DOI:10.16016/j.1000-5404.201411147

论著

5-羟甲基糠醛对模拟高原大鼠血红蛋白氧结合特性及游泳耐力和空间记忆能力的影响

官立彬[1],李晓栩[1],李锦松[2],杨诚忠[1],谭小玲[1],崔 宇[1],高钰琪[3],黄 珹[1] (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系:高原生理学与高原生物学教研室[1],高原军事医学系高原特殊药物与装备研究室,高原医学教育部重点实验室,全军高原医学重点实验室[3];510006 广州,广东药学院生命科学与生物制药学院[2])

[摘要] **目的** 探讨血红蛋白变构剂5-羟甲基糠醛[5-(Hydroxymethyl)-2-furfural,5-HMF]对血红蛋白氧结合特性的作用及其对大鼠耐缺氧能力的影响。**方法** 将SD成年雄性大鼠随机分为4组:平原空白组、高原空白组、平原用药组、高原用药组。空白组用生理盐水、用药组以50 mg/kg 5-HMF腹腔给药。高原暴露采用模拟海拔5 000 m低压舱内24 h。各组按原剂量经腹腔重复给药30 min后从腹主动脉采血,测血气及氧平衡曲线。大鼠经过游泳训练后,负重游泳力竭实验检测负重游泳力竭时间。大鼠经过记忆训练后,Morris水迷宫空间探索试验测大鼠空间记忆能力。**结果** 高原空白组负重游泳力竭时间、目标象限大鼠滞留时间、穿越平台位置次数、血氧饱和度、血氧分压等指标,较平原空白组显著降低($P<0.05$),高原用药后这些指标显著升高,但是负重游泳力竭时间、目标象限大鼠滞留时间仍低于平原水平。各给药组P50、希尔系数均较相应空白组显著降低($P<0.05$)。平原用药组较平原空白组负重游泳力竭时间显著降低($P<0.05$),血氧分压显著升高,其余指标无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 5-HMF在低氧条件下可增加血红蛋白氧亲和力、血氧饱和度及血氧分压,增强游泳耐力和空间记忆能力。

[关键词] 低氧;作业能力;氧亲和力;5-HMF;游泳耐力;空间记忆能力
[中图法分类号] R331.141; R364.4; R973 [文献标志码] A

Effect of 5-HMF on hemoglobin-oxygen affinity, swimming endurance and spatial memory ability of rats in high altitude simulated environment

Guan Libin[1], Li Xiaoxu[1], Li Jinsong[2], Yang Chengzhong[1], Tan Xiaoling[1], Cui Yu[1], Gao Yuqi[3], Huang Jian[1] ([1]Department of High Altitude Physiology and Biology, [3]Department of High Altitude Special Drug and Equipment Research, Key Laboratory of High Altitude Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Medical of PLA, College of High Altitude Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Medical College, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (5-HMF), hemoglobin allosteric agent, on the hemoglobin-oxygen affinity and hypoxia resistance capacity. **Methods** Adult SD male rats were randomly divided into a plain blank group, a high altitude blank group, a plain administration group and a high altitude administration group. 5-HMF was intraperitoneally injected into the SD rats at a dose of 50 mg/kg, and the rats were exposed in a hypoxia chamber for simulating 5 000 m of high altitude environment for 24 h. After 30 min repeated administration, blood was collected from the abdominal aorta to determine blood oxygen saturation (SaO_2), partial pressure of carbon dioxide ($PaCO_2$), partial pressure of oxygen (PaO_2), HCO_3^-, and oxygen binging curve. Exhaustion swimming time and spatial memory

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518201),国家自然科学基金面上项目(81370150,30973446)
[通信作者] 黄 珹,电话:(023)68772383,E-mail: hj3red@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1310.006.html(2015-03-24)

ability of the trained rats were assayed in the presence or absence of 5-HMF under hypoxia or normoxia. Morris water maze was applied to assay spatial memory ability. **Results** 5-HMF administration significantly decreased P50 and Hill coefficient under hypoxia or normoxia. Under hypoxia, $PaCO_2$, SaO_2, PaO_2, HCO_3^-, exhaustion time, target quadrant retention time and frequency across the platform were all decreased significantly compared to those under normoxia. These indicators were all increased significantly after 5-HMF administration under hypoxia, but still lower than those under normoxia, except HCO_3^- and frequency across the platform. After administration, PaO_2 was increased, and exhaustion time was decreased under normoxia. **Conclusion** 5-HMF increases hemoglobin-oxygen affinity, SaO_2 and PaO_2 under hypoxia, and further ameliorates the swimming endurance and spatial memory ability.

[**Key words**] hypoxia; operation ability; oxygen affinity; 5-HMF; swimming endurance; spatial memory ability

Supported by the National Basic Research Program (973, 2012CB518201) and the General Program National Natural Science Foundation of China (81370150, 30973446). Corresponding author: Huang Jian, Tel: 86-23-68772383, E-mail: hj3red@gmail.com

高原大气氧分压力(partial pressure of oxygen, PO_2)低于平原,在海拔5 000 m时,大气PO_2仅为平原的50%。由于高原大气PO_2降低,引起机体从大气中摄取的氧减少。另外,在高原作业时,机体对氧的需求较静息时显著增加,氧供需矛盾更加突出,作业能力显著降低[1]。如何在快速进驻高原的情况下保持良好作业能力成为高原医学的研究热点。在高原低氧环境下,有效促进更多的氧分子进入红细胞,即增强机体从外环境摄取氧,维持机体组织氧供需平衡,是提高高原作业能力的重要措施。

红细胞是机体运输和释放氧气的重要工具。从外环境中摄取的氧分子结合在红细胞内的血红蛋白分子上。2,3-二磷酸甘油酸(2,3-diphosphoglyceric acid,2,3-DPG)是Hb分子最重要变构剂,其与Hb结合后可使氧离曲线右移,即Hb氧亲和力降低。5-羟甲基糠醛[5-(Hydroxymethyl)-2-furfural,5-HMF]是一种化学活性较强的小分子无机物,其可以结合于血红蛋白的2,3-DPG结合位点,能竞争性减少2,3-DPG与血红蛋白的结合,增加Hb与O_2的亲和力[2]。有研究发现[3-5],鹿鼠、黄嘴针尾鸭、斑头雁等高原世居动物通过突变血红蛋白(hemoglobin,Hb)分子氨基酸位点,增加Hb氧亲和力,促进氧分子摄取以适应高原低氧环境。但是,平原世居动物在药物改变Hb氧亲和力是否增加高原耐受能力尚不清楚。为此,本研究探讨5-HMF增加Hb的氧亲和力后大鼠在模拟海拔5 000 m暴露下的学习记忆能力及游泳运动能力的变化特点。

1 材料与方法

1.1 实验样品及仪器

5-HMF溶液(上海信帆,货号:67-47-0,0.9%生理盐水溶解配置成10%溶液)。13%氨基甲酸乙酯(乌拉坦,按0.1 mg/g麻醉大鼠),自制缓冲液($NaHPO_4 \cdot 12HO_2$ 3.5 g; NaCl 4.5 g; $NaH_2PO_4 \cdot 2HO_2$ 1.95 g,蒸馏水定容至500 mL,pH调制7.45),22%牛血清白蛋白V,10%聚二甲基硅氧烷(消泡剂),1 mol/L HCl;1 mol/L NaOH;血气分析仪,肝素抗凝管,采血针,TCS HEMOX-ANALYZER氧平衡曲线仪,手术器械。

1.2 实验动物

104只SD成年大鼠(第三军医大学动物中心提供),雄性,平原饲养适应2周后,随机分为3个实验组,每组随机分为4个亚组:静息指标测定组[平原空白组,高原空白组,平原用药组,高原用药组,体质量(185 ± 17.54)g,n = 8];游泳运动力竭组[平原空白组,高原空白组,平原用药组,高原用药组,体质量(265.7 ± 21.6)g,n = 9];Morris水迷宫空间探索实验组[平原空白组,高原空白组,平原用药组,高原用药组,体质量(194 ± 18.6) g, n = 9]。自由饮水和进食。

1.3 实验方法

实验时将高原空白组与高原用药组大鼠放置于低压模拟舱模拟海拔5 000 m环境下24 h,放置前两用药组以50 mg/kg腹腔注射5-HMF,两空白组等比例腹腔注射生理盐水。开始实验前30 min按原剂量重复给药一次。平原空白组和平原用药组在平原进行。静息指标测定组经腹腔动脉采血,测血气、氧平衡曲线。游泳力竭组实验前1周,每天上午9:00 – 10:30,所有大鼠无负重游泳运动10 min,以适应游泳和实验人员操作。其中第5天,4个力竭组大鼠均在平原测定负重游泳运动的力竭时间作为基础值。第8天测负重游泳运动的力竭时间(t)。Morris水迷宫组在正式实验

前,先进行8 d定位航行训练,1次1只大鼠,分别从不同象限固定点入水寻找平台4次,以60 s为上限,找不到平台重新训练。第8天大鼠能在10 s内找到平台判定为达到训练标准。随机分组,用定位航行实验测定寻找平台时间。实验时撤离平台,测大鼠目标象限滞留时间(T)和穿越原平台所在位置次数(N)。

1.4 氧平衡曲线(oxygen equilibriumcurve, OEC)测量方法

用2.5 mL真空采血管(枸橼酸钠抗凝)自大鼠腹主动脉采1 mL血液置于冰上,配置OEC待测样品(3 mL自制缓冲液,30 μL新鲜血,12 μL 22%牛血清白带白V;10 μL 10%消泡剂)后,加入TCS HEMOX-ANALYZER氧平衡曲线仪测试槽,按仪器操作说明进行操作,测全血OEC。统计后取各组P50,希尔系数均值,根据希尔方程绘制氧平衡曲线[6]。

1.5 血气测量方法

用1 mL注射器自大鼠腹主动脉取1 mL新鲜全血,针尖用橡皮封闭,迅速加入血气分析仪中,按仪器造作说明书进行操作,测全血血气结果。观察二氧化碳分压($PaCO_2$),血氧分压(PaO_2),血氧饱和度(SO_2),碳酸氢根离子浓度(HCO_3^-)

1.6 大鼠负重游泳运动力竭时间的测定

在内壁光滑的圆桶中进行,桶高80 cm,直径60 cm,水深,60 cm,以大鼠尾部不能通过桶底支持休息为水高标准[7]。为防止大鼠游泳时皮毛附着气泡,影响游泳运动力竭时间,实验前1 d将水加热至沸腾,游泳运动时水温保持在(35 ± 2)℃[8]。实验时,每只桶中放1只大鼠,尾部挂以3%自身体质量铅条。大鼠沉入水面下10 s不能返回水面判定为力竭。从入水到不能返回水面所经历的时间作为大鼠负重游泳运动力竭时间(t)。

1.7 Morris水迷宫空间探索试验

Morris水迷宫空间探索试验在直径1.2 m圆形水池中进行,以软件虚拟线分为四个象限,每象限选取一固定入水点,平台固定于1象限。水深以淹没平台为标准,并以食物色素染黑掩盖平台。正式实验时,选远离平台象限固定入水点入水,用摄像头记录大鼠游泳轨迹,记录1 min,软件分析大鼠在目标象限(原平台所在象限)滞留时间(T)和穿越原平台位置次数(N)[9]。高原空白组和高原用药组在模拟海拔5 000 m下测量,平原空白组和平原组在平原进行。

1.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用双因素方差分析。

2 结果

2.1 5-HMF对大鼠外周血氧结合特性的影响

平原空白组大鼠P50为(39.71 ± 0.50) mmHg,希尔系数为(2.40 ± 0.03);高原空白组P50为(41.32 ± 1.12) mmHg、希尔系数为(2.42 ± 0.03)较平原空白组差异无统计学意义($P > 0.05$)。高原用药组P50为(31.14 ± 1.82) mmHg、希尔系数为(1.71 ± 0.12)较高原空白组、平原空白组显著降低($P < 0.05$);平原用药组为P50为(31.06 ± 0.82) mmHg、希尔系数为(1.78 ± 0.03),较平原空白组显著降低($P < 0.05$);氧平衡曲线见图1。

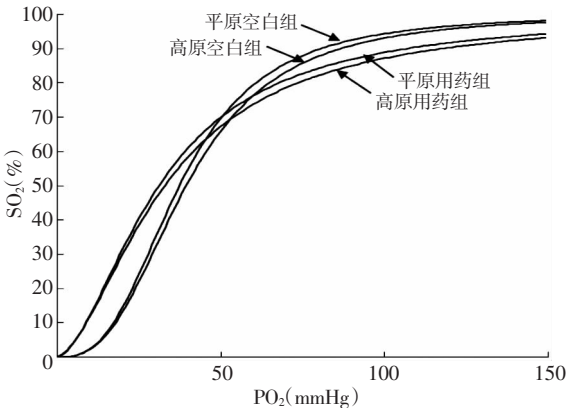


图1 5-HMF对低压低氧时大鼠外周血氧平衡曲线的影响

2.2 急性低氧暴露对大鼠运动力竭时间的影响及5-HMF的改善作用

实验前第5天,4个负重游泳运动力竭亚组大鼠在平原进行负重3%体质量游泳运动的力竭时间测定基本相同,平原空白组(141 ± 27) min;平原用药组(138 ± 31) min;高原空白组(142 ± 34) min;高原用药组(137 ± 32) min。进入模拟海拔5 000 m高原24 h后,高原用药组t较高原空白组显著升高[103 ± 32) *vs* (68 ± 27) min, $P < 0.05$],但显著低于平原空白组[(103 ± 32) *vs* (138 ± 23) min, $P < 0.05$];平原用药组t显著低于平原空白组[(112 ± 22) *vs* (138 ± 23) min, $P < 0.05$]。

2.3 急性低氧暴露对大鼠空间记忆能力的影响及5-HMF的改善作用

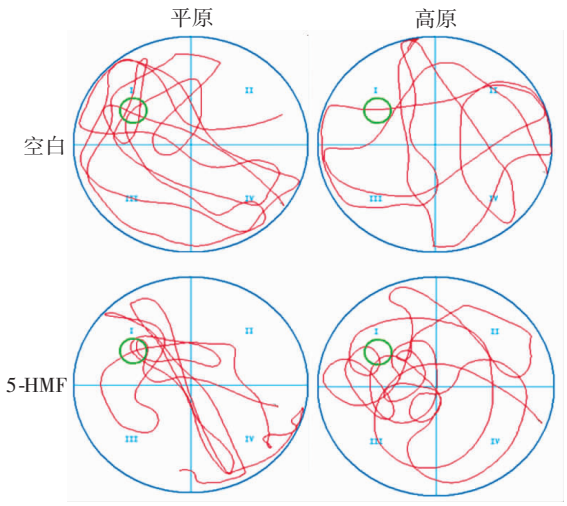
实验前第8天,4个Morris水迷宫组大鼠在平原进行定位航行实验基本相同,平原空白组(8.76 ± 1.54) s;平原用药组(7.56 ± 1.46) s;高原空白组(7.25 + 1.34) s;高原用药组(7.97 + 1.68) s。Morris

水迷宫空间探索试验结果显示，进入模拟海拔5 000 m高原24 h后，高原用药组T较高原空白组显著升高（$P<0.05$），但显著低于平原空白组（$P<0.05$）；平原用药组较平原空白组差异无统计学意义（$P>0.05$），见表1。运动轨迹见图2。

表1 低压低氧及5-HMF对大鼠目标象限滞留时间及穿越平台位置次数的影响（$\bar{x}\pm s, n=9$）

组别	目标象限滞留时间(s)	穿越原平台位置次数(次)
平原空白组	24.67±2.17	6.00±1.67
平原用药组	24.91±2.36	5.00±1.73
高原空白组	18.82±0.86[a]	3.88±1.55[a]
高原用药组	21.25±0.80[ab]	5.13±1.25[b]

a：$P<0.05$，与平原空白组比较；b：$P<0.05$，与高原空白组比较



绿色圆圈：原入水点，Ⅳ象限为入水点

图2 5-HMF对低压低氧时大鼠Morris水迷宫空间探索能力的影响

2.4 5-HMF对低压低氧时大鼠血气的影响

平原大鼠静息状态下，$PaCO_2$为（41.33±4.93）mmHg、PaO_2为（91.67±0.58）mmHg、SO_2为（97.00±1.00）%、HCO_3^-为（22.67±1.53）mmol/L。进入模拟海拔5 000 m高原24 h后，$PaCO_2$为（27.33±3.79）mmHg、PaO_2为（63.33±3.51）mmHg、SO_2为（87.00±1.00）%、HCO_3^-为（16.67±2.52）mmol/L，较平原空白组显著降低（$P<0.05$）。在急性低压低氧给予5-HMF后，$PaCO_2$为（36.67±2.89）mmHg、PaO_2为（69.00±1.00）mmHg、SO_2为（93.00±1.00）%、HCO_3^-为（22.00±1.00）mmol/L，较高原空白组均显著升高（$P<0.05$）。但较平原空白组，除HCO_3^-外，仍显著降低。平原用药后，较平原空白，PaO_2显著上升[（95.00±1.01）mmHg *vs*（91.67±0.58）mmHg（$P<0.05$）]。

3 讨论

骨骼肌、神经组织对氧依赖性十分强，因此体力劳动（如游泳）及脑力劳动（如学习记忆）均需要大量氧，而在高原低氧环境下，由于大气氧分压降低，肺泡气中的氧向血红蛋白弥散的动力降低，因而使机体从外环境中获取的氧减少，必然影响对骨骼肌、脑组织的氧供减少，降低游泳等体力劳动能力、学习记忆等脑力劳动能力[10-11]。我们的实验结果发现，大鼠在模拟海拔5 000 m低压舱暴露24 h后，大鼠游泳运动力竭时间、Morris水迷宫空间探索实验T和N均显著下降，说明低压低氧环境下大鼠的体力劳动能力与脑力劳动能力均下降。杨涛等[8]也证实了低压低氧暴露后大鼠t显著降低。

高原环境引起的体力劳动能力与脑力劳动能力下降的主要原因是作业时需氧量增高、高原低氧低氧造成组织氧供减少，氧供需矛盾更加突出[12]。增强机体从外界摄取更多氧，是缓解这一矛盾的根本措施。血红蛋白氧亲和力增加，则可以在高原低压低氧环境下增强红细胞流经肺泡时的氧合能力，从而从外界获取更多的氧气[13]。

大鼠外周血氧平衡曲线实验结果表明，5-HMF使氧平衡曲线左移、P50显著降低，说明增强血红蛋白氧亲和力[14,15]。但是希尔系数显著降低、氧平衡曲线顺时针旋转，提示5-HMF减低了血红蛋白亚基间的协同效应[16]。在低压低氧时[2]，以4 500 m为例，此时血氧分压在15～45 mmHg之间变化，由氧平衡曲线（图1）可知，45 mmHg所对应的血氧饱和度用药后显著高于未给药，这时红细胞能结合的氧气增加。当到达组织后，由于2,3-DPG、代谢性酸性产物等的作用，使氧平衡曲线“右移”，这样可以抵消5-HMF使氧平衡曲线左移对氧释放的不利效果。组织毛细血管处血红蛋白释放氧并不减少反而增多，这可能与5-HMF引起的氧平衡曲线右旋，也可能是因为在组织毛细血管内大量的2,3-DPG等与5-HMF竞争性结合血红蛋白相同的结合位点，竞争性抑制了5-HMF的变构效应。

在急性低压低氧条件下，给药后，$PaCO_2$、PaO_2、SO_2、HCO_3^-等显著升高，提示5-HMF可改善机体的耐缺氧能力。在常氧条件下，5-HMF使用后，虽然血氧分压升高，但t降低，提示在平原5-HMF虽可增强血红蛋白的氧摄取能力，但其使氧亲力增高不利于氧释

放。因为没有足够的2,3-DPG、代谢性酸性产物等变构因子,这一“不利效应”没有被抵消,所以影响了组织氧供。结果提示5-HMF要在一定海拔下使用才有效,而在平原使用效果不明显,甚至出现负性效果。

因此,5-HMF提高血红蛋白氧亲和力,对于在高原低压环境下提高机体耐缺氧能力,提高体力劳动与体力劳动能力具有明显的效果。为进一步开发5-HMF在高原环境下的应用提供了实验依据。但是5-HMF对CO_2的释放、血管收缩舒张活性的影响等其他副作用尚需要进一步明确,从而为进一步改造5-HMF提供了依据。

参考文献:

[1] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2005: 206-212.

[2] Yalcin O, Cabrales P. Increased hemoglobin O2 affinity protects during acute hypoxia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(3): H271-H281.

[3] McCracken K G, Bulgarella M, Johnson K P, *et al*. Gene flow in the face of countervailing selection: adaptation to high-altitude hypoxia in the betaA hemoglobin subunit of yellow-billed pintails in the Andes[J]. Mol Biol Evol, 2009, 26(4): 815-827.

[4] Natarajan C, Inoguchi N, Weber R E, *et al*. Epistasis among adaptive mutations in deer mouse hemoglobin[J]. Science, 2013, 340(6138): 1324-1327.

[5] McCracken K G, Barger C P, Sorenson M D. Phylogenetic and structural analysis of the HbA (alphaA/betaA) and HbD (alphaD/betaA) hemoglobin genes in two high-altitude waterfowl from the Himalayas and the Andes: Bar-headed goose (Anser indicus) and Andean goose (Chloephaga melanoptera)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2010, 56(2): 649-658.

[6] Mairbaurl H, Weber R E. Oxygen transport by hemoglobin[J]. Compr Physiol, 2012, 2(2): 1463-1489.

[7] Kregel K C, Allen D L, Booth F W, *et al*. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols[M]. Bethesda: Am Physiol Soc, 2006: 35-41.

[8] 杨涛, 黄庆愿, 单发波, 等. 急性高原低氧和力竭运动对大鼠骨骼肌AMPK磷酸化水平的影响[J]. 生理学报, 2012, 64(2): 193-198.

[9] Mendez I A, Montgomery K S, LaSarge C L, *et al*. Long-term effects of prior cocaine exposure on Morris water maze performance[J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 89(2): 185-191.

[10] Debevec T, Pialoux V, Mekjavic I B, *et al*. Moderate exercise blunts oxidative stress induced by normobaric hypoxic confinement[J]. Med Sci Sports Exerc, 2014, 46(1): 33-41.

[11] 王红阳, 韩晓庆, 赵雅宁, 等. 重度间歇低氧大鼠学习记忆功能与氧化应激的关系[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(1): 24-28.

[12] Al-Qahtani J M, Abdel-Wahab B A, Abd-El-Aziz S M. Long-term moderate dose exogenous erythropoietin treatment protects from intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits and hippocampal oxidative stress in young rats[J]. Neurochem Res, 2014, 9(1): 161-171.

[13] Peng W, Wang X, Gao W, *et al*. In vitro kinetics of oxygen transport in erythrocyte suspension or unmodified hemoglobin solution from human and other animals[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(9): 631-637.

[14] Dugdale A. Shifts in the haemoglobin-oxygen dissociation curve: can we manipulate P50 to good effect? [J]. Vet J, 2008. 175(1): 12-13.

[15] Hamilton C, Steinlechner B, Gruber E, *et al*. The oxygen dissociation curve: quantifying the shift[J]. Perfusion, 2004, 19(3): 141-144.

[16] Zhang Y, Manning L R, Falcone J, *et al*. Human erythrocyte membrane band 3 protein influences hemoglobin cooperativity. Possible effect on oxygen transport[J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 39565-39571.

(**收稿**:2014-11-17;**修回**:2015-01-08)

(编辑 黄 超)