

# 大鼠骨关节组织的敞开式质谱成像分析方法研究

朱时雨<sup>1</sup>, 李 婷<sup>1</sup>, 臧清策<sup>1</sup>, 张瑞萍<sup>1</sup>, 再帕尔·阿不力孜<sup>1,2</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;

2. 中央民族大学质谱成像与代谢组学国家民委重点实验室, 北京 100081)

**摘要:** 哺乳动物骨关节代谢异常与风湿性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎等多种疾病密切相关。因此, 研发适用于骨关节组织中代谢物可视化分析的质谱成像方法, 对于深入理解生理病理条件下骨关节组织不同微区的代谢特征具有重要意义。本文采用空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像 (airflow-assisted desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging, AFADESI-MSI) 技术, 以代谢物的检出数量、响应强度和成像效果为主要评价指标, 通过对骨关节组织样品切片制备方法、切片厚度和喷雾溶剂系统进行优化, 建立了大鼠骨关节组织的敞开式质谱成像分析方法。考察相邻的 6 张大鼠膝关节组织切片, 代表性代谢物响应强度的相对标准偏差均小于 20%, 表明该方法的重复性良好。进一步采用该方法对大鼠膝关节组织进行空间分辨代谢组学分析, 发现骨质中磷酸戊糖途径、乙醛酸和二羧酸酯代谢、TCA 循环等代谢通路更为显著; 骨髓中抗坏血酸代谢与嘌呤代谢通路更为显著; 软骨中精氨酸、脯氨酸代谢以及赖氨酸降解等氨基酸代谢通路更为显著。上述结果表明, 大鼠膝关节组织不同微区具有明显的代谢异质性。本文建立的 AFADESI-MSI 方法适用于大鼠骨关节组织分析, 为骨关节组织的代谢研究提供了可视化分析的技术手段。

**关键词:** 骨关节组织; 质谱成像 (MSI); 空间分辨代谢组学; 代谢异质性

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0739-09

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0103

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0103

## Development of an Ambient Mass Spectrometry Imaging Method for Rat Joint Tissues

ZHU Shi-yu<sup>1</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, ZANG Qing-ce<sup>1</sup>, ZHANG Rui-ping<sup>1</sup>, ABLIZ Zeper<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Key Laboratory of Mass Spectrometry Imaging and Metabolomics, State Ethnic Affairs Commission, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Metabolic abnormalities in mammalian joint tissues are closely linked to various diseases, including rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The variations of small molecule metabolites within bone joint tissues can affect cell proliferation, drive the secretion of inflammatory mediators, mediate leukocyte infiltration, and consequently induce synovial inflammation and cartilage damage. Therefore, the development of novel mass spectrometry imaging (MSI) methods for visualizing metabolites in joint tissues is crucial for comprehensively understanding the metabolic characteristics

of different microregions under both physiological and pathological conditions. In this study, an airflow-assisted desorption electrospray ionization (AFADESI)-MSI was used to establish an ambient MSI method for rat joint tissues. To ensure the effectiveness of the method, dynamic range, sensitivity, and imaging effect were selected as the primary evaluation criteria. The tissue preparation, section thickness, and spray solvent systems were systematically optimized. Compared to the AB glue transfer method, the tape adhesion method can obtain complete bone joint tissue sections and clearer images. A section thickness of 20  $\mu\text{m}$ , as opposed to 15  $\mu\text{m}$ , provides higher ion intensity in the  $m/z$  600-900 range. Among the tested spray solvent systems, compared with methanol-water (8:2,  $V/V$ ), acetonitrile-water (8:2,  $V/V$ ), and the acetonitrile-isopropanol-water (6:2:2,  $V/V/V$ ), the acetonitrile-isopropanol-water (4:4:2,  $V/V/V$ ) prove to be the most effective, detecting the highest number of metabolites and lipids when employed as the spray solvent. The precision of this method was evaluated on six adjacent rat knee sections under positive and negative ion modes, with the relative standard deviation (RSD) for the ion intensity of representative metabolites being less than 20%. Subsequently, this method was utilized for spatially resolved metabolomics analysis of rat knee tissues. A total of 613 metabolites are annotated in the overall knee tissues. Based on the optical images, the rat knee tissues were segmented into three microregions for bone, marrow, and cartilage. 452, 418, and 451 metabolites in these microregions are identified, respectively. In bone, the pentose phosphate pathway, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and the TCA cycle are more prominent. In bone marrow, ascorbate and purine metabolism pathways are more significant. In cartilage, arginine and proline metabolism, as well as lysine degradation, are more pronounced. These findings highlight significant metabolic heterogeneity across different microregions of rat knee joint tissues. Overall, this study develops an AFADESI-MSI method for in-depth profiling of metabolites within rat joint tissues, providing a powerful tool for *in situ* visualization of metabolites in metabolic studies of joint tissues.

**Key words:** joint tissues; mass spectrometry imaging (MSI); spatially resolved metabolomics; metabolic heterogeneity

骨骼是哺乳动物的重要器官,具有运动、保护、代谢和造血等多种功能<sup>[1]</sup>。骨关节是骨骼的连接部位,为肢体自由活动提供支持。风湿性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎等多种疾病会破坏骨关节结构,使其活动范围逐渐减小,从而导致骨关节功能的部分丧失<sup>[2]</sup>。X射线、计算机断层扫描(computed tomography, CT)和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等医学影像技术能够在形态学层面观察骨关节的状态,精确显示其变化<sup>[3]</sup>。然而,骨关节炎在引起软骨发生形态学改变之前,蛋白质、代谢物和多糖等多种生物分子含量均已发生改变<sup>[4]</sup>。其中,骨关节组织中的小分子代谢物,如氨基酸、葡萄糖和脂质等涉及能量代谢等多条代谢通路可能会影响细胞增殖,驱动炎性介质分泌,介导白细胞浸润,并且进一步诱导滑膜炎和软骨损伤<sup>[5]</sup>。因此,

针对骨关节中小分子代谢物进行原位可视化分析,对于深入理解生理病理条件下骨关节组织的代谢特征具有重要意义。

质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)是一种免标记,不局限于某种特定分子的新型分子成像技术,不仅可同时获得生物组织或细胞中多种分子的空间分布、相对含量及结构信息,还能够提供不同生理及病理过程中功能分子的动态变化与功能关联的信息<sup>[6]</sup>。基质辅助激光解吸电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI)和飞行时间二次离子质谱(time of flight secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)技术<sup>[7]</sup>已应用于骨和骨关节组织的质谱成像分析。其中,TOF-SIMS具有极高的空间分辨率,通常针对单细胞或组织的局部进行成像分析,可以分析骨关节组

织中的部分脂质类化合物<sup>[8]</sup>,并应用于骨质疏松症模型大鼠骨骼钙磷比的可视化分析<sup>[9]</sup>;MALDI-MSI技术可分析骨组织中的脂质类化合物<sup>[8,10]</sup>,对关节软骨和滑膜中生物大分子的表征具有明显优势<sup>[11]</sup>。目前,针对骨关节组织中氨基酸、糖类、核酸类物质等小分子代谢物的可视化分析仍面临着挑战,发展适用于骨关节组织中代谢物分析的高灵敏、高覆盖质谱成像方法是非常必要的。

空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像(airflow-assisted desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging, AFADESI-MSI)是本课题组自主研发的一种新型常压敞开式质谱成像技术<sup>[12]</sup>,可用于分析多种类型的生物样品,包括人和动物的心<sup>[13]</sup>、肝、脾、肺<sup>[14]</sup>、肾和脑等器官或肿瘤等组织<sup>[15-17]</sup>。与这些组织相比,骨关节组织最显著的特征是质地坚硬,且由骨质、肌肉、软骨和韧带等多个组织构成,各组织微区之间有较强的异质性,存在空腔使其连接不紧密,这些因素给骨关节组织的切片制备带来难度。

本研究拟建立一种骨关节组织中小分子代谢物分析的AFADESI-MSI方法,以大鼠膝关节为研究对象,以组织中代谢物的检出数量、响应强度和成像效果为主要评价指标,对骨关节组织切片制备方法、喷雾溶剂组成与配比进行优化,并将该方法应用于骨关节组织的空间分辨代谢组学研究,揭示骨关节组织不同微区的代谢特征。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

Q-Exactive 质谱仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;UlitiMate 3000 液相色谱仪:美国 DIONEX 公司产品;AFAI 离子源接口:自制,配有长度 50 mm,外径 4 mm,内径 3 mm 的离子传输管;高压电源(-10~10 kV):东文高压电源股份有限公司产品;MTS225 三维电控平移台:北京光学仪器厂产品;SC100 步进电机控制器:北京北光世纪仪器有限公司产品;CM1860 冷冻切片仪:德国 Leica 仪器有限公司产品;真空干燥器:中国上海越磁电子科技有限公司产品;真空抽气泵:美国 WELCH 公司产品;Microtek Digital 3480 扫描仪:中国上海中晶科技有限公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

乙腈、甲醇、异丙醇:均为色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;实验用水:杭州娃哈哈集团有限公司产品;羧甲基纤维素钠(CMC-Na):化学纯,国药集团化学试剂有限公司产品。

6 只健康雄性 SPF 级 SD 大鼠(许可证号:SYXK(京)2021-0050):购自北京维通利华实验动物技术有限公司;Superforst 防脱载玻片:美国 Eprexia 公司产品;环氧树脂 AB 胶:深圳蓝途新材料科技有限公司产品;Cryo-Gel 包埋胶:美国 Leica 公司产品;透明胶带:得力集团有限公司产品;载玻片(50 mm×75 mm×1 mm):宜兴德恩科技有限公司产品;双面胶:深圳东盛德意胶粘有限公司产品;橡胶滚轮:四川汇优美文化用品有限公司产品。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 大鼠骨关节组织切片的制备** 动物实验方案由中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会批准实施(No.00004876)。采用戊巴比妥钠腹腔注射处死大鼠,使用铡刀分离大鼠后肢,取大鼠膝关节并剥离肌肉组织,置于-80℃冷冻保存。配制 3% (w/V, g/100 mL) CMC-Na 溶液作为包埋剂,将冷冻的大鼠膝关节冠状面向上置于适宜模具中进行包埋。在-80℃环境下,使包埋剂低温凝固后剥离模具,将冷冻固体模块固定于切片机的样品架上进行冰冻组织切片。切片操作流程示于图 1,在-20℃环境中调整样品架角度进行粗切直至膝关节切面暴露。将适宜尺寸的透明胶带粘贴在膝关节组织表面,使用橡胶滚轮压平后,右手转动切片仪手柄,左手将胶带随着刀架的移动轻轻提起,完成切片。分别以 15、20 μm 厚度收取冰冻组织切片,一部分切片直接置于-80℃冷冻保存,另一部分切片紧贴于均匀涂布环氧树脂 AB 胶的载玻片上,使用橡胶滚轮按压平整,使组织与载玻片紧密贴合后置于-80℃静置 2 h 后取出,撕下透明胶带,将膝关节组织转移至载玻片上。在进行质谱成像分析前,将组织切片从-80℃冰箱中取出,置于-20℃环境中真空干燥 1 h,然后置于室温真空干燥 1 h。

**1.3.2 质谱成像数据的采集** 采用自主研发的常压敞开式 AFADESI-MSI 系统,设置喷雾



图1 大鼠骨关节组织切片操作流程

Fig. 1 Overview of rat joint tissue section preparation

电压 $\pm 7$  kV, 喷雾气体压强 0.7 MPa, 抽气流速 45 L/min. 喷雾溶剂系统为甲醇-水(8:2,  $V/V$ )、乙腈-水(8:2,  $V/V$ )、乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )和乙腈-异丙醇-水(6:2:2,  $V/V/V$ ), 喷雾流速 6  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 样品沿  $X$  轴移动速度 0.2 mm/s, 样品在  $Y$  轴移动间隔 0.2 mm. 采用正、负离子全扫描检测模式, 质量扫描范围  $m/z$  70~1 000, 离子源温度 350  $^{\circ}\text{C}$ , 分辨率 70 000, 最大进样时间 200 ms, 自动增益控制(automatic gain control, AGC)设为  $3 \times 10^6$ .

#### 1.4 数据处理

使用 Xcalibur(Thermo Fisher Science, USA) 将 Q-Exactive 质谱仪采集生成的 .raw 格式文件转换为 .cdf 格式文件. 使用 MassImager 软件重构质谱图像, 选择感兴趣区域(region of interest, ROI), 获得该区域的离子信号强度数据. 使用 MarkerView(SCIEX, USA) 进行峰对齐和同位素离子删除, 以及总峰面积归一化. 通过实验室自建的代谢物数据库和脂质数据库, 利用自动化工具 MSIannotator<sup>[18-19]</sup>(<https://github.com/Yingzhu96/MSIannotator>) 进行注释. 将检测到的离子汇总为 MSIdata 数据集, 利用 MSIannotator 将  $m/z$  实测值与数据库进行匹配, 质荷比容差设置为  $5 \times 10^{-6}$ , 对数据集进行快速注释. 更详细的代谢物注释流程参考文献[18-19]. 使用 SIMCA-P 14.1 软件(Umetrics, Sweden) 进行多变量统计分析, 寻找骨关节组织不同微区间的差异代谢物. 使用 MetaboAnalyst 6.0 进行代谢通路分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 大鼠骨关节组织切片制备方法的考察

**2.1.1 切片方法的考察** 以切片完整度、质谱成像效果和内源性代谢物离子信号强度作为评价指标, 考察胶带黏附和 AB 胶转移至载玻片 2 种切片方法. 光学图显示, 使用 AB 胶转移至

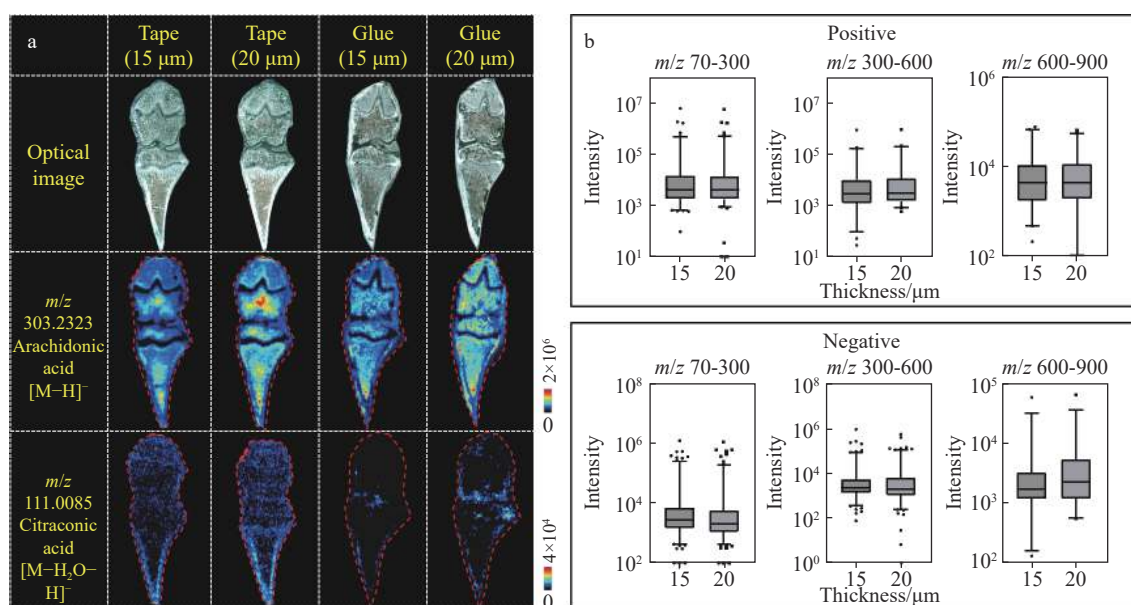
载玻片的切片完整度下降, 特别是骨质部分出现残缺和轮廓不清晰的现象, 并且随着切片厚度的增加变得更为严重, 示于图 2a. 骨质部分主要由骨细胞和大量钙化坚硬的细胞间质组成, 难以均匀地从胶带转移至载玻片上, 因此, AB 胶转移至载玻片的方法难以获得完整的骨关节组织切片. 质谱成像表明, 花生四烯酸(arachidonic acid)在大鼠膝关节组织中广泛分布, 针对花生四烯酸的质谱成像图能够对大鼠膝关节组织轮廓进行可视化表征. 此外, 在选用胶带黏附的大鼠膝关节组织切片进行成像分析时发现, 柠檬酸(citraconic acid)在骨质部分的离子信号强度较高, 有明显的微区异质性分布特征; 而在 AB 胶转移至载玻片的组织切片中, 由于组织切片转移不完整, 该代谢物的离子强度明显偏低. 因此, 本研究选择胶带黏附法进行大鼠骨关节组织切片的制备.

**2.1.2 切片厚度的考察** 本实验进一步考察了组织切片厚度对 AFADESI-MSI 的影响. 选择 15、20  $\mu\text{m}$  2 个厚度的切片, 根据检测到的离子质量大小不同, 将其分为  $m/z$  70~300、300~600、600~900 三个不同区间, 分别对不同区间内的离子强度进行统计分析. 结果表明, 在正离子模式下, 不同  $m/z$  区间的离子强度在 2 种厚度的切片中无明显差异; 而在负离子模式下,  $m/z$  600~900 区间的离子在 20  $\mu\text{m}$  切片中的强度整体略高于 15  $\mu\text{m}$  切片, 其余  $m/z$  区间的离子强度在 2 种厚度切片中无明显差异, 示于图 2b. 因此, 本研究选择 20  $\mu\text{m}$  作为制备骨关节组织切片的厚度.

### 2.2 喷雾溶剂系统的优化

根据化合物相似相溶的原理, 通过配制不同极性的喷雾溶剂对生物组织中不同极性的代谢物进行解吸, 以优化喷雾溶剂系统. 乙腈-水(8:2,  $V/V$ )是 AFADESI-MSI 分析最常用的喷雾溶





注: a. 胶带黏附(Tape)和AB胶转移至载玻片(Glue)2种切片制备方法在15、20  $\mu\text{m}$  厚度下的切片光学扫描图及代表性离子的质谱成像图; b. 15、20  $\mu\text{m}$  厚度切片在不同  $m/z$  区间成像分析获得的离子强度统计图

图2 样品切片方法优化的质谱成像及离子强度统计分析结果

Fig. 2 Results of MS images and ion intensity statistical analysis for cryosection method optimization

剂<sup>[20]</sup>,能够覆盖大多数内源性代谢物。骨关节组织中的软骨和骨髓2个微区含有丰富的脂类代谢物,本研究通过增加异丙醇含量降低喷雾溶剂极性,以期提高 AFADESI-MSI 对骨髓和软骨中脂质的检测能力。因此,选择甲醇-水(8:2,  $V/V$ )、乙腈-水(8:2,  $V/V$ )、乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )和乙腈-异丙醇-水(6:2:2,  $V/V/V$ )4种喷雾溶剂,考察不同溶剂组成和对比对骨关节组织中代谢物和脂质检出数量的影响。

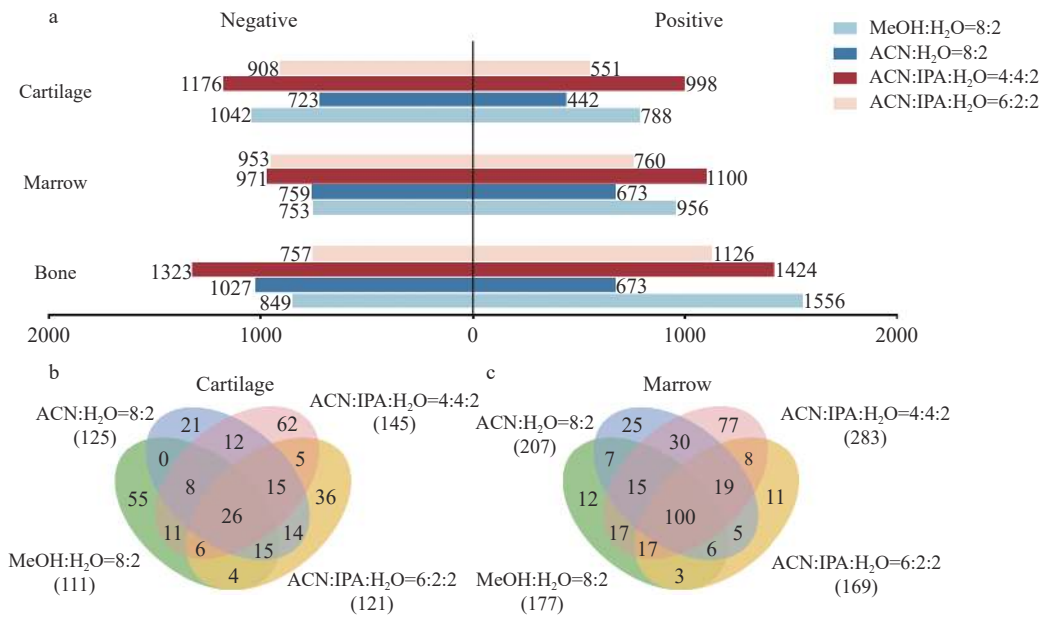
在正、负离子检测模式下,使用不同喷雾溶剂系统对相邻大鼠膝关节组织切片进行 AFADESI-MSI 分析,从得到的质谱成像图中圈选骨质、骨髓和软骨3个组织微区进行峰提取,并注释检测到的离子。对不同微区中4种喷雾溶剂检出的离子数量进行统计,结果示于图3a。在负离子模式下,使用乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )在软骨、骨髓和骨质中分别检测到1176、971和1323个离子,均优于其他3种溶剂配比;在正离子模式下,使用乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )在骨质中检测到1424个离子,略少于甲醇-水溶液(8:2,  $V/V$ )检测到的1556个离子,但在软骨和骨髓中分别检测到998和1100个离子,均优于其他3种喷雾溶剂系统。

另外,通过分析软骨和骨髓2个组织微区中

AFADESI-MSI 所检测到的脂质数量,进一步评价4种喷雾溶剂系统对脂质检测的影响,结果示于图3b、3c。在软骨组织中,以乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )为喷雾溶剂时,检测到数量最多的145个脂质,其中有62个脂质未在其他3个喷雾系统中检出。在骨髓组织中,以乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )为喷雾溶剂时,检测到数量最多的283个脂质,其中有77个脂质未在其他3个喷雾系统中检出。与其他3种喷雾溶剂相比,乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )系统中异丙醇含量最高,喷雾溶剂极性更低,在解吸代谢物的同时能够兼顾低极性脂质分子的解吸。综上,本研究选择乙腈-异丙醇-水(4:4:2,  $V/V/V$ )作为 AFADESI-MSI 分析骨关节组织的喷雾溶剂。

### 2.3 方法重复性考察

本实验分别在正、负离子检测模式下对6张相邻的大鼠膝关节组织切片进行 AFADESI-MSI 分析,在不同  $m/z$  范围内选择低、中、高离子强度的代表性内源性代谢物,考察和评价方法的重复性。在负离子模式下,以喹啉酸(quinolinic acid)、抗坏血酸(ascorbic acid)、泛酸(pantothenic acid)、花生四烯酸、硫酸胆固醇(cholesterol sulfate)、羟基脂肪酸脂肪酸酯(fatty acid esters of hydroxy fatty acids, FAHFA)O-36:3、磷脂酰



注: a. 在 3 个微区组织检测到的代谢物数量统计图; b. 在软骨中检测到的脂质数量韦恩图; c. 在骨髓中检测到的脂质数量韦恩图

图 3 不同喷雾溶剂系统下检测到大鼠膝关节组织切片中代谢物和脂质类化合物的数量统计图

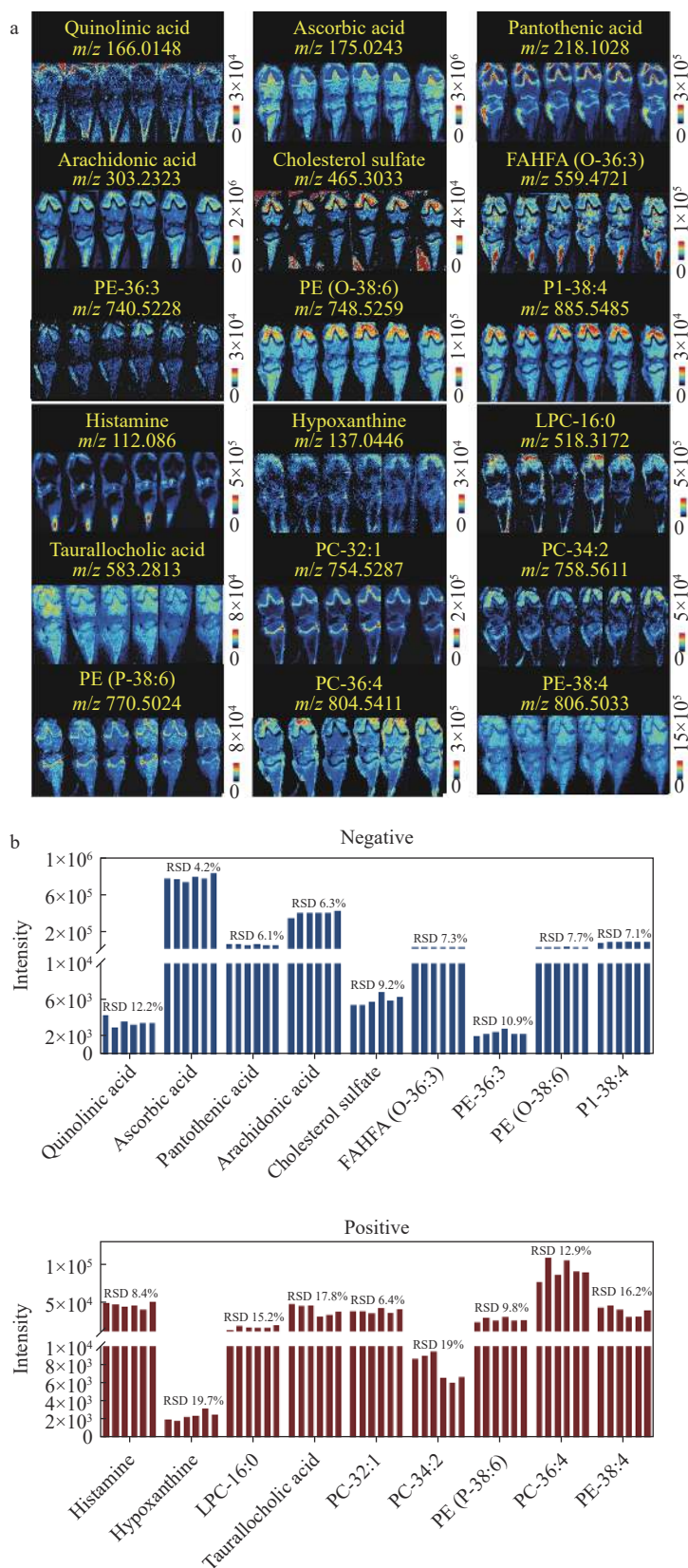
Fig. 3 Number of endogenous metabolites and lipids in rat joint tissue sections detected by AFADESI-MSI with different spray solvent systems

乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 36:3、PE (O-38:6)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 38:4 为代表性代谢物; 在正离子模式下, 以组胺 (histamine)、次黄嘌呤 (hypoxanthine)、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 16:0、牛磺酰胆酸 (taurallocholic acid)、磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 32:1、PC-34:2、PE (P-38:6)、PC-36:4 和 PE-38:4 为代表性代谢物, 其 AFADESI-MSI 成像分析结果示于图 4a。同一代谢物在连续切片中的空间分布特征和离子信号强度基本相同。对上述代表性代谢物在 6 个相邻切片中离子强度的相对标准偏差 (RSD) 进行统计分析, RSD 均小于 20%, 示于图 4b。上述结果表明, 建立的骨关节组织 AFADESI-MSI 分析方法具有良好的重复性。

#### 2.4 大鼠膝关节组织的空间分辨代谢组学分析

采用上述建立的 AFADESI-MSI 方法, 在正、负离子模式下开展大鼠膝关节组织的空间分辨代谢组学分析。通过对大鼠膝关节组织中代谢物的空间分布进行可视化表征, 发现代谢物的组织分布具有明显的微区特异性。例如, 次牛磺酸 (hypotaurine) 较多分布在软骨中, 天冬氨酸 (aspartic acid) 在骨髓中有较多分布, 溶血磷脂酰丝氨酸 (lysophosphatidylserine, LPS) O-17:0; O 特

异性分布在骨质中, 示于图 5a。利用微区特异性分布代谢物离子的质谱成像图与膝关节组织的光学图进行匹配, 能够实现大鼠膝关节组织中骨质、骨髓和软骨 3 个微区的准确分割, 示于图 5b。对各个微区中 ROI 进行圈选并提取数据, 利用实验室前期建立的代谢物数据库和注释工具 MSIannotator 对检测到的代谢物进行注释, 在整体膝关节组织中共注释到 613 个代谢物, 在骨质、骨髓和软骨 3 个微区中分别注释到 452、418 和 451 个代谢物, 示于图 5c。对 3 个微区的原始数据进行多变量统计分析, 筛选各个微区中特异性高表达的差异代谢物, 通过上述方法分别获得 68、118、128 个在骨髓、骨质和软骨中高表达的代谢物。利用上述差异代谢物进行代谢通路分析, 结果表明, 大鼠膝关节组织的不同微区具有明显的代谢异质性。磷酸戊糖途径、乙醛酸和二羧酸酯代谢、TCA 循环等糖代谢相关通路在骨质中更显著, 示于图 5d。抗坏血酸代谢与嘌呤代谢在骨髓中较显著, 示于图 5e, 可能与骨髓的造血、免疫等功能相关<sup>[21]</sup>。精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸的生物合成以及赖氨酸降解代谢通路在软骨中更显著, 示于图 5f, 可能与软骨中富含的蛋白聚糖和骨架 II 型胶原蛋白分子的新陈代谢有关<sup>[22]</sup>。

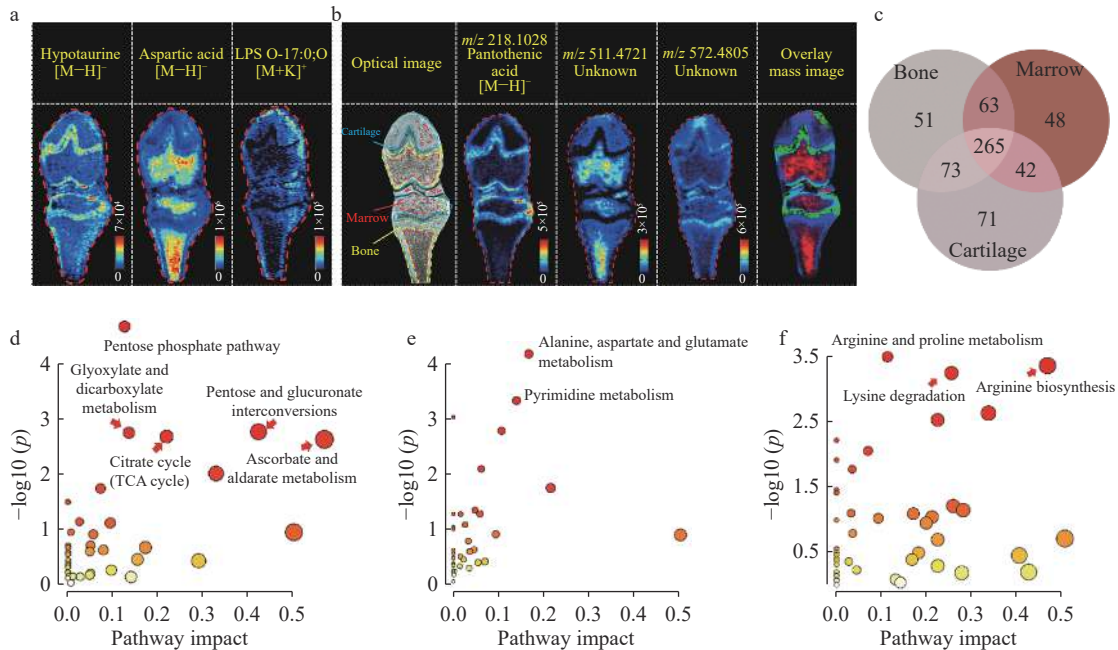


注：a. 代表性代谢物的质谱成像图；b. 代表性代谢物在正、负离子检测模式下获得的离子强度及 RSD 值

图 4 骨关节质谱成像方法重复性考察结果

Fig. 4 Precision of developed rat joint tissue MSI method





注: a. 大鼠膝关节组织中具有微区特异性分布特征的代表性代谢物质谱成像图; b. 微区特异性分布代谢物离子质谱成像结合光学图对大鼠膝关节组织不同微区进行精确划分; c. 大鼠膝关节3个微区中注释代谢物的统计结果; d. 骨质中显著的代谢通路;

e. 骨髓中显著的代谢通路; f. 软骨中显著的代谢通路

图5 大鼠膝关节组织不同微区的代谢异质性分析结果

Fig. 5 Analysis results of metabolic differences in various microregions in rat knee joints

### 3 结论

本研究系统地考察与优化了大鼠骨关节组织切片的制备方法、切片厚度和喷雾溶剂等关键参数对 AFADESI-MSI 分析的影响, 建立了一种适用于大鼠骨关节中小分子代谢物和脂质分析的质谱成像方法及其空间分辨代谢组学分析方法。结果表明, 该方法可实现大鼠骨关节组织中小分子代谢物和脂质分子的高覆盖可视化表征, 并基于特异性高表达的差异代谢物可用于骨关节结构中不同微区的精准划分。该研究为深入理解骨关节组织不同微区的异质性代谢特征提供了新的分子基础和可视化分析手段。

#### 参考文献:

- [1] LOPES D, MARTINS-CRUZ C, OLIVEIRA M B, MANO J F. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies[J]. *Biomaterials*, 2018, 185: 240-275.
- [2] Di MATTEO A, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid arthritis[J]. *The Lancet*, 2023, 402(10 416): 2 019-2 033.
- [3] LEE Y R, BRIGGS M T, CONDINA M R, PUDDY H, ANDERSON P H, HOFFMANN P, KULIWABA J S. Mass spectrometry imaging as a potential tool to investigate human osteoarthritis at the tissue level[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6 414.
- [4] GLYN-JONES S, PALMER A J, AGRICOLA R, PRICE A J, VINCENT T L, WEINANS H, CARR A J. Osteoarthritis[J]. *Lancet*, 2015, 386(9 991): 376-387.
- [5] YANG X Y, ZHENG K D, LIN K, ZHENG G, ZOU H, WANG J M, LIN Y Y, CHUKA C M, GE R S, ZHAI W, WANG J G. Energy metabolism disorder as a contributing factor of rheumatoid arthritis: a comparative proteomic and metabolomic study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132695.
- [6] 再帕尔·阿不力孜. 质谱分子成像技术与应用进展[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(9): 1 335-1 344.
- [7] ABLIZ Zeper. Progress on mass spectrometry imaging technology and its application[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2022, 41(9): 1 335-1 344(in Chinese).
- [8] ROCHA B, RUIZ-ROMERO C, BLANCO F J. Mass spectrometry imaging: a novel technology in rheumatology[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2017, 13(1): 52-63.
- [8] SCHAEPE K, BHANDARI D R, WERNER J, HENSS A, PIRKL A, KLEINE-BOYMANN M, ROHNKE M,



- WENISCH S, NEUMANN E, JANEK J, SPENGLER B. Imaging of lipids in native human bone sections using TOF-secondary ion mass spectrometry, atmospheric pressure scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization Orbitrap mass spectrometry, and Orbitrap-secondary ion mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(15): 8 856-8 864.
- [9] HENSS A, ROHNKE M, EL KHASSAWNA T, GOVINDARAJAN P, SCHLEWITZ G, HEISS C, JANEK J. Applicability of ToF-SIMS for monitoring compositional changes in bone in a long-term animal model[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2013, 10(86): 20 130 332.
- [10] GOOD C J, NEUMANN E K, BUTRICO C E, CASAT J E, CAPRIOLI R M, SPRAGGINS J M. High spatial resolution MALDI imaging mass spectrometry of fresh-frozen bone[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(7): 3 165-3 172.
- [11] ROCHA B, CILLERO-PASTOR B, RUIZ-ROMERO C, PAINE M R L, CAÑETE J D, HEEREN R M A, BLANCO F J. Identification of a distinct lipidomic profile in the osteoarthritic synovial membrane by mass spectrometry imaging[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2021, 29(5): 750-761.
- [12] LUO Z, HE J, CHEN Y, HE J, GONG T, TANG F, WANG X, ZHANG R, HUANG L, ZHANG L, LV H, MA S, FU Z, CHEN X, YU S, ABLIZ Z. Air flow-assisted ionization imaging mass spectrometry method for easy whole-body molecular imaging under ambient conditions[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(5): 2 977-2 982.
- [13] YI B, ZHANG P, CHEN J, FANG Z, YANG X, YANG D, ZANG Q, XU J, REN T, YANG H, GUO N. Dengzhanshengmai capsule alleviates heart failure and concomitantly decreases phenylacetylglutamine level, interacting with the intestinal microflora in rats[J]. *Microbial Biotechnology*, 2024, 17(1): e14365.
- [14] JIANG H, ZHENG B, HU G, KUANG L, ZHOU T, LI S, CHEN X, LI C, ZHANG D, ZHANG J, YANG Z, HE J, JIN H. Spatially resolved metabolomics visualizes heterogeneous distribution of metabolites in lung tissue and the anti-pulmonary fibrosis effect of Prismaomeris conate extract[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2024: 100 971.
- [15] WANG Z, FU W, HUO M, HE B, LIU Y, TIAN L, LI W, ZHOU Z, WANG B, XIA J, CHEN Y, WEI J, ABLIZ Z. Spatial-resolved metabolomics reveals tissue-specific metabolic reprogramming in diabetic nephropathy by using mass spectrometry imaging[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(11): 3 665-3 677.
- [16] WANG L, ZANG Q, TU X, LI X, LI T, ZHU S, ZHANG R, ABLIZ Z. On-tissue chemical derivatization-enhanced spatially resolved lipidomics reveals abnormal metabolism in type 2 diabetic rat brain[J]. *Talanta*, 2024, 269: 125 491.
- [17] LIU J, ZANG Q, LI X, TU X, ZHU Y, WANG L, ZHAO Z, SONG Y, ZHANG R, ABLIZ Z. On-tissue chemical derivatization enables spatiotemporal heterogeneity visualization of oxylipins in esophageal cancer xenograft via ambient mass spectrometry imaging[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2023, 34(11): 108 322.
- [18] ZHU Y, ZANG Q, LUO Z, HE J, ZHANG R, ABLIZ Z. An organ-specific metabolite annotation approach for ambient mass spectrometry imaging reveals spatial metabolic alterations of a whole mouse body[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(20): 7 286-7 294.
- [19] LI X, ZANG Q, ZHU Y, TU X, LIU J, LI T, ZHU S, WANG L, ABLIZ Z, ZHANG R. Database-driven spatially resolved lipidomics highlights heterogeneous metabolic alterations in type 2 diabetic mice[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(51): 18 691-18 696.
- [20] HE J, SUN C, LI T, LUO Z, HUANG L, SONG X, LI X, ABLIZ Z. A sensitive and wide coverage ambient mass spectrometry imaging method for functional metabolites based molecular histology[J]. *Adv Sci*, 2018, 5(11): 1 800 250.
- [21] D'ANIELLO C, CERMOLA F, PATRIARCA E J, MINCHIOTTI G. Vitamin C in stem cell biology: impact on extracellular matrix homeostasis and epigenetics[J]. *Stem Cells International*, 2017, 2017: 8 936 156.
- [22] KRISHNAN Y, GRODZINSKY A J. Cartilage diseases [J]. *Matrix Biology*, 2018, 71: 51-69.

(收稿日期: 2024-06-26; 修回日期: 2024-07-24)