

## 高原鼠兔和青海鼫鼠红细胞 2, 3-二磷酸甘油酸含量的初步研究

周虞灿 刘国富 温得启

(中国科学院西北高原生物研究所)

关于脊椎动物红细胞对组织氧供的调节机制,本世纪六十年代就已提出 (Benesch 和 Benesch 1967; Chanutin 和 Curnish 1967)。一般认为缺氧时红细胞中 2, 3-二磷酸甘油酸 (以下简称 2, 3-DPG) 含量的改变和氢离子浓度的改变一样也起着调节血红蛋白对氧的亲合力的作用。2, 3-DPG 功能的这一重要发现引起了人们的重视,并作了深入的研究 (Gray 1974; Duhm 1975; Ackers 1979)。目前 2, 3-DPG 已被公认为调节血红蛋白氧亲和力的因素之一。高原环境是低氧的环境,而低氧适应是一个错综复杂的过程。我们对高原动物血红蛋白对氧亲和力的研究,在于探索高原动物的低氧适应性与血红蛋白功能的关系。本文对同一海拔下生活习性不同的鼠种以及同一鼠种在不同海拔下的 2, 3-DPG 含量进行了比较,探讨生活习性和海拔高度对 2, 3-DPG 含量的影响。

### 一、材料与方 法

(1) 动物来源: 高原鼠兔 (*Ochotona curzonicae*) 共 65 只, 其中 46 只于 1981 年 4—5 月间捕自青海省海北州风匣口地区, 海拔约 3,250 米; 另 19 只于 1981 年 8 月捕于青海省海西州天峻县关角地区, 海拔约 3,850 米。

青海鼫鼠 (*Myosplax baileyi*) 25 只于 1981 年 4—5 月间捕自风匣口地区。

(2) 采血: 动物经乙醚麻醉, 颈部放血。以 4.5% 柠檬酸钠为抗凝剂。为避免因运输过程以及环境改变而引起 2, 3-DPG 量的偏离, 我们采取就地采血, 并制成无蛋白滤液, 冰冻带回实验室测定。

(3) 试剂: 2, 3-DPG 标准品, 美国 Sigma 公司产品。变色酸, 西德 Merck 公司产品, 其余均为国产分析纯或优级纯试剂。

(4) 血红蛋白 (Hb) 测定: 采用 Drabkin 氰高铁法 (Winterhalter 1974), 取已洗涤的红细胞悬液 0.02 毫升加 Drabkin 液 5 毫升, 3 分钟后, 在 540m $\mu$  下比色测定。

(5) 2, 3-DPG 测定: 采用 Bartlett 法 (1959), 略有修改。血液经离心除去血浆后用 3 倍量的 0.9% 氯化钠溶液将红细胞洗 2 遍, 去掉软层。吸取中层红细胞 0.5 毫升, 加去离子水 1.7 毫升, 振荡后再加入 70% 三氯醋酸 0.3 毫升, 搅拌, 离心, 过滤, 得无蛋白滤液。所有实验动物的滤液均是当天制取, 并放置在 0 $^{\circ}$ C 以下。取无蛋白滤液 0.1 毫升于

10 毫升试管内,再加入 0.01% (W/V) 变色酸浓硫酸溶液 3.9 毫升。然后在 30% 氯化钙盐浴内加热 ( $100 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 2 小时,用光程为 1 厘米的比色杯,在波长为  $690\text{m}\mu$  下比色测定(国产 72 型分光光度计)。

为简便测定值的计算,先按上述方法用标准试剂(毫克/毫升)制作标准曲线。计算方法如下:

a. 每克血红蛋白含 2, 3-DPG 微克分子数 (Hb-DPG)

$$\text{Hb-DPG} = \frac{\text{RBC-DPG}}{C_{\text{Hb}}}$$

式中  $C_{\text{Hb}}$  为每毫升红细胞含的血红蛋白克数。RBC-DPG 为每毫升红细胞含 2, 3-DPG 微克分子数,它由下式算出:

$$\text{RBC-DPG} = \frac{\text{测得 2, 3-DPG 含量(毫克)} \times 2,000}{266}$$

式中 2,000 为稀释倍数,266 为 2, 3-DPG 分子量。

b. 2, 3-DPG 与血红蛋白克分子比值,用 MR (Molar Ratio) 表示。因血红蛋白分子量一般为 65,000 左右,所以 1 克血红蛋白等于 15.38 微克分子,得比式:

$$\text{MR} = \frac{\text{Hb-DPG}}{15.38}$$

## 二、结果和讨论

高原鼠兔和青海麝鼠的血红蛋白和红细胞 2, 3-DPG 的测定结果列于表 1。血红蛋白含量彼此相差不大,麝鼠( $27.12 \pm 2.33$  克/100 毫升红细胞)高于鼠兔。而天峻关角捕获的高原鼠兔( $25.04 \pm 2.30$  克/100 毫升红细胞)又略高于海北风匣口地区的高原鼠兔( $24.44 \pm 2.12$  克/100 毫升红细胞)。它们的 2, 3-DPG 含量(克分子/克 Hb)彼此相差很大,其值随动物的生活习性,栖息地的海拔高度以及动物类型而异: 1. 海北高原鼠兔和海北青海麝鼠,两者海拔高度相同,只不过前者是地上活动,后者是地下活动,然而 2, 3-DPG 含量前者是  $28.94 \pm 4.23$ , 而后者只有  $11.94 \pm 2.97$ 。2. 海北高原鼠兔和天峻高原鼠兔,两者是同一鼠种,但栖息地的海拔高度不同,天峻比海北高 600 米左右,其 2, 3-DPG 含量天峻鼠( $31.92 \pm 6.23$ ) 高于海北鼠( $28.94 \pm 4.23$ )。

讨论上述结果时,需说明: 1. 虽然目前测定 2, 3-DPG 有两种方法,即变色酸法和酶分析法,我们选用的是变色酸法。据报道这两种方法所测得的结果相近 (Bartlett 1959; Tomita 和 Riggs 1971)。2. 我们测定的 2, 3-DPG 含量是采用混合血。在理论上静脉血红细胞中因还原血红蛋白高于动脉血,其 2, 3-DPG 浓度应比动脉血高,但两种血液比较分析结果并无差异 (Ravin 等 1973; Cook 1976)。作者认为血液从动脉到静脉的循环时间极短,而 2, 3-DPG 的代谢速度较慢(至少需要几小时以上),在较短时间内浓度变化不大。所以可以认为静、动脉两种血液 2, 3-DPG 的浓度基本一致。

从表 1 可见,麝鼠的血红蛋白含量明显高于鼠兔,这一结果与王祖望等(1979)的报道一致。不同海拔的高原鼠兔其血红蛋白含量又以海拔高的(天峻关角)高于海拔低的(海北风匣口)。关于生活在海拔高地区的某些哺乳动物以增加血红蛋白含量来适应低氧条

表 1 红细胞中 2, 3-二磷酸甘油酸的含量

Table 1 Content of 2,3-DPG in the red cell

动物名称 Species	动物个数 Number of animals	捕捉地点及 海拔高度(米) Catch region and altitude (m)	血红蛋白 (克/100 毫升红细胞) Hemoglobin (g/100mlrbc) Mean±SD	Hb-DPG (2,3-DPG $\mu$ M/gHb)		Hb 与 2,3-DPG 克分子比 MR (Molar ratio)	
				Mean±SD	C. V	Mean±SD	C. V
高原鼠兔 Pika ( <i>Ochotona curzonicae</i> )	46	Fenxiakou 3,250	24.44±2.12	28.94±4.23	0.15	1.88±0.27	0.15
	19	Guanjiao 3,850	25.04±2.30	31.92±6.23	0.195	2.07±0.41	0.196
青海鼢鼠 Zokor ( <i>Myosplas baileyi</i> )	25	Fenxiakou 3,250	27.12±2.33	11.94±2.97	0.25	0.77±0.19	0.25

件的报道很多。我们认为上述 2 种情况无疑是低氧适应的表现,而青海鼢鼠的血红蛋白含量高于同海拔的高原鼠兔,这除种间差异外,还在于鼢鼠对洞道低氧的一种补偿性的适应。

2, 3-DPG 及 MR 值,高原鼠兔 3 倍于青海鼢鼠,这与它们的血红蛋白含量恰好相反。这两种野生鼠是在同一地区捕获,它们的栖息生境和海拔高度相同,仅生活习性不同,鼢鼠营地下穴居生活,高原鼠兔为地面活动的鼠种。按低氧适应的理由,二者的 2, 3-DPG 值都应较高。但测定结果并非如此,青海鼢鼠红细胞 2, 3-DPG 值成倍地低于高原鼠兔的值,也较低于文献报道的其它啮齿动物的 2, 3-DPG 值 (Tomita 和 Riggs 1971; Nancay 和 Tanaka 1979)。根据 Kay (1977) 测定结果,穴居动物的 2, 3-DPG 含量较高,这与我们的结果正好相反,因此这是值得探讨的。

我们选择两种栖息高原的鼠种进行 2, 3-DPG 含量的比较,以观察生活习性对 2, 3-DPG 含量的影响。高原鼠兔虽洞穴,但浅而简单,洞口与地面相通,洞内大气压和气体的组成基本与洞外相近。而鼢鼠洞道深而复杂,洞口不直接与地面相连,洞内气体是通过疏松的小土丘与地面相连,以弥散方式与地面空气进行交换,所以洞道内氧含量很低,二氧化碳浓度很高,约为洞外大气中二氧化碳浓度的 20—30 倍以上 (王祖望等 1979)。这就说明鼢鼠是生活在高浓度二氧化碳的特殊环境里。Duhm (1975) 和 Tomita 等(1971)曾证明 2, 3-DPG 和二氧化碳对血红蛋白的结合有竞争作用,且二氧化碳与血红蛋白的结合能力大于 2, 3-DPG。所以在高浓度二氧化碳下,红细胞内游离的 2, 3-DPG 就增多,结果抑制了 2, 3-DPG 的合成。所以青海鼢鼠红细胞内 2, 3-DPG 含量如此之低,很可能是由于上述原因所致。当然也不能排除其它因素,尚待进一步探索。

海北高原鼠兔和天峻高原鼠兔 2, 3-DPG 含量的变化,说明 2, 3-DPG 含量与海拔有关。这两个海拔相差 600 米的高原鼠兔,测得的 2, 3-DPG 含量相差 3 微克分子/克 Hb。经统计学处理  $t = 1.91, 0.05 < P < 0.1$ 。差异虽不显著,但其  $t$  值接近  $t_{0.05} (t_{0.05} = 1.98)$ , 2, 3-DPG 含量与海拔高度的正比关系还是易见的。一般认为世居高原居民 2, 3-DPG 的量高于平原居民 (Ravin 等 1973; Heath 和 Williams 1977), 但他们的差异并不十分悬

殊。据认为在慢性低氧适应中，过多地增加 2,3-DPG 的量，虽有利于组织摄取较多的氧，但血液中 2,3-DPG 量过高会造成肺部游离血红蛋白的减少，从而使血液由肺泡摄氧过程发生困难，血氧饱和度下降。机体为了适应低氧环境，往往不得不加强其他的代偿机能（如血红蛋白含量的增高等），反馈调节 2,3-DPG 的浓度。我们的实验结果也表明了适应低氧的动物，随着海拔高度的增加，其 2,3-DPG 的增加梯度较为平缓。

### 参 考 文 献

- 王祖望、曾绍祥、韩永才，1979，高原鼠兔和中华鼯鼠气体代谢的研究。动物学报，25(1): 75—85。
- Ackers, G. K., 1979, Linked function in allosteric proteins: An exact theory for the effect of organic phosphates on oxygen affinity of hemoglobin. *Biochemistry*. 18: 3373—3380.
- Bartlett, G. R., 1959, Colorimetric assay methods for and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* 234: 469—471.
- Benesch, R. and R. E. Benesch, 1967, The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26: 162—167.
- Chanutin, A. and R. R. Curnish, 1967, Effect of organic and inorganic phosphates on oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Archs. Biochem. Biophys.* 12: 96—102.
- Cook, D. A., 1976, A practical and theoretical appraisal of the significance of  $P_{50}$  and 2,3-diphosphoglycerate determinations in the routine chemical pathology department. *Med Lab. Sci.* 33: 287—297.
- Duhm, J. 1975, Studies on 2, 3-diphosphoglycerate: Effect on hemoglobin, glycolysis and on buffering properties of human erythrocytes. In Brewer, G. J. (ed). *Erythrocyte structure and function*. 167—197pp New York.
- Gray, R. D., 1974, The effect of 2,3-diphosphoglycerate on the tetramer-dimer equilibrium of liganded hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 249: 2879—2885.
- Heath, D. and D. R. Williams, 1977, Man at high altitude, The pathophysiology of acclimatization and adaptation. 47—48 pp. Churchill Livingstone.
- Kay, F. R., 1977, 2,3-diphosphoglycerate, blood oxygen dissociation and the biology of mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 57: 309—316.
- Nancy, A. N. and K. R. Tanaka, 1979, Erythrocyte enzymes in groups of *rattus norvegicus* with genetic differences in 2,3-diphosphoglycerate levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B: 81—83.
- Ravin, M. B., W. L. Dyuyy, A. S. Keitt and G. Daicoff, 1973, Red cell diphosphoglycerate in surgical correction of cyanotic congenital. *Anesth. Analg.* (current researches) 52: 599—603.
- Tomita, S. and A. Riggs, 1971, Studies of the interaction of 2,3-diphosphoglycerate and carbon dioxide with hemoglobins from mouse and elephant. *J. Biol. Chem.* 246: 547—554.
- Winterhalter, K. H., 1974, Hemoglobins, porphyrins and related compounds. In Curtius, H. ch. and M. Roth (ed). *Clinical biochemistry, principles and methods*. 1305—1322 pp. Walter, de Gruyter Berlin, New York.

## A PRELIMINARY STUDY ON THE RED CELL 2, 3-DIPHOSPHOGLYCERATE IN THE PIKA AND THE ZOKOR

Zhou Yucan   Liu Kuofu   Wen Deqi

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

The content of 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG) in the red cell in two main harmful rodents, the pika (*Ochotona curzoniae*) and the zokor (*Myospalas baileyi*), on the Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau were analysed by means of colorimetry and were compared at different altitudes and life habits. The following conclusions were obtained:

1. Through the comparison of 2, 3-DPG content in different species and habits at the same altitude (Fenxiakou Menyuan County, 3250 m), it is noted that the pika lives above ground, but the zokor underground (burrow). The average content of 2, 3-DPG in the pika is  $28.94 \pm 4.23 \mu\text{M/gHb}$ , while in the zokor  $11.94 \pm 2.97 \mu\text{M/gHb}$ . Apparently, the former is much higher than the latter. The results show clearly that 2, 3-DPG content is affected by life habits.

2. As to the content of 2, 3-DPG in the pika at different altitudes, two groups of the animal were used: One was caught from Guanjiao, Tianjun County (3850 m), and the other was caught from Fenxiakou, Menyuan County (3250 m). The former's red cells contain  $31.92 \pm 6.23 \mu\text{M/gHb}$  (2, 3-DPG) and the latter's contain  $28.94 \pm 4.23 \mu\text{M/gHb}$ , ( $t = 1.91$ ). The results show the difference of average content of 2, 3-DPG in the pika at 3850 m and that at 3250 m is nearly significant, with the raising in altitude the content of 2, 3-DPG may increase slightly.