DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.014
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
220 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0220-04

吖啶橙与长波紫外线灭活血浆中 f_2 噬菌体的形态变化

王思雄,熊鸿燕,林 辉,徐 焰,李 莉,宋建勇 (第三军医大学预防医学系军队流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察吖啶橙(AO)与长波紫外线(UVA)消毒血浆中 f_2 噬菌体后形态的变化。方法 以 f_2 噬菌体为试验病毒,通过AO与UVA单用及联用灭活病毒效果测定筛选二者协同作用的最佳条件,在此最佳消毒条件下利用透射电镜观察 f_2 噬菌体在消毒前后形态的变化。结果 经AO处理后再经UVA照射,能明显减少血浆中 f_2 噬菌体的滴度,两因素的T/E值大于1;经有效灭活病毒的剂量(6 μg/ml AO +4 500 J/m^2 UVA)消毒后与消毒前相比,血浆中大多数 f_2 噬菌体由球形变为纺锤状和丝状,且轮廓变得不清晰,电子密度降低。结论 AO与UVA两因素具有协同增效作用;消毒后 f_2 噬菌体的形态明显发生了变化,由球形变为纺锤状和丝状。

关键词:吖啶橙;长波紫外线;f_2 噬菌体;血浆消毒;病毒灭活;透射电镜
中图法分类号:R187;R373.9 文献标识码:A

Observation of inactivation of bacteriophage f_2 in the plasma by acridine orange and UVA irradiation by transmission electron microscopy

WANG Si-xiong, XIONG Hong-yan, LIN Hui, XU Yan, LI Li, SONG Jian-yong (Department of Epidemiology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the morphological changes of bacteriophage f_2 in the plasma after inactivation by acridine orange (AO) and long-wave ultraviolet rays (UVA). Methods Bacteriophage f_2 was used as the test virus. The inactivation effects of AO, UVA, and combined use of AO and UVA were detected for the purpose of choosing the optimal condition of inactivating bacteriophage f_2 in plasma. After treatment with AO and UVA under this condition, the morphological changes of bacteriophage f_2 in plasma were observed by transmission electron microscopy. Results The titers of bacteriophage f_2 in plasma were significantly reduced after treatment with AO followed by UVA irradiation. The value of T/E of these two agents was higher than 1. Transmission electron microscopy showed that the effective dosage for inactivating the virus was 6 μg/ml AO+4 500 J/m^2 UVA. After inactivation of the virus, changes in shape were found in the majority of bacteriophage f_2 in plasma, from spheriform shape into spindle- and silk-like ones, with unclear contour and decreased electronic density. Conclusion UVA and AO have synergistic effect on the inactivation of bacteriophage f_2. Treatment with AO and UVA may result in changes in the shape of bacteriophage f_2, from spheriform shape into spindle- and silk-like ones.

Key words: acridine orange; long-wave ultraviolet ray; bacteriophage f_2; plasma disinfection; virus inactivation; transmission electron microscopy

血浆是临床上广泛使用的血液制品之一,同时又是许多血制品的重要原料,一旦原料血浆受到病原体污染,其带来的危害是极其严重的。为了减少临床上因使用血浆及其制品而引起病毒性疾病传播的危险性,探索一种能对可疑污染病毒的血浆及其制品进行有效灭活病毒处理技术是十分必要的,这将对阻断输注血浆及其制品传播的病毒性疾病具有重要意义。我们利用AO与长波紫外线(ultraviolet A, UVA)对血浆中非脂质包膜病毒的指示病毒-f_2 噬菌体进行消毒,利用透射电镜观察 f_2 噬菌体在消毒前后形态的变化。

1 材料和方法

1.1 宿主菌的培养

f_2 噬菌体的宿主菌为大肠杆菌(285),取10 ml LB培养基于一小锥形瓶中,用接种环分别取绿脓杆菌及大肠杆菌的单个菌

作者简介:王思雄(1973-),男,四川省泸州市人,硕士,助教,主要从事消毒学及分子流行病学方面的研究。电话:(023)68752286
收稿日期:2002-11-25;修回日期:2003-01-26

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

落接种 LB 培养基, 置 37 ℃摇床上增殖 6 h, 贮存于 4 ℃冰箱。

1.2　噬菌体滴定与保存

取宿主菌悬液 4 ml 和 0.4 ml 的 f_2 噬菌体在灭菌试管内混匀。于 37 ℃培育 15 min, 使噬菌体充分吸附。加入 8 ml LB 培养基, 于 37 ℃振摇培养 6 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 保留上清即为增殖的 f_2 噬菌体, 将增殖后的噬菌体分装, 贮存于 4 ℃冰箱备用。

测定滴度时, 将融化的 16 g/L 营养琼脂铺于平皿底层, 凝固后待用。另取 10 倍梯度稀释的不同稀释度的 f_2 噬菌体 10 μl 与 0.2 ml 宿主菌悬液在试管中混匀并放置 15 min, 加入 4 ml 47 ℃保温的半固体培养基, 振荡后倒入底层含琼脂的平皿内, 轻轻晃动使之分布均匀, 盖上盖, 待其凝固后 37 ℃培养 12 h, 计数噬斑数[1], 计算噬菌体滴度。

某稀释度噬菌体滴度(PFU/ml)= 噬斑数 × 稀释度 × 100

1.3　含病毒血浆的准备

将供血者的新鲜血浆分装后, 保存于 −20 ℃, 实验前置于 37 ℃水浴迅速融化, 加入适度稀释的病毒贮存液, 待消毒。

1.4　AO 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果观察

在室温下, 将终浓度为 6 μg/ml AO 与含病毒血浆混匀。作用 5~30 min, 进行病毒滴度测定。

病毒减少量对数值= 对照组病毒含量对数值 − 试验组病毒含量对数值

1.5　UVA 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果观察

将 2 ml 含病毒的血浆加入直径为 40 mm 的小平皿中, 经照射强度为 1 500 μW/cm² 的低臭氧紫外线消毒灯照射 5~30 min, 于照射前、后分别收集血浆做病毒滴度测定。

UVA 照射剂量 = (μW/cm²)·s = 10^{-2} J/m²

1.6　UVA 与 AO 对血浆中 f_2 噬菌体的协同灭活效果观察

将一定量 AO 加入模拟的污染血浆后, 再经 UVA 照射不同时间, 吸取血浆样本进行病毒滴度的测定。

1.7　灭活试验结果判断

UVA 与 AO 协同增效作用的判定以 T/E 值表示。T 为理论存活率, 即两因素单独作用时实测存活率的乘积。E 为实测存活率, 即两因素共同作用时实测存活率。T/E 值小于 1 为拮抗作用, 等于 1 为相加作用, 大于 1 为增效作用[2]。

1.8　透射电镜观察血浆中 f_2 噬菌体形态变化

按 1.6 的方法对模拟污染血浆进行消毒, 按照朱丽霞等[3]报道的方法制备电镜样本: 取消毒血浆 10 μl 与宿主菌 0.2 ml 混合 15 min 后稀释 10^4 倍, 然后取一滴混合液于 1%的琼脂糖胶块上, 盖上附有 Formvar 膜的电镜铜网, 水吸干后取下铜网。用 2%磷钨酸(pH 6.8)染色 5 min, 吸干多余染液。干燥后, 用透射电镜在 45 kV, ×34 k~×105 k 条件下对每个样本观察 15~20 个视野, 同时制备正常对照样本, 并且进行观察。

2　结果

2.1　AO 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果

在室温下, AO 为 6 μg/ml 时, 5~30 min 的作用可使 f_2 噬菌体灭活达 3.27~4.53 个对数级, 见表 1。

表 1　6 μg/ml AO 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果

Tab 1　Effect of 6 μg/ml AO on inactivation of bacteriophage f_2 in the plasma

Exposed time of AO (min)	Quantity of surviving bacteriophage f_2 (log, PFU)	Quantity of bacteriophage f_2 reduced (log, PFU)
5	4.56	3.27
10	4.16	3.67
15	3.78	4.05
20	3.55	4.28
25	3.36	4.47
30	3.30	4.53

Titer of bacteriophage f_2 positive control: 7.83log, PFU/ml

2.2　UVA 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果

在以照射强度为 1 500 μW/cm² 的 UVA 照射含 f_2 噬菌体血浆时, 随着照射强度的增加, 血浆中 f_2 噬菌体量下降较慢, 照射 5 min 时仅下降 1.21 个对数级, 照射 30 min 时也仅下降 2.63 个对数级, 见表 2。

表 2　UVA 对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果

Tab 2　Effect of UVA on inactivation of bacteriophage f_2 in the plasma

Group	Quantity of surviving bacteriophage f_2 (log, PFU)	Quantity of bacteriophage f_2 reduced (log, PFU)
Irradiation intensity of UVA		
5 min(4 500 J/m²)	5.77	1.21
10 min(9 000 J/m²)	5.65	1.33
15 min(13 500 J/m²)	5.19	1.79
20 min(18 000 J/m²)	4.83	2.15
25 min(22 500 J/m²)	4.59	2.39
30 min(27 000 J/m²)	4.35	2.63

Irradiation dose of UVA: 1 500 μW/cm²; Titer of bacteriophage f_2 positive control: 6.98 log, PFU/ml

2.3　UVA 与 AO 协同作用对血浆中 f_2 噬菌体的灭活效果

单独 UVA 照射时, 照射剂量为 4 500 J/m² 及 9 000 J/m² 仅分别使 f_2 噬菌体的滴度下降 1.21 和 1.33 个对数级, 而单用 AO (6 μg/ml)作用 30 min 能使 f_2 噬菌体下降 4.53 个对数级; 当血浆经终浓度为 6 μg/ml 的 AO 作用后再经剂量为 4 500 J/m² 和 9 000 J/m² UVA 照射分别使 f_2 噬菌体的滴度下降 6.03 及 6.27 个对数级, 见表 3。

表 3　UVA 与 AO 单用及联用对 f_2 噬菌体的灭活效果

Tab 3　Comparison of the inactivation effects of single use of UVA and AO and combined use of UVA and AO bacteriophage f_2

Group	Quantity of bacteriophage f_2 reduced (log, PFU)	Survival rate of bacteriophage f_2(%)
UVA(4 500 J/m²)	1.21	6.2
(9 000 J/m²)	1.33	4.7
AO 30 min	4.53	2.95×10^{-3}
AO 30 min+UVA (4 500 J/m²)	6.03	9.33×10^{-5}
AO 30 min+UVA (9 000 J/m²)	6.27	5.37×10^{-5}

Dosage of AO: 6 μg/ml; Titer of bacteriophage f_2 of the positive control: 6.98 log PFU/ml; The value of T/E was 196.03 when the plasma was exposed to AO (6 μg/ml) and UVA (4 500 J/m²); The value of T/E was 258.19 when the plasma was exposed to AO (6 μg/ml) and UVA (9 000 J/m²)

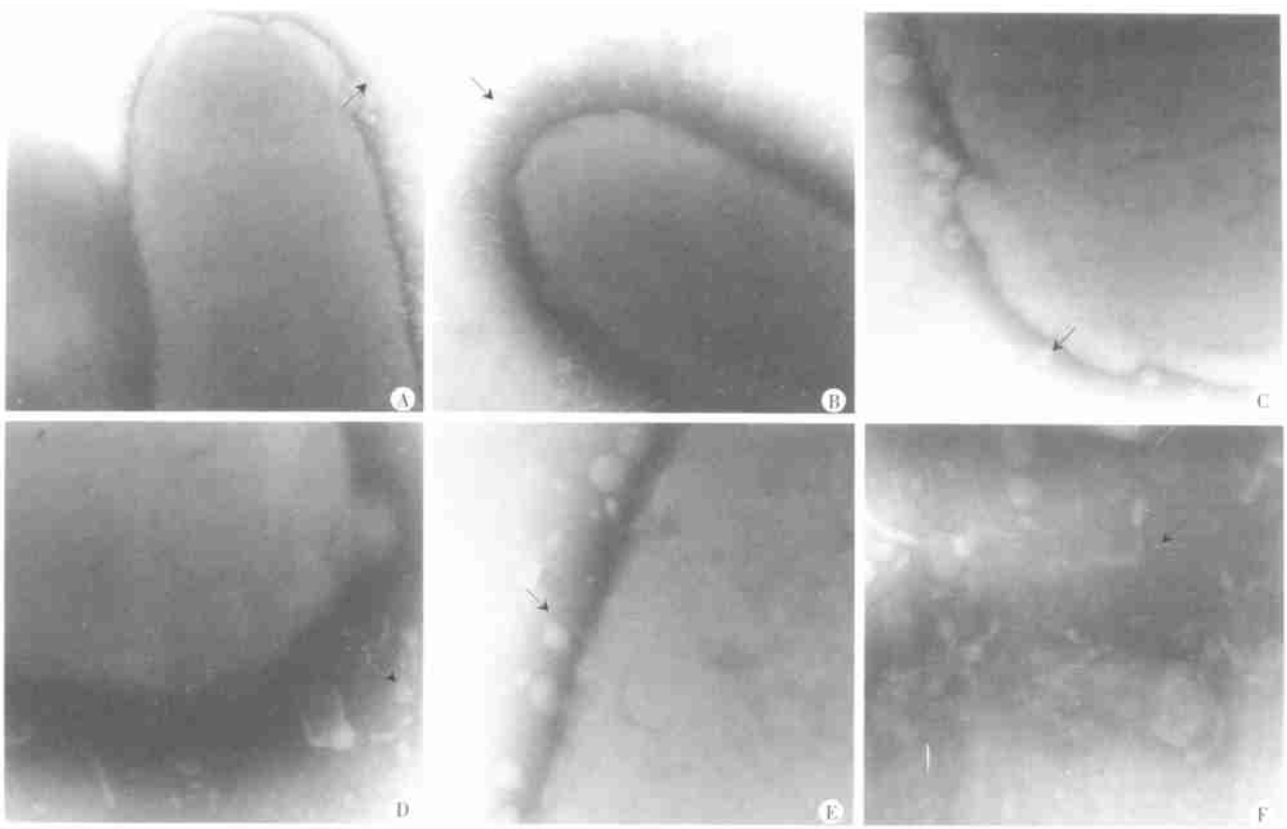
AO(作用 30 min)+UVA (4 500 J/m²)的 T/E 值为 196.03, AO(作用 30 min)+UVA (9 000 J/m²) 的 T/E 值为 258.19。说明

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

在此二者的联用方式下，两因素具有协同增效作用，明显比 AO 和 UVA 的单用效果好。

2.4 透射电镜对消毒血浆中 f_2 噬菌体的观察

在电镜下，未经处理的 f_2 噬菌体大多数围绕宿主菌呈 40 nm 左右圆形颗粒，轮廓清晰，见图 1A、C、E。被 AO 及 UVA 处理血浆中的 f_2 噬菌体大多数变得形态不规则，有的呈“纺锤状和丝状”形态，电子密度降低，轮廓清晰度下降，见图 1B、D、F。



A, C, E: Shapes of bacteriophage f_2 of the positive control (× 34 k, × 73 k, and × 105 k); Arrow shows the complete virus particle (40 nm spheriform particle with clear contour); B, D, F: Shapes of bacteriophage f_2 after inactivation with 6 μg/ml AO plus 4 500 J/m^2 UVA; Arrow shows the virus particle with decreased electronic density, unclear contour, and shapes change from the spheriform into the spindle- and silk-like (× 34 k, × 73 k, × 105 k)

图 1 AO（6 μg/ml）+UVA(4 500 J/m^2）消毒处理前后的 f_2 噬菌体颗粒形态变化的透射电镜观察照片

Fig 1 Changes of bacteriophage f_2 particle before and after inactivation with 6 μg/ml AO plus 4 500 J/m^2 UVA on transmission electron microscope photographs

3 讨论

本研究结果显示，终浓度为 6 μg/ml 的 AO 处理 30 min 后，再经剂量为 4 500 J/m^2 UVA 照射能使血浆中 f_2 噬菌体的滴度下降大于 6 个对数级，达到了血浆消毒的要求，且两因素具有协同增效作用。f_2 噬菌体是单链 RNA 病毒，被认为是血浆中存在的非脂质包膜病毒如甲型肝炎病毒(HAV)、人类细小病毒 B19 的指示病毒[4]。AO 是吖啶类化合物的重要衍生物之一。其在数分钟内可快速与细胞的核及细胞质中的特殊物质结合，直接插入 DNA、RNA、溶酶体的结构中。这种单纯的内插可以干扰细胞的正常结构和功能，阻止细胞的生长、繁殖，但其杀伤效应有一定的局限性，其与光量子相互作用的效应可进一步增强其杀伤效应。AO 光生物效应主要来自有氧光敏反应，产生超氧阴离子自由基和单态氧，能引起核酸的氧化损伤[5,6]。本研究选用 UVA 与 AO 进行血浆消毒，从实验结果可见两因素的协同效应，灭活血浆中 f_2 噬菌体的滴度明显高于 AO 与 UVA 单独作用时 f_2 噬菌体灭活的滴度，灭活滴度增高达 2 个对数级以上。可以深入探索这一现象的机制，并广泛地进行应用。

通过透射电镜观察 f_2 噬菌体的形态，发现经 AO 与 UVA 处理后，已完全失去感染性的大多数 f_2 噬菌体的圆形颗粒变得不规则，轮廓的清晰度降低，电子密度降低，在与宿主菌结合时“纺锤状和丝状”形态较多。这一现象可能表明，在我们设定的处理剂量下，f_2 噬菌

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

体的包膜超微结构已发生了变化, 颗粒的变形性增加。其灭活机制的还有待深入观察。

以上结果说明, AO 与 UVA 联用对血浆中危害严重的非脂质包膜病毒有很好的灭活效果, 有良好的应用前景, 但是要将其用于实际, 相关的研究有待进一步进行, 如 AO 与 UVA 对其它非脂质包膜病毒、脂质包膜病毒的灭活作用; 消毒后的血浆所致的急性、慢性、致癌动物试验; 消毒后血浆的新免疫原性产生; 消毒血浆的保存时间及其保存后的质量; 消毒后 AO 的降解、清除方法研究等。

参考文献:

[1] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 1996. 127.

[2] Ragab Depre N J, Water disinfection with the hydrogen peroxide-ascorbic acid-coper(II) system[J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 44(3): 555—560.

[3] 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 生物学中的电子显微镜技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1983. 73—79.

[4] Lee D, Foux M, Leonard E F. The effects of methylene blue and oxygen concentration on the photoinactivation of Q beta bacteriophage[J]. Photochem-photobiol, 1997, 65(1): 161—165.

[5] Wainwright M, Phoenix D A, Marland J, *et al*. A comparison of the bactericidal and photobactericidal activities of aminoacridines and bis(aminoacridines)[J]. Lett Appl Microbiol, 1998, 26(6): 404—406.

[6] Liu Z, Lu Y, Lebwohl M, *et al*. PUVA(8-methoxy-psoralen plus ultraviolet A) induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(1—2): 127—133.

(编辑　薛国文)

(上接 219 页)

术中还发生缝线缠绕晶体襻 2 例, 解除缝线缠绕后使人工晶体正位。睫状沟人工晶体植入发生前房出血 4 例。出血均于术后 2~3 周完全吸收。

2.3　术后并发症

术后早期术眼常见不同程度的色素膜炎症反应。眼压升高 4 例, 经降眼压药物治疗眼压降至正常, 随访眼压未再升高。1 例术后发生脉络膜及视网膜脱离, 行玻璃体手术视网膜复位, 视力恢复 0.1。远期并发症有黄斑前膜 1 例, 术后视力仅为 0.04; 人工晶体偏位 1 例, 行调位术后正位。人工晶体脱位于玻璃体腔 2 例, 均行玻璃体手术取出。1 例将取出的人工晶体行巩膜缝线固定术, 术后裸眼视力达 0.2, 未见视网膜损伤和脱离。术后感觉眩光及视物变形 1 例。

3　讨论

我们施行的 42 例 II 期后房型人工晶体植入患者, 除 1 例因术后黄斑前膜视力未能提高, 其余患者术后裸眼视力均有不同程度提高。分析玻璃体手术后 II 期后房型人工晶体植入术的视功能恢复与以下因素有关。

3.1　术前视功能状况

近年来, 随着玻璃体手术的广泛开展, 玻璃体晶体切除术后无晶体眼日益增多。由于玻璃体及晶体切除术的原发病通常较为复杂, 术后视网膜功能难以确定, 大部分患者需行 II 期人工晶体植入术[2]。II 期人工晶体植入术于玻璃体晶体切除术后 3~18 月进行, 此时视网膜病变的愈合已基本稳定, 此时手术可有效避免早期人工晶体植入术后复发视网膜脱离、继发性青光眼等并发症发生[2]。手术前排除视网膜玻璃体病变和其他眼病, 对矫正视力大于 0.1 者行 II 期后房人工晶体植入, 以保证 II 期人工晶体植入术后视力得到有效提高。

3.2　手术方式

II 期后房型人工晶体植入采用睫状沟植入术和巩膜缝线固定术。前房人工晶体植入相对于后房型人工晶体植入术有较多缺点[3], 现已较少使用。人工晶体睫状沟植入术操作简单, 时间短, 损伤小, 术中未见严重并发症, 术后眼内炎症反应轻, 视力恢复快[4]。人工晶体巩膜缝线固定术操作复杂, 缝线穿过巩膜壁可能刺伤血管导致玻璃体出血。如果巩膜缝线张力不均匀, 固定位置不对称可使人工晶体轻度倾斜和偏心[5], 我们认为这是术后裸眼视力低于矫正视力的原因之一。另外玻璃体手术后玻璃体腔完全被平衡盐液充填, 术中切开前房会有大量眼内液流出, 致眼压降低或眼球变形, 使操作不便并增加并发症的发生率[4]。

3.3　术中术后并发症

术中玻璃体出血、术后继发性青光眼、术后炎症反应均可导致术后视力恢复不良。玻璃体出血及炎症反应消失后, 视力明显提高。黄斑前膜可严重影响视力恢复。人工晶体移位与倾斜则产生眩光、视物变形等症状。人工晶体脱位于玻璃体腔可使视力突然下降, 因此避免手术并发症才能促进视力的恢复。

临床实践证明: 无晶体眼 II 期后房型人工晶体植入符合人眼的生理结构[6], 是矫正无晶体眼异常屈光状态并促进患眼视力提高的有益选择。

关键词: 无晶体眼; 人工晶体植入; 视功能; 玻璃体切除术
中图法分类号: R779.64　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 惠延年, 郝燕生, 王　琳. 玻璃体切除和人工晶状体植入联合手术治疗眼外伤[J]. 中华眼科杂志, 1994, 30(1): 414—416.

[2] 曹小燕, 惠延年, 王　琳. 玻璃体手术后无晶体眼的 II 期人工晶体植入术[J]. 中华眼底病杂志, 2001, 17(2): 96—98.

[3] Evereklioglu C, Er H, Bekir N A, *et al*. Comparison of secondary implantation of flexible open-loop anterior chamber and scleral-fixated posterior chamber intraocular lenses[J]. J Cataract Refract Surg, 2003, 29(2): 301—308.

[4] 龙崇德, 闻祥根, 林晓锋, 等. 玻璃体切除术后眼内灌注下 II 期人工晶体缝襻固定术[J]. 中国实用眼科杂志, 2002, 20(5): 362—364.

[5] Asmet D, Hakan F, Oner N K, *et al*. Tilt and decentration after primary and secondary transsclerally sutured posterior chamber intraocular lens implantation[J]. J Cataract Refract Surg, 2001, 27(2): 227—232.

[6] Hannush S B. Sutured posterior chamber intraocular lenses: indications and procedure[J]. Curr Opin Opthalmol, 2000, 11(4): 223—240.

(编辑　张大春)

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