

• 论 著 •

糖化清蛋白酶法快速检测及其临床意义评价^{*}吴杰红, 张志伦, 周良琼, 刘萍, 蒲晓允[△]

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 评价糖化清蛋白(GA)的酶法快速检测及其临床应用的意义。方法 检测 147 例 2 型糖尿病(T2DM)患者及 78 例健康者的空腹血糖(FPG)、餐后 2 h 血糖(2hBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)等指标;同时应用液态酶法测定 GA, 用 GA 高值血清和低值血清评估试剂盒的精密度及其线性, 建立 GA 参考范围;分析 GA 与各检测指标的相关性。结果 健康人群 GA 值为 $(14.48 \pm 2.12)\%$;对 147 例患者的相关性分析显示, GA 与 HbA1c 具有良好的相关性($r=0.8687, P<0.01$);GA 与 FPG、2hBG 呈正相关($r=0.854, 0.836, P<0.01$);HbA1c $>7.0\%$ 、 $4.0\% \leq HbA1c \leq 7.0\%$ 以及 HbA1c $<4.0\%$ 患者 GA 与 HbA1c 的相关系数分别为 $0.823 (P<0.01)$ 、 $0.756 (P<0.05)$ 和 $0.187 (P>0.05)$;健康者、临界者和 T2DM 患者间 GA 差异有统计学意义($P<0.001$)。结论 该法批内变异系数(CV) $<2\%$, 批间 $CV<5\%$, 线性测定 $r=0.9987$ 。GA 与 HbA1c 具有良好的相关性, 尤其表现于长期血糖控制欠佳的患者。酶法检测 GA 有良好的精密度和线性。

关键词:糖尿病, 2 型; 血红蛋白 A, 糖基化; 糖化清白蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1920-03

Primary assessment of enzymatic measurement of glycated albumin^{*}Wu Jiehong, Zhang Zhilun, Zhou Liangqiong, Liu Ping, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical significance of fast enzymatic measurement of glycated albumin(GA). **Methods** 143 cases of patients with type 2 diabetes mellitus(DM) and 78 cases of healthy controls were enrolled, for whom the fasting plasma glucose(FPG), postprandial 2 hours blood glucose(2hBG) and glycated hemoglobin(HbA1c) were measured. At the same time, the levels of GA were detected by using enzymatic measurement, the precision and linear range of the detection kits were analyzed by the detection of samples with high and low levels of GA, and the reference range of GA was constructed and the correlation between GA and other indexes was evaluated. **Results** The level of GA in healthy controls was $(14.48 \pm 2.12)\%$. In patients group, there was fine correlation between GA and HbA1C, FPG and 2hBG($r=0.8687, 0.854, 0.836, P<0.01$). In patients with HbA1c $>7.0\%$, $4.0\% \leq HbA1c \leq 7.0\%$ or HbA1c $<4.0\%$, the correlation coefficients between GA and HbA1C were $0.823 (P<0.01)$, $0.756 (P<0.05)$ and $0.187 (P>0.05)$, respectively. There was statistical difference of the level of GA between healthy controls, individual at criticality and patients with DM($P<0.001$). The enzymatic measurement of GA was with the coefficients of variability of within-run and between-run less than 2% and 5% respectively and the correlation coefficient of linear range was 0.9987. **Conclusion** GA could be well correlated with HbA1c, especially in patients with poor control of blood glucose for a long time. The enzymatic measurement of GA was with fine precision and linearity.

Key words: diabetes mellitus, Type 2; hemoglobinA, glycosylated; glycated albumin

糖尿病(DM)是一种病因和发病机制尚未完全明了的内分泌代谢性疾病, 目前发病率仅次于心脑血管疾病和肿瘤。中国 DM 发病率为 2%~3%, 并以每年千分之一的速度增长。血糖(blood glucose, BG)监测是 DM 日常诊治工作中一个非常重要的环节, 良好的 BG 控制能有效延缓 DM 急、慢性并发症的发生和发展。糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)测定作为 DM 疗效判定和调整治疗方案的金标准已广泛应用于, 其检测值可反映 DM 患者既往 2~3 个月的平均血糖水平, 可用于评估 BG 控制效果临床^[1]。但由于血液中血红蛋白(hemoglobin, Hb)半衰期较长, 对于因并发症、贫血或慢性失血等疾病而导致红细胞更新率增加的 DM 患者, 和处于治疗方案调整期的患者或 DM 初发患者, HbA1c 不能准确反映近期的 BG 控制情况或及时反映短期内 BG 水平的变化。

糖化清蛋白(glycated albumin, GA)对短期内 BG 变化敏感, 能反映患者近 2~3 周内的平均 BG 水平^[2]。本研究旨在通过对 DM 患者 GA 与各项常用 BG 监测指标的相关性分析,

评估 GA 的酶法测定以及在 DM 人群中的临床应用意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集健康对照者 78 例, 年龄 19~61 岁, 肝、肾功能无异常, 空腹血糖(FPG) $<6.11 \text{ mmol/L}$ 、餐后 2 h 血糖(2hBG) $<7.77 \text{ mmol/L}$; 临界者组选取 2hBG $7.77 \sim 11.1 \text{ mmol/L}$ 或 FPG $6.11 \sim 7.0 \text{ mmol/L}$ 的体检者 30 例, 年龄 35~68 岁; 随机选取本院收治的 2 型糖尿病(T2DM)患者 147 例, 年龄 31~73 岁, 均符合 1999 年世界卫生组织(WHO)DM 诊断标准, 纳入 DM 组。

1.2 仪器与试剂 采用日立 7170s 全自动生化分析仪, BG 试剂(己糖激酶法)由北京康大泰科试剂公司提供, GA 液态酶法试剂由日本旭化成公司提供, HbA1c 试剂由北京九强公司提供。

1.3 检测原理

1.3.1 先用糖化氨基酸氧化酶消除样品中存在的内因性糖化氨基酸, 再利用特异性蛋白酶将 GA 水解为糖化氨基酸, 氨基酮氧化酶作用于产生的糖化氨基酸, 生成葡萄糖醛酸、氨基酸

* 基金项目: 总装预研课题(51308050223)。 △ 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。

和过氧化氢,生成的过氧化氢在过氧化物酶的作用下,与定量的色素和 4-氨基安替比邻生成蓝紫色色素,测定该色素的吸光度值,计算 GA 浓度。

1.3.2 用前处理液修饰血清清蛋白的 SH 基,然后与溴甲酚紫(BCP)作用生成蓝紫色结合体,测定其吸光度值,计算清蛋白浓度。

1.3.3 按下列公式计算 GA 值:

$$GA \text{ 值} = GA \text{ 浓度} / 清蛋白浓度 / 1.14 \times 100 + 2.9$$

1.3.4 采用己糖激酶法测定 FPG、2hBG,采用乳胶凝集抑制法检测 HbA1c。

1.4 方法 参照试剂盒提供的操作步骤,分别在全自动化生化分析仪上设置相应的检测程序,由仪器自动完成检测。每次测定同时用质控品予以监测。分别选择 GA 高值血清和低值血清评估酶法试剂精密度、线性等试剂性能。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,采用方差分析、相关分析和线性回归等统计方法。

2 结 果

2.1 精密度检测 按照美国临床实验标准委员会(NCCLS)EPS-T 评价要求,分别选择 GA 含量为 8.5%、14.6%、29.5% 血清 3 份,一份连续测定 20 次,另两份平行测定,每日分上下午各测一次,连续 20 d,将测定结果记录备案。结果 CV 值批内分别为:1.28%、1.32%、1.01%,平均 1.20%;批间 CV 分别为:3.29%、3.17%、2.71%,平均 3.06%。

表 1 各试验组 HbA1c、GA、FPG 和 2hBG 结果比较($\bar{x} \pm 2s$)

组别	n	HbA1c(%)	GA(%)	FPG(mmol/L)	2hBG(mmol/L)
健康对照组	78	5.39 ± 0.24	14.18 ± 2.12	5.26 ± 0.31	5.359 ± 1.25
临界者组	31	5.98 ± 0.45 *	15.38 ± 1.21 *	6.17 ± 0.61 *	7.520 ± 1.24 *
DM 组	147	7.21 ± 1.22 * #	19.84 ± 3.01 * #	8.42 ± 1.55 * #	17.020 ± 4.025 * #

*: $P < 0.001$, 与健康对照组比较; #: $P < 0.001$, 与临界者组比较。

2.7 相关性分析 对 147 例患者的相关性分析显示,GA 与 HbA1c 具有良好的相关性($r = 0.8687, P < 0.01$);GA 与 FPG、2hBG 呈正相关($r = 0.854, 0.836, P < 0.01$);HbA1c > 7.0%、4.0% ≤ HbA1c ≤ 7.0% 以及 HbA1c < 4.0% 时 GA 与 HbA1c 的相关系数 r 分别为 0.823($P < 0.01$)、0.756($P < 0.05$)和 0.187($P > 0.05$);健康者、临界者和 DM 患者间 GA 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

3 讨 论

DM 诊断及病情的监测主要依靠 BG 浓度的测定。大量研究表明,长期监测、有效控制 BG 水平有助于减少 DM 相关并发症的发生。目前国内应用于临床的 BG 监测指标包括静脉 BG、指尖快速 BG、2hBG、HbA1c、GA。由于 BG 含量易受饮食、药物、情绪等诸多因素影响,有时不能客观反映人体 BG 真实水平,致使一些 DM 患者的病情不能有效地进行控制,从而继发严重的 DM 并发症。在 DM 诊断方面,BG 是不可替代的绝对指标,但它只能提供某个时间 DM 控制的一个特定点的情况,即只代表即刻的 BG 水平,属于短期 BG 控制监测方法,并不能作为评价疾病控制程度的指标。

HbA1c 是 Hb 和葡萄糖之间经过缓慢的,不可逆的,非酶促反应而结合形成的产物,其浓度与红细胞寿命(平均 120 d)和该时期内 BG 平均浓度有关,不受每天 BG 波动的影响,也不受运动或食物的影响,与抽血时间及患者是否空腹、是否使用胰岛素等因素无关,可反映患者抽血前 2~3 个月的平均 BG 水平,可用于评估 BG 控制效果,是判断 DM 长期控制的良好指标。但由于在血液中 Hb 半衰期较长,其更新率对 HbA1c

2.2 线性测定 按照 NCCLS EPS-P 的评价方案^[3],选择 29.5% 和 8.5% 的高低混合血清各 2 份,然后把其中一份等量混合产生中间值 19.0%;中间值再与高低值等量混合,产生 24.3%、13.8% 等 5 个不同梯度值,在仪器上以低值到高值和高值到低值分别测定,计算再次算术平均值,以 X 作为理论值,Y 作为测定值进行回归分析,其回归方程为 $Y = 0.9810X + 0.1180, r = 0.9987$ 。

2.3 回收试验 把 GA 含量为 14.6% 的血清,分成 3 份,分别加入含量为 8.5%、14.9%、29.5% 的血清,用本法双份平行测定,计算回收率分别为 101.8%、98.5%、103.1%,平均为 101.1%。

2.4 干扰试验 取 1 份血清(GA 含量为 14.6%)分成 5 份,分别加入三酰甘油(TG),Hb,胆红素(TBIL),尿酸(UA),抗坏血酸,其终浓度分别为 TG 8.7 mmol/L, Hb 200 g/L, TBIL 561 μ mol/L, UA 3 000 μ mol/L, 抗坏血酸 500 μ mol/L, 用本法测定,结果各干扰物在上述浓度下对 GA 测定均无影响。

2.5 参考范围 检测 78 例健康对照者血清 GA 水平,计算获得 GA 参考范围($\bar{x} \pm 2s$)为(14.18 ± 2.12)%。

2.6 健康对照组、临界者组和 DM 组 HbA1c、GA、FPG、2hBG 检测结果方差分析 健康对照组与临界者组、DM 组间 GA 差异有统计学意义($P < 0.001$);临界者组与 DM 组间 GA 差异有统计学意义($P < 0.001$);健康对照组与临界者组、DM 组间 HbA1c、FPG、2hBG 差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

有一定影响,对于因并发红血病、贫血或慢性失血等疾病而抑制红细胞更新率增加的 DM 患者,和处于治疗方案调整期的患者或 DM 的初发患者,HbA1c 不能及时地反映患者近期的控制情况,故 HbA1c 不是诊断 DM 的敏感指标,不能取代现行的糖耐量试验,可作为 DM 的普查和健康检查。健康人群的 HbA1c 4.0%~7.0%。如果大于 11.5% 时,说明患者存在着持续性高 BG,可能出现 DM 肾病,动脉硬化,白内障等并发症。

GA 作为 DM 患者近期 BG 控制指标,在临幊上可作为 BG 及代谢情况的监测手段,对早期发现 DM、指导 DM 治疗有较大意义。GA 是清蛋白的 N-末端与葡萄糖发生非酶促反应的产物。在血清中二者首先形成不稳定的葡萄糖胺或 Schiff 碱,其浓度与葡萄糖浓度有关。该中间产物经历了不可逆的重排,形成稳定的糖蛋白。在人体内清蛋白能与葡萄糖不断结合,其结果与 BG 浓度的关系密切,同时也受到清蛋白的寿命影响。GA 不像 HbA1c 受 Hb 变异和红细胞更新率的影响,因此能迅速、灵敏、特异地评价、监控 DM 的疗效。近年来研究表明,GA 本身能诱导视网膜外周细胞的凋亡,可对视网膜视神经造成直接损伤,加重 DM 视网膜病变引起视力的丧失;在肾脏方面,有研究发现高糖化蛋白引起肾小球系膜细胞分泌 IV 型胶原明显增加,进而通过减少肾小球系膜细胞形成和增加系膜基质扩张而促进肾小球硬化,可能是导致 DM 肾病的重要病理因素^[4-6]。最早的 GA 测定法为日本学者研发的高压液相阴离子交换法(HPLC)^[7],可准确测定患者较短期内 BG 控制的总体水平,但由于其检测成本高,处理样本量小,不宜临床常规开展。固体酶法 GA 测定技术是最早由美国 Genzyme 公司推出的一种特

异性较高的 GA 测定方法,不仅大大简化了测定过程,也提高了检测效率、降低了运作成本^[8]。但临床应用中发现,对于输注高能量氨基酸的患者,检测结果升高。为此,在原有技术基础上开发出液态试剂(GA-L),在提高产品稳定性的同时,加用糖化氨基酸消去体系去除内源性糖化氨基酸对检测结果的影响,同时在血清清蛋白的测定上也进行优化,即利用对氧化性清蛋白特异性更高的 BCP 替代溴甲酚红蓝(BCG),减少球蛋白对测定结果的影响^[9]。然后利用 GA 与血清清蛋白的百分比表示 GA 的水平,从而去除了血清清蛋白水平对检测结果的影响,更适用于低蛋白血症患者。GA 和 HbA1c 均能体现近期的 BG 变化水平,而 GA 所能反应的 BG 变化时间更近,因此可认为 GA 能在 BG 变化最显著时更确切和及时地反映 BG 水平,尤其适用于 BG 波动较大的初诊患者应用降糖治疗时的疗效观察。

本研究显示,Lucica GA-L 试剂盒测定血清 GA 水平,不仅具有良好的精密度(批内 CV<2%,批间 CV<5%)及稀释直线性($r=0.9987$),且干扰因素少,能很好地区分 DM 和非 DM 患者($P<0.001$),同时表现出与 HbA1c、FPG 和 2hBG 良好的相关性($P<0.001$),试验结果显示 GA、HbA1c 与 FPG、2hBG 的 r 分别为 0.745、0.739 和 0.612、0.608。通过对 78 例健康志愿者 GA 的测定,得出 Lucica GA-L 法测定成人 GA 的参考范围为(14.48±2.12)%。综上所述,Lucica GA-L 法测定 GA 不仅简便、快速,且准确、可靠,适用于监测高危人群和 DM 患者近期整体 BG 水平,具有重要临床价值。本研究为能否通过 GA 检测提供早期干预治疗,使 DM 并发微血管病变早期得以控制提供了新的研究方向。

参考文献

[1] American Diabetes Association. Standards of medical care in dia-

(上接第 1919 页)

由于钾离子检测受溶血因素干扰较大,因此笔者仅进行了黄疸及脂血的干扰实验。以测定结果进行干扰率的换算,结果显示,脂血因其散色作用对试剂的干扰较大,在血红蛋白测定中三酰甘油浓度超过 5.62 mmol/L 及在钾离子测定中三酰甘油浓度超过 11.20 mmol/L 时的干扰尤为明显。而胆红素干扰实验结果显示,对二氧化碳测定的干扰较为明显,当其浓度在 175.60 $\mu\text{mol/L}$ 时,二氧化碳测定干扰率为 5.88%,其余指标偏差不大,总体来看试剂的抗干扰性能良好。同时在方法对比实验中,测定结果与干化学分析仪 Vitros-250 具有很好的相关性($r\geq 0.97$),说明本方法是可靠的。

在整体检测过程中,笔者采用了干试剂冻干于微型光谱仪配套的一次性使用自制检测杯内进行测定,使用蒸馏水统一作为稀释液进行样品稀释,并根据所需取相应量已冻干于检测杯中的试剂,直接以检测杯作为比色池进行透射式比色测定。整套系统的检测耗时不超过 15 min,并在测定过程中由系统自动进行磁力混匀及孵育,于指定波长下进行检测,通过电脑微处理快速得出结果,整套装置检测时间短,测定结果有效可靠,能够满足野外急救、现场快速检验需求^[13],同时为进一步研发急救便携式生化分析仪奠定了基础。

参考文献

[1] 蒲晓允. 现场快速检验[M]. 重庆:重庆出版社,2003:2-4.
[2] 陈水泳. 临床检验仪器的发展趋势[J]. 医疗装备,2008,21(4):5-6.

betes[J]. Diabetes Care, 2004, 27(Suppl1): S15-35.

- [2] Schleicher ED, Gerbitz KD, Dolhofer R, et al. Clinical utility of non-enzymatic glycosylated blood proteins as an index of glucose control[J]. Diabetes Care, 1984, 7(6): 548-556.
- [3] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-P User comparison of quantitative clinical laboratory using patient samples; proposed guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 1986.
- [4] Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, et al. Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2005, 68(4): 1554-1561.
- [5] Amore A, Cirina P, Conti G, et al. Amadori-configurated albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(1): 53-60.
- [6] Cohen MP, Lautenslager GT, Hud E, et al. Inhibiting albumin glycation at tenuates dysregulation of VEGFR2 and collagen IV sub-chain production and the development of renal insufficiency[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(2): 789-795.
- [7] Shima K, Ito N, Abe F, et al. High-performance liquid chromatographic assay of serum glycated albumin[J]. Diabetologia, 1988, 31(8): 627-631.
- [8] 吴建华,刘庆. 糖化血清蛋白(GSP)的自动化测定及临床意义[J]. 微循环学杂志,2003,13(2):26-27.
- [9] 贾珂珂,李国权,张捷. 酰胺氧化酶法测定糖化白蛋白的评价[J]. 中国实验诊断学,2010,14(10):1620-1623.

(收稿日期:2011-05-20)

- [3] 王前,郑磊,张鹏. 战地快速检验的现状和发展趋势[J]. 人民军医,2005,48(2):118-119.
- [4] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:125.
- [5] 白晓,李强,吴杰红,等. 基于微型光谱仪干化学法检测电解质的实验研究[J]. 解放军医学,2008,10(33):1262-1264.
- [6] 赵鹤皋. 冷冻干燥技术与设备[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2005:10-15.
- [7] Anhorn MG, Mahler HC, Langer K. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients[J]. Int J Pharm, 2008, 363(1-2): 162-169.
- [8] 叶解明. 基质效应及定标方式对氯电极测定的影响[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(1):16-18.
- [9] 李桂云. 标本溶血对 15 项生化检验结果的影响及分析[J]. 检验医学与临床,2006,3(4):164-165.
- [10] 吴俊琪,徐瑞龙,杜忠明,等. VITROS-250 干式生化分析仪测定结果的比对校正[J]. 检验医学,2006,21(3):285-287.
- [11] Grabowska I, Stadnik D, Chudy M, et al. Architecture and method of fabrication PDMS system for uric acid determination[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 121(20): 445-451.
- [12] 潘德刚. 基层部队半自动生化分析仪使用现状及建议[J]. 医疗卫生装备,2006,27(1):76.
- [13] 管文军. 便携式医学检测仪器的设计[J]. 中国医疗器械杂志,2002,26(5):323-328.

(收稿日期:2011-05-20)