

补体调节缺陷对 ABO 血型不合输血引起溶血反应的潜在影响研究

朱青¹ 丁卫平¹ 高德兰²

[摘要] 目的:探讨补体调节缺陷对 ABO 血型不合输血引起溶血反应的潜在影响。方法:选取 60 例 O 型献血者血液标本作为研究对象,分别分离 A₁ 红细胞和抗 A 抗体,分析所有标本的抗 A 效价及补体激活情况,比较不同红细胞组补体激活和溶血情况。结果:流式细胞术检测结果显示经 AET 处理后的红细胞表面缺失 MIRL,所有 60 例献血者血清 IgM 效价均<100,8 例 IgG 效价<100,52 例 IgG 效价>100,其中有 20 例 C₃b 补体激活,Sperman 相关性分析结果显示 IgM 抗 A 效价与补体激活显著正相关($r=0.727, P<0.01$),未处理组红细胞未观察到溶血,而经 AET 处理组红细胞观察到溶血,20% AET 处理组红细胞可见轻微溶血。结论:反应性溶血膜抑制物缺陷可能是 ABO 血型不合输血引起溶血反应的影响因素。

[关键词] 补体;血型;输血;溶血

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.02.015

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Potential effect of complement regulation defect on hemolytic reaction induced by ABO blood type incompatibility transfusion

ZHU Qing¹ DING Weiping¹ GAO Delan²

(¹Department of Clinical Laboratory, Baoji Blood Center, Baoji, 721000, China; ²Department of Blood Transfusion, Baoji Central Hospital)

Corresponding author: GAO Delan, E-mail: 273733021@qq.com

Abstract Objective: To investigate the potential effect of complement regulation defect on hemolytic reaction induced by transfusion of ABO blood group incompatibility. **Method:** Sixty blood samples of O type blood donors were selected as study objects, A₁ erythrocytes and anti A antibodies were isolated respectively. The anti-A titers and complement activation of all specimens were analyzed. **Result:** Flow cytometry showed that the surface of RBC was absent after AET treatment. The IgM titer of all 60 donors was less than 100, 8 cases IgG titer>100, and 52 cases IgG titer>100, and C₃b complement of 20 cases were activated. Sperman correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between the titer of anti-A of IgM and the activation of complement ($P<0.01$). The hemolysis was not observed in the untreated group, but hemolysis was observed in the AET treated group, and slight hemolysis in the 20% AET treatment group. **Conclusion:** The defect of reactive hemolytic membrane inhibitor may be the influencing factor of hemolytic reaction caused by transfusion of ABO blood type incompatibility.

Key words complement; blood type; blood transfusion; hemolysis

在临床疾病治疗中输血是非常普遍的医治手段之一,输血原则为输同型血、交叉配血,如果血型不匹配,则易引发溶血性输血反应。轻微的不匹配输血是一种临床常见现象^[1]。当供体 ABO 血型凝集素抗受体红细胞表面的 ABO 抗原时,会发生一种轻微的 ABO 血型不匹配反应。这些轻微的不匹配输血反应,已被发现与不良结果相关,如溶血等^[2]。相关研究发现与补体调节相关的红细胞、衰变加速因子(decay-accelerating factor, DAF、CD55)和反应性溶血膜抑制物(membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL, CD59)的改变是溶血

发生的危险因素^[3],为了探讨补体调节缺陷对 ABO 血型不合输血引起溶血反应的潜在影响,对 60 例 O 型献血者血液标本进行研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 60 例 O 型献血者血液标本作为研究对象,分离 A₁ 红细胞和抗 A 抗体,将 60 例献血者的 A₁ 红细胞悬浮于生理盐水,分成 2 份,1 份 A₁ 红细胞去除 MIRL,主要步骤:①用 5N 氢氧化钠将 200 μ l 的 6% 乙胺硫脲(2-aminoethylisothiourom, AET) pH 调至 8.0;②加入 200 ml 上述红细胞悬浮液,在 37℃ 水浴条件下孵育 20 min;③生理盐水清洗 3 次,700 $\times$ g 离心 3 min 收集细胞。另 1 份未去除 A₁ 红细胞,采用流式细胞术(抗人 CD55

¹宝鸡市中心血站检验科(陕西宝鸡,721000)

²宝鸡市中心医院输血科

通信作者:高德兰, E-mail: 273733021@qq.com

荧光素异硫氰酸酯和抗人 CD59-PE)分析去除和未去除 MIRL 的 A₁ 红细胞表面情况。

1.2 方法

抗 A 效价分析:采用直接(IgM)或间接(IgG)对 60 例献血者血浆进行抗 A 效价评价,并采用 PBS 缓冲液稀释血浆 1 倍,采用标准化评分系统对血球凝集进行评分:0,阴性反应,无凝集;M+,仅在显微镜下可见的凝集物;W,弱反应,许多小的凝集物;2+,可见许多小的凝集物。

抗 A 抗体补体激活检测:1:100 比例 PBS 稀释的 400 ml 血浆和 100 μ l 的 5% A₁ 红细胞混匀,37℃孵育 30 min,吸取其中 100 ml 液体用小鼠单克隆抗 IgG 进行 IgG 敏化处理,其余液体加入 200 μ l AB 血清混匀后,37℃孵育 60 min,离心分离后,用小鼠单克隆抗人 C₃b/d 进行 C₃ 补体激活,0.85%的盐水冲洗 4 次,对 C₃ 活化进行评估。

采用混合红细胞的方法来模拟临床上由于红细胞 DAF 或 MIRL 受体缺失导致的 ABO 血型不合溶血。比例设定根据以人体共 5 000 ml 血液接受 300 ml 的输血,400 ml 的 1:100 稀释血浆和 100 ml 5%的 A₁ 红细胞混合进行 IgG 敏化处理,近似于体内情况。因此,对 2 组红细胞进行了测试:①100%未经处理的 A₁ 红细胞;②80%未经处理的 A₁ 红细胞和 20%的 AET 处理的红细胞组。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,IgM 和 IgG 抗 A 效价与补体激活相关性分析采用 Spearman 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

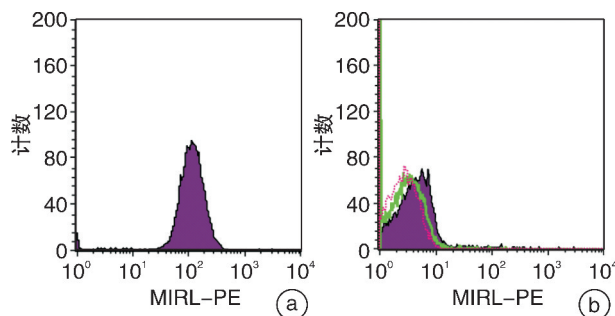
2 结果

2.1 2 组红细胞 MIRL 分析

流式细胞术检测结果显示经 AET 处理后的红细胞表面缺失 MIRL,见图 1。

2.2 O 型血献血者抗 A 效价及 C₃b 补体激活情况分析

所有 60 例献血者血清 IgM 效价均 <100 ,8 例 IgG 效价 <100 ,52 例 IgG 效价 >100 ,其中有 20 例 C₃b 补体激活,见表 1。



a: 未处理组红细胞 MIRL 流式细胞术分析结果;b: 经 AET 处理组红细胞 MIRL 流式细胞术分析结果。

图 1 2 组细胞流式细胞术分析 MIRL 情况

表 1 O 型血献血者抗 A 效价及 CS 补体激活情况分析

项目	例数	<100	>100
IgM 效价	60	60	0
IgG 效价	60	8	52
C ₃ b 补体激活	60	4	16

2.3 IgM 和 IgG 抗 A 效价与补体激活相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示 IgM 抗 A 效价与补体激活显著正相关($r=0.727, P<0.01$), IgG 抗 A 效价与补体激活无相关性($r=0.001, P>0.05$)。

2.4 不同比例红细胞补体激活及溶血反应情况分析

未处理组红细胞未观察到溶血,而经 AET 处理组红细胞观察到溶血,20% AET 处理组红细胞可见轻微溶血,见表 2。

表 2 不同比例细胞补体激活及溶血反应情况分析

组别	敏化方法	6% IgM	人抗 IgG	补体介导的溶血	人抗 C ₃ b/d
未处理组	O 血清	M+	2+	无溶血	0
	AB 血清	0	0	无溶血	0
AET 处理组	O 血清	W	2+	溶血	M+
	AB 血清	0	0	无溶血	0
20% AET 处理组	O 血清	W	2+	轻微溶血	/
	AB 血清	0	0	无溶血	0

3 讨论

补体是免疫系统的重要组成部分,保护机体防御病原体侵犯,参与某些疾病的病理反应。最近的研究发现补体各类溶血性疾病中也发挥作用。补

体系统大约由 50 种血浆和膜蛋白组成。近年来相关研究表明,一些基因的突变可能导致肌醇磷脂的合成障碍,进而引起红细胞膜上补体调节蛋白 CD55 和 CD59 的缺失^[4]。目前,临床研究发现阵

发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)红细胞表面的CD55和CD59表达均缺失,引起红细胞破坏出现溶血^[5-6]。

近年来,红细胞表面CD55、CD59的检测已经用于PNH的临床诊断,但相关研究发现不仅PNH患者CD55、CD59表达缺失,一些健康人群也可能发生CD55、CD59表达缺失^[7-8]。而CD55、CD59表达缺失可能与ABO血型不合输血引起溶血反应相关。这些分子表达的缺陷可能会导致红细胞对血管内补体介导的溶血敏感性增加^[9-10]。目前,临床上常采用低效价ABO血小板生成物以防止小的不匹配的血小板输血中出现明显的溶血。但是,避免红细胞溶血风险的最直接方法是不使用高效价的ABO血型同种凝集素^[11]。

化学试剂处理对红细胞膜与溶血敏感性相关的影响尚不清楚^[12],本研究采用AET处理60例O型血献血者红细胞,在现有的补体激活的知识的基础上,探讨低或无MIRL抗原表达情况下,红细胞对溶血影响。经处理后流式细胞术分析结果显示红细胞表面的MIRL显著降低。进一步对60例患者血清抗A效价进行分析,结果显示所有60例献血者血清IgM效价均<100,8例IgG效价<100,52例IgG效价>100,其中有20例C₃b补体激活。Sperman相关性分析结果显示IgM抗A效价与补体激活显著正相关,而IgG抗A效价与补体激活无相关性。MIRL是红细胞补体激活的重要调节因子,去除MIRL可增加红细胞敏感性,导致补体失调和溶血^[13-14]。本研究表明,低效价的抗A异凝集素,通常不能激活体外与健康的红细胞补体,而可能会导致由红细胞相关因素引起的大量溶血。进一步对溶血观察发现,经AET处理的红细胞出现明显的溶血反应。本研究采用混合红细胞的方法来模拟临床上常见的输血,结果显示混合有20%AET处理的红细胞组发生轻微的溶血反应。

目前,不兼容血小板输血中溶血的发生率尚不清楚,临床常采取缓解策略,以减少与血小板成分不匹配造成的小的不匹配输血相关的溶血。对于献血者抗A效价分析有可能降低此类溶血的发生率,有研究认为减少用量或用生理盐水替代血浆可以减轻这种轻微的不匹配的溶血,但会损害血小板的完整性和功能。

综上所述,与补体调节相关的反应性溶血膜抑制物缺陷可能是ABO血型不合输血引起溶血反应的影响因素。

参考文献

[1] Lozano M, Heddle N, Williamson LM, et al. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative. Practices associated with ABO-incompatible platelet transfusions: a BEST Collaborative international sur-

- vey[J]. *Transfusion*, 2010, 50: 1743-1748.
- [2] Dunbar NM, Katus MC, Freeman CM, et al. Easier said than done: ABO compatibility and D matching in apheresis platelet transfusions[J]. *Transfusion*, 2015, 55: 1882-1888.
- [3] Karafin MS, Blagg L, Tobian AA, et al. ABO antibody titers are not predictive of hemolytic reactions due to plasma-incompatible platelet transfusions[J]. *Transfusion*, 2012, 52: 2087-2093.
- [4] Refaai MA, Fialkow LB, Heal JM, et al. An association of ABO non-identical platelet and cryoprecipitate transfusions with altered red cell transfusion needs in surgical patients[J]. *Vox Sang*, 2011, 101: 55-60.
- [5] Brodsky RA. Complement in hemolytic anemia[J]. *Blood*, 2015, 126: 2459-2465.
- [6] Frazer-Abel A, Sepiashvili L, Mbughuni MM, et al. Overview of laboratory testing and clinical presentations of complement deficiencies and dysregulation[J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 77: 1-75.
- [7] Quillen K, Sheldon SL, Daniel-Johnson JA, et al. A practical strategy to reduce the risk of passive hemolysis by screening plateletpheresis donors for high-titer ABO antibodies[J]. *Transfusion*, 2011, 51: 92-96.
- [8] Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis [J]. *Transfusion*, 2015, 55: S47-S58.
- [9] Pai M, Cook R, Barty R, et al. Exposure to ABO-non-identical blood associated with increased in-hospital mortality in patients with group A blood[J]. *Transfusion*, 2016, 56: 550-557.
- [10] Zaffuto BJ, Conley GW, Connolly GC, et al. ABO-immune complex formation and impact on platelet function, red cell structural integrity and haemostasis: an in vitro model of ABO non-identical transfusion[J]. *Vox Sang*, 2016, 110: 219-226.
- [11] Zeller MP, Barty R, Aandahl A, et al. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. An international investigation into O red blood cell unit administration in hospitals: the GrouP O Utilization Patterns (GROUPO) study[J]. *Transfusion*, 2017, 57: 2329-2337.
- [12] Veeraputhiran M, Ware J, Dent J, et al. A comparison of washed and volume-reduced platelets with respect to platelet activation, aggregation, and plasma protein removal[J]. *Transfusion*, 2011, 51: 1030-1036.
- [13] Cooling LL, Downs TA, Butch SH, et al. Anti-A and anti-B titers in pooled group O platelets are comparable to apheresis platelets[J]. *Transfusion*, 2008, 48: 2106-2113.
- [14] Fung MK, Downes KA, Shulman IA. Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma: a survey of 3156 North American laboratories[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131: 909-916.

(收稿日期:2018-10-12)