

凝胶微柱直接抗人球蛋白试验 在卵巢癌患者中的应用价值

陈玮媛 张萍萍 雷琴 王翠碧 熊磊群 戎瑞明 屠蕊沁 吴肇颀 吕小英

作者单位: 361015 福建厦门, 复旦大学附属中山医院厦门医院输血科(陈玮媛、张萍萍、雷琴、王翠碧、熊磊群、戎瑞明、屠蕊沁、吕小英)

200032 上海, 复旦大学附属中山医院输血科(戎瑞明、吴肇颀)

通信作者: 吕小英, Email: lv.xiaoying@zsmhospital.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.03.023

【摘要】 目的 探讨对卵巢肿瘤患者进行凝胶微柱直接抗人球蛋白试验(GM-DAT)的阳性率及临床意义。方法 连续性纳入 2018 年 9 月—2019 年 2 月复旦大学附属中山医院厦门医院收治的 354 例妇科疾病患者作为研究对象,通过电子病历系统获得相关的临床和检验数据。使用 IH-1000 自动化血型鉴定仪对患者抗凝血标本进行 GM-DAT 检测,阳性标本使用标准试管法进行验证和单特异性抗-免疫球蛋白 G(IgG)和抗-C3d 分型。结果 354 例患者中检出 GM-DAT 阳性 7 例(占 2.0%),其中卵巢癌 5 例,输卵管癌 1 例,卵巢畸胎瘤 1 例。GM-DAT 在妇科恶性肿瘤患者中的阳性率明显高于妇科非恶性肿瘤患者(4.7% 比 0.4%, $P < 0.05$)。与 GM-DAT 阴性的卵巢癌患者比较,GM-DAT 阳性的卵巢癌患者年龄更大(岁: 68.4 ± 6.8 比 55.9 ± 11.5 , $P < 0.05$),血红蛋白(Hb)水平更低(g/L : 94.8 ± 16.3 比 111.9 ± 18.0 , $P < 0.05$)。结论 妇科恶性肿瘤尤其是卵巢癌患者中的 GM-DAT 阳性率较高。GM-DAT 弱阳性的卵巢癌患者可出现轻度贫血,提示存在红细胞自身免疫和潜在的副癌自身免疫性溶血性贫血。

【关键词】 副癌自身免疫性溶血性贫血; 凝胶微柱直接抗人球蛋白试验; 卵巢癌; 卵巢畸胎瘤

基金项目: 福建省厦门市医疗卫生指导性项目(3502Z20214ZD1071)

Clinical application of gel microcolumn direct antiglobulin test in patients with ovarian carcinoma

Chen Weiyuan, Zhang Pingping, Lei Shen, Wang Cuibi, Xiong Leiqun, Rong Ruiming, Tu Ruiqin, Wu Boting, Lyu Xiaoying. Department of Blood Transfusion, Zhongshan Hospital (Xiamen), Fudan University, Xiamen 361015, Fujian, China (Chen WY, Zhang PP, Lei S, Wang CB, Xiong LQ, Rong RM, Tu RQ, Lyu XY); Department of Blood Transfusion, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China (Rong RM, Wu BT)

Corresponding author: Lyu Xiaoying, Email: lv.xiaoying@zsmhospital.com

【Abstract】 Objective To investigate the positive rate and clinical significance of gel microcolumn direct antiglobulin test (GM-DAT) in patients with ovarian neoplasms. **Methods** The 354 patients with gynecological diseases admitted in Zhongshan Hospital (Xiamen), Fudan University from September 2018 to February 2019 were consecutively included as research objects, and relevant clinical and laboratory data were obtained through an electronic medical record system. Clinical and laboratory data were obtained via reviewing of medical records. Automated GM-DAT was performed on IH-1000 platform with anticoagulant blood samples. Positive samples were validated and typed by standard tube assay with monospecific anti-immunoglobulin G (IgG) or anti-C3d reagents. **Results** Positive GM-DAT was identified in 7 patients (accounting for 2.0%), including 5 cases of ovarian carcinomas, 1 case of fallopian tube carcinoma and 1 case of ovarian teratoma. The incidence of positive GM-DAT was significantly higher in patients with gynecological malignancies than those with non-malignancies (4.7% vs. 0.4%, $P < 0.05$). Compared with those with negative GM-DAT, patients with ovarian carcinoma and positive GM-DAT displayed elder age (years: 68.4 ± 6.8 vs. 55.9 ± 11.5 , $P < 0.05$) and lower hemoglobin (Hb) level (g/L : 94.8 ± 16.3 vs. 111.9 ± 18.0 , $P < 0.05$). **Conclusions** An elevated incidence of positive GM-DAT is confirmed in patients with gynecological malignancies, in particular in patients with ovarian carcinoma. Mild anemia is observed among weak positive GM-DAT cases with ovarian carcinoma, indicating erythrocyte autoimmunization and potential paraneoplastic autoimmune hemolytic anemia.

【Key words】 Paraneoplastic autoimmune hemolytic anemia; Gel microcolumn direct antiglobulin test; Ovarian carcinoma; Ovarian teratoma

Fund Program: Medical and Health Guidance Project of Xiamen City, Fujian Province (3502Z20214ZD1071)

自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia, AIHA)患者可产生针对自身红细胞抗原的抗体,导致红细胞破坏,当红细胞破坏超出了机体的代偿能力,则会出现贫血症状。早期免疫血液学研究表明,副癌 AIHA 可见于妇科肿瘤,尤其是卵巢畸胎瘤和卵巢囊肿患者,近期的研究进一步显示副癌 AIHA 亦可出现在卵巢癌患者中,甚至有时可充当恶性肿瘤进程的标志物^[1-2]。

直接抗人球蛋白试验(direct antiglobulin test, DAT)通过使用抗人球蛋白试剂形成肉眼可见的凝集反应,是证实红细胞膜上结合抗体或补体的标准方法^[3]。随着自动化血型鉴定仪器的发展,凝胶微柱卡广泛应用于临床实验室。凝胶微柱直接抗人球蛋白试验(gel microcolumn direct antiglobulin test, GM-DAT)具有灵敏度高、操作便捷的特点。然而目前对 GM-DAT 的临床价值,尤其是弱阳性 GM-DAT 结果的解读仍然存在争议。

本研究分析了妇科疾病患者的 GM-DAT 检测结果,调查卵巢肿瘤包括卵巢畸胎瘤和卵巢癌患者的 GM-DAT 阳性率,从副癌 AIHA 发病机制的角度对 GM-DAT 阳性在卵巢肿瘤患者中的临床意义进行了初步探索,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 连续性纳入 2018 年 9 月—2019 年 2 月入院的 354 例妇科患者作为研究对象。

1.1.1 纳入标准 ① 确诊为妇科疾病者;② 依从性较好者;③ 可正常沟通交流者。

1.1.2 排除标准 ① 存在活动性感染者;② 系统性自身免疫性疾病患者;③ 妊娠期女性;④ 拒绝配合本研究者。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并通过本院伦理委员会审批(审批号: B2023-011),所有对检测均获得过受检者或家属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 单一特异性抗-免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 和抗-C3d 试剂(均购自上海血液生物医药有限责任公司);IH-1000 自动化血型鉴定仪(购自瑞士达亚美有限责任公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 临床诊断和实验室数据收集 通过电子病历系统获得患者的临床诊断和实验室检查结果,包括全血细胞计数、总胆红素(total bilirubin, TBil)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)、人附睾蛋白 4(human

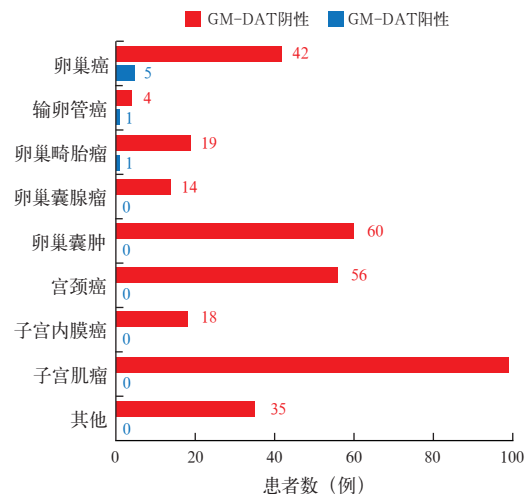
epididymis protein 4, HE4)以及糖类抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125)等。

1.3.2 GM-DAT 采用 IH-1000 自动化血型鉴定仪进行 GM-DAT 检测,患者血标本采用乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA)抗凝。阳性标本使用标准试管法进行验证以及单一特异性抗-IgG 和抗-C3d 分型。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 20.0 和 Shapiro-Wilk 统计软件处理数据并检验评估数值变量。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验比较两组间差异;不符合正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[*M*(*Q_L*, *Q_U*)]表示,以 *U* 检验比较两组间差异。计数资料则以例(百分比)表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验比较两组间差异。双侧 *P* < 0.05 视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的 GM-DAT 结果 本研究纳入 354 例妇科疾病患者,年龄 20 ~ 86 岁,平均(50.1 ± 13.4)岁;包括 129 例恶性肿瘤患者,其中宫颈癌 56 例,卵巢癌 47 例,子宫内膜癌 18 例,输卵管癌 5 例,外阴癌 3 例。354 例妇科疾病患者中检出 GM-DAT 阳性 7 例(总检出率为 2.0%),其中卵巢癌患者的检出率为 10.6%(5/47);输卵管癌的检出率为 20.0%(1/5),卵巢畸胎瘤的检出率为 5.0%(1/20)。GM-DAT 在妇科恶性肿瘤患者中的阳性率明显高于妇科非恶性肿瘤患者(4.7% 比 0.4%, *P* = 0.019)。354 例妇科疾病患者的临床诊断和 GM-DAT 阳性分布见图 1。



注: GM-DAT 为凝胶微柱直接抗人球蛋白试验; GM-DAT 阳性检出于卵巢癌、输卵管癌和卵巢畸胎瘤,未见于其他妇科肿瘤或非肿瘤性妇科疾病

图 1 354 例妇科疾病患者的临床诊断和 GM-DAT 阳性分布

除了 1 例卵巢畸胎瘤患者的阳性 GM-DAT 呈现 2+ 的凝集强度且分型为 1+ 抗 -IgG 和 1+ 抗 -C3d 以外,其余患者的阳性 GM-DAT 仅表现为弱阳性 (+/-),试管法抗 -IgG 和抗 -C3d 检测均为阴性。

2.2 卵巢癌患者的 GM-DAT 结果 47 例卵巢癌患者中检出 5 例弱阳性 GM-DAT,相较于 GM-DAT 阴性的卵巢癌患者,GM-DAT 阳性的卵巢癌患者年龄更大(岁: 68.4 ± 6.8 比 55.9 ± 11.5 , $P=0.009$),血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平更低(g/L: 94.8 ± 16.3 比 111.9 ± 18.0 , $P=0.048$)。GM-DAT 阴性和阳性的卵巢癌患者的年龄、输血史、妊娠史和检验指标等资料比较见表 1。

表 1 GM-DAT 阳性与阴性卵巢癌患者的临床特征比较

指标	GM-DAT 阳性 (n=5)	GM-DAT 阴性 (n=42)	t/Z/ χ^2 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	68.4 ± 6.8	55.9 ± 11.5	3.560	0.009
输血史[例(%)]	0(0.0)	7(16.7)	0.979	1.000
妊娠史[例(%)]	5(100.0)	40(95.2)	0.210	1.000
RBC($\times 10^{12}/L$, $\bar{x} \pm s$)	3.2 ± 0.4	3.7 ± 0.7	-1.754	0.086
Hb(g/L, $\bar{x} \pm s$)	94.8 ± 16.3	111.9 ± 18.0	-2.031	0.048
HCT(% , $\bar{x} \pm s$)	29.4 ± 5.2	34.0 ± 5.2	-1.897	0.064
PLT($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)	236.2 ± 100.4	257.9 ± 93.6	-0.486	0.630
TBil(mg/dL, $\bar{x} \pm s$)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3	-1.067	0.292
DBil(mg/dL, $\bar{x} \pm s$)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-0.969	0.338
LDH [U/L, $M(Q_L, Q_U)$]	222.0 (164.5, 294.5)	208.0 (168.3, 279.0)	-0.072	0.942
CA125 [kU/L, $M(Q_L, Q_U)$]	214.1 (69.6, 649.7)	107.0 (36.5, 311.0)	-0.752	0.452
HE4 [pmol/L, $M(Q_L, Q_U)$]	169.8 (160.4, 1118.0)	90.0 (66.5, 252.5)	-1.455	0.146

注: GM-DAT 为凝胶微柱直接抗人球蛋白试验, RBC 为红细胞计数, Hb 为血红蛋白, HCT 为血细胞比容, PLT 为血小板计数, TBil 为总胆红素, DBil 为直接胆红素, LDH 为乳酸脱氢酶, CA125 为糖类抗原 125, HE4 为人附睾蛋白 4

3 讨论

本研究结果显示,妇科恶性肿瘤尤其是卵巢癌患者的 GM-DAT 阳性率升高,表明副癌 AIHA 形成过程中卵巢抗原暴露的可能。

妇科相关副癌 AIHA 的最早记录可以追溯至 20 世纪 30 年代, 1 例卵巢畸胎瘤患者行脾切除术治疗无效,但切除畸胎瘤后溶血症状缓解^[4]。随后,副癌 AIHA 主要集中报道于卵巢畸胎瘤患者中^[5-8]。近期有文献表明,卵巢癌诊断前、中、后均可出现副

癌 AIHA^[1-2,9]。本研究利用 GM-DAT 这一高自动化、高灵敏度的检测方法得出卵巢癌患者中 DAT 阳性检出率偏高。

GM-DAT 检测中,凝胶微柱内含有抗人球蛋白试剂,在离心过程中将与抗人球蛋白试剂反应、凝集的红细胞滞留于凝胶孔筛中,而不反应的红细胞则被滤过,留存于凝胶底部。与传统试管法比较,GM-DAT 的灵敏度可达 98.4%~100%^[10-11]。GM-DAT 检测具有双重优势:①凝胶微柱卡中的抗 -IgG 试剂为来源于兔的多克隆抗体,偶而可检出红细胞上致敏的 IgA 或 IgM 分子;② GM-DAT 可检出少量的致敏 IgG 或 C3d,检测限低于传统试管法。然而目前对试管法阴性而 GM-DAT 阳性检测结果的临床意义仍存在争议,有时会被认定为由巨红细胞或白细胞增多引起的假阳性结果^[12]。尽管健康人群的红细胞上可出现少量的 IgG 或补体^[13-14],但本研究中 GM-DAT 弱阳性的卵巢癌患者出现了轻度贫血,表明卵巢癌患者中 GM-DAT 弱阳性可能已造成了某种程度的红细胞破坏。

卵巢肿瘤患者红细胞自身免疫现象的潜在机制仍然未知。卵巢皮样囊肿中可检出抗体,且囊液抗体滴度高于患者血清抗体滴度^[15-16],因此早期研究推断卵巢肿瘤直接生成了红细胞自身抗体。但某些患者囊液中未检出红细胞自身抗体,且生物素标记的红细胞自身抗体未结合至囊组织上^[17]。目前关于卵巢肿瘤患者出现副癌 AIHA 的假说主要包括两种:①肿瘤抗原刺激机体产生的抗体对红细胞具有交叉反应性;②肿瘤释放的物质促使红细胞膜上的抗原产生免疫原性^[18]。卵巢肿瘤的患病风险随着年龄增长而增加^[19],年龄越大的患者卵巢肿瘤分期越高,预后越差^[20-21]。由于 GM-DAT 弱阳性的卵巢癌患者通常年龄较大,GM-DAT 阳性可能也是此类患者潜在的危险因素,对卵巢癌预后的影响有待进一步研究。

妇科恶性肿瘤患者的 GM-DAT 阳性率较高表明其发生副癌 AIHA 的风险也较高。本研究中卵巢癌患者的 GM-DAT 阳性率为 10.6%,是已有文献报道的卵巢癌相关 AIHA 确诊率的 7.6 倍^[9]。而在相对少见的输卵管癌患者中,GM-DAT 的阳性率高达 20.0%。这意味着红细胞自身免疫对妇科恶性肿瘤患者具有潜在的临床意义。临床对不同贫血类型患者的治疗措施有一定差异^[22],应用 GM-DAT 可鉴别和区分妇科恶性肿瘤患者晚期常出现的慢性贫血与

副癌 AIHA, 为治疗方案的制定提供参考依据。

副癌 AIHA 的治疗原则与普通 AIHA 不同。除了少数 IgA 介导的副癌 AIHA 仍对免疫抑制剂有效外^[1], 大部分副癌 AIHA 使用皮质类固醇和脾切除术均无法缓解^[6, 8, 23]。副癌 AIHA 的治疗原则是治疗原发病, 切除卵巢肿瘤后患者贫血症状改善^[6, 8]。由于术前贫血和术中潜在出血风险, 可优先选择腹腔镜手术方式^[23]。因铂类化合物可能出现药物诱导的溶血性贫血, 建议使用紫杉烷代替标准铂类化合物作为一线化疗药物^[1]。

本研究有待进一步深入, 不足之处主要有以下方面。首先, GM-DAT 阳性的标本可进行放散试验从而验证抗体的特异性; 其次, 随访信息可为 GM-DAT 阳性在卵巢癌中的临床意义提供更多的证据。妇科肿瘤相关 AIHA 的潜在机制仍有待完善。

综上所述, 妇科恶性肿瘤尤其是卵巢癌患者的 GM-DAT 阳性率较高, 弱阳性 GM-DAT 的卵巢癌患者可出现轻度贫血, 提示红细胞自身免疫现象和潜在的副癌 AIHA。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- MORRIS P G, SWORDS R, SUKOR S, et al. Autoimmune hemolytic anemia associated with ovarian cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26 (30): 4993-4995. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.1231.
- LOH K P, KANSAGRA A, ASIK A, et al. Paraneoplastic autoimmune hemolytic anemia in ovarian cancer: a marker of disease activity [J]. *Rare Tumors*, 2015, 7 (1): 5598. DOI: 10.4081/rt.2015.5598.
- PARKER V, TORMEY C A. The direct antiglobulin test: indications, interpretation, and pitfalls [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141 (2): 305-310. DOI: 10.5858/arpa.2015-0444-RS.
- WEST-WATSON W N, YOUNG C J. Failed splenectomy in acholuric jaundice [J]. *Br Med J*, 1938, 1 (4041): 1305-1309. DOI: 10.1136/bmj.1.4041.1305.
- RAIMUNDO P O, COELHO S, CABELEIRA A, et al. Warm antibody autoimmune haemolytic anaemia associated with ovarian teratoma [J]. *BMJ Case Rep*, 2010, 2010: DOI: 10.1136/bcr.06.2009.1971.
- KIM I, LEE J Y, KWON J H, et al. A case of autoimmune hemolytic anemia associated with an ovarian teratoma [J]. *J Korean Med Sci*, 2006, 21 (2): 365-367. DOI: 10.3346/jkms.2006.21.2.365.
- MARTELLOSIO J P, LANDRON C, MILIN S, et al. Surgical treatment of an auto-immune hemolytic anemia [J]. *Rev Med Interne*, 2018, 39 (6): 435-438. DOI: 10.1016/j.revmed.2018.03.018.
- FELEMBAN A A, RASHIDI Z A, ALMATRAFI M H, et al. Autoimmune hemolytic anemia and ovarian dermoid cysts in pregnancy [J]. *Saudi Med J*, 2019, 40 (4): 397-400. DOI: 10.15537/smj.2019.4.24107.
- NENOVA I S, VALCHEVA M Y, BELEVA E A, et al. Autoimmune phenomena in patients with solid tumors [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2016, 58 (3): 195-199. DOI: 10.1515/foimed-2016-0026.
- DAS S S, CHAUDHARY R, KHETAN D. A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test [J]. *Hematology*, 2007, 12 (2): 175-178. DOI: 10.1080/10245330601111862.
- NOVARETTI M C, JENS E, PAGLIARINI T, et al. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study [J]. *J Clin Lab Anal*, 2004, 18 (5): 255-258. DOI: 10.1002/jcla.20033.
- ALWAR V, DEVI A M, SITALAKSHMI S, et al. Evaluation of the use of gel card system for assessment of direct coombs test: weighing the pros and cons [J]. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2012, 28 (1): 15-18. DOI: 10.1007/s12288-011-0098-7.
- GARRATTY G. The significance of IgG on the red cell surface [J]. *Transfus Med Rev*, 1987, 1 (1): 47-57. DOI: 10.1016/s0887-7963(87)70005-4.
- FREEDMAN J. The significance of complement on the red cell surface [J]. *Transfus Med Rev*, 1987, 1 (1): 58-70. DOI: 10.1016/s0887-7963(87)70006-6.
- De BRUYERE M, SOKAL G, DEVOITILLE J M, et al. Autoimmune haemolytic anaemia and ovarian tumour [J]. *Br J Haematol*, 1971, 20 (1): 83-94. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1971.tb00789.x.
- PAYNE D, MUSS H B, HOMESLEY H D, et al. Autoimmune hemolytic anemia and ovarian dermoid cysts: case report and review of the literature [J]. *Cancer*, 1981, 48 (3): 721-724. DOI: 10.1002/1097-0142(19810801)48:3<721::aid-cnrcr2820480311>3.0.co;2-u.
- COBO F, PEREIRA A, NOMDEDEU B, et al. Ovarian dermoid cyst-associated autoimmune hemolytic anemia: a case report with emphasis on pathogenic mechanisms [J]. *Am J Clin Pathol*, 1996, 105 (5): 567-571. DOI: 10.1093/ajcp/105.5.567.
- BAKER L R, BRAIN M C, AZZOPARDI J G, et al. Autoimmune haemolytic anaemia associated with ovarian dermoid cyst [J]. *J Clin Pathol*, 1968, 21 (5): 626-630. DOI: 10.1136/jcp.21.5.626.
- STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35 (2): 151-156. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.02.001.
- HEINTZ A P, ODICINO F, MAISONNEUVE P, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2006, 95 (Suppl 1): S161-192. DOI: 10.1016/S0020-7292(06)60033-7.
- DENG F, XU X, LV M, et al. Age is associated with prognosis in serous ovarian carcinoma [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10 (1): 36. DOI: 10.1186/s13048-017-0331-6.
- 董玉俊. 血常规检测在贫血鉴别诊断中的应用效果 [J]. *实用检验医师杂志*, 2021, 13 (2): 74-76. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.02.003.
- Nii M, Kondo E, Maki S, et al. Safety and efficacy of laparoscopic oophorectomy for ovarian dermoid cyst associated with autoimmune hemolytic anemia [J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2018, 7 (1): 27-30. DOI: 10.4103/GMIT.GMIT_9_17.

(收稿日期: 2023-05-09)

(本文编辑: 郗文)