

检验医学, 2006, 21(4): 429-431.

- [4] 李萍, 黄亨建, 刘小娟, 等. 常规生化检验的报告时间分析[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(6): 387-389.
- [5] 杨大千, 周云仙. 门诊病人检查的标本周转时间分析[J]. 中华医院管理杂志, 2005, 21(10): 698-699.
- [6] 张玉洪, 柏灵儿, 张莉萍. 住院患者急诊生化检验报告时间分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(24): 3344-3347.
- [7] 邓德耀, 李增安, 黄红兵, 等. 影响实验室生化结果回报时间的因

素探讨[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(9): 1136-1138.

- [8] 宋昊岚, 张水香, 彭志英. 生化检验的报告时间分析[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5): 27.
- [9] 李栋, 李艳, 余红, 等. 现代医院检验科“速度管理”的必要性[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(6): 344-345.

(收稿日期: 2011-12-09)

• 检验科与实验室管理 •

浅议糖化血红蛋白测定影响因素

杨燕¹, 邢文晓¹, 李贵连¹, 秦秀娟¹, 周琰¹, 崔文丽¹, 李真², 闫翠莲¹

(河北省石家庄市中心医院: 1. 检验科; 2. 病理科 050011)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.063

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2012)05-0629-02

糖化血红蛋白(GHb)是红细胞内的血红蛋白(Hb)与葡萄糖(Glu)间持续且不可逆的非酶促蛋白糖基化反应的产物。根据其带电荷的不同, 以电泳法分离得到糖基化的血红蛋白A1c(HbA1c)含量最高, 是糖尿病的重要检测指标。红细胞寿命一般为 120 d, 在细胞死亡前, 血液中的 HbA1c 含量保持不变, 与抽血时间、是否空腹无关。因此 HbA1c 反映过去 2~3 个月平均血糖水平, 能客观地代表慢性高血糖状态, 对评价糖尿病患者血糖控制方案及血糖控制水平具有重要的临床意义。HbA1c 测定的准确性直接关系到临床治疗效果, 保证 HbA1c 测定结果的准确性极其重要。本文将从以下几个方面阐述 HbA1c 测定中的各种影响因素。

1 标本处理方式的影响

1.1 抗凝剂种类 临床上常以乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管作为测定 HbA1c 的标准用管。据报道采用 EDTA-K₂ 抗凝管、枸橼酸钠抗凝管、肝素锂抗凝管对 HbA1c 检测结果无影响, 但肝素锂抗凝的全血检测结果略有偏高, 大约比 EDTA-K₂ 和枸橼酸钠抗凝标本高 0.5% 左右^[1]。这可能是由于 HbA1c 存在于红细胞中, EDTA-K₂ 与枸橼酸钠的抗凝机制是结合血浆中钙离子, 不影响 Glu 与 Hb 的结合, 而肝素锂抗凝全血所测结果略有偏高, 可能与标本含量偏少有关, 有待进一步探讨。

1.2 标本贮存条件 HbA1c 稳定性好, 变异率低, 个体内日间差小于 2%, 标本即使在室温下放置 3~14 d 也不会明显影响测定结果^[2-3]。潘玥等^[4]对不同温度条件下贮存的全血标本进行了检测, 证实全血标本 4~8 °C 保存 50 d 内, 检测结果与新鲜标本变异不明显; 在 17~23 °C 贮存第 7 天时, 所测结果则显著低于新鲜标本; 在 -20 °C 下贮存第 28 天时, 所测结果也显著低于新鲜标本。因此, 若全血标本不能及时测定, 需将其于 4~8 °C 保存, 并最好在 15 d 内进行测定, 此时 HbA1c 检测结果变异率小于 3%。

2 标本类型

HbA1c 检测可直接使用混匀的全血标本, 也可离心后使用纯红细胞标本。全血标本对 HbA1c 检测结果的影响大于纯红细胞标本。王瑶等^[5]建议, 采用免疫学方法测定 HbA1c 时, 为避免血浆中非特异性免疫物质的干扰, 以使用纯红细胞标本。对于免疫学方法以外的检测方法, 笔者更倾向于使用全血

标本, 因其还可同时检测总 Hb, 标本因素对二者的影响是一致的, 通过计算 HbA1c 百分比可消除标本因素的影响。

3 患者自身因素的影响

3.1 贫血患者 由于 HbA1c 反映过去 2~3 个月平均血糖水平, 因此, 影响红细胞寿命的疾病均可对 HbA1c 测定产生影响。如溶血性贫血患者, 红细胞生存期缩短, 导致检测值偏低; 缺铁性贫血患者, 红细胞生存期延长, 则导致测定值偏高; 此外, 部分手术后或大量失血患者由于红细胞大量丢失, HbA1c 检测结果也不能代表真实状况。

3.2 特殊情况下的糖尿病患者 在部分发病迅速的 I 型糖尿病患者中, 由于血糖在短期内达到高水平, 而 HbA1c 的合成是由 Glu 的游离醛基连接到 Hb β 链 N-末端缬氨酸上, 或与 Hb 上的游离赖氨酸形成 Schiff 碱, 然后经过 Amadori 分子重排, 形成稳定的糖基化产物, 该反应过程极为缓慢, 需数周才能与血糖达到平衡。此时, HbA1c 的水平往往正常或轻度升高, 并不能完全反应急速增高的血糖水平。

3.3 肾病患者 由于严重的肾病患者体内存在高浓度的尿素, 而尿素可自发地分离形成氨和氰酸盐, 氰酸盐经质子化作用后形成异氰酸, 异氰酸与蛋白质的 α 和 ε 氨基基团反应形成氨基甲酰。Hb β 链 N 端的缬氨酸可与异氰酸发生特异性的结合反应, 形成稳定的氨基甲酰血红蛋白(caHb)。caHb 与 HbA1c 的等电点相似, 对依据电荷原理检测 HbA1c 的方法, 如电泳法形成干扰, 造成结果假性偏高。若患者体内的 caHb 浓度超过 5.4%, 就会使离子交换法测定 HbA1c 发生极大的假性偏高^[6]。

3.4 黄疸和高脂血症患者 用电荷分离法检测因溶血形成的黄疸样本时, 因胆红素与快速血红蛋白同时移动, 且易吸收测定波长, 导致 HbA1c 值假性升高。高脂血症患者血浆标本呈乳糜状, 也会导致 HbA1c 假性升高, 因为乳糜会与 HbA1c 的第 1 片段一起洗脱并在 415 nm 波长处存在吸收效应。

3.5 患者年龄与种族 HbA1c 与空腹血糖呈正相关, 而空腹血糖水平随年龄增长有所增高, 因此 HbA1c 检测结果也随之发生变化^[7-8]。Pani 等^[9]的研究表明, 年龄每增加 1 岁, HbA1c 将增加 0.012% 或 0.010%。HbA1c 不仅与年龄呈正相关, 也与种族有关^[10]。种族差异对 HbA1c 影响的原因及意义尚不明确。但 Herman 等^[11]的调查显示, 白种人 HbA1c 平均水平

为 5.78%，西班牙人为 5.93%，亚裔美国人为 6.00%，美洲印第安人为 6.12%，非洲裔美国人为 6.18%，其他种族的 HbA1c 水平都较白人高。

4 方法学的影响

目前常用的 HbA1c 测定方法是离子交换层析法、亲和层析法及免疫法。日本积水医疗株式会社最新推出的酶法检测技术则是 HbA1c 测定方法的突破。

4.1 离子交换层析法 离子交换层析法基于不同组分所带电荷不同而进行组分分离。采用弱酸性阳离子交换树脂，以低离子强度和接近中性 pH 条件的洗脱液，使 HbA1c 几乎不带正电荷，使其在 HbA 前先洗脱；而 HbA 带正电荷，可用高浓度洗脱液将其洗出，通过色谱分析，得到 Hb 层析谱，计算 HbA1c 面积占 Hb 总面积的百分比，即可确定 HbA1c 值。此法虽可测定 HbA1c，但测定结果易受 HbA1c 前体 (Schiff 碱) 干扰。Schiff 碱是 Glu 与 Hb 分子的游离赖氨酸结合形成的，该过程迅速且可逆；当机体血糖浓度增高时，不稳定的 Schiff 碱增多，导致其在低离子强度洗脱液中含量增加，使 HbA1c 测定值偏高。近年来多采用离子交换高效液相色谱法 (HPLC) 测定 HbA1c，不仅提高了柱的分离能力，克服了 pH 值、温度和 Hb 变异体的影响，且精密度极高，批内变异系数基本可控制在 2% 以下^[10]。此法已被美国国家糖化血红蛋白标准化计划 (NGSP) 推荐为参考方法，是目前公认的金标准^[12]。

4.2 亲和层析法 亲和层析法利用硼酸盐能够可逆性结合整合在 Hb 分子上的葡萄糖的 1,2-顺位二醇基。未糖基化的 Hb 不与硼酸盐结合，在层析中先通过，加入高浓度的包含 1,2-顺位二醇基的多羟基复合物 (如山梨醇)，则 HbA1c 与硼酸盐的结合被山梨醇替换，从而被洗脱下来，再进行测定。该法不仅测定 β 链 N-末端糖基化的 Hb，还测定 α 链 N-末端以及其他氨基酸残基糖基化的 Hb，因此测定的是总 GHb^[10]。亲和层析法的优点是不易受其他物质干扰，如 HbA1c 前体、Hb 变异体 (HbF、HbS 和 HbC)，但 CLC330/385 亲和层析柱的测定结果偏低，尤其当 HbF > 20% 时，可导致 HbA1c 值下降 1%，甚至更多，可能与 HbF 的糖化速率较 HbA 更慢有关^[13]。

4.3 免疫法 免疫法是以 HbA1c 作为抗原，采用单克隆抗体特异性识别 HbA1c 的 β 链 N-末端最后 3~4 个氨基酸组成的抗原表位，通过比色或比浊测定 HbA1c 含量，再测定 Hb 含量，最后计算 HbA1c 在 Hb 中所占百分比。此法虽然特异性好，但对高浓度样本不可避免地存在后带现象，需要对样本进行稀释。理论上，此法不受 Hb 变异体的影响，但实际检测结果则相反。如 HbF 可使 DCA-2000 免疫法的测定值偏低，因为在 HbF 分子中，HbA 的 β 链被 γ 链取代，而 γ 链氨基端起始的几个氨基酸与 β 链不同，特异性的单克隆抗体不能与 HbF 糖化位点相结合，但总 Hb 却包括了 HbF。

4.4 酶法 酶法检测原理是将全血制成溶血液，用特异性蛋白内切酶将 Hb 酶解消化成果糖基氨基酸，后者在果糖基氨基酸氧化酶的作用下产生过氧化氢 (H_2O_2)， H_2O_2 浓度与血液中 HbA1c 含量成正比， H_2O_2 在过氧化物酶催化下与色素元指示系统反应，根据颜色变化程度可得 H_2O_2 浓度，从而得知样本中 HbA1c 含量，并同时测定同一份消化液的总 Hb 浓度，计算 HbA1c 和总 Hb 浓度比值，即为 HbA1c 结果。此法反应灵敏、特异，可使用全自动生化仪检测，不需昂贵的仪器。与常规 HPLC 和免疫法有很好的相关性^[14]。HbA1c 酶法检测试剂说明书提供的线性范围上限可达 16%，而高浓度临床标本

HbA1c 只达 12.9%，可以满足临床要求。李义龙等^[15]报道，高浓度的维生素 C、溶血素、胆红素和乳糜对 HbA1c 酶法测定值的干扰率均小于 5%，即维生素 C 浓度小于 500 mg/L、溶血素小于 5 000 mg/L、胆红素小于 400 mg/L 和乳糜小于 2.0% 对 HbA1c 测定值均无明显干扰。由于此法应用于临床的时间不长，还需对实际应用中存在的问题进行总结和研究。

5 结 语

多种因素均可造成 HbA1c 检测值假性升高或降低，这不仅与检测方法有关，也与患者状况和标本处理方式等有关。因此，开展 HbA1c 检测标准化工作极为重要，这将直接影响到采用 HbA1c 评估患者平均血糖浓度的准确性。实验室应认真进行质量管理，重视检测的所有过程，充分满足分析中各环节的质量要求，为糖尿病筛选、诊断、血糖控制、疗效观察提供准确、有效的检测结果，从而更好地服务于临床和糖尿病患者。

参考文献

- [1] 史晓丹,蔡淑敏.不同的采血时间不同的抗凝剂对糖化血红蛋白测定的影响[J].中国社区医师:医学专业,2011,13(1):129.
- [2] Rohlfing C,Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glycohemoglobin[J]. Clin Chem, 2002, 48(13): 1116-1118.
- [3] Little R, Rohlfing C, Tennill AL, et al. Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement: evaluation of five different high performance liquid chromatography methods[J]. Diabet Technol Thera, 2007, 9(1): 36-42.
- [4] 潘玥,何泳,史亚明.全血标本的贮存条件对糖化血红蛋白测定结果的影响[J].中国全科医学,2010,9(13):2988-2989.
- [5] 王瑶,谭炜.分析前标本不同处理方式对糖化血红蛋白检测结果的影响[J].检验医学与临床,2010,10(7):2216.
- [6] 索艳,李强.糖化血红蛋白测定方法及影响因素的研究进展[J].医学研究生学报,2010,23(2):211-212.
- [7] 史新辉,任君,谭琳琳,等.229例糖尿病患者血糖与糖化血红蛋白的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(5):493-494.
- [8] 张清松,苏衍卿,陈敏,等.血糖、C-肽及糖化血红蛋白间相关性分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(10):1026-1027.
- [9] Pani LN, Korenda L, Meigs JB, et al. Effects of aging on A1C levels in individuals without diabetes[J]. Diabetes Care, 2008, 31(21):1991-1996.
- [10] 纪立农,宁光.糖化血红蛋白[M].北京:人民卫生出版社,2010:13-14,127-128,128-129.
- [11] Herman WH, Ma Y, Uwaifo G, et al. Racial and ethnic differences in hemoglobin A1c among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program[J]. Diabetes Care, 2007, 30(23):2756-2758.
- [12] 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].上海:上海科学技术文献出版社,2007:161,176.
- [13] Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c"[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8): 1081-1082.
- [14] 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(10):465-466.
- [15] 李义龙,单战海,韩冰,等.酶法糖化血红蛋白试剂盒方法学比评价[J].中国实验诊断学,2010,8(14):1337-1338.