

• 临床检验研究论著 •

HbA1c 体外代谢动力学研究

沈雄文, 孙关忠, 李静云, 胡云华, 裘敏丽

(中国人民解放军第 117 医院检验科, 浙江杭州 310013)

摘要:目的 探索 HbA1c 与血糖浓度动态变化的规律, 建立 HbA1c 反映血糖控制情况的理论基础。方法 红细胞在不同浓度葡萄糖生理盐水中孵育, 测量不同时间段不稳定型糖化血红蛋白(L-HbA1c)和稳定型糖化血红蛋白(S-HbA1c)值的变化, 观察 L-HbA1c(1~24 h)和 S-HbA1c(1~48 h)浓度变化, 计算两者初级反应时的生成速率, L-HbA1c 合成的平衡常数及 L-HbA1c 与 S-HbA1c 转换比。结果 L-HbA1c 升高程度随葡萄糖浓度的增加而增加。在 4~8 h 达到最大, 至少在 8~20 h 内稳定, 在孵育的前 2 h 期间, L-HbA1c 浓度增加呈线性, 平均生成速率为 0.033%/h/mmol 葡萄糖/L; L-HbA1c 在无葡萄糖的生理盐水中减少到孵育前浓度, 平均降解速率为 0.018%/h/mmol 葡萄糖/L, 平衡常数为 1.83; S-HbA1c 升高程度随葡萄糖浓度的增加呈线性增加, 平均生成速率为 0.003%/h/mmol 葡萄糖/L; 在无葡萄糖环境中, S-HbA1c 浓度在 24 h 内无显著变化。结论 通过对 HbA1c 体外代谢动力学的初步探索, 证实血糖控制较为稳定的 2 型糖尿病患者主要是由于餐后-空腹血糖差造成 HbA1c 水平差异较大而且还可推算出治疗后 HbA1c 的急剧变化和平均滞后时间。

关键词:血糖; 血红蛋白 A, 糖基化; 动力学; 体外研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)24-2988-02

Research on HbA1c in vitro metabolic kinetics

Shen Xiongwen, Sun Guanzhong, Li Jingyun, Hu Yunhua, Qiu Minli

(Department of Clinical Laboratory, NO. 117 Hospital of PLA, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract: Objective To explore regularities of HbA1c and glucose concentration dynamic changes, establishing theoretical basis in HbA1c reflects the status of controlling blood glucose. **Methods** Red blood cells were incubated in physiological saline solution(PSS) with different concentrations of glucose, to measure the changes in different time for the L-HbA1c and S-HbA1c level, and to drawing glucose concentration vs T-HbA1c% curve. Observed in L-HbA1c(1-24 h) level and S-HbA1c(1-48 h) level changes, Calculated their formation rate of the primary reaction, the equilibrium constant of L-HbA1c synthesis reaction and L-HbA1c turn to S-HbA1c conversion ratio. Equilibrium constant is the ratio synthesis rate and degradation rate. **Results** L-HbA1c level increased with increasing concentration of glucose, attained the maximum in 4-8 hours, stabilized in 8-20 hours, first two hours after begin incubated, L-HbA1c level increased linearly, average rising rate was 0.033%/h/mmol glucose/L; L-HbA1c level will reduce in PSS without glucose till L-HbA1c level return to pre-incubated, average decreasing rate was 0.018%/h/mmol glucose/L. Equilibrium constant was 1.83; S-HbA1c level increased linearly with increasing concentration of glucose, average rising rate was 0.003%/h/mmol glucose/L; S-HbA1c level in PSS without glucose was no significant change in 24 hours. **Conclusion** Through preliminary study on HbA1c in vitro metabolic kinetics, understanding of stable glycemic control in 2 type diabetes patients who HbA1c difference is due to fasting - postprandial glycemic disparity. It also can be calculated dramatic changes and the lag time for HbA1c attain balance after treatment.

Key words: blood glucose; hemoglobin A, glycosylated; kinetics; in vitro

自 1969 年糖化血红蛋白首次被鉴定^[1]以来, 就受到广泛的关注, 临床以糖化血红蛋白(HbA1c)作为观察指标, 显示其与糖尿病并发症风险存在强烈相关性^[2]。对于大部分糖尿病患者的一般控制目标为 7.0%。1986 年开始的 HbA1c 标准化测量直到 2009 年才得以确定^[3]。在此基础上美国糖尿病协会(ADA)和世界卫生组织(WHO)先后在 2010 年和 2011 年首次将 HbA1c 与空腹血糖、餐后 2 h 血糖一起推荐为糖尿病的诊断项目^[4-5]。然而, 在临床实际应用中, 出现 HbA1c 与血糖浓度严重不符的现象。本研究对 HbA1c 进行体外代谢动力学的实验, 探索 HbA1c 与血糖浓度动态变化的规律。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集体检健康者静脉血液, EDTA-K₂ 抗凝处理, 置 4℃ 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 日本 Tosoh 公司 HLC-723G8 型全自动糖化血红蛋白分析仪及配套试剂; 美国 Abbott 公司 AEROSSET

全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 葡萄糖生理盐水溶液制备 分别溶解 1、2、4、8 g 葡萄糖于 1 L 生理盐水中, 葡萄糖浓度分别为 5.56、11.11、22.22、44.44 mmol/L。

1.3.2 测量方法 肝素抗凝全血 20 mL, 用生理盐水清洗 3 次, 制成血红蛋白浓度为 150 g/L 的红细胞悬液, 以 1:250 的比例置于浓度为 5.56、11.11、22.22、44.44 mmol/L 的 500 mL 葡萄糖生理盐水溶液中, 37℃ 孵育。在 0、0.5、1、2、4 h 时各测量 1 次 HbA1c, 然后每 4 h 测量 1 次, 每次 3 份, 取均值。孵育 4 h 后分别另取 10 mL 红细胞悬液, 用生理盐水洗涤 3 次后, 再用生理盐水将洗涤红细胞补足至 10 mL, 然后每 1 h 测量 1 次 HbA1c, 重复 2 次, 取均值。孵育 48 h 后再各取出 10 mL 红细胞悬液, 用生理盐水洗涤 3 次后, 再用生理盐水将洗涤红细胞补足至 10 mL, 然后每 1 h 测量 1 次 HbA1c, 重复 2 次, 取均

值。至 48 h 后分别测量各溶液葡萄糖浓度。各系列溶液葡萄糖浓度变化在 (± 0.5 mmol/L) 内判定浓度无显著改变。观察不稳定型 HbA1c(L-HbA1c)(1~24 h) 和稳定型 HbA1c(S-HbA1c)(1~48 h) 浓度变化。

1.3.3 计算公式 L-HbA1c 生成速率=(孵育 2 h 时的 L-HbA1c 百分浓度-0 h 时的百分浓度)/(2 h \times 葡萄糖溶液浓度 mmol/L); HbA1c 生成速率=(孵育 2 h 时的 L-HbA1c 百分浓度-0 h 时的百分浓度)/(2 h \times 葡萄糖溶液浓度 mmol/L); L-HbA1c 降解速率=(无葡萄糖生理盐水中孵育 8 h 时的 L-HbA1c 百分浓度-4 h 时的百分浓度)/(4 h \times 原溶液葡萄糖浓度 mmol/L); 平衡常数为生成速率与降解速率之比; L-HbA1c 与 S-HbA1c 转换比估算为 L-HbA1c 合成速率与 S-HbA1c 合成速率之比; 计算两者初级反应时的生成速率, L-HbA1c 合成的平衡常数及 L-HbA1c 与 S-HbA1c 转换比。

2 结 果

2.1 L-HbA1c 短期(1~24 h) 浓度变化 红细胞在 4 种浓度葡萄糖生理盐水溶液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育, L-HbA1c 升高的程度随葡萄糖浓度的增加而增加。在 4~8 h 达到最大, 至少在 8~20 h 内稳定, 在孵育的前 2 h 期间, L-HbA1c 浓度增加呈线性, 平均生成速率为 0.033%。孵育 4 h 后置无葡萄糖的生理盐水中, 37 $^{\circ}$ C 条件下 4~8 h L-HbA1c 在无葡萄糖的生理盐水中减少到孵育前浓度。L-HbA1c 平均降解速率为 0.018%/h/mmole 葡萄糖/L。L-HbA1c 平衡常数为 1.83。

2.2 S-HbA1c 短期(1~48 h) 浓度变化 红细胞在 4 种浓度葡萄糖生理盐水溶液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 在 2 h 后 S-HbA1c 开始升高, 升高的程度随葡萄糖浓度的增加呈线性增加。平均生成速率为 0.003%/h/mmole 葡萄糖/L。孵育 48 h 后, 置无葡萄糖的生理盐水中, S-HbA1c 的浓度在 24 h 内无显著变化。L-HbA1c 与 S-HbA1c 转换比为 0.033%:0.003% = 11:1。

2.3 实验期间, 各系列葡萄糖溶液内葡萄糖浓度均无显著下降。

3 讨 论

HbA1c 在体外各系列葡萄糖生理盐水溶液中, 模拟血糖环境浓度变化探讨对 HbA1c 的影响, 发现血糖浓度升高首先使 L-HbA1c 浓度线性升高, 持续约 2、4 h 内百分含量基本能与血糖浓度同步; 血糖浓度降低则使 L-HbA1c 在 4 h 内线性降低, 相位延迟时间约为 2~4 h, 其生成速率明显高于解离速率(0.033%/h/mmole 葡萄糖/L > 0.018%/h/mmole 葡萄糖/L), 平衡常数为 1.83。相同环境下, S-HbA1c 的形成速率较慢, 但无显著的可逆过程。L-HbA1c 与 S-HbA1c 转换比为 11:1。这解释了糖尿病控制过程中 L-HbA1c 水平急剧变化, 而 S-HbA1c 变化相对缓慢的原因。

文献[6]提出, 对于血糖控制较为稳定的 2 型糖尿病患者, 其 HbA1c < 7.3%, 餐后高血糖对 HbA1c 的贡献最高达到 70%; 对于血糖控制较差的患者, HbA1c \geq 9.3%, 空腹高血糖是主要贡献者; HbA1c 在 7.3%~9.3% 的患者, 空腹和餐后高血糖的贡献大致相当。对于 2 型糖尿病患者血糖控制情况, 空腹血糖和餐后血糖对 HbA1c 的贡献形成一个渐次变化的状况。

这里涉及到血糖时间节点的定义: 开始摄入膳食后的 4 h 为餐后阶段。此阶段, 食物中的碳水化合物被酶逐渐水解; 尽管胰岛素快速响应, 使餐后血糖在 2 h 内回复到基线水平, 但

吸收过程将持续到餐后 4 h。此后的 6 h 为吸收后阶段, 在此期间正常个体通过在餐后阶段贮存的肝糖原降解使血糖稳定在正常范围内, 真正的空腹阶段是在吸收后阶段结束, 在最近一次开始摄入膳食后约 10~12 h。在空腹阶段, 血糖通过糖异生被维持在接近正常的水平。对于 3 餐时间相对固定的正常饮食个体, 24 h 能被分为空腹、餐后和吸收后 3 个阶段。餐后阶段的时间约为 12 h, 因此, 人类有一半的时间是处于餐后阶段。真正空腹的时间是在凌晨有限的 3~4 h。

从 HbA1c 动力学的角度观察, 血糖控制较为稳定的患者, 升高的 HbA1c 是基于餐后高血糖引起的 L-HbA1c 积累逐渐转化, 餐后 2~4 h 的血糖浓度将决定此类患者 HbA1c 水平。假设患者空腹血糖为 6.0 mmol/L, 餐后 2~6 h 血糖为 16.0 mmol/L, 在此期间, 将净增加 0.12% 的 HbA1c。因此, 对于血糖控制较为稳定的 2 型糖尿病患者, 餐后-空腹血糖差是决定 HbA1c 水平的重要因素。对于血糖控制不理想者, 持续的高血糖将掩盖患者偶尔出现的低血糖发生, 导致严重后果, 这是使用 HbA1c 评估疗效时必须注意的问题。

HbA1c 动力学对于 2 型糖尿病患者疗效评估的观察。假设患者经治疗后, 平均血糖浓度由 15 mmol/L 下降为 7.5 mmol/L, 根据公式^[7]: $eAG(\text{mmol/L}) = 1.59 \times \text{HbA1c} - 2.59$ 计算得到 HbA1c 的估算 % 浓度为治疗前的 11.1% 和治疗后的 6.3%。红细胞平均寿命以 120 d 计, 则每天代谢的 S-HbA1c 为 1/120, 即 0.83%, S-HbA1c 合成的平均速率为 0.003%/h/mmole 葡萄糖/L, 每天合成的 S-HbA1c 为 0.54%, 则 S-HbA1c 需要 16.6 d 左右达到稳定, 平均血糖变化越大, 则达到平衡所需要的时间越长。这与临床上的认知较为符合。

通过对 HbA1c 体外代谢动力学的实验研究, 可以初步了解 HbA1c 随血糖变化的具体状况, 同时也为 HbA1c 所反映血糖情况的滞后性提供了理论依据, 并以此推算平均血糖改变后 HbA1c 达到平衡所需要的时间。为进一步探索 HbA1c 的临床应用确立了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Jandric Balen M, Lukenda V, Jandric I, et al. HbA1c - overall glycemia marker and hemolytic anemia indicator[J]. Med Glas Ljek komore Zenicko-dobojska kantona, 2012, 9(2): 406-408.
- [3] Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement; from chaos to order for improving diabetes care[J]. Clin Chem, 2011, 57(2): 205-214.
- [4] American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2010[J]. Diabetes Care, 2010, 33(1): S11-61.
- [5] 许文, 许惠根, 苏炳森. 糖化血红蛋白含量与糖尿病的相关性研究[J]. 国际医药卫生导报, 2012, 18(9): 1323-1325.
- [6] 陈雪梅, 汤国培, 赵赞. 糖化血红蛋白与空腹血糖变化的关系探讨[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(13): 1747.
- [7] Nathan DM, Kuenen J, Borg R, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values[J]. Diabetes Care, 2008, 31(8): 1473-1478.