

孕妇外周血液中胎儿红细胞的研究进展

吕 娜,朱宏远,战思恩
(首都医科大学附属北京妇产医院,北京 100026)

摘要:研究认为孕妇外周血液循环中出现胎儿红细胞的主要原因是脐动脉和绒毛间隙之间的压力不同造成的。如果绒毛屏障受到破坏时,胎儿的血液就会通过绒毛间隙,进入到母体,最终出现在母体的外周血液循环中。通常可能会有很少量的胎儿红细胞在母体的外周血液循环中出现,这是正常的情况,且没有明显的胎儿和母体不良反应。但是当胎儿进入母体的血量超过一定阈值时,就会引发胎母输血综合征,引起严重的临床症候群。本文主要从胎儿红细胞的来源;现有检测方法;对胎母输血综合征的诊治;与新生儿贫血的相关性;在产前诊断中的价值;及对子痫前期发病预测等临床应用进展方面进行分析总结,为临床诊疗提供依据。

关键词:胎儿红细胞; HbF; 胎母输血综合征; K-B 实验

中图分类号:R714.25 **文献标识码:**A

The Research Progress of Fetal Red Blood Cells in Maternal Peripheral Blood

LYU Na,ZHU Hongyuan,ZHAN Si'en
(Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China)

Abstract:It is believed that the main reason of the appearance of fetal red blood cells in maternal peripheral blood circulation is the pressure difference between umbilical artery and villus space. If the chorionic barrier is damaged, the blood of the fetus will pass through the chorionic space, enter the maternal body, and finally appear in the maternal peripheral blood circulation. In general, a small amount of fetal red blood cells may appear in the maternal peripheral blood circulation, which is a normal condition, and there is no obvious adverse reaction between the fetus and the maternal body. However, when the blood volume of the fetus entering the maternal body exceeds a certain threshold, it will lead to the transfusion syndrome of the mother and cause a serious clinical syndrome. This article mainly analyzes and summarizes the source of fetal red blood cells, the existing detection methods, the diagnosis and treatment of fetal mother blood transfusion syndrome, also the correlation with neonatal anemia, the value in prenatal diagnosis, and the prediction of pre-eclampsia, so to provide the knowledge basis for the clinical diagnosis and treatment.

Key words:Fetal erythrocyte; HbF; Fetomaternal hemorrhage; Kleihauer-Betke test

孕妇外周血液循环中存在的少量胎儿红细胞属于正常的生理现象,且可以出现于孕期的各个阶段。其主要原因是脐动脉和绒毛间隙之间存在压力差。当孕妇外周血液循环中的胎儿红细胞过多时,就会引起严重的临床症候群,导致妊娠的不良结局。然而,对孕妇外周血液循环中胎儿红细胞的检测、分析、研究可以在妊娠早期给临床以警示,为临床对疾病的早期判断和诊疗提供可靠的依据。

1 母体外周血中胎儿红细胞的来源

WALKNOWSKA 等^[1]在 1969 年研究发现了胎儿红细胞会存在于母体外周血液循环中。经过国内外大量学者的研究证实,在母体外周血液循环中,胎儿有核红细胞(FNRBCs)是可被发现的来自胎儿细

胞之一。在母体外周血液循环中,FNRBCs 的含量是极少的,大约是 $1/10^5 \sim 1/10^9$ ^[2]。围产期可有数目不等的胎儿红细胞进入到母体中。目前研究认为,在一些非正常妊娠情况下,当绒毛屏障受损时,胎儿的血液细胞就会以少量而缓慢的方式,亦或是大量而急速地通过绒毛间隙,进入到母体的外周血液循环中。母体外周血中的胎儿有核红细胞有增多的情况^[3]。在妊娠的各个阶段,胎儿有核红细胞数量也会有所不同。孕妇在孕 6 周以后即可在外周血中检出胎儿有核红细胞,并且由于妊娠期的不断延长,胎儿有核红细胞的数量也会逐渐增多。以 40 mL 孕妇外周血为一个计量单位,胎儿有核红细胞可由孕早期(6 周)时可见 100 个,到孕末期至分娩可增长到

1 000个^[4]。

2 胎儿红细胞的检测方法

通常少量的胎儿红细胞存在于母体的外周血液循环中是正常现象。但当胎儿失血量超过一定阈值时,就会引起胎儿严重的并发症,比如不同程度的贫血、水肿,甚至可能会出现胎死宫内,从而导致不良的妊娠结局。所以母血中胎儿红细胞的检测对于临床的诊治尤为重要。目前对于胎儿红细胞的检测大多是基于成人与胎儿血红蛋白组成成分差异而进行的。在胎儿的红细胞中 99 % 都是血红蛋白 F(HbF)。而成人的红细胞中主要以血红蛋白 A(HbA)的成分存在。其中,血红蛋白 F 仅仅占到 1% 以下。血红蛋白 F 在孕早期(6 周)时就已经开始出现,而孕期发展到 12 周至 18 周时,在胎儿的全部血红蛋白组成中,HbF 就可以占到 90 % 以上甚至是 100%。当血液凝固时,母血中的血红蛋白 F 也不会受到影响,表现较为稳定。

2.1 K-B 实验

Kleihauer-Betke(K-B)实验,即血红蛋白 F 酸洗脱试验。本实验是基于 HbF 比 HbA 抗酸洗脱能力强,当固定好的孕妇外周血涂片在酸性环境中温浴 1min 后,因为胎儿红细胞含有不被酸洗脱的 HbF,所以伊红将其染成红色。而母体的红细胞不含有血红蛋白 F 可被酸洗脱,不被伊红着色,呈无色空泡样。在显微镜下计数,计算出胎儿红细胞在 1000 个红细胞中所占的百分比。正常情况下,普通成年人 K-B 值应 <0.1%,孕产妇 K-B 值应 <1%^[5]。但患有某些血液系统疾病时,例如再生障碍性贫血或地中海贫血时,均会引起孕妇 K-B 值增高。应注意,K-B 法是有局限性的,当进行宫内输血治疗时或者胎儿红细胞由于不明原因已经存在于母体外周血中的情况就不适合本实验了^[6-7]。

此方法优点是灵敏度较高,既可以诊断胎母输血,又可以大体评估胎儿失血量。有研究^[8]分析,温度、洗脱时间、pH 值、染色时间等都会影响实验的准确性。应该注意胎儿血红蛋白可以被母体逐渐清除。一些其他疾病也可以使 K-B 实验呈阳性,结果的特异性和可重复性较差^[9]。K-B 实验是手工方法,所以缺少很好的质量控制体系,且受人为因素影响较大。但是此方法依然是实验室目前最常用的快速筛检方法。

2.2 流式细胞术

流式细胞术(FMC)是一种对悬浮在流体中的微小生物粒子或单细胞(如微球蛋白、微生物等)进行逐个、多参数、快速定性、定量分析或分选的技术。通过流式细胞技术可检测母体外周血中的胎儿红细

胞的数量。利用荧光标记抗血红蛋白 F 的单克隆抗体,可以标记孕妇外周血中含有的 HbF 胎儿红细胞,识别被荧光标记的单克隆抗体的特意结合,通过流式细胞术能快速准确检测出其在母血中的含量。流式细胞术检测母血中的胎儿红细胞的优点是定量检测准确、检测速度快、可重复性好,受人为因素干扰较小,为围产期胎母输血情况提供及时可靠的诊断依据。WONG 等^[10]研究表明,通过应用 HbF 标定的商品化检测定量试剂,对减少实验室间的误差可以起到重要作用。但由于流式细胞术价格成本十分昂贵,不适用于普查和基层医院等地区开展,所以临床上极少应用此方法。目前,在美国只有 4 % 左右的实验室定量检测胎儿红细胞时采用流式细胞术^[11]。

2.3 ELISA 的定量检测

酶联免疫吸附试验 ELISA 基于抗原和抗体的特异性结合这一特性。将保持免疫活性的已知抗原或抗体吸附到固相载体上,运用酶标记过的抗原或抗体与相应的抗原抗体反应从而吸附到固相载体上,将液相中多余的酶标成分洗涤掉,加入底物催化酶显色,有色产物的多少直接与待检的抗原或抗体的含量相关。目前,国外研制出的检测胎儿红细胞的产品多采用双多抗体夹心法。即用抗人血红蛋白 F 抗体作为捕获抗体,用辣根过氧化物酶标记过的羊抗人血红蛋白 F 抗体作为检测抗体。此外,为了更加方便,更加科学的研究胎儿红细胞,单克隆抗体的商品化试剂盒也已经制备成功了^[12]。该产品的优点是操作简捷、灵敏度高、特异性好、可广泛使用,更适合大量的筛查使用。但是,我国目前还没有这种商品用于实验检测。

2.4 HbF 碱变性实验

我们知道,HbF 蛋白既有很强的抗酸能力也有抗碱能力。本方法依托血红蛋白 F 比血红蛋白 A 有更强的抗碱能力,血红蛋白 F 在碱性环境中不容易变性沉淀,而在碱性环境中血红蛋白 A 易变性,且可被半饱和硫酸铵沉淀,而过滤液中 HbF 蛋白含量就可以轻易的检测出来了。这种方法可以快速诊断母血中是否含有过多的胎儿红细胞,对于妊娠期胎母输血的诊断有很大的帮助。但是,由于实验检验方法的限制,重复性不是很理想,没有很好的质量控制体系,对检验人员的要求很高,所以不适于临床开展。

2.5 高效液相检测 HbF γ 比值

高效液相检测法是以高压下的液体为流动相,并采用颗粒极细的高效固定相的柱色谱分离技术。成人的血红蛋白 HbA 与胎儿血红蛋白 HbF 有着不同的理化性质,通过高效液相装置中的流动相、固

定相进行吸附、分子筛、离子交换和分配作用对母血和胎儿的血红蛋白进行分离,再利用光电检测系统进行定量分析。在该体系中,HbF 蛋白会在图谱上出现特异性 γ 链峰,根据 γ 链峰的高低可计算出 HbF 所占比值。高效液相检测方法的优点是灵敏度高、检测快速、检测结果可靠和精确等优点。这种检测方法的缺点是仪器比较昂贵,检验费用比较高,并且不能测定出胎儿红细胞在母血中的具体含量。

3 胎儿红细胞的临床应用

3.1 胎母输血综合征的诊治

胎母输血综合征(FMH)在产科疾病中很少见,是孕期中胎儿红细胞经过胎盘的绒毛间隙进入到母体外周血液循环中从而引起胎儿不同程度的贫血、水肿甚至胎死宫内等一系列并发症的临床症候群^[13]。在妊娠和分娩的任何一个阶段,FMH 都有可能发生。胎母输血综合征的发病机制还尚未研究明确,所以 FMH 的早期诊断对于妊娠期孕产妇具有十分重要价值^[14]。目前国内外多以母体外周血中存在胎儿红细胞的含量来对 FMH 进行诊断和治疗,而应用较多的检测母体外周血中胎儿红细胞含量的方法仍为 K-B 实验。正常情况下的普通成年人 K-B 值应 $<0.1\%$ (地中海贫血除外),孕产妇 K-B 值应 $<1\%$ 。当孕产妇的 K-B 值 $>3\%$ 时,应列为胎母输血综合征。根据 K-B 实验还可以估算出胎儿失血进入母体外周血液循环的血量,即胎儿失血量(mL) = 母体血容量 \times 母体血细胞比容 \times 胎儿红细胞比例/正常新生儿血细胞比容^[15]。根据实验得出的母体外周血中胎儿红细胞的含量来指导需要宫内输血的胎母输血综合征患者的治疗,还为妊娠结局的评估提供了可靠的依据。

3.2 胎儿红细胞与新生儿贫血的相关性

在正常围产期,大约会有 5~30 mL 的胎儿红细胞进入母体外周血液循环中,这属于正常现象。但发生胎母输血非常严重,甚至是发生了胎母输血综合征时,短时间丢失进入到母体的胎儿红细胞数量过多,且胎儿红细胞新生数量不足以代偿,就会引起胎儿的贫血^[16-17]。胎母输血是新生儿期贫血常见原因之一^[18],新生儿贫血的程度与胎儿红细胞丢失进入母体的时间、失血速度和丢失血量有关。当胎儿红细胞急性失血进入母体外周血液循环的量小于等于胎儿自身血容量的 4% 时,表现为不同程度的贫血;当胎儿红细胞急性失血进入母体外周血液循环的量大于胎儿自身血容量的 50%,胎儿就会有严重的贫血,娩出的胎儿容易导致神经损伤、脑瘫、心力衰竭、低血容量性休克,甚至死亡。若发生宫内慢性失血时,除去胎盘外,胎儿的所有组织血管阻力增

加,流体静压升高也会导致胎儿水肿及生长受限^[19]。所以,围产期胎儿红细胞在孕妇外周血中的数量与新生儿贫血具有相关性。在围产期,应将 K-B 实验作为常规筛检实验,以此来监控和评价胎儿是否在宫内生长发育阶段发生有失血情况。

3.3 胎儿红细胞在产前诊断中的价值

在孕妇外周血中主要有 2 种来源于胎儿的细胞,一种是来自于胎盘细胞,包括细胞滋养细胞和合体滋养细胞;另一种是来自于胎儿血细胞,包括胎儿有核红细胞(FNRBCs)、粒细胞、淋巴细胞等^[20]。FNRBCs 从妊娠 6 周后至分娩会持续存在于母体外周血液循环中,而正常非孕妇女中无 FNRBCs。FNRBCs 的特点有生命周期短,大约为 90 d,不会受到既往妊娠的影响;FNRBCs 表面有数种特异性标志物,例如血型糖蛋白 A,转铁蛋白受体 CD36,CD71,胎儿血红蛋白(HbF)等,都可作为胎儿细胞的识别标记;FNRBC 属于单核细胞,容易从形态学上辨别,而且 FNRBCs 含有胎儿基因的全部遗传信息^[21]。基于以上特点,胎儿有核红细胞是最理想的产前诊断的来源细胞,能够提供更加可靠而精准的基因诊断。经研究证实发现,早在 1991 年就首次运用荧光原位杂交技术(FISH)用于染色体非整倍体疾病诊断。它是以孕期母体外周血中胎儿有核红细胞为研究对象进行检测的,PRICE 等^[22]用 18 号染色体特异性探针对于孕妇外周血中的胎儿细胞进行杂交,诊断出 1 例 18-三体综合征的胎儿。高海侠等^[23]运用 FISH 技术研究,对 10 例高危孕产妇外周血中富集的胎儿有核红细胞进行性别鉴定,其研究结果为对于诊断男性的灵敏度和特异性分别为 85.71% 和 100.00%,对于诊断女性的灵敏度和特异性分别为 100.00% 和 85.71%。所以,孕妇外周血中胎儿有核红细胞在产前诊断中是一种很有前途的靶细胞,对产前诊断有非常重要的价值。但是经研究发现,孕妇外周血中不是所有的有核红细胞全部来自胎儿,TROEGER 等^[24]应用单个细胞 PCR 技术检测母血中的 FNRBCs,发现约 51% 的 FNRBCs 来自胎儿。

3.4 胎儿红细胞对于产前诊断的价值

妊娠期并发症与母血中胎儿红细胞的数量之间的关系是近年来人们研究的热点。1998 年 HOIZGREVE 等^[25]首次报道先兆子痫病人(9/1 000)外周血中的胎儿红细胞数量明显高于对照组(2/1 000)。他们进一步研究发现,先兆子痫病人血中胎儿红细胞数量显著增加(38:7)。ANDERSON 等^[26]研究称结合 HbF、 α_1 -微球蛋白和血红素可以作为子痫前期的预测模型。因此,胎儿红细胞预测模型的构建和研究对于子痫前期的发病具有一定的价值,是我们

很好的研究方向。

4 总结

综上所述,胎儿红细胞对围产期的应用价值的重要性不断提高,对围产期疾病的诊疗提供了极大的帮助。目前,因胎儿红细胞具有无创产前诊断潜力而被广泛的学者研究。但由于母体血液循环中胎儿红细胞的缺乏,极大的阻碍了胎儿红细胞的分离及其在产前诊断中的进一步应用。为此 WEI 等^[27]学者最新研究开发出一种有效的纳米涂层沉积微流体混沌芯片,该芯片与 CD147 结合,用于从母体血液分离胎儿红细胞。这种方法在基础和临床应用方面会有很好的前景。而相较于目前广泛应用的基于 HbF 检测的常规方法,该方法避免了人为因素的干扰,大大提高了孕妇外周血中的胎儿红细胞检测结果的准确性、可靠性。期待该方法能够更早地更成熟地运用到临床检测中。

参考文献

- [1] WALKNOWSKA J, CONTE F A, GMMBACH M M. Practical and theoretical implications of Fetal-maternal lymphocyte transfer[J]. *Lancet*, 1969, 1(7606): 1119-1122.
- [2] LIM K H, SALAHUDDIN S, QIU L, et al. Light-scattering spectroscopy differentiates fetal from adult nucleated red blood cells: May lead to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Opt Lett*, 2009, 34(9): 1483-1485.
- [3] 陈莉娟, 朱剑文, 邹丽. 孕妇外周血中胎儿有核红细胞数量与胎儿窘迫的关系[J]. *实用医学杂志*, 2005, 21(26): 558-559.
- [4] SCHLUTTER J M, KIRKEGAARD I, PETERSEN O B, et al. Fetal gender and several cytokines are associated with the number of fetal cells in maternal blood-an observational study[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106934.
- [5] 刘莹. 产前母血胎儿有核红细胞、甲胎蛋白水平与胎母输血综合征的相关性分析[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(20): 4963-4965.
- [6] 曾选, 习永生, 甘雪华, 等. 妊娠期阴道出血时血红蛋白 F(HbF) 对鉴别母体血与胎儿血的作用研究[J]. *实验与检验医学*, 2010, 28(5): 463-464.
- [7] KATHERINE M, NIYATI M, MARA S. The Role of Betke-Kleihauer testing in the detection of fetomaternal hemorrhage: a retrospective chart review[J]. *JOGC*, 2018, 40(6): 843-844.
- [8] 杨树法, 翟燕红, 王文娟. 影响 Kleihauer-Betke 实验结果的实验因素分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(2): 138-139, 142.
- [9] JENNIFER C D, SHARON M C, AOIFE D. False positive Kleihauer-Betke (acid elution) test caused by elevated maternal fetal haemoglobin F cells[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 172: 136-137.
- [10] WONG L, HUNSBERGER B C, BRUCE BAGWELL C, et al. Automated quantitation of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry for HbF-containing fetal red blood cells using probability statemodelling[J]. *Int J Lab Hematol*, 2013, 35(5): 548-554.
- [11] MARIELA G F, SUZANE D B, SIMONE M C, et al. Flow cytometry

- in detection of fetal red blood cells and maternal F cells to identify fetomaternal hemorrhage[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2016, 35(6): 385-391.
- [12] THEIN S L, SAMPIETRO M, ROHDE K, et al. Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin after accounting for genetic modifiers[J]. *Am J Hum Genet*, 1994, 54(2): 214.
- [13] 陈沂, 胡静, 高劲松. 胎母输血综合征诊治进展[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(3): 283-287.
- [14] RAVISHANKAR S, MIGLIORI A, STRUMINSKY J, et al. Placental findings in feto-maternal hemorrhage in livebirth and stillbirth[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(4): 301-304.
- [15] KIM Y A, MAKAR R S. Detection of fetomaternal hemorrhage[J]. *Am J Hematol*, 2012, 87(4): 417-423.
- [16] 王晓梅, 赵友萍. 胎母输血综合征临床特点分析[J]. *中国医刊*, 2015, 50(12): 86-88.
- [17] 李兆娜, 张巍. 胎母输血综合征的研究进展[J]. *中国医刊*, 2015, 50(4): 35-37.
- [18] KADOOKA M, KATO H, KATO A, et al. Effect of neonatal hemoglobin concentration on long-term outcome of infants affected by fetomaternal hemorrhage[J]. *Early Hum Dev*, 2014, 90(9): 431-434.
- [19] 狄薇, 刘惠莉, 杨秀珍. 新生儿胎母输血综合征临床分析及文献复习[J]. *中国保健营养*, 2017, 27(20): 286.
- [20] CHEN F, LIU P, GU Y, et al. Isolation and whole genome sequencing of fetal cells from maternal blood towards the ultimate non-invasive prenatal testing[J]. *Prenat Diagn*, 2017, 37(13): 1311-1321.
- [21] BEAUDET A L. Using fetal cells for prenatal diagnosis: History and recent progress[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2016, 172(2): 123-127.
- [22] PRICE J O, ELIAS S, WACHTEL S S, et al. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165(6 Pt 1): 1731-1737.
- [23] 高海侠, 刘晓华, 岳洁. 基于纳米技术从孕妇外周血中分离胎儿有核红细胞并进行无创性产前诊断的可行性[J]. *广东医学*, 2017, 38(2): 280-283.
- [24] TROEGER C, ZHONG X Y, BURGEMEISTER R. Proximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin[J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 5: 1162-1165.
- [25] HOIGREVE W, GHEZZI F, DINARO E, et al. Feto-maternal cell traffic is disturbed in preeclampsia[J]. *Obstet Gynecol*, 1998, 91: 669-672.
- [26] ANDERSON U D, GRAM M, RANSTAM J, et al. Fetal hemoglobin, α 1-microglobulin and hemopexin are potential predictive first trimester biomarkers for preeclampsia[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2016, 6(2): 103-109.
- [27] WEI X Y, CAI B, CHEN K K, et al. Enhanced isolation and release of fetal nucleated red blood cells using multifunctional nanoparticle-based microfluidic device for non-invasive prenatal diagnostics[J]. *Sens Actuatur B Chem*, 2019, 281: 131-138.