

单细胞水平小分子质谱成像分析技术研究进展

梅翔^{1,2}, 尤穆英楠¹, 许国旺^{1,2}, 刘心昱¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁省代谢组学重点实验室, 国家医学蛋白质组学重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 大连理工大学化学学院, 辽宁大连 116024)

摘要: 质谱成像(MSI)技术通过结合质谱分析与空间分辨能力, 实现了生物组织中分子分布的无标记可视化。本文系统综述了 MSI 技术, 如基质辅助激光解吸电离质谱成像(MALDI-MSI)、二次离子质谱成像(SIMS-MSI)及解吸电喷雾电离质谱成像(DESI-MSI)的基本原理和技术进展, 并阐述了单细胞分析中样品制备及单细胞分辨率下的空间代谢组学研究进展。近年来, MALDI-MSI 通过透射模式基质辅助激光解吸/电离源与激光后电离技术实现了亚细胞分辨率与更广的分子覆盖范围; SIMS-MSI 结合气体团簇离子束显著提升了低丰度代谢物的检测能力, 且分辨率可达 25 nm; DESI-MSI 在微流控探针与敲击模式扫描的辅助下, 空间分辨率可达 6 μm , 可在常温常压条件下适用于活细胞分析与快速组织诊断。尽管 MSI 在灵敏度与分辨率间存在权衡挑战、低丰度化合物检测困难, 但其无需标记与多重检测的优势使其成为生命科学领域的重要工具。未来的技术优化将聚焦于提升检测通量、提高灵敏度及开发标准化数据分析方法。

关键词: 质谱成像(MSI); 单细胞分析; 基质辅助激光解吸电离(MALDI); 二次离子质谱(SIMS); 解吸电喷雾电离(DESI)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0680-14

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0075

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0075

Advances in Single-Cell Mass Spectrometry Imaging for Small Molecule Analysis

MEI Xiang^{1,2}, YOU Mu-ying-nan¹, XU Guo-wang^{1,2}, LIU Xin-yu¹

(1. State Key Laboratory of Medical Proteomics, CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. College of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Mass spectrometry imaging (MSI) has emerged as a powerful technique for label-free molecular mapping in biological tissues, enabling spatial analysis of small molecules at the single-cell level. MSI combines spatially resolved tissue sampling with high sensitivity, facilitating the visualization of molecular distributions. This review summarized advancements in the main MSI techniques: matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), secondary ion mass spectrometry imaging (SIMS-MSI), and desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI), which have evolved to offer improved resolution and sensitivity for small molecule analysis in complex biological environments. MALDI-MSI, widely used for its

capability to analyze complex biomolecules, has recently advanced with the development of t-MALDI-2 ion sources and laser post-ionization techniques. These innovations have enabled subcellular resolution (down to 1 μm) and deeper molecular coverage in single-cell studies, enhancing ion yield and detection sensitivity for complex molecules. SIMS-MSI, recognized for its high spatial resolution (down to 25 nm), has been improved through gas cluster ion beam (GCIB) technique, which increases ion yield and facilitates detailed analysis of low-abundance metabolites. SIMS-MSI is particularly suited for applications requiring ultra-high precision, such as mapping cellular organelles and metabolic profiling. DESI-MSI operates under ambient conditions and has recently achieved improved spatial resolution (down to 6 μm), making it applicable for live-cell analysis and rapid tissue diagnostics. The integration of microfluidic probes and tapping-mode scanning has enhanced the spatial resolution and ion detection efficiency of DESI-MSI, expanding its capabilities in clinical and real-time molecular studies. Despite of these advancements, challenges still remain, including the trade-off between spatial resolution and sensitivity, particularly for low-abundance compounds. Sample preparation methods, such as those involving vacuum or cryogenic conditions, may introduce artifacts and affect physiological relevance. Future developments of ambient-compatible environments and AI-driven data analysis workflows are critical to overcome these limitations. In conclusion, MSI, especially at the single-cell level, is transforming spatial metabolomics and holds great promise in cancer research, neuroscience, and drug development. Continued innovations in both hardware and analytical techniques will drive breakthroughs in understanding cellular heterogeneity and advancing precision medicine.

Key words: mass spectrometry imaging (MSI); single-cell analysis; matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI); secondary ion mass spectrometry (SIMS); desorption electrospray ionization (DESI)

质谱(MS)具有高通量、高灵敏度、高特异性和宽检测范围等特点,已成为生物化学领域最常用的分析和鉴定工具之一。质谱成像(MSI)是基于质谱的一种无标记分子成像技术,弥补了传统液质联用等技术因“匀浆化”分析而缺失空间位置信息的不足。其基本原理是利用质谱仪同时检测多个不同质荷比(m/z)离子的特性,通过表面原位电离与二维网格化扫描取样,同时捕获生物组织或细胞内多种分子的空间分布及相对丰度,并将这些信息转化为二维或三维的光学图像^[1]。

1997年, Caprioli等科学家首次将基质辅助激光解吸/电离质谱成像技术应用于组织样本中多种蛋白质和多肽的分子成像^[2],极大地推动了MSI技术的发展。目前,根据不同工作原理及离子化方法,MSI技术可分为二次离子质谱成像(SIMS-MSI)、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成像(DESI-MSI)3大类型。MSI技术在小分子研究

领域有助于解析代谢途径、揭示病理变化等;单细胞水平的MSI能够揭示细胞代谢异质性,在癌症、神经科学和精准医疗等领域具有重要意义^[3]。在恶性肿瘤研究中,可以解析肿瘤微环境中的代谢变化,深入研究肿瘤细胞与其微环境的相互作用^[4];在神经科学领域,单细胞MSI助力神经元功能状态的研究,提供神经活动的分子水平解析^[5]。此外,单细胞MSI还可应用于个性化药物筛选和治疗优化^[6],为精准医疗提供强有力的支持。

本文将综述近年来单细胞MSI领域的最新进展,主要包括MSI离子源的改造、单细胞成像分析方案及样品制备方法等。

1 单细胞水平质谱成像小分子电离技术

在MSI技术中,空间分辨率是衡量其成像性能的关键参数之一,直接决定了样品中可解析的最小空间。提高空间分辨率通常需要缩小光斑尺寸和步长,这使得单次采集的样品区域更小,

从而能够获得更精细的分子分布信息。然而,样品区域的缩小使从每个像素点解吸和电离的分子数量减少,进而导致质谱信号强度降低,影响检测灵敏度^[7]。近年来,随着解吸/电离方式、质量分析技术和样品制备方法的不断优化,MSI的空间分辨率已显著提升。

1.1 基质辅助激光解吸电离质谱成像技术

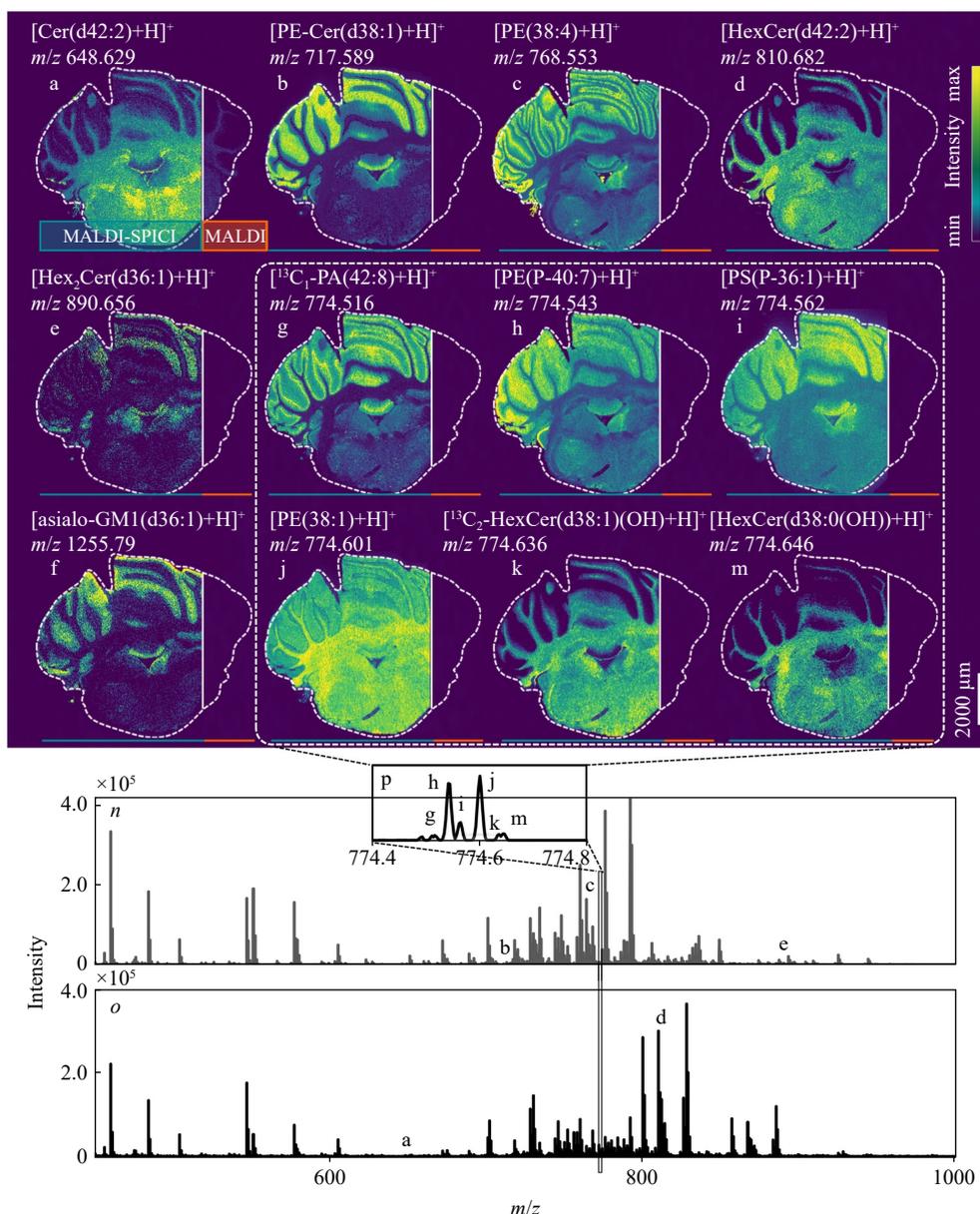
MALDI-MSI是目前应用最广泛且成熟的MSI技术之一^[8]。在MSI技术的改进中,最受关注的是空间分辨率的提升,其能够在单细胞成像中获得更精细的分子分布信息^[9]。Caprioli团队^[10]开发了一种真空透射几何离子源(t-MALDI MSI),能够将MALDI离子源中的激光束聚焦到直径小于10 μm,实现了亚细胞级空间分辨率成像。但当t-MALDI MSI像素尺寸减小时,离子丰度显著下降,导致目标化合物的信号丢失。为解决这一问题,引入了激光诱导后电离(MALDI-2)技术,其有效提升了离子丰度^[11]。Dreisewerd团队^[12]将这2种技术结合,开发了t-MALDI-2离子源,使MSI能够在亚细胞分辨率水平上分析组织和细胞中的脂质。通过在亚细胞水平上观察Vero B4细胞,正、负离子模式下分别检测到24种和12种不同的磷脂和糖脂,证明了t-MALDI-2-MSI技术在单细胞成像方面的巨大潜力。

除改造离子源方式外,Bookmeyer等^[13]提出了基于单光子诱导(SPICI)的化学电离技术,提高了高空间分辨率下的离子产率。在16 μm空间分辨率下,对小鼠脑和肾组织进行质谱成像分析,正、负离子模式下分别检测到约250和270种不同的脂质,覆盖度显著提升,示于图1。Zhang等^[14]开发了一种组织扩展质谱成像(TEMI)技术,通过水凝胶膨胀将细胞间距放大4~10倍,使50 μm激光束的等效分辨率达5~12.5 μm。这种“软加工”方法巧妙地规避了光学系统硬件的物理限制,为单细胞成像开辟了新路径。通过优化组织扩展和质谱成像方法,在单细胞水平上实现了脂质、代谢物、蛋白质和N-糖的高空间分辨率分布成像,成功揭示了脑组织不同功能层和肿瘤组织中的代谢异质性及生物分子的精细分布。此外,Joana等^[15]将MALDI-MSI与成像质谱细胞术(IMC)相结合,使用MALDI-MSI在5 μm空间分辨率下测得包括甘油磷脂类(如磷脂酰胆碱PC(37:5)和磷脂酰肌醇PI(34:1))在内的112种

代谢物;同时,利用IMC在1 μm空间分辨率下进行细胞表型的识别和分析。通过对这些数据的整合分析,揭示了不同细胞类型(如癌细胞、巨噬细胞、T细胞等)的代谢异质性,发现了特定细胞类型与特定代谢物的关联。

随着深度学习、图像分析及自动化数据处理技术的发展,计算机科学与质谱成像的交叉融合为突破单细胞分辨率瓶颈提供了全新路径。Esselman等^[16]提出利用自体荧光显微镜图像训练深度学习模型(Mask-RCNN)自动识别并分割人肾组织切片中的肾小球细胞,将分割后的肾小球区域扩展1.4倍后仅针对该区域进行数据采集,在5 μm空间分辨率下揭示肾小球硬化中脂质代谢异常。随后,该团队还提出一个简化的、基于显微镜驱动的MALDI-MSI数据采集工作流程,通过精确采样目标组织区域来优化从实验中获得的生物信息^[17]。

尽管真空MALDI-MSI取得了一些进步,但在接近生理条件下获得高质量、高信息量的生物分子的微米级空间分辨率质谱图仍是一个挑战。常压基质辅助激光解吸电离(AP-MALDI)技术的出现为解决这一问题提供了思路。AP-MALDI允许使用非挥发性和挥发性溶剂溶解样品^[18],且可获得细胞在接近生理条件下的代谢情况。Kompauer等^[19]在AP-SMALD-I10光源(TransMIT, Giessen, Germany)的基础上开发了一种新的MALDI-MSI源,将激光聚焦直径降低至1.4 μm,显著提高了成像的空间分辨率。后续工作中,他们又提出了自动对焦AP-MALDI-MSI系统,可为3D样品提供≤10 μm的横向分辨率^[20]。Lan等^[21]使用该技术在5 μm空间分辨率下揭示了乳腺癌类器官和正常乳腺类器官独特的脂质分布特征。Heiles等^[22]开发了一种新型AP-MALDI-MSI技术,使用213 nm波长激光及定制目标透镜,在小鼠脑和肾组织切片中实现了3 μm的有效空间分辨率。213 nm AP-MALDI-MSI技术结合高分辨率、高准确度的轨道阱质谱仪,能够清晰区分组织中的不同结构,如纤维束、颗粒层和分子层,示于图2,该技术为未来的MALDI-MSI研究提供了更高的空间分辨率和更广泛的应用前景。AP-MALDI-MSI通过光源革新与光学策略优化,正突破“高分辨率”与“生理兼容性”的长期矛盾,其在单细胞代谢



注: 通过单光子诱导后离子化增强-基质辅助激光解吸/电离 (MALDI-SPICI) (图像左侧 a~m), 在小脑和髓质的白质和灰质中发现了许多分析物的明显分布, 其中大多数分析物在普通 MALDI-MSI 中无法检测到 (图像右侧); 数据记录历时 42 h, 像素尺寸为 16 μm, 质量分辨率 (Res_m) 为 140 000, 重复频率 (f_{rep}) 为 300 Hz; (n, o): (n) 分子层和 (o) 白质记录的单像素点 MALDI-SPICI 质谱示例;

GM1=单唾液酸四己基神经节苷脂, PA=磷脂酸

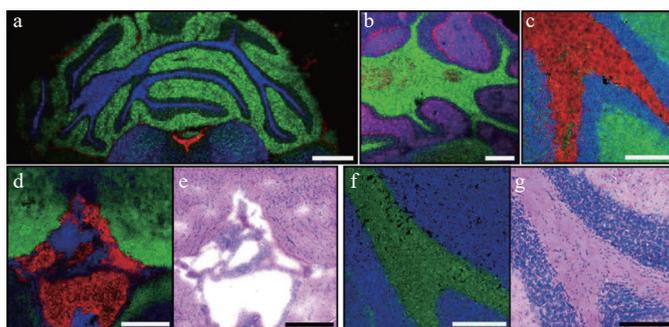
图 1 MALDI-SPICI-MSI 与常规 MALDI-MSI 对小鼠脑冠状切片的成像对比^[13]

Fig. 1 Comparison of MALDI-SPICI-MSI and conventional MALDI-MSI for imaging of mouse brain coronal sections^[13]

组学、肿瘤异质性解析等领域的应用, 将推动精准医学从组织水平向亚细胞尺度跨越。另外, Zhang 等^[23]将捕集离子迁移率分离与双极性电离技术相结合, 在质谱分析前对离子进行分离, 减少了离子抑制效应, 实现了单细胞脂质组的高通量原位分析。

此外, 还有一些 MALDI 的变体技术也具有

较高的分辨率, 如透射式大气压激光解吸电离/后光致电离质谱成像 (t-AP-LDI/PI MSI)。该技术结合了激光系统与真空紫外放电灯用于电离, 在 10 μm 空间分辨率下实现了小鼠小脑和人类黑色素瘤组织的生物分子分布可视化, 并通过优化参数, 在 4 μm 空间分辨率下观察了小鼠海马组织的物质分布^[24]。



注: a. 小鼠大脑小脑区域的 RGB MS 图像; b. 小脑部分区域的 RGB MS 图像; c. 小脑选定区域的 RGB MS 图像, 叠加[PI-Cer d40:0+H]⁺(*m/z* 866.6485)、[SM d36:1+K]⁺(*m/z* 769.5622)、[PC 38:6+K]⁺(*m/z* 844.5256) 3 种脂质分布; d. 外侧脑室的 RGB MS 图像; e. 图 d 中所示样本的 H&E 染色组织切片; f. 小脑选定区域的 RGB MS 图像, 叠加[PC 36:1+K]⁺(*m/z* 826.5723)、[PC 32:0+K]⁺(*m/z* 772.5253) 2 种脂质分布; g. 图 f 中所示样本的 H&E 染色组织切片

图 2 小鼠小脑的微米范围 MALDI-MSI^[22]

Fig. 2 Micrometer-range MALDI-MSI of mouse cerebellum^[22]

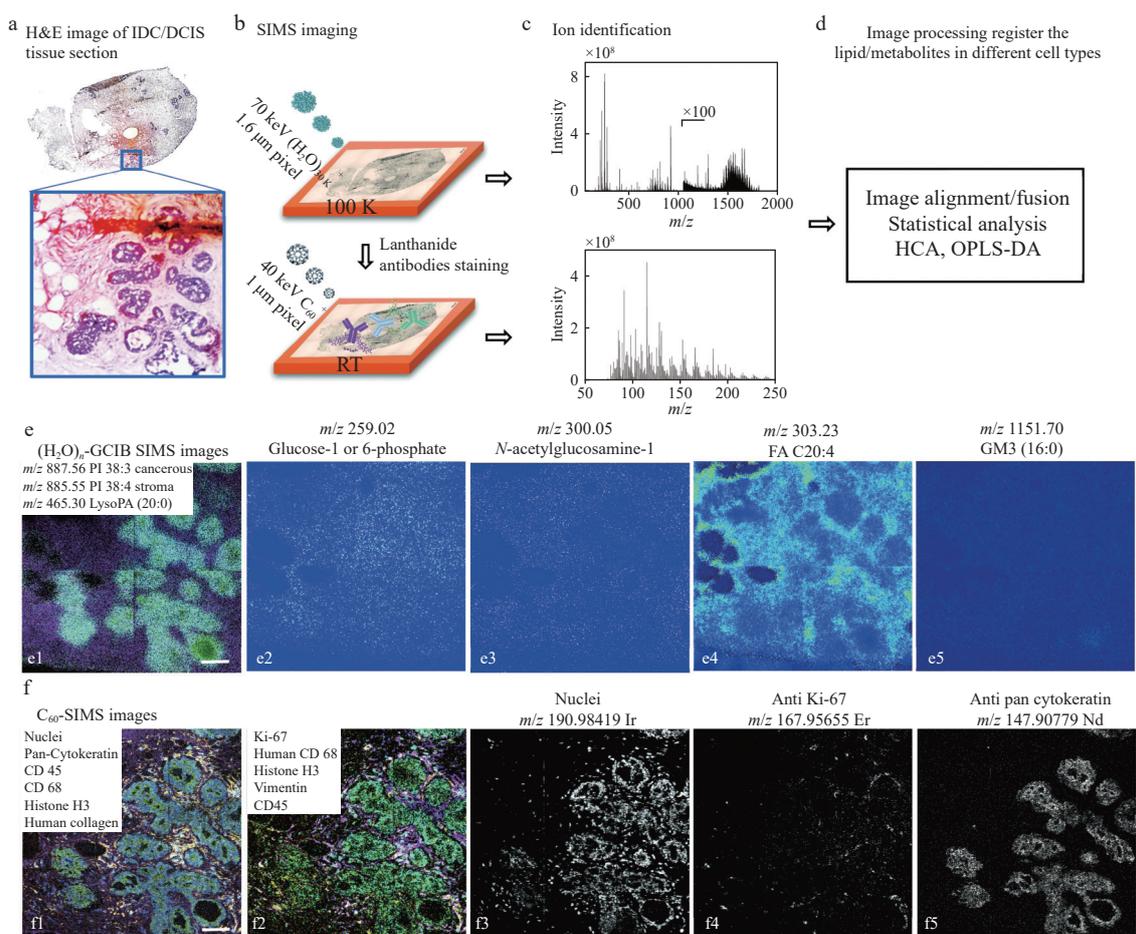
1.2 二次离子质谱成像技术

SIMS-MSI 是目前空间分辨率最高的质谱成像技术。近年来,通过优化气体团簇离子束(GCIB)显著提升了 SIMS 的检测能力。Winograd 团队^[25]提出 CO₂ 团簇离子束,凭借更强的范德华相互作用力增强团簇稳定性,以及弱酸性环境增强质子化效率,在 1 μm 空间分辨率下解析小鼠海马神经元细胞和大鼠脑组织细胞间隔中神经元中心肌磷脂和磷脂酰乙醇胺的亚细胞分布^[26]。利用 70 keV CO₂-GCIB 首次实现了 HeLa 细胞内嘌呤的空间构象可视化及代谢中间体 5-氨基咪唑-4-羧酰胺核糖核苷酸的亚细胞定位^[27],揭示了代谢通道的动态调控机制。该技术还成功追踪了顺铂诱导的细胞膜脂质重组^[28]。尽管 CO₂-GCIB 在理论上可实现亚微米级空间分辨率,但其在极小检测区域内的离子产率较低,难以支持单细胞中低浓度生物分子的质谱检测。

为解决这一问题,Winograd 团队^[29-30]提出了 H₂O 团簇离子束,使离子产率提高 10~100 倍,实现了低浓度磷脂酰乙醇胺过氧化物的原位成像,为氧化应激相关疾病研究提供了直接分子证据。随后,该团队开发了一种双模式 SIMS 成像技术,通过结合水簇气体团簇离子束 (H₂O)_n-GCIB-SIMS 和 C₆₀-SIMS,在冷冻乳腺癌组织切片中实现了单细胞水平的脂质、代谢物共定位分析。(H₂O)_n-GCIB-SIMS 在导管原位癌(DCIS)区域检测到磷脂酰肌醇 PI(38:3)的特异性富集。进一步结合 C₆₀-SIMS 的抗体标记成像,发现 Ki-67 阳性增殖细胞空间分布与溶血磷脂酸 LysoPA(20:0)的空间共定位(*p*<0.01),揭示了该

脂质在肿瘤细胞增殖中的潜在调控作用^[31-32],示于图 3。Lagator 等^[34]发现,将适量的 CO₂ 掺杂到水团簇中可显著提高小分子药物的二次离子产率并提升成像分辨率,通过在亚微米空间分辨率对猪肝和小鼠脑组织切片进行分析,验证了掺杂 CO₂ 的水团簇在药物分析中的有效性。

Daphnis 等^[33]提出原位基质增强二次离子质谱(ME-SIMS)技术,通过使用 10 keV 的 Ar₃₀₀₀⁺团簇离子束,将 MALDI 基质直接沉积到生物组织样本表面,显著提高了质谱成像的灵敏度。在 10 μm 空间分辨率下,该技术在正、负离子模式下分别检测到 34 和 28 种脂质。Adolphs 等^[35]使用 α-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为基质,探究了不同大小的 Bi 和 Ar 簇离子对分子离子产率及完整脂质分子信号的影响。Boštjan 等^[36]使用一种被称为兆电子伏-二次离子质谱(MeV-SIMS)的金涂层辅助分子成像技术,通过在有机组织表面涂覆不同厚度的金层增强二次离子产率。研究发现,在 0.5~2 nm 金层厚度下,二次离子产率达到最高值,且样品信号强度提高了 5 倍。此外,Yuan 等^[37]还提出了基于飞行时间二次离子质谱(TOF-SIMS)的成像分析方法——亚细胞增强分子成像(SEAM),创新性地将 SIMS-View、SIMS-Cut、SIMS-ID 三款自研计算模块集成于一体:首先,通过 SIMS-View 对全切片的质谱图像进行多通道可视化探索;然后,利用 SIMS-Cut 基于形态学和特征量自动分割出单个细胞核区域;最后,借助 SIMS-ID 对每个核区内的质谱指纹进行精确注释和定量。借助这一工作,在单细胞核水平上构建了包括肝脏功能性分



注: a. IDC/DCIS 组织半连续切片 H&E 染色; b. 多模态 SIMS 工作流程; c.d.e. 分子注释与空间分布; f. 抗体共定位显示

图3 单细胞水平多组学分析工作流程示意图及选定的叠加与单离子图像^[31]

Fig. 3 Schematic of the workflow on cell-type specific profiling of multi-omics on the IDC/DCIS tissue section at the single-cell level, and select overlay and single-ion images using $(\text{H}_2\text{O})_n$ -GCIB SIMS and C_{60} -SIMS^[31]

区、纤维化边界等多尺度空间代谢图谱,成功揭示了不同细胞亚群及其微环境中显著的代谢异质性,为组织代谢组学研究提供了更高分辨率和更丰富信息量的技术范式。

动态 SIMS 以纳米二次离子质谱(nanoSIMS)为代表^[38]。Levi-Setti 等^[39]于 1984 年使用 55 keV 液态金属 Ga^+ 离子束获得了约 100 nm 的横向分辨率;而 Malherbe 等^[40]引入射频等离子体 O^- 源后,横向分辨率可达到 50 nm。2024 年,Weber^[41]开发了高分辨率纳米二次离子质谱(NanoSIMS-HR),采用新设计的热离子化 Cs^+ 源,使得在 16 keV 冲击能量下横向分辨率提升至 25 nm,并在 30 nm 空间分辨率下解析出微藻细胞细胞壁上的小圆形特征。

1.3 解吸电喷雾电离质谱成像技术

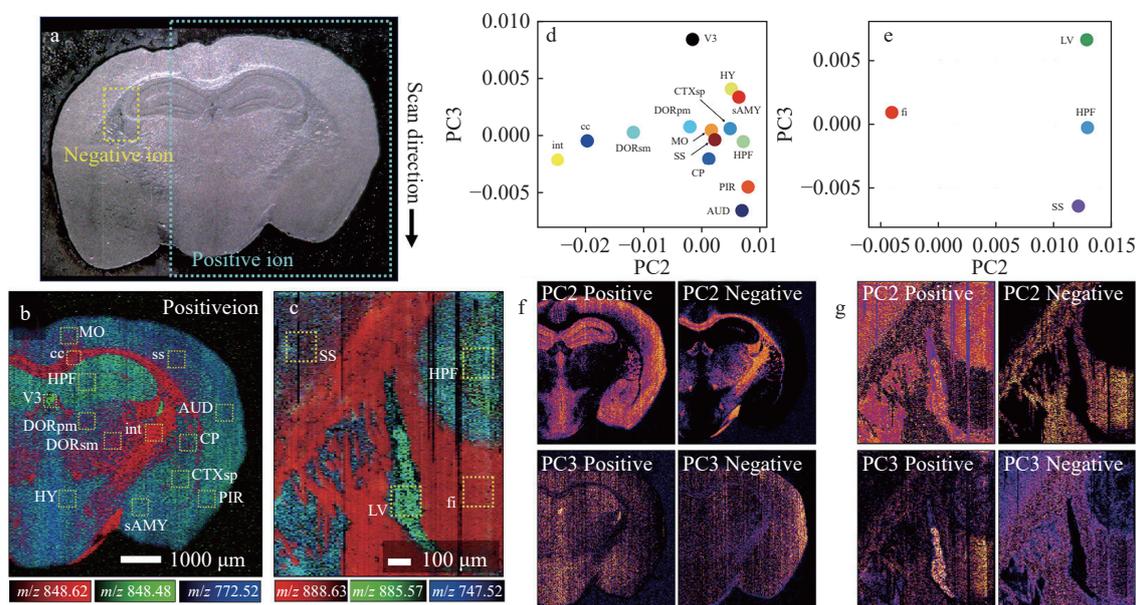
DESI-MSI 是基于环境电离的 MSI 主流方法

之一,具有对样品损伤最小的优点。2004 年, Cooks 等^[42]发明了 DESI 技术,并于 2006 年进一步将 DESI 源开发为成像工具^[43]。DESI-MSI 设备简便且可在常压下操作,是一种相对简单的成像方法。但由于喷雾大小和从大气到真空环境中传输效率的限制,该技术的典型空间分辨率约为 300 μm 。为提高传输效率,贺玖明团队^[44]开发了空气流辅助电离源(AFADESI),能够在开放空气中获取生物组织切片的高质量图像^[45]。通过严格优化毛细管溶剂,DESI 的空间分辨率可达 20 μm ^[46],但仍不足以完全区分细胞结构。后来,Laskin 等^[47]参照纳升电喷雾电离源(nano-ESI)构建了纳升解吸电喷雾电离(nano-DESI)源,通过在 2 根毛细管之间形成溶剂桥并接触样品以限制喷雾大小,实现分析物的解吸。由于主毛细管内径减小,喷射流非常细,且与样品接触的面积

非常小,因此纳升解吸电喷雾电离质谱成像(nano-DESI-MSI)的空间分辨率可达 $12\ \mu\text{m}$ ^[48]。此外,他们利用剪切力显微镜精确控制 nano-DESI 探针与样品表面之间的距离在 $1\ \mu\text{m}$ 以内,将 nano-DESI-MSI 的空间分辨率进一步提升至 $10\ \mu\text{m}$ 以下^[49]。通过进一步缩小主通道和喷雾通道尺寸、重新设计采样端口结构并缩短喷雾通道长度,该团队设计了集成微流控探针(iMFP),实现了 $8\sim 10\ \mu\text{m}$ 的空间分辨率,并对小鼠子宫组织中的脂质进行高空间分辨率成像,提供了用于组织细胞类型标定的分子特征图谱^[50]。然而,这种方式的样品采集和电离过程是分开的,所需

时间比一步电离更长,且2根毛细管需精确对准以确保采样效率。由于操作复杂性和环境不确定性,DESI-MSI 通常用于分析对空间分辨率要求适中的组织样本。

发展 DESI 变体技术可获得更高的空间分辨率,如单探针电喷雾电离(SPESI)通过将采样和电离过程集成于直径仅为 $6\ \mu\text{m}$ 的探针中,实现了 $8.5\ \mu\text{m}$ 的空间分辨率^[51];而轻敲模式扫描探针电喷雾电离(t-SPESI)采用电压驱动器控制纳升喷嘴探针进行轻敲振动,进一步将空间分辨率提升至 $6\ \mu\text{m}$,显著增强了成像精度和信噪比^[52],示于图4。



注: a. 小鼠脑组织切片的光学显微图像; b. c. 分别在正、负离子模式下获得的离子图像; d. e. 分别由图 b. c 中感兴趣区域(ROI)的质谱主成分分析(PCA)获得的评分图; f. g. 分别在正、负离子 MSI 数据的 PC 图像

图4 t-SPESI 质谱成像^[52]

Fig. 4 t-SPESI mass spectrometry imaging^[52]

2 单细胞质谱成像样品制备与预处理技术

根据单个细胞的大小,有2种主要的质谱成像方案。第1种方案是分离待分析的单个细胞,将其转移至与质谱兼容的载玻片上,然后对分离的单个细胞进行成像分析,其适用于分析较大尺寸且易分离的单细胞^[53],如单细胞真核生物和较大的神经元。Winograd 和 Ewing 团队^[54-55]利用 TOF-SIMS 技术对草履虫和四膜虫中的小分子化合物进行成像分析。Sweedler 等^[56]使用钨丝制成的尖针去除神经元,将其置于预先涂有聚赖氨酸的载玻片上,并采用 MALDI-MSI 技术对单个神经元不同区域的多肽进行成像分析。该方案

中,通常单张载玻片上仅有1个细胞,因此可将分子分布信息与单个细胞精准匹配,从而确保获得的质谱信息来自所选细胞。另一种成像方案更适用于尺寸小于 $30\ \mu\text{m}$ 的哺乳动物细胞,这种细胞难以单独分离。因此,在分析过程中,将细胞培养在与成像质谱兼容的载玻片上形成1个细胞群落,然后对这些包含多个细胞^[57]的细胞群落进行质谱成像分析。在导电载玻片上对细胞群落进行成像分析,可以在1次实验中获得大量的细胞分子信息。总的来说,这2种成像方案各具优点,根据不同的细胞特性选择合适的成像方案可以提高实验效率。

在单细胞 MSI 中, 细胞样品的制备是整个实验过程的关键环节。先进的样品制备方法不仅能够简化实验操作、提高实验效率, 还可以检测到细胞内部更多的分子信息。下面将介绍近年来在 MALDI 和 SIMS 技术中提出的创新样品制备方法。

在样品板上涂覆基质是 MALDI-MSI 分析的关键步骤。选择适当的基质(表 1)和沉积方法能够减少甚至避免分析物的损失, 促进分析物的有效电离, 从而获得更高质量的图像^[58]。对于 5 μm 以下的 MALDI-MSI, 基质层厚度至关重要。基质涂覆有基质升华和基质溶液喷雾 2 种常用方法。其中, 基质升华的优点是便于控制基

质层厚度, 但得到的信号强度较低; 与升华法^[19]相比, 基质溶液喷雾方法可以显著增强磷脂的信号。综上所述, 对于单细胞 MALDI-MSI, 需根据细胞特性对基质选择和涂覆方法进行优化, 以更好地获得单细胞和亚细胞水平上的化合物分布。2023 年, Yang 等^[59]开发了一种名为荧光引导的单细胞 MALDI 质谱成像(FluoMALDI)显微镜技术的新方法, 通过将荧光显微镜与 MALDI 成像相结合, 实现了对同一生物样本的多模态成像, 并利用多种荧光染料(如 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Fluorescein 等)和 MALDI 基质(如 CHCA、9AA 等)验证了 FluoMALDI 技术的荧光增强效果。

表 1 用于 MALDI 生物分子检测的常用基质

Table 1 Common MALDI matrices used for biomolecule detection

基质缩写 Abbreviation of matrix	基质全称 Full name of matrix	目标分子类型 Target molecule type	离子化模式 Ionization mode
DHB	2,5-二羟基苯甲酸	脂质、糖类、多肽	+/-
CHCA	α -氰基-4-羟基肉桂酸	脂质、代谢物、蛋白质	+
9-AA	9-氨基吡啶	脂质、代谢物、蛋白质、糖类	-
NEDC	N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐	脂质、代谢物	-
2-MBT	2-巯基苯并噻唑	脂质	+
TCNQ	四氰基醌二甲烷	药物	-
DHA	2,5-二羟基苯乙酸	脂质、蛋白质、多肽	+
NOR	去甲哈尔满(β -咔啉)	脂质、生物碱	+
SA	3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸	蛋白质、多肽	+
1,5-DAN	1,5-二氨基萘	脂质、极性小分子	+/-
DCTB	反式-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈	脂质	+

SIMS-MSI 的优点是无需基质, 但其需在超高真空环境中运行, 为了将细胞引入该环境, 通常需要进行化学固定、物理冷冻或干燥处理, 这一过程可能会破坏细胞原有的分子组成和分布。同时, 真空条件下细胞无法存活, 因此在超高真空环境下对活细胞进行质谱成像是一项巨大的挑战。Moon 等^[60]使用单层石墨烯包裹细胞, 保持活跃和湿润状态, 从而提高成像效果。将湿润的细胞置于涂有胶原蛋白的湿基质上, 细胞培养基的顶部设有微孔; 随后在细胞上覆盖 1 层石墨烯, 保护细胞免受干燥和细胞膜降解的影响。采用该方法制备的细胞可在超高真空环境中存活 10 min, 该团队在这种环境下进行了长达 30 min 的模拟实验, 活细胞膜未见明显变形。该技术能够在无任何标记的情况下, 在未经

处理的湿细胞膜上观察到胆固醇、磷酸乙醇胺及各种脂肪酸的分子分布。

3 基于单细胞质谱成像的小分子检测在揭示关键生物学过程中的应用

随着仪器空间分辨率和灵敏度的提升, MSI 已成为揭示生命科学奥秘的前沿技术。细胞异质性在活体中普遍存在, 深入了解单个细胞的代谢活动不仅能够揭示致癌机制, 还能推动靶向药物的研发。

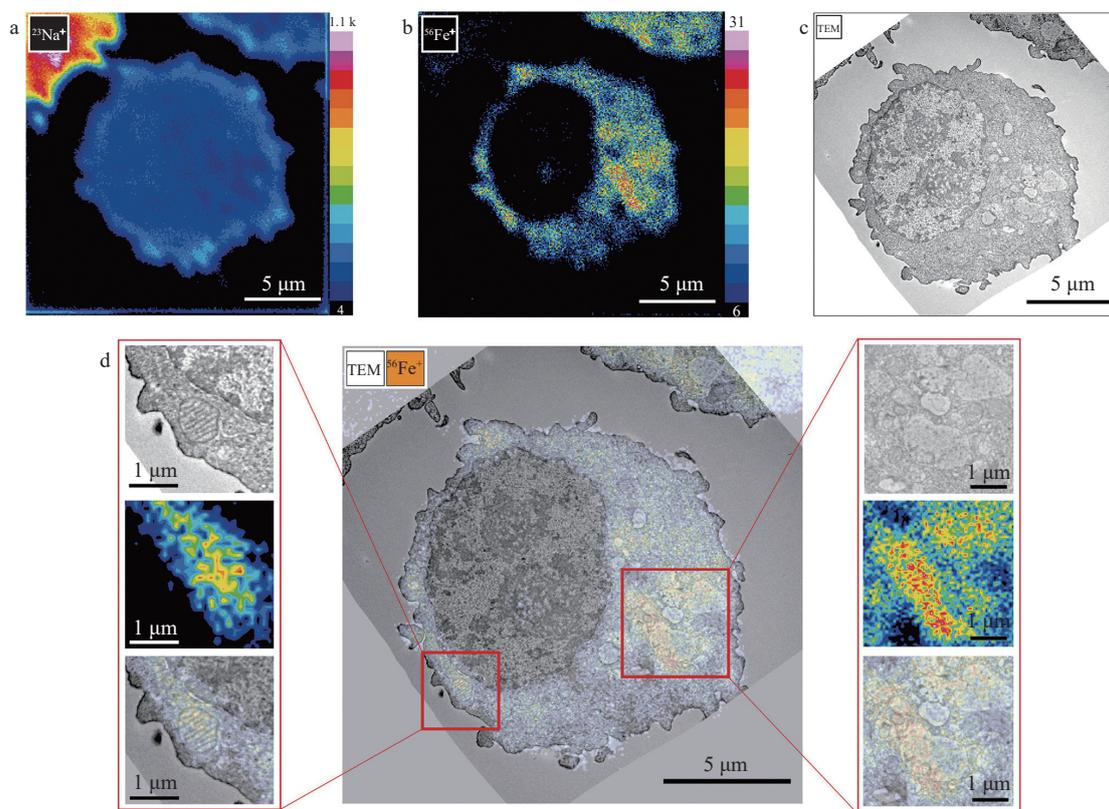
在亚细胞尺度的微量元素定位分析方面, Malherbe 等^[40]应用 nanoSIMS 技术对绿藻和拟南芥细胞中的微量元素进行定位, 发现钠、钙、磷及必需微量元素铁和铜在绿藻中呈现不同的分布特征; 对于拟南芥细胞, 锰、铁和铜等微量元素

在叶绿体中高度富集。Lovrić等^[61]采用 nanoSIMS 技术结合透射电子显微镜和背散射电子显微镜,建立了肺泡巨噬细胞中铁积累及亚细胞定位的研究方法,通过使用 nanoSIMS 和氦离子显微镜-二次离子质谱 (HIM-SIMS) 技术,发现铁主要积累在线粒体和类似囊泡的亚细胞区域中,示于图 5。该结果揭示了铁在亚细胞水平的代谢过程,并为降低过量铁负荷的细胞毒性提供了潜在的治疗靶点。

在代谢合成与动态分析方面,Chadwick 等^[62]采用同位素探针结合 nanoSIMS 技术分析生物膜的合成代谢活动,以研究细胞外电子转移和生物膜导电性。研究表明,与难溶电子受体在微米距离上的呼吸作用相关的生长抑制,对于优化微生物电化学装置及阐明微生物导电性现象的合成关系具有重要意义。Pareek 等^[27]通过 GCIB-SIMS 技术直接可视化了嘌呤酶复合体催化的嘌呤生物合成过程,发现嘌呤酶复合体中的 9 种酶协同

作用,指导代谢途径中的中间产物合成嘌呤核苷酸,增大途径流量,并影响腺苷酸单磷酸/鸟苷酸单磷酸的比例。该工作为理解嘌呤酶复合体对人类健康的重要性及其在侵袭性癌症中的作用提供了重要见解。Kompauer 等^[19]研发了大气压扫描微探针基质辅助激光解吸/电离质谱成像 (AP-SMALDI-MSI) 平台,识别了 220 多种脂质、代谢物和肽类的亚细胞分布,为区分草履虫中纤毛和口沟提供了创新方法。

在药物分布研究方面,Mamun 等^[63]采用 AP-MALDI-MSI 技术对小鼠肾脏中对乙酰氨基酚 (APAP) 及其代谢产物进行了 10 μm 空间分辨的成像分析,发现 APAP 主要在肾盂区域积累,而其代谢产物对乙酰氨基酚-半胱氨酸缀合物 (APAP-CYS) 在肾外髓和肾盂区域均有分布。此外,还发现了 1 种新的 APAP 代谢产物——APAP-丁基硫酸盐 (APAP-BS),并观察到其在肾脏、大脑和肝脏中的分布,揭示了 APAP 及其代



注: a. $^{23}\text{Na}^+$ 的离子图; b. $^{56}\text{Fe}^+$ 的离子图; c. 对应的 TEM 图像; d. TEM 图像与 $^{56}\text{Fe}^+$ 信号的叠加图

图 5 暴露于 500 μmol/L 柠檬酸铁铵(III)并经化学固定处理的肺泡巨噬细胞中铁元素的相关性透射电镜与纳米二次离子质谱成像分析^[61]

Fig. 5 Correlative TEM and NanoSIMS imaging of iron in alveolar macrophages exposed to 500 μmol/L ammonium iron(III) citrate and chemically fixed NanoSIMS imaging^[61]

代谢产物在肾脏中的分布差异,为理解 APAP 的药代动力学及潜在肾毒性提供了新的视角。Niehaus 等^[12]利用 t-MALDI-MSI 平台可视化了 Vero B4 细胞中多种磷脂和糖脂的分布。此外, Yin 等^[64]使用自制的近场激光解吸电离质谱(NDPI-MS)技术对 HeLa 细胞内的原黄嘌呤药物分布进行亚细胞多模态成像,发现药物分子主要位于细胞质中。随后, Cheng 等^[65]利用该仪器揭示了 2 种具有相似结构的萘啶类药物的差异性分布,强调了药物与生物环境相互作用的复杂性。Meng 等^[66]

通过微透镜光纤激光解吸电离-质谱成像(LDI-MSI)平台,阐明了纳米颗粒药物递送系统在细胞内的转运过程。这些研究展示了质谱成像技术在细胞和亚细胞水平上的强大应用潜力。从微量元素的亚细胞定位到药物代谢产物的分布(表 2),这些发现不仅为解析生物体系内的代谢过程提供了新的视角,也为开发新型治疗方法和药物递送系统提供了重要的科学依据。随着技术的不断进步,质谱成像有望在未来的生物医学研究中发挥更重要的作用。

表 2 基于单细胞质谱成像的小分子空间解析揭示关键生物学过程

Table 2 Key biological processes addressed by mass spectrometry imaging based small molecule spatial analysis at single-cell level

研究主题 Research topic	检测小分子类型 Type of detected small molecule	技术平台 Technology platform	生物学发现 Biological finding	应用价值 Application value
微量元素代谢调控	金属离子 (Fe, Cu, Mn, Na, Ca)	nanoSIMS HIM-SIMS	拟南芥叶绿体特异性富集 Mn/Fe/Cu; 肺泡巨噬细胞线粒体铁累积引发细胞毒性	解析铁过载疾病靶点
代谢通路动态可视化	同位素标记代谢物 嘌呤中间体 脂质/肽类	nanoSIMS GCIB-SIMS AP-SMALDI	生物膜长距离电子转移的代谢代价; 嘌呤酶复合体空间调控 AMP/GMP 比例; 草履虫纤毛脂质图谱定义亚结构	优化生物工程系统, 揭示癌症代谢重编程
药物空间药理学	药物原型及代谢物 磷脂/糖脂 原黄嘌呤药物 纳米颗粒药物	AP-MALDI- MALDI 近场 LDPI-MS 微透镜光纤 LDI	对乙酰氨基酚肾区分布差异; 原黄嘌呤胞质定位偏好; 萘啶类药物结构-分布相关性; 纳米载体胞内转运路径	指导肾毒性规避策略, 设计高效递送系统

近年来,随着技术的进步,高空间分辨率的多组学成像逐渐成为空间代谢组学中的强大技术手段。为进一步表征在自然组织环境中单细胞的大规模、无标记分子特征, Scupakov 等^[67]将形态测量图像分析与高空间分辨率 MALDI-MSI 相结合,对复杂组织背景下单个细胞的形态特征及单细胞特异性分子谱图进行分析,成功获得了多个具有细胞类型特异性的代谢图谱。Rappez 等^[68]开发了一种基于 MALDI-MSI 的开源方法 SpaceM,其结合荧光信号与形态空间特征,能够实现原位单细胞代谢组分析。Wang 等^[69]将 MALDI-MSI 与同位素示踪及多重免疫荧光染色相结合,检测了靶向细胞类型中的代谢变化和营养物质分配。这一单细胞水平的空间代谢组学技术进一步揭示了肾脏在损伤后修复及胚胎发育过程中的代谢轨迹^[70]。Li 等^[71]结合单细胞多组学分析与空间代谢组学技术,揭示了人体肾脏不同解剖区域的细胞异质性和代谢特征,发现即使是同一类型的肾小管上皮细胞,在不同的解剖区域也表现出不同的转录组、染色质可及性及

代谢组学特征。此外,研究还发现,疾病状态下近曲小管细胞的脂质代谢失调,并通过整合临床数据鉴定出与肾脏疾病进展相关的候选基因 PLEKHA1。这些发现为理解肾脏生理和病理机制提供了新视角,并为开发新型治疗策略提供了潜在靶点。

4 总结与展望

本文系统总结了单细胞领域 3 大核心技术的突破性进展: MALDI-MSI 通过透射几何离子源(t-MALDI-2)与激光后电离(MALDI-2)的协同创新,将空间分辨率提升至亚细胞尺度($<5\ \mu\text{m}$),同时拓展脂质/代谢物覆盖度,实现不同分子质量物质的深度覆盖; SIMS-MSI 凭借气体团簇离子束的工程化改造(如 $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ 掺杂策略),在维持 50 nm 超高分辨率的同时,将离子产率提升 10~100 倍,实现磷脂过氧化物等低丰度分子的原位成像,且可精细解析亚细胞元素动态; DESI-MSI 通过微流控探针与轻敲式扫描设计,突破常压成像分辨率极限($6\ \mu\text{m}$),为活细胞动态分析提

供新模式,可用于临床转化场景中的快速检测。3种技术各具优势、相互补充,共同构建了“亚细胞定位-单细胞代谢-组织微环境”的多尺度分子成像体系,推动空间代谢组学从“群体均值”向“单细胞异质性”的认知范式转变。

尽管 MSI 技术已取得显著进展,但仍存在3个瓶颈。其一,在灵敏度与分辨率的权衡上,亚微米尺度下离子通量骤减;以 CO₂-GCIB-SIMS 为例,低丰度分子的检测受限,亟待通过开发新型多模态离子源(如激光-团簇束复合电离)、增强后电离效率、结合离子迁移谱分离抑制效应等策略解决。其二,生理真实性存在缺失,因超高真空环境或复杂制样(如冷冻、固定)会破坏原位分子状态,导致活细胞动态监测受限,对此,优化石墨烯封装技术以实现近生理环境成像,以及发展常压原位代谢监测平台(如 AP-MALDI 联用微流控活细胞培养)是潜在的突破路径。其三,数据分析标准化不足,海量空间组学数据缺乏统一的分析框架,阻碍了跨平台结果的比较;未来需构建 AI 驱动的通用分析流程,并整合深度学习与多组学关联算法(如代谢-转录空间共定位)以攻克这一难题。随着跨学科融合的加速,单细胞 MSI 有望在精准医学等领域催生变革性突破。

参考文献:

- [1] WATROUS J D, DORRESTEIN P C. Imaging mass spectrometry in microbiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(9): 683-694.
- [2] CAPRIOLI R M, FARMER T B, GILE J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS[J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(23): 4 751-4 760.
- [3] XIE Y R, CASTRO D C, RUBAKHIN S S, TRINKLEIN T J, SWEEDLER J V, LAM F. Multiscale biochemical mapping of the brain through deep-learning-enhanced high-throughput mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(3): 521-530.
- [4] RIOS A C. Resolving the spatial heterogeneity of cancer in 3D[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2022, 22(10): 548-549.
- [5] BARRE F P Y, HEEREN R M A, POTOCHNIK N O. Mass spectrometry imaging in nanomedicine: unraveling the potential of MSI for the detection of nanoparticles in neuroscience[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(13): 1 974-1 984.
- [6] MENG Y Q, GAO C, LU Q, PANG Y, ZHANG L, LU X, LIANG G, SUN X L. Single-cell mass spectrometry imaging of multiple drugs and nanomaterials at organelle level[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8): 13 220-13 229.
- [7] DUNCAN K D, FYRESTAM J, LANEKOFF I. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics[J]. *The Analyst*, 2019, 144(3): 782-793.
- [8] CHUGHTAI K, HEEREN R M A. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 3 237-3 277.
- [9] BUCHBERGER A R, DeLANEY K, JOHNSON J, LI L. Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(1): 240-265.
- [10] ZAVALIN A, TODD E M, RAWHOUSER P D, HALL B, MCGEE J, MCMILLAN L E, KASZUBA E, MIKHAILOV V, LAZARUS P, CHEN Z, VENTER A R, CAPRIOLI R M. Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, 47(11): 1 473-1 481.
- [11] SOLTWISCH J, KETTLING H, VENS-CAPPELL S, WIEGELMANN M, MÜTHING J, DREISEWERD K. Mass spectrometry imaging with laser-induced postionization[J]. *Science*, 2015, 348(6 231): 211-215.
- [12] NIEHAUS M, SOLTWISCH J, BELOV M E, DREISEWERD K. Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 925-931.
- [13] BOOKMEYER C, RÖHLING U, DREISEWERD K, SOLTWISCH J. Single-photon-induced post-ionization to boost ion yields in MALDI mass spectrometry imaging[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61(34): 1-10.
- [14] 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.
- [15] NUNES J B, IJSSELSTEIJN M E, ABDELAAL T, URSEM R, van der PLOEG M, GIERA M, EVERTS B, MAHFOUZ A, HEIJS B, de MIRANDA N F C C. Integration of mass cytometry and mass spectrometry imaging for spatially resolved single-cell metabolic profiling[J]. *Nature Methods*, 2024, 21(10): 1 796-1 800.
- [16] ESSELMAN A B, PATTERSON N H, MIGAS L G, DUFRESNE M, DJAMBAZOVA K V, COLLEY M E, van de PLAS R, SPRAGGINS J M. Microscopy-directed imaging mass spectrometry for rapid high spatial resolution molecular imaging of glomeruli[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(7): 1 305-1 314.
- [17] ESSELMAN A B, WARD M S, MARSHALL C R, PINGRY E L, DUFRESNE M, FARROW M A, SCHRAG

- M, SPRAGGINS J M. A streamlined workflow for microscopy-driven MALDI imaging mass spectrometry data collection[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2024, 35(12): 2 795-2 800.
- [18] ZHANG J, LAMOTTE L, DODDS E D, LEBRILLA C B. Atmospheric pressure MALDI Fourier transform mass spectrometry of labile oligosaccharides[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(14): 4 429-4 438.
- [19] KOMPAUER M, HEILES S, SPENGLER B. Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- μm lateral resolution[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(1): 90-96.
- [20] KOMPAUER M, HEILES S, SPENGLER B. Autofocusing MALDI mass spectrometry imaging of tissue sections and 3D chemical topography of nonflat surfaces[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(12): 1 156-1 158.
- [21] LAN C, PENG Y, ZUO H, PEI J, LI Y, ZHANG T, WU H, DU L, ZENG C, ZHAO H, CHEN X, GAO H. Spatially lipidomic characterization of patient-derived organoids by whole-mount autofocusing SMALDI mass spectrometry imaging[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1 325: 342 989.
- [22] HEILES S, KOMPAUER M, MÜLLER M A, SPENGLER B. Atmospheric-pressure MALDI mass spectrometry imaging at 213 nm laser wavelength[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(2): 326-335.
- [23] ZHANG H, LIU Y, FIELDS L, SHI X, HUANG P, LU H, SCHNEIDER A J, TANG X, PUGLIELLI L, WELHAM N V, LI L. Single-cell lipidomics enabled by dual-polarity ionization and ion mobility-mass spectrometry imaging[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5 185.
- [24] QI K, LV Y, XIONG Y, TIAN C, LIU C, PAN Y. Development of transmission ambient pressure laser desorption ionization/postphotoionization mass spectrometry imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(14): 5 489-5 498.
- [25] TIAN H, MACIĄŻEK D, POSTAWA Z, GARRISON B J, WINOGRAD N. CO_2 cluster ion beam, an alternative projectile for secondary ion mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2016, 27(9): 1 476-1 482.
- [26] TIAN H, SPARVERO L J, BLENKINSOPP P, AMOSCATO A A, WATKINS S C, BAYIR H, KAGAN V E, WINOGRAD N. Secondary-ion mass spectrometry images cardiolipins and phosphatidylethanolamines at the subcellular level[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(10): 3 156-3 161.
- [27] PAREEK V, TIAN H, WINOGRAD N, BENKOVIC S J. Metabolomics and mass spectrometry imaging reveal channeled *de novo* purine synthesis in cells[J]. *Science*, 2020, 368(6 488): 283-290.
- [28] MOHAMMADI A S, LI X, EWING A G. Mass spectrometry imaging suggests that cisplatin affects exocytotic release by alteration of cell membrane lipids[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(14): 8 509-8 516.
- [29] SHERAZ S, TIAN H, VICKERMAN J C, BLENKINSOPP P, WINOGRAD N, CUMPSON P. Enhanced ion yields using high energy water cluster beams for secondary ion mass spectrometry analysis and imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(14): 9 058-9 068.
- [30] SPARVERO L J, TIAN H, AMOSCATO A A, SUN W Y, ANTHONYMUTHU T S, TYURINA Y Y, KAPRALOV O, JAVADOV S, HE R R, WATKINS S C, WINOGRAD N, KAGAN V E, BAYR H. Direct mapping of phospholipid ferroptotic death signals in cells and tissues by gas cluster ion beam secondary ion mass spectrometry (GCIB-SIMS)[J]. *Angewandte Chemie*, 2021, 133(21): 11 890-11 894.
- [31] TIAN H, SPARVERO L J, ANTHONY MUTHU T S, SUN W Y, AMOSCATO A A, HE R R, BAYIR H, KAGAN V E, WINOGRAD N. Successive high-resolution $(\text{H}_2\text{O})_n$ -GCIB and C_{60} -SIMS imaging integrates multi-omics in different cell types in breast cancer tissue[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(23): 8 143-8 151.
- [32] TIAN H, SHERAZ NÉE RABBANI S, VICKERMAN J C, WINOGRAD N. Multiomics imaging using high-energy water gas cluster ion beam secondary ion mass spectrometry $[(\text{H}_2\text{O})_n\text{-GCIB-SIMS}]$ of frozen-hydrated cells and tissue[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(22): 7 808-7 814.
- [33] LAGATOR M, PATEL B, SHERAZ S, LOCKYER N. Reactive gas cluster ion beams for enhanced drug analysis by secondary ion mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(38): 15 185-15 193.
- [34] DAPHNIS T, TOMASETTI B, DELMEZ V, VANVARENBERG K, PRÉAT V, THIEFFRY C, HENRIET P, DUPONT-GILLAIN C, DELCORTE A. Improvement of lipid detection in mouse brain and human uterine tissue sections using *in situ* matrix enhanced secondary ion mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(10): 2 259-2 268.
- [35] ADOLPHS T, HEEGER M, BOSSE F, RAVOO B J, PETERSON R E, ARLINGHAUS H F, TYLER B J. Matrix-enhanced SIMS: the influence of primary ion species and cluster size on ion yield and ion yield enhancement of lipids[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(10): 2 211-2 221.

- [36] JENČIČ B, PONGRAC P, VASIĆ M, STARIČ P, KELEMEN M, REGVAR M. Gold-assisted molecular imaging of organic tissue by MeV secondary ion mass spectrometry[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(10): 2 358-2 364.
- [37] 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 M Q. SEAM is a spatial single nuclear metabolomics method for dissecting tissue microenvironment[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(10): 1 223-1 232.
- [38] LI K, LIU J, GROVENOR C R M, MOORE K L. NanoSIMS imaging and analysis in materials science[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2020, 13(1): 273-292.
- [39] LEVI-SETTI R, WANG Y L, CROW G. High spatial resolution SIMS with the UC-HRL scanning ion microprobe[J]. *Le Journal de Physique Colloques*, 45(C9): C9-197-C9-205.
- [40] MALHERBE J, PENEN F, ISAURE M P, FRANK J, HAUSE G, DOBRITZSCH D, GONTIER E, HORRÉARD F, HILLION F, SCHAUMLÖFFEL D. A new radio frequency plasma oxygen primary ion source on nano secondary ion mass spectrometry for improved lateral resolution and detection of electropositive elements at single cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(14): 7 130-7 136.
- [41] WEBER P K, DEBLIQUI M, DEFOUILLOY C, MAYALI X, LIU M C, HESTRIN R, PETT-RIDGE J, STUART R, MORRIS M, RAMON C, JORGENS D M, ZALPURI R, ARNOLDI L, FARCY J, SAQUET N, VITCHER FICHOUS, RENAUD L, THOMEN A. The NanoSIMS-HR: the next generation of high spatial resolution dynamic SIMS[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(49): 19 321-19 329.
- [42] TAKÁTS Z, WISEMAN J M, GOLOGAN B, COOKS R G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. *Science*, 2004, 306(5 695): 471-473.
- [43] WISEMAN J M, IFA D R, SONG Q, COOKS R G. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2006, 45(43): 7 188-7 192.
- [44] HE J, TANG F, LUO Z, CHEN Y, XU J, ZHANG R, WANG X, ABLIZ Z. Air flow assisted ionization for remote sampling of ambient mass spectrometry and its application[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25(7): 843-850.
- [45] LUO Z, HE J, CHEN Y, HE J, GONG T, TANG F, WANG X, ZHANG R, HUANG L, ZHANG L, LV H, MA S, FU Z, CHEN X, YU S, ABLIZ Z. Air flow-assisted ionization imaging mass spectrometry method for easy whole-body molecular imaging under ambient conditions[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(5): 2 977-2 982.
- [46] TILLNER J, WU V, JONES E A, PRINGLE S D, KARANCSI T, DANNHORN A, VESELKOV K, MCKENZIE J S, TAKATS Z. Faster, more reproducible DESI-MS for biological tissue imaging[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(10): 2 090-2 098.
- [47] ROACH P J, LASKIN J, LASKIN A. Nanospray desorption electrospray ionization: an ambient method for liquid-extraction surface sampling in mass spectrometry[J]. *The Analyst*, 2010, 135(9): 2 233-2 236.
- [48] LASKIN J, HEATH B S, ROACH P J, CAZARES L, JOHN SEMMES O. Tissue imaging using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(1): 141-148.
- [49] YIN R, BURNUM-JOHNSON K E, SUN X, DEY S K, LASKIN J. High spatial resolution imaging of biological tissues using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(12): 3 445-3 470.
- [50] LI X, HU H, LASKIN J. High-resolution integrated microfluidic probe for mass spectrometry imaging of biological tissues[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1 279: 341 830.
- [51] RAO W, PAN N, YANG Z. High resolution tissue imaging using the single-probe mass spectrometry under ambient conditions[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015, 26(6): 986-993.
- [52] OTSUKA Y, KAMIHORIUCHI B, TAKEUCHI A, IWATA F, TORTORELLA S, MATSUMOTO T. High-spatial-resolution multimodal imaging by tapping-mode scanning probe electrospray ionization with feedback control[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2 263-2 272.
- [53] CASTRO D C, SMITH K W, NORSWORTHY M D, RUBAKHIN S S, WEISBROD C R, HENDRICKSON C L, SWEEDLER J V. Single-cell and subcellular analysis using ultrahigh resolution 21 T MALDI FTICR mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(17): 6 980-6 988.
- [54] COLLIVER T L, BRUMMEL C L, PACHOLSKI M L, SWANEK F D, EWING A G, WINOGRAD N. Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS[J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(13): 2 225-2 231.

- [55] OSTROWSKI S G, van BELL C T, WINOGRAD N, EWING A G. Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during *Tetrahymena* mating[J]. *Science*, 2004, 305(5 680): 71-73.
- [56] RUBAKHIN S S, GREENOUGH W T, SWEEDLER J V. Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(20): 5 374-5 380.
- [57] NIKITINA A A, van GROUW A, ROYSAM T, HUANG D, FERNÁNDEZ F M, KEMP M L. Mass spectrometry imaging reveals early metabolic priming of cell lineage in differentiating human-induced pluripotent stem cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(11): 4 880-4 888.
- [58] VALLIANATOU T, SHARIATGORJI M, NILSSON A, FRIDJONSDOTTIR E, KÄLLBACK P, SCHINTU N, SVENNINGSSON P, ANDRÉN P E. Molecular imaging identifies age-related attenuation of acetylcholine in retrosplenial cortex in response to acetylcholinesterase inhibition[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(12): 2 091-2 098.
- [59] YANG E, SHEN X E, WEST-FOYLE H, HAHM T H, SIEGLER M A, BROWN D R, JOHNSON C C, KIM J H, ROKER L A, TRESSLER C M, BARMAN I, KUO S C, GLUNDE K. FluoMALDI microscopy: matrix co-crystallization simultaneously enhances fluorescence and MALDI imaging[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(35): e2304343.
- [60] LIM H, LEE S Y, PARK Y, JIN H, SEO D, JANG Y H, MOON D W. Mass spectrometry imaging of untreated wet cell membranes in solution using single-layer graphene[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(3): 316-320.
- [61] LOVRIĆ J, NAJAFINOBAR N, KURCZY M E, de CASTRO O, BIESEMEIER A, von SYDOW L, KLARQVIST M, WIRTZ T, MALMBERG P. Correlative high-resolution imaging of iron uptake in lung macrophages[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(37): 12 798-12 806.
- [62] CHADWICK G L, JIMÉNEZ OTERO F, GRALNICK J A, BOND D R, ORPHAN V J. NanoSIMS imaging reveals metabolic stratification within current-producing biofilms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(41): 20 716-20 724.
- [63] MAMUN M A, RAHMAN M M, SAKAMOTO T, ISLAM A, OYAMA S, NABI M M, SATO T, KAHYO T, TAKAHASHI Y, SETOU M. Detection of distinct distributions of acetaminophen and acetaminophen-cysteine in kidneys up to 10 μm resolution and identification of a novel acetaminophen metabolite using an AP-MALDI imaging mass microscope[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(7): 1 491-1 500.
- [64] YIN Z, CHENG X, LIU R, LI X, HANG L, HANG W, XU J, YAN X, LI J, TIAN Z. Chemical and topographical single-cell imaging by near-field desorption mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2019, 58(14): 4 541-4 546.
- [65] CHENG X, YIN Z, RONG L, HANG W. Subcellular chemical imaging of structurally similar acridine drugs by near-field laser desorption/laser postionization mass spectrometry[J]. *Nano Research*, 2020, 13(3): 745-751.
- [66] MENG Y, CHENG X, WANG T, HANG W, LI X, NIE W, LIU R, LIN Z, HANG L, YIN Z, ZHANG B, YAN X. Micro-lensed fiber laser desorption mass spectrometry imaging reveals subcellular distribution of drugs within single cells[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2020, 59(41): 17 864-17 871.
- [67] ŠČUPÁKOVÁ K, DEWEZ F, WALCH A K, HEEREN R M A, BALLUFF B. Morphometric cell classification for single-cell MALDI-mass spectrometry imaging[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2020, 59(40): 17 447-17 450.
- [68] RAPPEZ L, STADLER M, TRIANA S, GATHUNGU R M, OVCHINNIKOVA K, PHAPALE P, HEIKENWALDER M, ALEXANDROV T. SpaceM reveals metabolic states of single cells[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 799-805.
- [69] WANG G, HEIJS B, KOSTIDIS S, MAHFOUZ A, RIETJENS R G J, BIJKERK R, KOUDIJS A, van der PLUIJM L A K, van den BERG C W, DUMAS S J, CARMELIET P, GIERA M, van den BERG B M, RABELINK T J. Analyzing cell-type-specific dynamics of metabolism in kidney repair[J]. *Nature Metabolism*, 2022, 4(9): 1 109-1 118.
- [70] WANG G, HEIJS B, KOSTIDIS S, RIETJENS R G J, KONING M, YUAN L, TIEMEIER G L, MAHFOUZ A, DUMAS S J, GIERA M, KERS J, CHUVA de SOUSA LOPES S M, van den BERG C W, van den BERG B M, RABELINK T J. Spatial dynamic metabolomics identifies metabolic cell fate trajectories in human kidney differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(11): 1 580-1 593.
- [71] LI H, LI D, LEDRU N, QIAO X, WU H, ASTHANA A, BYERS L N, TULLIUS S G, ORLANDO G, WAIKAR S S, HUMPHREYS B D. Transcriptomic, epigenomic, and spatial metabolomic cell profiling redefines regional human kidney anatomy[J]. *Cell Metabolism*, 2024, 36(5): 1 105-1 125.

(收稿日期: 2025-06-07; 修回日期: 2025-08-08)