

尿素氮对糖化血红蛋白检测的影响

孙艳虹 曾智杰 陈少谦 姜儆

作者单位:510080 广州市,中山大学附属第一医院检验医学部

【摘要】 目的 探讨血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)浓度在两类不同糖化血红蛋白(HbA1c)检测系统中对 HbA1c 检测结果的影响。方法 选择非糖尿病患者 53 例,其中包括非肾病 BUN 升高患者 24 例(1 组)和肾病患者 29 例(2 组),糖尿病肾病患者 21 例(3 组)。采用 Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统和 Bio-Rad Variant II 的 HPLC 离子交换系统检测受检者静脉血 HbA1c,对两套系统的检测结果做对比分析。结果 2 组和 3 组离子交换层析检测 HbA1c 结果较亲和层析检测结果偏高且差异具有统计学意义($P < 0.05$),1 组中 HbA1c 检测结果前者低于后者差异无统计学意义($P > 0.05$);各组两类检测系统检测结果均具有较好的相关性;1 组中两类检测系统检测结果差值的 95%CI 为 -0.286~0.043,且差异无统计学意义($P > 0.05$),其他两组两类检测系统检测结果差值的 95%CI 下限分别为 0.284、0.337,且差异均有统计学意义($P < 0.01$);3 组中两类系统检测结果的差值与 BUN 浓度有较好的相关性($P < 0.05$),其余两组两类系统检测结果的差值与 BUN 浓度无相关性($P > 0.05$)。结论 对于 BUN 升高的肾病患者,使用亲和层析检测方法,更能准确有效反映 HbA1c 的真实结果。

【关键词】 糖化血红蛋白;离子交换层析;亲和层析;血尿素氮

Interference of blood urea nitrogen in two different glycohemoglobin detection system

SUN Yan-hong, ZENG Zhi-jie, CHEN Shao-qian, et al. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 Objective To explore the interference of blood urea nitrogen (BUN) in the detection of HbA1c in two different HbA1c detection systems. **Methods** 53 cases nondiabetic patients including 24 cases non-nephropathy with high BUN patients(group 1) and 29 cases nephropathy patients(group 2) and 21 cases diabetic nephropathy patients (group 3) were selected. The HbA1c of the subjects was detected by Primus Ultra2 affinity chromatograph HPLC system and Bio-Rad Variant II ion exchange HPLC system and the results were compared. **Results** The results of Ion Exchange Chromatography method were higher than Affinity Chromatography method in group 2 and group 3 and the differences all had statistical significance($P < 0.05$), while the results was opposite in group 1, and no statistical difference ($P > 0.05$). There were good correlation between the results of the two detection systems. There was no statistical significance in the difference of results between the two detection systems in group 1 (difference 95%CI was -0.286~0.043, $P > 0.05$), but there were statistical significance in the differences of results between the two detection systems in the other two groups(difference 95%CI's lower limit was 0.284, 0.337 respectively, $P < 0.01$). There was correlation between the distinction of the results of the two detection systems and BUN level in group 3 ($P < 0.05$), but in the other two groups there were no correlations ($P > 0.05$). **Conclusion** So we conclude that for nephropathy patients with BUN increased, Primus Ultra2 Affinity Chromatograph HPLC system is a more accurate method to detect HbA1c.

【Key words】 HbA1c; Ion exchange chromatography; Affinity chromatography; Blood urea nitrogen

糖化血红蛋白(HbA1c)是血红蛋白珠蛋白分子的 β 链 N-末端缬氨酸残基与葡萄糖进行非酶促缩合反应的产物。HbA1c 的含量不受血糖浓度暂时波动的影响,可反映近 2~3 个月血糖的平均水平,是评价糖尿病(diabetes mellitus, DM)长期控制效果的良好指标。2002 年美国糖尿病协会明确将 HbA1c 作为 DM 血糖控制的金标准。HbA1c 检测用于常规实

验室始于 20 世纪 70 年代末期,且稳定发展至今,目前临床实验室中应用的 HbA1c 测定方法主要分为两类:一是基于 HbA1c 与非 HbA1c 的电荷不同,如离子交换层析、电泳和等电聚集方法;二是基于血红蛋白上糖化基团的结构特点,如亲和层析和免疫实验。而 HbA1c 的常用测定方法则包括离子交换层析、亲和层析法和免疫分析^[1]。

有文献^[2]报道,肾衰竭和尿素浓度增加的患者,可以观察到羧酸盐浓度上升,并且可检测出氨基酰血红蛋白(carbamylated hemoglobin, CarHb)。CarHb是血浆尿素及其代谢产物羧酸盐与血红蛋白分子进行非酶促反应的产物,是反映尿素浓度及作用时间的参数,其与肾病的关系密切,可作为评估慢性肾衰程度、透析充分性和鉴别急性慢性肾功能衰竭的指标。有文献^[3]报道,1 mmol/L 血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)可生成 0.063% CarHb。CarHb 对 HbA1c 检测的影响较大,常出现血糖控制良好的尿毒症患者 HbA1c 结果增高的情况。研究表明^[4],HbA1c 的检测特别是基于离子交换的检测方法会受到 CarHb 的影响而使结果发生错误的升高。本文拟对不同病理条件下血液标本中 BUN 的浓度对离子交换层析法和亲和层析法在 HbA1c 实际测定中的影响进行分析,探讨其对临床患者检测的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择我院 2008 年 4 月至 2008 年 9 月住院患者共 74 例,男 40 例,女 34 例,平均年龄 58 岁;其中非 DM 患者组 53 例,包括非肾病 BUN 升高者(1 组)24 例和肾病患者(2 组)29 例,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者(3 组)21 例。1 组及 2 组为 BUN> 14.3 mmol/L、HbA1c< 6%,且未做过透析;其中肾病组为肾内病区诊断患有肾脏疾病的患者,非肾病 BUN 升高组患者多来自 ICU 病房和外科病区等,其尿液检查、血肌酐正常,临床诊断排除了肾脏疾病,BUN 升高的原因多为发热、脓毒血症等引起血管内容量不足、低心输出量或胃肠出血后血液蛋白重吸收等。3 组为诊断患有 DN 者(BUN> 14.3 mmol/L、HbA1c 为 6%~9%)。

1.2 仪器与试剂 美国 Bio-Rad 公司 Variant II 及配套试剂和质控物;美国 Primus 公司 Ultra2 及配套试剂和质控物。

1.3 方法 所有患者均空腹采集静脉血 2 ml,ED-TA-K₂ 抗凝,于-20℃保存待测。采用 Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统和 Bio-Rad Variant II 的 HPLC 离子交换系统,质控在控时,检测每个静脉血标本的 HbA1c 结果,每个标本在不同的仪器上重复 3 孔测试,选择稀释模式进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,指标间相关性分析采用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 两类检测系统检测各组 HbA1c 结果的比较

Variant II 和 Ultra2 两类系统检测各组 HbA1c 的结果分别为:5.3%±0.7%、5.4%±0.6%(*P*> 0.05)、5.2%±0.7%、4.9%±0.6%(*P*< 0.05)、7.5%±1.5%、7.0%±1.6%(*P*< 0.05)(图 1)。

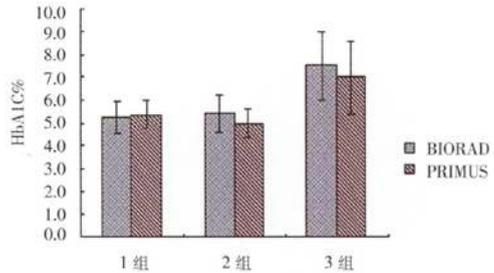


图 1 三组用 BIORAD-Variant II 和 PRIMUS-Ultra2 检测 HbA1c 结果的比较

2.2 两类检测系统检测 HbA1c 结果的相关性 对 74 例患者利用 Variant II 和 Ultra2 两类系统检测的 HbA1c 结果进行相关性分析,其 Pearson 相关系数 *r* 为 0.944;且不同组的相关系数 *r* 分别为 0.764、0.797、0.966,见表 1。

表 1 两类检测系统检测结果的相关性分析

组别	例数	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
患者组	74	0.944	0.000
1 组	24	0.764	0.000
2 组	29	0.797	0.000
3 组	21	0.966	0.000

对两种方法的检测结果进行线性回归分析,两种方法相关性良好。 $y = \text{Ultra2}, x = \text{Variant II}, y = 0.86x + 0.5564, r^2 = 0.892, P < 0.05$ (图 2)。

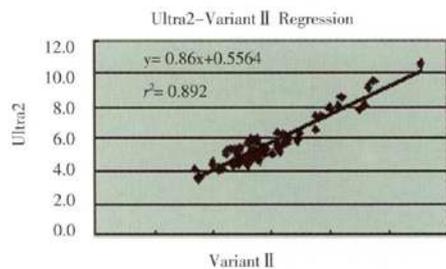


图 2 两类检测系统检测结果线性回归分析

2.3 两类检测系统检测 HbA1c 结果的比对分析 由表 2 所示:1 组中两类系统检测 HbA1c 结果差值的 95%CI 为-0.286~0.043,且其差异无统计学意义(*P*> 0.05);2 组和 3 组中 Variant II 比 Ultra2 检测结果偏高,差值的 95%CI 下限分别为 0.284、0.337,且其差异均有统计学意义(*P*均< 0.01)。

2.4 两类系统检测 HbA1c 结果差值与 BUN 浓度之

表 2 两类不同检测系统检测 HbA1c 结果比对分析

组别	例数	$\bar{x} \pm s$	95% 置信区间	t 值	P 值
患者组	74	0.247±0.055	0.137~0.358	4.457	0.000
1 组	24	-0.122±0.080	-0.286~0.043	-1.524	0.140
2 组	29	0.407±0.075	0.284	5.407	0.000*
3 组	21	0.483±0.089	0.337	5.412	0.000*

注: * 采用的是单侧的 t 检验

间的关系 74 例患者两类系统检测结果的差值与 BUN 浓度进行相关性分析, 其 Pearson 相关系数 r 值为 0.073, $P=0.533$, 两类系统检测结果的差值与 BUN 的浓度无线性相关性。1、2、3 三组, 两类系统检测 HbA1c 结果差值与 BUN 浓度的相关性分析, 其 Pearson 相关系数 r 值分别为 0.321、0.060、0.531, P 值分别为 0.110、0.757、0.013(表 3)。三个组中仅第 3 组, 两类检测系统检测 HbA1c 结果差值与 BUN 浓度有较好的相关性。

表 3 两类系统检测 HbA1c 结果的差值与 BUN 浓度的相关性分析

组别	例数	r 值	P 值
患者组	74	0.073	0.533
1 组	24	0.321	0.110
2 组	29	0.060	0.757
3 组	21	0.531	0.013

3 讨论

HbA1c 是血红蛋白珠蛋白分子的 β 链 N-末端缬氨酸残基与葡萄糖进行非酶促缩合反应的产物, 整个反应分两步, 首先形成不稳定的 Schiff 碱, 再经过 Amadori 重排, 形成稳定的酮胺化合物, 即 HbA1c^[9]。它的合成过程是缓慢且不可逆的, 积累并持续于红细胞 120 d 生存期中, 合成速率与红细胞所处环境中葡萄糖的浓度成正比。HbA1c 能够反映患者测定前 2-3 个月的平均血糖水平, 是评价血糖控制水平的重要指标。目前临床实验室常用的 HbA1c 测定方法有离子交换层析、亲和层析法和免疫分析^[1]。

本文采用 Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统和 Bio-Rad Variant II 的 HPLC 离子交换系统检测 HbA1c。其中 Bio-Rad Variant II 利用弱酸性阳离子交换树脂, 在选定低浓度洗脱液的离子强度及 pH 条件下, 利用不同成分的血红蛋白的带电性不同, 通过离子交换的管柱达到分析 HbA1c 的效果, 即基于 HbA1c 与其他血红蛋白电荷的不同进行分离; Primus Ultra2 利用葡萄糖和血红蛋白稳定结合会产生能与硼酸盐特异性结合的顺位二醇官能基, 使 HbA1c 选择性地结合于柱上, 而非 HbA1c 被洗脱而

分离测定。该方法利用硼酸盐与顺位二醇官能基唯一-特异性结合的特性检测所有被糖化的血红蛋白。

有文献^[2]报道, 肾衰竭和尿素浓度增加的患者, 可以观察到氰酸盐浓度上升并且可检测出 CarHb。CarHb 是在红细胞生存期内, 血红蛋白与血中异氰酸缓慢、连续的非酶促化学反应的产物。尿素在体内自发分解成铵与氰酸盐, 后者的反应形式异氰酸能使血红蛋白 HbA 中珠蛋白分子的两对肽链, 即 α 链和 β 链发生氨甲酰化, 其氨甲酰化的位置主要发生在肽链中 N-末端缬氨酸残基的 α -氨基基团上。CarHb 形成的化学反应式及步骤见图 3^[6]。

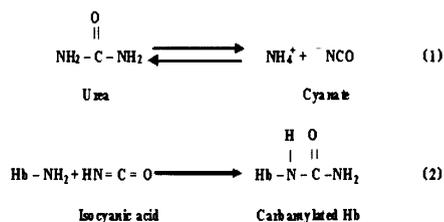


图 3 CarHb 形成的化学反应式及步骤

注: (1) 尿素自发分解为铵与氰酸盐; (2) 血红蛋白末端氨基与异氰酸反应形成 CarHb

CarHb 是反映尿素浓度及作用时间的参数。研究表明^[3], 在肾衰、尿毒症患者中, 1 mol/L 的 BUN 将产生 0.063% 的 CarHb。CarHb 与 HbA1c 的等电点相似, 在离子交换 HPLC 分析图上可能呈现一个独立的峰, 也可能与 HbA1c 峰重叠(视离子交换柱的分离能力而定), 因此在离子交换层析中 CarHb 可被错误的检测为 HbA1c, 使 HbA1c 发生错误的偏高^[7]。亲和层析高效液相方法利用硼酸盐与顺位二醇官能基特异性结合检测所有被糖化的血红蛋白^[8]。研究证明, 亲和层析方法在检测 HbA1c 时, 不会受到 CarHb 的干扰^[3,9,10], 故亲和层析法特异性强, 不受异常血红蛋白的影响, 检测所有被糖化的血红蛋白, 用经验算法从总 HbA1c 值计算出标准的 HbA1c, 客观的反应 HbA1c 的真实水平。

本文研究中的 74 例患者, 两类系统检测 HbA1c 结果差值的 95% CI 为 0.137~0.358, $P=0.000$, 提示对于 BUN 升高标本, 利用 Variant II 检测的结果比 Ultra2 检测的结果偏高。对于非肾病 BUN 升高组, 两类系统检测 HbA1c 结果差值的 95% CI 为 -0.286~0.043, $P=0.140$, 且其差异无统计学意义, 提示非肾病因素引起的 BUN 升高不能导致文献^[10]中报道的 HbA1c 的检测差异, 可能原因是 BUN 的升高在体内要达到一定的时间后才能形成 CarHb; 而非 DM 组中的肾病组和 DN 组, 两类系统检测

HbA1c 结果差值的 95% CI 下限分别为 0.284、0.337, $P=0.000$, 且其差异均有统计学意义, 提示肾病因素的 BUN 升高可导致两类系统检测结果存在显著性差异。非肾病 BUN 升高组多为肾前性因素引起的 BUN 浓度升高, 其病程短, 而 CarHb 是尿素和时间累积的产物, 由此推测非肾病 BUN 升高组形成的 CarHb 浓度低, 对离子交换层析方法的影响小; 肾病因素引起的 BUN 浓度升高, 其病程较长, 高浓度 BUN 长时间的累积形成较高浓度的 CarHb, 对离子交换层析的方法影响大。如能利用 HPLC 直接检测 CarHb 的含量更具说服力。两类系统检测 HbA1c 结果的差值与 BUN 浓度的相关性分析提示两类系统检测的差异与 BUN 的浓度无线性相关性 (Pearson 相关系数 $r=0.073$, $P=0.533$), 说明 BUN 升高并不是影响两类系统检测 HbA1c 结果差异的唯一因素。在 DN 患者组中, 两类系统检测 HbA1c 结果的差值与 BUN 浓度的 Pearson 相关系数 r 为 0.531, $P=0.013$, 提示在 DN 患者组中两类系统检测结果的差值与 BUN 浓度存在较好相关性, BUN 浓度越大, 检测结果的差异越大, 因此可以推测血 BUN 浓度对非 DN 患者测定 HbA1c 不随 BUN 浓度的变化而发生线性变化, 仅对 DN 患者的 HbA1c 的测定产生浓度依赖效应。至于非 DN 组 HbA1c 与 BUN 不存在线性相关, 可能与 BUN 浓度分布情况有关, 鉴于样本例数及时间有限, 没有对 BUN 浓度进行分层进而分析各层中两类检测系统检测 HbA1c 的差异与 BUN 浓度的关系, 是本文研究的不足之处, 有待以后进一步的研究。

对于临床上的一般血液标本, 包括非肾病因素的 BUN 升高标本, 利用 Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统和 Bio-Rad Variant II 的 HPLC 离子交换系统检测 HbA1c, 两种检测结果无显著性差异; 对于 BUN 升高的肾病患者标本, 包括 DN 患者, 两类系统检测结果有一定差异, Bio-Rad Variant II 的 HPLC 离子交换系统检测结果相对偏高。故使用离子交换层析检测 HbA1c 结果发生异常增高时应引

起注意, 特别是 BUN 升高的肾病患者, 应排除 CarHb 等异常血红蛋白的影响。对于 BUN 升高的肾病患者, 使用亲和层析检测方法, 更能准确有效反映 HbA1c 的真实结果。

4 参考文献

- Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27: 1761-1773.
- Lamb E, Dawnay A. Glycated haemoglobin measurement in uraemic patients. *Ann Clin Biochem*, 1992, 29: 118-120.
- Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CWM, et al. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay. *Clin Chem*, 1993, 39: 138-142.
- Bannon P, Lessard F, Lepage R, et al. Glycated hemoglobin in uremic patients as measured by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem*, 1984, 30: 485-486.
- Kwan JT, Carr EC, Barron JL, et al. Carbamylated haemoglobin in normal, diabetic and uraemic patients. *Ann Clin Biochem*, 1992, 29: 206-209.
- Kwan JT, Carr EC, Bending MR, et al. Determination of carbamylated hemoglobin by high performance liquid chromatography. *Clin Chem*, 1990, 36: 607-610.
- Cas W, Weykamp Ia, Kor Miedema, et al. Carbamylated Hemoglobin Interference in Glycohemoglobin Assays. *Clinical Chemistry*, 1999, 45: 438-440.
- 王虹, 高颖, 纪立农. Primus Ultra2 亲和层析 HPLC 系统在糖化血红蛋白检测上的临床应用. *中国检验医学杂志*, 2006, 7: 185-186.
- Bruns DE, Lobo PI, Savory J, et al. Specific affinity-chromatographic measurement of glycated hemoglobins in uremic patients. *Clin Chem*, 1984, 30: 569-571.
- Morgan LJ, Marenah CB, Morgan AG, et al. Glycated haemoglobin and fructosamine in non-diabetic subjects with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 1990, 5: 868-873.

(收稿日期: 2010-02-18)

(本文编辑: 杨军)

(上接 122 页)

- 潘柏申. 重视尿白蛋白检测的临床应用. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 1085.
- 郭玮, 吴桐. 不同时段尿白蛋白在诊断早期糖尿病肾脏损伤中的应用. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 1091.
- Acks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and recommenda-

- tions for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*, 2002, 48: 436.
- Jovanovic D, Krstivojevic P, Obradovic I, et al. Serum cystatin C and beta 2-microglobulin as markers of glomerular filtration rate. *Ren Fail*, 2003, 25: 123-133.

(收稿日期: 2009-12-21)

(本文编辑: 张志成)