

糖化清蛋白的诊断优势及其检测现状

尹逸丛 综述, 邱 玲[△] 审校
(北京协和医院检验科 100730)

关键词:糖化清蛋白; 糖尿病; 标准化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3456-03

糖尿病已经成为全球威胁人类健康的三大慢性非传染性疾病之一。目前,糖尿病患病率、发病率和糖尿病患者数量急剧上升,根据国际糖尿病联盟(IDF)统计,2012 年全世界糖尿病患者人数已经达到 3.71 亿^[1]。近 30 年来,随着我国经济的高速发展、生活方式西方化和人口老龄化,肥胖率上升,糖尿病患病率也呈快速增长趋势;2010 年全国 31 省市 18 岁以上 9 万余人口的糖尿病调查显示成年人糖尿病患病率达 9.65%^[2]。2013 年,中国研究人员在《美国医学会杂志》(JAMA)发表报告^[3],其调查显示中国已成为糖尿病人口大国,成人糖尿病患者数量估计超过 1 亿,可能已达“警戒级别”。

糖尿病人群不断增多,对中国社会与公共卫生构成挑战,给社会经济带来了沉重的负担,是严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题。糖尿病引起的长期碳水化合物及脂肪、蛋白质代谢紊乱可引起多系统损害,增加心脏病、中风、肾病、失明乃至截肢的风险^[4],降低患者生活质量,病死率高。因此,对于糖尿病的早期发现、有效防治有利于提高国人的生活质量,减轻患者及国家经济负担。近年来,糖化清蛋白(GA)逐渐受到研究者及临床的重视,被用来辅助诊断贫血、妊娠、血红蛋白(Hb)代谢异常患者体内真实血糖水平。

GA 比血糖相对稳定,不受短期生活方式影响;比糖化血红蛋白反映周期短;与糖化血清蛋白相比不受血液中蛋白浓度、胆红素、乳糜和低分子物质等影响。在诊断糖尿病方面具有十分重要的价值和优势。因此,GA 有望成为今后糖尿病监测的重要指标。本文主要阐述了 GA 的基本结构、在诊断糖尿病方面的优势及其检测现状。

1 GA 的结构

GA 是葡萄糖与血浆清蛋白发生非酶糖化反应的产物,反映糖尿病患者过去 2~3 周的平均血糖水平。

非酶糖化反应也被称为 Maillard 反应,是指蛋白质中氨基酸的 N 末端氨基或侧链氨基与葡萄糖及其衍生物的醛基缩合,产生可逆的 Schiff 碱中间体,经 Amadori 反应重排后形成相对稳定的糖基化产物-果糖胺,即 Amadori 产物。Amadori 产物降解产生的各种高度活性的羰基化合物,再与其他游离氨基基团反应,并经过一系列的化学重排和脱水反应,生成不可逆的糖基化终产物(AGEs)^[5]。

血清中清蛋白浓度比较高(3.0~5.0 g/dL),大约占血清蛋白的 60%,清蛋白在调节渗透压和 pH 及抗氧化方面具有十分重要的作用;它还是一种转运蛋白,可以结合多种激素、磷脂、药物和铁离子。清蛋白相对分子质量为 66 438,包括 585 个氨基酸残基。大量的研究已经证实了清蛋白发生非酶糖基化的主要位点,其赖氨酸、精氨酸和半胱氨酸由于其高度亲核特性,很容易被糖基化。研究证实,Lys-525 是人血清清蛋白在体内发生非酶糖基化最主要的位点,在健康人体内该位点发

生非酶糖基化反应的水平占总糖基化反应的 48%,在血糖水平不稳定的患者体内该位点发生非酶糖基化反应的水平占总糖基化反应的 33%^[6-8]。除此之外,赖氨酸的其他位点 Lys-199、Lys-281、Lys-489 也是赖氨酸发生糖基化的主要位点,但是其糖基化水平远低于 Lys-525,如 Lys-199 仅占总糖基化水平的 5%^[8]。由于赖氨酸糖基化位点众多,在总糖基化水平中所占比例高,所以日本临床化学糖尿病委员会定义 GA 为血清/血浆清蛋白中糖基化的赖氨酸^[9]。

2 GA 与其他血糖监测方法相比的优势

目前对糖尿病的检测项目主要为血糖、糖化血红蛋白和糖化血清蛋白^[10]。即刻血糖的检测容易受到药物、饮食、情绪等因素的影响,其检测结果只能代表采样当时的血糖情况,对诊断糖尿病尤其是治疗过程中监测患者的病情有很大的局限性。而且,空腹血糖要求个体空腹 8 h,对于早餐后或下午就诊的患者可操作性差。虽然口服葡萄糖耐量试验(OGTT)也可以用来诊断糖尿病,但是 OGTT 实验过程繁琐,耗时,变异性大,故临床使用率低。

糖化血红蛋白 A1c(HbA1c)是 HbA 的 b 链 N-末端缬氨酸的氨基与葡萄糖的羧基发生非酶促反应形成不稳定的 Schiff 碱,进一步通过转位、分子重排形成稳定的酮胺,即 HbA1c。因红细胞的半衰期为 120 d,故 HbA1c 可有效地反映患者过去 2~3 个月内的平均血糖水平,且不受空腹及胰岛素治疗的影响,变异性小。Petersen 等^[11]发现,不同个体的空腹血糖日间变异率约 12%~15%,而 HbA1c 仅约为 1.9%。HbA1c 测定更加便捷、可以在任意时间采血,其准确性、稳定性、可重复性高。目前,HbA1c 是国际上监测长期血糖控制的金指标。但是 HbA1c 的测定结果仍然受多种因素的影响:多种血红蛋白病,如血红蛋白 S、血红蛋白 C、血红蛋白 D、血红蛋白 E 等血红蛋白的存在会干扰 HbA1c 的检测^[12];妊娠也是影响 HbA1c 测定结果的因素之一,Rafat 等^[13]发现糖尿病患者于孕期由于铁缺乏导致 HbA1c 水平升高,不能真实反映血糖控制状态,而此时 GA 则可反映血糖控制情况。故 GA 可对初诊糖尿病患者和妊娠糖尿病患者的短期治疗效果做出较为准确的估计,从而有助于调整临床治疗方案及判断病情;此外,红细胞病理改变如溶血性贫血、肾衰竭、大量失血或输血将导致 HbA1c 结果不准确^[14];饮食和药物,如抗氧化剂(VC、VE 等)能抑制血红蛋白的糖基化,阿司匹林能使 HbA1c 轻微升高;尿毒症、高胆红素血症、高三酰甘油血症、阿片类药物等都会干扰 HbA1c 的检测^[15]。而 GA 由于半衰期为 19 d,可反映患者近 2~3 周内的血糖水平,对血糖值的变化较 HbA1c 更为灵敏,在反映近期内血糖的漂移变化及餐后血糖控制情况方面优于 HbA1c。而且 GA 的检测不受血红蛋白病、妊娠、红细胞寿命改变等影响。因此,测定 GA 对准确评价血红蛋白代谢异

常、妊娠贫血患者体内真实血糖水平具有重要意义。

糖化血清蛋白是测量血清中各种蛋白质、氨基酸的糖化值,其主要成分是 GA,还包括糖化球蛋白、脂蛋白等,反映测定前 2~3 周血糖的平均水平;但其测定结果反映血清中总的糖化血清蛋白质(包括清蛋白与其他蛋白分子),易受血液中蛋白浓度、胆红素、乳糜和低分子物质等的影响^[16]。而 GA 的测定是在糖化血清蛋白的基础上,利用 GA 与血清清蛋白的百分比表示 GA 的水平,去除了血清清蛋白水平对检测结果的影响,故较糖化血清蛋白更精确^[17-18]。

3 GA 的测量方法

GA 的检测方法包括比色法、色谱分析法、免疫分析法、酶法等。

3.1 比色法 硫代巴比妥酸法(TBA)是测量酮胺的经典比色法,是基于清蛋白释放的 5-羟甲基糠醛(HMF)可以和硫代巴比妥酸发生显色反应。氮蓝四唑(NBT)是另一种对酮胺进行定量检测的比色法,NBT 和酮胺释放的甲磺发生还原反应,通过测定吸光度来对酮胺进行定量检测。然而这两种比色法都存在缺陷,且特异性不高。TBA 法中形成的 HMF 具有热不稳定性,游离的葡萄糖也会干扰此反应;NBT 法容易受到巯基、尿酸、脂血的干扰^[19];苯胺加合物定量方法通过果糖胺和苯肼反应来对 GA 定量,但是这种方法并未应用于临床实验室。

3.2 色谱分析法 色谱分析法是对 GA 进行定量测定的一种方法,色谱分析法不受清蛋白浓度的影响。高效液相色谱法(HPLC)可以对 GA 中的糖基化的氨基酸进行定量检测,该法通过阴离子交换色谱柱提取纯度较高的清蛋白,再经亲和层析分离糖化的清蛋白和非糖化的清蛋白^[20]。清蛋白中的果糖胺产物经过水解和脱水,生成糠氨酸,液相色谱法可以直接对糠氨酸进行定量检测,和比色法相比该法的特异性更高。但是 HPLC 法的检测速度为 12 例标本/小时,无法满足大量的临床标本检测^[21]。

3.3 免疫分析法 硼酸盐酶联免疫吸附实验(ELISA)其原理是酶联的硼酸盐可以和 GA-抗人血清清蛋白抗体的复合物发生反应,但是 GA 的水平会受到抗体特异性的影响,应用这种方法时需要考虑抗体的化学位阻效应及硼酸盐的特性^[21]。

3.4 酶法 目前,临床检测广泛应用的是酶法,酶法试剂盒使用方便。该方法应用清蛋白特异的剪切酶包括蛋白酶、酮胺氧化酶及溴甲酚紫试剂对 GA 进行定量检测,是一种很敏感的方法。由于所受干扰少,酶法与比色法相比能更准确地对 GA 进行定量。酶法的基本原理是:首先加入酮胺氧化酶(KAOD)消除内源性糖化氨基酸,其次用清蛋白特异性的蛋白酶将 GA 转变为糖化氨基酸,生成的糖化氨基酸在 KAOD 的作用下生成葡萄糖酮醛,氨基酸和过氧化氢,过氧化氢在过氧化物酶(POD)的作用下定量地变换成有色物质,通过测定吸光度而定量从 GA 生成的糖化氨基酸。

但是各个厂家对血清的处理方法并不统一,经前期调研发现,有些厂家并没有消除内源性糖化氨基酸这一步骤,还有一些厂家直接测定糖化血清蛋白的值,并以此来代替 GA。而且各个厂家的酶法试剂盒在定值方面并不一致,部分厂家采用了测定清蛋白之后采用一定的公式将 GA 的结果转换成 GA%,而另一部分则是直接测定 GA 值。另外,各个厂家 GA 的单位也不一致,有些厂家采用 g/dL、g/L,有的厂家则采用 $\mu\text{mol/L}$ 。不同厂家酶法试剂盒间的巨大差异和参考范围的不一致必然会导致结果间的巨大差异,导致错误的医学决定,限制该项目在临床发挥其重要作用,因此,亟须实现 GA 检验结果的准确、

可比。

4 GA 的标准化现状

实现检验结果准确的最有效手段是建立和保证检验结果的溯源性。对于临床检验量值溯源的简单理解就是应用参考系统,即用参考测量程序或参考物质建立或验证常规检验结果的准确性。但是 GA 作为大相对分子质量且成分复杂的蛋白质,其参考系统的建立一直未有突破性进展。美国的 4 家商业性参考实验室曾推荐硼酸盐亲和层析法作为参考方法,但是文献^[22]称应用亲和层析法检测 GA 的结果存在正常人和糖尿病患者交叉的现象,正常个体的 GA 值范围为 0.6%~8.6%,糖尿病患者的 GA 值范围为 1.4%~16.5%。并且可能受到其他的糖化分子的影响,导致检测结果并不准确。随着质谱(MS)技术的发展,2015 年日本临床化学学会(JSCC)将 GA 定义为清蛋白分子中所有的糖化赖氨酸,利用同位素稀释质谱法(ID-MS)建立了 GA 测定的候选参考方法并研制了 GA 标准物质 JCCRM611-1^[23]。JSCC 将 GA 定义为清蛋白分子中所有的糖化赖氨酸,用所有糖化赖氨酸占清蛋白的摩尔比来表示 GA 的量。但是该方法操作步骤复杂,对设备要求较高,并且无商品化的同位素标记 GA。至今,西方国家及中国均未建立合适的参考方法及 GA 参考物质。然而,GA 在中国临床应用非常广泛,但是由于标准的不统一、结果一致性差,应用较为混乱。因此,GA 参考系统的建立仍有很长的路要走。

基于上述分析,GA 在贫血、妊娠、血红蛋白代谢异常等糖尿病患者的监测中发挥着重要作用。若将 GA 纳入糖尿病的诊断标准,势必会提高糖尿病患者的筛查、诊断、监测和治疗水平。如同糖化血红蛋白和胆固醇这两项监测指标,GA 必须在实现标准化之后才有可能被列入国际指南中^[24-25]。因此,建立 GA 参考系统,促进 GA 测定方法的标准化和一致化的工作亟待提上日程。

参考文献

- [1] Guariguata L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 98(3): 524-525.
- [2] 廖涌. 中国糖尿病的流行病学现状及展望[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(7): 1042-1045.
- [3] Xu Y, Wang LM, Jiang H, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [4] Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(12): 5509-5514.
- [5] Neelofar K, Ahmad J. Amadori albumin in diabetic nephropathy[J]. Indian J Endocrinol Metab, 2015, 19(1): 39-46.
- [6] Ueda Y, Matsumoto H. Recent topics in chemical and clinical research on glycated albumin[J]. J Diabetes Sci Technol, 2015, 9(2): 177-182.
- [7] Garlick RL, Mazer JS. The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo[J]. J Biol Chem, 1983, 258(10): 6142-6146.
- [8] Iberg N, Flückiger R, Iberg N, et al. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites[J]. J Biol Chem, 1986, 261(29): 13542-13545.
- [9] Takei I, Hoshino T, Tominaga M, et al. Committee on Diabetes Mellitus Indices of the Japan Society of Clinical

Chemistry-recommended reference measurement procedure and reference materials for glycosylated albumin determination[J]. Ann Clin Biochem, 2016, 53(1):124-132.

[10] 吴弟梅. 血糖、糖化清蛋白、糖化血红蛋白的检测方法与临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5):583-585.

[11] Petersen PH, Jorgensen LGM, Brandslund I, et al. Consequences Of Bias and Imprecision in Measurements of Glucose and HbA1c for the Diagnosis and Prognosis of Diabetes Mellitus[J]. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2005, 240(240):51-60.

[12] Lin CN, Emery TJ, Little RR, et al. Effects of hemoglobin C, D, E, and S traits on measurements of HbA1c, by six methods[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(7/8):819-821.

[13] Rafat D, Rabbani TK, Ahmad J, et al. Influence of iron metabolism indices on HbA1c in non-diabetic pregnant women with and without iron-deficiency anemia; effect of iron supplementation. [J]. Diabetes Metab Syndr, 2012, 6(2):102-105.

[14] Ueda Y, Matsumoto H. Recent topics in chemical and clinical research on glycosylated albumin[J]. J Diabetes Sci Technol, 2015, 9(2):177-182.

[15] 李娅, 宋宇, 段勇. 糖化血红蛋白检测的局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6):501-504.

[16] 王冰, 王玉明, 段勇. 糖化血清白蛋白分子特性及临床意义[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(6):693-696.

[17] Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, et al. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycosylated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes[J]. J Diabetes Sci Technol, 2015, 9(2):169-176.

[18] 包玉倩. 糖化白蛋白的临床应用——现状与未来[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 7(10):597-599.

[19] Mashiba S, Uchida K, Okuda S, et al. Measurement of glycosylated albumin by the nitroblue tetrazolium colorimetric method[J]. Clinica Chimica Acta, 1992, 212(1/2):3-15.

[20] Kouzuma T, Usami T, Yamakoshi M, et al. An enzymatic method for the measurement of glycosylated albumin in biological samples. [J]. Clin Chim Acta, 2002, 324(1/2):61-71.

[21] Kohzuma T, Yamamoto T, Uematsu Y, et al. Basic performance of an enzymatic method for glycosylated albumin and reference range determination [J]. J Diabetes Sci Technol, 2011, 5(6):1455-1462.

[22] Roohk HV, Zaidi AR. A review of glycosylated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes[J]. J Diabetes Sci Technol, 2008, 2(6):1114-1121.

[23] Takei I, Hoshino T, Tominaga M, et al. Committee on Diabetes Mellitus Indices of the Japan Society of Clinical Chemistry-recommended reference measurement procedure and reference materials for glycosylated albumin determination[J]. Ann Clin Biochem, 2016, 53(1):124-132.

[24] 张捷. 糖化血红蛋白检测的标准化进程及临床应用[J]. 中华检验医学志, 2012, 35(6):511-516.

[25] 周波, 刘秀雯, 邢精红. 临床血脂的测定与标准化研究进展[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(3):338-340.

(收稿日期:2016-06-23 修回日期:2016-09-29)

• 综 述 •

精准医学国内外发展现状

景鹏举 综述, 王建民, 王勇平[△] 审校
(兰州大学第一医院, 兰州 730000)

关键词: 精准医学; 组学; 大数据

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)24-3458-04

随着科学技术的迅猛发展及人们对健康的更高层次的认识和要求, 精准医学应运而生, 并迅速席卷全球。

1 精准医学的概念

精准医学是以个体化医疗为基础, 随着基因组测序技术快速进步及生物信息与大数据科学的交叉应用而发展起来的新型医学概念与医疗模式。

NIH 对精准医学的定义为“精准医学是考虑到每个人基因、环境和生活方式等个体化差异的用于疾病预防和治疗的新兴医疗方式”。简言之, 精准医学就是依据个体的差异(遗传与环境), 制订相应的疾病预防和治疗方案。

加州理工学院的 David Baltimore 对精准医学做了这样的解读“精准医学的愿景主要是由两项重要技术——DNA 测序和基因组技术来驱动的”。

中国科学院院士、生物信息学家陈润生先生表示, 精准医学有两个重要的基石, 一是以基因组为代表的组学研究的研究及发展, 包括基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等, 以及与此相伴随的大数据研究; 二是在了解组学知识的基础上, 打通基因型和表型的关联, 其中重要的工具就是生物信息学。“当前, 精准医学就是大数据与组学两大科学前沿的交汇”^[1]。

2 精准医学的研究内容及目标

2.1 精准医学的核心目标就是个体化治疗 目前, 精准医学还没有一个明确的定义, 但其主旨还是个体化医疗。主要体现在以下 3 个方面: 第一, 随着各学科技术的快速发展, 可以做到早发现、早诊断及早治疗; 第二, 依据基因组、转录组、代谢组的信息和影像学诊断, 进行精细的个体化分类, 实现对个体发生的癌症的生长速度、恶性行为、转移潜能和预后进行预测, 第

[△] 通讯作者, E-mail: wangyp312@163.com.