

代谢组学在单细胞领域应用的研究进展

栾瑞雪¹, 李雷², 仪书源¹, 李云琦¹, 王寿世³

(1 潍坊医学院麻醉学院, 山东 潍坊 261053; 2 东平县人民医院麻醉科; 3 青岛大学附属青岛市中心医院(青岛市肿瘤医院)麻醉科)

[摘要] 单细胞代谢组学(SCM)是以高通量检测和数据处理为手段,以组群指标分析为基础,以信息建模和系统集成为目标,对特定生理时期的某种细胞的所有小分子量代谢物进行定量和定性分析。本文综述了近年来代谢组学在单细胞领域中的研究及应用进展,并对其在医学领域的最新应用进行了详细的讨论。

[关键词] 代谢组学;高通量筛选分析;显微镜检查,原子力;流式细胞术;综述

[中图分类号] R34;R446-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)06-0941-04

doi:10.11712/jms.2096-5532.2023.59.186

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20231229.1009.002>;

2024-01-02 10:45:53

RESEARCH ADVANCES IN THE APPLICATION OF METABOLOMICS IN THE FIELD OF SINGLE-CELL ANALYSIS LUAN

Ruixue, LI Lei, YI Shuyuan, LI Yunqi, WANG Shoushi (School of Anesthesiology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

[ABSTRACT] Single-cell metabolomics is a quantitative and qualitative analysis of all low molecular weight metabolites within a certain type of cells at a specific physiological status, through high-throughput detection and data processing of sets of indicators for information modeling and system integration. This article reviews the research and application progress of metabolomics in the field of single-cell analysis in recent years, focusing on its latest application in the medical field.

[KEY WORDS] metabolomics; high-throughput screening assays; microscopy, atomic force; flow cytometry; reviews

代谢组学可以检测到所有的小分子,更具体地说,是分子量小于2 000的化学物质^[1-2]。通过代谢组学的研究,可以获得与代谢物及其产物变化和代谢途径相关的生物学信息。相对于仅显示细胞群共同特征的整体细胞分析,单细胞代谢组学(SCM)能够较为准确地发现细胞群体的特殊特征^[3-5]。SCM是目前仅有的可以描述只在几秒或几分钟内发生的细胞实时生化反应的分析技术^[6],它能够对不同细胞群中的细胞进行准确的生化表征,帮助我们深入了解各种细胞代谢机制。本文将从SCM的概念和常用方法、最新应用精选实例及其挑战和展望等方面进行综述。

1 SCM的概念及发展历史

1.1 SCM的定义

SCM是一种基于单个细胞水平对其代谢过程进行研究分析的技术。其基本原理是应用高通量测序技术,对单个细胞的代谢物进行检测。SCM具有高灵敏度和高分辨率,能够对细胞内的微小变化进行检测,相比于多细胞或组织可以有效地避免由于细胞异质性引起的误差,并且可反映单一细胞功能以及揭示细胞异质性与其代谢间的关系^[7-8]。

1.2 SCM的实验流程

与其他组学的流程类似,SCM分析的流程可以概述为:

[收稿日期] 2022-12-18; **[修订日期]** 2023-05-09

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(20200411-1322)

[第一作者] 栾瑞雪(1995-),女,硕士研究生。

[通信作者] 王寿世(1979-),男,副教授,硕士生导师。E-mail: wangshoushi1226@126.com。

①靶细胞或者靶细胞类型鉴定;②靶细胞检测样本的制备;③应用SCM技术分析样本;④SCM数据分析;⑤差异代谢物鉴定及相关代谢通路研究;⑥数据的生物学解释及后续实验^[4,9-10]。但不同实验的SCM分析步骤可根据不同的实验要求进行适当的调整。

SCM分析最常见的障碍是分离单个检测细胞。根据细胞内、外不同的特性,可以通过一些方法从不同类别的细胞混合物中分离出单个细胞^[7-8]。常见的细胞样本制备方法包括通过原子力显微镜探针直接可视化和穿透/提取、荧光激活细胞分选及微流控阵列等。其中第一种方法只保留了探针中的细胞代谢物,而后两种方法却可以保留细胞的完整原始形态^[7]。

1.3 SCM的发展历史

代谢组学是20世纪90年代中期发展起来的一门新兴学科,目前已经在疾病早期诊断、药物靶点发现、疾病机制研究及疾病诊断等方面取得了许多重大成果。生物学研究的历程往往要经过从宏观表型的观察到微观机制的探索,最后再回到宏观表型的解释和修正。而代谢组学起步较晚,并且与DNA和RNA不同,代谢物无法扩增,一些非常稀少的代谢物依赖更为灵敏的检测方法。此外,代谢物的浓度也可能在很短时间内发生颠覆性的变化,这些都决定了SCM的研究正面临着诸多困难。

2 目前常用的SCM研究方法或技术

常用的SCM分析方法主要包括质谱法、色谱法、荧光法以及超微电极电化学方法,其中单细胞质谱法(SCMS)已经

成为目前应用最为广泛的分析方法。

2.1 SCMS

质谱法凭借其高特异性、高灵敏度、强大的结构解析能力以及准确定量能力,近年来广泛应用于单细胞分析中。例如,有学者使用气相色谱-质谱仪测量单个海兔(海参)神经元中氨基酸的浓度^[11-12]。

根据使用离子化技术的不同分为如下4类:纳升电喷雾离子化质谱法、激光解吸附离子化质谱法、二次离子质谱法和电感耦合等离子体质谱法^[13]。纳升电喷雾离子化质谱法是一种具有高灵敏度和高离子化效率的“软”离子化技术,广泛应用于生命科学领域^[14-17],与传统的电喷雾离子源相比具有更充分的离子化时间和更高的离子化效率^[14,18]。激光解吸附离子化质谱法是利用一种特定波长的激光实现目标化合物的解吸附和离子化的,其中,基质辅助激光解吸电离可利用激光能量吸收基质并以最小碎片化的方式从大分子中产生离子^[14,19]。二次离子质谱法是一种兼具高分辨率和高灵敏度的表面分析质谱技术^[20-21],该法通常是使用特殊的高能一次离子束给予样品表面轰击处理将待测分子离子化。电感耦合等离子体质谱法是一种可以通过利用高温等离子体将检测样品原子化和离子化来实现多种同位素和金属元素的质谱定性和定量分析的无机元素质谱离子法^[22],具有多元检测、低检测限、高分辨率等优点^[23-24]。

2.2 色谱法

色谱法是一种可以定义为在流动相和固定相组成的恒定场中,因为物质和该两相作用差异的原因而将物质彼此分离开来的方法^[25]。早在1903年,就有研究人员发现并研究了色谱分离法^[18,26]。色谱法通常分为高效液相色谱法、毛细管电泳法^[27]、开管毛细管亲和液相色谱法等,这些检测技术由于分离效率高、质量检测限低等优势,已经广泛应用于SCM的检测。然而,色谱法的劣势在于样品前处理、衍生和分离等方面花费的时间较多,导致分析效率低下。

2.3 荧光法

对于单细胞的研究,荧光法是其中一种经典的分析方法^[28-29]。荧光显微成像是实时观测单细胞物质释放的重要工具,其原理是利用荧光衍生反应,即通过荧光探针标记囊泡或者关键蛋白分子^[30],但是荧光探针的波长宽度有一定限制,在有限光窗下只能检测3~4种不互相干扰的物质^[31]。荧光显微成像法主要采用纳米显微镜及激光扫描共聚焦显微镜等实时监测分泌囊泡、蛋白分子的运动。

2.4 超微电极电化学方法

超微电极电化学技术是实时观测单个细胞释放儿茶酚胺类递质等具有电化学活性信号分子的主要技术。这种技术一般采用半人工突触模式以及安培法将电极靠近单个细胞,在500~800 mA的电流条件下实时观测扩散到电极表面的信号分子。超微电极电化学技术虽然具有尺寸小、灵敏度高、响应速度快的优势,但却局限于只能检测细胞释放的物质。此外,这种技术只能用于检测具有电化学活性信号分子的物质^[32-33]。

3 SCM在不同研究领域的应用

SCM在肿瘤的诊断与药物治疗方面的应用广泛^[34-35],它不仅可以发现恶性肿瘤新的治疗组合策略,还可能有助于识别药物毒性的早期迹象^[34,36-38]。肿瘤细胞在发生遗传或非遗传改变时,会进行代谢重排以适应其免疫逃逸、快速生长、增殖、侵袭及转移所需要的物质基础和能量等变化。由于致癌活性、增殖状态、营养物质的可获得性及微环境在空间和时间上的不同,使得众多癌症类型的代谢过程变化各不相同^[39]。白血病细胞的代谢改变通常表现为葡萄糖消耗水平大幅提高、脂肪生成增加以及谷氨酰胺分解等,这些差异代谢变化为恶性血液系统肿瘤提供了新的治疗方案——靶点的竞争性葡萄糖代谢及靶向谷氨酰胺代谢^[39-41]。此外,代谢重排有助于形成肿瘤细胞免疫抑制的微环境,导致抗癌治疗的耐药性增加^[42-43]。但是,通过SCM分析并结合遗传信息,可以区分驱动耐药发展的调控途径和相关基因并找到改善抗癌治疗耐药性的新方法^[44],例如CHEN等^[45]将不同处理条件下的活伊立替康耐药细胞利用SCM技术进行了分析,证实了二甲双胍-伊立替康协同作用可以克服耐药。

SCM在神经学领域被广泛应用。神经元对比正常细胞有非常详细的亚型且体积更大,由疾病或信号导致的神经系统一系列变化通常会在单个细胞中得到反映^[46-47]。当前其多组学联合分析在结合神经细胞的生理学、形态学之后,将不断推进人类脑部疾病的诊断及治疗发展进程^[44-45,48-50]。

SCM在其他人类精准医学领域也有很深入而广泛的应用。①SCMS揭示感染细胞异质性。NGUYEN等^[51]研究了寄生虫克氏锥虫感染宿主细胞的异质性。这是首次在哺乳动物感染性疾病中应用SCM分析技术,即使用单探针SCMS技术对克氏锥虫异质性感染细胞进行SCM研究。②脂类分析是SCMS的另一个最新应用^[52-54]。准确而深入地表征类脂异构体在脂类组学研究领域中十分关键^[12,55]。针对这一现状,LI等^[55]开发了一种单细胞脂质组学的工作流程,即使用单细胞的光化学衍生化、电迁移和常压电离串联质谱法来量化区分脂质水平。

4 SCM的挑战及展望

综上所述,SCM在很多方面具有巨大的应用潜力,然而,仍还有一些挑战需要进一步解决。例如:①代谢组样本变化很快,这导致了代谢物及其相关产物的鉴定困难;②代谢物的丰度在单个细胞中可能会有非常大的差异,而微小代谢物需要具有高灵敏度的检测技术才能检测到,此外,单细胞内代谢物随时间变化的速率如何进行量化也仍是一个大挑战;③许多代谢组分析工具并不能覆盖更多满足不同研究需求的代谢物^[3]。值得高兴的是,最近分子生物学技术和计算方法的快速进展使上述问题不断得到解决。

SCM分析作为一个新兴的研究领域,近年来受到越来越多的关注^[56-58]。随着更高效、更廉价的高通量技术的出现及革新,跨模式的单细胞组学的联合将会极大扩展我们的视

野,加深我们对不同生物层之间相互作用的理解^[59]。总而言之,我们可以预见 SCM 分析将继续在具有不同表型的单个细胞或细胞亚群的研究中不断取得新成果,这些成果对细胞分化、疾病的发生和发展以及药物治疗等方面至关重要。相信在不久的将来,SCM 分析将在各个领域的基础研究和精准医学的发展等方面大放异彩。

[参考文献]

- [1] GUO S H, ZHANG C, LE A. The limitless applications of single-cell metabolomics[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021,71:115-122.
- [2] BAUERMEISTER A, MANNOCHIO-RUSSO H, COSTA-LOTUFO L V, et al. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022,20(3):143-160.
- [3] SHRESTHA B. Single-cell metabolomics by mass spectrometry[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020,2064:1-8.
- [4] 董媛媛,孙桂江,李遇伯,等. 单细胞组学相关技术的研究进展[J]. *广东医学*, 2022,43(7):920-924.
- [5] MACAULAY I C, PONTING C P, VOET T. Single-cell multiomics: multiple measurements from single cells[J]. *Trends in Genetics*, 2017,33(2):155-168.
- [6] EMARA S, AMER S, ALI A, et al. Single-cell metabolomics[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 965:323-343.
- [7] KUMAR R, GHOSH M, KUMAR S, et al. Single cell metabolomics: a future tool to unmask cellular heterogeneity and virus-host interaction in context of emerging viral diseases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020,11:1152.
- [8] MISRA B B. Open-source software tools, databases, and resources for single-cell and single-cell-type metabolomics[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020,2064:191-217.
- [9] CAO G D, SONG Z B, HONG Y J, et al. Large-scale targeted metabolomics method for metabolite profiling of human samples[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020,1125:144-151.
- [10] ROBERTS L D, SOUZA A L, GERSZTEN R E, et al. Targeted metabolomics[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2012,30:2.1-2.24.
- [11] ILIFFE T M, MCADOO D J, BEYER C B, et al. Amino acid concentrations in the *Aplysia* nervous system: neurons with high glycine concentrations[J]. *Journal of Neurochemistry*, 1977,28(5):1037-1042.
- [12] TAJIK M, BAHARFAR M, DONALD W A. Single-cell mass spectrometry[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40 (11): 1374-1392.
- [13] 谭思源,李曼莉,傅博强,等. 单细胞质谱分析方法研究进展[J]. *计量科学与技术*, 2021,65(5):20-29,13.
- [14] YIN L, ZHANG Z, LIU Y Z, et al. Recent advances in single-cell analysis by mass spectrometry[J]. *The Analyst*, 2019,144 (3):824-845.
- [15] DUNCAN K D, FYRESTAM J, LANEKOFF I. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics[J]. *The Analyst*, 2019,144(3):782-793.
- [16] LAGEVEEN-KAMMEIJER G S M, HAAN N D, MO-HAUPT P, et al. Highly sensitive CE-ESI-MS analysis of N-glycans from complex biological samples[J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):2137.
- [17] CAO Y Q, ZHANG L, ZHANG J, et al. Single-cell on-probe derivatization-noncontact nanocarbon fiber ionization: unraveling cellular heterogeneity of fatty alcohol and sterol metabolites[J]. *Analytical Chemistry*, 2020,92(12):8378-8385.
- [18] OOMEN P, AREF M A, KAYA I, et al. Chemical analysis of single cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2019,91(1):588-621.
- [19] HU K K, NGUYEN T D K, RABASCO S, et al. Chemical analysis of single cells and organelles[J]. *Analytical Chemistry*, 2021,93(1):41-71.
- [20] SVATOŠ A. Single-cell metabolomics comes of age: new developments in mass spectrometry profiling and imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2011,83(13):5037-5044.
- [21] LANNI E J, RUBAKHIN S S, SWEEDLER J V. Mass spectrometry imaging and profiling of single cells[J]. *Journal of Proteomics*, 2012,75(16):5036-5051.
- [22] LIU R, WU P, YANG L, et al. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2014,33(5):373-393.
- [23] PRÖFROCK D, PRANGE A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends[J]. *Applied Spectroscopy*, 2012,66(8):843-868.
- [24] BINGS N H, BOGAERTS A, BROEKAERT J A C. Atomic spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2013,85(2):670-704.
- [25] 波多野博行,史念东. 高速液相色谱法概论[J]. *分析仪器*, 1976(1):76-85.
- [26] ROOT K, WITTWER Y, BARYLYUK K, et al. Insight into signal response of protein ions in native ESI-MS from the analysis of model mixtures of covalently linked protein oligomers[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017,28(9):1863-1875.
- [27] STOLZ A, JOOB K, HÖCKER O, et al. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications[J]. *Electrophoresis*, 2019, 40 (1):79-112.
- [28] CONG Y Z, LIANG Y R, MOTAMEDCHABOKI K, et al. Improved single-cell proteome coverage using narrow-bore packed NanoLC columns and ultrasensitive mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020,92(3):2665-2671.
- [29] MONDAL S, KUMAR V, SINGH S P. Oxidative stress measurement in different morphological forms of wild-type and mutant cyanobacterial strains: overcoming the limitation of fluorescence microscope-based method[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020,200:110730.
- [30] NASUNO R, SHINO S, YOSHIKAWA Y, et al. Detection

- system of the intracellular nitric oxide in yeast by HPLC with a fluorescence detector[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020,598:113707.
- [31] 李玉桃. 基于纳米电化学探针的神经细胞突触间隙信号传输过程研究[D]. 武汉:武汉大学, 2014.
- [32] 孟君. 超微电极电化学研究表面活性剂水溶液[D]. 北京:中国科学院研究生院(理化技术研究所), 2009.
- [33] 蒋静. 单纳米粒子在超微电极上的随机碰撞电化学新方法研究[D]. 广州:华南理工大学, 2016.
- [34] MINNO A D, GELZO M, STORNAIUOLO M, et al. The evolving landscape of untargeted metabolomics[J]. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 2021,31(6):1645-1652.
- [35] CHALECKIS R, MEISTER I, ZHANG P, et al. Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019,55:44-50.
- [36] TIAN J J, FU G H, XU Z J, et al. Urinary exfoliated tumor single-cell metabolomics technology for establishing a drug resistance monitoring system for bladder cancer with intravesical chemotherapy[J]. *Medical Hypotheses*, 2020,143:110100.
- [37] PUSAPATI R V, DAEMEN A, WILSON C, et al. mTORC1-dependent metabolic reprogramming underlies escape from glycolysis addiction in cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2016,29(4):548-562.
- [38] XIAO Z T, DAI Z W, LOCASALE J W. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution[J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):3763.
- [39] ZUO F L, YU J, HE X J. Single-cell metabolomics in hematopoiesis and hematological malignancies[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022,12:931393.
- [40] MAYER R L, SCHWARZMEIER J D, GERNER M C, et al. Proteomics and metabolomics identify molecular mechanisms of aging potentially predisposing for chronic lymphocytic leukemia[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018,17(2):290-303.
- [41] CHAN W K, HORVATH T D, TAN L, et al. Glutaminase activity of L-asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2019,18(9):1587-1592.
- [42] DAGOGO-JACK I, SHAW A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018,15(2):81-94.
- [43] NOTARANGELO G, SPINELLI J B, PEREZ E M, et al. Oncometabolite d-2HG alters T cell metabolism to impair CD8⁺ T cell function[J]. *Science*, 2022,377(6614):1519-1529.
- [44] LEI Y L, TANG R, XU J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2021,14(1):91.
- [45] CHEN X X, SUN M, YANG Z B. Single cell mass spectrometry analysis of drug-resistant cancer cells; Metabolomics studies of synergetic effect of combinational treatment[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022,1201:339621.
- [46] QI M, PHILIP M C, YANG N, et al. Single cell neuro-metabolomics[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2018,9(1):40-50.
- [47] REHMAN R, MILLER M, KRISHNAMURTHY S S, et al. Met/HGFR triggers detrimental reactive microglia in TBI[J]. *Cell Reports*, 2022,41(13):111867.
- [48] PE'ER D, OGAWA S, ELHANANI O, et al. Tumor heterogeneity[J]. *Cancer Cell*, 2021,39(8):1015-1017.
- [49] YANG J, HAMADE M, WU Q, et al. Current and future biomarkers in multiple sclerosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(11):5877.
- [50] INAK G, RYBAK-WOLF A, LISOWSKI P, et al. Defective metabolic programming impairs early neuronal morphogenesis in neural cultures and an organoid model of Leigh syndrome [J]. *Nature Communications*, 2021,12(1):1929.
- [51] NGUYEN T D, LAN Y P, KANE S S, et al. Single-cell mass spectrometry enables insight into heterogeneity in infectious disease[J]. *Analytical Chemistry*, 2022,94(30):10567-10572.
- [52] DANLOS F X, GRAJEDA-IGLESIAS C, DURAND S, et al. Metabolomic analyses of COVID-19 patients unravel stage-dependent and prognostic biomarkers[J]. *Cell Death & Disease*, 2021,12(3):258.
- [53] HU T, ZHANG J L. Mass-spectrometry-based lipidomics[J]. *Journal of Separation Science*, 2018,41(1):351-372.
- [54] HONDO T, OTA C, NAKATANI K, et al. Attempts to detect lipid metabolites from a single cell using proton-transfer reaction mass spectrometry coupled with micro-scale supercritical fluid extraction: a preliminary study[J]. *Mass Spectrometry*, 2022,11(1):A0112.
- [55] LI Z S, CHENG S M, LIN Q H, et al. Single-cell lipidomics with high structural specificity by mass spectrometry[J]. *Nature Communications*, 2021,12(1):2869.
- [56] COLOMÉ-TATCHÉ M, THEIS F J. Statistical single cell multi-omics integration[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2018,7:54-59.
- [57] SEYDEL C. Single-cell metabolomics hits its stride[J]. *Nature Methods*, 2021,18(12):1452-1456.
- [58] MISEVIC G. Single-cell omics analyses with single molecular detection: challenges and perspectives[J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2021,35(4):264-276.
- [59] LANEKOFF I, SHARMA V V, MARQUES C. Single-cell metabolomics: where are we and where are we going[J]? *Current Opinion in Biotechnology*, 2022,75:102693.