

- [13] KANDALA P K, SRIVASTAVA S K. DOMming ovarian cancer growth[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 13: 1869-1875.
- [14] CHEN X, YING Z, LIN X, et al. Acylglycerol Kinase augments JAK2/STAT3 signaling in esophageal squamous cells[J]. *J Clin invest*, 2013, 123(6): 2576-2589.
- [15] 潘莉萍, 袁伟. 黄连素对 K562 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(5): 795-798.
- [16] 张亚军. 黄连素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015: 1-42.
- [17] HARDIE D G, SCHAFFER B E, BRUNET A. AMPK: an Energy-Sensing pathway with multiple inputs and outputs[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 190-201.
- [18] CHEN S, ZHU X, LAI X, et al. Combined cancer therapy with non-conventional drugs; all roads Lead to AMPK[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2014, 14(8): 642-654.
- [19] 柯昌康, 刘毓英, 倪云峰. 腺苷酸活化蛋白激酶在黄连素诱导人肺癌细胞凋亡中的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 3977-3980.
- [20] KAMEL W A, SUGIHARA E, YAMAGUCHI S I, et al. Statins induce apoptosis in osteosarcoma cells by activation of Ampk and p38-MAPK via suppression of mevalonate pathway[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4182.
- [21] LIU B, YUAN B, ZHANG L, et al. ROS/p38/p53/puma signaling pathway is involved in emodin-induced apoptosis of human colorectal cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15413-15422.
- [22] 姜恩平, 李贺, 于春艳, 等. 五味子乙素通过 p38MAPK 信号通路对结肠癌 SW480 细胞凋亡和侵袭的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(4): 675-679.
- [23] 周军挺, 王丽, 吴婷, 等. 小檗碱抗人结直肠腺癌的作用及其机制[J]. *中草药*, 2017, 48(3): 519-525.
- [24] 何旭春, 胡建达. 大黄素对人红白血病细胞株 HEL 作用的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(5): 1121-1124.
- [25] CHIDAMBARA MURTHY K N, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 688(1/2/3): 14-21.
- [26] 陈奇彪, 詹雄宇, 吕秀秀. 小檗碱增强阿霉素诱导的膀胱癌 T24 细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(5): 847-851.
- [27] KIM J S, OH D, YIM M J, et al. Berberine induces FasL-related apoptosis through p38 activation in KB human oral cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1775-1782.

(收稿日期: 2018-04-12 修回日期: 2018-06-28)

• 综 述 •

质谱成像技术及其在肿瘤蛋白质组学中的研究进展

王娜娜^{1,2}, 张 婷^{1,3} 综述, 胡成进^{1△} 审校

(1. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031; 2. 泰山医学院, 山东泰安 271016;
3. 潍坊医学院医学检验学系, 山东潍坊 261053)

摘 要: 质谱成像(MSI)作为蛋白质组学前沿技术, 近年来受到国内外学者的关注。该技术具有无标记、高通量、大数据、可视化等特点, 可检测多种生物分子的空间分布信息, 在组织或细胞水平上对肿瘤的准确诊断及研究应用潜力巨大。该文介绍了 MSI 像的优势、原理、样品制备及其在肿瘤蛋白质组学方面的研究进展。

关键词: 质谱成像; 蛋白质组学; 肿瘤; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2018. 23. 031

文章编号: 1673-4130(2018)23-2966-05

中图法分类号: R730. 21

文献标识码: A

质谱成像(MSI)是目前用来研究生物组织蛋白质组学的关键技术。在 1997 年, 德国 CAPRIOLI 教授首次提出了基质辅助激光解吸电离质谱分子成像技术(MALDI-MSI)^[1], 随后该团队经过近 10 年的研发, 2016 年 CAPRIOLI 教授又提出了全新的质谱成像策略^[2], 将该技术形象地称为“分子显微镜”。该技术能将组织和细胞的生物分子定位, 可视化测量蛋白质、脂质和其他生物分子在表达水平上的分布、空间重排和变更, 同时对分子群体进行分析用于研究及分子诊断。目前, 该前沿技术已引起国内学者的关注,

但尚在起步阶段, 相关报道较少见。

1 MSI 的优势

MSI 作为一种非常灵敏的分子成像技术, 在研究及应用上具有独特的优势: (1) MSI 具有快速检测能力及高空间分辨率, 图像采集速率 > 25 像素/s, 可以产生百万像素分子图像, 小至 50 μm 的结构在空间上得到分辨^[2]; (2) MSI 将质谱的灵敏度和选择性与经典组织学的空间描述特征相结合, 可以在组织切片、细胞表面直接鉴定和定位各种分子; (3) MSI 可以对未标记的样品进行分析, 不需要事先知晓分析物信

△ 通信作者, E-mail: hcj6289@163. com。

本文引用格式: 王娜娜, 张婷, 胡成进. 质谱成像技术及其在肿瘤蛋白质组学中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2966-2970.

息,并可以同时原位分析多种分子^[3]; (4)同一张组织切片可以在 MSI 分析后,洗脱基质再进行苏木素和伊红(HE)染色,并且可以将二者结果结合(重叠)分析; (5)灵敏度较高,可以直观的显示各种分子的含量,以及对各种分子的含量进行对比及聚类分析; (6)MSI 实验需要很少的标本,单个组织切片或细胞就可以成功进行实验,得到数千个不同分子的质谱图像。

2 MSI 的技术原理

MSI 技术是经过冰冻切片获得 10~12 μm 的组织片或将细胞制成薄层涂片,喷涂基质后将玻片置于质谱仪的靶上,利用成像软件选择拟成像区域进行成像。选用的基质材料具有激光激发波长的强能量吸收,用激光照射样品使组织表面物质解吸和电离^[4],产生离子后在质量分析仪中通过其质荷比(m/z)分离,将各个点的分子量信息转化为图片上的像素点。所有质谱数据经过平滑、对齐、归一化处理后得到了一幅完整的质谱图^[5]。质谱成像是一种半定量的方法,当某种物质在组织中有含量差异时,可以根据图像颜色的深浅来判断其相对含量。经过组织学染色的切片信息可以导入到质谱仪中,质谱成像结果可以结合组织学染色结果分析,以研究感兴趣物质的分布或做出临床病理诊断。

3 MSI 的样本制备

样品制备是整个实验过程中至关重要的环节,必须确保组织中分子的完整性以及空间分布的原位性,避免分析物的降解。样本制备主要包括样本的收集和储存、组织切片、组织预处理、基质喷涂等方面。手术取得标本后应将组织迅速储存于低温下,必须在冷冻过程中保留组织天然形态。通常将组织用铝箔纸包裹后置液氮中快速冷冻后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。制备切片时要避免形成冰晶,避免分析物降解;防止切片断裂、打卷;确定适宜的切片厚度等。切片洗涤完成充分干燥后,进行样品制备的另一个关键步骤基质覆盖,使用基质的目的是与组织切片表面的分析物形成共结晶,基质吸收激光能量,使分析物离子化后进入质谱仪进行检测。整个过程分析物的相对丰度和空间分布保持不变。使用基质的目的是与组织切片表面的分析物形成共结晶,基质吸收激光能量,使分析物离子化后进入质谱仪进行检测。整个过程分析物的相对丰度和空间分布保持不变^[6]。 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)常用于蛋白质成像分析,而 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)最常用于脂质和药物代谢物分析。常用的基质喷涂方法有喷雾法和气雾法,喷雾法适用于大蛋白质成像,气雾法适合从小分子、脂类、多肽到蛋白质的多种化合物,根据分析的物质类型选择最佳基质,多种基质多种应用。

4 MSI 在肿瘤蛋白质组学的应用

目前肿瘤的临床诊断依靠病理学与临床特征相结合,尚缺乏特异的理想生物标志物。手术切除仍然

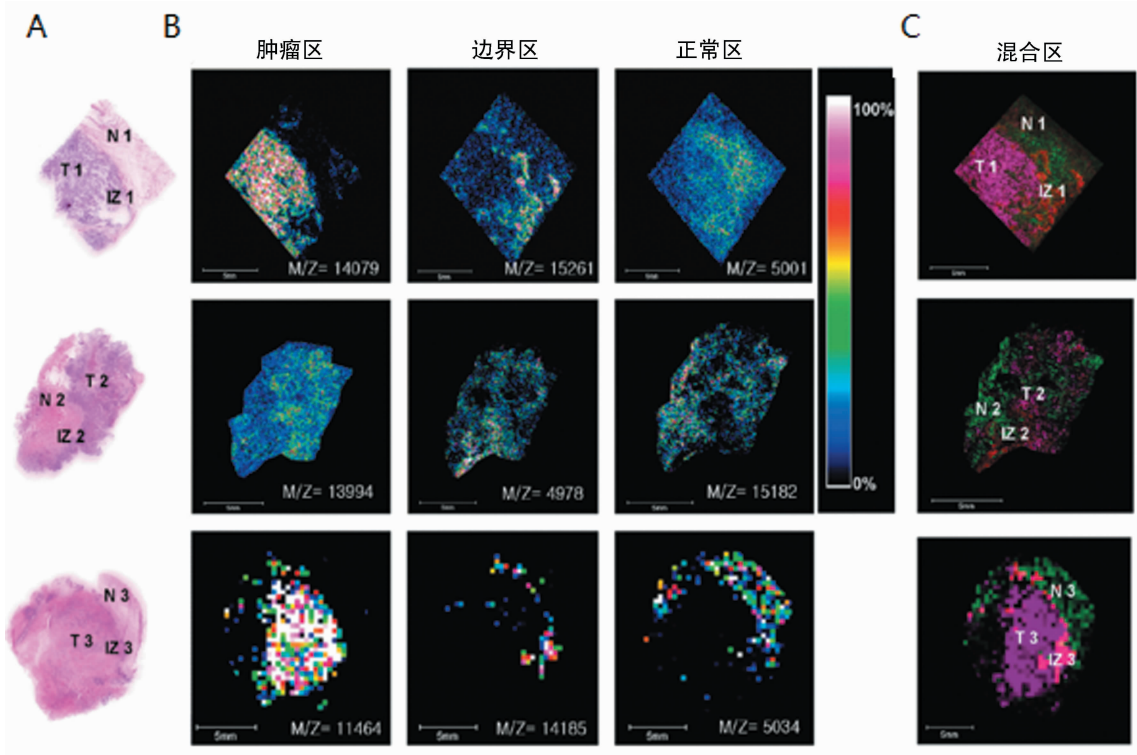
是大部分肿瘤治疗的“金标准”,但是对肿瘤边缘的视觉判断和组织学评估不够准确,不完全切除导致了肿瘤的复发^[7]。所以,全面了解肿瘤微环境,确定肿瘤区域特定分子定位,将对肿瘤类型、边界的确定及诊断治疗提供新的帮助。MSI 技术能够从组织样本中对其组织学背景下的分子进行无标记多重检测和分析^[8]。由于在整个分析过程中保持组织学结构完整,多个分析物的空间分布可以与组织学和临床特征相关联^[9]。MSI 技术和适宜的蛋白质组学技术相结合在肿瘤研究及临床分子诊断中具有实际的应用前景。

4.1 MSI 鉴定肿瘤边界 肿瘤治疗的关键是确保手术过程中肿瘤组织完全切除,以尽可能减少疾病的复发,并且边界的分子特征有助于了解肿瘤浸润的过程及疾病的临床管理。此外,确定边界也在肿瘤分期中起关键作用,这将影响后续治疗方案的实施。所以,快速准确地鉴定癌变组织边界是肿瘤手术治疗的关键。但是,肿瘤的精确定位仍然是困扰临床医生的挑战性问题。MSI 已成功用于快速鉴定肿瘤边界,揭示正常和肿瘤组织的蛋白质组学图谱的差异,并发现在卵巢癌、肾细胞癌、垂体腺瘤等组织中原位表征差异分子的分布,形象直观地显示出肿瘤的分布区域。KANG 等^[10]使用 MALDI-MSI 来识别卵巢癌分子特征,得到卵巢癌组织中边界区(IZ),肿瘤区(TZ)和正常区(NZ)特定的分子分布图像(图 1)。揭示了来自肿瘤和正常组织及边界区域的独特的多肽谱,并且将成像结果与病理学结果结合分析,验证了成像结果的正确性。SPRAGGINS^[2]团队利用 MALDI MSI 进行肾细胞癌组织成像,得到高分辨率的蛋白质成像图,结果显示肿瘤和正常区域不同的分子分布,这显示了 MSI 可以分析组织特异性分子的能力。CALLIGARIS 等^[11]研究了神经肽在正常垂体组织和垂体腺瘤样本中的定位,利用 MALDI MSI 分析了 45 例垂体腺瘤和 6 例正常垂体组织中激素水平,从采集组织到确定两种组织中肽和蛋白质激素的组成仅用了 30 min,远低于典型的垂体手术时间,结果发现正常组织和肿瘤组织有明显不同的蛋白特征,首次证明了该技术在临床应用中的巨大价值。因此,MSI 评估肿瘤边缘的潜在优势是能够识别组织病理学无法检测到的分子变化。MSI 有望帮助临床医生更精确、更快速的确定肿瘤的位置,切除所有的肿瘤组织,尽可能多的保留健康组织。

4.2 MSI 区分肿瘤类型 精准的肿瘤诊断是癌症有效治疗的前提。目前肿瘤的临床诊断通常依靠组织形态学和免疫组织化学分析。免疫组织化学需采用多种抗体,多张组织切片才能进行肿瘤分型^[12],并且操作步骤繁琐,受临床诊断经验等因素限制,往往难以做出确切诊断。而质谱成像技术只需要一张组织切片就可以获得空间分辨的具有不同肿瘤组织类型特征的蛋白质组学成像图,同时保持分析组织的形态

完整性。因此,可以通过分析不同组织特征的蛋白质图谱对肿瘤准确分类^[13]。RAUSER 等^[14] 利用 MALDI MSI 对乳腺癌组织进行质谱成像,直接从组织中区分不同 HER2 状态的乳腺癌并区分出肿瘤与基质组织,同时发现特定的蛋白质/肽表达变化与 HER2 表达强烈相关。其中质荷比 8 404 分子特异性显示在 HER2 阳性的肿瘤组织中,而不存在于 HER2 阴性的肿瘤组织中。因此可以用来区分 HER2 阳性和阴性患者。而质荷比 6 225 分子在 HER2 阳性和阴性病例中均存在,质荷比 4 969 分子只存在于基质中,而不存在于肿瘤组织中(图 2)。在另一项研究中, PAGNI 等^[15] 研究不同类型的甲状腺病变,将 MSI 应

用于细针穿刺细胞涂片,聚类分析甲状腺乳头状癌, Hürthle 细胞腺瘤,甲状腺髓样癌和增生性结节之间的蛋白质谱,结果发现与增生性结节患者相比,在 Hürthle 细胞腺瘤,甲状腺髓样癌和甲状腺乳头状癌患者中检测到的质荷比 4 965、质荷比 6 278 和质荷比 6 651 3 种不同蛋白质均下调。随后,通过比较 Hürthle 细胞腺瘤患者和甲状腺髓样癌患者获得的蛋白质谱图,质荷比 7 263、质荷比 8 294 和质荷比 8 310 处的蛋白质在这 2 个实体之间差异表达。这说明 MALDI MSI 可以区分良恶性甲状腺疾病以及不同类型甲状腺肿瘤。



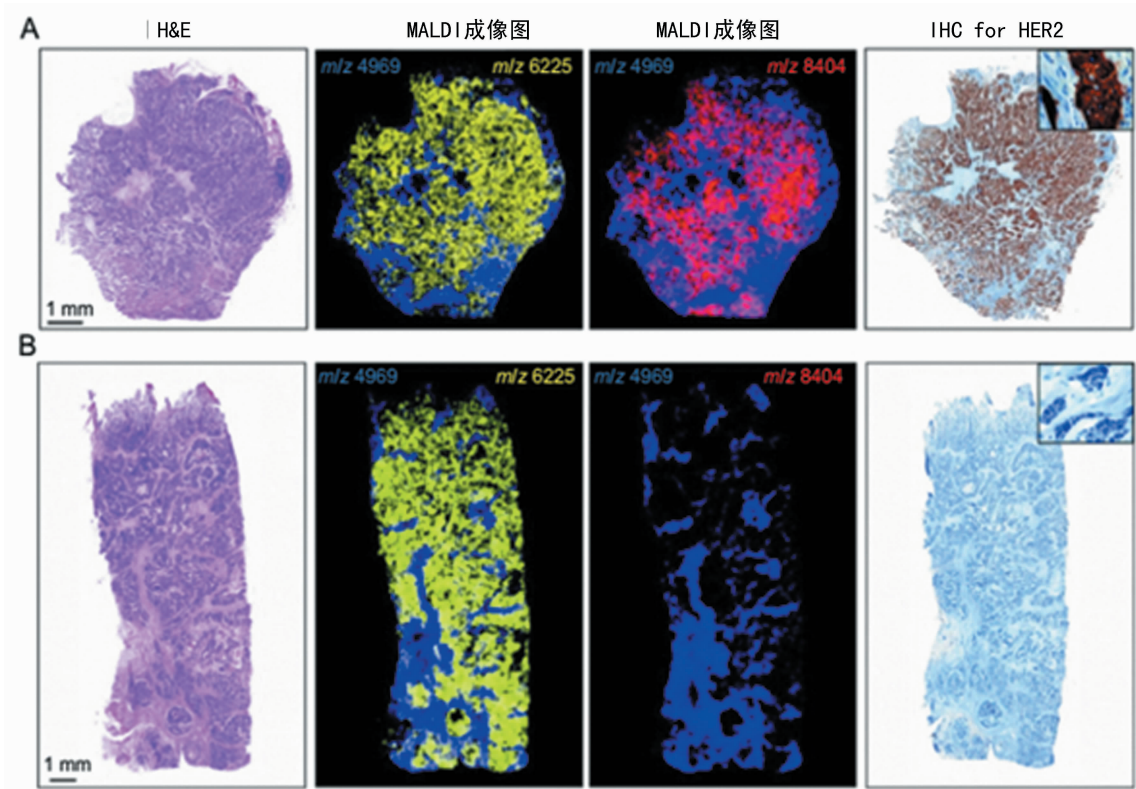
注:A 为 HE 染色;B 为 3 个区域内不同分子分布的质谱成像图;C 为区域分明的成像图

图 1 卵巢组织中差异表达蛋白的 MALDI MSI 图像

4.3 MSI 发现新肿瘤生物标志物 生物标记物可用于肿瘤的诊断,转移及预后等方面并且还有助于了解肿瘤发生和发展的生物学机制^[16]。但是肿瘤是一种复杂而异质的疾病,目前临床上缺乏理想的生物标志物。一种基于 MSI 的蛋白质组学被广泛应用于肿瘤潜在生物标志物的发现^[17],利用 MSI 可以原位表征组织内的各种分子的空间信息^[18],揭示健康和癌症组织的蛋白质组学图谱的差异,目前已经在肾细胞癌^[19]、肺癌^[20]、胃癌^[21]、结直肠癌^[22]、肝癌^[23]、乳腺癌^[24]等癌症中发现了新的潜在诊断、转移及预后生物标志物。NA 等^[19] 分析了乳头状肾细胞癌(RCC)的手术组织切片,得到不同组织区域的分子成像质谱图,结果显示 S100A11 和铁蛋白轻链是乳头状 RCC 癌症区域中的差异表达蛋白,并且经过免疫组织化学

验证 S100A11 和铁蛋白轻链在肿瘤细胞中过表达。这表明 S100A11 和铁蛋白轻链是鉴别诊断 RCC 的潜在生物标志物。淋巴结转移(LNM)是决定肿瘤患者适当治疗的重要因素之一,MSI 用于发现多种癌症中转移及预后的潜在标志物,并可结合串联质谱技术对标志物进行鉴定和功能预测。例如 S100A8 和 S100A9 用于胃腺癌转移的监测^[25], COX7A2、TAGLN2 和 S100-A10 用以监测 Barrett 腺癌发展以及预测区域性转移^[26]。在另一项研究中,GEMOLL 等^[22] 将胸腺素 β -4(T β -4)鉴定为结直肠(CRC)肿瘤相关的预后指标,并且非整倍体结直肠肿瘤表现出比二倍体肿瘤更差的预后。另外显示增加的 T β -4 蛋白水平与结直肠肿瘤患者的存活率降低相关。所以 T β -4 蛋白可能成为抗肿瘤的新分子靶标。这些研究证明

了 MSI 能够在组织学转化之前检测肿瘤相关蛋白表达的变化,使其成为识别肿瘤生物标志物的有用工具。



注:A 为 HER2 阳性乳腺癌组织;B 为 HER2 阴性乳腺癌组织;质荷比 8 404 分子只显示在 HER2 阳性的肿瘤组织中;质荷比 6 225 分子在 HER2 阳性和阴性病例中均存在;质荷比 4 969 分子只显示在基质中,而不存在于肿瘤组织中

图 2 乳腺癌组织中 HER2 表达的 MALDI MSI 图像

4.4 MSI 研究肿瘤的异质性 肿瘤的异质性目前被认为是基于遗传不稳定性和微环境应激的克隆进化,以及肿瘤干细胞的多向分化的结果^[27]。它具有独特的分子表型(肿瘤亚群),因此,鉴定这些临床相关肿瘤亚群对于了解肿瘤的发展及临床治疗方案的实施具有至关重要的作用^[28]。传统的蛋白质方法主要通过使用抗体的靶向测定来研究肿瘤异质性的临床意义,不适用于发现的新型肿瘤亚群。因此,需要一种能够对未标记的蛋白进行检测并且可以原位空间分析肿瘤分子信息的新技术。MSI 技术以其无标记,原位表征分子分布的优势已应用于肿瘤异质性的研究。BALLUFF 等^[29]首次展示了肿瘤组织的 MALDI 成像与先进的统计聚类分析相结合用于鉴定乳腺癌和胃癌中具有临床相关性的表型和分子独特的肿瘤亚群,获得不同组织区域的分割图谱,发现几个检测到的肿瘤亚群与胃癌患者的生存特征相关。在另一项研究中,PANDERI 等^[30]利用 MSI 对前列腺癌组织成像,揭示了前列腺癌异质细胞群的蛋白质组学改变。这表明 MSI 在研究肿瘤异质性方面具有很大的优势和潜力。

5 小 结

MSI 技术以其快速、高分辨率、无标记的原位分

析具有广阔的研究及临床应用潜力。目前采用 MSI 技术研究居多,其应用尚在起步阶段。但是该技术能可视化准确识别各种器官肿瘤组织中分子的空间分布特征及其相对含量信息,能实现具有特征信息的诊断图像。随着该技术的不断成熟和生物信息学处理软件的完善,其将成为肿瘤病理诊断的新技术而应用于临床。

参考文献

[1] 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):4751-4760.

[2] SPRAGGINS J M,RIZZO D G,MOORE J L,et al. Next-generation technologies for spatial proteomics: Integrating ultra-high speed MALDI-TOF and High Mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis[J]. Proteomics,2016,16(11/12):1678-1689.

[3] ARENTZ G,MITTAL P,ZHANG C,et al. Applications of mass spectrometry imaging to cancer[J]. Adv Cancer Res,2017,134:27-66.

[4] COLE L M,CLENCH M R. Mass spectrometry imaging tools in oncology[J]. Biomark Med,2015,9(9):863-868.

[5] ROCHA B,RUIZ-ROMERO C,BLANCO F J. Mass

- spectrometry imaging: a novel technology in rheumatology[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(1): 52-63.
- [6] QIN L, ZHANG Y, LIU Y et al. Recent advances in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for in situ analysis of endogenous molecules in plants[J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29(4): 351-364.
- [7] CHOW W H, DONG L M, DEVESA S S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(5): 245-257.
- [8] LY A, BUCK A, BALLUFF B, et al. High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(8): 1428-1443.
- [9] MANZANARES M D, GUTIÉRREZ-ROMÁN C I, MEDINA-CONTRERAS O. MALDI imaging, beyond classic diagnosis[J]. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2017, 74(3): 212-218.
- [10] KANG S, SHIM H S, LEE J S, et al. Molecular proteomics imaging of tumor interfaces by mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(2): 1157-1164.
- [11] CALLIGARIS D, FELDMAN D R, NORTON I, et al. MALDI mass spectrometry imaging analysis of pituitary adenomas for near-real-time tumor delineation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(32): 9978-9983.
- [12] KRIEGSMANN J, KRIEGSMANN M, CASADONTE R. MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: a valuable tool for cancer diagnostics (review)[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 893-906.
- [13] MEDING S, NITSCHKE U, BALLUFF B, et al. Tumor classification of six common cancer types based on proteomic profiling by MALDI imaging[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1996-2003.
- [14] RAUSER S, MARQUARDT C, BALLUFF B, et al. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(4): 1854-1863.
- [15] PAGNI F, MAININI V, GARANCINI M, et al. Proteomics for the diagnosis of thyroid lesions: preliminary report[J]. *Cytopathology*, 2015, 26(5): 318-324.
- [16] TIMMS J F, HALE O J, CRAMER R. Advances in mass spectrometry-based cancer research and analysis: from cancer proteomics to clinical diagnostics[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(6): 593-607.
- [17] FLATLEY B, MALONE P, CRAMER R. MALDI mass spectrometry in prostate cancer biomarker discovery[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(5): 940-949.
- [18] CRECELIUS A C, SCHUBERT U S, VON EGGELING F. MALDI mass spectrometric imaging meets "omics": recent advances in the fruitful marriage[J]. *Analyst*, 2015, 140(17): 5806-5820.
- [19] NA C H, HONG J H, KIM W S, et al. Identification of protein markers specific for papillary renal cell carcinoma using imaging mass spectrometry[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(7): 624-629.
- [20] RAHMAN S J, GONZALEZ A L, LI M, et al. Lung cancer diagnosis from proteomic analysis of preinvasive lesions[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 3009-3017.
- [21] BALLUFF B, RAUSER S, MEDING S, et al. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(6): 2720-2729.
- [22] GEMOLL T, STROHKAMP S, SCHILLO K, et al. MALDI-imaging reveals thymosin beta-4 as an Independent prognostic marker for colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43869-43880.
- [23] LE FAUDER J, LAOUIREM S, ALEXANDROV T, et al. Tumoral heterogeneity of hepatic cholangiocarcinomas revealed by MALDI imaging mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2014, 14(7/8): 965-972.
- [24] CHUNG L, PHILLIPS L, LIN M Z, et al. A novel truncated form of S100P predicts disease-free survival in patients with lymph node positive breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 64-70.
- [25] CHOI J H, SHIN N R, MOON H J, et al. Identification of S100A8 and S100A9 as negative regulators for lymph node metastasis of gastric adenocarcinoma[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(11): 1439-1448.
- [26] ELSNER M, RAUSER S, MAIER S, et al. MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(15): 4693-4704.
- [27] MARUSYK A, ALMENDRO V, POLYAK K. Intratumour heterogeneity: a looking glass for cancer? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(5): 323-334.
- [28] TURNER N C, REIS-FILHO J S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(4): E178-185.
- [29] BALLUFF B, FRESE C K, MAIER S K, et al. De novo discovery of phenotypic intratumour heterogeneity using imaging mass spectrometry[J]. *J Pathol*, 2015, 235(1): 3-13.
- [30] PANDERI I, YAKIREVICH E, PAPAGERAKIS S, et al. Differentiating tumor heterogeneity in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) prostate adenocarcinoma tissues using principal component analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectral data; differentiating tumor heterogeneity by PCA of MALDI-IMS data[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2017, 31(2): 160-170.