

基于单细胞代谢组学的他莫昔芬抗乳腺癌作用机制研究

仇小丹, 张翼, 白玉

(北京大学化学与分子工程学院, 北京分子科学国家研究中心, 教育部生物有机与分子工程重点实验室, 北京 100871)

摘要: 雌激素受体阳性型是乳腺癌最常见的亚型, 以他莫昔芬为代表的内分泌治疗是针对该亚型乳腺癌患者的主要治疗手段。然而, 乳腺癌是一种高度异质性的疾病, 部分患者在接受他莫昔芬治疗后仍然面临复发的风险。本研究利用单细胞流式质谱装置, 考察他莫昔芬作用下 MCF-7 细胞代谢产物的变化情况。结果表明, 在正、负离子模式下分别鉴定到 576、480 种代谢物, 在对照组和他莫昔芬给药组的细胞中分别鉴定到 811、776 种代谢物。其中, 在负离子模式下检测到的代谢物能够实现他莫昔芬给药前后 MCF-7 细胞的显著区分。在他莫昔芬作用下, MCF-7 细胞中共有 28 种代谢物含量上调, 59 种代谢物含量下调, 主要影响氨基酸代谢、核苷酸代谢等代谢通路。本研究利用基于质谱的单细胞代谢组学技术考察他莫昔芬对乳腺癌细胞产生的代谢变化, 从单细胞代谢组学角度阐明他莫昔芬抗雌激素受体阳性型乳腺癌的作用机制, 可为研究其他药物的作用机制提供参考。

关键词: 单细胞代谢组学; 质谱; 乳腺癌; 他莫昔芬

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0785-08

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0169

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0169

Study on the Mechanism of Tamoxifen against Breast Cancer by Mass Spectrometry Based Single-Cell Metabolomics

QIU Xiao-dan, ZHANG Yi, BAI Yu

(Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, College of Chemistry and Molecular Engineering,
Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Breast cancer is a malignant tumor that predominantly affects women. The incidence of breast cancer has risen annually and is increasingly occurring in younger population, posing a significant threat to women's health. Estrogen receptor-positive breast cancer is the most prevalent subtype, accounting for 75% of all cases. Endocrine therapy, particularly with tamoxifen, serves as the primary treatment for these subtypes. However, due to the highly heterogeneous nature of breast cancer, some patients remain at risk for recurrence even after undergoing tamoxifen treatment. Therefore, it is essential to investigate the mechanism of tamoxifen in breast cancer treatment from a single-cell perspective. In comparison to single-cell genomics and single-cell proteomics, single-cell metabolomics can offer a clearer representation of the chemical changes occurring within individual

cells by measuring the end products of cellular activity—metabolites. Thus, this approach can provide a more direct reflection of the differences between cells. In this study, single-cell mass cytometry was employed to investigate metabolite alterations in MCF-7 cells upon exposure to tamoxifen, aiming to elucidate its mechanism from a single-cell perspective. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay was utilized to assess the impact of tamoxifen on MCF-7 cell proliferation and established optimal conditions for subsequent therapies involving these cells. The results showed that 576 metabolites under positive ion mode and 480 metabolites under negative ion mode are identified by using single-cell mass cytometry approach. In total, 811 metabolites are detected in MCF-7 cells without tamoxifen treatment compared to 776 metabolites identified following tamoxifen administration. It demonstrated that metabolites observed under negative ion mode effectively distinguish between MCF-7 cells treated with and without tamoxifen. Exposure to tamoxifen can result in upregulation of 28 metabolites and downregulation of 59 metabolites, and these changes predominantly influence metabolic pathways including taurine-hypotaurine metabolism, caffeine metabolism, cysteine-methionine metabolism, glycine-serine-threonine metabolism, purine metabolism, starch-sucrose metabolism, and pyrimidine metabolism. The findings indicated that the intervention of the aforementioned metabolites and metabolic pathways may represent one of the mechanisms through which tamoxifen exerts its effects against estrogen receptor-positive breast cancer. This study employed single-cell metabolomics based on mass spectrometry to explore the metabolic alterations in breast cancer cells induced by tamoxifen, which is often overlooked in metabolomics studies based on bulk cells. Furthermore, it elucidates the mechanism of tamoxifen's action against estrogen receptor-positive breast cancer from a single-cell metabolomic perspective, thereby provides valuable insights for understanding the mechanisms underlying other therapeutic agents.

Key words: single-cell metabolomics; mass spectrometry; breast cancer; tamoxifen

乳腺癌是好发于女性的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升及年轻化趋势,严重威胁女性健康^[1-3]。雌激素受体阳性是乳腺癌中最常见的一类,约占所有乳腺癌患者的75%^[1-3]。针对这类患者,临床上可通过内分泌治疗以调节患者的内分泌功能进而抑制雌激素分泌,最终实现对乳腺癌的治疗作用^[4]。他莫昔芬是一种非甾体类药物,可与雌二醇竞争性结合雌激素受体,通过调节雌激素表达水平而抑制肿瘤生长,是原发性乳腺癌辅助激素治疗的理想药物^[4]。乳腺癌是具有高度异质性的疾病^[5-6],采用相同的治疗方案治疗具有相同临床分期及病理类型的患者时,其敏感性及患者预后存在明显差异。因此,有必要从单细胞角度研究抗乳腺癌药物的作用机制。

与单细胞基因组学和单细胞蛋白质组学相比,单细胞代谢组学通过对细胞活动的终产物——代谢物进行测定,能够更明确地表达单个

细胞正在发生的化学变化过程,进而更直接地反映细胞间的差异^[7-8]。由于质谱(mass spectrometry, MS)具有灵敏度高、特异性强等特点,在单细胞代谢组学领域得到广泛应用和发展^[9-12]。与电化学及荧光法等单细胞检测技术相比,质谱法不依赖于分析物特定的理化性质及荧光分子标记,不仅能够一次检测中同时实现多种分析物的测定,还可以通过二级质谱实现对分析物的结构鉴定,是组学研究的有力工具^[9-12]。目前,已有应用多种质谱技术开展单细胞代谢组学研究的报道,例如电感耦合等离子体质谱^[13]、基质辅助激光解吸附质谱^[14]、二次离子质谱^[15]及电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)^[16]等。其中,ESI-MS技术能够实现细胞代谢物的原位、实时及快速测定,在单细胞代谢组学领域应用广泛。多种基于ESI-MS的技术已被开发,例如免标记单细胞质谱流式^[17]、活单细胞质谱^[18]、单探针质谱^[19]、活细胞电发射电离质

谱^[20-21]及有机质谱流式^[22-23]等。以上技术为单细胞代谢组学研究提供了有力工具,促进了单细胞代谢组学领域的发展。

本研究以基于ESI-MS的单细胞代谢组学为主要技术手段,利用单细胞流式质谱装置测定他莫昔芬作用下乳腺癌MCF-7细胞的代谢产物,考察他莫昔芬给药后细胞中各代谢物的变化情况,以期从单细胞代谢组学角度阐明他莫昔芬治疗乳腺癌的作用机制。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Q Exactive™组合型四极杆Orbitrap™质谱仪:美国Thermo Scientific公司产品;毛细管:美国Polymicro Technologies公司产品;聚醚醚酮

(PEEK)管:仪佳(北京)科技有限公司产品;金属三通:北京熊川科技有限公司产品。

单细胞流式质谱装置参照CyESI-MS搭建^[17],示于图1。通过带有磁力搅拌的压力注射池(0.1 MPa)驱动获得单细胞悬浮液,利用外径150 μm、内径50 μm的毛细管引入细胞悬浮液。用外径360 μm、内径200 μm的毛细管包裹内毛细管,通过连接金属三通阀引入鞘液。鞘气也通过三通阀引入,并用外径790 μm PEEK管包裹中间毛细管。尖端处内层毛细管出口比中间毛细管短4 mm,以使细胞悬浮液与鞘液充分接触而实现代谢物提取并形成稳定的电喷雾。中间毛细管出口伸出外层管2 mm,以在氮气作用下实现雾化。鞘气压强0.5 MPa,鞘液流速10 μL/min,磁力搅拌转速150 r/min。

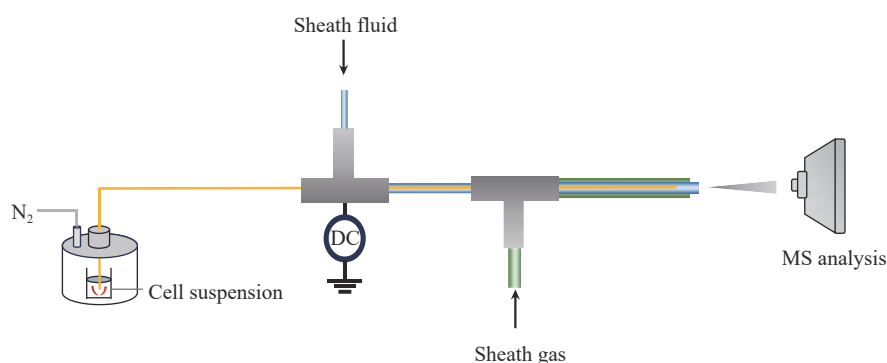


图1 单细胞流式质谱装置图

Fig. 1 Schematic of single-cell mass cytometry

1.2 主要材料与试剂

甲醇(质谱级)、甲酸铵、氨水、甲酸:美国Thermo Fischer公司产品;他莫昔芬:上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、胰蛋白酶:美国Cytiva公司产品;3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)细胞增殖与毒性检测试剂盒:上海贝博生物科技有限公司产品;Michigan Cancer Foundation-7(MCF-7)细胞及1640培养基:江苏凯基生物技术股份有限公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞培养与毒性测定 人乳腺癌细胞系MCF-7细胞培养在1640培养基(含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素)中,置于37℃、5%CO₂培养箱中。在测定细胞毒性时,取对数期的

MCF-7细胞接种到96孔板,过夜培养,使细胞完全贴壁。更换含有系列浓度他莫昔芬的新鲜培养基,继续培养24 h。向每孔中加入110 μL 5 g/L MTS的培养基溶液,培养箱中孵育1 h后,用酶标仪在490 nm条件下测定吸光度值。设置不含细胞的空白组及不含药物的对照组,空白组、对照组及实验组均设置3个复孔。

1.3.2 细胞给药 MCF-7细胞传代培养24 h后,将MCF-7培养基置换为含500 nmol/L他莫昔芬的培养基继续培养24 h。未经他莫昔芬处理的MCF-7细胞作为对照组。

1.3.3 细胞悬液制备 在开展CyESI-MS研究之前制备新鲜的细胞悬液。将生长至80%~90%密度的MCF-7细胞用胰蛋白酶充分酶解后,加入培养基淬灭。将上述溶液离心后弃去上清液,加入PBS使细胞重悬。

1.3.4 单细胞代谢物测定 在测定单细胞代谢物前,将分散在 PBS 中的细胞悬液置换至 140 mmol/L 甲酸铵溶液 (pH 7.3) 中。正离子模式下,鞘液为含 0.1% 甲酸的甲醇溶液;负离子模式下,鞘液为含 1% 氨水的甲醇溶液。

1.3.5 质谱参数 分别在正、负离子模式下采集数据。毛细管温度 320 °C,毛细管电压 ± 3.5 kV,分辨率设为 35 000,自动增益控制 (AGC) 为 10^6 ,最大注入时间 50 ms,微扫描为 1。

1.3.6 数据分析 首先,利用 MSConvert 软件 (ProteoWizard) 将 MS 原始数据转换成 mzML 格式。然后,利用名为 Pyteomics 的 Python 包读取 mzML 文件,并利用自开发的 Python 代码进行处理。使用细胞标志性代谢物 (正离子 m/z 760.584 4,负离子 m/z 306.076 0) 提取正、负离子模式下的单细胞事件,然后在每个单细胞事件中进行单细胞特征峰测定。提取所有单细胞脉冲中出现的峰后,在所有细胞中筛选出现频率 $> 20\%$ 及信噪比 > 3 的峰为单细胞的特征峰。将单细胞中检测到的特征峰依次与 HMDB 数据库、文献报道的单细胞代谢物库和体量细胞中二级质谱鉴定的代谢物库进行精确的质量数匹配 (偏差设为 10^{-5}), 以实现代谢物的鉴定。最后,从每个单细胞中提取所有鉴定代谢物的相对强度用于后续代谢组学数据分析与处理。利用统一流形逼近与投影 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 实现单细胞聚类分析,利用 Mann-Whitney U 检验实现代谢物差异性表征,利用 MetaboAnalyst 实现差异代谢物分析及代谢通路富集等。

2 结果与讨论

2.1 细胞毒性考察

与其他细胞毒性测定方法相比,MTS 法可提供简便、高通量的细胞活力测定,因此,本研究采用 MTS 法测定他莫昔芬细胞毒性。由于他莫昔芬主要作用于雌激素受体,故选用雌激素受体阳性的 MCF-7 细胞开展相关研究。利用 MTS 法测定他莫昔芬对 MCF-7 增殖的影响情况示于图 2。可以看出,在 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,他莫昔芬对 MCF-7 细胞活力基本无影响,细胞生长正常;当浓度升至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,MCF-7 细胞生长受到明显影响。为了防止药物浓度过

高对细胞状态造成影响 (此时细胞活力未发生明显变化) 而导致在单细胞数据采集时的代谢物发生泄露等问题影响数据分析的准确性,或者药物浓度过低导致在一定时间内药物引起的细胞代谢变化不显著,最终选择 MCF-7 细胞与他莫昔芬共孵育的浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

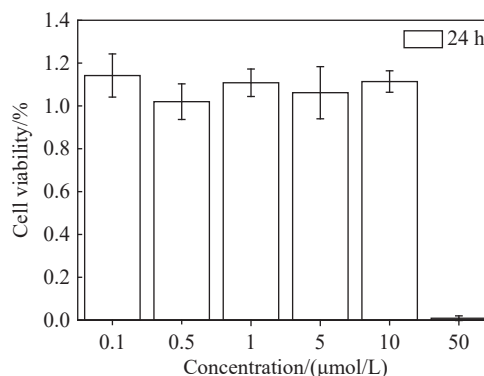


图 2 利用 MTS 法测定他莫昔芬对 MCF-7 增殖的影响

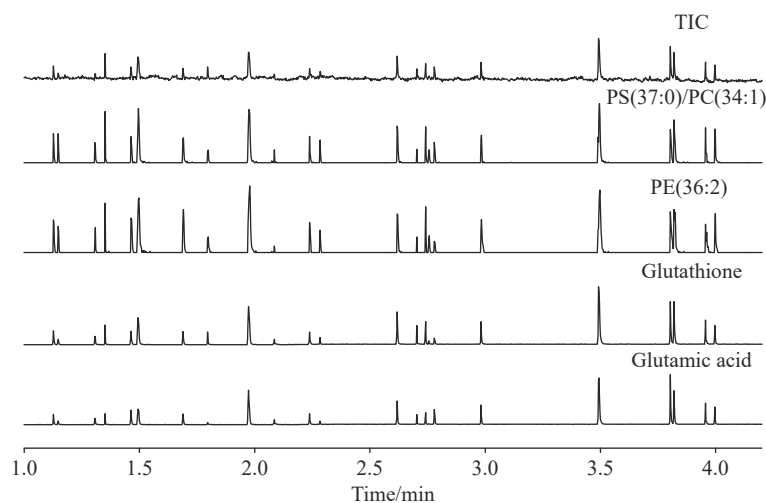
Fig. 2 Effect of tamoxifen on MCF-7 cell proliferation determined by MTS assay

2.2 MCF-7 细胞代谢物测定

目前,利用细胞裂解物进行药物作用机制研究的方法存在一定的不足,既无法在单细胞层面上考察不同细胞对药物反应的异质性,又需要利用萃取剂提取代谢物而引起操作繁琐。本研究利用搭建的单细胞流式质谱装置测定他莫昔芬给药后单个 MCF-7 细胞中的代谢物,以期从单细胞角度考察 MCF-7 细胞在他莫昔芬作用下的代谢变化。脂质是组成细胞膜的主要成分,因此,选用脂质作为正离子模式下单细胞信号检测及筛选的主要标准。在负离子模式下,选用细胞特征代谢物谷胱甘肽作为单细胞检测的主要筛选标准。利用单细胞流式质谱测定的单细胞总离子流图 (TIC) 及代谢物的提取离子流图 (EIC) 示于图 3。共测定 1 059 个细胞,其中,在正离子模式下分别测定 222、340 个对照组和他莫昔芬给药组 MCF-7 细胞;在负离子模式下分别测定 208、289 个对照组及他莫昔芬给药组 MCF-7 细胞,单细胞测定通量约为 10 个/min。通过检索 HMDB 数据库、文献报道的数据库及 UPLC-MS/MS 鉴定所得的乳腺癌细胞代谢物库,在正、负离子模式下,分别鉴定了 576、480 种代谢物。综合正、负离子模式下鉴定的代谢物,最终在对

对照组及他莫昔芬给药组的 MCF-7 细胞中分别鉴定了 811、776 种代谢物。以上研究结果证明, 单

细胞流式质谱具有优良的分析通量及代谢物测定能力。



注: 从上至下分别为负离子模式下单细胞事件的 TIC 图, 单细胞中 PS(37:0)/PC(34:1)、PE(36:2)、谷胱甘肽、谷氨酸等代谢物的 EIC 图

图 3 利用单细胞流式质谱装置在负离子模式下获得的总离子流图及相应代谢物的提取离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram obtained under negative ion mode by single-cell mass cytometry and corresponding extracted ion chromatograms of metabolites

2.3 他莫昔芬引起的 MCF-7 细胞代谢物变化

为了研究他莫昔芬引起的 MCF-7 细胞代谢物变化, 分别利用正、负离子模式下检测到的代谢物进行 UMAP 聚类分析, 示于图 4。以正离子模式下检测到的代谢物进行 UMAP 聚类分析时, 他莫昔芬给药组及对照组无法实现分群, 其原因可能是正离子模式下检测到的代谢物在他莫昔芬作用下发生的变化不够显著, 因此以该部分代谢物作为聚类标准时无法使细胞发生明显

分群。以负离子模式下检测到的代谢物作为聚类标准, 他莫昔芬作用下的 MCF-7 细胞及对照组细胞明显分群。与对照组相比, 他莫昔芬给药组的 MCF-7 细胞代谢发生明显变化。实验观察到对照组及给药组的组间细胞交叉及组内亚群聚集的现象, 反映了单细胞代谢的异质性。然而, 以上异质性在基于体量细胞的代谢组学研究中通常易被忽视, 这进一步凸显了单细胞代谢组学研究的重要价值。

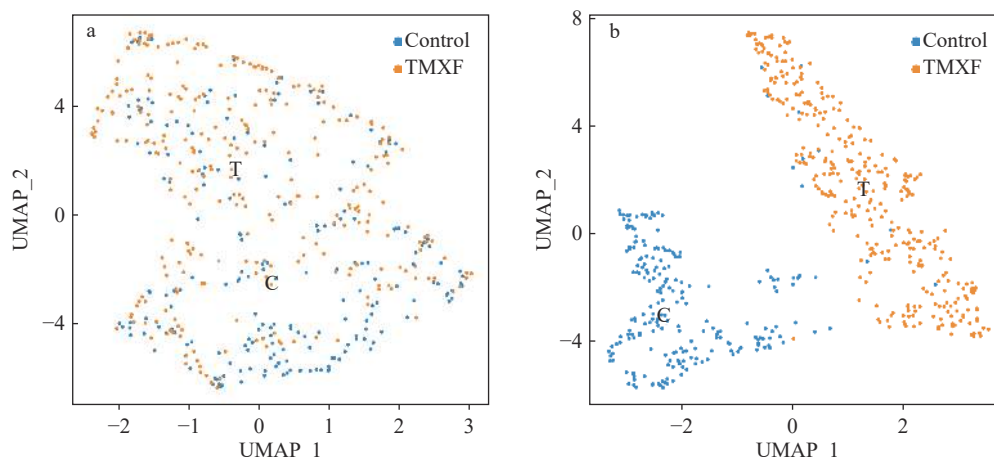
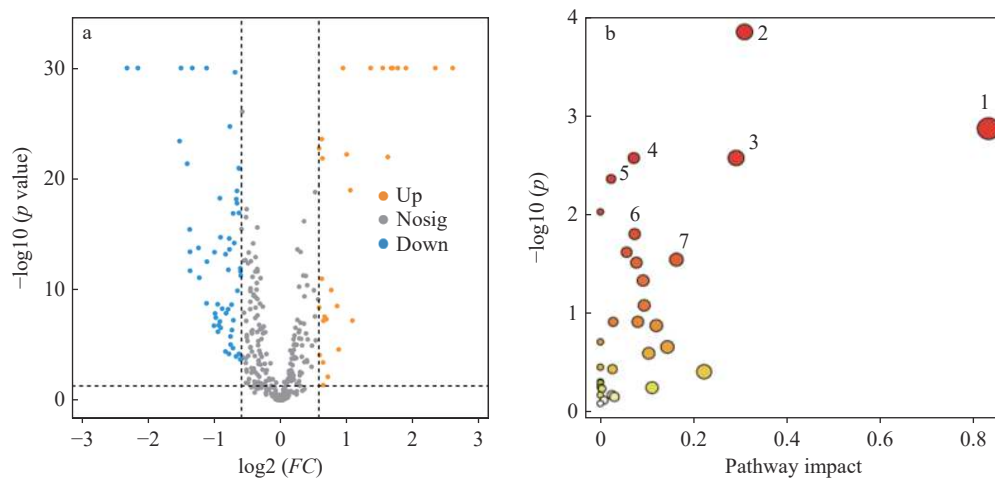


图 4 正(a)、负(b)离子模式下, MCF-7 细胞 UMAP 聚类分析结果

Fig. 4 UMAP clustering results of metabolites in MCF-7 cells under positive (a) and negative (b) ion modes

为进一步了解 MCF-7 细胞在他莫昔芬作用下发生的代谢变化,利用 Mann-Whitney U 检验考察他莫昔芬给药前后 MCF-7 细胞发生显著变化的差异代谢物。由于正离子模式下检测的代谢物在给药前后的 MCF-7 细胞中无显著差异,不能聚类,因此后续讨论主要针对负离子模式下检测到的代谢物。结果表明,他莫昔芬给药后,226 种代谢物发生显著变化($p < 0.05$),主要包括有机酸、脂肪酸、氨基酸等,其中,86 种代谢物

表现为含量上调,140 种代谢物表现为含量下调。为进一步发现他莫昔芬给药前后变化幅度较大($FC > 1.5$)且具有统计学差异($p < 0.05$)的代谢物,对单细胞代谢组学数据进行火山图分析,示于图 5。可见,他莫昔芬给药后, MCF-7 细胞中 28 种代谢物含量上调,59 种代谢物含量下调,示于图 5a。表现为上调的代谢物包括有机酸类化合物等,表现为下调的代谢物包括氨基酸、核苷酸等。



注: 1. 牛磺酸-次牛磺酸代谢; 2. 咖啡因代谢; 3. 半胱氨酸-甲硫氨酸代谢;
4. 甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢; 5. 嘌呤代谢; 6. 淀粉-蔗糖代谢; 7. 嘧啶代谢

图 5 火山图(a)及代谢通路分析结果(b)

Fig. 5 Volcano plot (a) and metabolic pathway analysis (b)

2.4 他莫昔芬引起的 MCF-7 细胞代谢通路变化

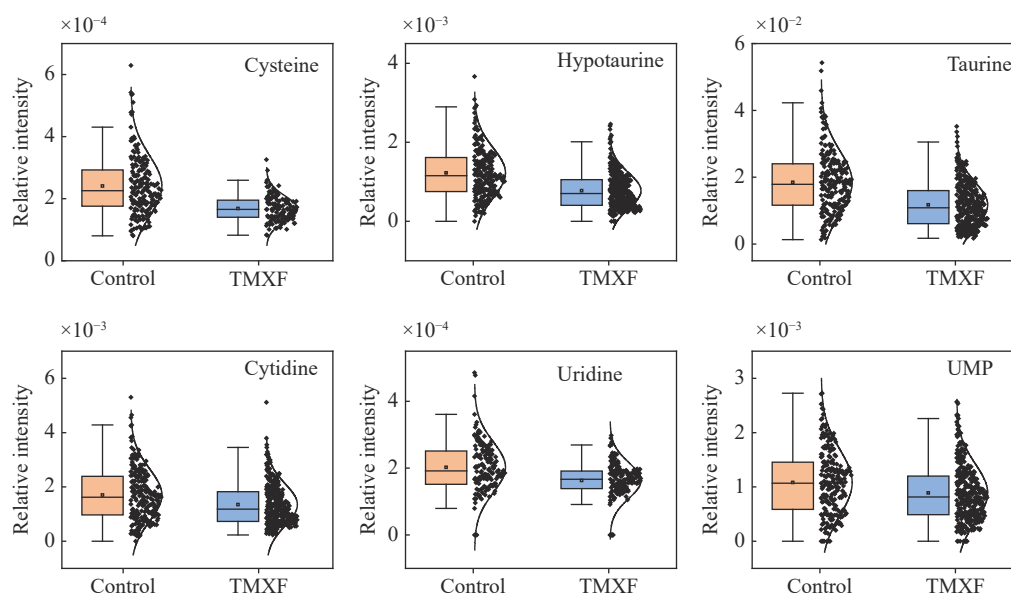
基于 Mann-Whitney U 检验及火山图分析所得的差异性代谢物,进一步考察了他莫昔芬给药引起的代谢通路变化,结果示于图 5b。可见,他莫昔芬给药引起 MCF-7 细胞发生变化的代谢通路共有 32 条,最显著的通路包括牛磺酸-次牛磺酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、半胱氨酸-甲硫氨酸代谢、嘌呤代谢、淀粉-蔗糖代谢、嘧啶代谢、咖啡因代谢等。其中,牛磺酸-次牛磺酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、半胱氨酸-甲硫氨酸代谢等均属于氨基酸代谢通路,嘧啶代谢及嘌呤代谢属于核苷酸代谢通路。

氨基酸代谢在肿瘤微环境中发挥着重要作用,影响癌症进展的各个方面^[24]。在他莫昔芬作用后, MCF-7 细胞的多条氨基酸代谢通路发生变化。他莫昔芬给药前,半胱氨酸可在半胱氨酸双加氧酶 1 作用下转化为半胱氨酸亚磺酸,然后通

过半胱氨酸亚磺酸脱羧酶转化为次牛磺酸,最后进一步转化为牛磺酸^[25]。在他莫昔芬给药后,由于以上代谢通路受到抑制, MCF-7 细胞中的次牛磺酸及牛磺酸含量均下降,而半胱氨酸由于参与多条代谢通路,其含量并未因为牛磺酸-次牛磺酸代谢通路的抑制而上调,同样表现为下调,示于图 6。核苷酸是多种合成代谢途径的底物,尤其是 DNA 和 RNA 的合成。肿瘤细胞的增殖、免疫逃避和转移等行为均在很大程度上依赖于增强的核苷酸代谢^[26]。尿苷是一种嘧啶核苷,在细胞遗传物质合成、蛋白修饰、肿瘤细胞能量代谢等多种途径中均发挥着重要作用^[27-28],其可通过将胞嘧啶核苷在胞嘧啶核苷脱氨酶的作用下生成。尿苷-胞苷激酶 2 是嘧啶补救合成途径的限速酶,可分别将尿苷和胞苷磷酸化为尿苷单磷酸和胞苷单磷酸^[29]。最近的研究表明^[30],尿苷-胞苷激酶 2 在许多类型的实体癌和造血癌中过表达,

与预后不良密切相关^[30]。本研究考察了他莫昔芬给药前后 MCF-7 细胞中胞苷、尿苷及尿苷单磷酸的含量变化。从图 6 可以看出, 在他莫昔芬

作用下, 以上 3 种代谢物的含量均下调, 提示他莫昔芬可能在以上代谢通路中发挥作用而起到抗乳腺癌的重要作用。



注: Control 为对照组; TMXF 为他莫昔芬给药组

图 6 他莫昔芬引起的 MCF-7 细胞代谢物变化情况

Fig. 6 Metabolite changes in MCF-7 cells induced by tamoxifen

3 结论

本工作利用基于质谱的单细胞代谢组学技术研究他莫昔芬作用下的 MCF-7 细胞代谢变化, 实现了单个 MCF-7 细胞中的代谢物鉴定, 并发现了在他莫昔芬作用下发生显著变化的代谢物及代谢通路。结果表明, 他莫昔芬对 MCF-7 细胞的氨基酸代谢及核苷酸代谢产生显著影响, 这可能是他莫昔芬抗雌激素受体阳性型乳腺癌的作用机制之一。本研究结果证明了基于质谱的单细胞代谢组学技术在药物作用机制研究方面的应用潜力, 同时也为其他药物的作用机制研究提供了参考。

参考文献:

- [1] HARBECK N, PENAULT-LLORCA F, CORTES J, GNANT M, HOUSSAMI N, POORTMANS P, RUDDY K, TSANG J, CARDOSO F. Breast cancer[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 66.
- [2] YANOVICH G, AGMON H, HAREL M, SONNENBLICK A, PERETZ T, GEIGER T. Clinical proteomics of breast cancer reveals a novel layer of breast cancer classification[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(20): 6 001-6 010.
- [3] YU T J, MA D, LIU Y Y, XIAO Y, GONG Y, JIANG Y Z, SHAO Z M, HU X, DI G H. Bulk and single-cell transcriptome profiling reveal the metabolic heterogeneity in human breast cancers[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(7): 2 350-2 365.
- [4] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2019, 321(3): 316.
- [5] GUO L, KONG D, LIU J, ZHAN L, LUO L, ZHENG W, ZHENG Q, CHEN C, SUN S. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy [J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2023, 12(1): 3.
- [6] LIU S, GAO Z, WU J, ZHENG H, LI B, SUN S, MENG X, WU Q. Single-cell and spatially resolved analysis uncovers cell heterogeneity of breast cancer[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2022, 15(1): 19.
- [7] FESSENDEN M. Metabolomics: small molecules, single cells[J]. *Nature*, 2016, 540(7 631): 153-155.
- [8] SEYDEL C. Single-cell metabolomics hits its stride[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(12): 1 452-1 456.
- [9] CHENG H, TANG Y, LI Z, GUO Z, HEATH J R, XUE M, WEI W. Non-mass spectrometric targeted single-cell metabolomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 168: 117 300.

- [10] 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.
- [11] XU T, LI H, DOU P, LUO Y, PU S, MU H, ZHANG Z, FENG D, HU X, WANG T, TAN G, CHEN C, LI H, SHI X, HU C, XU G. Concentric hybrid nanoelectrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization source for high-coverage mass spectrometry analysis of single-cell metabolomics[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(16): 2306659.
- [12] HU R, LI Y, YANG Y, LIU M. Mass spectrometry-based strategies for single-cell metabolomics[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2023, 42(1): 67-94.
- [13] YU X, HE M, CHEN B, HU B. Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1137(15): 191-207.
- [14] PAPAGIANNOPOULOU C, PARCHEN R, RUBBENS P, WAEGEMAN W. Fast pathogen identification using single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-aerosol time-of-flight mass spectrometry data and deep learning methods[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(11): 7523-7531.
- [15] SWEEDLER J V. Single cell profiling using ionic liquid matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry for neuronal cell type differentiation[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(5): 3078-3086.
- [16] 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.
- [17] 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): 9777-9783.
- [18] FUJII T, MATSUDA S, TEJEDOR M L, ESAKI T, SAKANE I, MIZUNO H, TSUYAMA N, MASUJIMA T. Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(9): 1445-1456.
- [19] STANDKE S J, COLBY D H, BENSON R C, BURGESS A W G, YANG Z. Mass spectrometry measurement of single suspended cells using a combined cell manipulation system and a single-probe device[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 1738-1742.
- [20] SHAO Y, ZHOU Y, LIU Y, ZHANG W, ZHU G, ZHAO Y, ZHANG Q, YAO H, ZHAO H, GUO G, ZHANG S, ZHANG X, WANG X. Intact living-cell electrolaunching ionization mass spectrometry for single-cell metabolomics[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(27): 8065-8073.
- [21] ZHU G, ZHANG W, ZHAO Y, CHEN T, YUAN H, LIU Y, GUO G, LIU Z, WANG X. Single-cell metabolomics-based strategy for studying the mechanisms of drug action[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(10): 4712-4720.
- [22] XU S, LIU M, BAI Y, LIU H. Multi-dimensional organic mass cytometry: simultaneous analysis of proteins and metabolites on single cells[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(4): 1806-1812.
- [23] 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: 4387.
- [24] QIU H, SHAO N, LIU J, ZHAO J, CHEN C, LI Q, HE Z, ZHAO X, XU L. Amino acid metabolism in tumor: new shine in the fog?[J]. *Clinical Nutrition*, 2023, 42(8): 1521-1530.
- [25] XU Q, LI Y, GAO X, KANG K, WILLIAMS J G, TONG L, LIU J, JI M, DETERDING L J, TONG X, LOCASALE J W, LI L, SHATS I, LI X. HNF4 α regulates sulfur amino acid metabolism and confers sensitivity to methionine restriction in liver cancer[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3978.
- [26] SHI D D, SAVANI M R, ABDULLAH K G, McBRAYER S K. Emerging roles of nucleotide metabolism in cancer[J]. *Trends in Cancer*, 2023, 9(8): 624-635.
- [27] MULLEN N J, SINGH P K. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2023, 23(5): 275-294.
- [28] MADSEN H B, PEETERS M J, THOR STRATEN P, DESLER C. Nucleotide metabolism in the regulation of tumor microenvironment and immune cell function[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 84: 103008.
- [29] TRAN D H, KIM D, KESAVAN R, BROWN H, DEY T, SOFLAEE M H, VU H S, TASDOGAN A, GUO J, BEZWADA D, AL SAAD H, CAI F, SOLMONSON A, RION H, CHABATYA R, MERCHANT S, MANALES N J, TCHEUYAP V T, MULKEY M, MATHEWS T P, BRUGAROLAS J, MORRISON S J, ZHU H, DeBERARDINIS R J, HOXHAI G. De novo and salvage purine synthesis pathways across tissues and tumors[J]. *Cell*, 2024, 187(14): 3602-3618.
- [30] FU Y, WEI X D, GUO L, WU K, LE J, MA Y, KONG X, TONG Y, WU H. The metabolic and non-metabolic roles of UCK2 in tumor progression[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 904887.

(收稿日期: 2024-09-17; 修回日期: 2024-10-15)