

[12] 罗华玉,肖奇志,苏文,等.1例18号染色体短臂部分四体胎儿的遗传学分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(5):731-734.

(收稿日期:2019-04-10 修回日期:2019-06-22)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.028

番禺地区 RhD 阴性孕妇基因分型对输血安全的影响及对策研究*

谢敬文¹,阮丽芬²,蓝文莉¹,马伟文¹

1. 广东省广州市番禺区中心血站,广东广州 511400;2. 广东省广州市番禺区中心医院,广东广州 511400

摘要:目的 对番禺地区 RhD 阴性的孕妇进行 RHD 基因分型以及产后追踪,为临床制订科学、合理的预防策略提供科学依据。方法 收集 2016 年 1 月至 2018 年 6 月番禺地区 RhD 阴性孕产妇标本 40 例,用间接抗人球蛋白试管法进行 RhD 阴性确认,用吸收放散试验进行放散 D 筛查,用 PCR-SSP 方法进行 RHD 基因分型。结果 经鉴定 40 例均为 RhD 阴性,吸收放散试验鉴定 9 例为放散 D 表型(Del),占比 22.5%。对 40 例标本进行基因分型检测,24 例为 RHD 基因全缺失型,占比 60.0%;9 例为 RHD1227A DEL 型,与血清学放散 D (Del)一致,占比 22.5%;5 例 RHD-CE(2-9)-D 型占比 12.5%;2 例 10 外显子全阳性,经进一步测序分析确定均为 RHD 711 del C 型,占比 5.0%。结论 该地区 RhD 阴性孕产妇中存在较高比例的 RHD1227A DEL(放散 D),临床医生适当结合吸收放散试验和基因分型结果,能更精准判断孕妇 RhD 血型,从而更加科学地制订产前抗-D 筛查和预防 RHD-HDN 发生的管理策略。

关键词:RhD 阴性; 孕妇; 产前筛查; 稀有血型; 基因分型; RHD 基因

中图分类号:R457.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2202-03

RhD 血型的重要性仅次于 ABO 血型系统,在 Rh 血型系统中 D 抗原的临床意义最大。D 抗原在汉族人群中的占比很高,本地区约有 0.23% 的个体为 D 抗原阴性^[1]。汉族人群中的 RhD 阴性血型有着复杂而丰富的遗传多态性,D 抗原也存在多种变异体。D 抗原是由 RHD 基因编码 417 个氨基酸组成的糖蛋白,其中 RHD 1227A DEL 型具有完整的 RHD 基因。RhD 阴性个体在接受 D 抗原致敏后几乎不产生同种不规则抗-D^[2],因此这类孕妇可以不必进行频繁的抗-D 监测以及预防性注射 Rh 免疫球蛋白阻断母体产生抗-D。现将广州市番禺地区 RhD 阴性孕妇 RHD 基因分型研究分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2018 年 6 月在本地区中心医院等各级医院筛查 RhD 阴性的孕妇共 40 例(孕产史见表 1),留取 EDTA-K₂ 抗凝全血 5 mL 备用。同时对孕妇生产情况进行回访追踪调查分析。

表 1 40 例孕妇的历史怀孕、生产和基因分型分布情况(n)

项目	孕 0	孕 1	孕 1	孕 2	孕 2	孕 3	孕 5
	产 0	产 0	产 1	产 1	产 2	产 1	产 1
未产生抗-D	15	3	12	4	1	2	1
产生抗-D	0	0	0	0	0	2	0
合计	15	3	12	4	1	4	1

1.2 仪器与试剂

1.2.1 设备 高速离心机(北京白洋离心机厂生产),低速离心机(北京医用离心机厂生产),涡旋振荡

器(其林贝尔公司生产),水浴箱(上海博讯公司生产),电泳仪(北京六一仪器厂生产),水平电泳槽(北京六一仪器厂生产),9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司生产),凝胶成像系统(珠海黑马公司生产)。

1.2.2 试剂 单克隆(IgM 型)抗-D(德国 Biotest 公司,生产批号:1029060/20181808),IgG 型抗-D 试剂(上海血液生物医药有限责任公司,生产批号:20160120/201710203),IgM/IgG 型抗-D(法国 DIA-GAST 公司,生产批号:BMJ1204D/BGM1604B),多特异性抗人球蛋白试剂(上海血液生物医药有限责任公司,生产批号:20160120/20175002),酸放散液(广州展全公司,生产批号:20160103/20170101)。电泳缓冲液(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:20160105/201708011);琼脂糖(北京康为世纪公司,生产批号:06910K);血液基因组 DNA 提取试剂盒(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:20160125/201708010);RH 基因变异体基因分型检测试剂盒(天津秀鹏生物技术开发有限公司,生产批号:201602100/201708010)。

1.3 方法

1.3.1 常规血清学方法鉴定 RhD 阴性(试管离心法) 取 3 种不同批号的 IgG 或 IgM+IgG 性质的抗-D 100 μL,分别与被检者 5%红细胞悬液 50 μL 混匀,使用 O 型 RhD 阴、阳性红细胞作为阴、阳性对照管,置 37 °C 水浴 60 min,再以大量生理盐水洗涤 3 次,去除上清液,分别向各管加入 100 μL 多特异性抗人球

* 基金项目:广东省广州市番禺区科技和信息化局 2017 年医疗卫生计划项目(2017-Z04-22)。

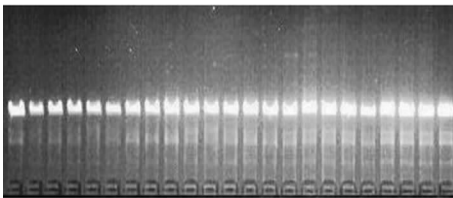
蛋白试剂,立即 110×g 离心 15 s 判定结果,待检测管出现凝集现象则为阳性,反之为阴性;3 种批号抗-D 试剂均检测为阴性才能确定标本为 RhD 阴性,否则判定为 D^u(弱 D)。

1.3.2 特殊放散 D(Del)表型鉴定方法 经 1.3.1 方法鉴定为 RhD 阴性的标本,另外取其 1 mL 红细胞标本与 IgG 抗-D 混合,置 37 °C 水浴 60 min 进行吸收试验,然后使用大量生理盐水洗涤 5 次,并采用酸放散试验,当吸收放散试验结果阳性时表明标本为 Del 表型。

1.3.3 RHD 基因分型 严格按照《全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书》操作提取待检标本的基因组 DNA 备用。利用 PCR-序列特异性引物(SSP)检测方法的原理,根据《RH 基因变异体基因分型检测试剂盒说明书》,在 9700 型 PCR 扩增仪进行基因分型试验:将 100 μL dNTP-Buffer 浓缩液、140 去离子水、2.0 μL Taq 酶(5 units/μL)和 25 μL 标本 DNA 总共 267 μL 混合液,向每个引物孔(1~24 孔)各加入 10 μL 上述混合液;扩增循环参数:9 6 °C 2 min,1 个循环;96 °C 20 s,68 °C 60 s,5 个循环;96 °C 20 s,65 °C 50 s,72 °C 45 s,10 个循环;96 °C 20 s,62 °C 50 s,72 °C 45 s,25 个循环;72 °C 2 min,1 个循环。产物电泳分析:吸取 5 μL 扩增产物,加到配制好的 2% 的琼脂糖凝胶中并进行电泳,电泳参数设置为电压 100 V,时间 15 min。电泳后用凝胶成像仪进行拍照、记录,并对照说明书分析结果。

2 结 果

2.1 血清学 RhD 阴性鉴定 按 1.3.1 的方法对 40 例筛查 RhD 阴性标本进行确认,40 例均鉴定为 RhD 阴性,吸收放散试验中确定 9 例 Del 表型(22.5%)。不规则抗体筛查检出 2 例含有抗-D;1 例孕 24、28 周时检测效价均为 16,孕 32 周时为 128;1 例孕 32 周时检测为 64。



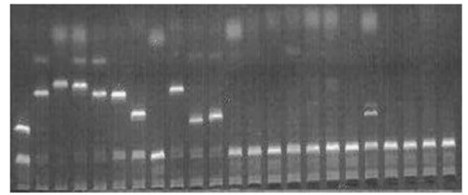
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

注:图中编号 1~23 对应 RHD 基因特异性条带分别是 EXON1、EXON2、EXON3、EXON4、EXON5、EXON6、EXON7、EXON9、EXON10、EXON5.1、EXON5.2、Weak D1、Weak D6、Weak D12、Weak D15、Weak D17、Weak D24、RHD M285、RHD1227A DEL、RHD(M11) DEL、RHD(R10W) DEL、RHD(L84P) DEL

图 1 RHD 基因全缺失型

2.2 RHD 基因分型 40 例标本中,24 例 RHD 基因全缺失型(1~10 外显子全缺失),占比 60.0%(图 1)。9 例 RHD1227A DEL 型(图 2),占比 22.5%,与血清学放散 D 检测结果一致。5 例 RHD-CE(2-9)-D 型占比 12.5%(图 3),2 例 10 外显子全阳性(图 4),经进一步测序分析确定均为 RHD 711 del C 型。2 例产生

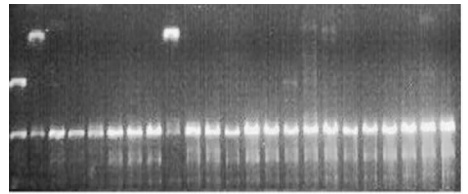
抗-D 的孕妇基因分型均为 RHD 基因全缺失型。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

注:图中编号 1~23 对应 RHD 基因特异性条带分别是 EXON1、EXON2、EXON3、EXON4、EXON5、EXON6、EXON7、EXON9、EXON10、EXON5.1、EXON5.2、Weak D1、Weak D6、Weak D12、Weak D15、Weak D17、Weak D24、RHD M285、RHD1227A DEL、RHD(M11) DEL、RHD(R10W) DEL、RHD(L84P) DEL

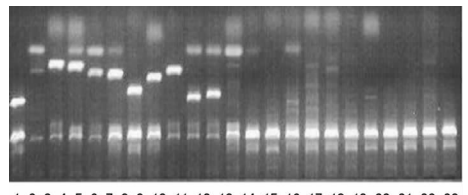
图 2 RHD1227A DEL 型



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

注:图中编号 1~23 对应 RHD 基因特异性条带分别是 EXON1、EXON2、EXON3、EXON4、EXON5、EXON6、EXON7、EXON9、EXON10、EXON5.1、EXON5.2、Weak D1、Weak D6、Weak D12、Weak D15、Weak D17、Weak D24、RHD M285、RHD1227A DEL、RHD(M11) DEL、RHD(R10W) DEL、RHD(L84P) DEL

图 3 RHD-CE(2-9)-D 型



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

注:图中编号 1~23 对应 RHD 基因特异性条带分别是 EXON1、EXON2、EXON3、EXON4、EXON5、EXON6、EXON7、EXON9、EXON10、EXON5.1、EXON5.2、Weak D1、Weak D6、Weak D12、Weak D15、Weak D17、Weak D24、RHD M285、RHD1227A DEL、RHD(M11) DEL、RHD(R10W) DEL、RHD(L84P) DEL

图 4 RHD 基因阳性

3 讨 论

临床上,RhD 阴性母体接收到 D 抗原致敏,免疫系统作出反应可以产生抗-D,当怀有 RhD 阳性胎儿时,该抗体可引发严重的新生儿溶血病(HDN),甚至死胎。国内学者研究认为实施 RhD 阴性妇女孕前宣教、孕期管理和术前供血管理等措施,能尽量减少无效妊娠、保证临床安全用血、有效节约和保护稀有血液资源^[3-6]。临床上一般对 RhD 阴性孕妇的产前管理策略是让其孕 16 周以后定期监测是否产生抗-D 或效价,孕 28 周左右和产后可预防性注射 Rh 免疫球蛋白阻断母体产生抗-D。国内外学者研究结果显示,经血清学方法鉴定为 RhD 阴性的标本中,还存在 14.5%~27.0% 的 RHD1227A DEL 型,其具有完整的 RHD 基因^[7-9]。RHD1227A DEL 型作为国内外较为常见的 RHD 变异型,其分子机制已被报道:在第 9

外显子 1227 位置的 C 碱基被 A 碱基代替,该突变未造成氨基酸的重排,但促使 RNA 转录时内含子被错误剪切,导致无法正常表达 RHD 蛋白^[10]。而且分析显示 RHD1227A DEL 具有较完整的 D 抗原,因此 RHD1227A DEL 型可能不发生 RHD 阳性致敏的同种免疫反应。有学者报道 RHD1227A DEL 型孕产妇围生期发生抗-D 同种免疫的可能性极小^[2],在抗-D 产生的个体中未检测出 RHD1227A DEL 型^[11]。国外,澳大利亚有学者通过成本效益研究,认为开展 RHD 基因分型检测是经济上合理的选择。Del 型个体在接受 D 抗原致敏后几乎不产生同种不规则抗-D,据此这部分孕妇可以不必进行频繁的抗-D 监测以及预防性注射 Rh 免疫球蛋白阻断母体产生抗-D。

本文主要收集和分析本地区范围内 40 例 RhD 阴性孕妇的产前血清学、基因分型结果,并追踪孕妇生产过程以及新生儿情况,从调查分析结果来看,9 例 RHD1227A DEL 型孕妇全部都生产了 RhD 阳性婴儿,均未产生抗-D,进一步印证了上述学者的论断。从调查数据可见,本地区有超过五分之一的经常规方法确认为 RhD 阴性的孕妇,利用特殊检测手段,可检出红细胞表面含有 D 抗原(放散 D)或通过 RHD 基因分确定为 RHD1227A DEL 型。这类型孕妇在已有报道中,未见有因怀孕或生产多胎 D 抗原阳性新生儿而产生抗-D 或发生 RHD-HDN 的情况^[6-14]。因此,这类孕妇可免去无效的、频繁的抗-D 监测和排除,以及为阻断母体产生抗-D 而注射 Rh 免疫球蛋白带来的风险,既可以减轻经济压力,又能排除因为担心产生抗-D 给胎儿造成不良影响所带来的心理负担。

本次调查对象中 24 例基因型为 RHD 基因缺失型的孕妇,有 2 例孕妇血清中产生抗-D。这 2 例孕妇均有 3 次怀孕史,均为第 1 胎顺利生产、未发生溶血;第 2 胎流产,本次检测为第 3 次怀孕。1 例孕妇分别于孕 24、28 和 32 周在番禺区中心血站做了抗体检测,抗体效价分别为 16、16 和 128;该孕妇在怀孕后期出现抗体效价快速增长的发展趋势,医生推断其发生 RHD-HDN 概率非常大,告诉患者家属提醒临床做好生产备血和输血治疗预案;该孕妇怀孕足月并顺产生下 1 名男性 RhD 阳性的婴儿,出生时所有生命体征均正常,24 h 后黄疸指数开始升高(总胆红素 297.4 $\mu\text{mol/L}$),48 h 后出现明显的溶血症状(总胆红素 459.2 $\mu\text{mol/L}$),经实验室诊断为 RHD-HDN;由于相应血液制品量不足和家属拒绝换血治疗,临床从第 2 天开始进行输注清蛋白和照射蓝光治疗,在第 3 天输注 50 mL RhD 阴性红细胞;经过对症治疗,从第 4 天开始各项指标均有不同程度下降,因此,临床不再考虑实行换血治疗;第 6 天以后婴儿情况稳定继续留院观察,并在第 13 天出院。另外 1 例孕妇在孕 32 周做了 1 次抗体检测,效价 64;电话回访胎儿父亲,反映足月顺产 1 名女性 RhD 阳性婴儿,出生后出现溶血,进行输注清蛋白和照射蓝光治疗,但未实行输血或换

血治疗,由于该产妇在外地生产,无法得知其治疗具体过程。其余 22 例孕妇均顺利生产,未发生 RHD-HDN,21 例新生儿为 RhD 阳性,只有 1 例为 RhD 阴性。另 5 例 RHD-CE(2-9)-D 型和 2 例 RHD 711 del C 型的孕妇,均顺利生产出 RhD 阳性婴儿,未发生 HDN 症状。

综上所述,笔者认为临床上有必要对 RhD 阴性的孕妇开展吸收放散试验或 RHD 基因分型等特殊项目筛查,产科医生结合血清学和基因分型检测结果,能更精准地指引 RhD 阴性孕妇进行产前抗-D 筛查、预防性注射 Rh 免疫球蛋白阻断抗-D 产生,以及提前制订好预防 HDN 发生的管理策略。

参考文献

- [1] 谢敬文,邓诗楨,严康峰,等.番禺地区 RHD 变异体基因分型研究[J].中国输血杂志,2013,25(3):138-142.
- [2] 朱美玲,周丹,谢亚琴,等. Del 红细胞膜 D 抗原分子定量分析[J].中国输血杂志,2008,21(7):512-513.
- [3] 邓冬梅,王远杰,刘友迎,等. RhD 阴性孕妇围生期安全输血管理[J].现代医药卫生,2017,33(22):3524-3526.
- [4] 王兰芳,王秀,何刘媛,等. 90 例 RhD 阴性孕妇血型不合对胎儿和新生儿的影响[J].临床输血与检验,2015,17(6):495-498.
- [5] 宋小川,居敏,许洁,等.新疆地区 RhD 阴性孕妇血清 IgG 抗-D 筛查与效价检测的分析[J].中国输血杂志,2015,30(11):1374-1376.
- [6] 王爱红,姜庆芳,郑荣军.检测 RhD 阴性孕妇的血清不规则抗体对预防新生儿溶血病的意义[J].临床血液学杂志(输血与检验),2017,30(1):119-121.
- [7] SEO M H, WONG E J, HONG Y J, et al. An effective diagnostic strategy for accurate detection of RhD variants including Asian DEL type in apparently RhD-negative blood donors in Korea[J]. Vox Sang, 2016, 111(4):425-430.
- [8] 徐群,孙昌魁,吕红娟,等. RhD(-) 孕产妇的 RhD 同种免疫分析及围产期孕妇新生儿溶血病的监测、预防和治疗[J].中国输血杂志,2010,23(10):858-860.
- [9] 王贞,贾双双,陈景旺,等. 100 例 RhD 初筛阴性孕妇 D 放散型表型筛查及基因型分析[J].中国输血杂志,2018,30(6):602-605.
- [10] 李继红,张春燕,孙建华,等.中国哈尔滨地区献血人群 RhDel 表型的分子机理研究[J].中国实验血液学杂志,2012,20(6):1478-1481.
- [11] 章旭,林凤秋,李剑平,等. DEL 型个体抗体筛选的调查分析[J].中国输血杂志,2009,22(10):796-799.
- [12] 孙瑜,翁美芝,熊莉,等. RhD 阴性围产期妇女 RH 基因型及同种免疫研究[J].实验与检验医学,2015,33(4):418-420.
- [13] 闫芳,王全立. RhD 阴性个体遗传多态性与抗-D 同种免疫关系研究[J].北京医学,2014,36(4):314-316.
- [14] 王淑平,汤伟娟,陈慧芬,等. RhD 初筛阴性孕产妇 RHD 基因表型相关研究[J].临床输血与检验,2013,15(3):209-211.