

恶性疾病导致 ABO 血型抗原或抗体减弱的讨论*

聂益军(南昌大学第一附属医院检验科细胞室,南昌 330006)

【摘要】 目的 调查恶性疾病状态下 ABO 血型抗原或血清抗体减弱的表现形式及正确鉴定 ABO 血型的方法。方法 经血清学检测为 ABO 正反定型不符的标本进一步用基因学方法进行检测,并以此判定为抗原或抗体减弱。结果 ABO 血型抗原减弱血清学试验多表现为混合凝集;O 型个体抗体减弱可以表现为单一抗体减弱也可表现为抗-A 及抗-B 同时减弱。结论 在血清学难以判定 ABO 血型时,基因分型是正确鉴定血型不可或缺的辅助手段。

【关键词】 恶性疾病; ABO 血型; 抗原; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)01-0066-03

血型是指各种血液成分(包括红细胞、白细胞、血小板等)的遗传多态性,ABO 血型为人类红细胞的表面抗原,是一种稳定的遗传标记。正常情况下,血型的遗传标记不会改变,但某些疾病(白血病、恶性肿瘤等)会引起 ABO 血型抗原或其血清抗体减弱,导致暂时性的“血型变异”,从而难以及时、准确地对 ABO 血型进行鉴定。由于疾病对 ABO 血型的影响多局限于免疫血清学,而发生在基因水平上的改变概率较小,因此基因分型是正确鉴定血型不可或缺的辅助手段。现将所涉及抗原及抗体减弱的案例举例说明并加以分析讨论。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者标本来源于南昌大学第一附属医院 2011~2012 年 ABO 血型抗原或抗体减弱的临床标本,共计 27 例,发病年龄 15~62 岁,血型鉴定前 3 个月均无输血史。其中男 14 例,女 13 例;恶性肿瘤导致的 ABO 血型抗原或抗体减弱的临床标本 10 例,白血病导致的 ABO 血型抗原或抗体减弱的临床标本 17 例;ABO 血型抗原减弱的 19 例,ABO 血型抗体减弱的 8 例。分别选取 A 型和 B 型抗原减弱各 1 例,O 型抗体减弱两例进行探讨分析。

1.2 仪器与试剂 单克隆抗-A、抗-B,ABO 试剂红细胞均由上海血液生物制品提供,离心机为日本久保田 KA-2200 台式离心机;DNA 提取试剂 Gene One Technology(美国产);人类 ABO 血型基因检测试剂盒[序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP 法)]为天津秀鹏产品;9700 扩增仪(美国 ABI 公司);凝胶成像仪(美国 BIO-RAD)。

1.3 方法

1.3.1 ABO 血型血清学鉴定 ABO 血型鉴定为正、反定型,均采用试管法,具体操作见《中国输血技术操作规程》。

1.3.2 ABO 血型基因学鉴定(PCR-SSP 法)

1.3.2.1 DNA 提取 900 μL 的溶液 L1 及 300 μL 的全血振荡后离心弃上清液,振荡以打破核细胞团。加入 200 μL L2 Buffer,振荡后将溶解物放入离心柱子中离心并弃去过滤液。加入 400 μL 溶液 W1 到离心柱子中,离心并弃去过滤液。加入 600 μL 溶液 W2 到离心柱子中,离心并弃去过滤液。将离心柱子转移另一干净的离心管中,加入 Elution Buffer(60~65 ℃),浸泡 1 min 后离心 30 s,移去离心柱子,获得 DNA。

1.3.2.2 加样 44 μL dNTP-Buffer + 56 μL 纯水 + 0.8 μL Taq 酶(5 U/μL) + 10 μL DNA。

1.3.2.3 扩增 96 ℃,2 min;1 个循环→96 ℃,20 s;68 ℃,60 s;5 个循环→96 ℃,20 s;65 ℃,45 s;72 ℃,30 s;15 个循环

→96 ℃,20 s;62 ℃,45 s;72 ℃,30 s;15 个循环→72 ℃,3 min;→4 ℃保存。

1.3.3 电泳 扩增产物电泳并根据格局表判定结果。

1.3.4 判定标准

1.3.4.1 ABO 血型抗原减弱的判定 患者红细胞与单克隆抗-A 和(或)抗-B 反应凝集强度未达到(+++)者,包括出现混合凝集时均判定为 ABO 抗原减弱^[1]。

1.3.4.2 ABO 血型抗体减弱的判定 用标准 A 细胞和(或) B 红细胞与患者血清反应,凡室温反应低于或等于(+)凝集者均判定为 ABO 抗体减弱^[1]。

1.3.4.3 ABO 血型基因学方法 采用 PCR-SSP,扩增产物电泳后在紫外灯下两个条带为阳性,只有一个条带为阴性(内对照)。根据格局反应判定血型。

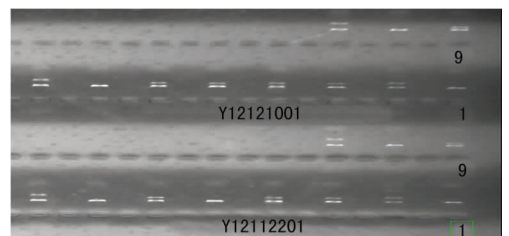
2 结果

2.1 试验结果 4 例血清学试验结果 见表 1。

表 1 血清学试验结果

病例	疾病	性别	年龄	正定型		反定型			基因学结果
				-A	-B	Ac	Bc	Oc	
例 1	M6	男	55	+mf	-	-	+++	-	A1O2
例 2	M3	女	43	-	+mf	+++	-	-	O2B
例 3	肺癌	男	26	-	-	-	-	-	O2O2
例 4	胃癌	女	51	-	-	-	+++	-	O1O2

注:M6 为红白血病;M3 为急性早幼粒白血病;mf 为混合凝集外观。



注:Y12112201 为例 1,格局反应为 1-2+3+4+5-6+7-8+9+10-11+(从上到下,从右到左的顺序,即右下角第一孔为 1);比对格局表判定为 A1O2。Y12121001 为例 2,格局反应为 1-2+3+4+5+6+7-8+9+10-11+;比对格局表判定为 O2B。

图 1 基因学电泳图像

* 基金项目:江西省卫生厅科技计划资助项目(20113021)。

2.2 基因学电泳图像 例 1 和例 2 的基因学电泳图像见图 1。

3 讨 论

ABO 血型是人类最重要的一个血型系统,其检测多采用血清学正反定型方法,任何影响抗原或抗体改变的因素均可干扰 ABO 血型定型的结果。1957 年 Van Loghem 等^[2]首先报道了急性粒细胞白血病(AML)患者 A 抗原减弱,国内也有相关血液疾病导致 ABO 血型抗原减弱的报道^[3-4]。但目前白血病及其他一些血液病导致红细胞 ABO 血型抗原减弱的原因及确切机制尚未明确,国内外学者普遍认为与下列因素有关:

(1)与体内血型基因突变有关联。ABO 血型抗原基因位于 9 号染色体,位于同一染色体的病毒致癌基因 *c-abl* 可干扰 ABO 基因的合成,导致患者红细胞 A 和(或)B 抗原减弱。又由于基因突变也可导致糖基转移酶活性降低,使 H 抗原转变为 A 或 B 抗原的过程阻断,而导致血型抗原减弱。(2)粒细胞白血病患者粒细胞异常增生,使红系细胞增生相对受到抑制,其红细胞的代谢受到干扰,红系增生受抑,造成 A、B、H 抗原物质减弱。(3)也可能与体内唾液黏蛋白产生过多,遮盖了红细胞表面的抗原部位而导致血型抗原强度变化有关。近年来的研究更多地放在分子生物学的调控机制上,认为在启动子区 CpG 岛内发现启动子附近有多个特异性半甲基化位点,可能是引起 ABO 抗原弱表达的原因^[5]。有研究表明,造成 ABO 血型抗原减弱的原因是 ABO 基因位于人类第 9 号染色体上,其启动子区域富含 CpG 岛。ABO 基因的表达受到近端启动子甲基化程度的影响,甲基化程度越高,ABO 基因的表达就越不活跃,从而导致 A、B 抗原表达减少^[6]。2009 年有研究检测了 21 例患者的 ABO 位点拷贝数及 DNA 甲基化变化,其中 11 例存在 1 个或 2 个 ABO 等位基因表达缺失,另 10 例患者未检测到 ABO mRNA 等位基因表达缺失。而在这 11 例 ABO 等位基因表达缺失的患者中,有 8 例(73%)的 ABO 基因启动子存在甲基化状态^[7]。此外,基因突变、染色体易位也可能使血型基因丢失或被掩盖^[8]。

本次研究对象中有 19 例抗原表达减弱,减弱程度从土至++不等(与单克隆抗-A 和(或)抗-B 反应的凝集程度),这其中有 12 例为白血病患者,7 例为肿瘤患者。白血病患者抗原减弱可能是由于粒细胞的异常增生导致红系增生受抑造成。而肿瘤患者可能与蛋白分泌过多有关。同时本研究发现几乎所有急性白血病造成的 ABO 抗原减弱,在试管法检测中均表现为混合凝集视野。这是由于疾病在急性发作之前或缓解之后患者红细胞上的抗原相对正常,而急性发作期间红细胞上的 ABO 抗原急剧减弱所形成的现象^[1]。

恶性肿瘤疾病造成抗体减弱可能是由于 3 方面原因:(1)放疗化疗时造成的机体正常免疫功能受到破坏;(2)肿瘤细胞的大量生长抑制了正常免疫细胞的活性;(3)大量失血。

本次研究对象中有 8 例血清抗体减弱,这是由于疾病、化疗等造成机体各大器官衰竭,体内免疫系统抑制,影响了免疫应答过程,使体液免疫、细胞免疫甚至固有免疫水平下降,出现严重感染或机会性感染就会大大增加,感染又会加重免疫抑制,进而使 B 淋巴细胞活化、增殖、分化的某一个阶段出现异常,抑制浆细胞生成,引起抗体水平下降。但令人关注的是同样为 O 型患者表现的抗体减弱形式也不尽相同。O 型患者抗体减弱可以表现为抗-A 和抗-B 同时减弱,因为 O 型个体的

抗-AB 不是抗-A 和抗-B 的混合物,抗-AB 识别的是 A 抗原和 B 抗原上共同的表位。O 型患者也可变现为抗-A 或抗-B 的单独减弱,可能是因为机体免疫系统受到侵害造成免疫球蛋白低下,进而使得免疫球蛋白分泌紊乱而造成抗-A 或抗-B 的单独减弱。也可能是一种免疫耐受现象,在其胚胎发育早期接触母体的 A 或 B 型抗原物质,经胎盘流入体内,反复刺激而发生免疫耐受现象,致使机体对该抗原不能产生免疫反应而相应地不产生抗-A 或抗-B^[9]。

由于疾病对 ABO 血型的影响多局限于免疫血清学,而发生在基因水平上的改变概率较小,因此基因分型是正确鉴定血型不可或缺的辅助手段。随着分子生物学技术的发展,检测基因结构的方法不断涌现,尤其是与 PCR 技术结合的检测技术进一步推动了基因研究的发展。红细胞血型分子生物学有多种,包括 PCR-SSP、序列特异性寡核苷酸探针聚合酶链反应(PCR-SSOP)、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)、PCR-DNA 测序、基因芯片等^[10]。本次试验研究中,对于 ABO 血型抗原或抗体减弱的确定就是通过 ABO 基因分型最终确定的,作者采用 PCR-SSP 法,其优点在于操作简便、结果直观(图 1 所示)。序列特异性引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP 法)的原理是根据不同类型核心序列关键几处碱基的差异设计一系列具有等位基因序列特异性的引物,从对应类型的核心序列起始扩增,直接扩增具有各种序列差异的等位基因特异性片段。PCR 产物经电泳分离可以呈现不同的扩增片段图谱从而分析判定标本的基因型。用分子生物学分型技术对红细胞抗原的基因型作鉴定其图像直观而清晰,同时还可以不受血清中自身抗体、不规则抗体、疾病和假、弱凝集的影响,对保证临床安全输血具有重要意义。

总之,ABO 血型抗原减弱血清学试验多表现为混合凝集;O 型个体抗体减弱可以表现为单一抗体减弱也可表现为抗-A 及抗-B 抗体同时减弱。对于在疾病发作期而难以正确定型的患者可进行 ABO 分子生物学试验,从基因型上确定患者 ABO 血型。必要时,可待患者疾病缓解后复查 ABO 血型,以便给患者一个真实、明确的 ABO 血型结果,为今后的临床输血提供支持和保障。

参考文献

- [1] 金沙,向东,刘曦,等. 疾病导致 ABO 血型抗原及抗体减弱的分析[J]. 临床输血与检验,2010,12(1):61-62.
- [2] Van Loghem JJ, Dor fmeier H, Vander Hart M. Two Antigens with abnormal serologic properties[J]. Vox Sang, 1957,2(1):16-24.
- [3] 王湘屏. 1 例白血病患者血型抗原减弱、抗体缺失[J]. 中国检验医学与临床,2003,4(2):74.
- [4] 黄菲,李翠莹,甘新宇,等. 白血病致 ABO 血型抗原减弱 4 例[J]. 中国输血杂志,2011,24(1):67-68.
- [5] 应燕玲,陶苏丹,和艳敏,等. 一例 ABO 血型系统 B 抗原减弱表达的分子机制[J]. 中华医学遗传学杂志,2011,28(4):397-400.
- [6] Kominato Y, Hata Y, Takizawa H, et al. Expression of human histoblood group ABO genes is dependent upon DNA methylation of the promoter region [J]. J Biol Chem,1999,274(52):37240-37250.

[7] Bianco-Miotto T, Hussey JD, Day KT, et al. DNA Methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients [J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4788-e4791.

[8] Gao S, Worm J, Guldborg P, et al. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2004, 109(8): 230-237.

[9] 董长征, 李丽, 王秀明, 等. O 型献血者缺乏抗-B 抗体 1 例 [J]. 临床输血与检验, 2003, 5(3): 218-219.

[10] 胡丽华. 临床输血学检验 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 61-62.

(收稿日期: 2013-06-10 修回日期: 2013-08-18)

• 临床研究 •

人附睾蛋白 4 与 CA125 联合检测在卵巢癌中的诊断价值*

霍怡杉, 黄艳春[△], 王 飞(新疆医科大学附属肿瘤医院检验科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 探讨血清人附睾蛋白 4(HE4)与 CA125 在卵巢癌妇女中的诊断价值。**方法** 采用电化学发光法检测 184 例卵巢癌患者血清标本 HE4 和 CA125, 以 132 例卵巢良性疾病和 57 例健康体检者作为对照组。**结果** (1)HE4 检测水平在绝经前后均为卵巢癌组高于健康对照组和良性疾病组($P < 0.05$), 但健康对照组与良性疾病组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 CA125 的检测水平在三组的比较中差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(2)单独检测 CA125 的阳性率为 79.35%, HE4 的阳性率为 67.39%, 而两者联合检测阳性率高达 92.39%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3)Fisher 判别分析表明对卵巢癌绝经前组与绝经后组联合检测 HE4 与 CA125 一致性较高, 正确率分别为绝经前组 78.82%(67/85), 绝经后组 79.80%(79/99)。**结论** CA125 对卵巢良恶性疾病的区分不如 HE4 好, 联合检测血清 HE4 与 CA125 对卵巢癌的诊断价值更高。

【关键词】 卵巢癌; 人附睾蛋白 4; CA125

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.030 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)01-0068-03

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤。由于它的早期临床症状不明显并且缺乏有效的早期诊断方法, 因此具有发现晚、预后差等特点。在全世界大概每年有 190 000 例新增的病例, 而且每年有 114 000 例患者死亡^[1]。在中国其发病率也在逐渐升高, 是影响女性健康的主要疾病之一。因此对卵巢癌的早期诊断显得尤为重要。多年来, 肿瘤标志物 CA125 被广泛用于卵巢癌的筛查、诊断、治疗和预后, 但它在胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肝癌、肺癌及月经、妊娠时也可升高, 使得其假阳性率变高^[2]。而且仅有 40%~50% 的 I~II 期卵巢癌患者中 CA125 水平升高, 并在许多良性疾如子宫内膜异位症、炎症中也会升高^[3]。2003 年 Hellstrom 等^[4]研究发现, 人附睾蛋白 4(HE4)比 CA125 特异性更高, 对卵巢癌的早期筛查优于 CA125。目前, 国内也有报道指出将二者联合检测可以提高卵巢癌的诊断能力^[5]。本研究共收集 184 例卵巢癌标本, 并以 132 例卵巢良性疾病和 57 例健康体检者作为对照组对三组的 HE4 与 CA125 进行比较, 进一步探讨其在卵巢癌患者中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 2 月至 2013 年 3 月初次在新疆医科大学附属肿瘤医院就诊的卵巢肿瘤患者血清, 经术后病理确诊分为卵巢良性疾病组 132 例, 其中绝经前 64 例, 绝经后 68 例, 年龄 22~84 岁, 平均 53 岁; 卵巢癌组 184 例, 其中绝经前 85 例, 绝经后 99 例, 年龄 18~77 岁, 平均 47 岁。另选无恶性病史、无急慢性感染、无急性与慢性肾病、无肝胆疾病和无任何外部疾病征兆的健康体检者 57 例作为健康对照组, 其中绝经前 31 例, 绝经后 26 例, 年龄 21~73 岁, 平均 45 岁。

1.2 方法 所有对象于清晨空腹采集静脉血 2 mL, 病例组为临床治疗前采集的标本, 并且无溶血、黄疸及脂血。室温下静置 20 min, 3 000 r/min, 6 min 离心后分离血清置于 -80 ℃ 冰箱保存。采用雅培 I2000 微粒子发光法测定 HE4 与 CA125, 严格按照仪器操作程序检测, 使用原厂配套的定标液及试剂。HE4 参考值: 绝经前 HE4 ≤ 70 pmol/L, 绝经后 HE4 ≤ 140 pmol/L; CA125 参考值: 0~35 U/mL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。定量资料符合正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 对资料进行描述, 采用单因素方差分析比较各组差异, 计数资料用 χ^2 检验, 并用 Fisher 的线性判别函数进行判别分析。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康对照组、卵巢良性疾病组和卵巢癌组绝经前与绝经后 HE4 及 CA125 水平的比较 HE4 检测水平在绝经前后均为卵巢癌组高于健康对照组和良性疾病组($P < 0.05$), 但健康对照组与良性疾病组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。CA125 水平在绝经前后卵巢癌组高于健康对照组和良性疾病组, 各组之间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 卵巢癌组 CA125、HE4 及 CA125 与 HE4 联合检测阳性率的比较 根据厂家设定的参考值, 高于参考值上限即为阳性, 两者联合检测时以任一指标大于参考值视为阳性。CA125 阳性率为 79.35% 明显高于 HE4 的阳性率 67.39%, 但 CA125 与 HE4 共同检测时阳性率可高达 92.39%, 结果差异均具有统计学意义($\chi^2 = 35.575, P < 0.05$)。见表 2。

* 基金项目: 新疆医科大学科研创新基金(xjc201272)。 △ 通讯作者, E-mail: huangyanchun0619@sohu.com。