

丙酮酸肌酸对大鼠胴体组成及机体氨基酸谱的影响

孔一力, 刘 仪, 张源淑, 苏小倩, 马海田*, 邹思湘
(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 以大鼠为实验对象, 灌胃丙酮酸肌酸(CrPyr), 通过观测其对机体胴体组成及其血清与组织中氨基酸谱的影响, 探讨丙酮酸肌酸对机体中营养物质的代谢流向及其胴体品质的影响。实验选用 40 只雄性清洁级 SD 大鼠, 随机分为对照组(C)、低剂量组(L)、中剂量组(M)和高剂量组(H)4 个处理组, 每个处理组按体质量分别灌胃 0、750、1500、3000mg/(kg bw·d)的 CrPyr。实验为期 7 周, 第 49 天宰杀大鼠, 借助反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法测定血清、组织中氨基酸含量的变化。结果表明: 与对照组相比, 在不影响饲料转化率的情况下, 灌胃 CrPyr 可显著($P < 0.05$)地提高其腿肌的相对质量; 灌胃 CrPyr 可显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)升高大鼠血清和骨骼肌中主要生糖氨基酸的含量, 但对肝脏组织的氨基酸谱则没有明显影响。提示, 灌胃 CrPyr 可能通过升高生糖氨基酸的含量, 从而促进大鼠体蛋白的合成。

关键词: 大鼠; 丙酮酸肌酸; 氨基酸谱

Effect of Creatine Pyruvate on Carcass Characteristics and Amino Acid Compositions in Rats

KONG Yi-li, LIU Yi, ZHANG Yuan-shu, SU Xiao-qian, MA Hai-tian*, ZOU Si-xiang
(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to investigate the effect of creatine pyruvate (CrPyr) on metabolic direction of nutritive substances, rats were administered CrPyr to explore carcass characteristics and amino acid compositions in serum and tissues. Forty healthy male SD rats were randomly divided into four groups, which were administered CrPyr at the dosages of 0, 750, 1500 mg/(kg bw·d) and 3000 mg/(kg bw·d), respectively. On the 49th day of the experiments, all rats were scarified after 12 h fasting. The content of amino acids in serum and tissues were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Results showed that relative weight of leg muscle in CrPyr-treated groups was significantly increased ($P < 0.05$) compared with the control group. Similarly, CrPyr-treated groups exhibited a significant increase in the content of glucogenic amino acid in serum and muscle. However, no obvious difference in amino acid composition in liver was observed. These investigations suggested that CrPyr could improve protein synthesis by elevating the concentration of glucogenic amino acid in serum and muscle of rats.

Key words: rats; creatine pyruvate; amino acid

中图分类号: Q555.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0214-07

随着生活水平和人们对食品健康要求的提高, 作为重要食品组成部分的肉类, 其品质越来越多受到人们的重视^[1]。为了生产优质的动物性食品, 生产者使用了大量的饲料添加剂和(或)生理调节剂, 但过多或者不合理的使用带来了严重的残留问题, 其在肉品中的残留已经

严重威胁到食品安全^[2]。所以, 如何安全有效的调节动物性食品中蛋白质和脂肪的合理沉积, 已经成为当前人们研究的热点之一^[3]。

丙酮酸肌酸(creatine pyruvate, CrPyr)作为一种新型的膳食补充剂, 适当补充能够促进人体在运动过程中能

收稿日期: 2009-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600439)

作者简介: 孔一力(1985—), 男, 硕士研究生, 主要从事动物机能生物化学研究。E-mail: 2008107037@njau.edu.cn

* 通信作者: 马海田(1974—), 男, 副教授, 博士, 主要从事营养生物化学研究。E-mail: mahaitian@njau.edu.cn

量的生成,以便延长机体运动时间,提高肌肉耐力和爆发力。已有的研究表明,CrPyr主要功能为促进能量的产生和耐力的保持、提高运动能力、重建能量储备、保持健康状态、缩短疲劳后的恢复时间^[4-5]。丙酮酸肌酸的主要效应成分为机体内正常的代谢中间产物——丙酮酸和肌酸,丙酮酸能增强代谢消耗能量,促进机体脂肪的分解,其产生的ATP的高能磷酸键又可转移给肌酸,促进机体蛋白质的合成,故此将其称之为“双功能营养素”。丙酮酸肌酸主要效应成分为机体内正常的代谢中间产物,因而在应用到肉品生产时具有传统添加剂和调节剂所无可比拟的安全性优势。

本实验以大鼠为研究对象,通过灌胃丙酮酸肌酸来探讨其对大鼠胴体组成及血清和组织中氨基酸谱的变化,旨在研究CrPyr对大鼠体蛋白代谢的影响,以期丙酮酸肌酸作为膳食补充剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40只清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量在257~262g之间,购于上海实验动物中心(许可证号:SCXX(沪)2003-0003)。饲喂实验鼠颗粒料,购自江苏省协同生物医药生物工程有限公司。实验大鼠自由饮水、采食。

1.2 试剂

丙酮酸肌酸(纯度99%) 南京乔康生物科技有限公司;邻苯二甲醛(OPA) 国药集团化学试剂有限公司;甲醇(色谱级) 德国默克公司;乙腈(色谱级) 美国天地公司;天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、色氨酸(Ser)、谷氨酰胺(Gln)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)和赖氨酸(Lys)标准品(纯度均大于98%)。

1.3 仪器与设备

Agilent-1200型高效液相色谱仪、二极管阵列检测器(DAD)、荧光监测器(FLD)、在线脱气机 美国安捷伦公司;C₁₈ ODS反相柱(4.6mm×250mm) 美国Waters公司;HT-220A体卧式柱温箱 上海泉岛公司。

1.4 方法

1.4.1 实验设计

40只清洁级雄性SD大鼠,随机分为对照组和低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只。各组按体质量分别灌胃0、750、1500、3000mg/(kg bw·d)的CrPyr。实验为期7周,记录大鼠体质量、采食量等。实验结束时,禁食12h后处死大鼠,采集血清、心脏、肝脏和骨骼肌等组织,于-20℃保存备用。

1.4.2 样品处理

血清样品100μL与乙腈按体积比1:2充分混匀,4℃静置30min后于4℃、12000r/min离心30min去蛋白,取上清备用。心脏、肝脏、骨骼肌分别与水按1:10(m/V)比例冰浴匀浆,4℃、3000r/min离心15min,取上清液100μL,与血清进行同样处理。

1.4.3 色谱工作条件

按参考文献[6]的条件并加以改进。简述如下,采用三元流动相(流动相A为10mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄(pH7.2,含体积分数0.3%四氢呋喃),流动相B为甲醇,流动相C为乙腈),邻苯二甲醛柱前衍生,FLD检测(激发波长为340nm,发射波长为450nm),柱温40℃,整个分析过程流速恒定为1mL/min。样品分析采用流动相梯度洗脱,其程序如表1所示。

表1 RP-HPLC流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure for RP-HPLC analysis

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	流动相C/%	流速/(mL/min)
0	6	14	80	1
5	6	14	80	1
15	9	21	70	1
25	13.5	31.5	55	1
30	18	42	40	1

1.4.4 衍生及分析

将待测样品20μL与衍生试剂邻苯二甲醛(OPA)按1:2的体积比充分混合,室温下准确反应2min后,加入终止反应液,立即满刻度进样(定量进样环体积为20μL)。实验结果以保留时间作定性分析,峰面积外标法定量分析^[7-8]。

1.5 统计处理

所得实验数据用SPSS16.0等软件进行单因素方差分析。实验结果以平均数±标准误表示,组间差异用*t*检验,判断有无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 丙酮酸肌酸对大鼠生长情况的影响

2.1.1 丙酮酸肌酸对大鼠体质量及饲料转化率的影响

表2 丙酮酸肌酸对大鼠体质量及饲料转化率的影响
Table 2 Effect of creatine pyruvate on body weight and feed conversion rate of rats

项目	初体质量/g	末体质量/g	日增质量/g	日均采食量/g	饲料转化率/%
对照组	261.5±3.5	424.6±12.4	3.8±0.3	28.98±0.27	13.84±0.88
低剂量组	262.9±3.0	434.2±6.7	4.2±0.2	29.93±0.22*	13.95±0.60
中剂量组	259.5±3.2	411.4±8.3	3.7±0.2	26.69±0.39**	14.09±0.33
高剂量组	257.5±3.1	388.0±7.4**	3.2±0.1**	26.50±0.43**	12.01±0.45

注:*.与对照组相比,差异显著($P < 0.05$);**.与对照组相比,差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表 2 可知, 与对照组相比, 灌胃高剂量的 CrPyr 可以极显著地降低大鼠的末体质量、日增质量和日均采食量($P < 0.01$), 中高剂量的 CrPyr 极显著地降低了大鼠的采食量($P < 0.01$), 低剂量的 CrPyr 却显著增加大鼠的采食量($P < 0.05$), 中、低剂量的 CrPyr 对大鼠的日增质量无显著影响($P > 0.05$)。且 3 个剂量的 CrPyr 对大鼠的饲料转化率均没有显著影响($P > 0.05$)。

2.1.2 丙酮酸肌酸对大鼠肌肉及主要脏器相对质量的影响

表 3 丙酮酸肌酸对大鼠肌肉及主要脏器相对质量的影响

Table 3 Effect of creatine pyruvate on relative weight of leg muscle and other organs in rats

项目	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
相对腿质量/%	5.682 ± 0.168	5.836 ± 0.111	6.120 ± 0.114*	6.150 ± 0.163*
相对腿肌质量/%	3.822 ± 0.164	4.001 ± 0.101	4.255 ± 0.088*	4.208 ± 0.111*
相对腿骨质量/%	1.557 ± 0.034	1.617 ± 0.045	1.533 ± 0.058	1.586 ± 0.028
腹脂率/%	1.283 ± 0.068	1.205 ± 0.075	1.137 ± 0.043	1.216 ± 0.031
相对心脏质量/%	0.296 ± 0.003	0.306 ± 0.008	0.279 ± 0.003*	0.283 ± 0.003
相对肝脏质量/%	3.333 ± 0.036	3.345 ± 0.020	3.181 ± 0.040	3.394 ± 0.096
相对肾脏质量/%	0.695 ± 0.013	0.715 ± 0.014	0.721 ± 0.016	0.717 ± 0.015
相对脾脏质量/%	0.282 ± 0.024	0.232 ± 0.009*	0.239 ± 0.009*	0.220 ± 0.010**

由表 3 可知, 与对照组相比, 中、高剂量的 CrPyr 均可以显著提高大鼠相对腿质量、相对腿肌质量($P < 0.05$); 3 个剂量的 CrPyr 对腹脂率无统计学上的影响, 但均有降低的趋势; 中剂量的 CrPyr 显著降低了大鼠的相对心脏质量, 3 个剂量组实验大鼠的相对脾脏质量与对照组相比均有显著下降($P < 0.05$), 但 CrPyr 对其他脏器的相对质量没有明显影响($P > 0.05$)。说明 CrPyr 在不影响饲料转化率的情况下显著地增加了腿肌的相对质量, 促进了蛋白质的沉积, 同时可以控制脂肪的沉积。

2.1.3 丙酮酸肌酸对大鼠血糖、肝糖原及肌糖原含量的影响

表 4 丙酮酸肌酸对大鼠血糖、肝糖原及肌糖原含量的影响

Table 4 Effect of creatine pyruvate on contents of blood glucose, hepatic glycogen and muscle glycogen

项目	血糖/(mmol/L)	肝糖原/(mg/g 肝组织)	肌糖原/(mg/g 肌肉组织)
对照组	4.985 ± 0.203	11.800 ± 2.202	0.976 ± 0.095
低剂量组	4.950 ± 0.212	12.784 ± 1.968	0.953 ± 0.103
中剂量组	5.123 ± 0.218	9.182 ± 2.139	1.384 ± 0.160*
高剂量组	5.680 ± 0.560	13.787 ± 2.802	0.764 ± 0.119

由表 4 可知, 实验组大鼠血糖水平与对照组相比没有统计学差异($P > 0.05$), 但显示出升高的趋势。灌胃

CrPyr 后, 3 个剂量组大鼠的肝糖原含量与对照组没有显著变化($P > 0.05$)。灌胃中剂量组的 CrPyr 可以显著升高大鼠肌糖原含量($P < 0.05$)。

2.2 15 种氨基酸标准品的 RP-HPLC 检测

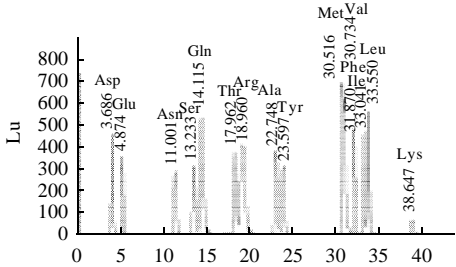


图 1 15 种氨基酸混合标准溶液的色谱图

Fig.1 Chromatogram of 15 mixed amino acid standards in aqueous solution

表 5 氨基酸测定的各种参数结果

Table 5 Regression equations for the determination of various amino acids

氨基酸	保留时间/min	回归方程	相关系数	每日组内 RSD	每日组间 RSD
Asp	3.686	$y=0.006x-0.252$	$R^2=0.995$	3.09	4.17
Glu	4.874	$y=0.006x-0.065$	$R^2=0.996$	3.84	5.23
Asn	11.001	$y=0.005x-0.088$	$R^2=0.996$	2.94	4.76
Ser	13.233	$y=0.004x-0.208$	$R^2=0.996$	5.65	5.89
Gln	14.115	$y=0.003x+0.027$	$R^2=0.996$	3.74	5.49
Thr	17.962	$y=0.006x-0.073$	$R^2=0.998$	4.41	3.87
Arg	18.960	$y=0.002x+0.021$	$R^2=0.995$	4.19	5.88
Ala	22.748	$y=0.003x-0.052$	$R^2=0.998$	4.53	5.05
Tyr	23.597	$y=0.004x-0.517$	$R^2=0.998$	3.98	5.02
Met	30.516	$y=0.003x-0.157$	$R^2=0.997$	3.53	4.88
Val	30.734	$y=0.004x-0.208$	$R^2=0.996$	4.35	5.67
Phe	31.870	$y=0.004x-0.662$	$R^2=0.999$	2.05	5.57
Ile	33.041	$y=0.004x-0.1$	$R^2=0.997$	3.91	4.88
Leu	33.550	$y=0.005x-0.125$	$R^2=0.999$	5.01	5.27
Lys	38.647	$y=0.016x+0.787$	$R^2=0.999$	4.40	5.63

由图 1 及表 5 所示, 15 种氨基酸标准品经 RP-HPLC 分析, 40min 内全部分离。在 5.20~333nmol/L 浓度范围内, 氨基酸的浓度与峰面积呈现良好的线性关系, 相关系数在 0.995~0.999 之间。最低检测限为 1.2nmol/L, ($R_{SN} \geq 3$), 检测灵敏度高。不同氨基酸测定的每日组内、每日组间精密密度分别为 2.99%~5.65% 和 3.87%~5.89%, 均在 6% 以内, 精密密度符合要求, 测定方法可靠, 可以作为定量的依据。

2.3 血清中氨基酸谱的变化

由表 6 可知, 与对照组相比 CrPyr 对大鼠血清中糖氨基酸的影响不尽一致: 3 个剂量的 CrPyr 均能极显著升高大鼠血清中 Asn 和 Ser 的含量($P < 0.01$); 低、

中剂量的 CrPyr 可极显著降低大鼠血清中 Gln 含量($P < 0.01$), 低剂量的 CrPyr 可显著地降低大鼠血清中 Arg 的含量($P < 0.05$), 高剂量的 CrPyr 可显著地降低大鼠血清中 Met 的含量($P < 0.05$)。灌胃高剂量的 CrPyr 可使实验组大鼠血清中生酮氨基酸——Lys 的含量较对照组显著升高($P < 0.05$)。所检测到的其他 5 种氨基酸, 包括芳香族氨基酸(Tyr 和 Phe)和支链氨基酸(Ile 和 Leu)灌胃 CrPyr 后在血清中的含量均无显著变化($P > 0.05$)。

表 6 丙酮酸肌酸对大鼠血清氨基酸谱的影响

Table 6 Effect of creatine pyruvate on amino acid composition in serum of rats

氨基酸	血清氨基酸含量/(nmol/L)			
	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
Asp	1.373 ± 0.412	0.939 ± 0.181	1.043 ± 0.172	1.078 ± 0.092
Glu	4.519 ± 0.950	4.888 ± 0.515	4.345 ± 0.679	5.652 ± 0.560
Asn	2.269 ± 0.437	6.702 ± 0.349**	6.570 ± 0.857**	7.387 ± 0.484**
Ser	5.890 ± 0.773	18.743 ± 1.183**	18.418 ± 2.533**	21.419 ± 1.938**
Gln	11.157 ± 0.745	5.949 ± 0.546**	7.094 ± 0.544**	8.985 ± 1.523
Tyr	15.543 ± 1.376	11.486 ± 1.340	13.203 ± 1.582	12.947 ± 2.005
Arg	7.981 ± 0.925	3.658 ± 0.364*	10.397 ± 2.215	5.103 ± 0.587
Ala	20.575 ± 3.104	21.705 ± 1.925	17.100 ± 3.619	26.419 ± 2.383
Met	3.669 ± 0.315	3.045 ± 0.164	3.450 ± 0.472	2.738 ± 0.194*
Val	6.028 ± 0.747	5.871 ± 0.329	5.917 ± 0.718	8.221 ± 0.690*
Phe	3.955 ± 0.449	3.643 ± 0.150	3.595 ± 0.296	3.865 ± 0.232
Ile	3.204 ± 0.410	2.857 ± 0.192	3.702 ± 0.366	3.444 ± 0.286
Leu	6.168 ± 0.704	5.358 ± 0.382	4.404 ± 0.982	6.840 ± 0.554
Lys	20.413 ± 1.754	20.990 ± 1.237	20.699 ± 2.727	26.129 ± 1.942*

2.4 肝脏中氨基酸谱的变化

表 7 丙酮酸肌酸对大鼠肝脏氨基酸谱的影响

Table 7 Effect of creatine pyruvate on amino acid composition in liver of rats

氨基酸	肝脏氨基酸含量/(nmol/g)			
	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
Asp	4.121 ± 0.757	5.290 ± 0.513	5.581 ± 0.355	4.740 ± 0.211
Glu	3.878 ± 0.622	3.936 ± 0.516	3.866 ± 0.610	3.509 ± 0.332
Asn	1.943 ± 0.297	2.512 ± 0.216	2.008 ± 0.200	1.871 ± 0.361
Ser	4.309 ± 0.616	4.733 ± 0.483	4.144 ± 0.379	4.397 ± 0.366
Gln	5.977 ± 0.698	6.740 ± 0.561	6.894 ± 0.592	6.146 ± 0.648
Tyr	8.375 ± 1.045	9.681 ± 0.912	8.683 ± 0.749	8.162 ± 0.661
Arg	2.195 ± 0.289	2.575 ± 0.226	2.522 ± 0.224	2.708 ± 0.298
Ala	13.967 ± 1.721	13.809 ± 1.482	12.978 ± 1.212	11.747 ± 0.691
Met	5.052 ± 0.787	5.651 ± 0.612	5.165 ± 0.320	5.130 ± 0.426
Val	2.637 ± 0.296	2.580 ± 0.251	2.579 ± 0.184	2.338 ± 0.146
Phe	1.347 ± 0.306	1.540 ± 0.228	1.510 ± 0.169	1.407 ± 0.159
Ile	4.041 ± 0.556	4.416 ± 0.430	4.169 ± 0.314	4.063 ± 0.278
Leu	1.151 ± 0.193	1.444 ± 0.160	1.335 ± 0.130	1.315 ± 0.112
Lys	11.529 ± 1.619	13.870 ± 1.343	13.256 ± 1.036	12.841 ± 1.027

由表 7 可知, 3 个剂量的 CrPyr 对大鼠肝脏组织中

检测到的各种氨基酸的含量均无显著影响($P > 0.05$)。

2.5 心脏中氨基酸谱的变化

表 8 丙酮酸肌酸对大鼠心肌氨基酸谱的影响

Table 8 Effect of creatine pyruvate on amino acid composition in myocardium of rats

氨基酸	心肌氨基酸含量/(nmol/g)			
	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
Asp	206.917 ± 15.948	224.123 ± 21.276	198.166 ± 24.491	184.005 ± 16.095
Glu	176.520 ± 11.858	220.728 ± 19.897	217.830 ± 17.753	218.258 ± 20.447
Asn	42.036 ± 3.088	48.900 ± 6.743	32.053 ± 2.964	47.433 ± 4.994
Ser	527.123 ± 37.966	486.546 ± 32.191	458.152 ± 35.676	489.232 ± 34.804
Gln	47.663 ± 2.855	43.401 ± 4.285	39.918 ± 3.362	42.700 ± 2.536
Tyr	62.724 ± 4.669	48.968 ± 4.355	51.023 ± 5.578	50.660 ± 3.793
Arg	25.627 ± 1.934	24.308 ± 1.835	22.540 ± 1.586	26.353 ± 2.161
Ala	1560.704 ± 87.368	1548.792 ± 111.501	1352.722 ± 118.504*	1429.992 ± 96.146
Val	66.132 ± 6.042	43.274 ± 6.542*	50.800 ± 2.959	51.916 ± 9.607
Phe	55.772 ± 1.984	34.736 ± 5.760**	41.833 ± 4.116*	41.798 ± 4.510*
Ile	22.147 ± 1.305	35.642 ± 7.151*	17.824 ± 1.583	30.708 ± 4.468
Leu	58.883 ± 3.548	56.762 ± 8.754	47.027 ± 4.136	58.928 ± 5.836
Lys	241.900 ± 16.939	208.085 ± 11.583	207.028 ± 15.581	207.748 ± 11.883

由表 8 可知, 与对照组相比, 灌胃中剂量的 CrPyr 可显著下调大鼠心肌中生糖氨基酸——丙氨酸(Ala)含量($P < 0.05$), 低剂量的 CrPyr 可显著降低 Val 的含量($P < 0.05$)。对兼生氨基酸而言, 3 个剂量的 CrPyr 均可显著地降低大鼠心肌组织中 Phe 的含量($P < 0.05$), 而低剂量的 CrPyr 却显著上调 Ile 的含量($P < 0.05$)。CrPyr 对其他在大鼠心肌组织中可检测到的氨基酸含量则无显著影响($P > 0.05$)。

2.6 骨骼肌中氨基酸谱的变化

表 9 丙酮酸肌酸对大鼠骨骼肌中氨基酸谱的影响

Table 9 Effect of creatine pyruvate on amino acid composition in muscle of rats

氨基酸	骨骼肌氨基酸含量/(nmol/g)			
	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
Asp	51.518 ± 4.165	24.050 ± 2.188	93.488 ± 29.999*	23.715 ± 3.201
Glu	52.408 ± 6.398	50.082 ± 7.671	135.168 ± 34.235**	54.804 ± 10.529
Asn	37.392 ± 2.180	35.091 ± 3.199	62.315 ± 8.195**	35.399 ± 4.496
Ser	83.887 ± 8.028	82.019 ± 5.783	128.103 ± 12.626**	66.239 ± 5.751
Gln	284.140 ± 14.148	371.606 ± 26.001	573.587 ± 54.480**	395.548 ± 44.766*
Thr	269.270 ± 11.121	299.434 ± 33.720	387.958 ± 19.025**	326.355 ± 33.147
Arg	63.116 ± 6.578	74.851 ± 10.637	90.946 ± 8.673*	70.018 ± 3.840
Ala	1568.692 ± 96.974	1579.141 ± 161.218	2081.235 ± 201.388*	1724.744 ± 102.688
Met	14.273 ± 0.972	7.949 ± 0.723**	11.043 ± 1.118*	8.519 ± 0.872**
Lys	10.306 ± 0.573	10.120 ± 0.899	12.715 ± 0.844	11.848 ± 1.758
Tyr	262.268 ± 30.072	249.210 ± 25.004	304.802 ± 22.516	262.285 ± 29.638
Val	79.078 ± 4.479	58.453 ± 6.596*	104.159 ± 10.312*	67.666 ± 7.961
Phe	2.010 ± 0.095	2.223 ± 0.173	2.172 ± 0.147	1.558 ± 0.183*
Ile	1.470 ± 0.090	1.137 ± 0.090*	1.540 ± 0.151	1.025 ± 0.131**
Leu	3.019 ± 0.196	2.411 ± 0.189	3.414 ± 0.347	2.179 ± 0.231*

由表 9 可知, 与对照组相比, CrPyr 能显著上调大

鼠骨骼肌中多数生糖氨基酸(Asp、Glu、Asn、Ser、Gln、Thr、Arg、Ala)的含量($P < 0.05$),且以中剂量的CrPyr作用最为明显($P < 0.01$);在骨骼肌中所检测到的生糖氨基酸中,3个剂量的CrPyr均可显著地降低Met含量($P < 0.05$),同样以中剂量的CrPyr对Met的下调作用最弱。

与生糖氨基酸变化趋势有所不同,灌胃CrPyr对大鼠骨骼肌中兼生氨基酸和生酮氨基酸的影响主要表现在下调其含量。与对照组相比,灌胃高剂量的CrPyr可显著地降低大鼠骨骼肌中兼生氨基酸——Phe和Ile的含量($P < 0.05$);同样,高剂量的CrPyr可显著地降低大鼠骨骼肌中生酮氨基酸——Leu的含量($P < 0.05$)。

灌胃CrPyr对大鼠骨骼肌中芳香族氨基酸和支链氨基酸的影响主要表现在下调其含量。只有Val在中剂量的CrPyr作用下含量显著升高。

3 讨论

3.1 丙酮酸肌酸对大鼠胴体组成的影响

本研究发现,灌胃丙酮酸肌酸可以在不影响饲料转化率的前提下降低大鼠日增质量,但却显著地提高了相对肌肉质量,同时腹脂率也有所降低,提示大鼠日增质量的降低可能是由于脂肪沉积的减少所致,说明丙酮酸肌酸具有调控大鼠能量重分配的作用——即降低脂肪含量、增强蛋白质沉积。另外,灌胃丙酮酸肌酸对大鼠主要脏器相对质量没有显著影响,这也间接说明丙酮酸肌酸不影响大鼠正常的生理机能。该结果从表观水平上说明CrPyr对大鼠蛋白质代谢具有积极的调节作用。

由于目前关于CrPyr的研究不多,对于动物代谢情况的影响更是未见报道,故本研究主要参照肌酸和丙酮酸的相关研究结果。韩新燕等^[9]的研究表明,饲料中添加一水肌酸(creatine monohydrate, CMH)在不影响育肥猪采食量的情况下有提高日增质量趋势,同时可显著提高肥育猪的眼肌面积和背最长肌率,并有一定的提高瘦肉率的作用。结果与本研究在肌肉增长方面相一致,说明CrPyr具有与CMH相似的促进蛋白沉积的作用。但在日增质量方面,CrPyr与CMH作用效果不同,CrPyr对大鼠的作用表现为降低日增质量,且其脂肪含量也有所降低,这可能与CrPyr中另一效应成分丙酮酸的功能有关。目前已有研究证明丙酮酸在降低体脂、减肥方面具有积极作用^[10]。Ivy等^[11]给5周龄的胰岛素抵抗肥胖型大鼠补充丙酮酸,经过3周发现补充丙酮酸降低肥胖鼠的体质量和食物转化率,增加静息代谢率和脂肪酸氧化。陈世伟等^[12]给膳食诱导的肥胖模型大鼠丙酮酸钙6周,肥胖大鼠的体质量增长缓慢,体内脂肪含量下

降。由此可以推断,CrPyr兼具肌酸的促进蛋白沉积和丙酮酸的降低体脂的功能,合并了肌酸和丙酮酸盐的双向效应,是一种应用前景广阔的膳食补充剂。

3.2 丙酮酸肌酸对大鼠机体组织中氨基酸谱的影响

氨基酸是蛋白质的主要组成成分,食品营养质量高低主要由其中氨基酸的种类和含量所决定。另有研究表明,血液中胆固醇的含量同样受食物中蛋白质的氨基酸组成模式的影响^[13]。因此,膳食蛋白中氨基酸的组成是衡量其营养价值高低的一项重要指标。

生糖氨基酸在动物体内能够转化为葡萄糖,是机体中重要的参与供能的氨基酸^[14]。本实验研究结果表明,灌胃丙酮酸肌酸可显著地提高大鼠血清及骨骼肌中主要生糖氨基酸含量。本实验中升高的生糖氨基酸多为非必需氨基酸(Asp、Glu、Asn、Ser、Gln、Ala),其来源主要是机体蛋白质的分解或者利用相应 α -酮酸自身合成,结合表观水平的蛋白质合成增加,推测本实验中生糖氨基酸含量的升高主要是由于自身合成增加。而合成非必需性的生糖氨基酸相应的 α -酮酸又是机体糖代谢的中间产物,是氧化供能提供原料,机体内有充足的 α -酮酸供合成生糖氨基酸,说明体内供能充足,氨基酸在这种状态下通常不参与或很少参与供能,而是作为合成蛋白质的原料^[15],并最终导致蛋白质合成的增加,这与本实验中丙酮酸肌酸可提高大鼠腿肌相对质量的研究结果相吻合。

谷氨酰胺(Gln)是机体内含量最丰富的条件性必需氨基酸,具有许多重要的生理功能^[16],尤其在解除氨毒^[17]和增加蛋白质合成^[18]方面具有重要作用。本研究发现,CrPyr能显著降低大鼠血清中Gln的含量,却极显著地提高Gln在骨骼肌中的含量,推测Gln在不同组织中这种相反的变化可能是由于其在不同组织中所起到的生理功能不同所致。血清中谷氨酰胺是动物机体氨转运的主要形式,氨是蛋白质分解的终产物,所以血清中Gln含量的降低提示蛋白分解减弱。与循环血液中的Gln作用不同,骨骼肌中Gln是蛋白质代谢的重要调节因子,能促进细胞内蛋白质等生物大分子的合成,减少骨骼肌中蛋白质的分解^[19],本实验结果显示实验组大鼠肌肉中Gln含量与对照组相比显著升高,提示蛋白质合成增加,与表观指标的相对腿肌质量增加相吻合。综合血清和骨骼肌中Gln的变化,均表现为促进机体蛋白质合成,最终表现为腿肌相对质量的显著增加。最近研究发现,Gln可以通过控制哺乳动物翻译的起始来影响蛋白质的合成^[20]。这为Gln含量的变化和肌肉质量增加之间的关系提供一种可能的解释。

门静脉血液中的氨基酸组成随着机体所采食的食物

蛋白的不同而发生变化,但其在外周血液中则不会有太大的波动,主要是因为肝脏是氨基酸的主要分解代谢场所。肝脏能够识别随着门静脉血液而进入机体的氨基酸,并根据机体的需求而调节各种氨基酸的代谢率^[21]。有研究表明,如果食物中某种氨基酸持续增高,则肝脏中相关酶活性升高(如丙氨酸氨基转移酶、酪氨酸氨基转移酶和谷氨酰胺酶等),分解多出部分的氨基酸^[22]。本实验中 CrPyr 对肝脏氨基酸谱没有显著影响,可能正是由于肝脏对于氨基酸水平的调节能力很强,同时对与对照组相近的肝脏氨基酸水平也说明实验组大鼠代谢处于一个较稳定的状态。

肌肉中氨基酸含量占机体氨基酸库的 50%~80%,其中骨骼肌中氨基酸的代谢对动物机体整体代谢有重要影响。肌肉产生的氨通过两个氨载体,即 Gln 和 Ala 在肌肉和肝脏组织间进行氨的转运^[23],特别是通过 Ala 介导的葡萄糖-丙氨酸循环,可由肝脏不断地为肌肉组织提供大量的葡萄糖来源。本实验研究结果显示,灌胃丙酮酸肌酸后,大鼠骨骼肌中两种主要的氨基转运载体 Ala 和 Gln 的含量均显著升高,提示了肌肉与肝脏组织之间的葡萄糖-丙氨酸循环旺盛,肌肉中有充足的能量,这也为蛋白质合成的增强提供了前提条件。

支链氨基酸(branched-chain amino acids, BCAA)是对亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)和缬氨酸(Val)3种必需氨基酸的统称。支链氨基酸主要在肝外组织进行氧化,其主要氧化部位在肌肉组织^[24]。研究表明支链氨基酸氧化产生三磷酸腺苷(ATP)的效率显著高于其他氨基酸,当机体需要蛋白质作为能量来源时,其是动物体内重要的能量来源^[25]。本实验结果表明,作为支链氨基酸的主要场所,骨骼肌中支链氨基酸含量与对照组相比显著下降。同时,实验组大鼠血糖升高但变化不显著($P > 0.05$),肝糖原没有显著变化,中剂量组大鼠肌糖原含量显著升高。这说明大鼠机体能量供给充分,血糖水平稳定,糖元含量充足,特别是肌糖原含量升高。在这种情况下氨基酸通常不会发挥其供能作用,且 BCAA 的供能作用主要在机体处于特殊生理阶段时发挥,故而推测 BCAA 含量的下降并非是由于氧化供能所致。BCAA 在体内只参与机体蛋白质的合成,而不作为生物活性物质的前体^[27],于是,推测 BCAA 含量的降低就是由于作为合成原料增加了蛋白质的沉积所致。

综上所述,补充丙酮酸肌酸可能通过加强机体能量供应,进而导致生糖氨基酸含量升高,为蛋白质的合成提供了能量基础和原料。另外,氨基酸的增加可能不仅能为蛋白质的合成提供原料,现代研究发现,氨基酸可以作为信号分子使真核细胞起始因子(eukaryotic

initiation factors, eIF)磷酸化程度发生变化,从而改变那些调节 mRNA 翻译起始阶段的蛋白质功能^[28-29]。这方面的研究进展为氨基酸含量增加(本实验中主要是生糖氨基酸)和蛋白质合成增加之间的关系提供了更多的合理的解释。但其中涉及的具体机制还有待进一步深入研究。作为机体内含量最丰富的条件性必需氨基酸, Gln 在血清和骨骼肌中均显示出有利于蛋白质沉积的变化。而肝脏由于富含调节氨基酸代谢的酶,其氨基酸水平变化与对照组相近,也间接说明实验组大鼠生理代谢稳定。于此同时,蛋白质合成的增加消耗了 BCAA,使其在主要代谢场所——骨骼肌中的含量显著低于对照组。

4 结 论

灌胃丙酮酸肌酸在不影响大鼠饲料转化率的情况下可以显著地增加肌肉的相对质量、升高血清及腿肌中生糖氨基酸的含量,表明丙酮酸肌酸对大鼠体蛋白的合成具有积极的调节作用。

参考文献:

- [1] 戴瑞彤,杨龙江,吴国强. 肉类质量的研究进展[J]. 肉类研究, 2000 (2): 11-13.
- [2] 赵青,钟土木,胡玉敏. 兽药与饲料添加剂残留对人体健康的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(1): 55-57.
- [3] 张振华,戴瑞彤,张应禄,等. 我国畜产品加工业的重大科技问题[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(5): 46-50.
- [4] van SCHUYLENBERGH R, van LEEMPUTTE M, HESPEL P. Effects of oral creatine-pyruvate supplementation in cycling performance[J]. Int J Sports Med, 2003, 24: 144-150.
- [5] JGER R, METZGER J, LAUTMANN K, et al. The effects of creatine pyruvate and creatine citrate on performance during high intensity exercise [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2008, 5(4) (electronic publication).
- [6] 牟德海. OPA 柱前衍生反相高效液相色谱法测定氨基酸含量[J]. 色谱, 1997, 15(4): 319-321.
- [7] UHE A M, COLLIER G R, MCLENNAN E A, et al. Quantization of tryptophan and other plasma amino acids by automated pre-column O-phthalaldehyde derivatization high-performance liquid chromatography: improved sample preparation[J]. J Chrom, 1991, 564: 81-91.
- [8] PIERRO D D, LAZZARINO G, PASTORE F S, et al. Determination of boronophenylalanine in biological samples using precolumn O-phthalaldehyde derivatization and reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 284: 301-306.
- [9] 韩新燕,许梓荣,邵明丽,等. 一水肌酸对肥育猪胴体组成及肌肉系水力的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(4): 401-406.
- [10] LENZ T L, HAMILTON W R. Supplemental products used for weight loss[J]. J Am Pharm Assoc, 2004, 44: 59-67.
- [11] IVY J L, CORTEZ M Y, CHANDLER R M, et al. Effects of pyruvate on the metabolism and insulin resistance of obese Zucker rats[J]. Am J Clin Nutr, 1994, 59(2): 331-337.
- [12] 陈世伟,刘翠娥,张杰,等. 丙酮酸钙对于肥胖大鼠脂质代谢及肥胖基因表达产物的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2003, 38(5): 771-774.
- [13] BASSAT M, MOKADY S. The effect of amino-acid-supplemented wheat

- gluten on cholesterol metabolism in the rat[J]. *Br J Nutr*, 1985, 53(1): 25-30.
- [14] BATTEZZATI A, RISO P. Amino acids: fuel, building blocks for proteins, and signals[J]. *Nutrition*, 2002, 18: 773-774.
- [15] WU Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1-17.
- [16] 张维睿, 杨桂芹, 王宏山. 谷氨酰胺的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2004, 31(7): 10-12.
- [17] ALBRECHT J, NOREMBERG M D. Glutamine: A Trojan horse in ammonia neurotoxicity[J]. *Hepatology*, 2006, 44: 788-794.
- [18] OEHLER R, ROTH E. Regulative capacity of glutamine[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6: 277-282.
- [19] 乔云芳. 谷氨酰胺对肉仔鸡生长性能和肉质的影响及其机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [20] BRASSE-LAGNEL C, LAVOINNE A, HUSSON A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 43-53.
- [21] 吴晋强. 动物营养学[M]. 2版. 合肥: 安徽科学出版社, 1999.
- [22] HASSINGER D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance[J]. *Biochem J*, 1990, 267(2): 281-290.
- [23] 何志谦. 人类营养学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [24] HARBANS L, KIRAN C. Metabolic and regulatory effects of branched chain amino acid supplementation[J]. *Nutrition Research*, 1995, 15(11): 1717-1733.
- [25] RENNIE M J, BOHÉ J, SMITHE K, et al. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle[J]. *J Nutr*, 2006, 136: 264-268.
- [26] DRUMMOND M J, DREYER H C, PENNING S B, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104(5): 1452-1461.
- [27] 伍喜林. 动物支链氨基酸营养研究进展[J]. *饲料与畜牧*, 1994(4): 10-12.
- [28] LIU Zhenqi, JAHN L A, WEI Liping, et al. Amino acids stimulate translation initiation and protein synthesis through an Akt-independent pathway in human skeletal muscle[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(12): 5553-5558.
- [29] WANG X, PROUD C G. A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(5): 1429-1442.