

# 幼儿血型 B 抗原性减弱的分析及探讨\*

杨云乐<sup>1</sup> 马玲<sup>2</sup> 王晓卫<sup>1</sup> 韩军<sup>1</sup> 李亭<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:分析 2 例幼儿血型 B 抗原减弱的原因,为今后婴幼儿血型的进一步研究提供实验性数据。方法:对 2017 年 2 例 13 个月龄患儿血型 B 抗原性减弱的样本进行血清学和 Sanger 双碱基 DNA 分子测序分析。结果:2 例样本其中 1 例 ABO 血型基因型为 ABO \* B101,另 1 例为 Bw 型。结论:本次研究提示,幼儿血型抗原减弱可能是红细胞上血型抗原表达减弱导致,血型基因并未发生突变;也有可能是由于血型亚型造成,在儿童血型鉴定时尤其要重视。

**[关键词]** 儿童血型;B 抗原减弱;血清学检测;基因测序

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.016

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Analysis and discussion on the weakening of blood group B antigen in children

YANG Yunle<sup>1</sup> MA Ling<sup>2</sup> WANG Xiaowei<sup>1</sup> HAN Jun<sup>1</sup> LI Ting<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, 210008, China; <sup>2</sup>Jiangsu Blood Center Blood Transfusion Research Laboratory)

Corresponding author: LI Ting, E-mail: 172516574@qq.com

**Abstract Objective:** To analyze the causes of the weakening of blood group B antigens in 2 children in order to provide experimental data for further studies on the blood type of children in the future. **Method:** Serum and Sanger double-base DNA sequencing analysis of 2 samples of 13 children with 13 months of age in our hospital in 2017. **Result:** One of the two samples had an ABO blood group genotype of ABO \* B101 and the other was a Bw type. **Conclusion:** This study suggests that the weakening of blood group antigens in children may be caused by weakened expression of blood group antigens on red blood cells. Blood group genes have not been mutated; it may also be due to blood group subtypes, which should be valued in children's blood group identification.

**Key words** child blood type; reduced B antigen; serological testing; gene sequencing

由于新生儿抗体发育较晚,同时因个体差异及不同种族和地区的儿童发育状况不一,ABO 血型系统发育成熟与否并无明显界限,我们前期的统计分析也说明了这一点<sup>[1]</sup>。因此,儿童阶段的血型鉴定时,均有可能出现正反定型不一致情况。但是,由于 ABO 抗原减弱和血型亚型的表现较为相似,所以往往儿童血型亚型更容易被忽视和漏检。本次试验对 2 例患儿血型鉴定时微柱凝胶法表现为 B 抗原减弱的样本进一步进行血清学检测和分子生物学分析,明确其抗原减弱的原因。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 样本来源

2 例 B 抗原减弱样本均来自我院住院患者,年龄均为 13 个月。其中腭裂 1 例,喘息性支气管炎 1 例。

#### 1.2 试剂

Diamed 血型鉴定卡(美国伯乐);单克隆抗 A、

抗 B 试剂、抗 H 及 A 型 B 型标准红细胞(上海血液生物医药有限责任公司);DNA 提取试剂盒(天津原平皓生物技术有限公司);外显子 1~4 及 5~7 测序引物序列分别参见文献[2-3],引物由南京金斯瑞科技有限公司合成。测序扩增用试剂 BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(美国 ABI 公司)。

#### 1.3 主要仪器

Alphalmager 凝胶成像仪(美国 Alphalmager 公司);Life Express Thermal 扩增仪(中国 BIOER 公司);ABI3500DX 基因测序仪(美国 ABI 公司);ND-100-Spectrophotometer DNA 定量分析仪(美国 NanoDrop 公司)。

#### 1.4 试验方法

**1.4.1 ABO 血型血清学鉴定** ①微柱凝胶法血型鉴定:抗 A、抗 B、抗 D 及阴性对照孔中分别加入待检 RBC 悬液(5%)10 μl,正反定型试验孔中分别加入 A、B 标准细胞悬液(0.8%)50 μl,待检血浆 50 μl。专用离心机(离心力 85 g)离心 10 min,判读结果。②试管法血型鉴定:严格按照《全国临床检验操作规程》(4 版)<sup>[4]</sup>进行盐水试管法血型复

\* 基金项目:南京市医学科技发展项目(No:YKK17159)

<sup>1</sup>南京医科大学附属儿童医院检验科(南京,210008)

<sup>2</sup>江苏省血液中心输血研究室

通信作者:李亭, E-mail: 172516574@qq.com

核,疑似亚型或抗原减弱者,采用多次离心技术及增加抗 H 试剂进一步试验,记录结果。

**1.4.2 基因测序** 采用 Sanger 双脱氧链末端终止测序法分析。①目的基因:扩增条件为 94℃ 5 min、94℃ 30 s、62.3℃ 30 s、72℃ 210 s、72℃ 10 min,共计 33 个循环,完成扩增后,在扩增管每孔加 10U 核酸外切酶 I 和 1 U 牛小肠碱性磷酸酶,37℃ 30 min 进行酶切纯化,80℃ 15 min 灭活酶的活性。②测序:扩增条件为 96℃ 5 min、96℃ 10 s、50℃ 30 s、60℃ 4 min,共计 25 个循环,完成扩增、纯化后,上机测序。③ABO 血型基因比对:测序结果与参考序列进行比对,ABO 血型参考序列为 ABO \* A101: AJ536122。使用 Sequencing Analysis 和 SeqScape 软件进行测序图谱分析和序列比对。

**2 结果**

**2.1 血清学检测结果**

采用微柱凝胶法(卡式法)结合盐水试管法对 2 例标本进行血清学血型鉴定,结果见表 1。其中与抗 H 反应结果为:1 号试剂 1+<sup>w</sup>,2 号试剂 2+,

O Cell 试剂 3+,B Cell 试剂 1+<sup>w</sup>。

表 1 2 份样本血清学 ABO 血型鉴定结果

样本号	方法	正定型		反定型			自身对照
		抗 A	抗 B	A <sub>1</sub>	B	O	
1	卡式法	4+	1+ <sup>w</sup>	0	0	0	0
	试管法	4+	1+	0	0	0	0
2	卡式法	0	0	4+	0	0	0
	试管法	0	1+ <sup>w</sup>	4+	1+	0	0

结果显示,经微柱凝胶法试验,2 号样本存在不同程度正反定型不符现象;经盐水试管法多次离心后可增强反应,其中 1 号样本未检出抗 A、抗 B 抗体,2 号样本检出抗 A 抗体及低效价抗 B 抗体;1 号样本与抗 H 的反应强度同 B 细胞,2 号样本与抗 H 反应较 B 细胞增强,而较 O 细胞减弱。

**2.2 基因测序结果**

经测序分析,2 例样本特征性碱基突变见表 2,图 1、2。

表 2 2 例血型抗原减弱标本的测序结果

样本号	血型表型	基因型	主要碱基序列
1	AB(B 弱)	A101/B101	297A>G;526C>G;657C>T;703G>A;796C>A;803G>C;930G>A
2	Bw	Bw03	297A>G;526C>G;657C>T;703G>A;721C>T;796C>A;803G>C;930G>A

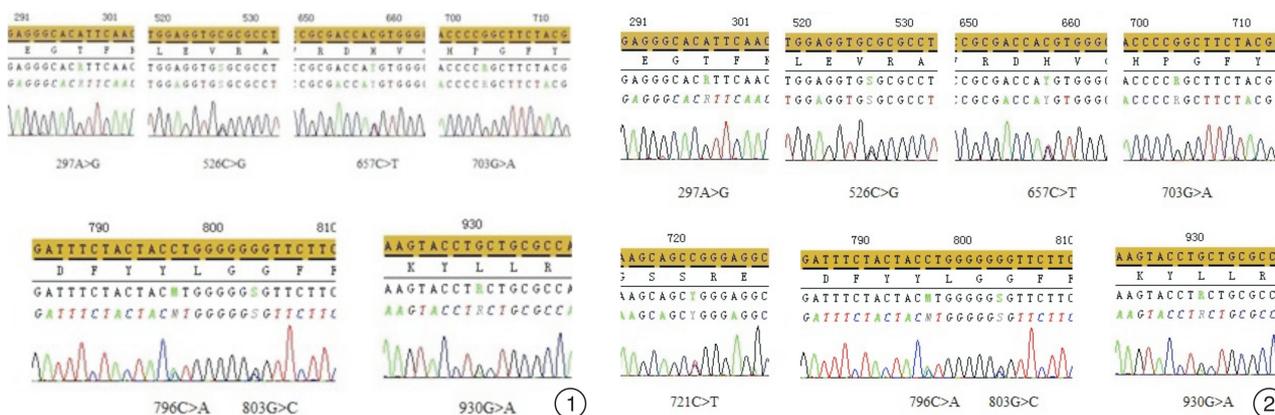


图 1 1 号样本测序结果;图 2 2 号样本测序结果

结果显示,1 号样本基因型为 A101/B101,表明此样本 ABO 血型基因并未发生突变,而是其红细胞上血型抗原表达减弱(B 抗原性减弱),血型表型为 AB(B 弱)型;2 号样本出现 Bw03 型 721C>T 特征突变,血型表型为 Bw 型。

通过血清学实验及分子生物学分析,2 例 B 抗原性减弱样本,1 例为血型 B 抗原表达减弱,1 例为 Bw 亚型。由此得出幼儿血型抗原减弱有可能 ABO 血型基因并未发生突变,而是其红细胞上血

型抗原表达减弱导致,也有可能是由亚型造成。

**3 讨论**

正确的血型鉴定是临床安全输血的重要保障。由于血型抗原发育的特点,婴幼儿 ABO 抗原无论在数量上和质量上都与成人红细胞有较大差异。Klein 等<sup>[5]</sup>报道 ABO 系统的抗原发育最早可以在胚胎期 5~6 周的红细胞上查到血型抗原,但其强度在胚胎期间并不明显增加,刚出生的新生儿红细胞所带的抗原数目只有成人的 25%~50%,出生

后逐步成熟,一般在 18 个月后才能充分表现抗原性。有文献报道,直到 2~4 岁时血型抗原才能基本达到成人水平<sup>[6]</sup>。

ABO 血型系统抗原抗体发育较晚,它不仅与自身遗传有关,更与环境密不可分且起主要作用。不同个体的食物、营养、卫生条件、环境等各种因素及不同国家和地区发展进程和环境影响的不同,表现在 ABO 血型系统的抗原和抗体水平是不同的。新中国成立以来,我国社会经济发展有了翻天覆地的变化、人的预期寿命有了极大的提高、营养与食物结构有很大的变化、卫生环境有了极大的改善、青少年的发育年龄也有大幅度提前,而这些对于对血型血清学的影响如何、尤其是这些巨大的变化反映在儿童的 ABO 血型抗原抗体上的情况,知之甚少。目前我们对儿童 ABO 血型鉴定的一些规定仍沿用许多年前,甚至是国外的参数。这些情况难以满足我国现阶段临床儿童 ABO 血型工作的需要。国内虽然也有少数有关新生儿 ABO 血型系统抗 A 和(或)抗 B 抗体的报道<sup>[7]</sup>,但未见现阶段我国不同年龄段 ABO 血型抗原与抗体及其相关问题的系统的、综合性的研究报告。

前期试验研究中我们发现,血型抗体产生的年龄界限不明,1 岁以上的幼儿仍存在正反定型不一致情况,而新生儿也有正反定型一致的现象<sup>[1]</sup>。ABO 血型系统的亚型在血清学试验中,其抗原也表现出不同程度凝集减弱或无凝集。所以,儿童血型鉴定时,如果是由于 ABO 亚型造成的抗原性减弱或正反定型不一致,则更容易被忽视和漏检。

本次试验,我们分析了 2 例 13 个月幼儿 B 抗原减弱样本。其中 2 号样本微柱凝胶法未检出 B 抗原和抗 B 抗体,而试管法检出较弱 B 抗原和 B 抗体,可能因为患者年龄较小(13 个月),抗原抗体发育不全,不易检出。而试管法可以通过多次离心等技术加强抗原抗体反应,所以更能准确反映抗原抗体产生情况。因此,在微柱凝胶法进行血型鉴定时,如有特殊情况应采用盐水试管法进一步确定。将此 2 例样本进一步采用 Sanger 双脱氧 DNA 分子测序的方法进行分析。结果显示,2 例 B 抗原减弱样本中,1 例是由 B 亚型(Bw03)所造成,另 1 例具有正常的 B101 等位基因,这表明该患者 B 抗原反应性减弱是由于红细胞上血型抗原表达减弱导致,并非 ABO 血型的基因突变。但是,引起其 B 抗

原弱反应性的具体机制尚不清楚。

B 亚型较 O 亚型较为少见,主要包括 B<sub>3</sub>\B<sub>X</sub>\B<sub>M</sub>\B<sub>el</sub>\B<sub>w</sub>等亚型。1956 年 Ievine 等发现 Bw 血型是 O 型及 B 型的混合型,之后 Marsh 等将同样血型称为嵌合体。Bw 型最先由日本检出,对抗 B 显示较弱凝集。

ABO 血型抗原的弱表达受多种因素影响。文献报道,ABO 基因酶催化活性区域的编码序列错义突变是形成 ABO 亚型的主要原因。另外如糖基转移酶分泌不足、酶催化活性区域外的编码序列错义突变、前体物质的变异或缺乏及其他转移酶的合成干扰等,也可能造成 ABO 血型抗原的表达减弱。

由于抗原减弱(凝集度<2+)的样本较少,本次试验仅分析了 2 例 13 个月幼儿 B 抗原减弱的情况。日后的工作中,我们仍将继续关注和分析研究儿童,特别是小于 1 岁的婴幼儿血型抗原性减弱的情况,以期儿童 ABO 血型抗原发育趋势及临床输血提供新的研究数据。

#### 参考文献

- [1] 王晓卫,韩军,李萌. 18 个月以内婴幼儿 ABO 血型正反定型分析[J]. 南京医科大学学报, 2015, 35(11): 1652-1653.
- [2] Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles[J]. Blood, 2001, 98: 1585-1593.
- [3] Zhu F, Tao S, Xu X, et al. Distribution of ABO blood group alleles and identification of three novel alleles in the Chinese Han population[J]. Vox Sang, 2010, 98: 554-559.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [5] Klein HG, Anstee DJ. ABO, H, LE, P1PK, GLOB, I, and FORS blood group systems. In: Mollison's blood transfusion in clinical medicine[M]. 12th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2014: 118-166.
- [6] Cooling L. Polylactosamines, there more than meets the "Ii": A review of the I system[J]. Immunohematology, 2010, 26: 133-155.
- [7] 钟月华. 1133 例新生儿 ABO 血型鉴定正反定型的结果分析[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(4): 27-28.

(收稿日期:2018-06-05)