

基于质谱技术的早产儿视网膜病血代谢产物的初步研究

杨秋萍¹ 李思涛¹ 郝虎^{1,2} 古霞¹ 石聪聪² 肖昕^{1,2} 蔡尧¹

(1. 中山大学附属第六医院儿科, 广东广州 510655;

2. 中山大学附属第六医院小儿遗传代谢病实验室, 广东广州 510655)

[摘要] **目的** 应用液相色谱-串联质谱技术 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 和代谢组学方法探讨早产儿视网膜病 (retinopathy of prematurity, ROP) 患儿出生血代谢产物差异, 寻找ROP早期诊断的新的生物标记物。 **方法** 收集2013年1月—2016年12月中山大学附属第六医院住院的21例ROP患儿 (ROP组) 及同期21例非ROP患儿 (非ROP组) 干血片标本, 利用LC-MS/MS进行代谢产物测定, 运用正交偏最小二乘判别分析法 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 寻找差异物质和生物标记物。 **结果** ROP组和非ROP组患儿血代谢谱有明显差异, 经模式识别分析、代谢物得分图 (Score-plot, S-plot)、权重分析初步得出10个差异较大的氨基酸。进一步统计分析发现ROP组患儿血谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸和甘氨酸水平明显高于非ROP组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。受试者工作特征曲线分析显示, 谷氨酸及鸟氨酸对ROP诊断价值最高。 **结论** ROP患儿与非ROP患儿比较血代谢产物具有明显差异, 谷氨酸及鸟氨酸是诊断ROP的代谢标志物。LC-MS/MS结合代谢组学分析方法在ROP早期识别与诊断中具有潜在的应用价值。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (2): 140-146]

[关键词] 早产儿视网膜病变; 代谢组学; 串联质谱; 液相; 生物标记物; 早产儿

Blood metabolites in preterm infants with retinopathy of prematurity based on tandem mass spectrometry: a preliminary study

YANG Qiu-Ping, LI Si-Tao, HAO Hu, GU Xia, SHI Cong-Cong, XIAO Xin, CAI Yao. Department of Pediatrics, Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China (Cai Y, Email: caiy33@mail.sysu.edu.cn)

Abstract: Objective To study new biomarkers for the early diagnosis of retinopathy of prematurity (ROP) by analyzing the differences in blood metabolites based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and metabolomics. **Methods** Dried blood spots were collected from 21 infants with ROP (ROP group) and 21 infants without ROP (non-ROP group) who were hospitalized in the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from January 2013 to December 2016. LC-MS/MS was used to measure the metabolites, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis was used to search for differentially expressed metabolites and biomarkers. **Results** There was a significant difference in blood metabolic profiles between the ROP and non-ROP groups. The pattern recognition analysis, Score-plot, and weight analysis obtained 10 amino acids with a relatively large difference. Further statistical analysis showed that the ROP group had significant increases in blood levels of glutamic acid, leucine, aspartic acid, ornithine, and glycine compared with the non-ROP group ($P<0.05$). The receiver operating characteristic curve analysis showed that glutamic acid and ornithine had the highest value in diagnosing ROP. **Conclusions** Blood metabolites in preterm infants with ROP are different from those without ROP. Glutamic acid and ornithine are the metabolic markers for diagnosing ROP. LC-MS/MS combined with metabolomics analysis has a potential application value in the early identification and diagnosis of ROP.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(2): 140-146]

Key words: Retinopathy of prematurity; Metabolomics; Tandem mass spectrometry; Liquid chromatography; Biomarker; Preterm infant

[收稿日期] 2022-09-28; [接受日期] 2022-12-17

[基金项目] 广州市科技计划项目 (201704020230; 202103000071)。

[作者简介] 杨秋萍, 女, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 蔡尧, 男, 主治医师。Email: caiy33@mail.sysu.edu.cn。

早产儿视网膜病 (retinopathy of prematurity, ROP) 是发生于早产及低出生体重儿的视网膜血管增生性疾病, 是婴幼儿最常见的致盲和致低视力眼病^[1]。随着医学的发展和早产儿救治水平的提高, 早产儿、低出生体重儿的存活率不断提升, ROP发病率也逐年上升。目前我国主要采用眼底数码相机或者间接眼底镜和透镜结合的方式进行ROP筛查, 为了早期发现和及时治疗, 降低ROP导致的视力障碍等相关后遗症, 早期预测和诊断尤其重要。代谢组学是对生物体代谢组分的定性和定量分析, 直观呈现生物体的代谢谱, 灵敏地反映生物体在疾病发生、发展过程中的代谢产物变化^[2]。Nivison-Smith等^[3]发现氨基酸代谢与视网膜发育、视网膜疾病 (尤其是发育过程中发生的) 密切相关。氨基酸代谢影响了视网膜血管发育和张力、氧化还原反应状态、免疫及炎症等功能^[4]。代谢组学用于识别与疾病相关的代谢物质变化, 代谢干预有利于疾病的预防, 提供寻找新治疗靶点的机会。目前ROP患儿与代谢相关的研究有限, ROP疾病中受影响的代谢物或途径尚不明确。本研究采用液相色谱-串联质谱技术与代谢组学分析方法对ROP患儿和非ROP患儿血代谢产物进行回顾性分析, 旨在探究ROP患儿特异性代谢标志物, 为ROP的早期识别与诊断、治疗提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性选取2013年1月—2016年12月中山大学附属第六医院住院的早产儿作为研究对象, 记录其出生时胎龄、体重、身长、呼吸支持方式、吸氧时间、是否患新生儿呼吸窘迫综合征 (neonatal respiratory distress syndrome, NRDS) 等指标情况。所有早产儿肠内及肠外营养均参考《中国新生儿营养支持临床应用指南》^[5]。

纳入标准: (1) 早产儿, 胎龄27~34周, 适于胎龄儿, 病程中诊断ROP的患儿为ROP组, 未诊断ROP患儿为非ROP组; (2) 早产儿母亲无高血压、糖尿病、肾脏疾病等慢性疾病, 无妊娠合并症, 无吸烟、酗酒、吸毒或药物滥用史。排除标准: 患儿有颅内出血、缺血缺氧性脑病、新生儿坏死性小肠结肠炎、先天性发育畸形、染色体异常、遗传代谢性疾病等严重疾病或者死亡。

1.2 ROP诊断标准

运用间接眼底镜和屈光度为25 D或28 D的透

光镜进行视网膜检查, 观察到视网膜血管分界处增生性病变、血管走行异常及不同程度的牵拉性视网膜脱离, 则诊断ROP^[6]。本研究获得中山大学附属第六医院医学伦理委员会批准 (批准文号: 2018ZSLYEC-114), 研究对象监护人均知情同意。

1.3 标本采集

新生儿出生24 h内, 留取足跟血3滴, 浸透于专用滤纸片上, 每个血滴>0.8 cm, 于室温自然干燥后1周内在我院遗传代谢病实验室进行血代谢物检测。

1.4 仪器和试剂

高效液相仪 (日本岛津公司)、串联质谱仪 (API 3200 QTRAP, 美国生物应用系统公司)、96微孔板氮吹仪 (北京众益中和生物技术有限公司)、96孔板离心机 (上海白洋)、台式高速离心机 (德国Hittech公司)。新生儿血片采集卡 (美国Whatman 903号滤纸)、96孔过滤板 (0.45 μm , 美国Millipore公司)、96孔聚丙烯微孔板 (美国Fisher公司)、酰基肉碱同位素内标 (美国Cambridge Isotope Labs公司)、甲醇及乙腈 (美国Sigma公司)。

1.5 样本处理及检测

用打孔器截取直径5 mm血片, 置于96孔微量过滤板中, 每孔加入100 μL 同位素内标使用液 (甲醇稀释内标储备液至100倍), 室温放置20 min, 3 000 r/min离心5 min, 转移至96孔聚丙烯微孔板中, 50℃吹干后加入60 μL 盐酸正丁醇 (3 mol/L), 聚四氟乙烯膜覆盖, 置于65℃恒温箱15 min, 然后50℃吹干, 加入80%乙腈100 μL 溶解, 铝模覆盖, 上机检测。检测结果运用软件Chemo View 1.2计算出所测样品中代谢产物浓度值。

1.6 数据采集与分析

通过电化学原理将被检测物质分子电离成不同质荷比 (m/z) 的带电粒子, 并根据 m/z 大小生成分离排列的图谱对离子峰的强度进行测定, 采用定量分析软件自动计算出所测样本氨基酸代谢产物浓度值, 利用SIMCA-P 13.0数据处理软件, 采用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 对患儿血代谢物质进行分析, 寻找差异代谢物。评价OPLS-DA模型匹配度的3个关键指标: R^2X 表示X矩阵解释率; R^2Y 表示Y矩阵解释率; R^2X 与 R^2Y 反映了模型稳定性; Q^2 表示模型预测性; R^2X 、

R^2Y 、 Q^2 三者均大于 0.5 表示模型匹配良好。根据 OPLS-DA 模型输出聚类图和变量得分图 (Score Plot, S-Plot), 聚类图中 2 组物质分布在左右 2 个区域提示 2 组代谢物存在显著差异; S-Plot 图中越偏向两极的物质具有越大的协方差和相关性, 以此筛选差异代谢物, 随后进行权重分析: 根据变量差异贡献 (variable importance in projection, VIP) 比较, 筛选出 VIP>1 的血差异代谢物。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验; 不符合正态分布的计量资料采用中位数 (四分位数间距) $M(P_{25}, P_{75})$ 描述, 组间比较采用秩和检验。计数资料采以例数和百分率 (%) 表

示, 组间比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Medcalc 软件进行受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析, 计算 ROC 曲线下方部分的面积 (area under the curve, AUC)、灵敏度 (sensitivity)、特异度 (specificity), 评价差异代谢物对 ROP 的诊断预测效果, 并寻找最佳的指标诊断的截断值。

2 结果

2.1 两组患儿基本情况

ROP 组和非 ROP 组各 21 例, 临床资料见表 1。两组出生胎龄、体重、出生身长、吸氧时长、NRDS 比例的比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 ROP 组与非 ROP 组临床资料比较

项目	ROP 组 (n=21)	非 ROP 组 (n=21)	$\chi^2/t/Z$ 值	P 值
性别 (男/女, 例)	7/14	16/5	7.850	0.006
出生胎龄 ($\bar{x} \pm s$, 周)	30.3 $\pm$ 3.2	30.5 $\pm$ 2.7	0.214	0.830
出生体重 ($\bar{x} \pm s$, g)	1 490 $\pm$ 510	1 530 $\pm$ 523	1.560	0.199
出生身长 ($\bar{x} \pm s$, cm)	38 $\pm$ 4	39 $\pm$ 3	1.629	0.111
吸氧时长 [$M(P_{25}, P_{75})$, h]	285(101, 734)	172(46, 438)	1.625	0.166
NRDS [n(%)]	17(81)	15(71)	0.525	0.468

注: [NRDS] 新生儿呼吸窘迫综合征。

2.2 血代谢谱模式识别分析

利用 OPLS-DA 模型对 ROP 组和非 ROP 组患儿血代谢谱进行分析。ROP 组和非 ROP 组患儿的 OPLS-DA 模型聚类图见图 1。该模型参数: $R^2X_{cum}=0.686$,

$R^2Y_{cum}=0.907$, $Q^2=0.522$, 均>0.5, 表明该模型解释能力较好, 稳定性和预测性较高。ROP 组和非 ROP 组的血代谢物质分布在左右两个区域, 提示两组之间血代谢产物存在显著差异。

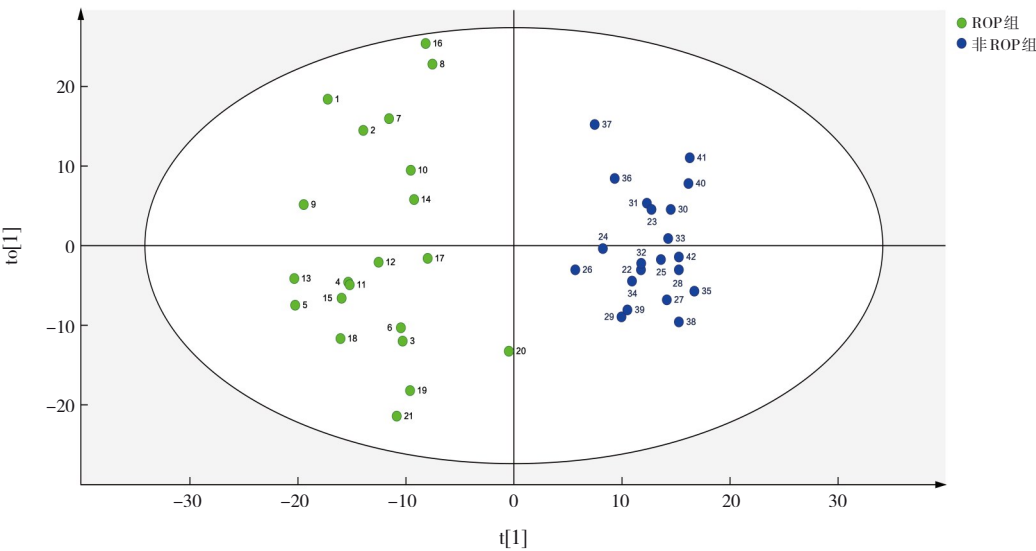


图 1 ROP 患儿和非 ROP 患儿血代谢物的 OPLS-DA 聚类图 横坐标 t[1] 表示预测组分, 呈现组间差异; 纵坐标 to[1] 表示正交组分, 呈现组内离散程度; 圆点旁边数字表示样本编号, 绿色圆点 1~21 为 ROP 组, 蓝色圆点 22~42 为非 ROP 组。

2.3 血代谢物差异物质筛选

根据血代谢物数据输出 S-Plot 图，图中偏向两极的为两组差异较大的物质，即最有可能为生物标志物。位于 S-Plot 图两极的共有 8 个物质（图 2

红色标记），初步筛选差异较大的代谢物有：谷氨酸、鸟氨酸、甘氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、缬氨酸及精氨酸（图 2）。

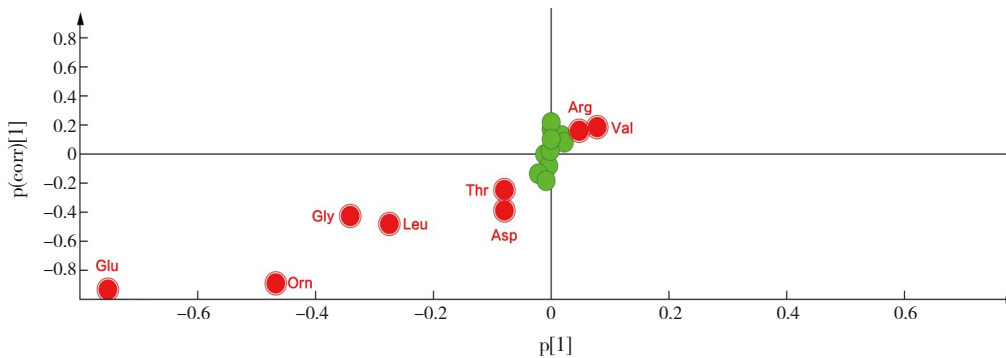


图 2 ROP 组和非 ROP 组患儿血代谢物 S-Plot 图 横坐标 $p[1]$ 表示协方差；纵坐标 $p(corr)[1]$ 表示相关性，图中越偏向两极的物质，其协方差和相关性越大，以此筛选差异代谢物，红色标记的为协方差和相关性绝对值较大的物质。[Glu] 谷氨酸；[Orn] 鸟氨酸；[Gly] 甘氨酸；[Leu] 亮氨酸；[Asp] 天冬氨酸；[Thr] 苏氨酸；[Arg] 精氨酸；[Val] 缬氨酸。

2.4 血代谢物权重分析

使用 OPLS-DA 模型分析变量重要性得分评价变量贡献，VIP 值越大，代表该物质对于区分两组所具有的贡献越大。因此筛选出 $VIP > 1$ 的血代谢产物，选择排名前 10 的物质：谷氨酸、鸟氨酸、甘氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、色氨酸、精氨酸、赖氨酸（表 2）。

2.5 重要血代谢物统计学分析

针对血代谢物权重分析 VIP 值排名前 10 的代谢物进行 t 检验或者秩和检验分析：符合正态分布的谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸及精氨酸采用 t 检验进行分析；不符合正态分布的鸟氨酸、甘氨酸、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸，采用秩和检验进行分析。统计分析显示，ROP 组谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、甘氨酸水平均高于非 ROP 组，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），见表 3。

2.6 ROC 曲线分析预测 ROP 中潜在的生物标志物

针对 t 检验及秩和检验统计分析有差异的谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、甘氨酸 5 个氨基酸进行 ROC 曲线分析，寻找潜在的代谢生物标志

物。通过比较 AUC 值、灵敏度、特异度，选出诊断价值较高的生物标志物，并计算出诊断的截断值。AUC 值越高，曲线越接近左上角（灵敏度及特异度越大），预测准确率越高。分析结果如表 4、图 3 所示，可见 5 种氨基酸都有较高的预测诊断价值，其中谷氨酸和鸟氨酸 AUC 值、灵敏度和特异度均较高，可见它们在识别 ROP 方面是所有代谢物中最好的，其参考截断值分别为 $223.92 \mu\text{mol/L}$ 、 $53.07 \mu\text{mol/L}$ 。

表 2 ROP 组和非 ROP 组患儿血代谢物中 $VIP > 1$ 的代谢物

氨基酸	权重值
谷氨酸 (Glu)	5.26727
鸟氨酸 (Orn)	3.24097
甘氨酸 (Gly)	2.35259
亮氨酸 (Leu)	1.98264
缬氨酸 (Val)	1.58027
苏氨酸 (Thr)	1.52163
天冬氨酸 (Asp)	1.46045
色氨酸 (Trp)	1.38488
精氨酸 (Arg)	1.38246
赖氨酸 (Lys)	1.21594

注：[VIP] 变量差异贡献。

表 3 ROP 组和非 ROP 组患儿血代谢物水平比较 (μmol/L)

氨基酸	ROP 组 (n=21)	非 ROP 组 (n=21)	t/Z 值	P 值
谷氨酸 ($\bar{x} \pm s$)	368 ± 60	168 ± 38	12.797	<0.001
亮氨酸 ($\bar{x} \pm s$)	215 ± 47	164 ± 44	3.583	0.001
天冬氨酸 ($\bar{x} \pm s$)	24 ± 7	20 ± 5	2.252	0.030
色氨酸 ($\bar{x} \pm s$)	54 ± 19	59 ± 15	-1.074	0.289
精氨酸 ($\bar{x} \pm s$)	12 ± 6	16 ± 9	-1.554	0.128
鸟氨酸 [$M(P_{25}, P_{75})$]	116.79(89.60, 128.03)	26.02(21.67, 33.33)	-5.320	<0.001
甘氨酸 [$M(P_{25}, P_{75})$]	223.20(159.73, 373.56)	171.70(128.94, 210.44)	-2.277	0.023
缬氨酸 [$M(P_{25}, P_{75})$]	85.45(65.24, 117.51)	104.58(93.30, 133.28)	-1.824	0.068
苏氨酸 [$M(P_{25}, P_{75})$]	27.98(20.30, 50.32)	23.09(18.93, 37.57)	-1.044	0.297
赖氨酸 [$M(P_{25}, P_{75})$]	15.06(9.87, 21.55)	17.28(12.78, 21.38)	-1.119	0.263

表 4 ROP 潜在代谢标志物的 ROC 曲线分析

氨基酸	AUC	95%CI	P 值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	截断值 (μmol/L)
甘氨酸	0.705	0.545~0.836	0.013	57.14	80.95	212.86
谷氨酸	0.995	0.907~1.000	<0.001	100	95.24	223.92
亮氨酸	0.805	0.654~0.911	<0.001	71.43	85.71	200.75
鸟氨酸	0.980	0.880~1.000	<0.001	90.48	100	53.07
天冬氨酸	0.678	0.516~0.814	0.038	52.38	90.48	25.4

注: [AUC] 曲线下面积; [95%CI] 95% 置信区间。

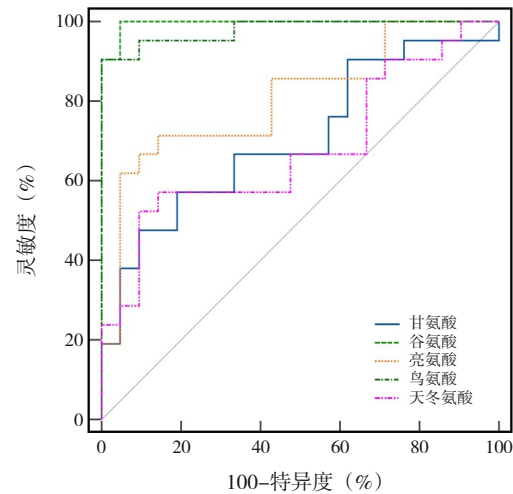


图 3 ROP 潜在代谢标志物的 ROC 曲线 谷氨酸与鸟氨酸对 ROP 的诊断价值最高。

3 讨论

ROP 是各种因素导致的微血管变性后新生血管增生性疾病, 早产、低出生体重、过度用氧是公认的危险因素^[6]。胎儿视网膜血管在 16 周左右开始发育, 直至足月才成熟。为了避免早产儿出生后未及时诊断及治疗而导致视力受损甚至致盲的风险, 在视网膜发育的过程中, 需要定期检查眼底了解血管生长情况。由于技术和条件限制,

部分地区甚至无法开展 ROP 筛查。近年来随着代谢组学和串联质谱技术发展迅速, 并逐渐应用于各种疾病, 如小儿哮喘、苯丙酮尿症、先天性肾上腺皮质增生症、新生儿支气管肺发育不良等的早期识别、精准诊断及个体化治疗^[7-10]。本研究对 ROP 患儿的血代谢产物进行分析, 以寻找可预测诊断 ROP 的生物标志物。

Fu 等^[11]总结了 ROP 与代谢相关的研究, 发现围生期早期的代谢失调是 ROP 和其他早产儿远期并发症的一个强有力但未被充分研究的危险因素, 说明视网膜血管的生长发育与机体代谢密切相关。Zhou 等^[12]对需要治疗的 ROP 患儿与无需治疗的 ROP 患儿的代谢物进行分析, 发现多个物质的变化主要富集于蛋白质消化吸收和氨基酰基-tRNA 生物合成途径。Nilsson 等^[13]对早产儿多个时间点的代谢物进行研究, 发现早产儿低水平的 1-磷酸鞘氨醇与严重 ROP 的发生发展有关。另外, 在新生小鼠的实验中发现, 饥饿、高血糖状态增加了视网膜细胞凋亡、减慢神经元的生长和促进了视网膜新生血管的生长^[14-15]。本研究对早产儿 ROP 组及非 ROP 组的代谢情况进行比较, 结果显示有 5 种差异代谢物即谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸及甘氨酸, 其中谷氨酸及鸟氨酸对 ROP 预测诊

断价值最高,可以作为早期识别诊断ROP的生物标志物,另外其可能在ROP疾病发展的过程中起到调节作用,需要更多动态的代谢数据进行研究及验证,有望通过营养调节、改变机体代谢情况来调节视网膜血管的生长发育过程。

谷氨酸是一种酸性氨基酸,储存于视网膜神经节细胞、双极细胞及光感受细胞神经末梢的突触囊泡内,在视觉系统中有重要生理作用^[16]。视网膜中多数兴奋性信号由谷氨酸介导,但神经突触间隙中过量的谷氨酸可引起视网膜神经元损伤甚至死亡^[17]。已有多个研究发现ROP患儿体内谷氨酸水平升高且与ROP发生呈正相关,对ROP有良好的诊断价值^[18-21]。本研究中ROP组患儿谷氨酸水平明显高于非ROP组患儿,与既往研究^[18-21]一致,提示高浓度的谷氨酸可能与ROP的发生发展有关。ROC曲线分析提示谷氨酸对预测ROP的灵敏度及特异度高,可作为ROP早期预测标志物或辅助诊断依据。

亮氨酸属于支链氨基酸,是人体必需氨基酸之一。研究发现,富亮氨酸 α -2糖蛋白1(leucine-rich α -2-glycoprotein 1, LRG1),是一种富含亮氨酸的 α -2-糖蛋白,它可以通过转化生长因子- β 信号通路,促进内皮细胞迁移,参与异常血管生成的病理过程^[22]。Mundo等^[23]研究发现LRG1在视网膜黄斑变性患者的血管内皮细胞及脉络膜新生血管膜周围组织中的水平较高,结果支持了抗LRG1单克隆抗体成为治疗新生血管相关视网膜病的候选治疗靶点。另外,视网膜中富含亮氨酸的小蛋白多糖,在许多与纤维和血管生成有关的上游信号中发挥着重要作用,可调节细胞分化、黏附、生长和修复机制^[24]。本研究发现ROP组患儿的亮氨酸水平明显高于非ROP组患儿,提示ROP患儿视网膜的异常血管增殖可能与亮氨酸有关。

鸟氨酸是尿素循环的中心部分,可以促进氨的排泄,天冬氨酸参与鸟氨酸循环。鸟氨酸-天冬氨酸被推荐为减少运动疲劳的营养补充剂之一^[25]。但有研究发现高浓度的鸟氨酸对视网膜色素上皮细胞具有特异性毒性,长期摄入过多鸟氨酸有视网膜病变风险^[26]。本研究发现ROP组患儿鸟氨酸水平明显高于非ROP组患儿,提示高浓度鸟氨酸可能增加了患儿视网膜病变风险。有一项多中心前瞻性队列研究分析发现天冬氨酸的摄入量与增生性糖尿病视网膜病变的发生率有关^[27],但具体机制尚不清楚。本研究ROC曲线分析提示鸟氨酸

对ROP的鉴别价值高,鸟氨酸可作为ROP早期预测诊断的代谢标志物。

甘氨酸是一种非必需氨基酸,参与蛋白质的合成和许多重要的生理功能。有研究发现甘氨酸可以模拟血管内皮生长因子对视网膜微血管内皮细胞的作用,促进体外和体内血管生成,还能有效地保护血管内皮细胞的线粒体功能^[28]。此外,甘氨酸可促进血红蛋白的生物合成,血红蛋白在控制活性氧水平和维持氧化磷酸化中起关键作用,从而为血管增殖提供良好的环境^[29-30]。最近有研究发现ROP患儿体内甘氨酸水平升高^[31],本研究与之一致,提示甘氨酸可能与ROP患儿视网膜血管过度增殖有关。

综上所述,本研究通过液相色谱-质谱技术和代谢组学方法比较了ROP患儿与非ROP患儿的血代谢产物,结果提示5种氨基酸存在明显差异,是ROP的潜在标志物,其中谷氨酸与鸟氨酸对ROP诊断价值最高,可以作为ROP早期诊断的生物标志物,有助于ROP的早期识别与诊断。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学分会眼科学组. 早产儿视网膜病变治疗规范专家共识[J]. 中华眼底病杂志, 2022, 38(1): 10-13. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20211119-00647.
- [2] 李思涛, 黄小玲, 吴时光, 等. 极低出生体重早产儿尿代谢组学研究[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(6): 434-438. PMID: 28592011. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.06.008.
- [3] Nivison-Smith L, Chua J, Tan SS, et al. Amino acid signatures in the developing mouse retina[J]. Int J Dev Neurosci, 2014, 33: 62-80. PMID: 24368173. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2013.12.005.
- [4] Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, et al. Inhibition of the glycolytic activator PFKFB3 in endothelium induces tumor vessel normalization, impairs metastasis, and improves chemotherapy[J]. Cancer Cell, 2016, 30(6): 968-985. PMID: 27866851. PMCID: PMC5675554. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.006.
- [5] 蔡威, 汤庆娅, 王莹, 等. 中国新生儿营养支持临床应用指南[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(12): 1177-1182. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3606.2013.12.020.
- [6] 张德双, 王华, 陈娟. 早产儿视网膜病变的最新研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2012, 8(6): 783-786. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2012.06.030.
- [7] Teoh ST, Leimanis-Laurens ML, Comstock SS, et al. Combined plasma and urinary metabolomics uncover metabolic perturbations associated with severe respiratory syncytial viral

- infection and future development of asthma in infant patients[J]. *Metabolites*, 2022, 12(2): 178. PMID: 35208252. PMCID: PMC8875115. DOI: 10.3390/metabo12020178.
- [8] Pieragostino D, Cicalini I, Di Michele S, et al. A case of suspected hyperphenylalaninemia at newborn screening by tandem mass spectrometry during total parenteral nutrition[J]. *Metabolites*, 2020, 10(2): 44. PMID: 31991569. PMCID: PMC7074497. DOI: 10.3390/metabo10020044.
- [9] Cicalini I, Tumini S, Guidone PI, et al. Serum steroid profiling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the rapid confirmation and early treatment of congenital adrenal hyperplasia: a neonatal case report[J]. *Metabolites*, 2019, 9(12): 284. PMID: 31766536. PMCID: PMC6950672. DOI: 10.3390/metabo9120284.
- [10] 李思涛, 郝虎, 刘梦娴, 等. 基于液相色谱-串联质谱联用技术的支气管肺发育不良患儿血代谢产物分析[J]. *中华围产医学杂志*, 2019, 22(3): 173-179. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-9408.2019.03.005.
- [11] Fu Z, Nilsson AK, Hellstrom A, et al. Retinopathy of prematurity: metabolic risk factors[J]. *Elife*, 2022, 11: e80550. PMID: 36420952. PMCID: PMC9691009. DOI: 10.7554/eLife.80550.
- [12] Zhou Y, Xu Y, Zhang X, et al. Plasma metabolites in treatment-requiring retinopathy of prematurity: potential biomarkers identified by metabolomics[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 199: 108198. PMID: 32828955. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108198.
- [13] Nilsson AK, Andersson MX, Sjöbom U, et al. Sphingolipidomics of serum in extremely preterm infants: association between low sphingosine-1-phosphate levels and severe retinopathy of prematurity[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(7): 158939. PMID: 33862236. PMCID: PMC8633973. DOI: 10.1016/j.bbalip.2021.158939.
- [14] Fu Z, Löfqvist CA, Liegl R, et al. Photoreceptor glucose metabolism determines normal retinal vascular growth[J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(1): 76-90. PMID: 29180355. PMCID: PMC5760850. DOI: 10.15252/emmm.201707966.
- [15] Cakir B, Hellström W, Tomita Y, et al. IGF1, serum glucose, and retinopathy of prematurity in extremely preterm infants[J]. *JCI insight*, 2020, 5(19): e140363. PMID: 33004691. PMCID: PMC7566718. DOI: 10.1172/jci.insight.140363.
- [16] Chi-Castañeda D, Ortega A. Circadian regulation of glutamate transporters[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 340. PMID: 29977228. PMCID: PMC6021491. DOI: 10.3389/fendo.2018.00340.
- [17] 杨曼, 谭薇. Müller细胞在糖尿病视网膜病变中的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(11): 1874-1876. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.11.13.
- [18] 雷祥, 栗占荣, 刘艳萍. 早产儿视网膜病变患儿血清谷氨酸水平变化的意义及其对预后的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2020, 35(1): 50-53. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2020.01.013.
- [19] 李志萍, 吴焕卿, 陈惠军. 早产儿视网膜病变患儿血清谷氨酸浓度变化及其相关关系[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(8): 782-784. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0216.
- [20] Rhee SY, Jung ES, Park HM, et al. Plasma glutamine and glutamic acid are potential biomarkers for predicting diabetic retinopathy[J]. *Metabolomics*, 2018, 14(7): 89. PMID: 29950956. PMCID: PMC6013531. DOI: 10.1007/s11306-018-1383-3.
- [21] Ozcan Y, Huseyin G, Sonmez K. Evaluation of plasma amino acid levels in preterm infants and their potential correlation with retinopathy of prematurity[J]. *J Ophthalmol*, 2020, 2020: 8026547. PMID: 33489343. PMCID: PMC7801939. DOI: 10.1155/2020/8026547.
- [22] 于菁, 王秋月. 富亮氨酸 α -2糖蛋白-1与糖尿病血管并发症[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2019, 39(6): 387-390. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.06.006.
- [23] Mundo L, Tosi GM, Lazzi S, et al. LRG1 expression is elevated in the eyes of patients with neovascular age-related macular degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8879. PMID: 34445590. PMCID: PMC8396268. DOI: 10.3390/ijms22168879.
- [24] Low SWY, Connor TB, Kassem IS, et al. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in the retina[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7293. PMID: 34298915. PMCID: PMC8305803. DOI: 10.3390/ijms22147293.
- [25] Mikulski T, Dabrowski J, Hilgier W, et al. Effects of supplementation with branched chain amino acids and ornithine aspartate on plasma ammonia and central fatigue during exercise in healthy men[J]. *Folia Neuropathol*, 2015, 53(4): 377-386. PMID: 26785372. DOI: 10.5114/fn.2015.56552.
- [26] Hayasaka S, Kodama T, Ohira A. Retinal risks of high-dose ornithine supplements: a review[J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(6): 801-811. PMID: 21767450. DOI: 10.1017/S0007114511003291.
- [27] Park SY, Kim J, Son JI, et al. Dietary glutamic acid and aspartic acid as biomarkers for predicting diabetic retinopathy[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7244. PMID: 33790305. PMCID: PMC8012375. DOI: 10.1038/s41598-021-83165-5.
- [28] Guo D, Murdoch CE, Xu H, et al. Vascular endothelial growth factor signaling requires glycine to promote angiogenesis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14749. PMID: 29116138. PMCID: PMC5677092. DOI: 10.1038/s41598-017-15246-3.
- [29] Amelio I, Cutruzzolà F, Antonov A, et al. Serine and glycine metabolism in cancer[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 191-198. PMID: 24657017. PMCID: PMC3989988. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.004.
- [30] Vandekeere S, Dubois C, Kalucka J, et al. Serine synthesis via PHGDH is essential for heme production in endothelial cells[J]. *Cell Metab*, 2018, 28(4): 573-587.e13. PMID: 30017355. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.06.009.
- [31] Yang Y, Wu Z, Li S, et al. Targeted blood metabolomic study on retinopathy of prematurity[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(2): 12. PMID: 32049343. PMCID: PMC7326483. DOI: 10.1167/iovs.61.2.12.

(本文编辑: 李惠清)