieh 等^[36]应

用MALDI质谱分子成像技术研究“氟扎平”在大鼠脑组织中的分布和含量水平,发现该药分布于大鼠的全脑尤其外侧脑室,与用 ^3H 标记的“氟扎平”放射自显影技术发现的结果一致,质谱分子成像能够很好的将药物及其代谢物进行明确的区分。

4 展望

基质辅助激光解吸电离质谱用于组织成像技术是一种全新的分子成像技术,它不局限于特异的一种或者几种分子,它可在组织切片中同时找到多种分子,并提供这些分子在组织中空间分布的精确信息,同时可对这些蛋白质分子含量进行相对定量。大量的研究工作表明,MALDI在生物学基础研究方面的初步应用已经证明了它的实用价值。然而到目前为止,质谱成像技术还处于起步阶段,样品制备、质谱条件、数据处理等方面还需要进一步探索、改进和完善。如在样品制备过程中,要尽量选取均匀的切片,尽可能降低可溶性蛋白的移位等问题;在基质选择的过程中,要尽可能保证高效的离子化效率和降低背景干扰,在基质覆盖过程中保证均匀,形成足够的样品和基质结晶,减少分子移位等;在质谱条件方面,成像的分辨率和质谱采集时间等都需要进一步优化,以及仪器的分辨率、灵敏度和多级质谱功能等都有待提高;数据处理方面还需要更全面的统计软件,以比较组织样本间的差异分子和建立预测模型,用于实际的临床诊断分析结果上。随着质谱技术、蛋白质科学和生物信息学等生命科学关键领域的技术发展,质谱成像技术具有许多优于其他分子成像技术的独特优势,将有可能在功能基因组学、临床蛋白质组学、代谢组学、药物研发等方面发挥较大作用,有望成为生物标志物发现、药物发现和开发的常规工具。

参考文献:

- [1] KARAS M, BACHMANN D, HILLENKAMP F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules[J]. *Anal Chem*, 1985, 57(14): 2 935-2 939.
- [2] TANAKA K, WAKI H, IDO Y, et al. Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988, 2(8): 151-153.
- [3] AEBERSOLD R, GOODLETT D R. Mass spectrometry in proteomics[J]. *Chem Rev*, 2001, 101(2): 269-295.
- [4] AEBERSOLD R, MANN M. Mass Spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(6 928): 198-207.
- [5] PACHOLSKI M L, WINOGRAD N. Imaging with mass spectrometry[J]. *Chem Rev*, 1999, 99(10): 2 977-3 005.
- [6] STOECKLI M, CHAURAND P, HALLAHAN D E, et al. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues[J]. *Nature Med*, 2001, 7(4): 493-496.
- [7] CHAURAND P, SCHWARTZ S A, CAPRIOLI R M. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(5): 676-681.
- [8] CHAURAND P, SCHWARTZ S A, CAPRIOLI R M. Profiling and imaging of proteins in tissue sections by MS[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(5): 86-93.
- [9] CALDWELL R L, CAPRIOLI R M. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(4): 394-401.
- [10] CHAURAND P, NORRIS J L, CORNETT D S, 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.
- [11] MCDONNELL L A, HEEREN R M A. Imaging mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(4): 606-643.
- [12] GOODWIN R J A, PENNINGTON S R, PITT A R. Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2008, 8(18): 3 785-3 800.
- [13] 许彬, 魏开华, 张学敏, 等. 生物组织的基质辅助激光解吸电离质谱成像新进展[J]. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30(3): 189-192.
- [14] 刘念, 魏开华, 张学敏, 等. 临床质谱学的最新进展: 质谱成像方法及其应用[J]. *中国仪器仪表*, 2007, 10: 76-80.
- [15] SCHWARTZ S A, REYZER M L, CAPRIOLI R M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation[J]. *J*

- Mass Spectrom, 2003,38(7): 699-708.
- [16] LEMAIRE R, DESMONS A, TABEL J C, 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.
- [17] SUGIURA Y, SHIMMA S, SETOU M. Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for MALDI in imaging MS[J]. Anal Chem, 2006, 78(24): 8 227-8 235.
- [18] BALUYA D L, GARRETT T J, YOST R A. Automated MALDI matrix deposition method with inkjet printing for imaging mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2007, 79(17): 6 862-6 867.
- [19] JURCHEN J C, RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16(10): 1 654-1 659.
- [20] TUSHER V G, TIBSHIRANI R, CHU G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (9): 5 116-5 121.
- [21] HEDENFALK I, DUGGAN D, CHEN Y, et al. Gene expression profiles in hereditary breast cancer[J]. N Engl J Med, 2001, 344 (8): 539-548.
- [22] SHYR Y, KIM K M. Weighted flexible compound covariate method for classifying microarray data [A]. In: a practical approach to microarray data analysis[M]. Norwell, MA, USA: Kluwer Academic Publishers, 2003: 186-200.
- [23] EVERITT B S. Cluster analysis[M]. New York: Halsted Press, 1993: 278-279.
- [24] CAPRIOLI R M, FARMER T B, GILE J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS [J]. Anal Chem, 1997, 69(23): 4 751-4 760.
- [25] YANAGISAWA K, SHYR Y, XU B J, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in NSCLC[J]. Lancet, 2003, 362(9 382): 433-439.
- [26] CHAURAND P, FOUCHECOURT S, DAGUE B B, et al. Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry proteomics[J]. 2003, 3(11): 2 221-2 239.
- [27] SCHWARTZ S A, WEIL R J, JOHNSON M D, et al. Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (3): 981-987.
- [28] ROHNER T C, STAAB D, STOECKLI M. MALDI mass Spectrometric imaging of biological tissue sections[J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126 (1): 177-185.
- [29] CHAURAND P, RAHMAN M A, HUNT T, et al. Monitoring mouse prostate development by profiling and imaging mass spectrometry [J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(2): 411-423.
- [30] 刘念, 刘锋, 许彬, 等. 生物组织质谱成像方法的建立及其在微波辐射后大鼠海马组织的蛋白组分析中的应用[J]. 分析化学, 2008, 36 (4): 421-425.
- [31] 张莹, 陈岗, 陆豪杰, 等. MALDI 质谱成像技术在非小细胞肺癌中的应用研究[J]. 质谱学报, 2007, 28(4): 209-213.
- [32] JACKSON S N, WANG H Y J, WOODS A S, et al. Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion-mobility-TOFMS[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2005, 16(2): 133-138.
- [33] JACKSON S N, WANG H Y J, WOODS A S. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS [J]. Anal Chem, 2005, 77(14): 4 523-4 527.
- [34] BUNCH J, CLENCH M R, RICHARDS D S. Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(24): 3 051-3 060.
- [35] SKOLD K, SVENSSON M, NILSSON A, et al. Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse[J]. J Proteome Res, 2006, 5(2): 262-269.
- [36] HSIEH Y, CASALE R, FUKUDA E. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(6): 965-972.