

# 溶血性贫血诊断进展

张连生<sup>1</sup> 李莉娟<sup>1</sup> 陈慧玲<sup>1</sup>

[关键词] 溶血性贫血;自身免疫性溶血性贫血;阵发性睡眠性血红蛋白尿;诊断

[中图分类号] R733.7 [文献标志码] C [文章编号] 1004-2806(2013)07-0443-04



**专家简介:**张连生,教授,兰州大学第二医院院长助理、大内科主任、血液病研究所所长、血液科主任,中国医师协会血液科分会常委、中华血液学会常委、甘肃血液学分会主任委员,《中华血液学杂志》、《白血病淋巴瘤》等杂志编委。2005—2006年在美国 MD Anderson 肿瘤中心学习一年。甘肃省领军人才第一层次。致力于各类血液疾病的诊治及细胞免疫治疗研究。

溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)是指红细胞遭破坏而寿命缩短,超过骨髓造血代偿时发生的一类贫血。临床上有急性或慢性 HA 的症状和体征,实验室检查有贫血、红细胞破坏增多、骨髓代偿性增生及红细胞缺陷或寿命缩短的证据。近年来由于各种检测技术的发展,特别是流式细胞术和分子生物学手段的应用,使 HA 的诊断取得了长足进步。现以血管外溶血中常见的自身免疫性溶血性贫血(AIHA)和血管内溶血中常见的阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)为例,就其诊断进展进行阐述。

## 1 AIHA

AIHA 是一种相对少见但可能致命的疾病,是各种病因导致 B 淋巴细胞产生抗自身红细胞特异性抗体,进而导致红细胞破坏增快而引起的一种获得性 HA,为免疫相关性血细胞减少综合征病谱中一员<sup>[1]</sup>。AIHA 可继发于药物或其他相关条件,如慢性淋巴细胞白血病、感染及系统性红斑狼疮(SLE)等自身免疫性疾病。直接抗人球蛋白试验(DAT)和间接抗人球蛋白试验(Coombs' antiglobulin test)是目前诊断 AIHA 最常用的方法,也是诊断 AIHA 的金标准。然而,2%~10%具有明显临床特征、糖皮质激素治疗有效的 AIHA 患者的 DAT 结果为阴性。使用流式细胞仪检测红细胞表面抗体 IgG 成为诊断 DAT 阴性 AIHA 患者的主要手段。此外,还有一些新的辅助诊断方法。

### 1.1 经典 Coombs 试验

1995 年抗人球蛋白试验(Coombs' 试验)问世,因其可检测针对自身红细胞的温抗体型,被广泛应用于临床。Coombs' 试验分为直接和间接 2 种,直接试验检查患者红细胞是否结合了自身抗体或补体;间接试验检查患者血清中是否有游离自身红细胞抗体(其实质为将被检者血清与红细胞温育后的 DAT)。因直接试验较间接试验更为灵敏、可靠,其应用也更为普遍。DAT 操作简单、特异性强,可使大部分 AIHA 患者确诊,但其缺点为灵敏度低。国内外均有 Coombs' 试验阴性的 AIHA 报道,这类患者临床特征与典型 AIHA 患者完全相同,经肾上腺皮质激素治疗的疗效良好。Biagi 等(1999)报道 333 例 AIHA 患者中,10 例 DAT 阴性,其中 8 例经<sup>51</sup>Cr 实验证明其红细胞寿命缩短;丁训杰(1999)报道的 DAT 阴性 AIHA 患者发生率似乎比国外更高。经典 DAT 的另一个不足是特异性较差,当激活的补体在红细胞膜上附着,可出现抗人全血清的 Coombs' 试验假阳性。

### 1.2 改良 Coombs 试验

人们通过改良抗人免疫球蛋白抗体的种类、在抗抗体上结合有利于检出的物质及促进抗体与二抗的结合等措施改良了 DAT,提高其灵敏度及特异性,并把 DAT 的应用范围扩大到红细胞发育的不同阶段乃至骨髓单个核细胞。

随着免疫学的发展,特异性抗免疫球蛋白单体的抗血清被提纯,包括 IgG、IgM、IgA 及补体(C)的单克隆抗体用于 DAT,不仅提高了试验的阳性率,还可以确定红细胞所结合的自身抗体类型。研

<sup>1</sup>兰州大学第二医院血液科(兰州,730030)  
通信作者:张连生, E-mail: zhangliansheng @ medmail.com.cn

究表明,大多数 AIHA 患者红细胞膜表面结合的自身抗体基本分为 3 类:单纯 IgG 型,占 30%~40%;IgG+C 型,占 40%~50%;单纯 C 型,占 10%。而 IgM 型较少见,IgA 型罕见。原发性 AIHA 以单纯 IgG 型和 IgG+C 型为多,继发于 SLE 的 AIHA 则主要为 IgG+C 型和 C 型。易于检出的物质(如荧光素、同位素等)标记抗体后,亦可提高 DAT 的灵敏度。Jenkins 等(1977)报道,同位素标记的放射性免疫法敏感性较高,可以测出每个红细胞上的 15~30 个抗体分子。Garra-ty 等(1990)报道,荧光素标记的抗体与被检红细胞作用后,采用荧光分光光度计分析和流式细胞术能对大量单个红细胞进行快速、灵敏、精确的检测,从而大大提高了 DAT 的灵敏度。Idelson 等(1976)利用酶介质(如胰蛋白酶、木瓜酶、无花果酶、菠萝酶等)处理红细胞,使其表面不完全抗体裸露,再进行 DAT,能使抗原抗体充分结合,从而提高试验的阳性率。Fabijanska-Mitek 等(1995)和 Fabijańska-Mitek 等(1997)用凝胶方法改良 DAT,不仅提高了试验的灵敏度,而且标本可以长期保存,为复审诊断提供依据。

上述改良方法均可在一定程度上提高 DAT 的灵敏度和特异度,但因耗时长、操作复杂、或需接触同位素及较为昂贵的实验设备和特殊的实验技术,未能广泛应用于临床。

### 1.3 流式细胞术检测红细胞表面抗体

DAT 阴性的主要原因可能与每个红细胞表面表达的免疫球蛋白分子少于 500 个有关。流式细胞仪因具有精度高、可再现性和可比性等优势,成为检测 AIHA 的另外一种灵敏方法。流式细胞仪可以定量检测红细胞膜表面结合的免疫球蛋白分子,无疑增加其对 DAT 阴性 AIHA 患者的诊断意义<sup>[2]</sup>。Thedsawad 等<sup>[3]</sup>观察流式细胞仪定量检测 Coombs' 试验阴性 AIHA 患者的结果显示,6 例 AIHA 患者(2 例随访期间患者,2 例初诊患者,2 例复发患者)DAT 定量分别为 31725、3823、1753、524、260 和 88,而 2 例健康对照者 DAT 定量分别为 104 和 78,具有明显差异。因此,利用流式细胞仪定量检测红细胞表面结合的抗体能明显提高 AIHA 患者的确诊率,尤其对 Coombs' 试验阴性 AIHA 患者更具有意义。

### 1.4 细胞因子检测

众所周知,机体自身抗原在细胞免疫和体液免疫调节作用下呈免疫耐受状态,而在溶血性疾病患者体内,红细胞的免疫耐受状态遭到破坏<sup>[4]</sup>。调节性 T 细胞(Treg)是一种能抑制免疫应答并产生免疫耐受的 T 细胞亚群,其分泌的白细胞介素 10(IL-10)是促进 B 细胞产生抗体的重要细胞因子,现已证实其在自身免疫性疾病(如 SLE、AIHA

等)的发展中亦扮演着重要角色。IL-12 主要由树突状细胞及活化的 B 细胞和 T 细胞产生,能够刺激 T 细胞产生  $\gamma$ -干扰素而在机体免疫应答中发挥作用,但在某种情况下 IL-12 具有抑制机体免疫应答和机体产生抗免疫球蛋白抗体的作用<sup>[5]</sup>。Ah-mad 等<sup>[6]</sup>采用流式细胞仪检测 27 例 AIHA 患者体内 Treg、IL-10 及 IL-12 水平的结果证实,AIHA 患者体内 Treg 水平较正常者明显减低(4.63% : 9.76%),而 IL-10 及 IL-12 水平较正常者明显增高。因此,机体内 T 细胞亚群及细胞因子水平在一定程度上对 AIHA 的诊断具有一定帮助。

总之,AIHA 的诊断并不困难,主要是针对自身抗体产生细胞及其调控的有关试验。对多种新的诊断方法的认识,将随着临床病例的增多而不断完善。存在的问题是,诊断 AIHA 的系列研究较少,病例数偏少且方法学质量不高,主要以小的案例报道为主。在评估不同诊断方法对 AIHA 确诊率和经济学效益方面的研究,尚需大样本随机对照试验。

## 2 PNH

PNH 是一种或几种造血干细胞 X 染色体上 PIG-A 基因突变使糖化肌醇磷脂(GPI)锚链蛋白合成受阻,引发红细胞膜上锚链的抑制性补体激活及膜反应性溶解的蛋白缺失,补体活化异常所导致的一种获得性造血干细胞缺陷性疾病<sup>[7]</sup>。其临床主要表现为血管内溶血、不同程度骨髓衰竭和血栓形成。PNH 患者的异常克隆与正常造血并存,使其发病机制的研究和诊断受到很大限制。上世纪 90 年代以前,PNH 的诊断主要是蔗糖溶血试验和酸溶血试验(Ham 试验),但二者的敏感性和特异性较差,且不能进行定量检测,尤其不适用于已接受红细胞输注的患者<sup>[8]</sup>。90 年代早期,抗 GPI-锚链蛋白的单克隆抗体检测(如抗 CD55 和抗 CD59)开始替代蔗糖溶血试验和 Ham 试验<sup>[9]</sup>。之后,荧光标记的嗜水气单胞菌毒素变体(FLAER)检测方法提高了诊断的敏感性和特异性,为 PNH 的早发现、早治疗打下了良好的基础<sup>[10]</sup>。

### 2.1 传统试验

**2.1.1 尿含铁血黄素试验** 尿含铁血黄素试验阳性可提示慢性血管内溶血,且无论有无血红蛋白尿,只要存在慢性血管内溶血试验结果均呈阳性。但在溶血初期,虽然有血红蛋白尿,但上皮细胞内尚未形成可检出的含铁血黄素,此时试验呈阴性反应<sup>[11]</sup>。

**2.1.2 热溶血试验** 热溶血试验是将患者的红细胞与自身含补体血清在 37℃ 下孵育,由于葡萄糖分解产酸而使血清酸化,使对补体敏感且有内在缺陷的红细胞溶解。该试验方法简便易行,且敏感性高,约有 88% 的 PNH 呈阳性反应,但 AIHA 和巨

幼细胞性贫血时可出现假阳性反应,虽然阳性率比PNH低,但证实其诊断PNH的特异性并不高<sup>[11-12]</sup>。

**2.1.3 Ham 试验** 1937年Ham建立的酸化血清溶血试验曾一度被国外作为PNH的惟一确诊试验。其原理是PNH患者病态红细胞在pH为6.4的弱酸性条件下易激活补体,导致红细胞溶解。该试验特异性较强,但会出现假阳性。

## 2.2 现代诊断技术

**2.2.1 流式细胞术检测 GPI-锚链蛋白** 迄今为止,在PNH患者血细胞表面已发现20余种蛋白表达缺乏,如衰变加速因子(DAF、CD55),反应性溶血膜抑制物(MIRL、CD59),C8结合蛋白(HRF),内毒素受体(CD14),低亲和力Fc受体(CD16)及尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPAR、CD87)等。在PNH患者的外周中CD59<sup>-</sup>红细胞所占的比例较CD55<sup>-</sup>细胞要高,故CD59单抗较CD55单抗在诊断PNH时更敏感。在PNH克隆的发展过程中,首先累及的是粒细胞,其次为单核细胞和红细胞,最后为淋巴细胞。因此,粒细胞CD59<sup>-</sup>最早检出,且对PNH有早期诊断的价值。另外,异常中性粒细胞的数量受输血的影响较少,由于PNH的异常细胞起源于造血干细胞,当外周血尚无CD59<sup>-</sup>细胞时,骨髓中可能已经存在CD59<sup>-</sup>细胞,故检测骨髓比外周血更有意义。流式细胞术是目前诊断PNH的金标准,能对PNH患者血细胞进行定量分析。但CD55、CD59等一些补体调节蛋白的表达受其他因素的影响,如骨髓增生异常综合征、细胞发育不全或炎症反应等均有可能导致膜蛋白表达的缺失。

**2.2.2 FLAER 检测法** FLAER是Alexa-488标记的无活性嗜水气单胞菌毒素的变体,它同野生型嗜水气单胞菌毒素相似,可特异地结合于GPI-锚链蛋白,但并不形成细胞通道,因而不会引起细胞的溶解、死亡。该标记类似于荧光素,可在一定条件下激发出荧光,通过流式细胞仪进行检测,并区分GPI<sup>-</sup>和GPI<sup>+</sup>细胞群。Battiwalla等<sup>[9]</sup>报道,FLAER对PNH克隆检出的敏感性为0.1%,其他靶向标记检出率的敏感性为1%;FLAER可以特异地与细胞膜上的GPI-锚链蛋白结合,可直接反映锚链蛋白的缺失情况,而不会受其他因素的影响。因此,FLAER诊断PNH的特异性较其他靶向标记方法明显提高。FLAER的优势还在于能对粒细胞和单核细胞进行GPI-锚链蛋白检测,且不受溶血与输血的影响,较传统流式技术更为敏感和特异。Sutherland等<sup>[10]</sup>比较了FLAER分析法与传统流式分析法对536例疑似PNH患者的诊断结果显示,FLAER分析法使63例患者检测出PNH克隆,检出率为11.8%,且克隆数都较大,不

受溶血和输血的影响;而传统分析法只有33例患者检测出PNH克隆,检出率仅为6.2%,且检测出的克隆数较小,很容易受到溶血和输血的影响。我们的研究也得出了同样结果,应用FLAER检测使PNH确诊率提高了5.17%。Battiwalla等<sup>[9]</sup>使用多参数流式细胞术与FLAER对PNH患者的诊断进行对比研究,靶向标记分别为粒细胞FLAER、CD55、CD16,单核细胞FLAER、CD55、CD14,每个细胞系的靶向标记分别两两组合。结果显示,FLAER<sup>+</sup>CD55<sup>+</sup>对粒系及单核系PNH克隆的检出率最高;单独应用CD16、CD14对粒系及单核系PNH克隆的检出率 $\geq 1\%$ ,单独应用FLAER对粒系及单核系PNH克隆的检出率 $> 0.1\%$ 。因此,FLAER技术对PNH的诊断具有举足轻重的作用,且不受克隆数目小的影响,但价格相对较高。

**2.2.3 PIG-A 基因突变检测** PNH的PIG-A基因突变是异质性的,不同患者突变位点各不相同。目前,已经报道的PIG-A基因突变有100多种,且随机发生于整个编码区,没有突变丛集区。PIG-A基因突变是诊断PNH的最特异方法,但由于技术问题,目前仅限于研究,尚未用于常规诊断,有望进一步发展。

综上,经典的补体溶血试验诊断PNH缺乏敏感度和特异度,流式细胞术和分子生物学手段的应用使PNH的诊断取得了突破性进展。临床工作中应根据患者的具体情况采用不同的诊断手段,对一些临床上高度怀疑,而CD55及CD59检测不能确诊的患者,强烈推荐结合FLAER检查,以获得明确诊断。对有条件的单位,应将FLAER技术作为诊断PNH的常规手段。

## 参考文献

- [1] BARROS M M, BLAJCHMAN M A, BORDIN J O. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment[J]. *Transf Med Rev*, 2010, 24: 195-210.
- [2] CHAUDHARY R, DAS S, GUPTA R, et al. Application of flow cytometry in detection of red-cell-bound IgG in Coombs-negative AIHA [J]. *Hematology*, 2006, 11: 295-300.
- [3] THEDSAWAD A, TAKA O, WANACHIWAN-AWIN W. Development of flow cytometry for detection and quantitation of red cell bound immunoglobulin G in autoimmune hemolytic anemia with negative direct Coombs test[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2011, 29: 364-367.
- [4] DIERICKX D, DE RYCKE A, VANDERSCHUEREN S, et al. New treatment options for immune-mediated hematological disorders[J]. *Eur J Intern Med*, 2008, 19: 579-586.

- LENIUS A, et al. High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival [J]. *Blood*, 2008, 112:3412-3424.
- [14] TEFFERI A, VARDIMAN J W. Myelodysplastic Syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361: 1872-1885.
- [15] JIANG Y, DUNBAR A, GONDEK L P, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML [J]. *Blood*, 2009, 113:1315-1325.
- [16] DELHOMMEAU F, DUPONT S, DELLA VALLE V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360:2289-2301.
- [17] KOSMIDER O, GELSI-BOYER V, CHEOK M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs) [J]. *Blood*, 2009, 114:3285-3291.
- [18] ITZYKSON R, KOSMIDER O, CLUZEAU T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias[J]. *Leukemia*, 2011, 25:1147-1152.
- [19] THOL F, FRIESEN I, DAMM F, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29:2499-2506.
- [20] NIKOLOSKI G, LANGEMEIJER S M, KUIPER R P, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2010, 42:665-667.
- [21] MAKISHIMA H, JANKOWSKA A M, TIU RV, et al. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies [J]. *Leukemia*, 2010, 24:1799-1804.
- [22] WALTER M J, DING L, SHEN D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 2011, 25:1153-1158.
- [23] PATNAIK M M, HANSON C A, HODNEFIELD J M, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 2012, 26:101-105.
- [24] YOSHIDA K, SANADA M, SHIRAISHI Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia[J]. *Nature*, 2011, 478:64-69.
- [25] MAKISHIMA H, VISCONTE V, SAKAGUCHI H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis [J]. *Blood*, 2012, 119:3203-3210.
- [26] KAO H W, SANADA M, LIANG D C, et al. A high occurrence of acquisition and/or expansion of C-CBL mutant clones in the progression of high-risk myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia[J]. *Neoplasia*, 2011, 13:1035-1042.

(收稿日期:2013-06-20)

(上接第 445 页)

- [5] SATTLER A, WAGNER U, ROSSOL M, et al. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation [J]. *Blood*, 2009, 113:1948-1956.
- [6] AHMAD E, ELGOHARY T, IBRAHIM H. Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia[J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2011, 21:297-304.
- [7] PARKER C J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19:141-148.
- [8] PU J J, MUKHINA G, WANG H, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia [J]. *Eur J Haematol*, 2011, 87:37-45.
- [9] BATTIWALLA M, HEPGUR M, PAN D, et al. Multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78:348-356.
- [10] SUTHERLAND DR, KUEK N, AZCONA-OLIVERA J, et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones[J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132:564-572.
- [11] KRAUSS J S. The Laboratory Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Update 2010 [J]. *Lab Medicine*, 2012, 43:20-24.
- [12] 韩冰, 赵永强. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症研究进展 [J]. *国际输血及血液学杂志*, 2009, 32(6):497-500.

(收稿日期:2013-06-16)