

ophagocytosis[J]. Eur Surg Res, 2003, 35: 115-122.

[19] TAMURA K, SHIBATA Y, MATSUDA Y, et al. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from fluids of cancer patients[J]. Cancer Res, 1981, 41: 3244-3250.

[20] 苏智雄, 黎乐群, 肖开银, 等. 围手术期输血对原发性肝癌患者免疫抑制酸性蛋白的影响[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(3): 209-210.

(收稿日期: 2011-12-13)

弱 D 和部分 D 研究进展

任本春¹ 张爱¹

[关键词] Rh 血型; 弱 D; 部分 D; 分子机制

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2012)08-0542-04

Rh 血型系统是目前所有已发现血型系统中最复杂的血型系统, 在临床输血中其重要性仅次于 ABO 血型系统。现已发现几十种 Rh 血型蛋白抗原, 其中与临床相关的抗原主要有 D、C、c、E、e 抗原。Rh 血型抗原特别是 D 抗原是引起溶血性输血反应和新生儿溶血病的最重要抗原, 具有很强免疫原性。除表达正常 D 抗原外, RhD 抗原也存在多种 D 抗原变异体, 包括弱 D、部分 D 和 DEL。实验室常规检测中, 当在盐水介质中反应为阴性、抗人球蛋白试验(IAT)为阳性时, 可认为弱 D 表现型(包括弱 D 和部分 D), 但其不能区别弱 D 或部分 D。弱 D 表现型在临床输血和产科中有重要意义。近几年来, 随着免疫学技术和分子生物学技术的发展, 人们对弱 D 表现型分子结构和分子机制的研究逐渐深入, 并建立了弱 D 表现型的输血策略和新生儿溶血病预防方案^[1-5]。现将 Rh 血型系统弱 D、部分 D 的研究进展论述如下。

1 Rh 血型概述

1.1 Rh 血型人群分布

Rh 血型系统在各个人群中具有不同的分布频率。通常采用血清学试验方法检测红细胞膜上是否有 D 抗原存在而将 Rh 血型分为 Rh 阴性和 Rh 阳性。在白人中 Rh 阴性分布频率为 14%~17%, 非洲人群大约 5%^[6], 远东的中国人 Rh 阴性分布频率约为 0.3%^[7], 印度人约 7.19%^[8]。从各地区 Rh 阴性血型分布频率来看, Rh 血型分布具有种族差异性, 可作为人类一种遗传标记。

1.2 Rh 基因结构及 Rh 多肽

Rh 基因由 RhD 基因和 RhCE 基因组成, 位于染色体 1p34~36.1, 都是由 10 个外显子组成, 具有高度同源性, 其长度分别为 57 295 bp 和 57 831 bp, 两个基因相隔 30 000 bp, 中间隔一个 SMP1 基因, 两基因尾对尾排列(5'RhD3'-3'RhCE5')。RhD

基因两端存在两个具有 98.6% 同源性的区域, 称之为 Rh 盒子(Hybrid Rhesus box)^[9-10]。RhD 基因和 RhCE 基因分别编码 417 个氨基酸组成的 D 抗原和 CE 抗原。D 多肽和 CE 多肽之间存在 31~35 个氨基酸差异, RhD 基因和 RhCE 基因编码的多肽都是 12 次穿过细胞膜, 根据多肽链在红细胞膜位置不同, RhD 多肽分为细胞外区、跨膜区和胞内区, 其氨基端和羧基端均位于细胞膜内, 胞外有 6 个环^[1,9,11]。RhD 多肽和 RhC 多肽的区别主要分布在 3、4、6 环上^[1]。

2 弱 D 和部分 D 的研究

弱 D 和部分 D 均为 D 抗原变异体, 其血清学反应在盐水介质中为阴性, IAT 为阳性^[12-14]。弱 D 表现型在白种人群分布频率为 0.2%~1.0%^[15-16], 在黑人分布频率为 1.7%^[17], 而中国华北地区汉族人群弱 D 表现型分布频率为 0.015%^[14]。

2.1 弱 D

目前, 已发现 70 多个弱 D 等位基因^[18], 通常为弱 D 基因编码区发生碱基突变, 使编码的 RhD 多肽上的氨基酸发生替换, 这种氨基酸替换主要位于跨膜区和胞内区, 进而影响 RhD 蛋白插入膜的效率, 表现为 RhD 蛋白抗原位点减少, 但抗原表位不变。根据 Wangner 等研究, 弱 D 抗原密度远小于正常 D 抗原密度, 数量从数十个到 3 811 个^[19]。弱 D 在欧洲主要表现为弱 D1、弱 D2、弱 D3 型, 它们总和占全部弱 D 的 90%~99%, 弱 D1 型为结构基因编码区 nt809bp(exon6)T>G, 导致第 9 跨膜区 Val(缬氨酸)270Gly(甘氨酸)氨基酸替换, 弱 D2 型为结构基因编码区 nt1154bp(exon9)G>C, 导致第 12 跨膜区 Gly(甘氨酸)385Ala(丙氨酸)氨基酸替换, 弱 D3 型为结构基因编码区 nt8bp(exon1)C>G, 导致胞内区 Ser(丝氨酸)3Cys(半胱氨酸)氨基酸替换^[4]; 据孙国栋等^[20]研究, 中国人群中弱 D 主要为弱 D15 型, 弱 D15 型为结构基因编码区 nt845bp(exon6)G>A, 导致第 9 跨膜区

¹ 福建省血液中心(福州, 350004)
通信作者: 任本春, E-mail: mbaren@sina.com

Gly(甘氨酸)282Asp(天冬氨酸)氨基酸替换。

2.2 部分D

部分D由于缺乏一些抗原表位,导致其在血清学反应中表现为弱D表现型,其有4种机制:①RhD基因和RhCE基因发生重组交换,形成RhD-CE-D或RhCE-D-CE重组基因;②RhD多肽链胞膜外环氨基酸的错义突变;③RhD多肽链散在的错义突变^[1];④RhD基因部分碱基缺失或复制导致的框移突变。

大部分的部分D是由于RhD基因的一部分被RhCE基因相应位置替换而形成RhD-CE-D融合基因。这种融合基因产生的抗原有别于正常D抗原,这种D变异体也被称为D类别,目前D类别被分为D^{II}-D^{VI},其主要区别为RhD基因2~9外显子被RHCE基因相应外显子所取代。D类别个体易发生同种免疫而产生抗体^[3,12,16]。Wanger用一个RhD和RHCE基因发卡结构来表示RhD/CE等位融合基因的形成。RhD和RHCE基因是尾对尾排列,因此RhD和RhCE基因交换重组就像一种顺式配对过程。这样具有高度同源性的RhD和RhCE基因重组形成的融合基因可以传递给下一代^[21]。在融合基因中,RhD通常为受者基因,RHCE基因为供者基因,其交换后的RhD基因的开放阅读框架(ORF)并未发生改变。这可通过r's单倍型中的外显子5和7中的突变同时出现在RhCE和RhD-CE(exon3-8)-D融合基因中证实,同样在D^{VI}型I单倍体中,RhCE和RhD-CE(exon4-5)-D的外显子5都编码226位Pro(脯氨酸),表现出E等位基因的特异性^[17]。

其他部分D为编码胞外环的外显子碱基一个或多个发生突变、缺失或置换,从而使胞外环上相应氨基酸发生替换,最终导致RhD抗原缺失某些表位。当该类部分D个体被免疫时,可针对该缺失表位产生同种免疫^[22]。

2.3 弱D和部分D检测技术进展

早期对弱D和部分D检测主要依赖血清学试验。与抗-D血清在盐水递质中反应为阴性,IAT为阳性即判定为D弱表现型(早期称为D^u)。随着分子生物学技术的发展,PCR-SSP、PCR-RLFP、序列分析、分子克隆等分子生物学技术被用于RhD血型的检测与研究,使之能够在分子水平上研究弱D和部分D的分子机制。1995年,第一个聚合酶链反应(PCR)检测RhD基因的方法建立,该方法采用3种方式检测RhD基因是否存在。一种是扩增RhD基因外显子10的3'非翻译端;第二种是扩增外显子7,获得不同长度RhD和RhCE扩增片段;第三种是扩增内含子4,获得600bp的为RhD,1200bp的为RhCE。以上3种方式都是将PCR产物经电泳后判断D基因是否存在。但由于

上述方法存在一定的假阳性和假阴性,人们调整检测策略,由检测RhD基因某个外显子或内含子发展到检测多个甚至全部外显子,再到有针对性检测某个具体等位基因^[23-24]。目前人们已根据各民族最常见等位基因建立了特异性RhD基因定型方法,且有商品化试剂盒用于检测^[25]。同时人们根据RhD基因结构特征,采用特异性引物序列扩增RhD基因10个外显子及其邻近区域并结合基因序列分析,可以获得RhD基因编码区和非编码区序列的变异情况,使RhD基因定型结果更加可靠。弱D和部分D检测就是通过PCR-SSP基因定型以及PCR产物序列分析进行的,序列分析一般是通过Sanger为基础的序列分析并成为测序的金标准,2010年Stabentheiner等通过GS FLX为基础的序列分析也获得良好的检测结果^[26]。

RhD阳性个体拥有一条Rh基因[RhD杂盒子,RhD(+)/RhD(-)]或两条RhD基因[RhD纯合子,RhD(+)/RhD(+)]。RhD阴性个体的形成有3种分子机制,其中一种为缺失RhD基因[RhD基因缺失纯合体,即RhD(-)/RhD(-)]^[27]。以往RhD基因数目或RhD合子型检测主要依据Rh小因子表型估计或通过家系调查^[17]。2000年,Wanger和Flegel建立了第一个RhD基因合子型直接检测技术,即限制性片段长度多态性(RFLP)方法^[10]。随后我国香港学者Chin等和奥地利学者Perco等报告了采用“扩增突变阻滞检测系统”和实时PCR鉴定已知RhD阳性表型个体的RhD基因数目^[17]。2003年,邵超鹏等^[28]设计了简易PCR检测方法,一次可判断3种RhD合子型,但随后发现有一定假阳性和假阴性。目前上述两位研究者改良了该试验,采用检测RhD第1外显子和融合杂盒子特定基因区域的方法,发展了稳定性和可靠性更好的检测RhD基因数目方法。2005年,兰炯采等^[29]检测上下游Rhesus和杂盒子Rhesus方法来判断RhD基因数目。

3 弱D和部分D与临床

3.1 弱D和部分D与新生儿溶血病预防

弱D由于抗原密度低(弱D1、弱D2除外)以及部分D抗原表位的缺失,当弱D或部分D妇女怀上D抗原正常的婴儿或输注D抗原表达正常的血液时,可能被免疫产生抗-D^[16,30-31]。由母婴RhD血型不合导致的新生儿溶血病,除临床上出现溶血、黄疸等症状外,还可出现核黄疸,从而出现运动和智力障碍等后遗症。国外见有D^{VI}型母亲孕育正常D阳性胎儿而发生新生儿溶血病的报道^[32]。国内也曾有未分型的弱D表现型个体被免疫产生抗-D从而发生新生儿溶血病的报道^[33]。因此若母亲为弱D表现型,可通过检测母亲弱D表现型分子特征而对其进行弱D和部分D分类,并同时检测

父亲的 RhD 基因数目来预测胎儿 Rh 血型,以便对弱 D 表现型的孕妇进行围生期胎-母免疫防护,进行抗-D 免疫预防,这对新生儿溶血病的预防、诊断、治疗都有极为重要临床意义。

3.2 弱 D 和部分 D 与输血策略

在德国,弱 D1、弱 D2、弱 D3 型个体暴露于正常 D 阳性血液或弱 D1、弱 D2 个体怀上表达正常 D 抗原的婴儿,未见有抗-D 同种免疫产生,因此建议弱 D1、弱 D2、弱 D3 可输注 D+ 血液,其他类型弱 D 和部分 D 都要求输注 RhD 阴性血液^[30,34]以避免产生抗-D 免疫。这可能是弱 D1、弱 D2、弱 D3 型的抗原密度较高以及氨基酸替代发生在胞内区和跨膜区。中国人群的弱 D 主要为弱 D15 型,因此当弱 D15 型个体输注 D 阳性血液时,可能产生抗-D^[1]。部分 D 由于缺乏相应抗原表位,当输注正常 D 阳性血液时,可产生针对相应表位的抗-D。因此对弱 D 表现型进行分子生物学分类,可对不同类型弱 D 表现型制定正确的输血策略。这对 RhD 阴性血液这种极为珍贵的资源来说,既有效地节约 Rh 阴性血液,也可以保证输血安全,不会导致产生抗-D。对弱 D 捐血者来说,显然弱 D 献血者血液应当被当作 D 阳性血液对待。

4 讨论

由于国内对弱 D 和部分 D 研究较少,其在人群分布频率不太清楚。因此开展弱 D 和部分 D 的分子机制研究,可填补国内在 Rh 血型系统研究领域的空白。这不但对研究人类血型进化有重要遗传意义,也可为临床制定正确输血策略以及新生儿溶血病预防方案提供理论基础,从而进一步保证血液安全和有效预防新生儿溶血病。

参考文献

- [1] FLEGEL W A, WAGNER F F. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice[J]. Clin Lab, 2002, 48: 53-59.
- [2] WAGNER F F, GASSNER C, MÜLLER T H, et al. Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features[J]. Blood, 1998, 91: 2157-2168.
- [3] WESTHOFF C M, VEGE S, HALTER-HIPSKY C, et al. D^{III}a and D^{III} type 5 are encoded by the same allele and are associated with altered RHCE*ce alleles; clinical implications[J]. Transfusion, 2010, 50: 1303-1311.
- [4] WAGNER F F, GASSNER C, MÜLLER T H, et al. Molecular basis of weak D phenotypes [J]. Blood, 1999, 93: 385-393.
- [5] CHOU S T, WESTHOFF C M, MÜLLER T H, et al. Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease[J]. Hematology, 2009: 178-184.
- [6] 赵桐茂. 人类血型遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 105-106.
- [7] SHAO C P, MAAS J H, SU Y Q, et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D_{el} and weak D phenotypes in chinese [J]. Vox Sanguinis, 2002, 83: 156-161.
- [8] MAKROO R N, RAINA V, CHOWDHRY M, et al. Weak D prevalence among Indina blood donors[J]. Asian J Transf Sci, 2010, 4: 137-139.
- [9] FLEGEL W A, WAGNER F F. Molecular Genetics of RH[J]. Vox Sang, 2000, 78: 109-115.
- [10] WAGNER F F, FLEGEL W A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box[J]. Blood, 2000, 95: 3662-3668.
- [11] SCOTT M L, VOAK D, JONE J W, et al. A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes [J]. TCB, 1996, 3: 391-396.
- [12] YAN L X, WU J J, ZHU F M, et al. Molecular basis of D variants in Chinese persons [J]. Transfusion, 2007, 47: 471-477.
- [13] 吴俊杰, 洪小珍, 许先国, 等. 中国人 Rh 部分 D 表型的分子机理[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(3): 587-591.
- [14] 孙国栋, 段现民, 尹志柱, 等. 华北地区汉族人群 Rh (D) 抗原弱表现型个体的分子机制遗传研究[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(2): 108-112.
- [15] WAGNER F F, KASSULKE D, KEROWGAN M, et al. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in South-West Germany [J]. Infusionsther Transfusionsmed, 1995, 22: 285-290.
- [16] HELENE ANSART-PIRENNE H, ASSO-BONNET M, Le Pennec PY, Roussel M, et al. RhD variants in Caucasians; consequences for checking clinically relevant alleles [J]. Transfusion, 2004, 44: 1282-1286.
- [17] DANIELS G. Rh blood group syetem [M]. Human Blood Groups 2nd ed, Oxford: Blackwell, 2002: 195-274.
- [18] Rhesus base. [2011-08-10] <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>.
- [19] WAGNER F F, FROHMAJER A, LADEWIG B, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes [J]. Blood, 2000, 95: 2699-2708.
- [20] 孙国栋, 段现民, 张彦平, 等. 中国人群中发现的主要弱 D 型-弱 D15 个体的分子背景研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 15(5): 1024-1028.
- [21] LEGLER T J, WIEMANN V, OHTO H, et al. D^{III} category phenotype and genotype in janpanese families [J]. Vox Sanguinis, 2000, 78: 194-197.
- [22] WAGNER F F, EICHER N I, JØRGENSEN J R, et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe [J]. Blood, 2002, 100: 2253-2256.
- [23] WAGNER F F, FROHMAJER A, FLEGEL W A.

- RHD positive haplotypes in D negative Europeans [J]. BMC Genetics, 2001, 2: 10-18.
- [24] 熊文, 邵超鹏, 周一炎. 中国人特异性 RHD 基因定型方法的建立[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(1): 4-7.
- [25] 李宏, 宋宁, 邓永福, 等. 四川地区汉族人群 Rh(D) 变异体分子机制研究[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(5): 365-372.
- [26] STABENTHEINER S, DANZE M, NIKLAS N, et al. Overcoming methodical limits of standard RHD genotyping by next-generation sequencing[J]. VoxSanguinis, 2011, 100: 381-388.
- [27] RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO J Jr, et al. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-D^s gene in Brazilians with the D-negative phenotype[J]. Braz Med BIOL Res, 2002, 35: 767-773.
- [28] 邵超鹏, 熊文. 一种新的 RHD 合子型直接测定方法[J]. 中华医学杂志, 2000, 84(9): 736-739.
- [29] 兰炯采, 周华友, 夏荣, 等. Rhesus 盒检测技术[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6): 1103-1105.
- [30] NOIZAT-PIRENNE F, VERDINER M, LEJEALLE A, et al. Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice[J]? Transfusion, 2007, 47: 1616-1620.
- [31] DENOMME G A, WAGNER F F, FERNANDES B J, et al. Patial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patient: implication for anti-D alloimmunization and prevention [J]. Transfusion, 2005, 45: 1554-1560.
- [32] PIERCE R, SCHUCKER J. Fatal Hydrops Fetalis Caused by Anti-D in a mother with partial D[J]. Obstetrics Gynecol, 2004, 104: 193-194.
- [33] 邵智利, 王更银, 赵继芬, 等. 弱D型妊娠致抗-D引起的新生儿溶血病救治成功1例[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(2): 121-122.
- [34] BACH-NGA, ROUSSEL M, PEYRARD T, et al. Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo-or autoantibodies[J]? Transfusion, [2011-8-20] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.2011.03207.x/full>.

(收稿日期: 2012-02-01)

论文中表格的使用规范

表应具有“自明性”, 表的内容不可与文字、插图重复。表应随正文, 一般先见文字后见表。

表一律用阿拉伯数字依序连续编排序号, 统一从1开始, 只有一个表则应标明“表1”。文中应按表序排列。

一般采用“三线表”, 即除上下表线(正线)外, 加排表头横线(反线)。必要的合计应在其上方加一横线(反线)。表应按统计学的制表原则设计, 力求结构简洁, 主、谓位置合理, 主语一般置表的左侧, 谓语一般置表的右侧。

每一表应有简短确切的表题, 表的各栏应标明标目词, 参数栏的标目词一般为量或测试项目及单位符号。如表中所有参数的单位相同, 可标注在表的右上方。平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)应标在表的右上方“单位”后。若各栏参数单位不同, 则应采用“物理量名称/单位符号形式”[如: BP/mmHg, TC/(mmol·L⁻¹)]标注在各栏标目词后。表格中的计量单位一律使用外文符号, 而不用中文名称。表中的量、单位、符号、缩略语等必须与正文一致。

表内小数点后位数要统一。表内不宜用“同上”、“同左”等类似词, 一律填入具体数字或文字。表内“—”或“…”(因“—”可能与代表阴性反应相混)代表未测或无此项, “0”代表实测结果为零。

表中不设“备注”栏, 如有需说明的事项(例如P值等), 可在表内有关内容的右上角用小号阿拉伯数字并加半圆括号(如¹⁾、²⁾、³⁾)标注(不宜用星号“*”, 以免与数学上共轭和物质转移的符号相混), 在表下用简练的文字注释。P值应按P<0.05、P>0.01、P<0.01顺序排列, 一般情况下P>0.05可不标注。

需要转页的表, 应在续表的右上角或左上角注明“续表”。