



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

亮氨酸调控猪肝脏氨代谢的作用机制研究

THE REGULATORY MECHANISM OF LEUCINE ON

HEPATIC AMMONIA METABOLISM IN PIGS

研 究 生: 李鲁鲁
CANDIDATE: LULU LI

导 师: 黄飞若 副教授
SUPERVISOR: ASSOCIATE PROF. FEIRUO 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

亮氨酸调控猪肝脏氨代谢的作用机制研究

The Regulatory Mechanism of Leucine on Hepatic Ammonia Metabolism in Pigs

硕士研究生：李鲁鲁

学 号：2013302110066

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

王艳青 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
--------------	---	------------	-------------

独创性声明

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。

研究生签名: 廖鲁鲁


时间: 2016 年 6 月 5 日

学位论文使用授权书

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。

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。

学位论文作者签名: 廖鲁鲁

导师签名: 

签名日期: 2016 年 6 月 5 日

签名日期: 2016 年 6 月 5 日

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目 录

摘 要	i
Abstract	iii
缩略语表	v
第一部分 文献综述	1
1 前言	1
2 肝脏分区与氨的代谢	2
2.1 肝脏的分区与功能	2
2.1.1 肝脏的结构分区	2
2.1.2 肝脏功能分区	3
2.2 肝脏氨来源及分区代谢	4
2.2.1 肝脏氨的来源	5
2.2.2 肝脏氨的分区代谢	6
3 肝脏氨代谢调控研究进展	7
3.1 尿素循环的调控	7
3.1.1 pH对尿素循环的调控	8
3.1.2 去乙酰化酶对尿素循环的调控	8
3.1.3 内分泌激素对尿素循环的调控	10
3.1.4 营养素对尿素循环的调控	10
3.1.5 转录因子在尿素循环调控中的作用	11
3.2 谷氨酰胺循环的调控	11
3.2.1 谷氨酰胺酶的调控作用	11
3.2.2 谷氨酸脱氢酶的调控作用	12
4 猪肝氨基酸代谢及对氨的作用	12
4.1 肝脏氨基酸的代谢特点	13
4.1.1 必需氨基酸在肝脏的代谢	13
4.1.2 非必需氨基酸在肝脏的代谢	14

4.2 肝脏氨基酸对氨代谢的影响.....	14
4.2.1 氨基酸对氨代谢的底物驱动.....	14
4.2.2 氨基酸对氨代谢的营养调控.....	15
5 猪门静脉灌注技术及应用.....	15
6 研究的目的意义.....	16
第二部分 试验材料与方法.....	17
1 材料及仪器.....	17
1.1 试验动物.....	17
1.2 试验材料.....	17
1.2.1 试验试剂.....	17
1.2.2 试验耗材.....	18
1.2.3 手术器械包.....	18
1.3 试验仪器.....	18
2 试验方法.....	19
2.1 门静脉-肝静脉血管插管的安装.....	19
2.1.1 动物术前的处理.....	19
2.1.2 动物诱导麻醉.....	19
2.1.3 保定动物.....	19
2.1.4 动物呼吸麻醉.....	19
2.1.5 备皮.....	19
2.1.6 开创.....	20
2.1.7 门静脉-肝静脉插管的安装.....	20
2.1.8 插管固定.....	21
2.1.9 术后护理.....	21
2.2 仔猪门静脉灌注与样品采集.....	21
2.2.1 门静脉氨基酸与 NH_4Cl 灌注量的确定.....	21
2.2.2 氨基酸和 NH_4Cl 溶液的配制.....	23
2.2.3 仔猪门静脉灌注.....	23

2.2.4 样品采样	23
2.3 基于 LC-MS/MS 的氨基酸定量检测	24
2.3.1 样本前处理	24
2.3.2 试验参数	24
2.3.3 上机检测	25
2.4 实时荧光定量 PCR 检测	26
2.4.1 肝组织总 RNA 的提取和检测	26
2.4.2 cDNA 的制备	26
2.4.3 实时荧光定量 PCR	27
2.5 SIRT4 蛋白表达量的检测	28
2.5.1 猪肝组织蛋白样品制备	28
2.5.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳	29
2.6 猪肝脏代谢酶活性的测定	30
2.7 肝静脉尿素氮及葡萄糖的测定	30
2.8 数据分析	31
第三部分 结果与讨论	32
第一章 亮氨酸对门静脉血氨代谢的调控作用	32
1 前言	32
2 结果与分析	32
2.1 亮氨酸对肝脏尿素生成的影响	32
2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响	33
2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响	33
2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响	35
2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响	36
2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响	37
3 讨论	37
4 小结	39
第二章 亮氨酸对丙氨酸来源氨代谢的调控作用	40

1 前言	40
2 结果与分析	40
2.1 亮氨酸对肝脏尿素和葡萄糖生成的影响.....	40
2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响.....	41
2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响.....	41
2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响.....	43
2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响.....	44
2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响	45
3 讨论	45
4 小结	46
第三章 亮氨酸对混合氨基酸来源氨代谢的调控作用.....	47
1 前言	47
2 结果与分析	47
2.1 亮氨酸对肝脏尿素生成的影响.....	47
2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响.....	48
2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响.....	48
2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响.....	49
2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响.....	50
2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响	51
3 讨论	51
4 小结	52
第四部分 结语.....	53
1 成果与结论.....	53
2 创新点.....	53
3 不足与展望.....	53
参考文献.....	54
附录 研究生在读期间发表学术论文.....	63
致 谢.....	65

摘 要

氨氮的排放加剧了我国蛋白质资源紧缺和氮排放污染的现状。氨是哺乳动物体内氮营养素周转代谢的产物，可以在肝脏生成尿素（尿氮）排出体外，也可生成谷氨酰胺等被进一步利用。课题组前期研究结果表明，亮氨酸在肝脏的代谢率仅为4%~13%，并在氮素代谢调控中发挥重要功能。本研究旨在利用猪门静脉灌注技术，探究亮氨酸对不同来源氨在猪肝代谢的调控作用及机理：1、门静脉血氨（ NH_4^+ ）是肝脏氨的主要来源，拟设置 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组、亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组，研究亮氨酸对门静脉血氨的代谢调控作用；2、丙氨酸是氨的重要转运体，拟设置 ^{15}N -丙氨酸组、亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组，研究亮氨酸对丙氨酸来源氨的代谢调控作用；3、混合氨基酸在肝脏的分解代谢产氨也是肝脏氨的主要组成部分，拟设置混合氨基酸组、亮氨酸+混合氨基酸组，研究亮氨酸对混合氨基酸来源氨的代谢调控作用。主要研究结果如下：

（1）亮氨酸对门静脉血氨的代谢调控作用：与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比，在灌注后的 40~80 min，亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组降低了肝静脉血液中尿素氮（ $P<0.05$ ）的水平，提高了肝静脉血液中 ^{15}N -谷氨酸（ $P<0.05$ ）和 ^{15}N -谷氨酰胺（ $P<0.05$ ）的水平。与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比，亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组增加了肝组织中 ^{15}N -谷氨酸（ $P<0.01$ ）和 ^{15}N -谷氨酰胺（ $P<0.01$ ）的含量，提高了肝组织中谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH）的活性（约 65%）及其基因表达水平（约 1.8 倍）（ $P<0.01$ ）。结果表明：当 NH_4Cl 提供肝脏氨源时，亮氨酸可通过提高肝脏 GDH 活性，减少尿素的产生，增加谷氨酸和谷氨酰胺的生成。

（2）亮氨酸对丙氨酸来源氨的代谢调控作用：与 ^{15}N -丙氨酸灌注组相比，在灌注后的 40~80 min，亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组降低了肝静脉血中尿素氮（ $P<0.05$ ）和葡萄糖（ $P<0.05$ ）的水平；提高了肝静脉血液中 ^{15}N -谷氨酸（ $P<0.05$ ）和 ^{15}N -谷氨酰胺（ $P<0.05$ ）的水平。与 ^{15}N -丙氨酸灌注组相比，亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组增加了肝组织中 ^{15}N -谷氨酸（ $P<0.01$ ）和 ^{15}N -谷氨酰胺（ $P<0.01$ ）的含量，提高了肝组织中 GDH 的活性（约 50%）及其基因表达水平（约 1.6 倍）（ $P<0.01$ ）。结果表明：当丙氨酸提供肝脏氨源时，亮氨酸不仅可以提高肝脏 GDH 活性，减少尿素的产生和增加谷氨酸和谷氨酰胺的生成，还可以降低猪肝葡萄糖的生成。

（3）亮氨酸对混合氨基酸来源氮的代谢调控作用：与混合氨基酸灌注组相比，在灌注后的 40~80 min，亮氨酸+混合氨基酸组降低了肝静脉血中尿素氮（ $P<0.05$ ）和非必需氨基酸（Non-essential amino acids, NEAA）（ $P<0.05$ ）的水平。与混合氨基酸灌注组相比，亮氨酸+混合氨基酸组降低了肝组织中 NEAA 的含量（ $P<0.05$ ），提高了肝组织中 GDH 的活性（约 45%）及其基因表达水平（约 1.5 倍）（ $P<0.01$ ）。结果表明：当混合氨基酸提供肝脏氮源时，亮氨酸通过不仅可以提高肝脏 GDH 活性，减少尿素的产生，还降低了肝脏其他 NEAA 的含量。

（4）亮氨酸调控 GDH 酶活的作用机理：以上研究表明，亮氨酸均可有效的提高猪肝脏 GDH 的酶活性（ $P<0.01$ ），而 SIRT4 是 GDH 活性的抑制因子。进一步分析了添加亮氨酸后肝脏 SIRT4 的基因表达发现：在 NH_4Cl 、丙氨酸、混合氨基酸作为氮源的条件，SIRT4 的 mRNA 丰度分别下调了约 50%、41%、45%（ $P<0.01$ ）；SIRT4 的蛋白表达量分别下调了约 55%、51%、59%（ $P<0.01$ ）。结果表明：亮氨酸可通过抑制线粒体 SIRT4 的表达，提高 GDH 的活性。

本研究得到以下结论：

1、门静脉 NH_4Cl 作为氮源时，亮氨酸可减少肝脏尿素的产生，增加谷氨酰胺的生成；丙氨酸作为氮源时，亮氨酸不仅减少了肝脏尿素产生和增加了谷氨酰胺的生成，还可以降低肝脏葡萄糖生成；混合氨基酸作为氮源时，亮氨酸不仅减少了肝脏尿素的产生，还降低了肝脏 NEAA 的含量。

2、亮氨酸减少肝脏尿素产生，增加谷氨酰胺生成的机理可能涉及到表观遗传学因子 SIRT4 的调控：亮氨酸通过抑制肝脏线粒体 SIRT4 的表达，提高 GDH 的酶活，促进更多的氨底物逃逸尿素循环，进入谷氨酰胺循环。

本研究通过营养学与表观遗传学相结合研究了亮氨酸调控猪肝脏氮代谢的作用及机理，为养猪生产中节氮减排营养措施的制定提供了理论基础和实践指导。

关键词：猪肝脏；亮氨酸；谷氨酸脱氢酶；尿素循环；谷氨酰胺循环

Abstract

Ammonia emissions exacerbate the protein resource scarcity and nitrogen emission pollution. Ammonia is a major product of nitrogen turnover in mammals. Ammonia can convert to urea which cannot be metabolized or convert to glutamine that can be further utilized. Our previous results show that hepatic leucine metabolism rate is only 4% to 13%. It is now well recognized that leucine plays an important function in the regulation of nitrogen metabolism. The aim of the present study was to explore the regulatory role and mechanism of leucine on ammonia metabolism from different source using ^{15}N tracer and portal infusion technology. 1. Portal ammonia (NH_4^+) is the main hepatic ammonia source, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ or leucine+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ was infused to explore the regulation of leucine on hepatic ammonia (from portal vein) metabolism. 2. Alanine is an important transporter of ammonia, ^{15}N -alanine or leucine+ ^{15}N -alanine was infused to explore the regulation of leucine on hepatic ammonia (from alanine) metabolism. 3. The catabolism of mixed amino acid is also an important ammonia source in the liver, mixed amino acids or leucine+mixed amino acids was infused to explore the regulation of leucine on hepatic ammonia (from mixed amino acids) metabolism. The main findings are as follows:

(1) The regulation of leucine on hepatic ammonia (from NH_4Cl) metabolism. Compared with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ perfusion group, leucine+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ group decreased hepatic vein urea nitrogen concentration ($P<0.05$) in 40~80 min post-infusion, increased ^{15}N -glutamate and ^{15}N -glutamine concentrations in both hepatic vein (40~80 min) ($P<0.05$) and liver tissue ($P<0.01$). Moreover, the addition of leucine improved the glutamate dehydrogenase (GDH) activity (about 65%) and gene expression (1.8-fold) ($P<0.01$). Taken together, when NH_4Cl served as hepatic ammonia source, the addition of leucine could effectively inhibit the generation of urea and promote the generation of glutamate and glutamine by regulating GDH expression and activity.

(2) The regulation of leucine on hepatic ammonia (from alanine) metabolism. Compared with the ^{15}N -alanine perfusion group, leucine+ ^{15}N -alanine group decreased hepatic vein urea nitrogen ($P<0.05$) and glucose ($P<0.05$) concentrations in 40~80 min post-infusion, increased ^{15}N -glutamate and ^{15}N -glutamine concentrations in both hepatic vein (40~80 min) ($P<0.05$) and liver tissue ($P<0.01$). Moreover, the addition of leucine improved GDH activity (about 50%) and gene expression (about 1.6-fold) ($P<0.01$). Taken together, when alanine served as hepatic ammonia source, the addition of leucine could not only effectively inhibit the generation of urea and promote the generation of

glutamate and glutamine by regulating GDH expression and activity, but also inhibit hepatic gluconeogenesis.

(3) The regulation of leucine on hepatic ammonia (from mixed amino acids) metabolism. Compared with the mixed amino acids perfusion group, leucine+mixed amino acids group decreased hepatic vein urea nitrogen ($P<0.05$) concentration in 40~80 min post-infusion, reduced most NEAA concentrations both in hepatic vein ($P<0.05$) and liver tissue ($P<0.05$) NEAA. Moreover, the addition of leucine improved GDH activity (about 45%) and gene expression levels (about 1.5-fold) ($P<0.01$). Taken together, when mixed amino acids as hepatic ammonia source, the addition of leucine could not only effectively inhibit the generation of urea by regulating GDH expression and activity, but also reduce hepatic NEAA contents.

(4) The regulatory mechanism of leucine on GDH activity. The addition of leucine can effectively improve the GDH activity ($P<0.01$) from different ammonia sources. Therefore, the expression of mitochondrial SIRT4, the inhibitory factor of GDH, was further analyzed. With NH_4Cl , alanine and mixed amino acid as ammonia sources, the SIRT4 mRNA level were down by 50%, 41%, 45%, the SIRT4 protein were down by 55%, 51%, 59% in the presence of leucine ($P<0.01$), respectively.

These results showed that:

1. With NH_4Cl as ammonia source, the addition of leucine could effectively inhibit ureagenesis and promote the generation of glutamate and glutamine. With alanine as ammonia source, the addition of leucine could not only inhibit ureagenesis and promote the generation of glutamate and glutamine, but also inhibit hepatic gluconeogenesis. With mixed amino acids as ammonia source, the addition of leucine could not only inhibit ureagenesis, but also reduce hepatic NEAA contents.

2. The effect of leucine on hepatic ammonia metabolism might involve in the regulation of epigenetic factor SIRT4: the addition of leucine could inhibit mitochondrial SIRT4 expression, then increased GDH activity and promoted ammonia escaping urea cycle and into glutamine circulation.

This study clarified the role and mechanism of the regulation of leucine on hepatic ammonia metabolism, and provide the theoretical basis and practical guidance for the development of pig production.

Keywords: Pig liver; leucine; glutamate dehydrogenase; urea cycle; glutamine cycle

缩略语表

Abbreviation

缩写 Abbr.	英文名称 English name	中文 Chinese name
PP	Periportal	门静脉周
PV	Perivenous	肝静脉周
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇式丙酮酸激酶
GK	Glucokinase	葡萄糖激酶
CPS1	Carbamoylphosphate synthetase 1	氨甲酰磷酸合成酶 1
OTC	Ornithine transcarbamylase	鸟氨酸氨甲酰转移酶
ASS	Argininosuccinate synthetase	精氨琥珀酸合成酶
ASL	Argininosuccinate lyase	精氨基琥珀酸裂解酶
GINase	Glutaminase	谷氨酰胺酶
NAG	N-acetylglutamate synthetase	N-乙酰谷氨酸合成酶
NO	Nitric oxide	一氧化氮
NH ₄ Cl	Ammonium chloride	氯化铵
GS	Glutamine synthetase	谷氨酰胺合成酶
RhBG	RhB glycoprotein	RhB 糖蛋白
GLT	Glutamate transporter	谷氨酸转运体
TCA	Tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
AQP8	Aquaporin-8	水通道蛋白-8
NCG	N-Carbamylglutamate	N-甲酰谷氨酸
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α	过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子-1 α
GDH	Glutamate dehydrogenase	谷氨酸脱氢酶
ALT	Alanine aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AST	Aspartate aminotransferase	天冬氨酸氨基转移酶
BCAA	Branched-chain amino acid	支链氨基酸
LKR	Lysine α -ketoglutarate reductase	赖氨酸 α -酮戊二酸还原酶
LOX	Lysyl oxidase	赖氨酰化酶
PheOH	Phenylalanine hydroxylase	苯丙氨酸羟化酶
AAA	Aromatic amino acids	芳香族氨基酸
mTOR	Mammalian target of rapamycin	雷帕霉素靶蛋白
BCAT	BCAA aminotransferase	BCAA 氨基转移酶
BCKD	Branch chain keto acid dehydrogenase	支链酮酸脱氢酶
FAS	Fatty acid synthase	乙酰辅酶 A 羧化酶
TAT	Tyrosine aminotransferase	酪氨酸氨基转移酶
SerDH	Serine dehydratase	丝氨酸脱氢酶

第一部分 文献综述

1 前言

随着人们消费水平的提高和对猪肉产品需求量的不断增加,养猪业得到了迅猛的发展。与此伴生的是养殖生产中面临的诸多问题和挑战。氮营养素的高效利用和氮排放污染问题严重制约了我国养猪业的可持续发展。随着养殖规模的不断扩大,蛋白质饲料资源日益短缺。目前,我国对鱼粉和大豆的进口依存度较高。然而,猪对日粮中蛋白质的利用率较低,大量的氮营养素通过粪尿排出体外。在商品猪 160 天全生长期内,每头猪平均每天产(排泄)总氮 30~50 克,其中粪与尿中氮各占一半左右(王振兴等 2014)。根据《全国畜牧业发展第十二个五年规划》,到 2015 年,全国畜禽养殖总量将达到 14 亿头(猪当量);规模化养殖比重将提升 10~15 个百分点,养殖总量将达到 7 亿头(猪当量),按照现有畜禽养殖污染防治水平测算,氮氮的年排放量将高达 80 万吨,给污染防治带来较大压力。

值得注意的是,尿氮绝大多数是以尿素的形式排出体外,而哺乳动物肝脏是尿素生成的关键部位(Häussinger 2007)。肝脏尿素循环最主要的底物是氨(Ammonia, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$),日粮蛋白质在肠上皮细胞和肠道微生物的作用下,产生大量的氨;同时动物机体氮营养素在周转代谢过程中也会产生氨,这些氨均会进入肝脏代谢。氨代谢成尿素这一过程不仅造成了氮营养素的浪费,还带来了环境压力。随着集约化与规模化养殖模式的盛行,氮排放问题更为值得关注,因为排放到环境中的尿氮在脲酶作用下迅速产生氨气并释放到空气中去(Canh et al 1998)。有报道指出,畜禽养殖所产生的氨占全球人为产氨的 64%,而这部分氨气主要来源于畜舍和粪污储存场所(Beusen et al 2008)。

氨是一种有毒物质,必须被肝脏代谢,那么探寻一种营养调控物质,抑制尿素的生成,促进氨在肝脏生成可供重新利用的氨基酸等氮营养素,这对于提高氮利用率、减少氮排放这一关乎养猪业可持续发展的问题至关重要。

2 肝脏分区与氨的代谢

肝脏是新陈代谢的重要器官，在营养代谢、分泌性蛋白合成以及尿素生成中发挥着关键作用。动物肠道吸收的营养物质均要由门静脉进入肝脏代谢后才输送到机体各组织器官（Shoveller et al 2005）。随着研究的不断深入，发现肝脏并不是传统上认为的实质性器官，而是由数以万计的肝小叶组成，肝细胞所处的肝小叶位置不同，其代谢特点也不同，这就形成了肝脏分区的观点（Jungermann and Keitzmann 1996）。肝脏分区的发现为氨代谢的研究提供了展新的思路。

2.1 肝脏的分区与功能

2.1.1 肝脏的结构分区

肝脏位于动物营养吸收和代谢的重要位置。肠道吸收的营养物质首先由门静脉进入到肝脏进行代谢和解毒，代谢产物经肝静脉输送到机体其他组织利用或肾脏排泄。此外，肝脏还具有发达的血管系统（Vollmar and Menger 2009）。肝脏的位置和丰富的血管系统实现了其对营养物质的摄取、代谢和重分配的功能。

肝脏的稳态依赖于肝脏内复杂代谢功能的实现和代谢活动有序地进行。为了高效的实现其代谢功能，肝细胞是高度专业化的（Colnot and Perret 2011）。早在 30 多年前，Jungermann 课题组的研究表明，肝细胞虽然在组织学上没有明显的区别，但肝细胞具有显著的功能差异和专业化的分工，肝细胞的功能差异取决于他们所处的肝细胞板波尔图中心轴的位置（Katz et al 1977）。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（图 1.1）：门静脉区（Zone 1），中间区域（Zone 2），肝静脉区（Zone 3）（Brosnan et al 2009）。肝小叶是肝脏构成的基本单位，大约有 6~8 层的肝细胞围绕于进入肝小叶的血管周围，这部分肝细胞被称为门静脉周（Periportal, PP）肝细胞；约 2~3 层的肝细胞围绕于流出肝小叶的血管周围，这部分肝细胞被称为肝静脉周（Perivenous, PV）肝细胞；大约有 6~10 层的肝细胞位于门静脉周与肝静脉周细胞群之间，这部分区域被称为中间区域。所以，Jungermann 提出了肝脏“区室化”的观点，根据这一概念，功能相反或互补的代谢途径位于肝脏内不同的非重叠区域，从而保持肝脏的最佳的代谢效率和稳态（Jungermann and Keitzmann 1996）。

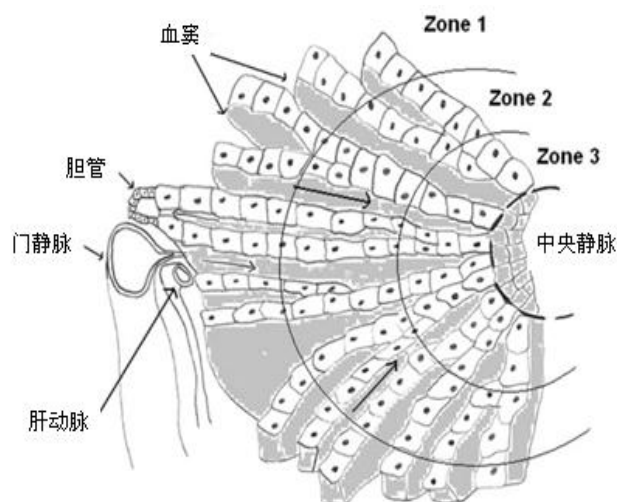


图 1.1 肝脏小叶与腺泡示意图（修改自 Brosnan et al 2009）

Fig 1.1 Diagrammatic representation of a hepatic acinus (modified from Brosnan et al 2009)

2.1.2 肝脏功能分区

肝细胞在营养素的合成和降解、有毒分子的转化和解毒、以至肝脏与机体的稳态中发挥着关键作用。基于肝细胞位于血管的位置，根据从门静脉到中央静脉的血液流向，每个肝小叶中的肝细胞均可以分为如上所述的两类细胞亚群：即上游的“门静脉周亚群”和下游的“肝静脉周亚群”。有意思的是，肝细胞位于不同的区域，表现出了巨大的代谢酶基因、蛋白表达水平和活性的差异（Braeuning et al 2006）。营养物质代谢及其中间代谢的许多酶大都不均匀地分布在整个肝脏，但是均优先表达在门静脉周肝细胞或肝静脉周肝细胞所在的区域（Gebhardt 1992）。因此，肝细胞无论位于两个区域的任意一个，往往有不同的、相辅相成的功能。两类细胞所表现的代谢酶的差异广泛的存在于糖代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、氮代谢和胆汁酸代谢等代谢通路（Gebhardt 1992）。

目前，对于区室化功能研究较多集中于糖类、脂质和氨基酸代谢（图 1.2）。葡萄糖的代谢为肝脏的区室化提供了很好的佐证，葡萄糖异生主要发生在门静脉周肝细胞，因为该区域磷酸烯醇式丙酮酸激酶（Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK）的表达和活性较高；而糖酵解主要发生在肝静脉周肝细胞，因为糖酵解

的关键酶葡萄糖激酶（Glucokinase, GK）和丙酮酸激酶（Pyruvate kinase, PK）仅表达于肝静脉周区域（Jungermann and Katz 1989）。对于脂质和氨基酸代谢而言，脂肪酸的降解和氨基酸的代谢主要发生于门静脉周区域，而脂肪酸和氨基酸（如谷氨酰胺）的合成主要发生于肝静脉周区域（Braeuning et al 2006）。值得注意的是，不仅三大营养物质，肝脏氨的代谢也存在着一个明显的分区差异，这将为氨代谢的研究提供新的切入点。

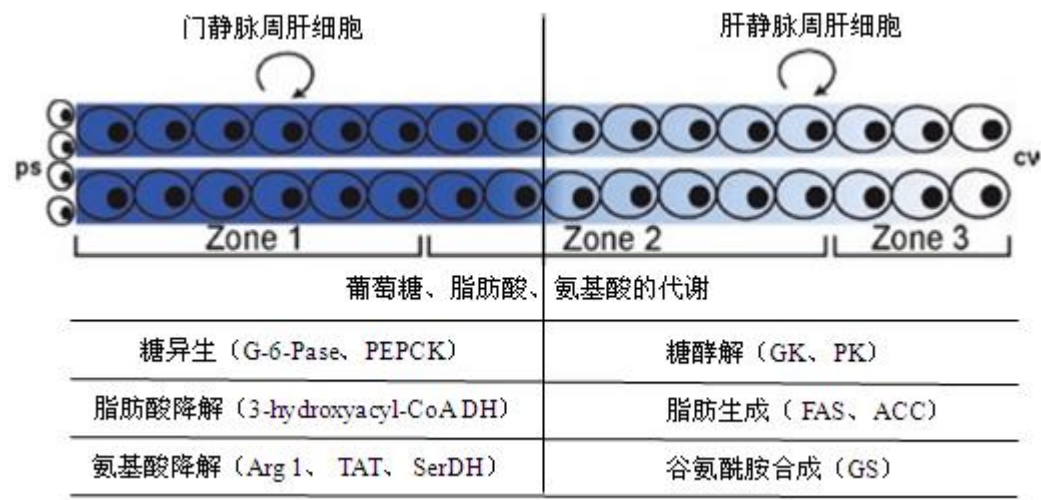


图 1.2 肝脏分区与营养物质代谢

G6Pase, 葡萄糖-6-磷酸酶; PEPCK, 磷酸烯醇式丙酮酸激酶; GK, 葡萄糖激酶; PK, 丙酮酸激酶; 3-hydroxyacyl-CoA DH, 3-羟酰-CoA 脱氢酶; FAS, 脂肪酸合成酶; ACC, 乙酰辅酶 A 羧化酶; Arg1, 精氨酸酶 1; TAT, 酪氨酸氨基转移酶; SerDH, 丝氨酸脱氢酶; GS, 谷氨酰胺合成酶。

Fig 1.2 Functions of the zoned liver and nutrition metabolism

G6Pase, glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; GK, glucokinase; PK, pyruvate kinase; 3-hydroxyacyl-CoA DH, 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase; FAS, fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; Arg1, Arginase 1; TAT, tyrosine aminotransferase; SerDH, serine dehydratase; GS, glutamine synthetase.

2.2 肝脏氨来源及分区代谢

氨在动物机体氮营养代谢过程中发起着不可替代的作用。氨作为机体蛋白质周转代谢的副产物，可以以底物的形式参与到尿素、氨基酸、核酸等含氮化合物的生成过程。然而，氨是一种有毒物质，必需被动物机体代谢清除，肝脏尿素循环是

氨代谢的最主要的途径，然而部分的氨仍然可以参与合成氨基酸等氮营养素。有意思的是，氨代谢命运的不同与肝脏分区结构密切相关（Gebhardt et al 2007）。那么明确氨的来源对其在肝脏的代谢及调控研究的尤为重要。

2.2.1 肝脏氨的来源

肝脏是氨最重要的代谢场所，来自于机体消化道和各个组织器官中的氨都要运输到肝脏进行代谢（Olde Damink et al 2002）。肝脏氨主要来自于肠道、肌肉及肝脏本身氮营养素的周转代谢和氨基酸脱氨等生理过程。

肠道是氨产生的一个最主要的场所，用于生成尿素的 25%左右的氨直接以氨的形式来自于小肠和结肠（Häussinger et al 1993）。肠道氨的产生主要有两种方式：结肠微生物对含氮营养物质的降解和氨基酸在小肠上皮细胞的分解代谢。在结肠中，细菌脲酶分解日粮含氮底物是氨产生的主要方式，而非细菌性产生的氨的比例较少，仅占 10%左右（Häussinger 2007）。在小肠中，谷氨酰胺（日粮来源和动脉来源）、丙氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等氨基酸均会在小肠粘膜分解代谢降解为氨（Weber and Veach 1979; Weber et al 1988）。此外，大约 15%~30%左右由肝脏生成的尿素没有直接由肾脏排出体外，而是分泌回肠道内，这部分尿素被肠道内的细菌脲酶重新降解为氨后也会由门静脉进入肝脏（Wolpert et al 1971; Hawkins et al 1993）。有报道指出，猪摄食后门静脉血氨的浓度可高达血液循环其他部分的十倍以上（Stoll et al 1998）。

除门静脉血氨外，肝脏及肌肉等组织器官产生的氨也是肝脏氨的重要来源。肌肉-肝脏间存在一个重要的生理循环-丙氨酸-葡萄糖循环，该循环负责将肌肉中产生的氨运至肝脏。肝脏内也存在着丰富的转氨酶与脱氨酶，动物摄食后日粮氨基酸由门静脉进入肝脏，在众多代谢酶的作用下产生的大量氨（Spanaki and Plaitakis 2012; Wright et al 2011）。这部分氨与门静脉血氨构成肝脏氨的主要来源，共同进入肝脏氨代谢通路。

综上，肝脏的氨来源主要包括：1）肠道产生的氨以血氨的形式由门静脉进入肝脏；2）肌肉中的大部分氨以丙氨酸的形式转运至肝脏；3）日粮氨基酸在肝脏的分解代谢产氨。然而，针对于不同来源氨在猪肝的代谢差异及其调控机理研究较少。

2.2.2 肝脏氨的分区代谢

哺乳动物肝脏存在两种氨的代谢通路：尿素循环和谷氨酰胺循环。两种代谢通路因其所处的肝脏分区不同而引起代谢的差异。一般情况下，门静脉周肝细胞主要发生尿素循环，肝静脉周肝细胞主要发生谷氨酰胺循环（Morris 2002; Meijer and Lamers 1990）。

（1）门静脉区尿素循环

在肝脏门静脉区的肝细胞主要发生尿素循环这一生理代谢过程。尿素循环是哺乳动物机体内氨解毒的主要形式，也是氮营养素周转代谢的重要环节。以健康成年人为例，大约 90%过剩的氮进入尿素循环这一不可拟的反应生成尿素，然后大部分的尿素会运输至肾脏，由肾脏排出体外；定量计算的话大约有 30g 左右的尿素被肾脏排出。关于人的尿素循环研究更多的集中于肝脏疾病和肝性脑病的发生。随着养殖生产中氮排放污染问题的加重，尿素循环作为体内过剩氮排放的主要形式，正在受到更多的研究和关注。

尿素循环主要发生在哺乳动物肝脏。主要分为 5 步：1 分子 NH_3 和 1 分子的 HCO_3^- 在氨甲酰磷酸合成酶 1（Carbamoylphosphate synthetase 1, CPS1）的催化下生成氨甲酰磷酸，要消耗大约 2 分子的腺苷三磷酸（Adenosine triphosphate, ATP）。第二步反应的催化酶是鸟氨酸氨甲酰转移酶（Ornithine transcarbamylase, OTC）。后三步反应的催化酶分别为精氨酸琥珀酸合成酶（Argininosuccinate synthetase, ASS）、精氨酸琥珀酸裂解酶（Argininosuccinatelyase, ASL）和精氨酸酶（arginase）。需要注意的是第三、四、五步反应均在胞浆中进行。尿素循环又成为鸟氨酸循环（Ornithine cycle），其作用不仅可清除对动物机体有毒的氨和过多的碳酸氢根。

为了保证尿素循环高效有序的进行，肝脏内还有众多的蛋白分子参与这一过程。比如谷氨酰胺酶（Glutaminase, GINase）、N-乙酰谷氨酸合成酶（N-acetylglutamate synthetase, NAG）、线粒体鸟氨酸/瓜氨酸转运蛋白 ORNT1 和 ORNT2、线粒体天冬氨酸/谷氨酸转运体（Häussinger 1983; Camacho et al 2003; Kobayashi et al 1999）等。肝脏是合成尿素最主要的器官，许多学者也在探究其他的细胞类型，比如肠上皮细胞是否也会产生的尿素（Wu 1995）。目前，尿素循环酶已经在肝外组织中发现，然而肝外组织尿素酶主要涉及到精氨酸的提供以及一氧化氮（Nitric oxide, NO）的产生，该过程被称为瓜氨酸-NO 循环（Husson et al 2003）。

(2) 肝静脉区谷氨酰胺循环

氨在哺乳动物肝脏解毒的另一主要方式是谷氨酰胺的合成。谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 是一种胞质酶, 该酶仅存在于肝静脉周肝细胞这一小的细胞亚群内 (Gebhardt and Mecke 1983)。有趣的是, 肝静脉周肝细胞不存在尿素循环酶, 因此, 随着肝脏血液从门静脉向肝静脉的流动, 尿素循环和谷氨酰胺合成这两个重要的氨解毒系统也会自动的切换 (Häussinger 1990)。谷氨酰胺合成酶存在于肝静脉周肝细胞, 因此谷氨酰胺循环不受尿素循环中关键催化酶或蛋白等的影响, 是肝静脉周肝细胞中高效的清除氨的方式。有学者研究发现, 选择性的破坏小鼠肝静脉周肝细胞, 没有影响到上游的尿素循环, 却出现了血液高血氨的症状 (Häussinger and Gerok 1984)。这很好的解释了谷氨酰胺循环在清除氨中的作用。有研究发现, 大约有 7%~25% 的氨没有进入门静脉周肝细胞的尿素循环, 而参与了肝静脉周肝细胞的谷氨酰胺合成 (Häussinger 1983; Cooper et al 1987)。

为了保证肝静脉周肝细胞清除氨的能力, 肝静脉周肝细胞特定的表达相关蛋白, 如 NH_4^+ 转运蛋白 RhB 糖蛋白 (RhB glycoprotein, RhBG)、谷氨酸转运体 (Glutamate transporter, GLT) 和鸟氨酸氨基转移酶 (Weiner et al 2003; Cadoret et al 2002); 同时, 肝静脉周肝细胞表现出了对 α -酮戊二酸、苹果酸和其他二羧酸配体的高度亲和及利用, 以作为谷氨酰胺合成的碳骨架 (Stoll et al 1991)。关于谷氨酰胺合成酶在肝静脉周肝细胞表达的调控机制还不是很清楚, 可能会涉及到多种信号通路或调控因子, 如 Wnt/ β -catenin 信号通路等 (Cadoret et al 2002)。

所以, 肝脏尿素合成是一个低亲和力、高能力 (low affinity, high capacity) 的氨解毒系统, 大部分的血氨在门静脉区降解为无毒的尿素, 另一部分氨逃逸此过程进入肝静脉区, 通过高亲和力、低能力 (high affinity, low capacity) 谷氨酰胺合成酶系统生成谷氨酰胺, 两者相互补充在机体的氨代谢稳态中发挥了重要的作用 (Häussinger 2007)。

3 肝脏氨代谢调控研究进展

肝脏氨代谢进程中, 如酸碱度 pH、去乙酰化修饰酶等均会对尿素循环产生调控作用。从调控的时间类型看, 可分为长期与短期调控, 对尿素循环的短期调控主要表现在酶活性上, 而长期调控主要发生在翻译水平上, 即酶含量上。

3.1 尿素循环的调控

3.1.1 pH 对尿素循环的调控

尿素循环的第一步反应为 NH_4^+ 和 HCO_3^- 在 CPS1 的作用下生成氨甲酰磷酸。所以 NH_4^+ 和 HCO_3^- 是尿素循环的底物来源，因为两种离子的状态受 pH 的严格调控，因此，尿素循环也会受到 pH 的影响。氨在哺乳动物体内的存在形式主要分为 NH_3 和 NH_4^+ ，它们之间存在一个动态平衡： $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ ，该反应的 pKa 为 9.25，在正常生理条件下，氨大多数是以铵根离子的形式存在。 NH_3 作为一种小分子的气体可以跨膜自由扩散，而 NH_4^+ 是一种离子形态则需要主动运输的形式，在转运体 RhBg 的作用下完成运输 (Jahn et al 2004; Weiner et al 2003)。有研究发现，在小鼠离体肝脏灌注试验中，pH 的改变显著影响了尿素合成的速率 (Häussinger et al 1985)。所以，动物机体 pH 的变化，会非常显著的影响尿素循环的进程，反之，由于尿素循环对 NH_4^+ 的清除，在动物机体系统 pH 稳态的调节中，发挥了主要的作用。

3.1.2 去乙酰化酶对尿素循环的调控

随着营养学研究的不断深入，表观遗传学在营养代谢中的作用引起了人们的关注，表观遗传学修饰广泛参与到猪营养调控的各个环节 (黄飞若 2016)。动物的营养状态也会影响到尿素循环，其对尿素循环的作用主要通过乙酰化与去乙酰化修饰来实现。哺乳动物细胞线粒体是能量代谢最为重要的细胞器，有趣的是，线粒体中的蛋白质存在广泛的赖氨酸乙酰化，乙酰化的线粒体蛋白参与到机体众多涉及到营养物质及能量代谢的途径，例如脂肪的 β 氧化、三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA)、氨基酸代谢、碳水化合物代谢以及尿素循环等过程 (Zhao et al 2010; Wang et al 2010)。

Sirtuins 是哺乳动物体内的去乙酰化家族的重要一种，Sirtuins 蛋白家族有包括：SIRT 1-7，其中 SIRT3、4、5 位于线粒体中。乙酰化过程需要用到代谢中间物乙酰 CoA 作为底物，并且依赖 NAD^+ ，而乙酰 CoA 和 NAD^+ 是动物机体内众多代谢途径的共同反应中间产物，一种营养物质的增多或减少，均会导致该物质中间代谢产物乙酰 CoA 和 NAD^+ 含量的增加或减少，继而对代谢酶产生不同的乙酰化修饰 (Dominy et al 2011)。因此，代谢酶的乙酰化状态高度灵敏的随着营养物质浓度和

能量水平的改变而改变。值得注意的是，尿素循环的限速步骤与第二步反应均发生在线粒体中，线粒体 Sirtuins 在尿素循环中的调控作用正在被进一步的探究和发现。

(1) SIRT3 对尿素循环酶 OTC 的调控

SIRT3 是线粒体 Sirtuins 的一种，是哺乳动物肝脏线粒体基质中最为主要的蛋白质去乙酰化酶 (Lombard et al 2007)。SIRT3 可以对线粒体诸多的代谢过程的催化酶去乙酰化修饰，进而改变酶的活性，以达到调控代谢的目的。SIRT3 不仅可以调控碳水化合物和脂质的代谢，还可以在尿素循环等氮代谢过程中产生作用。Hallows 等 (2011) 研究发现，在禁食的状态下，SIRT3 可以去乙酰化尿素循环的第二步催化酶 OTC，并提高 OTC 的活性，进而加速尿素循环。而在 SIRT3 缺失的小鼠模型中发现，小鼠表现出与人类尿素循环障碍相似的症状，如血清鸟氨酸含量升高，瓜氨酸水平降低等症状 (Hallows et al 2011)。

(2) SIRT5 对尿素循环酶 CPS1 的调控

SIRT5 也是线粒体 Sirtuins 的一种，主要表达于肝脏、心脏和大脑等线粒体功能比较旺盛的器官。SIRT5 可以作为去乙酰化酶对特定底物蛋白进行去乙酰化 (Newman et al 2012)。CPS1 是尿素循环的关键酶，也是尿素循环的第一步酶。Nakagawa 等 (2009) 研究表明，SIRT5 能够去乙酰化 CPS1 并使其活性升高。在禁食的情况下，哺乳动物肝脏线粒体中 NAD^+ 的含量显著上升，SIRT5 对 CPS1 去乙酰化作用明显增强，从而激活 CPS1 的活性并加速尿素循环；而在 SIRT5 敲除的小鼠中发现，CPS1 的活性无法激活，并且血液中氨的浓度维持在一个较高的水平 (Nakagawa et al 2009)。

Sirtuins 蛋白家族的调控作用除了受机体营养状态的影响，还感受着环境、疾病等因素的变化。目前，规模化和集约化养殖模式日趋盛行，现代化的养殖模式下非常容易使动物遭受到来自密度、运输、病原菌等的刺激。在众多的环境刺激因子下，这些病原性和非病原性抗原常常使机体处于免疫应激的状态。Sirtuins 可参与到抵抗应激的相关生理过程 (Rajendran et al 2011)。如在免疫应激期间，机体为了抵抗这些有害刺激，将更多的氨基酸用于肝脏糖异生和氧化供能，同时机体的蛋白质周转速度也会相应提高。猪肝脏氨基酸碳架进入糖异生的同时，氨基酸脱下氨，此时 SIRT3 和 SIRT5 的表达和活性会增加，尿素循环增强从而达到清除对机体有毒的氨的目的。

3.1.3 内分泌激素对尿素循环的调控

（1）胰高血糖素

胰高血糖素是一种内分泌激素，可参与调控机体的营养代谢。胰高血糖素主要在禁食（饥饿）的状态下分泌，最为主要的生理功能为提高血糖的浓度。除此之外，胰高血糖素还被认为是调控肝脏氨代谢的重要激素。胰高血糖素调控氨代谢的主要机制包括对谷氨酰胺酶的激活、促进氨基酸转运体的表达、N-乙酰谷氨酸的增加和蛋白质分解等途径（Häussinger 2007）。

胰高血糖素调控的形式也可分为短期和长期的调控。CPS1 催化氨甲酰磷酸的合成被认为是短期调控的关键（Ahuja and Powers-Lee 2008）。限速酶 CPS1 对氨的 K_m 值为 1~2 mM，胰高血糖素可以促进 CPS1 的天然激活剂 NAG 的合成（Nissim et al 1996）。其机理主要是胰高血糖素可通过提高谷氨酰胺酶的活性，提供给 NAG 生成更多的底物，从而增加 NAG 的生成和 CPS1 的活性（Brosnan et al 2002）。在长期的调控中，胰高血糖素可以上调肝脏尿素循环酶的表达，这一作用涉及到了多种的调控机制，包括转录、翻译、翻译后修饰等（Ulbright and Snodgrass 1993）。Soria 等（2013）研究表明，胰高血糖素不仅可以上调尿素循环酶 CPS1 和 OTC 的含量，还可以显著的促进氨转运体水通道蛋白-8（Aquaporin-8, AQP8）的表达，从而促进氨的转运和尿素循环的进行。

（2）其他内分泌激素

糖皮质激素是由肾上腺皮质分泌的一种激素，在免疫、糖脂代谢、蛋白质的代谢及生物合成中发挥调控作用。糖皮质激素的一项重要功能是可以促进蛋白质的降解、提高尿素循环酶的含量，促进尿素的生成（Sigsgaard et al 1988）。胰岛素虽然与尿素的生成没有直接的关系，但它是一个强的肝脏蛋白质降解抑制和胰高血糖素的拮抗激素，因此，也认为胰岛素是体内尿素循环的调控激素（Hallbrucker et al 1991）。此外，生长激素也可以减少尿素的生成，这可能涉及到机体的氮周转代谢和肝脏氨源的供应。

3.1.4 营养素对尿素循环的调控

营养素的含量和种类也会影响尿素循环。日粮中的脂质和碳水化合物的含量与乙酰 CoA 及 NAD^+ 的水平密切相关，继而影响到 Sirtuins 的活性，从而达到调控尿素

循环的目的。日粮整体的氨基酸水平也可以影响尿素循环的进行，腹腔注射氨基酸的全混合液，可以大大的提高尿素循环的效率并促进尿素的产生。NAG 是尿素循环关键酶 CPS1 的激活剂。有报道指出 NAG 的含量提高五倍，CPS1 的活性也相应的提高五倍（Stewart and Walser 1980）。日粮中添加 NAG 的类似物 N-甲酰谷氨酸（N-Carbamylglutamate, NCG）可以促进生长猪的氮周转和尿素产生。鸟氨酸的水平也具有调控 CPS1 酶活性的功能；精氨酸可以通过促进 NAG 的合成促进尿素生成而防止氨中毒（Kim et al 1972）。所以，营养物质对尿素循环的调控主要以氮营养（氨基酸）为主，主要表现在底物驱动及营养调控两个方面，其潜在的调控作用及应用前景将在下一章进行详细的概述。此外，饲用抗生素，如新霉素，也可以有效的降低脲酶的活性，降低尿素在肠道内的分解（Wolpert et al 1970）。

3.1.5 转录因子在尿素循环调控中的作用

过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子-1 α （Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α ）是一种核受体家族的转录激活蛋白。PGC-1 α 可作为辅助调节因子参有关线粒体生物合成等多条代谢通路。最近的研究表明，PGC-1 α 具有促进线粒体 SIRT3 表达的作用，PGC-1 α 的敲除的肝细胞中 SIRT3 基因的表达量显著降低，其具体的机制是 PGC-1 α 可以激活 SIRT3 基因的启动子区域，以达到增加 SIRT3 基因的表达的目的（Kong et al 2010; Buler et al 2012）。同样有研究表明，线粒体 SIRT5 的表达也会受到 PGC-1 α 的严格调控（Buler et al 2014）。门静脉周肝细胞是尿素循环发生的主要区域，PGC-1 α 可以显著促进门静脉周肝细胞 SIRT3 和 SIRT5 的表达，去乙酰化并激活尿素循环酶 OTC 和 CPS1 活性，促进尿素循环的发生，所以，PGC-1 α 是通过线粒体 Sirtuins 在尿素循环的中实现其调控作用（Li et al 2016）。

3.2 谷氨酰胺循环的调控

3.2.1 谷氨酰胺酶的调控作用

肝静脉周肝细胞分布于末端静脉，也就是肝静脉周围，虽然细胞数量约占总肝细胞数的 7% 左右，但是胞内有丰富的谷氨酰胺合成酶，这就决定了谷氨酰胺循环在氮代谢调控中也存在重要的价值（Gebhardt and Mecke 1983）。氨进入谷氨酰胺

循环代谢这一过程也存在短期与长期的调控，主要表现在对谷氨酰胺合成酶的作用上。谷氨酰胺合成酶的短期调控主要表现在底物水平和酶的共价修饰调节（Görg et al 2005）。由于谷氨酰胺合成酶的表达位于尿素循环的下游，所以底物的来源量受尿素循环的影响，导致尿素循环相关酶会间接对谷氨酰胺循环的发生调控作用。所以，能有效影响尿素生成的因素均会间接的对谷氨酰胺的合成产生影响。长期的调控来看，胰岛素与糖皮质激素能引起谷氨酰胺合成酶表达（Labow et al 2001）。

3.2.2 谷氨酸脱氢酶的调控作用

谷氨酸在肝脏氨基酸代谢中发挥着核心作用，不仅是因为谷氨酸在大多数氨基酸转氨中的作用，也因为精氨酸、鸟氨酸、脯氨酸、组氨酸、谷氨酰胺均可以分解代谢产生谷氨酸。不同的肝脏功能被限制在特定的细胞区域，谷氨酰胺的分解非常明确的在门静脉周肝细胞进行，而谷氨酰胺的合成在肝静脉周肝细胞进行。在此过程中谷氨酰胺、谷氨酸、氨的代谢形成了一个非常重要的代谢轴，即谷氨酰胺-谷氨酸- α -酮戊二酸轴（glutamine-glutamate- α -ketoglutarate axis）（Li et al 2006）。

谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH）在代谢轴中作用举足轻重。因为 GDH 可以催化谷氨酸到 α -酮戊二酸和氨这一可逆的反应。值得注意的是，GDH 在哺乳动物肝脏中有很高的表达，并且具有较高的酶活性，这样就能够很好的调控氨基酸与氨的比例，以提供给尿素循环适当的底物。此外，GDH 催化产生的谷氨酸还可以促进肝静脉周谷氨酰胺的合成，因此，谷氨酸不仅可以作为氨的来源，还可以作为氨的清除剂（Spanaki and Plaitakis, 2012）。GDH 在肝脏氮素代谢尤其是谷氨酰胺循环中的作用逐渐成为研究的热点。近期有报道表明，SIRT4 可通过 ADP 核糖基化作用下调线粒体中 GDH 的活性，在 SIRT4 敲除小鼠中，GDH 活性显著升高（Haigis et al 2006）。

4 猪肝脏氨基酸代谢及对氨的作用

肝脏是氮营养素周转代谢的重要器官，日粮中的吸收的氨基酸进入肝脏参与分解代谢、蛋白质合成等重分配过程。肝脏对氨基酸的代谢改变了肝静脉氨基酸的组成模式和肝外组织氨基酸的分配量。氨基酸不仅可以作为一种营养底物，还可以作为一种营养调控物质参与肝脏内众多代谢通路的调控过程。

4.1 肝脏氨基酸的代谢特点

最新的研究报道, 由门静脉进入肝脏的氨基酸中大约有 26%~42% 在肝脏代谢 (Li et al 2015)。首先, 氨基酸可在肝脏分解代谢, 肝脏中存在丰富的氨基酸代谢酶, 如丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、GDH 等氨基酸代谢酶。肝脏中氨基酸也可分解代谢作为能量的提供者, 如生糖氨基酸可作为糖异生的底物, 参与葡萄糖的生成。氨基酸还可以参与肝脏蛋白的合成。肝脏是合成白蛋白唯一的器官, γ -球蛋白以外的球蛋白、血浆蛋白及酶蛋白的生成、维持及调节均要肝脏的参与。此外, 肝脏还是抗氧化剂谷胱甘肽合成的重要场所 (Wu 2009)。

4.1.1 必需氨基酸在肝脏的代谢

肠道吸收的日粮氨基酸要经肝脏代谢后才输送到其他组织器官利用, 所以必需氨基酸在肝脏的代谢状况影响着日粮氨基酸对肝外组织的供给量。郑培培 (2015) 分析了不同蛋白水平 (低、中、高) 日粮对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响发现, 大约有 43%~59% 的赖氨酸, 30%~44% 的苏氨酸、4%~13% 的支链氨基酸 (Branched-chain amino acid, BCAA)、63%~79% 的苯丙氨酸在猪肝被代谢, 总必需氨基酸的代谢比例为 20%~34%。这些氨基酸或进入转氨和脱氨的分解代谢过程, 或参与肝脏的蛋白质的合成。值得注意的是, 低蛋白水平日粮能增加肝脏必需氨基酸的代谢水平。此时, 更多的必需氨基酸被肝脏利用, 说明肝脏在氨基酸代谢转化和分配中发挥关键作用 (Li et al 2015)。

赖氨酸在肝脏氧化代谢的比例较高, 原因是其代谢酶赖氨酸 α -酮戊二酸还原酶 (Lysine α -ketoglutarate reductase, LKR) 和赖氨酰化酶 (Lysyl oxidase, LOX) 均在肝脏表现出了高的活性, 并且其活性随日粮蛋白的水平升高而升高 (Kiess et al 2008)。蛋氨酸可与半胱氨酸进行转换; 可作为甲基供体参与到甲基化的修饰。苏氨酸在肝脏可以被苏氨酸脱氢酶催化分解, 也可参与到蛋白合成的过程。值得注意的是, BCAA 在肝脏的代谢率很低, 而苯丙氨酸在肝脏的代谢率极高, 其原因不仅是因为哺乳动物肝脏中有高的苯丙氨酸羟基化酶 (Phenylalanine hydroxylase, PheOH) 活性, 而是苯丙氨酸的代谢异常及累积, 会引起苯丙酮尿症的发生 (Dejong et al 2007)。

4.1.2 非必需氨基酸在肝脏的代谢

非必需氨基酸虽然动物自身可以合成，随着氨基酸营养的发展，非必需氨基酸的代谢也受到更多的关注。对非必需氨基酸代谢率更准确的研究，有利于为日粮的饲料配方设计提供更多的理论指导，从而提高氨基酸的平衡度。郑培培（2015）分析了不同蛋白水平日粮对仔猪肝脏氨基酸代谢的影响发现，大约有 16%~56%的精氨酸、77%~93%的酪氨酸、15%~39%的丝氨酸、23%~48%的甘氨酸、70%~84%的丙氨酸、4%~15%的组氨酸在肝脏代谢，而谷氨酸和天冬氨酸在猪肝脏有净生成。与必需氨基酸一致，低蛋白日粮也增加了非必需氨基酸在肝脏的代谢率和某些非必需氨基酸的生成。所以，日粮的氨基酸组成会影响到肝脏氨基酸的代谢率。

非必需氨基酸在肝脏的代谢差异与其对应的功能密切相关。精氨酸是尿素循环的重要中间产物并且是 NO 合成的前体，并具有重要的免疫功能（Appleton 2002; Morris 2002）。日粮中的谷氨酸和天冬氨酸在肠道被大量的代谢，而在肝脏存在净生成，源于谷氨酸在氨基酸转氨过程中的作用。丙氨酸是肝脏的氨提供者之一，因为丙氨酸可以参与葡萄糖-丙氨酸肌肉循环，该循环可将肌肉中的氨运至肝脏解毒。酪氨酸是苯丙氨酸代谢途径上的重要氨基酸，可在 PheOH 催化作用下转化生成，其在肝脏有较高的代谢率。所以，非必需氨基酸的代谢的研究将为其在肝脏功能的揭示提供研究基础。

4.2 肝脏氨基酸对氨代谢的影响

4.2.1 氨基酸对氨代谢的底物驱动

从氨基酸的代谢规律可发现，大约 26%~42%的氨基酸在肝脏进行代谢，与此相对应的是，绝大多数的氨基酸代谢酶在肝脏发现，所以，肝脏是氨基酸代谢旺盛的场所（Li et al 2015）。氨是氨基酸脱氨的产物，氨基酸的分解代谢会产生大量的氨，以提供给尿素循环和谷氨酰胺循环的底物。值得注意的是，芳香族氨基酸（Aromatic amino acids, AAA）在肝脏的代谢比例最高，催化 AAA 代谢的代谢酶活性也表现了较高的水平，如 PheOH（Fitzpatrick 2012）。肝脏是氨基酸糖异生的主要场所，在动物长期禁食或应激的情况下，蛋白质周转加快，肝脏糖异生增强，氨基酸碳骨架用以生糖，氮骨架以氨的形式释放。此外，谷氨酸、丙氨酸是哺乳动

物体内负责氨转运的氨基酸，也会以氨转运体的形式提供给肝脏大量的氨底物。所以，氨基酸以底物驱动的方式影响着肝脏的氨代谢过程。

4.2.2 氨基酸对氨代谢的营养调控

氨基酸不仅可作为一种营养底物，还是重要的营养调控物质。BCAA 的调控作用近年来被广泛的研究。BCAA 可作为调节分子调控多种细胞功能和营养物质代谢，参与激素分泌等（Kawaguchi et al 2011; Nair and Short 2005）。亮氨酸可以通过调控雷帕霉素靶蛋白（Mammalian target of rapamycin, mTOR）通路来调控蛋白合成和自噬等过程（Garlick 2005）。有趣的是，BCAA 在肝脏的代谢率很低，几乎不代谢；其在肝脏的代谢酶 BCAA 氨基转移酶（BCAA aminotransferase, BCAT）和支链酮酸脱氢酶（Branch chain keto acid dehydrogenase, BCKD）均具有低的酶活性（Brosnan et al 2006）。

在肝脏，氨和谷氨酸分别是肝脏氨基酸代谢终产物和中间产物。GDH 催化氨生成谷氨酸这一重要的可逆反应，绝大多数氨基酸都要经转氨酶作用生成谷氨酸，并在 GDH 作用下生成氨，然后才能进入肝脏尿素循环或谷氨酰胺这两个氨代谢通路。McGivan 等（1973）报道，在鼠离体肝脏灌注实验中，亮氨酸能够刺激肝细胞线粒体 GDH 的活性，促进氨朝向谷氨酸合成的方向反应，增加谷氨酸的生成；Mourão 等（1975）在鼠原代细胞培养实验中发现，亮氨酸能够有效的抑制尿素循环减少尿素的产生，促进更多的谷氨酸和谷氨酰胺的生成。然而两篇文章的报道仅限于小鼠，并且年代较久远，且其影响机制仍不清楚。

5 猪门静脉灌注技术及应用

动静脉插管技术成为研究动物体内营养物质代谢最为准确和有效的方法，能够精确的计算动物机体某一组织器官对营养物质的代谢利用情况。肝门静脉灌注技术是研究肝脏营养物质代谢的关键技术。首先，建立肝脏营养物质代谢的仔猪肝-门静脉血插管（郑培培等 2014）；然后应用利用灌注泵从门静脉进行营养物质的灌注，从肝静脉进行血液的采集。门静脉灌注技术可以定时、定量的灌注单个营养物质及营养物质混合液，探究营养物质的代谢去向（结合同位素示踪技术）、代谢率、及营养调控作用等。

6 研究的目的意义

蛋白质资源紧缺和氮排放污染问题制约了养猪业的可持续发展，提高氮营养素的利用率、减少氮排放是养猪生产的重要研究课题。猪摄食后，日粮蛋白质肠道分解、肝脏氨基酸脱氨、机体蛋白质周转等过程中会产生大量的氨在肝脏代谢，这些氨或是进入尿素循环生成尿素，或是进入谷氨酰胺循环生成谷氨酰胺等非必需氨基酸。尿素作为哺乳动物氮营养素代谢的终产物会以尿氮的形式排出体外，而谷氨酰胺作为一种重要的非必需氨基酸可以被机体进一步的利用。所以，寻求一种营养调控物质调控尿素的生成，促进谷氨酰胺的生成将有助于减少尿氮的排放。

课题组前期结果表明，猪肝脏亮氨酸代谢率极低，为其在肝脏营养调控的研究奠定了基础。本试验旨在探究亮氨酸对猪肝脏氮代谢的调控作用，运用肝门静脉灌注、同位素标记、高效液相色谱-质谱、定量 PCR 等技术手段阐明亮氨酸对不同氮源在肝脏尿素和谷氨酰胺循环中的调控作用及机理。完善亮氨酸调控猪肝脏氮营养素代谢的基础理论。为养猪生产中提高氮营养素的利用率、减少氮排放提供理论基础和实践指导。

第二部分 试验材料与方法

1 材料及仪器

1.1 试验动物

选择健康、体重 20 ± 1 kg 的杜×长×大三元杂交去势公猪 18 头，在环境温度为 21 ℃-25 ℃ 的代谢室内采用代谢笼（1.5 m × 0.75 m × 0.68 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 5 d 后进行手术，减小手术过程中的应激。

1.2 试验材料

1.2.1 试验试剂

肝门静脉-肝静脉插管安装与灌注：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）、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（200 IU/mL 和 100 IU/mL）、镇定剂（硫酸阿托品）、止血敏（酚磺乙胺）、氯化铵（ NH_4Cl ）固体粉末、20 种单体氨基酸（Amino acids, AA）固体粉末（Biosharp 公司）、 ^{15}N -丙氨酸固体粉末（上海化工研究院）、 ^{15}N - NH_4Cl 固体粉末（上海化工研究院）。

质谱、定量 PCR、酶活与蛋白表达检测：氨基酸标准品、TRizol 试剂（Invitrogen）、反转录酶（Toyobo）、Random primer（Toyobo）、RNase 抑制剂（Toyobo）、谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH）活性检测试剂盒（Sigma-Aldrich 公司）、谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthetase, GS）活性检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）、过硫酸铵、十二烷基硫酸钠（SDS）、Tris 和甘氨酸（Amresco）、预染蛋白质标准分子 marker 和化学发光底物试剂盒（Thermo）、SIRT4 抗体（Abcam）、 β -Actin 及二抗（Cell Signaling Technology）。

1.2.2 试验耗材

试验耗材主要包括：主要有肥皂、5 mL 和 10 mL 注射器、芦荟手套、破伤风抗霉素、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、输液导管、头皮针、中央静脉导管（MMCVCB，北京天地和协科技有限公司）、1.5 mL 离心管、EP 管、5 mL 和 10 mL 离心管、肝素负压采血管、锡箔纸、医用脱脂纱布、自封袋（18×20）、200 μ L 和 1 mL 枪头、标签纸、医用氧气等。

1.2.3 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 1 h 用紫外线照射消毒。所有手术器械在术前采用 120 $^{\circ}$ C-125 $^{\circ}$ C 的高压蒸汽灭菌 30 min，烘干备用。手术器械在手术前用 0.1% 新洁尔灭溶液浸泡。

1.3 试验仪器

高压灭菌锅购自上海申安医疗器械厂，低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司，-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱购自美国 Thermo 公司，实时定量 PCR 检测仪购自美国 Bio-Rad 公司，Ultimate 3000-API 3200 QTRAP LC-MS/MS 检测仪（API 3200 液质联用仪购自美国 AB 公司）由北京质谱医学研究有限公司提供使用，电子分析天平购自上海天平仪器厂，752 型紫外分光光度计购自上海菁华仪器有限公司，单通道恒速注射泵（CP-1100）购自北京思路高医疗科技有限公司，NanoDrop 2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo 公司、蛋白电泳仪购自 BioRad 公司等。

2 试验方法

2.1 门静脉-肝静脉血管插管的安装

2.1.1 动物术前的处理

试验猪手术前空腹 12 h，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 8 h 注射一次。在试猪手术前的 20 min 按约 0.4 mL/kg 的剂量注射镇定剂硫酸阿托品 8 mL，5 min 后以 0.1 mL/kg 剂量注射止血敏 2 mL。

2.1.2 动物诱导麻醉

在试猪的耳缘静脉按 3.0 mL/kg 体重注射含 2% 戊巴比妥钠的生理盐水，以诱导仔猪麻醉。

2.1.3 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。

2.1.4 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，在开始的约 5-10 min 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，以维持试猪的麻醉状态。手术过程中根据猪的瞳孔扩张程度和呼吸深度及频率来调节麻醉机旋钮。

2.1.5 备皮

用肥皂水润洗手术部位、并刮毛，待毛刮净后用清水仔细清洗术部，然后用络合碘消毒，75%酒精脱碘，盖好创布准备开创。

2.1.6 开创

沿右侧最后肋骨 2 cm 处与肋骨平行切开，距腰椎横突 2 cm 处。切开皮肤约 10 cm，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。

2.1.7 门静脉-肝静脉插管的安装

参照黄瑞林等（2003）和郑培培等（2014）描述的方法分别在门静脉和肝静脉安装血管插管。中央静脉导管（内外径分别为 1.67 mm 和 2.41 mm，长度约为 30 cm）安装前在导管内注满肝素钠溶液。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。玻璃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 2-3 cm，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 2 cm，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，直径应比导管外径稍大。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 2-3 cm。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 200 IU/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用止血海绵和纱布等进行止血，对暴露的肝、肠等组织要注意喷洒生理盐水，保持湿润。

2.1.8 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 1 cm 左右，并且做好标记。创口处外涂消炎粉以防止感染。

2.1.9 术后护理

在手术后，每头试猪立即通过肌肉注射一头份的破伤风抗毒素，术后 12~24 h 内，通过输液器从门静脉注射 5% 葡萄糖溶液给试猪以供给营养，直至试猪逐渐恢复到术前的采食量为止。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 100 IU/ml 肝素溶液冲洗 3 次，每隔两天进行彻底冲洗，既从导管内抽出 3 ml 淤血弃掉，然后在用肝素溶液冲洗。创口和导管出口处涂擦止痒软膏。

2.2 仔猪门静脉灌注与样品采集

2.2.1 门静脉氨基酸与 NH_4Cl 灌注量的确定

为模拟生理条件下，亮氨酸对猪肝不同来源氨代谢的调控作用，首先要确定动物摄食前后门静脉血液氨基酸和血氨的浓度。本课题组的研究表明，20 kg 左右仔猪摄食后门静脉氨基酸与氨的浓度分别在摄食后 0 h 和 2 h 左右达到最小值和最

大值。根据 Nui 等（2006）、Reverter 等（2000）和 Stoll 等（1998）的文献报道和本课题组前期的研究结果，确定了门静脉营养物质灌注浓度，以达到模拟猪摄食后 2 h 门静脉氨基酸与氨浓度的目的，从而更好的探究亮氨酸对氨代谢的调控作用。摄食前后门静脉营养物质浓度差值即需灌注浓度。20 kg 左右仔猪摄食后门静脉的血流速度最大值为 981.40 mL/min，平均值大约为 750 mL/min（郑培培等 2014）。据此，灌注浓度、灌注速率及需要量如下表 2.1。

表 2.1 门静脉氨基酸与血氨灌注量

Table 2.1 Portal perfusion amount of AA and NH_4Cl

AA	灌注浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	灌注时间 (min)	灌注速率 ($\mu\text{mol/min}$)	分子量	需要量 (g/头)
赖氨酸	100	80	75.0	146.19	0.88
苏氨酸	100	80	75.0	119.12	0.72
蛋氨酸	20	80	15.0	149.21	0.18
亮氨酸	150	80	112.5	131.18	1.18
缬氨酸	80	80	60.0	117.15	0.56
异亮氨酸	80	80	60.0	131.17	0.63
苯丙氨酸	60	80	45.0	165.19	0.60
组氨酸	20	80	15.0	155.00	0.19
天冬氨酸	10	80	7.5.0	133.10	0.08
半胱氨酸	20	80	42.0	121.15	0.15
天冬酰胺	40	80	30.0	132.12	0.32
丝氨酸	80	80	60.0	105.09	0.50
谷氨酸	60	80	45.0	147.13	0.53
谷氨酰胺	60	80	45.0	146.15	0.53
甘氨酸	90	80	67.5	75.07	0.41
丙氨酸	200	80	150.0	89.09	1.07
精氨酸	70	80	52.5	174.20	0.73
脯氨酸	100	80	75.0	115.13	0.69
酪氨酸	50	80	37.5	181.20	0.54
色氨酸	20	80	15.0	204.23	0.25
NH_4Cl	200	80	112.5	53.49	0.48

2.2.2 氨基酸和 NH_4Cl 溶液的配制

根据每头猪的需要量计算出所配溶液的浓度。用分析天平分别称取对应质量的氨基酸及 NH_4Cl 固体粉末于小烧杯中，并用适量的双蒸水溶解，然后转移到 250 mL 容量瓶中双蒸水定容至 250 mL；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。

2.2.3 仔猪门静脉灌注

待安装有门静脉-肝静脉插管的试猪恢复健康后，将仔猪编号 1-18 后随机分为三个实验组，每组 6 头。第一组，1-6 号，灌注 $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 溶液（1-3 号）和亮氨酸+ $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$ 溶液（4-6 号）；第二组，7-12 号，灌注 ^{15}N -丙氨酸溶液（7-9 号）和亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸溶液（10-12 号）；第三组，13-18 号，灌注 19 种氨基酸混合溶液（13-15 号）和亮氨酸+19 种氨基酸混合溶液（16-18 号）。灌注实验开始前，预灌注生理盐水 10 min，然后用 50 mL 注射器分别吸取需灌注的溶液 50 mL，连接灌注泵和输液管，从门静脉插管连续灌注 80 min，设定灌注泵的灌注速率为 3 mL/min。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。

2.2.4 样品采样

分别用注射器从肝静脉插管中抽取灌注后 0 min、20 min、40 min、60 min、80 min 时间点的肝静脉血液。每次采血时，首先用 5 mL 注射器缓慢从肝静脉插管中抽取 2 mL 血液丢弃，然后更换 10 mL 注射器从肝静脉插管中抽取约 8 mL 血样，置于肝素钠的真空采样管中轻轻摇晃并做好标记，迅速送往实验室在 2500 rpm、4 °C 下离心 15 min，离心后用 1000 μL 加样器将上清液分装于 0.5 mL 小管中，并做好标记置于 -80 °C 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，放入液氮中保存备用。

2.3 基于 LC-MS/MS 的氨基酸定量检测

2.3.1 样本前处理

取标准品混标/血液样品/组织匀浆液 40 μL 加 160 μL 甲醇（含 NVL），混匀后 13200 r 冷冻离心 4 min。取蛋白沉淀后上清 40 μL ，加 80 μL 标记缓冲液混匀，瞬离，再加 40 μL 标记液（AQC 溶液），混匀、瞬离后置 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温衍生 15 min。衍生后样本置冰箱冷却后混匀瞬离，取 100 μL 上机检测。

2.3.2 试验参数

（1）液相条件：

色谱柱：MSLab HP-C18（150*4.6 mm, 5 μm ）；柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：0.8 ml/min；流动相：A 水相：水（0.1%甲酸）、B 有机相：乙腈（0.1%甲酸）；进样量：20 μL ；梯度：表 2-2

表 2-2 液相梯度

Table 2-2 Liquid gradient							
	1	2	3	4	5	6	7
Retention	0.0	1.0	9.0	9.1	10.0	10.1	15.0
%A	95	95	30	0	0	95	95
%B	5	5	70	100	100	5	5

（2）质谱条件：

离子源：+ESI 电喷雾离子源，正离子方式；扫描方式：MRM 多反应监测

CUR: 20psi（气帘气）；CAD: Medium（碰撞气）；IS: +5500V（喷雾电压）；TEM: 500 $^{\circ}\text{C}$ （雾化温度）；GS1: 55 psi（雾化气）；GS2: 60 psi（辅助气）；EP: 10（射入电压）；CXP: 2.0（碰撞室射出电压）

(3) MRM 信息 (表 2-3)

表 2-3 MRM 信息

Table 2-3 MRM information

序号	氨基酸名称	缩写	PARENT ION	DAUGHTER ION
1	天门冬酰胺	Asn	303.10	171.01
2	丝氨酸	Ser	276.10	171.01
3	甘氨酸	Gly	246.10	171.01
4	谷氨酰胺	Gln	317.20	171.01
5	天门冬氨酸	Asp	304.10	171.01
6	组氨酸	His	326.20	171.01
7	苏氨酸	Thr	290.10	171.01
8	丙氨酸	Ala	260.20	171.01
9	谷氨酸	Glu	318.10	171.01
10	精氨酸	Arg	345.20	171.01
11	脯氨酸	Pro	286.20	171.01
12	半胱氨酸	Cys	581.60	171.01
13	赖氨酸	Lys	487.20	171.01
14	甲硫氨酸	Met	320.20	171.01
15	缬氨酸	Val	288.20	171.01
16	酪氨酸	Tyr	352.20	171.01
17	异亮氨酸	Ile	302.20	171.01
18	亮氨酸	Leu	302.20	171.01
19	苯丙氨酸	Phe	336.20	171.01
20	色氨酸	Trp	375.20	171.01
21	瓜氨酸	CIT	346.20	171.01

2.3.3 上机检测

氨基酸和 ^{15}N -氨基酸的检测方法为 AQC 衍生外标法。设定好 LC-MS/MS 的实验参数后, 取 100 μL 样品上机检测, 得到检测所有样品的离子流图 (氨基酸 M , 则 ^{15}N -氨基酸为 $\text{M}+1$)。通过氨基酸标准品建立线性方程和标准曲线, 进而可计算待测样品的浓度, 从而达到定量的检测氨基酸含量的目的。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测

2.4.1 肝组织总 RNA 的提取和检测

组织样从液氮中取出后立即放入装满液氮的研钵中，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。使用 Nanodrop2000 超微量分光光度计进行 RNA 浓度的测定，并通过 OD_{260/280} 及 OD_{260/230} 判断 RNA 的纯度，OD_{260/280} 值在 1.8 至 2.0 之间。确定合格的 RNA 用于进一步分析。

2.4.2 cDNA 的制备

逆转录反应体系如下表 2-4:

表 2-4 逆转录反应体系

Table 2-4 System of Reverse Transcription Reaction	
反应组分	使用量
Reaction Component	Volume
Total RNA	2.0 μ L
Oligo(DT) ₁₈	1.0 μ L
2 \times ES Reaction Mix	10.0 μ L
RI Enzyme Mix	1.0 μ L
RNase-free Water	Up to 20.0 μ L

根据提取的 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 1 μ L，2 \times ES Reaction Mix 10 μ L，RI Enzyme Mix 1 μ L，用 RNase-free Water 补充体积到 20 μ L，轻轻混匀，42 $^{\circ}$ C 反应 30 min，99 $^{\circ}$ C 反应 5 min，4 $^{\circ}$ C 反应 5 min，瞬间离心，得到的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.4.3 实时荧光定量 PCR

(1) 引物设计

本研究所用基因引物以 NCBI 上搜索得到的基因序列为模板, 通过引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计得到。在考虑引物设计所需遵守的基本原则的同时, 由于引物还需用于实时荧光定量实验, 因此引物长度片段长度在 100-300 bp 之间, 引物信息见表 2-5。SIRT4 基因 (No. EU357900) 引物引用了 Ren 等 (2013) 报道的引物序列。基因引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 并经过实验检测可用。

表 2-5 定量 PCR 引物序列

Table 2-5 Primers for Realtime PCR assay

基因	登陆号	来源	引物序列	产物大小 (bp)	退火温度
Gene	Accession No.	Source	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)	ta (°C)
GDH	NM_001244501	Sus	ACATTGGGCTCCCTCTTTGG	124	60
			CCCACTGGGAATGAAGCTGT		
GS	NM_213909	Sus	GGGCGAGAAAGTCCAAGCTAT	187	60
			CATGGCAGCAGGGACAAGAT		
CPS1	XM_005672159	Sus	AAGGCAAAGGAGATTGGGTTCT	147	60
			TACTGATGGGTATTCTGCAGCC		
OTC	NM_001164002	Sus	AAGCTGTCGCTGACGAATGA	166	60
			AGTCAGAGGCAGCAACTTCC		
β-actin	XM_003124280	Sus	GACATCCGCAAGGACCTCTA	205	60
			ACATCTGCTGGAAGGTGGAC		

注: GDH, 谷氨酸脱氢酶; GS, 谷氨酰胺合成酶; CPS 1, 氨甲酰磷酸合成酶 1; OTC, 鸟氨酸氨甲酰转移酶。

Note: GDH, Glutamate dehydrogenase; GS, Glutamine synthetase; CPS1, Carbamoyl-phosphate synthase 1; OTC, Ornithine carbamoyl-transferase.

(2) 定量 PCR 反应

分别加入上游引物、下游引物和 cDNA 于 20 μL PCR 反应体系 (表 2-6) 中, 用 RT-PCR 法检测目的基因和内参基因 (β-actin) 的表达量。最佳反应条件为:

95 ℃ 3 min 预变性；95 ℃ 10 s, 58 ℃ 20 s, 72 ℃ 20 s, 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。

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，同一样本中目的基因相对内参基因的表达量用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算，实验组相对对照组样本中目的基因的表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。比较对照组与实验组样品中目的基因的表达，进而得到基因的相对表达量。

表 2-6 定量 PCR 反应体系

Table 2-6 The formula of the real-time PCR analysis

反应组分 Reaction Component	使用量 Volume
cDNA	0.5 μL
SYBR FAST qPCR MasterMix (2×)	5.0 μL
ROX High (50×)	0.2 μL
PCR-grade water	4.0 μL
Primers	0.3 μL
Total Volume	10.0 μL

2.5 SIRT4 蛋白表达量的检测

2.5.1 猪肝组织蛋白样品制备

1) 猪肝组织称重，每 0.1 g 组织加入 1 mL 的 RIPA，用小剪刀剪碎组织，至用蓝枪头吸取无阻力。

2) 在研钵中，将已称重和初步处理后的猪肝组织磨成浆，冰上裂解 30 min, 12000 rpm 离心 10 min。

3) 取上清（上清与沉淀交界面的部分尽量不要）稀释 5 倍，BCA 试剂盒测蛋白浓度，根据所测的蛋白浓度，将蛋白稀释至 2 μg/μL。

2.5.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1) 胶板的制备：玻璃板和胶条事先洗净、晾干、装好，分离胶的各组分充分混匀后缓慢注入安装好的两玻板间，并在刚注入的分离胶上方轻缓地加入 1 mL 75% 乙醇液封以隔绝空气，注意加入乙醇时避免在固定位置一次性打入，冲散分离胶。静止一段时间后待分离胶凝固，倒弃乙醇，用滤纸吸干残留液体，再将混合好的浓缩胶加入两玻板间，及时将梳子垂直插入胶内，室温静止 1~2 h。分离胶（15 mL 体系）与浓缩胶（6 mL 体系）的制备遵照下表。

表 2-7 浓缩胶及分离胶配方表

Table 2-7 The formula of stacking gel and separating gel

	5%（浓缩胶）	15%（分离胶）	10%（分离胶）
H ₂ O（mL）	4.100	3.400	5.900
30% Acrylamide（mL）	1.000	7.500	5.000
缓冲液（mL）	0.750	3.800	3.800
10%SDS（mL）	0.060	0.150	0.150
10% 过硫酸铵（mL）	0.060	0.150	0.150
TEMED（mL）	0.006	0.006	0.006

2) 点样及电泳：拆除两玻板间的胶条，重新组装好玻板，倾斜着放入装有电泳液的电泳槽中，避免向凝胶底部引入气泡。往内槽中央加满电泳液，垂直向上拔去梳子，保证点样孔完整。蛋白样品在沸水中煮 8~10 min，置于冰上冷却，样品及预染蛋白 marker 加入上样孔内。采用 80V 低电压进行浓缩胶电泳，当样品进入分离胶后将电压调高至 120V，当目的蛋白处于分离胶的 1/2 处时，停止电泳。

3) 电转：电泳结束后将分离胶切下，转移至湿润的滤纸上，硝酸纤维素（PVDF）膜提前在甲醇中浸泡 15 s 活化，按以下顺序组装电转“三明治”：滤纸、分离胶、PVDF 膜、滤纸，用玻棒赶尽每层之间的气泡，装好夹子后放入电转槽中，注意正负极的安装，倒入转膜缓冲液，整个装置置于装满冰的冰盒中，恒流 200 mA 转膜 1 h。

4) 封闭：电转结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min，漂洗后的膜转移至封闭液中，摇床室温低速封闭 1 h。

5) 一抗孵育：一抗按 1:1000 的比例用一抗稀释液稀释之后制成工作液，将一抗工作液及 PVDF 膜封入自封袋中，4 ℃ 孵育过夜；

6) 二抗孵育：一抗孵育结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min。二抗按 1:5000 的比例用二抗稀释液稀释之后制成工作液，将二抗工作液及 PVDF 膜封入自封袋中，摇床室温低速孵育 2 h。

7) 暗室显影：二抗孵育结束后，PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min，再用 TBS 漂洗 2 次，每次 5 min。根据化学发光显色试剂盒说明书进行显色，压片。

2.6 猪肝脏代谢酶活性的测定

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 ℃，8000 r 离心 10 min，上清液稀释至适当的浓度用于酶活性的测定。

猪肝组织 GDH 活性可通过偶联酶促分析进行测定，即谷氨酸在 GDH 催化下生成 NADH，随后与探针反应得到比色（450 nm）产物，其与 GDH 活性成正比。一单位 GDH 的定义为，在 pH 7.6 和 37 ℃ 条件下，每分钟生成 1.0 μmol NADH 所需的酶量。检测步骤见产品说明书。氨甲酰磷酸合成酶 1（Carbamoyl-phosphate synthase 1, CPS 1）、鸟氨酸氨甲酰转移酶（Ornithine carbamoyl-transferase, OTC）的酶活采用 Nuzum 和 Snodgrass（1976）的方法测定，主要是运用比色法检测催化生成瓜氨酸的含量。谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthetase, GS）的酶活性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。

2.7 肝静脉尿素氮及葡萄糖的测定

肝静脉血液中的尿素含量和葡萄糖的含量由全自动生化分析仪检测（德国西门子公司，Siemens），标准品及检测仪器由中建三局武汉中心医院提供。

2.8 数据分析

采用 SPSS (V16.0) 统计分析软件分别对 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组和亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组、 ^{15}N -丙氨酸和亮氨酸 ^{15}N -丙氨酸组、混合氨基酸和亮氨酸+混合氨基酸组肝静脉血与肝组织内相关指标进行单因素方差分析, 对各组内不同时间点氨基酸水平采用一般线性模型进行单因素方差分析。数据结果采用平均值 \pm 标准差表示。 $P<0.05$ 表示差异显著; $P<0.01$ 表示差异极显著。

第三部分 结果与讨论

第一章 亮氨酸对门静脉血氨代谢的调控作用

1 前言

门静脉血氨（肠道来源）是肝脏氨的主要来源，主要由肠道微生物和肠上皮细胞分解含氮化合物产生。在猪摄食后，日粮中的氮营养素在肠道被消化吸收。在此过程中，肠道微生物分解日粮蛋白质、氨基酸等含氮化合物产生大量氨，源源不断的由肠道吸收经门静脉输送进入肝脏。肠上皮细胞是氨基酸首过代谢的场所，众多的氨基酸均会在小肠上皮细胞分解代谢，尤其以谷氨酸、谷氨酰胺和天冬氨酸最为显著（Wu 1998）。氨基酸的分解代谢会产生大量的氨，这些氨也会被肠系膜静脉吸收由门静脉进入肝脏。Stoll 等（1998）报道，仔猪日粮中的氮营养素大约有 18% 是以血氨的形式经门静脉进入肝脏代谢。在猪摄食后的 0.5~5 h，门静脉血氨浓度最高可达 260~330 $\mu\text{mol/L}$ ，约为血液循环系统其他部位的 10 倍以上。

门静脉血氨进入肝脏后进行代谢，或是进入尿素循环生成尿素，或是进入谷氨酰胺循环生成谷氨酰胺等非必需氨基酸。本课题组前期的研究表明，亮氨酸在猪肝脏的代谢率极低，这为其在氨代谢调控中的研究奠定了基础。所以，本实验旨在利用猪门静脉灌注技术，分别灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ，探究亮氨酸对肠道来源氨在肝脏代谢的调控作用。

2 结果与分析

2.1 亮氨酸对肝脏尿素生成的影响

由图 3.1 可知，随着 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注时间的增长，肝静脉血中尿素氮（Urea-N）的浓度也随之升高。在灌注后 80 min 时达到最大值， $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组尿素氮的浓度约为 7.79 mmol/L，亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组的浓度约为 6.70 mmol/L。与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组

相比, 在灌注后的 40~80 min, 亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组显著降低了猪肝静脉血液中尿素氮的水平 ($P<0.05$)。

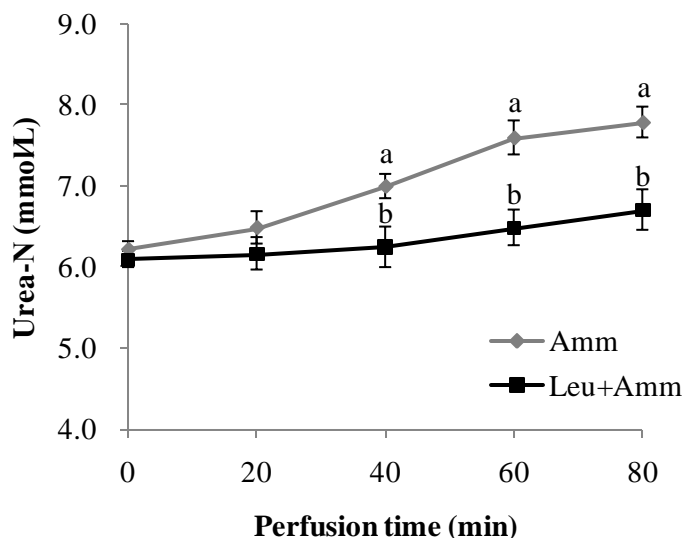


图 3.1 亮氨酸对肝静脉血尿素氮含量的影响

Fig 3.1 The effect of leucine on hepatic vein Urea-N concentration

2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响

2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响

由图 3.2 可知, 随着 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注的进行, 肝静脉中 ^{15}N -谷氨酸和 ^{15}N -谷氨酰胺的浓度呈现了明显的上升趋势。与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比, 在灌注后的 40~80 min, 亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组显著提高了肝静脉血液中 ^{15}N -谷氨酸 ($P<0.05$) 和 ^{15}N -谷氨酰胺 ($P<0.05$) 的水平。与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比, 在灌注的第 80 min, 亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组中肝静脉血液 ^{15}N -谷氨酸和 ^{15}N -谷氨酰胺的浓度分别提高了 48% 和 46%。虽然肝静脉中非同位素标记的谷氨酸和谷氨酰胺浓度并没有因 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注产生大的变化, 但是亮氨酸添加组仍然提高了灌注后 60~80 min 肝静脉血液中谷氨酸 ($P<0.05$) 和谷氨酰胺 ($P<0.05$) 的水平。

灌注结束后肝组织中游离谷氨酸和谷氨酰胺的含量如图 3.3 所示。与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比, 亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组显著提高了肝组织中 ^{15}N -谷氨酸 ($P<0.01$) 和 ^{15}N -谷氨酰胺 ($P<0.01$) 的含量, 其含量分别达到对照组的 128% 和 131%。亮氨酸添加组中非同位素标记的谷氨酸 ($P<0.01$) 和谷氨酰胺 ($P<0.01$) 含量也显著升高, 其含量分别为对照组的 121% 和 130%;

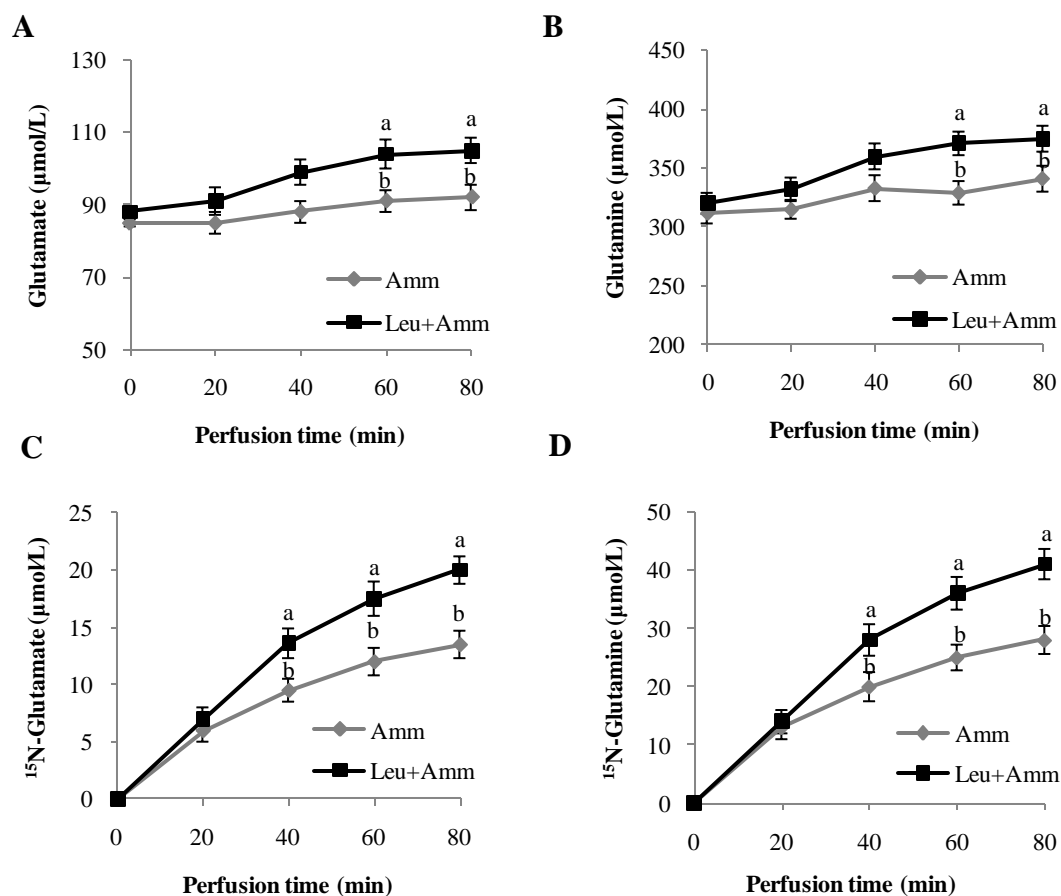


图 3.2 亮氨酸对肝静脉血谷氨酸和谷氨酰胺浓度的影响

Fig 3.2 The effect of leucine on hepatic vein glutamate and glutamine concentrations

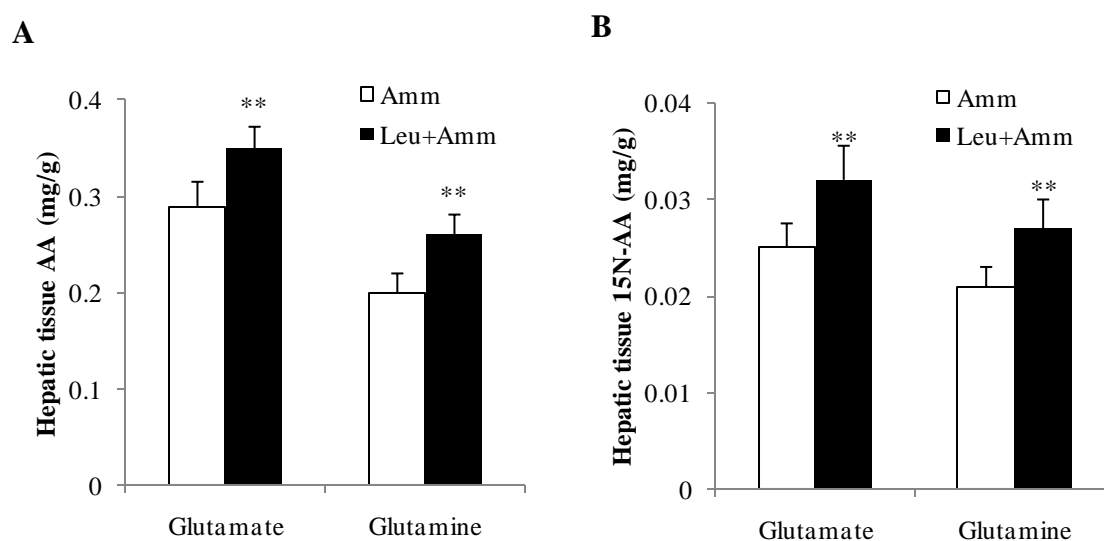


图 3.3 亮氨酸对肝组织谷氨酸和谷氨酰胺含量的影响

Fig 3.3 The effect of leucine on hepatic tissue glutamate and glutamine content

2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响

LC-MS/MS 的检测结果表明, 未有 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 参与到必需氨基酸 (Essential amino acids, EAA) 的合成; 非必需氨基酸 (Non-essential amino acids, NEAA) 除了谷氨酸和谷氨酰胺外, 天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸均检测到了 ^{15}N 标记 (表 3-1)。然而, 与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注组相比, 亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组并没有对肝静脉血液中 NEAA 的浓度产生显著的影响, 仅在灌注后的 60~80 min, 提高了肝静脉血液中 ^{15}N -天冬氨酸和非标记天冬氨酸的水平 ($P<0.05$)。

表 3-1 仔猪灌注亮氨酸和氯化铵后肝静脉 NEAA 的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)Table 3-1 Hepatic vein NEAA concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of pigs infused with Leu and NH_4Cl .

氨基酸	处理	采样时间 (min)					SEM
		0 min	20 min	40 min	60 min	80 min	
^{15}N -Asn	$^{15}\text{NH}_4^+$	0	3.36	4.84	5.23	5.51	2.03
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0	2.93	5.09	5.56	6.07	2.91
Asn	$^{15}\text{NH}_4^+$	21.28	21.76	22.41	23.23	24.41	2.15
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	22.31	22.93	24.92	25.56	26.97	2.89
^{15}N -Asp	$^{15}\text{NH}_4^+$	0	0.91	1.28	1.17 ^b	0.99 ^b	0.46
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0	0.83	1.40	1.42 ^a	1.55 ^a	0.73
Asp	$^{15}\text{NH}_4^+$	12.23	13.41	11.28	6.17 ^b	4.99 ^b	2.66
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	13.01	14.13	13.04	11.32 ^a	9.55 ^a	2.01
^{15}N -Arg	$^{15}\text{NH}_4^+$	0	5.35	8.02	11.16	14.65	3.24
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0	4.81	7.79	10.81	13.74	2.59
Arg	$^{15}\text{NH}_4^+$	60.23	58.34	55.52	61.46	65.78	6.14
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	57.29	61.82	59.88	62.25	62.33	8.29
^{15}N -Ser	$^{15}\text{NH}_4^+$	0	7.53	12.58	12.82	13.92	2.87
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0	8.15	11.39	13.73	14.21	3.36
Ser	$^{15}\text{NH}_4^+$	100.03	105.47	98.59	107.29	103.25	5.08
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	101.21	104.23	101.92	103.33	108.11	4.36
^{15}N -Gly	$^{15}\text{NH}_4^+$	0	6.43	10.14	12.02	12.56	2.97
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	0	7.01	9.28	11.15	12.73	3.19
Gly	$^{15}\text{NH}_4^+$	312.24	298.34	306.15	315.02	322.77	11.93
	Leu+ $^{15}\text{NH}_4^+$	307.91	303.21	312.58	306.28	313.63	13.15

注: 表中同行数值肩标无相同字母者表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values within a row with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$)

猪肝组织样品中，添加亮氨酸的也同样增加了 ^{15}N -天冬氨酸和未标记天冬氨酸的含量 ($P<0.01$)，而对其它 NEAA 未有显著的影响，结果如图 3.4 所示。

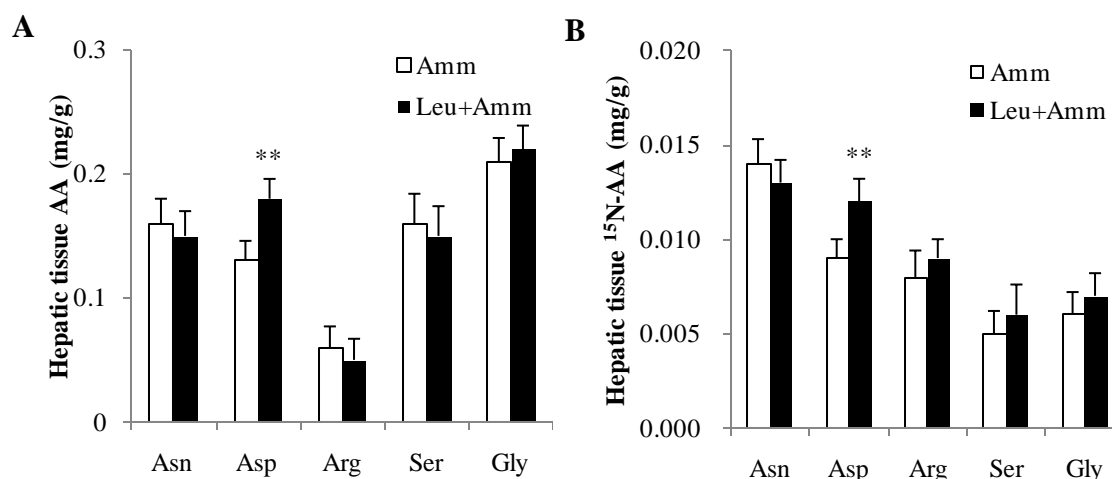


图 3.4 亮氨酸对肝组织 NEAA 含量的影响

Fig 3.4 The effect of leucine on hepatic tissue NEAA content

2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响

氨代谢通路代谢酶活性检测的结果如图 3.5，亮氨酸的添加极显著的提高了肝组织中谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH）的活性（约 65%）及其基因表达（1.8 倍）（ $P<0.01$ ）；显著的促进了尿素循环谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthetase, GS）而抑制了氨甲酰磷酸合成酶 1（Carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1）的活性及基因表达（ $P<0.05$ ）。

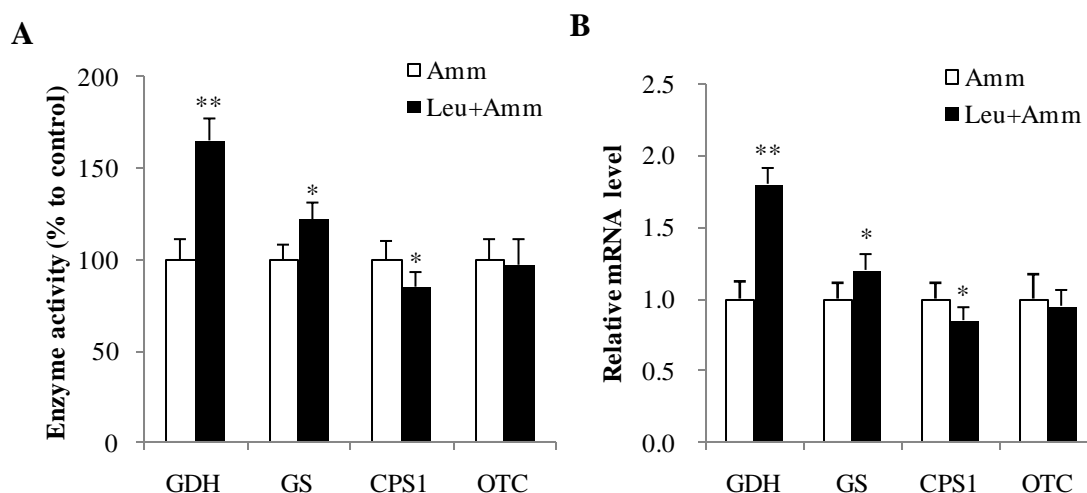


图 3.5 亮氨酸对肝组织代谢酶活及基因表达的影响

Fig 3.5 The effect of leucine on hepatic enzyme activity and gene expression

2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响

线粒体 SIRT4 是 Sirtuins 家族的成员之一，在灌注结束后肝组织基因表达的检测中发现（图 3.6），亮氨酸添加组中 SIRT4 基因的表达极显著的下调（ $P<0.01$ ）。与灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 相比，亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组 SIRT4 mRNA 水平下调了约 50%，蛋白水平下调了 55%。

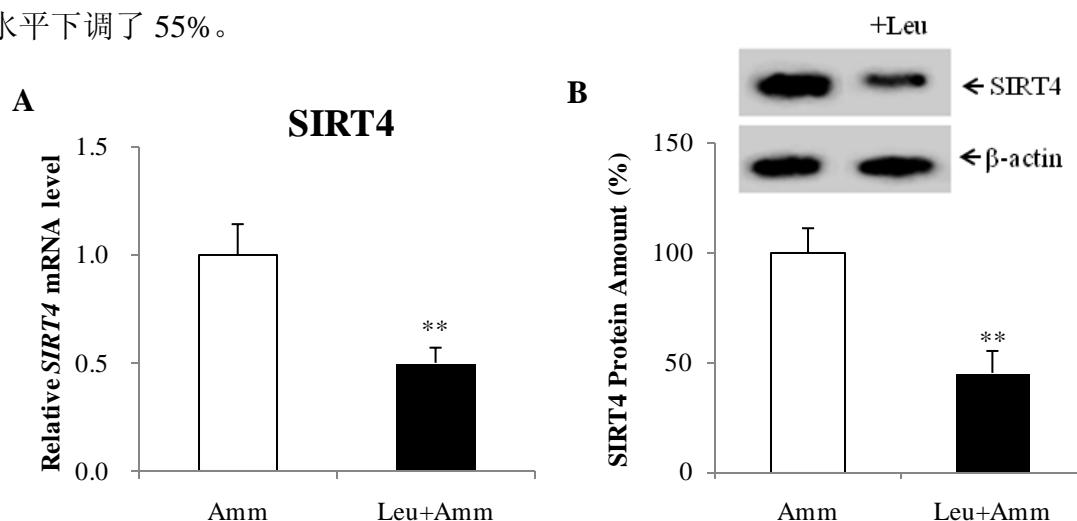


图 3.6 亮氨酸对肝组织线粒体 SIRT4 基因表达的影响

Fig 3.6 The effect of leucine on hepatic mitochondria SIRT4 gene expression

3 讨论

门静脉血氨是肝脏氨的重要来源，这一部分氨主要来自于肠道，包括肠道微生物对含氮物质的分解及肠上皮细胞对氨基酸的首过代谢（Häussinger 2007）。动物摄食后，门静脉血氨呈现了一个非常高的浓度，甚至能达到血液循环系统其他部位的 10 倍（Stoll et al 1998）。本实验模拟猪在摄食状态下门静脉血液中氨基酸和氨的浓度，分别灌注同位素标记的 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ，以探究亮氨酸对门静脉血氨（肠道来源氨）代谢的调控作用。值得注意的是，在氮营养素周转代谢中，氨是氨基酸脱氨的产物，肝脏中氨基酸的分解代谢会以底物驱动的方式影响到氨的代谢进程。有趣的是，亮氨酸在肝脏的代谢率极低（Suryawan et al 1998; Li et al 2015），那么亮氨酸如果对肝脏氨代谢产生作用，则其作用方式不是一种底物驱动，

而是作为信号分子进行营养调控。据此，本实验选择亮氨酸作为营养调控物质进行氨的代谢调控研究。

尿素循环是门静脉周肝细胞氨代谢的主要方式。在门静脉灌注过程中，不论是 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组还是亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组，肝静脉血液中尿素氮的水平均呈现出逐渐上升的趋势，表明肝脏中氨的增多，提供了尿素循环的所需的底物，从而加速了尿素循环的进行。然而与灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 相比，亮氨酸的添加显著抑制了肝脏尿素的产生。谷氨酰胺循环是肝静脉周肝细胞代谢的主要方式， ^{15}N -谷氨酸与 ^{15}N -谷氨酰胺的生成也随着灌注的进行而增加，表明底物氨的增多同样促进了肝脏谷氨酰胺循环的进行。有趣的是，与灌注 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 相比，亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组显著增加了肝脏 ^{15}N 及非 ^{15}N 标记的谷氨酸与谷氨酰胺的生成。由于生理状况下，门静脉血液中也存在非同位素标记的氨，这就不难解释亮氨酸+ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 组对非同位素标记的谷氨酸与谷氨酰胺的生成产生了相同的促进效果。McGivan 等（1973）在鼠肝脏离体线粒体的实验中报道，在 NH_4Cl 作为底物的条件下，亮氨酸显著促进了谷氨酸的生成，该报道与本实验的研究结果相似。由于 GS 的表达主要存在于细胞质，所以 McGivan 等（1973）对线粒体的研究中没有检测到谷氨酰胺含量的变化。本实验的研究结果进一步揭示，在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 作为氨源的情况下，亮氨酸可以起到降低尿素生成，而促进谷氨酰胺循环的作用。

氨除了生成尿素、谷氨酸和谷氨酰胺外，还可能参与到其它 NEAA 的生成。在 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 灌注后，对血液及组织中 NEAA 的分析发现，天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸等均出现了 ^{15}N 标记，说明上述 NEAA 可能作为中间代谢产物参与了氨代谢过程。然而，亮氨酸的添加没有对上述 NEAA 的生成产生显著的影响，而天冬氨酸除外。值得注意的是，亮氨酸显著减少了肝脏天冬氨酸的消耗。这可能是因为尿素的生成需要两个氮原子的提供，一个来源于氨，另一个来自于天冬氨酸（Brosnan et al 2001），本实验的结果很好的为这一结论提供了一个很好的证明。

为了更好的解释亮氨酸促进谷氨酸和谷氨酰胺生成,抑制尿素循环的这一结果,对氨代谢通路关键酶的基因表达和活性情况进行了检测。亮氨酸的添加显著的促进了肝组织中 GDH 的基因表达及活性,而 GDH 催化氨和 α -酮戊二酸生成谷氨酸这一可逆的反应 (Spanaki and Plaitakis 2012)。那么当氨底物存在的情况下,高的 GDH 活性使更多的氨向着谷氨酸生成的方向反应,以生成更多的谷氨酸。谷氨酸的增多为谷氨酰胺循环提供了底物,同时谷氨酸也可以再次结合氨生成谷氨酰胺,达到了进一步清除氨的效果。da Silva 等 (2009) 研究表明,小鼠日粮中添加亮氨酸可以显著提高 GDH 基因的表达。McGivan 等 (1973) 报道,亮氨酸可以刺激线粒体 GDH 的活性,促进氨与 α -酮戊二酸结合生成谷氨酸。Yang 等 (2010) 报道了亮氨酸可以变构激活 GDH 并提升其酶活水平。因此,亮氨酸诱导的 GDH 活性升高可使更多的氨走向谷氨酰胺循环,而更少的走向尿素循环。这就不难解释亮氨酸添加组中尿素循环酶 (CPS 1 和 OTC) 的活性与基因表达相对降低而谷氨酰胺循环酶 GS 活性与基因表达相对升高这一现象,这很可能是因为氨底物的重新分配,产生了对基因表达和酶活的不同底物驱动效应。

GDH 是线粒体中氨代谢的关键酶,而 SIRT4 也位于线粒体中 (Newman et al 2012)。SIRT4 是去乙酰化家族 Sirtuins 的重要成员,具有核糖基化转移酶的作用 (Argmann and Auwerx 2006)。Haigis 等 (2006) 年首次报道了, SIRT4 可以抑制 GDH 的活性。那么亮氨酸是否通过 SIRT4 对 GDH 发挥调控作用。而本实验对 SIRT4 基因表达的检测发现,亮氨酸显著抑制了 SIRT4 的表达,而 SIRT4 表达量的减少解除了对 GDH 表达及酶活性的抑制,从而达到了促进 GDH 的酶活作用。所以, SIRT4 在亮氨酸调控门静脉血氨代谢过程中发挥了至关重要的功能。

4 小结

亮氨酸对门静脉来源氨的代谢调控研究表明,亮氨酸可以通过抑制肝脏线粒体 SIRT4 的表达,提高 GDH 的活性,减少肝脏尿素的产生,增加谷氨酸和谷氨酰胺的生成。

第二章 亮氨酸对丙氨酸来源氨代谢的调控作用

1 前言

丙氨酸作为氨的转运体是肝脏氨的一个重要来源。丙氨酸可参与哺乳动物的重要生理过程，丙氨酸-葡萄糖循环（Alanine-glucose cycle）。该循环是肌肉中的氨转运至肝脏的主要形式，其具体过程为：在肌肉中，氨基酸分解代谢生成的氨基，氨基与丙酮酸生成丙氨酸；丙氨酸由血液循环运输至肝脏；在肝脏中，丙氨酸分解代谢产生氨和丙酮酸，两者分别合成尿素和葡萄糖。生成的葡萄糖再转运至肌肉重新分解产生丙酮酸，丙酮酸继续接受氨生成丙氨酸，此后这一过程循环往复（Felig et al 1970）。丙氨酸还是肠道谷氨酸、谷氨酰胺和天冬氨酸分解的产物，可在上皮细胞释放大量的丙氨酸，经门静脉运至肝脏（Windmueller 1982）。本课题组的研究表明，猪摄食后门静脉丙氨酸的浓度可高达 350 $\mu\text{mol/L}$ 以上（Li et al 2015）。

丙氨酸作为氨转运体，可转运机体其他组织器官内的氨进入肝脏。丙氨酸在肝脏代谢产生的氨，或是进入尿素循环生成尿素，或是进入谷氨酰胺循环生成谷氨酰胺等非必需氨基酸。本实验利用猪门静脉灌注技术，分别灌注 ^{15}N -丙氨酸和亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸，探究亮氨酸对丙氨酸来源氨在肝脏代谢的调控作用。

2 结果与分析

2.1 亮氨酸对肝脏尿素和葡萄糖生成的影响

由图 3.7 可知，随着 ^{15}N -丙氨酸的灌注，肝静脉血中尿素氮（Urea-N）的浓度呈逐渐上升趋势。在灌注后 80 min 时达到最大值，此时 ^{15}N -丙氨酸组尿素氮的浓度约为 7.48 mmol/L，亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组的浓度约为 6.45 mmol/L。与 ^{15}N -丙氨酸组相比，在灌注的 40~80 min，亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组显著降低了猪肝静脉血液中尿素氮的水平（ $P<0.05$ ），最高降低了约 14%（80 min）。同时，对肝静脉血液中葡萄糖的浓度进行了检测发现（图 3.7），丙氨酸的灌注过程中， ^{15}N -丙氨酸组及亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组肝静脉血液中葡萄糖的浓度也呈上升趋势。然而，与 ^{15}N -丙氨酸

酸组相比, 在灌注的 40~80 min, 亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组显著降低了肝静脉血中葡萄糖的水平 ($P<0.05$)。

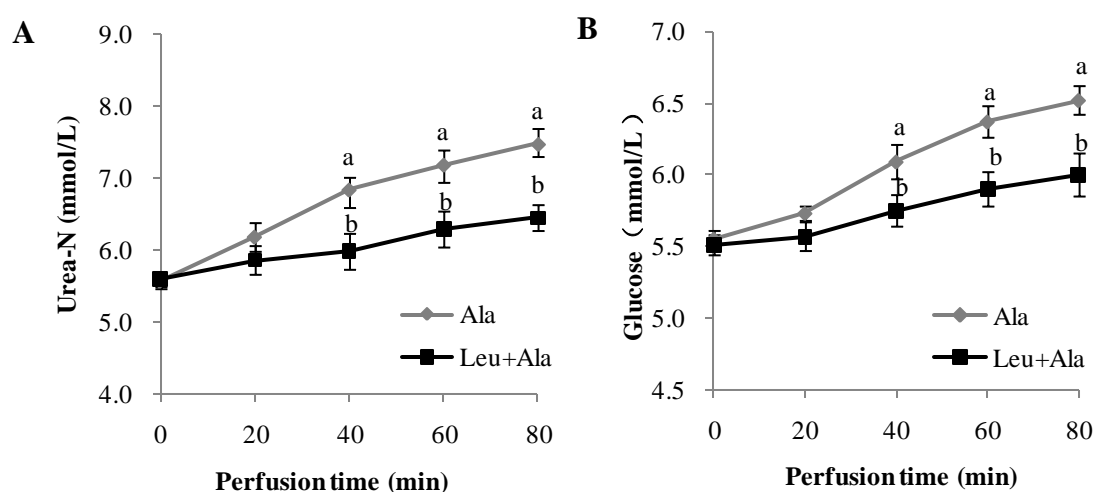


图 3.7 亮氨酸对肝静脉血尿素氮和葡萄糖含量的影响

Fig 3.7 The effect of leucine on hepatic vein Urea-N and glucose concentrations

2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响

2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响

由图 3.8 可知, 随着 ^{15}N -丙氨酸的灌注, 肝静脉血液中 ^{15}N -谷氨酸和 ^{15}N -谷氨酰胺的浓度逐渐上升, 在 ^{15}N -丙氨酸组分别可高达 $17.52\ \mu\text{mol/L}$ 和 $32.39\ \mu\text{mol/L}$ (80 min), 亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组分别可高达到 $23.37\ \mu\text{mol/L}$ 和 $42.28\ \mu\text{mol/L}$ (80 min), 约为 ^{15}N -丙氨酸组的 133% 和 130%。与 ^{15}N -丙氨酸组相比, 在灌注的 40~80 min, 亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组显著提高了 ^{15}N -谷氨酸 ($P<0.05$) 和 ^{15}N -谷氨酰胺 ($P<0.05$) 的浓度。肝静脉中非同位素标记的谷氨酸和谷氨酰胺水平也随 ^{15}N -丙氨酸灌注而升高。在灌注后的 60~80 min, 亮氨酸的添加显著提高了肝静脉中谷氨酸 ($P<0.05$) 和谷氨酰胺 ($P<0.05$) 的水平。

灌注结束后, 对肝组织中游离谷氨酸和谷氨酰胺的含量进行了分析, 如图 3.9 所示。与 ^{15}N -丙氨酸组相比, 亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组显著增加了 ^{15}N -谷氨酸 ($P<0.01$) 和 ^{15}N -谷氨酰胺 ($P<0.01$) 的含量, 其含量分别为 ^{15}N -丙氨酸组的 132% 和 124%; 同样, 亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组显著提高了肝静脉血中非同位素标记的谷氨酸 ($P<0.01$) 和谷氨酰胺 ($P<0.01$) 的含量, 其含量分别为 ^{15}N -丙氨酸组的 125% 和 126%。

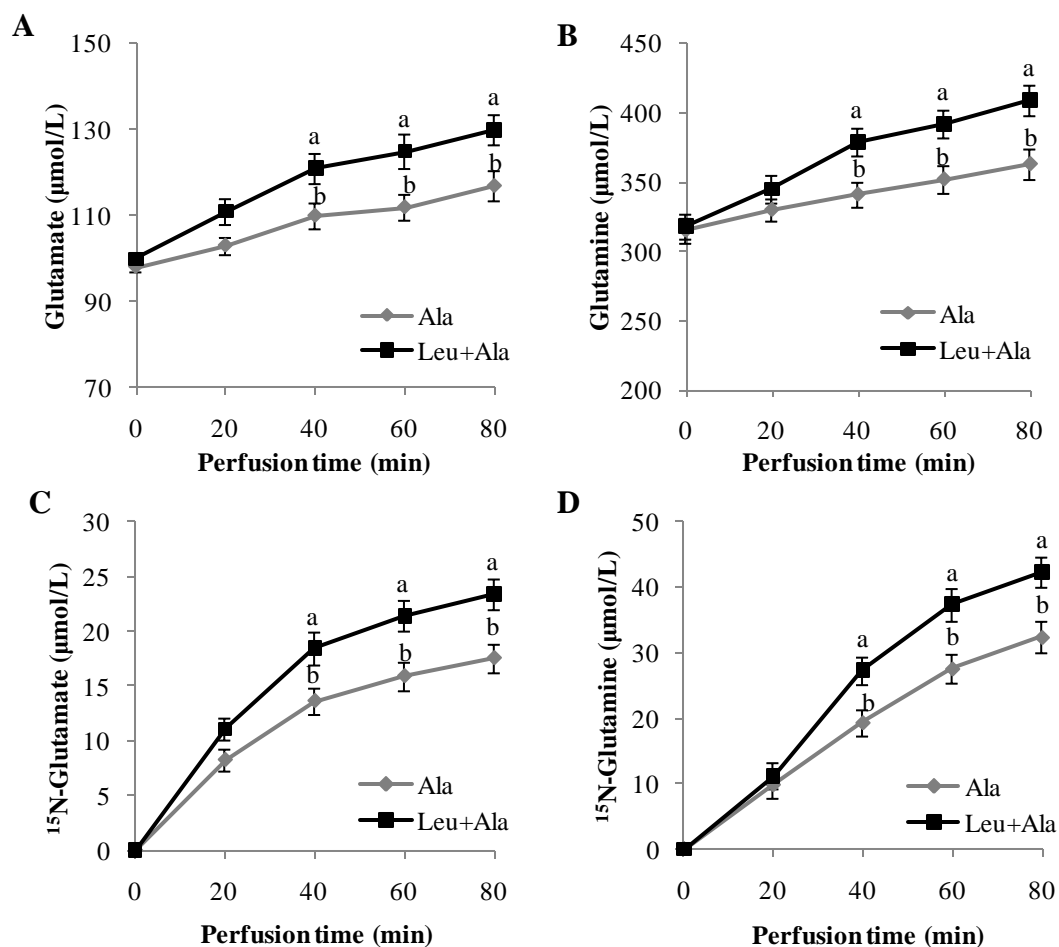


图 3.8 亮氨酸对肝静脉血谷氨酸和谷氨酰胺浓度的影响

Fig 3.8 The effect of leucine on hepatic vein glutamate and glutamine concentrations

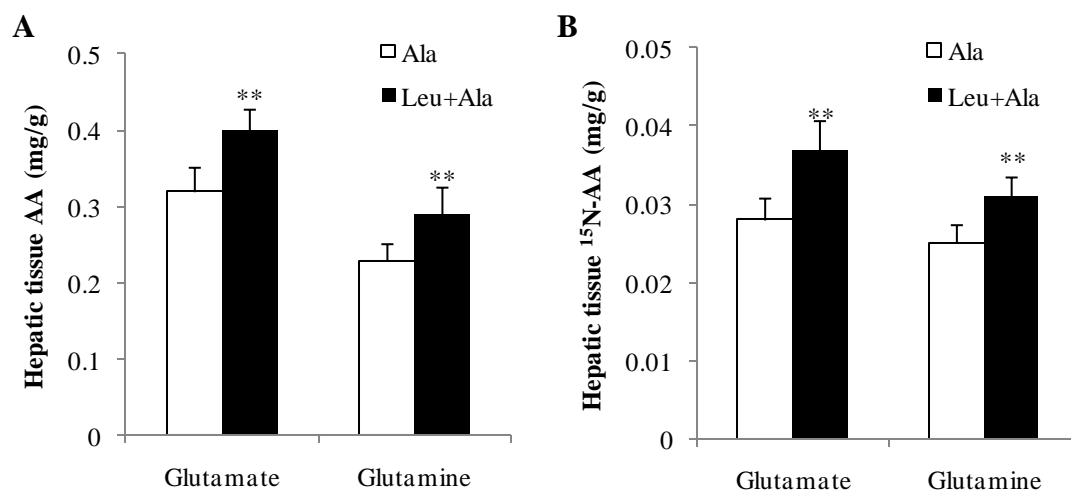


图 3.9 亮氨酸对肝组织谷氨酸和谷氨酰胺含量的影响

Fig 3.9 The effect of leucine on hepatic tissue glutamate and glutamine content

2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响

采用 LC-MS/MS 检测技术分析猪肝脏分别灌注 ^{15}N -丙氨酸及亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸后, 天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸等 NEAA 在肝静脉血液中的含量 (表 3-2)。结果发现, 上述氨基酸均出现了 ^{15}N 同位素标记; 然而与 ^{15}N -丙氨酸灌注组相比, 亮氨酸的添加并没有对肝静脉中上述 NEAA 的浓度产生显著的影响。

表 3-2 仔猪灌注亮氨酸和丙氨酸后肝静脉 NEAA 的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)Table 3-2 Hepatic vein NEAA concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of pigs infused with Leu and Ala.

氨基酸	处理	采样时间 (min)					SEM
		0 min	20 min	40 min	60 min	80 min	
^{15}N -Asn	^{15}N -Ala	0	1.53	1.94	2.05	2.31	2.33
	Leu+ ^{15}N -Ala	0	1.96	1.78	2.56	2.67	2.04
Asn	^{15}N -Ala	20.33	19.24	21.33	20.57	21.56	3.95
	Leu+ ^{15}N -Ala	19.01	19.93	22.12	23.32	23.27	2.87
^{15}N -Asp	^{15}N -Ala	0	0.82	1.85	2.21	2.17	0.86
	Leu+ ^{15}N -Ala	0	0.73	1.97	2.25	2.36	0.93
Asp	^{15}N -Ala	9.35	13.21	10.09	9.84	8.39	1.45
	Leu+ ^{15}N -Ala	10.21	12.65	11.53	10.18	9.45	1.13
^{15}N -Arg	^{15}N -Ala	0	5.75	9.72	12.56	13.95	3.73
	Leu+ ^{15}N -Ala	0	5.19	8.29	11.93	12.79	2.85
Arg	^{15}N -Ala	55.36	57.48	58.42	60.56	64.38	4.22
	Leu+ ^{15}N -Ala	53.47	59.84	56.84	61.75	63.12	5.36
^{15}N -Ser	^{15}N -Ala	0	6.43	10.88	13.26	12.78	2.32
	Leu+ ^{15}N -Ala	0	5.25	11.92	12.13	14.45	2.16
Ser	^{15}N -Ala	96.23	99.57	101.29	98.34	102.25	8.78
	Leu+ ^{15}N -Ala	98.71	96.34	103.37	100.23	103.36	6.39
^{15}N -Gly	^{15}N -Ala	0	4.32	9.16	12.55	12.67	2.27
	Leu+ ^{15}N -Ala	0	5.21	8.78	11.33	13.36	2.73
Gly	^{15}N -Ala	301.58	311.87	318.93	320.47	314.47	13.24
	Leu+ ^{15}N -Ala	295.93	309.36	310.83	307.84	322.65	15.45

注: 表中同行数值肩标无相同字母者表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values within a row with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

在灌注结束后，对肝组织样品中游离氨基酸的含量分析发现（图 3.9），与血浆呈现的结果一致，亮氨酸的添加没有对天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸等 NEAA 的含量产生显著的影响。

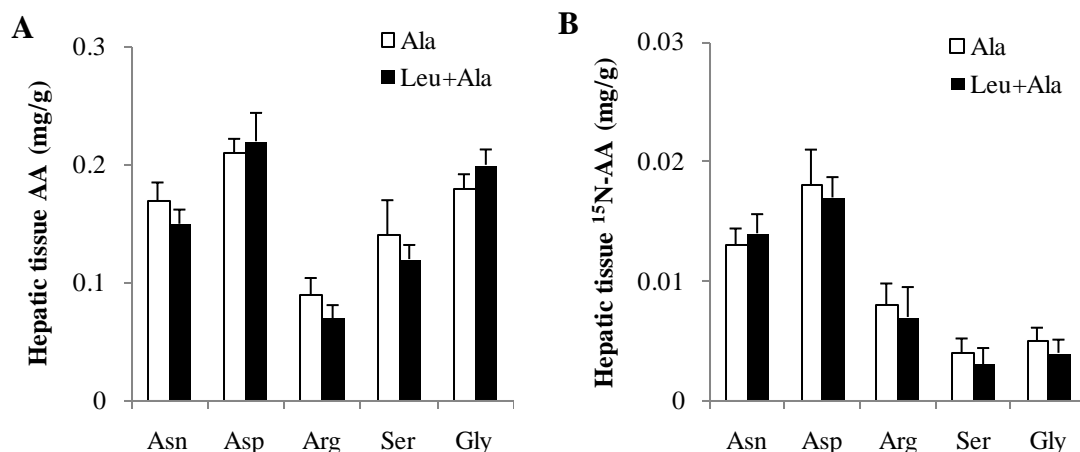


图 3.9 亮氨酸对肝组织 NEAA 含量的影响

Fig 3.9 The effect of leucine on hepatic tissue NEAA content

2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响

氨代谢通路代谢酶活性如图 3.10 所示，亮氨酸的添加显著的提高了肝脏 GDH 的活性（约 50%）及其基因表达水平（约 1.6 倍）（ $P<0.01$ ）；显著的促进了 GS 的酶活，抑制了 CPS1 的酶活性（ $P<0.05$ ），然而对 GS 和 CPS1 的基因表达无显著影响。

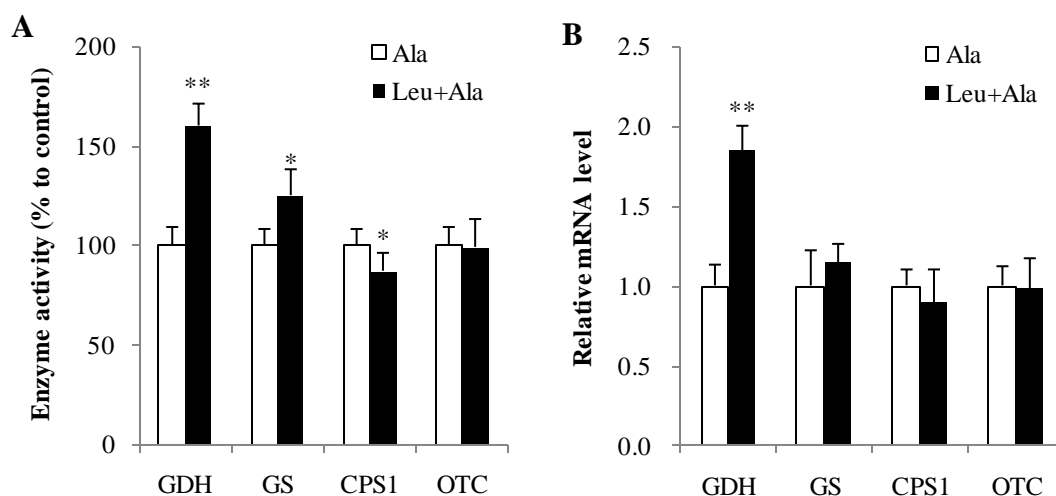


图 3.10 亮氨酸对肝组织代谢酶活及基因表达的影响

Fig 3.10 The effect of leucine on hepatic enzyme activity and gene expression

2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响

灌注 ^{15}N -丙氨酸与亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸结束后,对猪肝组织线粒体 SIRT4 基因表达的检测发现(图 3.6),亮氨酸能够显著的抑制线粒体 SIRT4 基因的表达($P<0.01$)。与灌注 ^{15}N -丙氨酸相比,亮氨酸+ ^{15}N -丙氨酸组 SIRT4 mRNA 的水平下调了约 41%,SIRT4 蛋白的水平下调了 51%。

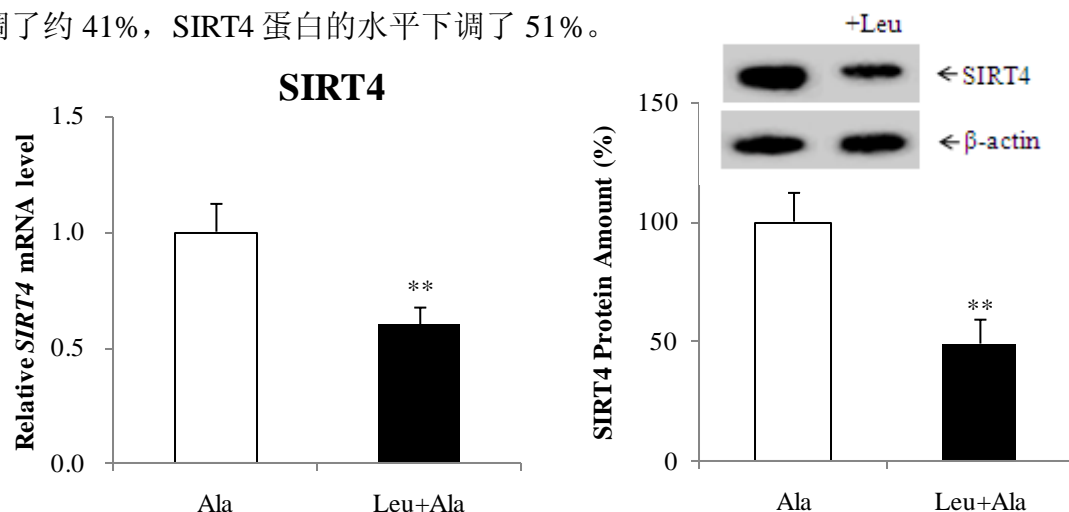


图 3.11 亮氨酸对肝组织线粒体 SIRT4 基因表达的影响

Fig 3.11 The effect of leucine on hepatic mitochondria SIRT4 gene expression

3 讨论

丙氨酸是哺乳动物内的氨转运体。肝脏与肌肉丙氨酸-葡萄糖循环的存在以及门静脉高浓度的丙氨酸含量,提供了肝脏大量的氨底物,所以,丙氨酸是肝脏氨的重要来源。本研究选择亮氨酸作为营养调控物质,探究亮氨酸对丙氨酸来源氨的代谢调控作用。

随着丙氨酸的灌注,肝静脉中尿素氮的含量呈现显著上升的趋势,说明了丙氨酸是尿素生成的重要底物来源。与灌注丙氨酸相比,亮氨酸的添加降低了肝静脉中尿素的水平,表明亮氨酸抑制了肝脏尿素的生成。丙氨酸是肝脏糖异生的重要底物(Felig 1973),本实验发现随着丙氨酸的增多,肝脏葡萄糖的输出明显增多,然而亮氨酸的存在抑制了糖异生的进行。Li 等(2003)报道,亮氨酸在胰岛素分泌的过程中有重要的促进作用。所以,亮氨酸可能是通过促进胰岛素的分泌量,从而达

到减少丙氨酸糖异生的效果。

对氨基酸含量的检测发现，随着 ^{15}N -丙氨酸的灌注，肝静脉血液 ^{15}N -标记的谷氨酸和谷氨酰胺的浓度均逐渐上升。并且亮氨酸的添加增加了肝静脉血液中和肝组织中 ^{15}N -标记的谷氨酸和谷氨酰胺生成。本实验的研究结果与 Mourão 等（1975）在鼠离体肝细胞实验相似，即在丙氨酸作为氨源的情况下，亮氨酸可抑制尿素的产生并促进谷氨酸和谷氨酰胺的生成。所以，在丙氨酸作为氨底物情况下，亮氨酸也可调控更多的氨逃逸了尿素循环而进入谷氨酰胺循环。

NEAA 含量的分析发现，天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸也出现了 ^{15}N -标记。 ^{15}N -标记的 NEAA 随着灌注的进行呈现上升的趋势，然而亮氨酸的添加没有对上述 NEAA 在肝静脉血及肝组织的含量产生显著影响。值得注意的是，与第一章结果不同的是，丙氨酸灌注组并没有增加天冬氨酸的消耗。其原因可能为，丙氨酸在肝脏中可转化为天冬氨酸，可能是弥补尿素循环进行所需第二个氮原子而产生的对天冬氨酸消耗（Brosnan et al 2004）。

为了更深入的探究亮氨酸对丙氨酸源氨代谢的机理，对氨代谢酶基因表达与活性进行了分析。亮氨酸的添加显著的促进了肝组织 GDH 的基因表达和活性，增加了氨向谷氨酸和谷氨酰胺的转化。同时，亮氨酸下调了 CPS1 的酶活性，上调了 GS 的酶活，然而对其基因表达没有显著的影响，这可能与灌注时间和丙氨酸作为氨底物提供效率有关，没有产生足够的底物促进效应，影响到基因表达。值得注意的是，亮氨酸添加组中线粒体 SIRT4 的基因表达极显著下调。SIRT4 是线粒体 GDH 酶活的抑制剂（Haigis et al 2006），亮氨酸通过抑制 SIRT4 的表达，提高了 GDH 的活性，促进了肝脏谷氨酸和谷氨酰胺的生成。

4 小结

亮氨酸对丙氨酸来源氨的代谢调控研究发现，亮氨酸不仅可以通过抑制肝脏 SIRT4 的表达，提高 GDH 的活性，减少肝脏尿素产生，增加谷氨酸和谷氨酰胺的生成，同时还降低了肝脏葡萄糖的含量。

第三章 亮氨酸对混合氨基酸来源氨代谢的调控作用

1 前言

氨基酸在肝脏的脱氨基反应产生的氨也是肝脏氨的一个重要来源。日粮中的氮营养素经肠道吸收后, 大约有 50%~70% 的日粮氨基酸会出现在门静脉血液中, 并由门静脉进入肝脏 (Shoveller et al 2005; Wu 1998)。肝脏是氨基酸代谢最为旺盛的器官, 绝大多数的氨基酸代谢酶在肝脏被发现。本课题组的研究表明, 在猪摄食后的 0~5 h, 出现在门静脉的氨基酸大约有 26%~42% 在肝脏代谢 (Li et al 2015)。这些氨基酸除了合成肝脏蛋白外, 其余一大部分则被分解代谢, 进行营养物质间相互转换或氧化供能等。大部分的氨基酸代谢酶均在肝脏存在, 其中芳香族氨基酸 (Aromatic amino acids, AAA) 代谢酶活性最高, AAA 的代谢率约为 63%~93%, 这些氨基酸在肝脏内分解代谢的过程中会产生相当数量的氨, 构成了肝脏氨的一个主要来源。

日粮氨基酸进入肝脏后进行分解代谢产氨, 这些氨或是进入尿素循环生成尿素, 或是进入谷氨酰胺循环生成谷氨酰胺等非必需氨基酸。本实验模拟猪摄食后门静脉氨基酸的浓度, 利用猪门静脉灌注技术, 分别灌注混合氨基酸和亮氨酸+混合氨基酸, 探究亮氨酸对肝脏混合氨基酸来源氨代谢的调控作用。

2 结果与分析

2.1 亮氨酸对肝脏尿素生成的影响

由图 3.12 可知, 随着混合氨基酸 (Mixed Amino acids) 灌注时间的增长, 肝静脉血中尿素氮 (Urea-N) 的含量呈现显著上升的趋势。在灌注后 80 min 时达到最大值, 混合氨基酸灌注组尿素氮的浓度约为 8.18 mmol/L, 亮氨酸+混合氨基酸组约为 6.75 mmol/L。与混合氨基酸灌注组相比, 在灌注后的 40~80 min, 亮氨酸+混合氨基酸组显著降低了猪肝静脉血液中尿素氮的水平 ($P<0.05$), 最高可降低 17.5% (80 min)。

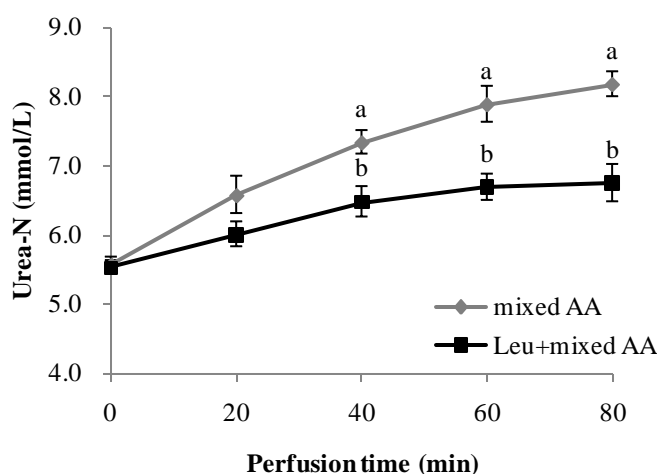


图 3.12 亮氨酸对肝静脉血尿素氮含量的影响

Fig 3.12 The effect of leucine on hepatic vein Urea-N concentration

2.2 亮氨酸对肝脏氨基酸生成的影响

2.2.1 亮氨酸对肝脏谷氨酸和谷氨酰胺生成的影响

随着混合氨基酸的灌注，肝静脉中谷氨酸与谷氨酰胺的浓度也均表现出上升的趋势。与混合氨基酸组相比，亮氨酸+混合氨基酸组显著提高了灌注后第 40 min 谷氨酸和谷氨酰胺的水平 ($P<0.05$)，却显著降低了灌注后第 80 min 谷氨酸的水平 ($P<0.05$)，而对谷氨酰胺的影响不显著。

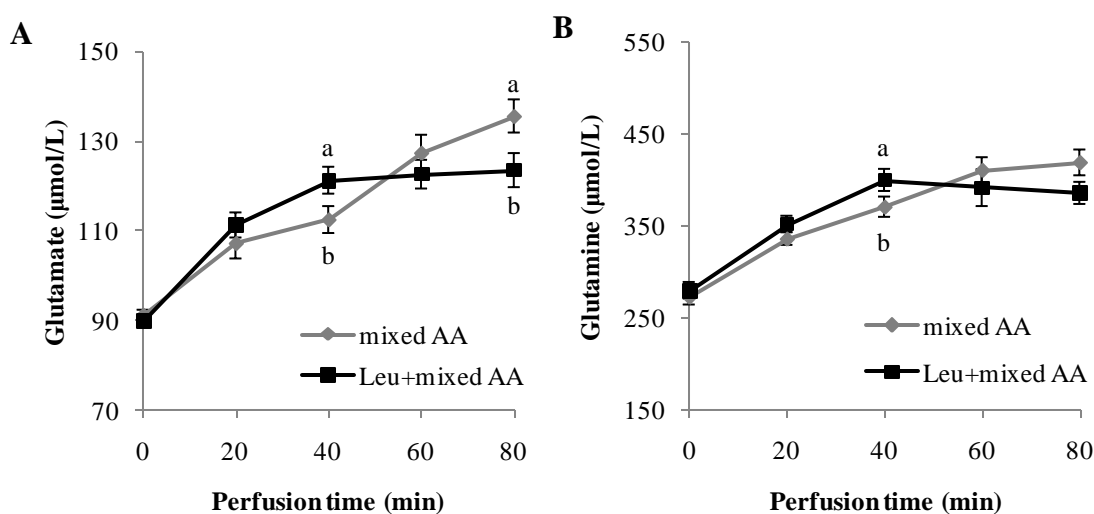


图 3.13 亮氨酸对肝静脉血谷氨酸和谷氨酰胺浓度的影响

Fig 3.13 The effect of leucine on hepatic vein glutamate and glutamine concentrations

灌注结束后, 肝组织样品中谷氨酸与谷氨酰胺的含量如图 3.14 所示, 亮氨酸的添加显著降低了肝组织中谷氨酸的含量 ($P<0.05$), 然而对谷氨酰胺的含量没有显著的影响。

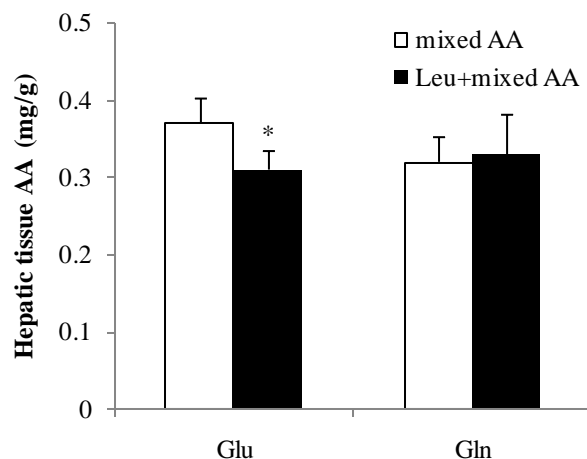


图 3.14 亮氨酸对肝组织谷氨酸和谷氨酰胺含量的影响

Fig 3.14 The effect of leucine on hepatic tissue glutamate and glutamine content

2.2.2 亮氨酸对其它非必需氨基酸生成的影响

表 3-3 仔猪灌注亮氨酸和混合氨基酸后肝静脉 NEAA 的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)

Table 3-3 Hepatic vein NEAA concentrations ($\mu\text{mol/L}$) of pigs infused with Leu and AAs.

氨基酸	处理	采样时间 (min)					SEM
		0 min	20 min	40 min	60 min	80 min	
Asn	AAs	17.18	23.46	27.96	34.81 ^a	35.72 ^a	2.42
	Leu+ AAs	18.25	23.78	25.29	25.85 ^b	26.93 ^b	2.56
Asp	AAs	9.78	14.72	15.89	11.27	9.79	1.18
	Leu+ AAs	10.32	15.43	14.64	10.54	9.25	1.32
Arg	AAs	61.24	68.34	75.67	81.26 ^a	85.78 ^a	5.21
	Leu+ AAs	59.37	71.82	72.94	73.25 ^b	72.33 ^b	6.38
Ser	AAs	99.05	115.25	126.48	137.28 ^a	139.59 ^a	7.11
	Leu+ AAs	98.27	116.37	121.32	123.25 ^b	122.25 ^b	9.28
Gly	AAs	309.78	321.26	332.45	349.07 ^a	352.87 ^a	17.66
	Leu+ AAs	306.23	319.87	327.47	329.24 ^b	331.85 ^b	14.27

注: 表中同行数值肩标无相同字母者表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Values within a row with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

采用 LC-MSMS 分析了分别灌注后 NEAA 在肝静脉血液中的含量（表 3-3）。结果发现，亮氨酸的添加显著降低了天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸（60~80 min）时在肝静脉血中的浓度（ $P<0.05$ ）；然而对天冬氨酸的水平没有显著的影响。组织样的分析也呈现了相同的结果（图 3.15）。

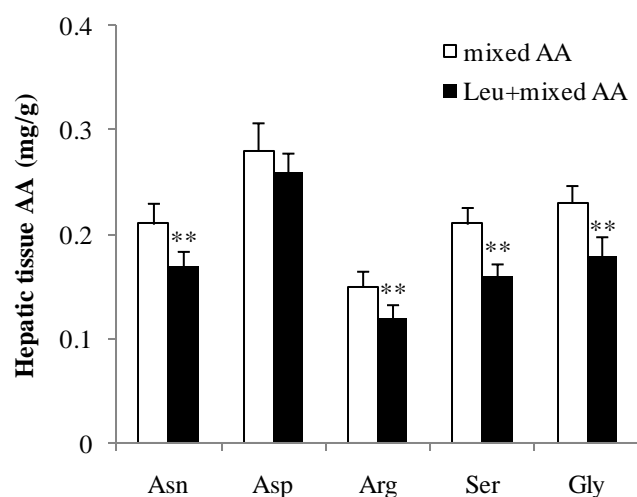


图 3.15 亮氨酸对肝组织 NEAA 含量的影响

Fig 3.15 The effect of leucine on hepatic tissue NEAA content

2.3 亮氨酸对肝脏氨代谢酶活及基因表达的影响

氨代谢通路代谢酶活性如图 3.16 所示，亮氨酸的添加显著的提高了 GDH 的活性（约 45%）及其基因表达水平（约 1.5 倍）（ $P<0.01$ ）；降低了 GS、CPS1 和 OTC 的活性（ $P<0.05$ ）和基因表达（ $P<0.05$ ）。

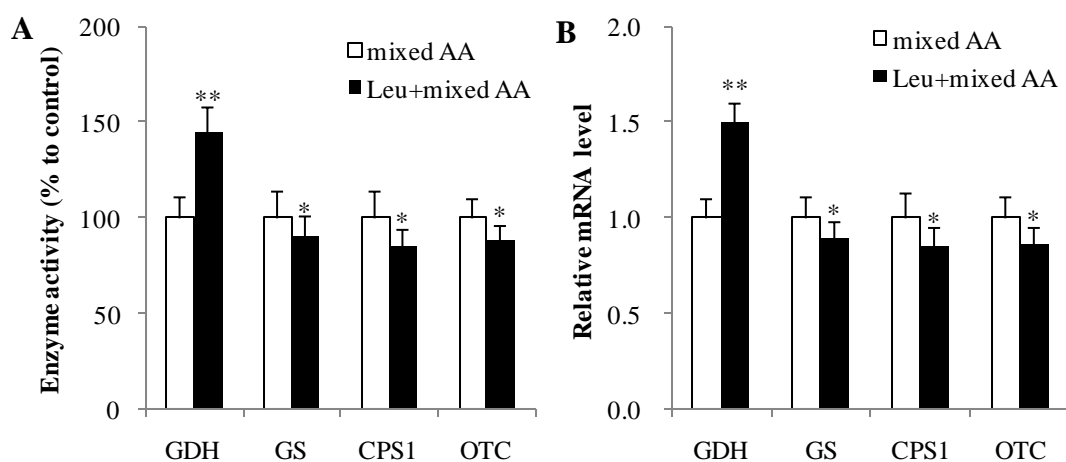


图 3.16 亮氨酸对肝组织代谢酶活及基因表达的影响

Fig 3.16 The effect of leucine on hepatic enzyme activity and gene expression

2.4 亮氨酸对肝脏线粒体 SIRT4 基因表达的影响

灌注混合氨基酸与亮氨酸+混合氨基酸结束后，对猪肝组织线粒体 SIRT4 基因表达的检测发现（图 3.17），亮氨酸能够显著的抑制线粒体 SIRT4 基因的表达（ $P<0.01$ ）。与灌注混合氨基酸相比，亮氨酸+混合氨基酸组 SIRT4 mRNA 的水平下调了约 45%，SIRT4 的蛋白水平下调了 59%。

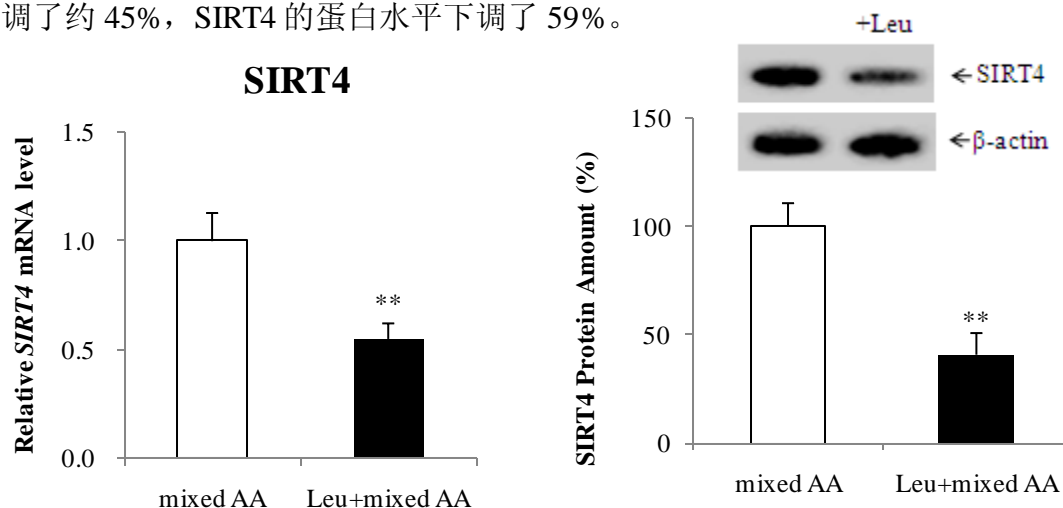


图 3.17 亮氨酸对肝组织线粒体 SIRT4 基因表达的影响

Fig 3.17 The effect of leucine on hepatic mitochondria SIRT4 gene expression

3 讨论

肝脏是氨基酸代谢旺盛的器官。动物在摄食后，大量的日粮氨基酸经肠道吸收后进入肝脏，在肝脏丰富的转氨酶与脱氨酶催化下分解代谢，或进行蛋白质的合成（Stoll et al 1998）。肝脏氨基酸分解代谢过程中产生大量的氨进入肝脏氨代谢通路。本实验模拟猪摄食后生理浓度下门静脉氨基酸浓度，探究了亮氨酸对肝脏混合氨基酸源氨代谢的调控作用。

肝静脉中尿素氮的含量随着灌注进行而逐渐升高，表明肝脏氨基酸分解代谢提供了尿素循环新的氨底物，亮氨酸的添加则显著抑制了尿素的生成。本实验中，亮氨酸对谷氨酸与谷氨酰胺调控产生了与前两章（氨或丙氨酸作为氨源）不同的效果。并且在本实验中，亮氨酸仅在灌注前期促进两种氨基酸的生成，而后期甚至降低了肝脏谷氨酸的含量。Mourão 等（1975）也指出，在 15 种氨基酸作为氨源的情况下，

亮氨酸能够抑制尿素生成，而对谷氨酸和谷氨酰胺作用不显著。这可能因为亮氨酸是蛋白质合成的信号分子，在氨基酸底物存在的情况下可启动肝脏蛋白质合成（Escobar et al 2005; Wilson et al 2010）。因此，亮氨酸与混合氨基酸的灌注不仅提供了氨底物促进了谷氨酸与谷氨酰胺的生成，同时提供了蛋白质合成的底物并启动了肝脏蛋白的合成。所以，灌注前期氨底物增多，亮氨酸促进谷氨酸和谷氨酰胺生成增多；灌注后期蛋白质合成增多，增加了谷氨酸和谷氨酰胺的消耗，尤其是肝组织中谷氨酸的消耗。因为肝脏是白蛋白合成的唯一场所，白蛋白（谷氨酸比例最多，约为 14%）的合成增加了对谷氨酸的消耗（Thalacker-Mercer and Campbell 2008）。

NEAA 的分析结果进一步证明了上述的结论。与混合氨基酸组相比，亮氨酸添加组中肝静脉与肝组织中天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸和甘氨酸的含量均显著降低。表明了亮氨酸可能通过促进肝脏蛋白的合成（Escobar et al 2005），增加了对上述 NEAA 的利用。然而天冬氨酸的含量没有显著的变化，可能是因为，天冬氨酸是提供尿素第二个氮原子的重要供体（Brosnan et al 2001），亮氨酸抑制尿素循环的同时减少了天冬氨酸的消耗，而亮氨酸促进蛋白合成的过程中又增加了天冬氨酸的消耗，导致了亮氨酸对天冬氨酸影响不显著。

氨代谢通路代谢酶及基因表达检测表明，亮氨酸仍然提高了 GDH 的酶活性和基因表达，却降低了 CPS1、OTC、GS 的酶活和基因表达。这可能因为亮氨酸调控更多的氨基酸参与蛋白合成，氨基酸的分解代谢减少，氨底物的减少减弱了对氨代谢酶和基因表达的底物驱动效应。而 SIRT4 作为 GDH 酶活的抑制因子（Haigis et al 2006），亮氨酸的存在同样抑制了 SIRT4 的基因表达，从而提高 GDH 活性，在一定程度上起到了促进氨底物进入谷氨酰胺循环的作用。

4 小结

亮氨酸对混合氨基酸的代谢调控作用研究表明，亮氨酸不仅可以通过抑制肝脏 SIRT4 的表达，提高 GDH 的活性，减少了肝脏尿素的产生，还降低了肝脏大多数 NEAA 的水平。

第四部分 结语

1 成果与结论

本研究利用猪门静脉灌注技术，探究了亮氨酸对不同来源氨在猪肝脏代谢的调控作用，得到了如下研究成果：

1) 门静脉 NH_4Cl 作为氨源时，当亮氨酸可减少肝脏尿素的产生，增加谷氨酰胺的生成；当丙氨酸作为氨源时，亮氨酸可减少肝脏尿素和葡萄糖的产生，增加谷氨酰胺的生成；当混合氨基酸作为氨源时，亮氨酸不仅减少了肝脏尿素的生成，还降低了肝脏 NEAA 的水平。

2) 亮氨酸可通过抑制肝脏线粒体 SIRT4 的表达，提高肝脏 GDH 的基因表达和活性，从而促进更多的氨逃逸尿素循环，进入谷氨酰胺循环。

2 创新点

1) 本研究采用猪门静脉灌注、 ^{15}N 同位素示踪和基于 LC-MS/MS 的氨基酸定量检测技术，从器官水平探究了亮氨酸对猪肝脏不同来源氨代谢的调控作用。

2) 本研究通过将表观遗传学和营养学相结合，明确了亮氨酸通过表观遗传学因子 SIRT4 调控猪肝脏氨代谢的机理。

3 不足与展望

1) 本研究在设置不同氨底物来源时，采用了 ^{15}N 同位素示踪技术，遗憾的是混合氨基酸组中由于氨基酸组成多，标记困难而没有采用。

2) 下一步应从细胞水平，采用门静脉周肝细胞和肝静脉周肝细胞培养、超表达和干涉技术深入验证和挖掘亮氨酸通过线粒体 SIRT4/GDH 通路调控猪肝脏氨代谢的机理。

3) 下一步应从动物个体水平，通过生长肥育猪（60~90 kg）饲养和屠宰实验，探究低蛋白日粮中补加支链氨基酸（亮氨酸）对猪肝脏尿素循环和谷氨酰胺生成的影响。

参考文献

1. 黄飞若, 猪营养代谢与表观遗传学. 北京: 化学工业出版社, 2016.
2. 黄瑞林, 印遇龙, 李铁军, 谭翔文, 高纪平, 陶礼华. 用于营养物质代谢的猪动静脉插管技术的研究. I. 插管及血流量计安装手术, 中国兽医杂志, 2003, 39: 19-20.
3. 王振兴, 许振成, 谌建宇, 庞志华, 骆其金, 叶万生. 畜禽养殖业氨氮总量控制减排技术评估研究. 环境科学与管理, 2014: 54-58.
4. 郑培培. 不同蛋白水平日粮影响仔猪肝脏氨基酸代谢的研究[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2015.
5. 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.
6. 郑培培, 李鲁鲁, 包正喜, 张萍, 赵胜军, 黄飞若. 不同蛋白水平日粮对仔猪肝脏氨基酸代谢影响的研究. 见: 李爱科, 李绍钰主编, 第七届中国饲料营养学术研讨会论文集. 中国畜牧兽医学会动物营养学分会第七届中国饲料营养学术研讨会, 郑州, 中国农业出版社, 2014, 296.
7. Ahuja V, Powers-Lee SG. Human carbamoyl-phosphate synthetase: insight into N-acetylglutamate interaction and the functional effects of a common single nucleotide polymorphism. *J Inherit Metab Dis*, 2008, 31: 481-491.
8. Appleton J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino acid. *Altern Med Rev*, 2002, 7: 512-522.
9. Argmann C, Auwerx J. Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act. *Cell*, 2006, 126: 837-839.
10. Beusen AHW, Bouwman AF, Heuberger PSC, Van Drecht G, Van Der Hoek KW. Bottom-up uncertainty estimates of global ammonia emissions from global agricultural production systems. *Atmos Environ*, 2008, 42: 6067-6077.
11. Braeuning A, Itrich 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.

12. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr*, 2006, 136: 207S-211S.
13. Brosnan JT, Brosnan ME. Hepatic glutaminase-a special role in urea synthesis? *Nutrition*, 2002, 18: 455-457.
14. Brosnan JT, Brosnan ME, Nissim I. A window into cellular metabolism: hepatic metabolism of 15 N-labelled substrates. *Metab Eng*, 2004, 6: 6-11.
15. Brosnan ME, Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90: 857S-861S.
16. Brosnan JT, Brosnan ME, Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lazarow A, Horyn O, Nissim I. Alanine Metabolism in the Perfused Rat Liver STUDIES WITH 15N. *J Biol Chem*, 2001, 276: 31876-31882.
17. Buler M, Aatsinki SM, Izzi V, Hakkola J. Metformin reduces hepatic expression of SIRT3, the mitochondrial deacetylase controlling energy metabolism. *PloS One*, 2012, 7: e49863.
18. Buler M, Aatsinki S M, Izzi V, Uusimaa J, Hakkola J. SIRT5 is under the control of PGC-1 α and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism. *FASEB J*, 2014, 28: 3225-3237.
19. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Lévy L, Lamers WH, Kitajewski J, Kahn A, Perret C. New targets of β -catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene*, 2002, 21: 8293-8301.
20. Camacho JA, Rioseco-Camacho N, Andrade D, Porter J, Kong J. Cloning and characterization of human ORNT2: a second mitochondrial ornithine transporter that can rescue a defective ORNT1 in patients with the hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome, a urea cycle disorder. *Mol Genet Metab*, 2003, 79: 257-271.
21. Canh TT, Aarnink AJA, Schutte JB, Sutton A, Langhout DJ, Verstegen MWA. Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing–finishing pigs. *Livest Prod Sci*, 1998, 56: 181-191.
22. Colnot S, Perret C. Liver Zonation. In: SPS Monga ed, *Molecular Pathology of Liver Diseases*, Molecular Pathology Library 5. 2011, pp. 7-16.
23. Cooper AJ, Nieves E, Coleman AE, Filc-DeRicco S, Gelbard AS. Short-term metabolic fate of [13N] ammonia in rat liver in vivo. *J Biol Chem*, 1987, 262: 1073-1080.

24. da Silva PM, Zoppi CC, Filiputti E, Silveira LR, Quesada I, Boschero AC, Carneiro EM. Preliminary report: Leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. *Metabolism*, 2010, 59: 911-913.
25. Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, Jalan R, Olde Damink SW. Aromatic amino acid metabolism during liver failure. *J Nutr*, 2007, 137: 1579S-1585S.
26. Dominy JE, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Nutrient-dependent acetylation controls basic regulatory metabolic switches and cellular reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011, 76: 203-209.
27. Escobar J, Frank J W, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288: E914-E921.
28. Felig P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, 1973, 22: 179-207.
29. Felig P, Pozefsk T, Marlis E, Cahill GF. Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science*, 1970, 167: 1003-1004.
30. Fitzpatrick PF. Allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 519: 194-201.
31. Garlick PJ. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr*, 2005, 135: 1553S-1556S.
32. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 1992, 53: 275-354.
33. Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krugel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem*, 2007, 41: 201-266.
34. 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.
35. Gärg B, Wettstein M, Metzger S, Schliess F, Häussinger D. Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology*, 2005, 41: 1065-1073.
36. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and

- opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells. *Cell*, 2006, 126: 941-954.
37. Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D. Inhibition of hepatic proteolysis by insulin. Role of hormone-induced alterations of the cellular K^+ balance. *Eur J Biochem*, 1991, 199: 467-474.
38. Häussinger D. Ammonia, urea production and pH regulation. In: Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M, eds. *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*. Hoboken, NJ: Blackwell Publishing, 2007, pp. 181-192.
39. 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.
40. Häussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J*, 1990, 267: 281-290.
41. Häussinger D, Gerok W. Hepatic urea synthesis and pH regulation. Role of CO_2 , HCO_3^- , pH and the activity of carbonic anhydrase. *Eur J Biochem*, 1985, 152: 381-386.
42. Häussinger D, Gerok W. Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: Impairment of glutamine synthesis in CCl_4 induced liver cell necrosis with no effect on urea synthesis. *Chem Biol Interact*, 1984, 48: 191-194.
43. Häussinger D, Lamers WH, Moorman AFM. Metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme*, 1993, 46, 72-93.
44. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, De Joseph MR. Effect of reducing brain glutamine synthesis on metabolic symptoms of hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 1993, 60: 1000-1006.
45. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoinne A. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 1887-1899.
46. Jahn TP, Møller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kühlbrandt W, Schjoerring JK. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett*, 2004, 574: 31-36.
47. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev*, 1989, 69: 708-764.

48. Jungermann K, Keitzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 1996, 16: 179-203.
49. Katz N, Teutsch HF, Jungermann K, Sasse D. Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1, 6-bisphosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS Lett*, 1977, 83: 272-276.
50. Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology*, 2011, 54: 1063-1070.
51. Kiess AS, Cleveland BM, Wilson ME, Klandorf H, Blemings KP. Protein-induced alterations in murine hepatic alpha-amino adipate delta-semialdehyde synthase activity are mediated posttranslationally. *Nutr Res*, 2008, 28: 859-865.
52. Kim S, Paik WK, Cohen PP. Ammonia intoxication in rats: protection by N-carbamoyl-L-glutamate plus L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3530-3533.
53. Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet*, 1999, 22: 159-163.
54. Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PloS One*, 2010, 5: e11707.
55. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism-glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr*, 2001, 131: 2467S-2474S.
56. Li C, Matter A, Kelly A, Petty TJ, Najafi H, MacMullen C, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Kwagh J, Collins HW, Hsu BY, Nissim I, Yudkoff M, Matschinsky FM, Stanley CA. Effects of a GTP-insensitive mutation of glutamate dehydrogenase on insulin secretion in transgenic mice. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15064-15072.
57. Li C, Najafi H, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Matschinsky FM, Stanley CA. Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2853-2858.
58. 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. *Sci Rep*, 2016, 6: 24156.

59. Li L, Zhang P, Zheng P, Bao Z, Wang Y, Huang F. Hepatic cumulative net appearance of amino acids and related gene expression response to different protein diets in pigs. *Livest Sci*, 2015, 182: 11-21.
60. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV Jr, Weissman S, Verdin E, Schwer B. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 8807-8814.
61. McGivan JD, Bradford NM, Crompton M, Chappell JB. Effect of L-leucine on the nitrogen metabolism of isolated rat liver mitochondria. *Biochem J*, 1973, 134: 209-215.
62. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau R. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev*, 1990, 70: 701-748.
63. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22: 87-105.
64. Mourão JM, McGivan JD, Chappell JB. The effects L-leucine on the synthesis of urea, glutamate and glutamine by isolated rat liver cells. *Biochem J*, 1975, 146: 457-464.
65. Nair KS, Short KR. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J Nutr*, 2005, 135: 1547S-1552S.
66. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 2009, 137: 560-570.
67. Newman JC, He W, Verdin E. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *J Biol Chem*, 2012, 287: 42436-42443.
68. 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.
69. Nuzum C, Snodgrass P. Multiple Assays of the Five Urea-cycle Enzymes in Human Liver Homogenates. In: Grisolia S, Baguena R and Mayor F, eds. *The Urea Cycle*. New York: Wiley, 1976, pp. 325-349.

70. Nui A, Katsuramaki T, Kikuchi H, Kukita K, Kimura H, Meguro M, Nagayama M, Isoke M, Hirata K. The functional integrity of a normothermic perfusion system using artificial blood in pig liver. *J Surg Res*, 2006, 131: 189-198.
71. Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int*, 2002, 41: 177-188.
72. Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *BioMed Res Int*, 2011.
73. Ren Y, Shan TZ, Zhu LN, Wu T, Guo J, Wang YZ. Effect of breed on the expression of Sirtuins (Sirt1-7) and antioxidant capacity in porcine brain. *Animal*, 2013, 7: 1994-1998.
74. Reverter M, Lundh T, Gonda HL, Lindberg JE. Portal net appearance of amino acids in growing pigs fed a barley-based diet with inclusion of three different forage meals. *Br J Nutr*, 2000, 84: 483-494.
75. Shoveller AK, Stoll B, Ball RO, Burrin DG. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J Nutr*, 2005, 135: 1609-1612.
76. 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.
77. Soria LR, Marrone J, Calamita G, Marinelli RA. Ammonia detoxification via ureagenesis in rat hepatocytes involves mitochondrial aquaporin-8 channels. *Hepatology*, 2013, 57: 2061-2071.
78. Spanaki C, Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox Res*, 2012, 21: 117-127.
79. Stewart PM, Walser M. Short term regulation of ureagenesis. *J Biol Chem*, 1980, 255: 5270-5280.
80. Stoll B, Burrin DG, Henry J, Yu H, Jahoor F, Reeds PJ. Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *J Nutr*, 1998, 128: 1517-1524.
81. 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.

82. Stoll B, McNelly S, Buscher HP, Häussinger D. Functional hepatocyte heterogeneity in glutamate, aspartate and α -ketoglutarate uptake: A histoautoradiographical study. *Hepatology*, 1991, 13: 247-253.
83. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68: 72-81.
84. Thalacker-Mercer AE, Campbell WW. Dietary protein intake affects albumin fractional synthesis rate in younger and older adults equally. *Nutr Rev*, 2008, 66: 91-95.
85. Ulbright C, Snodgrass PJ. Coordinate induction of the urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone is accomplished by three different mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 301: 237-243.
86. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 2009, 89: 1269-1339.
87. Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, Li H, Xie L, Zhao W, Yao Y, Ning ZB, Zeng R, Xiong Y, Guan KL, Zhao S, Zhao GP. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 2010, 327: 1004-1007.
88. Weber FL, Friedman DW, Fresard KM. Ammonia production from intraluminal amino acids in canine jejunum. *Am J Physiol*, 1988, 254: G264-G268.
89. Weber FL, Veach G. The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dog. *Gastroenterology*, 1979, 77, 235-240.
90. 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.
91. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol*, 1982, 53: 201-237.
92. Wilson FA, Suryawan A, Gazzaneo MC, Orellana RA, Nguyen HV, Davis TA. Stimulation of muscle protein synthesis by prolonged parenteral infusion of leucine is dependent on amino acid availability in neonatal pigs. *J Nutr*, 2010, 140: 264-270.

93. Wolpert E, Phillips SF, Summerskill WHJ. Ammonia production in the human colon: effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. *N Engl J Med*, 1970, 283: 159-164.
94. Wolpert E, Phillips SF, Summerskill WHJ. Transport of urea and ammonia production in the human colon. *Lancet*, 1971, 298: 1387-1390.
95. Wright G, Noiret L, Olde Damink SW, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver Int*, 2011, 31: 163-175.
96. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 2009, 37: 1-17.
97. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*, 1998, 128: 1249-1252.
98. Wu G. Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. *Biochem J*, 1995, 312: 717-723.
99. Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev*, 2010, 68: 270-279.
100. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 2010, 327: 1000-1004.

附录 研究生在读期间发表学术论文

1. **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.
2. **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 Science*, 2015, 182: 11-21.
3. **Li L**, Bao Z, Zhang P, Liu S, Wang T, Huang FR. L-Leucine Stimulates GDH Activity and Glutamate Synthesis by Regulating SIRT4 Pathway in Pig Liver. *Plos One*, (under review).
4. Zhang P, **Li L**, Bao Z and Huang F. Role of BAF60a/BAF60c in Chromatin Remodeling and Hepatic Lipid Metabolism. *Nutrition & Metabolism*, 2016, 13:1-13.
5. Bao Z, Li Y, Zhang J, **Li L**, Zhang P, Huang FR. Effect of particle size of wheat on nutrient digestibility, growth performance, and gut microbiota in growing pigs. *Livestock Science*, 2016. 183: 33-39.
6. Wang Y, Lin Q, Zheng P, **Li L**, Bao Z, Huang FR. Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Chylomicron and VLDL Synthesis and Secretion in Caco-2 Cells. *BioMed Research International*, 2014.
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. 刘霜, 罗杰, 张萍, 包正喜, **李鲁鲁**, 黄飞若. 不同谷物原料的粉碎粒度在畜禽日粮中的应用研究. *饲料广角*, 2016, 7: 22-26.
9. 郑培培, 徐俊科, 王悦, 包正喜, **李鲁鲁**, 黄飞若. 长链 n-3 多不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 对肠道上皮细胞脂肪酸转运相关基因的影响[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线 [2014-11-12] .

10. 郑培培, 徐俊科, 王悦, 包正喜, **李鲁鲁**, 黄飞若. 长链 n-3 多不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 对肠道上皮细胞乳糜微粒及甘油三脂的影响[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线 [2014-11-12] .
11. 郑培培, **李鲁鲁**, 包正喜, 张萍, 赵胜军, 黄飞若. 不同蛋白水平日粮对仔猪肝脏氨基酸代谢影响的研究. 第七届中国饲料营养学术研讨会论文集, 2014-10-16, 296.
12. 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

毕业将至，首先感谢导师黄飞若副教授在三年的研究生期间对我的辛勤培养。从您在出国深造期间对于我的谆谆教导，到回国后对我的悉心栽培，无不凝聚着您的辛劳和汗水。研究生的学习本身就是一个克服困难和不断成长的过程。从进入实验室后了解课题、阅读文献、设计课题、开展实验、数据分析和论文的写作均离不开导师的指导和帮助。导师不仅是学习科研上的良师，更是生活上的益友。在生活中对我无微不至的关心，指导我制定今后的人生规划。在这里，谨向我的导师致以最崇高的感谢和敬意。

衷心感谢华中农业大学动物营养与饲料科学系彭健教授、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。感谢你们在开题时给予我选题的指导，课题进展中给予我实验的帮助和克服困难的信心，中期检查时给予我进展的建议，毕业答辩前给予我论文的评阅。学习上，老师传授给我实用的知识，让我在课堂上受益匪浅；科研上，各位老师严谨的态度，渊博的知识，给了我莫大的熏陶和启发。

特别感谢本实验室徐俊科、林巧伟、王悦、郑培培、施忠秋、赵传超等师兄师姐；包正喜、廖睿、张建松、王超等同级同学；张萍、郭亮、周颖、王同心、刘霜、李蓉、秦廷洋等师弟师妹；以及动物营养系的各位同学和朋友在我试验过程中提供的支持和帮助。感谢在繁忙的实验中还帮助我完成任务繁重的动物实验。感谢你们一直在我需要帮助的时候挺身而出。感谢你们出现在我研究生的生活中，陪我度过了这充满苦难挫折，却满是美好回忆的研究生生活。

最后感谢我的家人朋友，对我无言的奉献，是你们在我遇到困难和挫折的时候，成为我最坚强的后盾；在我成功的时候，分享我成功的喜悦。

李鲁鲁

2016年5月