

陡脉冲电场选择性灭活血液中病原体效果观察

张强¹, 袁建强², 刘宏伟², 赵树铭¹, 何梦婕¹, 蒋天伦¹

1. 第三军医大学附属西南医院输血科, 重庆 400010; 2. 中国工程物理研究院流体物理研究所, 四川 绵阳 621000

【摘要】目的:观察纳秒级陡脉冲在10 ns脉宽参数下对病原体的杀伤效应,以及对红细胞的损伤作用,研究高压脉冲电场应用于血液病原体灭活的可能性。**方法:**以大肠埃希菌为研究对象,采用脉冲参数40~80 kV/cm、脉宽10 ns、重复频率1 Hz的陡脉冲进行实验处理,实验菌株活力以MTT法进行检测,三波长法检测处理前后的血液样品的游离血红蛋白(FHb)浓度。**结果:**在电场强度40 kV/cm、10个脉冲作用下活性抑制率达到54.5%,不同介质中脉冲数对细菌活性均有显著影响($P<0.05$);不同脉冲电场强度越大其抑制率有所升高,但均无统计学意义($P>0.05$);无菌条件下,脉冲数对红细胞的影响显著($P<0.05$);有菌条件下,脉冲数及电场强度对溶血仍有影响,但统计结果不显著(电场强度 $P=0.159$,脉冲数 $P=0.278$);FHb在10个脉冲数的作用下,没有显著增加,甚至比对照组更低。**结论:**纳秒级陡脉冲电场具备较强的杀菌能力,且在一定参数条件下不对血细胞产生明显的损伤作用,具备选择性杀伤的潜在作用。

【关键词】陡脉冲电场;红细胞;血红蛋白;杀菌;MTT法

【中图分类号】R331.1;Q6-33

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2016)09-0955-04

Effect of steep pulsed electric field on pathogen inactivation in blood

ZHANG Qiang¹, YUAN Jian-qiang², LIU Hong-wei², ZHAO Shu-ming¹, HE Meng-jie¹, JIANG Tian-lun¹

1. Department of Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute of Fluid Physics, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621000, China

Abstract: Objective To research on the possibility of applying high voltage pulsed electric field for pathogen inactivation in blood by observing the effects of steep pulsed electric field (SPEF) at 10 ns pulse width on pathogen inactivation, and studying the adverse influence on the red blood cell. **Methods** The Escherichia coli was treated by the steep pulse with 40-80 kV/cm, 10 ns pulse width, repetition frequency of 1 Hz. The bacterial activity was detected by MTT method, and the concentration of free hemoglobin (FHb) in blood sample was detected before and after three wavelength spectrophotometry. **Results** The inhibition ratio of bacterial activity was 54.5% with the treatment of 10 pulses at electric field intensity of 40 kV/cm. In different media, the number of pulses showed significant effects on the bacterial activity ($P<0.05$). The inhibited ratio of bacterial activity increased with the increasing electric filed density, without any statistical significance ($P>0.05$). Under the condition without bacteria, the number of pulses showed significant impacts on red blood cells ($P<0.05$); under the condition with bacteria, the number of pulses and electric filed density had effects on red blood cells, without significant statistical results ($P=0.278$, $P=0.159$). With the treatment of 10 pluses, the FHb concentration did not significantly increased, even lower than the FHb concentration of control group. **Conclusion** The nanosecond SPEF has strong ability of sterilization, without causing significant adverse effects on red blood cells at certain parameter conditions, which indicates a potential application of SPEF in selectively inactivating pathogens in blood.

Key words: steep pulsed electric field; red blood cell; hemoglobin; sterilization; MTT method

前言

【收稿日期】2016-04-15

【基金项目】国家重大科学仪器开发专项(2011YQ13001903);物理与生物交叉实验室基金(WSS-2015-01)

【作者简介】张强,研究生,检验技师,研究方向:血液病原体灭活, E-mail: zq_ptb@sina.com

【通信作者】蒋天伦,博士,副教授,研究方向:血液病原体灭活, E-mail: jtianlun@139.com

陡脉冲电场是一种有效的灭菌技术,其灭菌效应不受耐药因素影响,灭菌过程无污染物残留,能耗低且操作程序方便快捷,常在几毫秒内达到灭菌效果。现有研究发现,灭菌效果主要与电场强度、脉冲宽度、脉冲数等参数相关^[1-2]。很多研究认为陡脉冲电场在100 ns以上的脉宽参数下其杀菌作用强烈,同时在该参数下的脉冲效应可同样作用于真核细胞^[3-4]。进一步研究发现,在脉冲宽度进一步缩窄到

10 ns,电压在几十千伏的参数下,脉冲电场作用于真核细胞后会产生一系列细胞内效应,诱导细胞发生凋亡^[5]。目前,关于超快脉冲作用于原核生物的研究报道越来越多,但该技术是否可以成功应用于血液制品的研究仍鲜有报道。为进一步扩展陡脉冲电场的应用范围,本研究将脉冲宽度进一步缩窄到10 ns,研究杀菌效应与脉冲强度的关系,同时观察其对红细胞的损伤效应。在此基础上寻求将该技术应用于血液制品病原体灭活的可能性。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

大肠杆菌 *E.coli* (ATCC25922) 由重庆庞通医疗器械有限公司提供,用LB培养基培养,培养基含酵母提取物(OXOID, LP0021)、蛋白胨(OXOID, LP0042)、NaCl(成都科龙化工试剂厂,批号:20100430)、琼脂粉(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, DH010-1.1)。置于37℃,饱和湿度培养箱常规培养,12~14 h后用于实验。

1.2 样品制备

实验所用的血液制品为中国人民解放军重庆血站报废的血浆和红细胞。分别用生理盐水和血浆将培养的菌液用麦氏比浊仪(DADE BEHRING Microscan Turbidity Meter)调制成1个麦氏单位,约 10^8 cfu/mL浓度的细菌待用品,脉冲处理前分别用生理盐水、血浆配制成约 10^6 cfu/mL浓度的实验样品。用血浆配制的细菌与红细胞1:1混合,菌液最终浓度为 10^6 cfu/mL。配制好的样品加入到加载容器中,在不同脉冲参数下进行处理。

1.3 实验装置及脉冲处理

实验加样器如图1所示,电极直径0.2 cm。纳秒级陡脉冲发生器如图2所示,由合作单位中国工程物理研究院流体物理研究所研制,图2a为陡脉冲源实物图,图2b为光导开关,加载到生物样品上的电压波形如图2c所示。在单脉冲或多脉冲作用期间,由于生物负载的差异,电压幅值在8~15 kV左右,极性为负。加载电压的上升沿约3.8 ns,脉冲宽度约7.8 ns。取800 mL样品于加样器中,电极两边分别加载10、50、100个脉冲,对照组不加载电压,进行假处理。

1.4 MTT检测细菌活性

收集处理前后的细菌,接种96孔板,每孔100 mL样品,以生理盐水做调零孔,以假处理样品做为对照。加样后每孔加浓度5 mg/mL的MTT(SIGMA)20 mL,在5% CO₂、37℃条件下孵育15 min后直接用酶联免疫检测仪(THERMO, MULTISKAN

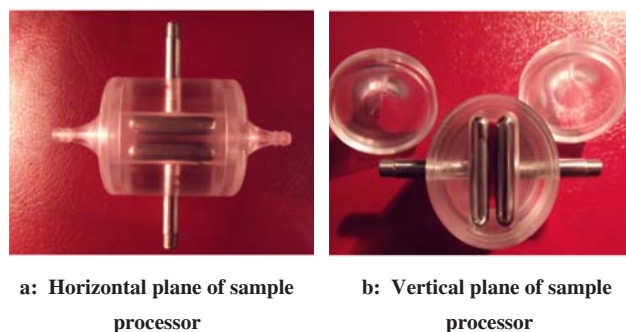
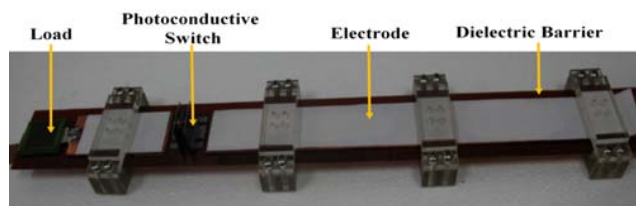


图1 样品加载处理器

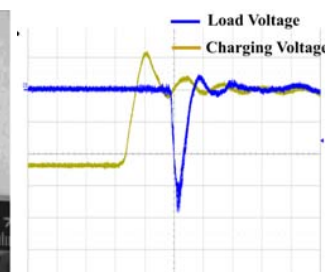
Fig.1 Processor for the sample



a: Ultra-short electromagnetic pulse source



b: Photoconductive switch



c: Overlapping voltage

The load voltage was the voltage loaded onto the sample, and the charging voltage was the voltage loaded onto the pulse source.

图2 超脉冲源、光导开关与重叠电压图

Fig.2 Ultra-short electromagnetic pulse source, photoconductive switch and overlapping voltage

SPECTRUM)检测在波长570 nm处的吸光度值。

1.5 三波长法检测游离血红蛋白(FHb)浓度

称取7.5625 g Tris(FARCO Chemical Supplies, 香港)溶于1000 mL水中,以浓盐酸调pH值至8.0,取300 mL待检标本于2.7 mL Tris-HCl中混匀,按照全波长酶标仪操作步骤,用Tris-HCl调零,在380、415、450 nm处测定样本吸光度值(OD值)。FHb浓度计算公式:

$$\text{FHb}(\text{mg/L}) = [1.68 \times \text{OD}_{415} - 0.84 \times (\text{OD}_{380} + \text{OD}_{450})] \times 1000(\text{mg/L}) \quad (1)$$

1.6 数据处理及统计学方法

结果中细菌活性抑制率及溶血增加率采用以下公式进行计算:

$$\text{细菌活性抑制率} = \frac{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

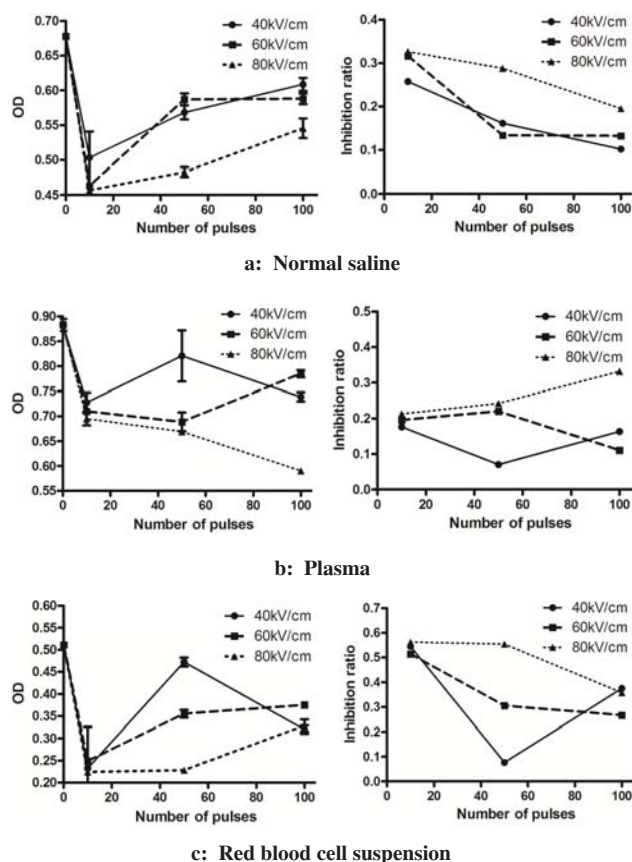
$$\text{溶血增加率} = \frac{\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{对照组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

统计分析方法为多因素方差分析,利用 SPSS 18.0 进行分析,图形结果绘制软件为 Graphpad Prism 5.0。

2 结果与分析

2.1 不同介质中陡脉冲电场对细菌活性的影响

用陡脉冲电场处理后,采用 MTT 方法检测细菌活性。不同介质中脉冲作用于细菌的效应不尽相同(图3),在红细胞悬液中对细菌的灭活效应更强。图3c显示,在电场强度 40 kV/cm、10 个脉冲作用下,活性抑制率达到 54.5%。



OD: Optical density

图3 不同介质中脉冲处理对细菌活性影响

Fig.3 Effects of steep pulsed electric field (SPEF) on bacterial activity in different media

从不同脉冲数可以看出,抑制率随脉冲数增加有所下降,但不成线性关系,方差分析在不同介质中脉冲数对细菌活性均有显著影响($P < 0.05$)。两两比较显示,当介质为生理盐水时,除 50 脉冲数与 100 脉冲数没有显著性差异外,其它各组别间均存在显著

性差异($P < 0.05$)。当介质为血浆和红细胞悬液时,各处理组与未处理组均存在显著性差异,而各处理组间差异不显著($P > 0.05$)。从不同脉冲强度可以看出,电场强度越大其抑制率有所升高,但均无统计学意义($P > 0.05$)。

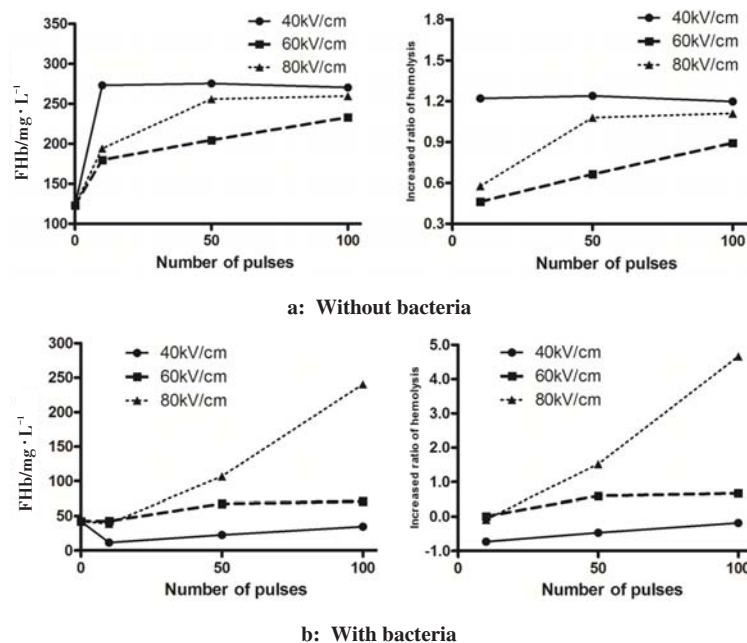
2.2 陡脉冲电场处理对红细胞溶血的影响

结果表明无菌条件下(图4a),脉冲数对红细胞的影响显著($P < 0.05$),随着脉冲数的增加溶血程度越高。两两比较显示,各处理组与未处理组之间差异显著,而各处理组间没有显著性差异($P > 0.05$)。统计结果仍表明,场强对溶血的影响不显著($P > 0.05$)。有菌条件下(图4b)可以看出脉冲数及电场强度对溶血仍有影响,但统计结果并不显著,均没有统计学意义(电场强度 $P = 0.159$,脉冲数 $P = 0.278$)。在 10 个脉冲数的作用下,FHb 没有显著增加,甚至比对照组更低。

3 讨论

高压脉冲电场在食品饮料行业的应用研究已较为广泛,在高压脉冲电场作用下,生物细胞或组织会发生一系列化学、物理变化,改变其生理活性^[6]。本研究也再次证实了高压脉冲电场能有效杀灭微生物病原体,在 10 个脉冲数时对 *E.coli* 的抑制率就可达 50% 以上,杀菌效果明显。而此参数下红细胞的溶血现象并不明显,尤其在有菌条件下,10 个脉冲数的作用几乎对红细胞不产生任何溶血影响。本文研究结果证实,陡脉冲电场应用于血液病原体灭活的可能性,提示只要预先设定好脉冲参数,便有可能对血液制品中的病原微生物进行选择性的杀伤,而不对发挥功能的血液成分产生明显的损伤。

现有研究认为,高压脉冲电场作用可能与生物分子的表达及酶活性相关,其中涉及信号传递等复杂的生物过程^[7-8]。而另有研究认为高压脉冲电场的作用机理与 Ca^{2+} 相关,其中一个重要的过程就是生物膜上微孔的形成、即电穿孔效应^[9-10]。该理论认为在脉冲电场的作用下生物膜的内外两面的电势平衡被打破,引发膜上微孔的产生。在此基础上, Ca^{2+} 包括其它如 Na^{+} 离子的平衡也被打破,从而产生一系列级联反应引发生物细胞的活性改变。不仅如此,有学者还认为微孔的形成,胞内离子浓度的升高引起活性氧的产生,导致 DNA 的损伤,凋亡蛋白的活化。Ganeva 等^[3]在扫描电镜下观察到脉冲电场的作用不仅起到提高质膜通透性的作用,而且还引起膜结构的改变,从而导致膜上微孔数量的增加。Ras-sokhin 等^[9]研究表明在没有 Ca^{2+} 存在下,脉冲电场会诱导细胞形成伪足样囊泡,其性质类似于细胞的阿



Fhb: Free hemoglobin

图4 陡脉冲电场处理对红细胞溶血影响
Fig.4 Effects of SPEF on red blood cell hemolysis

米巴样迁移,他们认为这种现象可能与脉冲电场作用于生物体更深层次的机制相关。本文研究发现,陡脉冲电场对细菌的抑制作用与脉冲数及电场强度并不存在显著的线性关系,当脉冲数增加时,其抑菌效果可能反而降低,实验结果显示10个脉冲数时其抑菌效果最强。虽然电场强度与抑菌效果存在一定正相关关系,但统计学意义并不显著。这些结果表明纳秒级脉冲电场的作用机理有别于传统方法的热效应,提示可能存在更多的生物内效应。纳秒级脉冲电场对细菌和红细胞的效应不尽相同,也从侧面佐证了其作用于生物体的机理不仅是单纯的物理过程,更多的可能涉及复杂的生物内效应。

有关高压脉冲电场的研究目前已取得众多可喜成果,但其内在作用机理还未能完全清楚,要使该技术达到应用要求还需对效应参数、作用机理做更深入的研究。

【参考文献】

- [1] GARCIA P A, ROSSMEISLJR J H, NEALII R E, et al. A parametric study delineating irreversible electroporation from thermal damage based on a minimally invasive intracranial procedure[J]. Biomed Eng Online, 2011, 10(1): 1-22.
- [2] GARCIA P A, PANCOTTO T, ROSSMEISL J R, et al. Non-thermal irreversible electroporation (N-TIRE) and adjuvant fractionated radio-therapeutic multimodal therapy for intracranial malignant glioma in a canine patient[J]. Technol Cancer Res Treat, 2011, 10(1): 73-83.
- [3] GANEVA V, GALUTZOV B, TEISSIE J. Evidence that pulsed electric field treatment enhances the cell wall porosity of yeast cells [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(3): 1540-1552.
- [4] FREY W, GUSBETH C, SCHWARTZ T. Inactivation of pseudomonas putida by pulsed electric field treatment: a study on the correlation of treatment parameters and inactivation efficiency in the short-pulse range[J]. J Membr Biol, 2013, 246(10): 769-781.
- [5] REN Z, CHEN X, CUI G, et al. Nanosecond pulsed electric field inhibits cancer growth followed by alteration in expressions of NF-kB and Wnt/beta-catenin signaling molecules[J]. PLOS One, 2013, 8(9): e74322.
- [6] TIMMERMANS R A, NIEROP GROOT M N, NEDERHOFF A L, et al. Pulsed electric field processing of different fruit juices: impact of pH and temperature on inactivation of spoilage and pathogenic micro-organisms[J]. Int J Food Microbiol, 2014, 173: 105-111.
- [7] LEONG S Y, OEY I. Effect of pulsed electric field treatment on enzyme kinetics and thermostability of endogenous ascorbic acid oxidase in carrots (*Daucus carota* cv. Nantes) [J]. Food Chem, 2014, 146: 538-547.
- [8] SHIRAISHI E, HOSSEINI H, KANG D K, et al. Nanosecond pulsed electric field suppresses development of eyes and germ cells through blocking synthesis of retinoic acid in Medaka (*Oryzias latipes*)[J]. PLOS One, 2013, 8(8): e70670.
- [9] RASSOKHIN M A, PAKHOMOV A G. Cellular regulation of extension and retraction of pseudopod-like blebs produced by nanosecond pulsed electric field (nsPEF)[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(3): 555-566.
- [10] SEMENOV I, XIAO S, PAKHOMOV A G. Primary pathways of intracellular Ca^{2+} mobilization by nanosecond pulsed electric field[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(3): 981-989.

(编辑:陈丽霞)