

论著

进食状态下不同时间点血中标记氨基酸浓度和丰度差异性分析

姬一兵¹ 朴建华¹ 张宇辉² 勾凌燕² 徐忠华² 李卫东¹ 田园¹ 杨晓光¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;

(2. 中国人民解放军第四军医大学白求恩军医学院,河北 石家庄 050081)

摘要:目的 通过示踪剂动态观察蛋白质和氨基酸的代谢变化过程中在同位素丰度达到稳定的平台期时,不同的时间点血液中标记氨基酸的丰度与浓度的变化,以此反映不同时点蛋白质和氨基酸的氧化分解状况。方法 选取20名健康成年男性为研究对象,分为2组,以7d为一个实验周期,给予受试者日常膳食5d后,第6天经静脉滴注给予稳定同位素¹³C标记的亮氨酸,持续3h。在输液结束前的30min内每隔15min取一次血液样品,测定血样中亮氨酸的浓度与¹³C的丰度值,并比较各时点丰度及浓度的差异性。结果 二组受试者3个时间点亮氨酸的浓度与¹³C丰度值之间的差异无统计学意义。结论 在进食状态下持续给予受试者稳定同位素的过程中,不同时间点机体蛋白质和氨基酸的氧化分解处于一个相对稳定的状态,可以在此时期内确定一个同一的时间点来研究机体处于不同的蛋白质和氨基酸营养状态下的各项代谢动力学参数。

关键词:标记氨基酸;同位素;浓度;丰度;人体

Analysis of Concentration and Enrichment of Labeled Amino Acid in Blood at Different Time Points in Feed State

JI Yi-bing, PIAO Jian-hua, ZHANG Yu-hui, GOU Ling-yan, XU Zhong-hua,
LI Wei-dong, TIAN Yuan, YANG Xiao-guang

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To explore the changes of the enrichment and concentration of stable isotope labeled amino acid in blood at the metabolic plateau of protein and amino acid in order to reflect the catabolism level of protein and amino acid. **Method** Twenty subjects were divided into two groups and were supplied two different doses of protein, the whole experience period was 7 days. All subjects were administered the ¹³C-leucine for 3 hours by the antecubital vein at the time of 12:00 on day 6 and the blood samples were collected per 15 minutes during the last 30 minutes of the infusion, and the ¹³C enrichment and concentration of leucine in blood samples were detected and compared. **Results** The difference of both ¹³C enrichment and leucine concentration in blood at three time points were not significant for every group subjects ($P > 0.05$). **Conclusion** The oxidation level of protein and amino acid were relative stable at the different time points in the course of stable isotope infusion in the status of feed. The identical time point of the metabolic kinetics parameters under the different nutritional conditions of protein and amino acid should be determined.

Key words: Labeled Amino Acid; Isotope; Concentration; Enrichment; Human Body

示踪剂氨基酸氧化法应用稳定同位素示踪技术标记氨基酸从而实现对机体内蛋白质和氨基酸的氧化分解过程的动态观察^[1,2],并通过蛋白质和氨基酸的氧化分解程度来反映机体对蛋白质和氨基酸的生理需要量。人体对蛋白质的代谢状态可以分为进食状态和吸收后状态,在这两个状态下机体内混合氨基酸代谢库内氨基酸的代谢变化是不同的,目前研

究表明吸收后状态不适于应用稳定同位素示踪技术来研究蛋白质和氨基酸的代谢动力学变化^[3],在进食状态下开展研究需要选择一个测定同位素丰度敏感性高的采样时间,得出氨基酸代谢的各项动力学参数,进食状态下体内氨基酸的代谢变化需要经过一个平台期,在这一阶段氨基酸代谢的各项参数均处于相对稳定状态,可以在这一时期内确定一个同一的时间设定采样点开展相关研究。

基金项目:达能膳食营养研究与宣教基金(Nb. DIC2006-07)

作者简介:姬一兵 男 博士

通讯作者:朴建华 男 研究员

1 材料与方法

1.1 材料

L - LEUCINE (1 - ^{13}C , 99%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc), SODIUM BICARBONATE (^{13}C , 99%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc)、 ^{13}C 标记亮氨酸溶液贮备液 (9.43 mg/ml)、 ^{13}C 标记碳酸氢钠贮备液 (7.78 mg/ml)、0.9% 氯化钠溶液、甲醇 (Fisher Scientific, HPLC 级)、乙腈 (Fisher Scientific, HPLC 级)、甲酸 (98%, 北京化学试剂公司, 分析纯)、去离子水 (Milli Q 纯化系统, Millipore, Bedford, MSA)、亮氨酸 (Sigma 公司产品, 纯度 98.0%)。

示踪剂贮备液的配制 亮氨酸 100 mg 溶于 10 ml 的生理盐水 (0.9% 氯化钠溶液) 中, 贮存在 10 ml 的安瓿中; 碳酸氢钠 80 mg 溶于 10 ml 蒸馏水中, 配制成为 10 ml 的原液, 贮存在 10 ml 的安瓿中。制剂配制完成后进行灭菌及热源检测, 达到静脉输液的要求。

注射泵 (北京鑫和丰公司)、静脉留置针 (美国 BD 公司)、数字式体重秤 (HW100KGL, Japan)、一次性无菌注射器 (美国 BD 公司)、2795 Alliance HPLC 系统 (Waters 公司)、三重四极杆串联质谱 (API 4000, Applied Biosystem 公司)、纯水机 (Millipore 公司)、低温高速离心机 (Biofugeprim, Heraeus 公司)、分析天平 (AX150, Mettler 公司)。

1.2 研究对象的选择及蛋白质摄入水平的设定

1.2.1 从中国人民解放军第四军医大学白求恩医学院选择 20 名健康男性受试者作为研究对象, 年龄在 21~25 岁之间, 身体健康, 无既往病史, 知情自愿参加本研究。本研究经过中国疾病预防控制中心营养与食品安全所伦理委员会的同意。

1.2.2 将 20 名研究对象分为 2 组, 每组 10 人, 按年龄、身高和体重配比, 使二组受试者在年龄、身高和体重上保持同质 ($P > 0.05$)。以 7 d 为一个实验周期, 通过准确对日常膳食中的蛋白质定量, 将二组受试者摄入的膳食蛋白质的量分别控制在每天 0.80 g/kg BW 和每天 0.89 g/kg BW 的水平。

1.3 实验期的设定

实验期为 7 d, 1~5 d 为适应期, 给予二组受试者预设的含有不同蛋白质质量的日常膳食, 二组受试者摄入的蛋白质质量基本能够满足机体对蛋白质的生理需要量^[3,7]。第 6 天于午餐后, 使用注射泵以 0.1 ml/min 的速度通过左臂贵要静脉将稳定同位素 ^{13}C 标记的亮氨酸于 3h 内输入受试者体内。

1.5 实验膳食的制备与给予

实验期的第 1~5 天为适应期, 于 7:00, 11:30, 18:00 给予受试者参照中国居民日常膳食制备实验膳食, 使二组受试者处于 2 个不同的蛋白质营养状态下, (每天 0.80 g/kg BW 和每天 0.89 g/kg BW), 第 6

天对其进行蛋白质的代谢动力学的研究, 第 7 天为自由进食期。实验膳食由白求恩医学院招待所按照实验设计的食谱定量制备。在适应期, 受试者每天进行日常的工作学习, 维持平时的生活状态, 但不从事剧烈的体力活动。

1.5.1 实验膳食为动物性食物和植物性食物的混合膳食, 一日三餐的食物种类以接近普通居民的日常生活为原则, 每餐主食为 1 种, 米饭或者面食, 副食为 2~3 个菜, 荤素搭配, 按照预设的蛋白质含量在各种食物中的分配, 对每种食物进行定量, 见表 1。

1.5.2 将实验研究预设的蛋白质剂量分配到每天食用的主食和副食当中, 以使受试者达到我们实验要求的蛋白质营养状态, 每餐都要制备足量的无氮膳食, 供受试者在摄入预设的实验膳食未能达到饱腹感时食用, 从而满足机体能量的需要量。实验期内 3 d 循环食谱见表 1。

表 1 实验期三日食谱

	第一天	第二天	第三天
	食物种类	食物种类	食物种类
早餐	咸黄瓜	咸黄瓜	拌小白菜
	萝卜丝	拌小白菜	海带丝
	藕粉浆	藕粉浆	藕粉浆
	切片面包	油条	油炸馒头片
午餐	醋溜土豆丝	烧茄子	炒西葫芦片
	炒青椒 (甜椒)	炒黄瓜片	烧茄子
	鸡丁	猪肉 (后臀尖)	酱牛肉 (瘦肉)
	炒饭	炒饭	炒饭
	瓜片汤	瓜片汤	瓜片汤
晚餐	糖拌西红柿	烧云豆	炒黄瓜片
	醋溜白菜片	炒芹菜茎	卷心菜
	葱油饼	油炸馒头片	炒饭
	菠菜汤	菠菜汤	菠菜汤

1.6 实验实施过程

1.6.1 输液的配制 输液开始前 1 h, 即实验周期第 6 天的 11:00, 由研究人员在一个单独的洁净房间内配制完成。

1.6.1.1 生理盐水 用 10 ml 注射器抽取 10 ml 生理盐水置于每名受试者的托盘内, 用来确保静脉血管通畅和防回血。

1.6.1.2 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 冲击剂量 以 1 ml 的注射器由 10 ml $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 的安瓿中抽取 1 ml。

1.6.1.3 ^{13}C -亮氨酸冲击剂量 用 5 ml 的注射器由 10 ml ^{13}C -亮氨酸的安瓿中抽取 3 ml。

1.6.1.4 ^{13}C -亮氨酸输液的配制: 用 BD 公司的 20 ml 无菌注射器从 100 ml 的生理盐水中抽取 10

ml,再由 10 ml ¹³C-亮氨酸安瓿中抽取贮备液 10 ml,将之混匀后装夹于注射泵卡槽内。

1.6.2 输液设备的连接 每名受试者的左臂肘窝贵要静脉处连接好带有三通管的静脉留置针,将配制好的装有¹³C-亮氨酸输液的 20 ml 注射器装夹于注射泵的卡槽中,并通过延长管与静脉留置针相连接。

1.6.3 输液的实施 在实验期第 6 天输液开始前 3 min 内,首先将 1 ml NaH ¹³CO₃ 冲击剂量通过套管针在 1 min 内缓慢注射入受试者贵要静脉内;然后将 3 ml ¹³C-亮氨酸冲击剂量通过套管针在 1 min 内缓慢注射入受试者贵要静脉内;在 12:00 将 20 ml 的 ¹³C-亮氨酸输液通过注射泵以 0.1 ml/min 的速率在 3 h 内由贵要静脉缓慢输入受试者体内。以上操作严格遵循无菌操作程序。

1.6.4 采样点的设计 在实验期的第 6 天早餐前,用 5 ml 真空抗凝管采集二组受试者血液的本底样品;在输液结束前的 30 min 内每隔 15 min 取 1 次血液样本,每名受试者取 3 个点的样品,用于测定亮氨酸的浓度和¹³C的丰度。

1.7 样品的测定

亮氨酸浓度及¹³C同位素丰度通过 HPLC-MS/MS 串联质谱仪测定。HPLC 条件:色谱柱选用 Waters 公司的 Atlantis 柱(4.6 mm ×100 mm,3.5 μm);流动相由乙腈(0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸(5:95,体积分数)溶液组成;流速 1 ml/min;进样体

积为 20 μl;洗针液为乙腈-水(1:1,体积分数)。每一个样品分析用时 3 min。串联质谱条件:采用 Turbo V 型电喷雾离子源(ESI),在正离子电离模式下,选用多反应监测(MRM)的质谱扫描方式测定(m/z):亮氨酸 132.2 → 86.3;¹³C-亮氨酸 133.2 → 86.3。

1.8 数据分析

通过统计分析软件 SPSS 16.0 中多样本均数比较的方差分析方法对二组试者 3 个不同时间点上的血液样品中亮氨酸浓度和¹³C同位素丰度值的差异性进行分析,以此来反映 3 个时间点上机体混合氨基酸代谢库内氨基酸的氧化分解程度是否存在显著性差异。

$$^{13}\text{C丰度} = \frac{^{13}\text{C(原子数)}}{^{13}\text{C(原子数)} + ^{12}\text{C(原子数)}} \times 100$$

$$^{13}\text{C原子百分超} = ^{13}\text{C丰度(样品)} - ^{13}\text{C丰度(天然)}$$

2 结果

2.1 3 个取样时间点血中亮氨酸浓度

静脉输液结束前 30 min(T1)、15 min(T2)和输液结束时(T3)二组受试者血中亮氨酸浓度测定结果见表 2 和表 3。经单因素方差分析,二组摄入不同蛋白质量的受试者在进食状态下的三个取样时间点上血中亮氨酸浓度之间差异无统计学意义,表明在标记氨基酸静脉输注结束前 30 min 内机体混合氨基酸代谢库内的氨基酸量处于一个相对稳定的状态。

表 2 不同时间点每天 0.80 g/kg BW 蛋白质组受试者血液中亮氨酸浓度 (nmol/ml)

取样时间	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	175.9	-	197.7	208.3	172.6	179.5	206.9	183.2	199.1	180.3
T2	172.9	-	191.0	197.5	162.4	201.9	195.0	163.7	197.4	208.2
T3	181.6	-	172.1	163.7	193.2	203.1	198.9	165.7	196.3	169.6

注:2 号受试者因病中途退出,表 4 同此。

表 3 不同时间点每天 0.89 g/kg BW 蛋白质组受试者血液中亮氨酸浓度 (nmol/ml)

取样时间	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T1	227.4	245.9	238.4	199.5	224.2	228.2	193.1	218.7	234.5	220.6
T2	229.7	236.2	235.8	252.1	216.8	199.5	209.2	242.0	238.3	243.1
T3	222.6	231.8	240.6	203.8	254.9	215.1	252.1	205.9	225.2	216.0

2.2 3 个取样时间点血中¹³C丰度

静脉输液结束前 30 min(T1)、15 min(T2)和输液结束时(T3)二组摄入不同蛋白质剂量的受试者血中¹³C丰度测定结果见表 4 和表 5。经单因素方差分析,二组受试者在进食状态下的 3 个取样时间点上血中¹³C丰度之间差异无统计学意义,表明在进食状态下体内蛋白质和氨基酸代谢达到平台期时氨基酸代谢库内的氨基酸氧化分解过程处于一个相对稳定

的状态,提示在研究蛋白质和氨基酸的生理需要时,可在平台期取任一时间点纵向比较摄入不同量的蛋白质和氨基酸组的分解代谢变化。

3 讨论

目前应用稳定同位素标记目标氨基酸从而实现氨基酸的示踪,通过示踪机体游离氨基酸代谢库内各种来源和去路的氨基酸的代谢动力学变化来探

表4 不同时间点每天0.80 g/kg BW蛋白质组受试者血液样品中¹³C丰度 (%)

取样时间	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	2.65	-	3.19	2.99	2.68	2.76	2.74	2.53	2.71	3.19
T2	2.53	-	2.29	2.92	3.51	2.67	2.98	2.40	2.38	2.89
T3	2.91	-	2.42	2.21	2.94	2.63	2.8	1.91	3.04	3.15

表5 不同时间点每天0.89 g/kg BW蛋白质组受试者血液样品中¹³C丰度 (%)

取样时间	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T1	3.79	3.53	3.61	3.59	4.59	3.62	3.72	3.88	3.85	3.74
T2	3.69	3.78	3.74	4.22	3.96	3.6	3.39	3.95	3.55	3.91
T3	3.12	3.92	3.42	4.13	3.81	2.86	3.57	4.34	3.78	3.33

讨机体对蛋白质和氨基酸的需要量的这一方法越来越得到广大学者的认可^[4,5]。蛋白质的代谢过程是受人体的生理节律所影响的^[6,7],为了考虑时间因素对蛋白质氧化分解过程的影响,在给予机体稳定同位素标记的示踪剂时通常实施24 h的静脉输液,并在一定的时间点上连续取样^[8],比较分析各个时间点上同位素丰度及氨基酸流量和氧化率的变化,这样虽然考虑了机体蛋白质代谢的生理节律问题,但静脉输液时间较长且取样过频,不易为受试者所接受,使得配合研究的效果较差。既往研究表明,在同位素丰度达到平台期时,样品中同位素的丰度会维持在一个相对稳定的易于为质谱仪所要检出的范围内^[9],对于采用短时间静脉输液的方式来研究氨基酸的代谢动力学过程,在同位素丰度达到平台期时的不同时间点上所得出的结果是相近的,因此可以考虑在平台期内同一时间点上取样并比较不同蛋白质组间氧化分解的差异。

在本项研究中,选择静脉输液结束前的30 min内,每隔10 min设置一个取样点来收集血液样品,此时机体氨基酸代谢已经达到一个稳定的平台期^[10,11]。处于氨基酸分解代谢的平台期的不同时间点上血中亮氨酸的浓度之间差异无统计学意义,并且¹³C-亮氨酸的丰度在各个时间点上的差异也无统计学意义,这在二组摄入不同蛋白质剂量的受试者中的结果是一致的,说明在进食状态下平台期内机体氨基酸代谢库内氨基酸的流量和氧化分解代谢处于一个相对衡定的状态,这一结果提示可以选择在氨基酸代谢平台期内的某一个时间点上采集样品用于比较不同蛋白质组的氨基酸的氧化分解,这样可以减少采样频次,易于为受试者所接受。

参考文献

- [1] KURPAD A V, REGAN M M, RAJ T, et al. Lysine requirements of healthy adult Indian subjects receiving long-term feeding, measured with a 24-h indicator amino acid oxidation and balance technique [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(2): 404-412.
- [2] KURPAD A V, REGAN M M, RAJ T, et al. Branched-chain amino acid requirements in healthy adult human subjects [J]. *J Nutr*, 2006, 136(1 Suppl): 256-263.
- [3] BOS C, GAUDICHON C, TOMÉ D. Isotopic studies of protein and amino acid requirements [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5(1): 55-61.
- [4] HUMAYUN M A, ELANCO R, BALL R O, et al. Reevaluation of the protein requirement in young men with the indicator amino acid oxidation technique [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(4): 995-1002.
- [5] ELANCO R, HUMAYUN M A, BALL R O, et al. Lysine requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(2): 360-365.
- [6] YOUNG V R, BORCONHA S. Nitrogen and amino acid requirements: the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern [J]. *J Nutr*, 2000, 130(7 suppl): 1841-1849.
- [7] MILLWARD D J. Protein and amino acid requirements of adults: current controversies [J]. *Can J Appl Physiol*, 2001, 26(Suppl): 130-140.
- [8] HSU J W, COONEWARDENE L A, RAFII M, et al. Aromatic amino acid requirements in healthy men measured by indicator amino acid oxidation [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(1): 82-88.
- [9] KURPAD A V, REGAN M M, VARALAKSHMI S, et al. Daily methionine requirements of healthy Indian men, measured by a 24-h indicator amino acid oxidation and balance technique [J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77(5): 1198-1205.
- [10] Wilson D C, Rafii M, Ball R O, et al. Threonine requirement of young men determined by indicator amino acid oxidation with use of L-[1-¹³C]phenylalanine [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(3): 757-764.
- [11] Pratt J M, Petty J, Riba-Garcia I, Robertson DH, et al. Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(8): 579-591.

[收稿日期: 2008-12-15]

中图分类号: R15; 562.6; O611.7; Q493.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2009)03-0239-04