DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.041
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
208 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0208-03

光量子效应对血液生物活性成分的影响

高 飞[1],熊鸿燕[2],徐 彬[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042;[2]预防医学系流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察特定条件下光量子效应对血液生物活性的影响。方法 采用全自动血气分析仪、血小板聚集测定仪、血凝测定仪以及微管吸吮系统和多聚赖氨酸吸附等技术观察在使用有效灭活血液病毒的光量子剂量下,光量子对血液主要生物活性成分的影响。结果 在适宜的血液浓度下,0.1 nmol/ml的8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)和三螺旋结构寡核苷酸(TFO)结合1 800 μW/cm^{2}的UVA照射,在3~20 min的照射时间内,血液的含氧量逐渐增加,红细胞弹性增强,红细胞粘附性降低,血凝相关指标有一定的变化,但维持在正常变化范围。结论 在有效灭活血液中病毒的特定条件下,光敏反应效应的非特异作用可使血液携氧状态改善,红细胞变形能力增强,血液粘滞度降低,血液凝血功能无明显变化。

关键词:光量子;血液;生物活性
中图法分类号:Q55;R331.1 文献标识码:A

Effect of photon on blood biologic components in photochemical treatment

GAO Fei, XIONG Hong-yan, XU Bin (Department of Clinical Laboratories, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effect of photon on blood biologic components in blood photochemical treatment. Methods After the blood sample was adjusted to an appropriate density, it was treated with 0.1 nmol/ml 8-MOP (8-methoxypsoralen), 0.1 nmol/ml TFO (triple helix-forming oligonuletide) and UVA (ultraviolet A radiation) at the intensity of 1 800 μW/cm^2 for 3~20 min. The changes of biologic activities of major components in blood were measured with automatic blood gas analyzer, platelet aggregation analyzer, blood coagulation analyzer, micropipette aspiration system and assay of poly-lysine adsorption. Results The oxygen content in blood was increased gradually. The resilience of erythrocyte was enhanced, but its adhesiveness was decreased. The parameters related to blood coagulation had some changes but all remained within the normal ranges. Conclusion Under the definite condition of blood virus being inactivated effectively, the nonspecific effect of photosensitive response may improve blood oxygen content, enhance the transfiguring ability of erythrocyte and decrease the blood viscosity, but having no obvious change on blood coagulation.

Key words: photon; blood; biologic activity

三螺旋结构寡核苷酸(Triple helix-forming oligonuletid, TFO)与光量子的联合效应在特异基因抑制及基因结构损伤的研究中展示出强有力的应用潜力,近年来倍受关注[1~3]。我们针对鸭乙肝病毒核酸特定区域设计筛选出了能与靶标序列有效结合的TFO,并将其与长波紫外线(Ultraviolet A radiation, UVA)联合作用用于体外血液中的病毒灭活。实验表明,在适宜的条件下,这一方法所产生的病毒灭活程度高于单纯的两种因子各自效应的4~5个对数级(结果另文报道),具有显著的协同效应。但是,这种处理方法对血液的生物活性及功能的影响如何是一个急待证实的问题,为此我们首先观察了在设定条件下被处理血液凝血功能、携氧状态及流变特性等指标的变化。

1 材料方法

1.1 血液的处理

正常血液用等渗盐水缓冲液(0.89%氯化钠,2.28%甘露醇,0.24%枸橼酸钠)作适当稀释,使红细胞含量为1×10^9/ml左右。加入用脂质体(Boehringer Mannheim 产品)包裹的0.1 nmol/ml人工合成的20 bp寡核苷酸(针对鸭乙肝病毒核酸设计的三螺旋结构寡核苷酸)和0.1 nmol/ml 8-甲氧基补骨脂素(8-methyoxypsoralen, 8-MOP;分析纯,江苏溧阳制药厂产品),混匀后置37 ℃孵育4 h,将血液分别加入24孔细胞培养板中(200 μl/孔),在强度为1 800 μW/cm^{2}的UVA下照射3、5、10、15、20 min,照射期间人工定时摇动使照射均匀。取血样进行相关指标检测。将未经TFO和UVA作用的血液(放置条件与试验组相同)样本作为对照组。320~380 nm UVA灯由北京光电源研究所提供。UVA强度测定仪由北京师范大学光电仪器厂提供。20 bp寡核苷酸合成由北京赛百盛生物技术有限公司完成。

1.2 血浆重要指标测定

分别取不同照射剂量的血液200 μl,立即用全自动血气分析仪(美国,Nova biomedical公司产品)测定相关指标,了解处理血液的血气指标变化;另取2 ml离心(800 r/min, 5min)用血小板聚集测定仪(Model paper-Ⅰ 北京世帝科学仪器公司)和血凝测定仪(Quadta Tek Ⅳ型血凝测定仪,美国,R^2 DIAGNOSTICS SOUTH BEND 公司产品)分别测定血小板聚集比例(RPA)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化凝血酶原时间(APTT)等指标的变化。各试验点均作两个复样。

1.3 红细胞生物活性变化

1.3.1 红细胞形态变化 将经不同照射剂量的样品涂片,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870693);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98M096)
作者简介:高 飞(1961—),女,天津市人,主管技师,主要从事检验学、血液学方面的研究。电话:(023)68757272
收稿日期:2000-11-02;修回日期:2001-01-20

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

用 Wright-Giemsa 染液染色, 在 BX50 显微镜及 PM-20 照相系统(日本, Olympus 公司)下观察红细胞形态。

1.3.2　红细胞变形能力测定　　红细胞膜的变形测定选用微管吸吮系统(德国, Axiovert35, Zeiss 公司产品), 参照吴泽志等[4]的实验方法进行, 模量 μ(弹性元件)的计算采用计算机软件(重庆大学生物工程研究院提供)分析。各样本测定值用 MicoCal Oringin 2.94 分析软件进行方差分析。

1.3.3　红细胞膜表面负电荷变化　　根据 Ben-Hur 等[5]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 红细胞悬液加入孔中。室温下再放置 30 min, 去除细胞悬液, 用 PBS 液洗涤 3 次, 再加超纯水(200 μl/孔)使红细胞溶血, 放置 10 min 后用酶标仪(测定波长 415 nm)测定各孔 D_{415}值。各试验点作 5 个复样。各样本测定值用 MicoCal Oringin 2.94 分析软件进行方差分析。

2　结果

2.1　处理血液的血气和凝血相关指标分析

被处理血液的氧分压、氧饱和度、氧含量随 UVA 照射时间的延长呈逐渐增加的趋势, 二氧化碳分压和总二氧化碳含量则逐渐下降, 显示被照射处理血液样品携氧状态的明显改善, 见表 1。与正常对照相比, 处理血液样品的 PT、TT、APTT 等测定值均有延迟的趋势, 但是, PT 值延迟 0.05 ~ 3 s, TT 值延迟 1.1 ~ 2.2 s, 与正常样品相比, 延迟时间均在 3 s 以内(无病理意义)。APTT 值延迟 3.9 ~ 9.6 s, 与正常样品相比, 延迟时间均在 10 s 以内(无病理意义)。RPA 降低 75% ~ 77%, 显示血小板的聚集能力明显下降, 见表 1。

表 1　处理血液血气及凝血相关指标的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of blood gas and coagulation related parameters in blood treated with TFO($\bar{x} \pm s$)

Index	Control	Irradiated by UVA			
		5 min	10 min	15 min	20 min
PT(t/s)	26.15±0.35	26.20±0.40	28.15±0.05	27.45±0.75	29.15±1.15
TT(t/S)	16.25±0.15	18.45±0.05	17.35±1.75	17.65±2.25	15.40±0.40
APTT(t/S)	45.50±3.60	49.40±1.30	51.10±1.00	55.10±1.10	53.90±0.10
RPA(%)	20.0±5.0	5.0±1.0	3.5±1.5	3.0±1.0	5.0±0.0
pH	7.291±0.005	7.338±0.004	7.424±0.045	7.421±0.023	——
PCO_2(p/KPa)	3.00±0.10	2.20±0.10	1.45±0.15	1.30±0.02	——
PO_2(p/KPa)	5.25±0.15	6.35±0.25	8.60±0.50	13.15±0.45	——
Hct(%)	24.5±0.50	25.0±0.00	24.0±1.00	24.0±0.00	——
Hbc(ρ_B/g·L^{-1})	81.5±0.5	84.0±1.0	80.5±2.5	79.8±1.0	——
TCO_2(C_B/mmol·L^{-1})	11.65±0.55	9.65±0.25	7.60±0.10	6.50±0.68	——
O_2Sat(%)	70.25±2.00	82.50±2.00	93.60±1.90	98.40±1.50	——
O_2Ct(ψ_B/ml·L^{-1})	80.5±1.5	97.5±3.5	106.0±2.0	112.5±4.4	——

2.2　红细胞聚集及变形能力变化

Wright-Giemsa 染色后光镜观察发现, 与正常对照组相比, 经 UVA 照射的红细胞盘状结构有所减弱, 但膜皱折消失, 显示出明显的携氧改善形态, 见图 1。多聚赖氨酸粘附试验结果见图 2, 与对照组相比, 随 UVA 照射剂量的增加红细胞膜粘附力明显下降($P < 0.01$), 3 ~ 20 min 的 UVA 照射下, 粘附力下降了 40.63% ~ 68.80%, 间接说明适宜的光量子照射可使红细胞膜表面负电荷增加, 细胞间的粘附性降低。

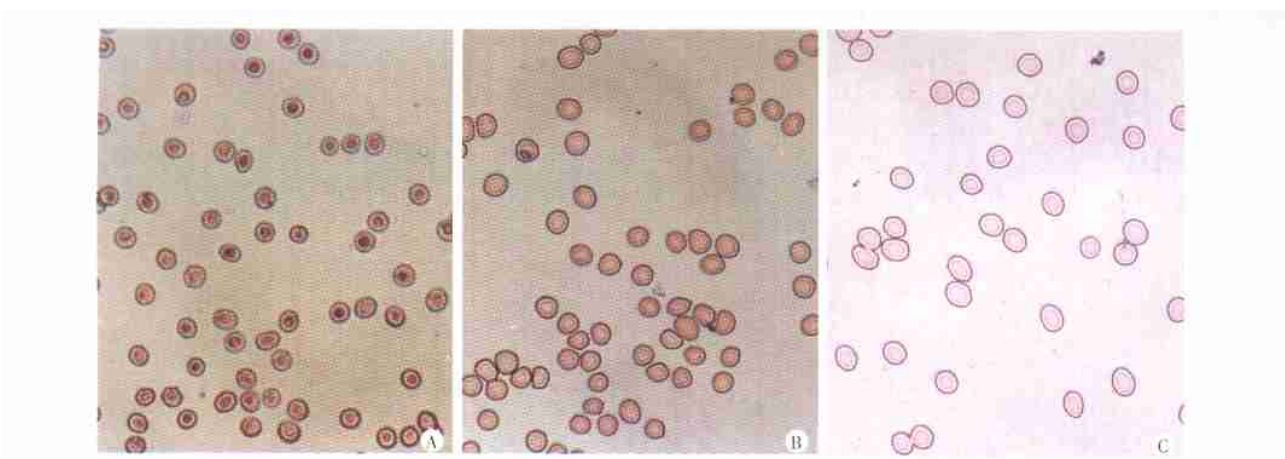


图 1　处理样品中红细胞形态的变化　(Wright-Giemsa× 200)

Fig 1　Morphological changes of erythrocyte in treated sample　(Wright-Giemsa× 200)

A: Control; B: Irradiated by UVA for 10 min; C: Irradiated by UVA for 20 min

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

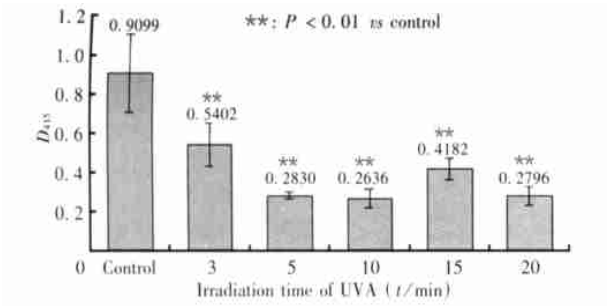


图 2 红细胞膜粘附力的变化

Fig 2 Changes of erythrocyte adhesiveness

微管吮吸试验结果见图 3, 随 UVA 照射剂量的增加, 红细胞的弹性模量 μ 逐渐减小, 照射 3~20 min 时, μ 值明显低于对照组($P<0.01$), 但照射到 10 min 后, μ 值又逐渐增大, 25 min 时恢复至对照组水平。说明在试验的设定剂量下, UVA 照射处理可以增加红细胞膜的弹性, 红细胞变形能力有显著提高。

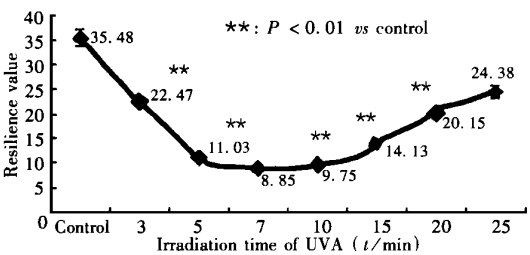


图 3 红细胞膜弹性模量变化

Fig 3 Changes of erythrocyte resilience

3 讨论

8-MOP 与 UVA 所致光化反应的主要作用靶是核酸, 但反应产生的阴离子氧(O_2^-)和单态氧($^1O_2$)自由基非常活跃, 可与反应体系内的蛋白、脂质等生物活性分子的基团反应, 导致一系列生物效应及一定的氧化损伤效应[6]。这种非特异的损伤对血液主要成分的影响将限制光敏化学方法的应用。

由于我们将 TFO 技术与光敏化学反应相结合, 使设定灭活病毒条件的 8-MOP 浓度和 UVA 照射剂量均大大降低, 而且, 由于在被处理血液中加入了适当的抗氧化剂甘露醇, 使反应所致的非特异损伤显著减弱。从实验结果可见, 在试验所设计的 8-MOP 及 UVA 处理剂量下, 血液的氧含量、红细胞弹性及粘附性有明显的改善, 而代表内、外源凝血系统的各项凝血指标有一定变化, 表明相关成分存在一定的氧化损伤, 但其损伤程度维持在无病理意义范围。这些结果为 TFO 与 UVA 的联合效应的进一步研究提供了有利的依据。

实验结果显示, 处理血液的 RPA 出现明显降低, 从指标数字表面看, 其显示血小板聚集能力的下降。但我们认为这可能与该成分表面负电荷的增加有关, 而不是其质量的损伤所致结果, 因为血小板成分与红细胞膜成分相似, 其对理化因子的抗力一般强于红细胞。当然我们所设定的条件对血小板功能的影响还有待进一步试验观察加以证实。

由于光化学效应变化的复杂性, 以及相关的研究缺乏系统性, 光化学反应对生物细胞的作用效应还缺乏明确的描述, 有些研究结果还有争议。但研究者们普遍认为, 低剂量(0.1 J/cm^2)的光化作用有利于细胞的激活, 可使细胞膜弹力增加, 细胞运动力和免疫功能增强; 中等剂量(1.0 J/cm^2)的光化作用可降低细胞的生长速度和对抗原的反应性; 高剂量(大于 1.0 J/cm^2)的光化作用则引起细胞的严重损伤, 导致细胞的凋亡。如果损伤所致的突变严重, 将导致癌变发生[7~10]。我们的结果表明, 在 0.1 nmol/ml 的 8-MOP 和 1.0 J/cm^2 UVA 的处理条件下, 血液红细胞呈现的是一种激活现象, 有利于改善血液供氧及粘滞度。

(致谢: 本课题中的红细胞变形能力测定工作得到重庆大学生物工程研究院国家生物工程重点实验室吴泽志教授、秦建老师的指导和帮助, 特此感谢。)

参考文献:

[1] Barre F X, Giovannangeli C, Henlene C, *et al*. Covalent crosslinks introduced via a triple helix-forming oligonucleotide coupled to psoralen are inefficiently repaired[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(3): 743—749.

[2] Guieysse A L, Praseuth D, Giovannangeli C, *et al*. Psoralen adducts induced by triplex-forming oligonucleotides are refractory to repair in HeLa cells[J]. J Mol Biol, 2000, 296(2): 373—383.

[3] Belousov E S, Afonina I A, Kutyavin I V, *et al*. Triplex targeting of native gene in permeabilized intact cell: covalent modification of the gene for the chemokine receptor CCR5[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(5): 1 324—1 328.

[4] 吴泽志, 李志清, 龙 勉, 等. 烧伤大鼠粒细胞与内皮细胞粘附力学特性的研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1996, 13(3): 219—222.

[5] Ben-Hur E, Rywkin S, Rosenthal I, *et al*. Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocynaines: protection of red cells but not of vesicular stomatitis virus with a water-soluble analogue of vitamin E[J]. Transfusion, 1995, 35(5): 401—406.

[6] Ben-Hur E, Moor A C E, Margolis-Nunno H, *et al*. The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine[J]. Transfu Med Rev, 1996, 10(1): 15—22.

[7] 赵建斌, 崔 勤, 胡 毅, 等. PUVA 抗癌与诱发肿瘤细胞凋亡的观察[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(6): 496—498.

[8] Seité S, Moyal D, Verdier M P, *et al*. Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens[J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2000, 16(1): 3—9.

[9] Lindelof B. Risk of melanoma with psoralen/ultraviolet A therapy for psoriasis. Do the known risks now outweigh the benefits[J]? Drug Saf, 1999, 20(4): 289—297.

[10] Lindelof B, Sigurgeirsson B, Tegner E, *et al*. PUVA and cancer risk: the Swedish follow-up study[J]. Br J Dermatol, 1999, 141(1): 108—112.

(编辑 谢义霞)

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