

· 论 著 ·

病毒灭活血浆残余亚甲蓝对人外周血单个核细胞免疫功能影响的体外研究^{*}

陈志忠, 李结敏, 陈尚良[△], 梁洁贞, 卢少芬, 陈超红, 陆倩文, 张 绮
(广东省肇庆市中心血站 526020)

摘 要:目的 利用人外周血单个核细胞(PBMC)研究用于血浆病毒灭活后残余的亚甲蓝是否对人体免疫细胞功能产生影响。方法 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC, 在 T 细胞特异性刺激因子 Anti-CD3/CD28 存在的条件下, 加或者不加不同浓度的亚甲蓝共培养, 培养至 72 h, 收集培养上清液, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子分泌情况; 培养 66 h 后, 加入 CCK-8 染料继续培养 4~6 h, 于 A₄₅₀ 处测定细胞增殖情况。结果 高浓度剂量亚甲蓝(1.25、2.5、5 μmol/L 组)对 Anti-CD3/28 刺激 PBMC 的增殖均有明显抑制作用($P < 0.01$), 其 OD 值由 0.897 ± 0.385 分别降至 0.632 ± 0.334 、 0.524 ± 0.254 、 0.445 ± 0.287 , 呈一定的剂量依赖效应。高浓度亚甲蓝(1.25、2.5、5 μmol/L 组)可下调 Anti-CD3/28 诱导 PBMC 分泌细胞因子白细胞介素(IL)-17a、IL-10、 γ -干扰素(IFN)- γ , 且呈剂量依赖效应。1.25、2.5、5 μmol/L 的亚甲蓝影响 PBMC 分泌 IL-17a, IL-17a 水平由 (406 ± 57) pg/mL 分别降至 (276 ± 38) 、 (192 ± 31) 、 (134 ± 24) pg/mL; 影响 PBMC 分泌 IL-10, IL-10 水平由 (184 ± 15) pg/mL 分别降至 (132 ± 13) 、 (110 ± 12) 、 (42 ± 8) pg/mL; 影响 PBMC 分泌 IFN- γ , IFN- γ 水平由 $(4\ 512 \pm 187)$ pg/mL 分别降至 $(2\ 876 \pm 143)$ 、 $(2\ 234 \pm 153)$ 、 $(1\ 988 \pm 112)$ pg/mL。结论 高浓度亚甲蓝(≥ 1.25 μmol/L)对人 PBMC 的增殖以及分泌细胞因子功能有显著抑制作用, 换言之, 血浆病毒灭活后残余浓度(≤ 0.33 μmol/L)的亚甲蓝对 PBMC 免疫功能无明显影响, 但该浓度的亚甲蓝对人纯 T 细胞免疫功能是否有影响需要进一步评估研究。

关键词: 病毒灭活血浆; 亚甲蓝; 人外周血单个核细胞; T 淋巴细胞; 免疫功能

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)16-2205-03

In vitro study on influence of residual methylene blue after virus inactivation plasma on immune function of human PBMC cells^{*}

CHEN Zhizhong, LI Jiemin, CHEN Shangliang[△], LIANG Jiezheng,

LU Shaofen, CHEN Chaohong, LU Qianwen, ZHANG Qi

(Zhaoqing Municipal Blood Center, Zhaoqing, Guangdong 526020, China)

Abstract: **Objective** To study the influence of residual methylene blue after plasma viral inactivation on the human immune cell function by using the peripheral blood mononuclear cell(PBMC). **Methods** PBMC were isolated by adopting the Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation method and co-cultured for 72 h in presence of specific T cell stimulating factors(Anti-CD3/28 and Anti-CD28), with or without different concentration of methylene blue. The culture supernatant was collected and detected the cytokines secretion situation by ELISA. After 66 h culture, CCK-8 dye was added and continuously cultured for 4~6 h, the proliferation was determined at A₄₅₀. **Results** The high-concentration doses of methylene blue (1.25, 2.5, 5 μmol/L groups) had significantly inhibiting effect on the proliferation of PBMC stimulated by Anti-CD3/28 ($P < 0.01$), its OD value was decreased from 0.897 ± 0.385 to 0.632 ± 0.334 , 0.524 ± 0.254 and 0.445 ± 0.287 respectively, showing certain dose dependent effect. The high concentrations of methylene blue (1.25, 2.5, 5 μmol/L groups) could down-regulate interleukin(IL)-17a, IL-10 and interferon (IFN)- γ secreted by anti-CD28 induced PBMC, moreover showing a dose dependent effect. 1.25, 2.5, 5 μmol/L methylene blue affected the IL-17a level secreted by PBMC from (406 ± 57) pg/mL descending to (276 ± 38) , (192 ± 31) , (134 ± 24) pg/mL respectively; affected PBMC to secrete IL-10, its level was reduced from (184 ± 15) pg/mL to (132 ± 13) , (110 ± 12) , (42 ± 8) pg/mL; affected PBMC to secrete IFN- γ , its level was deduced from $(4\ 512 \pm 187)$ pg/mL to $(2\ 876 \pm 143)$, $(2\ 234 \pm 153)$, $(1\ 988 \pm 112)$ pg/mL respectively. **Conclusion** High concentrations of methylene blue (≥ 1.25 μmol/L) has the significant inhibiting effect on the proliferation and cytokine secretion functions of PBMC. In other words, the residual methylene blue concentration in viral inactivation plasma (≤ 0.33 μmol/L) has no obvious effect on the immune function of PBMC, but whether this concentration of methylene blue having the effect on human pure T cell immune function needs to be further evaluated and studied.

Key words: virus inactivation plasma; methylene blue; the peripheral blood mononuclear cell; T lymphocyte; immune function

亚甲蓝光化学法灭活血浆中病毒的效果已被证实, 输注病毒灭活血浆成为国内外预防输注血浆制品传播疾病的有效措

施^[1-3]。亚甲蓝光化学法灭活病毒最终血浆制剂中亚甲蓝残余浓度 ≤ 0.30 μmol/L^[4], 即 ≤ 0.096 mg/L, 与临床的使用剂量

^{*} 基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(A2015238)。

作者简介: 陈志忠, 男, 副主任技师, 主要从事采供血管理和血液安全研究。 [△] 通讯作者, E-mail: fimmu2000@163.com。

(1~2)mg/kg 体质量相比,浓度是非常低的。但考虑到大量输注血浆的患者多为危重病,如多发性创伤、心脏手术、多器官衰竭、凝血功能紊乱等患者,本身功能较衰弱,同时大量输血本身也存在输血后免疫抑制的风险^[5],故有必要考虑亚甲蓝对人体免疫功能的影响。亚甲蓝毒理实验证明其安全^[6-7],但体内、外基因毒性实验结果尚不一致^[8-9]。目前,亚甲蓝一定程度的致突变性和其他不良反应已被体外实验所证明^[10],然而其对免疫细胞的影响尚未明确。为保障输血安全,笔者对亚甲蓝影响人外周血单个核细胞(PBMC)增殖以及分泌细胞因子功能进行了研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 新鲜人静脉血(枸橼酸钠抗凝)由肇庆市中心血站提供;淋巴细胞分离液购自天津灏阳生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8)购自日本株式会社同仁化学研究所;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自 Ebioscience 公司;Anti-CD3、Anti-CD28 购自 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离人 PBMC 在离心管中加入 20 mL 淋巴细胞分离液;取枸橼酸钠抗凝静脉血与等量 RPMI-1640 液充分混匀,用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上,注意保持清楚的界面;水平离心,2 000 r/min,20 min;用滴管吸出白色云雾层细胞,加入 5 倍体积的无菌 PBS,1 500 r/min 离心 10 min,洗涤细胞 2 次;末次洗涤时进行计数,将细胞用 RPMI-1640 重悬,调整细胞密度为 2×10^6 个/mL。

1.2.2 亚甲蓝溶液的配制 分析天平准确称取分析纯亚甲蓝试剂 0.032 g,溶于 10 mL RPMI-1640 液,充分溶解后,溶液经 0.22 μ m 过滤器滤过除菌,即为亚甲蓝溶液保存液(1 mmol/L),-20 $^{\circ}$ C 保存备用,根据实验需要取保存液使用 RPMI-1640 液进行稀释使用。

1.2.3 PBMC 的培养 96 孔培养板加入 Anti-CD3 (1 μ g/mL)、Anti-CD28 (5 μ g/mL),每孔 200 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜;吸走包被上清液,每孔加入 PBMC 细胞悬浮液 100 μ L;加入不同浓度亚甲蓝工作液(20、10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0 μ mol/L)100 mL,最终培养体积为每孔 200 mL,终浓度分别 10、5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04、0 μ mol/L,每组设 4 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养,72 h 后收集细胞或者上清液进行后续实验。

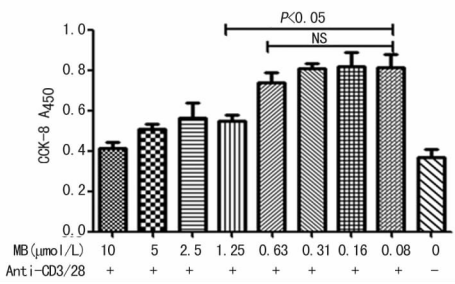
1.2.4 ELISA 检测细胞因子 细胞培养第 3 天收集各组细胞上清液,以 ELISA 检测 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-17a 和 IL-10 分泌情况。按照试剂盒说明,将捕获抗体用包被缓冲液稀释 250 倍,加入酶联板,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日 PBS-T 洗涤 5 次。加入检测缓冲液,每孔 200 μ L,于室温封闭 1 h,PBS-T 洗涤 5 次;分别加入待测细胞培养上清液和倍比稀释的标准品(按 1:2 000 稀释),每孔 100 μ L,室温反应 1 h,PBS-T 洗板 5 次。加入已稀释的检测抗体,每孔 100 μ L。于室温反应 1 h,PBS-T 洗板 5 次。加入 Avidin-HRP(按 1:250 稀释),每孔 100 μ L。于室温反应 30 min。PBS-T 洗涤 7 次。加入 TMB 底物缓冲液,每孔 100 μ L。显色 5~10 min。最后用 2 mol/L H₂SO₄ 显色终止液终止反应。于酶标仪测 450 nm 处光密度(OD)值。根据标准曲线,计算样品中细胞因子浓度。

1.2.5 CCK-8 法检测 MBL 对 PBMC 增殖的调节作用 按照 1.2.3 细胞培养 66 h 后,加入 20 μ L CCK-8,继续培养 4~6 h,测 450 nm 处 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

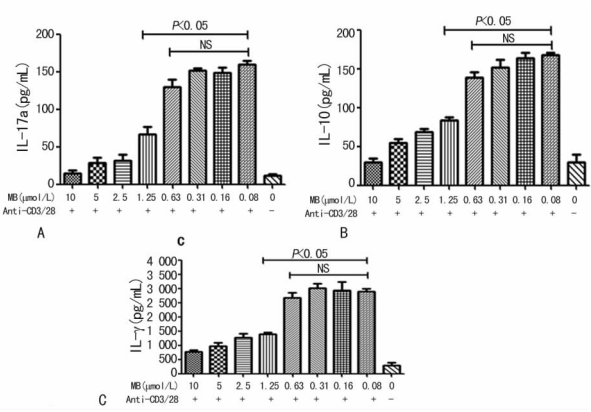
2.1 亚甲蓝抑制 PBMC 的增殖 CCK-8 法显示高浓度剂量的亚甲蓝对 PBMC 增殖有明显的抑制作用,且呈剂量依赖效应,见图 1。与对照组相比,亚甲蓝浓度 1.25、2.5、5 μ mol/L 组对 Anti-CD3/28 刺激 PBMC 的增殖均有明显抑制作用($P < 0.01$),其 OD 值由 0.897 ± 0.385 分别降至 0.632 ± 0.334 、 0.524 ± 0.254 、 0.445 ± 0.287 。



注:横坐标均表示亚甲蓝浓度分组;+表示 Anti-CD3/28 刺激条件,一则表示无 Anti-CD3/28。

图 1 亚甲蓝对 Anti-CD3/28 刺激 PBMC 增殖的影响

2.2 亚甲蓝抑制特异性刺激因子(Anti-CD3/CD28)诱导 PBMC 分泌细胞因子 在亚甲蓝与 Anti-CD3/28 共处理 PBMC 细胞组,高浓度亚甲蓝组(1.25、2.5、5 μ mol/L 组)可下调 Anti-CD3/28 所诱导 PBMC 分泌细胞因子 IL-17a、IL-10、IFN- γ 的分泌,且呈一定剂量依赖效应。亚甲蓝浓度 1.25、2.5、5 μ mol/L 组影响 PBMC 分泌 IL-17a,IL-17a 水平由 (406 ± 57) pg/mL 分别降至 (276 ± 38) 、 (192 ± 31) 、 (134 ± 24) pg/mL(图 2A);影响 PBMC 分泌 IL-10,IL-10 水平由 (184 ± 15) pg/mL 分别降至 (132 ± 13) 、 (110 ± 12) 、 (42 ± 8) pg/mL(图 2B);影响 PBMC 分泌 IFN- γ ,IFN- γ 水平由 $(4\ 512 \pm 187)$ pg/mL 分别降至 $(2\ 876 \pm 143)$ 、 $(2\ 234 \pm 153)$ 、 $(1\ 988 \pm 112)$ pg/mL(图 2C)。



注:横坐标均表示亚甲蓝浓度分组;+表示 Anti-CD3/28 刺激条件,一则表示无 Anti-CD3/28。

图 2 亚甲蓝对 Anti-CD3/28 刺激 PBMC 分泌 IL-17a、IL-10、IFN- γ 的影响

3 讨论

近年有学者研究认为,亚甲蓝能在动物模型中增加诱发膜

腺癌的概率^[8-9],随后有学者对其可能发生的机制进一步研究后认为,可能是亚甲蓝介导的 DNA 损伤增加了肿瘤的发生概率^[10]。2011 年,日本学者报道了 2 例输注亚甲蓝病毒灭活血浆发生过敏性反应从而致死的案例^[11],但其机制至今未明^[12]。最近,国内学者研究认为病毒灭活残余亚甲蓝对人 CIK 细胞的体外杀伤功能以及增殖未见明显影响^[13],国外学者研究发现亚甲蓝可影响 PBMC 细胞跨越内皮的迁徙能力,并且呈剂量效应^[14-16]。但亚甲蓝对 PBMC 免疫功能的影响,目前少见报道。

本研究通过分离健康志愿者 PBMC 与亚甲蓝共培养,研究评估其对人 T 淋巴细胞免疫功能的影响。本研究发现高浓度的亚甲蓝($\geq 1.25 \mu\text{mol/L}$)对 Anti-CD3/28 所诱导 PBMC 细胞增殖以及细胞因子 IL-17a、IL-10、IFN- γ 的分泌量有显著的抑制作用。IL-17a 主要由 Th17 分泌,属于 Th17 细胞因子,亚甲蓝对 PBMC 分泌 IL-17a 有抑制作用,将影响 Treg/Th17 的平衡;IL-10 主要由单核巨噬细胞和 Th 细胞分泌,属于 Th2 细胞因子,主要生物效应是刺激 B 淋巴细胞的分化增殖,产生抗体,亚甲蓝对 PBMC 分泌 IL-10 有抑制作用,可能将加大大量输血本身也存在输血后免疫抑制的风险。IFN- γ 主要由活化的 Th1 细胞和 NK 细胞分泌,属于 Th1 细胞因子,主要的生物学功能是刺激 CTL 细胞的分化增殖,实现细胞毒效应。在本研究中发现,亚甲蓝浓度低于 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 组对 PBMC 的增殖以及分泌细胞因子的功能无明显影响。目前,国家标准中对病毒灭活血浆亚甲蓝残余浓度要求为 $\leq 0.33 \mu\text{mol/L}$,仅为 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 的 $1/4$ 浓度,且血浆输入人体后,会被体内血容量稀释,故体内实际浓度将更加低,由此可见,输注亚甲蓝病毒灭活血浆不会因残余的亚甲蓝对人体 PBMC 细胞免疫功能产生影响。

PBMC 是从人外周血中分离得到,其主要由淋巴细胞构成,而且 T 淋巴细胞占其主要部分。本研究使用了特异性 T 淋巴细胞刺激因子为共培养的 PBMC 提供共刺激信号,一般认为只有 CD3⁺T 细胞会被活化增殖,执行相应的生物学功能。T 淋巴细胞是获得性免疫系统中最重要细胞,不仅影响免疫应答强度,而且影响机体免疫应答的类型,阐明亚甲蓝对人 T 细胞免疫功能的影响具有重要意义。T 淋巴细胞是获得性免疫应答中最重要细胞,不仅参与细胞免疫,而且辅助体液免疫;不仅激活免疫应答,而且诱导免疫耐受。一方面初始 T 细胞通过其抗原识别受体(TCR)/CD3 复合物识别抗原提呈细胞(APC)提呈的抗原肽后,活化并分化为效应 T 细胞,进而发挥效应和(或)调节功能。另一方面,T 细胞通过 Th1/Th2 亚群分化的影响,调节免疫应答的类型。故本研究实际上间接评估了亚甲蓝对 T 淋巴细胞免疫功能的影响。

但鉴于 PBMC 除 T 细胞外,还有 B 细胞、NK 细胞、单核细胞等,因此亚甲蓝上述的抑制作用不一定是其对 T 细胞的作用。因此在后续的研究中,将采用免疫磁珠负选法,分离获得纯化的 T 细胞,进一步明确亚甲蓝对 T 淋巴细胞免疫功能的影响。

参考文献

- [1] Seghatchian J, De Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends[J]. Transfus Apher Sci, 2006, 35(3): 189-196.
- [2] Chunhui Y, Guohui B, Hong Y, et al. Quantitative evalua-

tion of plasma after methylene blue and white light treatment in four Chinese blood centers[J]. Transfus Apher Sci, 2013, 49(3): 631-639.

- [3] Elikaei A, Hosseini SM, Sharifi Z, et al. Methylene blue based device for pathogen reduction in human plasma[J]. Iranian journal of pediatric hematology and oncology, 2013, 3(3): 97-102.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 全血及成分血质量要求: GB-18469[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.
- [5] Pandey S, Vyas GN. Adverse effects of plasma transfusion[J]. Transfusion, 2012, 52(Suppl 1): 65S-79S.
- [6] Sturmei RG, Wild CP, Hardie LJ. Removal of red light minimizes methylene blue-stimulated DNA damage in oesophageal cells: implications for chromoendoscopy[J]. Mutagenesis, 2009, 24(3): 253-258.
- [7] Masannat YA, Hanby A, Horgan K, et al. DNA damaging effects of the dyes used in sentinel node biopsy: possible implications for clinical practice[J]. J Surg Res, 2009, 154(2): 234-238.
- [8] National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of methylene blue trihydrate (Cas No. 7220-79-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)[J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2008(540): 1-224.
- [9] Auerbach SS, Bristol DW, Peckham JC, et al. Toxicity and carcinogenicity studies of methylene blue trihydrate in F344N rats and B6C3F1 mice[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 169-177.
- [10] Hiraku Y, Goto H, Kohno M, et al. Metal-mediated oxidative DNA damage induced by methylene blue[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9): 2776-2782.
- [11] Nubret K, Delhoume M, Orsel I, et al. Anaphylactic shock to fresh-frozen plasma inactivated with methylene blue[J]. Transfusion, 2011, 51(1): 125-128.
- [12] Politis C, Kavallierou L, Hantziara S, et al. Haemovigilance data on the use of methylene blue virally inactivated fresh frozen plasma with the Theraflex MB-Plasma System in comparison to quarantine plasma: 11 years' experience[J]. Transfus Med, 2014, 24(5): 316-320.
- [13] 姚仁南, 陈玲, 刘军权, 等. 病毒灭活血浆对人 CIK 细胞功能影响的体外实验研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(8): 741-744.
- [14] Muñoz-Díaz E, Puig L. Allergic and anaphylactic reactions to methylene-blue-treated plasma in Catalonia in the period 2008-2013[J]. Blood Transfus, 2014, 12(4): 628-630.
- [15] Werner I, Guo F, Bogert NV, et al. Methylene blue modulates transendothelial migration of peripheral blood cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82214.
- [16] Werner I, Guo F, Stock UA, et al. Methylene blue modulates adhesion molecule expression on microvascular endothelial cells[J]. Inflamm Res, 2014, 63(8): 649-656.