



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响

EFFECT OF PORTAL AMMONIA ON AMINO ACID
METABOLISM IN THE LIVER OF PIG

研 究 生: 包正喜
CANDIDATE: ZHENG XI BAO

导 师: 黄飞若 副教授
SUPERVISOR: ASSOCIATE PROF. FEI RUO HUANG

专 业: 动物营养与饲料科学
MAJOR: ANIMAL NUTRITION AND FEED SCIENCE

研究方向: 猪的营养
FIELD: SWINE NUTRITION

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇一六 年 六 月

JUNE, 2016

分类号

密级:

华中农业大学硕士学位论文

门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响

Effect of portal ammonia on amino acid metabolism in
the liver of pig

硕士研究生：包正喜

学 号：2013302110064

指导教师：黄飞若 副教授

指导小组：陶亚雄 教授

陈 庄 研究员

齐德生 教授

晏向华 教授

马立保 副教授

专业：动物营养与饲料科学

研究方向：猪的营养

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2016 年 6 月

华中农业大学动物科技学院

二〇一六年六月

本研究由以下两个项目提供经费资助


1 国家重点基础研究计划（973 计划）

2013CB127304

2 国家自然科学基金面上项目

31572409

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

| | | | |
|---|---|------------|-------------|
| 学位论文 是否保密 | 否 | 如需保密, 解密时间 | 年 月 日 |
| <h3 style="margin: 0;">独创性声明</h3> <p style="margin: 10px 0;">本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> 研究生签名: 包正喜 时间: 2016 年 6 月 7 日 </div> | | | |
| <h3 style="margin: 0;">学位论文使用授权书</h3> <p style="margin: 10px 0;">本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p style="margin: 10px 0;">注: 保密学位论文 (即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文) 在解密后适用于本授权书。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p>学位论文作者签名: 包正喜</p> <p>签名日期: 2016 年 6 月 7 日</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>导师签名: </p> <p>签名日期: 2016 年 6 月 7 日</p> </div> </div> | | | |

目 录

| | |
|-------------------------------|-----|
| 摘 要 | i |
| Abstract..... | iii |
| 缩略语表 | v |
| 第一章文献综述 | 1 |
| 1 前言 | 1 |
| 2 门静脉血氨 | 2 |
| 2.1 门静脉血氨的来源..... | 2 |
| 2.1.1 肠道微生物分解循环血液中的尿素 | 2 |
| 2.1.2 肠道微生物分解日粮蛋白质 | 4 |
| 2.1.3 肠道上皮细胞利用谷氨酰胺 | 4 |
| 2.2 门静脉血氨的影响因素..... | 6 |
| 3 肝脏氨代谢理论 | 7 |
| 3.1 肝脏的基本结构..... | 7 |
| 3.2 经典的氨代谢通路..... | 8 |
| 3.2.1 门静脉周—尿素循环 | 8 |
| 3.2.2 肝静脉周—谷氨酰胺循环 | 9 |
| 3.3 肝脏尿素合成的调控..... | 10 |
| 4 肝脏氨代谢与氨基酸代谢之间的关系 | 12 |
| 5 血插管技术和组学技术在营养代谢研究中的应用 | 13 |
| 5.1 血插管技术在动物营养研究中的应用 | 14 |
| 5.2 代谢组学在动物营养研究中的应用 | 15 |
| 6 本研究的目的与意义 | 16 |
| 第二章仔猪肝脏门静脉灌注技术的建立 | 17 |
| 1 前言 | 17 |
| 2 材料与方法 | 17 |
| 2.1 试验动物..... | 17 |
| 2.2 试验材料..... | 18 |
| 2.2.1 药品与耗材 | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2 手术器械包 | 18 |
| 2.3 仔猪门静脉-肝静脉血管插管的安装 | 18 |
| 2.4 门静脉灌注技术 | 20 |
| 2.4.1 NH ₄ Cl 灌注浓度的确定 | 20 |
| 2.4.2 NH ₄ Cl 溶液的配制 | 21 |
| 2.4.3 门静脉灌注 | 21 |
| 2.4.4 样品采样 | 21 |
| 2.5 肝静脉血浆尿素浓度的测定 | 22 |
| 2.6 数据分析 | 22 |
| 3 结果与分析 | 22 |
| 3.1 门静脉灌注技术 | 22 |
| 3.2 门静脉灌注 NH ₄ Cl 浓度对尿素的影响 | 23 |
| 4 讨论 | 24 |
| 第三章门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响 | 26 |
| 1 前言 | 26 |
| 2 材料与方法 | 27 |
| 2.1 试验动物 | 27 |
| 2.2 试验材料 | 27 |
| 2.3 仔猪门静脉-肝静脉血管插管的安装 | 27 |
| 2.4 门静脉灌注 NH ₄ Cl 实验 | 27 |
| 2.5 基于 GC-MS 的代谢组学分析 | 27 |
| 2.5.1 血浆预处理 | 27 |
| 2.5.2 GC-MS 分析 | 28 |
| 2.6 数字基因表达谱分析（RNA-seq(quantification)） | 28 |
| 2.6.1 总 RNA 的提取 | 28 |
| 2.6.2 Ion Proton 测序 | 28 |
| 2.6.3 测序数据 | 29 |
| 2.6.4 基因注释 | 29 |
| 2.6.5 差异表达基因的筛选 | 30 |
| 2.7 荧光定量 PCR 验证 | 30 |
| 2.7.1 cDNA 的制备 | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.7.2 定量 PCR 检测 | 31 |
| 2.8 肝脏酶活性测定 | 32 |
| 2.9 仔猪原代肝细胞的分离与培养 | 32 |
| 2.9.1 相关试剂的配制 | 32 |
| 2.9.2 仔猪原代肝细胞的分离 | 33 |
| 2.9.3 仔猪原代肝细胞的培养 | 34 |
| 2.10 实验处理 | 35 |
| 2.10.1 GC-MS 分析尿素和天冬氨酸中 ^{15}N 同位素 | 35 |
| 2.10.2 GC-MS 分析 | 35 |
| 2.10.3 同位素分析 | 35 |
| 2.11 数据分析 | 35 |
| 3 结果与分析 | 36 |
| 3.1 样品 GC-MS 分析 | 36 |
| 3.2 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏血清代谢产物的影响 | 38 |
| 3.3 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏基因表达的影响 | 38 |
| 3.4 荧光定量 PCR 对测序结果的验证 | 41 |
| 3.5 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏代谢酶活性的影响 | 42 |
| 3.6 尿素和天冬氨酸中 ^{15}N 丰度 | 43 |
| 4 讨论 | 43 |
| 5 小结 | 46 |
| 本研究的小结、创新点及尚未解决的问题 | 48 |
| 1 小结 | 48 |
| 2 创新点 | 48 |
| 3 待解决的问题 | 48 |
| 参考文献 | 49 |
| 附录 研究生在读期间发表的主要研究论文 | 59 |
| 致 谢 | 60 |

摘 要

肝脏是氨氮代谢的主要器官，来自肠道的血氨经门静脉进入肝脏主要通过尿素循环代谢。猪门静脉血氨浓度是循环系统其他部位的 10 倍，课题组前期研究发现随着日粮蛋白水平的升高，猪门静脉血氨浓度达到 250 $\mu\text{mol/L}$ -350 $\mu\text{mol/L}$ 。本课题旨在研究门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响。首先通过安装门静脉-肝静脉插管建立仔猪门静脉灌注技术；通过门静脉灌注高浓度（75mmol/L）和低浓度（25mmol/L）的氯化铵（Ammonium chloride, NH_4Cl ）溶液，采集肝静脉血液以及肝脏组织样品，基于气相色谱-质谱联用（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）的代谢组学分析了血液中的代谢产物变化；数字基因表达谱分析了肝脏组织基因表达，并检测了相关代谢酶活性；最后利用 ^{15}N 同位素研究 NH_4Cl 对肝细胞氨基酸代谢影响的机制。主要的研究结果如下：

（1）仔猪肝脏门静脉灌注技术的建立：通过门静脉血流速率以及摄食前后门静脉血氨的浓度，计算出门静脉血氨流量（ $\mu\text{mol/min}$ ）；设定体外灌注泵的速率（ mL/min ），计算出体外灌注氨的浓度；仔猪安装门静脉-肝静脉插管，待恢复健康后利用灌注泵通过门静脉插管进行体外灌注 NH_4Cl 溶液。通过检测肝静脉血液尿素含量发现，随着门静脉灌注 NH_4Cl 的浓度增加，血液中尿素浓度也增加。这些结果证实了仔猪肝脏门静脉灌注技术的可靠性。

（2）GC-MS 分析结果显示：灌注不同浓度的 NH_4Cl 引起 12 种血清差异代谢产物（ $P<0.05$ ）；与低浓度 NH_4Cl 相比，门静脉灌注高浓度 NH_4Cl 导致尿素和谷氨酰胺合成明显增加（ $P<0.05$ ），同时葡萄糖和葡萄糖-6 磷酸也显著增加（ $P<0.05$ ）；相反地，在高浓度组中丙氨酸（Alanine, Ala）、天冬氨酸（Aspartate, Asp）、谷氨酸、鸟氨酸、精氨酸等氨基酸含量大量降低（ $P<0.05$ ），其中 Ala 差异变化最大。

（3）数字基因表达谱分析结果显示：与低浓度组相比，高浓度组中共有 1164 个差异表达基因（Differentially expressed genes, DEGs），其中有 901 个 DEGs 上调，263 个 DEGs 下调。在这些 DEGs 中，尿素循环相关基因如 N-乙酰谷氨酸合成酶、氨甲酰磷酸合成酶 1、鸟氨酸氨甲酰转移酶、及精氨酸酶 1 基因表达大量上调；氨

基酸相关代谢酶基因也发生明显的变化，如谷氨酰胺合成酶、鸟氨酸氨基转移酶等；通过定量 PCR 验证测序结果发现一致性较高，说明测序结果准确可靠。

（4）肝脏代谢酶活性分析结果显示：高浓度组中氨甲酰磷酸合成酶 1、精氨酸 1、谷氨酰胺合成酶活性显著（ $P<0.05$ ）高于低浓度组；而高浓度组中鸟氨酸氨甲酰转移酶（ $P=0.054$ ）和谷氨酰胺酶（ $P=0.065$ ）活性较低浓度组有增加的趋势；并且随着 NH_4Cl 灌注浓度的增加，肝脏中丙氨酸氨基转移酶（Alanine aminotransferase, ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（Aspartate aminotransferase, AST）活性分别提高了 45.89%（ $P=0.039$ ）和 41.08%（ $P=0.045$ ）。这些结果说明门静脉灌注氨导致 ALT 和 AST 酶活性增加。

（5）通过 GC-MS 分析不同 ^{15}N 底物条件下尿素和 Asp 中 ^{15}N 丰度，结果显示：当肝细胞培养在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 中，尿素中两个氮原子只有一个氮被大量标记（ $\text{Urea}_{(m+1)}$ ），Asp 中 ^{15}N 标记量很少；当在肝细胞中添加 NH_4Cl 和 ^{15}N -Ala 时，尿素只有一个氮原子被大量标记，且 Asp 也被大量标记，其 ^{15}N 丰度是 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组的 4 倍（ $P<0.05$ ）；当同时添加 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 ^{15}N -Ala 时，尿素中两个氮原子均被大量标记，Asp 中 ^{15}N 丰度与 ^{15}N -Ala+ NH_4Cl 组没有明显差异（ $P>0.05$ ），然而 $\text{Urea}_{(m+1)}$ 中 ^{15}N 丰度明显减少（ $P<0.05$ ）。这些结果表明氨不能为尿素循环提供两个氮原子，Ala 通过转化成 Asp 为尿素合成提供前体物质。

综上所述：门静脉血氨进入肝脏尿素循环后，氨只能为尿素提供一个氮源，另外一个氮源主要是通过氨基酸代谢供给；因此，氨进入肝脏尿素循环后会诱导 Ala 代谢，在 ALT 和 AST 的作用下合成 Asp，为尿素合成提供额外的氮源。

关键词：血氨；门静脉；仔猪；尿素循环；天冬氨酸；丙氨酸

Abstract

Liver is the major organ of ammonia metabolism. The gastrointestinal original ammonia is normally removed by the liver via portal vein and entered the urea cycle for irreversible conversion to urea. The ammonia concentration in the portal vein of pig is up to 10-fold greater than elsewhere in the circulation. And the preliminary study showed that with the increase of dietary protein level, the concentration of portal ammonia is reached 250 μ mol/L-350 μ mol/L. The aim of this study was to explore the effects of portal ammonia on the hepatic amino acid metabolism in pig. Firstly, pigs were surgically implanted with catheter in the portal vein and hepatic vein to establish portal infusion technique. Then high concentration (75mmol/L) and low concentration (25mmol/L) of ammonium chloride (NH_4Cl) were infused into liver by portal catheter. Serum samples were collected to characterize metabolites based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics. Liver samples were collected to examine gene expression by digital gene expression profiles and related metabolic enzyme activity. Finally, mechanism of the influence of ^{15}N labeled NH_4Cl on hepatocyte amino acid metabolism was investigated. The main results were as follows:

(1) Establishment of portal infusion technique in liver of pig. The portal blood ammonia flow ($\mu\text{mol}/\text{min}$) was calculated based on the portal blood velocity and the concentration of portal ammonia before and after feeding. The concentration of ammonia in perfusion was calculated according to the infusion rate of pump in vitro. Then pigs, fitted acutely with transhepatic catheters, were infused with low or high concentration of NH_4Cl . The urea concentration of plasma was detected in hepatic vein. It was found that with the increase of ammonia concentration in perfusate, the urea synthesis was increased. This results confirmed the reliability of portal infusion technique.

(2) The results of GC-MS analysis showed that: there were 12 different metabolites in serum between two concentration of NH_4Cl infusion ($P<0.05$); in contrast with low concentration of NH_4Cl , the infusion of high ammonia concentration resulted in the significant synthesis of urea and glutamine ($P<0.05$) together with the glucose and glucose-6-phosphate; on the contrary, the content of alanine (Ala), aspartate (Asp), glutamate, ornithine and arginine were remarkably decrease ($P<0.05$), among which Ala was the greatest reduction.

(3) The results of digital gene expression profiles analysis showed that: compared with low concentration, there were 1164 differentially expressed genes (DEGs) in high concentration treatment, in which 901 DEGs were up-regulated and 263 DEGs were

down-regulated ($P<0.05$); in this DEGs, the gene related urea cycle such as N-acetylglutamate synthase, carbamoyl-phosphate synthase 1, ornithine carbamoyl-transferase and arginase 1 were significant up-regulated ($P<0.05$); the gene related amino acid metabolism were also changed ($P<0.05$) such as glutamine synthetase, ornithine aminotransferase; the results of quantitative PCR were in accordance with Ion proton sequencing result.

(4) The results of metabolic enzyme activity in liver showed that: the hepatic enzyme activity of carbamoyl-phosphate synthase 1, arginase 1, glutamine synthetase in high concentration of NH_4Cl were higher than that in low concentration ($P<0.05$); however, the activity of ornithine carbamoyltransferase ($P=0.054$) and glutaminase ($P=0.065$) were tended to increase; with the increase of NH_4Cl concentration infusion, the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were increased 45.89% ($P=0.039$) and 41.08% ($P=0.045$), respectively. These results indicated that ammonia lead to increase the activity of ALT and AST.

(5) The results of ^{15}N enrichment in urea and Asp based on GC-MS analysis showed that: there was much massive production of ^{15}N -urea_(m+1) (urea with one nitrogen atom labeled) and less production of ^{15}N -aspartate when only incubate with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. However, when ^{15}N -Ala and NH_4Cl as the substrate, there was largely one nitrogen atom labeled in urea and the ^{15}N enrichment in Asp was almost 4 times ($P<0.05$) in that $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Both nitrogen of urea was largely labeled when hepatocyte incubate in ^{15}N -Ala plus $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Compared with ^{15}N -Ala+ NH_4Cl group, no obvious changes was observed ($P>0.05$) in ^{15}N -Ala+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ with regard to ^{15}N enrichment in Asp, but the ^{15}N enrichment in Urea_(m+1) was significant reduction ($P<0.05$). These results indicated that ammonia had an inability to provided additional nitrogen for urea synthesis, and Ala was mainly through generating Asp for providing precursor to urea cycle.

Taken together: portal ammonia enter urea cycle and can only provide one nitrogen for urea in liver. The additional nitrogen source is supplied mainly through amino acid metabolism. Thus, the metabolism of ammonia via urea cycle in liver could induce Ala metabolism, following transamination to Asp via ALT and AST for providing the additional nitrogen for urea.

Key words: Blood ammonia; Portal vein; Pig; Urea cycle; Aspartate; Alanine

缩略语表

(Abbreviation)

| 序号 | 缩写 | 英文术语 | 中文术语 |
|----|--------------------|---|---------------|
| 1 | Ala | Alanine | 丙氨酸 |
| 2 | ALT | Alanine aminotransferase | 丙氨酸氨基转移酶 |
| 3 | Arg | Arginine | 精氨酸 |
| 4 | Arg1 | Arginase 1 | 精氨酸酶 1 |
| 5 | Asp | Aspartate | 天冬氨酸 |
| 6 | AST | Aspartate aminotransferase | 天冬氨酸氨基转移酶 |
| 7 | CPS1 | Carbamoylphosphate synthase 1 | 氨甲酰磷酸合成酶 1 |
| 8 | DEGs | Differentially expressed genes | 差异表达基因 |
| 9 | FDR | False Discovery Rate | 假阳性率 |
| 10 | G6P | Glucose-6-phosphatase | 葡萄糖-6-磷酸酶 |
| 11 | GATM | Glycine amidinotransferase | 甘氨酸脒基转移酶 |
| 12 | GC-MS | Gas chromatography-mass spectrometry | 气相色谱-质谱 |
| 13 | GLDC | Glycine dehydrogenase | 甘氨酸脱氢酶 |
| 14 | Gln | Glutamine | 谷氨酰胺 |
| 15 | GLS | Glutaminase | 谷氨酰胺酶 |
| 16 | GLUD1 | Glutamate dehydrogenase 1 | 谷氨酸脱氢酶 |
| 17 | GS | Glutamine synthase | 谷氨酰胺合成酶 |
| 18 | HAL | Histidine ammonia-lyase | 组氨酸氨裂解酶 |
| 19 | NAGS | N-acetylglutamate synthase | N-乙酰谷氨酸合成酶 |
| 20 | NH ₄ Cl | Ammonium chloride | 氯化铵 |
| 21 | OAT | Ornithine aminotransferase | 鸟氨酸氨基转移酶 |
| 22 | OCT | Ornithine carbamoyltransferase | 鸟氨酸氨甲酰转移酶 |
| 23 | Orn | Ornithine | 鸟氨酸 |
| 24 | PAH | para-aminohippuric acid | 对氨基马尿酸 |
| 25 | PCK1 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 | 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 |
| 26 | PLS-DA | Partial Least Squares-Discriminant Analysis | 偏最小二乘判别分析 |
| 27 | PSPH | Phosphoserine phosphatase | 磷酸丝氨酸磷酸酶 |
| 28 | RPKM | Reads Per Kb per Million reads | 基因表达量 |
| 29 | SDS | L-serine dehydratase/L-threonine deaminase | 丝氨酸脱氢酶/苏氨酸脱氨酶 |

第一章 文献综述

1 前言

目前我国生长猪对日粮氮的利用率不高, 仅为 24%-54%, 大量的氮通过粪尿的形式排放到环境中, 不仅造成蛋白质资源的浪费, 还对生态环境造成严重的污染。其中大量的氮浪费主要是日粮进入消化道后, 肠道上皮细胞和肠道微生物对日粮蛋白质和氨基酸的分解产生大量的氨通过门静脉进入肝脏, 进行尿素合成排出体外。肠道产生的大量氨通过血液循环进入门静脉, 导致门静脉血氨浓度升高。研究表明猪日粮中约有 18% 的氮营养素是以氨氮的形式出现在门静脉血液中, 并且其浓度是循环系统其他部位的 10 倍以上 (Stoll et al 1998; Häussinger 2007); 此外, 本课题组在前期研究中也发现随着日粮蛋白水平的升高, 门静脉血氨浓度随之升高, 其浓度可高达 250 μ mol/L-350 μ mol/L。

肝脏是氮营养素代谢的主要场所, 在氨基酸代谢, 分泌性蛋白质合成, 尿素循环等过程中发挥着重要作用。来自门静脉血氨进入肝脏代谢, 通过尿素循环合成尿素或者谷氨酰胺循环合成谷氨酰胺 (Glutamine, Gln), 并且大部分以尿素形式经肾脏排除体外, 少部分生成 Gln 进入循环系统。尿素的合成依赖于底物供给水平和酶活性。在尿素循环过程中需要消耗等量的两种氮源即氨和天冬氨酸 (Aspartate, Asp); 并且研究表明, 肝脏尿素生成依赖于这两种氮源的协调提供 (Milano et al 2000)。此外, 体内研究表明尿素循环底物的供给依赖氨基酸的供给以及氨基酸代谢酶活性, 这些因素对尿素合成有重要的作用 (Häussinger 2007)。因此, 较高浓度的门静脉血氨进入肝脏尿素循环时, 是否影响肝脏氨基酸代谢, 目前还不是很清楚。

随着营养研究的发展, 多重血插管技术在动物营养代研究中有着越来越重要的作用, 特别是研究体内单个器官的营养物质代谢特点。与传统的营养研究方法相比, 血插管技术可以连续测定几个时间点的血液生化指标, 全面了解动物营养代谢过程与规律。此外, 各种组学技术如代谢组学、转录组学也越来越多的应用到营养研究中, 从分子水平探讨营养代谢的机制, 提高了营养研究的准确性。因此, 本研究利用门静脉-肝静脉插管, 建立仔猪肝脏门静脉灌注技术; 在此基础上通过体外门静

脉灌注高低两种不同浓度的氯化铵（Ammonium chloride, NH_4Cl ），结合代谢组学和数字表达谱技术研究门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响；同时从细胞水平进一步探索其影响的机制。

2 门静脉血氨

氨是机体含氮化合物（蛋白质、氨基酸）代谢的一种重要副产物，在机体氮代谢中具有重要的作用。氨在动物体液中以两种形式共存，气态氨（ NH_3 ）以及带电形式的铵根离子（ NH_4^+ ），它们的相对浓度依赖于血液 pH。在正常生理 pH 条件下，98% 的氨以 NH_4^+ 的形式存在。氨是亲水性的，很容易以离子的形式转移。尽管较低的脂溶性，非离子形式的氨转运进入细胞是通过自由扩散。氨的跨膜转运需要在跨膜通道和转运体的协助下完成，例如水通道蛋白（Holm et al 2005）和猕猴蛋白（Weiner et al 2003）。

门静脉起源于腹腔消化器官（消化道和胰）、脾脏等的毛细血管，经逐级汇集后形成门静脉，是肝脏血液的主要来源。肠道产生大量的氨，通过门静脉进入肝脏代谢，是门静脉血氨的主要来源。门静脉血氨浓度较循环系统其他部分高，且受到多种因素的影响，如日粮蛋白水平、动物摄食状态以及日粮种类。

2.1 门静脉血氨的来源

门静脉血氨主要来自肠道。肠道是氨产生的主要场所，主要包括三部分：循环血液分泌到肠道中的尿素，在微生物的作用下分解产生氨；肠道微生物对日粮中未被消化吸收的蛋白质和氨基酸分解产生大量氨；此外，肠道上皮细胞利用日粮和血液中的谷氨酰胺供能，分解产生氨。

2.1.1 肠道微生物分解循环血液中的尿素

对体内尿素合成速率的研究表明，在较广的蛋白摄入范围内通过尿液排放的尿素占整个机体尿素合成的 70%-80%（Young et al 2000），然而有些报道的值低至 60%（Fouillet et al 2008）。这些明显缺少的尿素通常被认为是从血液循环分泌到肠道中（Metges 2000）。肠道（主要是结肠）粘膜表达尿素转运体，能够将血液中的尿素转运到肠腔（Stewart et al 2004）。分泌到肠道中的尿素在结肠粘膜或粘膜

附近水解产生氨和二氧化碳,较少在小肠分解。此外,肠道微生物分泌的脲酶能够利用这些尿素重新合成氨基酸。然而,在人体的研究发现肠道微生物利用 $^{15}\text{NH}_4^+$ 或 ^{15}N -尿素合成氨基酸的量只占血浆中必需氨基酸的 5%-10% (Jackson et al 2004)。与此一致的是,肠道尿素大部分被微生物降解成氨,重新吸收进入尿素循环,而较少部分用于微生物氨基酸合成 (Young et al 2000)。用于肝脏尿素合成的氨,15%-30%是由肠道细菌脲酶分解尿素产生的 (Hawkins et al 1993)。此外,在禁食期间肠道尿素水解明显 (el-Khoury et al 1996)。研究发现口服 $^{15}\text{NH}_4^+$, 65%作为氨基酸合成的前体物质,而不是用于 $^{15}\text{N}_2$ -尿素合成 (Metges et al 1999), 这提示肠道微生物脲酶表达是一个决定性因素,同时随着饲养周期而发生变化。

在人肠道中,循环血液分泌的尿素用于微生物氨基酸重新合成是很微弱的,大部分被分解成氨重吸收通过门静脉进入肝脏。在反刍动物上也存在相似的过程。循环血液中的尿素分泌到消化道几乎只发生在胃和小肠。在牛体内,内源性产生的尿素分泌到消化道的量从低蛋白日粮的 100%降低到高蛋白日粮的 30% (Mosenthin et al 1992a), 这似乎表明循环血液中的尿素分泌到消化道与日粮蛋白质的含量有关。但事实上,尿素进入消化道的速率依赖于血浆中尿素浓度而不是蛋白的摄入量 (Reynolds and Kristensen 2008)。循环血液分泌到肠道的尿素在返回到肝脏尿素循环的量几乎是一个固定值为 30%-50%, 然而,剩下的被肠道微生物用于氨基酸合成 (Reynolds and Kristensen 2008)。因此,当日粮蛋白不足时,消化道将回收的尿素作为氨基酸的来源,缓冲其不足;但是在高蛋白日粮时不能增加氨基酸的利用率。

与反刍动物的研究相比,在猪和人的研究表明分泌到肠道尿素随着蛋白摄入量和内源性尿素的产量增加而增多 (Thacker et al 1982; Young et al 2000)。很显然,循环血液中尿素的浓度不能直接决定尿素分泌到猪和人肠道的速率,然而在反刍动物上却可以。在禁食过程中,虽然分泌到肠道中的尿素可能有多达 50%被水解,Young 等 (2000) 认为分解产生的氨在肝脏重新进入尿素循环,但是 Fouillet 等 (2008) 则认为分解产生的氨有超过 80%的被用于合成氨基酸。虽然这两种观点存在分歧,但是这两组研究的数据均表明,摄食后内源合成尿素产生的肠道氨,重新进入肝脏大约占蛋白质摄入量的 10%。

2.1.2 肠道微生物分解日粮蛋白质和氨基酸

动物摄入的日粮蛋白质和氨基酸大部分在小肠被消化吸收，在回肠末端蛋白质的真消化率是 90%-95%，而未被消化的蛋白质进入后肠（Darragh et al 2000）。来自日粮和内源性器官的蛋白质和多肽被大肠微生物（主要是结肠）分解代谢产生大量的氨。每天从回盲连接处进入大肠的含氮化合物有 6-18g，即使是高消化率蛋白质也可能会避免小肠的消化（Bos et al 2007）。当进入大肠腔时，这些含氮化合物被结肠微生物强烈水解，释放游离氨基酸，同时进一步被大量的细菌代谢产生氨（Blachier et al 2007），进而随血液被吸收进入门静脉。

结肠腔氨的浓度随着日粮蛋白水平的增加而增加。不考虑日粮脂肪的含量，小鼠饲喂低蛋白日粮（8%），在结肠近端氨的浓度为 20-25mmol/L，而在结肠远端氨浓度为 30-40mmol/L（Lin and Visek 1991）。在鼠饲喂高蛋白日粮（32%）发现，近端结肠氨浓度比低蛋白日粮高 50%（30-40mmol/L），并且结肠远端氨的浓度是低蛋白日粮的 2 倍（Lin and Visek 1991）。在其他的鼠饲喂实验中发现，60%蛋白日粮引起的结肠近端氨浓度是 20%蛋白日粮结肠氨浓度的 2 倍多，但是对于结肠末端氨浓度却没有明显的差异。结肠静脉血氨的浓度可以反应结肠氨含量的差异（Mouille et al 2004）。与此观点一致的是，猪结肠灌注 NH_4Cl 实验表明结肠氨浓度和门静脉血氨浓度之间存在着直接联系（Eklou-Lawson et al 2009）。

2.1.3 肠道上皮细胞利用谷氨酰胺

门静脉血氨的另一个来源是肠道粘膜对日粮中氨基酸代谢产生的，尤其是小肠对 Gln 的利用。Windmueller 和 Spaeth（1974, 1975, 1980）经典的研究表明：1）小肠肠细胞主要的代谢燃料是 Gln，而不是葡萄糖；2）在饲喂和禁食状态下，传统动物肠道对 Gln 的利用量和无菌动物相当；3）肠腔和血液中的 Gln 均可被肠道细胞利用以满足禁食和饲喂时的需要。小肠含有高活性的谷氨酰胺酶，而谷氨酰胺合成酶活性较小，因此肠道适合利用 Gln 作为能量来源。肠道从血液和肠腔中摄取大量的 Gln，大多数 Gln 被小肠粘膜利用（Windmueller 1982），构成小肠重量的 75%，而大肠对 Gln 的利用较少。肠道 Gln 在粘膜谷氨酰胺酶的催化下转变成谷氨酸和氨。此外，肠道 Gln、谷氨酸和 Asp 在肠道首过代谢时几乎完全代谢，相当于大多数其

他氨基酸首过代谢的 30%-50%。只有丙氨酸（Alanine, Ala），精氨酸和酪氨酸在肠道首过代谢时净生成（Lopez et al 1998; Stoll et al 2006）。研究表明，在无菌鼠和无肝鼠中血氨的水平都同样的快速上升（Schalm et al 1979）；并且在抗生素治疗时，循环血液中氨的水平只有轻微的下调（Macclayton and Eaton-Maxwell 2009）。从这些实验中可以推断出肠道微生物对氨产生的作用有限。

肠道对 Gln 的利用与机体所处的状态有关。研究表明，在鼠体内肠道 Gln 的利用量为 200-900 μ mol/kg/h（Nose et al 2002）；而在鼠吸收后状态，肠道利用 Gln 量为 500 μ mol/kg/h（Hallemesch et al 2001）；在禁食状态的人为 20-30 μ mol/kg/h（van de Poll et al 2007）。在饲喂条件下，肠细胞中 Gln 分解产生的氨占整个小肠氨总量的 65%，而在禁食时所占比例高达 95%（Lopez et al 1998）。这些数据是根据动静脉浓度差异得出来的，因此不能揭示日粮中 Gln 的贡献。但是有研究表明小肠产生的大量氨，主要是由来自动脉血氨的 Gln 代谢产生的。人空肠和回肠摄取的 Gln 分别是 24%和 9%（Weber and Veach 1979）。当通过肠内营养和静脉营养提供 Gln 时，Gln 分解产生的氨是单一供给 Gln 时的 1.5 倍（Plauth et al 1999）；除去这些因素，这些研究均表明啮齿动物和人肠道 Gln 分解产生的氨是每天用于尿素合成氨的 10%。

上述提到肠道氨产生的三种来源，Gln 的脱氨占每天氨产量 10%，循环血液中尿素被微生物分解产生的氨占 10%，结肠细菌分解未被消化吸收的蛋白和氨基酸产生的氨占 5%。在饲喂和吸收后这些数据是相似的（Lopez et al 1998），这意味着 75%氨是以氨基酸（Ala、Gln）的形式转运到肝脏用于合成尿素（如图 1-1）。

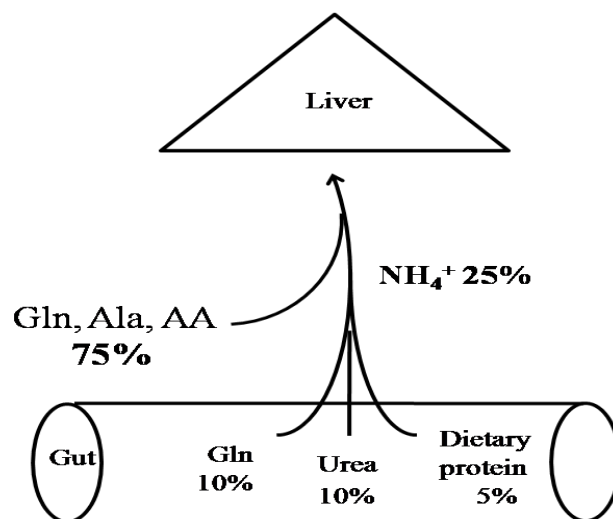


图 1-1 门静脉血氨的来源

肠道产生的氨通过门静脉进入肝脏，包括 Gln 分解（相当于摄入氨基酸的 10%），肠道微生物水解尿素（10%）以及结肠微生物分解代谢未被消化的蛋白质（5%）。剩下的氨以氨基酸的形式（相当于摄入氨基酸的 75%）如 Ala、Gln 以及其他的氨基酸转运到肝脏用于尿素合成。

Fig. 1-1 Sources of ammonia in portal vein

The portal vein carries intestinal ammonia derived from glutaminolysis (equivalent to ~10% of the ingested aminogroups), microbial intestinal urea hydrolysis (~10%), and colonic microbial catabolism of undigested protein (~5%) to the liver. The remaining ammonia are carried in the form of amino acid (equivalent to ~75% of the ingested amino groups) for urea synthesis in liver such as glutamine, alanine, and other amino acids.

2.2 门静脉血氨的影响因素

在正常生理条件下，循环系统中血氨浓度维持在很低水平，动脉血氨浓度为 $45\mu\text{mol/L}$ ，肝静脉血氨浓度约为 $20\text{--}40\mu\text{mol/L}$ 。然而，门静脉血氨浓度很高，是循环系统其他部位的 10 倍以上（Häussinger 2007）。本课题组在前期研究三种不同蛋白日粮对仔猪肝脏氨基酸代谢时发现，当饲喂 14%、17%、20% 三种蛋白质日粮后，门静脉血氨浓度不断升高，并且在摄食后 3 小时可高达 $250\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ 、 $350\mu\text{M}$ 。日粮蛋白水平影响着肠道氨基酸的消化率（Bühler et al 2006）。随着日粮蛋白水平的提高，大部分非必须氨基酸和所有的必须氨基酸在猪回肠的消化率相应的降低（Otto et al 2003; Htoo et al 2007）。因此，高蛋白日粮中较多的氨基酸进入后肠被肠道微生物分解产生氨。根据同位素示踪技术研究表明，吸收后状态，猪日粮约有 18% 的氮营养素是以氨氮的形式出现在门静脉血液中（Stoll et al 1998）。从这些数据可以看出，门静脉血氨浓度和日粮蛋白质含量直接相关，且随着日粮蛋白含量增加而升高。

门静脉血氨浓度与摄食与否有关。动物采食后门静脉血氨浓度迅速增加，此时血氨的主要来源是：饲料中蛋白质在后肠被微生物分解产生氨；而体内蛋白质周转代谢过程中产生的各种氨基酸经过转氨和脱氨作用后生成的氨，加之肾脏对 Gln 水解产生的氨，均可进入门静脉，导致血氨浓度升高。采食后，肠道消化液分泌增加，由血液分泌到肠腔的尿素也随之增加，动物消化道氨大部分是由微生物酶水解尿素产生的（Fauconneau and Michel 1970），加之未被小肠消化的蛋白质被微生物分解代谢，从而导致产生大量氨。

除此之外，动物采食的饲料种类对门静脉血氨浓度有很大的影响。许金华等（2005）研究表明，在猪日粮中添加 8% 可溶性纤维（果胶），可降低采食后 7h 内

静脉血氨的浓度。微生物对氮的需求主要由未消化的日粮蛋白、内源性蛋白和尿素提供。纤维具有刺激肠道蠕动功能，猪饲喂含有果胶的日粮后，食糜中较多的蛋白质和氨基酸从小肠转移到大肠（谯仕彦等 1998）。当后肠中含有较多的可用于微生物发酵的可发酵碳水化合物时，胃肠道中尿素的排泄增加，细菌的固氮能力增强（Mosenthin et al 1992a）。来自日粮中未被消化的蛋白质和氨基酸用于细菌氨基酸的合成，从而减少氨的释放和吸收（Mosenthin et al 1994）。此外，日粮中可发酵碳水化合物不被消化酶消化，几乎完全被后肠微生物发酵；在后肠，可发酵碳水化合物能够为微生物发酵提供能量，使微生物大量增殖，利用氨作为氮源生长，促进细菌同化作用，从而抑制氨的释放，降低血氨水平（Mosenthin et al 1992b）。因此，饲喂果胶日粮的猪，其肠道产生的氨较少，相应吸收的氨较少，故导致血氨浓度较低。

3 肝脏氨代谢理论

肝脏是氨代谢主要场所。门静脉血氨进入肝脏主要通过尿素循环和谷氨酰胺循环代谢。在健康动物机体，血氨的转运和代谢受到紧密的调控，对于维持较低血氨浓度（ $10\mu\text{mol/L}$ - $40\mu\text{mol/L}$ ）具有不可替代的作用，以防止高血氨引起的神经毒性。

3.1 肝脏的基本结构

肝脏是机体最大的消化腺，其结构和功能基本单位是肝小叶。小叶中轴贯穿一条静脉，为中央静脉。肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，形成肝细胞索。门静脉是肝脏血液的主要来源（约占 75%），将消化道中营养物质以及有害物质运送到肝脏后，反复分支最后汇入肝血窦；然后将代谢产物通过中央静脉汇集到肝静脉输送到循环血液。门静脉经过反复分支后汇入肝血窦，最后通过中央静脉汇集到肝静脉。肝动脉伴随着门静脉进入肝小叶，与胆管共同组成门脉三联管。研究表明，这些肝细胞在组织上虽然不可区分，但是它们的功能却不尽相同（Jungermann and Keitzmann 1996）。根据门脉三联管到中央肝静脉的位置，将肝小叶分为 3 部分：门静脉上游区域接受来自肝动脉和门静脉的血液（门静脉周），2/3 的门静脉区肝细胞在门脉三联管周围；中间区域；中央静脉下游 2/3 的静脉区肝细胞接近于中央

小叶静脉（肝静脉周）。研究表明不同分区部位的肝细胞表达不同的代谢酶系，因此导致了肝细胞代谢的异质性（Braeuning et al 2006）。

3.2 经典的氨代谢通路

肝脏氨代谢主要涉及到两条不同的代谢通路：尿素循环和谷氨酰胺合成，这两条代谢通路是严格分区（如图 1-2）。来自肠道的门静脉血氨进入肝脏，首先在门静脉周肝细胞通过尿素循环大量被清除（Meijer et al 1990）；其次，逃离门静脉周尿素循环的氨进入肝静脉周肝细胞，在谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthase, GS）的作用下生成 Gln（Häussinger 1990）。

3.2.1 门静脉周—尿素循环

门静脉周肝细胞尿素循环是哺乳动物清除氨的主要方式。在体内，大约 90% 的氨以尿素的形式排出体外。尿素循环过程分为细胞质和线粒体两部分，并且依赖能量的提供（如图 1-2）。来自血液中的氨首先接触到门静脉周肝细胞，进入线粒体在氨甲酰磷酸合成酶 1（Carbamoyl-phosphate synthase 1, CPS1）的作用下与二氧化碳生成氨甲酰磷酸，并且消耗 2 分子的 ATP；然后在鸟氨酸氨甲酰转移酶（Ornithine carbamoyltransferase, OCT）的作用下和鸟氨酸（Ornithine, Orn）生成瓜氨酸。这部分反应是在线粒体中进行的。生成的瓜氨酸由线粒体进入细胞质，与 Asp 在精氨基琥珀酸合成酶的作用下合成精氨基琥珀酸，紧接着在精氨基琥珀酸裂解酶的催化下生成精氨酸（Arginine, Arg）和延胡索酸；最后在精氨酸酶 1 的作用下将 Arg 分解成尿素和 Orn，生成的 Orn 又可以进入线粒体参与瓜氨酸的合成。这一系的反应，最终又回到 Orn 称为尿素循环或者是鸟氨酸循环。从尿素循环可以看出，尿素中的两个氮原子一个来自于血液中的氨，另一个氮原子来自于细胞质中的 Asp。

尿素循环包含五个酶：CPS1、OCT、精氨基琥珀酸合成酶、精氨基琥珀酸裂解酶以及精氨酸酶 1。其中 CPS1 和 OCT 都是线粒体蛋白，其他的酶都存在于肝细胞质中。然而体内尿素循环的有效运转，还需要其他的蛋白，比如肝脏谷氨酰胺酶（Häussinger 1983）、线粒体碳酸酐酶 V（Häussinger and Gerok 1985）、N-乙酰谷氨酸合成酶（Beliveau-Carey et al 1993），线粒体鸟氨酸/瓜氨酸逆向转运蛋白

(Camacho et al 1999)、线粒体天冬氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白 (Kobayashi et al 1999)。在尿素循环中, CPS1 是尿素循环的关键限速酶。在正常的生理条件下, N-乙酰谷氨酸能够变构激活 CPS1, 从而控制尿素循环。在线粒体中 N-乙酰谷氨酸由乙酰辅酶 A 和谷氨酸在 N-乙酰谷氨酸合成酶 (N-acetylglutamate synthase, NAGS) 的催化下生成。研究表明谷氨酰胺酶催化 Gln 的代谢产物氨能够激活尿素循环 (Häussinger 1983), 这主要是为 N-乙酰谷氨酸合成提供底物谷氨酸。

3.2.2 肝静脉周—谷氨酰胺循环

肝静脉周肝细胞分布于末端静脉, 肝细胞数量约占总肝细胞数的 7% 左右 (Gebhardt and Mecke 1983); 胞内有丰富的 GS 而缺少尿素循环酶 (Meijer et al 1990)。因此, 逃离门静脉周尿素循环的血氨进入肝静脉周, 在 GS 的作用下生成 Gln, 是氨解毒的另一条途径 (如图 1-2)。在完整肝小叶中, 门静脉周谷氨酰胺酶和肝静脉周谷氨酰胺合成酶同时被激活, 导致门静脉周 Gln 降解、肝静脉周 Gln 重新合成, 因此通过肝脏的 Gln 平衡几乎为零。这种耗能的谷氨酰胺循环称为细胞内谷氨酰胺循环。体内与体外试验均表明, 从门静脉摄取 7%–25% 的血氨在肝静脉周合成 Gln (Cooper et al 1988), 同时大约 70%–100% 的总体肝脏谷氨酸 (Glutamate, Glu) 吸收主要发生在肝静脉周肝细胞。GS 是谷氨酰胺合成的关键酶, 除此之外, 还需要 NH_4^+ 转运体 RhB 糖蛋白, 鸟氨酸氨基转移酶以及谷氨酸转运体的参与。Gln 合成在氨代谢中起着非常重要的作用, 同时也作为氮节约机制, 减少氮浪费。

研究表明尿素循环是一个高能力、低亲和力的氨代谢系统; 而谷氨酰胺合成是一个高亲和力、低能力的氨代谢系统, 能够将进入肝静脉周低浓度的氨转化成 Gln (Häussinger 1990)。肝脏内尿素循环与谷氨酰胺循环在维持动物机体氨代谢发挥了重要作用。随着肝脏血流方向, 尿素循环和谷氨酰胺合成在结构上相互切换, 并且依次呈现出低、高亲和力的氨代谢系统; 尿素循环因其较强的氨代谢能力起主导作用, 谷氨酰胺循环因其较高的亲和力起精细调控作用, 两者动态互补共同维持体内正常氨水平 (Häussinger 1990; Häussinger et al 1993)。除此之外, 尿素循环除了清除血液中的氨, 同时还不可逆转的伴随着血液碳酸氢根的清除, 对机体酸碱平衡有一定的调节作用。

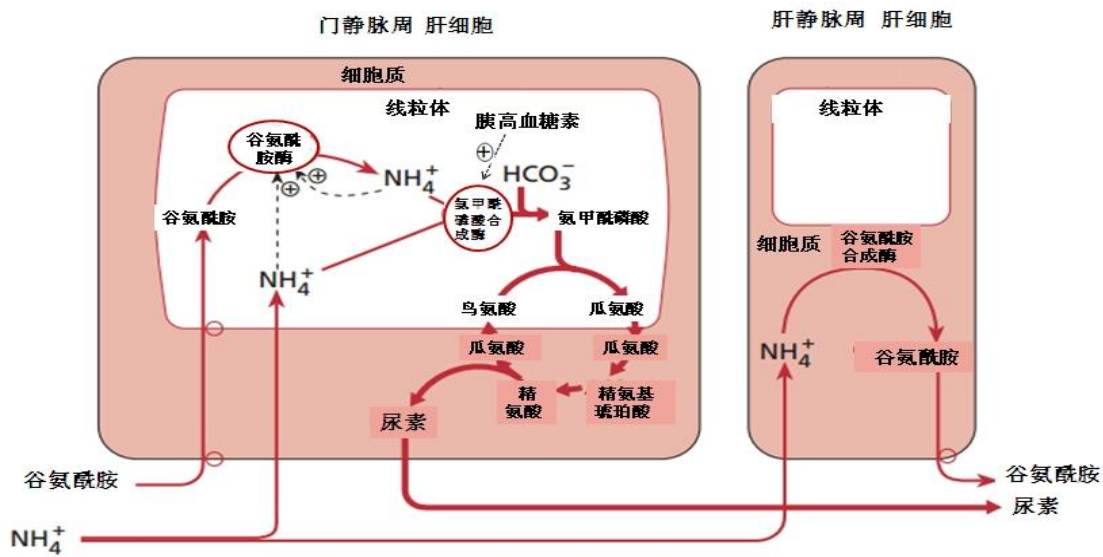


图 1-2 肝脏氨代谢（修改自 Häussinger 1990）

Fig. 1-2 Metabolism of ammonia in liver (modified from Häussinger 1990)

3.3 肝脏尿素合成的调控

肝脏尿素合成的调控主要包括短期调控和长期调控。短期调控主要是发生在底物水平和酶活性，然而长期调控是基因表达转录后影响酶浓度。尿素循环的底物依赖于氨基酸的供给、氨基酸转运系统的活性，以及氨基酸代谢酶，这些因素是体内尿素合成的重要决定因素（Häussinger 2007）。人体肝脏尿素生成对血浆中尿素氮的浓度非常敏感，并且从外源氨基酸生成的尿素直接和血浆氨基酸浓度相关，至少达到 15mmol/L（Vilstrup 1980）。因此，尿素合成在现实的底物浓度下不能达到饱和。此外，精氨基琥珀酸合成酶似乎是饱和氨浓度时尿素合成的限速酶；但是在生理低血氨浓度下，氨甲酰磷酸合成才是尿素合成的限速步骤（Meijer et al 1985）。

尿素合成的短期调控主要发生在线粒体 CPS1 作用于氨和碳酸氢根，在生理浓度下，CPS1 是尿素循环的限速酶。尿素循环对于氨具有较低的亲和力，但是这种较低的亲和力在一定程度上可以部分被线粒体谷氨酰胺酶弥补。线粒体 Gln 在谷氨酰胺酶的作用下分解产生氨和谷氨酸，在生理浓度范围内，谷氨酰胺酶可以被其自身的代谢产物氨所激活（Häussinger and Sies 1979）。肝脏谷氨酰胺酶这种独特的特征，使其作为一种线粒体氨的放大系统，因此谷氨酰胺酶活性是尿素循环流量的一个重要决定因素（Häussinger 1998）。所有已知增加尿素合成的因素如胰高血糖素、氨、增加氨基酸负荷或者碱中毒，均可激活谷氨酰胺酶，通过放大系统为

CPS1 提供氨。尿素合成也受到线粒体碳酸氢盐的控制, 这是由 pH、二氧化碳浓度以及线粒体碳酸酐酶 V 的活性决定。这种酶需要快速将二氧化碳转化成碳酸氢盐, 它是 CPS1 的底物, 通过乙酰唑胺抑制其活性可以阻断尿素合成 (Dodgson and Forster 1986)。

短期增加尿素合成也被认为是通过 N-乙酰谷氨酸来介导的, 虽然 N-乙酰谷氨酸短期调控因子控制尿素循环存在争议, 但是它作为一种共激活剂能够刺激 CPS1 的活性 (Lund and Wiggins 1984)。鼠腹腔内注射完整的混合氨基酸快速激活尿素合成, N-乙酰谷氨酸活性增加五倍, CPS1 活性也相应的增加五倍 (Stewart and Walser 1980)。虽然 N-乙酰谷氨酸在肝脏的半衰期大约为 20s, 但是它仍然能够快速响应蛋白摄入的减少。Orn 浓度也可能在影响 CPS1 活性以及调控尿素循环流量中起着重要作用 (Lund and Wiggins 1986)。此外, CPS1、精氨基琥珀酸合成酶以及精氨基琥珀酸裂解酶的活性也可以受到 MgATP 和游离 Mg^{2+} 的变构调控。并且在生理浓度范围内的尿素对尿素循环没有反馈抑制, 只有高浓度的尿素才对精氨基琥珀酸裂解酶活性具有一定的抑制作用。

就长期调控而言, 随着日粮蛋白的改变, 尿素循环酶的表达也发生相应的变化 (Snodgrass and Lin 1981)。胰高血糖素、胰岛素、糖皮质激素是这些反应的主要介导因子 (Morris et al 1987)。当蛋白摄入增加时, 肝脏尿素循环中五种酶浓度相应的增加, 导致尿素生成增多。尿素循环酶的这种长期调控主要发生在基因转录后水平 (Takiguchi and Mori 1995), 并且与尿素循环相关蛋白如鸟氨酸转运蛋白 (Camacho et al 1999) 或者谷氨酰胺酶 (Dhahbi et al 1999) 受到平行调控。在饥饿过程中胰高血糖素增加, 糖皮质激素增加蛋白分解, 这两种激素都与尿素生成以及酶活性增加有关 (Sigsgaard et al 1988)。胰高血糖素也可以通过快速机制调控尿素合成, 比如通过激活线粒体谷氨酰胺酶 (Hüssinger et al 1983)、氨基酸转运体 (Fehlmann et al 1979)、N-乙酰谷氨酸合成 (Staddon et al 1984)、刺激肝脏蛋白降解 (vom Dahl et al 1991)。胰岛素对尿素合成可能没有直接影响, 但它是其他已知激素调节因子 (如胰高血糖素) 的调节器, 同时也是肝脏蛋白降解潜在的抑制剂 (Hallbrucker et al 1991), 因此胰岛素是体内尿素合成的主要调控因子。生长激素降低尿素生成, 可能是通过减少肝脏氮的供给 (Wothers et al 1994)。能量限制下调 CPS1 和谷氨酰胺酶, 然而减少蛋白摄入降低尿素合成。

此外，肝脏精氨酸酶和一氧化氮合成酶可以竞争精氨酸（Stadler et al 1995）。Arg 可被一氧化氮合成酶催化转变成瓜氨酸和一氧化氮，此时尿素合成发生短暂的阻断。然而同整个尿素循环流量相比，肝脏中精氨酸代谢的这条途径是很小的。精氨酸能够刺激 N-乙酰谷氨酸合成酶，避免氨中毒（Kim et al 1972）。肉毒碱能够降低血浆氨浓度并且增加尿素合成，防止急性氨中毒（Costell et al 1984）。缺失肉碱转运体的脂肪肝小鼠抑制尿素循环酶的表达（Tomomura et al 1992）。因此，长链脂肪酸的堆积可能会导致依赖肌动蛋白的糖皮质激素激活受到抑制（Tomomura et al 1996）。在正常生理浓度范围内棕榈酰 CoA，CPS1 受到脂肪酸酰化的抑制。这种现象表明脂肪酸代谢和尿素合成之间存在联系。

4 肝脏氨代谢与氨基酸代谢之间的关系

肝脏氨基酸代谢是非常活跃的，几乎包含所有的氨基酸代谢酶。来自肠道的氨基酸、小肽以及外周组织中多余的氨基酸都能通过血液运输到肝脏进行代谢，通过氨基酸转氨作用生成其他的氨基酸，或者脱氨参与尿素循环，或者合成蛋白质。由于肝脏对氨基酸的大量代谢，从小肠吸收进入肝脏的总氨基酸只有一小部分以游离氨基酸的形式进入外周循环（Lobley et al 1995）。其中大部分的谷氨酸在肝静脉周被吸收用于谷氨酰胺循环，而其他的氨基酸比如 Ala、Glu、脯氨酸主要被门静脉周肝细胞用于尿素循环和糖异生。

氨作为氨基酸和蛋白质代谢的产物也主要在肝脏代谢合成尿素和 Gln。研究表明 Gln 和谷氨酸均可作为尿素氮的主要前体物质（Brosnan et al 1995; Nissim et al 1993）。肝脏 Gln 的代谢主要是通过磷酸依赖的谷氨酰胺酶介导，它主要存在于门静脉周肝细胞线粒体中，并且对微小的 pH 变化、氨以及胰高血糖素非常敏感（Brosnan et al 1995）。谷氨酰胺酶催化 Gln 生成的氨是氨甲酰磷酸合成的主要来源，并且 Gln 的酰胺氮能够直接转移到氨甲酰磷酸合成酶上（Meijer 1985）。除了生成氨外，Glu 是磷酸依赖的谷氨酰胺酶通路的第二个代谢产物。Glu 是肝脏氨基酸代谢的中心，能够参与肝脏内许多氨基酸代谢。几乎所有的氨基酸都可以发生转氨反应，将氨基酸通过 α -酮戊二酸生成谷氨酸，然后通过谷氨酸脱氢酶或者是天冬氨酸氨基转移酶代谢（Nissim et al 1993）。谷氨酸脱氢酶产生的氨通过 CPS1 进入尿素循环。天冬氨酸氨基转移酶将谷氨酸的氨基转移到草酰乙酸生成 Asp，然后通

过精氨基琥珀酸合成酶可能为尿素循环引入第二个氮原子（Kashiwagura et al 1985）。这些反应的代谢酶如氨基转移酶和谷氨酸脱氢酶都是可逆的，它们能够促进肝脏氨的清除。在氨基酸的这些反应过程中，Glu 可以作为其他非必须氨基酸合成的氮源供体，也可以作为氮源的受体，是机体氮平衡的中心，将肝脏氨代谢和氨基酸代谢联系起来。

进入肝脏的血氨除了生成尿素以及尿素循环的中间产物外，还有一部分生成 Gln 和其他的一些非必须氨基酸。在鼠门静脉灌注 $^{13}\text{NH}_4\text{Cl}$ ，大量标记物存在于 Glu、Asp、Ala（Cooper et al 1988）。当尿素合成减弱或者不足以代谢过量的氨，氨基酸的形成（Ala、Glu）可能作为氨氮的受体（Nissim et al 1993）。研究表明，在牛门静脉血氨吸收增加的情况下，肝脏氨基酸清除和分解增加（Lobley et al 1995；Mutsvangwa et al 1996），可能是由于尿素合成增加了 Glu 和 Asp 的转氨基反应，提高了氨基酸氮的需求量。在正常条件下，线粒体和胞质中 Asp-Glu 转酰胺基作用是平衡的（Cooper et al 1988），并且线粒体内谷氨酸脱氢酶的反应是不可逆的，这意味着尿素分子中的两个 N 原子可以由氨或氨基酸（Meijer et al 1990）来产生。但是在高尿素流量条件下，用于尿素合成的氨不足以提供尿素分子的两个氮原子，此时可能就需要肝脏内氨基酸的代谢为氨代谢合成尿素提供额外的氮源。然而，在体外培养绵羊肝细胞表明氨基酸氮对尿素合成不是必需的（Luo et al 1995）。但是在人和狗体内研究表明，肝脏灌注 ^{15}N 标记的 NH_4Cl ，肝静脉血液中 Asp 中 ^{15}N 的丰度很少，表明氨的代谢可能需要氨基酸氮的供给（Patterson et al 1995；Yang et al 2000）。因此，门静脉血氨进入肝脏通过尿素循环代谢，是否需要氨基酸氮源的供应有待进一步论证。

5 血插管技术和代谢组学技术在营养代谢研究中的应用

动物营养研究的核心问题是探索营养物质在机体的消化、吸收以及代谢转化规律，以实现营养物质利用的最大化。随着动物营养学研究的发展，需要综合生理学、生物化学、细胞生物学以及分子生物学等多学科来全面诠释机体营养代谢问题，而传统的营养研究手段难以深入了解机体营养代谢的动态过程以及其内在机制。采用多重血插管技术、代谢组学等技术能够全面系统的进行营养研究，有助于揭示深层次的分子代谢机制。

5.1 血插管技术在动物营养研究中的应用

血插管技术是指运用外科手术的方法在动物机体某个或某些部位的血管内（动脉和静脉）安装永久性的插管，方便对动物进行连续采血或灌注外源性的物质，为动物机体营养物质代谢的研究提供技术支撑。根据插管安装的位置不同，可以分为门静脉插管、肝静脉插管、股静脉插管、肠系膜静脉插管、颈动脉插管、股动脉插管等。在目前营养研究主要是将单一的插管组合形成多重血插管（如肠系膜静脉-门静脉-肝静脉-颈动脉插管），为研究单一器官或整体营养代谢提供较为科学的方法。

肠道是机体营养物质消化吸收的主要场所，日粮中的营养物质通过肠道消化吸收后，随血液循环进入门静脉。随着营养代谢研究的发展，多重血插管技术已经广泛应用于研究肠道营养物质的吸收。黄瑞林等（2006）和刘建高等（2007）通过安装猪肠系膜静脉-门静脉-颈动脉多重插管研究了不同水平或不同来源的淀粉对餐后门静脉血浆氨基酸、葡萄糖含量的动态影响。Yen 等（2004）利用这种方法研究了不同的日粮蛋白水平对门静脉血浆净氨基酸吸收量的影响。Stoll 等（1998）运用插管术同时结合同位素示踪技术证明了日粮中大约 1/3 必须氨基酸被肠道粘膜首代谢消耗。这些插管技术的成功应用，要求手术人员拥有丰富的外科手术经验，以及精确的术后护理。

肠道吸收的营养物质通过门静脉输送到肝脏进行代谢，最后由肝静脉输出到循环系统。Huntington（1989）、赵胜军（2010）和郑培培等（2014）分别在牛、羊、猪成功安装肝静脉插管，这有助于科研工作者在体内对肝脏营养物质代谢的研究。Kristensen 等（2009）通过在猪安装肠系膜静脉-门静脉-肝静脉-腹主动脉研究肝脏苯甲酸代谢转化规律。Li 等（2015）利用猪系膜静脉-门静脉-肝静脉-颈动脉多重插管研究了不同蛋白质日粮对肝脏氨基酸代谢转化的影响。Koeln 等（1993）通过基于肝静脉的多重血插管技术探索牛门静脉、肝静脉血浆氨基酸的变化。借助血插管技术，以便于在接近正常生理条件下得到某个器官或组织对养分的吸收代谢特点，从而更准确科学的理解营养物质内在代谢转化规律。

5.2 代谢组学在动物营养研究中的应用

代谢组学是指运用现代分析技术研究生物体受到刺激或扰动后，机体内各种代谢途径的底物以及产生的小分子代谢物随时间的变化规律，反映生理调控的终点，揭示生命活动的代谢本质，是系统生物学的重要组成部分。代谢组学技术需要高灵敏度、高分离度且稳定性好的分析手段。目前应用于代谢组学的分析方法主要有：气相色谱-质谱联用技术（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）、液相色谱-质谱联用技术、核磁共振技术等。

随着动物营养研究的深入，代谢组学技术已广泛应用于动物营养研究。通过代谢组学来探索营养学问题，从代谢水平研究营养素与机体之间的相互作用。目前利用这种技术的研究主要集中于碳水化合物、氨基酸和脂代谢等方面，从而在分子水平探索营养素对动物生理机能的影响（Elliott et al 2002）。He 等（2009）通过代谢组学技术发现生长育肥猪日粮添加精氨酸改变机体氨基酸和脂肪代谢，同时导致骨骼肌蛋白质合成增加以及肠道微生物代谢改善，显著提高动物机体生长性能。Noguchi 等（2003）应用代谢组学方法通过评价某些代谢产物与氨基酸摄入的相关性来确定日粮中氨基酸的适宜添加量。Bertram 等（2009）利用基于核磁共振的代谢组学方法揭示了日粮纤维对高胆固醇血症猪内源代谢的影响，并找出血浆标志物。Xiao 等（2012）基于 GC-MS 代谢组学研究发现，断奶仔猪日粮添加 Gln 影响机体氨基酸、糖、脂肪酸代谢谱。这些研究都可以用于评价饲料营养对动物机体的影响。

此外，动物肠道拥有复杂的微生物菌群结构，与宿主之间存在着代谢互动的过程。代谢组学作为一个高效的研究方法，为动物肠道微生物区系与宿主的相互作用提供了有效的分析手段。Martin 等（2010）通过此方法来研究日粮对微生物结构的调节作用和粪便中代谢产物的变化与宿主微生物的关系。Yap 等（2008）通过对小鼠尿液和粪便代谢组进行比较发现，肠道微生物菌群与短链脂肪酸和氨基酸的代谢可能有密切联系。运用此方法可研究饲用微生物添加剂在肠道的定植以及繁殖成优势菌群，从而直接反映宿主体内代谢过程对益生菌的生理效应。此外饲料经加工后，其营养成分及其可消化性等都会发生不同程度的变化；因此，可以借助代谢组学来评估饲料加工工艺对营养物质利用率的影响。

6 本研究的目与意义

肝脏是机体氮代谢的主要场所，来自肠道的门静脉血氨在肝脏主要通过尿素循环代谢。日粮中约有 18% 的氮营养素是以氨氮的形式出现在门静脉血液中，其浓度是循环系统其他部位的 10 倍以上；此外，课题组前期研究发现随着日粮蛋白水平的升高，猪门静脉血氨浓度达到 250 μ mol/L-350 μ mol/L。因此本研究旨在明确门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响。通过安装门静脉-肝静脉插管，建立仔猪肝脏门静脉灌注技术；通过门静脉灌注不同浓度的 NH_4Cl ，运用肝脏血浆代谢组学以及数字基因表达谱分析肝脏基因表达，来探索门静脉血氨对肝脏代谢谱、相关基因表达以及酶活的影响；同时在细胞水平探索氨对肝脏氨基酸代谢影响的机制，为调控肝脏氮代谢，减少尿素排放提供理论基础。

第二章 仔猪肝脏门静脉灌注技术的建立

1 前言

肝脏是动物机体最大的消化腺，可以合成、分解、储存、解毒、排泄等多种营养或有毒物质。肠道将日粮中的营养物质消化吸收后，通过门静脉进入肝脏，在肝脏进行加工后将代谢转化的营养物质由肝静脉输送到血液循环，为外周组织提供所需的营养物质（Vollmar and Menger 2009）。此外，肠道中大量的血氨进入肝脏，主要通过尿素循环代谢解毒。由此可见，肝脏在营养物质代谢中有着非常重要的作用，门静脉和肝静脉是营养物质进出肝脏的通道。

肝脏是机体营养素代谢的中枢。目前营养物质的研究主要集中在动物的整体水平，而对单个器官（如肝脏）的营养物代谢研究主要是通过体外肝细胞培养来进行，但是细胞水平结果不能完全反应机体内生理水平的代谢情况。而血插管技术的发展为器官营养物质的研究提供了技术手段。因此，本试验主要是通过安装仔猪门静脉-肝静脉插管，建立门静脉灌注技术，为研究肝脏营养物质代谢提供一种有效的方法。

2 材料与方法

2.1 试验动物

选择健康、体重 $20 \pm 1.1\text{kg}$ 的杜×长×大三元杂交去势雄猪 8 头，在环境温度为 $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的代谢室内采用代谢笼（ $1.5\text{m} \times 0.75\text{m} \times 0.68\text{m}$ ）单栏饲养，栏内有独立的饮水器和给料器。每天 08:00，16:00，24:00 按时饲喂，待试猪适应期 5d 后进行手术，减小手术过程中的应激。

2.2 试验材料

2.2.1 药品与耗材

主要有肥皂、络合碘、75%酒精棉、0.1%新洁尔灭溶液（苯扎溴铵溶液）、肝素—0.9%NaCl 溶液（200IU/ml 和 100IU/ml）、氯化铵（Ammonium chloride, NH_4Cl ）固体粉末、镇定剂（硫酸阿托品）、止血敏（酚磺乙胺）、5mL 和 10mL 注射器、生理盐水、5%葡萄糖注射液、青霉素、链霉素、异氟烷、戊巴比妥钠、消炎粉（灭菌结晶磺胺）、芦荟手套、破伤风抗毒素、无损伤缝合线（4-0，蓝黑色）、无损伤缝合线（6-0，蓝黑色）、油性 Mark 笔、肝素帽、4 号线、7 号线、10 号线、一次性口罩、头皮针、中央静脉导管（内外径分别为 1.67mm 和 2.41mm，长度约为 30cm，使用前导管内注满肝素钠溶液）、灌注泵等。

2.2.2 手术器械包

纱布、创布、刀片（圆头，24 号）、巾钳（6 把）、刀柄（4 号，1 把）、止血钳（8 把）、平剪（1 把）、线剪（1 把）、毛箭（1 把）、眼科剪（2 把）、长镊子（1 把）、平口镊子（2 把）、有齿镊（1 把）、长持针器（2 把）、短持针器（2 把）、圆弯针（3 个）、三棱针（3 个）和拉钩（4 把）、托盘、脸盆、水桶、绳子及麻绳、手术衣帽等。手术衣帽和整个手术间在手术前 1h 用紫外线照射消毒。所有手术器械在术前采用 120-125℃ 的高压蒸汽灭菌 30min，然后在烘箱中烘干备用。

2.3 门静脉-肝静脉血管插管的安装

（1）动物术前的处理

试验猪手术前空腹 12h，手术前一天开始注射抗生素（160 万单位青霉素+100 万单位链霉素/次/只），每隔 8h 注射一次。试猪手术前 20min 按约 0.4mL/kg 注射镇定剂硫酸阿托品 8mL，5min 后以 0.1 mL/kg 注射止血敏 2mL。

(2) 动物诱导麻醉

耳静脉按 2.5-3.5mL/kg 体重注射含 2%戊巴比妥钠的生理盐水，以诱导仔猪麻醉。

(3) 保定动物

将诱导麻醉的手术猪右侧侧卧于可调手术台上，并将其调整至腹部稍向上倾斜，用麻绳或橡胶带四肢保定。

(4) 动物呼吸麻醉

给保定的手术猪带上呼吸面罩，进一步采用异氟烷气体呼吸麻醉，在开始约 5-10min 内将麻醉剂控制阀的旋钮调至最大刻度“5”处，然后将旋钮置于 3 或 2 刻度处，以维持麻醉。手术过程中根据试猪的瞳孔扩张程度和呼吸深度来调节旋钮。

(5) 备皮

用肥皂水润洗手术部位、并刮毛，待毛刮净后用清水清洗术部，络合碘消毒，75%酒精脱碘，盖好创布。

(6) 开创

沿右侧最后肋骨 2cm 处与肋骨平行切开，距腰椎横突 2cm 处。切开皮肤约 10cm，按肌纤维走向钝性剥离腹外斜肌、腹内斜肌、腹直肌，分离肌肉、腹膜。用肝脏拉钩提拉腹壁，增大手术空间，暴露术部。取两块消毒纱布，用含抗生素的灭菌生理盐水浸润，一块铺在肠壁表面，另一块铺在肝脏表面用于保护肝脏。开创时尽可能减少组织损伤，特别要避免损伤大的血管和神经，出血时视情况轻重用纱布压迫止血或用止血钳止血。

(7) 门静脉-肝静脉插管的安装

参照黄瑞林等（2003）和郑培培等（2014）描述的方法分在门静脉和肝静脉安装插管。安装插管的基本过程如下：

门静脉插管的安装：先用温热盐水垫裹住暴露肠管并尽量往后压。术者左手探至肝门，找到肝门淋巴结，此时在肝门淋巴结的左侧可以看到门静脉。剥离门静脉上欲插管部位的浆膜等结缔组织。在门静脉周围用医用 4-0 无损伤缝合线做一荷包缝合，直径应比导管外径稍大，导管插入前预打一个结。将穿刺针沿门静脉走向插入，轻抽注射器见有回血后，迅速插入导丝，撤出穿刺器，导管沿导丝导入门静脉。血插管插入门静脉 2-3cm，将之前的荷包缝合进行结扎，固定血插管，检查血插管

是否通畅，将插管内充满肝素钠溶液，末端安上肝素帽，将之前的纱布撤出。在插管上用 4 号线做打结牵引，打双结以增加摩擦力，间隔 2cm，打 3-4 个结。门静脉插管安装完毕后，用纱布及时清理血迹，可防止血凝块成为异物。

肝静脉插管的安装：用拉钩提起上腹壁，将肝脏往下压，充分暴露肝的膈面。在肝与膈肌结合顶端有一悬韧带，其下为肝静脉窦，是几个较大肝静脉在后腔静脉的出口处。剪断悬韧带，用医用 4-0 无损伤缝合线预做一荷包缝合，直径应比导针外径稍大。在荷包缝合内，用穿刺针逆肝静脉血流方向插入，见有回血后，迅速插入导丝，撤出穿刺针，导管沿导丝导入肝静脉。血插管插入肝静脉 2-3cm。小心退出导丝，立即拉紧缝合线，打结，把插管缝合在膈肌上。导管在整个手术过程中要尽量使其充满 200IU/ml 的肝素钠生理盐水溶液，末端安上肝素帽。手术过程中要尽量不要破坏血管外的筋膜，防止大量出血。有出血现象时要及时进行止血，对暴露的肝、肠等组织要注意洒生理盐水，保持湿润。

（8）插管固定

导管安装完毕后，将其引出体表。连续缝合腹膜、结节缝合肌肉各层、最后外翻结节缝合皮肤。然后将导管用缝合线固定在尽可能高的背部，严禁 180 度弯曲导管。每根导管间距 1cm 左右，并且做好标记。创口处外涂消炎粉以防止感染。

（9）术后护理

术后每头试猪立即通过肌肉注射一头份的破伤风抗毒素，术后 12-24h 内，通过门静脉点滴 5% 葡萄糖给试术猪供给营养。术后连续 3 天内，每天两次肌肉注射青霉素（160 万单位青霉素/次/只）和链霉素（100 万单位青霉素/次/只），以防试猪感染。同时为了防止导管堵塞，每天每导管用 100IU/mL 肝素溶液冲洗 3 次，每 2 天冲洗时从导管内抽出 3mL 淤血。创口和导管出口处涂擦止痒软膏。

2.4 门静脉灌注技术

2.4.1 NH_4Cl 灌注浓度的确定

为了模拟生理条件下，门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响。首先要明确动物摄食前后门静脉血氨的浓度以及门静脉血流量。本实验室前期的研究结果发现，20kg 左右的仔猪饲喂高、低两种不同蛋白日粮后，门静脉血氨浓度达到 350 $\mu\text{mol/L}$

和 $250\mu\text{mol/L}$ ，且摄食前门静脉血氨浓度约为 $200\mu\text{mol/L}$ 。门静脉血流速度参考李铁军等（2003）的方法，通过肠系膜灌注对氨基马尿酸（Para-aminohippuric acid, PAH），分析门静脉和颈动脉血液中对 PAH 的浓度，通过公式 $\text{PVPF}=\text{Ci}\times\text{IR}\times(\text{PAH}_{\text{pv}}-\text{PAH}_{\text{a}})^{-1}$ 计算门静脉血流速度，其中 PVPF 为门静脉血浆流率 (mL/min)，Ci 为 PAH 灌注液浓度 (mg/mL)，IR 为 PAH 灌注速度 (mL/min)， PAH_{pv} 和 PAH_{a} 分别为门静脉和颈动脉血浆中 PAH 浓度 (mg/mL)。本课题研究表明 20kg 仔猪门静脉血流速率为 981.4mL/min （郑培培等 2014）。因此可知摄食不同蛋白水平前后，门静脉血氨的流量大约分别 $150\mu\text{mol/min}$ 和 $50\mu\text{mol/min}$ 。设定灌注泵的灌注速率为 2mL/min ，体外灌注 NH_4Cl 溶液的浓度分别为 75mmol/L 、 25mmol/L 。

2.4.2 NH_4Cl 溶液的配制

用分析天平分别称取 0.3344g 和 1.0031g NH_4Cl 固体粉末于小烧杯中，并用适量的生理盐水溶解，然后转移到 250mL 容量瓶中定容至 250mL ；然后用 pH 计调节溶液的 pH 至 7.3 ± 0.5 ，再用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。溶液现配先用。

2.4.3 门静脉灌注

待手术猪恢复健康后，随机分成 2 组，每组 4 头。试验前动物处于空腹状态。在门静脉灌注试验开始前，首先用生理盐水灌注 10min ，然后用 50mL 注射器分别吸取两种不同浓度的溶液 50mL ，连接灌注泵和输液管，从门静脉插管连续灌注 120min ，设定灌注泵的灌注速率为 2mL/min 。第一组灌注低浓度的 NH_4Cl 溶液 (25mmol/L)，第二组灌注高浓度的 NH_4Cl 溶液 (75mmol/L)。注意：灌注前要排空注射器和输液中的空气，当注射器中的溶液灌注完后，及时更换装有溶液注射器。

2.4.4 样品采集

分别用注射器从肝静脉插管中抽取灌注前、灌注后 30min 、 60min 、 90min 、 120min 时间点的肝静脉血液。每次采血时，首先用 5mL 注射器缓慢从肝静脉插管中抽取血液前 2mL 丢弃，然后更换 10mL 注射器从肝静脉插管中抽取约 8mL 血样，置于盛有数滴肝素钠的真空采血管中，并轻轻摇晃采血管做好标记，将采血管置于冰上，迅速送往实验室在 2500r/min 、 4°C 下离心 15min ，离心后用 $1000\mu\text{L}$ 加样器

将上清液分装于 0.5mL 小管中，并做好标记置于-80℃冰箱中保存。待灌注实验结束后，对动物实施安乐死；然后用缝合线远端结扎门静脉、肝动脉以及肝静脉，在靠近肝脏部位剪断门静脉、肝动脉和肝静脉，将肝脏取出于托盘中，用剪刀剪取肝脏组织，并在生理盐水中清洗干净，用锡箔纸包好，放入液氮中保存作备用。

2.5 肝静脉血浆尿素浓度的测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒，按照说明书进行操作。

2.6 数据分析

采用 SPSS（V16.0）统计分析软件进行单因素方差分析。所有的数据结果采用均值±标准差表示。 $P<0.05$ 表示差异显著。

3 结果与分析

3.1 门静脉灌注技术

门静脉灌注技术的步骤如图 2-1。整个过程主要包括门静脉-肝静脉插管的安装以及门静脉灌注两个方面。插管的安装主要包括试术猪的麻醉、保定、备皮、开创、暴露腹腔、门静脉安装、肝静脉安装、缝合、术后护理；而灌注过程主要包括灌注泵、门静脉灌注。麻醉是手术顺利进行的保障，本实验采取的措施是首先用耳缘静脉注射 2%的戊巴比妥钠诱导麻醉，然后在用异氟烷呼吸麻醉，以维持整个手术麻醉过程，并且在麻醉过程中要根据试术猪瞳孔扩张程度以及手术操作中动物的反应大小来判断是否加大呼吸麻醉剂量。门静脉-肝静脉的安装是灌注技术的关键。其中肝静脉插管的安装是逆着血流方向插入，并且荷包缝合结扎，同时固定在腹壁上以防止插管在腹腔中扭曲。门静脉血流速度和门静脉营养物质的浓度是体外模拟生理条件下肝脏营养物质代谢的保障。门静脉血流速度可以通过 PAH 的灌注测定，而门静脉营养物质的浓度可通过插管采集门静脉血样测定。灌注过程中，要排出注射器中的空气。

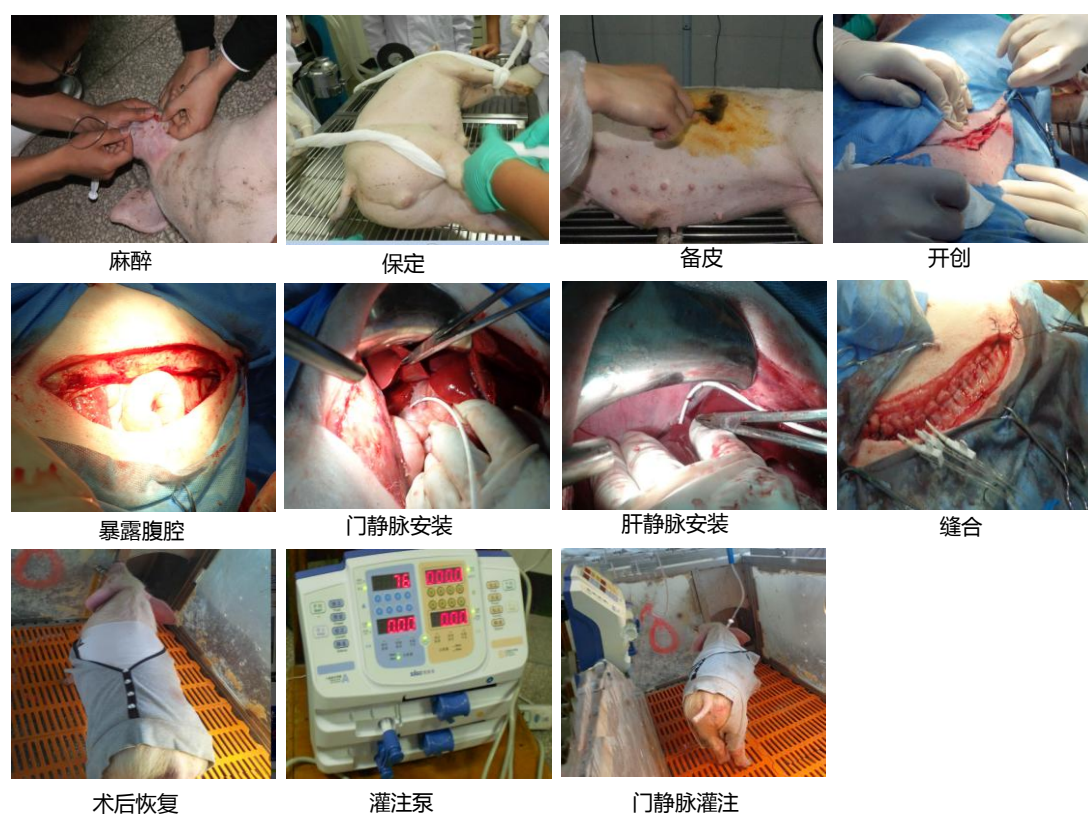


图 2-1 仔猪肝脏门静脉灌注技术的示意图

Fig. 2-1 The schematic diagram of portal infusion technique in liver of pig

3.2 门静脉灌注 NH_4Cl 对尿素浓度的影响

整个试验过程中，用于门静脉-肝静脉插管安装的 8 头仔猪，都成功的用于门静脉灌注试验。通过门静脉灌注两种不同浓度的 NH_4Cl 溶液，检测血液中尿素氮的浓度（图 2-2）。由图可知，在门静脉灌注 NH_4Cl 之前，血液中的尿素浓度维持在 2.50mmol/L 左右。在门静脉灌注两种不同浓度的 NH_4Cl 后，血液中的尿素浓度基本呈现相同的趋势，即随着门静脉灌注时间的延长，肝静脉血液中的尿素浓度也随之升高。并且门静脉灌注 NH_4Cl 后 0.5h、1h、1.5h、2h，高浓度组血液中尿素浓度都明显高于低浓度组 ($P<0.05$)。从以上结果可以看出，门静脉血氨浓度和尿素生成呈正相关，随着门静脉血氨浓度的增加，生成的尿素浓度随之增加。

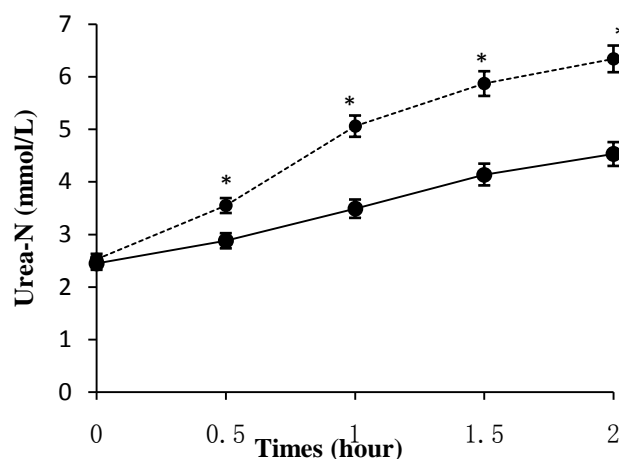


图 2-2 门静脉血氨对肝静脉血浆尿素浓度的影响

仔猪门静脉灌注高低两种不同浓度的 NH_4Cl ，采集不同时间点肝静脉血液，并检测尿素浓度。结果表示为平均值±标准差，*表示差异显著 ($P<0.05$)。实线表示低浓度氨，虚线表示高浓度氨。

Fig. 2-2 The effect of portal ammonia on the concentration of urea in hepatic vein

Two concentration of NH_4Cl were infused into liver by portal vein in pigs. The blood of hepatic vein were collected in different time and used to detected urea concentraion. Values were presented as mean±SD.* means significance difference ($P<0.05$). The solid line and dotted line represent low ammonia and high ammonia concentration of portal infusion, respectively.

4 讨论

仔猪肝脏门静脉灌注技术的建立，首先要确保门静脉-肝静脉插管的成功安装。为了确保血插管手术的顺利进行，对实验材料进行修改。在导管尖端入口 5cm 处套入输液管并用胶水固定，以增加缝合线与导管固定牵引力，防止脱落。将单腔导管改为多腔导管，在导管入口 2cm 处，相对应的地方用剪刀开两个小孔，增加血管流通性。此外，术后护理影响着插管安装的后期成功以及是否能够用于门静脉灌注。手术后动物一般都比较虚若且很少饮食，因此术后应该静脉输液 5% 葡萄糖溶液，对状态不佳的动物应连续输液几天；为防止伤口处发炎，术后在伤口处涂抹结晶磺胺，并且肌注消炎药（青霉素和链霉素）。术后伤口愈合期间，为避免仔猪瘙痒磨蹭，而导致插管脱落，应定期涂抹止痒膏，并且给试术猪定量制作一件宽松的衣服。术后护理定期用肝素钠冲洗插管，以防止血液凝固堵塞插管。

由于手术过程的顺利，以及术后护理到位，8 头手术猪全部恢复健康，并且门静脉-肝静脉插管畅通，均可以用于门静脉灌注。在门静脉灌注过程中要确定动物体门静脉血流速率。实验室前期研究研究发现 20kg 仔猪的门静脉血流速率可高达

981.4mL/min（郑培培等 2014）。而门静脉的血流速率与动物的体重是有关的，体重不同血流速率不同。因此在进行门静脉灌注前，可以通过肠系膜灌注 PAH，分析门静脉和颈动脉血液中对氨基马尿酸的浓度，根据李铁军等（2003）的方法测定门静脉血流速率。本试验以灌注 NH_4Cl 为例，实验室前期的研究发现，在 20kg 仔猪摄食前，门静脉血氨浓度大约为 $200\mu\text{mol/L}$ ，采食两种不同蛋白日粮后，门静脉血氨浓度分别高达 $250\mu\text{mol/L}$ 和 $350\mu\text{mol/L}$ ，通过采食前后门静脉血氨浓度差以及结合静脉血流速率计算出门静脉血氨的流量（ $\mu\text{mol/min}$ ）。对于不同的研究目的，可以根据相似的方法计算出门静脉营养物质的流量。最后可以根据体外设定灌注泵的速率（ mL/min ）来确定所需要灌注溶液的浓度。灌注泵速率的设定应根据实验动物的体重大小来确定，适当控制灌注速率，过快会引起动物不适，过慢导致配制浓度过大。

本试验以灌注不同浓度的 NH_4Cl 为例，发现随着灌注时间的延长，血液中尿素浓度逐渐增加；随着 NH_4Cl 灌注浓度的增加，血浆尿素浓度明显增加。门静脉中的大量血氨必须在肝脏通过尿素循环进行代谢，以维持血液中较低的血氨水平。当摄入高蛋白日粮时，大量未分解的蛋白进入后肠被微生物分解成氨通过静脉，进入肝脏引起尿素合成增加（Bikker et al 2006）。在狗门静脉灌注大量的 NH_4Cl ，血液中的尿素合成随之增加（Yang et al 2000）。同样的，鼠门静脉灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ，大量的尿素被同位素标记（Brosnan et al 2002），说明尿素合成增加。这些灌注模型的结果都与本研究的结果类似。因此可以看出，本研究建立的仔猪肝脏门静脉灌注技术可以用于体内肝脏营养物质的研究，为其提供一种有效的方法。

第三章 门静脉血氨对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响

1 前言

肝脏是氮营养素代谢的中枢。在氨基酸代谢，分泌性蛋白质合成，尿素循环等过程中发挥重要的作用。门静脉和肝动脉血液中的氨基酸和氨进入肝脏代谢，转化合成氨基酸或者蛋白质或者合成尿素，其余部分则由肝静脉进入血液循环。血氨在肝脏代谢涉及到两条途径：尿素循环和谷氨酰胺合成。来自肠道高浓度的血氨主要在肝脏代谢，大部分血氨通过尿素循环代谢，少部分合成谷氨酰胺（Glutamine, Gln）。这对于维持正常血氨代谢和较低血氨水平有重要的作用。

尿素循环是肝脏氨代谢的主要途径。在氨代谢过程中需要另一种重要氨基酸——天冬氨酸（Aspartate, Asp）的参与，为尿素合成提供第二个氮原子。肝脏尿素生成依赖于这两种氮源的协调提供（Milano et al 2000）。在反刍动物上的研究表明门静脉血氨吸收增加的情况下，肝脏氨基酸清除增加以及分解增加（Reynolds et al 1991; Mutsvangwa et al 1996）。因此氨代谢除了上述底物的供给外，可能还依赖于氨基酸的摄取以及氨基酸代谢酶活性（Häussinger 2007）。日粮中约有 18% 的氮营养素是以氨氮的形式出现在门静脉血中（Stoll et al 1998），是其他循环系统的 10 倍以上；课题前期研究发现猪门静脉血氨浓度随着日粮蛋白水平的增加而升高，在摄食后 3h 达到 250 μ mol/L-350 μ mol/L。当高浓度的门静脉血氨进入肝脏尿素循环后，对肝脏氨基酸代谢的影响还不是明确。

本试验主要是利用仔猪肝脏门静脉灌注技术，通过门静脉灌注高、低两种不同浓度的氯化铵（Ammonium chloride, NH_4Cl ），利用基于气相色谱-质谱（Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）代谢组学以及数字基因表达谱来分析不同浓度的血氨对肝脏氨基酸代谢谱以及基因表达的影响，同时检测肝脏代谢酶活性；最后在细胞水平上通过 ^{15}N 同位素来探索氨对肝脏氨基酸代谢影响的机制。

2 材料与方法

2.1 试验动物

门静脉灌注试验动物：同第二章 2.1。

原代肝细胞分离试验动物：5 日龄的杜洛克、大约克、长白猪杂交小猪。

2.2 试验材料

仔猪肝脏门静脉灌注技术所需的材料同第二章 2.2。

肝细胞分离器械及用品：20mL 注射器、输液管、普通剪刀、手术剪刀、眼科剪刀、手术结扎线、止血钳、动脉夹、纱布、托盘、大镊子、小镊子、玻璃分针、培养皿、细胞筛、细胞培养板或培养瓶、1、0.2、0.01 mL 枪及枪头、75%酒精棉球、离心管等。

2.3 仔猪门静脉-肝静脉血管插管的安装

同第二章 2.3

2.4 门静脉灌注 NH_4Cl 实验

同第二章 2.4

2.5 基于 GC-MS 的代谢组学分析

2.5.1 血浆预处理

将灌注 2h 后的血浆样本置于室温下解冻，涡旋混匀 15s，取 200uL 血浆移入管中，加入 800uL 甲醇，然后加入 60uL 核糖醇（0.2 mg/mL）作为内标。再将此混合物在室温下超声波处理 10min，接着用离心机 12000r/min，4℃ 离心 10min。取上清于试管中，然后将收集的上清液用氮气吹干至完全干燥。在干燥的样品中加入 60uL 甲氧基吡啶溶液（15mg/mL）涡旋振荡 30s，过夜反应 16h。最后，加入 60uL 二(三甲基硅基)三氟乙酰胺（bis(trimethylsilyl)-trifluoroacet-amid BSTFA）（含 1%三

甲基氯硅烷），常温条件下反应 60min。经过以上的反应，为次生代谢物含量的样品进行 GC-MS 分析。

2.5.2 GC-MS 分析

使用安捷伦 7890A/5975C 气相色谱系统分析，系统配备了 30.0m×0.25mm i.d. 溶凝石英毛细管柱，0.25- μ mHP-5MS 固定相（安捷伦，上海，中国）。以氦气作为载气，以恒定流速为 1mL/min 通过管柱，注射量 1 μ L，在不分流模式下运行。注射器温度保持在 250℃，柱温最初保持在 60℃，保持 3 min。接着以 7℃/min 的速度升温至 140℃，保持 4min，然后进一步 5℃/min 的速度升温至 300℃，并保持 1 min。柱中的气体被引入到离子源为 Agilent 5975 型质量选择检测器（安捷伦科技）中。MS 四极杆的温度设定为 150℃，离子源温度 230℃。质谱仪设定为电子轰击（EI）模式（70eV），捕获精确度为 0.1 原子质量单位，质量从 m/z 45-500 的原子。加速电压的溶剂延迟 6 min 后被打开。

2.6 数字基因表达谱分析（RNA-seq(quantification)）

2.6.1 总 RNA 的提取

将组织样品从-80℃冰箱中取出后立即放入处理过的装满液氮的研钵中，用研杵把组织样研磨成粉末状，在研磨时保证研钵中的液氮一直存在，以防止组织样分解，这一过程的操作需要佩戴手套和口罩，防止 RNA 降解。将研磨后的粉末组织样放入离心管中，然后按照 TRIZOL 试剂盒（Invitrogen）的操作方法进行提取总 RNA。

2.6.2 Ion Proton 测序

将肝脏提取 RNA 合格的样品送华大基因公司测序。实验流程如下图 2-1。样品提取总 RNA 后，使用 DNaseI 酶消化 total RNA 中的 DNA，消化产物用磁珠纯化；用带有 Oligo（dT）的磁珠富集 mRNA，向得到的 mRNA 中加入适量打断试剂高温条件下使其片断化，再以片断后的 mRNA 为模板，合成 cDNA，经过末端修复、磁珠纯化、连接接头后，对连接产物片段选择进行胶纯化回收，对连接产物进行

PCR 扩增并用磁珠纯化，从而完成整个文库制备工作。构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行大小和浓度检测，文库质控合格后使用 Ion Proton 进行测序。

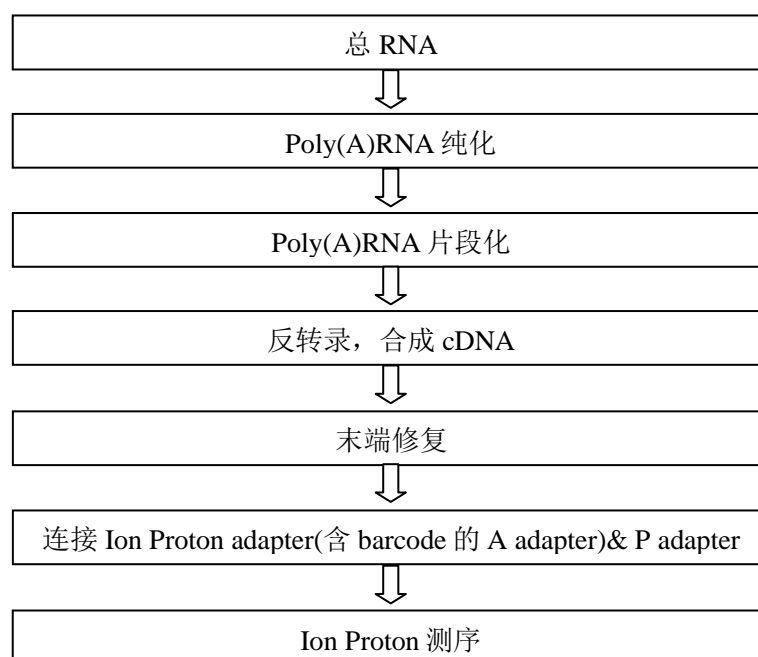


图 3-1 操作流程

Fig.3-1 Pipeline of experiments

2.6.3 测序数据

测序仪产生的原始图像数据经 Base Calling 转化为序列数据，称之为原始数据。将原始数据中包含低质量序列、Adaptor 序列等经过数据处理，得到 clean reads，数据处理如下：1）去除长度低于设定阈值（30）的 reads；2）修剪 reads 的 adaptor；3）从 3'端开始，以 15 为窗口统计 reads 平均质量，若平均质量值小于 9，则继续向 5'端滑动，直到窗口平均质量大于 9 为止，此时修剪掉该窗口结尾到 read 结尾的所有碱基；若修剪后长度小于设定阈值则去除。

2.6.4 基因注释

将获得的 clean reads 与近缘物种（sus scrofa）参考基因组和参考基因进行比对，并统计比对的比例，获得对项目总体情况的认识。利用唯一比对上基因的 reads 数目和唯一比对上参考序列的总 reads 数来计算基因表达量（Reads Per Kb per Million reads, RPKM），并给出该基因的相关信息（覆盖度、功能注释等）。

2.6.5 差异表达基因的筛选

差异表达基因（Differentially expressed genes, DEGs）的筛选是根据 mRNA 表达丰度高低有无进行分析比较的，通过基于泊松分布的假设检验计算样品中基因表达量相等的概率（p-value），p-value 越小，说明表达相等的概率越小。通过对 p-value 作多重假设检验校正，得到假阳性率（False Discovery Rate, FDR），通过 FDR 值控制差异表达基因筛选的假阳性率。以 $FDR \leq 0.001$ 且倍数差异在 2 倍及以上的基因来筛选 DEGs。

2.7 荧光定量 PCR 验证

对分析后得到的部分差异表达基因通过实时荧光定量 PCR 进行验证，选取 10 个测序分析结果为表达变化显著基因和 1 个作为内参（ β -actin）的看家基因。实时 PCR 分析由 ABI7500FAST 型荧光定量 PCR 仪完成，每个样本重复 3 次，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行操作。验证的基因引物序列采用 Primer 3.0 软件设计并由上海生物工程有限公司负责合成，引物序列及相关信息参见表 3-1

表 3-1 荧光定量 RT-PCR 验证的基因和引物相关信息

Table 3-1 Primer pairs and relative information used to analyze gene expression by real-time fluorescence quantitative PCR assay

| 基因 | 上游引物序列（5'-3'） | 下游引物序列（5'-3'） | 产物大小（bp） |
|----------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Gene | Upstream primer sequence (5'-3') | Downstream primer sequences (5'-3') | Products size (bp) |
| NAGS | CCTGTTCAAGAACGCCGAAC | GCGTAACGAGGCCAGATAGT | 130 |
| CPS 1 | AAGGCAAAGGAGATTGGGTTC | TACTGATGGGTATTCTGCAGCC | 147 |
| OCT | AAGCTGTCGCTGACGAATGA | AGTCAGAGGCAGCAACTTCC | 166 |
| GLS | CCAGAAGGCACAGACATGGT | TGGGCAGAAGCCACCATTAG | 120 |
| OAT | GCCTGCAAAATCGCTCGTAG | TCCAAACCCGTCGTAAGTGG | 150 |
| GLUD | ACATTGGGCTCCCTCTTTGG | CCCCTGGGAATGAAGCTGT | 124 |
| GLDC | TGTCCCTTTCTGCGCAATC | GCCTTTGCCTCCCATCATCT | 148 |
| SDS | CTACGTCCCTCCCTTTGACG | CCGATGGTCTCTATGGCGAG | 198 |
| GATM | TCCTAAGCCCACAATGGCTG | CTCGAACTCAGTCGTCACA | 113 |
| PSPH | GGTAAGTCGCCTACAGGAGC | CTGTTGGCAAACACGTTGGT | 120 |
| β -actin | GTCATTGAGAGCAATGCCAG | GTGTTCTACCCCAATGTG | 124 |

NAGS, N-乙酰谷氨酸合成酶；CPS 1, 氨甲酰磷酸合成酶 1；OCT, 鸟氨酸氨甲酰转移酶；GLS, 谷氨酰胺酶；

OAT, 鸟氨酸氨基转移酶; GLUD, 谷氨酸脱氢酶; GLDC, 甘氨酸脱氢酶; SDS, L-丝氨酸脱氢酶/苏氨酸脱氢酶; GATM, 甘氨酸胺基转移酶; PSPH, 磷酸丝氨酸磷酸酶。

NAGS, N-acetylglutamate synthase; CPS1, carbamoyl-phosphate synthase 1; OTC, ornithine carbamoyl-transferase; GLS, glutaminase; OAT, ornithine aminotransferase; GLUD, Glutamate dehydrogenase; GLDC, glycine dehydrogenase; SDS, L-serine dehydratase/L-threonine deaminase; GATM, glycineamidinotransferase; PSPH, phosphoserine phosphatase

2.7.1 cDNA 的制备

根据上述提取的 RNA 浓度计算出应加入体系的体积, 在 PCR 管中依次加入 Oligo(DT)₁₈ 1μL, 2×ES Reaction Mix 10μL, RI Enzyme Mix 1μL, 用 RNase-free Water 补充体积到 20μL, 轻轻混匀, 42℃ 反应 30min, 99℃ 反应 5min, 4℃ 反应 5min, 瞬间离心, 得到的 cDNA 置于-20℃保存备用。反应体系如下表 3-2。

表 3-2 逆转录反应体系

Table 3-2 System of Reverse Transcription Reaction

| Reaction Component | Volume |
|-------------------------|--------------|
| Total RNA | 2.0μl |
| Oligo(DT) ₁₈ | 1.0μl |
| 2×ES Reaction Mix | 10.0μl |
| RI Enzyme Mix | 1.0μl |
| RNase-free Water | Up to 20.0μl |

2.7.2 定量 PCR 检测

分别加入上游引物、下游引物和 cDNA 于 20μl PCR 反应体系 (表 3-3) 中, 用 RT-PCR 法检测 10 个目的差异基因和内参基因 (β-actin) 的表达量, 根据 RT-PCR 反应曲线得到各种样品目的基因和内参基因的 Ct 值, 采用 ΔΔCt 的方法进行相对定量, 比较两组样品中目的基因的表达。

最佳反应条件为: 95℃ 3min 预变性; 95℃ 10s, 58℃ 20s, 72℃ 20s, 退火/延伸进行 40 个循环。每一循环第二步结束时进行荧光信号收集。每个待测样品设置 3 个重复, 对得到的 3 个 Ct 值取算术平均值。

表 3-3 扩增反应体系

Table3-3 Amplification reaction system

| Reaction Component | Volume |
|--|-------------|
| cDNA | 0.5 μ l |
| SYBR FAST qPCR MasterMix (2 \times) | 5.0 μ l |
| ROX High (50 \times) | 0.2 μ l |
| PCR-grade water | 4.0 μ l |
| Primers | 0.3 μ l |
| Total Volume | 10 μ l |

2.8 肝脏酶活性测定

将采集的肝脏组织迅速解冻，并用匀浆器进行摇匀，所有操作均在冰上进行。将匀浆液在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000r/min 离心 10min，上清液稀释至适当的浓度用于酶活力测定。肝脏氨甲酰磷酸合成酶 1 (Carbamoylphosphate synthase 1, CPS1)、鸟氨酸氨甲酰转移酶 (Ornithine carbamoyltransferase, OCT)、精氨酸酶 1 (Arginase 1, Arg1)、谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthase, GS)、谷氨酰胺酶 (Glutaminase, GLS)、丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST) 活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定，按照说明书进行操作。CPS1 活性单位用每克蛋白质 (U/g protein) 表示，OCT、Arg1、GS、GLS、ALT 和 AST 活力单位均用每毫克蛋白质 (U/mg protein) 表示。

2.9 仔猪原代肝细胞的分离与培养

2.9.1 相关试剂的配制

(1) PBS 溶液 (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})：称 8gNaCl、0.20g KCl、1.83g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g KH_2PO_4 、2g 葡萄糖，溶于三蒸水中，调 pH 值至 7.2，定容至 1000 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，分装后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 灌流缓冲液 A：无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 溶液加入终浓度为 5mmol/L 的 EDTA，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，分装后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) 灌流缓冲液 B: 不含 EDTA 的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 溶液, 分装, 4℃ 保存。
灌流缓冲液 B1: 在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 溶液中缓慢滴加无菌的 60g/L CaCl_2 溶液, 使含有 0.6g/L CaCl_2 , 分装后 4℃ 保存。

(4) 灌流缓冲液 C: 在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 溶液中缓慢滴加无菌的 60g/L CaCl_2 溶液, 然后加入 20g/L IV 胶原酶, 使含有 0.6g/L CaCl_2 和 0.5g/L 胶原酶, 分装后 4℃ 保存。现配现用。

(5) IV 型胶原酶母液 (20g/L, 50×): 1g IV 型胶原酶干粉溶于 50mL 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 中配成 20 g/L 的母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装后-20℃ 保存。

(6) CaCl_2 母液 (64g/L, 100×): 称 1.28 g 无水 CaCl_2 溶于 20mL 三蒸水中配成 64g/L 的母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装后-20℃ 保存。

(7) William's medium E 基础培养液: 取 1 袋干粉倒入 900mL 三蒸水 (水温 15-20℃) 中, 用三蒸水润洗包装袋 3 次, 加入 2.2g NaHCO_3 、2.383g HEPES (10mmol/L) 和 1.169g NaCl (20mmol/L), 磁力轻轻搅动直至完全溶解, 用 1N HCl 或 1N NaOH 调 pH 为 7.2, 定容至 1000mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后 4℃ 保存。

(8) 地塞米松母液 (50 $\mu\text{mol/L}$, 500×): 称取 1.96mg 地塞米松干粉, 溶于 100mL William's medium E 基础培养液中, 微孔滤膜过滤除菌, 分装后-20℃ 保存。

(9) 人胰岛素母液 (1.7mmol/L): 取 97mg 人胰岛素加入 10mL 醋酸 (pH2.0, 无菌), 待完全溶解后在无菌条件下, 分装并-20℃ 保存。

2.9.2 仔猪原代肝细胞的分离

(1) 手术前仔猪自由饮水并禁食过夜, 颈部肌肉注射麻醉剂, 待仔猪麻醉后, 仰卧位保定在小动物手术台上, 使用 75%酒精浸泡后的纱布擦拭仔猪全身, 转入超净工作台内;

(2) 无菌条件下打开腹腔, 暴露肠系膜静脉, 用玻璃分针分离出一段下腔静脉, 结扎远肝门一端静脉, 近肝门一端静脉用动脉夹夹住并插管 (输液管钝性去针头部分), 绑紧后将动脉夹松开形成通路;

(3) 进行灌流分离。第一步为消化前灌流, 以 37℃ 预热的灌流液 A (含可结合 Ca^{2+} 的螯合剂 EDTA, 可使细胞间桥粒断裂) 按 50mL/min 的速率灌注, 待肝脏

稍为鼓胀时剪开下腔静脉胸段，持续大约 15min（以流出物中无或较少红细胞为宜），接着以同样速率灌注 37℃ 预热的灌流液 B（冲洗为目的），持续 5min，再以同样速率灌注 37℃ 预热的灌流液 B1（含 Ca^{2+} 利于胶原酶更好发挥作用），持续 5min（以肝脏变成黄白，且组织较为松散为宜）；

（4）待流出的液体变清后，进行第二步消化灌流，即以 20mL/min 速率灌入 37℃ 预热的含 0.5g/L 胶原酶 IV 的灌流液 C，并用止血钳适当夹住已剪开的下腔静脉胸段，使灌流液在肝脏内稍停 3-5min 后再缓慢流出，同时用 37℃ 预热无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 液间断地淋在肝脏的表面，使肝脏的温度维持在 37℃ 左右，以利于酶的消化，20-30min 后肝脏逐渐消化；

（5）轻微触动肝脏被膜，表现比较松软后，摘取肝脏，放入一无菌平皿中，加入 50mL 预冷的 Hanks 液，剔除胆囊、血管、脂肪和结缔组织，剪去肝脏周边消化不完全的部分；

（6）用镊子撕掉肝脏包膜，剪碎肝组织，大口径吸管轻轻吹打，随后分别过 100 目（150 μm ）、400 目（38 μm ）。所得肝细胞悬液用基础培养液清洗 2 次（4℃，500r/min 离心 5min），台盼蓝拒染法检测细胞活率、血细胞计数板计数；

（8）用含 10% 新生胎牛血清、1 \times SITE（Sigma-Aldrich 公司，含 10 $\mu\text{g/mL}$ 牛胰岛素、5.5 $\mu\text{g/mL}$ 人转铁蛋白、 $2.9\times 10^{-8}\text{M}$ 亚硒酸钠、2 $\mu\text{g/mL}$ 乙醇胺）、 10^{-7}M 人胰岛素、 10^{-7}M 地塞米松、双抗（100IU/mL 青霉素及 100IU/mL 链霉素，Gibco 公司）的贴壁培养液重悬，稀释到试验所需细胞浓度接种。

2.9.3 仔猪原代肝细胞的培养

细胞计数后，用贴壁培养液将细胞悬液稀释，6 孔板接种 1mL，细胞终密度约为 7×10^4 - 1×10^5 个/ cm^2 ，置于 37℃、5% CO_2 与饱和湿度的条件下的细胞培养箱内培养。4h 细胞贴壁后，用生长培养液（含 10% 胎牛血清及 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的基础培养液）全量换液，尽量去除死细胞与组织碎片，48h 后再用生长培养基全量换液。

2.10 实验处理

待细胞生长良好后，分别加入含有 0.35mmol/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ （99% ^{15}N ，Sigma-Aldrich 公司）、0.35mmol/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ +0.35mmol/L ^{15}N -Ala（99% ^{15}N ，Sigma-Aldrich 公司）、0.35mmol/L NH_4Cl +0.35mmol/L ^{15}N -Ala 的生长培养基中进行处理，每个处理 3 个重复，于 37℃、5% CO_2 与饱和湿度的条件下的细胞培养箱内培养。4h 后收集培养液用于同位素丰度的检测。

2.10.1 GC-MS 分析尿素和天冬氨酸中 ^{15}N 同位素

2.10.2 GC-MS 分析

样品预处理同 2.4.1，GC-MS 分析方法同 2.4.2

2.10.3 同位素分析

本试验中所用同位素为 ^{15}N ，并且只关注天冬氨酸和尿素中的同位素。天冬氨酸中的 ^{15}N 丰度通过使用离子的 m/z 为 419/418 进行检测。由于尿素中含有两个 N 原子，因此通过检测衍生后的尿素中 m/z 为 231、232、233 和 234 来确定尿素中氮原子是单标还是双标。根据 Lobley et al（1996）的方法计算同位素的丰度。以不添加同位素物质的培养液作为对照组，检测同位素的自然丰度，在计算时扣除。所有剂量组的同位素均与空白样品比较，通过绝对峰面积比较来鉴定同位素物质，即 $(A-B)/B$ ，A 为各剂量组下 $M+1$ 的峰面积，B 为空白对照的 $M+1$ 的峰面积。利用 MPE（mole percent enrichment）来表示同位素物质中同位素的丰度， $\text{MPE} = (\text{Rsample} - \text{Rstand}) / (1 + (\text{Rsample} - \text{Rstand}))$ ，Rsample 为同位素处理组中 $M+1/M$ 的峰面积比，Rstand 为生理盐水处理组中 $M+1/M$ 的峰面积比。

2.11 数据分析

对代谢组学数据利用 GC-MS 预处理软件 XCMS 对 Agilent 7890A/5975C 气质联用仪检测获得的原始文件进行数据预处理。对获得的保留时间、质核比及峰强的矩阵（共 317 个变量）进行代谢物的注释，注释所用数据库为 NIST 商业数据库

（NIST 2008）和 wiley 9 代谢组数据库。然后在 Simca-P 11.0 软件中，对样本进行主成分分析进行无监督的数据分析，观察各族数据的聚类并去除离群样本；然后用偏最小二乘判别分析（Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA）进行有监督的数据分析，并采用置换检验防止 PLS-DA 模型的过度拟合。并进一步通过 PLS-DA 模型变量的 VIP 值（Variable Importance on Projection）对差异变量进行筛选。采用 T 检验法（ $P < 0.05$ ）以及差异倍数不低于 2 倍来分析两组间的差异代谢产物。

测序原始数据经过处理后得到的数据，与参考基因组和参考基因进行比对，并根据 RPKM 方法计算出基因表达量；利用基于泊松分布分析方法，根据 $FDR \leq 0.001$ 且倍数差异不低于 2 倍的基因筛选出差异表达基因。对于 RT-PCR 数据，以目的基因 mRNA 的拷贝数与对应样本内参基因 mRNA 的拷贝数的比值表示基因 mRNA 的相对表达量，对于基因的相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行分析（Livak et al 2001）。

试剂盒法测定的肝脏组织酶活性以及尿素和天冬氨酸中同位素丰度采用单因素方差分析（V16.0, SPSS），结果以平均值 \pm 标准差表示， $P < 0.05$ 为显著性水平。

3 结果与分析

3.1 样品 GC-MS 分析

将灌注 2h 后四个相同的血清样本连续注射到 GC-MS 系统中，以检测注射样品的稳定性。数据显示所有的峰值具有稳定的保留时间并且无漂移。每一个样品进行四次技术重复，结果显示所有的峰值处具有相同的保留时间，峰值面积的相对保留时间小于 10%。图 3-2 为不同浓度门静脉 NH_4Cl 灌注试验血浆样品 GC-MS 总离子色谱图。根据 NIST 质谱库，通过将峰值处所有离子组成与标准质量色谱图进行对比，GC-MS 总离子色谱图中的 82 个信号峰被鉴定为内源性代谢产物。表 3-4 中列出了被鉴定的内源性代谢产物。这些代谢产物涉及到多种生化过程，尤其是在能量代谢、脂肪代谢、蛋白代谢以及氨基酸代谢。

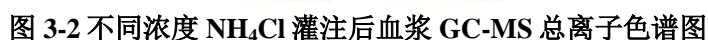


Fig. 3-2 Representative GC-MS total ion chromatograms of serum samples of infusion different concentration of NH_4Cl after chemical derivation

表 3-4 GC-MS 鉴定的肝脏血清代谢产物

| Carbohydrates and polyols | Lipids | Amino acids | Metabolic intermediates | Other metabolites |
|---------------------------|-------------------|---------------|-------------------------|---------------------|
| Ribose | Hexadecanoic acid | Alanine | Succinic acid | Guanine |
| Xylose | Linoleic Acid | Valine | Glyceric acid | lactic acid |
| 3,7-Dimethyl-1-octanol | Oleic acid | Leucine | Malic acid | Tetradecanoic acid |
| 2-Desoxy-pentos-7-ylose | Stearic acid | Isoleucine | Alpha-Ketoglutaric acid | Hypoxanthine |
| 2-Desoxy-pentos-9-ylose | Arachidonic acid | Glycine | Glycerophosphate | Terephthalic acid |
| 2-Keto-L-gluconic acid | 1-Monostearin | Serine | Citric Acid | 1-Docosene |
| Glucose | | Homoserine | Glycerol-3-phosphate | 2-Amino adipic acid |
| Gulonic acid | | Threonine | Urea | 4-Hydroxyproline |
| Lactose | | Ornithine | Pyruvic Acid | Aminomalonic acid |
| Gluconic acid | | arginine | N,N-Dimethylglycine | Putrescine |
| Ribitol | | Methionine | Carbodiimide | Uracil |
| Inositol | | Aspartate | Acetamide | Tetradecanamide |
| Erythritol | | Proline | Methyl-Hydroxylamine | Phosphoric acid |
| Threitol | | Glutamine | Ethylamine | hydroxylamine |
| Maltose | | Glutamate | N-Acetyl glucosamine | O-Methylphosphate |
| Gentiobiose | | Phenylalanine | Pyroglutamic acid | 2-Aminobutyric acid |
| Glucose-6-phosphate | | Asparagine | 3-Hydroxy-Pyridine | Malonic acid |
| Myo-Inositol-2-Phosphate | | Ornithine | | Pentanoic Acid |
| Inosine | | Lysine | | Ethanolamine |
| Erythronic acid | | Cystine | | |

3.2 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏血清代谢产物的影响

通过对高浓度组和低浓度组血清代谢产物进行 T 检验发现，两种不同浓度的 NH_4Cl 处理引起 12 种血清代谢产物发生明显变化（如表 3-5）。从表中可以看出，相比低浓度组，门静脉灌注高浓度的 NH_4Cl 导致肝静脉血液中丙氨酸（Ala）、天冬氨酸（Asp）、谷氨酸（Glu）、精氨酸（Arg）、鸟氨酸（Orn）和丝氨酸含量显著下调（ $P<0.05$ ），相反肝静脉血液中尿素、葡萄糖、葡萄糖-6 磷酸、谷氨酰胺（Gln）、缬氨酸和苏氨酸浓度显著上升（ $P<0.05$ ）。通过差异倍数不低于 2 进一步分析物发现，在所有的这些差异氨基酸中，高浓度氨引起 Ala 差异变化最大。

表 3-5 高浓度组与低浓度组显著差异的代谢产物

Table 3-5 Different metabolites between high concentration (HC) and low concentration of ammonia infusion piglets.

| No. | Metabolites | Up-down | P-value | Log ₂ (HC/LC) |
|-----|---------------------|---------|---------|--------------------------|
| 1 | Alanine | ↓ | 0.0094 | -3.6020 |
| 2 | Aspartate | ↓ | 0.0007 | -3.5389 |
| 3 | Glutamate | ↓ | 0.0013 | -2.6966 |
| 4 | Arginine | ↓ | 0.0060 | -1.9077 |
| 5 | Ornithine | ↓ | 0.0005 | -1.7890 |
| 6 | Serine | ↓ | 0.0117 | -1.4153 |
| 7 | Urea | ↑ | 0.0011 | 2.5040 |
| 8 | Glucose | ↑ | 0.0005 | 2.0631 |
| 9 | Glucose-6-phosphate | ↑ | 0.0092 | 1.3232 |
| 10 | Glutamine | ↑ | 0.0224 | 1.2453 |
| 11 | Threonine | ↑ | 0.0037 | 1.1557 |
| 12 | Valine | ↑ | 0.0039 | 1.0714 |

↑和↓分别表示在门静脉灌注高浓度 NH_4Cl 时显著上调和下调的代谢产物。Log₂(HC/LC)表示差异变化的倍数。

Up arrow and down arrow indicates an upregulated and downregulated metabolite in high concentration of NH_4Cl via portal vein infusion, respectively. Log₂(HC/LC) means the fold change between two group.

3.3 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏基因表达的影响

门静脉灌注两种不同浓度的 NH_4Cl 后，对肝脏组织进行数字基因表达谱分析以及差异表达基因（Differentially expressed genes, DEGs）的筛选。利用 RPKM 法计算基因表达量，同时利用 T 检测差异基因的方法，选取 $\text{FDR}\leq 0.01$ 并且基因差异表达倍数在 2 倍以上的基因为差异表达基因。筛选结果如下图所示，总共筛选到了

1164 个 DEGs (图 3-3)，其中有 901 个 DEGs 上调，263 个 DEGs 下调。基因表达水平如图 3-4。由图可知，只有少部分 DEGs 发生变化，大多数基因表达变化不明显。

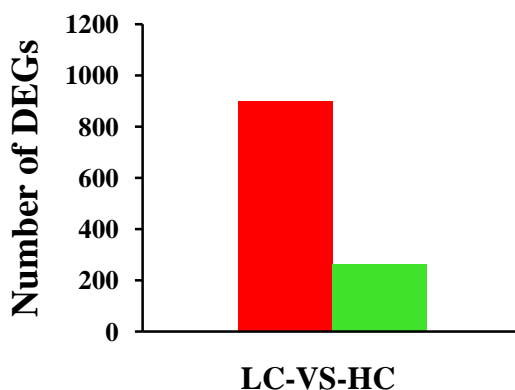


图 3-3 NH_4Cl 高浓度和低浓度肝脏差异表达基因

LC 为低浓度组，HC 为高浓度组；红色表示差异表达基因上调，绿色表示差异表达基因下调。

Fig. 3-3 Differentially expressed genes of the pig liver in high concentration and low concentration of NH_4Cl

LC and HC represent low concentration and high concentration of ammonia respectively. The red bar means up-regulated DEGs and the green bar means down-regulated DEGs

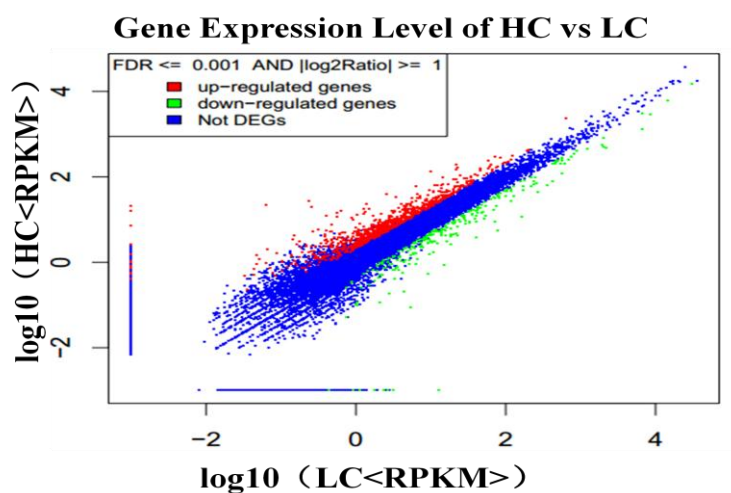


图 3-4 NH_4Cl 高浓度组和低浓度组肝脏差异基因表达的水平

红色代表上调的差异基因，绿色代表下调的差异表达基因，蓝色代表没有变化的基因。

Fig. 3-4 The level of gene expression of the high concentration and low concentration of NH_4Cl treatment in liver

Red represents up-regulated DEGs, green represents down-regulated DEGs, blue represents no significant difference gene expression.

通过对这些 DEGs 进一步分析发现：相比低浓度组，仔猪门静脉灌注高浓度 NH_4Cl 导致肝脏尿素循环相关酶基因如 N-乙酰谷氨酸合成酶（N-acetylglutamate synthase, NAGS）、氨甲酰磷酸合成酶 1（CPS1）、鸟氨酸氨甲酰转移酶（OCT）以及精氨酸酶 1（Arg 1）表达大量上调；氨基酸代谢相关的酶基因如谷氨酰胺酶（GLS）、谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase 1, GLUD1）、鸟氨酸氨基转移酶（OAT）、甘氨酸脒基转移酶（Glycine amidinotransferase, GATM）表达明显上调，而丝氨酸脱氢酶/苏氨酸脱氢酶（L-serine dehydratase/L-threonine deaminase, SDS）、磷酸丝氨酸磷酸酶（Phosphoserine phosphatase, PSPH）、组氨酸裂解酶（Histidine ammonia-lyase, HAL）和甘氨酸脱氢酶（Glycine dehydrogenase, GLDC）等基因表达显著下调。此外，还发现随着肝脏灌注 NH_4Cl 浓度增加，糖异生的关键酶如磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PCK1）和葡萄糖-6-磷酸酶（Glucose-6-phosphatase, G-6-P）基因表达明显上升。

表 3-6 肝脏灌注两种不同浓度的 NH_4Cl 部分差异表达基因

Table 3-6 Some of different gene expression between two different concentration of NH_4Cl infusion into liver

| Gene symbol | Gene title | HC-RPKM | LC-RPKM | $\text{Log}_2(\text{HC/LC})$ |
|-------------|--|---------|---------|------------------------------|
| NAGS | N-acetylglutamate synthase | 25.518 | 5.608 | 2.186 |
| CPS1 | Carbamoyl-phosphate synthase 1 | 3.136 | 0.985 | 1.67 |
| OTC | Ornithine carbamoyltransferase | 4.922 | 1.316 | 1.902 |
| GLUD1 | Glutamate dehydrogenase 1 | 2.915 | 1.196 | 1.285 |
| GLS | Glutaminase | 3.026 | 1.325 | 1.189 |
| GATM | Glycine amidinotransferase | 3.026 | 1.135 | 1.189 |
| Arg 1 | Arginase 1 | 8.186 | 3.062 | 1.418 |
| OAT | Ornithine aminotransferase | 5.207 | 2.553 | 1.028 |
| PCK1 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 | 4.114 | 1.469 | 1.485 |
| G-6-P | Glucose-6-phosphatase | 8.755 | 2.138 | 2.034 |
| SDS | L-serine dehydratase/L-threonine deaminase | 1.043 | 2.22 | -1.608 |
| PSPH | Phosphoserine phosphatase | 1.243 | 2.785 | -1.162 |
| HAL | Histidine ammonia-lyase | 1.578 | 3.453 | -1.129 |
| GLDC | Glycine dehydrogenase | 1.717 | 3.568 | -1.054 |

RPKM 代表基因表达量； $\text{log}_2 \text{HC/LC} \geq 1$ 表示差异表达基因上调， $\text{log}_2 \text{HC/LC} \leq -1$ 表示差异表达基因下调。

RPKM represent the gene expression level. $\text{Log}_2 \text{HC/LC} \geq 1$ means up-regulated DEGs, $\text{log}_2 \text{HC/LC} \leq -1$ means down-regulated DEGs.

3.4 荧光定量 PCR 对测序结果的验证

从测序结果中选出 10 个 DEGs, 以 β -actin 作为内参进行定量检测。表 3-7 为内参 (β -actin) 和 10 个基因定量检测的结果。从表中可以看出, 低浓度和高浓度组中内参的平均 Ct 值分别为 20.49 和 20.63; 与低浓度组相比, 肝脏 NAGS、CPS1、OCT、GLUD1、GLS、GATM 和 OAT 基因在高浓度组中表达大量上调, 而 SDS、PSPH 和 GLDC 在高浓度组肝脏组织中表达显著降低。将 PCR 定量结果与测序的结果进行比较发现一致性较高 (图 3-5)。

表 3-7 2 个样品中 10 个基因的定量检测结果

Table 3-7 The quantitative detecting result of 10 genen in two samples

| 基因 | 平均 CT 值 | | $\Delta\Delta CT$ | $2^{-\Delta\Delta CT}$ |
|----------------|---------|-------|-------------------|------------------------|
| Gene | LC | HC | HC vs LC | HC vs LC |
| β -actin | 20.49 | 20.63 | | |
| NAGS | 28.15 | 26.31 | -1.98 | 3.94 |
| CPS1 | 26.68 | 25.25 | -1.57 | 2.97 |
| OCT | 25.18 | 23.46 | -1.86 | 3.62 |
| GLUD1 | 23.9 | 22.79 | -1.25 | 2.38 |
| GLS | 25.58 | 24.68 | -1.04 | 2.06 |
| GATM | 24.48 | 23.52 | -1.10 | 2.14 |
| OAT | 23.81 | 22.96 | -0.99 | 1.98 |
| SDS | 23.62 | 25.27 | 1.51 | 0.35 |
| PSPH | 21.87 | 23.11 | 1.102 | 0.47 |
| GLDC | 24.60 | 25.76 | 1.025 | 0.49 |

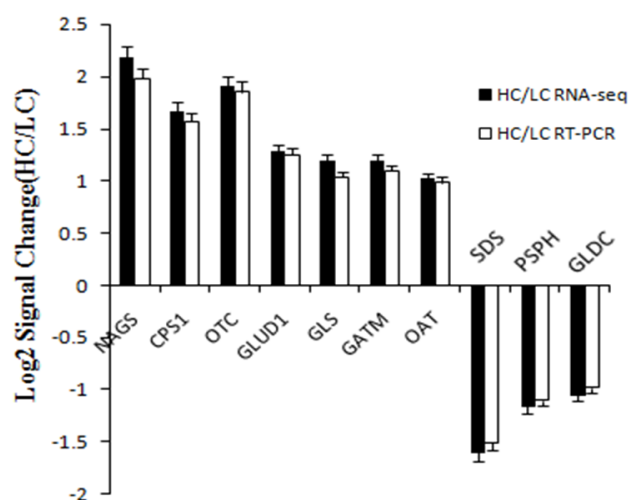


图 3-5 RT-PCR 对测序结果的验证

横坐标为基因名称，纵坐标为高浓度组和低浓度组差异基因表达倍数。黑色表示测序结果，白色表示 RT-PCR 检测结果。

Fig. 3-5 Validation of the RNA-seq (Quantificaton) results by RT-PCR

The abscissa axis represents gene symbol and the ordinateaxis represents fold change of gene expression in HC and LC. The black and white bar indicates the results of RNA-seq and RT-PCR, respectively.

3.5 不同浓度的 NH_4Cl 对肝脏代谢酶活性的影响

门静脉灌注不同浓度的 NH_4Cl 后，检测肝脏代谢酶活性，测定结果见表 3-8。从表中可以看出，门静脉灌注 NH_4Cl 后，高浓度组肝脏尿素循环酶 CPS1、Arg1 以及 GS 活性均显著高于低浓度组，并且分别提高了 50.76% ($P=0.028$)、41.23% ($P=0.042$) 和 46.98% ($P=0.032$)，这些结果与氨代谢相关酶基因表达的结果相似。同时与低浓度组相比，高浓度组 OCT ($P=0.054$) 和 GLS ($P=0.065$) 活性有增加的趋势。此外，同低浓度组相比，高浓度组肝脏 ALT 和 AST 活性分别提高了 45.89% ($P=0.039$) 和 41.08% ($P=0.045$)。这些结果说明仔猪门静脉灌注 NH_4Cl 引起肝脏 ALT 和 AST 活性增加。

表 3-8 门静脉灌注氨对仔猪肝脏代谢酶活性的影响

Table 3-8 The effect of ammonia loaded through portal vein on the metabolic enzyme activities in the liver of pigs

| Item | LC | HC | <i>P</i> -value |
|--------------------|------------|-------------|-----------------|
| CPS1, U/g protein | 9.14±1.28 | 13.78±1.69* | 0.028 |
| OCT, U/mg protein | 15.74±0.98 | 19.85±1.26 | 0.054 |
| ALT, U/mg protein | 5.23±0.54 | 7.63±1.35* | 0.039 |
| AST, U/mg protein | 25.36±3.53 | 35.78±2.75* | 0.045 |
| Arg1, U/mg protein | 23.57±2.67 | 33.29±2.56* | 0.042 |
| GS, U/mg protein | 10.45±1.18 | 15.36±1.52* | 0.032 |
| GLS, U/mg protein | 8.75±1.12 | 10.56±1.04 | 0.065 |

CPS I, 氨甲酰磷酸合成酶 I; OCT, 鸟氨酸氨甲酰转移酶; ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 天冬氨酸氨基转移酶; GS, 谷氨酰胺合成酶。LC 和 HC 分别表示门静脉灌注低浓度和高浓的 NH_4Cl 。结果表示为平均值±标准差。*表示差异显著 ($P<0.05$)

CPS I, carbamoylphosphate synthase-I; OCT, ornithine carbamoyltransferase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotrasferase; GS, glutamine synthase. LC and HC represent low concentration and high concentration of NH_4Cl in portal vein infusion. All values are present as mean ±SD. * means difference between treatment ($P<0.05$).

3.6 尿素和天冬氨酸中 ^{15}N 丰度

不同 ^{15}N 标记的氮源对天冬氨酸 (Asp) 和尿素中同位素丰度的影响见表 3-9。由表可知, 当肝细胞培养在含有 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 的培养基中, 尿素中只有一个氮原子被大量标记 ($\text{Urea}_{(m+1)}$), 而 Asp 中 ^{15}N 丰度很少。然而, 当在 NH_4Cl 中添加 ^{15}N -Ala 时, 尿素中仍然只有一个氮原子被大量标记, 但是 Asp 中 ^{15}N 的丰度是单独培养在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 中的 4 倍 ($P<0.05$), 说明天冬氨酸大量被标记。当肝细胞培养在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 ^{15}N -Ala 时, 尿素中两个氮源均被大量标记, 且 Asp 中 ^{15}N 与 ^{15}N -Ala+ NH_4Cl 组没有明显差异 ($P>0.05$); 然而 $\text{Urea}_{(m+1)}$ 中 ^{15}N 丰度明显减少 ($P<0.05$)。这些结果说明 NH_4Cl 不能为尿素合成提供两个氮原子; Ala 主要是通过转化成 Asp 为尿素合成提供前体物质。

表 3-9 不同 ^{15}N 标记氮源对尿素和天冬氨酸中同位素丰度的影响

Table 3-9 The effect of different ^{15}N labeled nitrogen source on the isotopic abundance in urea and aspartate

| Metabolite | $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ | ^{15}N -Alanine+ NH_4Cl | $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ + ^{15}N -Alanine |
|-----------------------|-----------------------------|--|--|
| Urea _(m+1) | 58.5 ± 2.3^a | 64.6 ± 3.4^a | 28.7 ± 2.4^b |
| Urea _(m+2) | 6.1 ± 0.8^b | 5.5 ± 0.3^b | 44.3 ± 3.2^a |
| Aspartate | 4.3 ± 0.4^b | 17.5 ± 1.2^a | 15.4 ± 0.8^a |

Urea_(m+1), Urea_(m+2) 分别表示尿素中含有一个或两个 ^{15}N 同位素。结果表示为平均值 \pm 标准差。同一行不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Urea_(m+1), Urea_(m+2), indicated urea contains one or two ^{15}N isotopomer respectively. All values are present as mean \pm SD. Values in a row with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$)

4 讨论

氨是动物机体蛋白代谢的副产物, 正常生理条件下, 动物机体血氨维持在较低的水平。来自肠道的大量血氨通过门静脉进入肝脏代谢, 通过尿素循环和谷氨酰胺合成转化成无毒尿素和谷氨酰胺。因此, 肝脏在氨代谢、维持机体血氨平衡中起着重要作用。同时肝脏富含各种氨基酸代谢酶, 氨基酸代谢非常活跃。肠道消化吸收的大量氨基酸在肝脏通过转氨基作用合成其他的氨基酸或者是合成蛋白质, 或者是通过脱氨基作用于尿素合成和糖异生。

在肝脏，氨通过尿素循环和谷氨酰胺合成代谢是分区的，相互之间以一种精密的方式来维持机体血氨的平衡（Häussinger 1986）。来自门静脉的血氨进入肝脏首先接触到尿素循环，逃逸尿素循环的氨然后在谷氨酰胺合成酶的作用下合成谷氨酰胺（Häussinger 1986）。在本试验中，与低浓度相比，仔猪门静脉灌注高浓度的 NH_4Cl ，尿素和 Gln 合成都增加。氨能够刺激尿素合成，随着肝脏氨负荷增多，尿素合成也相应增加。由于连续的门静脉血氨供应，通过尿素循环的流量将决定进入 GS 的氨流量（Häussinger et al 1983）。随着门静脉血氨的增多，进入 GS 的氨流量也增多，Gln 的合成也随之增多。鼠门静脉灌注 $^{13}\text{NH}_4\text{Cl}$ 过程中，大量的尿素和 Gln 被标记，说明了氨主要合成尿素和 Gln（Cooper et al 1988）。此外，随着门静脉灌注 NH_4Cl 浓度的增加，尿素循环基因如 CPS1、Arg1 以及 GS 基因也相应的增加，同时伴随着相应的酶活性增加，以清除过多的氨，维持血液中较低的血氨浓度。研究表明，摄取高蛋白日粮时，超过蛋白合成所需的氨基酸产生氨，肝脏尿素循环酶活性增加以代谢机体产生过多的氨（Morris 1992）。这些研究结果与本研究的結果相似，都是通过增加尿素循环相关酶活性，来增加尿素和 Gln 合成，从而减少进入循环血液中的氨。

在尿素循环过程中，氨和二氧化碳通过 CPS1 合成的氨甲酰磷酸是尿素循环的限速步骤，CPS1 是尿素循环的限速酶。研究表明，N-乙酰谷氨酸是 CPS1 的变构激活剂，在 NAGS 的作用下通过乙酰辅酶 A 和 Glu 合成（Lund and Wiggins 1984）。在本试验中，与低浓度相比，门静脉灌注高浓度的 NH_4Cl ，NAGS 基因表达量明显增加，激活 CPS1，从而促进尿素合成。这与高浓度组中尿素合成增加相一致。氨通过尿素循环代谢时，需要 Asp 为尿素合成提供第二个氮原子，依赖底物水平的供给以及酶活性。然而，尿素循环底物的提供却依赖于氨基酸的供给，以及氨基酸代谢酶，这些因素都决定着体内尿素合成（Häussinger 2007）。门静脉高浓度血氨进入肝脏，Asp 含量不足，机体需要为尿素合成提供额外的氮源。本试验研究发现，门静脉灌注高浓度的 NH_4Cl 降低血液中 Ala、Asp、Glu、Orn 和 Arg 的含量，但是增加了血浆中缬氨酸和苏氨酸的浓度。肝脏尿素生成对血浆中氨基酸氮的浓度很敏感，并且过多的外源氨基酸生成尿素直接与血浆中氨基酸的浓度有关（Vilstrup 1980）。此外，研究表明氨能够增加尿素合成，同时也能够增加氨基酸的代谢

(Hüssinger 2007)。因此,可以推测高浓度组中氨基酸含量的降低,可能是通过氨基酸代谢为尿素合成提供氮源。

在门静脉灌注 NH_4Cl 的条件下,肝脏不能从血浆中接受到等量的 Asp 用于尿素合成 (Yang et al 2000)。反刍动物肠系膜持续灌注 NH_4Cl , 结果发现游离氨基酸作为肝脏唯一可用的含氮化合物, 足够提供额外的氮以维持肝脏氮代谢 (Reynolds et al 1991; Loble et al 1995)。这些研究都进一步表明了高氨情况下, 肝脏氨基酸代谢为尿素合成提供额外的氮源。在高浓度组中尿素合成增多, 可以解释 Asp 含量下降, 因为这种氨基酸是尿素合成的第二个氮原子的直接供体 (De Bandt et al 1995)。Orn 和 Arg 是抗氨生成的氨基酸, 它们能够有效的将氨转化成尿素 (Barbul 1986)。虽然 Arg 是肝脏氨清除所必须的, 但是它也是尿素合成较强的激活剂, 并且导致氨基酸代谢增加 (De Bandt et al 1995)。研究表明 Arg 能够激活 NAGS, 从而加速尿素生成 (Meijer et al 1990)。此外, 本试验中发现高氨条件下, 肝脏中 Arg1 基因表达和酶活性都非常高, 有助于 Arg 降解为 Orn。Orn 可以通过转化成 Glu, 进一步生成 Asp 参与尿素循环, 或者通过增加线粒体内的转运体激活 CPS1 (Lund and Wiggins 1986)。

有趣的是高氨诱导的所有差异氨基酸中, Ala 差异变化是最大, 说明肝脏在清除大量氨时, Ala 是尿素的有效氮源。Brosnan 等 (2001) 研究表明, 通过小鼠门静脉灌注氨, 肝脏摄取大量的 Ala 用于尿素合成。此外 Yang 等 (2000) 给狗灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 模拟肝脏摄取氨的浓度超过 Asp 时, 也同样发现肝脏尿素合成的另外一个主要的氮源可能来自 Ala。这些研究结果与本试验的研究结果相一致, 并且都暗示着 Ala 在氨通过尿素循环代谢过程中有着非常重要的作用。门静脉周肝细胞尤其富含 ALT 和 AST (Hüssinger 1986)。Ala 发挥作用很可能是通过转氨基作用先生成 Glu, 然后生成 Asp 用于尿素合成 (Yang et al 2000)。同样的, 在本试验中也发现随着门静脉灌注 NH_4Cl 浓度的升高, 肝脏组织中 ALT 和 AST 的活性也明显增加, 它们能够促进 Ala 氮向尿素转移。因此, 当肝脏摄取氨浓度明显高于 Asp 时, Ala 作为肝脏尿素氮的有效来源, 主要是通过 ALT 将氨基转移给 Glu, 然后在通过 AST 生成 Asp, 从而促进尿素合成。

在禁食时, Ala 可能不是由肠道代谢产生。有研究表明, 用于肝脏尿素循环的 Ala 有可能是来自肝脏自身的蛋白质水解 (Lopez et al 1998)。在人和反刍动物的

研究中也表明灌注 NH_4Cl 能够刺激蛋白质降解（May et al 1992；Reaich et al 1992）。因此，可以推测门静脉灌注高浓度的氨可能诱导肝脏蛋白质分解，从而引起肝静脉血液中缬氨酸和苏氨酸浓度增加。此外，本试验中还发现了随着 NH_4Cl 灌注浓度的增加，血液中葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖的含量随之上升，同时肝脏组织中糖异生关键基因磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖-6-磷酸酶基因表达也随着上调。这说明门静脉高血氨刺激了肝脏葡萄糖异生。在鼠灌注氨过程中，同样也发现了血液中葡萄糖的浓度明显升高。可能是因为灌注的氨导致胰高血糖素的升高，引起糖异生增加（Nissim et al 1996）。血液中降低的 Ala、Glu、Asp 都是糖异生的前体物质，转氨后的碳骨架可能用于糖异生。

氨在肝脏主要是通过尿素循环代谢，在尿素合成过程中需要消耗同等分子量的氨和 Asp。随着门静脉 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸收的增加被肝脏清除的氨基酸也增加。并且本研究发现，随着门静脉灌注氨浓度增加，氨基酸代谢为尿素合成提供氮源，其中 Ala 是最重要的。为了进一步研究氨对氨基酸代谢影响的机制。在细胞水平上用同位素标记的 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 $^{15}\text{N-Ala}$ 作为示踪剂，鉴定尿素两个氮的来源。当肝细胞中只添加 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 时，尿素两个氮原子只有一个被大量标价，而 Asp 中 ^{15}N 的丰度很低。类似的研究在人和动物机体灌注 ^{15}N 标记的 NH_4Cl 时发现，尿素中只含有一个氮原子被大量标记（Patterson et al 1995；Yang et al 2000）。Brosnan et al （2001）通过鼠门静脉灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 也发现了类似的结果。这些研究均表明，氨只能通过合成氨甲酰磷酸进入尿素循环，不能通过天冬氨酸为尿素提供第二个氮。当在 $^{15}\text{N-Ala}$ 中添加未标记的 NH_4Cl ，Asp 中 ^{15}N 丰度明显增加，尿素仍然只有一个氮被大量标记。在鼠门静脉灌注 $^{15}\text{N-Ala}$ 和 NH_4Cl ，也发现了相似的结果（Brosnan et al 2001）。这说明在高浓度的氨条件下，Ala 主要是通过天冬氨酸为作为尿素氮的前体物质，也不能为尿素提供两个氮原子。只有当 NH_4Cl 和 Ala 均被 ^{15}N 标记时，尿素中两个氮原子才被大量标记，同时 Asp 中 ^{15}N 丰度较高。这些研究说明了氨不能为尿素合成提供两个氮原子，Ala 主要将氮转移到 Asp，用于尿素合成。

5 小结

门静脉血氨进入肝脏代谢，只能为肝脏尿素合成提供第一个氮源，另一个氮源通过氨基酸代谢提供；因此，氨通过肝脏尿素循环时诱导丙氨酸代谢，主要是通过

ALT 和 AST 将 Ala 和 Asp 氮联系起来，为尿素合成提供直接的前体物质（如图 3-6）。

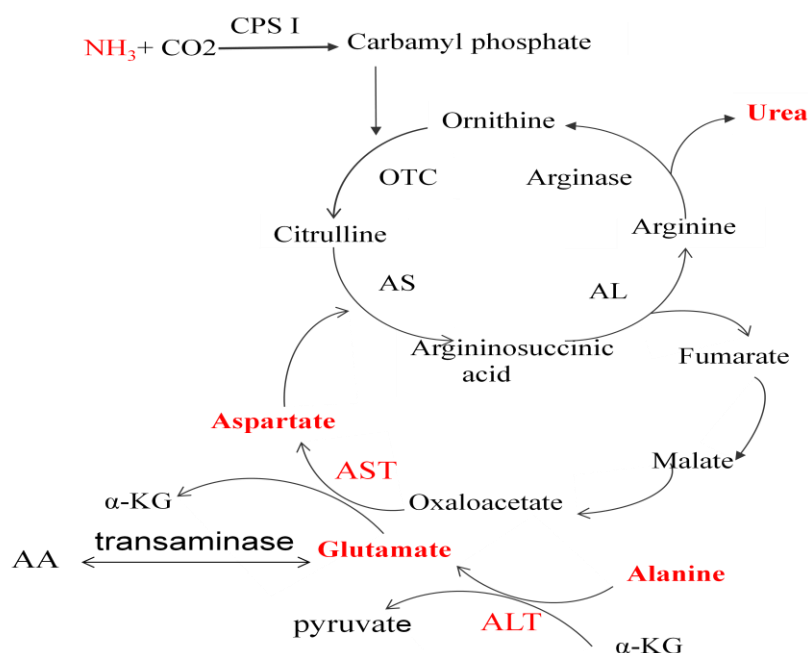


图 3-6 氨对氨基酸代谢的影响

尿素合成的两个氮源一个来自氨，另一个是 Asp。当氨浓度大于 Asp 时，机体主要是通过氨基酸代谢为尿素合成提供氮源，其中 Ala 通过 ALT 变成 Glu，然后在 AST 作用下生成 Asp，从而维持尿素循环的正常进行。

Fig. 3-6 The effect of ammonia on amino acid metabolism

The nitrogen source of urea synthesis was from ammonia and aspartate. When the concentration of ammonia is greater than aspartate, the nitrogen for urea synthesis was mainly through amino acid metabolism. Alanine serve this role following transamination to glutamate via ALT and then to aspartate via AST for incorporation into urea.

本研究的小结、创新点及待解决的问题

1 小结

- (1) 成功建立仔猪肝脏门静脉灌注技术；
- (2) 门静脉血氨进入肝脏尿素循环，只能为尿素合成提供一个氮源；另外一个氮源主要是通过氨基酸代谢供给；
- (3) 氨通过肝脏尿素循环代谢诱导 Ala 代谢，在 ALT 和 AST 的作用下合成 Asp，为尿素合成提供额外的氮源。

2 创新点

- (1) 成功建立仔猪肝脏门静脉灌注技术，用于肝脏营养物质代谢研究。
- (2) 从动物水平和细胞水平共同探索门静脉血氨对肝脏氨基酸代谢的影响，同时利用代谢组学、数字表达谱技术，从代谢产物、基因表达以及代谢酶活分析不同浓度的血氨对肝脏氨基酸代谢的影响；发现氨诱导丙氨酸通过 ALT、AST 为尿素合成提供天冬氨酸。

3 待解决的问题

- (1) 本试验虽然从多方面论证了血氨对肝脏氨基酸代谢有影响，但是未能定量分析血氨对氨基酸的影响。
- (2) 血氨对肝脏氨基酸代谢的影响主要是为尿素合成提供氮源，但肝脏氨基酸有可能来自蛋白质的分解提供的，因此后续有必要进一步探索血氨对肝脏蛋白质降解与否。

参考文献

1. 黄瑞林, 印遇龙, 戴求仲, 李铁军, 宾石玉, 侯振平, 张平. 采食不同来源淀粉对生长猪门静脉养分吸收和增重的影响. 畜牧兽医学报, 2006, 37: 262-269.
2. 李铁军, 印遇龙, 黄瑞林, 潘亚非, 谭翔文. 用于营养物质代谢的猪动静脉插管技术的研究. II. 门静脉营养物质净流量测定方法, 中国畜牧杂志, 2003, 39: 28-29.
3. 刘建高, 张平, 宾石玉, 黄瑞林, 李铁军, 印遇龙. 不同来源淀粉对断奶仔猪血浆葡萄糖和胰岛素水平的影响. 食品科学, 2007, 28: 315-319.
4. 譙仕彦, 郑春田, 姜建阳等译. 猪营养需要-NRC (1998), 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
5. 许金华, 谭翔文, 印遇龙, 黄瑞林, 李铁军. 果胶对猪血氨的影响. 南华大学学报, 2005, 33: 188-191.
6. 赵胜军, 王林枫, 王玲, 吴树清. 羊肝、门、肠系膜静脉和颈动脉血管瘘管手术安装及体会. 饲料工业, 2010, (S2).
7. 郑培培, 包正喜, 李鲁鲁, 胡长敏, 赵胜军, 刘东明, 黄飞若. 肝脏营养物质代谢的仔猪肝-门静脉血插管技术的建立. 动物营养学报, 2014, 26: 1624-1631.
8. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr*, 1986, 10: 227-238.
9. Beliveau-Carey G, Cheung CW, Cohen NS, Brusilow S, Rajman L. Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *Biochem J*, 1993, 292: 241-247.
10. Bertram HC, Malmendal A, Nielsen NC, Straadt IK, Larsen T, Knudsen KE, Laerke HN. NMR-based metabolomics reveals that plasma betaine increases upon intake of high-fiber rye buns in hypercholesterolemic pigs. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 1055-1062.
11. Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huerou-Luron I, Lalles JP, Awati A. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth

- performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J Anim Sci*, 2006, 84: 3337-3345.
12. Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome D. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*, 2007, 33: 547-562.
13. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Berot S, Evrard J, Fenart E, Tome D, Gaudichon C. The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *J Nutr*, 2007, 137: 594-600.
14. Braeuning A, Ittrich C, Köhle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, Schwarz M. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J*, 2006, 273: 5051-5061.
15. Brosnan JT, Brosnan ME. Hepatic glutaminase—a special role in urea synthesis. *Nutrition*, 2002, 18: 455-457.
16. Brosnan JT, Brosnan ME, Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lazarow A, Nissim I. Alanine metabolism in the perfused rat liver studies with ^{15}N . *J Biol Chem*, 2001, 276: 31876-31882.
17. Brosnan JT, Ewart HS, Squires SS. Hormonal control of hepatic glutaminase. *Adv Enzyme Regul*, 1995, 135: 131-146.
18. Bühler K, Wenk C, Broz J, Gebert S. Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs. *Arch Anim Nutr*, 2006, 6: 382-9.
19. Camacho JA, Obie C, Biery B, Goodman BK, Hu CA, Almashanu S, Valle D. Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet*, 1999, 22: 151-158.
20. Cooper AJ, Nieves E, Coleman AE, Filc-DeRicco S, Gelbard AS. Short-term metabolic fate of $[^{13}\text{N}]$ ammonia in rat liver in vivo. *J Biol Chem*, 1988, 262: 1073-1080.
21. Costell M, O'Connor JE, Miguez MP, Grisolia S. Effects of L-carnitine on urea synthesis following acute ammonia intoxication in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120: 726-733.
22. Darragh AJ, Hodgkinson SM. Quantifying the digestibility of dietary protein. *J Nutr*, 2000, 130: 1850S-1856S.

23. De Bandt JP, Cynober L, Lim SK, Coudray-Lucas C, Poupon R, Giboudeau J. Metabolism of ornithine, α -ketoglutarate and arginine in isolated perfused rat liver. *Br J Nutr*, 1995, 73: 227-239.
24. Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Tillman JB, Walford RL, Spindler SR. Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes. *Am J Physiol*, 1999, 277: E352-E360.
25. Dodgson SJ, Forster RE. Carbonic anhydrase, inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *J Appl Physiol*, 1986, 60: 646-652.
26. Eklou-Lawson M, Bernard F, Neveux N, Chaumontet C, Bos C, Davila-Gay AM, Tomé D, Cynober L, Blachier F. Colonic luminal ammonia and portal blood L-glutamine and L-arginine concentrations: a possible link between colon mucosa and liver ureagenesis. *Amino Acids*, 2009, 37: 751-760.
27. el-Khoury AE, Ajami AM, Fukagawa NK, Chapman TE, Young VR. Diurnal pattern of the interrelationships among leucine oxidation, urea production, and hydrolysis in humans. *Am J Physiol*, 1996, 271: E563-573.
28. Elliott R, Ong TJ. Science, medicine, and the future Nutritional genomics. *Brit Med J*, 2002, 324: 1438-1442.
29. Fauconneau G, Michel MC. The role of the gastrointestinal tract in the regulation of metabolism. Munro HN. Mammalian Protein Metabolism. *New York: Academic Press*, 1970, 481-522.
30. Fehlmann M, Le Cam A, Freychet P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport. *J Biol Chem*, 1979, 254: 10431-10437.
31. Fouillet H, Juillet B, Bos C, Mariotti F, Gaudichon C, Benamouzig R, Tomé D. Urea-nitrogen production and salvage are modulated by protein intake in fed humans: results of an oral stable-isotope-tracer protocol and compartmental modeling. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87: 1702-1714.
32. Gebhardt R, Mecke D. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J*, 1983, 2: 567-570.
33. Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D. Inhibition of hepatic proteolysis by insulin. *Eur J Biochem*, 1991, 199: 467-474.
34. Hallemeesch MM, Ten Have GA, Deutz NE. Metabolic flux measurements across portal drained viscera, liver, kidney and hindquarter in mice. *Lab Anim*, 2001, 35:

- 101-110.
35. Häussinger D, Gerok W, Sies H. Regulation of flux through glutaminase and glutamine synthetase in isolated perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 755: 272-278.
36. Häussinger D, Gerok W. Hepatic urea synthesis and pH regulation. Role of CO₂, HCO₃⁻, pH and the activity of carbonic anhydrase. *Eur J Biochem*, 1985, 152: 381-386.
37. Häussinger D, Lamers WH, Moorman AFM. Metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme*, 1993, 46: 72-93.
38. Häussinger D, Sies H. Hepatic glutamine metabolism under the influence of the portal ammonia concentration in the perfused rat liver. *Eur J Biochem*, 1979, 101: 179-184.
39. Häussinger D. Ammonia, urea production and pH regulation. In: Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M, editors. *Hepatology*, Wiley-Blackwell 2007, p. 181-192.
40. Häussinger D. Hepatic glutamine transport and metabolism. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biolo*, 1998, 72: 43-86.
41. Häussinger D. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur J Biochem*, 1983, 133: 269-275.
42. Häussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J*, 1990, 267: 281-290.
43. Häussinger D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv Enzyme Regul*, 1986, 25: 159-180.
44. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Joseph MR. Effect of reducing brain glutamine synthesis on metabolic symptoms of hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 1993, 60: 1000-1006.
45. He Q, Kong X, Wu G, Ren P, Tang H, Hao F, Huang R, Li T, Tan B, Li P, Tang Z, Yin Y, Wu Y. Metabolomic analysis of the response of growing pigs to dietary L-arginine supplementation. *Amino acids*, 2009, 37: 199-208.
46. Holm LM, Jahn TP, Moller AL, Schjoerring JK, Ferri D, Klaerke DA, Zeuthen T. NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*, 2005, 450: 415-28.

47. Htoo JK, Araiza BA, Sauer WC, Rademacher M, Zhang Y, Cervantes M, Zijlstra RT. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. *J Anim Sci*, 2007, 85:3303-3312.
48. Huntington GB, Reynolds CK, Stroud BH. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. *J Dairy Sci*, 1989, 72: 1583-1595.
49. Jackson AA, Gibson NR, Bundy R, Hounslow A, Millward DJ, Wootton SA. Transfer of ¹⁵N from oral lactose-ureide to lysine in normal adults. *Int J Food Sci Nutr*, 2004, 55: 455-462.
50. Jungermann K, Keitzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 1996, 16: 179-203.
51. Kashiwagura T, Erecińska M, Wilson DF. pH dependence of hormonal regulation of gluconeogenesis and urea synthesis from glutamine in suspensions of hepatocytes. *J Biol Chem*, 1985, 260: 407-414.
52. Kim S, Paik WK, Cohen PP. Ammonia intoxication in rats: protection by N-carbamoyl-L-glutamate plus L-arginine. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, 3530-3533.
53. Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Crackower MA. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet*, 1999, 22: 159-163.
54. Koeln LL, Schlagheck TG, Webb KE. Amino acid flux across the gastrointestinal tract and liver of calves. *J Dairy Sci*, 1993, 76: 2275-2285.
55. Kristensen NB, Nørgaard JV, Wamberg S, Engbæk M, Fernández JA, Zacho HD, Poulsen HD. Absorption and metabolism of benzoic acid in growing pigs. *J Anim Sci*, 2009, 87: 2815-2822.
56. Li L, Zhang P, Zheng P, Bao Z, Wang Y, Huang FR. Hepatic cumulative net appearance of amino acids and related gene expression response to different protein diets in pigs. *Livestock Sci*, 2015, 182: 11-21.
57. Lin H C, Visek W J. Large intestinal pH and ammonia in rats: dietary fat and protein interactions. *J Nutr*, 1991, 121: 832-843.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
59. Lobley GE, Connell A, Lomax MA, Brown DS, Milne E, Calder AG, Farningham DA. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for

- amino acid catabolism. *Br J Nutr*, 1995, 73: 667-685.
60. Lobley GE, Connell A, Revell D. The importance of transmethylation reactions to methionine metabolism in sheep: Effects of supplementation with creatine and choline. *Br J Nutr*, 1996, 75:47-56.
61. Lopez HW, Moundras C, Morand C, Demigne C, Remesy C. Opposite fluxes of glutamine and alanine in the splanchnic area are an efficient mechanism for nitrogen sparing in rats. *J Nutr*, 1998, 128: 1487-1494.
62. Lund P, Wiggins D. Is N-acetylglutamate a short-term regulator of urea synthesis? *Biochem J*, 1984, 218: 991-994.
63. Lund P, Wiggins D. The ornithine requirement of urea synthesis. Formation of ornithine from glutamine in hepatocytes. *Biochem J*, 1986, 239: 773-776.
64. Luo QJ, Maltby SA, Lobley GE, Calder AG, Lomax MA. The effect of amino acids on the metabolic fate of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in isolated sheep hepatocytes. *Eur J Biochem*, 1995, 228: 912-917.
65. Maclayton DO, Eaton-Maxwell A. Rifaximin for treatment of hepatic encephalopathy. *Ann Pharmacother*, 2009, 43: 77-84.
66. Martin FP, Sprenger N, Montoliu I, Rezzi S, Kochhar S, Nicholson JK. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics. *J Proteome Res*, 2010, 9: 5284-5295.
67. May RC, Masud T, Logue B, Bailey J, England B. Chronic metabolic acidosis accelerates whole body proteolysis and oxidation in awake rats. *Kidney Int*, 1992, 41: 1535-1542.
68. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau R. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev*, 1990, 70: 701-748.
69. Meijer AJ, Lof C, Ramos IC, Verhoeven AJ. Control of ureogenesis. *Eur J Biochem* 1985, 148: 189-196.
70. Meijer AJ. Channeling of ammonia from glutaminase to carbamoyl-phosphate synthetase in liver mitochondria. *FEBS lett*, 1985, 191: 249-251.
71. Metges CC, Petzke KJ, El-Khoury AE, Henneman L, Grant I, Bedri S, Young VR. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Am J Clin Nutr*, 1999, 70: 1046-1058.
72. Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the

- host. *J Nutr*, 2000, 130: 1857S-1864S.
73. Milano G, Hotston-Moore A, Lobley G. Influence of hepatic ammonia removal on ureagenesis, amino acid utilization and energy metabolism in the ovine liver. *Br J Nutr*, 2000; 83: 307-315.
74. Morris SM Jr, Moncman CL, Rand KD, Dizikes GJ, Cederbaum SD, O'Brien WE. Regulation of mRNA levels for five urea cycle enzymes in rat liver by diet, cyclic AMP, and glucocorticoids. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 256: 343-353.
75. Morris SM Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr*, 1992, 12: 81-101.
76. Mosenthin R, Saucer WC, Henkle H, Ahrens F, de Lange CF. Tracer studies of urea kinetics in growing pigs: 2. The effect of starch infusion at the distal ileum on urea recycling and bacterial nitrogen excretion. *J Anim Sci*, 1992b, 70: 3467-3472.
77. Mosenthin R, Saucier WC, Ahrens F. dietary pectin's effect on ileal and fecal amino acid digestibility and exocrine pancreatic secretions in growing pigs. *J Nutr*, 1994, 124: 1222-1229.
78. Mosenthin R, Sauer WC, de Lange CF. Tracer studies of urea kinetics in growing pigs: I. The effect of intravenous infusion of urea on urea recycling and the site of urea secretion into the gastrointestinal tract. *J Anim Sci*, 1992a, 70: 3458-3466.
79. Mouille B, Robert V, Blachier F. Adaptive increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287: G344-351.
80. Mutsvangwa T, Buchanan-Smith JG, McBride BW. Interactions between ruminal degradable nitrogen intake and in vitro addition of substrates on patterns of amino acid metabolism in isolated ovine hepatocytes. *J Nutr*, 1996, 126: 209-218.
81. Nissim I, Cattano C, Lin Z. Acid-base regulation of hepatic glutamine metabolism and ureagenesis: study with ¹⁵N. *J Am Soc Nephrol*, 1993, 3: 1416-1427.
82. Nissim I, Yudkoff M, Brosnan JT. Regulation of [¹⁵N] Urea Synthesis from [5-¹⁵N] Glutamine ROLE OF pH, HORMONES, AND PYRUVATE. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31234-31242.
83. Noguchi Y, Sakai R, Kimura T. Metabolomics and its potential for assessment of adequacy and safety of amino acid intake. *J Nutr*, 2003, 133: 2097S-2100S.
84. Nose K, Wasa M, Okada A. Gut glutamine metabolism at different stages of sepsis in rats. *Surg Today*, 2002, 32: 695-700.

85. Otto ER, Yokoyama M, Ku PK, Ames NK, Trottier NL. Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration. *J Anim Sci*, 2003, 81: 1743-1753.
86. Patterson BW, Carraro F, Klein S, Wolfe RR. Quantification of incorporation of [¹⁵N] ammonia into plasma amino acids and urea. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1995, 269: E508-E515.
87. Plauth M, Schneider BH, Raible A, Hartmann F. Effects of vascular or luminal administration and of simultaneous glucose availability on glutamine utilization by isolated rat small intestine. *Int J Colorectal Dis*, 1999, 14: 95-100.
88. Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM, Goodship TH. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol*, 1992, 263: E735-E739.
89. Reynolds CK, Kristensen NB. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J Anim Sci*, 2008, 86(Suppl): E293-E305.
90. Reynolds CK, Tyrrell HF, Reynolds PJ. Effects of diet forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production. *J Nutr*, 1991, 121: 994-1003.
91. Schalm SW, van der Mey T. Hyperammonemic coma after hepatectomy in germ-free rats. *Gastroenterology*, 1979, 77: 231-234.
92. Sigsgaard I, Almdal T, Hansen BA, Vilstrup H. Dexamethasone increases the capacity of urea synthesis time dependently and reduces the body weight of rats. *Liver*, 1988, 8: 193-197.
93. Snodgrass PJ, Lin RC. Induction of urea cycle enzymes of rat liver by amino acids. *J Nutr*, 1981, 111: 586-601.
94. Staddon JM, Bradford NM, McGivan JD. Effects of glucagon in vivo on the N-acetylglutamate, glutamate and glutamine contents of rat liver. *Biochem J*, 1984, 217: 855-857.
95. Stadler J, Barton D, Beil-Moeller H, Diekmann S, Hierholzer C, Erhard W, Heidecke C. Hepatocyte nitric oxide biosynthesis inhibits glucose output and competes with urea synthesis for L-arginine. *Am J Physiol*, 1995, 268: G183-G188.
96. Stewart GS, Fenton RA, Thevenod F, Smith CP. Urea movement across mouse colonic plasma membranes is mediated by UT-A urea transporters. *Gastroenterology*,

- 2004, 126: 765-773.
97. Stewart PM, Walser M. Short term regulation of ureagenesis. *J Biol Chem*, 1980, 255: 5270-5280.
98. Stoll B, Burrin DG. Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. *J Anim Sci*, 2006, 84(Suppl): E60-E72.
99. Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr*, 1998, 128: 606-614.
100. Takiguchi M, Mori M. Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem J*, 1995, 312: 649-659.
101. Thacker PA, Bowland JP, Milligan LP, Weltzien E. Effects of graded dietary protein levels on urea recycling in the pig. *Can J Anim Sci*, 1982, 62: 1193-1197.
102. Tomomura M, Imamura Y, Horiuchi M. Abnormal expression of urea cycle enzyme genes in juvenile visceral steatosis (jvs) mice. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1138: 167-171.
103. Tomomura M, Tomomura A, Dewan MA, Saheki T. Long-chain fatty acids suppress the induction of urea cycle enzyme genes by glucocorticoid action. *FEBS Lett*, 1996, 399: 310-312.
104. van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, van Leeuwen PA, Dejong CH. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *J Physiol*, 2007, 581: 819-827.
105. Vilstrup H. Synthesis of urea after stimulation with amino acids, relation to liver function. *Gut*, 1980, 21: 990-995.
106. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 2009, 89: 1269-339.
107. vom Dahl S, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W, Häussinger D. Regulation of liver cell volume and proteolysis by glucagon and insulin. *Biochem J*, 1991, 278: 771-777.
108. Weber FL, Veach G. The importance of the small intestine ingut ammonium production in the fasting dog. *Gastroenterology*, 1979, 77: 235-240.
109. Weiner ID, Miller RT, Verlander JW. Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the mouse liver. *Gastroenterology*, 2003, 124: 1432-1440.
110. Windmueller HG, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate

- from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys*, 1975, 171: 662-672.
111. Windmueller HG, Spaeth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem*, 1980, 255: 107-112.
112. Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem*, 1974, 249: 5070-5079.
113. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzym*, 1982, 53:201-237.
114. Wothers T, Grofte T, Jorgensen JO, Møller N, Vahl N, Christiansen JS, Vilstrup H. Effects of growth hormone (GH) administration on functional hepatic nitrogen clearance: studies in normal subjects and GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78: 1220-1224.
115. Xiao YP, Wu TX, Sun JM, Yang L, Hong QH, Chen AG, Yang CM. Response to dietary L-glutamine supplementation in weaned piglets: a serum metabolomic comparison and hepatic metabolic regulation analysis. *J Anim Sci*, 2012, 90: 4421-4430.
116. Yang D, Hazey JW, David F, Jittendra S, Rivchum R, Streen JM, Brunengraber H. Integrative physiology of splanchnic glutamine and ammonium metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 278: E469-E476.
117. Yap IK, Li JV, Saric J, Martin FP, Davies H, Wang Y, Wilson ID, Nicholson JK, Utzinger J, Marchesi JR, Holmes E. Metabonomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-induced gut microbiota modification in the mouse. *J Proteome Res*, 2008, 7: 3718-3728.
118. Yen JT, Kerr BJ, Easter RA, Parkhurst AM. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *J Anim Sci*, 2004, 82: 1079-1090.
119. Young VR, El-Khoury AE, Raguso CA, Forslund AH, Hambraeus L. Rates of urea production and hydrolysis and leucine oxidation change linearly over widely varying protein intakes in healthy adults. *J Nutr*, 2000, 130: 761-766.

附录 研究生在读期间发表的主要研究论文

1. **Bao, Z.**, Li, Y., Zhang, J., Li, L., Zhang, P., & Huang, F. R. Effect of particle size of wheat on nutrient digestibility, growth performance, and gut microbiota in growing pigs. *Livestock Science*, 2016, 183, 33-39.
2. Li, L., Zhang, P., **Bao, Z.**, Wang, T., Liu, S., & Huang, F. PGC-1 α Promotes Ureagenesis in Mouse Periportal Hepatocytes through SIRT3 and SIRT5 in Response to Glucagon. *Scientific Reports*, 2016, 6. 24156.
3. Zhang, P., Li, L., **Bao, Z.**, & Huang, F. Role of BAF60a/BAF60c in chromatin remodeling and hepatic lipid metabolism. *Nutrition & Metabolism*, 2016, 13, 1-13.
4. 郑培培, **包正喜**, 李鲁鲁, 胡长敏, 赵胜军, 刘东明, 黄飞若. 肝脏营养物质代谢仔猪肝-门静脉血插管技术的建立. *动物营养学报*, 2014, 26: 1624-1631.
5. 专利: 黄飞若, 张萍, **包正喜**, 李鲁鲁, 罗杰; 一种猪门静脉周肝细胞或肝静脉周肝细胞的分离与应用, 申请号: 201510749613.X.

致谢

转瞬间，又是一年毕业季，三年的研究生求学生涯也即将结束。忆往昔，昨日的奋斗和辛劳依稀历历在目，甜美与欢笑也都尘埃落定。值此毕业论文完成之际，谨向所有关心、爱护、帮助我的人表示最诚挚的感谢与最美好的祝愿。

衷心感谢我的导师黄飞若副教授对我学习上的辛勤培养和悉心指导以及生活上的关怀。在学术和科研上，您对我循循善诱的指导，给予鼓励、支持与信任将我从一个懵懂不羁的本科生变成一名合格的研究生；在生活上对我无微不至的关怀，让我感受到满满的温暖；在失落时开导我、启发我，让我更加坦然、自信的面对生活中的不期而遇。黄老师对科研的敏锐洞察能力、精益求精的工作作风和积极乐观的生活态度深深地感染着我，将指引着我以后的生活和工作。再次谨向黄老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意，感谢您作为良师益友，三年来在学习和生活中给予所有提供的关心、帮助和支持！

衷心感谢动物营养与饲料科学系的彭健教授、齐德生教授、晏向华教授、马立保副教授、齐智利副教授、王艳青副教授、周忠新副研究员、张妮娅老师、魏宏逵老师和孙铝辉老师在我读研期间给予的关心、支持和帮助！

衷心感谢武汉轻工大学的赵胜军老师、华中农业大学的胡长敏老师、刘东明老师在动物手术过程中给予的大力支持和帮助！

感谢我研究生的师兄、师姐、师弟、师妹们！感谢武汉轻工大学的刘正亚师兄、方勇师兄对实验中血插管技术提供支持和帮助！感谢林巧伟师姐、徐俊科师兄、王悦师姐、郑陪陪师姐、赵传超师兄、施忠秋师兄在我学习和生活中对我的鼓励、支持和帮助！感谢张建松、王超、李鲁鲁、廖睿、张萍、周颖、郭亮、王同心、刘霜、李蓉、秦廷洋、崔璐等在我试验和研究生生活中提供的热心帮助、鼓励与支持，感谢你们一路带给我的欢声笑语和美好回忆！

最后感谢我的家人和朋友，在三年的学习生活中给予的支持、鼓励和信任！你们永远是最坚实的后盾！

再次向所有给予我关心、帮助和支持的老师、同学以及亲人朋友们表示衷心的感谢，祝愿你们身体健康、学习进步、工作顺利！

包正喜
2016 年 5 月