

• 论 著 •

# 亚甲兰光化学法对红细胞膜损伤的研究

李秀娟<sup>△</sup>, 陈静静, 黄革玲

(福建省厦门市妇幼保健院检验科 361000)

**摘要:**目的 分析亚甲蓝(MB)对红细胞膜的损伤作用,探讨亚甲蓝光化学法(MBP)在红细胞制品病毒灭活方面的可行性。方法 以 MBP 处理红细胞悬液,光照度为 40 000 LUX,MB 浓度为 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ,在光照 0、20、40、60 min 后的不同时间点测定红细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶和 AchE 活性,并观察红细胞形态的变化及膜通透性的改变。结果 在红细胞制品灭活方面,MBP 还有缺陷,对红细胞膜的损伤较明显。随着照射时间的延长,红细胞的边缘出现了不规则、粘连,附着物也逐渐增多。红细胞的溶血度显著增大( $P < 0.05$ ),几乎呈线性。在照射过程中,膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶无明显下降( $P > 0.05$ )。膜 AchE 在 40 min 后下降速率增大,与对照组比,下降了大约 65%( $P < 0.05$ )。在照射 20 min 后渗透脆性也渐出现明显升高( $P < 0.05$ )。结论 MBP 对红细胞膜有损伤作用。

**关键词:**亚甲蓝; 红细胞膜; 研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)02-0181-02

## The Damaging Effect of Methylene Blue Photochemical Technique on RBC Membranes

Li Xiujuan<sup>△</sup>, Chen Jingjing, Huang Geling

(Department of Laboratory Medicine, Xiamen Municipal Maternal and Child-care Hospital, Fujian 361000, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of 5.0  $\mu\text{mol/L}$  methylene blue concentration that is subjected to irradiation intensity of 40 000 LUX within 0, 20, 40 and 60 minutes on the erythrocyte suspension using photochemical treatment method; and to observe the effects on structure and biological function of erythrocyte treated with methylene blue, and to determine the feasibility of applying methylene blue to RBC suspension. **Methods** Methylene blue concentration of 5.0  $\mu\text{mol/L}$  was added to erythrocyte suspension and was subjected to 40 000 LUX illuminance within 0, 20, 40, and 60 minutes. Erythrocyte membranes were then extracted to detect  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  activity, acetylcholinesterase (AchE) activity and to observe the variations of erythrocytes' shape and permeability. **Results** Methylene blue caused serious damage to erythrocyte membrane as suggested by the result of photochemical treatment made on erythrocyte suspension. As the irradiation time was prolonged, the structure of erythrocyte showed irregularities and accretions, as well as the increase of lesions. Hematocytolysis degree increased notably ( $P < 0.05$ ), nearly approaching linear.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  enzyme did not slow down notably ( $P > 0.05$ ) as the irradiation time was prolonged. AchE decreased significantly by 65% ( $P < 0.05$ ) after 40 minutes of irradiation time. Osmotic fragility dramatically increased after irradiating for 20 minutes ( $P < 0.05$ ), then significantly increased with longer irradiation time. **Conclusion** The damages to erythrocyte membranes induced by MB photochemical method were existed.

**Key words:** methylene blue; erythrocyte membrane; research

红细胞制品的病毒灭活,大多是通过加入光敏剂,如血卟啉衍生物、苯卟啉衍生物、部花菁 540、酞菁衍生物、酚噻嗪染料等。部花菁 540 主要作用于血液制品的包膜病毒,可以氧化损伤膜相关的酶<sup>[1]</sup>,需要稀释红细胞制品,减少血红蛋白的光吸收作用,以保证光照可以激活部花菁 540,而其灭活能力与激活水平密切相关<sup>[2]</sup>。酞菁衍生物对红细胞液层厚度有限制,其杀灭病毒的广度也需要试验证实。经光敏剂 S-303 处理的红细胞,其生命周期与对照红细胞没有差别<sup>[3]</sup>。国内外学者对亚甲蓝(MB)法灭活红细胞制品中病毒成分的研究已开展了多年<sup>[4-5]</sup>,发现 5.0  $\mu\text{mol/L}$  MB 浓度即可获得良好的病毒灭活效果。本研究选用 5.0  $\mu\text{mol/L}$  MB 浓度,观察随着灭活时间的延长,红细胞形态、渗透脆性、红细胞溶血度、膜 AchE、膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的变化,探讨红细胞膜的损伤程度,以评估 MB 对红细胞膜的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 新鲜红细胞悬液(福建省血液中心),亚甲蓝注射液(江苏济川), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶检测试剂盒、游离血红蛋白(FHb)测定试剂盒、蛋白测定试剂盒、乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

**1.2 主要仪器** JSM-6380LV 电镜(JEOL,日本)、UV-754 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、1-15K 型台式冷冻离心机(Sigma,美国)、高速冷冻离心机(Sigma,美国)。

**1.3 方法** (1)红细胞悬液的处理:制备含 5.0  $\mu\text{mol/L}$  MB 的红细胞悬液,在无菌、直径 10 cm 玻璃平皿中加入 20 mL 含 MB 红细胞悬液,在冰袋保持低温和轻微震荡条件下,用波长 600~700 nm 的荧光,光照度为 40 000 LUX,照射 20、40 和 60 min。未经光照处理的血液样本作为对照。(2)红细胞形态观察:用 5%戊二醛稀释、固定样本,点样上台,喷金,在电子扫描

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: lxj-0309@hotmail.com

显微镜下观察红细胞形态。(3)溶血度测定:对葛斌等<sup>[6]</sup>报道方法稍加改良。吸取待测红细胞悬液 100 μL 于洁净试管中,加 400 μL 生理盐水,37 °C 孵育 24 h,3 000 g 离心 6 min,取上清液 100 μL 用 FHB 试剂盒检测,于 510 nm 波长处比色。溶血度=(测试管 A-空白管 A)/(标准管 A-空白管 A)×100%。(4)红细胞渗透脆性测定:根据潘恩潭<sup>[7]</sup>介绍的方法测定经亚甲兰光化学法(MBP)处理的红细胞悬液及对对照品的红细胞渗透脆性(以每组刚开始溶血管的浓度为渗透脆性结果)。(5)红细胞膜蛋白浓度测定:根据李家增等<sup>[8]</sup>介绍的方法测定红细胞膜蛋白浓度。(6)红细胞 AChE 测定:按照试剂盒说明

书操作。

1.4 统计学处理 结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验对结果进行统计学处理。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

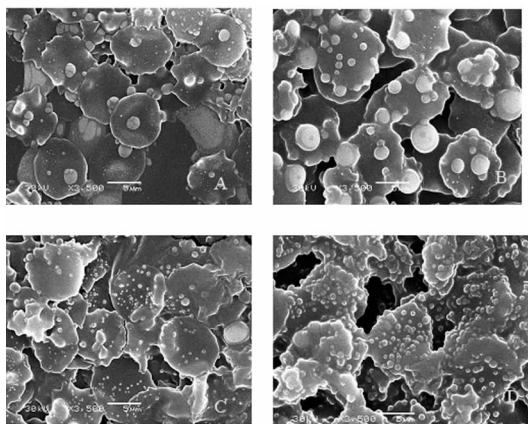
2.1 红细胞形态学变化 随着照射时间的延长,红细胞边缘逐渐不规则,部分出现膜粘连,且附着物逐渐增多。照射 60 min 后出现大片红细胞膜粘连。结果见图 1。

2.2 红细胞生物学功能影响 红细胞的各项生物学功能检测结果见表 1。

表 1 MBP 对红细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、AChE 活性、红细胞渗透脆性和溶血度的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

指标	对照组	20 min	40 min	60 min
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶活性(U/mg)	1.05±0.67	0.75±0.46	0.61±0.30	0.49±0.32
膜 AChE 活性(U/mg)	2.34±0.73	2.25±0.34	2.00±0.63	0.76±0.50*△
红细胞脆性(%)	0.47±0.02	0.48±0.02	0.52±0.03*▽	0.58±0.03*△
溶血度(%)	100.00±6.00	133.00±14.00*	158.00±20.00*▽	180.00±23.00*△

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与 20 min 组比较,▽ $P < 0.05$ ;与 40 min 组比较,△ $P < 0.05$ 。



注:A 为对照组,B 为照射 20 min,C 为照射 40 min,D 为照射 60 min。

图 1 处理不同时间的红细胞扫描电镜图片(×3500)

## 3 讨 论

红细胞膜约含脂类 40%、蛋白质 50%、碳水化合物 10%<sup>[9]</sup>,透射电镜观察红细胞膜呈暗-亮-暗区带。红细胞膜中层蛋白以 SDS-PAGE 可分为 7 条带区,主要为带 3 和血型糖蛋白<sup>[10]</sup>。影响红细胞膜稳定性的因素主要有能量代谢紊乱、离子通道功能失调、水外渗所致细胞脱水变形和红细胞膜遗传性缺陷等。红细胞是一类具有特殊生理功能的细胞,对外界物理、化学、生物因素的耐受性较低<sup>[5]</sup>。细胞膜隔开了细胞内外环境,是红细胞的重要结构,对外界变化敏感且迅速,因而膜损伤程度可间接反映细胞功能状态。

本研究结果显示,随着荧光照射时间的延长,红细胞边缘逐渐不规则,部分出现膜粘连,细胞外附着物也逐渐增多,说明红细胞表面负电荷下降,粘滞度上升,照射 60 min 后红细胞膜出现严重损伤。红细胞渗透脆性和溶血度也随荧光照射时间的延长而逐渐增大,提示红细胞对低渗氯化钠溶液抵抗力减小,脆性变大;溶血度反映红细胞膜通透性,随着时间的延长,溶血度增大,说明红细胞膜溶解或红细胞破坏增多。AChE 是

红细胞膜上的一种含巯基的酶,当细胞受到氧化损伤后,巯基相互交联,AChE 构像发生改变,可使酶活性下降。本研究中,AChE 活性下降为非匀速过程,推测红细胞经 MBP 处理后,只有在荧光照射时间较长的情况下才出现氧化损伤。红细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶是一种镶嵌在红细胞膜脂质双层中的蛋白质,具有水解 ATP 的活性,随着时间的变化,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性没有显著性变化。

研究表明 MBP 对红细胞膜有一定的损伤作用,但作用机制还不明确,一般从化学机制方面来解释,包括 I 型和 II 型反应<sup>[11-12]</sup>。红细胞膜中含有多价不饱和脂肪酸,易受自由基攻击而氧化产生脂类过氧化物,使蛋白质变性、酶失活,导致膜结构改变和功能受损<sup>[13]</sup>。本研究证实应用 MBP 灭活红细胞制品病毒成分过程中,红细胞膜也易受到损伤。

## 参考文献

- [1] Gaffney DK, Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells[J]. Cancer Res, 1990, 93(11): 7765-7769.
- [2] Lin HY, Chen CT, Huang CT. Use of Merocyanine 540 for Photodynamic Inactivation of Staphylococcus aureus Planktonic and Biofilm Cells[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(11): 6453-6458.
- [3] Rios JA, Hambleton J, Viele M, et al. Viability of red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment[J]. Transfusion, 2006, 46(10): 1778-1786.
- [4] Wagner SJ, Skripchenko O, Robinette D, et al. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue[J]. Transfusion, 1998, 38(3): 729-733.
- [5] 陆萍, 凌冰. 利用动物模型评估亚甲蓝光化学法红细胞病毒灭活效果[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(4): 38-40.
- [6] 葛斌, 陈立德, 张振明. 4-磺酸酯-2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧自由基对大鼠组织和红细胞的抗脂质过氧化作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(1): 47-50.
- [7] 潘恩潭. 血液学和血液学检验实验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 66-67.

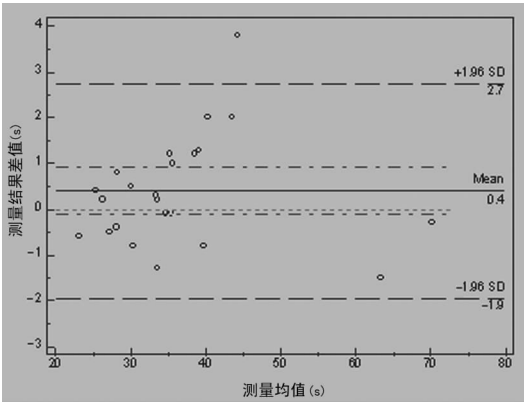


图 3 APTT

2.4 TT 检测 位于 95% 一致性界限外的点数有 1 个 (0.4%), 95% 一致性界限内最大差值为 1.4 s, 差值均值为 0.83 s, 相差幅度在临床上可接受, 见图 4。

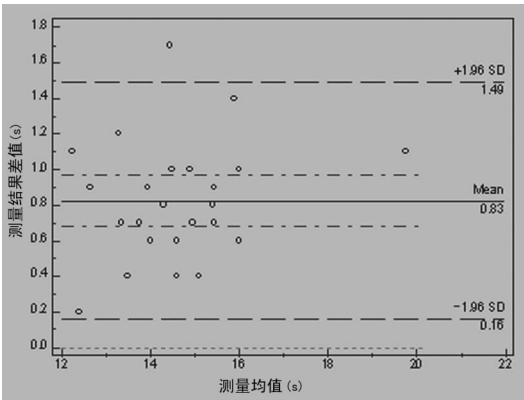


图 4 TT

### 3 讨论

在医学实验室中, 经常会对两种或多种检测方法的结果一致性进行分析。一般情况下, 其中一种方法是广泛应用或被称为“金标准”的方法, 而另一种方法则是更先进、更便于应用、更经济、无创或微创的方法。通过对两种测量方法进行一致性评价, 可以回答“两种方法能否互相替代”等类似问题。Bland-Altman 分析最初是由 Bland 和 Altman<sup>[1]</sup> 于 1986 年提出的, 其基本思想是计算出两种检测结果的一致性界限, 并以图形的方法直观反映该一致性界限, 最后结合临床实际, 得出两种检测方法是否具有一致性的结论。在进行两种方法的测定时, 通常是对同一批受试对象同时进行测量, 一般情况下不会获得完全相同的结果, 总是存在着有一定趋势的差异, 这种差异被称为偏倚。偏倚可以用两种方法检测结果差值的均数( $d$ )进行估计,

$d$  的变异情况则用差值的标准差( $SD$ )来描述。如果差值的分布服从正态分布, 则 95% 的差值应该位于  $(d \pm 1.96 SD)$  之间, 这一区间即为 95% 一致性界限, 95% 的差值都应位于该区间内。如果两种测量结果的差值位于 95% 一致性界限内, 在临床上是可以接受的, 提示两种方法具有较好的一致性, 可以互换使用。

本研究显示, ACL TOP 血凝仪应用两种不同比色杯检测 APTT、TT、FIB 和 PT, 结果的相差幅度在临床上均可接受; 同时, 由于比色杯是一次性耗材, 不必担心其对仪器寿命的影响, 因此国产比色杯完全可以取代原装配套产品。

对于本研究获得的数据, 也可进行相关分析和  $t$  检验。但相关分析回答的是“两种测量方法结果间密切程度如何”的问题<sup>[2-3]</sup>, 配对  $t$  检验回答的是“两种测量结果的平均差值是否等于 0”的问题<sup>[4-6]</sup>, 不能代替 Bland-Altman 一致性分析<sup>[7-10]</sup>。对于比对问题也可依据美国国家临床实验室标准化委员会颁布的《用患者样本进行方法学对比及偏差评估 EP9-A 指南文件》对结果进行方法比对及偏差评估, 但费时费力, 且难以掌握。因此笔者认为 Bland-Altman 分析是解决临床上连续数值变量比对问题的有效手段。

### 参考文献

- [1] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement[J]. Lancet, 1986, 1(8476):307-310.
- [2] 潘子昂, 王石麟, 李占魁. 医学统计学的基本方法(五)[J]. 中国骨质疏松杂志, 1996, 2(4):82-84.
- [3] 雷鸣. 正态性检验的直线相关分析法在医学统计中的应用[J]. 北华大学学报:自然科学版, 2010, 11(1):61-62.
- [4] 《宁夏医科大学学报》编辑部. 医学论文中统计学处理结果的解释和表达[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1):25.
- [5] 胡良平, 高辉. 如何正确运用  $t$  检验[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(2):209-212.
- [6] 曹瑾, 张双德, 高宏生. 卫生统计学中  $t$  检验应用的几点注记[J]. 中国现代医生, 2009, 3(30):109-110, 112.
- [7] 陈卉. Bland-Altman 分析在临床测量方法一致性评价中的应用[J]. 中国卫生统计, 2007, 24(3):1738-1739.
- [8] 夏寿扬, 史菊, 王娟. 改良 Bland-Altman 图评价血糖仪结果准确性[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(20):82-84.
- [9] 朱令宇, 李永杰, 张蒙生, 等. Bland-Altman 法在烟草测量仪器一致性评价中的应用[J]. 中国仪器仪表, 2009, 29(5):82-84.
- [10] 周欣, 曾山, 李贺, 等. 圆偏振光与线偏振光对心肌细胞外基质组织学分析的一致性研究: Bland-Altman 分析[J]. 武警医学院学报, 2008, 17(6):470-480, F2.

(收稿日期:2010-07-01)

(上接第 182 页)

- [8] 李家增, 王鸿利, 韩忠朝. 血液实验学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 1997:170-171.
- [9] 王鸿利. 血液学和血液学检验[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:74-75.
- [10] 刘隽湘. 输血疗法与血液制剂[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:7-8.
- [11] Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? [J]Photochem Photobiol, 1992, 55(1):145-157.

- [12] Hampton JA, Selman SH. Mechanisms of cell killing in photodynamic therapy using a novel in vivo drug/in vitro light culture system[J]. Photochem Photobiol, 1992, 56(2):235-243.
- [13] Weiss S, Young J, LoBuglio AF, et al. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1981, 68(3):714-721.

(收稿日期:2010-07-01)