

# 基于质谱的单细胞多维度多组学研究进展

何新宇<sup>1,2</sup>, 刘浩然<sup>1,2</sup>, 赵宝锋<sup>1</sup>, 张丽华<sup>1</sup>, 袁辉明<sup>3</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 谱系技术与装备研究中心, 广东 广州 510530)

**摘要:** 细胞作为生物体结构和功能的基本单位, 其个体层面的异质性(如细胞亚群差异、发育动态及肿瘤微环境调控机制等)在群体测量中往往被掩盖。为揭示这些关键的生物学信息, 单细胞分析技术已成为前沿研究热点。然而, 相较于易扩增的遗传物质, 以单细胞蛋白质组为核心的多维度分析面临样品组成高度复杂、丰度低且动态范围宽等严峻挑战。质谱技术凭借其检测灵敏度高、分子覆盖范围宽等优势, 已成为深入解析单细胞中功能分子信息网络的强有力工具。本文系统综述了近年来基于质谱的单细胞多维度多组学研究进展, 重点聚焦单细胞蛋白质组、分泌组等分析方法的创新与应用, 并对该领域未来的发展方向进行展望。

**关键词:** 单细胞分析; 质谱技术; 蛋白质组; 分泌组; 生物医学应用

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2025)06-0729-22

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0089

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0089

## Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Single-Cell Multidimensional Multi-Omics Analysis

HE Xin-yu<sup>1,2</sup>, LIU Hao-ran<sup>1,2</sup>, ZHAO Bao-feng<sup>1</sup>, ZHANG Li-hua<sup>1</sup>, YUAN Hui-ming<sup>3</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Separation Sciences for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China; 2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. Center for Cell Lineage Technology and Engineering, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

**Abstract:** As the fundamental structural and functional unit of living organisms, individual cells exhibit substantial differences in phenotype, function, and molecular composition, even under a uniform genomic background. This cellular heterogeneity—encompassing subpopulation differentiation, dynamic developmental processes, and microenvironmental interactions—is often obscured in traditional bulk measurements. To overcome this limitation, single-cell analysis techniques have emerged as powerful tools in systems biology, enabling dissection of cell states and functional transitions at an unprecedented resolution. Although single-cell RNA sequencing and other nucleic acid-based omics approaches have advanced rapidly, single-cell multidimensional multi-omics centered on the proteome continues to face significant challenges due to the intrinsic non-amplifiable nature, low abundance, and wide dynamic range of proteins and metabolites. Mass spectrometry (MS) has become a cornerstone of single-cell multi-omics research, offering high sensitivity, quantitative

robustness, and broad molecular coverage. This review provides a systematic overview of recent advances in MS-based single-cell multi-omics analysis, with a focus on strategies for proteomic and integrated multi-omics profiling. Key aspects including sample preparation, data acquisition and processing, and spatially resolved omics are discussed to illustrate the value of MS in elucidating multilayered molecular interaction networks within individual cells. Key advances in sample preparation—including nanoliter-volume microreactors, carrier-assisted quantification strategies, and fully integrated microfluidic platforms—have dramatically enhanced protein recovery and analytical throughput. Likewise, cutting-edge acquisition strategies, such as data-independent acquisition (DIA), plexDIA, and nDIA, have expanded proteome depth while maintaining quantitative accuracy in low-input contexts. Beyond intracellular dimensions, this review also highlights developments in single-cell secretome analysis. Both targeted approaches (e.g., barcoded antibody chips, CITE-seq) and untargeted MS-based methods (e.g., SCSP) are evaluated in terms of sensitivity, scalability, and coverage, which offer crucial insights into intercellular communication, immune regulation, and tumor microenvironmental dynamics. Finally, the review highlights current challenges, including low signal intensity, limited spatial and temporal resolution, and data integration complexity. It outlines prospective directions for the field, such as the development of spatially resolved multi-omics, AI-assisted data interpretation, and standardized pipelines for reproducible high-throughput analysis. Collectively, MS-based single-cell multidimensional multi-omics is poised to reshape biomedical research, providing powerful tools to unravel the molecular mechanisms underlying health and disease at single-cell resolution.

**Key words:** single-cell multidimensional analysis; mass spectrometry techniques; proteome; secretome; biomedical applications

细胞作为生物体结构和功能的基本单位,在遗传物质相同的前提下,受基因表达调控的内在机制及与微环境动态互作的共同驱动,表现出高度异质性。这种异质性在生物发育和疾病发生发展等生命过程中发挥着关键作用<sup>[1-3]</sup>。然而,传统的大规模细胞群体测量往往会掩盖关键的生物学信息,例如细胞亚群<sup>[4]</sup>、细胞生长发育<sup>[5]</sup>及肿瘤生长的微环境因素<sup>[6]</sup>等。为揭示这些信息,单细胞分析技术应运而生。该技术通过单独分析循环肿瘤细胞等高度异质性的细胞,不仅为阐明肿瘤形成等病理过程及其他重要生理机制提供了科学依据,也为活体检测和疾病治疗提供了新的视角和思路<sup>[7-8]</sup>。

细胞是由核酸、蛋白质、糖类、脂质等生命物质组成,遵循中心法则运行的高度有序系统<sup>[9]</sup>。近年来,单细胞 RNA 测序(scRNA-seq<sup>[10]</sup>)的突破性进展,使得生物体转录组图谱的高精度解析成为可能<sup>[11-12]</sup>。然而,单一的转录组数据难以全面揭示细胞的复杂性,其在研究蛋白质动态表达、代谢网络调控、表观遗传修饰以及细胞互作机

制等关键生物学过程中存在显著局限性<sup>[13]</sup>。一方面,为了全面理解单个细胞中基因型和表型之间的联系,有必要在细胞内所有分子水平上表征细胞异质性,尤其是作为生命活动直接执行者的单细胞蛋白质组<sup>[14-15]</sup>;另一方面,基于单一组学的研究无法全面反映生命进程的变化,从同一细胞个体而非同一样品中的不同细胞获得多组学信息,已成为生物学研究的重要目标<sup>[16]</sup>。除胞内的单细胞多组学分析外,细胞间交流频繁,解析细胞外空间和局部微环境维度的单细胞分泌组,可为单细胞异质性解析提供关键信息和重要补充<sup>[17-18]</sup>。

相较于遗传物质可扩增的特性极大简化了 scRNA-seq 分析,以单细胞蛋白质组为核心的新型单细胞多维度多组学分析仍面临众多挑战:目标分子种类繁多( $>10^4$ 种)、含量极低(zmol 级)、多组分分离过程中样品易丢失、代谢产物时空动态变化显著等<sup>[19-21]</sup>。这给单细胞分析方法和仪器的检测灵敏度、分辨率、选择性和通量提出了极高要求。传统单细胞分析方法(如免疫荧光

(IF)<sup>[22]</sup>和表面增强拉曼光谱(SERS)<sup>[23]</sup>依赖标记技术,存在检测分子覆盖度低、交叉干扰等问题;基于抗体的技术(REAP-seq[RNA element and protein sequencing]<sup>[24]</sup>)和单细胞条形码芯片(SCBC [single-cell barcoding chip]<sup>[25]</sup>)虽能实现多组学联合检测,但受限于高质量抗体的获取,仅可定量分析少量靶标分子。

相比之下,质谱(MS)技术通过直接检测特征碎片离子的质荷比( $m/z$ ),无需标记即可同步实现蛋白质、代谢物及脂质的定性定量分析。近年来,单细胞分选系统(如 CellenONE 平台)与高灵敏离子化技术(如纳升电喷雾电离(nanoESI))的协同创新,显著提升了单细胞分析通量和检测灵敏度,使现代质谱的检测灵敏度突破至单分子层面(zeptomole 级)。结合其宽动态范围( $>10^5$ )、高选择性及非靶向分析能力,质谱技术已成功应用于单细胞蛋白质组、代谢组及脂质组的深度解析<sup>[26-28]</sup>,揭示出传统方法难以捕捉的亚细胞分子梯度分布与瞬时代谢波动<sup>[29-30]</sup>。这些技术优势使质谱成为整合单细胞多维度多组学信息、构建分子调控网络的核心工具,为揭示细胞异质性的生物学本质提供了独特而强大的研究范式。

本文将综述基于质谱的单细胞多维度多组学分析技术的发展现状和应用,包括胞内的单细胞蛋白质组分析、胞外的单细胞分泌组分析,以及同一细胞多组学分析。通过深入探讨这些领域的前沿进展与相关应用,展望未来单细胞多维度多组学技术在生命科学和临床医学中的应用前景。

## 1 基于质谱的单细胞多维度蛋白质组分析

蛋白质是生命活动的直接执行者,其多样化的翻译后修饰与动态相互作用构成了细胞功能调控的关键分子基础。基于质谱技术的单细胞蛋白质组学研究,不仅能够实现数千种蛋白质的精准定量,还能解析其翻译后修饰位点(如磷酸化、泛素化)的空间分布与动态变化,为揭示蛋白质构效关系及调控网络提供系统视角<sup>[31]</sup>。然而,单细胞蛋白质组分析面临严峻的技术挑战:单个哺乳动物细胞(如 HeLa 细胞)总蛋白含量仅约 250 pg,其中低丰度调控蛋白(如转录因子)的拷贝数可低至数百分子<sup>[32]</sup>,且蛋白质缺乏类似核

酸的扩增手段。因此,基于质谱的单细胞蛋白质组分析面临的核心挑战是如何实现样品前处理的高回收率和质谱分析的高灵敏度。

### 1.1 单细胞蛋白质组样品制备

当前,单细胞蛋白质组学主要采用基于 bottom-up 策略的技术路线,即先将蛋白质酶解成肽段,然后进行液质联用分析。其样品处理流程沿袭群体细胞蛋白质组学的核心步骤(提取、变性、还原、烷基化与酶解),但微量样品在多步转移操作中的表面吸附损失成为制约质谱检测灵敏度的瓶颈<sup>[33]</sup>。

由于蛋白质与肽段在任意表面均存在难以完全消除的非特异性吸附,研究者提出通过极限缩小反应体积以减小接触界面的策略,从而提升单细胞蛋白质组分析的灵敏度和覆盖度。早期方法,如单细胞蛋白质组学质谱(SCoPE-MS)<sup>[34]</sup>在离心管内进行样品前处理,通过与串联质量标签(TMT)标记的载体细胞混合,成功实现了单个小鼠胚胎干细胞的蛋白质组定量分析;然而,微升级的样品处理体积导致了显著的样品吸附损失。其优化版本 SCoPE2<sup>[35]</sup>通过将单细胞分选在 384 孔板中,使样品处理体积减少至 1  $\mu$ L,大幅提高了样品处理回收率和效率,并结合 TMT 标记实现了上千个单细胞的高通量分析。为进一步适配皮克级的单细胞蛋白质含量并将蛋白质损失降至最低,样品处理体积需进一步压缩至纳升级;这一需求已超出现有传统微孔板平台的极限,因此需要依赖专为微量单细胞样本设计的高灵敏度单细胞处理平台。

随着微流控芯片技术的发展,具有低吸附表面与精准体积控制能力的新型平台逐步成为主流<sup>[36]</sup>。例如,方群团队<sup>[37]</sup>开发的 OAD-chip 芯片,通过油-气-液滴与顺序操作液滴阵列(SODA)技术,能够在 550 nL 液滴中实现单细胞前处理,并使用液质联用系统从单个 HeLa 细胞中鉴定出 51 种蛋白质;Kelly 团队<sup>[38]</sup>开发的 nanoPOTS 芯片,通过在载玻片上施加疏水涂层,并将反应液滴体积压缩至 200 nL,单个 HeLa 细胞蛋白质覆盖度突破 600 种<sup>[39]</sup>。改进型 nanoPOTS(N2)芯片<sup>[40]</sup>引入嵌套纳米孔结构,将反应体积进一步降低至 30 nL 以下,不仅使样品处理通量提升至 240 个单细胞,同时将单个 HeLa 细胞蛋白鉴定数量提升至 1 500 种以上。张祥民团队<sup>[41]</sup>创新性

地使用内径为 22  $\mu\text{m}$  的毛细管作为反应容器,开发了集成化蛋白质组分析装置(iPAD),将反应体系缩小至纳升级,在 2 nL 体积中完成单细胞的捕获、裂解与酶解,并从单个 HeLa 细胞中鉴定出 81 种蛋白质,验证了单细胞在超低体积下进行样品处理的可行性。

最近,结合新一代皮升级单细胞分选平台(如 CellenONE),Leduc 等<sup>[42]</sup>开发了纳米蛋白质组学样品制备(nPOP)分析方法。该方法通过在载玻片上沉积单细胞液滴,能够在平行制备数千个单细胞样品的同时,在低至 8 nL 体积中完成样品处理,单细胞蛋白质鉴定数量跃升至 3 000~3 700 种,标志着痕量蛋白质组样品处理技术迈入高回收率与高通量并重的新纪元。

尽管纳升级芯片平台已在痕量样品处理方面取得显著进展,但单细胞分选与质谱进样过程中频繁的移液操作仍造成不可忽视的样本损失。为解决这一问题,研究者纷纷转向构建自动化和集成化平台,以最大程度减少操作步骤与界面吸附,提高蛋白质组学分析的灵敏度与稳定性。

Ctorteccka 等<sup>[43]</sup>开发的 proteoCHIP 芯片采用复合聚四氟乙烯材质,可直接与 CellenONE 平台对接,在保持纳升级样品处理能力的同时,消除了分选与转移过程中的移液步骤,在单细胞水平稳定实现了近 2 000 种蛋白质的鉴定。Gebreyesus 团队<sup>[44]</sup>进一步构建了集成蛋白质组学芯片(iProChip)微流控装置,集成从细胞输入到蛋白质组样品处理的全流程,依托液压驱动实现纳升级精确操控,配合全自动化液体工作站,使单细胞蛋白质鉴定数量达到约 1 500 种。

在此基础上,Yang 等<sup>[45]</sup>在油包水芯片(OAD-

chip)基础上结合数字微流控技术,开发了集成单细胞蛋白质组样品处理的有源矩阵数字微流控芯片(AM-DMF-SCP)系统。该系统利用电场控制液滴在油包水环境中的运动,自动完成细胞悬液的分割、转移与反应,可在单个 HeLa 细胞中平均鉴定 2 258 种蛋白质。为降低微流控芯片设计的复杂性,方群团队<sup>[46]</sup>提出了“点取式”单细胞蛋白质组分析(PiSPA)工作流程,采用纳升级液体处理机器人执行单细胞捕获、蛋白质组前处理和质谱进样在内的全流程自动化操作,在大幅减少人为操作损失的同时,将蛋白质覆盖度提升至 3 000 种以上。

除提升自动化水平外,整合前处理步骤、降低操作次数也是当前单细胞样品处理方法发展的重点方向。Ye 团队<sup>[47]</sup>开发的单细胞集成化前处理技术(One-Tip),将细胞裂解、蛋白质提取与酶解步骤整合于两性离子涂覆的 Evotip 芯片上,全程仅需单细胞吸取和加入裂解消化试剂 2 个移液步骤,将吸附损耗控制在 1%以内,可从胚胎单细胞中鉴定 6 216 种蛋白质。该团队进一步推出了 Chip-Tip 方法<sup>[48-49]</sup>,通过将 Evotip 与 proteoCHIP-EVO96 芯片相结合,无缝对接了 CellenONE 单细胞分选平台与质谱系统(图 1),实现了几乎完全无移液的样本处理流程,从单个 HeLa 细胞中鉴定出超过 5 000 种蛋白质,标志着单细胞蛋白质组学深度覆盖分析的时代正式来临<sup>[50]</sup>。

综上所述,自动化集成化平台的发展不仅大幅提高了单细胞蛋白质组的样品处理通量,还从根本上减少了人为操作造成的样品损失,为实现高通量、高灵敏度的单细胞蛋白质组分析奠定了坚实基础。但现有方法在超低丰度蛋白(<10 copies/cell)分析、跨膜蛋白分析及翻译后

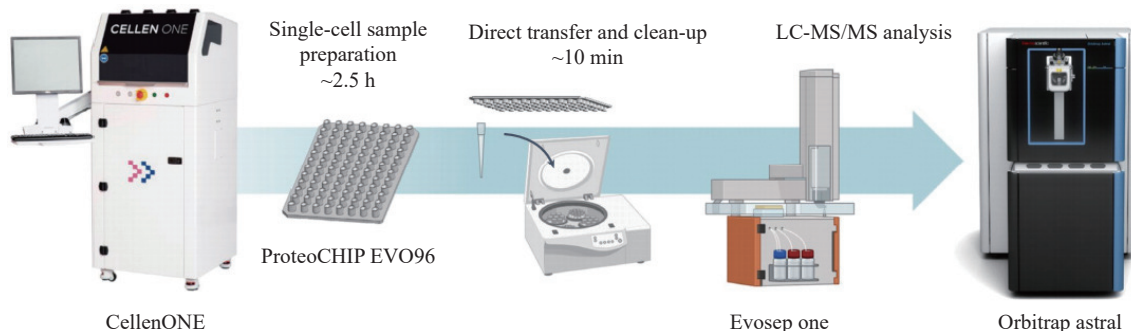


图 1 Chip-Tip 方法示意图<sup>[48]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of Chip-Tip<sup>[48]</sup>

修饰动态解析等方面仍存在不足。此外,由于单细胞空间蛋白质组学可以提供传统游离单细胞分析所缺乏的原位空间位置信息,已逐渐成为研究人员关注的焦点<sup>[51-52]</sup>,但与之匹配的、基于空间分选技术(如激光捕获显微切割(LCM))的高可靠性自动化单细胞蛋白质组处理平台仍处于初步探索阶段。面向下一代技术,核心发展方向将集中于仿生抗粘附界面材料开发(以最小化非特异性吸附损失)、人工智能(AI)驱动的自适应样品处理方案构建,以及与LCM等空间技术无缝整合的全自动高精度操作平台研发。

## 1.2 单细胞分泌组样品制备

细胞分泌的蛋白质(统称为分泌组)是一类由细胞合成后分泌到细胞外发挥重要生物学功能的蛋白质,主要包括生长因子、细胞外基质成分、细胞因子和激素等。分泌组是介导细胞间通讯并完成特定生物学功能的重要介质,主要通过经典、非经典和细胞外囊泡(EV)3种途径释放<sup>[53-54]</sup>。这类蛋白质不仅对理解人类生物学至关重要,更是多种重大疾病(如癌症、心血管疾病、神经退行性疾病)相关信号通路的核心调控因子。作为药物研发与疾病诊断的关键靶点,它们可用于动态监测致病机制、疾病进展及药物反应<sup>[17,55-56]</sup>。研究表明,分泌组的组成是高度动态的,取决于细胞类型和微环境刺激,表现出高度异质性<sup>[57-58]</sup>。为解析由蛋白质功能(而非遗传因素)决定的非遗传性细胞异质性,并弥补细胞内单细胞蛋白质组分析所缺失的胞外维度信息,迫切需要在单细胞水平进行分泌组分析。

单细胞分泌组无法直接采用单细胞蛋白质组的方法,主要因为质谱对低丰度、瞬时分泌蛋白的检测灵敏度不足,且分泌物易被稀释、扩散或降解,难以实现稳定捕获和定量分析;相比之下,基于抗体的方法具有较高的特异性、灵敏度和可靶向性,能够更有效地识别和定量单细胞水平的分泌产物<sup>[59]</sup>。因此,目前直接测量特定单细胞分泌蛋白质的方法主要依赖于抗体的靶向分析技术,包括以酶联免疫斑点(ELISPOT)<sup>[60]</sup>和荧光激活细胞分选(FACS)为代表的流式细胞术<sup>[61-62]</sup>。前者基于免疫的检测方法可用于活细胞分泌分析,但通常仅限检测单个细胞中的至多3种目标蛋白质;流式细胞术通过检测细胞表面捕获的分泌蛋白或其受体,可实现10余种分

泌蛋白的同时测量,但其多重检测能力受限于光谱重叠和抗体标记选择。为进一步提高分泌蛋白检测通量,Spitzer等<sup>[63]</sup>开发的质谱流式细胞术(CyTOF)利用金属同位素标记抗体并结合电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)检测,克服了光谱限制,可检测超过35种分泌蛋白。然而,该方法需要大量细胞样本( $>10^6$ 个),且涉及细胞固定等步骤,无法满足对同一细胞进行多参数分析或快速平行测定大量单细胞( $>1000$ 个)的需求。得益于微流控芯片技术的发展(如制备微升至皮升级反应室系统及在有限区域内形成高密度抗体条形码阵列),新一代高通量单细胞分泌组靶向分析方法——单细胞条形码芯片(SCBC)应运而生<sup>[64-66]</sup>。SCBC芯片利用装载细胞的微流控通道和相交的气动阀门,将细胞隔离在亚纳升微室阵列中,可同时对数百至数千个单细胞进行大规模并行分析。随后,利用集成在芯片上的空间编码抗体条形码带(而非依赖荧光标记),通过检测信号位置来识别和定量分泌蛋白,可满足数十种细胞因子的检测需求。在此基础上,Xue等<sup>[67]</sup>通过结合空间和光谱编码策略,将单细胞分泌的细胞因子的检测数量提升至42个。

但上述方法只能用于分析特定的目标分泌蛋白,难以全面深入表征细胞间通讯和分泌异质性。LC-MS技术能够提供分泌蛋白组的规模化解析,是未来单细胞分泌组分析的重要发展方向。然而,基于质谱的单细胞分泌组分析面临巨大挑战:需从细胞培养基中高丰度的共存血清蛋白(g/L级)背景下,区分、捕获和检测单细胞来源的极低丰度分泌蛋白(约ng/L级)和细胞外囊泡蛋白(EVs,  $10^3\sim 10^5$  vesicles/mL)<sup>[68-69]</sup>。最近,He等<sup>[70]</sup>首次提出了结合选择性富集和纳流液相色谱-串联质谱(NanoLC-MS/MS)分析的单细胞分泌组规模化分析方法(SCSP),示于图2。该方法集成了以下关键步骤:1)在微流控芯片上分离和培养经L-叠氮基高丙氨酸(AHA)代谢标记的单个细胞;2)利用炔炔功能化的毛细管微反应器,通过点击化学反应特异性富集新合成的分泌蛋白和细胞外囊泡蛋白;3)使用NanoLC-MS/MS进行高灵敏度分析。该技术成功从单个HeLa细胞中平均定量了389个分泌蛋白和细胞外囊泡蛋白,与单细胞抗体条形码芯片方法相比,显著提高了单细胞分泌组的鉴定覆盖度。

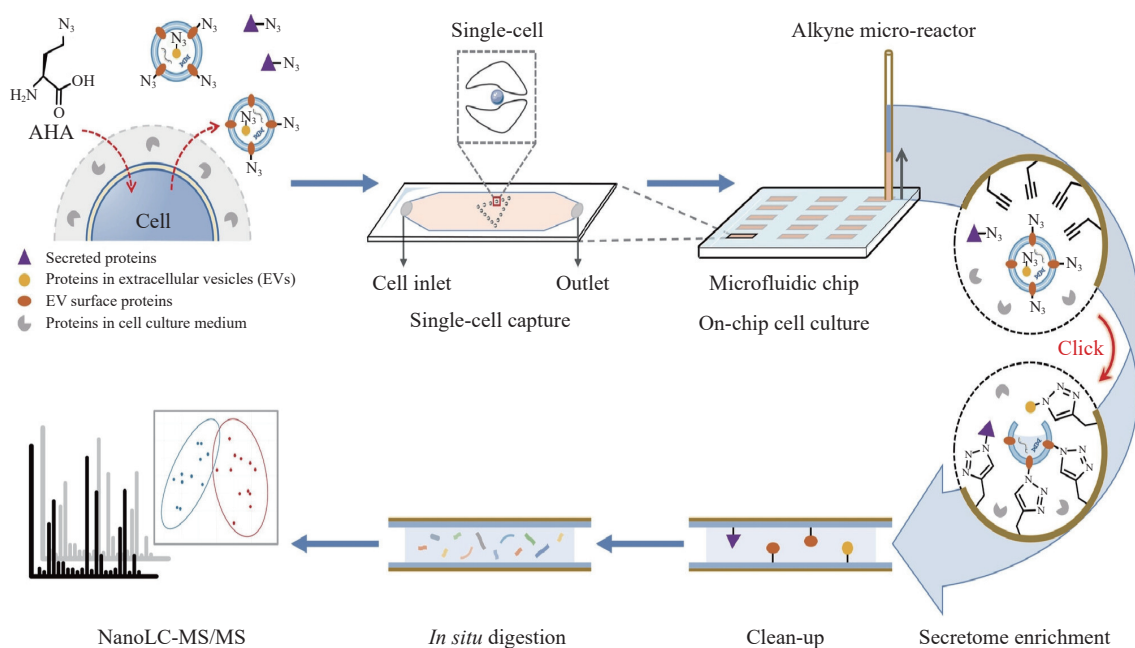


图2 单细胞分泌组分析示意图<sup>[70]</sup>  
Fig. 2 Schematic diagram of SCSP<sup>[70]</sup>

目前,基于质谱的单细胞分泌组研究仍处于起步阶段,现有方法的鉴定覆盖度和分析通量仍有待提高,亟需开发单细胞分泌组高通量与深度覆盖分析的新方法,为研究分泌调控机制的异质性提供新见解。

### 1.3 单细胞蛋白质组质谱数据采集

近年来,随着高精度色谱-质谱仪的持续发展,样品的色谱分离效率和质谱检测灵敏度显著提升,使得仪器性能不再是限制单细胞蛋白质组分析的主要瓶颈。然而,在具体的质谱分析方法层面,单细胞蛋白质组分析仍面临信号强度低、动态范围广(跨越6个数量级)以及背景噪声干扰严重(噪声信号占比>50%)等多重挑战<sup>[13]</sup>。为提升信号强度、覆盖宽动态范围、抑制背景噪声,研究者持续从数据采集策略、信号处理算法等多个维度进行优化,推动单细胞蛋白质组质谱分析向更高灵敏度的方向发展。

早期技术,如 SCoPE-MS 采用基于 TMT 的同步连续采集方法,通过引入载体蛋白(carrier proteome)增强低丰度肽段的 MS1 信号,实现了单细胞水平约 500 种蛋白质的定量分析<sup>[34]</sup>。然而,数据依赖性采集(DDA)模式仅覆盖 20%~30%的前体离子,且过量载体蛋白(通常添加 10~100 倍)会压缩低丰度信号的动态范围,降低定量精度。为增强信号检测深度,研究者转向数据非

依赖性采集(DIA)。DIA 将质谱扫描范围划分为连续窄窗口(通常 2~4 u),循环采集所有碎片离子信息,信号利用率提升至>80%,单细胞蛋白质鉴定数量突破 1 000 种。但 DIA 谱图复杂,应用于单细胞样品分析需依赖高精度谱图库与智能解卷积算法提升鉴定效率<sup>[71]</sup>。Demichev 等<sup>[72]</sup>开发了数据非依赖采集蛋白质组学的专用软件包——DIA-NN,结合卷积神经网络(CNN),将 DIA 数据分析的信噪比(S/N)提升 5 倍,变异系数(CV)控制在<12%,显著提高了定量精度。DIA-NN 支持大规模样本的并行分析,速度较传统工具快 10 倍,已成为单细胞 DIA 分析的基础标准。

在上述方法基础上,为进一步提高低输入样本信号鉴定能力,Krull 等<sup>[73]</sup>提出匹配增强器(MEs)方法(DIA-ME),通过将低输入样本谱图特征与高输入参考样本对齐,利用迁移学习补偿信号缺失,结果示于图 3a。将该方法应用于 U-2 OS 单细胞干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )响应研究时,蛋白质覆盖率提升 40%,成功捕捉 STAT1 磷酸化的时间依赖性激活。为进一步提高 DIA 分析的通量,Slavov 团队<sup>[74]</sup>开发了多重通路 DIA 方法(plexDIA)。该方法预设质量偏移窗口( $\Delta m/z$  0.5~1.0),单次进样可分析 3~5 个单细胞,通量提升 3 倍的同时保持稳定的定量精度( $CV < 15\%$ ),示

于图 3b。在肿瘤微环境解析中,利用该方法从 10 个单细胞中揭示了 EGFR 通路关键蛋白的表达异质性及耐药亚群的代谢-激酶协同调控机制。Thielert 等<sup>[75]</sup>开发了多重标记 DIA 方法(mDIA),将稳定二甲基标记与 DIA 采集结合,实现至多 5 个通路的同时测定。mDIA 利用多路复用通道相互隔离的特点,将其中 1 个通道作为非干扰性

的内标蛋白质组(spike-in proteome)参考通道,结合开发的 RefQuant 算法,在不损失鉴定深度的前提下,将鉴定数量和通量提升 2 倍。mDIA 在空间蛋白质组学中具有独特优势,其工作流程可无缝集成到深度视觉蛋白质组学(direct visualization of proteomes, DVP)管道中,将空间蛋白质组分析通量提升 4 倍。

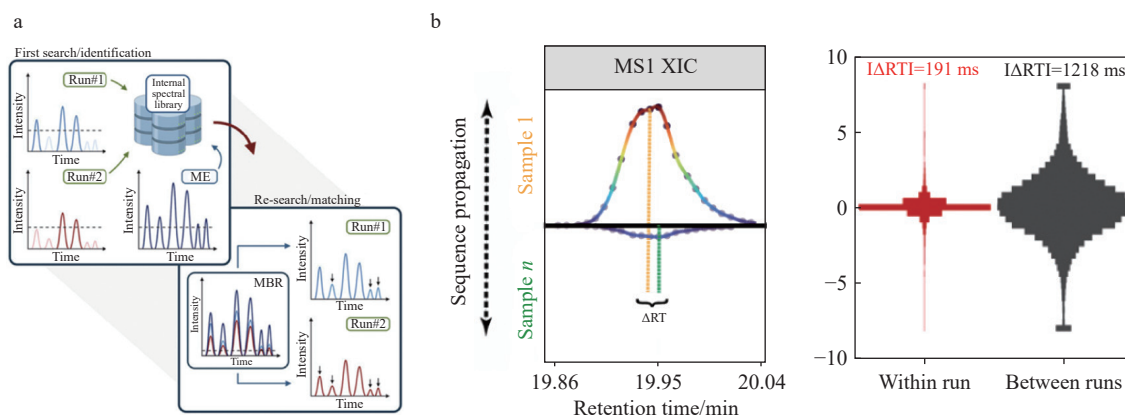


图 3 DIA-ME 数据分析示意图(a)<sup>[73]</sup>, plexDIA 中保留时间估计精度的提高(b)<sup>[74]</sup>

Fig. 3 Schematic diagram of DIA-ME data analysis (a)<sup>[73]</sup>, and improvement of retention time estimation accuracy in plexDIA (b)<sup>[74]</sup>

随着质谱性能的提升(如四极杆-Orbitrap-Astral 三合一平台),Guzman 等<sup>[76]</sup>提出了窄窗口 DIA(nDIA)策略。该方法采用 200 Hz 超高速 MS/MS 扫描与 1 u 窄窗口设计,实现近乎全肽段覆盖分析(>95%)。在 3~4.5 h 分析时间内,即可完成人类蛋白质组约 12 000 种蛋白质的检测,灵敏度达 amol 级。应用该方法,研究者成功从仅 250 pg 的 HeLa 细胞肽段中鉴定多达 7 400 种蛋白质,分析通量达 50 个单细胞/天。利用其深度覆盖和高精度定量能力,分析了初始态人多能干细胞(naive hPS)和滋养外胚层样细胞(TE-like),为囊胚形态调控(如 TE 上皮化、囊腔形成)提供了蛋白质层面的机制线索,助力体外受精(IVF)中可移植囊胚的筛选<sup>[77]</sup>。

从 DDA 到 nDIA,单细胞质谱技术通过数据采集策略与智能算法的协同创新,持续突破灵敏度与通量极限。未来,随着深度学习 AI 大模型的加入、时空分辨率信息的融入以及与临床应用的深度结合,该技术有望进一步揭示更复杂的生物网络机制,为疾病诊疗与系统生物学提供革命性工具。

## 2 单细胞多组学分析

单细胞多组学分析技术通过整合基因组、转录组、蛋白质组与代谢组等多层次分子网络信息,为解析细胞异质性的分子机制提供了系统性的研究工具。该技术能够揭示跨组学互作驱动的关键科学问题,如转录后调控对蛋白质丰度的非线性影响、代谢物对表观遗传修饰的动态调控等<sup>[16,78]</sup>。这种多组学整合的研究范式不仅有助于描绘“中心法则”的完整动态过程,更能系统揭示从核酸、蛋白质到代谢物的级联调控网络,为深入理解细胞功能异质性提供分子基础。然而,当前大多数单细胞多组学研究仍局限于以转录组为核心的数据整合,通常结合基因组和染色质可及性(如 ATAC-seq)进行分析。要实现真正意义上的功能解析,必须从蛋白质组这一细胞功能的主要执行者出发,在单细胞水平同步整合转录组、代谢组和翻译后修饰组(PTM 组)的信息。这种全维度的单细胞多组学研究面临的核心技术挑战在于超微量样本的并行处理:不同组学检测方法在样本制备(如转录组依赖 mRNA

逆转录扩增、蛋白质组需酶解获得肽段、代谢组需完整分子提取)和数据产出形式上存在显著差异,传统串联式分析方法常因样本耗尽导致数据缺失,且难以维持分子关联的时空一致性;同时,单细胞尺度的超微量样本对检测灵敏度提出极限要求,多组学信号采集易受处理步骤引入的背景噪声干扰<sup>[79]</sup>。质谱技术凭借其在蛋白质组、代谢组和 PTM 组分析中展现的宽动态范围、高灵敏度和深度覆盖等优势,已成为实现同一细胞内多组学同步分析的关键技术。特别值得关注的是,随着空间组学技术的快速发展,质谱技术因其无标记检测特性、高复用分析能力和全蛋白质组覆盖优势,在单细胞空间多组学研究中展现出独特价值。空间分辨的质谱技术(如基质辅助激光解吸电离质谱成像(MALDI-MSI)、解吸电喷雾电离质谱(DESI-MS)等)能够在不破坏样本空间信息的前提下,同时获取多种生物分子的原位分布特征,为在组织微环境背景下解析单细胞分子特征提供了革命性工具。这种空间多组学技术与单细胞测序技术的结合,使得研究人员能够在保留细胞空间位置信息的同时,获取单细胞分辨率的全基因组、转录组和蛋白质组数据,为发育生物学、神经科学和肿瘤微环境研究提供了全新的研究视角<sup>[80-81]</sup>。这种空间维度的扩展不仅丰富了单细胞分析的层次,更为全面理解细胞-微环境互作机制提供了关键技术支持。

### 2.1 单细胞蛋白质组-转录组分析

根据“中心法则”,蛋白质的翻译是通过 mRNA 指导蛋白质合成的核心生命过程。然而,细胞内 mRNA 并非静态存在,其丰度与定位受转录后加工、稳定性调控、运输及降解等复杂机制的动态调节。因此,仅依赖转录组信息难以准确预测蛋白质的实际表达水平。此外,不同细胞状态下的 mRNA 与蛋白质表达之间常常存在显著偏差,这进一步增加了预测的复杂性<sup>[82]</sup>。为更全面地理解细胞的功能状态,整合单细胞转录组与蛋白质组数据,对于揭示细胞异质性、解析信号通路动态及构建精确细胞功能图谱至关重要。

早期结合单细胞转录组与蛋白质组的技术主要基于核酸标记抗体,如 CITE-seq (cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing)<sup>[83]</sup>和 REAP-seq<sup>[24]</sup>,它们利用连接寡核

苷酸标签的抗体标记细胞表面蛋白质,实现表面蛋白质组与转录组的同步分析。Chung 等<sup>[84]</sup>在 CITE-seq 技术的基础上开发了 inspire-seq,通过修饰的双链核酸与抗体结合,并透膜进入细胞与核蛋白质结合,实现了核内蛋白质组与转录组的定量协同分析。然而,这些基于抗体的方法存在显著局限性:分析深度有限(仅 4~82 个靶蛋白),蛋白质定位范围受限,难以满足生物医学深入研究的需求。

为实现非靶向的蛋白质组分析,基于质谱的技术逐渐成为主流。由于 MS 与 RNA 测序原理不兼容,当前基于 MS 的单细胞蛋白质组-转录组分析策略需对单细胞裂解液进行组分预分离,以分别进行多组学分析。单细胞样品的微量特性对分离操作的精细度和后续分析的灵敏度提出了极高要求。近年来,微流控技术、高通量测序和质谱技术的协同发展才使此类分析成为可能。方群团队<sup>[85]</sup>在 PiSPA 平台基础上开发了单细胞转录组-蛋白质组同步分析平台(scSTAP),利用纳升级微流控液体处理机器人和顺序操作液滴阵列(SODA)技术,将微量单细胞裂解液均分为 2 份,分别进行基于 MATQ-seq (multiple annealing and dC-tailing-based quantitative single-cell RNA-seq)的转录组分析和基于 MS 的蛋白质组分析,成功在单个卵细胞中检测到 2 663 种蛋白质与 19 948 个基因。

尽管 scSTAP 等方法初步实现了高覆盖度联合分析,其应用仍局限于较大的卵细胞;在正常体细胞分析中,测序深度和数据重复性仍有待优化。此外,由于样本预处理及数据获取方式差异,基于 MS 的单细胞蛋白质组-转录组数据与先前的宏量测序(bulk sequencing)数据集相关性有限,亟需借助模态间数据嵌入与对齐算法进行进一步验证与补充,以降低组学间噪声与技术偏差的影响。

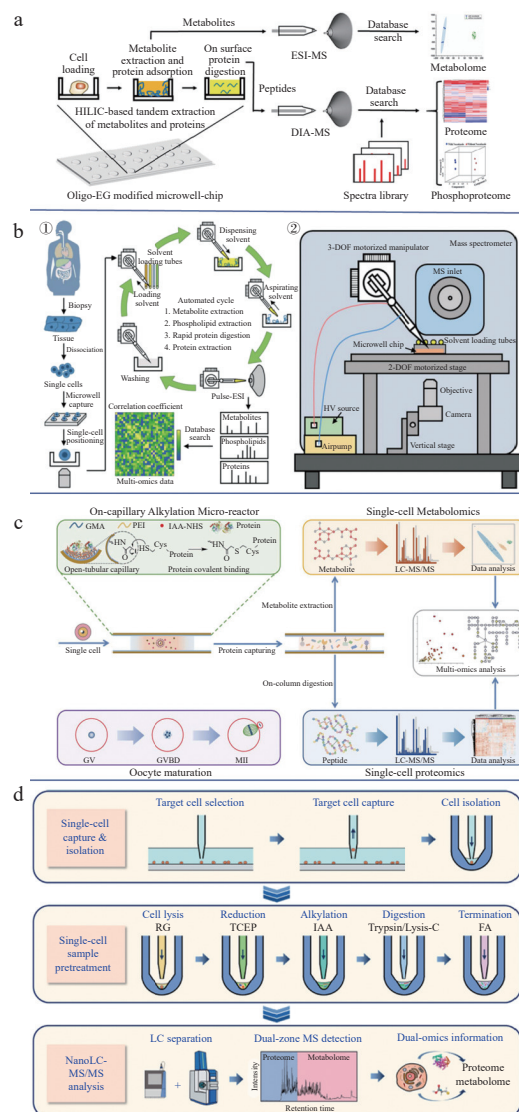
### 2.2 单细胞蛋白质组-代谢组分析

转录组数据难以全面反映细胞的分子状态,大量研究表明, mRNA 与蛋白质丰度之间的相关性有限(常为中等水平)<sup>[86]</sup>。此外,蛋白质的翻译后修饰(PTMs)及代谢物在调控关键信号通路和反映细胞代谢状态中的作用不可替代,其动态变化无法从转录数据中直接推断<sup>[20]</sup>。因此,为深入理解单细胞中基因型与表型的复杂关联,必须对

在细胞功能执行及细胞间通讯中发挥至关重要作用的蛋白质和代谢物进行深度表征。

过去几年间,高灵敏度 LC-MS 技术的进步极大提高了细胞中蛋白质和代谢物的鉴定覆盖度,使得单细胞等微量样本的多组学同时分析成为可能。然而,单细胞中代谢物和蛋白质含量极低,若采用类似 scSTAP 的物理均分策略会进一步稀释样本,显著降低鉴定覆盖率。因此,为解决这一问题, Li 等<sup>[87]</sup>开发了亲水修饰微孔芯片 (OEMC) (图 4a), 利用芯片表面修饰的配基与蛋白质的亲水相互作用, 实现蛋白质与代谢物的分离, 并通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定出 132 种代谢物; 随后对微孔表面捕获的蛋白质进行原位酶解, 进一步结合 LC-MS 平台, 成功实现了单细胞水平蛋白质组与磷酸化蛋白质组的联合分析, 鉴定出 1 200 余种蛋白质及超过 500 个高度可信的磷酸位点, 建立了首个大规模单细胞磷酸化蛋白质组数据集。此外, Zhao 等<sup>[88]</sup>提出了一种基于自动化显微操作系统的单细胞多组学质谱分析简化策略 (图 4b), 作为对传统流程繁琐操作问题的替代优化方案。该策略通过飞秒激光刻蚀技术构建体积仅 10 nL 的超微反应腔室, 实现阵列式单细胞的高效捕获与芯片内快速酶解, 显著提升了样本处理的通量与一致性。随后, 结合自动化显微操控与不同极性溶剂, 依次从同一单细胞中提取代谢物、磷脂和蛋白质, 并利用具备约 2 min 快速电离能力的 pulse-ESI 源, 在单一质谱平台上实现 3 类组分的连续检测, 可在单细胞水平鉴定约 1 400 种分子。尽管优化了提取流程以减少损耗, 该方法仍依赖非特异性分子作用进行分离, 难以完全避免低选择性分离机制引发的非特异性流失与背景干扰。为克服此限制, He 等<sup>[89]</sup>创新性地开发了毛细管烷基化微反应器 (OCAM), 示于图 4c。该方法基于蛋白质的烷基化反应, 将蛋白质共价键合到毛细管微反应器上, 然后采用有机溶剂提取小分子代谢物, 实现了同一细胞中蛋白质与代谢物的高效分离和同时分析。应用该技术, 该团队在单个小鼠卵母细胞中同时鉴定了多达 3 457 种蛋白质和 171 种代谢物, 展现了共价固定策略的巨大潜力。然而, 该方法仍需经历蛋白质与代谢物的空间分离与样品转移过程, 限制了其在高通量分析中的应用。为此, Wu 等<sup>[90]</sup>提出了一种基于质谱信号域分离的无物理转移

策略——单细胞蛋白质组与代谢组联合分析 (scPMA), 示于图 4d。该方法在常规 PiSPA 流程



注: 图 b 中①为单细胞多组学分析的简化工作流程, ②为自动化系统示意图; 图 d 为通过单次 LC-MS/MS 进样同时获取单个细胞的蛋白质组与代谢物组信息

图 4 基于 HILIC 的代谢物与蛋白质串联提取策略示意图(a)<sup>[87]</sup>; 高效自动化单细胞多组学质谱策略示意图(b)<sup>[88]</sup>; OCAM 策略实现同一单细胞蛋白质-代谢物组分析示意图(c)<sup>[89]</sup>; scPMA 分析策略示意图(d)<sup>[90]</sup>

Fig. 4 Schematic overview of the HILIC-based tandem extraction of metabolites and proteins (a)<sup>[87]</sup>; schematic diagram of the highly efficient and automatic single cell multi-omics mass spectrometry strategy (b)<sup>[88]</sup>; schematic diagram of the OCAM strategy for proteo-metabolome profiling in the same single cells (c)<sup>[89]</sup>; schematic diagram of the one-shot scPMA workflow (d)<sup>[90]</sup>

基础上,结合捕获离子迁移飞行时间质谱(timsTOF)技术,通过调节质谱参数和离子淌度窗口,实现肽段与代谢物信号的原位分辨。具体而言,将电荷态为0~1价的前体离子识别为代谢物信号,2~3价的离子识别为肽段信号,从而在单次LC-MS/MS进样和分析周期内同步完成单细胞蛋白质组与代谢组的检测,有效避免了传统分离转移步骤导致的信号损失与数据偏倚。该策略已成功应用于多种肿瘤细胞系(包括A549、HeLa、HepG2),分别平均鉴定到816、578、293种蛋白质以及72、91、148种代谢物,展现出优异的信号分离能力和数据分析通量。

总而言之,当前以单细胞蛋白质组-代谢组联合为核心的双组学技术处于起步阶段,已有策略虽初步实现了单细胞中多种组分的顺序提取,但在分析通量、方法普适性及对复杂生物系统的适配能力等方面仍存在明显限制;同时,面向2种以上组学的同步分析面临更高的技术门槛,亟需发展更精细的样本分离策略与高效稳定的多组学质谱平台。展望未来,该技术有望通过结合空间代谢组学与原位质谱成像以保持组织空间结构,或借助微流控平台实现活细胞动态培养与分钟级时间分辨率的采样,以精确捕捉细胞状态转变和多组学分子的快速变化轨迹,为解析细胞命运决定、肿瘤微环境演化等关键过程提供高维数据支撑与新视角。

### 2.3 单细胞代谢组-转录组分析

代谢组是汇集表观基因组、基因组和转录组效应的最后一个组学层面,它直接定义了最接

近生理或疾病状态的细胞表型。然而,单细胞代谢组学(SCM)仅提供细胞代谢中间产物和产物快照,缺乏代谢通量和功能的线索,限制了对生物学中代谢机制的深入解释。而基于单细胞RNA转录组学(scRNA-seq)的代谢建模为SCM提供了另一种途径,利用来自转录组的代谢途径的先验知识,可以预测代谢与表型的关系<sup>[91]</sup>。因此,为了更精确地表征代谢状态和功能,从同一单细胞个体水平分析单细胞代谢组和转录组对于单细胞研究同样重要。

与单细胞蛋白质组-代谢组更关注细胞功能执行和细胞间通讯不同,单细胞代谢组-转录组分析更倾向于准确地重现代谢状态和功能,这要求方法在环境改变(尤其是代谢扰动)中实现对高度动态的代谢过程进行实时分析<sup>[92]</sup>,因此单细胞样品均分的方法不能准确揭示真实的代谢组-转录组对应关系。近年来,随着基于毛细管的单细胞原生质采集技术的发展,研究者能够通过细微的毛细管直接从单个活细胞中提取细胞内的原生质组分(包括蛋白质、代谢物等),实现对单细胞内容物的实时精准采样。将此技术与ESI-MS相结合,可以实现对单细胞复杂生物分子的高效、无损、高灵敏度分析,使得在细胞状态转换过程中识别转录组与代谢组之间未被发现的关系成为可能<sup>[93-94]</sup>。Mao等<sup>[95]</sup>开发了单细胞代谢组和转录组同时分析方法(scMeT-seq),示于图5。利用内径300 nm的纳米毛细管从活细胞中提取亚皮升级细胞质进行代谢组采集和直接ESI-MS分析,同一细胞随后经9 μm毛细管快速

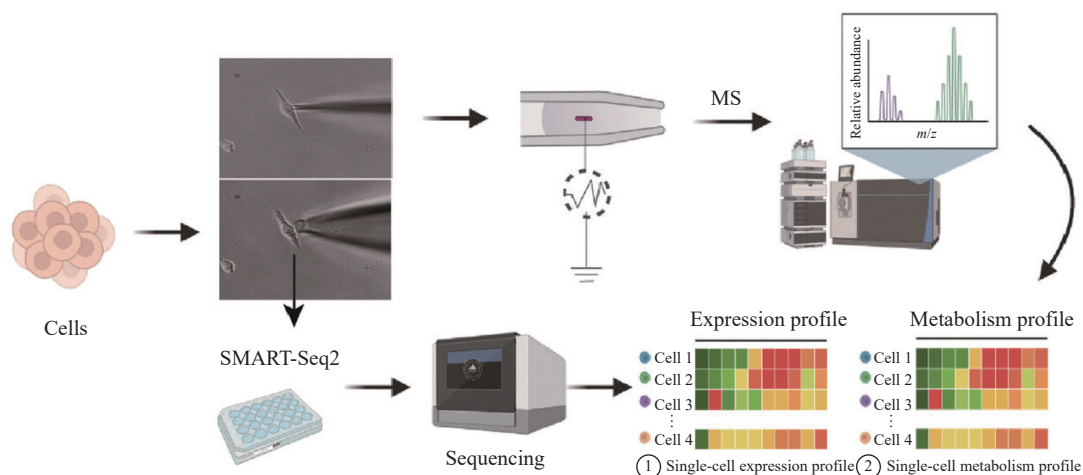


图5 scMeT-seq示意图<sup>[95]</sup>

Fig. 5 Schematic diagram of scMeT-seq<sup>[95]</sup>

裂解并进行 SMART-seq2 转录组测序, 避免传统分离法对代谢稳态和细胞活性的干扰, 实现低损耗、高保真的双组学数据采集。将该方法应用于小鼠腹腔单个巨噬细胞的代谢组-转录组分析, 平均检测到约 100 种代谢物和 7 400 多个基因, 证明了代谢组与转录组之间的关联性在细胞稳态与受扰动状态下表现出显著差异, 具体体现为两组学层面的协同调控程度或偏离程度存在状态依赖性变化, 这反映了细胞在不同生理或病理条件下对基因表达与代谢活动的动态调节机制。

单细胞代谢组与转录组联合分析技术的兴起, 为深入理解细胞内代谢与基因表达的协同调控提供了强有力的工具。通过同时捕获代谢物和转录组信息, 该技术能够揭示细胞状态转换过程中复杂的代谢-转录互作, 弥补了单一组学无法全面反映细胞动态变化的局限。然而, 目前单细胞代谢组-转录组联合测序仍面临多项挑战, 包括检测通量较低、代谢物种类和覆盖度有限、技术灵敏度不足以及数据整合和解析复杂度高问题<sup>[96]</sup>。未来, 发展更高效的样本处理和捕获方法, 完善多组学数据融合分析算法, 将是推动该领域发展的关键。同时, 结合空间组学和微流控技术, 有望实现细胞代谢与转录的时空动态解析, 为揭示细胞功能异质性和疾病机制提供更全面的视角, 有助于推动精准医学和靶向治疗的发展。

#### 2.4 单细胞空间多组学

单细胞的高度异质性由细胞内在和外在因素共同决定, 其内在表现为不同“组学”层间复杂的分子互作网络, 外在则体现为细胞通过精确定位与微环境相互作用实现功能调控, 包括受体-配体互作、信号通路传导(如形态发生素梯度)及其他微环境因素影响<sup>[97]</sup>。传统单细胞多组学技术虽能提供分子表达谱, 却因空间信息缺失导致对肿瘤异质性、免疫微环境等关键生物学过程的理解受限<sup>[13]</sup>。当前, 空间转录组测序技术(ST)已实现从转录组出发的空间多组学分析, 涵盖基因表达、染色质可及性和 DNA 甲基化等信息<sup>[98-99]</sup>, 但对于空间代谢组和完整蛋白质组的分析仍需依赖质谱技术。质谱驱动的单细胞空间蛋白质组与成像技术为此提供了关键解决方案, 其中单细胞空间蛋白质组的核心挑战在于保持空间信息的同时有效提升检测深度。Rosenberger 团队<sup>[51]</sup>开创性地将单细胞蛋白质组

技术引入空间分析, 提出单细胞深度视觉蛋白质组学(scDVP), 通过整合高精度成像、LCM 和 mDIA, 结合 AI 辅助的细胞识别与分离, 实现了小鼠肝脏组织切片中单细胞水平的空间蛋白质组分析, 检测到 1 700 种蛋白质, 并揭示门静脉与中央区域间 50%以上蛋白质的显著差异, 为无标记发现组织异质性细胞亚群提供了新范式。在亚细胞层面, Dong 等<sup>[100]</sup>发展的过滤器辅助扩增蛋白质组学(FAXP)通过组织扩张技术(体积放大约 20 倍)与 LCM 联用, 结合自研的过滤辅助样品处理技术, 在单个小鼠肝细胞核中平均鉴定到 2 368 种蛋白质, 将空间分辨率推进至亚细胞水平。MSI 作为另一重要技术方向, 通过原位电离实现蛋白质、多肽、脂质和代谢物的无标记同步检测<sup>[101]</sup>, 其发展重点在于提升空间分辨率。目前, 超高分辨率次级离子质谱(如 nanoSIMS、OrbiSIMS)已达到亚细胞级分辨率, 高分辨率 MALDI-2 质谱也正在突破单细胞微量分子检测极限<sup>[102]</sup>。组织扩展技术的创新应用进一步突破了仪器限制<sup>[103]</sup>, 如 Chan 等<sup>[104]</sup>开发的凝胶辅助质谱成像(GAMSI)通过可逆组织扩展将 MALDI-MSI 分辨率提升 3~6 倍至亚微米级; Zhang 等<sup>[105]</sup>发展的组织扩展质谱成像(TEMI)在不牺牲通量的前提下实现单细胞分辨率, 可同步分析数百种生物分子, 并成功应用于肿瘤代谢异质性研究。尽管单细胞空间多组学技术已取得显著进展, 但仍面临激光显微切割精度不足、质谱成像中高背景干扰与低丰度分子检出困难等技术瓶颈, 特别是不同分辨率数据的整合分析亟待开发多模态算法。未来发展方向将聚焦于灵敏度与分辨率的协同提升, 从静态切片分析向动态全景研究转变, 并通过开发自动化整合 MSI/转录组/蛋白质组数据的分析流程, 最终实现单细胞多维度全景图谱的构建。

### 3 单细胞多维度多组学分析的生物学应用

随着单细胞组学技术的迅猛发展, 传统依赖单一组学的研究模式已难以全面揭示细胞在不同状态间的转变及其复杂的功能调控机制。基于质谱的单细胞多维度多组学正逐步成为理解复杂生命系统的新兴利器。“多维度”强调在单个细胞中同时解析细胞内部功能状态和外部通讯行为。其中, 细胞内全蛋白质组揭示了细胞功

能执行层面的关键调控,而细胞分泌组则反映了细胞与其微环境间的动态通讯和免疫应答行为,两者结合可全面描绘细胞内外调控网络,不仅帮助我们更好地理解细胞分化、发育和代谢等基础科学问题<sup>[106]</sup>,还可为疾病治疗<sup>[107]</sup>和临床诊断<sup>[108]</sup>等提供关键信息。与此同时,“多组学”指在同一生物系统中整合多种组学数据(如转录组、蛋白质组、代谢组等)进行协同解析的方法,旨从多个分子层面系统揭示生物过程的调控机制。相比单一组学,多组学策略能够捕捉不同层级间的动态关系,如转录与翻译的耦合、蛋白表达与代谢变化的联动等,从而实现对细胞状态、功能网络和病理过程的更全面理解,其在描述新的免疫亚群和定义抗肿瘤免疫的重要调节因子<sup>[109]</sup>、绘制免疫系统的功能网络图谱<sup>[110-111]</sup>、解析导致癌症转移的循环肿瘤细胞(CTC)<sup>[112]</sup>、解读肿瘤微环境<sup>[113]</sup>、阐明治疗耐药机制<sup>[114]</sup>和开发个性化心脏病医疗工具<sup>[53]</sup>等热点生物学问题的研究中均发挥着至关重要的作用。

本部分将围绕“基于质谱的单细胞多维度多组学应用”,从生殖发育调控、疾病机制解析和临床诊疗3个方面,综述目前单细胞多维度多组学分析应用现状,并探讨其潜力与挑战。

### 3.1 单细胞多维度多组学分析在生殖发育调控研究方面的应用

单细胞多维度多组学分析为揭示配子形成、胚胎发育及生育力变化等复杂的生殖发育过程提供了前所未有的高分辨率视角。

单细胞蛋白质组学技术能以单细胞分辨率解析生殖细胞成熟与胚胎发育的动态功能调控网络,为揭示生命代际传递的分子机制提供了全新视角。在卵细胞等生殖细胞成熟的生物学过程中, Galatidou 等<sup>[115]</sup>采用 plexDIA 技术对年轻与高龄女性卵母细胞进行单细胞蛋白质组分析,首次揭示卵母细胞从未成熟生发囊泡(GV期)到成熟中期II(MII期)阶段,高龄产妇卵母细胞呈现显著蛋白质稳态失衡特征,表现为蛋白酶体复合物、TRiC 伴侣蛋白及减数分裂调控因子的表达水平降低。该发现为卵巢衰老导致生育力下降的分子机制提供了重要证据,所鉴定的差异蛋白(如 TRiC 组分)或将成为改善卵母细胞质量的潜在靶标<sup>[82]</sup>。此外,生殖细胞在形成和成熟过程中经历一系列高度时序化、空间化的调控事件,

包括转录沉默、翻译激活、蛋白修饰和分泌因子的动态释放等。方群团队<sup>[85]</sup>利用 scSTAP 对单个小鼠卵母细胞进行了深度和定量转录组和蛋白质组分析,实现了 mRNA-蛋白质成对的整体相关性分析,发现了在转录组和蛋白质组中具有不同表达模式的五类基因和 Slbp 这一在转录本和蛋白水平之间表现出负相关的 RNA 结合蛋白,构建了基于转录组-蛋白质组的互作网络,为卵母细胞的生殖发育和质量评估,以及由母体因素(如饮食或年龄)引起的单个卵母细胞之间的异质性研究提供了重要的技术支持。

Ye 等<sup>[47]</sup>采用“one-tip”蛋白质组方法对小鼠胚胎从卵细胞到四细胞期的早期发育过程变化进行深度分析,揭示了母源蛋白降解与合子基因组激活(ZGA)相关蛋白的时序表达,展示了从母型调控向合子型调控的关键转变过程。Stelloo 等<sup>[116]</sup>整合单细胞蛋白质组、磷酸化蛋白质组与 scRNA-seq 技术,首次绘制小鼠原肠胚形成的多维度基因表达调控图谱,鉴定出数百个具有胚层特异性表达模式的蛋白(如中胚层标志蛋白 Brachyury);通过 P300 邻近标记技术揭示原肠胚特异性增强子互作蛋白 ZEB2,并在人类胚胎模型中验证了 ZEB2 调控的跨物种保守性,进一步拓展了对出生缺陷发生机制的理解。

### 3.2 单细胞多维度多组学分析在疾病机制解析研究中的应用

单细胞多维度多组学分析正逐步成为揭示病理机制和优化治疗策略的重要工具。相较于传统基于群体样本的组学分析,单细胞多组学能够在单细胞分辨率下同时捕捉多种分子层级的信息(如转录组、蛋白质组、分泌组、代谢组等),从而全面揭示细胞异质性、动态调控网络及细胞间通讯机制,在多种重大疾病研究中展现出突出的应用潜力。

多系统萎缩(multiple system atrophy, MSA)是由  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein)在少突胶质细胞中异常聚集而导致神经退行性疾病,但其具体发病机制、触发因素及系统性生物学变化仍不清楚。深入理解 MSA 的单细胞蛋白质组学特征,有助于揭示潜在的病理机制并发现可靠的生物标志物。Guzman 等<sup>[76]</sup>基于 nDIA 方法对来源于 BA9 脑区(前额叶皮层)的 45 例 MSA 患者与 29 名对照者的脑组织进行蛋白质组分析,对每

个样本实现了超过 6 600 种蛋白质组的定量, 在 MSA 脑组织中发现免疫球蛋白、补体蛋白、炎症相关因子等表达水平明显升高, 提示局部或系统性免疫反应的参与可能是 MSA 进展的关键机制之一; 同时发现谷氨酸神经递质代谢异常, 进一步证明谷氨酸代谢的改变可能是导致 MSA 的一个潜在原因。

了解单细胞对药物干预的反应, 对于开发精准药物和阐释肿瘤耐药机制至关重要<sup>[117]</sup>。Wu 等<sup>[90]</sup>将 scPMA 方法应用于抗肿瘤药物阿霉素对 A549 单细胞蛋白质组和代谢组的影响研究, 发现在药物刺激组中共鉴定出 255 种差异表达蛋白质和 93 种差异表达代谢物。基于差异蛋白质组和代谢组信息, 通过联合通路分析分别定位了 62 条和 234 条相关通路, 证实药物作用机制与核糖体功能及 DNA 复制过程有关; 进一步通过蛋白质组与代谢组联合分析发现, ACOT7 蛋白可直接影响代谢物二十碳五烯酸的合成。He 等<sup>[70]</sup>应用 SCSP 方法研究人小胶质细胞 HMC3 细胞的分泌蛋白组及其对脂多糖(LPS)治疗的反应, 分析对照组和 LPS 刺激组单细胞的分泌组差异, 分别鉴定到 566 和 446 种蛋白质。研究发现, 信号素-从蛋白信号相关蛋白(SEMA3C、SLTM、ARHGDI A)仅在 LPS 刺激状态下被鉴定到; 另有 28 种蛋白质与对照组存在显著差异, 其中与神经退行性疾病途径相关的蛋白质(EIF2S1、VCP、PSMA2)在 LPS 处理的小胶质细胞中表达下调。该研究为理解神经退行性疾病的药物干预机制提供了新见解。

巨噬细胞极化是应对微环境变化的重要调控机制, 涉及其在不同刺激下向促炎型(M1)或抗炎型(M2)表型的功能转变。该过程不仅在维持机体免疫稳态中发挥关键作用, 还与多种疾病的发生发展密切相关, 如 M1 型巨噬细胞在感染防御和抗肿瘤免疫中发挥主导作用, 而 M2 型则在组织修复、免疫抑制及肿瘤进展中具有重要影响。Mao 等<sup>[95]</sup>利用 scMeT-seq 技术构建了巨噬细胞极化过程的代谢物-基因共表达网络, 筛选出甘油磷酸肌醇、磷酸胆碱和牛磺酸 3 种代谢物。在乳酸预处理的激活态巨噬细胞中进行功能实验, 结果表明, 这些代谢物可显著下调炎症相关基因(如 S100a8), 抑制糖酵解通路, 同时上调抗氧化相关基因, 诱导巨噬细胞向抗炎表型

(M2-like)极化, 表现出类似环磷酸腺苷(cAMP)的免疫调节效应, 为开发新的免疫调控因子和潜在干预策略提供了理论依据和实验基础。

### 3.3 单细胞多维度多组学分析在临床诊疗研究中的应用

基于质谱的单细胞多维度多组学分析正逐步从基础研究走向临床实践。尽管目前仅有较为成熟的单细胞蛋白质组学成功应用于实际研究, 但随着其余多维度多组学技术的不断发展, 这一策略有望成为推动精准医学发展的核心技术之一。该策略通过在单细胞分辨率下整合蛋白质组、分泌组等多种分子层级信息, 能够深入解析个体差异、疾病进程和干预效果, 为疾病早筛、风险评估、分型诊断及疗效预测提供更具敏感性与特异性的分子依据。

Tang 等<sup>[118]</sup>通过构建跨度 9 年的纵向血清单细胞蛋白质组数据库(涵盖 3 796 人 7 565 份样本), 系统解析蛋白质动态与衰老进程的关联, 鉴定出 86 种与 32 项临床特征显著相关的衰老核心蛋白(如 GDF15、FGF21), 并基于 22 种关键蛋白构建蛋白质组健康老化评分(PHAS), 实现了对心脏代谢疾病风险的预测, 其预测效能显著优于传统临床指标。

Guise 等<sup>[119]</sup>利用 nanoPOTS 技术分析死后肌萎缩侧索硬化症(ALS)和对照组织中单个运动神经元(MN)的蛋白质表达变化, 在单细胞分辨率下揭示 ALS 运动神经元的病理特征, 证实囊泡运输相关蛋白(如 RAB7A)表达持续下调导致神经突触营养物质运输障碍; 发现 TDP-43 病理阳性细胞中 DNA 损伤响应通路(ATM-CHEK2 轴)异常激活会加速神经元退变。该研究表明, 单细胞蛋白质组学能够捕捉神经退行性病变的早期分子标志物, 为疾病分期诊疗提供了新依据。

Gullotta 等<sup>[120]</sup>针对老龄化导致缺血性卒中风险增加和预后不良的问题, 研究了年龄相关的免疫系统变化对中风的影响。通过对白细胞的单细胞蛋白质组分析发现, 老年缺血性脑卒中患者的 CD62Llo 中性粒细胞亚群与再灌注和预后较差相关, 揭示了老年中风导致急性粒细胞生成失调进而影响神经系统疾病预后的机制。

## 4 总结与展望

作为生命活动的基本单元, 单细胞的异质性

是驱动复杂生物学功能的核心特征。传统群体细胞分析技术因无法解析细胞间分子表达的细微差异,在揭示发育调控、疾病机制等关键科学问题时存在局限性。单细胞分析技术的兴起,尤其是以质谱为核心的单细胞多维度多组学分析技术的突破,为生命科学研究提供了前所未有的分辨率。以质谱为核心的单细胞分析技术凭借检测范围广、灵敏度高的特点,成功突破了蛋白质、代谢物和分泌物等无法扩增分子的检测难题,在单细胞层面实现了从基因图谱到功能执行的多维度、多组学解析,涵盖从胞内代谢通路、基因表达调控、信号转导及能量代谢等核心生命过程到胞外分子间通信、免疫调节及组织微环境等复杂多层次生物学现象的系统解析。单细胞蛋白质组技术直接解析单个细胞内的蛋白质表达、修饰及功能定位,是揭示细胞异质性和精准调控机制的核心工具。分泌组作为细胞对外输出的“分子语言”,驱动微环境重塑与群体行为协调,是连接个体细胞与宏观生理病理过程的关键媒介。此外,整合单细胞转录组、蛋白质组及代谢组等数据,构建“基因表达-表观修饰-蛋白功能-代谢状态”的全息调控网络,有效突破单一组学的信息盲区。单细胞胞内蛋白质组、胞外分泌组与多组学整合共同构成“分子机制-细胞行为-系统生理”的三级研究体系,推动生命科学研究从描述性向机制驱动型跨越,为精准医学提供从诊断标志物到治疗策略的解决方案,最终实现对复杂生命系统的全面理解。

尽管近年来基于质谱的单细胞多维度多组学分析技术取得了显著进展,但仍面临诸多挑战和技术瓶颈。目前对同一细胞的多组学联合分析,尤其是与分泌组的整合研究,尚处于起步阶段,缺乏标准化的样品制备流程和深度覆盖的单细胞分泌组分析策略,分泌组与其他组学的同时分析尚未实现。同时,现有分析流程在样品分析通量和多组学样品处理兼容性方面存在局限,质谱平台虽具备高灵敏度和高分辨率的优势,但受限于单细胞样本中待测组分含量极低,需依赖长时间梯度洗脱的色谱分离流程和复杂的多组学样品预处理步骤,以提升分析深度与重复性。上述操作不仅显著延长了整体分析周期,还在一定程度上限制了方法在大规模、高通量单细胞组学研究中的应用。为提升分离通量与处理效率,

已有研究尝试以毛细管电泳(CE)替代传统纳流色谱(Nano-LC)实现快速分离<sup>[121]</sup>,但其分离流程与色谱仪器性能较液相色谱尚不成熟。此外,目前尚无统一的数据整合标准,导致多组学数据在结构、尺度与处理方式上存在显著异构性,阻碍了不同组学层面信息的深度融合与生物学意义的系统解析<sup>[122]</sup>。因此,亟需发展更全面且自动化的数据处理流程,以及适用于多组学协同分析的整合算法和计算框架。如何将质谱分析与空间信息、活细胞追踪、动态响应等技术融合,实现更高维度的单细胞系统生物学研究,是未来发展亟待突破的重要方向。

未来,单细胞多维度多组学在多个层面上仍有创新发展的空间。首先,整合目前单细胞多维度多组学的分析方法结合多层次的分析策略,有望实现单细胞分子的完整建模,全面解释细胞行为;其次,进一步精细化细胞功能单位,如确定分子的亚细胞定位和细胞外囊泡,能更精准地干预细胞调控和靶向治疗<sup>[123]</sup>;此外,为全面表征细胞的功能异质性,需进一步结合时空分辨信息<sup>[78]</sup>,发展提供组织原位空间信息的单细胞多组学方法(如单细胞深度视觉蛋白质组学(scDVP))或进行活细胞分泌组实时监测,为精准诊断与个性化治疗提供关键信息。

#### 参考文献:

- [1] MASUJIMA T. Live single-cell mass spectrometry[J]. *Analytical Sciences*, 2009, 25(8): 953-960.
- [2] ALTSCHULER S J, WU L F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference?[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 559-563.
- [3] REGEV A, TEICHMANN S A, LANDER E S, AMIT I, BENOIST C, BIRNEY E, BODENMILLER B, CAMPBELL P, CARNINCI P, CLATWORTHY M, CLEVERS H, DEPLANCKE B, DUNHAM I, EBERWINE J, EILS R, ENARD W, FARMER A, FUGGER L, GÖTTGENS B, HACOEN N, HANIFFA M, HEMBERG M, KIM S, KLENERMAN P, KRIEGSTEIN A, LEIN E, LINNARSSON S, LUNDBERG E, LUNDEBERG J, MAJUMDER P, MARIONI J C, MERAD M, MHLANGA M, NAWIJN M, NETEA M, NOLAN G, PE'ER D, PHILLIPAKIS A, PONTING C P, QUAKE S, REIK W, ROZENBLATT-ROSEN O, SANES J, SATIJA R, SCHUMACHER T N, SHALEK

- A, SHAPIRO E, SHARMA P, SHIN J W, STEGLE O, STRATTON M, STUBBINGTON M J T, THEIS F J, UHLEN M, van OUDENAARDEN A, WAGNER A, WATT F, WEISSMAN J, WOLD B, XAVIER R, YOSEF N. The human cell atlas[J]. *eLife*, 2017, 6: e27041.
- [4] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, CHAN V, FEARON D F, MERAD M, COUSSENS L M, GABRILOVICH D I, OSTRAND-ROSENBERG S, HEDRICK C C, VONDERHEIDE R H, PITTET M J, JAIN R K, ZOU W, KEVIN HOWCROFT T, WOODHOUSE E C, WEINBERG R A, KRUMMEL M F. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(5): 541-550.
- [5] CROW M, PAUL A, BALLOUZ S, JOSH HUANG Z, GILLIS J. Characterizing the replicability of cell types defined by single cell RNA-sequencing data using MetaNeighbor[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 884.
- [6] ZHU Y, SCHEIBINGER M, ELLWANGER D C, KREY J F, CHOI D, KELLY R T, HELLER S, BARR-GILLESPIE P G. Single-cell proteomics reveals changes in expression during hair-cell development[J]. *eLife*, 2019, 8: e50777.
- [7] SHAO X, WENG L, GAO M, ZHANG X. Single-cell analysis for proteome and related researches[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 120: 115-666.
- [8] CONSORTIUM H. The human body at cellular resolution: the NIH human biomolecular atlas program[J]. *Nature*, 2019, 574(7 777): 187-192.
- [9] NAM A S, CHALIGNE R, LANDAU D A. Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(1): 3-18.
- [10] KOŁODZIEJCZYK A A, KIM J K, SVENSSON V, MARIONI J C, TEICHMANN S A. The technology and biology of single-cell RNA sequencing[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(4): 610-620.
- [11] CONSORTIUM T M, COORDINATION O, COORDINATION L, COLLECTION O, PREPARATION L, ANALYSIS C D, ANNOTATION C T, GROUP W, GROUP S T W, INVESTIGATORS P. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris[J]. *Nature*, 2018, 562(7 727): 367-372.
- [12] CONSORTIUM T S, JONES R C, KARKANIAS J, KRASNOW M A, PISCO A O, QUAKE S R, SALZMAN J, YOSEF N, BULTHAUP B, BROWN P, HARPER W, HEMENEZ M, PONNUSAMY R, SALEHI A, SANAGAVARAPU B A, SPALLINO E, AARON K A, CONCEPCION W, GARDNER J M, KELLY B, NEIDLINGER N, WANG Z, CRASTA S, KOLLURU S, MORRI M, TAN S Y, TRAVAGLINI K J, XU C, ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ M, ALMANZAR N, ANTONY J, BEYERSDORF B, BURHAN D, CALCUTTAWALA K, CARTER M M, CHAN C K F, CHANG C A, CHANG S, COLVILLE A, CULVER R N, CVIJOVIĆ I, D'AMATO G, EZRAN C, GALDOS F X, GILLICH A, GOODYER W R, HANG Y, HAYASHI A, HOUSHDARAN S, HUANG X, IRWIN J C, JANG S, JUANICO J V, KERSHNER A M, KIM S, KISS B, KONG W, KUMAR M E, KUO A H, LI B, LOEB G B, LU W J, MANTRI S, MARKOVIC M, McALPINE P L, de MORREE A, MROUJ K, MUKHERJEE S, MUSER T, NEUHÖFER P, NGUYEN T D, PEREZ K, PULUCA N, QI Z, RAO P, RAQUER-MCKAY H, SCHAUM N, SCOTT B, SEDIGHZADEH B, SEGAL J, SEN S, SIKANDAR S, SPENCER S P, STEFFES L C, SUBRAMANIAM V R, SWARUP A, SWIFT M, van TREUREN W, TRIMM E, VEIZADES S, VIJAYAKUMAR S, VO K C, VORPERIAN S K, WANG W, WEINSTEIN H N W, WINKLER J, WU T T H, XIE J, YUNG A R, ZHANG Y, DETWEILER A M, MEKONEN H, NEFF N F, SIT R V, TAN M, YAN J, BEAN G R, CHARU V, FORGÓ E, MARTIN B A, OZAWA M G, SILVA O, TOLAND A, VEMURI V N P, AFIK S, AWAYAN K, BOTVINNIK O B, BYRNE A, CHEN M, DEGHANNASIRI R, GAYOSO A, GRANADOS A A, LI Q, MAHMOUDABADI G, McGEEVER A, OLIVIERI J E, PARK M, RAVIKUMAR N, STANLEY G, TAN W, TARASHANSKY A J, VANHEUSDEN R, WANG P, WANG S, XING G, DETHLEFSEN L, EZRAN C, GILLICH A, HANG Y, HO P Y, IRWIN J C, JANG S, LEYLEK R, LIU S, MALTZMAN J S, METZGER R J, PHANSALKAR R, SASAGAWA K, SINHA R, SONG H, SWARUP A, TRIMM E, VEIZADES S, WANG B, BEACHY P A, CLARKE M F, GIUDICE L C,

- HUANG F W, HUANG K C, IDOYAGA J, KIM S K, KUO C S, NGUYEN P, RANDO T A, RED-HORSE K, REITER J, RELMAN D A, SONNENBURG J L, WU A, WU S M, WYSS-CORAY T. The Tabula Sapiens: a multiple-organ, single-cell transcriptomic atlas of humans[J]. *Science*, 2022, 376(6 594): eabl4896.
- [13] VANDEREYKEN K, SIFRIM A, THIENPONT B, VOET T. Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2023, 24(8): 494-515.
- [14] SPECHT H, SLAVOV N. Transformative opportunities for single-cell proteomics[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(8): 2 565-2 571.
- [15] DOERR A. Single-cell proteomics[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 20.
- [16] BAYSOY A, BAI Z, SATIJA R, FAN R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(10): 695-713.
- [17] WU W, KRIJGSVELD J. Secretome analysis: reading cellular sign language to understand intercellular communication[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2024, 23(1): 100 692.
- [18] COCOZZA F, GRISARD E, MARTIN-JAULAR L, MATHIEU M, THÉRY C. SnapShot: extracellular vesicles[J]. *Cell*, 2020, 182(1): 262-262. e1.
- [19] REDIT C, CHA S, AI N. Single-cell proteomics: challenges and prospects[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 317-318.
- [20] NEUMANN E K, DO T D, COMI T J, SWEEDLER J V. Exploring the fundamental structures of life: non-targeted, chemical analysis of single cells and subcellular structures[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2019, 58(28): 9 348-9 364.
- [21] ZHU G, SHAO Y, LIU Y, PEI T, LI L, ZHANG D, GUO G, WANG X. Single-cell metabolite analysis by electrospray ionization mass spectrometry[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143: 116 351.
- [22] LIN J R, FALLAHI-SICHANI M, SORGER P K. Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8 390.
- [23] NAM W, REN X, TALI S A S, GHASSEMI P, KIM I, AGAH M, ZHOU W. Refractive-index-insensitive nanolaminated SERS substrates for label-free Raman profiling and classification of living cancer cells[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(10): 7 273-7 281.
- [24] PETERSON V M, ZHANG K X, KUMAR N, WONG J, LI L, WILSON D C, MOORE R, McCLANAHAN T K, SADEKOVA S, KLAPPENBACH J A. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(10): 936-939.
- [25] JI Y, QI D, LI L, SU H, LI X, LUO Y, SUN B, ZHANG F, LIN B, LIU T, LU Y. Multiplexed profiling of single-cell extracellular vesicles secretion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(13): 5 979-5 984.
- [26] ZHANG L, VERTES A. Single-cell mass spectrometry approaches to explore cellular heterogeneity[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2018, 57(17): 4 466-4 477.
- [27] BENNETT H M, STEPHENSON W, ROSE C M, DARMANIS S. Single-cell proteomics enabled by next-generation sequencing or mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 363-374.
- [28] XU T, FENG D, LI H, HU X, WANG T, HU C, SHI X, XU G. Recent advances and typical applications in mass spectrometry-based technologies for single-cell metabolite analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 157: 116 763.
- [29] FANG G, LIU D, ZHANG M, SHAO L, SHAO X, CHEN J, MENG C, WANG Y, ZENG K, CHEN Q. Single-organelle localization-based super-resolution imaging for subcellular molecules micro-dynamics[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2024, 504: 215 670.
- [30] WANG Z, ZHU H, XIONG W. Advances in mass spectrometry-based multi-scale metabolomic methodologies and their applications in biological and clinical investigations[J]. *Science Bulletin*, 2023, 68(19): 2 268-2 284.
- [31] MacCOSS M J, ALFARO J A, FAIVRE D A, WU C C, WANUNU M, SLAVOV N. Sampling the proteome by emerging single-molecule and mass spectrometry methods[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 339-346.
- [32] SCHWANHÄUSSER B, BUSSE D, LI N, DITTMAR G, SCHUCHHARDT J, WOLF J, CHEN W, SELBACH M. Global quantification of mammalian gene expression control[J]. *Nature*, 2011, 473(7 347): 337-342.

- [33] KELLY R T. Single-cell proteomics: progress and prospects[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2020, 19(11): 1 739-1 748.
- [34] BUDNIK B, LEVY E, HARMANGE G, SLAVOV N. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 161.
- [35] PETELSKI A A, EMMOTT E, LEDUC A, GRAY HUFFMAN R, SPECHT H, PERLMAN D H, SLAVOV N. Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(12): 5 398-5 425.
- [36] XU X, WANG J, WU L, GUO J, SONG Y, TIAN T, WANG W, ZHU Z, YANG C. Microfluidic single-cell omics analysis[J]. *Small*, 2020, 16(9): e1903905.
- [37] LI Z, HUANG M, WANG X, ZHU Y, LI J, WONG C, FANG Q. Nanoliter-scale oil-air-droplet chip-based single cell proteomic analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5 430-5 438.
- [38] ZHU Y, PIEHOWSKI P D, ZHAO R, CHEN J, SHEN Y, MOORE R J, SHUKLA A K, PETYUK V A, CAMPBELL-THOMPSON M, MATHEWS C E, SMITH R D, QIAN W, KELLY R T. Nanodroplet processing platform for deep and quantitative proteome profiling of 10-100 mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 882.
- [39] WILLIAMS S M, LIYU A V, TSAI C F, MOORE R J, ORTON D J, CHRISLER W B, GAFFREY M J, LIU T, SMITH R D, KELLY R T, PASA-TOLIC L, ZHU Y. Automated coupling of nanodroplet sample preparation with liquid chromatography-mass spectrometry for high-throughput single-cell proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(15): 10 588-10 596.
- [40] WOO J, WILLIAMS S M, MARKILLIE L M, FENG S, TSAI C F, AGUILERA-VAZQUEZ V, SONTAG R L, MOORE R J, HU D, MEHTA H S, CANTLON-BRUCE J, LIU T, ADKINS J N, SMITH R D, CLAIR G C, PASA-TOLIC L, ZHU Y. High-throughput and high-efficiency sample preparation for single-cell proteomics using a nested nanowell chip[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6 246.
- [41] SHAO X, WANG X, GUAN S, LIN H, YAN G, GAO M, DENG C, ZHANG X. Integrated proteome analysis device for fast single-cell protein profiling[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(23): 14 003-14 010.
- [42] LEDUC A, KHOURY L, CANTLON J, KHAN S, SLAVOV N. Massively parallel sample preparation for multiplexed single-cell proteomics using nPOP[J]. *Nature Protocols*, 2024, 19(12): 3 750-3 776.
- [43] CTORTECKA C, JACOME A S V, VASHIST T, SATPATHY S, UDESHI N D, CARR S A. A high-throughput sample preparation approach for label-free and multiplexed single-cell proteomics[C]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2022, 21(8): S18.
- [44] GEBREYESUS S T, SIYAL A A, KITATA R B, CHEN E S, ENKHBAYAR B, ANGATA T, LIN K I, CHEN Y J, TU H L. Streamlined single-cell proteomics by an integrated microfluidic chip and data-independent acquisition mass spectrometry[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 37.
- [45] YANG Z, JIN K, CHEN Y, LIU Q, CHEN H, HU S, WANG Y, PAN Z, FENG F, SHI M, XIE H, MA H, ZHOU H. AM-DMF-SCP: integrated single-cell proteomics analysis on an active matrix digital microfluidic chip[J]. *JACS Au*, 2024, 4(5): 1 811-1 823.
- [46] WANG Y, GUAN Z, SHI S, JIANG Y, ZHANG J, YANG Y, WU Q, WU J, CHEN J, YING W, XU Q, FAN Q, WANG H, ZHOU L, WANG L, FANG J, PAN J, FANG Q. Pick-up single-cell proteomic analysis for quantifying up to 3000 proteins in a Mammalian cell[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 1 279.
- [47] YE Z, SABATIER P, MARTIN-GONZALEZ J, EGUCHI A, LECHNER M, ØSTERGAARD O, XIE J, GUO Y, SCHULTZ L, TRUFFER R, BEKKER-JENSEN D B, BACHE N, OLSEN J V. Author correction: one-tip enables comprehensive proteome coverage in minimal cells and single zygotes[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3 099.
- [48] CTORTECKA C, CLARK N M, BOYLE B W, SETH A, MANI D R, UDESHI N D, CARR S A. Automated single-cell proteomics providing sufficient proteome depth to study complex biology beyond cell type classifications[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5 707.
- [49] YE Z, SABATIER P, van der HOEVEN L, LECHNER M Y, PHLAIRAHARN T, GUZMAN U H, LIU Z, HUANG H, HUANG M, LI X, HARTLMAYR D, IZAGUIRRE F, SETH A, JOSHI H J, RODIN S, GRIN-

- NEMO K H, HØRNING O B, BEKKER-JENSEN D B, BACHE N, OLSEN J V. Enhanced sensitivity and scalability with a Chip-Tip workflow enables deep single-cell proteomics[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(3): 499-509.
- [50] SINN L R, DEMICHEV V. Entering the era of deep single-cell proteomics[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(3): 459-460.
- [51] ROSENBERGER F A, THIELERT M, STRAUSS M T, SCHWEIZER L, AMMAR C, MÄDLER S C, METOUSIS A, SKOWRONEK P, WAHLE M, MADDEN K, GOTE-SCHNIERING J, SEMENOVA A, SCHILLER H B, RODRIGUEZ E, NORDMANN T M, MUND A, MANN M. Spatial single-cell mass spectrometry defines zonation of the hepatocyte proteome[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(10): 1 530-1 536.
- [52] ANONYMOUS. Method of the year 2024: spatial proteomics[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(12): 2 195-2 196.
- [53] UHLÉN M, KARLSSON M J, HOBER A, SVENSSON A S, SCHEFFEL J, KOTOL D, ZHONG W, TEBANI A, STRANDBERG L, EDFORS F, SJÖSTEDT E, MULDER J, MARDINOGLU A, BERLING A, EKBLAD S, DANNEMEYER M, KANJE S, ROCKBERG J, LUNDQVIST M, MALM M, VOLK A L, NILSSON P, MÅNBERG A, DODIG-CRNKOVIC T, PIN E, ZWAHLEN M, OKSVOLD P, von FEILITZEN K, HÄUSSLER R S, HONG M G, LINDSKOG C, PONTEN F, KATONA B, VUU J, LINDSTRÖM E, NIELSEN J, ROBINSON J, AYOGLU B, MAHDESSIAN D, SULLIVAN D, THUL P, DANIELSSON F, STADLER C, LUNDBERG E, BERGSTRÖM G, GUMMESSON A, VOLDBORG B G, TEGEL H, HOBER S, FORSSTRÖM B, SCHWENK J M, FAGERBERG L, SIVERTSSON Å. The human secretome[J]. *Science Signaling*, 2019, 12(609): eaaz0274.
- [54] ZHANG M, LIU L, LIN X, WANG Y, LI Y, GUO Q, LI S, SUN Y, TAO X, ZHANG D, LV X, ZHENG L, GE L. A translocation pathway for vesicle-mediated unconventional protein secretion[J]. *Cell*, 2020, 181(3): 637-652. e15.
- [55] SU J, SONG Y, ZHU Z, HUANG X, FAN J, QIAO J, MAO F. Cell-cell communication: new insights and clinical implications[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 196.
- [56] PROPPER D J, BALKWILL F R. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022, 19(4): 237-253.
- [57] HSU M N, WEI S C, GUO S, PHAN D T, ZHANG Y, CHEN C H. Smart hydrogel microfluidics for single-cell multiplexed secretomic analysis with high sensitivity[J]. *Small*, 2018, 14(49): e1802918.
- [58] GYURIS A, NAVARRETE-PEREA J, JO A, CRISTEA S, ZHOU S, FRASER K, WEI Z, KRICHEVSKY A M, WEISSLEDER R, LEE H, GYGI S P, CHAREST A. Physical and molecular landscapes of mouse glioma extracellular vesicles define heterogeneity[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(13): 3 972-3 987. e6.
- [59] CHEN Z, CHEN J, FAN R. Single-cell protein secretion detection and profiling[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2019, 12(1): 431-449.
- [60] STREECK H, FRAHM N, WALKER B D. The role of IFN- $\gamma$  Elispot assay in HIV vaccine research[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4: 461-469.
- [61] IRISH J M, HOVLAND R, KRUTZIK P O, PEREZ O D, BRUSERUD Ø, GJERTSEN B T, NOLAN G P. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells[J]. *Cell*, 2004, 118(2): 217-228.
- [62] FREER G, RINDI L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances[J]. *Methods*, 2013, 61(1): 30-38.
- [63] SPITZER M H, NOLAN G P. Mass cytometry: single cells, many features[J]. *Cell*, 2016, 165(4): 780-791.
- [64] LU Y, CHEN J, MU L, XUE Q, WU Y, WU P, LI J, VORTMEYER A O, MILLER-JENSEN K, WIRTZ D, FAN R. High-throughput secretomic analysis of single cells to assess functional cellular heterogeneity[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2 548-2 556.
- [65] XUE M, WEI W, SU Y, KIM J, SHIN Y S, MAI W X, NATHANSON D A, HEATH J R. Chemical methods for the simultaneous quantitation of metabolites and proteins from single cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(12): 4 066-4 069.
- [66] SHI Q, QIN L, WEI W, GENG F, FAN R, SHIN Y S, GUO D, HOOD L, MISCHEL P S, HEATH J R. Single-cell proteomic chip for profiling intracellular signaling pathways in single tumor cells[J]. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(2): 419-424.
- [67] XUE Q, LU Y, EISELE M R, SULISTIJO E S, KHAN N, FAN R, MILLER-JENSEN K. Analysis of single-cell cytokine secretion reveals a role for paracrine signaling in coordinating macrophage responses to TLR4 stimulation[J]. *Science Signaling*, 2015, 8(381): ra59.
- [68] KNECHT S, EBERL H C, BANTSCHJEFF M. Interval-based secretomics unravels acute-phase response in hepatocyte model systems[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2022, 21(6): 100-241.
- [69] MUKHERJEE P, MANI S. Methodologies to decipher the cell secretome[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(11): 2226-2232.
- [70] HE Y, LIU X, ZHU F, DAI Z, LI X, LI L, ZHAO B, YUAN H, LU Y, LIANG Z, ZHANG Y, ZHANG L. Single-cell secretome profiling enabled by selective enrichment and NanoLC-MS/MS analysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(4): e202417351.
- [71] TRAN N H, QIAO R, XIN L, CHEN X, LIU C, ZHANG X, SHAN B, GHODSI A, LI M. Deep learning enables *de novo* peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 63-66.
- [72] DEMICHEV V, MESSNER C B, VERNARDIS S I, LILLEY K S, RALSER M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(1): 41-44.
- [73] KRULL K K, ALI S A, KRIJGSVELD J. Enhanced feature matching in single-cell proteomics characterizes IFN- $\gamma$  response and co-existence of cell states[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 8262.
- [74] DERKS J, SLAVOV N. Strategies for increasing the depth and throughput of protein analysis by plexDIA[J]. *Journal of Proteome Research*, 2023, 22(3): 697-705.
- [75] THIELERT M, ITANG E C, AMMAR C, ROSENBERGER F A, BLUDAU I, SCHWEIZER L, NORDMANN T M, SKOWRONEK P, WAHLE M, ZENG W, ZHOU X, BRUNNER A D, RICHTER S, LEVESQUE M P, THEIS F J, STEGER M, MANN M. Robust dimethyl-based multiplex-DIA doubles single-cell proteome depth via a reference channel[J]. *Molecular Systems Biology*, 2023, 19(9): e11503.
- [76] GUZMAN U H, MARTINEZ-VAL A, YE Z, DAMOC E, ARREY T N, PASHKOVA A, RENUSE S, DENISOV E, PETZOLDT J, PETERSON A C, HARKING F, ØSTERGAARD O, RYDBIRK R, AZNAR S, STEWART H, XUAN Y, HERMANSON D, HORNING S, HOCK C, MAKAROV A, ZABROUSKOV V, OLSEN J V. Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(12): 1855-1866.
- [77] BUBIS J A, ARREY T N, DAMOC E, DELANGHE B, SLOVAKOVA J, SOMMER T M, KAGAWA H, PICHLER P, RIVRON N, MECHTLER K, MATZINGER M. Challenging the Astral mass analyzer to quantify up to 5,300 proteins per single cell at unseen accuracy to uncover cellular heterogeneity[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(3): 510-519.
- [78] LIU X, PENG T, XU M, LIN S, HU B, CHU T, LIU B, XU Y, DING W, LI L, CAO C, WU P. Spatial multi-omics: deciphering technological landscape of integration of multi-omics and its applications[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2024, 17(1): 72.
- [79] MA A, McDERMAID A, XU J, CHANG Y, MA Q. Integrative methods and practical challenges for single-cell multi-omics[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(9): 1007-1022.
- [80] LUNDBERG E, BORNER G H H. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(5): 285-302.
- [81] BRESSAN D, BATTISTONI G, HANNON G J. The dawn of spatial omics[J]. *Science*, 2023, 381(6657): eabq4964.
- [82] JIANG Z Y, FAN H Y. Five questions toward mRNA degradation in oocytes and preimplantation embryos: when, who, to whom, how, and why?[J]. *Biology of Reproduction*, 2022, 107(1): 62-75.
- [83] STOECKIUS M, HAFEMEISTER C, STEPHENSON W, HOUCK-LOOMIS B, CHATTOPADHYAY P K, SWERDLOW H, SATIJA R, SMIBERT P. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(9): 865-868.
- [84] CHUNG H, PARKHURST C N, MAGEE E M,

- PHILLIPS D, HABIBI E, CHEN F, YEUNG B Z, WALDMAN J, ARTIS D, REGEV A. Joint single-cell measurements of nuclear proteins and RNA *in vivo*[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(10): 1 204-1 212.
- [85] JIANG Y, ZHU L, CAO L, WU Q, CHEN J, WANG Y, WU J, ZHANG T, WANG Z, GUAN Z, XU Q, FAN Q, SHI S, WANG H, PAN J, FU X, WANG Y, FANG Q. Simultaneous deep transcriptome and proteome profiling in a single mouse oocyte[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(11): 113 455.
- [86] VOGEL C, MARCOTTE E M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(4): 227-232.
- [87] LI Y, LI H, XIE Y, CHEN S, QIN R, DONG H, YU Y, WANG J, QIAN X, QIN W. An integrated strategy for mass spectrometry-based multiomics analysis of single cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(42): 14 059-14 067.
- [88] 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.
- [89] HE Y, YUAN H, LIANG Y, LIU X, ZHANG X, JI Y, ZHAO B, YANG K, ZHANG J, ZHANG S, ZHANG Y, ZHANG L. On-capillary alkylation micro-reactor: a facile strategy for proteo-metabolome profiling in the same single cells[J]. *Chemical Science*, 2023, 14(46): 13 495-13 502.
- [90] WU J, XU Q, JIANG Y, CHEN J, YING W, FAN Q, WANG H, WANG Y, SHI S, PAN J, FANG Q. One-shot single-cell proteome and metabolome analysis strategy for the same single cell[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(14): 5 499-5 508.
- [91] HROVATIN K, FISCHER D S, THEIS F J. Toward modeling metabolic state from single-cell transcriptomics[J]. *Molecular Metabolism*, 2022, 57: 101 396.
- [92] FENDT S M, BUESCHER J M, RUDROFF F, PICOTTI P, ZAMBONI N, SAUER U. Tradeoff between enzyme and metabolite efficiency maintains metabolic homeostasis upon perturbations in enzyme capacity[J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6: 356.
- [93] LEE S, VU H M, LEE J H, LIM H, KIM M S. Advances in mass spectrometry-based single cell analysis[J]. *Biology*, 2023, 12(3): 395.
- [94] LAN Y, ZOU Z, YANG Z. Single cell mass spectrometry: towards quantification of small molecules in individual cells[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2024, 174: 117 657.
- [95] MAO X, XIA D, XU M, GAO Y, TONG L, LU C, LI W, XIE R, LIU Q, JIANG D, YUAN S. Single-cell simultaneous metabolome and transcriptome profiling revealing metabolite-gene correlation network[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(4): e2411276.
- [96] FLYNN E, ALMONTE-LOYA A, FRAGIADAKIS G K. Single-cell multiomics[J]. *Annual Review of Biomedical Data Science*, 2023, 6: 313-337.
- [97] SZALAŁATA A, HROVATIN K, BECKER S, TEJADALAPUERTA A, CUI H, WANG B, THEIS F J. Transformers in single-cell omics: a review and new perspectives[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(8): 1 430-1 443.
- [98] LIU Y, YANG M, DENG Y, SU G, ENNINFUL A, GUO C C, TEBALDI T, ZHANG D, KIM D, BAI Z, NORRIS E, PAN A, LI J, XIAO Y, HALENE S, FAN R. High-spatial-resolution multi-omics sequencing *via* deterministic barcoding in tissue[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1 665-1 681. e18.
- [99] PARK J, KIM J, LEWY T, RICE C M, ELEMENTO O, RENDEIRO A F, MASON C E. Spatial omics technologies at multimodal and single cell/subcellular level[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 256.
- [100] DONG Z, JIANG W, WU C, CHEN T, CHEN J, DING X, ZHENG S, PIATKEVICH K D, ZHU Y, GUO T. Spatial proteomics of single cells and organelles on tissue slides using filter-aided expansion proteomics[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 9 378.
- [101] GUO X, WANG X, TIAN C, DAI J, ZHAO Z, DUAN Y. Development of mass spectrometry imaging techniques and its latest applications[J]. *Talanta*, 2023, 264: 124 721.
- [102] ZHANG H, DELAFIELD D G, LI L. Mass spectrometry imaging: the rise of spatially resolved single-cell omics[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(3): 327-330.
- [103] TILLBERG P W, CHEN F, PIATKEVICH K D, ZHAO Y, YU C J, ENGLISH B P, GAO L, MARTORELL A, SUK H J, YOSHIDA F, DeGENNARO E M, ROOSSEN D H, GONG G, SENEVIRATNE U, TAN-

- NENBAUM S R, DESIMONE R, CAI D, BOYDEN E S. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(9): 987-992.
- [104] CHAN Y H, PATHMASIRI K C, PIERRE-JACQUES D, HIBBARD M C, TAO N, FISCHER J L, YANG E, COLOGNA S M, GAO R. Gel-assisted mass spectrometry imaging enables sub-micrometer spatial lipidomics[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5 036.
- [105] ZHANG H, DING L, HU A, SHI X, HUANG P, LU H, TILLBERG P W, WANG M C, LI L. TEMI: tissue-expansion mass-spectrometry imaging[J]. *Nature Methods*, 2025, 22(5): 1 051-1 058.
- [106] RAPOSO G, STOOVVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4): 373-383.
- [107] DANESHMANDI L, SHAH S, JAFARI T, BHATTACHARJEE M, MOMAH D, SAVEH-SHEMASHAKI N, LO K W, LAURENCIN C T. Emergence of the stem cell secretome in regenerative engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(12): 1 373-1 384.
- [108] RATAJCZAK M Z, RATAJCZAK J. Leukemogenesis occurs in a microenvironment enriched by extracellular microvesicles/exosomes: recent discoveries and questions to be answered[J]. *Leukemia*, 2024, 38(4): 692-698.
- [109] NI W, HAN E X, CYR M, MACKAY S, ZHOU J. Applying single-cell highly multiplexed secretome proteomics to characterize immunotherapeutic products and predict clinical responses[J]. *Proteomics*, 2023, 23(13/14): e2200242.
- [110] HANIFFA M, MAARTENS A, WINHEIM E, JARDINE L. Decoding the human prenatal immune system with single-cell multi-omics[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2025, 25: 285-297.
- [111] SCHÄFER P S L, DIMITROV D, VILLABLANCA E J, SAEZ-RODRIGUEZ J. Integrating single-cell multi-omics and prior biological knowledge for a functional characterization of the immune system[J]. *Nature Immunology*, 2024, 25: 405-417.
- [112] ZHANG Y W, GVOZDENOVIC A, ACETO N. A molecular voyage: multiomics insights into circulating tumor cells[J]. *Cancer Discovery*, 2024, 14(6): 920-933.
- [113] GUAN A, QUEK C. Single-cell multi-omics: insights into therapeutic innovations to advance treatment in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(6): 2 447.
- [114] PEKAYVAZ K, HEINIG M, STARK K. Predictive cardio-omics: translating single-cell multiomics into tools for personalized medicine[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2025, 22(5): 305-306.
- [115] GALATIDOU S, PETELSKI A, PUJOL A, LATTES K, LATORRACA L B, FAIR T, POPOVIC M, VASSENA R, SLAVOV N, BARRAGAN M. Single-cell proteomics reveals decreased abundance of proteostasis and meiosis proteins in advanced maternal age oocytes[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2024, 30(7): gaae023.
- [116] STELLOO S, ALEJO-VINOGRADOVA M T, van GELDER C A G H, ZIJLMANS D W, van OOSTROM M J, VALVERDE J M, LAMERS L A, RUS T, SOBREVALS ALCARAZ P, SCHÄFERS T, FURLAN C, JANSEN P W T C, BALTISSSEN M P A, SONNEN K F, BURGERING B, ALTELAAR M A F M, VOS H R, VERMEULEN M. Deciphering lineage specification during early embryogenesis in mouse gastruloids using multilayered proteomics[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(7): 1 072-1 090. e8.
- [117] BENDALL S C, SIMONDS E F, QIU P, AMIR E D, KRUTZIK P O, FINCK R, BRUGGNER R V, MELAMED R, TREJO A, ORNATSKY O I, BALDERAS R S, PLEVITIS S K, SACHS K, PE'ER D, TANNER S D, NOLAN G P. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum[J]. *Science*, 2011, 332(6 030): 687-696.
- [118] TANG J, YUE L, XU Y, XU F, CAI X, FU Y, MIAO Z, GOU W, HU W, XUE Z, DENG K, SHEN L, JIANG Z, SHUAI M, LIANG X, XIAO C, XIE Y, GUO T, CHEN Y M, ZHENG J S. Longitudinal serum proteome mapping reveals biomarkers for healthy ageing and related cardiometabolic diseases[J]. *Nature Metabolism*, 2025, 7: 166-181.
- [119] GUISE A J, MISAL S A, CARSON R, CHU J H, BOEKWEG H, van der WATT D, WELSH N C, TRUONG T, LIANG Y, XU S, BENEDETTO G, GAGNON J, PAYNE S H, PLOWEY E D, KELLY R

- T. TDP-43-stratified single-cell proteomics of post-mortem human spinal motor neurons reveals protein dynamics in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(1): 113-636.
- [120] GULLOTTA G S, de FEO D, FRIEBEL E, SEMERANO A, SCOTTI G M, BERGAMASCHI A, BUTTI E, BRAMBILLA E, GENCHI A, CAPOTONDO A, GALLIZIOLI M, COVIELLO S, PICCOLI M, VIGO T, DELLA VALLE P, RONCHI P, COMI G, D'ANGELO A, MAUGERI N, ROVERI L, UCCELLI A, BECHER B, MARTINO G, BACIGALUPPI M. Age-induced alterations of granulopoiesis generate atypical neutrophils that aggravate stroke pathology[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(6): 925-940.
- [121] JIA D, NEMES P. Development and validation of RoboCap, a robotic capillary platform to automate capillary electrophoresis mass spectrometry en route to high-throughput single-cell proteomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(42): 16 985-16 993.
- [122] GATTO L, AEBERSOLD R, COX J, DEMICHEV V, DERKS J, EMMOTT E, FRANKS A M, IVANOV A R, KELLY R T, KHOURY L, LEDUC A, MacCOSS M J, NEMES P, PERLMAN D H, PETELSKI A A, ROSE C M, SCHOOF E M, van EYK J, VANDERAA C, YATES J R, SLAVOV N. Initial recommendations for performing, benchmarking and reporting single-cell proteomics experiments[J]. *Nature Methods*, 2023, 20: 375-386.
- [123] HEIN M Y, PENG D, TODOROVA V, McCARTHY F, KIM K, LIU C, SAVY L, JANUEL C, BALTAZAR-NUNEZ R, SEKHAR M, VAID S, BAX S, VANGIPURAM M, BURGESS J, NJOYA L, WANG E, IVANOV I E, BYRUM J R, PRADEEP S, GONZALEZ C G, ANISEIA Y, CREERY J S, McMORROW A H, SUNSHINE S, YEUNG-LEVY S, DeFELICE B C, MEHTA S B, ITZHAK D N, ELIAS J E, LEONETTI M D. Global organelle profiling reveals subcellular localization and remodeling at proteome scale[J]. *Cell*, 2025, 188(4): 1 137-1 155. e20.

(收稿日期: 2025-06-14; 修回日期: 2025-07-23)