

糖化清蛋白的检测方法及其临床应用研究进展*

胡 婷 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: 糖化清蛋白; 糖尿病; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0444-03

随着人们生活水平的提高, 糖尿病(特别是 2 型糖尿病)患者有迅速增长的趋势。视网膜、肾、神经等组织并发症的发生是糖尿病患者致残和致死的主要原因。严格控制糖尿病患者的血糖可以有效地预防各种并发症的发生与发展。目前临床实验室检测用于监测血糖浓度的常用指标有空腹血糖、餐后 2 h 血糖、糖化血清蛋白(GSP)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、糖化清蛋白(GA)等。GA 是近年来提出的对糖尿病患者血糖监测的新指标。现就 GA 的生理特性、检测方法、检测方法的影响因素、临床应用及研究进展做一简要综述。

1 GA 的生理特性

GA 是血中葡萄糖与血浆中清蛋白发生非酶促反应的产物。糖化是一个缓慢的非酶促反应, 最初只是葡萄糖及其衍生物与清蛋白分子上非离子型的 ϵ 或 α -氨基与醛糖上羰基形成不稳定加合物即席夫碱。这是一个可逆反应, 席夫碱既可解离为蛋白质与醛糖, 又可通过转位重排生成较稳定的酮胺。再通过分子的重排、氧化、聚合以及分裂使得分子不可逆的连接, 形成终末糖基化产物。相对血浆中其他蛋白而言, 清蛋白的半衰期较长并且浓度最高, 所以最容易被糖化。

2 GA 的检测方法

GA 的检测方法按原理主要分为三大类: 第一类基于其所带电荷不同, 包括阳离子交换层析法和电泳法; 第二类基于其糖化基团的结构不同, 包括亲和层析法和免疫学方法; 第三类为化学反应方法, 包括比色法和酶法。不同方法检测 GA 的结果不同, 造成这样的原因主要是对 GA 水平的定义不同。在 GA 的测定方法中有的测定测定糖化氨基酸, 而即使测定的是糖化氨基酸, 其测定的糖化部位也可以不同。

高效液相色谱法(HPLC)是一种可以定量测定 GA 的敏感方法, 其测定的糖化部位是与血糖共价结合的赖氨酸残基。HPLC 法测定 GA 代价高昂, 处理样本量小, 不适宜临床常规开展而未得到广泛应用。丙烯酰胺凝胶电泳、亲和层析也因其成本较高、操作较繁琐, 故不适合应用于常规工作中。上述方法测定结果表示为 GA 峰面积与总的清蛋白峰面积之比。

酶联硼酸盐免疫法(ELBIA)是通过苯基硼酸盐与 GA 抗体结合的 GA 发生反应从而测定 GA 的免疫学方法。放射免疫法检测 GA 的原理是将 GA 预先通过硼氢化钠(NaBH₄)处理, 然后使用¹²⁵I 标记的抗体直接与 GA 外衣的山梨醇赖氨酸表位发生反应。由于该法测定时存在放射性物质对人体有害故不推荐使用。ELBIA 法和其他免疫学方法测定 GA 是用糖化氨基酸的浓度与总的清蛋白浓度的比值表示, 但由于使用的抗体特异性不同导致 GA 测定结果存在差异。

硫代巴比土酸法(TBA)是一种测定 GA 常见的比色方法。该法通过水解作用可以将葡萄糖和清蛋白共价结合的桥梁结构 5-羟甲基糠醛(5-HMF)分离出来, 从而使 5-HMF 与硫代巴比土酸发生反应, 即可测出 GA 的量。但该法中 HMF 不耐热并且游离的葡萄糖会造成干扰。近年由日本开发研制的应用液态试剂的酶法检测(Lucica GA-L 试剂), 消除了内源性糖化氨基酸的影响, 通过改良溴甲酚紫法(BCP)进行测定, 更加特异性地测定清蛋白, 该法的性能评价已经有研究报道^[1]。该法不仅分析速度快而且很多大、中型医院所配备的生化分析仪都可以进行 GA 测定。并且液态试剂的使用减少了溶解处理, 可操作性强。目前液态酶法对 GA 的检测被认为实验室应用最简便, 最快捷, 最好的方法。TBA 法和酶法测定的是糖化氨基酸, 表示为糖化氨基酸的浓度与总的清蛋白浓度的比值。其中酶法可以测定 GA 所有的糖化部位并且被推荐为最适合测定 GA 的方法。

研究表明通过使用标记¹⁶O/¹⁸O 和基质辅助激光解吸/飞行电离时间质谱法(MALDI-TOF MS)可以获得清蛋白被糖化的相关数据, 它可以检测到发生极少糖化的人类血清清蛋白结构中, 清蛋白与葡萄糖分子共价结合的不同区域的改变^[2]。

3 GA 检测的影响因素

3.1 清蛋白更新速度 血液清蛋白的更新速度在相同的血糖情况下, 血液清蛋白更新速度越快其 GA 水平越低, 血液清蛋白更新速度越慢其 GA 水平越高。因此一些影响血更新清蛋白速度的疾病都将影响 GA 水平, 如肝硬化、肾病综合征、甲状腺功能异常等。在评估伴有清蛋白转化异常的糖尿病患者 GA 水平时要考虑该因素。

3.2 人体质量指数(BMI) 受肥胖个体的清蛋白的更新速度快和肥胖个体的清蛋白水平较高等原因影响, BMI 越高则 GA 水平越低, 反之亦然。与非肥胖的非糖尿病儿童相比, 肥胖的非糖尿病儿童的 GA 水平较低^[3]。由此可见, 这种 BMI 和 GA 的负相关性不仅存在于成年, 也存在于儿童。所以在分析临床 GA 值时, 需考虑到 BMI 的因素, 尤其对肥胖和消瘦的患者。

3.3 甲状腺激素 甲状腺激素能够促进清蛋白的分解而清蛋白的更新速度影响 GA, 所以甲状腺激素对 GA 水平有影响。GA 与促甲状腺激素(TSH)呈正相关, 与血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)及游离甲状腺素(FT₄)呈负相关; 甲状腺功能减退时, GA 测定结果升高; 甲状腺功能亢进时, GA 测定结果降低^[4]。当糖尿病合并甲状腺功能不全时, 需要考虑该因素的影响。

3.4 超敏 C-反应蛋白(hs-CRP) hs-CRP 是一种炎症因子,

* 基金项目: 中山市科技计划项目(20122A034)。 作者简介: 胡婷, 女, 检验技师, 主要从事临床生物化学与检验的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: swan4130@163.com。

而炎症可降低清蛋白合成率、提高清蛋白的分解代谢率使清蛋白更新速度加快,所以 GA 的水平与 hs-CRP 呈负相关。尿酸是动脉粥样硬化的危险因素之一,它可以引起慢性炎症从而使人体内 hs-CRP 的水平升高而 GA 的水平降低,所以高尿酸血症患者其 GA 水平偏低^[5]。同样,长期吸烟者以及高三酰甘油血症患者其 GA 水平也是偏低^[6-7]。

3.5 种族 GA 存在种族差异,研究发现美籍白种人 GA 水平比黑人低^[8]。关于 GA 筛查糖尿病的诊断切点,我国和日本的研究就存在差异。关于不同种族间 GA 差异的程度还有待与进一步的研究。

3.6 GA 检测标本保存条件 标本的测定结果可随标本贮存时间的延长而逐渐降低或升高,因为被测定物质降解或者生成增加。据报道测定 HbA1c 标本 -70℃ 可以保存 25 年,并且研究表明 GA 与 HbA1c 的相关性良好。以 GA 为例,通过测定来源于糖尿病控制与并发症试验(DCCT)90 份冰冻 19~23 年的标本和 90 份新鲜标本的 GA,而这 180 份标本的 HbA1c 值都是新鲜标本时立即测定的并且涵盖了各个浓度范围。然后将冰冻标本和新鲜标本 GA 分别与 HbA1c 作线性回归分析,结果显示:两者之间无显著差异。通过上述分析得出酶法测定 GA 的标本 -70℃ 可以稳定 23 年^[9]。

4 GA 的临床应用

GA 是心血管疾病发生的一项独立危险因素,血糖控制差的 1 型糖尿病患者 GA 可改变巨噬细胞基因的表达,减少 ABCA-1 介导的胆固醇逆运输,使得细胞内脂质堆积,从而导致动脉粥样硬化^[10]。1 型和 2 型糖尿病的 GA 水平长期波动幅度大,则其患微血管疾病的风险增加^[11]。可见 GA 与糖尿病并发症发生、发展关系密切,对于糖尿病患者而言 GA 的检测显得极其重要。

4.1 评价短期血糖控制的水平 GA 水平反映的是近 2~3 周内的平均血糖水平,当在较短时间内血糖控制水平出现变化时,GA 可以及时反映血糖控制的水平。研究显示,在接受胰岛素治疗但血糖控制效果欠佳的 2 型糖尿病患者中,分别监测 2 周时间的 HbA1c 水平和 GA 水平,结果 HbA1c 水平仅从 10.9% 下降至 10.0%,而 GA 水平从 35.6% 下降至 25.0%。可见 GA 的下降幅度为 HbA1c 下降幅度的 10 倍以上,因此 GA 能够比 HbA1c 更好地反映血糖控制水平受治疗因素的影响而出现短期变化^[12]。所以 GA 是一个评价短期血糖控制水平的理想指标,尤其是对于糖尿病患者治疗方案调整后疗效的评价,还适用于出院患者的复诊开药以及长期随访。

4.2 筛查糖尿病 GA 可以作为筛查糖尿病的一项常规指标,同时检测 GA、空腹血糖和餐后 2 h 血糖可以提高糖尿病的筛查率。GA 异常提示着糖尿病高危人群需做进一步确证检查,特别是对于一些空腹血糖正常者其意义更大。上海市糖尿病研究所以及日本都有类似研究,运用该指标可以筛查出大部分未经诊断的糖尿病患者。

4.3 辅助鉴别应激性高血糖 在急性应激情况下如外伤、感染等,患者容易出现高血糖,此时难以与糖尿病鉴别。同时检测 GA 和 HbA1c 有助于判断高血糖的持续时间,确定患者是否有糖尿病史,然后客观地评估糖代谢紊乱发生的时间及严重程度以指导诊治^[13]。研究表明,40% 非糖尿病的骨折外伤患者高血糖被发现为隐匿性糖尿病,而 GA $\geq 17.5\%$ 可以用来鉴别是隐匿性糖尿病还是外伤等应激引起的高血糖^[14]。

4.4 特殊人群的应用 对于特殊人群,如贫血、妊娠、糖尿病肾病和异常血红蛋白病等,GA 比 HbA1c 更能真实地反映血

糖水平。(1)资料显示处于铁缺乏期的患者,其 HbA1c 水平都可能高于血糖的真实水平^[15]。绝经前妇女多数处于铁缺乏状态而孕妇妊娠中期对铁的需求极高,也极易出现铁缺乏症,以及缺铁性贫血患者 HbA1c 水平可能高于血糖的真实水平,而 GA 水平无影响。(2)糖尿病肾病的患者其 HbA1c 检测结果偏低而 GA 测定不受影响。GA 水平与血液透析患者的预后密切相关。通过观察 98 例患有 11 年糖尿病并且进行血透的患者 GA 水平,发现进行血液透析前 GA $\geq 29\%$ 的患者比 GA $< 29.0\%$ 的患者预后要差^[16]。但是对于肾衰竭晚期(Ⅲ期或Ⅳ期)患者,因其尿中大量蛋白的流失,导致清蛋白的代谢加速,此时 GA 水平也偏低。(3)对于异常血红蛋白病的患者,由于异常血红蛋白本身结构的不稳定性以及与血糖结合的不稳定性,使得 HbA1c 的检测受影响,而 GA 测定不受影响。

4.5 新生儿糖尿病的血糖监测 新生儿由于生理的特殊性与成人存在许多差异,关于新生儿的 GA 水平报道极少。新生儿的 GA 水平明显低于成人,并且与年龄和清蛋白相关^[17]。GA 也可以作为新生儿糖尿病血糖监测的良好指标。

4.6 GA 与 HbA1c 联合用于诊断的意义 GA 与 HbA1c 比值(GA/HbA1c)比 GA 更能反映血糖波动水平。(1)当 1 型糖尿病患者胰岛 β 细胞被迅速破坏时,其体内血糖和酮胺类物质水平在短时间内快速升高,故 GA 比 HbA1c 升高明显^[18]。1 型糖尿病中 GA/HbA1c 比 HbA1c 更好地监测血糖变异,尤其是爆发性 1 型糖尿病^[19]。由于 1 型糖尿病患者 GA 与 HbA1c 水平升高幅度比 2 型糖尿病患者明显,故可以将 GA/HbA1c ≥ 3.2 作为临界值,鉴别 1 型和 2 型糖尿病,其在鉴别诊断中的灵敏度和特异度分别为 97% 和 98%^[20]。(2)胰岛 β 细胞功能稳态模型评估法(HOMA- β)分析结果显示,接受胰岛素治疗的患者分泌胰岛素的能力及 HOMA- β 明显低于未接受胰岛素治疗的患者。可见,GA/HbA1c 水平与 HOMA- β 存在明显的负相关,说明内源性胰岛素分泌水平的降低使得 GA/HbA1c 水平升高^[21]。相关研究结果证实了,GA/HbA1c 水平与胰岛素的分泌功能尤其早期胰岛素分泌功能密切相关而与胰岛素抵抗无关^[22]。(3)慢性肝脏疾病患者脾功能往往处于亢进状态,导致其红细胞寿命明显缩短,从而使 HbA1c 水平有可能不随患者血糖水平升高而升高;而慢性肝脏疾病患者清蛋白的代谢速率减慢,导致清蛋白的代谢半衰期相对延长,从而使 GA 和果糖胺水平有可能不随患者血糖水平降低而降低,故 GA/HbA1c 水平可独立反映肝功能状况而与血糖无关^[23]。GA/HbA1c 在非酒精性脂肪肝疾病早期是下降的,但是随着疾病的发展,两者的比值逐渐增加,这可能与肝脏的纤维化有关^[24]。类似的报道也存在于丙肝病毒感染导致的肝纤维化中^[25]。

5 展望

对 GA 的研究是近年来临床医学的一个热点。GA 在多种病理状态下均能可靠地反映血糖控制的真实水平,这对评估病情、评价疗效和判断预后等具有极其重要的临床意义。GA 联合其他指标对临床的诊断意义更大。GA 作为一种新的诊断指标应用于临床,这就要求开展了 GA 检测的实验室需要进行量值溯源,其结果的准确性和可靠性才得以提高。GA 作为新的血糖监测方法,由于应用于临床上的时间较短,目前尚缺乏公认的正常值;虽然近年来该方面的研究国内外都有开展,但大样本量的研究尚未有报道。

参考文献

[1] Kouzuma T, Uemastu Y, Usami T, et al. Study of glycated amino

- acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method[J]. Clin Chim Acta, 2004, 346(1): 135-143.
- [2] Barnaby OS, Cerny RL, Clarke W, et al. Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(3/4): 277-285.
 - [3] Nishimura R, Kanda A, Sano H, et al. Glycated albumin is low in obese, non-diabetic children[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 71(3): 334-338.
 - [4] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Effects of thyroid hormone on serum glycated albumin levels; study on non-diabetic subjects[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2009, 84(2): 163-167.
 - [5] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Serum glycated albumin, but not glycated haemoglobin, is low in relation to glycemia in hyperuricemic men[J]. Acta Diabetol, 2010, 47(2): 173-177.
 - [6] Koga M, Saito H, Mukai M, et al. Serum glycated albumin levels are influenced by smoking status, independent of plasma glucose levels[J]. Acta Diabetol, 2009, 46(2): 141-144.
 - [7] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Serum glycated albumin, but not glycated hemoglobin, is low in relation to glycemia in men with hypertriglyceridemia[J]. J Diabetes Invest, 2010, 1(5): 202-207.
 - [8] Kohzuma T, Yamamoto T, Uematsu Y, et al. Basic performance of an enzymatic method for glycated albumin and reference range determination[J]. J Diabetes Sci Technol, 2011, 5(6): 1455-1462.
 - [9] Nathan DM, Steffes MW, Sun W, et al. Determining stability of stored samples retrospectively; the validation of glycated albumin[J]. Clin Chem, 2011, 57(2): 286-290.
 - [10] Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, et al. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated reverse cholesterol transport[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2013, 29(1): 66-76.
 - [11] Koga M, Murai J, Morita S, et al. Comparison of annual variability in HbA1c and glycated albumin in patients with type 1 vs. type 2 diabetes mellitus[J]. J Diabetes Complications, 2013, 27(3): 211-213.
 - [12] Kohzuma T, Koga M, Lucica GA-L glycated albumin assay kit: a new diagnostic test for diabetes mellitus[J]. Mol Diagn Ther, 2010, 14(1): 49-51.
 - [13] 陈浩, 田恒力, 戎伯英, 等. 脑外伤急性期空腹血糖、血清糖化白蛋白和乳酸脱氢酶联合检测的意义[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(12): 1478-1480.
 - [14] Pan J, Zou J, Bao Y, et al. Use of glycated albumin to distinguish occult diabetes mellitus from stress-induced hyperglycemia in Chinese orthopedic trauma patients[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 72(5): 1369-1374.
 - [15] Koga M, Morita S, Saito H, et al. Association of erythrocyte indices with glycated haemoglobin in pre-menopausal women[J]. Diabet Med, 2007, 24(8): 843-847.
 - [16] Fukuoka K, Nakao K, Morimoto H, et al. Glycated albumin levels predict long-term survival in diabetic patients undergoing haemodialysis[J]. Nephrology (Carlton), 2008, 13(4): 278-283.
 - [17] Suzuki S, Koga M, Niizeki N, et al. Glycated albumin is lower in infants than in adults and correlated with both age and serum albumin[J]. Pediatr Diabetes, 2013, 14(1): 25-30.
 - [18] Saisho Y, Tanaka K, Abe T, et al. Glycated albumin to glycated hemoglobin ratio reflects postprandial glucose excursion and relates to beta cell function in both type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetol Int, 2011, 2(3): 146-153.
 - [19] Matsumoto H, Murase-Mishiba Y, Yamamoto N, et al. Glycated albumin to glycated hemoglobin ratio is a sensitive indicator of blood glucose variability in patients with fulminant type 1 diabetes[J]. Intern Med, 2012, 51(11): 1315-1321.
 - [20] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Serum glycated albumin to haemoglobin A(1C) ratio can distinguish fulminant type 1 diabetes mellitus from type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47(Pt 4): 313-317.
 - [21] Koga M, Murai J, Saito H, et al. Glycated albumin and glycated hemoglobin are influenced differently by endogenous insulin secretion in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2010, 33(2): 270-272.
 - [22] Kim D, Kim KJ, Huh JH, et al. The ratio of glycated albumin to glycated haemoglobin correlates with insulin secretory function[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 77(5): 679-683.
 - [23] Bando Y, Kanehara H, Toya D, et al. Association of serum glycated albumin to haemoglobin A1C ratio with hepatic function tests in patients with chronic liver disease[J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(Pt 5): 368-372.
 - [24] Bando Y, Kanehara H, Aoki K, et al. The glycated albumin to glycated haemoglobin ratio increases along with the fibrosis stage in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Ann Clin Biochem, 2012, 49(Pt 4): 387-390.
 - [25] Aizawa N, Enomoto H. Elevation of the glycated albumin to glycated hemoglobin ratio during the progression of hepatitis C virus related liver fibrosis[J]. World J Hepatol, 2012, 4(1): 11-17.

(收稿日期: 2013-10-08)

• 综 述 •

产碳青霉烯酶泛耐药肠杆菌科细菌感染治疗药物的现况与未来

安淑娟¹, 蔡淑梅¹综述, 金凤玲^{2△} 审校

(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学第一医院, 甘肃兰州 730000)

关键词: 碳青霉烯酶; 替加环素; 多黏菌素; β -内酰胺酶抑制剂; 头孢洛林; 新碳青霉烯类

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0446-04

碳青霉烯类抗菌药物属于 β -内酰胺类, 但对超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 和头孢菌素 (AmpC) 酶稳定, 是治疗由产 ESBLs