

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶测定方法及其与糖尿病和糖化血红蛋白关系的研究进展*

李晶晶 综述,温冬梅,张秀明[△] 审校

(中山大学附属中山医院检验医学中心,广东中山 528403)

关键词:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 糖尿病; 糖化血红蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)18-2494-03

糖尿病是严重危害人类健康的常见病、多发病。氧化应激损伤在糖尿病的发生和病理发展过程中起重要作用^[1]。还原型谷胱甘肽(GSH)是体内的重要抗氧化物质,还原型辅酶Ⅱ(NADPH)和氢离子浓度(H⁺)对维持细胞中 GSH 的正常含量起重要作用。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)是催化磷酸戊糖途径第一步的关键酶,其主要代谢产物是 NADPH 和 H⁺。因此,研究 G-6-PD 与糖尿病发生和发展的关系近年来备受关注^[1-2]。糖化血红蛋白(HbA1c)是糖尿病长期血糖控制水平的良好指标,近年来不少国际组织推荐 HbA1c ≥ 6.5% 可作为糖尿病的诊断指标^[3]。HbA1c 是血红蛋白糖基化的产物,其含量受红细胞寿命和血糖水平的影响。G-6-PD 减少或缺乏可导致红细胞寿命缩短甚至发生溶血,可能影响血红蛋白的糖基化作用。本文就 G-6-PD 减少或缺乏与糖尿病和 HbA1c 的关系进行综述,供同道参考。

1 G-6-PD 的生理与生化功能

G-6-PD 是催化磷酸戊糖途径第一步的关键酶^[4],主要代谢产物是还原型辅酶Ⅱ(NADPH),见图 1。NADPH 和 H⁺ 对维持细胞中还原型谷胱甘肽(GSH)的正常含量起重要作用,两分子 GSH 可以脱氢氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG),而 GSSG 可在谷胱甘肽还原酶的作用下,又被 NADPH 和 H⁺ 重新还原为 GSH。GSH 是体内重要的抗氧化剂,可以保护一些含-SH 的蛋白质或酶免受氧化剂的损害。红细胞中的还原型谷胱甘肽(GSH)可以保护红细胞膜蛋白的完整性,以防止与此有关的溶血性贫血的发生。G-6-PD 缺乏时,还原型谷胱甘肽减少,血红蛋白容易被氧化变性^[5],形成变性珠蛋白小体固定于红细胞膜上,影响红细胞的变形性,在通过狭小的血管及脾易被破坏,引起血管外溶血。

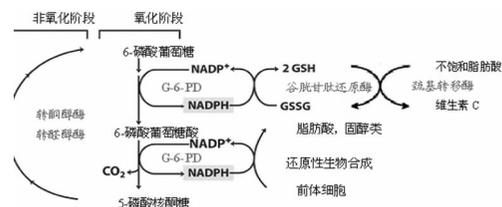


图 1 G-6-PD 催化的反应及其生理功能

2 G-6-PD 的测定方法

目前 G-6-PD 常用的测定方法可以分为筛选试验和确诊试验两大类,筛选试验包括高铁血红蛋白还原试验、硝基四氮唑蓝试验、Heinz 小体、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶荧光斑点试验等;确诊试验包括红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定、分子生

物学法等^[6]。现在国内各个实验室用于 G-6-PD 缺陷检测的方法中使用较多的为高铁血红蛋白还原法(MR)、荧光斑点法(FS)、改良四氮唑蓝法和 G-6-PD 活性直接测定法。其中 MR 法基本能检测出大部分的 G-6-PD 缺陷者^[7],该法操作简单,成本低廉,易为基层接受,适合大批量筛查,缺点是操作时间长,易出现假阳性,且灵敏度低。然而有报道称 MR 法和 FS 法可以正确诊断所有的男性 G-6-PD 缺乏者和严重的女性 G-6-PD 缺乏者,但对于半合子的女性 G-6-PD 缺乏者,其检出率只有细胞化学法的 50%^[7]。随着分子技术的不断进步,G-6-PD 的分子特征被人们逐渐了解,然而大量的基因突变对 G-6-PD 活性的检测又存在着不同的影响。尽管基因分析可以检测出已知的 G-6-PD 突变基因,但这项技术目前还没有充分发展为常规的筛查方法,这不仅仅是因为大量 G-6-PD 基因突变体的存在,而且还有很多不确定因素的存在。测定 G-6-PD 活性的方法很多,影响因素也较多,国内外已有多篇文献报道过有关 G-6-PD 各种测定方法之间的对比与测定结果的分析^[6-7]。

大部分 G-6-PD 缺乏者是无症状的^[7-8],但当发生感染、接触氧化剂或抗疟药之后,这些原本无症状的 G-6-PD 缺乏者很可能发生溶血,这对于临床用药是个极其不利的因素,因此建立一个标准化的适当的 G-6-PD 缺乏筛查方法至关重要。虽然 MR 法和 FS 法作为被推荐方法在发展中国家用来筛查严重的 G-6-PD 缺乏,但现有的常用检测方法并不能完全满足对 G-6-PD 检测的要求,因此新的检测技术随着科技的发展也不断推陈出新。如细胞过氧化物荧光测定(cytofluorometric)法^[4]、WST8/1-methoxy-PMS 酶测定法^[6]、细胞化学检测法^[7]等。细胞过氧化物荧光测定(cytofluorometric)法克服了以往检测技术对杂合子检出率低等缺点但以增加技术复杂性和劳动力为代价,是经典的高铁血红蛋白还原试验的延伸,可以在个体水平上评估 G-6-PD 缺乏程度。马里儿童的实验证明这种方法与遗传生化技术具有高度的一致性,且健康经济,可以作为筛查和研究的工具,特别是对于高通量流式细胞术的应用,它是一种间接测定 G-6-PD 缺乏的方法^[4]。正常红细胞可以快速的降低高铁血红蛋白,而 G-6-PD 缺乏的红细胞却不能,利用独特的氧化还原反应和红细胞中丰富的血红蛋白形成一个特异的自动荧光信号,可以充分区别红细胞中 G-6-PD 缺乏和正常的 G-6-PD 活性。有研究发现^[6] WST8/1-methoxy-PMS 酶测定法具有稳定性高,光敏感性强,受温度影响小,储存时间长等优点,其原理是在 WST8 转化为 WST8-formazan

* 基金项目:中山市科技计划项目(20132A091)。 作者简介:李晶晶,女,在读研究生,主要从事临床生物化学检验与研究工作。 [△] 通讯作者,E-mail:zxm0760@163.com。

时减少从 NADPH 得到 H 的载体 1-methoxy-PMS 量。此反应产生一种很强的容易识别的橙色,橙色的强弱与 G-6-PD 活性成正比,在温室孵育 2h 后,G-6-PD 活性正常的样本显示强橙色,G-6-PD 活性缺乏样本显示淡橙色(轻度缺乏)或无色(重度缺乏)。细胞化学检测法能检出所有的杂合子、纯合子以及双突变体,对 G-6-PD 缺乏是一个非常重要的检测方法,利用 G-6-PD 活性引起红细胞通过一系列的反应着色,有 G-6-PD 活性的红细胞出现紫黑色颗粒,而 G-6-PD 缺乏的红细胞不被染色^[7]。

在实际工作中,更倾向于使用更经济、准确的检测技术以达到最满意的检测结果,而现有的检测技术逐渐过时,特异性和灵敏度低,其结果的可靠性也存在争议^[7]。基因检测技术也只在少数有条件的实验室或课题研究中可行,很难推广使用,因此新的检测技术有可能将成为今后发展的主要方向。

3 G-6-PD 与糖尿病的关系

以前人们对 G-6-PD 缺乏的研究主要集中在其与溶血和预防疟疾^[9]之间的关系,现在人们逐渐开始研究 G-6-PD 缺乏与其他疾病之间的关系。一些中东的研究显示^[10],G-6-PD 活性降低与野生型的 G-6-PD 活性相比,在基于 G-6-PD 缺乏会增加患糖尿病的情况下,G-6-PD 活性下降可能会更倾向于糖尿病的发病。也有研究表明^[11]G-6-PD 缺乏可能是 2 型糖尿病的一个危险因素,G-6-PD 缺乏所致的氧化应激增加会加重糖尿病及并发症的发展,而长期的高血糖会增加 G-6-PD 酶转换葡萄糖 6 磷酸为 6 磷酸葡萄糖酸的工作负荷^[2],随着 G-6-PD 过多的代谢分解,从而导致 G-6-PD 的活性降低或缺乏,进而导致胰岛素抵抗和 β 细胞功能障碍的发展^[12]。长此以往,高血糖势必会引起胰岛素的分泌减少。国外已有报道称糖尿病患者 G-6-PD 缺乏症的发生率高于普通人群^[11],我国也有研究者^[13]对此作了相应的调查。在 Akter 等^[11]的研究中发现红细胞 G-6-PD 水平在糖尿病组中明显低于对照组,具有统计学意义,而两组糖尿病患者的红细胞 G-6-PD 水平并无统计学意义。Akter 还发现 G6PD 缺乏与糖尿病之间可能存在正相关。Adinortey 等^[14]也发现 G6PD 缺乏的患者患糖尿病的风险比 G6PD 正常的人高 1.6 倍。Heymann 等^[2]的研究结果显示,仅 45~65 岁的 G6PD 缺乏患者的糖尿病患病率比健康对照人群高,其推测这可能是由于选取的健康对照人群中存在 G6PD 缺乏者却未被检测出而被错误的分配到对照组。

2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞减少,其潜在的机制尚不完全清楚,G-6-PD 在胰岛 β 细胞的功能和生存中起着重要作用。这为更进一步的研究 G-6-PD 与糖尿病的关系提供了依据。上述报道揭示 G-6-PD 缺乏症与糖尿病的联系是多因素的,G-6-PD 缺乏症的患者同时患糖尿病的几率明显比 G-6-PD 正常的人高。这可能是由于糖尿病的发病基因与 G-6-PD 缺乏症的发病基因在某些方面存在相关性。

4 G-6-PD 对 HbA1c 测定的影响

糖化血红蛋白(HbA1c)是 Rahbar 在 1968 年证实糖尿病患者红细胞中存在的一种异常的血红蛋白,反映一段时期内平均血浆葡萄糖的浓度^[15]。HbA1c 是红细胞中血红蛋白与血糖结合的产物,此过程是不可逆反应,产物伴随红细胞直到其衰老死亡,HbA1c 与血糖浓度成正比,可以观测到 120 d 之前的血糖浓度。HbA1c 通常可以反映患者近 8~12 周的血糖控制情况,2010 年美国糖尿病协会^[16]正式认可 HbA1c 作为糖尿病的诊断标准。但有报道称^[17]大多数 1 型糖尿病不符合美

国糖尿病协会对儿童和青少年糖尿病的临床指南。影响 HbA1c 测定的主要因素为红细胞的更新率,缩短红细胞寿命的任何因素都可导致 HbA1c 绝对值的降低,而由 G-6-PD 缺乏所造成的氧化应激增加不仅缩短了红细胞的寿命,还对糖尿病的发病产生负面作用,在多个方面间接地影响着 HbA1c 的含量,因此由 G-6-PD 缺乏所造成的对 HbA1c 测定值的影响不容忽视。

Danzig 等^[18]发现一例 1 型糖尿病患者,在排除遗传性血红蛋白病的情况下空腹血糖值为 160 mg/dL,而 HbA1c 值为 5.9%。糖尿病时,由于血糖的增高,HbA1c 理所应当是增加的。Danzig JA 推测 HbA1c 值异常偏低可能是由于其患有 G6PD 缺乏,G6PD 缺乏的细胞,NADPH 对氧化剂的反应低下,谷胱甘肽的减少导致红细胞被氧化的敏感性增强并过早被破坏,HbA1c 含量随着红细胞的破坏而减少,从而导致 HbA1c 值与血糖值不一致。Danzig 等认为当 HbA1c 值与血糖值不一致时,应考虑到患者是否伴有 G6PD 缺乏。Akter 等^[11]也发现 HbA1c 值与红细胞 G6PD 缺乏呈负相关,但只在两组糖尿病患者中具有统计学意义。而 Heymann 等^[2]研究发现 G6PD 缺乏与 G6PD 正常的人相比,HbA1c 值没有明显的差别,因此 G-6-PD 缺乏与 HbA1c 测定之间必定存在着非常复杂的关系。

G-6-PD 的测定结果受多种因素的影响,其对 HbA1c 的测定也会引起相应的影响。(1)标本在常温下贮存时间因检测方法不同而有所差异,但总体上都是越早测定其测定值越准确。(2)当 G-6-PD 缺乏合并其他类型贫血时,如脾切除,使红细胞的寿命有所延长;脾肿大、血红蛋白病等使红细胞在 G-6-PD 缺乏的基础上寿命短缩,此时很难判断 G-6-PD 缺乏对 HbA1c 测定的影响程度。(3)标本的 pH 值也会相应的影响 HbA1c 的绝对值,在 pH 偏酸或偏碱的情况下合并 G-6-PD 缺乏,应先校正 pH 值再校正 G-6-PD 缺乏对 HbA1c 测定的影响。(4)有相当一部分 G-6-PD 缺乏的患者在没有诱因的情况下是不发生溶血的,也就是在不发病的情况下,其标本的 HbA1c 测定值应该在正常范围内,但由于服用某种药物或感染^[19]诱发溶血时,就会对 HbA1c 的测定产生影响。(5)不同种族间其遗传因素不同,可能存在不同类型的基因突变。(6)WBC 的存在,使 RBC 的 G6PD 活性检测值偏高,可能造成处于临界值的 G6PD 缺乏症漏检,临床进行血液标本红细胞 G6PD 活性测定时,应尽可能清除 WBC,为临床诊断提供可靠数据。

据报道^[20]G-6-PD 有缺陷的女性至少有 20% 在正常的检测中漏检,这部分漏检的女性其 HbA1c 测定值就值得推敲。目前,临床各个实验室对 G-6-PD 的检测主要以大批量标本的筛查为主,所用方也有所不同,从各种 G-6-PD 检测方法的检出率和优缺点来分析,大批量标本及基层实验室一般用高铁法进行筛查,但对于杂合子的 G-6-PD 缺乏患者来说,其 G-6-PD 缺乏程度轻重不一,发病情况也有轻重缓急,即使检测出其 G-6-PD 缺乏,也很难分析其对 HbA1c 测定造成的影响程度,更难纠正这种因 G-6-PD 缺乏而引起的 HbA1c 测定的误差。

5 展 望

提高 G-6-PD 缺乏的检出率尤其是女性患者,尽可能多的了解各方法在筛查 G-6-PD 缺乏中的临床价值,探讨 G-6-PD 缺乏及其测定对 HbA1c 测定的影响,最终是为了在临床工作中纠正因 G-6-PD 缺乏引起的 HbA1c 测定误差。研究如何纠正这种误差非常重要,这关系到在临床中对 HbA1c 值的正确判断,继而关系到对糖尿病病情的正确判断。探索更加精准的

测定 G-6-PD 的方法势在必行。

人们对各种 G-6-PD 检测方法之间的比较做了大量的研究^[6-7],每种测定方法都有其自身的优缺点。虽然这些方法在大批量筛查工作中得到广泛应用,但准确性远不及基因检测,而基因检测又不被大众化。很早就有人提出用基因检测来测定 G-6-PD 的缺乏程度,这也一度成为热点,但因开展条件的限制而难以推广。G-6-PD 与糖尿病发病基因之间有着千丝万缕的联系,这是目前研究中的最大瓶颈,或许人们在完全搞清楚这两者之间的联系与影响后,G-6-PD 缺乏对 HbA1c 测定造成的干扰就迎刃而解了。尽管几种常用方法都有不可避免的缺点,但通过先对育龄妇女进行筛查,然后对可疑对象再做进一步检查的流程,基本可满足现阶段对 G-6-PD 缺乏筛查的需求。

参考文献

[1] Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(32): 5695-5703.

[2] Heymann AD, Cohen Y, Chodick G. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency and type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(8): 58.

[3] Son JI, Rhee SY, Woo J, et al. Hemoglobin a1c May be an inadequate diagnostic tool for diabetes mellitus in anemic subjects[J]. *Diabetes Metab J*, 2013, 37(5): 343-348.

[4] Shah SS, Diakite SA, Traore K, et al. A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Sci Rep*, 2012, 2(20): 299.

[5] Pantaleo A, Ferru E, Carta F, et al. Irreversible AE1 tyrosine phosphorylation leads to membrane vesiculation in G6PD deficient red cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15847.

[6] De Niz M, Eziefula AC, Othieno L, et al. Tools for mass screening of G6PD deficiency: validation of the WST8/1-methoxy-PMS enzymatic assay in Uganda[J]. *Malar J*, 2013, 12(1): 210-220.

[7] Nantakomol D, Paul R, Palasuwan A, et al. Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Malar J*, 2013, 12(1): 289-296.

[8] Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *The Lancet*, 2008, 371(6): 64-74.

[9] Howes RE, Dewi M, Piel FB, et al. Spatial distribution of G6PD

deficiency variants across malaria-endemic regions[J]. *Malar J*, 2013, 12(1): 418-431.

[10] Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(5): 362-369.

[11] Akter N, Begum N, Ferdousi S. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase(G6PD)status in female type 2 diabetes mellitus and its relationship with HbA1c[J]. *Journal of Bangladesh Society of Physiologist*, 2010, 5(2): 60-65.

[12] Zhang Z, Liew CW, Handy DE, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis[J]. *FASEB J*, 2010, 24(5): 1497-1505.

[13] 张力佳,熊符. G6PD 缺乏症发病的分子病理学新机制[J]. *国际遗传学杂志*, 2011, 34(5): 271-276.

[14] Adinortey MB, Owusu RK, Galyuon IA, et al. G-6-PD deficiency-a potential risk factor for development of diabetes mellitus [J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 1017-1021.

[15] Basevi V, Mario S, Morciano C, et al. Comment on: American diabetes association, standards of medical care in diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(5): 53.

[16] Tucker ME. ADA officially endorses HbA1c for diagnosis [J]. *Endocrinology*, 2010, 17(1): 34.

[17] Wood JR, Miller KM, Maahs DM, et al. Most youth with type 1 diabetes in the T1D exchange clinic registry do not meet american diabetes association or international society for pediatric and adolescent diabetes clinical guidelines [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(7): 2035-2037.

[18] Danzig JA, Moser JT, Belfield PA. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency diagnosed in an adolescent with type 1 diabetes mellitus and hemoglobin a1c discordant with blood glucose measurements [J]. *J Pediatr*, 2011, 158(5): 849-851.

[19] Hsieh YT, Lin MH, Ho HY, et al. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase(G6PD)-Deficient epithelial cells are less tolerant to infection by staphylococcus aureus [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 79566-79570.

[20] Kaplan M, Hammerman C. Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: biochemical versus genetic technologies [J]. *Semin Perinatol*, 2011, 35(3): 155-161.

(收稿日期:2014-05-11)

• 综 述 •

免疫胶体金快速诊断技术应用进展

魏 彪^{1,2}, 张丹参^{2,3}, 聂凌云¹, 唐颜苹¹综述, 张癸荣^{1,2△} 审校

(1. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 2. 河北北方学院, 河北张家口 075000; 3. 河北科技大学, 河北石家庄 050018)

关键词: 胶体金; 快速诊断; 免疫层析技术; 半定量; 定量

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 18. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)18-2496-04

胶体金是由氯金酸(HAuCl₄)在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并通过静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。免疫胶体金快速诊

断技术是基于酶联免疫吸附试验、乳胶凝集试验、单克隆抗体技术、免疫胶体金技术和新材料技术的新型技术,由于其具有便捷、灵敏、安全、低成本等特点,已在诊断领域中日趋成熟^[1]。