

硝基四氮唑蓝法测定糖化血清蛋白的影响因素分析及对策*

彭秀娟,马永能,杨星悦,刘 珊,何 芳,刘国雄

(四川省绵阳市第三人民医院检验科,四川绵阳 621000)

[摘要] **目的** 探讨低清蛋白(Alb)血、高胆红素血对糖化血清蛋白(GSP)测定结果的影响。为临床诊断糖尿病(DM)、监测血糖控制水平提供可靠的参考数据。**方法** 根据需要分 3 组:正常对照组选择健康体检者 80 例;低 Alb 试验选择被临床初诊为 DM 的患者 159 例,其中 Alb 正常的 DM 患者 83 例为 DM 组,Alb 降低的糖尿病肾病(DN)患者 76 例为 DN 组;高胆红素组选择总胆红素增高而 Alb 和葡萄糖均正常的患者 186 例。采用贝克曼 AU2700 全自动生化分析仪测定 GSP、Alb、总胆红素(TBIL)和血糖等水平。分析 GSP 的水平与 TBIL 的关系。**结果** (1)DM 组 GSP 明显高于正常对照组和 DN 组($P < 0.01$),而 DN 组 GSP 明显低于正常对照组($P < 0.01$)。(2)采用直线相关分析发现,GSP 的水平与 TBIL 呈正相关($r^2 = 0.434, P < 0.01$)。**结论** 血 Alb 测定值低于 40.0 g/L,或者 TBIL 高于 55.0 $\mu\text{mol/L}$,用硝基四氮唑蓝显色法测定 GSP 不能作为判断患者短期(2~3 周)体内血糖的平均水平,应结合临床和糖化血红蛋白来评估。

[关键词] 血清蛋白;胆红素;血清白蛋白;糖化血红蛋白**[中图分类号]** R446.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)16-2231-03

The influence factors analysis and countermeasures on the determination of glycosylated serum protein with nitro blue tetrazolium method*

Peng Xiujuan, Ma Yongneng, Yang Xingyue, Liu Shan, He Fang, Liu Guoxiong

(Clinical Laboratory, Third People's Hospital of Mianyang County, Mianyang, Sichuan 621000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of hypoalbuminemia, hyperbilirubinemia on determination of glycosylated serum protein(GSP), and then provide reliable reference data for clinical diagnosis and monitoring of blood glucose control level. **Methods** According to the need, all cases were divided into 3 groups. Eighty healthy individuals were chosen as the normal control group. A total of 159 cases who have been initially diagnosed with diabetes were selected for low Alb test, including 83 cases of diabetic patients with normal Alb(DM group) and 76 diabetic nephropathy patients with hypoalbuminemia(DN group). The patients with hyperbilirubinemia, but being normal in Alb and glucose were selected as hyperbilirubinemia group. Beckman AU2700 automatic biochemical analyzer was used to determine of GSP, Alb, total bilirubin(TBIL) and blood sugar levels. **Results** (1)The Welch's correction *t* test analysis showed that the GSP levels in DM group were significantly higher than those in normal control group ($P < 0.01$). On the contrary, the GSP in DN group was lower than that of normal control group and DM group ($P < 0.01$). (2)The linear correlation analysis showed that the level of GSP was positively correlated with TBIL($r^2 = 0.434, P < 0.01$). **Conclusion** Either the concentration of serum Alb is lower than 40.0 g/L, or the measured value of TBIL is higher than 55.0 $\mu\text{mol/L}$, the determination of GSP prote with nitro blue tetrazolium colorimetric method can not be used to judge in short-term (2 to 3 weeks) average blood glucose level. The assessment of blood glucose level should be combined with clinical or determination of glycosylated hemoglobin.

[Key words] glycosylated serum protein; bilirubin; albumin; serum glycosylated hemoglobin

糖尿病(diabetes mellitus, DM)作为危害人类健康的重要疾病之一,其患病率逐年上升,预计至 2030 年将达 4.39 亿人^[1-2]。早在 2010 年,糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, GHb)被美国糖尿病协会推荐作为 DM 患者血糖控制监测、筛查和诊断糖尿病的常用实验指标^[3],但 GHb 的检测需要特殊的仪器,费用昂贵,在我国还未能普及。而常用的四氮唑蓝比色法(NBT)测定糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP)可以弥补价钱昂贵的缺点,是目前临床诊断 DM 或监测血糖控制的常用指标^[4]。GSP 是血液中的葡萄糖(glucose, Glu)与血清蛋白分子发生的非酶促糖化反应的产物,由于清蛋白的半衰期大约为 17~21 d,故 GSP 水平可有效反映患者过去 2~3 周内的平均葡萄糖水平,是检测 DM 患者血糖

控制非常适宜的指标^[5-6]。在实际工作中常发现 GSP 在低清蛋白(albumin, Alb)血中降低而在高胆红素血中升高的现象,这使得医生不能准确判断患者体内的血糖水平,患者得不到及时治疗,增加了医疗风险。本文拟对低 Alb 血和高胆红素血对 GSP 测定影响作一评估,以便临床医生正确评估患者的病情。虽然 GHb 中的 HbA1c 的测定易受血红蛋白其他(如 HbA0 等)成分的干扰^[7],但不受饮食、低蛋白和黄疸等影响因素的干扰,故在本研究中,采用 HbA1c 的测定结果作为评估血糖浓度的“金标准”。

1 资料与方法

1.1 一般资料 正常对照组选择 2013 年 9 月本院体检职工 80 例,所有的受试者均无基础疾病,要求清晨抽空腹血 3~5

* 基金项目:绵阳市科技局基金资助项目(14S-ZC-06);绵阳市卫生局基金资助项目(201232,201426);绵阳市第三人民医院基金资助项目(201441)。 作者简介:彭秀娟(1977-),主管检验师,硕士,主要从事临床免疫学检验工作与研究。

mL,且血清 Alb 正常(40.0~60.0 g/L)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)测定值正常(5.1~19.0 μmol/L);同时要求空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)正常(3.9~6.11 mmol/L)。低 Alb 和高胆红素试验组选取 2013 年 7~12 月本院住院或门诊的患者。低 Alb 试验选取临床已经确证的 DM 患者 159 例,其中 Alb 正常的单纯糖尿病(DM)患者 83 例(DM 组),清蛋白(Alb<40.0 g/L)降低的糖尿病肾病(DN)患者 76 例(DN 组);高胆红素组选择 TBIL 增高大于 55.0 μmol/L 而 Alb 和 Glu 正常的患者 186 例。

1.2 仪器 贝克曼 AU2700 全自动生化分析仪、Bio-Rad D-10 糖化血红蛋白仪

1.3 方法 GSP 采用 NBT 法,试剂由浙江宁波美康生物科技股份有限公司提供,正常参考范围为 1.00~2.14 mmol/L; Alb 测定采用溴甲酚绿(BCG)法,正常参考范围为 40.0~60.0 g/L;血糖测定采用己糖激酶(HK)法,正常参考范围为 3.90~6.11 mmol/L;TBIL 测定采用钒酸盐氧化(VO)法,正常参考范围 5.1~19.0 μmol/L,试剂均由上海科华生物工程股份有限公司提供。TBIL、Alb、血糖和 GSP 的测定采集受试者肘静脉血 3~5 mL,4 000 r/min,离心 5 min,取上层血清用 AU2700 全自动生化分析仪进行测定,对各组结果进行比较分析;HbA1c 的检测于采集受试者肘静脉血 3 mL 采用高效液相色谱法(Bio-Rad D-10 HbA1c 仪)进行检测,实验所用试剂是仪器配套试剂,性能稳定,并严格按说明书操作,正常参考范围为 4.0%~6.5%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 低 Alb 血中 GSP 结果降低 经方差分析 DM、DN 组 Glu、Alb、GSP 与正常对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$);经 *t* 检验分析 DM 组 GSP 明显高于正常对照组($P<0.01$),而 DN 患者组 GSP 明显低于正常对照组且低于 DM 组($P<0.01$)。各组 GSP 的检测结果见表 1,图 1。

表 1 DN 组与正常对照组及 DM 组 GLU、Alb 及 GSP 的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Glu(mmol/L)	Alb(g/L)	GSP(mmol/L)
正常对照组	80	4.68±0.64	44.1±4.2	1.37±0.09
DM 组	83	11.36±3.62	40.17±5.6	2.67±0.37
DN 组	76	13.94±3.17	31.7±4.2	1.12±0.23

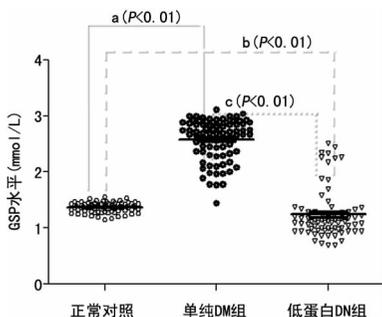


图 1 DN 组、正常对照组及 DM 组 GSP 的检测结果

2.2 血清 Alb 降低时, Glu 与 GSP 无相关性 直线相关分析

表明,在正常对照组中,Alb 水平正常时, Glu 与 GSP 成正相关($r^2=0.389, P<0.01$),而当 Alb 水平明显降低(DN 组)时, Glu 与 GSP 无相关性($P>0.05$)。

2.3 高胆红素血使 GSP 测定值增高 TBIL 测定采用钒酸盐氧化法,试剂本身有一定的抗胆红素干扰能力,按照厂家提供的说明表示,血标本中 TBIL 含量小于 5 mg/dL(大约 83.3 μmol/L)采用本方法对 GSP 的测定没有影响,但在实际工作中,结合临床诊断和 GHb 结果分析发现, TBIL>55.0 μmol/L 即有可能对 GSP 的测定造成影响,故本研究采用血标本中 TBIL>55.0 μmol/L 为高胆红素血。采用直线相关分析发现, GSP 的水平与 TBIL 呈正相关($r^2=0.434, P<0.01$)。见图 2。

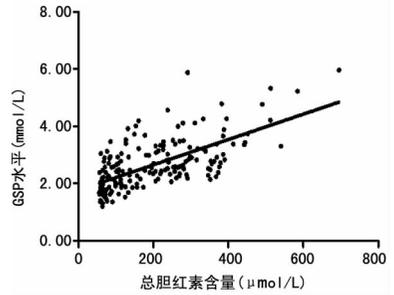


图 2 高胆红素血对 GSP 测定的影响

表 2 DN 组 GSP 和 HbA1c 的检测结果(n)

GSP 检测结果	HbA1c 检测结果		合计
	+	-	
+	6	1	7
-	49	20	69
合计	55	21	76

表 3 高胆红素组 GSP 和 HbA1c 的检测结果(n)

GSP 检测结果	HbA1c 检测结果		合计
	+	-	
+	4	128	132
-	2	52	54
合计	6	180	186

2.4 血 Alb 降低或 TBIL 升高时,需测定 GHb 反映患者平均血糖水平 为了更清楚地说明低清蛋白血和高胆红素血对 GSP 测定的影响,本研究同时用高效液相色谱法测定了 DN 组和高胆红素组试验者的 HbA1c。HbA1c 正常参考范围为 4.0%~6.5%,将大于 6.5%定义为阳性,小于 6.5%定义为阴性;GSP 正常参考范围为 1.00~2.14 mmol/L,将大于 2.14 定义为阳性,小于 2.14 定义为阴性,应用四格表 χ^2 检验(表 2 和表 3)对 GSP 和 GHb 两种方法评价血糖控制做相应评价,表 2 为 DN 组 GSP 和 HbA1c 的检测结果,发现 HbA1c 测定阳性的患者 55(72.3%)例, GSP 测定阳性的患者 7(9.2%)例($\chi^2=46.08, P<0.05$);表 3 为高胆红素组 GSP 和 HbA1c 的检测结果,发现 HbA1c 测定阴性的患者是 180(96.7%)例, GSP 测定阴性的患者是 54(29.0%)例($\chi^2=122.1, P<0.05$)。结果表明,两种测定方法差异有统计学意义,即当血清蛋白降低或总胆红素升高时,采用高效液相色谱法测 GHb 较 NBT 法测

GSP 更能反映患者真实的平均血糖水平,为医生提供更为有用的实验室参考。

3 讨 论

内源性或者外源性物质的干扰是影响实验室检测结果,造成错误测定和误判的主要原因之一。大量的研究表明,主要的内源性物质包括 M 蛋白、自身抗体、胆红素、脂肪和血红蛋白^[8-11]。而 Steen 等^[12]的研究表明严重的黄疸、脂血及溶血等标本,对实验结果有显著的影响。在比色法中改变了色度,或多或少会影响测定结果的准确性。对于全自动生化分析仪,目前通过设定双试剂、双波长等来减少或者消除实验方法或者干扰物对测定结果的影响,但是对个别项目来说,其影响仍很严重,影响了临床医生对疾病的诊断和判断。为了降低医疗风险,为临床医生提供符合患者病情的准确的检验结果,越来越多的研究者致力于这些干扰物对测定结果影响的研究,期望能消除干扰带来的影响。李文郎等^[13]在健康人血清中加入不同浓度的胆红素来评估其对 GSP 测定的影响,发现胆红素浓度越高,GSP 假性升高得越多。而清蛋白对 GSP 测定结果的影响也越来越被重视^[14]。在日常工作中,作者发现高胆红素和低 Alb 对 GSP 的测定结果影响非常严重,从表 1 和图 1 可以看出在血糖正常的正常对照组 GSP 的水平为 1.28~1.46 g/L (平均值为 1.37 g/L);而在 Alb 降低的 DN 患者中 GSP 明显降低,其 GSP 均值与正常对照组和 DM 组有明显的差异;而此时的血糖水平均值(13.94±3.17) mmol/L,明显高于正常对照组的(4.68±0.64) mmol/L 和 DM 组的(11.36±3.62) mmol/L。直线相关分析表明,在健康人中,Alb 水平在正常范围波动时,Glu 与 GSP 成正相关($r^2=0.389, P<0.01$),而在 Alb 浓度明显降低的 DN 组,Glu 与 GSP 不在具有相关性($r^2=0.161\sim 0.203, P>0.05$)。由此可见,血清清蛋白降低时,采用 NBT 法测定 GSP 已不能反映患者体内 2~3 周血糖的平均水平。

另一组高胆红素血的实验表明,当血清 TBIL 升高,GSP 假性升高。当 TBIL 高于 55.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,GSP 明显升高,而且随着 TBIL 水平的升高,GSP 的测定值也相应增高。作者采用直线相关分析发现,GSP 的水平与 TBIL 呈直线正相关($r^2=0.434, P<0.01$)。

为了更清楚地说明低 Alb 血和高胆红素血对 GSP 测定的影响,本研究同时测定了低 Alb DN 组和高胆红素组试验者的 HbA1c。同时将低于和高于 HbA1c 和 GSP 正常参考范围相应的设定为阴性和阳性建立四格表,发现在 DN 组,HbA1c 阳性的 55 例,其中 HbA1c 单独阳性的 49 例(89.09%);而在血糖正常的高胆红素组,HbA1c 阴性的 180 例,其中 HbA1c 单独阴性的 128 例(71.11%),两个试验均说明当 Alb 降低或 TBIL 升高时,与 GSP 测定相比,GHb 中 HbA1c 测定更能准确反映患者的真实血糖水平,对患者体内的血糖控制和治疗监测更有意义。上述试验结果表明,当清蛋白低于 40.0 g/L 或者 TBIL 高于 55.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,用 NBT 法测定 GSP 也不能作为判断患者短期(2~3 周)体内血糖的平均水平,需要结合临

床和采用 GHb 来综合评估。

参考文献

- [1] Danaei G, Finucane MM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants [J]. *Lancet*, 2011, 378(9785): 31-40.
- [2] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.
- [3] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010 [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(1): S11-61.
- [4] Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycosylated albumin as another glycemic control marker [J]. *Endocr J*, 2010, 57(9): 751-762.
- [5] 王迪,尹福在,李慧妍. 糖化血红蛋白及糖化血清蛋白与糖尿病肾功能衰竭患者的血糖监测 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2009, 29(z1): 4-6, 9.
- [6] 李沛霖,杨锐,周勇,等. 糖尿病肾病患者糖化血清蛋白测定的意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(6): 1093-1094.
- [7] Lo VM, Ma ES, Chau EM, et al. A spuriously 'normal' haemoglobin A1c result [J]. *Ann Clin Biochem*, 2012, 49(Pt 4): 408-411.
- [8] Dimeski G. Interference testing [J]. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29 Suppl 1: S43-48.
- [9] Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay [J]. *Clin Biochem Rev*, 2004, 25(2): 105-120.
- [10] Ismail AA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know [J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(8): 673-678.
- [11] Sturgeon CM, Viljoen A. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk [J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48(Pt 5): 418-432.
- [12] Steen G, Klerk A, Van Der Laan K, et al. Evaluation of the interference due to haemoglobin, bilirubin and lipids on Immulite 2 500 assays: a practical approach [J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48(2): 170-175.
- [13] 李文郎,陈爱华,黄国清. 胆红素对果糖胺测定的影响分析 [J]. *中国医药导刊*, 2010, 12(11): 1996.
- [14] 程涌江,林柳青. 血清清蛋白水平对果糖胺浓度的影响 [J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(21): 2719-2721.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-02-26)