研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.02011

基于知识导向的拟靶向分析方法建立及在糖尿病视网膜病变中的应用

侯衍青[1,2]，迟翔宇[4]，杜庭沪[2,5]，燕增旗[1,2]，侯带迪[2]，胡春秀[2]，刘月星[3*]，刘心昱[2*]，许国旺[1,2]

（1. 大连理工大学化学学院，辽宁 大连 116024；2. 中国科学院大连化学物理研究所，辽宁省代谢组学重点实验室，辽宁 大连 116023；3. 上海交通大学医学院附属第六人民医院糖尿病研究所，上海 200233；4. 天津威高医疗科技有限公司，天津 300500；5. 中国医科大学，辽宁 沈阳 110122）

摘要：糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy，DR）是由糖尿病引起的常见致盲性眼病，也是全球成年人获得性视力丧失的主要原因。DR 早期无症状，患者常因视力受损后再就诊而失去最佳治疗时机。传统 DR 检查方法存在局限性，不利于大规模快速筛查。生物标志物具有特异性和敏感性，能反映疾病所处阶段，寻找潜在生物标志物对 DR 早期诊断意义重大。本研究基于知识导向策略，从文献中筛选出 142 个与 DR 相关的潜在生物标志物，根据其物理化学性质，采用 Merck Supelco Discovery HS F5 色谱柱（100 mm×2.1 mm，3 μm）分离代谢物，建立了基于超高效液相色谱-串联质谱（UHPLC-MS/MS）的正、负离子切换扫描分析的拟靶向分析方法，提高了分析的覆盖度和通量。以 8 种同位素内标对方法学进行考察，结果显示其在正、负离子模式下线性关系良好，线性范围达 3 个数量级以上，相关系数（r^2）均在 0.995 以上；3 个浓度水平下提取回收率为 75%~108%，相对标准偏差（RSD）小于 13%；在正、负离子模式下，3 个浓度水平下所有同位素内标的日内精密度 RSD 小于 5% 的个数占总数的 91%，日间精密度 RSD 小于 10% 的个数占总数的 91%，RSD 最高不超过 16.3%，表明方法精密度良好。对 137 例血清样本进行分析，筛选出 85 个差异代谢物，进一步分析发现胆碱和 12-羟基二十碳四烯酸作为组合标志物能有效区分 DR 和无糖尿病视网膜病变的糖尿病患者。本研究开发的基于知识导向策略的拟靶向代谢组学分析方法为 DR 筛查和诊断提供了参考依据。

关键词：糖尿病视网膜病变；代谢组学；超高效液相色谱-串联质谱；疾病标志物

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Establishment and application of a knowledge-directed pseudo-targeted analytical method for diabetic retinopathy

HOU Yanqing[1,2], CHI Xiangyu[4], DU Tinghu[2,5], YAN Zengqi[1,2], HOU Daidi[2], HU Chunxiu[2], LIU Yuexing[3*], LIU Xinyu[2*], XU Guowang[1,2]

(*1. School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2. Liaoning Province Key laboratory of Metabolomics, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China; 3. Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai 200233, China; 4. Tianjin Weigao Medical Technology Co., Ltd., Tianjin 300500, China; 5. China Medical University, Shenyang 110122, China*)

Abstract: Diabetic retinopathy (DR) is a common blinding eye disease caused by diabetes mellitus and is the leading cause of acquired vision loss in adults worldwide. DR is asymptomatic in its early stages, and patients often miss the optimal treatment window by the time they seek medical attention due to vision impairment. Traditional methods used for DR diagnosis have inherent limitations and are not conducive to large-scale rapid screening. Biomarkers can reflect the stage of the disease

收稿日期：2025-02-24

* **通信联系人**. E-mail：liuxy2012@dicp.ac.cn（刘心昱）；E-mail：yuexing85@126.com（刘月星）.

基金项目：国家重点研发计划（2022YFC3401200）.

Foundation item: National Key R&D Program of China (No. 2022YFC3401200).

owing to their specificity and sensitivity, which is crucial for the early diagnosis of DR. In the present study, 142 potential literature-based biomarkers associated with DR were included in a knowledge-directed strategy. And metabolites with different physicochemical properties were chromatographically separated using a 100-mm Discovery HS F5 column. A pseudo-targeted metabolomics method based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) that simultaneously scans positive and negative ions was established to improve analysis coverage and throughput. The method was validated using eight representative isotope-labeled internal standards as analytical targets. All isotope-labeled internal standards exhibited satisfactory linearities in both positive- and negative-ionization modes, with linear dynamic ranges spanning over three orders of magnitude and correlation coefficients (r^2) above 0.995. Extraction recoveries ranged between 75% and 108% at three distinct concentration levels with relative standard deviations (RSDs) below 13%. Notably, 91% of the isotope-labeled internal standards exhibited intra-day precision with RSDs of less than 5% across both ionization modes. Similarly, 91% of the analytes demonstrated inter-day precision with RSDs of less than 10%, with all below 16.3%, indicating good method precision. The developed method was used to analyze 137 serum samples, including 40 DR-free patients with diabetes mellitus (NDR) and 97 patients with DR to investigate the practicality of the method. Quality control (QC) samples were used to evaluate the data, which revealed that the instrument was stable during the analytical sequence. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models were constructed to identify and differentiate between the metabolic profiles of the DR and NDR groups with the aim of providing a statistical basis for the classification and diagnosis of DR based on metabolic differences observed in the serum samples. The NDR group and DR groups of varying clinical grades were well separated. A total of 85 differential metabolites were identified between NDR and DR groups using nonparametric tests. Further analysis led to the selection of choline and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) as two markers that effectively distinguished the DR and NDR groups. In addition, the markers exhibited a good ability to distinguish between DR and NDR patients when used in combination. The pseudo-targeted metabolomics-based knowledge-directed method developed in this study provides a reference for screening and diagnosing DR.

Keywords: diabetic retinopathy (DR); metabolomics; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); disease markers

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy，DR)是由糖尿病引起的一种常见且严重的眼部并发症，具有高发病率和高致盲率，是全球成年人获得性视力丧失的主要原因之一[1,2]。我国约有 1 950 万 DR 患者，其中约 1/5 处于威胁视力的阶段，给个人和医疗系统带来沉重负担[3]。根据是否有新血管生成，将 DR 分为非增殖性 DR 和增殖性 DR(PDR)，非增殖性 DR 进一步分为轻度 DR(NPDR)、中度 DR(MNPDR)和重度 DR(SNPDR)[1]。DR 早期往往缺乏明显症状，导致患者常在视力受损后才就医，此时多已错过了最佳的治疗窗口，有时甚至造成失明。

早期诊断与及时干预对 DR 患者至关重要，可有效避免视力严重下降。临床上传统的 DR 检查方法包括眼底镜检查、眼底照相、荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography，FFA)和光学

引用本文：侯衍青，迟翔宇，杜庭沪，燕增旗，侯带迪，胡春秀，刘月星，刘心昱，许国旺. 基于知识导向的拟靶向分析方法建立及在糖尿病视网膜病变中的应用. 色谱，2026，44(3)：312-328.

HOU Yanqing, CHI Xiangyu, DU Tinghu, YAN Zengqi, HOU Daidi, HU Chunxiu, LIU Yuexing, LIU Xinyu, XU Guowang. Establishment and application of a knowledge-directed pseudo-targeted analytical method for diabetic retinopathy. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(3): 312-328.

相干断层扫描等[4-6]。然而，这些方法存在局限性：眼底镜检查及眼底照相只能定性观察视网膜形态学变化，主观性强且无法发现早期病变；FFA 虽然是 DR 诊断的“金标准”，但检测时间长、具有侵入性，对患者全身情况有限制，且人力、物力消耗大，不利于大规模快速筛查。

近年来，基于人工智能（AI）的眼底诊断方法逐渐兴起。例如，Dai 等[7]开发的深度学习系统 DeepDR 可实现 DR 的全程诊断；Li 等[8]提出的 DeepDR-LLM（integrated image-based deep learning and language models for primary diabetes care）系统可为糖尿病患者提供管理建议并辅助诊断 DR。尽管 AI 技术为 DR 的快速诊断提供了新思路，但目前的算法主要依赖眼底图片，仍需专业人员监督，且在医疗资源匮乏地区难以推广[9]。因此，探索一种快速、高效、简便且低成本的体外诊断标志物对于 DR 的早期发现和诊断具有重要意义。

DR 的发病机制尚不清楚，但近年来的研究显示，基因表达异常、表观遗传改变、信号通路失调及代谢紊乱均与 DR 的发生发展密切相关，尤其是代谢紊乱在 DR 进程中发挥关键作用。DR 患者体内多条代谢通路（如脂质代谢、氨基酸代谢和能量代谢）发生显著变化。尽管现有的非靶向和靶向代谢组学研究已发现上百种差异代谢物，但目前仍缺乏明确的早期诊断生物标志物，难以满足大规模人群的 DR 筛查需求。

本研究建立了一种基于知识导向（结合已报道 DR 相关文献和标志物进行分析）的拟靶向代谢组学分析方法，用于 DR 的研究。首先，通过文献调研筛选出 142 个潜在的 DR 生物标志物；其次，根据这些候选标志物的物理化学性质，开发了一种基于超高效液相色谱-串联质谱（UHPLC-MS/MS）正、负离子切换扫描的分析方法，并对其进行了方法学验证；最后，将该方法应用于 DR 患者的血清样本分析，以筛选出能够有效区分 DR 的组合标志物。

1 实验部分

1.1 主要仪器、试剂与材料

Exion LC AD 高效液相色谱仪-QTRAP 6500+ 三重四极杆复合线性离子阱质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）；Vanquish 超高效液相色谱-Q Exactive 高分辨质谱联用仪（美国 Thermo 公司）；冷冻离心浓缩仪（北京吉艾姆仪器有限公司）；台式高速冷冻离心机（日本 HITACHI 公司）；恒温混匀仪（德国 Eppendorf 公司）。

甲醇（色谱纯）购于 Merck 公司；甲酸（色谱纯）购于上海吉至生化科技有限公司；乙酸铵购自 Sigma-Aldrich，超纯水由 Milli-Q 系统制备；代谢组学的 14 种内标和 88 种化学标准品购自 Sigma-Aldrich 公司、天津阿尔塔科技有限公司和上海甄准生物科技有限公司等。

1.2 样品采集

本研究涉及的 137 例血清样本来自上海市糖尿病综合防治体系研究（SIDPCSS），采集受试者的性别、年龄、糖尿病持续时间、血糖等信息。经上海市第六人民医院伦理委员会批准（批准号 2018-KY-066（K）），所有参与者均签署了书面知情同意书。

1.3 样品前处理

将血清样本在冰上解冻并涡旋混匀后，取 50 μL 移入 Eppendorf 离心管中，加入 200 μL 含 14 种内标（质量浓度见表 1）的甲醇提取剂。涡旋 1 min 后，在 10 °C 下以 14 000 r/min 离心 10 min，取上清液进行冻干。冻干的样品加入 50 μL 含 25%（体积分数）甲醇的水溶液复溶，涡旋并离心后取上清液用于 LC-MS 分析。从每个样本中取 10 μL 混合制备质量控制样本（quality control samples，QC），用于监测分析过程的稳定性，QC 样本的预处理方法与实际样本相同。

1.4 分析条件

色谱柱：Discovery HS F5（100 mm×2.1 mm，3 μm）；柱温：40 ℃；流速：0.3 mL/min；流动相 A：含 0.1%（体积分数）甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液；流动相 B：含 0.1%（体积分数）甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的甲醇溶液；进样量：2 μL。梯度洗脱程序：起始梯度为 5%B，维持 1 min，在 3 min 内增至 60%B，随后在 4 min 内线性增加到 90%B 并维持 4 min，在 12.1 min 处降回初始梯度 5%B，平衡 3.9 min。

离子源：电喷雾离子源（ESI），正负离子切换扫描；采集模式：多反应监测模式（MRM）；正离子的喷雾电压为 5.5 kV；负离子的喷雾电压为−4.5 kV；气帘气（CUR）：276 kPa（40 psi）；离子源气体 1：345 kPa（50 psi）；离子源气体 2：345 kPa（50 psi）；离子源温度：400 ℃。

1.5 数据处理和统计分析

使用 Xcalibur 软件获取代谢物的母离子、子离子、保留时间等信息。使用 SCIEX OS 软件对所有

表 1　内标化合物的信息

Table 1　Information of internal standards (ISs)

IS	ESI modes	Class	Mass concentration/(μg/mL)
L-Phenyl-d5-alanine	+, −	amino acid	4
Glutamine-d5	+	amino acid	4
Cholic acid-2,2,4,4-d4	+, −	bile acid	2
Succinate-$^{13}C_4$	−	carboxylic acid	1
Folic acid-$^{13}C_5$	+, −	vitamin B	0.1
SM (d18:1/18:0)	+	SM	2
Stearic acid-18,18,18-d3	−	fatty acid	2
Palmitic acid-16, 16, 16-d3	−	fatty acid	2
Chenodeoxycholic acid-d4	+, −	bile acid	1.5
Hippuric acid-d5	+	benzenoid	0.4
Choline-d4	+	amine	2
12-HETE-d8	−	fatty acid	0.1
L-Leucine-5,5,5-d3	+	amino acid	1
2-Piperidone-d2	+	others	0.4

SM: sphingomyelin; HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid.

代谢物的色谱峰面积进行积分。利用同位素内标对代谢物校正后，进行统计学分析。

采用 SIMCA 13.0 软件对校正后的数据进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)，并通过交叉验证对 PLS-DA 模型进行评价。使用 Multiple Experiment Viewer 软件进行非参数检验，以寻找无糖尿病视网膜病变的糖尿病患者(NDR)与不同临床分级 DR 之间的差异代谢物。通过 R 语言构建热图和差异代谢物的受试者工作特征曲线(ROC 曲线)。最后，使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制柱状图。

2　结果与讨论

2.1　知识导向的 DR 相关代谢物列表的确定

利用 PubMed 和 Web of Science 数据库，以“diabetic retinopathy”“metabolomics and diabetic retinopathy”“metabolomics and proliferative diabetic retinopathy”“metabolic profiling and diabetic retinopathy”等为关键词进行文献检索，检索时间范围截至 2023 年 11 月。将 DR 代谢相关的研究进行归纳总结，从样本类型为血液、玻璃体、泪液等人体生物样本的研究中，筛选出 55 篇相关文献，从中找出与 DR 和 PDR 相关的代谢物(表 2)。将文献中满足以下任一条件的代谢物确定为候选代谢物：1)被重点讨论的潜在标志物；2)差异倍数(FC)>2 或 FC<0.5；3)变量权重值(VIP)>2 的代谢物。进一步综合考虑 DR 相关重要代谢物被检测到的频次和生理学意义，从候选代谢物中筛选出 142 个代谢物，用于后续的拟靶向分析。

表 2　糖尿病视网膜病变相关代谢物信息

Table 2　Information of diabetic retinopathy related metabolites

DR/PDR potential markers	Sample material	Study population	Analytical platform	Ref.
Adenosine, inosine, uric acid, xanthine	plasma	40 HC, 35 NDR, 39 DR	LC-MS	[10]
PDR: pseudouridine, Gln, Leu-Leu, *N*-acetyltryptophan	plasma	21 PDR, 21 non-PDR, 32 NDR	LC-MS	[11]
Arg, Cit, glutamic γ-semialdehyde, dehydroxycarnitine; PDR: carnitine	plasma	90 T2DM, 49 non-PDR, 34 PDR	LC-MS	[12]
Prostaglandin F2α	plasma	28 non-PDR, 22 NDR, 16 HC	LC-MS	[13]
2,4-Dihydroxybutyric acid, 3,4-dihydroxybutyric acid, ribonic acid, ribitol, TG(50:1), TG(50:2)	plasma	141 NDR, 90 NPDR, 186 MNPDR, 121 PDR, 107 PDR with fibrosis	GC-MS, LC-MS	[14]
2-Deoxyribonic acid, 3,4-dihydroxybutyric acid, erythritol, gluconic acid, ribose	plasma	(40 NDR, 40 DR) & (40 NDR, 40 DR, 40 HC)	GC-MS	[15]
Syringaldehyde, 12-HETE, *o*-cresol, *p*-cresol, linoleic acid, *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid, *cis*-11,14-eicosadienoic acid, arachidonic acid	serum	69 DR, 69 NDR, 69 HC	LC-MS	[16]
Gln, Glu, Gln/ Glu	plasma	32 DR, 32 NDR	GC-MS, LC-MS	[17]
Trimethylamine-*N*-oxide	plasma	40 HC, 30 non-PDR, 42 PDR, 50 NDR	LC-MS	[18]

表 2 （续）
Table 2 （Continued）

DR/PDR potential markers	Sample material	Study population	Analytical platform	Ref.
N-Lactoyl isoleucine, *N*-lactoyl valine, *N*-lactoyl tyrosine, *N*-lactoyl phenylalanine, *N*-(2-furoyl) glycine, 5-hydroxylysine, Cit, *N*,*N*,*N*-trimethyl-5-aminovalerate, myristoleate, palmitoleate, 5-dodecenoate, SM(d18:2/24:2), maleate, 3-hydroxypyridine sulfate, 4-vinylphenol sulfate, 4-ethylcatechol sulfate, dimethyl sulfone	plasma	328 DR, 1021 NDR	LC-MS	[19]
PDR: pipecolic acid, pantetheine, pyroglutamic acid, α-*N*-phenylacetyl-L-glutamine, (24*R*)-cholest-5-ene-3-β,24-diol	plasma and vitreous	plasma(88 PDR, 51 control) & vitreous (51 PDR, 23 control)	LC-MS	[20]
Asp, pyruvate	plasma	89 T2DM, 30 HC	GC-MS	[21]
Ala, His, Leu, pyruvate, Tyr, Val	plasma, cerebrospinal fluid	19 DR, 36 control	NMR	[22]
Ethanolamine, Thr, Lys, Arg, Met, acetylornithine, pipecolic acid, Trp, Gln, indole	serum	21 DR, 21 NDR	LC-MS	[23]
PDR: fumaric acid, uridine, acetic acid, cytidine	serum	21 PDR, 21 NDR	LC-MS	[24]
Tetradecenoylcarnitine, hexadecanoylcarnitine, Lys, Met, Trp, Tyr, total dimethylarginine, PC aa C34:2, PC aa C32:2, PC aa C36:2, PC aa C38:6, PC aa C40:6, PC ae C36:5, PC ae C42:3, SM(OH) C22:1, SM C24:0; PDR: pimelycarnitine, creatinine, total dimethylarginine, PC aa C32:2, LPC a C18:2, PC aa C36:1, PC aa C44:4, PC aa C44:5	serum	123 non-PDR, 51 PDR, 143 NDR	LC-MS and FIA-MS	[25]
Asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, Arg	serum	329 NDR, 27 non-PDR, 101 PDR, 107 CSME	LC-MS	[26]
Asymmetric dimethylarginine	serum	111 NDR, 71 DR	HPLC	[27]
Phenylacetylglutamine, *p*-cresol, *o*-cresol, nicotinuric acid, Orn, linoleic acid, linolelaidic acid, palmitoleic acid, γ-linolenic acid, α-linolenic acid, *cis*-7-hexadecenoic acid, hexadecanoic acid, elaidic acid, *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid, arachidonic acid	serum	(46 DR, 46 DM, 46 HC) & (23 DR, 23 DM, 23 HC)	LC-MS	[28]
Glu, PC, 13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid, Thr, Met, oxoglutarate, eicosatrienoic acid, 3-hydroxybutanoate, *N*-acetyl-L-glutamate, Asp, *N*-(L-arginino) succinate, Gln, Orn; PDR: Asp, Glu, Gln, Orn, 2-oxoglutarate, *N*-acetyl-L-glutamate, *N*-acetyl-L-aspartate, citrate, PC, 13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid, Met, Lys, Thr, Phe, *N*-(L-arginino) succinate, succinate, *N*(pi)-methyl-L-histidine, linoleate, pantothenate, dihomo-γ-linolenate, docosahexaenoic acid, icosapentaenoic acid	serum	15 HC, 15 T2DM, 15 non-PDR, 15 PDR	LC-MS	[29]
Linoleic acid, γ-linolenic acid, eicosadienoic acid, dihomo-γ-linolenic acid, arachidonic acid	serum	(49 DR, 49 NDR) & (20 DR, 20 NDR, 69 HC)	LC-MS	[30]
2-Pyrrolidone, thiamine triphosphate	serum	69 HC, 69 T2DM, 69 DR	LC-MS	[31]
Xanthine, 1-palmitoyl-GPA(16:0), Trp, glycoursodeoxycholate, phenylacetylglutamine, 5-methylthioadenosine	serum	123 DR, 116 NDR	Metabolon DiscoveryHD4	[32]
LPC(14:0), LPE(16:0p), LPE(18:0p), LPC(16:1)	serum	44 control, 43 DR	LC-MS	[33]
Taurolithocholic acid, tauroursodeoxycholic acid, arachidonic acid	serum	(82 HC, 60 NDR, 58 DR) & (20 NDR, 20 DR)	LC-MS	[34]

表 2 （续）
Table 2 （Continued）

DR/PDR potential markers	Sample material	Study population	Analytical platform	Ref.
2-Piperidone, 12-HETE	serum	216 NDR, 202 NPDR, 193 MNPDR, 198 SNPDR, 96 PDR	LC-MS, GC-MS	[35]
DR & PDR: homocysteine, folic acid	plasma	70 non-PDR, 65 PDR, 96 NDR, 80 HC	immunoassay, quantaphase Ⅱ folate radioassay kit	[36]
DR & PDR: homocysteine	plasma	156 HC, 71 non-PDR, 46 PDR, 62 NDR	HPLC	[37]
DR & PDR: 4-hydroxyphenethyl alcohol, 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, pachymic acid, dehydrotrametenolic acid	plasma	27 PDR, 18 non-PDR, 21 NDR	LC-MS	[38]
Arg, Cit	plasma	159 NDR, 92 non-PDR, 64 PDR	LC-MS	[39]
Cit, indoleacetic acid, chenodeoxycholic acid, 1-methylhistidine, PCs, hexanoylcarnitine, EPA; PDR: chenodeoxycholic acid, EPA, indoleacetic acid	plasma	27 T2DM, 28 non-PDR, 28 PDR, 27 HC	LC-MS, ELISA	[40]
Cytidine, cytosine, thymidine	plasma	41 HC, 37 DM, 38 DR	LC-MS	[41]
N-Methyl-glutamate, methylglutarylcarnitine, glucose-6-phosphate, *p*-cresol sulfate, PC(O-42:5), Cer(d18:2_24:1), SM(d33:1), SM(d34:2), SM(d36:5), Trp, PC(14:0_16:1), PC(14:0_14:0), PC(18:2_14:0); PDR: 2-methoxyresorcinol, α-hydroxyisobutyrate, 2-hydroxycaproic acid	plasma	97 T2DM, 97 DR	LC-MS	[42]
Tyr, 3-hydroxybutyrate, creatinine, citrate, ethanolamine, formate, hypoxanthine	serum, plasma, urine	666 DR, 2211 NDR	NMR	[43]
Tyr, Ala	plasma	655 macrovascular events, 342 microvascular events (nephropathy or retinopathy), 632 all-cause mortality	NMR	[44]
PDR: xanthine, pyruvate, palmitic acid, glyceraldehyde 3-phosphate, 2/3-phosphoglycerate, Gln, Pro, Cit, ribose phosphate	vitreous	(8 PDR, 9 ERM, 17 RD) & (9 ERM, 25 RD, 9 PDR)	LC-MS	[45]
PDR: pyruvate, lactate, Pro, urate, Cit, Orn, allantoin, dimethylglycine, *N*-acetylserine, succinate, α-ketoglutarate, inosine, creatine, Gly	vitreous, mouse retina	43 PDR, 21 ERM, OIR mice	LC-MS	[46]
PDR: Val, Ile, Leu, Ser, Gly, Ala, Phe, Lys	vitreous	30 PDR, 20 MH	HPLC	[47]
PDR: kynurenine, acylcarnitine, phospholipids, triacylglycerol	vitreous	49 PDR, 23 control, OIR mice	LC-MS	[48]
PDR: 20-HETE, 12-HETE, 5-HETE, 20-carboxy arachidonic acid, 11,12-epoxyeicosatrienoic acid	vitreous	31 PDR, 13 control	LC-MS	[49]
PDR: D-2,3-dihydroxypropanoic acid, isocitric acid, threonic acid, D-glucose, L-lactic acid, fructose 6-phosphate, Cit, pyruvate, uric acid, Orn, Lys, Leu, pyroglutamic acid, Ala, Thr, hydroxylamine, Val, L-alloisoleucine, Phe, creatinine, myoinositol, Gln	vitreous, aqueous humor	vitreous (28 PDR, 22 MH), aqueous humor (23 PDR, 25 control (non-diabetic patients with cataract)	GC-MS	[50]
DR & PDR: glucose, fructose, galactose, mannose, lactic acid	tear	19 PDR, 21 NDR, 20 non-PDR	LC-MS	[51]
Guanosine, uric acid, D-(+)-malic acid, pimelic acid, azelaic acid, 2-hydroxybenzothiazole, *N*,*N*-diethyl-4-methoxybenzamide, homovanillic acid, pipecolic acid, guvacoline, spironolactone, *N*,*N*-diethyl-3-methoxybenzamide, prostaglandin F2α 1-11-lactone, 2-methoxyestrone, tretinoin	tear	20 PDR, 21 non-PDR, 21 non-DM	LC-MS	[52]

表 2 （续）
Table 2 （Continued）

DR/PDR potential markers	Sample material	Study population	Analytical platform	Ref.
PDR: D-Ser, Glu	aqueous humor, vitreous	25 PDR, 25 control	HPLC	[53]
PDR: Arg, Pro, Cit, Orn, octanoylcarnitine	mouse whole eye, vitreous	20 PDR, 31 NDR, 10 OIR mice, 15 mice	LC-MS	[54]
Ceramide, lactosylceramide, SM	vitreous	4 control, 9 T2DM	LC-MS	[55]
PDR: docosatetraenoic acid, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, ±12(13)-epoxy-octadecenoic acid. ±19,20-epoxy-docosapentaenoic acid, ±9(10)-dihydroxy-octadecenoic acid, EPA	vitreous	41 PDR, 22 control	LC-MS	[56]
5-HETE	vitreous	16 non-PDR, 15 PDR, 7 RD, 9 ERM	LC-MS	[57]
PDR: lactate, succinate, 2-hydroxybutyrate, Asn, His, Gln, Thr, dimethylamine, ascorbate, formate, Ile	aqueous humor	13 DM, 14 DR, 7 control	NMR	[58]
Adenosine, adenine, xanthine, hypoxanthine, guanine, inosine	retinal tissues	10 STZ-induced diabetic mice, 10 NDR mice	LC-MS	[59]
N-acetyl-aspartate, creatine, *N*-acetyl-aspartate, choline	left visual cortex	15 NDR, 15 non-PDR, 15 HC, 15 PDR	MRS	[60]
18-Hydroxyeicosapentaenoic acid	vitreous, mice	DR, control (10 rats), STZ group (12 rats treated with STZ), EPA group(11 rats treated with both STZ and EPA-E)	LC-MS	[61]
PDR: 15-keto-dihydro-prostaglandin F2α	serum, OIR mice	24 NDR, 20 non-PDR, 24 PDR	13, 14-dihydro-15-keto PGF2α ELISA Kit	[62]
PDR: 19,20-dihydroxydocosapentaenoic acid	vitreous, mouse retina	17 PDR, 14 control, mice	LC-MS	[63]
PDR: glucose, galactitol, ascorbic acid	vitreous	22 PDR, 22 control	NMR	[64]

HC: healthy control; NDR: diabetes population without diabetic retinopathy; DR: diabetic retinopathy; LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry; PDR: proliferative diabetic retinopathy; Gln: glutamine; Leu: leucine; non-PDR: nonproliferative diabetic retinopathy; Arg: arginine; Cit: citrulline; T2DM: type 2 diabetes mellitus; TG: triglycerides; NPDR: mild nonproliferative diabetic retinopathy; MNPDR: moderate nonproliferative diabetic retinopathy; Glu: glutamic acid; Asp: aspartic acid; Ala: alanine; His: histidine; Tyr: tyrosine; Val: valine; NMR: nuclear magnetic resonance; Thr: threonine; Lys: lysine; Met: methionine; Trp: tryptophan; PC: phosphatidylcholine; LPC: lysophosphatidylcholine; FIA-MS: flow-injection analysis-mass spectrometry; CSME: clinically significant macular edema; HPLC: high performance liquid chromatography; Orn: ornithine; DM: diabetes mellitus; Phe: phenylalanine; LPE: lysophosphatidylethanolamine; SNPDR: severe nonproliferative diabetic retinopathy; EPA: eicosapentaenoic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Cer: ceramide; Pro: proline; ERM: epiretinal membrane; RD: retinal detachment; OIR: oxygen-induced retinopathy; Val: valine; Ile: isoleucine; Ser: serine; Gly: glycine; MH: macular hole; MRS: magnetic resonance spectroscopy; Asn: asparagine; STZ: streptozotocin; EPA-E: eicosapentaenoic acid ethyl ester.

2.2 色谱-质谱条件优化

本研究纳入的 142 个 DR 相关代谢物涵盖了不同极性的多种代谢物，如氨基酸、胆汁酸、脂质等。为确保这些代谢物在选定的色谱条件下能够有效出峰且有较好的分离效果，对 ACQUITY UPLC BEH C8（5 cm×2.1 mm，1.7 μm）、Discovery HS F5（5 cm×2.1 mm，3 μm）和 Discovery HS F5（10 cm×2.1 mm，3 μm）3 种色谱柱进行了筛选和比较。结果表明，由于部分候选代谢物极性较大，在 C8 柱上集中在前 3 min 出峰，分离效果较差。相比之下，其在五氟苯基柱上有较好的分离，峰形也更为理想。进一步对比 5 cm 和 10 cm 长的 Discovery HS F5 色谱柱后，最终选择了 10 cm 的 Discovery HS F5（10 cm×2.1 mm，3 μm）色谱柱进行样本分析，以获得更好的分离效果。

为了增强离子化效率并调控 pH，流动相中加入甲酸和乙酸铵。具体组成如下：A 相为含 0.1%（体积分数）甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的水溶液，B 相为含 0.1%（体积分数）甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的甲醇溶液。根据代谢物保留时间的分布，优化了液相色谱梯度和柱温。根据优化后的液相色谱条件，内标及 142 个目标代谢物的总离子流图见图 1。

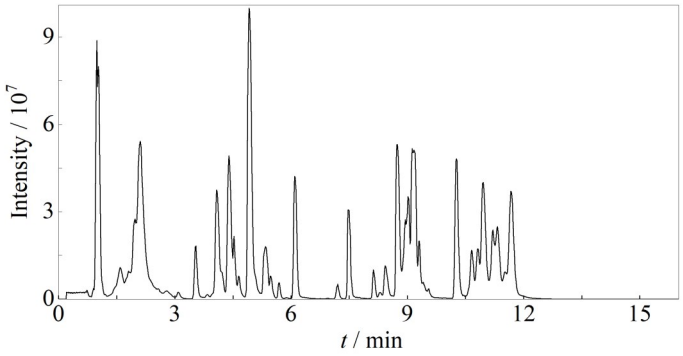


图 1　拟靶向方法中内标及目标代谢物在 10 cm Discovery HS F5 色谱柱的总离子流色谱图

Fig. 1　Total ion chromatogram of internal standards and target metabolites in pseudo-targeted method on 10 cm Discovery HS F5 column

根据目标代谢物的性质优化质谱条件。对于有标样的代谢物,采用标样优化代谢物的质谱参数,确定其保留时间、母离子、子离子、碰撞能(collision energy, CE)和去簇电压(declustering potential, DP)等。对于无标样的代谢物,首先利用高分辨质谱对 QC 样本进行分析,获取保留时间、MS^1 和 MS^2 信息,结合数据库(如 HMDB)的二级谱图,确定离子对并优化质谱参数。优化后的参数见表 3。

表 3　目标代谢物和内标化合物的质谱参数

Table 3　MS parameters of target metabolites and internal standards

No.	Metabolite	t_R/min	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	CE/eV	DP/V	ESI mode
1	L-phenyl-d5-alanine	5.23	171.12	125.11	20	20	+
2	Gln-d5	0.76	152.11	135.08	20	15	+
3	cholic acid-2,2,4,4-d4	7.53	377.30	359.29	20	45	+
4	folic acid-$^{13}C_5$	4.53	447.45	176.10	60	30	+
5	chenodeoxycholic acid-d4	8.16	361.30	247.17	30	30	+
6	hippuric acid-d5	4.53	185.10	110.07	20	30	+
7	choline-d4	2.18	108.13	60.08	30	50	+
8	L-Leu-5,5,5-d3	4.86	135.12	44.00	40	105	+
9	2-piperidone-d2	3.08	102.09	57.06	26	41	+
10	SM (d18:1/18:0)	11.32	731.61	184.07	35	74	+
11	xanthine	1.82	153.04	110.08	25	40	+
12	adenosine	3.77	268.10	136.06	26	26	+
13	pseudouridine	1.21	245.08	125.03	26	11	+
14	*N*-acetyltryptophan	5.05	247.11	146.06	44	14	+
15	Leu-Leu	9.22	245.19	86.10	20	20	+
16	Cit	1.16	176.10	159.21	13	15	+
17	carnitine	2.30	162.11	85.03	26	40	+
18	Arg	1.77	175.12	60.06	13	30	+
19	docosahexaenoic acid	8.91	329.25	161.13	47	56	+
20	Glu	1.16	148.06	84.11	23	15	+
21	pyroglutamic acid	1.10	130.05	84.11	19	35	+
22	pipecolic acid	0.97	130.09	84.08	30	100	+
23	Tyr	3.70	182.08	136.17	19	15	+
24	kynurenine	4.87	209.09	94.10	19	20	+
25	Leu	4.32	132.10	86.10	11	11	+
26	Ala	1.06	90.06	44.17	19	65	+
27	His	1.63	156.08	110.07	33	25	+

表 3 （续）
Table 3 （Continued）

No.	Metabolite	t_R/min	Precursor ion (*m/z*)	Fragment ion (*m/z*)	CE/eV	DP/V	ESI mode
28	uridine	1.77	245.08	113.09	15	15	+
29	cytidine	2.80	244.09	112.00	20	40	+
30	creatinine	2.37	114.07	44.13	22	25	+
31	nicotinuric acid	3.84	181.06	135.06	26	15	+
32	phenylacetylglutamine	4.41	265.12	130.05	20	26	+
33	Orn	4.57	133.10	70.15	23	20	+
34	pantothenate	3.51	220.12	72.04	29	14	+
35	eicosatrienoic acid	9.24	307.26	95.09	29	38	+
36	glycoursodeoxycholate	6.82	450.32	321.26	32	32	+
37	tauroursodeoxycholic acid	5.55	500.30	126.02	35	20	+
38	2-piperidone	3.11	100.08	56.04	23	35	+
39	indoleacetic acid	5.70	176.07	130.10	20	30	+
40	hexanoylcarnitine	9.70	260.19	85.02	45	100	+
41	eicosapentaenoic acid	8.23	303.23	149.02	26	23	+
42	1-methylhistidine	1.50	170.09	124.09	22	30	+
43	cytosine	2.06	112.05	95.03	29	14	+
44	Trp	6.12	205.10	188.20	15	20	+
45	hypoxanthine	1.76	137.05	110.09	28	75	+
46	Pro	1.24	116.07	70.16	21	25	+
47	*β*-Ala	1.26	90.05	55.02	26	14	+
48	±12(13)-epoxy-octadecenoic acid	8.51	297.24	71.09	32	44	+
49	9,10-dihydroxy-octadecenoic acid	7.62	315.25	279.23	17	41	+
50	homocysteine	4.40	136.05	90.10	11	20	+
51	folic acid	5.30	442.15	295.09	26	14	+
52	riboflavin	4.61	377.15	243.09	32	56	+
53	myo-inositol	0.89	181.07	81.03	15	90	+
54	4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone	0.91	127.04	69.00	35	38	+
55	indole	1.05	118.09	58.07	38	47	+
56	*N*-acetylornithine	1.85	175.11	115.09	17	25	+
57	3-methylxanthine	9.83	167.03	149.02	17	107	+
58	creatine	1.51	132.08	90.06	15	60	+
59	3-methylindole	0.73	132.08	90.90	26	38	+
60	serotonin	6.26	177.09	160.17	15	15	+
61	acetylcarnitine	4.85	204.12	85.02	45	100	+
62	homoarginine	2.29	189.13	130.09	23	35	+
63	norleucine	4.30	132.10	69.07	23	17	+
64	*N*-acetyl-L-tyrosine	4.28	224.13	136.20	23	15	+
65	guanidoacetic acid	5.60	118.06	72.06	17	20	+
66	4-methylcatechol	5.09	125.06	69.04	70	20	+
67	Gly	1.05	76.04	30.30	19	15	+
68	dimethylglycine	1.05	104.07	58.10	20	40	+
69	Phe	4.82	166.09	120.16	19	20	+
70	homoserine	1.14	120.07	56.05	30	60	+
71	guanosine	1.20	284.08	152.20	19	15	+
72	Ile	4.30	132.10	57.06	38	11	+

表 3 （续）
Table 3 （Continued）

No.	Metabolite	t_R/min	Precursor ion (*m/z*)	Fragment ion (*m/z*)	CE/eV	DP/V	ESI mode
73	adenine	3.12	136.06	92.03	30	80	+
74	hippuric acid	4.55	180.07	105.03	20	29	+
75	Phe-Phe	9.46	313.15	120.08	29	35	+
76	indole-3-propionic acid	6.12	190.09	55.02	29	29	+
77	Lys	1.19	147.11	56.06	56	20	+
78	taurine	0.89	126.02	44.05	29	23	+
79	DL-octopamine	5.20	154.08	84.05	26	119	+
80	*N*,*N*,*N*-trimethyl-5-aminovalerate	4.57	160.13	101.06	20	41	+
81	octanoylcarnitine	11.00	288.22	85.03	29	80	+
82	PC Aa C34:2	11.61	742.57	184.07	38	11	+
83	PC Ae C36:5	11.27	766.57	184.07	41	11	+
84	LPE(16:0P)	8.53	438.30	266.28	35	110	+
85	SM(D36:5)	10.34	723.54	664.46	38	11	+
86	sphingosine 1-phosphate	8.77	380.25	264.27	23	59	+
87	LPC 16:0	8.78	496.34	104.11	41	5	+
88	trimethylamine-*N*-oxide	2.50	76.08	59.07	22	101	+
89	Arg-Tyr	9.71	338.18	91.58	74	56	+
90	pimelycarnitine	7.00	304.18	85.03	32	83	+
91	asymmetric dimethylarginine	3.30	203.17	70.07	32	8	+
92	glutamic γ-semialdehyde	0.96	132.08	86.10	23	14	+
93	symmetric dimethylarginine	3.00	203.15	116.07	32	29	+
94	5-hydroxylysine	2.23	163.12	104.04	23	59	+
95	acetylhomoserine	2.25	162.11	103.04	23	29	+
96	elaidic acid	8.84	283.26	41.04	38	50	+
97	PC Aa C40:6	11.70	834.60	184.07	41	32	+
98	PC Aa C32:2	10.81	730.54	184.07	38	47	+
99	SM(D34:2)	10.37	701.55	184.07	29	29	+
100	palmitoleate	7.72	255.23	81.07	26	15	+
101	*N*-lactoyl valine	5.01	190.04	148.07	20	62	+
102	*N*-acetyl-L-phenylalanine	5.11	208.10	120.09	32	47	+
103	LPC 20:2	9.17	548.37	184.07	39	38	+
104	LPC 16:1	8.52	494.32	184.07	36	38	+
105	LPC 15:0	8.60	482.32	184.07	33	38	+
106	LPC(0:0/18:0)	9.30	524.37	184.07	36	38	+
107	choline	2.07	104.11	60.08	23	53	+
108	Val	2.13	118.09	72.08	26	41	+
109	ethanolamine	0.93	62.06	44.10	30	30	+
110	indoxyl	3.40	134.05	79.06	32	47	+
111	eicosadienoic acid	5.50	309.28	119.09	17	56	+
112	thiamine triphosphate	5.33	506.29	148.01	41	80	+
113	*N*-phenylacetylglycine	4.70	194.08	65.04	37	15	+
114	PC Aa C38:6	9.13	790.57	115.08	35	50	+
115	*N*6-(1-iminoethyl)-L-lysine	3.70	188.15	86.10	35	26	+
116	L-phenyl-d5-alanine	4.88	169.10	108.09	−20	−40	-

表 3 （续）
Table 3 （Continued）

No.	Metabolite	t_R/min	Precursor ion（*m/z*）	Fragment ion（*m/z*）	CE/eV	DP/V	ESI mode
117	cholic acid-2,2,4,4-d4	7.53	411.30	349.30	−40	−120	−
118	succinate-$^{13}C_4$	1.82	121.04	77.06	−20	−30	−
119	folic acid-$^{13}C_5$	4.52	445.15	311.08	−30	−75	−
120	stearic acid-18,18,18-d3	9.59	286.28	286.28	−20	−90	−
121	palmitic acid-16,16,16-d3	9.26	258.25	258.25	−10	−90	−
122	chenodeoxycholic acid-d4	8.15	395.31	395.31	−20	−120	−
123	12-HETE-d8	8.17	327.14	308.98	−10	−50	−
124	uric acid	1.44	167.02	69.01	−20	−30	−
125	inosine	2.64	267.08	135.03	−16	−10	−
126	Gln	1.07	145.06	109.00	−19	−20	−
127	arachidonic acid	9.11	303.23	231.21	−26	−71	−
128	hexadecanoic acid	9.25	255.23	237.22	−29	−62	−
129	*N*(pi)-methyl-L-histidine	1.05	168.08	72.01	−29	−20	−
130	2-oxoglutarate	1.02	145.01	73.04	−14	−14	−
131	linoleic acid	6.30	279.24	146.96	−17	−29	−
132	12-HETE	8.22	319.23	179.10	−21	−40	−
133	taurocholic acid	5.59	514.28	80.15	−135	−60	−
134	glycocholic acid	6.94	464.30	74.05	−85	−80	−
135	1,5-anhydroglucitol	0.98	163.06	100.80	−15	−100	−
136	chenodeoxycholic acid	8.18	391.29	373.29	−43	−80	−
137	uracil	0.90	111.02	41.92	−28	−20	−
138	5-HETE	8.33	319.23	115.04	−20	−44	−
139	20-carboxy arachidonic acid	7.91	333.21	271.21	−26	−59	−
140	cholic acid	7.51	407.28	345.28	−41	−92	−
141	DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid	7.50	197.05	137.02	−26	−62	−
142	glycochenodeoxycholate	7.50	448.31	74.03	−44	−8	−
143	hydroxyphenyllactic acid	0.91	181.08	71.01	−22	−25	−
144	malic acid	1.07	133.01	115.01	−19	−15	−
145	succinate	1.85	117.02	73.00	−15	−60	−
146	Asn	1.02	131.05	113.03	−14	−10	−
147	mannitol	0.90	181.07	71.01	−38	−38	−
148	Glu-Leu	4.81	259.13	130.09	−29	−35	−
149	indole-3-carboxaldehyde	5.95	144.05	115.05	−38	−65	−
150	γ-linolenic acid	7.70	277.22	121.10	−44	−86	−
151	isocitric acid	1.43	191.02	111.01	−17	−8	−
152	2,4-dihydroxybutyric acid	0.93	119.03	59.02	−17	−32	−
153	5-methylthioadenosine	1.07	296.08	83.09	−44	−122	−
154	inosinic acid	0.96	347.05	153.00	−20	−20	−
155	2-methylglutaric acid	0.99	145.06	127.05	−14	−38	−
156	3-dehydroepiandrosterone sulfate	7.28	367.16	96.96	−71	−44	−
157	13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid	8.35	311.22	249.22	−35	−53	−
158	docosapentaenoic acid	9.26	329.25	59.01	−41	−44	−
159	indoxyl sulfate	3.40	212.00	79.96	−38	−26	−
160	pyruvate	1.33	87.01	87.00	−11	−71	−

2.3　方法学评价

2.3.1　线性关系和检出限

本研究所分析的代谢物主要包括氨基酸、氨基酸衍生物和胆汁酸等类别，选择涵盖氨基酸及其衍生物、胆汁酸、维生素、苯类有机物等类别的 8 种同位素内标（苯丙氨酸-d5（L-phenyl-d5-alanine）、胆酸-d4（cholic acid-d4）、鹅去氧胆酸-d4（chenodeoxycholic acid-d4）、马尿酸-d5（hippuric acid-d5）、亮氨酸-d3（L-leucine-d3）、2-哌啶酮-d2（2-piperidone-d2）、琥珀酸-$^{13}C_4$（succinate-$^{13}C_4$）和叶酸-$^{13}C_5$（folic acid-$^{13}C_5$））进行方法学考察，它们与待测物具有相似的化学性质和物理行为，且具有良好的稳定性。制备不同浓度的混合溶液，质量浓度由高到低依次为 25 000、10 000、5 000、2 500、1 000、500、250、100、50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.1 ng/mL。将不同浓度的混合标准溶液加入到血清中，每个水平平行处理 3 份，在优化方法下进行分析。以同位素内标的色谱峰面积作为纵坐标，对应的质量浓度为横坐标构建标准曲线，每个标准曲线至少包括 6 个浓度点。将同位素内标信噪比（S/N）≥3 时的浓度设置为检出限（LOD）。如表 4 所示，8 种内标的相关系数（r^2）都达到 0.995 及以上，均具有良好的线性关系，且线性范围在 3 个数量级以上。

2.3.2　提取回收率和精密度

制备低、中和高 3 个水平的同位素内标混合液，以考察提取回收率和精密度。其中，中等浓度参照内源性代谢物的浓度进行选取，低浓度和高浓度分别为中等浓度的一半和两倍。同位素内标的中等质量浓度分别为苯丙氨酸-d5 4 μg/mL、胆酸-d4 2 μg/mL、鹅去氧胆酸-d4 0.5 μg/mL、马尿酸-d5 0.4 μg/mL、亮氨酸-d3 4 μg/mL、2-哌啶酮-d2 1 μg/mL、琥珀酸-$^{13}C_4$ 1 μg/mL、叶酸-$^{13}C_5$ 0.5 μg/mL。分别将混合液在提取前和提取后加入到血清样品中，每个水平平行处理 3 份，单个样本进样两次（n=3×2），通过计算提取前后的内标色谱峰面积的比值进行回收率评估。在低、中、高 3 个浓度水平下，所有物质的提取回收率为 75%~108%，相对标准偏差（RSD）均小于 13%。

在一天内对同位素内标的低浓度、中等浓度和高浓度进行分析，每个水平平行处理 3 份，进样两次，以同一浓度下内标峰面积的 RSD 作为日内精密度。对于日间精密度的考察，连续 3 天预处理和进样，得到的内标峰面积的 RSD 作为日间精密度。在正、负离子模式下，同位素内标日内精密度的 RSD 小于 5% 的个数占总数的 91%；日间精密度的 RSD 小于 10% 的个数占总数的 91%，RSD 最高不超过 16.3%，说明该方法精密度良好（表 5）。

2.4　DR 相关的差异代谢物筛查

2.4.1　数据质量评价

以 137 例血清样本为示范性应用，利用所建立的拟靶向方法对样本进行分析，每 10 个样本进一针空白和 QC。利用 80% 规则[65]和空白滤噪评估实际样本中 142 个代谢物的检出情况，最终有 137 个代谢物能够在本批样本中稳定检测。对稳定出峰的代谢物在 QC 中的重复性进行评价，如图 2 所示，有 96.35% 的代谢物采用内标校正后相对峰面积的 RSD<30%，这些代谢物的峰面积总和占总峰面积的 99.83%。对 QC 中 RSD<30% 的 132 个代谢物进行

表 4　8个同位素内标在正、负离子模式下的线性关系和检出限

Table 4　Linear relationships and LODs of eight isotopically labeled ISs in positive and negative ion modes

ESI mode	IS	LOD/(ng/mL)	Regression equation	Linear range/(ng/mL)	r^2
+	L-phenyl-d5-alanine	0.250	y=27137.734x−31396.400	5−10000	0.995
	cholic acid-d4	1.000	y=13291.700x−5673.280	2.5−10000	0.995
	chenodeoxycholic acid-d4	2.500	y=1865.577x−1962.004	5−5000	0.996
	hippuric acid-d5	0.250	y=16255.994x−2230.113	0.5−10000	0.995
	L-leucine-d3	5.000	y=269.239x−454.511	25−25000	0.998
	2-piperidone-d2	0.050	y=13600.611x+19335.051	5−10000	0.995
−	L-phenyl-d5-alanine	1.000	y=941.874x+124.198	2.5−25000	0.996
	cholic acid-d4	1.000	y=685.804x+48.025	5−25000	0.997
	succinate-$^{13}C_4$	2.500	y=1090.061x−565.412	25−25000	0.998
	folic acid-$^{13}C_5$	2.500	y=888.209x−1757.596	5−5000	0.995
	chenodeoxycholic acid-d4	0.050	y=5983.701x+987810	10−10000	0.998

y: peak area of the compound; x: mass concentration, ng/mL.

表 5 同位素内标化合物在低、中、高 3 个浓度水平下的精密度和提取回收率

Table 5 Precisions and extraction recoveries of ISs at low, medium and high concentration levels

ESI mode	IS	Intra-day RSDs/%			Inter-day RSDs/%			Extraction recoveries/% (Mean±RSD)		
		Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
+	L-phenyl-d5-alanine	1.4	3.5	1.8	4.4	5.1	3.1	99.7±8.0	89.3±4.0	93.7±1.9
	cholic acid-d4	4.4	4.5	0.7	7.9	7.1	7.9	99.6±8.1	84.1±11.7	89.1±3.3
	chenodeoxycholic acid-d4	2.8	1.6	2.3	5.6	5.5	6.5	96.6±7.0	84.6±5.5	87.3±5.6
	hippuric acid-d5	3.4	4.2	4.8	5.4	7.2	7.1	108.3±11.4	97.4±8.6	100.9±3.0
	L-leucine-d3	2.1	3.3	2.4	9.5	5.3	5.4	100.0±9.5	86.4±8.2	88.9±2.4
	2-piperidone-d2	4.7	3.2	3.0	15.1	6.9	7.4	87.7±10.1	82.3±3.3	81.2±5.5
−	L-phenyl-d5-alanine	2.8	1.7	1.6	6.7	6.1	7.5	103.0±8.2	89.3±4.5	91.9±4.0
	cholic acid-d4	3.6	1.0	4.2	7.2	7.1	8.0	99.3±8.5	85.5±5.5	89.6±7.7
	succinate-$^{13}C_4$	4.4	3.8	2.9	16.3	9.8	8.8	106.7±8.4	93.6±6.0	99.6±2.0
	folic acid-$^{13}C_5$	5.1	3.5	5.5	9.5	9.7	7.9	88.2±13.0	78.3±8.8	79.5±7.7
	chenodeoxycholic acid-d4	10.9	2.6	3.3	11.0	4.3	4.7	75.1±4.4	79.8±9.8	85±5

后续分析。主成分分析表明,QC 样本紧密结合在一起,质量评价结果表明采集的数据稳定可靠,可用于后续分析。

2.4.2 样本临床参数相关信息

本研究共分析了随机抽取的 137 名糖尿病患者,其中属于 NDR 的糖尿病患者有 40 位,DR 有 97 位。根据临床表现,将 DR 患者分为 NPDR(29)、MNPDR(33)、SNPDR(19)和 PDR(16)患者。将患者临床参数总结在表 6 中,各组人群的年龄和 BMI 均无差异。

2.4.3 NDR 与不同临床分级 DR 的代谢差异分析

为探究 NDR 与不同临床分级 DR 间的代谢变化,首先构建多变量 PLS-DA 模型。结果表明,NDR 与不同临床分级 DR 之间有明显的分离趋势(图 3)。对 4 个模型进行 200 次交叉验证,表明模型未拟合(图 4)。

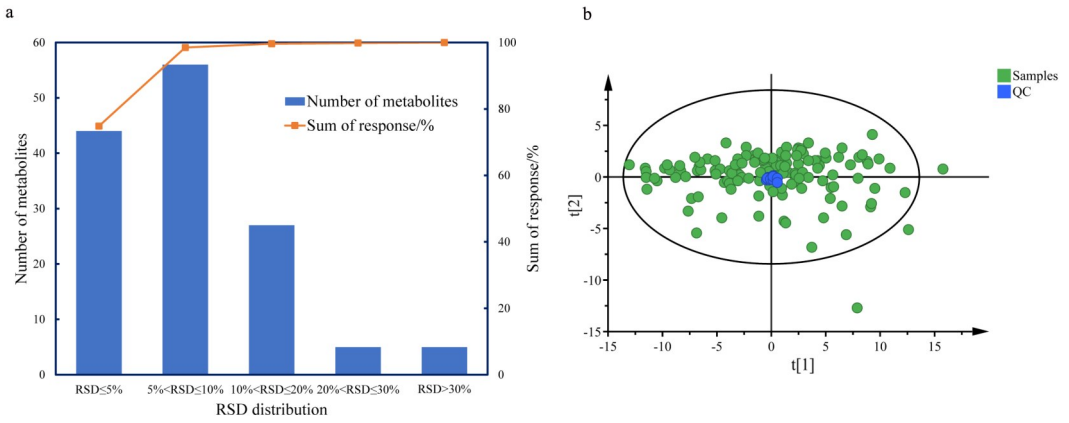


图 2 (a) 检测代谢物在 QC 中的相对标准偏差分布与(b)QC 和实际样本的 PCA 图

Fig. 2 (a) Relative standard deviation distribution of detected metabolites in QC and (b) PCA plot of QC and real samples

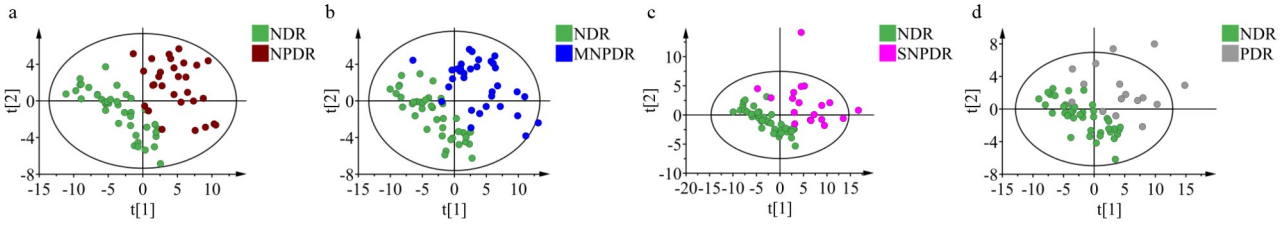


图 3 NDR 分别与(a)NPDR、(b)MNPDR、(c)SNPDR、(d)PDR 的 PLS-DA 得分图

Fig. 3 PLS-DA score plots of NDR versus (a) NPDR, (b) MNPDR, (c) SNPDR, and (d) PDR, respectively

表 6　研究对象的临床参数

Table 6　Clinical parameters of the subjects

Clinical parameter	Total	NDR	NPDR	MNPDR	SNPDR	PDR
Gender (male/female)	57/80	20/20	14/15	13/20	5/14	5/11
Age (years)	62.97±5.59	63.33±5.65	62.32±5.98	63.69±5.62	62.82±5.53	61.87±5.07
BMI (kg/m^2)	25.49±3.54	25.58±3.43	25.04±3.51	25.19±3.01	25.60±4.01	26.61±4.47
SBP (mmHg)	140.89±20.11	129.18±11.93	143.83±21.36**	147.41±19.03***	145.35±22.99*	148.00±22.48**
DBP (mmHg)	81.00±9.71	80.92±7.30	81.97±11.87	81.13±10.92	82.06±8.31	77.64±10.05
FPG (mmol/L)	8.35±2.02	7.84±1.96	7.95±1.84	9.05±1.76*	9.71±2.41*	7.69±1.69
HbA1c (%)	7.62±1.39	6.91±1.18	7.50±1.47	8.28±1.25***	7.98±1.10***	8.09±1.45**
TC (mmol/L)	5.05±1.09	5.00±1.07	4.81±1.22	4.90±0.94	5.49±1.07	5.46±1.04
TG (mmol/L)	1.56±0.77	1.65±0.79	1.41±0.82	1.46±0.57	1.59±0.75	1.82±0.97
HDL-c (mmol/L)	1.35±0.32	1.29±0.28	1.35±0.31	1.45±0.37	1.38±0.32	1.33±0.35
LDL-c (mmol/L)	3.03±0.95	2.98±0.84	2.92±1.05	2.90±0.95	3.35±1.00	3.29±0.99
T2DM duration (years)	8.97±5.73	6.73±5.30	6.54±3.28	9.14±4.45*	13.53±6.57***	12.27±6.33**
Uric acid (μmol/L)	319.71±82.25	338.31±66.32	314.15±90.64	324.45±92.05	294.71±96.92	289.50±57.97*

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: hemoglobin a1c; TC: total cholesterol; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein cholesterol. * p<0.05, ** p<0.01, *** p< 0.001 compared to NDR. Data represent mean±SD.

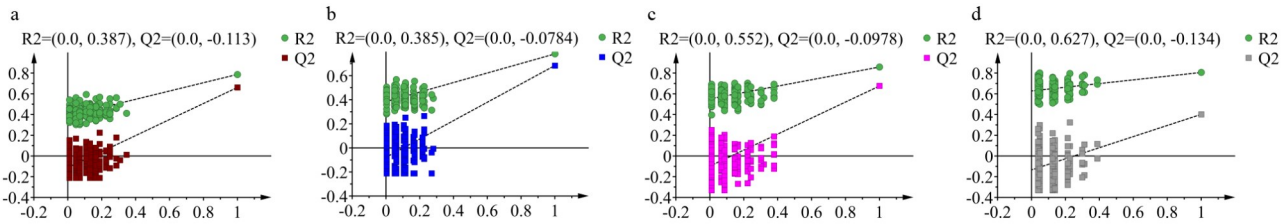


图 4　200 次扰动测试得到的 NDR 分别与(a)NPDR、(b)MNPDR、(c)SNPDR 和(d)PDR 的交叉验证图

Fig. 4　Cross-validation plots with 200 perturbation tests of NDR versus (a) NPDR, (b) MNPDR, (c) SNPDR, and (d) PDR, respectively

进一步采用 Mann-Whitney U 非参数检验筛选 NDR 与不同临床分级 DR 患者间的差异代谢物。NDR 与 NPDR 间有 78 个差异代谢物，与 MNPDR 之间有 77 个差异代谢物，与 SNPDR 之间有 77 个差异代谢物，与 PDR 之间有 38 个差异代谢物。其中，NDR 和不同临床分级 DR 间共有的差异代谢物有 30 个。以热图的形式展示共有的 30 个差异代谢物(p<0.05)的变化规律，从图 5 可以看到，与 NDR 相比，DR 患者体内的精氨酸、组氨酸、鸟氨酸等氨基酸含量升高，此外，二十碳五烯酸、12-HETE 和 5-羟基二十碳四烯酸(5-HETE)等多不饱和脂肪酸及相关代谢产物明显增多。进一步结合错误发现率(FDR)寻找显著性差异代谢物，12-HETE、5-HETE、胆碱、二十碳五烯酸、*N*-乙酰-L-酪氨酸、溶血磷脂酰胆碱(LPC，0:0/18:0)、丙酮酸和鞘氨醇-1-磷酸等 8 个代谢物在 NDR 和 4 个临床分级中均有显著性差异(p<0.05 且 FDR<0.05)。

2.4.4　NDR 与 DR 的差异代谢物分析

进一步比较 NDR 和 DR 的代谢变化，两组间共有 85 个差异代谢物，涵盖脂质、氨基酸、核苷酸、酚类、吲哚类等多种代谢物类别，其中花生四烯酸、12-HETE、LPC 和 3-甲基黄嘌呤等代谢物在 DR 组显著增加。对其中 32 个显著差异代谢物(FC>1.5、p<0.05 且 FDR<0.05)结合二元逻辑回归逐步向前筛选组合标志物，同时校正性别、年龄及 BMI 等混杂因素，筛选到胆碱和 12-HETE 作为组合标志物。构建组合标志物胆碱和 12-HETE 的 ROC 曲线，如图 6 所示，相比于 NDR，胆碱和 12-HETE 在 DR 中的含量上升。组合标志物的 AUC 值为 0.973，敏感度和特异性分别是 0.876、0.975，说明胆碱和 12-HETE 能很好地区分 NDR 和 DR。此外，进一步将组合标志物用于 NDR 和非增殖性 DR 的分析。ROC 结果显示敏感度和特异性分别为 0.889 和 1，说明组合标志物能有效判别早期 DR(AUC=

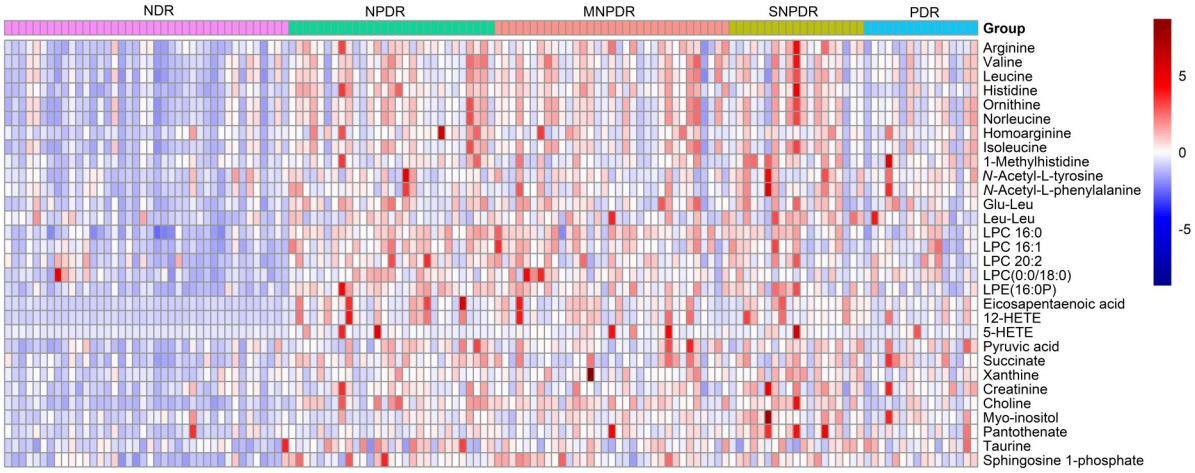


图 5 NDR 与不同临床分级间共有的显著性差异代谢物热图

Fig. 5 Heat map of significant differential metabolites shared between NDR and different clinical grades of DR

0.990),对 DR 进行早期诊断具有重要意义。

对胆碱和 12-HETE 在不同临床分级 DR 中的浓度进行分析,发现两者在不同临床分级 DR 中均显著高于 NDR。胆碱是一种重要的代谢物,根据 KEGG 的通路分析,胆碱涉及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、磷壁酸生物合成、甘油磷脂代谢和癌症中的胆碱代谢等多个代谢通路。胆碱的代谢产物三甲胺-*N*-氧化物(trimethylamine *N*-oxide,TMAO)等会影响炎症,可能促进糖尿病视网膜病变的发展。Xuan 等[35]检测到胆碱在 NDR 和 DR 之间有显著性差异,DR 患者体内的胆碱含量增多。有文献报道了喂食胆碱的小鼠产生代谢产物 TMAO,TMAO 会促进血管炎症[66,67],而血管炎症是 DR 产生机制之一。Liu 等[68]发现胆碱摄入量较多的女性患 DR 的几率更高。12-HETE 是一种促炎的不饱和脂肪酸代谢物,可增加 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)氧化酶和活性氧(ROS)的合成,引起氧化应激,进而诱发视网膜内皮炎症[69,70]。12-HETE 与花生四烯酸代谢、卵巢类固醇生成及醛固酮合成和分泌等通路相关。已有多篇文献报道 12-HETE 在 DR 发生发展中产生重要作用[35,70,71]。Moustafa 等[72]发现 12-HETE 可激活 Müller 胶质细胞、影响谷氨酸生成并引发炎症和氧化反应。Chen 等[73]发现儿童 DR 患病风险与血清 12-HETE 水平密切相关。胆碱参与甘油磷脂代谢,通过一系列酶促反应转化为磷脂酰胆碱,而磷脂酰胆碱是细胞膜中含量最丰富的磷脂之一,对维持细胞膜的结构和功能具有重要作用。细胞膜磷脂的分解可释放花生四烯酸[74,75],后者是合成 12-HETE 的前体物质。12-HETE 和胆碱的代谢通路之间存在潜在关联,两者的联合使用可从不同角度反映疾病的复杂代谢改变,提高对疾病的诊断准确性。胆碱和 12-HETE 在人体内具有多种重要的生理作用,仍需要深入了解两者的机制和相互关系,以更

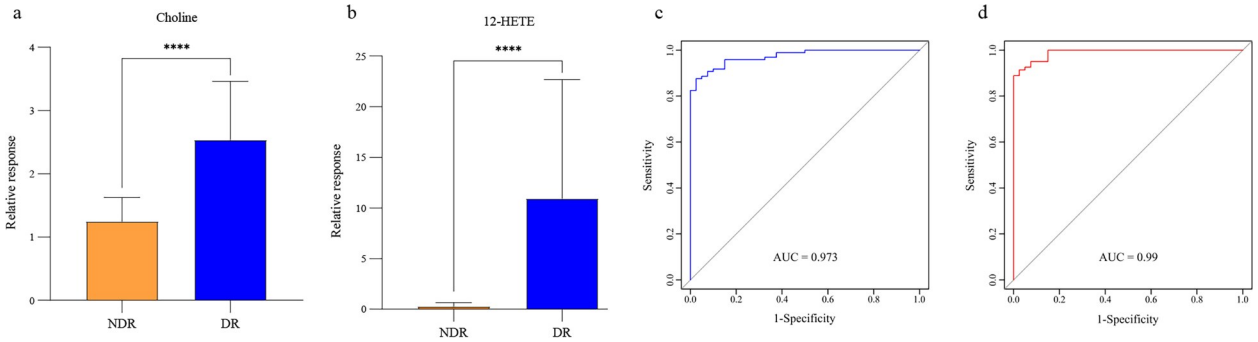


图 6 (a)Choline 和(b)12-HETE 在 NDR 和 DR 中的含量分布;组合标志物判别(c)NDR 和 DR、(d)NDR 和早期 DR 的 ROC 曲线

Fig. 6 (a) Choline and (b) 12-HETE content distribution in NDR and DR; (c) ROC curves of combined markers for distinguishing (c) NDR and DR, (d) NDR and early stage DR

好地理解 DR 的发病机制,为疾病早期诊断提供思路。

3　结论

本文面向糖尿病视网膜病变研究,开发了一种基于知识导向型的拟靶向代谢组学分析策略,用于确定与疾病相关的代谢物并建立分析方法。方法学考察结果表明,该方法能稳定且可靠地检测 DR 相关代谢物。将该方法应用于 NDR 和 DR 血清样本分析中,筛选出能有效区分两者的组合标志物 12-HETE 和胆碱。此外,该组合标志物对 NDR 和早期 DR 也具有良好的区分能力,为 DR 筛查和早期诊断提供了参考。本文提出的分析策略具有广泛的适用性和良好的分析效率,可推广至其他代谢性疾病,为疾病的早期诊断和精准治疗提供参考。

参考文献:

[1] Cheung N, Mitchell P, Wong T Y. Lancet, 2010, 376(9735): 124
[2] Wong T Y, Cheung C M G, Larsen M, et al. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2(1): 16012
[3] Hou X, Wang L, Zhu D, et al. Nat Commun, 2023, 14(1): 4296
[4] Kwan C C, Fawzi A A. Curr Diab Rep, 2019, 19(10): 95
[5] Mustafi D, Saraf S S, Shang Q, et al. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 167: 108361
[6] Torm M E W, Pircher M, Bonnin S, et al. Sci Rep, 2024, 14(1): 13450
[7] Dai L, Wu L, Li H, et al. Nat Commun, 2021, 12(1): 3242
[8] Li J, Guan Z, Wang J, et al. Nat Med, 2024, 30(10): 2886
[9] Grzybowski A, Brona P, Lim G, et al. Eye, 2019, 34(3): 451
[10] Xia J, Wang Z, Zhang F. Int J Endocrinol, 2014, 2014: 1
[11] Sun Y, Zou H, Li X, et al. Front Endocrinol, 2021, 12: 757088
[12] Sumarriva K, Uppal K, Ma C, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(8): 3119
[13] Peng L, Sun B, Liu M, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(4): 1276
[14] Curovic V R, Suvitaival T, Mattila I, et al. Diabetes, 2020, 69(10): 2217
[15] Chen L, Cheng C-Y, Choi H, et al. Diabetes, 2016, 65(4): 1099
[16] Guo C, Jiang D, Xu Y, et al. Front Mol Biosci, 2022, 9: 822647
[17] Rhee S Y, Jung E S, Park H M, et al. Metabolomics, 2018, 14(7): 89
[18] Liu W, Wang C, Xia Y, et al. Acta Diabetol, 2020, 58(2): 221
[19] Fernandes Silva L, Hokkanen J, Vangipurapu J, et al. J Clin Endocrinol Metab, 2024, 109(1): 100
[20] Wang H, Li S, Wang C, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(2): 17
[21] Li X, Luo X, Lu X, et al. Mol Biosyst, 2011, 7(7): 2228
[22] Lin H-T, Cheng M-L, Lo C-J, et al. J Clin Med, 2019, 8(6): 874
[23] Zhang F, Hu G Y, Lyu K J, et al. China Patent, 202111582209.X. 2022-03-25
张芳, 胡光奕, 吕康甲, 等. 中国专利, 202111582209.X. 2022-03-25
[24] Zhu X-R, Yang F-y, Lu J, et al. Nutr Metab, 2019, 16(1): 37
[25] Chen J, Yun J H, Kim J-M, et al. PLoS One, 2020, 15(10): e0241365
[26] Abhary S, Kasmeridis N, Burdon K P, et al. Diabetes Care, 2009, 32(11): 2084
[27] Malecki M T, Undas A, Cyganek K, et al. Diabetes Care, 2007, 30(11): 2899
[28] Zuo J, Lan Y, Hu H, et al. BMJ Open Diab Res Care, 2021, 9(1): e001443
[29] Wang Z, Tang J, Jin E, et al. Front Mol Biosci, 2022, 9: 871291
[30] Li J-S, Wang T, Zuo J-J, et al. Endocr Connect, 2020, 9(12): 1191
[31] Li J, Guo C, Wang T, et al. Nutr Diabetes, 2022, 12(1): 36
[32] Yousri N A, Suhre K, Yassin E, et al. Diabetes, 2022, 71(2): 184
[33] Xuan Q, Zheng F, Yu D, et al. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(15): 3585
[34] Feng S, Guo L, Wang S, et al. Diabetes Metab Syndr Obes, 2023, 16: 2117
[35] Xuan Q, Ouyang Y, Wang Y, et al. Adv Sci, 2020, 7(22): 2001714
[36] Malaguarnera G, Gagliano C, Salomone S, et al. Clin Ophthalmol, 2015: 1437
[37] Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I, et al. Eye, 2004, 18(5): 460
[38] Ding C, Wang N, Wang Z, et al. Pharmaceutics, 2022, 14(12): 2751
[39] Peters K S, Rivera E, Warden C, et al. Am J Ophthalmol, 2022, 235: 154
[40] Wang Z, Tang J, Jin E, et al. Front Endocrinol, 2022, 13: 986303
[41] Xia J-F, Wang Z-H, Liang Q-L, et al. Clin Chim Acta, 2011, 412(11/12): 940
[42] Ancel P, Martin J C, Doukbi E, et al. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12053
[43] Quek D Q Y, He F, Sultana R, et al. Metabolites, 2021, 11(9): 614
[44] Welsh P, Rankin N, Li Q, et al. Diabetologia, 2018, 61(7): 1581
[45] Haines N R, Manoharan N, Olson J L, et al. J Proteome Res, 2018, 17(7): 2421
[46] Tomita Y, Cagnone G, Fu Z, et al. Diabetologia, 2020, 64(1): 70
[47] Vidhya S, Ramya R, Coral K, et al. Exp Eye Res, 2018, 173: 179

[48] Fang J, Wang H, Niu T, et al. J Proteome Res, 2023, 22(7): 2293
[49] Lin A L, Roman R J, Regan K A, et al. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7451
[50] Wang H, Fang J, Chen F, et al. Acta Diabetol, 2019, 57(1): 41
[51] Zhang M Z, Wen X, Liu Q P. China Patent, 202211507791.8. 2023-01-13
张铭志, 温鑫, 刘庆平. 中国专利, 202211507791.8. 2023-01-13
[52] Wen X, Ng T K, Liu Q, et al. Heliyon, 2023, 9(5): e16109
[53] Jiang H, Du J, He T, et al. Clin Exp Ophthalmol, 2014, 42(9): 841
[54] Paris L P, Johnson C H, Aguilar E, et al. Metabolomics, 2015, 12(1): 15
[55] Wilmott L A, Grambergs R C, Allegood J C, et al. J Diabetes Complications, 2019, 33(3): 195
[56] Zhao T, Wang Y, Guo X, et al. Exp Eye Res, 2022, 214: 108799
[57] Schwartzman M L, Iserovich P, Gotlinger K, et al. Diabetes, 2010, 59(7): 1780
[58] Jin H, Zhu B, Liu X, et al. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174: 414
[59] Han X, Zhang L, Kong L, et al. Exp Eye Res, 2023, 233: 109538
[60] Ozsoy E, Doganay S, Dogan M, et al. J Diabetes Complications, 2012, 26(3): 241
[61] Suzumura A, Kaneko H, Funahashi Y, et al. Diabetes, 2020, 69(4): 724
[62] Zhao Y, Lei Y, Ning H, et al. EMBO Mol Med, 2022, 15: e16373
[63] Hu J, Dziumbla S, Lin J, et al. Nature, 2017, 552(7684): 248
[64] Barba I, Garcia-Ramírez M, Hernández C, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(9): 4416
[65] Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij E R, et al. Anal Chem, 2006, 78(2): 567
[66] Chen M L, Zhu X H, Ran L, et al. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9): e006347
[67] Seldin M M, Meng Y, Qi H, et al. J Am Heart Assoc, 2016, 5(2): e002767
[68] Liu W, Ren C, Zhang W, et al. Curr Eye Res, 2022, 47(2): 269
[69] Chen S, Qin X, Sun Y, et al. FASEB J, 2024, 38(18): e70064
[70] Chen S, Zou H. Curr Eye Res, 2022, 47(3): 329
[71] Dobrian A D, Morris M A, Taylor-Fishwick D A, et al. Pharmacol Ther, 2019, 195: 100
[72] Moustafa M, Khalil A, Darwish N H E, et al. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2024, 171: 106805
[73] Chen S, Qian Y, Lin Q, et al. Acta Diabetol, 2022, 59(11): 1505
[74] Yang H-J, Sugiura Y, Ikegami K, et al. J Biol Chem, 2012, 287(8): 5290
[75] Saito K, Goda K, Kobayashi A, et al. J Appl Toxicol, 2017, 37(8): 943