

基于质谱技术的神经肽研究进展

姬倩悦^{1,2}, 马敏^{1,2}, 彭鑫¹, 贾辰熙², 李灵军^{1,3}

1 天津大学 生命科学学院, 天津 300072

2 国家蛋白质科学中心 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室 放射与辐射医学研究所, 北京 102206

3 美国威斯康星大学麦迪逊分校 药学院和化学系, 美国 威斯康星 麦迪逊 53705

姬倩悦, 马敏, 彭鑫, 等. 基于质谱技术的神经肽研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1061–1068.

Ji QY, Ma M, Peng X, et al. Advances in mass spectrometry-based approaches for neuropeptide analysis. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1061–1068.

摘 要: 神经肽是一类重要的内源活性物质, 在神经系统中发挥重要的作用, 并连接大脑和其他神经器官。基于质谱技术的神经肽组学研究旨在对神经肽进行大规模研究, 在分子水平上得到重要信息, 进一步加深对神经系统调控机制以及神经疾病致病机理的理解。文中综述了利用质谱技术进行神经肽研究的基本策略, 包括样品处理、定性定量方法以及质谱成像等研究进展。

关键词: 神经肽, 质谱, 定性, 定量, 质谱成像

Advances in mass spectrometry-based approaches for neuropeptide analysis

Qianyue Ji^{1,2}, Min Ma^{1,2}, Xin Peng¹, Chenxi Jia², and Lingjun Li^{1,3}

1 School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences-Beijing, Beijing 102206, China

3 University of Wisconsin-Madison, Wisconsin 53705, USA

Abstract: Neuropeptides are an important class of endogenous bioactive substances involved in the function of the nervous system, and connect the brain and other neural and peripheral organs. Mass spectrometry-based neuropeptidomics

Received: December 25, 2016; **Accepted:** February 6, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21675006), National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. SQ2016YFJC040033, 2016YFA0501302).

Corresponding authors: Lingjun Li. E-mail: lingjun.li@wisc.edu

Chenxi Jia. E-mail: cjia@mail.ncpsb.org

国家自然科学基金 (No. 21675006), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. SQ2016YFJC040033, 2016YFA0501302) 资助。

are designed to study neuropeptides in a large-scale manner and obtain important molecular information to further understand the mechanism of nervous system regulation and the pathogenesis of neurological diseases. This review summarizes the basic strategies for the study of neuropeptides using mass spectrometry, including sample preparation and processing, qualitative and quantitative methods, and mass spectrometry imaging.

Keywords: neuropeptides, mass spectrometry, identification, quantitation, mass spectrometry imaging

“神经肽”最初是由 De Wied^[1]在 1971 年提出，是在神经细胞中合成的内源性肽段，通过调节神经来影响多种生理进程，具有典型的多肽短链结构，长度一般为 3–100 个氨基酸。神经肽的生理学功能主要是在神经元以及其他细胞或靶器官之间传递信号。在临床上，神经肽扮演着重要角色。神经肽的调节异常往往会引起一系列的神经系统疾病。经实验证明，精氨酸加压素、脑啡肽、 β -内啡肽等神经肽与癫痫的发生发展有着密切的关系，而胆囊收缩素和血管紧张素可以抑制脑内癫痫发作^[2]。也有研究发现神经肽与皮肤免疫反应、组织维护及修复有关^[3]。因此，神经肽以及神经肽受体已经成为治疗神经系统疾病的药物靶点^[4]。

神经肽是在神经元中合成，首先合成神经肽前体，然后经过一系列酶切、翻译后修饰等过程产生具有活性的神经肽。一个神经肽前体可以产生多个具有活性的神经肽。即使是同一家族的神经肽仍可能具有不同的功能，甚至会引起相反的调节作用。因此，神经肽的这些分子水平特性导

致对其研究极其困难并具有很大的挑战性。

传统的研究神经肽的方法主要是放射免疫法、免疫组织化学法、RNA 印迹试验等。这些方法不仅需要耗费大量时间，而且神经肽必须有已知信息，因此不适用于发现新的神经肽。此外，基于抗体的免疫化学法易发生交叉反应，难以区分同一神经肽的不同亚型^[5]。

近年来质谱技术发展迅速，应用领域越来越广。由于质谱分析具有高灵敏度、高准确度、分离和鉴定同时进行等特点，为神经肽的研究提供了新途径。在微量样品中，质谱仪可检测出大量神经肽，并可精确测量肽段的质荷比 (Mass/charge, m/z)，根据肽段的二级图谱进行从头测序、同源序列比对等方法，从而发现新型未知的神经肽。通过非标记方法或者同位素标记的方法，质谱可以检测神经肽的动态变化。此外，运用质谱成像技术可对神经肽的分布提供具体信息。图 1 概括了目前利用质谱研究神经肽的主要技术路线。

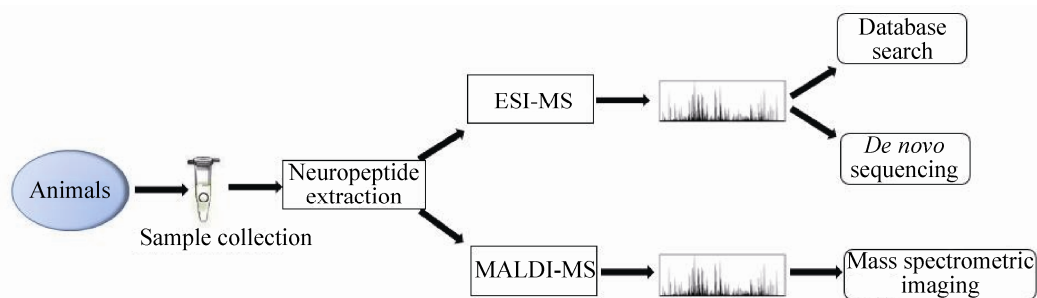


图 1 神经肽研究的技术路线流程图

Fig. 1 Flow chart of strategies for neuropeptide analysis by MS. ESI: electrospray ionization; MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization; MS: mass spectrometry.

1 样品制备

质谱是一种具有高灵敏度的分析仪器,若想对神经肽进行精确分析,则应提高样品的纯度。在神经肽检测过程中,很多因素会对其分析造成一定的影响,例如高盐、脂质以及能引起神经肽降解的酶等,均可抑制神经肽的检测信号,对分析结果造成影响。因此,需要采用特殊有效的样品制备方法和策略。

当动物的脑部组织被解剖出后,蛋白酶就开始快速降解蛋白质以及神经肽。相对丰度较高的蛋白质的降解产物通常很复杂,抑制了组织中相对丰度较低的神经肽的信号,对神经肽的检测造成困难。为了灭活组织中蛋白酶,常用的一种处理方法是对组织进行微波加热。Che等^[6]利用微波技术对小鼠的下丘脑和垂体进行加热,使其中蛋白酶迅速变性,并采用质谱和稳定同位素标记的方法对神经肽进行定量。经实验发现,经过微波加热后,在下丘脑中检测到的神经肽含量比未经此技术处理的样品高出2-3倍。Sturm等^[7]也利用微波加热的方法处理下丘脑和纹状体组织并且分析其中神经肽。另一种常用处理方法是利用生物样品稳定仪——Denator^[8]对样品进行处理。Sturm等^[9]比较了利用生物样品稳定仪灭活蛋白酶的样品和未灭活样品的神经肽数据,发现在利用电喷雾电离源分析时,动物死后的蛋白质降解片段会掩盖神经肽信号,增加图谱复杂性。此外,通过给实验动物灌注蛋白酶抑制剂的方法也可以有效抑制蛋白酶的降解作用^[10]。使用这种方法处理样品后,不仅可获得更多的完整神经肽数量,而且蛋白酶的降解产物也相应地减少。

对于体液中的神经肽,可以采用微透析技

术与质谱分析相结合,从而提高神经肽的鉴定数量。微透析技术(Microdialysis, MD)是一种利用膜透析原理对活体细胞外液中生化物质进行采集的技术。因对动物造成的干扰小,且样品不被非变量因素干扰,被广泛应用于神经生物学分析^[11]。但是,使用微透析技术时,其神经肽回收率低是阻碍其应用的瓶颈,因为与其他小分子相比,神经肽的尺寸较大,会堵塞透析膜,因此影响神经肽的回收率。为了增加神经肽的回收率,通常将亲和剂加在液体灌注探头中,分析物与亲和剂结合,导致透析液中分析物浓度降低,增大浓度梯度,驱动分析物透过透析膜,这种方法被称为亲和力增强微透析(Affinity-enhanced microdialysis, AE-MD)^[12]。实验结果发现利用抗体、环糊精等亲和剂,成功提高了细胞因子和神经肽的回收率^[13]。Schmerberg等^[14]比较了C18硅胶颗粒、抗体包被的微粒等不同亲和剂对神经肽进行富集,发现抗体包覆磁性纳米颗粒(AbMnP)的效果最好,使神经肽回收率增加超过40倍。利用此方法分析北黄道蟹神经器官中的神经肽,与常规方法相比检测到更多的神经肽,且蛋白质降解碎片的数量也大大降低^[15]。

2 质谱分析

液相色谱与二级质谱联用是神经肽分析强有力的工具,通常采用数据依赖采集方法对其进行高通量分析。但是神经肽的质量大小多变,质谱对大于4 kDa的肽段解离和裂解效果不佳,降低对中等或者质量大的肽段从头测序能力。根据神经肽的质量大小,分别采取不同的分析策略,可以精确鉴定到不同大小的神经肽。如利用数据依赖采集串联质谱方法检测质量小的

神经肽,自上而下 (Top-down) 的测序方法检测中等大小的神经肽,自下而上 (Bottom-up) 的方法分析质量大的神经肽,为神经肽的全面研究提供新的思路^[16]。

质谱数据库非依赖采集方法是通过从头测序的方法,不依赖于数据库,从质谱数据中按照质谱二级数据中碎片离子信息直接推测序列,这对于发现新型未知神经肽具有很大意义。Ye 等^[17]利用从头测序的方法研究了加利福尼亚龙虾中的神经肽,通过从头测序方法发现 34 种神经肽,包括 18 种新型神经肽,并揭示了加利福尼亚龙虾中向肌肽 (Orcokinin) 新型序列基序。

利用两种质谱技术基质辅助激光解吸电离-傅里叶变换质谱 (MALDI-FTMS) 和纳流液相色谱-电喷雾电离-四极杆-飞行时间串联质谱 (Nano LC-ESI-Q-TOF MS/MS), Ma 等^[18]将生物质谱分析和功能基因组分析结合,共同验证神经肽的功能。MALDI-FTMS 用来检测已知神经肽的精确质量,而 nano LC-ESI-Q-TOF MS/MS 用来对未知的神经肽进行从头测序。此外,利用同源转录组信息搜索质谱检测到的神经肽,验证了鞣花激素 β 亚型、蝗抗利尿肽等。而 Hayakawa 等^[19]将碰撞诱导解离 (Collision-induced dissociation, CID) 和电子转移解离 (Electron transfer dissociation, ETD) 这两种不同的离子碎裂方式结合,检测小鼠垂体肿瘤细胞中的神经肽。经过结合不同的解离方法,使同一肽段产生不同的碎片离子,为神经肽的鉴定提供更丰富的序列信息,从而提高鉴定可信度。

3 数据处理

质谱是一种高通量的分析仪器,一次实验可获得海量数据,所以需要严谨的数据处理手

段从庞大的质谱原始文件中鉴定、定量神经肽。肽组学分析数据与蛋白质组学的差别是不需要选择酶切,采用非特异性数据库进行搜索。分析质谱数据时,需要相应种属数据库提供神经肽名称、序列等信息。蛋白质前体数据库可以从网站上下载,例如 Uniprot、NCBI 等。

为了减小假发现率,在研究神经肽时,经常应用只含有潜在神经肽序列或其前体蛋白序列的数据库,而不是选用该生物的全蛋白质数据库。神经肽是由神经肽前体经酶切产生,所以许多研究者利用神经肽的剪切规律预测神经肽的序列,例如 NeuroPred^[20]是预测神经肽前体裂解位点,提供肽段潜在序列。而 SwePep 数据库中已经包含已经被注释的神经肽,可以手工或者利用软件直接与原始数据对比,鉴定神经肽^[21]。应用选定的数据库,利用搜库软件,例如 Mascot、SEQUEST、PEAKS 和 ProSightPC 等,通过肽段质量对数据进行分析,将图谱与含有理论肽段的数据对比,得到图谱对应的肽段信息。

除了与数据库对比,还可以通过从头测序的方法分析肽段,特别是在缺少相应种属的基因组序列时。在分析质谱图谱时,按照氨基酸的质量推测出肽段序列,然后进行序列同源比对,得到有相似序列的物种,根据其所属的家族推测出该肽段可能具有的功能。从头测序可以通过软件辅助分析,例如 PEAKS^[22]。通过加入化学修饰可以帮助指认多肽的碎片离子,使 b 离子和 y 离子在二级质谱中分开,例如还原甲基化标记法等。这种方法标记神经肽的 N 末端和赖氨酸的 ϵ 氨基,标记后每一个位点增加 28 Da,且 a_1 离子信号增强,有利于从头测序分析^[23]。同时,标记后的肽段带电状态变化不大,不会

降低肽段分析的精确度。

4 神经肽的定量

利用质谱技术可以测量不同情况下神经肽的含量, 质谱数据的高度重复性决定了定量的准确性。对神经肽的定量分为绝对定量和相对定量, 绝对定量是指获得某种肽段的精确表达量, 而相对定量则是通过质谱技术比较在不同条件下的样品中肽段表达量的差异。定量的手段分为非标记定量和稳定同位素标记定量。非标记定量通常是利用质谱图中峰面积、峰强度或者图谱数量进行定量, 这不能准确定量低丰度的神经肽。Frese 等^[24]借助高分辨率的串联质谱, 利用肽段的提取离子色谱图 (Extracted ion chromatogram, XIC) 的峰面积, 研究下丘脑和纹状体中调控进食的神经肽。利用胰蛋白酶酶解的 BSA 肽段作为内标, 在质谱水平上对检测技术的变化进行归一化。实验结果发现, 当大鼠进食高糖高脂肪的食物时, 促进食欲神经肽含量相对上调。Lee 等^[25]利用串联质谱对视交叉上核中神经肽进行研究, 通过比较峰强度, 发现在不同时间点的神经肽含量具有显著差异, 进一步实验得到神经肽调控大鼠的昼夜节律的证据, 这为探索视交叉上核的昼夜节律功能提供了重要的分子水平信息。

利用化学或者代谢方法引入的稳定同位素标记策略可实现同时对多个样品进行定量。利用标记试剂, 在肽段中引入同位素标签, 不同样品中同一肽段具有质量差, 在同一图谱中分析峰强度, 可以得到相关肽的比例。

研究者已发明可以进行多标定量的化学试剂, 在不增加样品复杂度的前提下增加标记数量, 例如 TMT^[26]、iTRAQ^[27]、DiLeu^[28]等方法。

上文提到还原甲基化标记法可以辅助从头测序, 除此之外, 还可以被运用于神经肽的定量。为了研究与进食相关的神经肽, Chen 等^[11]利用甲醛和氘代甲醛分别标记未进食和进食的动物的神经肽组, 以 1:1 的比例混合进行质谱分析, 观察质谱图谱可得到神经肽的相对变化比例。结果表明, 在进食之后, CabTRP 含量提高, 而 Pyrokinin 含量降低。结合质谱成像技术发现, 嗅叶和中央前大脑是关于进食的主要两个区域。同样, 研究者用此方法研究了温度对冷血生物神经肽的影响, 发现高温时心包器官中的 RFamide 和 RYamide 含量显著降低, 而窦腺中的 orcokinin 含量降低^[29]。

Hui 等^[30]研究蓝蟹的神经肽, 结合从头测序的方法, 利用 N,N-二甲基亮氨酸 (DiLeu) 对样品进行标记, 提高测序的准确度。被标记神经肽的二级图谱表现出高强度的指示离子 (m/z 114), 可作为神经肽检测的标签。同时, DiLeu 标记可增强神经肽在质谱中的碎裂, 有利于从头测序。此研究鉴定了蓝蟹 11 个家族的 130 种神经肽, 其中有 44 种是新发现的肽段。

代谢标记是在肽段合成过程中引入同位素, 即在细胞培养时引入同位素标记的氨基酸或者在饲养动物时喂食含有同位素的食物。细胞培养中使用氨基酸进行稳定的同位素标记 (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) 方法是将含有重标或者轻标的必需氨基酸加入培养基中, 并引入目标细胞中, 其所包含的蛋白质经胰蛋白酶酶解后, 会产生具有相应质量差的肽段。在蛋白质组学研究时, 因其较高的标记率, 而被广泛使用^[31]。但是, 这种方法缺点是试剂较为昂贵, 耗费时间较长, 而且并不是每一种样品都适用于此方法。

此外, 通过化学反应也可以将同位素引入肽段中, 常用的标记方法有四甲基溴化铵 (TMAB)、二甲基标记^[32]等。

以上方法是对神经肽进行相对定量, 获得不同样品之间肽段表达差异。对于已知的神经肽, 可以采用质谱多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 对肽段进行绝对定量。MRM 是根据待检测离子的质量信息, 有选择地收集二级质谱信号, 降低其他信号干扰。Kosanam 等^[33]采用 MRM 方法对大鼠脑部的 α 以及 γ 内啡肽进行定量, 以测定其相对于组织的含量, 其含量分别为 (13.8±0.57) ng/g 和 (2.5±0.43) ng/g。

5 质谱成像技术

目前, 利用质谱成像技术对神经肽的研究主要集中于鉴定和定量, 且神经肽空间分布也为研究其功能提供重要信息。免疫组织化学染色可以研究神经肽分布, 但是提供的化学信息较少, 并且抗体容易产生交叉反应而使结果不准确。由 Gessel 等^[34]发明的质谱成像方法 (Mass spectrometric imaging, MSI) 可以克服以上问题, 在组织、细胞水平对待测分子的空间分布信息进行成像, 具有高敏感度和化学特异性。待测样品被固定于含有 x - y 轴的样品板上, 通过质谱电离技术获得每个位点的质荷比信息, 根据信号强度得到相应的热点图, 从而显示出组织样品中生物分子的空间分布信息。

DeKeyser 等^[35]利用 MALDI 质谱分子成像技术研究了北黄道蟹围心器和脑部的神经肽组成, 鉴定了超过 10 个家族神经肽的分布, 发现同一家族的神经肽也会呈现不同的分布信息。OuYang 等^[36]将质谱成像与数据依赖采集方法相结合, 利用 MALDI-LTQ-Orbitrap XL 质谱仪

研究甲壳类动物的神经肽。将全质谱扫描与数据依赖采集扫描结合在一次质谱分析中, 使质谱成像分析更加快速, 且可同时进行神经肽的鉴定和分布研究。最终实验原位鉴定到蓝蟹的 39 种已知神经肽及一种新型神经肽。

但是, 利用质谱成像的方法研究神经肽仍然存在诸多问题。例如, 在研究小分子时, 基质在激光照射时产生的基质离子可能会掩盖分析物离子的信号, 特别是对于质量小于 500 Da 的分子。Shariatgorji 等^[37]分析了 D₄-CHCA 与 CHCA, 发现与 CHCA 相比, D₄-CHCA 的电离离子发生质量偏移, 低质量分析物的质谱峰不被基质覆盖。或者使用选择反应监测 (Selective reaction monitor, SRM), 只有特定的片段离子被检测, 因此基质离子不会对分析物的检测造成干扰^[38]。利用质谱成像进行定量、样品制备的重复性等问题也是质谱成像技术面临的难题。

6 总结与展望

神经肽是一种重要的信号分子, 在众多生理过程中具有重要作用, 也是药物研发的重要靶点。应用基于质谱的神经肽组学技术, 对神经肽鉴定和定量, 可为在不同的生理学进程中神经元之间信号传递与调控提供更加深刻的认识。

随着技术的发展, 更加先进的质谱仪和技术被利用于多种样品的研究。但是, 众多研究只是集中于鉴定到的神经肽数目, 而没有对其生物功能进行深入研究。例如, 不能有效区分内源性多肽和其前体的降解产物。一般方法是将检测到的数据与神经肽前体序列对比, 确定是否存在神经肽。但事实是检测到的肽段通常是活性神经肽的一部分, 这些缩短形式的神经

肽并不能被确认为独立的神经肽还是冗余。

即使近些年分析技术迅速发展,但新神经肽功能的研究仍然进程缓慢。这就需要开发可靠的方法,对具有重要生物学功能的神经肽进行深入研究。当前的定性和定量的方法,仍需简化流程、增加重现性,才能得到广泛推广和利用。为了从质谱数据中挖掘出更多的信息,生物信息学分析工具也需要进一步改进以适应质谱技术的飞速发展。

REFERENCES

- [1] de Wied D. Long term effect of vasopressin on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Nature*, 1971, 232(5305): 58–60.
- [2] Clynen E, Swijsen A, Raijmakers M, et al. Neuropeptides as targets for the development of anticonvulsant drugs. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 626–646.
- [3] Peters EMJ, Ericson ME, Hosoi J, et al. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(9): 1937–1947.
- [4] Hökfelt T, Bartfai T, Bloom F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2003, 2(8): 463–472.
- [5] Nelson MD, Trojanowski NF, George-Raizen JB, et al. The neuropeptide NLP-22 regulates a sleep-like state in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, 2013, 4: 2846.
- [6] Che FY, Lim J, Pan H, et al. Quantitative neuropeptidomics of microwave-irradiated mouse brain and pituitary. *Mol Cell Proteom*, 2005, 4(9): 1391–1405.
- [7] Sturm RM, Dowell JA, Li L. Rat brain neuropeptidomics: tissue collection, protease inhibition, neuropeptide extraction, and mass spectrometric analysis. *Methods Mol Biol*, 2010, 615: 217–226.
- [8] Zhang XZ, Petruzzello F, Zani F, et al. High identification rates of endogenous neuropeptides from mouse brain. *J Proteome Res*, 2012, 11(5): 2819–2827.
- [9] Sturm RM, Greer T, Woodards N, et al. Mass spectrometric evaluation of neuropeptidomic profiles upon heat stabilization treatment of neuroendocrine tissues in crustaceans. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 743–752.
- [10] Secher A, Kelstrup CD, Conde-Frieboes KW, et al. Analytic framework for peptidomics applied to large-scale neuropeptide identification. *Nat Commun*, 2016, 7: 11436.
- [11] Chen RB, Hui LM, Cape SS, et al. Comparative neuropeptidomic analysis of food intake via a multifaceted mass spectrometric approach. *ACS Chem Neurosci*, 2010, 1(3): 204–214.
- [12] van Wanseele Y, de Prins A, de Bundel D, et al. Challenges for the *in vivo* quantification of brain neuropeptides using microdialysis sampling and LC-MS. *Bioanalysis*, 2016, 18(8): 1965–1985.
- [13] Fletcher HJ, Stenken JA. An *in vitro* comparison of microdialysis relative recovery of Met- and Leu-enkephalin using cyclodextrins and antibodies as affinity agents. *Anal Chim Acta*, 2008, 620(1/2): 170–175.
- [14] Schmerberg CM, Li LJ. Mass spectrometric detection of neuropeptides using affinity-enhanced microdialysis with antibody-coated magnetic nanoparticles. *Anal Chem*, 2013, 85(2): 915–922.
- [15] Behrens HL, Chen RB, Li LJ. Combining microdialysis, nanoLC-MS, and MALDI-TOF/TOF to detect neuropeptides secreted in the crab, *Cancer borealis*. *Anal Chem*, 2008, 80(18): 6949–6958.
- [16] Jia CX, Lietz CB, Ye H, et al. A multi-scale strategy for discovery of novel endogenous neuropeptides in the crustacean nervous system. *J Proteomics*, 2013, 91: 1–12.
- [17] Ye H, Wang JX, Zhang ZC, et al. Defining the neuropeptidome of the spiny *Lobster panulirus interruptus* brain using a multidimensional mass spectrometry-based platform. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4776–4791.
- [18] Ma MM, Bors EK, Dickinson ES, et al. Characterization of the *Carcinus maenas* neuropeptidome by mass spectrometry and functional genomics. *Gen Comp Endocr*, 2009, 161(3): 320–334.
- [19] Hayakawa E, Menschaert G, de Bock PJ, et al. Improving the identification rate of endogenous

- peptides using electron transfer dissociation and collision-induced dissociation. *J Proteome Res*, 2013, 12(12): 5410–5421.
- [20] Southey BR, Amare A, Zimmerman TA, et al. NeuroPred: a tool to predict cleavage sites in neuropeptide precursors and provide the masses of the resulting peptides. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W267–W272.
- [21] Fälvh M, Sköld K, Norrman M, et al. SwePep, a database designed for endogenous peptides and mass spectrometry. *Mol Cell Proteom*, 2006, 5(6): 998–1005.
- [22] Ma B, Zhang KZ, Hendrie C, et al. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(20): 2337–2342.
- [23] Fu Q, Li LJ. *De novo* sequencing of neuropeptides using reductive isotopic methylation and investigation of ESI QTOF MS/MS fragmentation pattern of neuropeptides with N-terminal dimethylation. *Anal Chem*, 2005, 77(23): 7783–7795.
- [24] Frese CK, Boender AJ, Mohammed S, et al. Profiling of diet-induced neuropeptide changes in rat brain by quantitative mass spectrometry. *Anal Chem*, 2013, 85(9): 4594–4604.
- [25] Lee JE, Zamdborg L, Southey BR, et al. Quantitative peptidomics for discovery of circadian-related peptides from the rat suprachiasmatic nucleus. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 585–593.
- [26] Dayon L, Hainard A, Licker V, et al. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal Chem*, 2008, 80(8): 2921–2931.
- [27] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteom*, 2004, 3(12): 1154–1169.
- [28] Frost DC, Greer T, Li LJ. High-resolution enabled 12-plex DiLeu isobaric tags for quantitative proteomics. *Anal Chem*, 2015, 87(3): 1646–1654.
- [29] Chen RB, Xiao MM, Buchberger A, et al. Quantitative neuropeptidomics study of the effects of temperature change in the Crab Cancer borealis. *J Proteome Res*, 2014, 13(12): 5767–5776.
- [30] Hui LM, Xiang F, Zhang YZ, et al. Mass spectrometric elucidation of the neuropeptidome of a crustacean neuroendocrine organ. *Peptides*, 2012, 36(2): 230–239.
- [31] Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteom*, 2002, 1(5): 376–386.
- [32] Boersema PJ, Aye TT, Van Veen TAB, et al. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics*, 2008, 8(22): 4624–4632.
- [33] Kosanam H, Ramagiri S, Dass C. Quantification of endogenous α - and γ -endorphins in rat brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 2009, 392(1): 83–89.
- [34] Gessel MM, Norris JL, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry: spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. *J Proteomics*, 2014, 107: 71–82.
- [35] DeKeyser SS, Kutz-Naber KK, Schmidt JJ, et al. Imaging mass spectrometry of neuropeptides in decapod crustacean neuronal tissues. *J Proteome Res*, 2007, 6(5): 1782–1791.
- [36] OuYang CZ, Chen BM, Li LJ. High throughput in situ DDA analysis of neuropeptides by coupling novel multiplex mass spectrometric imaging (MSI) with gas-phase fractionation. *J Am Soc Mass Spectr*, 2015, 26(12): 1992–2001.
- [37] Shariatgorji M, Nilsson A, Goodwin RJA, et al. Deuterated matrix-assisted laser desorption ionization matrix uncovers masked mass spectrometry imaging signals of small molecules. *Anal Chem*, 2012, 84(16): 7152–7157.
- [38] Porta T, Grivet C, Kraemer T, et al. Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging. *Anal Chem*, 2011, 83(11): 4266–4272.

(本文责编 陈宏宇)