

· 临床研究 ·

亚甲蓝血浆病毒灭活对凝血因子的影响

宋 敏¹, 赵树铭¹, 刘凤君¹, 郭 辉², 蒋天伦^{1△}

(第三军医大学西南医院, 1: 输血科; 2: 检验科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨亚甲蓝(MB)光化学法血浆病毒灭活对主要凝血因子活性的影响, 以及血浆病毒灭活后制备冷沉淀的可行性。方法 将 16 袋 400 mL 全血成分分得的新鲜血浆均分为两份, 分别归为实验组和对照组; 实验组加入 MB 进行病毒灭活, 对照组不加 MB 但仍然进行病毒灭活光照过滤, 检测各阶段标本凝血因子Ⅷ(FⅧ):C 及纤维蛋白原(Fib)。结果 实验组与对照组之间 FⅧ:C 及 Fib 差异有统计学意义($P < 0.05$), 经过病毒灭活后实验组血浆中 FⅧ及 Fib 损失较大且含量未达制备冷沉淀的理论要求。结论 血浆病毒灭活对血浆中 FⅧ及 Fib 均有较为显著的影响, 且其损耗主要来自 MB 光化学反应, 血浆病毒灭活后不宜用于制备冷沉淀。

关键词:病毒灭活; 纤维蛋白原; 凝血因子Ⅷ; 亚甲蓝; 冷沉淀

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)11-1092-02

The influence of methylene blue virus inactivation on coagulation factor in plasma

Song Min¹, Zhao Shuming¹, Liu Fengjun¹, Guo Hui², Jiang Tianlun^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion Branch; 2. Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of methylene blue photochemical plasma viral inactivation on the activity of main coagulation factors, and the feasibility that the preparation of cryoprecipitate with viral inactivation plasma. **Methods** 16 prepared plasma were equally split into two aliquots, namely experimental group and control group respectively. The plasma of experimental group was inactivated with methylene blue light treatment, and the plasma of control group was treated with light without methylene blue. FⅧ and Fib concentration of specimens were analyzed. **Results** The difference of FⅧ and Fib was significant between the two groups ($P < 0.05$). The loss of FⅧ and Fib in the experimental group plasma was too large to prepare the cryoprecipitate. **Conclusion** The effect of plasma viral inactivation on FⅧ and Fib was significant, and was mainly by the photochemical reaction of methylene blue. Virus inactivated plasma is not appropriate for the preparation of cryoprecipitate.

Key words: virus inactivation; Fib; Factor Ⅷ; methylene blue; cryoprecipitate

近年来,随着人们生活水平和医疗保障水平的不断提高,输血的安全性问题,越来越受到公众的重视和关注,虽然对献血员都进行了筛选,但是由于当前科技水平的限制,检测方法较为局限,存在病毒标记物检测技术的局限性、窗口期、试剂敏感性、检测病毒种类的局限性等^[1],血液输注仍无法达到“零风险”。由于有些病毒颗粒片段存在于血浆中^[2],输注血浆传播某些传染病的可能性高于全血,故对血浆进行病毒灭活是当前提高输血安全性的重要措施。目前已有的血浆病毒灭活方法很多^[3],但对于单袋血浆病毒灭活最常用的是亚甲蓝(MB)光化学法血浆病毒灭活^[4-5],该方法现已在我国多家血站实行。据报道,MB 光化学血浆病毒灭活方法几乎可以灭活所有细胞外的含脂膜病毒,如可经血液传播的艾滋病毒(HIV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV)等^[6],但对于细胞内的病毒不具灭活作用,因此,在采用该方法进行血浆病毒灭活的同时,还需滤除血液中的白细胞^[7]。但是,如果经过病毒灭活处理后,虽然杀灭或去除了可能存在的病毒,但却对其中的有效血液成分的活性和(或)活力造成严重损伤,那就失去了病毒灭活的意义。尤其是现已证明冷沉淀是所有血液成分中病毒含量最高的^[2],用病毒灭活血浆制备冷沉淀就显得尤为重要了。基于此,本研究对冷沉淀的主要有效成分且对病毒灭活较为敏感的凝血因子Ⅷ(FⅧ)及纤维蛋白原(Fib)进行了如下实验研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 日本蓝桥血凝仪(Sysmex CA-7000),淄博中保康医用病毒灭活柜(ZBK-YBM-01),BECKMAN 低温离心机(Jb-MC Centrifuge),SANYO 速冻冰箱(CFC-free 型),四联采血袋(南京赛尔金),含有 MB 添加元件的病毒灭活柜配套一次性病毒灭活血袋(淄博中保康),Fib 检测试剂(德国 Marburg Lot:537511),FⅧ:C(FⅧ活性)检测试剂(德国 Marburg Lot:500881B)。

1.2 标本来源 均来自本血站街头无偿献血血液标本。随机抽取 16 袋 400 mL 全血,于 6 h 内进行血液成分分离。将所得血浆充分混匀后无菌等量分装于两个相同空血袋内,热合封口后分别归为实验组和对照组。同时留取血浆小辫子一份,做好标记用于检测 FⅧ及 Fib。整个操作过程严格按照标准操作规程(SOP)文件(根据《血站质量管理规范》制定)要求进行。

1.3 血浆病毒灭活处理 采用一次性病毒灭活血袋对血浆进行病毒灭活处理主要有两个步骤:光照及过滤。作者通过无菌操作将两组血浆与一次性血浆病毒灭活专用血袋相连,其中实验组血浆中加入 MB(浓度 1 μmol/L),对照组血浆中不加入 MB,两组血浆同时放入病毒灭活辐照箱内进行光照处理(光照强度 25 000~30 000 lux,温度 5~10 ℃,摆动频率 60 次/分钟条件下作用 30 min),光照后分别留取血浆小辫子一份,做好标记用于检测 FⅧ及 Fib;按要求过滤后再分别留取血浆小辫子

△ 通讯作者, E-mail: jtl@tmmu.edu.cn.

一份,做好标记备检。将三组备检小辫子立即放于 -50°C 冰箱速冻。整个操作过程严格按照 SOP 文件(根据《血站质量管理规范》制定)要求进行。

1.4 凝血因子检测 3 d 后,于 -50°C 冰箱取出三组小辫子, 37°C 水浴箱中复溶后,立即检测 FⅧ及 Fib。Sysmex CA-7000 血凝仪检测原理为免疫比浊法。检测过程严格按照凝血因子检测操作规程进行。

1.5 统计学处理 结果在 SPSS11.0 统计学软件上进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

实验组与对照组 FⅧ:C 及 Fib 浓度病毒灭活处理前后、光照前后变化差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、2,两组过滤前后比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 1 两组血浆病毒灭活处理前后凝血因子减少值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FⅧ:C(%)	Fib(g/L)
对照组	16	4.54±7.58	0.05±0.069
实验组	16	32.81±10.47	1.06±0.260

表 2 两组血浆光照前后凝血因子减少值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FⅧ:C(%)	Fib(g/L)
对照组	16	4.27±8.22	0.01±0.066
实验组	16	32.63±11.37	0.95±0.290

表 3 两组血浆过滤前后凝血因子减少值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FⅧ:C(%)	Fib(g/L)
对照组	16	0.27±4.83	0.04±0.029
实验组	16	0.18±6.36	0.11±0.280

3 讨 论

MB 光化学法血浆病毒灭活技术已相当成熟,该方法进行血浆病毒灭活操作简便,且能灭活几乎所有有包膜病毒^[8],但是,关于用 MB 光化学法病毒灭活后的血浆能否用于制备符合质量要求的冷沉淀尚有争议^[9-12]。本实验中将同一人份血浆均分为两份,分别进行加入 MB 与未加 MB 光照处理,观察 MB 光化学法血浆病毒灭活对冷沉淀中较为重要且较敏感的凝血因子的影响,实验结果显示,MB 光化学法血浆病毒灭活对 FⅧ及 Fib 均有较大程度上的影响。加入 MB 的实验组血浆经病毒灭活后,FⅧ:C 平均损失率达 40.5%,Fib 平均损失率达 47.6%,与未加入 MB 的对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时由三组数据对比可看出,病毒灭活过程中 FⅧ:C 及 Fib 的损耗主要来源于 MB 光化学反应,而单纯光照处理影响不大,且实验组和对照组过滤前后 FⅧ:C 及 Fib 浓度的损失率相比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验中,考虑到冷沉淀制备过程中人为因素影响较大,如冷沉淀中血浆保留量的影响等,未直接跟踪检测在制备为冷沉淀以后凝血因子的水平,而是留取检测标本后均按照冷沉淀原料血浆保存过程处理:三组小辫子标本留取后立即放于 -50°C 冰箱速冻,待 3 d 以后于 37°C 水浴箱中复溶待检,故本实验可以对制备成冷沉淀后质量进行预测。由于通过常规标准操作制备冷沉淀时,凝血因子也还会有一定的损失,故由实验结果可看出病毒灭活血浆制备为冷沉淀后凝血因子活性不符合质量要求标准。因

此,在血液成分制备中,可考虑先将新鲜冰冻血浆制备成冷沉淀后再将血浆进行病毒灭活。

目前输血安全性已获得显著提高,总体上血液已非常安全,但是由于病毒窗口期以及检测试剂灵敏度等问题,仍然存在输血传播艾滋病和肝炎等传染病的危险。据报道美国 90% 以上输血传播 HIV 和 HBV 以及 75% 以上输血传播 HCV 的危险均来自窗口期感染献血^[13]。我国血站主要采用 ELISA (酶联免疫吸附试验)方法对血液中 HBV, HCV 及 HIV 等进行检测,该法试剂灵敏度差异较大且窗口期较长^[14],而据报道即便是用灵敏度较高的核酸检测也只能将 HIV 检测窗口期由 22 d 缩短到 12 d, HCV 检测窗口期由 70 d 缩短到 14 d^[15]。另外尚有很多未被认识或一时难以找到有效检测手段的病毒存在经输血传播给受血者的危险。因此,对血液成分进行病毒灭活处理,是从根本上控制或杜绝经输血途径传播疾病的重要措施。现在都提倡成分输血,对于所有血液成分中病毒含量最高、输注危险性最大的冷沉淀,则更应进行病毒灭活处理后用于临床。但是我国目前推广使用的 MB 光化学法血浆病毒灭活对血浆中一些有效成分,尤其是凝血因子影响较大,病毒灭活后血浆不适合用于制备冷沉淀,因此,还有待努力寻找一种更安全可靠的病毒灭活技术,以更大幅度地提高输血安全性。

参考文献:

- [1] 江朝富. 临床输血风险及对策[J]. 实用医学杂志, 2003, 19(3): 226-228.
- [2] 黎劲. 去白细胞输血的临床应用[J]. 右江民族医学院学报, 2007, 29(1): 97-98.
- [3] 李忠平. 临床输用血浆病毒灭活的研究进展[J]. 国外医学输血及血液学分册, 2001, 24(2): 157-159.
- [4] 宋玉和. 血液成分病毒灭活与安全输血[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2007, 4(1): 77-78.
- [5] 沈莉, 李建民, 梁晓虎, 等. 亚甲蓝/光化学病毒灭活法对血浆蛋白浓度及凝血因子活性的影响[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(6): 474-475.
- [6] Abe H, Yamada-Ohnishi Y, Hirayama J, et al. Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system[J]. Transfusion (Paris), 2000, 40(9): 1081-1087.
- [7] Jeff RM. A new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(6): 945-955.
- [8] 王敦成, 卜凤荣, 许金波, 等. 亚甲蓝/光化学法灭活血浆中指示病毒及对血浆成分影响的初步研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2000, 14(1): 52-55.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18469-2001 全血成分及血质量要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [10] 王飞, 路志浩, 古醒辉, 等. 亚甲蓝光化学法血浆病毒灭活前后血浆成分的变化[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(2): 97-100.
- [11] 王飞, 卢舜华, 叶小演, 等. 血浆病毒灭活后质量回顾性分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(15): 2043-2044.
- [12] 齐村生, 任会莹, 曾凤琴. 病毒灭活新鲜冰冻血浆的质控指标初探[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(3): 253-254.
- [13] Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, et (下转第 1102 页)

模型。传统的心肌梗死模型通过开胸结扎冠状动脉完成,该方法破坏胸腔的正常解剖结构,对心肺功能影响大;同时手术造成损伤和炎症对动物的创伤大,不利于术后恢复。而利用介入方法行球囊封堵冠状动脉建立猪闭胸式心肌梗死模型,对动物机体的生理状态干扰降到最小,并可最大程度地模拟临床心肌梗死发生。因该方法有影像学的支持,使球囊封堵冠状动脉的位置相对固定,从而使心肌梗死的面积相对稳定;同时实验中可通过控制球囊的放气-充气,实现对心肌缺血和再灌注时间的准确控制^[16]。

研究结果显示,再灌注 72 h,采用 TUNEL 法检测心肌梗死后各区的凋亡细胞,假手术组未发生心肌细胞凋亡,而缺血再灌注组心肌梗死区、边缘区及非梗死区均有细胞凋亡发生,提示细胞凋亡参与心肌缺血再灌注损伤。通过 TUNEL 阳性细胞 AI 的检测,细胞凋亡主要出现在坏死中心区域和低灌注梗死边缘区,这与其他文献报道的研究结果一致^[11,14,17]。

细胞凋亡是一种细胞主动的死亡过程,在整个过程中牵涉到一系列相关基因的表达,其中 Bcl-2 基因家族是目前较为公认与凋亡密切相关的基因,研究表明,Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中具有代表性的抗凋亡和促凋亡蛋白^[18]。本研究采用免疫组织化学法检测猪不同心肌梗死区域中 Bcl-2 家族中 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。实验中采用高清晰度彩色病理图文分析系统,用阳性单位定量表达免疫组织化学阳性反应的程度。结果表明,缺血再灌注损伤可使心肌梗死区、边缘区及非梗死区中凋亡相关基因 Bax 的蛋白表达及 Bax/Bcl-2 增加,与相应区域心肌细胞凋亡增多的结果一致,但缺血再灌注梗死边缘区及非梗死区的 Bcl-2 蛋白表达也增加值得进一步研究。同时,缺血再灌注组心肌梗死区及边缘区的 Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值较非梗死区增加,与细胞凋亡主要分布在心梗死区及边缘区的结果一致。

本文对猪不同心肌梗死区域细胞凋亡的分布和凋亡密切相关 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化进行了探讨和分析,结果表明细胞凋亡参与心肌缺血再灌注损伤,细胞凋亡主要出现在坏死中心区域和低灌注梗死边缘区,对心肌再灌注损伤的发生机制进行了有益的探索,抑制心肌细胞凋亡可能是心肌保护作用的有效途径。

参考文献:

- [1] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2001, 6(4): 279-290.
- [2] Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction[J]. *Ann Med*, 2002, 34(6): 470-479.
- [3] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling[J]. *J Cell Physiol*, 2002, 193(2): 145-153.
- [4] Veinot JP, Gattinetti DA, Fliss A, et al. Early apoptosis

in human myocardial infarcts[J]. *Hum Pathol*, 1997, 28(4): 485-492.

- [5] Dispersyn GD, Borgers M. Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival[J]. *News Physiol Sci*, 2001, 16: 41-47.
- [6] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(6): H2726-H2731.
- [7] Zhang HF, Fan Q, Qian XX, et al. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium rabbits with acute myocardia ischemia and reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 777-783.
- [8] Sun HM, Guo T, Liu T, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after acute myocardial infarction in pigs[J]. *Heart Surgery Forum*, 2010, 13(5): E305-E310.
- [9] 孙海梅, 郭涛. 缺血后处理心肌保护作用的基础与临床研究[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(6): 1111-1113.
- [10] Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist[J]. *Circulation*, 2002, 105(20): 2332-2336.
- [11] Girm HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, et al. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2007, 41(4): 277-293.
- [12] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对缩小猪急性心肌梗死面积的作用观察[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5): 522-523.
- [13] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对猪心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3): 384-386.
- [14] Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death[J]. *Cardio vasc Res*, 2000, 45(3): 651-660.
- [15] Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(2): 197-208.
- [16] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 以球囊封堵法建立猪心肌梗死模型的可行性研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(46): 9032-9036.
- [17] Blagosklonny MV. Spotlight on apoptosis. Introduction [J]. *Leukemia*, 2000, 14(8): 1500-1501.
- [18] Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, et al. Hypoxia and acidosis activate cardiomyocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(29): 12825-12830.

(收稿日期: 2011-11-08 修回日期: 2011-12-09)

(上接第 1093 页)

al. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the interorganizational task force on nucleic acid amplification testing of blood donors[J]. *Transfusion (Paris)*, 2000, 40(2): 143-159.

- [14] Shan H, Wang JX, Ren FR, et al. Blood banking in China

[J]. *Lancet*, 2002, 360(9347): 1770-1775.

- [15] Chamberland ME, Alter HJ, Busch MP, et al. Emerging infectious disease issues in blood safety[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3 Suppl): 552-553.

(收稿日期: 2011-11-27 修回日期: 2011-12-25)