

RhD 抗原变异型同种免疫反应研究

饶神宗¹ 李归宁¹ 张敏¹ 王寒旭¹ 周晓亮² 陈凤花¹

[摘要] **目的:**研究 RhD 抗原变异型同种免疫反应。**方法:**采用微柱凝胶卡方法检测 2015-07—2016-06 江夏区 42 940 例本地居民 RhD 抗原;应用不同厂家 RhD 抗原试剂对初筛 RhD 阴性进行 RhD 阴性确认;使用 PCR-SSP 法对初筛 RhD 阴性的样本行 RhD 基因分型应用抗人球蛋白试验检测初筛 RhD 阴性样本中的弱 D;用吸收放散试验检测初筛 RhD 阴性样本中的 Del;对初筛 RhD 阴性样本进行不规则抗体筛查和抗体特异性鉴定。**结果:**在 42 940 例中共检出 179 例 RhD 阴性;在 179 例初筛 RhD 阴性中使用血清学方法检出弱 D 2 例、Del 15 例,应用 PCR-SSP 方法检出弱 D 5 例、D-CE(2-9)-D 融合基因型 12 例、Del 型 40 例;12 例 RhD-CE(2-9)-D 中有 2 例检出抗 D 抗体;5 例弱 D 未检出抗 D 抗体;Ddel 型人群中未检出抗体。**结论:**不同 RhD 的变异型对 D 抗原有不同的免疫反应;建立不同的输血策略保障输血安全。

[关键词] Rh 血型;间接抗人球蛋白试验;吸收放散试验;PCR-SSP

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.08.004

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

The study of isoimmunity of RhD antigenic variant

RAO Shen-zong¹ LI Guining¹ ZHANG Min¹ WANG Han-xu¹

ZHOU Xiaoliang² CHEN Fanghua¹

(¹Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Wuhan Mental Health Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Abstract **Objective:** To research the iso-immunization reaction of RhD variant. **Method:** Use microcolumn gel card to detected RhD antigen about 42 940 resident in Jiangxia District from July 2015 to June 2016; The RhD negative samples were confirmed in the preliminary screening RhD negative samples by different RhD reagent. RhD genetic type was performed in the preliminary screening RhD negative samples by PCR-SSP. The weak D in the preliminary screening RhD negative samples were detective by indirect antiglobulin test. The Del in the preliminary screening RhD negative samples were found out by absorption-elution test. Irregular antibody screening and antibody specificity identification were performed in preliminary screening RhD negative samples. **Result:** In 42 940 resident 179 persons were RhD negative weak D 2 persons, Del 15 persons were checked out in 179 persons preliminary screening RhD negative samples by serological examination. Weak D 5 persons, D-CE(2-9)-D fusion genetic type 12 persons, Del type 40 persons be inspected by PCR-SSP. D antibody 2 persons were checked out in 12 person's RhD-CE(2-9)-D. **Conclusion:** Different RhD antigenic variant have different immunization. The establishment different transfusion strategies guarantee blood transfusion safety.

Key words Rh blood group; indirect antiglobulin test; absorptionelution test; PCR-SSP

Rh 血型系统是人类最复杂的血型系统。在 Rh 血型系统中,D 抗原是最重要的抗原,也是免疫原性最强的抗原。因此抗 D 抗体亦是最有临床意义的抗体,在 RhD 阴性人群中有着非常重要临床意义。不同 RhD 抗原变异型在细胞上表达的程度不同,产生的临床影响也不一样。本研究收集本地区近期的 RhD 抗原变异型标本,研究其同种免疫状况,现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

2015-07—2016-06 江夏区 42 940 例本地居民,

其中男 20 484 例,女 22 456 例;年龄 1 d~96 岁,中位 38 岁。根据知情同意原则采集居民 EDTA 抗凝血 2 ml, RhD 初筛阴性居民再采集不抗凝血 5 ml。

1.2 主要试剂

微柱凝胶卡购自瑞士保亚美,单克隆抗 D 抗体试剂、抗人球蛋白试剂均购自上海血液生物医药有限责任公司,3 种抗 D 试剂分别购自上海血液生物医药有限责任公司、baso 和 荷兰 sanquin;基因组 DNA 提取试剂盒(TBG 公司);RhD 基因分型试剂(PCR-SSP 法)(天津秀鹏公司);抗体筛选细胞购自上海血液生物医药有限责任公司,抗体鉴定谱细胞购自瑞士保亚美。所有试剂均在有效期内使

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院(武汉,430022)

²华中科技大学同济医学院附属武汉精神卫生中心

用。

1.3 Rh 血型系统抗原检测

微柱凝胶卡检测 D 抗原,同时使用 3 种抗 D 试剂进行血清学复查,间接抗人球蛋白试验确认弱 D,用吸收放散试验检测 Del。

1.4 RhD 基因分型

对 179 例初筛 RhD 抗原阴性的样本,提取 DNA 后,再使用 PCR-SSP 方法进行 RhD 基因分型。

1.5 血清抗体检测

对初筛为 RhD 阴性血型的血样进行不规则抗体实验和检出的抗体鉴定。

1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 对所得数据进行统计分析。

2 结果

在 42 940 例中,共检出 RhD 初筛阴性标本 179 例,阴性率 0.42%,男女阴性率 $\chi^2=0.0081$, $P>0.05$,差异无统计学意义(见表 1)。

应用 4 种不同产品筛选 RhD 抗原见表 2。

表 1 42 940 例中 RhD 阴性率

性别	RhD(+) /例	RhD(-)/例	阴性率/%
女	22 361	95	0.42
男	20 400	84	0.41
合计	42 761	179	0.42

表 2 应用几种不同 RhD(IgG)试剂检测 179 例标本检测 RhD 抗原

试剂	阳性数	阴性数	阴性率/%
微柱凝胶卡	0	179	100
上海血液	0	179	100
Baso	0	179	100
sanquin	0	179	100

在 179 例 RhD 初筛阴性标本中,采用间接抗人球蛋白试验检测弱 D,共检测弱 D 2 例,阳性率 1.11%;使用吸收放散试验检测 Del,检出 Del 15 例,阳性率 8.38%。

在 179 例 RhD 初筛阴性标本中,采用 PCR-SSP 方法检测弱 D,共检测弱 D 5 例,阳性率 2.79%;RhD-CE(2-9)-D12 例,阳性率 6.70%;1227A 纯 32 例,阳性率 17.88%;1227A 杂 8 例,阳性率 4.47%;Dnull 117 例,阳性率 65.36%;其他 5 例,阳性率 2.79%。

对 179 例 RhD 初筛阴性标本进行抗体筛查,发现 2 例阳性,经抗体鉴定,确认为抗 D 抗体(见表 3)。

表 3 检测 179 例 RhD 初筛阴性标本中产生抗 D 抗体

类型	样本数	阳性数	阳性率/%
弱 D	5	0	0
RhD-CE(2-9)-D	12	2	16.67
1227A 纯	32	0	0
1227A 杂	8	0	0
Dnull	117	0	0
其他	5	0	0

3 讨论

人类血型系统中,Rh 血型系统是最复杂的血型系统,同时是最具抗原多态性的红细胞血型系统^[1]。在 Rh 血型系统中,D 抗原是最重要的抗原,也是免疫原性最强的抗原。RhD 抗原与临床输血关系密切,RhD 血型不合的输血可危及患者的生命;母子 RhD 血型不合的妊娠,有可能发生死胎、早产和新生儿溶血症。有研究证实,50%~75% RhD 阴性人群可以通过输血和妊娠被 RhD 抗原免疫从而产生抗-D 抗体。给 RhD 阴性者输注 RhD 阳性红细胞 200 ml,约 85% 产生抗-D 抗体^[2]。RhD 基因位于人 1 号染色体上,由紧密连锁的 RhD 基因和 RhCE 基因串联排列组成,RhD 基因由 10 个外显子及 10 个内含子组成。

Rh 血型系统中 5 种常见抗原免疫强度不一,依次为 D、E、c、C、e。而 RhD 抗原各类型在不同细胞上表达的强度不同,从增强 D 到正常 D 到弱 D,最弱的是 Del。通常,我们将 RhD 抗原免疫强度减弱称为 RhD 变异型,RhD 变异型包括弱 D、不完全 D(部分 D)、Del^[3]。

弱 D 抗原的改变主要是发生在细胞膜内或膜中,在细胞膜外蛋白质没有发生改变,抗原仅仅是数量发生改变而性质没有发生改变。正常 RhD 阳性红细胞表面有 10 000~30 000 个抗原表位,弱 D 型表位仅 70~4 000 个^[4]。弱 D 抗原很少产生抗体。弱 D15 型为中国人中最常见的类型。弱 D 表现型需要用间接抗人球蛋白试验来鉴定。

部分 D 的抗原改变主要是发生在细胞膜外,抗原免疫原性和数量都发生了改变^[5]。因此部分 D 更易产生抗体。部分 D 的 3 种类型分子形成机制:RhD/CE 融合等位基因、细胞外环的错义突变、散在的错义突变。多数部分 D 是 RhD/CE 融合等位基因,RhD Ψ 假基因和 RhD-CE-D 杂交基因是 2 种常见的部分 D 基因。我们在之前的研究中已发现 RhD-CE(2-9)-D 基因型 12 例,未检测到 RhD Ψ 假基因。

目前,多项研究发现中国汉族 Del 个体具有完整的 RhD 基因外显子,其红细胞膜可能具有完整的 RhD 抗原表达,则可不会被 RhD 抗原免疫产生同种免疫反应,同时大部分存在第 9 外显子 1227G

>A 位点突变, RhD 基因第 9 外显子 1227 位碱基之后即为 5 剪接部位的保守序列 GU, 当该位点由 G 突变为 A, 可能干扰了核小核糖核蛋白颗粒(snRNPs)对 5 剪接部位的保守序列 GU 的识别, 在剪接过程中将第 9 外显子连同第 9 内含子一起剪切, 从而造成多条 Del 转录本均缺失第 9 外显子, 无法表达正常的 RhD 蛋白。是 Del 的主要等位基因^[6-7]。Del 型有非常弱的 RhD 抗原, 是一种只能通过吸收放散试验才能检出的 RhD 血型, 还可以在 RhD 阴性个体中检出^[8]。

在本研究中, 在 42 940 例居民中检出 179 例 RhD 抗原阴性, 阴性率为 0.42%, 与中国汉族 0.2%~0.5% 相符合。男女性别比为 20 484/22 456, 符合当前社会现状。男女 RhD 阴性率差异无统计学意义。在相同条件下, 使用微柱凝胶卡筛选 RhD 阴性样本, 应用 3 组不同厂家的 RhD(IgG)试剂进行验证, 得到相同的结论: 179 例 RhD 阴性样本, 应用间接抗人球蛋白试验检出 2 例弱 D, 应用 PCR-SSP 检出 5 例弱 D, 二者间差异无统计学意义($P>0.05$)。应用吸收放散试验检出 15 例 Del, 应用 PCR-SSP 检出 40 例 Del, 二者间差异有统计学意义($P<0.05$)。在对 179 例 RhD 阴性样本进行抗体筛查, 发现 2 例阳性, 经抗体鉴定, 确认为抗 D 抗体。从而印证了部分 D 容易产生抗 D 抗体, 其他类型 D 变异体不容易产生抗 D 抗体。

在本研究中我们发现部分 Del 人群中产生了抗 D 抗体, 而其他的 RhD 抗原变异型没有产生抗 D 抗体。在排除样本量较小因素外, 我们分析不同的 RhD 抗原变异型的同种免疫强度是不相同的, 发生免疫反应的强度也是不一样的, 对临床的意义也不一样。同时采血机构对初筛为 RhD 阴性的样本可能会再检测是否为弱 D, 但很少有采血机构进一步检测 Del, 这种状况要引起我们足够的重视。在安全输血的大前提下, 对初筛为 RhD 阴性的样本尽可能采用 PCR-SSP 方法进行分型, 减少差错的发生。另一方面, 在临床输血工作中, 真正的 RhDnull 阴性血液及制剂, 不论是输注给 RhD 阴性人群还是输注给 RhD 阳性人群都不会发生溶血

性输血反应。RhD 抗原变异型的血液及制剂对于献血者和受血者的要求也不一样, 作为献血者, 从安全角度出发, 我们建议全部 RhD 抗原变异型的血液及制剂作为 RhD 阳性的血液及制剂供应临床用血机构; 作为受血者, 我们建议 RhD 抗原变异型的弱 D 或 Del 人群可以接受 RhD 阳性的血液及制剂, 而部分 D 人群接受作为 RhDnull 的血液及制剂。这样, 既保障输血安全, 又能节约稀缺的血液资源。

随着研究的不断深入, 我们会发现越来越详尽的 RhD 抗原变异型的基因型及分子背景, 更加简单快捷的检测方法, 这对于安全输血的贡献也越来越大。对于指导临床输血、保障输血安全、节约 RhD 血液资源、更有效的利用稀有血型资源具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 胡丽华. 临床输血学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 23—27.
- [2] Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system; a review[J]. Blood, 2000, 95: 375—387.
- [3] Geoff Daniels. Rh blood group system. Human Blood Groups[M]. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 2002: 195—274.
- [4] Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Molecular-basis of weak D phenotypes[J]. Blood, 1999, 93: 385—393.
- [5] Flegel WA, Wanger FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice [J]. Clin Lab, 2002, 48: 53—59.
- [6] Yang YF, Wang YH, Chen JC, et al. Prevalence of RhD 1227A and hybrid Rhesus box in the general Chinese population[J]. Transl Res, 2007, 149: 31—36.
- [7] Chen JC, Lin TM, Chen YL, et al. RhD 1227A is an important genetic marker for Rh D(el) individuals[J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122: 193—198.
- [8] Lee YL, Chiou HL, Hu SN, et al. Analysis of RhD genes in Taiwanese RhD-negative donors by the multiplex PCR method[J]. Clin Lab Anal, 2003, 17: 80—84.

(收稿日期: 2017-07-20)