

锥形光纤投影激光解吸质谱实现单细胞内药物和脂质同时成像

雷松谚¹, 罗京楷¹, 章珩¹, 殷志斌², 杭纬¹

(1. 厦门大学化学化工学院化学系, 福建 厦门 361005; 2. 深圳先进光源研究院, 广东 深圳 518038)

摘要:孔雀石绿(MG)作为一种杀菌消毒剂,其环境持久性与生物累积性已严重威胁生命健康安全。现有商品化质谱仪的空间分辨率不足,难以满足单细胞质谱成像的要求。针对上述问题,本研究在离子源部分创新性地采用锥形光纤结合投影光路的设计,有效防止中性分子污染离子源,从而确保其长期稳定性。将该离子源集成至飞行时间质谱仪中,构建了锥形光纤投影激光解吸飞行时间质谱成像平台,并对致癌性药物 MG 暴露下的 HeLa 细胞进行检测。通过形貌分析,表明 MG 暴露处理可导致 HeLa 细胞发生浓度依赖性的凋亡形态学变化;使用金纳米颗粒(Au NPs)作为纳米基质进行质谱成像(MSI),得到致癌性药物与内源性脂质代谢物的高分辨空间同时成像,并鉴定出包括甘油三酯(TGs)、磷脂酰肌醇(PIs)、磷脂酰乙醇胺(PEs)、磷脂酰胆碱(PCs)及神经酰胺(Cers)等 28 种脂质分子。结果表明,锥形光纤投影激光解吸质谱技术兼具高灵敏度、优异的抗污染性和高空间分辨率,可为单细胞毒理机制研究提供可靠的工具。

关键词:锥形光纤投影激光解吸质谱;金纳米颗粒;单细胞;质谱成像(MSI);药物与脂质

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0800-08

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0105

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0105

Tapered Fiber Projection Desorption Mass Spectrometry Enables Simultaneous Imaging of Intracellular Drugs and Lipids

LEI Song-yan¹, LUO Jing-kai¹, ZHANG Heng¹, YIN Zhi-bin², HANG Wei¹

(1. Department of Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Shenzhen Advanced Light Source Research Institute, Shenzhen 518038, China)

Abstract: As a widely utilized bactericidal and disinfectant agent, malachite green (MG) presents significant risks to ecological systems and public health due to its environmental persistence, bioaccumulation potential, and well-documented carcinogenic properties. The compound has been frequently detected in aquatic environments and agricultural products, thereby raising substantial concerns regarding its implications for food safety and ecosystem stability. Conventional mass spectrometry instruments often exhibit insufficient spatial resolution, which limits their capacity for detailed molecular imaging at the single-cell level—a critical capability for advancing toxicological research and elucidating cellular responses to environmental stressors. To overcome these analytical constraints, this study developed a novel ion source configuration that incorporated a precision

tapered fiber integrated with an optimized projection optical system. This advanced design not only enhances laser energy concentration but also serves as an effective physical barrier, effectively preventing neutral molecular species and particulate contaminants from entering the ionization region. As a result, the system demonstrates improved signal stability, measurement reproducibility, and long-term operational reliability. The newly developed ion source was integrated into a customized time of flight mass spectrometer (TOF MS), leading to the creation of an advanced imaging platform termed the tapered fiber projection laser desorption time of flight mass spectrometry (TFPLD-TOF MS) system. The platform was employed to analyze HeLa cells exposed to varying concentrations of MG. Morphological assessments revealed distinct concentration-dependent apoptotic features, including cellular shrinkage, membrane blebbing, and nuclear fragmentation—all of which are clear indicators of MG-induced cytotoxic effects at the cellular level. Moreover, by utilizing gold nanoparticles (Au NPs) as a high-performance nano-matrix to enhance laser desorption efficiency, the system achieved high resolution mass spectrometry imaging (MSI) capable of simultaneously mapping the spatial distribution of the carcinogenic drug and a diverse array of endogenous lipid metabolites. This approach enables the identification and spatial localization of 28 distinct lipid species across multiple lipid classes, including triglycerides (TGs), phosphatidylinositols (PIs), phosphatidylethanolamines (PEs), phosphatidylcholines (PCs), and ceramides (Cers). These findings provide valuable insights into MG induced lipidomic alterations, metabolic pathway disruptions, and subcellular compartment specific responses to toxic exposure. The TFPLD-TOF MS platform consistently demonstrates high analytical sensitivity, robust anti-contamination properties, and exceptional spatial resolution throughout the experimental evaluations. These characteristics make it as a powerful and reliable analytical tool for advanced toxicological studies, particularly in elucidating molecular mechanisms underlying single-cell responses to environmental contaminants and bioactive compounds. The platform holds significant potential for broader applications in cellular biology, clinical diagnostics, pharmaceutical development, and environmental health monitoring, offering new opportunities for advancements in molecular toxicology and precision medicine.

Key words: tapered fiber projection desorption mass spectrometry; gold nanoparticles; single-cell; mass spectrometry imaging (MSI); drugs and lipids

孔雀石绿(MG)是一种三苯基甲烷类药物,广泛用于纺织、造纸和丙烯酸工业^[1],并作为有效的杀菌剂和医用消毒剂成分^[2]。在水产养殖中, MG 因能高效防治寄生虫、细菌和真菌感染而受到重视,但其环境持久性、生物累积性及潜在的致癌、致畸、致突变风险,已引发了严重的环境和公共卫生担忧^[3]。现有 MG 的检测主要集中于水产品、肉类等食品及环境分析,而在单细胞水平上的检测研究却鲜有涉及。研究表明,药物的毒性与其在细胞内的分布密切相关,特定部位的积累可导致相应毒理效应^[4-5]。因此,在高空间分辨率下阐明 MG 在单细胞内的分布,对于深入理解其毒性机制、病理损伤和致癌潜力

至关重要。

质谱成像(MSI)凭借非靶向、免标记、高灵敏度及多组分同时检测能力^[6-7],在生物医学领域应用日益广泛,提升空间分辨率和优化图像细节是该技术发展的关键方向。当前广泛应用的基质辅助激光解吸/电离质谱成像(MALDI-MSI)技术中,有机基质在低质量范围产生干扰峰,且其不均匀结晶引发的“热点”效应会扭曲分析物信号并限制分辨率提升^[8-9]。相比之下,表面辅助激光解吸/电离质谱成像(SALDI-MSI)技术以纳米材料替代有机基质,可有效减少低质量区背景干扰,其均匀覆盖特性有助于激光光斑内信号重复性的提升,从而支持更高的空间分辨率^[10]。

为突破光学衍射极限,实现纳米级质谱成像,本课题组前期开发了近场解吸后电离(NDPI)技术,成功获得 250 nm 分辨率的单细胞成像,但近场系统操作复杂,且探针工作距离仅约 10 nm,极易受到污染^[11]。随后,课题组引入微透镜光纤激光解吸源以简化流程,光纤尖端与样品表面的工作距离约 10 μm ,实现了细胞器尺度动态过程解析,却面临长时间成像时解吸中性分子沉积于光纤尖端导致信号衰减的挑战^[12]。针对此核心瓶颈,本课题组在离子源部分创新性地引入锥形光纤与投影系统,将光纤尖端与样品表面的工作距离大幅扩展至 50 mm 以上,彻底避免了中性分子沉积污染。这不仅消除了信号衰减根源,还显著提升了长时间成像的信号强度与稳定性,确保系统具备无限期的操作耐久性,并使其易于与商用激光质谱仪集成,有力支撑国家重大科研仪器自主创新战略。

本研究以 Au NPs 为电离引发剂,创新性地将由锥形光纤与投影系统组合的离子源融入飞行时间质谱(TOF MS)中,并将其用于 MG 处理的 HeLa 细胞的质谱成像研究,以获得 MG 分子离子峰及内源性脂质在单细胞内的空间分布。旨在揭示细胞异质性的成因与机制,进而对 MG 毒性、病理损伤及致癌潜力进行深入剖析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

本研究使用实验室自行搭建的锥形光纤投影激光解吸飞行时间质谱仪,其离子源部分示于图 1。离子源部分采用由激光拼接机(LZM-100 CO₂, 日本 Fujikura 公司产品)制备的锥形光纤,通过将包层直径从 125 μm 缩减至约 30 μm ,使输出端纤芯直径达到约 600 nm。355 nm 脉冲激光

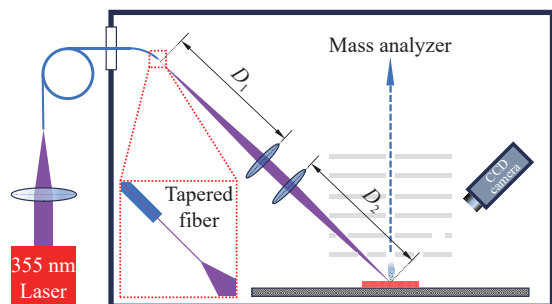


图 1 锥形光纤投影离子源部分示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the ionization source part of the tapered fiber projection

(LARK 355-3/5, 中国深圳杰普特光电股份有限公司产品)经激光耦合系统导入该光纤,并通过 1 对焦距 50 mm 的非球面透镜构建的投影系统,将光纤输出的激光束投影至样品表面。该系统满足公式(1)定义的距离关系(D_1 为第一透镜焦距, D_2 为第二透镜焦距, D_{fiber} 为锥形光纤的纤芯直径, D_{spot} 为样品表面光斑尺寸),从而在样品表面形成逼近光纤出口直径(约 600 nm)的亚微米级激光光斑。此设计实现了高空间分辨质谱采样的同时,还有效规避了光纤污染与损伤风险,在激光能量低于光纤损伤阈值时具备理论上的无限使用寿命。

$$\frac{D_1}{D_{\text{fiber}}} = \frac{D_2}{D_{\text{spot}}} \quad (1)$$

在 TOF MS 分析部分,激光解吸电离产生的离子由排斥脉冲推入加速区,经 12 kV 高压加速后进入无场飞行区,离子信号经微通道板(MCP)放大后,由 12 位高速数字化仪(ADQ12, 瑞典 Teledyne SP Devices 公司产品)采集。样品定位与观测系统包含:横向精度 10 nm 的闭环二维纳米定位台(SLC-17, 德国 SmartAct GmbH 公司产品)用于样品精确平移; z 轴电动载物台(KHE04006, 日本 Suruga Seiki Co.公司产品)用于控制垂直位置;图像传感器(CCD)摄像系统用于实时监测。数据采集基于 LabVIEW 软件编写的程序平台。为达到最佳实验效果,对仪器各项参数进行优化,结果列于表 1。

表 1 质谱仪主要工作参数

Table 1 Important parameters of the mass spectrometer

参数 Parameter	设定值 Set value
腔体气压/Pa	$\leq 5 \times 10^{-4}$
激光脉冲频率/Hz	10
成像步距/ μm	1.6
单脉冲能量/nJ	70
加速区电压/V	12000
排斥脉冲高压/V	-2750

1.2 主要材料与试剂

氯氨酸(纯度 98%)、柠檬酸钠(纯度 98%);上海安耐吉化学有限公司产品;MG(纯度 95%);上海麦克林生化科技有限公司产品;Dulbecco 改良的 Eagles 培养基(DMEM):美国 Sigma-Aldrich 公司产品;青霉素-链霉素(Gibco)、胎牛血清蛋白(FBS)、胰酶(0.25%, 2.5 g/L):美国 Thermo

Fisher Scientific 公司产品; 4%多聚甲醛固定液(浓度 16%); 上海碧云天生物技术有限公司产品; 乙酸铵(纯度 98%); 上海国药集团化学试剂有限公司产品; 磷酸盐缓冲盐水(PBS): 武汉普诺赛生命科技有限公司产品; HeLa 细胞: 来自中国科学院细胞/干细胞库; ITO 双面导电玻璃(24 mm×12 mm×1.1 mm(7~10 Ω)); 洛阳腾昌旭坤生物科技有限公司产品; 六孔板: 耐思生命科技股份有限公司产品; 超纯水(电阻率>10 MΩ·cm): 由 Millipore 超纯水系统制备; 气动喷枪(HS08ADC-KB): 中国宁波浩盛气动机械有限公司产品; 三维数码显微系统(VHX-600E): 日本 Keyence 公司产品; Q Exactive HF 质谱仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞培养 将 ITO 置于培养孔中作为细胞粘附生长的基底, 加入适量含 10%FBS 和 1% Gibco 的 DMEM 培养基。随后将 HeLa 细胞以 $10^3 \sim 10^4$ cells/mL 的密度接种于孔内, 置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.3.2 药物处理 培养 24 h 后, 移除培养孔中的旧培养基, 更换为含有不同浓度(0、5、10、20、50、100 μmol/L)MG 的 3 mL 新鲜 DMEM 培养基, 继续避光孵育细胞 6 h。因 MG 对光敏感, 易在长期光照下还原为无色 MG, 故其原液配制及含药培养基的细胞培养均需全程避光操作^[13-14]。

1.3.3 细胞固定与洗涤 药物处理结束后, 小心吸取培养基, 用 PBS 缓冲液轻柔漂洗贴附有细胞的硅片。加入适量 4%多聚甲醛溶液固定细胞 15~20 min。固定完成后, 去除固定液, 用 30 mmol/L 乙酸铵溶液洗涤以去除残留固定剂。最后, 将样品置于室温下自然干燥。

1.3.4 纳米金粒子的合成 本研究采用柠檬酸钠热还原法制备 Au NPs^[15]。首先, 将 1.0 g 氯金酸(HAuCl₄)溶解于 50 mL 去离子水中, 充分溶解后稀释 100 倍, 配制成浓度为 0.2 g/L 氯金酸溶液, 并另配制 1%柠檬酸钠水溶液, 备用。取 50 mL 氯金酸溶液置于圆底烧瓶中, 在剧烈搅拌下加热至沸腾。沸腾状态下迅速加入 2 mL 1%柠檬酸钠溶液, 加入后, 溶液颜色由无色依次变为灰色、黑色, 最终形成稳定的酒红色, 表明单分散球形 Au NPs 已生成。反应混合物继续回流反应 10 min, 随后取出烧瓶冷却至室温, 低温避光条件下保存。

1.3.5 Au NPs 喷涂样品制备 本实验采用喷雾沉积法制备 Au NPs 附着的 ITO 样品^[16]。将 ITO 玻璃水平固定在铁架台表面, 使用气动喷枪进行喷涂, 喷枪垂直于样品表面放置, 喷嘴与样品表面距离约 10 cm。Au NPs 溶液经喷枪喷嘴垂直喷涂于 ITO 表面。喷枪流速设定为 300 μL/min, 每次喷涂 5 s, 喷涂后间隔 1 min 进行干燥, 共喷涂 40 次。

1.3.6 数据分析 使用高性能 12 位数字化仪采集质谱数据, 并通过基于 LabVIEW 2020 开发的自定义程序以文本文件格式保存。采用定制开发的 MATLAB R2023b 脚本对这些采集的数据文件进行深入分析, 最终生成质谱文件和 MSI 数据。在生成 MS 图像时, 每个像素的信号强度均相对于同一图像中信号强度最高的像素进行归一化处理。

1.3.7 脂质提取与超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)联用分析 采用二氯甲烷-甲醇溶液(3:1, V/V)从 25 mg 细胞材料中提取脂质, 并加入适量内标混合物。样品经机械匀浆、超声处理及 -20 °C 过夜提取后, 离心, 取上清, 冻干并复溶于重悬液。采用 UPLC-MS(配备 CSH C18 柱)进行分析, 正离子模式下使用含甲酸铵的乙腈-异丙醇溶液进行梯度洗脱。利用 Q Exactive HF 质谱仪进行一级、二级质谱数据采集。一级分辨率为 120 000, 自动增益控制(AGC)为 3×10^6 , 最大注入时间为 100 ms, 使用分级碰撞能量(15、30、45 eV)进行碎裂。

2 结果与讨论

2.1 空间分辨率评估

该系统的理论衍射极限分辨率约为 600 nm。通过测量亚甲基蓝涂层表面在 70 nJ 激光能量下形成的激光烧蚀坑, 示于图 2, 评估其实际分辨率约为 1.2 μm。该结果证实了本系统离子源具备单细胞级空间分辨能力, 为后续开展单细胞尺度高分辨质谱成像奠定了基础。

2.2 锥形光纤长期稳定性探究

在 MSI 研究中, 密集的采样点需求要求方法具备优异的重现性, 同时锥形光纤需具备长期稳定性。本研究使用同一根光纤在 ITO 上施加了超过 200 000 个激光脉冲, 示于图 3, 从开始到结束, 质谱信号强度始终保持相对一致, 证明了该方法具有良好的可靠性和光纤的耐用性。

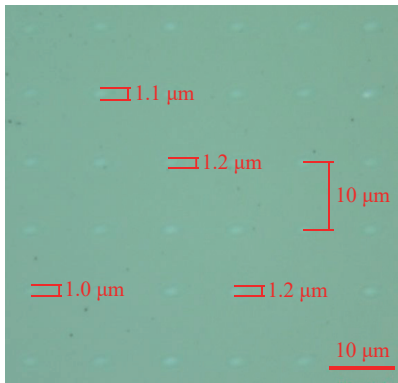


图2 70 nJ 激光能量下的弹坑图

Fig. 2 Optical image of craters at 70 nJ laser energy

2.3 单细胞质谱成像

2.3.1 细胞毒性考察 HeLa 细胞作为经典的永生细胞系, 在生物医学研究中具有重要价值^[17]。尽管经历数十年传代培养, 其基因组仍保持相对稳定, 这一特性使其成为研究单细胞异质性和细

胞进化模型的理想工具^[18]。本研究以 HeLa 细胞为实验模型, 通过形态学观察, 揭示了 MG 处理诱导的典型细胞凋亡特征。在光学显微镜下, 未经 MG 处理的 HeLa 细胞贴壁状态良好, 其形态规则、生长旺盛; 当 MG 浓度提升至 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时, 细胞形态发生显著改变; 经 20 $\mu\text{mol/L}$ MG 处理后, 大量细胞从 ITO 上脱落, 残留的贴壁细胞呈现细胞皱缩、细胞膜起泡等典型凋亡形态特征^[19]; 随着 MG 浓度的进一步增加, 这些凋亡特征愈发明显, 同时伴随细胞数量锐减及细胞结构破坏加剧。上述结果表明, MG 的细胞毒性作用及其诱导的凋亡程度均呈浓度依赖性增强, 示于图 4。鉴于 10 $\mu\text{mol/L}$ MG 处理已能诱导显著的凋亡形态学变化, 同时可保持相对充足的细胞数量, 本研究选用该浓度开展后续 MSI 实验。

2.3.2 MG 暴露后 HeLa 细胞的脂质质谱成像分析 毒理环境下单细胞代谢功能障碍及脂质代谢变化对于揭示致癌机制至关重要, 尤其是在化

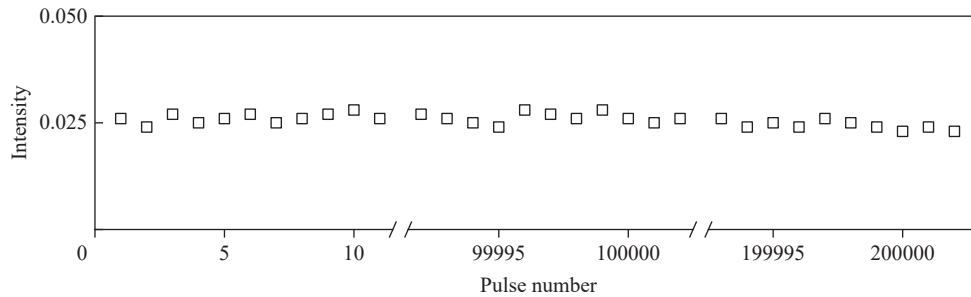
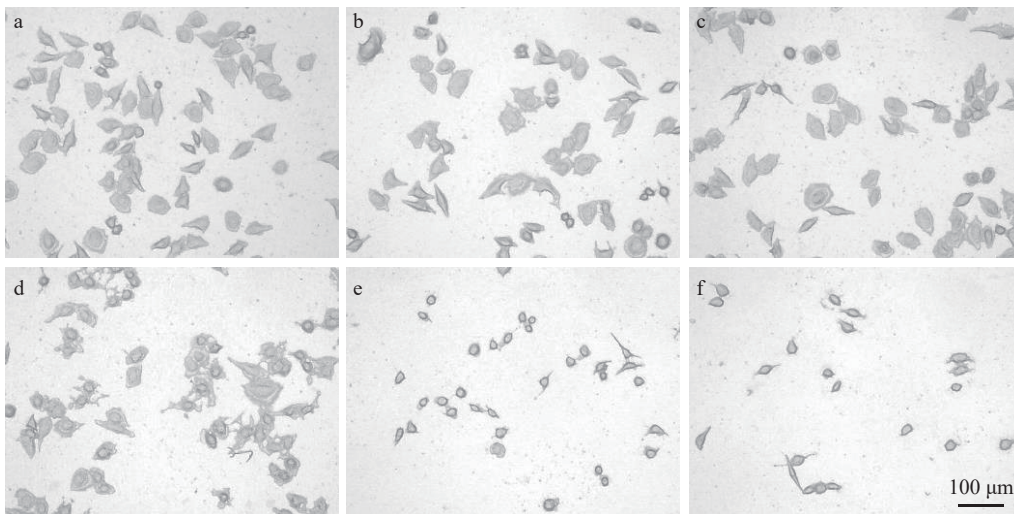


图3 光纤使用寿命

Fig. 3 Optical fiber lifespan



注: a. 0 $\mu\text{mol/L}$; b. 5 $\mu\text{mol/L}$; c. 10 $\mu\text{mol/L}$; d. 20 $\mu\text{mol/L}$; e. 50 $\mu\text{mol/L}$; f. 100 $\mu\text{mol/L}$

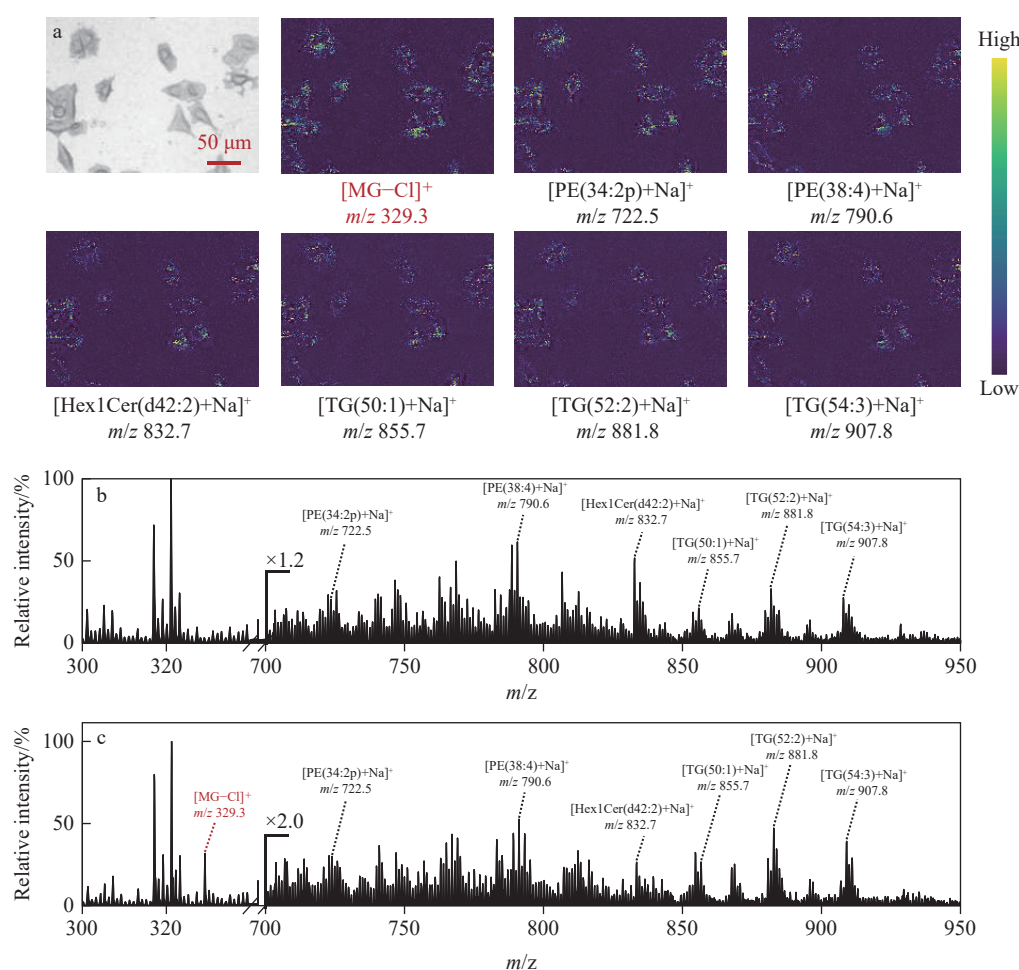
图4 MG 浓度梯度处理下的细胞毒性及凋亡效应

Fig. 4 Cytotoxicity and apoptosis effects under MG concentration gradient treatment

学物质干扰脂质稳态、诱发氧化应激及破坏线粒体生物能量学的研究背景下^[20]。尽管细胞凋亡伴随膜脂稳态破坏,并最终导致细胞结构崩溃,但传统基于细胞群体裂解物的研究方法存在显著局限,既无法捕捉单细胞对药物反应的异质性,又因涉及代谢物提取等繁琐操作步骤而效率低下^[21]。虽然透射模式的基质辅助激光解吸电离(t-MALDI)技术已应用于单细胞代谢成像,但有机基质在低质量数区域产生严重的背景干扰,限制了低分子质量物质与代谢物的同步检测及空间成像^[22]。针对这一问题,本研究采用自行搭建的锥形光纤投影激光解吸飞行时间质谱,凭借离子源部分锥形光纤与投影系统结合在高空间分辨和耐用性方面的优势,对经MG处理的HeLa细胞进行代谢物检测,成功实现了药物分子与脂质代谢物的空间共成像,示于图5。该技术可直接可视化药物暴露条件下单个细胞内关键代谢

物的空间分布特征与异质性,为在单细胞水平探究致癌药物诱导的代谢重编程及其与凋亡进程的空间关联提供了强大工具。

基于此平台获取的单细胞质谱数据,结合UPLC-MS/MS检索鉴定结果,在单细胞水平成功检测到MG暴露下HeLa细胞中28种代谢物的空间分布,包括甘油三酯(TGs)、磷脂酰肌醇(PIs)、磷脂酰乙醇胺(PEs)、磷脂酰胆碱(PCs)及神经酰胺(Cers)等,具体结果列于表2。MG离子的质谱成像图轮廓与细胞光学图像一致,且主要分布于细胞内细胞质区域,其成像信号强度反映MG离子在单细胞中的浓度差异。甘油磷脂作为细胞膜的核心组分^[23],其中,PCs与PEs参与维持细胞膜结构完整性,支持肿瘤细胞增殖所需的膜生物合成^[24];PIs通过调控磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路,影响细胞存活与增殖过程^[25];其他脂质分子,如TGs作为能量储存分子,可以



注: a. 细胞光学图及不同质荷比下的质谱成像图; b. 未处理 HeLa 细胞质谱图; c. MG 暴露下 HeLa 细胞质谱图

图5 MG 诱导下单细胞内药物与脂质代谢物的同时成像

Fig. 5 Simultaneous imaging of drug and lipids metabolites by MG

表2 MG暴露下表达的脂质分子信息

Table 2 Molecular information of lipids expressed under MG exposure

分子式 Molecular formula	脂质组 Lipid group	离子 加合形式 Ion adduct	实测质荷比 Measured m/z	分子式 Molecular formula	脂质组 Lipid group	离子 加合形式 Ion adduct	实测质荷比 Measured m/z
C ₃₉ H ₇₄ O ₇ NP	PE(34:2p)	[M+Na] ⁺	722.5	C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆	TG(50:1)	[M+Na] ⁺	855.7
C ₃₉ H ₇₆ O ₇ NP	PE(34:1p)	[M+Na] ⁺	724.5	C ₄₃ H ₇₉ O ₁₃ P	PI(34:2)	[M+Na] ⁺	857.5
C ₄₁ H ₇₄ O ₇ NP	PE(36:4p)	[M+Na] ⁺	746.5	C ₄₃ H ₈₁ O ₁₃ P	PI(34:1)	[M+Na] ⁺	859.5
C ₄₁ H ₇₆ O ₇ NP	PE(36:3p)	[M+Na] ⁺	748.5	C ₅₃ H ₉₈ O ₆	TG(52:4)	[M+Na] ⁺	877.7
C ₄₁ H ₇₈ O ₇ NP	PE(36:2p)	[M+Na] ⁺	750.5	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	TG(52:3)	[M+Na] ⁺	879.7
C ₄₃ H ₇₈ O ₈ NP	PE(38:4)	[M+Na] ⁺	790.5	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	TG(52:2)	[M+Na] ⁺	881.8
C ₄₃ H ₈₀ O ₈ NP	PE(38:3)	[M+Na] ⁺	792.6	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆	TG(52:1)	[M+Na] ⁺	883.8
C ₄₆ H ₈₉ O ₈ N	Hex1Cer(d40:1)	[M+Na] ⁺	806.6	C ₅₉ H ₉₀ O ₄	Co(Q10)	[M+Na] ⁺	885.7
C ₄₄ H ₈₄ O ₈ NP	PC(36:2)	[M+Na] ⁺	808.6	C ₅₇ H ₁₀₀ O ₆	TG(54:5)	[M+Na] ⁺	903.7
C ₄₈ H ₉₁ O ₈ N	Hex1Cer(d42:2)	[M+Na] ⁺	832.7	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₆	TG(54:4)	[M+Na] ⁺	905.8
C ₄₈ H ₉₃ O ₈ N	Hex1Cer(d42:1)	[M+Na] ⁺	834.7	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	TG(54:3)	[M+Na] ⁺	907.8
C ₅₃ H ₉₄ O ₆	TG(50:4)	[M+Na] ⁺	849.7	C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆	TG(54:2)	[M+Na] ⁺	909.8
C ₅₃ H ₉₆ O ₆	TG(50:3)	[M+Na] ⁺	851.7	C ₄₇ H ₈₅ O ₁₃ P	PI(38:3)	[M+Na] ⁺	911.6
C ₅₃ H ₉₈ O ₆	TG(50:2)	[M+Na] ⁺	853.7	C ₄₇ H ₈₇ O ₁₃ P	PI(38:2)	[M+Na] ⁺	913.6

为细胞代谢活动提供底物支持^[26]；此外，Cers 可响应药物应激，参与凋亡信号通路的调控^[27]。这些代谢物的空间分布特征揭示了 MG 暴露引发的脂质代谢动态变化，凸显了本技术解析单细胞代谢响应的能力。

3 结论

本研究使用锥形光纤投影激光解吸飞行时间质谱，Au NPs 取代传统有机基质，在单细胞内实现在 MG 毒物环境暴露下药物与代谢物的共同成像。

1) 本研究创新性地采用锥形光纤结合投影光路设计，将质谱仪离子源工作距离从传统近场技术显著提升至 50 mm，不仅防止中性分子对离子源的污染，确保系统的长期运行稳定性，更具备良好的系统兼容性。

2) 与 MALDI 使用的传统有机基质不同，Au NPs 基质的使用有效减少了低质量区背景干扰，避免重结晶后晶粒过大对空间分辨率的限制，为药物与代谢物的共同成像创造了条件。

3) 基于该激光解吸飞行时间质谱得到的实验数据，可得到 28 种具有参考价值的代谢物，为单细胞毒理机制研究提供了可靠工具。

参考文献：

[1] BARAPATRE A, AADIL K R, JHA H. Biodegradation

of malachite green by the ligninolytic fungus *Aspergillus flavus*[J]. CLEAN-Soil, Air, Water, 2017, 45(4): 1 600 045.

- [2] PIERRARD M A, KESTEMONT P, DELAIVE E, DIEU M, RAES M, SILVESTRE F. Malachite green toxicity assessed on Asian catfish primary cultures of peripheral blood mononuclear cells by a proteomic analysis[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 114: 142-152.
- [3] SONG X, SHAN Y, CAO L, ZHONG X, WANG X, GAO Y, WANG K, WANG W, ZHU T. Decolorization and detoxication of malachite green by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing novel thermostable laccase from *Trametes trogii*[J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130 591.
- [4] BIAN X, WANG W, ABUDUREXITI M, ZHANG X, MA W, SHI G, DU L, XU M, WANG X, TAN C, SUN H, HE X, ZHANG C, ZHU Y, ZHANG M, YE D, WANG J. Integration analysis of single-cell multi-omics reveals prostate cancer heterogeneity[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(18): e2305724.
- [5] BIEN T, KOERFER K, SCHWENZFEIER J, DREISEWERT K, SOLTWISCH J. Mass spectrometry imaging to explore molecular heterogeneity in cell culture[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(29): e2114365119.
- [6] WANG T, CHENG X, XU H, MENG Y, YIN Z, LI X, HANG W. Perspective on advances in laser-based high-resolution mass spectrometry imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(1): 543-553.

- [7] 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.
- [8] MA S, LENG Y, LI X, MENG Y, YIN Z, HANG W. High spatial resolution mass spectrometry imaging for spatial metabolomics: advances, challenges, and future perspectives[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 159: 116-902.
- [9] JUN J H, SONG Z, LIU Z, NIKOLAU B J, YEUNG E S, LEE Y J. High-spatial and high-mass resolution imaging of surface metabolites of *Arabidopsis thaliana* by laser desorption-ionization mass spectrometry using colloidal silver[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(8): 3 255-3 265.
- [10] GUINAN T, KIRKBRIDE P, PIGOUE P E, RONCI M, KOBUS H, VOELCKER N H. Surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry techniques for application in forensics[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2015, 34(6): 627-640.
- [11] 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.
- [12] MENG Y, HANG W, ZARE R N. Microlensed fiber allows subcellular imaging by laser-based mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(8): 2 558-2 578.
- [13] ZHANG D, PU H, HUANG L, SUN D W. Advances in flexible surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates for nondestructive food detection: fundamentals and recent applications[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109: 690-701.
- [14] XIAO X, CHEN C, DENG J, WU J, HE K, XIANG Z, YANG Y. Analysis of trace malachite green, crystal violet, and their metabolites in zebrafish by surface-coated probe nano-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2020, 217: 121-064.
- [15] CHEN D, DU M, HUANG Y, XU Y, CHEN Y, MA L, XIE Q, ZHU X, CHEN Z, XU H, WU X, YIN Z. Plasmonic polydopamine-modified TiO₂ nanotube substrates for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging[J]. *Nano Research*, 2023, 16(2): 3 028-3 039.
- [16] SCHWARTZ S A, REYZER M L, CAPRIOLI R M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 38(7): 699-708.
- [17] MASTERS J R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(4): 315-319.
- [18] ADEY A, BURTON J N, KITZMAN J O, HIATT J B, LEWIS A P, MARTIN B K, QIU R, LEE C, SHENDURE J. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line[J]. *Nature*, 2013, 500(7 461): 207-211.
- [19] YI M, PARTHIBAN P, HWANG J, ZHANG X, JEONG H, PARK D H, KIM D K. Effect of a bispindone analog on mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2014, 44(1): 327-335.
- [20] WANG R, LI B, LAM S M, SHUI G. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2020, 47(2): 69-83.
- [21] WU J, ZHANG W, OUYANG Z. Marching toward human lipidome project-Advancement of structural lipidomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2024, 177: 117-765.
- [22] 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.
- [23] HISHIKAWA D, HASHIDATE T, SHIMIZU T, SHINDOU H. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells[J]. *Journal of Lipid Research*, 2014, 55(5): 799-807.
- [24] PUENTE-COBACHO B, ESTEO C, ALTEA-MANZANO P, GARCIA-PEREZ J L, QUILES J L, SANCHEZ-ROVIRA P, MARTÍN-SALVAGO M D, MOLINA-JIMÉNEZ L, LUQUE R J, FENDT S M, VERA-RAMÍREZ L. *De novo* lipogenesis protects dormant breast cancer cells from ferroptosis and promotes metastasis[J]. *Redox Biology*, 2025, 80: 103-480.
- [25] EPAND R M. Features of the phosphatidylinositol cycle and its role in signal transduction[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2017, 250(4): 353-366.
- [26] BAKER Z N, ZHU Y, GUERRA R M, SMITH A J, ARRA A, SERRANO L R, OVERMYER K A, MUKHERJI S, CRAIG E A, COON J J, PAGLIARINI D J. Triacylglycerol mobilization underpins mitochondrial stress recovery[J]. *Nature Cell Biology*, 2025, 27(2): 298-308.
- [27] HUANG F, WANG H, YANG T, YANG D, LIU P, ALOLGA R N, MA G, LIU B, PAN A, LIU S, QI L. Ceramides increase mitochondrial permeabilization to trigger mtDNA-dependent inflammation in astrocytes during brain ischemia[J]. *Metabolism*, 2025, 166: 156-161.

(收稿日期: 2025-08-01; 修回日期: 2025-10-17)