

• 检验技术与方法 •

毛细管电泳法分析糖基化血红蛋白

苗 杰¹, 府伟灵², 邱振薇³, 李学慧¹, 王景胜^{1△}(1. 解放军第四〇四医院检验科, 山东威海 264200; 2. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038;
3. 海军威海水警区后勤部卫生科, 山东威海 264200)

摘 要:目的 探讨毛细管电泳在分析糖基化血红蛋白水平方面的临床应用价值。方法 该文利用长 30 cm、内径 25 μm 的未涂层熔融石英毛细管, 利用血红蛋白在 415 nm 波长处的特异性吸收峰, 二极管阵列(PDA)法检测健康人与糖尿病及高危人群中的糖基化血红蛋白(HbA1c)水平。在研究过程中, 对精密度和准确度进行了精确分析。结果 HbA1c 和非 HbA1c 成功分离, 峰型清晰锐利且能对 HbA1c 进行定量分析。结论 毛细管电泳法具有特异性好、精密度和准确度高等优点, 因此, 该法应该在临床上被推广应用。

关键词:毛细管电泳法; 糖化血红蛋白; 检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1919-03

Analysis of glycosylation hemoglobin by capillary electrophoresis

Miao Jie¹, Fu Weiling², Qiu Zhenwei³, Li Xuehui¹, Wang Jingsheng^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, 404 Hospital of PLA, Weihai, Shandong 264200, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Section of Health, Department of Logistics, Weihai Coastal Defence Regions, Weihai, Shandong 264200, China)

Abstract: **Objective** To discuss the application value of the capillary electrophoresis in detecting the glycosylation hemoglobin (HbA1c) level. **Methods** By utilizing the uncoated fused silica capillary column (30 cm in length and 25 μm in diameter) and the specific adsorption peak, the HbA1c levels in the healthy people, patients with diabetes mellitus (DM) and high risk people were detected by the photodiode array (PDA) method at the wavelength of 415 nm. During the research process, the precision and accuracy were performed the accuracy analysis. **Results** HbA1c could be effectively separated from non-HbA1c, with a sharp peak. And the relative quantity of HbA1c could be determined. **Conclusion** The capillary electrophoresis is characterized by specificity, high precision, and high accuracy. Therefore, it should be widely applied in clinic.

Key words: capillary electrophoresis; glycosylation hemoglobin; detection

糖尿病患者中的长期血糖浓度是一个重要的诊断和评价治疗效果的指标。糖尿病的诊断标准最初是基于患者与正常人血糖水平的偏离值。随着学术界对糖尿病综合症认识的加深, 诊断标准也随着重新修订。在 1997 年, 世界卫生组织(WHO)糖尿病诊断和分类委员会进行了大规模的人群分析, 提出了新的糖尿病诊断标准。其中, 空腹血糖(FPG)含量、2 h 后口服糖耐量测试(OGTT)以及糖化血红蛋白(HbA1c)的水平为诊断糖尿病水平的标志。

HbA1c 是糖基化血红蛋白的主要形式^[1]。糖化血红蛋白(HbA1c)的水平可以反映 3 至 4 个月内的血糖变化情况, 因此, HbA1c 的水平被认为是诊断长期血糖含量的关键标志物。在许多临床试验中, 临床诊断结果和糖尿病之间的关系已经被研究确证^[2]。糖化色素是由于葡萄糖附着在血红素上形成的。根据洗脱顺序, 这些分离出来的组分别被命名为 HbA1a、HbA1b 和 HbA1c。

近些年来, 国际临床化学联合会(IFCC)一直在致力于改善 HbA1c 测量的方法。通过分析血红蛋白的成分来检测和诊断糖尿病正成为一个新的检测手段^[3]。作为一种替代全蛋白分离的方法, HbA1c 的量化分析也可以通过鉴定肽谱的方法

实现。这一方法往往包括蛋白质的酶解以及酶解后特征肽谱的分析。由于高度自动化和准确性, 毛细管电泳技术被广泛应用并逐渐被用于分析 HbA1c。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)也被称为高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE), 它是以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术。在碱性环境中, 通过毛细管电泳技术, 人血中的 HbA1c 成分可以被分离和量化^[4]。该方法具有分离效率高、重复性好等特点。因此, 本文旨在探讨毛细管电泳法对 HbA1c 分离鉴定的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所采样时间为 2012 年 10 至 2013 年 2 月, 共采集解放军第四〇四医院 128 例健康人与 95 例糖尿病及高危人群为研究对象。所谓糖尿病高危人群是指血糖数值已达正常的高限或略高于正常值指标, 但还不能确诊为糖尿病的人群; 有糖尿病家族史的人群; 体质量严重超标的肥胖人群。

1.2 原理 本研究所用溶液来自于 Analis 公司的 HbA1c 测定试剂盒。在酸性环境中(pH4.5), 通过高压进样及电泳, HbA1c 从非 HbA1c 中分离出来。通过二极管阵列(Photo Diode Array, PDA)在 415 nm 紫外波长处检测吸收峰。

1.3 仪器与试剂 HbA1c CE 试剂盒为美国 Beckman—Coulter 公司提供;毛细管电泳仪(P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System)为美国 Beckman—Coulter 公司提供;未涂层熔融石英毛细管(25 μm 内径、30 cm 长度、有效长度 10 cm),北京普生瑞达生物技术有限公司。

1.4 方法

1.4.1 采用静脉取血法抽取 100 例健康人与 95 例糖尿病及高危人群的全血,在样本中加入抗凝剂 EDTA。加入溶血剂(hemolyzer),用微量加样器充分混匀。

1.4.2 电泳条件 紫外检测波长为 415 nm,毛细管电泳温度为 26 $^{\circ}\text{C}$ 。在进样前,首先用引发剂(pH4.7)高压冲洗 18 s,接着用硼酸盐缓冲液(pH4.5)预冲洗 1 min,在 4 kV 电压的条件下,进样 5 s,在 8 kV 的电压下,电泳 10 min。整个电泳过程持续为 15 min。

1.5 统计学处理 使用“Golden System”软件计算出各个峰值的面积并计算其所占的百分比,按照以下公式即可得到 HbA1c 的检测值。 $\text{HbA1c 检测值} = \text{HbA1c} / \text{HbA} \times 100\%$,应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理。95%为可信区间, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛细管电泳法分离血红蛋白 毛细管电泳法主要是根据核质比来分离 HbA1c。首先,在酸性条件下,由于 pH 值低于血红素的等电点($\text{pI}=7$),故血红素带正电荷。由于在 HbA1c 氨基上附着了葡萄糖分子,因此,HbA1c 与血红蛋白 A(HbA)带有不同的电荷。根据这一原理,研究者可以将二者分离开来。按照材料方法中所述电泳条件,血红蛋白分离结果良好,具体结果如图 1 所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。一个典型的电泳图表现出两个特征峰 HbA1c 和 HbA,与试剂盒产商相比,本次分离结果与其提供的图谱一致,分别为 $(7.16 \pm 0.01)\text{min}$ 与 $(7.87 \pm 0.01)\text{min}$ 。包括前后的冲洗时间,整个电泳过程持续 15 min。

2.2 健康人血糖水平 健康人的空腹血糖水平一般是低于 6.1 mmol/L。在本研究中,血糖含量正常者以及无糖尿病史者总共有 128 人。根据毛细管电泳结果,这些人群的 HbA1c/HbA 比值范围分布在 2.2%~5.6%。一般统计学结果认为 95%为可信区间, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。因此,参考值 95%的分布范围在 2.10%~5.15%,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 糖尿病患者的血糖水平 在那些确诊为糖尿病且血糖含量高于 6.1 mmol/L 的糖尿病患者中(共计 67 例),通过毛细管电泳检测,研究者发现 HbA1c 和 HbA 的比率大于 5.15% 的有 45 例,而小于 5.15% 的有 22 例。调查分析表明,这些 HbA1c/HbA 比值小于 5.15% 的患者都在使用药物进行糖尿病的控制。这一研究结果表明,长期服用降糖药物,有助于降低血浆中糖化血红蛋白的水平。

3 讨论

在临床测试中,HbA1c 的检测是一个关键的诊断糖尿病的指标。因此,提高 HbA1c 的诊断效率尤为重要。高度自动化、高度周转时间、仪器参数以及低成本是选择合适分析手段的前提条件。因此,世界各地的生产商都在致力于创造出高通

量的分析仪器。

作为一项新兴技术,毛细管电泳技术通常被临床实验室用来分离和量化蛋白质成分、血清蛋白以及血红素成分^[5]。目前,技术的发展已经允许许多公司开发出相应试剂盒来分析 HbA1c 水平。另一方面,疗效的诊断通常依赖于可重复的和偏差小的方法。因此,开发出有效诊断糖尿病患者 HbA1c 含量的检测方法尤为重要。HbA1c 测量的高度可重复性结果对于临床中有效诊断糖尿病风险具有重要的意义。患者检测结果的变化必须能够正确反映疾病的病理状态以及治疗的效果。然而,目前的许多数据表明,糖尿病患者的身体状况通常是比较复杂的。因此,诊断结果通常受到临床对照和取样间隔的影响。

在本次研究中,毛细管电泳诊断结果具有高度可重复性($<1.4\%$),该值远远低于正常所需要的 2%。一般而言,血红素浓度对 HbA1c 没有明显的影响。在采血时,糖化血红蛋白 LA1C 分子的浓度随着血糖浓度的变化而变化,该分子是产生稳定的 HbA1c 的中间分子^[6]。尽管 LA1C 分子的等电点接近于稳定的 HbA1c,但在 HbA1c CE 试剂盒中,LA1C 分子与 HbA 共同迁移,因此 LA1C 不会对 HbA1c 的量化分析结果产生影响。

而且,目前的实验表明,即使在于葡萄糖孵育后,HbA1c 的水平也不会有明显的增加。这就表明,该试剂盒所提供的检测方法是特异性针对 HbA1c 成分的。在相同的样本中,将 LA1C 与葡萄糖孵育后,LA1C 的水平升高了 4 倍,而 HbA1c 的水平仍然持续在稳定的水平。技术的优势促使更先进的高通量的分析仪来处理这些潜在的干扰成分。

在本次研究中,研究者展示了基于毛细管电泳的 HbA1c 量化分析结果。这一技术主要是基于毛细管电泳最近的发展。首先,硼酸盐缓冲液似乎是一个简单方便的实验条件。考虑到特异性,显然一些糖化血红素在检测中会起到相应的干扰作用。相比而言,血红素的中性复合物附加分子,例如尿素和乙醛,这些 HbA1c 的异构体很难被分离出来。由于这些中性分子附加物不能结合硼酸盐,因此,它们会与 HbA 共同迁移。

长期的高血糖会导致糖尿病并发症,例如,微血管病变、神经病变、肾的病变和视网膜病变,严重降低了患者的生活质量^[7]。众所周知,长期高血糖会增加血液和器官组织的蛋白,如血红蛋白的非酶促不可逆糖化作用。因此,血液中的糖化血红蛋白的检测就成为评价长期血糖控制的颇有价值的指标。对于人类,最常见的糖化血红蛋白的组成成分,HbA1c 在糖尿病患者中用作最可靠的指标。因此,要评价抗糖尿病治疗的有效性,监控 HbA1c 的水平是必要的。本项研究结果显示,毛细管电泳在监控 HbA1c 的水平方面具有准确度高、干扰因素少等优点。因此,在检验中,采用毛细管电泳法检测 HbA1c 水平具有重要的临床应用价值和前景。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.糖化血红蛋白的测定[J].全国临床检验操作规程.第3版.南京:东南大学出版社出版,2006:347-351.
- [2] 糖化血红蛋白测定试剂说明书[J].上海东方顺宇科技有限公司.
- [3] 刘玉泉,赵斌,荆成宝,等. HbA1c 乳胶凝集法测定及其临床应用[J].实用医技杂志,2004,11(4):444-445. (下转第 1922 页)

阳性,MRSA 阳性率为 59.50%。

2.3 实时荧光 PCR 法和头孢西丁筛选试验结果比较。见表 1。

表 1 RT-PCR 法和头孢西丁筛选试验结果比较

头孢西丁筛选试验	RT-PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	62	10	72
阴性	4	45	49
合计	66	55	121
χ^2	—	—	1.786
P	—	—	>0.05

—:无数据。

2.4 头孢西丁筛选试验的敏感度 93.93%,特异度 81.82%,阳性预期值 84.93%,阴性预期值 91.83%。

3 讨论

MRSA 是引发医院感染的常见病原菌之一,具有多重耐药性,患者一旦感染,治疗十分棘手[3]。因此快速鉴定 MRSA,对控制其引起的感染和播散,具有重要意义。

MRSA 是指表达 *mecA* 基因或具有另一种甲氧西林耐药机制如青霉素结合蛋白(PBP)与苯唑西林的亲和力改变的金黄色葡萄球菌[4]。对于 MRSA 菌株,PBP 通常分为 1、2、3、4 种,PBP2a 是 PBP2 的异构体。决定 MRSA 产生 PBP2a 的是一系列具有编码 PBP2a 调节表达功能的 *mec* 基因(*mecA*, *mecI*,*mecRI*) [5]。*mecA* 基因是导致金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药的主要原因。检测 *mecA* 基因或者 *mecA* 表达的 PBP2a 是预报对苯唑西林耐药最准确的方法。有些国家如瑞典、丹麦、荷兰等已将 *mecA* 基因的测定作为 MRSA 的确认试验,将含有 *mecA* 基因的菌株判断为 MRSA。

mecA 基因在金黄色葡萄球菌的耐药机制中发挥重要作用,携带有 *mecA* 基因的 MRSA 耐药严重且呈多重耐药。本实验中检测出携带有 *mecA* 基因的阳性率为 54.55%。高于樊新等 45%(54/120)的检出率[6],但低于耿燕等[7] 69.2%(54/174)的报道。提示本院金黄色葡萄球菌耐药情况不容乐观。

本次实验中有 4 株 *mecA* 基因阳性菌表现为头孢西丁筛选试验阴性,表明这些携带 *mecA* 基因的金黄色葡萄球菌可能是因为 *mecI* 的作用增大,*mecA* 基因处于抑制状态[8]。这类隐匿型或低水平耐药菌株接触 β 内酰胺类抗菌药物诱导剂后,可以使 *mecA* 活化。其治疗中应避免使用 β 内酰胺类抗菌药物。同时有 4 株单 *mecA* 基因呈阳性,这可能与这些菌株能高度表达 β 内酰胺酶或存在 PBP2a 之外的低亲和力 PBP 有关,这些菌株也应视为 MRSA。

VITEK2 全自动微生物分析仪药敏卡容纳多种抗菌药物,并可根据 CLSI 规则和耐药性推导未在卡内试验的多种抗菌药物的敏感性,为临床提供更多选择。头孢西丁具有诱导产生 PBP2a 的能力,尤其对于低水平耐药的葡萄球菌。而且头孢西丁 MIC 可直接判断敏感或耐药[9]。RT-PCR 技术利用 PCR 扩增,直接检测 *mecA* 基因,是 MRSA 检测的金标准,但一直以来实验影响因素颇多,临床应用有限。本次实验中,RT-PCR 技术 MRSA 发生率 54.55%,头孢西丁筛选试验 MRSA 发生率 59.50%。两种方法的检出率相近。

本次实验显示,头孢西丁筛选试验与 RT-PCR 技术结果相比较,检测 MRSA 灵敏度 93.93%,特异度 81.82%,阳性预期值 84.93%,阴性预期值 91.83%。两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但 RT-PCR 技术检测 MRSA,整个检测过程历时 2 h,加快了实验时间,同时操作简单快速,成本节约。而 PCR 成品试剂盒的应用也使 MRSA 的快速检测成为可能。可见 RT-PCR 技术完全可取代仪器法头孢西丁筛选试验,准确、快速地检测 MRSA。

参考文献

[1] Plata K,Rosato AE,Wegrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity[J]. acta biochimic polonica. 2009,292(4):597-612.

[2] Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards For Antimicrobia susceptibility testing[S] Wayne PA, USA:CLSI,2009.

[3] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(5):321-329.

[4] 崔巧珍,戎建荣. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析和 *mecA* 基因检测[J]. 中国微生态学杂志,2010,11(10):998-999.

[5] 吴晶,应春妹,汪雅萍,等. 金黄色葡萄球菌耐药性监测分析[J]. 上海交通大学学报,2011,31(12):1754-1757.

[6] 樊新,岳乔红,杨柳,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因的鉴定分析[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(6):66-67.

[7] 耿燕,王香玲,李妙羨,等. 头孢西丁纸片扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌的临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(3):71-73.

[8] 王敏,范婧,李先平,等. PCR 扩增法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 *mecA* 基因[J]. 广东医学,2008,29(4):566-568.

[9] Swenson JM, Tenover FC. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in Staphylococcus spp [J]. J Clin Microbiol,2005,43(1):3818-3823.

(收稿日期:2014-02-03)

(上接第 1920 页)

[4] 陈玲玲,陶耕. 对三种糖化血红蛋白测定方法的比较[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(9):1033-1034.

[5] Bose T. Chakraborti, Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: implication for oxidative stress in diabetes mellitus[J]. Biochim Biophys Acta,2008,1780:800-808.

[6] Little RR,Rohlfing CL. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb

(HbA1c) by 23 methods[J]. Clin. Chem,2008,54:1277-1282.

[7] M. Poitevin,G. Peltre,S. Descroix. Use of quasi-isoelectric buffers as anolyte and catholyte to improve capillary isoelectric focusing performances[J]. Electrophoresis, 2008, 29:1687-1693.

(收稿日期:2014-01-25)