

凝聚胺试验在交叉配血中的应用

李亚山 综述, 徐正良 审校(云南省第三人民医院检验科, 昆明 650011)

【关键词】 交叉配血; 凝聚胺试验; 输血

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.048 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1628-03

在临床输血技术中, 快速、准确地进行交叉配血试验可为临床紧急、大量输血提供安全保障。手工凝聚胺检测技术(MPT)具有快速、准确、灵敏度高、操作简便等特点。目前作为输血前试验正在国内许多医院血库常规应用。MPT 的商品化试剂盒也越来越多。因此血库工作人员只有详细了解 MPT 的优点和不足才能恰当地应用这一方法, 使输血更加安全。作者对 MPT 在国内外的临床应用研究作以下综述。

1 MPT 的原理和试剂组成

1.1 MPT 的原理^[1-3]

凝聚胺是一种高价阳离子季胺盐多聚物, 溶解后产生较多正电荷, 可以中和红细胞膜表面的唾液酸带有的负电荷, 使红细胞之间的距离减少。若是未被抗体致敏的红细胞, 则产生可逆的非特异性的凝集, 加入重悬液后散开, 为阴性反应; 若是抗体致敏的红细胞, 则凝集不可逆, 加入重悬液后不会散开, 为阳性反应。MPT 的反应可分为 3 个步骤: (1) 红细胞致敏阶段, 红细胞在低离子介质中被相应的抗体致敏; (2) 凝聚阶段, 凝聚胺使红细胞非特异性地紧密接近, 诱发凝集现象, 使抗体与相应抗原形成桥连; (3) 再悬浮阶段, 重悬液具有中和凝聚胺的作用, 使凝聚胺诱发的非特异性凝集散开, 而抗原抗体反应所致的特异性凝集不能散开, 凝集的程度与抗体、抗原的浓度和性质等有关。必要时还可增加抗球蛋白阶段(MPAT), 如用于 Kell 系统抗体测定等。

1.2 MPT 的试剂组成^[1,3-4]

1.2.1 低离子介质(LIM)在容量瓶中置 25 g 葡萄糖和 1 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)加蒸馏水至 500 mL 溶解备用。

1.2.2 凝聚胺溶液(1)贮存液: 取 5 g 凝聚胺加到生理盐水中配成 10% 的凝聚胺贮存液贮于塑料瓶中; (2)应用液: 取贮存液 2.5 mL 与 497.5 mL 生理盐水混合配成 0.05% 的凝聚胺应用液。

1.2.3 重悬液 (1)贮存液: 0.2 mol/L 枸橼酸钠 29.4 g 加蒸馏水溶解后加水至 500 mL; (2)应用液: 用枸橼酸钠贮存液 300 mL 加 5% 葡萄糖 200 mL 混合后备用。

2 MPT 的操作方法^[3]

2.1 配制 2%~5% 的红细胞悬液。

2.2 试管中加 2 滴待检血清加一滴试剂红细胞。

2.3 加 LIM 溶液 0.6 mL (或 12 滴) 混匀室温放置 1 min。

2.4 加入 2 滴 polybrene 试剂混匀, 3 400 r/min (1 000 g) 离心 15 s 至 1 min。

2.5 弃去上清液观察红细胞凝集, 若未见凝集则需重做。

2.6 加入 1 滴重悬液轻摇看结果。由凝聚胺引起的红细胞非特异性凝集应在 1 min 内完全散开, 若是由免疫抗体引起的凝集反应则不会完全散开。

3 MPT 的影响因素

3.1 抗凝剂和药物 (1) MPT 试验无须补体参与, 故用血清或 EDTA 抗凝血浆作测定标本差异无统计学意义^[5]; (2) 肝素会降低 MPT 反应敏感度, 因为凝聚胺试剂具有中和肝素作用, 此时凝聚胺试剂应多加 4~6 滴^[6]; (3) 止血敏会引起加入

凝聚胺后出现非免疫性的凝集。即使多加几滴凝聚胺试剂也不能排除干扰, 可见止血敏在人体内 4~6 h 的有效期过后, 重新抽血或使用其他的去干扰药物(如泰胃酶)后再检测^[6]。

3.2 血清蛋白

Lalezari^[7] 认为血清中的载脂蛋白 B 等物质能阻止或减轻 MPT 低离子介质中的红细胞离心时黏附到试管表面。即避免红细胞黏附试管壁现象的产生; 但高浓度的血清会导致 MPT 实验灵敏度的降低和抗体介导的凝集不稳定。

3.3 红细胞浓度

红细胞盐水悬液比例达不到 3%~5%, 低于此浓度凝集反应不明显, 浓度过高则影响观察效果。

3.4 加样比例

胡宁克和向东^[8] 在大量临床应用的基础上, 探讨了影响 MPT 配血的各种因素。包括加样的准确性、孵育的温度和时间。离心条件及结果观察技术等。认为其中加样的准确性最为重要。实验数据显示血清及红细胞的加样量每增加一倍, 而 LIM 加量不变。抗 D 抗体的检测灵敏度降低 4~8 倍。因此血清及红细胞悬液的加样量较多时, 应按比例增加 LIM 及凝聚胺试剂的加样量。

3.5 反应时间, 离心速度的影响^[9]

反应时间短, 离心速度低都不易形成假凝集, 而反应时间长会使假凝集减弱或消失。离心速度过高会使红细胞破裂。

3.6 试验温度的影响。

温度的降低会增加不常见抗体检测的灵敏度。但为了避免冷反应抗体的影响, 反应的最适温度为 22 ℃。冷凝集素会影响 MPT 的结果, 形成假凝集, 可在滴入重悬液后, 将试管立即置入 37 ℃ 水浴中, 转动试管, 并在 30 s 内观察结果, 大多数冷凝集会消失。

3.7 细菌污染可引起假阳性。

细菌污染的红细胞洗涤后, 该抑制作用消失。

4 MPT 的优缺点

4.1 MPT 的优点

MPT 主要用于 IgG 抗体的测定(也可测定 IgM 抗体), 有研究进行了 MPT 与经典的抗球蛋白试验^[10]。木瓜酶试验和盐水立即离心法等比较。总的来说, MPT 在测定大多数抗体时(如 Rh 系统有关的抗体、kidd 和 Duffy 系统的抗体等)比酶法、抗球蛋白法更加敏感, Fisher^[5] 随即选择了 5 381 例患者标本, 应用 MPT 法、盐水法、酶法和低离子抗球蛋白法, 在 244 列患者中共测到 264 例抗体, 其中 MPT 测出 206 例, 并认为 MPT 法(除抗 K 抗体)相对敏感, 快捷; 抗 K 抗体测定可以在常规凝聚胺试验后再补充抗球蛋白阶段(MPAT)来完成。Ferrer 等^[11] 进行了 MPT 与低离子介质的 IAT 法(即 LIAT)的比较。在 5 646 例患者血清标本的测定中发现 MPT 能检测出更多有明确临床意义的抗体, 能避免与临床价值不大的抗体起反应; 而 LIAT 法在测定有潜在意义的抗体方面更敏感。Mintz 和 Anderson^[16] 认为在做了仔细的抗体筛查和正确 ABO 定型的前提下 MPT 能符合 AABB 的标准, 可以代替 IAT 法, 也有许多国内学者^[12-13] 报道了 MPT 在我国血库工作中的作用, 认为 MPT 具有相对快速, 灵敏度高等特点。另外 MPT 还有一个优势, 单纯 IgG 型冷自身抗体能在 MPT 中测出。而在盐水介质和 IAT 中无反应^[14]。作者

选取了其中有代表性的内容(表 1、2)来说明 MPT 在特异性和灵敏度方面与其他方法的比较。

表 1 244 例患者用几种方法检测的抗体特异性比较

抗体分类	含抗体 列数	各种方法的抗体列数			
		盐水法	木瓜酶法	低离子抗球蛋白法	凝聚胺法
抗-C	12	0	10	3	12
抗-c	5	0	5	3	5
抗-D	40	0	26	16	38
抗-E	33	1	31	12	28
抗-e	1	0	1	1	1
抗-c ^w	10	0	9	0	10
抗-f	1	0	1	0	1
抗-K	20	3	4	20	20
抗-k	1	0	0	1	1
抗-KP ^a	1	0	0	1	1
抗-Fy ^a	6	0	0	6	6
抗-Jk ^a	2	0	0	2	2
抗-Jk ^b	5	0	0	3	5
抗-S	4	0	0	4	4
抗-Co ^b	1	0	1	1	1
抗-Wr ^a	13	0	3	10	12
抗-V ^w	1	0	0	1	1
抗-M	12	5	0	4	12
抗-N	3	1	0	0	3
抗-P ₁	9	6	0	7	6
抗-Le ^a	14	3	11	10	11
抗-Le ^b	14	11	3	8	6
白细胞抗体	11	0	0	11	0
自身冷抗体	14	14	6	3	5
DAT 阳性	12	0	12	3	12
DAT 阴性	19	0	13	3	3
总计	264	43	136	133	206

表 2 3 种方法灵敏度(效价^{*})比较(n)

抗血清	凝聚胺法	抗球蛋白法	菠萝酶法
抗-D	256	64	32
抗-C	16	4	4
抗-c	128	32	16
抗-E	32	8	8

注: * 能检测出上述抗体时的相应抗血清的最高稀释度。

4.2 MPT 的某些局限性 Fisher^[5]发现 MPT 法在检测部分 IgM 抗体(如部分 lewis. p1. H. I 等抗体)时偶有漏检现象。不过有学者认为这些抗体可能无重要临床意义。因为临床上很少因为这类抗体的存在而取消输血,故他们认为不能测出这类抗体可能反而是 MPT 的优势。MPT 的另一主要缺点是在检测 Kell 系统抗体时缺乏足够的敏感性。不过通过 MPAT 来弥补,但是仍有少量的抗-K 漏检^[15]。其次,MPT 的结果观察带有一定的主观性,特别从凝集到不凝集过程的把握。因操作者的不同会有判断差异,部分 MPT 阳性结果会随着放置时间延长而减弱或消失。当然总的来说,MPT 在测定有临床意义的抗体时(特别是 IgG 抗体)比酶法,抗球蛋白法更加敏感、快捷。虽然 MPT 只能测出部分 ABO 亚型的配血不合。然而其他输血前试验如盐水介质立即离心法^[17-18]和微柱凝胶技术^[20]等此类配血也有同样的不足,另外 MPT 在检测部分 IgM 抗体时偶有漏检现象,但这些抗体可能无重要临床意义,另外本

文也用盐水法和凝聚胺法联合应用,因为盐水法能检测出不配合的 IgM 抗体^[21]。Lin 和 Broadberry^[22]调查了台湾人和欧洲人红细胞抗原分布频度的差异,发现在欧洲人中 A2、B3 亚型很普通,而在中国台湾人中很少见;抗-K 在中国人中几乎为零,在考虑了中国人的红细胞抗原分布特点和总结了 MPT 的优缺点。笔者认为在正确鉴定患者和献血者血型的前提下(特别是 ABO 亚型),联合应用盐水法和 MPT,必要时再补充其他方法相互印证,已基本能满足我国血库输血前检验的需要。

参考文献

- [1] Lalezari P, Jiang AF. The manule polybrene test: a simple and rapid rocedure for detection of cell antibodies [J]. Transfusion, 1980, 20(2): 206-211.
- [2] Lalezari P. A new method for the detection of red cell antibodies [J]. Trasfusion, 2008, 8(6): 372-377.
- [3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 258.
- [4] 冯学冠. 盐水凝胶胺试验在交叉配血中的临床意义 [J]. 海南医学院学报, 2010, 16(3): 359.
- [5] Fisher GA. Use of the manual polybrene test in the routine hospital laboratory [J]. Transfusion, 1983, 23(2): 152-154.
- [6] 武建. 止血敏和肝素对凝聚胺交叉配血的干扰 [J]. 中国输血杂志, 1999, 12(3): 170.
- [7] Lalezari P. The manual hexadimethrine bromide (polybrene) test -Effects of serum proteins and practical applications [J]. Transfusion, 1987, 27(4): 295-301.
- [8] 胡宁克, 向东. 凝聚胺配血方法中技术要点的探讨 [J]. 陕西医学检验, 2000, 15(3): 18.
- [9] 马利平, 张建国. 凝聚胺试验在交叉配血中的应用 [J]. 济南医学院学报, 2005, 29(2): 62.
- [10] Mintz PD, Anderson G. Comparison of a manual hexadimethrine bromideatinglonulin test with salin and albumin-antiglobulin test for pretransfusion testing [J]. Trasfusion, 1987, 27(2): 134-137.
- [11] Ferrer Z, Wright J, Moore BP, et al. Comparison of a modified manual hexadimethrinne bromide (polybrene) and a low-ionic-strength solution antibody detection technique [J]. Trasfusion, 1985, 25(2): 145-148.
- [12] 胡宁克, 徐伟人, 刘达庄. 四种检测红细胞血型 IgG 抗体方法的比较 [J]. 临床检验, 1999, 17(1): 39.
- [13] 秦红群, 杜锦池, 沙成汉. Polybrene 法交叉配血 4 538 列结果分析 [J]. 中国输血杂志, 1998, 11(2): 103.
- [14] 谢作昕, 周湘静. 单纯 IgG 型冷凝集素致凝聚胺配血不合 1 例 [J]. 温州医学报, 2000, 30(4): 285.
- [15] 周金苟, 王雪明, 虞秀兰, 等. 手工凝聚胺与抗球蛋白和菠萝酶法的灵敏度比较 [J]. 临床检验杂志, 1997, 15(6): 369.
- [16] Mintz PD, Andedson G. Limitations of polybrene to detect ABO in compatibility [J]. Vox Sang, 1986, 51(4): 318-320.
- [17] Letendre PL, Villiams MA, Ferguson DJ. Comparison of a commercial hexadimethrine bromide method and low-ionic-strength for antibody with special reference to anti-K

[J]. Transfusion, 1987, 27(2): 138-141.

- [18] Shulman IA. ABO incompatibility missed by Saline immediate spin compatibility testing[J]. Transfusion, 1981, 21(4): 469-470.
- [19] Berry-Dortch S, Woodside CH, Boral LI. Limitations of the immediate spin cross match when used for detecting ABO incompatibility[J]. Transfusion, 1985, 25(2): 176-178.
- [20] Knox-Macaulay H, McDonald R. Diamed-ID microtyping system for detection of major ABO incompatibility[J].

lancet, 1994, 344(8929): 1089.

- [21] Lin-Chu M, Broadberry RE, Tsai SJ. Incidence of ABO subgroups in Chinese in Taiwan[J]. Transfusion, 1987, 27(1): 114-115.
- [22] Lin M, Broadberry RE. Modification of standard western pretransfusion testing for Taiwan[J]. Vox Sang, 2007, 67(2): 199-202.

(收稿日期: 2011-12-29)

原发性肝癌术后复发转移的研究进展

范高祥 综述, 王洪林[△] 审校(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 400016)

【关键词】 原发性肝癌; 根治性切除术; 复发转移; 分子标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.049 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1630-02

原发性肝癌(HCC)的发病率居恶性肿瘤中第3位。由于该病无特异性临床表现,确诊时多为中晚期,且大于80%的病例同时伴有肝硬化,预后不良。根治性切除术是治疗HCC的主要手段,但术后高复发转移率已成为制约患者术后长期生存的瓶颈,有报道称根治性切除后5年复发率约为60%~70%^[1]。现HCC术后复发转移机制、诊断及防治已成为国内外研究热点,本文就其研究进展作以下报道。

1 基础研究

1.1 癌基因及抑癌基因 癌基因和抑癌基因的异常表达在肝癌细胞增殖、侵袭和转移中起重要作用。Yano等^[2]研究发现合并突变型P53及hMSH2这两种基因突变的肝癌患者术后3年生存率及总生存率均比没有突变的患者明显降低。Schoniger-Hekele等^[3]发现癌基因小鼠双微体扩增基因(MDM-2)可通过使P53基因失活而增强肝癌的侵袭性。

在体外测定和异种移植的肿瘤模型中,研究人员已发现nm23-H1基因表达增加可以抑制肿瘤细胞的迁移和转移潜能^[4]。nm23-H1基因的缺失可以预测肝癌的复发转移^[5]。N-myc下游调节基因2(DRG2)属于NDRG家族,被定义为抑癌候选基因,研究表明NDRG2除了能抑制肿瘤增殖,增加细胞凋亡外,还能抑制肿瘤转移。最新一项研究分析了100例肝癌患者的免疫组化结果,提示NDRG2降低与淋巴结转移、肿瘤分化程度、门静脉栓塞、肿瘤浸润生长方式及肿瘤复发相关,且将肝癌细胞系转染NDRG2后可明显抑制其浸润及转移能力^[6]。

近年来,随着基因芯片技术的发展,利用基因谱预测肝癌的复发转移已成为可能。一项研究采用基因芯片技术在全基因组范围内比较40例伴或不伴肝内转移的肝癌基因谱表达,发现在9180个基因中153个基因表达存在差异,且仅与是否伴有转移相关。这项技术的发展为预测肝癌术后复发转移提供了有力的支持。

1.2 MicroRNAs 近年来,microRNAs在肝癌复发转移中体现出越来越重要的作用。MicroRNAs是一类内生的,长度约20~24个核苷酸的小RNA,其在细胞内具有多种重要的调节作用。研究发现超过50%的microRNA定位在癌相关基因区域或在脆弱区域,microRNA的异常表达在肿瘤的发生、发展、

诊断、治疗和预后评估等方面极具研究价值。Yoon等^[7]发现根治性切除术后肝癌组织中microRNA-221表达增加与肝癌局部短期复发相关,并且指出小于1次折叠变化的microRNA-221可作为根治性切除患者早期转移的预测因子。Fang等^[8]最近在异种肝癌移植的小鼠模型体内发现MicroRNA-29b能够抑制肝癌细胞转移中的内皮细胞微血管形成及向基质侵袭,研究发现MicroRNA-29b作用的靶点是金属基质酶-2(MMP-2)。利用分子医学技术检测microRNAs,可能成为今后预测肝癌术后复发并进行防治的新思路。

1.3 细胞因子及免疫环境 肝脏切除术造成细胞损伤启动了肝再生机制,使肝细胞生长因子再生。Wang等^[9]发现血清中肝细胞生长因子表达水平在侵袭性病理类型或有肝内转移的肝癌患者中明显增加。肝细胞生长因子受体(c-Met)对于原发性肝癌患者的预后具有指导意义,高度提示肝内复发。研究发现HGF可作用于c-Met,形成了HGF/c-Met信号传导系统,影响肿瘤新生血管的形成和肿瘤细胞对细胞外基质的降解,从而导致肝癌细胞的侵袭、转移。

转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是由细胞产生,调节细胞生长与分化。TGF- β 1在癌旁组织和术后患者血清的表达程度与肝癌的组织学分型及肿瘤的恶性程度呈正相关,TGF- β 1持续过度表达可能是导致HCC复发转移和术后免疫功能缺陷的重要因素之一。Li等^[10]发现IL-17A可以通过NF- κ B信号通路上调MMP2和MMP9表达从而促进肝癌的转移,可能与原发性肝癌患者的抗肿瘤免疫存在严重缺陷相关。

在肿瘤侵袭转移过程中,血管生成有着重要的作用。血管内皮生长因子(VEGF)是目前发现的作用最强、特异性最高的血管生成因子。VEGF与特异性受体结合后通过酪氨酸激酶介导的信号传导,调控血管内皮细胞的分化与血管生成,有利于肿瘤的侵袭和转移。Tamesa等^[11]随访32例肝癌患者血清中VEGF的变化,发现高VEGF患者组的生存期较低VEGF组的无瘤生存期短,复发组的血清VEGF水平较未复发组明显增高。胰岛素样生长因子-II,可促进肝癌细胞的增殖分化,间接提高肝癌细胞中血管内皮生长因子的水平,促进肝癌血管形成,亦在术后复发转移中起着重要作用。

1.4 黏附分子 癌细胞与细胞外基质或靶细胞间的黏附是肿

[△] 通讯作者, E-mail: whleqkd@163.com.