

## 核黄素联合紫外光灭活血小板悬液中的病毒及抑制细胞因子的实验研究

钟涛<sup>1,2</sup>, 沈继龙<sup>1</sup>, 许伟<sup>2</sup>, 张循善<sup>2</sup>, 卞茂红<sup>2</sup>, 杨鹏<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究核黄素联合紫外光进行血小板病毒灭活的安全性、有效性及对血小板保存中白细胞释放细胞因子的抑制作用; 观察灭活后血小板体外各参数的变化。方法 实验组: 将人巨细胞病毒标准株 (HCMV AD169) 注入核黄素溶液, 混匀后加入到单采血小板中, 以一定辐照剂量的紫外光照射, 检测照射前后病毒滴度和照射后不同时间细胞因子的变化, 并观察体外血小板部分参数的变化。对照组: 为相同来源新鲜单采血小板, 同步检测其细胞因子的含量和血小板体外各参数。以植物凝集素 (PHA) 同步刺激两组血小板,

用 ELISA 法检测细胞因子的含量。结果 实验组经 150  $\mu\text{mol/L}$  的核黄素结合辐照剂量为 1 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  的紫外光 ( $250 < \lambda < 350 \text{ nm}$ ) 照射 10 min 可有效灭活血小板中病毒; 对照组细胞因子含量随着保存时间的延长而显著增加; 实验组第 3 天和第 5 天的细胞因子含量相对于保存前 (0 d) 差异无统计学意义; 而在同一保存时间对照组中细胞因子含量高于实验组 ( $P < 0.05$ ); 实验组和对照组血小板悬液经过 PHA 同步刺激后: 接受 PHA 刺激的对照组与未接受 PHA 刺激的对照组相比, 细胞因子含量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 而接受 PHA 刺激的实验组与未接受 PHA 刺激的实验组相比, 细胞因子含量无显著变化。结论 核黄素结合紫外光照射可以有效灭活血小板中病毒, 抑制血小板保存中白细胞释放细胞因子的能力, 而单采血小板体外诸参数和阴性对照比较无明显差异。

**关键词** 核黄素; 紫外光; 病毒灭活; 人类巨细胞病毒; 细胞因子; 植物凝集素

**中图分类号** R 457.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)01-0013-05

2013-10-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30940067)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院输血科, 合肥 230022

作者简介: 钟涛, 男, 主管技师, 硕士研究生;

沈继龙, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

shenjilong53@126.com

## Immunomagnetic separation for purification of *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Lou Yan<sup>1,2</sup>, Shen Jilong<sup>1</sup>, Cheng Weisheng<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathogen Biology, Anhui Medical University Anhui Provincial Laboratory of Pathogen Biology and Anhui Key Laboratory of Zoonoses, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Pathogen Biology and Immunology, Anhui Medical College, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To obtain the highly purified tachyzoites without contamination of host cells and loss of parasite viability for the diverse purposes of *Toxoplasma* and toxoplasmosis approach. **Methods** The peritoneal fluids containing both parasites and redundant host cells were harvested from the mouse, that had been peritoneally inoculated with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) Wh3 strain (genotype China 1). *T. gondii* soluble antigen was prepared and used to immunize rabbits to obtain polyclonal rabbit anti-*Toxoplasma* antibodies. The mouse peritoneal exudate containing parasites was subjected to the antibody-coated immunomagnetic beads. The purity, recovery, viability and virulence to mice were tested. **Results** Immunomagnetic separation technique gave rise to as high as 98.2% of the tachyzoites purity; the removal rate of host cells reached to 96% and the recovery rate of tachyzoites was 73.5%. The viability of tachyzoites was 95.6% when detected by the MTS kit of cell proliferation and toxicity detection, and no attenuation of viability and virulence to mice was noted. **Conclusion** A high purity of *T. gondii* tachyzoites are achieved by immunomagnetic technique and no negative impacts of the novel method on the parasites viability and virulence are found, suggesting that the immunomagnetic separation, which is fast and simple to carry out, might be a useful in the immune and molecular approach of *Toxoplasma* and toxoplasmosis.

**Key words** *Toxoplasma gondii*; tachyzoites; purification; immunomagnetic separation

血制品在输注的过程中可能会发生感染性输血风险和免疫性输血不良反应<sup>[1]</sup>,因此要达到安全输血的目的,必须将血小板在输注过程中可能会发生的各种输血危险降到最低。有文献<sup>[2-3]</sup>报道血小板中白细胞(white blood cell, WBC)释放的细胞因子可引发输血相关性移植物抗宿主病(transfusion associated-graft versus host disease, TA-GVHD)等免疫性输血不良反应。因此,去除或灭活血小板中的WBC从而抑制细胞因子是避免其发生免疫性输血不良反应行之有效的方法。核黄素光化学法是近年来血液成分病原体灭活的热点,其对淋巴细胞也有灭活作用<sup>[4-5]</sup>。然而应用核黄素联合紫外光灭活血小板内病毒同时抑制细胞因子的相关研究国内外报道甚少。笔者采用核黄素联合紫外光对血小板中的病毒进行灭活,同时重点对细胞因子做了系统的实验观察。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** 核黄素(500  $\mu\text{mol/L}$  水溶液,湖北同济奔达鄂北制药有限公司);植物凝集素(PHA,美国Sigma公司);DMEM培养液(美国Gibco公司);96孔细胞培养板和24孔细胞培养板、25 ml细胞培养瓶(美国Corning公司);5%  $\text{CO}_2$ 培养箱(美国Thermo Scientific公司);胰蛋白(武汉凌飞科技有限公司);细胞因子酶标检测试剂(美国Biosource公司,上海森雄公司进口);1575 Immuno Wash洗板机(法国BIO-RAD公司);SUNRISE酶标仪(奥地利Tecan公司);紫外线光源(中国科学技术大学顺达高科技公司);紫外线强度测定仪(北京鑫四环公司);ABL-700血气分析仪(美国Denmark公司);全自动血细胞分析仪(美国Beckman-Coulter公司);血小板恒温振荡仪(苏州医用仪器厂);Nageotte血细胞计数板(美国Hausser公司);医用PVC血袋(病毒灭活血袋,上海输血技术公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国Gibco公司);新鲜单采血小板悬液由合肥市中心血站提供。

**1.2 实验病毒和宿主细胞** 人类巨细胞病毒(HCMV AD169株)、人胚成纤维细胞(human fibroblasts, HF)均由安徽医科大学微生物学教研室提供,宿主细胞的传代培养参照杨鹏等<sup>[6]</sup>方法。

**1.3 实验分组和灭活实验条件的选择** 将当日采集的15份新鲜单采血小板,每份血小板平均分为两等份(125 ml/bag):一份不做任何处理编入对照组;另一份作为实验组。取出冻存的巨细胞病毒,融解,

PBS( $\text{pH}=7.4$ )10倍稀释,测定稀释后的病毒悬液滴度。用无菌注射器分别抽取10 ml的病毒悬液注入到15只空PVC转移袋中,向这15份病毒悬液中分别加入终浓度为150  $\mu\text{mol/L}$ 核黄素溶液(核黄素先用生理盐水配置成500  $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,并将 $\text{pH}$ 值调节至4.0~5.0,高温灭菌),混匀后再按1:9的比例加入到实验组单采血小板中,将血袋口密封。此时HCMV的病毒滴度为( $7.40 \pm 0.22$ )  $\log\text{T-CID}_{50}$ ,混匀避光静置5 min后,将这15份病毒悬液均用辐照剂量为1500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 紫外光在距离单采血小板悬液保存袋10 cm处,照射10 min,在照射过程中将血袋平放于摇床上,不断振荡以保证均匀照射。照射后与对照组一同保存于血小板保存箱中,并分别于保存前(0 d)、保存的第3、5天取样待检。

**1.4 病毒滴定** 样本的病毒滴定参照王志勇等<sup>[7]</sup>的方法。

**1.5 细胞因子检测** 实验组和对照组分别于保存0、3、5 d,采用ELISA法检测白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 的含量,试剂盒购于上海森雄公司,操作按说明书进行,用酶标仪测定其吸光度(OD)值,以标准品OD值绘制标准曲线,并根据标准曲线计算出细胞因子的含量。

**1.6 PHA诱导的细胞因子测定** 保存前分别取对照组和灭活后的实验组单采血小板悬液各1 ml加入24孔细胞培养板中,向每孔中加入1 ml PHA(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的细胞培养液,5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 培养72 h;同时以同等样本量的不加PHA刺激的血小板混悬液的细胞培养板为平行对照。72 h后,将所有单采血小板悬液离心,取上清检测上述细胞因子的含量。

**1.7 血小板体外参数** 血小板计数(PLT)、血小板平均体积(MPV)、血小板平均宽度(PDW)和血小板压积(PCT)由全自动血细胞分析仪检测;血小板生化指标: $\text{pH}_{7.38}$ 、乳酸盐均由ABL 2700血气分析仪(乳酸盐测量范围为0~30 mmol/L)测定。

**1.8 WBC计数** 实验组和对照组分别于保存0、3、5 d,取1份样品(100  $\mu\text{l}$ )加入9份(900  $\mu\text{l}$ ) WBC稀释液混合,放置10 min,混匀,用移液器吸取混合液600  $\mu\text{l}$ 滴入Nageotte血细胞计数板中,室温沉降15 min,显微镜下计数一个满格子(50  $\mu\text{l}$ )上的白细胞。计算方法:  $\text{WBC数}/\mu\text{l} = (\text{WBC计数}/\text{每格}) \div 5$ 。

**1.9 血小板漩涡评分技术** 功能正常的血小板呈

圆盘状,当血小板透过光源轻轻旋转时,会出现一种漩涡现象。当血小板遇低温、体外保存时间延长、或乳酸堆积导致 pH 值降低时,血小板由圆盘状变成球状,失去展现漩涡现象的能力。因此外观检查血小板是否具有漩涡现象可作为血小板质量检测的辅助方法<sup>[8]</sup>。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 核黄素与紫外光联合作用对单采血小板悬液中 HCMV 的灭活效果** 光照强度为  $2\,560\,\mu\text{W}/\text{cm}^2$  时,辐照剂量为  $1\,500\,\text{mJ}/\text{cm}^2$  的紫外光 ( $250 < \lambda < 350\,\text{nm}$ ) 结合  $150\,\mu\text{mol}/\text{L}$  的核黄素照射  $10\,\text{min}$ ,灭活后比灭活前减少的滴度  $>6.97\,\log\text{TCID}_{50}$ ,灭活前后病毒滴度下降明显, HCMV 的灭活效果达到期望值,见表 1。

表 1 核黄素联合紫外光灭活血小板巨细胞病毒滴度变化 ( $n=15\,\bar{x} \pm s$ )

作用时间 (min)	紫外线辐射剂量 ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	logTCID <sub>50</sub>	
		0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核黄素	150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核黄素
10	0	$7.40 \pm 0.22$	$7.39 \pm 0.10$
10	1 500	$4.12 \pm 0.21$	LOD*

注: \* 按美国 FDA 标准,本实验方法 HCMV 的检出限为  $0.43\,\log\text{TCID}_{50}$

**2.2 两组单采血小板在储存期间 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  含量的变化以及残存的 WBC 计数的比较** 经核黄素光化学处理的实验组,细胞因子含量在保存期间均无明显变化且无统计学意义;而未经处理的对照组,细胞因子水平随着保存时间的延长而明显增加 ( $P < 0.05$ )。两组细胞因子含量在保存前差异无统计学意义,但在保存后的第 3、5 天,对照组和实验组细胞因子含量比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。实验组和对照组在储存前后单采血小板内残存的 WBC 计数变化不明显,差异均无统计学意义,见表 3。

**2.3 核黄素光化学法对 PHA 诱导单采血小板内残存 WBC 释放细胞因子的影响** 对照组在接受 PHA 刺激后与未接受 PHA 刺激的各细胞因子含量比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而实验组在接受 PHA 刺激后与未接受 PHA 刺激的各细胞因子含量比较,差异均无统计学意义;接受 PHA 刺激后的实验组与对照组各细胞因子含量比较,差异有统计

学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 2 核黄素联合紫外光对血小板保存过程中细胞因子含量的影响 ( $n=15\,\mu\text{g}/\text{ml}\,\bar{x} \pm s$ )

细胞因子	组别	保存前	保存时间(d)	
			3	5
IL-1 $\beta$	对照	$31.01 \pm 8.41$	$105.13 \pm 19.16^{\#}$	$327.16 \pm 23.05^{\#}$
	实验	$30.99 \pm 7.22$	$31.10 \pm 6.43^*$	$33.12 \pm 6.19^*$
IL-2	对照	$16.17 \pm 4.93$	$46.81 \pm 5.59^{\#}$	$85.13 \pm 9.27^{\#}$
	实验	$15.96 \pm 4.51$	$16.13 \pm 5.06^*$	$16.61 \pm 6.74^*$
IL-6	对照	$15.03 \pm 0.28$	$86.43 \pm 1.79^{\#}$	$180.54 \pm 11.55^{\#}$
	实验	$14.16 \pm 0.53$	$15.26 \pm 0.16^*$	$17.12 \pm 1.05^*$
IL-8	对照	$58.12 \pm 28.56$	$1\,155.17 \pm 372.01^{\#}$	$2\,073.14 \pm 530.56^{\#}$
	实验	$57.03 \pm 30.15$	$57.94 \pm 29.30^*$	$59.69 \pm 28.61^*$
TNF- $\alpha$	对照	$10.01 \pm 2.42$	$41.12 \pm 4.56^{\#}$	$93.17 \pm 6.53^{\#}$
	实验	$9.12 \pm 3.05$	$9.57 \pm 3.66^*$	$10.94 \pm 2.97^*$
IFN- $\gamma$	对照	—	$10.16 \pm 1.35^{\#}$	$69.17 \pm 4.58^{\#}$
	实验	—	—*	—*

—: 未检出;与同时时间点的对照组比较: \*  $P < 0.05$ ;与保存前比较:  $^{\#}P < 0.05$ ;与前一保存时间比较:  $P < 0.05$

表 3 两组血小板在贮存期间残留 WBC 计数的变化 ( $n=15\,\bar{x} \pm s$ )

保存时间(d)	WBC( $\times 10^6/\text{bag}$ )	
	对照组	实验组
0	$35.2 \pm 7.5$	$34.2 \pm 5.3$
3	$32.4 \pm 1.2$	$31.7 \pm 2.2$
5	$28.5 \pm 5.9$	$28.1 \pm 3.6$

表 4 PHA 刺激对血小板中细胞因子含量的影响 ( $\text{pg}/\text{ml}, n=15\,\bar{x} \pm s$ )

细胞因子	组别	未接受 PHA 刺激	接受 PHA 刺激
IL-1 $\beta$	对照	$117.23 \pm 20.11$	$695.13 \pm 57.34^*$
	实验	$35.61 \pm 9.16$	$38.11 \pm 6.52^{\#}$
IL-2	对照	$51.10 \pm 6.83$	$492.93 \pm 29.81^*$
	实验	$20.15 \pm 3.71$	$22.63 \pm 3.05^{\#}$
IL-6	对照	$94.37 \pm 5.26$	$3\,108.12 \pm 782.47^*$
	实验	$17.66 \pm 1.48$	$19.04 \pm 2.14^{\#}$
IL-8	对照	$1\,237.06 \pm 461.71$	$15\,318.93 \pm 1\,308.72^*$
	实验	$65.87 \pm 32.51$	$68.21 \pm 34.63^{\#}$
TNF- $\alpha$	对照	$51.28 \pm 4.80$	$349.17 \pm 72.35^*$
	实验	$11.23 \pm 3.35$	$11.71 \pm 3.86^{\#}$
IFN- $\gamma$	对照	$12.57 \pm 4.41$	$675.14 \pm 371.59^*$
	实验	—	— $^{\#}$

—: 未检出;与接受 PHA 刺激后对照组比较:  $^{\#}P < 0.05$ ;与未接受 PHA 刺激的对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 核黄素光化学法作用前后单采血小板体外诸参数的变化** 经核黄素光化学法处理后的实验组,其单采血小板在保存的第 0 天和第 5 天体外各项指标与同一保存时间的阴性对照比较差异均无统计学意义,见表 5。

表5 灭活后单采血小板在保存期内体外诸参数的变化情况(  $n = 15$  ,  $\bar{x} \pm s$  )

项目	组别	第0天	第5天
PLT( $\times 10^{11}$ /bag)	对照	1.28 $\pm$ 0.21	1.25 $\pm$ 0.14
	实验	1.26 $\pm$ 0.22	1.19 $\pm$ 0.13
PCT( % )	对照	22.23 $\pm$ 7.04	20.93 $\pm$ 8.22
	实验	21.35 $\pm$ 6.26	18.24 $\pm$ 6.53
MPV( fl )	对照	11.30 $\pm$ 1.60	11.60 $\pm$ 2.30
	实验	11.20 $\pm$ 1.80	11.90 $\pm$ 1.30
PDW( fl )	对照	17.20 $\pm$ 0.30	17.10 $\pm$ 0.50
	实验	17.60 $\pm$ 0.90	16.80 $\pm$ 0.60
乳酸盐产率 [mmol/( $10^{11}$ 细胞 $\cdot$ h )]	对照	0.11 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.03
	实验	0.17 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.22
pH <sub>22℃</sub>	对照	7.40 $\pm$ 0.05	7.43 $\pm$ 0.05
	实验	7.39 $\pm$ 0.05	7.15 $\pm$ 0.10
血小板漩涡	对照	3.00 $\pm$ 0	3.00 $\pm$ 0
	实验	3.00 $\pm$ 0.50	2.90 $\pm$ 0.50

### 3 讨论

核黄素是一种三环平面结构的芳香族化合物,它以平面结构插入核酸后,在紫外光或可见光的激活下,通过电子转移,使核苷酸中的鸟嘌呤碱基氧化并形成共价加成化合物,介导核酸骨架链的断裂,达到灭活病原微生物的目的。由核黄素吸收光谱可知,核黄素在紫外光区有3个吸收峰,峰值分别是221、265和375 nm。研究<sup>[9]</sup>表明在最大峰值处,可以最大限度地激发核黄素,本研究所采用的紫外线光源为250~350 nm,包含了265 nm这一核黄素吸收峰,与其吸收光谱相匹配。由于核黄素光化学法的作用机制是介导靶点核酸的断裂,国外有学者基于这一机制发现核黄素光化学法对WBC也有灭活作用<sup>[10]</sup>;且有研究<sup>[2,11]</sup>表明TA-GVHD等免疫性输血不良反应的发生与血小板中残存的WBC释放的细胞因子有强相关性,这提示了可通过核黄素光化学法来抑制WBC释放细胞因子,达到预防免疫性输血不良反应的发生。本研究显示用工作浓度为150  $\mu$ mol/L的核黄素结合辐照剂量为1 500 mJ/cm<sup>2</sup>的紫外光照射10 min,对血小板中的指示病毒HCMV灭活的滴度可达到>6.97 logTCID<sub>50</sub>,符合美国FDA标准,达到了病毒灭活的目的,并且这一结果与Ruane et al<sup>[12]</sup>报道也基本一致。灭活后,血小板在保存的第3、5天各细胞因子的含量相对于保存前并没有显著增加;而保存期间,在血小板中的WBC计数并没有显著变化的前提下,未经核黄素光化学处理的血小板中的细胞因子水平却随着保存时间的延长而明显增加。这一结果表明,核黄素光化

学法可明显抑制血小板中残存的WBC释放细胞因子。本研究采用经典的PHA刺激方法来诱导经核黄素光化学处理和未经核黄素光化学处理的血小板内残存的WBC释放细胞因子,结果显示,未经核黄素光化学处理的对照组中,接受PHA刺激后其细胞因子的含量比未接受PHA刺激的显著升高,而经核黄素光化学处理的实验组中接受PHA刺激和未接受PHA刺激的细胞因子的含量无显著变化,且明显低于未经核黄素光化学处理的对照组细胞因子的含量。这一实验充分证明了经核黄素光化学法处理后血小板内的WBC不会再被PHA刺激激活,已失去分泌细胞因子的活性,由此也就极大抑制了WBC释放细胞因子。

核黄素广泛的存在于人体器官中,其经光照射后的产物与在人体内的代谢产物相同,均为二甲基咯嗪,对人体无毒副作用,不会导致癌症发病率升高<sup>[13]</sup>。其联合紫外光作用后的血小板在PLT、MPV、PDW和PCT上以及体现血小板体外功能的pH值、乳酸盐的测定上与对照相比差异均无显著性。目前,随着分子生物学检测技术的使用和输血管理措施的改进,感染性输血风险已经大幅度的降低<sup>[14]</sup>。相反的,对免疫性不良反应的研究相对滞后,而其中TA-GVHD则是后果最为严重的免疫性输血风险,一旦罹病,其死亡率高达90%以上<sup>[15]</sup>。

综上所述,核黄素联合紫外光可以安全、有效的灭活单采血小板内的病毒,抑制血小板内残存的WBC释放细胞因子,从而实现了将病原体的灭活和预防TA-GVHD在同一个系统中完成,是一种经济、方便、快捷、非常有潜力的血小板安全处理方法。

### 参考文献

- [1] Benjamin R J. Red blood cell pathogen reduction: In search of serological agnosticism [J]. ISBT Science Series, 2006, 1: 222 - 6.
- [2] Shaiegan M, Pourfatollah A A, Namiri M, et al. Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage [J]. Arch Iran Med, 2006, 9( 1 ): 61 - 4.
- [3] Addas-Carvalho O M, Origa A F, Saad S T. Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor levels in stored platelet concentrates and the association with gene polymorphisms [J]. Transfusion, 2004, 44( 7 ): 996 - 1003.
- [4] Cui Z, Huang Y, Mo Q, et al. Inactivation of lymphocytes in blood products using riboflavin photochemical treatment with visible light [J]. Photochem Photobiol, 2008, 84( 5 ): 1195 - 200.
- [5] 王莉, 张博, 黄宇闻, 等. 核黄素光化学法对外周血淋巴细胞灭活作用的研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25( 10 ): 982

- 6.
- [6] 杨 鹏, 陶 勇, 张循善, 等. 核黄素光化学法灭活红细胞悬液巨细胞病毒的初步探讨[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(4): 402-5.
- [7] 王志勇, 张循善, 王明丽, 等. 维生素 B2 作为光敏剂灭活病毒的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41(1): 71-3.
- [8] AuBuchon J P, Herschel L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction [J]. *Transfusion*, 2005, 45(8): 1335-41.
- [9] 许 伟, 张循善, 钟 涛, 等. 核黄素光化学法灭活单采血小板细菌的效果评价[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(4): 398-402.
- [10] Fast L D, 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): 373-81.
- [11] Lin J S, Tzeng C H, Hao T C, et al. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions [J]. *Vox Sang* 2002, 82(3): 156-60.
- [12] Ruane P H, Ed rich R, Gamp D, et al Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light [J]. *Transfusion*, 2004, 44(6): 877-85.
- [13] Prowse C V. Component pathogen inactivation: a critical review [J]. *Vox Sang*, 2013, 104(3): 183-99.
- [14] 王惺惺. 血液细胞成分病原体灭活技术与效果评价[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(3): 206-10.
- [15] McQuiston J H, Childs J E, Chamberland M E, et al. Transmission of tick borne agents of disease by blood transfusion a review of known and potential risk in the United States [J]. *Transfusion*, 2000, 40(3): 274-84.

## Experimental studies on the virus inactivation and cytokines inhibition via riboflavin photochemical treatment in platelet suspension

Zhong Tao<sup>1,2</sup>, Shen Jilong<sup>1</sup>, Xu Wei<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Pathogenic Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup> Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To research the safety and efficacy of riboflavin ultraviolet light joint inactivation of virus, and the inhibition of leukocytes derived cytokines in platelets preservation and transfusion and to observe the biochemical alterations of the platelets following the inactivation measures. **Methods** In experimental group human cytomegalovirus (HCMV AD169) was injected into the platelets suspension in final concentration of 150  $\mu\text{mol/L}$  of riboflavin solution. After mixing, the sample was put into the apheresis platelets, followed by ultraviolet light sterilization, and the viral titer was tested in platelet suspension. The production cytokines were detected by ELISA on 0, 3 and 5 d after irradiation, and the change of platelets parameter was observed. Negative control group was composed of fresh apheresis platelets from the same collection without any treatments, cytokines were synchronously detected. Two groups of platelets were subjected to phytohemagglutinin (PHA) for synchronous stimulation. **Results**

A dose of 1 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  ultraviolet light combined with riboflavin gave rise to a effective sterilization of virus in the platelet suspension. The expression of leukocyte-derived cytokines was noted slight increase in the control group with the extension of saving time post-treatment. In the experimental group No. 3, 5 d the cytokine content had no significant difference relative to (0 d) before saving, while at the same retention time the cytokines content in the control group was higher than that in the experimental group ( $P < 0.05$ ); the two groups of platelet suspension after PHA synchronous stimulation: compared to the control group without PHA stimulated, the level of cytokines was increased significantly ( $P < 0.05$ ); while with respect to the experimental group without PHA stimulated, the level of cytokines showed no significant change. **Conclusion** Riboflavin plus ultraviolet light treatment can significantly inactivate selected virus, inhibit the production residual leukocytes of PLT release cytokines during storage, and *in vitro* apheresis platelets' various parameters compared with negative controls show no significant difference.

**Key words** riboflavin; ultraviolet light; virus inactivation; human cytomegalovirus; cytokine; phytohemagglutinin