

活体单细胞质谱分析研究进展

吴丹妮^{1,2}, 程思敏², 王鑫欣³, 谭思源², 冯璐璐², 龚晓云², 俞晓平¹

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 2. 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 国家市场监督管理总局技术创新中心(质谱), 北京 100029; 3. 大连理工大学医学部, 辽宁 大连 116024)

摘要: 单细胞作为生命活动的基础单元, 其代谢状态直接反映生命体的生理与病理过程。质谱技术以其高灵敏度、高分辨率、高覆盖率的分析特性, 以及卓越的结构鉴定与定量分析能力, 为单细胞分析提供了坚实的技术支撑。相较于群体细胞分析或固定化单细胞检测, 活体单细胞质谱分析能够真实保留代谢动态信息, 对揭示疾病微环境异质性、指导精准医疗具有重要意义。目前, 活体单细胞质谱分析方法的研究主要聚焦于样品前处理方法的创新。根据细胞捕获方法的不同, 可将活体单细胞质谱分析技术分为活体单细胞直接探针采样、活体单细胞质谱流式采样和激光辅助解吸附单细胞成像三大类。本文对近年来基于上述三类的活体单细胞质谱方法进行归纳与评述, 总结其在代谢物分析、生物标志物发现和癌症研究等领域的应用, 并对活体单细胞质谱技术的未来发展进行展望。

关键词: 活体单细胞; 质谱; 探针采样; 质谱流式; 激光辅助解吸附

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2025)06-0768-12

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0059

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0059

Recent Advances in Live Single-Cell Mass Spectrometry

WU Dan-ni^{1,2}, CHENG Si-min², WANG Xin-xin³, TAN Si-yuan², FENG Lu-lu²,
GONG Xiao-yun², YU Xiao-ping¹

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. National Market Supervision Technology Innovation Center, Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 3. Faculty of Medicine, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: As the fundamental unit of life activities, the single-cell serves as the core of biological systems, and its metabolic state directly and accurately reflects various physiological processes and pathological changes within the cell. Mass spectrometry (MS) technology, with its distinctive analytical characteristics of high sensitivity, high resolution, and wide analytical coverage, along with its excellent performance in both structural identification of molecules and quantitative analysis of compounds, provides powerful and solid technical support for single-cell analysis. Compared with bulk cell population analysis or fixed single-cell detection methods, live single-cell MS analysis can faithfully preserve real-time dynamic metabolic information. This advantage makes it an irreplaceable tool for revealing the heterogeneity of disease microenvironments and guiding the development and implementation of precision medicine. At present, research and development of live single-cell MS

methods mainly focus on continuous innovations and improvements in sample pretreatment techniques, which is critical for ensuring analytical accuracy and reproducibility. Based on the differences in single-cell capturing and sampling methods during analysis, current live single-cell MS techniques can be broadly divided into three major categories. These include direct probe sampling of live cells, mass cytometry-based sampling of live cells, and laser-assisted desorption for single-cell imaging. Each category represents a distinct technical approach with specific advantages and application scenarios. This article systematically summarized and reviewed recent advances in live single-cell mass spectrometry methods based on the above three categories, further discussing their typical applications in key fields, such as metabolite analysis, biomarker discovery, and cancer research. In addition, this review presented perspectives on the future development of live single-cell MS technology, including improving sampling precision, enhancing detection sensitivity, increasing spatial resolution, and achieving better integration with other single-cell analysis technologies to gain a more comprehensive understanding of live single-cell metabolism.

Key words: live single-cell; mass spectrometry; probe sampling; mass cytometry; laser-assisted desorption

在细胞群体中,每个细胞均具有独特性,群体行为并不能完全代表单个细胞的特性。近年来,单细胞质谱技术的发展推动了生命科学研究的进展。该技术能够在单细胞水平上实现高灵敏度和高分辨率检测,获取丰富的分子信息,进而揭示细胞群体中普遍存在的单细胞异质性现象,为疾病机制研究、生物标志物发现和医学诊断等领域提供了支撑^[1-2]。细胞间的内在异质性赋予了每个细胞独特的功能属性,使其对外界环境扰动产生不同响应。因此,对单细胞内源性代谢物的分析不可或缺。它不仅能够有效揭示单细胞间的代谢差异,还能助力识别细胞亚群,并阐释其特定功能与行为。然而,细胞并非孤立存在于生物体内,其功能和行为受周围微环境和动态生理过程的精细调控。活体单细胞分析的意义在于能够在细胞自然生理环境中实时监测其代谢与功能的动态变化,直接揭示细胞如何响应体内动态环境的外界刺激,为解析生理和病理机制提供更深入的见解。

在现代生物医学研究领域,单细胞分析技术已成为不可或缺的关键工具,其重要性在于能够在单细胞层面深入揭示细胞内各类生物分子的奥秘。对于单细胞基因组和转录组,核酸分子的可扩增特性使其可通过单细胞测序实现测量^[3]。而对于蛋白质、脂质及小分子代谢物,因其含量低且不可复制,需要使用灵敏度更高的分析方法。例如,荧光显微技术利用荧光物质在特定波长激发光照射下发射荧光的特性观察细胞;流式

细胞术基于激光激发细胞上标记的荧光物质产生散射光和荧光信号,通过光电探测器收集信号分析细胞的各种特性;拉曼光谱可与探针结合实现多重活体细胞分析;微流控技术可与3D打印结合实现单细胞活率的实时监测^[4-7]。这些技术为细胞的定性与定量分析提供了多样化手段。

由于单细胞中代谢物具有含量极低、结构复杂、种类繁多且动态范围广等特点,使其分析面临挑战。质谱技术以高灵敏度、高分辨率、广泛的分子覆盖范围,以及卓越的结构鉴定与定量分析能力,在单细胞代谢组分析中脱颖而出,为代谢物分析、细胞异质性研究及细胞信号通路解析提供了坚实的技术支撑^[8-12]。值得注意的是,代谢物变化速度极快,通常在毫秒级即可响应外界变化,其组成与细胞状态密切相关^[13-14]。因此,开发活体单细胞分析技术尤为重要且意义深远。

为避免细胞活性状态对代谢检测结果的影响,学者们在细胞前处理捕获方法上采取了不同手段。本文将聚焦活体单细胞质谱探针逐一采样、活体单细胞质谱流式采样和活体单细胞解吸附成像三类分析方法进行综述,并展望未来活体单细胞质谱的发展趋势。

1 活体单细胞质谱探针采样分析

单细胞体积微小(1~10 pL),在对单细胞代谢物进行质谱分析时,对离子源的灵敏度要求较高。纳升电喷雾电离(nanoelectrospray ionization,

nano-ESI)是电喷雾电离(ESI)技术的衍生技术,采用微米级喷嘴和纳升级流速,通过降低液滴尺寸显著提高了离子化效率和检测灵敏度。相较于传统ESI技术,nano-ESI更适用于微量样品分析。目前,国内外学者开发了一系列单细胞探针采样前处理方法,结合nano-ESI可实现单细胞代谢物的高灵敏离子化。单细胞探针既可用于细胞部分内容物的吸取或萃取,也可用于完整单细胞的直接采样分析。

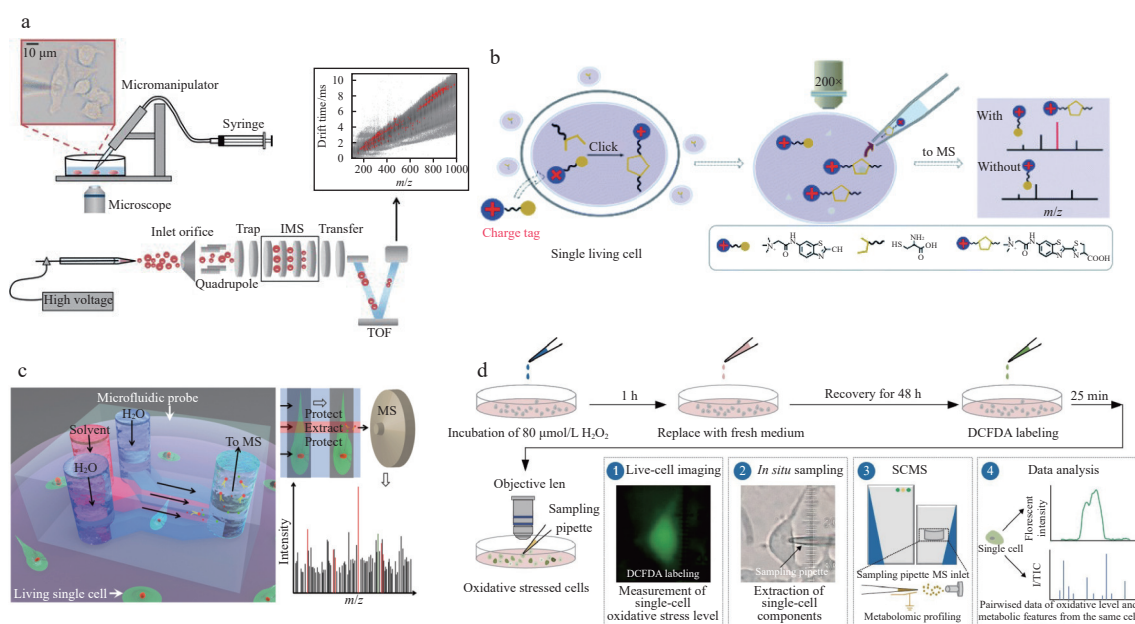
1.1 基于探针的活体单细胞部分内容物采样分析

2008年,Masujima团队首次提出了显微镜辅助下单细胞部分内容物的采样和质谱分析,并将其命名为“video-mass spectrometry”,这是基于nano-ESI的单细胞代谢组学分析方法的开创性工作。该团队利用nano-ESI喷针(nano-tip)作为单细胞探针直刺活细胞,通过负压吸取细胞内容物,再从针尖后端加入溶剂以辅助电离,成功检测出数百种小分子代谢物^[15]。利用该技术,该团队鉴定了人肝癌单细胞(HepG2)中他氟前列素代谢物,并分析了HepG2单细胞间的药物代谢异质性^[16];同时开展了植物细胞的分析研究,通过nano-tip尖端吸取植物细胞内容物,成功分析了天竺葵和蚕豆活体单细胞中的多种植物激素^[17-18]。

后来,学者们结合其他技术实现了对活体单细胞微量体积内容物的提取,不仅能保持细胞活性,还可对所提取的内容物进行质谱分析。Nemes等^[19]利用微探针单细胞毛细管电泳研究非洲爪蟾胚胎8细胞阶段的左右胚泡细胞,通过多溶剂提取法成功鉴定出其中的差异代谢物,并发现这些代谢物主要富集于精氨酸和脯氨酸代谢途径中。这表明在胚胎早期发育过程中,左右轴的代谢活动可能存在不对称性。此后,该团队进一步研究了非洲爪蟾胚胎8细胞中背侧和腹侧细胞间的代谢差异,结果显示,天冬酰胺和甜菜碱在背侧细胞中显著富集,揭示了胚胎早期发育过程中背腹轴上的代谢异质性^[20]。Vertes等^[21]将nano-tip单细胞采样与离子迁移质谱相结合,鉴定出单细胞中多种小分子代谢物与脂质,并通过还原型与氧化型谷胱甘肽的比值判断细胞活性状态,示于图1a。Masujima等^[22]将活体细胞特异性荧光探针技术与质谱分析相结合,利用荧光显微镜辅助实现对活体单细胞线粒体的精准

取样,检测到5 000多个特征峰,成功鉴定出1 700种代谢物,并借助荧光强度归一化实现了代谢物的相对定量分析。Ahmed等^[23]结合全息成像显微技术对HepG2细胞核及周围细胞器形态进行可视化,通过对比利用nano-tip尖端吸取细胞质前后的图像,推断吸取物位置,并计算吸取体积,结果显示,吸取区域前后体积总差值为1.16 pL,该方法提高了单细胞质谱分析的三维空间分辨能力与代谢物定量分析能力。Laskin等^[24]采用电渗技术精准控制细胞内容物的吸取体积,通过对洋葱细胞的皮升级小体积内容物的吸取,可使细胞在采样后仍保持活性,该方法实现了洋葱单细胞内代谢物的定性定量分析,部分黄酮类化合物为首次报道。杨志柏等^[25]将细胞悬浮于缓冲盐溶液中以维持其活性,结合激光拉制 θ 型双孔石英探针和石英毛细管,实现了细胞内容物的原位取样、传输、离子化和实时质谱分析。使用该方法在药物处理实验中检测到紫杉醇和多柔比星的已知代谢衍生物。该团队还利用此方法实时监测活体单细胞中抗癌药伊立替康的含量,揭示了单细胞药物摄取异质性,并分析了活体结肠癌干细胞的代谢特征,发现相较于普通癌细胞,癌干细胞的三羧酸循环代谢产物更丰富,表明它们的主要能量产生途径存在差异^[26]。由于代谢物浓度低且质谱响应差,检测灵敏度受限,黄光明等^[27]开发了一种原位信号放大策略,通过化学衍生化提高低丰度代谢物的质谱信号,该方法具有高度的生物兼容性,可在反应后保持细胞活性,示于图1b。基于2-氰基苯并噻唑与半胱氨酸的生物兼容点击反应,将带永久正电荷的季铵基团共价连接到半胱氨酸上,使半胱氨酸信号提高75倍,实现了对活体单细胞中低响应代谢物的高灵敏度质谱检测。

除nano-tip外,还有其他类型探针被用于活体单细胞分析。张新荣等^[28]利用钨探针富集具有活性的洋葱单细胞中代谢物,代谢物分子经辅助溶剂溶解后进行分析。与nano-ESI相比,该方法的灵敏度提高了约30倍。通过对洋葱单细胞进行检测,发现洋葱内表皮细胞富含果聚糖,而外表皮细胞的脂质含量较高。Nonami等^[29]采用细胞压力探针对植物单细胞内代谢物取样后进行质谱分析,以达到皮升级细胞液样品的检测。此外,Sweedler等^[30]通过结合全细胞膜片钳和毛细管电泳,将神经元和星形胶质细胞的生理活动



注: a. 毛细管微量采样单细胞质谱分析实验装置示意图^[21]; b. 靶向活体细胞中半胱氨酸的单细胞质谱分析工作流程示意图^[27]; c. 微流体探针辅助亚细胞区域取样质谱分析示意图^[32]; d. 结合活细胞荧光成像及单细胞质谱技术的跨模态分析^[34]

图1 基于探针的活体单细胞内容物直接采样和萃取

Fig. 1 Probe-based direct sampling and extraction of live single cells

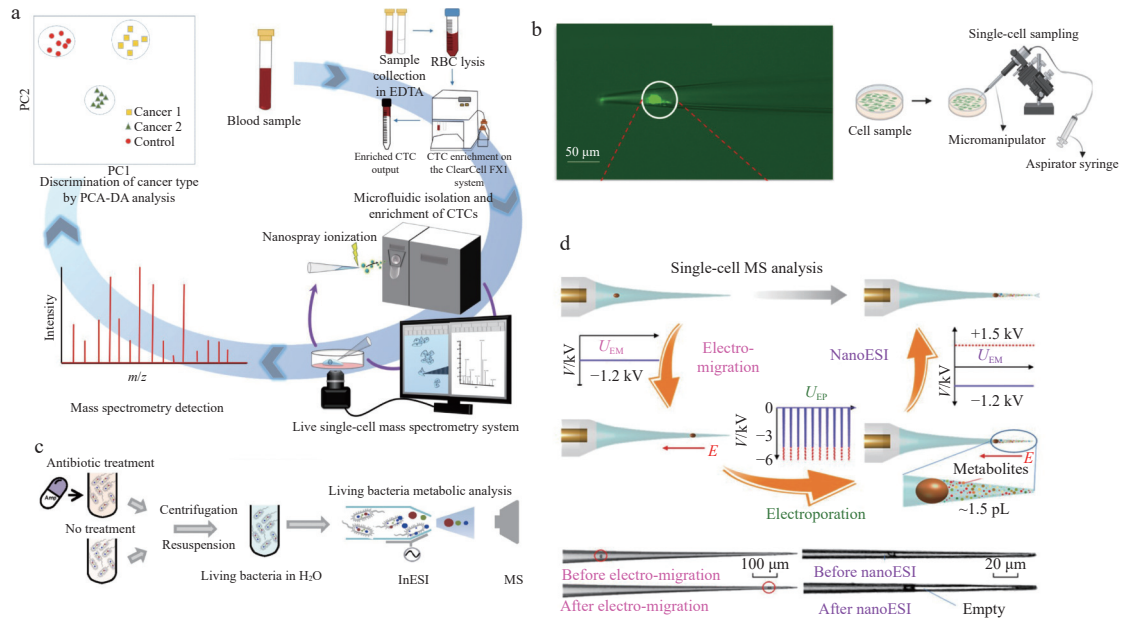
与其神经化学状态联系起来。之后,黄光明等^[31]利用溶酶体膜片钳技术和 nano-ESI 揭示了溶酶体亚群的代谢异质性。林金明等^[32]提出了微流控技术与质谱相结合(图 1c),通过流体探针从活体单细胞的亚细胞区域在线溶解目标组分,提供了亚细胞水平的高空间分辨率物质组成信息,同时细胞可持续增长保持活性。磷脂是细胞膜的关键成分,参与信号传导,与细胞类型和疾病状态密切相关。Mizuno 等^[33]提出了一种高效增溶方法分析活细胞中的磷脂,将细胞置于缓冲盐溶液中保持活性。该方法使用低临界胶束浓度的海藻糖 C14 选择性溶解细胞膜,释放磷脂,显著提高了磷脂的检测信号,可为肿瘤微环境中磷脂代谢差异研究提供帮助。熊伟等^[34]将单细胞质谱技术与活细胞特异性探针荧光成像相结合(图 1d),实现了单细胞多模态分析,并分析了代谢组和氧化应激表型关联的关系,发现细胞代谢异质性决定了其在氧化应激后的状态,初始细胞中谷胱甘肽高的亚群具有更强的抗氧化应激能力和抗衰老水平。

1.2 探针内完整活体单细胞采样分析

在单细胞研究领域,除采用探针穿刺单细胞对部分内容物进行直接采样外,还开发了多种完整活体单细胞采样技术。例如,先将单个完整细

胞直接引入特制的探针内,随后借助萃取液对代谢物进行高效提取,以便后续分析;也可通过 nano-tip 尖端使细胞与萃取液直接接触,细胞膜破坏并释放代谢物,从而实现代谢物的原位采样。这些方法为单细胞研究提供了更灵活、更高效的技术支持。

目前,主流方法都是利用负压吸取单细胞至 nano-tip 尖端而获得完整单细胞。Masujima 等^[35]通过 nano-tip 捕获完整单个人体淋巴细胞,超声处理后进行质谱检测,示于图 2a。结果显示,超声处理后的分子检测峰数量增多、信号增强、质谱检测范围提高到 m/z 2 000。该团队采用微流控技术对细胞富集,并对不同癌症类型中的循环肿瘤细胞进行单细胞分析,发现甘油磷脂、脂肪酸、固醇脂质等代谢物可作为潜在的诊断标志物。杨志柏等^[36]将细胞操纵系统与单探针单细胞质谱技术相结合,经细胞操作平台选定细胞并传输至探针尖端,在乙腈液滴中裂解后,有效排除复杂基质,适用于体液细胞分析。该技术适用于临床治疗中个性化药物分析,对精准医疗具有重要意义。Hankemeier 等^[37]开发了集成的单细胞电裂解和 nano-ESI 平台(图 2b),利用活细胞荧光染料 Calcein AM 对活细胞进行标记,使用 nano-tip 取样后施加 500 V 电压有效裂



注: a. 基于 nano-tip 的完整单细胞采样质谱分析流程图^[35]; b. 基于单细胞电裂解和 nano-ESI 的活体单细胞分析^[37]; c. 基于 nano-ESI 分析活菌代谢物在不同抗生素下的扰动^[40]; d. 基于电迁移和电穿孔的单细胞质谱分析工作流程^[44]

图 2 基于探针的完整活体单细胞采样

Fig. 2 Probe-based intact single-cell sampling

解单个细胞,提高了单细胞质谱分析的信号强度。

除负压吸取单细胞外,黄光明等^[38]直接将大肠杆菌溶液装载在 nano-tip 中,通过脉冲高压实现电穿孔释放内源蛋白,并利用脉冲高压产生的毫秒级微电泳分离基质,成功快速鉴定出大肠杆菌细胞中内源性蛋白质和蛋白质金属复合物,并发现钙调蛋白在细胞内同钙离子的结合状态与体外研究存在差异,证明了体外测量不能完全代表细胞内的实际情况。该方法避免了传统 nano-ESI 中电极与溶液接触可能带来的污染和氧化问题,为研究细胞内蛋白质的复杂相互作用提供了新工具。在此基础上,该团队通过在线电穿孔和毫秒级微电泳分离,结合高分辨率质谱中全碎裂扫描模式消除非特异性结合,实现了 17 种蛋白质和蛋白质复合物的原位鉴定^[39]。除研究蛋白质外,该团队还研究了抗生素对活细菌的代谢扰动,能够在 30 min 内检测到抗生素处理后细菌代谢物的变化,揭示了不同抗生素引起的独特代谢响应,示于图 2c^[40]。在维持单细胞活性方面,非挥发性缓冲盐对细胞环境至关重要,与生物分子尤其是蛋白质共同参与细胞结构维持和生命功能运作^[41]。但因其严重的离子抑制现象,使用单细胞质谱在自然环境中分析细胞颇具挑战^[42]。该团队^[43]开发了一种双脱盐电喷雾电离

质谱 (dual desalting electrospray ionization mass spectrometry, dd-ESI MS),可直接分析悬浮在缓冲盐溶液中的单细胞,通过诱导离子化过程中温和电泳效应和 θ 型喷针界面处水与甲醇的相互作用减少盐离子干扰。与传统的 nano-ESI 相比,dd-ESI MS 多鉴定出 70 种代谢物,大多数代谢物显示出更高的信号强度,提供了更全面的代谢组信息。欧阳证等^[44]开发了一种基于完整细胞电迁移和电穿孔的细胞质谱分析方法,示于图 2d。该方法无需高精度细胞操控平台,可直接将细胞悬液加入到 nano-tip 中,通过不锈钢电极施加特殊电压序列,利用细胞膜电荷驱动细胞电迁移,控制单个细胞定向运动至 nano-tip 尖端部分。随后,施加高压脉冲电压使细胞表面产生电穿孔,代谢物从孔道流出并进入到隔离的小体积液体中,有效避免了细胞内代谢物的过度稀释。利用该方法分析了酵母细胞间异质性、酵母细胞代谢变化及衣藻单细胞在光照及氮源扰动条件下的代谢变化。那娜等^[45]提出了一种新型的活体单细胞质谱分析方法,通过玻璃电喷雾技术对培养于载玻片的活体细胞开展原位质谱分析。使用三角形玻璃载玻片作为细胞培养基底,通过施加高电压使贴壁细胞从玻璃表面脱离并迁移至尖端,代谢物经电喷雾离子化后进入质谱仪检

测;之后,结合荧光显微镜证实了高压诱导下细胞在溶剂环境中没有改变生理形态,并采用死活细胞荧光染料进一步证明细胞的活性维持。该方法前处理步骤少,实现了活体单细胞的原位检测,避免了传统的复杂前处理过程中细胞吸附、污染和损伤等问题。

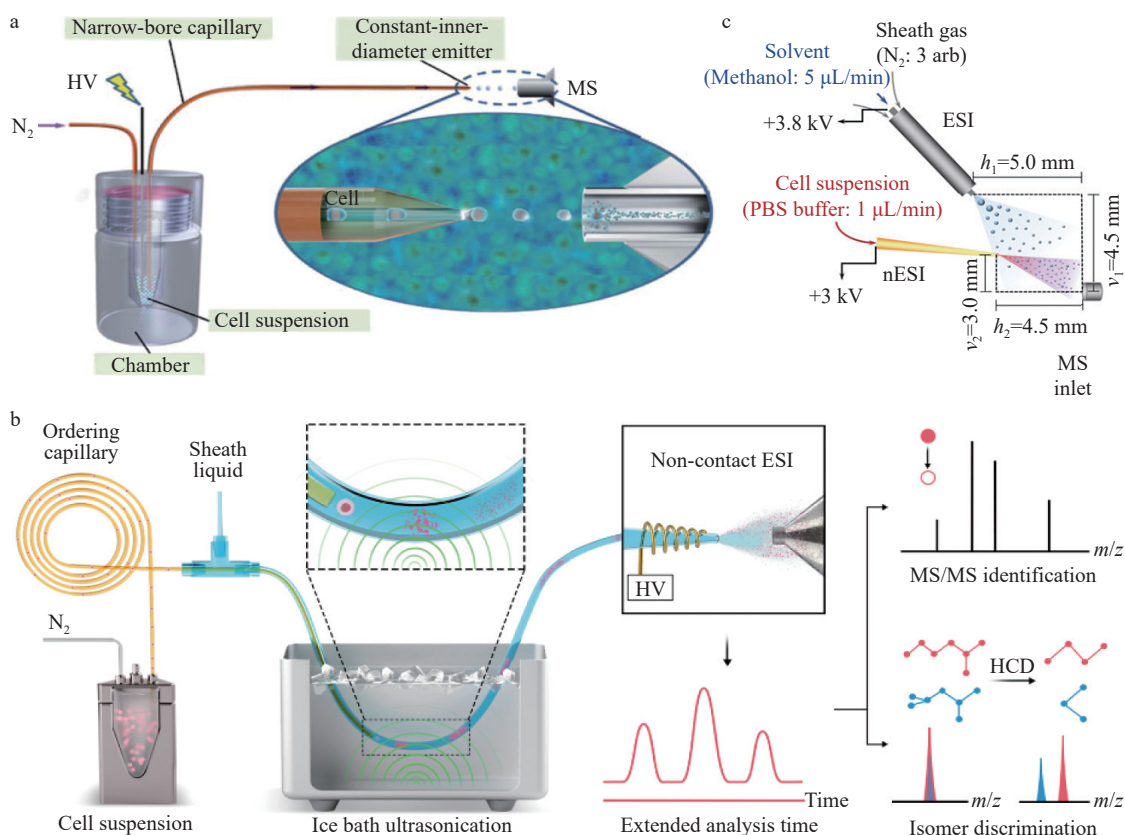
2 活体单细胞质谱流式采样技术

传统单细胞探针采样方法存在通量低、数据有限等缺点,难以满足高通量研究的需求。为此,单细胞质谱流式技术应运而生,该技术通过将ESI-MS与流式细胞术创新性整合,实现了单细胞分析通量和自动化水平的显著提升,并可实时检测单个细胞内数百种代谢物,为单细胞研究提供了更全面的数据信息^[46]。相较于传统方法,该技术能够最大程度地保持细胞的原始特性,从而确保所获取的检测结果更准确、更可靠,推动单细胞研究领域更高效、更精准化的发展。

2.1 无标记活体单细胞流式分析

2019年,张新荣等^[46]开发了单细胞有机质谱

流式无标记分析平台,将分析通量提升至38个细胞/min。利用这一平台,成功获得了数百个乳腺癌细胞的代谢图谱,并实现了多种癌细胞亚型的精准区分。之后,该团队提出了基于白细胞代谢图谱的快速分析策略,成功区分了不同的白血病亚型^[47]。在此基础上,该团队还针对自然杀伤细胞诱导的HepG2细胞凋亡过程开展了代谢异质性研究,为评估自然杀伤细胞毒性和研究单细胞凋亡通路提供思路^[48]。为进一步实现对活体单细胞的分析,提高单细胞质谱分析的灵敏度,该团队与汪夏燕团队合作,提出了一种完整活体细胞发射电离质谱(intact living-cell electrolaunching ionization mass spectrometry, ILCEI-MS),示于图3a。该方法利用单层窄孔毛细管采样单细胞,通过施加高电压将活体细胞直接发射到质谱仪中进行检测,无鞘流结构能够有效避免对细胞活性的影响和对代谢物的稀释。细胞进入质谱毛细管传输管后,在高温和低真空条件下释放代谢物,成功检测了小鼠多种组织原代单细胞,具有普遍适用性,实现了活体单细胞高灵敏、高通量检测^[49]。



注: a. 完整活体细胞发射电离质谱示意图^[49]; b. 有机细胞质谱流程图^[50]; c. 双喷雾电离装置示意图及在线脱盐机制^[51]

图3 无标记活体单细胞分析技术

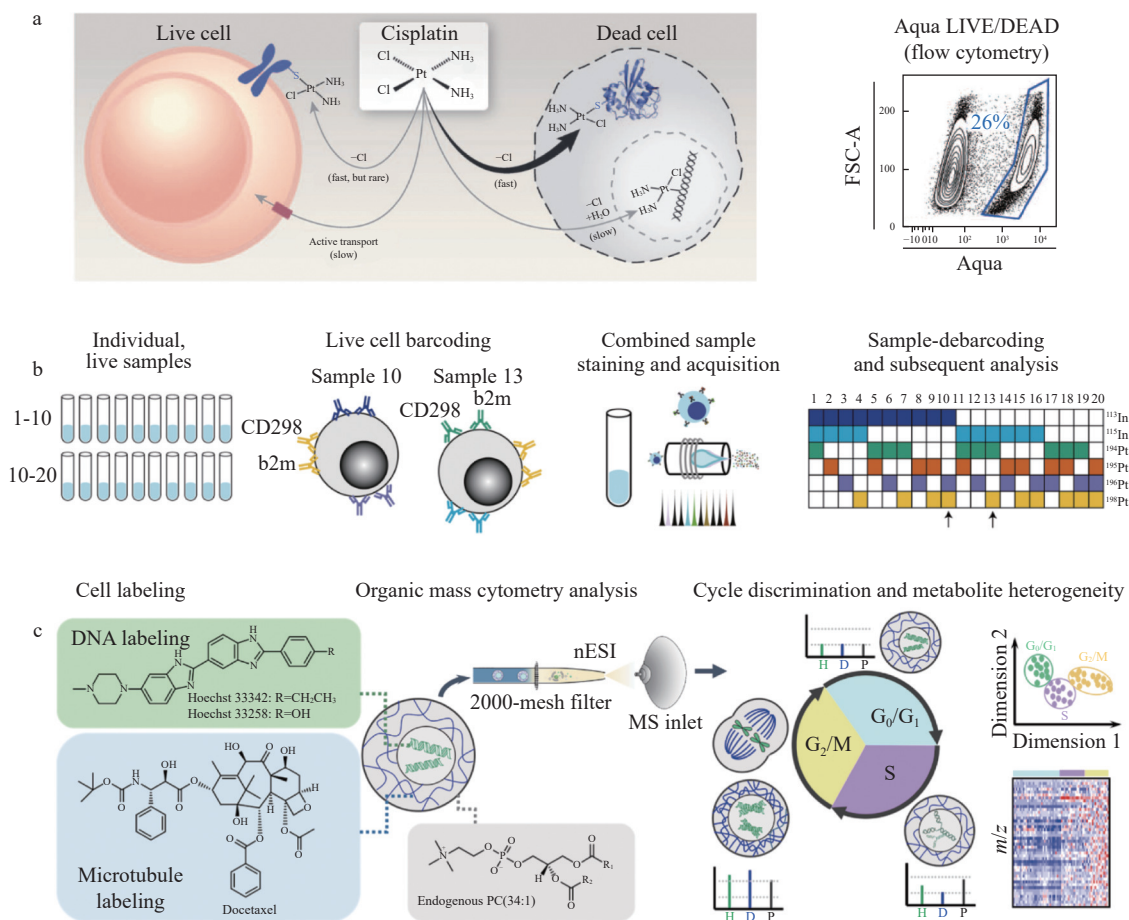
Fig. 3 Label-free live single-cell analysis technology

为进一步提升活体单细胞代谢物定性定量分析的效果,白玉等^[50]获取对数期细胞,以确保所测细胞的活性,示于图3b。然后,通过超声裂解单细胞延长单细胞分析时间,确保能够采集足够的MS/MS谱图用于代谢物鉴定和异构体鉴别,并利用异构体组成首次观察到乳腺癌MCF-7细胞可能存在的细胞亚型,实现了单细胞水平上的代谢物深度分析和同分异构体区分。该团队还尝试对悬浮于缓冲盐溶液中的细胞进行单细胞质谱流式分析,为减少基质对质谱分析的不良影响,开发了结合ESI和nano-ESI的新型双喷雾电离技术,实现了具有在线除盐功能的活体单细胞质谱分析,示于图3c^[51]。在双喷雾模式下,通过ESI引入的溶剂喷雾能够有效减少盐类的干扰;同时,该团队结合罗丹明质量标签,实现了单细胞表面蛋白的高灵敏检测。这种方法不仅能够保持细胞原生环境的同时有效去除盐类干扰,还可以实现高灵敏、高通量的单细胞分

析,对于理解细胞在不同生理和病理状态下的分子机制具有重要意义。

2.2 标记辅助活体单细胞流式分析

结合染料、同位素以及药物等标记的质谱流式技术可对单细胞进行精细分析,这种技术不仅提高了研究精度,还极大地扩展了对单细胞特性和行为的了解。Bodenmiller等^[52]利用化疗药物顺铂作为活体细胞标记物,成功实现了单细胞质谱分析过程中的死活细胞判别,示于图4a。顺铂能够快速进入膜受损的细胞并与蛋白质中的硫醇基团形成共价键,与荧光活性染料相比,其在不同浓度下均能有效标记死细胞。该方法提供了一种简单、快速且稳定的单细胞质谱流式细胞术中的细胞活性检测方法,能够与现有的细胞处理步骤兼容,并且不会影响细胞的后续功能分析。Bendall等^[53]开发了一种基于抗体的通用活体细胞条形码平台(图4b),使用铂和钨同位素作为条形码,这些金属同位素通过共价键与抗



注: a. 基于顺铂标记的死活细胞质谱流式分析^[52]; b. 活细胞条形码的潜在靶标^[53]; c. 有机质量流式细胞术检测细胞周期示意图^[55]

图4 标记辅助活体单细胞分析

Fig. 4 Labeling-assisted live single-cell analysis technology

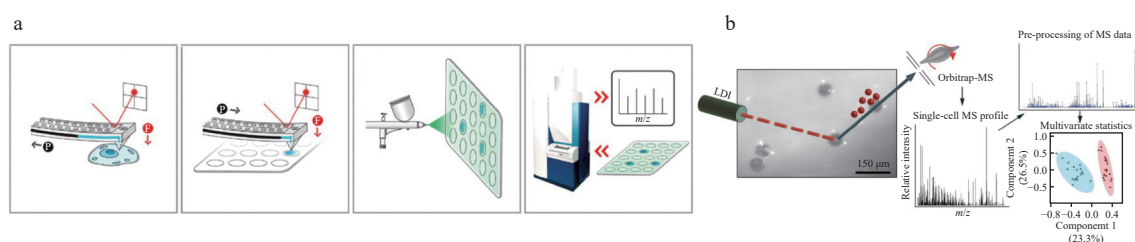
体结合,可以提高质谱流式细胞术实验的效率和可比性。除研究细胞死活外,还对不同周期下的单细胞信息进行探究,Nolan等^[54]选用5-碘-2-脱氧尿苷标记S期细胞,这种标记能够快速进入细胞,经短时间孵育即可测量细胞群体中的S期细胞,且不受DNA合成抑制剂干扰,同时借助抗细胞周期蛋白B1和细胞周期蛋白A区分G1和G2期细胞,并利用磷酸化组蛋白H3的抗体识别M期细胞。为精准分析不同细胞周期内的代谢组,严秀平等^[55]结合活细胞染料Hoechst、多西他赛和磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)(34:1)3种指示剂判别细胞周期,示于图4c。通过有机质谱流式细胞术实时区分单个细胞所处的周期阶段,发现不同周期单细胞下的氨基酸、核苷酸、能量代谢中间体和磷脂等代谢物表现出显著差异。白玉等^[56]通过结合稳定同位素标记技术的动态代谢组学,解析活细胞中代谢通路的活性和流动方向。采用2-脱氧葡萄糖抑制糖酵解,研究代谢扰动下的单细胞响应,表明动态代谢活性分析比静态浓度分析更敏感,并进一步研究肿瘤微环境中肿瘤细胞与巨噬细胞的相互作用,揭示了细胞异质性和肿瘤相关巨噬细胞的多样性。该方法能够同时提供代谢物浓度和活性信息,弥补了传统静态分析的不足。

3 活体单细胞成像分析

质谱成像(mass spectrometry imaging, MSI)是一种先进的分子成像技术,能够在组织样本原位揭示化合物的空间分布特征,凭借其高灵敏度和高空间分辨率的优势,为生物学、药理学、病理学以及临床医学研究提供了全新的视角和强大的工具,具有极为重要的应用价值和广阔的发展前景。

由于代谢组对环境变化的快速反应,将代谢物取样时的扰动最小化是至关重要的。Sweedler

等^[57]开发了一种结合光学成像、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析和多变量统计分析的方法,能够对大量单细胞进行分类,揭示稀有细胞的独特化学特征,并准确区分主要细胞亚群。之后,该团队采用MALDI-TOF MS技术揭示了胰岛细胞在化学组成上的异质性,为理解胰岛的内分泌功能和代谢调节机制提供了新视角^[58]。为在保留细胞生理环境和代谢状态的前提下进行分析,Zenobi等^[59]利用MALDI-TOF MS从单细胞藻类中成功检测到二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、三磷酸鸟苷(GTP)和尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖等几种化合物,并比较了“温暖”和“寒冷”条件下培养细胞的代谢异质性。在“温暖”条件下培养的细胞显示出更高的ATP/ADP比率,表明其具有更高的代谢活性。之后,该团队进一步将流体力显微镜(fluidic force microscopy, FluidFM)技术与MALDI-TOF MS相结合(图5a),通过施加负压,能够精准地从细胞内吸取代谢产物,同时,借助高精度机械臂的操控,实现对细胞内代谢物的定量提取,且在此过程中保持细胞活性。该方法可以在不破坏细胞环境和细胞活性的前提下,最大程度减少生理扰动并保留细胞背景信息,为多时间点分析和多分子联合分析创造可能^[60]。Pohnert等^[61]使用无基质激光解吸电离质谱(matrix-free laser/desorption ionization mass spectrometry, LDI-MS)分析淡水藻和海洋硅藻单细胞(图5b),将微藻细胞从培养基中取出,直接放置在玻璃纤维滤纸上,无需添加基质或其他预处理,成功地从单个微藻细胞中获得了化学指纹图谱,包括叶绿素a、岩藻黄素和 β -胡萝卜素等光合色素的信号。随后比较不同生长阶段的海藻细胞,发现其在代谢物组成上存在显著差异,尤其是光合色素的减



注: a. 基于 FluidFM 和 MALDI-MS 单细胞分析流程图^[60]; b. 单细胞藻类单细胞 MS 谱图的采集和数据处理方案^[61]

图5 活体单细胞质谱成像分析
Fig. 5 Live single-cell MS imaging analysis

少。该方法为理解微藻在不同环境条件下的生理变化提供了工具。鞠焜先等^[62]基于 MALDI-TOF MS 设计了功能性质量纳米探针,将其插入活体细胞膜后,可利用探针上底物肽感应酶的分秘,甚至将不同探针插入同一细胞以实现多重检测,在癌症早期诊断、药物疗效评估等领域有潜在的应用价值。

4 总结与展望

近年来,单细胞研究领域蓬勃发展,在生物医学前沿领域,特别是在癌症研究、免疫学和神经科学研究等关键领域中取得了显著进展。这些研究帮助科学家们深入理解疾病发生机制和细胞功能,助力揭示生命科学的核心奥秘。在癌症研究中,单细胞质谱技术能够精准剖析癌细胞的代谢特质,挖掘潜在的治疗靶点,为开发新的抗癌药物提供依据;在免疫学领域,该技术助力阐释免疫细胞的激活与调控机制;在药物研发领域,单细胞质谱技术同样扮演着不可或缺的角色,它能够助力科研人员发现潜在的药物靶标,深入探究药效发挥的内在机制,并且实时、精准地监测药物可能引发的毒性反应,从而大幅提升药物研发的成功率。单探针质谱技术融合了质谱分析的高灵敏度优势与探针精准取样的卓越能力,得以实现亚细胞水平的精细检测。该技术不仅能够直接对活体细胞进行精准取样,还具备特异性富集与检测的能力。然而,该技术在重复性方面尚存在一定的提升空间,偶尔出现的检测差异为其广泛应用带来了阻碍。质谱流式技术则凭借其高通量分析能力,极大地降低了单个细胞的测量成本,使高通量细胞分析成为可能。质谱成像技术能够还原生物样品中内源性分子的初始状态,并且可以在微米甚至纳米的极小尺度上直观展现生物分子在细胞、组织中的分布情况。

在单细胞研究这一充满潜力与挑战的领域,未来仍需在多个关键方向持续发力,以推动该领域更深入、更全面的发展。首先,分析方法及仪器设备的优化升级始终是单细胞研究取得突破的核心驱动力。随着对单细胞内复杂分子信息研究需求的日益提高,现有的仪器设备在灵敏度、覆盖度、分辨率和通量等方面仍存在很大的提升空间。其次,样品制备与处理方法的改进同样是单细胞研究获得准确可靠结果的关键环节。样品的质量和处理过程的精细程度直接影

响后续分析数据的准确性和可重复性。此外,在活体单细胞研究中,还存在着细胞的应激反应对代谢的影响。因此,开发更高效、更便捷,且能最大程度减少误差的样品制备与处理方法迫在眉睫。对于活体单细胞中的应激反应,可选择更温和的细胞分离方法,也可通过低温减缓代谢活动。此外,积极促进单细胞质谱技术与其他单细胞分析技术的深度融合,也是未来单细胞多组学研究的重要发展方向。不同的单细胞分析技术各有其独特优势和局限性,如荧光显微镜技术擅长对细胞的形态和特定分子的空间分布进行可视化,而单细胞测序技术则在基因表达分析方面具有较高的精度和通量。采用非侵入性或微创技术直接检测活细胞,实现原位分析,从而减少活体单细胞检测中细胞应激反应对代谢的影响。将单细胞质谱技术与这些技术相结合,能够充分发挥各自的长处,实现优势互补。最后,通过多技术交叉融合构建标准化的操作流程与严谨的质量控制体系,对于提高数据质量至关重要。标准化的操作流程能够确保不同实验室、不同实验人员之间的实验条件和分析方法具有可靠性;同时,严谨的质量控制体系则能在实验的各个环节对数据进行实时监测和评估,及时发现并纠正可能出现的偏差,显著提升数据的一致性和可比性,为单细胞计量研究提供坚实基础,推动该领域向着更精准、更高效的方向发展。

参考文献:

- [1] KINKER G S, GREENWALD A C, TAL R, ORLOVA Z, CUOCO M S, McFARLAND J M, WARREN A, RODMAN C, ROTH J A, BENDER S A, KUMAR B, ROCCO J W, FERNANDES P A C M, MADER C C, KEREN-SHAUL H, PLOTNIKOV A, BARR H, TSHERNIAK A, ROZENBLATT-ROSEN O, KRIZHANOVSKY V, PURAM S V, REGEV A, TIROSH I. Pan-cancer single-cell RNA-seq identifies recurring programs of cellular heterogeneity[J]. *Nature Genetics*, 2020, 52(11): 1 208-1 218.
- [2] ZENOBI R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives[J]. *Science*, 2013, 342(6 163): 1 243 259.
- [3] ZARAGOSI L E, DEPREZ M, BARBRY P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2020, 48(1): 327-336.
- [4] ZHANG L, SEVINSKY C J, DAVIS B M, VERTES A.

- Single-cell mass spectrometry of subpopulations selected by fluorescence microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(7): 4 626-4 634.
- [5] ZHANG X, WEI X, WU C X, MEN X, WANG J, BAI J J, SUN X Y, WANG Y, YANG T, LIM C T, CHEN M L, WANG J H. Multiplex profiling of biomarker and drug uptake in single cells using microfluidic flow cytometry and mass spectrometry[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(8): 6 612-6 622.
- [6] CHEN C, ZHAO Z, QIAN N, WEI S, HU F, MIN W. Multiplexed live-cell profiling with Raman probes[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3 405.
- [7] LIN M, LIU T, LIU Y, LIN Z, CHEN J, SONG J, QIU Y, ZHOU B. Three-dimensional printing enabled droplet microfluidic device for real-time monitoring of single-cell viability and blebbing activity[J]. *Micromachines*, 2023, 14(8): 1 521.
- [8] TAYLOR M J, LUKOWSKI J K, ANDERTON C R. Spatially resolved mass spectrometry at the single cell: recent innovations in proteomics and metabolomics[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2021, 32(4): 872-894.
- [9] ZHAO P, FENG Y, WU J, ZHU J, YANG J, MA X, OUYANG Z, ZHANG X, ZHANG W, WANG W. Efficient sample preparation system for multi-omics analysis via single cell mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(18): 7 212-7 219.
- [10] RUBAKHIN S S, ROMANOVA E V, NEMES P, SWEEDLER J V. Profiling metabolites and peptides in single cells[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(Suppl 4): S20-S29.
- [11] HEINEMANN M, ZENOBI R. Single cell metabolomics[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(1): 26-31.
- [12] SHIMIZU M, LEVI-SCHAFFER F, OJIMA N, SHINGAKI T, MASUJIMA T. A single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectroscopic assay of the cell-maturation process[J]. *Analytical Sciences*, 2002, 18(2): 107-108.
- [13] OKUMOTO S. Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(1): 45-54.
- [14] ALTSCHULER S J, WU L F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference?[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 559-563.
- [15] MIZUNO H, TSUYAMA N, HARADA T, MASUJIMA T. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, 43(12): 1 692-1 700.
- [16] FUKANO Y, TSUYAMA N, MIZUNO H, DATE S, TAKANO M, MASUJIMA T. Drug metabolite heterogeneity in cultured single cells profiled by pico-trapping direct mass spectrometry[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(9): 1 365-1 374.
- [17] SHIMIZU T, MIYAKAWA S, ESAKI T, MIZUNO H, MASUJIMA T, KOSHIBA T, SEO M. Live single-cell plant hormone analysis by video-mass spectrometry[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(7): 1 287-1 296.
- [18] LORENZO TEJEDOR M, MIZUNO H, TSUYAMA N, HARADA T, MASUJIMA T. *In situ* molecular analysis of plant tissues by live single-cell mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5 221-5 228.
- [19] ONJIKO R M, MORRIS S E, MOODY S A, NEMES P. Single-cell mass spectrometry with multi-solvent extraction identifies metabolic differences between left and right blastomeres in the 8-cell frog (*Xenopus*) embryo[J]. *Analyst*, 2016, 141(12): 3 648-3 656.
- [20] ONJIKO R M, PLOTNICK D O, MOODY S A, NEMES P. Metabolic comparison of dorsal versus ventral cells directly in the live 8-cell frog embryo by microprobe single-cell CE-ESI-MS[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(34): 4 964-4 970.
- [21] ZHANG L, VERTES A. Energy charge, redox state, and metabolite turnover in single human hepatocytes revealed by capillary microsampling mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(20): 10 397-10 405.
- [22] ESAKI T, MASUJIMA T. Fluorescence probing live single-cell mass spectrometry for direct analysis of organelle metabolism[J]. *Analytical Sciences*, 2015, 31(12): 1 211-1 213.
- [23] ALI A, ABOULEILA Y, AMER S, FURUSHIMA R, EMARA S, EQUIS S, COTTE Y, MASUJIMA T. Quantitative live single-cell mass spectrometry with spatial evaluation by three-dimensional holographic and tomographic laser microscopy[J]. *Analytical Sciences*, 2016, 32(2): 125-127.
- [24] YIN R, PRABHAKARAN V, LASKIN J. Quantitative extraction and mass spectrometry analysis at a single-cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(13): 7 937-7 945.
- [25] PAN N, RAO W, KOTHAPALLI N R, LIU R, BURGESS A W G, YANG Z. The single-probe: a miniatur-

- ized multifunctional device for single cell mass spectrometry analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9 376-9 380.
- [26] SUN M, YANG Z. Metabolomic studies of live single cancer stem cells using mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2 384-2 391.
- [27] ZHUANG M, HOU Z, CHEN P, LIANG G, HUANG G. Introducing charge tag *via* click reaction in living cells for single cell mass spectrometry[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(28): 7 308-7 312.
- [28] GONG X, ZHAO Y, CAI S, FU S, YANG C, ZHANG S, ZHANG X. Single cell analysis with probe ESI-mass spectrometry: detection of metabolites at cellular and subcellular levels[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3 809-3 816.
- [29] GHOLIPOUR Y, ERRA-BALSELLS R, HIRAOKA K, NONAMI H. Living cell manipulation, manageable sampling, and shotgun picoliter electrospray mass spectrometry for profiling metabolites[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 433(1): 70-78.
- [30] AERTS J T, LOUIS K R, CRANDALL S R, GOVINDAIAH G, COX C L, SWEEDLER J V. Patch clamp electrophysiology and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics for single cell characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 3 203-3 208.
- [31] ZHU H, LI Q, LIAO T, YIN X, CHEN Q, WANG Z, DAI M, YI L, GE S, MIAO C, ZENG W, QU L, JU Z, HUANG G, CANG C, XIONG W. Metabolomic profiling of single enlarged lysosomes[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 788-798.
- [32] ZHANG Q, LIN L, YI X, XIE T, XING G, LI Y, WANG X, LIN J M. Microfluidic sampling of undissolved components from subcellular regions of living single cells for mass spectrometry analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(49): 18 082-18 090.
- [33] SAKATA J, FURUSHO A, SUGIYAMA E, SAKANE I, TODOROKI K, MIZUNO H. Development of a highly efficient solubilization method for mass spectrometric analysis of phospholipids in living single cells[J]. *Analytical Sciences*, 2024, 40(5): 917-924.
- [34] WANG Z, GE S, LIAO T, YUAN M, QIAN W, CHEN Q, LIANG W, CHENG X, ZHOU Q, JU Z, ZHU H, XIONG W. Integrative single-cell metabolomics and phenotypic profiling reveals metabolic heterogeneity of cellular oxidation and senescence[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 2 740.
- [35] ABOULEILA Y, ONIDANI K, ALI A, SHOJI H, KAWAI T, LIM C T, KUMAR V, OKAYA S, KATO K, HIYAMA E, YANAGIDA T, MASUJIMA T, SHIMIZU Y, HONDA K. Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(2): 697-706.
- [36] STANDKE S J, COLBY D H, BENSON R C, BURGESS A W G, YANG Z. Mass spectrometry measurement of single suspended cells using a combined cell manipulation system and a single-probe device[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 1 738-1 742.
- [37] PANDIAN K, de AGUIAR HOMEM E ALMEIDA de MATOS L D, HETZEL L A, ZWIER R, van VELDHUIZEN P, SCHUBERT C, KARUPPUSAMY J, HARMS A C, ALI A, HANKEMEIER T. Enabling high-sensitivity live single-cell mass spectrometry using an integrated electrical lysis and nano electrospray ionization interface[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1 324: 343 068.
- [38] LI G, YUAN S, PAN Y, LIU Y, HUANG G. Binding states of protein-metal complexes in cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(22): 10 860-10 866.
- [39] LI G, YUAN S, ZHENG S, LIU Y, HUANG G. *In situ* living cell protein analysis by single-step mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(5): 3 409-3 415.
- [40] ZHAN L, HOU Z, WANG Y, LIU H, LIU Y, HUANG G. Rapid profiling of metabolic perturbations to antibiotics in living bacteria by induced electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2022, 33(10): 1 960-1 966.
- [41] TOYOSHIMA C, NOMURA H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium[J]. *Nature*, 2002, 418(6 898): 605-611.
- [42] STERLING H J, BATCHELOR J D, WEMMER D E, WILLIAMS E R. Effects of buffer loading for electrospray ionization mass spectrometry of a noncovalent protein complex that requires high concentrations of essential salts[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21(6): 1 045-1 049.
- [43] LIU H, WU T, HE H, ZHOU R, ZHAO J, ZHAN L, HOU Z, HUANG G. Dual desalting electrospray strategy for in-cell mass spectrometry to reveal novel sphingolipid metabolism in an epithelial-mesenchymal transition[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(15): 8 337-8 345.
- [44] LI Z, WANG Z, PAN J, MA X, ZHANG W, OUYANG Z. Single-cell mass spectrometry analysis of metabolites facilitated by cell electro-migration and electroporation[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(14): 10 138-10 144.

- [45] GE X, XING X, WANG X, YIN Y, SHEN X, OUYANG J, NA N. Glass electrospray for mass spectrometry *in situ* detection of living cells[J]. *Chemical Communications*, 2025, 61(21): 4 164-4 167.
- [46] YAO H, ZHAO H, ZHAO X, PAN X, FENG J, XU F, ZHANG S, ZHANG X. Label-free mass cytometry for unveiling cellular metabolic heterogeneity[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9 777-9 783.
- [47] YAO H, ZHAO H, PAN X, ZHAO X, FENG J, YANG C, ZHANG S, ZHANG X. Discriminating leukemia cellular heterogeneity and screening metabolite biomarker candidates using label-free mass cytometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(29): 10 282-10 291.
- [48] SHEN Z, ZHAO H, YAO H, PAN X, YANG J, ZHANG S, HAN G, ZHANG X. Dynamic metabolic change of cancer cells induced by natural killer cells at the single-cell level studied by label-free mass cytometry[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(6): 1 641-1 647.
- [49] SHAO Y, ZHOU Y, LIU Y, ZHANG W, ZHU G, ZHAO Y, ZHANG Q, YAO H, ZHAO H, GUO G, ZHANG S, ZHANG X, WANG X. Intact living-cell electrolaunching ionization mass spectrometry for single-cell metabolomics[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(27): 8 065-8 073.
- [50] QIN S, ZHANG Y, SHI M, MIAO D, LU J, WEN L, BAI Y. In-depth organic mass cytometry reveals differential contents of 3-hydroxybutanoic acid at the single-cell level[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4 387.
- [51] XU S, XUE J, BAI Y, LIU H. High-throughput single-cell immunoassay in the cellular native environment using online desalting dual-spray mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(24): 15 854-15 861.
- [52] FIENBERG H G, SIMONDS E F, FANTL W J, NOLAN G P, BODENMILLER B. A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2012, 81A(6): 467-475.
- [53] HARTMANN F J, SIMONDS E F, BENDALL S C. A universal live cell barcoding-platform for multiplexed human single cell analysis[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10 770.
- [54] BEHBEHANI G K, BENDALL S C, CLUTTER M R, FANTL W J, NOLAN G P. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle[J]. *Cytometry Part A*, 2012, 81A(7): 552-566.
- [55] XU S, YANG C, YAN X. Organic mass cytometry discriminating cycle stages of single cells with small molecular indicators[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(4): 2 312-2 320.
- [56] ZHANG Y, SHI M, LI M, QIN S, MIAO D, BAI Y. Dynamic single-cell metabolomics reveals cell-cell interaction between tumor cells and macrophages[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4 582.
- [57] ONG T H, KISSICK D J, JANSSON E T, COMI T J, ROMANOVA E V, RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. Classification of large cellular populations and discovery of rare cells using single cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(14): 7 036-7 042.
- [58] JANSSON E T, COMI T J, RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. Single cell peptide heterogeneity of rat islets of Langerhans[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(9): 2 588-2 595.
- [59] AMANTONICO A, URBAN P L, FAGERER S R, BALABIN R M, ZENOBI R. Single-cell MALDI-MS as an analytical tool for studying intrapopulation metabolic heterogeneity of unicellular organisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(17): 7 394-7 400.
- [60] GUILLAUME-GENTIL O, REY T, KIEFER P, IBÁÑEZ A J, STEINHOFF R, BRÖNNIMANN R, DORWLING-CARTER L, ZAMBELLI T, ZENOBI R, VORHOLT J A. Single-cell mass spectrometry of metabolites extracted from live cells by fluidic force microscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(9): 5 017-5 023.
- [61] BAUMEISTER T U H, VALLET M, KAFTAN F, SVATOŠ A, POHNERT G. Live single-cell metabolomics with matrix-free laser/desorption ionization mass spectrometry to address microalgal physiology[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 172.
- [62] FENG N, LI Y, SUN J, WANG H, MA Q, GUO J, JU H. Functional mass nanoprobe inserted on live cells for *in situ* monitoring multiple secreted enzymes with MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Nano Today*, 2023, 50: 101 889.

(收稿日期: 2025-05-15; 修回日期: 2025-06-26)