

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2023.04.06

· 临床研究 ·

# 1 例自身抗 LW 的血清学鉴定及基因分析

黄娟, 吴丽娜, 李彤彤, 解金辉(天津市血液中心免疫血液学研究室, 天津 300110)

**摘要:**目的 鉴定 1 例淋巴瘤患者的抗体类型和基因型。方法 采取盐水法、凝胶卡法、二硫苏糖醇(DTT)处理和木瓜酶处理等方法进行抗体筛查和鉴定;用成人和新生儿 RhD 阳性、阴性红细胞分别与患者血清反应;患者细胞进行自身酸放散试验、用新生儿 RhD 阴性红细胞吸收患者血清后酸放散。患者血清与 RhD 阳性、阴性红细胞交叉配血。提取患者 DNA, PCR 扩增, 检测 *ICAM4* 基因外显子 1~3 序列, 与标准序列比对, 确定患者 Landsteiner-Wiener(LW)基因型, 并观察是否存在突变。结果 患者抗筛呈抗 D 格局, DTT 处理可破坏抗原抗体反应, 木瓜酶处理对反应有所增强;患者血清与新生儿 RhD 阳性、阴性红细胞凝集强度无差别。患者自身放散液、新生儿 RhD 阴性红细胞吸收患者血清后放散液, 与成人 RhD 阳性红细胞反应均强于成人 RhD 阴性红细胞。患者血清与 RhD 阴性献血员红细胞配血凝集最弱, 选择 RhD 阴性红细胞输注, 输注效果安全有效。患者 *ICAM4* 基因第 299 位核苷酸为 A 纯合子, 基因型为  $LW^a/LW^a$ , 未发现突变。结论 血清学和分子生物学的结果证明该患者基因型为  $LW^a/LW^a$ , 含有自身抗 LW 抗体, 而非抗 D。

**关键词:** LW 抗体; 自身抗体; 血清学鉴定; 基因测序

**中图分类号:** R446

**文献标志码:** A

Landsteiner-Wiener(LW)血型系统(ISBT016)包括 3 个抗原: $LW^a$ 、 $LW^b$ 、 $LW^{ab}$ , 均由细胞间黏附分子 4(intercellular adhesion molecule 4, *ICAM4*)基因编码。 $LW^a$  和  $LW^{ab}$  为高频抗原<sup>[1]</sup>,  $LW^b$  为低频抗原,  $LW^a$  和  $LW^b$  是对偶抗原。 $LW^a/LW^b$  抗原多态性的分子基础是 299A>G 单核苷酸多态性导致 LW 糖蛋白 Gln100Arg 氨基酸的替换<sup>[2]</sup>。虽然 LW 与 RhD 是不同的抗原, 但对成人而言, LW 表达量与 RhD 表达量呈正相关, 成人 RhD 阴性红细胞的 LW 抗原表达少, 因此抗 LW 常被误认为抗 D。但新生儿红细胞上 LW 强表达<sup>[3]</sup>, 新生儿 RhD 阳性、阴性红细胞与抗 LW 反应均比成人红细胞强, 可以通过相关试验加以区分。本实验室鉴定 1 例自身抗 LW 并进行基因测序, 报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 标本来源** 患者, 女, 89 岁, 孕 1 产 1, 2004 年因乳腺手术输血, 2022 年入院诊断为淋巴瘤, 血红蛋白 37 g/L, 需输注红细胞, 医院因不规则抗体筛查阳性送检血液样本至天津市血液中心进行抗体鉴定和交叉配血。

**1.2 主要试剂与仪器** 单克隆抗 A、抗 B 及反定型 ABO 红细胞(上海血液生物制品公司), IgM 抗 D、不规则抗体筛选红细胞、16 系谱细胞(荷兰 Sanquin 公司), 微柱凝胶卡(美国 Bio-Rad 公司), Rh

分型试剂(德国 CE 公司), 酸放散试剂(珠海贝索公司), DNA 提取试剂盒(广州美基生物公司), Taq DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司)。所有试剂均在有效期内使用。孵育器、卡式离心机(美国 Bio-Rad 公司), 离心机(日本 KUBOTA 公司), 分光光度计(德国 Implen 公司), PCR 仪(美国 AB 公司), 电泳仪(美国 Thermo Fisher 公司), 凝胶成像仪(北京东讯天地公司)。

### 1.3 血清学检测

**1.3.1 血型和直接抗球蛋白试验** 采用试管法对进行 ABO、Rh 分型, 采用多抗卡进行直接抗球蛋白试验, 由于试剂限制未进行直接抗球蛋白分型。

**1.3.2 不规则抗体筛查与鉴定** 采用盐水法、微柱凝胶卡, 结合木瓜酶处理、0.2 mol/L DTT 处理细胞, 参照《全国临床检验操作规程》、《AABB 技术手册(第 20 版)》和试剂说明书操作。

**1.3.3 与新生儿红细胞反应** 因未取得脐血, 使用出生 2 d 的新生儿红细胞, 据报道新生儿 RhD 阴性红细胞上的 LW 抗原数量多于成人<sup>[3]</sup>。为排除 D 变异型和  $D^{el}$  干扰, 本研究使用的所有 RhD 阴性成人红细胞、新生儿红细胞均使用 3 种不同厂家试剂确认, 且 Rh 分型均为 *ccdee*。

**1.3.4 吸收放散试验** 患者自身细胞放散: 取患者压积红细胞, 洗涤 5 次, 按照试剂盒说明书进行酸放散。新生儿 RhD 阴性红细胞吸收患者血清后放

散:取 O 型、RhD 阴性的新生儿压积红细胞与患者等体积的血清混匀,37 °C 温育 60 min,其间数次混匀使其充分吸收。离心后弃上清液,洗涤 5 次,按照试剂盒说明书酸放散。用木瓜酶处理前后的 O 型 RhD 阳性、阴性成人红细胞与放散液反应,采用微柱凝胶卡检测。

**1.3.5 交叉配血试验** 患者血清与 6 份 AB 型 RhD 阳性红细胞、2 份 AB 型 RhD 阴性红细胞,采用盐水法、微柱凝胶卡、试管抗人球蛋白法进行主次侧交叉配血。

**1.4 ICAM4 基因测序** 按照试剂盒说明书提取外周血基因组 DNA。扩增和测序引物使用 NCBI 网站的 Primer-BLAST 程序设计,由 Invitrogen 公司合成,序列见表 1。PCR 扩增反应总体积为 50 μL,含模板 DNA 1 μL,正向引物 LWF (10 μmol/μL) 2 μL,反向引物 LWR (10 μmol/μL) 2 μL, dNTP 4 μL, 10×PCR Buffer 5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.6 μL。扩增程序:96 °C 预变性 8 min;95 °C 20 s, 75 °C 40 s, 10 个循环;95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 2 min, 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 5 μL PCR 产物,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶电泳成像系统观察并鉴定产物的特异性。扩增产物纯化后委托上海生工生物工程公司测序。序列比对和分析使用 DNAMAN 软件进行,与 GenBank 中的 NG\_007728.1 序列比对,确定标本的 LW 基因型。

表 1 LW 血型系统基因扩增、测序引物

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
扩增引物 LWF	CCGGCCCTGGCTCTCTGGCGC	1 223
LWR	GCCTCAGCCACCATGTATGGC	
测序引物 LWF	CCGGCCCTGGCTCTCTGGCGC	
LWR	GCCTCAGCCACCATGTATGGC	
LWPF	CATCTATTCCGAAAGCCTGG	

## 2 结果

**2.1 血型 and 直接抗球蛋白试验** 患者血型为 AB, CCDee。直接抗球蛋白试验阳性 2+<sup>s</sup>。

**2.2 抗体筛查** 患者血清在盐水介质中抗筛阴性,在微柱凝胶卡中与 RhD 阳性的 1、2 号细胞凝集强度 2+,与 RhD 阴性的 3 号细胞弱凝集 w+,木瓜酶处理后凝集有所增强,0.2 mol/L DTT 处理后均阴性,提示抗体对应的抗原可能被 DTT 破坏。

**2.3 抗体鉴定** 谱细胞结果显示患者血清中的抗体呈抗 D 格局,在微柱凝胶卡中与 RhD 阳性的细

胞凝集强度 2+,与 RhD 阴性的细胞弱凝集 w+。结合抗体筛查试验 0.2 mol/L DTT 可破坏抗原抗体反应,疑似抗 LW 抗体。

**2.4 与新生儿红细胞反应** 结果见表 2,患者血清与新生儿 RhD 阳性、阴性红细胞反应凝集强度均强于成人 RhD 阴性红细胞。

表 2 患者血清与新生儿红细胞反应结果

红细胞	新生儿 RhD 阳性细胞	新生儿 RhD 阴性细胞	成人 RhD 阳性细胞	成人 RhD 阴性细胞
凝胶卡	2+ <sup>s</sup>	2+ <sup>s</sup>	2+	w+

**2.5 吸收放散试验** 自身细胞放散液、新生儿 RhD 阴性红细胞吸收患者血清后放散液,均与酶处理成人 RhD 阳性红细胞反应强于 RhD 阴性红细胞,且新生儿 RhD 阴性红细胞吸收患者血清后放散液反应略强于自身细胞放散液。说明患者血清中的抗体可被新生儿 RhD 阴性红细胞吸收,符合抗 LW 抗体特征,不同于抗 D。

**2.6 交叉配血及输血** 患者血清与 6 份 AB 型 RhD 阳性红细胞反应,主侧盐水法均阴性,微柱凝胶卡和试管抗人球蛋白法均阳性 2+,与 2 份 AB 型 RhD 阴性红细胞反应主侧盐水法均阴性,微柱凝胶卡和试管抗人球蛋白法均呈弱阳性 w+。为缓解患者贫血状况,1 周内给予 3 次 AB 型 RhD 阴性红细胞进行输注,3 次输注后,患者血红蛋白由 37 g/L 升至 70 g/L,未发现输血不良反应。

**2.7 ICAM4 基因测序结果** 将标本外显子 1、2、3 的测序结果与参考序列对比,结果显示第 299 位核苷酸为 A 纯合子(图 1),该患者 LW 血型基因型为 LW<sup>a</sup>/LW<sup>a</sup>。外显子 1~3 其他位点与参比序列完全一致,未发现基因突变。

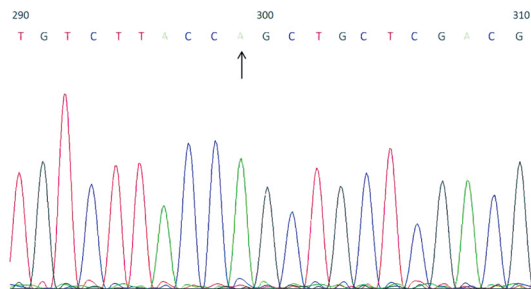


图 1 LW 基因外显子部分序列

## 3 讨论

LW 糖蛋白是细胞间黏附分子,也可与 Rh 蛋白、带 3 蛋白在红细胞膜上形成复合物。抗 LW 的谱细胞格局与抗 D 类似,抗体鉴定时可采取相关试

验予以区分:(1) DTT 能破坏 LW 抗原肽链上的 3 个二硫键从而破坏 LW 抗原,但不能破坏 D 抗原<sup>[4]</sup>。(2) RhD 阴性的成人红细胞不含 D 抗原,但含有少量 LW 抗原。(3) 与成人红细胞不同, RhD 阳性和 RhD 阴性的新生儿红细胞及脐血,均含有较多的 LW 抗原。有文献报道 RhD 阴性的成人红细胞可吸收抗 LW<sup>[5]</sup>,本研究采用新生儿 RhD 阴性的红细胞吸收,与成人 RhD 阴性红细胞相比,新生儿 RhD 阴性红细胞 LW 抗原量更多,吸收效果更好。可将放散液与新生儿红细胞反应,凝集应更强。(4) 据报道, LW 抗原不会被木瓜酶、无花果酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶破坏,但可被链酶蛋白酶破坏<sup>[6]</sup>。本实验结果显示木瓜酶对反应有所增强,与文献<sup>[7]</sup>结果相符,有条件时可采用链酶蛋白酶处理。另外,由于本研究采用测序方法检测患者 LW 基因型为 LW<sup>a</sup>/LW<sup>a</sup>,推测患者 LW 血型为常见的 LW(a+b-),不是产生同种抗 LW 的 LW(a-b-)血型。进一步佐证本例抗 LW 为自身抗体,而非同种抗体。

抗 LW 在自身免疫性溶血性贫血患者体内常见,绝大多数为自身抗体,多为 IgG 抗体,通常认为临床意义不大,仅有 1 例报道自身抗 LW 引起新生儿溶血症<sup>[8]</sup>。对于含有抗 LW 的自身免疫性溶血性贫血,有长期体内红细胞存活研究和案例显示<sup>[9-10]</sup>,选择 RhD 阴性红细胞安全有效;也有文献<sup>[5]</sup>报道 RhD 阴性血稀缺时可筛选凝集最弱的 RhD 阳性红细胞输注。本例患者确诊淋巴瘤,直接抗球蛋白试验阳性,其自身抗体具有特异性,与 RhD 阳性红细胞主侧凝集均较强,选择含有较少 LW 抗原的 RhD 阴性红细胞可以降低抗 LW 抗体对红细胞可能造成的破坏,临床反馈输注有效。

#### 4 参考文献

- [1] 肖建宇, 王思思, 陈青, 等. 南京地区汉族人群编码 LW 血型基因 ICAM4 多态性研究[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(7): 773-775.
- [2] Hermand P, Gane P, Mattei MG, *et al.* Molecular basis and expression of the LW<sup>a</sup>/LW<sup>b</sup> blood group polymorphism[J]. *Blood*, 1995, 86(4): 1590-1594.
- [3] (英)杰夫·丹尼尔(Geoff Daniels)主编,朱自严主译. 人类血型:中文翻译版[M]. 北京:科学出版社, 2007: 491.
- [4] 桂嵘, 张志昇, 王勇军. 输血相容性检测及疑难病例分析[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018: 183.
- [5] 杨乾坤, 王莉, 孔永奎, 等. 罕见的 LW 不规则抗体分析及输血策略:附 1 例报道并文献复习[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(2): 168-170.
- [6] 孙国栋, 向东. 直接抗球蛋白试验阳性患者体内温自身抗体特异性[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(6): 397-399.
- [7] Lopez GH, Wilson B, Millard GM, *et al.* A new high-prevalence LW antigen detected by an antibody in an Indigenous Australian homozygous for LW \* A c.309C>A variant[J]. *Vox Sang*, 2022, 117(7): 958-965.
- [8] Davies J, Day S, Milne A, *et al.* Haemolytic disease of the foetus and newborn caused by auto anti-LW[J]. *Transfus Med*, 2009, 19(4): 218-219.
- [9] Chaplin H, Hunter VL, Rosche ME, *et al.* Long-term in vivo survival of Rh(D)-negative donor red cells in a patient with anti-LW[J]. *Transfusion*, 1985, 25(1): 39-43.
- [10] 田冬冬, 赵鼎, 李志浩, 等. 罕见抗 LW 抗体自身免疫性溶血性贫血合并新生儿溶血病患者的输血策略[J]. 中国实验血液学杂志, 2021, 29(6): 1935-1939.

(收稿日期:2022-09-10)

(本文编辑:王海燕)