中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国科技论文统计源期刊
美国化学文摘(CA)收录期刊
WHO西太平洋地区医学索引（WPRIM）来源期刊

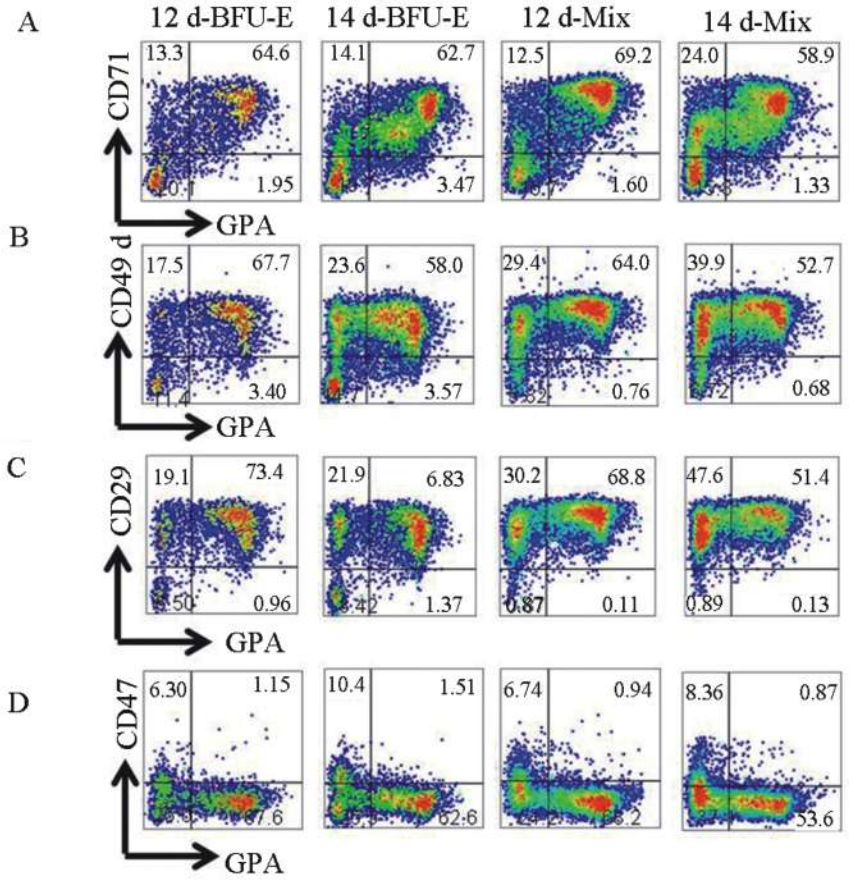
ISSN 1004－549X
CN 51－1394/R

中国输血雜志®

ZHONGGUO SHUXUE ZAZHI

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

2017年　第30卷　第3期



（See page 239）

ISSN 1004-549X
03>
9 771004 549178

中国输血杂志编辑委员会

中国输血杂志

ZHONGGUO SHUXUE ZAZHI

月刊　1988 年 3 月创刊　第 30 卷 第 3 期　2017 年 3 月 25 日出版

主　管
国家卫生和计划生育委员会

主　办
中国输血协会
中国医学科学院输血研究所

编　辑
中国输血杂志编辑委员会

主　编
刘　忠

编辑部主任
蔡　辉

出　版
中国输血杂志编辑部
610052　成都市东三环路二段
龙潭总部经济城华彩路 26 号
电话:028-61648584
传真:028-83373857
网址:www.cjbt.cn
电子邮箱:cjbt@cjbt.cn

印　刷
成都汇源文化发展有限公司

发　行
国内:四川省报刊发行局
代号:62-186
国外:中国国际图书贸易总公司
代号:M7383

订　阅
全国各地邮局
邮发代号 62-186

中国标准刊号
ISSN 1004-549X
CN 51-1394/ R

广告经营许可证号
5100004000542

订　价
16.00 元/ 期　全年192.00元

版权归中国输血杂志编辑部所有

本刊刊载的所有文章不代表本刊编委会及编辑部的观点,除非特别声明

目　次

专家述评

HTLV 与血液安全 …… 刘　忠　李　玲　(221)

HTLV 与血液筛查策略专题

浙江沿海地区无偿献血人群 HTLV 感染的流行病学与知晓情况调查
…… 王拥军　金秀国　周华平等(224)

遵义市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况调查
…… 刘永生　付　胜　文良雪等(227)

合肥地区献血人群 HTLV 筛查情况及分析…… 程卫芳　周学勇　刘　忠等(229)

无偿献血者 HTLV 筛查研究进展…… 李文慧　李　玲　刘　忠　(231)

基础医学与实验研究

人胚胎干细胞来源红系细胞膜蛋白表达的研究
…… 李　晴　邹　庆　马　峰等(235)

西达本胺联合地西他滨对霍奇金淋巴瘤细胞株增殖及凋亡的影响
…… 胡莲洁　姜　涛　贾永前等(242)

输注储存血液对黑色素瘤荷瘤小鼠辅助性 T 细胞 1 和 2 平衡的影响
…… 张敬军　张　琦　夏　荣等(247)

红细胞储存损伤对于大肠杆菌感染大鼠输注效果的影响
…… 王向明　焦伯海　刘　忠等(251)

干扰素刺激基因 15 抑制严重发热伴血小板减少综合征病毒复制的初步研究
…… 陈　旭　曾沛斌　陈利民等(255)

厦门地区献血者戊肝病毒感染研究　…… 欧山海　林永财　宋秀宇等(258)

不同照射剂量建立非清髓性移植物抗宿主病模型小鼠外周血 T 细胞消长性研究
…… 胡晓丽　李志强　(262)

江苏地区汉族人群 HLA-G 3′非翻译区基因多态性和单体型分析
…… 邵　雷　林　红　(267)

四氢嘧啶对人冰冻红细胞质量影响的初步研究
…… 周　洋　张学俊　刘嘉馨等(271)

人凝血因子Ⅸ-R338A 高活性突变体在毕赤酵母中的表达及活性测定
…… 戴永刚　尹胜菊　程凤凤等(276)

国内常用 7 家 HBsAg 酶免检测试剂盒灰区临界值的确定
…… 王庆敏　冯晨晨　黄成垠等(279)

临床研究

Rh 血型系统相容性输血在儿科中的应用探讨 … 邵智利　韩利霞　马德冉等(281)

534 例 Rh 血型系统同种抗体回顾性分析 …… 何燕京　王秋实　白英哲　(285)

调查研究

HPA-1-28*w* 基因分型检测技术体系的建立和广西瑶族、汉族人群 *HPA*-1-28*w* 基因多态性研究　…… 李丽兰　卢　芳　吴国光等(289)

高海拔地区献血者红细胞增多症患病比例及其影响因素的调查分析
…… 王　瑛　张玉华　赵　莲等(296)

四川省临床医生用血知识调查及分析
…… 钟 凌 赵 洁 饶绍琴等(300)
本院 2005-2015 年输血过敏性不良反应统计分析
…… 马凤莲 崔 丹 陈海丽等(303)

经验与方法

MCS+血细胞分离机单采血小板冲红献血者自身原因分析及应对措施 …… 邢志勇 王维娜 (305)

个例报告

急性白血病致 Rh 血型系统 D 抗原减弱 1 例
…… 周雪丽 解金辉 刘振云等(307)
造血干细胞移植后免疫介导的类抗体检出 1 例
…… 赵 洁 凌止发 袁 红等(309)

输血管理

假阳性献血者评估及告知模式的建立
…… 王新梅 邓雪莲 梁晓华等(311)

综述

α1-抗胰蛋白酶相关疾病及其临床应用进展
…… 张剑平 周兰贞 郭采平 (316)

血液质量管理

英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其启示(五)
…… 余卓丽 梁惠兰 郭永建等(320)

信 息 窗

世界低温生物科技与生命资源库大会(223) 2017 年本刊专题报道(230) 世界献血者日(234) 关于发布《临床实验室质量指标》等 5 项推荐性卫生行业标准的通告(241) 《中国输血杂志》编辑部邮售书(刊)目(246) 严正声明(250) 《临床输血进展》购书事宜(270) 《临床单病种输血》专著出版(275) 中国输血协会第七届理(监)事会成员名单(288) 血型基因检测开放平台(315) 《〈中国输血杂志〉创刊 25 周年纪念专辑》出版(324)

彩 页 索 引

CompoMat 全自动血液成分分离机(费森尤斯卡比) (封 二)
斯达必集血型仪(澳斯邦生物) (首 页)
ORTHO 血型检测工作站(奥森多医疗) (目次前)
采供血设备(威高集团) (目次前)
采供血设备(爱康生物) (目 次)
采供血设备(美国血液技术) (目 次)
血红蛋白分析仪、HTLV 检测试剂盒(艾康生物) (目 次)
中国科技核心期刊收录证书 (目 次)
中国输血杂志简介 (目 次)
一体化采血系统(达科为医疗) (对 文)
血液样本留样管理系统(赛默飞世尔) (对 文)
采供血设备(上海若骊生物) (对 文)
采供血设备(上海输血技术) (对 文)
采供血设备(美国血液技术) (封 三)
抗-D 试剂(贝索企业) (封 底)

本期责任编委(以姓名汉语拼音为序):安万新 蔡旭兵 陈会友 陈利民 陈 强 陈勤奋 崔徐江 董伟群 樊 晶 范道旺 冯觉平 傅 强 傅雪梅 高东英 郭永建 韩 威 黄成垠 纪宏文 江咏梅 乐爱平 李碧娟 李剑平 李聚林 李 平 李 维 李长清 李忠俊 练正秋 梁晓华 林东军 刘嘉馨 刘铁梅 刘衍春 栾建凤 罗广平 骆 群 吕 蓉 马 峰 马 廉 苗天红 聂咏梅 彭 涛 钱宝华 秦 莉 饶绍琴 任芙蓉 邵超鹏 宋 宁 苏 毅 孙 俊 孙启凤 汪传喜 汪德清 汪新民 王保龙 王乃红 王 迅 魏 晴 魏亚明 吴 涛 夏 荣 向 东 项红兵 谢毓滨 邢颜超 许金波 阎 石 杨江存 叶世辉 叶 欣 尹 文 于新发 于 洋 岳 文 张贺秋 张 曦 张循善 张 燕 章金刚 章 旭 赵国庆 赵树铭 郑优荣 周 虹 周华友 周 俊 周小玉 周学勇(特邀) 周 英 朱培元 朱自严 邹汉武 邹峥嵘

本期责任编辑:夏 玲 **本期责任校对**:闻 欣 **英文审校**:KA YI LI(李嘉怡)(美国)

协作出版单位(排名不分先后):北京市红十字血液中心 上海市血液中心 广州血液中心 福建省血液中心 北京军区总医院 天津市血液中心 大连市血液中心 黑龙江省血液中心 山东省血液中心 青岛市中心血站 浙江省血液中心 厦门市中心血站 南京红十字血液中心 江苏省血液中心 安徽省血液中心 江西省血液中心 河南省红十字血液中心 长沙血液中心 广西血液中心 重庆市血液中心 成都市血液中心 陕西省血液中心 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

[**期刊基本参数**]CN51-1394/R * 1988 * m * 16 * A4 * 104 * zh * P * ￥16.00 * 28 * 2017-3

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

Monthly Established in March 1988 Volume 30, Number 3 Mar 25, 2017

Responsible Institution

National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China

Sponsor

Chinese Society of Blood Transfusion & Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of Blood Transfusion

Editor-in-Chief

LIU Zhong

Managing Director

CAI Hui

Publishing & Mail-Order

Editorial Office of Chinese Journal of Blood Transfusion

P.O.Box 268, Chengdu 610052, China

Tel&Fax: 86-28-83373857

Website: www.cjbt.cn

Email: cjbt@ cjbt.cn

Overseas Distributor:

China International Book Trading Corporation

P.O.Box 399, Beijing, China

Code No.M7383

CSSN

ISSN 1004-549X

CN 51-1394/R

Copyright© by the Editorial Office of Chinese Journal of Blood Transfusion

All articles published represent the opinions of the authors, do not reflect the official policy of the publisher, unless this is clearly specified

CONTENTS

HTLV and Blood Safety ····· *LI Ling, LIU Zhong* (221)

Epidemiological study on the human T-cell leukemia virus type Ⅰ/Ⅱ infection in the east coastal areas of Zhejiang province ····· *WANG Yongjun, JIN Xiuguo, ZHOU Huaping, et al* (224)

Investigation on HTLV-Ⅰ/Ⅱ infection status among the voluntary blood donors in Zunyi, China ····· *LIU Yongsheng, FU Sheng, WEN Liangxue, et al* (227)

HTLV screening and analysis in donors in Hefei ····· *CHEN Weifang, ZHOU Xueyong, LIU Zhong, et al* (229)

Research progress in HTLV screening among blood donors ····· *LI Wenhui, LI Ling, LIU Zhong* (231)

A study on the expression of lineage specific membrane proteins on human embryonic stem cells-derived erythroid cells ····· *LI Qing, ZOU Qing, MA Feng, et al* (235)

The effects of Chidamide combined with Decitabine on proliferation and apoptosis of Hodgkin's lymphoma cell lines ····· *HU Lianjie, JIANG Tao, JIA Yongqian, et al* (242)

Effects of storage blood transfusion on balance of helper T cell 1 and 2 in melanoma bearing mice ····· *ZHANG Jingjun, YAN Yuzhong, XIA Rong, et al* (247)

The influence of erythrocyte storage lesion on transfusion effects for rats infected by Escherichia Coli ····· *WANG Xiangming, JIAO Baihai, LIU Zhong, et al* (251)

Study on the role of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) to inhibit the replication of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus ····· *CHEN Xu, ZENG Peibin, CHEN Liming, et al* (255)

Study of hepatitis E viral infection in blood donors in Xiamen, China ····· *OU Shanhai, LIN Yongcai, SONG Xiuyu, et al* (258)

Growth and decline changes of T cells in peripheral blood of non-myeloablative graft versus host disease with different irradiation doses in murine model ····· *Hu Xiaoli, LI Zhiqiang* (262)

Polymorphisms and haplotypes of human leukocyte antigen G, (HLA-G) 3′-UTR in Jiangsu Han population ····· *SHAO Lei, LIN Hong* (267)

The study of the effects of by adding ectoine into the cryoprotectants of human red cells ····· *ZHOU Yang, ZHANG Xuejun, LIU Jiaxing, et al* (271)

Expression and activity assay on highly active mutant R338A of FⅨ in Pichia Pastoris ····· *DAI Yonggang*, *YIN Shengju*, *CHENG Fengfeng*, *et al*(276)
Analysis and verification of the cut-off value in domestic HBsAg ELISA kits during blood donation screening using Youden index ····· *WANG Qingmin*, *FENG Chenchen*, *HUANG Chengyin*, *et al*(279)
The application study of Rh blood group system compatibility management in pediatric transfusion ····· *SHAO Zhili HAN Lixia MA Deran*, *et al*(281)
Retrospective analysis of Rh blood group alloantibodies in 534 cases ····· *HE Yanjing*, *WANG Qiushi*, *BAI Yingzhe*(285)
Establishment of the HPA-1-28*w* genotyping technique system and the study of HPA-1-28*w* polymorphism in Yao and Han populations in Guangxi, China ····· *LI Lilan*, *LU Fang*, *WU Guoguang*, *et al*(289)
Investigation on the prevalence rate and influence factors of high altitude polycythemia among blood donors in high altitude area ····· *WANG Ying*, *ZHANG Yuhua*, *ZHAO lian*, *et al*(296)
A survey and study on transfusion medicine knowledge of clinicians in Sichuan ····· *ZHONG Ling*, *ZHAO Jie*, *RAO Shaoqin*, *et al*(300)
Statistical analysis on allergic adverse transfusion in our hospital from 2005 to 2015 ····· *MA Fenglian*, *CUI Dan*, *CHEN Haili*, *et al*(303)
Analysis and countermeasures of MCS+ blood cell separator in apheresis platelet donors ····· *XING Zhiyong*, *WANG Weina*(305)
Case study: acute leukemia induced Rh-D antigen weakening ····· *ZHOU Xueli*, *XIE Jinhui*, *LIU Zhenyun*, *et al*(307)
To establish a set of inform mode for donor blood test results ··· *WANG Xinmei*, *DENG Xuelian*, *LIANG Xiaohua*, *et al*(311)
Research progress on related diseases and clinical application of α1-antitrypsin ····· *ZHANG Janping*, *ZHOU Lanzhen*, *GUO Caiping*(316)
The main recommendations of UK guidelines on the management of haemorrhage in pregnancy and it's inspiration, part 5: Intra-operative blood cell salvage in obstetrics ····· *YU Zhuoli*, *LIANG Huilan*, *GUO Yongjian*, *et al*(320)

中国输血杂志®

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

第七届编辑委员会成员名单

Members of the 7th Editorial Board

顾　问 Consultants

朱庆生 ZHU Qingsheng　高光明 GAO Guangming　倪道明 NI Daoming　严力行 YAN Lixing　李　芳 LI Fang
杨成民 YANG Chengmin　田兆嵩 TIAN Zhaosong　吴国光 WU Guoguang　江朝富 JIANG Chaofu　刘文芳 LIU Wenfang
兰炯采 LAN Jiongcai　林武存 LIN Wucun　单藕琦 SHAN Ouqi　孙绍忠 SUN Shaozhong

名誉主编 Honor Editor-in-Chief

郑忠伟 ZHENG Zhongwei　王憬惺 WANG Jingxing

主　编 Editor-in-Chief

刘　忠 LIU Zhong

副主编 Associate Editor-in-Chief（以下按姓名汉语拼音排序）

安万新 AN Wanxin　蔡旭兵 CAI Xubing　戴苏娜 DAI Suna　傅雪梅 FU Xuemei　付涌水 FU Yongshui
郭永建 GUO Yongjian　何　涛 HE Tao　胡　伟 HU Wei　李剑平 LI Jianping　刘　江 LIU Jiang
刘景汉 LIU Jinghan　马　峰 MA Feng　逄淑涛 PANG Shutao　裴雪涛 PEI Xuetao　秦敬民 QIN Jingmin
宋秀宇 SONG Xiuyu　孙常翔 SUN Changxiang　孙　俊 SUN Jun　汪德清 WANG Deqing　王双林 WANG Shuanglin
王兆福 WANG Zhaofu　王　震 WANG Zhen　许建荣 XU Jianrong　杨文玲 YANG Wenling　叶世辉 YE Shihui
赵国庆 ZHAO Guoqing　周　俊 ZHOU Jun　朱永明 ZHU Yongming

编　委 Members of Editorial Board

中国(China)

白连军 BAI Lianjun　陈长荣 CHEN Changrong　陈会友 CHEN Huiyou　陈嘉林 CHEN Jialin　陈　强 CHEN Qiang
陈勤奋 CHEN Qinfen　陈　青 CHEN Qing　崔徐江 CUI Xujiang　戴宇东 DAI Yudong　邓志辉 DENG Zhihui
董伟群 DONG Weiqun　窦桂芳 DOU Guifang　樊　晶 FAN Jing　范道旺 FAN Daowang　冯觉平 FENG Jueping
冯晓燕 FENG Xiaoyan　傅　强 FU Qiang　甘茂周 GAN Maozhou　高东英 GAO Dongying　高　明 GAO Ming
葛红卫 GE Hongwei　宫　锋 GONG Feng　宫济武 GONG Jiwu　谷俊侠 GU Junxia　桂　嵘 GUI Rong
韩　威 HAN Wei　韩　颖 HAN Ying　何　军 HE Jun　侯继锋 HOU Jifeng　胡丽华 HU Lihua
黄成垠 HUANG Chengyin　纪宏文 JI Hongwen　贾永前 JIA Yongqian　江咏梅 JIANG Yongmei　蒋天伦 JIANG Tianlun
蒋学兵 JIANG Xuebing　焦淑贤 JIAO Shuxian　靳艳华 JIN Yanhua　孔长虹 KONG Changhong　赖福才 LAI Fucai
乐爱平 LE Aiping　黎诚耀 LI Chengyao　李碧娟 LI Bijuan　李长清 LI Changqing　李翠莹 LI Cuiying
李建斌 LI Jianbin　李金明 LI Jinming　李聚林 LI Julin　李　平 LI Ping　李　维 LI Wei
李　勇 LI Yong　李志强 LI Zhiqiang　李忠俊 LI Zhongjun　练正秋 LIAN Zhengqiu　梁晓华 LIANG Xiaohua
廖　辉 LIAO Hui　林东军 LIN Dongjun　刘凤华 LIU Fenghua　刘嘉馨 LIU Jiaxin　刘　进 LIU Jin
刘素芳 LIU Sufang　刘铁梅 LIU Tiemei　刘衍春 LIU Yanchun　陆志刚 LU Zhigang　栾建凤 LUAN Jianfeng
罗广平 LUO Guangping　骆　群 LUO Qun　吕　蓉 LV Rong　马　廉 MA Lian　马曙轩 MA Shuxuan
毛　伟 MAO Wei　孟庆宝 MENG Qingbao　孟忠华 MENG Zhonghua　苗天红 MIAO Tianhong　穆士杰 MU Shijie
聂咏梅 NIE Yongmei　欧阳锡林 OUYANG Xilin　彭　涛 PENG Tao　戚　海 QI Hai　钱宝华 QIAN Baohua
钱开诚 QIAN Kaicheng　秦　莉 QIN Li　邱　艳 QIU Yan　饶绍琴 RAO Shaoqin　任芙蓉 REN Furong
戎　霞 RONG Xia　单桂秋 SHAN Guiqiu　邵超鹏 SHAO Chaopeng　沈行峰 SHEN Xingfeng　宋　宁 SONG Ning
苏　毅 SU Yi　孙玉英 SUN Yuying　唐长玖 TANG Changjiu　田亚平 TIAN Yaping　汪传喜 WANG Chuanxi
汪新民 WANG Xinmin　王保龙 WANG Baolong　王海平 WANG Haiping　王洪波 WANG Hongbo　王鸿捷 WANG Hongjie
王乃红 WANG Naihong　王全立 WANG Quanli　王同显 WANG Tongxian　王学锋 WANG Xuefeng　王　迅 WANG Xun
王燕宁 WANG Yanning　王　毅 WANG Yi　魏　晴 WEI Qing　魏亚明 WEI Yaming　文爱清 WEN Aiqing
文　军 WEN Jun　吴　谨 WU Jin　吴　涛 WU Tao　奚永志 XI Yongzhi　夏　荣 XIA Rong
向　东 XIANG Dong　项红兵 XIANG Hongbing　肖　南 XIAO Nan　肖小璞 XIAO Xiaopu　谢亦武(香港) Vincent Xi-Wu XIE
谢毓滨 XIE Yubin　邢颜超 XING Yanchao　徐　华 XU Hua　徐卫平 XU Weiping　许金波 XU Jinbo
阎　石 YAN Shi　杨宝成 YANG Baocheng　杨江存 YANG Jiangcun　杨仁池 YANG Renchi　叶明亮 YE Mingliang
叶　欣 YE Xin　尹建平 YIN Jianping　尹　文 YIN Wen　于　群 YU Qun　于笑难 YU Xiaonan
于新发 YU Xinfa　于　洋 YU Yang　岳　文 YUE Wen　詹林盛 ZHAN Linsheng　张贺秋 ZHANG Heqiu
张　兰 ZHANG Lan　张　曦 ZHANG Xi　张循善 ZHANG Xunshan　张　燕 ZHANG Yan　张印则 ZHANG Yinze
张　哲 ZHANG Zhe　章金刚 ZHANG Jingang　章　旭 ZHANG Xu　曾劲峰 ZENG Jinfeng　赵树铭 ZHAO Shuming
郑山根 ZHENG Shangen　郑优荣 ZHENG Yourong　周　虹 ZHOU Hong　周华友 ZHOU Huayou　周吉成 ZHOU Jicheng
周小玉 ZHOU Xiaoyu　周　英 ZHOU Ying　朱发明 ZHU Faming　朱　明 ZHU Ming　朱培元 ZHU Peiyuan
朱易萍 ZHU Yiping　朱永宝 ZHU Yongbao　朱自严 ZHU Ziyan　庄　辉 ZHUANG Hui　邹汉武 ZOU Hanwu
邹峥嵘 ZOU Zhengrong

外籍(International)

陈利民 Limin Chen(Canada)　Hua Shan(USA)　Tongmao Zhao(USA)　Yanyun Wu(USA)　Yanhua Li(USA)

本期关注

“输血具有拯救生命、改善健康之效”既早已成为常识,也几乎是本刊每一篇论文写作孕(蕴)意——体现的是科研课题的设计、实施——的前提,而及时向需要输血的患者提供足够的血液(可及或可得),并确保患者健康不因输血再受到危害(安全)已成为一国制定卫生保健政策、建设卫生基础设施的一项重要依据和不可或缺的“组分”!血液的“安全”和“可得”,本是两个区分明晰的概念,它们同为国家血液政策制定的前提和所要达到目标;然而在我国因最近些年血液可得水平(反映自全民献血率)相对于迅速发展的临床医疗水平明显滞后,全国范围内的季节性、区域性临床供血短缺现象的频现和常态化,以至连不少输血专家也视“血液的可得性”为安全性问题,甚至上升到关乎“国家安全”的高度(诉说“血液安全”最著名的桥段便是“输血可能不安全,但没有血输是最不安全的”)。

血液供应不足其实是一个全球性现象,这里所说的“不足”除了量的欠缺,更凸显的是血液供应在世界范围极不均衡的问题:发达国家和地区高于中低收入国家[其中包括去年已成为“中等偏高收入国家”的中国(据中国社科院发布的一个专门报告称)]数倍乃至十多倍的献血率,使得其以不及全球一成五的人口提供了全世界近一半的献血量!很明显,血液的可得水平与一国的人均收入关系密切,但人源血的特殊性,除了始终受“人源”限制外,保存期及储运条件的严苛,亦使得血液供应的充足(可得性)同安全一样,成为“永恒”的过程和目标。hESCs 和 iPSCs 的发现,标志着干细胞应用时代的曙光初见,这两类干细胞向红系细胞定向诱导分化及其所产生的相对成熟的红系细胞,不但丰富了细胞移植、再生医学的内容,而且也为血液的可得性开辟了蹊径(尽管到实现临床应用还实在是相距甚远)。本期“基础医学与实验研究”栏目中的《人胚胎干细胞来源红系细胞膜蛋白表达的研究》,考察了 hESCs 来源红系细胞的膜蛋白表达情况——以此作为评价 hESCs 来源红细胞发育过程与成熟度的指标之一,既证明 hESCs 向红细胞诱导生成是一个逐步成熟的过程(由此提供进一步研究的线索),也有助于研究与红细胞生成中膜缺陷相关的遗传性疾病的发病机理。

近年来成为输血医学研究热点的血液(重点是红细胞和血小板)储存损伤,实质上也关乎血液的可得和安全——为了有效改善患者的治疗效果和状态,及时应对拯救生命的不测之需,不管是血站还是医院输血科(血库)都必须备有适当的库存(储存时间不断变化的全血及血液成分),随着储存期的延长(越来越接近储存有效期限),红细胞也好、血小板也罢,从形态到功能都发生一系列改变,输给患者虽“合理”“合法(规)”或也会取得“改善”“拯救”之效,但其进入机体后所引起的 TRIM,却会进而导致输(术)后感染率、死亡率以及肿瘤切除后的复发率上升,又直接威胁到了输血(患者)的安全。《输注储存血液对黑色素瘤荷瘤小鼠辅助性 T 细胞 1 和 2 平衡的影响》与《红细胞储存损伤对于大肠杆菌感染大鼠输注效果的影响》二文所述研究,凭藉实验动物模型,前者模拟临床肿瘤输血,探讨了输注不同储存期血液对荷瘤小鼠产生 TRIM(是否抑制 TH1,致 TH1/TH2 失衡)的影响;后者以大肠杆菌为介质,探讨了输注不同储存期红细胞对免疫力低下大鼠输血后死亡率的影响。

不惟血液储存损伤,像从血液链条最前端(献血者中)的新发病原体(传染病)的检测与追踪(《干扰素刺激基因 15 抑制严重发热伴血小板减少综合征病毒复制的初步研究》),到最末段患者输血(移植)不良反应的处置与预防(《不同照射剂量建立非清髓性移植物抗宿主病模型小鼠外周血 T 细胞消长性研究》),都是“血液安全”(细想同样也与“血液可得”密切关联)常做常新的主题。至于本期“HTLV 与血液筛查策略专题”则更是直面血液的“安全”和“可得”,通过对三个“具代表性”地区(沿海的浙江、中部的安徽合肥与西部的贵州遵义)献血者中 HTLV 感染情况调查以及对感染者的确认试验与追踪分析,显示不管是本地自有的(如浙江,奇异的是两地 5 名感染者的 HTLV 毒株竟然分属 3 种),还是输入性的(如遵义唯一的 1 名感染者),HTLV 在献血者中感染现状再也容不得忽视。为此,本期“专家述评”《HTLV 与血液安全》结合中外 HTLV 流行的现状、危害性(“专题”中的综述《无偿献血者 HTLV 筛查研究进展》有较翔实的释述),以及治疗的可及性、经济成本与伦理的分析,对 HTLV 纳入我国血液筛查(包括筛查模式、范围及对象)与否作了理据并重的评述。本期专题的立(用)意诚如述评者所言,是为同行开展相关工作“提供参考”,以共同“推动血液 HTLV 筛查的开展”;但编者从字里行间还悟出了更甚(深)的蕴意:向国家卫生行政主管部门,乃至更高的决策层面,提供完善国家血液政策(进一步保障血液的安全与可得)的建议(这恰是本刊主事者一直再做的“中国梦”)!

· 专家述评 ·

HTLV 与血液安全*

刘忠△ 李玲(中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052)

摘要:人类嗜 T 淋巴细胞病毒(HTLV)是 1 种逆转录病毒,经输血传播是其主要传播方式之一,临床危害较大。预防经输血传播 HTLV 的有效方法是对血液做 HTLV 筛查。目前,一些发达国家已将 HTLV 检测列入血液筛查的常规检测项目。早在 2000 年,我国就有了东南沿海地区人群中 HTLV 感染的报道;近年来,在这一地区献血者中也检测出了 HTLV。2015 年,国家卫生计生委划拨专项经费在国内部分地区的无偿献血者中开展 HTLV 检测试点。就 HTLV 是否应列入我国的血液常规筛查项目以及如何列入,本文从 HTLV 在我国的流行情况、危害性、治疗的可及性、社会经济学及伦理等方面,对是否考虑将 HTLV 纳入我国的血液筛查,以及 HTLV 检测范围、献血模式、患者选择等关乎我国应如何开展 HTLV 血液筛查等问题作了评述。

关键词:人类嗜 T 淋巴细胞病毒;血液安全;献血者;血液筛查;输血传播

中图分类号:R373 R446.6 R457.1 **文献标识码**:C **文章编号**:1004-549X(2017)3-0221-03

HTLV and blood safety *LI Ling, LIU Zhong. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China. Corresponding-author: LIU Zhong*

Abstract: Human T-lymphotropic virus (HTLV) is a retrovirus, whose main mode of transmission is through blood transfusion, clinical harm seriously. The effective method to prevent HTLV transmission by blood transfusion is to conduct HTLV blood screening. At present, part of Europe and the United States and Asian countries have been testing HTLV in blood screening routinely. As early as 2000, it was reported that there was HTLV prevalence in the population in the southeast coastal areas in China. In recent years, HTLV was discovered in blood donors. In 2015, the state administrative department of public health carried out special transfer funds to pilot testing on HTLV in unpaid blood donors. To investigate whether HTLV should be included in the blood routine screening projects, this article will explore the HTLV epidemic in our country, its harmfulness, the accessibility of treatment, socioeconomic status and ethics. Additionally, in order to review and consider whether HTLV should be included in blood screening, this article will also discuss the detection range, mode of blood donation, patient selection.

Key words: donors; HTLV; prevalence rate; screening

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(human T-cell lymphotropicvirus, HTLV)是最早被发现的 1 种人类逆转录病毒,其传播途径有输血、注射或性接触等,也可经母体垂直传播,人感染 HTLV 后可引起成人 T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤(adult T-cell leukemia/lymphoma,ATL)、热带痉挛性麻痹症、下肢瘫痪等疾病,严重者可以致死亡[1]。目前尚无防治 HTLV 的疫苗和特效药物,人一旦感染将终身携带,并可能会产生严重的疾病后果。HTLV 在全球各处均有发现,分布于多个国家和地区。已报道的各国献血者中 HTLV 流行率分别为:日本 0.66%-1.02%[2]、美国 0.025%[3]、法国为 0.0056%[4]、新西兰和英国分别为 0.0045%和 0.0048%[5],瑞典为 0.003%[6],瑞士为 0.000 079%[7],荷兰为 0.003 66%[8]。日本是 HTLV-1 高流行区域,1984 年即开始在献血者中筛查 HTLV-1 并持续至今[9];美国于 1988 年将 HTLV-1 列入献血者常规筛查项目;法国于 1991 年、荷兰在 1993 年也相继对所有的献血者做 HTLV 筛查[8,10]。1998 年,瑞典 Tynell 等[11]通过成本效用分析发现,如果对该国每一位献血者都做 HTLV 检测,1 年的花费大约是 3 000 000 美元,但如果仅对首次献血者做这项检测,1 年只需要 440 000 美元。据此,瑞典决定只对首次献血者做 HTLV-1 检测。

自上世纪末季阳等[12]首次发现福建地区存在 HTLV 流行后至今,我国已陆续报道了部分地区的 HTLV 流行率,高发区集中在东南沿海地区,福建为流行率最高的省份,其献血者者中的 HTLV 总体流行率为 0.024 3%,其中宁德地区为最高为 0.171%,莆田地区次之为 0.044 6%,再次为南平和厦门,分别为 0.024 8%和 0.024 2%[12]。同在沿海地区的广东省,其献血者的 HTLV 流行率为 0.2%[13],在此之前报道的广东湛江地区献血者的 HTLV 流行率为 0.017%[14]。2014 年的 1 项调查显示沈阳地区献血者 HTLV 感染率为零[15];但同时另 1 项对华中地区的河南省及武汉地区人群做的流行病学调查却显示 HTLV 流行率达到了 0.056%[16]。相比上述发达国家,我国一些 HTLV 高发地区 HTLV 流行率已经超出 10 倍甚至更高,但因所报道的各地区 HTLV 流行率不一,且大部分调查的时间都是几年前甚至 10 多年前(如《中国输血杂志》在近 20 年前便开始报道至今,本文未引的大多数文

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.001

*基金项目:北京协和医学院青年基金(3332015121);△通信作者:刘忠(1969.01-),男,医学博士,主任技师,教授,博士研究生导师,主要从事输血医学研究,电话:028-68169108,Email:108349730@qq.com

献),而最近些年,随着中国社会、经济发展水平的快速发展而来的人口的频繁流动,势必造成当前各地区的 HTLV 在献血者中流行情况的变化,如何获得这方面相对全面准确的数据? 这便是 2016 年国家卫生行政主管部门在全国范围内开展献血者 HTLV 筛查试点工作的初衷。

国家卫生和计划生育委员会制定的《血站技术操作规程(2015 版)》首次要求各地根据当地的情况开展地方性、时限性经血传播病原体的筛查,也就是各地要根据各自的具体情况来制定血液筛查策略。那么针对 HTLV 来说,应如何考虑 HTLV 是否该列入当地的血液筛查? 一般来说,考虑 1 种新发或再发的病原体是否应该列入献血者常规血液筛查项目,须综合考虑的因素因素有:1)病原体的流行率,包括在普通人群中的流行率,在献血人群中的流行率,以及在不同区域的流行率;2)病原体的危害程度、治疗效果和预后;3)社会经济效益以及检测可及性。凭藉这几个要素所建立的评估模式——综合考虑、确定各种因素权重,通过加权计算和分析——可以得到 1 个相对科学、合理的理论依据,为国家制定 HTLV 的筛查策略提供支持。调查 HTLV 在不同人群和地区的流行率,可以作为是否需要在献血者中开展该项目常规检测,以及是在全国范围内、还是在局部高发区开展筛查提供依据。同时,根据病原体本身的特点和致病程度、是否有成熟的检测试剂以及检测成本的高低,经过成本效益分析,考虑是否应该常规开展 HTLV 筛查。2015 年,国家卫生行政主管部门划拨专项经费在全国部分省市的无偿献血者中开展 HTLV 试点检测,并要求在福建、广州、浙江 3 个东南沿海省份的献血者中全面开展 HTLV 筛查,其他各省市自治区按照 10%献血者的比例检测,以期获得全国各地献血者中的 HTLV 流行情况,为下一步国家决策是否将献血者 HTLV 检测纳入常规筛查项目提供数据支持。目前,全国每年大约有 1 200 万人献血,初步估算若全面开展 HTLV 筛查,每年大约需要 1.2 亿元经费;即使暂时维持原状(不开展对献血者的 HTLV 筛查),也要考虑 HTLV 感染而引起的 ATL 所花费的成本较献血者 HTLV 筛查所需成本孰轻孰重! 总之,我国是否应该将 HTLV 纳入献血者常规筛查以及该项目应该怎么评价,亟需列入国家更高层面决策者的议事日程。此外,关于 HTLV 的在血液病患者中的流行率、危害程度及治疗效果和预后等问题也尚待解决。制定国家血液筛查策略是 1 项科学严谨细致的工作,既有赖于科学的数据,也要考虑病原体危害性,治疗的可及性,还要考虑社会经济学等多种因素等。只有通过对大量数据的分析,制定并依靠精确的数学模型,方能在政策实施前得到 1 个可行的的评价方法。

在考虑某种病原体是否列入血液筛查时,还需要研究如何开展病原体检测,这也需要科学分析和综合评估,评估内容包括:1)检测范围,根据流行率情况可以考虑是全国性检测,还是在某些地区检测;2)检测频率,根据病原体的特点,决定在何种(哪类)人群中开展检测,如 HTLV 筛查是在献血者中常规开展,还是只对首次献血者检测,或定期献血者随机检测等;3)检测对象:根据献血类别、患者类别和产品类别等制定筛查策略。

本期“HTLV 与血液安全专题”系国内的输血科研机构与血站及 HTLV 流行地区医院合作,对 HTLV 在献血者和普通人群中的流行率所作的调查,初步评估与分析了 HTLV 在我国是否该列为献血者血液筛查项目。4 篇文章反映了不同角度或不同地区无偿献血者中 HTLV 的流行情况,包括沿海地区(浙江省)和非沿海地区(安徽合肥和贵州遵义)献血者中的 HTLV 感染情况,并对 HTLV 感染者作了追踪分析。除了总结经验外,更意在为国内同行开展相关工作提供参考,关于 HTLV 是否应该列入献血者常规检测项目以及如何开展还有很多工作要做,欢迎同行批评指正并提出宝贵意见,同时期待和国内外同行一起努力推动此项工作的开展。

参 考 文 献

[1] Dorsey KA, Moritz ED, Steele WR, et al. A comparison of human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, hepatitis B virus, and human T-lymphotropic virus marker rates for directed versus volunteer blood donations to the American Red Cross during 2005 to 2010. Transfusion, 2013.,53(6):1250-1256.

[2] Satake M, Yamaguchi K. Tadokoro K, Current prevalence of HTLV-Ⅰ in Japan as determined by screening of blood donors. J Med Virol, 2012. 84(2):327-335.

[3] Barnes DM. HTLV-Ⅰ: to test or not to test. Science, 1988,242(4877):372-373.

[4] Pillonel J,Le Marrec N, Girault A, et al. Epidemiological surveillance of blood donors and residual risk of blood-borne infections in France, 2001 to 2003. Transfus Clin Biol, 2005, 12(3):239-246.

[5] Laperche S, Worms B, Pillonel J, Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. Vox Sang, 2009, 96(2):104-110.

[6] Malm K, Ekermo B, Hillgren K,et al. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 infection in Sweden. Scand J Infect Dis, 2012,44(11): 852-859.

[7] Böni J, Bisset LR , Burckhardt JJ ,et al. Prevalence of human T-cell leukemia virus types Ⅰ and Ⅱ in Switzerland. J Med Virol, 2004,72(2): 328-337.

[8] Prinsze FJ, Zaaijer HL.The outcome of donor screening for human T-cell lymphotropic virus infection in The Netherlands. Vox Sang, 2012,102(3):198-203.

[9] Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? Transfusion, 2016,56(1):249-260.

[10] Sailly JC, Lebrun T, Coudeville L. Cost-effective approach to the screening of HIV, HBV, HCV, HTLV in blood donors in France. Rev Epidemiol Sante Publique, 1997,45(2):131-141.

[11] Tynell E, Andersson S, Lithander E, et al. Screening for human T cell leukaemia/lymphoma virus among blood donors in Sweden: cost effectiveness analysis. BMJ, 1998,316(7142):1417-1422.

[12] 季阳, 黄如欣,秦占芬,等. 中国 6 省区献血类者人类嗜 T 淋巴细胞病毒Ⅰ、Ⅱ型抗体血清流行病学调查. 中华传染病杂志, 2000,18(4):257-259.

[13] Xie J,Ge S,Zhang Y,et al. The prevalence of human T-lymphotropic virus infection among blood donors in southeast China, 2004-2013. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(4):e0003685.

[14] 孙淑君, 刘丽华,杨洋,等. 广东籍献血人群 HTLV 感染状况调

查. 临床输血与检验, 2013,15(1):15-18.
[15] 周平, 罗均,谢朝阳. 湛江地区无偿献血人群 HTLV-I 感染状况的调查研究. 广东医学院学报, 2009,27(3):309-311.
[16] 刘炜,王芳,王雪妹, 等. 沈阳地区 9050 名无偿献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染状况调查. 中国卫生检验杂志, 2014,24(4):588-590.
[17] Ma Y,Zheng S,Wang N,et al., Epidemiological analysis of HTLV-1 and HTLV-2 infection among different population in Central China. PLoS One, 2013,8(6): e66795.

(2016-10-17 收稿,修回)
本文编辑:蔡辉

CRYO2017
世界低温生物科技与生命资源库大会
The World Cryobiology and Biobanking Conference

大会时间:2017 年 7 月 20-23 日
大会地点:丰大国际酒店,合肥,中国
主办单位: 国际低温生物学会　　中国医药生物技术协会
承办单位: 中国科学技术大学　中国医药生物技术协会组织生物样本库分会　安徽医科大学
　　中国医学科学研究院输血研究所　上海芯超生物科技有限公司
协办单位: 银丰低温医学科技有限公司

本次大会是集低温生物医学、生物保存技术、低温保存设备和生命样本库“产、学、研、用”为一体的国际盛会,首次在中国召开。全世界致力于低温生物科学基础研究、生命资源保存技术、低温生物转化医学、低温动植物科技和生命资源库(基因、细胞、组织、器官库)等领域的优秀科学家、医学家、技术专家、企业家、年轻学者和科技工作者汇聚一堂,共话学术前沿,共享技术创新。本次大会与第 54 届国际低温生物学会年会共同召开,由国际低温生物学会和中国医药生物技术协会主办,中国科学技术大学、中国医药生物技术协会组织生物样本库分会、安徽医科大学、中国医学科学研究院输血研究所及多家行业领军企业承办。

大会主题　揭开生物冷冻成活或死亡的科学机理,交流生命资源保存最新技术,学习生物样品库的国际标准,聚焦生物科技与精准医学应用。

大会亮点　1)科技大讲堂(包括生物样本库国际标准培训)　国际低温生物学会(SFC)前任、现任和候任三位主席,国际生物与环境资源样本库协会(ISBER)前任、现任和候任三位主席和美国血液库联盟(AABB),美国组织库联盟(AATB)的专家和其他中外著名科学家为讲席团的系列精彩讲座和培训课程,内容涵盖:生物细胞、组织、器官低温损伤和低温保存的原理及研究方法,低温保护剂原理及相关特性,低温保存最新技术,玻璃化保存技术,低温外科医疗技术,生命资源库的建设、技术、法规、伦理及管理的国际标准等。2)八大科技创新论坛　低温生物基础研究论坛;生命资源保存最新技术论坛;企业家论坛;血液细胞和血液制品保存论坛;干细胞及免疫细胞保存论坛;生殖细胞-组织保存论坛;动植物保存技术及在现代农业中的应用论坛;基因保存及精准医学论坛。

文章发表:大会接受的口头或板报演讲摘要将收录并发表于国际著名 SCI 期刊低温生物学(Cryobiology)
会议网址: http://cryo2017.biobank.org.cn(注册缴费、摘要投稿)
会务组联系方式:
于前锋(学术/投稿/板报): 17755195307　　Email:vion@ustc.edu.cn
许靖曼(参会): 021-51320288-5203　　Email:jingman_xu@shbiochip.com
徐燕萍:021-51320288-5307　　Email:yanping_xu@shbiochip.com
张小燕:021-51320288-5415　　Email:xiaoyan_zhang@shbiochip.com
刘　海(展商)13818219973　　Email:liuhai@shbiochip.com

国际低温生物学会简介

国际低温生物学会(Society for Cryobiology)于 1964 年在美国成立,半个多世纪以来,一直致力于低温生物医学的基础研究和生命资源冷冻保存尖端技术的创新及应用,是低温生物医学领域里成立最早、最具影响力的国际学术组织。学会汇聚了大批世界上最优秀的低温生物学家,促进了低温生物学科的发展和技术创新,成为全球低温生物医学相关产业的创新阵地和技术源泉。低温生物科技与生命资源库已成为现代精准医学、动植物保存、生物科技研究与发展等众多领域中必不可少的“支架工程”。对国家而言,生命资源的储备和再利用如同能源资源一样,其战略意义重大。发展先进低温保存技术,开发高端低温保存仪器和设备刻不容缓。只有依托低温医学技术的发展,建立生命资源库(包括正常的细胞、组织和器官和各类疾病样本),方可为医学应用、生物科技,药物开发和疾病研究提供保存完好、必不可少的生物材料。

· HTLV 与血液筛查策略专题 ·　　· 论著 ·

浙江沿海地区无偿献血人群 HTLV 感染的流行病学与知晓情况调查*

王拥军[1]　金秀国[2]　关亮[3]　李建华[4]　杜勇[5]　陈李[6]　孟忠华[1]　周华平[1△]

(1.浙江省血液中心,浙江 杭州 310006;2.舟山中心血站;3.台州中心血站;4.嘉兴中心血站;5.宁波中心血站;6.温州中心血站)

摘要:目的　了解浙江沿海地区无偿献血者人类嗜 T 淋巴细胞病毒(HTLV)感染状况,提出综合性防控策略。**方法**　采用 ELISA 方法筛查 2013-2015 年浙江省沿海 6 市(区)无偿献血者 58 609(人)份血清中抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ,阳性者以 WB 法确证,并做 *HTLV* 基因测序和同源性分析;随机对 10 197 名献血者开展 HTLV 知晓情况问卷调查。**结果**　本组献血者人群的抗-HTLV 阳性率 0.01%(5/58 609),抗体类型为抗-HTLV-Ⅰ,均属世界群世界人种亚型;该 5 位 HTLV 感染者均为本地首次献血者,其中台州市发现的 HTLV 毒株与福建泉州的分离株同源,舟山市发现的 HTLV 毒株与日本的分离株 MT-2 同源。献血者对 HTLV 的知晓情况:随机问卷调查(10 分制)人均得分 0.75(0-8)分,其中<1 分者占调查对象的 79.0%(8059/ 10 197),>5 分者占 1.40%(143/ 10 197)。**结论**　浙江沿海台州和舟山地区献血人群中存在 HTLV 感染和散在的小流行;献血者对 HTLV 的知识极其匮乏,亟待采取相应防控策略。

关键词:人类嗜 T 淋巴细胞病毒;抗-HTLV;HTLV 感染率;献血者;HTLV 知晓情况;浙江沿海

中图分类号:R373　R446.6　R193.3　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2017)3-0224-03

Epidemiological study on the human T-cell leukemia virus type Ⅰ/Ⅱ infection in the east coastal areas of Zhejiang province

WANG Yongjun, JIN Xiuguo, GUANG Liang, LI Jianghua, DU Yong, CHEN Li, MENG Zhonghua, ZHOU Huaping. 1. *Zhejiang Blood Center, Hangzhou* 310006, *China*; 2. *Zhoushan Blood Center*; 3. *Taizhou Blood Station*; 4. *Jiaxing Blood Station*; 5. *Ningbo Blood Station*; 6. *Wenzhou Blood Center.Corresponding author:ZHOU Huaping*

Abstract: Objective　To study the prevalence of HTLV-Ⅰ/Ⅱ in volunteer blood donors in the east coastal areas of Zhejiang province and to provide comprehensive preventive measures. **Methods**　HTLV-Ⅰ/Ⅱ antibody was detected by ELISA in voluntary blood donors from 2013 to 2015 in the east coastal areas of Zhejiang province. The positive samples were confirmed by WB, PCR and homology analysis. A survey of knowledge about HTLV infection was performed. **Results**　The positive rate for HTLV antibody was 0.01% (5/58 609), and the prevalent antibody was anti-HTLV-Ⅰ. Homology analysis showed that HTLV-Ⅰ belonged to the subtype of Mongoloid race. The five donors were first-time local donors. The HTLV strains found in Taizhou were homologous strains of Quanzhou of Fujian province, while the HTLV strains found in Zhoushan were homologous strains of Japan. The mean score of knowledge on HTLV infection among blood donors was only 0.75 (0-8). About 79.0% (8 059/10 197) of the respondents received the scores of one or lower and only about 1.40% (143/10 197) of the respondents received the scores of five or higher. **Conclusion**　It is suggested that in the east coastal areas of Zhejiang province, HTLV-Ⅰ was the main prevalent virus. The prevalence of HTLV-Ⅰ was very low without HTLV-Ⅱ. There was a severe lack of knowledge about HTLV infection and a critical need to take comprehensive preventive measures.

Key words: human T-lymphotropic virus; anti-HTLV; infection rate; volunteer blood donor; knowledge about HTLV; east coastal areas of Zhejiang province

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(human T-lymphotropic virus, HTLV)是人类最早发现的逆转录病毒[1]。HTLV 主要由血液或体液中的 $CD4^+$T 淋巴细胞介导传播,因此输血传播 HTLV 已引起国内外学者的关注,特别是我国现行的献血者筛查策略难以明确排除 HTLV 感染者,而 HTLV 感染引起的疾病既无有效的治疗手段,也没有预防疫苗,其造成的风险已成为输血安全所面临的重大课题之一。鉴于 HTLV 多流行于我国东南沿海地区且存在明显的地区性差异,我们调查了浙江沿海地区无偿献血人群 HTLV 感染的流行病学情况,并据此提出了防控经输血传播 HTLV 的策略,现报道如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象　随机选取浙江省杭州、温州、宁波、舟山、台州和嘉兴 6 个沿海城市 2013-2015 年的无偿献血者 58 609 名,献血者严格按《献血者健康检查要求》检查合格后采集全血或血液成份。血样采集后,血清学检测由各血站筛选,阳性者送厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心确认。

1.2　试剂与仪器　抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ ELISA 诊断试剂盒(96T/ 盒,北京万泰实业有限公司);免疫印迹(WB) HTLV-Ⅰ/Ⅱblot 2.4 试剂盒(MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd Singapore);DL1000 DNA Marker(大连 TaKaRa);所有试剂均

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.002

*基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10004702);△通信作者:周华平(1967.05-),女,副主任护师,主要从事输血相关流行病学调查研究,电话:13989801797,Email:wyjygm@aliyun.com

为批号检定合格试剂并且有效期内使用。PCR 扩增仪(PE9600,美国 ABI 公司)。

1.3 抗-HTLV Ⅰ/Ⅱ的初筛与确证 采用 ELISA 方法对献血者血清初筛,阳性者再用 WB 做确证试验,检测方法严格按各试剂说明书操作。

1.4 *HTLV* 基因测序 根据文献[2-3]方法,抗-HTLV 确证试验阳性者行 PCR 检测,阳性片段做克隆测序验证:以 *Dr1GenTL ET M* 基因组 DNA 抽提试剂盒提取抗-HTLV 的前病毒核酸,严格按试剂盒操作手册操作;测序由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心和中国食品药品检定研究院完成。

1.5 HTLV-Ⅰ同源性分析 参考文献[2]方法,从 GenBank 中下载分型明确的 HTLV-Ⅰ代表株和部分国内东南沿海的 HTLV-Ⅰ毒株核酸序列,分别为世界群世界人种亚型 CH、MT-2,世界群日本人种亚型 ATK、H5,世界群西非人种亚型 HS35,美拉尼西亚群代表株 MEL 5,福建莆田分离株 htlv 446、htlv346、htlv568,福建泉州分离株 dai、wu、lin、ding,广东汕头分离株 whp。

1.6 献血者 HTLV 知晓情况问卷调查 从 58 609 名经抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ筛选的无偿献血者中,随机选取 10 197 人,完成问卷调查,问卷中包含我们设计的 10 个问题,由简到难:1)你是否知晓 HTLV? 2)你是否知晓 HTLV 的传播途经? 3)你是否知晓 HTLV 感染后可能导致的严重疾病? 4)你是否知晓不同地域 HTLV 感染状况? 5)你是否知晓我国 HTLV 感染状况? 6)你是否知晓我国沿海地区 HTLV 感染率相对较高? 7)你是否知晓 HTLV 可防可治? 8)你是否知晓 HTLV 阳性不能献血? 9)你是否知晓献血者应当筛查 HTLV? 10)你是否知晓国家正在试点检测献血者 HTLV?

1.7 统计学分析 应用 SPSS11.0 统计软件分析献血者感染 HTLV 的同源性,组间计量数据比较采用 t 检验,计数数据(率)的比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 浙江沿海 6 市无偿献血人群 HTLV 流行情况及不同地区人群 HTLV 感染率比较 共筛查 58 609 人(份)血清,经确证,抗-HTLV-Ⅰ阳性 5 例(表 1);取这 5 人的全血做 *HTLV* 基因测序:HTLV-Ⅰ型阳性,阳性率约 0.01%(5/58 609)。调查发现该 5 位 HTLV-Ⅰ感染者均为首次献血者。

2.2 HTLV-Ⅰ同源性分析 对确定的 6 株 HTLV-Ⅰ膜蛋白(env gp46)的部分序列的分析显示:与台州的例 1 和 2 HTLV-Ⅰ毒株氨基酸序列最为接近的毒株是福建泉州分离株 dai,同源性高达 99.4%;与例 3 毒株氨基酸序列最为接近的毒株是福建泉州分离株 ding,同源性高达 98.8%;与舟山市的例 4 和例 5 毒株氨基酸序列最为接近的毒株是日本的分离株 MT-2,同源性高达 99.4%。

2.3 无偿献血者 HTLV 知晓情况问卷调查 本次问卷调查,共发放问卷 12 350 份,收回 10 197 份,有效问卷 10 197 份,10 分值的问卷最低得分 0 分,最高得分 8 分,人均得分 0.748 分(表 3)。

表 1 浙江沿海不同地方献血人群 HTLV 感染状况

	n	抗-HTLV-Ⅰ阳性(%)
杭州市	10 030	0(0)
温州市	10 558	0(0)
宁波市	10 776	0(0)
舟山市	9 054	2(0.02)
台州市	9 072	3(0.03)
嘉兴市	9 119	0(0)
合计	58 609	5(0.01)

表 2 5 名抗-HTLV 阳性献血者的流行病学资料

	性别	年龄(岁)	居住地	职业	献血次数	家庭成员情况
例 1	男	53	台州市玉环县	工人	首次	丈夫抗-HTLV-Ⅰ阳性
例 2	女	29	台州市温岭市	经商	首次	家属未检测
例 3	女	42	台州市路桥区	农民	首次	家属未检测
例 4	女	41	舟山市	农民	首次	家属未检测
例 5	男	38	舟山市	农民	首次	父母均为抗-HTLV-Ⅰ阳性

表 3 10 197 名浙江沿海地区无偿献血者 HTLV 知晓情况问卷调查得分

	n	得分率(%)	累计得分
0 分	5815	57.0	0
1 分	2244	22.0	2244
2 分	1679	16.5	3358
3-5 分	316	3.1	1114
6-8 分	143	1.4	911
9-10 分	0	0	0
合计	10197	100	7627

3 讨论

自发现 HTLV 以来,全球已报道的 HTLV 感染例数>1 000万[4-5]。根据 *HTLV* 基因组及血清学反应可分为 HILV-Ⅰ和Ⅱ型,最近报道又发现 2 种新型的 HTLV,即 HTLV-Ⅲ和Ⅳ型[6-7],但是由于并未发现与之相关的特异性疾病,故 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染依然是世人关注的焦点。

HILV-Ⅰ主要流行于日本南部、加勒比海地区、非洲中部、美洲中部与南部、巴布亚新几内亚和澳大利亚,近年来欧洲和中东一些国家也有关于 HTLV-Ⅰ感染的报道;而美国、巴拿马、巴西、意大利、法国和瑞典等几个国家,HTLV-Ⅱ感染率较高[8]。在我国,HTLV 流行的地区差异明显,从以往国内报道的 HTLV 血清学阳性调查情况看,HTLV 感染者主要集中在广东、福建等地[9]。我们此次对浙江沿海 6 市 58 609名无偿献血者所作的抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ筛查,首次发现了 3 名台州籍常住居民和 2 名舟山籍常居民抗-HTLV-Ⅰ阳性,2 地无偿献血者的抗-HTLV-Ⅰ阳性率均为 0.03%(表 1),大大高于已开展 HTLV 筛查的英国献血者的抗-HTLV 阳性率(1/10 万)[10]。除台州、舟山外,在浙江沿海其地区的无偿献血者中尚未发现 HTLV 感染者,提示浙江省 HTLV 流行存在地域性差异(表 1),台州和舟山地区存在 HTLV 散在的小流行,从流行病学调查资料看,可能存在家族聚集性,首次献血者应是我们重点关注的对象(表 2)。

HTLV-Ⅰ分为多个群和亚型,除世界群世界人种亚型在全球各地均有分布外,其他群和亚型都存在明显的地域性。季阳等[11]对来自福建和广东的 HTLV-Ⅰ做的核苷酸序列测定结果证实,这些病毒株均属世界群 a 亚型(Aa 型)。我们

对本次在台州和舟山发现的 HTLV-Ⅰ毒株也作了同源性分析,确定 5 例同属世界群世界人种亚型,其中台州的 HTLV-Ⅰ毒株与福建泉州的分离株同源,舟山市的 HTLV-Ⅰ毒株则与日本的分离株 MT-2 同源。这一发现,为我国 HTLV-Ⅰ流行的地域性分布研究提供了基础数据。

为进一步了解献血者对 HTLV 的知晓情况,我们事先对本组 HTLV 筛查对象中的 10197 人作了 HTLV 知晓情况的问卷调查:人均得分仅 0.748 分,其中得分≤1 分者占 79.0%(8 059/10 197),≥5 分者占 1.4%(143/10 197)(表 3)。说明目前无偿献血人者的 HTLV 知识极其匮乏,需要引起有管方面和相关部门的关注。

结合上述调查和分析,为有效预防输血传播 HTLV,我们提出如下综合性防控策略:1)加强宣教。利用各种媒体普及 HTLV 的知识,起码要让献血者了解什么是 HTLV,HTLV 通过什么途经传播,HTLV 阳性不能参加无偿献血。2)有针对性地实施地域性筛查策略。为控制 HTLV 的输血传播,日本、美国、法国、英国、荷兰、加拿大、叙利亚、瑞典等都先后施行了不同的献血者抗-HTLV 筛查制度,取得了很好的效果;美国的资料显示,在筛查 HTLV 之前,其输血传播的危险性是 0.02%,筛查后残余风险降为 0.0016%[12]。因此,我们建议如若目前暂时不能对所有献血者做 HTLV 筛查,应首先考虑对反复多次输血的患者、输血同时做免疫抑制治疗的患者或抗-HTLV 阴性的患者拟输的血液做抗-HTLV 检测;或者像瑞典一样对首次献血者筛查 HTLV[13] 也可以如英国采取 mini-pool 的方式筛查献血者 HTLV[10]。3)应用白细胞过滤技术。HTLV 感染的靶细胞主要是 $CD4^+$ T 淋巴细胞,滤除临床用血中的白细胞,既有利于降低输血引起的免疫反应,又可减少输血传播 HTLV 的风险。4)应用病毒灭活技术的应用。筛查方法的"窗口期"问题、免疫静默感染、试剂灵敏度差异以及新发传染病病毒的出现,都使得输血的残余风险难以彻底消除,对血液制剂做病原体灭活处理是杜绝输血传染病的重要手段,现有可以利用的血液及其成分的病原体灭活技术有亚甲蓝光化学法、补骨脂素光化学法、核黄素光化学法及伽马射线辐照法,可进一步保证血液安全。5)输注>14 d 的库存血。Donegan 等[14] 的研究显示不同库存时间的血液成分 HTLV 的传播率不同:0-5 d 为 74%,6-10 d 为 44%,11-14 d 为 0,因而即便没有对献血者做 HTLV 筛查的地区,临床上输注库存期>14 d 的血液(成分)会相对安全。

参 考 文 献

[1] Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh an dcultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77(12): 7415-7419.

[2] 王颖彬, 张军, 张国忠, 等. 福建沿海地区人 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型膜基因的克隆和系统树分析.病毒学报, 2000,16(3):193-197.

[3] 谢金镇,陈长荣,张军,等. 应用 Taqman MGB 定量 PCR 技术建立 HTLV-I 前病毒的检测体系病毒学报.2009, 25(05):17-21.

[4] Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemiavirus t ype 1 (HTLV-1) infectivity and cellular t ransformat ion . Nat Rev Cancer, 2007, 7(4): 270-280.

[5] Gessain A, Cassar O . Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Front Microbiol,2012, 3(1):388-389.

[6] Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology,2005,2(1): 30-31.

[7] Calattini S, Betsem E, Bassot S, et al. New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. J Infect Dis 199; 2009,561-564.

[8] Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102:7994-7999.

[9] 季阳,黄如欣,秦占芬,等. 中国 6 省区献血者人类嗜 T 淋巴细胞病毒Ⅰ/Ⅱ型抗体血清流行病学调查.中华传染病杂志, 2000,18(4)257-259.

[10] Davison KL, Dow B,Barbara JA, et al. The introduction of anti-HTLV testing of blood donations and the risk of transfusion-transmitted HTLV, UK: 2002-2006. Transfus Med, 2009, 19(1), 24-34.

[11] 季阳, 庄文, 曹凤, 等. 中国献血者中人类嗜 T 淋巴细胞病毒感染流行病学研究. 医学研究通讯, 2005, 34(1): 28- 29.

[12] Davidson F, Lycett C, Jarvis LM, et al. Detection of HTLV-Ⅰ and -Ⅱ in Scottish blood donor samples and archive donations. Vox Sang, 2006,91(3), 231-236.

[13] Giesecke J. HTLV screening of Swedish blood donors. Lancet, 1995,345(8955), 978-980.

[14] Donegan E, Lee H, Operskalski EA, et al. Transfusion t ransmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types Ⅰ and Ⅱ compared with human immunodeficiency virus type Ⅰ. Transfusion, 1994,34(6): 478-479.

(2016-11-17 收稿,2017-03-21 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn　　bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

遵义市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况调查

刘永生 付胜 苏丽 刘建 费安芳 文良雪△(遵义市中心血站,贵州 遵义 563000)

摘要:目的 了解遵义市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况。**方法** 用 ELISA 法筛查无偿献血者血浆中抗 HTLV-Ⅰ/Ⅱ,筛查呈反应性的标本进行双孔复检,仍为反应性则用 Western blot 和实时荧光 PCR 进行确证实验。**结果** 38 739 份标本中检测出 10 份初筛反应性标本,其中确认 1 份阳性,确认阳性率为 0.0026%。**结论** 目前遵义市无偿献血者人群 HTLV 感染率处于较低水平。

关键词:无偿献血者;人类嗜 T 淋巴细胞病毒;感染率

中图分类号:R373 R446.6 R457.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0227-02

Investigation on HTLV-Ⅰ/Ⅱ infection status among the voluntary blood donors in Zunyi, China *LIU Yongsheng, FU Sheng, SU Li, LIU Jian, FEI Anfang, WEN Liangxue. Zunyi Blood Center, Zunyi* 563000, *China. Corresponding author: WEN Liangxue.*

Abstract: Objective To investigate the infection rate of human T-Lymphotropic virus (HTLV) in Zunyi voluntary blood donors. **Methods** Screening was conducted with ELISA. Those who were screened positive and reactive were reexamined. Lastly, those who remained positive and reactive were confirmed by Western blot and PCR. **Results** There were 10 cases likely positive in 38 739 blood donors by screening, and among them 1 case was indentified positive by Western blot. The positive rate of anti-HTLV Ⅰ/Ⅱ in blood donors in Zunyi was 0.002 6%. **Conclusion** The anti-HTLV Ⅰ/Ⅱ blood donors in Zunyi is still at a relatively low lever.

Key words: volunteer blood donors; human T-Lymphotropic virus; infection rate

人类嗜 T 淋巴细胞病毒(human T-Lymphotropic virus,HTLV)于 1979 年被首次分离,它是人类发现的第 1 个与癌症相关的逆转录病毒[1]。其中 HTLV-Ⅰ型在人类可引起多种疾病,如成人 T 细胞白血病/淋巴瘤(adult T-cell leukemia/lymphoma,ATL)、热带痉挛性截瘫/HTLV 相关性脊髓病(tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy)、T-多毛细胞/巨粒细胞白血病(T-hairy cell/largegranulocytic leukemia)等[2]。其主要传播途径为性传播、输血及血细胞制品、静脉注射药物公用针头、器官移植及母婴传播等[3]。为了解遵义市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况,增强输血安全性,并为全国 HTLV 感染状况提供区域性资料,本文对 2015 年 8 月-2016 年 5 月期间共 38 739 份标本进行筛查,报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 贵州省遵义市 2015 年 8 月 25 日-2016 年 5 月 31 日全部无偿献血者 38 739 名,年龄为 18-55 周岁。所有献血者均严格按照《献血者健康检查要求》检查合格,采集血液后留取 EDTA 抗凝血样 6 mL,室温下 1 000 g 离心 10 min,取血浆做检测。

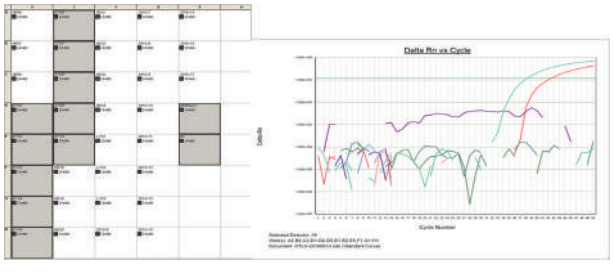
1.2 仪器与试剂 HTLV Ⅰ/Ⅱ抗体检测试剂盒(北京万泰,批号:T20150903 等),FAME 全自动酶免分析仪(瑞士 HAMILTON 公司),STAR 全自动加样仪(瑞士 HAMILTON 公司)。HTLV BLOT 2.4(MP Biomedicals Asia PacificPte. Ltd. 批号:AK6002,有效期 20170101)。

1.3 方法 采用酶联免疫双抗原夹心法进行 HTLV Ⅰ/Ⅱ抗体筛查,严格按照试剂说明书进行操作。临界值(Cut-off)=阴性对照孔均值+0.18。标本 OD 值与 Cut-off 的比值(S/CO)≥1.0 为阳性,<1 为阴性。初筛呈反应性的标本取原标本进行双孔复查,仍为反应性的标本,将其再次离心,取白膜层,取血浆分装,送往厦门市中心血站用实时荧光 PCR 和蛋白印记实验(Western blot)进行确认。

2 结果

2.1 初筛结果 38 739 份标本,采自 2015 年 8 月-2016 年 5 月遵义市无偿献血者,经 2 次酶免检测初筛,其中 10 个结果均为反应性。

2.2 确认结果 10 份初筛反应性标本经提取 DNA 后进行实时荧光 PCR,编号为 ZY05 的标本 PCR 结果阳性(图 1)。



注:左图:加样格局表,右图:扩增结果,绿色为 ZY05,红色为阳性对照

图 1 实时荧光 PCR 结果图

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.003

△通信作者:文良雪(1989.02-),女,主管检验师,主要从事血液检测工作,电话:085128634562;Email:shuiyang5656@163.com

经 Western blot 确认,其中编号为 ZY05 的标本出现 rgp46-Ⅰ、p24、p19 和 GD21 这 4 个蛋白条带(图 2),确认为 HTLV-Ⅰ型阳性。感染阳性率 0.0026%。

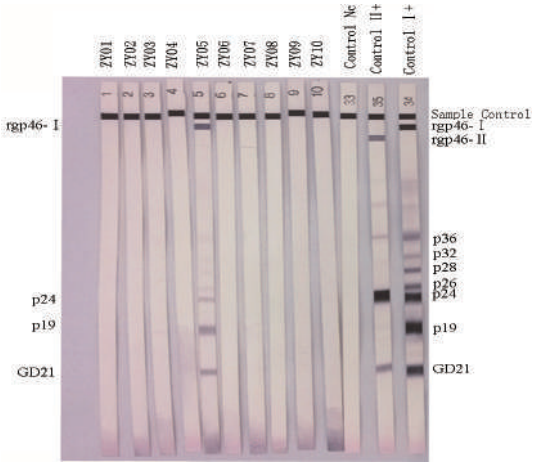


图 2　Western blot 确认试验

2.3　流行病学调查　该感染者性别女,籍贯贵州习水,1979 年出生,常规体检正常,无传染病及家族史,为无症状携带者。自述无吸毒史、无受血史、无婚外性接触史。其在本市私人医疗机构进行过 2 次人流手术。该感染者曾在福建省龙岩市工作。2015 年 12 月在本市献血 1 次。该血液经 HTLV 初筛 2 次阳性,作为病毒感染阳性血液进行隔离报废处置,避免发往临床输注于患者;并对该献血者进行献血屏蔽,避免其再次献血。

3　讨论

HTLV 的流行地区包括日本西南部、中非、加勒比地区、意大利南部及南美洲等[4],全世界有超过 1500 万感染者[5]。我国也有部分高流行区域[6],如福建东南沿海一带[7-8]。HTLV 感染为终生性的感染,该病毒可终生潜伏。当前并未研制出治愈 HTLV 感染的特效药物,且该病毒无相关预防性疫苗。因此及时发现感染者,阻断传播途径,是预防该病毒向健康人群传播的有效措施。输血是 HTLV 家庭外水平传播的最主要途径[9],欧洲强制检测献血员 HTLV 感染的国家包括葡萄牙、法国、英国、挪威等,我国相关部门于《血站技术操作规程》(2015 版)发布后开始在部分血站开展了 HTLV 感染情况摸底调查。

由于 HTLV 在体内很少表达病毒抗原,直接检测抗原受到限制,因此 HTLV 感染的诊断一般采用检测其抗体来进行,如 ELISA、Western blot、化学发光法、免疫荧光试验等。北京万泰 HTLV Ⅰ/Ⅱ抗体检测试剂盒采用 HTLV(Ⅰ+Ⅱ)型的基因重组抗原预包被微孔条,加入待测样品及酶标 HTLV(Ⅰ+Ⅱ)型抗原(HTLV-HRP)试剂,检测待检标本中的抗 HTLV,敏感性高,适用于大规模筛查。本站对 2015 年 8 月-2016 年 5 月之间所采血液标本进行全覆盖检测,经 2 次 ELISA 检测,其中 10 个结果均为反应性。

初筛反应性结果通过 Western blot 进行确认。WB 检测主要是通过转印技术将灭活 HTLV 病毒粒子产生的特异性蛋白(重组抗原)电泳带转移到特定载体上,再与待检测血浆进行反应,从而达到检测血浆中 HTLV 特异性抗体的目的。WHO 规定的 WB 阳性判定标准是 p24、p19、p53 中的一条带或几条带和 gp21、gp46、gp68 中的一条带或几条带。在本次实验当中,编号为 ZY05 的标本出现特异性的 p24 和 p19 蛋白条带,证实该标本为 HTLV-Ⅰ阳性。由于 ELISA 实验特异性不如确认试剂,故不可避免地会出现初筛反应性而确认结果阴性的现象,产生原因可能是由于一些非特异性抗原引起的交叉免疫反应。

HTLV 可经逆转录后整合至人类基因组当中,通过实时荧光 PCR 检测该病毒片段是诊断 HTLV 感染最敏感的方法,该方法不仅可以检测病原体,还可以利用型特异性引物对 HTLV 进行分型以确证 HTLV-Ⅰ或 HTLV-Ⅱ病毒的存在。本实验提取初筛反应性标本白膜层细胞的人基因组 DNA,经过实时荧光 PCR 检测,ZY05 号标本结果为阳性。

综上,该结果表明遵义市无偿献血者 HTLV 感染率为 0.0026%,尚处于较低水平。对该感染者流行病学史分析发现,其在私人医疗机构进行多次人流手术,并曾于 HTLV 小流行区工作生活,是其感染的高危因素。该感染者为无症状携带者,共献血 1 次。

从上述情况来看,HTLV 无症状感染者进行无偿献血会使经血液传播病毒的风险大大增加,严重威胁血液质量安全。鉴于 HTLV 带给感染者不可估量的严重后果,为确保输血安全,切断传播途径,积极开展 HTLV 抗体筛查,将该项目列入献血人群筛查的法定项目具有重大意义。

参　考　文　献

[1] Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1980,77(12):7415-7419.

[2] Matsuura E,Yamano Y, Jacobson,et al. Neuroimmunity of HTLV-1 infection. J Neuroimmune Pharmacol, 2010,5(3):310-325.

[3] Sonoda S, Li HC, Tajima K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. Cancer Sci, 2011, 102(2):295-301.

[4] Kibler VK, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type Ⅰ: 25 years of progress and challenges. J Biomed Sci, 2005,12(1):7-11.

[5] Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene,2005,24(39):6058-6068.

[6] 白松涛,魏天佐. 人类嗜 T 淋巴细胞病毒在中国不同人群中的流行状况. 中国输血杂志,2008,21(6):468-470.

[7] 林铁辉,许海. 莆田地区无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染调查与分析. 中国输血杂志,2014,27(7):754-756.

[8] 徐冬峰,李海华,汤纯柳. 宁德市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况调查. 中国输血杂志,2015,28(1):63-64.

[9] 李瑞兰,李忠平. HTLV 传播及流行现状. 临床输血与检验,2005,7(3):235-238.

(2016-08-23 收稿,2017-01-11 修回)

本文编辑:夏玲

· 论著 ·

合肥地区献血人群 HTLV 筛查情况及分析*

程卫芳[1] 周学勇[1] 杨斌[1] 丁利[1] 索小红[1] 高德玉[1] 张云[1] 李玲[2] 刘忠△
(1.安徽省血液中心,安徽 合肥 230031;2.中国医学科学院 输血研究所)

摘要:目的 调查合肥地区献血者 HTLV 的血清学流行情况,为该地区血液安全筛查策略的制定提供参考。**方法** 采用国产或进口双抗原夹心法 ELISA 试剂分别筛查献血者血液标本,初筛反应性标本进行双孔复试,复试反应性标本利用蛋白印迹法(WB)进一步确认。**结果** 9 964 份献血者标本共筛选出 4 份反应性,占 0.04%;经确认 3 份不确定,1 份阴性。**结论** 合肥地区献血人群中存在一定的血清学筛查阳性率,有必要扩大监测量及进行抗-HTLV 确认和追踪研究,为是否将 HTLV 纳入当地献血者血液筛查提供依据。

关键词:献血者;HTLV-Ⅰ/Ⅱ;ELISA;筛查;合肥地区

中图分类号:R373 R446.11 R193.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0229-02

HTLV screening and analysis in donors in Hefei *CHENG Weifang*[1], *ZHOU Xueyong* [1], *YANG Bin* [1], *DING Li* [1], *SUO Xiao*[1], *GAO Deyu* [1], *ZHANG Yun* [1], *LI Ling* [2], .1. *Anhui Blood Center*, *Hefei China*, 230031; 2. *Institute of Blood Transfusion*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*. *Corresponding author*: *LIU Zhong*.

Abstract: Objective Surveying HTLV epidemiological characteristics of blood donors in Hefei , providing the reference for establishing blood screening strategy formulation. **Methods** Donors samples were tested by an ELISA reagents which was made in China or exported. All samples of ELISA screening reactive were retested twice, if retested results were still reavtive, the samples was confirmedby Westen Blot (WB). **Results** There were 9 964 samples were collected and tested by ELISA reagents, of these, 4 donors samples were screening reactive (0.04%). These samples were confirmed by WB, 3 donors were determined indeterminate, 1 donors was determined false positives. **Conclusion** According to the experimental results, there were certain screening positive rate of donors in Hefei. It is necessary to expand the amount of monitoring and follow-up, providing the reference for deciding whether screening HTLV-Ⅰ/Ⅱ antibodyin blood donors.

Key words: donors; HTLV-Ⅰ/Ⅱ; ELISA; screening; Hefei

人类 T 淋巴细胞白血病病毒(HTLV)可引起严重疾病,输血是其重要传播途径之一,迄今为止,我国尚未在全国范围内将 HTLV 检测列为献血者常规筛查项目。为了解 HTLV 在合肥地区无偿献血人群的流行情况,防止经输血传播 HTLV,同时为合肥地区制定筛查策略,是否将 HTLV-Ⅰ/Ⅱ筛查列为无偿献血常规筛查项目提供一定的科学依据,本文对合肥地区献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ进行了血清学筛查和确证分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 安徽省血液中心 2016 年 4 月 6 日-5 月 15 日采集的无偿献血者血液标本共 9 964 份。

1.2 试剂与仪器 人类 T 淋巴细胞白血病病毒抗体 ELISA 检测试剂盒(北京万泰,批号/有效期:T20160101/20161231),人 T 淋巴细胞病毒Ⅰ型和Ⅱ型抗体 ELISA 检测试剂盒(英国索林,批号/有效期:D417610/20170210),人类 T 淋巴细胞白血病病毒抗体确证试剂盒(MP 公司,批号/有效期:AK4011/20160601);STAR 全自动加样仪(HAMILTON),FAME 全自动酶免分析仪(HAMILTON)。

1.3 方法 使用国产或进口各 1 家抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ ELISA 试剂(双抗原夹心法)对 9 964 份标本进行检测,其中万泰试剂检测 5 024 份,索林试剂检测 4 940 份。所有操作均严格按照试剂盒说明书要求进行。对初次检测 S/Co 值≥1 的样本均做双孔复查,复查任一孔 S/CO≥1 判为筛查反应性,送中国医学科学院输血研究所做 WB 确证试验。同时,对任意一种 ELISA 试剂检测反应性样本使用另一家试剂检测,判定标准同前。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果 9 964 份献血者标本共筛查出抗-HTLV-Ⅰ/Ⅱ反应性 4 份,均为单试剂反应性,筛查反应率为 0.01%(1/9 964);其中万泰试剂检出反应性标本 3 份,反应率 0.06%(3/5 024);索林试剂检出反应性标本 1 份,反应率 0.02%(1/4 940)(表 1)。

2.2 初筛反应性标本的确证结果 所有初筛反应性的标本进一步做 WB 确证实验,经 WB 确证后,有 3 份结果为不确定,1 份阴性(表 1)。

2.3 流行病学调查 4 份初筛反应性的献血者年龄分布在 20-45 岁之间,男性 2 人,女性 2 人,均为单试剂弱反应性(S/CO 值在 1-4 之间),经 WB 确认,3 份可疑,1 份阴性;3

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.004
*基金项目:协和青年基金(3332015121);△通信作者:刘忠(1969.01-)男,博士,博士生导师,教授,主要从事输血医学研究,电话:028-68169108,Email:108349730@qq.com

名可疑者男性 2 人,女性 1 人,均是第一次献血,籍贯分别为安徽省合肥市、六安市、宿州市,家族直系亲属中均无白血病史,亦非来自我国东南沿海地区或在当地打过工。后续还将对献血者追踪调查补充试验;同时亦应考虑是否存在与试剂相关的假反应性。

表 1　合肥地区抗-HTLV 反应性献血者相关信息

	年龄(岁)	性别	民族	职业	血型	献血次数	抗-HTLV(万泰)		抗-HTLV(索林)		确证结果
							S/CO 1	S/CO 2	S/CO 1	S/CO 2	
1#	36	男	汉	职员	B	1	3.56	3.79	0.66	0.72	不确定(GD21 有条带)
2#	24	女	汉	其他	A	1	0.03	0.04	1.15	1.23	-
3#	20	男	汉	学生	O	1	3.02	2.89	0.37	0.39	不确定(GD21 有条带)
4#	45	女	汉	其他	O	1	1.89	2.00	0.24	0.25	不确定(GD21 有条带)

3　讨论

HTLV 属逆转录病毒科肿瘤病毒亚科哺乳类 C 型病毒,最早于 1980 年被报道[1],分为 HTLV-Ⅰ型和 HTLV-Ⅱ型。HTLV-Ⅰ可引起成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、热带痉挛性截瘫/HTLV 相关性脊髓病等,HTLV-Ⅱ与 T-多毛细胞/巨粒细胞白血病等疾病相关。其主要传播途径包括输血传播、性传播和母婴传播。HTLV 在世界各地的献血者中有广泛分布,为控制 HTLV 经输血传播,很多国家和地区如日本、美国、法国、荷兰、瑞典、韩国、中国台湾等已先后将其列入血液常规筛查项目[2]。我国大陆地区是 HTLV 非流行区,目前尚未在全国范围内将献血者 HTLV 检测列入常规筛查,但已有部分地区报道献血者中存在 HTLV 无症状感染者,如沿海的福建莆田地区筛查阳性率为 0.35%,确认阳性率 0.10%;福建厦门地区筛查阳性率为 0.04%,确认阳性率 0.02%;福建宁德地区确认阳性率 0.34%;浙江台州地区确认阳性率 0.03%;而内陆的郑州地区、北京地区、沈阳地区虽然筛查阳性率分别为 0.09%、0.05%、0.06%,但均无确认阳性献血者[3-9]。本次合肥地区献血者 9 964 份标本中共筛查出反应性标本 4 份,筛查阳性率为 0.04%。其中,国产万泰试剂筛查阳性率为 0.06%,与 HTLV 非流行区使用同家试剂的北京地区的 0.05%、沈阳地区的 0.06%结果近似,低于沿海流行区如福建莆田地区的 0.35%。进口索林试剂筛查阳性率为 0.02%,低于国产试剂,这可能与不同的 ELISA 试剂存在反应率差别有关。

近期各地区均在进行献血者 HTLV 流行情况监测,是否将 HTLV 纳入全国或地方献血者常规筛查需要依据各地区流行情况,检测成本效益,危害性等方面而定。目前,在还未开展献血者 HTLV 筛查的地区,为避免 HTLV 输血传播风险,可输注储存 10 d 以上的血液或滤白血液。

参　考　文　献

[1] 宋蓓.人类 T 淋巴细胞病毒及其相关疾病的研究进展.实用医药杂志, 2009,26(8):73-75.

[2] 邓诗桢,谢敬文,严康峰,等.广州献血人群 HTLV 流行状况初步调查.辽宁医学杂志,2016,30(2):14.

[3] 林铁辉,许海.莆田地区无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染调查与分析.中国输血杂志,2014,27(7):754-756.

[4] 陈长荣 谢金镇 张永昌,等.厦门市无偿献血者 HTLV 感染情况及基因亚型分析.中国输血杂志,2012,25(12):1257-1261.

[5] 徐冬峰,李海华,汤纯柳.宁德市无偿献血人群,HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况调查.中国输血杂志,2015,28 (1):63-64.

[6] 郑朝晖,冯月清,王雪飞,等.台州地区无偿献血者人类嗜 T 淋巴细胞白血病病毒感染情况调查.中国输血杂志,2015,28(4):426-427.

[7] 吕永磊,焦修凤.郑州地区 8800 名无偿献血者 HTLV 感染情况调查.河南医学研究,2015(9):41-43.

[8] 郭金金,张微,张文学,等.北京地区献血者 HTLV 感染情况调查.临床输血与检验,2015,17(1):82.

[9] 刘炜,王芳,王雪妹,等.沈阳地区 9050 名无偿献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染状况调查.中国卫生检验杂志,2014,24(4):588-590.

(2016-09-25 收稿,12-15 修回)

本文编辑:李弘武

2017 年本刊专题报道

临床用血全面质量管理体系与智能信息化(上)

临床用血全面质量管理体系与智能信息化(下)

HTLV 与血液筛查策略(3 期)

4℃冷藏保存血小板体外实验研究

输血传播疾病

高原输血与耐缺氧机制研究

Rh 血型系统基础与临床

细胞研究及治疗

准确报告抗筛结果 提高安全有效输血水平

单采治疗临床应用

临床输血评价

海军远海岛礁血液保障

单采深度自体储血

烧伤输血

· 综述 ·

无偿献血者 HTLV 筛查研究进展

李文慧 李玲 刘忠(中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052)

摘要:人类嗜 T 细胞病毒(Human T-lymphotropic virus,HTLV)与成人 T 细胞白血病和热带痉挛性下肢轻瘫/HTLV 相关脊髓病密切相关。该病毒主要通过输血、性接触和母婴传播。无偿献血者 HTLV 筛查是预防其经输血传播有效的方法。欧美等国先后通过成本-效用分析,建立本国无偿献血者 HTLV 筛查策略。由于我国各地区 HTLV 流行率和经济情况不同,不同地域的研究人员针对无偿献血者提出了不同的 HTLV 筛查策略。然而,该策略目前尚无定论。本文对我国各地区和国外的无偿献血者 HTLV 筛查研究进展进行综述。

关键词:HTLV 流行率; 成本-效用分析; HTLV 筛查

中图分类号:R373 R446.6 R193.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-549X(2017)3-0231-04

Research progress in HTLV screening among blood donors *LI Wenhui, LI Ling, LIU Zhong. Institue of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China.*

Abstract: Human T-lymphtropic virus(HTLV-1 and HTLV-2) are closely associated with adult T-cell leukemia(ATL) and HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Blood transfusion, sexual intercourses and mother to child are main patterns of HTLVs transmission. HTLV screening among blood donors is an effective prevention of transmission of HTLVs through transfusion. A series of cost-effectiveness analysis were performed in Europe and in the United States, which contributes to implementation of HTLV screening among blood donors. Researchers from different areas of China suggest dissimilar strategy because of the discrepancy of HTLV prevalence and economy, which, however, is still unclear. We present an overview of different strategies of HTLV screening among blood donors in different regions of China and other foreign countries.

Key words: HTLV prevalence; cost-effectiveness analysis; HTLV screening

人类嗜 T 细胞病毒(human T-lymphtropic virus, HTLV)是 1 种逆转录病毒,隶属于逆转录病毒科 RNA 肿瘤病毒亚科,HTLV 可分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型[1]。HTLV-1 通过感染 CD4+淋巴细胞,引起成人 T 细胞白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) 和热带痉挛性截瘫(tropical spastic par paresis,TSP),也称为 HTLV-1 相关性脊髓病(HTLV-associated myelopathy, HAM)[2-3]。1980 年,美国 Poiesz 等[4]从其新建立的 T 细胞病毒株中首次发现并分离出人类嗜 T 淋巴细胞病毒Ⅰ型(human T-cell lymphotropic virus type 1,HTLV-1)。一旦感染 HTLV-1,因种族和性别而异,发展为 ATL 和 TSP /HAM 的可能分别为 2%-3%和 0.25%-4.00%。ATL 患者表现为血液和骨髓中异常 T 淋巴细胞快速增长,出现淋巴结病、肝脾肿大、高钙血症、溶骨性病变等。HAM/TSP 患者主要临床特征为:缓慢起病,逐步进展的两下肢步行困难,伴排尿不畅。尽管目前有多种治疗方式,但治疗效果尚不令人满意[5]。该病毒亦与自身免疫性疾病相关。HTLV-Ⅱ型也与 TSP/HAM 相关,加重神经方面病情[6]。此外,它也可能影响血小板计数,与肺炎、支气管炎、关节炎、哮喘、皮炎有一定关系[7-8]。目前尚无 HTLV-Ⅲ、Ⅳ与疾病相关的报道[1]。

1 概述

HTLV-1 主要传播途径有母婴传播(通过母乳喂养),性传播和输血传播。输血传播主要通过血液制品中携有 HTLV-1 的淋巴细胞,是 HTLV-1 家庭外水平传播的最主要途径[9]。Okochi 等[10]研究发现,受血者输入抗 HTLV 阳性献血者的全血或成分血,出现血清阳性占 63.4%。母婴传播的几率约为 20%,可因母亲体内 HTLV 病毒载量(proviral load)、母婴间 HLA-1 型的匹配性及喂养时间不同而存在个体差异[11]。在性传播途径中,携带者 HTLV 病毒载量越高,易感者感染该病毒风险就越大。HTLV-Ⅱ主要通过静脉注射的方式传播[12]。

目前预防经输血传播的有效方法是对血液进行 HTLV 筛查和对血液成分进行白细胞过滤[13]。成本效用分析作为政策制定的重要参考评估手段,欧美等国先后参考成本效用值,建立 HTLV(主要是 HTLV-1)筛查策略。虽然我国厦门于 2004 年、深圳于 2014 年分别在献血者人群全面开展 HTLV 筛查,一些地区也对献血者进行过 HTLV 感染率调查,但均未见成本效用分析报道,对 HTLV 筛查策略制定指导意义有限。2015 年,中国国家卫生计生委员会下发了《关于血站做好人类嗜 T 淋巴细胞病毒监测工作的通知》要求各省(区、市)开展 HTLV 筛查工作。本文总结了国内、外无偿献血者 HTLV 感染调查现状和 HTLV 筛查成本效用分析及策略现状。

2 国内现状

本文归纳了近二十年来中国大陆地区 HTLV-1 流行情况

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.005

的 30 个横断面调查,包括我国 14 个省、2 个直辖市、1 个自治区。共 443 096 名献血者,其中福建 165 049 名,广东 32 368 名,浙江 21 824 名。血液标本主要来源于各地方采供血机构。所有的标本都经过酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)初筛,阳性或者结果不确定的样本采用免疫印迹试验(Western Blot, WB)或者核酸检测(Nuclear Acid Test, NAT)进一步确证(表 1)。

表 1　我国大陆地区 HTLV-1 流行情况

作者	发表时间(年)	地区	筛选试验	确证试验	标本收集时间	来源人群	标本数量(n)	阳性人数(n)
关淑芬[14]	2001	山东	PA	NT	1996	献血者	749	0
唐荣才[15]	2003	江苏	ELISA	NAT	2002	献血者	95 000	5
曾劲峰[16]	2004	广东	ELISA	WB	2002	献血者	3 260	0
祝宏[17]	2004	浙江	ELISA	WB	2002	献血者	4 846	0
Wang. Y[18]	2005	海南	ELISA	WB	2004-2005	献血者	12 084	0
	2005	河南	ELISA	WB	2004-2005	献血者	14 266	0
	2005	湖北	ELISA	WB	2004-2005	献血者	8 800	0
	2005	江苏	ELISA	WB	2004-2005	献血者	9 500	0
	2005	江西	ELISA	WB	2004-2005	献血者	8 500	0
	2005	吉林	ELISA	WB	2004-2005	献血者	8 900	0
	2005	辽宁	ELISA	WB	2004-2005	献血者	18 300	0
	2005	山东	ELISA	WB	2004-2005	献血者	13 769	0
	2005	天津	ELISA	WB	2004-2005	献血者	4 635	0
	2005	新疆	ELISA	WB	2004-2005	献血者	1 820	0
	2005	浙江	ELISA	WB	2004-2005	献血者	4 846	0
张秋文[19]	2007	福建	ELISA	WB	2006	献血者	3 000	1
曹谊[20]	2008	江苏	ELISA	WB	2004	献血者	3 608	0
杜勇[21]	2008	浙江	ELISA	WB	2006-2007	献血者	5 556	0
李交[22]	2008	广东	ELISA	WB	2006-2007	献血者	26 608	9
张水波[23]	2009	湖南	ELISA	WB	2008	献血者	830	0
陈长荣[24]	2012	福建	ELISA	WB/NAT	2004-2009	献血者	131 823	24
Ma Y[25]	2013	河南,湖北	ELISA	WB	2008-2011	献血者	3 548	2
孙淑君[26]	2013	广东	ELISA	WB	2012	献血者	2 500	1
林铁辉[27]	2014	福建	ELISA	WB	2012-2013	献血者	19 874	20
刘玮[28]	2014	沈阳	ELISA	NAT/WB	2013	献血者	9 050	0
郭金金[29]	2015	北京	ELISA	WB	2013	献血者	1 696	0
徐冬峰[30]	2015	福建	ELISA	WB/NAT	2013	献血者	10 352	35
郑朝辉[31]	2015	浙江	ELISA	WB/ NAT	2013	献血者	6 576	2
吕永磊[32]	2015	河南	ELISA	WB	2014	献血者	8 800	0

注:ELISA:enzyme-linked immunosorbent assays,酶联免疫吸附试验; NAT: nucleic acid tests,核酸检测;PA:particle agglutination tests,颗粒聚集检测;NT: not test ,未检测

从表 1 可以看出,我国 HTLV-1 流行主要集中在福建、广东、浙江等东南沿海地区。近年来 HTLV 感染率调查表明厦门是 HTLV 的流行区[24],河南、湖北等也有案例报道[25],HTLV 有向非流行区蔓延的趋势。2012 年, 陈长荣等[24]通过分析厦门市 HTLV 流行情况结合流动性大的城市存在 HTLV 感染散发案例的现象,提出在我国献血者常规筛查项目应增加 HTLV 筛查项目。林铁辉等报道福建莆田对 19 874 名无偿献血者筛查确证有 20 名 HTLV 感染者,建议开展 HTLV 筛查[27]。广东省佛山、深圳等城市中也有 HTLV 感染报道,广东省通知要求 2016 年 3 月 1 日前全省开展献血者 HTLV 筛查检测[34]。唐荣才等[15]报道南京无偿献血抽样中有 5 名感染案例,后续未见阳性报道[18, 20]。江苏省 2016 年 2 月起在江苏省市血液中心、南京市血液中心、徐州市中心血站、苏州市中心血站开展不少于 2.5 万人次的抽样 HTLV 检测。刘炜等[28]调查表明沈阳地区献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染率低,建议对血制品仅作滤白处理。然而,不论是各地方根据我国卫计委的 HTLV 检测工作通知做的 HTLV 筛查部署,还是科研工作者等提出的预防 HTLV 传播的建议,都缺乏成本效用分析评估依据。

3　国外现状

各国针对 HTLV-1 流行情况等采取了不同的筛查策略并且不断完善。日本是 HTLV-1 高流行区域,最早于 1984 年开始 HTLV-1 筛查并持续至今[35]。1988 年,考虑到 HTLV-1 相关疾病的危害性以及当时美国 HTLV-1 筛查感染率为 0.025%。为了预防 HTLV-1 的传播,尽管预估仅仅首次检测就可能花费 5 000 万美元,美国仍将 HTLV-1 筛查列入常规筛查项目[36]。欧洲献血者 HTLV 的流行率很低,各国对于 HTLV 筛查可接受成本效应比不一,采取的策略也有所不同。法国于 1991 年开展了 HTLV 筛查项目,Saillyj 等[37]估算检测出 1 个阳性 HTLV 血清的费用约为 1 227 469 美元,预防一次与 HTLV 感染相关的成人 T 细胞白血病的费用是 680-6 140 万美元。1994 年 3 月-1995 年 3 月份瑞典对所有献血者筛查 HTLV,感染率为 2/100 000,3 名受血者因输血而感染。1998 年,瑞典 Tynell 等[38]通过成本效用分析得出,对每一位献血者都进行 HTLV 筛查的费用是 302 万美元,仅仅对新献血者筛查的费用是 44 万美元。丹麦在实施该策略 1 年后回顾性分析:220 000 献血者中有 7 人是阳性,感染率为

0.03%。最终,瑞典和丹麦都决定只对新献血者进行 HTLV-1 检测。荷兰在 1993 年开始对所有的献血者进行 HTLV 筛查。通过分析 2001-2010 年调查结果,发现新献血者中平均有 1.4 人/年感染 HTLV,定期献血者中平均有 0.5 人/年感染 HTLV[39]。2012 年,BorkentRaven 等[40] 通过成本效用分析指出,如果对每一位献血者都进行筛查,增加的成本效用比是 5 003 640 美元/质量调整生命年;如果只筛查新献血者则为 2 468 610 美元/质量调整生命年,相比于其他的预防措施如白细胞过滤,HTLV 筛查的成本效用值过高。挪威于 1998 年对 33 000 献血者进行筛查发现 1 例 HTLV-II 阳性,在 2000 年开始了 HTLV 筛查。同年,Stigum 等[41] 建立的模型将 HTLV 流行率作为 1 个重要的依据,当流行率为 1/10 000 时,如果检测所有的新献血者,成本效用比为 420 000 美元/质量调整生命年。如果流行率是 1/100 00,其比值为 41 000 美元/质量调整生命年。在 2000-2006 年未发现 1 例 HTLV 阳性,挪威于 2007 年终止了 HTLV 筛查项目。同样的原因,芬兰也在 2008 年终止了 HTLV 筛查,现仅对细胞类成分血采取白细胞过滤方法。Laperche 等[42] 认为,一些 HTLV 低流行国家且尚未出现过一例输血相关的 HTLV 感染案例才可采取芬兰和挪威的策略。澳大利亚、比利时、罗马尼亚和西班牙仅对细胞类血液制品(红细胞和血小板)采用白细胞过滤方法。尽管白细胞过滤方法被认为是一种很有效的降低输血传播病毒风险的方法,但除了挪威和芬兰,法国、英国等其它国家未因引入该方法而修改 HTLV 筛查政策。这样的后果是大大增加成本效用比。

综上所述,预防无偿献血者 HTLV 传播引起了国内外学者广范的关注,国外根据本国的情况采取了相应的预防策略并做了相应的成本效用分析。上述国家虽然属于发达国家,财政资源也受限,而白细胞滤过很有效且较为经济,从成本效用的角度来看,强制性 HTLV 筛查就引起了争议[12]。国内各地虽不同程度开展了 HTLV 相关的研究,但未结合当地的经济等因素针对 HTLV 筛查作成本效用分析,因此,从成本、效用、安全角度综合分析来评估我国 HTLV 筛查策略是一件刻不容缓的事情。

参 考 文 献

[1] Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. Viruses, 2011,3(7):1074-1090.

[2] Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980,77(12):7415-7419.

[3] Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, et al. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. Nature, 1981,294(5838):268-271.

[4] Murphy EL, Biswas HH. Human T-cell lymphotropic virus types I and II. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia (PA): Churchill Livingston/Elsevier; 2010.

[5] Barbeau B, Hiscott J, Bazarbachi A, et al. Conference highlights of the 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, 26-30 June 2013, Montreal, Canada. Retrovirology, 2014,11:19.

[6] Biswas HH, Engstrom JW, Kaidarova Z, et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. Neurology, 2009,73(10):781-789.

[7] Bartman MT, Kaidarova Z, Hirschkorn D, et al. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. Blood, 2008,112(10):3995-4002.

[8] Poiesz BJ, Poiesz MJ, Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. Cancer Invest, 2003,21(2):253-277.

[9] Goncalves DU, Proietti FA, Ribas J G, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. Clin Microbiol Rev, 2010,23(3):577-589.

[10] Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. Vox Sang, 1984,46(5):245-253.

[11] van Tienen C, McConkey SJ, de Silva TI, et al. Maternal proviral load and vertical transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 in Guinea-Bissau. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012,28(6):584-590.

[12] Laperche S, Pillonel J. Relevance of safety measures to avoid HTLV transmission by transfusion in 2014. Transfus Clin Biol, 2014,21(4-5):167-172.

[13] 李瑞兰, 李忠平. HTLV 传播及流行现状. 临床输血与检验, 2005(03):235-238.

[14] 关淑芬, 陈国敏, 马一盖, 等. 北京地区部分献血员嗜人 T 细胞病毒 I 型血清抗体调查. 临床输血与检验, 2001(1):20-21.

[15] 唐荣才, 刘衍春, 刘毅, 等. 南京地区街头无偿献血者中抗 HTLV-Ⅰ/Ⅱ的初步调查. 中国输血杂志, 2003(6):404-405.

[16] 曾劲峰, 李活, 张红, 等. 深圳地区献血人群人类淋巴细胞病毒感染率的血清学研究. 现代医药卫生, 2004,20(19):1975.

[17] 祝宏, 朱发明. 4846 名无偿献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ抗体检测. 浙江预防医学, 2004(3):19.

[18] Wang Y, Li X, Song A, et al. Prevalence and partial sequence analysis of human T cell lymphotropic virus type I in China. J Med Virol, 2005,76(4):613-618.

[19] 张秋文, 林海. 宁德市无偿献血者 HTLV-Ⅰ感染率调查及 1 名感染者病毒膜基因的同源性分析. 中国输血杂志, 2007(2):147-148.

[20] 曹谊. 献血者人类嗜 T 淋巴细胞病毒Ⅰ/Ⅱ感染情况调查. 检验医学与临床, 2008(1):65.

[21] 杜勇, 张哲, 张奕琴, 等. 宁波市人类嗜 T 淋巴细胞白血病病毒感染情况调查. 现代预防医学, 2008(13):2591.

[22] 李交, 刘志泉. 佛山市地区 HTLV-I 感染的血清流行病学研究. 医学检验与临床, 2008(3):77-78.

[23] 张水波. 湘潭地区无偿献血人群中 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染的血清学调查. 医学临床研究, 2009,26(7):1274-1275.

[24] 陈长荣, 谢金镇, 张永昌, 等. 厦门市无偿献血者 HTLV 感染情况及基因亚型分析. 中国输血杂志, 2012(12):1257-1261.

[25] Ma Y, Zheng S, Wang N. Epidemiological analysis of HTLV-1 and HTLV-2 infection among different population in Central China. PLoS One, 2013,8(6):e66795.

[26] 孙淑君, 刘丽华, 杨洋, 等. 广东籍献血人群 HTLV 感染状况

调查. 临床输血与检验, 2013(1):15-18.
[27] 林铁辉, 许海. 莆田地区无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染调查与分析. 中国输血杂志, 2014(7):754-756.
[28] 刘炜, 王芳, 王雪妹, 等. 沈阳地区 9050 名无偿献血者 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染状况调查. 中国卫生检验杂志, 2014(4):588-590.
[29] 郭金金, 张微, 张文学, 等. 北京地区献血者 HTLV 感染情况调查. 临床输血与检验, 2015(1):82-83.
[30] 徐冬峰, 李海华, 汤纯柳. 宁德市无偿献血人群 HTLV-Ⅰ/Ⅱ感染情况调查. 中国输血杂志, 2015(1):63-64.
[31] 郑朝晖, 冯月清, 王雪飞, 等. 台州地区无偿献血者人类嗜 T 淋巴细胞白血病病毒感染情况调查. 中国输血杂志, 2015(4):426-427.
[32] 吕永磊, 焦修凤. 郑州地区 8800 名无偿献血者 HTLV 感染情况调查. 河南医学研究, 2015(9):41-43.
[34] 广东省血站开展人类嗜 T 淋巴细胞病毒(HTLV)监测工作实施方案.粤工办函[2016]10 号.
[35] Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? Transfusion, 2016,56(1):249-260.
[36] Barnes DM. HTLV-I: to test or not to test. Science, 1988,242(4877):372-373.
[37] Sailly JC, Lebrun T, Coudeville L. Cost-effective approach to the screening of HIV, HBV, HCV, HTLV in blood donors in France. Rev Epidemiol Sante Publique, 1997,45(2):131-141.
[38] Tynell E, Andersson S, Lithander E, et al. Screening for human T cell leukaemia/lymphoma virus among blood donors in Sweden: cost effectiveness analysis. BMJ, 1998,316(7142):1417-1422.
[39] Prinsze FJ, Zaaijer HL. The outcome of donor screening for human T-cell lymphotropic virus infection in The Netherlands. Vox Sang, 2012,102(3):198-203.
[40] Borkent-Raven BA, Janssen MP, van der Poel C L, et al. Cost-effectiveness of additional blood screening tests in the Netherlands. Transfusion, 2012,52(3):478-488.
[41] Stigum H, Magnus P, Samdal HH, et al. Human T-cell lymphotropic virus testing of blood donors in Norway: a cost-effect model. Int J Epidemiol, 2000,29(6):1076-1084.
[42] Laperche S, Worms B, Pillonel J. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. Vox Sang, 2009,96(2):104-110.

(2016-05-12 收稿,11-24 修回)

本文编辑:李弘武

世界献血者日

每年 6 月 14 日,世界各国都会庆祝世界献血者日,通过这个活动来提高人们对需要获得安全血液和血液制品的认识,同时感谢献血者献出的可挽救生命的血液礼物。无论是有计划的治疗还是紧急干预,血液都是重要资源。血液有助于罹患危及生命疾病的病人延长生命并提高生活质量,同时还能支持复杂的医疗和外科手术程序。血液对于各种紧急情况(自然灾害、事故、武装冲突等)时的伤员治疗也至关重要,并且在孕产妇和围产期保健方面具有不可缺少的救命作用。采供血机构是一个有效的卫生体系的重要组成部分,它使病人获得数量充足的安全血液和血液制品。确保安全和充足的血液供应就需要发展以自愿无偿献血为基础的全国协调有序的输血服务。然而,许多国家的采供血机构在既要提供充足的血液,又要确保其质量和安全性问题上面临挑战。

今年的活动重点

每年有数百万人的生命和健康受到紧急情况的影响。在过去十年中,多个灾害在全球造成了逾百万人死亡,每年受到紧急情况影响的人超过 2.5 亿。自然灾害(如地震、洪水和风暴)造成了对紧急卫生保健的巨大需求,同时也往往对重要卫生设施造成破坏。诸如道路交通事故和武装冲突等人为灾害也带来了大量卫生保健要求和一线治疗需求。输血是紧急卫生保健的一个重要组成部分。紧急情况增加了输血需求,加大了血液运输的困难和复杂程度。在紧急情况下确保充足的血液供应就要有组织良好的血液服务,这只能通过让整个社区和献血人群全年坚定参与自愿无偿献血来得到保证。因此,今年的活动重点是在紧急情况下的献血。在遇有危机或紧急情况时,人的自然反应是"我能做什么? 我如何提供帮助?"因此,2017 年的活动口号是:"你能做什么?",辅助宣传内容为"献血。现在献血。经常献血"。这次活动强调每一个人在紧急情况下的作用,即通过献出宝贵的血液礼物来帮助别人。活动还强调,定期献血十分重要,这样在紧急情况出现之前就已有足够的血液储备。

今年的活动目标

2017 年世界献血者日的主要目标是:

鼓励所有人通过献血来加强所在社区的卫生服务应急准备;

使权威部门参与制定有效的国家献血者规划,在紧急情况下有能力对血液需求的上升迅速作出反应;

推动将输血服务纳入到国家应急准备和反应活动之中;

使更多公众认识到全年坚定参与献血的必要性,以保持充足供应并使本国的血液做到自给自足;

表彰和感谢定期献血的个人,同时鼓励年轻人成为新的献血者;

促进国际合作,确保在全世界宣传自愿无偿献血原则并就此形成共识,同时提高血液安全性和可得性。

今年世界献血者日活动的主办方

2017 年世界献血者日活动由主办国越南通过其国家血液和输血研究所(NIHBT)主办。全球主会场活动将于 2017 年 6 月 14 日在河内举行。

(摘自　上海血液中心　官网)

· 论著 · · 基础医学与实验研究 ·

人胚胎干细胞来源红系细胞膜蛋白表达的研究*

李晴[1] 邹庆[2] 毛斌[1] 黄淑[1] 赖默温[1] 潘旭[1] 孙文翠[1] 陈谊金[1] 刘嘉馨[1] 马峰[1,2△]

(1.中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052;
2.中国医学科学院 输血研究所 四川新生命干细胞科技股份有限公司联合实验室)

摘要:目的 探讨人胚胎干细胞(hESCs)来源红系细胞在发育过程中其膜蛋白,包括膜表型分子、膜骨架蛋白和跨膜蛋白的表达情况。**方法** hESCs 与小鼠主动脉-性腺-中肾(mAGM-S3) 基质细胞共培养产生造血干祖细胞(CD34$^+$ CD45$^+$)和 GPA$^+$细胞,挑取共培养 12 d 的细胞,同时磁珠分选人脐血中的 CD34$^+$细胞,在多种特定细胞因子 SCF、IL-6、IL-3、FLT3-L 、TPO、EPO 等诱导下,分别进行集落培养 12-14 d 产生红系爆发式集落形成单位(BFU-E),运用流式细胞术(FACs)、qRT-PCR 和免疫荧光染色等方法检测并比较 hESCs 和人脐血 CD34$^+$细胞 2 种来源的红系细胞膜蛋白的表达情况,并以后者作为对照组。**结果** hESCs 来源 BFU-E 的膜蛋白的表达趋势与对照组相近:其膜骨架蛋白和跨膜蛋白的基因,如 *SPTA*、*SPTB*、*ANK*1、*EPB*41 等基因转录水平都在逐渐增强,而一些膜蛋白如黏附分子 CD49d、CD29、CD71 等的表达逐渐降低,CD47 基本不表达;带 3 蛋白(Band 3)表达量较高且与成体型血红蛋白 β-globin 的表达呈正相关。**结论** 在 hESCs 向红系诱导生成过程中,一些膜表型分子表达在逐渐降低,而膜蛋白表达逐渐增强。

关键词:人胚胎干细胞;红系细胞;膜蛋白表达;红系爆发式集落形成单位;带 3 蛋白

中图分类号:R457.7 R321 R331.1$^+$41 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0235-07

A study on the expression of lineage specific membrane proteins on human embryonic stem cells-derived erythroid cells

LI Qing[1], *ZOU Qing*[2], *MAO Bin*[1], *HUANG Shu*[1], *LAI Mowen*[1], *PAN Xu*[1], *SUN Wencui*[1], *CHEN Yijin*[1], *LIU Jiaxin*[1], *MA Feng*[1]. 1.*Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (CAMS & PUMC), Chengdu* 610052, *China*; 2.*Joint Laboratory of the Institute of Blood Transfusion/CAMS&PUMC and Sichuan Neolife Stem Cell Biotech INC. Corresponding author: MA Feng*

Abstract: Objective To investigate the changes in the expression of membrane proteins during hESC-derived erythroid differentiation, including phenotypic molecules, cytoskeletal proteins and transmembrane proteins. **Methods** Human embryonic stem cells and mAGM-S3 (a murine AGM-derived stromal cell line) cells were first co-cultured to produce CD34$^+$ CD45$^+$ hematopoietic stem/progenitor cells and GPA + cells, which were harvested at day 12. At the same time, human umbilical cord blood CD34$^+$ cells (hUCB-CD34$^+$ cells) were purified from mononuclear cells by positive selection using the CD34 MicroBead Kit. Then these cells were cultured separately in semi-solid medium for 12-14 days with various cytokines including SCF, IL-6, IL-3, FLT3-L, TPO, EPO in order to generate burst-forming unit-erythroid for colony assay. The expression pattern of the membrane proteins of hESCs-derived erythroid cells were compared with those derived from hUCB-CD34$^+$ cells using flow cytometry analysis and real-time polymerase chain reaction and immunochemical staining. **Results** The total gene expression of skeletal and membrane proteins of erythroid cells including SPTA, SPTB, EPB41 and ANK1 increased on these hESC-derived erythroblasts along with the cell maturation, while the expression of most adhesion molecules including CD49d, CD29 and CD71 gradually decreased, and CD47 showed no expression during colony culture, which was similar to those from hUCB-CD34$^+$ cells. The expression of band 3 is parallel to the progressive maturation labeled by the expression rate of β-globin, a marker for definitive hematopoiesis. **Conclusion** This study shows that while the expression of major red cell membrane proteins increases, the expression of most adhesion molecules decreases in vitro in erythroid induced production system, which helps lay a foundation for further studies on disease models associated with defect of membrane proteins during erythropoiesis.

Key words:human embryonic stem cells; erythroid cells; membrane protein expression; burst-forming unit-erythroid; band 3

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.006
*基金项目:国家自然科学基金(NSFC81356880);△通信作者:马峰(1961.10-),男,医学博士,研究员,博士研究生导师,主要从事干细胞、造血干细胞、造血发生以及与血液疾病相关的基础和临床研究,电话:028-61648510, Email:mafeng@hotmail.co.jp

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的发现,标志着干细胞研究跨入了全新的应用时代。近年来,已有大量关于 hESCs 向红系细胞定向诱导分化的研究报道,

源于 hESCs 的造血祖细胞具有谱系特异性标志表型 $CD34^+CD45^+CD43^+$，能产生相对成熟的红系细胞[1-7]；但同时也均显示这种源自 hESCs 的红系细胞不能表达成熟型血红蛋白——β 血红蛋白[5-6]。直到 2008 年，hESCs 向红系细胞的诱导分化取得突破，不但有学者建立了体外高效的诱导分化体系[6]，而且进一步证明 hESCs 诱导生成的红系细胞既能表达较高比例的成体型 β-珠蛋白（β-globin），同时具有成熟后脱核的能力，还表现出正常的携带和释放氧气功能[7]。成体来源红细胞的生成是 1 个由造血干细胞（hematopoietic stem cells，HSCs）定向分化发育为红细胞的动态、阶段性过程，包括 HSCs 产生定向的红系祖细胞、红系细胞终末分化以及脱核成为网织红细胞并最终成熟为红细胞这 3 个阶段。在红系发育阶段，HSCs 定向分化为红系爆发集落形成单位（burst-forming unit-erythroid，BFU-E）和红系集落形成单位（colony-forming unit-erythriod，CFU-E），两者可通过集落形成能力区分[8-9]。有研究显示在红系终末分化阶段伴随大量膜蛋白的生成[10-12]，在网织红变成双凹圆盘红细胞的阶段也伴随着细胞表面积减小、细胞器丢失，以及细胞膜和骨架成分的重新分布等变化[13-18]。正常红细胞直径约 7 μm，能被挤压通过更小直径的毛细血管，在人体循环血流中可抵抗血管和脏器壁的切应力而不致破裂，正是缘于其本身的膜结构和骨架支撑。膜蛋白作为评价 hESCs 来源红系细胞成熟度的 1 项指标，在维持红细胞的形态及功能特性方面都有重要的作用。近年来，已有研究发现成体来源红细胞的膜骨架蛋白（α-spectrin、β-spectrin、4.1R、Ankyrin 等）在终末分化过程中的表达不断增强，而其他跨膜蛋白有表达逐渐增加或降低等不同的表达模式，证实了成体来源的红细胞的膜骨架蛋白和跨膜蛋白表达在不断增强，而一些膜蛋白如黏附分子却在减少[19]。虽然人们对于成体来源红系细胞终末分化阶段的膜蛋白成分的表达情况已有了一定认识，但对于 hESCs 来源红系细胞的膜蛋白表达情况的研究同样重要。我们采用体外半固体培养条件分别诱导 hESCs 和小鼠主动脉-性腺-中肾（mouse Aorta-Gonad-Msonephros cells，mAGM）基质细胞共培养产生造血干祖细胞（$CD34^+$ $CD45^+$）和 GPA^+ 细胞，随后将其与人脐带血（human umbilical cord blood，hUCB）来源单个核细胞中的 CD34 阳性细胞（hUCB-MNCs-$CD34^+$）进一步诱导分化为红系细胞，以 hUCB-MNCs-$CD34^+$ 细胞来源红系细胞的膜蛋白表达情况为参考，将这 2 种细胞的形态和膜蛋白的表达情况作了比较，旨在了解其膜蛋白在早期发育与后期成熟过程的异同，期望为建立红系细胞膜相关疾病模型及药物筛选提供一定的依据，报道如下。

1　材料与方法

1.1　造血细胞来源　hESCs 细胞系 H1（购自美国 Wicell 基金会）；mAGM-S3（1998 年取自日本 C3H 小鼠的 AGM 区），现在本实验室稳定传代培养。

1.2　主要仪器与试剂　超净工作台（美国 LABCONCOA2）；CO_2 培养箱（HeraCell1502）、细胞离心甩片机 cytospin-4）、台式常温高速离心机（LABOFUGE 400）（美国 Thermo）；普通倒置显微镜（CKX31）、倒置相差显微镜及成像系统（CKX41）、荧光倒置显微镜及成像系统（IX71）（日本 Olympus）；流式细胞仪（FACSCantonII，美国 BD）；生物辐照仪（RS-2000，美国 RADSOURCE）；荧光定量 PCR 仪（iQ5，美国 BIORAD）。细胞培养基 DMEM/F12（批号 12800-017）、血清替代物（KSR）（批号 10828-028）、L-谷氨酰胺（L-Glutamine）（批号 25030-164）、非必需氨基酸（NEAA）（批号 07796）、IMDM（批号 12440-061）、0.25% TrypsinEDTA（批号 25200-114）、青霉素/链霉素（penicillin-streptomycin solution）（批号 15070063）（美国 Gibco）；mTeSR1 培养基（批号 14K58472D）、人脐血 CD34 阳性细胞分选试剂盒（批号 18096）、甲基纤维素（货号 H4230、批号 15K66259）（加拿大 STEM CELL）；维生素 C（批号 A4544-100G，美国 Sigma）；胎牛血清（FBS）（批号 04-002-1A，以色列 BI）；α-MEM 液体培养基（批号 SH30265.01，美国 Hyclone）；麦格氏-姬姆萨（May-Giemsa）染液（批号 1.01424.1000，德国 MERCK）；干细胞生长因子（SCF）（批号 199-12813）、FMS 样的酪氨酸激酶 3 配体（FLT3-L）（批号 061-04051）、白细胞介素-6（IL-6）（批号 099-04631）（日本 Wako）；促血小板生成素（TPO）（批号 NHK0828-SD）、IL-3（批号 MYE0317）（日本 Kirin）；碱性成纤维生长因子（bFGF）（批号 234-FSE，美国 R&D）；血管内皮生长因子（VEGF）（批号 RC034）和促红细胞生成素（EPO）（批号 RC086）（上海生工）；流式抗体 CD45-PE、CD34-APC、7-AAD、CD71-FITC、CD47-FEITC、CD49d-PE（批号分别为 555483、555824、51-68981E、555536、556045、555503，美国 BD）；CD29-PE（批号 303004，美国 Biolegend）；免疫染色抗体一抗羊抗人 Hb（批号 A80-134A-4，美国 BETHYL）；一抗鼠抗人 Hb ε 亚基（Hbε）（批号 CR8008M，美国 COR TEX）；β 亚基（Hbβ）（批号 sc-21757，日本 Santa Cruz）；兔抗人带 3 蛋白（band 3）（批号 ab108414，英国 Abcam）；荧光二抗驴抗羊-Cy3、驴抗鼠-FITC、驴抗兔-FITC（批号分别为 107715、104895、106796，美国 Jackson Immuno Research）；封片剂 MOUNTING MEDIUM（批号 400515，美国 Thermo）；人脐带血［四川新生命干细胞科技股份有限公司提供，≥3（人）份（约 80 mL/份），脐带血采集后<24 h 分离单个核细胞（mononuclear cells，MNCs），置液氮-196℃保存，采集前产妇或其直系亲属已签署可用于科学研究的《知情同意书》，本实验开始前通过本所伦理委员会的审批］。

1.3　hESCs、mAGM-S3 细胞培养　hESCs 维持未分化培养、mAGM-S3 基质细胞的准备以及 hESCs 和 mAGM-S3 共培养产生造血干/祖细胞均参考文献［20］方法。

1.3.1　hESCs 维持培养　将 135 μL Matrigel 溶解于 12 mL DMEM/F12 中，混匀后取 1 mL 铺于 35 mm 培养皿，室温放置 1 h；0.5 mmol/L EDTA 消化 hESCs 3 min，转移到准备好的培养皿中，加入 2 mL mTeSR TM1 培养基作维持培养，传代 1 次/5 d。

1.3.2　AGM-S3 基质细胞准备　将冻存的 AGM-S3 细胞复苏到明胶包被的培养皿中，用 10 mL α-MEM、5% 胎牛血清培养，待 AGM-S3 细胞的生长密度接近 100% 时，用生物辐照射仪以 15 Gy 照射 650 s。

1.3.3　hESCs 和 mAGM-S3 共培养产生造血干/祖细胞

AGM 区是成体造血的发生的部位,该区域基质细胞具有支持成体造血的功能[7]。hESCs 和 AGM 共培养一定阶段可产生具有较强的集落形成能力的"CS"样细胞。取 hESCs(约 2×10^{4}个)克隆接种于辐照后的 2×10^5 mAGM-S3 基质细胞上共培养,前 3 d 用 hESCs 培养基维持培养,然后转换成造血分化液,此时共培养 0 d。

1.4 红系细胞的诱导分化 将人脐带血来源 CD34$^+$细胞集落培养生成红系细胞膜蛋白的表达作为实验研究的对照组,hESCs 来源造血干/祖细胞集落培养生成的红系细胞膜蛋白的表达作为实验组。

1.4.1 hESCs 来源造血干/祖细胞集落培养生成红系细胞 CD34 分子表达于人类造血干/祖细胞表面,并随细胞的成熟逐渐减弱至消失。CD45 是成体造血的重要分子,二者共表达可反映成体造血潜能,也可提示本实验体系中 hESCs 诱导生成的血细胞是否具有成体造血的特性。将 hESCs 与 mAGM-S3 共培养 12 d 时,6 孔板加入 0.25% Trypsin-EDTA 200 μL/孔,消化 5 min,加入冰 PBS(-)200 μL/孔终止消化,用 1 mL 吸头反复吹打,取出所有细胞,用 IMDM 培养基制成细胞悬液。按 5×10^{4}个/3.5 cm 皿的密度接种于半固体培养基[基础成分是甲基纤维素(H4230)]中,每个 3.5 cm 皿需 0.8 mL 的 H4230,添加细胞因子组合 100 ng/mL SCF、50 ng/mL IL-6 mL、10 ng/mL IL-3、5 ng/mL FLT3-L、10 ng/mL TPO、8 U/mL EPO,保证最终接种的总体积为 1.1 mL/3.5 cm 皿,不足的量用 IMDM 培养基补足。细胞置于 37℃、5% CO_2 孵育箱中培养,记为集落培养 0 d,分别挑取培养 12 和 14 d 的 BFU-E 集落 30 个,Mix 集落 15 个,细胞总量分别为 1.2×10^{6}和 8×10^{5}个,用 0.2%FBS-PBS(-)洗 2-3 遍,最后重悬至细胞悬液,留作后续检测。

1.4.2 人脐带血来源 CD34$^+$细胞集落培养生成红系细胞 将每份新鲜人脐带血加等体积 PBS 稀释混匀,分装至 50 mL 离心管,35 mL/管,向各管加 10 mL HES(羟乙基淀粉)混匀,静置 30-40 min,吸取上清,630 g 离心 5 min;弃上清,PBS 重悬;加等体积 20 mL Fico 分离液(Ficoll-Hypaque),将细胞悬液缓缓加至分离液上方,关掉离心刹车,630 g 离心 20 min;用一次性巴氏吸管,小心吸取 MNCs 层;用少量 PBS 重悬,台盼蓝染色并计数;PBS 洗涤后再离心重悬,将(1.5-2)×10^{7}个/支获得的 MNCs 置于-196℃液氮长期保存。CD34 磁珠分选 MNCs 得到成体造血干细胞(脐血中的 CD34$^+$细胞),按 300 个/3.5 cm 的密度接种至半固体培养基[基础成分是甲基纤维素(H4230)],每个 3.5 cm 皿需 0.8 mL 的 H4230,添加细胞因子组合 50 ng/mL SCF、50 ng/mL IL-6、10 ng/mL IL-3、10 ng/mL TPO、8 U/mL EPO,细胞置于 37℃、5% CO_2孵育箱中培养,记为集落培养 0 d。分别挑取培养 12 和 14 d 的 BFU-E 集落 100 个,细胞总量为 7.9×10^{6}个,用 0.2%FBS-PBS(-)洗 2-3 遍,最后重悬至细胞悬液,留作后续检测。

1.5 瑞姬氏(May-Grünwald-Giemsa,MGG)染色 按每张片子含 1×10^{4}个细胞的密度将 2 种不同来源的红系细胞重悬于 50-100 μL PBS(-)中,放置甩片离心机中以 450 r/min 离心 5 min,室温晾干后,用锡箔纸包好放置-80℃冰箱保存,待做 MGG 染色和免疫荧光染色;以麦格氏液固定 10 min,姬姆萨 B 液染色 3 min,自来水冲洗,姬姆萨 A 液染色 20 min,自来水冲洗,自然晾干、封片,显微镜下观察并拍照记录。

1.6 流式细胞检测 在共培养 12 d 的细胞以及 2 种干细胞来源、培养 12 和 14 d 的 BFU-E 细胞分别取 1× 10^{5}个细胞,加 PBS(-)10 mL,300 g 离心 5 min,吸弃上清,用 0.05% 胰酶消化 5 min,吹打后细胞悬液 40 μm 滤膜过滤,使其充分形成单个细胞,加入胎牛血清终止后计数;用兔血清 20 μL 冰上封闭 20 min,加入流式荧光抗体染色,抗体检测组合为 CD71-FITC /GPA-APC、CD47-FITC /GPA-APC、CD49d-PE/GPA-APC 和 CD29-PE/GPA-APC,常温孵育 30 min。用含 2% 血清的 PBS(-)1 mL 洗去非特异性抗体,300 g 离心 5 min,用 200 μL 含 2% 血清的 PBS(-)重悬细胞,BD FACScanton Ⅱ上机检测,记录结果。数据分析使用 flowjo7.2.5 作图分析。

1.7 qRT-PCR 由于 hUCB-MNCs-CD34$^+$细胞体外诱导而来液体培养的红系细胞膜骨架蛋白和跨膜蛋白的表达量不断增强,其中膜骨架蛋白主要包括有 α-血影蛋白(α-spectrin)、β-血影蛋白(β-spectrin)、4.1R、锚蛋白(Ankyrin)、束蛋白(Dematin)等,跨膜蛋白主要包括 GPA、GPC、RhD 和 RhAG 等[19],故在基因转录水平检测 hESCs 和脐血对照组 2 种来源的红系细胞膜蛋白的表达情况。qRT-PCR 反应(表 1)是在热循环仪(BioRad,IQ5)上运行:首先将所有实验数据做归一化处理,将检测样品和参照品每个基因 qRT-PCR 的循环阈值 CT 值减去样品自身的内参基因 *GAPDH* 的 CT 值,记为 ΔG,对于某一基因,用检测样品的 ΔGs 减去参照品的 ΔGc,记为 ΔΔCt,然后按照公式 2-ΔΔCt 运算,计算各个基因相对于参照品的表达水平。所有的反应平行做 3 份。

表 1 qRT-PCR 反应体系

主要成分	PCR 反应体系(μL)
F(10 pmol/μL)	0.4
R(10 pmol/μL)	0.4
ddH_2O	4.7
Mix(10)	7.5
DNA	2
总体积	15

注:内参为 GAPDH

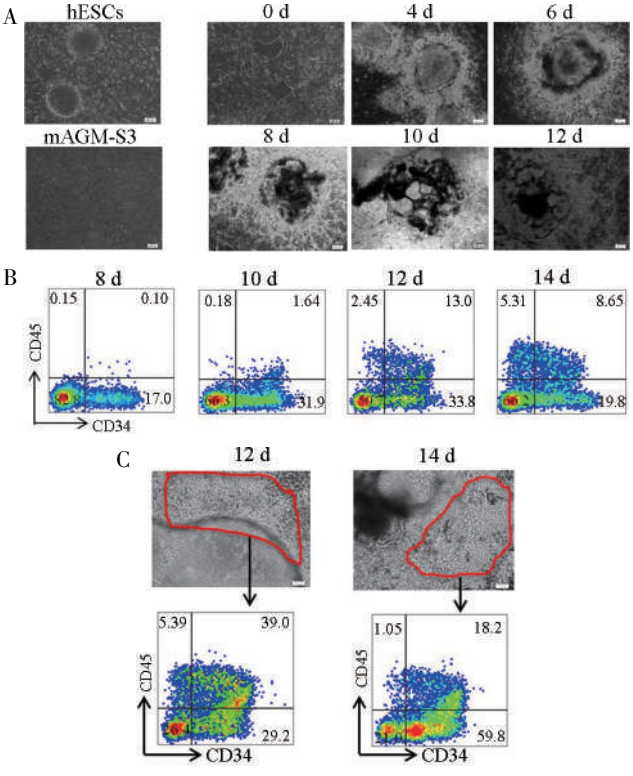
1.8 间接免疫荧光染色 将上述准备好的片子取出吹干,标记待用。染色前使用水性记号笔将玻片的染色区域圈出,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS(-)洗 3 次,采用含 5%脱脂牛奶的 0.1% Triton-100/PBS(-)破膜处理 30 min,5% 脱脂牛奶/PBS(-)冲洗 3 次,加入荧光一抗(1∶100 稀释),每张玻片均染 Hb 和 1 个血红蛋白亚基,一抗组合分别为羊抗人 Hb/鼠抗人 Hbε、羊抗人 Hb/鼠抗人 Hbβ、羊抗人 Hb/兔抗人 Band 3;4℃孵育过夜,5% 脱脂牛奶/PBS(-)洗去一抗后 加荧光二抗驴抗羊-Cy3、驴抗鼠-FITC 驴抗兔-FITC(1∶100 稀释),常温孵育 30 min,用 5%脱脂牛奶/PBS(-)洗去二抗,以 0.1% Tween-20/PBS(-)做后固定,1 μg/mL DAPI 染核 3 min,PBS(-)染缸浸洗 3 遍后用封片剂封片,荧光显微镜下观察、计数并拍照。

1.9 统计学分析 每次实验平行重复 3 次,用 GraphPad-Prism 5 软件作统计学分析,数据以"均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)"

表示,两样本均数比较采用配对 t 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

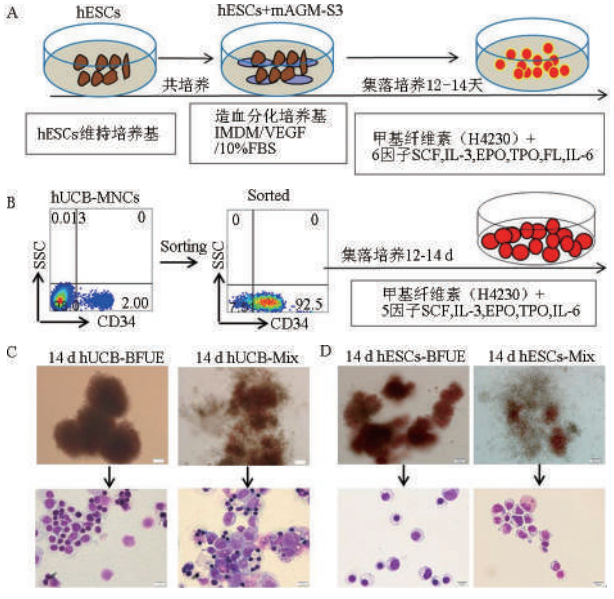
2.1　hESCs 与 mAGM-S3 基质细胞共培养　1)镜下观察:将未分化状态的 hESCs 克隆、接种到 mAGM-S3 基质细胞上共培养 0-3 d,hESCs 克隆逐渐贴紧基质细胞,整个克隆外缘像 1 圈"拧紧的绳",此为产生造血集落的开始;在 3-4 d,hESCs 克隆周围开始像"番茄蒂儿"样向四周分化铺出;到 4-6 d,内皮样细胞逐渐外伸;6-7 d 犹如心肌细胞样的收缩和舒张交替的细胞生长形态;7 d 呈明显血管样结构,且在其沟壑处的内缘和外缘开始出现"鹅卵石"(cobblestone-like cells,CS)样细胞,并随着时间的延长,该类细胞逐渐增多(图 1-A)。2)流式检测:分别取共培养 8 、10、12 和 14 d 的细胞,检测 CD34 与 CD45 的表达比例(图 1-B);再分别取共培养 12、14 d"CS"样的细胞(图 1-C 中的红色标记区域)作流式检测并留作后期集落培养:12 d 时表达 CD34 的比例接近 68%、$CD34^+CD45^+$细胞群接近 40%, 14 d 表达 CD34 的比例高达 78%(图 1-C)。



A hESCs 与 mAGM-S3 各自形态及两者共培养造血分化中 4、6、8、10 、12 d 细胞形态变化;B 共培养 8、10、12、14d 细胞流式检测结果;C 镜下 12d 的"CS"样细胞及其 $CD34^+CD45^+$比例达 39%

图 1　hESCs 与 mAGM-S3 共培养诱导分化过程中造血干细胞的产生

2.2　半固体培养诱导产生红系集落　1)共培养至 12 d,将含"CS"样细胞较多的克隆,经 0.25%Trypsin/EDTA 消化,按 5×10^4个/3.5 cm 皿接种至半固体状态的甲基纤维素培养基上,并在一定浓度的相关造血因子的作用下,培养 12-14 d 诱导生成红系集落(图 2-A);2)分选人脐血 MNCs 获得纯度达 92.5%的 $CD34^+$细胞,按照 300 个/3.5 cm 皿度接种到半固体的培养基上,在相关刺激因子作用下培养(图 2-B);3)在分别培养 12、14 d 后,各取 2 种来源的红系集落镜下观察,均可见较多红色的红系集落(BFU-E);将集落用枪头挑取集落,0.2%FBS-PBS(-)洗 2-3 遍后, MGG 染色:2 种来源的红系集落细胞均是 1 个异质性细胞群,其中 hESCs 来源培养 12 d 时的 BFU-E 集落以中幼红细胞为主,14 d 时以晚幼红细胞为主,细胞胞浆增多,因 Hb 合成增加,其颜色呈灰蓝或灰红色,核固缩成"碳核"且偏位(图 2-C,D),提示本体系中红系发育其处在 1 个不断成熟的过程。



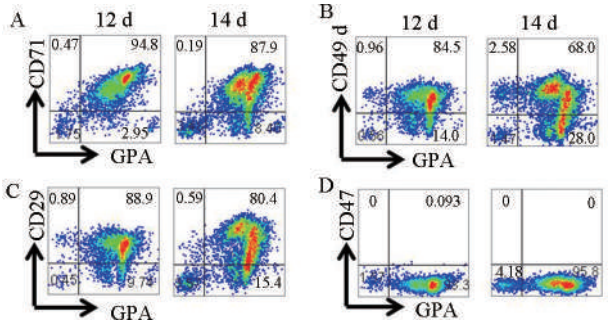
A hESCs 诱导产生红系集落流程;B 人脐血 $CD34^+$诱导产生红系集落流程;C 人脐血 $CD34^+$来源集落培养 14 d 产生 BFU-E、Mix 及其 MayGrünwald Giemsa 染色结果 ;D hESCs 来源集落培养 14 d 产生 BFU-E、Mix 及其 MG G 染色结果(标尺分别为 100 和 10 μm)

图 2　半固体培养诱导生成红系集落

2.3　hUCB-$CD34^+$来源 BFU-E 细胞膜表型分子的检测　GPA 作为红系细胞的特异性标志物,其出现标志着红系发育开始进入原始红细胞阶段[21-22],因此以 GPA 为限定分子,通过流式细胞术解析 hUCB-$CD34^+$来源集落培养生成的 BFU-E 细胞的 CD71、CD49d、CD29、CD47 等相关膜表型分子共表达的变化,并采用 Flowjo10.0 专用软件分析:根据膜表型分子不同的表达趋势分为 2 类——表达逐渐下降类,包括 CD71、CD49d、CD29,即 GPA^+CD71^+、GPA^+CD49d^+、GPA^+CD29^+等细胞群在红系细胞发育过程中逐渐转为 GPA^+CD71^-、GPA^+CD49d^-、GPA^+CD29^-、GPA^+CD36^-,其中下降最明显的是 CD49d,其次是 CD29、CD36、CD71(图-3A, B, C);基本不表达类,$GPA^+CD47^-CD34^-$(图 3-D)。

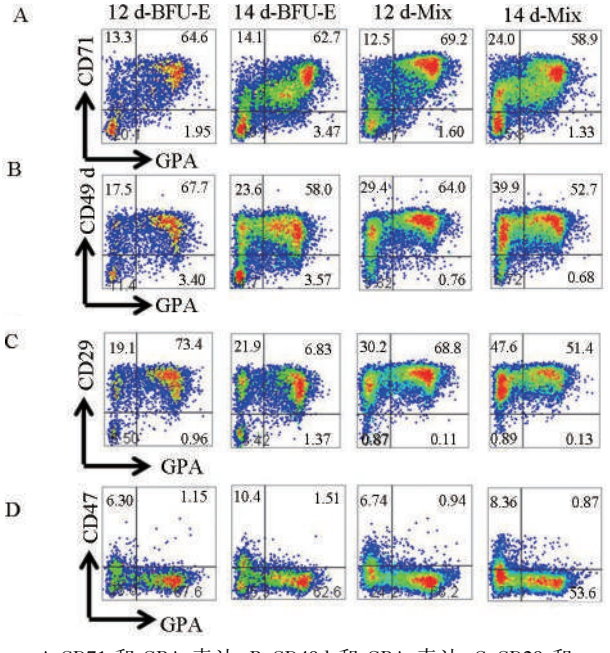
2.4　hESCs 来源 BFU-E 细胞膜表型分子的检测　hESCs 来源 BFU-E 细胞膜表达呈现趋势与对照组(hUCB-$CD34^+$来源)较为相似,也可将其分为 2 大类:一类是表达逐渐下降,如 CD71、CD49d 和 CD29(图 4-A, B, C),并且 GPA^+CD49d^+与 GPA^+CD29^+细胞群的表达趋势与 GPA^+CD71^+十分相似;一类是基本不表达的 CD47(图 4-D)。此外,Mix 集落中红系细胞的膜蛋白表达趋势也与 BFU-E 集落相似,但其上升或下

降的趋势不如 BFU-E 集落明显。



A CD71 和 GPA 表达;B CD49d 和 GPA 表达;C CD29 和 GPA 表达;D CD47 和 GPA 表达

图 3 人脐血 CD34⁺来源 BFU-E 细胞 12、14 d 的膜表型分子表达情况

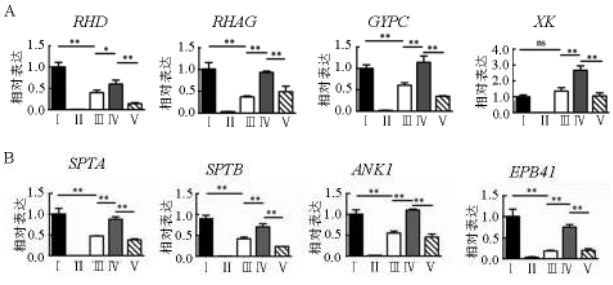


A CD71 和 GPA 表达;B CD49d 和 GPA 表达;C CD29 和 GPA 表达;D CD47 和 GPA 表达

图 4 hESCs 来源 BFU-E 和 Mix 集落细胞 12、14 d 的膜表型分子的表达情况

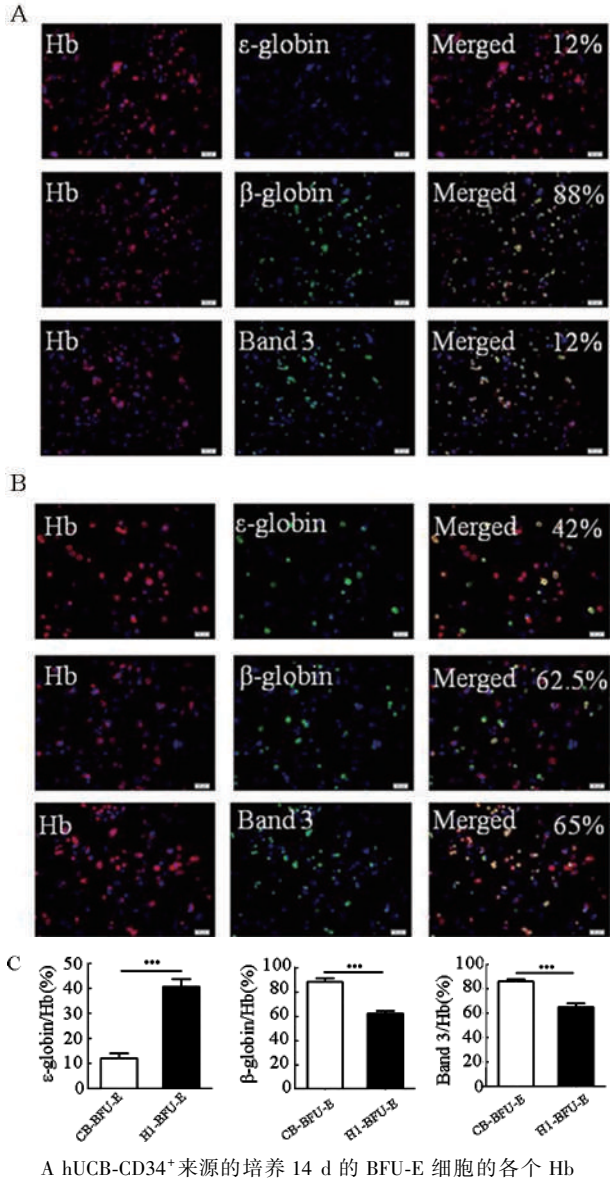
2.5 不同来源红系细胞膜蛋白基因的表达 qRT-PCR 检测:相较于对照组而言,本体系 hESCs/mAGM-S3 来源红系细胞在共培养阶段处于幼稚时期,几乎不表达相关的膜蛋白基因,而通过后期的集落培养,在一定细胞因子的诱导下,最终生成的红系集落细胞,表达相关的跨膜蛋白基因 *RHD*、*RHAG*、*GYPC* 和 *XK* 等(图 5-A),以及膜骨架蛋白基如 *SPTA*、*SPTB*、*ANK*1 和 *EPB*41 等(图 5-B),并且它们的表达都在逐渐增强。

2.6 不同来源 BFU-E 细胞的 Hb 及 Band 3 表达 免疫荧光染色显示 2 种来源的 BFU-E 细胞均表达较高比例的 Hb;对照组红细胞作为成体型红细胞的代表,表达较高比例的 β-globin 和 Band 3(图 6-A);实验组 BFU-E 集落 Band 3 表达比例>65%、β-globin 为 85%左右,并且 Band 3 表达上升趋势与成体型血红蛋白 β-globin 相似(图 6-B)。2 种来源的 BFU-E 细胞的 Hb 及其亚型、Band 3 的表达有明显差异,(P<0.01)(图 6C)。



A 跨膜蛋白基因的表达;B 膜骨架蛋白基因的表达;Ⅰ 人脐血 CD34⁺来源培养 14 d 的 BFU-E 细胞;Ⅱ 分选的共培养阶段 12 d 的 GPA⁺细胞;Ⅲ hESCs 来源培养 12 d 的 BFU-E 细胞;Ⅳ hESCs 来源培养 14 d 的 BFU-E 细胞;Ⅴ hESCs 来源培养 14 d 的 Mix 细胞;* P<0.05;** P<0.01

图 5 2 种来源红系集落细胞各膜蛋白基因的表达情况(n=3,$\bar{x}\pm s$)



A hUCB-CD34⁺来源的培养 14 d 的 BFU-E 细胞的各个 Hb 亚基及 Band 3 表达比例;B hESCs 来源的培养 14 d 的 BFU-E 细胞的各个 Hb 亚基及 Band 3 表达比例;C Hb 分别与 ε-globin、β-globin、Band 3 共表达百分比;* P<0.01

图 6 2 种来源的 BFU-E 细胞的各个 Hb 亚基及 Band 3 的表达比例 (n=3,$\bar{x}\pm s$)

3　讨论

近年来,为尽早将 hESCs 来源的红细胞应用于临床,中外众多研究团队致力于体外诱导产生红细胞的产量、成熟度及功能特性的研究。对体外诱导生成的红细胞成熟度的评价主要包括脱核效率的提高、β-globin 的表达等[7];而红细胞的膜蛋白作为其重要的功能蛋白,对维持红细胞的双凹盘状,变形性和功能特性有着重要的作用,有望成为红系发育成熟过程中的另一重要监测指标[19]。

早在 2008 年我们中就有人证明了 hESCs 在体外诱导生成红系是 1 个逐渐成熟的过程:经过与具有成体造血"教育环境"的基质细胞共培养诱导生成造血干祖细胞,再通过后期集落培养,液体培养,最终生成能表达高比例 β-globin [(99.8±0.6)%]的红细胞并具有 G6PD 高活性[7]。随后有研究对不同来源的红系细胞发育过程中的膜蛋白作了解析,如 An 等[23]的小鼠实验结果显示,从红系发育早期至后期过程中,几乎所有的红细胞膜骨架蛋白的表达都呈上升趋势(Actin 除外),而跨膜蛋白/整合蛋白分表达量呈上升、下降、基本不表达 3 种不同模式。为了研究 HSCs 来源的红系细胞发育,Southcott 等[24]用流式细胞术解析得到了红系细胞特异性表面抗原的表达顺序。Liu 等[19]则将 hUCB-MNCs-CD34$^+$ 细胞来源的红系细胞的膜蛋白表达情况归类,最终将 Band 3、α4-integrin(CD49d) 作为筛选该来源不同发育阶段红系细胞的标志物。我们近前对于 hESCs 来源的红系细胞的 CD36 表达模式的研究也发现:hESCs 与 mAGM-S3 基质细胞在共培养阶段生成的红系细胞表型为 GPA$^+$CD36$^-$,而在悬浮培养阶段 GPA$^+$CD36$^+$的红系细胞数量明显增多,随着其进一步成熟,红系细胞表型为 GPA$^+$CD36$^-$[25]。

本组数据显示,hESCs(实验组)和 hUCB-MNCs-CD34$^+$细胞(对照组)2 种不同来源造血干祖细胞诱导生成的 BFU-E 集落红系细胞的膜表型分子,不仅流式解析呈相同趋势(图 3-4),而且 qRT-PCR 证实 hESCs/mAGM-S3 来源红系细胞在共培养阶段虽然几乎还未表达相关的膜蛋白基因,但通过后期集落培养生成的红系细胞,其膜骨架蛋白和跨膜蛋白基因的表达都在逐渐增强(图 5),提示本实验体系红系发育处于 1 个膜蛋白活跃合成的发育过程。同时,我们解析了 hESCs 诱导生成的 Mix 集落红系细胞相关膜蛋白基因的表达趋势,发现其普遍低于 BFU-E 集落(图 5)。这些数据说明本实验体系可以逐步将 hESCs 来源的红细胞"教育"成熟。

Band 3 作为 1 个重要的评价体外生成的成体来源(骨髓、外周血、脐带血)的红细胞的成熟度的蛋白分子[26],对于本实验体系同样适用。免疫荧光染色结果显示,hESCs 来源培养 14 d 的 BFU-E 细胞也表达较高比例的 β-globin 和 Band 3,而且 Band 3 与 β-globin 的表达水平明显平行呈正相关(图 6),说明 Band 3 可作为追踪 hESCs 来源红细胞成熟度的良好标志蛋白,它的表达及其与其他膜蛋白的共表达可用来定义 hESCs 来源红细胞成熟中的关键步骤。

综上,本实验体系中 hESCs 向红细胞的诱导生成是 1 个逐步成熟的过程,即遵循一定的规律:共培养阶段产生的 GPA$^+$细胞还处于幼稚时期,但经过 AGM-S3 基质细胞的"教育",该阶段诱导产生的造血干祖细胞(CD34$^+$CD45$^+$细胞),通过后期添加特定的红系相关诱导因子做集落培养,在适宜的环境下定向分化为红系细胞,并不断发育成熟。在此成熟过程中,hESCs 和 hUCB-MNCs-CD34$^+$细胞来源的红系细胞变化相似;某些谱系特异性膜蛋白表达上调,其中最典型的就是 Band 3 蛋白的表达(图 6),此外,大多数红细胞膜蛋白基因表达增强,而一些膜表型分子,如黏附分子的表达逐渐减少(图 4)。因此,hESCs 来源红系细胞膜蛋白在早期发育阶段期的表达模式较好地模拟了人类红系生成过程,通过追踪 hESCs 来源红细胞膜蛋白的表达或可为研究早期人类红细胞生成提供理想的实验模型,尤其适用于研究与红细胞生成中的膜缺陷相关的遗传性疾病的发病机理。例如,遗传球形红细胞增多症是目前主要的红细胞膜蛋白缺陷疾病,病因是由于相关膜蛋白基因 *SPTA*、*SPTB*、*ANK*1、*SLC*4*A*1 突变导致 α-spectrin、β-spectrin、Ankyrin、Band 3 和 Band4.2 蛋白缺陷或异常[27]。同时,通过共培养和集落测细胞谱系特异性膜蛋白的表达模式为 hESCs 来源红细胞的成熟的研究提供了明确线索。

虽然我们的实验体系暂时无法精确到蛋白定量水平,但进一步的研究是希望在各发育不同阶段通过单细胞转录和蛋白组学检测手段,对各成熟阶段红系细胞膜蛋白做深度解析,发现并筛选人类红细胞早期生成过程中的阶段性膜蛋白特异性异常基因,最终通过基因编辑技术矫正患者 iPS 细胞的缺陷膜蛋白基因并诱导生成患者所需的红细胞,以达到个体化治疗的目的。同时,这也将为分子药物筛选以及基因靶向治疗提供可靠的实验证据。

参 考 文 献

[1] Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, et al. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. Mol Cell Biol, 1993, 13 (1): 473-486.

[2] von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, et al. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood, 1999, 94 (2): 550-559.

[3] Wessely O, Bauer A, Quang CT, et al. A novel way to induce erythroid progenitor self renewal: Cooperation of c-Kit with the erythropoietin receptor. Biological Chemistry, 1999, 380 (2): 187-202.

[4] Carotta S, Pilat S, Mairhofer A, et al. Directed differentiation and mass cultivation of pure erythroid progenitors from mouse embryonic stem cells. Blood, 2004, 104 (6): 1873-1880.

[5] Chang KH, Nelson AM, Cao H, et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. Blood, 2006, 108 (5): 1515-1523.

[6] Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. Blood, 2008, 112 (12): 4475-4484.

[7] Ma F, Ebihara Y, Umeda K, et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (35): 13087-

13092.
[8] StephensonJR, Axelrad AA, McLeod DL, et al. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, 68 (7): 1542-1546.
[9] Dover GJ, Chan T, Sieber F. Fetal hemoglobin production in cultures of primitive and mature human erythroid progenitors: differentiation affects the quantity of fetal hemoglobin produced per fetal-hemoglobin-containing cell. Blood, 1983, 61(6): 1242-1246.
[10] Blikstad I, Nelson WJ, Moon RT, et al. Synthesis and assembly of spectrin during avian erythropoiesis: stoichiometric assembly but unequal synthesis of alpha and beta spectrin. Cell, 1983, 32(4): 1081-1091.
[11] Chen KL, Liu J, Heck S, et al. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (41): 17413-17418.
[12] Liu J, Mohandas N, An X. Membrane assembly during erythropoiesis. Curr Opin Hematol, 2011, 18 (3): 133-138.
[13] Waugh RE, McKenney JB, Bauserman RG, et al. Surface area and volume changes during maturation of reticulocytes in the circulation of the baboon. J Lab Clin Med, 1997, 129 (5): 527-535.
[14] Zhang J, Randall MS, Loyd MR, et al. Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and independent mechanisms during reticulocyte maturation. Blood, 2009, 114 (1): 157-164.
[15] Kundu MI, Lindsten T, Yang CY, et al. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. Blood, 2008, 112 (4): 1493-1502.
[16] Liu J, Guo X, Mohandas N, et al. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. Blood, 2010, 115 (10): 2021-2027.
[17] Keerthivasan G, Small S, Liu H, et al. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. Blood, 2010, 116 (17): 3331-3340.
[18] Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. Nature, 2008, 454 (7201): 232-235.
[19] Liu J, Zhang J,Ginzburg Y, et al. Quantitative analysis of murine terminal erythroid differentiation in vivo: novel method to study normal and disordered erythropoiesis. Blood, 2013, 121 (8):e43-e49.
[20] 郁金凤,孙文翠,路旭琳,等. 人胚胎干细胞高效诱导产生巨噬细胞方法的建立. 中国输血杂志, 2015,28(5):482-487.
[21] Zhang J,Randall MS,Loyd MR, et al. Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and-independent Mechaisms during reticulocyte maturation.Blood, 2009, 114 (1):157-164.
[22] Liu J, Mohandas N,An X Membrane assembly during erythropoiesis. Cur Opin Hematol, 2011, 18 (3):133-138.
[23] Chen K, Liu J, Heck S,et al.Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression.Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(41): 17413-17418.
[24] Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. Blood, 1999, 93 (12): 4425-4435.
[25] Mao B, Shu H, Lu XL, et al.Early development of definitive erythroblasts from human pluripotent stem cells defined by expression of glycophorin A (CD235a), CD34 and CD36. Stem Cell Reports, 2016, 7 (5): 869-883.
[26] Low PS, Allen DP,Zioncheck TF,et al. Tyrosin phosphorylation of Band 3 inhibits peripheral protein binding. J. Biol. Chem, 1987, 262 (10): 4592-4596.
[27] Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. Semin Hematol, 2004, 41 (2): 118-141.

(2017-01-31 收稿,03-21 修回)
本文编辑:蔡辉

关于发布《临床实验室质量指标》等 5 项推荐性卫生行业标准的通告

现发布《临床实验室质量指标》等 5 项推荐性卫生行业标准,其编号和名称如下:

WS/T 496-2017 临床实验室质量指标
WS/T 497-2017 侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南
WS/T 498-2017 细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南
WS/T 499-2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南
WS/T 514-2017 临床检验方法检出能力的确立和验证

上述标准自 2017 年 7 月 1 日起施行。

特此通告。

国家卫生计生委
2017 年 1 月 25 日

· 论著 ·

西达本胺联合地西他滨对霍奇金淋巴瘤细胞株增殖及凋亡的影响

胡莲洁　姜涛　王甫珏　成晓敏　贾永前△(四川大学 华西医院 血液内科,四川成都 610041)

摘要:目的　探讨西达本胺联合地西他滨对霍奇金淋巴瘤(HL)细胞株 Hs445 和 L428 细胞增殖及凋亡的影响。**方法**　采用 MTT 法检测西达本胺单用或联合使用地西他滨对 Hs445 和 L428 细胞的增殖与抑制作用,流式细胞术检测细胞凋亡情况及线粒体膜电位变化,Western blot 检测细胞内 cleaved PARP 蛋白的表达。**结果**　西达本胺作用 24、48、72 h 可抑制 Hs445 和 L428 细胞增殖,且呈现浓度和时间依赖性,对 2 种细胞的 IC50(μmol/L)分别为 1.91 和 3.46。西达本胺(μmol/L)(对 Hs445 为 0.25、0.5,对 L428 为 1、2)与地西他滨(μmol/L)(0.5、2)分别联合作用 72 h,对 2 种细胞的增殖抑制率(%)分别为 35.76±0.97、54.20±1.32、54.12±1.24、73.13±0.45,41.05±0.67、56.40±0.39、67.80±0.89、82.35±1.45,对应浓度的西达苯胺单药组的增殖抑制率(%)为 12.02±1.41、31.00±0.90,18.03±0.91、36.00±0.21(P<0.05),且均为两药相互作用的协同指数(CI)<1。0.5 μmol/L 西达本胺单用或其与 2 μmol/L 地西他滨联合作用 48 h 后 Hs445 细胞凋亡率(%)分别为 13.22±3.12 *vs* 67.26±7.87(P<0.01);2 μmol/L 西达本胺单用或其与 2 μmol/L 地西他滨联合作用 48 h 后 L428 细胞凋亡率(%)分别为 34.03±4.67 *vs* 70.58±5.76(P<0.01);联合用药组 cleavedPRAP 蛋白表达和线粒体膜电位的下降也明显高于单药组。**结论**　西达本胺可抑制 HL 细胞株增殖并诱导其凋亡,与地西他滨联用对 HL 细胞株的增殖抑制及诱导凋亡具有明显著的协同效应。

关键词:霍奇金淋巴瘤;西达本胺;地西他滨;细胞增殖;细胞抑制;表观遗传学调控

中图分类号:R453　R733.4　R979.1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2017)3-0242-05

The effects of Chidamide combined with Decitabine on proliferation and apoptosis of Hodgkin´s lymphoma cell lines

HU Lianjie, JIANG Tao, WANG Fujue, CHENG Xiaomin, JIA Yongqian. Department of Hematology, Western China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, *China. Corresponding author: JIA Yongqian*

Abstract: Objective　To investigate the effects of Chidamide combined with Decitabine on the proliferation and apoptosis of Hodgkin´s lymphoma (HL) cell lines Hs445 and L428. **Methods**　MTT method was used to determine the anti-proliferating effect of Chidamide alone or combined with Decitabine on Hs445 and L428 cell. The cell apoptosis and mitochondrial membrane potential were analyzed by flow cytometry. The expression of cleaved PARP protein was assayed by Western blot. **Results**　Chidamide displayed a proliferation inhibition effect on Hs445 and L428 cells in a dose- and time- dependent manner after 24, 48, 72 h. The IC50 (μmol/L) of Chidamide on Hs445 and L428 cells were 1.91 and 3.4, respectively. The Chidamide (μmol/L) (0.25,0.5 for Hs445 and 1,2 for L428) combined with Decitabine (μmol/L) (0.5, 2) were used for 72 hours treatment separately. The proliferation inhibition rate (%) of the two cells were 35.76±0.97, 54.20±1.32, 54.12±1.24, 73.13±0.45; 41.05±0.67, 56.40±0.39, 67.80±0.89, 82.35±1.45, respectively. The proliferation inhibition rate (%) of the Chidamide group in the same concentration gradient were 12.02±1.41, 31.00±0.90; 18.03±0.91, 36.00±0.21(P<0.05). The CI of the two drugs were all less than 1. The 48h apoptotic rate (%) of Chidamide (0.5 μmol/L) alone or combined with Decitabine (2 μmol/L) on Hs445 were 13.22±3.12 *vs* 67.26±7.87 (P<0.01). The 48h apoptotic rate (%) of Chidamide (2 μmol/L) alone or combined with Decitabine (0.5 μmol/L) on L428 were 34.03±4.67 *vs* 70.58±5.76 (P<0.01). The expression of cleaved PARP and the decline of the mitochondrial membrane potential of the combined group were also more significant than single group. **Conclusion**　Chidamide can inhibit the proliferation of HL cell lines and induce apoptosis. The combination of Chidamide with Decitabine has significant synergistic effect on proliferation and apoptosis of HL cell lines.

Key words: Hodgkin Lymphoma; Chidamide; Decitabine; cell proliferation; cell inhibition; epigenetic regulation

霍奇金淋巴瘤(Hodgkin′s lymphoma,HL)是 1 种来源于生发中心 B 淋巴细胞的恶性肿瘤。近年来 Murray[1] 和 Seitz[2] 等的研究证实表观遗传学调控异常在 HL 的发病机制中起重要作用。目前研究较多的表观遗传学调控异常,包括组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases,HDAC)异常活化及 DNA 异常甲基化 2 个方面,而这 2 方面的异常与 B 细胞特异性基因表达下调和 HL 特征性的基因表达上调有关,后两者共同促进了 HL 细胞的恶性转化[3]。因此,可以推测 HDAC 抑制剂联合去甲基化药物对 HL 的治疗可能具有协同作用。地西他滨是目前国内最常用的去甲基化药物,广泛应用于骨

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.007

△通信作者:贾永前(1963.12-),男,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事造血干细胞及脐血干细胞移植的临床研究和血液病的实验诊断研究,电话:028-85422366,Email:jia_yq@scu.edu.cn

髓增生异常综合征及老年急性髓细胞白血病的治疗;西达本胺是国内研发的第 1 个选择性 HDAC 抑制剂,已被批准用于外周 T 细胞淋巴瘤的治疗[4]。西达本胺联合地西他滨对 HL 细胞的作用如何,我们为此探讨了二者联合作用对 HL 细胞株 Hs445 和 L428 细胞增殖及凋亡的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 HL 细胞株来源 Hs445 细胞株(HTB-146),L428 细胞株(CRL-1845)(美国 ATCC),浓度均为 1×10^6个/mL。

1.2 主要试剂与仪器 西达本胺(片剂 5 mg/片,批号 20150825,深圳微芯公司);地西他滨(注射液 50 mg/安瓶,批号 120303,江苏正大天晴公司);PRMI1640 培养基(货号 SH30022.01B),胎牛血清(货号 sv300160.03)(美国 Hyclone);噻唑蓝(MTT)(货号 M2128,美国 Sigma 公司);Cocktail 蛋白酶抑制剂(货号 4693116001,美国 Roche 公司);磷酸酶抑制剂(货号 KGP602),周期检测试剂盒(货号 KGA511)(南京凯基生物科技发展有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(货号 CW0014S,北京康为试剂公司);Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒(货号 FXP018-100,北京四正柏公司);线粒体膜电位检测 JC-1 染料(货号 C2006,上海碧云天公司);GAPDH 抗体(货号 TA336621,北京中杉金桥公司),Cleaved PRAP 抗体(货号 5625S,美国 Cell Signaling Technology);碘化丙啶(PI)(货号 C0123,上海宝曼生物科技有限公司);RNA 酶(货号 M0044,上海远慕生物科技有限公司);96 孔板(NEST,货号 701101,上海百研生物科技有限公司);酶标仪(ELX800,美国 BioTek);CO_2恒温孵箱(3111 型,美国 Thermo Scientific);离心机(Allegra X-15R),流式细胞仪(MoFlo XDP Navios)(美国 Beckman Coulter)。

1.3 细胞培养 分别取 1×10^6个 Hs445 和 L428 细胞悬浮培养在含 10%胎牛血清(1 mL)和 1%青霉素/链霉素(100 U/mL,0.1 mL)的 RPMI 1640 培养液 10 mL 中,在 37℃、5%CO_2饱和湿度的恒温培养箱中持续培养,每 2-3 d 换液传代,以 1:3传代,取对数生长期细胞做试验,所有试验均重复 3 次。

1.4 实验分组及细胞增殖抑制试验 实验组:取 Hs445 和 L428 细胞 1.35×10^4个,按 90 μL/孔接种于 96 孔板,加入终浓度分别为 0.1、0.3、1、3、10、30 μmol /L 的西达本胺各 10 μL,每个浓度设 3 个复孔;对照组:不加药,其他培养细胞的条件同实验组;空白组:仅为不含细胞的培养液。按上述分组方法铺 3 个 96 孔板(每个 96 孔板均含相同的实验组、对照组、空白组),将 3 个板置 37℃、5%CO_2饱和湿度培养箱中培养,分别培养至 24、48、72 h,在各个培养时间终点时取出 96 孔板,加入 MTT 溶液 20 μL/孔,继续在培养箱中再孵育 4 h,取出 96 孔板,加入 MTT 溶解液 100 μL/孔,孵箱外室温放置待蓝紫色结晶甲瓒充分过夜溶解,次日用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度(OD)值,采用 graphpad prism6 软件(美国 GraphPad Software)计算细胞增殖抑制率[IR(%)=(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%]及 IC50。根据文献[5]方法及我们前期的预实验结果,两药联合作用时,Hs445 细胞中西达本胺浓度选择 0.25 和 0.5 μmol/L,L428 细胞中西达本胺浓度选择 1 和 2 μmol/L,2 种细胞中地西他滨浓度均选择 0.5 和 2 μmol/L,培养时间 72 h,并同时设对照组和空白组,采用 CalcuSyn v2.0(英国 BIOSOFT)软件计算协同指数(CI)。

1.5 细胞周期检测 收集药物处理 24 h 的细胞悬液,250 g 离心 5 min,PBS 洗涤细胞 2 次;残余 PBS 重悬细胞后加至 1 mL 预冷的 75%乙醇中,4℃冰箱过夜固定;300 g 离心 5 min,PBS 洗涤细胞 2 次,加 PBS 200 μL 重悬细胞,加入 2 μL PI 及无 DNA 酶污染的 RNA 酶(工作液 5 μg/mL)混匀,37℃水浴 30 min 后上流式细胞仪检测。

1.6 细胞凋亡检测 收集药物处理 48 h 的细胞悬液,500 g 离心 5 min,PBS 洗涤细胞 2 次;加入 200 μL 的结合缓冲液(binding buffer)重悬细胞,避光加入 2 μL 的 Annexin-V-FITC 和 1.5 μL PI,避光孵育 15 min 后,<1 h 上流式细胞仪检测。

1.7 线粒体膜电位检测 收集药物处理 72 h 的细胞,重悬于 0.5 mL 培养液中,加入 0.5 mL Jc-1 工作液(50 μL Jc-1+8 mL ddH_2O+2 mL 缓冲液),培养箱孵育 20 min,300 g 离心 3 min,PBS 洗涤 2 次,200 μL PBS 重悬后上流式细胞仪检测。

1.8 Western blot 检测 收集药物处理 48 h 的各组细胞,加入 Cocktail 细胞裂解液 50 μL 及 1%的磷酸酶抑制剂 0.1 μL 混匀后冰上裂解 40 min,10 000 g 离心 20 min 收集上清,BCA 法测蛋白浓度,以 40 μg 总蛋白做 SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜,次日洗涤后加入相应二抗共孵育 1 h,洗涤后做 X 光胶片显影[5]。

1.9 统计学分析 定量数据用"均数±标准差($\bar{x}$±s)"表示,采用 SPSS17.0 统计软件做统计学分析,两样本均数比较采用 t 检验,多组均数的比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 西达本胺对 Hs445 及 L428 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响 1)西达本胺能抑制 Hs445 和 L428 细胞增殖,且呈现时间和浓度依赖性(图 1)。西达本胺作用 48 h 对 Hs445 和 L428 细胞的 IC50 分别为 1.91 和 3.46 μmol/L。2)当西达本胺浓度为 0 和 1 μmol/L 时,Hs445 细胞 G0/G1 期细胞比例(%)分别为 66.82±4.08 *vs* 79.65±5.97($t=3.07$,$P<0.05$),G_2/M 期细胞比例(%)分别为 23.74±2.37 *vs* 16.18±1.62($t=4.56$,$P<0.05$);L428 细胞 G0/G1 期细胞比例(%)分别为 57.51±5.75 *vs* 81.51±8.15($t=4.17$,$P<0.05$),G_2/M 期细胞比例(%)分别为 32.71±3.27 *vs* 15.13±1.51($t=4.56$,$P<0.05$)(图 2)。3)以 1 和 0.3 μmol/L 西达本胺分别处理 Hs445 和 L428 细胞 48 h 后细胞凋亡开始增加,并随着药物浓度增加细胞凋亡率逐渐增加(图 3)。

2.2 西达本胺联合地西他滨协同抑制 Hs445 及 L428 细胞增殖 见表 1-2。

2.3 西达本胺联合地西他滨协同促进 Hs445 及 L428 细胞凋亡 为检测西达本胺联合地西他滨对 Hs445 及 L428 细胞凋亡的影响,分别进行单药及两药联合后细胞凋亡率、凋亡蛋白 Cleaved PARP、线粒体膜电位的检测。Hs445 细胞选用 0.5 μmol/L 西达本胺和 2 μmol/L 地西他滨,L428 细胞选用 2 μmol/L 西达本胺和 0.5 μmol/L 地西他滨。西达本胺单药

作用、西达本胺和地西他滨联合作用 Hs445 和 L428 细胞的凋亡率(%)分别为 13.22±3.12、34.03±4.67,67.26±7.87、70.58±5.76(t=11.06、8.54,P<0.01)(图 4)。Hs445 细胞单药组和对照组均无明显的 Cleaved PARP 表达,联合用药组 Cleaved PARP 的表达增加,L428 细胞对照组无明显的 Cleaved PARP 表达,单药组均可见少量 Cleaved PARP 表达,联合用药组 Cleaved PARP 表达明显强于单药组(图 5-a);两药联合处理 Hs445 和 L428 细胞 72 h 的线粒体膜电位降低程度均明显高于单药组(图 5-B)。

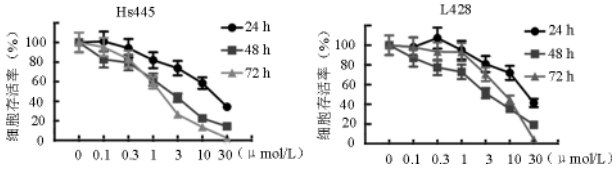
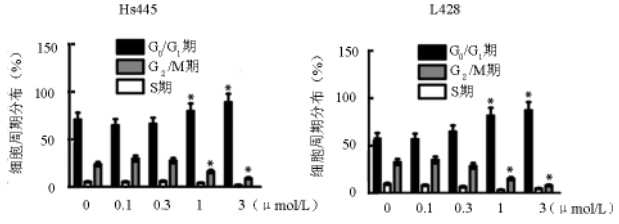


图 1　西达本胺对 Hs445 和 L428 细胞增殖的影响



*与西达本胺浓度为 0 组比较,P<0.05

图 2　西达本胺对 Hs445 和 L428 细胞周期的影响

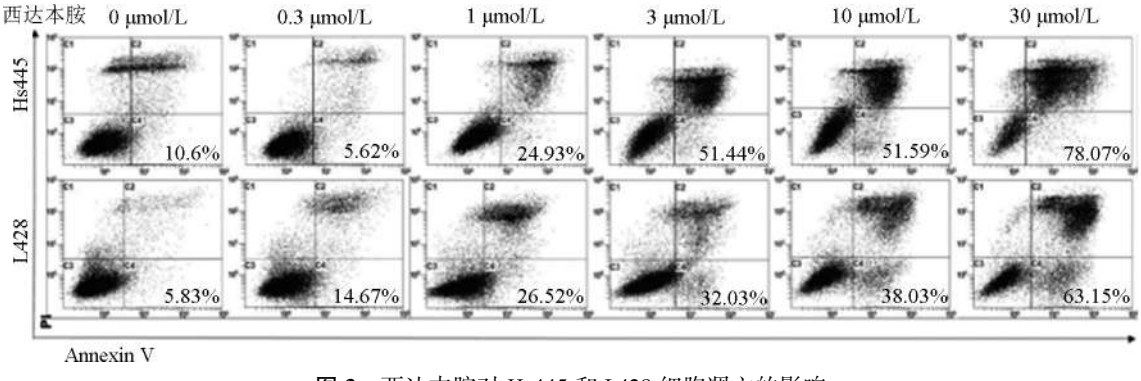


图 3　西达本胺对 Hs445 和 L428 细胞凋亡的影响

表 1　西达本胺联合地西他滨对 Hs445 细胞增殖的影响及两药协同指数

		地西他滨				
		0 μmol/L	0.5 μmol/L		2 μmol/L	
		IR(%)	IR(%)	CI	IR(%)	CI
西达本胺	0.25	12.02±1.41	35.76±0.97*	0.55	54.20±1.32*	0.61
(μmol/L)	0.5	31.00±0.90	54.12±1.24*	0.54	73.13±0.45*	0.51

注:根据药物作用 2 种细胞株的 IC50 值,选择低浓度的西达本胺与地西他滨分别联合作用 72 h;IR(%)为增殖抑制率,CI 为两药协同指数(下同);* 和西达本胺单药组相比,t 值分别为 24.02、37.82、26.13、72.51,P<0.05

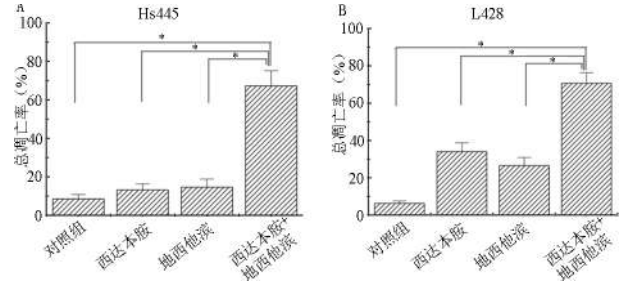
表 2　西达本胺联合地西他滨对 L428 细胞增殖的影响及两药协同指数

		地西他滨				
		0 μmol/L	0.5 μmol/L		2 μmol/L	
		IR(%)	IR(%)	CI	IR(%)	CI
西达本胺	1	18.03±0.91	41.05±0.67*	0.23	56.40±0.39*	0.16
μmol/L	2	36.00±0.21	67.80±0.89*	0.12	82.35±1.45*	0.12

* 和西达本胺单药组相比,t 值分别为 35.28、67.13、60.23、54.79,P<0.05

3　讨论

HL 是严重危害青少年生命健康的恶性淋巴系统肿瘤,约占所有淋巴瘤类型的 11.2%[7]。目前对 HL 的治疗已使得约 70%-80%的 HL 患者获得了长期无病生存,但仍有约 5%-10%的人对现有治疗原发耐药,约 10%-15%的早期患者和 20%-40%的进展期患者出现复发[8-9];因而大剂量化疗联合自体造血干细胞移植是复发/难治 HL 患者的主要选择。近年来,新的分子靶向药物及表观调控药物已在 HL 的治疗中显示出良好的应用前景,如 CD30 单抗(BV)、PD-1 单抗、HDAC 抑制剂、来那度胺和 m-TOR 抑制剂等[7]。



*P<0.01

图 4　西达本胺联合地西他滨对 Hs445 和 L428 细胞凋亡率的影响

HDAC 的异常活化及 DNA 的异常甲基化是 HL 表观遗传学调控异常的最重要的 2 个方面。有研究发现,HL 细胞和病理组织中均存在Ⅰ类 HDAC(HDAC1-3)的高表达[10-11],这为 HDAC 抑制剂在 HL 中的应用提供了理论依据。体外研究证实,Ⅰ类 HDAC 抑制剂 MGCD0103 可抑制 HL 细胞株增殖并诱导凋亡,可能的机制包括上调乙酰化组蛋白和细胞周期调节蛋白 P21、下调 XIAP、激活 caspase3 和 caspase9 等[12]。有数项临床研究显示,在复发/难治 HL 患者中,使用 HDAC 抑制剂治疗的反应率大约为 20%[13-14]。西达本胺是苯酰胺类 HDAC 抑制剂,能选择性抑制 HDAC1-3 和 10,对多种肿瘤细胞具有良好的抑制作用[15];我们的研究显示西达本胺对 HL 细胞株 Hs445 和 L428 具有抑制增殖、阻滞细胞停滞于 G0/G1 期及诱导凋亡的作用(图 1-3)。

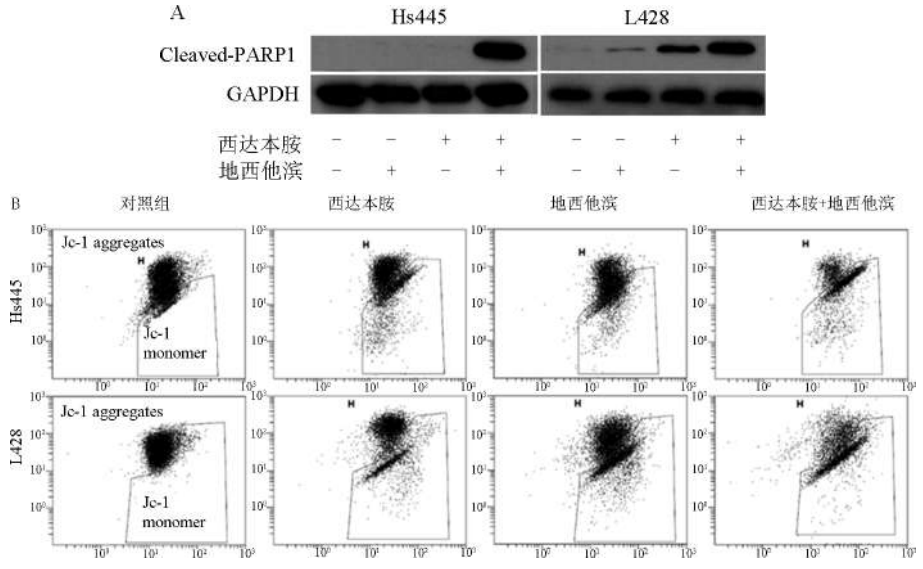


图 5 西达本胺联合地西他滨对 Hs445 和 L428 细胞凋亡蛋白及线粒体膜电位的流式检测

由于 HL 细胞株和原代肿瘤细胞均存在异常甲基化引起的 B 细胞特异基因的表达下调[15],因此去甲基化药物对 HL 有潜在的治疗作用。地西他滨主要用于骨髓增生异常综合征和老年急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)的治疗,其在淋巴系统恶性肿瘤中的应用正在探索中[17-18]。Swerev 等[5]研究显示地西他滨能抑制经典型 HL 细胞株的增殖,机制可能与促进 *CDKN1A* 和 *GADD45A* 等基因表达有关。而 2 种不同作用机制的表观遗传学调控药物联合治疗 HL 是否具有协同作用引起了人们的关注。已有体外实验证实,地西他滨和多种 HDAC 抑制剂能通过激活 caspase-3 和上调乙酰化组蛋白来协同抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞的增殖并诱导凋亡[19]。同样也有临床实验显示,地西他滨联合 vorinostat 在复发/难治急性淋巴细胞白血病的治疗中表现出较好的临床应用前景和良好的耐受性[20]。我们的研究显示,西达本胺联合地西他滨对 HL 细胞株 Hs445 和 L428 有协同抑制增殖和促进凋亡的作用(表 1-2),联合作用时线粒体膜电位的变化和 Cleaved PARP 的表达情况也符合凋亡相关改变(图 4-5)。

HDAC 抑制剂与去甲基化药物协同作用的相关机制目前还不是很清楚。真核生物基因组的功能与组蛋白的翻译后修饰(post-translational modifications,PTMs)关系密切,真核生物通过特定的蛋白识别组蛋白 PTMs 组成“语言”调控基因表达,而 DNA 的甲基化和组蛋白的 PTMs 在染色体的重塑、效应蛋白的募集以及促进大分子复合物到达基因组的远隔位点上起协同作用,目前认为 DNA 甲基化与组蛋白 PTMs 之间可能存在信息交流[21]。Kalac 等[19]的研究显示 Panobinostat 能够增强地西他滨的去甲基化作用,促进基因表达上调,而地西他滨也能增强 Panobinostat 乙酰化组蛋白的作用。西达本胺联合地西他滨在 HL 细胞中是否具有同样的效应还需要进一步的实验来证实。

总之,西达本胺对 HL 细胞株具有抑制增殖、促进凋亡的作用。西达本胺联合地西他滨对 HL 细胞株的增殖抑制和诱导凋亡具有明显的协同效应,提示 HL 患者可能存在 DNA 的异常甲基化及 HDAC 的异常活化。我们的研究也为今后 HDAC 抑制剂联合去甲基化药物应用于难治/复发 HL 提供了一定的实验依据。本研究尚未阐明两药相互作用的具体机制,接下来的研究将进一步探索两药相互作用对 Hs445 和 L428 细胞组蛋白乙酰化水平的影响及 2 个细胞株中特定基因甲基化水平的影响,并进一步研究两药在 HL 动物模型中是否具有协同作用。

参 考 文 献

[1] Murray PG, FanY, Davies G, et al. Epigenetic silencing of a pro-apoptotic cell adhesion molecule, the immunoglobulin superfamily member IGSF4, by promoter CpG Methylation protects Hodgkin lymphoma cells from apoptosis. Am J Pathol,2010,177(3):1480-1490.

[2] Seitz V, Thomas PE, Zimmermann K, et al. Classical Hodgkin′s lymphoma shows epigenetic features of abortive plasma cell differentiation. Haematologica,2011,96(6):863-870.

[3] Ehlers A, Oker E, Bentink S, et al. Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype. Leukemia,2008,22(4):835-841.

[4] Shi Y, Dong M, Hong X, et al. Results from a multicenter, open-label, pivotal phase II study of chidamide in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. Ann Oncol,2015,26(8):1766-1771.

[5] Swerev TM, Wirth T, Ushmorov A. Activation of oncogenic pathways in classical Hodgkin lymphoma by decitabine: a rationale for combination with small molecular weight inhibitors. Int J Oncol, 2017,50(2):555-566.

[6] Jensen EC. The basics of western blotting. Anat Rec (Hoboken), 2012 ,295(3):369-371.

[7] Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol,2016,91(4):434-442.

[8] Rueda Domínguez A, Alfaro Lizaso J, de la Cruz Merino L, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of Hodgkin′s lymphoma. Clin Transl Oncol, 2015,17(12):1005-1013.

[9] Ramchandren R. Advances in the treatment of relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. Oncologist,2012,17(3):367-376.

[10] Adams H, Fritzsche FR, Dirnhofer S, et al. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma. Expert Opinion Ther Targets, 2010,14(6):577-584.

[11] Gloghini A, Buglio D, Khaskhely NM, et al. Expression of histone deacetylases in lymphoma:implication for the development of selectiveinhibitors.Br J Haematol,2009,147(4):515-525.

[12] Buglio D, Mamidipudi V, Khaskhely NM, et al. The class-Ⅰ HDAC inhibitor MGCD0103induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and synergizes with proteasome inhibitors by an HDAC6-independent mechanism. Br J Haematol, 2010,151(4):387-396.

[13] Younes A, Sureda A, Ben-Yehuda D, et al.Panobinostat in patients with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma after autologous stem-cell transplantation: results of a phase II study. J Clin Oncol.2012,30(18):2197-2203.

[14] Younes A, Oki Y, Bociek RG, et al. Mocetinostat for relapsed classical Hodgkin's lymphoma:anopen-label, single-arm, phase 2 trial. Lancet Oncol, 2011,12(13):1222-1228.

[15] Ning ZQ, Li ZB, Newman MJ, et al. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity. Cancer Chemother Pharmacol,2012,69(4):901-909.

[16] Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O,et al.Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma.Blood,2006,107(6):2493-2500.

[17] Yun S, Vincelette ND, Abraham I,et al.Targeting epigenetic pathways in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematicreview ofHypomethylatingagents trials. Clin Epigenetics, 2016,8(68):1-9.

[18] Pera B, Tang T, Marullo R,et al.Combinatorial epigenetic therapy in diffuse large B cell lymphoma pre-clinical models and patients. Clin Epigenetics, 2016,8(79):1-10.

[19] Kalac M, Scotto L, Marchi E, et al. HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL.Blood,2011,118(20):5506-5516.

[20] Burke MJ,Lamba JK, Pounds S, et al.A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. Am J Hematol., 2014,89(9):889-895.

[21] Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. Biochim Biophys Acta, 2014,1839(8):627-643.

(2017-01-24 收稿,03-23 修回)

本文编辑:蔡辉

《中国输血杂志》编辑部邮售书(刊)目

《临床输血进展》46.00 元/册;《中国输血杂志》合订本:88 年、89 年、90 年卷每卷均 21.00 元,99 年卷 30 元/本,2000 年卷(含增刊)40 元/本,2001 年卷 48 元/本,2002 年卷、2003 年卷、2004 年卷每本均为 51 元,2005 年卷 60 元/本,2006 年卷 70 元/本,2007 年卷 80 元/本,2008 年卷上册 100 元、下册 100 元,2009 年卷上册 100 元、下册 100 元,2010 年卷上册 100 元、下册 100 元,2011 年卷上册 100 元、下册 100 元,2012 年卷上册 120 元、下册 120 元,2013 年卷上册 120 元、下册 120 元,2014 年卷上册 130 元、下册 130 元,2015 年卷上册 130 元、下册 130 元,2016 年卷上册 130 元,下册 130 元;增刊:1994 年 2.5 元/本,1996 年 4 元/本,2001 年 98 元/本,2004 年 20 元/本,2008 年 5 元/本,2010 年 35 元/本,2012 年 38 元/本。2015,2016 年《中国输血杂志》15.00 元/期,全年订价 180.00 元。2017 年《中国输血杂志》16.00 元/期,全年订价 192.00 元,可直接汇款至本刊编辑部邮购(地址:610052　四川省成都市东三环路二段龙潭总部经济城华彩路 26 号,收款人:《中国输血杂志》编辑部),并请注明书(刊)名、合订本年卷名、本数,如需要购书发票者请注明。

· 论著 ·

输注储存血液对黑色素瘤荷瘤小鼠辅助性 T 细胞 1 和 2 平衡的影响*

张敬军 严育忠 朱鑫方 陈淑英 张琦△ 夏荣△
(复旦大学附属华山医院 输血科,上海 200040)

摘要:目的 探究输血对黑色素瘤荷瘤小鼠 TH1/TH2 平衡及其细胞因子表达的影响。**方法** 构建黑色素瘤小鼠肿瘤模型,设新鲜血组与储存血组(30 只/组):经小鼠尾静脉分别输注新鲜全血(0 d)或储存血(15 d)0.2 mL,分别在输血后 15、30 min 与 1、4、8 h 收集小鼠全血,用微量标本多指标流式蛋白定量技术(CBA)检测各时间点血浆中细胞因子 TNF-α、INF-γ、IL-2、IL-4、IL-10 的表达水平;另设未输血组(6 只/组)为对照组。**结果** 1)新鲜血组与对照组比较,输血后 4 h TNF-α 分泌水平(pg/mL)分别为 9.14±0.83 *vs* 1.72±0.90(P<0.01);储存血组与对照组比较,输血后 4 hIL-4 和 IL-10 表达水平(pg/mL)分别为 1.55±0.17 vs 0.29±0.08 和 5.4±1.39 *vs* 0.2±0.08(P<0.01)。2)储存血组与新鲜血组比较,输血后 1 h TNF-α 和 INF-γ 表达水平(pg/mL)分别为 3.67±1.76 *vs* 7.64±1.04(P<0.05)和 0.27±0.16 *vs* 0.49±0.18 (P<0.05);输血后 4 h IL-2 的表达水平(pg/mL)分别为 0.29±0.08 *vs* 0.89±0.21(P<0.01);输血后 4 h IL-10 的表达水平(pg/mL)分别为 5.40±1.39 *vs* 2.38±0.54 (P<0.01) 。**结论** 输血可促进小鼠体内 TH1 和 TH2 细胞因子的表达,而相对于输注新鲜血,输注储存血组小鼠体内 TH1 细胞因子表达有所降低,而 TH2 细胞因子表达得到进一步促进,致 TH1/TH2 失衡,平衡向 TH2 方向偏移。

关键词:异体输血;储存血;新鲜血;黑色素瘤; TH1/TH2 平衡;输血相关免疫调节;小鼠;动物实验
中图分类号:R457.1+2 R392.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0247-04

Effects of storage blood transfusion on balance of helper T cell 1 and 2 in melanoma bearing mice *ZHANG Jingjun, YAN Yuzhong, ZHU Xinfang, CHEN Shuying, ZHANG Qi, XIA Rong. Department of Blood Transfusion, The Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai* 200040, *China. Co-corresponding authors: ZHANG Qi, XIA Rong.*

Abstract: Objective To investigate the effects of blood transfusion on TH1/TH2 balance and expressions of cytokines in melanoma-bearing mice. **Methods** The tumor model of melanoma mice was established. The fresh blood group and stored blood group were set up (30 mice/group). Mice were transferred with 0.2 mL fresh blood (D0) or stored blood(D15) via tail vein. The whole blood in mice were collected at 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 4 hours and 8 hours after blood transfusion respectively. The expression levels of cytokines (TNF-α, INF-γ, IL-2, IL-4, IL-10) in plasma at each time point were detected by cytometric beads array (CBA). Control group was also set up without blood transfusion (6 mice/group). **Results** 1) The secretion levels of TNF-α(pg/mL) were 9.14±0.83 in the fresh group and 1.72±0.90 in the control group respectively at 4 hour after blood transfusion (P<0.01).The expression levels of IL-4(pg/mL) were1.55±0.17 in the stored group and 0.29±0.08 in the control group respectively at 4 hour after blood transfusion (P<0.01).The expression levels of IL-10 (pg/mL) were 5.4±1.39 in the stored group and 0.2±0.08 in the control group respectively at 4 hour after blood transfusion (P<0.01). 2) The expression levels of TNF-α(pg/mL) were 3.67±1.76 in the stored group and 7.64±1.04 in the fresh group respectively at 1 hour after blood transfusion (P<0.05).The expression levels of INF-γ(pg/mL) were 0.27±0.16 in the stored group and 0.49±0.18 in the fresh group respectively at 1 hour after blood transfusion (P<0.05).The expression levels of IL-2 (pg/mL) were 0.29±0.08 in the stored group and 0.89±0.21 in the fresh group respectively at 4 hours after blood transfusion (P<0.01). The expression levels of IL-10 (pg/mL) were 5.40±1.39 in the stored group and 2.38±0.54 in the fresh group respectively at 4 hours after blood transfusion (P<0.01). **Conclusion** Blood transfusion promotes the expressions of TH1 and TH2 cytokines. Compared with the infusion of fresh blood, infusing stored blood promotes the expressions of TH2 cytokines and the balance of TH1/TH2 in infusing stored blood group shifts to TH2 dominance.

Key words: allogeneic blood transfusion; storage blood; fresh blood; melanoma; TH1/TH2 balance; transfusion related immunomodulation; mice; animal experiment

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.008
*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570166,81170530);△共同通信作者:张琦(1981.04-),女,医学博士,副研究员,硕士研究生导师,电话:021-66895067;Email:zhangqfdhs@163.com;共同通信作者:夏荣(1966.03-),医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师,主要从事临床输血及血液免疫学研究,电话:021-52888331,Email:xiarongcn@126.com

输血是现代医学实践中的 1 种重要的治疗手段,也是 1 把双刃剑,如红细胞在体外储存过程中发生的贮存损伤使输血在拯救患者生命的同时,也引起了机体的输血相关免疫调节(transfusion related immune modulation,TRIM)[1],进而增加患者肿瘤切除后复发、术后的感染率和死亡率[2-4]。TRIM

是指同种异体输血所产生的免疫调节的副反应,包括抑制细胞毒性细胞和单核细胞的活性、抑制前列腺素释放,抑制辅助性 T 细胞 1(helper T cell type 1,TH1)因子的释放,增了抑制性 T 细胞的活性等[5-7]。TH1/TH2 细胞平衡在机体免疫调节过程中尤为重要。TH1 细胞介导细胞免疫,其分化受抑制时,机体细胞免疫功能降低,抗肿瘤及抗感染能力下降;TH2 细胞介导体液免疫,与自身免疫性疾病的发生密切相关。我们以黑色素瘤荷瘤(C57BL/6)小鼠为载体,模拟临床肿瘤输血,探究输注不同储存时间血液对荷瘤小鼠早期 TH1/TH2 细胞表达及平衡的影响,报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物与细胞来源及其一般情况　黑色素瘤荷瘤 C57BL/6 小鼠 66 只,雄性,5-8(7±0.89)周龄,体重(20±1)g 用于构建小鼠肿瘤模型;Blab /c 小鼠 14 只,雄性,5-8(6.6±0.98)周龄,体重(19.6±0.92)g 用于采集血液;均为 SPF 级[SCXK(沪)2014-0002,购于上海南方模式生物科技股份有限公司],5 只/笼以适应清洁级环境,喂普通饮食;实验中动物使用和处置遵照复旦大学动物保护与使用委员会相关使用指南。黑色素瘤 B16 细胞(NMTC-0048,购于上海南方模式生物科技股份有限公司)。

1.2　主要试剂与仪器　DMEM 培养基(批号 AAH206539,美国 Hyclone 公司);PBS 缓冲液(批号 1563250,南京凯基公司);FBS(批号 1640958,美国 Gibco 公司);CPDA-1 抗凝剂(批号 140430,上海血液中心);CBA 试剂盒(批号 5110932,美国 BD 公司)。离心机(TBL-40B,瑞江分析仪器有限公司);4℃ 冰箱(BCD-216A,中国 Haier 公司);-80℃ 冰箱(ULT1786-4-V49,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);流式细胞分析仪(FACSCauto,美国 BD 公司)。

1.3　小鼠肿瘤模型的构建　C57BL/6 小鼠 66 只,并对小鼠的右侧侧腹部行备皮,接种 B16 细胞 5×10^5 个/只,具体操作方法:用左手拇指和食指捏住小鼠双耳,小指和手掌根按住小鼠背部皮肤制动,右手持针,先用针头平面挑起皮肤,然后沿皮下缓慢进针,当针头进至 2/3 时,将肿瘤细胞注射至皮下,注射结束后停留片刻,旋转针头缓慢拔出,右手拇指轻压进针处 15 s 防止细胞流出。接种 1 周后小鼠右侧侧腹部皮下长出肉眼可见肿块,肿块直径约 6 mm,即模型构建成功。

1.4　小鼠血液的采集与储存　取 1 个棉球置于 30 cm^3 的密闭容器中,再用 1 mL 注射器吸取 0.2 mL 溴氟烷注射于棉球上,将小鼠置于密闭容器中直至充分麻醉,Blab /c 小鼠 28 只,摘除眼球并取血 0.6 mL/只于盛有 14% CPDA-1 1.5 mL 的 EP 管中,缓慢混匀,血液采集过程中注意小鼠抓取不宜太紧,切勿挤压小鼠,使血液自然流出,尽量减少溶血;分出新鲜全血:于采血当日(储存期 0 d)做输血试验;储存血:4℃ 保存 15 d 后做输血试验。

1.5　实验动物分组　将已建立的 C57BL/6 小鼠肿瘤模型(66 只)随机分为输注新鲜血(0 d)组:包含 5 个检测时间点小组(6 只/小组),共计 30 只;输注储存血(15 d)组:检测时间点与每小组小鼠数量同 0 d 组;对照组:未输血小鼠 6 只(表 1-2)。

1.6　血液标本采集　经 C57BL/6 小鼠尾静脉输注 200 μL/只不同储存时间供血小鼠全血,每只小鼠严格记录输血完成时间,分别在输血后 15、30 min 及 1、4、8 h 取受血小鼠全血 0.6 mL/只,300 g 离心 15 min,取上清,-80℃ 冻存备检测。

1.7　检测指标及方法　用血清微量标本多指标流式蛋白定量技术(cytometric bead array,CBA)检测 TH1(TNF-α、INF-γ、IL-2)和 TH2(IL-4、IL-10)细胞因子,按照试剂盒说明书操作:1)配制 TH1/TH2 细胞因子的标准曲线;2)在每个流式管中依次加入小鼠血清(50 μL/标本)试剂和 TH1/TH2 荧光反应物,轻摇充分混匀;3)常温避光孵育 3 h 加入洗涤液 1 mL;4)200 g 离心 5 min 弃上清,标本中加入洗涤液 300 μL/管重悬,流式细胞仪检测,结果用 FCAP Array V3 软件分析。

1.8　统计学分析　采用 Stata 11.0 统计学软件,实验数据用"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示,若 2 组间比较满足正态分布和方差齐性,采用 t 检验,不符合则采用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　输新鲜血和输储存血对小鼠血清中细胞因子表达的影响　见表 1-2。

2.2　输注储存血对小鼠 TH1/TH2 平衡的影响　输血后 1 h 输储存血组与输新鲜血组 C57BL/6 小鼠 TNF-α 表达水平(pg/mL)分别为 3.67 ± 1.76 *vs* 7.64 ± 1.04($t=3.9$,$P<0.05$);输血后 30 min 和 1 h,输储存血组与输新鲜血组小鼠 INF-γ 表达水平(pg/mL)分别为 0.23± 0.05 *vs* 0.43 ± 0.06 和 0.27 ± 0.16 *vs* 0.49 ± 0.18(t 值分别为 5.52、2.8,$P<0.05$);在输血后 4 h 输储存血组与输新鲜血组小鼠 IL-2 表达水平(pg/mL)分别为 0.29 ± 0.08 *vs* 0.89 ± 0.21($t=5.86$,$P<0.01$),IL-4 的表达水平(pg/mL)分别为 1.55 ± 0.17 *vs* 1.42 ± 0.14($P>0.05$),IL-10 表达水平(pg/mL)为 5.40 ± 1.39 *vs* 2.38 ± 0.54($t=4.55$,$P<0.01$)(图 1)。

表 1　C57BL/6 小鼠输注新鲜血(0 d)后血清中细胞因子的表达　(pg/mL)

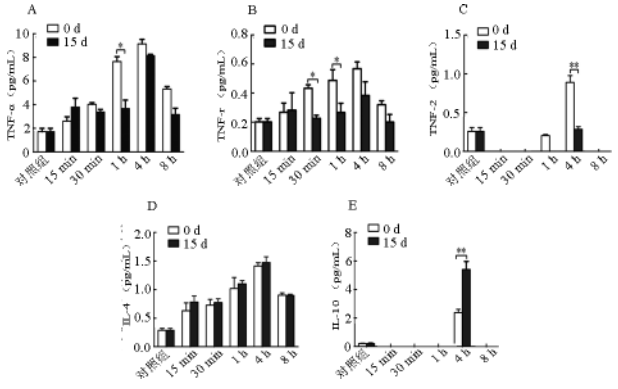
		n	TNF-α	INF-γ	IL-2	IL-4	IL-10
对照组		6	1.72±0.90	0.20±0.06	0.22±0.12	0.29±0.08	0.20±0.08
输注新鲜血组	15 min	6	2.60±0.91	0.27±0.16	0.00±0.00	0.63±0.33▲	0.00±0.00
	30 min	6	4.03±0.35*	0.43±0.06#	0.00±0.00	0.73±0.25▲	0.00±0.00
	1 h	6	7.64±1.04**	0.49±0.18#	0.20±0.04	1.02±0.47▲	0.00±0.00
	4 h	6	9.14±0.83**	0.57±0.11##	0.89±0.21△△	1.42±0.14▲▲	2.38±0.54◇
	8 h	6	5.33±0.50*	0.32±0.07#	0.00±0.00	0.90±0.10▲	0.00±0.00

注:与对照组相比,* t 值分别为 5.14、7.01,$P<0.05$,** t 值分别为 8.6、12.8,$P<0.01$;# t 值分别为 5.2、3.02、2.64,$P<0.05$,## $t=5.8$,$P<0.01$;△△ $t=5.27$,$P<0.01$;▲ t 值分别为 2.67、3.33、3.05、9.36,$P<0.05$,▲▲ $t=14.2$,$P<0.01$;* ◇ $t=9.84$,$P<0.05$

表 2 小鼠输注储存血(15 d)后血清中细胞因子的表达 (pg/mL)

		n	TNF-α	INF-γ	IL-2	IL-4	IL-10
对照组		6	1.72±0.90	0.20±0.06	0.26±0.12	0.29±0.08	0.20±0.08
输注储存血组	15 min	6	3.80±1.81	0.28±0.29	0.00±0.00	0.78±0.26▲	0.00±0.00
	30 min	6	3.38±0.54	0.23±0.05	0.00±0.00	0.78±0.16▲	0.00±0.00
	1 h	6	3.67±1.76	0.27±0.16	0.00±0.00	1.10±0.14▲	0.00±0.00
	4 h	6	8.14±0.85**	0.42±0.20#	0.29±0.08	1.55±0.17▲▲	5.40±1.39◇◇
	8 h	6	3.16±1.34	0.20±0.13	0.00±0.00	0.90±0.05▲	0.00±0.00

注:与对照组相比,** t=10.97,P<0.01;# t=2.5,P<0.05;▲ t 值分别为 3.58、5.46、3.31、8.66,P<0.05,▲▲ t=13.13,P<0.01;◇◇ t=9.17,P<0.01



* P<0.05; * * P<0.01

图 1 C57BL/6 小鼠输注储存血对血清中 TH1/TH2 平衡的影响

3 讨论

随着现代医学技术的发展,血液有效储存时间虽然大大延长,但是红细胞在储存过程中的储存损伤问题也越发突显,而输血引起的 TRIM 及其对临床疾病转归特别是肿瘤预后的影响逐渐引起临床的重视。我们主要探究早期同种异体输注不同储存时间血液对 C57BL/6 小鼠细胞因子的表达以及 TH1/TH2 平衡的影响,鉴于小鼠血液在体外储存 7 d 储存损伤程度近似于人类血液储存>20 d[8],故实验将储存 15 d 的 BABL/C 小鼠(供血体)全血作为长期储存血,以 C57BL/6 小鼠为载体,模拟临床肿瘤患者同种异体输血,连续检测 8 h 内不同时间点 C57BL/6 小鼠全血中 TH1/TH2 相关细胞因子的表达:与未输血 C57BL/6 小鼠相比,输血(无论输新鲜血还是储存血)小鼠 TH1/TH2 细胞因子分泌增加,且在输血后 4 h 达到高峰(表 1-2);与输新鲜全血小鼠相比,输储存血小鼠的 TH1 细胞因子 IL-2、TNF-α、INF-γ 表达明显降低,而 TH2 细胞因子 IL-10 分泌增加,说明荷瘤小鼠 TH1 细胞的免疫功能降低,TH1/TH2 细胞因子分泌失衡(图 1)。

临床研究发现输血可引起一些种类的手术、感染、急性炎症等患者体内细胞因子的变化,这种变化多发生在输注的 12-24 h[9-11]。而有动物实验则显示用 LPS(lipopolysaccharide)刺激小鼠后 1 h,小鼠体内 IL-β 表达明显增加,3 h 达到高峰[12-13]。酵母聚糖(zymosan)诱发小鼠急性关节炎后,小鼠体内的 IL-β 在 2 h 可被检测到,8 h 达到高峰[12-13]。另据报道,严重烧伤的小鼠模型在早期(3-12 h)已有多种细胞因子表达发生明显改变[14];还有研究者以 LPS 干预小鼠急性脓毒症模型后 2 h,小鼠的一氧化氮合酶(NOS)水平增加,4-6 h 达到高峰,8 h 开始下降[15]。鉴于小鼠机体的免疫应答在外界干预的早期就发生了明显的炎症反应,故我们选择在 C57BL/6 小鼠肿瘤模型输血后≤8 h 检测其细胞因子的表达分泌情况:小鼠外周血中细胞因子的表达水平在输血后 4 h 达到高峰,证实了前述研究的结果。据此我们推测在输血早期(4-6 h)小鼠机体的炎症反应最剧烈,这为研究早期输血后炎症反应与肿瘤的转移提供了进一步的依据。

TH1/TH2 细胞平衡是维持机体自身免疫稳定的重要机制,若发生免疫偏离会导致特定类型免疫应答效应呈现优势,对机体产生不利影响。有研究发现 TH2 细胞因子能促进基质金属蛋白酶的表达,增加癌细胞的侵袭和转移,而 TH1 细胞因子能够抑制肿瘤的生长[16-17]。另有动物研究证实,输注储存红细胞,上清液能促进小鼠全血中 IL-10 和 TNF-α 分泌,能抑制 LPS 刺激的 TNF-α 表达[18-19];而正常人输注储存血后其体内的 TNF-α 分泌明显被抑制,IL-10 则大量释放[20]。同样的结果在本组实验数据中得到体现(表 1-2,图 3),提示当机体输注储存血后,抑制了机体 TH1 细胞的免疫功能,使 TH2 细胞因子的表达占优势,而这种 TH1/TH2 失衡可能会降低机体对癌细胞的抑制杀伤作用,同时促进肿瘤细胞的侵袭和远处转移——输注储存红细胞对肿瘤患者的不良预后可能是通过调节机体 TH1/TH2 细胞平衡实现的[21-22]。当然要确定其中机制还需下一步深入实验,本研究的不足之处是小鼠全血中细胞因子表达水平低,今后可对荷瘤小鼠输血前先用 LPS 干预后再检测。

总之,输血可促进 C57BL/6 小鼠体内 TH1/TH2 细胞因子的表达,而相对于输新鲜血,输储存血小鼠体内 TH1 细胞因子表达有所降低,而 TH2 细胞因子表达得到进一步促进,使 TH1/TH2 平衡向 TH2 方向偏移,而由此诱发 TH1/TH2 失衡可能在后续的肿瘤的侵袭和转移中发挥一定作用。本研究结果为进一步研究输血与肿瘤复发的相关性提供了一定实验基础。

参 考 文 献

[1] Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. Blood Rev, 2007, 21(6): 327-348.

[2] Horvath KA, Acker MA, Chang H, et al. Blood transfusion and infection after cardiac surgery. Ann Thorac Surg, 2013, 95(6): 2194-2201

[3] Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-Cell storage and complications after cardiac surgery. N Engl J Med, 2008, 358(12): 1229-1239

[4] Koch CG, Li L, Duncan AI, et al. Transfusion in coronary artery bypass grafting is associated with reduced long-term survival. Ann Thorac Surg, 2006, 81(5): 1650-1657

[5] VanTwuyver E, Mooijaart RJ, ten Berge IJ, et al. Pretransplantation blood transfusion revisited. N Engl J Med, 1991, 325(17): 1210-1213

[6] Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res, 2002, 102(1): 6-12

[7] Vamvakas EC. Possible mechanisms of allogeneic blood transfusion-associated postoperative infection. Transfus Med Rev, 2002, 16(2): 144-160

[8] d'Almeida MS, Jagger J, Duggan M, et al. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. Transfus Med, 2000, 10(4), 291-303

[9] Georgios I, Drosos, Konstantinos S, et al. Blood transfusion and cytokines' changes in total knee replacement. Arch Orthop Trauma Surg, 2012, 132(10): 1505-1513

[10] Sablotzki A, Dehne M, Welters I, et al. Alterations of the cytokine network in patientsundergoing cardiopulmonary bypass. Perfusion, 1997, 12(6): 393-403

[11] Bilgin YM, Brand A. Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade? Vox Sang, 2008, 95(4): 261-271

[12] Limei Li, Zhaoliang Fei, Jianke Ren, et al. Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice. BMC Immunol, 2008, 9(1): 1-9.

[13] Wang J, Wang HY, Zhu RR, etal. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1b transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. Biomaterials, 2015, 53(2): 475-483.

[14] Celeste C. Finnerty, Rene Przkora, David N. Herndon, et al. Cytokine expression profile over time in burned mice. Cytokine, 2009, 45(1): 20-25

[15] Zhang N, Weber A, Li B, et al. An inducible nitric oxide synthase-luciferase reporter system for in vivo testing of anti-inflammatory compounds in transgenic mice. J Immunol, 2003, 170(12): 6307-6319

[16] Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4): 265-273

[17] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin, Invest, 2007, 117(5): 1175-1183

[18] Karam O, Tucci M, Toledano BJ, et al. Length of storage and in vitro immunomodulation induced by prestorageleukoreduced red blood cells. Transfusion, 2009, 49(11): 2326-2334

[19] Patel MB, Proctor KG, Majetschak M. Extracellular ubiquitin increases in packed red blood cell units during storage. J Surg Res, 2006, 135(2): 226-232

[20] Biedler AE, Schneider SO, Seyfert U et al. Impact of alloantigens and storage-associated factors on stimulated cytokine response in an in vitro model of blood transfusion. Anesthesiology, 2002, 97(5): 1102-1109.

[21] Mynster T, Nielsen HJ. Storage time of transfused blood and disease recurrence after colorectal cancer surgery. Dis Colon Rectum, 2001, 44(7): 955-64.

[22] Atzil S, Arad M, Glasner A, et al. Blood transfusion promotes cancer progression: acritical role for aged erythrocytes. Anesthesiology, 2008, 109(6): 989-997.

(2016-11-17 收稿, 2017-03-09 修回)

本文编辑: 蔡辉

严正声明

近期不断地有各地编委老师,投稿作者反应,有冒名"钓鱼网站"以各种方式非法收取所谓"定稿费"、"录用证明费"、"发表费"等各种明目的费用,对本刊长期以来形成的良好声誉造成了十分恶劣的影响。

在此郑重声明:本刊正式的收费项目只有审稿费(60 元/篇),版面费,杂志发行费(16 元/本)3 种。除此之外的任何费用,均与《中国输血杂志》编辑部无关! 此外,本部未开通任何形式的网上支付方式,如广大同仁在投稿,发稿,购买本刊印刷品过程中,发现任何问题,请及时与本刊编辑部电话联系确认,不要轻易转账付款,以杜绝此类"钓鱼牟利"事件的发生,维护广大作者,读者权益和编辑部声誉!

特此声明,谢谢大家!

《中国输血杂志》编辑部

· 论著 ·

红细胞储存损伤对于大肠杆菌感染大鼠输注效果的影响*

王向明 焦伯海 王珏 尹湧华 宋宁 田力 李玲 孔玉洁 欧国进 于浩 刘忠△
(中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所, 四川 成都 610052)

摘要:目的 探讨红细胞(RBCs)储存损伤对大肠杆菌感染的免疫力低下大鼠输血后死亡率的影响。**方法** 将69只SPF级SD大鼠,根据是否使用免疫抑制剂(环磷酰胺和地塞米松)和输注RBCs的储存时间不同,随机分成3个实验组:免疫抑制+9 d RBCs组、免疫抑制+1 d RBCs组和免疫抑制+生理盐水(NS)组(18只/组);1个正常对照组:单纯NS组,含15只大鼠。每只大鼠经股静脉放出全身20%血液后,分别输注与失血量相同的储存9或1 d的浓缩RBCs及等量NS,随后植入大肠杆菌溶液0.5 mL,并连续观察7 d。术后24 h,取尾静脉血浆用亚铁嗪微板法测定血清铁,并以LB培养基血细菌培养15 h,用紫外分光光度仪测定OD_{600};术后24 h处死各免疫抑制组大鼠3只/组,取组织做病理检查。**结果** 3个免疫抑制组和对照组分别输注9、1 d RBCs和NS后的大鼠死亡率分别为10/15,11/15和9/15($P>0.05$),死亡大鼠的平均生存时间(h)分别为55.6±21.3,38±16.6和28.3±15.0($P<0.05$);24 h血清铁离子浓度(μmol/L)分别为34.1±9.8,28±10.2,26.8±9.0和22.4±5.9($P>0.05$);血细菌培养的结果(OD_{600})分别为0.510±0.340,0.790±0.281,0.427±0.107和0.349±0.069($P<0.05$);24 h回肠组织细菌计数(个/1 000倍视野)分别为44±9,101±7和27±8($P<0.05$)。**结论** 输注不同储存时间的RBCs对于大肠杆菌感染的免疫力低下大鼠的死亡率没有明显影响;但是相比储存时间长的RBCs,新鲜RBCs输注后明显促进了免疫力低下大鼠体内大肠杆菌的增值并加速了感染大鼠的死亡。

关键词:输血;红细胞;储存损伤;大肠杆菌;免疫抑制;SD大鼠;动物实验

中图分类号:R457.1 R331.1+43 R378.2+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0251-04

The influence of erythrocyte storage lesion on transfusion effects for rats infected by Escherichia Coli *WANG Xiangming, JIAO Baihai, WANG Jue, YIN Yonghua, SONG Ning, TIAN Li, LI Ling, KONG Yujie, OU Guojin, YU Hao, LIU Zhong. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China. Corresponding author: LIU Zhong*

Abstract: Objective To investigate the influence of storage lesion of red blood cells (RBCs) on mortality of Sprague-Dawley rats infected by Escherichia Coli (E. coli). **Methods** 69 SPF-SD rats, according to use of cyclophosphamide and dexamethasone or transfusion with RBCs stored 9 days or less than 1 day or with normal saline (NS), were randomly divided into four groups: normal + NS; immunosuppression + 9d RBCs; immunosuppression +1d RBCs: immunosuppression +NS, and control group. Each of three immunosuppressive groups contained 18 rats, while the control group had 15 only. The rats, subjected to bloodletting 20% of total blood volume, were transfused with RBCs stored nine days, or less than one day or with NS, separately, and then were injected with E. coli (0.5 mL) through femoral vein. When transfused 24 h later, the blood of rats were collected from tail vein to determine serum iron and blood bacteria culture, and three rats of every immunosuppressive group were killed to make pathological specimen. **Results** For the immunosuppressive groups transfused 9d RBCs, 1d RBCs, NS and control group, the mortality were 10/15, 11/15 and 9/15, respectively ($P>0.05$). The mean survival time (h) were 55.6±21.3, 38±16.6 and 28.3±15.0, respectively ($P<0.05$). The serum iron ion concentration (μmol/L) were 34.1±9.8, 28±10.2, 26.8±9.0 and 22.4±5.9, respectively ($P>0.05$). Meanwhile, the values (OD=600 nm) of blood culture were 0.510±0.340, 0.790±0.281, 0.427±0.107 and 0.349±0.069, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** No statistical difference in mortality of immunosuppressive rats infected by E. coli were found, when they were transfused with RBCs of stored different periods, separately. Nevertheless, infusion of RBCs with shorter storage period, compared with RBCs stored for longer time, promotes the proliferation of E. coli in immunosuppressive rats, and accelerates the death process of rats.

Key words: transfusion; red blood cell; storage lesion; Escherichia Coli; immunosuppression; S-D rats; animal research

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.009
*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81370669),中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-024),北京协和医学院教改项目(10023201601901)和四川省科技厅科技计划项目(2015JY0121);△通信作者:刘忠(1969.01-),男,医学博士,主任技师,教授,博士研究生导师,主要从事输血医学研究,电话028-68169108,Email:liuz@ibt.pumc.edu.cn

最近20多年来,红细胞储存损伤逐渐成为输血医学领域研究的重点。尽管有关红细胞储存损伤的研究显示随着

储存时间的延长,红细胞形态和理化性质等均发生了一系列的改变[1-2],但是关于红细胞储存损伤的临床研究至今仍没得出肯定性结论。多个随机对照临床研究(randomized controlled trials, RCTs)的结果支持输注储存期短红细胞的患者死亡率有增加的趋势;而也有回顾性研究显示输注储存期长红细胞增加了心脏手术和创伤患者的死亡率和感染并发症的风险[3-4]。由于前瞻性临床实验受到医学伦理、志愿者招募以及运作成本等限制,而回顾性临床研究又难以克服自身的局限性(如选择偏倚、研究对象不可控等),因而红细胞储存损伤相关的动物实验研究便成为较理想的替代选择。一系列人与鼠红细胞储存后溶血率和存活率的对比实验为动物实验的顺利开展提供了依据[5-7]。有研究发现无论人或鼠输注储存期较长的同种异体红细胞后,受血者体内均发生了明显的溶血,血清游离铁明显升高[8-9];但是收集输注不同储存期红细胞的鼠血浆做体外培养大肠杆菌时,却未见明显差异($P>0.05$);而当增加培养液内铁离子含量时,则对大肠杆菌增殖产生了抑制作用[9-10]。然而,这些体外的研究结果与众多回顾性临床研究所得的结论——储存期长的血液增加输血患者感染风险——相悖。为了明确红细胞储存损伤对于大肠杆菌感染大鼠输血后的影响,我们建立了 SD 大鼠感染大肠杆菌的菌血症模型[11]来分析红细胞储存损伤对于免疫抑制 SD 大鼠的影响,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物一般情况　105 只 10 周龄的 SPF 级雄性 SD 大鼠(300±10)g[购自简阳达硕实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(川)2015-030],其中供血鼠 36 只,实验鼠 69 只,各实验大鼠首先适应环境 1 周,控制 12 h/12 h 昼夜节律,均单独饲养在独立通气系统内(温度 22-26℃、湿度 40-60%、压力-5~5 Pa),并保持水食充足和垫料干燥。

1.2　主要试剂与仪器　大肠杆菌 DH5a(本所输血传播病原体研究中心馈赠);铁检测试剂盒(亚铁嗪微板法,批号 20160105009,南京森贝伽生物科技有限公司);环磷酰胺(规格 0.2 g,批号 H32020857,江苏盛迪威医药医药有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(批号 H37021969, 山东鲁抗辰欣药业股份有限公司);戊巴比妥钠(规格 5 g,批号 20151225,德国 Merck KGaA);CDPA-1 保存液(批号 150422,四川南丁格尔生物科技有限公司);0.9% 氯化钠注射液(批号 M14112224, 四川科伦药业股份有限公司);独立送风隔离笼具(ICV-Ⅱ),医用净化工作台(CJ-1F 型)(苏州市冯氏实验动物设备有限公司);生物安全柜(BSC-1000Ⅱ A2,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);全温振荡器(7Q2-312,上海精宏实验设备有限公司);多功能全自动酶标仪(SpectraMax M2e, 美国 Molecular Device);紫外分光光度计(Ultrospec 6300 pro,德国 Amersham Biosdiences);五分类血液细胞分析仪(BC-5800, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);低温高速离心机(Sorvall Stratos, 美国 Thermo Fisher Scientific);高温灭菌锅(HVA-85, 日本 HIRAYAMA);实验室超纯水机(MK2,美国 CASCADA BIO);冰箱(BCD-206TMZL,青岛海尔股份有限公司)。

1.3　免疫抑制大鼠模型的制备和分组　将 69 只大鼠随机分成 3 个实验(用药)组:输注储存 9 d 红细胞(免疫抑制+9 d RBCs)组、1 d 红细胞(免疫抑制+1 d RBCs)组和生理盐水(免疫抑制+NS)组和 1 个对照(正常+NS)组,3 个实验组均为大鼠 18 只/组(其中处死 3 只/组做病理检查),对照组为 15 只。用药(分别应用药物环磷酰胺和地塞米松[12-13])前、后与输血前测定大鼠体重以及输血前肛温、输血前 WBC 与 RBC;3 个实验组大鼠的这些指标相近($P>0.05$)(表 1-2)。

表 1　各组实验大鼠的基础数据分析

	n	初始体重(g)	术前体重(g)	肛温(℃)	术前 WBC($\times10^9$/L)	术前 RBCs($\times10^{12}$/L)	手术时间(min)
免疫抑制+9d RBCs 组	18	309±9.8	270±10.6	35.9±1.2	0.18±0.11	6.1±0.78	39.6±7.1
免疫抑制+1d RBCs 组	18	311±9.5	268±7.5	36.0±1.0	0.30±0.16	6.2±0.70	39.6±7.1
免疫抑制+NS 组	18	310±9.0	270±15	36.5±0.8	0.21±0.17	6.5±0.60	40.4±19

表 2　各实验组大鼠输血前用药情况

	输血前 5 d	输血前 1 d	输血前 0 d
环磷酰胺	75 mg/kg 腹腔注射	60 mg/kg 腹腔注射	
地塞米松	3 mg/kg 皮下注射	3 mg/kg 皮下注射	
戊巴比妥钠			40 mg/kg 腹腔注射

1.4　大鼠红细胞的采集和制备　将专门供血的 SPF 级正常雄性 SD 大鼠 36 只[(310±10)g],用 2% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,75% 医用酒精局部消毒后去毛,暴露颈静脉,置入 22 G 一次性无菌静脉留置针,用预先吸入 CPDA-1 保存液的一次性无菌注射器(按 CPDA-1∶全血=1∶7)抽取静脉血 4.2 mL 后立即注射至无菌负压采血管内,并注入适量空气[14],混匀并放入 4℃冰箱分别保存<24 h 或 9 d 后 4℃ 400 g 离心 15 min,最后在超净台内弃去血浆和白膜层以获得浓缩红细胞(Hct 70%-75%)[9]。

1.5　大肠杆菌的使用、培养和检测　1)将自制大肠杆菌 LB 培养基溶液(OD_{600}=1.882)置于 4℃冰箱保存 16 d,连续测定其溶液中细菌 OD_{600}值(表 3);2)使用前 4 h 取 500 μL 大肠杆菌溶液,1 500 g 离心 10 min 后弃上清,分别用等量 0.9%生理盐水吹打、洗涤、1 500 g 离心 10 min 弃上清 2 次,最后用等量 0.9%生理盐水混悬后保存于 4℃冰箱备用;3)标准 LB 培养基的制备:按照胰蛋白胨 2 g、酵母菌 1 g、氯化钠 2 g 加去离子水定容至 200 mL,于 121.3℃、103.4 kPa 高温灭菌 20 min 备用;4)血细菌培养和定量检测:在超净工作台,按照 10 μL(离心后血液)∶5 mL(LB 培养基)比例加入无菌试管内,于 37℃、200 次/min 全温振荡器内培养 15 h[15],用 2 个无菌离心管分别取上层培养液 1 mL,其中 1 管 1 500 g 离心 10 min 后取上清作为对照调零[16],调整紫外分光光度计 OD=600 nm,连续检测 3 次,并取其均值。

表 3　感染使用的大肠杆菌不同时间检测情况

	1 d	5 d	8 d	12 d	16 d
OD_{600}	1.882	1.704	1.705	1.720	1.717

1.6　血清铁浓度检测　1)血浆的制备:用固定器将大鼠竖直固定后暴露尾巴,75%酒精局部皮肤消毒后,用 22 G 采血

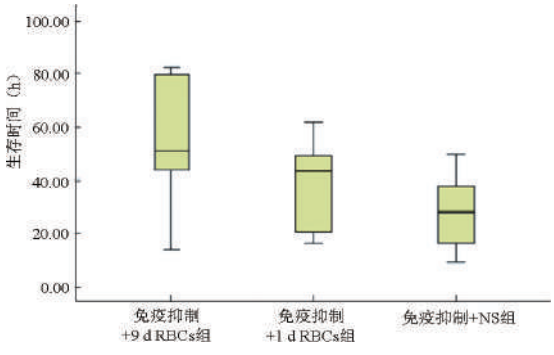
针和肝素化的离心管取血 1 mL 左右,1 000 g 离心 10 min 后取上层血浆,-20℃储存备用;2)检测前的准备:按照试剂说明书用 10%稀盐酸浸泡 96 孔板 24 h 后,用去离子水冲洗>10 次,拍干备用;3)将标准品、空白对照(各 2 孔)和全部标本添加完毕后,摇匀并室温静置 15 min,用酶标仪在波长 562 nm 处测定并计算血清铁离子浓度[17]。

1.7 放血、输血和细菌植入 实验大鼠用 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后,立即检测肛温;置于铺有一次性无菌手术垫巾的手术固定板上用橡皮筋固定四肢,在左下腹外侧动脉波动明显处以 75%酒精消毒局部皮肤并去毛,用镊子提起皮肤后剪开,钝性分离皮下组织并游离股静脉,两端用手术线拉紧,置入 22 G 一次性无菌静脉留置针缓慢放出至全身 20%血量(按 100 g 大鼠体重的总血量约为 6.5 mL)时,立即输注备好的浓缩红细胞或等量生理盐水,再注入备好的菌液 500 μL/只后,结扎近端和远端股静脉,逐层缝合手术口。观察记录并比较各组大鼠的症状和生存时间。

1.8 统计学分析 所有实验数据用 SPSS 17.0 统计软件处理;大鼠术后存活时间从手术结束开始计算,具体到小时;任意 2 组之间大鼠死亡率比较应用 *Fisher* 卡方检验;大鼠术后生存时间、24 h 血清铁离子浓度以及血培养的 OD_{600} 值均用"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示,采用单因素方差分析进行统计分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

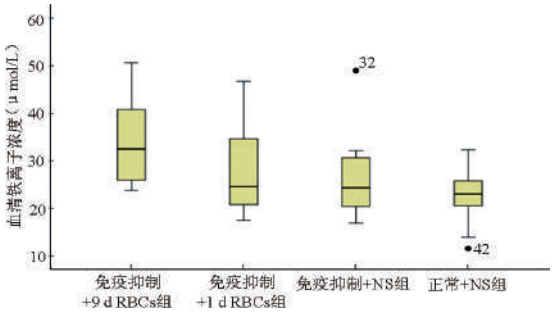
2.1 手术大鼠输注不同储存期红细胞后生存时间和死亡率比较 见图 1,表 4。



注:黑线为均值,箱体为 25%和 75%的四分位区间,两端为极值分布情况

图 1 各组死亡大鼠的平均生存时间

2.2 输注不同储存期红细胞大鼠术后 24 h 血清铁、血细菌及细菌计数比较 免疫抑制+9 d RBCs 组血清铁离子浓度较其他各组升高($P>0.05$);免疫抑制+1 d RBCs 组血培养测得的细菌浓度高于其他各组($P<0.05$)。免疫抑制+1 d RBCs 组回肠和肝组织病理切片细菌计数(个/×1 000 倍视野)较另外 2 个实验组和对照组大鼠升高($P<0.05$)(图 2-4,表 4)。



注:图中离散点 32 所代表的本肉眼可见有明显的溶血,而离散点 42 所代表的标本未见异常,多次检测所得结果差异不大

图 2 术后 24 h 血清铁离子浓度

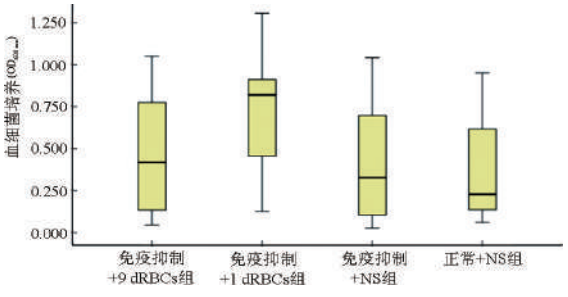
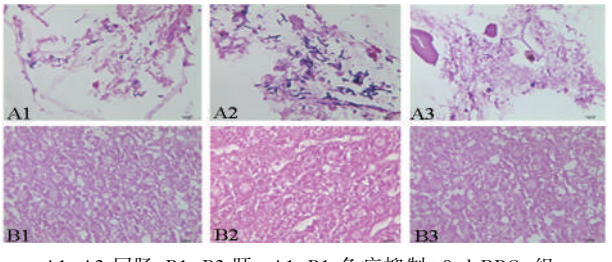


图 3 各组大鼠术后 24 h 取尾静脉血大肠杆菌培养 15 h 检测 OD 值



A1-A3 回肠;B1-B3 肝;A1、B1 免疫抑制+9 d RBCs 组;A2、B2 免疫抑制+1d RBCs 组,A3、B3 为免疫抑制+NS 组

图 4 术后 24 h 大鼠回肠和肝脏的病理切片

表 4 各组实验大鼠的基础数据分析

	死亡率(%)	死亡大鼠平均生存时间(h)	24 h 血浆铁离子水平(μmol/L)	血细菌培养(OD_{600})	回肠/肝细菌计数(1 000 倍视野)
免疫抑制+9 d RBCs	66.7(10/15)	55.6±21.3	34.1±9.8	0.510±0.340	肝 20±3,肠 44±9
免疫抑制+1 d RBCs	73.3(11/15)	38±16.6	28±10.2	0.790±0.281	肝 34±5,肠 101±7
免疫抑制+NS	60(9/15)	28.3±15.0	26.8±9.0	0.427±0.107	肝 15±1,肠 27±8
正常+NS	0(0/15)		22.4±5.9	0.349±0.069	

3 讨论

尽管回顾性临床研究的系统综述认为输注储存时间长的红细胞可能与患者死亡率的增加相关[3];但本组动物实验研究数据显示:输注不同储存时间的红细胞后,大肠杆菌感染的免疫抑制大鼠的死亡率并无明显变化;反而输注了储存期短红细胞大鼠死亡率有所增加(表 4)。这一结果不仅印证了 Ng 等[3]所作的 1 项对 8 个 RCTs 的 meta 分析结果,而且也证实了另 1 项对 13 个 RCTs 的 meta 分析得出的结论:相比储存期较长的红细胞,输新鲜红细胞使患者死亡率增加了 4%*o*[1]。另外,免疫抑制+9 d RBCs 组大鼠的平均生存时间明显长于免抑+1 d RBCs 组($P<0.05$)(图 1,表 4)。

多个对人、鼠红细胞储存损伤对比的研究发现:鼠红细胞储存 7 d 的损伤程度相当于人红细胞储存约 21 d[5];而鼠红细胞储存 14 d 时的损伤程度则相当于人红细胞储存 42 d[6]。因而以鼠类为研究对象的此类研究中均以储存 1 d 的鼠红细胞作为新鲜血,一般用储存 7 或 14 d 的鼠红细胞作为陈旧血。考虑到我国现行的红细胞保存期 35 d,以及红细胞储存不同时间可能产生的差异,所以我们分别以 1 和 9 d 作为鼠红细胞的储存期。以往不管研究对象是人还是鼠,都证明储存时间长的同种异体红细胞输注后引起的溶血均较新鲜红细胞明显[10-11]。本实验中输血 24 h 后血清铁水平,免疫抑制+9 d RBCs 组大鼠较免疫抑制+1 d RBCs 组也有一定的增高趋势($P>0.05$)(图 2,表 4),再次予以了证实。

本组实验数据显示:免疫抑制+1 d RBCs 组大鼠的血细菌培养结果明显高于免疫抑制+9 d RBCs 组、免疫抑制+NS 组和正常对照组($P<0.05$)(图 3,表 4),说明新鲜血液或更有利于细菌生长。已有多个研究显示,相比储存期长的红细胞,输新鲜红细胞使院内感染率增加 43%[18];而烧烫伤患者输注红细胞的储存时间与患者<30 d 的菌血症发生率呈负相关[19]。尽管疾病状态有可能不同,我们所做的病理分析结果却也证实:免疫抑制+1 d RBCs 组大鼠回肠和肝脏组织内大肠杆菌的数量明显高于免疫抑制+9 d RBCs 组(图 4)。这些结果解释了当血清铁>15 mol/L 时,对大肠杆菌的生长有抑制作用,且抑制作用的强度与其浓度成正比[10]。

对预实验的分析显示:1)给免疫抑制的大鼠放血 20%后,无论输注储存 1、9 d 红细胞还是 NS,均没有大鼠在术后<1 周死亡(每组 8 只)。这在一定程度上排除了放血和免疫抑制剂等因素对于死亡率的干扰。2)在选择放血和输血血管时,由于大鼠股静脉操作相对简单,创伤小,并且能够满足放血 20%的实验要求,所以我们排除了颈静脉和股动脉以及尾静脉。3)对于正常人来说,输注红细胞后溶血主要发生在输血后<1 h[20],但本组免疫抑制的大鼠在输注红细胞后血清铁峰值出现在 24 h 左右,其主要原因可能是环磷酰胺和地塞米松对于巨噬细胞的抑制作用所致[21]。

总之,本组实验数据未见输注不同储存时间红细胞对于大肠杆菌感染的免疫抑制大鼠死亡率有明显影响。但输注新鲜红细胞较陈旧红细胞明显促进了免疫抑制大鼠体内大肠杆菌的增值,并加速了大鼠的死亡。本实验的不足是未涉及对促进大肠杆菌增值的物质基础的探索,也没有对死亡大鼠的死因做病理解剖分析。由于红细胞输注是临床危重患者常用的治疗手段,所以有待更加深入而广泛的临床随机对照研究来证实红细胞储存损伤对于感染患者的影响。

参 考 文 献

[1] 王全立. 红细胞贮存损伤研究进展. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 515-519.

[2] 武世文, 文爱清. 红细胞储存损伤的研究进展. 中国输血杂志, 2013, 26(6): 593-595.

[3] Ng MS, Ng AS, Chan J, et al. Effects of packed red blood cell storage duration on post-transfusion clinical outcomes: a meta-analysis and systematic review. Intensive Care Med, 2015, 41(12): 2087-2097.

[4] Wang D, Sun J, Solomon SB, et al. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. Transfusion, 2012, 52(6): 1184-1195.

[5] Makley AT, Goodman MD, Friend LA, et al. Murine blood banking: characterization and comparisons to human blood. Shock, 2010, 34(1): 40-45.

[6] Gilson CR, Kraus TS, Hod EA, et al. A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival. Transfusion, 2009, 49(8): 1546-1553.

[7] d'Almeida MS, Jagger J, Duggan M, et al. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. Transfus Med, 2000, 10(4): 291-303.

[8] Hod EA, Brittenham GM, Billote GB, et al. Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron. Blood, 2011, 118(25): 6675-6682.

[9] Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood, 2010, 115(21): 4284-4292.

[10] 黄晴, 刘健. 不同血清钙、铁离子水平对大肠杆菌体外生长的影响. 中国热带医学, 2010, 10(5): 546-547.

[11] 吴峥嵘, 何明, 李渊. 产 ESBLs 大肠杆菌感染大鼠实验模型的建立与评价. 医学研究杂志,2012, 41(8): 45-47.

[12] Yan Y, Zhao Z, Wan H, et al. A novel fungus concentration-dependent rat model for acute invasive fungal rhinosinusitis: an experimental study. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 3856-3867.

[13] 李相玲, 白莎莎, 周联,等.环磷酰胺和地塞米松对小鼠肠道黏膜免疫抑制的比较.中国免疫学杂志, 2013(01): 39-42..

[14] Hu H, Xenocostas A, Chin-Yee N, et al. Transfusion of fresh but not old stored blood reduces infarct size and improves cardiac function after acute myocardial infarction in anemic rats. Crit Care Med, 2012, 40(3): 740-746.

[15] 王升智, 高波, 周智慧,等. 重组大肠杆菌 DH5a 生长曲线的测定. 黑龙江畜牧兽医, 2010, (21):96-98.

[16] 杨广. 液体培养条件下细菌浓度两种测定方法比较. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 71-72.

[17] 黄妍, 马怀安, 徐静,等. 血清铁测量参考方法的建立及方法学评价. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 453-457.

[18] Carson JL, Guyatt G, Heddle NM, et al..Clinical Practice Guidelines From the AABB. JAMA, 2016.

[19] Cartotto R, Yeo C, Camacho F, et al. Does the storage age of transfused blood affect outcome in burn patients? J Burn Care Res, 2014, 35(2): 186-197.

[20] Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NP, et al. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. Transfusion, 2008, 48(7): 1478-1485.

[21] 王兴旺, 陈敏珠, 徐叔云.环磷酰胺的免疫药理作用.中国病理生理杂志, 1991, 7(06): 664-665.

(2016-08-23 收稿,2017-03-07 修回)

本文编辑:蔡辉

· 论著 ·

干扰素刺激基因 15 抑制严重发热伴血小板减少综合征病毒复制的初步研究*

陈旭[1] 李世林[1] 曾沛斌[2△] 陈利民[1△]

(1.北京协和医学院 中国医学科学院 输血研究所,四川 成都 610052;2.四川大学 华西公共卫生学院)

摘要:目的 了解干扰素刺激基因 15(ISG15)对严重发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)复制的影响。**方法** 1)*ISG*15 基因克隆:通过逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 的方法,从 Hela 细胞中扩增获得 *ISG*15 基因,然后连接质粒形成 ISG15 表达载体。2)研究 *ISG*15 表达对 SFTSV 复制的影响:将 *ISG*15 质粒转染 Hela 细胞并过表达后,接种 SFTSV,随后用荧光定量 RT-PCR 的方法观察 *ISG*15 对 SFTSV 复制的影响。**结果** 成功构建 *ISG*15 表达质粒,并在 Hela 细胞内过表达;SFTSV 成功在 Hela 细胞内增殖,同时过表达 *ISG*15 可以抑制 SFTSV 的复制。**结论** 初步证明在 Hela 细胞中,过表达 *ISG*15 可以抑制 SFTSV 的复制,但具体机制还有待进一步探讨。

关键词:干扰性刺激基因 15;血小板减少综合征;严重发热;病毒复制;基因克隆;PCR,实时荧光定量

中图分类号:Q511 R511 R456 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0255-04

Study on the role of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) to inhibit the replication of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

CHEN Xu[1], *LI Shilin*[1], *ZENG Peibin*[2△], *CHEN Limin*[1△]. 1. *Institute of Blood Transfusion, Chinese Academic of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China*; 2. *West China School of Public Health, Sichuan University. Co-corresponding authors: ZENG Peibin, CHEN Limin*

Abstract: Objective To analyze the impact of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) on the replication of SFTSV. **Methods** To construct a plasmid with over-expression of ISG15, ISG15 gene was amplified from Hela cell using reverse transcription (RT)-PCR and then cloned in the plasmid. The effect of ISG15 expression on SFTSV replication was evaluated by transfecting over-expressed ISG15 plasmid on Hela cells. The effect of ISG15 over-expression on SFTSV replication was evaluated after infection with SFTSV using quantitative RT-PCR. **Results** ISG15 was expressed successfully in Hela cells. Hela cell supported the replication of SFTSV. The over-expression of ISG15 might inhibit the replication of SFTSV. **Conclusion** The over-expressed ISG15 can inhibit the replication of SFTSV. However, its mechanism needs to be further explored.

Key words: ISG15; SFTS; severe fever; virus replication; gene clone; PCR; real-time fluorescence quantification

严重发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopenia syndrome,SFTS)是由新近发现的布尼亚病毒(bunyavirus)严重发热伴血小板减少综合征病毒(SFTS virus,SFTSV)引起的传染性疾病,2009 年首次报道于中国,早期致死率高达 6.3%-30%[1-3]。SFTS 患者的临床特征主要是严重发热,血小板及白细胞减少,也会出现相关胃肠道症状;病程包括潜伏期、严重发热期、多器官衰竭期和恢复期等 4 个阶段[4-5]。SFTS 是 1 种经蜱传播的疾病,主要发生于每年 4-10 月,发病高峰期在 5-7 月[6];易感人群主要为长期劳作于蜱虫分布集中的湖北,河南等地区的山区丘陵地带、有较高暴露风险的农民[6]。SFTSV 可以通过血液传播,对其疫区的血液安全造成一定影响[7]。目前,SFTS 没有针对性的治疗手段,普遍使用利巴韦林做抗 SFTSV 治疗,但是效果不稳定[8-9]。干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene,ISGs)是由病毒刺激机体后,激活干扰素通路产生的一系列基因,它们对病毒的复制有一定的影响,有研究显示 *ISG*15 和 *ISG*16 能够促进 HCV 的复制,同时阻断干扰素(interferon, IFN)信号通路[10-11]。阐明 *ISGs* 与 SFTSV 复制的关系或有利于揭示 SFTSV 的致病机制和宿主先天免疫的关系,为此我们选取 *ISGs* 家族中广泛存在的 *ISG*15 作为研究对象,探讨其与 SFTSV 复制的关系,报道如下。

1 材料与方法

1.1 SFTSV 来源 2012 年 9 月,由河南省信阳市 154 医院采集自在该院就诊,临床症状为发热、血小板减少患者的全血 20(人)份(3 mL/份),通过干冰冷链运输至本实验室,放于-80℃保存;本实验室采用针对 SFTSV 的荧光定量试剂盒(批号 2015004,广州达安基因公司)测定其载量。本实验开始时间为 2015 年 3 月,距标本采集时间间隔为 2 年半左右。

1.2 主要试剂与仪器 人类宫颈癌传代细胞系 Hela 细胞(加拿大多伦多大学的马学忠博士惠赠),本实验室常规冻存于液氮罐内长期保存,每支冻存管(容积 1 mL)含细胞 1×10^7

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.010

*基金项目:国家自然科学基金(81400096),成都市科技局科技惠民技术研发项目(2015-HM01-00214-SF)和中国医学科学院医学与健康创新工程项目(2016-I2M-3-025) △共同通信作者:曾沛斌(1984.03-),男,理学博士,副研究员,主要从事血液安全与输血传染病病研究,zengpeibin@live.cn;陈利民(1967.02-),男,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事输血传染病和干扰素抗病毒治疗研究,电话:028-61648530,Email:lzmin_chen_99@yahoo.com

个;培养基(批号 NYK0997,美国 Hyclone 公司);胎牛血清(FBS,批号 1428478,美国 Gibco 公司);总 RNA 纯化试剂盒即 Trizol 试剂(批号 135304,美国英杰公司);逆转录试剂盒 IScript™ cDNA Synthesis Kit(批号 161-311,美国伯乐公司);琼脂糖(批号 0000337463,美国英杰公司);测序载体 p-TA2(批号 438300,日本 TOYOBO 公司);表达载体 pcDNA3.1 由实验室自己构建;蛋白免疫印迹所用 ISG15 抗体(批号 0001,美国赛信通公司);ECL 试剂(批号 1608902,美国密理博公司);RIPA 裂解液(批号 R0010,中国碧云天公司);SYBR Green 荧光定量试剂盒(批号 14931400,美国 Roche 公司)。细胞培养瓶(批号 430720,美国康宁公司);细胞培养箱(DRP-9082,美国赛默飞公司);离心机(Centrifuge5424R,德国艾本德公司);电泳仪(EPS301, 美国伯乐公司);化学发光成像仪(LASmini4000,美国通用公司)。本实验所有引物均由北京擎科公司合成。

1.3 Hela 细胞培养与 SFTSV 的接种　将 Hela 细胞 1 mL 中加入了 50 mL 10%FBS、5 mL 100 μg/mL 青霉素与 5 mL 100 μg/mL 链霉素培养 6 h,弃去培养基,重新加入新鲜培养基 12 mL,放入 37℃、5%CO_2 细胞培养箱内培养 2 d。以收集的 SFTSV 病毒液 5 mL 感染 Vero 细胞。采用荧光定量-PCR 方法(操作按试剂盒说明书)测定患者血浆及 SFTSV 感染 Vero 细胞上清液中的病毒载量(cp/mL)。接种 SFTSV 1.0 MOI 于 Hela 细胞中培养 48 h,收集细胞和上清液。

1.4 ISG15 过表达质粒的构建　将 Hela 细胞 2×10^5 个/mL 平铺在 24 孔板内,500 mL/孔,用 100 IU/mL 的 IFNα 刺激 Hela 细胞 24 h 后,用总 RNA 纯化试剂 Trizol 试剂收集细胞内总 RNA,使用逆转录试剂盒做逆转录获取相应的 cDNA,以便做 PCR,琼脂糖电泳获取相应 ISG15 片段(ISG15 的 GeneBank 登录号为 NM_005101, 扩增 *ISG*15 目的基因所需上游引物:5′-GAG AGG CAG CGA ACT CAT CT -3′,下游引物:5′-CTT CAG CTC TGA CAC CGA CA-3′),连接到测序载体 pTA2 上测序后,再将该 *ISG*15 目的片段连接到表达载体 pc-DNA3.1 上,用蛋白免疫印迹法验证 *ISG*15 蛋白表达。

1.5 Hela 细胞总蛋白质提取与蛋白免疫印迹试验　将构建好的 ISG15 质粒 4 μg 转染到 Hela 细胞内 48 h,将该 Hela 细胞用 RIPA 裂解液裂解 20 min,12 000 g 离心 15 min,获取蛋白质样品,用 BCA 法测定蛋白样品浓度。将蛋白质样品(25 μg/孔)上样到电泳凝胶内行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜到 PVDF 膜上用 5%脱脂牛奶 10 mL 封闭 2 h,用特异性 ISG15 抗体孵育、4℃过夜后,用 1×TTBS(1 L TTBS 含 8.77g NaCl, 2.42 g Tris, 1 g Tween, pH7.5)洗 3 次(10 min/次),再用 HRP 标记的二抗孵育 1 h,用 1×TTBS 洗 3 次(10 min/次)。采用化学发光法(将 ECL 试剂轻轻滴加到膜上),用化学发光成像仪显影。

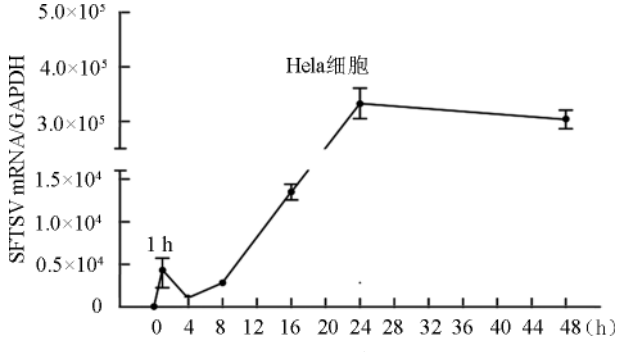
1.6 实时荧光定量 PCR 检测　*ISG*15 的表达以及 SFTSV 在 Hela 细胞内的扩增:将 ISG15 质粒 1 μg 转染到 24 孔细胞培养板内的 Hela 细胞里 48 h 后,用总 RNA 纯化试剂盒提取 Hela 细胞内 RNA,用逆转录试剂盒(First Strand cDNA Synthesis Kit)获取 cDNA,以实时荧光定量 PCR 检测 *ISG*15 在分子水平的表达,扩增 *ISG*15 所需荧光定量引物(上游:5′-CGCAGATCACCCAGAAGATT-3′,下游:5′-GCCCTTGTTATTCCTCACCA-3′),反应体系条件为 95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,20 个循环,20 μL 反应体系(1 μL cDNA,上下游引物各 1 μL,2×SYBR mix 10 μL,H_2O 7 μL);同时,用 SFTSV 1.0 MOI 感染 Hela 细胞,用 RNA 提取试剂盒收集不同时间点(0、4、8、16、24、48 h)细胞内总 RNA,再用实时荧光定量 PCR 检测 SFTSV 相对拷贝数(所用的引物为 SFTSV 编码的 *NS* 基因荧光定量引物,上游:5′-TTAGACCTCCTTCGGGAGGTCA-3′,下游:5′-TGGAGCATTTGCTCAG CGACAT-3′)。

1.7 实验分组　将 ISG15 质粒及表达载体 pcDNA3.1 分别转染到 Hela 细胞中:1)观察转染了 ISG15 质粒组相对于转染空载 pcDNA3.1 组(转染空载组)是否成功高表达(同时设未处理组);2)比较转染 ISG15 组和转染 pcDNA3.1 组对 SFTSV 复制的影响(同时设只感染病毒组为对照组)。所有试验每组均重复 3 次($n=3$)。

1.8 统计学分析　使用 Graphpad Prism5.0 软件,所有试验均重复 3 次,采用独立样本 t 检验对数据做比较分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

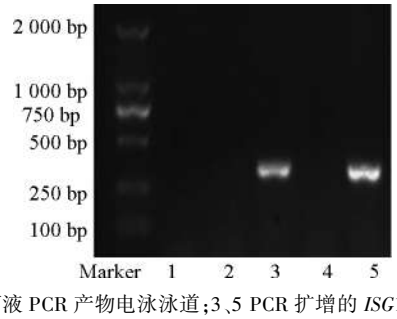
2.1 SFTSV 在 Hela 细胞内增殖　随着培养时间的推移,Hela 细胞内 SFTSV 拷贝数呈上升趋势,24 h 达到最高峰,随后直到 48 h 有所下降,但依然明显高于刚开始感染 SFTSV 时,说明 SFTSV 成功在 Hela 细胞内增殖(图 1)。



注:GAPDH 为内参蛋白

图 1　随培养时间推移 SFTSV 在 Hela 细胞内的增殖情况

2.2 *ISG*15 连接到表达载体　通过连接、转化、菌液扩增,将获取目的基因 *ISG*15 连接到表达载体 pc-DNA3.1 上,用获取的菌液作为模板,经 PCR 检测、琼脂糖凝胶电泳验证:*ISG*15 成功连接到表达载体上(图 2)。



1-5 菌液 PCR 产物电泳泳道;3、5 PCR 扩增的 *ISG*15 对应的条带为 400 bp 左右

图 2　菌液 PCR 扩增的 *ISG*15 RNA 电泳

2.3 目的基因 *ISG*15 的表达鉴定 将表达载体 pc-DNA3.1 上对应菌液中提取的 *ISG*15 质粒转染到 Hela 细胞内 48 h:1)提取细胞总 RNA,逆转录获取 cDNA,加入特异的 *ISG*15 荧光定量引物,实时荧光定量 PCR 显示 *ISG*15 在分子水平成功高表达(图 3);2)用相应的蛋白质裂解液获取蛋白质,蛋白免疫印迹试验点 ISG15 在蛋白水平成功高表达,且明显高于未处理组、转染空载组($P<0.01$)(图 4)。

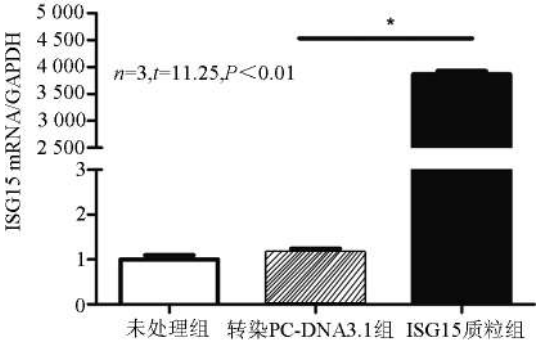


图 3 *ISG*15 的实时荧光定量 PCR 结果

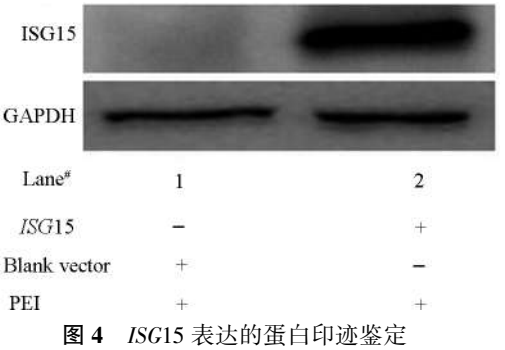


图 4 *ISG*15 表达的蛋白印迹鉴定

2.4 过表达 ISG15 抑制 SFTSV 的复制 将 *ISG*15 质粒转染到 Hela 细胞内,用 SFTSV 感染 Hela 细胞 24 h,收取细胞内总 RNA,逆转录获取 cDNA,实时 PCR 检测 SFTSV 表达水平:相对于转染空载 pc-DNA3.1 组,转染 ISG15 组中 SFTSV 拷贝数是呈明显下降趋势($t=4.467$,$P<0.05$),提示过表达 *ISG*15 抑制 SFTSV 的复制(图 5)。

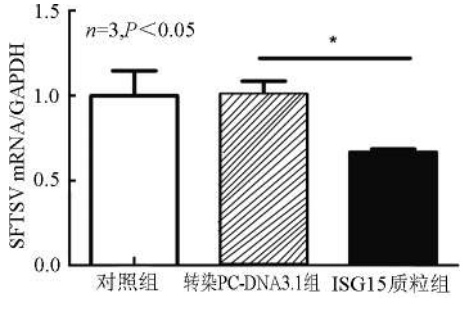


图 5 过表达 ISG15 抑制 SFTSV 的复制

3 讨论

SFTSV 是 1 种新发病毒,于 2009 年由中国人首次报道[1];在目前尚无特效抗病毒治疗药物的情况下,了解 SFTSV 的生活周期及其与宿主先天免疫之间的关系,有助于阐明 SFTSV 的致病机制,为抗病毒药物的研发提供支持。

据报道Ⅰ型 IFN 刺激宿主细胞后,IFNα/β 能和相应的 IFN 受体(IFNAR)结合,进而激活 Jak/STAT 信号途径,导致 *ISGs* 的大量产生,这些基因在抗病毒过程中发挥着重要作用;其中有很多 *ISGs* 的表达产物,如 *ISG*15、*MxA*、*OAS*3 被认为是抗病毒蛋白,对病毒的复制有抑制作用[12]。但也有研究者认为 HCV 和登革热病毒感染宿主后,*ISG*15 能够抵抗 IFN 的抗病毒效应,并促进病毒的复制和分泌[10-13]。总之这些研究都说明 *ISGs* 在机体对抗病毒感染的过程中发挥了重要作用,而且存在病毒特异性,对不同的病毒可以通过不同的途径影响病毒的生活周期。本实验数据首先证实了 Hela 细胞能够支持 SFTSV 的复制,随着细胞培养时间的推移,SFTSV 在细胞内的拷贝数逐渐上升,到细胞培养 24 h 达到最高峰,直到 48 h 拷贝数有所下降(图 1),这可能是随着 SFTSV 感染细胞时间的延长,细胞生长状态受到影响所致。

为了进一步弄清 *ISG*15 对 SFTSV 复制的影响,我们构建了 *ISG*15 高表达质粒,先通过菌液 PCR 成功验证了目的基因(*ISG*15)连接到表达载体上面,再从分别从 mRNA 水平与蛋白水平验证了其在 Hela 细胞内成功高表达(图 2-4);进而将该 *ISG*15 转染到 Hela 细胞内,观测到其表达的 *ISG*15 抑制了 SFTSV 的复制(图 5)。此前曾有报道登革热病毒编码的 VP24 蛋白能够直接和 STAT1 相互作用,进一步阻断 IFN 信号通路[13];并且登革热病毒还能够通过下调 STAT2 的水平进一步阻断 IFN 反应,它编码的 NS4B 蛋白在猴细胞内能够阻断 IFNα/β 和 IFNγ 信号转导途径[13-14]。我们的发现初步证明 ISG15 能够在 Hela 细胞中抑制 SFTSV 的复制。有研究显示 SFTSV 的 S 片段编码的 NSs 蛋白在宿主固有免疫中起到了重要作用[15];*ISG*15 可能通过与 SFTSV 编码的 NSs 蛋白相互作用进而抑制 SFTSV 的复制,这个推论还有待进一步探讨。

本实验初步阐明了 *ISG*15 能够抑制 SFTSV 的复制,为病毒逃逸宿主固有先天免疫的机制提供了一定的理论依据;但 *ISG*15 如何抑制 SFTSV 的复制、是否通过与病毒相关蛋白质的相互作用来抑制 SFTSV 的复制等问题尚需阐明。因此,筛选 *ISG*15 与病毒蛋白作用的靶点以及相关的功能研究是后续研究的 1 个重点方向,同时由于 IFN 在宿主固有免疫中的重要作用,*ISG*15 是否通过影响 IFN 信号通路抑制 SFTSV 的复制也值得更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1523-1532.

[2] Ohagi Y, Tamura S, Nakamoto, C. et al. Mild clinical course of severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in an elderly Japanese patient. Case Rep Infect Dis, 2014(2014): 918135. http://dx.doi.org/10.1155/2014/918135

[3] Zhang YZ, He YW, Dai YA, et al. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. Clin Infect Dis, 2012, 54(4): 527-533.

[4] Liu Q, He B, Huang SY, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis. Lancet Infect Dis, 2014, 14(8): 763-772.

[5] Wang LY, Cui N, Lu QB, et al. Severe fever with thrombocytope-

nia syndrome in children: a case report. BMC Infect Dis, 2014 (14): 366.
[6] Xu B, Liu L, Huang X, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002369. doi:10.1371/journal.ppat.1002369
[7] Wang Y, Deng B, Zhang J, et al. Person-to-person asymptomatic infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus through blood contact. Intern Med, 2014, 53(8): 903-906.
[8] Debing Y, Jochmans D, Neyts J. Intervention strategies for emerging viruses: use of antivirals. Curr Opin Virol, 2013, 3(2): 217-224.
[9] Tasdelen-Fisgin N, Ergonul O, Doganci L, et al. The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(8): 929-933.
[10] Chen L, Sun J, Meng L, et al. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. J Gen Virol, 2010, 91(2): 382-388.
[11] Chen S, Li S, Chen L. Interferon-inducible protein 6-16 (IFI-6-16, ISG16) promotes hepatitis C virus replication in vitro. J Med Virol, 2016, 88(1): 109-114.
[12] Schneider WM, Chevillotte MD, Rice, CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 513-545.
[13] Jones M, Davidson A, Hibbert L, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. J Virol, 2005, 79(9): 5414-5420.
[14] Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(24): 14333-14338.
[15] Ning YJ, Wang M, Deng M, et al. Viral suppression of innate immunity via spatial isolation of TBK1/IKKepsilon from mitochondrial antiviral platform. J Mol Cell Biol, 2014, 6(4): 324-337.

(2016-08-11 收稿,2017-02-19 修回)
本文编辑:蔡辉

· 论著 ·

厦门地区献血者戊肝病毒感染研究*

欧山海　林永财　谢金镇　倪宏英　宋秀宇△(厦门市中心血站,福建 厦门 361004)

摘要:目的　研究献血者戊肝病毒感染情况。**方法**　对厦门地区部分献血者标本进行戊肝病毒抗原(HEV-Ag)、抗体(HEV-IgG 和 HEV-IgM)检测,HEV-Ag 阳性和 HEV-IgM 阳性者进行 HEV 核酸检测,核酸检测阳性标本进行序列测定和基因型分析。**结果**　总共 6 263 人份献血者标本中,检出 1 447 例 HEV-IgG 阳性(1 447/6 263, 23.10%)、42 例 HEV-IgM 阳性(42/6 263,0.67%)、12 例 HEV-Ag 阳性(12/6 263,0.19%);12 例 HEV-Ag 阳性标本中检出 8 例 HEV 核酸阳性(8/6 263,0.13%),42 例 HEV-IgM 阳性标本中未检出 HEV 核酸阳性。8 例 HEV 核酸阳性有 4 例测序成功,分别为 2 例Ⅰ型、2 例Ⅳ型。随访显示大部分阳性献血者 HEV 病毒血症可较长时间持续存在。**结论**　厦门地区献血者戊肝病毒现症感染率较高,在今后的输血保障工作中应引起重视。HEV-IgM 检测对献血者 HEV 现症感染的检出率较低,而 HEV-Ag 的检出率较高且同 HEV 核酸检测具有较高的一致性,有望在血液筛查中得以推广。

关键词:戊肝病毒;献血者;戊肝抗原
中图分类号:R457.1　R446.6　R373.2^{+}1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2017)3-0258-04

Study of hepatitis E viral infection in blood donors in Xiamen, China　*OU Shanhai, LIN Yongcai, XIE Jinzhen, NI Hongying, SONG Xiuyu. Xiamen Blood Service, Xiamen* 361004, *China. Corresponding author: SONG Xiuyu*

Abstract: Objective　To study the prevalence of hepatitis E virus infection in blood donors. **Methods**　Blood samples from donors were tested for HEV-Ag, HEV-IgG and HEV-IgM. HEV-Ag or HEV-IgM positive samples were tested with HEV RNA. Phylogenetic analysis of HEV sequences obtained from HEV RNA positive samples were performed by direct sequencing. **Results**　1 447 (23.10%), 42 (0.67%) and 12 (0.19%) out of 6 263 samples were tested positive for HEV-IgG positive, HEV-IgM, and HEV-Ag, respectively. HEV RNA was detected in 8/12 (66.7%) of the HEV-Ag positive samples whereas 0 was detected in HEV-IgM positive samples. 4 of 8 HEV RNA positive samples were successfully sequenced, of which 2 were genotype I and 2 were genotype IV. Results from follow-up indicated chronic viremia in HEV infected donors. **Conclusion**　The study indicated a high prevalence of current HEV infection in Xiamen blood donors and attention should be paid in future work regarding blood safety. HEV-Ag test has a better coincidence rate with HEV RNA than HEV-IgM test, which has a better prospect of application in blood screening.

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.011
*基金项目:福建省医学科技创新课题(2015-CXB-51);△通信作者:宋秀宇(1963.02-),女,主任技师,教授,主要从事临床医学检验工作,电话:0592-2212453,Email:songxyxm@hotmail.com

Key words:hepatitis E virus; blood donor; HEV-Ag

戊型肝炎(简称戊肝)是由戊肝病毒(hepatitis E virus,HEV)感染引起的一类传染性疾病,主要经粪-口传播,可爆发性流行,发展中国家较为常见,孕妇患急性戊肝的死亡率可达 20%-25%[1]。HEV 虽然主要经消化道传播,但是经输血传播的途径近年来已被多次证实[2-5],从而在输血行业引起越来越多的关注;国内近年来已有数个地区对献血者 HEV 感染情况进行研究,然而现有研究往往存在一定的不足之处。我们知道,HEV RNA 检测因灵敏度高特异性强,一直被认为是戊肝感染诊断的金标准,血液中检出 HEV RNA 阳性则表明存在 HEV 病毒血症,是现症感染的指标之一;但是 HEV RNA 检测同时具有操作要求高、价格昂贵等特点,限制了其在血液筛查中的大规模应用,因此研究者往往采用了检测戊肝抗体(HEV-IgG、HEV-IgM)的方法[6-9]或者在 HEV-IgM 阳性基础上进行 HEV RNA 检测的方法[10-13]进行献血者 HEV 感染的研究。其中 HEV-IgG 是戊肝既往感染的指标,而 HEV-IgM 虽然是近期感染的指标,但通常具有 5 个月的拖尾期[1],不宜作为现症感染的指标,与 HEV RNA 的相关性也较弱,因此采用 HEV-IgM + HEV RNA 检测的方法,很可能导致部分 HEV 早期感染者的漏检,之前采用这种研究模式的地区包括本单位在内[13],HEV 病毒血症的检出比例往往较低甚至检测不到。而戊肝抗原检测是近年来新兴的 1 种戊肝现症感染检测方法,经过不断改良,灵敏度和特异性大大提高,和 HEV RNA 也有较高的一致性[1],有望应用于大规模的血液 HEV 筛查。本研究拟通过应用 HEV 抗原检测,结合戊肝抗体、RNA 检测,对本地区献血者 HEV 感染情况进行重新评估,以期对今后血液筛查策略的制定提供更为准确的数据。

1 材料与方法

1.1 标本 从 2013 年 12 月-2014 年 5 月间随机检测无偿献血者标本 6 263 人份。献血者年龄 18-60 岁,其中男性 4 133人份,女性 2 130 人份。所有入组标本均为血站各常规血液筛查指标合格者。

1.2 试剂与仪器 STAR 全自动加样系统(瑞士 Hamilton 公司),FAME 全自动酶免工作站(瑞士 Hamilton 公司),戊肝抗原检测试剂盒(北京万泰公司),戊肝抗体 IgG 检测试剂盒(北京万泰公司),戊肝抗体 IgM 检测试剂盒(北京万泰公司),病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(北京金麦格公司),一步法 RT-PCR 试剂盒 (北京金麦格公司),CFX96 Touch™荧光定量 PCR 检测系统(美国 Bio-rad 公司)。所有试剂均为批批检产品并在有效期内使用。

1.3 献血者戊肝抗原、抗体检测 6 263 人份献血者标本同时应用戊肝抗原检测试剂盒、戊肝抗体 IgG 检测试剂盒、戊肝抗体 IgM 检测试剂盒在全自动酶免工作站上进行检测,所有操作严格按照说明书要求完成,检测 OD 值大于试剂盒设定的 cutoff 值判为阳性。

1.4 献血者戊肝病毒核酸检测 戊肝抗原检测阳性或戊肝抗体 IgM 检测阳性的标本都进行了戊肝病毒的核酸检测。具体是:先采用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA,得到的病毒 RNA 采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行 real-time RT-PCR 检测,反应体系如下:RNA Template 5 μL,2×One-Step RT-PCR reaction buffer 12.5 μL,GenMagScript RT Enzyme MIX 1.5 μL,PrimerJVHEVF 0.5 μL,PrimerJVHEVR 0.5 μL,Probe JVHEVP 0.5 μL,补充 DEPC H_2O 使最终体积为 25 μL。用于 HEV 检测的 real-time PCR 引物和探针针对 HEV 病毒 ORF3 区域,其序列见表 1。

表 1 PCR 引物探针序列

名称	序列	HEV 基因组上位置
JVHEVF	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	5261-5278
JVHEVP	FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA	5283-5300
JVHEVR	AGGGGTTGGTTGGATGAA	5311-5328

PCR 检测程序:反转录 55℃ 15 min,预变性 95℃ 15 min,变性 95℃ 15 s,退火及延伸 55℃ 45 s,收集荧光 FAM,重新变性,共 45 个循环。以标准质粒制备标准定量曲线,以阈值(Ct 值)为参数,通过标准曲线计算相应的拷贝数(详见文献[14])。

1.5 序列扩增、测定与基因型分析 戊肝病毒核酸检测阳性标本送到厦门大学"分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室"进行序列扩增和测序。测序结果使用 DNASTAR 软件包处理后,与参考序列做同源性比对,各基因型参考序列从 GenBank 里选择代表性序列,分别为:Ⅰ型(A F051830、AF076239、AF185822、AF444002、AF444003、AF459438、M94177);Ⅱ型(M 74506);Ⅲ型(AF060668、AB074918、AF082843、AY 115488);Ⅳ型(AY 594199、AB080575、AB097812、AB108537、AB161719)。同源性分析采用 MEGA5.0 软件。

1.6 HEV 阳性献血者的随访检测 除去无法联系上或不愿配合者,共有 8 名 HEV 抗原阳性献血者在当次献血后间隔 1-3 个月左右得到至少 1 次随访,其中 1 名献血者得到 2 次随访。随访时采集标本,分别按前述方法进行 HEV 抗原、抗体和核酸检测。

2 结果

2.1 献血者 HEV 抗原抗体检测结果 总共 6 263 人份献血者标本中,检出 1 447 例 HEV-IgG 阳性(1 447/6 263,23.10%)、42 例 HEV-IgM 阳性(42/6 263,0.67%)、12 例 HEV-Ag 阳性(12/6 263,0.19%),见表 2。

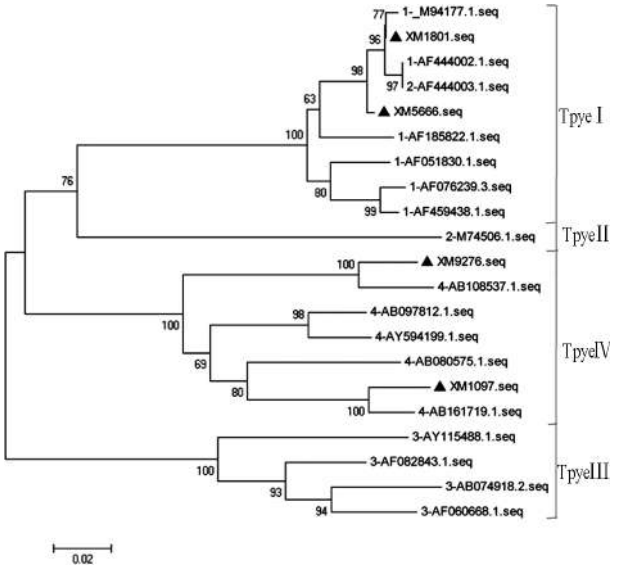
表 2 献血者 HEV 抗原抗体检测结果(n=6 263)

	n	阳性率(%)
HEV-Ag 阳性	12	0.19
HEV-IgM 阳性	42	0.67
HEV-IgG 阳性	1 447	23.10

2.2 献血者 HEV 核酸检测结果 12 例 HEV-Ag 阳性标本中检出 8 例 HEV 核酸阳性(8/6 263,0.13%);阳性献血者的基本信息如表 3 所示;42 例 HEV-IgM 阳性标本中未检出 HEV 核酸阳性。HEV 核酸阳性标本有 4 例测序成功,经基因分型结果 2 例为Ⅰ型、2 例为Ⅳ型(图 1)。

表 3　HEV-Ag 阳性献血者的基本情况

	性别	年龄(岁)	职业	学历	HEV-Ag (S/CO)	HEV RNA (copies/mL)
XM1251	男	46	公司职员	本科	2.8	2.78E+04
XM1801	女	38	家庭主妇	初中	2.9	4.47E+04
XM9686	男	35	公司职员	高中	4.4	4.89E+04
XM4589	男	33	医生	硕士	1.2	7.22E+04
XM1097	男	35	自由职业	高中	4.5	8.84E+04
XM2176	女	47	工人	高中	1.3	2.18E+05
XM5666	女	42	家庭主妇	小学	1.4	5.55E+05
XM9276	男	23	农民	高中	5.5	7.15E+05
XM1149	男	32	工人	高中	2.9	-
XM8624	女	35	个体户	高中	9.9	-
XM9726	男	33	农民	初中	1.2	-
XM3357	男	23	学生	本科	2.1	-



4 条序列分别标记为▲XM1801，▲XM5666，▲XM9276 及▲XM1097

图 1　献血者 HEV 序列的系统进化树分析

2.3　献血者随访结果　8 名献血者的随访检测结果如表 4 所示。需要指出的是，被随访的几名献血者在问及如何感染上 HEV、有无生食东西的习惯或有无疫区接触史等情况时，都表示没有或不清楚。

表 4　HEV 阳性献血者的随访检测结果

	日期(d)	HEV-Ag	HEV-IgM	HEV-IgG	HEV RNA (copies/mL)	ALT (IU/mL)
XM8624	1	+	-	-	-	<40
	19	+	-	-	1.41E+05	<40
	92	+	-	-	4.18E+05	<40
XM9686	1	+	-	-	4.89E+04	<40
	82	-	-	-	3.74E+06	<40
XM4589	1	+	-	-	7.22E+04	<40
	87	+	-	-	6.10E+05	<40
XM1097	1	+	-	-	8.84E+04	<40
	38	+	-	-	2.09E+04	<40
XM1801	1	+	-	-	4.47E+04	<40
	91	+	-	+	6.32E+04	<40
XM2176	1	+	-	-	2.18E+05	<40
	78	+	-	+	1.74E+05	<40
XM1149	1	+	-	-	-	<40
	75	+	-	+	-	<40
XM1251	1	+	-	-	2.78E+04	<40
	21	+	-	-	-	<40

3　讨论

正如前述，目前国内对献血者 HEV 感染获得的数据要么是献血者既往 HEV 的感染情况(HEV-IgG)，要么是近期感染情况(HEV-IgM)，而对于献血者现症感染的情况研究往往存在一定的不足之处：受限于操作和成本方面的考虑，研究者往往没能直接对研究对象全体进行 HEV RNA 检测，而是仅对 HEV-IgM 阳性的个体进行 HEV RNA 检测；但由于 HEV-IgM 同 HEV RNA 的阳性符合率较低，因此所获得的献血者病毒血症(HEV RNA 阳性)的比率往往较低，很可能存在漏检的情况，不能真实反应献血者现症感染的情况。比如绍兴市 50 例 HEV-IgM 阳性标本中仅检出 6 例 HEV RNA 阳性[10]；温州市 28 例 HEV-IgM 阳性标本中仅检出 3 例 HEV RNA 阳性[11]；盐城市 10 例 HEV-IgM 阳性标本中未检出 HEV RNA 阳性[12]。我们在以前的研究中 186 例 HEV-IgM 阳性标本中也仅检出 4 例 HEV RNA 阳性[13]，而在本次研究中 42 例 HEV-IgM 阳性无 1 例检出 HEV RNA 阳性。检出率低的可能原因一方面 HEV-IgM 阳转的时间本就晚于病毒复制的高峰时间，另一方面 HEV-IgM 通常具有 5 个月的拖尾期，在体内存在的时间较长，而此时体内的 HEV RNA 很可能已经消失，因而造成二者的阳性符合率较低。而对于血制品来说，血液中是否含有病毒以及含量多寡恰恰是我们更关心的问题，这要求我们用更准确的方法来评估。

本研究引入了 HEV-Ag 检测，正是 HEV 现症感染的指标之一。在前几年国内也有 2 家单位应用了 HEV-Ag 进行献血者的研究，其中沈阳 2 250 献血者中未检出 HEV-Ag 阳性[15]、瓦房店 1 万余献血者中仅检出 10 例阳性[16]。需要指出的是，他们所用的 HEV-Ag 试剂是旧版本的试剂(都是北京万泰公司生产，由厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室研发)，灵敏度和特异性都存在提高的空间。近期厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室对该试剂进行了改良，灵敏度和特异性都有一定的提升，与 HEV RNA 检测结果也有较高的一致性[14]。本研究中，我们应用改良后的 HEV-Ag 试剂，在 6 263 人份献血者标本中就检出 12 例 HEV-Ag 阳性，阳性率达 0.19%；12 例 HEV-Ag 阳性中检出 8 例 HEV RNA 阳性，阳性符合率达到 66.7%(8/12)，HEV RNA 的总体阳性率也高达 0.13%，远高于我们之前的研究数据 2/1 万(4/20 389)[13]。这些数据至少说明 2 个问题：1)本地区献血者的 HEV 现症感染率较高，尤其是 HEV 病毒血症 0.13%的比率与本地区献血者隐匿性乙肝感染的比例接近[17]，这在今后的输血安全上应引起重视，是否需要在献血者常规筛查中引入 HEV 的相关检测，有待相关部门进行综合考量；2) HEV RNA 与 HEV-Ag 检测的阳性符合率较高，与 HEV-IgM 的符合率较低。而 HEV-Ag 检测灵敏度高、特异性强且操作方便、成本较低，适合于 HEV 现症感染的大规模筛查，有望在今后得到推广应用。

关于献血者 HEV 病毒血症的持续时间问题，需要对献血者做较长时间段的随访检测，国内尚没有这方面的报道。国外有学者报道，英国献血者 HEV 病毒血症平均持续时间为 5-7 周[18]；德国献血者 HEV 病毒血症的持续时间在 20-

80 d[19];荷兰献血者 HEV 病毒血症的平均持续时间为 68.4 d[20]。本研究也对献血者进行了随访检测,但受限于各方面的因素,无论随访人数或者随访次数都有所欠缺。不过从现有获得的数据,我们至少能获得 2 点信息:1)我国献血人群 HEV 感染者体内的病毒血症也可能较长时间持续存在。8 例随访者中除 2 例转阴,其他 6 例都持续 RNA 阳性,而且持续时间普遍超过 80 d(有 2 例甚至超过 90 d),病毒血症持续时间甚至比前述国外报道的还长。这是否与 HEV 基因型有关(欧美国家主要是Ⅲ型)还不得而知,但是长期存在的病毒血症无疑加剧了输血传播风险(因献血者可能短时间内重复献血),给血液安全保障带来较大麻烦;2)献血者病毒血症的病毒拷贝数大多不高。研究显示急性戊肝患者体内的 HEV 病毒浓度往往大于 10^7 copies/mL,而本研究中献血者无论初次还是随访,病毒浓度都相对较低,波动于 10^4-10^5 之间,造成这种差异的原因还有待进一步的深入研究。

总之,本研究对厦门地区献血者 HEV 感染情况进行重新评估,发现本地区献血者存在较高的 HEV 现症感染率,而且献血者体内的病毒血症可较长时间持续存在,在今后的输血安全保障工作中应引起足够的重视。

(致谢:衷心感谢厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室的郑子峥、温桂平老师对于本研究给予的指导和帮助)

参 考 文 献

[1] 纪文芳,温桂平,唐自闽,等.戊型肝炎病毒感染实验室诊断方法研究进展.病毒学报,2016,32(3):385-392.

[2] Matsui T, Kang JH, Matsubayashi K,et al. Rare case of transfusion-transmitted hepatitis E from the blood of a donor infected with the hepatitis E virus genotype 3 indigenous to Japan: Viral dynamics from onset to recovery. Hepatol Res, 2015,45(6):698-704.

[3] Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, et al. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route.Transfusion,2008, 48(7):1368-1375.

[4] Boxall E, Herborn A, Kochethu G, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a ´nonhyperendemic´ country. Transfus Med,2006, 16(2):79-83.

[5] Colson P,Coze C,Gallian P,et al.Transfusion-associated hepatitis E, France. Emerg Infect Dis,2007,13(4):648-649.

[6] 杨琳琳,张燕.郑州地区无偿献血人员戊肝病毒感染情况调查分析.中国继续医学教育,2015,7(14):20-21.

[7] 聂冬梅,郑欣,许晓绚,等.深圳地区献血者戊型肝炎病毒感染流行病学调查.热带医学杂志, 2014,14(10):1336-1338.

[8] 王丽,王拥军,孟忠华,等.献血者中戊型肝炎病毒血清阳性率的研究.中国输血杂志, 2013,26(12):1237-1238.

[9] 高东英,彭耿,朱家明,等.献血员戊型肝炎病毒亚临床感染情况调查.中华肝脏病杂志, 2004,12(1):11-12.

[10] 桑列勇,庄培芬,傅立强,等.无偿献血人群戊型肝炎病毒感染情况调查.中华实验和临床病毒学杂志, 2007,21(1):29-31.

[11] 黄国永,王海虹,陈筱华,等.温州 3044 例献血者戊型肝炎病毒血症及基因分型的研究.北京医学, 2009,31(6):366-368.

[12] 葛健民,黄宏亮,贾红志.盐城地区献血者戊型肝炎病毒感染情况初步调查.中国输血杂志, 2015,28(5):562-563.

[13] 陈长荣,欧山海,张永昌,等.厦门地区无偿献血者 HEV 隐性感染情况及基因型分析.中国输血杂志,2009,22(5):383-384.

[14] Wen GP,Tang ZM,Yang FL,et al.A valuable antigen detection method for diagnosis of acute hepatitis E.J Clin Microbiol,2015,53 (3):782-788.

[15] 黄旭颖,李剑平.沈阳地区无偿献血者戊型肝炎病毒感染情况调查.中国输血杂志, 2012,25(9):870-871.

[16] 王新波,王晓东.瓦房店地区无偿献血者戊型肝炎病毒感染状况.临床输血与检验, 2009,11(2):148-151.

[17] 欧山海,林永财,倪宏英,等.闽南地区无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染研究.中国输血杂志, 2010,23(12):1033-1037.

[18] TedderRS,Tettmar KI,Su RB,et al.Virology, serology, and demography of hepatitis E viremic blood donors in South East England.Transfusion, 2016,56(6pt2):1529-1536.

[19] Vollmer T,Diekmann J,Eberhardt M,et al.Hepatitis E in blood donors: investigation of the natural course of asymptomatic infection, Germany,2011.Euro Surveill,2016,21(35): 30332.

[20] Hogema BM, Molier M, Sjerps M,et al. Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors. Transfusion, 2016,56(3):722-728.

(2016-10-28 收稿,2017-03-12 修回)

本文编辑:闻欣

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

不同照射剂量建立非清髓性移植物抗宿主病模型小鼠外周血 T 细胞消长性研究*

胡晓丽　李志强△(上海交通大学附属第六人民医院 输血科,上海 200233)

摘要:目的　探讨不同照射剂量建立非清髓性移植物抗宿主病(GVHD)模型小鼠外周血 T 细胞消长性变化,了解 GVHD 发病中 T 细胞的作用。**方法**　50 只 BALB/C 小鼠随机分成 5 组(10 只/组),包括对照组:不作任何处理;8 Gy 单纯照射(IRD)组:仅接受 8Gy 全身照射(TBI);7.5 GyIRD 组:仅接受 7.5 GyTBI;8 GyGVHD 组:接受 8 GyTBI 后<24 h 移植供鼠(10 只 C57BL/6)1×10^7个骨髓细胞和 2.5×10^7个脾细胞;7.5 GyGVHD 组:除接受 7.5 GyTBI,其他实验条件同 8 GyGVHD 组。观察 2 个 GVHD 组小鼠移植后 GVHD 临床症状,肝、肺与肠病理变化,嵌合率以及 T 细胞亚群变化。**结果**　8 与 7.5 GyGVHD 组小鼠移植后均为供鼠 H-2Kb 阳性细胞>90%。10、17、24 d 的 GVHD 评分,8 与 7.5 GyGVHD 组分别为 7.25±0.29 *vs* 5.63±0.25(P<0.01),5.00±0.41 *vs* 4.00±0.41(P<0.05),6.50±0.41 *vs* 8.00±0.41;GVHD 评分组内两两比较,除 8 GyGVHD 组 10 与 24 d 比较有较大变化(P<0.05)外,其余变化更明显(P<0.01)。$CD4^+/CD8^+$比值,8 与 7.5 GyGVHD 组分别为 0.42±0.03 *vs* 0.31±0.03,0.27±0.02 *vs* 0.19±0.01,0.43±0.03 *vs* 0.32±0.03(P<0.01);$CD4^+/CD8^+$比值组内两两比较,除 10 与 24 d 相近外,10 较 17 d 和 17 较 24 d 都变化明显(P<0.01)。$CD4^+CD25^+$T 比例,8 与 7.5 GyGVHD 组分别为 0.028 4±0.009 1 *vs* 0.020 9±0.004 9(P>0.05),0.014 0±0.004 3 *vs* 0.006 6±0.001 2(P<0.05),0.009 4±0.000 8 *vs* 0.005 1±0.000 7(P<0.01);组内两两比较,均为 17 与 24 d 相近,10 较 17 d 和 10 较 24 d 变化明显(P<0.01)。**结论**　非清髓性移植物抗宿主病模型小鼠发病过程中 $CD4^+$T 细胞起更重要的作用;随着小鼠移植后生存时间的延长,其体内的 $CD4^+CD25^+$T 细胞呈阶梯式下降,下降幅度与照射剂量呈负相关。

关键词:移植物抗宿主病,非清髓性;干细胞移植;骨髓细胞;脾细胞;动物模型;小鼠;T 细胞;照射剂量;移植时间

中图分类号:R457.1+2　R457.7　R331.1+4　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2017)3-0262-05

Growth and decline changes of T cells in peripheral blood of non-myeloablative graft versus host disease with different irradiation doses in murine model

Hu Xiaoli, LI Zhiqiang. Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Blood Transfusion Department, Shanghai 200233, *China. Corresponding: author: LI Zhiqiang*

Abstract: Objective　To investigate the possible role of T cells in peripheral blood of non-myeloablative graft versus host disease with different irradiation doses in murine model by testing their growth and decline changes. **Methods**　50 SPF grade BALB/C mice were randomly devided into 5 groups(10 mice/group). Control group: were with no treatment; 8 GyIRD group: only received 8 Gy Xray TBI(total body irradiation); 7.5 GyIRD group: only received 7.5 Gy Xray TBI; 8 GyGVHD group: were injected with bone marrow cells(1×10^7) and splenocytes(2.5×10^7) of donors(C57BL/6) via tail vein within 24 hours after receiving 8 Gy Xray TBI; 7.5 GyGVHD group: treatment is the same with 8 GyGVHD group except the 7.5 Gy irradiation dose. The clinical symptoms, histopathological analysis of the liver, lung and intestinal, the chimeric rate and growth and decline changes of T cell subsets were observed in both two GVHD groups after transplantation. **Results**　Allogeneic H-2Kb positive cells proportion was higher than 90% in both 7.5 GyGVHD group and 8 GyGVHD group after transplantation. The GVHD score in 8 GyGVHD group is higher than 7.5 GyGVHD group on the 10th, 17th, 24th day, 7.25±0.29 *vs* 5.63±0.25, 5.00±0.41 *vs* 4.00±0.41, 8.00±0.41 *vs* 6.50±0.41 respectively; Compared within the 7.5 Gy and 8 Gy GVHD group on the 10th, 17th, 24th day, differences are all P<0.01 except difference on 10 d *vs* 24 d within 8 GyGVHD group is P<0.05. Value of CD4/CD8 is compared between 8Gy and 7.5Gy GVHD group on the 10th, 17th, 24th day, 0.42±0.03 *vs* 0.31±0.03, 0.27±0.02 *vs* 0.19±0.01, 0.43±0.03 *vs* 0.32±0.03(P<0.01); Value of CD4/CD8 within the 7.5 Gy and 8 GyGVHD group ,10 d *vs* 24 d(P>0.05),10 d *vs* 17 d and 17 d *vs* 24 d(P<0.01). The propotion of the $CD4^+CD25^+$ between 8 Gy and 7.5 Gy GVHD group on the 10th, 17th, 24th day, 0.028 4±0.009 1 *vs* 0.020 9±0.004 9,(P>0.05), 0.014 0±0.004 3 *vs* 0.006 6±0.001 2, (P<0.05), 0.009 4±0.000 8 *vs* 0.005 1±0.000 7, (P<0.01) respectively; the proportion of $CD4^+$ $CD25^+$ within the 7.5 Gy and 8 GyGVHD group,17 d *vs* 24 d (P>0.05),10 d *vs* 17 d and 10 d

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.012

* 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目基金(13140902903),第四轮(2015-2017 年)上海市公共卫生重点建设项目《输血医学》(15GWZK0501);△通信作者:李志强(1962.09-),男,主任医师,教授,硕士研究生导师,主要从事血液病学与输血反应诊防研究,电话:021-24058722,Email:kcb039@126.com

vs 24 d ($P<0.01$). **Conclusion** $CD4^+$ cells in the pathogenesis of murine model of non-myeloablative graft versus host disease play a more pivotal role; as time prolonged, $CD4^+$ $CD25^+$ cell propotion decreased gradually, the decline was negatively correlated with the irradiation dose.

Key words: GVHD; non-myeloablative; stem cell transplantation; bone marrow cells; spleen cells; animal model; mice; T cells; irradiation dose; transplantation time

移植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD)是异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplant,AHSCT)后主要的并发症[1]。GVHD 是由供者免疫细胞攻击受者器官所致,主要由抗原提呈细胞(APCs)激活的效应 T 细胞和失调的细胞因子介导[2-3]。在 GVHD 发病过程中,供者的各 T 细胞亚群均发挥重要作用。我们以不同照射剂量建立非清髓性 GVHD 小鼠模型,探究受鼠外周血 T 细胞变化,旨在明确 GVHD 发病过程中各 T 细胞亚群消长情况,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物一般情况 供鼠 C57BL/6 小鼠 20 只,雄性,8-10(8±1)周龄,24-26(25±1) g;受鼠 BALB/C 小鼠 50 只,雌性,6-8(7±1)周龄,18-20(18±1)g;供受鼠均为 SPF 级[购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物号 SCXK(沪)2013-0016],动物饲养于本院动物房(SPF 级)[实验许可证号 SYXK(沪)2011-0128],鼠笼经高压灭菌,更换 3 次/周,标准颗粒饲料、饮用水、垫料等一切物品均无菌处理,移植前 1 周于饮水中加入庆大霉素(32 万 U/1 000 mL)。

1.2 主要仪器与试剂 低温高速离心机(Allegra X-22R),流式细胞仪(Navios)(美国 Beckman 公司);超净台(CA-920-2 型,上海上净净化设备有限公司);倒置显微镜(XDS-1B,重庆光电仪器有限公司); 6 M-Xray 直线加速器(ONCOR,德国 SIEMENS 公司)。RPMI(批号 AAK202835),PBS(批号 AAL208993)(美国 Hyclone 公司);硫酸庆大霉素注射液(批号 15040402,海南伊顺药业有限公司);红细胞裂解液(批号 66076821,上海碧云天生物技术有限公司);单克隆抗体 PC5.5-H2Kb(批号 B195007),FITC-CD3(批号 B207072),PE-CD4(批号 B196677),PC7-CD8(批号 B207880),APC-CD25(批号 B178867)(美国 Biolegend 公司)。

1.3 实验分组与各组实验方法的建立 受鼠 50 只 BALB/C 小鼠,其中 10 只不做任何处理,作为正常对照组。另 40 只小鼠于移植-1 d 行 6 M-XRay 直线加速器全身照射(TBI),20 只接受总剂量 7.5 Gy,20 只接受总剂量 8 Gy,剂量率均为 3 Gy/min;各取 10 只接受照射后不再进一步处理的小鼠分别作为 7.5 和 8 Gy 2 个 IRD 组;超净台内无菌条件下提取 C57BL/6 供鼠骨髓和脾细胞,将二者制备成混合细胞悬液,给余下各 10 只接受 7.5 、8 Gy 照射后<24 h 的小鼠分别经尾静脉输注 0.3 mL/只,混合细胞悬液中含骨髓细胞数 1×10^7 个、脾细胞数 2.5×10^7 个,定为 7.5 和 8 Gy 2 个 GVHD 组。

1.4 小鼠 GVHD 模型的建立 按照文献[4]方法,临床评分由体重、姿势、活动度、皮毛纹理、皮肤完整性 5 项分值相加组成,每项指标按正常、轻度、重度改变分别评定为 0、1、2 分。移植后每日观察受鼠进食和精神情况,有无体重下降、活动度下降、弓背、竖毛、脱毛、腹泻等表现;每日称量体质量直至实验结束,记录生存情况。

1.5 小鼠各器官 GVHD 病理变化 解剖出现典型 GVHD 的小鼠,取肺、肝、肠等组织标本,用 10% 甲醛固定,常规包埋、切片、HE 染色后显微镜下做形态学观察。

1.6 流式细胞术检测嵌合率及外周血 T 细胞亚群 移植后 10、17、24 d 经尾静脉取小鼠外周血 40 μL/只,加入单克隆抗体 PC5.5-H2Kb、FITC-CD3、PE-CD4、PC7-CD8、APC-CD25 各 1 μL,4℃避光孵育 1 h,加入红细胞裂解液 1 mL,冰上静置 5-10 min,500 g 离心 3 min 弃上清,PBS 洗涤 2 次,上流式细胞仪检测。

1.7 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件对数据做统计分析,计量资料以"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示,2 组组间比较采用 t 检验或组内多个时间点比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验小鼠的临床表现

2.1.1 临床症状 7.5 与 8 Gy 2 个 IRD 组小鼠均未出现弓背、竖毛等 GVHD 症状;7.5 与 8 Gy 2 个 GVHD 组小鼠移植后 10 d 左右开始出现 GVHD 症状,主要为严重竖毛(图 1-A),17 d 左右竖毛好转,GVHD 评分略下降(图 1-B),24 d 左右陆续出现活动度下降、弓背、轻度脱毛,临死前 1 周左右出现腹泻、肛门红肿、大片脱毛等(图 1-C、D、E、F)。7.5 与 8 Gy 2 个 GVHD 组小鼠移植后 10、17、24 d,2 组组内 GVHD 评分先升后复降;移植后 10 、17、24 d,GVHD 评分 8 GyGVHD 组均高于 7.5 GyGVHD 组(表 1)。

2.1.2 体重变化 7.5 与 8 Gy 2 个 IRD 组小鼠照射初期体重出现下降而后逐渐上升恢复至移植前水平; 7.5 与 8 Gy 2 个 GVHD 组小鼠自移植后体重逐渐下降直至死亡(图 2)

2.1.3 生存率情况 7.5 与 8 Gy 2 个 IRD 组小鼠均长期存活;7.5 与 8 Gy 2 个 GVHD 组小鼠随着体重下降,陆续死亡,生存时间(d)分别为 44.50±8.06 与 28.00±7.71($t=-4.566$, $P<0.05$)(图 3)。

2.2 组织病理改变 各靶器官损伤情况,8 GyGVHD 组小鼠较 7.5 GyGVHD 组更加严重,炎性细胞浸润更明显(图 4)。

A 小鼠出现弓背、竖毛、少动;B 精神状态及弓背好转;C、D、E、F 小鼠后期表现明显弓背、脱毛、腹泻、肛门红肿等

图 1 7.5 与 8 Gy IRD 2 组小鼠 GVHD 症状

表 1　7.5 与 8 Gy GVHD 2 组小鼠 GVHD 评分

	10 d	17 d	24 d
7.5 GyGVHD 组	5.63±0.25**	4.00±0.41*	6.50±0.41**
8 GyGVHD 组	7.25±0.29	5.00±0.41	8.00±0.41

*与 8 GyGVHD 组比较，$t=3.46$，$P<0.05$；**t 值分别为 8.51，5.20，$P<0.01$；2 个组组内 10、17、24 d 两两比较，F 值分别为 70.20，48.79，除 8 Gy GVHD 组 10 与 24 d（$P<0.05$）外，其余均为 $P<0.01$

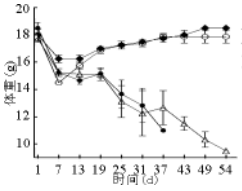


图 2　小鼠体重变化

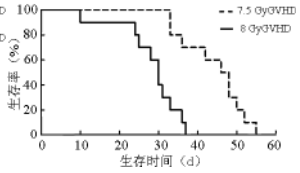


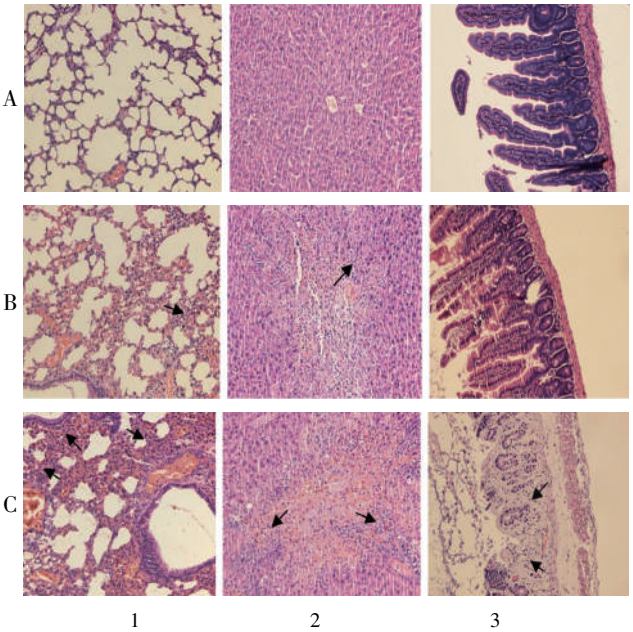
图 3　小鼠生存曲线

2.2.1　肺组织 GVHD 病理学表现　正常组：小鼠肺泡腔清晰，肺组织结构完好，无炎性细胞浸润（图 4-A1）；7.5 GyGVHD 组：小鼠肺泡壁可见炎性细胞浸润，有充血（图 4-B1）；8 GyGVHD 组：可见大量炎性细胞浸润，肺泡腔因间质严重充血明显压缩（图 4-C1）。

2.2.2　肝脏组织 GVHD 病理学表现　正常对照组：小鼠肝脏结构清晰，无炎症细胞浸润（图 4-A2）；7.5 GyGVHD 组：小鼠肝实质区炎性细胞浸润伴出血、结构破坏（图 4-B2）；8 GyGVHD 组：小鼠炎性细胞浸润，伴细胞坏死（图 4-C2）。

2.2.3　肠组织 GVHD 病理学表现　正常对照组：小鼠肠结构完整，无炎症细胞浸润（图 4-A3）；7.5 GyGVHD 组：小鼠组织结构模糊，炎细胞浸润（图 4-B3）；8 GyGVHD 组：小鼠肠组织结构破坏明显，模糊不清（图 4-C3）。

2.3　流式细胞术检测嵌合率　7.5 与 8 GyGVHD 2 组小鼠均为外周血中 H-2Kb 阳性细胞＞90%，呈完全嵌合状态（图 5）。



A 正常组小鼠；B 7.5 GyGVHD 组小鼠；C 8 GyGVHD 组小鼠；1 肺组织；2 肝组织；3 肠组织

图 4　各组小鼠组织病理变化表现（HE 染色）

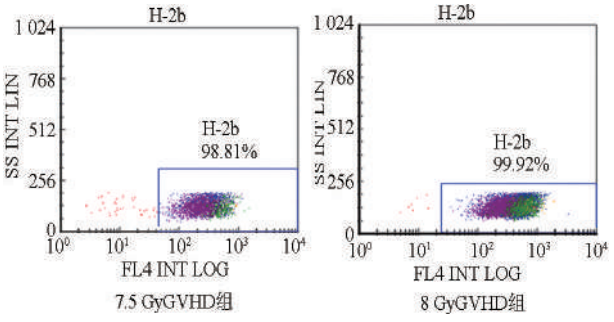


图 5　7.5 与 8GyGVHD 组小鼠嵌合率检测

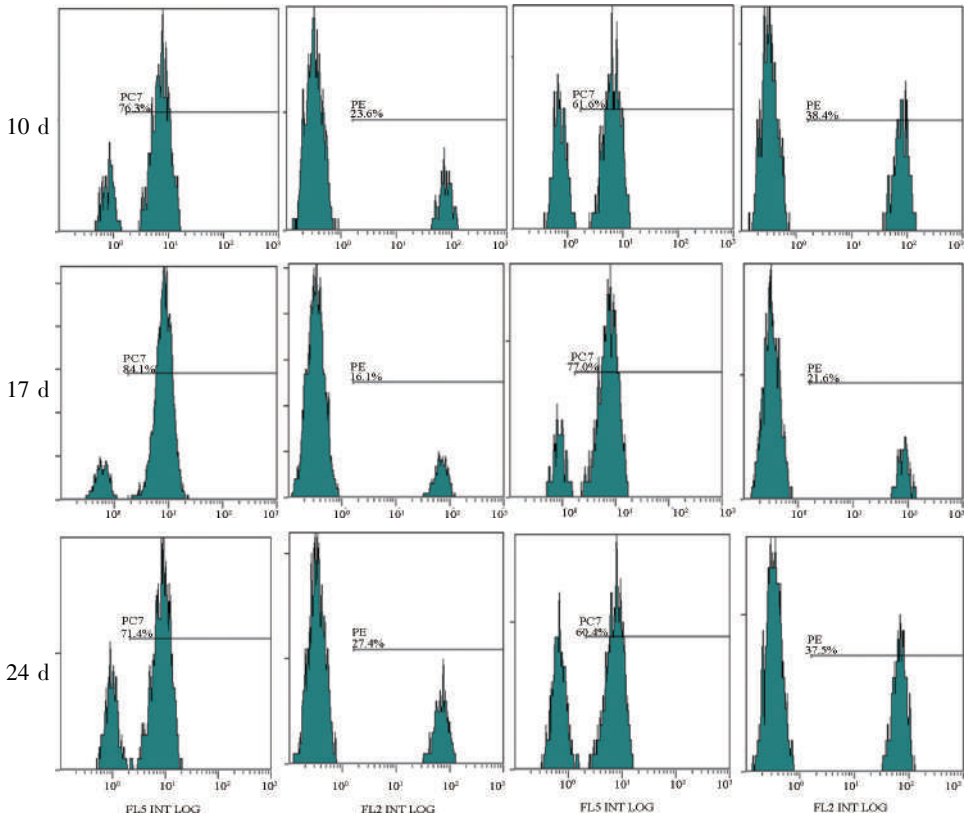
2.4　流式细胞术检测 T 细胞亚群变化

2.4.1　$CD4^+/CD8^+$ 比值变化　7.5 与 8 GyGVHD 2 组小鼠外周血 T 细胞中 $CD4^+/CD8^+$ 比值与正常对照组小鼠相比，出现比例倒置现象；8 GyGVHD 组在各检测时间均较 7.5 GyGVHD 组高，2 组均随着小鼠生存期的延长，$CD4^+/CD8^+$ 比值先升又复降至起始检测时的水平（图 6，表 2）。

2.4.2　$CD4^+CD25^+$T 细胞比例变化　8 GyGVHD 组小鼠在 17、24 d 时 $CD4^+CD25^+$T 细胞比例均较 7.5 GyGVHD 组小鼠高，10 d 时 2 组无明显变化；2 组小鼠随着生存期的延长，$CD4^+CD25^+$T 细胞比例均呈阶梯式下降，均从 10–17 d 时下降明显（$P<0.01$），其后略有下降（$P>0.05$）（图 7，表 2）。

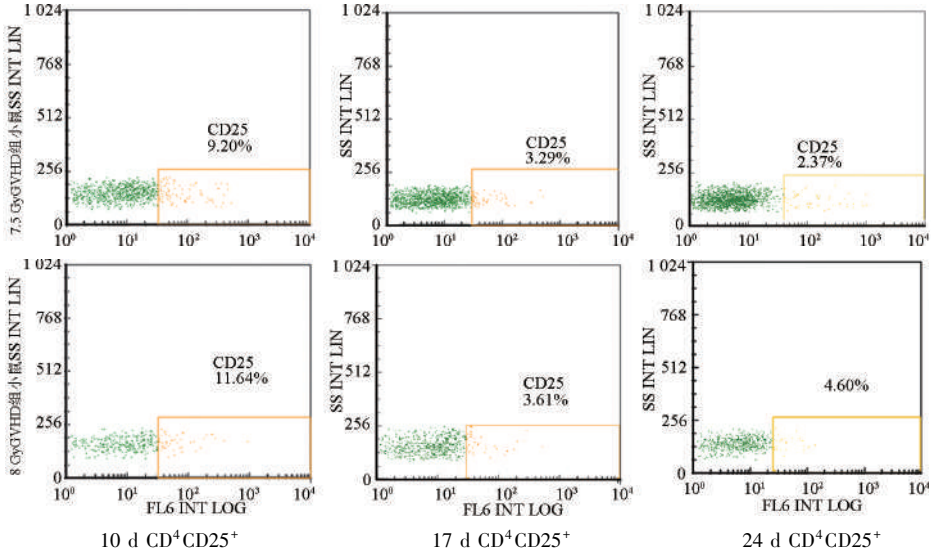
3　讨论

在 AHSCT 过程中消除供者骨髓中 T 细胞活性可以降低受者 GVHD 发生率，但移植失败以及肿瘤复发比例也相应升高[5]。供者 T 细胞介导 GVHD 同时亦介导了移植物抗肿瘤（graft versus tumor，GVT）效应，选择性抑制 T 细胞 GVHD 效应保留 GVL 作用一直是国内外研究热点。因此探究 GVHD 发病中各 T 细胞作用具有重要意义。至今已见诸报道的绝大多数 GVHD 小鼠模型为 $CD4^+$T 细胞介导免疫排斥[6-7]，但也有研究认为 $CD4^+$T 与 $CD8^+$T 细胞一道均在 GVHD 发病过程中起作用[8]。另外，不同品系小鼠建立的 GVHD 模型中起主要作用的 T 细胞也不同。在 C3H.SW 小鼠为供鼠、C57BL/6 为受鼠建立的 GVHD 模型中，只有 $CD8^+$T 细胞介导了 GVHD 的靶器官如皮肤组织、肝组织中炎症反应[9]；而在 B10.D2 小鼠移植到 DBA/2 小鼠的 GVHD 模型中，则为 $CD4^+$T 及少量 $CD8^+$T 细胞介导了 GVHD 的靶器官如皮肤组织、肝组织以及结肠组织的炎症反应[9]。在 $CD4^+$T 细胞中有 1 个调节性 T 细胞（Treg 细胞）群，它们在维持机体免疫稳态中起关键作用[10]。Treg 细胞在 AHSCT 后 GVHD 免疫功能障碍中是否起关键作用仍具争议[11]；有学者认为 Treg 细胞可预防 GVHD，故体外扩增 Treg 细胞用于 GVHD 治疗[12]；但最终因 Treg 细胞体外扩增数量少且性状难以维持，限制了其临床应用[13]；另有研究显示 GVHD 患者的 Treg 细胞较未发病患者并未下降，反而升高，但其机制尚不清楚[1]。



7.5 GyGVHD 组小鼠 $CD8^+$　　7.5 GyGVHD 组小鼠 $CD4^+$　　8 GyGVHD 组小鼠 $CD8^+$　　8 GyGVHD 组小鼠 $CD4^+$

图 6　7.5 与 GyGVHD 2 组小鼠不同时间 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 比例部分流式检测



10 d CD^4CD25^+　　17 d CD^4CD25^+　　24 d CD^4CD25^+

图 7　7.5 与 8 GyGVHD 2 组小鼠不同时间 $CD4^+CD25^+$ 比例部分流式检测

表 2　各组小鼠移植后不同时间外周血 T 淋巴细胞亚群比例　　(%)

	n	检测时间(d)	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD4^+/CD8^+$	$CD4^+CD25^+$
7.5 GyGVHD 组	10	10	75.68±1.23	23.53±1.55	0.31±0.03*	0.020 9±0.004 9
		17	83.20±0.70	16.05±0.83	0.19±0.01*	0.006 6±0.001 2△
		24	74.50±1.96	23.65±2.43	0.32±0.03*	0.005 1±0.000 7△△
8 GyGVHD 组	10	10	67.78±1.95	28.68±1.38	0.42±0.03	0.028 4±0.009 1
		17	77.68±1.76	20.60±1.57	0.27±0.02	0.014 0±0.004 3
		24	68.03±2.04	29.05±1.65	0.43±0.03	0.009 4±0.000 8
正常对照组	10	–	22.45±1.61	73.75±2.39	3.30±0.32	–

* 与 8 GyGVHD 组比较，t 值分别为 5.61、5.66、4.61，$P<0.01$；2 个组内 $CD4^+/CD8^+$，10 与 17 d、17 与 24 d 比较，F 值 38.49、31.52，$P<0.01$；△与 8 GyGVHD 组比较，$t=3.31$，$P<0.05$；△△与 8 GyGVHD 组比较，$t=7.79$，$P<0.01$；2 个组内 $CD4^+CD25^+$，10 与 17 d、10 与 24 d 比较，F 值 11.47、34.43，$P<0.01$

在本实验中,我们建立了 7.5 与 8 Gy 2 个 GVHD 组模型小鼠,并设立 2 个对应的 IRD 组。7.5 与 8 Gy2 个 IRD 组小鼠在初期体重下降后均又逐渐恢复且长期存活(图 2),说明我们选择的照射剂量均为亚致死性,即非清髓性。2 组 GVHD 小鼠均分别成功植入了骨髓细胞 1×10^7 个/只和脾细胞 2.5×10^7 个/只,而且嵌合率>90%(图 5),临床表现符合 GVHD 特点[4]。2 组不同照射剂量处理的 GVHD 小鼠与正常对照组小鼠相比,$CD4^+/CD8^+$ 在移植后早期都发生了倒置现象,均先下降后上升,相同时间段内 GVHD 评分也先下降后上升(图 6,表 2),证实 $CD4^+/CD8^+$ 随着随着移植受者临床症状减轻而下降、加重而上升,呈正相关。2 组不同照射剂量的 GVHD 小鼠组间,移植后 10、17 及 24 d,8 Gy 组较 7.5 Gy 组 $CD4^+$T 细胞比例高而 $CD8^+$T 细胞比例低,即 $CD4^+/CD8^+$ 在临床症状严重的 8 GyGVHD 组小鼠中明显增大($P<0.01$)(图 6,表 2)。随着小鼠存活时间的延长,2 组不同照射剂量的 GVHD 小鼠的 $CD4^+CD25^+$T 细胞比例均呈阶梯式下降至最小,8 Gy 组比 7.5 Gy 组 $CD4^+CD25^+$T 下降幅度更慢($P<0.05$ 或<0.01),下降幅度与照射剂量呈负相关(图 6,表 2)。

总之,通过对 7.5 和 8Gy2 个 GVHD 模型小鼠组内及组间 T 细胞亚群与小鼠移植后临床症状的观察、比较,我们认为 $CD4^+$T 细胞在 GVHD 发病过程中起更重要的作用,随着受者移植后时间的延长,$CD4^+CD25^+$T 细胞呈阶梯式下降,下降幅度与照射剂量呈负相关。本实验研究了不同照射剂量的 GVHD 模型小鼠外周血 T 细胞的变化,明确了 GVHD 发病进程中 T 细胞的消长性,但实验没有涉及机制研究。下一步我们将进一步研究 CD4+T 细胞在 GVHD 发病过程中的主要机制,为临床非清髓性造血干细胞移植后发生 GVHD 的患者的治疗提供依据。

参 考 文 献

[1] Sung AD, Chao NJ. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(1):25-32.

[2] Teshima T. JAK inhibitors: a home run for GVHD patients? Blood, 2014, 123(24):3691-3693.

[3] Fiuzaluces C, Garatachea N, Simpson R J, et al. Understanding graft-versus-host disease. Preliminary findings regarding the effects of exercise in affected patients. Exerc Immunol Rev, 2015, 21(1):80-112.

[4] Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et a1. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I.The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood, 1996, 88(8):3230-3239.

[5] Yang YG, Sergio JJ, Pearson DA, et al. Interleukin-12 preserves the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-versus-host disease in mice. Blood, 1997, 90(11):4651-4660.

[6] Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, et al. Effector $CD4^+$ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. Blood, 2011, 117(12):3268-3276.

[7] Meguro A, Ozaki K, Oh I, et al. IL-21 is critical for GVHD in a mouse model.Bone Marrow Transplant, 2009, 45(4):723-729.

[8] Podgorny P J, Liu Y, Dharmani-Khan P, et al. Immune cell subset counts associated with graft-versus-host disease.Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(4):450-462.

[9] Murphy GF, Whitaker D, Sprent J, et al. Characterization of target injury of murine acute graft-versus-host disease directed to multiple minor histocompatibility antigens elicited by either $CD4^+$ or $CD8^+$ effector cells.Am J Pathol, 1991, 138(4):983-990.

[10] Zheng SG, Gu J, Chen D, et al. TGF-β-induced $CD4^+$ $Foxp3^+$ T cells attenuate acute graft-verse-host disease via suppressing expansion and killing of effector $CD8^+$ cells. J Immunol, 2014, 193(7):3388-3397

[11] Pang N, Duan X, Jiang M, et al. Reconstitution and clinical significance of T cell subsets in the early stage after related HLA-mismatched peripheral blood hematopoietic SCT without T-cell depletion in vitro.Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8):8892-8901.

[12] Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A,et al. Critical role for CCR5 in the function of donor $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. Blood, 2005, 106(9):3300-3307.

[13] Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human $CD4^+$ $CD25^+$, regulatory T cells upon repetitive in vitro, stimulation. Eur J Immunol, 2009, 39(4):1088-1097.

(2016-09-24 收稿,2017-03-16 修回)

本文编辑:蔡辉

欢 迎 赐 稿　　欢 迎 订 阅

《中国输血杂志》邮发代号:62-186

· 论著 ·

江苏地区汉族人群 HLA-G 3′非翻译区基因多态性和单体型分析*

邵雷 林红△(江苏省血液中心,江苏 南京 210042)

摘要:目的 调查江苏地区合格献血者 *HLA-G* 3′非编码区(3′-UTR)基因多态性和单体型特征。**方法** 提取江苏地区合格献血者全血基因组 DNA,PCR 方法扩增 *HLA-G* 3′UTR,利用基因测序对多态性位点进行基因分型,直接计算基因频率和基因型频率,利用 SHEsis 软件分析单体型。**结果** 江苏地区 88 名献血者 *HLA-G* 3′UTR 共有 8 个多态性位点:+2960 14 bp 插入/缺失,+3003*C/T*, +3010*C/G*,+3027*A/C*, +3035*C/T*, +3142*C/G*,+3187*A/G*, +3196*C/G*,其基因频率及基因型频率均符合 Hardy-weinberg 平衡定律(P>0.05);各位点紧密连锁(D′>0.7),SHEsis 软件分析求得频率>0.03 的单体型有 6 种,其中单体型 UTR-3(DTCCCG AC,频率=0.256)最为常见。**结论** 本研究分析了江苏地区合格献血者 *HLA-G* 3′UTR 的 8 个多态性位点、连锁不平衡和单体型频率的特征,对于研究本地区 *HLA-G* 的基因多态性以及与相关疾病的关系提供了重要依据。

关键词:合格献血者;人类白细胞抗原-G;3′非编码区;多态性;基因型;单体型

中图分类号:R457.1^{+}1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0267-04

Polymorphisms and haplotypes of human leukocyte antigen G,(HLA-G) 3′-UTR in Jiangsu Han population *SHAO Lei, LIN Hong. Jiangsu Province Blood Center, Nanjing* 210042, *China. Corresponding author: LIN Hong*

Abstract Objective To investigate the genetic polymorphisms of human leukocyte antigen-G 3′ untranslated region (3′-UTR) and analyze the characteristics of genotypes and haplotypes in eligible blood donors in Jiangsu. **Methods** Genomic DNA was extracted from 88 eligible blood donors. HLA-G 3′UTR gene was amplified by PCR and sequenced. The polymorphism sites were determined by gene sequencing. Gene and genotype frequencies were calculated directly and the characteristics of haplotypes were analyzed by SHEsis software. **Results** There were 8 polymorphism sites of HLA-G 3′UTR in 88 donors In Jiangsu: + 2 960 14 bp Ins/Del, + 3 003 C/T, + 3 010 C/G, + 3 027 A/C, + 3 035 C/T, + 3 142 C/G, + 3 187 A/G and + 3 196 C/G. All the alleles and genotypes frequencies were in accord with Hardy-Weinberg equilibrium (P>0.05). Each locus linked closely (D′>0.7). A total of 6 haplotypes with a frequency of over 0.03 were found. The most common haplotype was UTR-3 (DTCCCGAC, f=0.256). **Conclusion** This study analyzes the gene polymorphisms, linkage disequilibrium and the characteristics of haplotypes in Jiangsu blood donors. It provides an important basis for studying gene polymorphisms of HLA-G and the relationship among related diseases in this region.

Key words: eligible blood donors; HLA-G; 3′UTR; polymorphism; genotype; haplotype.

人类白细胞抗原 HLA G(human leukocyte antigen G HLA-G)属于人类主要组织相容性复合体非经典型Ⅰ类分子(Ⅰb),位于 6 号染色体的短臂,是由 Geraghty 和他的同事在 1987 年第 1 次提出[1]。*HLA-G* 基因结构与其他经典型Ⅰ类(Ⅰa)基因类似,但在不同人群中的表达十分保守,呈现出限制性组织表达的模式[2]。HLA-G 分子首先是在胎盘表面滋养层上被发现,可能参与孕期母体的免疫调节。除了在滋养层表达,HLA-G 还在一些普通的组织中被检测到,包括角膜、胸腺、红系细胞、内皮前体细胞等[3]。

尽管 *HLA-G* 基因编码区多态性较低,但启动子区和 3′非翻译区(3′-untraslated region, 3′-UTR)的突变对其表达调控影响较大。*HLA-G* 3′-UTR 部分的单体型影响 HLA-G 蛋白的表达,可能是因为这些多态性位点(如 +3142)[4]影响特殊的 microRNA 结合的稳定性或是选择性剪切(如 14 bp 多态性)[5]。本研究应用分子生物学与统计学方法,对 *HLA-G* 3′-UTR 的多态性位点和单体型进行分析,了解江苏地区合格献血者中 *HLA-G* 的分子生物学特点,为后续研究 HLA-G 在疾病进展相关免疫调控中的作用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 随机提取 2015 年江苏地区 88 例无血缘关系合格献血者全血标本,男性 55 例,女性 33 例,年龄 18-55 岁。

1.2 试剂与仪器 Axygen DNA 提取试剂盒(美国 Axygen 公司,批号 11313KC3),Nanodrop© DNA 定量仪(ND-1000,美国 NanoDrop Technologies 公司),PCR 扩增仪(PE9600,美国 ABI 公司),凝胶成像系统(Tanon-2500,上海天能)。

1.3 全血基因组 DNA 提取 采用 Axygen DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,Nanodrop© DNA 定量仪测定浓度和纯度,DNA 浓度为(50-100) ng/μL,纯度($A_{260}/_{280}$)为 1.70-1.80。

1.4 *HLA-G*3′UTR 基因 PCR 扩增和测序分型 PCR 扩增引物序列为 Forward:5′-TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT-3′和 Re-

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.013

*基金项目:江苏省 2014"六大人才高峰"资助项目(2014-WSN-002);△通信作者:林红(1971.03-),女,研究员,主要从事输血相关传染病与输血安全等方面的研究,电话:025-85411563,Email:linhong712003@sina.com

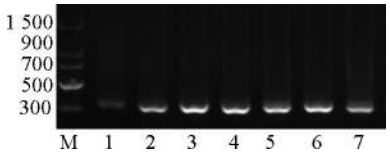
verse：5′-GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT-3′，扩增产物为 357 bp，引物交由南京金斯瑞生物公司合成。使用 20 μL 扩增反应体系，包括 5×PCR Buffer 10 μL，dNTP（2 mol /L）2.0 μL，引物（10 mol /L）各 1 μL，Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL，基因组 DNA［（50-100）ng/μL］2.0 μL，补 ddH_2O 至 20 μL。PCR 反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，60℃ 退火 60 s，72℃ 延伸 30 s，40 个循环；72℃ 延伸 7 min，PCR 产物用 2% 的琼脂糖进行电泳，观察特异性扩增产物并拍照记录。

1.5 PCR 产物纯化及测序　PCR 产物纯化后送上海华大基因测序，测序引物与扩增引物相同，测序结果用 Chromas 和 Mega6.0 软件进行比对，分析 *HLA-G* 3′UTR 基因型。

1.6 统计学分析　采用 SPSS 19.0 统计软件直接计算 *HLA-G*3′UTR 突变位点的等位基因和基因型频率，应用拟合优度 χ^2 检验对检测到的突变位点基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡检验，应用 SHEsis 软件进行单体型分析，并估计其比值（oddratio，OR），$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1 *HLA-G*3′-UTR 基因 PCR 扩增结果　对 *HLA-G* 3′-UTR 进行 PCR 扩增，2% 凝胶电泳显示条带单一清晰（图 1），大小在 300-500 bp 之间，可用于测序。



M：Generay 200 bp I DNA marker，第 1-7 孔为随机的受检者标本

图 1　*HLA-G* 3′-UTR 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图

2.2 *HLA-G* 3′-UTR 测序及其多态性位点检出情况　经测序和序列比对，本试验共检测到 8 个多态性位点，包括 14-bp INS/DEL（rs1704）、+3003*C/T*（rs1707）、+3010*C/G*（rs1710）、+3027*A/C*（rs17179101）、+3035*C/T*（rs17179108）、+3142*C/G*（rs1063320）、+3187*A/G*（rs9380142）和+3196*C/G*（rs1610696），其等位基因和基因型分布见表 1。对这 8 个多态性位点进行 Hardy-Weinberg 平衡（HWE）检验，结果显示所有基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡（$P>0.05$），说明本研究的人群遗传符合孟德尔遗传规律。

表 1　江苏汉族人群 *HLA-G* 3′UTR 多态性位点的等位基因和基因型频率

	+2960 14 bp D^{el}/Ins（rs1704）	+3003 *C/T*（rs1707）	+3010 *C/G*（rs1710）	+3027 *A/C*（rs17179101）	+3035 *C/T*（rs17179108）	+3142 *C/G*（rs1063320）	+3187 *A/G*（rs9380142）	+3196 *C/G*（rs1610696）
等位基因	D^{el}（0.710）	*C*（0.062）	*C*（0.670）	*A*（0.097）	*C*（0.903）	*C*（0.330）	*A*（0.727）	*C*（0.688）
	Ins（0.290）	*T*（0.938）	*G*（0.330）	*C*（0.903）	*T*（0.097）	*G*（0.670）	*G*（0.273）	*G*（0.312）
	D^{el}/D^{el}（0.500）	*CC*（0.011）	*CC*（0.455）	*AA*（0）	*CC*（0.818）	*CC*（0.068）	*AA*（0.545）	*CC*（0.489）
基因型	D^{el}/Ins0.420）	*CT*（0.102）	*CG*（0.432）	*AC*（0.193）	*CT*（0.170）	*CG*（0.523）	*AG*（0.364）	*CG*（0.398）
	Ins/Ins（0.080）	*TT*（0.886）	*GG*（0.114）	*CC*（0.806）	*TT*（0.011）	*GG*（0.409）	*GG*（0.091）	*GG*（0.114）
H-W 平衡检验	0.840	0.232	0.830	0.316	0.827	0.086	0.434	0.485

2.3 江苏汉族人群 *HLA-G*3′-UTR 基因型频率及其与其它人群的比较　将江苏人群的 *HLA-G* 3′-UTR 多态性位点与其他国家和地区人群比较，发现+2960 14 bp INS/DEL（rs1704）位点与葡萄牙人和几内亚人有统计学意义（$\chi^2=11.27$，$P<0.05$），与国内其他地区及日本、巴西人群均没有统计学差异；+3003*C/T*（rs1707）位点在所有人群之间均无统计学意义（$\chi^2=0.01$，$P>0.05$）；+3010*C/G*（rs1710）位点与其他人群均有统计学差异（$\chi^2=5.2$，$P<0.05$）；江苏人群在其他 5 个位点与云南人相比均有统计学差异（$\chi^2=90.82$，$P<0.05$）；在+3142*C/G*（rs1063320）位点与巴西人有统计学意义，在+3187*A/G*（rs9380142）位点与葡萄牙人具有统计学意义，在+3196*C/G*（rs1610696）与几内亚人有统计学差异，其他位点与其他人群相比均无统计学意义（$\chi^2=0.21$，$P>0.05$）。

表 2　江苏人群与其他国家和地区人群的 *HLA-G* 3′-UTR 多态性位点等位基因频率比较

基因多态性		巴西北方人[6]	葡萄牙人[6]	几内亚人[6]	日本人*	北京人*	云南人[7]	江苏汉族人
+2960 14bp Ins/Del	Ins	0.375	0.475	0.392	0.120	/	0.265	0.290
	Del	0.625	0.524	0.608	0.880	/	0.735	0.710
+3003*C/T*	*C*	0.066	0.017	0.058	0	0.040	0.048	0.062
	T	0.934	0.983	0.942	1	0.960	0.952	0.938
+3010*C/G*	*C*	0.539	0.625	0.600**	/	/	0.535	0.670
	G	0.461	0.375	0.367**	/	/	0.465	0.330
+3027*A/C*	*A*	0.035	0	0	/	/	0.218	0.097
	C	0.965	1	1	/	/	0.782	0.903
+3035*C/T*	*C*	0.871	0.842	0.825	/	/	0.773	0.903
	T	0.129	0.158	0.175	/	/	0.227	0.097
+3142*C/G*	*C*	0.449	0.375	0.325	0.280	0.430	0.470	0.330
	G	0.551	0.625	0.675	0.720	0.570	0.530	0.670
+3187*A/G*	*A*	0.701	0.617	0.725	/	/	0.612	0.727
	G	0.299	0.383	0.275	/	/	0.388	0.273
+3196*C/G*	*C*	0.764	0.625	0.508	0.780	0.840	0.964	0.688
	G	0.236	0.375	0.492	0.220	0.160	0.036	0.312

* 数据来自 http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov；** 几内亚人群+3010 位点为 *C/G/T*，*T* 的基因频率为 0.033；/：Hapmap 网站上未找到这 2 个人

群的相应多态性位点的突变频率

2.4 *HLA-G* 基因 3′UTR 区 8 个多态性位点的连锁不平衡和单体型分析　应用 SHEsis 软件计算 *HLA-G* 基因 3′UTR 区 8 个多态性位点的连锁不平衡(表 3)。D′>0.7 认为是强连锁。根据表 3 中 D′值的结果,*HLA-G*3′UTR 的 8 个 SNP 位点中,+2960 14 bp 插入/缺失(14 bpI/D)、+3003 *C/T*、+3010 *C/G*、+3027 *A/C*、+3035 *C/T*、+3142*C/G*、+3187*A/G* 和+3196 C/G 紧密连锁(图 2),可以进行单体型构建,其命名参照相关的参考文献[8]。

表 3　江苏人群 *HLA-G* 3′-UTR 各多态性位点之间的连锁不平衡情况

SNPs	+3003*C/T*	+3010*C/G*	+3027*A/C*	+3035*C/T*	+3142*C/G*	+3187*A/G*	+3196*C/G*
+2960 14bp	0.996	1	0.493	0.591	1	1	0.533
+3003*C/T*	/	1	1	1	1	0.667	0.997
+3010*C/G*	/	/	1	0.999	0.867	0.865	1
+3027*A/C*	/	/	/	0.868	0.999	0.999	0.359
+3035*C/T*	/	/	/	/	0.999	0.999	0.504
+3142*C/G*	/	/	/	/	/	0.791	0.741
+3187*A/G*	/	/	/	/	/	/	0.898

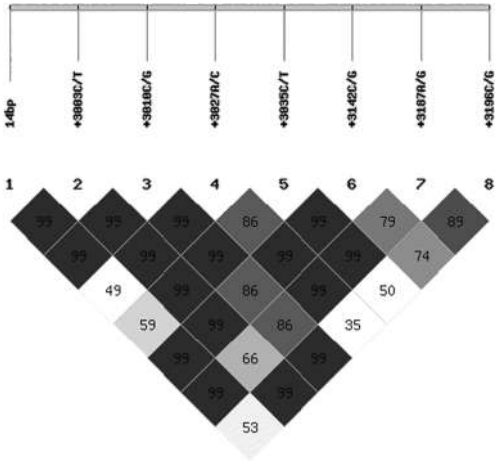


图 2　*HLA-G* 3′UTR 各 SNP 位点之间的连锁不平衡情况

结果显示,江苏地区人群 *HLA-G* 3′UTR 8 个位点可以构成 20 种单体型,取频率(f)>0.03 的单体型进行分析(表 4),其中单体型 UTR-3 在 88 例江苏合格献血者中频率最高(0.256)。

表 4　江苏汉族人群 *HLA-G* 3′UTR 单体型分型及其频率

单体型组成	单体型	频率(f)	95% CI
D T C C C G A C*	UTR-3	0.256	0.404~2.476
D T G C C C G C*	UTR-1	0.231	0.612~1.635
I T C C C G A G*	UTR-2	0.210	0.593~1.687
I T C A T G A C*	UTR-7	0.063	0.420~2.381
D C G C C C A C*	UTR-4	0.057	0.404~2.476
D T C C C G A G*	UTR-10	0.057	0.404~2.476
D T G C C C A C	UTR-6	0.012	/
I T C C T G A C	UTR-5	0.011	/

* f>0.03

3　讨论

HLA-G 在肿瘤、病毒感染、器官移植等多种病理状态有高表达,并且 *HLA-G* 基因多态性也与各种病理状态具有相关性[9]。*HLA-G* 基因多态性包括编码区和非编码区的多态性,其中编码区的多态性有限,相应地编码几个独特的 HLA-G 分子,仅在二聚体形成和与抑制性受体相互作用的蛋白区域有很少的氨基酸差异[11]。相反,非编码区多态性包括 5′URR 和外显子 8 上的 3′UTR 的多态性在决定基因和蛋白表达的维度上具有重要的作用。研究认为非编码区与 *HLA-G* mRNA 的稳定性和 HLA-G 蛋白表达相关,参与 HLA-G 分子的表达调控有关,影响 HLA-G 分子的功能[12]。3′-UTR 是从编码区末端的终止密码子延伸至多聚 A 尾巴前端的区域,可以调节转录本的稳定性、亚细胞定位和翻译水平,决定某一特定 mRNA 的命运,是许多基因表达所必需的 1 个调节区。*HLA-G* 3′-UTR 介导的功能的修饰可影响 1 个或多个基因的表达,从而导致疾病的发生[13]。

本研究通过 PCR 扩增 *HLA-G* 3′ UTR 和直接测序的方法共检测到 14 bp 插入/缺失、+3003*C/T*、+3010*C/G*、+3027*A/C*、+3035*C/T*、+3142*C/G*、+3187*A/G*、+3196*C/G* 等 8 个位点的多态性。分析基因型和多态性之间的关联以及单体型,发现江苏汉族人群 *HLA-G* 3′-UTR 多态性具有独特性。除了+3027*A/C* 位点无 *AA* 纯合子基因型外,其余位点都有 3 个基因型,且 8 个多态性位点的基因频率都>0.05,可以作为研究 *HLA-G* 基因多态性与疾病相关的候选基因。

比较江苏人群与其他地区和国家人群 *HLA-G* 3′-UTR 的多态性发现,不同位点的基因频率在不同地区都有统计学差异,尤其是+2960 14 bp Del/Ins 位点,尽管在不同国家和地区人群中等位基因的频率分布有差异,但没有统计学意义,说明这个位点在不同人群中非常稳定。与本国人群相比,江苏人群与北京人群的已知多态性位点均不具有统计学意义,但与云南人群相比,除了+2960 14 bp Del/Ins 和+3003 *T/C* 外,其他 6 个位点的差异均具有统计学意义,说明 *HLA-G* 3′-UTR 基因在中国的分布具有地域性。江苏人群与其他大陆不同地区人群相比,只在某个多态性位点上具有显著性差异。

由于 HLA 不同基因座位的某些等位基因经常连锁在一起遗传,而连锁的基因并非完全随机地组成单体型,有些基因总是较多地在一起出现,致使某些单体型在群体中呈现较高的频率,从而引起连锁不平衡。本实验应用 SHEsis 软件构建江苏人群 3′-UTR 的单体型分布特征,UTR-1(DTGCCCGC)(23.1%)、UTR-2(ITCCCGAG)(21.0%)、和 UTR-3(DTCCCGAC)(25.6%)的比例占约 70%,而且这 3 个单体型的基因型组成相差很大。云南人群中[7],UTR1(37.1%)、UTR3(27.5%)和 UTR-7(ITCATGAC)(20.7%)的比例则超过 80%。巴西人群中[8]则是 UTR1(25.8%)、UTR2(24.2%)、UTR3(12.6%)和 UTR4(DCGCCCAC)(13.2%)合计 75.8%。以上分析说明不同人群的 3′-UTR 的单体型组成相差很大。

这些单体型在健康人群和患病人群中的差异是否具有统计学意义,还有待进一步探讨。

本研究以江苏省合格献血者为研究对象,对 *HLA-G* 3′-UTR 基因多态性位点进行了分析,获得了江苏地区 3′-*UTR* 基因多态性位点等位基因和单体型频率在人群中的分布数据,为今后研究江苏地区 *HLA-G* 3′-*UTR* 基因多态性与疾病相关性提供了基础数据。

参 考 文 献

[1] Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. Proc Natl Acad Sci USA, 1987 , 84 (24): 9145-9149.

[2] McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, et al. Human placental*HLA-G* expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. J Immunol, 1995, 154(8): 3771-3778.

[3] AppsR, GardnerL, MoffettA. A critical look at HLA-G. Trends Immunol, 2008, 29(7): 313 -321.

[4] Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G , et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3′UT region of the *HLA-G* gene influences *HLA-G* mRNA stability. Hum Immunol, 2003, 64(11): 1005-1010.

[5] Veit TD, de Lima CP, Cavalheiro LC, et al. *HLA-G* +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. Tissue Antigens, 2014, 83(4): 260-266.

[6] Lucena-Silva N, Monteiro AR, de Albuquerque RS, et al. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3′ untranslated region of the *HLA-G* gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. Tissue Antigens, 2012, 79 (4): 272-278.

[7] 陈婷婷,林俊,晋松,等.云南地区 *HLA-G* 基因 3′非翻译区三个位点多态性与系统性红斑狼疮的关联研究. 中华医学遗传学杂志,2014, 31 (4): 228-232.

[8] Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, et al. Thegenetic structure of 3′untranslated region of the *HLA-G* gene: polymorphisms and haplotypes. Genes Immun, 2010, 11(2): 134-141.

[9] Carosella ED, Moreau P, LeMaoult J, et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. Trends Immunol, 2008 , 29(3): 125-132.

[10] Castelli EC, Moreau P, Mendes-Junior CT, et al. In silico analysis of microRNAS targeting the*HLA-G* 3′ untranslated region alleles and haplotypes. Hum Immunol, 2009, 70(12): 1020-1025.

[11] Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, et al. Implications of the polymorphism of *HLA-G* on its function, regulation, evolution and disease association. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(3): 369-395.

[12] Hviid TVF, Rizzo R, Melchiorri L, et al. Polymorphism in the 5′upstream regulatory and 3′untranslated regions of the *HLA-G* gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. Hum Immunol, 2006 , 67(1-2): 53-62.

[13] Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, et al. Implications of the polymorphism of *HLA-G* on its function, regulation, evolution and disease association. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(3): 369-395.

(2016-05-03 收稿, 2017-03-20 修回)

本文编辑:夏玲

《临床输血进展》购书事宜

应本刊众多读者的要求,汇集本刊“临床输血”专栏 11 年(1998 年第 4 期-2009 年 3 期)共计 65 篇文章的《临床输血进展》已于 2010 年 9 月出版。作为田兆嵩教授主持、国内多位知名输血专家撰稿的专栏,“临床输血”刊行 10 余年间深受读者欢迎,俨然成为本刊的 1 个品牌。本书内容全面,涵盖临床输血的方方面面,加之本书出版前田教授与各位作者对原文章的补充修订,相信对各位临床输血工作者丰富临床输血理论知识,提高临床输血操作技能不无裨益。欢迎订购,定价:46 元,邮购电话:028-61648584,传真:028-83373857,汇款地址:(邮政编码:610052)四川省成都市东三环路二段龙潭总部经济城华彩路 26 号《中国输血杂志》编辑部(请在汇款附言中注明您购书的册数、联系电话、是否需要发票等)。

· 论著 ·

四氢嘧啶对人冰冻红细胞质量影响的初步研究*

周洋[1] 张学俊[1] 王红[1] 钟锐[1] 贺曾[1] 韩玎玎[1] 厉保秋[2] 刘嘉馨[1△]

(1.中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052;2.山东大学 药学院)

摘要:目的 通过在红细胞深低温冰冻的冻存液中添加渗透压调节物-四氢嘧啶(ectoine),检测红细胞冰冻前后的质量,探讨 ectoine 用于深低温冰冻红细胞的可能性,为 ectoine 可用于红细胞深低温冰冻的研究提供实验依据。**方法** 取悬浮红细胞样品 8 袋,每袋分为对照组(复方甘油组、甘油组)和实验组(1.5% ectoine 甘油组、3% ectoine 甘油组和 4.5% ectoine 甘油组)共 5 组。实验组:ectoine 起始浓度为 1.5%、3%与 4.5%(W/V)(加红细胞后终浓度为 1.05%、2.10%与 3.15%)。将 5 组(2 组对照组与 3 组实验组)冻存液分别加入红细胞,红细胞冰冻后解冻并洗涤。测定冰冻前(未加冻存液)及解冻洗涤后红细胞数、血红蛋白量、红细胞变形性、渗透脆性,并用电镜扫描,观察红细胞显微形态。**结果** 与 2 组对照组相比,3% ectoine 甘油组红细胞回收率最高(89.26±2.60)%($P<0.05$);3% ectoine 甘油组解冻洗涤的红细胞与冰冻前红细胞,在 50^{-1}、100^{-1}、200^{-1}和 $1\,000^{-1}$的剪切率值上相比 $P>0.05$,差异无统计学意义;1.5% ectoine 甘油组解冻洗涤的红细胞,50%溶血率时氯化钠浓度为(4.57±0.08)g/L,3% ectoine 甘油组(4.80±0.17)g/L,2 组分别与复方甘油组(4.98±0.26)g/L 相比 $P<0.05$,差异具有统计学意义;电镜扫描显示 3 组实验组红细胞与复方甘油组红细胞解冻洗涤后,均无棘状和球形红细胞,甘油组可见破膜、皱缩的红细胞。**结论** 3% Ectoine 作为渗透压调节物用于冰冻红细胞,可用于高浓度甘油冰冻红细胞时作为渗透压调节物,相对于 3%乳酸钠的复方甘油(商品化复方甘油),可提高解冻洗涤的红细胞回收率,改善解冻洗涤的红细胞质量,具有在深低温冰冻红细胞的潜力。

关键词:四氢嘧啶;红细胞;回收率;渗透脆性;变形性

中图分类号:R457.1 R331.1+41 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0271-05

The study of the effects of by adding ectoine into the cryoprotectants of human red cells

ZHOU Yang[1], *ZHANG Xuejun*[1], *WANG Hong*[1], *ZHONG Rui*[1], *HE Zeng*[1], *HANG Dingding*[1], *LI Baoqiu*[2], *LIU Jiaxin*[1]. 1. *Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China*; 2. *School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University. Corresponding author: LIU Jiaxin*

Abstract: Objective To discuss the possibility of ectoine to preserve red blood cells (RBCs) at low temperature by adding ectoine into the cryoprotectants of erythrocytes and to determine the qualities of RBCs before and after cryopreservation. **Methods** Blood samples were collected from eight individuals in Chengdu, and each sample was divided into two control groups (compound glycerin group and glycerin group) and three experimental groups (1.5% ectoine glycerin group, 3% ectoine glycerin group and 4.5% ectoine glycerin group). The three experimental groups contained 1.5%, 3.0% and 4.5% (final concentrations were 1.05%, 2.10% and 3.15%) ectoine, which were the initial concentrations in the cryoprotectants. Erythrocytes were added in five different cryoprotectants, frozen at −80℃ and thawed at 37℃, then deglycerolized with high concentration sodium chloride. The quantity of RBCs, RBC deformability and the osmotic fragility were determined, and RBCs were scanned with the scanning electron microscope (SEM). **Results** The 3% ectoine glycerin group of thawed RBCs had the highest rate of recovery (89.26±2.60)%, and demonstrated significant difference with the control groups in thawed RBCs ($P<0.05$). The 3% ectoine group of thawed RBCs had no significant difference when compared to the unfrozen RBCs in regards to RBC deformability. The osmotic fragilities of the 1.5% ectoine glycerin group of thawed RBCs and the 3.0% ectoine glycerin group of thawed RBCs and the compound glycerin group of thawed RBCs were (4.57±0.08)g/L vs (4.80±0.17)g/L vs (4.98±0.26)g/L, and there were significant differences in three different groups. There were no acanthocytes or spherocytes from RBCs by SEM from the experimental groups of thawed RBCs. **Conclusion** Ectoine can be the potential cryoprotectant to preserve RBCs.

Key words: ectoine; erythrocyte; rate of recovery; osmotic fragility; deformability

血液保存是随着输血医学的发展而建立的,而红细胞保存是血液保存的最重要研究课题之一。红细胞保存目前有 3 种主要的方法[1]:低温液态保存、深低温冰冻保存和冷冻干燥保存。低温液态保存红细胞易受“保存损伤”[2],目前保

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.014

*基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ591);△通信作者:刘嘉馨(1964.04-),男,研究员,博士研究生导师,主要从事生物医学工程、血液保存和血液代用品研究,电话:028-68169102,Email:jxliu8122@vip.sina.com

存的有效时长不超过 5 周。冰冻红细胞依目前的研究表明可保存 10 年,甚至是 37 年[3],此种深低温方法能长期保存红细胞并充分利用稀有血型,保障用血[4]。目前使用的复方甘油深低温冰冻保存红细胞,细胞在解冻洗涤后形态、功能发生变化[5],提高冰冻红细胞在解冻洗涤后的质量,也是一项研究课题。甘油冰冻红细胞时含量达 57%,高浓度甘油产生高渗透压,需要一定的渗透压调节物,维持与调节红细胞的渗透压。四氢嘧啶(ectoine)是一种小分子的相容性环状氨基酸,为耐盐菌和嗜盐菌的渗透压调节物[6],能提高大分子在高温的活性[7]、细胞在低温的存活率[8],且对红细胞的毒性小[9],也能够保护酶在深低温的稳定性[10]。我们首次将 ectoine 与甘油联用,将 ectoine 作为渗透压调节物,加入红细胞冰冻保存液中,探索 ectoine 可用于深低温的可能性、探索 ectoine 提高冰冻红细胞在解冻洗涤后的质量的可能性,现报告如下。

1　材料与方法

1.1　样品来源与制备　四川德阳血液中心取回人全血 3 袋(均为 B 型,分别在 2016-07-07 采 1 袋、2017-07-13 采 2 袋,保存液均为 CPDA)、四川成都血液中心取回悬浮红细胞 5 袋(分别为 2016-06-24 采 O 型 1 袋、2016-07-03 采 A 型 1 袋、2016-09-11 采 A 型 2 袋、2016-09-11 采 B 型 1 袋,保存液均为 MAP)共 8 袋。德阳的全血需离心去除大部分血浆,留浓缩红细胞;每袋浓缩红细胞加入 75 mL 的 MAP 红细胞保存液制成悬浮红细胞。悬浮红细胞均放置于 4℃血液冷藏箱中保存备用。

1.2　仪器与试剂　五分类血细胞计数分析仪(深圳迈瑞,BC-5800);红细胞变形仪(北京普利生,LBY-BX);全波长酶标仪(biotek,Epoch);台式离心机(beckman coulter,allegra X-15R);电子扫描显微镜(美国 FEI,Quanta);氯化钾(天津瑞金特,分析纯,批号 20151102);十二水合磷酸氢二钠(成都科龙,分析纯,批号 2015082401);ectoine(山东大学药学院提供,HPLC > 95%);乳酸钠(成都科龙,分析纯,批号 2015011201);甘油(成都科龙,分析纯,批号 20110119);聚乙烯吡咯烷酮(PVP) K30(成都科龙,分析纯,批号 2015011901);磷酸二氢钾(成都科龙,分析纯,批号 2015010101);氯化钠(天津瑞金特,分析纯,批号 20160411);氢氧化钠(成都科龙,分析纯,批号 20120401);戊二醛 50%(成都科龙,分析纯,批号 20100519);无水乙醇(重庆川东,分析纯,批号 20150801);超纯水(美国 PALL,cascada RO/BIO 系统制成);0.9% 氯化钠注射液(四川科伦,批号 B16040514)。

1.3　溶液配制

1.3.1　红细胞变形 PVP 液　PVP 15 g、十二水合磷酸氢二钠 716 mg、磷酸二氢钾 68 mg、氯化钠 380 mg,加超纯水至 100 mL 并用 10% 氢氧化钠调整 pH 值为 7.4。

1.3.2　商品化复方甘油组冻存液　甘油 57 g、乳酸钠 3 g、十二水合磷酸氢二钠 0.2 g、氯化钾 30 mg,加超纯水至 100 mL。

1.3.3　甘油组冻存液　甘油 57 g、十二水合磷酸氢二钠 0.2 g、氯化钾 30 mg,加超纯水至100 mL。

1.3.4　1.5% ectoine 甘油组冻存液　ectoine 1.5 g、甘油 57 g、十二水合磷酸氢二钠 0.2 g、氯化钾 30 mg,加超纯水至100 mL。

1.3.5　3.0% ectoine 甘油组冻存液　ectoine 3 g、甘油 57 g、十二水合磷酸氢二钠 0.2 g、氯化钾 30 mg,加超纯水至 100 mL。

1.3.6　4.5% ectoine 甘油组冻存液　ectoine 4.5 g、甘油 57 g、十二水合磷酸氢二钠 0.2 g、氯化钾 30 mg,加超纯水至 100 mL。

1.3.7　9%氯化钠液　氯化钠 9 g 加超纯水至 100 mL。

1.4　红细胞甘油化并冰冻　自采集日 7 d 内的 8 袋红细胞作为实验对象(即 $n=8$)。实验分为 5 组:复方甘油组、1.5% ectoine 甘油组、3.0% ectoine 甘油组、4.5% ectoine 甘油组和甘油组。以复方甘油组为阳性对照组,甘油组为阴性对照组;1.5% ectoine 甘油组、3.0% ectoine 甘油组和 4.5% ectoine 甘油组为实验组。每袋悬浮红细胞从血液冷藏箱取出后 1 500 g 离心 10 min,去上清及白膜层,生理盐水重悬压积(Hct)为 50%-60%。每袋红细胞的每组取 10 mL 重悬的红细胞于 50 mL 离心管中,离心管 1 500 g 离心 10 min,去上清,留浓缩红细胞(5-6 mL)。每组浓缩红细胞样品加入 10 mL 冻存液于离心管中。加冻存液的操作步骤如下:1)4 次等量加入 0.5 mL 冻存液(每加入 0.5 mL 轻摇 1 min)共 2 mL,2 mL 加完轻摇 10 min;2)4 次等量加入 2 mL 冻存液(每加入 2 mL 轻摇 1 min)共 8 mL,8 mL 加完轻摇 10 min;3)室温静置 20 min;4)1 500 g 离心 10 min(降速时采用最小降速模式,无刹车),去上清;5)含红细胞和少量冻存液的 50 mL 离心管-80℃冰冻保存 1 周以上。

1.5　冰冻红细胞解冻并去甘油化　取冰冻红细胞于 37℃水浴箱中,轻摇解冻。五组红细胞去甘油化的操作步骤均相同,步骤如下:1)8 次等量加入 0.5 mL 9%氯化钠液(每加入 0.5 mL 轻摇 1 min)共 4 mL,4 mL 加完轻摇 10 min;2)8 次等量加入 1 mL 生理盐水(每加入 1 mL 轻摇 1 min)共 8 mL,8 mL 加完轻摇 10 min;3)4 次等量加入 4 mL(每加入 4 mL 轻摇 1 min)共 16 mL,16 mL 加完静置 10 min;4)加生理盐水至 50 mL,1 000 g 离心 5 min(降速时采用最小降速模式,无刹车);5)弃 10 mL 上清后加入 10 mL 生理盐水,1 500 g 离心 10 min(降速采用最小降速模式,无刹车);6)按照步骤 5 依次弃上清 20 mL、30 mL 及 40 mL;7)生理盐水洗涤并离心红细胞,直至上清无溶血现象,将最后离心后浓缩红细胞用生理盐水重悬 Hct 至 45%-55%。测定冰冻前(未加冻存液)及解冻洗涤后的红细胞(红细胞数、血红蛋白量及平均红细胞体积 MCV)、变形性、渗透脆性并电镜扫描红细胞。

1.6　红细胞变形性测定　参照文献[11]的方法,测定红细胞 50^{-1}、100^{-1}、200^{-1} 及 $1\ 000^{-1}$ 的剪切率值,以 50^{-1}、100^{-1}、200^{-1} 及 $1\ 000^{-1}$ 的剪切率值大小表示红细胞的变形指数。剪切率值越大表示红细胞的变形能力越好。

1.7　红细胞渗透脆性测定　参照全国临床检验操作规程中红细胞渗透脆性光电比色法[12]测定红细胞在氯化钠不同浓度下的溶血值,计算红细胞在产生 50%溶血率时氯化钠的浓度(g/L),以此浓度为报告。氯化钠浓度越高,渗透脆性越高,则红细胞抵抗低渗能力越弱。

1.8　电镜扫描　参照文献[13]红细胞显微形态测定方法进

行红细胞电镜样品制备及扫描。

1.9 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件分析,数值以"均值±标准差($\bar{x}\pm s$)"表示。两组数据之间采用配对 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

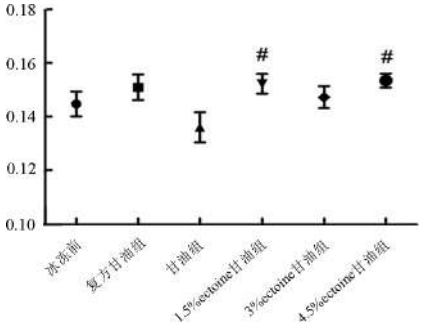
2.1 红细胞五分类计数及计算结果 3.0% ectoine 甘油组的红细胞回收率最高;甘油组中未含有 ectoine 或者乳酸钠作为渗透压调节物,回收率低于 20%。1.5% ectoine 甘油组 MCV 和 3.0% ectoine 甘油组 MCV 均小于复方甘油组 MCV,但大于冰冻前(未加冻存液)MCV,结果见表 1。

表 1 红细胞五分类计数及计算结果 ($n=8;\bar{x}\pm s$)

	红细胞数回收率(%)	血红蛋白回收率(%)	MCV(fL)
冰冻前	-	-	101.72±4.31
复方甘油组	84.34±3.75	84.43±3.67	111.95±5.87$^{\&}$
甘油组	18.93±7.79	10.45±6.92	80.57±4.85$^{\&}$
1.5% ectoine 甘油组	81.56±6.07$^{\#}$	76.47±7.33$^{*\#}$	103.93±4.66$^{*\#}$
3.0% ectoine 甘油组	89.26±2.60$^{*\#}$	89.72±2.42$^{*\#}$	108.70±5.34$^{*\#\&}$
4.5% ectoine 甘油组	62.28±8.50$^{*\#}$	63.23±8.93$^{*\#}$	121.29±4.56$^{*\#\&}$

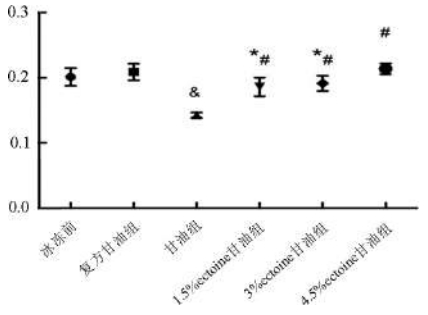
注:* 表示与复方甘油配对 t 检验,# 表示与甘油配对 t 检验,& 表示与冰冻前红细胞配对 t 检验 1)红细胞数回收率:1.5% ectoine 甘油组#$t=-33.485$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=-7.528$,#$t=-32.496$;4.5% ectoine 甘油组 * $t=11.525$,#$t=-25.720$;2)血红蛋白回收率:1.5% ectoine 甘油组 * $t=2.490$,#$t=-28.933$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=-7.796$,#$t=-30.608$;4.5% ectoine 甘油组 * $t=8.386$,#$t=-22.835$;3)MCV:复方甘油组 &$t=-13.468$;甘油组:&$t=13.280$;1.5% ectoine 甘油组 * $t=5.011$,#$t=-13.665$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=9.765$,#$t=15.924$,&$t=-13.491$;4.5% ectoine 甘油组 * $t=-5.518$,#$t=36.768$,&$t=-13.320$,均为 $P<0.05$

2.2 红细胞变形性数值 结果见图 1-4。图 1 结果显示 50^{-1}剪切率下 3% ectoine 甘油组和 2 组对照组及冰冻前差异无统计学意义。图 2 结果显示 100^{-1}剪切率下 3%ectoine 甘油组和 2 组对照组相比 $P<0.05$,差异具有统计学意义;与冰冻前相比差异无统计学意义。图 3 结果显示 200^{-1}剪切率下与结果 100^{-1}剪切率一致,3%ectoine 甘油组和 2 组对照组相比 $P<0.05$,差异具有统计学意义;与冰冻前相比差异无统计学意义。图 4 结果显示 1000^{-1}剪切率下 3%ectoine 甘油组和 2 组对照组相比 $P<0.05$,差异具统计学意义;与冰冻前相比差异无统计学意义。



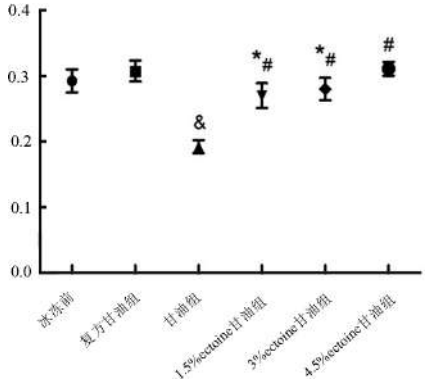
* 表示与复方甘油配对 t 检验,# 表示与甘油配对 t 检验,& 表示与冰冻前红细胞配对 t 检验,50^{-1}剪切率:1.5% ectoine 甘油组#$t=-2.570$;4.5% ectoine 甘油组#$t=3.607$,均为 $P<0.05$;

图 1 红细胞 50^{-1}剪切率($n=8;\bar{x}\pm s$)



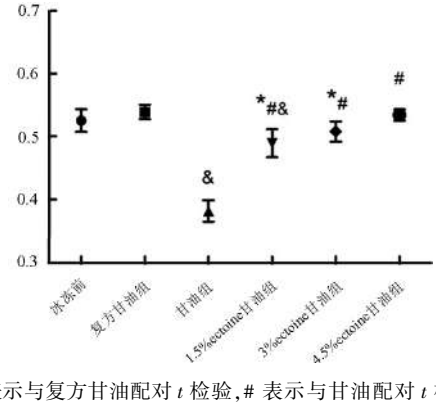
* 表示与复方甘油配对 t 检验,# 表示与甘油配对 t 检验,& 表示与冰冻前红细胞配对 t 检验,100^{-1}剪切率:甘油组:&$t=5.126$;1.5% ectoine 甘油组 * $t=9.320$,#$t=-4.384$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=9.781$,#$t=-5.561$;4.5% ectoine 甘油组#$t=-17.463$,均为 $P<0.05$;

图 2 红细胞 100^{-1}剪切率($n=8;\bar{x}\pm s$)



* 表示与复方甘油配对 t 检验,# 表示与甘油配对 t 检验,& 表示与冰冻前红细胞配对 t 检验,200^{-1}剪切率:甘油组:&$t=7.942$;1.5% ectoine 甘油组 * $t=6.931$,#$t=-6.974$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=11.839$,#$t=-9.718$;4.5% ectoine 甘油组#$t=-24.582$,均为 $P<0.05$;

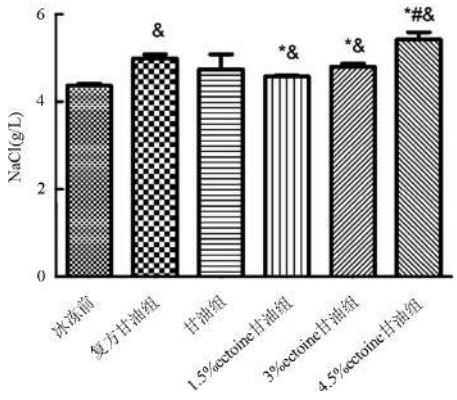
图 3 红细胞 200^{-1}剪切率($n=8;\bar{x}\pm s$)



* 表示与复方甘油配对 t 检验,# 表示与甘油配对 t 检验,& 表示与冰冻前红细胞配对 t 检验,1 000^{-}1剪切率:甘油组:&$t=8.727$;1.5% ectoine 甘油组 * $t=4.947$,#$t=-7.695$;3.0% ectoine 甘油组 * $t=5.643$,#$t=-10.212$;4.5% ectoine 甘油组#$t=-13.334$,均为 $P<0.05$

图 4 红细胞 1 000^{-1}剪切率($n=8;\bar{x}\pm s$)

2.3 红细胞渗透脆性 结果见图 5。图 5 结果显示 3% ectoine 甘油组与复方甘油组、冰冻前相比差异具有统计学意义。



渗透脆性:复方甘油组 &$t=-6.806$,;1.5% ectoine 甘油组 $*t=4.664$,&$t=-3.257$;3.0% ectoine 甘油组 $*t=4.369$,&$t=-6.805$;4.5% ectoine 甘油组 $*t=-3.813$,#$t=-2.665$,&$t=-6.123$,均为 $P<0.05$

图 5　红细胞 50%溶血率时氯化钠浓度($n=8$;$\bar{x}\pm s$)

2.4　电镜扫描　结果见图 6(图片中的显微均为放大6 000X),6-C 可看见破膜、皱缩的红细胞;其余组图红细胞为双凹圆盘状,无明显的棘状红细胞、球形红细胞。

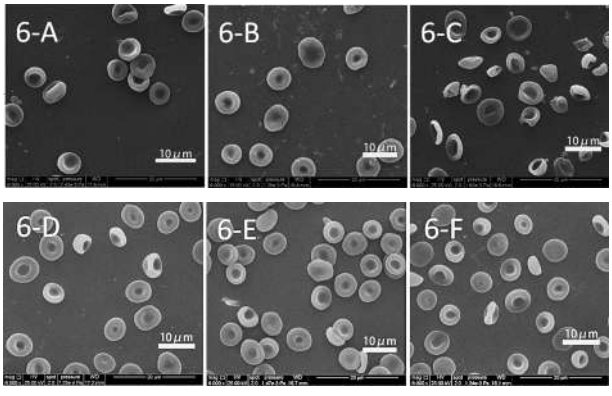


图 6　电镜扫描红细胞形态

3　讨论

四氢嘧啶(ectoine)全称 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸,分子式为 $C_6H_{10}N_2O_2$,是存在于耐盐菌和嗜盐菌中的一种两性渗透压补偿溶质[14]。Galinski 等[6]首次在一种嗜盐外硫红螺菌中发现、分离并解析 ectoine。Ectoine 可提高嗜盐菌和耐盐菌在高浓度 NaCl 的耐受力,降低葡萄球菌 α-溶血素对牛红细胞的氧化损伤[9]。对于红细胞深低温冰冻保存,Polge 等[15]首次使用甘油作为保护剂冰冻细胞,随后 Meryman[16]使用高浓度甘油作冻存液,并用高浓度氯化钠去除冰冻红细胞的甘油,使红细胞能够深低温冰冻保存成为可能。目前以高浓度甘油为基础的复方甘油在血站中已用于红细胞深低温冰冻保存。在复方甘油中,乳酸钠作为高浓度甘油冰冻和洗脱时的渗透压调节物[16],维持红细胞的体积。笔者将 ectoine 加入冻存液中,替换乳酸钠成分,测定冰冻前后红细胞的质量。发现 3% ectoine 甘油组在红细胞数回收率和血红蛋白回收率上比 3%乳酸钠的复方甘油组提高 6%,红细胞的渗透脆性比复方甘油组低;在红细胞变形性上 3% ectoine 甘油组和冰冻前(为加冻存液)红细胞相比差异无统计学意义,显示出 3% ectoine 甘油组在冰冻红细胞时对红细胞的变形性影响低。笔者通过结果得出 3% ectoine 具有良好的效果,推测与 ectoine 是嗜盐菌和耐盐菌的渗透压调节物,可调节细胞及细菌的渗透压相关。笔者检测 3% ectoine 甘油冻存液在不含高浓度甘油时的渗透压为 450 mmol/kg,高于 1.5% ectoine(230 mmol/kg)、甘油组(不含甘油时 23 mmol/kg),低于 4.5% ectoine (700 mmol/kg)、乳酸钠(590 mmol/kg),通过此结果推测红细胞在加入高浓度甘油、洗脱高浓度甘油时需要一定的调节渗透压。红细胞中甘油含量过高易导致血管内溶血,因此高浓度甘油(加红细胞后甘油终浓度为 40%)冰冻红细胞需在解冻后对甘油洗脱。笔者检测对照组及实验组在解冻洗涤后红细胞内甘油残余量,发现均未超过 2 g/L,说明 ectoine 在洗脱、洗涤过程中对甘油的洗脱影响低。ectoine 加入红细胞冻存液,通过实验检测红细胞冰冻洗涤后的质量影响较小,显示出 ectoin 可用于红细胞深低温冰冻,这与文献[17]的结论一致。

高浓度甘油渗透压高,快速加入或移除易使红细胞内外渗透压差过大,导致细胞体积偏移大而造成“渗透损伤”[18]。为降低渗透损伤本实验在红细胞添加冻存液和洗脱冻存液时采用多步的方法:添加冻存液分 2 步[16],每步 4 次[18],共 8 次;洗脱冻存液时采用 8 次[19]等量。本实验详细叙述高浓度甘油添加(加红细胞后甘油终浓度为 40%)、洗脱的方法,也为后续实验开展做方法铺垫。有文献研究,使用大分子的非渗透性 PVP 作为冻存液,在添加和洗脱冻存液时可减少操作时间和步骤[20];也有文献指出 9% ectoine 在液氮中可保护红细胞[21],冰冻后的红细胞质量优于加 20%甘油的冻存液,这些为进一步研究 ectoine 冰冻保存红细胞提供了研究方法与思路。本实验主要研究了 ectoine 对冰冻红细胞在解冻洗涤后的质量影响,而对红细胞冰冻后功能的影响还需进一步实验。

综上所述,通过实验发现,3% ectoine 作为冰冻红细胞用冻存液成分-调节渗透压,与 3%乳酸钠的冻存液相比,红细胞回收率好、变形性影响低、降低红细胞的渗透脆性、对形态变化小。因此,ectoine 具有作为渗透压调节物在深低温保存红细胞的潜力。

参　考　文　献

[1] Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation ofred blood cells: past, present, and future. Transfusion Medicine Reviews, 2005,19(2):127-142.

[2] D´Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. Transfusion, 2015,55(1):205-219.

[3] Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, et al. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80 degrees C for up to 37 years. Vox Sang, 2000,79(3):168-174.

[4] 郝晶茹. 冰冻解冻红细胞的制备、保存及临床应用. 中国医药指南, 2013,(28):57-58.

[5] Pallotta V, D´Amici GM, D´Alessandro A, et al. Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2012,48(4):226-232.

[6] Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus Ectothiorhodospira. Eur J Biochem, 1985,149(1):135-139.
[7] 郑昕, 张苓花. Ectoine 提高啤酒麦芽中酶的热稳定性的研究. 酿酒科技, 2009,(5):36-38.
[8] Freimark D, Sehl C, Weber C, et al. Systematic parameter optimization of a Me_2SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. Cryobiology, 2011,63(2):67-75.
[9] Bownik A, Stępniewska Z. Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. Toxicon, 2015,99:130-135.
[10] Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes : protection against heating, freezing and drying. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992,37(1):61-65.
[11] 张警丹, 王红, 钟锐, 等. 一氧化氮对保存悬浮红细胞部分功能的量效关系初步比较. 中国输血杂志, 2015,28(3):271-276.
[12] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 3 版. 东南大学出版社, 2006:168-169.
[13] 于青. 红细胞老化及一氧化氮对红细胞保存质量影响的初步研究.中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所, 2012:20.
[14] Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems, 2005,(1):5.
[15] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 1949,164(4172):666.
[16] Meryman HT, Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. Transfusion, 1972,12(3):145-156.
[17] Barik D, Barik SR, Rout S. Effects of various organic osmolytes on preservation of RBCs at different temperature by using various preservation techniques. Advances in Life Sciences, 2016,5(5):1789-1796.
[18] 舒志全, 罗昭锋, 张毅, 等. 红细胞在保护剂添加和洗涤时的非平衡渗透响应实验研究. 中国生物医学工程学报, 2006,(1):25-29.
[19] Gao DY, Liu J, Liu C, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum Reprod, 1995,10(5):1109-1122.
[20] Schmid P, Huvard MJ, Lee-Stroka AH, et al. Red blood cell preservation by droplet freezing with polyvinylpyrrolidone or sucrose-dextrose and by bulk freezing with glycerol. Transfusion, 2011,51(12):2703-2708.
[21] Assal RE, Guven S, Gurkan UA, et al. Bio-inspired cryo-ink preserves red blood cell phenotype and function during nanoliter vitrification. Advanced materials, 2014,26:5815-5822.

(2016-12-01 收稿,2017-03-16 修回)

本文编辑:闻欣

《临床单病种输血》专著出版

2016 年 7 月 25 日国家标准化管理委员会批准 GB/T 13745-2009《学科分类与代码》国家标准第 2 号修改单,自 2016 年 7 月 30 日起实施。GB/T13745-2009《学科分类与代码》国家标准第 2 号修改单:一、在“320 临床医学”下增设二级学科 32032“输血医学”。二、在 32032“输血医学”下设立三级学科“基础输血学、献血服务学、输血技术学、临床输血学、输血管理学和输血医学其他学科”。中华医学会与中国医师协会输血分会积极响应国家对输血专业的逐步重视, 中华医学会临床输血学分会主任委员、中国医师协会输血科医师分会首任会长刘景汉教授牵头,组织专家筹措与撰写专著《临床单病种输血》。

《临床单病种输血》已由人民卫生出版社 2017 年 1 月出版,全书共十章,涉及内科、外科、妇产科、组织与器官移植等五十个疾病(病种)输血,以及输血疗效评价、输血不良反应诊断与治疗、自体输血与治疗性血细胞单采与置换等方面,旨在让临床医护人员更好地实施科学、安全用血,减少不必要的输血。该书理论联系实际,内容新颖,为进一步规范医疗机构临床科学、安全用血起到抛砖引玉的作用,为临床医护人员、医学院校师生及其他领域的同道提供了单病种输血相应的治疗原则与操作方案。

主　　编:刘景汉　李志强　王海林

购买网址:人卫智慧服务商城　http://suo.im/2O5vkd

人民卫生出版社旗舰店　http://dwz.cn/dbzsxt

定　　价:55 元。人卫出版(ISBN 978-7-117-23893-9),2017 年 1 月。

· 论著 ·

人凝血因子Ⅸ-R338A 高活性突变体在毕赤酵母中的表达及活性测定

戴永刚　尹胜菊　程凤凤　程世亮　张艳丽　李萌　王园　刘新凤
（山东省交通医院 检验科，山东 济南 250031）

摘要：目的　人凝血因子Ⅸ（hFⅨ）在人类内源性凝血过程中起着非常重要的作用。hFⅨ表达量绝对或相对不足会导致 B 型血友病。本研究用毕赤酵母生产重组高活性突变体 hFⅨ-R338A。**方法**　首先构建 pPICZaA-hFⅨ-R338A 酵母分泌表达载体，其次将其用电转化入毕赤酵母 SMD1168 中，再次利用 G418 抗药性的能力筛选表达量高的单克隆重组菌株，培养并将表达产物纯化，稀释后检测其凝血活性。**结果**　通本研究获得的重组 SMD1168-hFⅨ-R338A 表达量达到（90-120）mg/L；比活力约为人血中野生型 hFⅨ凝血活性的（38.93±5.1）%，比野生型的酵母重组 hFⅨ高 6.85 倍。**结论**　人凝血因子Ⅸ高活性突变体 R338A 是潜在的天然凝血因子替代品。

关键词：人凝血因子Ⅸ高活性突变体；毕赤酵母；蛋白表达
中图分类号：R457.1^{+}1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1004-549X（2017）3-0276-03

Expression and activity assay on highly active mutant R338A of FⅨ in Pichia Pastoris　*DAI Yonggang, YIN Shengju, CHENG Fengfeng, CHENG Shiliang, ZHANG Yanli, LI Meng, WANG Yuan, LIU Xinfeng. Shandong Jiaotong Hospital, Jinan* 250031, *China*

Abstract: Objective　Human coagulation factor Ⅸ (hFⅨ) plays a very important role in intrinsic coagulation in humans. The absolute or relative lack of hFⅨ can lead to hemophilia B. In this study, recombinant and high activity mutant hFⅨ-R338A produced by Pichia pastoris was analyzed. **Methods**　First, PPICZaA-hFⅨ-R338A yeast expression vector was constructed, and then was transformed into Pichia pastoris SMD1168. The resistance ability of the recombinant strain was screened by G418, and the expression product was obtained and purified. **Results**　The production of recombinant SMD1168-hFⅨ-R338A achieved 90-120 mg/L in this study, which was approximately 38.93% of the natural hFⅨ coagulation activity, 6.85 times higher than that of the wild-type yeast recombinant hFⅨ. **Conclusion**　High activity mutant hFⅨ-R338A which is produced by Pichia pastoris exhibits potential to become replacement for natural hFⅨ.

Key words: human coagulation factor Ⅸ; high activity mutant; Pichia pastoris; protein expression

B 型血友病是 1 种凝血因子Ⅸ异常的 X 染色体连锁的遗传病，其原因是凝血因子Ⅸ绝对或相对缺乏，导致不同程度的出血倾向[1]。在内源性凝血机制中凝血因子Ⅸ水解成由轻链和重链组成的 hFⅨa。hFⅨa 可以绑定凝血因子Ⅷ和其他因子共同激活凝血因子 X 从而启动下游的凝血反应。因此，在凝血过程中，hFⅨ起着非常重要的作用[2]，因此补充 hFⅨ是治疗 B 型血友病的最好方法。但是无论是血液中提取的 hFⅨ或者真核生物表达生产的 hFⅨ（如辉瑞）[3]，其产量低，生产成本高，售价高昂。在前期的研究中我们已经用毕赤酵母 SMD1168 表达出了 hFⅨ。证明毕赤酵母可以作为 1 种较好的 hFⅨ表达系统，比较已上市的真核生物表达的 hFⅨ，其表达量有很大优势，但其凝血活性较低（5.5%）左右。有研究表明某些氨基酸的改变会增强其凝血活性[5-10]。在重链水解酶区的 R338 突变为 A 后，可以显著改变其蛋白酶活性达到原来的 2 倍左右[11-12]。因此，本文准备构建这种突变体提高酵母表达的凝血因子的活性。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器　基因定点突变引物序列 R338A1：5 · CGAGCCACATGTCTTGCTTC TACAAAGTTCACC · 3 R338A2：5 · GGTGAACTTTGTAGAAGCAA GACATGTGGC TCG · 3；检测引物序列 P07s：5 · CAAGGTGGTTTGCTCCTGTA -3 P07a：5 · TAGCTGCATTGTAGTTGTGGTG · 3 由上海生工合成；毕赤酵母 SMD1168 株（本实验室自制）；pPIC9K-hFⅨ和 pPICZaA 载体由本实验室构建；单克隆抗体（SANTA 公司）；凝血活性检测试剂盒（重庆血液制品研究所）等。普通 PCR 仪（珠海黑马）；BD 凝胶成像分析系统；蛋白电泳仪（天能）；Bio-RAD 电转化仪等（天能）。

1.2　方法

1.2.1　pPICZaA-hFⅨ质粒的构建　将 pPIC9K-hFⅨ和 pPICZaA 载体同时双酶切，将反应完的体系进行 1%琼脂糖凝胶电泳。切下目的条带（pPIC9K-hFⅨ的 1300 bp 和 pPICZaA 3600 bp），纯化目的基因和载体并测定含量。用 DNA 连接酶进行连接，将体系全部加入到 E. coli 感受态细胞中，进行转化操作，涂到 Amp-LB 培养板中。如转化和连接成功，样品板会长出若干菌落。每个板子上挑取 3 个生长良好、轮廓清晰的白色菌落，放入含有培养基三角瓶中摇瓶培养。提取质粒测序，比对目标序列，筛选出完全正确的菌进行保种。

1.2.2　突变质粒的构建　用 PFU 酶体系进行突变，之后用 DpnI 酶切反应体系进行线性化。在感受态细菌中加入所有

doi：10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.015

经过 Dpn I 消化并纯化后的突变产物,全部涂布到含有适当抗生素的平板上,培养过夜。挑选单克隆菌落进行酶切鉴定,确认得到的质粒的大小和质粒中插入片断的大小与预期是否相符。取 3-5 个酶切鉴定正确的克隆测序,最终确认得到的是预期的突变克隆。

1.2.3 转化构建重组酵母 用 *Sac* Ⅰ线性化 pPICZaA-hFⅨ及空载体分别与感受态酵母细胞混匀,冰浴,用 Bio-Rad 电转仪转化。电击结束后立即加入山梨醇溶液,混匀。转化物涂布于 RD 选择性平板上, 28 ℃培养 48-96 h,观察转化子的生长。再将 RD 平板上生长的阳性克隆分别转种至高浓度 YPD-G418 平板上正常生长的菌落即为高拷贝整合菌株。

1.2.4 表达 挑取筛选出的高拷贝整合菌株于 BMGY 培养基中,摇瓶培养至对数生长期,分离菌体。再重悬并震荡培养,每隔 24 h 加入甲醇 48 h 分离取上清。

1.2.5 纯化 表达上清先用透析袋尽量除去培养基成分,再用阴离子交换层析进行分离,采用线性密度缓冲液洗脱和收集蛋白峰,最后进行浓缩和冻干。

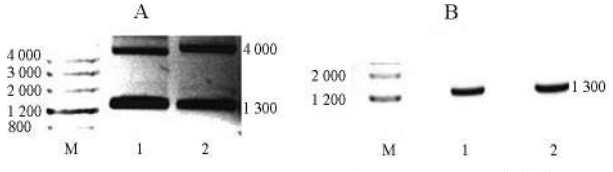
1.2.6 重组蛋白检测及活性测定 用 SDS-PAGE 电泳分离重组蛋白,将 50 kD 左右的条带电转移到硝酸纤维素膜上,用鼠抗 hFⅨ抗体做 Western blot,初步验证表达纯化产物是否为 hFⅨ。

1.2.7 凝血活性测定 测定前,将样品稀释为 5 mg / L。将标准血浆用稀释液Ⅰ作 1/5-1/160 倍比稀释,其对应的 hFⅨ:C 百分活性为 200%-6.25%。hFⅨ蛋白活性测定按照试剂盒说明书进行。

1.2.8 所有实验至少重复 3 次 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,结果用 SPSSl8.0 统计软件进行分析,数据比较应用 t 检验,$P<0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pPICZaA-hFⅨ的构建结果 按照质粒构建流程图所示,前期已构建好的 pPIC9K-hFⅨ和 pPICZaA 载体用 Xho I 和 Not I 进行双酶切,将得到的目的片段和 pPICZaA 切开的载体进行连接,构建 pPICZaA-hFⅨ质粒。然后用 P06s 和 P05a 引物进行 PCR 验证,结果如 B 图所示,证明可以得到目的条带;如图 A 所示,用 XhoI 和 Not I 进行双酶切进行双酶切验证,证明可以得到目的条带(1500 bp)和载体(5400 bp),进一步证明 pPICZaA-hFⅨ质粒构建成功。挑取 3 个单克隆进行测序,得到了含完全正确的 hFⅨ编码不含信号肽的 cDNA 序列的 pPICZaA-hFⅨ质粒。如图 2 所示,经过目的基因的测序,筛选出只有目的位点突变的质粒,和基因文库中的待突变位点都突变变成设计后的位点。



A:为 Xho I 和 Not I 双酶切验证,其中 1-2 为两个单菌落;
B:PCR 验证,其中 1-2 为两个单菌落

图 1 pPICZaA-hFⅨ质粒构建鉴定

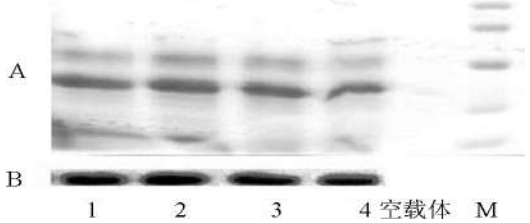
图 2 突变质粒的构建结果测序

2.2 毕赤酵母的转化、筛选和表达 将毕赤酵母 SMD1168 菌株进行感受态的制备,电转化转入 pPICZaA-hFⅨ-R338 突变质粒及 pPICZaA 空质粒,筛选 Mut^+ 和多拷贝菌株,成功筛选的候选菌株进行基因组 PCR 筛选,用 P07s 和 P07a 引物 PCR,结果如图 3 所示,在 500 bp 的位置有目的条带,证明菌株成功的转入各种突变质粒并发生整合,SDS-PAGE 和 Western Blot 检测表达结果。将筛选出来的突变型菌株进行诱导表达 48 h,提取表达上清,制样,SDS-PAGE 电泳并用 Western Blot 进行检测,如图 4-A 所示,发现每种突变体菌株表达上清制样 SDS-PAGE 电泳后在 55KD 的位置上均有 1 个明显的蛋白条带;如图 4-B 所示,用 hFⅨ的单克隆抗体和每种突变体蛋白做 Western Blot 时也可以得到较清晰的条带,由于位置和免疫原性均符合 hFⅨ的特性,所以可以初步认定各种突变体 hFⅨ得到了表达;如图 5 所示,纯化的蛋白 SDS-PAGE 电泳检测时均没有明显杂蛋白条带。

2.3 重组突变的 hFⅨ蛋白凝血活性 通过测定标准血浆的凝血时间,得到的回归方程如下:Y = -11ln(x) + 86.9 R2 = 0.955。其中 X 为样品的凝血时间(s),Y 为凝血活性 hFⅨ:C(%),每个样品测量 3 次。测定各种突变体 hFⅨ的凝血时间。结果如图 6 所示,用毕赤酵母 SMD1168 表达的各种 hFⅨ有活性,比较空载体的表达上清均有显著差异($P<0.05$)。具体数值见表 1。

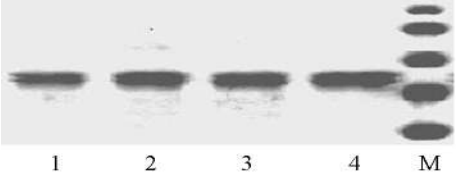
1:SMD1168-hFⅨ-R338A

图 3 突变体质粒转入菌体后的转化子基因组 PCR 筛选



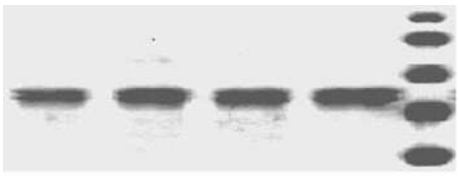
A:突变体菌株表达上清 SDS-PAGE 电泳图;其中 1-4 为 hFⅨ-R338A 筛选的 4 个菌株;B:相对应的 Western Blot 检测结果

图 4 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 检测突变体蛋白表达



1-4:hFⅨ-R338A 筛选的 4 个菌株

图 5 突变体蛋白纯化后 SDS-PAGE 电泳检测



纵坐标为凝血活性 hFⅨ:C)

图 6　突变体 hFⅨ蛋白活性比较

表 1　突变体 hFⅨ凝血活性 hFⅨ:C(%)

类型	hFⅨ:C	突变体/野生型
空载体	0.00	0.00
F9(未突变)	5.69(±1.2)	1.00
R338A	38.93(±5.1)	6.85

3　讨论

R338 位点位于 hFⅨ C 端的类凝乳蛋白酶区域,该区域是个典型的蛋白酶区域,有类似凝乳蛋白酶的活性。有报道显示 R338 突变成 A 后,凝血活性比野生型 hFⅨ高 2.5-3 倍。在 hFⅨ的立体结构中 R338 位点在靠近蛋白酶活性区域口袋的外缘,与蛋白酶的活性中心距离较远[12],所以不能通过加强蛋白酶活性中心的催化能力,而是通过增强与 hFⅧa 的结合能力来实现的;同时,R338 还是潜在的蛋白酶剪切位点,可以被识别 Arg 的蛋白酶(如凝血酶)切断从而影响 hFⅨ蛋白酶的活性。突变后潜在的酶切位点消失后,hFⅨ变得比野生型更加稳定;再次,肝素是 hFⅩ的非竞争性抑制剂,可以强烈抑制 hFⅩase 的活性,从而起到抗凝血的作用,同时它不仅抑制 hFⅩ,还可以抑制 hFⅨ。研究发现肝素与 hFⅨa 的结合位点正好位于 R338 位的 Arg 处,当突变发生后肝素与 hFⅨa 的结合能力降低了 2 倍,这使得其对 hFⅩase 的抑制作用大大下降,相应提高了 R338A-FⅨa 的凝血活性。

本试验结果得到的结论是点突变 hFⅨ可以提高酵母表达的凝血因子的活性。在本试验中构建的 hFⅨ-R338A 凝血活性为 38.93%,比酵母表达的野生型 hFⅨ活性 5.69%增加了 6.85 倍,虽然原核生物表达的 hFⅨ活性比较天然 hFⅨ还有一定的差距,但是本试验构建的酵母表达菌摇瓶表达量一般都在>100 mg/L 的水平,表达量较高,可以大大降低生产成本,因此酵母表达 hFⅨ的高活性突变体在研制 hFⅨ蛋白质药物方面有较大的价值和意义[12-13],可以实现 hFⅨ的高效表达。

参　考　文　献

[1] Dahlback B. Blood coagulation. TheLancet, 2000, 355(9215): 1627-1632.

[2] Buenas S, Mann KJ. Blood coagulation. Biochemistry (MOSC). 2002, 67(1): 3-12.

[3] 赵彦鼎.人血源凝血因子Ⅸ纯化研究概况.中国输血杂志, 2006,19(5):412-415.

[4] Kasper CK, Osterud B, Minami JY,et al. Hemophilia B: characterization of genetic variants and detection of carriers. Blood, 1977, 50(3): 66-351.

[5] Misawa S, Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies. Biopolymers, 1999, 51(4): 297- 307.

[6] Kelly ME,Zhuo J.Induction of immune tolerance to FⅨ following muscular AAV gene transfer is AAV-dose/FⅨ-level dependent. Molecular Therapy,2009,17(5):124-135.

[7] Kane JF, Hartley DL. Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in Escherichia coli. Bioprocess Technol, 1991, 12(5): 121- 145.

[8] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in E. coli. Curr Opin Biotechnol, 1998, 9(5): 497-501.

[9] Hou J, Yan R, Yang L, et al. High-level expression of fusion protein containing 10 tandem repeated GLP-1 analogs in yeast Pichia Pastoris and its biological activity in a diabetic rat model. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71 (6): 1462-1469.

[10] MutucuMarana VP,Duffy EJ,Lotlar P,et al.The active site of Factor Ⅸa is located far above the membrane surface and its conformation is altered upon association with factor Ⅷa A fluorescence study. J Biol Chem,1992,267(24):17012-17021.

[11] LU HZ,CHEN L,WANG HW, et a1. Gene therapy for hemophil ia B mediated by recombinant adeno-associated viral vector with hFⅨ-R338A,a high catalytic activity mutation of human coagulation Factor Ⅸ.Science in Chice(C),2001,44(6):585-592.

[12] Yan JB, Wang S, Huang WY, et al. Transgenic mice can express mutant human coagulation factor Ⅸ with higher level of clotting activity. Biochemical Genetics, 2006, 44(7-8): 347-358

[13] Clifton J, Huang F, Gaso-Sokac D, et al. Use of proteomics for validation of the isolation process of clotting factor Ⅸ from human plasma. J Proteomics , 2009(3): 11-16.

(2016-09-02 收稿,2017-03-16 修回)

本文编辑:夏玲

欢　迎　赐　稿　　欢　迎　订　阅

《中国输血杂志》邮发代号:62-186

· 论著 ·

国内常用 7 家 HBsAg 酶免检测试剂盒灰区临界值的确定

王庆敏 冯晨晨 蒋昵真 胡文佳 朱绍汶 黄成垠△(江苏省血液中心,江苏 南京 210042)

摘要:目的 采用约登指数(Youden index)对国内常用 HBsAg ELISA 血液筛查试剂的阳性判定值进行验证,探讨其"灰区"设置的必要性及设定范围。**方法** 利用 SPSS 软件对国家卫计委临床检验中心的"血液筛查试剂多中心评估项目"数据进行统计分析。计算在不同 S/CO 值下试剂的灵敏度、特异性及约登指数,约登指数=(灵敏度+特异性)-1,以 S/CO 值为横坐标,约登指数为纵坐标,绘制曲线,观察每种试剂在最大约登指数下的 S/CO 值。**结果** 代码为 23003、23081、23043、23001 的国产试剂,在 S/CO 值为 0.2-0.4 时,其约登指数最大;代码为 23021、23089、23107 的进口试剂,约登指数最大时的 S/CO 值为 0.5-0.7。**结论** 被评估的 7 家 HBsAg 酶免筛查试剂盒均有必要设置"灰区";其阳性判定值设定为国产试剂 S/CO≥0.3、进口试剂 S/CO≥0.6 为宜。

关键词:献血者;酶免检测;灰区;约登指数

中图分类号:R457.1 R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0279-03

Analysis and verification of the cut-off value in domestic HBsAg ELISA kits during blood donation screening using Youden index

WANG Qingmin, FENG Chenchen, JIANG Nizhen, HU Wenjia, ZHU Shaowen, HUANG Chengyin. Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042, *China. Corresponding author: HUANG Chengyin*

Abstract: Objective To verify the cut-off value of seven domestic HBsAg ELISA kits using the Youden index, and to evaluate the necessity of setting a gray zone range. **Methods** Data were collected from evaluation of blood screening reagents by multiple centers, which were organized by the National Health and Family Planning Commission of National Center for Clinical Laboratory of China. SPSS statistic system was used to analyze the data. The Youden index were calculated under different S/CO values. The Youden index equaled to sensitivity plus specificity minus 1. Each curve was plotted by the S/CO value on the horizontal axis and Youden index on the vertical axis. **Results** Among HBsAg ELISA kits from seven manufacturers, the Youden index obtained a maximal peak when the S/CO values of the NO. 23003, 23081, 23043 and 23001 domestic reagents ranged from 0.2 to 0.4. Meanwhile, when the S/CO value of the NO. 23021, 23089 and 23107 imported reagents ranged from 0.5 to 0.7, the Youden index obtained the maximal peak. **Conclusion** It is necessary to set up the gray zone range for seven evaluated HBsAg ELISA kits. The cut-off values for domestic ELISA kits are greater than or equal to 0.3, while no less than 0.6 for imported kits.

Key words:blood donor; ELISA; gray zone range; Youden index

ELISA 已成为采供血机构最常规的血液筛查方法,其结果判断是根据被测物的吸光度值同 Cut off 的比值(S/CO 值)来决定,一般将 S/CO 值≥1,判断为反应性;S/CO 值<1,则判断为阴性。为了提高血液的安全性,许多实验室将判定值下移,即设置"灰区"。其主要目的是减少弱阳性标本的漏检。

目前国内对"灰区"设置并无统一标准,对此也有所争议。随着 ELISA 检测试剂质量的不断改进,实验室质量管理的不断完善,以及血站核酸检测的全覆盖,灰区设置对于提高血液安全的作用需要做进一步评估和验证。我们根据国家卫计委临床检验中心牵头组织的"血液筛查试剂多中心评估项目"所得数据,利用 SPSS 统计软件计算每种试剂不同 S/CO 值下的约登指数,并绘制曲线图。对国内血站常用的 ELISA 筛查血液 HBsAg 试剂盒的判定值进行了验证,探讨 HBsAg ELISA 血液筛查试剂设置"灰区"的必要性,以及其设定的范围,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本总数为 1 478 份,其中 ELISA 筛查 HBsAg 反应性标本 896 份,阴性标本 582 份。标本来自于国家卫计委临床检验中心、11 个血液中心和 3 个中心血站。标本留取使用统一的 5 mL 试管,每个标本(血袋)留取 10 管血浆,每管约 3 mL。在检验报告发布 12 h 内留取,并在-25℃以下冻存。

1.2 标本处理 3 支寄到国家卫计委临床检验中心进行化学发光检测及确认实验,3 支标本管分别寄送到参与评价的 3 家血站的实验室进行检测,其余标本在留样血站保存备用。标本均在 10℃以下快递运输。

1.3 试剂评价范围与方法

1.3.1 试剂盒选择 在全国血站使用量超过 2%的 7 个厂家的试剂盒,厂家试剂代码为:23003、23001、23021、23089、23107、23081、23043,其中国产 4 家,进口 3 家。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.016

△通信作者:黄成垠(1963.12-),主任技师,主要从事血液筛查策略及血液保存新技术的研究,电话:025-85411806,Email:huangchengyin1223@126.com

1.3.2　血站实验室选择　选择 3 家使用同一厂家试剂的血站实验室,采用血站常规应用的血液筛查工作平台,对标本进行平行检测,均以 S/CO≥1 判定为阳性,S/CO<1 判定为阴性为结果判定标准。同时报告标本检测的 S/CO 值。

1.3.3　厂家试剂检测结果的确定　各血站检测结果均为阳性时,结果判定为阳性;检测结果均为阴性时,结果判定为阴性;检测结果不一致时,以多数实验室的检测结果为准。

1.3.4　标本最终结果的确定　国家卫计委临床检验中心使用雅培和罗氏的化学发光试剂进行平行检测,各参与血站使用各厂家的 ELISA 试剂常规检测,所有厂家检测结果均为阳性时即确定为真阳性,所有厂家检测结果均为阴性时即判为真阴性,结果不一致时,进行确认。中和试验采用对应的雅培或罗氏的中和试剂进行,有任何一家确认试剂确认为阳性的,该标本检测结果即为阳性。剔出结果不确定的标本,不纳入数据统计。

1.4　统计学分析　利用 SPSS 软件(17.0)分析试剂评估数据。计算在不同 S/CO 值下试剂的约登指数,约登指数=(灵敏度+特异性)-1,以 S/CO 值为横坐标,约登指数为纵坐标,绘制曲线。

2　结果

896 份 HBsAg 检测反应性标本,经确认真阳性标本 584 份,阴性 312 份;582 份阴性标本,经确认均为阴性。每个厂家的试剂均有 3 个血站的实验室参与了评估。4 个国内厂家的 ELISA 检测试剂盒不同界点值(S/CO 值)下的约登指数,见图 1;3 个国外厂家 ELISA 检测试剂盒不同界点值(S/CO 值)下的约登指数,见图 2。各试剂在最大约登指数下的灵敏度、特异性及 S/CO 值见表 1。

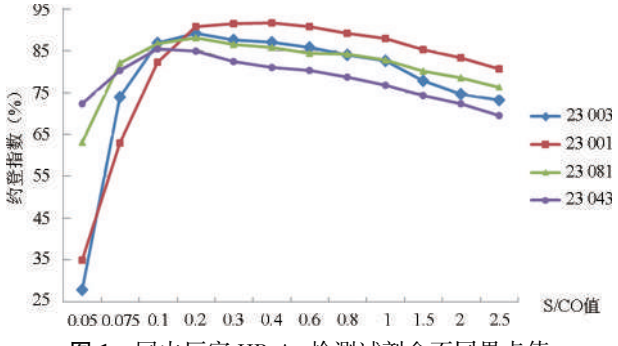


图 1　国内厂家 HBsAg 检测试剂盒不同界点值(S/CO 值)下的约登指数

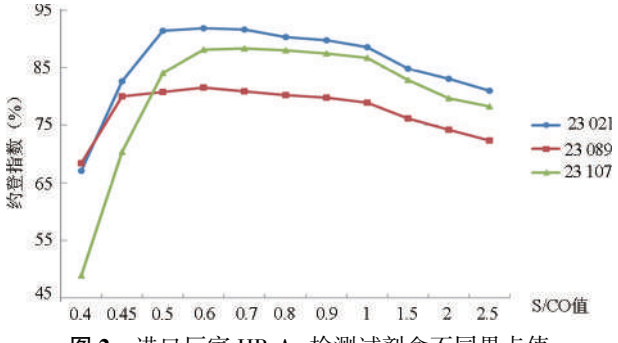


图 2　进口厂家 HBsAg 检测试剂盒不同界点值(S/CO 值)下的约登指数

表 1　各试剂最大约登指数下的 S/CO 值及其灵敏度和特异性

		最大约登指数	灵敏度(%)	特异性(%)	S/CO 值
试剂代码	23003	0.88	95.4	91.6	0.2
	23081	0.88	96.6	91.8	0.2
	23043	0.85	92.0	93.0	0.3
	23001	0.92	96.2	95.4	0.4
	23021	0.92	96.8	95.2	0.5
	23089	0.82	92.5	89.1	0.6
	23107	0.88	94.0	94.4	0.7

3　讨论

ELISA 检测试剂盒的 cut-off 值设定,常用的方法有[1]:1)测定标本对阴性比值,即 cut-off = 2 或 3×(阴性对照吸光度值的均值);2)以阴性对照吸光度均值+2 SD 或 3 SD,即 cut-off =95.3%(单侧)的可信度+2 SD,或 99%(单侧)的可信度+3 SD;多种厂家的试剂盒均采用以上 2 种方法,方法简单易行,但仅考虑了阴性人群,可能会导致假阴性比例较高。3)综合阴性对照吸光度均值+2 SD 或+3 SD/阳性对照吸光度-2 SD 或-3 SD 和转化血清结果,这是较好的模式,但由于转化型血清标本难以得到,因次应用有一定难度。4)使用受试者工作特性(ROC)曲线设定 cut-off 值是较好的方法,它可同时兼顾方法的灵敏度和特异性。

约登指数是筛检试剂较好的评价指标,约登指数=(灵敏度+特异性)-1 或 1-(假阴性率+假阳性率),它表示筛检方法发现真阳性与真阴性的总能力,约登指数的范围在 0-1 之间,指数越大,其真实性越高。以不同界点值为横坐标,约登指数为纵坐标,绘制曲线,可以确定筛查试剂及诊断实验的最佳界点值[2-4]。

有资料表明,在 ELISA 检测 S/CO<1 的灰区标本中,经确证试验和核酸检测确认,有一定比例的标本为真阳性,为了提高血液安全,减少这部分标本的漏检,多数实验室将 cut-off 值下移,即设置灰区,其设置范围从 0.1-0.8 不等[5-8]。但灰区设置多少并没有标准依据,所以对此也意见不一。我们采用国家卫计委临床检验中心牵头组织的血液筛查试剂评估项目的数据,对国内常用的 ELISA 检测 HBsAg 试剂盒设定的判定值(S/CO 值)进行验证,结果表明,其结果判定的最佳界点值并非 S/CO≥1,由图 1、图 2 和表 1 的结果可以看出,代码为 23003、23081、23043、23001 的国产试剂,在 S/CO 值为 0.2-0.4 时,其约登指数最大;代码为 23021、23089、23107 的进口试剂,约登指数最大时的 S/CO 值为 0.6-0.7。

被评估的 7 个厂家 ELISA 检测 HBsAg 试剂盒,其界点值的设定方法多采用 cut-off=2 或 3×(阴性对照吸光度值的均值),以及 cut-off =阴性对照吸光度均值+2 SD 或+3 SD,这些设定方法会导致弱阳性标本的漏检,所以设置灰区是有必要的,设定的范围需要实验室的验证,此外还要结合本实验室的检测能力,来确定其阳性判定值的范围。

(致谢:国家卫计委临床检验中心血液筛查试剂评估项目组成员单位:国家卫计委临床检验中心、北京市红十字血液中心、上海市血液中心、天津市血液中心、河北省血液中心、江苏省血液中心、辽宁省血液中心、黑龙江省血液中心、

· 论著 · · 临床研究 ·

Rh 血型系统相容性输血在儿科中的应用探讨

邵智利[1] 韩利霞[1] 马德冉[1] 刘建玲[1] 王乐[1] 陈静[2] 田野[1] 刘景汉[3]
(1.河北省儿童医院 输血科,河北 石家庄 050031;2.河北医科大学附属第三医院;3.解放军总医院)

摘要:目的 将 Rh 血型系统相容性输血应用在儿科输血中。**方法** 采用微柱凝胶法,对本院 2015 年 5 月-2016 年 7 月临床申请输血的患儿血液标本 3 254 例、献血者血液标本 6 851 例做 ABO 和 Rh 血型表型鉴定并将检测结果录入输血信息管理系统,经过电子比对筛选,共做 4 493 次交叉配血。**结果** 本组输血患儿与本地献血者的 Rh 表型分布频律从高到低为 CCDee:38.94%(1 267/3 254) *vs* 41.67%(2 855/6 851),CcDEe:38.60%(1 256/3 254)*vs* 35.50%(2 432/6 851),CcDee:9.25%(301/3 254)*vs* 9.56%(655/6 851),ccDEE:7.87%(256/3 254)*vs* 7.95%(545/6 851),ccDEe:4.36%(142/3 254)*vs* 4.11%(282/6 851),CCDEe:0.34%(11/3 254)*vs* 0.63%(43/6 851)、ccDee:0.40%(13/3 254)*vs* 0.31%(20/6 851)、CcDEE:0.25%(8/3 254)*vs* 0.28%(19/6 851)、CCDEE:0(0/3 254)*vs* 0(0/6 851)($P<0.05$);在 4 493 次交叉配血中,有 3 273 次受血者和献血者 Rh 抗原表型一致,713 次受血者与献血者抗原非一致性但是符合相容性输注,507 次输血患儿的 Rh 表型与献血者的不相容,Rh 系统抗原相容性输血比例达到 88.72%(3 986/4 493)。**结论** 采用 Rh 系统相容性输血可有效地预防输血患儿免疫抗体的产生;同时可方便快捷地满足 Rh 系统不规则抗体阳性患儿输血和重度高胆红素血症患儿换血对血源的需求。

关键词:相容性输血;Rh 血型;Rh 抗原;交叉配血;儿科输血
中图分类号:R457.1+1 R720.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0281-04

The application study of Rh blood group system compatibility management in pediatric transfusion

SHAO Zhili[1] *HAN Lixia*[1] *MA Deran*[1] *LIU Jianling*[1] *WANG Le*[1], *CHEN Jing*[2], *TIAN Ye*[1], *LIU Jinghan*[3] 1. *Children's Hospital of Hebei Province*, *Shijiazhuang* 050031, *China*; 2. *The Third Hospital of Hebei Medical University*; 3. *The General Hospital of Chinese People's Liberation Army*

Abstract: Objective To apply the Rh compatibility system into the pediatric transfusion therapy. **Methods** Blood specimens from 3 254 children patients and 6 851 donors were collected from May 2015 to July 2016. The Rh groups of these participants were tested by micro-column gel method. A total of 4 493 times of cross matching assay were done with the electronic blood bank protocols. **Results** The Rh blood phenotypes were significantly distributed between donors and recipients ($P<0.05$). The frequencies were CCDee 38.94% (1 267/3 254) vs 41.67% (2 855/6 851), CcDEe 38.60% (1 256/3 254) vs 35.50% (2 432/6 851), CcDee 9.25% (301/3 254) vs 9.56% (655/6 851), ccDEE7.87% (256/3 254) vs 7.95% (545/6 851), ccDEe 4.36% (142/3 254)vs 4.11% (282/6 851), CCDEe0.34% (11/3 254) vs 0.63% (43/6 851), ccDee0.40% (13/3 254) vs 0.31% (20/6 851), CcDEE0.25% (8/3 254) vs 0.28% (19/6 851), CCDEE0% (0/3 254) vs 0% (0/6 851), respectively. Among the 4 493 times of cross matching based on the Rh group, the consistent antigen phenotype was observed in 3 273 pairs, 713 cases were not consistent, but compliant with the compatibility transfusion rules, 507 cases were not compliant with the rules. In sum, the compatible transfusion rate reached up to 87.28% (3 986/4

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.017

山东省血液中心、河南省血液中心、深圳市血液中心、重庆市血液中心、云南省血液中心、吉林省血液中心、山东菏泽市中心血站、湖北襄阳市中心血站、河北沧州市中心血站等)

参 考 文 献

[1] 李金明.临床酶免疫测定技术.北京:人民卫生出版社,2005:104.
[2] 唐婧,包建玲,孟存仁,等.ROC 曲线对 ELISA 检测丙型肝炎抗体阳性判断值的确定和分析.检验医学,2014,29(8):826-830.
[3] 陈木新,陈家旭.3 种 ELISA 试剂检测并殖吸虫病的效果评价.中国血吸虫病防治杂志,2016,28(3):264-268.
[4] 徐林发,汪素珍,王柏省.应用 ROC 曲线求解最佳切点的方法介绍.中国卫生统计,2011,28(6):701-703.
[5] 陈善华,李丽莉,李浩,等.ELISA 方法检测 HBsAg 设置灰区的必要性探讨.中国输血杂志,2013,26(10):1013-1014.
[6] 陈洪生,陈佳徽,张三明,等.ELISA"灰区"范围的设定对献血者血液检测安全和血源保护的意义.中国输血杂志,2015,28(9):1140-1141.
[7] 李秀,王红丽,马超,等.ELISA 方法定性检测 HBsAg 灰区和相关实验室结果分析.中国实验诊断学,2014,18(2):290-291.
[8] 陈显,胡文佳,黄成垠,等.献血者 ELISA 检测为灰区标本的确证实验及核酸检测情况分析.中国输血杂志,2015,28(2):198-199.

(2016-09-27 收稿,2017-03-01 修回)
本文编辑:闻欣

493). **Conclusion** The Rh compatibility transfusion could prevent the antibody production in pediatric blood recipients. In addition, the transfusion demand from systemically irregular antibody-positive children and pediatric patients with severe hyperbilirubinemia can be met.

Key words: compatibility transfusion; Rh group; Rh antibody; cross matching; pediatric transfusion.

Rh 血型是 ABO 血型系统之外与输血安全关系最为密切的红细胞血型系统,在输血医学中的地位极其重要。由于 Rh 血型不合导致的严重的免疫溶血性输血反应(HTR)及新生儿溶血病(HDN)时有发生[1],国内外许多医院对长期输血患者做 Rh 血型交叉配型后输血效果显著[2-4];国内已有血站建立了 Rh 血型表型数据库服务于临床[5]。本院自 2015 年 5 月起对入院拟输血患儿和拟输血液(献血者)做 Rh 血型系统 D、C、c、E、e 抗原表型检测,并建立相应数据库,根据表型一致或少抗原血液输给多抗原患者的原则做交叉配血,现回顾性分析报道如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象　1)本院 2015 年 5 月-2016 年 7 月住院的所有输血患儿 3 254 名,年龄为出生 1 h-14(中位年龄 2.3)岁,男性 1 825 人、女性 1 429 人;2)同期河北省血液中心供应本院的血液 6 851 U(1 U=200 mL 红细胞)。2 组对象均作了 ABO 和 Rh 血型系统全套抗原的检测、不规则抗体筛查和抗体特异性鉴定以及交叉配血试验,患儿血样采集 3 mL/人(份),献血者血标本为血袋上预留全血标本为 3 mL,患儿标本以 EDTA-K_2抗凝,2 种标本均在 4℃保存。

1.2　试剂与仪器　ABO 标准血清、抗球蛋白试剂、谱细胞(上海血液生物医药有限责任公司提供);ABO 血型定型红细胞、ABO/RhD 血型定型检测试剂卡、Rh 血型分型检测卡、抗球蛋白(IgG)检测卡、血型分析用稀释液、不规则抗体筛选红细胞(江苏力博医药生物有限公司提供);所有试剂均为批批检合格产品且在有效期内使用。全自动血型及配血分析系统(ZJWT-2100,江苏中济万泰生物医药有限公司);离心机(Baso 2005-2,台湾 BASO 企业有限公司);微柱凝胶板式离心机(LB-3000)和试剂卡孵育器(LB-37)(江苏力博医药生物有限公司);输血信息管理系统(海慧输血管理系统 TMS3.0,北京海慧软件有限公司)。

1.3　输血前血型血清学检测　输血前 ABO 和 Rh 抗原检测、不规则抗体筛选、输血前交叉配血试验均严格按文献[6]方法和试剂使用说明书操作。

1.3.1　ABO、Rh 血型鉴定　采用试管法及卡式法(全自动设备加样)2 次鉴定,结果一致录入血型鉴定结果;抗体筛选试验均采用卡式法(机器或手工加样);所有检测结果由人工全自动配血分析系统录入科室输血信息管理系统数据库中。

1.3.2　不规则抗体筛选和鉴定　用生理盐水将筛选红细胞配制成 0.8%-1%红细胞悬液,按照不规则抗体筛选红细胞试剂说明书操作,检测患者血清中是否有不规则抗体。

1.3.3　交叉配血　根据 Rh 配型输血原则(表 1),按照女性、多次输血患儿、危重患儿的顺序优先选择献血者(血液),对于无法找到相同或相合血液的少数稀有 Rh 表型患儿,提供其他 Rh 表型献血者血液。

表 1　献血者与受血者卡式法(手工加样)交叉配血试验相合/相容性格局

受血者	献血者								
	CCDee	CcDEe	CcDEE	CcDee	ccDEE	ccDEe	CCDEe	CCDEE	ccDee
CCDee	☆								
CcDEe	▲	☆	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
CcDEE			☆		▲			▲	
CcDee	▲			☆					▲
ccDEE					☆				
ccDEe					▲	☆			▲
CCDEe	▲						☆	▲	
CCDEE								☆	
ccDee									☆

☆ 相合性输注;▲ 相容性输注

1.4　输血患儿与献血者(血样)RhC-c、E-e 之间的不配合概率　不配合率计算公式:对偶抗原 C 和 c 之间的不配合概率(MMPCc)=$C^2(1-C^2)+c^2(1-c^2)$,MMPEe=$E^2(1-E^2)+e^2(1-e^2)$;C-c、E-e 之间的总体不配合概率($MMP_{总}$)=$MMP_{Cc}\times MMP_{Ee}$[11]

1.5　统计学处理　采用 SPSS 19.0 统计软件,不同(地区)人群之间的 Rh 系统表型分布比例比较采用χ^2检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　3 254 名输血患儿与献血者(血样)Rh 抗原表型检测分布频率　本组输血患儿与献血者(血样)抗原表型分布频率均为 CCDee>CcDEe>CcDee >ccDEE>ccDEe>CCDEe>ccDee>CcDEE>CCDEE($P<0.05$),其中 CCDee 与 CcDEe 2 个表型差异更明显($P<0.01$),其他表型频率相近($P>0.05$)(表 2)。本地献血者与国内 3 个地区献血人群的 Rh 表型频率比较,惟与南宁地区献血者有较大不同($P<0.05$)(表 3)。

2.2　3 254 名输血患儿既往输血情况与不规则抗体筛查　3 254名输血患儿中,有输血史者 457 例,占 14.04%;不规则抗体筛查阳性 84 例,占 2.58%,包括 Rh 系统 52 例[抗-D 12 例, Rh 系统其他抗体 40 例(76.92%),分别是抗-E 30 例、抗-C 7 例、抗-c 3 例],MN 系统抗体 18 例,冷抗体 10 例,Duffy 系统 2 例,不明原因抗体 2 例(表 4)

2.3　本院(组)输血患儿与献血者(血液)RhC-c 之间 MMP 35.33%,RhE-e 之间 MMP 27.58%,CcEe 抗原随机输注的 $MMP_{总}$ 53.17%。本院输血患儿 Rh 系统相容性输注达到 88.72%,不配合率降至 11.28%(表 5)。

表 2 3 254 名输血患儿与 6 851(人)份献血者(血样)Rh 血型分型(布)情况 (%)

	血型	CCDee	CcDEe	CcDEE	CcDee	ccDEE	ccDEe	CCDEe	CCDEE	ccDee	合计
受血者	A	305(9.37)	333(10.23)	1(0.03)	64(1.97)	59 (1.81)	32(0.98)	5(0.15)	0	1(0.03)	800(24.59)
	B	453 (13.92)	436(13.40)	2(0.06)	105(3.23)	103(3.17)	56(1.72)	3(0.09)	0	3(0.09)	1 161(35.68)
	O	377 (11.59)	370 (11.37)	3(0.09)	95(2.92)	68 (2.09)	45(1.38)	2(0.06)	0	6(0.18)	966(29.69)
	AB	132 (4.06)	117 (3.60)	2(0.06)	37(1.14)	26 (0.80)	9 (0.28)	1(0.03)	0	3(0.09)	327(10.05)
	合计	1 267(38.94) *	1 256 (38.60) *	8(0.25)	301(9.25)	256(7.87)	142(4.36)	11(0.34)	0	13(0.40)	3 254(100)
献血者	A	707(10.32)	648 (9.41)	5(0.07)	165(2.41)	145(2.12)	61(0.89)	11(0.16)	0	5(0.07)	1 747(25.50)
	B	1013(14.79)	845 (12.33)	6(0.09)	214(3.12)	199(2.90)	99(1.45)	15(0.22)	0	5(0.07)	2 396(34.97)
	O	869(12.68)	717 (10.47)	3(0.04)	210(3.07)	152(2.22)	95(1.39)	15(0.22)	0	6(0.09)	2 067(30.177)
	AB	266(3.88)	222 (3.24)	5(0.07)	66(0.96)	49(0.72)	27(0.39)	2(0.03)	0	4(0.06)	641(9.36)
	合计	2 855(41.67)	2 432(35.50)	19(0.28)	655(9.56)	545(7.95)	282(4.11)	43(0.63)	0	20(0.31)	6 851(100)

注:总体差异χ^2值为 14.753,$P<0.05$;*$\chi^2=9.8$,$P<0.05$

表 3 本地献血者(血样)Rh 血型分布情况及其与南宁、沈阳、山东献血者的比较 (%)

	n	CCDee	CcDEe	CcDEE	CcDee	ccDEE	ccDEe	CCDEe	CCDEE	ccDee
河北献血者	6 851	41.67 *	35.50 *	0.28 *	9.56	7.95 *	4.11 *	0.63 *	0	0.31
山东地区献血者[17]	401	39.15	37.41	0	10.22	7.23	3.49	1.50	0	1.0
沈阳地区献血者[18]	4 117	39.96	33.91	0.85	10.35	7.09	4.83	2.74	0	0.27
南宁地区献血者[19]	28 205	59.95	24.42	0.11	8.5	2.82	2.15	1.5	0.02	0.27

* 与南宁地区献血者比较χ^2值分别为 1 570、1 341、7.465、268、46.036、47.146,$P<0.01$

表 4 84 例 Rh 系统及其他不规则抗体阳性类型统计

	n	比例(%)
Rh 系统抗体	52	61.90(52/84)
抗-D	12	23.08(12/52)
抗-E	30	57.69(30/52)
Rh 系统其他抗体	10	19.23(10/52)
MN 抗体	18	21.43(18/84)
冷抗体	10	11.90(10/84)
duffy 抗体	2	2.38(2/84)
不明原因抗体	2	2.38(2/84)
合计	84	2.58(84/3 254)

注:本组数据中,HDN55 例,其中 Rh 抗体 52 例、MN 抗体 1 例、Duffy 抗体 2 例

表 5 本院 2015 年 5 月-2016 年 7 月输血患儿 Rh 系统相合性输注情况 (%)

	相合性输注	相容性输注	不相容输注	合计
A 型	815(18.14)	192(4.27)	131(2.92)	1 138(25.33)
B 型	1 163(25.88)	225(5.01)	141(3.14)	1 529(34.03)
O 型	1 040(23.15)	196(4.36)	118(2.63)	1 354(30.14)
AB 型	255(5.70)	100(2.23)	117(2.60)	472(10.51)
合计	3 273(72.85)	713(15.87)	507(11.28)	4 493(100)

3 讨论

目前已发现的 Rh 抗原有 55 种,Rh 是最具遗传多态性的红细胞血型系统,除有个别抗-E 在无刺激条件下出现的例子外,绝大多数 Rh 抗体都是通过妊娠和输血免疫产生的,其中的不规则抗体也是临床输血引起交叉配血不合最主要的原因,严重者常致免疫性输血反应和 HDN[7]。由于国内临床较早就开展 RhD 相容性输血、围生期孕妇免疫性抗体监测和治疗,故抗-D 检出率呈逐年下降趋势[8];同时,我国 RhE 阴性的人群比例却高于 RhD 阴性者[9-10]。国外的研究早已指出,1 次随机输血产生抗-E 的概率为 0.004 217,为抗-D 的 2.49 倍[11];国内也有临床研究报告证实,在临床检出的不规则抗体中 Rh 抗体比例>7 成,其中除抗-D 以外的抗体比例>6 成。本组住院输血患儿中,检出不规则抗体 84 例,Rh 抗体占绝大对数,其次为 MN 抗体,剩余极少的 Duffy 抗体。本组输血患儿带不规则抗体者中的绝大多数检出自 HDN,其中 Rh 系统 HDN 中,抗-D 只占 23.08%(12/52),而抗-E 达到 57.69%(表 4)。有研究证实,人群中高比例 E 阴性抗原女性的妊娠免疫会给新生儿带来极大风险[12]。由此我们认为,Rh 系统配合性输注,能降低女性的输血免疫风险,减轻未来妊娠免疫性抗体对新生儿的伤害,尤其是“二胎”国策推出后,这种妊娠免疫风险的机会在升高。

本组 RhCcEe 抗原随机输注的 MMP 为 53.17%,本院通过建立 Rh 系统输血数据库,运用输血管理系统电子对比配血后 MMP 仅为 11.28%,大大降低了输血不配合比例与产生 Rh 抗体的风险(表 4)。本院输血科平时红细胞库存总量基本维持在 A、B、O 血型各 40 袋,AB 型 10 袋的标准,包装规格为 0.5 或 1 U(1 U=200 mL),日均发放各临床用血科室 20 U 红细胞。按照表型一致或少抗原的血液输给多抗原的患者,并在 ABO 血型一致的前提下,以按女性患儿和多次长期输血患儿优先的原则(表 1),本院 2015 年 5 月-2016 年 7 月在输血前共作 4 493 次交叉配血,表型一致并作相合性输血占 72.85%,少抗原的血液输给多抗原的患儿(相容性输血)占 15.87%、符合率 88.72%,表型不符(不相合)输血占 11.28%(表 4)。本组中不相合输血大部分系库存血数量较少的 AB 型和比例相对低的抗原表型患儿,而 Rh 血型中极低比例的表型 ccDee 确实很难找到可供的血液,CCDEE 更是罕见。因此 ccDee、CCDEE 可配合血液,除非使用同型冰冻红细胞,否则现有常规方法难以解决这 2 类患者的同型输血。

目前发达国家由于加强了对新生儿黄疸的早期监测及干预,需要换血治疗的重度高胆红素血症已不多见[13];但包括我国在内的亚洲及非洲发展中国家,换血疗法仍是新生儿 ICU 中常用的 1 种防治手段,尤其对防止胆红素脑病、治疗重度高胆红素血症最为快速有效[14-15]。寻找 Rh 相合血液输注仍是困扰临床的问题。通过对 15 个月的临床实践及其数据统计,我们认为 Rh 系统配合性输血能够较好地解决 Rh

系统 HDN 紧急换血和改善患儿贫血状况的红细胞相合抗原血液的备血问题,除 D 阴性患儿需向血液中心联系备血外,其他类型的红细胞>90%都能在输血科血库存中找到,有效缩短了患儿等待血源的时间。

由于 Rh 血型系统的遗传多态性因人种不同而具有不同的遗传结构[16],加之临床条件和医学伦理的限制,本组输血患儿和献血者标本未做 PCR 基因测序;因而我们应用微柱凝胶方法所得到的结果或需要 RhCE 抗原基因分型的验证,以及更多同行的临床研究加以证实。

本组住院输血患儿与所输血液的献血者(河北本地人)的表型 CCDee 、CcDEe 频率有较明显的差异($P<0.05$)(表 3),我们考虑可能与患儿中的新生儿比例较高有关,尤其是其中 Rh 系统 HDN 患儿带 CcDEe 表型抗原者较多所致。另外,我们还比较了本地(组)献血者(血液)Rh 抗原表型分布与国内三地献血者的异同:与南宁地区献血者存在较明显的差异($P<0.05$),(表 3)。这一结果可能与地域和民族差异相关[17-19]。

总之,在儿科输血中采用 Rh 系统配合性输注的方法,对输血患儿和献血者血液做 Rh 系统血型表型检测,利用医院输血信息管理平台,建立数据库,制定合理的配血规则,通过电子交叉配血,开展精准和个体化输血治疗,能有效地预防受血患儿产生免疫性抗体,对于女童尤其更有意义。随着国家"二胎"政策的推出,女性因为妊娠产生免疫性抗体的机会大大增加,如何降低其生育的风险,使她们都能生育健康下一代,同样也成为输血工作者重要的任务。

参 考 文 献

[1] Avent ND and Reid ME.The Rh blood group system:a review,Blood,2000,95(2):375-387.

[2] Chou ST,Jackson T,Vege S,et al High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors.Blood,2013,122(6):1062-1071.

[3] Hojjati MT,Einollahi N,Nabatchian F,et al.Allele-specific oli-go-nucleotide polymerase chain reaction for the determination of RhC/c and RhE/e antigens in thalassaemic patients.Blood Transfus,2011,9(3):301-305.

[4] 党鑫堂,伍昌林,彭进,等. 地中海贫血患者 Rh 配型输血研究.中国输血杂志,2015,28(7),800-803.

[5] 唐秋民,周燕,何保红,等. Rh 血型表型库的建立及在临床输血中的应用.临床输血与检验,2009,11(4):328-330.

[6] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程(第 4 版).北京:人民卫生出版社,2015:118-143.

[7] 李勇,于卫建,蒋利星.Rh 血型系统//李勇, 马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术.北京:科学出版社,2006:177-206.

[8] 吴远军,吴勇,陈宝婵,等. Rh 血型抗体的检测及结果分析.细胞与分子免疫学杂志,2008,24,604-606.

[9] 王谦,燕备战,于洋.31776 名患者红细胞血型意外抗体分析 .中国输血杂志,2011,11(24):966-968.

[10] 陈洪国,谭廷爵.8775 例临床输血治疗患者意外抗体筛查结果分析.国际检验医学杂志,2012,33(44):444-445.

[11] 李育,贝娜.受血者与献血者 Rh 表型检测的临床意义.浙江医学,201 5,37(10):827-829.

[12] 王淑平,汤伟娴,陈慧芬.22 481 例孕妇不规则抗体筛查的临床价值研究.中国输血杂志,201 4,27(2):116-117.

[13] Smits-Wintjens VE, Rath ME,Van Zwet EW, et a1.Cholestasis in neonates with red cell alloimmune hemolytic disease: incidence, risk factors and outcome. Neonatology, 2012,101(4): 306-10.

[14] Ghaemi S,Saneian H,Mo′ayedi B,et a1.The effect of different blood components on exchange transfusion outcomes.J Pak Med Assoc,2012,62(1):S45-S48.

[15] Murki S,Kumar P.Blood exchange transfusion for infants with severe neonatal hyperbihrubinemia.Semin Perinatol,2011,35(3):175-184.

[16] 周华友, 兰炯采.人类 Rh 血型系统研究进展.中国输血杂志,2004,17(3):211-214.

[17] 朱海峰,吕红娟,毛永鑫.山东地区无偿献血者 Rh 表现型分布.临床输血与检验,201 0,1 2(4):361-362.

[18] 张坤莲,王慧,李剑平.沈阳地区献血者 Rh 抗原表型分布调查.中国输血杂志,2008,21(12):963-964.

[19] 申卫东,周燕,唐秋民,等.南宁市无偿献血人群 Rh 血型表型分布调查.广西医学,2010,32(2):151-153.

(2017-01-06 收稿,03-21 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn　　bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

534 例 Rh 血型系统同种抗体回顾性分析

何燕京 王秋实△ 白英哲(中国医科大学 附属盛京医院 输血科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 调查 Rh 血型系统同种抗体在单一医院备血患者人群中的分布情况,分析 Rh 血型同种抗体产生原因及临床意义。**方法** 对备血患者进行不规则抗体筛查及抗体鉴定,对鉴定为 Rh 血型抗体者,检测其红细胞表面相应 Rh 抗原并统计患者相关资料。**结果** 在 146 896 例备血患者中,1 200(0.82%)例抗体筛选阳性,其中 534 例患者检测出 Rh 血型系统同种抗体,抗体特异性为抗-E 300 例(56.18%),抗-cE 72 例(13.48%),抗-D 66 例(12.36%),抗-Ce 64 例(11.99%),抗-c 16(3.00%),抗-C 8 例(0.75%),抗-e 3 例(0.56%),抗-D+G、抗-D+G+C 与抗-G+C 各 2 例(0.37%),抗-G、抗-D+E 与抗-Cw 各 1 例(0.19%);抗-E、抗-D、抗-G 和抗-cE 患者检出率在输血史与妊娠史各自互相进行比较 $P<0.05$;Rh 血型系统同种抗体总体检出率在性别方面,2 者不具有统计学意义($P>0.05$),抗-D 和抗-Ce 在女性患者中总体检出率明显大于男性($P<0.05$),抗-cE 在男性患者中检出率大于女性($P<0.05$)。**结论** Rh 血型系统同种抗体的检出率低于白种人,其中抗-E 检出率最高;妊娠和输血是 Rh 血型系统同种抗体产生的主要免疫因素,对拟输血患者,推荐 Rh 抗原同型输血,对从源头上减少 Rh 血型系统同种抗体引起的输血反应具有重要意义。

关键词: Rh 血型; 不规则抗体;同种抗体;抗体特异性鉴定;抗体分布

中图分类号:R457.1+1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0285-04

Retrospective analysis of Rh blood group alloantibodies in 534 **cases** *HE Yanjing, BAI Yingzhe, WANG Qiushi. Department of Blood Transfusion of Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang* 110002, *China*

Abstract:Objective To conduct a retrospective analysis on Rh blood group alloantibodies in 534 patients from a single hospital and to explore the cause and the clinical significance of anti-Rh blood group alloantibodies. **Methods** Irregular antibody testing and antigen identification were carried out in transfused patients. Anti-Rh antibodies were examined on the surface of erythrocyte in those identified with Rh antigens. Clinical data, including gender, age, medical history, transfusion history, pregnancy history and alloantibody specificity, were collected. **Results** A total of 1 200 samples (0.82%) containing irregular antibodies were found among 146 896 patients. Anti-Rh alloantibodies were identified in 534 patients (534/1200, 44.50%) with anti-E being the most common and specific antibody (300/534,56.18%), followed by anti-cE (72/534, 13.48%), anti-D (66/534, 12.36%), anti-Ce (64/534, 11.99%), anti-c (16/542, 3.00%), anti-C (8/532, 0.75 %), anti-e (3/534, 0.56%), anti-D+G (2/534, 0.37%), anti-D+G+C (2/534, 0.37%), anti-G+C (2/534, 0.37%), anti-G (1/534,0.19%), anti-D+E (1/534,0.19%) and anti-Cw (1/534,0.19%). The most common causes for anti-D, anti-G were due to pregnancy, and for anti-cE and anti-c, these causes were transfusion. Patient gender did not impact the frequencies of alloantibodies against red blood cell Rh antigens, and anti-D and anti-Ce were identified more in female patients ($P<0.05$) while anti-cE in men ($P<0.05$). **Conclusion** The prevalence of Rh antibodies is lower in Chinese population as compared with that in Caucasian population. Of all the anti-Rh blood group alloantibodies, anti-E is the most frequently identified. Alloimmunization by pregnancy and transfusion constitute the major causes of anti-Rh alloantibodies. Therefore, screening and analyzing for the presence of alloantibody in patient's blood before blood transfusion is important for ensuring the safety of blood transfusion. Especially for patients requiring multiple blood transfusions, the transfusion with blood of the same Rh factors is important to prevent Rh alloimmunization.

Key words: Rh blood group; irregular antibodies; antibody specificity identification; antibody distribution

血型不规则抗体是指 ABO 血型系统以外的血型抗体,在临床输血中具有重要意义。Rh 血型系统是最为复杂的血型系统,所表达的血型抗原多达 55 种[1],与临床密切相关的有 D、C、E、c、e 和罕见的 Cw、f、G 等[2],而针对这些抗原产生的同种抗体引起的免疫溶血性输血反应(HTR)或新生儿溶血病(HDN)在国内外时有报道[3-4]。为调查 Rh 血型系统同种抗体的检出率及分布情况,我们回顾性调查了 3 年间 146 896 名就诊患者 Rh 血型系统同种抗体的发生情况,现就对检出的 534 例 Rh 血型系统同种抗体的结果分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本 对 2013 年 1 月-2015 年 12 月,146 896 例本院

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.018

△通信作者:王秋实(1971.12-),女,教授,主要从事输血医学和干细胞免疫相关研究,电话:024-96615-75114, Email:wangqsl@sj-hospital.org

备血患者行不规则抗体筛查,新生儿组 7 508 例(5.11%),男性 4 344 例,女性 3 164 例;非新生儿组 1-100 岁 139 388 例(94.89%)(图 1),其中男性 37 330 例(26.78%),女性 102 058 例(74.55%)。

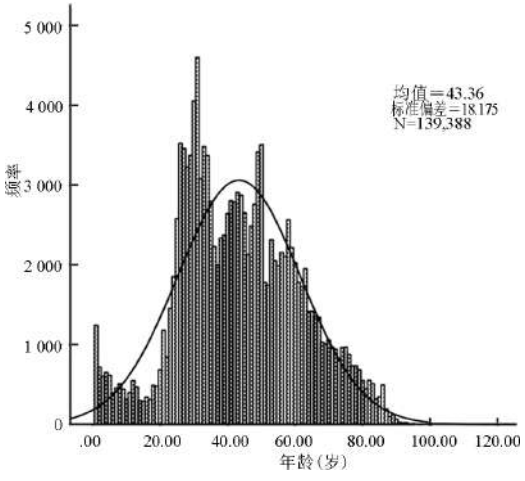


图 1　直方图显示非新生儿组年龄分布

1.2　仪器与试剂　抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、二硫基乙醇(2-Me)、ABO 反定细胞、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 3 支装红细胞不规则抗体筛选细胞(均为上海市血液生物医药有限责任公司,批号有 20135308、20135604、20135611 等);11 支装谱细胞、微柱抗球检测卡、全自动血型配血分析仪(IH-1 000)(均来自美国 Bio-rad,批号 06171.33.x - 06271.35.x,06171.45x - 06271.45.x 等);所有检测卡、试剂均在有效期内使用。

1.3　红细胞血型与不规则抗体筛查及鉴定　ABO、Rh 血型鉴定、抗体筛查、抗体鉴定均严格按相应试剂说明书操作。ABO、Rh 血型鉴定及抗体筛查使用伯乐全自动血型配血分析仪(IH-1 000)检测,对于抗体筛查阳性结果均使用盐水法、微柱凝胶卡复查,使用盐水法、微柱凝胶卡做抗体鉴定,根据与谱细胞的反应格局判定抗体特异性,判断抗体特异性。应用吸收放散试验区分复合(或联合)抗体和混合抗体。对鉴定为 Rh 抗体者,采用相应单克隆抗血清试剂检测其血型抗原,以确认所检抗体的准确性,并询问孕产史、输血史。操作按文献[5-6]中进行。

1.4　统计学处理　本研究数据采用 *SPSS* 22.0 统计软件进行统计学处理,统计计数变量采用频数和百分比,按照抗体类型计算阳性率和构成比,计数资料组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法,统计结果 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　Rh 血型系统同种抗体特异性分布与输血史和妊娠史的关系　在 146 896 例被检者中,1 200(0.82%)例抗体筛选阳性;其中 534(44.5%,534/1200)例被检者检测出 Rh 血型系统同种抗体,其中 52 例为新生儿,则以其母亲输血史及妊娠史资料进行统计。检出 518 例(97.00%)存在单个 Rh 血型系统同种抗体,16 例(3.00%)存在多种抗体,其中 10 例(62.5%,10/16)为抗-E 合并其他抗体;有输血史和/或妊娠史 522 例,无输血史且无妊娠史 12 例,2 者经统计分析具有统计学意义($P<0.01$),结果见表 1。

表 1　534 例患者 Rh 血型系统同种抗体特异性分布及其与输血史和妊娠史的关系　(n,%)

	阳性数	输血史		妊娠史	
		有输血史	无输血史	有妊娠史	无妊娠史
抗-E#	300(56.18)	202(37.83)	98(18.35)	228(42.70)	72(13.48)
抗-cE#	72(13.48)	61(11.42)	11(2.06)	32(5.99)	40(7.49)
抗-D#	66(12.36)	17(3.18)	49(9.18)	59(11.04)	7(1.31)
抗-Ce##	64(11.99)	62(11.61)	2(0.37)	58(10.86)	6(1.12)
抗-c##	16(3.00)	10(1.87)	6(1.12)	9(1.69)	7(1.13)
抗-C##	4(0.75)	2(0.37)	2(0.37)	4(0.75)	0
抗-e	3(0.56)	2(0.37)	1(0.19)	3(0.56)	0
抗-D+G	2(0.37)	0	2(0.37)	2(0.37)	0
抗-D+G+C	2(0.37)	0	2(0.37)	2(0.37)	0
抗-C+G	2(0.37)	0	2(0.37)	2(0.37)	0
抗-G#	1(0.19)	0	1(0.19)	1(0.19)	0
抗-D+E	1(0.19)	0	1(0.19)	1(0.19)	0
抗-Cw	1(0.19)	1(0.19)	0	1(0.19)	0
合计	534(100)	357(66.85)	177(33.15)	402(75.28)	132(24.72)

#有无输血史与有无妊娠史患者检出率各自互相进行比较,抗-E($\chi^2=5.549$,$P<0.05$)、抗-D($\chi^2=54.711$,$P<0.05$)和抗-G(共 7 例,$P<0.05$)、抗-cE($\chi^2=25.533$,$P<0.05$);##抗-Ce($\chi^2=2.133$,$P>0.05$)、抗-c($P>0.05$)、抗-C($P>0.05$);其余检出的 Rh 血型同种抗体因检出数过少而未做统计学处理

2.2　性别与 Rh 血型系统同种抗体产生的关系　调查检测出非新生儿组 Rh 血型系统同种抗体 482 例(90.26%),男性 116 例,男性总体检出率是 0.31%(116/37 330);女性 366 例,女性总体检出率是 0.36%(366/102 058),2 者不存在统计学差异($\chi^2=1.814$,$P>0.05$)。性别与抗体在总人群中的检出率关系见表 2。

表 2　482 例非新生儿组患者 Rh 血型系统同种抗体在总被检人群中不同性别的分布情况　(n,%)

	男性	女性
抗-D*	3(0.01)	35(0.03)
抗-Ce*	6(0.02)	58(0.06)
抗-E*	63(0.17)	223(0.22)
抗-cE*	37(0.10)	32(0.03)
抗-c*	7(0.02)	5(7.71×10^{-3})
抗-D+G	0	1(1.71×10^{-3})
抗-D+G+C	0	1(1.71×10^{-3})
抗-C+G	0	2(1.71×10^{-3})
抗-C	0	4(3.43×10^{-3})
抗-D+E	0	1(0.86×10^{-3})
抗-e	0	3(2.57×10^{-3})
抗-Cw	0	1(0.86×10^{-3})
Rh 血型同种抗体阴性	37 214(99.68)	101 692(99.65)
合计	37 330(100)	102 058(100)

*抗-D($\chi^2=6.917$,$P=0.009$)和抗-Ce($\chi^2=9.895$,$P=0.002$)在女性患者中的总体检出率明显大于男性($P<0.05$);抗-cE($\chi^2=25.31$,$P<0.001$)、抗-c($\chi^2=6.086$,$P<0.05$)在男性患者中的总体检出率更高($P<0.05$);抗-E($\chi^2=3.302$,$P>0.05$)总体检出率在性别分布中不具有统计意义($P>0.05$);其余检出的 Rh 血型同种抗体因检出数过少而未做统计学处理

2.3　Rh 血型系统同种抗体在不同年龄段中的分布情况　按国内文献报道[11]进行年龄分组,不同的年龄段中 Rh 血型系统同种抗体的总体检出率存在统计学差异($P<0.05$)。Rh 同种抗体检出率最高的是<1 岁(0.69%,52/7 508);非新生

儿组患者则随着年龄的增大,Rh 同种抗体的检出率逐渐升高,其中 1-17 岁年龄段患者抗体检出率最低(0.09%,9/9945),>70 岁年龄段检出率达到 0.64%(75/11 797)(图 2).

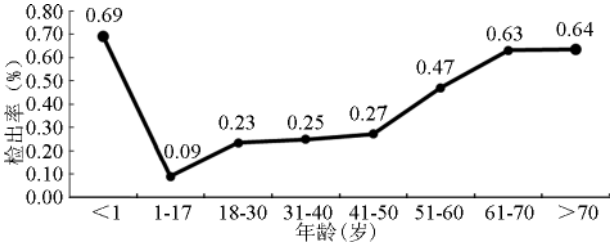


图 2 Rh 血型系统同种抗体在不同年龄段中的检出情况

3 讨论

红细胞不规则抗体是引起输血不良反应、血型鉴定困难以及疑难配型等的主要原因之一。由于不同种族红细胞血型抗原分布存在差异,被红细胞抗原免疫的机率不同,人群及地区的不同,不规则抗体特异性及检出率也存在差异。本研究对辽宁地区 146 896 例被检者中,检出不规则抗体 1 200 例(0.82%),高于上海 0.50%[7] 不规则抗体检出率,低于印度(3.4%)[8] 和美国(2.2%)[9] 的报道。

有文献报告[9-11] 抗-E 检出最多,检出率在 20.8%[9]-45.3%[11],抗-E 的检出率高于抗-D 的产生。本调查中抗-E 占检出不规则抗体的 25%(300/1200),占 Rh 血型系统同种抗体的 56.18%(300/534),远高于抗-D 12.36%(66/534)的比率,不同于 Ameen 等[12] 报告的抗-D (46.85%, 349/745) 高于抗-E(31.68%, 236/745)以及 Azarkeivan 等[13] 报告的抗-D(28.57%%,8/28)高于抗-E (14.29%, 4/28)的结果,而与国内报道[10-11]抗-E 高于抗-D 的结果一致。这可能是因为我国人群 RhE 抗原阳性占 47.64%[14],远高于 RhD 阴性(0.34%)的频率,同时我国采用 ABO 和 RhD 同型输血,RhE 阴性患者因输血、妊娠等接受 RhE 抗原刺激后产生抗-E 病例增多。同时我们调查发现仅 3.67%(11/300)的抗-E 既无妊娠史也无输血史,为天然抗体(在室温反应良好)。抗-E 已成为最多见的 Rh 血型抗体,在输血及妊娠患者中具有重要的意义。

Ameen 等[12] 报道的 Rh 血型系统同种抗体抗-D (46.85%,349/745)检出率最高,在白种人中 RhD 阴性的分布频率 15%,黄种人 RhD 频率占到了 99.7%。本调查中检出抗-D 66 例(12.36%,66/534),非新生儿组中 35 例为女性患者,检出率明显大于男性($P<0.05$)。同时我们调查发现 80.30%(53/66)的抗-D 患者有妊娠史无输血史,其中 20 例来自产科患者,28 例来自新生儿患者,占检出抗-D 例数的 72.73%(48/66),同时在有无输血史与有无妊娠史患者检出率各自互相进行比较中,发现抗-D($\chi^2=54.711$,$P=0$),因此妊娠为抗-D 产生的主要原因,我们认为:虽然我国 RhD 阴性患者大多数输用 RhD 阴性血液,输血导致产生抗-D 概率降低;但是由于二胎政策的开放,同时抗-D 免疫球蛋白的缺乏及临床应用并未推广,在大部分 RhD 阴性女性妊娠第一胎 RhD 阳性胎儿时,发生免疫产生抗-D,因此妊娠产生的抗-D 是我国抗-D 产生的主要原因。

Rh 血型系统具有较强的免疫原性的抗原主要有 D、C、c、E、e 5 种,其抗原的免疫性强弱依次为 D>E>c>C>e[15],可由输血或妊娠免疫产生。在我们检测出的 534 例 Rh 血型系统同种抗体中(52 例新生儿以其母亲资料进行统计),有输血史和/或妊娠史有 522 例,无输血史且无妊娠史有 12 例,二者经统计分析具有统计学意义($P<0.01$),表明妊娠和输血的同种免疫是 Rh 同种抗体产生的主要原因。调查中抗-G 共 7 例($P<0.05$),全部患者仅有妊娠史;抗-C 共 8 例,而虽然 C 抗原免疫性弱,但在仅有妊娠史的 6 例抗-C 患者中,平均妊娠次数为(3.17±0.98)次,且 5 例为 RhD 阴性患者血清中同时存在抗-G。而 54.17%(39/72)抗-cE 患者仅有输血史,同时在妊娠史与输血史比较中,抗-cE($\chi^2=25.533$,$P<0.001$)说明抗-cE 以输血免疫产生为主。87.50%(56/64)抗-Ce 既有输血史又有妊娠史,其余 8 例(12.5%,8/64)抗-Ce 中仅有妊娠史的 2 例患者均有 2 次妊娠史,仅有输血史的 6 例患者平均输血次数是 2.2 次,说明抗-Ce 需要较强的免疫刺激才能产生。e 抗原的免疫性最弱,在我们检出的 3 例抗-e 患者中,既有输血史又有妊娠史的有 2 例,仅有妊娠史的 1 例患者有过 4 次妊娠史。

不规则抗体在不同性别的检出率报告不一,国内外均有报告与性别无关[9-10],王钰箐等[7] 报道女性的不规则抗体检出率高于男性。本调查中,非新生儿组中虽然女性患者中检出 Rh 同种抗体 366 例,远多于男性检出例数 (116 例),但由于本院女性患者较多,二者在 Rh 同种抗体总体检出率上不具有统计学意义($P>0.05$)。但抗-D 和抗-Ce 在女性中的总体检出率明显高于男性($P<0.05$),这与国内外报道的[11-12]抗-D 以女性为主结果一致。同时我们调查发现抗-cE 和抗-c 在男性中的总体检出率高于女性($P<0.05$)。抗-E($\chi^2=3.298$,$P>0.05$)总体检出率在性别分布中不具有统计意义。

同时我们发现年龄与 Rh 血型系统同种抗体检出率有明显的关系。检出率最高的是新生儿,这与辽宁及周边地区的重症新生儿大部分转入本院,特别是新生儿溶血病大多需要输血治疗有关。其他年龄段患者则随着年龄的增大,Rh 同种抗体的检出率逐渐升高,其中 1-17 岁年龄段患者抗体检出率最低(0.09%,9/5 827),这与台湾[16] 报道一致,但与我国南方地区报道[10] 的 1-17 岁年龄段抗体检出率最高不同,这是因为南方地区此年龄段中的地中海贫血患者较多,需要定期输血从而导致免疫机会增加。>70 岁年龄段检出率达到 0.64%(75/11 797),与 61-70 岁年龄段间(0.63%,91/14421)比较无统计意义($\chi^2=0.002$,$P>0.05$),这与 Jan[16] 报道的 61-80 岁年龄段不规则抗体检出率最高一致,这可能与年纪越大、妊娠次数、输血几率等产生免疫的机会增多有关。

综上所述,我们通过对 534 例 Rh 血型系统同种抗体情况进行观察和分析,抗-E 是最多见的 Rh 血型同种抗体;Rh 同种抗体总体检出率与性别无关,但抗-D 和抗-Ce 在女性中的总体检出率明显高于男性($P<0.05$),抗-cE 在男性中的总体检出率高于女性($P<0.05$);Rh 血型系统抗体产生的重要原因是输血和妊娠,同时与抗原的免疫性也有关,抗-D 、抗-G 是以妊娠免疫产生为主,抗-cE、抗-c 以输血免疫产生为主。我们建议注射抗-D 免疫球蛋白来封闭进入母体的 RhD

阳性抗原,以预防抗-D 的产生。而对于有过输血史和妊娠史的输血患者,对其进行同种抗体的筛查。有条件的实验室可尝试在这些患者中采用 Rh 抗原同型输注,降低机体产生 Rh 血型系统同种抗体的概率。

参 考 文 献

[1] Daniels GL, Cartron JP, Fletcher A, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens: Vancouver report. Vox Sang, 2003, 84(3):244-247.

[2] 杰夫.丹尼尔. Rh 血型基因与蛋白//朱自严,主译.人类血型.2 版,北京:科学出版社,2007: 232-326.

[3] 谭金哲,陈龙,韩冰,等.抗-E、抗-c 致回忆性迟发性溶血反应 1 例. 中国输血杂志,2013,26 (12):1276-1277.

[4] Hatano Y, Otsuka S, Chousa M, et al. Fatal delayed hemolytic transfusion reaction associated with anti-Di^b and anti-E. Transfus Apher Sci,2012,47(3):263-268.

[5] 刘达庄.免疫血液学.上海:上海科技出版社,2002: 190-191.

[6] 李勇,杨贵贞.人类红细胞血型学实用理论与实验技术.北京:中国科学技术出版社,1999:214-294.

[7] 王钰箐,蔡晓红,龚淞颂,等.46346 名患者不规则抗体筛查结果及分析.中国输血杂志,2015,28(8):1004-1006.

[8] Thakral B, Saluja K, Sharma RR,et al. Red cell alloimmunization in a transfused patient population: a study from a tertiary care hospital in north India. Hematol, 2008,13(5): 313-318.

[9] Winters JL, Pineda AA, Gorden LD,et al. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. Transfusion,2001, 41(11),1413-1420.

[10] Mo Z, Li H, Huang L,et al.Prevalence and specificity of RBC alloantibodies in the general hospitalised population in Guangxi. Transfus Medic,2015,25(6):313-319.

[11] Xu P, Li Y, Yu H.Prevalence, specificity and risk of red blood cell alloantibodies among hospitalised Hubei Han Chinese patients. Blood Transfus,2014,12(1):56-60.

[12] Ameen R, Aleyaadi O, Alshemmari S, et al. Frequency of red blood cell alloantibody in Kuwaiti population. Med Princ Pract, 2005, 14(4):230-234.

[13] Azarkeivan A,Ahmadi MH,Zolfaghari S, et al.RBC alloimmunization and double alloantibodies in thalassemic patients. Hematol, 2015,20(4):223-227.

[14] 刘毅,吴敏慧,郑凌,等.Rh 血型 CcEe 抗原在南京地区部分人群分布频率.中国输血杂志,2009,22(10):830-831.

[15] 徐路琼.IgM、IgG 抗-E 和 IgG 抗-c1 例.中国输血杂志,2014,27(5):543-544.

[16] Jan RH, Yu LC, Wen SH, et al. Incidence of alloantibodies in transfused patients in Eastern Taiwan. Tzu Chi Med J, 2009,21(1): 66-69.

(2016-07-29 收稿,2017-01-24 修回)

本文编辑:夏玲

中国输血协会第七届理事会

理 事 长:朱永明

副理事长:孙绍忠　付涌水　郭永建　戴苏娜　杨文玲　叶世辉　胡丽华　杨汇川　王东根

秘 书 长:戴苏娜 (兼)

理　　事(以下按姓氏笔划排序):

丁彦杰	丁　恒	丁增桥	刁爱仁	于志静	于保田	马现君	王双林*	王东根*
王兆强*	王兆福*	王丽虹	王　明*	王学锋	王宝燕	王　荣	王相荣*	王秋锁
王　艳	王　健	王锦才*	王　震*	王露楠	车嘉琳	巨　昆	方奎明	尹　文
孔冬冬	石仲仁	卢　伟	卢　岑	叶世辉*	史文君	付涌水*	付道兴	白旭华
白连军*	白　林*	冯书礼*	冯　凌*	宁玉梅*	毕星秀	吕运来	吕　豪	朱为刚*
朱永明*	刘永生	刘亚欣	刘　忠	刘建岭	刘绍辉	刘荣敏	刘嘉馨*	闫晓鹏
许建荣*	许　萍	孙　光*	孙绍忠*	孙　俊*	孙常翔*	纪宏文	杜　晓*	李云龙
李少冬*	李代红	李　刚*	李莎燕*	李海林	李　鸿	李碧娟*	杨文玲*	杨汇川*
杨向萍	杨　茂	杨征宇	杨金本	杨　勇	杨联昌	吴佳佳	吴晓晖	吴敦武
吴　婷	邱　艳	邱　峰*	何广文	何秉洪	何　涛*	何路军	余明权	余晋林
余　梅	邹峥嵘*	汪　华	沃德勒	沈　军	宋秀宇	张天弼	张太江	张传国
张国强	张金磊	张　波	张建伟	张香兰	张洪斌*	张海林	张循善	陆韬宏*
陈火玲	陈安心	林毅胜	欧阳熊妍	明　钰	易　峰	金秀国	周小玉	周　俊
周雪丽	周道平*	周德军	庞广礼*	郑慧丽	赵生银*	赵志坚	赵　楠*	胡　伟*
胡克义	胡丽华*	钟磊石	逄淑涛	宫济武*	骆　群*	秦　莉*	秦　梅	秦敬民*
贾　婪*	夏　卫	夏　荣*	原先根	钱宝华	徐　军	徐　红	徐笑红	栾建凤*
郭永建*	郭兆富	郭艳丽	郭铭华	郭喜彪	郭豫学*	唐蓉群*	黄丽平	黄国永
黄循伟	黄　聪	曹汝安	戚　海*	崔　欣*	符策瑛*	梁　昕	梁晓华*	彭继红
葛健民	董艳虹*	蒋天伦	蒋绪亮	蒋德席*	喻学华*	喻　琼	程世东	傅雪梅*
鲁国勇	曾　敏*	谢　军	蔡旭兵	谭　敏	黎诚耀	潘　伟	潘若文	潘　健
穆士杰	戴苏娜*							

(* 常务理事)

中国输血协会第七届监事会

监事长:刘　江　　**副监事长**:安万新　　**监事**:吕杭军　李　芳

· 论著 · · 调查研究 ·

HPA-1-28*w* 基因分型检测技术体系的建立和广西瑶族、汉族人群 *HPA*-1-28*w* 基因多态性研究*

李丽兰[1,2] 卢芳[1,2] 申卫东[1,2] 吴国光[1△](1.南宁输血医学研究所,2.南宁中心血站,广西 南宁 530007)

摘要:目的 建立 *HPA*-1-28w 基因分型检测技术体系并用以研究广西瑶族和汉族人群的血小板抗原(HPA)-1-28*w* 基因多态性。**方法** 通过设计序列特异性引物和优化 PCR 反应条件,摸索 *HPA*-1-28*w* 基因分型检测技术体系,其组成包括前期已建立的 *HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 技术和新研发的 *HPA*-18-28*w* PCR-SSP 方法 2 部分组成。使用 10 例已预先测序确定 *HPA*-18-28*w* 基因型和 20 例已预先使用商品试剂盒检测 *HPA*-18-21*w* 基因型的本研究广西瑶族标本,对新研发的 *HPA*-18-28*w* PCR-SSP 方法做验证。应用所建立的 *HPA*-1-28*w* 基因检测技术对广西地区无血缘关系的 1424 名健康瑶族人和 908 名健康汉族人做 *HPA*-1-28*w* 基因分型和多态性分析。**结果** 所建立的 *HPA*-1-28*w* 基因分型技术系统,不仅对 *HPA*-18-28*w* 基因的分型结果与对验证用标本的测序分型结果完全一致,而且对 *HPA*-18-21*w* 基因的分型检测结果与商品试剂盒的分型结果完全一致。广西瑶族人群的 *HPA* 各等位基因频率分别为:*HPA*-1*a* 0.998 2、1*b* 0.001 8,2*a* 0.874 6、2*b* 0.125 4,3*a* 0.661 5、3*b* 0.338 5,5*a* 0.996 8、5*b* 0.003 2,6*a* 0.978 6、6*bw* 0.021 4,15*a* 0.407 7、15*b* 0.592 3;汉族人群 *HPA* 各等位基因频率分别为:*HPA*-1*a* 0.998 3、1*b* 0.001 7,2*a* 0.957 6、2*b* 0.042 4,3*a* 0.532 5、3*b* 0.467 5,4*a* 0.999 4、4*b* 0.000 6,5*a* 0.984 0、5*b* 0.016 0,6*a* 0.989 0、6*bw* 0.011 0,15*a* 0.534 1、15*b* 0.465 9;广西瑶族和汉族人群的 *HPA*-7-14*w*、*HPA*-16-28*w* 基因均以 *aa* 纯合子形式存在。在本组广西瑶族人群中发现 2 例罕见的 *HPA*-6*bb* 纯合子基因型个体,而在汉族人群中发现了 1 例中国人群中罕见的 *HPA*-4*ab* 基因型个体。**结论** 建立了完善的 *HPA*-1-28*w* PCR-SSP 基因分型检测技术体系,并成功应用于广西瑶族和汉族人群的 *HPA*-1-28*w* 基因筛查和分型研究;广西瑶族、汉族人群 *HPA* 基因频率分布在 *HPA*-2, -3, -5, -15 系统和 *HPA*-6*w* 等均不同($P<0.05$),藉此有助于了解广西瑶族和汉族人群 HPA 的免疫学特点。

关键词:人类血小板特异性抗原;*HPA* 基因;基因分型;基因多态性;等位基因频率;瑶族;汉族;广西

中图分类号:R457.1+1 Q503 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0289-08

Establishment of the HPA-1-28*w* genotyping technique system and the study of HPA-1-28*w* polymorphism in Yao and Han populations in Guangxi, China

LI Lilan, LU Fang, SHEN Weidong, WU Guaguang. Nanning Institute of Transfusion Medicine, Nanning Blood Center, Guangxi 530007, *China. Corresponding author: WU Guoguang*

Abstract: Objective To develop a genotyping technique system for human platelet antigens (HPAs) -1 to -28*w*, and to study on the gene polymorphism of *HPA*-1 to -28*w* in Chinese Guangxi Yao and Han population with the developed genotyping technique system. **Methods** The *HPA*-1-28*w* DNA-based genotyping technique system was established by designing sequence-specific primers and optimizing PCR reaction conditions. The technology system consisted of *HPA*-1-17*w* multi-PCR-SSP technology, which was established and reported earlier, and the newly developed *HPA*-18-28*w* PCR-SSP technology method. The effectiveness of the *HPA*-18-28*w* PCR-SSP genotyping technique was evaluated by using the samples that had been previously identified the *HPA*-18-28*w* genotype by sequencing (10 samples of Guangxi Yao population) or by commercial genotyping kit (20 samples of Guangxi Yao population). A total of 1 424 and 908 unrelated and random healthy individuals from Yao and Han ethnic groups were studied for HPA-1-28*w* polymorphism by the developed technique. **Results** The genotyping results of HPA-18-28*w* for the validation samples by our developing technique were consistent with both of the results of sequencing genotyping and commercial kit´ genotyping. The HPA allele frequencies in Guangxi Yao population were *HPA*-1*a* 0.998 2, 1*b* 0.001 8, 2*a* 0.874 6, 2*b* 0.125 4, 3*a* 0.661 5, 3*b* 0.338 5, 5*a* 0.996 8, 5*b* 0.003 2, 6*a* 0.978 6, 6*bw* 0.021 4, 15*a* 0.407 7, 15*b* 0.592 3. The HPA allele frequencies in Guangxi Han population were *HPA*-1*a* 0.998 3, 1*b* 0.001 7, 2*a* 0.957 6, 2*b* 0.042 4, 3*a* 0.532 5, 3*b* 0.467 5, 4*a* 0.999 4, 4*b* 0.000 6, 5*a* 0.984 0, 5*b* 0.016 0, 6*a* 0.989 0, 6*bw* 0.011 0, 15*a* 0.534 1, 15*b* 0.465 9. In Guangxi Yao and Han population, the only homozygous *a*/*a* genotype was detected in *HPA*-7-14*w* and *HPA*-16-28*w*. The rare HPA-6*b*/6*b* genotype was found in two individuals of Guangxi Yao population, and HPA-4*a*/4*b* genotype that was rare in Chinese was found in one individual of Han ethnicity. **Conclusion** In this study, the HPA-1-28*w* genotyping technique system has been

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.019

*基金项目:广西自然科学基金青年基金(2013GXNSFBA019206),广西科学研究与技术开发计划项目(主席资金)(08160-06),南宁市科学研究与技术开发计划项目(科技惠民重大专项)(20133141);

△通信作者:吴国光(1943.03-),男,研究员,主要从事输血医学、免疫血液学和免疫遗传学研究,电话:0771-3212994,Email:guangwu@szonline.net.

established. The genotyping technique system can be applied to *HPA*-1-28*w* genotyping research and screening. The results showes that the frequency distribution of HPA-1-28*w* gene in Guangxi Yao and Han population is significant in *HPA*-2, -3, -5, -15 system and *HPA*-6*w* ($P<0.05$). The data will help to understand the immunological characteristics of HPA in Yao and Han populations in Guangxi, China.

Key words: human platelet antigen (HPA); HPA Genotyping; Guangxi Yao population; Guangxi Han population.

人类血小板特异性抗原(human platelet antigen,HPA)是血小板本身特有的抗原,自 1959 年第 1 个 HPA 被鉴定出[1]以来,迄今共有 35 个 HPA 被发现和正式命名,分别为 HPA-1-29w,其中包括 6 大已验证有对偶抗原的系统 HPA-1-5,15[2]。HPA 的主要载体是 GPⅢa、GPⅡb、GPⅠa、GPⅠbα、GPⅠbβ 和 CD109 等 6 大具有重要功能的血小板糖蛋白。目前所发现的 HPA 中,除 HPA-14bw 是由于在核苷酸 1 901-1 911位置上 AAG 等 3 个碱基缺失外,其他抗原均因单核苷酸取代而产生,表现为单核苷酸多态性(SNP)。HPA 可通过输血、妊娠、移植等途径使个体被免疫而产生相应的抗-HPA,从而导致胎儿/新生儿同种免疫血小板减少症(foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia, FNAIT)、血小板输注无效(platelet transfusion refractoiness, PTR)、输血后紫癜(post transfusionpurpura, PTP)等血小板免疫异常疾病的发生[3]。由于 HPA 分布具有地域和种族的特异性,不同人群中导致血小板免疫疾病发生的主要 HPA 亦有所不同,因而通过对人群 *HPA* 基因多态性的调查可有助于掌握各种(类)人群 HPA 的特征和了解该特定人群中可能参与血小板免疫异常疾病的主要 HPA。为此,我们建立了以序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)为技术基础的 *HPA*-1-28*w* 基因分型检测技术体系,并以此对广西瑶族和汉族人群展开 *HPA*-1-28*w* 基因多态性研究,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　研究对象

1.1.1　技术验证标本　10 例已预先使用 DNA 测序检测确定了 *HPA*-18-28*w* 基因型(均为 *a/a* 基因型)的 DNA 标本,20 例已预先使用 HPA 多重 PCR 基因分型试剂盒(美国 G&T Biotech, Inc. Rockville,批号 NAN02)检测确定的 *HPA*-18-21*w* 基因型(均为 *a/a* 基因型)的 DNA 标本。本技术验证 DNA 标本均来自于本研究广西瑶族人群中随机选取的标本。

1.1.2　广西瑶族、汉族人群　1)2007 年 1 月 1 日-2015 年 12 月 31 日,在广西巴马、大化、都安、金秀等瑶族聚居区,随机征集无血缘关系的瑶族人(通过查看身份证和问询方式确认个体民族属性为瑶族,且为该采集地当地人口)自愿参加本研究,在向他们告知了本研究的目的、意义并取得其知情同意后,共采集瑶族自愿者 1 424 人(份)标本[5 mL/份,EDTA 抗凝,标本采集后 2-10℃运输(时间<6 h)至本实验室后于-80℃冻存,并于标本采集<1 年检测]。2)2007 年 1 月 1 日-2015 年 12 月 31 日,随机征集无血缘关系的南宁中心血站汉族献血者(通过查看身份证和问询方式确认个体民族属性为汉族,且为广西壮族自治区人)自愿参加本研究,在向他们告知了本研究的目的、意义并取得其知情同意后,共采集汉族自愿者 908 人(份)[5 mL/份,EDTA 抗凝,标本采集后 2-10℃运输(运输时间<3 h 内)至本实验室后于-80℃冻存,并于标本采集<1 年检测]。

1.2　试剂与仪器　Puregene DNA Purification Kit(德国 QIAFEN 公司,批号 84501421);PCR 引物(上海捷瑞生物工程有限公司合成制备);rTaq DNA 聚合酶[美国 TaKaRa Biotechnology(Dalian),批号 CK7601AA];HPA 多重 PCR 基因分型试剂盒(美国 G&T Biotech, Inc. Rockville,批号 NAN02);琼脂糖(西班牙 Biowest,批号 111860);DNA green 绿如蓝核酸染料(北京天恩泽基因科技有限公司,批号 108111)。核酸蛋白测定仪(Biophotometer 6131 型),常温高速台式离心机(5415D 型)(德国 Eppendorf);PCR 扩增仪(美国 ABI,GeneAmp9700 型);水平电泳仪(Model 96 Agarose Gel Electrophoresis Systems),凝胶成像分析系统(Molecular Imager Gel DocTM XR System 型)(美国 Bio-Rad)。

1.3　DNA 提取应用　Puregene DNA Purification Kit 提取血液标本 DNA,按试剂盒使用说明书操作;将 DNA 标本(100 μL/份),于-20℃保存待用。

1.4　*HPA*-1-28*w* 基因分型技术体系的建立

1.4.1　*HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 基因分型技术　按文献[4]方法建立:共使用 16 种 PCR 引物混合液,含引物对,dNTP,$MgCl_2$ 等,其中包含 6 种多重 PCR-SSP 引物混合液的组合(多重 4*a*、4*b*、5a、5b、6a 和 6b 组合)(表 1)。PCR 反应的总体积 9 μL,含有 PCR 引物混合液 7 μL、DNA 样品(含 80-100 ng DNA)1 μL 和已稀释的 rTaq DNA 聚合酶(0.5 U)1 μL。PCR 扩增程序为 95℃ 5 min, 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 90 s,30 个循环,置 72℃延长 5 min,降温至 12℃,完成扩增。使用琼脂糖凝胶电泳做 PCR 扩增产物的分析:取 7μL PCR 产物、5 μL 接点 DNA 长度标记(Marker),在 3%琼脂糖凝胶中以 100 V 电泳 30 min 后,在凝胶成像分析系统下拍照记录实验结果。

1.4.2　*HPA*-18-28*w* PCR-SSP 基因分型技术　针对 *HPA*-18-28*w* 各等位基因单核苷酸多态性位点,设计 PCR-SSP 序列特异性 PCR 引物(表 2),每个 PCR 反应体系包含目的基因特异性引物和内参照引物各 1 对,内参照引物序列为 CRP Ⅰ:5′-CCAGCCTCTCTCATGCTTTTGGCCAGACAG-3′ 和 CRP Ⅱ:5′ -GGGTCGAGGACAGTTCCGTGTAGAAGTGGA-3′,扩增 440 bp 的内对照。PCR 反应的总体积为 9 μL/管,由 7 μL PCR-Mix(含引物对、dNTP、$MgCl_2$ 等),1 μL DNA 样品(含 50-100 ng DNA),1 μL 稀释的 Taq DNA 聚合酶(0.375 U)组成。PCR 扩增程序为 95℃ 5 min, 95℃ 30 s、60℃30 s(*HPA*-19-21*w*, 26-27*w*)或 63℃ 30 s(*HPA*-18*w*,22-25*w*,-28*w*)、72℃ 45 s,30 个循环,72℃延长 5 min,降温至 12℃,完成 PCR 扩增。使用琼脂糖凝胶电泳做 PCR 扩增产物分析:取 7 μL PCR 产物、5 μL 接点 DNA Marker 在 3%琼脂糖凝胶中 100 V

电泳 30 min 后,在凝胶成像分析系统下拍照记录实验结果。

1.4.3 技术验证

1.4.3.1 *HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 基因分型技术的验证 采用文献[4]方法。

1.4.3.2 *HPA*-18~28w 基因分型的技术验证 应用我们建立的分型技术,对 10 例已按文献[14, 20-21]测序检测方法确定了 *HPA*-18-28*w* 基因型的标本、20 例已使用 HPA 多重 PCR 基因分型试剂盒检测确定了 *HPA*-18-21*w* 基因型的标本,做相应 *HPA* 基因分型检测,分型检测试验重复 3 次/标本,比较分型结果与标本 *HPA* 基因型别的一致性和观察重复试验结果的一致性。

1.5 广西瑶族和汉族人群标本 *HPA*-1-28*w* 基因分型检测 应用我们建立并经验证的 *HPA*-1-28*w* 基因分型检测技术对广西瑶族人群标本 1 424 份、汉族人群标本 908 份作 HPA 基因分型检测(检测步骤同 1.4.1 和 1.4.2)。

1.6 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计学软件对实验数据作统计学处理,基因频率按群体遗传基因计数法计算 χ^2 值,比较基因分布的期望值和观察值,验证其是否符合 Hardy-Weinberg (HW) 平衡法则;不同人群基因频率分布比较采用 χ^2 检验,以显示多态性分布的差异性,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *HPA*-1-28*w* 基因分型的 *HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 基因分型技术检测 按目的条带的大小和有无判读标本的基因型(图 1)。

2.2 *HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 基因分型技术验证 应用文献[4]方法 100%分型正确。

2.3 *HPA*-18-28*w* PCR-SSP 基因分型技术验证 应用我们建立的 *HPA*-18-28*w* 的基因分型方法,对 10 例已测序确定基因型标本、20 例已使用商品试剂盒确定基因型标本的分型(重复试验 3 次/标本)结果完全一致。

2.4 广西瑶族、汉族人群 *HPA*-1-28*w* 基因频率分布。

表 1 *HPA*-1-17*w* 基因分型引物[4]

PCR 引物混合液	*HPA* 等位基因		特异性引物序列(5′-3′)		共同引物序列(5′-3′)	SNP 或缺失	目的基因/内参照产物大小(bp)
1a	1a	1aF	ACTTACAGGCCCTGCCTCT	1R	GTGCAATCCTCTGGGGACT	176T>C	188/429
1b	1b	1bF	ACTTACAGGCCCTGCCTCC				188/429
2a	2a	2aF	CCCCCAGGGCTCCTGAC	2R	CCAGCGACGAAAATAGAGG	482C>T	241/429
2b	2b	2bF	CCCCCAGGGCTCCTGAT				241/429
3a	3a	3aR	GGGGGAGGGGCTGGGGA	3F	GAAAGACCTGGGAAGGCGG	2621T>G	136/429
3b	3b	3bR	GGGGGAGGGGCTGGGGC				136/429
多重 4a 组合和	4a	4aF	GCTGGCCACCCAGATGCG	4R	GCTGTCCTGGCGTCTGGAG	506G>A	158/429
多重 4b 组合*	4b	4bF	GCTGGCCACCCAGATGCA				158/429
	7a	7aF	CAAGGTGCGAGGCTGTC	7R	GGGCCTGGCAGGCACAG	1297C>G	117/429
	7bw	7bF	CAAGGTGCGAGGCTGTG				117/429
	11a	11aF	ACCGAAAATACCTGCAACCG	11R	CAGCTCACATCAAGTGTCC	1976G>A	219/429
	11bw	11bF	ACCGAAAATACCTGCAACCA				219/429
	14a	14aR	AGACTCCACACTCACTTCTT	14F	AGCCTGCTGCCATGGGAGTG	1909-1911AAG>del.AAG	306/429
	14bw	14bR	AGACTCCACACTCACTTAAA				306/429
多重 5a 组合和	5a	5aF	GTCTACCTGTTTACTATCAAAG	5R	TCTCATGGAAAATGGCAGTA	1600G>A	249/429
多重 5b 组合*	5b	5bF	GTCTACCTGTTTACTATCAAAA				249/429
	9a	9aR	GGCAGCCCCCAGTCCAC	9F	GGATATACAGCCCCAGGG	2602G>A	200/429
	9bw	9bR	GGCAGCCCCCAGTCCAT				200/429
	13a	13aF	AAAAGGTTAACATTTTCAGTAAC	13R	CCGGTAGGGAGAATGATGC	2483C>T	112/429
	13bw	13bF	AAAAGGTTAACATTTTCAGTAAT				112/429
	17a	17aR	GGTCACCTGGTCAGTTAGCG	17F	TTTGTCCCCTCTCTTTCCTCC	622C>T	153/429
	17bw	17bR	GGTCACCTGGTCAGTTAGCA				153/429
多重 6a 组合和	6a	6aF	GACGAGTGCAGCCCCCG	6R	GCGGACACAGGAGAAGTC	1544G>A	163/429
多重 6b 组合*	6bw	6bF	GACGAGTGCAGCCCCCA				163/429
	8a	8aR	CTGACTCAATCTCGTCACA	8F	TGTGTGTGTTTTAATGGAGG	1984C>T	290/429
	8bw	8bR	CTGACTCAATCTCGTCACG				290/429
	10a	10aF	CCCAGTGAGTGAGGCCCG	10R	GTGCAATCCTCTGGGGACT	263G>A	103/429
	10bw	10bF	CCCAGTGAGTGAGGCCCA				103/429
	16a	16aR	GTGAGCTTTCGCATCTGGG	16F	GAGAAGAAGATAAAAACTAAC	497C>T	194/429
	16bw	16bR	GTGAGCTTTCGCATCTGGA				194/429
12a	12a	12aF	GACGCTCGTGGACTGCGG	12R	GCAACGCAGGTCGCGGTAG	119G>A	252/792
12b	12bw	12bF	GACGCTCGTGGACTGCGA				252/792
15a	15a	15aF	CAAATTCTTGGTAAATCCTGG	15R	GACCTTATGATGACCTATTC	2108C>A	225/429
15b	15b	15bF	CAAATTCTTGGTAAATCCTGT				225/429

* 多重 4*a*、5*a*、6*a* 组合中均只含有该组合系列中的 *HPA* 的 *a* 等位基因的扩增引物;多重 4*b*、5*b*、6*b* 组合中均只含有该组合系列中的 *HPA* 的 *b* 等位基因的扩增引物

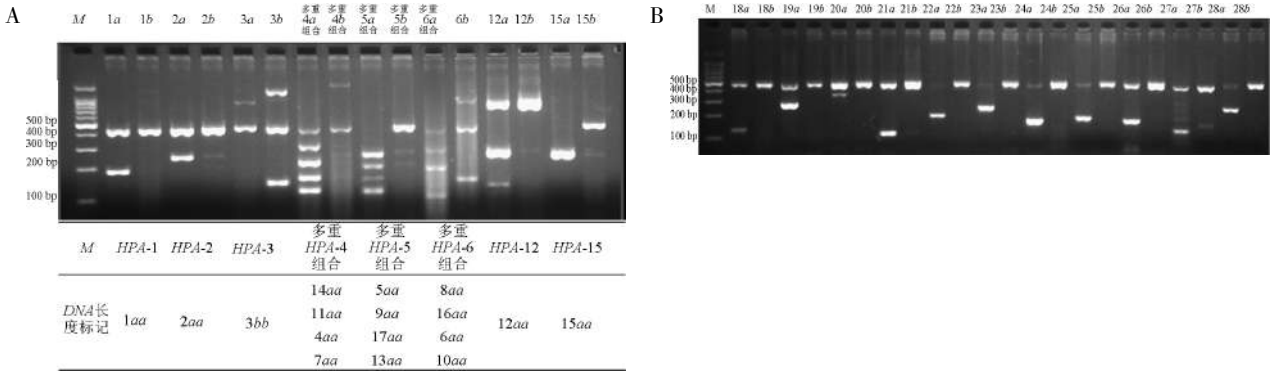
2.4.1 瑶族人群 *HPA*-1-28*w* 各等位基因频率分布　均符合 HW 群体遗传平衡法则;其 *HPA*-4、*HPA*-7-14*w*、*HPA*-16-28*w* 只有 *a*/*a* 纯合子个体,*HPA*-2、3、6、15 均存在 *a*/*a* 和 *b*/*b* 纯合子个体(表 3);HPA 对偶抗原不配合率依次为 *HPA*-15(0.366 3)、3(0.347 6)和 2 系统(0.1953)(表 4)。

2.4.2 汉族人群 *HPA*-1-28*w* 基因频率分布　均符合 HW 群体遗传平衡法则;其 *HPA*-7-14*w*、*HPA*-16-28*w* 只有 *a*/*a* 纯合子个体,*HPA*-2、3、15 均存在 *a*/*a* 和 *b*/*b* 纯合子个体(表 3);HPA 对偶抗原不配合率依次为 HPA-3(0.373 9)、15(0.373 8)和 2(0.0779)(表 4)。

2.5 广西瑶族、汉族和壮族人群 *HPA* 基因频率分布情况比较　*HPA*-1 等位基因频率,瑶族与汉族人群相近,2 个民族 *HPA*-1*b* 均低于壮族人群($P<0.05$);*HPA*-2、3、5 等位基因频率,瑶族的 *HPA*-2*b* 高于汉族和壮族人群,*HPA*-3*b*、5*b* 均低于汉族和壮族人群($P<0.05$);*HPA*-6、15 等位基因频率,瑶族 *HPA*-6*bw*、15*b* 均高于汉族和壮族人群;汉族除仅在 *HPA*-1 等位基因频率与壮族人群有差异($P<0.05$)外,*HPA*-2-17*w* 各等位基因频率 2 个民族人群相近($P>0.05$)(表 5)。

表 2　*HPA*-18-28*w* 基因分型引物

HPA 等位基因		序列特异性引物(5′-3′)		共同引物(5′-3′)	SNP	产物大小(bp)
HPA-18*a*	18aF	CCCGAGCACATCATTTATATACAG	18R	TTGGAAGGGTGAGCATTTTC	2235G>T[5]	131
HPA-18*bw*	18bF	CCCGAGCACATCATTTATATACAT				131
HPA-19*a*	19aR	CATCTGGGTGGCCAGCTT	19F	GGAAGAGGAAAAGGGACCAG	487A>C[6]	276
HPA-19*bw*	19bR	CATCTGGGTGGCCAGCTG				276
HPA-20*a*	20aF	TCCTCTTTCCCCACAGGAC	20R	TTGGAATTCTGTGCCATTAGC	1949C>T[6]	338
HPA-20*bw*	20bF	TCCTCTTTCCCCACAGGAT				338
HPA-21*a*	21aF	GGGGAGCCCTACATGACG	21R	TAGAACCTGGGTGTGTGCAA	1960G>A[6]	114
HPA-21*bw*	21bF	GGGGAGCCCTACATGACA				114
HPA-22*a*	22aF	TCCTGCAGGCTGGGACAA	22R	GGATGGGCACGTACCTAAGA	584A>C[7]	194
HPA-22*bw*	22bF	TCCTGCAGGCTGGGACAC				194
HPA-23*a*	23aR	GTCATGTAGGGCTCCCCG	23F	CACCCCTGAACTCCACACTT	1942C>T[7]	239
HPA-23*bw*	23aR	GTCATGTAGGGCTCCCCA				239
HPA-24*a*	24aR	TGGTCTGAGGTAGGACACAGC	24F	CAGTGGCTCCAACACACATC	1508G>A[8]	174
HPA-24*bw*	24bR	CTTGGTCTGAGGTAGGACACAGT				174
HPA-25*a*	25aF	GTGATTGAAGATAACACTGTTAC	25R	CCTCGCCAAAATCTCAACAT	3347C>T[9]	182
HPA-25*bw*	25bF	GTGATTGAAGATAACACTGTTAT				182
HPA-26*a*	26aR	CACAGCTGCCACATTCACAC	26F	CTTCCTGGGCTGTGTGTTTT	1818G>T[10]	170
HPA-26*bw*	26bR	ACAGCTGCCACATTCACAA				169
HPA-27*a*	27aF	CCAGGTGGACTGGGGGC	27R	CGAGAACTGGATCCTGAAGC	2614C>A[11]	128
HPA-27*bw*	27bF	CCAGGTGGACTGGGGGA				128
HPA-28*a*	28aF	AAGATTGTGCTGCTGGACG	28R	TGTTCTGCTCCCTCTCACCT	2311G>T[12]	238
HPA-28*bw*	28bF	CAAGATTGTGCTGCTGGACT				239



A *HPA*-1-17*bw* 基因分型检测及电泳结果;B *HPA*-18-28*w* 基因分型检测电泳(*HPA*-18-28*w* 均为 *a*/*a* 基因型)

图 1　广西瑶族罗 XX 样本的 *HPA*-1-28*w* 基因分型电泳结果

3　讨论

HPA 基因分型技术是研究 *HPA* 多态性分布的主要方法,如国内有学者应用 PCR-SSP 技术研究浙江汉族人群 *HPA*-1-6 基因频率的分布[13];我们也较早就建立了以 DNA 测序分型技术鉴定 *HPA*-1-17*w* 的方法[14]。我们此次新建立的 *HPA* 基因分型技术体系进一步以 *HPA*-1-28*w* 基因的鉴定和频率分布为研究目标,该技术体系包括 *HPA*-1-17*w* 多重 PCR-SSP 基因分型检测和 *HPA*-18-28*w* PCR-SSP 基因分型检测 2 部分技术方法,前者包含 6 种多重 PCR 引物组合(表 1),每个标本仅需 16 个 PCR 反应即可完成 *HPA*-1-17 基因分型检测(图 1-A),较常规 PCR-SSP 基因分型检测方法的反应数减少了一半多,提高了检测效率[4];后者采用常规的 PCR-SSP 技术,每个 PCR 体系中仅扩增获取 1 个 *HPA* 等位基因目的片段,每个标本完成 *HPA*-18-28*w* 基因分型检测需要 22 个 PCR 反应(图 1-B),经过我们所作的特异性、系统性和重复性验证,证明其 *HPA* 基因型检测结果 100% 正确并体出良好的稳定性。

表 3 广西瑶族、汉族人群 *HPA*-1~28w 基因频率分布

	瑶族(n=1 424)				汉族(n=908)			
	观察频率	预期频率	等位基因频率	HW 分析	观察频率	预期频率	等位基因频率	HW 分析
1*a*/1*a*	0.996 5(1 419)	0.996 5 (1 419.004 4)	1*a*=0.998 2	χ^2=0.004 4	0.996 7(905)	0.9967 (905.002 5)	1*a*=0.998 3	χ^2=0.002 5
1*a*/1*b*	0.003 5(5)	0.003 5 (4.991 2)	1*b*=0.001 8	*P*>0.05	0.003 3 (3)	0.0033 (2.995 0)	1*b*=0.001 7	*P*>0.05
1*b*/1*b*	0.000 0(0)	0.000 0 (0.004 4)			0.000 0 (0)	0.0000 (0.002 5)		
2*a*/2*a*	0.764 0(1088)	0.765 0(1 089.375 2)	2*a* =0.874 6	χ^2=0.1105	0.917 4 (833)	0.9170 (832.632 4)	2*a*=0.957 6	χ^2=0.090 3
2*a*/2*b*	0.221 2(315)	0.219 3 (312.249 6)	2*b* =0.125 4	*P*>0.05	0.080 4 (73)	0.0812 (73.735 1)	2*b*=0.042 4	*P*>0.05
2*b*/2*b*	0.014 7(21)	0.015 7 (22.3752)			0.002 2 (2)	0.0018 (1.632 4)		
3*a*/3*a*	0.445 9(635)	0.437 6 (623.148 9)	3*a* =0.661 5	χ^2=1.9672	0.288 5 (262)	0.2835 (257.458 4)	3*a*=0.532 5	χ^2=0.366 5
3*a*/3*b*	0.431 2 (614)	0.447 8 (637.702 2)	3*b* =0.338 5	*P*>0.05	0.487 9 (443)	0.4979 (452.083 1)	3*b*=0.467 5	*P*>0.05
3*b*/3*b*	0.122 9 (175)	0.114 6 (163.148 9)			0.223 6 (203)	0.2186 (198.458 4)		
4*a*/4*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(142 4)	4*a*=1.000 0	*NA*	0.998 9 (907)	0.9989(907.0003)	4*a*=0.999 4	χ^2=0.000 3
4*a*/4*b*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	4*b*=0.000 0		0.001 1 (1)	0.0011(0.9994)	4*b*=0.000 6	*P*>0.05
4*b*/4*b*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.0000(0.0003)		
5*a*/5*a*	0.993 7(1 415)	0.993 7(1 415.014 2)	5*a* =0.996 8	χ^2=0.0143	0.968 1 (879)	0.968 4 (879.231 6)	5*a*=0.984 0	χ^2=0.239 1
5*a*/5*b*	0.006 3(9)	0.006 3(8.971 6)	5*b* =0.003 2	*P*>0.05	0.031 9 (29)	0.0314 (28.536 9)	5*b*=0.016 0	*P*>0.05
5*b*/5*b*	0.000 0 (0)	0.000 0(0.014 2)			0.000 0 (0)	0.0003 (0.231 6)		
6*a*/6*a*	0.958 6(1365)	0.957 6(1 363.653 3)	6*a* =0.978 6	χ^2=2.8992	0.978 0 (888)	0.9781 (888.110 1)	6*a*=0.989 0	χ^2=0.112 6
6*a*/6*bw*	0.040 0 (57)	0.041 9(59.693 5)	6*bw* =0.021 4	*P*>0.05	0.022 0 (20)	0.0218(19.779 7)	6*bw*=0.011 0	*P*>0.05
6*bw*/6*bw*	0.001 4(2)	0.000 5(0.653 3)			0.000 0 (0)	0.0001 (0.110 1)		
7*a*/7*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	7*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	7*a*=1.000 0	*NA*
7*a*/7*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	7*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	7*bw*=0.000 0	
7*bw*/7*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
8*a*/8*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	8*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	8*a*=1.000 0	*NA*
8*a*/8*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	8*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	8*bw*=0.000 0	
8*bw*/8*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
9*a*/9*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	9*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	9*a*=1.000 0	*NA*
9*a*/9*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	9*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	9*bw*=0.000 0	
9*bw*/9*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
10*a*/10*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	10*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	10*a*=1.000 0	*NA*
10*a*/10*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	10*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	10*bw*=0 .000 0	
10*bw*/10*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
11*a*/11*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	11*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	11*a*=1.000 0	*NA*
11*a*/11*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	11*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	11*bw*=0 .000 0	
11*bw*/11*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
12*a*/12*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	12*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	12*a*=1.000 0	*NA*
12*a*/12*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	12*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	12*bw*=0 .000 0	
12*bw*/12*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
13*a*/13*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	13*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	13*a*=1.000 0	*NA*
13*a*/13*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	13*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	13*bw*=0 .000 0	
13*bw*/13*bw*	0.000 0(0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
14*a*/14*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	14*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	14*a*=1.000 0	*NA*
14*a*/14*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	14*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	14*bw*=0 .000 0	
14*bw*/14*bw*	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
15*a*/15*a*	0.177 0(252)	0.166 2(236.643 4)	15*a* =0.407 7	χ^2=2.8402	0.288 5 (262)	0.285 3 (259.058 4)	15*a*=0.534 1	χ^2=0.1539
15*a*/15*b*	0.461 4(657)	0.482 9(687.713 1)	15*b* =0.592 3	*P*>0.05	0.491 2 (446)	0.497 7 (451.883 3)	15*b*=0.465 9	*P*>0.05
15*b*/15*b*	0.361 7(515)	0.350 9(499.643 4)			0.220 3 (200)	0.217 0 (197.058 4)		
16*a*/16*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	16*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	16*a*=1.000 0	*NA*
16*a*/16*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	16*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	16*bw*=0 .000 0	
16*bw*/16*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
17*a*/17*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	17*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	17*a*=1.000 0	*NA*
17*a*/17*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	17*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	17*bw*=0 .000 0	
17*bw*/17*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
18*a*/18*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	18*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	18*a*=1.000 0	*NA*
18*a*/18*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	18*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	18*bw*=0 .000 0	
18*bw*/18*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
19*a*/19*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	19*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	19*a*=1.000 0	*NA*
19*a*/19*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	19*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	19*bw*=0 .000 0	
19*bw*/19*bw*	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
20*a*/20*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	20*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	20*a*=1.000 0	*NA*
20*a*/20*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	20*bw*=0.0000		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	20*b*=0 .000 0	
20*bw*/20*bw*	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
21*a*/21*a*	1.000 0(1 424)	1.000 0(1424)	21*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	21*a*=1.000 0	*NA*
21*a*/21*bw*	0.000 0(0)	0.000 0(0)	21*bw*=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	21*bw*=0 .000 0	
21*bw*/21*bw*	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
22*a*/22*a*	1.000 0(1424)	1.000 0(1424)	22*a*=1.000 0	*NA*	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	22*a*=1.000 0	*NA*

(转下页)

表 3　广西瑶族、汉族人群 *HPA*-1-28w 基因频率分布(续)

	瑶族(n=1 424)				汉族(n=908)			
	观察频率	预期频率	等位基因频率	HW 分析	观察频率	预期频率	等位基因频率	HW 分析
22a/22bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	22bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	22bw=0.000 0	
22bw/22bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
23a/23a	1.000 0(1424)	1.000 0(1 424)	23a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	23a=1.000 0	NA
23a/23bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	23bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	23bw=0 .000 0	
23bw/23bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
24a/24a	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	24a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	24a=1.000 0	NA
24a/24bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	24bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	24bw=0 .000 0	
24bw/24bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
25a/25a	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	25a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	25a=1.000 0	NA
25a/25bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	25bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	25bw=0 .000 0	
25bw/25bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
26a/26a	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	26a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	26a=1.000 0	NA
26a/26bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	26bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	26bw=0 .000 0	
26bw/26bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
27a/27a	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	27a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	27a=1.000 0	NA
27a/27bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	27bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	27bw=0 .000 0	
27bw/27bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		
28a/28a	1.000 0(1 424)	1.000 0(1 424)	28a=1.000 0	NA	1.000 0 (908)	1.000 0 (908)	28a=1.000 0	NA
28a/28bw	0.000 0(0)	0.000 0(0)	28bw=0.000 0		0.000 0 (0)	0.000 0 (0)	28bw= 0.000 0	
28bw/28bw	0.000 0 (0)	0.000 0 (0)			0.000 0 (0)	0.000 0 (0)		

NA 无法评估

表 4　广西瑶族、汉族人群各 HPA 对偶抗原不配合率(MP)*

	瑶族(n=1 424)	汉族(n=908)
HPA-1	0.003 6	0.003 4
HPA-2	0.195 3	0.077 9
HPA-3	0.347 6	0.373 9
HPA-4	0.000 0	0.001 1
HPA-5	0.006 4	0.031 0
HPA-6*w*	0.041 0	0.021 5
HPA-7-14*w*	0.000 0	0.000 0
HPA-15	0.366 3	0.373 8
HPA-16-28*w*	0.000 0	0.000 0

* MP=$a^2(1-a^2)+b^2(1-b^2)=2ab\ (1-ab)$

由于我们建立的技术体系包含了上述 2 类方法,可按 *HPA*-1-28*w* 基因分型的实际需要单独或综合采用,避免不必要的实验室工作。这 2 类基因分型的建立各有难点,在常规 PCR-SSP 试验条件摸索中,除了需要适合的 PCR 引物外,通常还要通过调整反应体系中的镁离子浓度和 PCR 反应条件的退火温度,以及必要时还需要添加甲酰胺、二甲基亚砜(DMSO)、硫酸铵等 PCR 反应增效剂以达到最佳的 PCR 反应条件;而多重 PCR 由于反应体系中引入了的目的基因引物>2 对,在反应条件摸索时还需要注意引物之间可能产生的非特异性扩增,以及引物对 DNA 模板、DNA 聚合酶、镁离子、dNTP 等的竞争。

表 5　本组广西瑶族、汉族人群与壮族人群 *HPA* 等位基因频率比较

	瑶族(n=1424)	汉族(n=908)		壮族(n=2 659)[4]		
	等位基因频率	等位基因频率	与瑶族人群比较统计分析	等位基因频率	与瑶族人群比较统计分析	与汉族人群比较统计分析
HPA-1*a*	0.998 2	0.998 3	χ^2=0.006 3	0.991 5	χ^2=13.592 6	χ^2=9.310 5
HPA-1*b*	0.001 8	0.001 7	P>0.05	0.008 5	P< 0.05	P< 0.05
HPA-2*a*	0.874 6	0.957 6	χ^2=90.493 4	0.956 9	χ^2=188.492 8	χ^2=0.016 1
HPA-2*b*	0.125 4	0.042 4	P< 0.05	0.043 1	P< 0.05	P>0.05
HPA-3*a*	0.661 5	0.532 5	χ^2=77.659 8	0.512 2	χ^2=168.149 0	χ^2=2.234 1
HPA-3*b*	0.338 5	0.467 5	P< 0.05	0.487 8	P< 0.05	P>0.05
HPA-4*a*	1.000 0	0.999 4	χ^2=1.089 6	1.000 0	*NA*	χ^2=3.191 3
HPA-4*b*	0.000 0	0.000 6	P>0.05	0.000 0	P>0.05	
HPA-5*a*	0.996 8	0.984 0	χ^2=22.383 4	0.985 0	χ^2=23.987 4	χ^2=0.090 1
HPA-5*b*	0.003 2	0.016 0	P< 0.05	0.015 0	P< 0.05	P>0.05
HPA-6*a*	0.978 6	0.989 0	χ^2=7.034 8	0.985 1	χ^2=4.644 4	χ^2=1.501 4
HPA-6*bw*	0.021 4	0.011 0	P< 0.05	0.014 9	P< 0.05	P>0.05
HPA-7-14*a*	1.000 0	1.000 0	*NA*	1.000 0	*NA*	
HPA-7~14*bw*	0.000 0	0.000 0		0.000 0		
HPA-15*a*	0.407 7	0.534 1	χ^2=71.398 3	0.525 6	χ^2=103.225 1	χ^2=0.392 4
HPA-15*b*	0.592 3	0.465 9	P< 0.05	0.474 4	P< 0.05	P>0.05
HPA-16*a*	1.000 0	1.000 0	*NA*	1.000 0	*NA*	*NA*
HPA-16*bw*	0.000 0	0.000 0		0.000 0		
HPA-17*a*	1.000 0	1.000 0	*NA*	1.000 0	*NA*	*NA*
HPA-17*bw*	0.000 0	0.000 0		0.000 0		
HPA-18~28*a*	1.000 0	1.000 0	*NA*	/		
HPA-18~28*bw*	0.000 0	0.000 0		/		

与广西瑶族人群比较,P<0.05;与广西瑶族、汉族人群比较,P<0.05;NA 无法评估

广西是中国多民族聚居地区,其中壮族、汉族和瑶族是本地 3 大主要民族。在对广西壮族人群 *HPA* 多态性研究[4]的基础上,我们应用新建立的 *HPA*-1-28w 基因分型技术体系进一步对广西瑶族和汉族人群展开 *HPA* 基因多态性研究。通过比较广西这 3 大民族人群的 *HPA* 多态性分布,可发现 3 个民族 *HPA* 等位基因频率的一些特点:瑶族人群除 *HPA*-1 等位基因频率分布与广西汉族相近外,*HPA*-2*b* 明显高于汉族和壮族人群($P<0.05$),而 *HPA*-3*b*、5*b* 均明显低于汉族和壮族人群($P<0.05$),*HPA*-1*b* 低于壮族人群($P<0.05$),*HPA*-6*bw*、15*b* 则明显高于汉族和壮族人群($P<0.05$);而广西汉族与壮族人群比较,除 *HPA*-1 等位基因频率的差异较明显($P<0.05$)外,其他 *HPA* 等位基因的分布二者相似(表 5)。本组广西瑶族、汉族人群的 *HPA*-7-14*w*、*HPA*-16-28*w* 均为 *aa* 纯合子基因型,而未见带 *bw* 等位基因的个体,与广西壮族人群情况相同[4]。瑶族和汉族人群的 *HPA*-3 和 15 均有较高的杂合度,它们的 *ab* 杂合子基因型的频率为 0.431 2-0.491 2(表 3)。此次在广西汉族人群中发现了 1 例中国人群中罕见的 *HPA*-4*ab* 基因型个体(表 3),在瑶族人群中发现了 2 例罕见的 *HPA*-6*bw*/6*bw* 纯合子基因型个体(表 3),而这种个体在汉族人群中尚未发现,在壮族人群中目前也仅发现了 1 例[4]。广西瑶族人群的 *HPA*-6*bw* 分布频率明显高于汉族和壮族人群[4]($P<0.05$)(表 3,5)。*HPA*-6*bw* 基因频率在世界各个种族和人群中的分布普遍较低,6*bw*/6*bw* 基因型个体更是罕见,抗-HPA-6bw 介导的血小板同种免疫案例尚未见报道,以至 HPA-6bw 一直未被发现和确认[2]。6*bw*/6*bw* 基因型个体的发现,为我们揭示了 1 个值得期待和进一步观察研究的前景——在广西瑶族人群中是否会产生和发现抗-HPA-6bw 引发的血小板同种免疫的案例,从而填补 HPA-6bw 认证的国际血小板免疫学学术上的空白。

在亚洲人群中,介导 HPA 同种免疫疾病发生的主要 HPA 抗体依次为抗-HPA-3、抗-HPA-4 和抗-HPA-5,其中抗-HPA-4 目前主要的报道多出自日本[15]。广西地区汉族人群中,先前已发现和报道过 2 例抗-HPA-3a 和 1 例抗-HPA-5b 引起的新生儿同种免疫血小板减少案例[16-19]。本组广西瑶族和汉族人群中 *HPA*-1-28w 各对偶抗原不配合率高低依次为 HPA-15、HPA-3、HPA-2 和 HPA-6w(表 4)。因此在广西瑶族和汉族人群中,应注意以上抗原参与的血小板同种免疫。

综上,通过建立和以 PCR-SSP 为基础的 *HPA*-1-28*w* 基因分型检测技术体系,我们为 *HPA* 基因分型检测提供了 1 种有效快速的方法,并应用该方法成功地开展了广西瑶族和汉族人群 *HPA*-1-28*w* 基因多态性特征的研究。这套检测体系的应用不但有助于我们了解我国各民族人群 HPA 多态性特征,而且能为预测 HPA 相关同种免疫血小板减少在不同民族人群中的发生风险、为人类分子免疫血液学和遗传学研究提供基础数据。本技术在推广使用中,需要有不同多态性的 HPA DNA 标本用于技术质控,才能确保试验操作结果的正确性,为此,我们目前正在使用细胞工程技术,开发多组的配组(谱)HPA DNA,作为本技术推广时配套的质控和参比试剂,这已在第 14 届国际血小板免疫学研讨会的合作研究所项目中,初步使用并获得良好的评价。

参 考 文 献

[1] Engelfriet CP, van der Hart van Loghem JJ Jr.The use of chicken red cells in the Coombs consumption test as a specific and simple method for the detection of the L.E. factor.Vox Sang, 1959,4:485-492.

[2] The HLA Informatics Group of the Anthony Nolan Research Institute, the European Bioinformatics Institute. All HPA-alloantigen/protein data.2016-12-26, http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html.

[3] Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, et al. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. Vox Sang, 2010,99(4):375-381.

[4] 申卫东, 李丽兰, 廖燕, 等. 多重 PCR-SSP 技术应用于 HPA-1-17*bw* 基因分型研究和广西壮族人群 HPA 多态性的分布. 中国输血杂志, 2014, 27(1):8-14.

[5] Bertrand G, Jallu V, Saillant D, et al. The new platelet alloantigen Cab a: a single point mutation Gln 716 His on the alpha 2 integrin. Transfusion, 2009,49(10):2076-2083.

[6] Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, et al. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2010,50(2):324-333.

[7] Peterson JA, Pechauer SM, Gitter ML, et al. New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2012,52(5):1117-1124.

[8] Jallu V, Dusseaux M, Kaplan C. A new Ser472Asn (Cab2(a+)) polymorphism localized within the αIIb "thigh" domain is involved in neonatal thrombocytopenia. Transfusion, 2011, 51(2):393-400.

[9] Kroll H, Feldmann K, Zwingel C, et al. A new platelet alloantigen, Swi(a), located on glycoprotein Ia identified in a family with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2011,51(8):1745-1754.

[10] Sachs UJ, Bakchoul T, Eva O, et al. A point mutation in the EGF-4 domain of β(3) integrin is responsible for the formation of the Sec(a) platelet alloantigen and affects receptor function. Thromb-Haemost, 2012,107(1):80-87.

[11] Jallu V, Bertrand G, Bianchi F, et al. The αIIb p.Leu841Met (Cab3(a+)) polymorphism results in a new human platelet alloantigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2013, 53(3):554-563.

[12] Poles A, Woźniak MJ, Walser P, et al. A V740L mutation in glycoprotein Ⅱb defines a novel epitope (War) associated with fetomaternalalloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2013,53(9):1965-1973.

[13] 朱发明, 严力行. 浙江省汉族人群血小板同种抗原 1-6 基因频率的研究. 血栓与止血, 2001, 7(3):109-111.

[14] Wu GG, Tang QM, Shen WD, et al. DNA sequencing-based typing of HPA-1 to HPA-17w systems.Int J Hematol, 2008,88(3):268-271.

[15] Wu GG. Detection of Clinically Relevant Platelet Antibodies in the Asian Population. ISBT Science Series, 2014, 9(1): 112-117.

[16] Wu GG, Zhou Y, Shen WD, et al. HPA-3a neonatal alloimmune

thrombocytopenia: a case report from China, and HPA-3a allele frequencies in the GuangXiZhuang and Han populations. ISBT Science Series, 2015, 10(2):57-60.

[17] 周燕, 钟周琳, 李丽兰, 等. 抗-HPA-3a 抗体所致新生儿同种免疫血小板减少性紫癜一例并文献复习. 中华血液学杂志, 2013, 34(1): 45-48.

[18] 周燕, 申卫东, 刘金莲, 等. 第 2 胎抗 HPA-3a 抗体可使新生儿同种免疫血小板减少症患儿病情加重. 临床检验杂志, 2014, 32(10):753-755.

[19] 周燕, 钟周琳, 李丽兰, 等. 国内首例抗 HPA-5b 引发的新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜的检测、诊断及分析. 中国实验血液学杂志, 2014,22(2):399-402.

[20] Liu Y, Hong X, Xu X, et al. Prevalence of the HPA-18w to -21w alleles in the Chinese Han population. Int J Immunogenet, 2013, 40(2):99-103.

[21] Stafford P, Garner SF, Rankin A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Va (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion, 2008, 48(7): 1432-1438.

(2017-01-23 收稿,03-18 修回)

本文编辑:蔡辉

· 论著 ·

高海拔地区献血者红细胞增多症患病比例及其影响因素的调查分析

王瑛[1#]　张玉华[1#]　赵敬湘[1]　李鹏龙[1]　刘佳[2]　赵莲[1△]　周虹[1△]

(1.军事医学科学院 野战输血研究所,北京,100850;2.军事医学科学院附属医院)

摘要:目的　了解高原献血人群中高原红细胞增多症(HAPC)发病情况及其影响因素。**方法**　收集 2015 年 5-7 月在海拔 3 000-4 000 m 地方献血的 289 名献血者基本信息、既往病史、体格检查等资料,获得其 HAPC 患病比例,采用 *t* 检验、*Wilcoxon* 秩和检验及 *Logistic* 回归等统计方法做单因素或(和)多因素分析。**结果**　收缩压(mmHg),有、无 HAPC 的献血者为 115.42±14.38*vs* 121.56±8.42 ($P<0.01$);汉族、藏族与其他少数民族献血者中患 HAPC 的比例为 64.89%(170/262) *vs* 62.50%(5/8) *vs* 21.05%(4/19)($P<0.01$);从事脑力劳动、不吸烟的献血者患 HAPC 的比例为 81.08%(30/37)、73.25%(178/243),高于体力劳动者和吸烟者($P<0.05$);献血者 ABO 血型中,A、B、O 和 AB 型者患 HAPC 的比例为 45.21%(33/73) *vs* 63.33%(57/90) *vs* 69.31%(70/101) *vs* 70.00%(14/20) ($P<0.01$)。此外,除单因素分析获得的收缩压、民族、工作性质、吸烟及血型外,经多因素分析显示:年龄($OR=1.333$)、舒张压($OR=1.377$)、脉搏(OR=1.161)等在 HAPC 的发生中也有一定影响。**结论**　年龄、民族、工作性质、吸烟、血压、脉搏、ABO 血型可能为诱发 HAPC 的因素,高原采血尤其是应急采血需关注献血者相关资料及参数变化。

关键词:高原红细胞增多症;HAPC 影响因素;高原献血者;民族;血压;血型;高原采血

中图分类号:R555^{+}.1　R193.3　R457.1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2017)3-0296-04

Investigation on the prevalence rate and influence factors of high altitude polycythemia among blood donors in high altitude area

WANG Ying[1#], *ZHANG Yuhua*[1#], *ZHAO Jingxiang*[1], *LI Penglong*[1], *LIU Jia*[2], *ZHAO Lian*[1△], *ZHOU Hong*[1△]. 1. *Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850, *China*; 2. *Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences. Jointfirsts: WANG Ying, ZHANG Yuhua. Co-corresponding authors: ZHAO Lian, ZHOU Hong*

Abstract: Objective　*To study the prevalence rate and influence factor of the high altitude polycythemia (HAPC) among blood donors in high altitude area.* **Methods**　The essential information, previous medical history and physical assessment data of 289 blood donors who donated blood at the altitude of 3 000-4 000 m from May to July in 2015 were collected. The prevalence ratio of HAPC was obtained. T-test, Wilcoxon rank-sum test and Logistic regression were used respectively to carry out single factor analysis and/or multiple-factor analysis. **Results**　The systolic pressure of the non-HAPC patients was (121.56±8.42) mmHg, which was significantly higher than that of HAPC patients [(115.42±14.38) mmHg, $P<0.01$]. The prevalence ratios of HAPC in Han nationality, Zang nationality and other minorities were 64.89% (170/262) *vs* 62.50% (5/8) *vs* 21.05% (4/19), respectively ($P<0.01$). The prevalence ratios of HAPC in mental workers and nonsmokers were 81.08% (30/37), 73.25% (178/243), which were higher than that in manual workers and smokers ($P<0.05$). The prevalence ratios of HAPC in people who were A type, B type, O type or AB type were 45.21% (33/73) *vs*

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.020

#并列第一作者;△共同通信作者:赵莲(1974.08-),女,理学博士,研究员,硕士研究生导师,主要从事血液代用品、休克发病机制与救治药物研究,电话:010-66931969, Email:zhaolian@bmi.ac.cn;周虹(1966.10-),女,医学博士,研究员,博士研究生导师,主要从事血液代用品、失血性休克的损伤机理及抗休克药物研究,电话:010-66930962,Email:zhouhtt1966@163.com。

63.33%（57/90）*vs* 69.31%（70/101）*vs* 70.00%（14/20），respectively（$P<0.01$）. Moreover, in addition to the systolic pressure, ethnicity, job, smoking history and blood type, age（$OR=1.333$）, diastolic pressure（$OR=1.377$）and pulse（$OR=1.161$）were also considered the major factors of HAPC, which were shown by multiple-factor analysis.**Conclusion** The age, ethnicity, job, smoking history, pressure, pulse and blood type play the key roles in the morbidity of HAPC. Theses related information of the blood donors should be closely monitored in the emergency blood collection in the high altitude area.

Key words:high altitude polycythemia; influencing factor of HAPC; blood donors at high altitude; nation; pressure; blood type; blood collection at high altitude

高原红细胞增多症（high altitude polycythemia，HAPC）是指人长期处于高原低氧环境时，机体中的红细胞过度增生，导致血液黏滞度升高、血流阻力增加，进而引起一系列症状和体征的 1 种慢性高原病[1]。HAPC 患者血液具有“浓、黏、聚、凝”等特点[2]，呈现出平均红细胞体积（mean corpuscular volume、mean cell volume，MCV）减小、平均红细胞血红蛋白浓度（mean corpuscular hemoglobin concentration、MCHC）增加等变化[3]，并伴随心室肌代偿性增生等组织病理改变，影响着生活在高原的军地群众健康。驻守青藏高原（海拔 3 000-5 000 m）的官兵是当地献血的主要人群，也是 HAPC 高发人群。据先前 1 项对西藏山南、日喀则、那曲等地的驻军官兵所作的抽样调查结果显示，其 HAPC 总发病率约 16.48%，且无明显症状[4]。若患者在已患 HAPC 情况下献血，不仅其血液质量无法保证，而且可能会对献血者健康造成危害。为此，我们针对高原地区献血军人展开了调查分析，旨在了解该献血人群中 HAPC 发病比例，并对影响 HAPC 的相关因素加以分析，以便为在高原筛选合格献血者，保障献血者的健康，提供指导依据，报道如下。

1 对象与方法

1.1 调查对象 2015 年 5-7 月，现场收集西藏拉萨、山南、林芝 3 家军队血站（位于海拔 3 000-4 000 m）的献血者资料，共计 289 名，其中现役官兵 284 人、其他职业者 5 人。记录这些献血者基本情况、既往病史、体格检查等数据，计算获得其 HAPC 发病比例（表 1-2）。

1.2 统计分析方法 采用 Epidata 3.0 软件录入数据，定量资料以“均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）”表示，定性资料以频数和百分比（%）表示，采用 SAS 9.2 软件对调查数据做统计学分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.2.1 以 HAPC 作为分组变量做单因素分析 对于定量指标，当其满足正态性和方差齐性时，采用 t 检验；当其不满足正态性或方差齐性时，采用 *Wilcoxon* 秩和检验。对于定性指标，根据数据的具体情况，采用 χ^2 检验或 *Fisher* 精确概率法。

1.2.2 以 HAPC 作为因变量做多因素分析 以 HAPC 为因变量，以献血者的年龄、民族、高原居住时间、工作性质、饮酒、吸烟、身高、体重、血压、脉搏、血型为自变量，采用 Logistic 回归做多因素分析。

2 结果

2.1 青藏高原军队血站献血者的基本情况与 HAPC 发病比例 见表 1-2。

表 1 青藏高原军队血站献血者的基本情况（定性指标）

	分类	*n*	比例（%）
性别	男	288	99.65
	女	1	0.35
民族	汉	262	90.66
	藏	8	2.77
	其他*	19	6.57
文化程度	小学	1	0.35
	初中	45	15.85
	高中	144	50.70
	专科	75	26.41
	本科	18	6.34
	研究生及以上	1	0.35
职业	工人	3	1.04
	军人	284	98.61
	教师	1	0.35
工作性质	体力劳动	240	86.64
	脑力	37	13.36
饮酒	是	3	1.18
	否	251	98.82
吸烟	是	11	4.33
	否	243	95.67

* 其他为土家族 5 人，满族 4 人，彝族 2 人，布朗族、苗族、壮族、布依族、侗族、白族、哈尼族各 1 人；另有 1 人未填写民族；* 表中某些因素例数总和<289，原因为有献血者未记录此项信息。

表 2 青藏高原军队血站献血者 HAPC 发病比例

	分类	*n*	比例（%）
HAPC	无	110	38.06
	有	179	61.94

2.2 青藏高原军队血站献血者患 HAPC 的单因素分析 表 3-4。

2.3 青藏高原军队血站献血者患 HAPC 的多因素分析 采用前进法、后退法和逐步法分别对自变量筛选，综合 3 种方法的结果，确定最终进入模型的自变量为年龄、民族、吸烟、收缩压、舒张压、脉搏、血型；发现年龄、民族、吸烟、血压、脉搏、血型对 HAPC 的发生有一定影响（表 5）。

3 讨论

HAPC 是 1 种适应机制，其病因可能为高原缺氧造成促红细胞生成素增多引起[5]，也有可能是高原强紫外线等极端环境造成的机体自由基代谢紊乱引起[6]；红细胞过度增多会导致血液黏度增大，呈高凝状态[7]，MCV 变小[3]。如果献血者罹患 HAPC，不但其所献的血液质量会受影响，而且还会影响献血者献血后的身体健康。对于军队采供血机构来说，现役官兵是无偿献血的主要人群，且多为汉族男性青壮年，

在地广人稀、少数民族聚居的青藏高原更是如此,因而也成了 HAPC 的高发群体[4]。已有研究发现驻青藏高原部队的献血(者)反应发生率(7.43%)明显高于其他地区驻军(4.27%)[8];这可能与青藏高原的极端地理、气候环境有关。本组调研数据显示,地处青藏高原地区军队血站献血者(现役官兵占 98.61%)HAPC 发病比例>6 成(表 1-2),这可能是导致献血不良反应发生的因素之一。因此,我们对本组高原献血者的 HAPC 患病情况及其影响因素作了分析。

表 3　青藏高原军队血站献血者患 HAPC 的单因素定量分析

	HAPC	n	$\bar{x}\pm s$	中位数	四分位数间距	最小值-最大值	P
年龄(岁)	无	107	22.37±4.95	21.00	6.00	18.00-58.00	>0.05
	有	179	21.99±3.97	21.00	3.00	18.00-43.00	
高原居住时间(年)	无	110	4.19±5.93	2.00	2.00	1.00-40.00	>0.05
	有	179	4.49±5.69	3.00	2.00	1.00-34.00	
身高(cm)	无	104	172.12±4.57	172.00	5.00	160.00-188.00	>0.05
	有	176	172.31±5.57	172.00	8.00	158.00-182.00	
体重(kg)	无	104	65.39±12.22	64.00	8.25	50.00-170.00	>0.05
	有	175	65.43±8.74	65.00	10.00	30.00-91.00	
收缩压(mmHg)	无	102	121.56±8.42	120.00	10.00	100.00-140.00	<0.01
	有	174	115.42±14.38	120.00	18.75	90.00-145.00	
舒张压(mmHg)	无	100	79.68±7.16	80.00	0.00	60.00-100.00	>0.05
	有	174	79.77±11.70	80.00	22.50	60.00-110.00	
脉搏(次/min)	无	101	81.41±3.93	82.00	4.00	70.00-90.00	>0.05
	有	176	83.03±5.23	82.00	12.00	74.00-98.00	

表 4　青藏高原军队血站献血者患 HAPC 的单因素定性分析

	分类	无 HAPC		有 HAPC		P
		n	比例(%)	n	比例(%)	
民族	汉	92	83.64	170	94.97	<0.01
	藏	3	2.73	5	2.79	
	其他	15	13.64	4	2.23	
工作性质	体力	95	93.14	145	82.86	<0.05
	脑力	7	6.86	30	17.14	
饮酒	是	2	2.67	1	0.56	>0.05
	否	73	97.33	178	99.44	
吸烟	是	10	13.33	1	0.56	<0.01
	否	65	86.67	178	99.44	
ABO 血型	A	40	36.36	33	18.97	<0.01
	B	33	30.00	57	32.76	
	O	31	28.18	70	40.23	
	AB	6	5.45	14	8.05	

表 5　青藏高原军队血站献血者患 HAPC 的多因素分析

变量名	参数估计值	统计量	P	OR	
				估计值	95%置信区间
截距	-7.296 8	1.84	>0.05		
年龄	0.287 5	7.90	<0.05	1.333	(1.091,1.629)
民族(藏)	-0.328 0	0.08	>0.05	0.720	(0.069,7.473)
民族(其他)	-1.847 5	6.88	<0.01	0.158	(0.040,0.627)
吸烟	-5.459 1	8.29	<0.01	0.004	(<0.001,0.175)
收缩压	-0.305 0	27.68	<.0.01	0.737	(0.658,0.826)
舒张压	0.319 7	20.95	<.0.01	1.377	(1.201,1.579)
脉搏	0.149 0	8.99	<0.01	1.161	(1.053,1.279)
血型(B)	1.387 9	6.29	<0.05	4.006	(1.354,11.853)
血型(AB)	0.658 5	0.76	>0.05	1.932	(0.438,8.523)
血型(O)	1.099 4	5.04	<0.05	3.002	(1.150,7.836)

本组献血人群中 HAPC 患者占 61.94%,远远高于以往 2.7%的报道[9],这可能与本组对象绝大多数为男性及汉族有关。在高原工作的临床医师目前一致的看法是 HAPC 患者绝大多数为男性,男女之比为 58∶1[10];另外,与世居同海拔地区的藏族人相比,汉族移居者血液中的 Hb 要高许多,即使已适应当地气候环境,移居高原地区多年的汉族人,其 Hb 仍同样高[11]。本组多为移(暂)居高原的汉族现役官兵,故 HAPC 患病比例较高。

通过对引起高原献血人群患 HAPC 的各个单因素分析,发现无 HAPC 的献血者收缩压明显高于有 HAPC 者(表 3)。从 1960 年代起便有学者注意到 HAPC 与患者心脏受累之间的关系:存在心脏损害的 HAPC 患者,常常是 HAPC 在先,心脏损害在后。这是由于心血管系统是缺氧代偿的重要器官,当机体处于缺氧条件下,心室肌通过增加收缩力来提高每搏输出量,长此以往将最终导致心力衰竭[12];故 HAPC 患者若捐献血液,极有可能加重其缺氧并加速其患心力衰竭的进程,后果严重。这是由于 HAPC 患者处于红细胞高度增生的状态,机体 Hb 水平较高,当他们拟献血时,一定要充分考虑到其基础 Hb,密切观察其 Hb 水平及心功能变化。

HAPC 与民族、工作性质、吸烟等因素具有相关性。许多学者认为职业也是影响 HAPC 发病率的重要因素,但结论不一。如从事工作强度较大的体力劳动者,被认为 HAPC 发病率较高[13];但在对更高海拔地区男性居民的调查显示,脑力劳动组 HAPC 发病率明显地高于体力劳动组,这可能是由于脑力劳动时,脑组织耗量增加,易导致机体缺氧,而且脑力劳动未能发挥体力劳动时心肺功能的代偿作用[14]。本组对象基本为现役官兵,虽然均非高强度体力劳动者,但其中脑力劳动者的 HAPC 发病率同样较高(表 4)。关于吸烟对 HAPC 的影响,有 1 项对世居拉萨、阿里等地区 2 757 名藏族人群的 HAPC 患病情况所作的调查分析显示,藏族吸烟人群 HAPC 发病率明显高于非吸烟人群[15]。我们本次调研的结果与之相反(表 4-5),推测可能为现役官兵对其吸烟情况有所隐瞒有关;也可能由于本组对象绝大多数为汉族,因此与上述藏族吸烟人群的调查结果不一致。

红细胞 ABO 血型无疑也是引起 HAPC 发病的重要因素之一。本组人群中的 B、AB、O 型献血者患 HAPC 的比例均高于 A 型献血者(表 4-5)。血型作为 1 种遗传信息,与很多疾病的易感性存在关联,如 A 型血的人较非 A 型者增加了胃癌、胰腺癌的发生风险[16-17]。目前关于 ABO 血型与 HAPC 发病的相关性研究鲜见,其机制有待进一步论证。但有研究者对西藏那曲地区 1 234 名藏族男、女的血型调查分

析显示,藏族女性中 A 型血的人占到了 23.5%,高于 A 型血在藏族男性中的 21.17%[18],这也可能是女性 HAPC 患病率较低的因素之一。尽管我们所作的多因素回归分析结果,尚不能确定血型是 HAPC 发病的独立影响因素(表 5),但在 HAPC 发病机制及救治方法尚不明确的情况下,明确血型的具体影响可为预防发病提供参考。此外,经 *Logistic* 逐步回归分析也发现年龄、舒张压、脉搏等在 HAPC 的发生中均有一定影响。

总之,对上述调查结果的分析,可提示高原地区军队血站:在下部队采血时,除了关注血液相关生化指标外,还应综合考虑献血者上述相关指标,避免采集无明显症状的 HAPC 患者血液,从而确保献血者的身体健康,保障战备工作。本研究尚存在一定不足,如标本数较少、采样范围局限等,导致了样本数的不均衡,如采样人群中 83.64%为汉族,仅 2.73%为藏族;99.65%为男性,仅 1 名女性;而民族、性别恰恰是 HAPC 的关键影响因素。因此,在本研究的基础上应进一步扩大采样范围,增加标本数,从而更好地明确 HAPC 发病的关键因素,更好地杜绝高原采血工作中不良事件的发生,增强军队采供血机构的保障能力。

参 考 文 献

[1] 高亮,崔建华,马广全,等. 大豆异黄酮对海拔 5 000 m 以上高原红细胞增多症患者氧自由基代谢的影响. 第三军医大学学报, 2012, 34 (24): 2528-2529.

[2] 司本辉, 肖青林, 常开齐, 等. 高原不同人群血液流变学指标改变及血液粘度的调节. 微循环杂志, 2004, 14(4): 43-45.

[3] 青格乐图. 高原红细胞增多症 86 例的血常规结果分析. 国际检验医学杂志, 2011, 32(16): 1892-1893.

[4] 李雪冰. 驻藏官兵高原红细胞增多症发病影响因素调查及与前炎性细胞因子关系研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2014.

[5] Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. Blood Rev, 2013, 27(1): 41-53.

[6] 阿祥仁, 张鑫生, 程海花, 王丽萍.不同海拔高原红细胞增多症患者体内同型半胱氨酸与氧自由基代谢水平的相关性研究. 临床荟萃, 2006, 21(5): 322-324.

[7] 耿东升, 兰建国, 刘发.高原红细胞增多症及药物防治.高原医学杂志, 2007, 17: 58-64.

[8] 陈萍, 田尚玉. 某高原部队无偿献血者献血反应原因调查分析. 西北国防医学杂志, 2007, 28(2):151.

[9] 李骥, 孙红娟, 蒋磊, 等.拉萨市区健康成人的血红蛋白分析. 现代预防医学, 2012, 39(2) : 392-393.

[10] 冉云德, 王洪斌, 李木成. 高原红细胞增多症 1240 例分析. 高原医学杂志, 1992,2(2): 41-43.

[11] Wu T, Wang X, Wei C, et al. Hemoglobin levels in Qinghai-Tibet: different effects of gender for Tibetans vs. Han. J ApplPhysiol, 2005, 98(2): 598-604.

[12] 吴小东, 杜磊. 高原红细胞增多症. 中国输血杂志, 2013, 26(6): 589-592.

[13] 张朝霞, 赵兰君, 王东林, 周永强. 青海海西地区高原红细胞增多症调查分析. 现代预防医学, 2010, 37 (1):2021-2022.

[14] 曹祯吾, 贺彪. 高原红细胞增多症的流行病学研究. 西藏科技, 1995,67(1): 25-32.

[15] 白玛康卓, 巴桑次仁, 次仁央宗, 等. 不同海拔地区世居藏族人群高原红细胞增多症患病率的流行病学调查. 第三军医大学学报, 2016,38(3):220-225.

[16] 王在标, 尹慢慢, 蔡慧, 等. ABO 血型与胃癌发生风险的病例-对照研究及 meta 分析. 第二军医大学学报, 2014, 35(5): 560-565.

[17] Risch HA, Lu L, Wang J, Zhang W, Ni Q, Gao YT, et al. ABO blood group and risk of pancreatic cancer: a study in Shanghai and meta-analysis. Am J Epidemiol, 2013, 177(12): 1326-1337.

[18] 那曲地区人民医院,辽宁省第三批赴藏医疗队. 那曲地区 1234 名藏族 ABO 血型调查. 西藏医药, 1978, 2: 22-25.

(2016-06-26 收稿,2017-03-03 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

四川省临床医生用血知识调查及分析

钟凌　赵洁　何屹　林嘉　吴艳红　杨佳　杨静　李倩　饶绍琴△
（四川省人民医院 检验科输血科 四川省输血质控中心，四川 成都 610072）

摘要：目的　掌握四川省临床医生用血知识现状，分析存在缺陷，探讨改进措施。**方法**　由医学伦理委员会授权设计调查问卷，问卷由 2 大部分共 20 个问题组成，内容包括输血相关法规和标准、输血相容性实验室检测技术、输血反应、血液成分选择。调查对象为四川省二、三级医院的临床医生。调查结果采用 EpiData 3.1 软件进行统计分析。**结果**　31 家医院 786 名医生完成了问卷调查，平均分 12.02±2.77，正确率 60.1%。输血相关法规和标准正确率较高（74.50%），与其余 3 部分（输血相容性实验室检测技术 56.20%、输血反应 52.20%、血液成分选择 53.10%）差异具统计学意义（$P<0.05$）。正确率最高（93.4%）的 1 题是关于复核交叉合血结果和血袋标签确认的问题，正确率最低（15.8%）的 1 题是“有输血史和妊娠史的患者在输血前应选用哪种介质做交叉配血”。工龄>15 年的医生在输血相容性实验室检测技术、输血反应、血液成分选择方面优势显著（$P<0.05$）。学士组得分高于学士以下组（$P<0.05$）和硕士及以上组（$P<0.05$）。高级职称组在“输血反应”得分高于初级组（$P<0.05$），“血液成分选择”得分高于初、中级（$P<0.05$）。麻醉科医生在“法规和标准”、“血液成分选择”的得分明显高于其他专业医生（$P<0.05$）。**结论**　当前四川省临床医生对用血知识的掌握程度和执行情况尚可，仍应加强监管、沟通和针对性培训。

关键词：四川省；临床医生；用血
中图分类号：R457.1　R193.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1004-549X(2017)3-0300-04

A survey and study on transfusion medicine knowledge of clinicians in Sichuan　*ZHONG Ling, ZHAO Jie, HE Yi, LIN Jia, WU Yanhong, YANG Jia, YANG Jing, LI Qian, RAO Shaoqin. Department of Blood Transfusion and Laboratory Medicine, Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China*

Abstract: Objective　To obtain information on transfusion knowledge and identify deficient areas in clinicians in Sichuan province in order to design educational plan for improvement. **Methods**　The questionnaire was authorized by Medical Ethics Committee of Sichuan Provincial People's Hospital. This survey was performed by means of the questionnaire which was composed of 20 questions assessing transfusion medicine knowledge including regulations and standards, laboratory testing technique of blood compatibility, transfusion reaction and selection and use of blood components. The questionnaires were administered to clinicians from grade Ⅱ and Ⅲ hospitals of different geographic locations in Sichuan. The data were analyzed by EpiData 3.1 software. **Results**　786 clinicians from 31 hospitals finished all questions. The overall mean score for the 20 questions of all respondents was 12.02±2.77 with accurate rate of 60.1%. Respondents performed better on transfusion related regulations and standards (74.50%) than other three parts, including laboratory technology (56.20%), transfusion reaction (52.20%), and selection and use of blood components (53.10%) ($P<0.05$). The subject on verification of crossmatch results and labeling of blood bag achieved the highest score (93.4%). The subject on choosing what kind of media to do crossmatch for patients with history of transfusion and pregnancy achieved the lowest score (15.8%). Clinicians with 15-year or longer career obtained better score evidently, especially in the last three parts ($P<0.05$). Clinicians with bachelor degrees got the better scores ($P<0.05$). Clinicians titled with senior did better in selection and use of blood components than intermediate title and primary title ($P<0.05$). A significantly stronger performance was noted in anesthesia for rule and selection of blood composition ($P<0.05$). **Conclusions**　In Sichuan Province, the doctors have a decent grasp on the knowledge on rational use of blood. In the future, supervision, communication and targeted training should be strengthened.

Key words: Sichuan; clinicians; blood use

当前血液资源的数量和质量有了显著的提高，但仍供不应求，这与持续增高的临床用血量密切相关[1]，一方面手术用血量不断增加，另一方面用血不合理较为严重[2]。临床用血主要由临床医生来决定[3]，但临床医生常仅凭个人经验指导用血[4]，同时行政监管也不到位。因此《医疗机构临床用血管理办法》（办法）[5]规定每个省建立 1 个临床输血质量控制中心（QCCBT），以监督用血并承担相应的继续教育。四

doi：10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.021
*基金项目：四川省卫生体项目-四川省临床用血质量体系建立及推广（30305030143）；△通信作者：饶绍琴（1959.07-），女，主任技师，硕士研究生导师，主要从事临床输血质量管理工作，电话：028-87394893，Email：raoshaoqin@126.com

川省 QCCBT 拟对省内大中型医院临床用血情况和临床医生的用血知识进行调查,以发现问题,解决问题,实现合理用血。

1 对象与方法

1.1 对象 来自四川省内 14 家三级甲等医院和 17 家二级甲等医院的共临床医生 896 名,该 31 家医院包括综合性医院和妇幼保健院,涵盖临床各主要专业,如麻醉科、普外科、妇产科、血液内科等。

1.2 方法 本项目调查时间段为 2015 年 8 月-2016 年 8 月。本项目经四川省人民医院伦理委员会批准,以问卷形式进行调查。内容为临床医生背景信息和用血相关知识。前者包括:受调查者的性别、年龄、专业、教育背景、医院级别等。后者为 20 道单选题(总分 20 分):6 道输血相关法规和标准的题目;5 道输血相容性实验室检测技术的题目;3 道输血反应的题目;6 道血液成分选择的题目。每题有 3 个选项,其中 1 个选项是“我不知道”,以减少猜测。题目由输血科主任从 200 道输血相关问题的题库中筛选出来并通过了临床医学教育专家和输血专家的审核。为了确保调查问卷具有代表性和合理性,先进行试点研究:来自 2 所医院(一所为二级甲等,一所为三级甲等)不同科室的 50 名医生,完成 200 道问题,分别计算 200 道和 20 道题目的准确度,两者差异无统计学意义。问卷调查采用匿名形式。每家医院由 1 名研究员负责分发和收集问卷。由 2 位研究员负责汇总分析所有问卷,并通过 EpiData 3.1 软件分析数据。

1.3 统计学分析 采用 SPSS16.0 软件(SPSS , Chicago, IL)分析数据。计算每 1 题的正确率,并统计得分。评分规则是答对 1 题得 1 分,答错 1 题得 0 分。结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。群体之间定性变量的比较采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法,定量变量采用 t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 问卷调查结果概况 来自 14 家三级医院和 17 家二级医院共 896 名临床医生参与了本次调查,其中 786 名医生(87.7%)完成所有题目。问卷平均分为 12.02±2.77,平均正确率为 60.10%。其中输血相关法律法规正确率较高(74.50%),与其他 3 部分(输血相容性实验室检测技术 56.20%、输血反应 52.20%、血液成分选择 53.10%)差异具统计学意义($t=173.41,211.88,203.49$,$P<0.05$)。正确率最高的 1 题是关于复核交叉合血结果和血袋标签确认的问题,93.4%(734/786)的医生回答正确。正确率最低的是“有输血史和妊娠史的患者在输血前应选用哪种介质做交叉配血”的问题,正确率仅为 15.8%。

2.2 性别、年龄、工龄对得分的影响 临床医生性别对得分无影响;年龄<40 岁的得分略低于≥40 岁,但差异无统计学意义($t=2.82,2.73,2.87,2.65$,$P>0.05$)。而工龄≥15 年的医生总体上优势明显($t=4.57$, $P<0.05$),尤其在输血相容性实验室检测技术、输血反应、血液成分选择 3 部分差异具统计学意义($t=4.65,4.15,5.93$,$P<0.05$)(表 1)。

表 1 按性别、年龄(岁)、工龄(年)分组的得分情况 ($\bar{x}\pm s$)

		n	法规和标准	输血相容性实验室检测技术	输血反应	血液成分选择	平均分
性别*	男性	489	4.52±1.15	2.79±1.06	1.56±0.88	3.13±1.28	12.01±2.88
	女性	291	4.37±1.16	2.84±1.05	1.56±0.80	3.27±1.28	12.04±2.59
年龄(岁)*	<40	584	4.44±1.15	2.77±1.07	1.54±0.84	3.16±1.27	11.9±2.81
	≥40	179	4.54±1.20	2.92±1.01	1.68±0.86	3.26±1.35	12.4±2.72
工龄(年)§	<15	539	4.42±1.16	2.77±1.09	1.54±0.84	3.14±1.28	11.87±2.84
	≥15	199	4.6±1.07	2.96±1.01#	1.68±0.84#	3.38±1.30#	12.61±2.55#

#与工龄<15 年的相比,P 均<0.05;* 780 份问卷填写了性别;☆763 份问卷填写了年龄;§ 738 份问卷填写了工龄

2.3 学历、职称对得分的影响 学士组平均分高于学士以下组($t=8.39$, $P<0.05$)和硕士及以上组($t=10.03$, $P<0.05$)。硕士及以上组在“法规和标准”和“输血相容性实验室检测技术”得分均最低($t=13.14,4.21$, $P<0.05$),学士以下组在“输血反应”及“血液成分选择”得分最低($t=3.57$, 5.15, $P<0.05$)(表 2)。高级职称组在“输血反应”得分高于初中级职称,尤其是初级组($t=11.17$, $P<0.05$);在“血液成分选择”得分高于初、中级($t=12.06$,$P<0.05$)(表 2)。

表 2 按教育背景、职称分组的得分情况 ($\bar{x}\pm s$)

		n	法规和标准	输血相容性实验室检测技术	输血反应	血液成分选择	平均分
学历※	学士以下	142	4.51±1.11	2.75±0.94	1.47±0.79*	2.96±1.16*	11.69±2.48#
	学士	522	4.51±1.13	2.87±1.04	1.63±0.86	3.27±1.31	12.25±2.74
	硕士及以上	109	4.17±1.31*	2.56±1.20*	1.52±0.86	3.03±1.34	11.28±3.19#
职称§	高级	148	4.47±1.13	2.89±1.01	1.72±0.87*	3.48±1.30*	12.56±2.33
	中级	255	4.59±1.10	2.82±1.03	1.64±0.82	3.18±1.30	12.23±2.78
	初级	283	4.43±1.18	2.93±1.04	1.52±0.84	3.20±1.16	12.08±2.61

#与学士学历相比,P <0.05;* 与其他 2 组比,P <0.05;※773 份问卷填写了教育背景;§ 676 份问卷填写了职称

2.4 医院级别及科室类别对得分的影响 786 名临床医生,54.6%来自二级医院,45.4%来自三级医院。二级医院临床医生平均分高于三级医院($t=3.01$,$P<0.05$)(表 3)。不同专业临床医生的调查结果:麻醉科医生平均分明显高于其他专业($t=15.82$,$P<0.05$);尤其是“法规和标准”、“血液成分选择”2 部分优势显著($t=13.12,18.93$, $P<0.05$),“输血相容性实验室检测技术”和“输血反应”略低于最高分,但差异不具统计学意义。外科作为“用血大户”仅在“输血反应”1 项中得分最高,其余 3 项排名靠后(表 4)。

表 3　按医院等级分组的得分情况　($\bar{x}\pm s$)

	n	法规和标准	输血相容性实验室检测技术	输血反应	血液成分选择	平均分
二级医院	429	4.59±1.03	2.69±0.95	1.56±0.81	3.19±1.25	12.32±2.41#
三级医院	357	4.42±1.28	2.80±1.14	1.57±0.89	3.18±1.32	11.68±3.13

#与三级医院比,$P<0.05$

表 4　按临床专业分组的得分情况　($\bar{x}\pm s$)

	n	法规和标准	输血相容性实验室检测技术	输血反应	血液成分选择	平均分
麻醉科	22	5.08±0.72#	2.96±0.91	1.54±0.66	3.83±0.96#	13.41±2.00#
妇产科	52	4.42±1.27	3.10±0.80	1.65±0.81	3.54±1.41	12.70±2.23
儿科	40	4.28±1.01	3.10±0.78	1.55±0.96	3.50±1.32	12.41±2.02
外科	224	4.61±1.04	2.79±1.02	1.70±0.85	3.21±1.27	12.32±2.68
内科	217	4.41±1.14	2.92±1.08	1.61±0.82	3.26±1.23	12.21±2.52
其他	66	4.00±1.38	2.27±1.21	1.02±0.77	2.29±1.21	9.58±3.46

#与其他组比,$P<0.05$, 差异具统计学意义,※ 621 份问卷填写了专业

3　讨论

临床医生作为决策者在用血全过程中发挥着核心作用[6]。本调查结果显示临床医生用血知识的正确率为 60.1%,而美国、伊朗等地的正确率为 30%- 40%[7-10],加拿大的正确率为 52%。可能是由于本问卷主要涉及基础知识,没有复杂的案例分析。问卷中输血相关法规和标准部分的正确率最高,而实验室技术、输血反应、血液成分选择 3 部分的正确率较低,一方面与临床医生用血理论知识,尤其免疫血液学较匮乏有关;另一方面在中国现行的输血模式中,临床医生与输血科基本脱节即输血科缺乏临床背景的医生,而临床医生缺乏输血科工作经验。在制定输血方案、推行节约用血新型医疗技术、会诊特殊疗病例时临床医生和输血科应相互积极配合。同时临床用血管理委员会应制订本机构临床用血管理制度尤其是培训制度,在继续教育中加强理论知识的转化和深化。

问卷中正确率最高的一题是关于复核交叉合血结果和血袋标签确认的问题,这在《办法》中已三令五申。此结果说明该要求已在临床工作中得到了广泛的落实。正确率最低的一题涉及实验室操作,临床医生相对了解较少。因此临床医生宜学习相关实验室知识,加强与输血科的沟通交流。

工龄 15 年及以上的临床医生得分明显高于工龄较短的医生。但也有报道得分随着年限增长而降低的[11],这可能是由于临床医生接受培训的时间点不同。在美国,加拿大等地,医学生在医学院时就已接受了正规的培训[12],工作后相对较少。而在中国,临床医生缺乏正规系统的指导,输血医学未独立设科,输血知识分散于外科、内科、检验医学中,内容也局限于 ABO 血型、Rh 血型及常见血液制品的临床应用。因此,专设输血医学系迫在眉睫。同时继续教育中应注重培训的系统性和针对性,能够给予临床医生体系化的学习。

在学历分组中,本科整体掌握程度最佳,而学士以下、硕士及以上薄弱点各不相同。这可能是因为学士以下组理论知识较薄弱;硕士及以上组临床应用培训较少。因此针对不同学历的临床医生,继续教育可有所侧重。在职称分组中,高级职称组在输血反应、血液成分选择得分均较高,说明其血液管理能力更强。因此,各级医生的用血权限应各有不同,须明确规定用血申请流程,建立《办法》中要求的临床用血申请管理制度。

SA 等[1]发现:病理科、血液科医生用血知识优势明显;Philip 等[7]发现血液科医生优于其他专业内科医生;孙启凤[13]等报道骨科、普外科位居不合理用血的前两位;刘丽等[14]发现内科医生得分偏低;这些结果与我们的调查结果一致。此外,我们还发现麻醉科医生得分显著高于其他专业。《办法》中已明确将麻醉科医生列入临床用血管理委员会的成员,成为重点控制人群[15]。针对各临床科室,管理委员会应定期评审科室和医师的用血情况并公示。

综上所述,当前四川省临床医生对用血知识的掌握程度和执行情况尚可,但仍有不足之处。临床用血管理委员会应建立起涵盖全过程的管理制度并监督实施,尤其是继续教育应更具系统性和针对性。临床医生在加强自身学习的同时与输血科建立良好的合作关系,这样才能有效推进临床合理用血,保护稀缺血液资源。

参　考　文　献

[1] Arinsburg SA, Skerrett DL, Friedman MT, et al. A survey to assess transfusion medicine education needs for clinicians. Transfus Med, 2012, 22(1):44-49; quiz 49-51.

[2] Christensen RD, Juul SE, Del Vecchio A. The expanding evidence base to guide neonatal hematology and transfusion medicine practice. Clin Perinatol, 2015, 42(3): xix-xx.

[3] Gharehbaghian A, Javadzadeh Shahshahani H, Attar M, et al. Assessment of physicians knowledge in transfusion medicine, Iran. Transfus Med, 2009, 19(3):132-138.

[4] Kasraian L, Tavassoli A. A survey of resident physicians´ knowledge concerning transfusion medicine in Shiraz, Iran. Asian J Transfus Sci, 2014, 8(2):118-120.

[5] 中华人民共和国卫生部.医疗机构临床用血管理办法.卫医发[2012]85.

[6] 刘慧南,林振平,胡文静,等.我国临床合理用血的状况及管理措施探讨.临床血液学杂志,2015,28(2):138-141.

[7] Philip J, Kumar S, Chatterjee T, et al. Knowledge of transfusion medicine among resident doctors in clinical specialities: a cross-sectional studyfrom a tertiary care centre. Indian J Hematol Blood Transfus, 2015, 31(3):374-377.

[8] Ramani KV, Mavalankar DV, Govil D. Study of blood-transfusion services in Maharashtra and Gujarat States, India. J Health Popul Nutr, 2009, 27(2):259-270.

[9] Shi L, Wang J, Liu Z, et al. blood donor management in china. Transfus Med Hemother, 2014, 41(4):273-282.

[10] Verlicchi F, Facco G, Macri M, et al. Blood transfusion practice: a nationwide survey in Italy. Blood Transfus, 2014, 9(4):430-435.

[11] Yu X, Huang Y, Qu G, et al. Safety and current status of blood transfusion in China. Lancet, 2014, 375(9724):1420-1421.

[12] 何屹,林嘉,饶绍琴.临床合理用血评估与管理系统的数据分析.中国输血杂志,2014,27(7):774-777.

[13] 孙启凤,马欣,张正芳,等.6 所医疗机构临床用血现状调研.中

国输血杂志,2014,27(3):234-237.
[14] 刘丽,苏虹.安徽省三级综合性医院内科合理用血现况研究.临床血液学杂志,2015,28(4):273-276.
[15] 胡晓燕,王苑,朱鑫方,等.3228 例临床用血调查分析及对策探讨.中国输血杂志,2015,28(8):942-945.

(2016-10-18 收稿,2017-03-20 修回)
本文编辑:夏玲

· 论著 ·

本院 2005-2015 年输血过敏性不良反应统计分析

马凤莲[1] 崔丹[1] 陈海丽[1] 刘玉振[2](1.郑州市第七人民医院,河南 郑州 450000; 2.河南省红十字血液中心)

摘要:目的 调查分析发生过敏性输血反应的原因,探究其处理措施,降低过敏性输血不良反应的发生。**方法** 对本院 10 年住院患者发生输血过敏反应进行回顾性总结分析。**结果** 本院 76 703 人输血,发生输血过敏反应 93 例(0.12%)。不同的血液成分中悬浮红细胞、去白悬浮红细胞、洗涤红细胞、血小板、冷沉淀以及血浆过敏反应发生率分别为 0.11%、0.08%、0.00%、0.21%、0.10%、0.13%。过敏性输血反应中轻度过敏、重度过敏、休克、紫癜构成比分别为 88.2%、7.5%、3.2%、1.1%;输血 0 次和 1 次以上的患者再次输血过敏反应发生率分别为 0.08%、0.17%;男女输血患者过敏发生率分别为 0.10%、0.15%;1 例过敏性紫癜是由于患者缺乏 IgA 导致的。**结论** 血小板过敏反应发生率最高,洗涤红细胞最低;输血次数越多过敏反应发生率越高,女性输血过敏反应发生率高于男性;对过敏反应的患者,再次输血选择洗涤红细胞或洗涤血小板,慎输血浆;对检出 IgA 抗体的患者,选 IgA 缺乏献血者的血液。

关键词:输血反应;过敏;紫癜;瘀斑;荨麻疹
中图分类号:R457.1+3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)3-0303-03

Statistical analysis on allergic adverse transfusion in our hospital from 2005 **to** 2015

MA Fenglian[1], *CUI Dan*[1], *CHEN Haili*[1], *LIU Yuzhen*[2]. 1. *Seventh People's Hospital of Zhengzhou City of Henan Province*, *Zhengzhou* 450000, *China*; 2. *Red Cross Blood Center of Henan Province*

Abstract: Objective To investigate the causes of allergic transfusion reactions and to explore the treatment measures to reduce the occurrence of allergic transfusion adverse reactions. **Methods** The allergic transfusion reactions of patients in our hospital were retrospectively analyzed throughout ten years. **Results** There were 93 cases of blood transfusion reactions in 76 703 individuals (0.12%). The allergic reaction rates from transfusion of different blood components, such as suspended red blood cells, red blood cells to the white suspension, washed red blood cells, platelets, cryoprecipitate, and plasma, were 0.11%, 0.08%, 0.00%, 0.21%, 0.10%, and 0.13%, respectively. The constituent ratio of allergic transfusion reactions in mild allergy, severe allergy, shock, purpura was 88.2%, 7.5%, 3.2%, 1.1%, respectively. Patients with zero or one time and more times of blood transfusion experienced an allergic reaction rate of 0.08% and 0.17%. The incidence of allergies in men and women are 0.10% and 0.15%, respectively. One case of allergic purpura is caused by IgA deficiency. **Conclusion** The highest incidence of allergic reaction occurs after platelet transfusion when there is minimal washing of red blood cells. Higher frequency of blood transfusion is also associated with higher incidence of allergic reaction. Females experience higher incidence of transfusion reactions than males. In patients with allergic reactions, repeat transfusions should involve washing of red blood cells or platelets before transfusion. Caution should be taken when transfusing plasma. In patients with IgA antibodies, IgA deficient blood should be chosen for transfusion.

Key words: transfusion reaction; allergies; purpura; ecchymosis; urticaria

输血治疗在抢救失血性休克、急诊创伤、重度贫血患者中起着不可替代的作用。临床治疗过程中不管输注哪种血液成分,都有可能会发生输血不良反应,影响治疗效果。现将本院 10 年输血发生的过敏性输血不良反应进行统计,分析其发生的原因,探究其处理措施,降低输血不良反应的发生,提高输血治疗效果。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2005 年 1 月-2015 年 12 月共 76 703 人输血,发生过敏性输血不良反应 93 例,输血 0 次患者 45 177 例,输血 1 次以上患者 31 526 例,男性输血患者 43 623 人,女性输血患者 33 080 人。同时输注血浆和悬浮红细胞患者 835 例。

1.2 过敏性紫癜患者 女,45 岁,孕 5 产 2,人流 3 次,无输血史,皮肤黏膜无黄染、皮疹及出血点情况,血常规、血凝、肝肾功、尿常规无明显异常,患子宫肌瘤,行子宫全切术,因术

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.022

后 d3 患者重度贫血(Hb 47 g/L),输注 O 型 Rh 阳性悬浮红细胞 4 U,输血后 d2 发现患者髂腰间和会阴部有密集大小不等的紫癜,稍高于皮面,压之不褪色,治疗后 d7,皮肤紫癜逐步减轻, d11,紫癜变黄而逐渐消退。

1.3 方法　对过敏性输血不良反应进行统计。输血过敏反应按《临床输血》标准判断[1]。

2 结果

2.1 输血过敏反应与血液品种的关系　见表 1。

表 1　不同血液品种发生输血过敏反应统计

	输血人数(*n*)	过敏人数(*n*)	发生率(%)
悬浮红细胞	33 682	38	0.11
悬浮红细胞+血浆	835	1	0.12
去白悬浮红细胞	1 210	1	0.08
洗涤红细胞	109	0	0.00
血小板	926	2	0.21
冷沉淀	4 766	5	0.10
血浆	35 175	46	0.13
合计	76 703	93	0.12

2.2 输血过敏反应与输血次数的关系　输血 0 次患者 45 177 例,再次输血发生过敏反应 38 例(发生率 0.08%)。输血 1 次以上患者 31 526 例,再次输血发生过敏反应 55 例(发生率 0.17%)。2 者有显著差异($\chi^2=12.515$,$P<0.01$)。

2.3 输血过敏反应与性别的关系　男性输血患者 43 623 人次,发生输血过敏反应 43 例(发生率 0.10%),女性输血患者 33 080 人次,发生输血过敏反应 50 例(发生率 0.15%)。2 者有显著差异($\chi^2=4.295$,$P<0.05$)。

2.4 输血过敏反应分类　见表 2。

表 2　输血过敏反应分类统计结果

	例数	百分比(%)
轻度过敏反应	82	88.2
重度过敏反应	7	7.5
过敏性休克	3	3.2
紫癜	1	1.1
合计	93	100.0

2.5 过敏性紫癜患者症状　见图 1 和图 2。

2.6 过敏性紫癜患者输血效果检查　见表 3。

2.7 过敏性紫癜患者鉴别检查　见表 4。

图 1　患者髂腰间过敏性瘀斑

图 2　患者会阴部过敏性瘀斑

表 3　过敏性紫癜患者输血效果

	血红蛋白(g/L)	血小板($\times10^9$/L)
手术前	130	384
手术后 d1	66	163
手术后 d3	47	138
输血后 d1	80	204
输血后 d2	87	231
输血后 d4	89	261

注:正常范围:血红蛋白(115-150)g/L;血小板(125-350)$\times10^9$/L

表 4　过敏性紫癜患者鉴别检查结果

	实验结果	正常范围
束臂试验出血点(*n*)	16	<10
血小板计数($\times10^9$/L)	231	125-350
凝血酶原时间 PT(s)	10.6	9.6-14.0
活化部分凝血酶时间 APTT(s)	33	20-35
凝血酶时间 TT(s)	16.9	14.0-24.0
纤维蛋白原 FIB(g/L)	2.25	2.00-4.00
IgA(g/L)	0.003	2.01-2.69

注:IgA 检测血样品为输血前留下样品,其余为输血后 d2 采集的血样品

3 讨论

本院输血过敏反应发生率为 0.12%,低于文献报道[2]。93 例过敏性输血反应中轻度过敏占 88.2%、重度占 7.5%、休克占 3.2%,因此,严格掌握输血指征,否则因为输血过敏休克致人死亡的是要负法律责任的。不同的血液成分中发生过敏反应发生率最高是血小板,其次是血浆,最低是洗涤红细胞,因为血小板输注需要 6 人份以上手工血小板混合输注,抗原复杂增加了过敏反应的发生率。输血次数越多发生过敏反应发生率越高,女性输血过敏反应发生率高于男性,因为有输血史和妊娠史,机体受到血浆蛋白免疫刺激而致敏,再次输血时致敏原与受血者中存在相应抗体结合,发生抗原抗体反应。因此,对过敏反应的患者,再次输血选择洗涤红细胞或洗涤血小板,慎输血浆。

本次发现 1 例严重过敏性紫癜是由于患者 IgA 缺乏导致的,现对其发生的原因进行分析。

鉴别诊断:1)血小板因素。血小板在 50×10^9/L 以下,大多会出现明显的出血,最常见的是皮肤紫癜[3],由表 3 可知:患者手术后输悬浮红细胞 800 mL,血红蛋白由 47 g/L 升到 80 g/L,输血后血红蛋白上升,排除迟发型溶血反应;血小板由 138×10^9/L 升到 204×10^9/L,排除输血后、特发性及药物引起血小板减少性紫癜;表 4 显示血小板计数、PT、APTT 均正常,排除血栓性血小板减少性紫癜。2)凝血因子因素。表 4 显示凝血酶原时间 PT 、凝血酶时间 TT 、活化部分凝血酶时间 APTT 、纤维蛋白原 FIB(g/L)均正常,排除凝血因子缺乏导致的出血。3)血管因素:输血后患者出现紫癜后做毛细血管脆性试验(束臂试验)呈阳性,而手术前该患者体格检查时皮肤黏膜无皮疹及出血点,因此,本例输血反应定性为输血后免疫复合物沉积导致血管壁损伤,血液外渗。

病因分析:对患者输血前血浆进行 IgA 检测[4],表 4 显示 IgA 含量为 0.003 g/L,而其 IgA 抗体效价为 1∶2 048(输血后 IgA 抗体效价测定为 1∶512),证明该患者是 IgA 缺乏者,

· 短篇论著 · · 经验与方法 ·

MCS+血细胞分离机单采血小板冲红献血者自身原因分析及应对措施

邢志勇[1] 王维娜[2#](1. 武威市中心血站,甘肃 武威 733000;2. 武威市人民医院)

摘要:目的 探讨 MCS+血细胞分离机单采血小板采集过程中"冲红"的原因及应对措施。**方法** 选取 2012 年 1 月-2013 年 12 月单采血小板过程中有冲红(有肉眼可见的红细胞)现象的 27 例作为实验组,另选取同期在本站正常单采血小板的献血者 70 例作为对照组,分别对 2 组献血者标本进行全血常规及血红蛋白项目检测。**结果** 冲红组中献血者的 Hb、Hct、MCV、MCH、MCHC 均低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 2 组献血者 RBC 计数比较无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 单采血小板冲红现象与外周血的 Hb、Hct、MCV、MCH、MCHC 降低有关,与献血者多次采血及混合献血造成红细胞未完全成熟有关。

关键词:单采血小板;冲红;应对措施

中图分类号:R457.1+1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)3-0305-02

Analysis and countermeasures of MCS+ blood cell separator in apheresis platelet donors *XING Zhiyong*[1], *WANG Weina*[2]. 1. *Wuwei Blood Center*, *Wuwei* 733000, *China*; 2. *Wuwei People's Hospital*

Abstract: Objective To investigate the causes and countermeasures of "red flush" during the collection of platelets using MCS+ blood cell separator. **Methods** From January 2012 to December 2013, 27 patients with red flush phenomenon during platelet collection (visible presence of red blood cells with the naked eye) were designated as the experimental group; 70 patients with normal platelets were selected as control group. Routine blood tests and hemoglobin were performed on specimens from both groups of blood donors. **Results** The Hb, Hct, MCV, MCH and MCHC of the blood donors in the experimental group were lower than those in the normal control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$), and the RBC count of the two groups had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** The phenomenon of red blood cells in platelets is related to the decrease of Hb, Hct, MCV, MCH and MCHC in peripheral blood, which is related to the incomplete maturation of red blood cells caused by repeated blood collection and blood donation.

Key words: apheresis platelets; mixed red blood cells; countermeasures

随着成分输血的开展,单一血小板成分的输注已成为肿瘤、血液病、骨髓衰竭等疾病的重要治疗手段[1]。血小板主要用手工和单采 2 种方法提取,单采血小板具有供者单一、纯度高、白细胞和红细胞污染低、保存时间长、治疗效果好等优点,临床用量急速上升。随着血小板用量的增长,对于血小板的质量和安全问题也越来越突出,特别是红细胞混入量超标的问题。在用 MCS+血细胞分离机采集血小板的过程中,有时会有大量红细胞混入的现象发生,也称为"冲红"[2],使采集的产品不能达到《全血及成分血质量要求》

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.023

#共同第一作者:王维娜(1978.12-),女,主管护师,主要从事临床输血的研究,电话:0935-2250221,Email:xpj1331@163.com

可基本确定系由抗-IgA 引起的免疫反应。由于该患者是女性多次生孩和流产,再次怀孕可通过胎血刺激 IgA 缺乏母亲产生极高效价的 IgA 抗体(效价为 1∶2 048),这类抗体属于 IgG 类,当输入含有 IgA 的血液时,IgA 和 IgA 抗体结合产生免疫复合物(导致输血后 IgA 抗体效价降低为 1∶512),沉积在小血管壁上,吸附补体,产生血管活性物质,使毛细血管和细小血管发炎,导致毛细血管脆性和通透性增加。图 1、2 显示过敏性紫癜患者出现髂腰间和会阴部有密集大小不等的紫癜,与陈永平等[5]报道输血过敏性紫癜情况不一样。

治疗方案:过敏性紫癜是以毛细血管和小动静脉为主的变态反应性疾病。可采用静脉输注降低血管通透性的药物(如维生素 C)和抗过敏治疗药物(如地塞米松)。

预防措施:对 IgA 水平缺乏的患者或检出抗 IgA 抗体的患者,首选 IgA 缺乏献血者的血液,在美国和欧洲已建立 IgA 缺乏献血者档案,仅在紧急情况下使用。次选洗涤红细胞或洗涤血小板,对于有 IgA 过敏性输血反应风险的受血者,要求红细胞和血小板洗涤 5 次以上,去除残留血浆蛋白。

参 考 文 献

[1] 付涌水,钱开城,陆志刚.临床输血.北京:人民卫生出版社,2013:280-299.

[2] 方定安.百色市输血反应分析.右江民族医学院学报,2013,35(2):191-192.

[3] 林静霞,任俊,肖帆. 输血不良反应的临床特点及影响因素分析.中国输血杂志,2015,28(3):291-294.

[4] 赵玉林 ,冯明亮,沈彤.上海地区献血人群免疫球蛋白 A 缺乏调查.中国输血杂志,2011,24(3):211-214.

[5] 陈永平,苟正英.输血致过敏性紫癜 1 例.重庆医学,2002,31(3):255.

(2016-06-11 收稿,2017-02-28 修回)

本文编辑:闻欣

(GB19469-2012)中的标准,造成了血液和耗材的浪费。本研究回顾性探讨机采血小板中红细胞混入量超标的影响因素及相应的应对措施,现报告如下。

1　材料与方法

1.1　资料来源　所有标本均来自本血站 2012 年 1 月—2013 年 12 月机采成分献血者,共采集 1 069 例次。献血者筛选标准皆符合《献血法》、《献血者健康检查要求》(GB19467-2011)中献血者体检、血液学检查标准,捐献血小板前 5 d 未服阿斯匹林或阿斯匹林类药物。按照《全血及成分血质量要求》(GB19469-2012)中对单采血小板中红细胞混入量标准为 $\geq 8.0\times10^9$/袋,分为冲红组与正常对照组,其中冲红组 27 例,男 15 例,女 12 例,年龄 22-53 岁,平均(36.5±10.1)岁;另随机选择 70 例符合标准的机采血小板献血者作为正常对照组,男 39 例,女 31 例,年龄 20-51 岁,平均(34.7±11.2)岁。经统计学分析,比较 2 组献血者在性别、年龄均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2　血小板采集　使用 MCS+(Haemonetics)血细胞分离机,按机器操作规程选择标准程序,采用 995E 号耗材,16 号单针穿刺,处理 4-5 个循环,采血速度(50-100)mL/min,血小板收集阀值 85%,血小板/血细胞参数 1。

1.3　检测方法及指标　用日本光电 MEK-7222K 全自动血细胞分析仪检测献血者机采前手指血计数,机采血小板的 Plt 计数测定时样品稀释 2 倍,检测试剂均在有效期内使用,并严格执行仪器操作规程。检测指标为血红蛋白(Hb)、红细胞计数(RBC)、红细胞压积(Hct)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)等。

1.4　统计学方法　所有数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异,有统计学意义。

2　结果

2.1　单采血小板冲红的发生率　1 069 例次 MCS+血细胞分离机血小板采集过程中,有冲红现象者 27 例次,发生率为 2.25%。

2.2　2 组 Hb、Hct、MCV、MCH 及 MCHC 检测指标的比较　经检测发现冲红组 Hb 指标低于对照组($P<0.01$),Hct、MCV、MCH 及 MCHC 指标均明显低于对照组($P<0.05$),组间比较差异有统计学意义,见表 1。

表 1　超标组与对照组采血前血细胞计数比较　($\bar{x}\pm s$)

	冲红组	对照组	t	P
n	27	70		
RBC($\times10^{12}$/L)	4.95±0.41	5.16±0.53	1.09	>0.05
Hb(g/L)	135±10.7	151±11.9	5.07	<0.01
Hct	0.39±0.02	0.46±0.04	3.01	<0.05
MCV(fl)	73.1±4.77	95.4±3.67	9.13	<0.05
MCH(pg)	21.7±4.06	28.4±2.73	5.76	<0.05
MCHC(g/L)	295.30±21.40	341.60±13.61	5.37	<0.05
Plt($\times10^9$/L)	175±12.6	195±11.5	4.39	<0.05

3　讨论

血小板输注是临床治疗血小板数量减少或功能异常导致出血、降低病死率的有效治疗手段。随着单采血小板在各血站的开展,浓缩单采血小板使用量呈快速增长趋势,在排除机器本身因素对血小板采集效果的影响之后,献血者自身的因素也成为影响单采血小板质量的主要因素,同时也是 1 个可控的因素[3]。本研究探讨了血小板采集过程中红细胞大量混入(冲红)的相关影响因素,并提出了相应的防范措施,对于提高机采血小板的质量和采集成功率有显著的作用。

单采血小板的采集原理是按照血液成分的比重不同,通过离心法进行收集,主要通过血细胞分离机中的光电探测器探测血浆浊度的变化,从而识别并收集血小板,在冲浪环节,若吸入的血浆冲入红细胞进入到血小板层面而引起红细胞的混入,若混入量过多,可导致单采血小板产品出现肉眼可见的红细胞,程度严重者可导致血小板收集失败。本文结果显示,冲红组中 27 例发生红细胞混入量较多的献血者中,除 RBC 外,Hb、Hct、MCV、MCH、MCHC、Plt 等指标均明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1),可能与献血者外周血中的红细胞体积偏小、血红蛋白含量少、密度低有关,离心时很难与血小板层分离,而冲浪淘洗血小板时,光电探测器无法识别血小板,从而造成红细胞混入量超标的现象(冲红)发生。另对超标组 27 例献血者进行回顾性调查时发现,有 19 例为多次(1 年内机采次数>12 次)献血者,这可能是因为多次献血,外周血中年轻红细胞多,以至生成的红细胞体积小,血红蛋白含量少,比重低,机体将未完全成熟的红细胞过早地释放入外周血中。

为避免机采血小板中红细胞混入量超标的情况发生,应做到:1)建立 1 支固定志愿机采血小板队伍,并严格专门管理。对于在采集过程中,连续有 2 次冲红现象的献血者,要延长采集间隔,至少在 2 个月以上;2)降低献血者的精神紧张情绪,在采集前、采集中医护人员要对献血者精神疏导,耐心与其交流,做好心理护理;3)严格献血者筛选标准,除严格执行《献血者健康要求》(GB18467-2011)中对机采血小板的要求外,笔者建议,应尽可能的将 Hb、Hct、MCV、MCH、MCHC 等指标也作为机采血小板的常规检查项目,对红细胞各项指数偏低者应延期采集血小板。由于采取了上述的防范措施,本站 2014-2015 年机采血小板红细胞混入量超标下降至 1.3%,极大地降低了红细胞混入量的超标率和血小板耗材的浪费。

参　考　文　献

[1]　吕毅,郝宝岚,王艳,等.手工分离血小板与单采血小板质量及输注疗效的对比研究.中国输血杂志,2008,21(9):690-691.

[2]　伏春琴.单采血小板失败 20 例原因分析.当代医学,2012,18(4):160-161.

[3]　张杰,周信.机采血小板过程中常见护理风险分析及防治措施.中华医院感染学杂志,2012,22(15):3299.

(2016-08-16 收稿,2017-03-31 修回)

本文编辑:夏玲

· 个例报告 ·

急性白血病致 Rh 血型系统 D 抗原减弱 1 例

周雪丽[1] 解金辉[2] 刘振云[1] 张警丹[1](1.中国医学科学院 血液病医院 血液学研究所,天津 300020,2.天津市血液中心)

摘要:目的 对 1 例 Rh 血型系统 D 抗原血清学检测呈现混合视野凝集的患者进行基因分型,以明确患者的 RhD 表型,确定血型后给予 RhD 同型红细胞输注,探讨实验室检测方法和输血方案的选择。**方法** 分别采用血型血清学和基因检测试剂盒对患者 Rh 血型系统 D 抗原进行检测,血型确认后多次输血观察输血后反应。**结果** 患者 RhD 抗原检测,微柱凝胶卡式初检及确认试验均为双群表现,IgM 抗-D 试管法为 1+混合视野凝集,基因分型确认为正常 D 抗原,多次输注 RhD 阳性红细胞,无抗-D 产生。**结论** 白血病常引起红细胞血型抗原减弱,当血清学试验不能确认时可进一步进行基因分型鉴定,一旦血型确认,可以输注同型血液。

关键词:急性白血病;D 抗原;减弱

中图分类号:R457.1^{+}1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)3-0307-02

Case study: acute leukemia induced Rh-D antigen weakening *ZHOU Xueli, JIE Jinhui, LIU Zhenyun, ZHANG Jindan.* 1. *Department of Hematology, Hematologic Hospital, Chinese Medical College, Tianjin* 300020, *China*; 2. *Tianjin Blood Center*

Abstract: Objective To genotype one patient with mixed-field agglutination in RhD antigen using serological tests, to identify patient's RhD phenotype, to infuse with same phenotype of RhD, and to explore the methods of laboratory detection and options of transfusion. **Methods** Serological tests and gene detection tests were used to identify RhD antigens in the patient. After determination of RhD phenotype, transfusion reactions were observed after infusion of identical RhD blood. **Results** From micro column gel chromatography and confirmation tests, patient's RhD antigens were confirmed to have characteristics from two phenotypes. IgM anti-D tube test determined that the sample had more than one mixed-field agglutination. Genotype was determined to be positive for RhD antigen. Multiple infusions of RhD positive blood did not result in production of anti-D antibodies. **Conclusion** Leukemia often causes weakening of RhD antigen. When serological tests cannot be used to confirm the phenotype, it can be complemented with genotyping. Upon determination of blood type, blood transfusion with blood of identical genotypes can be performed.

Key words: acute leukemia; D antigen; weakening

患者,男性,19 岁,以“鼻出血 6 天,发热、乏力 4 天”为主诉,于 2016 年 9 月 2 日入本院。院外无输血史。入院后外周血涂片检查可见 56%幼稚细胞,初步诊断考虑为急性白血病。入院后血常规检查:Hb 67 g/L,需输红细胞。ABO 血型鉴定为 B 型,Rh 血型 D 抗原为混合视野凝集,血清学检测未能明确定型。9 月 3 日予以 B 型 RhD 阴性悬浮红细胞 1 U 输注。后经基因检测,为正常 *D* 基因型,确认为 RhD 阳性。9 月 2 日-10 月 17 日住院期间共输 11 次、“B 型 RhD 阳性”悬浮红细胞 22 U,交叉配血相合,输血过程顺利,无抗-D 产生。考虑为疾病引起 D 抗原减弱。

1 血型血清学检查

1.1 试剂与仪器 全自动血型配血系统(ORTHO AutoVue Innova and Ultra Systems),ABO/Rh 正反定型血型定型试剂卡(Ortho Biovue System,批号: ABR163A),抗-A、抗-B 血型定型试剂(长春博德,批号:20151106),RhD(IgM)血型定型试剂(Baso 抗-D,批号:V166026),A_1、B、O 反定型细胞为本实验室自制,Rh+K 分型卡(BIO-RAD,批号:50110.10.01),检测供者血型用 ABO/Rh 血型确认卡(Diagnostic Grifols, S.A. 批号:16003.03),RhD 基因检测试剂盒(秀鹏,批号:160603001),血液基因组 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Blood Mini Kit,批号:151048736)。

1.2 ABO 及 RhD 血型鉴定(血清学试验) ABO 血型进行正反定型检测,RhD 抗原进行初筛及部分确认试验,卡式法血型鉴定设对照孔,试管法设 O 细胞对照。ABO 血型正反定型一致,为“B”型,RhD 抗原鉴定在微柱凝胶卡的初筛及确认试验中表现为双群,在试管法中表现为 1+混合视野凝集,血清学试验未能最终确定 RhD 表型(表 1)。

表 1 患者 ABO 及 RhD 血型鉴定

	抗-A	抗-B	抗-D	A_{1c}	B_c	对照/O_c
ABO/Rh 正反定型卡	0	4+	mf	4+	0	0
手工试管法	0	4+	mf	4+	0	0
ABO/Rh 血型确认卡	0	4+	mf	/	/	0

1.3 Rh 分型试验 见表 2。

表 2 患者 Rh 分型试验

	抗-C	抗-c	抗-E	抗-e	抗-K	对照
Rh+K 分型卡	mf	4+	0	4+	0	0

1.4 *RhD* 基因分型试验 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶浓度为 2.5%,结果如图 1 所示。其中前 9 孔分别扩

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.024

增 RhD 第 1、2、3、4、5、6、7、9、10 外显子,结果内质控带与特异性带均有扩增产物,表明该标本含有完整的外显子,E5.1 与 E5.2 为第 5 外显子中易发生突变的 2 个位点没有突变。后面 11 个孔扩增不同 RhD 变异型,内质控扩增成功,但是没有特异条带出现,排除这些变异型存在。据此结果,表明该血型为 RhD 阳性。

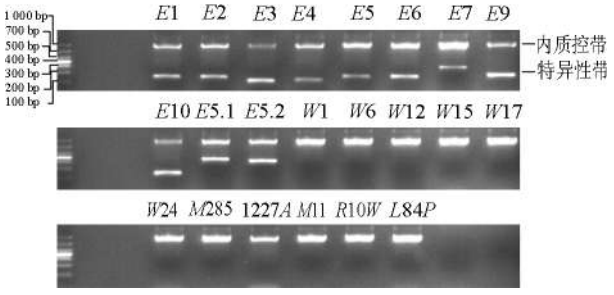


图 1　*RhD* 基因分型电泳图谱

2　讨论

该患者在血型鉴定过程中,发现其 RhD 抗原检测在 ABO/Rh 正反定型卡上表现为双群,试管法为 1+混合视野凝集,此结果与正常 D 表现不同。混合视野凝集表明患者红细胞部分携带 D 抗原,部分无 D 抗原,一般见于输入与自身不同型血液、嵌合体表型、不同血型骨髓移植后血型转变期、白血病、恶性肿瘤导致的红细胞血型抗原减弱及基因异常致 D 抗原变异等。经询问临床病史、输血史等,患者无输血史,无移植,可排除这些因素的影响,诊断初步考虑为急性白血病,不能排除疾病因素导致 D 抗原减弱,但抗原减弱的最终判断往往需要回顾性分析,患者在疾病缓解后减弱的抗原可恢复正常,此时能够明确判断。

为了解患者是否为基因异常致 D 抗原变异,对患者进行 RhD 确认试验和 Rh 分型试验,用确认供血者 RhD 血型的 ABO/Rh 血型确认卡进行检测(微孔管 D 为单克隆抗-D,人源 IgM 和 IgG 抗体混合物,克隆 P3×290,P3×35,P3×61,P3×21223B10,该抗-D 单克隆试剂可发现 D 抗原的弱 D 和部分变异体,其中包括 D^{VI} 变异体),结果仍为混合视野凝集,与初筛结果无差别。Rh 分型试验中 C 抗原亦呈现混合视野凝集。作为受血者,一般无需进行 RhD 阴性的确认试验[1]。对于变异 D 患者,给予 D 抗原阴性血液输注,以避免产生抗-D。本实验室对 RhD 阴性患者曾开展过确认试验,一般表现为与 IgM 抗-D 呈阴性反应,在确认试验中呈 3+~4+凝集反应。此患者初筛及确认试验均呈现混合视野凝集,结果一致,与既往所见弱 D 表现不同,血清学试验不能确定患者 RhD 表型。RhD 血型的最后确定关系到白血病治疗期间的输血选择,因此对其进行 RhD 基因检测,基因检测证实该患者为正常 D。因此,考虑患者为白血病所致 D 抗原减弱。

血液病引起的 ABO 抗原减弱比较常见[2,3,4],减弱程度轻者表现为混合视野凝集,重者甚至完全不见凝集,需要进行吸收放散试验才能证实抗原的存在,随着疾病的缓解,减弱的抗原可恢复正常,疾病复发时可再次出现血型抗原减弱。RhD 抗原减弱偶见报道[5,6]。白血病病程中血型抗原减弱还可见于其他红细胞血型系统抗原,且各抗原减弱的程度不一,彼此独立[7]。此患者除 D 抗原减弱外,还存在 Rh 血型系统 C 抗原减弱。

对于因疾病引起抗原减弱的输血选择方面,相应输血对策也有研究[8,9]。如果不进行基因检测,直接给患者输注 RhD 阴性红细胞,也不会对患者造成伤害,但是 RhD 阴性血液在我国属于稀有血液,不易得到。该患者在基因检测确认为正常 D 后,予以 D 抗原阳性血液输注,经多次输血,配血相合,无输血反应,未检测到抗-D 产生,其优点一是血液容易得到,临床支持治疗有保障,二是减少输血费用,减轻患者经济负担。

恶性血液病如急性白血病、骨髓异常增生综合征及恶性实体瘤可引起红细胞血型抗原减弱,因此在血型鉴定时要注意患者疾病诊断,对这些患者,如果 RhD 初筛试验为阴性或异常应进行确认试验,甚至进行基因分型,以取得正确结果,便于输血选择。

该患者最终确诊为急性混合细胞白血病,经 VDCP、MACVP2 疗程诱导未缓解,红细胞血型抗原减弱是否与疾病的恶性程度及预后相关,目前还无统计学资料。

参　考　文　献

[1]　汪德清.常用红细胞血型血清学技术·Rh 血型鉴定试验//汪德清. 输血技术操作规程. 北京:人民卫生出版社,2016:27.

[2]　庞辉. 急性白血病致 ABO 血型变异 1 例. 临床输血与检验,2012,14(2):183-184.

[3]　康晓珍,魏寿忠,林桂花. 急性红白血病(M6)引起血型抗原减弱 1 例. 国际检验医学杂志,2014,35(10):1376.

[4]　Bianco T,Farmer BJ,Sage RE,et al. Loss of red cell A,B,and H antigen is frequent in myeloid malignancies. Blood,2001,97(11):3633-3639.

[5]　舒群峰,周本霞,魏胜男,等. 胃癌致 Rh 血型系统 D 抗原减弱 1 例. 中国输血杂志,2006,(19)4:329.

[6]　李廷孝,闫东河,孙福廷,等. 慢性粒细胞白血病急性变致血型 B、D 抗原减弱 1 例.中国输血杂志,2001,14(2):108-109.

[7]　董健康,吴国光,童文燕. 急性白血病引起血型变异 1 例报告. 中国输血杂志,1988,1(3):124.

[8]　周雪丽,阎石,陆荣,等. 血液病患者 ABO 血型抗原减弱及其输血对策. 临床输血与检验,1999,9(4):325-326.

[9]　庄光艳,闫芳,侯玉涛,等. 血液病致 ABO 抗原减弱的血型基因定型研究. 北京医学,2014,36(6):478-480.

(2016-12-29 收稿,2017-03-16 修回)

本文编辑:夏玲

· 个例报告 ·

造血干细胞移植后免疫介导的类抗体检出 1 例

赵洁[1] 凌止发[2] 袁红[1] 何屹[1] 范亮峰[3] 向东[3]
(1.四川省人民医院,四川 成都 610031 2.川北医学院附属医院;3.上海市血液中心)

摘要:目的 探讨造血干细胞移植后免疫介导的自身免疫性溶血性贫血患者血清血检测方法和处理措施,选择合适的血液品种,最大程度的保障患者输血安全。**方法** 采用盐水介质试管法,聚凝胺法进行抗体筛选,用聚凝胺法鉴定类抗体,采用盐水介质试管法,抗球蛋白法,聚凝胺法进行交叉配血实验。**结果** 患者血清中存在类抗-Ce 自身抗体。**结论** 任何类型的同种异体造血干细胞移植后都有可能发展成自身免疫性溶血性贫血,所产生的类同种特异性自身抗体可以针对患者自身红细胞上的抗原。

关键词:自身抗体;类抗体;造血干细胞移植;自免溶贫;安全输血
中图分类号:R457.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)3-0309-03

1 资料与方法

1.1 病例资料 患者,男,1 岁 8 个月,于半年前诊断为幼年型粒单核细胞白血病行同种异体的造血干细胞移植术(hematopoietic stem cell transplantation HSCT),术前患者 ABO 血型为 O 型,供者为 AB 型。2016 年 6 月 30 日因严重贫血再次入院,Hb 为 58 g/L,与多袋 AB 型红细胞悬液凝胶卡交叉配血结果均为 2-3+的凝集强度,为临床抢救需要,在主次侧不合的情况下输注了 AB 型辐照洗涤红细胞 1u,输注后 d5 Hb 为 69 g/L,HCT 为 21.6%,再次申请输注辐照洗涤红细胞 1 U 以纠正贫血。

1.2 主要试剂 抗-A、抗-B、抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e(均由上海血液生物医药有限公司提供,批号分别为:20140817、20140817、 20140821、 20153002、 20163101、 20153201、20153301),ABO 细胞(上海血液生物医药有限公司,批号:20165311),聚凝胺试剂(上海血液生物医药有限公司,批号:20157504),抗球蛋白卡(DiaMed,批号:50531.04.05),进口谱细胞(Ortho Clinical,批号:RC448;Sanquin,批号:800230103),多特异性抗球蛋白试剂(抗 IgG+C3,上海血液生物医药有限公司,批号:20155001),单抗 IgG(上海血液生物医药有限公司,批号:20155102),单抗 C3d(上海血液生物医药有限公司,批号:20155201)。

1.3 方法 ABO、Rh 血型:试管法;抗体筛选和抗体鉴定:盐水介质试管法检测 IgM 抗体,抗球蛋白卡检测 IgG 抗体,直接抗球蛋白:试管法。吸收放散试验、交叉配血试验均按文献[1-2]方法操作。

2 结果(表 1-7)

表 1 患者 ABO 血型鉴定

	-A	-B	Ac	Bc	Oc	自身对照
IS	3+	3+	-	-	-	-
多次	4+	4+	-	-	-	±

注:IS:盐水介质试管法初次离心结果;多次:盐水介质试管法多次离心结果;Ac:A 型细胞

表 2 患者 Rh 血型系统分型

	-D	-C	-c	-E	-e
IS	4+	4+	-	-	4+
多次	4+	4+	$1+^{mf}$	$1+^{mf}$	4+

表 3 直接抗球蛋白试验

	多抗	单抗 IgG	单抗 C3d	ABs
IS	$3+^{s}$	$3+^{s}$	-	$1+^{mf}$

注:多抗、抗 IgG+C3d;ABs ,AB 血浆;s,强;mf,混合视野

表 4 患者血清与筛选细胞反应格局表

序号	Rh-Hr					Kidd		MNSs				Duffy		Lewis		*P*	患者血清		
	D	C	E	c	e	Jk^a	Jk^b	M	N	S	s	Fy^a	Fy^b	Le^a	Le^b	P1	IS 多次离心	卡	Poly
1	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	2+	1+
2	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	$2+^{s}$	$2+^{s}$
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	2+	2+

注:Poly,聚凝胺法;卡,抗球蛋白卡

表 5 酸放散液与 ABO 细胞反应格局

	Ac	Bc	Oc
IS	-	-	-

表 6 交叉配血试验记录

	供者抗原检测							主侧试验方法		
	-A	-B	-D	-C	-c	-E	-e	盐水	Poly	IAT
供者 1	+	+	+	+	+	+	+	-	2+	$2+^{s}$
供者 2	+	+	+	+	-	-	+	-	$3+^{w}$	$2+^{s}$
供者 3	+	+	+	-	+	+	-	-	1+	2+

注:IAT:抗球蛋白法;w:弱;供者 1,2,3 的 Rh 分型分别是:DCcEe,DCCee,DccEE

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.025

表 7　患者血清、酸放散液与谱细胞反应格局

	Rh					Kell		Duffy		Kidd		Lewis		*P*	MNS				卡	酸放散液+卡	Poly
	C	D	E	c	e	K	k	Fy^a	Fy^b	JK^a	JK^b	Le^a	Le^b	P_1	M	N	S	s			
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	2+	4+	4+
2	+	+	0	0	+	+	w	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	2+^{s}	4+	4+
3	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	2+^{s}	4+	2+^{w}
4	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	2+	4+	2+^{s}
5	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	2+	4+	4+
6	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	2+^{s}	4+	2+^{w}
7	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	2+^{s}	4+	2+^{s}
8	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	2+	4+	2+^{s}
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	2+^{s}	4+	2+^{s}
10	0	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	2+	4+	2+^{s}
11	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	2+^{s}	4+	4+
12	w	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	2+^{s}	4+	2+^{w}
13	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	2+	4+	4+
14	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	2+^{s}	4+	3+^{s}
15	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	2+^{s}	4+	2+
16	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	2+^{s}	4+	3+^{s}

3　讨论

任何类型的同种异体造血干细胞移植后都有可能发展成自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia AIHA),即使是 ABO 血型相合的移植。患儿 ABO 血型已由 O 型转变为 AB 型,直接抗球蛋白试验呈强阳性;血清和放散液的间接抗球蛋白试验阳性,且与所有谱细胞在凝胶卡中均有强度基本一致的反应,无明显反应格局,仅存在温自身抗体,未能确定其特异性;酸放散液与 ABO 细胞均无凝集反应,于是排除了抗 ABO 血型系统的抗体。患儿的 Rh 分型中-c, -E 出现混合视野,考虑可能是 5 d 前由于急诊入院抢救输血的需要,输注了 1 袋 Rh 不同型的红细胞悬液导致的(目前很多医院只能做到 ABO,RhD 同型输注,不能做到 Rh 血型的同型输注)。患儿年仅 1 岁 8 个月,Hb69g/L,临床考虑仍属抢救用血,在主次侧不合的情况下也必须输注红细胞,而此时我们只能做到 ABO,DCcEe 抗原匹配输注,以避免同种抗体引起的严重输血反应。配血的时候选择了 Rh 分型不同的红细胞悬液分别是 DCcEe, DCCee ,DccEE 与其配血,同时用 3 种介质分别是盐水法,聚凝胺法,快速抗球法交叉配血。结果发现虽然供者 1,2,3 主侧配血均为阳性,但其中 1 供者的聚凝胺法配血结果与另外 2 个供者有明显差异,而此供者的 Rh 血型与患者是不一致的,于是我们考虑用聚凝胺法重新将血清与谱细胞反应,观察其有无强弱反应的差异。表 7 中聚凝胺法有明显的强弱反应差异,判断出患者血清中存在类抗-Ce 的自身抗体,从而也反向印证了聚凝胺法配血的结果。

罕见的情况下,患者体内的类同种特异性自身抗体所具有的"特异性",可以针对患者自身红细胞上的抗原。此时可以避开类抗体特异性的红细胞输注,而不必考虑患者自身相应的血型,有报道显示避开类抗体特异性的红细胞可以明显延长体内存活时间[3]。因此我们选择了 Rh 血型为 DccEE 的红细胞悬液,经辐照洗涤处理后输注,3 d 后随访患儿,Hb 升至 100 g/L,状态良好,准备出院,于 15 d 后随访,患儿状态良好。

同种异体造血干细胞移植后发生自身免疫性溶血性贫血的概率在 3%-5%,而一般人群发病的概率为 0.001%。干细胞移植后的 AIHA 发生机制可能是供者免疫系统对供者红细胞抗原产生了自身抗体。危险因素包括非恶性疾病,HLA 不匹配,ABO 血型不合,移植时年龄过小,慢性移植物抗宿主病,移植中淋巴细胞耗尽[4]。AIHA 的确诊必须满足以下所有的标准:直接抗球蛋白试验阳性,血浆和放散液的间接抗球蛋白试验阳性,溶血的临床和实验室证据(增加的乳酸脱氢酶、胆红素,降低血红蛋白和结合珠蛋白,输血需求的增加),排除其他原因引起的溶血。发生 AIHA 的时间与抗体的类型没有关系。在这些患者中没有发现抗 ABO 血型系统的抗体[5]。

近年研究结果表明, 在同种抗体和自身抗体之间还存在 1 种兼有两者特点的抗体, 称之为类同种自身抗体, 该类抗体既具有选择性的针对相应的红细胞上的血型抗原、类似于同种抗体的性质, 又有针对自身红细胞血型抗原的自身抗体的性质,类自身抗体甚至可以有广泛的反应性,在与不同的谱细胞反应时显示相对的强度,尤其是与相应抗原阳性的谱细胞反应比相应抗原阴性的谱细胞反应更强[6]。类抗体的特异性针对 Rh 系统的抗原比较常见,Duffy 系统抗-Fy^a, Fy^b;MNS 系统抗-S,-U;Kell 系统抗-K,-Kp^b;Kidd 系统抗-Jk^a,-Jk^b,-Jk^3;Diego 系统抗-Wr^b,-Di^b;LW 系统抗-LW;Lutheran 系统抗-Lu^a;Colton 系统抗-Co^a等[7,8]也有报道。

如果患者血清中同时存在自身抗体和同种抗体,则同种抗体有可能被自身抗体所掩盖,此时会面临严重的输血反应的风险。可以通过经典的试验方法自身吸收试验。通常使用自身红细胞,经放散抗体后吸收自身血清中的抗体,以期暴露被掩盖的同种抗体。据 Issitt 等[9]报道,此法可以检出 27%的患者含有同种抗体 ,但是有 1 种情况例外,即患者近期输过大量一体红细胞。这是因为患者的红细胞与异体的红细胞混合在一起,输入循环中的异体红细胞,有可能吸附同种抗体以致于影响检测结果。所以通常在输注异体血后应等 3-4 个月(红细胞的正常寿命范围),才可用自身吸附法,无疑等待时间太长,不可操作。此外一半情况下温抗体

· 输血管理 ·

假阳性献血者评估及告知模式的建立*

王新梅 臧亮 薛萍 邓雪莲△ 梁晓华△(大连市血液中心,辽宁 大连 116001)

摘要:目的 立足于假阳性献血者的评估,建立一套完善的针对献血检测结果的献血者告知模式。**方法** 利用 Shinow 9.0 信息化管理平台,进行献血者检测评估后进行结果告知,并制定一定的工作流程和相应书面文件,通过对 1 726名拟回召献血者的告知情况进行分析,确定整个告知模式运行的有效性。**结果** 2013-2015 年本中心共对 1 643 名经过评估符合拟回召条件的献血者进行结果告知,联系成功 1 329 人,其中进行归队复查 351 人,回告成功率为 26.41%;共有 434 名拟回召献血者进行了归队复查,其中 3 次复查均合格符合归队条件的 64 人,占总复查人数的 14.75%,复查合格人数 267,占总复查人数的 61.52%;确立了献血者检测信息回告的方式、拟回召献血者检测信息回告流程以及与整个献血者告知模式相关的纸质文件。**结论** 立足于献血者评估而建立的献血者告知模式可以正常有效的运行且适合本中心工作。

关键词:献血者评估;回召;假阳性;回告模式

中图分类号:R193.3 **文献标识码:**C **文章编号:**1004-549X(2017)3-0311-05

To establish a set of inform mode for donor blood test results *WANG Xinmei, ZANG Liang, XUE Ping, DENG Xuelian, LIANG Xiaohua. Clinical Laboratory, Dalian Blood Center, Dalian* 116001, *China*

Abstract: Objective To establish a set of perfect mode to inform donors of their blood test results based on the false positive assessment of the blood donor. **Methods** After use of Shinow 9.0 information management platform for evaluation of detecting blood donors, donors were informed of test results and the working process and the corresponding paperwork were set up. To determine the effectiveness of the information mode, 1 726 donors were recruited and informed of their situation from Jan 2013 to Sep 2015 were analyzed. **Results** 1 643 donors who met the requirements of recall were informed of their test results from January 2013 to September 2015. 1 329 donors were contacted successfully, 351 donors returned to test at a rate of 26.41%. From January 2013 to September 2015, there were 434 donors who returned to test successfully. There were 64 donors who followed up for three times, at a rate of 14.75%. The number of qualified donors was 267, and the rate was 61.52%. According to the assessment of blood donors, the method and process to inform donors of their results were implemented and program files related to this model were established. **Conclusion** According to the assessment of the blood donors, we performed and established an effective and appropriate mode to in-

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.026

*基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心专项课题(卫技中【2012】12 号 28-8-3);△共同通信作者:邓雪莲(1974.12-),女,主任技师,研究方向为输血相关传染性疾病的风险评估,电话:0411-82653557,Email:dengxuelian@dlbc.org.cn;梁晓华(1968.07-),女,主任技师、教授,硕士研究生导师,主要从事血液免疫和血液安全的研究,电话:0411-82654596,Email:liangxh@dl.cn

型自身免疫性溶血性贫血患者严重贫血,血样中的红细胞通常很少。而此患者年龄偏小,血色素偏低,且于 5 d 前输注过 1 U 红细胞,无法进行进一步的自身吸收试验。

(致谢:特别感谢上海市血液中心血型参比室的支持!)

参 考 文 献

[1] 丁苏鄂.常用血清学检查技术//刘达庄,朱自严,包于勤.免疫血液学.上海:上海科学技术出版社,2002:194-219.

[2] 中华人民共和国卫生部.中国输血技术操作规程(血站部分).天津:天津科学技术出版社,1997:83-86.

[3] 向东,刘曦,王健莲,等,红细胞自身抗体的血清血特点分析及配血对策.中国输血杂志,2008 21(12):924-925

[4] Park JA, Lee HH, Kwon HS, et al. Sirolimus for refractory autoimmune hemolytic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a case report and literature review of the treatment of post-transplant autoimmune hemolytic anemia. Transfusion Medicine Reviews, 2016(30):6-14.

[5] Sanz J, Arango M, Carpio N, et al. Autoimmune cytopenias after umbilical cord blood transplantation in adults with hematological malignancies: a single-center experience. Bone Marrow Transplantation, 2014, 49:1084-1088.

[6] Dwyre DM, Clapper A, Heintz M, et al. A red blood cell autoantibody with mimicking anti-E specificity. Transfusion, 2004, 44(9): 1287-1292.

[7] Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. Durham (NC): Montgomery Scientific Publications, 1998:960-965.

[8] Harvey G, David J, Sally VR. Serologic problem solviing: mollison's blood transfusion in clinical mecicine. Blackwell Publishing, 2005: 272-273.

[9] 徐文皓,李志强,包于勤,等.自身免疫溶血性贫血患者同种抗体检测技术的进展.中国输血杂志,2001,14(10):275-277.

(2016-10-25 收稿,2017-修回)

本文编辑:李宜蔓

form donors in our blood center.

Key words:evaluation of blood donors; recall; false positive; mode of information

降低输血传播疾病的风险是血液筛检的根本目的。一直以来,风险评估工作最为关注的是“阴性”结果的血液风险问题。因此,通过提高指标检测的灵敏度、增加检测次数或检测指标,以期最大限度地减少“漏检”的发生。然而,随之而来的是假阳性或不确定结果的增加和由此带来的不必要的血液报废及潜在的合格献血者被淘汰问题[1-3]。针对潜在的合格献血者,许多国家已制定了或在探索相关的制度或策略进行追踪评价,以确定能否再次准入[4-8](以下称“回召”)。对于检测结果不合格的献血者,进行进一步的评估后进行回召正在成为成熟的采供血服务体系中献血者服务工作的重要组成部分。那么对于这部分需重新进行评估的献血者在此我们称作拟回召献血者,本中心通过 Shinow 9.0 信息化管理平台对这部分献血者的检测结果进行告知。Shinow 9.0 软件被称为现代血站管理信息系统,它能够实现血站管理对“一个办法、两个规范”要素的全面覆盖,建立并完善采供血业务全面安全控制和管理。对于这部分拟回召献血者检测结果的告知,则是整个献血者回召工作的基础,如果告知方式或言语不当,会引起献血者的不满意甚至引起不必要的法律纠纷。因此,做好这部分工作,取得这部分献血者的理解,对于献血者回召工作的开展、巩固和扩大固定无偿献血队伍,提高献血者满意度具有重要意义,笔者对本中心此项工作的现状和对策作初步探讨如下。

1　材料与方法

1.1　标本　2013 年 1 月-2015 年 9 月本中心酶免四项不合格献血者 3 765 人,经过评估后符合回召条件的 1 643 人,2013 年以前没有实施归队流程未经评估和电话回告自行进行归队复查和初筛不确定的 83 名献血者,对这两部分拟回召献血者进行告知。

1.2　方法

1.2.1　首先制定献血者回告所需的纸质文件该纸质文件应覆盖拟回召献血者复查前、中、后各个环节,其应包括献血者献血前所应了解的献血常识以及关于血液检测告知的宣传单、拟回召献血者进行复查时所填的申请单以及拟回召献血者评估后检测结果报告单。

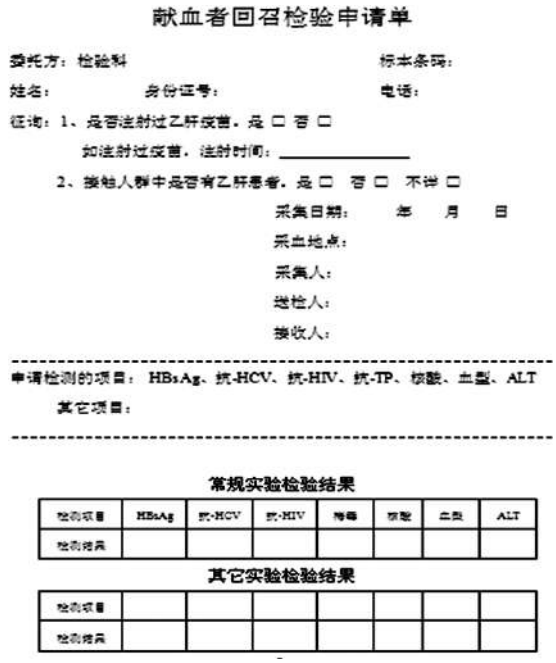
1.2.2　制定拟回召献血者检测信息回告流程　将符合条件的献血者纳入到回召范畴进行追踪检测评估,对这部分献血者通过 Shinow 9.0 信息化管理平台及其辅助方式进行检测结果告知。

1.2.3　回告方式及分析方法　建立多途径的献血者检测结果回告方式。统计分析 2013 年 1 月-2015 年 9 月间拟回召献血者的告知情况,确定整个告知模式运行的有效性。

2　结果

2.1　献血者回告中的纸质文件　见图 1-3。

图 1　献血前宣传单



献血者回召检验申请单

委托方：检验科　　标本条码：

姓名：　　身份证号：　　电话：

征询：1、是否注射过乙肝疫苗，是 □ 否 □

如注射过疫苗，注射时间：_____

2、接触人群中是否有乙肝患者，是 □ 否 □ 不详 □

采集日期：　年　月　日

采血地点：

采集人：

送检人：

接收人：

申请检测的项目：HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP、核酸、血型、ALT

其它项目：

常规实验检验结果

检测项目	HBsAg	抗-HCV	抗-HIV	梅毒	核酸	血型	ALT
检测结果							

其它实验检验结果

检测项目							
检测结果							

图 2　献血者回召检验申请单

归队单次检测结果报告

献血者姓名：　　证件类型：身份证　　证件号码：232321197

最后一次献血不合格项目：HBsAg　　归队检测次数：2

标本条码	00802150	接收时间	2015-11-12 14:21	评估时间	2015-11-16 13:50
检测结论	合格	评估结论	继续归队检测	评估人	
结论描述					

常规试验检测结果

检测项目	试验序列	S/CO值	检测结果	检测时间	检测人
NAT联检	诺华NAT	0.05	NEG	2015-11-13 15:46	
HBsAg	一检	0.09	-	2015-11-13 12:41	
	二检	0.66	-	2015-11-13 12:55	
Anti-HCV	一检	0.05	-	2015-11-13 12:44	
	二检	0.02	-	2015-11-13 13:08	
Anti-TP	一检	0.08	-	2015-11-13 13:03	
	二检	0.06	-	2015-11-13 12:44	
HIV Ag/Ab	一检	0.09	-	2015-11-13 12:47	
	二检	0.28	-	2015-11-13 13:10	
ALT	二检	0.24	-	2015-11-13 11:07	

补充试验检测结果

检测项目	方法学	定量结果	定性结果	检测时间	检测人
抗-HBc总(电化)	电化学发光	0.151	REACT	2015-11-16 13:47	
抗-HBe(电化)	电化学发光	1.24	-	2015-11-16 13:47	
抗-HBs(电化)	电化学发光	463.1		2015-11-16 13:47	
HBeAg(电化)	电化学发光	0.134	-	2015-11-16 13:47	
HBsAg(电化)	电化学发光	0.595	-	2015-11-16 13:47	

图 3　单次检测结果报告单

2.2 本中心拟回召献血者检测信息回告流程 对于所有献血者都要在献血前进行关于血液检测的告知,在此基础上我们将初筛不确定、既往不合格和实施归队流程后检测不合格的全部人员均纳入献血者评估流程进行结果回告(图 4)。

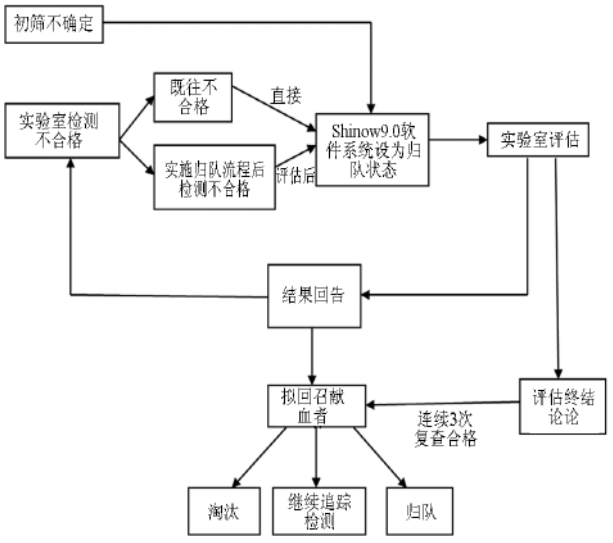


图 4 拟回召献血者检测信息回告流程

2.3 献血者检测信息回告方式 针对拟回召献血者相对于检测不合格献血者的特殊性,本中心主要采取信息化管理平台、电话和面谈的告知方式。

2.3.1 信息化管理平台告知 首先进入 Shinow 9.0 软件系统献血者档案查询界面打开献血者信息窗口核对献血者信息以及检测评估结果,然后进入到结果回告界面,按照检测日期筛查出献血者,点击进入回告信息界面,进行献血者结果回告(图 5)。

2.3.2 电话告知 当拟回召献血者在信息化管理平台留存的电话发生改变,我们将根据其归队申请单上记录的电话号码进行电话告知,工作人员必须通过交谈确定献血者的身份证号码、献血证编号等个人信息,在明确是本人的情况下,将检测结果告知其本人并做好更改记录便于以后统计。

2.3.3 面谈 面谈多出现在通过电话告知后,献血者对告知事项仍然有疑问主动到血站进行咨询。献血者咨询时,必须出示本人身份证件和献血证,工作人员与献血者在单独的办公室里一对一进行咨询和告知,献血者的疑虑可以得到更加明确仔细的答复。

2.4 拟回召献血者归队统计情况 2013 年 1 月-2015 年 9 月本中心酶免 4 项不合格献血者 3 765 人,经过评估后符合归队条件的 1 643 人,占不合格献血者比例为 43.64%,对这部分拟回召献血者通过 Shinow 9.0 信息化管理平台进行回召和追踪检测,结果回告情况如表 1 所示,表中归队复查人数为总复查人数 434 减去了 2013 年以前没有实施归队流程未经评估和电话回告自行进行归队复查和初筛不确定的 83 名献血者。2013 年 1 月-2015 年 9 月共有 434 名拟回召献血者进行了归队复查,其中检测合格 267 人,占总复查人数的 61.52%,3 次检测均合格 64 人,占总复查人数的 14.75%,再次复查献血者 227 人,占总复查人数 52.3%(表 2)。

图 5 利用 Shinow 9.0 信息化管理平台告知流程

表 1 2013 年 1 月-2015 年 9 月献血者评估后结果回告情况

回告总人数	联系成功	归队复查人数	回告成功率(%)
1 643	1 329	351	26.41

表 2 2013 年 1 月-2015 年 9 月拟回召献血者复查结果统计表

	复查 1 次	复查 2 次	复查 3 次及 3 次以上	总计
合格	128	75	64	267
仍需追踪	0	26	20	46
均不合格	79	36	5	120
确证感染	0	0	1	1
总数	207	137	90	434

3　讨论

本中心从 2013 年 1 月开始进行献血者回召工作至今已近 3 年,在这段时间里通过我们不断地完善和改进建立了目前立足于献血者评估的献血者告知模式。我们将 ELISA 单侧反应性标本和双侧弱阳性标本进一步进行电化学发光和梅毒 TPPA 附加实验,并结合核酸检测结果将经评估为 ELISA 假阳性反应的献血者作为拟回召对象,将其检测结果及附加检测结果录入 Shinow 9.0 软件信息平台设为归队状态,作为结果回告献血者,对于所有献血者都要在献血前发放宣传单(图 1),让献血者对于我们的血液检测有一个初步的了解以便于回告人员在结果回告时更容易与献血者沟通。由结果 3 可知,对于献血者的告知方式,我们主要采取以信息化管理平台回告为主,电话、面谈回告为辅的告知方式。通过信息化管理平台回告人员可以更方便和快捷地核对和查询献血者相关检测信息,并且便于以后进行数据统计。对于告知时限我们设定首次告知的时间不超过献血后 2 个星期,复查的时间为距该次检测不少于 3 个月;对于复查结果的告知,各血站应根据实际情况确定告知的最长时限,如本中心规定为采血检测后一周内。为了避免拟回召献血者由于等待结果时间过长产生焦虑情绪,以及不延误某些确有疾病的献血者进一步检查和治疗,如遇特殊情况需复查或送法定机构确认的,事后需向献血者认真解释。面对不同的献血者告知内容可能会有所不同,但都应明确表达 3 层意思:1)表示感谢;2)明确告知无健康问题,反应性结果应是血液中某些干扰物质造成的,暂时不能献血;3)清楚介绍归队流程,欢迎并希望其回来复查,最终回到献血队伍中来。从图 4 和图 5 可以看到,我们制定和明确了信息化管理平台告知以及整个献血者评估后结果回告的流程,整个流程的制定可以更加规范我们的工作。图 2 和图 32 张表单在献血者每次复查结束后需要装订在一起进行存档保存,对于所有的拟回召献血者复查检测的记录需都有专人进行归档保存,便于查找和归队时进行审批需要。

本文所研究的献血者告知模式是针对 2 部分献血者进行的,一部分为献血后复查不合格经过评估后可以纳入拟回召范畴的献血者,这部分献血者的告知由血液中心呼叫中心完成;另一部分为进行归队复查的拟回召献血者,这部分献血者复查结果的回告是由检验科专职人员进行回告。2013 年 1 月-2015 年 9 月本中心酶免四项不合格献血者 3 765 人,经评估后符合归队条件的 1 643 人,占不合格献血者比例为 43.64%,从表 2 可知进行归队复查的 434 人中检测结果合格人数 267 人,合格率 61.52%,其中已完成 3 次检测且均合格的归队献血者 64 人,由以上数据可以看出拟回召献血者在不合格献血者中占有一定比例,且这部分献血者追踪检测合格率很高,由此可见对于假阳性献血者进行评估后重新回召这项工作是非常有意义的,通过这项工作的开展我们可以给献血者提供更准确的检测结果以消除其顾虑并可以避免血液资源的浪费。由表 1 可见,通过 Shinow 9.0 信息化管理平台对经评估后符合归队条件的 1 643 名献血者进行回召和追踪检测,其中 1 329 人次联系成功,通过我们告知后进行归队复查献血者 351 人次,回告成功率 26.41%,与其他血站相比还是相对较高的,这说明我们整个献血者告知模式的运行还是有效可行的。从表 2 可见,自 2013 年 1 月-2015 年 9 月,共有 434 名拟回召献血者进行了归队复查,再次复查献血者 227 人,占总复查人数 52.3%,由此可见,对于归队复查献血者的结果回告成功率要明显高于评估后献血者首次结果回告,其原因一方面是由于回告的献血者不同,归队复查献血者的回告本身针对的就是已同意进行复查的献血者所以回告成功率会高;另一方面是由于结果告知人员的不同,归队献血者复查结果是由检验科专业人员从专业的角度进行解释。

对评估后献血者检测结果的告知首先要遵循授权原则,血站应确定专职的工作人员,经系统培训后予授权。一般情况下应选择医学专业毕业并有一定血液检测工作经验、具有中级以上职称资格的人员从事该项工作,并对几种经血传播疾病的感染途径、检测手段、治疗前景等相关知识和信息有一定的了解,能够为献血者做进一步检查和治疗提供正确的建议[9],并经过血液检测项目与判断、相关传染病知识、沟通技巧、献血者的护理等专业知识和技术的培训。被授权医务人员应严格执行保密原则未经献血者本人同意,不得将献血者的不合格情况告知他人[10]。

经过评估后献血者告知模式运行近 3 年的时间,我们发现当整个告知模式确定后,其中对于回召成功率影响最大且出现问题最多的环节就是对献血者复查结果的回告。现将我们在结果回告过程中经常遇到的问题和解决方式总结如下:1)被告知检测结果不合格后担心自己是否还能再次献血。在这部分献血者中以多次献血的重复献血者居多,这些献血者大部分都很热衷于血液捐献这项事业、充满爱心、乐于助人,对于无偿献血有很高的热情。对于这部分献血者我们应尽可能的将归队流程介绍清楚,明确的告知他们如果归队后经过检测评估合格后是可以再次献血的,在回答问题过程中要注意尽量避免由于检测结果的不合格而影响到献血者的献血热情。2)询问不合格原因,担心自己得病,心情很紧张。对于这部分拟回召献血者首先我们要明确的告知其身体是健康的以消除其紧张恐惧心理,然后再根据其具体情况,介绍可能引起检测结果假阳性的原因。3)质疑我们检测水平。这部分献血者被告知检测结果不合格后,自行去医院检查结果均合格,所以会对我们的检测结果产生怀疑,当我们告知其可以回来重新复查进行归队时会对我们的告知人员产生抵触情绪。对于这部分献血者首先我们的态度要非常的诚恳,并抱着设身处地替对方着想的心态与其进行交流,其次要向献血者说明血站对于血液的检测不是确证实验不能进行疾病诊断,然后再根据不同献血者的具体情况向他们介绍一下引起检测结果假阳性的原因。在这部分献血者中我们也经常会遇到向我们索要检测费用且态度十分恶劣的,对于这种献血者首先我们要放平心态积极与其沟通,稳定好献血员的情绪,对于他们由于献血所造成的经济损失和心理负担表示抱歉和遗憾,高度赞扬其无偿献血奉献爱心,然后通过一系列的耐心讲解,让其能够理解我们的工作,最终能够重新回到献血队伍中。4)认为复查时间过长且过程

繁琐。这部分献血者往往都是愿意进行归队再次献血的,所以我们在回告过程中要将我们归队流程中关于检测时间的设置详细且耐心的向其解释清楚,并告知虽然复查的过程相对长一些,但既不会影响他们的健康,又能最大限度的确保血液安全,而且每次复查也相当于对自己的血液做了一次免费检查,以此消除其抵触心情。我们发现提出质疑且疑问较多的献血者往往通过我们的有效沟通都会进行归队追踪检测,由此可见有效且专业的沟通是非常重要的,所以在结果回告时我们应耐心倾听和关注献血者的语言和非语言的信息,了解献血者的心理变化,热情周到地为献血者提供咨询服务。

整个告知模式运行到现在也是存在需要改进和提高的地方,我们希望将来能在信息化管理平台中设置一个对献血者进行定时提醒复查的程序,对到时间可以复查还没进行检测的献血者和即将到复查时间的献血者进行短信提醒或是电脑发出提示,告知回告人员给这些献血者打电话提示他们来进行复查。其次,整个告知模式还缺少与献血者的互动,我们希望今后能够通过发放调查问卷的形式对献血者的回告进行满意度调查,这样可以更多的了解献血者对于回告工作的看法,更加有益于我们今后工作的改进和提高。

综上所述,本中心立足于献血者评估而建立的献血者告知模式可以正常而有效的运行且适合本中心献血者回召工作。

参 考 文 献

[1] Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, et al. Frequency of HBV DNA Detection in S Blood Donors Testing Positive for the Presence of Anti-HBc: Implications for Transfusion Transmission and Donor Screening. Transfusion. 2003,43(6):696-704.

[2] Holland P, Comanor L. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. Vox Sanguinis. 2006,91(1):1 - 12.

[3] Eder A, Goldman M, Rossmann S, et al. Selection Criteria to Protect the Blood Donor in North America and Europe Past (Dogma), Present (Evidence), and Future (Hemovigilance) Europe: Past (Dogma), Present (Evidence), and Future (Hemovigilance). Transfus Med Rev. 2009,23(3):205-220.

[4] Allain JP, Reesink HW, Lucey C. A European perspective on the management of donors and units testing positive for hepatitis B virus DNA. Transfusion.2006,46(7):1256-1258.

[5] O'Brien SF, Yi QL, Fan WL, et al.Impact of a policy to permit the return of donors repeat-reactive to the Abbott PRISM antibody to hepatitis B core antigen assay. Transfusion. 2009,49(2):271-277.

[6] FDA. Guidance for Industry: Requalification Method for Reentry of Blood Donors Deferred Because of Reactive Test Results for Antibody to Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc). [2010-05][OL]: http://www. fda. gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceCompliance Regulatory Information/Guidances/default.htm.

[7] FDA. Guidance for Industry: Nucleic Acid Testing (NAT) for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Hepatitis C Virus (HCV): Testing, Product Disposition, and Donor Deferral and Reentry. [2010-05][OL]: http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm.

[8] FDA. Guidance for Industry: Use of Nucleic Acid Tests on Pooled and Individual Samples from Donors of Whole Blood and Blood Components, including Source Plasma, to Reduce the Risk of Transmission of Hepatitis B Virus (Draft Guidance). [2011-11][OL] http://www. fda. gov/BiologicsBlood-Vaccines/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidancesy.

[9] 王丽.血站与血液筛检不合格献血者的沟通技巧.中国医学创新,2012,9(11):148-149.

[10] 方放,李素娥.献血后检测不合格信息告知的探讨.中国输血杂志,2006,19(6):517-518.

(2016-05-31 收稿,2017-02-09 修回)

本文编辑:李弘武

血型基因检测开放平台

本中心致力于非传染性输血安全和中国人群血型分子遗传背景研究,建立了血型血清学和分子遗传学血型基因检测平台。可接受疑难血型标本鉴定、RhD(-)供者库中的 D 变异体排查以及稀有血型的确认。欢迎送检标本或科研合作等方式与本中心联系!

联系电话:028-61648522

联系人:田力　宋宁

中国医学科学院　输血研究所　临床输血研究中心　血型研究室

· 综述 ·

α1-抗胰蛋白酶相关疾病及其临床应用进展*

张剑平　周兰贞　郭采平△(深圳市卫光生物制品股份有限公司,广东 深圳 518107)

摘要:α1-抗胰蛋白酶(AAT),是人类血浆中重要的蛋白酶抑制剂,保护机体正常细胞和器官不受蛋白酶的损伤。α1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)是常见的 1 种单基因遗传病,患者会出现肺气肿、肝硬化以及其他疾病,严重者甚至出现死亡。α1-抗胰蛋白酶缺乏症常用的治疗方法是静脉输注 AAT 制剂进行补充治疗,近年来 AAT 吸入疗法、基因疗法和干细胞疗法取得了新的进展。本文简述了 AAT 的分子特性、作用机制以及其相关疾病研究进展,并综述了 AAT 在 AATD 相关疾病中的应用情况,进而展望了 α1-抗胰蛋白酶产品的市场应用及技术发展前景。

关键词:α1-抗胰蛋白酶;α1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD);临床应用;研究进展

中图分类号:R457　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004-549X(2017)3-0316-04

Research progress on related diseases and clinical application of α1-antitrypsin　*ZHANG Janping, ZHOU Lanzhen, GUO Caiping. Shenzhen Weiguang Biological Products Co., Ltd, Shenzhen* 518107, *China. Corresponding author: GUO Caiping*

Abstract: α1- antitrypsin (AAT), an human plasma protease inhibitor, plays an important role in protecting the normal cells and organs from protease damage. α1-antitrypsin deficiency (AATD) is a common single-gene disease. The patients with AATD may develop emphysema, cirrhosis and other diseases, even are at risk of death. AAT replacement therapy with intravenous infusions of purified AAT from human plasma is the most usual clinical treatment method for AATD to elevate the serum AAT level and partially recover the biochemical defect. In recent years, several new therapeutic methods for AATD, including the inhaled AAT, gene therapy and stem cell therapy, have been developed. In the present paper, the molecular characteristics, the functional mechanism of AAT and its related diseases were described. In addition, the application of AAT in the AATD-related diseases was reviewed, and the technological development and market prospects of AAT product were studied.

Key words: α1- antitrypsin; alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD); clinical application; research progress

α1-抗胰蛋白酶(α1-antitrypsin,AAT 或 α1-AT),又称 α1-蛋白酶抑制剂(α1-protease inhibitor,α1-PI)。它是人血浆中最重要的蛋白酶抑制剂,其抑制能力占血浆总蛋白酶抑制能力的 90%以上,能抑制多种丝氨酸内切肽酶,如中性粒细胞弹性蛋白酶、胰蛋白酶、血浆素、凝血酶等,其主要作用是保护机体正常细胞和器官不受蛋白酶的损伤,抑制感染和炎症,维持机体内环境的平衡。血浆中的 AAT 主要由肝脏产生,其它如肠、肾、脾等也能产生少量的 α1-AT,这些肝外合成的 AAT 在局部组织损伤的调节中起重要作用[1]。

α1-抗胰蛋白酶缺乏症(alpha-1-antitrypsin deficiency, AATD)是世界范围内最普遍的遗传疾病之一,主要表现为肺气肿、肝硬化、肝癌,韦格纳型血管炎,少数体现复发性脂膜炎,纤维肌痛以及其它炎症。

常用的治疗方法是输注 AAT 制剂进行增补治疗,近年来 AAT 吸入疗法、基因治疗及干细胞治疗等取得了新的发展,本文针对该领域的技术发展历程进行梳理,展望 α1-抗胰蛋白酶产品的市场应用及技术发展前景。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.027

*基金项目:深圳重组血浆蛋白类创新药物工程实验室项目;△通信作者:郭采平(1971.06-),女,教授级高级工程师,主要从事生物制品研发领域研究,电话:13823712110,Email:gcpzxy0402@aliyun.com

1　α1-抗胰蛋白酶的分子特性和作用机制

AAT 为单链糖蛋白,肽链由 394 个氨基酸残基组成,分子量为 45-56 KDa。等电点为 pI 4.7-5.0,正常人血浆中 AAT 的含量为(2.90±0.45)g/L,在体内的半衰期为 3-5 d。AAT 的抑制作用有明显的 pH 依赖性,最大活力处于中性或弱碱性,当 pH4.5 时活力基本丧失[2]。

AAT 主要抑制肺脏中弹性蛋白酶的活性,保护肺部不受弹性蛋白酶的酶解损伤。在酶抑制过程中,AAT 与蛋白酶活性中心的结合模式与蛋白酶-底物的结合模式相似。AAT 捕获目标酶,并与目标酶结合形成 AAT-蛋白酶 1:1的共价复合物,蛋白酶对结合的 AAT 产生缓慢的酶解,AAT 构象由 S 型向 R 型转换,封闭蛋白酶的反应中心从而达到抑制蛋白酶活性的作用,保护机体正常细胞和器官不受蛋白酶的损伤,抑制感染和炎症,维持机体内环境的平衡[3]。

2　α1-抗胰蛋白酶的遗传学研究

AAT 基因为常染色体共显性遗传,目前识别的不同基因变体至少有 90 种,称为 Pi(protease inhibitor)系统[4]。常见的正常等位基因为 PiM,表现为正常的血浆 AAT 水平。缺陷变体只占一小部分,最常见的缺陷变体为 Z 和 S,2 者相对于 M 型呈显性遗传。PiZZ 变体是 AAT 缺乏症最常见的原因

(96%),另外 4%与 PiSZ 基因型相关;PiMS 目前未发现引起 AAT 缺乏相关的临床病症;PiMZ 和 PiSS 是否引起 AAT 缺乏症则仍存争议[5]。

Frederick J de Serres 回顾全球 10 区域 193 个国家的 AATD 流行病学调查,分析了最常见的 PI*S 和 PI*Z 5 种基因型的分布,据估算,该 97 个国家中共有超过 1.9 亿 AATD 缺陷型基因携带者,其中 0.1%为 PI*ZZ, 0.7%为 PI*SZ, 2.1%为 PI*SS,22.3%为 PI*MZ,其余 74.8%为无临床症状的 MS 基因型。详细结果如表 1 所示。值得注意的是,60%的 PI*ZZ 主要分布在欧洲和北非,其中北欧和中欧即有 41%的患者;PI*SZ 基因型中,48%的主要分布于中欧和北欧,20%在北非和中非,16%在南非。亚洲 PI*ZZ 排前三的是泰国、巴基斯坦和沙特阿拉伯;PI*SZ 最多的也是这 3 个国家,其中泰国 38 847 例,巴基斯坦 33 669 例,沙特 24 705 例[6]。

表 1 以 97 个国家遗传流行病学调查结果估算的全球 5 种 AATD 基因型分布 (*n*)

	总人口	遗传型				
		PI*MS	PI*MZ	PI*SS	PI*SZ	PI*ZZ
北非	239 969 561	17 456 763	1 694 985	625 651	74 339	5 246
中南非	163 438 852	7 857 844	0	564 757	0	0
北欧	170 348 060	3 943 763	2 360 998	28 882	38 968	16 872
东欧	68 723 604	1 390 728	1 049 474	11 673	10 795	5 719
中西欧	353 046 170	33 984 368	8 061 106	1 460 725	565 430	57 188
中北亚	1 580 801 804	11 139 101	6 877 323	61 140	78 652	29 582
东亚、澳洲和新西兰	1 754 929 275	5 821 537	813 033	60 263	31 371	6 130
中北非	497 976 203	26 757 978	8 910 172	416 618	252 599	45 689
加勒比	38 528 615	2 133 147	368 386	42 125	14 325	1 218
南美	396 387 912	32 056 062	4 474 606	746 066	202 575	14 250
合计	5 264 150 044	142 541 291	42 564 136	4 017 900	1 269 054	181 894

3 α1-抗胰蛋白酶与疾病的关系

α1-抗胰蛋白酶缺乏症(alpha-1-antitrypsin deficiency, AATD)是世界范围内最普遍的遗传疾病之一,属于常染色体隐性遗传疾病,是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstruct obstructive pulmonary disease, COPD)的遗传基础,主要表现为肺气肿、肝硬化、肝癌,韦格纳型血管炎,少数体现复发性脂膜炎,纤维肌痛以及其它炎症[7-9]。越来越多的研究表明,α1-抗胰蛋白酶缺乏症除了主要发展成肺脏和肝脏疾病以外,还和其它多种疾病相关(表 2)[10]。

表 2 其它可能和 AAT 相关的疾病

	参考文献作者及发表时间
血管炎	Dowd et al, 1995; Esnault, 1997; Griffith et al, 1996
脂膜炎	Chowdhury et al, 2002; Gross et al, 2009; Kjus et al, 2002; Smith et al, 1987; Valverde et al, 2008
纤维肌痛症	Ablin et al, 2009; Blanco et al, 2004; Blanco et al, 2010
哮喘	Blanco et al, 2008; Blanco et al, 2011; Eden et al, 1997
胰腺炎	Rabassa et al, 1995; Needlham & Stockley, 2004
肾疾病	Szönyi et al, 2006; Ting et al, 2008
糖尿病	Kalis et al, 2010; Lisowska-Myjak et al, 2006
癌症	Li et al, 2011; Lindor et al, 2010; Topic et al, 2011
风湿性关节炎	Grimstein et al, 2010; Grimstein et al, 2011
动脉粥样硬化	Stakisaitis et al, 2001; Talmud et al, 2003
急性前色素层炎	Fearnley et al, 1988; Saari et al, 1986
慢性鼻窦炎	Kilty et al, 2008, 2010; Maune et al, 1995

也有报道发现 AAT 过表达与癌症相关。Pérez-Holanda 等[11]在西班牙和奥地利的 1 项研究(267 结肠直肠癌患者+327 健康对照组)表明,结肠癌患者组平均血浆 AAT 水平(208±60) mg/dL 显著高于对照组(144±20.5) mg/dL ($P<0.01$)。Zhou 等[12]则报道乳腺癌(IBC),导管原位癌(DCIS)及乳腺非典型导管增生(ADH)与 AAT 合成增加有关,患者血浆中检测到含 41/42 个氨基酸 AAT C 末端片段,他们认为该多肽片段能抑制肿瘤相关的免疫系统机能。

4 α1-抗胰蛋白酶制剂的临床应用

α1-AT 主要用于因遗传性 α1-AT 缺乏引起的肺气肿患者的终身增补治疗和肺部炎症性疾病的防治,如慢性阻塞性肺气肿、肺囊性纤维化、急性肺损伤、成人呼吸窘迫综合症等。自 1981 年 Gadek 等首次在临床上应用富含人 AAT 的血浆组份制剂对 5 名 PiZZ 型严重的 AAT 缺乏患者进行临床治疗[13],AAT 增补疗法逐渐成熟,已成为临床批准的 AATD 肺气肿患者的标准治疗:即每周按 60 mg hAAT/kg 体重静脉注射,以提升患者血液 AAT 水平,使弹性蛋白酶与蛋白酶抑制剂之间达到平衡,从而减缓疾病进程[14]。但是目前仅有 4%的 AATD 患者被确诊,因为价格等原因又只有极少数患者在接受增补治疗[15]。

AAT 与抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)联合使用,治疗弥漫性血管内凝血,在临床上有比较广泛的应用前景[16]。与高密度脂蛋白 HDL 联合治疗肺气肿,可明显降低抽烟导致肺气肿的急性炎症反应[17]。此外,有关 AAT 的零星案例报道和临床研究的用途还包括:脉管炎、复发性脂膜炎、纤维肌痛、支气管哮喘[18]。随着 AATD 诊断技术和生产工艺的进步以及增补疗法的推广,AAT 的应用将进一步扩大。

5 未来展望

随着分子诊断技术在临床上的应用,与 α1-AT 相关的疾病会越来越多被确诊,相应的治疗方案也会不断发展进步。目前针对 AATD 的治疗方法主要是静脉注射 AAT,既贵又不方便,并且只有 2%-3%的 AAT 可到达靶器官[19],且对由于错误折叠的 Z 蛋白在胞内的异常堆积引起的肝脏疾病疗效不佳,只有抑制缺陷型 AAT 的表达才能够缓解或治疗 AATD 相关的肝脏疾病。静脉注射补充剂的不足促进了新的治疗方法的发展,目前已有一定基础并将进一步发展的治疗方法

包括以下几方面：

5.1 吸入增补治疗　吸入给药法是通过特殊的吸入装置，使药物呈雾状喷出，经患者口、鼻吸入后，进入支气管及肺泡，从而达到局部或全身治疗的效果。喷雾颗粒的大小是药物能否到达肺泡的关键因素，10 μm 以上的颗粒几乎 100% 沉积于支气管中，2-10 μm 的颗粒可进入支气管和细支气管，在吸收部位肺泡沉积率最大的颗粒为 2.5-3.0 μm。因此喷雾颗粒的大小是 AAT 制剂能否沉积在肺泡的关键。

Brand 等[20]借助于 1 种吸入新型装置，使蛋白酶抑制剂约 70%在囊性纤维化和蛋白酶抑制剂缺乏症患者的肺部沉积。吸入的 AAT 能够减少囊性纤维化患者的气道炎症，并且对肺的功能没有明显影响[21]。研究表明，吸入方法可以成功地增强呼吸上皮的抗-NE 容量，而吸入 AAT 可痕量进入肺间质发挥全身作用，但间质损伤导致的肺气肿是个严重的问题[19,22]。至今尚未有雾化吸入型补充剂获批，但 Kamada 公司的雾化吸入 AAT 制剂已完成Ⅱ期和Ⅲ期临床研究，有望成为治疗 AATD 的首个吸入制剂[23]。综上所述，吸入增补治疗是要保证有足够吸入量的 AAT 达到肺泡区，通过完整的上皮进入间质，又不对该区域产生影响。因此，未来需要解决的问题是喷雾颗粒大小、给药剂量，以及如何促进药物透过上皮细胞间质组织，进而确保有效浓度的 AAT 并发挥最大疗效。

5.2 基因治疗　基因治疗 AATD 已形成势头。第 1 例基因治疗是用质粒-阳离子脂质体系统运载普通正常的 AAT 基因入鼻粘膜[24]，能瞬间提高鼻灌洗液标本的 AAT 水平，但 14 d 后即回到基线水平，目前正在进行一期临床。用重组腺病毒载体递载 AAT 的治疗结果更好一些，目前有 2 项研究进行一期临床试验、1 项研究正进行 2 期临床试验[25]。但迄今为止尚无基因治疗 AATD 被批准。这类基因治疗无法防止有缺陷的 AAT-Z 蛋白产生，所以无法改善由缺陷蛋白积累于肝细胞而引起的 AAT-相关肝病。

基因防治 Z-AAT 相关肝病的手段应能抑制突变基因翻译，近来这方面的研究集中于用 siRNA 下调内源 AAT 的表达。最初的研究是利用核酶剪切 mRNA 下调 AAT 表达。利用 SV40 的载体系统递送核酶到携带突变型 AAT PIZ 基因的转基因小鼠肝脏，结果显著地减少肝脏中 AAT mRNA 和蛋白水平[26]。也有研究利用 siRNA 转录后沉默基因的作用下调内源性 AAT 水平。Cruz 等[27]使用腺相关病毒载体转导技术在转基因小鼠肝脏中表达 siRNA，降低 Z AAT 水平。但理想的基因治疗是既能下调 PiZ 蛋白，又能上调 M-AAT 表达。Mueller 等[28]利用上述腺病毒载体，插入靶向 PiZ AAT 基因的 miRNAs 同时又可驱动野生型的 PiM 基因表达，这一方法在转基因小鼠身上获得了理想的效果：降低循环 Z-AAT 的量同时增加 M-AAT 的分泌，但这一手段的性能和安全性有待进一步研究。

5.3 干细胞治疗　基因治疗成功的必需条件是目的基因能长期稳定表达，而干细胞自我更新和分化的特点使其成为极具吸引力的基因递送平台。早期的研究主要集中在间充质干细胞上。Ghaedi 等[29]利用慢病毒载体将正常的 AAT-Jred 基因转入从 hMSCs 分化的肝细胞样细胞中，诱导间质干细胞表达正常的 AAT。Li 等[30]将 AAT 基因成功导入脂肪间充质干细胞（AT- MSCs），移植入小鼠肝脏可持续稳定的表达人 AAT，并且不会产生 anti-hAAT 抗体。也有研究者用慢病毒和腺病毒将人 AAT 基因转入骨髓瘤细胞，然后移植入小鼠肝脏，可分化成肝细胞并稳定表达人 AAT[31]。这些结果表明，慢病毒和重组腺相关病毒载体介导的干细胞治疗 AAT 缺乏的可行性，为 AAT 缺乏患者提供了潜在的治疗方法。近年来，随着诱导多能干细胞（iPSCs）的发展，在 AAT 缺乏方面的治疗也有报道。Yusa 等[32]利用锌指核酸酶和 piggyBac 转座子技术的结合，在 iPSC 上成功的校正 AATD 的点突变，将校正的 iPSC 在体外分化成肝细胞样细胞，能在移植的小鼠模型肝脏中发挥作用。虽然这种方法能够持续稳定的表达 AAT，但是临床应用的安全性还有待评价。

6　总结

总之，未来五年，新的 AATD 治疗方法的安全性和有效性会进一步评估，更为有效的给药方式和基因治疗呈递系统将会研究出来，更多的新基因和生物标记物会研究出来，以预测个体 AATD 临床症状的风险和评估 AATD 进程以及治疗效果，这些进步会促进更加个性化治疗方案的开展。

参　考　文　献

[1] Lomas DA, Hurst JR, Gooptu B. Update on alpha-1 antitrypsin deficiency: new therapies. J Hepatol, 2016, pii: S0168-8278(16)30083-6.

[2] Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1- antitrypsin deficiency. Lancet, 2005, 365(9478): 2225-2236.

[3] Hopkins PC, Stone SR. The contricution of the conserved hinge region residued of alpha-l-antitrypsin to its reaction with elastase. Biochemistry, 1995, 34(48): 15872-15881.

[4] Barlow I, Sewell WA. Alpha1-antitrypsin deficiency and Pi typing. J Allergy Clin Immunol, 2008,122(3): 658.

[5] Green CE, Vayalapra S, Hampson JA, et al. PiSZ alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD): pulmonary phenotype and prognosis relative to PiZZ AATD and PiMM COPD. Thorax,2015, 70(10): 939-945.

[6] de Serres FJ, Blanco I, Fernández-Bustillo E. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z deficiency alleles of a1-antitrypsin deficiency in Asia. Eur Respir J, 2006, 28(6): 1091-1099.

[7] Zuo L, Pannell BK, Zhou T, et al. Historical role of alpha-1-antitrypsin deficiency in respiratory and hepatic complications. Gene, 2016, pii: S0378-1119(16)00006-8.

[8] Stockley RA. The multiple facets of alpha-1-antitrypsin. Ann Transl Med, 2015, 3(10):130.

[9] Bouchecareilh M. Alpha-1-antitrypsin deficiency. Med Sci (Paris), 2014, 30(10):889-895.

[10] Karnaukhova, E. Recent advances in the research and development of alpha-1 proteinase inhibitor for therapeutic use. Lung Diseases, InTech, Rijeka, 2012: 83-104.

[11] Pérez-Holanda S, Blanco I, Menéndez M, et al. Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls. BMC Cancer, 2014, 14(355):

355-363.

[12] Zhou J, Trock B, Tsangaris TN, et al. A unique proteolytic fragment of alpha1-antitrypsin is elevated in ductal fluid of breast cancer patient. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(1): 73-86.

[13] Gadek JE,Klein HG, Holland PV, et al. Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects. Journal of Clinical Investigation, 1981, 68(5): 1158-1165.

[14] Petrache I, Hajjar J, Campos M. Safety and efficacy of alpha-1-antitrypsin augmentation therapy in the treatment of patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. Biologics,2009, 3:193-204.

[15] Strange C, Beiko T. Treatment of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36(4):470-477.

[16] Levy JH, Sniecinski RM, Welsby IJ, et al. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. Thromb Haemost, 2016, 115(4):712-728.

[17] Moreno JA, Ortega-Gomez A, Rubio-Navarro A, et al. High-density lipoproteins potentiate α1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 51(4): 536-549.

[18] Blanco I, Lara B, de Serres F. Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2011, 6(14): 14-24.

[19] Hubbard RC, Crystal RG. Strategies for aerosol therapy of α1-antitrypsin deficiency by the aerosol route. Lung, 1990, 168(Suppl): 565-578.

[20] Brand P, Schulte M, Wencker M, et al. Lung deposition of inhaled alpha1-proteinase inhibitor in cystic fibrosis and alpha1-antitrypsin deficiency. Eur Respir J. 2009, 34(2):354-360.

[21] Monk R, Graves M, Williams P, et al. Inhaled alpha 1-antitrypsin: gauging patient interest in a new treatment. COPD,2013, 10(4):411-415.

[22] Franciosi AN, McCarthy C, McElvaney NG. The efficacy and safety of inhaled human α-1 antitrypsin in people with α-1 antitrypsin deficiency-related emphysema. Expert Rev Respir Med, 2015, 9(2):143-151.

[23] Rachmiel M, Strauss P, Dror N, et al. Alpha-1 antitrypsin therapy is safe and well tolerated in children and adolescents with recent onset type 1 diabetes mellitus. Pediatr Diabetes. 2015, doi: 10.1111/pedi.12283. [Epub ahead of print]

[24] Mueller C, Flotte TR. Gene-based therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency.COP,2013, 10(Suppl)1:44-49.

[25] Brebner JA, Stockley RA. Recent advances in α-1-antitrypsin deficiency-related lung disease. Expert Rev Respir Med,2013,7(3): 213-29.

[26] Duan YY, Wu J, Zhu JL et al. Gene therapy for human α1-antitrypsin defciency in an animal model using SV40-derived vectors. Gastroenterology, 2004,127(4):1222-1232.

[27] Cruz PE, Mueller C, Cossette TL, et al. In vivo post-transcriptional gene silencing of α-1 antitrypsin by adeno-associated virus vectors expressing siRNA. Lab Invest, 2007, 87(9):893-902.

[28] Mueller C, Tang Q, Gruntman A, et al. Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles. Mol Ther, 2012, 20(3): 590-600.

[29] Eggenschwiler R, Loya K, Wu G, et al. Sustained knockdown of a disease-causing gene in patient-specific induced pluripotent stem cells using lentiviral vector-based gene therapy. Stem Cells Transl Med,2013, 2(9):641-654.

[30] Li H, Lu Y, Witek RP, et al. Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of α1-antitrypsin. Mol Ther, 2010, 18(8): 1553-1558.

[31] Li H, Zhang B, Lu Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-based liver gene delivery. J Hepatol, 2011, 54(5): 930-938.

[32] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of α1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. Nature, 2011, 478(7369): 391-394.

(2016-09-30 收稿,2017-03-20 修回)

本文编辑:闻欣

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn bloo. cbpt. cnki. net

· 血液质量管理 ·

英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其启示(五)
——产后出血预防和管理指南

余卓丽[1]　梁惠兰[1]　马春会[1]　黄懿[2]　郭永建[1△]
(1. 佛山市中心血站 广东 佛山 528000;2. 南方医科大学附属南海医院妇产科)

关键词:产后出血;产妇;预防;管理;指南
中图分类号:R714.46^{+}1　R457.1　　**文献标识码**:C　　**文章编号**:1004-549X(2017)3-0320-05

产后出血(postpartum haemorrhage,PPH)是产妇死亡的首位原因,其预防和救治十分复杂,需要多学科密切合作,综合考虑应用多种医疗技术。英国皇家妇产科医师学会(Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, RCOG)于 2016 年 12 月发布了《产后出血预防和管理指南(第 2 版)》[循证指南 52 号(Green-top guideline No. 52)](以下简称《指南》),对 2009 年发布的同文题指南(第 1 版)做了全面更新,从原发性 PPH 预测、预防和管理,到继发性 PPH 管理和风险管理,共提出了 50 多条推荐意见,其中有近半数的推荐是第 1 版《指南》没有的,还附有多个很实用的附录[1]。《指南》特别强调了产科、麻醉科和输血实验室以及上下级医务人员之间的密切沟通和通力合作。《指南》的推荐对于我国 PPH 救治指南的制定具有重要的参考价值,作为 1 份典型的患者血液管理指南,《指南》的编制过程和方法对于我国血液标准,尤其是临床输血指南的编制也具有学习和借鉴意义。现将其主要内容介绍如下。

1 《指南》主要推荐意见概览　(表 1)

表 1　主要推荐概览

推荐	等级
1 PPH 的预测和预防	
1.1 PPH 危险因素及使其最小化	
1.1.1 危险因素	
推荐 1　在产前或产中可能出现 PPH 危险因素,应据此对孕产妇照护计划做出调整	√
推荐 2　临床医生必须掌握 PPH 危险因素,并将其作为指导孕妇选择分娩地点需要考虑的因素	√
推荐 3　已知具有 PPH 危险因素的孕妇宜选择在设置血库的医院分娩	D
1.1.2 降低 PPH 危险——治疗产前贫血	
推荐 4　宜对产前贫血做适宜的调查和治疗,以降低与 PPH 相关疾病的发生率	D
1.1.3 降低 PPH 危险——减少产程出血	
推荐 5　子宫按摩对 PPH 预防无益	A
推荐 6　在第 3 产程宜常规预防性使用缩宫药物以降低 PPH 危险	A
推荐 7　不存在 PPH 危险因素的阴道产产妇在第 3 产程肌注缩宫素 10 IU 是预防 PPH 的首选措施,使用更大剂量缩宫素无益	A
推荐 8　对于剖宫产的产妇,宜给予缩宫素 5 IU 缓慢静注,以增强子宫收缩和减少失血	B
推荐 9　对于具有出血危险且没有妊娠高血压的产妇,可联合使用缩宫素和麦角新碱以降低少量 PPH(500-1 000 mL)的危险	C
推荐 10　对于具有出血危险因素的产妇,采用 PPH 综合预防措施也许比单用缩宫素更能奏效	√
推荐 11　对于 PPH 高危产妇,在剖宫产时除了使用缩宫素外,还宜考虑使用氨甲环酸(0.5-1.0 g),以减少失血	A
2 PPH 管理	
2.1 确定出血严重程度	
推荐 12　临床医生宜认识到以肉眼估计围产期出血量是不精确的,PPH 评估宜包括临床症状和体征	C
2.2 沟通与多学科协作	
2.2.1 与产妇沟通	
推荐 13　与产妇及其陪产者的沟通非常重要,从一开始就宜明确告知其所发生的事情	√
2.2.2 通知和召集相关专业人员参与 PPH 产妇救治	
推荐 14　宜通知具有适宜专业水平的相关工作人员做好 PPH 产妇抢救准备	√
推荐 15　产妇出现少量 PPH(出血量 500-1 000 mL)但没有临床休克时,宜通知主管助产士、一线产科和麻醉人员做好 PPH 产妇抢救准备	√
推荐 16　产妇出现大量 PPH(出血量>1 000 mL)、继续出血或者临床休克时,宜召集包括资深成员在内的多学科团队参加抢救	√
2.3 复苏	
2.3.1 少量 PPH 的治疗措施	
推荐 17　对于没有休克的少量 PPH(出血量 500-1 000 mL)宜采取治疗措施:1)建立 1 条 14 G 静脉通路;2)紧急静脉采血 20 mL 检测:(1)血型;(2)全血细胞计数;(3)凝血功能包括纤维蛋白原(Fib);3)测量脉搏、呼吸、血压 1 次/15 min;4)开始输注预温的晶体液	√

(转下页)

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.03.028
△通信作者:郭永建(1956.12-),男,主任医师、教授,主要从事血液质量管理研究。电话:13509368467, Email:director@fjxyzx.org

表 1 主要推荐概览(续)

推荐	等级
2.3.2 大量 PPH 的管理措施	
推荐 18 对于大量 PPH(出血量>1 000 mL)且仍在继续出血或伴有休克宜采用全面治疗方案:1)A 和 B——评估气道和呼吸;2)C——评价循环状态;3)平卧;4)采取可用的适宜措施保持体温;5)如果临床需要,尽快输血;6)在血液送达之前,输注 3.5 L 预温液体,最初 2 L 为预温等渗晶体液,随后可用等渗晶体液或胶体液(琥珀酰明胶),但不宜输注羟乙基淀粉;7)采用可用的最好预温设备以快速预温输注液体;8)专用血液过滤器会降低输注速度,不宜使用	√
2.3.3 输血	
2.3.3.1 红细胞	
推荐 19 红细胞输注指征没有严格标准,宜根据临床和血液学评估结果作出输血决定	√
推荐 20 大量 PPH 输血方案应包括紧急输注 O 型、RhD 阴性、K 阴性红细胞,并尽快转换为输注具体血型的血液	D
推荐 21 如果产妇存在有临床意义的红细胞抗体,需密切联系输血实验室,避免危及生命大出血产妇的红细胞输注受到延误	D
推荐 22 所有接生单位特别是没有血库的接生单位都宜存有 O 型、RhD 阴性、K 阴性红细胞	√
推荐 23 剖宫产和阴道产 PPH 救治宜考虑紧急采用术中红细胞回收技术	D
2.3.3.2 FFP	
推荐 24 如果凝血试验结果未出但出血仍在继续,输入 4 U 红细胞后宜输注 FFP(12-15)mL/kg,直到获得凝血试验结果	D
推荐 25 如果疑似凝血病,如胎盘早剥、羊水栓塞或者未及时发现的 PPH,但又无法做凝血试验,宜考虑尽早输注 FFP	√
推荐 26 如果 PT(或 APTT)>1.5 倍正常值且出血仍在继续,可能需要 FFP 输注剂量>15 mL/kg 才能纠正凝血病	D
推荐 27 临床医生宜认识到如果预计要用 FFP,应尽快通知输血实验室,由于需要融化时间,FFP 送达总会滞后些	√
2.3.3.3 Fib	
推荐 28 在 PPH 仍在继续期间,宜维持 Fib>2 g/L	C
推荐 29 补充 Fib 宜采用冷沉淀	D
2.3.3.4 血小板	
推荐 30 在 PPH 仍在继续期间,实验室监测显示 Plt<75×10^9/L 时宜输注血小板	D
2.3.3.5 抗纤溶药物	
推荐 31 PPH 管理宜考虑使用氨甲环酸	B
2.3.3.6 重组因子Ⅶa(rFⅦa)	
推荐 32 如果不是临床试验需要,不推荐大量 PPH 患者常规使用 rFⅦa	√
2.4 大量 PPH 的监测和检查	
推荐 33 大量 PPH(失血量>1 000 mL)、继续出血或临床休克患者的整套监测和检查方案:1)立即采集 20 mL 静脉血做以下项目:(1)交叉配血至少 4 U;(2)全血细胞计数;(3)凝血筛查试验包括 Fib 测定;(4)肝肾功能;2)测量体温 1 次/15 min;3)连续记录脉搏、血压和呼吸频率(使用血氧饱和度监测仪、心电图仪和全自动血压计记录);4)留置 Foley 导尿管记录尿量;5)建立 2 条 14 G 外周静脉通路;6)考虑动脉留置管监测(如果有经验丰富的工作人员做插管);7)如适宜,出血得到控制后,考虑将患者转入 ICU 或者特护病房;8)在改良产科早期预警图(附录 4)上做记录;9)改良早期产科预警图显示异常时,立即采取进一步处理措施;10)记录液体进出量与血液及血制品输注和抢救过程	D
2.5 麻醉师在 PPH 管理中作用	
推荐 34 PPH 管理需要多学科协作,麻醉师在维持患者血流动力学稳定方面起重要作用,并在必要时决定并实施适宜的麻醉方案	D
2.6 止血方法	
推荐 35 临床医师宜准备联合应用药物、物理和外科手术的方法治疗 PPH 患者的出血。宜根据 PPH 病因选择具体止血方法	D
2.6.2 手术止血	
推荐 37 如果药物治疗无法控制出血,宜尽快做手术治疗	D
推荐 38 对于宫缩乏力是出血唯一或主要原因的大部分产妇,子宫内球囊压迫术是手术治疗的一线方法	C
推荐 39 根据患者病情和医生经验,可将外科保守治疗作为二线方法	C
推荐 40 手术室宜有子宫背带式缝合术操作分解图可供使用	√
推荐 41 尽早行子宫切除术,尤其是植入性胎盘和子宫破裂时	C
推荐 42 如可能,最好能与另 1 名经验丰富的医生共同做出子宫切除的决定	√
3 继发性 PPH 的管理	
推荐 43 对于继发性 PPH 患者,宜采集阴道上段和宫颈拭子标本做阴道微生物学检查,怀疑子宫内膜炎时宜开始采用适宜的抗生素治疗	D
推荐 44 盆腔超声检查可能有助于排除存在妊娠产物残留(retained products of conception,RPOC),尽管其所做出的 RPOC 诊断并不可靠	C
推荐 45 RPOC 清除术宜由经验丰富的医师实施或指导	D
4 风险管理	
4.1 培训和准备——实施 PPH 最佳管理方案的保障措施	
推荐 46 每个产科病区宜有 PPH 管理的多学科协作方案	√
推荐 47 所有产科工作人员都宜接受产科急症包括 PPH 管理的培训	B
推荐 48 宜开展 PPH 管理的多专业培训,包括团队演练	B
推荐 49 宜对估计失血量≥1 500 mL 的所有 PPH 病例开展正式的临床事件分析	D
4.2 记录	
推荐 50 出现 PPH 的分娩和抢救过程宜予精确记录	√
4.3 救治情况讨论会	
推荐 51 在双方都方便的时候为产妇(包括其配偶)提供参与产科出血救治情况讨论的机会	√
5 审核指标建议	
1)接受孕期贫血筛查孕妇的比例(100%)	
2)第 3 产程中使用缩宫素产妇的比例(100%)	
3)在产房中接受 PPH 风险因素评估产妇的比例(100%)	
4)适宜记录管理过程尤其是 PPH 产妇各种事件发生时间(100%)	
5)产妇出血量>1 500 mL 时通知 PPH 风险管理团队(100%)	
6)具有接受过 PPH 技能培训多学科团队的比例(100%)	

注:"√"为《指南》编写组根据临床经验强力推荐的最佳实践

2 《指南》附录

2.1 附录 1 指南及其证据水平和推荐强度分级方法的说明:1)临床指南是经过系统研制得出的推荐性陈述,为临床医生和患者在特定情况下需要做出适宜的治疗决策时提供帮助;每项指南都是采用系统和标准的方法制定,有关指南制定过程的详细信息请参见《RCOG Green-top 指南编制方法》;指南是推荐意见,而不是强制规定疾病管理或治疗的唯一方法;应用指南提供的推荐之前,必须充分考虑患者个体需求、本机构资源和局限以及当地人群的差异,对推荐的适用性做出评价;希望指南本地化这一过程能够有助于将指南的推荐整合到本机构的临床常规之中;对于存在临床不确定

性、需要进一步研究的问题,务必给予关注和留意。2)《指南》采用的证据水平和推荐强度分级方法(表 2)。

表 2　证据水平和推荐强度分级方法

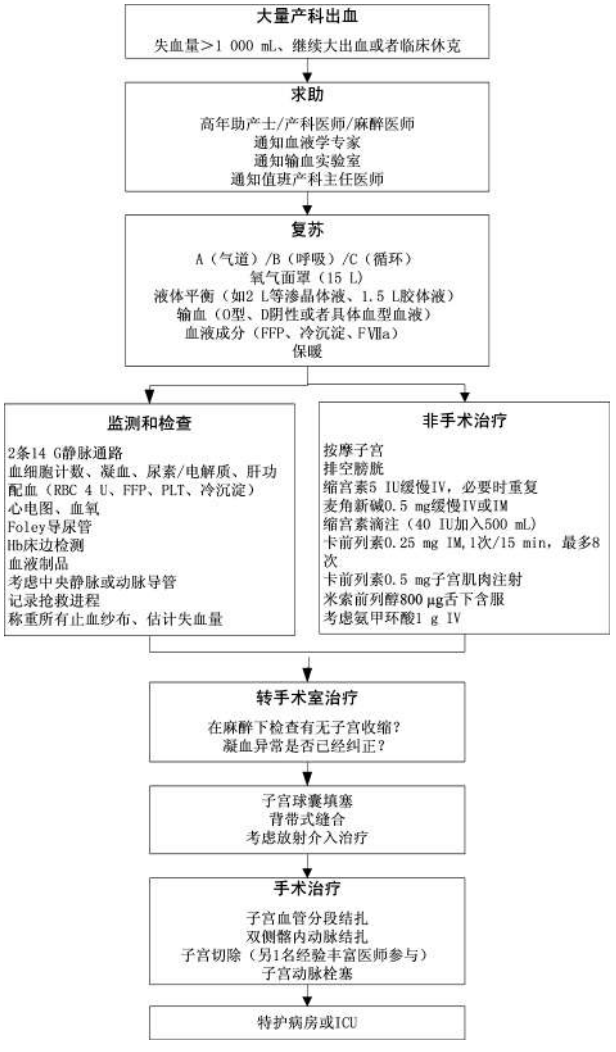
证据水平		推荐强度	
级别	判定标准	级别	判定标准
1++	RCT 的高质量的 Meta 分析、系统评价,或出现偏倚的可能性很小的 RCT	A	至少有证据等级为 1++级的 1 项 Meta 分析、系统评价或 RCT,直接适用于目标人群;或者至少有证据等级为 1+的 1 项系统评价或者大多数主要研究,直接适用于目标人群并取得总体一致的结果
1+	RCT 的较高质量的 Meta 分析、系统评价,或出现偏倚的可能性小的 RCT		
1−	RCT 的 Meta 分析、系统评价,或出现偏倚可能性大的 RCT		
2++	病例对照或队列研究的高质量的系统评价,或出现混杂、偏倚和巧合的可能性很小且反映因果关联的可能性大、高质量的病例对照或队列研究	B	大多数研究的证据等级为 2++级,直接适用于目标人群并取得总体一致的结果;或者证据等级为 1++的研究的外推证据
2+	出现混杂、偏倚和巧合的可能性小且反映因果关联的可能性较大、较高质量的病例对照或队列研究	C	大多数研究的证据等级为 2+级,直接适用于目标人群并取得总体一致的结果;或者证据等级为 2++的研究的外推证据
2−	出现混杂、偏倚和巧合的可能性大且反映因果关联的可能性较小的病例对照或队列研究	D	证据等级为 3 或 4 级;或者证据等级为 2+的研究的外推证据
3	非分析性研究,即病例报告、病例系列分析	√	最佳实践(good practice point):《指南》编写组根据临床经验强力推荐的最佳实践
4	专家意见		

2.2　附录 2　PPH 原因(表 3)。

表 3　PPH 原因

类别	危险因素或注释
1 宫缩(tone):子宫收缩异常	
子宫过度膨胀	羊水过多、多胎妊娠、巨大胎儿
羊膜腔感染	发热、胎膜迟破
子宫功能或者解剖异常	急产、滞产、子宫肌瘤、前置胎盘、子宫畸形
使用子宫松弛剂如镁和硝苯地平	特布他林、卤代麻醉剂、硝酸甘油
膀胱膨胀	可能妨碍子宫收缩
2 组织(tissue):妊娠产物残留	
胎盘小叶或副胎盘残留	
凝血块残留	
3 损伤(trama):生殖道损伤	
宫颈、阴道或会阴撕裂伤	急产、手术产
剖宫产拉伤、撕裂伤	胎位不正、深部操作
子宫破裂	先前子宫手术
子宫内翻	多次妊娠且脐带过度牵拉
4 凝血酶(thrombin):凝血功能异常	
原有疾病	
甲型血友病	
原发性血小板减少性紫癜	紫癜
血管性血友病	
既往 PPH 病史	
妊娠期间发病	
妊娠期血小板减少症	紫癜
先兆子痫合并血小板减少症如溶血-肝酶升高-血小板减少综合征	血压升高
DIC	
妊娠高血压伴合并症	凝血病
宫内死胎	胎儿死亡
严重感染	发热、中性细胞增多/减少
胎盘早剥	产前出血
羊水栓塞	突然衰竭
抗凝治疗	栓塞病史

2.3　附录 3　PPH 管理流程(图 1)。



注:宜同时做复苏、监测、检查和治疗

图 1　大量产后出血管理流程

2.4　附录 4　产科早期预警图(略)。

2.5　附录 5　产科出血记录表示例(略)。

3　编制过程的说明

3.1　目的和范围　1)原发性 PPH 是最常见的产科出血,其传统定义是在胎儿娩出后<24 h 产妇生殖道出血量≥500 mL;PPH 可分为少量(minor)出血(500−1 000 mL)和大量出血(major)(>1 000 mL),后者可进一步分为较大量(moderate)出血(1 000−2 000 mL)和严重(severe)出血(>2 000 mL);对于体重较小(如<60 kg)的产妇,较少的出血量可能就具有临床意义。《指南》的推荐适用于出血量≥500 mL 的原发性 PPH 患者。2)继发性 PPH 是指产妇产后 24 h−12 周、出血量异常多的产道出血。《指南》也提供了继发性 PPH 管理的推荐意见。3)患有出血性疾病和服用治疗性抗凝剂的妇女发生 PPH 的危险较大。《指南》未提供具有这类疾病和治疗史以及拒绝输血的产妇发生 PPH 时具体管理的推荐意见,如有需要请参见其他文件。4)《指南》主要是针对在具有主任医师领导的英国产科中心工作的临床医生制定的,其中的推荐意见可能不太适合于在设施、资源和常规

医疗实践方面存在差异的产科机构。现在越来越强调能够在家分娩或在具有助产士领导的产科机构分娩,产科医生和助产士宜制定社区产科急症(包括 PPH)指南,这部分内容不在《指南》范围。5)《指南》范围仅限于 PPH 的管理,产前出血管理见 RCOG Green-top 指南 63 号,与前置胎盘和前置胎盘合并胎盘植入有关的 PPH 的预防和管理见 RCOG Green-top 指南第 27 号,血液和血液制品在产科中的适当使用见 RCOG Green-top 指南第 47 号。

3.2 背景和流行病学 产科出血即使在发达国家仍然是国家孕产妇死亡的主要原因之一。英国 2011-2013 年孕产妇死亡和发病率保密调查报告确定了在英国和爱尔兰因产科出血导致直接死亡的 13 个病例,指出产科出血是导致孕产妇死亡的第 2 位原因,推荐重点提高产科医生和助产士基本临床技能和及时识别出血严重程度的能力,强调产科出血管理必须具有良好的沟通和团队合作。1 项系统评价表明 PPH 发病率可能存在地区差异。PPH 诊断标准宜统一,以使来自不同地区的数据可做比较。

3.3 证据的发现和评估(略)

4 PPH 的预测和预防推荐意见的证据

4.1 PPH 危险因素及使其最小化

4.1.1 危险因素

【推荐 1】在产前或产中可能出现 PPH 危险因素,应据此对孕产妇照护计划做出调整(√)。

【推荐 2】临床医生必须掌握 PPH 危险因素,并将其作为指导孕妇选择分娩地点需要考虑的因素(√)。

【推荐 3】已知具有 PPH 危险因素的孕妇宜选择在设置血库的医院分娩(D 级)。

【证据】1)尽管大多数 PPH 病例没有可事先识别的危险因素,但是一些病例对照研究已经确定了在产前和产中出现的 PPH 危险因素(附录 2);2010 年发表的 1 篇综述总结了 PPH 的危险因素,尽管其方法学存在局限性,但这些研究提供了对 PPH 危险水平做出判断的指南,有助于临床医生与孕妇讨论分娩计划(表 4);孕产妇和儿童健康的保密调查报告推荐已知具有 PPH 危险因素的孕妇不宜在没有血库的医院分娩(4 级)。2)加拿大妇产科学会发布的 PPH 预防和管理指南总结了 PPH 原因与 4 方面因素有关,分别是宫缩乏力(tone)、软产道裂伤(trauma)、胎盘组织(tissue)和凝血障碍(thrombin),简称 4T,PPH 与其中≥1 个因素有关,最常见的是宫缩乏力(4 级)。

4.1.2 降低 PPH 危险——治疗产前贫血

【推荐 4】宜对产前贫血做适宜的调查和治疗,以降低与 PPH 相关疾病的发生率(D 级)。

【证据】1)英国国家卫生与服务优化研究院(National Institute for Health and Care Excellence,NICE)的指南推荐为孕妇做贫血筛查,英国血液学标准委员会(British Committee for Standards in Haematology,BCSH)已制定了孕妇贫血调查和管理指南。如果孕妇 Hb 小于正常范围值(英国是首次产检时 110 g/L,妊娠 28 周时 105 g/L),宜调查其原因;如果有适应证,宜补充铁剂。缺铁性贫血孕妇口服铁剂无效时,宜予肠外补铁治疗(4 级)。2)1 项患者群体研究结果显示产前贫血(Hb<90 g/L)与更多的产时或产后出血量相关(3 级)。

表 4 PPH 危险因素和水平

危险因素	4T	*OR*(95%*CI*)
多胎妊娠	宫缩乏力	3.30(1.00-10.60)
		4.70(2.40-9.10)
既往 PPH	宫缩乏力	3.60(1.20-10.20)
先兆子痫	凝血障碍	5.00(3.00-8.50)
		2.20(1.30-3.70)
巨大胎儿	宫缩乏力	2.11(1.62-2.76)
		2.40(1.90-2.90)
第 2 产程失败	宫缩乏力	3.40(2.40-4.70)
		1.90(1.20-2.90)
第 3 产程延长	宫缩乏力	7.60(4.20-13.50)
		2.61(1.83-3.72)
胎盘滞留	胎盘组织	7.83(3.78-16.22)
		3.50(2.10-5.80)
		6.00(3.50-10.40)
胎盘植入	胎盘组织	3.30(1.70-6.40)
会阴切开	产道裂伤	4.70(2.60-8.40)
		2.18(1.68-2.76)
		1.70(1.20-2.50)
会阴裂伤	产道裂伤	1.40(1.04-1.87)
		2.40(2.00-2.80)
		1.70(1.10-2.50)
全身麻醉	宫缩乏力	2.90(1.90-4.50)

4.1.3 降低 PPH 危险——减少产程出血

【推荐 5】子宫按摩对 PPH 预防无益(A)。

【推荐 6】在第 3 产程宜常规预防性使用缩宫药物以降低 PPH 危险(A)。

【推荐 7】不存在 PPH 危险因素的阴道产产妇在第 3 产程肌注缩宫素 10 IU 是预防 PPH 的首选措施,使用更大剂量缩宫素无益(A)。

【推荐 8】对于剖宫产的产妇,宜给予缩宫素 5 IU 缓慢静注,以增强子宫收缩和减少失血(B)。

【推荐 9】对于具有出血危险且没有妊娠高血压的产妇,可联合使用缩宫素和麦角新碱以降低少量 PPH(500-1 000 mL)的危险(C)。

【推荐 10】对于具有出血危险因素的产妇,采用 PPH 综合预防措施可能比单用缩宫素更能奏效(√)。

【推荐 11】对于 PPH 高危产妇,在剖宫产时除了使用缩宫素外,还宜考虑使用氨甲环酸(0.5-1.0 g),以减少失血(A)。

【证据】1)子宫按摩:Cochran 系统评价分析了胎儿娩出后,子宫按摩在胎盘娩出前做、或在娩出后做、或在娩出前后都做是否能够有效预防 PPH,共纳入 2 项 RCT,评价结果显示这几种处理方法没有明显差异(P>0.05)(1++级)。2)第 3 产程管理:(1)评价在阴道产第 3 产程采取 PPH 预防措施的效果的数篇 Cochran 评价均得出结论,在第 3 产程采取主动管理和预防性使用缩宫药物能够降低 PPH 危险。第 3 产程主动管理应用包括缩宫药物、早期钳夹脐带和控制性牵拉脐带在内的干预措施,以加快胎盘娩出,其目的是减少出血量。在预期管理过程中,期待着胎盘剥离的迹象和胎盘自然娩出。1 项 Cochran 系统评价发现,对出血危险高低不一的

产妇实施主动管理之后,分娩时产妇原发性出血的危险降低(出血量>1 000 mL,*RR* 0.34, 95% *CI* 0.14-0.87),分娩后产妇 Hb<90 g/L 的危险减少(*RR* 0.50,95%*CI* 0.30-0.83)(1++级)。(2)第 3 产程的主动管理使新生儿体重降低,原因是早期钳夹脐带致婴儿血容量减少。1 项针对对照试验所做的系统评价和 Meta 分析发现,推迟钳夹脐带时间>2 min 对新生儿有益,而且这一益处一直延续到婴儿期;因此不再推荐将早期钳夹脐带作为第 3 产程的主动管理措施。关于钳夹脐带时机的选择请见 RCOG 的科学影响文件(scientific impact paper)14 号。NICE 指南推荐,如果不存在脐带完整性和胎儿健康问题,钳夹脐带不宜早于胎儿分娩后 1 min(1+级)。3)缩宫素和麦角新碱联合用药:(1)Mcdonald 及其同事对第 3 产程预防性使用麦角新碱联合缩宫素和单用缩宫素的效果所做的 Meta 分析显示,对于预防出血量>1 000 mL 的 PPH,麦角新碱-缩宫素、缩宫素 5 IU 或缩宫素 10 IU 的疗效相似。对于出血量>500 mL 的 PPH,麦角新碱-缩宫素具有小幅降低 PPH 危险的作用(*OR* 0.82,95%*CI* 0.71-0.95)。2 种用药方法的主要差别在于恶心、呕吐、血压升高等不良反应的发生率,麦角新碱联合缩宫素组比单用缩宫素高了近 5 倍(*OR* 4.92,95%*CI* 4.03-6.00)。因此,对于少量 PPH 的产妇,在考虑应用麦角新碱联合缩宫素时,需要在增加药物不良反应和降低少量 PPH 危险之间做出权衡和选择(1++级)。(2)1 项关于缩宫素剂量与阴道产 PPH 预防效果的 RCT 采用对宫缩乏力或出血采取治疗措施作为主要结局指标,发现采用 500 mL 静脉滴注>1 h 的给药方法,大剂量缩宫素(40 或 80 IU)并不比小剂量(10 IU)具有更好的 PPH 预防效果(1+级),提示使用大剂量缩宫素的结局并不比小剂量好。4)前列腺素:(1)2 项关于前列腺素预防 PPH 的 Cochran 评价发现,在常规预防 PPH 方面,无论是肌注的前列腺素还是口服或舌下含服的米索前列醇都没有传统的注射缩宫药物[(缩宫素和(或)麦角新碱)]效果好。另外 1 项系统评价的结论是,预防 PPH 缩宫素比米索前列醇效果更好(1++级)。(2)根据 Cochran 系统评价和英国现行标准实践,推荐将给予阴道产产妇肌注缩宫素 10 IU 作为第 3 产程预防 PPH 的首选方案。宜在胎儿前肩部娩出后,或者在胎儿娩出后、脐带钳夹和剪断前立即给产妇肌注缩宫素,该策略已经过 NICE 产程照护指南批准(1+级)。5)卡贝缩宫素:(1)英国批准卡贝缩宫素专门用于预防剖宫产 PPH。1 项关于长效的缩宫素衍生物(卡贝缩宫素)预防 PPH 效果的 Cochran 评价结果显示,与缩宫素比较,卡贝缩宫素能够减少剖宫产过程中的缩宫素用量,但对于阴道产 PPH 没有作用。卡贝缩宫素和缩宫素在降低 PPH 危险方面没有明显差异(*P*>0.05)(1++级)。(2)加拿大妇产科学会推荐在选择性剖宫产的产妇中应用卡贝缩宫素(100 μg,静脉推注时间>1 min)预防 PPH。根据各种缩宫药物(缩宫素、麦角新碱联合缩宫素、米索前列醇、卡贝缩宫素和 15-甲基前列腺素 F_{2a})预防剖宫产产妇 PPH 效果的 RCT 的结果和英国现行标准实践,NICE 剖宫产指南推荐缩宫素 5 IU 缓慢静脉注射以预防剖宫产 PPH(1+级)。6)氨甲环酸:1 项关于在 PPH 低危产妇应用氨甲环酸预防 PPH 的 Cochran 评价发现:(1)氨甲环酸(1.0 或 0.5 g 静脉注射)联合常规缩宫药物,能够降低剖宫产和阴道产出血量>400 或 500 mL 的 PPH 发生率;(2)对于剖宫产产妇,氨甲环酸能够有效地降低出血量>1 000 mL 的 PPH 发生率(*RR* 0.43,95% *CI* 0.23-0.78,纳入研究 4 项、产妇 1 534 名),但是对于阴道产产妇出血量>1 000 mL 的 PPH 发生率没有影响;(3)产后静脉注射氨甲环酸的产妇,其产后 2 h 的出血量减少(减少值均数-77.79 mL,95% *CI*-97.95-57.64 mL,纳入研究 5 项、产妇 1 186 名),其结论是需要针对氨甲环酸所致的包括血栓在内的严重不良反应风险以及在 PPH 高危产妇使用氨甲环酸做进一步研究(1++级)。**(待续)**

《〈中国输血杂志〉创刊 25 周年纪念专辑》出版

为庆贺《中国输血杂志》创刊 25 周年(1988-2013 年),由本刊编辑部精心策划、本刊第六届编委会 22 名编委或顾问联袂奉献的《〈中国输血杂志〉创刊 25 周年纪念专辑》(本刊第 26 卷增刊)于日前正式出版发行。全辑共收录 27 篇专文,分别以编委各自所在专业研究领域的现状与发展,所正在从事和取得的科研或管理工作成果,以及对杂志与其专业、行业关系的认识和对杂志今后进步的期望与寄托等为视角,“全景式”地展示了输血学科、输血行业应有的面貌与本刊在学科建设、行业发展中应踞的地位。一辑在手,既可对输血医学及本刊有个清晰的了解,又颇具有保存和收藏的价值。

定价 15 元/本,欲购请直接汇款到编辑部(免收邮寄费),地址:610052 四川省成都市成华区龙潭总部经济城华彩路 26 号。

(《中国输血杂志》编辑部)