

研究报告

高胆碱饮食对小鼠血清氨基酸谱的影响

韦秋燕¹, 余术宜², 邓富良², 李健哲³(1. 广西中医药大学, 药学院, 广西南宁 530299; 2. 中南大学高等研究中心, 湖南长沙 410012;
3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011)

摘要:目的 建立高胆碱饮食小鼠模型, 探究高胆碱饮食对小鼠血清氨基酸代谢的影响。方法 选取 20 只 SPF 级 4 周龄小鼠随机分为 2 组: 对照组给予普通鼠粮及实验室饮用水, 高胆碱饮食组小鼠给予 3% 胆碱水溶液代替日常饮用水, 饲养 8 周后采集小鼠血清, 应用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪(UPLC-MS/MS)定量检测血清氨基酸水平。采用主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析判断高胆碱饮食组和对照组氨基酸组成相似性。结果 高胆碱饮食组与对照组相比, 胱氨酸、丝氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、脯氨酸、反式 4-羧基脯氨酸和支链氨基酸水平显著升高, 赖氨酸、瓜氨酸水平显著降低, 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。支链氨基酸中异亮氨酸水平由 34.20 ± 2.71 升高至 $72.59 \pm 10.42 \mu\text{mol/L}$; 亮氨酸水平由 68.59 ± 4.06 升高至 $113.04 \pm 14.64 \mu\text{mol/L}$; 缬氨酸水平由 129.86 ± 10.54 升高至 $161.95 \pm 16.54 \mu\text{mol/L}$ 。结论 高胆碱饮食引起小鼠血清氨基酸代谢发生显著变化, 其中精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸可作为高胆碱饮食引起氨基酸代谢异常的生物标志物。

关键词: 高胆碱饮食; 氨基酸; 氨基酸代谢; 超高效液相色谱串联质谱法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)06-0828-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.06.005

Effects of high choline diet on serum amino acids profile in mice

WEI Qiuyan¹, YU Shuyi², DENG Fuliang², LI Jianzhe³(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Nanning 530299, China;
2. Advance Research Center, Central South University, Hu'nan Changsha 410012, China; 3. Ruikang
Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Nanning 530011, China)

Abstract: Objective To establish a high choline diet mouse model and investigate the effect of high choline diet on serum amino acid metabolism in mice. **Methods** Twenty SPF-grade 4-week-old mice were randomly divided into two groups, the control group was given ordinary mouse food and laboratory drinking water, and the high-choline diet group were given 3% choline aqueous solution instead of daily drinking water. Serum was collected after 8 weeks of feeding, and serum amino acids levels were quantified by ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were used to determine the similarity of amino acid composition between the high choline diet group and the control group.

Results Compared with the control group, the levels of cystine, serine, alanine, glutamic acid, phenylalanine, asparagine, threonine, proline, trans-4-hydroxyproline and branched-chain amino acids were significantly higher and the levels of lysine were significantly lower in the high-choline diet group, with isoleucine levels of 34.20 ± 2.71 and $72.59 \pm 10.42 \mu\text{mol/L}$; the levels of leucine were 68.59 ± 4.06 and $113.04 \pm 14.64 \mu\text{mol/L}$; the levels of valine were 129.86 ± 10.54 and $161.95 \pm 16.54 \mu\text{mol/L}$, respectively, and the differences between groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The high choline diet cause significant changes in serum amino acid metabolism in mice.

Key words: High choline diet; amino acids; metabolism of amino acids; ultra-high liquid chromatography tandem mass spectrometry

收稿日期: 2022-04-27

作者简介: 韦秋燕 女 硕士研究生 研究方向为药理毒理学、基础药理学 E-mail: 2572813153@qq.com.

通信作者: 李健哲 男 主任药师 研究方向为临床药理学 E-mail: lijianzhe20035@126.com

胆碱作为机体必需营养物质之一, 在维持机体正常生理活动和健康发挥着重要作用, 参与细胞膜磷脂、乙酰胆碱合成, 维持细胞膜通透性、促进细胞物质交换, 间接影响机体对营养物质的交换和吸收, 此外, 胆碱还作为机体甲基供体的来源, 机体内

的半胱氨酸接受甲基供体促进蛋氨酸合成增加^[1]。胆碱可来源于生物体自身合成,但自身合成量往往不足以满足正常生理需求,必须从富含胆碱、磷脂酰胆碱、甜菜碱和左旋肉碱的食物(动物肝脏、肉类、花菜、大豆、鱼、蛋类等)中获取^[2]。随着胆碱的生物作用以及致病机制的不断深入研究发现,适量摄入胆碱具有改善机体认知功能^[3-4];缺乏胆碱造成机体形成非酒精性肝损伤、肾功能损伤,引起高血压反应^[5-6],氨基酸代谢紊乱,使胱硫醚含量升高,降低天冬酰胺和苏氨酸含量^[7];目前相继报道,高胆碱饮食,会破坏肠黏膜屏障功能,引起炎症反应,加重心肌纤维化,造成不良心血管事件和诱发慢性肾病等疾病^[8-14],但目前高胆碱饮食对氨基酸代谢的影响尚未见有报道。

氨基酸作为人类饮食的重要组成部分,不仅作为蛋白质和肽类的基本要素在所有生物活性细胞及生物体中发挥着至关重要的作用,更重要的是作为信号分子在驱动着众多信号通路和维持代谢^[15]。在各种病理状态下,氨基酸代谢失衡,引起血液氨基酸水平变化,对各种生理过程和器官功能产生特定不良影响,分析血中氨基酸水平在心血管疾病、糖尿病以及慢性肾病等疾病中起着重要预测作用,可作为检测这些疾病的有效生物标志物^[16-20]。因此,本实验通过建立高胆碱饮食小鼠模型,采用UPLC-MS/MS靶向检测高胆碱饮食小鼠血清中23种氨基酸代谢变化,筛选氨基酸代谢差异生物标志物,分析高胆碱饮食对氨基酸代谢的影响及病理生理学意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

AB SCIEX Qtrap 6500+ 液质联用仪(美国SCIEX公司);TGL-165M 台式冷冻离心机(湖南仪修电子科技有限公司);POWERTEX 涡漩振荡器(艾本德中国有限公司);METTLER TOLEDO 十万分之一天平(广州广电计量检测股份有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

SPF 级雄性 KM 小鼠 20 只,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2019-0004;实验动物伦理号:2021sydw0061,寄养于湘雅医学院动物学部内,温度控制在 20~22 °C、湿度保持在 50%~70%;23 种氨基酸标准品和内标(对氨基苯甲酸,美国 Sigma 公司);氯化胆碱(北京酷来搏科技有限公司);乙腈为 LC/MS 级、甲酸、无水乙醇、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);超纯水由纯水系统制备,电阻率为 18.25 MΩ。

1.2 动物实验设计

20 只 SPF 级雄性 KM 小鼠,置于温度 20~22 °C、湿度 50%~70% 以及 12 h 明暗循环的环境中适应性喂养 1 周后,随机分为对照组和高胆碱饮食组,每组 10 只。对照组和高胆碱饮食组均给予普通鼠粮饲养(营养成分如表 1 所示),对照组小鼠日常饮用水为实验室灭菌饮用水,高胆碱饮食组小鼠日常饮用水为 3% 胆碱水溶液(用实验室灭菌饮用水配制而成)。实验期间所有小鼠自由饮水,对照组和高胆碱饮食组平均每天饮水量分别为 59.1 mL 和 60.4 mL,实验期为 8 周。所有实验操作均符合湘雅医学院动物学部动物伦理要求,并按照实验动物使用原则进行实验。

表 1 饲料的营养成分和含量

营养成分	含量/(g/kg)
水分	≤100
粗蛋白	≥180
粗脂肪	≥40
粗纤维	≤50
粗灰分	≤80
钙	10~18
总磷	6~12
钙:总磷	1.2:1~1.7:1

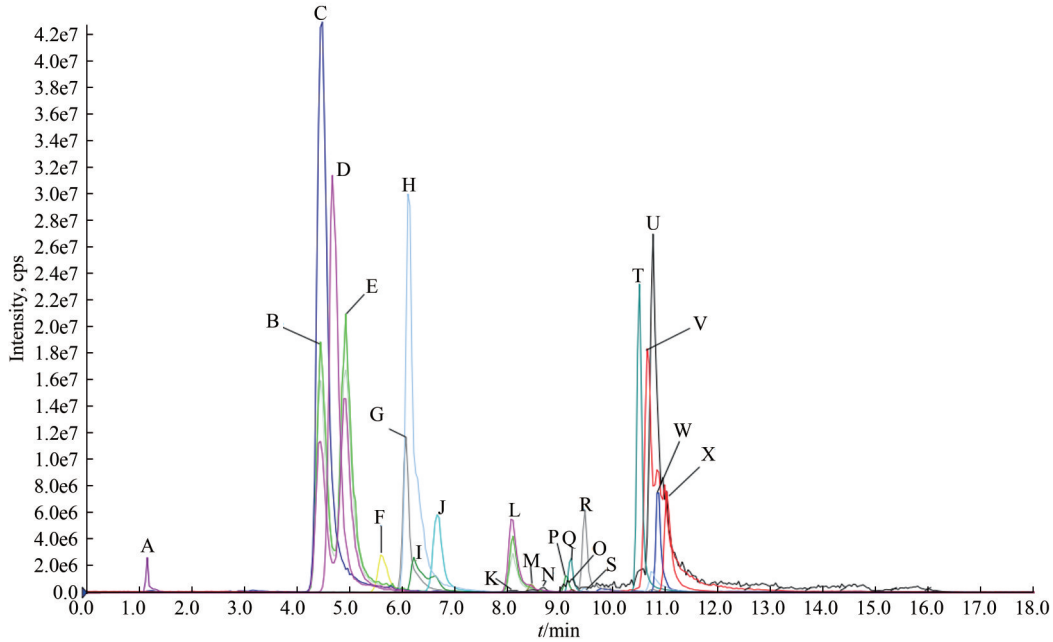
1.3 血浆样品收集

小鼠禁食不禁水 12 h 后,腹腔注射水合氯醛(50 mL/kg)麻醉小鼠,迅速眼眶取血,置于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,收集血清分装至 EP 管中,置于-20 °C 冷冻保存,待测。

1.4 LC-MS/MS 分析

使用超高效液相色谱串联质谱仪(Ultra-high liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS),配备 Waters X Bridge Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm;美国 Waters 公司)靶向定量检测血清中氨基酸水平;流动相 A:含 5 mmol/L 乙酸钠的 0.1% 甲酸水溶液, pH=4.0, 流动相 B:含 5 mmol/L 乙酸钠的 0.1% 甲酸乙腈溶液;柱温 40 °C,进样量为 1 μL;流速为 0.25 mL/min,洗脱梯度为:0~3.0 min, 92% B, 3.0~6.0 min, 92%~85% B, 6.0~9.0 min, 85%~65% B, 9.0~14.0 min, 65% B, 14.0~14.5 min, 65%~92% B, 14.5~18.0 min, 92% B。每针洗脱时长为 18 min,各氨基酸出峰位置如图 1 所示。

离子检测方式:多反应离子检测(Multiple reactive monitoring, MRM);扫描方式:正离子(positive)模式;离子化方式:电喷雾离子化,喷雾电压 5 500 V;喷雾气(Gas1):50 psi;辅助加热气(Gas2):50 psi;碰撞气(CAD):Medium,质谱参数见表 2。



注:A:对氨基苯甲酸;B:异亮氨酸;C:苯丙氨酸;D:色氨酸;E:亮氨酸;F:蛋氨酸;G:缬氨酸;H:脯氨酸;I:γ-氨基丁酸;J:酪氨酸;K:丙氨酸;L:反式4-羧基脯氨酸;M:苏氨酸;N:甘氨酸;O:天冬酰胺;P:丝氨酸;Q:谷氨酸;R:瓜氨酸;S:天冬氨酸;T:高胱氨酸;U:精氨酸;V:组氨酸;W:赖氨酸;X:胱氨酸

图1 23种氨基酸的多反应监测模式总离子流色谱图

Figure 1 Multiple response monitoring model total ion flow chromatogram of 23 amino acids

表2 23种氨基酸和内标分析的质谱参数

Table 2 Mass spectral parameters for the analysis of 23 amino acids and internal standards

No.	成分	Q1/Q3	DP(V)	CE(eV)
1	Asp	134.1/73.9	67.13	13.14
2	Cys-Cys	241.1/152.1	45.90	16.52
3	Ser	106.1/60.2	46.94	12.42
4	Val	118.0/72.3	39.33	12.37
5	Ala	90.1/44.2	130.00	13.00
6	Trp	205.2/188.1	46.48	10.70
7	Glu	148.0/84.1	54.14	19.84
8	Gly	76.2/30.2	40.70	16.70
9	Tyr	182.2/136.1	42.71	15.05
10	Met	150.1/56.1	45.69	18.72
11	Leu	132.1/86.1	56.16	11.41
12	Ile	132.2/86.0	47.39	12.84
13	Phe	166.2/120.2	51.13	14.79
14	Asn	133.2/74.1	43.20	19.00
15	Thr	120.0/56.1	57.00	18.00
16	Arg	175.2/70.2	80.00	22.00
17	Lys	147.2/84.1	62.48	17.51
18	His	156.1/110.0	76.04	17.71
19	GABA	104.3/87.1	38.00	11.00
20	CCP	176.0/159.0	130.00	14.00
21	Pro	116.0/70.2	58.35	18.70
22	H-Hyp-OH	132.0/86.1	52.59	16.71
23	Hcy	269.2/136.1	22.14	12.24
24	PABA*	138.0/77.20	81.96	24.31

注:*代表内标化合物

1.5 血清样本前处理

取小鼠血清 30 μL,按 1:3 的体积比加入含 200 ng/mL 对氨基苯甲酸的甲醇溶液,涡旋混匀 10 min,在 4 °C 条件下 12 000 r/min,离心 10 min 沉淀蛋白,取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.6 统计学分析

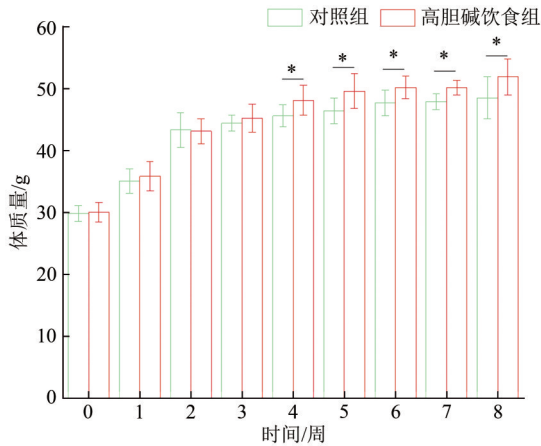
采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

采用 SIMCA-P14.1 软件进行代谢组学分析。通过主成分分析(Principal component analysis, PCA)在无监督模式下对两组进行分类以及降维,了解数据的集中趋势以及离群值。在监督模式下的正交偏最小二乘-判别分析(Orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)进一步探究两组数据间氨基酸的分布特点,建立分类模型以及计算代谢物的变量重要性值(Important variable method, VIP)。采用置换检验评估拟合优度参数(R^2)和预测能力参数(Q^2),对 OPLS-DA 建立的预测模型进行验证。以 $VIP > 1, P < 0.05$ 为条件筛选差异代谢物氨基酸。

2 结果

2.1 高胆碱饮食对小鼠体重的影响

如图 2 所示,各组小鼠初始体质量较均一,体质量随着时间的增长而增加,第 4 周后,高胆碱饮食组小鼠体质量与对照组存在差异,且具有统计学意义($P < 0.05$);对照组小鼠行为活跃,被毛平整光滑,高胆碱饮食组小鼠被毛失去光泽。说明长期摄入高胆碱饮食致小鼠体质量增加,且对小鼠健康产生一定的影响。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$

图2 高胆碱饮食对小鼠体质量的影响

Figure 2 Effect of high choline diet on body weight of mice

2.2 高胆碱饮食对小鼠血清氨基酸水平的影响

使用 Origin 2021b 软件对血清中氨基酸的组成比例进行分析,结果如图 3 所示,高胆碱饮食显著影响各氨基酸在血清中的组成比例,其中支链氨基酸(亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)与芳香族氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)的比值在对照组和高胆碱饮食组分别为 2.75 和 3.49,高胆碱饮食组较对照组显著升高。通过使用内标化合物和氨基酸标准曲线对血清中氨基酸进行绝对定量分析,结果如表 3 所示。与对照组相比,高胆碱饮食组小鼠血浆脯氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、胱氨酸、丝氨酸、丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、反式 4-羟基脯氨酸和支链氨基酸水平显著升高,然

而赖氨酸、瓜氨酸水平显著降低,组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

表3 高胆碱饮食小鼠与正常小鼠血清氨基酸和胆碱含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the contents of serum amino acids and choline with high choline diet and normal ($\bar{x} \pm s$)

氨基酸	对照组/ ($\mu\text{mol/L}$, $n=10$)	高胆碱饮食组/ ($\mu\text{mol/L}$, $n=10$)	VIP
Asp	20.49±2.04	22.17±3.10	0.04
Cys-Cys	8.56±1.41	11.93±0.81 ^{###}	0.39
Ser	68.85±8.97	94.60±13.73 ^{###}	0.32
Val	129.86±10.54	161.95±16.54 ^{###}	1.16
Ala	1396.94±230.24	2206.59±555.11 ^{###}	0.39
Trp	51.19±9.44	53.52±9.52	0.82
Glu	48.73±6.15	74.00±9.34 ^{###}	0.40
Gly	103.37±17.12	139.98±42.59 [*]	0.06
Tyr	2.39±1.03	2.13±0.92	0.10
Met	21.29±3.48	24.73±1.80 [*]	0.12
Leu	68.59±4.06	113.04±14.64 ^{###}	2.04
Ile	34.20±2.71	72.59±10.42 ^{###}	2.19
Phe	31.00±4.86	43.82±7.00 ^{###}	1.33
Asn	15.62±2.12	23.16±2.15 ^{###}	0.14
Thr	83.57±11.90	125.47±9.76 ^{###}	0.32
Arg	77.29±12.12	89.20±4.00 [#]	1.25
Lys	225.54±22.69	135.60±23.95 ^{###}	1.18
His	41.40±6.92	71.88±11.83 ^{###}	1.01
GABA	7.45±0.25	7.51±0.21	0.01
CCP	102.29±14.88	82.14±6.14 [#]	0.34
Pro	65.97±8.40	115.51±19.19 ^{###}	2.31
H-Hyp-OH	30.72±7.05	50.18±7.13 ^{###}	0.31
Hcy	11.42±0.41	11.44±0.03	0.01
Choline	5.33±1.24	9.25±0.58 ^{###}	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$

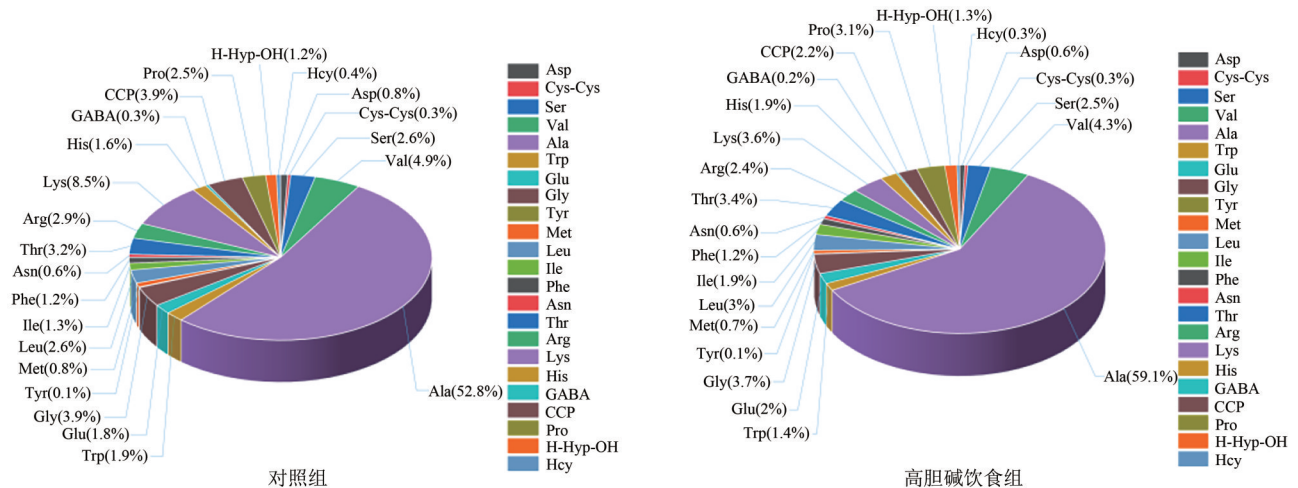


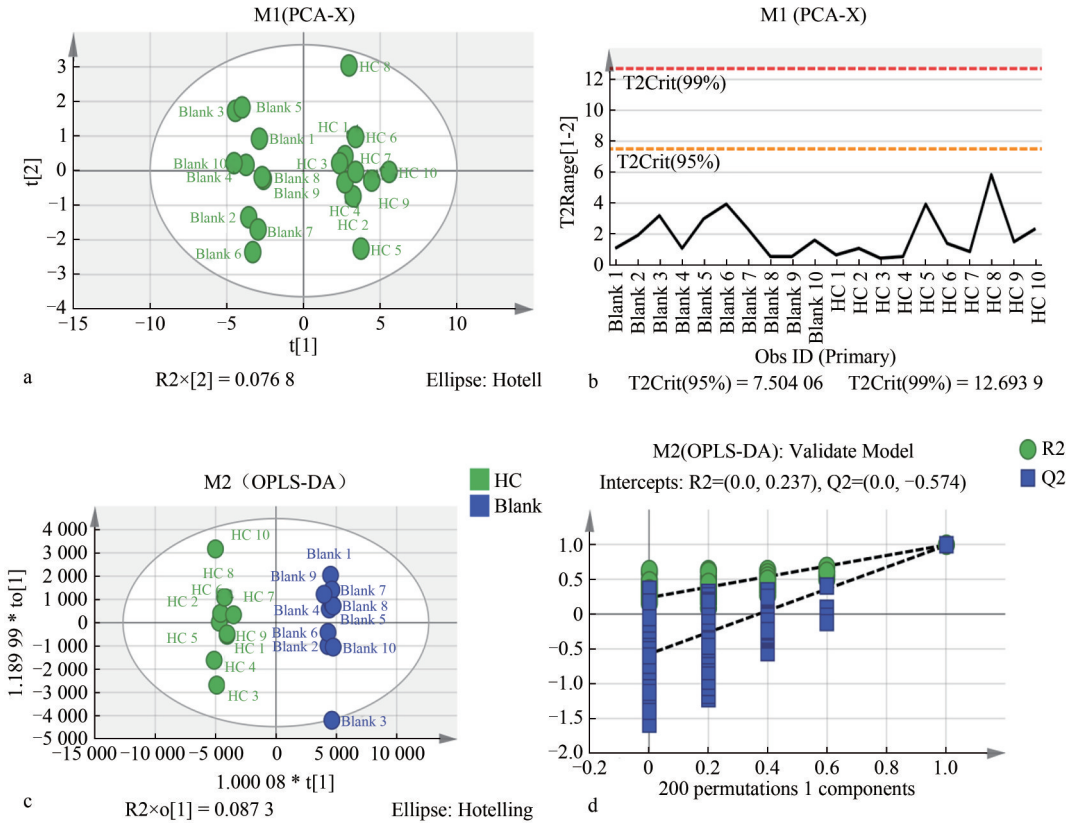
图3 高胆碱饮食对血清中氨基酸占比的影响

Figure 3 Effect of high choline diet on the percentage of amino acids in serum

2.2.1 氨基酸的多元统计分析

对 23 种氨基酸进行多元统计分析,结果如图 4 所示。在无监督模式下 PCA 分析图(图 4a)显示,血清氨基酸聚类分布在高胆碱饮食组和空白组间分别集中,即氨基酸代谢水平可较好地地区分两组样

本,表明高胆碱饮食后氨基酸代谢发生显著改变。95% Hotelling's T² 置信区间线图(图 4b)未发现超出区间外的离群值。进一步在有监督模式下,采用正交偏最小二乘判别分析两组氨基酸代谢特征,如图 4c 所示,在该模式下更好的体现了高胆碱饮食



注:a:PCA散点得分图,图中Blank和HC分别代表对照组和高胆碱饮食组样本;b:Hotelling's T2置信区间线图;c:OPLS-DA散点得分图,图中Blank和HC分别代表对照组和高胆碱饮食组样本;d:置换检验图

图4 血清氨基酸的主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析

Figure 4 Principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis of serum amino acids

组和对照组氨基酸代谢的差异。OPLS-DA模型的置换检验图(d)显示R2在Y轴的截距小于0.4,Q2在Y轴的截距小于0.05,未出现过拟合现象,表明该模型构建有效(R2=0.237,Q2=-0.574)。根据OPLS-DA模型计算各氨基酸的VIP值,结果见表3。

2.2.2 差异代谢物分析

在OPLS-DA模型下,根据VIP>1、P<0.05(表3),结合S-plots图(图5)可以筛选出8种代谢差异最显著的氨基酸,即精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸,为高胆碱饮食引起氨基酸代谢异常的生物标志物。

3 讨论

本研究对高胆碱饮食小鼠血清氨基酸含量进行了测定,结果显示,高胆碱饮食导致小鼠体内多种氨基酸代谢异常。PCA和OPLS-DA多元统计分析显示,氨基酸有效的对高胆碱饮食组和对照组进行区分。通过以VIP>1和P<0.05为条件,筛选出精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸8个氨基酸代谢差异标志物,可作为区分高胆碱饮食和正常饮食的关键因素。

氨基酸作为人体必需营养物质,参与多种病理生理进程,维持机体正常代谢。精氨酸是机体内的一种条件必需氨基酸^[21],在合成NO、调节血压和伤口愈合中发挥至关重要的作用,被称为血管动态平衡的关键调节剂^[22]。在生长发育阶段或某些疾病状态下,精氨酸合成能力低下,精氨酸/NO代谢途径代谢失衡,产生精氨酸不能满足自身需求,需要通过食物或蛋白质转化补充。精氨酸作用于内皮细胞代谢产生NO,具有舒张血管,抑制血小板的聚集和平滑肌增生,减少主动脉内膜增厚,降低心脏输出负荷的作用^[23]。瓜氨酸和鸟氨酸是合成精氨酸的内源性前体物质,先是谷氨酸与脯氨酸分别在二氢吡咯-5-羧酸(P5C)合成酶或脯氨酸氧化酶的作用下生成P5C,P5C在鸟氨酸转氨酶作用下形成鸟氨酸,鸟氨酸经过鸟氨酸氨基甲酰转移酶作用下生成瓜氨酸,最终瓜氨酸在精氨酸琥珀酸合成酶和精氨酸琥珀酸酯裂解酶的连续作用下形成精氨酸^[24]。在本研究中发现高胆碱饮食组精氨酸显著升高,而精氨酸的前体氨基酸瓜氨酸显著降低,可能是由于高胆碱饮食破坏血管NO动态平衡,进而导致精氨酸水平应激性升高。因此,不难预测长期高胆碱饮食将会促进瓜氨酸进一步减少,一方面导致精氨酸

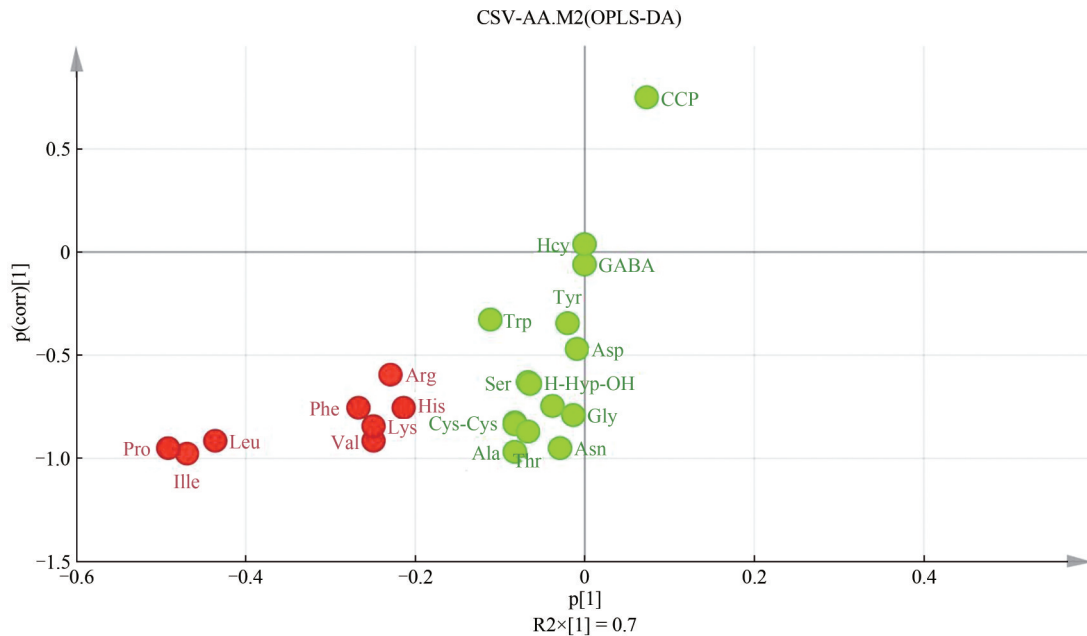


图5 氨基酸在 OPLS-DA 模型下的 S-plots 分析

Figure 5 S-plots analysis of amino acids under OPLS-DA model

的耗竭,另一方面也会导致机体内部 NO 和一氧化氮合酶(eNO)活性降低,进一步加重血管内皮损伤^[25]。

亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸统称为支链氨基酸(Branched chain amino acid,BCAA)。越来越多证据表明,BCAA 是心血管代谢疾病的生物标志物,它们的异常积累参与了心血管疾病的发病过程,主要与激活 mTOR 信号通路有关,导致活性氧和线粒体功能障碍,胰岛素抵抗,加重心肌梗死,引起心力衰竭和高血压。此外,BCAA 积累还可增强 Caspase-3 活性,导致氧化应激,加重心肌缺血再灌注损伤^[26-29]。本研究中高胆碱饮食导致 BCAA 异常积累,具有激活 mTOR 信号通路和增强 Caspase-3 活性,诱发心血管疾病的风险,这一发现将为高胆碱饮食致心血管疾病领域进行补充。

然而,高胆碱饮食引起 BCAA 积累的潜在机制尚未报道,近期研究发现,高胆碱饮食可影响肠道微生物生态,增加梭菌属、埃希氏菌属等菌群丰度,引起肠道菌群失调^[30-32],肠道微生物及其代谢产物与维持氨基酸体内平衡密切相关,梭菌属、拟杆菌属、韦永氏球菌属、埃氏巨型球菌等肠道微生物可新合成一些营养必需氨基酸^[33]。本研究中高胆碱饮食组 BCAA 异常积累,可能是通过影响肠道中与 BCAA 代谢相关肠道微生物所致。然而,高胆碱饮食是否是通过影响支链氨基酸代谢菌群,进而与心血管疾病紧密联系,有待进一步深入研究。

研究表明,高胆碱饮食促进机体内源性活性氧的积累,进而引起氧化应激反应造成肝损伤^[25]。酪

氨酸、苯丙氨酸和色氨酸为芳香族氨基酸(Aromatic amino acid,AAA),BCAA 与 AAA 的比值简称为支芳比,其测定对临床诊断肝炎、肝硬化和了解肝损伤具有重要意义。肝癌或肝功能不全的患者血浆中游离氨基酸水平普遍升高,且酪氨酸转氨酶活性降低,芳香族氨基酸在肝脏中代谢去路受阻,在血浆中升高趋势最显著;此外,由于肝功能不全,胰岛素反馈作用使胰高血糖素水平升高,机体处于高分解代谢状态,进一步促进 AAA 的积累,由于 BCAA 在肝外中的肌肉或脂肪组织中代谢,不受肝脏的影响,血浆中 BCAA 水平处于正常或略升高状态,且在肝脏不能降低胰岛素水平时,BCAA 可作为能源物质被摄取和利用,以维持机体正常代谢^[10]。支芳比在不同肝功能不全患者中大小排序依次为:健康人>肝癌患者>慢性肝炎患者>肝硬化患者^[34-35]。GUO 等^[36]研究表明,提高肝功能患者血清中的支芳比,利于纠正患者血清氨基酸谱紊乱,对肝功能不全患者具有显著治疗作用。本研究中高胆碱饮食组 BCAA 和 AAA 水平均有升高趋势,但 BCAA 升高趋势大于 AAA,表明高胆碱饮食可能会导致 BCAA 异常积累进而引起肝损伤^[37],但可能高胆碱饮食所造成的肝损伤作用小于升高支芳比带来的保护作用,以至于本实验中高胆碱饮食组支芳比升高。

综上所述,本研究筛选出精氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸等 8 种氨基酸,可作为区分高胆碱饮食与正常饮食代谢差异的生物标志物,同时为本课题组探究高胆碱

饮食与心血管疾病的关系提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] ZHENG F, LI R, TANG K N, et al. The physiological function of CHO and the regulatory effect of RPC on perinatal dairy cows [J]. *Feed Industry*, 2019, 40(5): 48-51.
- [2] ZEISEL S H, KLATT K C, CAUDILL M A. Choline[J]. *Advances in Nutrition*, 2018, 9(1): 58-60.
- [3] BLUSZTAJN J K, SLACK B E, MELLOTT T J. Neuroprotective actions of dietary choline[J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 815.
- [4] 邢立东, 周明. 胆碱在动物中应用效果的研究进展. *饲料与畜牧*, 2014(7): 39-43.
XING L D, ZHOU M. Research progress on the effect of choline application in animals[J]. *Feed and Animal Husbandry*, 2014(7): 39-43.
- [5] KRATZING C C, PERRY J J, ELLWAY C P, et al. Kidney function during choline deficiency[J]. *Pathology*. 1972, 4(1): 53-59.
- [6] HABERL E M, POHL R, REIN-FISCHBOECK L, et al. Hepatic lipid profile in mice fed a choline-deficient, low-methionine diet resembles human non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2020, 19(1): 250.
- [7] MUDD A T, ALEXANDER L S, JOHNSON S K, et al. Perinatal dietary choline deficiency in sows influences concentrations of choline metabolites, fatty acids, and amino acids in milk throughout lactation[J]. *The Journal of Nutrition*, 2016, 146(11): 2216-2223.
- [8] JANEIRO M H, RAMÍREZ M J, MILAGRO F I, et al. Implication of trimethylamine N-oxide (TMAO) in disease: Potential biomarker or new therapeutic target[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1398.
- [9] ZHANG W C, MIKEDA A, ZUCKERMAN J, et al. Inhibition of microbiota-dependent TMAO production attenuates chronic kidney disease in mice[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 518.
- [10] SHUAI W, WEN J Y, LI X L, et al. High-choline diet exacerbates cardiac dysfunction, fibrosis, and inflammation in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Journal of Cardiac Failure*, 2020, 26(8): 694-702.
- [11] ARIAS N, ARBOLEYA S, ALLISON J, et al. The relationship between choline bioavailability from diet, intestinal microbiota composition, and its modulation of human diseases[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2340.
- [12] CHEN M L, YI L, ZHANG Y, et al. Resveratrol attenuates trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis by regulating TMAO synthesis and bile acid metabolism via remodeling of the gut microbiota[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e02210-e02215.
- [13] KOETH R A, WANG Z N, LEVISON B S, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(5): 576-585.
- [14] YANG F, LUO S H, WAN S Q, et al. Ligustrum robustum intervention improves colonic barrier function and reduces intestinal inflammatory response in mice fed with high-choline diet[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2021, 48(2): 316-320.
- [15] HU X M, GUO F F. Amino acid sensing in metabolic homeostasis and health[J]. *Endocrine Reviews*, 2020, 42(1): 56-76.
- [16] CHEN R, HAN S, LIU X F, et al. Perturbations in amino acids and metabolic pathways in osteoarthritis patients determined by targeted metabolomics analysis [J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1085: 54-62.
- [17] CALDERÓN-SANTIAGO M, PRIEGO-CAPOTE F, GALACHE-OSUNA J G, et al. Determination of essential amino acids in human serum by a targeting method based on automated SPE-LC-MS/MS: discrimination between atherosclerotic patients [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 70: 476-484.
- [18] WANG Q H, WEN Y, XIA T Y, et al. Quantification of 18 amino acids in human plasma: Application in renal transplant patient plasma by targeted UHPLC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(13): 1337-1351.
- [19] ROTH E, DRUML W. Plasma amino acid imbalance: Dangerous in chronic diseases[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2011, 14(1): 67-74.
- [20] GAR C, ROTTENKOLBER M, PREHN C, et al. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes [J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2018, 55(1): 21-32.
- [21] MORRIS C R, HAMILTON-REEVES J, MARTINDALE R G, et al. Acquired amino acid deficiencies: A focus on arginine and glutamine[J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2017, 32(1_suppl): 30S-47S.
- [22] ZARIC B L, RADOVANOVIC J N, GLUVIC Z, et al. Atherosclerosis linked to aberrant amino acid metabolism and immunosuppressive amino acid catabolizing enzymes [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 551758.
- [23] NITTYNEN L, NURMINEN M L, KORPELA R, et al. Role of arginine, taurine and homocysteine in cardiovascular diseases [J]. *Annals of Medicine*, 1999, 31(5): 318-326.
- [24] WU C, LIU J F, KONG X F, et al. Research advances on endogenous arginine synthesis in piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(1): 5-9.
- [25] 郭建军. 绞股蓝茶皂苷提取物对高胆碱饮食诱导的小鼠血管内皮和肝损伤的保护作用[D]. 陕西师范大学, 2016.
GUO J J. Protective effect of Gypenoside extract on vascular endothelial and liver injury induced by high choline diet in mice [J]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2016.
- [26] NEINAST M, MURASHIGE D, ARANY Z. Branched chain amino acids[J]. *Annual Review of Physiology*, 2019, 81: 139-164.
- [27] LI S L, WANG Z H. Research progress of effect of branched-chain amino acids on cardiovascular diseases [J]. *Guangxi Medical Journal*, 2021, 43(18): 2235-2238.
- [28] LIAN K, GUO X, WANG Q, et al. PP2Cm overexpression alleviates MI/R injury mediated by a BCAA catabolism defect and oxidative stress in diabetic mice [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 866: 172796.
- [29] WHITE P J, NEWGARD C B. Branched-chain amino acids in disease[J]. *Science*, 2019, 363(6427): 582-583.
- [30] YU H N, HUANG H Y, LI R, et al. Gut microbiota and metabolism in mice with choline dietary stress [J]. *Journal of*

- Zhejiang University of Technology, 2019, 47(6): 679-684.
- [31] KALNINS G, KUKA J, GRINBERGA S, et al. Structure and function of CutC choline lyase from human microbiota bacterium *Klebsiella pneumoniae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(35): 21732-21740.
- [32] DALLA VIA A, GARGARI G, TAVERNITI V, et al. Urinary TMAO levels are associated with the taxonomic composition of the gut microbiota and with the choline *TMA*-lyase gene (*cutC*) harbored by Enterobacteriaceae[J]. Nutrients, 2019, 12(1): 62.
- [33] LIN R, LIU W T, PIAO M Y, et al. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism [J]. Amino Acids, 2017, 49(12): 2083-2090.
- [34] 马亚楠, 刘树业. 生理体液法分析肝硬化及肝癌患者的血清氨基酸变化[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(11): 2088-2090. MA Y N, LIU S Y. The changes of serum amino acids in patients with liver cirrhosis and liver cancer were analyzed by physiological body fluid method [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2012, 16(11): 2088-2090.
- [35] LI X. Experimental research on the amino acids in liver disease with physiological fluid method [J]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2010.
- [36] GUO J S, ZHAO F J, CHEN H Z, et al. Application of soybean high branched-chain and low aromatic amino acid mixture in treatment of hepatic dysfunction [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 1990(2): 127-133.
- [37] ZHENYUKH O, GONZÁLEZ-AMOR M, RODRIGUES-DIEZ R R, et al. Branched-chain amino acids promote endothelial dysfunction through increased reactive oxygen species generation and inflammation [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(10): 4948-4962.

《中国食品卫生杂志》顾问及第五届编委会名单

顾问: 陈君石、黄璐琦、江桂斌、李林、沈建忠、吴清平、Jianghong Meng(美国)、Patrick Wall(爱尔兰)、Samuel Godefroy(加拿大)、Gerald Moy(美国)、Paul Brent(澳大利亚)、Marta Hugas(比利时)、Yukikko Yamada(日本)、Tom Heilandt(德国)、Andreas Hensel(德国)、Christopher Elliott(英国)、Christine Nelleman(丹麦)

主任委员: 卢江

副主任委员: 王竹天、李宁、孙长颢、王涛、谢剑炜、应浩、丁钢强、张峰、张永慧

主编: 吴永宁

编委(按姓氏笔画排序)

丁钢强(中国疾病预防控制中心营养与健康所)

于洲(国家食品安全风险评估中心)

于维森(青岛市疾病预防控制中心)

马宁(国家食品安全风险评估中心)

马会来(中国疾病预防控制中心)

马群飞(福建省疾病预防控制中心)

王君(国家食品安全风险评估中心)

王茵(浙江省医学科学院)

王涛(浙江清华长三角研究院)

王硕(南开大学医学院)

王慧(上海交通大学公共卫生学院)

王永芳(国家卫生健康委员会卫生健康监督中心)

王竹天(国家食品安全风险评估中心)

王松雪(国家粮食和物资储备局科学研究院)

王晓英(中国动物疫病预防控制中心)

计融(国家食品安全风险评估中心)

邓小玲(广东省疾病预防控制中心)

卢江(国家食品安全风险评估中心)

匡华(江南大学食品学院)

朱心强(浙江大学医学院)

应浩(中国科学院上海营养与健康所)

张丁(河南省疾病预防控制中心)

张峰(中国检验检疫科学研究院)

张卫兵(南通市疾病预防控制中心)

张立实(四川大学华西公共卫生学院)

张永慧(广东省疾病预防控制中心)

张旭东(国家卫生健康委员会医院管理研究所)

张剑峰(黑龙江省疾病预防控制中心)

张朝晖(中国海关科学技术研究中心)

张惠媛(中国海关科学技术研究中心)

张遵真(四川大学华西公共卫生学院)

陈波(湖南师范大学化学化工学院)

陈颖(中国检验检疫科学研究院)

陈卫东(广东省市场监督管理局)

邵兵(北京市疾病预防控制中心)

武爱波(中国科学院上海营养与健康所)

赵舰(重庆市疾病预防控制中心)

赵云峰(国家食品安全风险评估中心)

赵贵明(中国检验检疫科学研究院)

钟凯(科信食品与营养信息交流中心)

(下转第842页)