糖化血红蛋白及其测定方法的研究进展

吕志贵[1]综述，高绪锋[2]审校(1. 安徽省六安市计划生育服务站检验科　237000；
2. 安徽省六安市人民医院检验科　237005)

【关键词】 糖化血红蛋白；　糖尿病；　血糖
DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2013.07.051　文献标志码：A　文章编号：1672-9455(2013)07-0862-03

糖化血红蛋白(GHb)作为糖尿病血糖监测的有效指标，对糖尿病患者的病情评估、制订治疗方案有重要意义。近年来有关 GHb 检测的标准化问题越来越引起人们的关注，本文对临床常用的检测 GHb 方法及其研究进展进行综述。

1　GHb 的特性

1968 年 Ranbar 证实了糖尿病(DM)患者的红细胞中存在有一种异常的血红蛋白，后来证实此种血红蛋白为 GHb。人类血红蛋白有 3 种：分别为 HbA1(97%)、HbA2(2.5%)和 HbF(0.5%)，HbA1 又分为 HbA1a1、HbA1a2、HbA1b 和 HbA1c。HbA1c 作为 GHb 的一种亚型，其 β 链 N 末端有 1 个或 2 个缬氨酸发生不可逆糖化反应的 Hb，约占总 GHb 的 60%～70%，结构稳定，是 GHb 分子中最有特征性的成分。Hb 四聚体 β 链的 N 端缬氨酸是最常见的糖基化位点，其余的 GHb(HbA1a1、HbA1a2、HbA1b)是 α 链 N 端的 44 个氨基酸中的 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。GHb 的形成主要取决于血糖浓度及血糖与 Hb 的接触时间，反映最近 2～3 个月的平均血糖水平。检测 GHb 的商品化方法都可检测 HbA1c，但对检测非 HbA1c 的 GHb 检测却有很大区别。2002 年美国糖尿病协会已明确规定应定期检测 HbA1c，并将其作为监测糖尿病血糖控制的金标准[1]。

2　GHb 的测定方法

GHb 的测定方法有几十种之多，目前常用的基本上可分为两大类：一类是基于 GHb 和 Hb 的电荷不同，如离子交换层析法、电泳法；另一类是基于 Hb 上糖化基团的结构特点，如亲和层析法、免疫法和酶法等。研究表明不同的原理测定的结果存在差别，而糖尿病患者治疗目标要求测定值不受测定方法的影响，因此在实验室里应用不同 GHb 测定方法所产生的结果可比性非常重要[2]。

2.1　基于 GHb 与非 GHb 所带的电荷不同

2.1.1　离子交换色谱法　主要有高效液相色谱法(HPLC)和手工微柱法。离子交换色谱法精密度高、重复性好且操作简单，被临床广泛采用。其基本原理是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，在选定的低浓度洗脱液离子强度及 pH 条件下，由于 Hb 中各组分所带电荷不同而分离。HbAβ 链 N 末端缬氨酸糖化后几乎不带正电荷，吸附率较低，首先被洗脱；非糖化的 HbA 带正电荷，吸附率较高，用高浓度洗脱液方可洗脱，由此而得到相应的 Hb 层析谱，其横坐标是时间，纵坐标是百分比，GHb 值以 HbA1c 部分的面积占总 Hb 面积的百分比表示。美国临床化学协会、GHb 标准化分会和 IFCC HbA1c 标准化工作组建议，糖尿病控制与并发症试验(diabetes control and complications trial，DCCT)研究中把 HPLC 作为检测 GHb 的金标准[3-6]。但由于此方法所使用的仪器昂贵，难以在基层医院和实验室普及。

2.1.2　毛细管电泳　毛细管电泳能分离检测糖化血红蛋白和血红蛋白的变异体，样品用量少、操作简便、重复性好、省时、高效。每次仅消耗 2～3 nL 样品，仅需 0.5～0.75 nL 血液和 1.5～2.25 nL 溶血试剂，由电脑控制，完全自动化操作，简单易用，在减少人为误差的基础上，重复性也得到了极大提高；整个过程仅需 7.7 min，将 HbA1c 和非 HbA1c 分离，并通过仪器软件对 HbA1c 峰面积进行计算，从而达到直接定量分析的效果。郑慧斐等[7]使用未涂层熔融石英毛细管，在电泳分离前对管壁进行动态涂层，电泳结束后再用 0.2 mol/L NaOH 高压冲洗涂层，既能避免使用昂贵的涂层毛细管，又能较好地控制蛋白质的吸附，而且样品分离度及结果重复性均较佳，该法高效、快速、重复性好，具有一定的推广应用价值。

2.1.3　琼脂凝胶电泳法　Hb 于酸性缓冲液条件下(pH6.0)，在琼脂糖凝胶上的电泳迁移取决于 Hb 在凝胶上的吸附情况及其所带的电荷。HbA0 因其 N 末端的缬氨酸残基对凝胶的负电荷有高度的亲和力，因此它的迁移速率减慢。HbA1c 因它所连接的糖的阻断作用，不可再与凝胶结合，利用 HbA1c 和 HbA0 对凝胶的亲和力不同，导致的电泳迁移速率也不同，通过电泳将各成分分开。该方法标本用量少，分辨率高，重复性好。研究发现此法检测 HbA1c 与血糖有显著相关性，且结果不受温度及胎儿血红蛋白的影响[8]。它可测定的 Hb 线性范围较宽(13.0～39.0 g/L)，可发现异常 Hb，异常 Hb 的存在可使 HbA1c 假性增高[9]。该方法的缺点是每次测定均需成批进行样本分析，速度比较慢，无法进行实时个体检测，自动化程度较差，所测结果与技术人员扫描和对电泳的波峰判断有关，并且费用昂贵，因此并不适合临床实验室常规使用。

2.1.4　等电点聚集法　是测定 GHb 的新技术，它是在聚丙烯酰凝胶中加入载体两性介质(如 ampholin)的薄板上形成一个由阳极到阴极逐渐增加的 pH 梯度。溶血液中各个组分将移动到各自等电点的 pH 位置上，这样就得到比一般电泳法更好的分划效果和比较集中的色带。通过分辨率高的微量吸光度仪扫描，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，是一种理想的检测方法，但仪器价格相当昂贵，难以用作常规检测。

2.2　基于 GHb 的结构特点不同

2.2.1　亲和色谱法　用于分离糖化与非糖化 Hb 的亲和层析凝胶柱是由交联了间氨基苯硼酸的琼脂糖珠载体组成的。当总的 GHb 通过载体时，硼酸可与整合在血红蛋白分子中的葡萄糖顺位二醇基发生可逆性结合反应，致使糖化的 Hb 选择性地结合于凝胶柱上，其他非糖化 Hb 及不稳定型 GHb、HbF 等随流动相(天门冬酰胺缓冲液)流出；然后用另一种含糖或多羟化合物流动相(山梨糖醇缓冲液)将 GHb 洗脱下来，利用两部分 Hb 本身的颜色，在 415 nm 条件下测定并计算出亲和色谱所测的 GHb。操作简单、快速、特异性强，不受异常血红蛋白的干扰，对经翻译以后修饰的血红蛋白和病理血红蛋白的影响相对不敏感，对血标本储存时间要求不严[10-11]；其主要缺点是

检测结果为糖化血红蛋白总量，不能测试 GHb 的单一组分。大量实验还证明，该法所测 GHb 值与 HPLC 等法所测 HbA、HbAc 及空腹、餐后 2 h 血糖均呈高度相关，表明该法对糖尿病患者是一种较理想的病情监测指标[12]。

2.2.2　免疫法　利用抗原抗体的特异性结合反应测定 GHb，以 Hbβ 链糖基末端最初的 4～10 个氨基酸残基作为抗体识别位点，制备相应的单克隆抗体。抗原抗体结合测定 HbA1c 的含量，再测定 Hb 总量，计算出 HbA1c 占总 Hb 的百分比。目前的免疫学方法不仅能检测 HbA1c，也能检测 HbA2c；高浓度样本检测结果偏低，这与抗体浓度不能达到相关高度有关，需要稀释；还有 HbS、HbC、HbE 和 HbF 等变异血红蛋白可影响检测结果[13]。因此，此类方法只能作为判断糖尿病血糖水平的指标，不可用于变异血红蛋白的研究，建议各实验室根据本地区人群血红蛋白变异不同，选择适合本地区的糖化血红蛋白测定方法[14]。

2.2.2.1　化学发光法　又叫离子捕获法，是近年来发展起来的新方法，采用离子捕捉免疫分析法，应用抗原抗体反应原理，联合荧光标记物，通过连接带负电的多阴离子复合物，吸附到带正电的纤维表面，经过一系列彻底清洗等步骤后，测定荧光强度变化率，计算浓度。其具有检测系统易于规范和重复，可减少操作技术误差，检测的灵敏度和特异性高，批内、批间变异系数小、回收率高、准确度高、交叉污染率小、影响因素少等优点，适用于批量标本的检测[15]。

2.2.2.2　胶乳凝集法　把乳胶增强免疫比浊法和自动化分析仪很好地结合起来，具有快速、准确、特异性强、重复性好、灵敏度高、线性范围宽等优点，可以使用自动化分析仪进行批量检测，其容易受高浓度葡萄糖、高三酰甘油(TG)、高胆红素等因素的干扰；在常规情况下，不受临床常用抗凝剂、红细胞压积比的变化干扰，具有广泛的临床应用价值。研究表明对于无血红蛋白变异的标本，胶乳增强透射比浊法是一种快速、准确、价廉、精密度高的测定 HbA1c 的方法，可以在有自动生化分析仪的医院广泛开展[16-17]。不同的样本前处理方式不同，溶血时间对糖化血红蛋白的结果无明显干扰，异常高 TG 标本对本方法存在一定的影响，糖尿病患者一般都伴有血脂代谢异常，对那些异常高 TG 的糖尿病患者来说，分析其所测得的 HbA1c 应充分考虑脂浊可能造成的影响。

2.2.2.3　金标免疫渗滤法(金标法)　免疫渗滤法操作简便易行、快速准确、试剂稳定，代表仪器有挪威 NycoCardReaderII 特种蛋白多功能定量金标检测仪，是公认的较为简单的一种方法，其特异性较高[18]。有研究报道，该法不受(除 HbS 和 HbC 之外)任何血红蛋白变异体和降解产物的干扰，不同抗凝剂及黄疸、脂血对其测定影响小，从其性能评价指标观察，也显示出具有精密度、准确度较高及线性好等优点。该法有较好的溯源性，较其他的方法(高效液相色谱法、免疫比浊法、微柱法等)具有操作简便快速、适于床旁监测、不用采集静脉血液等优点，完全能满足临床对糖尿病患者的监测要求，可在日常工作中推广使用[19]。

2.2.2.4　放射免疫法　该法具有精密度高、特异性强、快速、价格相对便宜，可批量测试，且不受各种干扰因素的影响；其主要缺点是目前对制备高效价的抗体尚存在许多困难，仍处于研究中，未能形成商品化试剂盒。

2.3　酶法　全血经溶血处理后，用特异蛋白内切酶将 Hb 酶解消化成果糖氨基酸，再经果糖氨基酸氧化酶作用下产生过氧化氢(hydrogen peroxide，H_2O_2)，H_2O_2 的浓度与血液中 GHb 的含量呈正比。H_2O_2 在过氧化物酶的作用下与相应的色原耦联，发生颜色变化，根据其变化程度可得 H_2O_2 浓度，进而得知样本中 GHb 的含量；同时测定同一管消化液的总 Hb 浓度，计算 GHb 和 Hb 的浓度比值，即为 GHb 结果[20-22]。有研究验证日本生产的酶法糖化血红蛋白检测试剂(Norudia HbA1c)与 HPLC 法之间的相关性，得出相关系数为 0.99，可以使用公式相互转换，此法提供了一个像临床生化反应一样快速均一的反应系统，有很好的精密度，可同时检测 GHb 和 Hb，不需要昂贵、专用的仪器。

3　小结与展望

测定 GHb 的方法会受到各种干扰因素的影响，对变异 Hb 及 GHb 衍生物的研究有助于提高 GHb 检测结果的准确性，不同测定 GHb 方法的影响因素尚有待进一步深入研究。

从多方面评价，目前适于我国国情并能在各级医院广泛开展的应是亲和色谱微柱法，国外许多学者也多推荐本法。值得指出，目前国内生产的亲和色谱微柱法试剂盒，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。

参考文献

[1] 雷纯刚. 糖化血红蛋白检测的临床价值[J]. 医学检验与临床，2011，22(4)：110.

[2] Little RR，Rohlfing CL，Hanson S，et al. Effects of hemoglobin(Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb(HbA1c) by 23 methods[J]. Clin Chem，2008，54(8)：1277-1282.

[3] 麦爱芬. 高效液相层析法检测糖化血红蛋白[J]. 检验医学与临床，2011，8(15)：1893-1895.

[4] Kaiser P，Akerboom T，Ohlendorf R，et al. Liquid chromatography-isotope dilution-mass spectrometry as a new basis for the reference measurement procedure for hemoglobin A1c determination[J]. Clin Chem，2010，56(5)：750-754.

[5] Kaiser P，Akerboom T，Molnar P，et al. Modified HPLC-electrospray ionization/mass spectrometry method for HbA1c based on IFCC reference measurement procedure[J]. Clin Chem，2008，54(6)：1018-1022.

[6] 涂国华，姜旭淦，李礼，等. 高效液相层析法测定糖化血红蛋白方法的建立与评价[J]. 江苏大学学报：医学版，2011，21(2)：147-154.

[7] 郑慧斐，王惠民，丛辉，等. 毛细管电泳法快速检测糖化血红蛋白[J]. 中国实验诊断学，2009，13(6)：738-740.

[8] 吴宇芳，关晓东. 琼脂糖凝胶电泳法测定糖化血红蛋白及其临床应用[J]. 西部医学，2003，1(2)：101-102.

[9] Schnedl WJ，Reisinger EC，Katzensteiner S，et al. Haemoglobin O padova and falsely low haemoglobin Alc in a patient with type I diabetes[J]. J Clin Pathol，2012，50(5)：434-435.

[10] 梅方超，吴琴，程中应. 高压液相离子交换层析法与微粒色谱法测定糖化血红蛋白的比对[J]. 现代检验医学杂志，2011，26(1)：163-164.

[11] 缪怡，徐雪亮，金洁美，等. 变异血红蛋白对 2 种基于 HPLC 原理的糖化血红蛋白检测系统的影响[J]. 检验医学，2009，24(4)：251-254.

[12] 谢荣荣,潘素芳,于湄,等. 离子交换 HPLC 法和亲和层析 HPLC 法检测糖化血红蛋白结果的比较和分析[J]. 中国实验诊断学,2009,13(3):384-386.
[13] Rohlfing CL, Connolly SM, England JD, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(5):811-814.
[14] 邱兰英,顾向明. 胶乳凝集比浊法测定糖化血红蛋白的分析性能评价[J]. 检验医学与临床,2012,09(2):142-144.
[15] 张阳. 糖化血红蛋白检测方法及临床应用[J]. 现代医药卫生,2007,23(15):2286-2287.
[16] 王建柱,贾兴旺,董振南,等. 免疫比浊法测定糖化血红蛋白的方法评价[J]. 标记免疫分析与临床,2011,18(5):334-336.
[17] 吴晓虹,沈雄文. 免疫凝集法检测糖化血红蛋白的应用评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(19):2240-2241.
[18] 李岚岚,侯小洪,李霞,等. 金标定量法检测糖化血红蛋白的方法学评价[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(10):890-891.
[19] Schwartz KL, Monsur J, Hammad A, et al. Comparison of point of care and laboratory HbA1c analysis: a MetroNet study[J]. J Am Board Fam Med, 2009, 22(4):461-463.
[20] 肖弘,王敏,李小盛. 酶化学法测定糖化血红蛋白性能的验证[J]. 检验医学与临床,2011,08(12):1450-1451.
[21] 曾子杰,罗文英. 自建糖化血红蛋白酶法检测系统的探讨[J]. 中国医药指南,2011,09(21):114-115.
[22] 王中东. 探讨两种不同糖化血红蛋白检测方法的相关性[J]. 社区医学杂志,2009,7(11):25.

(收稿日期:2012-09-19 修回日期:2012-12-23)

压疮预防的研究进展

陈 勇 综述,顾 玲 审校(重庆市江北区石马河社区卫生服务中心护理部 400021)

【关键词】 压疮; 护理; 预防
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.07.052 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)07-0864-02

压疮不仅增加患者痛苦,加重病情,而且延长住院日,增加医疗费用和护理难度,严重时可因激发感染引起败血症而危及生命[1-3]。我国没有完全统计出用于压疮的医疗费用,而在荷兰大于 1%的卫生保健经费用于压疮的防治或支付压疮所致的住院费用;美国的压疮治疗费用每年约 10 亿美元[4]。在国外,患者及家属因发生压疮提出起诉并要求赔偿的案例日益增多[5]。因此,压疮的预防和护理是医院护理工作的重点,是护理质量考核、反映医院医疗护理质量高低的主要指标之一,是临床护理急需攻克的难题。

1 科学认识压疮

1.1 压疮的定义 压疮是身体局部组织长期受压,导致血液循环障碍,持续缺血、缺氧,不能适当供给皮肤和皮下组织所需营养,以致局部组织失去正常功能而形成溃烂和组织坏死[6]。Cinsdule 提出,在 9.3 kPa 压力下,组织持续受压 2 h 以上,就可以引起组织不可逆的损伤[4]。中医认为压疮的发生,在内是由于久卧伤气,气虚而血行不畅,久病而出现气血亏虚;在外是由于躯体重量对褥点的压迫及躯体着褥点摩擦挤压而致受压部位气血失去流畅,造成局部皮肤失氧而坏死肉腐,形成疮疡[7]。事实证明,只要施加足够的压力,并有足够的时间,任何部位都可以发生压疮,因此现在多采用压疮或压力性溃疡一词。

1.2 形成压疮的高危人群和危险因素 压疮多发生于体质虚弱、长期高烧、大小便失禁或多汗,皮肤经常受潮湿、摩擦的刺激,使皮肤抵抗力降低者;恶液质、病情危重、长期卧床不能自行翻身的患者[8]。美国压疮顾问小组研究证实,压疮发病率与年龄呈正相关,40 岁以上患者的压疮发生率为 40 岁以下患者的 6～7 倍[9]。目前公认引起压疮的因素主要有 4 种,即压力、剪切力、摩擦力及潮湿。有实验表明,剪切力只要持续 30 min,即可造成深部组织不可逆损害。而压力和剪切力并存时,压疮发生的危险更大;摩擦力是两个物体接触并向不同方向移动或相对移动时所形成的力,作用于皮肤会直接损伤皮肤的角质层;潮湿、污染也是引起压疮的重要因素;其次,感觉和运动障碍、全身缺乏营养或皮肤抵抗力降低、医源性等也能引发压疮[10]。

1.3 压疮的分期 随着医学研究的不断深入,2007 年,美国国家压疮顾问委员会(NPUAP)发布了新的压疮分期方法,在原来Ⅰ～Ⅳ期的基础上,增加了不可分期和可疑深部组织损伤期,使压疮的分期更加符合临床特点,更加清楚实用。

Ⅴ期:不可分期,有独特创面特点,无法确定其实际深度,缺损涉及全程,但溃疡的实际深度完全被创面的坏死组织(黄色、棕色、灰色、褐色、绿色或棕褐色)或焦痂(棕褐色、棕色或黑色)所掩盖,除非彻底清除坏死组织或焦痂暴露出创面底部[11]。Ⅵ期:可疑深部组织损伤期,皮下组织受压力和(或)剪切力作用受到损伤,皮肤完整褪色,局部成紫色或黑紫色,或形成充血性水泡。与邻近组织相比,该区域的组织可先出现疼痛、硬肿、糜烂、松软、较冷或较热,以往临床中将其归纳为Ⅰ期。与Ⅰ期不同的是,在排除外源性因素,采取积极护理措施,接受最佳治疗,也会迅速发展成为深层组织溃疡[10]。

2 压疮的预防

压疮的损害不是从皮肤受损开始,而是由深而浅的发展,从深部肌肉经皮下脂肪至真皮、皮肤及毛发[11]。护理人员通过有效的护理干预可以预防;而在国外认为,压疮可以预防,但并非全部,若入院时局部组织已有不可逆损伤,24～48 h 就有可能发生压疮[12]。

2.1 加强管理,全面评估 我国临床长期以来将压疮预防的重点放在护理管理,加强基础护理上。黄秀英[13]通过对 26 例难免性压疮患者实施压疮的三级监控制度,规范护理流程,结果无一例发生压疮。因此,对每例住院患者及时进行病情评估,尤其是对长期卧床不能自行翻身、大小便失禁、病重等高危人群,入院时立即进行评估,这是预防压疮关键的一步,是有效护理干预的一部分。经评估快速识别高危人群,重点预防,并