

• 临床检验研究论著 •

肾移植患者移植后血清芳香族氨基酸的测定*

肖乐东¹, 郑 淋², 张 将², 唐爱国², 莫喜明^{2△}

(1. 邵阳市第一人民医院检验科,湖南邵阳 423000;2 中南大学湘雅二医院检验科,湖南长沙 410011)

摘要:目的 观察肾移植患者移植后血清中的色氨酸(Tyr)、酪氨酸(Trp)及苯丙氨酸(Phe)含量变化情况,并探讨其与肾功能损伤的关联。方法 用高效液相色谱-荧光法(HPLC-FD)测定肾移植患者和健康对照组血清 Tyr、Trp 和 Phe 含量,用自动生化分析仪测定血清肌酐、尿素氮、尿酸、胱抑素 C、 β_2 微球蛋白含量。分析氨基酸代谢与肾功能之间的关系。结果 肾移植后患者血清 Tyr、Trp 含量与健康对照组比较差异无统计学意义,分别为(63.93 ± 13.75) vs (58.13 ± 16.50) $\mu\text{mol/L}$ 和 (35.27 ± 7.82) vs (37.15 ± 9.37) $\mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$ 。Phe 含量高于健康对照组[(60.75 ± 13.55) vs (38.19 ± 10.85) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$],其中 CKD3 期患者 Phe 浓度明显高于 CKD1 与 CKD2 期患者($P < 0.01$)。经相关分析发现,Phe 浓度与胱抑素 C、 β_2 微球蛋白浓度存在相关性。结论 肾移植后患者体内存在芳香族氨基酸 AAA 代谢变化,这种变化与肾脏功能的状态密切相关。

关键词:色谱法,高压液相; 氨基酸类; 肾移植**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.003**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)02-0134-03

Determination of aromatic amino acids in serum of patients with post renal transplantation*

Xiao Ledong¹, Zheng Lin², Zhang Jiang², Tang Aiguo², Mo Ximing^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Shaoyang, Shaoyang, Hunan 422000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: Objective To observe serum tryptophan (Tyr), tyrosine (Trp) and phenylalanine (Phe) concentration change in post-renal transplantation patients, and explore the correlation of aromatic amino acid metabolic change with renal function. **Methods**

Kidney transplant patients and healthy people serum Tyr, Trp and Phe content were determined by high performance liquid chromatography-fluorescence spectrometry (HPLC-FD), and automatic biochemical analyzer was used to detected creatinine, urea nitrogen, uric acid, cystatin C and β_2 -microglobulin content. The relationship between aromatic amino acid metabolism and renal function were analyzed. **Results** Compared with the healthy control group, the concentrations of serum Tyr and Trp in post-renal plantation patients had no significant difference [(63.93 ± 13.75) vs (58.13 ± 16.50) $\mu\text{mol/L}$; (35.27 ± 7.82) vs (37.15 ± 9.37) $\mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$]. The concentration of serum Phe significantly increased than the healthy control group [(60.75 ± 13.55) vs (38.19 ± 10.85) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$], which CKD3 period, patients Phe concentration was significantly higher than CKD1 and CKD2 period patients ($P < 0.01$). The correlation analysis showed that Phe concentrations correlated with cystatin C and β_2 -microglobulin concentration. **Conclusion** Aromatic amino acid(AAA) metabolic change can be observed in post-renal transplantation patients, which is closely related to the state of renal function.

Key words:chromatography, high pressure liquid; amino acids; kidney transplantation

芳香族氨基酸(AAA)是指含有芳香环侧链的氨基酸,包括苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Trp)和色氨酸(Trp)3种。Trp 是人体内一种必需氨基酸,参与人体蛋白质合成和代谢调节^[1]。苯丙氨酸(Phe)是具有生理活性的氨基酸,亦是人体的必需氨基酸之一。正常情况下,Phe 主要代谢途径是经苯丙氨酸羟化酶(PAH)羟化作用生成 Tyr。PAH 是一种单加氧酶,主要存在于肝脏及肾脏,催化的反应不可逆,所以 Tyr 不可能转化为 Phe。故 Tyr 是一种非必需氨基酸,来源器官主要是肝脏和肾脏^[2]。大量研究表明,人体内 AAA 浓度变化与肾功能有着密切的关系^[3-6]。肾移植后患者体内的肾脏滤过和重吸收功能基本得到恢复,但其对 AAA 的代谢功能是否恢复尚不明了。本研究通过同时测定肾移植患者移植后血清中 AAA 的含量及肌酐(Cr)、尿酸(UA)、尿素氮(Bun)、胱抑素 C(CysC)、 β_2 微球

蛋白(BMG)等多种肾功能指标,初步探讨了肾移植后患者血清 Trp、Tyr 和 Phe 含量变化情况及其与肾功能状态的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于湘雅二医院行肾移植后的患者共 100 例,其中男 71 例,女 29 例,年龄 19~63 岁,平均 38.22 岁。移植时间 6 月至 7 年,平均 4.2 年。体检健康成人 20 例(X 线、B 超、心电图、血常规、血生化、内外科检查等均正常),男 14 例,女 6 例,年龄 20~65 岁,平均 38.85 岁,作为健康对照组。纳入对象于上午 8:00~10:00 抽取空腹静脉血 5 mL 于促凝管内,2650×g 离心 5 min 分离血清待检。

1.2 Tyr、Trp 和 Phe 的定量测定 AAA 氨基酸的测定采用本室建立的高效液相色谱程序波长荧光法进行检测^[7]。色谱

* 基金项目:湖南省科技计划项目(2010SK3205)。 作者简介:肖乐东,男,主任检验师,主要从事高效液相色谱临床检验应用研究。

△ 通讯作者,E-mail:moximing@yahoo.com.cn。

条件:色谱柱为 Megres C18(4.6 mm×250 mm, 内径 5 μm), 流动相为乙腈水溶液(乙腈和水的体积比为 1:9), 流速为 1.0 mL/min。荧光检测器激发波长和发射波长:0.0~4.5 min 分别为 228 nm 和 306 nm; 4.5~8.0 min 为 210 nm 和 300 nm; 8 min 后调至 285 nm 和 353 nm, 每次进样量 20 μL。

1.3 Cr、Bun、UA、Cys C、BMG 测定 利用雅培 C-8000 全自动生化分析仪进行测定, 其中 Cr、Bun、UA 采用酶法检测, Cys C、BMG 采用透射免疫比浊法进行检测。

1.4 统计学处理 用 SPSS 19.0 软件进行分析, 均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布资料的组间比较用两独立样本的 t 检验, 非正

态分布资料的组间比较用 Mann-Whitney 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾移植后患者与健康成人肾功能指标 肾移植后患者按血清 Cr 值分为肾功能正常组(A 组, Cr < 133 μmol/L, 38 例)、肾功能代偿组(B 组, Cr < 177 μmol/L, 40 例)和肾功能失代偿组(C 组, Cr < 450 μmol/L, 22 例)。肾移植后患者与健康对照血清 Cr、Bun、UA、Cys C、BMG 水平见表 1。随着血清 Cr 水平的上升, 其他反映肾脏滤过和重吸收功能的指标也明显升高。

表 1 肾移植后患者与健康成人肾功能 5 项结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cr(μmol/L)	Bun(mmol/L)	UA(μmol/L)	CysC(mg/L)	BMG(mg/L)
健康对照组	20	65.7 ± 18.9	4.37 ± 1.08	300.7 ± 71.1	0.96 ± 0.18	2.45 ± 0.71
A 组	38	105.6 ± 14.3	5.35 ± 1.10	298.4 ± 53.1	1.65 ± 0.27	2.66 ± 0.84
B 组	40	158.9 ± 12.1	9.21 ± 2.08	406.6 ± 71.5	2.51 ± 0.39	3.95 ± 1.11
C 组	22	242.7 ± 28.9	14.39 ± 5.23	412.5 ± 98.6	3.64 ± 0.95	7.50 ± 3.85

2.2 健康成人与肾移植后患者血清 Tyr、Phe 和 Trp 含量 20 例健康成人和 100 例肾移植后患者血清 Tyr、Phe 和 Trp 浓度, 见表 2。与健康人比较, 肾移植患者血清 Tyr、Trp 含量无明显减少, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 Phe 含量明显升高, 差异有统计学意义($t = 5.260, P < 0.01$)。

表 2 肾移植患者与健康人血清 Tyr、Trp 和 Phe 的含量($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	n	Tyr	Trp	Phe
健康对照组	20	58.13 ± 16.50	37.15 ± 9.37	62.19 ± 10.85
肾移植组	100	63.93 ± 13.75	35.27 ± 7.82	98.25 ± 21.63*

*: $P < 0.01$, 与健康对照组比较。

2.3 肾移植患者不同亚组间血清 Tyr、Phe 和 Trp 含量的比较 依据移植后患者的肾功能状态, 肾移植患者被分成了 A、B、C 3 组。对这 3 组患者血清中 Tyr、Phe 和 Trp 含量进行比较, 见表 3。肾功能正常组与肾功能代偿组相比, Tyr、Trp 和 Phe 浓度无明显差异($P > 0.05$), 肾功能失代偿组与肾功能正常组、肾功能代偿组相比, Tyr、Trp 浓度无明显差异($P > 0.05$), 但 Phe 浓度显著升高($P < 0.01$)。

表 3 肾移植后患者不同分期之间血清 Tyr、Phe 和 Trp 含量($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	n	Tyr	Trp	Phe
A 组	38	64.17 ± 14.85	36.66 ± 7.11	82.90 ± 18.32*
B 组	40	65.46 ± 13.55	33.11 ± 9.09	89.25 ± 21.45*
C 组	22	62.15 ± 12.84	36.03 ± 7.26	123.30 ± 24.90

*: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

2.4 肾移植后患者血清 Tyr、Phe 和 Trp 含量与其他肾功能生化指标的相关性分析 对 100 例肾移植后患者血清 Tyr、Phe 和 Trp 含量与血清中其他反映肾脏功能的指标(Cr、Bun、UA、Cys C、BMG)进行相关性分析, 结果表明: Phe 与 Cr、Bun、Cys C、BMG 有相关性(r 分别为 0.507、0.531、0.459、0.547, 均

$P = 0.000$), Trp 与 UA、BMG 有一定的相关性, 见表 4。

表 4 肾移植后患者血清 Tyr、Phe 及 Trp 与肾功能生化指标的相关性

项目	Tyr		Phe		Trp	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
Cr	-0.054	0.595	0.507	0.000	-0.116	0.250
Bun	-0.009	0.925	0.531	0.000	-0.164	0.073
UA	0.057	0.534	0.183	0.046	-0.181	0.048
CysC	-0.051	0.611	0.459	0.000	-0.175	0.082
BMG	0.044	0.665	0.547	0.000	-0.201	0.045

3 讨 论

肾脏在人体中起到排泄、生物合成和新陈代谢的重要作用, 其功能受损将影响人体正常的生理功能。AAA 作为一类含特殊结构的氨基酸, 其参与体内许多的正常生理代谢与物质合成^[8]。现有研究证实肾脏是 Phe 向 Tyr 转化的一个重要器官^[9]。健康人由于其 PAH 活性正常, 体内的 Phe 向 Tyr 转化, Phe 和 Tyr 含量均维持在正常水平。同时, 肾脏产生色氨酸双加氧酶和吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO), 影响 Trp 的代谢^[10]。在肾功能衰竭时, AAA 的代谢会发生改变。在临床中, 成年肾功能衰竭的患者, 可通过移植一个肾脏来基本满足对人体排泄有毒物质的需要, 但能否纠正物质代谢的紊乱和肾脏分泌的各种酶或激素, 尚不清楚。肾移植患者极易发生排斥反应^[11], 虽然可以通过使用免疫抑制剂来抑制排斥反应的发生, 但只能降低排斥反应发生的概率, 而不能全部避免。所以, 患者仍可能面临着各种排斥反应, 移植肾的功能将受到不同程度的损伤。

研究结果显示, 在肾移植后的患者中, 虽然移植后 A 组患者肾功能以 Cr 的参考值为标准认为在正常范围, 但与同龄的对照组比较, 仍明显升高($t = 8.985, P = 0.000$)。同时, 反映肾脏滤过功能较敏感的指标 Cys C 在肾移植后的各组患者中都是升高的($P = 0.000$)。这说明进行过肾移植(下转第 139 页)

思路。

参考文献

- [1] Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, 30(3): 211-219.
- [2] Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, et al. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 32(10): 1750-1754.
- [3] Jansen H, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ. Hepatic lipase: a pro- or antiatherogenic protein[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(9): 1352-1362.
- [4] Guerra R, Wang J, Grundy SM, et al. A hepatic lipase(LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 100(9): 4532-4537.
- [5] Couture P, Otvos JD, Cupples LA, et al. Association of the C-514T polymorphism in the hepatic lipase gene with variations in lipoprotein subclass profiles: the Framingham offspring study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 26(3): 815-822.
- [6] Murtom S, Tahvanainen E, Antikainen M. Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels: Results from Finnish EARS participants[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 34(10): 1879-1884.
- [7] Andersen RV, Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, et al. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: the Copenhagen city heart study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 46(11): 1972-1982.
- [8] Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al. Polymorphisms asso-

(上接第 135 页)

的患者中,移植肾的慢性损伤过程是普遍而持续存在的,只是程度的不同。

同时实验结果显示:进行过肾移植的患者 Tyr、Trp 水平与健康对照组人群的差异无统计学意义,而 Phe 水平明显升高,且随着肾功能变化,肾功能受损严重时,Phe 明显升高。相关分析结果表明,血清 Phe 浓度与 Cr、Bun、Cysc、BMG 具有相关性。可能一方面是因为随着肾单位的逐渐破坏,残存的肾单位越来越少,生成的 PAH、IDO 酶活性明显减弱,Phe 由于转化受阻而水平升高^[12]。另一方面,随着肾脏滤过功能的受损,肾脏对体内有害物质的排泄作用下降,而过高的 Phe 在体内是一种神经毒性物质。Tyr 作为一种非必须氨基酸,其可通过饮食、蛋白质降解以及 Phe 转化等途径保持其在体内的代谢平衡。

综上所述,肾功能状态与 AAA 的代谢密切相关,肾移植后患者体内出现的 AAA 代谢变化可能对其疾病的进展与愈后有密切的联系,有待更深入地研究来阐明。

参考文献

- [1] 肾髓,杜燕娥,曾乾娜,等.慢性乙型肝炎患者色氨酸和犬尿氨酸的检测及意义[J].重庆医学,2011,40(3):248-249.
- [2] Moller N, Meek S, Bigelow M, et al. The kidney is an important site for in vivo phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney[J]. *PNAS*, 2008, 102(3): 1242-1246.
- [3] Kopple JD. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kid-

ney failure[J]. *J Nutri*, 2007, 137(Suppl 1): S1586-1590.

- [4] Yves B, Robert A, Maureen B, et al. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency[J]. *ASN*, 2008, 66(5): 591-596.
- [5] Pawlak D, Tankiewicz A, Mysliwiec P, et al. Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in experimental chronic renal failure[J]. *Nephron*, 2002, 90: 328-335.
- [6] Saito A, Niwa T, Maeda K, et al. Tryptophan and indolic tryptophan metabolites in chronic renal failure[J]. *Clin Nutr*, 2008, 33(13): 1402-1406.
- [7] Li Y, Tang AG, Mu S. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: Application in chronic kidney disease patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(10): 1032-1035.
- [8] Pencharz PB, Hsu JW, Ball RO. Aromatic amino acid requirements in healthy human subjects[J]. *J Nutr*, 2007, 137(Suppl 1): S1576-1578.
- [9] Nair KS. Amino acid and protein metabolism in chronic renal failure[J]. *J Ren Nutr*, 2005, 15(1): 28-33.
- [10] 李剑欣,张绪梅,徐琪寿.色氨酸的生理生化作用及其应用[J].氨基酸和生物资源,2005,27(1):58-62.
- [11] 杨俊伟,黎磊石.移植肾的慢性排异反应[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2008,10(5):423-428.
- [12] Sun J, Shannon M, Ando Y, et al. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: a pilot study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 28(2): 107-113.

(收稿日期:2013-09-08)

(收稿日期:2013-09-08)

ney failure[J]. *J Nutri*, 2007, 137(Suppl 1): S1586-1590.

- [4] Yves B, Robert A, Maureen B, et al. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency[J]. *ASN*, 2008, 66(5): 591-596.
- [5] Pawlak D, Tankiewicz A, Mysliwiec P, et al. Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in experimental chronic renal failure[J]. *Nephron*, 2002, 90: 328-335.
- [6] Saito A, Niwa T, Maeda K, et al. Tryptophan and indolic tryptophan metabolites in chronic renal failure[J]. *Clin Nutr*, 2008, 33(13): 1402-1406.
- [7] Li Y, Tang AG, Mu S. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: Application in chronic kidney disease patients [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(10): 1032-1035.
- [8] Pencharz PB, Hsu JW, Ball RO. Aromatic amino acid requirements in healthy human subjects[J]. *J Nutr*, 2007, 137(Suppl 1): S1576-1578.
- [9] Nair KS. Amino acid and protein metabolism in chronic renal failure[J]. *J Ren Nutr*, 2005, 15(1): 28-33.
- [10] 李剑欣,张绪梅,徐琪寿.色氨酸的生理生化作用及其应用[J].氨基酸和生物资源,2005,27(1):58-62.
- [11] 杨俊伟,黎磊石.移植肾的慢性排异反应[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2008,10(5):423-428.
- [12] Sun J, Shannon M, Ando Y, et al. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: a pilot study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 28(2): 107-113.

(收稿日期:2013-08-18)