

# 双胎输血综合征患儿 A<sub>2</sub> 血型 2 例及其家系基因调查

陈海婧<sup>1</sup> 张敏<sup>1</sup> 鲁学良<sup>1</sup> 孙浩然<sup>1</sup> 饶神宗<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:分析 2 例 ABO 亚型 A<sub>2</sub> 及其家系成员的血型基因。方法:同时应用血清学实验、序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)方法检测患者及其家系成员 ABO 基因,并进行测序。结果:2 例患者血清学结果均为 A 亚型,PCR-SSP 分型结果为 A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>,其母亲血清学结果为 O 型,PCR-SSP 分型结果为 O<sub>01</sub>/O<sub>02</sub>,其父亲血清学结果为 A 亚型,PCR-SSP 分型结果为 A<sub>205</sub>/A<sub>205</sub>,所有家庭成员的 PCR-SSP 结果与测序结果相符。结论:ABO 血型亚型具有遗传基础,可以结合分子生物学方法、血清学方法和家系调查等方法进行最终确认。

**[关键词]** ABO 血型;A<sub>2</sub> 亚型;家系调查

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.10.010

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Identify A<sub>2</sub> blood group in Twin-to-twin transfusion syndrome newborns and pedigree surveys

CHEN Haijing ZHANG Min LU Xueliang SUN Haoran RAO Shenzong

(Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: RAO Shenzong, E-mail: 1833703604@qq.com

**Abstract Objective:** To test the A<sub>2</sub> blood group in two cases of Twin-to-twin transfusion syndrome newborn and to research the ABO blood group of their family members. **Method:** The ABO blood group that the patients and their parents were detected by serological experiment, sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR-SSP) and sequencing of gene sequences. **Result:** The serological results of the patients specimen were typed as A subtype and genotyped as A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>, the serological results of the mother specimen was typed as O and genotyped as O<sub>01</sub>/O<sub>02</sub>, the serological results of the father specimen was typed as A subtype and genotyped as A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>, and the result of all the family members about sequencing of gene sequences are consistent with PCR-SSP methods. **Conclusion:** ABO subtype has a genetic basis and can be identified by molecular biological methods combined with serological methods and family surveys.

**Key words** ABO blood group; A<sub>2</sub> subtype; family line investigation

1900 年 Karl Landsteiner 发现了人类第一个血型系统—ABO 血型系统,也是最具临床意义的血型系统。根据凝集原 A、B 的分布,ABO 血型系统将血液分为 A、B、AB、O 4 型。红细胞表面上只有凝集原 A 的称为 A 型血,即 A 型血的红细胞表面有 A 抗原,血清中含有抗 B 抗体。ABO 血型系统的 A 抗原是在 α-1,3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶作用下,将 N-乙酰半乳糖连接于前体 H 物质的半乳糖所形成,而 B 抗原是在 α-1,3-半乳糖胺基转移酶作用下,将 D-半乳糖连接于前体 H 物质的半乳糖所形成。ABO 血型亚型通常表现为红细胞上相关抗原表达减弱或者 ABO 血型鉴定正反定不符<sup>[1]</sup>,是由基因突变所导致的,包括基因的点突变、插入、缺失和重组等。我院在患者诊断中发现 2 例 A<sub>2</sub> 亚型,现将鉴定结果及家系调查结果报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

患儿们为早产儿(33W+),均无输血史,单合子单绒毛膜双胎。小儿子出生时面色欠红润,体重 1 750g, Hb 208g/L,出院诊断为早产儿,代谢性酸中毒,新生儿呼吸窘迫综合征,双胎输血综合征输血者,新生儿贫血,低出生体重儿;大儿子出生时面色红润,多血貌,进行过 2 次部分换血治疗,体重 2 050g, Hb 235g/L,出院诊断为早产、高危、低出生体重儿,新生儿黄疸,双胎输血综合征受血者,新生儿红细胞增多症-高黏滞度综合征,卵圆孔未闭,呼吸性碱中毒,宫内感染性肺炎。经家属知情同意,对家系二代共 4 名家庭成员血型做血清学及分子生物学鉴定。

### 1.2 主要试剂与设备

单克隆抗-A、抗-B、抗-AB、抗-H 试剂及人 ABO 反定型用标准红细胞(上海血液生物医药有限责任公司),ID-Centrifuge 12 S II 型离心机(瑞士达亚美有限公司),ABO、RhD 血型检测卡(瑞士达

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院(武汉,430022)  
通信作者:饶神宗, E-mail: 1833703604@qq.com

亚美有限公司)。人类基因组 DNA 提取试剂盒(天根(北京)生化技术有限公司)。人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(天津市秀鹏生物技术开发有限公司)。试剂盒均在有效期内使用。SIG-MA1-14 高速离心机(德国 SIGMA 公司),ABI 9700PCR 仪(美国 ABI 公司),JY300C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),JY-SP3 型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),GenoSens1860 凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司),ABI 3730XL 测序仪,所有仪器均能正常使用。

1.3 方法

1.3.1 血清学实验 采用微柱凝胶法和试管法检测 ABO 血型,应用试管法进行抗-H 实验和吸收放散实验。

1.3.2 基因组 DNA 提取 严格按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,并调整基因组 DNA 含量为 15~100 ng/ $\mu$ l,纯度 A260/A280 = 1.6~1.8。

1.3.3 ABO 基因分型 采用 PCR-SSP 法,应用人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒,对本标本进行基因分型。

1.3.4 测序和分析 应用 ABI 3730XL 测序仪对 4 个家庭成员样本进行测序。序列比对和分析使用软件 FinchTV 阅读测序图谱,软件 DNAMAN 比对和分析测序结果,与 GenBank:NG\_006669 序列进行比对,确定样本基因型。

2 结果

2.1 血型血清学鉴定结果

患儿们血型鉴定:正定均为 A 抗原减弱,凝集出现双群,反定无凝集。大儿子结果见图 1,小儿子结果见图 2。

2 患儿及其父母亲 4 个人抗-H 实验结果提示

父亲、大儿子和小儿子为亚型,母亲为正常血型,见表 1。

家系 4 人吸收放散实验结果均为阴性。

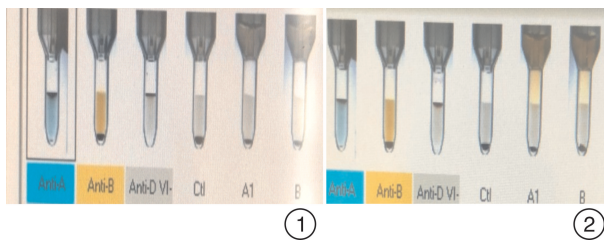


图 1 大儿子血型;图 2 小儿子血型

表 1 家系抗-H 实验结果

被检测者	O <sub>c</sub>	B <sub>c</sub>	P <sub>c</sub>
父亲	3+	1+	3+
母亲	1+	1+	1+
大儿子	3+	1+	3+
小儿子	3+	1+	3+

注:O<sub>c</sub>:O 型新鲜红细胞;B<sub>c</sub>:B 型新鲜红细胞;P<sub>c</sub>:患者新采集红细胞。

2.2 ABO 基因分型结果

对患儿们及其家系进行 ABO 血型基因分型检测(以 A<sub>101</sub> 为参考序列),根据 PCR 扩增产物电泳分析的结果分型表,大儿子基因分型为 A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>(见图 3),小儿子基因分型为 A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>(见图 4),其母亲基因分型为 O<sub>01</sub>/O<sub>02</sub>(见图 5),其父亲基因分型为 A<sub>205</sub>/A<sub>205</sub>(见图 6)。

2.3 测序

根据 NCBI 网站提供的 The Blood Group Antigen Gene Mutation Database 综合结果判定(以 A<sub>101</sub> 为参考序列)父亲、母亲、大儿子和小儿子 4 人 ABO 基因 1~7 外显子 7 个测序图谱(见图 7、8),综合结果判定,见表 2。

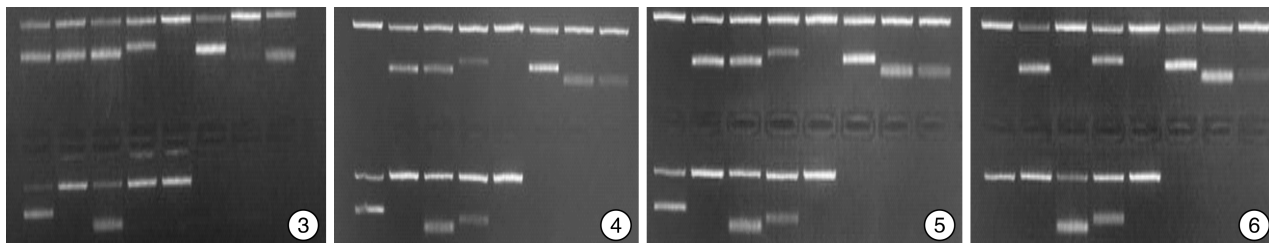


图 3 大儿子 PCR 扩增产物电泳图(A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>);图 4 小儿子 PCR 扩增产物电泳图(A<sub>205</sub>/O<sub>02</sub>);图 5 母亲 PCR 扩增产物电泳图(O<sub>01</sub>/O<sub>02</sub>);图 6 父亲 PCR 扩增产物电泳图(A<sub>205</sub>/A<sub>205</sub>)

3 讨论

双胎输血综合征(TTTS)是双胎妊娠的一种并发症,发生于 10%~15%单绒毛膜双胎妊娠,在 2 000 例孕妇中就有 1 例孕妇可能发生。这种疾病

发展迅速,不平衡的慢性血液从一个双胞胎转移到另一个双胞胎(受体),导致其中一个双胞胎(受体)发生心力衰竭、核黄疸等并发症,双胞胎(供体)在双胞胎(受体)突然死亡后如没有立即采取急救措

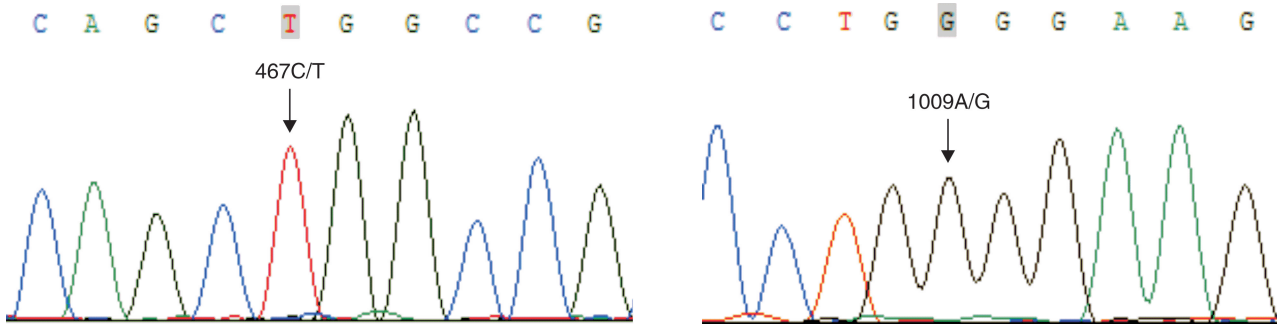


图 7 父亲的测序图谱

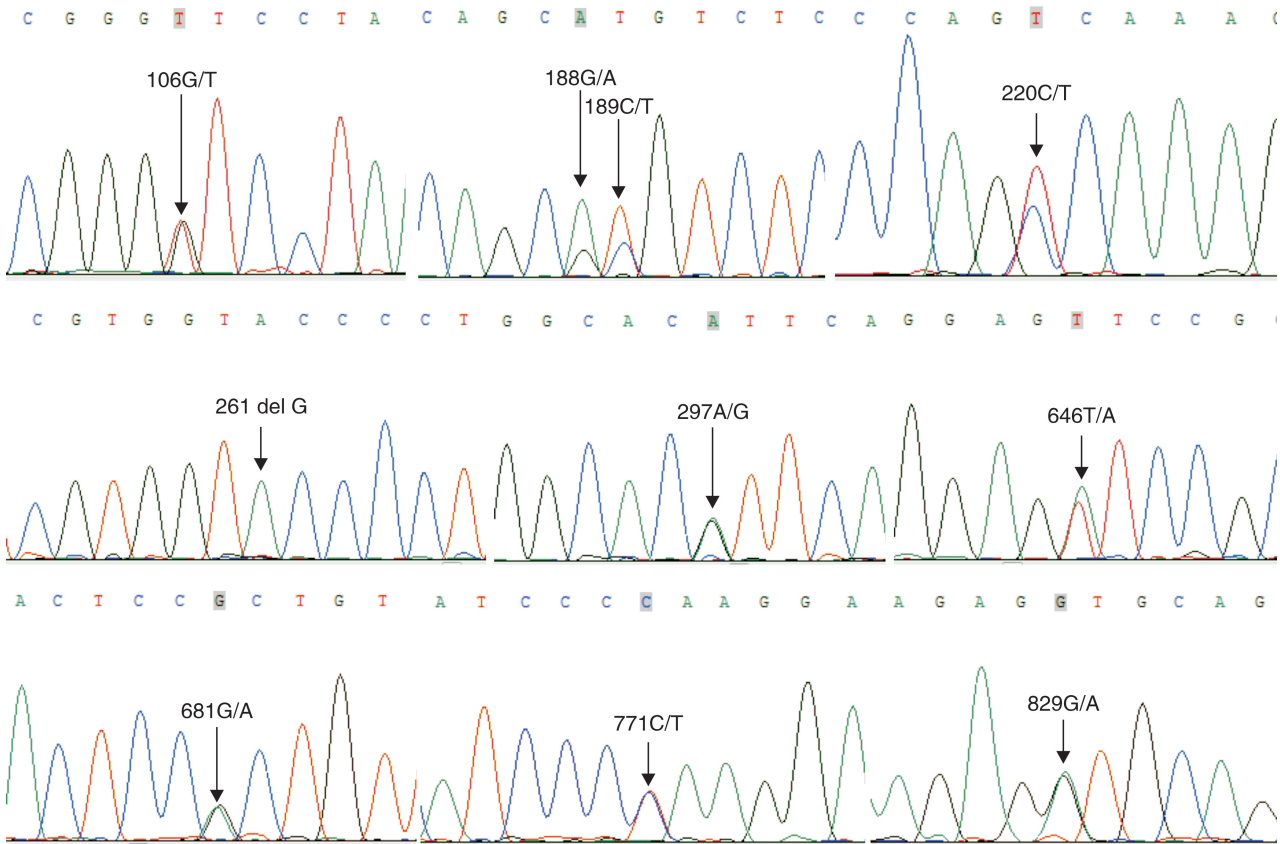


图 8 母亲的测序图谱

表 2 家系 7 个外显子结果

被检测者	等位基因	碱基替换	氨基酸替换	表现型
父亲	A <sub>205</sub>	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A <sub>2</sub>
	A <sub>205</sub>	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	
母亲	O <sub>01</sub>	261delG	88fs + truncation	O
	O <sub>02</sub>	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	
大儿子	A <sub>205</sub>	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A <sub>2</sub>
	O <sub>02</sub>	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	
小儿子	A <sub>205</sub>	467C>T;1009A>G	P156L;R337G	A <sub>2</sub>
	O <sub>02</sub>	106G>T;188G>A;189C>T;220C>T; 261delG;297A>G;	V36F;R63H;P74S;88fs + truncation	

施干预也会很快死亡<sup>[2]</sup>。此外,30%存活的胎儿由于多种因素的综合作用而存在神经发育迟缓,包括早产和围产期不良事件(AEs)<sup>[3]</sup>。

ABO 血型系统是目前最具有临床意义的血型系统。血清学方法鉴定 ABO 血型是通过检测红细胞表面抗原和血清中的抗体来确定的。但不同红细胞抗原亚型、抗体在某些疾病基础时可能会发生凝集强度的变化,从而影响我们对 ABO 血型的判断<sup>[4]</sup>。

ABO 血型亚型是由于基因发生突变,导致红细胞上 A 抗原或 B 抗原表达减弱,数目减少,与抗-A 或抗-B 反应凝集强度减弱,具有遗传基础和明确的血清学特点,一般可通过正反定型不符或正定型的凝集强度减弱等发现<sup>[5-6]</sup>。ABO 亚型在日常工作中血清学方法很容易漏检,这给血型鉴定和临床输血带来了极大的安全隐患。在日常工作中,对于婴幼儿血型的鉴定,出于抗原发育成熟度方面的考虑,通常不注重亚型的鉴定。从而不能做出正确的结论,影响患儿的输血安全。本研究中的患儿仅 1 d,发生亚型漏检的可能性非常大。对于 TTTS 中受血者的换血治疗而言,意义尤为重要。

最常见的 ABO 亚型存在于 A 型人群中,A 型红细胞因红细胞上 A 抗原量分布不同,除了最常见的 A<sub>1</sub> 型,还存在一些 A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>el</sub>、A<sub>x</sub> 等亚型<sup>[7]</sup>,其中 A<sub>2</sub> 亚型较为常见,有研究发现 A<sub>2</sub> 亚型的器官(心脏、肾脏、肝脏等)供者移植给非 A 型(B 型、O 型)受者,可使生存期显著延长<sup>[8]</sup>。也有报道指出 A<sub>2</sub> 亚型肾脏移植给非 A 型的受者,长期生存率与同血型移植患者相似。因此,对 A<sub>2</sub> 血型进行研究具有重要的意义。

ABO 亚型具有遗传基础,从本研究中我们发现,通过家系调查及分子生物学方法鉴定证实患者 A<sub>205</sub> 血型是从父亲遗传所得。本例再次验证了 A<sub>2</sub> 的遗传性。由本例研究可见,血清学方法可以简单快捷地鉴定血型,但对于 ABO 血型正、反定型不符等疑难血型,由于血清学方法存在易受抗原活性、

抗体特异性、微生物污染及试剂限制等因素影响,难以准确鉴定血型。而基因分型技术则不受这些因素的影响,基因分型技术在基因水平上进行分型,测序,有助于正确鉴定血型。家系调查能缩小检查范围,提高血型的检测速度和检出率,对正确鉴定血型提供帮助。因此,我们可通过血清学方法结合分子生物学方法及家系调查等措施来快速鉴定血型,为安全输血和临床输血水平的提高做出应有的贡献。

#### 参考文献

- [1] 黄颖,林甲进,朱碎永,等. A<sub>2</sub> 亚型的血清学和分子生物学的对比分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4):518-520.
- [2] Faria JCP, Victorino CA, Souza FIS, et al. Assessment of the prescription of red blood cell concentrates in the pediatric age group[J]. Rev Assoc Med Bras, 2018, 64:181-186.
- [3] Jeyakanthan M, Meloncelli PJ, Zou L, et al. ABH-Glycan Microarray Characterizes ABO Subtype Antibodies; Fine Specificity of Immune Tolerance After ABO-Incompatible Transplantation[J]. Am J Transplant, 2016, 16:1548-1558.
- [4] 林甲进,朱碎永,施顺秋,等. A<sub>2</sub>B 亚型血型血清学特征及采血前后主要血液指标的变化[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(12):2623-2624.
- [5] 曹红军,孟宪军,王照军,等. ABO 亚型鉴定结果分析与报告-附 B(A)04 亚型一例[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(1):152-154.
- [6] 滑世轩,张福明,孙长义,等. A<sub>end</sub>B 亚型鉴定与家系调查及输血治疗对策[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(6):980-982.
- [7] 陈妍,马玲,朱绍汶,等. 南京地区汉族人群红细胞 A 血型亚型分子生物学研究[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(5):773-776.
- [8] 花紫菱,李丽玮,李志强. 上海地区人群红细胞 A<sub>2</sub> 亚型血清学与分子生物学研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(5):659-662.

(收稿日期:2018-08-09)