

用同位素示踪技术研究大鼠体内铬的赋存状态

丰伟悦 钱琴芳 丁文军 柴之芳

(中国科学院高能物理研究所, 中国科学院核分析技术开放实验室, 北京 100080)

以富集稳定同位素 $^{50}\text{Cr}^{3+}$ 作示踪剂, 用 Sephadex G-25 凝胶色谱法和中子活化法研究了 Cr(III) 在正常和患糖尿病大鼠肝胞液、血清及尿液中的赋存状态。研究发现: (1) Cr(III) 在大鼠血清中可迅速与血清蛋白结合, 以某种特定蛋白质为载体将 Cr(III) 运送到身体各部; 在大鼠肝胞液中, 铬主要与高分子量蛋白质结合, 并可能以高分子量铬结合蛋白的形式储存在肝脏中。(2) 在两组大鼠的血清、肝胞液及尿液中均发现有一低分子量($< 5\ 000\text{D}$)的铬结合物质存在。(3) 糖尿病大鼠尿中低分子量铬配合物的排泄总量远高于正常组大鼠, 这可能是造成糖尿病大鼠体内缺铬的原因之一。

关键词 富集稳定性同位素示踪技术 Cr(III) 大鼠 赋存状态

中图分类号 Q · 503 O · 614. 61

Cr(III) 被确认为动物及人体必需微量元素以来, Cr(III) 的生物效应逐渐为人们所认识。Schwarz 等^[1]把能改善动物和人体内葡萄糖耐量的含铬化合物命名为“葡萄糖耐量因子”(GTF)。Anderson 等^[2]系统研究了饮食中铬对大鼠组织中铬浓度和铬吸收的影响, 发现饮食中的铬形式显著影响组织铬浓度。而 Schwarz 等的研究发现, 与简单的无机盐相比, GTF 具有高的小肠吸收率及对葡萄糖代谢的刺激效应, 这是无机铬所没有的。上述结果说明铬的生物特性与其化学形式密切相关。

目前, 对动物及人体内铬的赋存状态的研究还很少, 对生物体内源性铬配合物的代谢及生物功能的研究尚处于起步阶段, 有许多问题值得深入研究。对从动物体内提取出的低分子量的含铬配合物(LMW Cr)的初步研究表明^[3~7], LMW Cr 有可能作为体内六价铬的解毒剂, 还可作为营养剂发挥一些生物功能。但由于动物及人体内的铬含量极低(ng/mL 级), 繁琐的生化分离提取工作及大量容器、试剂的使用所引起的铬元素的沾污影响不容忽视, 有关结果还需要进一步的仔细考证。此外, 有关糖尿病动物及人体内铬的赋存状态及生物作用机理还未涉及。

本文用可活化的富集稳定性 ^{50}Cr 同位素示踪技术, 结合凝胶色谱法研究 Cr(III) 在正常及患糖尿病大鼠肝细胞胞液中的赋存状态、在血液中的结合状态及在尿中的代谢产物, 以期在有

收稿日期: 1998-12-01 收到修改稿日期: 1999-03-25

丰伟悦: 女, 31 岁, 应用化学专业, 博士

铬的代谢及生物功能方面得出一些结果。

1 实验方法

1.1 玻璃仪器及试剂

所有玻璃仪器均用体积比为 1 : 1 HNO₃ 浸泡一星期后, 用去离子水洗净, 在 100 级超净室中晾干备用。

0.1 mol/L CH₃COONH₄ 缓冲液 (pH = 6.60): 称取乙酸铵 (AR, 北京化工二厂) 38.540 克, 溶于 5000 mL 去离子水中, 用 NH₄OH (AR, 北京化工二厂) 调 pH = 6.60。

1.2 实验动物

北京医科大学实验动物中心提供的 Wistar 雄性大鼠 12 只, 体重 (170 ± 20) g, 随机分为 2 组。一组按每公斤体重注射 90 mg 四氧嘧啶溶液, 造糖尿病大鼠模型, 另一组作为对照组。

1.3 富集稳定性示踪剂 ⁵⁰Cr³⁺ 的制备

称取少量 Cr₂O₃ (中国原子能科学研究院生产, ⁵⁰Cr 丰度为 94.2%), 加少量 HClO₄ 加热溶解后, 加入几滴浓 HCl 和 30% H₂O₂ 使 Cr 保持在 +3 价, 溶液呈浅绿色, 加水稀释备用。

1.4 生物材料的获取

给糖尿病大鼠和正常大鼠按每 100 g 体重尾静脉注射 50 μg 上述 ⁵⁰Cr³⁺ 示踪剂溶液, 每 24 h 注射 1 次, 连续注射 3 d, 第 4 天取颈静脉血后杀死大鼠。取肝脏, 用去离子水冲洗干净后用钛刀切成小块。将组织和 10 mmol/L HEPES 及 0.25 mol/L 蔗糖组成的缓冲溶液 (pH = 7.4) 按 1 : 4 (V/V) 放入玻璃匀浆器中匀浆。在 35000 r/min (100,000 g, Beckman 7L 型超高速离心机) 下离心 2 h 后的上清液, 即为大鼠的肝细胞胞液。

大鼠血液凝固后按 2500 r/min 离心 5 min, 收集血清, -70 °C 冷藏备用。

将实验期间收集的大鼠尿液在 10,000 r/min 离心 30 min, 上清液在 -20 °C 下冷藏备用。

1.5 凝胶色谱柱的操作

取上述经离心获得的大鼠肝胞液、血清及尿液约 10 mL, 分别上 Sephadex G-25 凝胶柱 (2.6 cm (Φ) × 60 cm)。用 0.1 mol/L CH₃COONH₄ 缓冲液 (pH = 6.60) 洗脱, 流速为 19 mL/h, 每份收集 4 mL。

1.6 中子活化法的测定

上述经凝胶柱分离的组分, 分别在红外灯下烤至碳化, 用聚四氟乙烯薄膜和铝箔包装, 在中国原子能科学研究院反应堆中照射 24 h, 中子注量率为 $2 \times 10^{13} / (\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。冷却 10 d 后, 在高纯锗探测器及多道分析仪上测定。

2 实验结果

2.1 大鼠肝胞液凝胶色谱的分离

正常和患糖尿病大鼠肝胞液凝胶色谱分离结果示于图 1。从图 1 可以看出, 大鼠肝胞液的 Sephadex G-25 色谱图显示有 4 个较明显的蛋白吸收峰。第 1 个峰最高, 说明肝胞液中以高分子量蛋白为主。根据 Sephadex G-25 凝胶柱对球形蛋白的分级范围 (1000~5000 D), 推测这一部分蛋白质分子量 > 5000 D。在 100~200 mL 洗脱体积之间, 有 2 个矮且宽的峰, 这两部分蛋白质分子量约在 1000~5000 D 范围内。第 4 个峰主要由无机盐、氨基酸、小肽等小分子量物质组成, 其分子量 < 1000 D。对上述 4 个组分的紫外色谱分析显示, 它们分别在波长为 280 (I)、

260 (II、III) 和 290 nm (IV) 处有最大紫外特征吸收峰, 说明上述 4 个组分的化学组成各不相同。

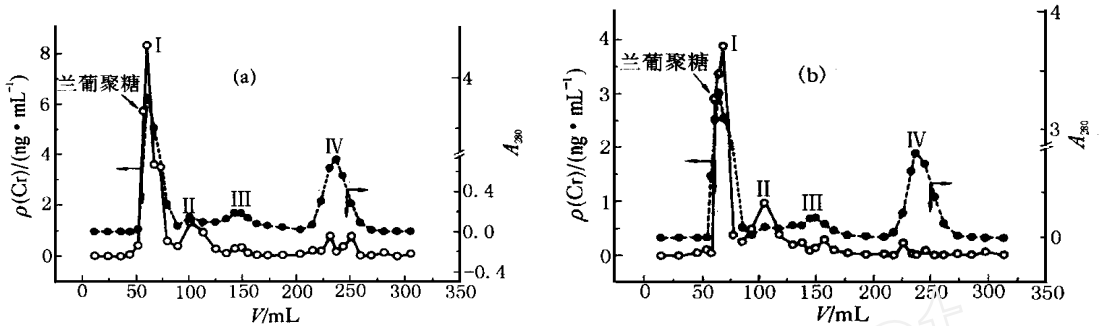


图 1 正常及糖尿病大鼠肝胞液通过 Sephadex G-25 分离后的洗脱曲线

Fig 1 Sephadex G-25 chromatography of the liver cytosol of the normal and diabetic rat
(a)——正常大鼠(normal rat), (b)——糖尿病大鼠(diabetic rat)

正常组和糖尿病组大鼠肝胞液经 Sephadex G-25 分离后 Cr 的洗脱曲线基本一致。正常组大鼠肝胞液中占总洗脱量 59.8% 的 Cr 集中在第 I 个蛋白峰中, 第 II 个峰的 Cr 量占总洗脱量的 26.9%。而糖尿病大鼠肝胞液中第 I 个铬峰占总洗脱量的 58.2%, 第 II 个峰占 36.8%。

2.2 大鼠血清凝胶色谱的分离

血清的凝胶色谱分离结果示于图 2。血清铬的 Sephadex G-25 的洗脱曲线与肝胞液的非常相似, 只不过在 100~ 130 mL 洗脱体积之间有较肝胞液明显的紫外吸收峰($\lambda=280$ nm)。对血清铬的 4 个紫外吸收峰的色谱分析表明, 它们分别在 λ 为 280 (MW 5000 D)、260 (MW 约 1000~ 5000 D)、270 (MW 约 1000~ 5000 D) 和 290 nm (MW 1000 D) 有最大紫外特征吸收峰。正常组大鼠血清中, 占总洗脱量 90.3% 的 Cr 与第 1 个蛋白峰重合, 第 2 个铬峰占总量的 8.2%。糖尿病组大鼠血清铬的洗脱曲线与正常组类似, 第 1 个铬峰占总量的 89.1%, 第 2 个峰占 10.2%。

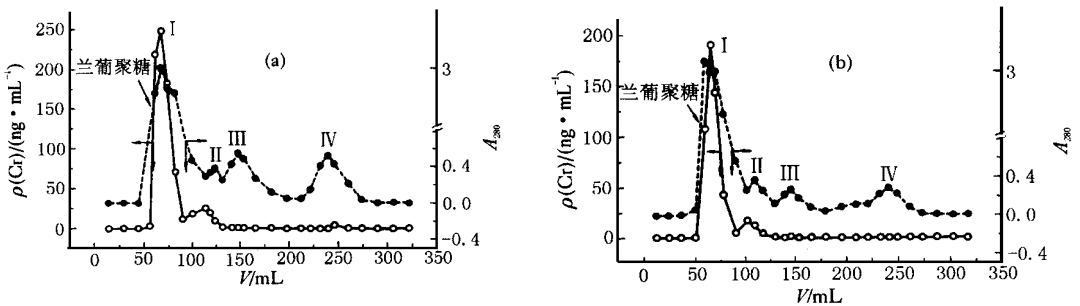


图 2 正常及糖尿病大鼠血清通过 Sephadex G-25 分离后的洗脱曲线

Fig 2 Sephadex G-25 chromatography of serum of the normal and diabetic rat
(a)——正常大鼠(normal rat), (b)——糖尿病大鼠(diabetic rat)

2.3 大鼠尿液凝胶色谱的分离

尿主要是从肾脏排出的各种代谢终产物,如尿素、尿酸、肌酸酐、无机盐、水等小分子物质。尿也是体内金属元素的主要排泄途径之一。大鼠尿的 Sephadex G-25 洗脱曲线示于图 3。从图 3 看出,大鼠尿的洗脱曲线与肝胞液和血清的明显不同。280 nm 处紫外吸收峰主要集中在低分子量物质上。洗脱图谱显示有 4 个紫外吸收峰,以 100~150 mL 洗脱体积之间的峰值最高、最宽,说明是分子量接近的配合物的混合物。这 4 个组分的紫外色谱特征与血清中的类似,即分别在 $\lambda = 280$ (MW 5000 D)、260 (MW 约 1000~5000 D)、270 (MW 约 1000~5000 D) 和 290 nm (MW 1000 D) 有最大紫外特征吸收峰。几乎所有的 Cr 都集中在 100~150 mL 洗脱体积的紫外吸收峰上。

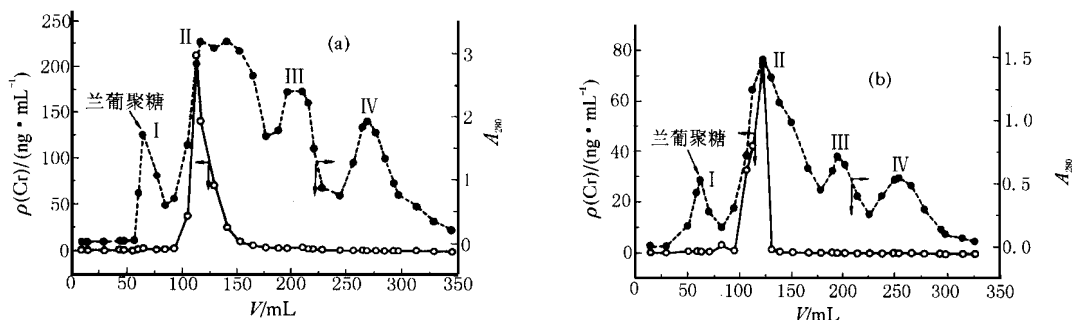


图 3 正常及糖尿病大鼠尿液通过 Sephadex G-25 分离后的洗脱曲线

Fig. 3 Sephadex G-25 chromatography of urine of the normal and diabetic rat

(a) —— 正常大鼠(normal rat), (b) —— 糖尿病大鼠(diabetic rat)

3 讨 论

3.1 大鼠体内 Cr(III) 赋存状态及代谢特点

根据文献[8],已知大鼠对以灌胃方式进入体内的铬的吸收率只有 0.1% 左右,此次以静脉注射的方式进入大鼠体内的铬也只有约 1%。

对两组大鼠肝胞液、血清以及尿液的凝胶色谱分离结果显示,在同一洗脱位置处,血清、肝和尿中都发现有一相似低分子量的含铬配合物存在。从相对百分含量上看,以血清中为最少(~10%),尿中最多(~100%),但从所含的低分子量铬配合物的绝对量上看,又以肝胞液中为最少。这一结果说明低分子量铬配合物很可能作为进入体内铬的代谢产物,或是作为某种生物活性形式而在动物体内发挥一定的生理功能。从啤酒酵母等物质中提取出的 GTF 性质表明^[9,10],它在 260 nm 处有最大紫外吸收,烟酸是 GTF 的特定成分之一。Yamamoto 等^[4-7]在对从动物组织中提取出的 LMW Cr 的研究中发现,LMW Cr 也在 260 nm 处有最大紫外吸收,但它不含烟酸。有关 LMW Cr 或 GTF 的化学组成及结构功能方面的问题还有待于大量的研究证实。

大鼠血清凝胶色谱提示,进入大鼠体内的 Cr(III) 主要与血清中的大分子蛋白质结合(约占总量的 90%),少部分以低分子量铬配合物形式存在(约占总量的 10%)。目前,Cr(III) 与血浆蛋白的结合还存在着争论。北京医科大学邢锋和李荣昌的研究^[11]表明,Cr(III) 与人血清白蛋白有结合作用。近年许多的研究则认为,Cr(III) 离子主要与运铁蛋白结合^[12,13]。Yamamoto 等^[6]的体外实验结果表明,Cr(III) 与低分子量铬配合物(LMW Cr) 及血清蛋白的亲合力以

LMW Cr, 运铁蛋白、血清白蛋白的顺序下降。

本次实验所发现的铬在大鼠肝脏中的赋存状态与以往报道的有不同。本文发现, Cr(III)在大鼠肝脏中主要与高分子量的蛋白质结合, 并可能以铬结合蛋白的形式蓄积在肝脏中。而 Yamamoto 等^[6,7]认为 LMW Cr 是肝中主要的结合铬的物质。他在给小鼠注射 $K_2Cr_2O_7$ 后 2 h, 大于 72% 的铬以 LMW Cr 形式在肝中富集, 血浆中的 LMW Cr 占 22% ~ 25%。而本实验是在给 Wistar 大鼠注射 $^{50}Cr^{3+}$ 后 24 小时的分析结果, 在肝胞液和血清中高分子量的铬都占了绝大部分。同时, Yamamoto 等人^[6]的研究还认为肝胞液中脱辅基的 LMW Cr 无法诱导, 即肝中自然存在的 LMW Cr 的量是一定的。本实验对糖尿病大鼠肝胞液、血清铬的测定结果表明, 与总洗脱量相比, 低分子量含铬配合物所占的百分比均高于正常组大鼠。这一结果似乎预示着糖尿病大鼠有自发地调节体内某种与铬有关的生物功能的能力, 而这种调节又是与体内胰岛素水平相关的。铬以低分子量铬配合物形式大量损失在尿中是造成糖尿病大鼠体内缺铬的重要原因。这与 Mertz^[14]曾描述过的糖尿病患者体内缺铬的恶性循环相类似。

3.2 低分子量铬配合物的生物学意义

虽然铬作为必需营养元素的重要性已显而易见, 但是对铬在生物体内的赋存方式仍所知甚少。LMW Cr 是目前已知唯一的从哺乳动物体内提取出的内源性的含铬配合物。人们之所以对低分子量的铬配合物感兴趣, 主要是因为活着的有机体内合成的除酶和核酸以外的大多数的生物活性物质都是低分子量的化合物, 如激素、维生素和某些体内起调节作用的物质。LMW Cr 生化功能的研究还刚刚开始, 还有许多问题需要深入研究。

长期以来一直有种观点认为大部分的微量元素当被吸收时很容易转化为生物活性形式。但是从我们以前的代谢实验可以看到, 铬, 即使是三价形式, 在哺乳动物体内仍不能很快地转化为生物活性形式。对缺铬人群来说, 迫切需要找寻一种具有高吸收、高生物利用度的补铬剂来改善他们体内的铬的营养状况。如果能在生物体内找到某种生物活性形式的铬化合物, 那么作为将来可能的铬的营养补剂, 将无疑具有广阔的应用前景。

目前, 对体内铬的营养状况还缺乏相应的检测手段。人发、血清、汗液和尿液中铬的含量都不能作为诊断依据。如能从血清或尿液中分离某一类似 LMW Cr 的组分, 它能真实地反映体内铬的状况, 将会具有极大的诊断价值。我们正在积极进行有关生物体内铬配合物的分离纯化工作。

参 考 文 献

- 1 Schwarz K, Mertz W. Chromium (III) and the Glucose Tolerance Factor. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 85: 292~ 295
- 2 Anderson RA, Bryden NA, Polausky MM, et al. Dietary Chromium Effects on Tissue Chromium Concentrations and Chromium Absorption in Rats. *J Trace Elem Exp Med*, 1996, 9(1): 11~ 25
- 3 Davis CM, Vincent JB. Isolation and Characterization of a Biologically Active Chromium Oligopeptide From Bovine Liver. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 339(2): 335~ 343
- 4 Yamamoto A, Wada O, Ono T. A Low molecular weight Chromium-binding Substance in Mammals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1981, 59: 515~ 523
- 5 Yamamoto A, Wada O, Suzuki H. Purification and Properties of Biologically Active Chromium Complex From Bovine Colostrum. *J Nutr*, 1988, 118: 39~ 45
- 6 Yamamoto A, Wada O, Ono T. Distribution and Chromium-binding Capacity of a Low molecular weight

- Chromium-binding Substance in Mice J Inorg Biochem, 1984, 22: 91~ 102
- 7 Yamamoto A, Wada O, Ono T. Isolation of A Biologically Active Low-molecular-mass Chromium Compound From Rabbit Liver. Eur J Biochem, 1987, 165: 627~ 631
 - 8 Feng W Y, Ding W J, Qian Q F, et al Using the Enriched Stable Isotope Cr-50 as A Tracer to Study the Metabolism of Physiological Amounts of Chromium (III) Intra-gastrical Administration in Diabetic Rats—Comparing With the Normal Biol Trace Elem Res, 1998, 63(2): 129~ 138
 - 9 Haylock S J, Buckley P D, Blackwell L F. Separation of Biologically Active Chromium-containing Complexes From Yeast Extracts and Other Sources of Glucose Tolerance Factor (GTF) Activity. J Inorg Biochem, 1983, 18: 195~ 211
 - 10 Hwang D L, Lev-Ran A, Papoian T, et al Insulin-like Activity of Chromium-binding Fractions From Brewer's Yeast J Inorg Biochem, 1987, 30: 219~ 225
 - 11 邢峰, 李荣昌. 铬(III)与人血清白蛋白的结合作用. 北京医科大学学报, 1992, 24(3): 219~ 221
 - 12 Borgnet F, Cornelis R, Delanghe J, et al Study of the Chromium Binding in Plasma of Patients on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Clinica Chim Acta, 1995, 238: 71~ 84
 - 13 Moshaghie AA, Anim B, Bagrafshan MR. Comparative Binding Study of Aluminum and Chromium to Human Transferrin, Effect of Iron Biol Trace Elem Res, 1992, 32: 39~ 46
 - 14 Mertz W. Chromium, History and Nutritional Importance Biol Trace Elem Res, 1992, 32: 3~ 8

STUDY ON CHROMIUM SPECIATION IN RATS BY THE ISOTOPE TRACER TECHNIQUE

Feng Weiyue Qian Qinfang Ding Wenjun Chai Zhifang

*(Institute of High Energy Physics, Laboratory of Nuclear Analysis Techniques,
the Chinese Academy of Sciences, P. O. Box 2732, Beijing 100080)*

ABSTRACT

The chromium speciation in the liver cytosol fraction, serum and urine of both normal and diabetic rats are studied by the enriched stable isotope tracer technique combined with the gel chromatography and the neutron activation analysis (NAA). The results are as follows:

(1) When Cr(III) enters the animal body, it is most likely to be combined with serum proteins. The chromium-protein compound acts as a carrier to transport Cr to the whole body. In the liver cytosol fraction, Cr(III) is also mainly combined with the high molecular weight protein and retains as chromium-protein substance in the liver.

(2) A low molecular weight chromium-containing compound is found in all the liver cell cytosol fraction, serum and urine of the two group rats.

(3) The diabetic rats lose more amount of low molecular weight of chromium compound in urine than the normal rats do. This might be a main reason to explain why the diabetic rats retain lower Cr in their bodies than the normal group.

Key words Enriched stable isotope tracer technique Cr(III) Rat Speciation