

RH 亚型案例报道专刊

2021 年 1 月

编者导读:

Rh 血型系统是最具多态性和复杂性的血型系统, 目前共发现 62 个抗原, 其中 D、C、c、E 和 e 等抗原是与临床密切相关的抗原。

根据红细胞表面是否表达 D 抗原将 Rh 血型分为 RhD 阳性和 RhD 阴性。除此之外, 还有一部分个体的 D 抗原在红细胞表面表达异常, 现已统称为 D 变异型, 主要包括弱 D (weak D)、部分 D (partial D)、放散 D (Del) 等表型。目前已确认的 D 变异型至少 450 种, 已知有 30 余种可产生抗 D。为避免在血清学上 RhD 变异体被误定为 RhD 阳性或 RhD 阴性, 采用分子生物学技术鉴定 D 变异型变得越来越重要。

与 RhD 抗原类似, RhC/c/E/e 抗原也存在弱表达及部分型等变异型, 但对 RhC/c/E/e 抗原及其编码基因的研究远少于 RhD 抗原及 RHD 基因, 目前已报道的 RHCE 等位基因约 150 种, 远少于 RHD 等位基因。由于 RhC/c/E/e 抗原具有较强的免疫原性, 且中国人群中的抗-E 发生频率相当高, 为更好提升临床输血安全, 对 RHCE 基因及 RhC/c/E/e 抗原开展深入研究是非常重要的工作。

Rh null 是一种罕见的表型, 特征是红细胞上失去所有 Rh 抗原的表达。Rh null 表型个体可能表现出不同严重程度慢性代偿性溶血性贫血, 伴有口形红细胞增多症。根据不同的遗传机制, 将 Rh null 分为两种类型: 调节型和无效型。调节型是由 RHAG 基因突变引起的, 更为常见。一个功能性的 RhAG 对于 Rh 抗原的表达和 Rh 蛋白在红细胞膜上的正确组装是必要的。所有的 RHAG 基因的分子缺陷都被证实是有害的, 可能导致 Rh null 表型。因此, 尽管 RHAG 基因不属于 Rh 血型编码基因, 但因其突变会引起 RhD 表达缺陷, 故我们也将列入 RH 亚型这一期期刊。

本月期刊检索了近 5 年国内公开报道的 RH 亚型多篇优秀文献, 就中国人群存在的 RH 亚型种类, 产生抗体情况及对应输血策略进行归纳汇总, 以便阅读, 在此郑重感谢所有文章作者所做出的努力及贡献。编者仅为收录方便学习, 无观点诱导及评判, 亦无商业目的。

共计 16 篇文献, 加上 4 篇往期期刊文献 (详见附表), 主要内容如下:

- 1、RH 亚型 25 种, 其中, RHD 基因变异 15 种 (c.711delC、c.26T>G、c.208C>T、c.210_211insG、c.1022T>A、c.689G>A、c.1148T>C、c.341G>A、c.662C>G、c.496C>G、c.17C>T、c.29G>C、c.1212C>A、c.1184C>T、c.739 G>C); RHCE 基因变异 4 种 (c.48G>C、IVS4+29A>C、c.308C>T、c.1059G>A); RHD 和 RHCE 融合基因 2 种 (RHCE-D(4)-CE、RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)); RHAG 基因变异 4 种 (c.532delG、c.540C>A、c.236G>A、c.572G>A)。
- 2、明确产生抗体的亚型样本 3 例: RHCE IVS4+29A>C 产生抗 C, RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)产生抗 Hr0, RHCE c.1059G>A 产生抗 e。
- 3、提出对应输血策略 8 篇: 3、6、7、10、11、14、15、16

目录

1 《Rh 血型系统遗传分子学研究进展》	3
2 《RhC 弱表达变异型标本同时发生 RHCE、RHD 基因突变 1 例》	5
3 《基因分型技术对 1 例 PNH 患者抗-C 同种抗体合并抗-f 类同种自身抗体的辅助鉴定》	6
4 《A new RhD variant allele is caused by a RhD 26 T > G mutation in a Chinese Han woman with a weak D phenotype》	9
5 《A new RHD variant allele in Exon 2 identified in a Chinese individual》	10
6 《新的 Rh 血型弱 D 变异体一例》	10
7 《RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)基因引起 RhD--表型 1 例》	11
8 《A novel nucleotide deletion in RHAG allele identified in a Chinese Rh null individual》	12
9 《Identification of a novel missense mutation (p.Ser230Asn) in RHD allele in a Chinese individual with partial D phenotype》	13
10 《中国汉族人群中发现一例 Rh 血型弱 D59 型》	13
11 《弱 D25 变异型血型抗原表位分析及输血策略探讨》	15
12 《A new RHD variant allele is caused by a RHD 662C>G mutation》	16
13 《A novel nonsense mutation in RHAG gene responsible for Rhnull phenotype in a Chinese individual》	16
14 《Identification of a novel frequent RHCE*ce308T variant allele in Chinese D- individuals, resulting in a C+c- phenotype》	17
15 《A serologic weakly reactive RhD is caused by a c.496C>G (p.His166Asp) in RHD gene》	19
16 《四例 Rh 弱 D 变异体的分子遗传学分析》	20

RH 亚型专刊

(编辑: 艾丽萍, 张悦, 陈悦妍)

1 《Rh 血型系统遗传分子学研究进展》

作者: 范佳鸣 曾艳 张建军

来源: 中国优生与遗传杂志,2020,28(2):267-269,131.

摘要: Rh 血型系统是最具复杂性和多态性的红细胞血型系统, 在临床仅次于 ABO 血型。在 Rh 血型系统中 D 抗原免疫性最强, 由于 RhD 基因易突变导致 D 抗原存在多种变异体, 突变的 D 抗原会导致血清学反应出现不确定或者矛盾的结果, 引起输血性溶血反应、新生儿溶血病等, 因此鉴定 RhD 阴性基因型在临床输血和产前诊断中具有非常重要的临床意义。随着分子技术的发展, 对 Rh 抗原分子机理的深入研究, 分子鉴定各种 D 变异体已成为热点, 本文就 Rh 基因结构、Rh 血型基因分型、分子检测方法等研究进展进行简要综述。

Rh 血型系统是临床最重要的血型系统之一, 最具复杂和多态性。目前已知由 49 个明确的血型抗原组成, 其中 D 抗原为 Rh 血型系统中最重要抗原, 抗原不匹配可直接导致新生儿溶血、溶血性输血反应的发生。由于 RhD 基因存在许多突变, 会导致血清学反应出现不确定或者矛盾的结果, 因此确定其基因型非常重要。在产前诊断中, 若能对 Rh (D) 阴性的孕产妇进行准确分型鉴定, 在第一胎预先做好筛查, 就能有效的预防新生儿溶血病 (Rh-HDN) 的发生。现将 Rh 血型系统的分子学研究进展综述如下。

1 Rh 基因概况

Rh 血型系统抗原位于 1p36.1-p34.3, 主要由两个高度同源的 RhD 基因和 RhCE 基因编码组成, 同源性高达 96%~97%, 呈紧密串联、方向相反排列。这两个基因序列都含有 10 个外显子, RhD 基因编码 RhD 多肽, RhCE 基因编码 RhCE 多肽, 两条多肽链结构相似, 均由 417 个氨基酸残基组成, 其中仅 35 个氨基酸不同, 12 个跨膜结构形成 6 个细胞外环, 细胞外环上具有 Rh 抗原位点。RhD 和 RhCE 基因之间存在一个独立的 SMP1 基因, 推测与这两个基因的转录有关, 又有研究推测 SMP1 基因的多态性与特殊 Rh 单体型紧密连锁。RhD 基因的上下游各有一个 Rhesus 盒, Rhesus 盒可能与 RhD 和 RhCE 基因表达调控相关。Okuda 等人在研究中还发现 RhD 和 RhCE 基因之间还存在数个 Alu 重复序列和 CpG 岛。

2 RhD 血型变异

随着分子技术的发展尤其是 RhD 基因的成功克隆、测序, Rh 阴性 RhD 等位基因缺失机理明确, 在中国人群中血清学确定的 Rh (D) 阴性个体中仅约 70% 为“真阴性”, 存在许多“假阴性”即 D 变异体。D 变异体具有丰富的多态性, 且不同种族存在较大差异。D 变异体个体能和真阴性个体产生同种免疫风险, 而且不同的 D 变异体孕妇对妊娠阳性胎儿产生的免疫反应也是不同, 因此对 RhD 基因进行分子学鉴定非常重要。

2.1 RhD 基因全缺失

高加索人的 RhD 阴性表现型几乎全部都是由两个 1 号同源染色体上对应 RhD 等位基因同时缺失所致, 在中国 RhD 初筛阴性人群中也是主要的发生机制, 约占 70% 左右, 血清学检测表现为盐水初筛法和间接抗球蛋白试验 (IAT) 均为阴性。分子机制是由于 RhD 基因上下游的 Rhesus 盒高度同源, 在 Rhesus 盒的 5701 和 7163 之间存在 463bp 的同等区, 断裂点区域位于该同等区内, 产生一个杂交 Rhesus 盒, 上下游之间的 RhD 基因完全缺失。

Rh (D) 阴性个体通过输血或妊娠产生抗-D 抗体, 该抗体可通过胎盘导致胎儿溶血引起 HDN, 且抗体的效价与妊娠次数呈正相关。有研究对妊娠免疫产生抗-D 与未产生抗-D 个体中 RhD 基因外显子全缺失、部分缺失例数进行了统计学比较分析, 结论得到妊娠免疫产生的抗-D 抗体与 RhD 基因外显子不完整性呈正相关, 全缺失型在临床引起的病情也较为严重。有相关文献资料显示高浓度的抗体从产生到消失可持续约两年半之久, 但是即便抗体消失, 体内致敏细胞一旦再次接触少量抗原就能触发联级反应产生大量抗体, 导致胎儿溶血。

2.2 D 变异体

D 变异体有很多种类, 如部分 D、弱 D、D 放散 (DEL)、D—型等。根据抗原位点数量是否改变又可分为量变和质变两种, 量变是指 D 抗原位点增加或减少但抗原表位数目基本不变, 如增加的有 D—型, 减少的有弱 D、DEL 型; 质变是指抗原性和数量都发生改变, 如部分 D 型。D 抗原的表达强弱不一, 其中 DEL 最弱。

2.2.1 部分 D

部分 D (partial D) 即红细胞膜上一个或多个 Rh (D) 抗原表位缺失, 是引起同种输血反应和新生儿溶血病最常见

的变异体，血清学检测表现为盐水初筛法为阴性，间接抗球蛋白试验（IAT）为阳性。其分子形成机制主要分为 RhD-CE-D 融合等位基因形成、细胞外环的错义突变和散在的错义突变三类。大部分的部分 D 是以第一类由于 RhD 基因中的一部分基因被 RhCE 基因替换形成融合基因产生为主，称为 D 类别。由于 RhD 和 RhCE 基因紧密连锁高度同源性且方向相反，易形成发卡结构发生交换重组，并且在遗传学上该融合基因可以稳定遗传。部分 D 分为 6 类，用 D II ~ D VII 表示。D VI 是白种人中最重要表型，在中国人群中最常见的部分 D 以 RhD-CE (2-9) -D 等位基因为主，其次 D VI III 型（RhD-CE (3-6) -D）、D va (hus) 型也较为常见。

部分 D 的氨基酸变异主要位置是在胞外环区域，由于缺乏一个或数个表位，作为受体当输入 Rh (D) 阳性血或者妊娠 Rh (D) 阳性胎儿，就会针对自身缺乏的这部分表位产生抗体因而导致溶血，而且有文献报道孕妇可产生高效价的同种抗-D 抗体。作为供体则会导致 Rh 阴性受体产生抗-D 或者体内抗体效价增高，因此部分 D 应视作供血阳性而受血阴性原则对待。

D 抗原位点缺失数目在不同个体间会存在差异，大部分的部分 D 表型为弱 D 特性，但有极少部分会出现不同结果。根据李丹等人的报道，因为使用的初筛试剂为高效价的单克隆抗体，使得部分 D 表型个体其盐水初筛实验呈阳性反应，结果误判为 Rh (D) 阳性，当患者妊娠阳性胎儿时，会导致抗体产生而被临床忽视，因此必须高度重视。

2.2.2 弱 D

血清学检测表现为盐水初筛法为阴性，IAT 为阳性，其显著特征是红细胞表面 RhD 抗原位点的显著性减少。弱 D 的分子机制已明确，是由于 RhD 基因编码区域发生碱基突变，氨基酸替换区域发生在跨膜区或胞质区，从而影响蛋白有效插入红细胞膜，导致红细胞表面 RhD 抗原位点的显著性减少。根据 Wanger 等人的研究，弱 D 表型个体的抗原密度远远小于正常 D 阳性表型个体，约为 70~4000 个。弱 D 型种类很多，目前 GenBank 记录和文献报道的已有近百种，但在中国人中发现的种类较少，主要有 21 种，其中以弱 D15 型为主，约占弱 D 型个体中的 80% 以上。弱 D15 型是由于 RhD 基因第 6 外显子的第 845 位碱基发生 G→A 突变，使 282 位氨基酸发生 Gly→Asp 改变。

由于弱 D 型的 RhD 抗原位点属于量变而非质变，红细胞带有正常的 RhD 多肽，认为孕妇不会产生抗-D。加拿大 CBS 产前诊断的方针中提到弱 D1、弱 D2 或弱 D3 患者可以不用注射 Rh 免疫球蛋白。在国内一般也认为弱 D15 型孕妇妊娠阳性胎儿不会产生免疫反应不用注射，但随着研究的深入，有文献对弱 D15 型的安全性提出了疑问，目前国内已有文献对弱 D15 同种免疫进行了报道。周丹等人对红细胞抗原表位进行了分析，证实弱 D15 型红细胞膜 D 抗原除了数量减少外，还存在“质的变化”，即抗原表位存在缺失，有部分 D 型抗原性质，被命名为部分 D 型弱 D15 型。王满妮等人对弱 D15 型产生抗-D 的原因进行了探讨，该研究对 2 例抗-D 阳性的弱 D15 型标本同时进行了基因检测和红细胞 D 抗原表位分析，基因检测结果为弱 D15 型 845G>A 特异性突变并排除其他突变的可能，但红细胞的 D 抗原表位结果显示存在抗原表位缺失，并提示抗原性的改变可能与空间结构的改变相关。因此在临床检测中对弱 D15 型基因检测的同时对红细胞抗原表位进行检测，可以更加准确地指导临床孕妇免疫球蛋白的输注使用。

为保证临床安全，中国人弱 D 型的输血策略应为：作为受血者弱 D 型应视作 Rh (D) 阴性，作为供血者应视作 Rh (D) 阳性对待。

2.2.3 D 放散 (DEL 型)

DEL 是一种极弱的 D 变异体，与弱 D 型相比较，相同的是 D 抗原表位不存在缺失，不同的是 D 抗原数量比弱 D 型还要少的多，每个红细胞上的 D 抗原分子数可能在 30 个以下。抗原表达如此之少，以至于血清学检测表现为盐水初筛法和 IAT 均为阴性，仅吸收放散试验呈阳性反应。DEL 型民族差异性较大，其中 RhD1227A (K409K) 为亚洲人特有，又称“亚洲型”，在中国 Rh 阴性人群中的比例高达 16%-26% 左右。其分子机制是由于 RhD 基因的第 9 外显子 1227 位发生 G>A 碱基突变，该等位基因碱基突变为同义突变，但是影响 mRNA 正常拼接，RhD 基因表达正常 Rh (D) 蛋白的效率降低。RhD1227A 等位基因与 Ce 单倍型密切相关，有研究证实 Ce 单倍型对弱 D 表型有抑制作用，导致红细胞上的抗原密度显著下降。

由于 DEL 型的抗原表达极少，许多国家的输血指南中将 DEL 型作为“Rh (D) 阴性”输给阴性受血者。国内也对汉族 DEL 型孕妇是否可免去抗-D 产前检查进行研究探讨，结果显示 DEL 型孕妇妊娠 Rh (D) 阳性胎儿发生抗-D 同种免疫反应的可能很小，我国 Rh (D) 汉族阴性孕妇中的 DEL 个体可免去定期的产前抗-D 检测，以及免去预防性 Rh 免疫球蛋白的使用。但是 2011 年王宝燕等人在国内首次报道了 2 例 Rh (D) 阴性患者因输入 DEL 型血液引起抗-D 效价升高，国外早几年也已经有因输注 DEL 型红细胞而产生抗-D 免疫的报道，因此 Körmöczi 等人在研究中提出了一个新的概念，将 DEL 分为 DEL 弱 D 型和 DEL 部分 D 型。2014 年陈青等人也在文献中提到将 DEL 分为完全表位和不完全表位区别对待。完全表位即 DEL 弱 D 型，可以输入 Rh (D) 阳性血液或者妊娠 Rh 阳性胎儿而不发生同种免疫；不完全表位即 DEL 部分 D 型，接受 D 抗原刺激后可引起抗-D 同种免疫产生抗体。

3 RhD 基因杂合性

在 Rh (D) 阳性表型中存在一定比例的 RhD+/RhD-杂合子, 且不同 Rh (D) 表型 (弱 D、DEL) 杂合基因类型所占的比例结果在不同地区人群中差异显著。当 Rh (D) 阴性孕妇体内产生抗体, 产前检测丈夫 RhD 基因的杂合性非常有必要。若丈夫为 Rh (D) 阳性纯合子, 则胎儿为 Rh (D) 阳性的概率为 100%, 必须在孕期采取相应的措施来预防胎儿溶血。若丈夫为 Rh (D) 阳性杂合子, 则有文献报道可以通过对孕妇外周血中胎儿游离 DNA 检测来判断胎儿的 Rh 血型。

4 Rh 血型基因分子检测方法

1991 年首次采用 Southern Blotting 技术检测 RhD 基因, 1993 年首次建立 PCR 分型方法。随着分子技术的快速发展, 出现了多种以 PCR 为基础的分子诊断技术, 常见的有: ①序列特异性引物 PCR (PCR-SSP): 根据特异性位点设计序列特异性引物, 特异性扩增某个外显子或者内含子, 是目前最常用的 Rh 血型基因分型技术之一, 也可以应用该技术来推测 RhD 基因的杂合性; ②多重链接探针扩增技术 (MLPA): 是一种针对 DNA 序列进行定性和半定量分析的技术, 该技术特异、高效, 但是仅能对已知 RhD 基因进行明确分型, 不能用于不能明确分型的标本; ③实时荧光定量 PCR: 有研究报道采用实时荧光定量 PCR 对孕妇血浆中游离胎儿 DNA 进行胎儿 RhD 基因型检测, 方法特异性好, 敏感性高, 可用于诊断和预防新生儿 Rh 溶血; ④DNA 高通量测序: 对 PCR 产物直接进行测序检测, 确定各种碱基变异位点。

综上所述, Rh 血型系统最具多态性、复杂性, 临床上用血清学方法检测出的 Rh (D) 表达减弱, 应进一步采取分子生物学方法确定其基因型, 以选择合适的输血方案, 避免稀有血液的浪费; 同时明确基因分型对于 Rh (D) 阴性的孕妇在产前预防 Rh (D) HDN 和孕期免疫球蛋白治疗有指导性意义。

2 《RhC 弱表达变异型标本同时发生 RHCE、RHD 基因突变 1 例》

作者: 李勤 王菲 郭忠慧 武云香 王晨 赵俸涌 张德梅 朱自严

来源: 中国输血杂志, 2020, 33(9):982-985.

摘要: 目的: 分析 1 例血清学 RhC 抗原弱表达标本的 RH 基因背景。方法: 标本经 RhD 阴性确认及 Rh 分型后, 抽取基因组 DNA。QRT-PCR 检测是否具有 RHD 基因, 由于该标本具有 RHD 基因, 对 RHD 和 RHCE 基因同时进行测序分析, 并对 RHD 基因进行合子型分析。结果: 标本血清学 RhC 弱表达, 同时 RhD 阴性, RHD 和 RHCE 基因同时发生突变, RHD 基因突变为 RHD*01N.16 (c.711delC; p.Val238Cysfs*8), 合子型为 RHD/-。RHCE 基因发现 2 个突变, 分别是 RHCE*01.01 (c.48G>C; p.Trp16Cys) 及 RHCE-D(4)-CE。结论: RhC/c/E/e 抗原同样具有大量变异型, RH 基因背景也相当复杂, 为进一步提升输血安全性, 开展针对 RhC/c/E/e 变异型的研究具有一定意义。

标本: 2020 年 4 月山西省 1 名女性健康献血者, 31 岁, 籍贯河南省鹿邑县, 无孕产史。Rh 分型显示 C 弱表达。

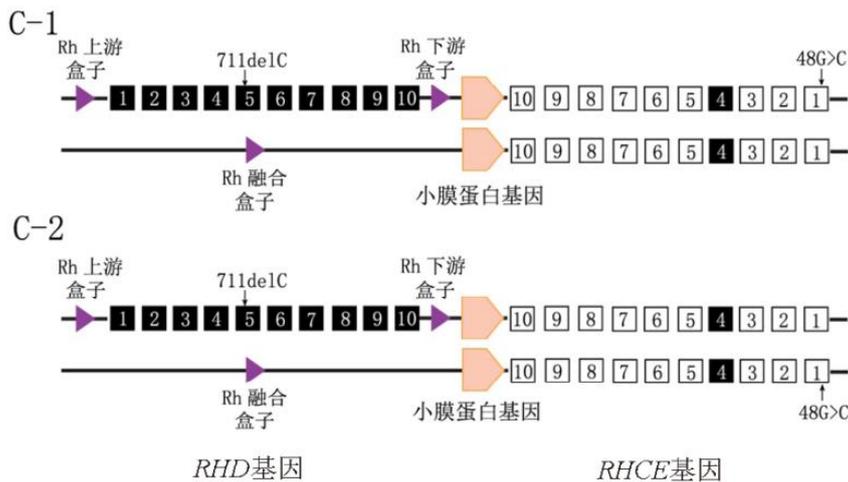
血清学结果: 该标本红悬液与 IgM 抗-C 的凝集强度为 1+, 与 IgM 抗-c, 抗-E, 抗-e 的凝集强度均为 4+, 与 IgM 抗-D 为阴性, RhD 确认试验结果为阴性。血清学结果显示该标本为 dC^vcEe。

分子生物学结果

QRT-PCR 检测 RHD 基因第 4、5、9、10 外显子。该标本 4 个外显子区域均检测到荧光信号, 提示该标本虽然血清学层面为 RhD 阴性, 但具有 RHD 基因。RHD 基因 10 个外显子的常规 PCR 结果, 显示该标本具有基本完整的 RHD 基因。

测序结果显示, 该标本具有中国人群中频率第 3 的无效 RHD 等位基因: RHD*01N.16(c.711delC; p.Val238Cysfs*8)。导致血清学 RhD 抗原阴性。RHD 合子型为 RHD/-。

使用 RHCE 特异性引物扩增, 无法扩出该标本的 RHCE 第 4-5 外显子片段, 使用 RHD 特异性上游引物配 RHCE 特异性下游引物, 扩出第 4-5 外显子片段, 提示该标本 RHCE 第 4 外显子可能被 RHD 基因取代, 可能是 RHCE-D(4)-CE。测序并使用 RHCE*ce 基因序列, 作为比对序列, 发现 RHCE 第 1 外显子存在突变: RHCE*01.01(c.48G>C; p.Trp16Cys)。该突变为杂合突变。RHCE 基因的 48、178、203、307 位 4 个核苷酸的多态性, 控制了 C/c 抗原的分型 (48G, 178C, 203A, 307C 编码 c 抗原; 而 48C, 178A, 203G, 307T 编码 C 抗原), 而 676 位这个核苷酸的多态性控制了 E/e 抗原的分型 (676C 编码 E 抗原; 676G 编码 e 抗原)。该标本是在 RHCE*ce/RHCE*cE 基因型的基础上发生了突变。在正常情况下, 该标本的血清学表型应当是 ccEe。但其基因发生突变, 即 178、203、307 均为纯合的调控 c 抗原的碱基, 而 48 位的 G>C 突变, 可能编码了少量 C 抗原, 导致该个体弱表达 C 抗原。由于缺少家系标本, 无法确定 48G>C 突变是发生在 RHCE*ce 上, 还是在 RHCE*cE 上。综合考虑 RHD 基因, 我们推测该标本可能有 4 种 RHD-RHCE 连锁型 (下图)。



图注：可能的 RHD、RHCE 基因连锁型。根据 PCR 及测序结果，该标本的 RHD 基因 1 条完全缺失，另 1 条为 711delC，该标本的 2 条 RHCE 基因同时突变，1 条为 RHCE-D(4)-CE，另 1 条 RHCE-D(4)-CE 同时伴随 48G>C；由于缺乏家系成员标本，该个体的 RHD、RHCE 基因连锁型有 4 种可能，如图 C-1，C-2 所示；图 C-1，及 C-2 均代表了 2 种可能的情况，即同时发生 RHCE-D(4)-CE 和 48G>C 突变的原始 RHCE 基因可能是 RHCE*ce，或是 RHCE*cE。
讨论

与 RhD 抗原类似，RhC/c/E/e 抗原也存在弱表达及部分型等变异型，但对 RhC/c/E/e 抗原及其编码基因的研究远少于 RhD 抗原及 RHD 基因，目前已报道的 RHCE 等位基因约 150 种，远少于 RHD 等位基因（已发现至少 450 种）。由于 RhC/c/E/e 抗原具有较强的免疫原性，且中国人群中的抗-E 发生频率相当高，为更好提升临床输血安全，对 RHCE 基因及 RhC/c/E/e 抗原开展深入研究是非常重要的工作。

该样本的 RHD 及 RHCE 基因同时具有突变位点。RHD 基因的突变，是造成中国人群 D 阴性的，发生频率位列第 3 的无效等位基因：RHD*01N.16 (c.711delC; p.Val238Cysfs*8)。而 RHCE 基因上有 2 个已经被报道过的突变，分别是 RHCE*01.01 (c.48G>C; p.Trp16Cys) 及 RHCE-D(4)-CE。RHCE-D(4)-CE 是无效基因，还是导致 RhCE 抗原弱表达，目前尚无定论。RHCE*01.01 是 1 个频率相对较高的等位基因，在各个人群中均有发现。当 RHCE*01.01 单独存在时，血清学表现为弱 e，但当 1 条 RHCE 基因上同时存在 RHCE*01.01 和其他突变时，在血清学层面弱 e、弱 C、部分 e，及部分 C 均有可能发生。因此，根据现有的结果，我们无法明确此标本是弱 C 还是部分 C，只能称呼其为 C 变异型。

分析 RhC/c/E/e 变异型的基因背景，难度要略高于研究 RhD 变异型的基因背景。首先，RHCE 基因可细分为 4 条野生型基因，分别是：RHCE*ce、RHCE*Ce、RHCE*cE 和 RHCE*CE 基因，各自编码正常的 ce、Ce、cE 和 CE 抗原。2 条 RHCE 基因两两组合，调控血清学 C/c/E/e 抗原的表达，其次，RhC/c/E/e 变异型的 2 条 RHCE 基因同时存在的，目前尚无 1 条突变，1 条完全缺失的报道；而 RhD 变异型大多数情况是，1 条 RHD 基因突变，1 条完全缺失，少部分情况是 2 条 RHD 基因同时突变。正是基于 RhC/c/E/e 变异型的基因突变的特点，如果缺乏其他家系成员的标本，也无 RNA 标本，很难明确 RHCE 突变位点到底发生在 4 种野生型 RHCE 基因的哪 1 种上。因此，本次在 RHCE 基因上发现的 2 个突变，无法做出明确定位，只是推测。此外，该标本的 RHD 基因也有突变，该突变的 RHD 基因是否对本次报道的 C 抗原弱表达起了调控作用，也需要进一步分析。

3 《基因分型技术对 1 例 PNH 患者抗-C 同种抗体合并抗-f 类同种自身抗体的辅助鉴定》

作者：孔永奎 杨乾坤 蔡晓红 宋婕 邵明 王静 王莉 吕先萍

来源：中国实验血液学杂志,2020,28(5):1740-1745.

摘要：目的：通过基因分型对 1 例有输血史的 PNH 患者疑难抗体进行鉴定。方法：采用卡式凝胶法检测患者 RH 分型，谱细胞鉴定 PNH 患者抗体特异性。在血清学鉴定困难的情况下，利用基因分型的方法排除 RH 无关表型，利用不同的 RH 表型细胞分别吸收放散后进行抗体鉴定，不同的 RH 表型细胞组合排除其它无关抗体。结果：卡式凝胶法鉴定显示 RH 分型 C 抗原存在双群，其它抗原阳性，分别进行 RHD 合子型鉴定、RHD 和 RHCE 基因测序分析。结果显示，RHD 基因型为纯合子 RHD/RHD，RHCE 基因未发现 c.122A>G 突变，排除携带有 C^w 抗原；RHCE 第 1 外显子 48G，第 5 外显子存在 676 碱基 G/C 杂合，第 2-4、6-10 外显子没有发生突变，第 4 内含子发现一个新的突变 IVS4+29A>C。因此可以判断出 RH 血型基因型为 Dce/DcE，其表型应该为 ccDEe。结合不同的 RH 表型细胞吸收放散实验最终确定患者血清中含有抗-C 同种抗体合并罕见的抗-f 类同种自身抗体，最后选择配血相合的 AB 型 ccDEE 的红细胞输注给患者，未出现输血不

良反应。结论：基因分型可以辅助用于患者血清中疑难抗体的鉴定，从而减少患者输血风险。

标本：患者女性，70岁，门诊以“白细胞升高、贫血原因待查”收入院，后住院诊断为“阵发性睡眠性血红蛋白尿症（PNH）、高血压2级”。患者既往和近期均有输血史，因贫血申请红细胞输注，行常规血型鉴定和抗体筛查。

血清学检测结果：患者标本血清呈酱油色，为防止干扰，采用手工试管法进行血型正反定型。检测结果显示，患者血型为AB型，RHD阳性，RH分型C抗原存在双群，其它为阳性。RH分型结果见图1，可明显观察到C抗原双群且有“拖带”现象。毛细管试验后抗-C孔仍有部分“拖带”干扰判断，确切的RH分型可以通过进一步的分子生物学检测来判断。抗人球蛋白试验与抗体的鉴定患者自身红细胞盐水立即离心（IS）不凝集，但DAT反应阳性。这表明，患者血清中可能存在IgG抗体。抗体筛查阳性（表1），根据10组谱细胞抗体鉴定结果（表2），推测患者血清中可能存在同种抗体、类抗体或复合抗体。

表1 患者血清抗体筛查

Screening cells	RH phenotypes	Liss/Coombs card
I	R ₁ R ₁ (CCDee)	4+
II	R ₂ R ₂ (ccDEE)	0
III	Rr(ccdee)	2+
Auto control	unidentified	1+s

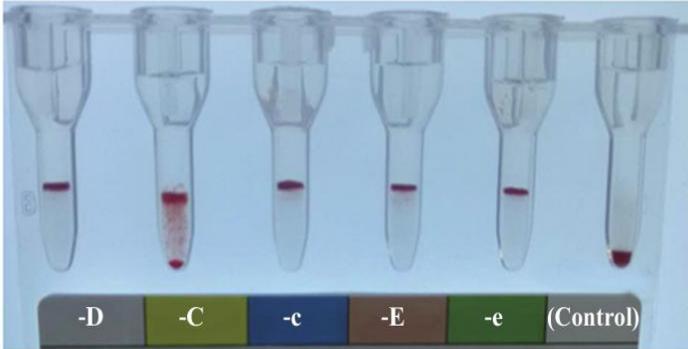


图1 微柱凝胶卡内患者RH表型的反应模式。凝胶柱中患者红细胞与抗C反应时出现双群，与抗D、抗c、抗E和抗e反应结果均为4+凝集；对照结果显示患者红细胞在凝胶柱中没有自凝集。

表2 患者血清抗体鉴定

Panel cells	Rh-hr					RH phenotypes	Antibody identification	
	D	C	E	c	e		IS	IAT
1	+	+	0	0	+	CCDee	0	2+
2	+	+	0	0	+	CCDee	0	2+
3	+	+	+	+	+	CcDEe	0	2+
4	+	+	+	+	+	CcDEe	0	2+
5	+	0	+	+	+	ccDEe	0	2+
6	+	+	+	+	+	CcDEe	0	2+
7	0	+	0	+	+	Ccdee	0	3+
8	+	0	+	+	0	ccDEE	0	0
9	0	0	0	+	+	ccdee	0	2+
10	+	+	0	0	+	CCDee	0	2+

RH基因型的分析

经酶切纯化后的PCR产物直接作为测序模板，按照BigDye试剂盒（ABI公司）说明书操作。采用文献中PCR测序引物，ABI 3730进行测序。对照通过对100例健康体检者测序确定在相应位点有无突变以排除多态性。采用DNAMAN和Chromas Pro软件进行序列的拼接和比对，RHD和RHCE等位基因的命名方法参照ISBT血型抗原等位基因数据库。

RHD基因测序结果与RHD*01相比，10个外显子无缺失、杂合突变，结合双管PCR法确定两条链是纯合子RHD(+)。RHCE基因采用直接测序法测定1-10外显子，与RHCE*01相比，第1外显子48G，第5外显子存在676碱基G/C杂合，第2-4、6-10外显子没有发生突变，第4内含子发现一个新的突变IVS4+29A>C，在其它100例健康对照测序中未发现该内含子突变，此外第1外显子为122A，未出现c.122A>G突变，所以排除患者携带有C^w抗原。由此可以判断RH血

型基因型为 Dce/DcE，其表型应为 ccDEe，患者单倍型 Dce 含有顺式 ce 抗原，即 f 抗原。

吸收之后抗体的鉴定：患者血清先用 R1R1 和 rr 联合吸收后与 CC^wDee 不反应，排除抗-C^w。随后将患者血清分成 2 份：一份用 O 型 R1R1 细胞吸收，然后上清与 10 组谱细胞的 5、7、9 反应阳性，分析 5、7、9 谱细胞 RH 表型可知，其 RHCE 单倍型均含有顺式 ce，因此怀疑是罕见的抗-f 类同种自身抗体（自身分型为 ccDEe，含有顺式 ce）；另外 1 份采用 rr 或与患者分型相一致的 ccDEe 吸收患者血清，吸收后的血清与 10 组谱细胞的 1、2、3、4、6、7、10 反应阳性，这说明患者血清中含有抗-C 同种抗体。将 R1R1 和 rr 吸收后的红细胞、自身细胞分别进行放散，放散液与相应的谱细胞进行反应，其中 rr 细胞放散液与含有顺式 ce 的细胞呈现阳性反应，与 R1R1 和 R2R2 细胞不反应，这说明其血清中除了含有抗-C 同种抗体外，还含有罕见的抗-f 类同种自身抗体。表 3 显示利用 sanquin 谱细胞验证患者血清中的抗体，吸收后上清液、R1R1 和 rr 细胞放散液、自身细胞放散液分别与代表性的 sanquin 谱细胞反应的格局。

表 3 患者血清经特异性 RH 细胞吸收放散后不同表型 RH 细胞的反应模式

Method	Wiener	Race-Fish	Supernant after absorption	CCDee elute	ccdee elute	Autocontrol absorption	Antibody identification
Combined absorption	R ₁ R ₁ ^w	CC ^w Dee	-	+	-	+	anti-C, No anti-C ^w
CCDee absorption	R ₀ r	cDe/cde	+	-	+	+	anti-f
	r' r	Cde/cde	+	+	+	+	anti-f
	rr	cde/cde	+	-	+	+	anti-f
ccdee absorption	R ₁ R ₁	CCDee	+	+	-	-	anti-C
	R ₂ R ₂	ccDEE	-	-	-	-	anti-C

两步吸收放散法排除抗-G：由于同种抗-C 经常与抗-G 同时出现，因此采用 ccdee 细胞先将抗-f 类同种自身抗体吸收掉。第一步用 CCDee (D+C+G+) 细胞将抗-C 和抗-G 吸收掉，然后再将其放散，放散液中含有抗-C 和抗-G；第二步用 ccDee (D+C+G+) 吸收第一步的放散液，放散后未获得抗-G，所以同种抗体仅含有抗-C。

交叉配血：抗-C 同种抗体合并抗-f 类同种自身抗体必须输注 C 抗原、ce 复合抗原均阴性的血液，因此交叉配血时筛选 AB 型 ccDEE 的悬浮红细胞，而不宜选用与自身分型相同的 ccDEe 血液。盐水法、凝聚胺法、抗人球蛋白卡式法显示 ccDEE 红细胞与患者血清交叉配血主侧为阴性，输注后患者未出现输血不良反应。为了减轻患者体内抗体对红细胞造成的致敏和溶血反应，推荐临床上积极治疗 PNH 原发病，同时应用激素来减轻抗体对红细胞的破坏。

讨论

抗体筛查试验操作时若出现抗体筛查方法选择失误、谱细胞抗原杂合或缺失、复杂复合抗体，经常会漏检或错报有临床意义的抗体，给患者输血带来很大的风险。抗体筛查结合基因型分析可以用来辅助检出未知的有临床意义的抗体。

大多数情况下，由于机体存在免疫监视、免疫自稳和免疫耐受的原因，患者体内不会自发产生同种抗体和自身抗体。本研究中，抗体筛查阳性的患者诊断为 PNH，患者在疾病迁延过程中需要反复多次输血，很容易产生同种抗体甚至复合抗原抗体。因此，输血科对于既往有输血史的 PNH 患者的抗体筛查和抗体鉴定需要慎重对待。

本研究通过对患者 RH 基因型的精准分析，综合多次吸收放散试验来进行抗体鉴定，在患者血清中发现了抗-C 同种抗体和比较罕见的抗-f 类同种自身抗体，同时测序分析也发现 1 个新的第 4 内含子 IVS4+29A>C 突变。有研究认为，中国人 RHD 和 RHCE 不同之处不仅在于编码区，也存在非编码区的第 4 内含子，2 者在长度上存在着最显著的差别，其长度分别为 426 和 1078bp，但由于该内含子新突变处于 29 位，相对远离 GU--AG 剪切位点。因此，其对 RHCE 基因的转录翻译是否有影响还有待进一步研究。从表 2 可以看出，在初次进行抗体鉴定时，按照反应格局判断应为抗-e，这明显与图 1 中 RH 分型格局中有 e 抗原相矛盾，故怀疑是类-e。类抗体最早由 Issitt 等报道，其最明显的特征是除了能与相应抗原阳性的细胞出现较强反应，也能与相应抗原阴性的细胞出现弱反应或阴性反应；考虑到患者有输血史，毛细管试验又无法精确分离供受者细胞，此时为了更准确的弄清楚 C 抗原双群到底是由于红细胞输注引入的“外来抗原”，还是 C 抗原变异造成的，同时为了准确鉴定患者体内的抗体，有必要弄清楚患者自身准确的 RH 分型，故本研究采用分子生物学试验和基因测序以明确患者自身准确的 RH 基因型。结果显示，该患者基因型是 Dce/DcE，其表型为 ccDEe。有报道显示，C^w 抗原频率较低，常与 Dce 抗原同时产生，但 C^w+红细胞常伴有 C 抗原的减弱从而造成与抗-C 抗体的反应性降低。从测序结果来看，编码区不存在 122A>G 突变，也排除了患者自身存在 C^w 抗原的可能性，由此推测 RH 分型卡中 C 抗原双群是由于患者输入的异体血中含有 C 抗原所致。接下来将患者血清分别用 O 型 R1R1 细胞和 rr 细胞吸收，鉴定结果参见表 3，从中不难判断患者血清中除了含有抗-C 同种抗体外，还含有罕见的抗-f 类同种自身抗体。由于

抗-C 常伴有抗-G 的产生, 为了验证患者血清中是否含有抗-G, 先将抗-f 类同种自身抗体吸收后再采用 2 步吸收放散法, 从而证实患者血清中不含抗-G 而仅含抗-C 同种抗体。

抗-f 抗体是 1953 年由 Rosenfield 等在表现型为 DCe/DcE 多次输血的血友病患者体内发现, 随后的 1954 年 Jones 等在 Rosenfield 报道的基础上又发现了抗-f 可以同时伴随抗-c 和抗-e 出现, 后来陆续有抗-f 作为同种抗体的相关报道。庄光艳等分析了 6 例抗筛阳性的不含 ce 抗原的患者血清, 发现 6 例患者血清中均含有抗-f 同种抗体, 其中 2 例同时存在抗-e 和抗-c。由此认为, 红细胞上缺乏 Rh 复合抗原 ce 的患者经过输血或妊娠免疫, 可能产生针对该复合抗原的抗-f, 而抗-f 与单纯的 c 和 e 抗原均无反应性, 且抗-f 可能和 Rh 系统的抗-c 或抗-e 同时存在。一般情况下, 当体内存在同种抗体时, 只需输入相应抗原阴性的血液即可, 但本例患者血清中同时存在抗-C 和罕见的抗-f 类同种自身抗体, 因此推荐采用 ccDEE 分型的 AB 型红细胞而不用与其自身分型相同的 ccDEe 分型的红细胞给患者输注, 从而减轻抗-f 类同种自身抗体对患者红细胞的破坏。

综上所述, 对于多次反复输血的患者一方面要加强 RHCE 抗原的检测, 避免引入不必要的 RHCE 抗原从而使患者产生免疫; 另一方面, 在分析抗体鉴定结果时要考虑到 RHCE 复合抗原抗体和 RH 系统类抗体的可能性, 当结果不一致时要从多方面分析其原因, 不能仅凭 RH 表型分析就认定患者红细胞上存在某抗原, 其血浆中就不应该存在相应抗体的“阴性排除法”原则, 如此可能会漏检有临床意义的复合抗原抗体和 (或) 类抗体, 对于抗体鉴定困难的血清, 必要时可加做受者基因分型来辅助抗体鉴定, 做到“精准输血”, 从而减少患者的输血风险。

4 《A new RhD variant allele is caused by a RhD 26 T > G mutation in a Chinese Han woman with a weak D phenotype》

《一个新的 RhD 等位基因是由一个弱 D 表型的中国汉族妇女的 RhD 26 T>G 突变引起的》

作者: Qian C, Li Q, Yuan C, Bao Y, Yu S, Li S, Wang Y, Tao Z, Zhong J.

来源: Transfusion. 2019 Apr;59(4):1400-1401.

样本: 一名 66 岁中国汉族妇女

结果: D 血型检测显示与 Bioxun 公司 ABO/RhD 血型测试卡呈非常弱阳性反应, 与 Jiangsu Libo 公司 ABO/D 血型测试卡呈强阳性反应, 与上海血液生物医药公司 D (IgM) 血液鉴定试剂呈弱凝集。CE 血清型为 CCee。患者血浆不规则抗体筛查为阴性。样本与 D-screen 鉴定部分 D 试剂盒(DIAGAST)的反应性见表 1。检测结果显示, 样本可能为 D 变异型。RhD 合子型检测证实只有一个 RhD 等位基因, 为杂合子(RhD+/RhD-)。外显子测序显示 RhD 基因第 1 外显子第 26 位 T>G 突变, 导致 p.Val9Gly。

讨论: 该突变与弱 D 26 型等位基因核苷酸突变发生的位置一致(c.26 T > A, p.Val9Asp)。但是, 核酸和蛋白质的取代是不同的。这种弱 D 表型主要是由 RhD 基因的单核苷酸突变造成的, 突变编码的氨基酸变化预计位于 RhD 胞内域, 而不是红细胞外表面。突变可能干扰膜整合, 从而影响红细胞跨膜区中 D 蛋白的表达效率, 表现为弱 D 抗原表型。这种氨基酸变化在 Single Nucleotide Polymorphism 数据库和 Exome Aggregation Consortium 数据库中未见报道。因此, 将该 RhD 新等位基因的核苷酸序列数据提交到 GenBank, 序列号为 MH593379。

表 1 样本与 D-screen 鉴定部分 D 试剂盒的反应性

Anti-D clone	Immunoglobulin class*	Conditions	RT/AHG
HM16	IgM	Saline tube test, RT	O
HM16	IgG	Saline tube test, AHG	3+
P3 × 61	IgM	Saline tube test, RT	O
P3 × 35	IgG	Saline tube test, AHG	3+
P3X21211F1	IgM	Saline tube test, RT	O
P3X21223B10	IgM	Saline tube test, RT	O
P3 × 241	IgG	Saline tube test, AHG	3+
P3 × 249	IgG	Saline tube test, AHG	3+
P3 × 290	IgG	Saline tube test, AHG	3+

* 对于 IgM/IgG 试剂, 盐水法试验后还需进行抗人球蛋白(AHG)法试验: 洗涤 3 次后加入 AHG, 短暂离心, 第二次读结果。RT: 室温。

5 《A new RHD variant allele in Exon 2 identified in a Chinese individual》

《在 1 例中国个体中发现一个外显子 2 中的新 RHD 变异等位基因》

作者: Zhu Y, Feng Z, Lyu H, Jiao S, Hu B.

来源: Transfusion. 2019 Feb;59(2):791-792.

样本: 来自一名中国北方汉族男性献血者。

血清学结果: 使用细胞离心机采用两种不同单克隆 IgM 抗 D 进行盐水试管分型试验。验证试验使用微柱凝胶卡采用两种不同单克隆 IgG 抗 D 人工进行 IAT。不同抗 D 的血清学检测结果均为阴性。CE 表型为 ccee。因为我们之前的数据显示约 13% 的 D 阴性表型实际上是 Del 变异体, 所以还进行了 D 抗原吸收放散试验和分子学基因分型。用多克隆抗体进行 D 吸收放散试验, 证实为 D 阴性表型。

分子生物学结果: PCR-SSP 结果显示存在全部 10 个外显子。PCR-RFLP 测定 RHD 合子型, 证实该献血者只有一个 RHD 等位基因, 即杂合子 (RHD+/RHD-)。进一步 DNA 测序在 RHD 基因的第 2 外显子中发现一个新的 c.208C>T 突变和 c.210_211insG (1:25284632, GRCh38.p7)。克隆测序进一步证实了这一结果。

讨论: c.208C>T 突变诱导了 D 蛋白中的 p.Arg70Trp。预测 c.210_211insG 突变会引起移码形成一个终止密码子, 编码一个截断的 158 个氨基酸的蛋白 (p.R71EfsTer88)。因此, 预测为 D-表型。在 RHD 基因中未检测到其他核苷酸的变化。该等位基因此前未被报道 (dbSNP 和 ExAC 数据库), 已提交到 GenBank, 序列号为 MF488716 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF488716>)。DNA 测序有助于检测 RHD 基因罕见突变。

6 《新的 Rh 血型弱 D 变异体一例》

作者: 贺云蕾 俞露 许德义 郭雯玉 邓刚

来源: 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(7):731-733.

摘要: 目的: 鉴定并确认在中国人中发现 1 例新的弱 D 型。方法: 对 1 例从宁波市中心血站无偿献血者中筛查出的 RhD 抗原弱表达标本, 应用常规血清学试剂对其进行 RhCE 分型, 应用 D-screen 试剂盒分析其 RhD 抗原表位。应用序列特异性引物聚合酶链反应检测 RHD 基因合子型, 并对 RHD 基因全部外显子及邻近内含子区域进行测序分析。结果: 在该献血者中发现了一种新的 RHD 等位基因: RHD (1022T>A), 其 D 抗原表位检测结果与弱 D 型血清学特征一致。结论: 在中国人群中发现 1 种新的弱 D 等位基因。

对象: 本例为宁波市中心血站的无偿献血者, 男性, 28 岁, 汉族, O 型。在 RhD 血型鉴定中, 经 RhD 阴性确认实验, 发现为 D 抗原弱表现型。

Rh 表型: 该献血者 D 抗原的常规盐水法检测 (IgM 型抗-D 试剂) 表现为弱阳性 (+), 间接抗人球法 (IAT) 检测结果也为弱阳性: 1+ (IgG 型抗-D 试剂)、1+ (IgM/IgG 抗-D 试剂)。Rh 其他抗原盐水法检测结果为 C+c+E-e+, 即 Ccee 表型。

RHD 基因分析结果: 经 RHD 全部外显子及其邻近内含子区域测序 (上海桑尼测序有限公司), 仅在第 7 外显子第 1022 位发现 T>A 纯合突变导致第 341 位氨基酸被置换 (Ile341Asn)。检索 GenBank, dbRBC 及 RhesusBase 数据库未发现该变异序列, 提交该弱 D 新等位基因至 NCBI GenBank 数据库, 获得序列号 KT377957。PCR-SSP 检测献血者标本是否存在 RHD 基因缺失, 结果为杂合 RHD 基因型 (即 RHD+/RHD-), 与测序结果吻合。

RhD 抗原表位分析: 用 D-screen (Diagast, 法国) 中各个抗-D 单克隆抗体分析该献血者 RhD 抗原表位分布, 其中 D 抗原表位参考 Scott 命名, 见表 1。该检测结果提示弱 D (1022T>A) 的 D 抗原表位无明显缺失, 主要表现为 D 抗原分子数量显著下降。

表 1 RhD 抗原表位

克隆株	HM10	HM16	P3 * 61	P3 * 35	P3 * 212 11 F1	P3 * 212 23 B10	P3 * 241	P3 * 249	P3 * 290
表位	6.6	6.4	6.4	5.4	8.2	9.1	5.4	2.1	3.1
亚型	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgM	IgG	IgG	IgG
弱 D(1022T>A)	+	2+	+	2+	+	+	2+	2+	2+

讨论

目前共发现 100 余种弱 D 型变异体, 其中绝大多数在白人检出, 中国人群中发现的弱 D 型种类较少, 最常见的为弱 D 型 15。白人中弱 D 的频率约为 0.2%~1%, 而中国人中弱 D 的频率仅约为 0.01%, 同时其等位基因组成和频率也

与白人区别较大。弱 D 型主要由 RhD 蛋白的跨膜区或胞内区的氨基酸替换影响 RhD 蛋白插入膜的效率造成，通常表现为 RhD 蛋白抗原位点减少，但抗原表位不变。正常 D 阳性个体红细胞表面的抗原数约为 10000~30000，而弱 D 型个体红细胞表面的抗原分子数量远小于正常 D 抗原密度，仅有数十个到数千个不等。弱 D 型主要由错义突变引起，但也发现少量弱 D 型个体具有不同的分子机制，如 Fichou 等报道的 1 例 RhD 蛋白末尾 8 个氨基酸被另外 4 个氨基酸取代导致的弱 D 表型，Le Marechal 等报道的 1219 位缺失 6 个核苷酸造成的弱 D60 (407delFW)，以及 Ogasawara 报道的第 960 位核苷酸同义突变 (c.960G>A) 但引起剪接异常的弱 D 表型。

我们此次在中国人中发现的新弱 D (1022T>A)，其突变位于 RhD 蛋白跨膜区，符合弱 D 的定义，血清学表现也与弱 D 一致。弱 D (1022T>A) 的突变位于第 7 外显子，编码第 341 个氨基酸，该氨基酸替换位于 RhD 蛋白第 11 次跨膜区，跨膜区的突变可能引起 RhD 蛋白整合至红细胞膜时蛋白折叠异常，干扰 RhD 蛋白整合至细胞膜，从而影响 D 蛋白锚定至细胞骨架，导致 D 抗原的弱表达。邻近 341 位突变的弱 D 型还有弱 D7 (G339E)、弱 D30 (E340M)、弱 D70 (L338V) 以及弱 D86 (V345E)，其氨基酸突变均位于 RhD 蛋白第 11 次跨膜区。弱 D (1022T>A) 是否具有免疫原性仍有待临床进一步证实。目前，国内学者一般认为弱 D 型个体作为受血者而言，宜视为 RhD 阴性更为安全，而作为供者而言，应看做 RhD 阳性。因此，该弱 D 型献血者的血液我们以 RhD 阳性血液供应于临床。虽然血清学检测是血型鉴定的经典方法，但开展分子生物学研究可正确区别 D 变异体的亚类，可辅助制定正确的输血策略及新生儿溶血病预防方案，因此对输血安全具有重要意义。

7 《RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)基因引起 RhD--表型 1 例》

作者：刘颖 颜廷宇 李鑫 丁铮 李剑平 刘凤华

来源：临床输血与检验,2019,21(3):327-329.

标本来源：患者，女，汉族，黑龙江大庆市人，66 岁，无输血史，孕 6 产 6，但只有 2 个子女存活至成年，其余都在出生后不久死亡。2014 年 7 月以贫血待查在哈尔滨市某医院入院，在输血前做血型鉴定为 A 型，RHD+，抗体筛查为阳性，性质待定，与库存 A 型 RHD 阳性供血者进行交叉配血实验均凝集，后送本实验室做进一步鉴定。抽取患者及其弟、其女儿、其侄女的血液标本，进行血清学检测和基因检测。

ABO 和 Rh 血型鉴定：患者 ABO 血型正、反定型相符，为 A 型。患者红细胞与 IgM+IgG 抗-D 血清（美国 Millipore 公司）凝集，而与 IgM 单克隆抗-C，抗-c、抗-E，抗-e（上海血液生物医药）均不凝集，并且应用人源的抗-C、抗-c、抗-E，抗-e 血清（实验室自制）进行吸收放散实验，也未检测到细胞上的相应抗原，证实其 Rh 血型为 D--型。

RhD 抗原强度检测：正常 DCCee 红细胞检测一人源抗-D 效价为 4，而患者红细胞检测该人源抗-D 效价为 64。2 种红细胞与此人源抗-D 血清做吸收放散试验，正常 DCCee 红细胞放散液的抗-D 效价为 4，而患者红细胞放散液的抗-D 效价为 512。

直接抗人球蛋白试验：结果显示为阴性。

抗体鉴定：患者血清与谱细胞（荷兰 Sanquin）在盐水介质中反应均为阴性，抗球蛋白试验中均出现凝集。与自身细胞反应阴性，可排除自身抗体，患者体内存在抗高频抗原的同种异型 IgG 抗体。

吸收放散试验：患者血清分别与 O 型 DCCee、DccEE、dccee 和 DCCEe 红细胞等比例混合，在 37℃吸收 2h。放散试验：吸收后的细胞洗涤后做乙醚放散试验，留取放散液。患者血清经过吸收后，与相应红细胞进行间接抗人球蛋白试验，结果均为阴性，表明患者血清中的抗体已被完全吸收；而放散液与所有红细胞进行间接抗人球蛋白试验，结果均为阳性，由此证明患者血清存在的抗体是一种针对 Rh 血型系统高频率的抗体。结合患者的血清型 D--，该抗体极有可能为抗-Hr0。

交叉配血试验：根据患者的血型及抗体情况，通过中国稀有血型库查询到 1 名 A 型 D 献血者，并取得了该献血者的血样与患者进行交叉配血试验，试验结果无凝集无溶血。

患者家系血清学检查：患者家系 4 人，包括患者及其弟弟、女儿、侄女，ABO 及 Rh 血型监测结果见表 4。

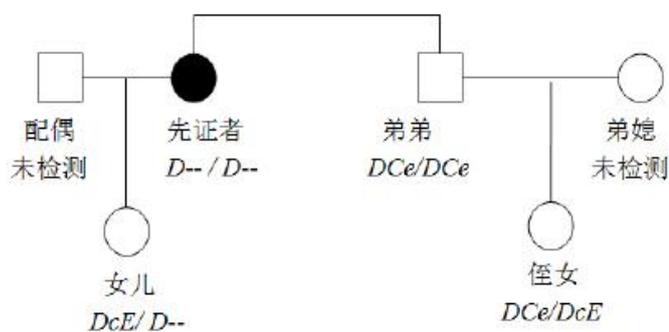
表4 患者及其家系的血清型

	-A	-B	Ac	Bc	-D	-C	-c	-E	-e
患者	4+	0	0	3+	4+	0	0	0	0
弟弟	4+	0	0	3+	4+	4+	0	0	3+
侄女	0	4+	4+	0	4+	4+	3+	3+	3+
女儿	4+	0	0	4+	4+	0	3+	3+	0

家系 RhCE 基因测序结果：将检测到的先证者 RHCE 基因 10 个外显子的扩增产物序列结果与 NCBI 基因序列数据库 RHCE*00101 和 RHD*00101 序列进行比对，外显子 1、3-10 测序结果与 RHCE 基因序列一致，外显子 2 测序结果与 RHD 基因序列一致。

患者家系遗传图谱：根据患者及其家系的血清学表型和 RHCE 基因检测结果，以下是可能的遗传图谱（图 1）（D--代表不能正常编码 RhCE 蛋白的 RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)基因）。

图 1 先证者家系遗传图谱



讨论

我们对 1 例 A 型、RHD 阳性、抗体筛查阳性，与库存 A 型、RHD 阳性供血者进行交叉配血实验均凝集而导致配血困难的患者进行检测发现，其 RhCE 抗原缺失、患者血清中含有 IgG 型高频率 Rh 抗体。

本研究发现的属于 D--型，缺失全部的 C/c、E/e 抗原。用 O 型 DCCee、DccEE、dccee、DCCEe 细胞将患者血清中抗体吸收，放散液与带有各种 Rh 抗原的 O 型红细胞均反应，说明患者血清中的反应抗体不是由单独的抗-C、-c、-E、-e 混合而成，而是一种针对 Rh 血型系统高频率 Hr0 抗原（Rh17）反应的抗体，即抗-Hr0。由于 Rh Hr0 抗原是一个非常普遍的抗原，是 CcEe 基因共同位点的产物，仅在缺失型的细胞上缺失 Hr0 抗原；抗-Hr0 能与 Rhnull 和 D--表型红细胞外的所有红细胞均发生凝集。IgG 型的抗-Hr0 可引起严重的新生儿溶血病，而患者共生育子女 6 人，只有 1 男 1 女存活至成年，其余都在出生不久死亡，可能原因是患者体内抗-Hr0 引起新生儿溶血病所致。含有抗-Hr0 的患者输血必须输注 Hr0 抗原阴性的血液，而 Hr0 抗原阴性的血液非常罕见。非常幸运的是本实验室通过中国稀有血型库找到了一位与患者 ABO 同型的 D--献血者，通过滨州市中心血站，获得了献血者的血样与患者进行交叉配血试验，结果无凝集溶血，这也佐证了患者的血型为 RHD--型，也说明了建立稀有血型供者库是非常有意义的。

Rh 抗原缺失变异有 Rhnull、RhD--、RhDc-、RhDCw-等，虽然变异的血清学表现为相对应的 D、C、c、E、e 抗原的缺失，但其产生的分子机制却不尽相同。即便是表型相同的 RhD--，其分子机制也有不同。张秀铮等发现 1 例 Rh 缺失 D--型的 RHCE 基因的第 1、10 外显子检出 RHCE 基因的特异性序列，2、3、6、7、8、9 全为 RHD 基因序列；伍伟健等分析 1 例 Rh 缺失 D--型，未检出 RHCE 基因的特异性序列；陈文伟等发现 RHCE-D(3-5)-CE 的基因替换也可以导致 CE 抗原无法表达；而本实验室新发现的 RhD--表型患者的 RHCE 基因的第 2 外显子为 RHD 基因序列，该变异目前未见报道。

8 《A novel nucleotide deletion in RHAG allele identified in a Chinese Rh null individual》

《在一个中国 Rh null 个体中发现一个新的 RHAG 核苷酸缺失等位基因》

作者：Tian L, Xu H, Xiao J, Ying B.

来源：Transfusion. 2018 Mar;58(3):826-827.

样本：先证者为 20 岁中国女性，无输血史。血红蛋白水平为 96 g/L，严重网状细胞增多(17.39%)。血液样本取自先证者及其父母。

结果：Rh null 先证者及其父母的 Rh 表型和基因型见表 1。

(1) 血清学结果：通过标准试管法，先证者红细胞对所有不同特异性的抗 Rh (D、C、c、E、e) 均呈阴性反应，表型为 Rh null。

(2) 分子生物学结果：对 RHD 基因 10 个外显子进行扩增和测序，RHD 合子型由上游和杂交 Rhesus 盒子存在与否决定。采用等位基因特异性 PCR 扩增 RHC/c 和 RHE/e 等位基因，检测 RHCE 基因型。扩增 RHAG 基因 10 个外显子，并对其进行直接测序分析。测序分析在 ABI 公司 3130 基因分析仪上进行。先证者 RHD 基因 10 个外显子均存在且序列正常，提示其 RHD 基因完整且不含突变。先证者及其父母的 RHAG 基因发现第 4 外显子 532 位鸟嘌呤(G)缺失(c.532delG)。先证者为纯合缺失，其父母为杂合缺失。

表 1 Rh null 先证者及其父母的 Rh 表型、RH 基因型和 RHAG 基因突变

Sample	Rh typing		
	Phenotype	RH genotype	RHAG gene mutation
Proband	Null	Dce/DcE	532delG/532delG
Mother	DCcee	DCe/Dce	532G/532delG
Father	DccEe	Dce/DcE	532G/532delG

讨论: Rh null 是一种罕见的表型,特征是红细胞上失去所有 Rh 抗原的表达。Rh null 表型个体可能表现出不同严重程度的慢性代偿性溶血性贫血,伴有口形红细胞增多症。分子遗传学研究表明,Rh null 表型呈常染色体隐性遗传。根据不同的遗传机制,将 Rh null 分为两种类型:调节型和无效型。调节型是由 RHAG 基因突变引起的,更为常见。一个功能性的 RhAG 对于 Rh 抗原的表达和 Rh 蛋白在红细胞膜上的正确组装是必要的。所有的 RHAG 基因的分子缺陷都被证实是有害的,可能导致 Rh null 表型。本研究中,我们报道了一个中国 Rh null 女性的分子遗传学研究,并在 RHAG 基因中发现了一个新的缺失突变。该新 RHAG 等位基因的核苷酸序列已提交到 GenBank,序列号为 KY094063。在 RHAG 中的 532 位 G 缺失导致从 178 位氨基酸开始的阅读框移,使得 185 位提前出现终止密码子(p.178Glyfs185),最终导致调节型 Rh null 表型。

9 《Identification of a novel missense mutation (p.Ser230Asn) in RHD allele in a Chinese individual with partial D phenotype》

《在一个具有部分 D 表型的中国人的 RHD 等位基因中鉴定一个新的错义突变(p.Ser230Asn)》

作者: Zhang J, Guo M, Tian L.

来源: Transfusion. 2018 Jul;58(7):1816-1817.

血清学结果: 用微柱凝胶卡在自动 AutoVue 仪器上检测 D 表型结果为阴性。用单克隆 IgM 抗 D (上海血液生物医药) 室温下进行盐水法试验,结果 3+。采用 D-screen 部分 D 鉴定试剂盒(Diagast)对先证者红细胞上是否存在 D 表位进行鉴定(表 1)。用 9 种不同的 IgG 和 IgM 单克隆抗 D 进行试管法试验,结果表明,只有一种 IgG 单克隆抗体和一种 IgM 单克隆抗体不能与先证者的红细胞发生反应。根据血清学结果,我们将先证者定义为部分 D 表型。

表 1 不同单克隆抗 D 的反应结果

Assay/manufacture	Anti-D clone	Immunoglobulin class	Conditions	Results
Ortho	D7B8	IgM	Gel matrix test, RT	0
Shanghai Hemo-Pharmaceutical & Biological Co. Ltd	TH-28	IgM	Saline tube test, RT	3+
Diagast D-screen identification kit for partial Rhesus D	HM10	IgM	Saline tube test, RT	4+
	HM16	IgG	Saline tube test, AHG	4+
	P3X61	IgM	Saline tube test, RT	0
	P3X35	IgG	Saline tube test, AHG	0
	P3X21211F1	IgM	Saline tube test, RT	3+
	P3X21223B10	IgM	Saline tube test, RT	4+
	P3X241	IgG	Saline tube test, AHG	W+
	P3X249	IgG	Saline tube test, AHG	4+
	P3X290	IgG	Saline tube test, AHG	4+

AHG = antihuman globulin.

分子生物学结果: RHD 合子型由上游和杂交 Rhesus 盒子存在与否决定,结果显示先证者为杂合子。采用等位基因特异性 PCR 方法扩增 RHCE*C/c 和 RHCE*E/e 等位基因,检测 RHCE 基因型,结果为 RHCE*ce/cE。对 RHD 基因的全部 10 个外显子进行 PCR 扩增和测序,结果表明,RHD 基因第 5 外显子 689 位出现了一个新的错义突变 G>A,导致 D 蛋白 p.Ser230Asn。

讨论: 部分 D 表型缺乏一个或多个 D 抗原表位,因此,具有部分 D 表型的个体在输血或妊娠时存在抗 D 免疫的风险。分子研究表明,部分 D 表型的红细胞在至少一个胞外环中有氨基酸取代。230 位氨基酸替代位点预计位于第 4 个胞外环。因此,血清学和分子分析结果与先证者红细胞部分 D 表型一致。在 dbSNP、ExAct、Rhesusbase 和 ISBT 数据库中均未发现 c.689G>A 突变。该 RHD 新等位基因的核苷酸序列已提交到 GenBank,序列号为 KY094064。

10 《中国汉族人群中发现一例 Rh 血型弱 D59 型》

作者: 廖昭平 徐慧英 刘春华 王蕊 项凯华 冯洁 乐芳嘉 吴婷 陶志华.

来源: 中华医学遗传学杂志,2018,35(2):261-264.

摘要：目的：鉴定中国汉族人群中发现的 1 例 Rh 血型弱 D59 型。方法：采用常规血清学试剂对筛查出的 D 变异型血型做血清学鉴定，结合 12 种单克隆抗体对该标本 RHD 抗原表位进行确认；使用 PCR-SSP 法对弱 D 型进行基因分型。对 RHD 基因的 10 个外显子及侧翼序列进行测序并分析其杂合性。结果：在该标本中发现等位基因 c.1148T>C，其血清学反应格局符合弱 D 表型。RHD 合子型鉴定其为 RHD+/RHD-杂合型。

结论：该先证者为中国人人群中首次发现的弱 D59 型。

对象：患者，汉族，52 岁，患肺部疾病，在 RhD 血型鉴定中发现不同试剂与其反应性有差异。采集其家系两代共 4 人的 EDTA 抗凝外周血，进行血清学和分子生物学分析。

先证者家系谱图（图 1）及相关血清学结果（表 1）：采用 3 种 IgM 抗 D 血型鉴定卡和 1 种 IgG+IgM 单克隆抗 D 检测先证者 RhD 血型，强生血型卡为阴性，戴安娜及博迅血型卡为弱阳性，上海血液生物公司的手工试剂（IgG+IgM 混合单克隆抗 D）检测为强阳性。家系其他成员检测结果均未见异常。

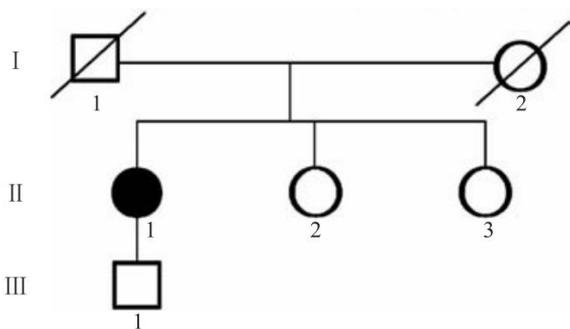


图 1 先证者家系图

家系成员 RhD 抗原表位分析：12 种 IgG 单克隆抗体（ALBAclone）使用抗人球蛋白方法对家系成员红细胞抗原表位进行检测：均为阳性，红细胞膜表面表达完整的 D 抗原表位。

PCR-SSP 结果：采用天津秀鹏人类红细胞 RhD 基因分型试剂盒（PCR-SSP）检测先证者及家系的 RHD 基因，排除其为中国人人群中常见的 RHD-CE(2-9)-D、Dva（Hus）、DVI III 型、弱 D15 型或 DEL RHD 1227A 变异型。

表 1 家系成员的血清学检测结果

家系成员	RHCE 表型	c.1148T>C 突变	DAT	IAT	强生血型卡抗-D	戴安娜血型卡抗-D	博迅血型卡抗-D	IgG+IgM 单克隆抗-D
II ₁	Ccee	有	-	+	-	±	±	3+
II ₂	ccEe	无	-	-	4+	4+	4+	4+
II ₃	ccEe	无	-	-	4+	4+	4+	4+
III ₁	Ccee	无	-	-	4+	4+	4+	4+

注：DAT 表示直接抗人球蛋白试验，IAT 表示间接抗人球蛋白试验

杂合性检测结果：双管复式 PCR 方法对 RHD 进行杂合性检测，检测出融合 Rh 盒子（2778 bp）和 RHD 基因的第 1 外显子（767bp），表明该患者的基因型为 RHD+/RHD-。

RHD 基因外显子及侧翼序列测序：PCR 扩增 RHD 基因的 10 个外显子及其侧翼序列，PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳条带鉴定，将不同批次 PCR 产物切胶，用美国 AXYGENE 公司生产的凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。结果提示其第 8 外显子存在 c.1148T>C 突变，导致亮氨酸突变为脯氨酸（p.Leu383Pro），家系其他成员未见突变。

讨论：弱 D59 型于 2007 年由法国学者 Le Marechal 等采用高效液相色谱分析法发现，但对其血清学反应特点及遗传特点缺乏研究，国内亦未见相关报道。D59 是编码区第 8 外显子 c.1148T>C 发生突变，导致第 12 跨膜区亮氨酸突变为脯氨酸（p.Leu383Pro）。跨膜区及胞内区发生氨基酸改变会引起 D 抗原折叠和插入细胞膜效率降低，从而引起抗原数量的减少。本例先证者不规则抗体筛查阴性，DAT 检测阴性而 IAT 检测阳性，提示其可能为 D 变异型血型。由于临床检测试剂针对 D 抗原表位有可能不一致，需要进一步检测抗原位点及采用分子生物学方法予以确认。本例标本细胞表面 D 抗原表位的反应格局表明其 D59 型表面抗原表达完整，c.1148T>C 突变仅减少了抗原数量的表达。部分 D 血型是 RhD 蛋白在红细胞膜外部分通过与 RHCE 互换、缺失或者突变导致抗原表位缺失形成。弱 D 血型通过改变 RhD 蛋白在细胞内或者跨膜区的插入效率导致红细胞表面抗原分子数量的减少，但并不影响细胞外 D 抗原的表达，因此大部分弱 D 的个体（弱 D1~D3 型）不会引起同种免疫。然而，其他种类的弱 D 型仍然有潜在导致同种免疫的可能性，例如弱 D4.2 型。在这种情况下，将这些弱 D 血型归为部分 D 更为恰当。尽管中国人人群中未见关于弱 D15 型个体被免疫产生抗 D 的报道，但是表面抗原检测发现其红细胞膜表面存在第 1、8、9 抗原表位的缺失，表明弱 D15 型可能具有“部分 D”抗原的特性。国外也有关于弱 D15 型个体被免疫产生抗 D 的病例报道。因此，作为受血者先证者宜输注 RhD 阴性血，作为供血者则应比照 RhD 阳性血原则。本例家系调查仅发现先证者一人携带有突变基因，因其父母均已去世，无法推测 D59 来自亲代遗传还是自发突变。

11 《弱 D25 变异型血型抗原表位分析及输血策略探讨》

作者: 王贞 贾双双 陈景旺 张润青 罗广平 姬艳丽 来源: 中国输血杂志,2018,31(3):234-237.

摘要: 目的: 对 1 例输注阳性血液的 D 变异型患者进行 Rh 血型血清学及分子生物学鉴定, 并对其进行不规则抗体检测, 探讨该 D 变异型的输血策略。方法: 采集患者标本, 用 2 种不同的单克隆抗-D 试剂鉴定 D 抗原, 并用试剂盒检测 D 变异体抗原表位, RhCE 抗原分型, 红细胞直接抗球蛋白试验, 不规则抗体筛查; 采用多重链接酶依赖的探针扩增 (MLPA) 方法检测 RHD 及 RHCE 基因型, 对于 MLPA 检测不到的 RHD 突变型等位基因, 对 RHD 基因全部 10 个外显子进行 PCR 扩增及产物直接测序分析。结果: 该患者初步 D 抗原鉴定结果显示为 D 抗原弱表达, 且直接抗球蛋白试验阴性; D 抗原表位检测结果显示其红细胞与 D 抗原 epD5.4、epD2.1 和 epD3.1 表位特异性单克隆抗体产生弱凝集反应, 与其余表位抗体均无凝集反应, 大量输注 D 阳性血液后的 168d 及 232d 抗体筛查结果均为阴性; RhCE 抗原分型为 ccEe, MLPA 结果显示其基因型为 RHD/d, RHCE 基因 MLPA 基因分型结果与血清学表型一致; RHD 基因外显子直接测序发现其第 3 外显子携带纯合的 c.341G>A (p.Arg114Gln) 错义突变。结论: 患者为弱 D25 变异型, 对弱 D25 型的 D 抗原进行表位分析的显示其部分抗原表位缺失。该患者大量输注阳性血液后未产生抗-D, 为制定该血型患者的临床输血策略提供数据。

研究对象: 患者, 男, 54 岁, 因胰腺癌入住中山大学附属肿瘤医院, 既往输血史不详。2017 年 3 月因急救在 1d 内大量输注 D 阳性血液共计 18U, 2017 年 9 月回院复查, 送检患者标本至本中心临床输血研究所进行 D 抗原血型鉴定及不规则抗体检测, 2017 年 10 月再次对患者进行不规则抗体检测。

血型血清学试验结果: 该患者标本与抗-D (IgM, 克隆号 Rum-1) 常规盐水试管法反应为弱阳性 (1+), 与抗-D (IgM/IgG, 克隆号 TH-28/MS-26) 盐水法反应呈弱阳性 (w+), 微柱凝胶卡 IAT 法检测为阳性 (3+), Rh 其他抗原分型为 ccEe; 红细胞直接抗球蛋白试验阴性。患者在大量输注阳性血后的 168d 及 232d, 2 次抗体筛查检测结果均为阴性。D-Screen 试剂盒检测抗原表位结果显示, 该患者红细胞与针对 D 抗原的 epD5.4、epD2.1 和 epD3.1 表位的单克隆抗-D 反应呈阳性 ($\pm \sim 3+$), 与其余表位单克隆抗-D 反应均为阴性, 表现为 D 变异型 (表 1)。

表 1 D-Screen 试剂盒抗原表位检测结果

编号	D-Screen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
克隆号	HM10	HM16	P3 * 61	P3 * 290	P3 * 212 11 F1	P3 * 212 23 B10	P3 * 241	P3 * 249	P3 * 290
抗体类型	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgM	IgG	IgG	IgG
针对的 D 抗原表位	6.6	6.4	6.1	5.4	8.2	9.1	5.4	2.1	3.1
患者标本	-	-	-	-	-	-	2+	3+	\pm
D+对照	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
D-对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MLPA 基因型分析: 患者基因型为 DcE/dce, RHCE 基因分型结果与血清学表型一致。RHD 基因的 MLPA 基因分型显示其基因型为 D/d, 但 MLPA 未鉴定出其携带的突变型 RHD 等位基因。

RHD 基因直接测序: 患者 RHD 基因直接测序结果发现, 第 3 外显子携带 c.341G>A (p.Arg114Gln) 错义突变, 编码区其他序列与正常 RHD 基因序列相同。

讨论

本文中的这例患者在临床初筛时发现 D 抗原检测为弱阳性, 初步判定为 D 变异型, MLPA 方法未鉴定出其具体 D 变异型型别。MLPA 方法针对 RHD 基因外显子 2-7, 9, 10, 3'-UTR 及 IVS1, 以及 RHCE 外显子 2 及 5 的野生型特异性序列, 共设计了 >20 条与之特异性结合的探针, 所以可通过多条探针信号峰的存在与否检测 RHD 基因的完整性, 可检出 RHD 基因的缺失及 D-CE-D 杂合基因, 多位点的设置保障了检测准确性。同时体系中还包含了 21 条针对 RHD 突变位点的特异性探针, 结合野生型位点的检测结果, 可以鉴定常见的 64 种 RHD 变异基因型。包括我国人群常见的 DEL (1227G>A), 部分 DVI3 型 (D-CE (3-6) -D) 及弱 D15 型 (845G>A) 等 RHD 变异型, 经检测该患者并未携带上述 D 变异型等位基因。进一步进行 RHD 基因测序发现其第 3 外显子存在 341G>A 点突变, 被最终鉴定为弱 D25 型。该突变导致了第 114 位氨基酸发生改变, 该氨基酸位于 RhD 蛋白的第 4 跨膜区, 导致 D 抗原表达异常的具体机制尚不清楚。此外, 我们进一步采用 D 抗原表位试剂盒对此例弱 D25 型患者进行了抗原表位分析, 发现其同时具有部分抗原表位弱表达以及部分抗原表位缺失的特征。

以往报道显示, 一些弱 D 血型个体, 由于存在抗原表位缺失, 在 D 阳性抗原的免疫刺激下, 可以发生同种免疫, 产生针对其缺乏表位 D 抗原的同种抗-D, 这些弱 D 包括弱 D4.2、弱 D15、弱 D21、弱 D33 和弱 D41 等。而弱 D1、弱 D2、弱 D3 则极少会产生同种抗体。所以国际输血协会 (ISBT) 针对以往被命名为弱 D, 但后期证实其抗原表位缺乏并有产生同种抗-D 报道的, 被重新归类于部分 D, 被命名为弱部分 D (weak partial D), 例如弱 D15 和弱 D21 现在分别被 ISBT 命名为弱部分 D15 和弱部分 D21, 临床上要作为 D 阴性受血者对待。因此, 现阶段临床上对于不同的弱 D 型别的输血策略采用以下原则: 1) 对于已明确能产生同种抗-D 的弱 D 型受血者, 应作为 D 阴性对待, 应输注 RhD 阴性血液; 2) 对于已明确不会产生同种抗-D 的弱 D 型受血者, 应作为 D 阳性对待, 可以安全输注 D 阳性血液。现在明确具有此特征的仅有白种人中最常见的弱 D1、弱 D2、弱 D3 型; 3) 对于尚不清楚能不能产生同种抗-D 的弱 D 血型受血者, 出于输血安全考虑, 暂时作为 D 阴性患者对待, 输注 D 阴性血液。因此对于 D 变异型具体型别的鉴定以及相关免疫血

清学的研究对于正确指导临床输血至关重要。

弱 D25 型现仅有包括本例患者在内的 3 例报道（2013 年在中国人首次报道），且目前没有相关 D 抗原表位及是否能产生同种抗-D 的报道。本文首次用 D 抗原表位检测试剂盒证实 1 例弱 D25 型患者，其 D 抗原表位存在缺失的情况。此外，该患者由于急救需要，短时间内输注了大量 D 阳性血液，分别于输血后 168d 及 232d 进行不规则抗体检测，结果显示其并未产生同种抗-D。在接受 D 抗原刺激后发生初次免疫，外周血检出抗-D 时间通常在 2-6 个月之间。虽然 D 变异型个体存在 D 抗原缺失，在完整 D 抗原的 D 阳性血液刺激下有产生同种抗-D 的可能性，但最终能否发生同种免疫还取决于患者的免疫状态，由于该患者罹患胰腺癌这一基础疾病，且对于胰腺癌的临床治疗，都会导致患者机体发生免疫抑制和低下的状态，从而出现对免疫刺激反应下降，不产生同种抗体的情况。因此，弱 D25 型个体能否产生同种抗-D，应该采用何种输血策略，仍需要临床更多弱 D25 型患者相关数据的支持，目前建议作为 D 阴性患者处理。

12 《A new RHD variant allele is caused by a RHD 662C>G mutation》

《一个新的 RHD 等位基因是由 RHD 662C>G 突变引起的》

作者：Feng J, Tian L, Chen J. 来源：Transfusion. 2017 Jun;57(6):1566-1567.

样本来源：一名患有轻度 α 地中海贫血的中国孕妇

血清学结果：患者的 RhD 血型首先使用商用微柱凝胶卡在自动 AutoVue 仪器（Ortho）上进行检测，结果显示弱 2+ 混合相。用另外 13 种单克隆抗 D 对该样本进行了进一步检测。使用另外两份不同时间从患者身上采集的样本，所有抗体都获得了相同的结果。同时，直接抗人免疫球蛋白试验结果为阴性。用间接抗人免疫球蛋白法对不同 IgG 抗 D 克隆进行试管或微柱凝胶试验，均显示阳性反应。综上所述，血清学检测未能提供证明弱 D 或部分 D 的证据（表 1）。

分子生物学结果：RHD 合子型检测证实先证者只有一个 RHD 等位基因，即杂合子(RHD+/RHD-)。RHCE 基因型为 Cc/ee。RHD 基因 10 个外显子测序结果显示，RHD 基因第 5 外显子中存在新的 c.662C>G 错义突变，诱导 RhD 蛋白 p.Pro221Arg，预测这一氨基酸变化位于第 7 跨膜结构域。在 RHD 基因中未检测到其他核苷酸的变化。

讨论：弱 D 表型主要是由 RHD 基因的单核苷酸突变导致的，这些突变编码的氨基酸变化预测位于 RhD 胞内域或跨膜域，而不是胞外域。本例基因分型结果符合弱 D，但血清学结果不符合弱 D。与一些单克隆抗 D 试剂缺乏反应性（表 1）表明红细胞可能缺乏 D 抗原表位。然而，弱 D 红细胞并不缺乏 D 抗原表位。因此，目前还不清楚这是部分 D 还是弱 D 等位基因。这种氨基酸变化在 dbSNP 和 ExAct 数据库中没有报道。我们已经将这一新的 RHD 等位基因的核苷酸序列提交到 GenBank，序列号为 KU559899。基于序列的基因分型方法非常有助于检测 RHD 基因的罕见突变。

表 1 不同条件下患者红细胞与不同单克隆抗 D 的反应性

Assay/manufacturer	Anti-D clone	Immunoglobulin class	Conditions	Results
Ortho	D7B8	IgM	Gel matrix test, RT	2+
Grifols	P3x61	IgM	Gel matrix test, RT	W+
Millipore	TH-28/MS-26	IgM/IgG	Saline tube test, RT/AHG*	1+/3+
Shanghai Hemo-Pharmaceutical & Biological Co. Ltd, China	MS-26	IgG	Gel matrix test, 15 min, 37°C	3+
Shanghai Hemo-Pharmaceutical & Biological Co. Ltd, China	TH-28	IgM	Saline tube test, RT	1+
Diagast—D-screen identification kit for partial Rhesus D	HM10	IgM	Saline tube test, RT	0
	HM16	IgG	Saline tube test, AHG	3+
	P3X61	IgM	Saline tube test, RT	0
	P3X35	IgG	Saline tube test, AHG	3+
	P3X21211F1	IgM	Saline tube test, RT	W+
	P3X21223B10	IgM	Saline tube test, RT	0
	P3X241	IgG	Saline tube test, AHG	3+
	P3X249	IgG	Saline tube test, AHG	4+
	P3X290	IgG	Saline tube test, AHG	2+

* 对于 IgM/IgG 试剂，在读取盐水法初始结果后，加入抗人免疫球蛋白(AHG)：用生理盐水洗涤三次，加入 AHG 并短时间离心后第二次读结果。

13 《A novel nonsense mutation in RHAG gene responsible for Rhnull phenotype in a Chinese individual》

《一名中国个体中发现一种新的导致 Rhnull 表型的 RHAG 基因无义突变》

作者：Hou L, Yan QD, Tian L. 来源：Transfus Apher Sci. 2017 Apr;56(2):220-222.

摘要: 背景: Rhnull 是一种罕见的常染色体隐性遗传表型,其特征是红细胞上缺乏 Rh 抗原表达。调节型 Rhnull 是由 RHAG 突变引起的。在这项研究中,在一个中国 Rhnull 个体中发现了一个新的 RHAG 基因无义突变。目的和方法: 用标准血清学方法对 Rhnull 个体及其家系成员进行 Rh 表型分型。对基因组 DNA 进行 PCR 和直接测序,分析 RHAG 基因全部 10 个外显子。结果: 血清学检测结果显示先证者为 D-C-c-E-e-表型。分子分析表明,先证者在 RHAG 基因第 4 外显子中存在 540C>A 纯合突变。其父母该突变杂合,兄弟未携带该突变。540C>A 突变为无义突变,导致提前出现终止密码子 (Tyr180stop)。结论: 这些结果表明,在一名中国个体中, RHAG 基因 540C>A 无义突变导致了 Rhnull 表型的调节型。我们的结果有助于更好地理解 Rhnull 表型的遗传机制。

血液样本: 来自先证者及其父母兄弟,在攀枝花血液中心采集。先证者是一名 32 岁的中国男性健康献血者。

Rh 表型和基因分型: PCR 扩增先证者 RHD 基因 10 个外显子并测序,结果显示其 RHD 基因完整且无突变。RHCE 基因型检测方法为等位基因特异性 PCR 扩增 RHC/c 和 RHE/e 等位基因。

表 1 Rhnull 先证者及其家族成员的 Rh 表型和基因型

Sample	Rh typing	
	Phenotype	RH genotype
proband	null	DCe/DCe
mother	DCcEe	DCe/DCe
father	DCcEe	DCe/DCe
brother	DCcEe	DCe/DCe

红细胞渗透脆性分析: 当 NaCl 浓度为 5.2171 g/L 时,先证者红细胞的 50%发生溶解,而正常红细胞在 4.0-4.45 g/L NaCl 浓度下发生溶解。结果表明,先证者红细胞对渗透胁迫的抵抗力降低,红细胞的渗透脆性增加。

RHAG 基因突变检测: 利用直接测序法扩增并分析了先证者及其父母兄弟 RHAG 基因的 10 个外显子,与 RHAG 基因参考序列(GenBank 登录号 NC 000006)比较。结果显示先证者在 RHAG 基因第 4 外显子中存在 540C>A 纯合突变。其父母该突变杂合,兄弟未携带该突变。该新 RHAG 等位基因的核苷酸序列已提交到 GenBank,登录号为 KU879002。

讨论

Rh 蛋白对红细胞膜的结构和功能非常重要,因此 Rhnull 表型可导致 Rh 缺乏综合征。该综合征与口形红细胞增多、球形红细胞增多、渗透脆性增加、膜磷脂组织异常、细胞体积改变和离子运输系统改变有关。Rh 缺乏综合征患者表现为轻度代偿性溶血性贫血。

Rhnull 根据不同的遗传机制分为调节型和无效型。无效型由 RH 基因失活突变引起,调节型由单独的调节 Rh 抗原表达的抑制基因突变引起。

调节型是 Rhnull 表型中最常见的类型。Rhnull 调节型的遗传基础可能来自于 RHAG 基因的突变,RhAG 蛋白对于红细胞膜中 Rh 复合物的形成和维持红细胞膜的完整性至关重要。RHAG 基因高度保守,所有已鉴定的 RHAG 基因突变均与 Rhnull 表型相关。移码突变、外显子缺失、剪接位点突变或 RHAG 基因全缺失很大程度上改变了基因表达和/或蛋白质结构。有趣的是,仅改变单个氨基酸残基的 RHAG 基因错义突变也可能导致 Rhnull 表型。错义突变是 Rhnull 表型调节型最常见的遗传机制。到目前为止,已报道了 8 个与 Rhnull 表型相关的错义突变。最近,在一名巴西孕妇中首次报道了导致 Rhnull 表型的 RHAG 基因无义突变。本研究中的无义突变 540C>A 被预测会导致 RhAG 蛋白截短。可能这种截短了的蛋白没有被组装在红细胞膜中,从而导致 Rhnull 表型。

14 《Identification of a novel frequent RHCE*ce308T variant allele in Chinese D- individuals, resulting in a C+c- phenotype》

《在中国 D-个体中鉴定出一个新的高频 RHCE*ce308T 变异等位基因,导致 C+c-表型》

作者: Stegmann TC, Ji Y, Bijman R, et al. 来源: Transfusion. 2016 Sep;56(9):2314-21.

摘要: 背景: RHCE 等位基因具有高度多态性;已报道有超过 60 种变异导致 C、c、E 和 e 抗原表达减少。关于 RHCE 变异在中国人群中的频率了解的并不多。携带变异的个体在不匹配的妊娠或输血中有可能产生同种抗体。在本研究中,对中国献血者 RHCE 等位基因进行表型和基因分型,发现了一个新的临床相关突变。研究设计和方法: 来自 200 例 D- 和 200 例 D+ 的中国献血者(广州血液中心随机选择)的血液样本通过 RH 多重连接依赖探针扩增 (MLPA) 试验进行分析,

并与可获得的血清型 RhCe 表型进行比较。在基因分型结果异常的样本中对 RHCE 基因的所有外显子进行测序。通过转导培养的人成红细胞来检测新变异 RHCE 等位基因的表型。结果：通过 MLPA 在 6 个 D-献血者(6/200)中发现 RHCE 基因外显子 2 拷贝数异常，而在 D+献血者中未发现(0/200)。通过对这 6 个献血者的 RHCE 基因测序，发现了一个新的变异 RHCE*ce308C>T (p.103Pro>Leu)等位基因，在本研究中的 D-个体中等位基因频率为 0.015。在 D+个体中未检测到该变异，表明其与 D-单倍型连锁。献血者红细胞血清学 C 表达较弱，c 表达缺失。体外转染 cDe/ce 和 CDe/CDe 成红细胞 RHCE*ce308T 变异的研究证实，该变异与抗 C 反应性有关，而缺失 c 的表达。结论：用标准 RHCE 基因分型对携带该变异的个体进行基因分型可能会错误地预测 C-表型或 c+表型。在为中国人设计的 RHCE 基因分型试验中，应考虑到这种新变异。

TABLE 2. Serology and genotyping results for the six serologically D- donors carrying the new variant allele RHCE*ce308T

Samples	Serology conclusion	Sample Number	Probes in MLPA determining C expression (value)		Probes in MLPA determining C expression (value)		Probe in MLPA determining c expression (value)		MLPA conclusion
			DCE01-48C	CE_BigC_IVS2lns	CE02_307C				
RHCE variant samples	C+ ^w c+ D- E- e+	13	0	0	1.2			RHCE*ce/RHCE*ce308T	
	C- c+ D- E- e+	60*	0	0	1.2			RHD*01N.01	
	C+ c+ D- E- e+	69	0	0	1.4				
	C+ c+ D- E- e+	130	0	0	1.1				
	C+ c- D- E- e+	3	1	1.2	0.2			RHCE*Ce/RHCE*ce308T	
	C+ c- D- E- e+	10	1	1.3	0.2			RHD*01N.01/RHD*01.EL.01	
Controls	C+ c- D- E- e+	50	1.8	2.1	0			RHCE*Ce/RHCE*Ce RHD*01N.01/RHD*01.EL.01	
	C+ c+ D- E- e+	41	0.9	1.6	1			RHCE*Ce/RHCE*ce RHD*01N.01	
	C- c+ D- E- e+	4	0	0	1.9			RHCE*ce/RHCE*ce RHD*01N.01	

* All donors were typed with a Chinese in-house gel card.
† No RBCs were available to repeat this discrepant serology.

TABLE 3. Serologic analysis of RBC of donors carrying RHCE*ce308T*

Monoclonal antibody	RhD(-)13 ce/ce(308T)			RhD(-)593* Ce/ce(308T)		Control Ce/Ce		Control Ce/ce		Control Ce/ce	
	Untreated	Untreated	Papain	Untreated	Papain	Untreated	Papain	Untreated	Papain	Untreated	Papain
Anti-C											
MS24	+/++	++++	++++	++++	NA	++++	++++	-	-	-	-
MS273	+/++	++++	++++	++++	NA	++++	++++	-	-	-	-
P3x225	-	+	NA	+	NA	+	+/++	-	-	-	-
DG02	-	+	NA	+	NA	+	+/++	-	-	-	-
Anti-c											
MS33 (Epitope 1)	NA	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
MS42 (Epitope 2)	++++	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
BS240 (Epitope 3)	++++	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
951 (Epitope 4)	++++	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
BB7.D4 (Epitope 5)	++++	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Adsorption-elution											
With MS24 (anti-C)	++++	++++	++++	++++	NA	++++	NA	-	NA	-	NA
With M33 (anti-c)	++++	-	-	-	NA	++++	NA	++++	NA	++++	NA

* Donor RhD(-)593 was identified after the first screening and also confirmed by sequencing of all RHCE exons.

注：表 3 最后 2 列的对照，按与抗 C 的反应结果及正文内容推测，应是 ce/ce 对照，而不是 Ce/ce 对照。

讨论

新 RHCE*ce308T 变异等位基因已提交至 GenBank，登录号 KU319432 (dbSNP rs 号 rs747882675)。这种脯氨酸到亮氨酸的取代 (p.Pro103Leu) 位于 Rhce 蛋白的第 2 个胞外环。308T 核苷酸和 307C 一起位于 RHCE*ce 等位基因上。该变异与常见 RHD 缺失等位基因 RHD*01N.01 连锁。在 ExAc 频率数据库中，c.308C>T 变异等位基因仅在东亚人群中检测到，这表明该变异是东亚人群特有的。广州地区总献血者人群中新变异的等位基因频率估计约为 0.001，与 ExAc 数据库中报告的等位基因频率一致。

C/c 多肽之间的差异是由 4 种氨基酸取代决定的。然而，与非人灵长类动物 (与抗 c 反应，不与抗 C 反应) 的同源性分析、在罕见 Rhc 变异体中 Rhc 表达、以及在 RHD307T>C 质粒转导的 K562 细胞中观察到 c 反应性，证明这 4 种氨基酸取代仅有 1 种与 c 表达严格相关。这种丝氨酸到脯氨酸的取代位于 Rhce 蛋白的第二个胞外环。在本研究中检测到的新的 RHCE*ce308T 变异导致脯氨酸到亮氨酸的氨基酸取代，导致 c 的表达缺失。这加强了之前的结论，即 103Pro

对 c 的表达至关重要。脯氨酸在蛋白质中形成弯曲或环，是蛋白质三级结构的关键。我们的研究表明，三级结构的改变不仅导致 c 表达缺失，而且与 C 样表达有关。这与 RHCE*ce307C>T (p.Pro103Ser) 等位基因相关的 C 表达一致。然而，新的 RHCE*ce308C>T 的 C 表达也表明，p.Ser103 本身对 C 的表达并不是必需的，因为在我们的变异体中，p.Pro103 被 p.Leu103 取代。所以最有可能的是，C 表达不仅与 RHCE*c 和 RHCE*C 等位基因间多态氨基酸差异有关，还与 RHD 和 RHCE 等位基因间第 3、4 和/或 6 胞外环中的一些氨基酸差异有关。观察到存在 p.Ser103 的 RHD 基因不导致 C 表达，证实了这一结论。事实上，p.Ser103 只有在缺乏下游 RhD 特异氨基酸时能够诱导 C 表达，这一结论是基于以下观察得出的：1) 只有 RHD 特异外显子存在于 5' (外显子 1 和 2) 和 3' 末端 (外显子 9 和 10) 的 D-CE-D 杂交基因导致 C 表达；2) RHD 特异核苷酸被 RHCE 特异核苷酸取代的 RHD 变异 (如 RHD*03N.01、RHD*01N.06 或 RHD*04.01) 可以导致 C 表达，但通常是低的和可变的；3) 非人灵长类动物 RHCE 序列的分析表明，只有 p.Pro103 下游氨基酸序列包含人类 RHCE 特异核苷酸的非人灵长类动物与抗 C 血清反应，而氨基酸序列与人类 RHD 基因类似的非人灵长类动物与抗 C 血清不反应。C 表位的形成和稳定可能需要额外的胞外环或 Rhce 蛋白特有的蛋白构象。这一假说进一步得到了几种变异等位基因描述的支持，在这些等位基因中，胞外环的突变导致 C 表达的减少，而不影响 E/e 的表达。

值得注意的是，杂交 CE-D 变异等位基因 RHCE*02.04(其中第 4 个胞外环由 RHD 编码)和 RHCE*02.08.02(其中第 6 个胞外环来自 RHD)导致 C 表达改变。总之，RHCE*ce308T 突变的表型进一步证明了 c 的表达主要依赖于 p.Pro103，并强烈支持了 C 的表达是在没有 p.Pro103 的情况下由其他 RHCE 特异氨基酸 103 位起 C 末端决定的假说。一些 C 表位是否也需要 p.Ser103，这意味着新的 RHCE*ce308T 变异导致了部分 C 表达，目前还不能从我们的研究中得出结论。至少在一个献血者中我们可以看到 RhC 抗原的表达减弱；这是否意味着也存在像在非洲黑人中发现的 RHCE 变异那样的部分 RhC 表达，还不能得出结论。在这方面，很有趣的是，在多次输完全匹配的 RhCc 血液的患者中，这种新的变异是否能引起抗 C 免疫反应。由于这种新的变异导致 c 表达缺失和 C 表位增加，携带这种新变异等位基因 (与一个正常 RHc 等位基因呈反式) 的供体理论上可以免疫 C-受体，尽管减弱的 C 抗原的免疫原性尚不清楚。然而，携带该等位基因 (与一个正常 RHC 等位基因呈反式) 的受体不应该输 c+血，因为我们的数据显示 c 表达缺失。因此，用基因分型匹配输血供体和受体时，应考虑这种新等位基因变异。

15 《A serologic weakly reactive RhD is caused by a c.496C>G (p.His166Asp) in RHD gene》

《血清学弱反应性 RhD 由 RHD 基因 c.496C>G (p.His166Asp)引起》

作者: Zhao H, Tian L, Chen J.

来源: Transfusion. 2016 Nov;56(11):2897-2898.

标本来源: 四川大学华西第二医院一名中国女性患者

血清学结果: 首先在 AutoVue 仪器上检测 RhD 血型，结果为弱 2+ 阳性。WADIANA 仪器得到类似的弱 1+ 阳性结果。然后用盐水试管法，不同条件下均为阴性结果 (室温/立即离心; 4°C/15min; 37°C/15min) anti-D-IgG 试剂半自动微柱凝胶卡试验结果强阳性(4+)。直接抗人免疫球蛋白试验结果阴性。血清学检查均不能为证实弱 D 或部分 D 提供依据。

分子生物学结果: RHD 合子性检测结果表明，先证者为 RHD+/RHD-杂合子。RHCE 基因型为 Ce/Ce。DNA 测序结果进一步表明，在 RHD 基因第 4 外显子 496 位存在一个新的错义突变 C>G，诱导 RhD 蛋白 p.His166Asp。在 RHD 基因上没有检测到任何其他核苷酸变化。

讨论: Flegel 及其同事之前报道了 RHD 基因的 c.497A>C (p.His166Pro) 突变，也导致了 RhD 蛋白 166 位残基的氨基酸替换。正常的 His 是亲水的酸性极性氨基酸; Pro 是疏水的非极性氨基酸; Asp 是亲水的碱性极性氨基酸。His 的替换改变了 RhD 蛋白的理化特性，并可能导致 RhD 蛋白结构和功能的改变。166 位残基位于 RhD 蛋白第 3 胞外环。在 DFW 中 p.His166Pro 导致了部分 D 表型。因此，本研究中的 p.His166Asp 预计会导致部分 D 表型，这仅仅是基于 166 位氨基酸变化。在 dbSNP 和 ExAct 数据库中没有发现此变异。该 RHD 新等位基因的核苷酸序列已提交到 GenBank，登录号为 KU559900。基于序列分型是检测 RHD 基因罕见突变的有效方法。

16 《四例 Rh 弱 D 变异体的分子遗传学分析》

作者：贺云蕾 邓刚 许德义 梁伟 俞露

来源：中华医学遗传学杂志,2016,33(6):837-840.

摘要：目的：分析 4 例 Rh 血型弱 D 型变异体的分子机制。方法：采用血清学方法检测 RhD、C、c、E、e 抗原表型，通过间接抗人球蛋白实验确认样本 RhD 血型表型；采用序列特异性引物聚合酶链反应检测 RHD 基因合子型，并对 RHD 基因的全部 10 个外显子及其邻近内含子序列测序分析。结果：4 例样本 RhD 血清学检测均为弱阳性。RHD 基因外显子测序结果显示 1 号样本第 1 外显子第 17 位碱基 C>T 变异，2 号样本第 1 外显子第 29 位碱基 G>C 变异，3 号样本第 9 外显子第 1212 位碱基 C>A 变异，4 号样本第 4 内含子处存在 IVS4+5G>A 变异。RHD 单体型分析发现 4 例样本均为杂合 RHD 基因型。根据 RhesusBase 的命名规则，4 例标本分别为弱 D31 型、弱 D71 型、弱 D72 型及弱 D82 型。结论：开展 Rh 弱 D 的血清学及分子生物学检测，将有助于深入了解其免疫学及遗传学特点，为制定正确的临床输血策略以及预防新生儿溶血病提供依据。

对象：1、2、4 号样本为 2015 年内本血站无偿献血者中检出，期间无偿献血总数为 73190 人次。3 号样本为医院肛肠外科送检到本站进行检测的患者样本，女性，46 岁。经初筛后进行 RHD 阴性确认实验，发现均为 D 抗原弱表现型。

血清学检测结果

表 1 RhD 抗原血清学检测结果

	IgM 抗-D	IgG 抗-D	IgM/IgG 抗-D
样本 1	1+	1+	1+
样本 2	1+	2+	1+
样本 3	1+	1+	1+
样本 4	1+	2+	1+

RHD 基因测序结果：对 4 例弱 D 型样本的 10 个 RHD 基因外显子及其邻近内含子进行序列分析，其中 1 号样本第 1 外显子第 17 位碱基发生 C>T 突变，2 号样本第 1 外显子第 29 位碱基发生 G>C 突变，3 号样本第 9 外显子第 1212 位碱基发生 C>A 突变，4 号样本检出 IVS4+5G>A 突变。根据 RhesusBase 的命名，4 例样本分别为

弱 D31 型、弱 D71 型、弱 D72 型及弱 D82 型。

RHD 单体型分析结果：经 RHD 基因上、下游和杂交盒子 PCR 扩增后凝胶电泳分析，4 例样本均检出上、下游和杂交盒子，即缺失一条 RHD 基因，为 RHD+/RHD-型。

RH 基因型分析

表 2 各样本的 RH 基因型

样本	测序结果	RHD 杂合性	CE 表型	基因型	弱 D 型
1	17C>T	RHD+/RHD-	Ccee	DCe/dce	弱 D31 型
2	29G>C	RHD+/RHD-	Ccee	DCe/dce	弱 D71 型
3	1212C>A	RHD+/RHD-	Ccee	DCe/dce	弱 D72 型
4	IVS4+5G>A	RHD+/RHD-	ccEe	DcE/dce	弱 D82 型

讨论：弱 D31 型于 2005 年首次在德国德累斯顿被发现。本研究发现的弱 D31 型为中国人人群中首次报告。其 RhD 蛋白第 6 位脯氨酸被亮氨酸替换 (Pro6Leu)。由于氨基酸突变位点发生在胞内区，D 抗原表位未改变仅表现为表达量减弱。弱 D71 型的突变位于第 10 位氨基酸处，即精氨酸被脯氨酸替代 (Arg10Pro)。其位于 RhD 蛋白跨膜区，除弱 D71 型，弱 D6 和弱 D61 型也为该氨基酸位点发生突变，提示该位点对于 RhD 抗原正常表达的重要性。弱 D72 型 RhD 蛋白第 404 位天冬氨酸被谷氨酸替换 (Asp404Glu)，未涉及细胞膜外蛋白质的改变，所以表现为 D 抗原减弱而抗原性质未改变。弱 D82 型由于正常第 4 外显子的 5'剪接位点 (IVS4+5G>A) 下游第 5 个碱基 G>A 碱基置换导致异常剪接，从而造成 RhD 抗原表达减弱。正常 RhD 阳性个体红细胞表面的 D 抗原分子数约为 10000~30000，而弱 D 型个体红细胞表面的抗原分子数显著减少，仅有几百到几千个不等，如弱 D4.1 约表达 4000 个，而弱 D12 型红细胞表面分子数少于 100 个。一般认为，弱 D 型红细胞表现为 D 分子数目的减少，但也发现弱 D15 型个体红细胞 D 抗原不仅数目减少，而且缺失某些表位包括 ep1 (2)、ep8 (1)、ep9 (1) 表位。综上所述，由于抗原密度低以及缺失某些表位 (例如弱 D15)，部分弱 D 表型妇女怀上正常 RhD 阳性的婴儿或输注 D 阳性血液时，可能被免疫产生抗-D。中国人人群中的弱 D 主要为弱 D15 型。国外有报道弱 D15 型妇女被免疫产生抗-D 的病例，国内也曾有未被分型的弱 D 被免疫产生抗-D 的病例。因此，国内学者一般认为当弱 D 型个体作为受血者而言，则宜被视为 RhD 阴性受血者较为安全；而作为供者而言，则应被看做 RhD 阳性供者。

ISBT 命名	RH 基因	核苷酸变化	蛋白变化	表型	同种抗体	样本说明	作者单位	编号
RHD*01N.16	RHD	c.711delC	p.Val238Cysfs*8	D-	未筛查抗体	山西省 1 名女性健康献血者，31 岁，籍贯河南省鹿邑县，无孕产史。	上海市血液中心 太原市红十字血液中心	2
RHCE*01.01	RHCE	c.48G > C	p.Trp16Cys	弱 C 或部分 C	未筛查抗体	山西省 1 名女性健康献血者，31 岁，籍贯河南省鹿邑县，无孕产史。	上海市血液中心 太原市红十字血液中心	2
RHCE*02.10.01 RHCE*Ce.10.01	RHD+RHCE	RHCE-D(4)-CE	/	无效基因，还是导致 RhCE 抗原弱表达，尚无定论	未筛查抗体	山西省 1 名女性健康献血者，31 岁，籍贯河南省鹿邑县，无孕产史。	上海市血液中心 太原市红十字血液中心	2
/	RHCE	IVS4+29A > C	/	RhC 双群	抗 C	患者女性，70 岁，诊断为“阵发性睡眠性血红蛋白尿症（PNH）、高血压 2 级”。患者既往和近期均有输血史。100 例健康对照测序未发现此突变。	郑州大学第一附属医院输血科 上海交通大学医学院附属瑞金医院输血科	3
/	RHD	c.26T > G	p.Val9Gly	弱 D	抗体筛查结果阴性	一名 66 岁中国汉族妇女	浙江大学医学院附属第二医院 上海复旦大学生命科学学院 上海血液中心 上海市皮肤病医院	4
/	RHD	c.208C > T	p.Arg70Trp	D-	未筛查抗体	一名中国北方汉族男性献血者	青岛血液中心 青岛市妇女儿童医院产科	5
/	RHD	c.210_211insG	p.R71EfsTer88	D-	未筛查抗体	一名中国北方汉族男性献血者	青岛血液中心 青岛市妇女儿童医院产科	5
/	RHD	c.1022T > A	p.Ile341Asn	弱 D	未筛查抗体	献血者，男性，28 岁，汉族，O 型。	宁波市中心血站	6
/	RHD+RHCE	RHCE(1)-D(2)-CE(3-10)/	/	D--	抗 Hr0	女，汉族，黑龙江大庆市人，66 岁，无输血史，孕 6 产 6，但只有 2 个子女存活至成年，其余都在出生后不久死亡。以贫血入院	哈尔滨市血液中心 辽宁省血液中心 哈尔滨医科大学附属第一医院输血科	7
/	RHAG	c.532delG	p.178Glyfs185	Rh null	未筛查抗体	先证者为 20 岁中国女性，无输血史。血红蛋白水平为 96 g/L，严重网状细胞增多 (17.39%)。	四川大学华西医院检验科 中国医学科学院输血研究所	8

/	RHD	c.689G>A	p.Ser230Asn	部分 D	未筛查抗体	/	成都市第二人民医院检验科 临沂市中心血站 中国医学科学院输血研究所	9
RHD*01W.59 RHD*weak D type 59	RHD	c.1148T>C	p.Leu383Pro	弱 D	未筛查抗体	汉族，52岁，患肺部疾病	浙江大学医学院附属第二医院	10
RHD*01W.25 RHD*weak D type 25	RHD	c.341G>A	p.Arg114Gln	弱部分 D	抗体筛查结果阴性	患者，男，54岁，胰腺癌，既往输血史不详。因急救在1d内大量输注D阳性血液共计18U	广州血液中心临床输血研究所	11
/	RHD	c.662C>G	p.Pro221Arg	弱 D 或部分 D	未筛查抗体	一名患有轻度α地中海贫血的中国孕妇	四川大学华西第二医院 中国医学科学院输血研究所	12
/	RHAG	c.540C>A	p.Tyr180stop	Rh null	未筛查抗体	先证者是一名32岁的中国男性健康献血者，在攀枝花血液中心采集	四川大学华西医院 攀枝花血液中心 中国医学科学院输血研究所	13
/	RHCE	c.308C>T	p.Pro103Leu	C+c-	未筛查抗体	200例D-和200例D+中国献血者（广州血液中心随机选择）。D-个体中该新等位基因频率为0.015；D+个体中未发现。	荷兰阿姆斯特丹大学 广州血液中心 荷兰MRC-Holland公司 荷兰Sanquin公司	14
/	RHD	c.496C>G	p.His166Asp	部分 D	未筛查抗体	四川大学华西第二医院一名中国女性患者	四川大学华西第二医院 中国医学科学院输血研究所	15
RHD*01W.31 RHD*weak D type 31	RHD	c.17C>T	p.Pro6Leu	弱 D	未筛查抗体	本血站无偿献血者	浙江省宁波市中心血站	16
RHD*01W.71 RHD*weak D type 71	RHD	c.29G>C	p.Arg10Pro	弱 D	未筛查抗体	本血站无偿献血者	浙江省宁波市中心血站	16
RHD*01W.72 RHD*weak D type 72	RHD	c.1212C>A	p.Asp404Glu	弱 D	未筛查抗体	医院肛肠外科送检到本站进行检测的患者样本，女性，46岁	浙江省宁波市中心血站	16
RHD* 01W.82 RHD*weak D	RHD	c.1184C>T	p.Ala395Val	弱 D	未筛查抗体	本血站无偿献血者	浙江省宁波市中心血站	16

type 82								
/	RHAG	c.236G>A	S79N	球形细胞增多症	未筛查 抗体	西安 38 岁男性	第四军医大学唐都医院 陕西省血液中心 美国芝加哥大学	201904-18
/	RHD	c.739 G>C	p.Val247Leu	弱 D 或部分 D	未筛查 抗体	1 例中国北方汉族孕妇	青岛市妇女儿童医院 青岛市中心血站	202011-11
/	RHCE	c.1059G > A	p.Trp353stop	CCDee	抗 e	一名 8 天大的婴儿，是母亲的第二个孩子，被证实患有 HDN，而她的哥哥作为母亲的第一个男孩，没有患 HDN。她母亲没有输血史。IgG 抗 e 引起 HDN	华东师范大学 上海市血液中心 太原市红十字会血液中心	202011-12
/	RHAG	c.572G > A	p.Arg191Gln	弱 D	未筛查 抗体	中国广州血液中心一位 D 变异献血者	广州血液中心 荷兰阿姆斯特丹大学 广东省第二人民医院	202011-13

注：最后 4 篇为往期期刊：

201904-18 表示 2019 年 4 月期刊的第 18 篇：Mu S, Cui Y, Wang W, Wang L, Xu H, Zhu O, Zhu D. A RHAG point mutation selectively disrupts Rh antigen expression. *Transfus Med.* 2019 Apr;29(2):121-127.

202011-11 表示 2020 年 11 月期刊的第 11 篇：Lyu H, Jiao S, Ma W, Hu B. A novel RhD allele caused by c.739 G> C mutation was identified in a Chinese individual. *Transfusion.* 2020 Oct 27.

202011-12 表示 2020 年 11 月期刊的第 12 篇：Zhao FY, Li Q, Zhang DM, Guo ZH, Wu YX, Wang F, Zhang JM, Qian M, Zhu ZY. A novel silent RHCE allele in Chinese population. *Transfus Med.* 2019 Dec;29(6):430-433.

202011-13 表示 2020 年 11 月期刊的第 13 篇：Wen J, Verhagen OJHM, Jia S, Liang Q, Wang Z, Wei L, Luo H, Luo G, Vidarsson G, van den Akker E, Ji Y, van der Schoot CE. A variant RhAG protein encoded by the RHAG*572A allele causes serological weak D expression while maintaining normal RhCE phenotypes. *Transfusion.* 2019 Jan;59(1):405-411.

下期主题：HPA 基因分型



为中国血型基因检测贡献力量!!!
为人民服务!!!



天津秀鹏生物微信公众平台
与您分享专业的体外诊断信息

更多内容请登录秀鹏生物网站
www.biosuper.com