

# 非酒精性脂肪肝大鼠血清氨基酸谱的改变及分析

叶 春<sup>1</sup>, 房 宇<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学体育科学学院, 江苏 南京 210023)

(2. 南京大学医学院附属鼓楼医院急诊科, 江苏 南京 210093)

**[摘要]** 通过分析高脂饲料喂养导致的非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠血清中氨基酸谱的变化, 初步探讨非酒精性脂肪肝对机体氨基酸代谢的影响. 20只大鼠随机分为高脂组和正常组, 高脂组大鼠采用高脂饲料喂养. 24周后, 两组大鼠取肝脏作病理分析, 取血测定血液中ALT、AST、GLU、chol、TG、HDL、LDL、CP, 并采用HPLC测定血清中游离氨基酸谱, 两组进行对照分析. 高脂组大鼠肝脏出现明显的脂肪性病变, 其血清中除牛磺酸较正常组显著下降( $p < 0.01$ )以外, 其余氨基酸均较正常组升高. 其中, 天冬酰胺、鸟氨酸、酪氨酸、瓜氨酸、色氨酸、苯丙氨酸显著升高( $p < 0.001$ ); 天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、谷氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸升高, 但没有显著性差异( $p > 0.05$ ); 支链氨基酸和芳香族氨基酸明显增高( $p < 0.05$ ), Fischer(支/芳)明显下降( $p < 0.05$ ). 非酒精性脂肪肝大鼠血清中氨基酸升高可能与胰岛素抵抗有关, Fischer(支/芳)比值下降与肝细胞损伤有关. 而血清中鸟氨酸、瓜氨酸和牛磺酸浓度的变化具有特征性, 在临床上对NAFLD的诊断和预后以及进一步研究其机理有潜在的价值.

**[关键词]** 非酒精性脂肪肝, 血清, 氨基酸

**[中图分类号]** G804.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2016)01-0090-05

## Changes and Analysis of Serum Free Aminogram in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease(NAFLD) Rats

Ye Chun<sup>1</sup>, Fang Yu<sup>2</sup>

(1. Department of Physical Education, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Emergency Center of Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** To elucidate the characteristic changes of serum amino-acid metabolism in NAFLD rats. Twenty SD rats were randomly divided into two groups, standard diet fed group (con) and high fat diet fed group (HF). The whole duration of the study were 24 weeks, the serum concentration of free amino-acids and ALT, AST, Glu, Chol, TG, HDL, LDL, CP, the morphological changes of liver was detected. The HF rats exhibited severe steatohepatitis; the Asn, Cir, Cit, Tyr, Trp and Phe in the serum of HF group were significantly higher than that in the control group ( $p < 0.001$ ), the levels of most other amino acids tended to increased although there was no significant difference compared with control. Thus the Fischer (BCAA/AAA) ratio was reduced ( $p < 0.05$ ). The Tau was significantly lower than that in the control ( $p < 0.001$ ). Our results suggested the increase of HF rats serum free amino acids were related to the insulin resistance and the decreased BACC/AAA was related to the liver cell injury degree. The changed level of serum Cit, Cir and Tau may have more means as potential marker for the early diagnosis of NAFLD and in-depth research.

**Key words:** non-alcoholic fatty liver disease, serum, amino-acids

随着人们生活水平的提高和生活方式的改变, 非酒精性脂肪肝 NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) 发病率逐年增加. 据报道在美国大约有 24% 的成年人和 3%~9% 的儿童患有非酒精性脂肪肝<sup>[1]</sup>. 非酒精性脂肪肝是指排除过量饮酒和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪性变为主要特

收稿日期: 2013-04-07.

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(09KJB340001).

通讯联系人: 叶春, 博士, 讲师, 研究方向: 运动生化. E-mail: 12144@njnu.edu.cn

征的病理综合征<sup>[2]</sup>.经过多年的研究,越来越多的学者认为非酒精性脂肪肝是代谢综合症的一种.通过该病症能准确预测患者罹患糖尿病、心血管疾病、脑卒中、肝硬化和癌症的可能性<sup>[3]</sup>.因此,了解非酒精性脂肪肝对机体代谢的影响意义重大.

研究认为,由于长期高热量食物摄入与低消耗导致脂肪细胞不堪重负,出现胰岛素抵抗,部分的脂肪溢出进入其他非脂肪组织如骨骼肌、肝脏之中<sup>[4]</sup>.肝脏细胞内的脂肪沉积增加,对肝细胞产生脂肪毒性作用,严重影响肝细胞功能<sup>[5]</sup>.肝脏是人体糖、蛋白质、脂肪代谢的中心.肝功能受损后会使这三大能量物质的代谢出现紊乱,反过来又会进一步加重非酒精性脂肪肝,形成恶性循环<sup>[6-7]</sup>.目前,国内外针对 NAFLD 代谢紊乱的研究主要集中在脂肪代谢和糖代谢<sup>[8-9]</sup>,而针对蛋白质代谢的研究鲜有报道.本文以非酒精性脂肪肝大鼠血清中的氨基酸谱为研究对象,初步探讨非酒精性脂肪肝对蛋白质代谢的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 动物饲养和管理

实验采用纯系雄性 SD 大鼠 20 只,体重 180 g~210 g,由南京中医药大学实验动物中心提供.20 只大鼠随机分为 2 组:正常组和高脂组,每组 10 只.正常组采用国家标准啮齿类动物混合饲料喂养;高脂组采用高脂饲料(正常饲料加 10%的猪油、5%的胆固醇和 5%蛋黄)喂养.各组分笼饲养,每笼 5 只,自由摄食与饮水,喂养 24 周,每周称取体重.24 周结束后空腹 12 h,以 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,留取血清和肝脏标本.

### 1.2 指标测定

1.2.1 测定大鼠体重和肝指数(肝湿重/体重 $\times 100\%$ ).

1.2.2 采用日立 7600-020 全自动生化仪测定血清中 ALT、AST、GLU、chol、TG、HDL、LDL 和 CP.

1.2.3 肝组织

经甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,在光镜下观察.以肝小叶内未见脂滴肝细胞为阴性,脂滴肝细胞占肝细胞总数 $<1/3$  为(+), $1/3\sim 2/3$  为(++), $>2/3$  为(+++).几乎均呈脂滴肝细胞为(++++).

1.2.4 血清中氨基酸测定方法

样品去蛋白,离心取上清液待用.采用邻苯二甲醛进行柱前自动衍生化,自动进样 1  $\mu\text{L}$ ,用 C18 色谱柱分离,紫外波长 338 nm 检测,用 Agilent 提供的混合对照品进行定性及外标法定量.仪器为 Agilent 1200 液相色谱仪,包含 G1367C 自动进样器、G1312B 二元梯度泵、G1316B 柱温箱、G1315C 型号 DAD 检测器.色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse AAA 3.0 $\times$ 150 mm 3.5  $\mu\text{m}$ .

1.2.5 统计学处理

所有数据均以(均数 $\pm$ 标准差)表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学处理,按  $t$  检验分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 大鼠的体重和肝指数

结果见表 1:高脂组体重和肝指数与正常组相比显著升高( $P<0.001$ ).结果提示长期高脂饲料喂养使大鼠体重明显增加,肝脏明显肿大.

### 2.2 血清 ALT、AST、GLU、chol、TG、HDL、LDL 和 CP 的变化

结果见表 2,高脂组 GLU、CHOL 和 LDL 与正常组相比显著性升高( $P<0.01$ );AST 和 CP 显著升高( $P<0.05$ );ALT、TG 和 HDL 略有升高( $P>0.05$ ).结果提示高脂组大鼠肝功能受损,血糖、血液中脂肪代谢相关指标均增高,糖代谢和脂肪代谢出现一定程度的紊乱.

表 1 大鼠体重和肝指数

Table 1 The changes of weight and coefficient of live

	体重/g	肝指数/%
高脂组	647.00 $\pm$ 54.16***	3.60 $\pm$ 0.53***
正常组	536.44 $\pm$ 29.04	2.36 $\pm$ 0.39

注:与正常组比较\*\*\* $p<0.001$ .

表2 血清ALT、AST、GLU、chol、TG、HDL、LDL和CP水平  
Table 2 Levels of serum ALT、AST、GLU、chol、TG、HDL、LDL and CP

	ALT	AST	GLU	Chol	TG	HDL	LDL	CP
正常组	28.67±5.2	147±34.34	3.38±0.383	2.29±0.41	1.81±0.3	0.94±0.28	0.35±0.1	0.346±0.06
高脂组	33.4±6.02	193±20.83*	4.35±0.3**	3.19±0.6**	2.0±0.45	0.99±0.22	0.61±0.18**	0.42±0.06*

注:与正常组比较\*\* $p<0.01$ ,\* $p<0.05$ .

2.3 肝脏的病理学变化

见图1、图2,正常组肝脏未见病理学变化.高脂组10只大鼠的肝脏均见弥散性肝细胞脂肪变性(+++),汇管区可见少量炎性细胞(+),肝脏脂肪变性程度与正常组相比有显著性差异( $p<0.01$ ).结果提示:高脂组大鼠肝细胞出现明显脂肪性变,并出现轻度非酒精性脂肪肝的病理表现.

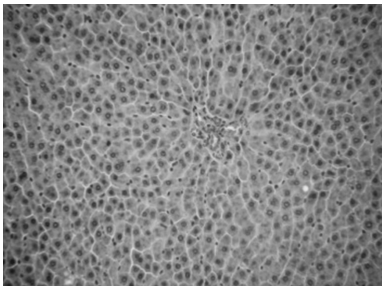


图1 正常组肝脏

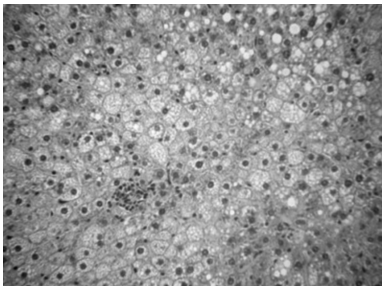


图2 高脂组肝脏

Fig 1 Light microscopy of liver lobular architecture in control group(×100) Fig 2 Fat degeneration in high fat diet fed group(×100)

2.4 血清中氨基酸谱的变化

结果见表3,血清中除牛磺酸较正常组显著下降( $p<0.01$ )以外,其余氨基酸均较正常组升高.其中,天冬酰胺、鸟氨酸、酪氨酸、瓜氨酸、色氨酸、苯丙氨酸显著升高( $p<0.001$ );天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、谷氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸升高,但没有显著性差异( $p>0.05$ );支链氨基酸和芳香族氨基酸明显增高( $p<0.05$ ),Fischer(支/芳)明显下降( $p<0.05$ ).

表3 血液中游离氨基酸浓度、支链氨基酸、芳香氨基酸和Fischer(支/芳)  
Table 3 Levels of serum free amino acids、BCAA、AAA and Fisher

Table 3 Levels of serum free amino acids 、BCAA、AAA and Fisher				mg·100 mL <sup>-1</sup>			
	正常组	高脂组	<i>P</i> 值		正常组	高脂组	<i>P</i> 值
天冬氨酸	175.41±21.59	179.20±13.54	<i>p</i> >0.05	酪氨酸	107.06±11.66	137.34±19.26	<i>p</i> <0.001
谷氨酸	333.23±93.62	440.84±143.80	<i>p</i> >0.05	缬氨酸	241.34±38.22	275.45±48.39	<i>p</i> >0.05
天冬酰胺	100.93±10.78	122.51±14.94	<i>p</i> <0.001	蛋氨酸	97.46±7.55	95.80±14.19	<i>p</i> >0.05
丝氨酸	374.78±38.68	430.74±62.88	<i>p</i> >0.05	色氨酸	107.58±18.83	158.73±27.71	<i>p</i> <0.001
组氨酸	42.23±8.32	49.24±1 052	<i>p</i> >0.05	苯丙氨酸	98.27±8.27	123.89±22.00	<i>p</i> <0.001
甘氨酸	453.64±57.85	517.17±72.21	<i>p</i> >0.05	异亮氨酸	148.41±16.09	154.31±27.21	<i>p</i> >0.05
苏氨酸	376.79±42.72	400.89±57.24	<i>p</i> >0.05	瓜氨酸	48.82±7.33	88.75±16.74	<i>p</i> <0.001
鸟氨酸	70.26±8.48	94.48±7.60	<i>p</i> <0.001	亮氨酸	173.25±19.74	191.51±24.81	<i>p</i> >0.05
精氨酸	270.79±31.26	288.37±53.74	<i>p</i> >0.05	赖氨酸	442.73±41.00	503.37±98.01	<i>p</i> >0.05
谷氨酰胺	780.18±84.78	879.39±135.15	<i>p</i> >0.05	支链氨基酸	563±22.4	621.27±33.54	<i>p</i> <0.05
丙氨酸	712.93±51.09	721.92±99.99	<i>p</i> >0.05	芳香氨基酸	312.91±12.95	419.96±22.90	<i>p</i> <0.05
牛磺酸	635.67±57.49	539.99±34.26	<i>p</i> <0.001	Fischer(支/芳)	1.8	1.48	<i>p</i> <0.05

3 讨论

近年来,非酒精性脂肪肝(NAFLD)发病率呈迅速上升趋势,主要原因是肥胖和Ⅱ型糖尿病的流行.尽管NAFLD属于非恶性疾病,但是研究表明大约有40%的NAFLD患者会转变成非酒精性肝炎(NASH),NASH患者中又有25%的人恶化为肝纤维化甚至肝硬化<sup>[10]</sup>.NAFLD常常伴有中心性肥胖、Ⅱ型糖尿病以及高血脂、高血压等疾病,很多学者认为NAFLD是代谢综合征在肝脏的一种病理表现<sup>[11]</sup>.因此,

了解 NAFLD 导致蛋白质、脂肪和糖三大能量物质代谢失衡的特点及其发生机理,对于防治 NAFLD 具有重要的临床意义。目前,这方面的研究主要集中在脂肪和糖的代谢紊乱上,而针对蛋白质代谢紊乱的研究则很少见。

### 3.1 国内外学者

针对糖尿病和肝源性糖尿病血清中氨基酸谱的变化有较多研究。糖尿病影响了机体的三大能量物质的代谢,使能量代谢处于分解亢进状态,所以导致血清中支链氨基酸的浓度增加,芳香族氨基酸作为糖异生底物因消耗增加而浓度下降<sup>[12]</sup>。肝源性糖尿病胰高血糖素升高,外周组织对支链氨基酸的摄取和降解速度加快,而芳香族氨基酸由于肝脏灭活和清除能力降低而升高<sup>[13]</sup>。

本实验中,大鼠经过 24 周的高脂饲料喂养后,血液中生化指标和肝脏出现典型的脂肪肝变化<sup>[14]</sup>。同时,血清中氨基酸谱出现了不同于糖尿病和肝源性糖尿病的变化。除了牛磺酸浓度下降以外,其他氨基酸浓度都有不同程度的升高,尤其是芳香族氨基酸升高显著。结合上述国内外研究成果,本实验中氨基酸谱变化的原因可能是 NAFLD 伴有胰岛素抵抗,导致机体最大的蛋白质库——肌肉大量分解,同时由于肝功能受损,胰高血糖素升高,促进了外周组织利用和摄取支链氨基酸,两种作用相互抵消,所以支链氨基酸升高并不明显。NAFLD 导致肝脏功能下降,所以对芳香族氨基酸灭活和清除能力下降,导致血清中芳香族氨基酸浓度显著升高。

### 3.2 临床上

常常用血清中的 Fischer(支/芳)值作为判断慢性肝病肝功能损伤程度的指标<sup>[15]</sup>。Rose<sup>[16]</sup>测定了急性重症肝炎患者血清中氨基酸谱的变化,发现芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸和蛋氨酸)显著升高,支链氨基酸正常或是略有降低,Fischer(支/芳)值明显下降,并且与肝功能的指标呈正相关。有学者进一步研究发现<sup>[17-18]</sup>,血清中的苯丙氨酸、酪氨酸和蛋氨酸尤其是酪氨酸与凝血蛋白(PTA)成非常显著的负相关,PTA 越低,肝细胞损害常常越严重。本实验结果显示,高脂组大鼠的 Fischer(支/芳)值、酪氨酸明显下降,与其肝细胞的损伤程度相一致。这可能是由于过量的脂肪囤积在肝细胞内,脂肪毒性作用损伤到肝细胞功能。

### 3.3 本实验

观察到,非酒精性脂肪肝导致血清中瓜氨酸和鸟氨酸显著升高,而精氨酸没有变化,分析原因可能是由于肝功能受损后,抑制了肝脏中的尿素循环,造成精氨酸琥珀酸合成酶活性下降,导致血清中瓜氨酸和鸟氨酸显著升高,形成临床上所说的瓜氨酸血症<sup>[19-20]</sup>。但是,与一般情况下的瓜氨酸血症有所不同,本实验中所发现的瓜氨酸血症同时伴有鸟氨酸的显著升高,该现象的机理有待进一步研究。

还发现,高脂组大鼠血清中唯一显著下降的游离氨基酸是牛磺酸,其原因可能有两种:一是肝功能下降,合成牛磺酸的能力下降;二是由于高脂饲料导致肝细胞需要摄取大量的牛磺酸合成牛磺胆酸,以增加脂质和胆固醇的溶解性,增加脂类的吸收<sup>[21-22]</sup>。目前,大多数的研究证实牛磺酸对于脂肪肝具有治疗作用<sup>[23]</sup>,本研究结果从一个新的角度给出了牛磺酸治疗非酒精性脂肪肝的机理。

总之,本研究结果表明,非酒精性脂肪肝大鼠血清中氨基酸谱发生改变与糖尿病和肝源性糖尿病有相似之处,但也存在不同之处。不同之处在于:糖尿病导致血清中支链氨基酸上升、芳香族氨基酸下降;肝源性糖尿病导致血清中支链氨基酸下降、芳香族氨基酸上升;非酒精性脂肪肝导致血清中支链氨基酸和芳香族氨基酸都下降。此外,非酒精性脂肪肝导致血清中瓜氨酸和鸟氨酸浓度明显增加,牛磺酸浓度明显下降,提示这 3 种氨基酸可以作为判断非酒精性脂肪肝病变程度及预后的重要指标,这一发现也为牛磺酸治疗非酒精性脂肪肝提供了理论依据。

### [参考文献]

- [1] YU A S, KEEFE E B. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Rev Gastroenterol Disord, 2002(2): 11-19.
- [2] PAPANDIEOU D, ROUSSO I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children[J]. Clin Nutr, 2007(26): 409-415.
- [3] MADHUSUDANA G. The blind men “see” the elephant-the many faces of fatty liver disease[J]. World journal of gastroenterol, 2008, 14(6): 831-844.



- [4] UNGER R H, ORIC I. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2002, 1 585: 202–212.
- [5] DONNELLY K L, SMITH C L. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Invest*, 2005, 115: 1 343–1 351.
- [6] LEWIS G F, CARPENTIER A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2002, 23: 201–229.
- [7] HOWARD C T. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem[J]. *Clinical medicine*, 2011, 11(2): 176–178.
- [8] ADAMS L A, LINDOR K D. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *CMAJ*, 2005, 172(7): 899–905.
- [9] NEUSCHWANDER-TETRI B A, CALDWELL S H. Nonalcoholic steatohepatitis summary of an AASLD single topic conference[J]. *Hepatology*, 2003, 37: 1 202–1 219.
- [10] MATTEONI C A, YOUNOSSI Z M, GRAMLICH T. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity[J]. *Gastroenterology*, 1999, 116: 1 413–1 419.
- [11] BUGIANESI E, MCCULLOUGH A J, MARCHESINI G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease[J]. *Hepatology*, 2005, 42: 987–1 000.
- [12] 刘民力, 张丹, 丁晓红, 等. 肝原性糖尿病血浆中氨基酸谱改变及分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2000, 16(2): 116–117.
- [13] 马乃诚, 李荣, 张和顺. 糖尿病患者血浆游离氨基酸的改变[J]. *天津医药*, 1999, 12(27): 723–724.
- [14] BAU J I, LLAYMAN D K. A reduced carbohydrate, increased protein diet stabilizes glycemic control and minimizes adipose tissue glucose disposal in rats[J]. *Nutr*, 2006, 136: 1 855–1 861.
- [15] HARRIS R A, JOSHI M. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313: 391–396.
- [16] ROSE H M, YOSHIMURA N. Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology[J]. *Gastroenterology*, 1977, 72: 483–489.
- [17] 杨芊, 李兰娟. 慢性重型肝炎患者氨基酸谱研究[J]. *浙江医学*, 2000, 22: 586–588.
- [18] 杨艳玲, 孙芳. 尿素循环障碍的临床和实验室筛查研究[J]. *中国儿科杂志*, 2005, 43(5): 331–334.
- [19] 陈文, 张静. 牛磺酸对高胆固醇血症大鼠胆固醇/胆汁酸代谢的影响[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(6): 21–25.
- [20] CHRISTOPHER L G, ANGELA M N. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301: R1710–R1722.
- [21] CALAMITA Y Y, CHOU C H. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit[J]. *Agic Food Chem*, 2011, 59: 450–457.

[责任编辑: 黄 敏]