

糖化血红蛋白临床检测方法的进展研究

赵志强 综述, 陈忠寒 审校(广西壮族自治区百色市田阳县人民医院检验科 533600)

【关键词】 糖化血红蛋白; 检测方法; 研究进展

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.055 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)21-3070-02

糖化血红蛋白(HbA1c)指标的联合检测弥补了单纯血糖浓度检测诊断和治疗糖尿病、糖尿病并发症的缺陷,有助于及早发现糖尿病及相关并发症,及时采取针对性治疗措施^[1]。随着越来越多的 HbA1c 检测技术的应用,HbA1c 检测准确度得到了明显提升,该项指标的检测分析操作越来越便利。本文对 HbA1c 检测技术进行了综述。

1 HbA1c 特性

HbA1c 是人体内血红蛋白的主要构成成分,血糖浓度的检测很多时候并不能准确反映真糖水平,而 HbA1c 指标检测真糖水平灵敏度相对更高,因而越来越多地用于糖尿病诊疗工作中^[2]。关于 HbA1c 的研究是在二十世纪 70 年代开始的,国外学者研究电泳溶血产物时,发现了快速泳带组分,并分析得出此种组分在快速泳动状态下有着与 HbA1c 相同的组成结构,糖尿病患者血清标本中该物质浓度会上升数倍^[3]。人体内存在 3 种血红蛋白(Hb),不同 Hb 携带不同种类的电荷,正常生理状态下,血液中的葡萄糖会发生自由扩散并结合 Hb 中的糖基化位点,当葡萄糖与红细胞内的 Hb 发生不可逆非酶促蛋白糖基化反应时,就会生成 HbA1c,其在人体内存在的时间与红细胞的寿命相等,红细胞寿命为 120 d,则 HbA1c 检测结果便是 4 个月的平均血糖水平,此项指标的检测结果与人体受检时间和受检状态没有关联,影响因素少,因而可更准确地反映糖尿病及相关并发症控制效果。HbA1c 目前已是多个国家糖尿病筛查、诊疗的主要项目和金标准^[4]。

2 HbA1c 检测方法研究进展

2.1 免疫法

2.1.1 免疫比浊法 免疫比浊法检测 HbA1c 水平准确度高、可操作性强,已经为很多糖尿病研究及临床实践所应用^[5]。规范取血清标本后,将配制好的 HbA1c 抗体缓冲液混入受检标本内,使抗 HbA1c 抗体结合 HbA1c 产生抗原抗体复合物,之后继续加入多聚半抗原缓冲液以结合反应液中的残余抗 HbA1c 抗体产生不溶的抗原抗体复合物,以比浊法检测标本中 HbA1c 水平,并通过另一通道检测 Hb 水平,根据公式计算得出 HbA1c 百分水平^[6]。此种检测方式所需时间短、成本低、可重复、操作简便。但容易受交叉污染、黄疸标本及脂浊标本影响,高于浓度标准时难以完成检测,Hb 和 HbF 变化可影响检测结果^[7]。

2.1.2 离子捕获法 血清标本中的抗体与 HbA1c 结合后,可通过荧光标记处理产生复合物,并结合携带负电荷的多聚阴离子复合物,在正电荷纤维表面发生吸附作用,清洗处理并检测荧光强度,分析得出 HbA1c 水平^[8]。此种检测方法特异性好、灵敏度高,可重复、回收,适用于自动化检测,交叉污染极小。

2.1.3 乳胶凝集法 此法以抗原抗体凝集反应处理血清标本,直接检测经处理的血清标本中所含的 HbA1c、Hb 水平。此种检测方法用时短、特异性及准确度高、可重复操作,可完全

由全自动生化仪智能完成检测,节省人工成本,降低出错率。但此种检测技术不适用于单个标本检测操作,且容易受标本中的三酰甘油、胆红素、葡萄糖水平干扰^[9]。

2.1.4 其他免疫法 放射免疫法不会受到任何因素干扰,因而检测得出的 HbA1c 水平更加接近真实水平,且此种检测方法适用于批量检测,可节省成本,有更好的特异性,但受高效价抗体制备限制难以推广^[10];金标免疫渗滤法可配合床边血清检测共同完成,准确度和特异性好,可在短时间内得出检测结果,方便医生和护士随时了解患者 HbA1c 水平和病情变化。

2.2 酶法 溶血处理血液标本,通过特异蛋白内切酶处理使 Hb 酶转变为果糖氨基酸,在果糖氨基酸氧化酶作用下生成过氧化氢,血液标本中的 HbA1c 水平和过氧化氢水平检测结果呈正相关,促使过氧化氢与过氧化氢酶发生色原偶联作用,观察反应过程中的颜色变化,分析其中的过氧化氢水平,进而推测标本中的 HbA1c 水平。与此同时,检测同一管消化液中所含 Hb 水平,计算两项值浓度比,即可得出 HbA1c 值^[11]。此种检测技术是近年来的一种突破性 HbA1c 测定方案,在以下方面有所体现:血液标本中的 HbA1c 经特异蛋白内切酶特异酶解处理形成果糖基氨基酸,因而检测结果不会因血浆中的球蛋白和清蛋白等相关因素的变化而受到影响;检测中的果糖基氨基酸氧化酶不会轻易发生反应,而是仅仅和果糖基氨基酸在固定的蛋白酶体系中反应;过氧化氢的检测敏感性良好,在溶血体系中检测该项指标,使用过氧化物酶代替过氧化酶以避免过氧化物酶分解色素原产生的负反应影响检测准确度。另外,使用此种方式检测血清标本 HbA1c 值,可形成与临床生化反应相似的快速、均一反应体系,可完成多项指标同时检测,准确度高、成本较低^[12]。

2.3 离子交换层析法 此种检测方式包含了手工微柱法与高效液相色谱法,可通过血红蛋白 β 链 N 末端缬氨酸糖化作用产生不同电荷产物,制造中性 pH 环境,HbA1c 所携带正电荷数量相对较少,予以离子交换层析法处理,将其与 HbS、HbF 等分离处理^[13]。此法多使用 Bio-rad D-10 设备完成检测分析,所得结果准确度高、可重复性良好。美国互联网诈骗投诉中心(IFCC)HbA1c 标准化工作组和临床化学协会建议将此种技术检测所得的 HbA1c 结果作为 HbA1c 检测和糖尿病等疾病临床诊疗金标准^[14]。但此种检测方式所需仪器昂贵,其中的微柱法需人工操作,且操作步骤繁琐,难以控制微柱质量及层析反应时间,容易出现操作和技术误差而影响检测结果的准确度与可靠性。另外,此种检测技术没有很好的可重复性,检测结果容易受到 pH、环境温度等众多因素干扰而出现偏差,且需仔细辨别检测中的图谱,以免因变异 Hb、HbF 等指标干扰微柱分离能力^[15]。

2.4 电泳法 常见的电泳法为琼脂凝胶电泳法,此法中的凝胶吸附 Hb 程度及所带电荷会直接影响酸性缓冲液处理后的

Hb、琼脂糖凝胶电泳迁移情况。HbA1c 与糖的连接使其难以继续发生结合作用^[16]。因而,可通过观察 HbA1c 迁移的速度及 HbA1c 与凝胶之间的亲和力判断 HbA1c 水平。由于 HbA1c 有其自然颜色,可不经染色处理、直接使用光密计定量测量 HbA1c 水平,配合扫描仪分析波峰面积,了解 HbA1c 值^[17]。当前最常见的电泳设备为法国 Sebia 半自动电泳仪,采用此种装置可通过对少量标本分析检测重复测定标本中的 HbA1c 值及血糖浓度,且不容易因温度变化等因素影响检测准确性。而且,此法可在 13.0~40.0 g/L 的线性范围内发现异常 Hb,从而判断标本中是否存在促使 HbA1c 值出现假性上升的 Hb 物质^[18]。检测近期有大量失血经历的患者血液标本中的新生红细胞含量激增,从而导致 HbA1c 值水平假性下降,同时标本中的红细胞生命周期与正常周期不同,影响最终 HbA1c 值的准确性^[19]。可见,采用此法检测 HbA1c 值时,要询问患者是否有脾切除、大红细胞贫血及溶血性贫血等病史和手术史,以免得到有偏差的检测结果而影响临床诊断和治疗。另外,此种检测方法适用于批量检测分析,且取得结果所需时间长,实时个体标本检测不能使用此种检测手段。费用过高也是限制此种检测方式推广和应用的制约因素。

2.5 亲和层析法 利用了 Hb 分子中所含葡萄糖顺位二醇基与硼酸发生可逆结合反应,使用间-氨基苯硼酸琼脂糖参与反应,向层析柱内加入血液样本,促使结合反应在柱中发生,其中的非 HbA1c 成分自行流出层析柱,之后添加山梨醇等同样含有顺位二醇基的高浓度多羟基复合物,替换 HbA1c 和硼酸的结合产物,测量被洗脱下的产物含量可计算得出 HbA1c 值^[20]。此种检测方法对变异 Hb、病理 Hb 不敏感,直接测定的结果为 HbA1c 总量,此种检测方式所得结果不会受 HbC、HbS 之外的 Hb 变异体及降解产物干扰,结果相对准确,可配合个体标本即时检测分析。

3 结 语

HbA1c 联合血糖值检测分析法是糖尿病及相关并发症诊断和治疗的根本,根据需要灵活选择合适的 HbA1c 检测技术对 HbA1c 值检测准确度和综合临床治疗效果至关重要。近年来,关于 HbA1c 检测分析的新技术不断涌现,临床上也出现了越来越多的 HbA1c 检测参考标准,HbA1c 临床检测方法和判断标准必将逐渐实现统一。目前,国内 HbA1c 检测研究明显落后于国外,国内临床应加大 HbA1c 检测分析研究力度,为糖尿病诊疗工作提供便利。

参考文献

[1] 郭莉,郭慧淑,刘越坚,等.糖化血红蛋白检测在糖尿病诊治中的临床价值[J].中国老年学杂志,2013,33(4):920-921.

[2] 李延飞,陈伟菊,许万萍,等.并发症体验对 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白检测依从性影响的研究[J].护士进修杂志,2013,28(1):8-10.

[3] Song SY, Han YD, Park YM, et al. Bioelectrocatalytic detection of glycosylated hemoglobin(HbA1c) based on the competitive binding of target and signaling glycoproteins to a boronate-modified surface[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 35(1):355-362.

[4] 陈璐,孙伯欣.糖化血红蛋白与血脂检测在 2 型糖尿病检测中的临床评价[J].中国老年学杂志,2013,33(19):

4856-4857.

[5] 薛茜男,边超,佟建华,等.基于混合 SAMs 包裹的纳米团簇和 SPA 的抗体固定方法用于糖化血红蛋白免疫场效应型传感器的制备[J].纳米技术与精密工程,2011,9(6):477-482.

[6] 李钟响.糖化血红蛋白检测对糖尿病诊断、血糖控制及疗效评价的临床意义[J].临床和实验医学杂志,2009,8(1):110.

[7] 王丽娟,纪立农.国际专家委员会关于糖化血红蛋白检测在糖尿病诊断中的作用的报告[J].中国糖尿病杂志,2009,17(8):563-568.

[8] 李小琳,秦雄,梁晓刚.糖化血红蛋白与空腹血糖在诊断前驱糖尿病中的意义[J].广东医学,2013,34(11):1739-1741.

[9] 杨雪,王薇,王治国.8 种糖化血红蛋白床旁检测仪性能的分析[J].中国糖尿病杂志,2013,21(8):695-698.

[10] 吕雪梅,高赞,邬云红,等.糖化血红蛋白检测对中国西藏藏族糖尿病及糖尿病前期诊断价值的研究[J].中国糖尿病杂志,2013,21(8):686-688.

[11] 谢荣荣,潘素芳,于涓,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.

[12] Chuang YC, Lan KC, Hsieh KM, et al. Detection of glycosylated hemoglobin(HbA(1c)) based on impedance measurement with parallel electrodes integrated into a microfluidic device[J]. Sens Actuators B Chem, 2012, 171(20):1222-1230.

[13] 于秀娟,欧超伟.糖化血红蛋白检测的影响因素及临床意义[J].中国老年学杂志,2013,33(19):4930-4933.

[14] Risk factors associated with high glycosylated hemoglobin levels, ($\geq 5.7\%$) in Korean adults with normal fasting glucose[J]. Journal of Endocrinological Investigation, 2012,35(8):730-734.

[15] 赵翠伶,王丽娟,王连英,等.不同糖化血红蛋白检测方法在临床中的应用探讨[J].中国医刊,2013,48(8):35-36.

[16] 赵文辉.糖尿病肾病患者尿微量清蛋白、糖化血红蛋白、胱抑素 C 检测的临床意义[J].国际检验医学杂志,2013,34(12):1604-1605.

[17] 李华,冯振东,叶树新,等.2 型糖尿病患者血液流变学指标与血糖监测指标的相关性分析[J].中国全科医学,2013,16(15):1763-1765.

[18] 陈健. TOSOH HLC-723G8 全自动糖化血红蛋白分析仪性能评价[J].检验医学,2013,28(10):925-927.

[19] 续燕.糖化血红蛋白、空腹血糖检测在糖尿病诊断及疗效评价的临床应用[J].中国医药导刊,2013(11):1889-1890.

[20] 薛茜男,边超,佟建华,等.基于混合 SAMs 包裹的纳米团簇和 SPA 的抗体固定方法用于糖化血红蛋白免疫场效应型传感器的制备[J].纳米技术与精密工程,2011,9(6):477-482.