

athy[J]. *Nephrology* (Carlton), 2009, 14 (3): 332-337.

[15] 韩玲. 糖尿病肾病患者肾脏早期损害指标的探讨[J]. 现代中西医结合杂志. 2009, 18(4): 32-34.

[16] Sejdiu I, Torffvit O. Decreased urinary concentration of Tamm Horsfall protein is associated with development of renal failure and cardiovascular death within 20 years in type 1 but not in type 2 diabetic patients[J]. *Scand J Urol Nephrol*, 2008, 42(2): 168-174.

[17] 张丽, 李素梅, 章容, 等. DM2 患者 GFR、尿 Alb 和尿 Alb/尿 Cr 测定及其临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(2): 127-130.

[18] 梁卫华, 崔幸琨, 杨宝财, 等. HbA1c、sCysC 和 nRBP 联合检测在 2 型糖尿病早期肾损伤中的临床研究[J]. 河北医药, 2010, 32(2): 232-233.

[19] 刘惠玲, 江怡, 陈菊萍, 等. 彩色多普勒超声诊断早期糖尿病肾病临床价值的研究[J]. 上海医学影像, 2006, 15 (4):

322 -324.

[20] Heine GH, Sester U, Girndt M, et al. Acanthocytes in the urine; useful tool to differentiate diabetic nephropathy from glomerulone phritis[J]. *Dbetes Care*, 2004, 27: 190 - 194.

[21] Granier C, Makni K, Molina L, et al. Gene and protein markers of diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(3): 792-799.

[22] Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, et al. Common variants in glutamine; fructose-6 -phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy and increased GFPT2 mRNA levels [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 748 -755.

(收稿日期: 2011-09-16)

糖化血红蛋白的检测技术与临床应用进展

严芝光 综述, 钟 东 审校(广西壮族自治区防城港市第一人民医院 538021)

【关键词】 糖化血红蛋白; 检验; 糖化血红蛋白

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 06. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)06-0714-03

正常血红蛋白有 3 种: 血红蛋白 A(HbA), 血红蛋白 F(HbF), 血红蛋白 A2(HbA2), 成人红细胞中主要含有 HbA。在用层析法分离血红蛋白时, 可洗脱出 3 种含糖成分: HbA1a、HbA1b 和 HbA1c 合称为糖化血红蛋白(GHb) [1]。糖化血红蛋白(HbA1c)是血液中红细胞内血红蛋白与血糖结合的产物。HbA1c 检测用于常规实验室始于 20 世纪 70 年代末期, 且稳定发展至今, 检测 HbA1c 是了解糖尿病控制良好与否的重要指标, 现在国外已将糖化血红蛋白监测作为糖尿病疗效判定和调整治疗方案的“金指标”; 近年有许多报道表明, HbA1c 在冠心病、心肌梗死、脑梗死等疾病的诊治方面有很重要的临床价值。本文就 HbA1c 的检测技术及临床应用进展进行综述。

1 糖化血红蛋白(HbA1c)的定义及生物学特征

国际临床化学协会(IFCC)定义: HbA1c 化学结构通常为具有一个特定六肽的血红蛋白分子, 是葡萄糖和血红蛋白 β 链 N 末端缬氨酸(Val) (βN-1-去氧果糖基血红蛋白)的一个稳定加合物。因为 HbA1c 与红细胞的生存期有关, 其合成速率与平均 120 d 生命周期的红细胞糖化量呈正比函数关系, 临床上 HbA1c 代表了最近 2~3 月平均血糖的控制水平。血红蛋白四聚体 β 链的 N 端缬氨酸是最常见的糖基化位点, 占 HbA1 的 80%。其余的 GHb 是 α 链 N 端的 44 个氨基酸(赖氨酸的 ε-氨基基团)中的 1 个与葡萄糖、葡萄糖-6 磷酸、果糖-1, 6-二磷酸或丙酮酸结合形成。现有的各种检测方法根据可捕捉的物质不同, 其被测量也不同; 检测 GHb 的商品化方法都可检测 HbA1c, 但对非 HbA1c 的 GHb 的检测却有很大区别。

2 HbA1c 检测方法和性能评价

2.1 离子交换层析法[2-4] 检测原理: 由于血红蛋白 β 链 N 末端缬氨酸糖化后所带电荷不同, 在偏酸溶液中总糖化血红蛋白(GHb)及 HbA 均具有阳离子的特性, 因此经过阳离子交换层析柱时可被偏酸的缓冲液平衡过的树脂来吸附, 但二者吸附率不同; GHb 正电荷较少吸附率较低, HbA 正电荷较多吸附

率较高。用不同 pH 的磷酸盐缓冲液可以分次洗脱出 GHb 和 HbA, 得到相应的 Hb 层析谱, 其横坐标是时间, 纵坐标是百分比, HbA1c 值以百分率来表示。该方法大部分都用全自动测定仪测定, 如日本 TOSOH 公司生产的全自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723G7, 其离子交换 HPLC 法是 HbA1c 检测的金标准。是目前测试 GHb 精密性、准确性最高的方法。国内主要采用 Bio-Rex70 阳离子树脂微柱层析法, 其微柱可重复使用多次。

2.2 手工微柱法[5] 采用微柱法离子交换层析和梯度洗脱技术可全自动分离血红蛋白的变异体与亚型, 除可测定糖化血红蛋白外, 还可同时检测出血红蛋白 S(HbS)与血红蛋白 C(HbC)的存在与否, 在计算糖化血红蛋白值时会自动扣除变异体产生的影响, 从而使结果更为准确、可靠, 变异系数(CV) < 2%。层析柱价格也较为低廉, 适合标本较多的医院检测, 但由于手工操作层析时间和微柱的质量不易控制, 易产生操作技术误差, 重复性欠佳。目前有 Bio-Rad 和西班牙 BIOSYSTEMS 等多家公司产品(如英国 DREW SCIENTIFIC 公司 DS 5 糖化血红蛋白仪、Bio-Rad 公司的 DIASTA 检测仪等)在临床上使用。

2.3 等电点聚集法[6] 是测定 GHb 的新技术, 它是在聚丙烯酰胺凝胶中加入载体两性介质的薄板上形成一个由阳极到阴极逐渐增加的 pH 梯度, 血液中各个组分将移动到各自的等电点的 pH 位置上, 这样就得到比一般电泳法更好的分界效果和比较集中的色带, 通过分辨率高的微量光密度仪扫描, 可以准确地测定出各自组分的含量。由于它能够分辨出一级结构不同的 HbA、HbAc、HbF、HbS 及 HbC 等, 可完全避开各种物质的干扰, 是一种理想的方法, 但仪器价格相当昂贵, 难于用作常规检测。

2.4 亲和层析法 基于结构不同进行分析, 最早是由 Mallia 等[7]于 1981 年研发的。该方法利用对 m-氨基苯基硼酸依赖的

糖化血红蛋白 1,2-顺式二醇基团和固定的硼酸阴离子的特殊反应而设计的。与血红蛋白 α 和 β 链的 Val 和 e-Lys 连接的葡萄糖均会与硼酸结合形成可逆的复合物,未糖化血红蛋白先被洗脱后,再用山梨醇分离复合物,并将全部糖化血红蛋白洗脱出来。检测结果是“总”糖化血红蛋白,通过校准其结果与 HPLC 有良好的相关性。该方法不受温度^[8]、尿毒症、HbF 或 Schiffbase 的干扰,同一实验室的精密度较高,而实验室间的结果存在差异^[9]。代表的仪器有英国 DREWSCIENTIFIC 公司的 DSI; BID-RAD 公司的 Micromat II。

2.5 离子捕获法^[6] 它是近年发展起来的新方法。代表仪器有 Abbott 的 IMX,其原理是糖化血红蛋白与相应抗体结合后,联以荧光标记物,形成一反应复合物,再联结带负电荷的多聚阴离子复合物,而在 IMX 反应孔中的玻璃纤维预先包被了高分子的四胺化合物,使纤维表面带正电,使上述反应复合物吸附在纤维表面,经过一系列清洗后测定其荧光强度,从而得到糖化血红蛋白的浓度,该方法适用于成批糖化血红蛋白标本的检测。

2.6 免疫法 单克隆抗体技术的运用使该方法有了快速发展,最早是英国 Dako 公司研制出识别葡萄糖附着在血红蛋白的 β 链 N 末端 8 个氨基酸抗原位点的单克隆抗体,用酶免疫 (EIA) 原理进行检测。该方法具有良好的精密度及与其他方法良好的相关性^[10]。目前,可以在自动生化仪上用比浊法进行定量测定,由于各厂家产品的单抗针对的抗原决定簇不同、亲和力不同等因素将会影响结果的可比性。

2.7 酶法 是近几年才推出在自动生化仪上测定的方法。其原理是在蛋白酶的作用下,切断 HbA1c 的 β 链 N 末端的糖化二肽,糖化二肽在果糖基肽氧化酶的作用下生成过氧化氢,在过氧化物酶的存在下与显色剂产生显色反应,通过测定吸光度值求出 HbA1c 的百分浓度。该方法精密度好,与 HPLC 和免疫法均有良好的相关性。李义龙等^[11]、徐成轩等^[12]报道酶法检测 HbA1c 与 HPLC 法和免疫法相比较有较好的相关性,且具有操作简单、快速并可应用于全自动生化仪等特点,是临床较为理想的检测 HbA1c 方法。

2.8 金标定量法 由亲和层析法发展而来,目前在国内使用较多的有 2 种方法。一种是利用硼酸亲和原理在颜色反射计上进行 HbA1c 快速检测。HbA1c 特异地与硼酸复合物结合呈蓝色,而未糖化血红蛋白呈红色,通过两者光强度的比例计算出 HbA1c 的百分浓度。另一种是基于免疫反应原理在荧光分析仪上检测含 HbA1c 的荧光染料分子的斑点数,换算成 HbA1c 的百分浓度。该方法在床边检验 (POCT) 应用,POCT 检测 HbA1c 具有便携、速度快的优点,但是精密度和准确度相对其他方法要差,且对样本中血红蛋白量有较大限制。最新报道^[13]了 8 款采用 POCT 方法检测 HbA1c 的产品,仅 2 款通过了 NGSP 评价。目前代表产品有挪威 Axis-Shield 公司的 NycocardReader II、韩国 i-CHROMA Readerey 及日本京都的 SP-4430。

3 HbA1c 的临床应用

3.1 HbA1c 在糖尿病诊治的应用

3.1.1 HbA1c 能早期发现糖尿病 当体检者空腹和餐后 2 h 血糖正常,但有糖尿病三多一少症状,不能确诊时,可检测 HbA1c,常能明确诊断,较单独检测 1~2 次空腹和餐后血糖更准确。若 HbA1c > 6.5% (正常值的高限),是可疑对象,提示要提高警惕追踪观察,常可早期发现糖尿病^[14]。

3.1.2 HbA1c 可作为长期血糖控制的重要监测指标

HbA1c 不受偶尔 1 次升高或降低的影响,而且与采血时间、患者是否空腹、是否使用胰岛素等因素无关,空腹或餐后 2 h 血糖,只能反映采血瞬间的水平,而血糖易受进食、糖代谢、药物、情绪、应激等多种因素影响;HbA1c 的数据则比较客观稳定,可作为筛选糖尿病的辅助诊断指标^[15],为临床调整药物剂量或治疗方案提供简单而实用的参考。

3.1.3 HbA1c 能预测糖尿病并发症的发生 有文献报道,糖尿病患者 HbA1c 每增加 1% 其慢性并发症平均增加 12%, HbA1c 每下降 1%, 可以使糖尿病死亡的危险下降 21%, 心脏病发作减少 14%, 微血管并发症下降 37%, 周围血管疾病减少 43%。因此 HbA1c 也是反映慢性并发症发生的重要指标。如果能将 HbA1c 水平降低至 8% 以下,糖尿病的并发症将大大降低。

3.1.4 HbA1c 能鉴别是否为应激性高血糖 当处于应激状态,如发生严重的感染、创伤、烧伤、突发性心脑血管急症、剧痛以及休克时,可出现短暂的血糖增高现象,此时检测 HbA1c 可区分血糖升高是应激性所致,还是糖尿病所致^[16]。

3.1.5 妊娠糖尿病的应用 庞玲^[17]、赵恻^[18]、马勇等^[19]报道资料显示,随 HbA1c 水平增高,各种母婴并发症发生率逐渐增高,尤其是妊娠高血压综合征和高胆红素血症明显增加。提示测定 HbA1c 有利于改善 GDM 患者母婴预后。HbA1c 可作为 GDM 筛查诊断和监测母婴并发症的良好指标。

3.1.6 HbA1c 作为糖尿病的诊断依据的不足^[20] 因为 HbA1c 仅是糖化血红蛋白的其中一种成分,一些其他的血红蛋白如 Hbs、Hbc、HbF、HbE 会干扰检查结果。此外,影响红细胞的疾病,如慢性疟疾、贫血都会影响 HbA1c 的检查结果。缺铁性贫血的患者在补铁治疗后 HbA1c 会明显下降。所以检查 HbA1c 需要在纠正上述疾病后进行。不同年龄、性别、种族的 HbA1c 值都有差异,目前并没有足够多的流行病学资料提示不同年龄、性别、种族诊断糖尿病的特异的 HbA1c 值。此外,如果患者有典型的“三多一少”糖尿病症状,血糖水平迅速升高,如 1 型糖尿病或暴发性 1 型糖尿病, HbA1c 就没有足够的时间来升高。这时测得的 HbA1c 值并不能准确反映疾病的进展与严重程度。

3.2 HbA1c 在心脑血管病变的应用 近来研究显示, HbA1c 与心血管疾病有密切关系^[21]。Robert 等^[22]报道,非糖尿病冠心病患者中, HbA1c 在 6% ~ 7% 时,其冠状动脉事件和心肌缺血事件发生率、血管重建率、心血管死亡率显著增高,预后较差。国内学者也得出类似结论^[23],并认为 HbA1c 水平与冠脉病变程度积分呈显著的正相关关系, HbA1c 水平升高是除血糖外的另一个冠心病的独立危险因素^[24]。国外研究表明, HbA1c 水平与微血管并发症病变程度密切相关,是冠心病的独立危险因素^[25]。HbA1c 在冠状动脉病变发展中的机制尚不十分明确,可能与下列因素有关:(1) HbA1c 可使红细胞黏度升高,流动性变小,变形能力明显降低。(2) HbA1c 还可造成氧合血红蛋白的离解速度减慢,红细胞对氧亲和力增加,红细胞 2,3 二磷酸甘油酸 (2,3-DPG) 含量显著下降,引起组织与细胞缺氧。(3) HbA1c 水平升高所反映的持续高血糖状态损伤内皮,一方面增加内皮素的释放,减少 NO、前列环素的释放,使血管舒缩能力受损;另一方面葡萄糖的直接毒性作用使内皮细胞复制减少,修复能力下降,最终导致内皮细胞损伤,促进了动脉粥样硬化的形成^[26]。因此,在临床中, HbA1c 检测亦应作为鉴别糖尿病性冠心病与非糖尿病性冠心病的早期检测和诊断的指标,通过严格控制血糖,降低 HbA1c 水平,对延

缓和防止动脉粥样硬化和心血管并发症的发生和发展,降低病死率和致残率,提高患者生活质量有重要意义,应在临床上予以重视。

4 展 望

4.1 根据上述各种测定方法的特性从方法的精确性评价,以 HPLC 法最为理想,但因其价格十分昂贵,我国尚不能广泛采用。目前国内多采用的阳离子交换树脂微柱法,因易受诸多干扰因素影响,误差较大,不是一个理想的方法。从性价比方面评价,适于目前我国国情并能在各级医院广泛开展的作为首选的应是亲和色谱微柱法。该法除具备上述优点外,如果试剂盒质量合格,其精确度亦较高。另外,酶法及金标定量法在我国亦应用较多。值得指出的是^[27],所有方法的被分析物 HbA1c 都是自我定义的,而实际 HbA1c 值是不同的。由于受各种干扰,如:红细胞生存期的改变、异常血红蛋白、黄疸和高脂血症、乙酰化血红蛋白、氨基甲酰化血红蛋白等因素均可造成 HbA1c 值出现假性升高或降低,所有检测方法都存在非特异性,且影响到采用 HbA1c 值评估患者平均血糖浓度的准确性。因此,HbA1c 检测的标准化和质量控制显得尤为重要。目前国内生产的试剂盒,多数尚不合质量要求,建议使用者在选择某试剂盒时应首先进行有关质量检验,并建立各自参考标准。

4.2 GHb 的测定包括总 GHb 和 HbA1c 为糖尿病患者及冠心病患者提供了一项评估血糖及心脑血管管长期控制情况指标。有规律地定期检测 GHb 和 HbA1c 可有效地预防糖尿病及相关并发症的发生。

参考文献

- [1] 邱文升. 对糖化血红蛋白及其测定方法基本概念的认识[J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(3): 169-172.
- [2] 包韧. 糖化血红蛋白检测的方法探讨[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(21): 2937-2939.
- [3] 王笠, 李琳, 王达, 等. 糖化血红蛋白的检测和临床应用[J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18(2): 119-121.
- [4] 刘英, 张辉敏. 糖化血红蛋白分析仪应用能力评价[J]. 预防医学情报杂志, 2008, 24(2): 84-87.
- [5] 潘莉莉, 张玉英, 李强, 等. 微柱法测定糖化血红蛋白及对血糖控制的评价[J]. 辽宁医学杂志, 2007, 22(4): 185-186.
- [6] 黄颖, 樊希承. 糖化血红蛋白几种常见检测方法综述[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(2): 125-127.
- [7] Mallia AK, Hermanson GJ, Krohn RI, et al. Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins [J]. Anal Lett, 1981, 14: 649-661.
- [8] Hall PM, Cook JG, Gould BJ. An inexpensive, rapid and precise affinity chromatography method for the measurement of glycosylated hemoglobins [J]. Ann Clin Biochem, 1983, 20(3): 129-135.
- [9] John WG. Glycated haemoglobin analyses-assessment of within-and between-laboratory performance in a large UK region [J]. Ann Clin Biochem, 1987, 24(5): 453-460.
- [10] John WG, Gray MR, Bates DL, et al. Enzyme immunoassay a new technique for estimating of hemoglobin A1c [J]. Clin Chem, 1993, 39(4): 663-666.
- [11] 李义龙, 单战海, 韩冰, 等. 酶法糖化血红蛋白试剂盒方法学比对评价 [J] 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1336-1338.
- [12] 徐成轩, 李鹏, 李卫东. 酶法检测糖化血红蛋白的临床实验室应用价值 [J]. 吉林医学, 2010, 31(34): 6217-6218.
- [13] Lenters-Westra E, Slingerland RJ. Six of eight hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria [J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 44-52.
- [14] 戴晓灵. 糖化血红蛋白在糖尿病诊治中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2008, 5(6): 373-374.
- [15] 王笠, 胡晓波. 糖化血红蛋白的检测和临床应用 [J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18(2): 119-121.
- [16] 林志凤. 糖化血红蛋白对糖尿病诊断及监测的临床意义 [J]. 临床军医杂志, 2003, 31(6): 20-21.
- [17] 庞玲, 王友沛, 龚永生, 等. 妊娠期糖尿病患者糖化血红蛋白水平测定及意义 [J]. 山东医药, 2010, 50(3): 95-96.
- [18] 赵怿, 杨慧霞, 马海燕. 妊娠合并糖代谢异常孕妇糖化血红蛋白水平与母儿合并症的关系 [J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(5): 306-308.
- [19] 马勇, 覃艳玲. 糖化血清蛋白及糖化血红蛋白在妊娠糖尿病诊断的探讨 [J]. 中国医学工程, 2004, 12(6): 87.
- [20] 于冬妮, 郭立新. 糖尿病诊断标准变迁及对糖化血红蛋白作为糖尿病诊断标准的思考 [J]. 中国实用内科杂志, 2009, 29(9): 805-807.
- [22] Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, et al. Meta-analysis: Glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus [J]. Am Intern Med, 2004, 141(2): 141.
- [22] Robert A, Corpus MD, William W, et al. Relation of hemoglobin A1c to rate of major cardiovascular events in non-diabetic patients undergoing percutaneous coronary revascularization [J]. AM J Cardiol, 2003, 92: 1282.
- [23] 胡继红, 张允平, 成金罗. 冠心病患者糖化血红蛋白与冠状动脉狭窄 132 例临床分析 [J]. 临床荟萃, 2008, 23(8): 578-579.
- [24] 金文胜, 潘长玉. 血糖与动脉粥样硬化的相关研究 [J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(1): 19-22.
- [25] 杜馥曼, 王崑民. 非糖尿病冠心病患者的 HbA1c 分析 [J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(3): 257-258.
- [26] 杨跃进. 冠心病与糖尿病 [J]. 医师进修杂志: 内科版, 2004, 7(1): 45-47.
- [27] 居漪. 糖化血红蛋白检测技术和质量控制 [J]. 检验医学, 2010, 25(11): 910-917.

(收稿日期: 2011-10-28)