

缬氨酸对肝昏迷兔血浆支链 α -酮酸的影响

吴锡铭 缪鹤章 周晴 (杭州市第六医院临床药理室, 杭州 310014)

摘要 报告了用气相色谱法测定血浆支链酮酸(Branched-Chain Keto Acids, BCKA'S)浓度, 以及静脉输注高浓度L-缬氨酸(L-valine, val)治疗半乳糖胺引起兔肝昏迷(Hepatic Coma, HC)的结果。

HC兔血浆BCKA'S明显低于正常组水平, 相对应的支链氨基酸(Branched-Chain Amino acids, BCAA'S)及其它氨基酸多数增高, 芳香族氨基酸(Aromatic Amino Acids, AAA'S)大幅度升高, 用5% val静脉输注48h, 血浆BCKA'S提高约3倍, BCAA'S改变不大, AAA'S下降37%; 血浆BCKA'S/BCAA'S、BCAA'S/AAA'S比值也明显增高。提示, 高浓度val能纠正HC血浆BCKA'S及主要氨基酸紊乱。

关键词 L-缬氨酸 支链 α -酮酸 肝性昏迷 半乳糖胺

L-缬氨酸(L-valine, val)为生糖支链氨基酸(Branched-Chain Amino Acids, BCAA'S), 近年临床用于治疗肝昏迷(Hepatic Coma, HC), 能使脑色氨酸和氨含量降低, 改善昏迷症状, 促进清醒, 比联用三个BCAA'S明显^[1,2]。但其机理尚未阐明, 本文采用气相色谱法对血浆支链酮酸(Branched-Chain Keto Acids, BCKA'S)及主要氨基酸进行了分析, 并对val改善HC的机理作初步探讨。

材料与方 法

试剂: α -酮异戊酸钠(α -Keto-Isovaleric acid, sodium; KIVA)、 α -酮异己酸钠(α -keto-isocaproic acid, sodium; KICA)、 α -酮- β -甲基正戊酸钠(α -keto- β -methyl-n-valeric acid, sodium; KMVA)、 α -酮戊酸钠(α -keto-valeric acid, sodium; KVA)均为Sigma产品; 双-(三甲基硅烷)-三氟乙酰氨(BSTFA)、三氟醋酸酐为Merck产品; 邻苯二胺AR试剂; 半乳糖胺(Galactosamine, GalN)由本室制备; L-缬氨酸购自上海康达氨基酸厂。

动物: 新西兰 δ 兔, 体重1.7—2.5 kg, 在实验前禁食12h, 自由饮水。

实验分组 正常对照组, 只iv生理盐水。肝昏迷组, 自兔耳部iv 10% GalN 1.0 g/kg。昏迷

组分为两组: 治疗组, 于GalN中毒后iv gtt 5% val注射液100 mg/kg·h, 2h后改为50 mg/kg·h, 共治疗2d。对照组, 同上法给等量生理盐水。各组动物分别于中毒前及中毒后12、24、36、48h, 从股动脉取血, 每次6ml立即离心(5000 r/min, 20min), 分取1/2血浆作肝功能、蛋白质及氨基酸(AA)分析, 剩余血浆-30°C保存, 待测BCKA'S。

AA和BCKA'S的气相色谱(GC)分析

1 GC条件 色谱柱: 3mm(id)x1.5m螺旋型玻璃柱, 内装2% OV₁₀₁涂布于100—200目的Chromosorb W AW DMCS担体上; 检测器: 氢火焰离子化检测器; 流速: 载气(氮气)40 ml/min、氢气30 ml/min、空气300 ml/min; 温度: 柱温110°C 5min, 程序升温5°C/min至250°C, 10min后降温, 注射室温度280°C, 检测器温度300°C; 进样: 3 μ l。

2 AA的含量测定 按照文献方法^[3-5]制备AA三氟乙酰丁酯衍生物, 并进行血浆AA的分离测定。

3 BCKA'S的含量测定 取正常兔血浆分别配制成0、15、40、75、110、150 nmol/m KIVA, KICA, KMVA的系列标准液, 各加入内标KVA 40 nmol, 用盐酸(2 mol/l)酸化后加入邻苯二胺(0.046 mol/l), 70°C反应1h, 加硫酸铵至饱和, 用氯仿提取, 减压蒸干。残物加无水吡

旋溶解, 加 BSTFA 50 μ l 密封, 80°C 油浴中反应 30 min, 反应液为 BCKA'S 的邻三甲硅恶酚 (o-trimethylsilylquinoxalins, OTMSQ'S) 衍生物, 即可进行 GC 分离并定量。

统计方法 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作 t 检验。

结 果

1 血浆 BCKA'S 的定量

BCKA'S 在上述色谱条件下, 其 OTMSQ'S 衍生物稳定, 无论标准品或血浆样品, 均获得分离良好的色谱图 (见图 1)。所分离的 BCKA'S 以 KVA 为内标的色谱峰高与进样量间有良好的线性相关 (见图 2)。从兔血浆中 KIVA、KMVA、KICA 的百分回收率为 $86.52 \pm 2.5\%$ ($n = 7$)、 $92.40 \pm 4.6\%$ ($n = 6$)、 $90.75 \pm 6.2\%$ ($n = 6$)、一日内变异系数 (CV%) 分别为 1.6% ($n = 5$)、1.3% ($n = 5$)、1.5% ($n = 5$)、日间 CV% 5.7% ($n = 5$)、4.2% ($n = 5$)、5.2% ($n = 5$)。

2 HC 兔血浆 BCKA'S 及主要 AA 的分析

HC 对照组 GalN 中毒后 12、24、36、48 h 血浆经 GC 测定 BCKA'S 及主要 AA 含量, 结果如表 1。

表 1 可见, 兔 GalN 中毒 24 h 后, 血浆 BCKA'S 明显降低, 而血浆主要 AA 则显著增高, 与正常对照组比较, 均有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中 48 h 后 BCKA'S 降低的幅度最大, 这与兔在中毒 48 h 后出现严重的昏睡、对外界刺激反应迟钝或呈激惹状态, 后肢瘫痪、抽搐等症状基本一致。

表 1 HC 兔血浆支链酮酸及主要氨基酸浓度 (nmol/ml)

	正常组 (n=11)	GalN 中毒后时间 (h)			
		12 (n=11)	24 (n=11)	36 (n=9)	48 (n=8)
Ala	405 \pm 32	608 \pm 69*	1731 \pm 210**	3050 \pm 209**	3850 \pm 440**
Val	215 \pm 17	243 \pm 12	286 \pm 15	395 \pm 19*	469 \pm 46**
Ile	132 \pm 11	139 \pm 11	162 \pm 14	220 \pm 17*	226 \pm 23*
Leu	198 \pm 19	210 \pm 23	325 \pm 27*	416 \pm 33**	449 \pm 52**
Tyr	69 \pm 8	100 \pm 21	391 \pm 25**	800 \pm 72**	988 \pm 81**
Phe	89 \pm 7	96 \pm 12	114 \pm 16	212 \pm 16**	230 \pm 37**
Orn	70 \pm 4	108 \pm 7	132 \pm 13*	155 \pm 8**	139 \pm 14**
KIVA	12 \pm 2	12 \pm 2	8 \pm 2	6 \pm 1*	2 \pm 0.4**
KMVA	23 \pm 5	22 \pm 4	12 \pm 2	6 \pm 2**	4 \pm 1**
KICA	36 \pm 8	34 \pm 7	18 \pm 5*	15 \pm 3**	12 \pm 2**

显著性差异与正常组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

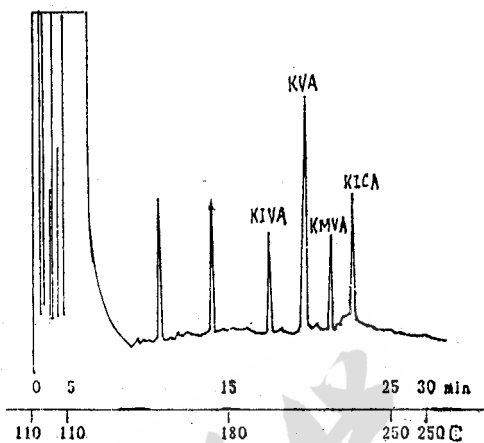


图 1 血清 α -支链酮酸邻三甲硅嗪 D 恶酚衍生物的气相色谱分析

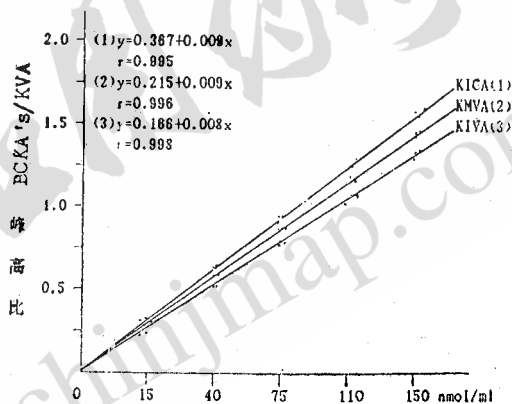


图 2 KVA 为内标的色谱峰高与进样量间的线性相关

3 val对HC兔血浆BCKA'S和BCAA'S含量的影响

治疗组血浆BCKA'S和BCAA'S按上述不同间隔时间经GC测定,结果如表2。

实验表明,治疗组在GalN中毒后24、36、48h后,血浆BCKA'S明显增高,与对照组比较,有

显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。相对应的血浆BCAA'S变化不大,芳香族氨基酸(AAA'S)则大幅度下降。因此经val治疗后的血浆BCAA'S/AAA'S及BCKA'S/BCAA'S比值与对照组治疗前后比较,均明显提高,上述HC症状也明显减轻,见图3。

表2 缬氨酸对HC兔血浆支链酮酸及主要氨基酸影响

	正常组 (n=11)	输注5%Val治疗组血浓度(nmol/ml)			
		12 (n=11)	24 (n=11)	36 (n=10)	48 (n=9)
Ala	405 ± 32	598 ± 39	1075 ± 87**	1769 ± 165**	2642 ± 295**
Val	215 ± 17	228 ± 10	496 ± 21*	544 ± 32**	505 ± 29*
Ile	132 ± 11	129 ± 16	159 ± 7	251 ± 19*	279 ± 23**
Leu	198 ± 19	202 ± 24	268 ± 31	314 ± 28*	326 ± 33**
Tyr	69 ± 8	97 ± 8	235 ± 19**	326 ± 31**	368 ± 49**
Phe	89 ± 7	86 ± 6	115 ± 10	130 ± 11	136 ± 10*
Orn	70 ± 4	82 ± 5	94 ± 7	111 ± 10*	116 ± 15*
KIVA	12 ± 2	12 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	7 ± 1
KMVA	23 ± 5	19 ± 1	16 ± 2	13 ± 1	10 ± 1*
KICA	36 ± 8	33 ± 4	26 ± 2	21 ± 2*	19 ± 2*

显著性差异与正常组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

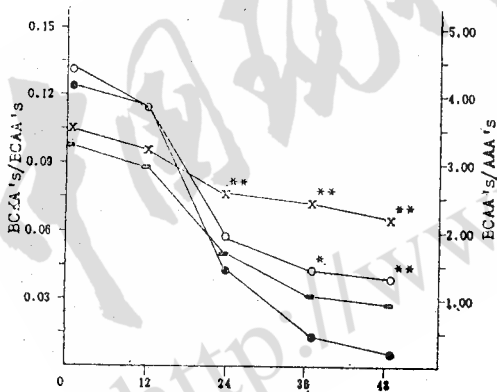


图3 Val对BCKA's/BCAA's及BCAA's/AAA's比值的影响

- 治疗组血浆BCKA's/BCAA's比值
- 对照组血浆BCKA's/BCAA's比值
- △—△ 治疗组血浆BCKA's/AAA's比值
- ◇—◇ 对照组血浆BCKA's/AAA's比值
- 对照组血浆BCAA's/AAA's比值

治疗前后比较显著性差异 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

4 对血浆鸟氨酸(Orn)和尿素(BUN)的影响

治疗组于GalN中毒后36、48h的血浆经GC测定Orn(nmol/ml)分别为111 ± 10, 116 ± 15, 对照组相应为155 ± 8, 189 ± 14, 两组间均有显著性

差异($P < 0.01$)。用Monarch生化分析仪测定血浆BUN(mg/dl)分别为13 ± 3, 12 ± 2, 对照组为35 ± 7, 46 ± 9, 两组间比较,也有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 对血浆蛋白、血糖等影响

应用蛋白电泳分析血浆蛋白及Monarch生化仪测定血糖、胆红素及ALT,结果如表3

表3可见,治疗组于GalN中毒48h后,血浆球蛋白、血糖、胆红素含量均降低,与对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。血浆白蛋白增高,A/G比值也有所提高,ALT无明显改变。

讨论

实验表明, val能提高HC血浆BCKA'S的水平,纠正血浆主要AA紊乱。据报告^[6,7], HC肝脏酮酸脱氢酶活性增高是导致血浆BCKA'S低水平,并使BCKA'S/BCAA'S比值下降的主要原因。由于BCAA'S和相对应的BCKA'S结构相似,有共同的酶催化系统,在体内是一个相互影响、平衡代谢的“池库”,过量的val能对“池库”中酶生化效应起调控作用^[8]。血浆BCKA'S升高提示对氨

表3 缬氨酸对HC兔血浆蛋白、血糖及胆红素等含量的影响

	对照组 (n=8)	治疗组 (n=10)	正常组 (n=11)	Pb
ALT IU/L	826.9±56.7	773.4±42	54.4±3.2	>0.05
GLU mg/dl	212.6±13.5	74.3±6.0	127.3±9.0	<0.01
BILIT mg/dl	5.3±0.2	1.2±0.1	0.7±0.04	<0.05
Tp g/dl	4.6±0.7	5.3±0.7	6.6±0.9	>0.05
ALB g/dl	0.7±0.04	3.5±0.3	4.8±0.8	<0.01
GLB g/dl	3.9±0.2	1.8±0.1	1.8±0.2	<0.05
A/G	0.18	1.94	2.67	

a) $\bar{x} \pm s$ GalN中毒48h后的兔血浆值

b) 治疗组与对照组比较显著性差异

有解毒作用^[9]。HC常伴有高血氨及负氮平衡，BCKA'S能与血氨结合后转变为必需AA，既抵消了高血氨症，又可弥补蛋白质的不足。一般认为^[10]，BCAA'S与AAA'S在细胞膜上有共同的转运载体，外源BCAA'S是通过竞争而减少AAA'S透过血脑屏障，从而改变血浆BCAA'S/AAA'S比值。因此，应用单一支链氨基酸-val有可能成为HC的一种有效的辅助疗法。

参 考 文 献

- 1 公开特许公报 昭.54—89014, 1979
- 2 G. Kleinberger, et al. Abstracts 1987, 3, 290
- 3 William M. Lamkin and Charles W. Gehrke. Quantitative gas chromatography of amino acids. Anal Chem, 1985, 37(3): 383
- 4 Charles W. Gehrke, Robert W. Zumwalt and Kenneth C. Kuo. Amino acid analysis Hydrolysis, Ion-exchange cleanup, derivatization, and quantitation by gas-liquid chromatography. J Chromatogr, 1974, 94, 113
- 5 U. Langenbeck, U. Wendel, Angelika Mench-Hoinowski et al. Correlations between branched-chain amino acids and branched-chain α -keto acids in maple

syrapurine disease. Clinica Chimica Acta, 1978, 88; 283

- 6 Munoz S and Walser M. Utilization of α -ketoisocaproate for synthesis of hepatic export proteins and peripheral proteins in normal and cirrhotic subjects. Gastroenterology, 1986, 90; 1834
- 7 Schauder P, Schroder K, Herbertz L, et al. Evidence for valine intolerance in patients with cirrhosis. Hepatology, 1984, 4; 667
- 8 Walajtys-Rode E, E. Coll K, and R. Williamson J. Effects of branched chain α -ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells, J Biol Chem 1979, 254; 11521
- 9 C. Maddrey W, M. D., L. Weber F, et al. Effects of ketoanalogues of essential amino acids in portal-systemic encephalopathy. Gastroenterology, 1976, 71; 190
- 10 Schauder P, Schroder K, Herbertz L et al. Oral administration of α -ketoisovaleric acid or valine in humans: Blood kinetics and biochemical effects. J Lab Clin Med, 1984, 103; 597

收稿日期: 1993-10-04

Wu Ximin, Miao Hezhang, Zhou Qing

(Department of Clinical Pharmacology, Hangzhou Sixth Hospital, Hangzhou 310014)

Abstract The paper reports the effects of L-valine on plasma levels of branched-chain α -keto acids and amino acids (BCKA'S and BCAA'S) following galactosamine-induced hepatic coma (HC) in rabbits. A method of high specificity using gas chromatography was developed for the determination of BCKA'S and BCAA'S in plasma.

The results showed that the plasma concentration of BCKA'S from rabbits with HC was significantly lower than that of the normal group. Many of the amino acids were grossly elevated.

In rabbits with HC, L-valine 100 mg/kg·h in the first 2h followed by 50 mg/kg·h, was infused continuously over 24h after a two-day period of adaptation to the treatment. Plasma concentration (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$) of KIVA, KMVA and KICA increased from 2.2 ± 0.8 to 7.3 ± 0.7 , 3.5 ± 0.9 to 9.5 ± 0.4 and 11.7 ± 2.0 to 18.7 ± 1.7 respectively. The plasma AAA'S was obviously reduced and the ratio of BCKA'S to BCAA'S and BCAA'S to AAA'S was evidently enhanced. It suggested that the deranged BCKA'S and main amino acids pattern can be corrected by infusion of high concentration L-valine in hepatic coma.

Key words L-valine Branched-chain α -keto acids Hepatic coma Galactosamine