

MALDI 质谱成像技术在非小细胞肺癌中的应用研究

张莹¹, 陈岗², 陆豪杰^{1,3}, 杨芃原^{1,3}

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 上海市胸科医院, 上海 200030; 3. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

摘要: 采用基质辅助激光解吸电离时间飞行质谱成像技术分析组织切片已在基础与临床医学研究中迅速发展。质谱成像技术通过对冰冻组织切片表面的质谱扫描可以快速直观地得到组织中的分子, 如蛋白、多肽等分布信息。采用质谱成像技术对人的非小细胞肺癌组织切片及癌旁组织切片进行研究, 对基质覆盖方式和质谱条件进行了优化, 初步建立了以质谱成像法寻找非小细胞肺癌中生物标志物的方法。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 制备 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的冰冻组织切片, 用 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 α -腈基-4-羟基肉桂酸(含 0.1% 三氟乙酸)的 50% 乙腈水溶液, 以气流辅助喷洒的方式覆盖在组织切片表面, 循环 10 次, 置于干燥器中待干后, 用正离子反射式和线性模式分别进行质谱扫描。通过对来自 3 位患者的 10 对肺癌/癌旁组织研究, 结果表明, 癌组织中有 $m/z\ 3\ 000\sim 3\ 500$ 范围内的特征性簇峰出现。质谱成像技术用于非小细胞肺癌能够直观地在分子水平上反映出癌组织和正常组织间的差异, 有望进一步提高肺癌临床诊断的准确度。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 非小细胞肺癌; 质谱成像; 组织切片

中图分类号: O657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)04-209-05

MALDI Profiling MS Application to Analysis of Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Ying¹, CHEN Gang², LU Hao-jie^{1,3}, YANG Peng-yuan^{1,3}

(1. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Chest Hospital, Shanghai 200030, China;

3. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) profiling for tissue section analysis is rapidly developed in fundamental and clinical medical research. Through scanning on the frozen tissue slices, distribution information of molecules such as protein and peptides from a certain tissue were directly obtained in little time by profiling MS technology. Based on the profiling MS technology, human being's non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue and paracancerous tissue slices were investigated furthermore, matrix application method and mass spectrometry acquisition mode were optimized, a profiling MS method analysis of NSCLC for biomarkers was estab-

收稿日期: 2007-06-26; 修回日期: 2007-07-26

基金项目: 863 重大专项基金(No. 02BAC11A11, 2006AA02Z134,)、国家自然科学基金(Nos. 20405003, 30672394)、国家自然科学基金重点项目(No. 30530040)资助、上海市重大基础研究(No. 04DZ14005)、上海市青年科技启明星计划(A类)(No. 06QA14004)

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

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

lished afterward. 10 μm frozen tissue slices was prepared at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, then, $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic-acid (CHCA) 50% acetonitrile solution containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) were air-sprayed onto the tissue surface. After ten cycles of coating and drying, tissue slices were placed in a dessicator until completely dried. Both reflector mode and linear mode were employed for mass scan. By investigating 10 couples of NSCLC carcinoma/paracancerous tissue slices from three different patients, it indicates that cluster peaks appears in the m/z ranges from 3 000 to 3 500 is the characteristic of NSCLC. Moreover, the profiling MS technique, which can directly display the differences of carcinoma/paracancerous tissue at the molecular level, it could be employed to improve the clinical diagnosis accuracy of NSCLC.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS); non-small cell lung cancer(NSCLC); profiling MS; tissue slices

原发性肺癌的发病机理,早期诊断和治疗是人类所面临的最严峻的挑战之一。肺癌的发病率和死亡率至今居高不下,其中非小细胞肺癌(NSCLC)患者约占 80%^[1]。越来越多的新技术被用来从蛋白质和多肽水平上寻找 NSCLC 相关生物标志物,质谱成像(Profiling-MS)技术正是其中之一^[2-3]。它实验操作简单,不需任何标记物,只需将实体组织冷冻切薄片,经过简单预处理后就可直接在质谱仪上进行检测,能在组织水平上直接分析微量蛋白质和多肽以及它们的一级结构。质谱成像技术通过比较正常与疾病组织的分子分布,在肿瘤早期诊断、预后评估等临床应用中扮演着重要角色^[4],此外,它还兼具质量范围宽、灵敏度高、准确度高、分辨率好等优点^[5]。本工作采用质谱成像技术对比鳞形非小细胞肺癌(squamous cell of carcinoma NSCLC)^[6]和癌旁组织中的分子分布,并从样品制备等方面进行较为详细的探讨,初步建立了质谱成像技术寻找 NSCLC 的生物标志物方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Leica 3000 冰冻组织切片机:德国 Leica 公司产品;切片厚度:10 μm ;冷冻箱温度: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;ABI 4700 MALDI-TOF/TOF-MS 蛋白质组学仪:美国 ABI 公司产品;氮气激光器,激光波长 355 nm;加速电压 20 kV;采用离子延迟引出技术(delayed extraction)。

1.2 主要材料与试剂

基质 α -腈基-4-羟基肉桂酸(CHCA):纯度 98.5%;乙腈(ACN):色谱纯;三氟乙酸(TFA):色谱纯;无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$):色谱纯,以上均购

自美国 Sigma 公司。

1.3 试验条件

1.3.1 组织切片样品制备 非小细胞肺癌组织及癌旁组织分别于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 在 Leica 3 000 冰冻切片机上制作冰冻切片,切片厚度 10 μm 。将新鲜冰冻组织切片用 75% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 水溶液润洗 2 次,每次 5 min。用含 0.1% TFA 的 50% ACN 水溶液配制成 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CHCA 基质溶液,用蠕动泵以 $5\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ 推动 100 μL 基质溶液均匀喷洒在组织切片上,待组织表面溶液将干时,再次喷洒基质溶液,循环 2 次。将喷好基质的组织切片放在室温下,待溶剂挥发析出结晶后放入干燥器中干燥 2h。干燥后的组织切片用导电胶带贴在 MALDI 不锈钢靶板上,送入质谱仪分析。

1.3.2 质谱条件 随机取每片组织切片 10 个点,每个点累加 100 次扫描数据得到质谱图,10 个点累加后得到总质谱图。用正离子反射式模式检测,质量扫描范围 m/z 1 000~5 000;正离子线性模式检测,质量扫描范围 m/z 1 000~20 000。

2 结果与讨论

2.1 NSCLC 特征质谱峰

正离子反射式检测模式对非小细胞鳞形肺癌组织(A)和癌旁组织(B)进行质谱成像扫描得到的质谱图,示于图 1。可见,癌组织在 m/z 3 000~3 500 之间产生簇峰,成为区别于癌旁组织的特征峰。鳞癌和癌旁组织的电镜图示于图 2,其中,图 2A 表现出鳞癌细胞明显角化,而癌旁组织(图 2B)则有正常肺组织中明显的细支气管和肺气泡。

2.2 NSCLC 特征质谱峰验证

取 10 对非小细胞肺癌和癌旁组织样品进行特征峰验证, 结果列于表 1。10 对样品中簇峰均只出现在 NSCLC 组织切片中, 癌旁组织中不会出现。这进一步验证了这组簇峰是 NSCLC 鳞癌特征峰。

2.3 样品制备对质谱测定的影响

2.3.1 组织切片润洗

样品均用 75% 乙醇水溶液润洗 2 次, 每次 5 min, 以去除表面的血和无机盐等。实验中发现大量表面杂质的存在会产生许多杂峰, 对组织中的质谱峰产生屏蔽效应。未润洗的组织表面相对不平整也使得整体信号强度下降且产生较大噪音, 影响质谱峰的质量。在切片加基质前需要进行润洗以保证组织

表面完全暴露及表面的均匀性, 但过长时间的润洗会导致组织表面分子移位或降解等。根据实验结果, 用 70% 乙醇水溶液润洗 2 次, 每次 5 min 较为合理。

2.3.2 基质覆盖方式

基质覆盖方式是质谱成像技术的关键, 合适的基质覆盖方式有利于产生均匀的样品表面, 形成均匀的结晶, 促进目标分子的离子化, 保证质谱信号^[7]。喷雾式 (air-spraying) (A) 和滴加式 (liquid-dropping) (B) 基质覆盖方式在 NSCLC 组织切片上得到的质谱图示于图 3。喷雾式加样方式通过蠕动泵将基质溶液喷洒在组织切片表面, 同滴加式相比, 其覆盖均匀且不会破坏组织表面分子空间分布, 得

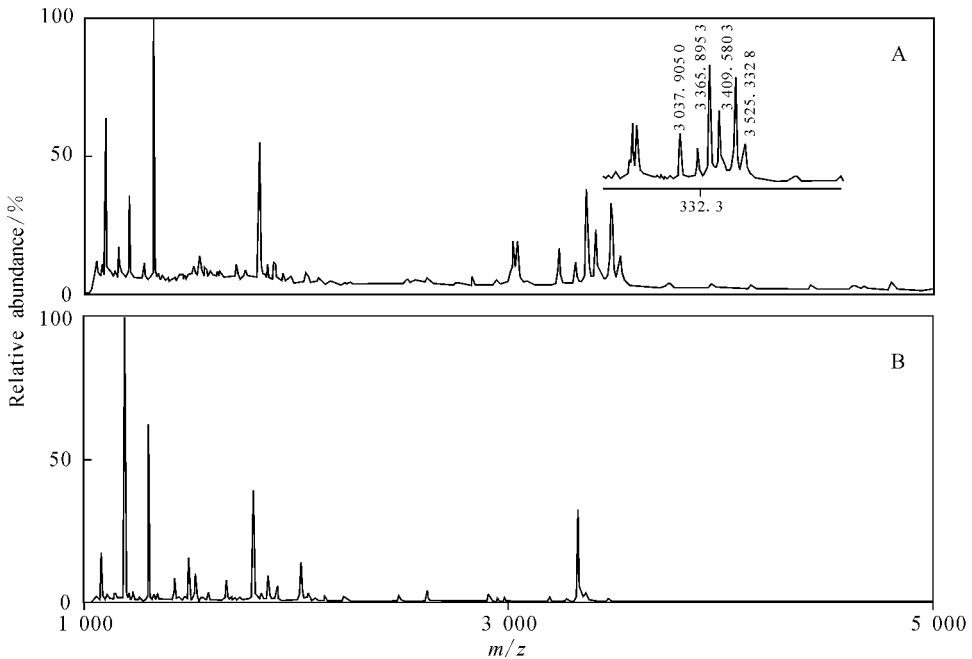


图 1 非小细胞肺癌组织 (A) 和癌旁组织 (B) 的质谱图

Fig. 1 Mass spectra of NSCLC tissue (A) and paracancerous tissue (B)

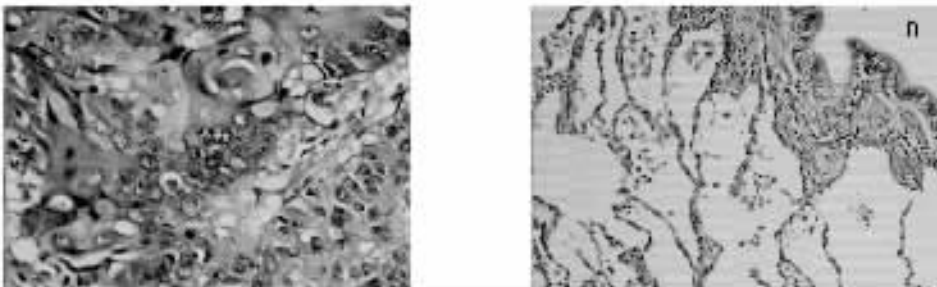


图 2 非小细胞肺癌组织 (A) 和癌旁组织 (B) 的电镜图

Fig. 2 Electron micrographs of NSCLC tissue (A) and paracancerous tissue (B)

表 1 非小细胞肺癌特征峰验证

Table 1 Verification of characteristic cluster peaks from NSCLC

样品号 No.	非小细胞肺癌 NSCLC	癌旁 Paracancerous tissue
1	Y	N
2	Y	N
3	Y	N
4	Y	N
5	Y	N
6	Y	N
7	Y	N
8	Y	N
9	Y	N
10	Y	N

注：“Y”表示检测到特征簇峰的信号；“N”表示没有明显检测到特征簇峰的信号

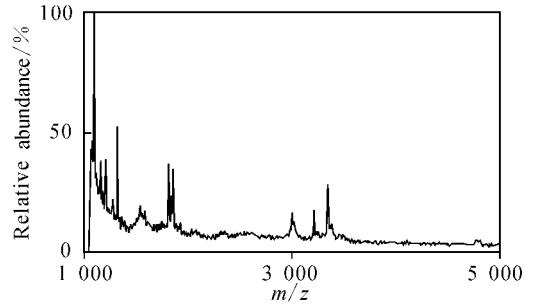
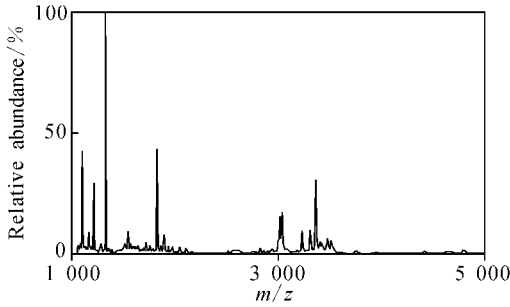


图 3 喷雾式(A)和滴加式(B)基质覆盖方式产生的非小细胞肺癌组织质谱图

Fig. 3 Mass spectra of NSCLC tissue with different matrix application methods of air-spraying(A) and liquid-dropping(B)

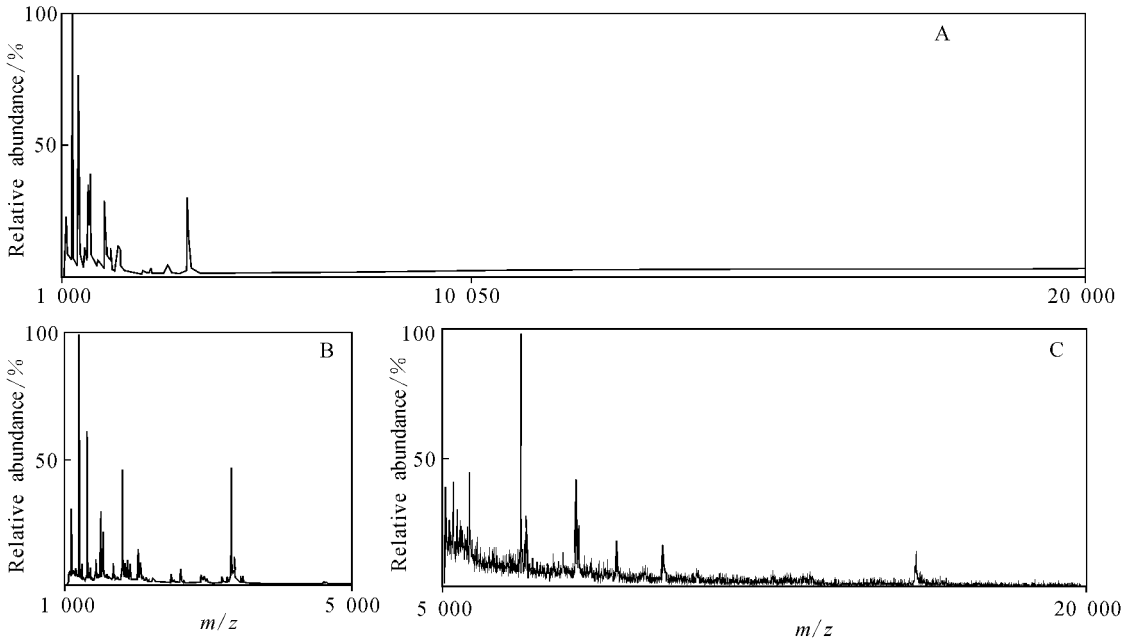


图 4 线性模式(A),反射模式(B)和线性模式(C)扫描方式产生的非小细胞肺癌癌旁组织质谱图

Fig. 4 Mass spectra of NSCLC paracancerous tissue with different MS detective modes of linear mode (A), reflector mode (B) and linear mode (C)

到的质谱信号明显优于滴加式。

2.3.3 质量扫描范围 由于质谱成像是组织表面所有分子的扫描,样品相对复杂、相对分子质量分布范围广,为了避免由于相对分子质量扫描范围过宽带来的屏蔽效应,采取了分段式扫描,即在不同的分子质量范围内采用不同的扫描模式。 m/z 1 000~20 000 全范围线性扫描(A)和分段(B、C)扫描得到的 NSCLC 质谱图于图 4,其中图 4B 为反射模式, m/z 1 000~5 000;图 4C 为线性模式, m/z 5 000~20 000。从图中可以看出,分段式扫描提供了更多的相对分子质量信息,比全范围扫描具有明显的优势。

3 结 论

本工作采用质谱成像技术对人的非小细胞肺癌组织切片及癌旁组织切片进行研究,探索样品制备,质谱检测等技术条件,初步建立了以质谱成像法寻找非小细胞肺癌中生物标志物的方法。结果表明,癌组织中有 m/z 3 000~3 500 范围内的特征性簇峰出现,并通过对 10 例病人的癌/癌旁组织的研究得到验证。随着质谱成像技术的不断发展,再结合探针取样技术,将会实现非小细胞肺癌的临床微创诊断,在分子水平的基础上将会大大增加非小细胞肺癌的临床诊断的准确性。

参考文献:

[1] 侯恩存. 非小细胞肺癌治疗进展[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(7): 902-904.
 [2] PIERSON J, NORRIS J L, AERNI H R, et al. Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on

brain tissue sections by MALDI mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2004, 3: 289-295.
 [3] WISEMAN J M, PUOLITAIVAL S M, TAKATS Z, et al. Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization[J]. Angew Chem, 2005, 44(43): 7 094-7 097.
 [4] YANAGISAWA K, SHYR Y, XU B G, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer [J]. Lancet, 2003, 362 (9 382): 433-439.
 [5] 何美玉, 王光辉, 熊少祥. 现代生物质谱及其应用 [J]. 现代仪器, 2001, 1: 6-8.
 [6] 陈 岗, 廖美琳. 非小细胞肺癌新亚型分类的临床意义[J]. 肿瘤, 2006, 26(12): 1 102-1 104.
 [7] SCHWARTZ S, REYZER M, CAPRIOLI R. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation [J]. J Mass Spectrom, 2003, 38: 699-708.



欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

国际刊名化代码 CODEN: FCEXES

邮发代号: 46-104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 粤 010029

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物,中文核心期刊。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医学、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

本刊入选美国化学文摘千种表,俄罗斯《文摘杂志》、《日本科技文献速报》、英国皇家化学学会《分析文摘》(AA)、《质谱公报》(MBS)等。本刊为中文核心期刊,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),“中国科技期刊精品数据库”收录期刊,《中国科学引文数据库》来源期刊,《中国科技期刊数据库》来源期刊,《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,《中国期刊网》全文收录期刊等。

本刊自 2008 年起变更为月刊,国内外公开发行。大 16 开,单价:12.00 元/册,全年 144 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部。邮编:510070,电话:(020)87684776 或 37656606,E-mail:fxcsxb@china.com,写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数。