DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.032
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)21-1961-03

论著

亚甲基蓝光化学法对全血中人免疫缺陷Ⅰ型病毒的灭活研究

张 耀[1],熊鸿燕[1],马 菲[1],鲍作义[2] ([1]第三军医大学预防医学院军队流行病学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

提 要:目的 观察不同浓度的亚甲基蓝(methylene blue, MB)与可见光联合作用对全血中人免疫缺陷Ⅰ型病毒(HIV-1)的灭活能力。方法 以HIV-1为试验病毒,通过MB与可见光(640 nm)单独及联合作用于含病毒的模拟全血,采用MT4细胞感染法评价病毒的灭活效果。结果 当全血中MB含量分别为5、10、15 μmol/L时,以40 000 Lux强度的可见光分别照射30、20、10 min,可完全杀灭试验滴度为$10^{5.78}$ $TCID_{50}$HIV-1病毒。结论 亚甲基蓝光化学法可高效灭活全血中HIV-1病毒。

关键词:亚甲基蓝;光化学法;HIV-1型病毒
中图法分类号:R187;R373.9 文献标识码:A

Inactivation of HIV-1 in whole blood by methylene blue photochemical method

ZHANG Yao[1], XIONG Hong-yan[1], MA Fei[1], BAO Zuo-yi[2] ([1]Department of Epidemiology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: **Objective** To observe the ability of inactivating human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in whole blood by visible light combination with methylene blue (MB) at different concentrations. **Methods** HIV-1 was used as the test virus. The contaminated blood was treated by MB, visible light (640 nm), combined with MB and visible light (640 nm). The test of MT4 cell infection was used to evaluate the virus inactivation efficacy. **Results** After being treated by MB at the concentrations of 5, 10, and 15 μmol/L, and then irradiated respectively by visible light (40 000 Lux, 640 nm) for 30, 20, and 10 min, all the added indicated virus at the titer of $10^{5.78}$ $TCID_{50}$ of HIV-1 could be inactivated absolutely. **Conclusion** Methylene blue photochemical method can inactivate HIV-1 in blood effectively.

Key words: methylene blue; photochemical method; HIV-1

临床上用血的安全性问题日益受到普遍重视。据WHO统计,全球5%~10%的人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染源于输血或血制品,经输血途径传播HIV的危险性依然很高[1];有研究表明,一次输血所致HIV-1、HIV-2感染的危险性分别为$1/10^6$与$1/10^8$[2]。目前,随着HIV在我国传播速度的加快,HIV威胁我国输血安全已成为迫在眉睫的现实问题,而常规的血清学方法难以检出处在"窗口期"的感染的HIV病毒,因此寻找有效的对血液中感染病毒进行灭活的方法,是保证临床用血安全的重要措施。本实验以HIV-1为模型病毒,通过MB与可见光单独及联合作用于HIV污染血液,观察其灭活效应,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂材料

抗凝全血购自中国人民解放军307医院输血科,为正常新鲜全血,4 ℃冰箱保存备用。MB购自Sigma公司,将其配成生理盐水贮存液,避光保存备用。使用芸香叶苷(上海生工)做血液成分保护剂。细胞培养液为RPMI1640培养基(美国Gibco-BRL公司)补加10%热灭活新生牛血清,含10^6 U/L青霉素、100 mg/L链霉素和5 mol/L Hepes。实验用光源为德国Magazin投影仪灯,光照强度使用北京师范大学光电仪器厂照度计(ST-80C)测量,样本使用旋涡式微量振荡混匀器(北京海淀医疗仪器厂)混匀。实验照度40 000 Lux,实验温度22~24 ℃。

1.2 实验用细胞与病毒

本实验在军事医学科学院全军艾滋病检测中心生物安全Ⅲ级(biological safety level 3, BSL-3)实验室内进行。细胞采用MT4细胞,系携HTLV的传代人T淋巴细胞(引自日本);病毒为

作者简介:张 耀(1979-),男,四川省南充市人,硕士研究生,主要从事血液消毒方面的研究。电话:(023)68752286
通信作者:熊鸿燕,电话:(023)68753387
收稿日期:2004-03-22;修回日期:2004-07-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HIV-1 B3 亚型(引自美国)经实验室传至 21 代,病毒滴度 8.0 $LogTCID_{50}$。

1.3 样品的制备

取抗凝全血 45 ml,按 9(全血):1(病毒原液)的容量比接种病毒,混匀后分别配制成终浓度为 0、5、10、15 μmol/L MB 含病毒全血,加入芸香叶苷使其在全血中终浓度为 0.35 mmol/L,此时混合血液中 HIV 的滴度为 7.0 $LogTCID_{50}$。同时,另取取抗凝全血 4.5 ml,加入 0.5 ml 病毒原液,使 HIV 在血液中的滴度为 7.0 $LogTCID_{50}$,不加入 MB 和芸香叶苷,作为对照组。

1.4 MB 与可见光单独作用对全血中 HIV-1 灭活效果观察

将含病毒的全血加入 16 孔细胞培养板中,每孔 0.6 ml。将此 16 孔板置于旋涡式振荡混匀器上按适当频率振荡,同时在 40 000 Lux 照射强度下作用 0、10、20、30 min,对处理样本进行病毒滴度测定。将终浓度为 15 μmol/L MB 的含病毒全血加入 16 孔细胞培养板中,每孔 0.6 ml,将此 16 孔板置于旋涡式振荡混匀器上按适当频率在避光条件下振荡 0、10、20、30 min 后,对处理样本进行病毒滴度测定。

1.5 MB 与可见光联合作用对全血中 HIV-1 灭活效果观察

将终浓度为 5、10、15 μmol/L MB 的含病毒全血,各取 0.6 ml 加入 16 孔细胞培养板中。将此 16 孔板置于旋涡式振荡混匀器上按适当频率振荡,同时在 40 000 Lux 照射强度下作用 10、20、30 min,对处理样本进行病毒滴度测定。

1.6 处理样本病毒滴定

按照卫生部消毒技术规范(2002 年版)操作。先在 96 孔细胞培养板各孔中,加入 100 μl 用培养液制备的 MT4 细胞(含细胞 4×10^5/ml)。取实验组与对照组样本做 1∶10 系列稀释,从 10^{-1} 至 10^{-7}。取稀释好的样本 100 μl/孔滴上述 96 孔细胞培养板,每个稀释度平行做 4 孔。37 ℃、5% CO_2 培养箱培养,于滴定后第 3 天补加 50 μl 新鲜培养液,逐日观察记录细胞病变状况至第 7 天,对未见病变细胞盲传 3 代后,计算 $TCID_{50}$。试验重复 3 次。

1.7 灭活实验结果判定

MB 与可见光的协同增效作用以 T/E 值判定。T 为两因素单独作用时实测存活率的乘积,E 为两因素共同作用时实测存活率。T/E<1 为拮抗作用,T/E=1 为相加作用,T/E>1 为增效作用[3]。

2 结果

2.1 培养 7 d 后细胞形态

在倒置显微镜下可见,未病变 MT4 细胞呈集落生长,细胞颗粒均匀,轮廓清晰(图 1)。病变细胞也呈集落生长,但明显可见被感染细胞融合,出现多核巨细胞,发生"空泡样"病变(图 2)。

2.2 可见光与 MB 单独作用全血中 HIV-1 病毒的灭活效果

如表 1 所示:阳性对照组病毒滴度为 5.78 $LogTCID_{50}$;以照度为 40 000 Lux 可见光单独作用全血 10~30 min,全血中 HIV-1 病毒滴度未见明显下降。而单独以终浓度为 15 μmol/L 的 MB 作用全血 10~30 min 全血中 HIV-1 病毒滴度最高仅下降 0.34 个对数级。

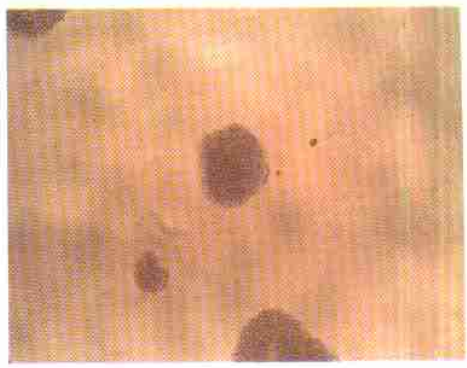


图 1 未病变细胞形态

Fig 1 Normal morphology of MT4 cells

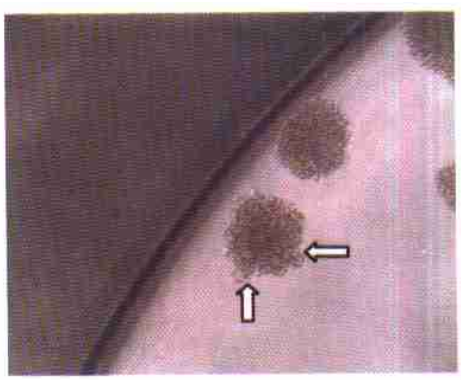


图 2 病变细胞形态:MT4 细胞融合肿胀,形成多核巨细胞

Fig 2 Pathological changes of MT4 cells: MT4 cells formed multinucleate giant cells after fusion and swelling

表 1 40 000 Lux 可见光与 15 μmol/L MB 单独作用对全血中 HIV-1 病毒的灭活效果

Tab 1 Inactivation efficacy of HIV-1 in blood treated by visible light at the intensity of 40 000 Lux and MB at the dose of 15 μmol/L, respectively

Exposed time (min)	Titer after inactivation by visible light ($LogTCID_{50}$)	Titer after inactivation by MB ($LogTCID_{50}$)
0	5.78	5.78
10	5.61	5.50
20	5.57	5.72
30	5.78	5.44

The temperature: 22~24 ℃; Results: Means of tests for 3 times; Titer of HIV-1 positive control: 5.78 $LogTCID_{50}$

2.3 MB 与可见光联合作用对全血中 HIV-1 病毒的灭活效果

当全血中 MB 含量分别为 5、10、15 μmol/L 时,以 40 000 Lux

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

强度的可见光分别照射 30、20、10 min, 可完全杀灭实验滴度为 $10^{5.78}$ $TCID_{50}$HIV-1 病毒。各剂量组的平均灭活对数值> 5.00。阳性对照组的病毒滴度为 5.78 $LogTCID_{50}$。由实验可看出, 当随着 MB 浓度的增加, 完全灭活病毒所需要的时间减少。在实际应用中, 其最佳灭活病毒的条件应根据实际情况以及结合下一步 MB 的急、慢性毒性试验进一步确定。结果见表 2。

表 2　MB 与可见光联合作用对全血中 HIV-1 病毒的灭活效果

Tab 2　Inactivation efficacy of HIV-1 in blood treated by combined visible light and MB

Concentration of MB (μmol/L)	Intensity of light illumination (Lux)	Titer after inactivation by MB photochemical methods ($LogTCID_{50}$)		
		10 min	20 min	30 min
5	40 000	4.67	3.33	0
10	40 000	3.78	0	0
15	40 000	0	0	0

The temperature: 22～24 ℃; Results: Means of tests for 3 times; Titer of HIV-1 positive control: 5.78 $LogTCID_{50}$

当全血中 MB 含量为 5、10 μmol/L 时, 与 40 000 Lux 可见光联合作用 10 min 的 T/E 值分别为 12 93、98 84; 当全血中 MB 含量为 15 μmol/L, 联合作用 10 min 的 T/E 值大于 10^5。结果说明这两种因素联合作用具有明显的协同增效作用。

3　讨论

亚甲基蓝(MB)属酚噻嗪衍生物, 是一种光敏染料。亚甲蓝分子在水溶液中带有阳性电荷, 与带有阴性电荷的脂包膜病毒具有高度亲和能力。在波长为 600～700 nm 可见光照作用下, 亚甲基蓝分子被激发产生单线态分子氧, 这种单线态分子穿透病毒外壳, 通过与病毒核酸的鸟嘌呤碱基结合而影响而使核酸产生缺口, 引起核酸链的断裂或导致碱基位点丢失, 从而阻止其复制[4]。此外, 在有氧光照条件下产生的氧自由基, 对病毒核酸和膜蛋白也有破坏作用[5]。

亚甲基蓝光化学法灭活血液成分中病毒的技术在欧美等发达国家开展多年, 在国外已经开始应用于临床[6], 是一项比较成熟的技术。其具有应用工艺简单, 对血浆中有效成分破坏小的特点。此外, 亚甲基蓝是治疗氰化物和亚硝酸盐中毒的解毒剂, 临床使用剂量比血浆消毒的剂量要大数百倍, 在毒理学方面对人体是比较安全的。1992－1997 年德国和瑞士已有 80 万单位的新鲜冰冻血浆(MB-FFP)经亚甲基蓝光化学法灭活处理后应用于临床。近年来国内关于这种方法的研究尚处于起步阶段, 仅限于实验室的研究而未应用于临床。

目前, 国内外关于亚甲基蓝光化学法的研究和临床应用主要针对血浆病毒的灭活, 对于全血中病毒的灭活方法国内外报道很少。其原因可能是全血中红细胞等固体成分多, 难以被可见光均匀照射, 使灭活病毒作用明显降低。本实验采用增加可见光照射强度(比国内外报道剂量高 1～2 倍), 降低被照射血液的厚度(2～5 mm), 并在照射过程中使用旋涡式震荡仪, 以适当速度混悬血液, 以提高光化学反应的均匀性, 研究结果显示, 其灭活病毒的效果是完全的。为降低非特异光化学反应对血液成分的损害, 我们在血液中加入了国际共认[7] 的适量芸香叶苷(rutin)成分作为光萃灭剂, 根据血液成分分析试验显示, 在有效灭活血液中病毒的同时, 血液主要成分的含量和活性无明显变化(另文报告)。这些结果说明, 亚甲基蓝光化学法对全血中 HIV-1 病毒灭活效果显著, 有良好的应用前景。当然, 在临床应用之前, 还有一系列的问题需进一步证实, 如经此方法处理的全血免疫原性变化如何？光照处理后血液的保存时间及保存方法与常规操作有无差异？处理的血液是否存在慢性毒性作用？我们将继续开展这些问题的研究。

参考文献:

[1] Lackritz E M. Prevention of HIV transmission by blood transfusion in the developing world: achievement and continuing challenges[J]. AIDS, 1998, 12 (Suppl A): S81－S86.

[2] Williamson L M, Allain J P. Virally inactivated fresh frozen plasma[J]. Vox Sang, 1995, 69(3): 159－165.

[3] 王思雄, 熊鸿燕, 林　辉, 等. 吖啶橙与长波紫外线灭活血浆中 f_2 噬菌体的形态变化[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(3): 220－223.

[4] Epe B, Mutzel P, Adam W. DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes *in vitro*[J]. Chem Biol Interact, 1988, 67(1－2): 149－165.

[5] Wagner S J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes[J]. Transfus Med Rev, 2002, 16(1): 61－66.

[6] Zhou X P, Xu J B, Sun P, *et al*. The effect of methylene blue/photochemical method for virus inactivation on plasma components[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2003, 11(3): 305－307.

[7] Margolis Nunno H, Bardossy L, Robinson R, *et al*. Psoralen-mediated photodecontamination of platelet concentrates: inactivation of cell-free and cell-associated forms of human immunodeficiency virus and assessment of platelet function *in vivo*[J]. Transfusion, 1997, 37(9): 889－895.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net