

[12] Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans[J]. J Gen Virol, 2001, 82: 693-712.

[13] Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus[J]. Methods Mol Biol, 2009, 510: 33-53.

[14] Peng JS, Wang X, Liu MQ, et al. Genetic variation of hepatitis C virus in a cohort of injection heroin users in Wuhan, China[J]. Virus Res, 2008, 135: 191-196.

[15] Sylvie CJB, Anja H, Anders F, et al. Hepatitis C virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41: 1091-1100.

[16] 徐文胜, 张瑞麒, 缪晓辉, 等. 提高乙型肝炎病毒 P 基因区聚合酶链反应检测阳性率的策略[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26: 72-75.

[17] Li H, Thomassen LV, Majid A, et al. Investigation of putative multisubtype hepatitis C virus infections in vivo by heteroduplex mobility analysis of core/envelope subgenomes[J]. J Virol, 2008, 82: 7524-7532.

[18] Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, et al. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region[J]. J Virol Methods, 2003, 109: 187-193.

[19] Pawlowsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Gastroenterology, 2002, 122: 1554-1568.

[20] Jm P. Molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Gastroenterology, 2002, 122: 975-982.

[21] Mao H, Lu Z, Zhang H, et al. Colorimetric oligonucleotide array for genotyping of hepatitis C virus based on the 5' non-coding region[J]. Clin Chim Acta, 2008, 388: 22-27.

[22] Fang XF, Wang YM. Survey of HCV infection in intravenous drug abusers in Chongqing[J]. Chin J Drug Depend, 2001, 10: 220-222.

[23] Bokharai SFKH, Amiri A. Distribution of different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16: 2005-2009.

[24] Van Asten LVI, Lamzira S. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis[J]. J Infect Dis, 2004, 189: 292-302.

[25] Liu JY, Liu YC, Lee SS, et al. Extremely high prevalence and genetic diversity of hepatitis C virus infection among HIV-infected injection drug users in Taiwan[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(11): 1761-1768.

[26] Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevalier S, et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45: 1140-1145.

(收稿日期: 2011-08-20)

• 综 述 •

糖化血红蛋白检测方法研究进展

蔡瑜综述, 温和审校

(安徽省合肥市第一人民医院检验科 230061)

关键词: 血红蛋白 A, 糖基化; HbA1c; 离子交换层析; 亲和层析

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 02. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)02-0194-03

目前, 糖化血红蛋白(HbA1c)可作为糖尿病筛选、诊断、长期血糖控制、疗效评估的有效监测指标^[1], 在临床中广泛应用。HbA1c 对总死亡率的预测价值超过胆固醇浓度、体质指数和血压, HbA1c 下降 1% 导致微血管并发症危险性减少 35%, 严格控制血糖水平可使眼睛病变、神经病变、心血管病变和肾脏病变降低^[2]。

1 糖化血红蛋白 HbA1c 的特性

1962~1965 年 Rahbar 在电泳溶血产物时发现一条异常快速泳带组分, 后来证实此快速泳动的 Hb 实际上与 HbA1c 的结构相同, 在糖尿病患者血清中浓度增加 2~3 倍^[3]。健康人出生后有 3 种血红蛋白, HbA($\alpha_2\beta_2$, >95%)、HbA2($\alpha_2\delta_2$, 2%~3%)、HbF($\alpha_2\gamma_2$, 1%)。血红蛋白根据所带电荷不同, 利用离子交换层析或电泳法分离 HbA, 组分被命名为 HbA0、HbA1a1、HbA1a2、HbA1b 和 HbA1c。健康人体内, 葡萄糖随着血液自由扩散到红细胞内与血红蛋白发生反应, 血红蛋白 β 链 N 末端的缬氨酸(Val)是最常见的糖基化位点。糖化血红蛋白就是红细胞中血红蛋白与葡萄糖不可逆的非酶促蛋白糖基化反应的产物, 寿命与红细胞的寿命一致。人体内红细胞的寿命约为 120 d, 因此糖化血红蛋白反映的是检测前 120 d 平均血糖水平, 较 FPG 和 OGTT 有独特的优越性, 并且与患者是否空腹、抽血时间、是否使用胰岛素等因素无关。但是几乎所有会改变红细胞寿命的因素都会导致 HbA1c 检测结果的不

准确, 如再生障碍性贫血、溶血性贫血、活动性出血、慢性酒精中毒、脾切除术后、镰刀状细胞贫血、红细胞清除障碍、遗传性球形红细胞增多症^[4]。1996 年 4 月起在日本, HbA1c 被纳入老年人保健法中糖尿病筛选的检查项目。2002 年美国糖尿病协会(ADA)已将其作为监测糖尿病控制的金标准。

2 糖化血红蛋白 HbA1c 的检测方法

WHO/WPRO 宣言建议, HbA1c 作为评估长期血糖控制情况的金标准应每 3~6 个月检测一次^[5]。HbA1c 的测定方法经过 30 多年的发展已有 30 多种, 按其理化性质大致可以分为两大类: 一类是基于糖化与非糖化血红蛋白所带电荷不同, 如离子交换层析法和电泳法等; 另一类是基于糖化与非糖化血红蛋白的结构不同, 如亲和层析、免疫法及酶法等。其中, 免疫法又可分为 RIA、EIA 和胶乳免疫凝集法等。美国临床化学协会(AACC)、糖化血红蛋白标准化分会和 IFCC HbA1c 标准化工作组建议将 HPLC 方法作为检测糖化血红蛋白的金标准^[6]。

2.1 离子交换层析法 离子交换层析法是基于血红蛋白 β 链末端缬氨酸糖基化后所带电荷不同而建立的。应用弱酸性阳离子交换树脂, 在一定低浓度洗脱液和接近中性 pH 条件下, HbA1c 末端缬氨酸糖基化后几乎不带正电荷, 首先被洗脱。非糖基化的 HbA 带正电荷, 被高浓度洗脱液洗脱, 因此可通过此方法将其与其他组分(HbA1b、HbA1a、HbF、HbA0)区分

开。所得到的层析谱的横坐标是时间,纵坐标是百分比。HbA1c 值通过 HbA1c 峰面积占 Hb 总面积百分比来表示。离子交换 HPLC 法对全血直接测定 HbA1c,其批内和批间变异系数 CV 均可以小于 1% ($CV < 1\%$),结果精确。此方法曾应用于美国 DCCT 的研究,是目前检测 HbA1c 的金标准^[6]。运用离子交换 HPLC 方法的仪器有日本爱科来 HA-8160、Bio-Rad D-10、Bio-Rad DiaStat、Bio-Rad Variant A1c、Bio-Rad Variant II A1c、Bio-Rad Variant II Turbo A1c 和日本森村 G7 全自动糖化血红蛋白分析仪。虽然离子交换层析法具有精密度高、重复性好、操作简单等优点,但是其易受 HbF、L-A1c (HbA1c 前体)、变异血红蛋白(HbS、HbE、HbC 和 HbD)及乙酰化血红蛋白的干扰,并受外界环境温度的影响。胎儿血红蛋白(HbF)在刚出生时在血红蛋白中约占 60%~95%,成人上限约为 1%。在某些病例情况下 HbF 异常升高,如白血病、贫血、珠蛋白生成障碍性贫血、遗传性胎儿血红蛋白持续症。其中遗传性胎儿血红蛋白持续症患者血红蛋白中 HbF 会高达 30%,由于患者无明显症状,常常被医师和患者忽视^[7]。HbF 的等电点与 HbA1c 相近,可能会与 HbA1c 同时洗脱,在层析谱上与 HbA1c 峰重叠而使结果产生偏差。有报道指出,当 HbF > 15% 时,应用日本森村 A1c 2.2 Plus 糖化血红蛋白分析仪检测 HbA1c 时结果会偏低^[8]。L-A1c 是 HbA1c 前体,Carmargo 等^[9]发现 L-A1c 可使离子交换色谱法测定的 GHb 值比实际高出 1.64%。为了避免 L-A1c 的影响,可以将全血样品用溶血剂处理后再进行测定。李青等^[10]研究发现,血红蛋白乙酰化水平增高会干扰 D-10 系统对 HbA1c 的检测,而 PDQ 系统(亲和层析)则不受影响。尿毒症患者由于肾功能严重受损,体内有过多尿素形成,其代谢产物结合于 Hb 的 α 链及 β 链 N 端的氨基,形成氨基甲酰 Hb,由于它的等电点和糖化血红蛋白相似,用离子交换方法检测尿毒症患者 HbA1c 值将会增高 0.47%~1.1%^[11]。

2.2 亲和层析法 亲和层析法利用一种水溶性蓝色硼酸衍生物与血红蛋白分子上的葡萄糖顺位二醇基可逆结合的原理,将糖化血红蛋白通过共价键选择性地牢固结合于凝胶柱上制得亲和和吸附系统。而非糖化血红蛋白及不稳定糖化血红蛋白等随流动相洗脱,再用高浓度含糖或含顺位二醇基的多羟基化合物(如山梨醇)将结合的糖化血红蛋白置换下来,从而达到分离目的。除 HbA1c 外,血液中其他氨基酸残基糖基化的血红蛋白都可与 Hb 相结合,因此该方法的检测结果为糖化血红蛋白总量,而不是单一组分的含量。亲和层析具有操作简单、快速、价廉、精密度较高及不受 Hb 变异体影响等优点^[12]。正是由于亲和层析高效液相法不受变异血红蛋白和糖化血红蛋白衍生物的影响^[13],更能客观地反映所有被糖基化的血红蛋白。亲和层析法代表仪器有 Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统、PDQ 系统,可识别和定量变异血红蛋白。但是近期 Rohlifing 等^[14]研究发现,当 HbF > 20% 时,Primus CLC330/385 检测 HbA1c 与 IFCC 推荐参考方法相比测得的 GHb 值降低 1%。研究表明,60% 的糖基化发生在血红蛋白 β 链末端,HbF 由两条 α 链和 γ 链组成。不同于正常血红蛋白的 β 链, γ 链末端由甘氨酸残基组成,易发生乙酰化导致糖化速度较慢,从而引起 GHb 值偏低。

2.3 免疫法 免疫法的原理是以血红蛋白 β 链 N 末端最初的 4~8 个氨基酸残基作为抗体识别位点,制备相应的单克隆抗体,HbA1c 与相应的单克隆抗体结合发生凝集,用比浊法测定 HbA1c 含量,可用于全自动生化分析仪上进行检测。用比

浊法测定 HbA1c 含量后还需测定 Hb 总量,计算出 HbA1c 占 Hb 的百分比。免疫法的特异性好,但是许多同源的糖化血红蛋白变异体也有相同的 N 末端结构,从而会对结果造成干扰。在定标方面,需与 HPLC 作相关校正。免疫法测定 HbA1c,精密度较差,CV 值大约为 6%^[15]。免疫法代表仪器有 DCA 2000,约在 7 min 内读取数据,每次实验均应使用一个新试剂盒。董永康等^[16]研究发现,10.2 mmol/L 三酰甘油、8.0 mmol/L 胆固醇、10.1% HbF 对该仪器无干扰,同时,DCA2000 测定结果比 DS5 低压阳离子交换色谱法联合梯度规避法偏高。

2.4 电泳法 电泳法的原理是基于胶体颗粒在一定条件下带有不同电荷,带有电荷的胶体颗粒可以借静电吸引力在电场中泳动。血清中各种蛋白质都有其等电点,蛋白质在各自的等电点时呈中性状态,当外界溶液的 pH 大于等电点,蛋白质带负电;当外界溶液的 pH 小于等电点,蛋白质带正电。血红蛋白经琼脂糖电泳后,距阴极最近的是含糖基最少的 HbA1a 和 HbA1b,处于中间位置的是 HbA1c,距阳极最近的成分主要是 HbA0。Doelman 等^[17]采用毛细管电泳法测定 HbA1c 其结果不受不稳定 HbA1c 片段或氨基甲酰化以及乙酰 Hb 变异体的影响,其他 Hb 变异体如 HbF、HbC 和 HbS 等也不干扰本法的结果准确。尿毒症患者的血红蛋白易发生乙酰化,干扰 GHb 检测。电泳法对氨基甲酰 Hb 敏感,而用离子交换色谱法测定的 GHb 偏高^[18-19]。电泳法速度比较慢,自动化程度低,急诊插入、自动维护等功能比较欠缺,无法进行实时检测。电泳法需成批进行样本分析,目前尚无商品化仪器,所以本法主要用于糖化血红蛋白研究。

2.5 酶法 酶法的原理是变性后的血标本经蛋白酶消化,糖基化的缬氨酸释放出来,作为底物果糖缬氨酸氧化酶(FVO)的氧化产生 H_2O_2 , H_2O_2 在辣根过氧化物酶的作用下与特定的色原耦联^[20]。酶法检测糖化血红蛋白可应用于自动生化分析仪,操作方便、简单,样品通过性大,无变异血红蛋白的干扰,具有准确、省时、重复性好、特异性高等特点。直接酶法单通道直接测定样本中的 HbA1c 百分比,而不需要另外检测总血红蛋白,处理后的样本与氧化还原剂反应,去除了小分子和高分子干扰物质^[21]。酶法检测糖化血红蛋白在低值可检测范围比 HPLC 法更低,而在高值可检测范围也比 HPLC 法低^[22]。酶法测定正常和异常全血标本时,批内和批间精密度均小于 2%,与 HPLC 法和免疫法相比呈良好的相关性^[20]。

3 讨论

临床常以糖化血红蛋白作为监测指标来了解患者近阶段的血糖情况,以及评估糖尿病慢性并发症的发生与发展情况。HbA1c > 9% 时,说明患者存在持续性高血糖,可以出现糖尿病肾病、动脉硬化、白内障等并发症。监测糖化血红蛋白对预防糖尿病孕妇的巨大胎儿、畸形胎、死胎以及急、慢性并发症的发生、发展的监督具有重要意义。Wisconsin 糖尿病视网膜病变流行病学研究表明,糖化血红蛋白每增加 1%,导致增殖性视网膜病变增加 70%,蛋白尿增加 20%,而冠心病事件只增加 10%,这些结果显示高血糖很可能对微血管并发症的危险性要大于心血管疾病。目前,糖化血红蛋白的临床实验室测定有 HPLC、亲和层析、免疫法和酶法等方法,纵观这些测定方法,因为原理的不同,测定结果的准确度、重复性、精密度都有差异。GHb 不同的测定方法会受到各种干扰因素的影响,对变异 Hb 和 GHb 衍生物的研究有助提高 GHb 检测结果的准确性。董永康等对英国 DS-5 糖化血红蛋白分析仪低压阳离子交

换色谱法联合梯度规避法和德国拜耳 DCA2000 免疫法进行评价,高浓度甘油三酯、胆固醇和 HbF 对 DCA2000 无干扰,但是高浓度总胆红素对 DS-5 层析柱有破坏作用。此外,DCA2000 测定结果比 DS-5 偏高^[16]。GHb 作为糖尿病血糖检测的有效指标,可以指导对糖尿病患者的病情评估,制定治疗方案。尿毒症患者 HbA1c 结果离子交换法(Bio-Rad Variant)均高于亲和层析法(美国 Primus 公司 PDQ);亲和层析 HPLC 法能准确检测新生儿脐带血的 HbA1c,而离子交换法不能测出。尿毒症患者体内生成氨基甲酸 Hb,由于等电点和糖化血红蛋白相似,在离子交换方法中极大影响检测的准确性^[23]。有研究指出 HbA1c 还与年龄呈正相关,与种族也有关系^[24]。据 Frank 报道 HbA1c 百分含量与年龄有关,每年长 10 岁,HbA1c 百分值将增加 0.11%~0.15%(HPLC 法测定)^[25]。为了减少不同地区和实验室之间的误差,IFCC 和 NGSP 都积极推动 HbA1c 检测方法和检测结果的标准化。Dhatt 等^[26]比对了这两个国际化组织的检测结果,认为 IFCC 的方法在设计 and 概念上比 NGSP 更好,并将取代 NGSP 方法。IFCC 的方法是先水解 HbA1c,再用 HPLC 加质谱和毛细管电泳的方法测定 β 链糖基化 N 末端残基。并且定期收集全球各个定点化实验室的标本进行比对,建立参考值。健康人平均 HbA1c 水平为 3%~6%,不同实验室之间参考值有一定差异。

参考文献

[1] International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32:1327-1334.

[2] Stratton IM, Alder AI, Neil HA, et al. Association of glycaemic with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study [J]. *BMJ*, 2000, 321(7258):405-412.

[3] Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969, 36(5):838-843.

[4] Kutter D, Thoma J. Hereditary spherocytosis and other hemolytic anomalies distort diabetic control by glycated hemoglobin [J]. *Clin Lab*, 2006, 52(9-10):477-481.

[5] Asia-Pacific Type 2 Diabetes Policy Group. Type 2 diabetes practical targets and Treatment. 4th ed. Sydney: Health Communications Australia Pty Ltd and In Vivo Communications Pty Ltd, 2005.

[6] Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A Five-Year Progress Report [J]. *Clin Chem*, 2001, 47:1985-1992.

[7] Bunn FH, Forget BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects [J]. Philadelphia: WB Saunders Co, 1986:425-427.

[8] Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2009, 3(3):446-451.

[9] Camargo JL, Felisberto M, Gross JL. Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care [J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(9):836-839.

[10] 李青, 邓家德, 李拥玲. 乙酰化血红蛋白对高效液相色谱检测 HbA1c 影响的探讨 [J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(12):1165-1166.

[11] Bry L, Chem PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and

chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin [J]. *Clin Chem*, 2001, 47:153.

[12] Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, et al. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(1):264-265.

[13] Seung-Tae Lee, Cas-W Weykamp, Yong-Wha Lee, et al. Effects of Hemoglobin Variants on the Measurement of Glycohemoglobin by 14 Analytical Methods [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(12):2202.

[14] Rohlfing C, Connolly S, England J, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on HbA1c results: five common HbA1c methods compared to the IFCC reference method [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(5):811-814.

[15] Goodall I, Colman PG, Schneider HG, et al. Desirable performance standards for HbA(1c) analysis-precision, accuracy and standardisation; consensus statement of the Australasian Association of Clinical biochemists (AACCB), the Australian diabetes Society (ADS), the Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), Endocrine Society of Australia (ESA), and the Australian Diabetes Educators Association (ADEA) [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(8):1083-1097.

[16] 董永康, 张恒, 汤俊明, 等. DS5 和 DCA2000 糖化血红蛋白仪检测糖化血红蛋白的比较 [J]. *实用医技杂志*, 2008, 15(8):1021-1022.

[17] Doelman CJ, Siebelder CW, Nijhof WA, et al. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated [J]. *Clin Chem*, 1997, 43(4):644-648.

[18] Sabater J, Quereda C, Herreral I, et al. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin and total plasmatic proteins in end-stage renal disease [J]. *Am J Nephrol*, 1991, 11(1):37-43.

[19] Phillipov G, Chartes P, Beng C, et al. Alternate site testing for HbA1c using the Primus CLC330 GHb analyzer [J]. *Diabetes Care*, 1997, 20(4):607-609.

[20] Liu L, Hood S, Wang Y, et al. Direct enzymatic assay for % HbA1c in human whole blood samples [J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(7-8):576-583.

[21] 段桂萍, 王静. 糖化血红蛋白直接酶法测定自动化分析的应用 [J]. *中国实用医药*, 2009, 4(24):216-217.

[22] 阮绍均. 高压液相层析法与酶法检测糖化血红蛋白的比较 [J]. *实验与检验医学*, 2009, 27(5):465-466.

[23] 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.

[24] Herman WH, Ma Y, Uwaifo G, et al. Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30:2453-2457.

[25] Frank Q. Effect of age on the percentage of hemoglobin A1C and the percentage of total glycohemoglobin in non-diabetic persons [J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 134:451-453.

[26] Dhatt GS, Agarwal MM, Biahawi B. HbA1c: a comparison of NGSP with IFCC transformed values [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 358(1-2):81-86.