

豚鼠 ^{14}C 葡萄糖示踪动力学研究

咎林森 邱 怀 袁志发

(西北农业大学动物科学系, 陕西杨凌 712100)

摘 要 以豚鼠为试验动物, 研究了 ^{14}C 标记的葡萄糖 (^{14}C -GLUC) 在动物体内的转运与代谢规律, 其示踪动力学模型可用 $\hat{G} = 1157.0476e^{-0.0339t} + 14.6515e^{-0.0346t} - 1171.6911e^{-2.0976t}$ 一级吸收二室模型来描述。研究还证明, CNT 对葡萄糖在动物体内转运与代谢有调控作用, 有助于改善机体能量再分配。

关键词 豚鼠, ^{14}C 葡萄糖示踪, 动力学, 环核苷酸

中图分类号 Q591.2

糖普遍存在于动物各组织中, 葡萄糖在体内除主要用于氧化功能外, 还可参与脂肪蛋白质的合成与代谢, 因而葡萄糖的代谢问题已成为近年来研究的热点^[1~4]。本文旨在从机理上探讨 ^{14}C 标记的葡萄糖在动物体内的转运与代谢规律。

1 材料与方法

1.1 试验动物及饲养

从第四军医大学选购体重相近 (600 $\pm$ 12) g 成年健康的英国种雄性豚鼠 24 只作为试验动物, 随机分成 3 组, 每组 8 只, 分别饲养在由雏鸡笼改制的笼舍内。试验期间, 豚鼠自由采食与饮水, 每天除按饲养标准喂给专用配合饲料外, 还加喂 1 次青菜。

1.2 试验处理

试验共分 3 组, 分别为 cAMP、cGMP 及 ^{14}C -GLUC 处理, cAMP、cGMP 制剂均由进口分装的美商 Sigma 公司产品。cAMP、cGMP 加 0.9% 生理盐水配制而成, 浓度均为 0.30 mg/kg, ^{14}C -GLUC 由 6167.9 MBq/L 与葡萄糖盐水 (GLUC 50 g $\cdot$ L $^{-1}$, NaCl 9 g $\cdot$ L $^{-1}$) 配制而成。每只动物均腹部皮下注射各组相应制剂 1 mL。

1.3 试验步骤及研究方法

1.3.1 试验步骤 ① 试验处理结束后, 各组固定 4 只动物, 于 0.33, 0.50, 1.0, 3.0, 5.0, 8.0, 12, 17, 24, 26, 30, 34, 48, 63, 67, 72, 96 h 心脏采血, 制备血浆, 用于分析 ^{14}C -GLUC 之变化。② 在步骤①结束后, 立即处死各组另外 4 只豚鼠, 解剖, 分别固定部位取样, 其脏器主要有: 生殖器、小肠、膀胱、胃、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肌肉 (左右大腿)、脂肪 (腹部皮下)、皮毛 (背中线上)、脑等, 各组织随机取样 15~20 mg 迅速冷冻, 用于测定组织中 ^{14}C -GLUC 之变化。

1.3.2 研究方法 ① 血液及组织中 ^{14}C -GLUC 测定: 先把血浆及经过匀浆处理的组织样

收稿日期 1997-12-18

课题来源 霍英东教育基金资助项目

作者简介 咎林森, 男, 1963 年生, 副教授, 博士

品加入试管里,然后再向试管内加入 600 mL[∘] L⁻¹的高氯酸 (HClO₄) 300^μ L, 0.3 L[∘] L⁻¹的过氧化氢 (H₂O₂) 600^μ L, 异丙醇 1 滴, 加盖。置 70~ 80[∘] C 的恒温箱中消化 1~ 2 h, 为使消化完全, 消化期间要轻轻振摇试管。取消化后的样品 900^μ L (300^μ L HClO₄ 600^μ L H₂O₂) 移入本底值相同的闪烁杯内, 再加 10 mL 闪烁液, 振摇至澄清, 使达均相。置避光暗处适应 8~ 10 h, 以减少因化学发光而引起的计数误差, ¹⁴C 记数效率为 95% ② 示踪动力学模型构建: 根据示踪动力学的理论和方法, 采用一级吸收二室模型来构建 ¹⁴C-GLUC 示踪动力学模型, 并根据构建模型计算的血药浓度理论值与实际值进行比较, 用 *F* 检验, 以确定拟合的准确程度和构建模型的可靠程度 ③ 试验数据处理: 试验所得数据均在西北农业大学应用数学实验室上机处理, 包括运用麦夸法室分析计算机程序来构建动力学模型, 计算动力学参数和检验拟合度^[5~ 6], 以及对其他试验结果进行方差分析和多重比较等

2 结果与分析

2.1 ¹⁴C-GLUC 动力学模型

豚鼠腹腔注射 ¹⁴C-GLUC 后不同时间放射性变化见表 1, 其 *C-t* 曲线如图 1 所示。

表 1 血液 ¹⁴C-GLUC 浓度变化 kBq[∘] g⁻¹

序号	时间 (h)	实测值	预测值	序号	时间 (h)	实测值	预测值
1	0.33	4089.00	4064.05	10	26.00	3438.00	2860.79
2	0.50	4914.00	5085.00	11	30.00	2565.00	2491.22
3	1.00	6606.00	6317.64	12	34.00	1251.00	2169.39
4	3.00	5694.00	6335.26	13	48.00	684.00	1247.50
5	5.00	5400.00	5913.90	14	63.00	255.00	795.79
6	8.00	5499.00	5331.13	15	67.00	213.00	692.99
7	12.00	5001.00	4805.78	16	72.00	186.00	582.95
8	17.00	4635.00	3905.28	17	96.00	177.00	362.92
9	24.00	4002.00	3173.52				

用麦夸法室分析计算程序^[5~ 6]上机进行 60 次迭代, *F* 检验表明, 拟合结果符合一级吸收二室模型, 其方程为:

$$\hat{C} = 1157.0476e^{-0.0359t} + 14.6515e^{-0.0346t} - 1171.6911e^{-2.6976t}$$

式中, $\hat{C}$ 为预测值 (kBq[∘] g⁻¹), *t* 为时间 (h)。

据此方程估算的血液 ¹⁴C-GLUC 浓度与实测值 (表 1, 图 1) 相近, 其非线性相关 *Z* = 0.9735, 经方差分析, 二者无统计学差异 (*P* > 0.05)。值得一提的是, 12 h 以前 *C-t* 曲线拟合效果比较理想, 而 63 h 以后拟合效果较差, 说明此模型是描述 ¹⁴C-GLUC 12 h 以内代谢情况的最佳方程。

由该方程计算出 ¹⁴C-GLUC 的动力学参数看, ¹⁴C-GLUC 在动物体内吸收很快, 吸收速率常数 (*k*_a) 为 2.6976 h⁻¹, 其吸收半衰期 (*t*_{1/2*k*_a}) 为 0.2569 h, 并于 1.6228 h (*t*_{max}) 达到

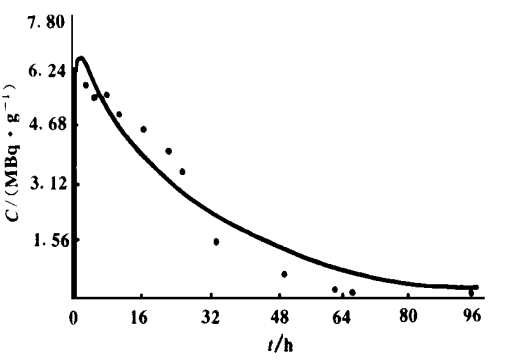


图 1 GLUC *C-t* 曲线

峰浓度 ($c_{\max}$) 6544. 0398 $\text{kBq} \cdot \text{g}^{-1}$; 分布速率常数 (T) 为 $0. 0359 \text{ h}^{-1}$, 其消除半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 为 19. 3036 h; 消除速率常数 (U) 为 $0. 03458 \text{ h}^{-1}$, 其消除半衰期 ($t_{1/2U}$) 为 20. 0405 h; 在 96 h 之后, 血液 ^{14}C -GLUC 浓度达到较低水平。

2. 2 ^{14}C -GLUC 分布与转运代谢

根据 ^{14}C -GLUC 在 12 个器官和组织以及血液中的分布^[5], 计算 GLUC 在体内的分布比例 (%), 并作为 CK 来确定 cAMP 和 cGMP 对 GLUC 在动物体内的转运规律及其参与糖元、脂肪、蛋白质合成的作用 (表 2)

表 2 ^{14}C -GLUC 在动物体内的代谢、转运情况							%
处理	肝脏	心脏	胃	小肠	肾脏	睾丸	肌肉
cAMP 处理	2. 58a A	1. 92a	1. 37a	1. 10a A	1. 28a A	5. 40a A	7. 86a A
cGMP 处理	1. 12b B	1. 63a	1. 03b	2. 97b B	2. 80b B	7. 38b B	2. 72b B
CK	1. 15b B	1. 71a	1. 68c	2. 80C B	2. 59c C	1. 65c C	6. 83c C

处理	脾脏	膀胱	大脑	皮毛	脂肪	血液	合计
cAMP 处理	1. 70a	2. 44a A	4. 03a A	5. 48a A	2. 60a A	0. 66a A	38. 42a A
cGMP 处理	1. 77a	3. 69b B	4. 80b B	4. 01b B	4. 90b B	0. 42b B	39. 54b A
CK	1. 80a	4. 71c C	4. 30c A B	4. 18b B	4. 59c B	0. 48c C	38. 49a A

注: ① 血液中 ^{14}C -GLUC 含量是按 96 h 时测定结果计算的; ② 数字后字母表示纵向差异显著性, a, b, c 为显著水平 ($P < 0. 05$); A, B, C 为极显著水平 ($P < 0. 01$)。

由表 2 知, 外源性葡萄糖在转运过程中除一部分随代谢排出体外, 多数参与蛋白质、脂肪的合成而沉积于肌肉、脂肪、膀胱、大脑、皮毛等组织或器官中, 比例在 4. 18% ~ 6. 83%; 血液中的 GLUC 比例最少, 仅占 0. 48%。

另据作者相关试验对肌注 ^{14}C -GLUC 处理组动物肌肉鲜样 CP ($20. 13\% \pm 0. 42\%$) 和 CF ($19. 87\% \pm 0. 03\%$) 的测定结果^[5], 计算出肌肉组织中 GLUC 参与蛋白质合成沉积于肌肉中的比例为 1. 37%, 而参与脂肪合成沉积于肌肉中的比例为 0. 91%, 二者之比为 1. 51。受 cAMP 和 cGMP 的影响, GLUC 在动物体内的转运与代谢, 在许多脏器或体液中有明显的差异, 主要表现为 cAMP 促进 GLUC 参与蛋白质合成和脂肪分解, 肌肉组织增加 15. 08%, 脂肪组织减少 43. 36%; 而 cGMP 的作用则大致相反, 肌肉组织减少 60. 18%, 脂肪组织增加 6. 75%。

据报道^[2], 鼠肝蛋白更新快, 半衰期为 5~ 96 h; 肌肉组织总蛋白的半衰期为 30 d, 而其糖元的半衰期只有 0. 5~ 1. 0 d, 故肌肉组织中蛋白质周转很慢; 脑中脂质也慢 (三脂酰甘油的半衰期 10~ 172 h), 磷酸酯 200 d, 胆固醇 > 1 000 d)。另外, 有报道认为, 鼠心脏、肝脏及兔的肌肉中存在蛋白-糖元结合物, 且这种结合是靠共价键相连的, 在中性 pH 条件下, 这种物质很难被提取出来, 通常情况下都与其他某些大分子物质结合存在^[5]; 而且葡萄糖残基与蛋白质结合时会导致糖元合成的外源启动^[7]。这些研究成果有助于解释糖与脂肪及蛋白质之间的关系。

3 讨 论

3. 1 示踪剂选择与示踪剂量的确定

^{14}C 具有半衰期长, 对农业生物试验可不作校正, 只能放射出 γ 射线, 测量方便等优

点。而且 ^{14}C 又是一切有机物的骨架元素,组成物质的 C—C 键,一般比较牢固。有人曾用 ^3H ^{14}C 双标记法测定了产蛋母鸡输卵管中蛋白质的合成动态,1 次性腹腔注射了剂量为 6.67 MBq/g 活重的 ^{14}C 亮氨酸和剂量为 29.10 MBq/g 活重的 ^3H 亮氨酸;4.5 h 时,输卵管蛋白分泌部的蛋白质比活度 ^{14}C 氨基酸为 (140.16 ± 9.60) MBq/g, ^3H 氨基酸为 (800.40 ± 49.80) MBq/g^[8]。Sephens C A 等^[1]研究了母鸡生殖系统各组织对 ^{14}C 标记糖的吸收与结合,将 $\text{D}[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{GLCN}$ (氨基葡萄糖)、 $\text{D}[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{GalN}$ (半乳糖胺)和 $\text{D}[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{GLUC}$ (葡萄糖)干物质 1.85 MBq 或 3.70 MBq 制备成 1 mL 生理盐水,经翅膀静脉注射引入体内^[1]。根据前人大量试验结果和本次实验的预试验,测定结果以 6167.9 kBq 剂量处理,未造成机体辐射损伤(国家放射性卫生标准为等效年用量 $< 185\text{ GBq}^{[9]}$),说明本次试验是在正常生理状态下进行的。

3.2 ^{14}C -GLUC 在动物体内的代谢

物质代谢通常可分为 4 大类,即氧化、还原、水解和合成,另外,还有一些特殊类型的反应。所有这些反应都依赖于物质的化学性质和酶促过程。代谢反应往往包括物质化学键的断裂,即反应的结果会使标记分子的一部分丢失。因此,如果标记的位置选择不当,标记原子在代谢的过程中会与标记物分子的主体分离,不能再起“示踪”之功能,对试验结果的准确性也影响很大。葡萄糖(GLUC)因有比较牢固的 C—C 键, ^{14}C 就标记在 1 号位上,成为 C 架上的一元,因而也较稳定^[1,5]。在生理状态下,由于体内代谢过程中经氧化、酵解等反应, ^{14}C -GLUC 肯定会产生降解,一方面分解供能最终以 CO_2 和水的形式排出体外,另一方面被吸收和结合,参与糖元、脂肪和氨基酸的合成而沉积于体内^[3], ^{14}C 所在碳架也随之转移到另一类物质中去,进而达到“示踪”的目的。因此本次试验所测得不同组织、体液中有关 ^{14}C -GLUC 的放射性,实质上就是 GLUC 在该组织、体液中代谢累积的量,不一定是 ^{14}C -GLUC 原型。示踪代谢动力学的意义正在于此。

3.3 CN T 调控与葡萄糖利用

Stephen^[1]报道了 ^{14}C 标记糖在母鸡生殖系统各组织的吸收与结合,认为半乳糖(Gal)是氨基葡萄糖中连接碳水化合物与蛋白质的重要成分。Marat^[7]用 ^{14}C 葡萄糖示踪技术,阐明了碳水化合物与蛋白质之间的关系,认为当葡萄糖残基与蛋白质结合时,就会发生糖元合成的外源启动。另据报道,大肠杆菌在有葡萄糖存在的培养液中生长时,葡萄糖及其代谢产物作为一种信号抑制乳糖代谢的酶的合成,葡萄糖用完后,才转而利用乳糖,在此过程中,cAMP 可以克服葡萄糖的阻遏作用,而且这种效应是 cAMP 特有的,其他核苷酸或磷酸化合物都无此作用,而 cAMP 也只作用在受葡萄糖阻遏的酶^[2]。

本次 ^{14}C -GLUC 示踪动力学研究及作者相关试验研究^[5]结果表明,机体糖利用的加强与 cAMP 调控有关,集中表现为血糖升高,血中脂肪酶活性升高,肝中转氨酶活性下降以及血中肾上腺素和生长激素水平升高等诸多方面。最终表现为: ^{14}C -GLUC 的总体利用效率提高,在肌肉组织内聚积增多和脂肪组织聚积减少等方面。来自血中睾酮、生长激素、胰岛素水平升高的信息有力地证明了 cAMP 能有效地改善了能量的分配,充分动员糖元和脂肪分解供能,强化蛋白质合成机制,减少了糖异生造成的蛋白质损失。

参 考 文 献

- 1 Stephens C A. 母鸡生殖系统各组织对 ^{14}C 标记糖的吸收和结合. 核农学通报, 1987(4): 27
- 2 余微明, 祁国荣编著. 代谢(一): 糖代谢及其调控与核酸代谢. 北京: 科学出版社, 1988
- 3 北京农业大学主编. 动物生物化学(第 2 版). 北京: 农业出版社, 1987
- 4 刘 毅, 康 南. ^3H 萱草根素在小白鼠体内吸收分布、排泄和代谢的初步观察. 畜牧兽医学报, 1990, 21(1): 54~ 58
- 5 咎林森. CNT 在动物体内代谢规律及基因表达调控的研究 [博士学位论文]. 陕西杨陵: 西北农业大学动物科学系, 1997
- 6 周静芋, 宋世德, 袁志发等. 用麦夸法进行室分析曲线拟合. 西北农业大学学报, 1996, 24(1): 75~ 78
- 7 Marta L. The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart. Eur J Biochem, 1983, 135: 175~ 179
- 8 张世荣. 胰岛素和胰岛素介体对细胞的 cAMP 和脂解的调节. 生物化学与生物物理学报, 1987, 19(2): 97~ 85
- 9 陈毓荃主编. 生物化学研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1995

Trace Kinetics of ^{14}C -GLUC in Quineu Pigs

Zan Linsen Qiu Huai Yuan Zhifa

(Department of Animal Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Using trace kinetics and radioimmunoassay and other techniques, distribution features and metabolic law of ^{14}C -GLUC and effect of its CNT controlling in quinea pigs as test animals have been studied. The results of trace kinetics indicated that metabolism of GLUC could be described with two compartment medals of first-order rate process, $\hat{C}(\text{GLUC}) = 1157.0476e^{-0.0359t} + 14.6515e^{-0.0346t} - 1171.6911e^{-2.6976t}$. Further research showed that CNT was good to the improvement of energy distribution of body.

Key words Quinea pig, ^{14}C -GLUC trace, kinetics, CNT