

^{79}Se -AMS 生物示踪方法学的研究

王伟¹, 何明¹, 陈春英², 李柏², 陆丽燕¹, 龚杰¹, 吴绍雷¹,
周国强², 焦芳², 许耀刚², 赵金璇², 武绍勇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. 中国科学院, 高能物理研究所, 北京 100049)

摘要: 由于具有放射性非常弱以及对生物组织甚至是细胞无损伤的特点, ^{79}Se 是对硒元素进行长期无损伤生命科学研究的理想示踪核素。 ^{79}Se 示踪方法学的建立对于硒的生命科学与生物医学研究将具有十分特殊的意义。加速器质谱测量 ^{79}Se (^{79}Se -AMS)的生物示踪方法学具有高灵敏度, 高准确性以及高精度等特点。通过采用 ^{79}Se -AMS 方法对亚毒性剂量的硒代谢过程进行研究, 建立了 ^{79}Se -AMS 生物示踪方法学, 重点探索了生物示踪样品的制备流程, 化学处理以及样品测量过程。采用分子负离子的引出形式以及四阳极双栅电离室对 ^{79}Se 和 ^{79}Br 两种同量异位素进行鉴别, 从而记录实际样品中 ^{79}Se 的原子个数。实验建立了亚毒性剂量硒在 Wistar 大鼠肾脏内的代谢曲线, 为生命科学以及生物医学领域提供了新的测量方法与手段, 也为 AMS 的应用开拓了新的领域。

关键词: ^{79}Se ; 加速器质谱仪; 生物示踪

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)03-0160-06

Biological Tracer Methodology of ^{79}Se -AMS

WANG Wei¹, HE Ming¹, CHEN Chun-ying², LI Bai², LU Li-yan¹, GONG Jie¹, WU Shao-lei¹,
ZHOU Guo-qiang², JIAO Fang², XU Yao-gang², ZHAO Jin-xuan², WU Shao-yong¹, JIANG Shan¹

(1. *Department of Nuclear Physics, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;*

2. *Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: ^{79}Se , with little radioactivity and little intrusiveness to biological tissue even to cell, is an ideal tracer nuclide for long period and non-intrusive biological research of selenium. Establishment of its tracer methodology is significant in biomedicine and life science. ^{79}Se -AMS is an alternative owing to its high sensitivity, accuracy and precision. Tracer experiment using ^{79}Se was carried out to investigate the metabolism kinetics of selenium in the rat kidney, and therefore establishment of ^{79}Se -AMS biological tracer methodology is detailed, including tracing sample preparation, chemical procedure, and AMS measurement processing. During AMS measurement, molecular negative ions of SeO_2^- were extracted

from the ion source, and the counts of ⁷⁹Se were determined from the discrimination between ⁷⁹Se and ⁷⁹Br by four-anode double-grid ionization chamber. Metabolism curve of sub-poisonous selenium in the kidney of Wistar rat was established finally. Further applications of ⁷⁹Se-AMS for biological research will be explored.

Key words: ⁷⁹Se; accelerator mass spectrometry; biological tracer

硒(Se)是动植物体内不可或缺的微量元素之一,它在人体内含量的过量或不足与人类许多疾病都存在着复杂的联系^[1],研究该元素的生物示踪方法将为其在生命科学以及生物医学中的应用提供技术手段^[2]。

长寿命放射性核素⁷⁹Se的半衰期长达 $(2.80 \pm 0.36) \times 10^5$ a^[3],其放射性比活度约为 $1\text{Bq}/10^{14}$ 原子。⁷⁹Se衰变时放射出的能量仅为150.7 keV 纯 β 射线,对生物组织甚至细胞的辐射损伤远小于⁷⁵Se,⁷⁹Se的加速器质谱测量方法(⁷⁹Se-AMS)具有灵敏度高,相对测量准确性高以及测量精度高等特点^[4],适合长周期、无损伤的生物示踪研究。⁷⁹Se-AMS的生物示踪方法将为更细微,更深层次地研究硒的生命科学提供可靠的技术方法。为此,本工作开展⁷⁹Se的生物示踪实验,以研究大鼠亚中毒剂量肾模型中的硒代谢动力学,从而建立⁷⁹Se-AMS的生物示踪方法学。

1 试验部分

1.1 样品制备

1.1.1 实验动物与分组 生物示踪实验以两月龄的雄性 Wistar 大鼠(购自北京维通利华研究中心)为研究对象,体重为 200 g 左右。实验中,将 27 只大鼠随机分为 9 组,包括预实验组 1 组,示踪组 7 组以及空白组 1 组,每组 3 只。

1.1.2 示踪剂的量及给予方式 实验中,含⁷⁹Se同位素示踪剂的 Na₂SeO₃ 溶液以尾静脉注射的方式给予每只大鼠。取出 17 mL 经反应堆照射,并经 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓 HNO₃ 溶解稀释至 100 mL 的标准溶液(其中 $^{79}\text{Se}/\text{Se}_{\text{total}} = 4.68 \times 10^{-5}$),以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 值至 6.5 左右,然后放入 70 °C 烘箱浓缩至 15 mL。此时,溶液中 Se 的浓度为 $0.382 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 0.4 mL 溶液作为单位注射剂量,每只大鼠注射 1 个单位,即含 Na₂SeO₃ 的量为 $0.382 \times 0.4 \times 173/79 = 0.335 \text{ mg} = 335 \mu\text{g}$ 。(大鼠静脉注射 Na₂SeO₃ 的最低致死剂量(MLD 值)为 6.57

mg/Na₂SeO₃(kg 体重))。

1.1.3 实验过程及取样 预实验于示踪组开始实验前两天进行,分别对 3 只大鼠注射 1 单位不含⁷⁹Se的天然 Na₂SeO₃ 溶液、1.5 单位不含⁷⁹Se的天然 Na₂SeO₃ 溶液以及 1 单位含⁷⁹Se的 Na₂SeO₃ 示踪剂溶液,然后放入代谢笼观察大鼠生理状况。实验发现,3 只大鼠在 48 h 内均无异常反应;7 组示踪组共 21 只大鼠分别在注射 1 单位示踪剂后的 0.5、1、2、4、8、16 以及 32 h 处死;空白组的 3 只大鼠不注射任何溶液而直接处死。对处死的大鼠进行解剖后,分别取血液以及心、肝、脾、肺、肾、脑等脏器组织,并且每间隔 4 h 取 32 h 示踪组大鼠的粪便等作为生物样品,对所有的生物样品称量记录后放入冰箱急冻保存。重点测量肾脏样品中的⁷⁹Se,其他样品留取备用。

1.1.4 生物样品的处理 称取冷冻的肾脏样品,剪碎置入聚四氟乙烯的消化内罐中,加入 20 mg 左右的纯 SeO₂(99.8%,购买于 J&K Chemical Corporation)作为载体,加入 4 mL 浓 HNO₃(BV III)与 1 mL H₂O₂ 溶液(40%,MOS 级),静置 10 h 进行预消解,置于 145 °C 的烘箱中进行 4.5 h 的高温密闭消解。取出消化罐冷却,在 110 °C 的电热板上排除余酸至罐内溶液剩约 0.4 mL 时,加入 3 滴 H₂O₂ 溶液,然后将溶液转移至离心管中,加入 5 mL 去离子水稀释。

1.1.5 测量样品的制备 配制 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液,调节样品溶液的 pH 值至 6.5,逐滴加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO₃,使生成 Ag₂SeO₄ 沉淀,沉淀完全后,置入 4 °C 的冰箱中 4 h,离心后固液分离,用冷水反复洗涤沉淀 3 次后,将分离出的残留物在 100 °C 的电子烘箱中烘烤约 12 h,最后置入茶色干燥皿保存。生物样品的制备流程示于图 1。

1.2 测量过程

测量过程在北京 HI-13 串列加速器上完成,测量样品包括 1 个流程空白样品、21 个大鼠肾样及一系列标准样品。所有样品均制备成硒酸

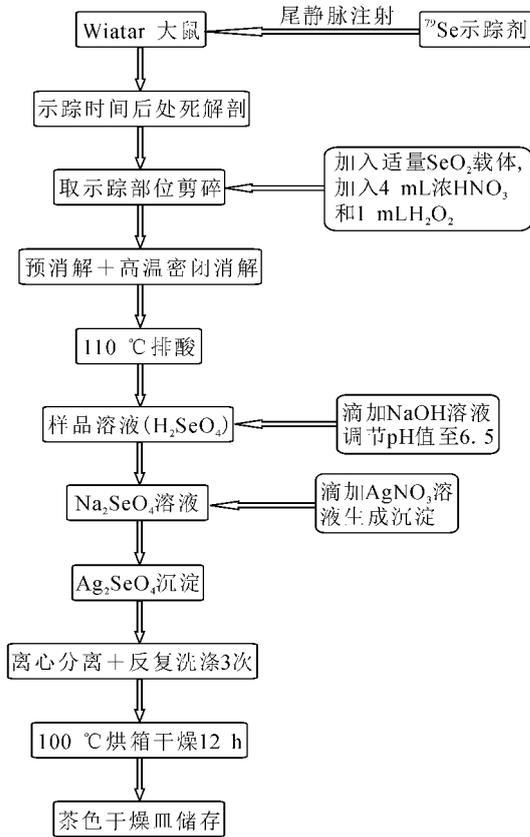


图 1 生物样品的制备流程

Fig. 1 Flow chart of preparation on biological samples

银(Ag_2SeO_4)的化学形式,测量前与银粉按质量比6:1混合,装入AMS高纯铝靶锥中进行测量。测量时,从离子源引出 SeO_2^- 分子负离子,经加速器加速、剥离器剥离后,高能分析磁铁选择11+电荷态的粒子,终端探测器选用四阳极双栅充气电离室探测器。实验过程中分别采用交替测量以及同时测量的方法,即交替测量 $^{80}\text{SeO}_2^-$ 粒子束流与 ^{79}Se 粒子计数,结合同步测量 $^{76}\text{SeO}_2^-$ 离子束流与 ^{79}Se 粒子计数的方法,将有助于提高样品的测量精度,并且可以对交替测量的数据结果进行校正。测量时,每隔6个生物样品测量1次理论值为 $^{79}\text{Se}/\text{Se}_{\text{total}} = 2.45 \times 10^{-9}$ 的标准样品,以此来监测 ^{79}Se 的传输光路,并刻度传输效率的变化情况。每个生物样品各测量

2次,测量时间均在300s以上。空白样品与监测标准样品各测量1次,测量时间为600s。

2 结果与讨论

^{79}Se -AMS测量的关键在于同量异位素 ^{79}Br 的干扰。生物样品中的Br含量很高,依据国际原子能机构生物标准样给出的数据^[5],Br元素在马肾中的含量约为 1.04×10^{-4} 。实验发现,测量过程中来自同量异位素 ^{79}Br 的本底干扰非常强,这对 ^{79}Se 的测量是非常不利的。基于此问题,采取了以下3个措施:第一,采用 SeO_2^- 分子负离子的引出形式压低 ^{79}Br 同量异位素本底^[4];第二,数据处理时采用软件开门的方法压低 ^{79}Br 的本底;第三,采用四阳极双栅电离室探测器探测粒子的能量,相对能损的双维谱来记录 ^{79}Se 的粒子计数,从而依据 ^{79}Se 与 ^{79}Br 在气体介质中损失能量的不同来鉴别这两种同量异位素。通过上述方法, ^{79}Se 与 ^{79}Br 最终可以在双维谱上实现一定程度的鉴别。图2给出了流程空白样品、 1×10^{-7} 标准样品、 5×10^{-8} 标准样品以及0.5h肾样品的Et-E1双维谱,谱中椭圆区域即为 ^{79}Se 计数区域。从谱中可以看出, ^{79}Se 与 ^{79}Br 的峰计数区域较明显地分开。

流程空白样品是指消解过程中只加入纯度为99.8%的 SeO_2 ,而不加入任何生物组织而制备出的 Ag_2SeO_4 样品,它反映了样品处理过程由于交叉污染所引入的 ^{79}Se 量。肾脏组织的样品包括0.5、1、2、4、8、16、32h等7个时间点的各3个样品,由于测量时间比较长,计数大约都在100~1000之间,可见由此所造成的统计误差要小于10%。此外,由于AMS测量准确性比较高,同一样品的2次测量值的标准偏差小于3%,因此对2次测量的结果取平均值,并用标准样品的测量值进行校正,最后计算出实际样品的测量值,列于表1。表1分别给出了测量样品的时间点,同位素比值的测量结果,所加入的载体量以及肾脏样品的质量。 ^{79}Se 的绝对含量则可用式(1)来计算:

$$^{79}\text{Se}(\text{g}/\text{g}) = \frac{^{79}\text{Se}/^{80}\text{Se} \text{ 测量值} \times 0.4961 \times \text{载体 } \text{SeO}_2 \text{ 的质量}(\text{g}) \times \frac{79}{111}}{\text{肾质量}(\text{g})} \quad (1)$$

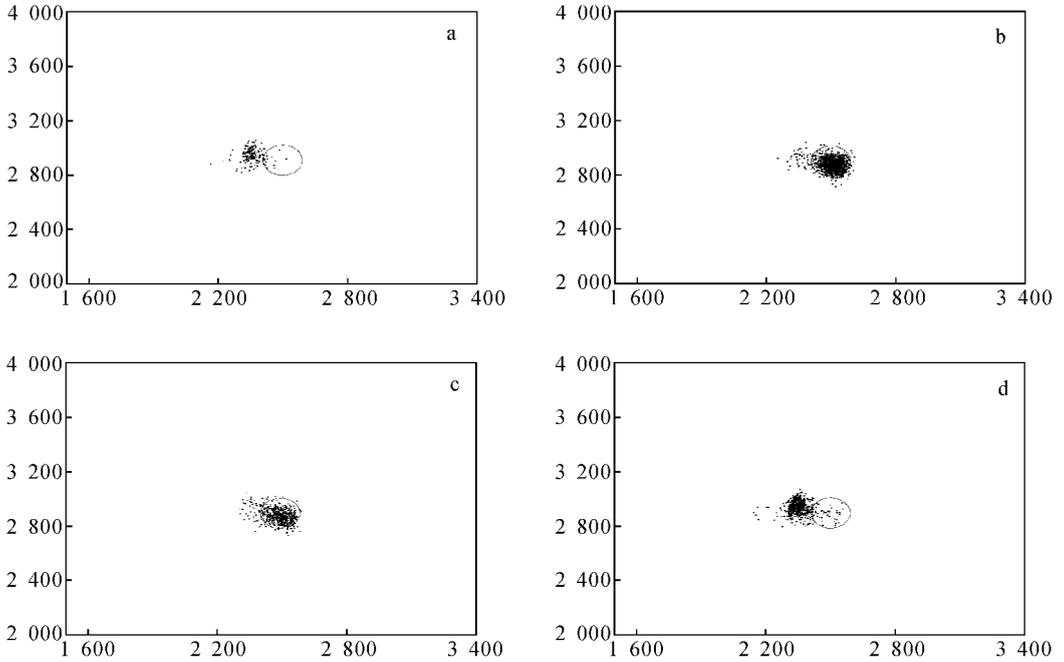


图 2 空白样品 (a)、 1×10^{-7} 标准样品 (b)、 5×10^{-8} 标准样品 (c) 以及示踪 0.5 h 后肾样品 (d) 的双维谱
 Fig. 2 Two-dimensional spectra of blank sample (a), standard sample with 1×10^{-7} (b), standard sample with 5×10^{-8} (c), kidney sample taken 0.5 h after ⁷⁹Se injection (d)

表 1 大鼠静脉注射⁷⁹Se 后,不同时间点肾样品⁷⁹Se 含量的实际测量数据

Table 1 The measurement results of kidney sample with different time points after ⁷⁹Se injection

| 样品描述 | ⁷⁹ Se/ ⁸⁰ Se | 载体量/mg | 肾质量/g | ⁷⁹ Se 净含量/(g · g ⁻¹) | 标准偏差/(g · g ⁻¹) |
|---------|------------------------------------|--------|-------|---|-----------------------------|
| 流程空白 | 5.65×10^{-11} | | | | |
| 0.5 h-1 | 5.99×10^{-9} | 21.1 | 0.92 | 4.84×10^{-11} | |
| 0.5 h-2 | 1.08×10^{-9} | 20.1 | 0.77 | 9.90×10^{-11} | |
| 0.5 h-3 | 1.29×10^{-9} | 19.7 | 0.80 | 1.12×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 2.32×10^{-11} | 2.19×10^{-11} |
| 1 h-1 | 2.51×10^{-9} | 22.1 | 0.85 | 2.32×10^{-11} | |
| 1 h-2 | 4.14×10^{-9} | 21.5 | 0.86 | 3.65×10^{-11} | |
| 1 h-3 | 7.50×10^{-9} | 22.9 | 0.85 | 7.14×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 4.37×10^{-11} | 2.49×10^{-11} |
| 2 h-1 | 6.80×10^{-9} | 22.7 | 0.93 | 5.86×10^{-11} | |
| 2 h-2 | 7.62×10^{-9} | 20.5 | 1.02 | 5.39×10^{-11} | |
| 2 h-3 | 6.04×10^{-9} | 20.2 | 0.83 | 5.16×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 5.47×10^{-11} | 3.53×10^{-12} |
| 4 h-1 | 6.36×10^{-9} | 21.8 | 0.87 | 5.64×10^{-11} | |
| 4 h-2 | 7.28×10^{-9} | 20.2 | 0.99 | 5.23×10^{-11} | |
| 4 h-3 | 7.17×10^{-9} | 20.7 | 1.00 | 5.25×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 5.37×10^{-11} | 2.34×10^{-12} |

续表

| 样品描述 | $^{79}\text{Se}/^{80}\text{Se}$ | 载体量/mg | 肾质量/g | ^{79}Se 净含量/ $(\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 标准偏差/ $(\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ |
|--------|---------------------------------|--------|-------|--|--|
| 8 h-1 | 5.24×10^{-9} | 20.4 | 0.88 | 4.31×10^{-11} | |
| 8 h-2 | 3.69×10^{-9} | 20.4 | 0.91 | 2.93×10^{-11} | |
| 8 h-3 | 4.45×10^{-9} | 21.7 | 1.15 | 2.96×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 3.40×10^{-11} | 7.88×10^{-12} |
| 16 h-1 | 9.27×10^{-9} | 20.2 | 0.95 | 6.93×10^{-11} | |
| 16 h-2 | 4.70×10^{-9} | 21.4 | 0.87 | 4.06×10^{-11} | |
| 16 h-3 | 5.93×10^{-9} | 19.7 | 0.99 | 4.16×10^{-11} | |
| 平均值 | | | | 5.05×10^{-11} | 1.63×10^{-11} |
| 32 h-1 | 1.38×10^{-9} | 20.5 | 0.83 | 1.21×10^{-10} | |
| 32 h-2 | 1.56×10^{-9} | 20.8 | 1.04 | 1.10×10^{-10} | |
| 32 h-3 | 1.67×10^{-9} | 20.9 | 1.01 | 1.22×10^{-10} | |
| 平均值 | | | | 1.18×10^{-10} | 6.49×10^{-12} |

表 1 还给出了 3 个肾脏样品测量值的标准偏差,以及空白样品的测量值,其中空白样品的测量值给出了本次实验测量的灵敏度水平,为 5.65×10^{-11} 。

对 7 个时间点肾脏样品的测量结果进行分析,图 3 给出了所有数据结果与时间点的对应关系。可以发现,0.5 h 与 1 h 的测量结果不确定度比较大,这是由于 3 个平行样中其中一个数据点偏离较严重的结果。这两个时间点血液中 ^{79}Se 的含量比较高,很可能是由于肾脏样品处理时混入了血液而导致交叉污染。此外,根据测量结果,亚毒性剂量 Se 在大鼠肾脏内的代谢存在两个峰值,第一个峰值出现在 2 h 与 4 h 之间,第二个峰值出现在 32 h 左右,说明了 ^{79}Se 摄入峰值应在 32 h 左右或之后。

关于摄入 Na_2SeO_3 后,硒在大鼠肾内的代谢趋势,国际上有比较深入的研究,其中以 SUZUKI 等^[6-9]所做的研究最为深入。综合文献数据给出的结果,可以肯定的是尾静脉注射 Na_2SeO_3 给大鼠后,Se 在肾内聚集的峰值应该出现 2~4 h 之间,这一点与数据比较吻合。第二个峰值则是由肾针对亚毒性剂量 Na_2SeO_3 的解毒机制所产生的。

3 结论

采用 ^{79}Se 示踪方法研究大鼠亚中毒剂量肾模型中的硒代谢动力学,获得了亚毒性剂量硒在

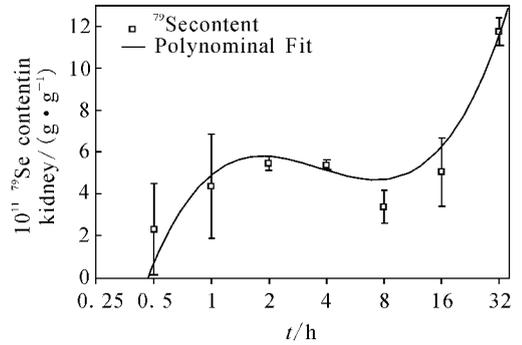


图 3 示踪大鼠肾脏样品 ^{79}Se 的含量与取样时间点的对应关系

Fig. 3 Correlative chart of ^{79}Se content in the kidney of tracer rats vs time point of sampling

Wistar 大鼠肾脏内的代谢曲线,成功建立了 ^{79}Se 的加速器质谱 (^{79}Se -AMS) 生物示踪方法学。此方法还存在一些缺点,如实际生物样品的测量灵敏度尚未达到方法研究时的测量灵敏度,由于生物数量以及束流时间的限制等原因导致数据精度低。此外,从原理上来讲, ^{79}Se -AMS 的生物示踪方法更适于长时间、无损伤的生物示踪实验。接下来的工作将着重提高实际生物样品的测量灵敏度与数据精度,并尝试长周期、细胞水平的生物示踪实验以进一步改进 ^{79}Se -AMS 的生物示踪方法,从而为更细微、更深层次地研究硒的生命科学提供可靠的技术手段。

参考文献:

- [1] 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 湖北:华中理工大学出版社,1994.
- [2] 刘建福,张瑾洁,张永康. 微量元素硒与人体健康关系的研究进展[J]. 吉首大学学报:自然科学版, 1997,18(3):72-79.
- [3] HE M, JIANG S S, JIANG S, et al. Measurement of the half-life of ⁷⁹Se with PX-AMS[J]. Nucl Instru and Meth B, 2002, 194(4):393-398.
- [4] WANG W, LI C L, HE M, et al. Measurements of ⁷⁹Se with AMS based on extracting molecular negative ions [J]. Chin Phys C, 2008, 32: 205-209.
- [5] MURAMATSU Y, PARR R M. Survey of currently available reference materials for use in connection with determination of trace elements in biological and environmental materials[M]. IAEA/RL/128, International Atomic Energy Agency, 1985.
- [6] KOBAYASHI Y, OGRA Y, SUZUKI K T. Speciation and metabolism of selenium injected with ⁸²Se-enriched selenite and selenate in rats[J]. J Chromatogr B, 2001,760(1):73-81.
- [7] SUZUKI K T, SOMEKAWA L, KURASAKI K, et al. Simultaneous tracing of ⁷⁶Se-selenite and ⁷⁷Se-selenomethionine by absolute labeling and speciation[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 217(1):43-50.
- [8] SUZUKI K T, CHIAKI D, SUZUKI N. Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 217(2):185-195.
- [9] SUZUKI K T, YUKI O, SUZUKI N. Availability and metabolism of ⁷⁷Se-methylseleninic acid compared simultaneously with those of three related selenocompounds[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 217(1):51-62.

=====

(上接第 159 页)

- [3] ENDO A, KOMAGATA D, SHIMADA H. Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis[J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39(12):1670-1673.
- [4] ENDO A, HASUMI K. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis[J]. The Journal of Antibiotics, 1985,38(3):321-327.
- [5] 朱宝雷,任立华. 辛伐他汀的合成[J]. 齐鲁药事, 2006,25(7):422-423.
- [6] 朱占元,吴庭照,牟玲. 辛伐他汀的合成[J]. 浙江化工,2002,33(1):49-50.
- [7] 陈宇瑛. 辛伐他汀的研究[J]. 精细与专用化学品, 2003,10:16-18.
- [8] CHEN L C, LAI Y K. Production by *Clonostachys compactiuscula* of a lovastatin esterase that converts lovastatin to monacolin J[J]. Enzyme and Microbial Technology,2006,39(5):1051-1059.
- [9] SCHIMMEL T G, BORNEMAN W S, CONDER M J. Purification and characterization of a lovastatin esterase from *Clonostachys compactiuscula* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997,63(4):1307-1311.
- [10] KOMAGATA D, YAMASHITA H, ENDO A. Microbial conversion of compactin (ML-236B) to ML-236A[J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39:1574-1577.
- [11] KOMAGATA D, SHIMADA H, MURAKAWA S, et al. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin L to monacolin J by a monooxygenase of *Monascus ruber* [J]. The Journal of Antibiotics, 1989,42(3):407-412.
- [12] 杨仲毅,甘春晖. 辛伐他汀的生物合成[J]. 生物工程学报,2008,24(3):349-354.
- [13] XIE X K, TANG Y. Efficient synthesis of simvastatin by use of whole-cell biocatalysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2054-2060.
- [14] WANG H, WU Y H, ZHAO Z X. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass[J]. Journal of Mass Spectrometry,2001,36:58-70.
- [15] 姚新生. 有机化合物波谱解析[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:190-199.