

血型嵌合体专刊

2020 年 3 月

编者导读:

ABO 正反定型不符是输血医学中的一个重要问题, 原因之一就是血型嵌合体。嵌合体是指个体中同时存在 2 个或以上不同细胞系细胞的现象。ABO 血型嵌合体患者血清学试验表现为正定存在混合凝集外观, 可由 ABO 血型不相符的干细胞移植、非 O 型血患者输注 O 型血、罕见的 ABO 亚型如 B3、全身开米拉、多胎干扰等引起。血型嵌合体不仅表现在 ABO 血型, 其他血型如 Rh、MNS、Kell、Kidd、Duffy、P1PK 等系统中均可存在。

检测嵌合体的方法包括血型分型(包括血清学、PCR、测序、流式细胞术)、HLA 分型及 STR 测定等。

检测嵌合体的应用有: 解释血型遗传不符合经典遗传规律的原因; 预防输血反应; 监测移植后患者体内嵌合体的分布及其数量变化, 评估及预测移植后的排斥反应、GVHD。

本月期刊检索了国内外公开报导的嵌合体相关多篇优秀文献, 就嵌合体的种类、检测方法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。

目录

1 《嵌合体血型的研究进展》	3
2 《双精子嵌合体致 ABO 血型正反定型不符 1 例》	6
3 《ABO 基因调控区变异对其表型的影响》	8
4 《血型嵌合体一例血清学特点及基因学测序分析》	9
5 《罕见开米拉 A3B3 血型的分子生物学研究》	10
6 《异常 ABO 表型遗传的分子背景研究》	11
7 《四配子嵌合体导致的真两性畸形机制研究》	11
8 《AB/O 嵌合体血型血清学特点分析的发现》	12
9 《利用红细胞 Kidd 血型基因实时荧光定量 PCR 法监测个体嵌合状态》	13
10 《ABO 基因相关多态性位点在 ABO 血型不合 HSCT 移植后嵌合体定量分析中的研究》	13
11 《输血相关微嵌合体的进展》	14
12 《Somatic Mosaicisms of Chromosome 1 at Two Different Stages of Ontogenetic Development Detected by Rh Blood Group Discrepancies》	16
13 《The First Case of Congenital Blood Chimerism in Two of the Triplets in Korea》	20
14 《Multiparameter Investigation of a 46,XX/46,XY Tetragametic Chimeric Phenotypical Male Patient With Bilateral Scrotal Ovotestes and Ovary Activity》	20
15 《Hematopoietic Chimera in a Male Blood Donor and His Dizygotic Twin Sister》	21
16 《ABO Genotype-Phenotype Discrepancy Due to Chimerism Resolved by Clonal Separation》	22
17 《Acquired RhD Mosaicism Identifies Fibrotic Transformation of Thrombopoietin Receptor-Mutated Essential Thrombocythemia》	24
18 《Mixed Field Reactions in ABO and Rh Typing Chimerism Likely Resulting From Twin Haematopoiesis》 ..	25
19 《ABO Chimerism With a Minor Allele Detected by the Peptide Nucleic Acid-Mediated Polymerase Chain Reaction Clamping Method》	29
20 《Amplification Refractory Mutation system-PCR Is Essential for the Detection of Chimaeras With a Minor Allele Population: A Case Report》	30
21 《Many Genetically Defined ABO Subgroups Exhibit Characteristic Flow Cytometric Patterns》	30
22 《Acute Intravascular Hemolysis After Transfusion of a Chimeric RBC Unit》	32
23 《RHD Positive Haplotypes in D Negative Europeans》	34

嵌合体专刊

(编辑: 艾丽萍, 张悦)

1 《嵌合体血型的研究进展》

作者: 喻琼 郑岩

来源: 中国输血杂志 2010年2月第23卷第2期

“开米拉”(Chimera)源于希腊语,是指有狮头、羊头、蛇头或龙头的一个混合生物。开米拉这个概念运用于医学界,是 Anderson 1951 年第一次提出的,是指个体中同时存在 2 个或以上不同细胞系细胞的现象,又称嵌合体。根据嵌合体细胞的起源不同,分为镶嵌体和嵌合体。镶嵌体又称马赛克(Mosaicism),是由单独的合子细胞发育而成的。嵌合体又称开米拉(Chimera),是由 2 个或多个遗传上不同的合子细胞合并发育而成,具有遗传上不同类型细胞的混合。

目前,已经发现的嵌合体现象主要有 2 种: 1 种是血型开米拉,也称做 Twin Chimeras,是由于双生子之间的血管交叉吻合,造血细胞通过吻合的血管交换而产生的,人类血型嵌合体十分罕见。另一种嵌合体为全身组织器官性的开米拉,是指同一个体的不同组织中存在着不同来源的细胞的现象,它通常是在一些性别异常的个体,如雌雄同体的个体中被发现的。这 2 种嵌合体现象可以单独或同时存在。

1 血型嵌合体的发现及研究历史

1952 年 Dunsford 在 1 名 25 岁的献血者血液中,发现有 2 种血型的红细胞,后经研究证明这是人类第 1 例血型嵌合体现象。目前全球已发现 70 多例先天性嵌合体血型。嵌合体血型大多数是在大量标本的血型检测或 HLA 分型过程中偶然被发现的。嵌合体 ABO 血型鉴定中检测到同时存在 2 种红细胞群,出现混合凝集外观。嵌合体现象常常会导致 ABO 血型遗传不符合经典遗传规律。血型嵌合体不仅表现在 ABO 血型,其他血型如 P 系统, Kidd, 以及 Duffy 系统中均可存在。最早关于血型亚型、骨髓以及其它组织嵌合体的研究是在 20 世纪 80 年代, Ginsburg 等已经开始用 RFLP 的方法研究移植失败和血液病复发的患者体内的 B、T 淋巴细胞的嵌合体。Schmorl 等于 1983 年在 1 名死于子痫惊厥孕妇的肺循环中首先发现了滋养层细胞,认为胎儿的细胞可以进入母亲的血液循环,致使母亲体内含有 2 种细胞系,也就是妊娠期嵌合体现象。Eric 等 1997 年运用双巢式 PCR 的方法,对肾脏、肾脏和胰脏、肝脏移植的患者的跟踪研究时,在受者体内发现了特异性的供者 MHC HLA-DR 基因。通过对供者 HLA-DR 基因的分析,研究组中所有的患者(有和没有为嵌合体存在的)均表现出了频率以及程度类似的排斥反应。Anan 等在 1999 年,研究血液病患者的血型嵌合体时,发现 2 名无 MDS 的患者的血液中同时含有 2 种不同的造血细胞系,而 1 名 MDS 患者的血液中则检测出 ABO 镶嵌体, MDS 患者体内的恶性克隆性细胞的产生是第 7 号、9 号或者其他的染色体异常而导致的,在 MDS 患者的外周血中,很少见到镶嵌体。但同时 Anan 等认为, MDS 患者体内含有 2 种不同的造血细胞系,其中的 1 种细胞恶性克隆性增生,在外周血中难以检测到恶变细胞系,因此,常规外周血检测不会发现血型嵌合体现象。

2 嵌合体的分类

嵌合体可以分为先天遗传性和获得性,获得性嵌合体是由于骨髓移植,胎肝移植,异体外周血造血干

细胞移植，宫内输血等造成的，而先天性嵌合体是在胚胎时期形成的，又分为双倍体，三倍体及四配子体嵌合体。随着检测技术的提高，自然产生的嵌合体将比我们以前意识到的要多。

2.1 先天性嵌合体

指在胚胎或妊娠时期形成的嵌合体：

1) **Twin Chimeras**: 由于妊娠早期异卵双生子之间存在血管的交叉吻合，造血干细胞会经由吻合的血管通路进入对方体内。同时，在获得性免疫耐受的基础上，异卵双生子的血管吻合相互分离之后，植入的造血干细胞便可在新的宿主体内长期增殖，导致由造血干细胞发育成熟的身体内全部细胞（外周血细胞，淋巴细胞，巨噬细胞、脾等）都是嵌合。但仅限于造血细胞系，实质组织器官的细胞很少见。在动物中双倍体嵌合体常见，而检测出来的人类血型嵌合体相对少见，这原因有 4 个：健康个体的是在偶然情况下发现的；双生子需是 2 个受精卵中异基因表达不同抗原时才能检测出来；而且随着年龄增长嵌合体的比例会有所减少；少于 1% 的细胞群（微量开米拉）很难检测出来。

2) **Tetragametic Chimeras**: 是在受精过程中，由 2 个卵细胞和 2 个精子相互结合而产生的四倍体。这一四倍体受精卵继续进行减数分裂，就可能产生多种不同来源的细胞系。因此这一嵌合体并不局限于造血细胞系，可能是检测出外周血中同时存在 2 种不同的造血细胞系而被发现；也可在其他组织器官如口腔粘膜上皮，头发，甲状腺等存在不同的细胞系而被发现；还可以在一些性别异常（体内同时有 2 种不同的性染色体，表现为同时具有男性和女性的生殖器官）的个体中发现；一些同性的嵌合体会因为一些特殊的表象而被发现的，比如不同颜色的眼睛，或是身体上出现片状的不同颜色的皮肤等；也有一些情况是在 HLA 分型或是染色体检测时出现异常而被发现的。另外，也有报道在严重畸形的新生儿中也可以发现这种嵌合体的存在。

3) **妊娠血型嵌合体**: 是指妊娠期间及其后的一段时间内，母体循环中含有胎儿的细胞的现象。妊娠期间，胎儿的细胞可以经由胎母之间的血液交换进入母体循环，定植于母体内，并能长期存在。在母体血浆中检测胎儿的 DNA 对预测新生儿溶血病是个重大发现，它降低了传统侵入性产前诊断的风险，从母体血液中已能鉴定胎儿 RhD 血型。临床上许多病例显示一些自身免疫性疾病（如系统性硬皮病 SS 和系统性红斑狼疮 SLE 等）以及移植物抗宿主病（GVHD）等都可能与这种微小嵌合体有关。虽然这些自身免疫性疾病的发生机制仍尚未明确，但临床上认为这种嵌合体是直接刺激母体内的主要组织相容性复合体（MHC）抗原的因素，并且很可能与器官移植后的慢性排斥反应以及一些恶性血液疾病的复发有关。

2.2 获得性嵌合体

1) **异体干细胞嵌合体**: 在异体造血干细胞及骨髓移植之后形成的嵌合体。移植后，具有增殖能力的造血细胞会在受者体内继续增殖，分化，成熟，随后释放到外周血中，以部分替代病变的细胞的功能。但作为异源的移植物，会刺激受者的免疫系统，产生一定的排斥反应，因此，通过对受者体内这种嵌合体的存在状态，数量的增加、减少等变化的检测，可以评估和预测移植物的状态，移植后的 GVHD，以及一些相关疾病的情况，对于移植后的治疗方案的制定具有重要的参考价值。完全性嵌合体是由供者的造血细胞完全取代受者的造血细胞系，混合的异基因嵌合体会同时对供者和受者的血细胞产生影响。这种移植后的嵌合体对于受者来说可能是有利的，它可能会使受者产生对于供者细胞或器官的免疫耐受性，而减弱或避免 GVHD 发生。

2) 红细胞移植后的嵌合体: 见于常规含有红细胞的血液输注, 输注后受者体内会含有供受双方的红细胞。人类有 30 个血型系统, 309 个抗原, 常规血型鉴定只有 ABO 和 Rh(D) 抗原, 血液输注时别的血型抗原是不可能相同的。而且例如非 O 型受者接受 O 型红细胞时, ABO 血型鉴定会出现开米拉现象。受者的红细胞可以通过 DNA 检测技术加以区分。淋巴细胞的嵌合现象非常少见, 往往是由于输入未经辐照的非去白细胞的红细胞而产生的, 这一现象可见于宫内输血、血液疾病输血以及外伤输血后。

3) 实质器官移植后的嵌合体: 见于实质器官如肾脏、胰脏、肝脏等的移植后。

4) 肿瘤嵌合体: 一些血液系统的肿瘤本身相对于发生的部位来说, 就是一种嵌合体。例如绒毛膜癌——一种恶性的胚胎源性肿瘤, 就是一种肿瘤嵌合体。在绒毛膜癌中, 经常可以发现有不同的胚胎期的组织细胞。Nanolov 等曾发现在 1 个男性 (XY) Burkitt 淋巴瘤患者的体内, 检测到女性的染色体组 (XX), 另外 2 例相似的病例中也发现同样的现象。这种嵌合体的发现, 可以提示肿瘤的起源, 对临床上肿瘤的诊断、评估及治疗方案的确定具有重要的参考价值。

3 嵌合体血型的检测方法

早期, 嵌合体的检测仅限于血清学方法。如 ABO 正反定型, ABH 唾液物质, 细胞遗传学试验、血型体外凝集试验等。该方法只能在出现混合凝集外观时提示可能是血型嵌合体, 敏感性很低, 需更加敏感的实验进一步确认。随着分子生物学的发展, 分子生物学以及其他领域的高新技术, 特别是分子克隆、PCR 体外扩增和 DNA 测序技术, 为嵌合体血型的发展带来了无限的生机和前途。目前运用于嵌合体血型鉴定的主要有小卫星 DNA (minisatellite DNA)、微卫星 DNA (microsatellite DNA)、PCR-序列特异性引物 (PCR-SSP)、PCR-短串联重复序列 (short-tandem repeat), PCR-直接测序法、克隆测序法、芯片技术、流式细胞术等方法。

3.1 PCR-序列特异性引物 (PCR-SSP) 法

PCR-SSP 法是 1 项针对基因突变位点的不同核苷酸分别设计一系列特异性引物, 简捷, 易操作, 特异性好和灵敏度高, 结果直观。由于 HLA 等位基因丰富, PCR-SSP 法鉴定 HLA 等位基因在开米拉血型鉴定中, 常常出现 3 个或 4 个等位基因, 提示嵌合体的可能性。而在进一步进行 ABO-SSP 法检测其 ABO 等位基因时, 由于目前大多数商业试剂 A 基因是在排除 B 和 O 等位基因的基础上确定的, 如果嵌合体血型中嵌合 A 抗原, 会造成漏检 A 等位基因。为了避免这一点, 我们在选择此法确定嵌合体血型时, 必须单独设计 1 个针对 A 基因序列的引物进行特异性扩增。

3.2 PCR-直接测序法

PCR-直接测序法虽然具有相对灵敏度高, 特异性好等优点, 但是对于嵌合体血型鉴定, 只有个别文献报道可鉴定出 2 个以上等位基因。由于数量很少的细胞系会与血液中的主体细胞产生竞争性抑制, 直接测序往往不能鉴定出拷贝数较少的基因。而这时对基因进行克隆测序, 挑选大量克隆子测序是唯一可以发现低拷贝数量基因的方法。

3.3 PCR-短串联重复序列 (short-tandem repeat)

短串联重复序列 PCR 复合扩增, 是指由 2-7bp 串联重复序列作为核心单位而成的 DNA 序列, 具有高度的多态性和体细胞完整性, 同一位点在不同个体间因核心单位重复次数不同而存在长度多态性。STR 作为一类呈高度多态性的遗传标记, 已广泛应用于法医鉴定中。此技术灵敏、快速, 是目前最常用的检测嵌合体

的方法之一。商业试剂盒中 D5S818, D13S317, D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51, D3S1358, vWA, FGA, TH01, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, CSF1PO, Amelogenin 位点等位基因的扩增中某个或某些位点可出现 3 或 4 个峰, 由于竞争性抑制, 额外峰常形成比正常峰低的峰, 易漏检。STR 位点中有些位点没有出现异常, 有一部分可能是在父源、母源中可能含有相同的重复数目, 而被遮盖的原因。

3.4 流式细胞术

流式细胞仪对检测骨髓移植后的嵌合体非常敏感, 可以精确地检测出 1%-10% 的微量红细胞, 而常规的血清凝集试验则无法测出如此微量的红细胞。

4 意义

嵌合体血型课题已从人们当初对其的好奇转向对免疫耐受机制等研究的重要领域。随着异基因干细胞移植和骨髓移植的不断开展, 人工诱导的嵌合体越来越多见。有研究表明异基因干细胞移植以及骨髓移植之后形成的嵌合体, 对受者和移植物均有影响, 并且可能有利于宿主对于移植物的免疫耐受, 在一定程度上能反映移植物的状态。在不同的条件下, 通过适当的检测方法对移植后的患者体内嵌合体的分布及其数量的变化的检测, 可用来评估及预测移植后的排斥反应、GVHD 以及一些自身免疫性疾病的情况。比如白血病患者体内的残留的白血病微小嵌合体, 往往提示有疾病复发的危险。因此准确以及敏感的检测出患者体内的微小残留病变, 可以早期预测、发现疾病的复发, 对其采取相应的治疗措施, 以改善患者的病情。

嵌合体血型能引起严重的输血反应: 有 1 例 61 岁因移植术后高血压症, Hct 降低, 输入量为 281 ml O 型 (此捐血者有双胞胎, 血液中含少量 B 抗原) 的红细胞几小时后发生严重的溶血。嵌合体现象常常会导致 ABO 表现型遗传上的不相符。在中国台湾中发现 1 个 21 岁大学生的血清学为 AelBel, 但她的父亲、母亲却分别为 BO1 型和 A102O02 型。通过单体型基因的 HLA-ABC, HLA-DR-B, 16 个 STR 位点以及 2 个 X 染色体, 6 个 Y 染色体 STR 位点的检测分析, 证实该个体为 A102O02/B101O02 开米拉血型。我们在 1 例外科手术需输血的常规血型鉴定中, 孩子是 A3B3 型, 但父母则分别为 AB 型和 O 型, 对亲子关系产生怀疑, 我们发现此男孩是 A102/O01, B101/O01 嵌合的四倍体开米拉, 其中 A102/O01 基因是引起弱 A 表达的原因。HLA-A, DR 基因和 STR-PCR 检测的 D8S1179, D13S317 和 vWA 位点均有 2 个以上的单体型存在。

2 《双精子嵌合体致 ABO 血型正反定型不符 1 例》

作者: 朱培元, 严京梅, 薛敏, 叶东, 姚根宏, 栾建凤

来源: 临床输血与检验 2014 年 1 月第 16 卷第 1 期

摘要

目的: 对 1 例正定型呈混合凝集的血型正反定型不符样本进行鉴定。

方法: 采用微柱凝胶法进行 ABO、RhD 血型鉴定、直接抗球蛋白试验和不规则抗体筛查, PCR-SSP 法进行 ABO 基因分型, 并分析外周血染色体核型。

结果: 先证者 ABO 正定型为红细胞混合凝集, 反定型检出抗-A1。母亲和父亲分别为 O 型和 AB 型。先证者 ABO 基因座位存在 O1、A201 和 B 三个等位基因, 其中 O1 来自母亲, A201 和 B 来自父亲。核型分析显示先证者血液中存在 46,XX 和 46,XY 两种细胞, 而父母核型正常。

结论：先证者为孤雌分裂产生的两个相同的卵子被两个精子受精后所产生的嵌合体。

临床资料

先证者，年龄 17 岁，女性，试管法 ABO 血型鉴定发现正反定型不一致，正定型为 AB 型，反定型为 B 型（存在抗-A）。其母足月妊娠，单胎分娩。先证者无输血史，未接受过造血干细胞或器官移植。体格检查显示女性外生殖器、乳房发育正常。妇科检查显示子宫前位、大小正常。血清卵泡雌激素、黄体生成素、泌乳素、睾酮和雌二醇水平在正常范围。

方法

（1）血清学试验：采集先证者及其父母的外周血样本，采用微柱凝胶法进行血型鉴定、直接抗球蛋白试验和不规则抗体筛查。

（2）ABO 基因分型：使用人类 ABO 血型基因检测试剂盒（购自天津秀鹏生物技术开发公司）。

（3）染色体核型分析：制备植物凝集素刺激的外周血淋巴细胞间期核，分析 G 带染色体，计数并分析 100 个分裂相。

结果

（1）血清学结果

先证者 ABO 正定型呈混合凝集，在抗-A 和抗-B 柱中均有约 50% 的红细胞凝集；反定型检出抗-A。（图 1、表 1）。先证者 RhD⁺，直接抗球蛋白试验阴性，不规则抗体筛查试验阴性。其父亲为 AB、RhD⁺，母亲为 O、RhD⁺。

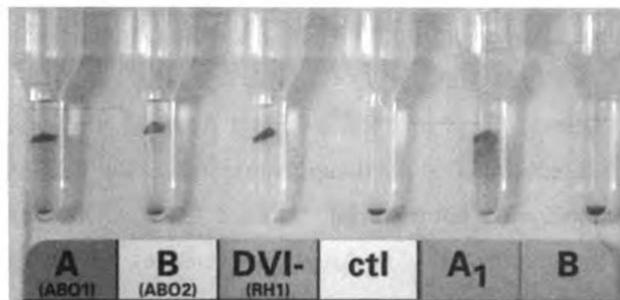


图 1 先证者 ABO、RhD 鉴定结果

表 1 先证者及其父母血清学及 ABO 基因分型结果

系统	父亲	母亲	先证者
RhD	+	+	+
ABO			
表型	AB	O	AB(混合凝集)
基因型	A201B	O1O1	O1A201B

（2）ABO 基因分型结果

先证者存在 O1、A201 和 B 等 3 个等位基因，父亲基因型为 A201B，母亲为 O1O1（表 1）。

（3）染色体核型分析结果

先证者血液中存在 2 种细胞：46,XX（46/100）和 46,XY（54/100）。

讨论

由于本研究中的先证者外表正常，分娩时并无双胞胎，无输血史和干细胞移植史，其父母 ABO 血型正

反定型相符，因此怀疑为罕见的双精子嵌合体。ABO 基因分型显示先证者的 2 个等位基因 A201 和 B 来自父亲，而只有 1 个等位基因 O1 来自其母亲，因此 ABO 混合凝集是由于同时存在 A2 和 B 两种红细胞所致。此外，核型分析结果表明父亲遗传了 1 个 X 染色体给 46,XX 细胞，遗传了 1 个 Y 染色体给 46,XY 细胞。这些结果均证实先证者为双精子嵌合体所导致的 ABO 血型正反定型不符。

本研究显示父亲遗传了 2 个单倍体给先证者，母亲只遗传了 1 个单倍体，因此该先证者为孤雌激活的 2 个相同的单倍体卵子被 2 个精子受精后所产生。

3 《ABO 基因调控区变异对其表型的影响》

作者：王静，顾玉微，游国岭，王成云，顾萍，潘秋辉

来源：中国输血杂志 2019 年 9 月第 32 卷第 9 期

摘要

目的：探讨 ABO 基因调控区增强子、启动子变异对 ABO 表型的影响。

方法：对 4 名来自上海儿童医学中心血型鉴定正反不符的患儿标本，采用 ABO-Rh 血型确认卡、中性卡、抗球蛋白检测卡在全自动血型检测系统上做血清学血型鉴定、抗球蛋白试验和抗体筛查，采用 PCR 结合直接测序法检测患儿及其中 1 个家系的 ABO 基因增强子、启动子、第 1-7 外显子及其邻近内含子序列。

结果：4 名患儿的红细胞分别与凝胶卡中抗-A、抗-B 试剂反应出现弱阳性或双群现象（DP），其表型分别为 ABweak、Aweak、Aweak、AweakB 型。DNA 测序：4 名患儿基因型分别为 ABO*A1.02/B.01、ABO*A1.02/O.01.02、ABO*A1.01/O.01.02、ABO*A1.02/B.01/O.01.04，同时 ABO 基因调控区增强子或启动子分别存在变异现象；2 例为增强子微卫星拷贝数异常、其中 1 例伴启动子变异，2 例为血型嵌合体引起增强子突变而导致的血型抗原弱表达。病例 3 患儿父母表型分别为 A 和 B 型，基因型分别为 ABO*A1.02/O.01.01 和 ABO*B.01/O.01.02。

结论：ABO 基因调控区对 ABO 血型的正常表达起着非常重要的作用，增强子异常或启动子的变异将导致 ABO 血型抗原的表达减弱；检测增强子序列也可以发现可能存在的 ABO 血型嵌合体。

表 2 标本 ABO 血型血清学检测

	抗-A	抗-B	抗-H	A ₁ c	Bc	Oc	DAT	IAT	抗体筛查
患儿 1	4+	DP	2+	-	-	-	-	-	-
患儿 2	DP	-	3+	-	3+	-	-	-	-
患儿 3	2+	-	3+	4+	4+	-	-	-	-
患儿 3 父	4+	-	+	-	4+	-	-	-	-
患儿 3 母	-	4+	+	4+	-	-	-	-	-
患儿 4	DP	4+	+	-	-	-	-	-	-
正常 AB 型标本	4+	4+	±	-	-	-	-	-	-

注：DAT 为直接抗球蛋白试验；IAT 为间接抗球蛋白试验；正常 AB 型血清为试验对照；DP 为凝胶法的双群结果

讨论

标本 2 为 ABO*A1.02/O.01.02 基因型，增强子 CBF/NF-Y 微卫星序列第 1 串联第 41 位为 A/C/G 3 个碱基，检测到 3 个等位基因，为嵌合体。1 个 43bp 串联是 A 等位基因（第 41 位为 A），4 个 43bp 串联是 2 个 O 等位基因（第 1 串联第 41 位分别为 G 和 C）。嵌合体的等位基因正是引起 A 型抗原减弱的原因。

标本 4 为 ABO*A1.02/B.02/O.01.04 基因型，增强子第 1 串联第 41 位为 A/C/G3 个碱基，带 3 个等位基因，为嵌合体。1 个 43bp 串联是 A 等位基因（第 41 位为 A），4 个 43bp 串联是 B 等位基因（第 1 串联第

41 位为 G)，另外 4 个 43bp 串联是 O 等位基因（第 1 串联第 41 位为 C）；外显子的多态性也显示该患儿同时存在 A1.02、B.02 和 O.01.043 个等位基因(表 3)，分别遗传自其父 ABO*B.02/B.02 和母 ABO*A1.02/O.01.04 等位基因（表 3）。嵌合体的等位基因是造成其 A 型抗原弱表达的原因。

4 《血型嵌合体一例血清学特点及基因学测序分析》

作者：孔存权，连利霞，朱伟彦，杨子怡，燕备战

来源：郑州大学学报（医学版） 2019 年 1 月第 54 卷第 1 期

摘要

目的：对一例疑似血型嵌合体进行血清学及基因学鉴定。方法：采用血清学标准方法鉴定 ABO 血型；PCR 扩增 ABO 基因 7 个外显子及其侧翼序列，通过测序分析进行基因学定型；采用凝聚胺介质和 Liss-coombs 卡进行交叉配血试验。结果：血清学正定型表现为抗 A 凝集（强度为 4+），抗 B 呈混合凝集（±）且抗 B 管底部有大量红细胞。反定型显示 A、B、O 型细胞均不凝集。家系调查显示其父为 B 型，母为 A 型，子为 O 型，正反定型均一致。测序结果显示 ABO 基因第 6、7 外显子存在 3 个等位基因 A102、B101 和 O02，其中 O02 和 B101 来自于其父，A102 来自于其母。配血试验表明 AB 型悬浮红细胞配血主、次侧均无溶血、无凝集；A、B、O 型悬浮红细胞配血主侧无溶血、无凝集，次侧无溶血、有凝集。结论：患者是嵌合体血型。

表 1 先证者及家系调查血清学结果

受检者	正定型					反定型			
	抗 A	抗 B	抗 D	抗 H	抗 AB	自身 c	Alc	Bc	Oc
先证者	4+	±	4+	1+	4+	0	0	0	0
父亲	0	4+	4+	1+	4+	0	3+	0	0
母亲	4+	0	4+	1+	4+	0	0	3+	0
儿子	0	0	4+	4+	0	0	3+	3+	0

0 代表无凝集，+ 代表凝集强度，± 代表混合凝集

讨论

目前的研究表明具有嵌合体血型的人，其红细胞在做 ABO 血清学检测时常呈现混合外观视野，但常规的玻片法、试管法等鉴定时并不容易发现，具有高灵敏度的微柱凝胶卡法也只能怀疑，嵌合体血型弱抗原也不能通过吸收释放试验与抗原减弱区分开来，确诊还需要借助 DNA 血型分型技术。嵌合体现象常常会导致 ABO 血型遗传不符合经典遗传规律。具体到本例先证者，其外表正常，分娩时并无双胞胎、输血史和干细胞移植史，其血清学结果为 AB 型，但其红细胞凝集不典型（混合视野），基因定型显示可能含有 A102/B101/O02 等位基因。家系调查结果显示其父为 B 型，基因型为 B101O02；母为 A 型，基因型为 A102O01；初步怀疑先证者为嵌合体或者亚型。第 6、7 外显子测序结果表明先证者具有 A102/B101/O02 共 3 个等位基因，B101 和 O02 可能来自于其父，而 A102 来自于其母。先证者的遗传因素导致在 3 个等位基因存在的情况下，A 与 B 转移酶未能充分发挥作用，血型鉴定时呈现混合凝集外观。先证者未能显示 4 个等位基因可能是在一个合子中产生的细胞遗传学异常的结果，例如三体型，额外的染色体来自一个亲本。

5 《罕见开米拉 A3B3 血型的分子生物学研究》

作者：陈爱蓉，黄毅

来源：实验与检验医学 2012 年 2 月第 30 卷第 1 期

摘要：

目的：一例 ABO 表型鉴定困难的个体及其家系的分子遗传背景的研究。方法：用常规血清血型方法对其 ABO 血型分型；PCR-SSP 法进行基因分型；同时通过 ABO 基因直接测序及克隆测序、HLA 分型、以及 15 个常染色体位点短串联重复序列检测对该研究对象进行家系研究。结果：患者血清学分型定为 A3B3 型，其 ABO 基因分型、序列测定、HLA-B、DR 基因分型、和 STR-PCR 特异性检测的 vWA 和 D8S1179 位点均有两个以上的单倍体存在。结论：该研究对象认定是一例罕见的开米拉血型，清晰提示此罕见血型的分子基础，有助于深入认识此种分子遗传的方式。

标本来源：

检测对象是一个 12 岁的男孩，因发现右下腹包块伴腹痛 2d 入我院，嵌顿疝术前常规血型鉴定中发现血型鉴定困难。我们分别采集了该男孩和他父母、祖父共计 4 人的血液标本 7ml：5ml 不抗凝血，用于 ABO 血型分型；2ml EDTA 抗凝血，用于 DNA 检测。该家系籍贯为湖南韶山，均没有输血史及血液病史，患者为独生子女。

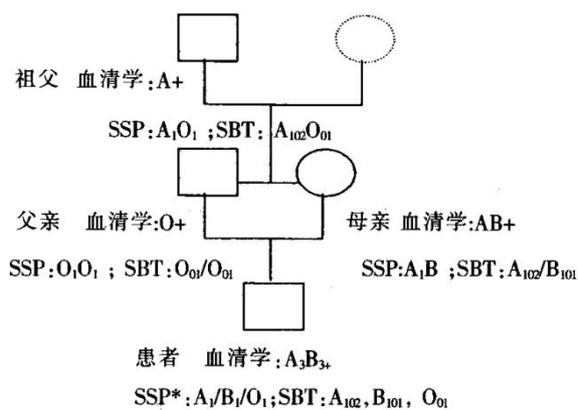


图 1 罕见开米拉血型家系图谱

表 2 HLA-A、B 以及 HLA-DRB1 分型结果

位点	祖父	父亲	母亲	孩子
HLA-A	2,-	2,33	2,31	2,-
HLA-B	27,39	27,51	7,62	7,51,27
HLA-DRB1	13,14	13,14	8,16	13,16,14

讨论：

由于患者没有输血史和移植病史，家系均为健康人群，可以排除获得性开米拉。这个男孩的血型分型为 A3B3 型，ABO 基因型分型为 B101、O01 和少量的 A102。此例中患者低拷贝数量的 A102 基因是引起 AB 表达异常的原因。同时由于竞争性抑制，额外峰常形成比正常峰低的峰，易漏检；而有些常染色体 STR 位点没有出现异常，有一部分原因可能是由于父源或母源中含有相同的重复数目而被掩盖。由于缺少对该男孩的咽拭子、头发毛囊、以及指甲等的进一步分析，无法判断该例患者是否为 A102/O01，B101/O01 四倍体全身性的开米拉。我们对该男孩的父母的 STR 检测的结果并不能区分该男孩是这两种开米拉中的哪一种，目前暂定为血型开米拉。

6 《异常 ABO 表型遗传的分子背景研究》

作者：喻琼，苏宇清，邓志辉

来源：实验与检验医学 2013 年 2 月第 31 卷第 1 期

我们实验室在一个 4 岁中国汉族男孩，在外科手术前输血的常规血型鉴定中，检出为 A3B3 型，但其父母血型分别为 O 型、AB 型。家属对其亲子关系产生怀疑，通过对其家系的调查得知 4 年前，他的母亲自然分娩了一男一女，而女婴在出生后的第二天因缺氧症窒息而死。在其血液标本研究中发现，ABO 血型基因、HLA-A、DR 基因、和 D8S1179, D13S317, 和 vWA 位点均有三条单倍体存在。这是一例的典型的血型开米拉嵌合体现象，可以很好解释其遗传方式。

7 《四配子嵌合体导致的真两性畸形机制研究》

作者：崔英霞，朱培元，叶小勤，吴元锺，王咏梅，印洪林，姚兵，黄宇烽

来源：中华男科学 2004 年 2 月第 10 卷第 2 期

摘要

目的：报告 1 例四配子嵌合体导致的真两性畸形并讨论其发病机制。方法：对 1 例外生殖器模糊的患者外周血的淋巴细胞、经培养的皮肤成纤维细胞、两种不同性腺组织的成纤维细胞进行染色体核型分析，同时用 X 和 Y 染色体探针进行双色荧光原位杂交（FISH）；对患者红细胞血型、人类白细胞抗原（HLA）和 77 个短重复序列（STR）微卫星标记进行检测；对患者性腺的 2 种不同组织进行组织病理学检查；同时对患者的父母进行红细胞血型、HLA 和 STR 检测。结果：患者外周血淋巴细胞、皮肤成纤维细胞、呈白色和黄色性腺组织的成纤维细胞染色体核型均为 46,XX/46,XY；FISH 检测所有细胞都显示了 XX 或 XY 的杂交信号。46,XY 的核型在外周血淋巴细胞、皮肤成纤维细胞和白色性腺组织的成纤维细胞中占优势；46,XX 的核型在黄色性腺组织的成纤维细胞中占优势。外周血淋巴细胞及 3 种不同组织培养物的 STR 位点检测、ABO 血型分析和 HLA 检测都显示有 2 个不同的单倍体来自父亲，1 个单倍体来自母亲。组织病理学检查患者同一性腺上有两种不同组织，呈白色的组织是睾丸，呈黄色的组织是卵巢。结论：性腺组织病理学检查、染色体核型分析、FISH 是鉴定真两性畸形患者的有效方法，红细胞血型、HLA 和 STR 可为鉴定四配子嵌合体提供重要证据。根据检测结果，患者是由于其母亲生殖细胞孤雌分裂形成 2 个相同配子分别与 X 精子和 Y 精子双受精，形成 2 个合子再经融合发育而成的 1 个个体。

红细胞血型结果

患者 ABO 血型有 A 型和 B 型 2 个红细胞群，血浆中有抗 A1 抗体。其父为 AB 型，其母为 O 型。患者 Rh、Kidd、P 和 MNSs 血型，与父母均相同。推测患者有 2 个不同的单倍体来自父亲。

讨论

该患者红细胞 ABO 血型有 A、B 两个细胞群，核型为 46,XX/46,XY，STR 和 HLA 都显示有父源的 2 个不同配子成分和母源的 1 个配子成分（由于孤雌分裂形成 2 个相同配子，DNA 完全相同，显示只有 1 个配子成分），因此诊断为四配子嵌合体。这种情况可解释为来自母亲生殖细胞经孤雌分裂形成两个相同的

配子与 X 精子和 Y 精子双受精。该患者性腺组织经病理学检查证实为卵辜，诊断为真两性畸形。就其形成机制，可能是由于在未分化性腺中 46,XX/46,XY 两种细胞系的存在，XY 染色体导致性腺分化为辜丸，XX 染色体导致性腺分化为卵巢，两种组织基本同步分化，因此发育成相同的两个性腺即卵辜。至于在卵巢和辜丸的成纤维细胞中都显示有 46,XX/46,XY 的嵌合，可能是因为两种性腺组织融合成 1 个器官卵辜，成纤维细胞彼此混合所致。由于卵辜中有两种性腺组织，使辜酮分泌量较男性低而较女性高，因此男性附属性器官得不到发育，但使患者阴蒂肥大，同时支持细胞合成抗 Müller 激素（AMH）不足，使女性附属性器官得以发育。该患者在出生 2 个月时检查的外周血染色体核型为 46,XY，11 年后再次检查时染色体核型为 46,XX/46,XY，出现了嵌合，可能是在生命的早期阶段，1 种克隆选择占优势所致。由于当时 46,XY 细胞占优势，46,XX 细胞太少，在检测水平以下而没有检测出来。

8 《AB/O 嵌合体血型血清学特点分析的发现》

作者：关茵 许飞 田宗斌 向东

来源：临床血液学杂志 2018 年 31 卷 4 期

样本介绍：

受检者，女，无输血史，怀孕第 1 胎时，受检者正定型检测抗-A 和抗-B 两管均有混合视野，第 1 胎孩子 ABO 血型无异常。此次为二次受孕，孕 37 周，正定型检测依然是抗-A 和抗-B 两管均有混合视野，经询问，受检者本人是双生子，有一个双生哥哥。标本送至上海血液中心输血研究所血型参比室进一步检测。

结果：

(1) 受检者原始细胞 ABO 正反定型结果见表 1：

表 1 患者血样正反定型结果

反应条件	正定型		反应条件	反定型			
	抗 A	抗 B		A1c	Bc	Oc	自身
IS	2 ^s +mf	2+mf	IS	0	0	0	0
多次离心	2 ^s +mf	2 ^s +mf	增加 4 滴血清	0	0	0	0

注：IS 立即离心(Immediate Spin)；mf 混合视野凝集(Mixed Field)。

(2) 受检者原始细胞抗-H 检测结果：患者细胞 2+mf，Bc 对照 1+，Oc 对照 3+；

(3) 分离吸收后细胞的 ABO 正定型及抗-H 检测结果见表 2。

表 2 分离吸收后细胞的 ABO 正定型及抗-H 检测结果

栏目	IS/多次	
	抗-A 吸收后未凝集的悬液	抗-B 吸收后未凝集的悬液
抗-A	-/-	-/-
抗-B	-/-	-/-
抗-H	3+/4+	3+ ^s /4+

讨论:

根据结果可见,在分别去除与抗 A 及抗 B 反应的红细胞后,剩余红细胞均符合 O 型红细胞特点。判断受检者为 AB/O 嵌合体血型。本例受检者为孕妇,有一个双生子哥哥,可判断为异卵双生子。通过上述检测过程,排除了存在 A 型或 B 型红细胞的可能。可以确定受检者体内仅存在 AB 型和 O 型两群红细胞。这两群红细胞很可能是异卵双生子之间血液交换形成的嵌合型。其他可能性包括白血病造成的抗原减弱,由于患者没有任何血液病症状,基本可以排除这一可能性。另外检测过程中发现 AB 型和 O 型细胞总量基本相当,但未进一步测定 2 种细胞的比例。

输血策略:

嵌合体血型的献血和输血也应视情况而定,一般不会造成免疫性输血问题。例如本例 AB/O 嵌合型,正反定型会鉴定为 AB 型,无论作为受血者还是献血者,均不会出现免疫性输血问题。

9《利用红细胞 Kidd 血型基因实时荧光定量 PCR 法监测个体嵌合状态》

作者: 陈舒, 许先国, 刘瑛, 洪小珍, 朱发明, 吕杭军, 严力行

来源: 中国实验血液学杂志 2012; 20 (3): 676-678

摘要

本研究建立红细胞 Kidd 血型基因实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术以监测个体嵌合状态。根据红细胞 Kidd 血型等位基因的差异设计 TaqMan MGB 探针和特异性引物,进行实时荧光定量 PCR 检测个体嵌合状态,利用倍比稀释的方法模拟个体 DNA 嵌合状态并进行敏感性分析。结果表明,实时荧光定量 PCR 法可有效区分 JK*A 和 JK*B 等位基因。人工嵌合 JK*A 和 JK*B 的 DNA 标本实测值与理论值无显著差异 ($P>0.05$)。在 10^4 个嵌合型细胞中存在 156 个供者型细胞时,该方法可有效检出供者型细胞。结论:建立的红细胞 Kidd 血型基因实时荧光定量 PCR 法检测嵌合体具有可行性,可以在一定范围内用于定量监测嵌合样本。

10 《ABO 基因相关多态性位点在 ABO 血型不合 HSCT 移植后嵌合体定量分析中的研究》

作者: 刘峰

来源: 华中科技大学博士学位论文 2011

摘要

目的: SYBR green I 实时荧光定量 PCR 方法在 ABO 血型不合 HSCT 移植后嵌合体定量分析中的评价。方法: 抽提相应 261 (正常纯合子、突变纯合子、杂合子)、803 (正常纯合子、突变纯合子、杂合子) 模板,经白蛋白基因标定浓度至 $20\text{ng}/\mu\text{l}$, 467 (杂合子、正常纯合子) 模板浓度标定至 $40\text{ng}/\mu\text{l}$, 对阳性及相应位点的阴性模板按 10 倍比例稀释制备人工混合嵌合体 DNA 模板,以及 100% (纯阳性模板)、0% (纯阴性

模板)，同步进行实时荧光定量 PCR 检测。扩增完毕后进行熔解曲线分析。所得的 Ct 值与实际稀释后所对应 NPs 阳性位点基因拷贝数的对数值由稀释度低到高的顺序逐点纳入回归分析，以确定各位点线性定量检测范围。结果：通过熔解曲线分析，所有位点阳性模板均扩增出特异性产物。(1)所有 261 位点比例稀释线性定量检测范围均至少 $\geq 10^{-3}$ 。(2)467 位点比例稀释线性定量检测范围至少 $\geq 10^{-2}$ 。(3)所有 803 位点比例稀释线性定量检测范围均至少 $\geq 10^{-2}$ 。结论：建立的 ABO 基因相关 NPs 在嵌合体定量分析中的具有较高的检测灵敏度，同时 261、803 杂合子阳性与纯合子阳性的线性定量检测范围无明显差异。

11 《输血相关微嵌合体的进展》

作者：崔颖，包汝娟，穆士杰

来源：中国输血杂志2018年9月第31卷第9期

摘要

输血相关微嵌合体 (TA-MC) 是由输血引起的同种异体细胞稳定持续存在的异体暴露。TA-MC 与创伤后的输血有关，但涉及的深层机制仍需进一步研究。本文综述了 TA-MC 的最新的诊断方法、TA-MC 的免疫耐受机制、影响 TA-MC 产生的因素及 MC 的临床意义

2 输血微嵌合体的诊断分析方法

早期诊断 TA-MC 的技术主要依赖于：1) PCR 识别 Y 染色体法，基于性别的鉴定方法；2) 基于实时定量 PCR 的检测法，它的运用极大地提高了研究者们对微嵌合体的检测灵敏度和特异性。3) 人白细胞抗原 (HLA) -DR 检测法，该技术能识别 HLA-插入/缺失多态性。这些方法在之前的文献中已有详细的说明，本文介绍 1 种基于 HLA 抗原的通过流式细胞术在血细胞中分选微嵌合体的方法，Drab-bels、Eikmans 等通过 1 种靶向人 HLA 抗原的单克隆抗体，建立比例低至 0.01% 的微嵌合体的最佳分离方法，该单抗能识别 2 个不同的抗原，1 种针对微嵌合细胞，另 1 种靶向宿主细胞。分离成功后，再使用 DNA 分析法测 HLA 等位基因的特异性、Y 染色体的 RT-qPCR 测定来验证分离的细胞群的纯度，分选后的阳性部分的嵌合 DNA 标记物的 PCR 信号与预处理样品相比显著增强，因此该方法已成功运用到从胎儿脐带血单核细胞中分离母体微嵌合体细胞。该方法能最大程度地富集宿主中可能存在的微嵌合体细胞，为微嵌合体细胞的表型和功能的研究开辟了一条新的道路。

3 TA-MC 的形成机制

产生 TA-MC 的机制尚未完全阐明，由创伤和输血引起的免疫系统变化可能是导致 MC 发生的原因。严重创伤会诱发短期免疫抑制及与免疫抑制有关的感染性并发症，二者均是导致创伤患者死亡的重要原因。早期研究显示，创伤和刺激会使涉及固有免疫和获得性免疫的 T 细胞、B 细胞和单核细胞等的功能受损。体内实验表明，使用如植物血凝素 (PHA)、美洲商陆有丝分裂原 (PWM) 或细菌脂多糖 (LPS) 等刺激创伤后 5-10d 的小鼠，小鼠会表现出 Th1 型细胞因子，如白细胞介素 (IL) -2、干扰素- γ (IFN- γ) 等分泌减少、T 细胞增殖反应降低；Th2 型细胞因子，如 IL-4 和 IL-10 分泌增加，该实验现象也已经在人体中得到证实。此外，还伴有 IgG 或 IgM 减少。尽管单核细胞增多，但其功能被抑制，具体表现为受刺激后 HLA-DR 表达降低和 IFN- γ 分泌减少。早期研究也指出随着 T 细胞的抑制，巨噬细胞产生的前列腺素 E2、IL-6、IL-10

增加；固有免疫应答失调，Toll样受体（TLR）-2和TLR-4介导巨噬细胞分泌的IL-1、IL-6和TNF- α 增加；中性粒细胞在受到严重创伤刺激后，分泌IL-10水平升高。在分子水平上，外周血单核细胞分泌的NF- κ B减少，这使得T细胞活化的重要环节受损。以上研究的主题都涉及了创伤后Th2型细胞因子对T细胞免疫应答的抑制。所以，伴随创伤的免疫系统紊乱或许能解释为什么患者创伤后输血会出现TA-MC。创伤性损伤和输血是重要的免疫刺激物，它们引起的免疫调节形成了一个独特的环境，这对TA-MC的发展至关重要。1项病例对照研究的实验显示，创伤后输血的TA-MC的患者体内淋巴细胞反应很弱。以上的研究，只能说明“短期TA-MC”或许是由创伤后短暂的免疫系统紊乱引起的；然而，这些嵌合体是如何在宿主免疫系统恢复后得以延续数十年，深层的机制还不太清楚。一种解释是宿主对嵌合体长期的外周免疫耐受，机体清除反应性的宿主细胞，或诱导机体对嵌合体无应答。

4 影响 TA-MC 形成的因素

迄今为止，几乎所有的研究都表明，TA-MC似乎仅出现于创伤性损伤后输血的患者中，但不是所有的创伤后输血都会引发TA-MC，所以需要进一步的研究确定是否有其他因素，如供体/受体HLA匹配程度、创伤的严重程度、输血产品的可变性等，但归根结底，取决于这些因素是否影响免疫应答的类型。近几年有关影响TA-MC形成的因素的研究进展有以下几例：

1) Bloch等试图确定在围产期输血期间是否会产生持久的高水平TA-MC。他们进行了1项前瞻性群组研究，发现在22例接受输血48h内的产妇中，仅有2例妇女出现短暂的TA-MC的证据；但输血后6周和6个月后的2个时间点，都没有检测到持续存在的TA-MC。

2) Amanda等开展的1项病例群体分析研究发现，极个别年轻女孩体内的稳定持久存在的微嵌合体也可能是其母亲孕期输血导致的。

3) Sanchez等纳入了409例名内外科成人和儿科女性受血者，评估她们接受了去白细胞和辐照的红细胞和血小板输注后体内是否会产生TA-MC。在输血48周后发现，在207名成人中，有40名成人（占比19%）受血者表现出低水平MC；202名儿童中，有44名（占比22%）儿童受血者表现出低水平的MC，但均无持久性，证明成人和儿童接受去白细胞和辐照的成分血后，能防止体内出现持久性的TA-MC。但Rena等纳入了2000—2012年期间输注单位红细胞（RBC）的澳大利亚创伤患者（n=86），结果显示，55例输注血液成分的患者中有9例（占比16.3%）显示TA-MC；31例输注去白细胞的单位红细胞的受血者中有3例（占比9.6%）显示TA-MC。因此，虽然澳大利亚普遍采用去白细胞成分血，但临床结果显示TA-MC的发生率并未显著改变。值得注意的是，纳入以上研究的患者中有一半被记录为在输血时脾损伤或脾切除。因此，但该项研究推断，脾是过滤异常细胞和产生抗体和淋巴细胞的重要器官，若脾脏受损后，即使输注去白细胞成分血，供体细胞依然能够逃避受体的免疫系统。

5 微嵌合体的临床意义

“微嵌合体”的消极临床意义被认为与自身免疫性疾病有关，但之后有研究发现，胎儿嵌合细胞常见于患有红斑狼疮（SLE）且受到创伤的女性体内，她们与健康对照（ $P < 0.001$ ）具有显著性差异，而与无创伤的SLE女性患者（ $P > 0.01$ ）没有统计学差异，所以自身免疫性疾病与微嵌合体的关系，就跟鸡与蛋的例子一样，无法确定明确的因果关系。“微嵌合体”的存在，也有积极的方面：

1) “修复假说”提出具有多能祖细胞功能的嵌合细胞可以发展成为实质细胞应答组织损伤。胎儿祖细胞

在组织损伤后具有多谱系分化、后续招募和再生的能力。

2) 嵌合体为试图寻找改进技术的产前诊断提供了动力, 产前基因诊断依赖于损伤性采样, 例如, 绒毛膜绒毛活组织检查和羊膜穿刺术, 这些方法都有导致孕妇流产的风险, 若孕妇外周循环中的胎儿嵌合细胞或游离 DNA 能被精准地检测到, 就能使孕妇避免高风险的抽样。

12 《Somatic Mosaicisms of Chromosome 1 at Two Different Stages of Ontogenetic Development Detected by Rh Blood Group Discrepancies》

《用 Rh 血型差异检测 1 号染色体在个体发育的两个不同阶段的体细胞镶嵌体》

作者: Eva-Maria Dauber, et al.

来源: Haematologica, 104 (3), 632-638 Mar 2019

摘要

自发性 Rh 血型改变是一个显著的标志, 被报道主要发生在血液系统疾病患者。常规血型分型时, 2 例无血缘关系的个体在高免疫原性 c 抗原(RH4)方面表现出原因不明的混合红细胞表型, 与输血和母胎不相容有临床相关性。大约一半的红细胞是 c 阳性, 而另一半是 c 阴性。这些显然血液健康的女性没有输血或移植的历史, 他们的嵌合体检测结果为阴性。在血液、指甲、头发、白细胞亚群和红系祖细胞中, 1 号染色体微卫星侧翼的基因分型显示, 包括 RHD/RHCE 位点在内的杂合性部分丧失, 其 1p 区域分别为 26.7 Mb 和 42.4 Mb。值得注意的是, 在一个病例中, 所有被研究的组织都检测到这种情况, 而在另一个病例中, 只有髓细胞显示杂合性缺失。两者均携带 RhD 阳性单倍型 CDe 和 RhD 阴性单倍型 cde。RHD/RHCE 基因型的红细胞单群和双色荧光原位杂交分析表明, 改变的细胞系中 cde 单倍体缺失, CDe 单倍体重复。因此, 两个先证者的红细胞 C 抗原(RH2)水平均高于杂合对照组。综上所述, Rhc 表型的分裂似乎是由部分 1p 的缺失和姐妹染色体同源部分的重复引起的。在一个病例中, 这种现象仅限于骨髓干细胞, 而在另一个病例中, 一个多能干细胞系受到影响, 在个体发育的不同阶段表现出体细胞镶嵌现象。

结果

(1) 2 例非亲属个体中自发性 Rh 血型异常

常规血清学血型检测显示, 在 2 例无已知血液病的无血缘关系的女性(先证者 A 和 B)中, c 抗原分型出

现了未预料到的混合视野凝集。这一点在所有使用的抗 c 分型试剂(6 个单克隆和 1 个多克隆)中都很明显。流式细胞术检测 A、B 先证者的 c 阳性红细胞比例分别为 53%、50%(表 1)。此外, 2 例先证者显示正常的 C+D+E-e+ Rh 表型。其他血型(ABO, MNS, P1Pk, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd)均为正常表型(表 1)。这些个体的血浆中未发现意外的红细胞抗体, 红细胞直接抗球蛋白检测为阴性。

表 1 2 例自发性 c 抗原(RH4)混合视野分型先证者的血型表型。

Table 1. Blood group phenotypes of the 2 propositae with spontaneous c antigen (RH4) mixed-field typing.

Proposita	Rh	Blood group phenotype							
		ABO	MNS	P1Pk	Lutheran	Kell	Duffy	Kidd	
A	c± (53% c+)	D+C+E-e+Cw-	A	M-N+S-s+	PI-	Lu(a-b+)	K-k+, Kp(a-b+)	Fy(a+b+)	Jk(a+b+)
B	c± (50% c+)	D+C+E-e+Cw-	A	M+N+S+s+	PI+	Lu(a-b+)	K+k+, Kp(a-b+)	Fy(a+b+)	Jk(a+b-)

±: mixed-field agglutination.

对两例先证者的血源 DNA 进行常规的 RHD/RHCE 基因分型和 RHD 杂合性测定, 结果为 RHD 杂合(Dd), 并预测为常见的 Ccee 表型。两例先证者的 c 阳性红细胞亚群的 c 抗原表达量与 CcDdee 表型对照红细胞相似。两例先证者的 C 抗原表达量均高于 CcDdee 对照, 接近 CCDDee 对照的较高表达量。

(2) 排除先天性或获得性异源嵌合体是造成 Rh 表型异常的原因

双胞胎异源嵌合体或双精受精, 以及人工异源嵌合体(由于输血或器官移植)可能是混合血型表型的原因。然而, 两名先证者都否认有双胞胎或输血或器官移植史。此外, 全血 DNA 的 15 个微卫星位点的分析(位点位于染色体 2-5, 7, 8, 11-13, 16, 18, 19, 21)排除了异源嵌合体: 完全纯合或均衡杂合的等位基因峰, 两个等位基因的最大值出现在每个位点。

(3) 先证者 A 个体发育早期 1 号染色体杂合性缺失

由于 RHD/RHCE 位点位于 1 号染色体的短臂上, 通过 1 号染色体杂合微卫星标记检测同源嵌合体的可能性。在先证者 A 中, 用全血 DNA 和分类的白细胞亚群(CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞和粒细胞)分析 D1S468 (21 Mb RH * D 端粒), D1S234 (0.5 Mb RH * D 端粒)和 D1S233 (5.7 Mb RH * D 着丝粒), 结果显示所有样品的峰高明确不平衡。这表明存在 2 个细胞群, 其中 1 个丢失了 1 个 1p 片段。在 6 个单发根中有 2 个也发现了 LOH。19 个 BFU-E 集落的 DNA 分析表明, 9 个集落具有完整的 LOH。其他比 D1S233 更有着丝粒性的微卫星位点也进行了检测, 但没有 LOH 的证据。LOH 在受影响细胞系 1p 上的最小扩展量至少为 26.7 Mb。

(4) B 先证者中限制在髓细胞内的 1 号染色体杂合性缺失

先证者 B 中, 用全血 DNA 进行 D1S507 (10.3 Mb RH * D 端粒)和 D1S2890 (32.1 Mb RH * D 着丝粒)之间区域的微卫星分析, 结果显示所有样本 LOH 峰高不平衡诊断, 从而证明 2 个细胞群的存在, 其一失去了 1 个等位基因。位于 D1S2890 着丝粒的 D1S252 未显示 LOH。头发的检测结果显示所有检测位点都没有 LOH。用口腔拭子、单发根、分类的白细胞亚群(CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和粒细胞)和 BFU-E 集落的 DNA 进一步研究 D1S2890 的等位基因。在分类的粒细胞和 4/22 个 BFU-E 集落中发现了 LOH 的髓系限制性模式。相

反, 头发(n=3)、颊细胞和淋巴细胞亚群未显示 LOH。

(5) 单红细胞前体细胞分子分析证实 RH 基因型分裂

对分离的 BFU-E 集落的 DNA 进行 RHCE*c 的实时 PCR 基因分型。对两个混合 Rhc 表型的个体的每一个的 6 个 BFU-E 样本进行分析, 显示相似的模式: 6 个测试的 BFU-E DNA 样本中有 3 个显示了 RHCE*c 等位基因的杂合结果;相反, 另一半显示在该位点 LOH(表 2)。重要的是, 只有 RHCE * c 杂合 BFU-E 集落也被发现是 RHD 杂合(Dd), 而 LOH 仅与纯合或潜在半合 RHD 阳性(DD 或 D-)相关(表 2)。这些结果强调了观察到的血型异常的单倍型性质, 并指出 2 个红细胞系共存: 1 个是 2 个亲本 RH 单倍型编码的正常 c 阳性表型(CDe/cde), 另 1 个是仅由 LOH 修饰的 RHCE*c 阴性亲本单倍型编码的 c 阴性表型(纯合 CDe/CDe 或半合 CDe/---)。

表 2 两个 Rh 表型分裂个体的单个红细胞祖细胞的分子 RHCE*c 分析及 RHD 分型。

Table 2. Molecular RHCE*c analysis and RHD typing of single erythroid progenitor cells of both individuals with Rh phenotype splitting.

Proposita	BFU-E colony	RHCE*c	RHD
A	A1	LOH	absent (DD or D-)
	A2	heterozygous	heterozygous Dd
	A3	heterozygous	heterozygous Dd
	A4	LOH	absent (DD or D-)
	A5	heterozygous	heterozygous Dd
	A6	LOH	absent (DD or D-)
B	B1	heterozygous	heterozygous Dd
	B2	LOH	absent (DD or D-)
	B3	LOH	absent (DD or D-)
	B4	heterozygous	heterozygous Dd
	B5	heterozygous	heterozygous Dd
	B6	LOH	absent (DD or D-)

LOH: loss of heterozygosity; BFU-E: erythropoietic burst-forming units.

(6) Rh 血型异常是由体细胞重组相关复制引起的

为了确定 Rhc 阴性细胞克隆是由 CDe 单倍体的半合缺失(CDe/---)还是由 CDe 单倍体的更复杂的体细胞重组相关复制所致, 我们对来自两个研究个体的固定外周血细胞进行了双色 FISH 分析。在先证者 A 和 B 中, FISH 分析显示, 在所有分叶核和圆核中, RH 位点以二倍体存在。尽管没有染色体测序证据, 但这些结果表明 RHCE * c 阳性 / RHD 阴性单倍型体细胞重组相关缺失和 RHCE * c 阴性/ RHD 阳性单倍型体细胞重组相关复制是观察到红细胞表型分裂的原因。因此, 2 个先证者的 LOH 影响的 RHCE*c 阴性细胞系很可能具有纯合的 CDe/CDe 单倍型。

讨论

观察了在常规血清学 Rhc 分型中有不明原因的混合视野凝集的两个个体。混合 Rhc 表型的常见原因, 如红细胞输血或造血干细胞移植, 在这 2 例先证者中被排除。进行了进一步的分子检测, 以确定这种情况的潜在机制。跨不同染色体的微卫星分析排除了已知会导致混合血型表型的自发异源嵌合体。

利用 1 号染色体微卫星标记, 发现涉及 RH 位点的 1p 的部分单倍体缺失的体细胞同源嵌合体是该 2 例

先证者 Rhc 表型异常的原因，分别包含至少 26.7 Mb 和 42.4 Mb。

C (RH2)抗原在红细胞上高表达，几乎接近 RHCE*C 纯合对照的水平，表明 1p 的一部分缺失(消除 RHCE*C 等位基因)已被包含 RHCE*C 等位基因的另一条染色体的同源段的复制修复。FISH 结果进一步支持了这一观点，显示所有检查的细胞核中均存在两个 RH 位点。因此，LOH 受影响的细胞在其改变的 1p 上也没有显示 RH 缺失，这种缺失只能被一个 RH-FISH 信号识别。相反，它们似乎在 1p 上都保留了 RH 位点，在本实验中与正常细胞没有区别。因此，该血清学 Rhc 分型混合视野凝集的机制可能是部分染色体丢失之后复制的体细胞重组。

旨在识别被 LOH 影响的细胞系和组织的进一步研究显示，2 位先证者存在不同结构。在先证者 B 中，观察到 LOH 细胞系特异的分布，即发生在髓细胞亚群的一部分而不是发生在淋巴组织或非造血组织。因此，只有一些(不是全部)研究的 BFU-E 集落表现出 LOH。这些结果与早期研究中自发 Rh 表型分裂的主要遗传背景一致。已在绝大多数混合 RhD 和 RhC 或 RhE 表型的个体中发现髓系限制同源嵌合体，由包括 RHD/RHCE 位点的变异 1 号染色体段的 LOH 导致。在本研究中，这一遗传背景首次报道于自发 Rhc 表型异常。

相反，先证者 A 显示了 LOH 不同的组织累及范围。除了部分骨髓干细胞和 BFU-E 集落外，淋巴细胞和发根也受到这种体细胞改变的影响。这些结果表明，在个体发育的早期阶段，LOH 在一个多能干细胞系中发育，仍然能够分化成造血细胞和发根细胞。

在 1p 上的中等拷贝 LOH 可以损害许多不同基因的表达，包括编码 Rh 血型抗原的基因。混合视野凝集模式的血型分型结果的分析对此类患者的安全输血治疗至关重要。明确的血型分型是输血支持和评估母胎不相容产前调查的先决条件。在许多机构，为了配血，不仅进行 ABO 和 RhD 分型，还考虑 c、K 等高免疫原性抗原。这种扩展的配血策略显著降低了输血受者的同种异体免疫率，对于多次输血的患者群体或育龄妇女尤为理想。两位先证者不是抗 c 和抗 C 同种异体免疫，因为两种抗原都存在。因此，对于这两种抗原似乎不需要特殊的输血策略。

值得注意的是，混合血型表型往往逃避血清学检测，但可能通过分子筛选揭示。后者与献血者检测尤其相关：它可以避免报道过的大量有未检测到的 D 阳性细胞亚群的血清学 D 阴性献血者的红细胞浓缩物导致的抗 D 免疫。

除了这些对输血医学的影响外，血型异常可能只是具有更广泛临床意义的潜在遗传改变的第一个证据。虽然越来越多的认识到包括 LOH 在内的体细胞同源嵌合体在明显健康的受试者中并不少见，但 LOH 为基础的血型差异很可能是髓系疾病的替代标记。除了急性髓系白血病和骨髓增生异常综合征外，在其他恶性肿瘤如结直肠癌、神经母细胞瘤、肺癌和肝细胞癌中也检测到 1p 等位基因缺失。因此，抑癌基因可能位于这个染色体区域。因此，根据 1p 上 LOH 的个体组织分布，潜在的抑癌基因功能丧失可能会增加受影响器

官的恶性转化风险。或者，中等拷贝的 LOH 也可能导致致癌突变的复制，从而增加癌症的可能性。最近的数据表明，检测 LOH 不仅对髓系肿瘤有诊断作用，而且对预后也有潜在的影响。综上，当遇到自发性血型表型分裂的患者时，应考虑进行临床和实验室血液病筛查调查。

13 《The First Case of Congenital Blood Chimerism in Two of the Triplets in Korea》

《韩国首例三胞胎之二中的先天性血液嵌合体》

作者：Yoo Na Chung, et al

来源：J Clin Lab Anal, 32 (8), e22580 Oct 2018

摘要

背景：嵌合体由来自不同受精卵的两个或两个以上的不同细胞群组成。双胞胎所引起的血液嵌合在文献中已有报道。在此，我们报告了第一例三胞胎中的血型嵌合。

方法：ABO 血型分型采用人工平铺法(英国 Merck Millipore)和微柱凝集法(瑞士 Cressier)。使用抗-A-PE 耦合单克隆抗体和 FACS Canto II (美国 BD)进行流式细胞术分析。通过等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)和直接测序外显子 6 和 7 进行分子分析。

结果：ABO 血型显示抗 A 混合视野凝集和弱凝集。流式细胞术分析显示同时存在 A 细胞和 O 细胞。AS-PCR 和测序显示两个嵌合新生儿，每个新生儿的基因型为 A102/O01/O02。

结论：这是韩国首例有记录的三胞胎血液嵌合体病例。我们建议对 ABO 血型正反定型不符的新生儿进行全面的血型嵌合调查，因为在临床环境中血液嵌合需要一定的谨慎。

14 《Multiparameter Investigation of a 46,XX/46,XY Tetragametic Chimeric Phenotypical Male Patient With Bilateral Scrotal Ovotestes and Ovulatory Activity》

《有双侧阴囊卵睾及排卵活动的 46,XX/46,XY 四配子嵌合表型男性患者的多参数研究》

作者: Yolande van Bever, et al

来源: Sex Dev, 12 (1-3), 145-154 2018

摘要

我们报告一个成年男性, 最初表现为男性女性型乳房和无痛阴囊肿块, 没有额外的生殖器异常。培养的外周血淋巴细胞和口腔涂片的核型显示 46,XX/46,XY 嵌合结构, 占不同的百分比。多分子分析和血型鉴定都提示其为四配子起源。

血型血清学及分子生物学结果

用手工标准凝胶卡(DiaMed AG, 瑞士 Cressier)进行 ABO 血清学分型。用一个 ID 卡完成 Rh 和 K 的分型。通过测序进行 ABO 基因分型。由荷兰阿姆斯特丹 Sanquin 公司免疫血液部门使用标准化程序, 通过实时定量等位基因特异性 PCR 对 RHCE、RHD、FY、JK 和 K 分型。

ABO 血清学结果显示 O 型和 AB 型红细胞双群 (图 1)。A 和 B 抗原的存在与抗 A 和抗 B 抗体的缺失是一致的。DNA 基因分型支持了血清学的发现。主要血型为 O、K 阴性、K (a)阳性, 15%的红细胞同时表达 A、B 两种血型, K 抗原阳性、K (a)抗原阴性。这表明存在 4 个等位基因, 符合四配子嵌合, 其中 O 细胞系占 85%, AB 细胞系占 15%。

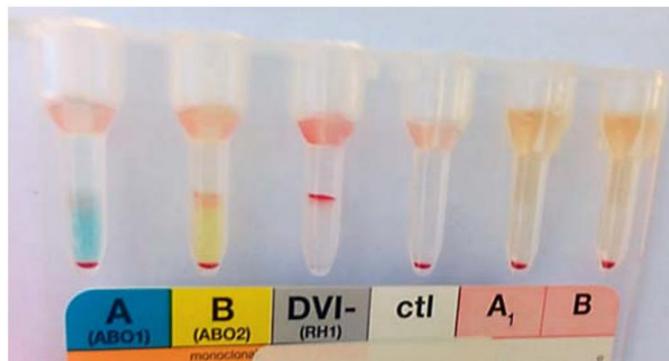


图 1 用单克隆抗体检测 ABO 和 RhD 血型的 ID 卡(DiaMed, 瑞士 Cressier), 显示混合视野的凝集模式, 表明 O 型细胞和 A 和 B 抗原表达弱的红细胞群同时存在。无抗 A1、抗 B 抗体。RhD 未见混合视野。

15 《Hematopoietic Chimera in a Male Blood Donor and His Dizygotic Twin Sister》

《一个男性献血者和他的异卵双胞胎姐妹的造血嵌合体》

作者: Miola MP, Lopes AG, Silva AP, et al.

来源: Transfus Med Hemother. 2019; 46 (4) :276 - 281.

摘要

人类双胎造血嵌合体是一种偶然发现的现象，其发生率尚不清楚。嵌合体案例的检测需要研究家庭医疗记录、数据分析以及对造血细胞和其他组织细胞的调查。探讨 ABO、Lewis 和分泌型组织-血型系统之间的相互作用，以检测造血嵌合体的案例。我们报告一例罕见的造血嵌合体，双胞胎在 ABO、Rh 和 Kidd 红细胞表型中呈现混合视野反应。利用从混合视野中分离出的红细胞，结合分子生物学方法和家庭成员的调查，当比较该男性双胞胎及其双胞胎妹妹的口腔上皮细胞和外周血时，我们发现了与孟德尔遗传模式不一致的基因型。通过对口腔上皮细胞 ABO、Lewis 和分泌表型及基因组 DNA 的分析，发现男性双胞胎基因型为 ABO*A1.01/ABO*B.01 和 FUT2*01N.02/FUT2*01N.02，女性双胞胎基因型为 ABO*O.01.01/ABO*O.01.02 和 FUT2*01/FUT2*01。HLA-DRB1 基因分型结果显示，男性和他的孪生姐妹之间不一致。我们的结论是，本研究用的血清学分析结合分子方法是检测造血嵌合体案例的很好的工具。

16 《ABO Genotype-Phenotype Discrepancy Due to Chimerism Resolved by Clonal Separation》

《用克隆分离检测嵌合导致的 ABO 基因型-表型差异》

作者：Yang HS, Shin JG, Yang JJ, et al.

来源：Ann Hematol, 96 (9), 1583-1585 Sep 2017

血型嵌合是一种罕见的现象，通常发生于先天或后天获得。嵌合不同于镶嵌，前者是在同一个体中有两个或两个以上的受精卵衍生出两个不同遗传细胞系，后者是由一个受精卵产生不同细胞系。由于通常通过混合视野凝集或细胞分型与血清分型的差异在血型分型时被识别，因此需要进一步评估来区分 ABO 亚型、cis-AB 和血型嵌合。为了区分嵌合与 ABO 差异的其他原因，可以使用多种方法，如 ABO 基因分型、DNA 测序、短串联重复分型和流式细胞术。在这里，我们提出一个 ABO 基因型-表型差异案例，通过仔细审查序列图检测。

一名 30 岁的女性因腹部异物切除手术入院。术前例行血型分型时，红细胞呈弱反应或混合视野反应，在抗 A 抗体的凝胶柱中呈双群，血清分型鉴定有抗 B 抗体(图 1a)。通过人工试管法，她的红细胞与抗 A1 试剂的凝集很弱(±)，与抗 H 试剂的凝集很强(3+)。患者的样本被送往本区域参比实验室进行 ABO 基因分型。她的基因型被报道为 O/O 等位基因。患者否认有输血或移植史。由于该患者的基因型-表型差异无法解释，我们调查了样本错误标记和其他常规 ABO 分型相关技术程序等分析错误的可能性。对程序的彻底评估没有

显示出任何错误的迹象。

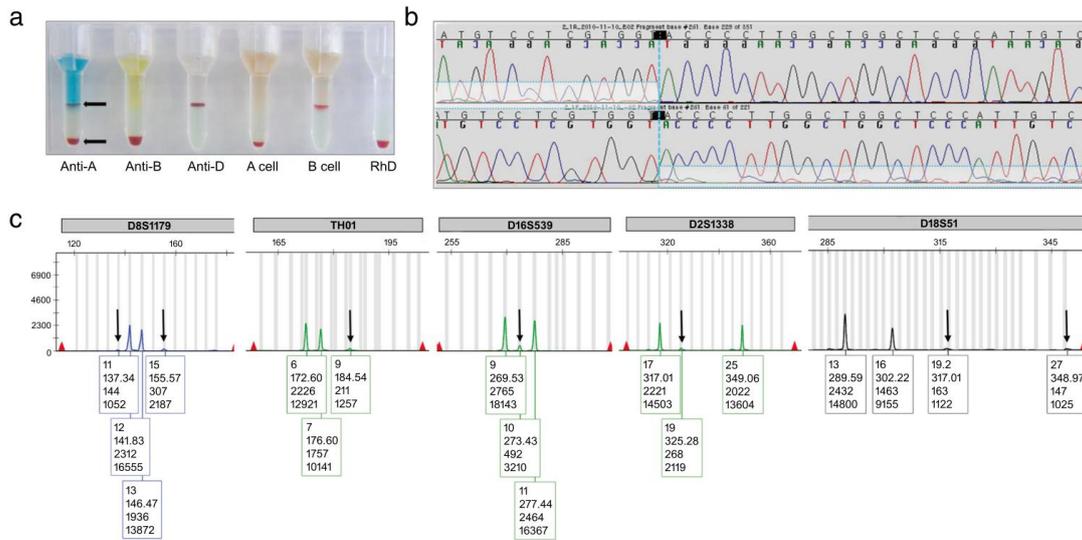


图 1 三等位基因 ABO 基因型导致的基因型-表型差异。a 使用微柱凝集的血清学检测。在与单克隆抗 A 抗体的反应中，发现了两个不同的红细胞群。一个主要群(约 70~80%)为 O 型，另一个次要群为 A 型。b 直接测序显示杂合缺失。反向反应和正向反应的 c.261delG 缺失位点前后分别出现小的连续相移峰。c 该患者的 STR 分析，显示两个主要的和一个或两个次要的等位基因(箭头)

通过直接测序分析来检测基因型-表型差异。第 6 号外显子上的核苷酸 261 杂合缺失(图 1b)。有趣的是，测序图显示在核苷酸 261 处的主高峰周围有非常小的核苷酸附加峰。由于正向和反向测序图分别在核苷酸 261 的另一侧显示出清晰的序列，因此我们认为这些不是常见的基线噪声，而是杂合峰。最后，通过克隆和测序分析，我们分别分离出了 O01、O02 和 A102 等位基因。利用 Identifiler PCR 扩增试剂盒(美国 ABI)和 GeneMapper ID v3.2 程序(ABI)对患者外周血 DNA 进行 12 个短串联重复序列(STR)位点的检测，以确认血型嵌合(图 1c)。其中至少有 7 个位点(D8S1179、TH01、D16S539、D2S1338、vWA、D18S51 和 FGA)在主高 STR 峰旁还出现了 1~2 个额外峰，与嵌合现象一致。

在实验室中有时会遇到由混合视野红细胞凝集导致的细胞分型 ABO 差异。混合视野凝集出现在各种情况下，包括非特异性 ABO 血型红细胞输血、ABO 血型不相容输血、A 或 B 亚型、嵌合和镶嵌。由于输血和移植史在一开始就被否认，因此怀疑 A 亚型，如 A3。然而，最初的 ABO 基因分型并没有显示出任何 A 等位基因，这更提示了 ABO 表型和基因型之间的血型差异。Cho 等人通过 2 例双精嵌合体和四配子嵌合体描述了嵌合体和镶嵌体都能引起 ABO 表型-基因型差异。此外，一项研究通过对外显子 6 和 7 进行克隆、测序和 STR 分析，发现 1 个 ABO 表型-基因型差异案例最可能为包括 B101/O01 和 O01/O02 基因型的双精嵌合。在本研究中，初步的直接测序只检测到 O01 和 O02 等位基因。然而，测序图显示杂合峰不明显，小到容易被忽略。通过扩增子的 TA 克隆和测序分析，确认从核苷酸位置 261 开始有小杂合峰，发现有 1 个 261delG 的 A101 等位基因(表 1)。最常见的 O 型等位基因 O01 与 A101 有相同的序列，除了核苷酸 261 处的鸟嘌呤缺失。

这种移码突变产生了一个提前终止密码子，在 117 个氨基酸后终止了翻译。在极少量的 A101 与 O01 或 O02 共存的情况下，很难甚至不太可能被检测到。因此，当可能存在嵌合体时，对测序图的仔细检查是必要的。

表 1 三等位基因 ABO 基因型多态性总结

Table 1 Summary of polymorphisms of tri-allelic ABO genotypes

cDNA position	Reference (A101)	gDNA	Allele 1	Allele 2	Allele 3
261	G	delG+delG+(G)	delG	delG	G
297	A	R		G	
467	C	C+(T)			T
646	T	W		A	
681	G	R		A	
771	C	Y		T	
829	G	R		A	
Alleles		O01, O02, A102	O01	O02	A102

通过克隆测序分析，分离出两个主等位基因 O01 和 O02 和一个次要等位基因 A102。空白表示与参考序列相同的碱基。括号内的碱基表示小峰，G 鸟嘌呤，ND 未检测到，R 腺嘌呤或鸟嘌呤，A 腺嘌呤，Y 胸腺嘧啶或胞嘧啶，C 胞嘧啶，T 胸腺嘧啶，W 腺嘌呤或胸腺嘧啶。

当对外周血 DNA 检测 12 个 STR 位点时，发现了一两个额外的 STR 峰。双精嵌合体表现为一个三倍体受精卵，因为一个卵子含有一个单倍体核，并由两个单倍体精子核或一个二倍体精子核受精。相比之下，四配子嵌合体是遗传嵌合体的一个相对罕见的原因，它是通过两个不同的卵子与两个精子受精产生的，并产生两个母亲和两个父亲的等位基因。因此，本案例属于四配子嵌合体而非双精嵌合体。由于未对毛囊、指甲、颊粘膜等非造血组织进行 STR 分析，仅此结果不足以区分局限于循环血细胞的嵌合体和全身嵌合体。另一个限制是缺乏家系研究；通过克隆和测序鉴定的每一个等位基因，或在 STR 基因座上显示的每一个 DNA 贡献是来自父亲还是母亲，都无法得到确认。

这是一例罕见的血液嵌合体，通过克隆测序分析发现存在分离的 O 和 A 型红细胞，并显示出四个 STR 峰。综上所述，当显示混合视野凝集的 ABO 差异对基因型-表型差异的存在提出疑问时，应该考虑克隆分离或富集次要等位基因来鉴定血型嵌合体。

17 《Acquired RhD Mosaicism Identifies Fibrotic Transformation of Thrombopoietin Receptor-Mutated Essential Thrombocythemia》

《获得性 RhD 镶嵌体鉴定血小板生成素受体突变的原发性血小板增多症的纤维化转化》

作者：Montemayor-Garcia C, Coward R, Albitar M, et al.

来源：Transfusion.2017;57(9):2136 - 2139.

摘要

背景：带有 1 个正常核型的获得性拷贝中性杂合性缺失（CN-LOH）已在骨髓恶性进展中被报道。

病例报告：一位 65 岁妇女，患有 MPL 突变的原发性血小板增多症（ET）和骨髓纤维化进展，在移植前常规检测中发现与抗 D 有混合视野反应，并有 RhD 分型差异史。该患者从未接受输血或移植。

结果：凝胶免疫凝集显示 A 型红细胞和 RhD 表型的混合视野反应，主要是 RhD 阴性群，有一小部分携带 RhD 抗原的循环红细胞。随后的基因组微阵列 SNP 分析揭示了 1 号染色体 p36.33-p34.2 的 CN-LOH，这是 MPL 突变 ET 发生纤维化进展的已知分子机制。受 CN-LOH 影响的染色体区域包括 RhD、RHCE 和 MPL 基因。我们提出了一个由外周淋巴细胞和骨髓衍生细胞的 RhD 杂合性测定支持的时间分子事件模型。

结论：导致克隆选择和髓系恶性进展的 CN-LOH 事件也可能影响相邻不相关基因的表达，包括编码血型抗原的基因。混合视野反应的检测和差异血型分型结果的调查对这些患者的适当输血支持是重要的，可以为骨髓增生性疾病的进展提供一个有用的替代标记。

输血策略

从理论上讲，有获得性 RhD 镶嵌体的受者可以输入 RhD 阳性红细胞，然而这个病人在围移植期接受了 RhD 阴性血液制品直到 RhD 分裂机制被阐明。

18 《Mixed Field Reactions in ABO and Rh Typing Chimerism Likely Resulting From Twin Haematopoiesis》

《ABO 和 Rh 血型嵌合体的混合视野反应可能是由孪生造血引起的》

作者：Sharpe C, Lane D, Cote J, et al.

来源：Blood Transfus, 12 (4), 608-10 Oct 2014

引言

在输血医学实验室，由于混合视野反应的存在，ABO 和 Rh 分型可能会出现差异。为了解决这一差异并为输血提供相容的血液，需要从患者处获得相关的历史信息并进行额外的实验室调查。通常，当发现病人最近曾从非同型的供者那里接受过输血或干细胞移植时，根据病史很容易确定混合视野反应的原因。某些 ABO 亚型和病理或生理情况也可能导致 ABO 分型的混合视野反应；但是，它们应该很少影响 Rh 分型。类似地，有报道一个白血病患者 RhD 表型改变，但这并没有影响 ABO 分型。ABO 和 Rh 分型混合视野反应的一个潜在原因是在个体中存在嵌合体或镶嵌体。当一个个体内有包含一个以上受精卵的遗传物质的两个或两个以上不同的细胞群时，就称为嵌合体。尽管强调嵌合体是血型分型差异的一个原因的概念的描述已经存在了几十年，但嵌合体并不常见，在常规输血前检测中，当正反向 ABO 血型分型发生混合视野凝集时，嵌合现象会带来挑战。嵌合有几种不同的表现形式。先天性嵌合是指两个双绒毛膜胎盘之间发生胚胎融合或异卵双胞胎血管吻合，导致造血细胞交换的情况。部分造血嵌合也存在，是输血或干细胞移植的结果；在这些情况下，嵌合的证据仅限于身体的一部分（造血细胞）。血清学和分子生物学的方法可能有助于确定混合视野反应的原因。此外，一种高灵敏度的流式细胞术方法可以通过检测红细胞上低水平的 A 和 B 抗原或样品中较低比例的红细胞来帮助确定 ABO 亚型。在这里，我们报道了使用血型基因分型和流式细胞术来调查一个在 ABO、RhD 和 RhE 分型中出现混合视野反应的病人。

病例报告

一位 70 岁的女性在手术前被发现 ABO 正定型和 RhD 及 RhE 分型中有混合视野反应。她没有输血或移植的历史，但有七次怀孕。在完全解决 ABO 和 Rh 差异之前，病人接受了手术，不需要输血。使用试管法和凝胶柱凝集技术（MTS，美国 Ortho）对患者 EDTA 抗凝血样本进行 ABO 检测。对第二个样本进行重复检测。用来自四家厂商的抗 A、抗 B、抗 A, B（美国 Ortho BioClone 鼠单抗混合抗血清；加拿大 Dominion Novaclone；美国 Immucor Gamma-Clone；德国 Bio-Rad Seraclone）检测患者红细胞。RhD 和 RhE 分型采用单抗混合抗血清进行试管法；抗 D 试剂来自美国 Ortho BioClone、加拿大 Dominion Novaclone 和美国 Immucor Gamma-Clone；抗 E 试剂来自美国 Ortho BioClone 和德国 Bio-Rad Seraclone。血清学和基因分型结果见表 1。试管法和 MTS 凝胶法显示了用抗 A 和抗 A, B 的正定型呈宏观混合视野反应，而抗 B 试剂无反应。立即离心法的反应强度从 1 到 2+ 不等，取决于使用的抗血清。反定型时，患者血浆样本与 B 型红细胞立即离心后反应 3+，所有其他细胞（A1、A2 和 O）均无反应。用抗 D 试剂和抗 E 试剂立即离心后观察到宏观混合视野反应。未检测 Lewis 或其他血型表型。

表 1 血清学和分子分型总结

ABO group	
Forward group	
Anti-A	1-2+mf
Anti-B	0
Anti-AB	1-2+mf
Reverse group	
A1 cells	0
A2 cells	0
B cells	3+
O cells	0
Molecular typing ABO*A2.01, ABO*0.01.01 present	
RhD	1+mf
RhE	1+mf

mf=混合视野，宏观。

由于血清学检查怀疑是嵌合体，病人被进一步询问，并透露她有一个双胞胎兄弟，不幸在出生几个月后死亡。通过基因分型和流式细胞术对样本进行进一步评估。用实验室常规使用的 PCR-ASP 和 PCR-RFLP 方法对外周血进行基因分型分析，发现明显的 ABO*A2.01/O.01.01 基因型。基因组 DNA 用于分析分布在 17 条染色体上的 21 个短串联重复 (STR) 位点，以确定存在两个以上的等位基因。这是在瑞典隆德斯科内地区的大学和地区实验室移植免疫学实验室，采用已建立和验证的用于临床常规分析的方法进行的。在 21 个 STR 基因座中，有 6 个有明显的证据表明存在两个以上的等位基因，这证实了嵌合是存在的，并且在 DNA 水平上可以检测到。使用基因组 DNA 进行实时 PCR 分析，以确定是否存在 Y 染色体的标记特异性基因，即 SRY (性别决定区 Y) 基因，因为患者的双胞胎是男性。这是基于 Finning 等人发表的一篇文章，在瑞典隆德斯科内地区的北欧基因组血型分型参比实验室利用已建立和验证的方法，从孕妇血浆中预测胎儿 RHD 状态。本实验包括一个 SRY 基因的标记物。该女性患者的 SRY 基因阳性信号显示其存在男性 DNA。实验室用单克隆抗 A 进行流式细胞术检测发现有两个不同的红细胞群。大多数 (88%) 反应性非常弱，其余 12% 与 A2 对照红细胞表达水平相同，呈强阳性 (图 1)。所有红细胞对抗 B 无反应。抗 H 检测是强阳性，表明该患者所有红细胞的 H 抗原表达水平和在 O 型和 A2 型红细胞中观察到的一样高 (图 2)。为了解释为什么该患者大多数“O 型红细胞”表达低水平的 A 抗原，进行 FUT2 基因分型，发现她是分泌型 (数据未显示)，分泌型血浆中 A 糖脂可以吸附到 O 型红细胞表面，因此被抗 A1 弱染色。

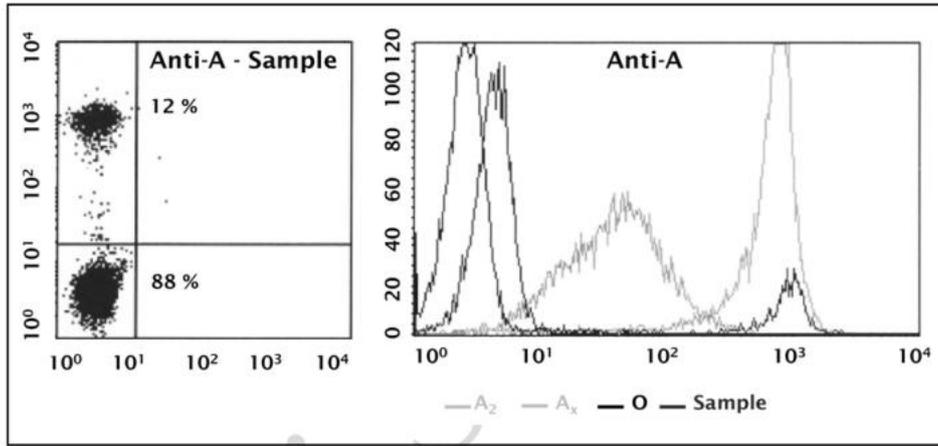


图 1 用一抗抗 A（克隆 ES-15）和二抗 PE 结合的大鼠抗小鼠 Ig 检测该样本。在直方图中，x 轴代表对数 PE 荧光，y 轴代表线性计数。直方图中包含了不同表型的相关对照红细胞。对于点图，x 轴和 y 轴分别代表对数 FL1 和 PE 荧光。用抗 A 抗体检测时，可以清楚地分辨出两个细胞群，每个细胞群的百分比用点图表示。

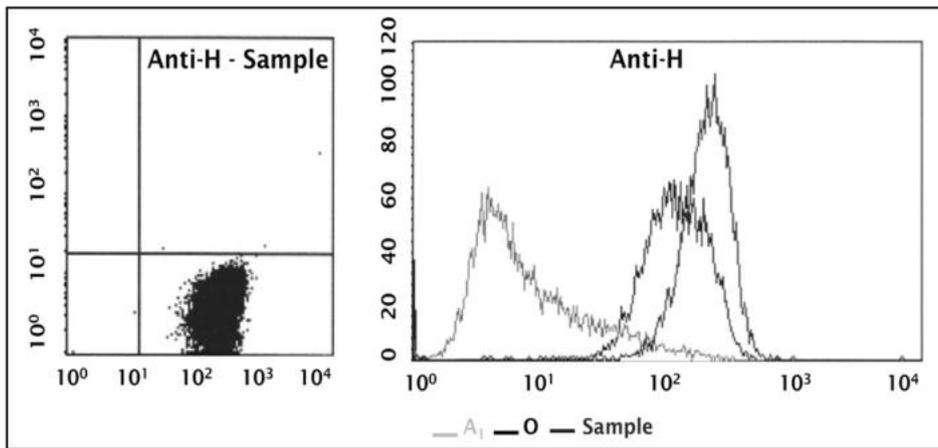


图 2 样品用 FITC 标记的抗 H（克隆 BRIC231）进行检测。在直方图中，x 轴代表对数 FITC 荧光，y 轴代表线性计数。直方图中包含了不同表型的相关对照红细胞。对于点图，x 轴和 y 轴分别代表对数 FITC 和 FL2 荧光。仅见一个细胞群，表明所有红细胞都在正常水平上表达 H 抗原。

讨论

这是一个 ABO 血型 and Rh 血型不一致的病例，是对一位以前不知道是嵌合体的患者进行输血前常规血清学检测发现的。虽然这种情况不常见，但由于某些嵌合个体以前未被诊断且无症状，这种情况可能会出现。本例尤其令人痛心的是，双胞胎的生物学证据依然存在，但多年前人已夭折。用试管法和 MTS 凝胶技术在 ABO、RhD 和 RhE 分型中观察到混合视野反应。流式细胞术分析还发现了一个红细胞双群（一群次要 A 型红细胞和一群主要 O 型红细胞，被 A 糖脂弱染色，和分泌型一致）。基因分型显示同时存在 ABO**A2.01* 和 ABO**O.01.01* 等位基因。可能存在足够的次要细胞群的 DNA 被基因分型试验扩增，且可能该患者的主要基因型是 ABO**O1.01/O1.01*，次要细胞群，最有可能在子宫内从她的双胞胎获得，是 ABO**A2.01/O1.01* 或 ABO**A2.01/A2.01*。STR 分析证实存在 2 个以上的等位基因，通过实时 PCR 检测 SRY 基因发现存在男性 DNA。

由于该病人不是最近输血的接受者，也没有接受过干细胞或器官移植，因此寻找到额外的历史资料，显示她是双胞胎妊娠的产物，是唯一的幸存者。像之前描述的那样，本例表明，免疫不成熟双胞胎可能通过胎盘血管吻合在子宫内接收另一个双胞胎的细胞，包括造血干细胞，随后在造血细胞内产生天然永久基因嵌合体，导致 ABO 和 Rh 分型出现混合视野。此外，在该患者中发现其他血型抗原（如 D 和 E）的混合视野凝集，与嵌合体一致，使 A 亚型作为血清学发现的解释非常不可能。综上所述，本病例确认了一个永久性基因嵌合体的病例，该嵌合体是由子宫内遗传物质的孪生交换引起的。对嵌合体存在的怀疑最初是由输血前常规样本 ABO 和 Rh 差异的发现引起的。进一步的询问发现了一个死去的双胞胎的存在。该差异的进一步检测是在参比实验室实现的，包括使用流式细胞术来描述和量化两个不同的细胞群的存在。

19 《ABO Chimerism With a Minor Allele Detected by the Peptide Nucleic Acid-Mediated Polymerase Chain Reaction Clamping Method》

《用肽核酸（PNA）钳位 PCR 检测有次要等位基因的 ABO 嵌合体》

作者：Rie Sano, et al

来源：Blood Transfus, 12 (3), 431-4 Jul 2014

引言

ABO 正反定型不符是输血医学中的一个重要问题。其原因之一是血液嵌合，显示混合视野凝集。然而，混合视野凝集可以在不同的情况下看到，包括 ABO 血型不相容的干细胞移植，最近在非 O 型血受体中输入 O 型红细胞，罕见的 ABO 亚型如 B3，和嵌合体。已经有几种分子方法用于鉴定嵌合，即 ABO 基因分型、HLA 分型和 DNA STR 分析。这些方法通常可以检测到一个嵌合体的三个或多个等位基因。然而，在普通 PCR 分析中，由于主等位基因的优先扩增，一些有次要等位基因的嵌合体可能被忽略。我们报告一例血液嵌合，其中 B 红细胞占不到总红细胞群体的 1%。通过直接测序 ABO 基因外显子 6 和 7 的普通 PCR 产物，无法鉴定外周血单核细胞中的 B 等位基因，但通过肽核酸(PNA)钳位 PCR 发现了 B 等位基因。

20 《Amplification Refractory Mutation system-PCR Is Essential for the Detection of Chimaeras With a Minor Allele Population: A Case Report》

《扩增阻滞突变系统-PCR 是检测有次要等位基因嵌合体的关键：一个病例报告》

作者：Eun Jeong Won, et al.

来源：Clin Pathol, 66 (5), 446-8 May 2013

摘要

血液嵌合体是免疫血液学实验室一个罕见但重要的问题。一些分子方法，如 ABO 基因分型、人类白细胞抗原(HLA)分型和 DNA 短串联重复序列(STR)分析，已被用于鉴定嵌合体。不幸的是，次要等位基因群体可能被基于 PCR 的方法忽略，这种方法优先扩增主要等位基因群体。1 例 AweakB (AwB)显示混合视野模式，被送往我们的实验室作进一步评估。对 ABO 第 6 和第 7 外显子的直接测序显示为 B101/O02 基因型。对 12 个 STR 位点和 HLA 分型的分析没有提供任何嵌合的证据。然而，扩增阻滞突变系统(ARMS)-PCR 除了鉴定了 B101/O02 外，还鉴定了次要等位基因 A102。通过克隆和测序确定了该嵌合体的三个等位基因。因此，ARMS-PCR 是必要的，特别是在有次要等位基因群体的嵌合体的情况下。

21 《Many Genetically Defined ABO Subgroups Exhibit Characteristic Flow Cytometric Patterns》

《许多基因定义的 ABO 亚型表现出特征性的流式细胞术模式》

作者：Hult AK, Olsson ML.

来源：Transfusion. 2010;50(2):308 - 323.

摘要

背景：我们实验室之前已经开发了一种流式细胞术检测低水平 A/B 抗原的方法。本研究的目的是探讨这种方法是否可以用来描述不同的 ABO 亚型，并在参比实验室中成为有用的工具。研究设计和方法：对常规血清学检测显示 ABO 血型差异 (n=94) 的血样，通过 ABO 基因分型和流式细胞术进一步分析。为了验证单克隆抗 A 和抗 B 试剂的特异性并建立正常的流式细胞术模式，我们还对 80 例具有常见表型的献血者样本

进行了评估。结果：检测到几种亚型的流式细胞术模式不同，但 A（弱）（n=80）比 B（弱）（n=14）更明显。两种亚型，A（finn）（n=11）和 A（3）（n=10）显示出诊断特征，并被用来确定随时间和供者之间的重复性。总的来说，亚型内的一致性是显著的。在 A（x）样本（n=10）中可以清楚地看到等位基因增强现象，其中不同的反式等位基因导致高、低或无 A 抗原表达。包括 O/A 和 O/B 嵌合体或 A（h）和 B（h）类孟买血型的非亚型样本显示出明显不同的直方图。来自孕妇的样本（n=10）显示获得性 A 抗原丢失，在妊娠晚期明显加重。结论：从遗传学上定义的 ABO 亚型和其他异常表型显示流式细胞术的特点，可能为 ABO 差异的调查提供有价值的信息。我们的结论是，所提出的检测方法可以补充参比实验室传统血清学和基因分析。

样本队列

一些样本不包含已知导致弱 A 或 B 表达的 ABO 基因突变，但由于 ABO 正定型差异和怀疑 ABO 亚型状态被送到我们实验室（n=29；表 1）。他们被纳入研究，以突出一些与以下四类样本相关的流式细胞术模式：A3、嵌合、类孟买和妊娠。10 个个体为 A3 亚型。在其他 9 个样本中，对 ABO 弱表型的遗传解释没有在 ABO 基因中找到，而是在其他地方。在这 9 个样本中，有 5 个表现出嵌合体迹象，4 个为类孟买表型。最后，10 个弱 A 表型孕妇样本被纳入。

表 1 非 ABO 基因突变导致 ABH 表达较弱的样本特征

ABO phenotype	ABO genotype	Number	Condition	Figures
A ₃	A ¹ O ¹	8	Apparently healthy*	5K
	A ¹ O ^{1v}	2		
A _w (B)	A ² B	7	Pregnancy	7F-7H
	A ¹ B	1		
	A ¹ O ¹	1		
	A ¹ O ^{1v}	1		
A _w	O ¹ O ¹ (+A ¹)	3	Chimera	7A
A _h	A ¹ O ^{1v}	1	Para-Bombay†	7C
	A ² O ¹	1		
B _w	O ¹ O ¹ (+B)	2	Chimera	7B
B _h	B O ¹	2	Para-Bombay†	7D and 7E

*10 人中有 4 人是健康的献血者。其余样本来自于非血液系统恶性肿瘤和妊娠的患者。†FUT1=非功能；FUT2=功能。

结果

在 5 个嵌合样本中，O 型为主要细胞群，A 或 B 型细胞所占比例较小。虽然 ABO 基因分型通常不太适合定义嵌合状态，但流式细胞术被认为非常适合对嵌合体中的两个细胞群进行定量。图 1 显示了两个这样的样本，其中 3%和 2%的细胞群分别来自 A 和 B（图 1A 和 1B）。在 O/A 样本的直方图中，主要 O 型细胞群有一个有趣的向右移动，相当于 B 型红细胞上通常存在的 A 抗原的数量。这可能与血浆中存在的来源于次要 A 型红细胞群的 A 特异性糖脂的摄取相一致。然而，在 O/B 样品中没有观察到这种现象。

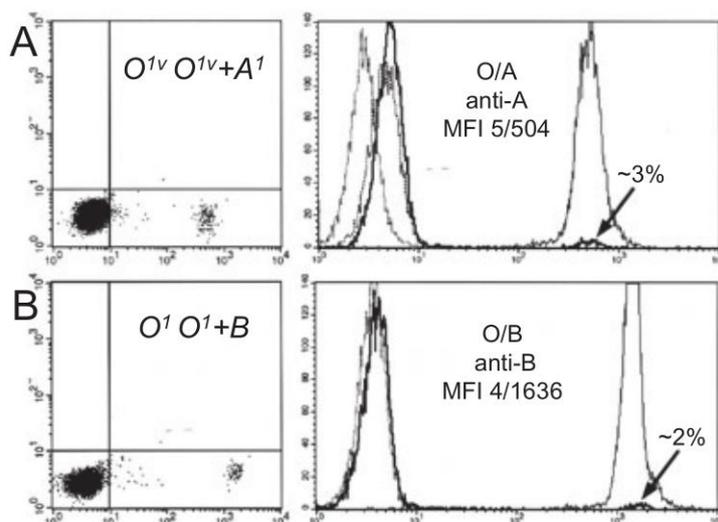


图1 嵌合样本，其在直方图中分别给出两个细胞群体的 MFI 值以及 A 或 B 抗原阳性红细胞的百分比。

讨论

嵌合体可能模仿弱或非典型的 A/B 表达。嵌合体在血清学上很难与 Aw 或 Bw 亚型区分，可能由于输入了 ABO 血型相容但不完全相同的红细胞引起混合视野反应。本研究纳入的 5 例患者均被证实为非输血患者，均显示在主要 O 型红细胞群中有少量的 A 或 B 型红细胞。通过流式细胞术，可以很容易地定量检测正常表达 A 或 B 抗原的次要细胞群的百分比，并对血清学结果进行解释。在 O/A 嵌合体中，在主要红细胞群中发现的少量 A 抗原与 B 型红细胞中发现的 A 抗原水平相当（图 1A）。我们推测，这可能是由于体内血浆中源自表达 A 抗原的次要细胞群的糖脂被摄取所致，但 O/B 嵌合体未见同样的现象（图 1B）。这很可能反映了其他研究者所描述的现象，他们使用血型血清学技术对嵌合患者和非 O 型患者接受 O 型供者输血或骨髓移植后的样本进行检测。

22 《Acute Intravascular Hemolysis After Transfusion of a Chimeric RBC Unit》

《1 个嵌合红细胞单位输血后急性血管内溶血》

作者：Axel Pruss, et al.

来源：Transfusion, 43 (10), 1449-51 Oct 2003

摘要

背景：天然血细胞嵌合很少发生在人类身上。本文报告一例因输入嵌合红细胞而发生输血反应的病例。

病例报告：一位 61 岁的 O 型血男性患者在接受选择性肾脏手术后，接受了两个单位的压积 O 型红细胞。输

血后立即出现溶血性输血发作。血清学复查显示，在两个输血单位中，一个是红细胞混合视野凝集模式。该单位的供者是一名 24 岁的健康男性，他有一个双胞胎妹妹。通过凝胶凝集技术和流式细胞术检测，两者都显示出 95% O 型和 5% B 型红细胞的相同混合物。结果也通过 ABO 血型基因分型得到证实。

结论：这是首次报道与嵌合红细胞输血相关的溶血性输血反应。

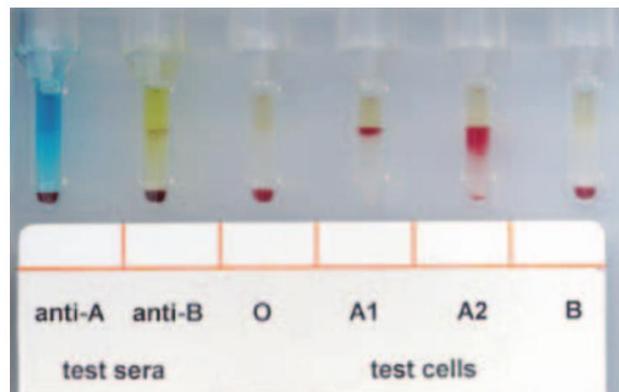
病例报告

一位 61 岁的白人男性接受了右肾多房肾细胞癌切除术。手术后，病人因为严重的高血压被转到重症监护病房。术后 3 天，他的血红蛋白水平从 12.4 降至 10.6 g/dL，并给予 2 个单位的压积 O 型红细胞。病人的血型是 O ccD.Ee, K-。包括自身对照在内的抗体筛选试验均为阴性。输血后约 30 分钟，病人出现寒颤、呼吸急促、心动过速和血红蛋白尿。他的自由血浆 Hb 水平从低于 2 上升到 25.2 mg/dL，乳酸脱氢酶从 225 上升到 435 个单位/L。溶血在几个小时内消退，病人不再需要输血。

结果

对患者和供者的血清学分析显示，患者的 DAT 呈阳性，两个输血单位之一的红细胞呈现混合视野凝集模式（见下表）。该单位红细胞的捐赠者是一名 24 岁的健康男性，他有一个双胞胎姐妹。在血清学和流式细胞术检测中，供者和他的姐妹显示了大约 95% 的 O 型和 5% 的 B 型红细胞的相同混合物（见下图）。D 抗原也有类似的结果。此外，在他们的血清样本中只检测到抗 A 异种凝集素。血型基因分型结果均表现为 O 型等位基因扩增强，B 型等位基因扩减弱。不幸的是，无法获得双胞胎父母的血样进行检测。然而，根据记录，母亲的血型为 B，父亲的血型为 O。

Test	Patient	Transfused RBC units	
		1	2
ABO	O	O	O (B) mix field
Rh (D)	D+	D+	D- (D+) mix field
anti-A	++++	NT	NT
anti-B (isoagglutinins)	++++ (anti-B-titer: 4)	NT	NT
Antibody screening	-	NT	NT
DAT	C3d ++, IgG +	NT	NT
Eluate	-	NT	NT
Crossmatch	(+)		



讨论

在本研究中，我们描述了一个病人，他在输血后出现了急性溶血性输血反应，输入的一个嵌合血液单位中含有 O 型和少量的 B 型红细胞。通过凝胶凝集试验、流式细胞术和血型基因分型可定量检测次要 B 细胞群。输入的嵌合单位的总体积为 281 mL。因此，输入的不相容红细胞的体积仅约为 15 mL 红细胞。虽然受影响的病人有可检测到的抗 B 溶血素（效价 4），但为什么即使是少量的 ABO 血型不匹配的红细胞也能在一些病人中引起巨大的反应，其原因在很大程度上还不清楚。值得一提的是，输血前对供者的血液进行

检测时，红细胞与血清分型结果的差异已经很明显，但这种差异没有得到准确的解释，供者被错误地归类为O型。同样，输血前完全忽略了弱的血清学不相容。因此，对献血者进行准确的处理对于保证输血安全是绝对必要的，任何异常都应该在输血前进行澄清。

23 《RHD Positive Haplotypes in D Negative Europeans》

《D 阴性欧洲人中 RHD 阳性单倍型》

作者：Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA.

来源：BMC Genet. 2001;2:10.

1 例 D+/-嵌合体的红细胞流式细胞术显示 94% D 阴性红细胞和 6% D 阳性红细胞的混合物。这个嵌合体在 3 个月的随访中被确认。这位 24 岁的捐赠者很健康，没有双胞胎。对这名捐献者的回顾检查显示，有 13 个单位被作为 D 阴性处理。追踪两名 D 阴性受体，并对其进行抗体筛选，两名受体均被抗 D 免疫。

下期主题：中国稀有血型系统基因分型



为中国血型基因检测贡献力量!!!

为人民服务!!!