

# 无创尿硫测定含硫氨基酸的分解代谢

侯纯升<sup>①</sup> Linda Wykes John Hoffer

School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, Montreal, Quebec, Canada H9X 3V9

**【摘要】** 目的 验证尿硫测定是否可以在生长迅速的新出生的小猪模型上精确反映含硫氨基酸的分解代谢情况。方法 在有充分营养支持的小猪肠内营养模型上,观测静脉注射的无机硫酸盐、以及蛋氨酸中的硫是否完全经尿排泄。结果 以总硫方式测定的无机硫酸盐和蛋氨酸在尿中的回收率分别为 95.6% 和 105.5%。结论 在生长迅速的小猪模型上,尿硫测定这一无同位素标记、无创的方法可以精确反映含硫氨基酸的分解代谢情况。

**【关键词】** 含硫氨基酸; 蛋氨酸; 硫; 分解代谢; 小猪

中图分类号 R-332

文献标识 A

文章编号 1009-6604(2003)04-0356-03

**Noninvasive detection of urinary sulfur for measuring the catabolism of sulfur amino acid** Hou Chunsheng, Linda Wykes, John Hoffer. School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, Montreal, Canada H9X 3V9

**【Abstract】 Objective** To test whether urinary sulfur excretion can be used as an accurate indicator of the catabolism of sulfur amino acid in growing newborn piglets. **Methods** Using a well-nourished enteral nutrition piglet model, we tested whether intravenous inorganic sulfate and methionine were fully excreted as sulfur in the urine. **Results** Recovery rate of inorganic sulfate and methionine as total sulfur in urine were 95.6% and 105.5%, respectively. **Conclusions** Detection of urinary sulfur, as a non-tracer and noninvasive method, may be employed to accurately measure the catabolism of sulfur amino acid in the growing piglet model.

**【Key Words】** Sulfur amino acid; Methionine; Sulfur; Catabolism; Piglet

蛋白质和氨基酸代谢是围手术期临床营养的一个重要研究领域,氨基酸在机体内的代谢主要有两条途径,第一是被应用于蛋白质合成,第二是被分解为二氧化碳、尿素、硫酸盐等代谢终末产物。因为氨基酸的以上代谢主要发生于进食状态,所以找到一种精确而有效的方法来测定进食状态下的氨基酸分解代谢对于我们更好地研究机体蛋白质代谢具有非常重要的意义。目前国际上还没有方法可以很满意地测定非稳定状态下的氨基酸分解代谢。在历史上尿素产生量测定曾经被应用于全身氨基酸分解代谢的研究,然而尿素在肠道的水解作用限制了此方法的精确性<sup>[1]</sup>。目前国际上主要应用示踪物标记的必需氨基酸氧化法测定全身氨基酸分解代谢。本方法是目前最精确的测定全身氨基酸分解代谢的方法,并被应用于人体的各种必需氨基酸需要量的测定<sup>[2]</sup>。然而此方法在正常进食的非稳定状态下在精确性方面存在缺陷<sup>[3]</sup>,另外此方法还存在操作复杂、费用昂贵、需要多次采集血样等缺点。基于以上两种方法的缺陷,探索一种简单、精确、无创的方法用来测定正常进食状态下的氨基酸分解代谢对于氨基酸的代谢研究具有重要的意义。本研究主要探讨硫作为一种代谢终末产物是否可以精确反映含硫氨基酸的分解代谢情况。

硫主要来源于蛋氨酸和半胱氨酸两种含硫氨基酸的分解代谢,无机硫酸盐和牛磺酸是最主要的两种含硫的代谢终末产物,而它们几乎完全从尿中排出体

外<sup>[4,5]</sup>。本研究的目的在于建立含硫氨基酸代谢的小猪动物模型并在这一模型上验证简单、无创的尿硫测定含硫氨基酸分解代谢的方法。

## 材料与方法

### 一、动物与材料

雄性小猪(Landrace × Yorkshire),购自 McGill 大学,蛋氨酸购自 Ajinomoto 公司,硫酸镁购自 Sabex 公司。

### 二、模型制备

依照改良 Wykes 法<sup>[6]</sup>建立小猪肠内营养模型。2%异氟醚吸入麻醉,行右颈外静脉、右股静脉插管,胃造瘘,膀胱造瘘,所有插管经皮下隧道从右颈背部引出。术后经胃造瘘管用 COMPAT 肠内营养泵 24 小时恒速持续营养支持。营养供给量依据每天早晨的体重调整。用膀胱造瘘管行 24 小时尿液收集。

### 三、肠内营养组分

肠内营养提供能量  $1.1 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,其中晶体氨基酸、多聚葡萄糖及脂肪乳分别提供 24%、38% 和 38% 的能量。氨基酸供给量为  $15.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,所有必需氨基酸均超过美国国家营养学会标准的小猪营养需要量,其中含硫氨基酸供给量是需要量的 120%。

### 四、实验目的及设计

1. 实验目的及假设:在一个有充分营养支持下的小猪模型上,机体的蛋白质和谷胱甘肽的合成处于饱和状态,在此状态下再给予外源性的蛋氨酸理论上应

该完全分解。本实验的目的是通过计算蛋氨酸注射后尿中含硫代谢产物的额外排出量占蛋氨酸注射量的百分比得出蛋氨酸的尿硫回收率,从而评价尿硫排出量是否可以精确反映蛋氨酸的分解代谢情况,本实验的假设是蛋氨酸的尿硫回收率是 100%。

2. 实验设计 6 只出生 3 天的仔猪经模型制备手术后给予持续肠内营养,术后第 6 日晨在 2 小时内静脉注射硫酸镁 1.2mmol·kg<sup>-1</sup>,术后第 10 日晨在 2 小时内静脉注射蛋氨酸 1.2mmol·kg<sup>-1</sup>,收集从第 4 天至第 11 天每天的 24 小时尿以及每天早晨的静脉血。

五、指标的检测

1. 尿总硫、无机硫酸盐的检测 依据 Lundquist 法<sup>[7]</sup>分别将所有含硫物用强酸氧化转变为无机硫酸盐,然后用硫酸钡浊度测定在 600nm 下用分光光度计(Perkin Elmer Lambda 3A UV/VIS)测定。

2. 蛋氨酸、牛磺酸的检测 血浆蛋氨酸和牛磺酸,以及尿牛磺酸在用异硫氰酸苯脂衍生后在 Waters 高压液相色谱仪上行紫外线检测<sup>[8]</sup>。

3. 半胱氨酸、同型半胱氨酸的检测 经 TCEP-HCl 还原,monobromobimane 衍生后,血浆总半胱氨酸、同型半胱氨酸在 Waters 公司 600 型高压液相色谱仪上行荧光检测<sup>[9]</sup>。

六、尿硫回收率计算

根据注射硫酸盐或蛋氨酸以后 24 小时以及 48 小时尿中的无机硫酸盐、牛磺酸及总硫排出量超出其给药前相同时间内的基础排出量的额外排出量,计算额外排出量的摩尔数占注射硫酸镁或蛋氨酸的摩尔数的百分比,从而得出其相应的回收率。

七、统计分析

结果以  $\bar{x} \pm s_x$  表示,  $t$  检验用于检验尿硫回收率是否与 100% 有显著差异,单因素方差分析用于检验不同时间血中含硫氨基酸的浓度以及尿硫含量。统计软件为 Sigmapstat for Windows version 2.03, SPSS Inc.

结 果

一、生长情况

小猪体重的增长率为 (79.4 ± 2.8)g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>

二、硫酸镁的尿硫回收率

静脉注射 1.2 mmol·kg<sup>-1</sup>硫酸镁后的第一个 24 小时,尿中的总硫以及无机硫酸盐的含量分别从给药前平均基础水平的 (2.50 ± 0.13)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和 (1.86 ± 0.19)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>上升到 (3.65 ± 0.13)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和 (3.04 ± 0.17)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(图 1)。如果假设

给药前后每天的尿总硫和无机硫酸盐的基础分泌量恒定,注射硫酸镁后 24 小时,硫酸镁中的硫作为尿总硫和无机硫酸盐的回收率分别为 (95.9 ± 3.1)% 和 (98.6 ± 2.7)%,均与 100% 无显著差异。

三、蛋氨酸的尿硫回收率

在注射 1.2 mmol·kg<sup>-1</sup>蛋氨酸后的第 1 天和第 2 天,尿中的总硫含量分别从给药前平均基础水平的 (2.61 ± 0.15)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>上升到 (3.45 ± 0.13)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和 (3.01 ± 0.22)mmol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(图 1)。蛋氨酸的 24 小时尿总硫回收率为 70%,其中尿无机硫酸盐和牛磺酸的回收率分别为 44% 和 18%,蛋氨酸的 48 小时尿总硫回收率为 106%,与 100% 无显著差异。其中尿无机硫酸盐和牛磺酸的回收率分别为 49% 和 49% (表 1)。

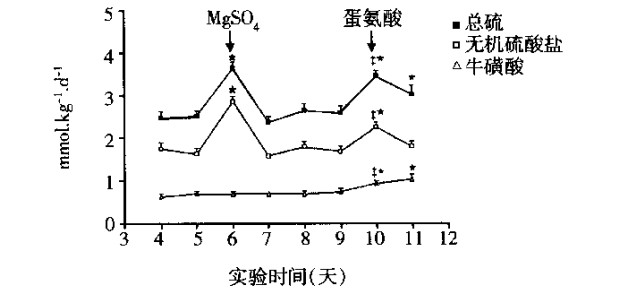


图 1 实验期间尿总硫、无机硫酸盐和牛磺酸的排出量 ( $\bar{x} \pm s_x$ ) \* 与基础排出量(第 4、5、8、9 天)有显著性差异 ( $F = 11.32 \sim 71.89, q = 4.01 \sim 23.17, P < 0.05$ );† 与蛋氨酸注射后的第 1 天(第 11 天)有显著性差异 ( $F = 11.33 \sim 71.89, q = 4.13 \sim 7.61, P < 0.05$ )。

四、血清含硫氨基酸含量变化

蛋氨酸给药后 24 小时和 48 小时的血清蛋氨酸、同型半胱氨酸、半胱氨酸、及牛磺酸的浓度和给药前无显著性差异(表 2)。

讨 论

含硫氨基酸代谢是目前国际上氨基酸代谢研究的焦点之一<sup>[10]</sup>,其中蛋氨酸是机体八种必需氨基酸之一,半胱氨酸是机体合成谷胱甘肽的最重要的前体,而谷胱甘肽是机体内最重要的内源性抗氧化物,对保护机体重要的生理功能起着重要的作用;同型半胱氨酸升高是动脉粥样硬化的重要致病因素,是目前国际上心血管疾病病因学研究的热点。此外静脉营养制剂中氨基酸的配方中的半胱氨酸、牛磺酸含量都有待改进。基于以上原因,建立一个和人类代谢接近的大动物模型来进一步研究含硫氨基酸代谢对于营养代谢研究以及其它相关领域的研究都具有重要的意义。

表 1 蛋氨酸注射后 24、48 小时内尿硫额外排出量和回收率 <sup>†</sup> ( $\bar{x} \pm s_x$ )						
	额外排出量 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$			蛋氨酸的尿硫加收率 %		
	无机硫酸盐	牛磺酸	总硫	无机硫酸盐	牛磺酸	总硫
24h	524 ± 43	218 ± 46	842 ± 88	43.6 ± 3.6	18.0 ± 3.8	70.1 ± 7.3
48h	585 ± 48	567 ± 75	1269 ± 32	48.7 ± 4.0	48.8 ± 6.6 *	105.5 ± 2.9 *

† 蛋氨酸(Met)的注射剂量为 1200 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; \* 与 24h 有显著性差异 ( $t = 3.93 \sim 6.53, P < 0.05$ )

万方数据

表 2 蛋氨酸注射前、注射后 24、48 小时的血浆含硫氨基酸浓度 ( $\bar{x} \pm s_x$ ) (单位  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

	蛋氨酸	同型半胱氨酸	半胱氨酸	牛磺酸
0h	119 ± 14	19 ± 3	208 ± 32	137 ± 19
24h	112 ± 19	37 ± 6	197 ± 35	139 ± 22
48h	112 ± 13	39 ± 8	214 ± 39	140 ± 19

小猪是模拟人,特别是新生儿氨基酸代谢的最重要的动物模型之一<sup>[6]</sup>,本模型被广泛应用于肠内外营养的研究。然而小猪对含硫氨基酸的代谢还存在较大的空白。本研究成功建立了含硫氨基酸代谢的小猪动物模型,并探讨了蛋氨酸这种必需氨基酸在小猪体内的代谢情况。本研究还首次在大动物上评价并验证了尿硫测定这一简单、无创、无需同位素标记的测定全身含硫氨基酸分解代谢的方法。

在本研究中,我们首先用静脉注射的硫酸镁模拟内源性含硫代谢产物并观察其排出的情况。实验结果表明无机硫酸盐在 24 小时内完全从尿中排出体外,本结果与文献报告相符<sup>[4]</sup>,它验证了实验中的尿总硫和无机硫酸盐的检测方法精确可靠,并检验了本模型的稳定性。在随后的蛋氨酸代谢实验中,在有充足营养供给的情况下,和硫酸镁相同剂量的外源性的蛋氨酸在 48 小时内完全分解并从尿中排出,其中一半以无机硫酸盐的形式排出,另一半以牛磺酸的形式排出。蛋氨酸注射后 24 小时,血清中的蛋氨酸、半胱氨酸、同型半胱氨酸,以及牛磺酸的浓度已经恢复到注射前的水平,这提示蛋氨酸的分解代谢在第一个 24 小时已经完成,其分解代谢产物中的无机硫酸盐几乎完全在第一个 24 小时排出,而牛磺酸因为存在细胞内外的交换,特别是在肌细胞内外的交换,而肌肉内的牛磺酸代谢池代谢较慢<sup>[5]</sup>,因此牛磺酸主要在第二个 24 小时排出。

氨基酸在机体内的合成和分解代谢主要发生在进食状态下,目前测定进食状态下氨基酸分解代谢主要依靠稳定同位素标记的氨基酸氧化法,通过测定有同位素标记的一种必需氨基酸的氧化来直接反映标记氨基酸的分解代谢情况,同时间接反映全身氨基酸的分解代谢情况。该方法需要测定标记同位素的丰度和二氧化碳的产生量,需要多次抽取血样标本,以上情况决定了该方法操作复杂,费用昂贵,有一定的创伤。另外这种方法在正常进食的非稳定状态下测定氨基酸分解代谢在准确性和精确度方面存在缺陷<sup>[7,8]</sup>。因此应用一种简单而精确的方法测定进食状态下的氨基酸分解代谢将有助于我们更好地研究机体内氨基酸及蛋白质的代谢。本研究结果提示尿硫测定可以精确反映含硫氨基酸的分解代谢,而蛋氨酸作为一种必需氨基酸,其分解代谢的情况在一定程度上可以反映机体内氨基酸总体的分解代谢情况。本实验为应用尿硫含量测定蛋氨酸分解代谢这一方法应用于全身氨基酸分解代谢提供了可行性依据。

氨基酸的需要量测定一直是营养代谢研究的一个

重要课题。本课题中我们验证了用简单的尿硫测定可以精确反映蛋氨酸的分解代谢,这也为简单无创的用硫作为一种标记物测定蛋氨酸这种必需氨基酸的分解代谢的方法应用于机体氨基酸需要量的测定提供了可行性。这一简单、易行、无创,而且无需同位素标记的方法很可能可以替代复杂而昂贵的标记氨基酸氧化法用于人体氨基酸需要量的测定。

参 考 文 献

1 Hamadeh MJ ,Hoffer LJ. Tracer methods underestimate short - term variations in urea production in humans. *Am J Physiol* ,1998 ,274 :E547 - E553.

2 Zello GA ,Wykes LJ ,Ball RO ,et al. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. *J Nutr* ,1995 ,125 :2907 - 2915.

3 Hoffer LJ. Evaluation of the adaptation to protein restriction in humans. In :El - Khoury AE ,eds. *Methods for the investigation of amino acid and protein metabolism*. Boca Raton :CRC Press ,1999 :83 - 102.

4 Bauer JH. Oral administration of radioactive sulfate to measure extracellular fluid space in man. *J Appl Physiol* ,1976 ,40 :648 - 650.

5 Sturman JA ,Hepner GW ,Hofmann AF ,et al. Metabolism of [ 35s ]taurine in man. *J Nutr* ,1975 ,105 :1206 - 1214.

6 Wykes LJ ,Ball RO ,Pencharz PB. Development and validation of a total parenteral nutrition model in the neonatal piglet. *J Nutr* ,1993 ,123 :1248 - 1259.

7 Lundquist P ,Martensson J ,Sorbo B ,et al. Turbidimetry of inorganic sulfate , ester sulfate , and total sulfur in urine. *Clin Chem* ,1980 ,26 :1178 - 1181.

8 Robitaille L ,Hoffer LJ. Measurement of branched chain amino acids in blood plasma by high - performance liquid chromatography. *Can J Physiol Pharmacol* ,1988 ,66 :613 - 617.

9 Hum S ,Robitaille L ,Hoffer LJ. Plasma glutathione turnover in the rat : effect of fasting and luthionine sulfoximine. *Can J Physiol Pharmacol* ,1991 ,69 :581 - 587.

10 Stipanuk MH. Homocysteine , cysteine , and taurine. In :Shils ME ,Olson JA ,Shike M ,et al ,eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore : Williams & Wilkins ,1999 :543 - 558.

【编者按】 临床营养与一切手术科室的围手术期处理密切相关,微创外科也不例外。本文特请南京军区总医院解放军普通外科研究所黎介寿院士审阅,认为从尿中测定硫的排出量来观察无机硫酸盐以及蛋氨酸的分解代谢是一无创的方法,较之目前常用的核素标记法简单。但实验方法的设计是在有充分营养支持下的小猪模型上进行的,机体的蛋白质和谷胱甘肽的合成处于饱和状态,亦即体内的氨基酸的合成和分解处于平衡状态,输入的蛋氨酸代谢后形成的硫完全排出。在临床应用常需考虑测定的是在合成和分解不平衡的情况,是否适用于临床有待进一步研究。但本方法作为一种测试方法可以介绍给读者。特此刊登此文。

( 收稿日期 2003 - 05 - 26 )  
( 修回日期 2003 - 07 - 15 )