□ 원 저 □

기관지 천식, 만성폐쇄성 폐질환, 폐결핵 환자의 적혈구내 2,3-DPG(Diphosphoglycerate)활성도에 대한 연구

전북대학교 의과대학 내과학교실

김 정 권 · 이 충 섭 · 이 용 철
이 수 영 · 송 하 숙 · 이 양 근

= Abstract =

A Study on the 2,3-DPG (Diphosphoglycerate) Activity in Red Blood Cells of the Patients with Bronchial Asthma, COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) and Pulmonary Tuberculosis

Jeong Kwon Kim, M.D., Choong Seob Lee, M.D., Yong Chul Lee, M.D.

Soo Yeong Lee, M.D., Ha Sook Song, M.D. and Yang Geun Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Chon Buk National University College of Medicine, Chon Buk, Korea

Red blood cells synthesize 2,3-DPG that shifts the oxygen dissociation curve to right and consequently, increase the oxygen utilization and metabolism in the peripheral tissue. Recently there are many reports on the 2,3-DPG activity in red blood cell and related factor, ie PH, Temperature hemoglobin, anoxia, bicarbonate, and high altitude. On these fundamental basis, clinically I investigate the relationship between 2,3-DPG activity in red blood cell and known environmental factors in bronchial asthma, COPD and pulmonary tuberculosis.

The result doesn't show significant change of 2,3-DPG activity according to each disease, its duration, and its severity. But, it shows a correlation between 2,3-DPG activity and environmental factors. Especially a arterial oxygen partial pressure shows a reverse correlation with 2,3-DPG activity. These results suggest that 2,3-DPG activity mainly depends on the arterial oxygen partial pressure.

서 론

조직은 대사에 필요한 산소를 헤모글로빈에 결합된 산소로부터 공급받게되는데, 헤모글로빈의 β -chain에 결합하고 있는 2,3-DPG가 산소해리 및 조직의 산소 제공에 직접 관여하고 있다¹⁻³⁾. 정상에서 혈중 2,3-DPG활성도는 1.6~2.6 $\mu\text{mol/ml}$ 이며, 헤모글로빈은 산소보다 2,3-DPG에 대해 선택적으로 더 많은 친화력을 가지고 있다^{24,25)}. 조직의 산소요구량이 증가되면 적혈구내 2,3-DPG의 활성도가 증가되어 결국 산화헤모글로빈으

로부터 산소를 유리시켜 조직의 산소이용율을 증대시키게 된다^{2,3)}. 적혈구내의 2,3-DPG의 활성도의 변화는 각종 질환에서도 변화되고 있으며 혈중내 환경변화에 좌우된다고 알려져 있다^{4,5,12,14,16)}.

Kahn등⁴⁾은 만성간질환 폐질환 그리고 신질환 환자에 서 2,3-DPG 활성도의 변화를 관찰했으며, 혈중 환경조건(PH, Hemoglobin, Bicarbonate, PO_2 , Altitude)들의 변화와 2,3-DPG 농도변화사이에 밀접한 연관성을 보고 하였다. 이에 국내에서는 질환에 따른 2,3-DPG 활성도에 대한 보고가 거의 없어 호흡기질환을 대상으로 질환에 따른 2,3-DPG활성도와 혈중환경 변화에 따른

2.3-DPG 활성도의 관계를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

호흡기질환이 없는 23세에서 64세까지의 남자 7명과 여자 3명을 정상대조군으로 했고, 1988년 10월에서 1989년 9월까지 외래에서 통원치료를 받는 환자와 입원 환자를 대상으로 기관지천식 환자 15명, 만성폐쇄성폐질환 환자 7명, 폐결핵 환자 13명을 실험하였는데, 나이는 15세에서 67세까지 있었고 남자 25명과 여자 10명이었다. 병력은 1개월에서 18년까지 다양한 분포를 보였다.

2. 방 법

먼저 헤파린으로 처리한 주사기를 이용하여 환자의 요골동맥에서 약 3ml의 혈액을 채취한 다음, 즉시 동맥혈 가스분석을 이용하여 PH, PCO₂, PO₂, Bicarbonate를 측정하였고, 동시에 아래방법을 이용하여 2.3-DPG 활성도를 측정하였다.

1) 2.3-DPG활성도 측정방법

(1) 단백질을 분리한 상층액 : 채취한지 30분 이내의 헤파린으로 용해시킨 혈액 0.5ml를 8% cold trichloroacetic acid 1.5 ml속에 옮긴다음 충분히 흔든다. 그리고 혼합물은 단백질을 침전을 위해 약 5분간 냉장시켜 둔다. 그 후에 깨끗한 상층액을 얻기위해 3,000 RPM에서 10분간 원심분리시켜 단백질을 제거한 상층액을 얻게된다. 다음에 1 mg NADH(dihydronicotinamide adenosine dinucleotide)속에 triethanolamine buffer용액 8 ml를 넣고 섞어 잘 혼합시킨다. 혼합시켜 만든 용액 1.25 ml에 ATP(adenosine triphosphate) 0.05 ml와 단백질을 분리한 상층액 0.125 ml를 혼합한 다음 흔들어 섞는다. 그리고 GAPD(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)/PGK(3-phosphoglycerate phosphokinase) enzyme혼합액 0.01 ml와 phosphoglycerate mutase 0.01 ml를 첨가한 다음 흔들고 5분간 기다린다. 그리고 340 nm에서 흡광도를 기록하여 초기 흡광도를 얻는다. 다시 용액에 phosphoglycolic acid 0.05 ml를 첨가한 다음 흔들고, 37°C에서 15분간 저장시킨다. 그리고 다시 340 nm에서 흡광도를 기록하여 최종흡광도를 얻는다.

(2) 적혈구내 2.3-DPG산술 : Lewry et al의 산술방법²⁶⁾에 따라 초기 흡광도에서 최종 흡광도를 뺀 다음 0.030을 다시 빼고 그 결과 얻어진 값에 7.7을 곱한값이 결국 적혈구내 2.3-DPG농도(umoll/ml)가 된다.

실험 성적

1988년 10월부터 1989년 9월까지 전북대학병원에서 치료를 받은 기관지천식 환자 15명, 만성폐쇄성폐질환 환자 7명, 폐결핵 환자 13명 그리고 정상대조군 10명을 대상으로 동맥혈 가스분석을 실시하여 PH, PCO₂, PO₂, bicarbonate를 측정하고 동시에 2.3-DPG활성도를 측정하여 상호 상관관계를 관찰하기 위해 상관계수를 측정하였다. 각 집단의 검사성적을 Table로 표시하였으며, 혈중 환경 조건(PH, PCO₂, PO₂, bicarbonate)과 2.3-DPG활성도는 평균치가 각각 7.40, 39.6 mmHg, 98.5 mmHg, 27.9 mM/L 그리고 2.2 μM/ml를 보였으며(Table 1), 기관지천식 환자에서는 각각 평균치가 7.43, 39.5, 98.5, 27.9 그리고 2.2를 보였으며(Table 2), 만성폐쇄성폐질환 환자에서는 평균 7.40, 40, 41, 94, 27, 그리고 2.4를 보였으며(Table 3), 폐결핵환자에서는 평균 7.42, 41, 94, 27 그리고 2.1을 보였다(Table 4). 또한 각 질환에서 혈중환경조건(PH,

Table 1. Datas on Normal Persons

Pts.	pH	PCO ₂	PO ₂	Bicarbonate	2,3-DPG activity
1	7.38	38	96	23	2.2
2	7.41	40	98	24	2.1
3	7.40	42	101	25	1.8
4	7.36	36	97	27	2.0
5	7.43	38	100	24	1.8
6	7.42	39	101	22	2.2
7	7.41	41	95	24	2.3
8	7.42	40	103	24	2.4
9	7.36	40	96	24	2.6
10	7.38	42	98	25	2.6
Mean	7.40	39.6	98.5	24.2	2.2

* Units :

PCO₂ : mmHg,

PO₂ : mmHg,

Bicarbonate : mM/L

2,3-DPG activity : μM/ml

Table 2. Datas on B. Asthma (Bronchial Asthma)

Pts.	pH	PCO ₂	PO ₂	Bicarbonate	2,3-DPG activity
1	7.48	31	125	19	1.3
2	7.43	30	120	20	0.9
3	7.52	37	69	30	3.5
4	7.36	46	79	28	2.9
5	7.34	47	74	27	3.3
6	7.46	42	97	31	2.6
7	7.38	52	97	32	2.5
8	7.41	42	98	25	2.0
9	7.41	44	118	28	1.2
10	7.44	34	88	23	2.0
11	7.46	38	110	28	1.3
12	7.41	39	112	25	0.8
13	7.48	36	103	27	1.1
14	7.45	39	89	27	2.0
15	7.45	35	103	24	1.3
Mean	7.43	39.5	98.5	27.9	2.2

* Units are same as Table 1.

Table 4. Datas on Pulmonary TB (Tuberculosis)

Pts.	pH	PCO ₂	PO ₂	Bicarbonate	2,3-DPG activity
1	7.47	28	96	21	2.1
2	7.35	50	100	27	2.2
3	7.35	48	76	25	3.0
4	7.41	38	83	24	2.9
5	7.43	34	89	25	2.2
6	7.49	50	96	37	1.2
7	7.44	46	82	31	2.0
8	7.45	42	84	29	1.4
9	7.38	37	107	22	0.2
10	7.43	34	123	23	1.8
11	7.45	40	99	27	2.6
12	7.44	42	81	28	3.0
13	7.40	44	100	27	3.2
Mean	7.42	41	94	27	2.1

* Units are same as Table 1.

결 과

Table 3. Datas on COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

Pts.	pH	PCO ₂	PO ₂	Bicarbonate	2,3-DPG activity
1	7.43	30	63	20	2.9
2	7.41	35	80	22	2.7
3	7.38	36	98	24	1.9
4	7.46	42	68	23	3.2
5	7.30	39	101	25	2.4
6	7.33	52	87	36	1.9
7	7.42	51	92	37	1.6
Mean	7.40	41	84	27	2.4

* Units are same as Table 1.

PCO₂, PO₂, bicarbonate)과 2,3-DPG활성도의 상관관계를 관찰했는데, Fig. 1은 PH와 2,3-DPG활성도, Fig. 2는 PCO₂와 2,3-DPG활성도, Fig. 3은 bicarbonate와 2,3-DPG활성도를 표시하여 상관관계를 측정하였으나 유의한 상관관계는 없었다. 그러나 Fig. 4에서 PO₂와 2,3-DPG활성도와 상관관계를 표시하였는데 상관계수 -0.9008로 유의한 역상관관계를 보였으며, 각 질환에 있어서도 유의한 상관관계를 보였다.

정상대조군 10명과 환자 35명에서 혈중환경조건(PH, PCO₂, PO₂, bicarbonate)과 2,3-DPG활성도를 측정하여 각질환별로 비교관찰하였으며, 아래 결과를 얻었다.

1) 혈중 PH 변화에 대한 2,3-DPG 활성도는 환자들의 PH변화범위가 좁은 이유때문인지 모든 집단에서 일정한 상관관계를 볼 수 없었다.

2) PCO₂의 변화에 따른 2,3-DPG의 활성도는 기관지천식 환자에서 분압증가시 증가하는 영향을 보였으나, 유의한 상관관계는 볼 수 없었다.

3) Bicarbonate변화에 대한 2,3-DPG활성도는 bicarbonate 농도증가시 기관지천식 환자에서는 2,3-DPG의 활성도가 증가되고 만성폐쇄성폐질환 환자에서 감소하는 경향을 보였으나, 유의한 상관관계는 없었다.

4) PO₂와 2,3-DPG 활성도의 변화는 동맥산소분압이 증가하면서 모든 집단에서 모두 2,3-DPG 활성도가 감소하였으며, 상관계수=-0.9008로 아주 유의한 역상관관계를 보였다.

Fig. 1. Correlation between pH and 2,3-DPG activity.

Fig. 2. Correlation between PCO_2 and 2,3-DPG activity.

Fig. 3. Correlation between Bicarbonate and 2,3-DPG activity.

Fig. 4. Correlation between PO_2 and 2,3-DPG activity.

고 안

조직내 산소공급 및 대사는 산소해리 곡선에 영향을 미치는 여러 조건들에 의해 좌우된다. 최근 각종질환에서 적혈구내 2,3-DPG 활성도의 변화가 보고되고 있으며, 조직의 대사에 직접적인 영향을 미침으로써 2,3-DPG형성 및 영향을 미치는 조건들에 대한 연구가

활발하게 진행되고 있다^{4~6)}. 2,3-DPG는 적혈구내에서 형성되고 산소해리곡선을 좌우 이동시켜 조직내 산소공급 및 대사에 관여하게 된다. 적혈구 2,3-DPG활성도 변화에 관하여 여러 환경요인들이 영향을 미친다고 보고되었고, 여러 효소들도 적혈구내 2,3-DPG 대사를 조절하여 농도 변화에 영향을 미친다고 발표되었다^{1~5,7~9)}. 또한 만성폐쇄성폐질환, 만성신부전 그리고 간질환과 같은 특정질환에서 2,3-DPG농도 변화는 질환의 정도에

결 론

관계하는 것이 아니고 혈중내 환경의 변화에 직접적인 영향을 받는다고 보고 되었다^{5,6)} Nakano등¹⁴⁾은 간질환이나 만성 폐쇄성폐질환 환자를 대상으로 한 적혈구내 2,3-DPG활성도 측정 실험에서 2,3-DPG활성도가 총담즙 산과 동맥 PH에 관여한다고 했으며, 질환의 심한 정도에 따라 증가하고 만성폐질환보다 간경화와 간암 환자에서 더욱 증가한다고 보고했다. Ramirez¹⁵⁾와 Carlone등¹⁸⁾은 bicarbonate 혈액투석을 받은 만성신부전 환자에서 동맥혈 PH의 증가가 적혈구 용적의 변화없이 직접 2,3-DPG농도를 증가시키지 못한다고 했다. Bogatskaia등¹³⁾은 bicarbonate변화에 따른 2,3-DPG활성도에 대해 보고 하였는데 hexokinase활성도의 감소가 glycolysis속도 감소에 관여하고, 2,3-DPG파괴율이 증가가 노쇠과정에 따른 적혈구 2,3-DPG 활성도가 떨어지는 원인들중의 하나가 된다고 했다¹³⁾. 또 다른 보고에서는 수혈 및 과산소증 상태에서 2,3-DPG 활성도의 감소와 조혈작용의 감소를 보고하였고^{11,23)} β -교감신경 자극제로 치료를 받고 있는 기관지천식 환자에서 2,3-DPG와 조직내 산소 전달이 약물에 의해 큰 영향을 받지 않는다고 보고하였다¹⁰⁾. 또한 빈혈이 있을때에도 적혈구 2,3-DPG활성도가 증가되어 헤모글로빈-산소 친화력의 변화를 일으키며, 고 지대에서 산소결핍에 대한 보상작용으로 2,3-DPG 활성도를 증가시켜 조직에 산소전달을 용이하게 한다고 보고하였다^{2,3,19,21,22)}.

본 연구에서는 각종 호흡기질환을 가진 환자를 대상으로 질환에 대한 2,3-DPG 농도 변화의 상관성 및 혈중내 조건 변화에 따른 2,3-DPG 농도변화의 상관관계를 규명해보고자 했으며, 연구 결과에서 각 질환에 따른 2,3-DPG 농도의 차이는 관찰할 수 없었으며, 혈액내 PH의 감소와 동맥 CO₂의 분압이 증가함에 따라, 2,3-DPG 농도의 차이는 관찰할 수 없었으며, 혈액내 PH의 감소와 동맥 CO₂의 분압이 증가함에 따라, 2,3-DPG의 농도가 증가하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의성은 없었고, bicarbonate농도의 변화도 관계가 없었다. 그러나 동맥산소 분압이 감소함에 따라 2,3-DPG 농도가 아주 유의하게 증가하는 것으로 보아 적혈구내 2,3-DPG의 변화는 헤모글로빈과 산소의 결합 농도에 따라 크게 좌우되며 주로 산소농도에 의하여 2,3-DPG 농도가 결정 되어지는 것이라고 암시해주고 있는 것이다.

이상의 결과로 적혈구 2,3-DPG 활성도는 bicarbonate농도의 변화에 따라 영향을 받지않고 혈중 PH의 감소와 CO₂분압이 증가함에 따라 적혈구 2,3-DPG활성도가 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 상관관계는 없었고, 또한 병의 정도나 기간에 영향을 받지 않았다. 그러나 동맥산소분압이 감소함에 따라, 적혈구 2,3-DPG활성도가 증가하는 유의한 역상관관계를 관찰할 수 있어 적혈구 2,3-DPG활성도에 동맥혈의 산소분압이 가장 중요한 역할을 미치고 있음을 암시해주고 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Kister J, Marden MC, Bohn B, Poyart C: Functional properties of hemoglobin in human red cells; II. Determination of the Bohr effect. *Resp Physiology* 73:363-78, 1988
- 2) Boning D, Enciso G: Hemoglobin oxygen affinity in anemia. *Blunt* 54:361-368, 1987
- 3) Samaja J, Di-Prampero PE, Cerretelli P: The role of 2,3-DPG in the oxygen transport at altitude. *Resp Physiology* 64:191-202, 1986
- 4) Kahn RC, Zaroulis C, Goetz W, Howland WS: Hemodynamic oxygen transport and 2,3-DPG changes after transfusion of patients in acute respiratory failure. *Intensive Care Med* 12(1):22-25, 1986
- 5) Agusti AG, Rodriguez, Roisin R, Roca J, Aguilar JL, Agusti-Vidal A: Oxyhemoglobin affinity in patients with COPD and acute respiratory failure; role of mechanical ventilation. *Cirt Care Med* 14(7):610-613, 1986
- 6) Timms RM, Tisi GM: The effect of short-term oxygen supplementation on oxygen hemoglobin affinity in patients with COPD. *Am Rev Res Dis* 131(1):62-72, 1985
- 7) Clerbaux T, Serteyn D, Willems E, Brasseur L: Determination of the standard oxyhemoglobin dissociation curve in horses, Effect of temperature, pH and Diphosphoglycerate. *Can J Vet Res* 50(2):188-92, 1986
- 8) Hobish MK, Powers DA: pH dependence of 2,3-DPG binding to human hemoglobin AO at 21.7

- degrees C. *Proteins* **1**(2):164-75, 1986
- 9) Schmidt W, boning D, Braumann KM: Red cell age effects on metabolism and oxygen affinity in humans. *Resp Physiology* **68**(2):215-25, 1987
 - 10) Susanni EE, Mundel T, Mitchell G, Rosendorff C: Beta-adrenergic receptors and oxygen transport. *Clin Physiol Biochem* **5**(2):12-16, 1987
 - 11) Volzhskaya AM, Troshikhin GV, Baishukurova AK: Oxygen transport properties of blood in the presence of excess oxygen in the body. *Fiziol zh SSSR* **73**(6):798-8-2, 1987
 - 12) Ando R, Saito H, Takeuchi J: Factors that effect oxygen affinity of hemoglobin in chronic hemodialysis patients. *Nephron* **46**(30):268-72, 1987
 - 13) Bogatskaia LN, Pissaruk AV: Mechanism of changes in the rate of glycolysis and levels of ATP and 2,3-DPG in human erythrocytes during aging. *Ukr Biokhim zh* **59**(5):81-3, 1987
 - 14) Nakano T, Tujioka H, Tamura S, Smuro Y, Nabeshima K, Hada T, Higashimo K: Erythrocyte 2,3-DPG in liver diseases. *Am J Gastroenterol* **82**(120):1283-6, 1987
 - 15) Ramirez G, Collice GL, Jame S, John CC, Nelson WP: Increase in p50 with the use of bicarbonate hemodialysis. *Int J Artif Organs* **10**(60):361-6, 1987
 - 16) Espinos D, Alvarez-Sala JL, Villegas A: Relationship of red-cell 2,3-diphosphoglycerate with anemia, hypoxaemia and acid-base status in patients with cirrhosis of the liver. *Scand J Clin Lab Invest* **42**(8):613-6, 1982
 - 17) Agrafiotis A, Camus F, Rottembourg J, Eugene L, Legrain M: Erythrocyte organic phosphates and whole blood oxygen affinity in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Invest* **12**(6):463-5, 1982
 - 18) Carlone S, Serra P, Farber MO, Roberts L, Manfredi F: Red blood alkalosis and decreased oxygen-hemoglobin affinity. *Am J Med Sci* **284**(2):8-16, 1982
 - 19) Clench J, Ferrell RE, Schull WJ: Effect of chronic altitude hypoxia on hematologic and glycolytic parameters. *Am J Physiol* **242**(5):R447-51, 1982
 - 20) Summerfield GP, Bellingham AJ, Manlove L, Forbes AM, Goldsmith HJ: Erythrocyte metabolism in patients on haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Sci* **62**(5):479-88, 1982
 - 21) Krasomski G, Zachara B, Krajewski J: 2,3-diphosphoglycerate concentration in the red blood cells of anemic pregnant women in various periods of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* **13**(4):243-9, 1983
 - 22) Dawson RB: Preservation of red blood cells for transfusion. *Hum Pathol* **14**(4):756-3, 1983
 - 23) Dawson RB: Preservation of red blood cells for transfusion. *Hum Pathol* **14**(3):213-7, 1983
 - 24) Benesch R, Benesch RE: Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature* **221**:618, 1969
 - 25) Grisolia S, Moore K, Lague J, Grady H: Automatic procedure for the microestimation of 2,3-diphosphoglycerate. *Anal Biochem* **31**:235, 1969
 - 26) Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* **239**:18, 1964