

微流控螺旋芯片-质谱联用系统用于单细胞代谢组学分析

杨 燕, 牛姗姗, 魏榆珈, 陈明丽, 魏 星, 王建华

(东北大学理学院化学系分析科学研究中心, 辽宁 沈阳 110819)

摘要: 为揭示细胞间的代谢异质性, 更精准地理解生物过程和疾病机制, 本研究构建了一种高通量、无标记、高灵敏度的微流控螺旋芯片-质谱联用平台(μ CyESI-MS), 用于单细胞水平的代谢组学分析。该平台采用螺旋微流控通道实现细胞单分散聚焦排列, 结合鞘液辅助的在线裂解与提取, 实现了代谢物的即时释放与高分辨质谱检测, 检测通量可达约 30 cells/min。利用 μ CyESI-MS 平台对 3 种典型人癌细胞系(HeLa、HepG2 和 MCF-7)进行单细胞代谢谱采集, 检测并初步鉴定了氨基酸、小分子脂质、核苷酸、糖脂及磷脂等多类代谢物。结果显示, 脂质类代谢物在 3 种细胞类型间存在显著表达差异, 特别是磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)等结构脂质在细胞类型识别中具有良好的区分能力。该研究表明, μ CyESI-MS 平台在单细胞层面对复杂代谢特征的高通量检测和异质性解析具有应用潜力。

关键词: 单细胞代谢组学; 微流控芯片; 质谱; 细胞分型

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2025)06-0780-10

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0077 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0077

Coupling Spiral Microfluidic Chip and Mass Spectrometry for Single-Cell Metabolomics Analysis

YANG Yan, NIU Shan-shan, WEI Yu-jia, CHEN Ming-li, WEI Xing, WANG Jian-hua

(Research Center for Analytical Sciences, Department of Chemistry, College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Abstract: Single-cell metabolomics has emerged as a powerful tool to decipher cellular heterogeneity and uncover hidden biological processes at the individual cell level. However, achieving high-throughput and sensitive detection of metabolites from single cells remains a significant technical challenge. In this study, an integrated microfluidic chip-mass spectrometry platform (μ CyESI-MS) was developed that enables label-free, real-time, and high-throughput metabolic profiling of single cells. The μ CyESI-MS system utilizes a spiral microfluidic chip fabricated from polydimethylsiloxane (PDMS), featuring two inlets and one outlet for cell introduction, sheath fluid injection, and analyte collection, respectively. The 10-loop spiral channel efficiently aligns and focuses cells into a single-cell stream. Each cell is lysed on-chip by the sheath fluid, and the released intracellular metabolites are directly transferred into an electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MS) for immediate

analysis. This approach achieves a throughput of approximately 30 cells per minute, with minimal signal overlap and excellent detection sensitivity. This platform was applied to profile the metabolic fingerprints of three widely used human cancer cell lines, including HeLa, HepG2, and MCF-7. By matching accurate mass values with metabolite databases, a variety of metabolites were detected and identified, including tyrosine, carnitine, phosphocholine, glycerophosphocholine, acylcarnitine, glutathione, monoglyceride MG16, long-chain acylcarnitine, and lysophosphatidylcholine (LysoPC 16:0). Lipids, especially phosphatidylcholines (PCs) and sphingomyelins (SMs), are important components of the cell membrane and exhibit high ionization efficiency under positive ion mode. As a result, they are more readily detected by mass spectrometry, showing strong and specific signal responses. Dimensionality reduction using t-SNE revealed that the three cancer cell types could not be clearly separated in the small-molecule metabolite range (m/z 300-650), whereas the lipid-rich region (m/z 650-900) exhibited significant discriminatory power for cell-type classification. Ten representative lipid molecules with significant differences were selected, including PCs plasmalogen phosphatidylcholines (PC Ps), and SMs. Their relative abundances in HeLa, HepG2, and MCF-7 cells were compared, and their potential as biomarkers for cancer cell typing was evaluated. This study presents a robust and scalable platform for high-throughput single-cell metabolomics analysis. The μ CyESI-MS system integrates precise microfluidic cell handling with sensitive MS detection, offering new opportunities for exploring metabolic heterogeneity, discovering biomarkers, and improving our understanding of disease mechanisms at the single-cell level.

Key words: single-cell metabolomics; microfluidic chip; mass spectrometry; cell typing

细胞是生物体结构与功能的基本单位^[1-2],其代谢活动直接反映其生理或病理状态^[3]。传统代谢组学多以细胞群体为分析对象^[4],因而难以揭示细胞间潜在的代谢异质性^[5-6]。实际上,即便来源相同、表型一致的细胞,其代谢状态也可能存在显著差异^[7]。因此,在单细胞水平开展代谢组学研究,并揭示这种异质性具有重要意义^[8]。单个细胞体积小,所含代谢物种类多、结构复杂、丰度低且稳定性较差,对分析方法的响应能力、分辨率和覆盖度均提出了较高要求。

质谱技术因其高灵敏度、高分辨率和广泛的代谢物识别能力,已成为当前最具优势的单细胞代谢组学分析工具。电感耦合等离子体质谱^[9](ICP-MS)、二次离子质谱^[10](SIMS)、基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)^[11]和电喷雾电离质谱(ESI-MS)^[12]等技术已被广泛应用于单细胞层面的分子检测。其中,ICP-MS在痕量元素分析方面具有独特优势,常用于药物摄取或金属标记研究;SIMS和MALDI-MS具备空间成像能力,可用于单细胞代谢物定位检测,但其软电离程度有限,常对代谢物完整性造成影响;相比之下,ESI-MS离子化更温和,特别适用于极性较

强、分子质量较小的细胞内代谢物,因此成为使用最广泛的单细胞代谢组学检测方法之一。在ESI-MS基础上,研究者发展了多种微型化接口策略以实现单个细胞的在线裂解与分析,包括激光烧蚀-ESI-MS^[13]、单探针ESI^[14]、T探针ESI^[15]和毛细管电泳-ESI-MS^[16](CE-ESI-MS)等,这些策略具有高灵敏度和高选择性,但普遍存在检测通量低、操作复杂、细胞排列不稳定等局限^[17]。

流式质谱^[18](CyTOF)是一种功能强大的单细胞分析工具,其兼具ICP-MS和流式细胞术的特点,可在单细胞水平上同时检测多个蛋白^[19]和代谢标记物^[20-21],但通常需依赖荧光探针和质量标签^[22],难以有效覆盖结构复杂、丰度低、缺乏标签的代谢物,限制了其在代谢组学中的应用。为此,人们尝试将ESI-MS与流式细胞技术耦合^[23],以提高单细胞代谢物的分析通量、扩大代谢组覆盖范围并实现高灵敏检测^[24]。目前,已开发出以毛细管微通道为主的单细胞流排列系统耦合ESI-MS,实现了细胞类型的区分^[25]、细胞亚群的精细分型^[26]以及癌细胞中代谢异常的揭示^[27]。但是,这些方法只能提供单细胞代谢组学的静态描述,缺乏生物学途径的代谢活性信息。

为此,研究者们结合稳定同位素示踪法开发动态单细胞代谢组学,揭示了细胞间相互作用和异质性代谢活动^[8]。

本研究发展了一种微流控螺旋芯片-质谱联用平台(μ CyESI-MS),可对细胞悬浮液进行排列和聚焦,并以ESI-MS为检测器实现单细胞代谢组分析。该平台旨在实现高通量、快速的单细胞代谢组检测,在较短时间内获取大量单细胞的代谢信息,同时覆盖脂质、氨基酸、多肽、核苷酸及小分子脂质等多类型代谢物,以期揭示在单细胞水平下细胞代谢的异质性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Q Exactive™ Plus 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪:美国 Thermo Scientific 公司产品,配有ESI源及Xcalibur数据处理系统;毛细管(外径365 μ m,内径40 μ m):邯郸市永年区孟锐仪器科技有限公司产品;注射泵(Pump 11 Elite):美国 Harvard 公司产品;BX53M 正置荧光显微镜:日本 Olympus 公司产品;SW-CJ-2FD 超净台:江苏苏州安泰技术有限公司(中国)产品;HERA Cell 150 细胞培养箱、Countess II 细胞计数仪:美国 Thermo Scientific 公司产品;HVE-50 高压灭菌器:日本 Hirayama 公司产品。

微流控芯片单细胞流式质谱(μ CyESI-MS):通过注射泵注入细胞悬浮液,将其引入芯片中进行细胞的排列和聚焦。在鞘液入口处引入鞘液,对排列好的单细胞进行裂解和代谢物提取,随后将代谢物引入质谱仪进行检测。

1.2 主要材料与试剂

甲醇(质谱级)、甲酸铵、甲酸:美国 Thermo Scientific 公司产品;聚二甲基硅氧烷(PDMS, RTV 615)预聚体、固化剂:美国 Momentive Performance Materials 公司产品;表面氧化硅片:上海祥晶电子科技股份有限公司产品;SU8-2050 光刻胶:美国 MicroChem 公司产品;磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶、HeLa 细胞完全培养基、MCF-7 细胞完全培养基、HepG2 细胞完全培养基:武汉普诺赛生命科技有限公司产品;荧光微球(9.94 ± 0.76 μ m):美国 Bangs Laboratories 公司产品;细胞膜红色荧光染色试剂盒(Dil, Beyo3D™):上海碧云天生物技术有限公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 微流控芯片制备 采用PDMS标准软光刻技术制备本实验所需的微流控芯片。利用AutoCAD软件设计微流控芯片的具体结构图案,在透明薄膜(MicroCAD Photomask, Ltd., Suzhou, China)上打印微流控芯片的螺旋通道图案,制作成菲林掩膜。将硅片置于等离子清洗机中清洗,随后在硅片表面旋涂光刻胶进行前旋和后旋处理。将硅片放入烘胶台进行前烘,再在掩膜对准器(7 mW/cm², CETC, 中国)下通过紫外光照射,固化通道结构并使其与硅片结合。设定特定的温度和时间参数对硅片进行后烘,然后通过显影技术清除多余的通道结构部分。在烘胶台中以200 $^{\circ}$ C, 30 min 的条件进行硬烤坚膜处理。随后,将混合均匀的30 g PDMS 预聚物 RTV 615 A 胶和3 g B 胶(10:1, w/w)倾倒在硅片通道(即阳模)上,并置于模具培养皿中。经真空脱气处理1 h后,将模具在60 $^{\circ}$ C 烘烤90 min 以固化PDMS。将PDMS复制品从模具上剥离,并进行打孔、胶带除尘处理,再将PDMS复制品通道面与玻璃处理面进行封接。最终,将整个芯片在120 $^{\circ}$ C 烘烤1 h, 备用。

1.3.2 细胞培养与计数 本研究使用的细胞系来自中国医学科学院肿瘤医院。这些细胞系即MCF-7(乳腺癌细胞)、HepG2(肝癌细胞)、HeLa(宫颈癌细胞),在完全培养基和37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养,并每隔1天以1:2的比例传代,以维持其对数生长期。通过细胞计数仪计算细胞数,以获得单细胞代谢组学分析的最佳细胞密度($n=3$)。

1.3.3 细胞染色 使用Beyo3D™细胞膜红色荧光染色试剂盒,参照说明书对MCF-7细胞进行染色。具体操作如下:细胞经PBS洗涤、胰酶消化、离心后重悬于1 mL 染色溶液(含2.5 μ L 400 \times 染色增强液、5 μ L 200 \times Dil 染色液和992.5 μ L 染色缓冲液)中,室温避光衍生15 min,即可进行单细胞聚焦排列的显微成像。

1.3.4 细胞悬浮液制备 μ CyESI-MS 分析前,需制备新鲜的细胞悬液。用0.25%胰蛋白酶对细胞进行消化,以1 300 r/min 离心3 min 后弃去上清液,将细胞分散到PBS中。清洗步骤重复3次。将细胞重悬于140 mmol/L 甲酸铵水溶液(pH 7.3)中。在细胞注入芯片前,用140 mmol/L

甲酸铵水溶液彻底清洗芯片通道,待背景总离子色谱(TIC)稳定后,以 $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ 流速将细胞悬浮液引入装置。鞘液为含 0.1% 甲酸的甲醇溶液,用于破裂细胞并提取细胞代谢物,鞘液流速 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ 。

1.3.5 质谱条件 正离子模式采集数据,毛细管温度 $320\ ^\circ\text{C}$,毛细管电压 $3.5\ \text{kV}$,分辨率 $35\ 000$,自动增益控制(AGC)为 1×10^6 ,质量扫描范围 $m/z\ 150\sim 1\ 000$,最大注入时间 $50\ \text{ms}$,微扫描(Micro scan)为 1 。测量前,使用校准溶液对质谱进行校准。

1.3.6 数据分析 使用 Xcalibur 软件对原始数据进行 TIC 和提取离子色谱(EIC)的查看与提取,利用 SCMeTA 的 python 包^[28]对原始数据(.raw)进行数据导入、预处理、单细胞数据筛选及代谢物筛选。通过与人类代谢组数据库 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和 METLIN 代谢物数据库(<https://metlin.scripps.edu/>)等在线数据库的标准物匹配精确的质量数,实现代谢物的鉴定。最后,采用 t 分布随机邻居嵌入(t-SNE)算法对单细胞代谢组数据进行降维和可视化分析。

2 结果与讨论

2.1 单细胞聚焦排列系统

在离心作用的影响下,通道中心线附近流速较大的流体倾向于绕中心线向外流动,并迫使壁附近相对静止的流体向内循环,从而在径向形成2个对称涡流,即 Dean 流。前期研究^[29-30]表明,微流控芯片上的 Dean 二次流可以实现单个粒子或细胞的稳定聚焦。本工作设计的芯片具有2个入口和1个出口,分别用于细胞注入、鞘液注入和单细胞出口,示于图 1a。细胞悬浮液经入口引入 10 周期螺旋通道完成细胞排列与聚焦,通过 Comsol 模拟可知,在螺旋微柱的作用下二次流效果明显,示于图 1b;在 $1\sim 5\ \mu\text{L}/\text{min}$ 流速下,通道出口的荧光颗粒和细胞均聚焦排列良好(呈单颗粒流状态),证明该芯片可以稳定高效地实现单细胞排列,示于图 1c。

2.2 单细胞 $\mu\text{CyESI-MS}$ 检测的可行性分析

微流控芯片内集成的螺旋通道结构可有效将细胞排列为单个、完全分散的状态,有利于后续的单细胞操作。鞘液的引入可实现对单个细胞的在线裂解与代谢物提取。裂解后的代谢产

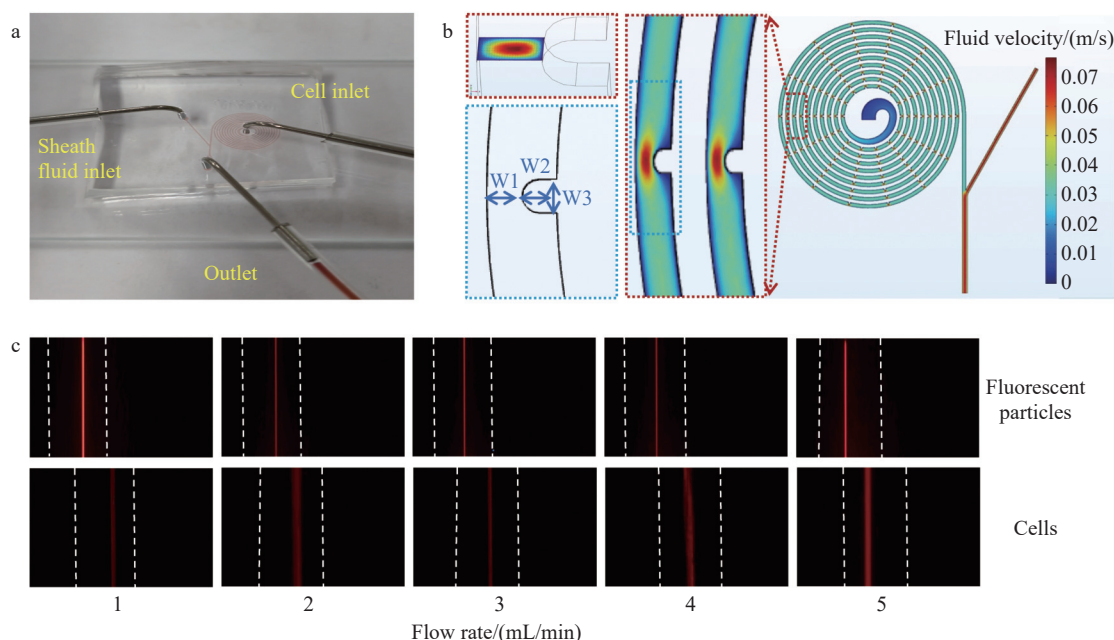


图1 螺旋通道微流控芯片实物图(a);芯片通道中流体的 Comsol 模拟图,以及通道结构图(通道宽度为 $100\ \mu\text{m}$,空间周期性限域微柱长度和宽度均为 $50\ \mu\text{m}$)(b);在 $1\sim 5\ \mu\text{L}/\text{min}$ 流速下,直径为 $9.77\ \mu\text{m}$ 的荧光颗粒和 Dil 染色的 MCF-7 细胞的荧光轨迹(c)

Fig. 1 Photograph of the microfluidic chip (a); simulation of the Dean flow in the channel by using Comsol, and diagram of channel structure ($W1$, $W2$, and $W3$ are all $50\ \mu\text{m}$) (b); fluorescence trajectory of the fluorescent particles with a diameter of $9.77\ \mu\text{m}$ and Dil-stained MCF-7 cells within the flow rate of $1\sim 5\ \mu\text{L}/\text{min}$ (c)

物随流体进入下游,并直接耦合至质谱仪进行分析检测。当单细胞进入分析通道并被裂解时,TIC图中会出现瞬时的信号脉冲,每个脉冲信号代表1个单细胞事件,示于图2a。考虑到脂质是细胞膜的主要组成成分,本研究选取了代表性磷脂酰胆碱类分子 m/z 760.58(PC 34:1)和 m/z 732.55(PC 32:1)的EIC图作为单细胞事件的标志,分别示于图2b、2c。结果显示,这2种特征脂质在单细胞事件中均呈现明显的信号响应,可作为单细胞裂解与代谢物释放的典型标志物。

在EIC中, m/z 760.58、732.55的频率与TIC相匹配,且在2个脉冲之间,EIC强度急剧下降为零,表明细胞事件之间几乎不存在重叠。对HeLa细胞在 m/z 760.58脉冲的零值(图3a)和峰值(图3b)时的对应质谱图进行分析,结果显示,仅在峰值时段呈现出明显的脂质信号群,验证了该系统能够实现单个细胞代谢物的高灵敏检测,且以脂质类代谢物为代表的特征峰在单细胞水平上可清晰捕捉。同时,在20 min内最高可检测到600多个单细胞事件,证明该方法能够

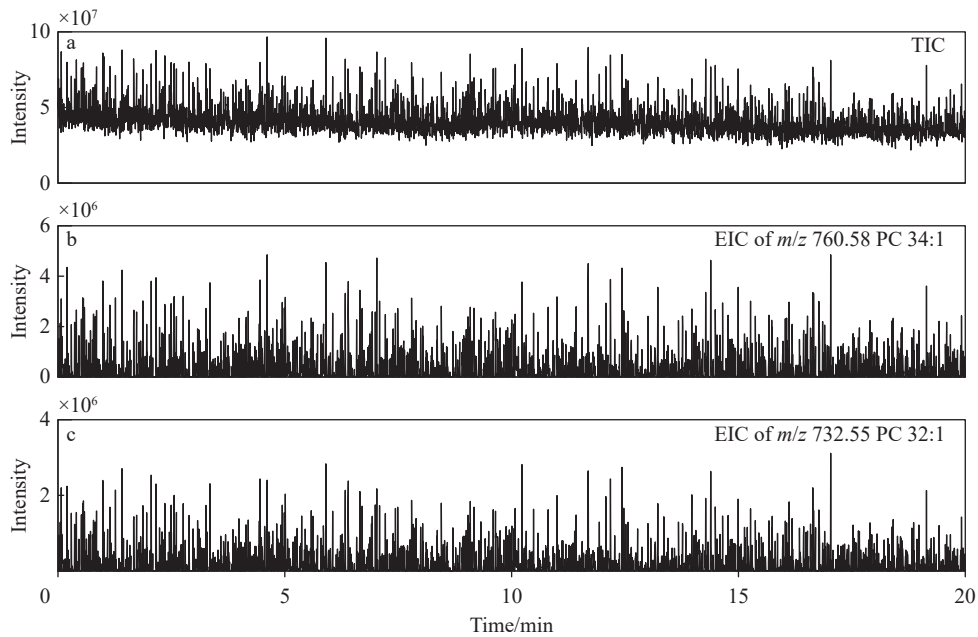


图2 单细胞 μ CyESI-MS 分析正离子模式下,HeLa 细胞的 TIC 图(a),PC 34:1(m/z 760.58)(b)和 PC 32:1(m/z 732.55)(c)的 EIC 图

Fig. 2 TIC of HeLa cells (a), and EIC of PC 34:1 (m/z 760.58) (b) and PC 32:1 (m/z 732.55) (c) for single-cell μ CyESI-MS analysis under positive ion mode

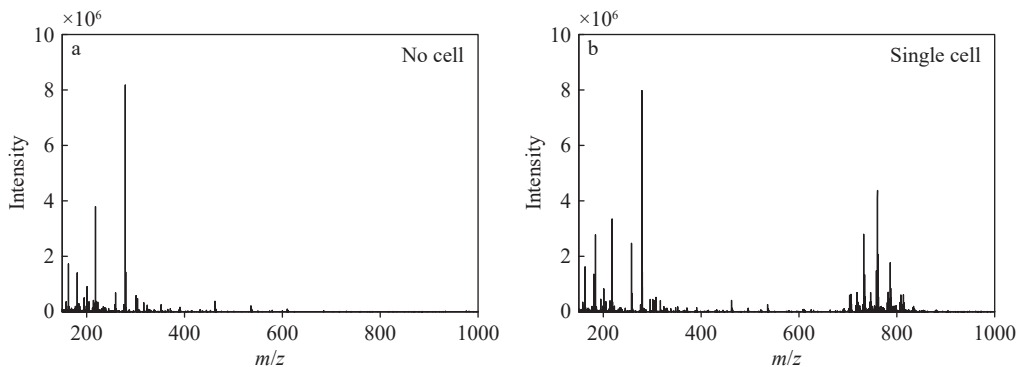


图3 正离子模式下,HeLa 细胞在 m/z 760.58 相邻2个脉冲之间的零值(a)和峰值(b)的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of HeLa cells in zero value (a) and peak value (b) between two adjacent pulses of m/z 760.58 under positive ion mode

以流式细胞术的方式高通量检测单细胞代谢物信号。

为进一步评估 μ CyESI-MS 分析单细胞的能力,将3种癌细胞制备的细胞悬浮液分别通入装置中进行单细胞代谢组分析。从原始质谱图中提取相应的代谢谱,分别对应 HepG2、HeLa 和 MCF-7 细胞的特征代谢谱,示于图 4a~4c。由于细胞在与鞘液的短暂提取过程中,细胞裂解有限,因此提取的代谢物主要来自细胞膜,这也是谱图中脂质信号占主导的主要原因。为验证所得信号来源于单个细胞而非细胞团块,进一步使用 140 mmol/L 甲酸铵缓冲液将细胞悬液稀释至不同浓度(5×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 cells/mL)并检测。如图 4d 所示,每分钟质谱响应的脉冲数与细胞浓度成正比。当细胞浓度达到 3×10^4 cells/mL 时,系统每分钟平均可检测到约 30 个单细胞事件,此时细胞在微流控芯片中呈现稳定的单分散状态,信号脉冲清晰、无重叠;而当浓度高于 4×10^4 cells/mL 时,观察到脉冲信号出

现重叠,且芯片中细胞排列紊乱。因此,本实验采用 3×10^4 cells/mL 的细胞浓度。

2.3 单细胞代谢谱分析

为评估所构建的微流控芯片-质谱联用系统在单细胞代谢物覆盖范围上的表现,选取 1 张典型的 HeLa 单细胞质谱图对代谢物进行鉴定与注释。基于高分辨质谱精确质量数与 HMDB 和 METLIN 等在线数据库中的标准物对代谢物进行匹配,同时结合群体代谢组数据以提升鉴定的准确性。HeLa 单个细胞在 m/z 150~900 范围内的质谱图示于图 5a,覆盖了大多数小分子代谢物及脂类分子的特征区域。将 m/z 300~650 范围内的特征峰响应强度放大 10 倍显示,并使用不同颜色标注各扫描区间,可有效提升谱图的可视化效果。

在 m/z 150~300 范围内,鉴定到多种常见小分子代谢物,包括氨基酸类(如酪氨酸 m/z 182.081 1)、类氨基酸(如肉碱 m/z 162.112 4),以及小分子脂质(如磷酸胆碱 m/z 184.073 3、甘油

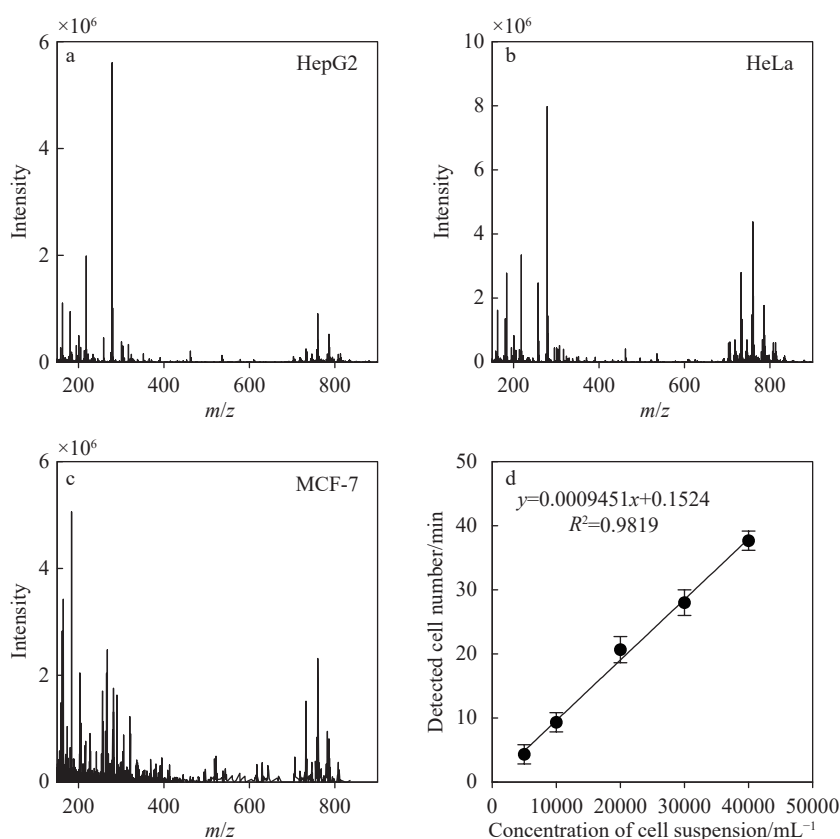


图4 HepG2(a), HeLa(b)和 MCF-7(c)的单细胞代谢谱,以及细胞浓度与细胞数的关系(d)
Fig. 4 Single-cell metabolic profiles of HepG2 (a), HeLa (b), MCF-7 (c), and the relationship between cell concentration and cell number (d)

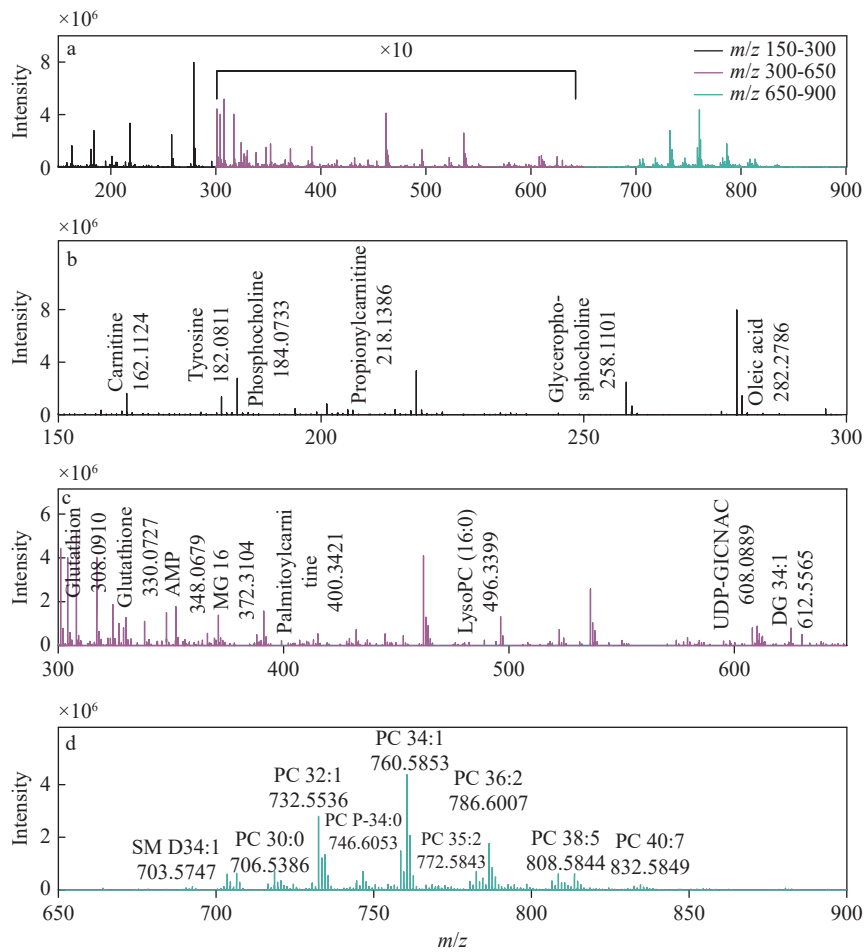


图5 HeLa单细胞的代谢物质谱图(a),以及在 m/z 150~300(b)、300~650(c)、650~900(d)范围内对主要的代谢物进行标记

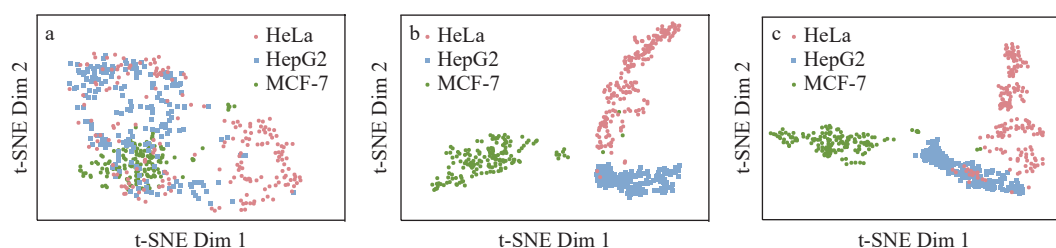
Fig. 5 Metabolic mass spectrum of HeLa single-cell (a), and labeling of major metabolites within the range of m/z 150-300 (b), 300-650 (c), 650-900 (d)

磷胆碱 m/z 258.110 1、酰基肉碱 m/z 218.138 6) 等, 示于图 5b。在 m/z 300~650 范围内, 识别到谷胱甘肽分子离子峰 (m/z 308.091 0) 及其钠离子加合物峰 (m/z 330.072 7)、核苷酸类(如腺苷一磷酸 AMP m/z 348.067 9)、糖脂类(如甘油糖脂 MG 16 m/z 372.310 4)、长链酰基肉碱 (m/z 400.342 1), 以及溶血磷脂 LysoPC(16:0) (m/z 496.339 9) 等代谢物, 示于图 5c。在 m/z 650~1 000 范围内, 检测到的多数信号归属于脂质类代谢物, 尤其是 PC 家族成员, 示于图 5d。PC 类分子为细胞膜的重要组成部分, 且在正离子模式下具有较高的离子化效率, 因此更易被质谱检测识别, 表现出强烈且特异的信号响应。

2.4 细胞类型的区分

为验证所采集的单细胞代谢谱是否具有区分

细胞类型的能力, 本研究选取 3 种来源不同的癌细胞, 即 HeLa ($n=200$)、HepG2 ($n=200$) 和 MCF-7 ($n=160$) 作为研究对象, 在正离子模式下获取其代谢指纹图谱, 并采用 t-SNE 算法对其进行降维处理, 以实现高维代谢信息在二维空间中的可视化。在 m/z 300~650 的小分子脂质区间内, 3 种细胞在二维投影中未能实现清晰分离, 呈现出较强的群体重叠, 表明该区间的代谢物不足以有效区分不同类型的癌细胞, 示于图 6a。然而, 在脂质类代谢物更为丰富的 m/z 650~900 区间内, 3 种细胞类型之间展现出明显的分离趋势, 揭示该区间内的代谢组分在 3 类细胞中存在较高的异质性, 具有较强的细胞类型区分能力, 示于图 6b。进一步将 2 个质量区间的代谢特征进行整合, 在 m/z 300~900 范围内, 3 类细胞在图中均



注: a. m/z 300~650; b. m/z 650~900; c. m/z 300~900

图 6 3 种样品的 t-SNE 分析

Fig. 6 t-SNE analysis of three samples

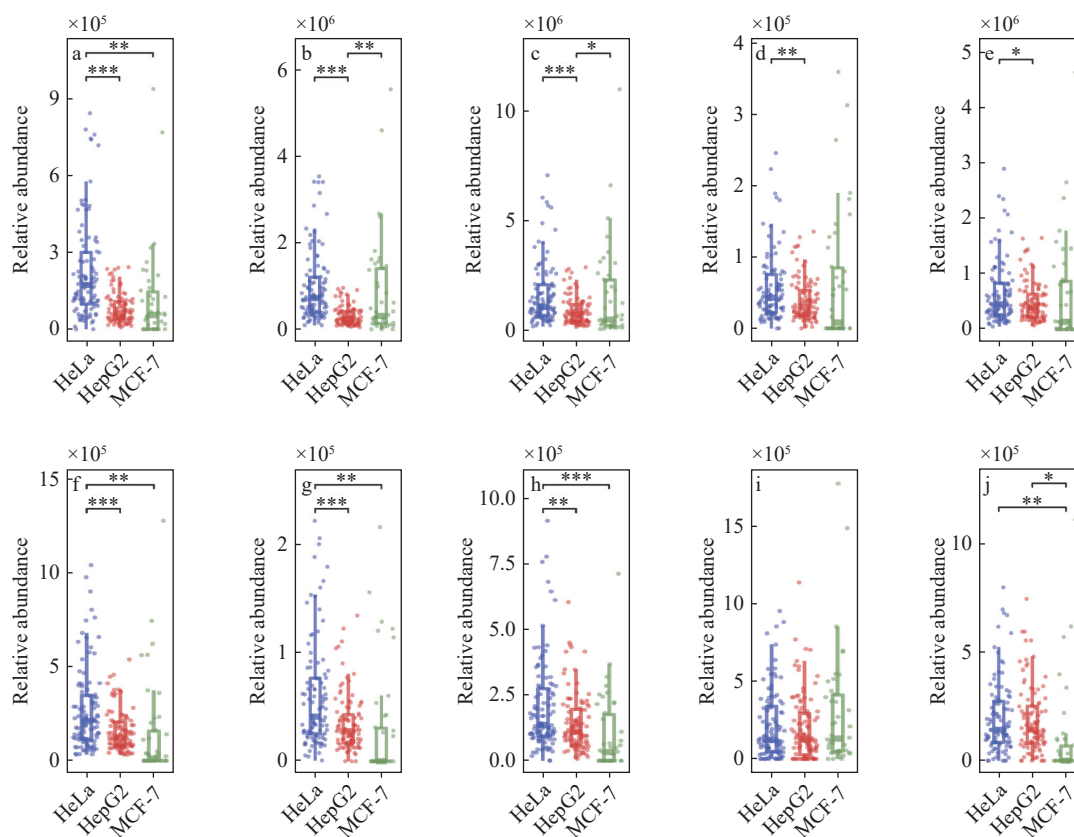
实现较为明确的聚类分布;结合全谱代谢信息后,单细胞代谢组数据可有效反映不同细胞间的代谢差异,示于图 6c。上述结果表明,所搭建的单细胞分析系统不仅具有较高的分辨率,而且可用于异质性细胞群体中不同类型细胞的识别和分类,能够实现单细胞水平下的代谢物检测。

2.5 脂质代谢在 3 种细胞中的表达

基于 t-SNE 降维结果表明,脂质类代谢物在区分不同细胞类型中具有关键作用,且脂质代谢

异常在肿瘤发生与进展过程中扮演着重要角色。为进一步验证不同类型癌细胞在脂质代谢水平上的异质性,本研究从单细胞代谢谱中筛选出 10 种具有显著差异的代表性脂质分子(包括 PC、PC P 以及 SM),比较其在 HeLa、HepG2 和 MCF-7 三种癌细胞中的相对丰度,示于图 7a~7j。

结果显示,大多数脂质分子在 3 类细胞间均存在显著的表达差异。其中,PC 30:0、PC 38:5、PC 40:7 以及 PC P-34:0 在 HeLa 细胞中的丰度显



注: a. PC 30:0; b. PC 32:1; c. PC 34:1; d. PC 35:2; e. PC 36:2; f. PC 38:5; g. PC 40:7; h. PC P-34:0; i. SM D 34:1; j. SM D42:2;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

图 7 10 种脂质在 HeLa、HepG2 及 MCF-7 细胞内的相对含量

Fig. 7 Relative abundances of ten lipids in HeLa, HepG2 and MCF-7 cells

著高于 HepG2 和 MCF-7, 提示 HeLa 细胞中存在活跃的脂质合成或富集机制, 示于图 7a, 7f~7h。此外, PC 32:1 和 PC 34:1 在 HeLa、MCF-7 细胞中的丰度显著高于 HepG2, 三者间具有统计学差异, 进一步体现了 HeLa 细胞特异性的脂质代谢特征, 示于图 7b、7c。PC 35:2 的表达水平在 3 种细胞中依次递减, 即 MCF-7>HeLa>HepG2, 显示出渐进式的变化趋势, 示于图 7d。而 PC 36:2 在 HeLa 细胞中的丰度显著高于 HepG2, 其他组间未显示显著差异, 表明该脂质在乳腺与宫颈癌细胞中可能具有相似的代谢特征, 示于图 7e。在 SM 方面, SM D34:1 在 3 类细胞中的相对丰度差异不显著, 表达水平相近, 示于图 7i; 而 SM D42:2 在 MCF-7 中的丰度显著低于 HeLa 和 HepG2, 示于图 7j。这些差异表达的脂质代谢物在单细胞层面展现出良好的细胞类型区分能力, 进一步证实了单细胞代谢组技术在揭示肿瘤细胞代谢异质性及识别潜在生物标志物方面具有重要应用前景。

3 结论

本研究开发的 μ CyESI-MS 平台为单细胞代谢组学分析提供了一种高通量、无标记且灵敏的方法。该平台通过集成微流控螺旋芯片与质谱系统, 实现了对单细胞代谢物的在线裂解、提取与即时检测, 能够全面覆盖多类代谢物, 并解析细胞间的代谢异质性。在对 HeLa、HepG2 和 MCF-7 三种典型癌细胞的分析中, 脂质类代谢物展现出良好的细胞类型识别能力, 进一步凸显了该平台在细胞异质性研究中的应用潜力。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] FESSENDEN M. Metabolomics: small molecules, single cells[J]. *Nature*, 2016, 540(7 631): 153-155.
- [3] NAJUMUDEEN A K, VANDE VOORDE J. Spatial metabolomics to unravel cellular metabolism[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2025, 26(4): 228.
- [4] LEONE R D, ZHAO L, ENGLERT J M, SUN I M, OH M H, SUN I H, ARWOOD M L, BETTENCOURT I A, PATEL C H, WEN J, TAM A, BLOSSER R L, PRCHALOVA E, ALT J, RAIS R, SLUSHER B S, POWELL J D. Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion[J]. *Science*, 2019, 366(6 468): 1 013-1 021.
- [5] MARJANOVIC N D, WEINBERG R A, CHAFFER C L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer[J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(1): 168-179.
- [6] NG N H J, TEO A K K. Heterogeneity and cell fate flux in single human pancreatic islet cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 222.
- [7] PLASS M, SOLANA J, ALEXANDER WOLF F, AYOUB S, MISIOS A, GLAŽAR P, OBERMAYER B, THEIS F J, KOCKS C, RAJEWSKY N. Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics[J]. *Science*, 2018, 360(6 391): eaaq1723.
- [8] ZHANG Y, SHI M, LI M, QIN S, MIAO D, BAI Y. Dynamic single-cell metabolomics reveals cell-cell interaction between tumor cells and macrophages[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4 582.
- [9] CORTE RODRÍGUEZ M, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ GARCÍA R, BLANCO E, BETTMER J, MONTES-BAYÓN M. Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS)[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(21): 11 491-11 497.
- [10] HUANG L, CHEN Y, WENG L, LEUNG M, XING X, FAN Z, WU H. Fast single-cell patterning for study of drug-induced phenotypic alterations of HeLa cells using time-of-flight secondary ion mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(24): 12 196-12 203.
- [11] NEUMANN E K, COMI T J, RUBAKHIN S S, SWEDLER J V. Lipid heterogeneity between astrocytes and neurons revealed by single-cell MALDI-MS combined with immunocytochemical classification[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2019, 58(18): 5 910-5 914.
- [12] 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.
- [13] SHRESTHA B, VERTES A. *In situ* metabolic profiling of single cells by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(20): 8 265-8 271.
- [14] SUN M, YANG Z. Metabolomic studies of live single cancer stem cells using mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2 384-2 391.

- [15] ZHU Y, LIU R, YANG Z. Redesigning the T-probe for mass spectrometry analysis of online lysis of non-adherent single cells[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 084: 53-59.
- [16] PORTERO E P, NEMES P. Dual cationic-anionic profiling of metabolites in a single identified cell in a live *Xenopus laevis* embryo by microprobe CE-ESI-MS[J]. *Analyst*, 2019, 144(3): 892-900.
- [17] QIN S, MIAO D, ZHANG X, ZHANG Y, BAI Y. Methods developments of mass spectrometry based single cell metabolomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 164: 117 086.
- [18] QIN S, ZHANG X, ZHANG Y, MIAO D, WEI W, BAI Y. Multi-dimensional bio mass cytometry: simultaneous analysis of cytoplasmic proteins and metabolites on single cells[J]. *Chemical Science*, 2025, 16(7): 3 187-3 197.
- [19] FUSCO L, GAZZI A, GIRO L, SCHEFER R B, D'ALMEIDA S M, CAGLIANI R, ZOCCHEDDU M, UYAR R, BESBINAR Ö, ÇELİK D, YILMAZER A, MITRANO D M, ORECCHIONI M, DELOGU L G. Nanoplastics: immune impact, detection, and internalization after human blood exposure by single-cell mass cytometry[J]. *Advanced Materials*, 2025, 37(12): e2413413.
- [20] LI Y, WANG B, AHMAD KHAN Z, HE J, CHEUNG E, SU W, WANG A, JIANG H, JIANG L, DING X. Platinum-chimeric carrier cells for ultratrace cell analysis in mass cytometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(40): 14 998-15 007.
- [21] DANG J, LI H, ZHANG L, LI S, ZHANG T, HUANG S, LI Y, HUANG C, KE Y, SHEN G, ZHI X, DING X. New structure mass tag based on Zr-NMOF for multiparameter and sensitive single-cell interrogating in mass cytometry[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(35): e2008297.
- [22] LIU Z, YANG Y, ZHAO X, WANG T, HE L, NAN X, VIDOVIĆ D, BAI P. A universal mass tag based on polystyrene nanoparticles for single-cell multiplexing with mass cytometry[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 639: 434-443.
- [23] LIU Q, GE W, WANG T, LAN J, MARTÍNEZ-JARQUÍN S, WOLFRUM C, STOFFEL M, ZENOBI R. High-throughput single-cell mass spectrometry reveals abnormal lipid metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2021, 60(46): 24 534-24 542.
- [24] HUANG Q, MAO S, KHAN M, ZHOU L, LIN J. Dean flow assisted cell ordering system for lipid profiling in single-cells using mass spectrometry[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(21): 2 595-2 598.
- [25] YAO H, ZHAO H, ZHAO X, PAN X, FENG J, XU F, ZHANG S, ZHANG X. Label-free mass cytometry for unveiling cellular metabolic heterogeneity[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9 777-9 783.
- [26] QIN S, ZHANG Y, SHI M, MIAO D, LU J, WEN L, BAI Y. In-depth organic mass cytometry reveals differential contents of 3-hydroxybutanoic acid at the single-cell level[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4 387.
- [27] SHEN Z, ZHAO H, YAO H, PAN X, YANG J, ZHANG S, HAN G, ZHANG X. Dynamic metabolic change of cancer cells induced by natural killer cells at the single-cell level studied by label-free mass cytometry[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(6): 1 641-1 647.
- [28] PAN X, PAN S, DU M, YANG J, YAO H, ZHANG X, ZHANG S. SCMeTA: a pipeline for single-cell metabolic analysis data processing[J]. *Bioinformatics*, 2024, 40(9): btae545.
- [29] WEI X, WEI Y, ZHANG X, WU , CHEN M, WANG J. A spiral microfluidic chip endows high efficiency single cell alignment at extremely low flow for ICP-MS analysis[J]. *Microchemical Journal*, 2023, 190: 108 635.
- [30] ZHANG X, WEI X, WU C, MEN X, WANG J, BAI J, SUN X, WANG Y, YANG T, LIM C, CHEN M, WANG J. Multiplex profiling of biomarker and drug uptake in single cells using microfluidic flow cytometry and mass spectrometry[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(8): 6 612-6 622.

(收稿日期: 2025-06-09; 修回日期: 2025-07-17)