DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.023
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1646 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1646-03

亚甲蓝光化学效应对血液中大肠杆菌的灭活效果及对血细胞生物学功能影响

胡小兵,熊鸿燕,宋建勇,王思雄 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察特定条件下,亚甲蓝(MB)光化学效应对血液中大肠杆菌的灭活效果及对血细胞生物学功能的影响。方法 血液样本以15 μmol/L的MB在40 000 lx卤钨灯照射下,加入0.35 mmol/l的芸香苷,作用10~40 min,观察对血液中大肠杆菌的灭活效果,并采用多聚赖氨酸粘附试验、ATP酶促反应和中性粒细胞吞噬试验等技术观察血细胞某些生物学功能的变化。结果 处理40 min,血液中大肠杆菌下降近5个对数级,亚甲蓝与卤钨灯照射两因素的T/E值大于1,具有协同增效作用。血细胞形态无明显变化,红细胞膜表面负电荷下降了11.23%~25.49%,Na^+-K^+ ATP酶活性在处理的20~30 min时增加了7.60%~20.07%。中性粒细胞的NBT吞噬显色反应呈增高趋势,20 min时阳性率增加9.00%。结论 亚甲蓝光化学效应可以有效灭活血液中的大肠杆菌。在有效灭活血液中细菌的特定条件下,血细胞的形态和功能无显著变化,但红细胞粘附力升高了11.23%~25.49%。

关键词:亚甲蓝;光化学效应;大肠杆菌;红细胞;中性粒细胞;生物学功能
中图法分类号:R187;R331.1+4 文献标识码:A

Photochemical effect of MB on the inactivation of *E. coli* in blood and biologic functions of blood cells

HU Xiao-bing, XIONG Hong-yan, SONG Jian-yong, WANG Si-xiong (Department of Epidemiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the photochemical effect of methylene blue (MB) on the inactivation of *E. coli* in blood and on biological functions of blood cells. **Methods** The blood was treated with 15 μmol/L MB, 40 000 Lux halogen lamp irradiation and 0.35 mmol/l rutin for 10~40 min. The photochemical effect of MB on the inactivation of *E. coli* in blood was observed. The changes of biologic functions of blood cells were measured by means of RBC membrane binding to poly-L-lysine, reaction promoted by ATP enzyme and neutrophil phagocytosis tests. **Results** After treatment for 40 min, the *E. coli* count in blood decreased by 5 log units. The value of T/E of MB and irradiation of halogen lamp was higher than 1. No obvious changes of the morphology of blood cell were found. The negative electrical charges on membrane of RBC decreased by 11.23%~25.49%. After treatment of the blood for 20~30 min, the activity of Na^+-K^+ ATP enzyme of RBC membrane increased by 7.60%~20.07%. When the blood had been treated for 10~20 min, the positive rate of neutrophil phagocytosis enhanced by 9.00%. **Conclusion** MB photochemical treatment can effectively inactivate *E. coli* in blood. Under morphology-specific condition of effectively inactivated blood bacteria, the shapes and functions of blood cells are not altered, but the RBC adhesion may increase by about 11.23%~25.49%.

Key words: methylene blue (MB); photochemical treatment; *E. coli*; erythrocyte; neutrophil; biologic function

近年来,由于自体输血具有诸多优点而受到提倡,并已成为一种应用十分广泛的技术,但其细菌污染的严重性越来越受到关注[1~2]。为了寻找一种可行、有效的血液细菌的灭活方法,我们对亚甲蓝(Methylene blue, MB)与卤钨灯联合作用下光化学效应对血液中细菌的灭活效果进行了实验研究。结果表明,在适宜的条件下,这一方法可使血液中大肠杆菌的含量下降5个对数级以上,并且具有明显的协同增效作用。但是在卤钨灯照射下MB光化学效应对血细胞的生物活性是否有影响一个亟待证实的问题。为此,我们在实验室条件下观察了在设定条件下被处理血液的血细胞形态、红细胞膜表面负电荷、Na^+-K^+ ATP酶及中性粒细胞吞噬功能等指标的变化。

作者简介:胡小兵(1973—),男,贵州省安顺市人,硕士,主治医师,主要从事流行病学和消毒学方面的研究,现在成都军区卫生防疫队。电话:(028)89971817
通信作者:熊鸿燕,电话:(023)68752287

收稿日期:2002-12-04;修回日期:2003-04-21

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

1　材料和方法

1.1　材料

人新鲜全血(第三军医大学附属西南医院输血科提供); 大肠杆菌 8099(由军事医学科学院五所); MB、多聚赖氨酸(分子量为 30 000～70 000)、NBT 染料(Sigma 公司, 美国); 聚蔗糖 Ficoll400(博士德公司); 芸香苷(中国医药集团上海化学试剂公司); ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所); UV-9200 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); BX41 系统显微镜(Olympus 公司, 日本); UV-2201 型紫外分光光度计(岛津株式会社, 日本); ZS-5000 板式酶标仪(航天二院 283 厂); ST-80C 照度计(北京师范大学光电仪器厂); Halogen 卤钨灯泡(1 000 W)(PHILIPS 公司, 荷兰)。

1.2　方法

1.2.1　含菌血液的准备　实验前根据需要取一定量保存于 4 ℃冰箱的新鲜全血加入无菌带盖离心管中, 将菌悬液按 1∶100 的比例加入血液, 混匀, 使菌浓度达到 10^6～10^7 cfu/ml。

1.2.2　血液的处理　将 MB 和芸香苷加入含菌新鲜全血, 使其终浓度分别为 15 μmol/L 和 0.35 mmol/L, 混匀放置 20 min 后, 取 5 ml 加入 100 ml 输血用血袋中, 40 000 lx 卤钨灯照射 40 min, 照射局部降温处理, 使温度保持在 25 ℃左右。取血样进行常规活菌计数及相关指标检测。将未经处理的血液(放置条件与试验组相同)样本作为对照组。

1.2.3　T/E 值的计算　MB 与卤钨灯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 时为相加作用, 大于 1 为增效作用[3]。公式如下。

$$\text{T/E 值}=\frac{\text{MB 单独作用时的存活率}\times\text{卤钨灯单独作用时的存活率}}{\text{MB 与卤钨灯共同作用时的存活率}}$$

1.2.4　血细胞形态变化　将血液样本涂片, 用瑞氏染液染色, 在 1 000 倍显微照相系统下观察血细胞形态变化。

1.2.5　红细胞膜表面负电荷变化　根据 Ben-Hur 等[4] 的方法, 将多聚赖氨酸溶液(1 mg/ml)加入 96 孔细胞培养板中(30 μl/孔), 室温下放置 30 min, 去除多聚赖氨酸溶液, 37 ℃孵干, 分别将 200 μl 红细胞悬液(红细胞浓度＝5×10^7/ml)加入孔中。室温下再放置 30 min, 去除红细胞悬液, 用 PBS 洗涤 3 次, 再加超纯水(200 μl/孔)使红细胞溶血, 放置 10 min 后用紫外分光光度计测定吸收峰值, 根据吸收峰值用酶标仪测定各孔 A 值。各试验点作 5 个复样。

1.2.6　红细胞膜 Na^+-K^+ ATP 酶活性变化　按 ATP 酶测试盒说明进行样品红细胞的计数、洗涤、制备红细胞膜悬液。取 200 μl 进行 Na^+-K^+ ATP 酶促反应, 无机磷的浓度(显示酶活性)用分光光度计测定(A_{660})。各试验点作 5 个复样。

1.2.7　中性粒细胞吞噬功能变化　用中性粒细胞分离液分离中性粒细胞。按常规中性粒细胞活性测定法[5]: 吸取中性粒细胞层的细胞 20 μl 于清洁玻片上, 加 2 滴 NBT 染液, 37 ℃孵育 15 min, 涂片, 干燥后甲醇固定, 用 Wright-Giemsa 染液染色。光镜下计数 100 个细胞中有还原 NBT(呈紫色沉着物)的细胞数。每个试验点计数 3 组。

1.3　统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 在 SPSS10.0 统计软件上进行 t 检验。

2　结果

2.1　MB 光敏效应及单因素对血液中大肠杆菌的灭活效果

在 MB 光敏效应作用下, 血液中大肠杆菌的下降 5.020 个对数级, 灭活率为 99.999%。而单独使用 15 μmol/L MB 和单独使用 40 000 lx 的卤钨灯作用 40 min 只能使血液中的大肠杆菌下降 1.474 和 0.224 个对数级。MB(作用 40 min)＋卤钨灯(40 000 lx)联用的 T/E 值为 201.98。说明在此联用方式下, 两因素具有显著的协同增效作用, 而单用 MB 的杀灭效果较差, 单用卤钨灯则基本没有杀灭作用。

2.2　血细形态学变化

Wright 氏染色后光镜观察发现, 经 MB 光化学效应处理的血液样品与未消毒处理的血液样品相比, 血细胞形态学没有明显变化。

2.3　红细胞膜活性变化

多聚赖氨酸粘附试验的红细胞溶血液经吸收光谱测定, 其吸收峰为 400～590 nm, 见图 1, 。选择在 450 nm 处, 分光光度计检测结果显示, 在 MB 光化学效应的处理下, 随着照射时间的增加, 红细胞膜粘附力明显升高, 10～40 min 处理过程中, 粘附力升高了 11.23%～25.49%。说明适宜 MB 光化学效应处理, 膜表面负电荷有降低的趋势, 见表 1。

生化酶促反应结果显示, 红细胞膜 Na^+-K^+ ATP 酶活性在处理的 20～30 min 时明显升高, 增加值为 7.60%～20.07%, 10 min 和 40 min 时与处理前相比没有明显变化, 见表 1。说明短时间 MB 光化学效应处理可提高红细胞膜 Na^+-K^+ ATP 酶活性。

表 1　钨灯照射不同时间后血细胞生物学功能变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of biologic functions of blood cell($\bar{x}\pm s$)

	Control	10 min	20 min	30 min	40 min
Erythrocyte adhesion(A_{450})	0.568±0.047	0.700±0.051 **	0.655±0.048 *	0.713±0.068 **	0.632±0.024 *
Erythrocyte Na^+-K^+ ATP enzyme(A_{660})	0.168±0.008	0.167±0.006	0.181±0.006 *	0.202±0.010 **	0.169±0.024
Rate of neutrophil phagocytosis(%)	37.667±4.509	41.333±3.512	46.667±2.517 *	39.000±6.247	37.333±3.215

*: $P<0.05$, * *: $P<0.01$ *vs* control

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

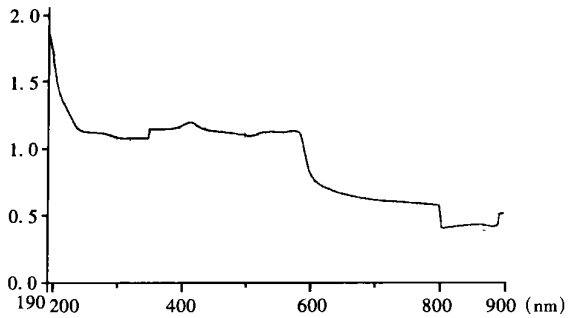
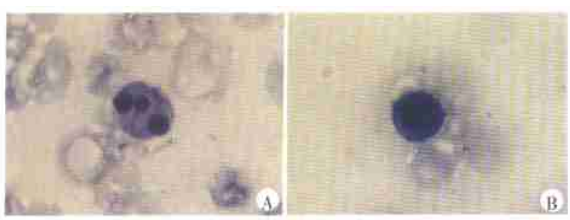


图 1 红细胞溶血液吸收光谱

Fig 1 Absorption spectrum of erythrocytic hemolysate

2.4 中性粒细胞吞噬功能的变化

中性粒细胞吞噬功能测定结果显示，MB 光化学效应作用 10～20 min 时，中性粒细胞的 NBT 吞噬显色反应呈增高趋势，20 min 时阳性率增加 9.00%。随着照射时间的延长，吞噬阳性率又逐渐降低，并与正常组相似，见图 2、表 1。说明短时间 MB 光化学效应处理可提高中性粒细胞的吞噬能力。



A: Negative; B: Positive

图 2 中性粒细胞吞噬显色反应 (Wright-Giemsa× 1 000)

Fig 2 Color reactions of neutrophil phagocytosis (Wright-Giemsa× 1 000)

3 讨论

MB 是一种吩噻嗪染料，属于多靶点光敏剂，其主要靶点包括细菌的脂质膜和核酸。其杀菌机制是由于具有阳离子性质，MB 易与带负电荷的微生物表面脂蛋白和核酸结合，经一定强度的可见光照射，使其受到激发产生羟自由基和单态氧，从而达到杀菌作用[6]。本研究结果显示，在 MB 光化学效应的作用下，可以使血液中的大肠杆菌下降 5 个对数级以上，达到有效灭活血液中大肠杆菌的效果。

羟自由基和单线态氧一方面可起到灭活细菌的作用，另一方面也可能对血液成份和功能造成损害。MB 光化学反应产生的活性氧是具有高反应性的短命小分子，它与蛋白质的氨基酸残基发生能量转移反应，通过活化氧分子(如单态氧负离子和羟自由基等)的能量传递，使氨基酸残基结构发生改变，从而影响蛋白质的二级结构和三级结构，并可影响蛋白质的抗原性，使抗原决定簇结构发生改变，如果是有活性的酶，酶活力也会发生改变。由于核酸是 MB 光化学效应的靶位点之一，白细胞 DNA 也会受攻击，从理论上讲一方面会造成白细胞功能的损伤；另一方面 DNA 的损伤有导致突变而致癌的危险，但由于光化学效应的复杂性，以及相关研究缺乏系统性，这一结论还无定论。

我们在实验过程中加入了保护剂，保护剂的作用是淬灭过剩的自由基以保护血液的安全，所选择的芸香苷可以淬灭 OH^- 和 O^-，已经广泛用于血液及血液制品消毒的保护，常用剂量为 0.35 mmol/L[7,8]。在加入保护剂后，经过有效灭活血液中细菌的 MB 光化学效应的处理，血细胞的形态无显著变化，红细胞的 Na^+-K^+ ATP 酶活性活性和中性粒细胞的吞噬功能甚至有短暂的提高，但总的没有发生明显变化，红细胞表面负电荷下降，导致其粘滞度的上升了 11.23%～25.49%。综上所述，本研究显示 MB 对血细胞生物学功能无显著影响。

参考文献：

[1] Sugai Y, Sugai K, Fuse A. Current status of bacterial contamination of autologous blood for transfusion[J]. Transfus Apheresis Sci, 2001, 24(3): 255－259.

[2] Wehner M, Konig F. Microbiological contamination of intraoperatively collected erythrocyte concentrate in mechanical autotransfusion in tumor surgery [J]. Anaesthesiol Reanim, 2001, 26(1): 11－17.

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

[4] Ben Hur E, Rywkin S, Rosenthal I, *et al*. Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocyanines: protection of red cell but not of vesicular stomatitis virus a water-soluble analogue of vitamin E[J]. Transfusion, 1995, 35(5): 401－411.

[5] 钱玉昆. 实用免疫学技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 17－22.

[6] Bachmann B, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, *et al*. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light[J]. J Med Virol, 1995, 47(2): 172－177.

[7] Marx G, Mou X, Freed R, *et al*. Protecting fibrinogen with rutin during UVC irradiation for viral inactivation[J]. Photochem Phtobiol, 1996, 63(4): 541－546.

[8] 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): 889－896.

(编辑 薛国文)

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