

克伦特罗对绵羊肝脏血流量和氮代谢的影响

郑元林, 韩正康, 陈 杰, 艾晓杰

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘 要:在 4 头门静脉、肝静脉、肠系膜静脉和股动脉上安装血管导管的绵羊中研究了克伦特罗 (CL, 0.8 mg/kg BW, 肠系膜静脉给药, 每天 2 次, 连续 5 d) 对其肝脏生长代谢的影响。结果表明: CL 对肝脏血流量影响较小。而在 CL 作用下绵羊血浆中尿素氮水平明显下降, 肝静脉和门静脉血液尿素氮流量分别减少 16.86% ($P < 0.01$) 和 15.51% ($P < 0.05$)。肝静脉多肽流量在 CL 处理期也较对照期下降 38.71% ($P < 0.01$), 门静脉处多肽水平处理期则与对照期相当。克伦特罗还增加绵羊肝脏 IGF-I 的合成和分泌, 门静脉和肝静脉中的增加幅度分别为 38.84% ($P < 0.01$) 和 33.18% ($P < 0.01$)。提示 CL 可通过增强对绵羊肝脏氮的储留及肝脏 IGF-I 的合成和分泌从而促进机体的生长代谢。

关键词:克伦特罗; 血流量; 氮代谢; IGF-I; 多血管导管; 羊

中图分类号: S852.21

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)02-0114-05

克伦特罗 (Clenbuterola, CL) 为一种 β -肾上腺素能受体激动剂。自 80 年代初发现 β -受体激动剂可促进动物生长并改变动物胴体组成以来, 国外对其作了大量研究^[1-3]。在许多动物尤其是反刍动物中均发现这类物质能促进肌肉增重和体脂下降。对其进一步研究发现 β -受体激动剂对机体代谢有重要的影响^[1,3,5], 是当前提高动物瘦肉率研究的热点之一。肝脏是机体内实质器官中血液供应最丰富、代谢率最高的器官, 并起着代谢中枢的作用。另一方面对机体生长、发育及代谢具有特殊作用的胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factors, IGFs) 主要由肝脏合成并分泌到血液中。GH 的促生长作用在相当程度上是通过 IGF-I 来实现的, 动物血液中 IGF-I 水平与生长起平行性变化^[4]。为此本文利用装有多种慢性血管导管的绵羊研究在克伦特罗作用下进出绵羊肝脏的血流量以及血液中 IGF-I、氮代谢水平的变化, 以期在整体水平上探讨克伦特罗影响机体生长代谢的有关肝脏机制。

1 材料和方法

1.1 药品 克伦特罗, 江苏金坛制药厂生产。

1.2 实验动物 实验动物为绵羊 (湖羊), 4 头, 体重为 27.75 ± 2.63 kg, 单栏舍饲, 青干草自由采食。

1.3 血管导管的安装 血管导管为医用聚乙烯导

管, 前端套上一段硅橡胶管。血管导管的安装主要参照 Katz 等人^[5]及本实验室先期工作的方法。动物手术前一天禁食禁水。绵羊用戊巴比妥钠麻醉。按常规手术方法, 于右侧最后一根肋骨后 3 cm 处与肋骨平行, 切开长约 20 cm 的切口, 暴露肝脏等脏器。分别在门静脉、肝静脉、肠系膜静脉处安装血管导管, 并固定导管于血管管壁及其附近的组织上。然后将导管引出至皮肤外。于左侧股的中部做一 5 cm 长切口, 钝性分离出股动脉, 在其上向躯干方向安装血管导管并将导管引出体外。所有导管均用荷包缝合, 使之血流不被完全阻断。每天用 300 U/ml 肝素钠的生理盐水冲洗疏通血管导管一次以防凝血。术后约一星期, 动物基本恢复正常。

1.4 实验设计及血样采集 实验分为 2 期, I 期为对照期, II 期为克伦特罗处理期, 每期持续 5 d。每日 8:00 和 20:00 分别从肠系膜静脉导管滴注生理盐水 100 ml (对照期) 或克伦特罗 0.8 mg/kg BW · 100 ml 生理盐水 (克伦特罗处理期)。在对照期和 CL 处理期最后一天分别从肝静脉、门静脉和股动脉每隔 3 h 采集血样 1 次, 连续采样 24 h。血样采集后立即分离出血浆, 分装后于 -30°C 保存待测。

1.5 样品分析

1.5.1 血流量的测定: 参照 William 等人^[6]的方法。采样时用恒流泵由肠系膜静脉导管连续灌注 1.5% PAH, 速度为 1 ml/min。血流量的计算公式为:

$$\text{血流量 (L/min)} = \frac{\text{PAH 注入量 (mg/min)}}{[\text{PAH}]_v - [\text{PAH}]_a \text{ (mg/L)}}$$

收稿日期: 2000-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (No. 39570536)

作者简介: 郑元林 (1961-), 男, 江苏泰州人, 副教授, 博士。主要从事动物营养生理调控的研究。现在徐州师范大学生物系工作。

公式中 $[PAH]_v$ 为门静脉或肝静脉处血样中PAH的浓度, $[PAH]_a$ 为股动脉中PAH浓度。

1.5.2 血浆尿素氮的测定:二乙酰一肟法。

1.5.3 血浆多肽的测定:参照Chen等人^[7]所用方法并加以改进。具体方法为:取血浆7.5 μ l与水3.1925 ml混匀后,加25% HClO₄溶液0.8 ml总体积为4 ml,混匀后离心(8 500 g \times 15 min, 4 $^{\circ}$ C)取出上清液与2 mol/L K₂CO₃溶液1 ml混匀后离心(8 500 g \times 15 min, 4 $^{\circ}$ C)。取出上清液用紫外吸收法测其OD₂₃₈。用谷胱甘肽配制成系列梯度浓度的溶液,绘制出标准曲线,以此计算样品中多肽的含量。

1.5.4 IGF-I的放免测定:IGF-I标准品由瑞士Ciba Geigy公司H.H. Peter博士惠赠。IGF-I抗体由美国北卡罗来纳州大学Louis E. Underwood教授惠赠。¹²⁵I-IGF-I采用氯胺-T标记法由我室在上海生物制品研究所放免室的协助下标记。羊抗兔抗体(二抗)购自上海生物制品研究所。采用美国Nichols Institute提供的方法提取IGF-I。吸取0.1 ml血浆至离心管中,加入0.9 ml酸醇混合液(2 mol/L HCL:乙醇=1:7)。封口后混匀,室温孵育30 min后离心(4 $^{\circ}$ C, 1 400 g \times 30 min)。取0.2 ml上清液至另一离心管内,加入0.1 ml 0.855 mol/L Tris-Base (pH 11.0)封口后混匀,室温孵育30 min,离心(4 $^{\circ}$ C, 1 400 g \times 30 min)。取0.1 ml上清液与0.9 ml PBS(pH 7.5)混匀。4 $^{\circ}$ C保存待测。取0.1 ml制备好的IGF-I待测样品,同批按双抗体法测其IGF-I的含量。计数使用FMJ-182型放射免疫 γ -计数器。本测定最小检测量为:0.06 ng/ml,批内误差为4.8%,批间误差为8.2%。

1.6 数据统计 各期数据用平均值 \pm 标准差表示。期间差异显著性用t-检验法检验。

2 结果

2.1 克伦特罗对绵羊肝脏血流量的影响 正常日粮条件下以及给予克伦特罗处理后绵羊肝脏的血流量见表1。正常日粮条件下,绵羊肝血流量约为2.5 L/min。门静脉处的血流量占肝静脉血流量的87.26%。克伦特罗处理后门静脉和肝静脉处血流量分别比对照期上升了11.50%和9.65%,但均无显著性差异($P > 0.05$)。暗示克伦特罗对肝脏血流量影响较小。

2.2 克伦特罗对绵羊肝脏尿素氮生成的影响 表2列出了绵羊在正常日粮条件下以及在CL作用后

表1 正常日粮条件下和克伦特罗处理后绵羊肝脏的血流量水平

Table 1 Liver blood flux of sheep during control and clenbuterol-treated ($\bar{x} \pm SD$) L/min

期 别 Item	n	门静脉 Portal vein	肝静脉 Hepatic vein
对照期 Control	4	2.26 \pm 0.48	2.59 \pm 1.11
处理期 Treatment	4	2.52 \pm 0.61	2.84 \pm 0.68

肝静脉和门静脉处尿素氮的昼夜平均流量。在CL的影响下,肝静脉及门静脉处尿素氮水平明显下降。肝静脉处尿素氮的流量处理期较对照期下降16.86% ($P < 0.01$),门静脉处的尿素氮流量也同时下降15.51% ($P < 0.05$)。进一步观察尿素氮流量的肝静脉—门静脉(H-P)差值可发现:在CL的影响下其差值减少了23.27% ($P < 0.05$)。

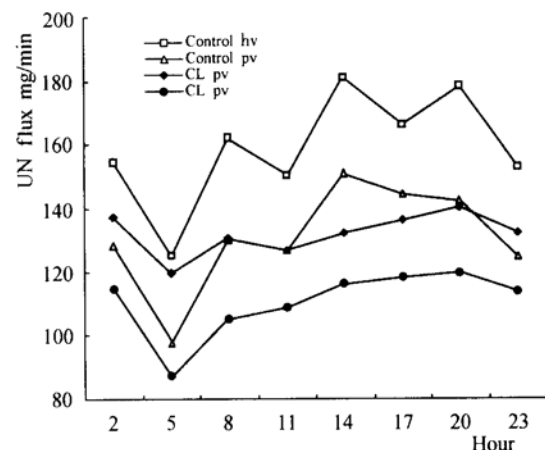


图1 CL作用下绵羊肝脏血中尿素氮流量的昼夜变化
Fig.1 Dynamic effects of clenbuterol on liver blood UN flux in sheep during 24h

图1为绵羊血浆中尿素氮流量的昼夜变化。在CL的影响下,血浆中尿素氮流量始终低于对照期的。肝静脉与门静脉的尿素氮流量之差除5:00这一点外,一天内其余各点CL处理期的均低于对照期的。

2.3 克伦特罗对绵羊肝脏血液中多肽水平的影响 绵羊在正常日粮条件下以及给予CL处理后门静脉和肝静脉处血浆中多肽的昼夜平均水平见表3。实验结果显示CL处理期与对照期的门静脉多肽水平非常接近,流量相差7.59% ($P < 0.05$)。但绵羊在CL处理期肝静脉血浆中多肽水平显著下降,其流量下降了38.71% ($P < 0.01$)。而且在CL处理期肝静脉处血浆中多肽水平非常接近同期门静

表2 克伦特罗对绵羊肝脏血中尿素氮流量的影响

Table 2 Effects of clenbuterol on urea-N flux in liver blood of sheep ($\bar{x} \pm SD$) mg/min

项目 Item	门静脉 Portal vein	肝静脉 Hepatic vein	肝-门差(H-P)
对照期 Control	130.79 ± 16.45	158.86 ± 17.48	28.11 ± 4.50
处理期 Treatment	110.50 ± 10.70 *	132.08 ± 6.54 **	21.57 ± 5.55 *

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表3 克伦特罗对绵羊肝脏血中多肽流量的影响

Table 3 Effects of clenbuterol on peptide flux in liver blood of sheep ($\bar{x} \pm SD$) g/min

项目 Item	门静脉 Portal vein	肝静脉 Hepatic vein	肝-门差(H-P)
对照期 Control	24.12 ± 3.38	48.00 ± 14.88	23.99 ± 13.54
处理期 Treatment	25.95 ± 2.95	29.42 ± 2.83 **	3.48 ± 3.38 **

** $P < 0.01$

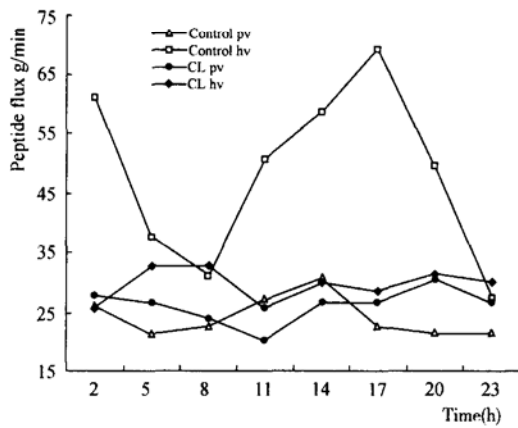


图2 CL作用下绵羊肝脏血中多肽流量的昼夜变化
Fig.2 Dynamic effects of clenbuterol on liver blood peptide flux in sheep during 24h

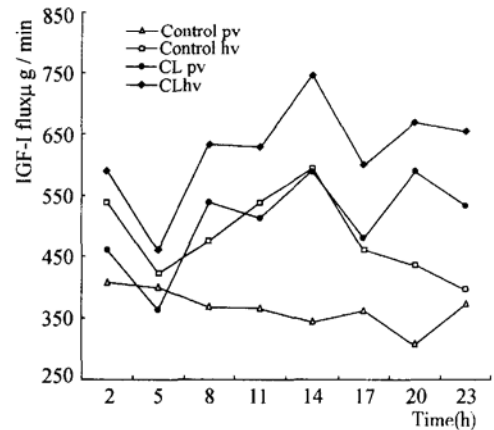


图3 CL作用下绵羊肝脏血中IGF-I流量的昼夜变化
Fig.3 Dynamic effects of clenbuterol on liver blood IGF-I flux in sheep during 24h

脉处的水平。观察其肝-门(H-P)多肽差值可发现CL影响非常明显。处理期的H-P多肽流量差仅为对照期的14.51% ($P < 0.01$)。

绵羊血液中多肽流量的昼夜波动见图2。门静脉处血中多肽水平变化不大。而对照期的肝静脉血中多肽流量变化较大,经CL处理后,肝静脉血中多肽水平下降、变化趋缓,接近同期门静脉血中水平。

2.4 克伦特罗对绵羊血液中IGF-I水平的影响

平均24h内肝静脉和门静脉中IGF-I的水平见表4。正常日粮条件下,绵羊肝静脉中IGF-I平均流量比门静脉中的高出27.50% ($P < 0.05$)。在CL的影响下绵羊肝静脉和门静脉中IGF-I的水平相对对照期均有较大幅度的提高。就IGF-I的流量而言,门静脉和肝静脉中的增加幅度分别为38.84% ($P < 0.01$)和33.18% ($P < 0.01$)。显示出在CL的影响下肝脏分泌IGF-I增加,使整个机体的IGF-I循环

水平维持在一个较高的水平上。

图3显示了正常日粮条件及在CL影响下肝、门静脉中IGF-I水平的昼夜变化。比较肝静脉和门静脉中IGF-I的水平,可发现肝静脉中IGF-I水平总是高于门静脉中的。在正常日粮条件下肝脏分泌IGF-I的动态变化过程中,可发现午后(14:00)血液中IGF-I水平最高。肝静脉中IGF-I的流量达 $592.55 \pm 250.82 \mu\text{g}/\text{min}$,为同一时刻门静脉中IGF-I流量的172.71%。在CL影响下,绵羊肝脏IGF-I的分泌量在整体水平上均有所提高。肝静脉中IGF-I的最高水平仍出现在午后,与对照期相比,其提高的幅度为25.87%;而在清晨血液中IGF-I水平最低。正常饲喂时5:00时肝静脉中IGF-I的流量为 $423.19 \pm 139.26 \mu\text{g}/\text{min}$,仅比同一时间门静脉中的高5.52%,处理期同一时间的肝静脉IGF-I流量也仅增加9.17%。观察8:00与20:00两个

表 4 克伦特罗对绵羊肝脏血液中 IGF-I 流量的影响

Table 4 Effects of clenbuterol on IGF-I flux

项目 Item	in liver blood of sheep ($\bar{x} \pm SD$) $\mu\text{g}/\text{min}$	
	门静脉 Portal vein	肝静脉 Hepatic vein
对照期 Control	366.55 \pm 31.77	467.36 \pm 97.86
处理期 Treatment	508.93 \pm 73.33 * *	622.45 \pm 97.87 * *

* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

采样点还可发现在给予 CL 后,绵羊肝脏血液中 IGF-I 浓度随即出现较大幅度的变化,其提高的程度均高于其他观察点。提示 CL 可较迅速地增加肝脏 IGF-I 的分泌量。

3 讨 论

β -肾上腺素能受体激动剂作为一种营养分调配的生理调节剂在许多种动物中均表现出促进生长的作用^[1,8]。生长与机体内的代谢水平密切相关。许多学者的研究证明 β -激动剂与组织的相应受体特异性结合后,通过一系列信息传递过程,强烈影响动物的脂肪代谢和蛋白质代谢^[1,10]。我们实验室以及其他学者^[6,9,10]对许多动物的研究发现以不同的给药方式如肌注、静注及口服等给予 CL, CIM 等 β -激动剂后均降低了血中尿素氮的浓度。但不同给药方式的体内药物动力学有差异,肌注给药吸收的速度和程度以及生物利用度与静注类似,两者均优于口服给药。此外,由于以饲喂方式给药时剂量控制的准确度也低于静脉及肌注给药。故本实验选择了肠系膜静脉给药的方式,一方面可模拟药物在胃肠道被吸收后经过体内的途径,另一方面可使 CL 能迅速的直接作用于肝脏,以探讨 CL 在肝脏水平上的生物学效应。肝脏是体内一个重要的代谢器官和内分泌器官,在机体的物质代谢中起着代谢中枢的作用。并且肝细胞上存在着大量的 β -受体,因此 β -激动剂也可直接影响肝脏的物质代谢^[3,8]。我们的实验结果进一步表明绵羊肝脏中的氮代谢受 CL 的调节。在 CL 的作用下,流出肝脏的尿素氮水平明显下降,并使机体整个循环血中尿素氮水平与对照期相比明显下降。肝脏是体内生成尿素的最主要部位。血液中尿素绝大多数是由肝脏经鸟氨酸循环从氨基酸中所脱下的氨生成的。通过血液循环至肾脏排出体外。血浆中尿素氮的水平可反映动物蛋白质代谢状况,并可作为蛋白沉积的一个指标。由于肝

脏是体内实质器官中血液供应最丰富、代谢率最高的器官,肝血液流入量约占心输出量 1/4。因此,肝脏部位尿素生成的减少可为其它部位如肌肉的蛋白沉积提供充分的氨基酸等原材料^[8]。显然 CL 这种降低肝脏尿素氮生成的作用有助于促进蛋白质的沉积。Danilson 等^[11]认为循环中多肽相当一部分是蛋白质合成受干扰时的产物,由于肝脏为机体内代谢最活跃的器官之一,因而肝脏内蛋白质的合成与分解的水平对机体的生长发育有非常重要的意义。我们在观察 CL 对绵羊肝脏血中多肽水平的影响时,发现在正常日粮条件下,肝静脉处多肽水平非常显著的高于肝脏门静脉处多肽水平。表明肝脏在蛋白质代谢中,生成较多的多肽。但在 CL 的作用下,门静脉处多肽水平尽管较对照期稍有增加,但无生物统计学上的意义,两期为同一水平。但在肝静脉中多肽水平与对照期相比明显下降,接近同期门静脉处的水平。提示在 CL 作用下,肝脏在蛋白质代谢过程中,多肽生成量明显减少。表明 CL 确能影响绵羊肝脏的蛋白质代谢。或加强其合成能力或抑制其降解速率。

另一方面近年来体内外的研究充分显示出 GH 的促进生长效应主要通过 IGF 实现的^[12]。Elassser 等^[13]显示牛血浆中 IGF-I 水平很明显地与日增重相关。大量的研究资料已表明 IGF 是 GH 生长轴中的延伸部分,是该轴中最直接的促进生长代谢的因子。IGF 在体内主要由肝脏产生并受 GH 的调控^[14]。鉴于 CL 对肝脏内分泌的影响的研究报道尚少。我们通过利用多种慢性血管导管技术可直接在活体中观察 CL 对肝脏内分泌的影响。我们的结果表明在 CL 影响下,肝静脉中 IGF-I 的水平显著提高,并且在门静脉中 IGF-I 也同时维持在一个较高的水平上。由于 IGF-I 在肝细胞内合成后即分泌入血并贮存在血液之中^[12],在 CL 影响下绵羊血液中可持续维持这种高水平状态,从而促进机体的生长代谢。因此,CL 可通过对绵羊肝脏氮代谢的影响及肝脏合成和分泌 IGF-I 的影响调节机体的生长代谢。这可能是 CL 加强体内蛋白质合成、促进机体生长的肝脏机制之一。

参考文献:

- [1] Yang Y T and McElligott M A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue [J]. *Biochem J*, 1989, 261: 1~10.
- [2] Beermann D H, Bulter W R, Hogue D E, et al. Cimaterol-

- induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs [J]. *J Anim Sci*, 1987, 65: 1514~1524.
- [3] Podolin D A, Gleeson T T, Mazzeo R S. Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: Evidence of aging and training effects [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267: E680~E688.
- [4] Peter M A, Winterhalter K H, Schmid C, et al. Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone [J]. *Endocrinology*, 1994, 135: 2558~2567.
- [5] Katz M L, Bergman E N. A method for simultaneous cannulation of the sheep [J]. *Am J Vet Res*, 1969, 30: 655~661.
- [6] Williams PEV, Pagliani L, Innes G H, et al. Effects of a β -agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves [J]. *Br J Nutr*, 1969, 57: 417~428.
- [7] Chen G, Russell J B, et al. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate limiting step in ruminal protein degradation [J]. *J Dairy Sci*, 1987, 70: 1211~1219.
- [8] Squires E J, Adeola O. The role of growth hormone, β -adrenergic agents and intact males in pork production. A review [J]. *Can J Anim Sci*, 1993, 73: 1~23.
- [9] 方炳虎, 陈杖榴, 黄显会. 克伦特罗在猪体内的生物利用度及药物动力学研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 1997, 28(3): 233~237.
- [10] Eisemann J H, Huntington G B. Metabolite flux across portal-drained viscera, liver, and hindquarters of hyperinsulinemic, euglycemic beef steers [J]. *J Anim Sci*, 1994, 72: 2919~2929.
- [11] Danilson D A, Webb K E, Herbein J H. Transport and hind limb exchange of peptide and serum protein amino acid in calves fed soyor urea-based purified diets [J]. *J Anim Sci*, 1987, 64: 1852~1857.
- [12] Froesch E R, Schmid C, Schwander J, Achwander J. Actions of insulin-like growth factors [J]. *Ann Rev Physiol*, 1985, 47: 443~467.
- [13] Elsasser T H, Rumsey T S, Hammond A C, et al. Influence of parasitism on plasma concentrations of growth hormone, somatomedin-C and somatomedin-binding protein in calves [J]. *J Endocrinol*, 1988, 116: 191~200.
- [14] Schwander J C, Hauri C, Zapf J, et al. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status [J]. *Endocrinology*, 1983, 113: 297~305.

Effects of Clenbuterol on the Hepatic Blood Flux and Metabolism of Nitrogen in Sheep

ZHENG Yuan-lin, HAN Zheng-kang, CHEN Jie, AI Xiao-jie
(Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Four sheep installed chronic polycatheters in the portal vein, hepatic vein, mesenteric vein and femoral artery were used to study the effects of clenbuterol (0.8 mg/kg BW, twice daily for 5 d) on hepatic metabolism. The results showed that clenbuterol had a little effect on the blood flux of sheep liver. However, there was a decline of the serum urea-nitrogen level distinctly during clenbuterol treatment period, the urea-nitrogen flux of hepatic and portal vein were decreased by 16.86% ($P < 0.01$) and 15.51% ($P < 0.05$), respectively. The peptide flux of hepatic vein was also decreased by 38.71% ($P < 0.01$) compared with that of control, but the peptide level of portal vein in treatment period was similar to control. Moreover, the IGF-I level of hepatic synthesis and secretion was elevated with clenbuterol treatment, the IGF-I flux of portal vein and hepatic vein were increased by 38.84% ($P < 0.01$) and 33.18% ($P < 0.05$), respectively. These data suggest that clenbuterol would improve growth metabolism by increasing nitrogen deposition and IGF-I level of liver in sheep.

Key words: Clenbuterol; Blood flux; Nitrogen metabolism; IGF-I; Chronic polycatheter; Sheep