

天津地区 RhD 阴性围产期妇女 RHD 基因分型及 Rh 表型分析

韩雪, 韩红梅, 李捷

天津市第五中心医院输血科, 天津 300450

【摘要】 目的 研究天津地区 RhD 阴性围产期妇女 RHD 基因分型, 并分析不同基因型的 RhC、c、E、e 分布特征。方法 收集 2017 年 1 月至 2019 年 12 月在天津市第五中心医院就诊的 RhD 阴性围产期妇女标本 104 例, 应用血清学方法进行 RhC、c、E、e 表型鉴定; 使用 PCR-SSP 法对间接抗人球蛋白试验(IAT)确认为 RhD 阴性的样本进行 RHD 基因分型。结果 104 例 RhD 初筛阴性个体中 RhC/E 血型分型结果显示, ccee 57 例(54.8%), Ccee 29 例(27.9%), ccEe 10 例(9.6%), CCee 4 例(3.8%), CcEe 3 例(2.9%), ccEE 1 例(1%); RHD 基因分型结果显示, 全缺失 RHD 基因型 70 例(67.3%), DEL RHD 1227A 纯合型 13 例(12.5%), RHD-CE(2-9)-D 型 10 例(9.6%), 弱 D15 型 5 例(4.8%), DEL RHD 1227A 杂合型 2 例(1.9%), RhD 阳性 2 例(1.9%), 2 例(1.9%)不能用此 PCR-SSP 方法确定其基因型。结论 RhD 阴性围产期妇女的 RHD 基因型分子机制具有丰富的多态性, 主要为 RHD 全缺失型, 其次为 DEL RHD 1227A 纯合型和 RHD-CE(2-9)-D 型。

【关键词】 Rh 血型系统; RhD 阴性孕妇; RHD 基因; 基因分型

【中图分类号】 R714.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2022)16-2087-04

RhD genotyping and Rh phenotype analysis in RhD negative perinatal women. HAN Xue, HAN Hong-mei, LI Jie. Department of Blood Transfusion, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, CHINA

【Abstract】 Objective To study RhD genotyping and characteristics of RhC/c/E/e phenotypes in RhD negative perinatal women in Tianjin. **Methods** Samples from 104 RhD negative perinatal women from January 2017 to December 2019 in the Fifth Central Hospital of Tianjin were collected. The phenotypes of RhC, c, E, and e were identified by serological method. The genetic typing of RHD samples were identified based on PCR-SSP. **Results** The RhC/E blood group typing of the 104 cases with negative results in RhD primary screening showed 57 cases of ccee (54.8%), 29 cases of Ccee (27.9%), 10 cases of ccEe (9.6%), 4 cases of CCee (3.8%), 3 cases of CcEe (2.9%), and 1 case of ccEE (1%). RHD genetic typing showed 70 cases with complete deletion of RHD gene (67.3%), 13 cases of DEL RHD 1227A homozygotes (12.5%), 10 cases of RHD-CE(2-9)-D (9.6%), 5 cases of weak D15 (4.8%), 2 cases of DEL RHD 1227A Heterozygotes (1.9%), 2 case of RhD positive (1.9%), and 2 cases could not be genotyped by the PCR-SSP method (1.9%). **Conclusion** The molecular mechanism of RHD genotype in RhD negative perinatal women is rich in polymorphism, mainly complete deletion of RHD gene, followed by DEL RHD 1227A homozygous type and RHD-CE(2-9)-D type.

【Key words】 Rh blood group system; RhD negative perinatal women; RHD genotype; Genotyping

Rh 血型系统在人类红细胞血型系统中最具高度多态性, 抗原复杂多变。在 Rh 血型系统最重要的 D、E、C、c、e5 种抗原中, D 抗原免疫原性最强, 由 RHD 基因编码, 10 个外显子组成, 编码区总长为 1 251 bp, 编码 417 个氨基酸组成的糖蛋白。D 抗原存在多种变异体, 包括部分 D 型(partial D)、弱 D (week D) 型、DEL 等, 是临床上引起新生儿溶血病、溶血性输血反应的最主要的血型抗原, 对 D 抗原阴性孕妇的妊娠结局具有重要的临床意义。关于 Rh 阴性个体的血清学表型、RHD 基因型检测分析一直是国内外研究的热点, 不同地区民族皆对其有相关报道。本文旨在对天津地区 RhD 阴性的孕产妇 RHD 基因分型进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 收集 2017 年 1 月至 2019 年 12

月在天津市第五中医医院产科就诊的围产期妇女标本 10 139 例, 其中 RhD 抗原血清学初筛试验阴性标本 104 例, 年龄 20~39 岁, 平均(28.72±7.65)岁, 每例留取 EDTA 抗凝血标本约 5 mL。纳入标准: ①产前 RhD 检测结果为阴性; ②彩超检查均为单胎妊娠。排除标准: ①异位妊娠者; ②孕期合并有子宫内膜炎、既往有血液、免疫系统疾病史的患者和临床资料不完整者。本研究经天津市第五中心医院伦理委员会批准, 所有参与者均签署知情同意书。

1.2 试剂 ABO、RhD 血型定型检测卡(单克隆抗体)(生产批号 20151204、20161204、20171204、20181204, 长春博讯生物技术有限公司); RhD 血型抗原检测卡(单克隆抗体)(生产批号 20160601、20170601、20180601, 长春博讯生物技术有限公司); 核酸提取或

纯化试剂盒(天津秀鹏,生产批号 201808001);人类红细胞 RHD 基因分型试剂盒(PCR-SSP 法)(天津秀鹏,生产批号 201810002);琼脂糖(Biowest);EB 染料(天津秀鹏,生产批号 201703001)。

1.3 仪器 TD-3A 型血型血清学离心机(长春博讯科研仪器有限责任公司);涡旋混匀器(其林贝尔 VDRTEX-5);高速离心机(SIGMA SIGMA1-14);水浴锅(天津泰斯特 HHW21.420A II);PCR 扩增仪(ABI 9700 型);凝胶成像系统(Clinx GenoSens1860)。

1.4 方法

1.4.1 Rh 抗原检测 采用 Rh 血型抗原试剂卡检测 D、C、c、E、e 5 种抗原,Rh 血型抗原检测卡每孔加入 1%待检红细胞悬液 50 μL,离心后,根据待检红细胞与检测卡 RhC、c、D、E、e 单克隆抗体反应格局,判读 Rh 血型表型结果。

1.4.2 基因组 DNA 的提取 严格按照天津秀鹏生物技术开发有限公司生产的核酸提取或纯化试剂盒说明书操作,提取 104 例经抗人球蛋白法确定为 RhD 阴性的样本提取基因组 DNA 备用。DNA 产物应该保存在 -20℃,以防 DNA 降解。

1.4.3 PCR 检测 根据《人类红细胞 RhD 基因分型试剂盒(PCR-SSP 法)》说明书,在 ABI9700 扩增仪上进行试验操作,操作步骤如下:将 80 μL dNTP-Buffer 工作液、0.8 μL Taq 酶和 10 μL DNA 总共 90.8 μL 混合液漩涡混匀并瞬时离心;向每个引物孔(1~8 孔)各加入 10 μL 上述混合液。PCR 循环参数为 96℃ 2 min,1 个

循环;96℃ 20 s,68℃ 60 s,5 个循环;96℃ 20 s,65℃ 50 s,72℃ 45 s,10 个循环;96℃ 20 s,62℃ 50 s,72℃ 45 s,18 个循环;72℃ 5 min,1 个循环。将 PCR 产物移至 2.5%琼脂糖凝胶电泳孔中,电泳参数设置为 140~150 V 电泳 15~20 min,电泳后紫外光下成像仪拍照记录并对照说明书判读结果。

2 结果

2.1 Rh 血型系统抗原检测 104 份阴性标本均未发现 CCEe、CcEE 及 CCEE 表型,其他抗原表型由多至少分别为 ccee 57 例(54.8%)、Ccee 29 例(27.9%)、ccEe 10 例(9.6%)、CCee 4 例(3.8%)、ccEE 3 例(2.9%)、CcEe 1 例(1%)。

2.2 RhD 阴性围产期妇女标本 RHD 基因分型 104 例 RhD 阴性围产期妇女中 RHD 基因全缺失型 70 例,占全部阴性标本的 67.3%;DEL RHD 1227A 纯合型标本 13 例,占全部阴性标本的 12.5%;RHD-CE(2-9)-D 标本 10 例,占全部阴性标本的 9.6%;弱 D15 型标本 5 例,占全部阴性标本的 4.8%;DEL RHD 1227A 杂合型标本 2 例,占全部阴性标本的 1.9%;RhD 阳性标本 2 例,占全部标本的 1.9%;另外有 2 例不能用此 PCR-SSP 试剂盒确定其基因型,占全部标本的 1.9%。见图 1。不规则抗体筛查检出 3 例阳性,其抗体为抗-D,基因分型均为全缺失型。

2.3 RHD 基因型及 Rh 表型 70 例 RHD 完全缺失型中 ccee 55 例(78.6%)、Ccee 11 例(15.7%)、ccEe 4 例(5.7%),其他 RHD 基因分型及 Rh 表型分布见表 1。

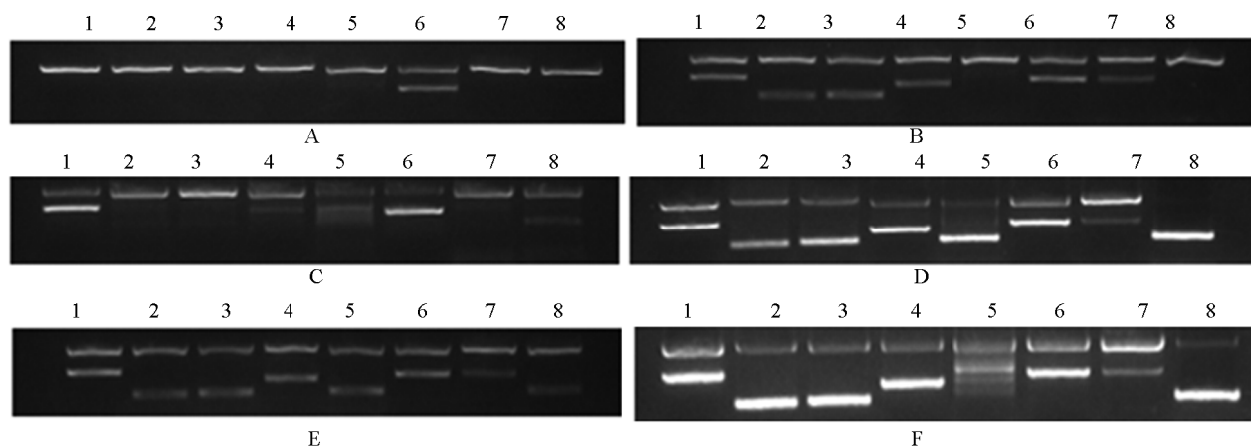


图 1 RHD 基因分型 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳的条带格局

注:A,RHD 基因全缺失型;B,DEL RHD1227A 纯合型;C,RHD-CE(2-9)-D 型;D,弱 D15 型;E,DEL RHD1227A 杂合型;F,RhD 阳性。

表 1 RHD 基因分型及 Rh 表型分布[例(%)]

RHD 基因型/Rh 表型	ccee	Ccee	ccEe	CCee	CcEe	ccEE	合计
RHD 完全缺失型	55 (78.6)	11 (15.7)	4 (5.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	70
DEL RHD1227A 纯合型	0 (0)	9 (69.2)	0 (0)	3 (23.1)	1 (7.7)	0 (0)	13
RHD-CE(2-9)-D	0 (0)	6 (60)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10
弱 D15	0 (0)	3 (60)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5
DEL RHD1227A 杂合型	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2
RhD 阳性	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	2
不能定型	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2

3 讨论

Rh 血型系统具有复杂多态性,在临床输血体系中占有重要地位,仅次于 ABO 血型系统。本研究 104 例 RhD 阴性标本的 Rh 表型 ccee (54.8%) 和 Ccee (27.9%) 频率最高。基因分型中 RHD 全缺失型为大多数,占全部标本的 67.3%,其 Rh 表型主要是 ccee (78.6%),说明 RHD 全缺失型与 ccee 表型具有高度关联性。

D 抗原具有多种变异体,不同民族和地区的分子背景均有不同,有研究表明 RHD 基因之间产生的氨基酸重排和基因突变影响了抗原的表达^[1]。目前发现亚洲人群中存在部分 D(partial D)、弱 D(weak D)、Del 等变异体^[2]。部分 D 主要有 RHD-CE(2-9)-D、DVI III、RHD-CE(2-7)-D2 等类型,由于 RHD 基因与 RHCE 基因在方向上相反,有很大的概率产生替换,表现为缺失一个或多个抗原表位,且易被致敏产生对应缺失的抗原表位的抗体。RHD-CE(2-9)-D 型是中国人人群中主要的等位基因,其分子机制是缺少 2~9 外显子,本研究中共检出 10 例,分别在表型 Ccee (60%)、ccEe (40%) 中检出,与先前国内学者检测 RHD-CE(2-9)-D 等位基因存在于 CDe 单体型中的结果^[3]不一致,表明 RHD-CE(2-9)-D 等位基因与 RhC/E 抗原之间没有明确联系。

BECKER 等^[4]采用 Southern 分析技术及 PCR 基因定型分析了弱 D 中 RHD 基因表达情况,发现弱 D 的基因组及转录水平与正常 D 表型相比,均未显示任何差异。弱 D 的弱免疫原性不能用 RHD 基因本身的结构差异来解释,D 抗原的弱表达可能是 Rh 相关复合物中的相关因素或尚未确定的抑制基因引起的。另有研究认为,弱 D 由于发生了氨基酸替换和外显子突变^[5]。突变处于跨膜区,可能影响红细胞膜的表达,导致红细胞膜上的抗原数量减少,而抗原表位不变。国外已有报道弱 D 型供血者的红细胞输注给 Rh 阴性患者,刺激机体产生 IgG 抗体并引起严重的溶血性输血反应^[6]。其中弱 D 最常见有弱 D15 型和弱 D12 型,而弱 D15 型在中国人中被广泛发现,同样可激发同种免疫反应,所以应重视对弱 D15 型的检测。本次实验共检测出 5 例弱 D15 型,血清分型分别是 Ccee (60%) 和 CcEe (40%)。

Del 型极弱表达 D 抗原,只有通过吸收放散的方法才能检测到,输注给 Rh 阴性患者仍会产生免疫应答。各地 Del 表型的分子机理各有其特点,中国汉族人群的研究资料表明,Del 型主要由 RHD1227A 等位基因编码组成^[7]。亚洲 RhD 阴性个体中,Del 型占较高比例,高加索人 RhD 阴性个体中 Del 型占 0.33%^[8],国内报道为 15.6%~29.95%^[9-11]。本研究检出 Del RHD1227A 型 15 例,占 14.4%,略低于国内平均水平,说明 Del 型的分布存在一定的地区差异。其血清表型分别为 Ccee、CCee 及 CcEe,推测 1227A 可能与 C 抗原相关,但由于

本次研究标本量较少,这一观点还需要大量标本进一步研究证实。虽然 DEL 型具有完整的 RHD 基因,但极弱的表达 D 抗原,临床上将它归为 RhD 阴性。有研究发现 DEL 型与正常 D 抗原相比,具有很少的抗原分子数量,每个红细胞上的 D 抗原分子数量可能在 30 个以下^[12]。1227A 因其位于第 9 外显子最后一位,影响了 mRNA 的正常连接形成了短的 mRNA,从而降低了 RHD 基因的表达效率,也就造成了红细胞膜上的 D 抗原分子数量明显减少。邵超鹏等^[13]研究说明,编码 RhD 1227A 等位基因的中国汉族 Del 个体 100% 携带 RHD 基因。如果 Del 型个体表达完整的 D 抗原,Del 个体将可能不会被 D 抗原致敏产生免疫应答。本文中 104 例标本中有 3 例产生了抗-D,其基因型均为全缺失型,可以印证上述观点。也就是说 Del 患者可以输注 RhD 阳性红细胞而不产生抗-D 抗体,Del 型女性妊娠 RhD 阳性胎儿将可能不会引起新生儿溶血病。对于这部分孕妇,在整个孕期及产后不需要注射 RhD 免疫球蛋白,可免去产妇注射免疫球蛋白产生的风险和经济负担,以及对是否发生新生儿溶血病的心理压力。目前,国际上均不对 Del 型进行检测,将其作为 RhD 阴性血型对待,供给 RhD 阴性患者使用。而由于输注 Del 血液而产生抗-D 的病例并不罕见,这无疑存在很多弊端和风险。国外已有学者发现 RhD 阴性孕产妇被 Del 型胎儿红细胞免疫和 RhD 阴性受血者输注 Del 型血液,而产生抗-D 抗体的病例^[14-16]。由此可见,结合血清学检查和 RHD 基因分型对 RhD 阴性产妇和临床输血均具有重要的意义。

通过本次研究,基本确定了 RhD 阴性产妇的基因分型情况,但仍有部分个体的基因型通过此 PCR-SSP 法无法确定,需对其外显子测序才能明确其基因型。本文也证实了 RhD 阴性个体的 D 基因多态性,研究 RHD 基因的变异,对人类输血安全和预防新生儿溶血病的发生具有重要意义。

参考文献

- [1] 谢敬文, 邓诗植, 严康峰, 等. 番禺地区 RHD 变异体基因分型研究[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(3): 138-142.
- [2] 乔芳, 田亚娟, 王远花, 等. 石家庄地区 RHD 变异型的分子背景研究[J]. 临床输血与检验, 2020, 22(4): 400-405.
- [3] 邵超鹏, 李楨, 熊文, 等. cis 基因交换形成 RHD-CE(2-9)-D 等位基因[J]. 遗传, 2005, 27(4): 561-565.
- [4] BECKERS EA, FAAS BH, LIGHTHART P, et al. Lower antigen site density and weak D immuno-genicity cannot be explained by structural genomic abnormalities: regulatory defects of the RHD gene [J]. Transfusion, 1997, 37(6): 616-623.
- [5] 李宏, 宋宁, 邓永福, 等. 四川地区汉族人群 Rh(D) 变异体分子机制研究[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(5): 368-372.
- [6] FLEGEL WA, KHULL SR, WAGNER FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2RBCs [J]. Transfusion, 2000, 40(4): 428-434.
- [7] 陈安心, 吴俊杰, 徐凤娟, 等. 浙江汉族 Rh Del 表型的分子机理研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(5): 1029-1032.

产后盆底神经肌肉电刺激生物反馈联合Kegel运动对PFD病情转归的影响

刘华, 胡方慧, 刘敏燕, 谢群好

肇庆市高要区人民医院妇产科, 广东 肇庆 526040

【摘要】 **目的** 探讨产后盆底神经肌肉电刺激生物反馈联合凯格尔(Kegel)运动对盆底功能障碍(PFD)患者病情转归的影响。**方法** 选择2019年8月至2020年12月肇庆市高要区人民医院收治的120例产后早期盆底功能障碍患者为研究对象,根据随机数表法分为观察组和对照组各60例。对照组实施Kegel运动训练,观察组实施盆底神经肌肉电刺激生物反馈联合Kegel运动训练。比较两组患者治疗后6个月的疗效、治疗前及治疗后6个月的肌纤维肌力评分、盆底功能障碍评分(PFDI-20)、盆底功能影响评分(PFIQ-7)、尿动力学[排尿时间(VT)、最大尿道压(MUP)、最大尿流率(Q_{max})]指标,同时比较两组患者的并发症发生情况。**结果** 治疗后6个月,观察组患者的总有效率为98.33%,明显高于对照组的80.00%,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后6个月,观察组患者的I类、II类肌纤维肌力评分分别为(10.33±0.29)分、(12.04±0.46)分,明显高于对照组的(8.56±0.28)分、(10.01±0.47)分,PFDI-20、PFIQ-7评分、VT分别为(10.94±2.06)分、(10.12±2.04)分、(32.44±2.53) s,明显低于对照组的(18.05±3.77)分、(19.81±3.05)分、(37.01±2.49) s, MUP、Q_{max}分别为(86.02±4.35) cmH₂O、(27.30±5.11) mL/s,明显高于对照组的(79.17±4.08) cmH₂O、(23.27±5.45) mL/s,差异均有统计学意义($P<0.05$);观察组并发症发生率为5.00%,明显低于对照组的26.67%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 盆底神经肌肉电刺激生物反馈联合Kegel运动训练应用于产后早期盆底功能障碍能有效改善患者的盆底肌力和尿动力学指标,提高生活质量,临床应用效果显著,并发症低,值得推广使用。

【关键词】 盆底功能障碍;电刺激;生物反馈;凯格尔运动;疗效;肌纤维肌力;生活质量

【中图分类号】 R714.46 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2022)16—2090—04

Effect of postpartum pelvic floor neuromuscular electrical stimulation biofeedback combined with Kegel exercise on the prognosis of pelvic floor dysfunction. LIU Hua, HU Fang-hui, LIU Min-yan, XIE Qun-hao. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhaoqing Gaoyao District People's Hospital, Zhaoqing 526040, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To explore the effect of postpartum pelvic floor neuromuscular electrical stimulation biofeedback combined with Kegel exercise on the prognosis of patients with pelvic floor dysfunction (PFD). **Methods** A total of 120 patients with early postpartum pelvic floor dysfunction treated in Zhaoqing Gaoyao District People's Hospital from August 2019 to December 2020 were selected as the research objects. They were randomly divided into an observation group and a control group, with 60 patients in each group. The control group received Kegel exercise training, and the observation group received pelvic floor neuromuscular electrical stimulation biofeedback combined with Kegel exercise training. The curative effect at 6 months after treatment, muscle fiber strength score, pelvic floor dysfunction score (PFDI-20), pelvic floor function impact score (PFIQ-7), urodynamics [urination time (VT), maximum urethral pressure (MUP), maximum urinary flow rate (Q_{max})] before treatment and at 6 months after treatment, and the incidence of complications were compared between the two groups. **Results** Six months after treatment, the total effective rate of the observation group was 98.33%, significantly higher than 80.00% of the control group ($P<0.05$). Six months after treatment, the muscle strength scores of class I and class II muscle fibers in the observation group were (10.33±0.29) points

通讯作者:刘华, E-mail:liuhuafu@126.com

[8] WAGNER FF, FROHMAJER A, FLEGEL WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans [J]. BMC Genet, 2001, 2: 10.

[9] 吕蓉. 安徽地区 RHD(-)个体 D 基因外显子多态性检测[J]. 安徽医学, 2008, 29(3): 251-253, 258.

[10] 叶健忠, 杨向萍, 蔡于旭, 等. 海南汉族 RhD 阴性个体 RHD 基因研究[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(2): 97-100.

[11] 苏宇清, 吴国光, 邵超鹏. 中国人 RhD 阴性个体中 D 基因多态性的研究[J]. 临床输血与检验, 2003, 5(2): 91-94.

[12] WAGNER J, KRMCZI GF, BUCHTA C, et al. Anti-D immunization by DEL.Red blood cells [J]. Transfusion, 2005, 45(4): 520-526.

[13] 邵超鹏, 苏宇清, 吴国光, 等. 中国人真实 RhD 阴性个体和 RhDel 型 RHD 基因研究[J]. 华中科技大学报(医学版), 2002, 31(5): 501-504.

[14] GASSNER C, DOESCHER A, DRNOVSEK TD, et al. Presence of RHD inserologically D-,C/E + individuals: a European multicenter study [J]. Transfusion, 2005, 45(4): 527-538.

[15] WAGNER T, KONTDC GF, BUCHTA C, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells [J]. Transfusion, 2005, 45(4): 520-526.

[16] YASUDA H, OHTO H, SAKTUNA S, et al. Secondary anti-D immunization by Del red Blood cells [J]. Transfusion, 2005, 45(4): 1581-1584.

(收稿日期:2021-12-11)