

^{13}C -辛酸呼气试验在小鼠胃排空检测中的应用

王维刚¹ 周嘉斌² 万颖寒² 严惠敏^{2*}¹ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092;² 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 本文介绍用稳定同位素 ^{13}C 标记的辛酸混入液体和固体试餐喂饲小鼠, 通过检测小鼠餐后 3 小时内设定时间点呼气中 $^{13}\text{CO}_2$ 的丰度, 根据胃动力计算公式, 用数据拟合出小鼠胃排空曲线, 计算出小鼠胃排空三个主要参数: GEC、 $t_{1/2}$ 、 t_{lag} , 检测小鼠胃动力的功能。

关键词 胃排空; 胃动力; ^{13}C -辛酸; 呼气试验; 小鼠模型

小鼠胃排空的体内实验一向比较难以开展, 有研究者^[1]利用酚红为染料, 标记胃内食物, Croci^[2]利用碳末作为标记物研究小鼠的胃排空, Wang等^[3]用玻璃微珠作为标记物混入试验餐中研究胃排空。胃排空为一个动态的过程, 需多只实验动物进食同样的试餐, 在多个时间点分别处死动物, 取出胃和小肠, 清理胃内容物, 评价胃排空情况。无论是从动物伦理角度还是从实验数据收集的角度来看上述方法都有很大的缺陷。1993年, Ghos等^[4]率先利用 ^{13}C 标记的中链脂肪酸-辛酸建立了 $^{13}\text{CO}_2$ 呼气实验测量胃固体排空的方法, 他们用 ^{13}C 标记试验餐, 然后收集餐后一段时间内的受试者呼出的气体样品, 根据 ^{13}C 排出丰度的变化, 通过一系列数学运算来得到胃排空的诊断指标。这一方法在人身上取得了成功, 和放射性同位素闪烁照相比较, 无论是敏感性、安全性还是特异性都令人满意^[4,5]。目前该方法已在猫^[6]、小鼠^[7]、狗^[8]等的动物实验中获得应用。本文将介绍这一方法在分析小鼠胃排空(液体、固体试餐)中的实验过程和要点, 为相关领域的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

^{13}C -辛酸(99% ^{13}C 丰度, Sigma 公司)、脂肪乳(Intralipid, 华瑞制药公司)、Finnigan MAT^{plus} 呼气分析质谱仪(Bremen 公司)、微型真空泵(成都为诚电子机械中心)、气体流量计(天津流量仪表有限公司)、100 ml 气密蓝盖瓶(Schott Duran 公司)、10 ml 真空集气管(Labco 公司)。

1.2 试验动物

健康雄性 C57BL/6 小鼠 4 只, 8 周龄, 体重 23~28 克。每只小鼠独立饲养在恒温(21~22℃)房间, 每隔

12 h 光暗循环。非实验期间小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。实验前 2 周, 每日将小鼠置于气室内 3 小时进行环境适应性训练, 以减少紧张。

1.3 试验餐配制

为排除昼夜节律的影响, 所有试验均在禁食(可自由饮水)17 小时后, 选择同一时间段进行, 本实验选择时间段为 1p.m. 至 4p.m.。液体试验餐: 脂肪乳和 ^{13}C -辛酸按体积比 1 000: 1 配制成试验餐, 每次试验时小鼠灌胃 50 μl 。固体试验餐: 取生蛋黄, 称重, 每克生蛋黄加入 ^{13}C -辛酸 1.5 μl , 充分搅拌均匀, 置 60℃ 烤箱烘烤 2 小时, 制作成小粒, 每次试验小鼠进食 0.2 克。所有试验餐都是新鲜配置。

1.4 试验装置安装

实验装置参考文献^[7], 使用 100ml 气密瓶作为呼气试验气室。2 个三通阀插入橡胶瓶塞控制气体进出, 出气阀接一个 10ml 注射器以收集气体样品, 各装置间使用气路管进行连接。非采样期间, 两个三通阀保持开放, 使用微型真空泵及流量计来控制气流速度在 3ml/秒(图 1A)。经验证, 该流速的空气可以保证气体采样前可以排出残留的 CO_2 ^[7]。

1.5 气体采样流程

关闭 2 个三通阀, 停气流 90 秒, 以使气室内 CO_2 浓度积累大于 1%, 开放抽气管阀, 以注射器抽取气室内 10ml 气体样品并注射到 10ml 真空集气管; 开放两个三通阀(图 1B)。采样结束后气体样品送检, 所有小鼠在呼气实验期间都置于气室内。

收稿日期: 2010-04-02 接受日期: 2010-07-06

国家国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2008AA02Z126)资助

项目

* 通讯作者。Tel: 021-50793648-82011, Email: yanhuimin123@hotmail.com

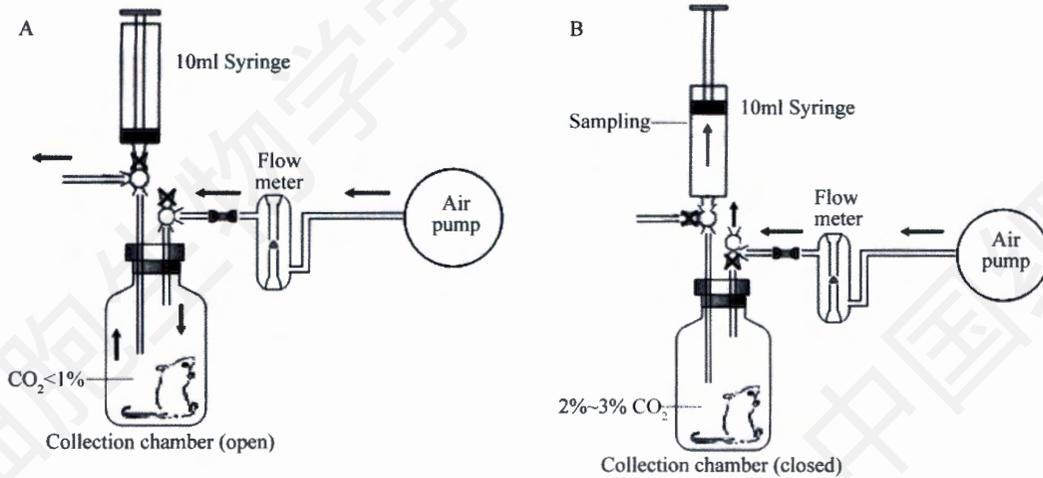


Fig.1 Air collection system

A: the system is open to allow a continual airflow; B: the system is closed to allow CO₂ to accumulate to be sampled.

1.6 气体采样点设置

液体试验餐采样点: 实验开始至第 10 分钟, 每隔 2.5 分钟采样一次, 并增加第 1 分钟的采样点; 第 10 分钟至第 30 分钟内, 每隔 5 分钟采集一次; 第 30 分钟至第 180 分钟内每隔 15 分钟采样一次。固体试验餐采样点: 实验开始至第 30 分钟, 每隔 5 分钟采样一次; 第 30 分钟至第 180 分钟内每隔 15 分钟采样一次。

2 结果

2.1 数据分析

在呼气试验的结果计算中用到两个经最小面积演变法非线性拟合出的数学公式(以下称为公式①和公式②):

$$\textcircled{1} y = at^{be}e^{-ct}$$

式中:

y 为每小时呼气中排出的 ¹³C 分数; t 为小时;

a、b、c 为常数。

$$\textcircled{2} y = m(1 - e^{-kt})^\beta$$

式中:

y 为呼气中 ¹³C 的累积排出分数; t 为小时; m、k、β 为常数, 当时间为无穷大时, m 为总的 ¹³C 累积回收率。对 ¹³CO₂ 呼气试验的两条拟合曲线以 t(小时为单位) 为时间变量进行非线性回归分析(Metlab R2007a), 用 Metlab 中的 lsqcurvefit 函数编程, 计算出常数 a、b、c、m、k 和 β, 从而可以计算出呼气试验的三个主要诊断参数:

半排空时间($t_{1/2}$)

$$t_{1/2} = (-1/k) \times \ln(1 - 2^{-1/\beta})$$

排空延迟时间(t_{lag})

$$t_{lag} = (\ln \beta)/k$$

胃排空系数(GEC)

$$GEC = \ln a。$$

2.2 胃排空数据的拟合

呼气中 ¹³CO₂ 分别按公式①和公式②进行数据拟合。

液体试餐 ¹³CO₂ 排出丰度时间拟合曲线(公式①拟合图)见图 2A; 累积 ¹³CO₂ 排出丰度时间拟合曲线(公式②拟合图)见图 2B。固体试餐 ¹³CO₂ 排出丰度时间拟合曲线(公式①拟合图)见图 3A; 累积 ¹³CO₂ 排出丰度时间拟合曲线(公式②拟合图)见图 3B。

2.3 胃排空参数的统计分析

用 Origin 7.0 软件(OriginLab 公司)进行统计分析, 数据表示为均数 ± 标准误。胃排空相关系数见表 1。

3 讨论

目前国内通常使用的胃排空检测方法是染料法(葡聚糖蓝 2000、酚红、甲基橙)和微珠法(碳末、微珠), 这些方法都需要在特定时间点批量处死小鼠, 清理胃内容物, 检测标记物, 其优点是简单易行, 缺点是无法提供胃排空的通常检测指标: $t_{1/2}$ 、 t_{lag} 和 GEC 的计算, 只能对胃排空情况进行估算。放射性同位素闪烁照相法在研究中被认为是评估胃排空的金标准^[9]。Bennink 等^[10]用 ^{99m}Tc 标记试验餐, 利用特制的 γ 照相机来动态监测小鼠胃内容物的放射性核素的丰度, 并通过计算得到胃动力的各项指标。但由于该方法具有放射性并需要较高的核医学实验条

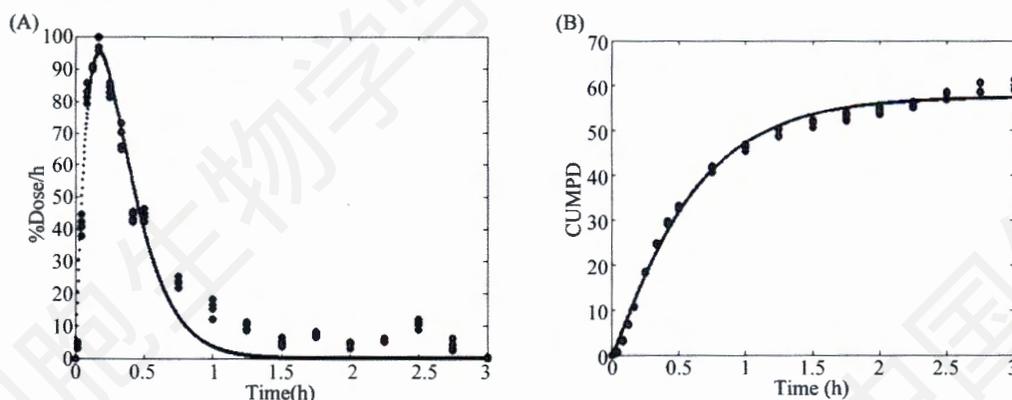


Fig. 2 Curves after introlipid administration
A: typical $^{13}\text{CO}_2$ excretion curves; B: $^{13}\text{CO}_2$ cumulative % dose recovery curves.

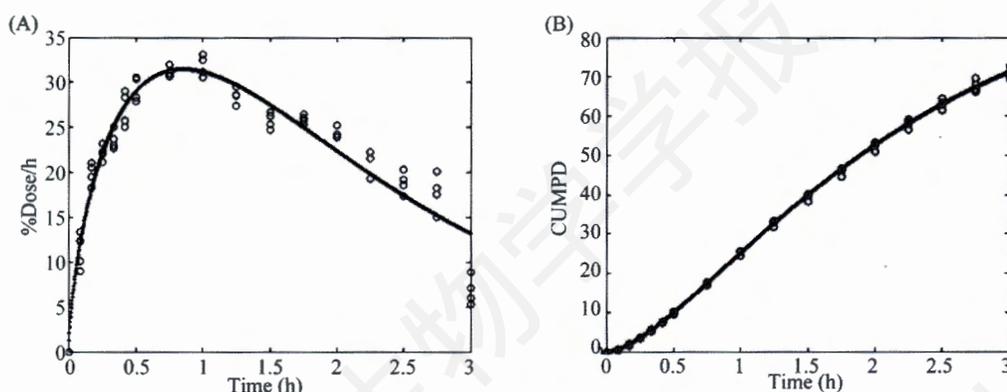


Fig. 3 Curves after egg yolk administration
A: typical $^{13}\text{CO}_2$ excretion curves; B: $^{13}\text{CO}_2$ cumulative % dose recovery curves.

Table 1 Gastric emptying parameters of both meals

Test meal	GEC	$t_{1/2}$ (min)	t_{lag} (min)
Introlipid	6.10 ± 0.28	26.23 ± 4.57	NA
Egg yolk	4.21 ± 0.27	83.96 ± 3.95	32.77 ± 3.18

Data are the mean \pm SEM (n=4).GEC, gastric emptying coefficient; $t_{1/2}$, gastric half emptying time; t_{lag} , lag phase; NA, not applicable.

件(特制的 γ 照相机及操作资质)而限制了它的应用。也有研究者^[11]用 ^{14}C 标记的试餐通过呼气试验来动态测量小鼠胃动力。 ^{14}C 是一种半衰期非常长(5 730 年)的放射性同位素,使用起来无论对操作者还是对环境污染大,对于使用该同位素进行研究一直存在很大争议。而 ^{13}C 是一种稳定同位素,具有碳元素相同的化学特性,无放射性。用 ^{13}C 标记的特定化合物经机体代谢分解后产生的 $^{13}\text{CO}_2$ 经从体内呼吸出,呼气中 ^{13}C 丰度的变化可通过气体同位素比值质谱仪检测从而反映机体的代谢功能和疾病状态。 ^{13}C 呼气实验有如下优点:非侵入性、易于操作、无放射性、可以

对同一实验对象重复检测、可以敏感地检测药物对胃动力障碍性疾病的疗效、检查可以随时随地进行、不需要 γ 照相机。

一个理想的 ^{13}C 呼气检测胃排空实验应该包括用一个在胃酸环境下稳定的 ^{13}C 化合物来标记试验餐,这个化合物可以迅速被小肠吸收,然后被肝氧化。在这个过程中胃排空属于限速步骤,吸收和氧化分解极为迅速,所以,呼气中的 ^{13}C 就可以近似地来描述胃排空过程。辛酸与试验餐一起摄入胃内后不被分解、吸收,而以原型排入十二指肠,在十二指肠近端完全吸收,经门静脉系统转运,在肝脏内迅速脱羧,

产出 CO_2 经肺呼出。胃排空是整个代谢过程的限速步骤, $^{13}\text{CO}_2$ 在呼气中的排出情况与胃排空的情况一致, 因此测定 $^{13}\text{CO}_2$ 在呼气中排出速率就可测出胃排空速率。

由于胃排空的影响因素很多, 所以本实验前需要按特定时间段对小鼠进行适当的训练, 以排除紧张、昼夜节律对其影响。液体试验餐可以直接予小鼠灌胃, 剂量可控; 而由于禁食达 17 小时, 固体试验餐新鲜配置, 颗粒小, 小鼠饥饿时容易迅速被其进食完毕。由于胃张力对胃排空也有一定影响, 本实验采取的试餐量比较小, 不会造成小鼠胃过分扩张, 也就避免了对胃排空的影响。本研究参考文献^[7]设置了固体采样时间, 预实验发现, 液体排空速度很快, 故在排空曲线斜率比较大的时间段适当增加采样点, 收集气体样品的总时间是 3 小时, 采样时间段过短数据点过少, 无法拟合计算; 过长导致实验繁复冗长, 实验动物易疲劳, 影响实验结果。

对 ^{13}C 呼气实验的两条拟合曲线以 t 为时间变量进行非线性回归分析, 计算出 a 、 b 、 c 、 m 、 k 和 β , 从而计算出呼气试验主要诊断参数: $t_{1/2}$ 、 t_{lag} 、 GEC 。胃排空系数是总的胃排空速率的指数, 这一指标反应的是具有最大排空速率的时间。半排空时间就是当时间趋向无穷大, 在 ^{13}C 累积排出曲线上有一半 ^{13}C 的剂量被排出的时间, 对应生物学意义即半数的胃内容物排空需要的时间。半排空时间和排空延迟时间只与曲线形状有关。 k 值为胃排空速率, β 描述了胃排空的起始阶段^[12]。排空延迟时间 t_{lag} 指胃将固体食物研磨成可以通过幽门排空的小颗粒所需的时间。为了方便起见, t_{lag} 被定义为 10% 固体内容物排空的时间。延迟时间的长短与食物的量、热量、食物颗粒大小、检测技术以及是否存在胃动力障碍有关。进食液体食物时, 一般没有延迟期, 除非食物有很高的热量(如高糖液体)。

本实验使用 C57/6 小鼠, 得到胃排空的三个诊断指标与国外研究者^[7]得到的小鼠胃动力指标接近。

说明本实验的胃排空结果是可靠的。小鼠胃排空的检测在胃动力疾病研究及相关治疗药物的开发中起着重要的作用。

参考文献(References)

- 1 Grunewald KK, Tucker TJ. Gastric emptying in exercised mice. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1985; 80(2): 173-5.
- 2 Croci T, Landi M, Emonds-Alt X, Le Fur G, Maffrand JP, Manara L. Role of tachykinins in castor oil diarrhoea in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121(3): 375-80.
- 3 Wang SC, Lu KY, Chen SM, Young TK. Gastric emptying and intestinal transit of liquid and solid markers in rats with chronic uremia. *Chin J Physiol* 2001; 44(2): 81-7.
- 4 Ghooys YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, *et al*. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 1993; 104(6): 1640-7.
- 5 Maes BD, Mys G, Geypens BJ, Evenepoel P, Ghooys YF, Rutgeerts PJ. Gastric emptying flow curves separated from carbon-labeled octanoic acid breath test results. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 1): G169-75.
- 6 Peachey SE, Dawson JM, Harper EJ. Gastrointestinal transit times in young and old cats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000; 126(1): 85-90.
- 7 Symonds EL, Butler RN, Omari TI. Assessment of gastric emptying in the mouse using the [^{13}C]-octanoic acid breath test. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(9): 671-5.
- 8 Wyse CA, Preston T, Love S, Morrison DJ, Cooper JM, Yam PS. Use of the ^{13}C -octanoic acid breath test for assessment of solid-phase gastric emptying in dogs. *Am J Vet Res* 2001; 62(12): 1939-44.
- 9 张开光, 胡运彪, 王承党, 莫剑忠, 王少先, 萧树东. 非溃疡性消化不良的胃电图和胃排空研究. *中华内科杂志* 1996; 35: 317-21.
- 10 Bennink RJ, De Jonge WJ, Symonds EL, van den Wijngaard RM, Spijkerboer AL, Benninga MA, *et al*. Validation of gastric-emptying scintigraphy of solids and liquids in mice using dedicated animal pinhole scintigraphy. *J Nucl Med* 2003; 44(7): 1099-104.
- 11 Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 2005; 54(8): 1078-84.
- 12 Elashoff JD, Reedy TJ, Meyer JH. Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology* 1982; 83(6): 1306-12.

^{13}C -Octanoic Acid Breath Test in Detection of Gastric Emptying of the Laboratory Mouse

Wei-Gang Wang¹, Jia-Bin Zhou², Ying-Han Wan², Hui-Min Yan^{2*}

(¹School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai 201203, China)

Abstract Gastric emptying studies in the laboratory mouse are hampered for the lack of a non-invasive and repeatable technique. The aim of the present study was to adapt the non-invasive ^{13}C -octanoic acid breath test to assess gastric emptying of both liquid and solid meal in the mouse. Gastric emptying rates were investigated for a liquid meal (Intralipid) and a solid meal (egg yolk) incorporating ^{13}C -octanoic acid. Mathematical analysis of the $^{13}\text{CO}_2$ excretion rate allowed the calculation of gastric emptying parameters (GEC, $t_{1/2}$, and t_{lag}). The breath test can continuously and non-invasively assess gastric emptying in the mouse. This method can be used to assess gastric emptying in drug development and disease studies in the mouse.

Key words gastric emptying; gastric motility; ^{13}C -octanoic acid; breath test; mouse model

Received: April 2, 2010 Accepted: July 16, 2010

This work was supported by the National High-tech R&D Program of China(863 Program, No.2008AA02Z126)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com