

# 运用标记水测定动物水周转率\*

刘志龙

(北京昌平流字五号动昆室 102206)

刘忠敏

(北京师范大学分析测试中心)

动物有机体不断与周围发生着水交换,而维持内环境的相对稳定是动物基本特征之一。因而研究动物水平衡状况成为生理生态学主要内容。虽然已积累相当多的资料,如测定肺皮失水量、尿浓度、肾脏指数等等,但绝大部分为实验室条件下的结果,实际应用受到限制。生态学家一直在寻找能够在自然状况下反映动物水代谢的示踪物,先后用作示踪物的有尿素、 $T_{1284}$ 、艾温氏蓝、安替匹林等等。理想示踪物应该具有下列性质:在体水中均匀扩散;能被迅速代谢或分解;在示踪浓度时没有毒害;能容易而且准确地测量等。上述几种示踪物因种种缺陷而未能得到广泛采用。由于 Lifson 和其同事们的杰出工作,同位素标记水技术已成为研究自然状态下动物水平衡的首选方法<sup>[24]</sup>。近年来同位素价格不断下跌,同位素测量技术不断得到发展,因此此技术已经在人类<sup>[27]</sup>、哺乳动物<sup>[9,10,12-14]</sup>、鸟类<sup>[2,3,15,26,29,33]</sup>、两爬动物<sup>[18]</sup>、陆地无脊椎动物<sup>[4,16]</sup>得到广泛的应用。我国在动物水平衡方面研究工作比较少,只有几篇关于肺皮失水量方面的研究<sup>[1]</sup>。本文介绍这种测定动物自然状况下水周转率的方法。

**(一) 同位素水类型** 标记水有两种:氘水(HDO)和氚水(HTO)( $^3\text{H}$ ),氘水为稳定性同位素,不具有放射性,特别适合象人这样的特殊实验对象,但样品制备、分析测量较复杂。高浓度时,可用红外吸收和常规质谱测量<sup>[1,30]</sup>;低浓度时就必须用分辨率很高的无机质谱来测量<sup>[23]</sup>。而且HDO价格较高,除非特殊需要,HDO已经被HTO取代。

氚水是放射性的,半衰期为12.3年,释放

射线为软 $\beta$ ,其在空气中最大射程小于1mm,是比较安全的放射性同位素。优点很多,如价格低廉,样品制备、测量简便等等。液闪测量灵敏度极高,可测量到 $10^{-12}-10^{-15}\mu\text{g}$ ,而最精确的化学分析只能测量到 $1\mu\text{g}$ 左右。因此只需给动物引入极其微量的同位素,完全符合生理条件和不存在环境污染问题,但HTO毕竟还是放射性的,使用时要非常谨慎。

**(二) 原理和方法** 把一定量同位素引入体内,迅速扩散并与体水达到平衡。动物体组织细胞一般不能区别一元素的各个同位素,也就是说同位素在体内的吸收、分布、运输、代谢、排泄等规律是一致的。通过测量体水中同位素活性变化可计算出动物水周转率。 $^3\text{H}$ 在总体水中下降是时间的指数,可表示为:

$$K = (\ln H_1^3 - \ln H_2^3) / t \quad (1)$$

K: 周转率;  $H_1^3$ 、 $H_2^3$ :  $^3\text{H}$ 的活性; t: 取样时间间隔。常用的还有生物半衰期( $T_{1/2}$ ),即同位素在生物体内代谢一半所需要的时间:

$$T_{1/2} = \ln 2 / K = 0.693 / K \quad (2)$$

实验室内可以多次取样,故采用 $\ln H^3$ 对时间进行线性回归,求得K值。总体水处于平衡状态,得水量与失水量相等,等于总体水乘上周转率。野外动物总体水总是有所改变的。Nagy & Costa<sup>[10]</sup>给出了体水规律变化的公式(单位为 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),  $W$ : 总体水(ml),  $M$ : 体重(g)。

线性变化:

$$\text{失水量} = \frac{2000(W_2 - W_1) \ln(H_1^3 W_1 / H_2^3 W_2)}{t(M_1 + M_2) \ln(W_2 / W_1)} \quad (3)$$

\* 承蒙孙儒泳教授指导和审阅文稿,特表谢意。

指数变化:

$$\text{失水量} = \frac{2000W_1 \ln(W_2/W_1) \ln(H_1 \cdot W_1/H_2 \cdot W_2)}{t (M_1 + M_2) [1 - (W_1/W_2)]} \quad (4)$$

线性和指数变化:

$$\text{得水量} = \text{失水量} + 2000 (W_2 - W_1) / t (M_1 + M_2) \quad (5)$$

指数变化主要适用于生长迅速或严重缺水后恢复期的动物, 通常的动物研究均采用线性变化。

**(三) 操作步骤** 野外研究具体操作步骤包括活捕动物, 称重与标记动物; 引入同位素; 抽取样品; 原处放回动物; 重捕动物; 抽取重捕样品; 样品处理和测量。

同位素进入体内需要一定时间与体水扩散达到平衡, 这段时间称为平衡时间, 平衡时间内不给动物食物和水。达到平衡后抽取第一次样品, 平衡时间越短, 动物就能越快取样后原处放回。平衡时间与动物个体大小、同位素引入途径有关, 变温动物还与气温有关系。一般来说, 从静脉引入同位素比腹腔、肌肉及灌胃的平衡时间要短些, 但静脉注射易污染注射器, 大多数还是用腹腔注射, 鸟类因腹气囊而改用肌肉注射。对于小于 300g 的动物, 腹腔、肌肉注射平衡时间 1 小时已经足够, 天气寒冷时爬行类需较长些时间<sup>[6, 19]</sup>; 大些动物需要 2—4 小时的平衡时间, 一些反刍动物灌胃则需要 10 小时<sup>[18, 19]</sup>。如果对平衡时间不放心, 可在实验室内对几只动物进行每隔 10 分钟连续取样, 测出平衡时间。

可以用来作为样品的较多, 血液、唾液、眼泪、淋巴液、尿液或粪便、蒸发水、汗水等<sup>[19, 22]</sup>, 节肢动物可用体腔液<sup>[6, 16]</sup>。粪尿中同位素与体水存在着时滞, 不能用作平衡时间时的样品, 但已证明可作重捕样品<sup>[6, 16]</sup>。但是最常用的还是血液, 因为取样和处理最简便, 结果更可信。爬行类和小型兽类常用眼眶后的眶静脉丛取血, 将用肝素抗凝过的蛋白管小心插入眼睑与眼球之间, 然后拔出, 就可取血样。一般取两个平行血样品。大型动物可用针刺破四肢、尾、耳缘静脉等处取样, 鸟类翼上臂静脉或腿上任一

静脉均可用作取血样。

最好在一个到两个生物半衰期间重捕动物。如果早于一个生物半衰期重捕取样, 可能会发生同位素水不充分周转和测量上细微误差引起结果较大的误差。<sup>3</sup>H 分析长于 5 个半衰期时取样仍相当精确, 对小型动物, 重捕时间一般为 3—8 天。生活在潮湿环境中的动物一般有较短的生物半衰期。

血液样品制备常有三种方法。离心法: 将血液样品在 15600g 转速下离心 3 分钟, 取上清液在同样转速下离心 2 分钟, 取上清液用于测量。真空蒸馏法: 将血样品在真空系统中进行蒸馏而得到水样品。消化法: 用酸或碱进行消化, 将一些大分子水解成易溶的小分子, 常用的消化剂有过氯酸、甲酸、硝酸、氢氧化钾或钠以及季胺盐、双氧水等。

我们摸索出适用于野外的简便方法<sup>[17]</sup>。将 20 $\mu$ l 血样加到含 100 $\mu$ l 甲酸的闪烁瓶中, 再加 50 $\mu$ l 双氧水, 旋紧盖, 24 小时后加闪烁液进行测量或置于阴暗处带回实验室测量。此法不需要复杂仪器, 也不要加热保温, 比较实用。闪烁液配方很多, 常用的为三份甲苯加两份乙醇独乙醚, 每升含 3g 2, 5-二苯基噻唑 (PPO) 和 0.2g 1, 4-双-2, 5-二苯基噻唑苯 (POPOP)。用液闪测量每瓶至误差为  $\pm 1\%$  或者测量 5min, 记录 cpm 和 H 数。H 数用于判断两行样品的淬灭程度。由于水周转率结果取决于两样品的相对浓度, 那些影响测量绝对值的因素如淬灭、计数效率等显得不重要, 也没有必要将 cpm 换算为微居。

**(四) 应用前景** 标记水法的准确性已经在从无脊椎到兽类和人等多种动物中进行了比较性研究。早期研究表明: HDO 研究啮齿类平均误差在  $-8 - +5\%$  之间。Nagy & Costa<sup>[18]</sup>总结了从爬行类到兽类的 HTO 法准确性研究, 误差为  $\pm 8\%$ 。由于野外未知因素, 认为 HTO 法提供了对大多数动物测量误差为  $\pm 10\%$  的准确性。而且这个误差还不能证明是来自 HTO 法, 还是来自于与之比较的那种方法。

HTO 法目前已得到广泛应用, 得出了许多

有价值的理论和实践上成果。Hagy<sup>[21]</sup>综述了至1986年5月运用HTO法测量出的动物水周转率与体重、生境、食性以及大类群间的关系(见表1),得到有益的结论,如水周转率与动物体重对数线性回归非常显著;室内测定动物的结果与野外测定的结果在回归直线上截距与斜率均存在显著性差异;给出了预测野外动物水周转率的方程式;野外测量水代谢率在一些方面表现出显著性差异,如雀形目与其它鸟类相比;沙漠与非沙漠中的兽类、鸟类、爬行类;海鸟与其它鸟类比较;草食兽类与其它兽类;草食与肉食的有袋类;猛禽与其它鸟类等等。

表1 运用标记水测量水周转率的动物种类统计表,引自Nagy(1988)

类群	实验室	野外
真兽类	98	43
有袋类	16	19
单孔目		1
鸟类	27	27
爬行类	26	27
两栖类	5	1
鱼类	45	
水生节肢	27	2
陆生节肢	27	7
软体动物	6	
环节动物	3	

综上所述:HTO法是一种已经广泛应用的测定动物自由生活状态下水代谢率的先进技术,实验室内测定结果均是一种理想化的结果,野外自然条件(如温度、湿度、风速等)随时总是变化的,从Nagy<sup>[21]</sup>的结论看到,室内测定结果不能用于野外。因此HTO法倍受生理生态学工作者的欢迎,也将受我国科研人员的重视。

### 参 考 文 献

1 自增结 孙儒泳 1988 长爪沙鼠和金黄地鼠的肺皮失水量的研究 兽类学报 8:49-54

2 Alkon P. U., B. Pinshow and A. A. Degen 1982 Seasonal water turnover rate and body water volumes in desert chuars. *Condor* 84:332-337.

3 Bakko E. B. 1975 A field water balance study of grey squirrel, *Sciurus carolinensis* and red squirrel, *Tamiasciurus hudsonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51:759-768.

4 Bohm B. C. and N. F. Hadley 1977 Tritium-determined water flux in the free roaming desert tenebrionid beetle, *Eleodes armata*. *Ecol.* 58:407-414.

5 Booth D. T. 1987 Water flux in Malleefowl, *Leipoa ocellata* Gould (Megapodidae). *Aust. J. Zool.* 35:147-159.

6 Cooper P. D. 1983 Validation of the doubly labeled water method for measuring water flux and energy metabolism in tenebrionid beetles. *Physiol. Zool.* 56:41-46.

7 Cooper P. D. 1985 Seasonal changes in water budgets in two free-ranging tenebrionid beetles, *Eleodes armata* and *Cryptoglossa verrucosa*. *Physiol. Zool.* 58:458-472.

8 Crum B. G., J. B. Williams and K. A. Nagy 1985 Can tritiated water dilution space accurately predict total body water in chukar partridges? *J. Appl. Physiol.* 59:1383-1388.

9 Degen A. A., M. Kohn A. Hazan et al. 1986 Energy expenditure and water flux in three sympatric desert rodents. *J. Anim. Ecol.* 55:421-429.

10 Etzion Z., N. Meyerstein and R. Yagil 1984 Tritiated water metabolism during dehydration and rehydration in the camel, *Camelus dromedarius*. *J. Appl. Physiol.* 55:217-220.

11 Goyal S. P. 1986 Field urine concentration in two Indian desert gerbils. *J. Mamm.* 56:626-632.

12 Green B., J. Dunsmore, H. Butts et al. 1978 Turnover of sodium and water by free-living rabbits, (*Oryctolagus cuniculus*). *Aust. Wildl. Res.* 5:93-99.

13 Green B., D. King and H. Butts 1986 Water, sodium, and energy turnover in free-living perenties, *Varanus giganteus*. *Aust. Wildl. Res.* 13:589-596.

14 Holleman D. F., K. G. White and D. D. Feist 1982 Seasonal energy and water metabolism in free-living Alaskan voles. *J. Mamm.* 63:293-296.

15 Karasov W. H., L. R. Ham and J. C. Munger 1988 Measurement of HDO by IR absorbance in doubly labeled H<sub>2</sub>O studies of energy expenditure. *Amer. J. Physiol.* 255:R174-R177.

16 King W. W. and N. F. Hadley 1979 Water flux and metabolic rates of free-roaming scorpions, using the doubly labeled water technique. *Physiol. Zool.* 52:176-189.

17 Liu Z. L., Z. M. Liu and R. Y. Sun 1992 Seasonal

- water turnover rates of free-living Brandt's voles, *Microtus brandtii*. *Physiol. Zool.* **65**:215-225.
- 18 Nagy K. A. and D. P. Costa 1980 Water flux in animals: analysis of potential errors in the tritiated water method. *Am. J. Physiol.* **238**:R454-R465
- 19 Nagy K. A. 1983 The doubly labeled water method; a guide to its use. *Univ. Calif. Los Angeles Pub.* **12**: 1417
- 20 Nagy K. A. 1987 Field metabolic rate and food requirement scaling in mammals and birds. *Ecol. Monogr.* **57**:111-128.
- 21 Nagy K. A. and C. C. Peterson 1988 Scaling of water flux rate in animals. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **120**:1-172.
- 22 Rubsamén K. U. Nolda and W. Von Engelhardt, 1979 Differences in the specific activity of tritium labeled water, blood, urine and evaporative water in rabbits. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**:279-282.
- 23 Schoeller D. A. E. Van Santen, D. W. Peterson et al. 1980 Total body water measurement in human with O-18 and H-2 labeled water. *Amer. J. Clin. Nutr.* **33**: 2686-2693.
- 24 Streit B. 1982 Water turnover rates and half-life times in animals studied by use of labeled and non-labeled water. *Comp. Biochem. Physiol.* **72A**:445-454.
- 25 Studier E. H. and D. A. Rimple 1980 Concentration and composition of natural urine of some Michigan small mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* **67A**:163-165.
- 26 Tibout H. M. III and K. A. Nagy 1991 Validation of the doubly labeled water method for measuring water flux and CO<sub>2</sub> production in the tropical hummingbird, *Amazilia saucerrottei*. *Physiol. Zool.* **64**:362-374.
- 27 Weathers W. W. and F. G. Stiles 1989 Energetics and water balance in free-living tropical hummingbirds. *Condor* **91**:324-331.
- 28 Webster M. D. and W. W. Weathers 1989 Validation of single sample doubly labeled water method for measuring energy metabolism. *Amer. J. Physiol.* **256**: R572--376.
- 29 Williams J. B. and B. Dwinell 1990 Field metabolism of free-living female savannah sparrows during incubation; a study using doubly labeled water. *Physiol. Zool.* **63**:353-372.
- 30 Zweens J. H. Frankena A. Reicher et al. 1980 Infra-spectrophotometric determination of D2O in biological fluids. *Pflugers. Arch.* **385**:71-77.