

光照与核黄素浓度对核黄素光动力灭活病原体效果的研究

何缘圆^{1,2,3} 李彦玉⁴ 尹云弟^{2,3} 李玲^{2,3} 陈可洋¹ 刘忠^{1,2,3}

摘要 目的 探究不同光照时间条件下核黄素灭活病原体效果的影响。方法 采用含水疱性口炎病毒(VSV)血浆分4组,分别添加核黄素浓度致终浓度为50、100、150 $\mu\text{mol/L}$, 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照组。观察其在10、15、20、25 min的生长滴度,不进行光照的为对照组。用Reed-Muench法计算灭活前后培养后生长滴度,通过灭活后log减少因子评价不同浓度核黄素对灭活效果的影响。结果 在无光照的条件下添加核黄素无病原体灭活效果,随着光照时间从15 min增加到25 min,无核黄素组VSV灭活效果增加;当光照小于15 min时,50~150 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素VSV灭活效果差异无统计学意义;当光照时间为15~25 min时,添加核黄素后VSV灭活效果增强,但不同浓度核黄素组间差异无统计学意义。结论 在25 min内核黄素病原体灭活效果随光照时间的增加灭活效果越好,与核黄素浓度影响较小。

关键词 核黄素; UVA; 病原体灭活光化学法; VSV

中图分类号 R 33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0959-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.014

输血是现代医学治疗中不可或缺的手段,但是输血感染仍然时有发生,感染性风险由可通过输血传播的病原微生物构成,其中包括人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒等多种病毒以及大肠杆菌、金黄色葡萄菌、梅毒等细菌和原虫等。血液病原体灭活技术是最有希望能够进一步降低输血感

染风险的方法,是保障血液安全的最后一道屏障,但血液病原体灭活技术目前还不成熟,还需要进一步研究和发展。

核黄素光化学病原体灭活法作为一种新型高效的病原体灭活技术近年来得到广泛的关注。核黄素一般是指维生素B₂,是人体必需的营养物质。核黄素的安全性也已经得到了充分的肯定,它被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)归类为一般认为是安全的^[1],并与紫外线介导的活化一起用于新生儿黄疸的治疗^[2]。核黄素光化学法的原理是核黄素在受到紫外光或可见光激活,鸟苷碱基被氧化,通过电子转移对鸟嘌呤残基进行修饰,阻断核酸复制对核酸造成不可逆损伤^[3-4],从而实现抑制或破坏病原体复制的目的。Mirasol PRT系统对临床相关病原体有效和灭活白细胞^[5],而不显著损害产品的功效^[6]或导致产品损失^[7-8],同时也不需要后续的清除步骤。目前很少有文章报道血液病原体灭活研究中核黄素浓度与紫外光照联合作用效果,本文将探究不同光照时间与不同浓度核黄素对血浆水疱性口炎病毒(*vesicular stomatitis virus*, VSV)灭活效果的影响,为核黄素光化学法病原体灭活技术灭活条件的选择和灭活效果的优化提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 倒置光学显微镜购自日本尼康株式会社; ABO型血浆由四川德阳中心血站提供; 核黄素购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 生理盐水购自四川科伦药业股份有限公司。

1.2 实验用病毒与细胞 VSV(原代剂量15 ml由本所输血传播病原体研究中心馈赠); Vero E6(由本实验平台输血安全课题组传代保存)

1.3 实验方法

1.3.1 核黄素浓度配制 取生理盐水配制终浓度为500 $\mu\text{mol/L}$ 的核黄素生理盐水溶液,溶液避光保存。

1.3.2 病毒培养 取出VSV存管,水浴锅解冻。VSV复苏反复感染Vero E6细胞,连续传代,以增加病毒毒力; 收集病毒培养液,离心过滤后,放入

2023-03-23 接收

基金项目: 四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目(编号: 2020YFH0024); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号: 2018PT32016)

作者单位: ¹ 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫, 合肥 230032

² 中国医学科学院/北京协和医学院输血研究所, 成都 610052

³ 中国医学科学院输血不良反应研究重点实验室, 成都 610052

⁴ 太原市血液中心, 太原 030024

作者简介: 何缘圆, 女, 硕士研究生;

陈可洋, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: chenkeyang@ahmu.edu.cn;

刘忠, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: liuz@ibt.pumc.edu.cn

-80 °C 保存备用。使用前检测病毒原液滴度。

1.3.3 病原体灭活 本实验旨在评估水疱性口炎病毒 VSV 在不同核黄素浓度和不同紫外光照时间下灭活效果。实验准备需要提前培养好细胞,实验当天取出同血型血浆,将血浆混合病毒液后再加入不同工作浓度核黄素配制好后加入血袋,配制为 4 组核黄素浓度,每组核黄素终浓度为 50、100、150 μmol/L 以及空白对照组;使用 365 nm 紫外线灯各组照射时间为 10、15、20、25 min 及未进行光照的对照组;每组设置重复实验 6 次。病毒灭活后,在灭活实验后使用终点滴定法(1:10 连续稀释,每个稀释 8 个平行样品)分析样品。Vero E6 细胞与每个病毒样本一起培养,并在 37 °C 和 5% CO₂ 下培养 3~5 d。每天使用显微镜记录细胞病理学效应,并使用 Reed - Muench 法^[9] 计算病毒滴度。

1.4 统计学处理 结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来描述。采用多因素方差分析比较不同核黄素浓度和不同紫外光照剂量光照前后病原体生长量差异,采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析;P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光照时间对灭活效果的影响 当光照时间为 10 min 时,不添加核黄素组与添加核黄素组各组间差异有统计学意义(P < 0.001),添加核黄素浓度 50 μmol/L 组与 100 μmol/L 组组间差异无统计学意义

(P = 0.633) (图 1A); 当光照时间为 15 min 时,不添加核黄素组与添加核黄素组各组间差异有统计学意义(P < 0.001),添加核黄素组各组间差异无统计学意义,P 值分别为 0.859、0.128、0.174(图 1B); 当光照时间为 20 min 时,不添加核黄素组与添加核黄素组各组间差异有统计学意义(P < 0.001),添加核黄素组各组间差异无统计学意义,P 值分别为 0.076、0.110、0.361(图 1C); 当光照时间为 25 min 时,不添加核黄素组与添加核黄素组各组间差异有统计学意义(P < 0.001),添加核黄素组各组间差异均无统计学意义,P 值分别为 0.361、0.361、1.000(图 1D)。实验结果证明,在实验时间 25 min 内,当光照时间到 15 min 后增加光照时间对病原体灭活效果无影响。

2.2 核黄素对 VSV 灭活效果的影响 当不添加核黄素时,光照 10 min 与光照 20 min 和 25 min 组差异有统计学意义(图 2A); 当核黄素浓度为 50 μmol/L 时,只有光照 20 min 组和光照 25 min 组间差异无统计学意义(P = 0.235) (图 2B); 当核黄素浓度为 100 μmol/L 时,只有光照 20 min 组和光照 25 min 组间差异无统计学意义(P = 0.658) (图 2C); 当核黄素浓度为 150 μmol/L 时,只有光照 20 min 组和光照 25 min 组间差异无统计学意义(P = 0.474) (图 2D)。实验结果表明,当核黄素浓度超过 50 μmol/L 后,增加核黄素浓度对病原体灭活效果无影响。

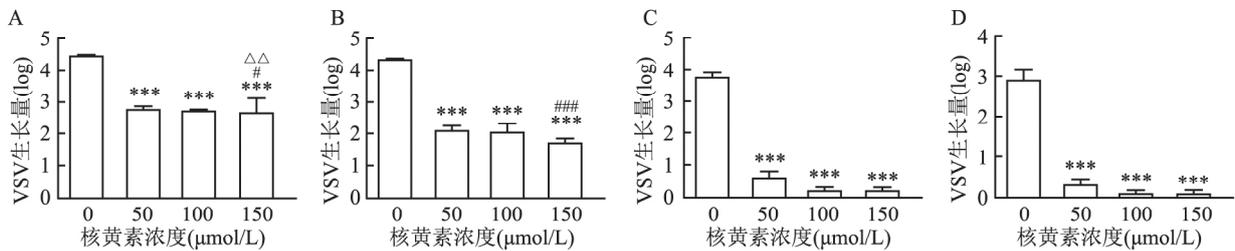


图 1 核黄素光化学法病原体灭活后 VSV 生长量

A - D: 光照时间分别为 10、15、20、25 min; 与对照组比较: *** P < 0.001; 与浓度 50 μmol/L 组比较: # P < 0.05, ### P < 0.001; 与浓度 100 μmol/L 组比较: △△ P < 0.01

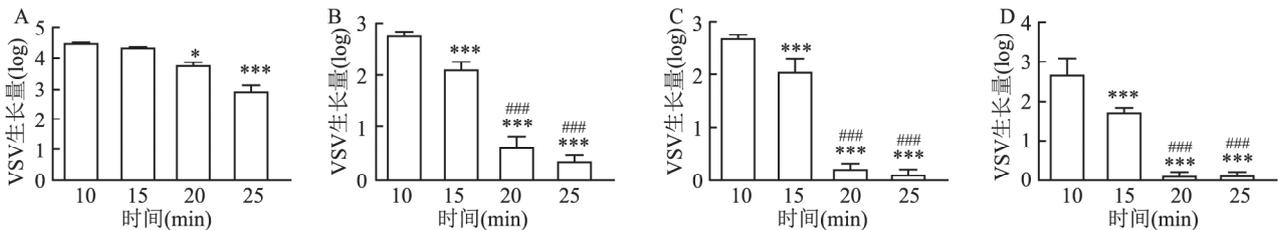


图 2 核黄素光化学法病原体灭活后 VSV 生长量

A: 不添加核黄素; B - D: 核黄素浓度分别为 50、100、150 μmol/L; 与 10 min 组比较: * P < 0.05, *** P < 0.001; 与 15 min 组比较: ### P < 0.001

2.3 光照时间与核黄素浓度相互作用对病原体灭活效果的影响 总结上述各实验结果可得出结论: 在 25 min 内, 光照时间越长, 效果越好, VSV 生长量越低。与核黄素浓度相比, 光照时间的增长比核黄素浓度的增加效果更明显。当核黄素浓度增加到 50 $\mu\text{mol/L}$ 后再增加核黄素浓度病原体灭活效果不会增强。见表 1 和图 3。

表 1 光照时间与核黄素浓度相互作用时
实验结果检出 VSV 生长量 log 数统计

作用时间 (min)	核黄素浓度($\mu\text{mol/L}$)			
	0	50	100	150
0	5.62 \pm 0.22	5.62 \pm 0.22	5.62 \pm 0.22	5.62 \pm 0.22
10	4.44 \pm 0.12	2.74 \pm 0.23	2.69 \pm 0.16	3.10 \pm 0.23
15	4.31 \pm 0.14	2.09 \pm 0.38	2.05 \pm 0.64	1.71 \pm 0.39
20	3.72 \pm 0.39	0.60 \pm 0.55	0.20 \pm 0.31	0.10 \pm 0.25
25	2.89 \pm 0.59	0.32 \pm 0.35	0.10 \pm 0.25	0.10 \pm 0.25

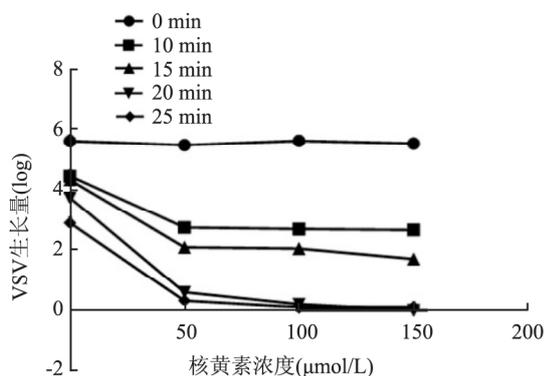


图 3 光照时间与核黄素浓度联合作用
灭活病原体后 VSV log 生长量

3 讨论

核黄素光化学病原体灭活技术在 20 世纪 60 年代被发现, 通过对这项技术的深入研究表明活性氧介导的非特异性氧化应激以及核黄素分子插入到微生物的 RNA 和 DNA 中会对微生物造成损伤^[10-12]。到目前为止, 在一些欧洲国家核黄素光化学法病原体灭活技术已被运用于临床^[13]。

在核黄素联合紫外光照光化学法灭活病原体的实验中, 紫外光照剂量增加可有效提高病原体的灭活效果, 当紫外光照的时间达到 20 min 以上时, 效果尤为明显。相比于紫外光照剂量增加带来的有效改变, 核黄素浓度的增加对于灭活效果有一定的提升, 但就不那么显著了。孔令魁等^[14]的早期核黄素紫外光照灭菌实验也证实核黄素浓度 12.5 ~ 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 灭活后细菌下, 降数与无核黄素的空

白对照比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但是随着核黄素浓度的增加灭菌效果趋于下降核黄素浓度 $> 75 \mu\text{mol/L}$ 后无灭菌效果 ($P > 0.05$)。

该实验表明, 核黄素与紫外光照两者联合对病原体的灭活是具有促进作用的, 且差异有统计学意义。该实验结果表明将紫外照射的剂量增加后, 紫外光照剂量引起的病原体生长量变化幅度要大于核黄素浓度变化引起的病原体生长量变化。这与 Makdoui et al^[15]在对观察紫外光 (UVA) 活化核黄素对角膜炎中常见的 3 种细菌的抗菌作用时结果基本一致。这可能是由于紫外线剂量的增加也有可能放大氧化应激产生的数量, 然而核黄素浓度的增加并不一定起到同样的作用。也许只需要少量的核黄素就可以达到所研究的效果, 过量的核黄素甚至可以阻止紫外线渗透到液体溶液的深层。同时受试病毒的代谢周期、代谢途径等也可能是影响氧化应激敏感性的因素之一。关于其他作用条件可能会给病原体灭活带来的影响以及其中的作用机制等还需要后续的实验继续深入探索。

该实验表明核黄素联合紫外光 A 对 VSV 灭活确实存在一定的疗效, 但也存在一定的局限性。本文只验证了核黄素浓度和紫外光 A 剂量的影响, 其他实验表明病原体的灭活也可能与其他因素有关, 例如不同的介质、温度、光照距离及其他机械因素。后续实验将进一步探索。

面对各种传染病的威胁, 警示了血库和输血医学领域迫切需要有更新的技术创新。由于核黄素光化学病原体灭活的优越性, 在保持处理后产品无需清除工作且高质量减少副反应的发生, Mirasol PRT 系统可能会被进一步展开研究, 其开发应用在未来也具有非常大的潜力。

参考文献

- [1] Moore T J, Morrow R L, Dormuth C R, et al. US Food and Drug administration safety advisories and reporting to the adverse event reporting system (FAERS) [J]. *Pharmaceut Med*, 2020, 34(2): 135-40.
- [2] Olsen J H, Hertz H, Kjaer S K, et al. Childhood leukemia following phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia (Denmark) [J]. *Cancer Causes Control*, 1996, 7(4): 411-4.
- [3] Mundt J M, Rouse L, Van den Bossche J, et al. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies [J]. *Photochem Photobiol*, 2014, 90(5): 957-64.
- [4] Yin Y, Li L, Gong L, et al. Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on pathogen reduction and platelets [J]. *Transfusion*, 2020, 60(11): 2647-54.

- [5] Fast L D , DiLeone G , Marschner S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation [J]. *Transfusion* , 2011 , 51(7) : 1397 - 404.
- [6] Johansson , P , Simonsen A , Brown P , et al. A pilot study to assess the hemostatic function of pathogen-reduced platelets in patients with thrombocytopenia [J]. *Transfusion* , 2013 , 53(9) : 2043 - 52.
- [7] Rebullà P , Vaglio S , Beccaria F , et al. Clinical effectiveness of platelets in additive solution treated with two commercial pathogen-reduction technologies [J]. *Transfusion* , 2017 , 57(5) : 1171 - 83.
- [8] Mirasol Clinical Evaluation Study Group. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with mirasol pathogen reduction technology [J]. *Transfusion* , 2010 , 50(11) : 2362 - 75.
- [9] Reed L J , Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. *Am J Epidemiol* , 1938 , 27(3) : 493 - 7.
- [10] Tsugita A , Okada Y , Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin [J]. *Bba-Mol Cell Res* , 1965 , 103(2) : 360 - 3.
- [11] Kumar V , Lockerbie O , Keil S , et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level [J]. *Photochem Photobiol* , 2004 , 80: 15 - 21.
- [12] Corbin F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer [J]. *Int J Hematol* , 2002: 253 - 7.
- [13] Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update [M]. *Transfus Med Hemoth* , 2014 , 41(4) : 309 - 25.
- [14] 孔令魁, 赵乙洁, 陈祖伟, 等. 核黄素结合紫外线照射病原体灭活实验条件的建立 [M]. *医学研究杂志* , 2008 , 37(7) : 55 - 8.
- [15] Makkoumi K , Bäckman A , Mortensen J , et al. Evaluation of anti-bacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA) [J]. *Graef Arch Clin Exp* , 2009 , 248(2) : 207 - 12.

Effect of light and riboflavin concentration on photodynamic inactivation of pathogens by riboflavin

He Yuanyuan^{1 2 3} , Li Yanyu⁴ , Yin Yundi^{2 3} , Li Lin^{2 3} , Chen Keyang¹ , Liu Zhong^{1 2 3}

(¹ School of Public Health , Health Inspection and Quarantine , Anhui Medical University , Hefei 230032;

² Institute of Blood Transfusion , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Chengdu 610052; ³ Key Laboratory of Transfusion Adverse Reactions , Chinese Academy of Medical Sciences ,

Chengdu 610052; ⁴ TaiYuan Blood Centre , Taiyuan 030024)

Abstract Objective To investigate the effect of riboflavin on inactivation of pathogens under different light time conditions. **Methods** Plasma containing *vesicular stomatitis virus* (VSV) was divided into 4 groups , and the final concentrations of riboflavin were 50 , 100 , 150 $\mu\text{mol/L}$ and 0 $\mu\text{mol/L}$ was used as the control group. The growth titers at 10 , 15 , 20 and 25 min were observed. The control group was treated with no light. The growth titers of VSV culture before and after inactivation were calculated by Reed-Muench method , and the effect of different concentrations of riboflavin on the inactivation effect was evaluated by log reduction factor after inactivation. **Results** Under the condition of no light , the addition of riboflavin had no pathogen inactivation effect. With the increase of light time from 15 min to 25 min , the inactivation effect of VSV in the non-riboflavin group increased. When the light was less than 15 min , there was no significant difference in the inactivation effect of 50 to 150 $\mu\text{mol/L}$ riboflavin VSV. When the light duration was 15 to 25 min , the inactivation effect of VSV was enhanced after the addition of riboflavin , but there was no difference between different concentrations of riboflavin groups. **Conclusion** The inactivation effect of riboflavin pathogen within 25 min is better with the increase of light time , and has little influence on riboflavin concentration.

Key words riboflavin; UVA; photochemical method of pathogen inactivation; VSV