

## • 综述与译文 •

# 稳定核素在钙吸收和钙代谢 动力学研究中的应用

北京协和医院核医学科 姜国辉 江 骥综述 王世真审

**摘 要:** 钙是人体含量最丰富的元素之一, 一旦体内钙吸收和钙代谢失衡, 则可使机体产生诸多疾病。由于放射性核素的辐射损害使其在钙代谢研究、特别是在婴幼儿及孕妇钙代谢研究中的应用受到限制。本文介绍用单稳定核素、双稳定核素示踪法在钙吸收和钙代谢动力学研究中的基本原理、操作方法、应用结果及安全性, 并讨论了现阶段这些方法的局限性。

### 一、前 言

钙是人体含量最丰富的元素之一。成年人体内钙总量约为1kg, 其中90%以上存在于骨组织, 其余的在体液(主要是血浆)以及软组织的细胞结构和胞浆中。在正常情况下, 钙在体内的含量及分布既恒定又平衡, 这种恒定和平衡对维持机体的健康非常重要。

骨组织的钙稳定是通过骨溶解和新骨形成之间的平衡而维持的, 骨钙既保持了骨组织的功能, 又是机体的钙贮库, 通过骨钙与体液钙的交换, 保持血浆钙的稳定水平。血浆钙水平由甲状旁腺素(PTH), 降钙素和维生素D三者共同维持, 体内存在两个钙浓度梯度: 骨-血浆钙浓度梯度和细胞内-细胞外钙浓度梯度。成年人血浆钙一般稳定在 $2.5\text{mmol/L}$  ( $10\text{mg/dL}$ ), 细胞内钙浓度较低而恒定, 一般在 $0.1\sim 1\text{mmol/L}$ 。一旦体内钙含量、钙恒定与钙平衡、浓度梯度发生变化, 则可使机体产生诸多疾病, 例如: 心、脑血管疾病, 代谢性骨病以及衰老等。

研究人体钙吸收及钙代谢动力学的方法有多种, 包括经典的代谢平衡研究法<sup>[1]</sup>, 放射性核素示踪法<sup>[2]</sup>等, 但由于代谢平衡研究

需要收集72小时粪、尿, 方法繁琐且不能提供更多有用的钙代谢动力学参数。放射性核素示踪法主要使用 $^{45}\text{Ca}$ , 它是 $\beta^-$ 粒子, 半衰期为165天, 根据钙在人体内的代谢特性, 将 $^{45}\text{Ca}$ 引入人体后所导致的辐射剂量是不容忽视的, 因而限制了这些方法在人体内钙吸收及代谢中的应用, 特别是不适于低体重出生儿(LBWI)、早产儿、新生儿、儿童及孕妇等。因此, 尽管在这一领域进行了三十多年的研究, 但有关人体钙吸收及其一些代谢机制仍未完全阐明。随着科学技术的发展, 稳定核素技术目前已越来越广泛地引起了人们的注意, 一是它不具有放射性, 可以用于婴幼儿及孕妇; 二是稳定同位素的生产及探测仪器和技术在近二十年内有了巨大发展, 使近几年来国外稳定核素在钙吸收及代谢中应用日益广泛, 并推动了钙代谢研究。

### 二、用单标记或双标记稳定核素技术 研究人体肠钙吸收及生物利用度

某些研究表明, 钙摄入量与成年骨质量呈正相关, 并认为青少年时期增加钙摄取能提高成年后骨质量, 并可降低以后老年性骨质疏松发生率<sup>[3]</sup>。在早产儿及儿童中补充多少钙既安全又可以满足钙吸收、骨钙沉积以及各种含钙食物中钙的生物利用度是需要研

究解决的问题。

1988年, Laura等<sup>[4]</sup>建立了用双稳定核素示踪技术配合热电离四极质谱技术研究钙吸收的方法。他们研究了7例两周龄早产儿的钙吸收率, 每一婴儿用一次弹丸式方法静脉给予 $7.5\mu\text{g/kg}^{46}\text{Ca}$ , 立即以管饲法给予与标准食物均匀混合在一起的 $^{41}\text{Ca}$   $1.25\text{mg/kg}$ , 然后将婴儿移至特制的代谢床, 收集尿液(每4小时一份), 共收集24小时。用Finnigan热电离四极质谱测定尿样中 $^{41}\text{Ca}$ 和 $^{46}\text{Ca}$ 同位素丰度。自然界中的钙含有 $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{46}\text{Ca}$ ,  $^{48}\text{Ca}$ 共六种稳定同位素(见表1), 为了减少仪器测定误

表1 钙的稳定同位素

	天然丰度(%)	与 $^{48}\text{Ca}$ 的比率	纯度(%)
$^{40}\text{Ca}$	96.95	521.2	
$^{42}\text{Ca}$	0.646	3.519	95
$^{43}\text{Ca}$	0.135	0.7312	83
$^{44}\text{Ca}$	2.083	11.27	98
$^{46}\text{Ca}$	0.0035	0.01714	40
$^{48}\text{Ca}$	0.186		98

差, 实验中分别测定 $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{46}\text{Ca}$ 丰度及其与天然 $^{48}\text{Ca}$ 丰度的比率, 并用 $^{48}\text{Ca}/^{43}\text{Ca}$ 比率变异来校正测量精度。校正后,  $^{44}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 的测量误差小于1%,  $^{46}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 测量误差小于3%。测定尿样中 $^{41}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 及 $^{46}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 比率, 并分别减去天然丰度 $^{44}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 及 $^{46}\text{Ca}/^{48}\text{Ca}$ 比率, 即为尿样中 $^{44}\text{Ca}$ 及 $^{46}\text{Ca}$ 百分超。早产儿钙的真实吸收率由以下公式计算:

钙吸收率( $\alpha$ ) =

$$\frac{{}^{44}\text{Ca}/{}^{48}\text{Ca}\text{天然比率} \times {}^{46}\text{Ca}\text{剂量} \times {}^{44}\text{Ca}\text{百分超}}{{}^{46}\text{Ca}/{}^{48}\text{Ca}\text{天然比率} \times {}^{44}\text{Ca}\text{剂量} \times {}^{46}\text{Ca}\text{百分超}} \times 100\%$$

由上式可看出, 测定钙吸收率与尿样的浓度及体积无关, 利用静脉及口服给予两种稳定核素, 一次便可测定出真实的肠钙吸收率。通过研究钙吸收率在不同时间的函数变化, 观察到在给予 $^{44}\text{Ca}$ 及 $^{46}\text{Ca}$ 12小时后, 从尿中测

出的钙吸收率达到近似恒定值, 即吸收率曲线近乎与X轴平行。这就表明只需在给予示踪剂12小时后某一时间取一次尿样, 就可测出肠钙吸收率。研究结果表明, 二周龄早产儿肠钙吸收率约为48%。为了探讨该研究方法的稳定性, Laura等重复研究了其中三名早产儿三周龄时的肠钙吸收率, 其结果基本与前次相同。钙稳定核素的天然丰度及纯度见表1, 其中 $^{44}\text{Ca}$ 价最廉(7美元/mg), 但它不适于婴儿静脉给药, 因为探测 $^{44}\text{Ca}$ 需要较高的浓度, 而这一浓度对于婴幼儿是很危险的。 $^{44}\text{Ca}$ 是理想的口服示踪剂。 $^{46}\text{Ca}$ 在极低浓度下便可探测到, 所以适于婴幼儿静脉给药, 由于它较昂贵(2000美元/mg), 故在儿童及成年人钙代谢研究中不宜应用, 而选用 $^{42}\text{Ca}$ 静脉给药较为理想。

1989年, Judy等<sup>[5]</sup>建立了单稳定核素示踪技术配合快原子轰击质谱(FAB-MS)测定肠钙吸收的方法, 并与双稳定核素示踪法做了对比研究, 同时研究了不同配方商品钙片的生物利用度。该研究包括6名11~17岁的健康青少年。他们将 $^{44}\text{Ca}$ 制备进三种不同的商品钙剂中: 两种不同比例的苹果酸枸橼酸钙(钙:枸橼酸:苹果酸分别为6:2:3和5:1:1)和碳酸钙。每种钙剂中含 $^{44}\text{Ca}$ 35mg, 普通钙( $^{40}\text{Ca}$ )215mg, 将其混合于普通饮食中口服, 30分钟后静脉注射10ml $^{42}\text{Ca}$ 示踪剂, 并取2ml血测定 $^{41}\text{Ca}$ , 然后分别于口服示踪剂后90, 120, 150, 180, 300分钟时取血2ml, 用高分辨率高精度快原子轰击质谱, 测定 $^{41}\text{Ca}$ 百分超, 按以下公式求出 $^{44}\text{Ca}$ 的丰度: 丰度 =  $\text{mmol}^{44}\text{Ca}/\text{mmol}$ 总钙, 再由SAS程序计算钙吸收率, 该结果代表由单稳定核素示踪方法得出的钙吸收率。收集口服及静脉给予双核素示踪剂后24小时尿样, 并按上述双核素示踪法测得的钙吸收率为 $41.4\% \pm 8.2\%$ (口服后8~12小时尿样); 用单稳定核素示踪法测得的钙吸收率为 $41.64\% \pm 9.6\%$ (口服后150分钟血样), 两种方法测得的结

果高度相关。这一结果提示,口服 $^{44}\text{Ca}$ 后150分钟,抽取一份血样测定钙吸收率是可行的。Marshall和Nordin<sup>[6]</sup>曾用放射性核素示踪法比较了几种不同的钙吸收测定方法,指出双核素技术并不比单核素技术更为精确。Francis等<sup>[7]</sup>的研究证明,多时间点采取血样获得的结果亦并不优于单时间点采样测定。由于 $^{44}\text{Ca}$ 较为廉价,单稳定核素示踪技术又较为简单,这就为较大范围地研究儿童及孕妇钙的吸收率提供了一个新的方法学。Judy等对三种不同商品营养钙剂的生物利用度研究结果提示,碳酸钙吸收率最低,为 $26.7\% \pm 7.8\%$ ,苹果酸枸橼酸钙吸收率为 $39.5\% \pm 10.6\%$ (配方比例为5:1:1)和 $41.4\% \pm 8.2\%$ (配方比例为6:2:3)。

以往,人们认为奶钙较谷类及蔬菜中的钙吸收率高,然而却没有任何资料证实这一观点。1989年,Susan等<sup>[8]</sup>用双标记稳定核素示踪方法研究了普通饮食、富钙饮食及蔬菜等不同食物中钙的生物利用度及长期补充富钙食物对肠钙吸收率的影响。实验中,10名健康男性自愿者分别口服等量含有30 mg  $^{44}\text{Ca}$ 的脱脂奶,富钙脱脂奶及水田芹汤,同时静脉注射3mg  $^{42}\text{Ca}$ ,用原子吸收光谱(AAS)和快原子轰击质谱探测口服后24小时内血浆、唾液及给药6天内的尿样中钙含量和 $^{44}\text{Ca}$ 、 $^{42}\text{Ca}$ 丰度。结果表明,血、尿及唾液中 $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ 水平基本一致,脱脂奶的钙吸收率为 $45.5\% \pm 1.9\%$ ,富钙脱脂奶为 $35.7\% \pm 4.7\%$ ,水田芹为 $27.4\% \pm 1.9\%$ 。为了观察外源性掺入的钙与内源性标记的钙在吸收率上是否有差别,Susan等将新鲜水田芹置入去离子水中,加入放射性钙同位素 $^{47}\text{Ca}$ ,3天后将水田芹上部茎及叶做成匀浆,并测定其中标入的内源性 $^{47}\text{Ca}$ 的量,另将相同剂量的 $^{47}\text{Ca}$ (外源性)掺入普通水田芹匀浆。分别给16只大鼠灌胃,用 $\gamma$ 计数器测定给药后7天的整体大鼠 $\gamma$ 计数,计算其放射性钙滞留率。结果表明,外源性掺入的钙(钙

滞留率 $80.3\% \pm 1.2\%$ )与内源性标入的钙(钙滞留率 $76.3\% \pm 2.2\%$ )吸收率无明显差别。这表明可以用外源性掺入的钙示踪剂来研究含钙食物的钙吸收率。他们还观察了大量补充含钙食物对钙吸收率的影响,每天加服568ml富钙脱脂奶连服四周,测定其吸收率,结果发现,长期服用高钙含量食物,其肠钙吸收率下降。这说明机体内钙吸收有内在反馈调节机制。

### 三、双稳定核素示踪技术在钙代谢动力学研究中的应用

以往,放射性核素示踪方法结合数学模拟技术曾广泛用于研究正常成人及各种钙代谢障碍病人的钙代谢动力学<sup>[9,10]</sup>,但由于放射性损伤的限制,新生儿及儿童等完整的钙代谢动力学机制一直未能阐明。近几年,稳定核素技术及质谱技术的巨大发展极大地促进了这一领域的研究。

1985年,Larry等<sup>[11]</sup>报道了用稳定核素技术配合高精度热电离质谱探测手段研究新生儿钙代谢的方法学。为了证实该方法的可靠性,他们用新生恒河猴按类似方法,以 $^{45}\text{Ca}$ 和 $^{47}\text{Ca}$ 代替 $^{46}\text{Ca}$ 和 $^{48}\text{Ca}$ 做了对比研究。该方法以三室模型表示钙在体内的动力学分布(见图1),该模型可以由以下方程表示:注射剂量分数 $= C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} + C_3 e^{-k_3 t}$ ;

式中,  $M_1$ : 快速交换的钙代谢池。主要包括血浆和细胞外液钙

$M_2$ : 与细胞内液及软骨组织钙有关的代谢池

$M_3$ : 易与血浆及细胞外液交换的沉积在骨表面的钙

$V_a$ : 从胃肠道中吸收的钙

$V_i$ : 口服摄入的钙

$V_f$ : 内源性粪排泄钙,  $V_u$ : 尿排泄钙

$V_F$ : 总的粪排泄钙(包括未吸收部分及内源性粪排泄部分)

$V_{os}$ : 骨沉积钙

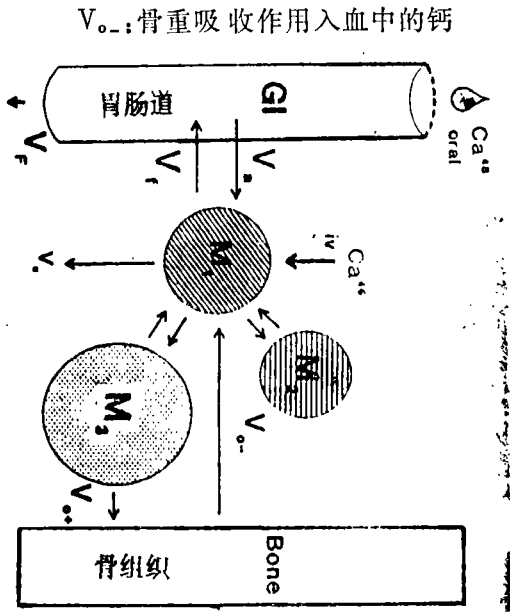


图1 钙代谢动力学模型

实验开始时,给受试者静脉注射 $80\mu\text{g}^{45}\text{Ca}$ ,同时每天给予恒量的口服 $^{48}\text{Ca}$ ,每72小时口服一次染色剂(指示口服钙剂后的粪排泄),将新生儿置于代谢床中共九天。注射 $^{45}\text{Ca}$ 后15,30,60分钟及4,24小时各取血1ml,服药后第一天每4小时收集一份尿样,其余天每8小时收集一次尿样,当第一次口服的染色剂出现后,每72小时收集一份粪样。整个研究过程中,均需测定食物总摄入钙、尿钙、粪钙:用EDTA滴定分析法测定总的血清钙及尿钙,用原子吸收光谱测定总饮食钙及粪钙,用高精度热电离质谱(TIMS)测定 $^{45}\text{Ca}$ 及 $^{48}\text{Ca}$ 百分超,并以天然 $^{42}\text{Ca}/^{44}\text{Ca}$ 比率测定误差进行校正。所有数据用SAAM计算机程序配合反卷积数学方法<sup>[12]</sup>进行拟合分析。新生恒河猴按上述方法分别口服 $1.85\text{MBq}(0.05\text{mCi})^{45}\text{Ca}/\text{ml}$ 食物,静脉注射 $740\text{MBq}(20\text{mCi})^{47}\text{Ca}$ ,然后分别收集不同时间的血、尿、粪样,用碘化钠晶体闪烁测量 $^{47}\text{Ca}$ 比活度,三个月后当 $^{47}\text{Ca}$ 衰变完后,再用液体闪烁测量 $^{45}\text{Ca}$ 比活度,用上述同一程序分析其钙代谢动力学。该程序可提供如下钙代谢动力学参数:

$V_i, V_a, V_u, V_f, V_F, V_{o+}, V_{o-}, V_{Bal}$  (代谢平衡),  $V_{oBal}$  (综合代谢平衡),  $V_a/V_i, V_F/V_u, M_1, M_2, M_3$ 。结果表明,新生儿及新生恒河猴钙代谢动力学参数完全符合三室( $M_1, M_2, M_3$ )代谢模型。新生儿与新生恒河猴的钙代谢动力学基本相似,从而支持了用双稳定核素示踪法结合质谱技术研究新生儿钙代谢的有效性。通过该研究还发现,用经典的稳态房室模型研究新生儿钙代谢动力学是不适合的,因为新生儿每天以约体重1%的速度生长,因此作者修正了稳态模型以说明在研究过程中逐渐扩大的钙代谢库。与成年人钙代谢动力学参数比较,该研究发现新生儿的钙丢失主要以粪钙排泄形式,而成年人主要以尿钙排泄形式;新生儿钙吸收是成年人的10倍左右,相应的新生儿各种动力学参数亦大大超过成年人,新生儿钙代谢呈较高的正平衡,而成年人往往呈轻度负平衡。

尽管Larry等介绍的方法能够提供较完整、精确的钙代谢动力学参数,但该项研究费用较为昂贵,并且时间较长,不能用作常规临床研究。

1990年, Yergey等<sup>[13]</sup>用 $^{42}\text{Ca}, ^{44}\text{Ca}, ^{46}\text{Ca}$ 同时研究了早产儿、儿童及成年人的钙代谢动力学。他们对Larry的方法进行了某些改进,并研究了不同机体状态对钙吸收率的影响。该方法是给早产儿静注 $^{46}\text{Ca}$ 、口服 $^{41}\text{Ca}$ ,给儿童及成年人静注 $^{42}\text{Ca}$ 、口服 $^{41}\text{Ca}$ ,按研究目的的不同分别收集血、尿及粪样;以研究饮食钙吸收率为目的时,仅收集24小时尿样;当研究包括各种动力学参数时,则收集6份血样、24小时尿样及给药后4~5天粪样。结果,早产儿钙代谢动力学与Larry等报道的结果一致,儿童钙丢失与成年人一样,主要以尿排泄形式而非粪排泄形式;对于成年人,用该方法得出的结果与经典的平衡研究法结果基本一致,但平衡法由于系统误差的原因,得出的结果变异较大。研究表明,空腹状态得到的钙吸收率偏高,不能代

表正常饮食状态的钙吸收率。

同年, Roger等<sup>[14]</sup>探讨了稳定核素示踪法结合热电离质谱技术研究钙代谢的精确度和稳定性。指出该方法探测生物样品中低于 $10\text{ng}^{48}\text{Ca}$ 的相对精确度为 $0.25\%\sim 0.5\%$ , 低于 $1\text{ng}$ 的 $^{48}\text{Ca}$ 相对精确度(为 $1\%\sim 2\%$ ), 而用中子活化分析法探测 $25\mu\text{g}^{48}\text{Ca}$ 只有 $1\%\sim 2\%$ 的精确度, 探测 $1\mu\text{g}^{48}\text{Ca}$ 只有 $3\%\sim 6\%$ 的精确度。在13个月9次不同时间测定中, 实验过程的化学沉淀作用及仪器因素造成的结果重复性误差只有 $1.2\%$ 。该研究还提示, 用单份血样或尿样测得的钙吸收率比按较精确的数学反卷积法得到的结果高 $6\%\sim 10\%$ , 并提出了修正这个误差的经验公式。

1991年, Steven等<sup>[15, 16]</sup>用双稳定核素示踪法研究了LBWI儿童的内分泌性粪钙排泄, 结果表明, LBWI的内源性粪钙排泄 $[15.5\pm 8.9\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 为总摄入钙的 $7.2\%\pm 4.1\%$ , 净钙吸收为 $103\pm 38\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 而正常儿童内源性粪钙排泄率为 $1.4\pm 0.4\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 并且认为LBWI较正常儿童及成年人内源性粪排泄率高的原因可能与LBWI肠道功能尚未完全健全有关。研究还提示, 骨钙沉积主要与钙吸收率有关, 而与内源性粪钙排泄关系不大。

#### 四、用稳定核素离子显微显像法 研究肠组织钙转运

肠道钙吸收至少包括三个限速步骤: 穿过微绒毛膜, 在胞浆及细胞器中转运, 耗能转运至基底膜。1990年, Subhash等<sup>[17]</sup>报道了用稳定核素 $^{44}\text{Ca}$ 示踪结合离子显微显像及冰冻切片技术研究钙转运的方法。该方法利用第二离子质谱, 根据质荷比的不同识别同位素, 探测稳定核素产生的第二离子信号, 并使之在组织切片上直接显像。第二离子质谱立体分辨率为 $0.5\mu\text{m}$ , 它能使组织中 $0.5\mu\text{m}$ 厚度内的稳定核素显像, 因此可以用 $^{44}\text{Ca}$ 示踪研究肠组织不同细胞内钙的转运过

程。作者用该方法研究了富含维生素D及缺乏维生素D时肠组织对钙转运的影响。具体方法是, 将鸡十二指肠部分肠段结扎, 注射 $20\text{mmol/L}^{44}\text{CaCl}_2 1\text{ml}$ , 分别在注射后2.5, 5, 20分钟时取结扎肠段部分组织迅速冲洗冰冻, 制成超薄冰冻切片, 用第二离子质谱进行微观离子显像分析。研究结果提示, 在富含维生素D的肠组织, 注射 $^{44}\text{Ca}$  2.5分钟后, 钙离子已迅速浓集在肠微绒毛膜内边缘区; 而在缺乏维生素D的肠组织, 在注射后5分钟及20分钟时才见到 $^{44}\text{Ca}$ 离子渐渐浓集在微绒毛膜内边缘区。并且富含维生素D肠组织内 $^{44}\text{Ca}$ 分布更为广泛均匀, 提示维生素D能增加肠钙离子转运速率。

#### 参 考 文 献

- 1 Aubert JP et al. J Clin Invest 1963; 42 (6): 885-897
- 2 Neer R et al. Clin Invest, 1967; 46: 1364-1379
- 3 Sandler RB et al. Am J Clin Nutr, 1985; 42: 270-274
- 4 Laura SH et al. Pediatr Res, 1988; 23 (6): 589-594
- 5 Judy FM et al. Clin Chim Acta, 1989; 183: 107-113
- 6 Marshall DH et al. Clin Sci, 1981; 61: 477-481
- 7 Francis RM et al. Am J Clin Nutr, 1986; 43: 72-76
- 8 Susan IF et al. Br J Nutr, 1989; 62: 379-388
- 9 Heaney RP et al. J Clin Endocrinol, 1958 18: 1246-1267
- 10 Lazor MZ et al. J Clin Invest, 1963; 42: 1238-1247.
- 11 Larry J M et al. Pediatr Res, 1985; 19(4): 329-334
- 12 Berman M et al. 1978 SAAM Manual, USDHEW Publication No. (NIH) 78-180, Washington, DC
- 13 Yergey AL et al. Can J Physiol Pharmacol, 1990; 68: 974-976
- 14 Roger IP et al. Biomed Environ Mass Spectrom, 1990; 19: 353-359
- 15 Steven AA et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991; 12: 469-473
- 16 Steven AA et al. Pediatr Res, 1991; 29(6): 615-618
- 17 Subhash C et al. Proc Natl Acad Sci, 1990; 87(8): 5715-5719