

同位素稀释技术测定钙的生物利用度

鲍善芬 W. Windisch M. Kirchgessner

由于近十多年来骨质疏松病因学研究的进展,定量测定钙的生物利用度已成为营养学家的热门话题^[1]。目前为止已有包括体内、体外的许多种方法用于生物利用度的测定^[2-5],其中同位素稀释技术被认为是最为准确、可靠的定量测定方法。因为与一般代谢方法不同,该方法可以从总的粪便钙排泄中区分来自内源性钙的排泄,从而计算出钙的真正吸收(true absorption)而不是表观吸收(apparent absorption)^[3]。早在五十年代,曾有人用此方法对牛观察了钙的生物利用度^[4]。这些年通过对此方法的逐步改进,以大鼠为动物模型,分别对锌、锰、铁、钴等微量元素的生物利用度进行了测定^[5-9]。

大鼠对钙等矿物质的吸收代谢机制与人类相似,因此在钙生物利用度的研究中常被用作实验动物模型。本项研究建立了用同位素稀释技术测定生长期大鼠钙的生物利用度的方法,主要包括确定同位素⁴⁵Ca 注射后机体达到平衡的时间以及选择适当的参比组织,从而计算出内源性粪钙排泄及钙的真正吸收率。

1 材料与方法

1.1 同位素稀释技术的原理及步骤

同位素稀释技术包括肌肉注射⁴⁵Ca 以标记机体内源性钙库,此后出现在粪便中的放射性钙均为内源性钙。当粪便中排泄的⁴⁵Ca 活性趋于稳定时,粪钙的比活性,(specific activity SA)即粪中⁴⁵Ca 活性与粪中总钙量之比,与参比组织的比活性之比应该是相对恒定的。因此选择适当的参比组织并测定其比活性即可将粪中⁴⁵Ca 的活性换算为钙的量从而得到内源性粪

钙的排泄量(公式 1),根据公式(2)可计算得到钙的真正吸收。

计算公式如下:

$$F_E = F_A / SA_R \dots\dots\dots (1)$$

$$A \% = \frac{I - (T - F_E)}{I} \times 100 \% \dots\dots\dots (2)$$

- 其中: F_E : 为内源性粪钙排泄量(mg/d)
- F_A : 粪中⁴⁵Ca 活性(Bq/d)
- SA_R : 参比组织的比活性(Bq/mg)
- $A \%$: 真吸收率
- I : 总钙摄入量(mg/d)
- T : 总粪钙排泄量(mg/d)

1.2 动物及处理

32 只雄性 SD 大鼠,体重 96g,随机分为四组,每组 8 只,分别饲喂在有机玻璃代谢笼中,代谢笼配置可分别收集粪和尿的装置以及大鼠吃食的“餐厅”。整个实验期间所有大鼠饲喂人工半合成饲料,其中含 20% 的酪蛋白,36.5% 的淀粉,28% 白糖,3% 纤维素,7% 可可油,1% 植物油,0.2% DL-蛋氨酸,0.3% 维生素混合物,4% 矿物质混合物,制备饲料时同时加入各种微量元素的溶液。维生素、矿物质和微量元素的加入量参照标准^[10]。饲料含钙(碳酸钙形式) 4.3g/kg,磷 3.2g/kg,大鼠自由饮用含 0.014% NaCl 的纯水溶液。室温 24℃,相对湿度 50~60%,12 小时昼夜交替。

实验开始便训练大鼠每天分别于 8:00 和 16:00 进“餐厅”进食,每次给予足够的时间使吃完所有饲料后退出。经过 5 天对代谢笼及饲喂方式和时间的适应后开始正式实验。第一天投料 9g,以后每天以 0.25g 的量递增。正式实验当天,在轻度乙醚麻醉下给每只大鼠左大腿肌肉注射 75μl 剂量为 273kBq 的⁴⁵Ca,注射液

作者单位:100853,解放军总医院微量元素研究室(鲍善芬),慕尼黑技术大学营养生理研究所(W. Windisch M. Kirchgessner)

用生理盐水稀释 $^{45}\text{CaCl}_2$ 配制而成。从注射之日起,每天记录实际进食量并分别收集粪便和尿样。在注射同位素后的第6、9、12和15天分别处死一组大鼠。乙醚麻醉下断头,取血于肝素抗凝管中,离心后取血浆保存,同时分别收集肝脏、肾、脾、睾丸、胰、小肠、注射端及非注射端大腿肌肉、脑、皮毛及股骨等组织,封装塑料袋内,于 -20°C 保存待测。

1.3 分析方法

粪便、经 100°C 烘干的血浆、尿样、组织放入白金坩埚,于马弗炉内 500°C 灰化48小时,灰份用 6NHCl 溶解,并置于低温电热板上加热至近干,重复上述操作一次后,用 0.3NHCl 溶解残渣、过滤并定容于容量瓶中。将溶液转移至酸洗干燥过的聚乙烯瓶中存放待测。

样品溶液用 $0.5\%\text{La}_2\text{O}_3-0.3\text{NHCl}$ 液稀释后,于火焰原子吸收分光光度计(PEAAS 300)422.3nm处测定钙含量。

样品溶液用AquaSafe 500 plus溶液稀释,并充分混匀,于 β 液闪计数器(Kontron instrument)上测定 ^{45}Ca 的放射活性。结果经背景及放射性蜕变校正并根据标准曲线计算,以放射性活性单位Bq表示。

1.4 结果计算及统计学处理

将所有原始数据输入计算机,用minitab统计软件系统计算并进行回归和方差分析。

2 结果

2.1 整个实验期间大鼠生长良好,注射同位素时体重为112g,在处死之日,四个组平均体重分别为124、139、156和170g,平均生长速度为 4.4g/d 。四个组之间组织钙水平不因处死时间不同而异,分别为血浆 92 ± 4 ,肌肉 84 ± 16 ,肝脏 38 ± 3 ,脾 41 ± 9 ,睾丸 53 ± 3 ,肾 105 ± 49 ,脑 118 ± 41 ,胰 358 ± 118 ,小肠 148 ± 36 ,皮毛 $159\pm53\mu\text{g/g}$ 以及股骨 $108\pm13\text{mg/g}$ 。

2.2 第一组大鼠左右两侧大腿肌肉中 ^{45}Ca 活性分别为18.97和17.33Bq/g,说明同位素注射后6天 ^{45}Ca 从注射位置向体内的转移和重新分配已基本完成。

第四组(即最后处死的一组)大鼠在 ^{45}Ca 注

射后的1~14天内每天粪尿中 ^{45}Ca 排泄量参见图1。由此可见,注射后的前两天粪中 ^{45}Ca 的排泄较多,分别占注射剂量的10%和7%左右,第三天迅速下降至约3%后呈稳定下降趋势。尿中 ^{45}Ca 的排泄与粪便有相似的趋势。在整个实验期间,从粪和尿中排泄的 ^{45}Ca 占注射总剂量的4%,仍有约96%的 ^{45}Ca 滞留在体内。与粪相比,尿中 ^{45}Ca 的排泄相对较少,从图2可看出,每天从粪便排泄的 ^{45}Ca 活性占总排出的88%左右。 ^{45}Ca 注射后七天内,其排泄量呈现较大的波动,一周后趋于稳定。

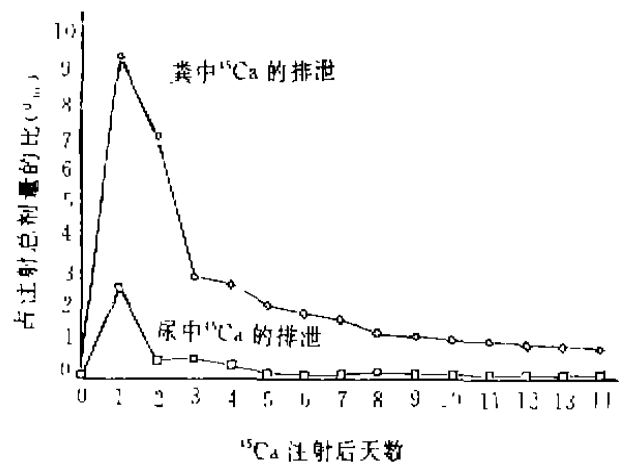


图1 注射 ^{45}Ca 后大鼠每天粪及尿中 ^{45}Ca 的排泄

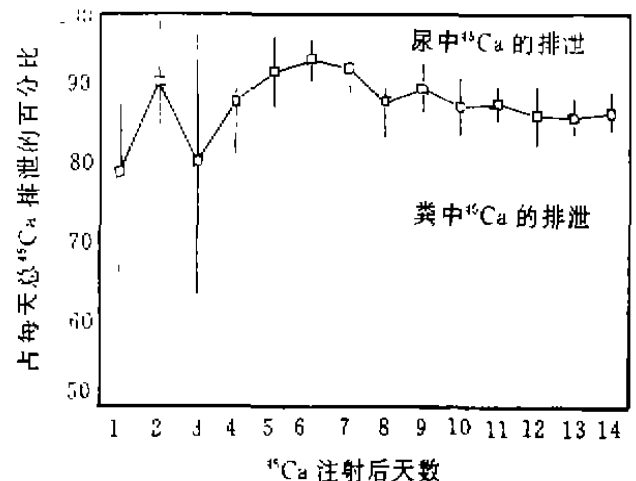


图2 每天 ^{45}Ca 排泄中来自粪和尿排泄各占的百分比

2.3 表1给出了四组大鼠处死前3天收集的粪、尿及不同组织中的 ^{45}Ca 的比活性以及后三组大鼠比活性与时间的半对数方程。考虑到放射性蜕变机饲料从摄入到排出需约1天时间,将这三天的粪 ^{45}Ca 活性首先校正到与参比组织采样同一天水平。由表可见,粪、尿及组织中

的⁴⁵Ca 比活性随时间的变化呈指数形式下降, 第一组(即注射后 6 天处死组)大鼠粪、尿及组织中的⁴⁵Ca 比活性大多显著高于其它三组, 同样说明⁴⁵Ca 注射后 6 天, 机体尚未达到新的平衡。从表中相应的回归方程可以看到粪便的比活性下降最快, 有趣的是血浆比活性的下降与粪便的下降速度相似, 二者斜率分别为 0.0886 和 0.0909。肌肉、睾丸、肝、脾下降速度次之。

表 1 四组大鼠粪、尿及不同组织中⁴⁵Ca 的比活性以及比活性与时间的半对数回归方程。

	⁴⁵ Ca 注射后天数				SE	$y, ^{45}\text{Ca}$ 比活性(Bq/ μg)	
	6	9	12	15		$x: ^{45}\text{Ca}$ 注射后天数	R ²
血浆	0.340 ^a	0.271 ^b	0.218 ^c	0.173 ^d	0.036	$\ln(y) = -0.434 - 0.0886x$	96
肌肉	0.199 ^a	0.168 ^b	0.133 ^b	0.110 ^c	0.040	$\ln(y) = -1.034 - 0.0830x$	99
肝脏	0.272 ^a	0.212 ^b	0.192 ^c	0.142 ^d	0.025	$\ln(y) = -0.820 - 0.0738x$	86
脾	0.287 ^a	0.205 ^b	0.161 ^b	0.132 ^c	0.060	$\ln(y) = -0.764 - 0.0785x$	99
睾丸	0.414 ^a	0.281 ^c	0.233 ^b	0.193 ^c	0.035	$\ln(y) = -0.585 - 0.0748x$	97
肾	0.336 ^a	0.239 ^b	0.252 ^b	0.184 ^c	0.036	$\ln(y) = -0.954 - 0.0470x$	0
脑	0.188 ^a	0.161 ^b	0.162 ^b	0.106 ^b	0.039	$\ln(y) = -1.820 - 0.0006x$	0
胰	0.057 ^a	0.037 ^b	0.037 ^b	0.046 ^b	0.020	$\ln(y) = -2.026 - 0.1287x$	33
小肠	0.146 ^a	0.075 ^b	0.099 ^b	0.067 ^b	0.013	$\ln(y) = -2.393 - 0.0126x$	0
皮毛	0.211 ^a	0.145 ^b	0.147 ^b	0.120 ^b	0.051	$\ln(y) = -1.561 - 0.0366x$	23
股骨	0.223 ^a	0.203 ^a	0.238 ^a	0.168 ^b	0.021	$\ln(y) = -1.230 - 0.0318x$	0
尿	0.382 ^a	0.223 ^b	0.204 ^b	0.177 ^c	0.042	$\ln(y) = -0.106 - 0.0471x$	85
粪	0.089 ^a	0.043 ^b	0.036 ^b	0.027 ^c	0.010	$\ln(y) = -2.305 - 0.0909x$	85

注: 右上角字母不相同的组间有显著差异, 回归方程不包括第 6 天这一组。

粪中⁴⁵Ca 比活性值显著低于其它体液及组织, 这是由于粪⁴⁵Ca 被大量外源性钙所稀释的结果。

2.4 表 2 列出了各组组织比活性与粪便比活性之比。对多数组织而言, 注射⁴⁵Ca 后 6~9 天,

表 2 各组大鼠组织比活性与粪便比活性之比

组织	⁴⁵ Ca 注射后天数				S.E	P
	6	9	12	15		
血浆	3.88 ^b	6.35 ^a	6.98 ^a	8.49 ^a	0.64	0.41
肌肉	2.33 ^b	3.93 ^a	3.79 ^a	4.14 ^a	0.90	0.65
肝脏	3.14 ^b	5.03 ^a	5.37 ^a	5.41 ^a	0.64	0.14
脾	3.42	4.89	4.50	5.26	1.26	0.46
睾丸	4.79 ^b	6.59 ^a	6.52 ^a	7.28 ^a	0.98	0.25
肾	3.86 ^a	5.62 ^b	7.04 ^a	8.91 ^a	0.97	0.01
脑	2.08 ^c	3.78 ^b	4.56 ^{ab}	6.24 ^a	1.15	0.03
胰	0.66	0.87	1.05	0.79	0.49	0.46
小肠	1.74 ^b	1.75 ^b	2.75 ^a	2.50 ^a	0.49	0.01
皮毛	2.40 ^b	3.45 ^{ab}	4.19 ^{ab}	4.53 ^a	1.24	0.39
股骨	2.58 ^c	4.61 ^b	6.65 ^a	6.36 ^a	0.67	0.01
尿	4.40 ^b	5.23 ^b	5.72 ^{ab}	6.54 ^a	0.93	0.05

注: 右上角字母不相同的组间有显著差异

p 值为⁴⁵Ca 注射后 9、12、15 天三组大鼠统计结果

此比值显著上升, 这与前面所观察到的⁴⁵Ca 排泄的动态变化结果是一致的。同位素注射后 9

~15 天, 该比值在血浆、肌肉、肝和脾等组织中基本稳定, 这可从表上所列的后三组方差分析所得 p 值看出(不包括第一组), p 值在 0.4~0.6 之间, 这是机体在此期间已基本达到平衡的重要证据之一, 同时表明这几种组织有可能当选为参比组织。

2.5 根据上述结果我们估价了各组实验动物的钙平衡状况。以处死前三天各组大鼠粪尿测定结果的均值计算钙平衡, 并分别以血浆、肌肉、肝和脾为参比组织计算了内源性粪钙及钙的真正吸收。(见表 3)。

3 讨论

同位素稀释技术的应用是基于这样一种考虑, 即来自食物中的元素经过消化吸收进入体内; 而另一方面, 体液和组织中的元素在各种生理过程中也可重新流回消化道经粪便排出, 这是一种不可避免的内源性的丢失。这两种过程同时受到营养因素和机体内环境稳定调节因素的影响。当食物中元素的供给量超过需要量时, 机体可调动内环境稳定调节机制以增加内源性粪丢失, 当供给量正好等于机体需要量时, 内环

境稳定调节因素几乎不会发生影响,这时的吸收仅与营养因素有关。此时,作为定量某一食物标准的生物利用度可以等同于真正吸收率^[1]。

表 3 钙平衡以及以不同参比组织估价的
内源性粪钙排出和真正吸收率

	⁴⁵ Ca 注射后天数			SE
	9	12	15	
钙平衡				
每日钙摄入量(mg/d)	39.4	42.6	45.8	
总粪钙排出(mg/d)	6.9	7.7	7.7	2.0
总尿钙排出(mg/d)	0.1	0.2	0.2	0.05
滞留量(mg/d)	32.4 ^b	34.7 ^{ab}	37.8 ^a	2.1
表观吸收率(%)	83	82	83	4.7
总利用率(滞留量占总摄入量%)	82	82	83	5
内源性粪钙(占总粪钙的%)				
参比组织 血浆	16	17	16	2
肌肉	27	28	26	7
肝脏	20	19	19	3
脾	23	23	22	7
钙的真正吸收率(%)				
参比组织 血浆	85	85	86	4
肌肉	87	87	88	4
肝脏	86	85	86	4
脾	86	86	87	4

应用同位素稀释技术的关键是确定同位素注射后机体达到平衡的时间、以及选择适当的参比组织,从而计算得出内源性粪便排泄量及真正吸收。从本项研究结果可以看到,同位素注射后机体达到平衡的时间可从以下几方面考虑:(1)同位素注射后粪中⁴⁵Ca 排泄的动态观察,找出粪便中⁴⁵Ca 排泄达到稳定的时间点。(2)组织比活性与粪比活性之比趋于稳定的时间点。对参比组织的选择也可参照以下标准:(1)组织比活性与粪比活性之比不得小于1,因为若小于1,则所计算的吸收率将大于100%。如本次实验中的胰脏便不适于作为参比组织。(2)组织比活性与粪比活性之比应比较稳定。从表中可见,同位素注射9~15天后,该比值在血浆、肌肉、肝和脾等组织中基本稳定($p=0.4-0.6$),而在睾丸、肾、脑、皮毛、及股骨中,该比值变化较大($p=0.01-0.3$),因此也不适于作为参比组织。以前的工作中有人认为尿也不失为

较好的参比组织,但是我们的实验否定了这一看法($p=0.03$)。Weigand 等人曾提出^[6]参比组织的比活性与时间的回归方程斜率与相应的粪便的斜率相近,在我们的实验中,以此标准来衡量,最好的参比组织应当为血浆,其次是肌肉、脾、睾丸和肝脏(斜率分别为粪:0.0909,血浆:0.0886,肌肉:0.0830,脾:0.0785,睾丸:0.0748,肝:0.0738)。

表3是以各组最后3天的代谢结果计算的钙平衡,由于⁴⁵Ca 注射后6天机体尚未达到平衡,故不计算第1组的钙平衡。粪和尿中钙的排泄量随着因动物生长钙摄入量的增加而增加,然而后3组中钙的表观吸收及滞留保持不变,这同样说明在此期间钙代谢处于稳定状态。分别以血浆、肌肉、肝和脾为参比组织计算内源性粪钙及钙的真正吸收,后3组中随时间改变这两项指标仍没有变化,以不同组织为参比组织所计算的内源性粪钙及钙的真正吸收值也近似相等,其中血浆的值稍低,分别为内源性粪钙占总粪钙的16~17%和钙的真正吸收率为85~86%。由于前面已经提到,血浆比活性的下降斜率与粪便的最接近,因此以血浆作为参比组织所计算的内源性粪钙及钙的真正吸收值应该是最准确的。本实验测得饲料中碳酸钙型式存在的钙的真正吸收为86%。一方面由于饲料中含有较少的阻碍钙吸收的成分如植酸盐等,另一方面,是由于饲料中钙的含量接近大鼠的实际需要量,内环境稳定调节机制没有很大的影响。因而吸收率较高。

4 结论

同位素稀释技术对于定量测定钙的内源性排泄和钙的真正吸收是一个很准确的方法。⁴⁵Ca 肌注9天后粪中⁴⁵Ca 活性可用于计算内源性钙的排泄量,而血浆是最为理想的参比组织。实验测得饲料中碳酸钙型式存在的钙的真正吸收为86%。

参 考 文 献

- 1 Weaver CM. Calcium bioavailability and its relation to osteoporosis. Proc Soc Exp Biol Med. 1992;200:157.

(下转第36页)

BMD,以作出正确评价。

与国内比较,240例绝经后妇女各年龄组各部位均值($\bar{x}$),除Ward's外,其它各部BMD均值较北京、沈阳同性别同年龄组BMD均值低,与全国十三省市骨矿含量调查组报道结果相近。Ward'sBMD均值与国内报道结果相近^[2,4,5]。各部位累积丢失率与国内报道相似,以Ward's累积丢失率最高。OP检出率Ward's最高。DXA测定Ward's敏感性最高。 ≤ 70 岁组累积丢失率顺序Ward's $> L_2-L_4 > N > T$;与国内报道不一致; > 70 岁以上组则为Ward's $> N > T > L_2-L_4$,与国内报道一致^[2,4,5]。本调检出率,Ward's及 L_2-L_4 检出率与北京接近,其它部

位与北京报道结果差异较大^[3]。这主要由于受试者经SPA筛选的缘故。

参 考 文 献

- 1 马海波等,成年女性及骨折病人腰椎和髌部骨密度、骨质疏松研究及防治,第一版,北京化学工业出版社,1992,82—83
- 2 刘忠厚,段云波等,骨质疏松症的诊断和筛选,《中国老年学杂志》1995,15(1),53
- 3 关青,陶国枢,刘晓玲等,北京市区1333人双能X线骨密度测定及骨质疏松检出调查,《中国骨质疏松杂志》1995,1,111,76—80
- 4 郭庆开等,沈阳地区537例正常DXA测量结果,《中国骨质疏松杂志》1996,2,(3),70—72
- 5 刘忠厚,潘子昂等,骨骼生长规律和原发性OP症预诊的研究,《中国骨质疏松杂志》1995,1,(1),1—7

(上接第30页)

- 2 Diepenmaat Walters MGE and Schreuder HAW. A continuous in vitro method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods in:Schlemmer U,ed. Bioavailability 93' nutritional chemical and food processing implications of nutrient availability proceedings. Bundesforschungsanstalt for Ernährung, 1993,43—47.
- 3 Kirchgessner M. Homeostasis and homeorhesis in trace element metabolism in:Anke M et al ed. Trace elements in man and animals TEMA 8 proceedings of the eighth international symposium on trace elements in man and animals. Verlag media touristik, 1993,4—21.
- 4 Visek WJ, Monroe BA, Svanson EW et al. Determination of endogenous fecal calcium in cattle by a simple isotope dilution method. J Nutr 1983,50:23
- 5 Kirchgessner M, Windisch W and Weigand E. True bioavailability of zinc and manganese by isotope dilution technique. in:Schlemmer U,ed. Bioavailability 93' nutritional chemical and food processing implications of nutrient availability proceedings. Bundesforschungsanstalt for Ernährung, 1993,213—222
- 6 Weigand E, Helbig U and Kirchgessner M. Radioisotope dilution technique for determination endogenous manganese in feces of the growing rat. Biol Trace Elem Res. 1986;10:261.
- 7 Weigand E and Kirchgessner. ⁶⁵Zn labeled tissuezinc for determination of endogenous fecal zinc excretion in growing rats. Nutr Metabol. 1976;20:314.
- 8 Kirchgessner M, Reuber S and Kreuzer M. Endogenous excretion and true absorption of cobalt as affected by the oral supply of cobalt. Biol Trace Elem Res. 1995;41:175.
- 9 Kreuzer M and Kirchgessner. Endogenous iron excretion—A quantitative means to control iron metabolism? Biol Trace Elem Res 1991;29:77.
- 10 Nutrient requirements of laboratory animals. National academy of sciences Washington DC 1978.