

γ 射线和紫外线应用于血液制剂中病原体和白细胞的灭活*

周炜鑫, 郭天虹 综述, 黄远帅[△] 审校

(西南医科大学附属医院输血科, 四川泸州 646000)

[关键词] γ 射线; 紫外线; 白细胞; 血传病原体; 灭活

[中图分类号] R457

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)28-4005-03

据 2015 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报道,全球每年采集的献血量约为 1.08 亿单位。通常,从献血员的全血中可以分离出红细胞、血小板和血浆等成分。红细胞可以用于大量失血的患者,挽救其生命;血小板可以用于各种原因引起的小血小板减少的患者;血浆里的凝血因子和血浆衍生蛋白质可以用作血友病和先天免疫缺陷患者的替代治疗;血浆里提取出来的免疫球蛋白通过静脉或者肌肉注射,适用于免疫缺陷综合征患者、药物或者免疫抑制引起的免疫功能失调、免疫紊乱导致的血液疾病及炎症反应,此外,还可以提供被动免疫及有效调节免疫缺陷患者的免疫应答,是现在广泛使用的生物制剂。由此可见,现代医学中,血液制剂的输注与患者息息相关,是不可或缺的支持疗法。本文就输血安全以及 γ 射线和紫外线在提高血液制剂安全性上的应用进行综述。

1 输注血液制剂可能会引起的不良后果

伴随着输血而来的弊端在于输血除了会引起发热、过敏等不良输血反应,还可能会引起疾病的传播。有报道称,患者在使用了血浆衍生物-纤维蛋白粘合剂后感染了人类微小病毒 B19^[1]。而且血液本身的一些成分也会引起一些不良后果,例如当受血者输注了含有残留的献血员白细胞的血液制剂后,会引起免疫相关的严重后果,包括非溶血性的发热反应、人类白细胞抗原(HLA)同种异体免疫反应、输血相关的移植物抗宿主疾病(transfusion-associated graft-versus-host disease, TA-GVHD)等^[2]。血小板相关的细胞因子和白细胞相关的炎症因子 IL-6、IL-8 和 TNF 等则会引起非溶血性发热反应和过敏反应。而血小板相关的细胞因子是主要原因,因为在用白细胞过滤器去除白细胞后,可以减少非溶血性发热反应的发生但并不能消除,而过敏反应却无变化^[3]。因此,血液制剂的安全一直受到医务人员和患者的高度重视。

随着监管力量的日益增强以及不断出现的先进的筛选技术,大大降低了输血引起的疾病传播,比如病原体减少技术(pathogen reduction technology, PRT)可以减少输血引起的疾病传播,提高血液安全性,同时保证血液制剂结构和功能的完整性^[4]。然而,尽管病毒检测技术的不断提高,仍然不能避免输血引起的窗口期疾病传播,故输血仍然存在风险。对于会引起不良后果的白细胞,有研究表明,25 Gy 的 γ 辐照足以阻止 T 淋巴细胞的增殖,可以预防免疫功能低下的患者发生 TA-GVHD^[5];白细胞滤过减少器处理的血液制剂要求每个输注单位残余的白细胞数低于 5×10^6 (美国)和 1×10^6 (欧盟),这 2 种方法处理血液制剂都可以减少但不能消除以上白细胞引起的相关不良免疫反应。故为了能进一步提高血液制剂的安全

性,需要更多更有效的方法应用于去除血液制剂中的包括病原体、白细胞等给受血者带来不良反应的物质。

2 需要保障血液制剂的安全性

能够提高血液制剂安全性的理想方法应该具备以下特点^[6]:(1)可以灭活所有有包膜和无包膜的病毒;(2)对产品的生物活性无不良反应,最小程度地减少生物制剂的成分丢失;(3)在适宜的条件下稳定可靠,适用于大批量血浆制剂的流水线灭活;(4)不能添加一些后续步骤中必须去除的物质;(5)应当经济安全,可以广泛应用;(6)灭活步骤最好在血液制剂保存的最终容器里进行;(7)该方法对产品没有毒理学作用。目前,常用于灭活病原体和白细胞的方法有 γ 射线辐照、紫外线照射、白细胞过滤器过滤、碘液灭菌等,在灭活病原体或者白细胞上各有优缺点。碘酒可用于灭活几乎所有类型的病原微生物,包括细菌、病毒、寄生虫等,是一种运用至今的消毒灭菌方法,可灭活血清、血浆或者血浆蛋白中有包膜和无包膜的病毒。但目前应用最广泛的是 γ 射线和紫外线照射。

2.1 γ 射线辐照对病原体和血液成分的影响

γ 射线是一种电磁波,是原子核能级跃迁蜕变时释放出的射线,因此很小的剂量能通过相互作用拥有强大的穿透力。γ 射线可以通过二次反应产生自由基和活性氧来最大限度地灭活病原体。近半个世纪以前,就有学者报道 γ 射线能通过电离作用消除病原体核酸的活性和传染性^[7];肖洁等^[8] 研究报道 20~40 Gy 的¹³⁷Csγ 射线能够有效灭活单采血小板里的铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和表皮葡萄球菌而不影响血小板的质量;Miecka 等^[6] 报道称,45 Gy 的 γ 射线的剂量几乎可以灭活所有包括无包膜病毒在内的血源性传播病毒。γ 射线灭活病毒主要与剂量,病毒核酸大小及病毒的种类相关^[9]。通常 γ 射线灭活细菌需要的剂量是 20~25 Gy,而灭活病毒的剂量更大。尽管病毒的核酸大小远远小于细菌,但灭活病原体所需的 γ 射线的剂量与病原体的核酸体积大小成反比。因此,γ 射线辐照常用于医疗设备、药品、食品、培养专用血清等的消毒灭菌。与此同时,γ 射线还能够降低白细胞的活性,γ 射线辐照处理血液制剂灭活白细胞来预防 TA-GVHD 已经有 40 年^[10]。

然而商业性的治疗型生物制剂并未把 γ 射线辐照作为灭活病毒的常用方法,因为 45~50 Gy 的剂量在灭活病毒的同时也可能破坏生物制剂的活性,比如血浆相关蛋白等。有研究表明 γ 射线破坏蛋白质有 2 个机制:(1)可以直接作用于目标蛋白的共价键,通过光子聚集的能量来破坏这个蛋白分子;(2)间接与水分子作用产生自由基和活性氧来破坏 99.9% 的蛋白质^[11]。间接作用包括:在有氧条件下,γ 射线作用于水溶液会

* 基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(120336);西南医科大学附属医院自然科学基金项目(15048)。 作者简介:周炜鑫(1990—),在读硕士,主要从事自体输血、输血安全研究。 △ 通讯作者, Tel:15808307577; E-mail:hys@live.cn。

产生水合电子、氢原子、过氧化氢及最具杀伤力的羟基自由基等,均可导致蛋白质发生物理和化学方面的改变,比如蛋白质侧链氧化、蛋白链分离和破碎、交联、解链、形成新的反应基团,包括疏水性氨基、酰基残基氧化形成的羟基和过氧化氢衍生物,蛋白质羧基化产物,二聚酪氨酸等许多新的基团。这一系列反应破坏了蛋白质的完整性,导致蛋白质丧失了生物活性^[12]。

尽管理论上如此,但在实践过程中有学者发现,在某些条件下,杀病毒剂量的 γ 射线并没有对相关蛋白产生明显的影响。在 Tran 等^[13]的研究中,对于用杀病毒剂量(45 Gy)的 γ 射线辐照静脉注射的免疫球蛋白(intravenous immunoglobulins, IVIG)后,发现其 Fab 和 Fc 段的结构域保持辐照前的完整性,故推荐使用 γ 射线来处理 IVIG 提高其安全性。Smeltzer 等^[14]用不同剂量 γ 射线对 IgG 进行照射,通过 SDS-PAGE、HPLC、ELISA 等方法来检测 IgG 的抗原结合能力和 Fc 段结合能力,以此来探究 γ 射线对 IgG 结构和功能的影响。结果显示,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,杀病毒剂量 50 Gy 射线的照射下,免疫球蛋白多肽链的完整性和二级结构不被破坏,三级结构构象发生了变化但不足以影响免疫球蛋白功能活性,并且对最重要的结构区域的构象完整性无影响,因为对比辐照和未辐照的 IVIG 的熵值大小接近,故证明在辐照下蛋白质并未发生明显的内部反应。所以,尽管 γ 射线对蛋白质分子的热稳定性产生了轻微的影响,但是并没有改变 IgG 的本质。进一步研究还发现, γ 射线对 IgG 完整性的影响小于 pH 的变化对 IgG 完整性的影响。Grieb 等^[15]研究发现,porcine parvo-virus(PPV)是最耐受 γ 辐照的无包膜病毒,用 45 Gy 的剂量辐照混入 PPV 病毒的单克隆抗体,当抗坏血酸钠和自由基清除剂加入后或者将单克隆抗体冻干后辐照,都可以使 PPV 数量减少 1×10^5 个,并且保护单克隆抗体的功能活性和主要结构的完整性。当剂量增加至 50 Gy 时,可以灭活 1×10^{10} 个的 PPV,而单克隆抗体跟抗原结合的活性可以得到超出 97% 的恢复。因此,他们认为,在杀病毒剂量的 γ 辐照过程中,加入抗氧化剂或者自由基清除剂,或者在冰冻固体状态下辐照可以很好地保护生物制剂有效成分的活性。

除了对血浆蛋白的影响, γ 射线对红细胞和凝血因子等也有一定的影响。 γ 射线会改变红细胞的形态、电解质浓度等。Xu 等^[16]研究了不同剂量的 γ 射线对红细胞超微结构的影响,以及辐照后红细胞储存不同时间下的电解质和 pH 的变化。结果显示随着剂量的增加,出现异常形态红细胞(棘形红细胞,退化红细胞等)的比例逐渐增加;辐照对 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 水平有影响,且对 K^+ 的影响最大,因为辐照可能会改变细胞的渗透压和膜通透性,随着剂量增大,电解质水平改变更加明显。而 pH 的下降与 γ 射线剂量和红细胞储存时间相关。Sarkar 等^[17]研究了 γ 射线与凝血因子之间的联系,他们用 30 Gy 剂量的 γ 射线辐照新鲜冰冻血浆后,通过检测 PT、APTT、TT、vWFAg、FII、FV、FVIII、FIX、FX、FXI、FXII、C 蛋白、S 蛋白、D-二聚体等的变化,探讨 γ 射线对新鲜冰冻血浆凝血和抗凝功能的影响。结果显示,30 Gy 的 γ 射线辐照后,缩短了 PT、APTT、TT,激活了 FIX、FX、FXI、FXII。但是这些变化都很微小,无重要的临床意义。而对抗凝系统(C 蛋白、S 蛋白活性)和纤溶系统也无影响。该研究结果与 Weisbach 等^[18]的研究相符。由此可见, γ 射线可以用于血浆及其血浆衍生蛋白制品和红细胞制剂的病原体和残留白细胞的灭活。

2.2 紫外线照射对病原体和血液成分的影响 近年来,有学

者提倡用紫外线来替代 γ 射线。因为与光化学、光动力学灭菌法相比较,紫外线具有明显的优势,它本身具有活性,不需要加入可能会封闭蛋白质以致产生有害免疫反应^[19]的光敏化合物,因此,也不需要去除光敏化合物及它的代谢产物。一般来讲,最常使用的是短波(UVB, 200~280 nm)和中波紫外线(UVB, 200~280 nm)。UVC 和 UVB 灭活病原体的原理在于,可以作用于病毒的核苷酸使之形成环丁烷嘧啶和嘧啶二聚体,从而阻止病毒核酸的复制延长,达到灭活病毒的作用^[20]。Mohr 等^[21]研究结果表明,通过比较 $1\text{ J}/\text{cm}^2$ UVC 和 $2\text{ J}/\text{cm}^2$ 的 UVB 照射对血浆功能的影响,得出 UVC 更加适合血浆的灭菌;DNA 病毒比 RNA 病毒、单链核酸病毒比双链核酸病毒对紫外线敏感。用 $1\text{ J}/\text{cm}^2$ UVC 照射含病毒[水疱性口炎病毒(VSV)、单纯疱疹病毒(SHV-1)、脑心肌炎病毒(EMCV)、猪细小病毒(PPV)和艾滋病病毒(HIV)等]的血浆后,除 HIV 以外,所有病毒都被灭活了,同时凝血因子和血浆蛋白的损失不超过 $10\%\sim 20\%$ 。Fast 等^[10]报道称,核黄素(维生素 B_2)联合紫外线辐照可以通过不可逆地改变核酸,来灭活大部分的病原体及抑制由白细胞引起的一系列诸如移植植物抗宿主反应,同种异体免疫等有害的免疫反应。此外,核黄素(维生素 B_2)联合紫外线辐照还可以减少有包膜和无包膜的病毒,以及与临床相关的污染菌^[4]。重要的是,这种方法处理新鲜冰冻血浆后对蛋白质和凝血因子Ⅷ的活性无影响^[22]。因此,紫外线照射可以用于血液制剂的病原体灭活。

2.3 γ 射线辐照和紫外线照射对白细胞功能的影响 此外, γ 射线和紫外线都可以作用于白细胞,减低它的活性,有学者对比研究了这两种方法对白细胞的不同影响。Fast 等^[10]研究了全血用核黄素(维生素 B_2)联合紫外线和单独用 γ 射线分别处理后,通过体内和体外实验来对比 2 种方法对白细胞活性和功能的影响。体外实验表明,核黄素(维生素 B_2)联合紫外线照射可以抑制同种免疫反应及让白细胞失去抗原提呈的能力;相反, γ 射线辐照不具有此作用。2 种方法都可以阻止淋巴细胞的增殖。 γ 射线辐照后分泌的细胞因子浓度(TNF- α 、IL-10、IL-6、IL-1 β 、IL-8)与未作处理组比较并未发现明显差异,而核黄素(维生素 B_2)联合紫外线处理后,可以影响细胞因子的合成从而使大部分的细胞因子(除 TNF- α 、IL-8 外)分泌减少。体内实验包括从核黄素(维生素 B_2)联合紫外线、 γ 射线(25 Gy)处理的血液和不作处理的血液分离出白细胞注射到小鼠体内,观察他们发生 GVHD 的发展情况,结果这 2 种方法处理过的白细胞输注后都未引起小鼠的 GVHD。因此,他们推荐用核黄素(维生素 B_2)联合紫外线照射来替代 γ 射线辐照处理血液来提高成本效益。Reddy 等^[23]作了一个体内体外实验,结果表明,核黄素(维生素 B_2)紫外线照射与 γ 辐照(25 Gy)相比,对于灭活白细胞预防 GVHD 的能力是相同的,但更加有效地减少细胞因子生成和同种免疫反应,该结果与 Fast 等^[10]的实验结果相符。最近, Pohler 等^[2]的研究也证实了 γ 射线辐照和紫外线这两种方法对于预防 GVHD 具有同样的效果,而在抑制 T 细胞增殖、细胞因子分泌和抗原提呈能力方面,紫外线优于 γ 射线辐照。因此紫外线照射作为替代 γ 射线辐照的一种方法,应用于灭活血液制剂中残留的白细胞来预防 GVHD。

3 展 望

由此可见, γ 射线和紫外线灭活病原体和白细胞的机制和影响都有不同之处。 γ 射线杀病原体有直接和间接作用,直接作用是射线与核酸的相互作用,导致核酸链的交联和断裂。间

接作用是与细胞内外的环境,如与水发生作用产生自由基、羟自由基和氢原子等^[24]。紫外线(254 nm)可以直接作用于核酸,导致嘧啶二聚体的产生,从而阻止核酸转录的延长。当加入核黄素后,在紫外光照射下,可以特异性地在核酸的鸟嘌呤碱基处对 DNA 造成损伤,从而使核酸骨架链断裂,灭活病原体^[25]。γ 射线和紫外线都可以灭活白细胞预防 GVHD,但在抑制 T 细胞增殖、细胞因子分泌和抗原提呈能力方面,紫外线优于 γ 射线辐照。不足之处在于,两种方法处理血液制剂可能会破坏生物制剂的有效成分。γ 射线与水分子作用产生自由基和活性氧破坏蛋白质,紫外线通过氧化芳香族氨基酸,打开肽链之间的二硫键来破坏蛋白质的结构。但对于 γ 射线,加入抗氧化剂或自由基清除剂,或者在冰冻固体状态下辐照可以很好地保护生物制剂的有效成分活性。总之,临床工作中,应当根据不同目的来选取不同的方法,同时不断创新改进现有方法,尽可能地保证血液制剂的质量。

参考文献

- [1] Hino M, Ishiko O, Honda KI, et al. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery[J]. *Br J Haematol*, 2000, 108(1): 194-195.
- [2] Pohler P, Müller M, Winkler C, et al. Pathogen reduction by ultraviolet C light effectively inactivates human white blood cells in platelet products[J]. *Transfusion*, 2015, 55(2): 337-347.
- [3] Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, et al. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to Universal prestorage leukoreduction [J]. *Transfusion*, 2004, 44(1): 16-24.
- [4] Goodrich RP, Doane S, Reddy HL. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products[J]. *Biologicals*, 2010, 38(1): 20-30.
- [5] Luban NL. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by inactivation of T cells in platelet components[J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(4 Suppl 11): S34-45.
- [6] Miekka SI, Busby TF, Reid B, et al. New methods for inactivation of lipid-enveloped and non-enveloped viruses [J]. *Haemophilia*, 1998, 4(4): 402-408.
- [7] Sullivan R, Fassolitis AC, Larkin EP, et al. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation[J]. *Appl Microbiol*, 1971, 22(1): 61-65.
- [8] 肖洁, 彭涛, 宋建, 等. ^{137}Cs γ 射线辐照杀灭机采血小板中细菌的研究[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(9): 913-916.
- [9] Nims RW, Gauvin G, Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes—a review[J]. *Biologicals*, 2011, 39(6): 370-377.
- [10] Fast LD, Nevola M, Tavares J, et al. Treatment of whole blood with riboflavin plus ultraviolet light, an alternative to gamma irradiation in the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease? [J]. *Transfusion*, 2013, 53(2): 373-381.
- [11] Kempner ES. Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules[J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90(10): 1637-1646.
- [12] Headlam HA, Davies MJ. Beta-scission of side-chain alkoxyl radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(11): 1171-1184.
- [13] Tran H, Marlowe K, Mckenney K, et al. Functional integrity of intravenous immunoglobulin following irradiation with a virucidal dose of gamma radiation[J]. *Biologicals*, 2004, 32(2): 94-104.
- [14] Smeltzer CC, Lukinova NI, Towcimak ND, et al. Effect of gamma irradiation on the structural stability and functional activity of plasma-derived IgG[J]. *Biologicals*, 2015, 43(4): 242-249.
- [15] Grieb T, Forng RY, Brown R, et al. Effective use of gamma irradiation for pathogen inactivation of monoclonal antibody preparations[J]. *Biologicals*, 2002, 30(3): 207-216.
- [16] Xu D, Peng M, Zhang Z, et al. Study of damage to red blood cells exposed to different doses of γ-ray irradiation [J]. *Blood Transfus*, 2012, 10(3): 321-330.
- [17] Sarkar RS, Philip J, Prathip Kumar BR, et al. Effect of gamma irradiation with 30 Gy on the coagulation system in leukoreduced fresh frozen plasma [J]. *Med J Armed Forces India*, 2013, 69(1): 37-40.
- [18] Weisbach V, Strobel J, Hahn B, et al. Effect of gamma irradiation with 30 Gy on the coagulation system in leukoreduced fresh-frozen plasma [J]. *Transfusion*, 2007, 47(9): 1658-1665.
- [19] Pelletier JP, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2006, 19(1): 205-242.
- [20] Douki T, Laporte G, Cadet J. Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(12): 3134-3142.
- [21] Mohr H, Gravemann U, Müller TH. Inactivation of pathogens in single units of therapeutic fresh plasma by irradiation with ultraviolet light [J]. *Transfusion*, 2009, 49(10): 2144-2151.
- [22] Stanojkovic Z, Antic A. Pathogen inactivation in fresh frozen plasma using riboflavin and ultraviolet light; effects on plasma proteins and coagulation factor VIII [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2011, 68(1): 51-56.
- [23] Reddy HL, Doane SK, Keil SD, et al. Development of a riboflavin and ultraviolet light-based device to treat whole blood [J]. *Transfusion*, 2013, 53 Suppl 1: S131-136.
- [24] Sommer R, Pribil W, Appelt S, et al. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation; a comparative approach [J]. *Water Res*, 2001, 35(13): 3109-3116.
- [25] 程珍珍, 张博, 钱开诚. 血细胞病原体灭活技术及其研究进展 [J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(5): 596-599.