

基于单细胞代谢组学探究 LncRNA LINC01063 对结直肠癌细胞的影响机制

郭登辉, 王梦颖, 赵维坚, 赵瑶瑶, 郭广生, 汪夏燕

(北京工业大学化学与生命科学学院化学系, 材料循环低碳再生全国重点实验室,
环境安全与生物效应卓越中心, 北京 100124)

摘要: 长非编码 RNA 是人类基因组中长度超过 200 个核苷酸且不编码蛋白质的功能性 RNA 分子, 广泛参与基因表达调控、染色质修饰、表观遗传调控等生物学过程, 并在细胞分化、发育及疾病发生中发挥着重要作用。长非编码 RNA LINC01063 是一种在结直肠癌组织中高表达的长非编码 RNA, 其功能尚未明确。本研究利用完整活单细胞电发射电离质谱装置, 考察了 LINC01063 对结直肠癌细胞 DLD-1 细胞代谢的影响。通过对 1 397 个 DLD-1 细胞和 1 946 个干预 LINC01063 表达的 DLD-1 细胞进行单细胞代谢组学检测, 分别检测到 1 163、960 个代谢物相关离子, 共计 1 254 个代谢物相关离子。通过对单细胞代谢数据的降维分析, 能够实现 LINC01063 基因干扰前后 DLD-1 细胞的区分聚类; 同时, 对 2 组细胞中差异代谢物的鉴定和通路分析发现, 干扰 LINC01063 基因主要影响 DLD-1 细胞的氨基酸代谢和脂质代谢通路。本研究利用基于质谱的单细胞代谢技术, 考察了 LINC01063 干扰前后对结直肠癌细胞的代谢变化, 从单细胞代谢组学的角度阐述了长非编码 RNA LINC01063 对结直肠癌细胞的影响机制, 可为后续研究提供参考。

关键词: 单细胞代谢组学; 质谱; 长非编码 RNA; LINC01063; 结直肠癌; 基因干扰

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)06-0790-10

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0071

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0071

Investigating the Role of the Long Non-coding RNA (lncRNA) LINC01063 in Colorectal Cancer Cells Using Single-Cell Metabolomics

GUO Deng-hui, WANG Meng-ying, ZHAO Wei-jian, ZHAO Yao-yao, GUO Guang-sheng, WANG Xia-yan

(Center of Excellence for Environmental Safety and Biological Effects, State Key Laboratory of
Materials Low-Carbon Recycling, Department of Chemistry, College of Chemistry and Life Science,
Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is a highly prevalent form of cancer on a global scale. In 2022, global statistics indicated that more than 1.9 million new colorectal cancer cases and 930 000 deaths occurred worldwide. Its incidence and mortality rates rank third and second among malignant tumours, respectively. The development of colorectal cancer is the result of multiple complex molecular mechanisms, given the highly heterogeneous and complex nature of the disease. Long non-coding RNA (lncRNA) is a class of functional RNA molecules that are characterised by a length of

more than 200 nucleotides and an absence of protein-coding potential. LncRNA is extensively present in the human genome and plays a pivotal role in cancer development by regulating the proliferation, invasion, metastasis, and metabolic reprogramming of tumour cells. Long intergenic non-coding RNA 1063 (LINC01063) is an LncRNA that is highly expressed in colorectal cancer, but its mechanism of action has not yet been fully elucidated. Single-cell metabolomics has been demonstrated to reveal metabolic and phenotypic diversity among cells, thereby providing a more comprehensive understanding of cellular phenotypes when compared to genomics and transcriptomics. In this study, the effect of LINC01063 on the metabolism of DLD-1 colorectal cancer cells was investigated using intact living-cell electro-launching ionization mass spectrometry. Single-cell metabolomics was performed on 1 397 and 1 946 DLD-1 cells with LINC01063 expression interfered with. A total of 1 254 metabolite-associated ions were detected in the two cell types, with 1 163 and 960 ions detected in the two cell types, respectively. The dimensionality reduction analysis of single-cell metabolic data enabled the differentiation of DLD-1 cells before and after LINC01063 gene interference, and the metabolic pathways obtained from population cells were compared with those from single cells for analysis. Among them, 15 pathways were identified in both analysis methods, and the single-cell analysis additionally identified 12 unique metabolic pathways, such as glycerophospholipid metabolism and nicotinate and nicotinamide metabolism. This finding indicated that single-cell metabolic analysis has the potential to unveil metabolic features that are not discernible in population cells. The investigation revealed that interference with the LINC01063 gene primarily affected amino acid and lipid metabolism pathways in DLD-1 cells, as determined by single-cell metabolomics. A combination of mass spectrometry-based single-cell metabolic technology and rigorous research methods was utilized to investigate metabolic changes in colorectal cancer cells before and after LINC01063 interference. The present study has utilized a comprehensive single-cell metabolomics analysis to elucidate the mechanism by which LINC01063 exerts its effect on colorectal cancer cells, and can provide a valuable reference for future research in this field.

Key words: single-cell metabolomics; mass spectrometry; long non-coding RNA; LINC01063; colorectal cancer; gene interference

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球范围内的高发性恶性肿瘤之一^[1]。2022 年全球新发结直肠癌病例超 190 万例, 死亡病例达 93 万例, 其发病率与死亡率分别位列恶性肿瘤第 3 位和第 2 位^[2]。由于结直肠癌的高度异质性和复杂性, 其发生发展涉及多种复杂的分子机制。长非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是人类基因组中长度超过 200 个核苷酸且不编码蛋白质的功能性 RNA 分子, 通过调控肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和代谢重编程等过程, 在癌症的发生发展中发挥着重要作用^[3]。其中, 长基因间非编码 RNA 1063 (long intergenic non-coding 1063, LINC01063) 是一种在结直肠癌中高表达的 LncRNA^[4], 其作用机制尚未得到充分阐明。

细胞代谢物作为生命活动的直接产物, 不仅

蕴含着丰富的细胞表型信息, 还能够短时间内反映细胞状态的动态变化^[5]。然而, 传统的代谢组学分析对象为群体细胞, 获得的是多数细胞的平均信息, 因此掩盖了细胞间的异质性; 而单细胞代谢组学能够揭示细胞间的代谢多样性和表型多样性, 提供比基因组学和转录组学更丰富的细胞表型信息^[6-7]。为更准确、全面地剖析 DLD-1 结直肠癌细胞在 LINC01063 干扰后的响应机制, 需要采用能够快速直接检测代谢物的单细胞分析方法。

在代谢组学研究中, 质谱凭借高灵敏度、无需标记、可同时检测多种物质以及良好的定性能力等优势, 已成为分析生物样本 (如组织和细胞) 的有力工具^[8-9]。近年来, 基于质谱的单细胞代谢物分析方法取得了显著进展, 已被证实可用

于肿瘤细胞的研究^[10],例如电感耦合等离子体质谱^[11]、基质辅助激光解吸/电离质谱^[12]、二次离子质谱^[13]及电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)^[14]等方法。其中,ESI-MS展现出了出色的定性分析能力,能够对单细胞进行实时、快速的检测分析^[15],例如,实时单细胞质谱^[16]、单探针质谱^[17]、诱导感应电喷雾质谱^[18]、免标记单细胞质谱流式^[19]、有机质谱流式细胞术^[20]、完整活单细胞电发射电离质谱(intact living-cell electro-launching ionization mass spectrometry, ILCEI-MS)^[21-22]等。这些技术为单细胞代谢组学研究注入了强大动力,有力地推动了该领域的发展。

本研究以单细胞代谢组学技术为主要分析手段,利用ILCEI-MS装置检测LINC01063被干扰前后DLD-1细胞中代谢产物的变化情况,旨在从单细胞代谢组学层面揭示LINC01063在结直肠癌中的潜在作用机制。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

LTQ Orbitrap XL 高分辨质谱仪、UltiMate 3000 RSLC 微流速液相色谱系统、1300 Series A2 生物安全柜、Forma Steri-Cycle CO₂ 恒温培养箱:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; Observer A1 荧光倒置生物显微镜:上海蔡司光学仪器有限公司产品; FACS Calibur 流式细胞仪:美国 BD 公司产品。

ILCEI-MS 装置参照已发表的文献^[22]搭建,由1根具有薄壁尖端的窄等内径毛细管喷嘴、进样瓶和氮气供给装置组成,示意图示于图1。窄等内径毛细管喷嘴尖端薄壁的设计有利于溶液以射流的形式喷出,通过氮气供给装置将密封

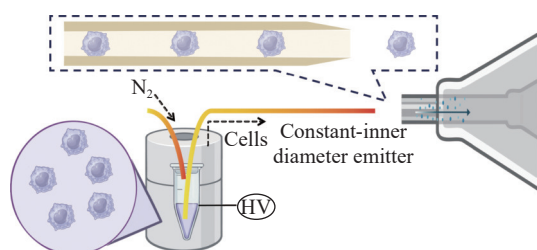


图1 完整活单细胞电发射电离质谱装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of intact living-cell electro-launching ionization mass spectrometry

在进样瓶内的细胞悬液驱动进入外径360 μm、内径20 μm的窄等内径毛细管喷嘴内。由于细胞直径与喷嘴内径大小接近,从而使细胞在进样过程中得到分离分散。通过给细胞溶液施加合适电压,细胞以稳定射流进入质谱进样口,并被分析检测。

1.2 主要材料与试剂

甲酸铵(质谱纯)、氨水(优级纯)、甲酸(质谱纯)、DMEM 培养基、青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin, P/S)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、0.25%胰蛋白酶-EDTA、二甲基亚砜、总RNA抽提试剂 Trizol: 均为美国 Thermo Fischer 公司产品; 异丙醇、无水乙醇: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品; 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒: 上海近岸蛋白科技有限公司产品; sh-LINC01063 慢病毒和 sh-NegCtrl 对照慢病毒: 由北京擎科生物公司设计合成; 人结直肠癌细胞系 DLD-1: 由北京中国医学科学院医学研究所提供; 聚酰亚胺涂层石英毛细管(O.D. 360 μm, I.D. 20 μm): 永年县锐丰色谱器件有限公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞培养与慢病毒感染 将人结直肠癌细胞系 DLD-1 细胞培养于含 10%FBS 及 1%P/S 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中。慢病毒感染前 24 h,将 DLD-1 细胞接种至 6 孔板,过夜培养至细胞完全贴壁后,向 6 孔板中加入分装好的 100 μL 病毒原液,继续培养 48 h。

1.3.2 细胞干扰效果检测 由于慢病毒携带绿色荧光标记蛋白,在慢病毒感染细胞 48 h 后,可通过以下方法评估感染效率及目标基因的表达情况:使用实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测目标基因的转录水平;使用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况;使用流式细胞术量化绿色荧光蛋白阳性细胞的比例。

1.3.3 单细胞悬液制备 在开展 ILCEI-MS 研究前,需制备新鲜的细胞悬液。具体操作如下:首先,使用胰蛋白酶对生长密度达到 80%~90%的细胞进行充分酶解处理,随后加入适量培养基终止消化;接着,对上述溶液进行离心,弃去上清液后,加入 DMEM 培养基重悬细胞;然后,取一定

体积的细胞悬液,经离心去除培养基,加入 150 mmol/L 甲酸铵水溶液(pH 7.2~7.4),清洗细胞并离心;最后,将细胞分散于甲酸铵水溶液中,以备后续 ILCEI-MS 分析。

1.3.4 细胞裂解液制备 当 DLD-1 NegCtrl 和 DLD-1 shLINC01063 细胞在培养瓶中生长至 80%覆盖度(25 cm²)时,使用 PBS 清洗 2 次,以去除培养基和细胞碎片。随后加入胰酶处理细胞,最后添加 3 mL 含 10%FBS 的培养基终止酶解。将细胞转移至离心管中,于 4 °C 下以 1 000 r/min 离心 10 min,去除培养基,用 1 mL PBS 重悬细胞,重复离心操作 2 次进行清洗。向细胞中加入 400 μ L 预冷的 80%甲醇水溶液,置于液氮中冷冻 2 min,然后在常温水解冻 2 min,反复冻融 5 次。最后,于 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至离心管中并真空干燥。用 50 μ L 10%甲醇水溶液复溶后,再次于 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于后续的高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析。

1.3.5 窄等内径毛细管喷针的制备 截取长度 40 cm、外径 360 μ m、内径 20 μ m 的聚酰亚胺涂层毛细管,采用本课题组开发的湿法毛细管刻蚀技术,将其一端制成等内径的毛细管尖端^[23]。随后,通过液相冲洗等内径毛细管喷针,直至喷针出口处出现连续液滴,以确保毛细管内部清洁。最后,将毛细管喷针置于密封无尘的环境中妥善保存,以备后续使用。

1.3.6 高效液相色谱-串联质谱分析 Bonus-RP 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μ m);流动相 A 为 0.1%甲酸水, B 为甲醇;流速 0.3 mL/min,进样体积 3 μ L;梯度洗脱程序为 0~3 min(5%B), 3~13 min(5%~95%B), 13~18 min(95%B), 18~18.3 min(95%~5%B), 18.3~20 min(5%B)。

使用 Xcalibur 软件采集质谱数据,在数据依赖模式下进行。在正离子模式下,一级质谱分辨率设置为 30 000,电喷雾电压 3.4 kV,离子传输管温度 350 °C,质量扫描范围 m/z 50~1 000,自动增益控制(AGC)目标值设为 4×10^5 ;二级质谱(MS^2)扫描参数为:AGC 目标值设为 5×10^4 ,最大注入时间(MIT)为 22 ms,高能碰撞诱导解离(HCD)的碰撞能量为 25%、35%、60%。

1.3.7 完整活单细胞电发射电离质谱分析 在正离子模式下采集数据,参数设置如下:毛细管温度 350 °C,毛细管电压 1.4 kV,分辨率设置为 30 000,AGC 为 5×10^5 ,MIT 为 50 ms,质量扫描范围 m/z 100~1 000。

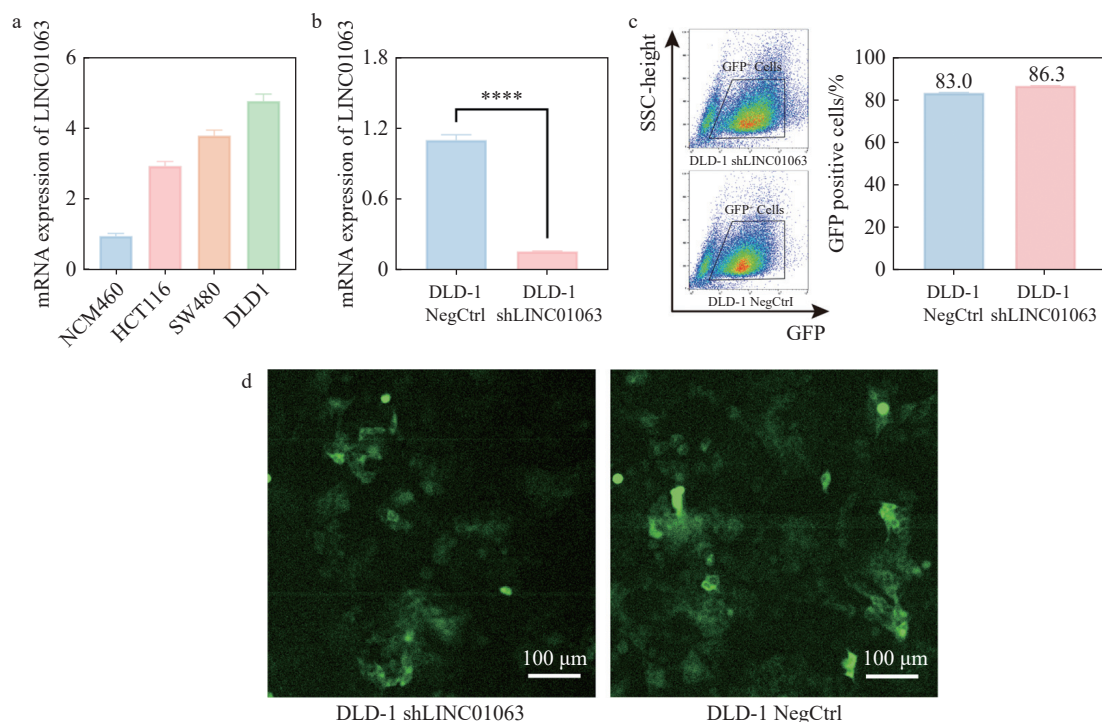
1.3.8 数据分析 单细胞信号筛选及分析在本课题组开发的单细胞分析平台上开展。单细胞筛选以 PC 34:1(m/z 760.585 1 ± 0.004)的信号作为标准,将扣除同一批次无细胞背景溶液信号后,强度不低于 1×10^5 的细胞信号认定为测得的单细胞信号。此外,要求单个细胞内收集到的代谢物离子信号强度不低于 1×10^3 ,细胞代谢物离子在所有单细胞中的出现频率需大于 10%,且信噪比均大于 3。通过基于 R 语言的程序开展 UMAP 聚类分析,探究基因干扰前后单细胞代谢谱的总体差异情况。利用 Student t 检验进行差异分析,筛选出具有显著性差异的离子。基于文献^[21-22]报道的单细胞代谢物列表,以及通过群体细胞 HPLC-MS/MS 法分析,结合在线 mzCloud 数据库、人类代谢组数据库(HMDB)和 Compound Discoverer 3.3(Thermo Fisher Scientific)软件鉴定的代谢物库,对特征离子进行差异代谢物注释。

完成上述定性分析后,利用在线代谢组学分析工具 MetaboAnalyst 和京都基因与基因组百科全书(KEGG)对所有特征代谢物进行通路分析,探究基因干扰前后单细胞的代谢通路差异。

2 结果与讨论

2.1 基因干扰效果

由于慢病毒载体携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),可通过倒置荧光显微镜和流式细胞仪检测细胞表达 GFP 的荧光强度,以此判断慢病毒干扰效率。同时,RT-qPCR 能够快速准确地检测细胞内基因的表达水平,因此通过以上技术评估干扰前后的基因表达水平,结果示于图 2a。选用常见且易获得的人结肠上皮细胞 NCM460、人结肠癌细胞 HCT-116、SW480 以及人结肠直肠癌细胞系 DLD-1 进行基因表达水平对比,结果表明,DLD-1 细胞的 LINC01063 表达水平更高,故选择其细胞作为后续研究对象。经慢病毒干扰后,DLD-1 细胞中 LINC01063 的表达量显著降低至 0.2,表明 DLD-1 干扰细胞系构建成功,示于图 2b。感染后的细胞 GFP 阳性率约



注: a. LINC01063 在细胞系中的基因表达水平; b. 慢病毒感染后, DLD-1 中 LINC01063 的基因表达水平; c. GFP 阳性细胞;
d. 慢病毒感染后, DLD-1 细胞中绿色荧光蛋白表达情况

图 2 LINC01063 基因干扰效果的检测

Fig. 2 Demonstration of LINC01063 gene interference effect

为 80%, 示于图 2c、2d。上述结果表明, DLD-1 细胞中 LINC01063 基因干扰细胞系已成功构建, 可用于后续单细胞代谢组学的质谱分析。

2.2 单细胞代谢组学检测

ILCEI-MS 可同时实现单细胞在线分散和无稀释质谱进样, 具有高灵敏度和高通量检测的优点, 能够有效获取细胞代谢异质性信息^[22]。本研究利用搭建的完整活单细胞电发射质谱装置, 测定 LINC01063 基因干扰前后细胞中的代谢物, 以期从单细胞角度考察 DLD-1 细胞在 LINC01063 基因被干扰后的代谢变化。作为细胞膜的主要成分, 脂质在细胞结构和功能中发挥着重要作用。本研究以脂质 PC 34:1 (m/z 760.585 1 ± 0.004) 为标准, 用于单细胞检测及筛选。首先, 在细胞浓度为 5×10^5 cells/mL, 氮气压强为 2.07 MPa 的条件下, 评估 ILCEI-MS 技术检测代谢谱图的效率, 质谱所捕获的单细胞相关脉冲信号示于图 3, 平均每分钟检测到 51 个信号, 具有极高的单细胞质谱检测通量。利用 ILCEI-MS 获得单细胞的代谢谱图, 分别检测了 1 397、1 946 个 DLD-1 NegCtrl 细胞和 DLD-1 shLINC01063 细胞, 每种细胞分别检

测到 1 163、960 个代谢物相关离子, 共检测到 1 254 个代谢物相关离子。以上研究结果表明, ILCEI-MS 技术具有优良的分析通量和代谢物测定能力。

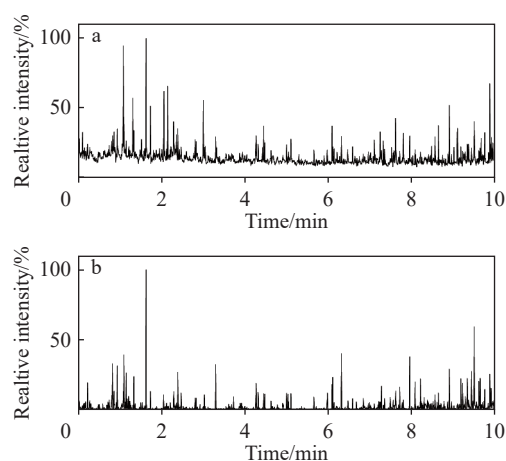


图 3 利用 ILCEI-MS 获得的总离子流图(a)及 m/z 760.585 1 的提取离子流图(b)

Fig. 3 Total ion chromatogram obtained using ILCEI-MS (a) and extracted ion chromatogram with m/z 760.585 1 (b)

2.3 基因干扰引起的 DLD-1 细胞代谢物的变化

为可视化基因干扰前后细胞代谢谱的差异,本研究采用无监督非线性学习算法 UMAP, 基于代谢指纹信息对单个细胞进行聚类。结果显示, 基因干扰前后的 DLD-1 细胞呈现明显分群; 与对照组相比, 基因干扰组 DLD-1 细胞的代谢发生显著变化, 示于图 4。

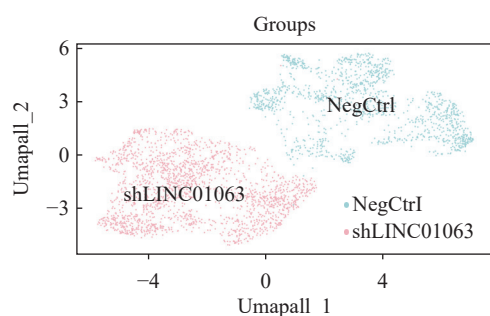


图 4 基因干扰前后细胞中代谢物的 UMAP 聚类分析结果

Fig. 4 Results of UMAP cluster analysis of metabolites in cells before and after gene interference

为深入探究基因干扰对细胞代谢的影响,本研究采用 Student t 检验进行差异分析。经生物学意义、数据分布特征及统计分析方法等多方面综合考量,筛选出基因干扰前后变化幅度较大 ($FC > 1.5$) 且具有统计学差异 ($p < 0.05$) 的相关代谢物离子。基于文献报道的单细胞代谢物列表及群体细胞 HPLC-MS/MS 分析构建的代谢物库,对特征离子进行差异代谢物注释;代谢通路分析采用 MetaboAnalyst 6.0 和 KEGG 在线工具完成。

2.4 群体细胞与单细胞代谢通路对比

采用 HPLC-MS/MS 法分析 DLD-1 NegCtrl 和 DLD-1 shLINC01063 群体细胞裂解液,使用 Compound Discoverer 3.3 软件对原始数据进行在线的数据库搜索,并对结果进行差异代谢物分析。随后,利用在线代谢组学分析工具 MetaboAnalyst 6.0 和 KEGG 对代谢物进行通路分析,从而获得群体细胞代谢通路。

群体细胞与单细胞获得的代谢通路对比结果列于表 1。在群体细胞中,共检测到 19 条发生显著变化的代谢通路;而在单细胞水平上,检测到 27 条发生变化的代谢通路。其中,15 条代谢通路在群体细胞和单细胞代谢中均有发现,另外,在单细胞代谢分析中还发现甘油磷脂代谢通路、烟酸酯和烟酰胺代谢通路等 12 条独特的代谢通路。这一结果表明,相较于群体细胞代谢分析,单细胞代谢分析具有更高的分辨率和独特性,能够揭示更多群体细胞无法察觉的代谢特征。

2.5 基因干扰引起的 DLD-1 细胞代谢通路变化

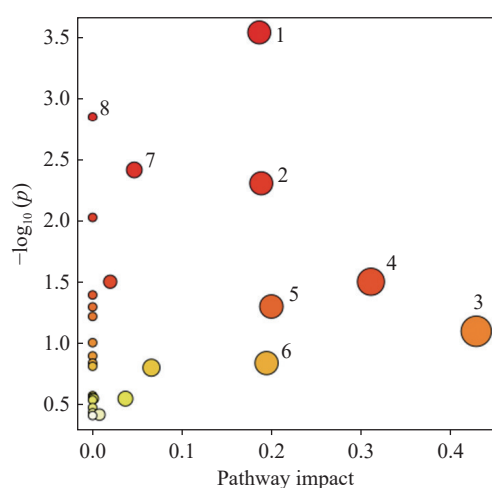
本研究进一步考察了基因干扰引起的单细胞代谢通路变化,结果示于图 5。可见, LINC01063 干扰后导致 DLD-1 细胞发生变化的代谢通路共有 27 条,其中变化最显著的通路包括精氨酸生物合成、精氨酸-脯氨酸代谢、牛磺酸-亚牛磺酸代谢、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、烟酸酯-烟酰胺代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、氮代谢等。其中,精氨酸生物合成、精氨酸-脯氨酸代谢、牛磺酸-亚牛磺酸代谢、丙氨

表 1 群体细胞与单细胞代谢通路分析的对比研究

代谢通路 Metabolic pathway	DLD-1 shLINC01063 vs. DLD-1 NegCtrl	
	群体细胞代谢 Population cell metabolism	单细胞代谢 Single-cell metabolism
Arginine biosynthesis	√	√
Arginine and proline metabolism	√	√
Taurine and hypotaurine metabolism	√	√
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	√	√
Glycerophospholipid metabolism		√
Nicotinate and nicotinamide metabolism		√
Glycine, serine and threonine metabolism	√	√
Nitrogen metabolism	√	√
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	√	

续表

代谢通路 Metabolic pathway	DLD-1 shLINC01063 vs. DLD-1 NegCtrl	
	群体细胞代谢 Population cell metabolism	单细胞代谢 Single-cell metabolism
Linoleic acid metabolism		√
Phosphonate and phosphinate metabolism		√
Biotin metabolism		√
α -Linolenic acid metabolism		√
β -Alanine metabolism	√	
One carbon pool by folate	√	
Lysine degradation		√
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis		√
Cysteine and methionine metabolism		√
Pyrimidine metabolism		√
Arachidonic acid metabolism		√
Fatty acid biosynthesis		√
D-Amino acid metabolism	√	√
Glutathione metabolism	√	√
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	√	√
Butanoate metabolism	√	√
Histidine metabolism	√	√
Purine metabolism	√	√
Porphyrin metabolism	√	√
Sphingolipid metabolism	√	√
Primary bile acid biosynthesis	√	√
Fatty acid degradation	√	



注: 1. 精氨酸生物合成; 2. 精氨酸-脯氨酸代谢; 3. 牛磺酸-亚牛磺酸代谢; 4. 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢; 5. 甘油磷脂代谢; 6. 烟酸酯-烟酰胺代谢; 7. 甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢; 8. 氮代谢

图5 代谢通路分析结果

Fig. 5 Results of the metabolic pathway analysis

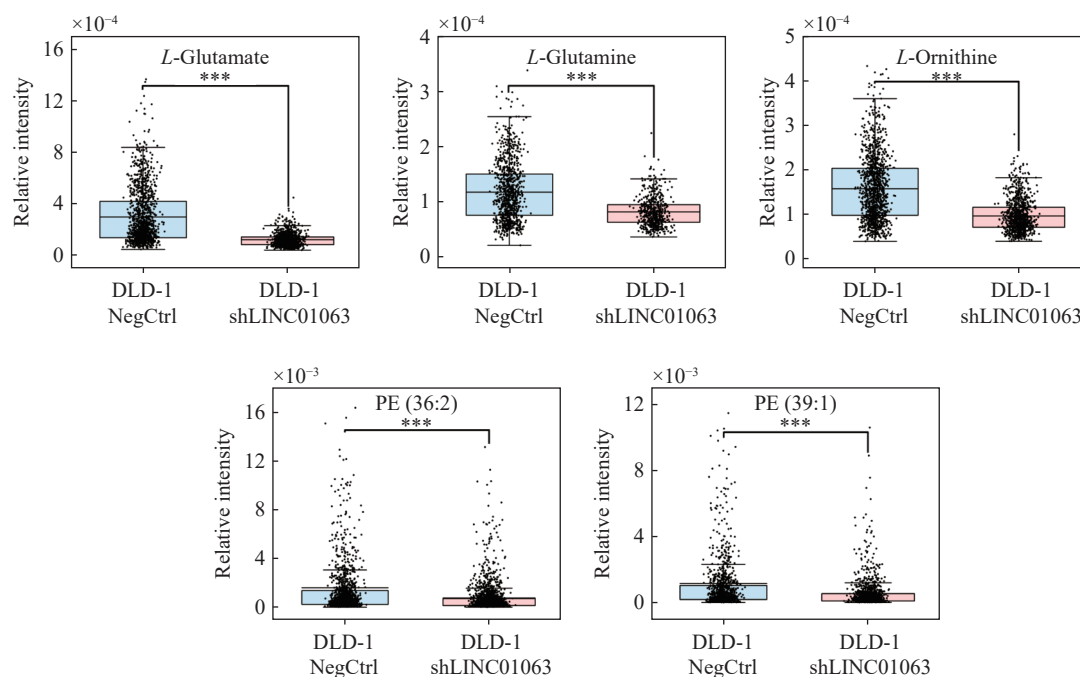
酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢属于氨基酸代谢; 甘油磷脂代谢属于脂质代谢; 烟酸酯-烟酰胺代谢属于辅助因子和维生素的代谢; 氮代谢属于能量代谢。

氨基酸代谢在肿瘤微环境中发挥重要作用, 影响癌症进展的各个方面^[24]。LINC01063 干扰后, DLD-1 细胞中的多条氨基酸代谢通路发生改变, 其中最为显著的是精氨酸生物合成。具体而言, *L*-谷氨酸在谷氨酰胺合成酶催化下与氨结合生成 *L*-谷氨酰胺; 随后, *L*-谷氨酸经谷氨酰胺脱氢酶催化脱氨生成 α -酮戊二酸和氨, 其中 α -酮戊二酸可参与糖酵解等代谢过程, 氨则在后续反应中被进一步利用。在精氨酸代琥珀酸合成酶、精氨酸代琥珀酸裂解酶等酶的依次作用下, 一系列中间产物转化并最终生成 *L*-精氨酸; 最后, *L*-精氨酸在精氨酸酶催化下水解生成尿素和 *L*-鸟氨

酸。该过程能够为肿瘤细胞提供能量并提高肿瘤细胞的抗氧化水平,从而导致肿瘤发生^[25]。在 LINC01063 表达水平降低后,精氨酸生物合成代谢通路中的 *L*-谷氨酸、*L*-谷氨酰胺、*L*-鸟氨酸含量出现下调,这表明 LINC01063 可能是肿瘤代谢重编程的核心调控因子,其可能通过抑制谷氨酰胺分解、尿素循环或氨基酸转运,破坏肿瘤的能量供应、氧化还原平衡和生物合成,进而抑制肿瘤进展。

癌症中脂质代谢失调是一种显著的代谢异常,其中癌细胞通过脂质代谢产生能量和形成生物膜,这种改变对肿瘤微环境的反应会影响癌症的增殖、存活、侵袭和转移^[26]。磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰胆碱(PC)是真核膜中最丰富的甘

油磷脂,它们头部基团的物理化学性质差异对其与细胞内大分子的相互作用具有相反的调节作用。因此,二者对膜结构和功能的总体影响差异显著^[27]。细胞内 PE 和 PC 的水平受到严格调节,这不仅是为了维持细胞膜的完整性和动力学,也是为了保障器官的正常功能^[28]。在对 LINC01063 进行干扰后,PC 和 PE 均出现了下调。癌细胞增殖依赖大量膜磷脂合成以支持细胞分裂,而 PC 和 PE 的减少意味着癌细胞分裂过程的减弱;同时,PC 和 PE 的减少还可能引发细胞应激(如内质网应激或线粒体功能障碍),并可能促进细胞凋亡。这些代谢变化提示,干扰 LINC01063 基因后可能通过上述代谢通路发挥抗结直肠癌的作用,示于图 6。



注: 相对丰度=峰强度/总离子强度, 其中***代表 $p \leq 0.001$

图 6 LINC01063 干扰对 DLD-1 细胞代谢物变化情况

Fig. 6 Metabolite changes in DLD-1 cells induced by LINC01063

3 结论

本工作采用基于质谱的单细胞代谢组学技术,研究 LINC01063 基因干扰对细胞代谢的影响,实现了 LINC01063 基因干扰前后单个细胞内代谢物的鉴定,并揭示了在 LINC01063 基因干扰作用下发生显著变化的代谢物及其代谢通路。研究表明,基因干扰对细胞的氨基酸代谢、脂质代谢产生显著影响。本研究不仅证明了基

于质谱的单细胞代谢组学技术在研究基因干扰作用机制方面的应用潜力,还为其他基因作用机制的研究提供了有益参考。

参考文献:

- [1] 逢雪超, 徐燕, 纪丽云. 质谱定量蛋白质组学技术筛选结直肠癌外周血单个核细胞差异表达蛋白[J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 216-223.

- PANG Xuechao, XU Yan, JI Liyun. Identification of the differentially expressed proteins in the PBMC of colorectal cancer by DIA-MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2018, 39(2): 216-223(in Chinese).
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, SOERJOMATARAM I, JEMAL A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] FERRER J, DIMITROVA N. Transcription regulation by long non-coding RNAs: mechanisms and disease relevance[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024, 25(5): 396-415.
- [4] DUAN L, XIA Y, LI C, LAN N, HOU X. Identification of autophagy-related lncRNA to predict the prognosis of colorectal cancer[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 906 900.
- [5] YU L, LI K, ZHANG X. Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115 774-115 786.
- [6] ZENOBI R. Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives[J]. *Science*, 2013, 342(6 163): 1 243 259.
- [7] ALSEEKH S, AHARONI A, BROTMAN Y, CONTREPOIS K, D'AURIA J, EWALD J, EWALD J C, FRASER P D, GIAVALISCO P, HALL R D, HEINEMANN M, LINK H, LUO J, NEUMANN S, NIELSEN J, de SOUZA L P, SAITO K, SAUER U, SCHROEDER F C, SCHUSTER S, SIUZDAK G, SKIRYCYZ A, SUMNER L W, SNYDER M P, TANG H, TOHGE T, WANG Y, WEN W, WU S, XU G, ZAMBONI N, FERNIE A R. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 747-756.
- [8] HAN J, HUANG X, LIU H, WANG J, XIONG C, NIE Z. Laser cleavable probes for *in situ* multiplexed glycan detection by single cell mass spectrometry[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(47): 10 958-10 962.
- [9] 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): 1 806-1 812.
- [10] HUANG Q, MAO S, KHAN M, LI W, ZHANG Q, LIN J M. Single-cell identification by microfluidic-based *in situ* extracting and online mass spectrometric analysis of phospholipids expression[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(1): 253-256.
- [11] HARRISON P T, VYSE S, HUANG P H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 61: 167-179.
- [12] SUDA K, TOMIZAWA K, OSADA H, MAEHARA Y, YATABE Y, SEKIDO Y, MITSUDOMI T. Conversion from the "oncogene addiction" to "drug addiction" by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3): 292-299.
- [13] RIZVI N A, RUSCH V, PAO W, CHAFT J E, LADANYI M, MILLER V A, KRUG L M, AZZOLI C G, BAINS M, DOWNEY R, FLORES R, PARK B, SINGH B, ZAKOWSKI M, HEELAN R T, SHEN R, KRIS M G. Molecular characteristics predict clinical outcomes: prospective trial correlating response to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib with the presence of sensitizing mutations in the tyrosine binding domain of the EGFR gene[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(10): 3 500-3 506.
- [14] PARK S Y, KIM Y M, PYO H. Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through inhibition of ataxia telangiectasia mutated[J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9: 222.
- [15] 仇小丹, 张翼, 白玉. 基于单细胞代谢组学的他莫昔芬抗乳腺癌作用机制研究[J]. *质谱学报*, 2024, 45(6): 785-792.
- QIU Xiaodan, ZHANG Yi, BAI Yu. Study on the mechanism of tamoxifen against breast cancer by mass spectrometry based single-cell metabolomics[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2024, 45(6): 785-792(in Chinese).
- [16] 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): 1 445-1 456.
- [17] CHEN X, PENG Z, YANG Z. Metabolomics studies of cell-cell interactions using single cell mass spectrometry combined with fluorescence microscopy[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(22): 6 687-6 695.
- [18] 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.

- [19] 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.
- [20] 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.
- [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): 4 712-4 720.
- [22] 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): 8 065-8 073.
- [23] LI R, SHAO Y, YU Y, WANG X, GUO G. Pico-HPLC system integrating an equal inner diameter femtopipette into a 900 nm I. D. porous layer open tubular column[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(29): 4 104-4 107.
- [24] CHEN J, CUI L, LU S, XU S. Amino acid metabolism in tumor biology and therapy[J]. *Cell Death & Disease*, 2024, 15(1): 42.
- [25] LIN Y, ZHANG Y, HUANG T, CHEN J, LI G, ZHANG B, XU L, WANG K, HE H, CHEN H, LIU D, GUO S, HE X, LAN P. Arginine deprivation induces quiescence and confers vulnerability to ferroptosis in colorectal cancer[J]. *Cancer Research*, 2025, 85(9): 1 663-1 679.
- [26] ZOU Y, ZHANG Y, LI M, CAO K, SONG C, ZHANG Z, CAI K, GENG D, CHEN S, WU Y, ZHANG N, SUN G, WANG J, ZHANG Y, SUN Y. Regulation of lipid metabolism by E3 ubiquitin ligases in lipid-associated metabolic diseases[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 265: 130 961.
- [27] 陈静, 谢佩斯, 蔡宗苇. 脂质质谱成像揭示三氯生促进三维肝癌肿瘤细胞球增长的相关机理[J]. *质谱学报*, 2023, 44(2): 213-222.
CHEN Jing, XIE Peisi, CAI Zongwei. Mass spectrometry imaging reveals lipid changes associated with the cell proliferation of liver tumor spheroids treated with triclosan[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2023, 44(2): 213-222(in Chinese).
- [28] KWARTENG D O, GANGODA M, KOOLJMAN E E. The effect of methylated phosphatidylethanolamine derivatives on the ionization properties of signaling phosphatidic acid[J]. *Biophysical Chemistry*, 2023, 296: 107 005.
(收稿日期: 2025-05-28; 修回日期: 2025-07-16)