

诱导纳升电喷雾串联质谱法区分单细胞中 柠檬酸/异柠檬酸

零 晨, 侯壮豪, 黄光明

(中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽 合肥 230026)

摘要: 柠檬酸与异柠檬酸是三羧酸循环中的关键异构体, 区分二者对于解析细胞代谢调控至关重要。然而, 单细胞样品量有限且代谢成分复杂, 使其在单细胞水平的区分和定量面临挑战。本研究建立了一种基于诱导纳升电喷雾电离串联质谱(InESI MS/MS)方法, 实现了单个活细胞内柠檬酸与异柠檬酸的直接区分与定量。利用标准溶液二级质谱图, 鉴定出具有区分性的特征碎片离子(柠檬酸 m/z 87、异柠檬酸 m/z 117), 并建立相对定量校准曲线。通过进一步在人工细胞内液中建立柠檬酸的绝对定量模型, 并应用于单个 HepG2 细胞分析, 成功获取胞内全谱及目标离子(m/z 191)的二级质谱图, 基于建立的定量模型推算出单个细胞内柠檬酸和异柠檬酸浓度分别约为 205、36 $\mu\text{mol/L}$ 。外源添加实验显示, 不同孵育条件下, 两者胞内相对含量存在显著差异。该方法可为单细胞内柠檬酸和异柠檬酸的直接、快速区分与定量提供有效手段, 有望拓展至其他重要同分异构体代谢物的单细胞研究。

关键词: 单细胞; 诱导纳升电喷雾(InESI); 质谱; 柠檬酸; 异柠檬酸; 同分异构体

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0808-08

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0095

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0095

Single-Cell Discrimination of Citrate/Isocitrate Isomers *via* Induced Nano-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

LING Chen, HOU Zhuang-hao, HUANG Guang-ming

(School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Citrate (CA) and isocitrate (ICA) are key isomeric metabolites in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, synthesized sequentially from acetyl-CoA and oxaloacetate, with isomerization catalyzed by aconitase 2 (ACO2). The dynamic balance between CA and ICA is essential for cellular energy metabolism, redox homeostasis, and signaling. Understanding their distribution and regulation at the single-cell level is critical for deciphering cellular heterogeneity in physiological and pathological processes. However, conventional methods, such as liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), rely on chromatographic separation and necessitate metabolite extraction from large cell populations (>1 000 cells), obscuring single-cell heterogeneity. Therefore, there is an urgent need for analytical methods capable of direct differentiation of CA and ICA within individual cells. Nano-electrospray ionization mass spectrometry (nanoESI-MS), known for its high sensitivity, low sample consumption,

and minimal sample preparation, is well-suited for single-cell metabolomics. Although tandem mass spectrometry (MS/MS) can theoretically differentiate isomers *via* characteristic fragment ions, practical application in single cells is hindered by matrix suppression. To overcome this problem, an induced nano-electrospray ionization (InESI) technique was employed. InESI utilizes specific frequency alternating current pulses applied to an electrode, inducing ionization from the sample capillary without direct contact, effectively reducing salt interference and improving ionization efficiency and sensitivity. In this study, an InESI MS/MS method was established for the direct differentiation and quantitation of CA and ICA within single living cells. Analysis of standard solutions identified diagnostic fragment ions: m/z 87 for CA and m/z 117 for ICA. A relative quantitation calibration curve based on the intensity ratio (I_{87}/I_{117}) versus concentration ratio demonstrated excellent linearity ($R^2=0.9930$). Additionally, an absolute quantification curve for CA was constructed using the intensity of the precursor ion (m/z 191) in artificial intracellular solution. Applied to single HepG2 cells, the method successfully acquired full scan spectra (detecting endogenous metabolites such as glutamate (m/z 146) and glutathione (m/z 306) and targeted MS/MS spectra of the precursor ion (m/z 191, $[M-H]^-$ for both isomers), enabling direct, label-free differentiation. Based on the established curves, intracellular concentrations of CA and ICA were determined to be approximately 205 $\mu\text{mol/L}$ and 36 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Further, exogenous incubation experiments (2 mmol/L CA, 2 mmol/L ICA, or 1 mmol/L CA+1 mmol/L ICA) revealed significant differences in the intracellular CA/ICA relative content ratio (6.27 ± 1.19 , 1.49 ± 0.09 , and 3.99 ± 1.29 , respectively), aligning with theoretical expectations and validating the method's reliability. This work provides a powerful tool for the rapid, direct differentiation and quantitation of CA and ICA isomers in single cells, offering a strategy for analyzing other isomeric metabolites in single-cell metabolomics.

Key words: single-cell; induced nano-electrospray (InESI); mass spectrometry; citrate; isocitrate; isomer

柠檬酸(citrate, CA)与异柠檬酸(isocitrate, ICA)是三羧酸循环(TCA cycle)中的核心同分异构体代谢物,对细胞能量代谢、氧化还原稳态及信号传导至关重要^[1-5]。在TCA循环中,柠檬酸由乙酰辅酶A和草酰乙酸缩合生成,并在顺乌头酸酶2(aconitase, ACO2)催化下,经顺式乌头酸中间体异构化为异柠檬酸^[6]。在单细胞水平上深入解析这对异构体的分布与调控,对于揭示细胞异质性在生理病理过程中的作用具有重要意义。然而,单细胞内代谢物含量极低,且复杂基质背景下同分异构体具有相同的分子质量(m/z 191 $[M-H]^-$)和高度相似的理化性质,使得在单细胞尺度上实现二者的直接、准确区分面临巨大挑战。

目前,区分柠檬酸与异柠檬酸主要依赖色谱-质谱联用技术,如液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)^[7-9]和气相色谱-质谱(GC-MS)^[10-12]。这些方法均通过色谱分离实现异构体区分,通常需要

从大量细胞($10^4\sim 10^6$)中提取富集代谢物,无法获取单细胞信息,从而掩盖了细胞间的异质性。细胞群体分析显示,柠檬酸与异柠檬酸浓度在不同细胞类型和状态下存在显著差异。柠檬酸浓度范围可从数十至数百 $\mu\text{mol/L}$ 量级^[13-15],而异柠檬酸浓度通常显著低于柠檬酸,常处于低 $\mu\text{mol/L}$ 甚至接近检测限水平^[13-14]。然而,这些群体测量结果反映的是平均值,无法揭示细胞个体差异。更重要的是,受限于传统方法对极低含量样品(如单细胞)的检测灵敏度不足及对样品的破坏性富集,目前尚无在单细胞水平上原位、直接测定柠檬酸和异柠檬酸绝对浓度及其比例的方法报道。

近年来,单细胞质谱技术^[16-17],例如基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)^[18-20]、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)^[21-23]、电喷雾电离质谱(ESI-MS)^[24-27]等,在单细胞分析领域发展迅速。

其中,纳升电喷雾电离质谱(nanoESI-MS)^[28-29]因其高灵敏度、低样品消耗和无需复杂样品前处理等优势,在单细胞代谢物原位检测中展现出巨大潜力。通过结合二级质谱(MS/MS)分析,理论上可依据特征碎片离子谱图区分同分异构体^[9,30]。然而,单细胞基质中高浓度盐分等干扰物常导致严重的离子抑制效应,显著降低了目标离子信号强度并影响其碎裂效率,阻碍了基于碎片离子的可靠区分。传统 nano-ESI 采用直流电压驱动且需电极接触样品,易引发交叉污染和盐结晶堵塞针尖,限制了其在复杂基质中的稳定性。本课题组开发了诱导纳升电喷雾电离(InESI)技术^[31],通过在电极上施加特定频率的交流脉冲,在样品毛细管与电极保持非接触的情况下诱导样品离子化。该设计不仅避免了电极污染,更能有效减少盐离子干扰,提升高盐环境下的分析稳定性。Zhu 等^[32]研究表明,在模拟脑脊液(aCSF)中,传统 nanoESI 因盐堵塞在 60 s 内信号完全丧失,而 InESI 可维持稳定喷雾超过 24 min。这种抗干扰特性结合提升的电离效率,为单细胞内同分异构体(如柠檬酸/异柠檬酸)的直接 MS/MS 分析提供了新策略。

本工作拟建立基于诱导纳升电喷雾电离串联质谱(InESI MS/MS)方法,旨在实现对单个活细胞内柠檬酸与异柠檬酸的原位直接区分与定量,考察不同外源添加条件下细胞内该异构体对的含量变化,为单细胞代谢组学中关键同分异构体的精准解析提供有效的技术手段。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Synapt G2-Si 质谱仪:美国 Waters 公司产品,配备 MassLynx4.1 数据处理系统;Eclipse Ti2 倒

置显微镜:日本尼康公司产品;P-2000 型激光拉针仪:美国 Sutter 公司产品;Milli-Q 纯水仪:美国 Millipore 有限公司产品;MFG-2230M 信号发生器:中国台湾固纬电子有限公司产品。

InESI MS/MS 装置示于图 1,核心组件为自制的 nano-ESI 源。拉制好的喷针(针尖内径 $\sim 1 \mu\text{m}$)置于铜片电极上,喷针尖端距质谱入口约 0.5 cm,通过外加交流电压实现离子化。

1.2 主要材料与试剂

二水合柠檬酸三钠、氯化钠、氯化钾、六水合氯化镁、碳酸氢铵、葡萄糖:国药集团化学试剂有限公司产品;异柠檬酸三钠:北京华中海威公司产品;*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(HEPES):北京百灵威科技有限公司产品;甲醇(HPLC级):美国 Honeywell Burdick[®]Jackson 公司产品;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液:上海 Sangon Biotech 公司产品;硼硅酸盐毛细管:美国 Sutter 公司产品;超纯水:由 Milli-Q 纯水仪制备。无特别说明溶剂均未进行任何提纯处理。

1.3 人工细胞内液制备

参考 Zhuang 等^[33]报道配制人工细胞内液:称取 0.104 4 g 氯化钾、0.003 5 g 氯化钠、0.027 6 g 氯化镁、0.007 9 g 碳酸氢铵、0.018 0 g 葡萄糖、0.023 8 g *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸,溶于 10 mL 超纯水中,充分混匀后调至 pH 7.4。

1.4 实验条件

1.4.1 细胞培养 将人肝癌细胞 HepG2 培养在 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素)中,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中。

1.4.2 外源代谢物孵育 取对数生长期 HepG2 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,加入新鲜配制且额外添

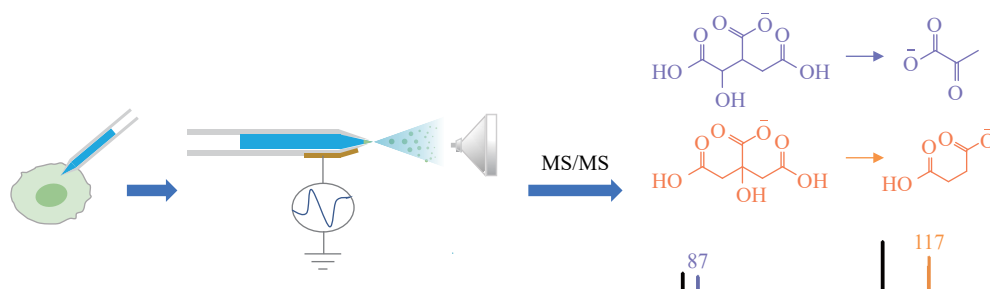


图 1 诱导纳升电喷雾电离串联质谱法检测单个细胞中柠檬酸/异柠檬酸的装置示意图

Fig. 1 Schematic of the detection of CA/ICA in single cells by InESI MS/MS

加不同代谢物的培养基(2 mmol/L 柠檬酸、异柠檬酸或 1 mmol/L 柠檬酸+1 mmol/L 异柠檬酸混合溶液), 将各组细胞放置在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 2 h。每组实验独立检测并分析 5 个单细胞。

1.4.3 单细胞前处理与取样 使用 PBS 清洗细胞 3 次去除培养基残留, 将细胞置于 PBS 中以待取样。在倒置显微镜下, 使用预注甲醇-水溶液(1:4, *V/V*)的纳米喷针对单个细胞进行穿刺取样。通过精密控制的负压系统施加气压-34 kPa, 持续抽取 5 s, 以标准化取样体积。单细胞内容物进入喷针后, 立即进行质谱分析。

1.4.4 质谱条件 负离子采集模式; 毛细管入口温度 100 °C; 扫描时间 0.5 s; 全谱质量扫描范围 m/z 60~900, 二级质谱质量扫描范围 m/z 50~300。二级质谱图通过碰撞诱导解离(CID)获得, 捕集碰撞能量(Tape CE)设定为 4 V, 传输碰撞能量(transfer CE)设定为 5 V, 构建相对定量曲线及在单细胞检测中启用“Target Enhancement Mass”(目标离子增强)功能, 并将目标离子设定为 m/z 117。电源为外加交流电压, 频率 1 000 Hz。

2 结果与讨论

2.1 基于特征碎片离子的异构体区分

为实现单细胞基质中柠檬酸与异柠檬酸的特异性区分, 本研究采用 1 mg/L 柠檬酸、异柠檬酸、柠檬酸-异柠檬酸(1:1, *V/V*)标准溶液进行二级质谱分析, 以筛选和鉴定其诊断性特征碎片离子。在捕集碰撞能量设定为 4 V、传输碰撞能量设定为 5 V 的条件下, 获得 3 种样品的二级质谱图, 示于图 2。结果显示, 柠檬酸和异柠檬酸均产生 m/z 85、111、129 等共同碎片离子, 主要源于羧基断裂、中性丢失及脱水反应。例如, m/z 147 由母离子 $[M-H]^-$ 经中性丢失 1 分子 CO₂ 形成; 同时, 两者展现出区分性的特征碎片离子。柠檬酸特征离子为 m/z 87(C₃H₃O₃⁻), 推测由 m/z 147 经连续脱羧(CO₂)和脱甲基(CH₃)反应形成, 其对称分子结构可能促进稳定的烯醇化中间体形成。异柠檬酸则特异性产生 m/z 117(C₄H₅O₄⁻)和 m/z 73(C₃H₅O₂⁻), 其中 m/z 117 的生成与异柠檬酸分子中 β -羟基空间位阻诱导的重排反应有关, 导致 m/z 147 丢失 1 分子 CH₂O^[30]。在二者等体积混合溶液的二级质谱图中, m/z

87、117 均明显存在, 验证了这 2 种离子作为异构体诊断标志的可靠性和特异性。

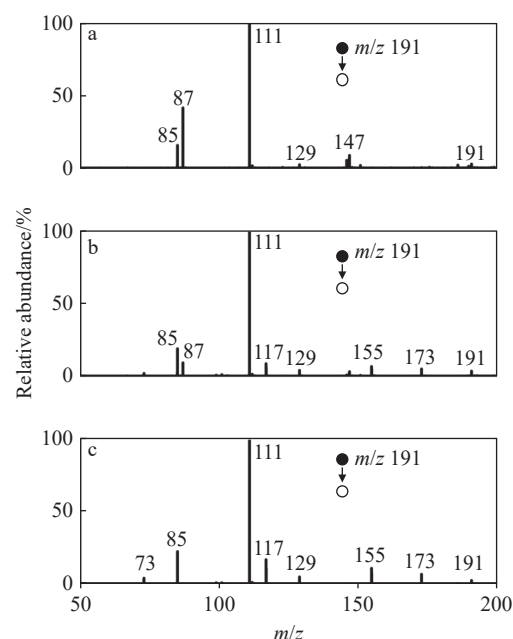


图 2 负离子模式下, 诱导纳升电喷雾电离串联质谱法检测柠檬酸(a)、柠檬酸-异柠檬酸(1:1, *V/V*)(b)和异柠檬酸(c)的二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectra of CA (a), CA-ICA (1:1, *V/V*) (b) and ICA (c) by InESI MS/MS under negative ion mode

2.2 绝对定量曲线和相对定量曲线的建立

为实现单细胞水平柠檬酸与异柠檬酸的同步定性与定量分析, 本研究构建了协同作用的双重定量模型。首先, 针对 2 种同分异构体比例分析的需求, 建立了基于特征碎片离子强度比(I_{87}/I_{117})的相对定量方法。通过调节柠檬酸/异柠檬酸标准溶液的浓度比例(1:3~19:1), 利用 InESI MS/MS 技术系统考察这 2 个关键碎片离子的响应规律。结果表明, 特征碎片离子强度比(I_{87}/I_{117})与柠檬酸/异柠檬酸浓度比之间呈良好的线性关系, 线性相关系数(R^2)为 0.993 0, 示于图 3, 表明该相对定量模型在不同配比条件下均能精准反映异构体比例变化。该方法有效规避了单细胞体积差异带来的绝对信号波动, 为后续真实细胞内比例的精确测定提供了可靠的校正基础。

其次, 为实现单细胞中柠檬酸和异柠檬酸的绝对浓度测定, 建立了模拟细胞内液基质的绝对定量标准曲线。验证实验显示, 在相同浓度下, 柠檬酸和异柠檬酸母离子(m/z 191)的信号强度

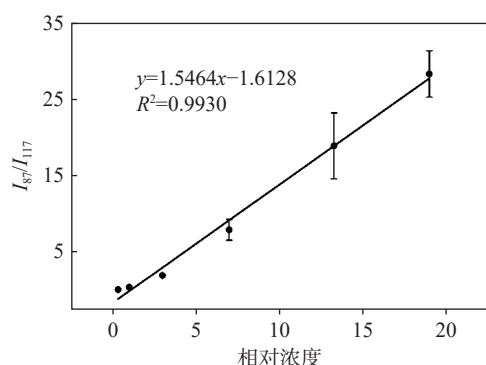


图3 柠檬酸和异柠檬酸标准溶液的相对定量标准曲线

Fig. 3 Calibration curve for relative quantitation of CA and ICA

无显著差异,因此采用柠檬酸在人工细胞内液中构建绝对定量曲线。考虑到高盐基质对信号的抑制作用,将配制的人工细胞内液(具体成分见1.3节)稀释10倍,分别加入梯度浓度(10~200 mg/L)的柠檬酸标准品,通过InESI-MS采集全扫描模式下 m/z 191 的信号强度。结果显示,柠檬酸浓度与其信号响应强度呈较好的线性关系,示于图4,表明所建立的定量方法具有较好的适用性和准确性。

该双标准曲线模型结合了相对定量与绝对定量方法的优势:相对定量模型通过碎片离子强度比准确反映异构体间的浓度比例;而绝对定量模型基于母离子信号定量确定两者总浓度;两者联合可计算细胞内柠檬酸和异柠檬酸的绝对浓度。

2.3 单个 HepG2 细胞中柠檬酸/异柠檬酸的区分与定量

本研究将所建立的方法应用于单个 HepG2 细胞的直接分析,以检测在实际生物样本中的

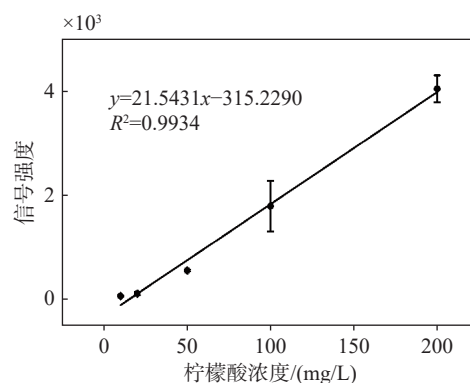


图4 柠檬酸在人工细胞内液中的标准曲线

Fig. 4 Calibration curve of CA in artificial intracellular solution

应用情况。通过交替采集方式,同时获取目标母离子 (m/z 191) 的二级谱图和全扫描谱图,示于图5。全谱中成功检测到谷氨酸 (m/z 146) 和谷胱甘肽 (m/z 306) 等多种细胞内源代谢物,证明采样毛细管针尖有效穿刺细胞膜并实现胞质代谢物的离子化,示于图5a。目标离子 m/z 191 的信号强度为681,基于绝对定量曲线计算,细胞中柠檬酸和异柠檬酸的总浓度为46.24 mg/L ($\sim 241 \mu\text{mol/L}$)。

在 m/z 191 的二级谱图中,同时检测到柠檬酸特征碎片离子 m/z 87 与异柠檬酸特征碎片离子 m/z 117,其强度比 (I_{87}/I_{117}) 约为7.12,示于图5b。通过相对定量曲线换算,获得柠檬酸/异柠檬酸浓度比约为5.64,进而推算出该细胞中柠檬酸浓度约为39.28 mg/L ($\sim 205 \mu\text{mol/L}$)、异柠檬酸浓度约为6.96 mg/L ($\sim 36 \mu\text{mol/L}$)。该柠檬酸浓度处于文献报道的典型癌细胞范围(71~761 $\mu\text{mol/L}$)内^[13-15],而异柠檬酸浓度与Hodek等^[14]报道的C2C12肌细胞浓度(27.95 $\mu\text{mol/L}$)相近。该方法

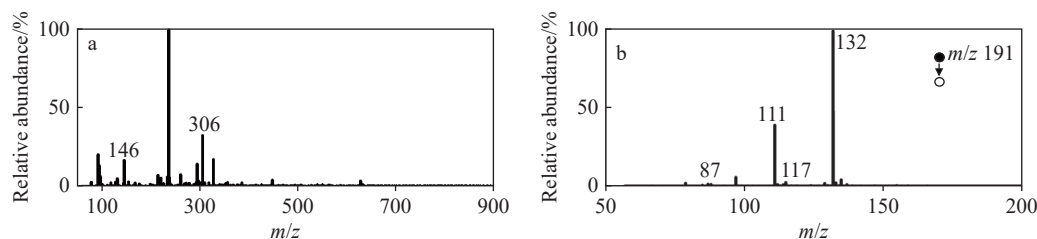


图5 负离子模式下,诱导纳升电喷雾电离串联质谱法检测单个 HepG2 细胞的全谱(a)和母离子 m/z 191 的二级谱图(b)

Fig. 5 Full scan mass spectrum of a HepG2 cell (a) and MS/MS spectrum of m/z 191 (b) by InESI MS/MS under negative ion mode

首次实现了在单细胞水平上对柠檬酸与异柠檬酸这对关键代谢同分异构体的无标记、直接区分与定量,为单细胞代谢组学研究提供了强有力的技术手段。

相较于传统 LC-MS/MS 方法需汇集大量细胞以获得足够分析物的局限,本方法基于 InESI 对高盐基质效应的显著抑制及对离子化效率与碎片离子检测灵敏度的提升,实现了低丰度代谢物的原位、实时分析,极大地推动了单细胞代谢组学中同分异构体的研究。需要指出的是,目前绝对定量仍依赖外标曲线,未来若能实现单细胞内绝对定量的在线校准,将进一步提升单个细胞内柠檬酸和异柠檬酸的定量精度和准确性。

2.4 外源孵育对 HepG2 细胞中柠檬酸/异柠檬酸浓度的影响

为进一步验证方法的准确性和灵敏度,本研究设计了外源添加实验,将 HepG2 细胞分为柠檬酸组(添加 2 mmol/L 柠檬酸)、异柠檬酸组(添加 2 mmol/L 异柠檬酸)以及混合组(同时添加 1 mmol/L 柠檬酸和 1 mmol/L 异柠檬酸),孵育 2 h 后进行检测,结果示于图 6。可见,3 组细胞中柠檬酸/异柠檬酸的相对含量比(基于 I_{87}/I_{117} 及校准曲线计算)存在显著差异。具体而言,柠檬酸组比值最高,为 6.27 ± 1.19 ;混合组次之,比值为 3.99 ± 1.29 ;异柠檬酸组最低,为 1.49 ± 0.09 。这些实测比值与各组的理论添加比例高度一致,证

实了本方法能够准确反映细胞内柠檬酸/异柠檬酸相对含量的动态变化,具备良好的可靠性。此外,该实验进一步证明了 InESI MS/MS 技术在复杂生物样品中区分结构相似异构体的优越性能,具备应用于单细胞代谢网络动态监测和代谢调控机制解析的潜力。

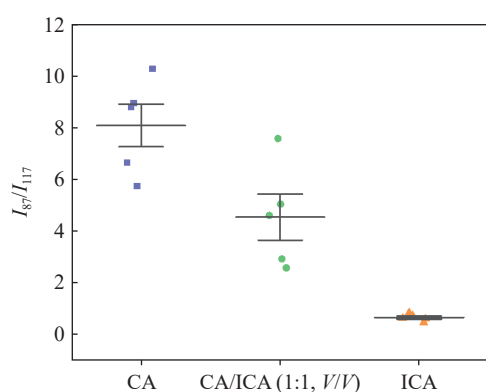
本方法实现了单细胞尺度柠檬酸/异柠檬酸的精准定量,为揭示代谢调控机制提供了新视角。柠檬酸/异柠檬酸比值可直接反映顺乌头酸酶的催化效率,而顺乌头酸酶活性受铁硫簇稳定性、活性氧(ROS)及氧气供应等多因素调节。例如,缺氧或活性氧累积可显著抑制顺乌头酸酶活性,导致柠檬酸堆积与异柠檬酸减少(柠檬酸/异柠檬酸比值升高)^[34-35],这一现象可通过本方法在单细胞水平直接捕捉。顺乌头酸酶作为连接柠檬酸/异柠檬酸比例变化与疾病的核心枢纽,在不同疾病中呈现差异化调控。例如,在前列腺癌中,顺乌头酸酶异常活化(通过降低锌离子浓度解除对顺乌头酸酶的抑制),加速柠檬酸向异柠檬酸转化,促进能量生成并驱动恶性表型^[34];而在侵袭性非小细胞肺癌中,顺乌头酸酶低表达导致细胞内铁稳态失调,通过降低铁调节蛋白 1 (IRP1)蛋白表达和游离铁池水平,最终加速肿瘤生长^[36]。因此,通过监测单细胞柠檬酸和异柠檬酸的比例,能够直接反映顺乌头酸酶活性,为癌症代谢机制研究提供新思路。未来,可结合多组学手段,进一步探讨异构体代谢在细胞功能及疾病状态中的调节作用。

3 结论

本研究建立了基于 Induced Nano-ESI MS/MS 的单细胞同分异构体区分方法,在单细胞水平上实现了柠檬酸与异柠檬酸的无标记、直接区分。该方法基于特征碎片离子(m/z 87、117)对单个 HepG2 细胞中的目标物进行特异性区分,并结合全谱对其定量。最后,通过外源添加实验证实了该方法的可靠性与准确性,为拓展应用于其他关键同分异构体的单细胞分析提供了有力工具。

参考文献:

- [1] WILLIAMS N C, O'NEILL L A J. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in



注: CA 组为外源添加 2 mmol/L 柠檬酸; CA/ICA(1:1, V/V)组为外源添加 1 mmol/L 柠檬酸+1 mmol/L 异柠檬酸; ICA 组为外源添加 2 mmol/L 异柠檬酸; $n=5$

图 6 外源柠檬酸/异柠檬酸孵育后, HepG2 细胞中特征碎片离子强度比(I_{87}/I_{117})

Fig. 6 Intensity ratio of characteristic fragments (I_{87}/I_{117}) in HepG2 cells after incubation with exogenous CA/ICA

- innate immunity and inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 141.
- [2] WANG R, LOU L. The central role of the citric acid cycle in energy metabolism: from metabolic intermediates to regulatory mechanisms[J]. *Biological Evidence*, 2024, 14(3): 110-121.
- [3] MA C, TIAN X, KIM J P, XIE D, AO X, SHAN D, LIN Q, HUDOCK M R, BAI X, YANG J. Citrate-based materials fuel human stem cells by metabonegenic regulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(50): E11741-E11750.
- [4] IACOBAZZI V, INFANTINO V. Citrate—new functions for an old metabolite[J]. *Biological Chemistry*, 2014, 395(4): 387-399.
- [5] ARNOLD P K, FINLEY L W S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(2): 102 838.
- [6] AKRAM M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 68(3): 475-478.
- [7] AL KADHI O, MELCHINI A, MITHEN R, SAHA S. Development of a LC-MS/MS method for the simultaneous detection of tricarboxylic acid cycle intermediates in a range of biological matrices[J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 2017: 5 391 832.
- [8] WINTERHOFF M, CHEN F, SAHINI N, EBENSEN T, KUHN M, KAEVER V, BÄHRE H, PESSLER F. Establishment, validation, and initial application of a sensitive LC-MS/MS assay for quantification of the naturally occurring isomers itaconate, mesaconate, and citraconate[J]. *Metabolites*, 2021, 11(5): 270.
- [9] GUAN S, ARMBRUSTER M R, HUANG T, EDWARDS J L, BYTHELL B J. Isomeric differentiation and acidic metabolite identification by piperidine-based tagging, LC-MS/MS, and understanding of the dissociation chemistries[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(13): 9 305-9 311.
- [10] LI W, HUO J, BERIK E, WU W, HOU J, LONG H, LEI M, LI Z, ZHANG Z, WU W. Determination of the intermediates in glycolysis and tricarboxylic acid cycle with an improved derivatization strategy using gas chromatography-mass spectrometry in complex samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2023, 1 692: 463 856.
- [11] SURABHI S, JACHMANN L H, LALK M, HAMMER-SCHMIDT S, METHLING K, SIEMENS N. Bronchial epithelial cells accumulate citrate intracellularly in response to pneumococcal hydrogen peroxide[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(11): 2 971-2 978.
- [12] KIM Y L, LEE W, CHUNG S H, YU B M, LEE Y C, HONG J. Metabolic alterations of short-chain fatty acids and TCA cycle intermediates in human plasma from patients with gastric cancer[J]. *Life Sciences*, 2022, 309: 121 010.
- [13] YAMAMOTO T, SATO K, YAMAGUCHI M, MITAMURA K, TAGA A. Development of simultaneous quantitative analysis of tricarboxylic acid cycle metabolites to identify specific metabolites in cancer cells by targeted metabolomic approach[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 584: 53-59.
- [14] HODEK O, HENDERSON J, ARGEMI-MUNTADAS L, KHAN A, MORITZ T. Structural elucidation of 3-nitrophenylhydrazine derivatives of tricarboxylic acid cycle acids and optimization of their fragmentation to boost sensitivity in liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2023, 1 222: 123 719.
- [15] FIORI J, AMADESI E, FANELLI F, TROPEANO C V, RUGOLO M, GOTTI R. Cellular and mitochondrial determination of low molecular mass organic acids by LC-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 150: 33-38.
- [16] 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.
- [17] TAJIK M, BAHARFAR M, DONALD W A. Single-cell mass spectrometry[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(11): 1 374-1 392.
- [18] CHAN Y H, PATHMASIRI K C, PIERRE-JACQUES D, HIBBARD M C, TAO N, FISCHER J L, YANG E, COLOGNA S M, GAO R. Gel-assisted mass spectrometry imaging enables sub-micrometer spatial lipidomics[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5 036.
- [19] ZHANG Y, CHEN P, GENG H, LI M, CHEN S, MA B, MA Y, LAI J, CUI X, CHONG W, CHEN H, WANG X, SUN C. Development of a single-cell spatial metabolomics method for the characterization of cell-cell metabolic interactions[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(14): 7 986-7 994.
- [20] KRESTENSEN K K, HENDRIKS T F E, GRGIC A, DERWEDUWE M, de SMET F, HEEREN R M A,

- CUYPERS E. Molecular profiling of glioblastoma patient-derived single cells using combined MALDI-MSI and MALDI-IHC[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(7): 3 846-3 854.
- [21] TIAN X, WANG Y, XU T, GUO Y, BI Y, LIU Y, LIANG Y, CUI W, LIU Y, HU L, YIN Y, CAI Y, JIANG G. Bioconcentration of inorganic and methyl mercury by algae revealed using dual-mass single-cell ICP-MS with double isotope tracers[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(18): 7 860-7 869.
- [22] FAN Z, RONG Y, SADHUKHAN T, LIANG S, LI W, YUAN Z, ZHU Z, GUO S, JI S, WANG J, KUSHWAHA R, BANERJEE S, RAGHAVACHARI K, HUANG H. Single-cell quantification of a highly biocompatible dinuclear iridium(III) complex for photocatalytic cancer therapy[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2022, 61(23): e202202098.
- [23] XU Y, CHEN B, HE M, CUI Z, HU B. All-in-one microfluidic chip for online labeling, separating, and focusing rare circulating tumor cells from blood samples followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(37): 14 061-14 067.
- [24] LOMBARD-BANEK C, LI J, PORTERO E P, ONJIKO R M, SINGER C D, PLOTNICK D O, AL SHABEEB R Q, NEMES P. *In vivo* subcellular mass spectrometry enables proteo-metabolomic single-cell systems biology in a chordate embryo developing to a normally behaving tadpole (*X. laevis*)[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2021, 60(23): 12 852-12 858.
- [25] van der LOH M, SCHIFFMANN M, POLACK M, WINK K, BELDER D. Coupling of droplet-on-demand microfluidics with ESI/MS to study single-cell catalysis[J]. *RSC Advances*, 2024, 14(35): 25 337-25 346.
- [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] 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.
- [28] ZHENG X, HOU Z, QIAN Y, ZHANG Y, CUI Q, WANG X, SHEN Y, LIU Z, ZHOU Y, FU B, SUN R, TIAN Z, HUANG G, WEI H. Tumors evade immune cytotoxicity by altering the surface topology of NK cells[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(5): 802-813.
- [29] LAN Y, CHEN X, YANG Z. Quantification of nitric oxide in single cells using the single-probe mass spectrometry technique[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(51): 18 871-18 879.
- [30] HU Q, SUN Y, MU X, WANG Y, TANG H. Reliable quantification of citrate isomers and isobars with direct-infusion tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2023, 259: 124 477.
- [31] HUANG G, LI G, COOKS R G. Induced nanoelectrospray ionization for matrix-tolerant and high-throughput mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2011, 50(42): 9 907-9 910.
- [32] ZHU H, ZOU G, WANG N, ZHUANG M, XIONG W, HUANG G. Single-neuron identification of chemical constituents, physiological changes, and metabolism using mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(10): 2 586-2 591.
- [33] ZHUANG M, HOU Z, CHEN P, LIANG G, HUANG G. Introducing charge tag *via* click reaction in living cells for single cell mass spectrometry[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(28): 7 308-7 312.
- [34] XUE Y N, LIU Y N, SU J, LI J L, WU Y, GUO R, YU B B, YAN X Y, ZHANG L C, SUN L K, LI Y. Zinc cooperates with p53 to inhibit the activity of mitochondrial aconitase through reactive oxygen species accumulation[J]. *Cancer Medicine*, 2019, 8(5): 2 462-2 473.
- [35] MATASOVA L V, POPOVA T N. Aconitate hydratase of mammals under oxidative stress[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2008, 73(9): 957-964.
- [36] MIRHADI S, ZHANG W, PHAM N A, KARIMZADEH F, PINTILIE M, TONG J, TAYLOR P, KRIEGER J, PITCHER B, SYKES J, WYBENGA-GROOT L, FLADD C, XU J, WANG T, CABANERO M, LI M, WEISS J, SAKASHITA S, ZASLAVER O, YU M, CAUDY A A, ST-PIERRE J, HAWKINS C, KISLINGER T, LIU G, SHEPHERD F A, TSAO M S, MORAN M F. Mitochondrial aconitase ACO₂ links iron homeostasis with tumorigenicity in non-small cell lung cancer[J]. *Molecular Cancer Research*, 2023, 21(1): 36-50.

(收稿日期: 2025-06-18; 修回日期: 2025-08-07)