

- [18] 何成禄,何增品,徐从琼,等. 血浆(1,3)-B-D 葡聚糖和血清半乳甘露聚糖检测对重症患者侵袭性真菌感染的早期诊断价值[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(2):54-56.
- [19] Koo S, Bryar JM, Baden LR, et al. Prognostic features of galactomannan antigenemia in galactomannan-positive invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4):1255-1260.
- [20] Pickering JW, Howard WS, Catherine AB, et al. Evaluation of a (1,3)-b-D-Glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(15):5957-5962.
- [21] Wingard JR. Novel serum markers supplanted tissue diagnosis for invasive fungal infections in acute leukemia and transplantation[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2012, 25(3):487-491.
- [22] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008, 10(4):7394.
- [23] Marty FM, Koo S. Role of (1->3)-beta-D-glucan in the diagno-

sis of invasive aspergillosis[J]. Med Mycol, 2009, 47(Suppl 1):S233-S240.

- [24] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. beta-D-Glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2011, 52(6):750-770.
- [25] 曹国君,赵芳,刘璐,等. 通用 PCR 法在痰标本真菌检测中的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13):1635-1636.
- [26] White PL, Mengoli C, Bretagne S, et al. Evaluation of aspergillus PCR protocols for testing serum specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11):3842-3848.
- [27] 曹敏华. 菌血症患者血浆(1,3)-β-D-葡聚糖检测意义探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22):2802-2803.
- [28] 吴志平,邵丽霞,周东升,等. 侵袭性真菌感染者血浆(1,3)-β-D 葡聚糖检测结果分析[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(2):160-161.

(收稿日期:2014-04-08)

• 综 述 •

血红蛋白变异体对糖化血红蛋白测定方法的干扰

徐胜男 综述,温冬梅,张秀明 审校
(中山市人民医院,广东中山 528403)

关键词: 血红蛋白变异体; 糖化血红蛋白; 干扰

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2345-03

目前,大部分糖化血红蛋白的检测系统可排除常见的血红蛋白变异体杂合子的干扰,或给出警告提示信息,而一些较为罕见的血红蛋白变异体引起的干扰常被临床医生和患者忽视。因此对于血红蛋白变异体普遍存在的地区,应谨慎选择 HbA1c 的检测系统,对于变异体携带者可选择合适的替代指标用于评估血糖水平。

1 血红蛋白和糖化血红蛋白

血红蛋白是由珠蛋白和血红素构成的一种结合蛋白质,相对分子质量为 64 458。血红素由原卟啉与亚铁原子组成。每一个珠蛋白分子由两对多肽链组成,一对 α 链,由 141 个氨基酸残基构成,含较多组氨酸,其中 α87 位组氨酸与血红素的铁结合,在氧的运输中具重要作用;另一对是非 α 链,包括 β、γ、δ、ξ 及 ε 5 种。β、δ 和 γ 链均由 146 个氨基酸残基组成,但氨基酸组成、排列顺序、等电点不同,电泳时泳动的速度也不同。每一条肽链和一个血红素连接,构成一个血红蛋白单体。人类血红蛋白是由两对(4 条)血红蛋白单体聚合而成的四聚体。不同类型的血红蛋白珠蛋白结构略有不同,但血红素均相同。健康人出生后有 3 种血红蛋白:(1)血红蛋白 A(HbA),由一对 α 链和一对 β 链组成(α₂β₂),占血红蛋白总量的 95% 以上。胚胎 2 个月时 HbA 即有少量出现,初生时占 10%~40%,出生 6 个月后即达成人水平。(2)血红蛋白 A₂(HbA₂),由一对 α 链和一对 δ 链组成(α₂δ₂)。出生 6 个月后可以占血红蛋白的 2%~3%。(3)胎儿血红蛋白(HbF):由一对 α 链和一对 γ 链组成(α₂γ₂),出生时占体内血红蛋白的 70%~90%,以后渐减,至 6 个月,可降至血红蛋白总量的 1% 左右。

糖化血红蛋白 HbA₁ 又可分为 HbA_{1a1}、HbA_{1a2}、HbA_{1b} 和 HbA_{1c},HbA_{1c} 约占 HbA₁ 的 80%,其 β 链氨基末端具有

特异性六肽结构。随着病情发展,患者的血糖会变得难以控制,从诊断确立开始越早有效控制血糖,越有利于缓解患者长期的疾病发展进程^[1]。HbA_{1c} 目前被很多国家视为诊断和监控 T2DM 发展的指标,在我国其诊断价值和适用性仍被质疑。大量数据表明,糖尿病最终会伴随长期的微血管并发症。围绕 HbA_{1c} 是否适宜作为诊断指标的讨论,其主要内容是,血糖和 HbA_{1c} 作为诊断工具的利与弊,分析前和分析中的变量,检测成本以及可接受程度。首先,HbA_{1c} 反映血糖的平均水平,比任一时间点的血糖值更能体现机体血糖代谢的平均水平,而红细胞 120 d 寿命中,近期血糖水平的波动对 HbA_{1c} 检测值的贡献较大,标本采集前一个月的影响达 50%,而采集前第 2 个月的影响达 25%^[2]。其次,检测过程可对患者提供更多的便利条件。不需空腹采血,一次样本采集即可得到较准确的结果,因此患者的接受度和依从性较高,更有利于隐性 T2DM 患者的筛查。相比之下口服葡萄糖耐量试验(OGTT)需要更复杂的分析前准备,包括检测前至少 3 d 的均衡饮食,空腹 8 h 以上,且检测耗时 2 h 以上。另外,恶心、呕吐、胃排空延迟和建立静脉通道的患者均不适用该项检查,众多变异因素均可能得到不可靠的检测结果。另外,OGTT 需要多次采血,患者依从性较差,而 HbA_{1c} 不受饮食状态和昼夜节律的影响,检测前变异度较血糖小。静脉血收集到抗凝管之后,红细胞还会以每小时 7% 的速度在体外酵解葡萄糖,理想状态下样本应该冰浴保存且在 30~60 min 内检测,而大部分实验室无法严格遵守这一操作。HbA_{1c} 在静脉血中具有较高的分析前稳定性,在 4 ℃ 可稳定保存 1 周^[3]。

大量的流行病学资料证明,HbA_{1c} 的升高不仅可以作为 2 型糖尿病病情进展的检测指标,也是糖尿病肾病、糖尿病视网

膜病变、心血管事件等并发症发生的风险因素,同时可以作为强化治疗或改变治疗方案的指征。

2 常见的血红蛋白变异体

最为常见的血红蛋白变异体包括血红蛋白 S(HbS)、血红蛋白 E(HbE)、血红蛋白 C(HbC)和血红蛋白 D(HbD),全球范围:HbS、HbE、HbC、HbD 的分布依次减少,这 4 种变异体均由血红蛋白 β 链的 1 个氨基酸被替换而生成。(1)HbS,即镰形红细胞血红蛋白, β 链第 6 位的谷氨酸突变为缬氨酸。HbS 纯合子携带者表现为严重的镰形红细胞贫血,由于红细胞镰形变后不易通过微循环,血液黏滞性增高,致使微循环阻塞。组织梗死、骨痛、瘫痪、酱油尿和感染是常见症状。(2)HbE 位于 β 链第 26 位的谷氨酸突变为赖氨酸。HbE 携带者通常无贫血症状。(3)HbC 位于 β 链第 6 位的谷氨酸突变为赖氨酸;HbC 携带者通常血红蛋白水平正常或有轻度贫血。(4)HbD 位于 β 链第 121 位的谷氨酸突变为谷氨酰胺,其携带者常有轻度溶血性贫血。大部分血红蛋白异构体的杂合子通常无症状,红细胞生存率正常,如果糖尿病患者同时携带血红蛋白异构体基因,不易引起临床医生的注意。

3 血红蛋白变异体对糖化血红蛋白的测定方法的影响

3.1 基于电荷量差异的检测方法

3.1.1 阳离子交换色谱法 很多物质对这种方法有干扰,如醛亚胺 HbA1c、HbF、氨基甲酰血红蛋白以及血红蛋白变异体,要得到稳定结果须严格控制温度和湿度。某些血红蛋白变异体、加合物或衍生物其洗脱峰与 HbA、HbA1c 均不会重叠,这些变异体的影响不构成不是以上等式的变量,因此对 HbA1c 的检测没有影响。而血红蛋白变异体或其糖化衍生物不能与 HbA 或 HbA1c 分离时(图谱上的峰有重叠),会导致 HbA1c 的测定结果不准确,具体可分为以下 3 种情况。(1)血红蛋白变异体与 HbA1c 的洗脱峰重叠。很多血红蛋白变异体的形成是 α 或 β 链的一个中性氨基酸被一个带正电荷的基团取代。这种改变降低了非糖化血红蛋白变异体的洗脱时间,使其与 HbA1c 一起洗脱,导致 HbA1c 的检测值假性升高,有些患者的 HbA1c 检测值可高达 54%。包括 Hb Raleigh($\beta 1 \text{ Val} \rightarrow \text{Ala}$)^[4], Hb Graz($\beta 2 \text{ His} \rightarrow \text{Leu}$)^[5-6], Hb Sherwood Forest($\beta 104 \text{ Arg} \rightarrow \text{Thr}$)^[5-6], Hb South Florida($\beta 1 \text{ Val} \rightarrow \text{Met}$)^[7] 和 [$\beta \text{N-Methionyl-1 (NA) Val} \rightarrow \text{Leu}$]^[8]。在 Hb Raleigh、Hb South Florida 和 Hb Niigata 的例子中,氨基端发生的变异使得乙酰化血红蛋白在体内更容易形成,造成 HbA1c 的假性偏高,乙酰化 HbA 在某些方法中与 HbA1c 一起洗脱,使用这些方法检测时也会导致 HbA1c 假性偏高^[9]。通常血红蛋白变异体与 HbA1c 一起洗脱或是分离取决于使用的方法。这些不一致的结果的产生是因为使用了不同的溶液,分析柱,温度,压力,流速,洗脱时间。因此同一变异体使用不同方法得出的 HbA1c 结果可能存在很大差异。另外,如果系统未提供异常峰的警告信息提示,没有使用校正公式,用 HbA1c 的计算公式可能得出不准确的结果。(2)糖化的血红蛋白变异体成分与 HbA1c 一起洗脱,而非糖化变异体成分与 HbA 完全分离。这种情况会导致 HbA1c 假性偏高,糖化的血红蛋白变异体峰与 HbA1c 峰重合,而分母只包括 HbA 峰下面积。这种效果见于用 Tosoh A1c 2.2+系统分离含有 Hb G Philadelphia 的样本时。相反,Hb G Philadelphia 的存在会导致 Bio Rad variant 系统的检测值假性偏低^[10]。而 Bayer DCA-2000, Roche TinaQuant 和 Primus CLC 385 不受这种变异体影响^[10]。(3)血红蛋白变异体与 HbA 一起洗脱,而糖化的变异体与 HbA1c 完全分离。这种情况使 HbA1c 结果假性偏低,因为分母包括

了 HbA 和血红蛋白变异体,使得 HbA1c 的百分比变低。包括 HbD G philadelphia, J Baltimore, Opadove。使用 Bio Rad 系统时^[10-11],以及 Hb Sherwood Forest 和 Opadova 使用 Hitachi L-9100 系统时^[11],同一变异体使用不同平台和系统时可产生假性偏高和偏低的结果。HbE 和 J Baltimore 使用 Tosoh A1c 2.2+时可产生这种类型的干扰,而 HbD 和 G philadelphia 不会^[8,10]。值得注意的是,同一种变异体在使用不同的系统测定时,可导致 HbA1c 出现不同方向的偏倚。对于变异体纯合子携带者,例如 HbSS 或 HbCC,为了得到更准确的 HbX1c 体内浓度的结果^[12],很多学者提出了不同的建议,例如对 HPLC 程序的改良,对 HbA1c 计算公式的校正,或是使用不同的参考范围。然而,考虑到有多种干扰因素使得糖化血红蛋白结果的解读变得很困难,临床医生应该考虑使用除 HbA1c 之外的其他指标来评估长期血糖控制的情况。

3.1.2 电泳法 目前琼脂糖凝胶电泳的方法不常用于检测糖化血红蛋白,该方法依据电荷差异分离血红蛋白组分^[13]。扫描凝胶的光密度值可以量化血红蛋白中各组分的含量,血红蛋白变异体对这种方法造成干扰的类型与阳离子交换色谱法相似。而酸碱度,离子强度,温度的微小变异不会对血红蛋白的迁移造成很大影响。与阳离子交换高效液相色谱法相比,血红蛋白变异体携带者的样本使用不同的琼脂糖凝胶电泳系统,得出的结果一致性较好。血红蛋白变异体或衍生物与 HbA 或 HbA1c 发生协同泳动,会影响 HbA1c 的检测值,HbF 或氨基甲酰血红蛋白会导致 HbA1c 结果假性偏高^[5]。

3.1.3 等点聚焦电泳 等电聚焦电泳测糖化血红蛋白并不常用,其原理是利用 pH 值梯度依据电荷差异分离血红蛋白组分。凝胶经固定后使用高像素集成显微光密度测定法来量化血红蛋白成分。Hb Pavie($\alpha 135 \text{ val} \rightarrow \text{Glu}$)、Hb Hafnia($\beta 116 \text{ His} \rightarrow \text{Gln}$)和 Hb Fontainebleau($\alpha 21 \text{ Ala} \rightarrow \text{Pro}$)与 HbA1c 在等电聚焦电泳的过程中与 HbA1c 发生协同泳动会使检测值假性偏高^[14]。

3.2 免疫分析法 很多试剂盒采用胶乳凝集抑制法或免疫比浊法的原理,抗体识别 Hb β 链前 4~10 个氨基酸(氨基端的糖化基团),包括免疫比浊法,胶乳凝集抑制法等,这些抗体可识别可逆反应的产物 Schiff 碱或其他糖化血红蛋白,包括化学衍生物。由于 HbS 和 HbC 的突变位点靠近 β 链的氨基末端,一些基于免疫学原理的分析方法会受这两种异构体干扰。HbE 和 HbD 的突变位点距 β 链氨基端较远,不影响免疫学方法。HbF、Hb Graz 和 Hb Raleigh 被证明可使免疫法的结果假性偏低^[15-16]。其他变异体(氨基端前 4~10 个氨基酸发生变异的)也会产生类似结果。例如,Hb Raleigh($\text{Val} \rightarrow \text{Ala}$)使得氨基端更容易发生乙酰化,避免了这一位点糖化反应的发生,进一步降低了免疫法的检测结果^[15]。另外,Hb Long Island、Hb South Florida 和 Hb Niigata 在评估长期血糖控制情况时其应用也受到限制^[17-18],因为在体内这几种变异体更易发生乙酰化。

3.3 硼酸盐亲和和层析高效液相色谱法 硼酸盐亲和和色谱法受血红蛋白变异体和衍生物的影响最小。该方法测定的是总糖化血红蛋白,包括 HbA1c 和 ketoamine 结构(α 链和 β 链氨基端的赖氨酸和缬氨酸残基形成)。凝胶柱中的琼脂糖被羰基二咪唑激活后与间氨基苯硼酸相连,而硼酸可与整合在血红蛋白分子上的顺位二醇作可逆性结合,因此糖化血红蛋白与亲和树脂结合,再用反式多元醇配体-山梨醇洗脱,通过检测 415 nm 波长处的吸光度值来量化糖化和非糖化成分。与微柱法相比,亲和层析法对温度不敏感,不受 HbF、氨基甲酰血红蛋白的干扰,对于血红蛋白异构体携带者长期以来一直被当做参考方

法。由于硼酸盐亲和层析色谱法可将糖基化血红蛋白与非糖基化血红蛋白分离,与血红蛋白的种类无关,大部分异构体对该方法无干扰。据报道 Primus 生产的 CLC330 和 CLC385 不受常见的血红蛋白变异体和衍生物的干扰,较明显的偏高的检测值来自含有 HbAC 和 HbCC 的样本。使用 Abbott IMX Hemoglobin assay 测定 HbAC 样本时得出的 HbA1c 有正向偏倚^[10],该系统使用的是硼酸盐/阳离子捕获法,推测导致该偏倚的原因可能为聚阴离子捕获试剂,可能与非糖化 HbC6 号位的 lys 替换发生反应。在较为少见的血红蛋白变异体中,Hb Himeji(β 140Ala \rightarrow Asp)可导致糖化血红蛋白结果的假性偏高,源于 Hb Himeji 在体内发生过度糖基化。Hb Himeji 中发生的 β 140Ala \rightarrow Asp 替换可促进体内形成 Hb Himeji1c^[17]。亲和层析法洗脱的是全部的糖化血红蛋白(不仅包括 HbA1c),有人用患者样本对两种方法的结果用线性回归分析,结果表明,当亲和层析法的结果也用 HbA1c(%)来表达,得出的结果基本一致。

4 其他干扰 HbA1c 测定的因素

糖化血红蛋白的检测可被血红蛋白的化学衍生物影响。长期存在于糖尿病患者体内的化学衍生物,其物理或化学性质可能接近糖化血红蛋白,使 HbA1c 测定结果不准确,尤其当使用方法的原理是基于电荷差异时。氨基甲酰血红蛋白,以很高的浓度存在于尿毒症患者体内,是最常见的化学衍生物之一。 β 链末端不常见的突变,可促进乙酰化血红蛋白在体内形成。尽管体外实验中正常血红蛋白与 aspirin 接触时会产生乙酰化血红蛋白,在长期服用小于或等于 1 g/d 阿司匹林的患者体内未检测出乙酰化血红蛋白^[11]。

HbF 是胎儿血红蛋白的主要成分,其结构为 $\alpha_2\gamma_2$ 。出生时 HbF 的含量为 60%~95%,1 岁以前降至接近成年人的水平。健康成年人的 HbF 参考值上限为 1%,一些病理状态可表现为 HbF 水平上升,如白血病,地中海贫血和持续性胎儿血红蛋白增高症。最普遍的持续性胎儿血红蛋白增高症患者 HbF 含量高达 30%,缺乏典型明显临床表现,因此容易被患者和医生忽视。一些研究检测了 HbF 升高对不同 HbA1c 检测方法的影响,得出了不同的结论,但这些研究均未使用能够免除 HbF 干扰的参比方法。IFCC 参考方法检测的是 HbA1c β 链氨基末端糖化和非糖化的六肽结构,而 HbF 没有 β 链因而不会干扰 IFCC 参考方法,因此,用 IFCC 参考方法作为参比方法可以对一些商品化的 HbA1c 试剂盒进行评估。

过去,很多阳离子交换色谱法或电泳法不能将 HbF 从 HbA1c 或 HbA1 成分中分离出来,而如今大部分厂商生产的基于阳离子交换高效液相色谱法原理的试剂盒均可将正常水平的 HbF 分离,结果显示成为一个单独的峰。其中部分方法在 HbF 水平升高时也可单独分离 HbF。除此之外,影响 RBC 半衰期的病理状态,包括透析、溶血^[18]、缺铁性贫血或是输注红细胞均会影响糖化血红蛋白的测定值^[18-19]。

5 小 结

目前使用的大部分基于色谱法和免疫分析法的 HbA1c 检测系统可排除常见的血红蛋白变异体杂合子(如 HbAS、HbAC 和 HbAE)引起的干扰或给出明确的警告提示信息,而一些较为罕见的血红蛋白变异体引起的干扰常被临床医生和患者忽视。而对于 HbSS 或 HbCC 或 HbSC 携带者,尽管亲和层析色谱法可以准确测定其糖化血红蛋白的含量,患者的红细胞代谢异常导致糖化血红蛋白无法反映患者血糖的平均水平。对于血红蛋白变异体普遍存在的地区,应谨慎选择 HbA1c 的检测系统,发现血红蛋白异构体导致的异常结果时尽可能选择果糖胺,糖化清蛋白等作为替代指标来评估患者的血糖水平。

参考文献

- [1] UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes[J]. *Lancet*, 1998, 352(9131): 837-853.
- [2] Ogawa A, Hayashi A, Kishihara E, et al. New indices for predicting glycaemic variability[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): 46517.
- [3] Florkowski C. HbA1c as a diagnostic test for diabetes Mellitus-Reviewing the evidence[J]. *Clin Biochem Rev*, 2013, 34(2): 75-83.
- [4] Little RR. Usefulness of glycated albumin assay for diabetes monitoring[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2011, 5(6): 1463-1465.
- [5] Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, et al. Abnormal haemoglobins, Hb Takamatsu and Hb G-Szuhu, detected during the analysis of glycated haemoglobin (HbA1C) by high performance liquid chromatography[J]. *J Clin Pathol*, 2000, 53(11): 854-857.
- [6] Mieczkowska E, Koncki R, Tymecki L. Hemoglobin determination with paired emitter detector diode[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(9): 3293-3297.
- [7] Nakamura M, Miyazaki A, Takubo T, et al. Identification of the First Japanese Family Harboring a Novel Hemoglobin Variant "Perpignan", Which Caused Low HbA1c Measurement During Diabetic Follow-Up[J]. *Jpn Clin Med*, 2011, 2(2): 1-7.
- [8] Watanabe T, Kato K, Yamada D, et al. A nondiabetic case of hemoglobin variant (Hb Niigata) within appropriately high and low HbA1c titers detected by different methods[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(7): 1562-1564.
- [9] Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2009, 3(3): 439-445.
- [10] Makris K, Spanou L. Is there a relationship between mean blood glucose and glycated hemoglobin[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2011, 5(6): 1572-1583.
- [11] Bhat VS, Dewan KK, Krishnaswamy PR. Diagnostic dilemma of HbA1c detection in presence of a hemoglobinopathy: a case report[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2011, 26(1): 91-95.
- [12] Weykamp C. HbA1c: A review of analytical and clinical aspects[J]. *Ann Lab Med*, 2013, 33(6): 393-400.
- [13] 沈晶晶, 陈晓穗. 等电聚焦电泳测定糖化血红蛋白[J]. *临床检验杂志*, 1998, 16(4): 209-210.
- [14] Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(2): 153-163.
- [15] Little RR. Usefulness of glycated albumin assay for diabetes monitoring[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2011, 5(6): 1463-1465.
- [16] Campo S, Sardo MA, Raimondo G. Identification and genomic analysis of hemoglobin Long Island-Marseille in a nondiabetic subject of Italian origin[J]. *Acta Haematol*, 1994, 91(4): 211-212.
- [17] Lee SY, Chen YC, Tsai IC, et al. Glycosylated hemoglobin and albumin-corrected fructosamine are good indicators for glycemic control in peritoneal dialysis patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): 57762.
- [18] Kapadia C, Zeitler P. Hemoglobin A1c measurement for the diagnosis of Type 2 diabetes in children[J]. *Int J Pediatr Endocrinol*, 2012, 2012(1): 31.
- [19] Son JI, Rhee SY, Woo JT, 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.