

江豚血液学的初步研究*

官之梅 陈道权 王小强

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

本文对从长江中获得的江豚进行了血液学、血液化学特征的测定和血红蛋白、血浆蛋白电泳图谱的研究。发现江豚的嗜中性粒细胞所占百分比比较高,淋巴细胞的百分比比较低,具有嗜碱性粒细胞。江豚血红蛋白的电泳类型为 I-II, 即电泳相对迁移率在人类 Hb S 和 Hb F 之间,并有 4 条非血红素蛋白带 (NHP)。用醋酸纤维薄膜作支持物进行电泳,血浆的总蛋白 (TP) 带可分成 8 条主要的区带,从阳极到阴极依次是: 前白蛋白 (ζ)、白蛋白 (A) 和 6 条后白蛋白带 (PA); 然而用聚丙烯酰胺凝胶作支持物共可分成 16 条区带,其中 14 条后白蛋白带。脂蛋白 (Lp) 在聚丙烯酰胺凝胶上可分成 4 条区带: α_1 -脂蛋白、 α_2 -脂蛋白和 β -脂蛋白,分别相当于聚丙烯酰胺凝胶上总蛋白电泳图谱中的 PA9、PA10 和 PA11,而前- β -脂蛋白和乳糜微粒在起点处。运铁蛋白 (Tf) 的电泳图为一区带,相当于 PA6。

关键词 血液学,血液化学,血红蛋白,血浆蛋白,脂蛋白,运铁蛋白

鲸类的血液学研究是由 Gulliver (1845) 开始的,他仅报道了几种鲸类红血球的测量数据。后来许多学者对鲸类的血液学和血液化学做了大量的研究^[5-8,14,15]。鲸类血红蛋白的研究是由 Eichelberger (1937) 开始的,60 年代有了较大的发展^[4,10,16]。1979 年 De Monte 和 Pilleri 曾对 29 种鲸类血红蛋白相对迁移率的研究结果进行了概括^[6];1982 年他们又对 15 种鲸类的血浆总蛋白 (Tp) 和某些种类的运铁蛋白 (Tf)、血浆铜蓝蛋白 (Cp)、脂蛋白 (Lp)、和免疫球蛋白 (Ig) 的研究工作进行了综述^[7]。最近,加拿大的 Don Lint^[11] 将鲸类血浆白蛋白的免疫学 and 同工酶及主要蛋白的电泳迁移率特征应用到鲸类的系统发生与进化上,证实属同一科的白鲸 (*Delphinapterus leucas*) 和一角鲸 (*Monodon monoceros*) 有很近的亲缘关系。我国长江中江豚 (*Neophocaena phocaenoides*) 的血液学资料还未见报道。江豚属鼠海豚科 (Phocaenidae),淡水和近海均有分布。但我国长江中的江豚与沿海的江豚是否为同一种类尚有争议,搞清长江中江豚的血液学特征,对其分类学上的归属问题有重要的参考价值,某些血液学参数也是健康监测的重要依据。血红蛋白相对迁移率的研究,除能为分类和系统发生提供证据外,血红蛋白电泳图谱的变异,作为研究和分离异常血红蛋白的有效方法,也是临床诊断的重要手段。

* 光密度扫描由朱蓝非同志所做,特此致谢。
1987 年 2 月 16 日收到。

材 料 和 方 法

取自生活在长江中的野生江豚共 6 头, 5 雌 1 雄。其中 ♀₁、♀₂ 和 ♀₃ 是一个群体中的豚, 于 1984 年 12 月捕到后饲养在未清理过的泥质池中, 1985 年 1 月 31 日因吞食池中的异物而致死; ♀₄ 是 1985 年 2 月 2 日捕到的, 测定时背部受伤, ♀₅ 为 1985 年 10 月 21 日所捕获。

血样取自尾动脉的外周血。血液有形成分与血液生化值的测定用常规法^[1,2,15]。血红蛋白电泳相对迁移率的研究用以前所用过的方法^[3,6,17]。血浆总蛋白的分离用醋酸纤维薄膜^[7]和聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳^[14]及自制的竖直薄板连续电泳, 因不同的支持物所分离的血浆蛋白带的数量和迁移率是不相同的^[7], 本文采用多种支持物, 目的是便于和其它学者工作进行比较。醋酸纤维薄膜电泳用 pH8.6 的巴比妥缓冲系统, 离子强度为 0.06; 聚丙烯酰胺凝胶电泳均用 pH8.3 的 Tris-盐酸缓冲系统作为电极缓冲液, 胶浓度为 7%, 电泳在 6℃ 下进行。

血红蛋白的电泳图谱用氨基黑 10B 和联苯胺 (benzidine) 染色液分别染色^[7,17], 以鉴别血红蛋白带和血红蛋白溶液中的非血红素蛋白带 (NHP)。血浆总蛋白带用氨基黑 10B、脂蛋白用苏丹黑染液、运铁蛋白用 Mueller (1962) 所介绍的方法^[13]。

结 果 与 讨 论

1. 血液的有形成分与血液的生化特征

我们观察到江豚外周血涂片上的血细胞可分成嗜中性粒细胞 (N)、嗜酸性粒细胞 (E) 和嗜碱性的杆状核与分叶核粒细胞、单核细胞 (M)、大小淋巴细胞 (L)、浆细胞和红细胞, 偶而发现有网状细胞、髓细胞、晚幼红细胞、异性淋巴细胞和异性单核细胞、晚幼粒细胞、幼浆细胞和小浆细胞。

江豚各类血细胞与血液化学值的测定结果见表 1。江豚血细胞的数量与其它学者所作 21 种鲸类的结果相比较有明显不同^[6]: 江豚的嗜中性粒细胞 (N) 的百分比比较高, 占白细胞的 75%, 然而其它 21 种鲸类的嗜中性粒细胞平均为 $46.7 \pm 26.3\%$, 仅印河豚 (85.75%) 高于江豚。江豚的嗜酸性粒细胞 (E) 和淋巴细胞 (L) 的百分比则较低, 分别为 5.0% 和 16.1%, 而其它 21 种鲸类的嗜酸性粒细胞平均为 $12.9 \pm 13.6\%$, 淋巴细胞平均为 $28.5 \pm 12.1\%$ ^[6]。在江豚吞食异物后的病理状态下所测结果为嗜中性粒细胞高、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞低的现象更为明显, 分别为 82.7%、3.82% 和 9.9%。De Monte (1979) 认为嗜中性粒细胞所占白细胞的比例低, 而淋巴细胞数量高是动物生活能力强的象征^[6]。江豚与白暨豚的结果相比, 白暨豚的嗜中性粒细胞比例较低 (55.7%)、淋巴细胞的数量较高 (28.54%)^[9]。江豚和白暨豚生活在同一环境、摄取同种饵料, 然而江豚的种群数量却大大超过白暨豚。当然这还和其它许多因素有关, 但在饵料资源并不充足的情况下、从生存竞争中能保持较大的种群数量来看, 江豚的生活能力不可能比白暨豚弱。因此, 我们认为单从嗜中性粒细胞的降低和淋巴细胞的相对增加似乎不能判断一个种生活能力的强弱。

据所测定的 22 种鲸类^[6,9]当中仅有 8 个种的血涂片上有嗜碱性粒细胞 (B)。而 6 头江豚中,其中 4 头的血涂片上有嗜碱性粒细胞。

背部受伤的一头江豚(♀)各类血细胞中常常发现许多空泡。

病理状况下江豚的红细胞和血红蛋白的数量略有下降,白细胞数量则显著上升。这和白暨豚相似: 病豚“联联”的血红蛋白数量和红细胞计数分别为 10.33 克/100 毫升和 2.66×10^6 个/微升,均低于正常值 11.07 克/100 毫升和 3.69×10^6 个/微升,而白细胞数 9964 个/微升则高于正常值 7668 个/微升^[9]。

江豚与生活在同一生境的白暨豚的血液学特征相比有许多相似之处,如血红蛋白值,红细胞和白细胞的数量,白蛋白与球蛋白的比值(均大于 1)等。但白细胞的分类计数则明显地不同,且江豚具嗜碱性粒细胞而白暨豚没有。

2. 血红蛋白的电泳图谱

江豚血红蛋白的电泳图谱呈现一条密度较大的深染色带和 4 条密度较小的淡染色带。淡染带中的 3 条在深染带的正极一方、1 条在负极一方。用联苯胺试验^[17]证实仅深染色带为血红蛋白带,其余的 4 条淡染带为非血红素蛋白带。血红蛋白带的相对迁移率 (mr) 为 0.425,相对迁移率的百分比 (mr%) 为 86.75%。按照 De Monte^[6]对鲸类血红蛋白类型的划分方法应属血红蛋白类型 I—II,即江豚血红蛋白带的迁移位置在人类 Hb S 和 Hb F 之间。性别对血红蛋白类型没有影响。

江豚的血红蛋白和淡水豚类相比,较接近 *Platanista indi* (印河豚, Hb 类型 II—III) 和 *Inia geoffrensis* (亚河豚, Hb 类型 III)。它们均具一条血红蛋白带,并都伴有数量各异的非血红素蛋白带。De Monte (1979) 认为具有非血红素蛋白带似乎是淡水豚

表 1 江豚的血液学和
Tab. 1 Characteristics of Hematology and

种类和健康状况 species and health condition		Sex	Hb (g/100ml)	RBC (10 ⁶ /μl)	PCV (%)	WBC (10 ³ /μl)
江 豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	正常的 normal	♂				
		♀ ₁				
		♀ ₂				
		♀ ₃	10.5	4.65	53.5	6300
		♀ ₅	12.0	4.43	51.0	5000
		mean	11.3	4.54	52.3	5650
	不正常的 abnormal	♂	10.5			
		♀ ₁				59400
		♀ ₂	9.7	3.35		19100
		♀ ₃				
		*♀ ₄	10.6	3.94	54.0	2800
		mean	10.10	3.35		39200
白 暨 豚 <i>Lipotes vexillifer</i>	normal 正常的		11.07	3.69	41.2	7668
	abnormal 不正常的	mean	10.33	2.66	49.0	9964

* 标本♀₄未列入平均值之中。

类血红蛋白电泳图谱的特点。我们所做的结果并非如此，不仅淡水豚——白暨豚没有非血红素蛋白带^[3]，而且又证实江豚的血红蛋白溶液中具有非血红素蛋白带。

江豚血红蛋白电泳图谱和海豚相比，就我们所收集到的资料来看和北鲸豚 *Lissodelphis borealis*、镰鳍斑纹海豚 *Lagenorhynchus obliquidens* (两者均属 Hb 类型 I) 与宽吻海豚 *Tursiops truncatus*、鼠海豚 *Phocaena phocoena*、白鲸 *Delphinapterus leucas*、灰鲸 *Eschrichtius glaucus*、亚河豚和印河豚(它们均属 Hb 类型 II) 相近似^[6]。

江豚和白暨豚的血红蛋白电泳特征相差甚大。这种不同种类的豚血红蛋白类型的不同，进一步证实血红蛋白的电泳特征具有不受外界环境影响的种的特点。因此种的血红蛋白类型可能有助于豚类的分类和评价它们在系统发生中的关系^[4,6]。

从许多学者所进行的鲸类血红蛋白呼吸功能的研究结果^[10,16]，一般说来血红蛋白对氧气的亲和力与其电泳迁移率成反比，即类型 I 比其它类型有较大的氧亲和力，而且具有同样电泳迁移力的血红蛋白具有同样的功能。江豚的血红蛋白类型为 I—II，100% 的血红蛋白带在相对迁移率为 0.425 的位置上。而白暨豚的血红蛋白为类型 V—VI，相对迁移率的平均值分别为 0.422 和 0.485，其含量百分比分别为 61.42% 和 38.58%^[9]。因此似乎可以认为江豚血红蛋白的呼吸功能较白暨豚强，从而和血红蛋白携带氧有关的快速游泳能力、潜泳的深度和持续时间以及热调节功能等江豚均应比白暨豚强。

3. 血浆总蛋白的电泳图谱

为了便于与其他的搜索结果进行比较，我们用醋酸纤维薄膜对血浆总蛋白进行电泳分离。用浙江黄岩曙光化工厂所产的醋酸纤维薄膜，可将江豚的血浆总蛋白分成 8 条主要的区带，从阳极到阴极依次是前白蛋白带(5)、白蛋白带(A)和 6 条后白蛋白带(PA)。

血液生物化学特性
Blood Biochemistry of *Neophocaena phocaenoides*

E (%)	N (%)	B (%)	L (%)	M (%)	others (%)	Tp (g/dl)	A (g/dl)	G (g/dl)	GPT (ug/dl)	AKP (ug/dl)	BUN (mg/dl)
4.6	77.3	0.3	15.6	2.0	0.00						
2.0	73.0	0.0	22.0	2.0	1.00						
7.0	72.0	0.0	19.0	1.0	1.00						
2.5	76.0	2.0	16.0	1.0	3.00	9.4	5.1	4.3	65	9.5	52.5
8.9	80.1	0.0	7.7	3.3	0.00	6.7	3.7	3.0	105	2.5	31.9
5.0	75.7	0.5	16.1	2.1	1.00	8.0	4.4	3.7	85	6.0	42.2
3.0	89.0	0.0	8.0	0.0	0.00						
1.0	84.3	0.0	9.7	4.7	0.03	7.0	3.9	3.5	51.2		34.8
2.3	81.6	1.4	10.1	2.7	1.90	7.4	4.2	3.3	25.2		32.5
9.0	76.0	0.0	11.8	2.5	0.08						
0.0	16.0	2.0	40.0	21.0	21.00						
3.82	82.7	0.34	9.9	2.5	0.50	7.2	4.0	3.4	38.2		33.7
12.7	55.7	0.0	28.5	2.8	1.93	6.7	3.5	3.2	20.77	13.2	54.5
11.8	69.2	0.0	14.8	3.4	2.71	6.2	3.1	3.1	107.6	11.8	38.5

缺少一条比白蛋白泳动稍快的异白蛋白带 (heA) (图 2)。江豚血浆总蛋白电泳图谱的特点是: 白蛋白带之前没有异白蛋白带, 然而其后有一拖尾, 形成 1 条淡染带。各条后白蛋白带彼此分离清晰, PA 1 和 PA 5 是后白蛋白带中着色较深的染色带, PA 2 和 PA 3 的光密度较小, 着色淡。PA 6 是宽度较大的染色带 (图 2)。

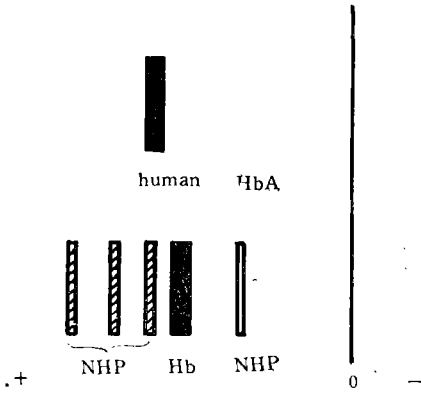


图 1 江豚血红蛋白带在醋酸纤维膜上的电泳图谱。

Fig. 1 The electrophoretogram of hemoglobin fractions on cellulose acetate membrane of *Neophocaena phocaenoides*.

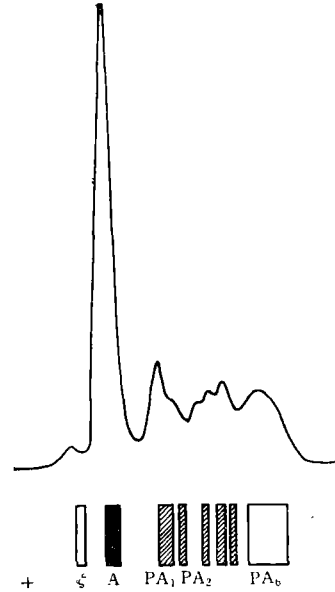


图 2 江豚血浆蛋白带在醋酸纤维膜上的光密度图和电泳图。(图下右为“-”)

Fig. 2 The densitograms and electrophoretogram of plasma protein fraction on cellulose acetate membrane of *Neophocaena phocaenoides*.

为了更好地了解脂蛋白和运铁蛋白的电泳图谱, 我们同时采用了聚丙烯酰胺凝胶作支持物对血浆总蛋白进行电泳分离。它可将后白蛋白带分成 14 条区带 (图 3)。

脂蛋白 用醋酸纤维薄膜作支持物分离脂蛋白的效果不理想。因此采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳。这种方法分离脂蛋白所得到的前- β -脂蛋白 (Pre- β -Lp) 在 β -脂蛋白 (β -Lp) 之后 (这与纸电泳和醋酸纤维薄膜电泳的分离结果相反)。江豚血浆脂蛋白可分成清晰的 4 条带, 从阳极到阴极依次是 α_1 -脂蛋白、 α_2 -脂蛋白和 β -脂蛋白; 前- β -脂蛋白和乳糜微粒在起点处。 α_1 -脂蛋白和 α_2 -脂蛋白是分离很清晰的两条细染色带, 它们的相对迁移率分别为 46.7% 和 40.0%, 分别相当于聚丙烯酰胺凝胶总蛋白电泳图谱中的 PA 9 和 PA10; β -脂蛋白为一条边缘分界线不太清晰的宽染色带, 相对迁移率为 26.7%, 相当于 PA11。前- β -脂蛋白和乳糜微粒在起点处, 是很深的染色带, 这是为了便于和总蛋白的电泳图谱进行对照, 均用 7% 的凝胶, 因此前- β -脂蛋白和乳糜微粒不能进入成层胶。

江豚脂蛋白的电泳图谱和白暨豚相比有较大差异: 江豚的 α -脂蛋白为光密度较大的区带, 而白暨豚的 α -脂蛋白为扩散的淡染色带; 江豚的 β -脂蛋白为淡染色带而白暨豚的则为光密度较大的深染色带。

运铁蛋白 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 江豚的运铁蛋白呈 1 条区带, 相对迁移率为 78.2%, 相当于 PA6, 比人类的运铁蛋白的迁移率快得多, 和白暨豚的运铁蛋白的电泳迁

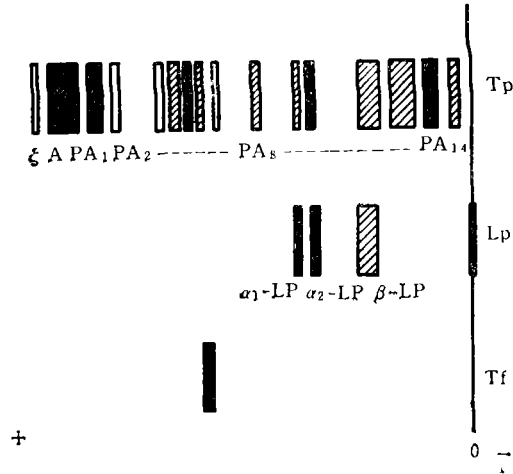


图3 江豚血浆总蛋白、脂蛋白和运铁蛋白在聚丙烯酰胺凝胶上的电泳图。
Fig. 3 The electrophoretogram of serum total protein (Tp), lipoprotein (Lp) and transferrin (Tf) on polyacrylamide gel of *Neophocaena phocaenoides*.

移率相似,只是没有分裂成运铁蛋白A和B两条区带^[9]。

对血浆蛋白带性质的鉴别本来就是一项十分复杂和难度较大的工作,由于大型水生哺乳类的标本难以获得,这一工作就更加困难。因此在没有对各条蛋白带作出分类鉴别之前,我们采用 De Monte 的命名法^[6]:除明显可鉴别的前白蛋白和白蛋白外,各后白蛋白带按其向正极的电泳迁移率,从快到慢依次命名为 PA1、PA2……。鉴于许多学者证实鲸类脂蛋白的电泳图谱和人类的相似,本文则和大多数学者一致,按人类脂蛋白的命名法对江豚的脂蛋白命名。

江豚血浆总蛋白的扫描图有别于其它任何一种鲸类。不同种类的血浆蛋白带所分离的带数、各带的迁移率和光密度均不相同。因此,血浆蛋白的光密度图谱似乎可以作为生化分类的依据之一。此外,掌握了一个种的血浆蛋白类型,对某些疾病的诊断和治疗的可靠性也是很重要的。致于它们在遗传学、免疫学上的意义有待对各个电泳区带的性质作更详细的研究。

参 考 文 献

- [1] 上海市医学化验所, 1979. 临床生化检验(上册)。141—150页。上海科技出版社。
- [2] 陈道权、官之梅, 1985. 白暨豚血液有形成分, 动物学杂志, 20(6): 8—11。
- [3] 官之梅, 1985. 白暨豚血红蛋白的相对迁移率, 动物学杂志, 20(5): 13—15。
- [4] Baluda, M. C., Kulu, D. D. and Sparkes, R. S. 1972. Cetacean hemoglobins: electrophoretic finding in nine species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41(B): 647—653.
- [5] De Monte, T. and Pilleri, G. 1977. Some blood chemistry values obtained from *Stenella coeruleoalba* (Meyen: 1833) and *Delphinus delphis* (Linnaeus, 1758) from the Western Mediterranean. *Investigation on Cetacea*, (G. Pilleri ed.), Berne, 8: 223—230.
- [6] ———, 1979. Cetacean hematology. I. Hemoglobin. II. The blood cells. *Investigations on Cetacea*, (G. Pilleri ed.), Berne, 10: 277—306.
- [7] ———, 1982. Cetacean hematology. III. Plasma proteins. *Investigations on Cetacean*, (G. Pilleri ed.), Berne, 14: 197—229.
- [8] Engelhardt, F. R. 1979. Haematology and plasma chemistry of captive Pinnipeds and Cetacea, *Aquatic Mammals*, 7(1): 11—20.

- [9] Guan Zhimei and Chen Daoquan. 1986. Hematology of Chinese River dolphin (*Lipotes vexillifer*) A working paper submitted to Workshop on the Biology and Conservation of Platanistoid Dolphins. (in press)
- [10] Horvath, S. M., Chiodi H., and Ridgway, S. H., 1968. Respiratory and electrophoretic characteristics of hemoglobin of Porpoise and Sea Lion. *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**: 1027—1033.
- [11] Lint, D. and Clayton, J., 1986. Evolution of odontocetes: A serum albumin immunological and biochemical perspective. Poster presented at Annual Meeting, Society for the Study of Evolution, University of New Hampshire, 22—25 June/86.
- [12] Medway, W. and Geraci, J. R., 1965. Blood chemistry of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) *Ibid.*, **209**(1): 169—172.
- [13] Mueller, T. O., Smith O., and Irwin, M. R., 1962. Transferrin variation in columbidal. *Genetics*, **47**: 1385—1392.
- [14] Ridgway, S. H., 1968. The bottlenosed dolphin in biomedical research. Methods of animal experimentation, Academic Press Inc., New York, **3**: 387—445.
- [15] Ridgway, S. H., Simpson, G., Patton, G. S., Gilmartin, W. G., 1970. Hematological findings in certain small cetaceans. *J. V. M. A.*, **157**(5): 566—575.
- [16] Sharp, G. D., 1975. A study of electrophoretic and O₂ dissociation properties of the hemoglobin of some delphinid cetaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51**(A): 637—681.
- [17] Van Ros G., et M. Van Sande, 1965. La comparaison des hémoglobines animales par électrophorèse de zone en milieux gelifiés et son intérêt en systématique zoologique. *Bull. Soc. Roy. Zool. Anvers*, **35**: 19—64.

A PRELIMINARY STUDY ON HEMATOLOGY OF BLACK FINLESS PORPOISE (*NEOPHOCAENA* *PHOCAENOIDES*)

Guan Zhimei Chen Daoquan and Wang Xiaoqiang

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

Hematology, Blood biochemical characteristics electrophoretograms of hemoglobin and serum protein of black finless porpoises from the Changjiang river were investigated. The percentages of granulocytes of neutrophils and lymphocytes are high. There are basophils on blood smears. Hemoglobin of black finless porpoises belongs to Hb type I—II, having the relative mobility rate of Hb between human Hb S and Hb F, with 4 bands of non-hem protein (NHP). By electrophoresis on cellulose acetate membrane, serum total protein (Tp) of the animal can be divided into 8 bands. From positive pole to negative pole, they are pre-albumin (ξ), albumin (Λ) and 6 post-albumin (PA). By polyacrylamide gel, Tp presents 16 bands, among which lipoprotein has 4 bands: α_1 -Lp, α_2 -Lp, β -Lp band corresponding to PA 9, PA 10 and PA 11 respectively; pre- β -Lp and chylomicron are at the origin. Teansferrin presents one band, corresponding to PA 6.

Key words Hematology, Blood biochemistry, Hemoglobin, Serum protein, Lipoprotein, Transferrin