



质谱技术在单细胞代谢组学中的应用

潘思远, 杨金磊, 张四纯*, 张新荣

清华大学化学系, 北京 100084

*通讯作者, E-mail: sczhang@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2024-07-12; 接受日期: 2024-09-12; 网络版发表日期: 2024-10-08

国家自然科学基金(编号: 22227803)资助项目

摘要 单细胞代谢组学可以研究细胞的异质性, 有助于研究者理解生命体如何改变状态以应对环境变化. 质谱技术因其高灵敏度、高通量等优势被广泛应用于单细胞代谢组学研究中. 针对要解决的生命科学问题, 研究者对质谱技术在代谢物覆盖度、分析通量和代谢物空间信息三个方面有着不同的需求. 本文从以上三个需求出发, 对近年来质谱技术在单细胞代谢组学领域中的发展和应用进行归纳总结, 并对其未来前景提出展望.

关键词 单细胞分析, 代谢组学, 质谱

1 引言

细胞是生物体结构和功能的基本单位. 在生物体中, 即使细胞来源相同, 拥有相同的基因, 但因环境等因素的影响, 其表型会产生差异. 在体外实验中, 即便在相同条件下培养, 在看似同质的细胞群体中, 细胞间也存在异质性, 这是细胞生长中的随机过程导致的. 因此, 在外界作用的诱导下, 细胞群体分化产生细胞异质性. 在临床研究中, 细胞异质性往往是生物学问题的核心, 例如, 肿瘤组织存在异质性, 不同的肿瘤细胞亚型导致单一的治疗方式无法取得效果. 然而, 传统的群体细胞研究方法只能得到平均值, 无法研究细胞异质性, 因此, 单细胞方法的开发具有极高的研究价值.

近年来, 单细胞基因组学、单细胞转录组学和单细胞蛋白质组学都有了很大进展, 对生命科学研究起到了重要的推动作用. 单细胞代谢组学可以对细胞代谢的异质性进行研究, 具有广阔的开拓空间和研究价

值. 代谢组被定义为特定细胞、器官或有机体中的全部小分子代谢物, 包括内源性和外源性的小分子, 例如丙酮酸、乳酸、糖、三磷酸腺苷(ATP)、药物及其代谢物和脂质等^[1]. 从生物研究的角度来看, 基因组处在研究的上游, 指导下游的反应; 转录组和蛋白质组则处在研究的中游, 是关键功能的执行者; 而代谢组处在研究的下游, 是上游反应在表型上的体现. 基因组、转录组和蛋白组的微小变化可以在代谢物上得到放大, 因此代谢物是细胞生命活动最直观的表型.

单细胞代谢组学目前仍面临较大的挑战. 相较于其他组学, 单细胞代谢组学具有样品体积小、代谢物含量动态范围大、结构多样性强等特点. 细胞在面对机械应力变化、pH值等参数变化和环境分子离子变化等压力时会做出应对, 细胞内的分子组成随之发生变化^[2]. 基因组在一定时间范围内可以认为处于静态, 转录组和蛋白质组的变化时间以分钟为单位, 而代谢组变化的时间尺度缩小至毫秒级. 目前单细胞代谢组

引用格式: Pan S, Yang J, Zhang S, Zhang X. Application of mass spectrometry in single-cell metabolomics. *Sci Sin Chim*, 2024, 54: 1826–1836, doi: 10.1360/SSC-2024-0166

学缺乏深刻的生物学见解, 主要原因是现有方法难以覆盖尽可能多的代谢物, 导致只能从丰度高或易电离的主要代谢物间寻找联系, 因此需要提高对低丰度代谢物的检测能力^[1]. 与DNA、RNA等大分子相比, 代谢物小分子缺乏稳定有效的扩增方法; 与蛋白质分析相比, 小分子化合物种类繁多, 不适合标记, 常用的分析技术很难对其进行研究. 因此, 开发新型的代谢组学研究方法是十分必要的.

单细胞代谢组学的研究过程可分为获取单细胞、分析代谢物和处理数据三个环节. 在分析代谢物环节中, 质谱技术因具有高灵敏度、高通量, 能够同时测量数百种代谢物等特点, 在单细胞代谢组学研究中得到应用, 已经取得了初步的成果. 例如, 在肿瘤治疗中, 提高覆盖度有助于发现新的靶点, 提高通量将获取肿瘤细胞的统计学信息, 原位分析有助于研究肿瘤微环境. 然而在具体研究中, 代谢物覆盖度、分析通量和保留细胞原始位置信息等需求是相互制约而非独立的. 为了提高质谱技术分析能力, 人们针对以上三种需求进行了不同的技术改进, 在不同的应用领域中大放异彩(表1). 本篇综述将回顾近年来三种需求中各具代表性的工作, 旨在针对性地为研究者提供思路, 并为同时满足多需求的潜在方法进行展望.

2 提高代谢物覆盖度

对单个细胞的内容物进行取样, 是最早开发的一大类重要的单细胞研究方法. 单细胞水平的代谢物含量较低, 通常只能得到纳升或皮升的液体量, 常规方法难以得到有效数据. 为了提高代谢物覆盖度, 一些

研究组从提取单细胞代谢物入手, 设计方法对单细胞代谢物进行较为灵敏的分析.

2.1 超微探针提取

超微探针提取指的是用探针对细胞内容物直接提取的方法. Masujima课题组^[3]是最早使用单细胞技术研究细胞代谢的一批研究者, 提出了使用超微探针提取细胞内容物并使用质谱检测的概念(图1a). 植物细胞因体积较大, 相关的单细胞分析发展较早. Nonami课题组^[13]设计了一种石英毛细管探针, 其中填充导电混合油, 将探针刺入郁金香球茎外表面的第二层鳞片, 提取细胞内容物, 后续对待测物进行纳升电喷雾质谱分析. 该方法主要测量了植物细胞中的糖类代谢物. Zhang课题组^[4]将钨针插入细胞中富集代谢产物, 然后将富集的代谢物直接从针尖解吸/电离, 进行质谱检测. 该方法与将富集的分析物洗脱到液相用于后续的质谱检测的方法相比, 避免了稀释待测物, 将灵敏度提高了约30倍.

传统的膜片钳技术使用特制的玻璃微吸管吸附于细胞表面, 使之形成密封空间, 其中包含一到数个离子通道. 对该膜片施加电压, 通过观测电流变化, 可以得到离子通道的各种参数. Sweedler课题组^[5]利用该思想, 将膜片钳技术引入哺乳动物细胞的单细胞代谢组学研究中, 建立了膜片钳和毛细管电泳-质谱(CE-MS)联用的方法(图1b). 该方法首先通过膜片钳施加负压, 提取单个神经细胞内的物质, 随后进行CE-MS分析, 增加测量代谢物的覆盖度.

Huang课题组^[14]在膜片钳法的基础上, 改用诱导纳升电喷雾质谱(induced nanoESI-MS)进行代谢物分

表 1 基于质谱的单细胞代谢组学技术
Table 1 Single-cell metabolomic technologies based on mass spectrometry

方法	优势	劣势	代表技术
超微探针提取	高灵敏度, 高覆盖度	单次实验时间长, 通量低	1. 活细胞视频质谱 ^[3] 2. 固相萃取法 ^[4] 3. 膜片钳法 ^[5]
液滴微萃取	高灵敏度, 高覆盖度	单次实验时间长, 通量低	1. T形探针法 ^[6] 2. 重溶法 ^[7]
微阵列法	高通量	低灵敏度, 低覆盖度	1. 压电点胶法 ^[8]
微流体法	高通量	较低灵敏度, 较低覆盖度	1. 免标记质谱流式细胞术 ^[9]
空间代谢组学	获取细胞代谢的空间信息	单细胞分割困难, 低灵敏度, 低覆盖度	1. 基质辅助激光解吸电离 ^[10] 2. 二次离子质谱 ^[11] 3. 电喷雾质谱 ^[12]

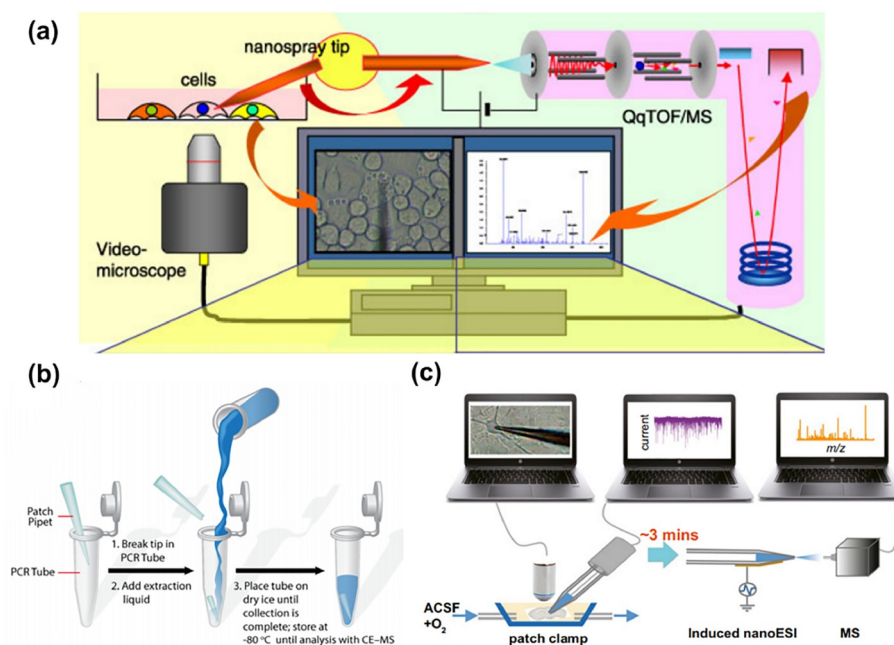


图 1 (网络版彩图)超微探针提取技术在单细胞代谢组学中的应用. (a) 活单细胞视频质谱法^[3], (b) 使用膜片钳和CE-MS研究神经元^[5], (c) 使用膜片钳和induced nanoESI-MS研究神经元^[14]

Figure 1 (Color online) The application of probe sucking techniques in single-cell metabolomics. (a) Live single-cell video-mass spectrometry. Reproduced with permission from Ref. [3]. Copyright 2008, Wiley. (b) Study of neurons using patch clamp and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS). Reproduced with permission from Ref. [5]. Copyright 2014, American Chemical Society. (c) Study of neurons using patch clamp and induced nanoESI. Reproduced with permission from Ref. [14]. Copyright 2017, National Academy of Sciences.

析,不仅能够克服严重的离子抑制效应和基质效应,而且流速较低,适合小体积样品的测量,对神经元中的多巴胺和乙酰胆碱等物质进行了测量(图1c)。该技术进一步揭示了一种新的神经元内尿刊酸代谢途径,与阳光诱导的神经行为变化存在联系^[15]。

2.2 液滴微萃取

液滴微萃取不采用物理手段侵入细胞,而是通过萃取手段将代谢物富集至萃取溶剂中。Yang课题组^[6]设计了一种液滴微萃取质谱技术,能够对单个活细胞进行实时、原位代谢组学分析(图2a)。该技术的核心是双通道探针,一个通道用于注射溶剂,在细胞表面产生液体结,另一个通道用于将细胞代谢物送入下一环节进行质谱分析。该技术具有原位分析组织切片的潜力,因此也被用于质谱成像(MSI)中, Yang课题组^[16]将单探针应用于小鼠肾脏切片的MSI成像,对内髓质、外髓质和皮质的差异性进行了研究(图2b)。

Zhang课题组^[7]设计了另一种液滴微萃取质谱技术,通过毛细管将溶剂包裹在细胞上,提取细胞内化合

物,然后再将溶剂吸回毛细管,晾干后用辅助溶剂重新溶解代谢物分子,使用自制电离源进行后续检测(图2c)。Zhang课题组使用拉伸后的高硼硅玻璃毛细管为探针,将乙腈、二甲基亚砜、水和甲醇等溶剂的萃取能力进行了比较,并探究了该技术在药物筛选上的应用。该技术虽然能够较为灵敏地测量细胞内代谢物,但电喷雾时间较短,无法得到好的二级质谱数据。为此, Zhang课题组^[17]结合脉冲直流电喷雾电离(pico-ESI)能够延长电喷雾时间的优势,对该技术进行了发展(图2d)。该方法成功解决了单细胞代谢物技术难以研究物质二级质谱的难点,为物质的精细化指认提供了依据。

3 提高分析通量

悬浮细胞检测在生物体系中有着广泛的应用场景,然而与组织切片中的细胞相比,悬浮细胞的细胞间连接被去除,在获取单细胞上面临挑战和困难^[18]。微阵列技术和质谱流式细胞术的提出,提高了单细胞代

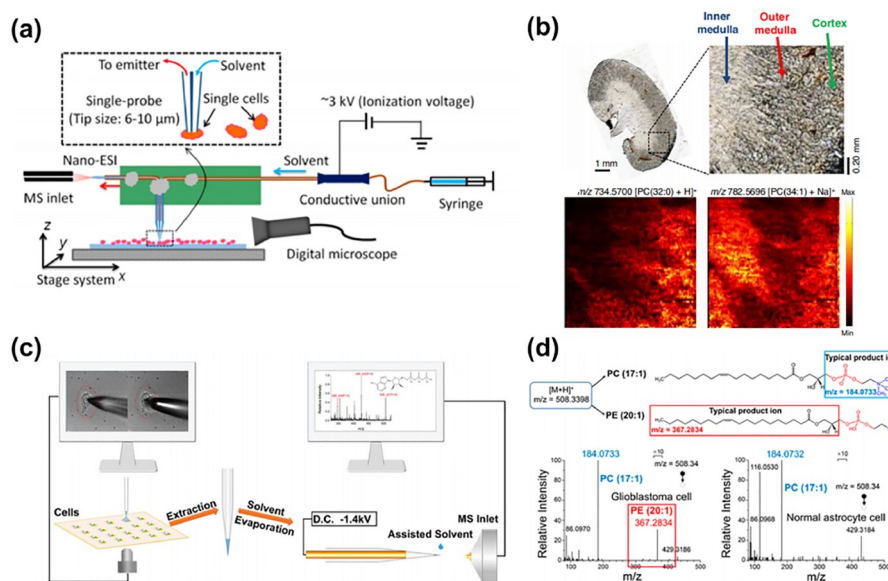


图 2 (网络版彩图)液滴微萃取技术在单细胞代谢组学中的应用. (a, b) 双通道探针技术及其应用^[6,16]; (c, d) 单探针萃取技术及其应用^[7,17]

Figure 2 (Color online) The application of probe extraction techniques in single-cell metabolomics. (a, b) Dual-channel probe technology and its application. (a) Reproduced with permission from Ref. [6]. Copyright 2014, American Chemical Society; (b) Reproduced with permission from Ref. [16]. Copyright 2015, American Chemical Society. (c, d) Single probe technology and its application. (c) Reproduced with permission from Ref. [7]. Copyright 2016, Springer Nature; (d) Reproduced with permission from Ref. [17]. Copyright 2018, American Chemical Society.

谢组学分析的通量。

3.1 微阵列技术

早期的悬浮细胞单细胞分离技术需要荧光显微镜辅助, 缺点是会引入外源物质, 并且存在荧光光谱重叠。Zenobi课题组^[8]最早将微阵列的思想引入质谱分析中, 开发了一种高通量的单细胞代谢物分析方法。他们使用一种商用非接触式压电点胶系统, 以点阵的形式, 将单细胞内容物点在预先涂好基质的板上, 随后通过基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)技术进行质谱分析(图3a)。

制备微阵列的方式多种多样, 各自具有对应方面的优劣势。为解决细胞团簇的问题, Wu课题组^[19]将聚二甲基硅氧烷(PDMS)板和离心辅助下的细胞捕获相结合, 制备微阵列平台。首先将细胞悬液加入装有PDMS板的锥形离心管中, 对试管进行离心, 单细胞沉入PDMS板上的小孔中。离心后, 将装载有细胞的PDMS板分离出来, 转移到细胞培养皿中, 用新鲜的培养基进行培养, 从而得到可靠的单细胞微阵列。Wu课题组^[20]联合飞行时间二次离子质谱(TOF-SIMS)方法,

进行代谢物分析(图3b)。该方法研究顺铂培养不同时间时HeLa细胞的代谢差异, 解决了MALDI-MS依赖基质、无法解析三维(3D)结构的缺陷。

3.2 免标记质谱流式细胞术

流式细胞术是通过激光照射液流内细胞, 分析散射光信号和荧光信号, 快速检测细胞物理化学性质的技术, 具有高通量的特点。Nolan课题组^[21]将电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和流式细胞术联用, 实现了细胞多参数同时测量, 但因需要外加金属同位素标签, 不适合进行代谢物分析。

Zhang课题组^[9]提出了免标记的质谱流式细胞术(CyESI-MS), 装置分为三个部分: 细胞进样系统、内容物在线萃取系统和质谱分析系统。首先准备含有细胞悬液的自动进样瓶, 通过进样泵造成内外压力差, 使细胞悬液通过毛细管进入装置的下一部分。内容物在线萃取系统的核心是三层同轴毛细管, 细胞以单细胞形式, 通过内层毛细管传输; 注射泵以恒定速度注入纯甲醇鞘流液, 通过中层毛细管传输, 对细胞内容物进行在线萃取; 辅助气通过外层毛细管传输, 快速

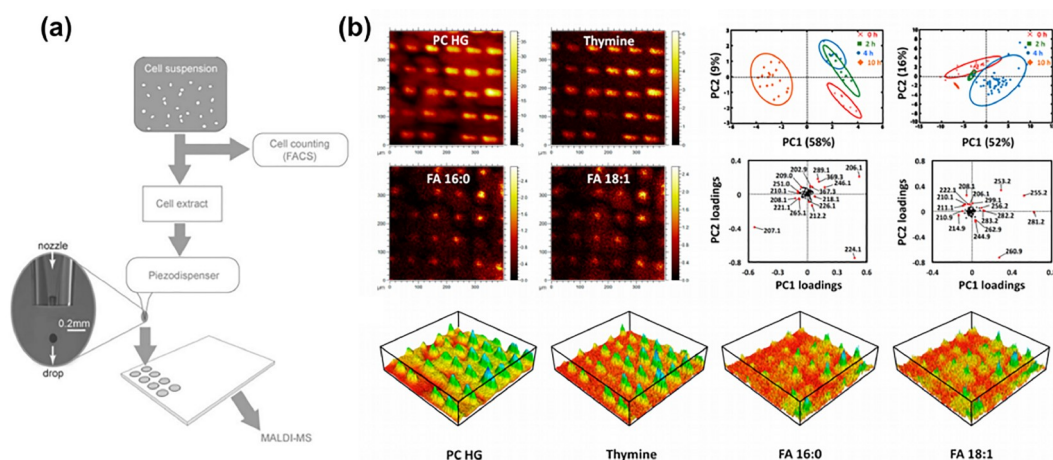


图 3 (网络版彩图)微阵列技术在单细胞代谢组学中的应用。(a) 压电点胶系统制备微阵列^[8];(b) 离心辅助细胞捕获制备微阵列^[20]

Figure 3 (Color online) The application of microarray techniques in single-cell metabolomics. (a) Piezoelectric droplet dispensing system for microarray fabrication. Reproduced with permission from Ref. [8]. Copyright 2008, Wiley. (b) Centrifugation-assisted cell capture for microarray fabrication. Reproduced with permission from Ref. [20]. Copyright 2016, American Chemical Society.

蒸发溶液; 高压电源对提取出的细胞内容物进行离子化。质谱分析系统采用Orbitrap质谱, 对进入的细胞内容物进行质谱分析(图4a)。Zhang课题组使用该方法测量了乳腺癌细胞、肝癌细胞的代谢组学, 使用基于t分布的随机近邻嵌入(t-SNE)算法进行数据降维, 成功对癌细胞进行了分型。Zhang课题组^[22]基于该方法, 对自然杀伤(NK)细胞杀伤癌细胞进行了研究, 指出杀伤过程中发生变化的代谢通路, 进一步实现了肿瘤细胞的精细化分型。Zhang课题组^[23]使用该方法研究了三阴性乳腺癌的多不饱和脂质组与细胞耐药性的关系。基于以上基础, Zhang课题组^[24]将CyESI-MS推广至临床研究, 成功实现了人外周血单个核细胞检测, 使用代谢组对T细胞、B细胞、NK细胞和单核细胞进行了分类(图4b)。Zhang课题组的工作大大提高了单细胞代谢物研究的通量, 使得将单细胞代谢组学应用至临床研究成为可能。

Liu课题组^[25]对免标记质谱流式细胞术进行改进, 同时测到了膜蛋白和代谢物, 并对耐阿霉素癌细胞进行了研究(图4c)。Liu课题组将罗丹明质量标签(RMTs)与连接了特异性抗体的金纳米颗粒(GNPs)组装, 对细胞表面抗原进行标记, RMTs在电离过程中发生在线解离, 将蛋白信号转化为放大后的RMTs信号。在该方法中, 每种细胞具有独立的表面抗原比例特征和代谢组特征, 在细胞分型上具有优势。

Zenobi课题组^[26]使用类似的同轴毛细管装置, 将Zhang课题组使用的电喷雾离子源(ESI)换成介质阻挡放电离子源(DBDI), 减少基质效应和离子抑制的影响(图4d)。该工作观察到胰腺导管腺癌(PDAC)细胞和正常细胞在脂质上的差异, 通过qPCR发现PDAC细胞的ATP柠檬酸裂解酶(ACLY)表达上调, 并对调控ACLY的信号通路的蛋白进行研究, 将代谢组学与蛋白质和转录联系起来, 指出了治疗PDAC的一个新靶点。

4 空间代谢物分析

空间代谢组学是一种新兴的生物分析技术, 通过在组织的空间尺度上测量和分析代谢物的分布, 提供生物代谢过程与空间环境的关系。随着单细胞技术的发展, 单细胞空间代谢组学应运而生, 它通过在单细胞水平上进行空间代谢物分析, 进一步细化了对细胞异质性的认识。在这里, 我们将讨论三类不同原理的单细胞代谢物空间信息获取技术: 基质辅助激光解吸电离(MALDI)技术、二次离子质谱(SIMS)技术和基于电喷雾离子源(ESI)的成像技术。

4.1 MALDI-MS

MALDI-MS技术通过将基质液和样品混合, 在平台上干燥后用激光照射, 使得基质/样品发生解吸和

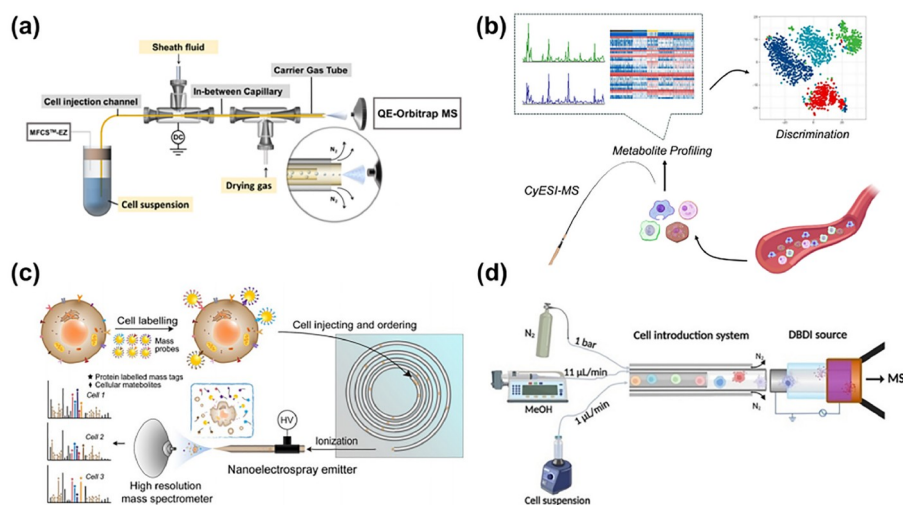


图 4 (网络版彩图) 免标记质谱流式细胞术在单细胞代谢组学中的应用. (a, b) 基于ESI离子源的免标记质谱流式细胞术^[9,24]; (c) 蛋白质代谢物同测的免标记质谱流式细胞术^[25]; (d) 基于DBDI离子源的免标记质谱流式细胞术^[26]

Figure 4 (Color online) The application of label-free mass cytometry in single-cell metabolomics. (a, b) Label-free mass cytometry based on the ESI ion source, (a) Reproduced with permission from Ref. [9]. Copyright 2019, American Chemical Society; (b) Reproduced with permission from Ref. [24]. Copyright 2024, Royal Society of Chemistry. (c) Label-free mass cytometry for simultaneous measurement of proteins and metabolites. Reproduced with permission from Ref. [25]. Copyright 2021, Wiley. (d) Label-free mass cytometry based on the DBDI ion source. Reproduced with permission from Ref. [26]. Copyright 2021, Wiley.

电离, 最终进入质量分析器进行分析^[27]. MALDI-MS 技术会对细胞状态造成一定影响, 导致约30%的蛋白质损失^[28].

哺乳动物的大脑功能与细胞异质性有关, 独立采用MALDI-MS和免疫细胞化学(ICC)方法以及先进行ICC后进行MALDI-MS的研究已经被报道. 然而ICC需要对细胞进行固定, 固定后代谢物的MALDI信号很差. Sweedler课题组^[29]将MALDI-MS和ICC进行联用, 先对组织切片进行MALDI-MS分析, 再使用多聚甲醛, 冲洗掉基质并对细胞进行固定, 进行免疫染色, 通过对脂质和小分子代谢产物的检测, 对星形胶质细胞和神经元的差异进行了研究 (图5a). 前人将星形胶质细胞和神经元多基于细胞系或培养的原代细胞, Sweedler课题组是对大脑组织直接进行研究, 能够保存细胞间的位置信息. Sweedler课题组将质谱和免疫化学联用的优势在于可以对免疫化学中看似同质的细胞借助质谱数据进行分型, 为星形胶质细胞和神经元的亚型指认提供可能的研究方法.

虽然质谱在单细胞代谢组学中具有优势, 但单一的质谱只能得到某一方面的信息, 不同质谱间的联用有助于提高数据覆盖度. Sweedler课题组^[28]将MALDI-MS和CE-MS进行联用, 首先进行MALDI-MS测量, 然

后从目标细胞中收集样品进行CE分离和分析, 借助CE-MS的高覆盖度补充MALDI-MS的不足. 在该方法中, MALDI-MS用于检测胰高血糖素和胰岛素, 从蛋白层面将每个细胞进行初步分类, 接下来通过CE-MS, 对小分子代谢物, 如: 18种蛋白源性氨基酸和多巴胺进行检测. 该方法第一次在单细胞水平上对胰岛 α 细胞和胰岛 β 细胞中的多巴胺进行表征.

传统的MALDI-MS技术可以在某个时间点对组织进行成像, 得到细胞的原位空间代谢信息, 但缺乏对代谢过程的动态研究. 同位素标记技术已经被广泛运用于群体细胞的代谢过程研究中, 但不具有分析细胞异质性的能力. Rabelink课题组^[30]建立了一个使用同位素示踪来进行原位细胞代谢测量的MALDI-MS平台, 对诱导中度缺血性损伤和健康的小鼠肾脏结构进行空间和分子解析, 根据脂质的差异对近端小管(PT)进行分型(图5b). Rabelink课题组随后研究同位素标记的代谢物在不同亚型中的差异, 发现谷氨酰胺是PT区域的主要碳源, 且PT区域的不同亚型细胞之间, 谷氨酰胺用于三羧酸循环的用法不同. 这进一步证明, PT组织中的三羧酸循环和糖代谢有很高的异质性.

基于MALDI-MS的单细胞代谢组学的一个关键挑战是将代谢物分配到单个细胞. Alexandrov课题组^[10]

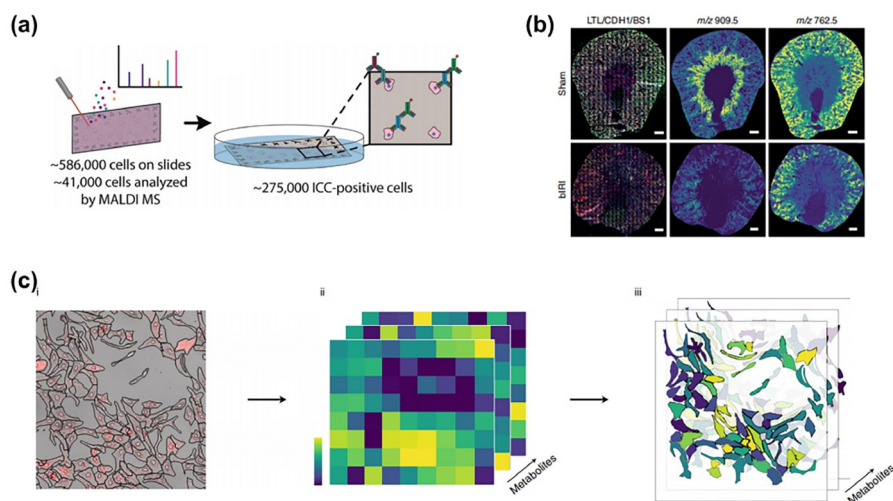


图 5 (网络版彩图)MALDI-MS技术在单细胞代谢组学中的应用. (a) MALDI-MS和ICC联用^[29]; (b) MALDI-MS和同位素追踪联用 (标尺: 500 μm)^[30]; (c) SpaceM实现代谢物的单细胞分配^[10]

Figure 5 (Color online) The application of MALDI-MS in single-cell metabolomics. (a) Coupling of MALDI-MS with ICC. Reproduced with permission from Ref. [29]. Copyright 2019, Wiley. (b) Coupling of MALDI-MS with isotope tracing (scale bar: 500 μm). Reproduced with permission from Ref. [30]. Copyright 2022, Nature Publishing Group. (c) SpaceM achieves single-cell assignment of metabolites. Reproduced with permission from Ref. [10]. Copyright 2021, Nature Publishing Group.

提出了SpaceM技术, 采用传统的细胞培养方法, 使用市售的MALDI装置即可进行高精度的单细胞代谢分析, 首先进行显微成像, 采集细胞的荧光强度和形态属性, 接下来进行常规的MALDI成像, 最后再次显微成像. 该方法的创新点在于提出了一种新的单细胞辨认方法, 通过将细胞的显微图像与MALDI激光消融标记的显微图像进行亚细胞精度的共配, 精确估计细胞的哪些部分被激光消融, 将代谢物数据指认到单细胞中.

4.2 SIMS

SIMS成像技术利用聚焦后的高能离子束撞击样品表面, 将能量传递至目标分子, 样品表面及一定深度的分子碎裂后被质量分析器收集, 进行测量^[31]. SIMS成像的一个重要优势是, 除了分子或元素成像外, 它还可以收集细胞的形态信息. 然而, SIMS成像涉及样品的制备过程, 需要在高真空条件下维持细胞形态, 这往往会对细胞的代谢状态造成影响^[2].

傅里叶变换质谱具有必要的质量分辨率和精度, 但成像速度较慢; 相反, 飞行时间(TOF)离子质谱的分析速度快, 但缺乏获得代谢物化学式所需的准确性. 为了克服这种分歧, Gilmore课题组^[32]使用了混合质量分析仪的设计, 开发了3D OrbiSIMS (图6a, b). 3D Orbi-

SIMS是在TOF-SIMS的基础上, 增加了Orbitrap作为质量分析器, 在研究样本时, 先使用TOF-SIMS快速成像, 找到感兴趣的组织区间, 然后使用Orbitrap进行高质量分辨率分析. 3D OrbiSIMS结合了TOF成像以及Orbitrap的优势, 同时具有亚细胞横向分辨率和高质量分辨率.

塑料微粒(MPs)对环境和人体健康存在威胁, 早期对MPs的研究存在诸多限制, 传统的质谱方法需要对MPs进行热分解, 分析方法具有破坏性. Zhang课题组^[33]使用TOF-SIMS对单细胞中的MPs进行原位分析成像, 提供了一种直接从草履虫中检测和分型小微粒的有效策略, 具有高灵敏度、高化学特异性和高空间分辨率.

Zhang课题组^[11]介绍了一种新的SIMS成像方法, 在组织分区和细胞代谢指纹提取上进行了改进, 命名为空间单核代谢组学(SEAM) (图6c). SEAM的基本功能是SIMS-View, 即将数百个质量数通道降维至三个, 进行可视化处理, 投射到彩色平面上. SEAM提供的额外功能有: 单核分割(SIMS-Cut), 单核表征(SIMS-ID)和差异代谢物分析(SIMS-Diff), 在细胞水平, SIMS-Cut将细胞分段输入SIMS-ID进行表示, 然后聚类分型, 通过SIMS-Diff发现不同簇间的离子种类差异. Zhang

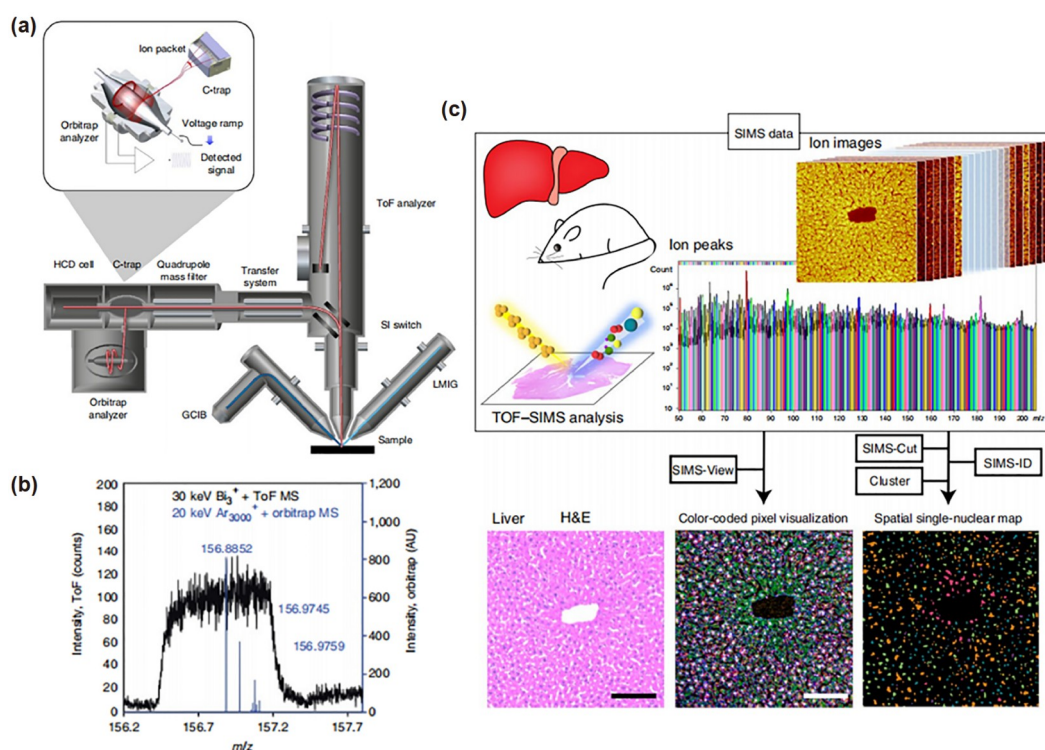


图 6 (网络版彩图)SIMS成像技术在单细胞代谢组学中的应用. (a, b) 3D OrbiSIMS技术^[32]; (c) SEAM技术 (标尺: 100 μm)^[11]
Figure 6 (Color online) The application of SIMS in single-cell metabolomics. (a, b) 3D OrbiSIMS technique. Reproduced with permission from Ref. [32]. Copyright 2017, Nature Publishing Group. (c) SEAM technique (scale bar: 100 μm). Reproduced with permission from Ref. [11]. Copyright 2021, Nature Publishing Group.

课题组使用SEAM对野生型小鼠的肝脏细胞进行了分析,发现了具有不同代谢特征的肝细胞亚群.根据单细胞代谢物的指纹图谱,肝脏细胞可以被分为八个不同的亚群.这一现象与使用蛋白质组学或转录组学进行分型的结果高度一致.此外,Zhang课题组对人肝纤维化细胞进行代谢组学与转录组学联合分析时发现,肝纤维化样本中存在两种有明显代谢差异的肝细胞亚群,区分亚群细胞的主要特征在于谷丙酰胺含量的上升及其对应的跨膜转运蛋白的基因表达上调.该工作将代谢组学与转录组学进行了结合,证明了代谢组学分型的准确性与可靠性,并提供了其他组学无法提供的大量代谢物异质性信息.

4.3 ESI-MS

基于ESI的成像方法具有在环境下研究时无需前处理的优势,尽管在空间分辨率上仍有不足,但能将对细胞代谢组分的影响降到最低.Cooks课题组^[12]在2004年进行了解吸电喷雾电离(DESI)的报道,将电喷

雾带电液滴和溶剂离子引导到待分析表面,通过带电粒子对材料表面的撞击产生表面材料的气态离子,进行后续分析.Laskin等^[34]进一步使用纳升电喷雾替代传统电喷雾,开发了nano-DESI,在两个玻璃毛细管之间形成一个液体桥,初级毛细管将溶剂送入液体桥,与沉积在基质上的分析物接触并提取组织中的待测分子后,次级毛细管将其吸出,喷入质谱进行分析(图7a).该方法减少溶剂飞溅,且大大提高了DESI的空间分辨率.Lanekoff课题组^[35]使用更细的毛细管,对人脸上皮细胞的氨基酸和脂质进行测量,将DESI应用至单细胞尺度上(图7b).

Vertes课题组^[36]开发了激光烧蚀电喷雾电离(LAESI)方法,将红外激光烧蚀和电喷雾电离相结合(图7c).Vertes课题组使用中红外聚焦激光束对样品表面进行烧蚀,产生中性粒子,再使用电喷雾源产生液滴,与中性粒子融合,产生LAESI信号.对贴壁细胞的传统研究方法涉及解离,会对细胞状态造成影响.为避免这一问题,Vertes课题组^[37]对LAESI进行优化,做到

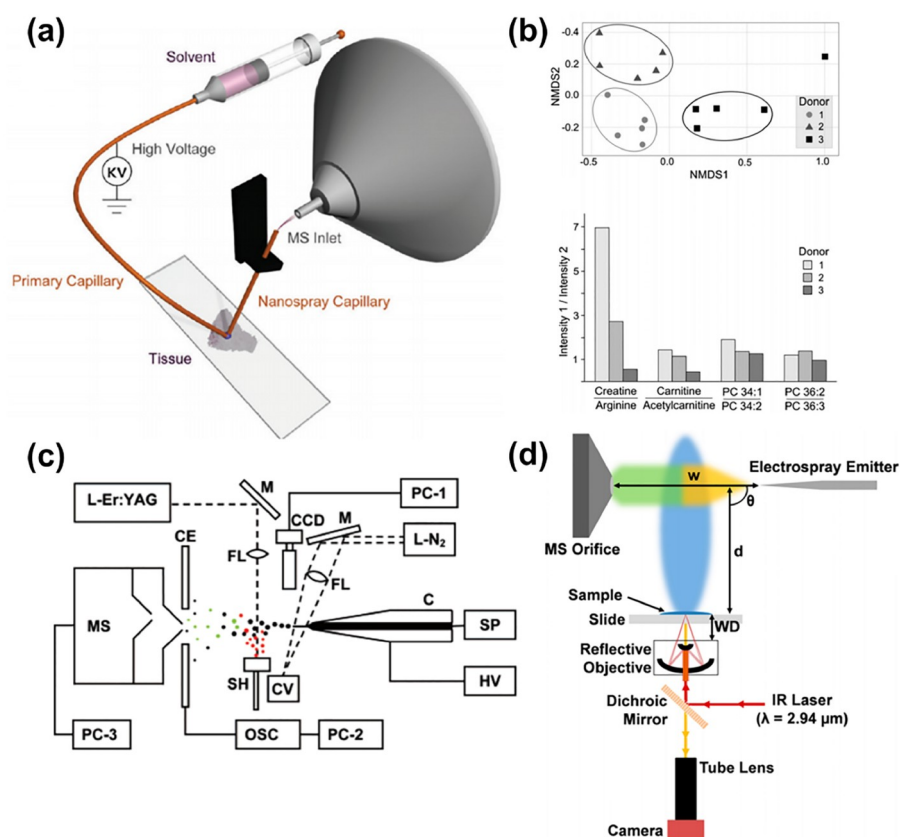


图 7 (网络版彩图)ESI成像技术在单细胞代谢组学中的应用. (a) nano-DESI的基本原理^[34]; (b) nano-DESI在单细胞上的应用^[35]; (c) LAESI的基本原理^[36]; (d) LAESI在单细胞上的应用^[37]

Figure 7 (Color online) The application of ESI-based imaging technology in single-cell metabolomics. (a) The basic principle of nano-DESI. Reproduced with permission from Ref. [34]. Copyright 2012, American Chemical Society. (b) The application of nano-DESI on single cells. Reproduced with permission from Ref. [35]. Copyright 2017, Royal Society of Chemistry. (c) The basic principle of LAESI. Reproduced with permission from Ref. [36]. Copyright 2007, American Chemical Society. (d) The application of LAESI on single cells. Reproduced with permission from Ref. [37]. Copyright 2015, American Chemical Society.

直接对贴壁细胞进行测量(图7d). Vertes课题组采用传输几何代替反射几何进行聚光, 将光斑尺寸降低至10~20 μm , 对贴壁生长的哺乳动物细胞进行了研究, 比较了原位分析和解离后分析的代谢差异.

5 总结与展望

经过数十年的发展, 单细胞代谢组学在质谱方面涌现出了许多新颖且高效的技术, 但仍然存在改进的空间. 单细胞超微探针提取和萃取技术尚未做到自动化, 通量较低. 细胞微阵列技术和质谱流式细胞术对细胞状态的影响较小, 通量较高, 但无法探究细胞的空间信息. 原位成像技术多数需要对样品进行预处理, 会破坏细胞原始状态, 无法得到准确的代谢物信息.

MALDI-MS技术更适合测大分子蛋白质, 而且引入的基质会影响细胞的代谢状态; SIMS成像技术的整体能量较高, 会产生较多碎片分子, 影响代谢物的测量. DESI和LAESI成像技术无需预处理, 但空间分辨率还需要优化. 未来, 开发同时解决覆盖度、通量和原位分析多需求的单细胞代谢组学研究方法, 将成为热点问题.

单细胞代谢组学在临床医学中具有极大潜力, 例如: 肿瘤细胞微环境和血癌细胞快速分选等是非常火热的研究领域, 单细胞代谢组学可以研究肿瘤细胞异质性的产生, 为肿瘤治疗提供方法. 后续质谱技术的方法学研究, 将主要聚焦于科学问题, 为不同的疾病诊疗手段和切入点开发不同特点的质谱分析方法.

除了发展硬件外, 软件的发展也是必不可少的, 用算法来补充仪器的不足是一个可行思路. 目前, 张新荣

课题组^[38]开发了首个针对单细胞代谢物数据处理的软件SCMeTA (<https://www.sc-meta.com/>), 已经得到广泛应用. 回顾代谢组学的发展历程, 在早期, 我们对代谢物的研究多是基于先验知识, 先通过生物学研究得知代谢物的存在, 再通过化学分析手段证明. 未来, 随

着生物信息学和人工智能的发展, 研究新的代谢物或者曾经未知的代谢物将成为可能. 同时, 随着多组学研究的不断发展, 将单细胞代谢组学与传统组学联合分析具有极大潜力, 有助于揭示被单一分析方法忽视的生物学问题.

致谢 感谢审稿专家提出修改意见和建议. 感谢中国计量科学研究院姚欢博士和清华大学化学系潘星宇博士为文章提出建议.

参考文献

- Zenobi R. *Science*, 2013, 342: 1243259
- Zhang L, Vertes A. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 4466–4477
- Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. *J Mass Spectrom*, 2008, 43: 1692–1700
- Gong X, Zhao Y, Cai S, Fu S, Yang C, Zhang S, Zhang X. *Anal Chem*, 2014, 86: 3809–3816
- Aerts JT, Louis KR, Crandall SR, Govindaiah G, Cox CL, Sweedler JV. *Anal Chem*, 2014, 86: 3203–3208
- Pan N, Rao W, Kothapalli NR, Liu R, Burgett AWG, Yang Z. *Anal Chem*, 2014, 86: 9376–9380
- Zhang XC, Wei ZW, Gong XY, Si XY, Zhao YY, Yang CD, Zhang SC, Zhang XR. *Sci Rep*, 2016, 6: 24730
- Amantonico A, Oh JY, Sobek J, Heinemann M, Zenobi R. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 5382–5385
- Yao H, Zhao H, Zhao X, Pan X, Feng J, Xu F, Zhang S, Zhang X. *Anal Chem*, 2019, 91: 9777–9783
- Rappez L, Stadler M, Triana S, Gathungu RM, Ovchinnikova K, Phapale P, Heikenwalder M, Alexandrov T. *Nat Methods*, 2021, 18: 799–805
- Yuan Z, Zhou Q, Cai L, Pan L, Sun W, Qumu S, Yu S, Feng J, Zhao H, Zheng Y, Shi M, Li S, Chen Y, Zhang X, Zhang MQ. *Nat Methods*, 2021, 18: 1223–1232
- Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. *Science*, 2004, 306: 471–473
- Gholipour Y, Erra-Balsells R, Hiraoka K, Nonami H. *Anal Biochem*, 2013, 433: 70–78
- Zhu H, Zou G, Wang N, Zhuang M, Xiong W, Huang G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2586–2591
- Zhu H, Wang N, Yao L, Chen Q, Zhang R, Qian J, Hou Y, Guo W, Fan S, Liu S, Zhao Q, Du F, Zuo X, Guo Y, Xu Y, Li J, Xue T, Zhong K, Song X, Huang G, Xiong W. *Cell*, 2018, 173: 1716–1727.e17
- Rao W, Pan N, Yang Z. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, 26: 986–993
- Zhang XC, Zang Q, Zhao H, Ma X, Pan X, Feng J, Zhang S, Zhang R, Abliz Z, Zhang X. *Anal Chem*, 2018, 90: 9897–9903
- Comi TJ, Do TD, Rubakhin SS, Sweedler JV. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 3920–3929
- Huang L, Chen Y, Chen Y, Wu H. *Anal Chem*, 2015, 87: 12169–12176
- Huang L, Chen Y, Weng LT, Leung M, Xing X, Fan Z, Wu H. *Anal Chem*, 2016, 88: 12196–12203
- Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir ED, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP. *Science*, 2011, 332: 687–696
- Shen Z, Zhao H, Yao H, Pan X, Yang J, Zhang S, Han G, Zhang X. *Chem Sci*, 2022, 13: 1641–1647
- Yang J, Cheng R, Pan X, Pan S, Du M, Yao H, Hu Z, Zhang S, Zhang X. *Anal Chem*, 2024, 97: 3008–3016
- Pan S, Liu C, Yao H, Pan X, Li J, Yang J, Du M, Liu P, Zhang S, Zhang X. *Chem Commun*, 2024, 60: 392–395
- Xu S, Liu M, Bai Y, Liu H. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 1806–1812
- Liu Q, Ge W, Wang T, Lan J, Martínez-Jarquín S, Wolfrum C, Stoffel M, Zenobi R. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 24534–24542
- Zhu X, Xu T, Peng C, Wu S. *Front Chem*, 2021, 9: 782432
- Comi TJ, Makurath MA, Philip MC, Rubakhin SS, Sweedler JV. *Anal Chem*, 2017, 89: 7765–7772
- Neumann EK, Comi TJ, Rubakhin SS, Sweedler JV. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 5910–5914
- Wang G, Heijs B, Kostidis S, Mahfouz A, Rietjens RGJ, Bijkerk R, Koudijs A, van der Pluijm LAK, van den Berg CW, Dumas SJ, Carmeliet P, Giera M, van den Berg BM, Rabelink TJ. *Nat Metab*, 2022, 4: 1109–1118

- 31 Wu K, Jia F, Zheng W, Luo Q, Zhao Y, Wang F. *J Biol Inorg Chem*, 2017, 22: 653–661
- 32 Passarelli MK, Pirkl A, Moellers R, Grinfeld D, Kollmer F, Havelund R, Newman CF, Marshall PS, Arlinghaus H, Alexander MR, West A, Horning S, Niehuis E, Makarov A, Dollery CT, Gilmore IS. *Nat Methods*, 2017, 14: 1175–1183
- 33 Feng J, Zhao H, Gong X, Xia MC, Cai L, Yao H, Zhao X, Yan Z, Li Z, Nie H, Ma X, Zhang S. *Anal Chem*, 2021, 93: 5521–5528
- 34 Laskin J, Heath BS, Roach PJ, Cazares L, Semmes OJ. *Anal Chem*, 2012, 84: 141–148
- 35 Bergman HM, Lanekoff I. *Analyst*, 2017, 142: 3639–3647
- 36 Nemes P, Vertes A. *Anal Chem*, 2007, 79: 8098–8106
- 37 Jacobson RS, Thurston RL, Shrestha B, Vertes A. *Anal Chem*, 2015, 87: 12130–12136
- 38 Giera M, Yanes O, Siuzdak G. *Cell Metab*, 2022, 34: 21–34

Application of mass spectrometry in single-cell metabolomics

Siyuan Pan, Jinlei Yang, Sichun Zhang^{*}, Xinrong Zhang

Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China.

^{*}Corresponding author (email: sczhang@mail.tsinghua.edu.cn)

Abstract: Single-cell metabolomics can investigate cellular heterogeneity, playing a pivotal role in understanding how organisms alter their states in response to environmental changes. Mass spectrometry, with its advantages of high sensitivity and high throughput, has been extensively utilized in the context of single-cell metabolomics. Researchers have distinct requirements for mass spectrometry in terms of metabolite coverage, analytical throughput, and spatial information of metabolites, depending on the questions related to life science they aim to address. This paper starts from these three demands, reviews the development and application of mass spectrometry technology in the field of single-cell metabolomics in recent years, and offers our prospective of this field.

Keywords: single-cell analysis, metabolomics, mass spectrometry

doi: [10.1360/SSC-2024-0166](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0166)