



基于质谱技术的细胞成像研究*

周鹏^{1)**} 王欣^{2,3)**} 罗茜^{2)***} 赵超^{2)***}

(¹) 深圳市第二人民医院 (深圳大学第一附属医院) 超声科, 深圳 518035;

(²) 中国科学院深圳先进技术研究院科学仪器研究所 (集群), 深圳 518055; (³) 山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要 细胞模型可以模拟多种生命状态和疾病发展, 包括单细胞、二维 (2D) 细胞、三维 (3D) 细胞微球和类器官等模型, 是解析错综复杂的生物化学问题的重要工具。近年来, 以细胞作为实验模型, 采用质谱技术并结合形态学分析, 可以从时空水平获得细胞中多种物质分子的量变和空间分布变化, 包括代谢物和脂质等内源生物小分子、药物和环境污染物等外源小分子、蛋白质和多肽等内源生物大分子, 为考察细胞-细胞相互作用、肿瘤细胞微环境、细胞生物信息时空异质性提供了可能。本文综述了基于质谱技术的细胞成像研究, 包括细胞模型的选择和制备、细胞模型的形态学分析、质谱空间组学技术、质谱流式等技术的选择和方法发展及其相关应用。最后, 提出了该领域面临的难点问题 and 未来的发展方向。

关键词 细胞成像, 空间组学, 质谱, 时空异质性

中图分类号 Q7, O657.6

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0348

CSTR: 32369.14.pibb.20240348

细胞模型为疾病诊断、药物药效评价、毒理学研究等多个研究领域工作的开展提供了可能, 是不可或缺的重要生物材料。随着生物和细胞分析技术的不断进步, 以解决科学问题为导向构建的体外细胞模型得以迅速发展^[1-2]。早期的体外细胞模型多数只包括二维 (2D) 模型, 无法准确模拟生物体中复杂的细胞及其微环境构成, 更无法开展复杂的细胞生物学功能研究。随着细胞培养技术的改进, 先后出现了三维 (3D) 细胞培养技术为基础的细胞微球模型。随着多能干细胞技术的出现, 高度模拟人体器官发育的类器官技术得以发展。3D 细胞模型和类器官模型比传统的 2D 细胞模式具有更多的优点, 具有个性化以及更强的生理相关性, 尤其适用于疾病发生发展分子机制、细胞和生物分子新功能探索等方面的研究^[3-4]。

常见的细胞模型成像主要选用标记的方法进行靶向的基因、蛋白质和小分子代谢物的原位成像, 以此为基础开展细胞类型、状态、代谢和药物药效等方面的研究, 具有标记特异性差、实验操作复杂等缺点。与此不同的是, 质谱空间多组学技术以质谱技术作为基础, 结合高端影像技术可同时进行多种分子的定性、定量和空间成像, 具有免标记、高灵敏度和高通量的优势^[5-7]。该技术可以检测几百甚至上千种外源和内源分子, 同时开展这些分子之

间相互作用的研究, 在肿瘤代谢、药物药效分析、污染物毒性筛选、法医鉴定等多个领域具有广泛的应用^[5-8]。另外, 与细胞的基因组、转录组和蛋白质组信息相比, 代谢组可以在短时间内对外界刺激、细胞生理变化作出反应, 这种迅速精准发生的细胞状态变化使得空间代谢研究成为探索细胞、器官、生物体生理病理相关分子机理的重要思路^[9-10]。

为全面了解适用于细胞成像的质谱多组学、质谱空间组学等技术, 本文对该技术及其应用进行了总结评述, 重点描述了细胞模型的构建、细胞样品的制备、细胞形态分析和成像分析以及基础研究和临床研究应用, 同时提出该领域的难点问题并对发展趋势进行了展望。

* 国家自然科学基金 (22176195), 广东省人才项目 (2021QN02Y028), 国家重点研发计划 (2022YFF0705003), 深圳市基础研究重点项目 (JCYJ20210324115811031), 深圳市抑郁症精准诊断与治疗重点实验室项目 (ZDSYS202206061006 06014) 和广东省科技创新平台高等级生物安全实验室建设项目 (2021B1212030004) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

赵超 Tel: 0755-26417984, E-mail: chao.zhao@siat.ac.cn

罗茜 Tel: 0755-26417984, E-mail: qian.luo@siat.ac.cn

收稿日期: 2024-07-29, 接受日期: 2024-12-04

1 细胞模型的构建

适用于质谱多组学和质谱空间组学技术的细胞模型主要包括3D细胞模型、3D组装细胞模型和类器官模型等, 开发针对性强、操作简便、重现性好、能够模拟真实细胞生长及微环境的细胞模型是关键。

1.1 3D细胞模型

常规的2D细胞培养虽然操作和观察方便, 但存在较大的局限性: 细胞从组织中分离出来并置于2D培养环境, 随着培养时间的延长, 细胞形态会趋于扁平, 继而分裂异常, 损失了重要的表型信息。此外, 2D培养环境抑制细胞形成多维结构, 无法准确模拟细胞真实的生长排列情况以及细胞间的代谢活动和信号交换传递。因此, 急需开发可以准确模拟体内细胞生长的模型, 来满足更为复杂的细胞及其微环境相关研究的需求。

3D细胞培养是将细胞和模仿体内细胞环境的3D培养载体在体外进行共培养, 细胞在3D空间结构中迁移、生长, 构成3D载体复合物。与传统的2D细胞模型相比, 3D细胞模型可以较为真实地模拟细胞间相互作用、生理病理反应等, 使得复杂生物现象的模拟成为了可能^[11-13]。

按照培养载体的不同, 3D细胞培养主要有两种培养体系, 即基于支架和非支架的3D细胞培养技术^[11-12]。有支架的模型是将目标细胞、细胞生长因子、再造基质蛋白以及支架混合后共同培养来模拟细胞间相互作用和细胞增殖等^[13]。无支架的3D细胞培养主要是指细胞自发聚集形成的细胞微球, 微球尺寸在几百微米到厘米级别, 该模型与肿瘤组织具有一定的相似性, 主要采用超低吸附培养板法、磁悬浮培养法、悬滴培养法以及微流控等技术开展细胞微球制备^[14]。其中, 多数无支架的3D细胞微球模型更适用于质谱空间组学的分析(图1)^[14]。Xie等^[15]分别采用人肝癌细胞HepG2构建2D和3D细胞微球模型, 并使用质谱空间成像技术探索细胞脂质代谢物空间分布及其表达谱变化。研究发现, 与2D细胞模型相比, 3D细胞微球脂质类别和脂质代谢物表达谱变化更接近于实体肿瘤的代谢物分布和表达信息, 再次证明了3D细胞微球是一种更适合模拟实体肿瘤的体外模型。以单种3D细胞微球模型为基础, 继续引入其他细胞种类并进行共培养或细胞操控, 即构建能够模拟肿瘤及其微环境的复杂3D细胞微球模型, 可以更加真实地再现器官结构和功能的复杂性。Lazzari等^[16]选取胰

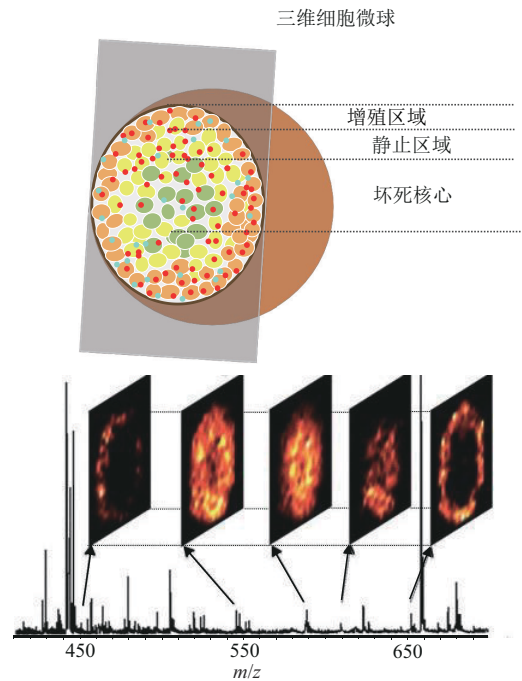


Fig. 1 Schematic diagram of 3D multicellular spheroids structure^[14]

图1 3D细胞微球结构的示意图^[14]

腺癌细胞、成纤维细胞和内皮细胞开展三重细胞共培养构建了胰腺癌肿瘤及其微环境的3D细胞模型, 该模型可以用于相关药物药效评价、肿瘤发展变化等过程研究, 成为评估各种治疗策略的有利工具。

1.2 类器官模型

类器官模型是比多重3D细胞微球更为复杂、多样的细胞模型。该模型是由从患者分离的干细胞经过增殖、分化并自我组织形成的类似器官结构的体外模型, 保留了原有器官和组织的结构和生物信息^[17]。类器官分为胚胎干细胞、诱导多能干细胞、成体干细胞等。与动物模型相比, 患者来源的类器官模型更适合低时间成本、高通量分析的需求。迄今为止, 类器官模型被广泛应用, 包括疾病模型构建、药物筛选、肿瘤精准医疗、环境毒理分析等多个领域, 是最具前景的研究方向^[18]。

为了维持类器官基因组结构、多重生物信息的异质性、病理特征等, 在类器官培养过程中需要加入多种生长因子, 包括促进癌症干细胞增殖分化、抑制细胞凋亡相关的生长因子、维持体外长期培养的营养因子等, 以提高类器官培养的成功率。此外, 肿瘤及其微环境, 是模型制备的重要步骤。将肿瘤细胞、免疫细胞、上皮细胞等与细胞因子进行组合并共培养, 可制备能够模拟肿瘤及其微环境的

细胞模型^[19]。Koledova等^[20]利用基质与上皮细胞间化学和机械信号影响乳腺发育和肿瘤发生,构建了乳腺癌患者来源3D类器官(PDO)-癌细胞相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)共培养模型,并发现CAF可促进PDO形态多样性,从而表现出较强的增殖能力和异质性^[21-22]。

2 细胞样品的制备

细胞样本的尺寸远小于常见的组织器官等生物标本,且复杂程度根据实验要求不同而呈现多样性,使得细胞标本的空间成像研究具有一定的挑战性。其中,细胞样本的制备优化、针对基质辅助激光解吸电离质谱成像(matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging, MALDI-MSI)的基质选择与喷涂等流程,对于获取高质量成像结果起到了重要作用^[23]。

2.1 切片

按照研究目的的不同,细胞样本的制备主要包括两种:细胞爬片和需要进行切片的细胞标本。其中,细胞爬片标本不需切片,是让玻片置于培养瓶内,使细胞在一定的固相表面(如普通玻片、具有特殊导电涂层的玻片)上贴壁生长,从而获得相对应的细胞模型,后续直接进行质谱空间成像和组织形态分析等实验。细胞爬片标本操作简便,但玻片较难固定,由于边缘效应,细胞在玻片上易聚集导致分布不均,从而影响后续检测结果。

针对需要切片的细胞标本,多数制备冰冻和石蜡切片。与石蜡切片相比,冰冻切片制备时间短、没有繁杂的清洗、脱蜡等前处理过程,可以有效保持细胞状态,并最大程度保留细胞内和细胞间的物质分子组成和分布,便于后续开展质谱空间成像研究。针对细胞标本的冰冻切片制备,一般流程包括样本(半)包埋、切片最适温度调整、切片及切片存储。在细胞标本切片制备中,保持细胞切片形貌完整、操作简便实验的关键。

常规的冰冻切片通常采用OCT包埋剂(optimal cutting temperature compound)进行包埋,但其存在易污染样品、透明度低、抑制离子电离且出现干扰峰等缺陷,不适用于后续进行质谱分析。因此,对于包埋试剂的选择和切片条件优化是标本制备的关键。已经报道的包埋剂有明胶、冰和聚丙烯酰胺凝胶(PAAG)等^[23-26]。明胶不易对样本电离产生干扰,但3D细胞微球直径较小,明胶透明度有限,导致3D细胞微球不易被观察和定位^[23]。

为了解决这一问题,Tucker等^[24]进行细胞球切片前,先用稀释的蓝色染料对其进行染色,从而提高了切片时细胞球的能见度。但这种方法会抑制样本表面离子电离,限制样本表面的信号产生。Xie等^[25]对明胶包埋细胞微球的切片制备方法进行改进,开发了一种冰覆盖的辅助细胞微球切片定位和制备的方法。研究者将细胞微球放置在自制的切片模具上,在细胞微球周围滴加水,由于模具温度较低,细胞球周围的水迅速冻结成冰,再添加OCT包埋剂(图2)。该方法既维持细胞样本的完整性,又保证了小尺寸细胞微球的可视化定位。Yang等^[26]发现了一种新的包埋试剂PAAG,并以大鼠肝脏和大西洋鲑眼球样本切片作为研究对象,采用MALDI-MSI分别评估了PAAG、明胶、OCT和琼脂糖4种包埋试剂对标本的包埋效果,结果表明,相比于其他包埋剂,PAAG具有一步操作无需加热、细胞形态保持完整、显著提高代谢产物离子信号强度等优点。除了细胞标本包埋之外,切片时的温度也直接影响冰冻切片质量。其中,较为合适的冰冻切片中的刀片温度需保持在-14~-16°C,机器内部温度需保持在-20°C。

2.2 基质选择与喷涂优化

与其他类型的质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)实验操作相比,MALDI-MSI中的基质选择和喷涂方法的优化直接影响到MSI数据质量。基质喷涂过程是利用基质喷涂装置将具有特殊物理化学性质的基质喷涂在样本切片上,从而促进样品分子离子化的过程。基质的选择是MALDI-MSI中最重要的一步之一,合适的基质通常具有较高的离子化效率和真空稳定性,并与待测分子相容性好^[27-29]。

MALDI-MSI常用的基质大多数为有机小分子基质,在低分子质量范围干扰小分子分析物的检测,限制了MALDI-MSI在低分子质量范围内的分析应用^[27-29]。为解决上述问题,寻找背景干扰小、解吸/解离效率高的新基质对于获取高质量的MALDI-MSI结果具有重要意义。一些新型小分子基质成为近几年研究的热点,包括N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐、N-苯基-2-萘胺等^[29-33]。Chen等^[32]设计并合成了新型双极性基质4-氨基噌啉-3-甲酰胺(4-AC),与其他常规基质如2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)和9-氨基吡啶(9-aminoacridine, 9-AA)相比,4-AC在355 nm时背景干扰小、分析物离子化强度高、稳定性好,可用于可视化多种代谢物的时空变化。Holbrook

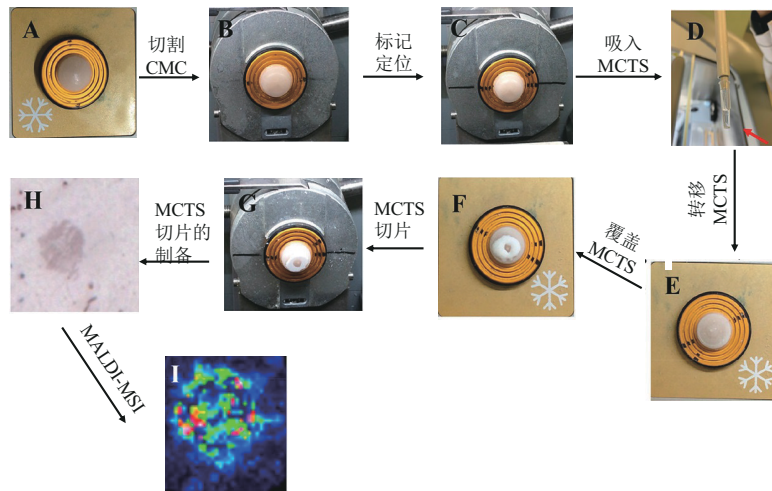


Fig. 2 Preparation of frozen section coated with ice [25]

图2 冰覆盖冰冻切片的制备 [25]

A: CMS冰冻模块; B: 切割修整后的CMC冰冻模块; C: 细胞球的标记位置; D: 吸取细胞球; E: 将细胞球至于CMC冰冻模块, 进行冰覆盖; F: 在冰周围添加OCT包埋剂; G: 包埋后进行细胞球的切片; H: 采用显微镜观察切片的完整性; I: 细胞球切片标本的质谱成像分析。CMC: 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose), MCTS: 多细胞肿瘤微球 (multicellular tumor spheroids), MALDI-MSI: 基质辅助激光解吸电离质谱成像 (matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging)。

等 [33] 采用氟化胺作为基质添加剂, 增强生物样本中脂质分子的信号, 该团队将此方法应用于细胞裂解液、肝细胞和单细胞在内的多种样品分析中。结果显示, 所选取的生物样本中阴离子检测模式的 [M-H]⁻ 脂质信号均有所增强, 并在脂质的空间定位方面也获得了更高的灵敏度。

基质喷涂装置的选择和喷涂方法的优化也同样对 MALDI-MSI 结果产生较大影响。采用喷涂装置, 可以将基质薄雾均匀喷涂在样品切片表面, 干燥后形成均匀的基质结晶膜, 形成的基质结晶直径越小越均匀就越有利于提高质谱成像的空间分辨率 [34]。目前, 常见的基质喷涂装置主要分为手动和自动喷涂装置两类。常见的自动喷涂装置包括 ImagePrep、TM-Sprayer 和 SMALDI Prep 等。ImagePrep 喷涂装置采用独特的震动雾化技术, 通过控制震动雾化的条件将雾粒均匀喷洒在样品切片上, 操作简单, 但通量较低, 系统维护要求高, 适合于获取 50~200 μm 的空间分辨率 [35]。TM-Sprayer 喷涂装置是通过温控喷嘴技术, 将基质经热惰性气流输送到样品靶板上, 同时通过加压加热的氮气流进行干燥, 干燥后确保获得细腻、均一稳定的基质涂层, 有效提高了质谱信号强度, 并改善成像的空间分辨率 [36]。SMALDI Prep 是一款具有双喷涂模式的新型全自动基质喷雾仪, 包括线形喷雾模式和旋转气助喷雾模式。线形喷雾模式主要用于大区域基质喷涂, 根据样本情况任意选择喷涂区

域。旋转气助模式主要适用于高分辨率细胞、组织成像, 基质结晶颗粒大小平均小于 10 μm, 满足多种低丰度化合物的检测和单细胞成像需求 [37]。另外, 一些处于研发阶段的基质喷涂设备也涌现出来。Xie 等 [38] 设计了一种基质结晶温度可控的基质升华装置, 并利用此喷涂装置分别对草莓、肾脏和贻贝组织中的内源性和外源性成分进行 MALDI-MSI 检测, 结果表明, 此升华装置在 0°C 以下可以稳定控制基质升华温度, 从而在样本表面生成直径小于 0.2 μm 的微小均匀基质晶体, 因此获得了良好的重现性和物质分子的高质量谱图。Luo 等 [39] 通过调控氮气流、加热灯温度以及喷枪温度等参数构建了可控制基质膜形成的非接触加热基质喷涂装置。该装置采用激光雕刻技术制作二维移动平台, 利用质量流量计控制高压氮气实现基质溶液的雾化, 加热灯的引入能够实现基质溶液的快速挥发, 显著提高了基质的喷涂速度。Meng 等 [40] 采用基于压电陶瓷驱动的超声喷嘴, 制造了一种用于基质涂层的自动装置 SoniCoat。与 TM-Sprayer 和电喷雾基质涂层装置相比, SoniCoat 装置无需高压气流和高电压即可实现良好的基质雾化效果, 能够获得直径约为 10 μm 更均匀的基质结晶, 并极大地减少分子扩散。

3 细胞样品的形态分析

细胞形态学分析可全面阐明细胞和组织模型的

组成和空间结构等,为质谱成像等分子鉴定技术中精准区域划分和选择提供了重要的帮助,细胞形态学分析和质谱成像两者相辅相成,缺一不可。目前,应用于质谱空间组学的细胞形态学分析技术有苏木素-伊红(HE)染色和免疫荧光技术等。

3.1 HE染色

HE染色是细胞形态分析中最为简单且行之有效的方法,广泛用于临床和基础研究中。碱性的苏木素染色液可以将细胞内的细胞核、细胞质中的核糖核酸等染成蓝紫色,酸性的伊红则可以将细胞质与细胞外基质中的成分等染成不同程度的红色或粉红色。HE染色法具有操作简单、核质比分明及细胞透明度好等优势。但是,HE染色仅可粗略分辨细胞的形态异质性,无法特异性地定位或检测细胞内部的分子变化。因此,以HE染色为基础,仍需要更为准确全面的细胞定位方法,并获得多种细胞种类的可视化信息。

3.2 免疫荧光技术

免疫荧光技术是一项对样本中的不同靶蛋白质或其他生物分子的分布进行可视化研究的形态学分析技术,在病理学、分子生物学、临床诊断中应用广泛。与HE染色类似,免疫荧光技术在质谱为基础的成像分析中同样提供重要的细胞形态和细胞类型等信息。免疫荧光成像时,荧光基团信号易重

叠,成像通道有限,无法准确地可视化多种特定大分子在组织中的分布。为了提高检测通量,多重免疫组化技术应运而生^[41-43]。采用该技术可以在单个组织切片中同时检测多种生物标志物,结合质谱流式细胞技术等方法,可以在疾病的时空演进中,获得更为丰富的细胞组成、细胞功能和细胞-细胞间相互作用等信息^[44]。

4 质谱为基础的成像分析

常规的质谱分析方法可以获得细胞中的多种物质分子的定性和定量信息,但无法获得物质分子的定位信息。随着质谱技术的快速发展,先后涌现出多种基于质谱的细胞分析新方法。例如,质谱与高端影像技术结合,形成了质谱成像技术,可以实现细胞切片水平多重生物分子的同时鉴定分析,将单细胞用金属标签抗体进行标记,再采用电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)对单细胞中金属标签进行定量分析,由此产生质谱流式技术,最终实现单细胞中多种蛋白质的定量分析。同时,结合影像技术,产生了成像质谱流式技术^[45-47]。

4.1 质谱成像

细胞尺度的质谱成像分析流程详见图3,包括细胞切片标本的制备(详见前文第2节)、形态学

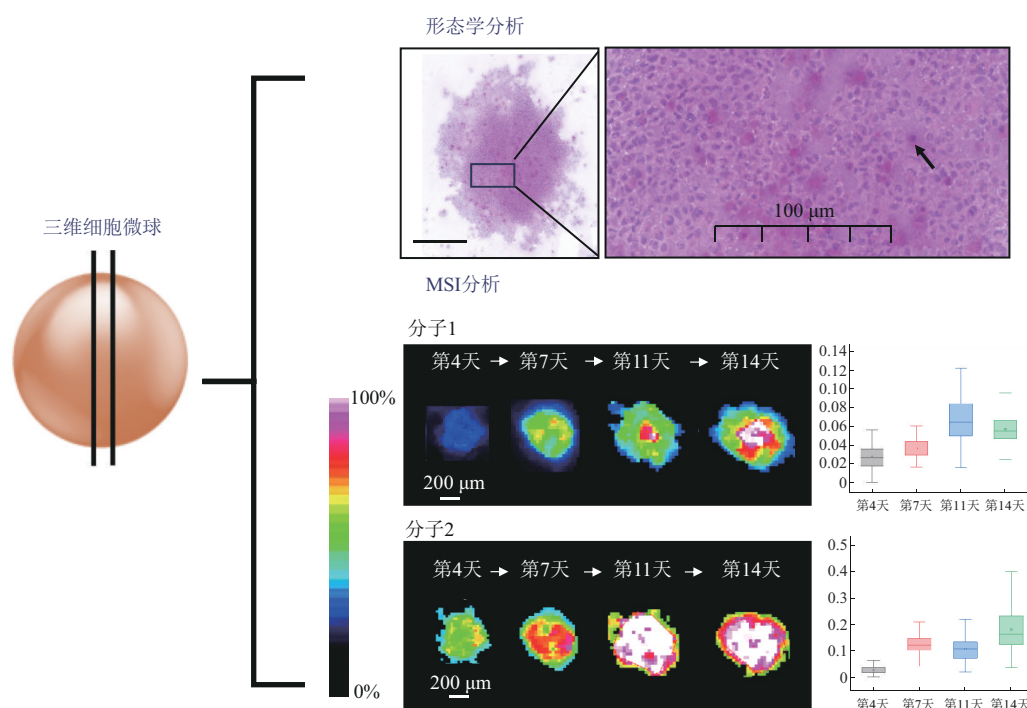


Fig. 3 Histologic and MSI analysis of 3D multicellular spheroids

图3 3D细胞微球的形态学和质谱成像分析

分析(详见前文第3节)、质谱成像仪器选择以及数据分析等。

针对细胞标本, MSI多采用二次离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS)和基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)离子源,使细胞标本表面的物质分子离子化,继续传输进入质量分析器,获得物质分子的质谱信号强度、质荷比或离子淌度等指纹信息,经信息转化成离子图像后,最终实现多种物质分子的原位可视化检测。与器官组织标本分析相比,细胞标本的物质成像更要综合考虑仪器的空间分辨率、灵敏度和分子特异性,根据实际需求来

选择最为合适的分析策略。与MALDI-MSI相比, SIMS-MSI具有较高的空间分辨率,可达到纳米级别的亚细胞水平,与高分辨静电场轨道阱质谱联用,可以实现对细胞器中内源物质分子的高空间分辨率、高质量分辨率的3D成像,但检测生物大分子蛋白质和多肽的能力较差^[45-47]。MALDI-MSI具有检测质量范围宽(小分子、蛋白质和多肽等)等优势,但存在基质峰干扰等缺陷。以MALDI-MSI作为基础,出现了激光诱导后电离MALDI-2技术,可以有效提高多种待测物检测灵敏度达2~3个数量级,同时降低了离子抑制效应(图4)^[48]。

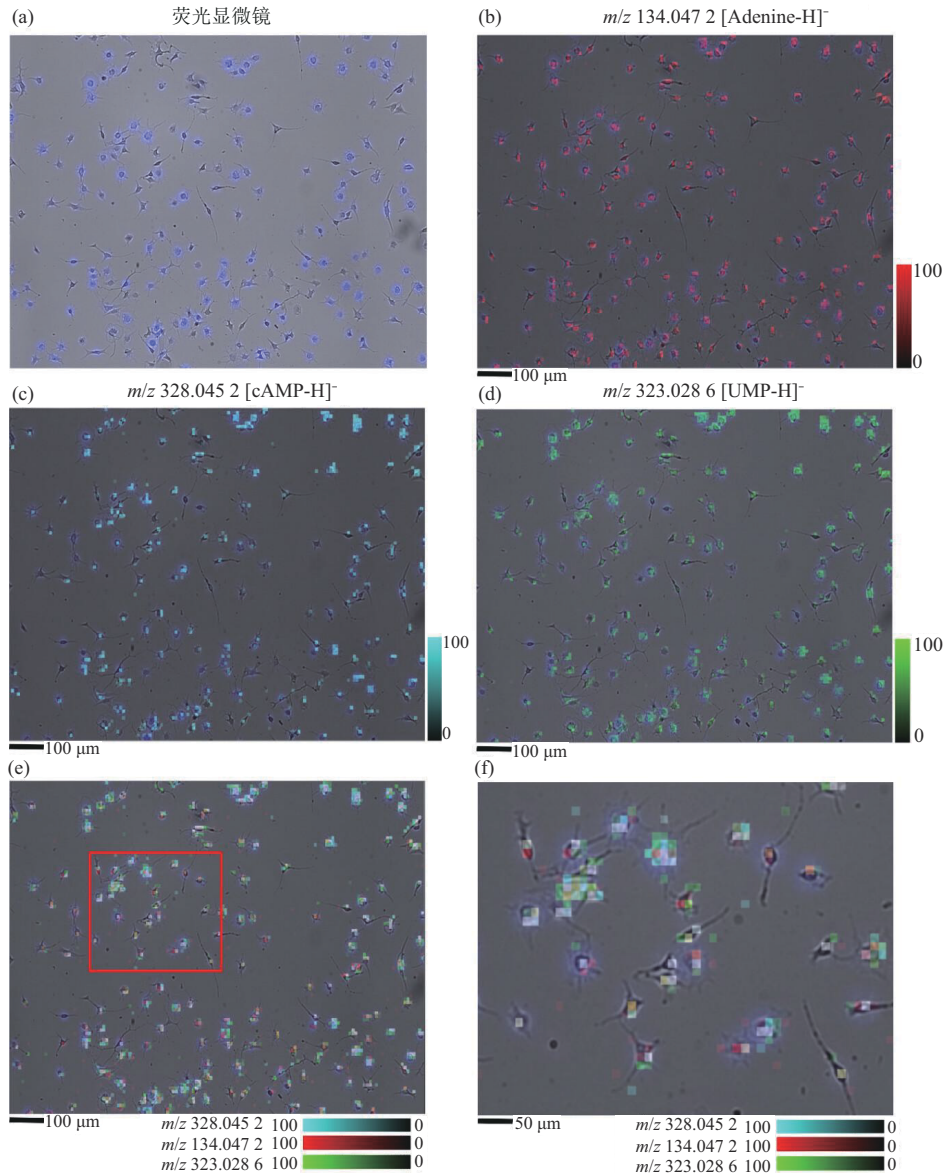


Fig. 4 Utility of MALDI-2-MSI combined with oversampling for single-cell metabolomics analysis of iPSC-derived astrocytes^[48]

图4 MALDI-2-MSI与过采样相结合用于iPSC衍生星形胶质细胞的单细胞代谢组学分析^[48]

4.2 质谱流式分析

与质谱空间成像技术相比,飞行时间细胞计数法(cytometry by time-of-flight, CyTOF)将传统流式细胞术与质谱技术相结合,在单细胞水平实现多种蛋白质的高通量定量分析,但无法获得物质分子的空间信息。与传统流式细胞术相比,CyTOF尤其适用于高度复杂的细胞集群样本的研究,内容包括免疫及其微环境表征、免疫细胞组成、细胞功能和信号转导等^[49-50]。成像质谱细胞术(imaging mass cytometry, IMC)是以CyTOF技术作为基础,在组织切片水平测定多种金属同位素标记物,是集免疫细胞分析、质谱分析和组织形态分析为一体的新兴单细胞成像技术,在组织切片水平来分析细胞表型、免疫微环境、蛋白质表达、细胞-细胞相互作用,广泛应用于人体肿瘤免疫细胞组成和微环境变化等^[49-50]。

CyTOF和IMC技术通常与多组学技术相融合,应用于肿瘤演进及其分子机制研究。Ali等^[50]首先采用IMC,选取人体乳腺癌肿瘤组织,开展37种蛋白质的共定位表达分析,确定乳腺癌免疫细胞组成和原位表达特征。然后开展标本的全转录组测序分析,发现了173个与乳腺癌演进密切相关的基因,并进行靶向测序分析。随后,对组织切片水平的单细胞进行分割,深度表征单细胞蛋白质表达、相邻细胞信息,绘制乳腺癌单细胞水平的蛋白质和基因图谱,将肿瘤分子表型和细胞基因组信息相关联,发现肿瘤演进的微环境特征和变化,这些特征可以作为开发乳腺癌新诊疗方案的靶标。Sorin等^[51]选取人体肺癌标本,采用CyTOF技术检测到超过160万个细胞,并归纳细胞组成,包括内皮细胞、肿瘤细胞和14种免疫细胞亚群。其中,浸润性免疫细胞、巨噬细胞含量和表达尤为突出。同时,发现细胞-细胞间位置信息在肿瘤诊疗中具有重要作用,例如,低分级标本CD8⁺和CD4⁺T细胞与癌细胞的相关性比高分级标本高。另外,作者整合癌细胞免疫微环境细胞亚群后,发现特定细胞群簇与病人生存率具有显著相关性,推断肿瘤免疫微环境细胞组成和定位可能具有重要的预后价值。

5 应用

以3D细胞模型为研究对象,采用质谱成像技术开展肿瘤相关药物代谢分析较为广泛。药物的器官分布和渗透直接影响其临床疗效,对此开展深入研究对于药效的精准评价和癌症复发分子机制研究具有重要作用。Liu等^[52]以3D培养的HCT116结

肠癌细胞球作为研究对象,采用MALDI-MSI评估了抗癌药物伊立替康的空间分布和药物渗透,与动物模型实验相比,此方法具有准确快速的优点,为药效的快速评估提供了更为节省成本和时间研究策略。Liu等^[53]采用3D细胞微球-质谱成像结合的方法针对肿瘤的免疫治疗药物药效进行评估,并且实现了抗体型药物的精准传递。研究中选取西妥昔单抗作为典型药物,西妥昔单抗是一种与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)胞外结构域结合的单克隆抗体,EGFR在结直肠癌中过度表达,介导细胞分化、增殖、迁移和血管生成。他们绘制了西妥昔单抗在两种不同结肠癌细胞系(HT-29和DLD-1)中的时间依赖性渗透和空间分布,3D细胞微球的ATP含量随药物暴露浓度增加而升高。

Tobias等^[54]对成像的研究平台进行改进,将悬浮在基质凝胶中的细胞植入纸基支架中进行培养,形成组织微环境,并结合MALDI-MSI进行药物药效筛选,该方法具备准确快速和高通量等特点。Machálková等^[55]开发了一种基于MALDI-MSI和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)成像的多模态半自动配准程序,对结直肠癌球状模型进行哌立福新药物渗透分析,并且MSI和IHC信号的量化是通过一个从球体边界到球体中心的等距层的信号强度评估算法来实现的。研究发现,24h内含有哌立福新的球状区域可与细胞多个区域共定位,并显示出临床上重要的特征,如增殖、凋亡和转移潜能。这种方法为肿瘤组织内,化疗药物的生物利用度和分布研究提供了新的见解。

除了药物时空成像之外,还可以同时对母体药物及其代谢物、内源代谢物等进行空间定位、定性和定量研究。Chen等^[56]使用MALDI-MSI和液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)研究羟氯喹(HCQ)的生物分布及其在不同时间点对A549细胞代谢的影响。在进行质谱成像前,研究人员首先对A549细胞球体切片进行HE染色,从而获得球体的外部区域,再通过图像分割将球体图像划分为内部和外部区域,利用MALDI-MSI和LC-MS/MS研究两个区域内的脂质代谢的时空变化规律及分子机制变化。结果表明,HCQ在细胞球体中的空间分布具有时间依赖性,即球体内部和外部区域的脂质代谢物的质谱信号强度变化各不相同,例如脂质PI[(38:3)-H]⁻在HCQ暴露的球体内部区域

下调, 在外部区域上调, 而[LPI(18:0)-H]⁻和[PS(34:1)-H]⁻在A549细胞的内部和外部区域具有相似的空间分布, 结果表明, HCQ暴露显著改变肿瘤细胞生物信息的时空异质性。

6 总结与展望

以质谱为基础的多种前沿成像技术, 可以获得高维度、多参数的成像数据, 实现对人体正常生理过程、疾病发生发展进程中多种细胞、细胞器多重生物信息的原位可视化观测, 并筛选疾病相关的阶段性生物标志物。其中, MSI、CyTOF 以及 IMC 实现了细胞间质、细胞-细胞间及其边界、细胞内部的物质分子深度原位分析。未来的研究方法侧重于以下3个方面: a. 通过这些前沿成像技术, 将获得大量细胞数据, 均需更快速、高效、准确性高的图像数据算法来实现单细胞、多细胞器、罕见细胞亚群、复杂细胞形态的准确分割和识别, 开发能够提高细胞可视化准确率的深度学习模型和算法是关键, 并建立更为完备的数据集成工具, 在解析输出结果的同时, 能够有效地揭示质谱空间组数据的生物学意义; b. 融合多种生物医学手段, 包括超声、磁共振、声镊操控等, 实现细胞模型的精准构建, 从而更好地模拟复杂疾病、肿瘤发生发展的进程; c. 构建通用性强、操作稳定、特异性强的细胞成像平台, 实现数据交互, 更好地服务于临床研究中疾病分子机制研究和精准诊疗。

参 考 文 献

- [1] Wang C, Tang Z, Zhao Y, *et al.* Three-dimensional *in vitro* cancer models: a short review. *Biofabrication*, 2014, **6**(2): 022001
- [2] Kogler S, Kõmurcu K S, Olsen C, *et al.* Organoids, organ-on-a-chip, separation science and mass spectrometry: an update. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, **161**: 116996
- [3] Lancaster M A, Knoblich J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, **345**(6194): 1247125
- [4] Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 2016, **165**(7): 1586-1597
- [5] Zhang H, Lu K H, Ebbini M, *et al.* Mass spectrometry imaging for spatially resolved multi-omics molecular mapping. *NPJ Imaging*, 2024, **2**(1): 20
- [6] Jiang L X, Yang M, Wali S N, *et al.* High-throughput mass spectrometry imaging of biological systems: current approaches and future directions. *Trends Analyt Chem*, 2023, **163**: 117055
- [7] Zenobi R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science*, 2013, **342**(6163): 1243259
- [8] Castro D C, Xie Y R, Rubakhin S S, *et al.* Image-guided MALDI mass spectrometry for high-throughput single-organelle characterization. *Nat Methods*, 2021, **18**(10): 1233-1238
- [9] Elia I, Haigis M C. Metabolites and the tumour microenvironment: from cellular mechanisms to systemic metabolism. *Nat Metab*, 2021, **3**(1): 21-32
- [10] Cao J, Yao Q J, Wu J, *et al.* Deciphering the metabolic heterogeneity of hematopoietic stem cells with single-cell resolution. *Cell Metab*, 2024, **36**(1): 209-221.e6
- [11] 卢晓琴, 刘晓凤, 钟浩, 等. 三维细胞培养技术及其应用进展. *生物医学工程学杂志*, 2023, **40**(3): 602-608
- [12] Lu X Q, Liu X F, Zhong H, *et al.* *J Biomed Eng*, 2023, **40**(3): 602-608
- [13] De S, Singh N. Advancements in three dimensional *in-vitro* cell culture models. *Chem Rec*, 2022, **22**(9): e202200058
- [14] Koroleva A, Deiwick A, El-Tamer A, *et al.* *In vitro* development of human iPSC-derived functional neuronal networks on laser-fabricated 3D scaffolds. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(7): 7839-7853
- [15] Liu X, Hummon A B. Mass spectrometry imaging of therapeutics from animal models to three-dimensional cell cultures. *Anal Chem*, 2015, **87**(19): 9508-9519
- [16] Xie P, Zhang J, Wu P, *et al.* Multicellular tumor spheroids bridge the gap between two-dimensional cancer cells and solid tumors: the role of lipid metabolism and distribution. *Chin Chem Lett*, 2023, **34**(2): 107349
- [17] Lazzari G, Nicolas V, Matsusaki M, *et al.* Multicellular spheroid based on a triple co-culture: a novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. *Acta Biomater*, 2018, **78**: 296-307
- [18] Francies H E, Garnett M J. What role could organoids play in the personalization of cancer treatment?. *Pharmacogenomics*, 2015, **16**(14): 1523-1526
- [19] Velasco V, Ali Shariati S, Esfandyarpour R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng*, 2020, **6**: 76
- [20] Unagolla J M, Jayasuriya A C. Recent advances in organoid engineering: a comprehensive review. *Appl Mater Today*, 2022, **29**: 101582
- [21] Koledova Z. 3D coculture of mammary organoids with fibrospheres: a model for studying epithelial-stromal interactions during mammary branching morphogenesis. *Methods Mol Biol*, 2017, **1612**: 107-124
- [22] Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, **2**(11): a003244
- [23] 周天浩, 辛肇晨, 杜少倩, 等. 乳腺癌类器官共培养技术的建立和优化. *上海交通大学学报: 医学版*, 2021, **41**(8): 1017-1024
- [24] Zhou T H, Xin Z C, Du S Q, *et al.* *J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci*, 2021, **41**(8): 1017-1024
- [25] Zhao C, Cai Z. Three-dimensional quantitative mass spectrometry imaging in complex system: from subcellular to whole organism. *Mass Spectrom Rev*, 2022, **41**(3): 469-487
- [26] Tucker L H, Conde-González A, Cobice D, *et al.* MALDI matrix application utilizing a modified 3D printer for accessible high resolution mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2018, **90**(15): 8742-8749
- [27] Xie P, Zhao C, Liang X, *et al.* Preparation of frozen sections of

- multicellular tumor spheroids coated with ice for mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2020, **92**(11): 7413-7418
- [26] Yang C, Wu R, Liu H, *et al.* Polyacrylamide gel as a new embedding medium for the enhancement of metabolite MALDI imaging. *Chem Commun*, 2023, **59**(26): 3842-3845
- [27] Jaskolla T W, Lehmann W D, Karas M. 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(34): 12200-12205
- [28] Beavis R, Chait B. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom*, 1992, **27**(2): 156-158
- [29] Strnad Š, Pražienková V, Sýkora D, *et al.* The use of 1, 5-diaminonaphthalene for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging of brain in neurodegenerative disorders. *Talanta*, 2019, **201**: 364-372
- [30] Hou J, Chen S, Zhang N, *et al.* Organic salt NEDC (N-naphthylethylenediamine dihydrochloride) assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of metal ions in real samples. *Analyst*, 2014, **139**(13): 3469-3475
- [31] Liu H, Zhou Y, Wang J, *et al.* N-phenyl-2-naphthylamine as a novel MALDI matrix for analysis and *in situ* imaging of small molecules. *Anal Chem*, 2018, **90**(1): 729-736
- [32] Chen Y, Hu D, Zhao L, *et al.* Unraveling metabolic alterations in transgenic mouse model of Alzheimer's disease using MALDI MS imaging with 4-aminocinnoline-3-carboxamide matrix. *Anal Chim Acta*, 2022, **1192**: 339337
- [33] Holbrook J H, Sekera E R, Lopez A, *et al.* Enhancement of lipid signals in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with ammonium fluoride as a matrix additive. *Anal Chem*, 2023, **95**(28): 10603-10609
- [34] Huang X, Zhan L, Sun J, *et al.* Utilizing a mini-humidifier to deposit matrix for MALDI imaging. *Anal Chem*, 2018, **90**(14): 8309-8313
- [35] Wang X, Han J, Yang J, *et al.* Matrix coating assisted by an electric field (MCAEF) for enhanced tissue imaging by MALDI-MS. *Chem Sci*, 2015, **6**(1): 729-738
- [36] Zhou P, Xiao Y, Zhou X, *et al.* Mapping spatiotemporal heterogeneity in multifocal breast tumor progression by noninvasive ultrasound elastography-guided mass spectrometry imaging strategy. *JACS Au*, 2024, **4**(2): 465-475
- [37] Müller M A, Kompauer M, Strupat K, *et al.* Implementation of a high-repetition-rate laser in an AP-SMALDI MSI system for enhanced measurement performance. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, **32**(2): 465-472
- [38] Xie H, Wu R, Winnie Hung Y L, *et al.* Development of a matrix sublimation device with controllable crystallization temperature for MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2021, **93**(16): 6342-6347
- [39] Luo Y, Song C, Mao J, *et al.* Developing a noncontact heating matrix spraying apparatus with controllable matrix film formation for MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2022, **94**(35): 12136-12143
- [40] Meng L, Han J, Chen J, *et al.* Development of an automatic ultrasonic matrix sprayer for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Anal Chem*, 2022, **94**(17): 6457-6462
- [41] Sheng W, Zhang C, Mohiuddin T M, *et al.* Multiplex immunofluorescence: a powerful tool in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(4): 3086
- [42] Radtke A J, Chu C J, Yaniv Z, *et al.* IBEX: an iterative immunolabeling and chemical bleaching method for high-content imaging of diverse tissues. *Nat Protoc*, 2022, **17**(2): 378-401
- [43] Jarosch S, Köhler J, Sarker R S J, *et al.* Multiplexed imaging and automated signal quantification in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by ChipCytometry. *Cell Rep Methods*, 2021, **1**(7): 100104
- [44] Tsai A G, Glass D R, Juntilla M, *et al.* Multiplexed single-cell morphometry for hematopathology diagnostics. *Nat Med*, 2020, **26**(3): 408-417
- [45] Zhao C, Cai Z. Mass spectrometry-based omics and imaging technique: a novel tool for molecular toxicology and health impacts. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2023, **261**(1): 10
- [46] 赵超, 蔡宗苇. 基于质谱成像和组学分析的环境毒理研究. *化学进展*, 2021, **33**(4): 503-511
Zhao C, Cai Z W. *Prog Chem*, 2021, **33**(4): 503-511
- [47] 周鹏, 蔡宗苇, 赵超. 基于空间组学-临床影像技术的肿瘤精准诊断. *化学进展*, 2024, **36**(2): 159-166
Zhou P, Cai Z W, Zhao C. *Prog Chem*, 2024, **36**(2): 159-166
- [48] McKinnon J C, Balez R, Young R S E, *et al.* MALDI-2-enabled oversampling for the mass spectrometry imaging of metabolites at single-cell resolution. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2024, **35**(11): 2729-2742
- [49] Chevrier S, Levine J H, Zanotelli V R T, *et al.* An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell*, 2017, **169**(4): 736-749.e18
- [50] Ali H R, Jackson H W, Zanotelli V R T, *et al.* Imaging mass cytometry and multiplatform genomics define the phenogenomic landscape of breast cancer. *Nat Cancer*, 2020, **1**(2): 163-175
- [51] Sorin M, Rezanejad M, Karimi E, *et al.* Single-cell spatial landscapes of the lung tumour immune microenvironment. *Nature*, 2023, **614**(7948): 548-554
- [52] Liu X, Weaver E M, Hummon A B. Evaluation of therapeutics in three-dimensional cell culture systems by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2013, **85**(13): 6295-6302
- [53] Liu X, Lukowski J K, Flinders C, *et al.* MALDI-MSI of immunotherapy: mapping the EGFR-targeting antibody cetuximab in 3D colon-cancer cell cultures. *Anal Chem*, 2018, **90**(24): 14156-14164
- [54] Tobias F, McIntosh J C, LaBonia G J, *et al.* Developing a drug screening platform: MALDI-mass spectrometry imaging of paper-based cultures. *Anal Chem*, 2019, **91**(24): 15370-15376
- [55] Machálková M, Pavlatovská B, Michálek J, *et al.* Drug penetration analysis in 3D cell cultures using fiducial-based semiautomatic coregistration of MALDI MSI and immunofluorescence images. *Anal Chem*, 2019, **91**(21): 13475-13484
- [56] Chen Y, Wang T, Xie P, *et al.* Mass spectrometry imaging revealed alterations of lipid metabolites in multicellular tumor spheroids in response to hydroxychloroquine. *Anal Chim Acta*, 2021, **1184**: 339011

Mass Spectrometry-based Cell Imaging*

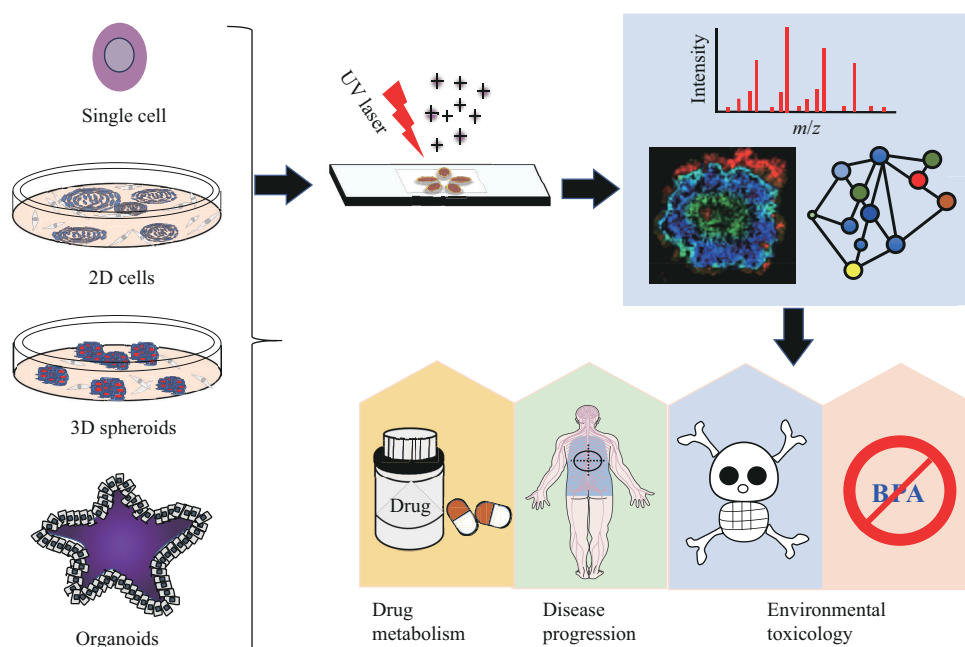
ZHOU Peng^{1)**}, WANG Xin^{2,3)**}, LUO Qian^{2)***}, ZHAO Chao^{2)***}

¹⁾Department of Ultrasound, First Affiliated Hospital of Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China;

²⁾Institute of Scientific Instrumentation, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

³⁾College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Graphical abstract



Abstract Cell models can simulate a variety of life states and disease developments, including single cells, two-dimensional (2D) cell cultures, three-dimensional (3D) multicellular spheroids, and organoids. They are essential tools for addressing complex biochemical questions. With continuous advancements in biological and cellular analysis technologies, in vitro cellular models designed to answer scientific questions have evolved rapidly. Early in vitro models primarily relied on 2D systems, which failed to accurately replicate the complex cellular

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22176195), the Guangdong Province Zhu Jiang Talents Plan (2021QN02Y028), the National Key R&D Program of China (2022YFF0705003), the Key Program of Fundamental Research in Shenzhen (JCYJ20210324115811031), the Shenzhen Key Laboratory of Precision Diagnosis and Treatment of Depression (ZDSYS20220606100606014), and the Guangdong Science and Technology Department (2021B1212030004).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

ZHAO Chao. Tel: 86-755-26417984, E-mail: chao.zhao@siat.ac.cn

LUO Qian. Tel: 86-755-26417984, E-mail: qian.luo@siat.ac.cn

Received: July 29, 2024 Accepted: December 4, 2024

compositions and microenvironmental interactions observed *in vivo*, let alone support sophisticated investigations into cellular biological functions. Subsequent improvements in cell culture techniques led to the development of 3D culture-based models, such as cellular spheroids. The advent of pluripotent stem cell technology further advanced the development of organoid systems, which closely mimic human organ development. Compared to traditional 2D models, both 3D cellular models and organoids offer significant advantages, including personalization and enhanced physiological relevance, making them particularly suitable for exploring molecular mechanisms of disease progression, discovering novel cellular and biomolecular functions, and conducting related studies. The imaging analysis of common cellular models primarily employs labeling-based methods for *in situ* imaging of targeted genes, proteins, and small-molecule metabolites, enabling further research on cell types, states, metabolism, and drug efficacy. However, these approaches have drawbacks such as poor labeling specificity and complex experimental procedures. By using cells as experimental models, mass spectrometry technology combined with morphological analysis can reveal quantitative changes and spatial distributions of various biological substances at the spatiotemporal level, including metabolites, proteins, lipids, peptides, drugs, environmental pollutants, and metals. This allows for the investigation of cell-cell interactions, tumor microenvironments, and cellular bioinformational heterogeneity. The application of these cutting-edge imaging technologies generates vast amounts of cellular data, necessitating the development of rapid, efficient, and highly accurate image data algorithms for precise segmentation and identification of single cells, multi-organelle structures, rare cell subpopulations, and complex cellular morphologies. A critical focus lies in creating deep learning models and algorithms that enhance the accuracy of cellular visualization. At the same time, establishing more robust data integration tools is essential not only for analyzing and interpreting outputs but also for effectively uncovering the biological significance of spatially resolved mass spectrometry data. Developing a cell imaging platform with high versatility, operational stability, and specificity to enable data interoperability will significantly enhance its utility in clinical research, thereby advancing investigations into disease molecular mechanisms and supporting precision diagnostics and therapeutics. In contrast to genomic, transcriptomic, and proteomic information, the metabolome can rapidly respond to external stimuli and cellular physiological changes within a short timeframe. This rapid and precise reflection of ongoing cellular state alterations has positioned spatial metabolomics as a pivotal approach for exploring the molecular mechanisms underlying physiological and pathological processes in cells, tissues, and organisms. In this review, we summarize research on cell imaging based on mass spectrometry technologies, including the selection and preparation of cell models, morphological analysis of cell models, spatial omics techniques based on mass spectrometry, mass cytometry, and their applications. We also discuss the current challenges and propose future directions for development in this field.

Key words cell imaging, spatial omics, mass spectrometry, spatio-temporal heterogeneity

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0348

CSTR: 32369.14.pibb.20240348