

# 基于质谱的单细胞多组学分析技术研究进展

霍志远<sup>1,2#</sup>, 周金萍<sup>3#</sup>, 马秀敏<sup>3</sup>, 周 严<sup>1,2</sup>, 黄 琳<sup>1,2</sup>

(1. 上海市胸科医院/上海交通大学医学院附属胸科医院检验科, 2. 胸部肿瘤研究所, 上海 200030;  
3. 新疆医科大学附属肿瘤医院临床检验中心, 乌鲁木齐 830011)

**摘要** 近年来, 随着质谱技术的飞速发展, 单细胞质谱技术在生命科学领域发挥着越来越重要的作用. 质谱已被广泛用于检测细胞群代谢和蛋白组, 单细胞质谱多组学技术结合微观生物学和尖端质谱分析, 为在单细胞层面进行深入研究提供了强有力的工具, 进一步阐明了细胞微观复杂性. 特别是在生物医学应用中, 单细胞质谱多组学有助于细胞图谱绘制、生命现象分子机制探究及精准医学的发展等. 本文综合评述了近年来基于质谱的单细胞代谢、蛋白组及其整合组学技术研发中面临的挑战与突破, 并对其未来的发展趋势进行了展望.

**关键词** 单细胞; 质谱技术; 代谢组学; 蛋白质组学; 多组学分析

中图分类号 O657.6 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240389

## Advances in Single-cell Multi-omics Analysis Based on Mass Spectrometry

HUO Zhiyuan<sup>1,2#</sup>, ZHOU Jinping<sup>3#</sup>, MA Xiumin<sup>3\*</sup>, ZHOU Yan<sup>1,2\*</sup>, HUANG Lin<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Institute of Thoracic Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China;

3. Clinical Laboratory Center, Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**Abstract** With the rapid development of mass spectrometry technology in recent years, single-cell mass spectrometry has played an increasingly vital role in the field of life sciences. Mass spectrometry has been widely applied to detect the metabolome and proteome of cell populations. The multi-omics technology of single-cell mass spectrometry combines microscopic biology with cutting-edge mass spectrometry analysis, providing a powerful tool for in-depth study at the single-cell level and further clarifying the micro-level complexity of cells. Especially in biomedical applications, single-cell mass spectrometry multi-omics helps to build cell atlas, explore the molecular mechanisms of biological phenomena, and promote the development of precision medicine. Therefore, this article systematically summarizes and reviews the challenges and breakthroughs in the development of mass spectrometry-based single-cell metabolism, proteomics, and multi-omics technologies in recent years, and provides an outlook on its future development trends.

**Keywords** Single-cell; Mass spectrometry technology; Metabolomics; Proteomics; Multi-omics analysis

收稿日期: 2024-08-15. 网络首发日期: 2024-09-10.

联系人简介: 黄 琳, 女, 博士, 副研究员, 主要从事纳米生物医学工程、单细胞单分子传感和临床质谱技术开发方面的研究.

E-mail: linhuang@shsmu.edu.cn

周 严, 女, 硕士, 助理实验师, 主要从事纳米生物材料和临床质谱技术开发方面的研究. E-mail: zhouyan@shchest.org

马秀敏, 女, 博士, 教授, 主要从事感染免疫方面的研究. E-mail: maxiumin1210@sohu.com

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 82372148)和中央引导地方科技发展资金项目(批准号: ZYYD2024CG06)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 82372148) and the Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Projects, China(No. ZYYD2024CG06).

# 共同第一作者.

细胞是构成生命的基本单位,包含了大量的生物化学信息(如基因组、转录组、代谢组、脂质组和蛋白质组等),这些信息在疾病发生、系统生物学和基础细胞生物学的研究中具有重要价值.人体内的细胞多样性十分复杂,一方面,细胞的表型和功能是由来自不同组学层的各种分子的复杂相互作用形成的,不同组学之间存在显著差异,单个组学不能反映完整的信息,不足以全面理解和建模细胞生物学过程<sup>[1-3]</sup>;另一方面,传统的种群水平的分析通常忽略了细胞间的变化,无法充分捕捉细胞群体的复杂模式,并且忽略了与细胞间异质性相关的重要信息<sup>[4]</sup>.因此,单细胞多组学分析对于全面揭示细胞的状态和功能,从遗传信息、信号调控、蛋白表达和代谢通路等多层面探究生命活动的奥秘以及疾病的发生、发展与治疗机制至关重要.

单细胞多组学技术是在单细胞单组学技术的基础上,实现在同一细胞中测量多种组学数据的前沿技术,曾被《Nature Methods》杂志选为2019年年度技术,并被中国科协列入20个重大科学问题及工程技术难题<sup>[5]</sup>,其技术难点主要在于单个细胞的分离捕获与单细胞中来自不同组学层、浓度极低、种类繁多分子信号的采集.近年来,激光捕获显微切割、机器人显微操作、荧光激活细胞分选、微流控平台等单细胞捕获分选技术的出现和发展,大大提高了单细胞的分离和捕获效率,并推动了单细胞组学的研究进展<sup>[1]</sup>.而质谱技术凭借其效率高、速度快、成本低、检测灵敏度高和准确性高等优点,已被广泛证实可作为单细胞中蛋白质、脂质和代谢物检测的有力工具<sup>[6-9]</sup>.

因此,结合了先进单细胞捕获技术和尖端质谱分析优势的单细胞质谱多组学成为生命科学领域的研究热点.单细胞分选、微量化合物提取与标记、质谱软硬件、生物信息学组学连接模型等技术的快速更新迭代,促使单细胞质谱多组学技术在多路复用、吞吐量、分辨率和准确性等方面取得不断的进展与突破.本文系统总结了近年来单细胞质谱代谢组、蛋白组及多组学技术的突破与挑战,综合评述了单细胞多组学技术在细胞图谱绘制、分子机制探究及精准医学研究等生物医学领域的研究进展,并探讨了其在未来的发展趋势,旨在为优化单细胞质谱多组学技术、解析细胞内的分子组成和功能状态及进一步揭示生命活动的多样性和复杂性提供新思路.

## 1 单细胞的分离与捕获技术

单细胞分离与捕获技术是单细胞代谢组学、蛋白质组学及多组学研究的重要基础.目前,常见的单细胞分离与捕获技术包括荧光激活细胞分选(FACS)、激光捕获显微切割(LCM)和微流控技术,这些技术的发展极大提高了单细胞的分离和捕获效率,可靠地推动了单细胞组学的研究进展.

FACS技术被广泛用于分离单个细胞<sup>[10]</sup>,利用荧光抗体或荧光染料结合到细胞表面的特定分子上,在流式细胞仪荧光活化系统检测下将标有荧光的细胞分选出来.FACS技术具有高通量的特点,在细胞分选方面非常有效,但这种方法只能检测具有荧光活性的细胞,在悬浮状态下需要较大的起始体积,并且极易破坏细胞组织.Sherman等<sup>[11]</sup>利用FACS纯化技术,通过血管内皮细胞标记物CD34或醛脱氢酶(ALDH)活性分离脐带血来源的内皮集落形成细胞(ECFC),最后,通过液相色谱串联质谱仪(LC-MS/MS)进行蛋白质组学分析,发现了与CD34-和CD34+ ECFC细胞膜相关的100多个差异物( $P < 0.05$ ),其中,CD34+细胞上的血管紧张素原转化酶(CD143)有显著富集.Melliou等<sup>[12]</sup>将人脑类器官酶解成单细胞悬浮液,并利用FACS技术纯化和分选细胞群,在多肽提取之后,通过Thermo Q Exactive HF-X质谱仪进行蛋白质组学分析.研究表明,在对培养了8周的类器官进行蛋白质组学分析时,可以鉴定出大约2000~7000种不同的蛋白质.此外,还可以对每个样本中的大约2000种蛋白质进行定量分析[图1(A)].

LCM是一种先进的技术<sup>[13]</sup>,利用计算机辅助的激光系统将单个细胞从固体组织中分离出来,可在切片和染色处理后,从大部分实体组织样本中快速准确地获取单个细胞.该技术成功保持了细胞形态和结构,并保留了空间位置信息,但通量较低,不利于大规模应用.Guise等<sup>[14]</sup>利用LCM技术从死后的肌萎缩侧索硬化症(ALS)患者和对照捐献者的脊髓组织样本中获取单个运动神经元(MN),并结合纳升级微量液滴蛋白处理系统(nanoPOTs)以及Thermo Orbitrap Exploris 480质谱仪来探究上述MN的蛋白质

表达差异。Rosenberger等<sup>[15]</sup>利用高分辨率成像、LCM技术、单细胞离子淌度飞行时间质谱仪(timsTOF SCP)以及机器学习等,开发了一种全新的具有空间分辨的单细胞蛋白质组学方法,并基于该方法获得了肝脏组织中的单细胞蛋白质组学信息,发现其在空间上存在明显的异质性。

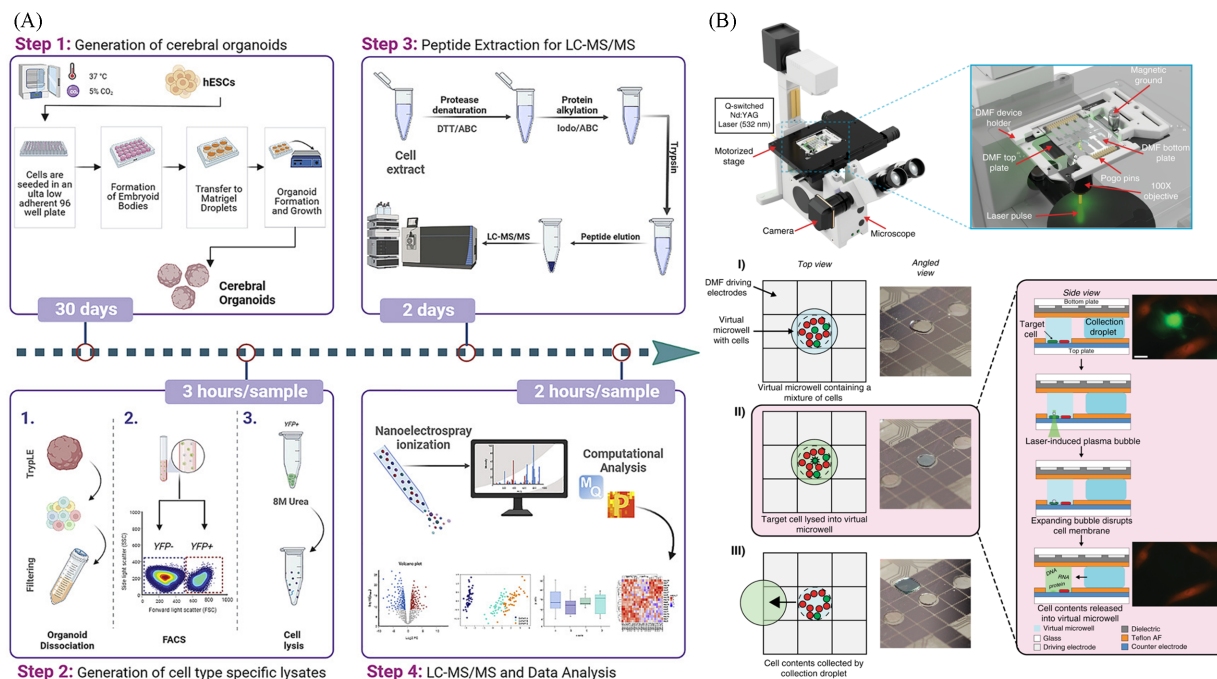


Fig. 1 Research progress in single-cell separation and capture technologies

(A) FACS for single-cell proteomics<sup>[12]</sup>. Copyright 2022, Elsevier; (B) digital microfluidic technique for single-cell proteomics<sup>[18]</sup>. Copyright 2020, Springer Nature.

微流控是一种在微观尺度上精确控制流体的新技术<sup>[16]</sup>,通过微尺度下流体控制将细胞限定在一个微小的腔室或通道内,对单细胞进行精确定位与分离.该技术具有样品消耗量低、流体控制精确、分析检测速度快等特点,越来越受到重视,但由于研发成本高昂、标准化程度低等缺点,实现产业化比较困难. Feng等<sup>[17]</sup>设计了用于持续的细胞分离和惯性聚焦的微流控装置,并与脉冲电场诱导的电喷雾电离高分辨质谱(PEF-ESI-HRMS)相结合,以实现高通量单细胞代谢组学分析.在接近生理条件下,该系统每分钟分析80个单细胞,从单个细胞中检测到900多种特征,并初步鉴定出约120种代谢物. Lamanna等<sup>[18]</sup>开发了用于单细胞质谱多组学的单细胞数字微流控分离技术(DISCO),DISCO结合了数字微流控技术、激光细胞裂解技术和具有人工智能的图像处理技术,从异质细胞群体中收集单细胞的物质,然后通过二代测序分析单细胞基因组和转录组,最后通过纳米流LC-MS/MS分析蛋白质组.通过DISCO与蛋白质组学分析的结合,能够精确地鉴定出每个细胞中的蛋白质数量,其准确性与目前最先进的无标记单细胞蛋白质组学方法相当[图1(B)].

## 2 单细胞质谱代谢组学

作为系统生物学的前沿领域,单细胞质谱代谢组学通过质谱技术深入揭示了细胞代谢活动的总体状况<sup>[19]</sup>.该技术结合质谱分析和单细胞分离捕获技术,通过单细胞的采集、样品制备、质谱分析和数据解析等步骤,对细胞生理时期内的差异性代谢物进行定性分析和定量分析,以便进一步了解细胞代谢活动的个体差异及疾病的代谢机理.质谱技术包括基质辅助激光解吸电离质谱法、纳升电喷雾式离子化质谱法和二次离子质谱法<sup>[20-25]</sup>,对多个组分进行分析的同时,能够准确地识别和定量更多的代谢产物,从而对待测单细胞的分子结构进行分析.

近年来,单细胞技术与质谱代谢组学的联用得到了广泛探索<sup>[26-28]</sup>(图2).为了消除传统方法中操作者间的变异性并提高工作效率,Chen等<sup>[29]</sup>开发了首个自动化单细胞质谱系统(SCMS).该系统生成

了微小的亚纳升液滴来提取单个细胞,对最小化稀释微量细胞的内容物并提高分析灵敏度至关重要。SCMS系统无需人工干预,实现了稳健的单细胞代谢分析,改变了单细胞代谢物的分析方式。最大限度地减少人类的参与。Marques等<sup>[30]</sup>开发了一种创新的锥形探针技术,用于气动辅助纳米喷雾解吸电喷雾电离(PA nano-DESI)质谱分析。这项技术能够对较大的细胞进行化学成像,同时对尺寸小至15  $\mu\text{L}$ 的细胞进行全面的代谢组学分析,深入探究细胞内部的化学环境,揭示细胞异质性的微小差别。激光消融电喷雾电离质谱(LAESI-MS)是一种用于单细胞代谢组学的新兴技术,在原位探测单细胞分子组成方面具有独特的优势,Taylor等<sup>[28]</sup>开发了一种创新的集成方法,即将显微镜与LAESI源的光学系统相结合,从而实现基于视觉信息的原位单细胞分析。此外,他们进一步将这种技术与漂移管离子迁移率质谱仪(DTIMS)相融合,通过结合精确的测量质量来确定离子碰撞截面。通过上述技术改进,提高了对单个细胞分子结构的识别精度,为单细胞分析提供了一种更为可靠的方法[图2(A)]。

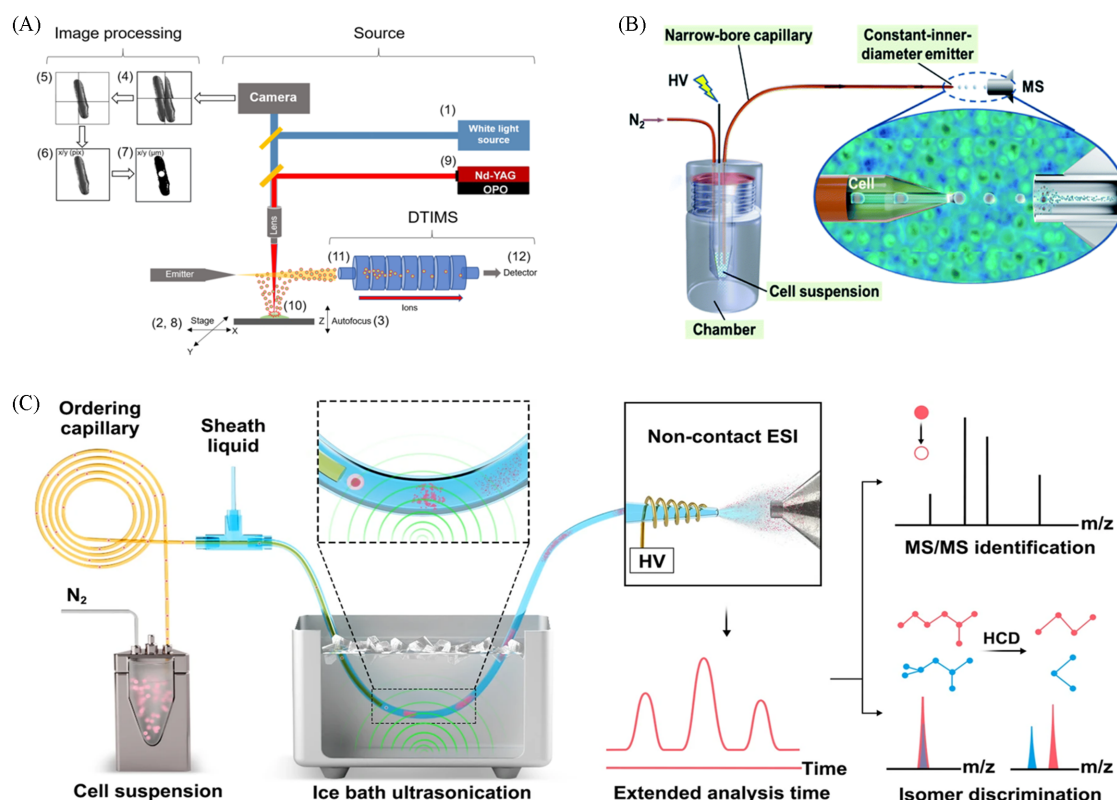


Fig. 2 Research progress in single-cell mass spectrometry metabolomics

(A) Schematic of LAESI-DTIMS based on microscope system<sup>[28]</sup>. Copyright 2021, Molecular Diversity Preservation International; (B) schematic illustration of the ILCEI-MS system<sup>[27]</sup>. Copyright 2022, the Royal Society of Chemistry; (C) the workflow of ID-organic cytoMS<sup>[26]</sup>. Copyright 2024, Springer Nature.

基于电渗流方法和单细胞取样技术,Zhang等<sup>[31]</sup>结合电喷雾离子化质谱技术,建立了单细胞定量质谱平台及创新的单细胞代谢组学方法。这种方法用于分析单个循环肿瘤细胞(CTC)中的目标代谢物,并通过机器学习方法确定了4种关键的代谢物分子,并将CTC分为C1和C2两个亚群。体内和体外实验结果均显示,与肿瘤转移风险显著相关的是C2亚群。这一方法有望预测肿瘤的转移,并为揭示肿瘤转移机制和评估肿瘤患者预后提供新的依据。Shao等<sup>[27]</sup>开发了一种无标记平台,将完整活细胞电发射电离质谱(ILCEI-MS)与代谢组学分析相结合,用于研究基于单细胞代谢组学的药物作用机制(sMDA-scM)。他们利用该平台揭示了经吉非替尼处理的非小细胞肺癌细胞(NSCLC)可分为两个亚群,这两个亚群具有不同的代谢反应特征,并且对吉非替尼治疗的反应表现出异质性。这些发现为评估临床药物的早期治疗效果和克服NSCLC亚群中的药物抗性提供了依据[图2(B)]。

目前,单细胞代谢组学技术面临着一些挑战,如单个细胞在线流式分析时间短,难以捕获二级质

谱数据,难以区分同分异构体,并且在鉴定深度方面存在限制。Qin等<sup>[26]</sup>基于在线高效单细胞裂解装置和非接触电喷雾高分辨率质谱,开发了深度有机质谱流式分析平台(ID-organic cytoMS)。与现有技术相比,该平台将单个细胞的分析时间延长了40倍,确保充足的二级质谱数据采集,并通过在线取样确保高通量方法,实现了单细胞同分异构体的定性和定量分析。这一分析平台获得了丰富的单细胞代谢物鉴定谱图,实现了高达600种代谢物的鉴定,并且该研究首次发现人乳腺癌细胞(MCF-7)具有潜在的细胞亚型,揭示了3-羟基丁酸的丰度异质性,为进一步深入轮廓分析单细胞代谢组和肿瘤过程提供了基础[图2(C)]。Cao等<sup>[32]</sup>将流式分选与纳米粒子增强的基质辅助激光解吸电离质谱技术相结合,开发了用于造血干细胞的高通量单细胞代谢组学(HI-SCMET)平台。通过HI-SCMET平台,可以从单个细胞中检测出超过100种代谢物,并绘制了可用于造血干细胞异质性分析的造血谱系全细胞代谢组谱图。该研究分析了所有分裂时间的造血细胞群体和造血干细胞亚群的单细胞代谢组,并检测到在造血干细胞增殖过程中水平呈趋势变化的33种代谢物。通过遗传或药理干预氧化戊糖磷酸途径(Oxipp)可促进造血干细胞中的活性氧水平,降低造血干细胞在氧化应激下的自我更新能力。并克服了以往代谢组学分析中存在的灵敏度不足、通量有限、细胞完整性受损及靶向性不足等问题。Marques等<sup>[30]</sup>通过合作,从整体代谢组学的角度,将单细胞探针、单细胞质谱技术和生物信息学软件包相结合,开发了单细胞异质性质谱技术(SinCHet-MS)。他们通过该技术将细胞分组为亚群并量化,发现细胞亚群的代谢物,定量分析细胞异质性和亚群并揭示细胞异质性的变化。该技术可用于定量分析细胞异质性,并加深对人类疾病中细胞代谢及其治疗策略的理解。

### 3 单细胞质谱蛋白质组学

蛋白质是细胞功能的主要执行者,构成了生命的细胞结构基础,并决定着细胞的功能。它参与调节细胞内的各种活动。1994年,Wilkins首次提出了“蛋白质组”这一概念,是指由基因组编码的所有蛋白质的集合。作为功能基因组学的重要领域,蛋白质组学的研究关注蛋白质组的组成、修饰、蛋白质间的相互作用及其功能。近年来,在生物质谱技术的支持下,蛋白质组学研究取得了显著进展,帮助研究者更深入地从分子层面理解生命过程。

质谱技术的不断发展推动了蛋白质组学技术的进步,精确定量分析可以清楚表征细胞信号传导、代谢途径和调控机制<sup>[33,34]</sup>。传统的蛋白质组学分析通常基于大量细胞得出蛋白质表达的平均值,然而这种方法忽略了单个细胞的个体差异影响,缺乏对细胞异质性和亚型特征的关键信息。因此,传统的蛋白质组学分析限制了对早期胚胎发育、肿瘤细胞异质性等稀有细胞群体的研究。针对这些问题,单细胞质谱蛋白质组学技术的兴起提供了一种新的解决途径。

单细胞质谱蛋白质组学通过细胞裂解、蛋白质提取、酶解、色谱分离和质谱分析等一系列环节,对单细胞中大量蛋白质进行定性和定量分析,进一步分析蛋白质的表达和修饰状态,实现对单个细胞内蛋白质的高通量检测,提供单个细胞蛋白质组视图,揭示不同蛋白质之间的相互作用等。

随着单细胞质谱技术的日益发展,仪器硬件得到提升,大量新的质谱分析方法被提出来<sup>[35,36]</sup>(图3)。Petelski等<sup>[37]</sup>提出了单细胞蛋白质组学第二代方法(SCoPE2),采用冷冻-加热周期进行细胞裂解,不仅巧妙地规避因对单细胞进行清洁而造成样本在处理过程中的损失,还显著提高了样本的制备速度,通过简化流程使自动化操作更为便捷。相较于传统的纳米液相色谱(nanoLC)技术,Shen等<sup>[38]</sup>提出的毛细管微量采样技术(CE-ESI-HRMS)扩展到不同细胞尺寸的蛋白质组学分析,因灵敏度上实现了大约20倍的提升及在测量速度上实现了倍增,在单细胞分析中更具优势。通过微量分析技术,能够从5 ng的细胞蛋白消化物中扩展分析至722个的蛋白质组,这对于探测更小细胞中的蛋白质具有重要意义,毛细管微量采样技术的引入使得从培养物中分离、转移和分析单个神经元成为可能。研究证实了毛细管电泳高分辨质谱(CE-HRMS)技术在亚细胞蛋白质组学分析上具有足够的灵敏度。CE-ESI-HRMS技术不仅在可扩展性、灵敏度和速度上补充了nanoLC技术,可适用于广泛的细胞尺寸上,为单细胞蛋白质组学领域带来了新的活力。Slavov<sup>[39]</sup>提出了利用质谱定量分析单细胞发育过程中的转录后

调控过程这一创新的方法。许多单细胞发育过程在转录后受到调控,上述方法可定量单细胞中的蛋白质及其各种修饰,有助于探索细胞在发育过程中蛋白质的合成和降解过程。此外,还可以揭示单细胞中的蛋白质构象和活性功能分析,从而将蛋白质的功能与细胞的发育过程紧密相连。

质谱流式细胞技术(CyTOF)是一种结合了传统流式细胞技术和质谱分析的单细胞分析技术,既有传统流式细胞技术的高速分析的特点,又有飞行时间质谱的高分辨能力。CyTOF技术通过金属同位素标记的抗体识别细胞表面或内部蛋白,继而利用质谱对细胞蛋白进行检测。与常规单细胞蛋白质组学技术相比,CyTOF技术提高了检测通道,可对细胞亚型进行更精确的分类及对细胞内信号通路进行全面分析。其次,有效避免了不同检测通道之间的信号干扰,从而简化了实验设计流程和提高了数据的可靠性。因此,CyTOF技术已成为单细胞蛋白质组学研究的又一工具。Subrahmanyam等<sup>[40]</sup>基于CyTOF技术同时检测超过40种不同的抗体,并收集了关于T辅助细胞亚群的高维单细胞蛋白质组数据。通过使用大量谱系标记、细胞因子和其它功能标记,用以识别和表征CD4+T细胞亚群,最后运用自动化和无偏差的高维数据分析工具,全面表征T辅助细胞并发现新的特征。

单细胞蛋白质组学作为一个新兴领域,在揭示细胞异质性方面展现出了潜力。然而,数据的完整性和分析解读的准确性仍面临着巨大的挑战。Zhang<sup>[36]</sup>提出了一种用于单细胞蛋白质组学的肽段水平差异表达分析方法(pepDESC),通过分析肽段水平的信息平衡了蛋白质组的覆盖范围与定量的准确性,为无标记定量识别差异表达的蛋白质提供了强有力的工具,其有效性已在现实的单细胞及不同的数据集中得到了验证[图3(A)和(B)]。Wang等<sup>[35]</sup>则提出了DeepSCP新框架,利用深度学习技术提高单

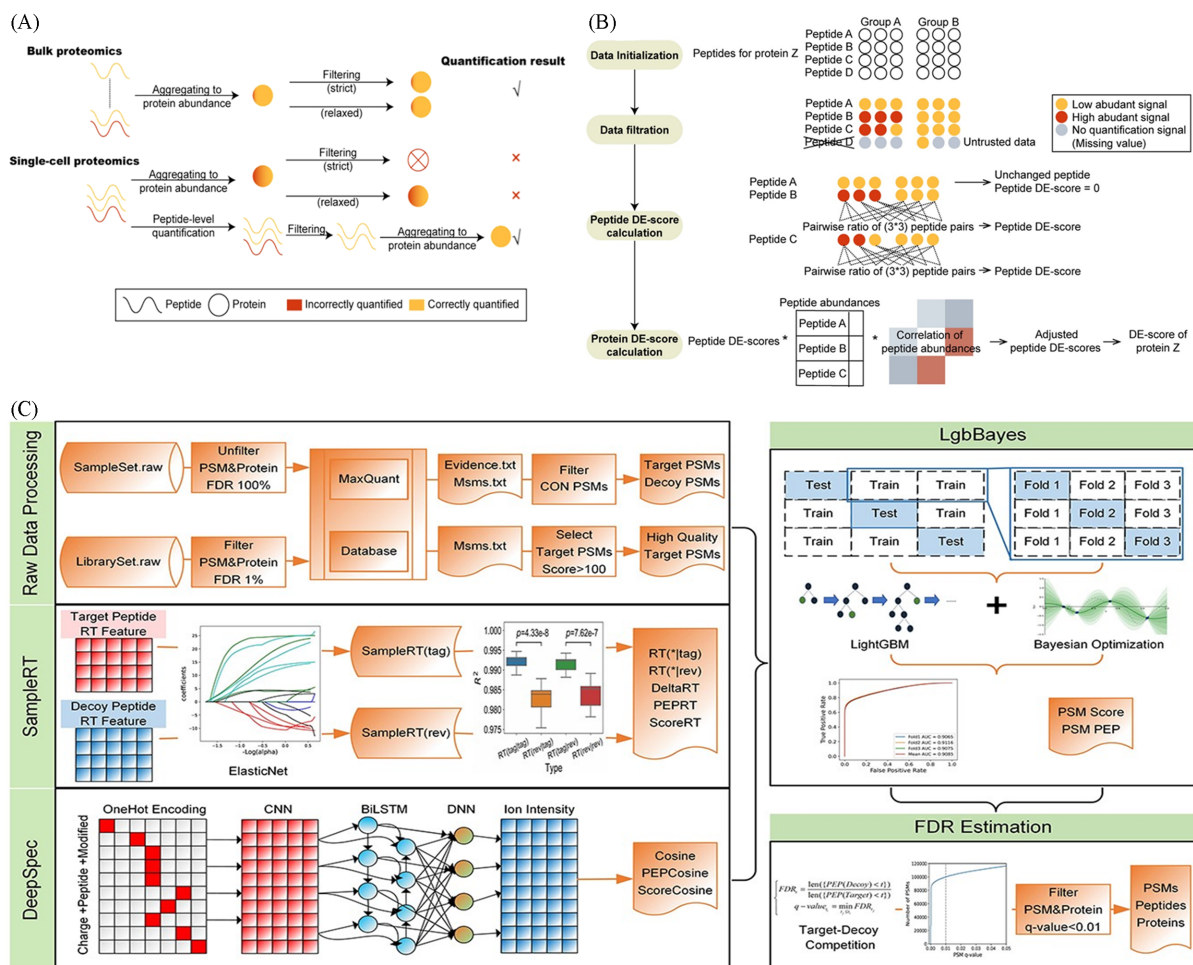


Fig. 3 Research progress in single-cell mass spectrometry proteomics

(A, B) The workflow of pepDESC is illustrated by protein Z<sup>[36]</sup>. Copyright 2023, Elsevier;

(C) the overall framework of DeepSCP<sup>[35]</sup>. Copyright 2022, Oxford University Press.

细胞蛋白质组学覆盖率. DeepSCP通过深度学习方法构建了一系列特征以预测肽谱匹配(PSMs)的保留时间和片段离子强度,并利用优化的集成学习模型来预测PSM标签.通过目标诱饵竞争的方法,当 $q$ 值控制在0.01水平时,DeepSCP能够鉴定出更可靠的肽段和蛋白质[图3(C)]. Naval等<sup>[41]</sup>提出了一种创新的靶向分析方法,即使用特定蛋白质的合成肽段,取代以往的载体蛋白质组.其优势在于通过特定的合成肽段作为参照能够更准确地捕捉到目标蛋白质的表达变化,能够针对特定蛋白质进行深入分析,从而显著提升了这些蛋白质在单细胞中的鉴定和定量的精确度. Huffman等<sup>[42]</sup>提出了一种创新的优先级单细胞蛋白质组学(pSCoPE)方法,该方法在实时保留时间的基础上引入了定义肽分析时间顺序的优先级.当肽前体在扫描中被检测到而占空比时间不足以分析列表中的所有肽时,能最大限度地提高肽分析的一致性、数据完整性和仪器时间利用率.

## 4 单细胞质谱多组学

单细胞多组学技术(如代谢组、转录组和蛋白质组分析等)能够在单细胞内同时分析多种分子组的表达及调控情况,有助于观察和理解单一组学无法揭示的组学间相互作用关系和模式.进一步揭示了单细胞内多个分子层的细胞异质性,有利于加强对细胞事件的全面了解,并在多层面探究疾病的发生、发展与治疗机制.近年来,一些前沿的单细胞多组学技术应运而生,不仅推动了生物学研究的发展,也为探索细胞层面的复杂性提供了前所未有的工具和方法.

质谱技术以其高特异性、高灵敏度和高通量等特点,能够更准确地解析细胞内的分子组成和功能状态.单细胞质谱技术结合组学分析,为生物领域提供了更为精准的分子层面解读.现在已有多种空间组学方法(如转录组、蛋白组)来测量单细胞级的空间信号分布,但是仍然缺乏空间代谢组学的分析方法.空间代谢组学可以揭示细胞间的异质性和组织结构. Yuan等<sup>[43]</sup>报道了一种空间单核代谢组学方法(SEAM),通过结合高空间分辨率质谱成像和机器学习算法的灵活平台,实现了组织原位单细胞核图像识别、代谢异质性的可视化,并基于原位代谢指纹对单细胞核进行识别和聚类.研究者将SEAM应用于研究人类纤维化肝脏的空间代谢谱,并发现具有特殊代谢特征的肝细胞亚群.这些特征与其接近纤维化微环境有关,并通过空间转录组学和小鼠早期胚胎空间转录组测序技术(Geo-seq)验证了这一发现.这些证明了SEAM在探索单细胞水平上空间代谢特征的能力.

近年来,基于质谱技术的发展,研究者对单细胞转录组和蛋白质组的联合分析有了更深入的探索.如Jiang等<sup>[44]</sup>基于微流控技术、高通量测序技术和质谱技术,开发了一种对单细胞同时进行转录组和蛋白质组分析的平台(scSTAP),实现了在单细胞水平对转录组和蛋白质组进行深度联合定量分析,为理解细胞内转录和翻译之间的关系提供了依据.该研究通过scSTAP对不同成熟期的小鼠卵母细胞进行分析,平均定量深度为19948个基因和2663个蛋白组.并且深入分析了单个RNA和蛋白质对的关联性以及减数分裂调控网络,鉴定了30对转录-蛋白质对作为卵母细胞成熟的特异性标记,这有助于探索卵母细胞减数分裂过程中的转录和翻译调控特征. Mennillo等<sup>[45]</sup>对健康对照(HC)和溃疡性结肠炎(UC)患者的外周血和结肠活检样本进行了单细胞、空间转录组学和蛋白质组学的联合分析[图4(A)].研究者基于单细胞转录组+表面蛋白测序技术(CITE-seq)与质谱流式技术(CyTOF)构建了结肠表面蛋白的细胞图谱,并利用先进的成像和检测技术,如多重离子束成像、索引共检测和福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样本上的多路RNA原位杂交技术(RNA-ISH),揭示了肠道组织中不同亚群的空间分布.研究发现,单核吞噬细胞是维多珠单抗治疗UC的主要靶点,并在细胞基质和上皮层中显示出变化.空间分析揭示了UC患者活检样本中单核吞噬细胞和成纤维细胞亚群的密度和接近度有所增加.这项研究强调了将单细胞组学与转录组学和蛋白质组学方法相结合,能够深入解析免疫表型,并为开发更精确的生物标志物算法提供可能.

此外,基于液相色谱串联质谱技术(LC-MS/MS)研究单细胞多组学,描述单细胞水平的蛋白质组和代谢组特征至关重要. Wu等<sup>[46]</sup>提出了一次LC-MS/MS分析中获得单细胞蛋白质组和代谢组信息的全新策略,被称为一次性单细胞蛋白质组和代谢组分析(scPMA).他们基于这一策略开发了一套完整的

工作流程,实现了从单细胞捕获、纳升级样本预处理、一次性LC注入和酶解肽段与代谢物的分离到蛋白质组和代谢组的双区域质谱检测.通过scPMA策略,他们成功对单个肿瘤细胞进行了双组学分析和初步分类,从而深入理解了调控细胞状态的机制,为未来在肿瘤免疫方面的研究提供了新的工具和策略.

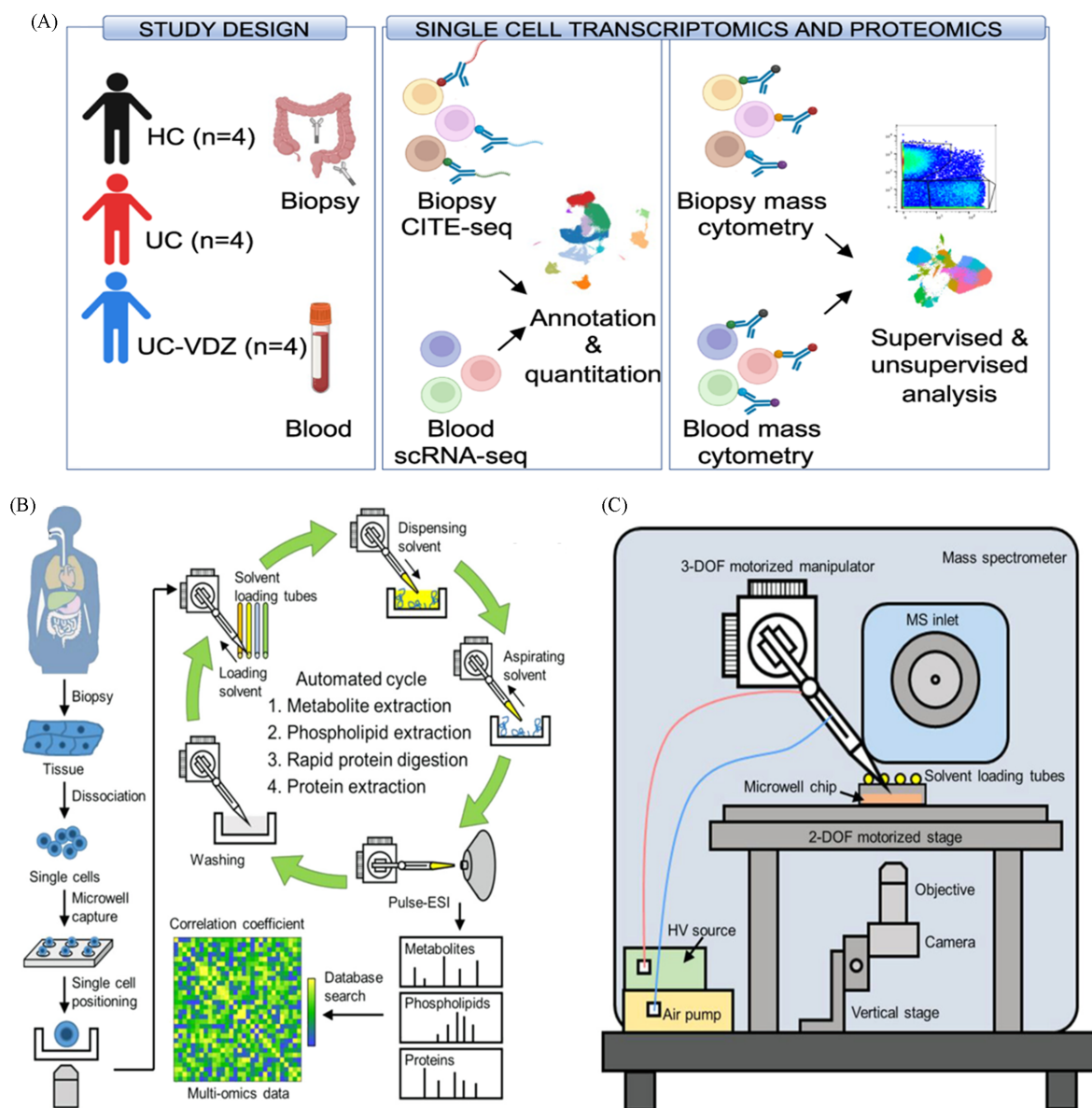


Fig. 4 Research progress in single-cell mass spectrometry multi-omics

(A) Schematic of platform design combining single-cell transcriptomics (CITE-seq) and proteomics (CyTOF)<sup>[45]</sup>. Copyright 2024, Springer Nature; (B, C) schematic of the highly efficient and automatic single-cell multi-omics mass spectrometry strategy<sup>[47]</sup>. Copyright 2023, American Chemical Society.

然而,在单细胞层面上缺少实时的细胞内消化和提取方法,且多组学数据的高效分析也仍然面临一定的挑战. Zhao等<sup>[47]</sup>开发了一种结合质谱技术的系统,实现对单细胞进行快速且自动化的样品制备及蛋白质组学和代谢组学的联合分析[图4(B)和(C)].该系统具有10皮升级微孔芯片来容纳单个细胞,其中的蛋白质可以在5 min内被消化,这比传统的大量样本消化快了144倍.此外,研究者还开发了一种自动化的皮升级提取系统,用于从单细胞中采集代谢物、磷脂和蛋白质.如2 min内从700 pL的单个细胞样本溶液中获得了二级质谱图,10 min内从单个细胞中检测到了1391种蛋白质、磷脂和代谢物.通过多组学分析癌症组织样本细胞,细胞分类的准确度比单一组学分析提升了40%.这种自动化

的单细胞质谱多组学分析系统, 在研究细胞异质性和癌症诊断方面极为高效.

## 5 单细胞质谱多组学的生物学应用

单细胞质谱多组学在生物医学的应用尚处于早期阶段, 主要涉及细胞图谱绘制、分子机制探究及精准医学研究. 其中, 单细胞质谱多组学技术为细胞图谱的绘制提供了强有力的新型工具, 大大推动了细胞图谱的研究进展. Wagner等<sup>[48]</sup>结合单细胞质谱蛋白质组学和转录组学技术, 分析了144个乳腺癌肿瘤样本、46个乳腺癌近肿瘤样本和4个缩小乳房成形术组织的2600万个细胞, 构建了广泛的人类乳腺癌生态系统单细胞图谱, 揭示了乳腺上皮细胞和免疫细胞的表型多样性、肿瘤细胞的表型异常以及肿瘤的个体化差异, 并强调了同型和异型肿瘤-免疫细胞的关系, 使基于生态系统的乳腺癌患者诊断分型成为可能. Friebel等<sup>[49]</sup>结合单细胞质谱蛋白质组学技术、免疫荧光成像和基因命运图谱技术对38例接受神经手术切除的胶质瘤、脑转移及癫痫(对照)患者的新鲜手术切除组织展开分析研究, 绘制了蛋白和基因层面的脑肿瘤白细胞图谱, 明确揭示胶质瘤和脑转移瘤组织驻留和入侵免疫细胞的异质性, 为了解肿瘤中的个体免疫成分和开发激活免疫防御反应的靶向免疫疗法提供了重要的理论依据.

单细胞质谱多组学技术能够揭示细胞群中多个分子层的细胞异质性, 并阐述这种变异在捕获的组学层之间是如何耦合或解耦的, 这些技术产生的数据集有助于深入了解驱动细胞异质性的关键生物学过程和分子机制<sup>[3]</sup>. Guo等<sup>[50]</sup>通过对体内与体外成熟卵母细胞的单细胞质谱蛋白及基因组异质性分析, 为评估体外受精对卵母细胞质量的影响和研究卵母细胞成熟机制提供了新的见解. Schoof等<sup>[51]</sup>通过对原发性髓系白血病干细胞的单细胞质谱蛋白质组学研究, 发现一系列不同分化阶段的细胞的蛋白表达异质性, 为细胞发育及分化研究奠定了分子基础[图5(A)]. Brunner等<sup>[52]</sup>将小型化样品制备与低流量液相色谱以及新型捕获离子迁移率质谱仪相结合, 实现了药物扰动下不同细胞周期细胞的单细胞转录组和蛋白组差异分析, 揭示了细胞周期的关键调节因子.

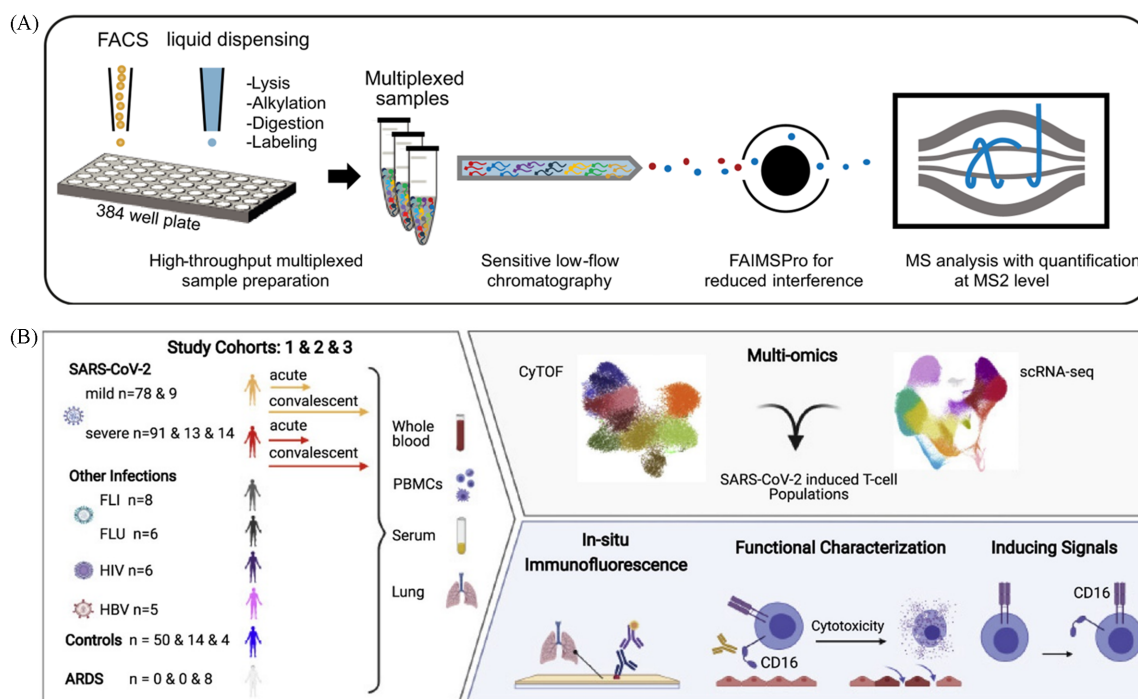


Fig. 5 Biomedical applications of single-cell mass spectrometry multi-omics

(A) Quantitative LC-MS-based single-cell proteomics (scMS) serves as a tool for characterizing cellular hierarchies<sup>[51]</sup>. Copyright 2021, Springer Nature; (B) platform combining single-cell transcriptomics and single-cell proteomics for biomarker discovery in severe COVID-19<sup>[55]</sup>. Copyright 2022, Elsevier.

疾病的发生发展是一个复杂的过程,涉及基因、蛋白、代谢等多组学层面,不同的组学方法适用于评估疾病复杂病理生理学的不同部分,对单一组学子集的分析只能提供一个扭曲的、有偏见的、不完整的底层生物学图景.单细胞质谱多组学技术提供了更高灵敏度(单细胞级)的信号捕获手段和多组学数据集整合平台,从而为疾病的发生发展提供更全面的分子信息,是推进临床精准医学的有效手段. Tsai 等<sup>[53]</sup>基于 CyTOF,对健康的人类骨髓细胞与多种患病骨髓和血液样本的细胞进行单细胞蛋白质组学分析,发现层合蛋白 B1 为急性白血病的骨髓细胞的显著标志特征,且层合蛋白 A/C 有助于区分正常和肿瘤成熟 T 细胞.进一步将形态测量法与免疫分型相结合,研究者构建出一种高通量、高度复用的单细胞形态计量特征分析方法,该方法或可起到优化常规的血液病理学自动化诊断的作用. Zhang 等<sup>[54]</sup>对共计 263 例活跃期系统红斑狼疮(SLE)、缓解期系统红斑狼疮和健康对照临床外周血样本进行了单细胞质谱蛋白和基因组学研究,发现 CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>T 细胞的丰度和功能失调可以作为 SLE 预后和伴随诊断的潜在生物标志物. Georg 等<sup>[55]</sup>应用单细胞转录组测序(scRNA-seq)、单细胞免疫组库测序(VDJ-seq)、CyTOF 技术手段将单细胞转录组学、单细胞蛋白质组学与机制研究相结合,评估致病性 T 细胞的功能和诱导信号,发现活化的高细胞毒性 CD16<sup>+</sup> T 细胞可作为严重的新型冠状病毒感染(COVID-19)的生物标志物,并揭示了 T 细胞区室的改变及它们的上游信号和功能相关性,解释了在严重 COVID-19 中观察到的重要免疫病理学特征[图 5(B)]. Mogilenko 等<sup>[56]</sup>采用 CyTOF, scRNA-seq 和 CITE-seq 等技术手段,表征了基因、转录以及蛋白组层面的免疫细胞年龄相关变化,并揭示了免疫衰老系统中器官特异性变化,进而发现了一个免疫衰老的细胞新型显著标志——GZMK<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Taa 细胞,为年龄相关的免疫系统功能障碍提供了新型治疗靶点.

## 6 总结与展望

近年来,随着单细胞分选技术、质谱检测技术及大数据分析整合平台等软硬件设施的飞速发展,单细胞质谱多组学技术已实现了纳克/升级别的检测灵敏度,以及定量和半定量级别的检测精度.为解决细胞图谱绘制、生命现象分子机制探究以及精准医学等生物医学难题提供了坚实的技术支持.

尽管这一领域已经取得了一些成就,但在以下几个方面仍亟待提升.(1)检测性能:目前,单细胞质谱多组学技术存在以下问题,如在样本前处理过程中出现损失、仪器在小样本量检测时灵敏度不足以及其它物质带来干扰等.此外,细胞生物学的不断深入发展对单细胞质谱多组学技术的分析能力提出了更高的要求,因此迫切需要开发更高灵敏度、精度和特异性的新型单细胞质谱多组学技术.仪器性能的提升和新技术的融合是单细胞质谱多组学检测性能提升的未来发展方向.如,破坏性更小的高效电离技术有望实现细胞增殖或药物治疗期间对细胞内成分的实时分析;设计并引入新型内标物有望实现单细胞内各种生物分子的全面精确定量.(2)数据分析:通过复杂的计算方法可以把多个组学的数据整合到一起,但这种数据整合后的分析效果与准确性难以判断.因此,迫切需要建立统一的基准测试流程,并生成数据分析指南,以便评价基于不同模型的整合方法的性能优劣.(3)组学融合:目前,单细胞质谱多组学技术在组学融合方面存在融合层面较少(仅实现 2 个或 3 个层面的组学融合)和不同组学信息多源自多套设备(极少能够实现一套设备中多组学信息同时采集)的问题.因此,将更多组学层次、时间维度、三维空间结构、细胞表型以及细胞谱系等整合到单细胞质谱组学研究中,生成涵盖多组学和多尺度综合图谱,将有助于更深入了解健康与疾病的状态,逐步揭示生命的奥秘并持续推动医药科学的进步.此外,设计构建同时采集多组学信息的检测平台将有助于统一不同数据集的多组学信息,减少样本在不同仪器间辗转过程中带来的系统误差和偶然误差.总之,单细胞质谱多组学技术的进步对推动生物医学研究领域的发展意义重大.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Baysoy A., Bai Z., Satija R., Fan R., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2023, 24(10), 695—713
- [ 2 ] Flynn E., Almonte-Loya A., Fragiadakis G. K., *Annu. Rev. Biomed.*, 2023, 6(1), 313—337
- [ 3 ] Macaulay I. C., Ponting C. P., Voet T., *Trends Genet.*, 2017, 33(2), 155—168

- [ 4 ] Zhu Q., Zhao X., Zhang Y., Li Y., Liu S., Han J., Sun Z., Wang C., Deng D., Wang S., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 8170
- [ 5 ] Ma A., McDermaid A., Xu J., Chang Y., Ma Q., *Trends Biotechnol.*, **2020**, *38*(9), 1007—1022
- [ 6 ] Chen W., Yu H., Hao Y., Liu W., Wang R., Huang Y., Wu J., Feng L., Guan Y., Huang L., *ACS Nano*, **2023**, *17*(20), 19779—19792
- [ 7 ] Wang Y., Xu X., Fang Y., Yang S., Wang Q., Liu W., Zhang J., Liang D., Zhai W., Qian K., *ACS Nano*, **2024**, *18*(3), 2409—2420
- [ 8 ] Wu J., Wei X., Gan J., Huang L., Shen T., Lou J., Liu B., Zhang J. X., Qian K., *Adv. Funct. Mater.*, **2016**, *26*(22), 4016—4025
- [ 9 ] Zhang J., Teng F., Hu B., Liu W., Huang Y., Wu J., Wang Y., Su H., Yang S., Zhang L., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(18), 2311431
- [ 10 ] Herzenberg L. A., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg L. A., *Clinical Chem.*, **2002**, *48*(10), 1819—1827
- [ 11 ] Sherman S. E., Kuljanin M., Cooper T. T., Lajoie G. A., Hess D. A., *Stem Cells Dev.*, **2020**, *29*(14), 895—910
- [ 12 ] Melliou S., Diamandis P., *Star Protoc.*, **2022**, *3*(4), 101774
- [ 13 ] Espina V., Heiby M., Pierobon M., Liotta L. A., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2007**, *7*(5), 647—657
- [ 14 ] Guise A. J., Misal S. A., Carson R., Chu J. H., Boekweg H., van Der Watt D., Welsh N. C., Truong T., Liang Y., Xu S., Benedetto G., Gagnon J., Payne S. H., Plowey E. D., Kelly R. T., *Cell Rep.*, **2024**, *43*(1), 113636
- [ 15 ] Rosenberger F. A., Thielert M., Strauss M. T., Schweizer L., Ammar C., Mädler S. C., Metousis A., Skowronek P., Wahle M., Madden K., Gote-Schniering J., Semenova A., Schiller H. B., Rodriguez E., Nordmann T. M., Mund A., Mann M., *Nat. Methods*, **2023**, *20*(10), 1530—1536
- [ 16 ] Lecault V., White A. K., Singhal A., Hansen C. L., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2012**, *16*(3/4), 381—390
- [ 17 ] Feng D., Li H., Xu T., Zheng F., Hu C., Shi X., Xu G., *Anal. Chim. Acta*, **2022**, *1221*, 340116
- [ 18 ] Lamanna J., Scott E. Y., Edwards H. S., Chamberlain M. D., Dryden M. D. M., Peng J., Mair B., Lee A., Chan C., Sklavounos A. A., Heffernan A., Abbas F., Lam C., Olson M. E., Moffat J., Wheeler A. R., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*(1), 5632
- [ 19 ] Misra B. B., *Methods Mol. Biol.*, **2020**, *2064*, 191—217
- [ 20 ] Cao Y. Q., Zhang L., Zhang J., Guo Y. L., *Anal. Chem.*, **2020**, *92*(12), 8378—8385
- [ 21 ] Duncan K. D., Fyrestam J., Lanekoff I., *Analyst*, **2019**, *144*(3), 782—793
- [ 22 ] Hu K., Nguyen T. D. K., Rabasco S., Oomen P. E., Ewing A. G., *Anal. Chem.*, **2020**, *93*(1), 41—71
- [ 23 ] Lageveen-Kammeijer G. S. M., de Haan N., Mohaupt P., Wagt S., Filius M., Nouta J., Falck D., Wuhler M., *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 2137
- [ 24 ] Oomen P. E., Aref M. A., Kaya I., Phan N. T. N., Ewing A. G., *Anal. Chem.*, **2018**, *91*(1), 588—621
- [ 25 ] Yin L., Zhang Z., Liu Y., Gao Y., Gu J., *Analyst*, **2019**, *144*(3), 824—845
- [ 26 ] Qin S., Zhang Y., Shi M., Miao D., Lu J., Wen L., Bai Y., *Nat. Commun.*, **2024**, *15*(1), 4387
- [ 27 ] 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., *Chem. Sci.*, **2022**, *13*(27), 8065—8073
- [ 28 ] Taylor M. J., Mattson S., Liyu A., Stopka S. A., Ibrahim Y. M., Vertes A., Anderton C. R., *Metabolites*, **2021**, *11*(4), 200
- [ 29 ] Chen A., Yan M., Feng J., Bi L., Chen L., Hu S., Hong H., Shi L., Li G., Jin B., Zhang X., Wen L., *IEEE T Bio-Med Eng.*, **2022**, *69*(1), 325—333
- [ 30 ] Marques C., Friedrich F., Liu L., Castoldi F., Pietrocchia F., Lanekoff I., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2023**, *34*(11), 2518—2524
- [ 31 ] Zhang W., Xu F., Yao J., Mao C., Zhu M., Qian M., Hu J., Zhong H., Zhou J., Shi X., Chen Y., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 2485
- [ 32 ] Cao J., Yao Q. J., Wu J., Chen X., Huang L., Liu W., Qian K., Wan J. J., Zhou B. O., *Cell Metab.*, **2024**, *36*(1), 209—221
- [ 33 ] Fuchs S., Sawas N., Staedler N., Schubert D. A., D'Andrea A., Zeiser R., Piali L., Hruz P., Frei A. P., *Eur. J. Immunol.*, **2019**, *49*(3), 462—475
- [ 34 ] Pali C. G., Cheng Q., Gillespie M. A., Shannon P., Mazurecyk M., Napolitani G., Price N. D., Ranish J. A., Morrissey E., Higgs D. R., Brand M., *Cell Stem Cell*, **2019**, *24*(5), 812—820
- [ 35 ] Wang B., Wang Y., Chen Y., Gao M., Ren J., Guo Y., Situ C., Qi Y., Zhu H., Li Y., Guo X., *Brief Bioinform.*, **2022**, *23*(4), bbac214
- [ 36 ] Zhang Y., *Mol. Cell. Proteomics*, **2023**, *22*(7), 100583
- [ 37 ] Petelski A. A., Slavov N., Specht H., *Jove-J. Vis. Exp.*, **2022**, (190), e63802
- [ 38 ] Shen B., Pade L. R., Choi S. B., Muñoz-Llanca P., Manzini M. C., Nemes P., *Front. Chem.*, **2022**, *10*, 863979
- [ 39 ] Slavov N., *Development*, **2023**, *150*(13), dev201492
- [ 40 ] Subrahmanyam P. B., Maecker H. T., *Methods Mol. Biol.*, **2021**, *2285*, 49—63
- [ 41 ] Naval P., Paneda L. P., Athanasopoulou M., Teppo J. S., Zubarev R. A., Vegvari A., *Methods Mol. Biol.*, **2024**, *2817*, 133—143
- [ 42 ] Huffman R. G., Leduc A., Wichmann C., di Gioia M., Borriello F., Specht H., Derks J., Khan S., Khoury L., Emmott E., Petelski A. A., Perlman D. H., Cox J., Zanoni I., Slavov N., *Nat. Methods*, **2023**, *20*(5), 714—722
- [ 43 ] Yuan Z., Zhou Q., Cai L., Pan L., Sun W., Qumu S., Yu S., Feng J., Zhao H., Zheng Y., Shi M., Li S., Chen Y., Zhang X., Zhang M. Q., *Nat. Methods*, **2021**, *18*(10), 1223—1232
- [ 44 ] Jiang Y. R., Zhu L., Cao L. R., Wu Q., Chen J. B., Wang Y., Wu J., Zhang T. Y., Wang Z. L., Guan Z. Y., Xu Q. Q., Fan Q. X.,

- Shi S. W., Wang H. F., Pan J. Z., Fu X. D., Wang Y., Fang Q., *Cell Rep.*, **2023**, *42*(11), 113455
- [45] Mennillo E., Kim Y. J., Lee G., Rusu I., Patel R. K., Dorman L. C., Flynn E., Li S., Bain J. L., Andersen C., Rao A., Tamaki S., Tsui J., Shen A., Lotstein M. L., Rahim M., Naser M., Bernard-Vazquez F., Eckalbar W., Cho S. J., Beck K., El-Nachef N., Lewin S., Selvig D. R., Terdiman J. P., Mahadevan U., Oh D. Y., Fragiadakis G. K., Pisco A., Combes A. J., Kattah M. G., *Nat. Commun.*, **2024**, *15*(1), 1493
- [46] Wu J., Xu Q. Q., Jiang Y. R., Chen J. B., Ying W. X., Fan Q. X., Wang H. F., Wang Y., Shi S. W., Pan J. Z., Fang Q., *Anal. Chem.*, **2024**, *96*(14), 5499—5508
- [47] Zhao P., Feng Y., Wu J., Zhu J., Yang J., Ma X., Ouyang Z., Zhang X., Zhang W., Wang W., *Anal. Chem.*, **2023**, *95*(18), 7212—7219
- [48] Wagner J., Rapsomaniki M. A., Chevrier S., Anzeneder T., Langwieder C., Dykgers A., Rees M., Ramaswamy A., Muenst S., Soysal S. D., *Cell*, **2019**, *177*(5), 1330—1345
- [49] Friebel E., Kapolou K., Unger S., Núñez N. G., Utz S., Rushing E. J., Regli L., Weller M., Greter M., Tugues S., *Cell*, **2020**, *181*(7), 1626—1642
- [50] Guo Y., Cai L., Liu X., Ma L., Zhang H., Wang B., Qi Y., Liu J., Diao F., Sha J., *Mol. Cell. Proteomics*, **2022**, *21*(8), 100267
- [51] Schoof E. M., Furtwängler B., Üresin N., Rapin N., Savickas S., Gentil C., Lechman E., Keller U. A. D., Dick J. E., Porse B. T., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*(1), 3341
- [52] Brunner A. D., Thielert M., Vasilopoulou C., Ammar C., Coscia F., Mund A., Hoerning O. B., Bache N., Apalategui A., Lubeck M., *Mol. Syst. Biol.*, **2022**, *18*(3), e10798
- [53] Tsai A. G., Glass D. R., Juntilla M., Hartmann F. J., Oak J. S., Fernandez-Pol S., Ohgami R. S., Bendall S. C., *Nat. Med.*, **2020**, *26*(3), 408—417
- [54] Zhang L., Du F., Jin Q., Sun L., Wang B., Tan Z., Meng X., Huang B., Zhan Y., Su W., *Adv. Sci.*, **2023**, *10*(35), 2300123
- [55] Georg P., Astaburuaga-García R., Bonaguro L., Brumhard S., Michalick L., Lippert L. J., Kostevc T., Gäbel C., Schneider M., Streitz M., *Cell*, **2022**, *185*(3), 493—512
- [56] Mogilenko D. A., Shpynov O., Andhey P. S., Arthur L., Swain A., Esaulova E., Brioschi S., Shchukina I., Kerndl M., Bambouskova M., *Immunity*, **2021**, *54*(1), 99—115

(Ed.: Y, K, S)