

# 不同病因的慢性肾病患者血清氨基酸谱存在显著差异

蔡 稀, 李 蓉, 曾 粒, 钟 玲\*

(重庆医科大学附属第二医院肾内科, 重庆 400010)

**摘要** 慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)患者血清氨基酸谱发生了显著性变化,但目前并无不同病因的CKD患者血清氨基酸谱的比较研究。本研究主要探究不同病因CKD患者血清氨基酸谱的差异,以及差异氨基酸与肾疾病发生发展的相互关系。选取79例确诊慢性肾病的成年患者,根据其病因,分糖尿病肾病组、高血压肾病组及慢性肾小球肾炎组。另选取25例性别年龄匹配的健康成年人作为正常对照组。收集及处理清晨空腹血清标本,采用反相高效液相色谱法(reverse-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定血清中22种游离氨基酸的水平。结果显示,与正常对照组相比,3组CKD患者血清赖氨酸、丝氨酸、甘氨酸、伽马氨基丁酸(GABA)、色氨酸、亮氨酸以及酪氨酸水平均显著下降( $P < 0.05$ ),而血氨水平显著升高( $P < 0.05$ )。糖尿病肾病组患者血清苏氨酸水平明显高于其余3组( $P < 0.05$ ),而血清天冬氨酸水平显著低于其余3组( $P < 0.05$ )。慢性肾小球肾炎患者血清异亮氨酸水平显著低于糖尿病肾病及高血压肾病患者( $P < 0.05$ )。上述结果证实,慢性肾病患者血清氨基酸谱较正常对照发生显著变化,且不同病因CKD患者部分血清氨基酸水平存在显著差异。其中,色氨酸水平的差异可能是不同病因CKD患者肾功能恶化速度不一致的原因之一。

**关键词** 慢性肾病; 血清; 氨基酸; 反相高效液相色谱法

**中图分类号** R692.5

## Significant Differences in Serum Amino Acid Profiles among Patients with Chronic Kidney Disease of Different Etiology

CAI Xi, LI Rong, ZENG Li, ZHONG Ling\*

(Department of Nephrology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract** The serum amino acid profiles in chronic kidney disease (CKD) patients changed significantly. However, there is no study regarding to the differences of the serum amino acid profiles in CKD patients of different etiology. This study mainly focuses on the differences of the serum amino acid profiles in CKD patients of different etiology and discusses the roles of different amino acids in the occurrence and development of diseases. A total of 79 adults with advanced CKD were segregated into three cohorts by etiology: diabetic nephropathy (DN,  $n = 20$ ), hypertensive nephropathy (HN,  $n = 26$ ), and chronic glomerulonephritis (CGN,  $n = 33$ ). Twenty-five gender-matched healthy adults were selected as healthy controls (HC,  $n = 25$ ). Early-morning fasting serum samples were collected, processed, and subjected to RP-HPLC. The results showed that all CKD patients of the three cohorts were characterized by a serum profile showing a decrease of lysine, serine, glycine, GABA, tryptophan, leucine, and tyrosine, and an increase of ammonia when compared to healthy controls ( $P < 0.05$ ). The

收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-05-14; 接受日期: 2018-05-21

国家临床重点专科和国家重大基础研究(973)(No. 2013CB967202)资助

\* 通讯作者 Tel: 023-63713366; E-mail: zhongling.zl@hotmail.com

Received: April 2, 2018; Revised: May 14, 2018; Accepted: May 21, 2018

Supported by National Key Clinical Specialty and National Basic Research Program (973) of China (No. 2013CB967202)

\* Corresponding author Tel: 023-63713366; E-mail: zhongling.zl@hotmail.com

DN patients were characterized by a serum profile of increased threonine and decreased aspartic acid levels as compared to the patients of HN and CGN groups and the healthy controls ( $P < 0.05$ ). The CGN cohort alone was characterized by a serum profile of decreased isoleucine when compared to the patients of DN and HN groups and the healthy controls ( $P < 0.05$ ). The present study clearly demonstrated that CKD patients with different etiology display significant differences in serum amino acids profiles, specifically some amino acids. The difference of tryptophan levels among CKD patients with different etiology may be one of the reasons for the different rates of renal function deterioration.

**Key words** chronic kidney disease; serum; amino acid; reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

氨基酸作为蛋白质的基本成分,可由食物蛋白质在体内经过消化与水解产生。氨基酸被吸收后,可再合成为人体所需的蛋白质,或分解代谢生成其他物质,从而参与人体的生长、发育、代谢和免疫调节等各种生理病理过程<sup>[1,2]</sup>。既往研究证明,氨基酸代谢受营养状态、肾功能、糖代谢等因素影响<sup>[2,3]</sup>。因此,当肾功能异常时,人体内氨基酸代谢会发生显著变化。已有研究报道,慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)患者血氨基酸水平较正常人发生显著变化<sup>[4-6]</sup>。且这些异常水平的氨基酸反过来在加重 CKD 病程进展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。大量研究证实,糖尿病肾病、高血压肾病及慢性肾小球肾炎是 CKD 患者的主要病因,然而上述疾病间病情进展、营养状态、糖代谢、脂代谢等存在显著差异<sup>[8,9]</sup>。综上所述,推测不同病因 CKD 患者之间氨基酸代谢存在显著差异,且此差异可能是肾功能恶化速度不一致的原因之一。目前未见关于不同病因 CKD 患者血清氨基酸代谢差异的系统性研究。本研究采用反相高效液相色谱法(reverse-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)比较糖尿病肾病、高血压肾病、慢性肾小球肾炎患者及正常对照的血清氨基酸谱差异,分析氨基酸与肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、血浆白蛋白等临床指标的相关性,初步探讨不同病因 CKD 患者氨基酸代谢差异与疾病发生发展的相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例选择

选取 2016 年 10 月至 2016 年 12 月期间,重庆医科大学附属第二医院肾内科临床确诊为中晚期慢性肾病患者 79 例,其中男性 48 人,女性 31 人。根据病因的不同分为 3 组,即糖尿病肾病组( $n = 20$ );高血压肾病组( $n = 26$ );慢性肾小球肾炎组( $n = 33$ )。并满足以下条件:年龄  $\geq 18$  岁,根据 KDOQI

(2012)临床实践指南定义为慢性肾病 4 ~ 5 期( $\text{eGFR} \leq 20 \text{ mL}/(\text{min } 1.73 \text{ m}^2)$ ),并出现与此相关的临床症状及代谢紊乱的患者。排除合并肝胆疾病、甲状腺疾病以及肾移植患者,排除近 3 月体重改变  $> 10\%$  的患者。同时选取性别年龄匹配的健康成年人,无肥胖、高血压或糖脂代谢紊乱等病史 25 例,作为正常对照组。所有患者禁食 12 h,留取清晨空腹血清标本,  $-80^\circ\text{C}$  保存待测。

该研究经重庆医科大学伦理委员会审核并批准。向参与者告知与解释本研究相关情况及其配合内容,并获其同意,均签署知情同意书。

### 1.2 材料

DABS-Cl、*N,N*-dimethylfromamine、盐酸、碳酸钠、磷酸钠、乙胺、氨基酸标准品均购于 Sigma 公司(美国);HPLC 级及衍生所需有机溶剂、超纯水均购于 Millipore 公司(美国);安捷伦 1260 型高效液相色谱仪(Agilent Technologies(德国), Milli-Q 超低有机物超纯水机(Millipore 公司(美国))。

### 1.3 反相高效液相色谱(RP-HPLC)

**1.3.1 标本处理及衍生化** 从  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中取出血清标本,于常温状态下( $37^\circ\text{C}$ )解冻 15 min。在 100  $\mu\text{L}$  血清标本中加入 90% 甲醇(含内标正亮氨酸, 250 nmol/mL)。混匀,冰浴 10 min,直至血清蛋白质完全沉淀。离心(15 000 g, 15 min),取其上清液置于加热真空浓缩器中,干燥。将残留物溶解于 100  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  (0.15 mol/L, pH 8.6)。在等量(20  $\mu\text{L}$ )氨基酸标准品或等量(20  $\mu\text{L}$ )脱蛋白质样本中加入 180  $\mu\text{L}$  缓冲液(乙腈/乙醇/流动相 A, 50/25/25, v/v/v),稀释,涡旋至充分混合,再加入 200  $\mu\text{L}$  DABS-Cl (12.4 mmol/L 溶于丙酮中),涡旋 15 min,随后冰浴 5 min,离心(15 000 g, 15 min),加入 400  $\mu\text{L}$  缓冲液,再次离心。静置,取其上清液,作为待测样品保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

**1.3.2 色谱条件** 色谱柱为 C18 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ),进样量 20  $\mu\text{L}$ ,柱温  $50^\circ\text{C}$ ,流速 1 mL/

min,数据采集频率 5 Hz,紫外线检测波长 436 nm,流动相 A:9 mmol/L 磷酸二氢钠,4% 二甲基甲酰胺 ( dimethylformamide, DMF ), 0.16% 三 乙 胺

Table 1 High performance liquid chromatography gradient

	Time ( min )									
	0	3.0	10.5	52.5	67.5	99	110	111	120	
Mobile phase A ( % )	20	20	80	65	50	0	0	20	20	
Mobile phase B ( % )	80	80	20	35	50	100	100	80	80	

Mobile phase A: 9 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4% DMF, and 0.16% TEA ( adjusted to pH 6.55 with phosphoric acid )  
Mobile phase B: 80% ( v/v ) CAN

1.4 临床数据的计算方法

肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 的估算采用 2009 年美国慢性肾病流行病学合作工作组 (chronic kidney disease epidemiology collaboration, CKD-EPI) 开发的基于血肌酐 CKD-EPI<sub>scr</sub> 方程<sup>[10,11]</sup>。使用肌氨酸氧化酶法测定肌酐水平<sup>[12]</sup>。采用直接过氧化物酶法测定低密度脂蛋白 ( low-density lipoprotein, LDL) 水平<sup>[13]</sup>。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 24.0 统计软件对所有实验数据进行处理与分析。由于样本量较小,故采用 Shapiro - Wilk 检验判断计量资料是否服从正态分布。若数据服从正态分布,则使用  $\bar{x} \pm s$  描述;若数据不服从正态数据分布,则采用 M ( Q1, Q3 ) 描述。多组间正态数据的差异比较采用 One-Way ANOVA,非正态数据的差异比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。方差齐,多重比较时采用 LSD 方法矫正 P 值;方差不齐,多重比较时使用 Tamhane ' s T2 的方法矫正 P 值。定性资料以百分率描述,多组间定性资料的比较采用卡方检验。使用斯皮尔曼相关分析评估差异氨基酸与其他临床指标的相关性。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料、治疗情况及检查指标

2.1.1 一般资料及治疗情况 本研究采用 Kruskal-Wallis 秩和检验或卡方检验分析比较了各组研究对象的一般资料及治疗情况,结果如 Table 2 所示。本研究共纳入 25 例对照及 79 例中晚期 CKD 患者 ( 男性 48 例,女性 31 例 ), 中晚期 CKD 患者包括糖尿病肾病患者 20 例、高血压肾病患者 26 例,以及慢性肾小球肾炎患者 33 例。慢性肾小球肾炎组患者平均年龄较糖尿病肾病患者及高血压肾病患者小 ( P < 0.05 )。间接提示,糖尿病肾病及高血

( triethylamine, TEA ), 滴加磷酸调节 pH 至 6.55。流动相 B: 含水乙腈 ( 80% ( v/v ) ), 充分混匀后用 0.22 μm 滤膜过滤。线性梯度洗脱,具体洗脱程序见 Table 1。

压肾病是由于继发多年的糖尿病和高血压而引起。4 组性别未见显著差异 ( P > 0.05 )。治疗方面,糖尿病肾病、高血压肾病及慢性肾小球肾炎患者间接受肾替代治疗情况未见显著差异。糖尿病肾病患者使用胰岛素及其他口服降糖药治疗。糖尿病肾病及高血压肾病患者使用血管紧张素转化酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂 ( ACEI/ARB )、β 受体阻滞剂以及钙通道阻断剂 ( calcium channel blockers, CCB ) 进行降压治疗。

2.1.2 检查指标 本研究采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 秩和检验,以及事后多重比较对各组研究对象的实验室检查指标进行差异显著性分析。结果如 Table 3 所示,糖尿病肾病患者、高血压肾病患者及慢性肾小球肾炎组患者 eGFR、血浆白蛋白及血钙水平显著低于正常对照组,但血肌酐、血尿素氮及血磷水平明显高于正常对照组 ( Table 3, P < 0.05 ), 且 3 组 CKD 患者间上述临床指标水平未见显著差异 ( Table 3, P > 0.05 )。此外,糖尿病肾病患者总胆固醇及低密度脂蛋白平均水平显著低于其他 3 组 ( Table 3, P < 0.05 )。此外,与正常对照相比,糖尿病肾病患者血糖水平显著升高,而高密度脂蛋白水平显著下降 ( Table 3, P < 0.05 )。糖尿病肾病患者及高血压肾病患者甘油三酯平均水平较正常对照组高 ( Table 3, P < 0.05 )。糖尿病肾病患者 PTH 平均水平明显低于高血压肾病患者及慢性肾小球肾炎组 ( Table 3, P < 0.05 )。

2.2 样本血清氨基酸的水平

2.2.1 血清样品中 24 种氨基酸的分离 采用反相高效液相柱前衍生法对血清样品进行分析,结果见 Fig. 1。

由 Fig. 1 可知,90 min 内各氨基酸达到基线分离,衍生试剂峰对血清标本中氨基酸的测定没有干扰。

**Table 2    The general, clinical characteristics and treatment of participants (M (Q1, Q3))**

	DN cohort (n = 20)	HN cohort (n = 26)	CGN cohort (n = 33)	HC cohort (n = 25)	<i>P</i> -value
Age (year)	63.5 (58.0, 78.5) <sup>ab</sup>	69 (66, 78) <sup>ab</sup>	46 (31, 69)	54 (48, 58)	0.000
Sex (M/F)	15/5	15/11	18/15	15/10	0.505
Dialysis, n (%)	20 (100%)	26 (100%)	28 (85%)	–	0.000
<b>Diabetic Rx</b>					
Insulin, n (%)	20 (100%)	1 (4%)	–	–	0.000
Acarbose, n (%)	7 (35%)	–	–	–	0.000
Repaglinide, n (%)	2 (10%)	1 (4%)	–	–	0.000
<b>Hypertensive Rx</b>					
ACEI/ARB, n (%)	8 (40%)	16 (62%)	–	–	0.000
β-blocker, n (%)	7 (35%)	7 (27%)	–	–	0.000
CCB, n (%)	15 (75%)	21 (81%)	–	–	0.000
Diuretic, n (%)	–	–	–	–	0.000

Comparisons performed via Kruskal-Wallis rank test followed by post-hoc testing or chi-square testing. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. HC cohort; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. CGN cohort; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. HN cohort.  
DN, diabetic nephropathy; HN, hypertensive nephropathy; CGN, chronic glomerulonephritis; HC, healthy control; Rx, prescription medication; ACEI, ACE inhibitor; ARB, angiotensin-renin blocker; CCB, calcium channel blocker

**Table 3    The levels of laboratory indicators of participants ( $\bar{x} \pm s$ ) or M(Q1, Q3)**

	DN cohort (n = 20)	HN cohort (n = 26)	CGN cohort (n = 33)	HC cohort (n = 25)	<i>P</i> -value
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	5.0 (3.9, 7.3) <sup>a</sup>	5.3 (4.5, 7.2) <sup>ab</sup>	4.0 (3.7, 6.3) <sup>a</sup>	110.5 (103.5, 124.8)	0.000
Creatinine(μmol/L)	788.9 ± 478.9 <sup>a</sup>	703.7 ± 324.9 <sup>ab</sup>	954.6 ± 484.4 <sup>a</sup>	51.7 ± 10.9	0.000
BUN(mmol/L)	21.5 ± 7.4 <sup>a</sup>	17.2 ± 11.8 <sup>a</sup>	22.1 ± 9.0 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.9	0.000
Glucose(mmol/L)	8.6 ± 4.3 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.5	5.6 ± 2.3	4.6 ± 0.5	0.000
Triglycerides (mmol/L)	1.6 (0.8, 2.0) <sup>a</sup>	1.3 (1.1, 2.4) <sup>a</sup>	1.21 (0.8, 1.6)	1.12 (0.9, 1.2)	0.017
Total cholesterol (mmol/L)	2.8 (2.7, 3.9) <sup>abc</sup>	3.9 (3.3, 4.3)	3.7 (3.6, 4.3)	4.1 (3.7, 4.3)	0.011
HDL(mmol/L)	0.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2	0.007
LDL (mmol/L)	1.3 (1.1, 1.8) <sup>abc</sup>	1.7 (1.4, 2.4)	2.0 (1.4, 2.6)	2.1 (2.0, 2.2)	0.000
Albumin (g/L)	36.9 (33.7, 39.7)	37.0 (35.2, 39.3) <sup>a</sup>	39.0 (35.3, 43.0) <sup>a</sup>	46.3 (44.4, 47.2)	0.000
PTH (pg/mL)	97.1 (47.3, 158.3) <sup>bc</sup>	278.5 (146.4, 456.6)	209.2 (71.1, 452.8)	–	0.000
Calcium(mmol/L)	2.1 (1.93, 2.24) <sup>a</sup>	2.2 (1.95, 2.40) <sup>a</sup>	2.1(2.02, 2.28) <sup>a</sup>	2.34 (2.31, 2.37)	0.000
Phosphate (mmol/L)	1.4 (1.1, 1.8) <sup>ab</sup>	1.6 (1.2, 2.0) <sup>a</sup>	1.7 (1.4, 2.2) <sup>a</sup>	1.1 (1.0, 1.3)	0.000

Comparisons performed via one-way ANOVA or Kruskal-Wallis rank test followed by post-hoc testing. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. HC cohort; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. CGN cohort; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. HN cohort.  
DN, diabetic nephropathy; HN, hypertensive nephropathy; CGN, chronic glomerulonephritis; HC, healthy control; eGFR, estimated glomerular filtration rate; BUN, blood urea nitrogen; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; PTH, parathyroid hormone

**2.2.2 研究对象血清氨基酸谱的差异** 本研究采用 Kruskal-Wallis 秩和检验、单因素方差分析(One-Way ANOVA)及事后多种比较对 4 组间血清赖氨酸、丝氨酸、甘氨酸、GABA、色氨酸、亮氨酸、酪氨酸、血氨、苏氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、鸟氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、甲硫氨酸及组氨酸水平进行差异显著性分析,结果见 Table 4。

由 Table 4 可知,3 组 CKD 患者血清赖氨酸、丝氨酸、甘氨酸、GABA、色氨酸、亮氨酸以及酪氨酸水平皆显著低于正常对照组 (*P* < 0.05),而血氨水平显著高于正常对照 (*P* < 0.05)。  
糖尿病肾病组患者血清苏氨酸水平高于其余 3 组 (*P* < 0.05),血清天冬氨酸水平显著低于其余 3 组 (*P* < 0.05)。此外,与正常对照组相比,血清脯氨酸水平升高 (*P* < 0.05),血清鸟氨酸水平下降 (*P* < 0.05)。

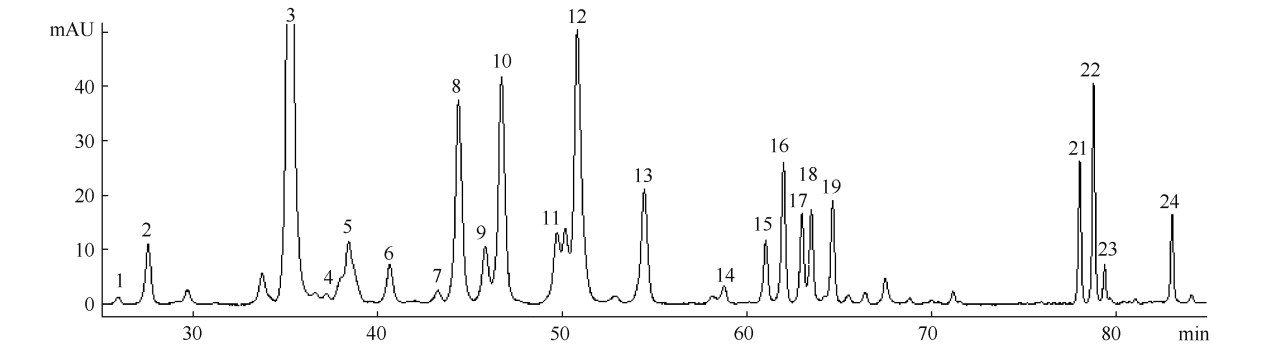


高血压肾病患者血清苏氨酸、异亮氨酸以及鸟氨酸水平显著高于慢性肾小球肾炎组( $P < 0.05$ )。

慢性肾小球肾炎患者血清异亮氨酸水平明显低于糖尿病肾病及高血压肾病患者,此外,与正常对照组相比,血清苯丙氨酸及鸟氨酸水平

显著下降( $P < 0.05$ ),脯氨酸水平显著升高( $P < 0.05$ )。

说明 CKD 患者血清氨基酸水平较正常对照发生显著变化,且不同病因 CKD 患者间部分氨基酸水平也存在显著差异。



**Fig. 1 Representative chromatogram of serum samples** The representative chromatogram displays the separation of dabsyl-serum samples by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in order of elution. Retention time (minutes) is displayed on the *x*-axis. Labels: (1) aspartic acid, (2) glutamic acid, (3) DABS-Cl, (4) asparagine, (5) glutamine, (6) serine, (7) threonine, (8) glycine, (9) arginine, (10) alanine, (11) GABA, (12) proline, (13) valine, (14) methionine, (15) isoleucine, (16) leucine, (17) tryptophan, (18) norleucine (internal standard), (19) phenylalanine, (20) ammonia, (21) ornithine, (22) lysine, (23) histidine, and (24) tyrosine

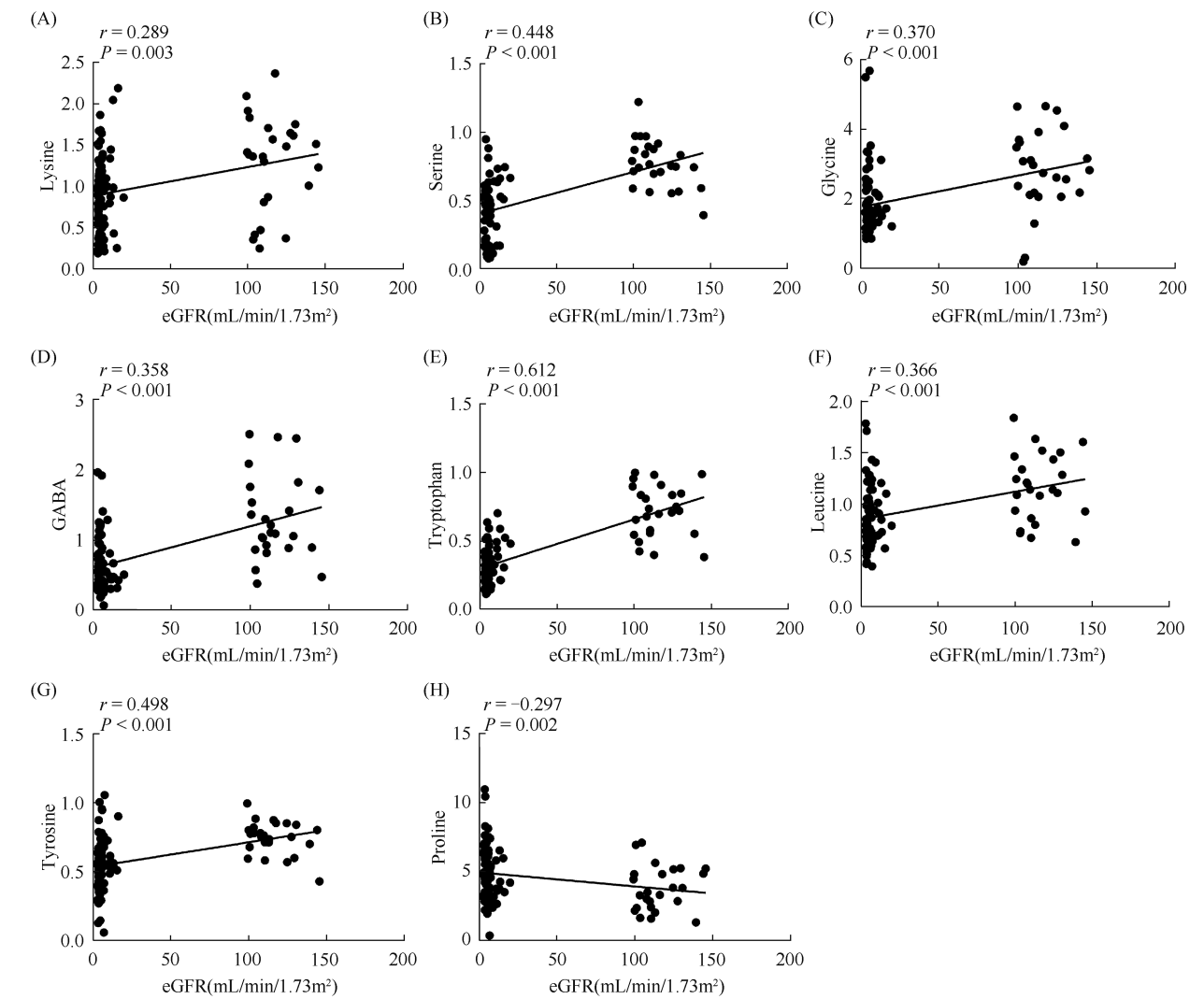
**Table 4 The levels of serum amino acids of participants ( $\bar{x} \pm s$ ) or M(Q1, Q3)**

Moiety (mmol/L)	DN cohort ( <i>n</i> = 20)	HN cohort ( <i>n</i> = 26)	CGN cohort ( <i>n</i> = 33)	HC cohort ( <i>n</i> = 25)	<i>P</i> -value
Lysine	0.91 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.53 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.58	0.000
Serine	0.47 (0.35, 0.54) <sup>a</sup>	0.43 (0.17, 0.52) <sup>a</sup>	0.48 (0.20, 0.53) <sup>a</sup>	0.76 (0.70, 0.88)	0.000
Glycine	1.42 (1.15, 1.72) <sup>a</sup>	1.56 (1.16, 2.11) <sup>a</sup>	1.53 (1.17, 2.06) <sup>a</sup>	2.82 (2.18, 3.61)	0.000
GABA	0.51 (0.33, 0.85) <sup>a</sup>	0.44 (0.30, 0.79) <sup>a</sup>	0.51 (0.32, 0.73) <sup>a</sup>	1.11 (0.89, 1.71)	0.000
Tryptophan	0.29 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.19	0.014
Leucine	0.83 (0.65, 1.14) <sup>a</sup>	0.88 (0.70, 1.06) <sup>a</sup>	0.76 (0.58, 0.91) <sup>a</sup>	1.14 (0.93, 1.44)	0.000
Tyrosine	0.57 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.12	0.000
Ammonia	0.36 (0.22, 0.53) <sup>a</sup>	0.41 (0.32, 0.62) <sup>a</sup>	0.37 (0.19, 0.54) <sup>a</sup>	0.22 (0.12, 0.27)	0.000
Threonine	0.43 (0.35, 0.50) <sup>abc</sup>	0.32 (0.28, 0.39) <sup>b</sup>	0.27 (0.23, 0.33)	0.33 (0.25, 0.40)	0.000
Aspartic acid	0.03 (0.01, 0.06) <sup>abc</sup>	0.12 (0.05, 0.19)	0.09 (0.05, 0.16)	0.11 (0.08, 0.13)	0.000
Phenylalanine	0.71 (0.61, 0.90) <sup>b</sup>	0.62 (0.12, 0.81)	0.56 (0.14, 0.67) <sup>a</sup>	0.70 (0.57, 0.87)	0.038
Isoleucine	0.69 (0.59, 0.88) <sup>b</sup>	0.69 (0.53, 0.78) <sup>b</sup>	0.56 (0.46, 0.66)	0.66 (0.52, 0.75)	0.013
Proline	5.52 ± 1.56 <sup>a</sup>	4.55 ± 1.55	4.80 ± 2.26 <sup>a</sup>	3.79 ± 1.60	0.019
Ornithine	0.53 (0.41, 0.67) <sup>a</sup>	0.63 (0.48, 0.77) <sup>b</sup>	0.47 (0.39, 0.68) <sup>a</sup>	0.88 (0.47, 1.64)	0.0130
Glutamic acid	0.22 (0.17, 0.28)	0.32 (0.26, 0.47)	0.29 (0.23, 0.44)	0.38 (0.21, 0.73)	0.0768
Arginine	0.37 (0.29, 0.46)	0.37 (0.28, 0.54)	0.31 (0.23, 0.40)	0.50 (0.23, 1.10)	0.0861
Valine	1.51 (1.33, 1.67)	1.44 (1.21, 1.71)	1.27 (1.15, 1.54)	1.68 (1.25, 2.10)	0.0883
Asparagine	0.05 (0.04, 0.12)	0.06 (0.03, 0.12)	0.07 (0.04, 0.13)	0.03 (0.02, 0.09)	0.0817
Glutamine	1.70 (1.34, 1.92)	1.65 (0.75, 2.05)	1.54 (1.17, 2.01)	1.55 (1.06, 2.04)	0.859
Alanine	2.86 ± 0.91	2.82 ± 0.62	2.95 ± 0.85	2.40 ± 1.41	0.190
Methionine	0.07 (0.05, 0.15)	0.08 (0.05, 0.14)	0.07 (0.05, 0.12)	0.07 (0.03, 0.27)	0.984
Histidine	0.27 (0.21, 0.31)	0.29 (0.19, 0.35)	0.25 (0.22, 0.33)	0.31 (0.19, 0.36)	0.791

Comparisons performed via one-way ANOVA or Kruskal-Wallis rank test followed by post-hoc testing. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. HC cohort; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. CGN cohort; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs. HN cohort  
DN, diabetic nephropathy; HN, hypertensive nephropathy; CGN, chronic glomerulonephritis; HC, healthy control; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid

**2.2.3 CKD 患者血清氨基酸与其他临床指标的相 关性** 由于 3 组 CKD 患者 eGFR 及血浆白蛋白都 表现出显著的低水平。因此,本研究采用斯皮尔曼 相关性分析,对 CKD 患者血清氨基酸水平与上述参 数的相关性进行检查,以揭示它们的潜在联系。结 果如 Fig. 2 所示,CKD 患者 eGFR 与血清赖氨酸、丝 氨酸、甘氨酸、GABA、色氨酸、亮氨酸以及酪氨酸水

平呈正相关(Fig. 2A-G,  $P < 0.05$ ),与血清脯氨酸水 平呈负相关(Fig. 2H,  $P < 0.05$ )。如 Fig. 3 所示, CKD 患者血浆白蛋白与血清丝氨酸、甘氨酸、 GABA、色氨酸以及酪氨酸水平呈正相关(Fig. 3A- E,  $P < 0.05$ ),与血氨水平呈负相关(Fig. 3F,  $P < 0.05$ )。说明 CKD 患者上述血清氨基酸水平的变化 可能与 CKD 患者肾功能受损及营养状况不佳有关。

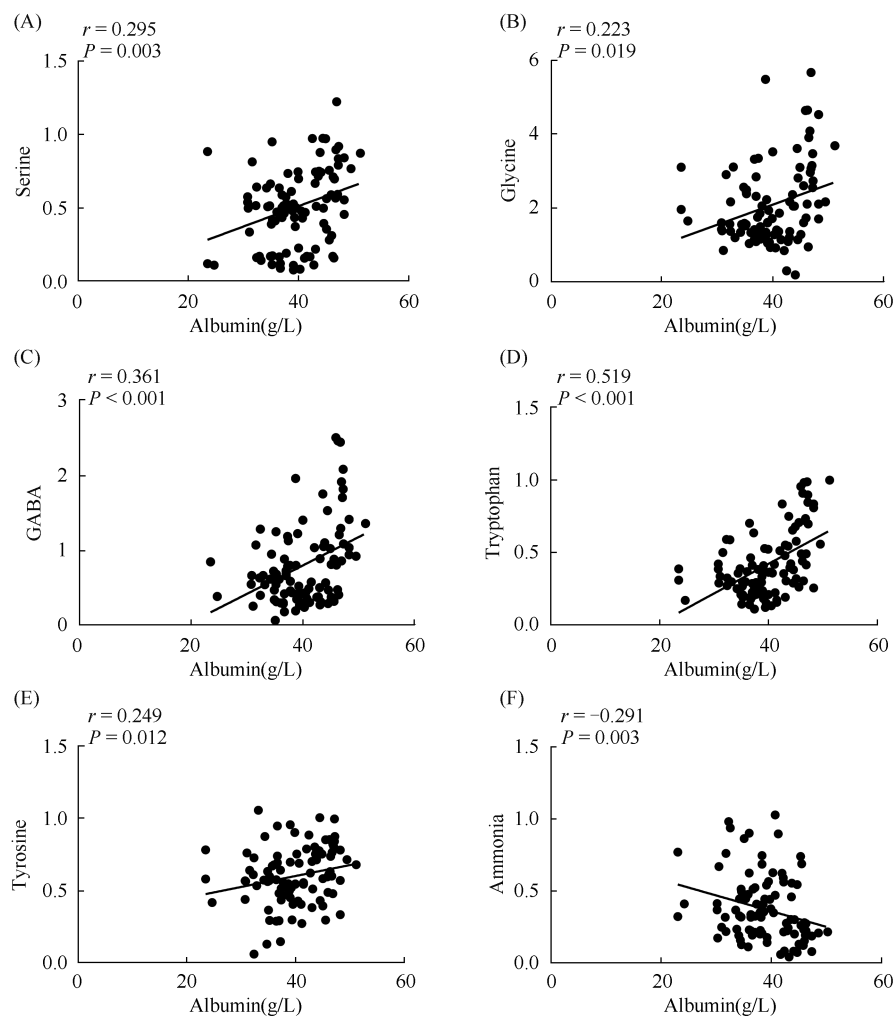


**Fig.2 Significant correlations between eGFR and serum amino acid levels in all CKD patients** Correlation plots displaying the significant Spearman correlations between eGFR and serum amino acid levels in all CKD patients. (A) Lysine and eGFR; (B) Serine and eGFR; (C) Glycine and eGFR; (D) GABA and eGFR; (E) Tryptophan and eGFR; (F) Leucine and eGFR; (G) Tyrosine and eGFR; (H) Proline and eGFR

3 讨论

慢性肾病(CKD)是指由各种原因导致肾结构或 肾功能异常,且肾功能异常持续时间超过 3 个月的慢 性肾疾病。若未能及时进行有效治疗,最终将发展为 终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)<sup>[8,14]</sup>。糖

尿病肾病、高血压肾病以及慢性肾小球肾炎是 CKD 的主要病因<sup>[8]</sup>。既往研究证实,CKD 患者体内血清 氨基酸水平较正常人发生显著变化。而目前未见关于 不同病因 CKD 患者血清氨基酸代谢差异的系统性 研究。因此,本研究采用反相高效液相色谱法比较 糖尿病肾病、高血压肾病、慢性肾小球肾炎患者及



**Fig.3 Significant correlations between serum albumin levels and serum amino acid levels in all CKD patients**  
Correlation plots displaying the significant Spearman correlations between serum albumin levels and serum amino acid levels in all CKD patients. (A) Serine and Albumin; (B) Glycine and Albumin; (C) GABA and Albumin; (D) Tryptophan and Albumin; (E) Tyrosine and Albumin; (F) Ammonia and Albumin

健康成年正常对照血清氨基酸谱的差异。结果显示,CKD 患者血清氨基酸水平较正常对照发生显著变化,且不同病因 CKD 患者间部分血清氨基酸水平也存在一定差异。部分差异氨基酸与 eGFR 及血浆白蛋白存在统计学意义的相关性。

既往研究表明,与正常人相比,CKD 患者血清丝氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、亮氨酸水平降低<sup>[4-6]</sup>。此外,Shah 等及 Duranton 等的研究显示,不同时期 CKD 患者血清氨基酸谱也存在显著差异,提示随着 CKD 病程的进展,血浆游离氨基酸水平也会出现动态变化<sup>[15,16]</sup>。本研究发现,3 组 CKD 患者血清赖氨酸、丝氨酸、甘氨酸、GABA、色氨酸、亮氨酸以及酪氨酸水平皆显著低于正常对照组。在肾疾病氨基酸相关的研究中,本研究结果是第一个提示不同病因 CKD 患者血清氨基酸水平存在显著

差异。上述研究之间,以及本研究与上述研究之间结果并不完全一致,可能与研究对象来源于不同种族或所用标本类型不同有关。其次,氨基酸测量方法的不同也是结果出现偏差的原因之一。

Duranton 等及 Chou 等的研究结果皆显示,CKD 患者体内色氨酸水平与 eGFR 水平存在相关性<sup>[16, 17]</sup>,提示色氨酸可能与 CKD 患者肾功能恶化速度有关。色氨酸作为一种必需氨基酸,只能从食物中获取。色氨酸吸收后,可用于合成组织蛋白质或经分解代谢生成犬尿氨酸、吲哚硫酸酚、5-羟色胺等物质,从而参与人体多种生理病理过程<sup>[18]</sup>。其中,在大量研究中,吲哚硫酸酚表现出明显的肾毒性<sup>[18, 19]</sup>。与上述研究结果相似,本研究发现,3 组 CKD 患者血清色氨酸水平均显著低于正常对照,CKD 患者色氨酸水平与 eGFR 及血浆白蛋白水平皆

显示强正相关。提示在本研究中,CKD 患者色氨酸水平的下降可能与肾功能受损及营养不良有关。更重要的是,本研究发现,糖尿病肾病组患者色氨酸水平下降最为明显。如前所述,色氨酸代谢可能与肾功能恶化速度有关。此外,既往研究发现,糖尿病导致的 CKD,其肾功能恶化速度明显快于非糖尿病 CKD。因此,推测色氨酸水平的差异可能是导致不同病因 CKD 患者肾功能恶化速度不一致的原因之一,但仍需后期进行大量研究来证明此假设。

既往研究表明,CKD 患者体内苯丙氨酸 4-羟化酶活性明显减弱,导致苯丙氨酸-酪氨酸的转换明显受阻<sup>[20]</sup>。与之相符,张爱平等及 Duranton 等的研究发现,中晚期 CKD 患者血浆酪氨酸-苯丙氨酸比值显著降低<sup>[6,16]</sup>。然而,本研究仅发现,糖尿病肾病组出现此种变化(DN: 0.79 *vs* HC: 1.06 *vs* HN: 0.97 *vs* CGN: 1.02),提示糖尿病肾病组患者体内苯丙氨酸 4-羟化酶活性受损的程度可能高于高血压肾病患者及慢性肾小球肾炎患者。此外,本研究还发现,糖尿病肾病患者血清苏氨酸水平明显高于其他 3 组,而天冬氨酸水平明显低于其他 3 组,这可能与本研究中糖尿病肾病患者皆使用胰岛素治疗有关。慢性肾小球肾炎患者血清异亮氨酸水平显著低于糖尿病肾病及高血压肾病患者,血清苯丙氨酸水平显著低于糖尿病肾病及正常对照,这可能与慢性肾小球肾炎组患者平均年龄及 eGFR 水平较低有关。

李科慧等研究结果显示,给予接受连续性血液净化治疗的急性肾衰竭患者足够氨基酸,不仅在不加重患者氮质血症的基础上改善患者蛋白质合成,还可以进一步改善其细胞免疫功能,增强多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)吞噬功能<sup>[21, 22]</sup>。综合本研究发现,CKD 患者体内色氨酸水平与肾功能关系密切,给予 CKD 患者色氨酸补充治疗,也许有利于延缓肾功能的恶化。但这个问题仍需进一步研究。

本研究存在的不足与展望:1) 本研究每组样本量较少,血清氨基酸与临床指标相关性分析结果仅显示出较弱相关性,代表性不足,后续研究中将加大每组样本量。2) 本研究为横断面研究。因此,本文的结果并不能反映随着 CKD 病程进展,血清氨基酸的动态变化。3) 本研究糖尿病肾病及高血压肾病组年龄大于其他 2 组,这与糖尿病肾病及高血压肾病患者在发生肾功能损害前,有较长的基础病史有关,可能会对结果有影响。4) 本研究糖尿病肾病患者接受胰岛素抗糖治疗,高血压肾病患者接受

ACEI/ARB 等降血压治疗,上述治疗措施可能影响结果。后期研究可纵向观察不同时期糖尿病肾病患者,或高血压肾病患者血清氨基酸谱的差异,从而避免基础疾病治疗差异对结果的影响,并可观察随着肾功能变化,血清氨基酸水平的动态变化。5) 本研究尚不能说明糖尿病肾病、高血压肾病和慢性肾小球肾炎血清氨基酸失调及异常的氨基酸代谢对疾病发生发展影响的机制。

综上所述,本研究发现 CKD 患者血清氨基酸谱较正常对照发生显著变化,且不同病因 CKD 患者间部分血清氨基酸水平存在差异。其中,血清色氨酸水平的差异可能是不同病因 CKD 患者肾功能恶化速度不一致的原因之一。

参考文献 (References)

[ 1 ] Wu G. Functional amino acids in nutrition and health [ J ]. Amino Acids, 2013, **45**(3): 407-411

[ 2 ] Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [ J ]. Amino Acids, 2009, **37**(1): 1-17

[ 3 ] Dai ZL, Wu G, Zhu WY. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health [ J ]. Front Biosci ( Landmark Ed ), 2011, **16**: 1768-1786

[ 4 ] Kopple JD. Abnormal amino acid and protein metabolism in uremia [ J ]. Kidney Int, 1978, **14**(4): 340-348

[ 5 ] Nair KS. Amino acid and protein metabolism in chronic renal failure [ J ]. J Ren Nutr, 2005, **15**(1): 28-33

[ 6 ] 张爱平, 克丙申, 栾晓晨, 等. 慢性肾功能衰竭患者血清氨基酸含量的变化及意义 [ J ]. 山东医药 ( Zhang AP, Ke BS, Luan XC, *et al.* The changes and significance of serum amino acids in patients with chronic renal failure [ J ]. Shangdong Med J ), 1991, **1991**(4): 139-140

[ 7 ] Karu N, McKercher C, Nichols DS, *et al.* Tryptophan metabolism, its relation to inflammation and stress markers and association with psychological and cognitive functioning: Tasmanian Chronic Kidney Disease pilot study [ J ]. BMC Nephrol, 2016, **17**(1): 171

[ 8 ] 彭炎强, 郑颐, 陈永松, 等. 探讨不同病因的中晚期慢性肾脏病患者临床特点及意义 [ J ]. 黑龙江医学 ( Peng YQ, Zheng Y, Chen YS, *et al.* Clinical features of chronic kidney disease with different etiology at middle and advanced stage and the analysis of its potential significance [ J ]. Heilongjiang Med J ), 2011, **35**(2): 90-93

[ 9 ] 王旭方, 李梦婕, 葛永纯, 等. 糖尿病肾病患者血清及尿液代谢组学特点及临床意义 [ J ]. 肾脏病与透析肾移植杂志 ( Wang XF, Li MJ, Ge YC, *et al.* Serum and urinary metabolomic analysis in patients with diabetic nephropathy [ J ]. Chin J Nephrol Dial Transplant ), 2012, **21**(3): 201-209

[ 10 ] Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward [ J ]. Kidney Int, 2014, **85**(1): 49-61

[ 11 ] Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, *et al.* Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate [ J ]. JAMA, 2012, **307**(18): 1941-1951

[ 12 ] Suzuki H. Sarcosine oxidase: structure, function, and the application to creatinine determination [ J ]. Amino Acids, 1994, **7**(1): 27-43

[ 13 ] Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation [ J ]. Clin Chem, 2002, **48**(2): 236-254



[14] Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, *et al.* Global prevalence of chronic kidney disease-a systematic review and Meta-analysis[J]. PLoS One, 2016, **11**(7): e0158765

[15] Shah VO, Townsend RR, Feldman HI, *et al.* Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013, **8**(3): 363-370

[16] Duranton F, Lundin U, Gayraud N, *et al.* Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2014, **9**(1): 37-45

[17] Chou CA, Lin CN, Chiu DT, *et al.* Tryptophan as a surrogate prognostic marker for diabetic nephropathy [J]. J Diabetes Investig, 2018, **9**(2): 366-374

[18] 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(Li JX, Zhang XM, Xu QS. The physiological and biochemical effects of tryptophan and its application[J]. Amino Acids Biotic Resour), 2005, **27**(3): 58-62

[19] Fujii H, Nakai K, Fukagawa M. Role of oxidative stress and indoxyl sulfate in progression of cardiovascular disease in chronic kidney disease[J]. Ther Apher Dial, 2011, **15**(2): 125-128

[20] Kopple JD. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure[J]. J Nutr, 2007, **137**(6 Suppl): 1586S-1590S

[21] 李科慧, 周红卫, 史应龙. 连续性血液净化补充氨基酸对危重症患者血清氨基酸谱和细胞免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志(Li KH, Zhou HW, Shi YL. Effect of amino acid level and cell immune function during continuous hemofiltration in Critically ill patients[J]. Chin J Gerontol), 2014, **34**(8): 2094-2096

[22] 李科慧, 周红卫, 史应龙. 连续性高容量血液滤过中血清氨基酸水平对免疫功能的影响[J]. 广西医科大学学报(Li KH, Zhou HW, Shi YL. Effect of amino acid level during continuous high volume hemofiltration on immune function[J]. J Guangxi Med Univ), 2015, **32**(2): 218-222