

利用 AMS 测量方法研究大鼠的钙吸收率

窦亮¹, 何明¹, 董克君¹, 武绍勇¹,
庞芳芳^{1,2}, 王小明¹, 杨旭冉¹, 赵庆章¹, 姜山¹

(1. 中国原子能科学研究院核物理研究所, 北京 102413;

2. 广西师范大学物理科学与技术学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 钙是人体所必需的元素之一, 参与众多的生命生理调控, 准确测量生物体的钙吸收率, 对于合理补钙和预防钙代谢疾病具有重要意义。本研究采用⁴¹Ca 标记 SD 大鼠体内钙库, 利用加速器质谱(AMS)法测量长寿命放射性核素⁴¹Ca 灵敏度高的特点, 开展对大鼠钙吸收率的准确测定。结果表明: 大鼠每 100 g 体重每天摄入 28 mg 碳酸钙、28 mg 柠檬酸钙、10 mg 碳酸钾的表观吸收率分别为(67.57 ± 2.79)%、(65.21 ± 2.96)%、(87.50 ± 1.10)%, 净吸收率分别为(73.19 ± 3.60)%、(71.47 ± 4.01)%、(92.74 ± 1.81)%。该方法可以得出钙的真实吸收率, 且不受所评价的钙剂中钙的化学形式和种类的影响, 进一步拓展了同位素评价钙吸收率的应用领域, 可为建立适宜于我国人民的钙参考摄入量标准提供实验依据。

关键词: 加速器质谱(AMS); 内源钙库法; SD 大鼠; 真实吸收率; 表观吸收率

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2015)05-0180-06

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2015.0054

Study on Calcium Absorptivity of Rats by ⁴¹Ca-AMS Measurement

DOU Liang¹, HE Ming¹, DONG Ke-jun¹, WU Shao-yong¹, PANG Fang-fang^{1,2},
WANG Xiao-ming¹, YANG Xu-ran¹, ZHAO Qing-zhang¹, JIANG Shan¹

(1. China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2. College of Physical Science and Technology, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Calcium is one of the essential elements that form human bone (the main form of calcium is $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), and it participates and regulates many life processes. Osteoporosis is the most common disease of calcium deficiency, while recent research shows that organisms (especially osteoporosis organisms) take in too much calcium, possibly causing some other diseases. Thus, the accuracy of calcium absorption rate measurement is very meaningful for reasonable calcium supplement and prevention diseases of calcium metabolism. Based on the high sensitivity of ⁴¹Ca measurement with accelerator mass spectrometry and the innovative methods of ⁴¹Ca labeling endogenous calcium, the

收稿日期: 2015-04-30; **修回日期:** 2015-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(11375272)资助

作者简介: 窦亮 (1984—), 男(汉族), 山东日照人, 助理研究员, 从事粒子物理与原子核物理研究。E-mail: douer-2@163.com

网络出版时间: 2015-11-16; **网络出版地址:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20151116.1349.014.html>

calcium absorption rate of rats was studied. The results show that rats intake 28 mg calcium carbonate, 28 mg calcium citrate and 10 mg calcium citrate per 100 g body weight each day, the apparent absorption rates are $(67.57 \pm 2.79)\%$, $(65.21 \pm 2.96)\%$ and $(87.50 \pm 1.10)\%$, the static absorption rates are $(73.19 \pm 3.60)\%$, $(71.47 \pm 4.01)\%$ and $(92.74 \pm 1.81)\%$, respectively. This method can obtain the true absorption of calcium without extrinsic labeling, and it is not affected by the chemical structure and sorts of calcium supplements.

Key words: accelerator mass spectrometry (AMS); ^{41}Ca labeling endogenous calcium; SD rats; real absorption rate; apparent absorption rate

钙是人生的必需元素,它参与调控众多的生命生理过程,骨钙的流失会导致骨质疏松症(OP)等多种疾病^[1]。据悉,2009 年中国因缺钙而患骨质疏松症的总人数达 9 千万^[2],因此,补钙已成为社会的流行趋势。但研究表明,如果生物体内摄入过量的钙,会因钙的代谢异常而产生多种疾病,例如肾脏、血管等软组织异位钙化^[3-4]。目前,关于生物体钙含量与骨质疏松症的临床和机理研究存在 2 个主要问题:1) 钙在生物体内的代谢调控机制尚不明确。目前,对摄入钙的吸收、转运途径以及与钙离子通道的相互关系^[5],骨质疏松与动脉硬化的关联^[6]以及异位钙化的机理^[7]等都不十分清楚。摄入钙的吸收途径、血钙的代谢途径、异位沉积机理等也都没有明确的结论,这使得与钙代谢相关疾病的防治存在随意性和不确定性。钙源的物理化学特性与个体吸收差异使统计学水平的研究结论难以指导对钙代谢异常相关疾病的防治。2) 我国人民的钙摄入量标准尚不确定。在 2000 年中国营养学会上修订了我国居民膳食钙适宜的摄入量(AI),18 岁以上为 800 mg/d,50 岁以上为 1 000 mg/d。2002 年中国居民营养与健康状况调查报告表明:我国居民每标准人日钙摄入量只有 388.8 mg,其中,城市为 438.6 mg,农村为 369.6 mg,仅为推荐值的 50%左右。因为这个推荐值参考了美国的数据,并没有仔细的科学评价,由此引发的问题是:一方面,这个值与世界卫生组织的推荐值 500 mg^[2]相差较大;另一方面,人体中钙的摄入从 400 mg 增加到 800 mg,是否会对人体钙代谢产生影响。因此,钙的摄入量是一个有待研究的重要问题,我国急需建立一套符合国民身体需求的钙参考

摄入量标准。

在钙的吸收率研究中,常用的方法有药代动力学法、尿增量法、钙平衡法、同位素(^{45}Ca , ^{47}Ca , ^{46}Ca , ^{48}Ca)示踪法等^[8-11],但都缺乏系统、深入地研究,数据可比性差。同时,各种方法都存在较明显的局限性,因此,文献报道中的钙吸收率,尤其是较长时间的钙吸收率数据并不准确。

目前,测量生物体钙吸收率的黄金方法是双标稳定性同位素示踪法^[12]。其基本原理是,将待测钙源用一种钙的稳定同位素标记,以口服方式摄入,然后静脉注射另一种钙稳定同位素;一定时间后,这两种钙稳定同位素在体内达到代谢平衡,具有相同的代谢行为;收集 24~48 h 尿液,通过测定同位素钙比值推算钙的吸收率。但该方法仍存在一些问題:首先,该方法是以前口服和静脉注射的两种稳定性同位素钙在生物体内的代谢过程相同为前提的,然而这一假设并没有得到证实;其次,尽管实验中使用的是浓缩的稳定同位素,但人体内也有该稳定同位素,存在内源钙的干扰,所以灵敏度和准确性受到限制;此外,对于口服钙剂,钙元素存在多种化学形式;最后,用同位素标记市售钙剂必须保证每一种化学形式钙的同位素丰度保持一致,这是普通同位素外标法无法满足的,因此会导致操作复杂,数据可信性较差,而且费用极其昂贵。

^{41}Ca 辐射低、半衰期长,作为研究生物体钙代谢的示踪核素具有非常明显的优势^[13]。 ^{41}Ca 标记内源钙库法是用 ^{41}Ca 标记大鼠体内钙库后,再以口服方式喂食钙剂,通过测定粪便中的总钙以及 ^{41}Ca 与 ^{40}Ca 的比值来实现钙吸收率的准确测定,由此可以实现任意条件下(钙的

化学形式、剂量、药物等)钙吸收率的准确测定。本工作利用加速器质谱(AMS)法测量长寿命放射性核素 ^{41}Ca 灵敏度高的特点,通过 ^{41}Ca 标记SD大鼠体内钙库的方法,分别测量SD大鼠对不同剂量的碳酸钙和柠檬酸钙的吸收率,并对钙剂进行评价。希望通过标准化的模型建立、示踪方法与测定,从根本上解决传统生物示踪技术的不足,从而为合理补钙、建立适宜于我国人民的钙参考摄入量标准奠定研究基础。

1 测量原理与建模

1.1 ^{41}Ca 标记内源钙库法测量钙吸收率的原理

本实验采用的 ^{41}Ca 标记内源钙库法测量大鼠的钙吸收率是在平衡法的基础上,将含有 ^{41}Ca 的氯化钙溶液以肌肉注射形式注入大鼠体内,标记体内钙库。待 ^{41}Ca 在体内达到平衡后,即粪钙中 ^{41}Ca 与 ^{40}Ca 的比值相对恒定后,喂食一定量的口服钙剂,根据式(1)^[8]可得到钙的吸收率,即:

$$\text{吸收率} = ((\text{口服摄入钙总量} - \text{粪钙总量} + \text{粪钙中内源钙总量}) / \text{口服摄入钙总量}) \times 100\% \quad (1)$$

在式(1)中,口服摄入钙总量已知,粪钙总

量可以通过原子光谱法测得。如何计算粪钙中内源钙总量是问题的关键,理想的计算方式示于式(2)^[8],即:

$$\text{粪钙中内源钙总量} = \frac{\text{粪钙总量} \times \text{粪钙中}^{41}\text{Ca} \text{ 的丰度}}{\text{粪钙中内源钙所含有}^{41}\text{Ca} \text{ 的丰度}} \quad (2)$$

由于口服钙剂中不含有 ^{41}Ca ,粪钙中的 ^{41}Ca 均来自于内源钙,因此,首先要计算粪钙中内源钙所含有 ^{41}Ca 的丰度。这需要在建立大鼠体内 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 平衡的前提下,跟踪并计算粪钙中内源钙所占有的量。

1.2 动物饲养及建模

大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司提供的断乳3周后SD大鼠)正常饲养至3月龄,选取48只体重相近的雄性大鼠(SPF级),分为4组,分别标记为A、B、C、D组,每组12只大鼠。按照实验动物国家标准(GB 14923—2010、GB 14924.3—2010、GB 14925—2010、GB 14922.2—2011)对大鼠进行选择和饲养。

采用肌肉注射法向A、B、C组大鼠右大腿注入540 μL 氯化钙储备液(含54 ng ^{41}Ca);向D组大鼠右大腿注入540 μL 不含 ^{41}Ca 的氯化钙溶液(Ca^{2+} 浓度与储备液相同)。大鼠的代谢与取样情况列于表1。

表1 大鼠的代谢与取样

Table 1 Metabolism and sampling of rats

分组	喂食种类	灌胃量 ¹⁾ /mg	取样
A组	无钙饲料 ²⁾ +灌胃碳酸钙(注射后第42天只喂食无钙饲料)	70	收集大鼠注射后的粪便样品
B组	无钙饲料+灌胃柠檬酸钙(注射后第42天只喂食无钙饲料)	11	同A组
C组	同A组	25	同A组
D组	同A组	70	同A组

注:1) 灌胃量为每只100 g的大鼠每天的灌胃量;2) 无钙饲料的钙含量低于0.03 g/kg,大鼠从饲料中摄入的钙可忽略不计

A组和B组大鼠用于比较不同化学形式的钙剂对钙吸收率的影响,灌胃的碳酸钙和柠檬酸钙的剂量不同,但钙含量相同;A组和C组大鼠用于比较不同剂量的钙剂对钙吸收率的影响;D组大鼠作为对照组。

注射 ^{41}Ca 后,收集大鼠每天的粪便样品,并测量其 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值,结果示于图1。

从图1可以看出,注射 ^{41}Ca 后第28天, $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值趋于平衡。实验取注射后第35天到第49天粪便(除去第42天)中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 的平均值作

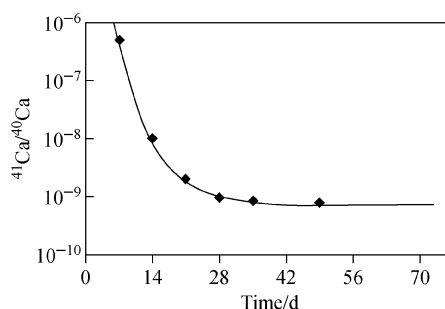


图1 注射 ^{41}Ca 后,大鼠粪便中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值

Fig. 1 Ratio of $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in rat feces after injecting ^{41}Ca

为粪便中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值,记为 $R_{\text{总}}$,摄入钙的平均值记为 $S_{\text{总}}$,粪钙总量为 $F_{\text{总}}$ 。由于第42天喂食的饲料中不含钙,大鼠粪便中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值即为内源钙的比值,记为 $R_{\text{内}}$ 。因此,表观吸收率可表示为:

$$\text{表观吸收率} = \frac{S_{\text{总}} - F_{\text{总}}}{S_{\text{总}}} \quad (3)$$

真实吸收率可以表示为:

$$\text{真实吸收率} = \frac{S_{\text{总}} - F_{\text{总}} + F_{\text{总}} \times R_{\text{总}} \div R_{\text{内}}}{S_{\text{总}}} \quad (4)$$

2 样品制备与测量

2.1 主要仪器与试剂

HI-13 串列加速器质谱(AMS):中国原子能科学研究院产品;AA700CRT 原子吸收分光光度计:美国 Perkin Elmer 公司产品;5840R 冰冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;GSL1300 型真空管式高温炉:沈阳科晶设备制造有限公司产品。

碳酸钙、双氧水、草酸铵均为分析纯,盐酸和氨水均为优级纯:北京化学试剂公司产品;硝酸和氢氟酸:均为 MOS 级,北京化学试剂研究所产品。所有离心管、试管、坩埚、研钵、移液管、枪头在使用前均用 20% 盐酸浸泡 48 h 以上,然后用去离子水冲洗干净、烘干备用。

2.2 样品制备

将 100 g 大鼠粪便样品经 80 °C 烘干后,于玛瑙研钵内研碎;将研碎后的粪便样品置于瓷坩埚内,在 900 °C 马弗炉中灼烧灰化 3 h,冷却后用硝酸-双氧水混合溶液(4:1,V/V)消解,蒸至近干,然后用去离子水稀释至 15 mL;加入等体积的饱和草酸铵,必要时滴加氨水维持 pH 10 左右,混匀后静置 3 h,以 3 600 r/min 离心 5 min,去除上清液,用 2 mL 2.5% 草酸铵和 2 mL 去离子水分别洗涤沉淀 2 次;加入适量的(一般约为 2 mL)4 mol/L 硝酸溶解沉淀,然后用去离子水稀释至 15 mL;再加入 6 mL 氢氟酸,隔夜放置;以 3 600 r/min 离心 10 min,用 1 mL 去离子水洗涤氟化钙沉淀 2 次。将上述湿法制成的 CaF_2 样品由真空管式高温炉充氩气二次氟化并烘干,以进一步提高氟氧比,具体流程如下:

1) 容器清洗:对炉管进行严格的清洗并烘干,分别将聚四氟乙烯反应料盒及支架先用硝

酸,再用氢氟酸各浸泡 24 h,然后用去离子水冲洗 3 次以上,烘干备用。

2) 样品准备:将湿法制得的氟化钙与适量的浓氢氟酸混合,然后装入料盒内,固定在支架上,一同放入真空炉内。

3) 氟化反应:密封真空炉,启动机械泵抽真空后再充氩气,重复 3 次,充氩气至常压,关闭两端阀门,停止真空泵,缓慢升温至 150 °C 左右,保温使其反应 4 h;然后抽真空分离过量的氟化氢,停止加热;待炉内温度降低后小心取出,称其质量、真空干燥保存。

2.3 原子吸收法测量总钙

采用标准样品对原子吸收光谱仪进行刻度,结果列于表 2。

表 2 刻度原子吸收光谱仪
Table 2 Scale atomic absorption spectrometer

标准样品	吸光度/ABS	钙含量/ μg
S1	0.0028	0.00
S2	0.0744	2.50
S3	0.1568	5.00
S4	0.2204	7.50
S5	0.2765	10.00

以吸光度为横坐标 x ,钙含量为纵坐标 y ,绘制标准曲线,示于图 2。得到的线性回归方程为 $y=34.726x$,线性回归系数 $R^2=0.9937$ 。

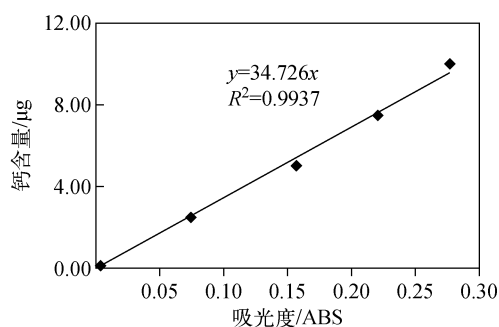


图 2 标准样品的线性拟合曲线

Fig. 2 Linear fitting curve of standard samples

2.4 AMS 法测量粪便中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ 值

将制得的氟化钙与氟化铅按质量比 1:4 混合后压入内径为 1.5 mm 的靶锥,在 AMS

测量过程中,离子源引出 CaF_3^- 负离子,加速器端电压选为 8.27 MV,膜剥离后的电荷态选为+7 态。探测器为多阳极充气电离室,其中 4 块阳极板分别记录不同粒子在同一气体中的能量损失 (ΔE_1 、 ΔE_2 、 ΔE_3 和剩余能量

ΔE_R),从而实现同量异位素的鉴别^[14]。电离室中充有丙烷气体,气压为 4.5 kPa。用偏置法拉第杯记录束流强度,采用 VME-MIDAS 系统获取数据。结合原子吸收光谱仪对总钙进行测量,其结果列于表 3。

表 3 测量结果列表
Table 3 Measurement results

分组	摄入钙总量/mg	粪钙总量/mg	粪钙中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$	内源钙中 $^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$
A 组	28 ± 0.1	9.08 ± 0.78	$(8.43 \pm 1.22) \times 10^{-10}$	$(4.87 \pm 0.14) \times 10^{-9}$
B 组	28 ± 0.1	9.74 ± 0.83	$(7.17 \pm 1.15) \times 10^{-10}$	$(3.98 \pm 0.16) \times 10^{-9}$
C 组	10 ± 0.1	1.25 ± 0.11	$(9.07 \pm 1.21) \times 10^{-10}$	$(2.16 \pm 0.15) \times 10^{-9}$
D 组	28 ± 0.1	8.88 ± 0.69	0	0

注:大鼠体重的多样性是导致测量结果多样性的主要原因,模型采用每 100 g 大鼠的钙吸收率代替整只大鼠的钙吸收率,以减小相对误差

3 结果计算与讨论

综合上述数据,可以得到:

$$\phi_A = \frac{28 - 9.08}{28} \times 100\% = (67.57 \pm 2.79)\% \quad (6)$$

$$\phi_B = \frac{28 - 9.74}{28} \times 100\% = (65.21 \pm 2.96)\% \quad (7)$$

$$\phi_C = \frac{10 - 1.25}{10} \times 100\% = (87.50 \pm 1.10)\% \quad (8)$$

其中, ϕ_A 、 ϕ_B 、 ϕ_C 分别为 A、B、C 组大鼠钙的表观吸收率。

$$\eta_A = \frac{\left(28 - \left(9.08 - \frac{0.843}{4.87} \times 9.08\right)\right)}{28} \times 100\% = (73.19 \pm 3.60)\% \quad (9)$$

$$\eta_B = \frac{\left(28 - \left(9.74 - \frac{0.717}{3.98} \times 9.74\right)\right)}{28} \times 100\% = (71.47 \pm 4.01)\% \quad (10)$$

$$\eta_C = \frac{\left(10 - \left(1.25 - \frac{0.907}{2.16} \times 1.25\right)\right)}{10} \times 100\% = (92.74 \pm 1.81)\% \quad (11)$$

其中, η_A 、 η_B 、 η_C 分别为 A、B、C 组大鼠钙的真实吸收率。

结果表明,大鼠对钙的真实吸收率明显高于表观吸收率。在相同剂量下,A、B 组大鼠对

钙的真实吸收率在误差范围内大致相等。大鼠钙摄入量在 10 mg/100 g(大鼠体重)~30 mg/100 g(大鼠体重)范围内时,A、C 组大鼠对钙的真实吸收率与钙摄入量呈反比,当钙摄入量低于 10 mg/100 g(大鼠体重)时,口服摄入的钙几乎被大鼠完全吸收。

本实验采用辐射低、半衰期长的 ^{41}Ca 标记体内钙库,通过 AMS 法测量钙吸收率,能避免传统测量钙吸收率的不足,排除内源性钙的干扰,得出真实的钙吸收率,且不受所评价的钙剂中钙的化学形式和种类的影响,进一步拓展了同位素评价钙吸收率的应用领域,为合理补钙、建立适宜于我国人民的钙参考摄入量标准奠定了研究基础。该模型在市售钙剂评价及临床钙代谢监测方面有着潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 陈可冀. 骨质疏松症与相关疾病[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:1-48.
- [2] 中国营养学会. 中国居民膳食营养参考摄入量[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000:137-144.
- [3] 李思汉. 过量钙与人体健康[J]. 实用妇幼卫生, 2003,14(1):9-11.
LI Sihan. Excess calcium and human health[J]. Practical maternal and child health, 2003, 14 (1): 9-11(in Chinese).
- [4] 王振纲. 对补钙有关问题的初步探讨[J]. 药物

- 不良反应杂志, 2006, 8(5): 326-329.
- WANG Zhengang. Preliminary discussion of related problems on supplemental calcium[J]. *Adverse Drug Reactions Journal*, 2006, 8(5): 326-329(in Chinese).
- [5] TADROSS M R, DICK I E, YUE D T. Mechanism of local and global Ca^{2+} sensing by calmodulin in complex with a Ca^{2+} channel[J]. *Cell*, 2008, 133(7): 1 228-1 240.
- [6] FARHAT G N, NEWMAN A B, SUTTON T K, et al. The association of bone mineral density measures with incident cardiovascular disease in older adults[J]. *Osteoporosis Int*, 2007, 18: 999-1 008.
- [7] DOHERTY T M, FITZPATRICK L A, INOUE D, et al. Medullar endocrine and genetic mechanism of arterial calcification[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4): 629-672.
- [8] 沈洪涛, 姜山, 何明. 钙吸收率分析方法研究[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2009, 2(1): 59-64.
- SHEN Hongtao, JIANG Shan, HE Ming. Research on analysis methods for calcium absorptivity[J]. *Chin J Osteoporosis Bone Miner Res*, 2009, 2(1): 59-64(in Chinese).
- [9] SPENCER H, SCHECK J, LEWIN I. Comparative absorption of calcium gluconate and calcium lactate in man[J]. *J Nutrition*, 1959, 89(3): 283-292.
- [10] SCHUETTE S A, KNOWLES J B. Intestinal absorption of calcium dihydrophosphate and calcium citrate compared by two methods[J]. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47(5): 884-888.
- [11] HEANEY R P. Estimation of true calcium absorption in men[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(5): 786-788.
- [12] DE GRAZIA J A. A isotope method for measurement of intestinal absorption of calcium in man[J]. *J Lab Clin Med*, 1965, 66(5): 822-829.
- [13] 窦亮. ^{41}Ca 标记内源钙库法测量大鼠钙吸收率的方法研究[D]. 北京: 中国原子能科学研究院, 2014: 63-65.
- [14] 窦亮, 何明, 董克君, 等. 加速器质谱测量岩石样品中 ^{41}Ca 的初步研究[J]. *原子能科学技术*, 2013, 47(12): 2 322-2 326.
- DOU Liang, HE Ming, DONG Kejun, et al. Preliminary study of ^{41}Ca -AMS measurement in rock samples[J]. *Atomic Energy Science and Technology*, 2013, 47(12): 2 322-2 326(in Chinese).