

糖化血红蛋白标准化及其检测技术的发展*

周文娟 吴云翔 易 军**

(南京理工大学环境与生物工程学院, 南京 210094)

摘要 糖尿病已成为继心血管疾病和癌症之后威胁人类健康的三大杀手之一。糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA_{1c})是反映血糖控制状况的重要指标,可预示并发症发生的风险,具有重要的临床研究价值。美国糖尿病协会(ADA)与世界卫生组织(WHO)于2010~2011年相继推荐其为糖尿病诊断的新标准,并采用HbA_{1c}≥6.5%作为临床诊断切点。中国关于HbA_{1c}的研究起步较晚,尚无国家化的标准检测方法,检测质量与国际标准法存在较大差距。同时,由于种群之间的差异性,国际标准所推荐的糖尿病诊断切点,不一定适用于中国人群。为此,本文综述了:a. HbA_{1c}的测定标准法,简介了国际及国家标准法的发展建立,以及两类标准方法的相互关系;b. HbA_{1c}的临床检测,概述了亲和层析法、免疫法及酶法在其测定中的应用;c. HbA_{1c}的即时检测,介绍了数种商业化即时检测仪的信息。旨在为促进国内HbA_{1c}临床检测技术的发展以及家用化HbA_{1c}检测仪的设计提供信息支持。

关键词 糖尿病,糖化血红蛋白,临床诊断,即时检测

学科分类号 Q51, R587.1, TQ937

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0281

近年来,由于人们生活水平的提高,现代生活方式的转变,以及社会老龄化的加速,糖尿病逐渐成为威胁人们健康的主要非传染流行病之一。国际糖尿病联合会最近一期的调查报告显示,2013年世界范围内的糖尿病患者总人数大约为3.82亿,其中46%的患者并未意识到自己的病情。糖尿病致死总人数仅2013年就达到510万,平均每6秒便有一人死于糖尿病,当年该项医疗支出超过5480亿美元。而糖尿病已经不再是人们常常认为的“富贵病”,80%的糖尿病患者来自于中等、低收入国家。其中我国就有接近1亿糖尿病患者,居全球首位^[1]。

糖尿病是胰岛素分泌缺陷或作用障碍引起的慢性代谢紊乱疾病,临床表现为机体血糖含量明显升高。当机体长期处于高血糖环境下,会促进体内蛋白质的糖化反应,进而改变蛋白质结构,损害其正常功能,导致糖尿病相关并发症的发生。糖基化血红蛋白(glycohemoglobin, GHb)作为一种典型的糖化蛋白质,反映一段时间内(2~3个月)平均血浆葡萄糖浓度,用以表征糖尿病人体内血糖控制状况^[2-3]。

GHb是血红蛋白与糖类化合物发生非酶促化学反应所形成的稳定糖化产物,源于血红蛋白翻译后的修饰,因此蛋白糖基化反应并不改变血红蛋白氨基酸序列。糖化位点可为血红蛋白 α 亚基、 β 亚基的第1位缬氨酸主链氨基以及部分赖氨酸侧链氨基,但这些位点的糖化概率有着巨大差异。Shapiro等^[4]通过对人体血红蛋白体内以及体外糖基化位点进行的研究,指出由于缬氨酸 α -NH₂的pKa值远低于赖氨酸 ϵ -NH₂,且二者所处环境存在差异(空间位阻以及周围基团电荷差异),在体内环境下 β 亚基的第1位缬氨酸主链氨基的糖化概率最高(该糖化位点见图1)。而根据糖种类,糖基化血红蛋白可分为葡萄糖糖化、果糖糖化以及乳糖糖基化血红蛋白等。人体内游离的葡萄糖含量远高于其他

* 国家自然科学基金(面上项目21271104,青年项目31200555)和中央高校基本科研业务费专项资金(30920140111011)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 025-84303273, E-mail: yijun@njust.edu.cn

收稿日期: 2014-10-05, 接受日期: 2015-03-23

糖类物质，β亚基的氮端缬氨酸主链氨基的糖化概率最高，因此体内大部分糖基化血红蛋白为β亚基氮端缬氨酸与葡萄糖的加合物，该物质被命名为HbA_{1c}。

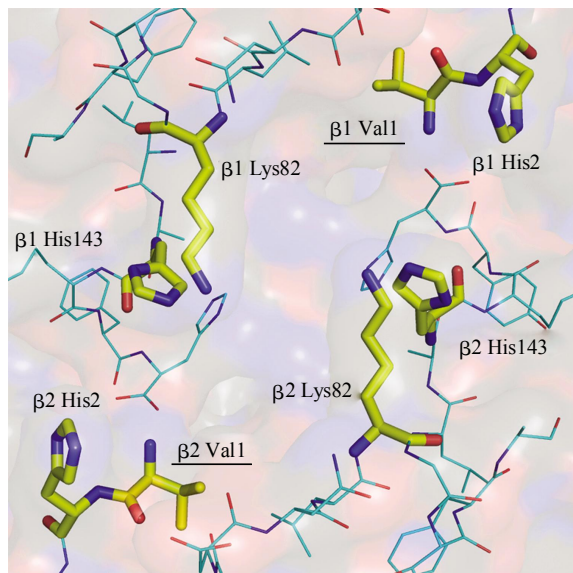


Fig. 1 Glycation site of HbA_{1c} formation
图1 HbA_{1c}糖基化位点结构图

1958年，Allen等^[9]首次从健康成人血液中分离出几种洗脱早于正常成人血红蛋白(adult hemoglobin, HbA)的成分，统称为快速洗脱血红蛋白，其中包括HbA_{1c}。Bunn等^[10]通过对HbA_{1c}的水解产物进行实验分析，证实其糖化位点为血红蛋白β链的第1位缬氨酸的α氨基，中性的α氨基与具开环结构葡萄糖的醛基在非酶促条件下发生可逆的亲核加成，形成不稳定的席夫碱，其中部分席夫碱经由不可逆的阿马杜里(Amadori)重排，形成稳定的酮氨结构即HbA_{1c}(图2)。值得关注的是，从结构功能学角度研究Hb糖基化反应仍为空白。例如，该过程中关键一步即席夫碱形成在体内受葡萄糖及Hb结构影响，体现在以下三个方面：a. 亲核加成反应需要β亚基的第1位缬氨酸主链氨基为中性，而在生理环境下部分Hb该位点的氨基带正电；b. 体内葡萄糖绝大部分以环状半缩醛形式存在，不利于亲核加成反应；c. 不同构象(如，紧张态或舒张态)的Hb由于四级结构变化，导致葡萄糖绑定点的空间结构和环境变化。这些因素都将直接或间接影响体内HbA_{1c}的形成。

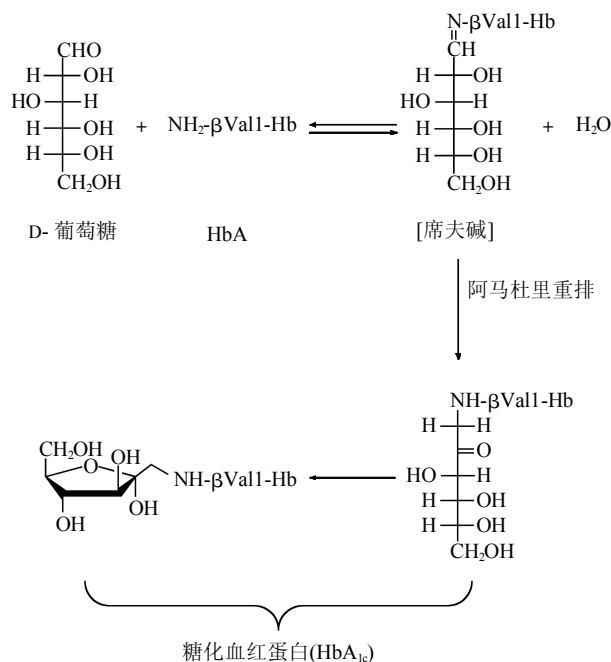


Fig. 2 Nonenzymatic formation of HbA_{1c}
图2 非酶促糖化血红蛋白形成过程

HbA_{1c}在临床具有重要的研究价值，其应用受到研究者的重视。Koenig等^[7]通过研究糖尿病人HbA_{1c}、空腹血糖以及糖耐受量的关系，建议采用HbA_{1c}作为糖尿病控制水平的一项监控指标。Gabbay等^[8]通过研究胰岛素依赖型少年糖尿病人体内高糖与高脂相关性，证实了GHb(特别是HbA_{1c})的含量有助于反映糖尿病人长期血糖控制状况的好坏。国际临床化学联合会(International Federation of Clinical Chemistry, IFCC)于20世纪90年代组建了致力于HbA_{1c}标准化的工作组，并于2002年公布了HbA_{1c}检测的国际标准法^[9]。同时，美国糖化血红蛋白标准化计划组织(National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP)、日本糖尿病协会/日本临床化学协会(Japanese Diabetes Society/Japanese Society for Clinical Chemistry, JDS/JSCC)、Swedish相继建立了各自的国家标准法^[10-11]。IFCC、NGSP在随后数年对各自标准法测定结果的准确度、精密度及稳定性进行了调查研究，证实以上方法应用于临床的可靠性^[11-12]。

HbA_{1c}标准化工作的成功，使得其在临床应用更加广泛，2010年和2011年，美国糖尿病协会

(American Diabetes Association, ADA)与世界卫生组织(World Health Organization, WHO)相继推荐使用 HbA_{1c} 含量作为糖尿病诊断的新标准, 采用 HbA_{1c} ≥ 6.5% 作为临床诊断切点^[13-14]. Tankova 等^[15]通过比较 HbA_{1c} 指标与其他糖尿病诊断标准之间的相关性, 证实其作为糖尿病监控指标的可靠性和实用性. 2013 年, 纪立农等^[16]出版了第一本系统介绍 HbA_{1c} 的书籍, 着重从 HbA_{1c} 与糖尿病管理、诊断及筛选的角度, 阐述了 HbA_{1c} 指标在临床应用的重要性, 同时对 HbA_{1c} 检测国际标准化进程和中国标准化进程做了详细介绍. 最近, Little 等^[17]对 NGSP 和 IFCC 关于 HbA_{1c} 标准化的工作进行了回顾, 指出 HbA_{1c} 检测技术的发展以及标准化的普及已取得一定成就, 但其完善化工作仍任重而道远.

标准法需要贵重的仪器以及复杂的操作, 使得其在临床推广上存在困难. 基于 GHb、HbA_{1c} 结构特点, 建立了针对测定 GHb 的亲亲和层析法和针对测定 HbA_{1c} 的免疫法及酶法, 这些方法无需专业配套仪器, 可结合医疗机构现有的检测设备进行测定, 适合于临床应用的推广^[18-23]. 随着糖尿病患者人数激增, 人们对自身健康意识的提高, 越来越多的人开始关注自身血糖控制状况, HbA_{1c} 即时检测设备(point of care, POC)已陆续市场化^[24]. 目前市面出现的 HbA_{1c} 即时检测设备更多适用于医疗机构, 其家用化进程受检测技术的局限仍进展缓慢.

我们在血红素蛋白的结构功能学及其调控重要生物分子新陈代谢机理方面具有丰富的研究经验, 希望借助于 HbA_{1c} 结构功能学信息, 为家用 HbA_{1c} 即时检测仪的设计提供新思路^[25-26]. 并从结构功能学角度阐明 HbA_{1c} 与糖尿病并发症的相关性, 提升 HbA_{1c} 检测指标作为糖尿病诊断、治疗的指导价值.

中国关于 HbA_{1c} 的研究起步较晚, 尚无国家化的标准检测方法, 其检测质量与国际标准法存在较大差距. 同时, 由于种群之间的差异性, 国际标准所推荐的 HbA_{1c} ≥ 6.5% 的糖尿病诊断切点, 不一定适用于中国人群^[27-28]. 为此, 本文综述了 HbA_{1c} 检测的国际标准法、几种国家标准法及目前临床常用的几种检测法, 为进一步推进中国 HbA_{1c} 标准化进程以及检测方法的研究提供信息支持.

1 HbA_{1c} 标准法

1.1 IFCC 方法

根据 GHb(包括 HbA_{1c})电荷、结构及化学性质

的特异性, 研究人员设计了一系列的 GHb 检测方法, 如离子交换色谱法、电泳法、亲和色谱法、免疫法等^[29]. 这些方法基于不同的检测原理及测定对象(如离子交换法针对 HbA_{1c}, 亲和色谱法针对总体 GHb 等), 在操作要求、环境以及干扰因素等方面存在显著差异. 由于这些方法的差异性, 导致不同实验室间糖尿病人血样测定结果的相互比较变得十分困难. 美国病理学会 Little 等^[30]采用阳离子交换 HPLC 方法作为参考标准, 比较了 7 种商业化仪器检测得到的 GHb 结果. 研究证实了通过参考标准的校准, 可增强不同 GHb 检测方法所得结果的可比性, 使其能够更好地用于临床诊断^[30].

正因如此, 20 世纪 90 年代国际临床化学联合会(IFCC)组建了致力于 HbA_{1c} 标准化的工作组, 开始着手于其标准方法的制定. 首先, IFCC 从分子水平对 HbA_{1c} 做了明确的定义, 即 Hb 1 个或 2 个 β 链氮端缬氨酸与葡萄糖反应, 发生不可逆的糖基化所形成的稳定产物. 再者, 根据其定义, 设计一种具有 HbA_{1c} 针对性的检测方法(详见下文). 最后, IFCC 通过在全球范围内组建标准实验室网络, 对该方法所得实验数据进行评估, 证实其结果的可靠性、稳定性与精密度. 该方法最终在 2002 年得到世界范围的认可通过, 成为检测 HbA_{1c} 的国际标准化方法^[9]. IFCC 检测 HbA_{1c} 的具体操作如下:

1.1.1 溶血液的制备

选取 EDTA 作为抗凝剂处理新鲜血液, 通过离心去除血液中的血清等杂质, 然后将沉积红细胞通过 10 倍体积的生理盐水清洗 2 次, 接着红细胞在 37℃ 下与 10 倍体积的生理盐水混合孵化 4 h, 离心弃去上清以去除 HbA_{1c} 前驱反应物(席夫碱). 沉积红细胞与超纯水混合、裂解、通过离心除去细胞碎片等杂质得到血红蛋白. 用含有氰化钾(10 mmol/L)以及乙磺酸缓冲液(50 mmol/L, pH 6.2)的储备液将血红蛋白稀释至 50 g/L.

1.1.2 蛋白酶解

溶血样(2 g/L)与金黄色葡萄球菌 V8(Glu-C, 20 μg/L)在醋酸铵溶液(50 mmol/L, pH 4.3)中于 37℃ 下搅拌 18 h, 以裂解血红蛋白得到 β 链氮端六肽, 而后在 -20℃ 下冷冻终止该裂解反应.

1.1.3 β 链氮端六肽的分离与定量

高效液相色谱 - 电喷雾质谱(high performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry, HPLC-ESI/MS)联用法: 采用以氰丙

基为固定相的反相 HPLC 柱, 用浓度为 0.023% 的三氟乙酸 - 乙腈为洗脱液进行梯度洗脱, 在 5~20 min 时间区间内的洗脱成分进入 ESI/MS 系统, 以多离子扫描模式检测糖基化以及非糖基化 β 链氮端六肽的相对含量, 从而得到 HbA_{1c} 数值.

高效液相色谱 - 毛细管电泳 (high performance liquid chromatography-capillary electrophoresis, HPLC-CE) 联用法: 采用 C₁₈ 反相 HPLC 进行初分离, 0.1% 的三氟乙酸 - 乙腈为洗脱液进行梯度洗脱, 收集并冻干 15~18 min 时间区间内得到的洗脱成分 (糖基化和非糖基化 β 链氮端六肽的混合物). 冻干成分溶解于少量 0.01% 的三氟乙酸水溶液注入 CE 柱, 在电压为 25 kV, 温度 20°C, 以 H₃PO₄/NaH₂PO₄ (pH 2.5) 为缓冲液的条件下进行精细分离, 根据 214 nm 吸收峰测定糖基化以及非糖基化 β 链氮端六肽的相对含量.

由于 IFCC 方法具有高度的特异性, 能排除包括镰刀型血红蛋白 (hemoglobin S, HbS)、血红蛋白 C (hemoglobin C, HbC)、胎儿血红蛋白 (fetal hemoglobin, HbF)、以及氨基甲酰化 Hb 等的干扰, IFCC 方法所测得到的 HbA_{1c} 数值能反映其真实含量. Weykamp 等^[12]通过对标准样品连续 6 年在 14 个标准实验室内采用 IFCC 方法, 对其结果进行跟踪测定, 结果证实该方法 (标准品及标准方法) 具有良好的稳定性. 然而, 该方法所需仪器设备价格昂贵、需要专业人士进行操作、分析测试过程耗时较长、不利于临床应用, 方法存在一定局限性.

1.2 NGSP 方法

NGSP 成立于 1996 年, 与 IFCC 类似, 通过建立参考实验室网络系统, 对不同的 HbA_{1c} 检测方法采用统一参考标准 (基于 DCCT 参考标准, 采用 HPLC Bio-Rex 70 阳离子交换柱) 进行校准, 使不同方法所测结果具有可比性^[11]. 1971 年, Trivelli 等^[31]首次尝试使用以 Bio-Rex 70 阳离子交换色谱法分离正常人以及糖尿病人体内快速洗脱血红蛋白并进行检测, 实验发现 HbA_{1c} 含量占该部分蛋白的 75%~80%, 同时测出糖尿病人 GHb 含量基本为正常人该值的 2 倍, 但该方法存在操作时间长, 以及分离过程中对环境温度敏感问题. 1980 年, Schifreen 等^[32]针对上述问题对该方法作出改进, 建立了使用 Bio-Rex 70 树脂的阳离子 HPLC 法, 针对 HbA_{1c} 成分进行测定. 通过添加适量比例的乙醇极大缩短了操作时间, 并通过控制实验温度提高了

检测结果的精确度. 1987 年, DCCT 发表关于以 Bio-Rex 70 树脂为固定相的阳离子交换 HPLC 作为参考方法测定 HbA_{1c} 的可行性分析研究^[33]. DCCT 的 Bio-Rex 70 树脂阳离子交换 HPLC 法的具体操作如下:

1.2.1 溶血样的制备

取 EDTA 抗凝的静脉血, 离心去除血浆等杂质. 沉积红细胞通过 2 倍体积生理盐水清洗 2 次, 每次均通过离心去除上清液. 然后添加等体积的去离子水, 涡流混匀 1 min 以裂解红细胞. 接着加入等体积的甲苯, 涡流混匀 1 min 后离心去除上层甲苯和细胞碎片. 最后, 将溶血样转移至干净的玻璃管中在 37°C 孵化 6 h 以上, 以除去 HbA_{1c} 前驱反应物.

1.2.2 HbA_{1c} 的分离及其定量

将经磷酸钠缓冲液稀释 60 倍的溶血样注入以 Bio-Rex 70 树脂为固定相阳离子 HPLC 柱中, 由于糖基化的血红蛋白表面正电荷降低, 糖化组分在 pH 6.8 的磷酸钠缓冲液条件下先行洗脱, 而后换成 pH 6.4 的磷酸钠缓冲液将非糖化组分洗脱下来, 洗脱顺序为 HbA_{1(a+b)}}、HbA_{1c}}、HbA_{0}}. 通过在 410 nm 下检测分离组分波峰, 依据峰面积的相对大小确定 HbA_{1c} 浓度. 研究数据证实该方法具有高度的精确性、准确度、良好的稳定性以及较宽的线性范围^[34]. 但该方法无法将 HbA_{1c} 与 HbF、氨基甲酰化 Hb、HbS、HbC 等进行有效分离^[35], 从而导致其测定结果略高于 IFCC 测定结果.

1.3 JDS/JSCC 方法

1995 年, JDS 和 JSCC 共同合作, 着手于日本 HbA_{1c} 国家标准方案的建立. JDS 设计了命名为 JDS Calibrator Lot 1 的 HbA_{1c} 检测校准物 (冻干溶血样), 并推荐将其作为日本 HbA_{1c} 检测方法的参考校准物^[36]. 采用 JDS Calibrator Lot 1 标准物为参照物, 结合 Tosoh 或 Kyoto Daiichi 两种 HPLC 检测 HbA_{1c} 的方法成为当时日本国内使用频率最高的 HbA_{1c} 检测方法. 2000 年, JSCC 启用 KO500 高分辨率的阳离子 HPLC 代替上述两种 HPLC, 并与 JDS 合作设计了新的 HbA_{1c} 检测校准物 (深度冷冻血样)-JDS/JSCC Calibrator Lot 2. 通过 JDS/JSCC Calibrator Lot 2 校准后的 KO500 HPLC HbA_{1c} 检测法, 成为 JDS/JSCC 的参考标准化方案. 该方法具有精密度高、稳定性好等优点, 其测定结果略高于 IFCC 测定值, 低于 NGSP 测定值 0.2%^[10].

1.4 Mono S 方法

1986年, Jeppsson 等^[37]发表了通过采用 Mono S HR 5/5 阳离子交换柱分离 HbA_{1c} 的方法. 2004年, GE Healthcare 在其离子交换操作手册中, 详细介绍了 Mono S HPLC 方法用于检测 HbA_{1c} 的操作步骤, 其中对早期使用的 Mono S HR 5/5 柱与现今使用的 Mono S 5/50 GL 柱进行了对比研究, 证实改进后的 Mono S 5/50 GL 柱检测精度上具有优越性^[38]. GE Healthcare Mono S 5/50 GL HPLC 法的具体操作如下:

1.4.1 溶血样的制备

选取 EDTA 作为抗凝剂处理新鲜血液, 取 14 μ l 的血样, 用 700 μ l 缓冲液(柠檬酸 0.02 mol/L, Na₂HPO₄ 0.055 mol/L, TritonTMX-100 0.1% (w/v), pH 5.4) 对其进行稀释裂解, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下孵化 30 min 以去除不稳定 HbA_{1c}, 通过离心(3 000 g, 10 min) 以去除细胞碎片等杂质, 得到样品 Hb.

1.4.2 HbA_{1c} 的分离及其定量

选择 Mono S 5/50 GL 作为 HPLC 的分离柱, 注射样品体积为 10 μ l, 流速为 2 ml/min, 进行梯度洗脱, 洗脱 A 液为丙二酸钠 20 mmol/L 与叠氮化钠 0.2 g/L 的混合液, pH 5.7, 洗脱 B 液为添加了 LiCl 0.3 mol/L 的洗脱 A 液, 在 415 nm 下检测分离成分的波峰, 依据峰面积的相对大小确定 HbA_{1c} 浓度. 该方法中采用 pH 5.7 的环境进行盐浓

度梯度洗脱, 在此条件下, 四聚物 Hb 分解为 α/β 二聚物, 因此, 在最终“HbA_{1c} 洗脱峰”中, 糖化 β 链非糖化 α 链二聚物占据绝大多数, 同时也含有少量非糖化 β 链糖化 α 链二聚物, 以及 0.3% 的氨基甲酰化 β 链二聚物. 另外, 该方法可以将 HbF、HbA₃、HbA₀、以及乙醛加合的 Hb 与 HbA_{1c} 分离, 其结果相比 NGSP, 以及 JDS/JSCC, 更接近于 IFCC 检测值.

2004年, Hoelzel 等^[36]发表了关于 HbA_{1c} 检测的 IFCC 标准法与美国、日本、瑞典 3 个国家标准法之间的比较研究报告(表 1 括号内值). 2007年, IFCC 推荐使用 mmol HbA_{1c}/mol Hb 作为 HbA_{1c} 含量的标准单位. Geistanger 等^[39]采用统计学方法分析了 IFCC 标准法与美国、日本、瑞典 3 个国家标准法之间的相关性, 依据新的 HbA_{1c} 标准单位, 重新给出了转化等式(表 1). 文中采用 IFCC 测定 HbA_{1c} 的结果 ≥ 53 mmol/mol 为糖尿病诊断基线. 数据显示, IFCC 测定结果在 4 种方法中数值最小, 但 Mono S、JDS/JSCC、NGSP 这三种 HbA_{1c} 测定方法同样显示出其结果的高度稳定性与良好重复性. 鉴于 IFCC 测定法难于在临床检测上推广, 以及仪器设备昂贵等因素考虑, Mono S、JDS/JSCC、NGSP 这三种方法在世界范围内得到了广泛认可, 并被其他国家采用.

Table 1 Comparison of IFCC HbA_{1c} reference method with three national designated comparison methods (DCMs)

表 1 HbA_{1c} 国际标准法及三种国家标准法结果比较

方法	国家	原理	单位	国家标准法与国际标准法转换公式
IFCC	国际	RP-HPLC	mmol HbA _{1c} /mol Hb ^[39]	
		ESI/MS or CE	% ^[36]	
NGSP	美国	IE-HPLC	%	NGSP A _{1c} = 0.09148 (IFCC A _{1c}) + 2.152% ^[39]
		Bio-rex 70		(NGSP A _{1c} = 0.915 (IFCC A _{1c}) + 2.15%) ^[36]
JDS/JSCC	日本	IE-HPLC	%	JDS/JSCC A _{1c} = 0.09274 (IFCC A _{1c}) + 1.724% ^[39]
		KO500		(JDS/JSCC A _{1c} = 0.927 (IFCC A _{1c}) + 1.73%) ^[36]
Mono S	瑞典	IE-HPLC	%	Swedish A _{1c} = 0.09890 (IFCC A _{1c}) + 0.884% ^[39]
		Mono S		(Swedish A _{1c} = 0.989 (IFCC A _{1c}) + 0.88%) ^[36]

上述三种国标法的基本原理是通过蛋白质表面净电荷的差异对 Hb 进行分离, 并未对 HbA_{1c} 具有特异性, 其结果的溯源仅来自于 HPLC 分离的色谱图的峰值(在定义的洗脱环境、树脂、试剂以及标准化样品多次测得的特征洗脱峰), 三者所测得

“HbA_{1c} 波峰”可能包含其他无法分离开来的非糖化 Hb 成分, 其测定结果都略高于 IFCC 检测值, 这同样使得这三种方法对同一样品所测得的数据不同.

2 亲和层析法

亲和层析法测定 GHb 含量的基本原理是采用氨基苯硼酸与固定相基质(如琼脂糖或聚丙烯胺等)交联作为分离介质, 利用硼酸基团所携带的羟基与血红蛋白糖化所形成的顺位二元醇可逆结合, 将 GHb 绑定在分离介质上, 使其与非糖化血红蛋白分离, 绑定的 GHb 成分通过山梨醇洗脱, 其含量通常采用光谱法测定. 由于亲和层析中硼酸基团并非针对 HbA_{1c} 特异性绑定, 除 HbA_{1c} 外, 其他位点的糖化产物同样能够与硼酸结合绑定, 因此该法的检测对象为 GHb.

亲和层析法不受诸如 HbF、HbS、HbC、甲酰化 Hb、乙酰化 Hb 等血红蛋白变体(表 2)的影

响, 这些变体在离子交换法中, 因表面净电荷与 HbA_{1c} 近似, 可能会随 HbA_{1c} 共洗脱, 从而影响测定值. 而亲和层析介质硼酸基团无法与这些变体结合, 变异体的存在不会干扰测定, 因此亲和层析适用人群更加广泛. Yatscoff 等^[40]通过采用数种方法对不同 HbF 含量(占 1%~20%总血红蛋白)的样品中 GHb 含量进行测定, 证实 HbF 的存在会对离子交换法检测结果产生巨大干扰, 而对亲和层析则无明显干扰. Weykamp 等^[41]在试管中对血红蛋白进行甲酰化和乙酰化, 然后分别采用离子交换 HPLC、亲和层析以及酶免疫法对该样品 GHb 含量进行测定, 结果显示血红蛋白的甲酰化和乙酰化会干扰离子交换法, 而对亲和法和酶免疫法则没有显著影响.

Table 2 Common Hb variants and chemical modified Hb derivatives
表 2 某些常见影响 HbA_{1c} 测定的突变型血红蛋白以及血红蛋白衍生物结构

血红蛋白变体		血红蛋白加合物 (α ₂ β ₂)	
名称	结构	名称	结构
HbF	α ₂ γ ₂	甲酰化 Hb	βVal1-NHCHO
HbS (α ₂ β ₂)	βVal6	乙酰化 Hb	βVal1-NHCOCH ₃
HbC (α ₂ β ₂)	βLys6	HbA _{1a1}	βVal1-N-fructose-1, 6-diphosphate
HbD (α ₂ β ₂)	βGln121	HbA _{1a2}	βVal1-N-glucose-6-phosphate
HbE (α ₂ β ₂)	βLys26	HbA _{1b}	βVal1-unidentified carbohydrate

相比于离子交换法, 除不受大多数血红蛋白变体干扰外, 亲和层析法还具有以下优势: a. 席夫碱的存在对其所测定结果无明显影响, 血样无需预处理去除席夫碱^[42]; b. pH 以及温度对其检测结果影响较小^[42]; c. 血样的储存时间以及储存环境对其检测结果影响较小. 因此, 采用亲和法操作步骤更加简便, 检测所需时间较短^[43].

Klenk 等^[42]将亲和微柱法与离子交换 HPLC 法测定 GHb 含量的结果进行对比, 对前者做出了评估, 结果表明, 上述两种方法所测结果相比具有高度的相关性(相关系数达到 0.98), 同时亲和法有着良好的精密度, 批内变异系数(variable coefficient, CV) < 2%, 批间 CV < 3.5%, 其测定结果不受席夫碱的干扰, 温度和 pH 的变化对其检测影响较小, 并且亲和微柱相比于离子交换柱更易于再生进行重复利用. 研究还通过将亲和微柱法分离出的 GHb 成分(绑定成分)继续采用离子交换 HPLC 进行分离, 证实亲和法所分离得到 GHb 成分包含 60%的

HbA_{1c} 和 40%的糖化 HbA₀. Little 等^[43]分析了全血血样的储存时间以及储存环境对离子交换 HPLC、离子交换微柱法、亲和微柱法测定 GHb 结果的影响, 实验结果表明全血样品的收集处理以及储存条件会对离子交换法测定结果产生很大影响, 而对亲和层析法测定结果的影响较小.

尽管亲和层析法测定 GHb 相比于离子交换法, 在抗干扰因素方面有着巨大的优势, 但该方法同样存在一定的局限性. 硼酸与 GHb 二元醇之间的结合是可逆的, 键合并不十分稳定, 洗脱流速以及洗脱溶液成分都会影响 GHb 与硼酸的结合. 实验发现, GHb 的量与洗脱流速成反比, 并且随着洗脱缓冲液成分改变, GHb 的绑定量有所差别, 缓冲液中含有氨基以及 Mg²⁺ 则会增强 GHb 与硼酸的绑定^[44]. Klenk 等^[42]通过对未绑定在硼酸亲和介质上血红蛋白采用离子交换 HPLC 法分离, 发现有少量 HbA_{1c} 未绑定在介质上, 随非糖化血红蛋白一起洗脱下来, 硼酸亲和介质无法将全部的 GHb 绑

定. 这种不稳定的键合, 可能会对亲和层析法的测定结果带来一定的影响.

亲和法所测结果为总体 GHb 含量, 而目前国际糖化血红蛋白指标是以 HbA_{1c} 含量进行描述, 因此亲和法所测结果用于临床诊疗, 必须先转化为 HbA_{1c} 的含量, 这个过程必然会引入误差, 影响测定结果的准确性和精密度.

3 免疫法

HbA_{1c} 免疫检测法是基于糖化与非糖化血红蛋白结构差异而设计的检测方法, 其基本原理是采用较已知浓度过量的 HbA_{1c} 抗体与其特异性结合形成可溶性复合物(免疫复合物), 通过测定该复合物的浓度直接表征 HbA_{1c} 含量或通过测定剩余抗体含量间接表征 HbA_{1c} 含量. 刘蔚等^[45]对 2011 年全国糖化血红蛋白检测仪器现状的调查显示, 中国 600 家医院临床 HbA_{1c} 检测仪中, 除离子交换法使用率占 37.2%, 免疫法的使用率高达 28.9%, 位居第二. 目前该法应用于 HbA_{1c} 检测的多为免疫比浊法, 常用的免疫比浊法可分为胶乳增强免疫凝集法和免疫抑制比浊法^[46].

3.1 胶乳增强免疫凝集法

胶乳增强免疫凝集法是通过添加促聚剂(如聚乙二醇、胶乳等)促使免疫复合物凝集, 从液相中析出, 形成悬浊液, 通过生化分析仪测定溶液浊度, 并与提供的标准样品所测标准曲线对比, 确定 HbA_{1c} 含量.

2001 年郑彤等^[18]通过使用商业化的 HbA_{1c} 测定试剂盒结合生化分析仪, 采用免疫凝集法, 对不同浓度的 HbA_{1c} 标准品(HbA_{1c} 含量 0%~14.7%)及 30 例临床样本(HbA_{1c} 含量 3.8%~14.2%)进行测量(表 3), 2013 年刘阳等^[47]测定低、中、高三个浓度的标准品(4.4%、7.2%、13.5%), 评估胶乳增强免疫凝集法测定 HbA_{1c} 的能力. 上述实验数据显示, 实验重复性好、回收率高, 试剂等在 4℃ 冷藏条件下稳定时间较长, 且低浓度的三酰甘油、胆红素对实验结果无明显影响(表 3). 并且刘阳等在实验中将该法与高效液相色谱法相比较, 实验数据表明两种方法的测定结果显著相关($P < 0.001$, $r = 0.994$), 说明胶乳增强免疫凝集法符合美国临床实验室标准化委员会(national committee for clinical laboratory standards, NCCLS)要求, 能够满足临床需要.

Table 3 Comparison of HbA_{1c} results by commercialized immunology assay kits

表 3 商业化免疫法试剂盒测定 HbA_{1c} 结果比较

		胶乳增强免疫凝集法		免疫抑制比浊法			
		实验 1 ^[18]	实验 2 ^[47]	实验 3 ^[19]	实验 4 ^[20]	实验 5 ^[48]	实验 6 ^[49]
低浓度 HbA _{1c}	批内 CV/%	3.20	2.12		2.10		2.30
	批间 CV/%	4.30	2.51		2.30		2.40
	日间 CV/%		2.78				
中浓度 HbA _{1c}	批内 CV/%		2.82	3.60	1.50	3.50	1.60
	批间 CV/%		2.91	4.10	1.90		1.90
	日间 CV/%		3.05			3.81	
高浓度 HbA _{1c}	批内 CV/%	4.10	3.12	4.70	1.30	2.24	1.40
	批间 CV/%	5.40	3.59	5.30	2.00		2.10
	日间 CV/%		3.98			2.45	
干扰阈值 ¹⁾ (mmol·L ⁻¹)	三酰甘油	13.2	9	10.5	5.05		5.05
	胆红素	0.225	0.663	0.22	0.292		
	维生素 C		2.87	0.57			
	尿酸			1.8			
	胆固醇				4.4		4.4

¹⁾当干扰物质的浓度低于阈值时, 其对实验结果无明显影响.

3.2 免疫抑制比浊法

免疫抑制比浊法是通过添加凝集素(多聚半抗

原等), 与剩余 HbA_{1c} 抗体结合, 形成不溶性复合物致溶液浑浊, 此时溶液浊度与 HbA_{1c} 的含量成反

比. 通过生化分析仪测定溶液浊度, 对比标准曲线确定 HbA_{1c} 含量.

为评估免疫抑制比浊法检测 HbA_{1c} 的能力及其临床应用价值, 2004 年曹友德等^[19]测定了商业化的 HbA_{1c} 标准品(4.7%、7.8%、15.4%)和 30 份临床样品(HbA_{1c} 含量 4.1%~13.8%), 2011 年王建柱等测定了 229 份临床样本(129 例为糖尿病患者, 100 例为对照组), 2013 年时勇^[48]分析了所在医院的 HbA_{1c} 高、中、低三个水平的 40 例双份全血标本, 林天浩等^[49]分析了所在医院 1 年内 134 份糖尿病样本及 100 份对照样本. 实验结果表明, 实验的精密度高、重复性好. 同时, 低浓度的三酰甘油、胆红素对实验无明显干扰(具体试验数据见表 3), 实验回收率高. 同时, 王建柱等^[50]比较了该法与高效液相色谱法, 所得实验数据说明两种方法所测定的 HbA_{1c} 数值具有显著相关性(以高效液相色谱法结果为 X , 免疫抑制比浊法结果为 Y , $Y = 1.0342 X + 0.1042$, $P < 0.01$, $r = 0.997$).

3.3 HbA_{1c} 检测免疫传感器

随着免疫方法在 HbA_{1c} 测定技术中的应用, 人们更趋向于利用此原理设计微型 HbA_{1c} 检测仪器. 传感器由于其体积小、灵敏度高等优点, 越来越广泛应用于微型检测器. 现已有结合免疫法和传感器设计 HbA_{1c} 检测方案的报道, 主要分为电压型和电流型两种.

2010 年边超等^[20]报道了由一次性测试条及芯片组成的电压指示型 HbA_{1c} 快速检测免疫微传感器. 该设计是将抗体分子(Hb 抗体、HbA_{1c} 抗体)绑定在一次性测试条的敏感电极表面, 当待测抗原(Hb、HbA_{1c})与抗体分子形成免疫复合物时, 会引起电极表面界面电势的变化, 从而引起传感器输出电压的变化. 该方法是利用双测量池分别对 Hb、HbA_{1c} 进行定量检测, 再利用两者比值指示体系中 HbA_{1c} 的含量. 在提高传感器灵敏度方面, 他们进行了一系列的改进: a. 设计在电极表面吸附带更多活性位点的纳米金粒子来吸附抗体分子. b. 为了牢固绑定纳米金粒子于电极表面, 避免纳米金粒子的相互聚集. 首先用混合硫醇溶液处理纳米金粒子, 形成相互排斥的表面带羧基的混合硫醇自组装单层膜的纳米金粒子. 同时用巯基乙胺溶液处理电极, 在其表面形成带氨基的巯基乙胺自组装单层膜. 然后利用羧基与氨基的相互反应, 将纳米金粒子共价绑定于电极表面. c. 为了将抗体分子有效绑定于纳米金粒子表面. 首先用 N-羟基丁二酰亚

胺与二氯乙烷的混合液与纳米金表面的羧基反应成 N-羟基丁二酰亚胺酯, 再利用抗体与酯反应形成稳定的酰胺结合而将抗体绑定在纳米金表面. 研究表明, 葡萄糖球菌蛋白 A(staphylococcal protein A, SPA)能针对绑定抗体分子的不变区, 减少随机绑定时对可变区(抗原抗体特异结合的区域)的封闭^[51-52].

2002 年 Stallner 等^[21]报道了结合免疫原理及酶联免疫法用以测定 HbA_{1c} 的电流指示型免疫微传感器. 该方案将作为 Hb、HbA_{1c} 亲和和吸附基质的触珠蛋白绑定于纤维素膜, 再将该膜吸附于微量滴定盘中外加电压为 600 mV 的铂电极. 检测过程中, 触珠蛋白先将待测样本中 Hb、HbA_{1c} 亲和和吸附于电极表面, 后依次向滴定盘中加入 HbA_{1c} 抗体、葡萄糖氧化酶标记的抗 HbA_{1c} 抗体的抗体、葡萄糖溶液. 溶液中葡萄糖会在其氧化酶的作用下, 于电极表面反应产生过氧化氢, 再在外电场作用下转换为电流变化信号表征体系中 HbA_{1c} 的百分含量. 整个反应体系中, 电流变化越明显, 说明绑定葡萄糖氧化酶量越多, 即所含 HbA_{1c} 的含量越高. 具体的电流变化对照曲线由已知浓度的标准品(HbA_{1c}%: 0%~50%)测试所得. 经测试发现, 该方法的响应时间长, 还需要进一步改进研究.

4 酶 法

2003 年 Sakurabayashi 等^[53]首次报道了果糖基氨基酸氧化酶(fructosyl amine oxidase, FAOX)用于 HbA_{1c} 的检测, 随后 Nanjo 等^[54]于 2007 报道了果糖基肽链氧化酶(fructosyl peptide oxidase, FPOX)用于 HbA_{1c} 的检测. 酶法测定 HbA_{1c} 的基本原理和实验流程可大致分为三步(图 3). a. 酶解: HbA_{1c} 经酶解反应, 其 β 链糖基化的氮末端水解生成果糖基缬氨酸(fructosyl valine, FV)或果糖基缬氨酸组氨酸复合物(fructosyl valyl histidine, FVH); b. 酶催化: 果糖基氨基酸复合物(FV、FVH)经 FAOX、FPOX 催化氧化产生过氧化氢(H₂O₂)(见方程式(1)、(2)); c. H₂O₂ 的测定: 体系中产生的 H₂O₂ 可用电化学检测法与光谱检测法测定, 从而确定待测样品中 HbA_{1c} 含量.

电化学检测法: Nanjo 等^[54]于 2007 年报道了采用自行设计的流动注射型分析仪, 进行同步测定总体血红蛋白和 HbA_{1c}. 该法用表面活性剂处理样品, 产生十二烷基硫酸钠-血红蛋白(sodium lauryl sulfate-hemoglobin, SLS-Hb), 于 540 nm 处测定吸光值确定总体血红蛋白的量. 将 HbA_{1c} 裂解为

FVH, 再利用 FPOX 氧化该复合物及电化学法测定体系中生成的 H_2O_2 含量, 从而确定 HbA_{1c} 的含量, 实验结果均经标准品进行校正. 所得结果与 JDS、IFCC 方法测定的 HbA_{1c} 含量具良好线性相关性(Y : 酶法测定结果, X : JDS 测定结果, Z : IFCC 测定结

果; $Y=2.61X-5.04$, $r=0.997$; $Y=2.44Z-0.79$, $r=0.998$). 但是当总体血红蛋白在 $2.6\sim 11.2$ g/L 浓度范围内, 测定结果具良好的线性, 故实际检测样品须经至少 20 倍稀释.

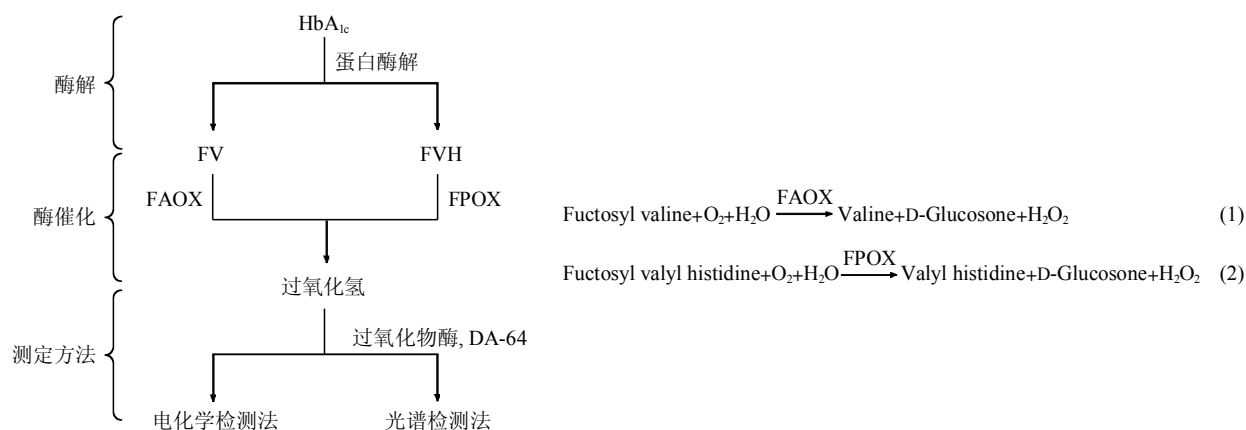


Fig. 3 Scheme of HbA_{1c} measurement by enzymatic method

图3 酶法检测 HbA_{1c} 基本流程

光谱检测法: Sakurabayashi 等^[53]在 2003 年利用光谱法对 HbA_{1c} 进行检测. 首先将血样预处理破碎、酶切, 释放出 FV, 通过测定 571 nm(500~670 nm)处的吸光值计算总体血红蛋白的浓度. 然后, FAOX 催化氧化 FV 产生的 H_2O_2 会在过氧化物酶(peroxidase, POD)催化下, 与色素原 N- 羧甲基氨基羧基 -4, 4- 二甲氨基二苯胺化钠(DA-64)发生显色反应. 再在 751 nm 处测定吸光值确定 HbA_{1c} 的浓度. 从而计算体系中 HbA_{1c} 的百分含量. 2004 年 Hirokawa 等^[23]发现, 曲霉素真菌酶(*Aspergillus protease*)能酶解 Glu-C 作用于 HbA_{1c} 所产生的果糖氨基六肽生成 FVH 产物, 且 *Aspergillus protease* 不会酶解产生 FV. 随后, 他们在此前研究的基础上, 改进了光谱测定 HbA_{1c} 的方法. 首先将血样预处理、酶解得 FVH, 再通过 FAOX 消除机体内生性果糖基氨基酸的干扰. 利用 POD 催化 DA-64 与 FPOX 酶解 FVH 产生的 H_2O_2 发生显色反应, 于 570 nm 处确定 HbA_{1c} 含量. 实验比较了 13 种蛋白水解酶, 发现它们都只能将果糖氨基六肽水解为 FVH 而非 FV, 并且中性蛋白酶的水解能力最强. 还发现 FAOX 只能氧化果糖基氨基酸; 而 FPOX 既可作用于果糖基氨基酸, 又能作用于果糖基多肽

链^[55].

目前酶法测定 HbA_{1c} 试剂盒已经市场化, 其中采用日本积水医疗株式会社提供的酶法测定 HbA_{1c} 试剂盒所测得的 HbA_{1c} 的结果可溯源至 IFCC, 其原理为: 将 HbA_{1c} 裂解为 FVH, 经 FPOX 催化氧化生成 H_2O_2 , 结合 POD、显色剂进行光谱检测. 2010 年李义龙等^[56]对此款试剂盒进行了评价, 实验结果显示, 当样品中 HbA_{1c} 含量在 4.3%~12.9% 浓度范围内具良好线性. 批内、批间、总 CV 均低于 2%、回收率好、抗维生素 C (< 500 mg/L)、胆红素 (< 400 mg/L)等干扰能力好(以 $\pm 5\%$ 为检测限). 且与免疫法、高效液相法测定结果具显著相关性, 说明该试剂盒能满足临床检测 HbA_{1c} 的需求(相关系数均为 $r = 0.99$, $P < 0.05$). 2014 年 Jaisson 等^[57]对 Abbott 公司推出的一款酶法检测 HbA_{1c} 试剂盒进行效价评定, 结果显示其精密度高(批内、日间 CV 均低于 1.2%), 在 3.9%~17.1% HbA_{1c} 浓度范围内具良好线性. 与离子交换高效液相色谱法具良好相关性(Y : 酶法测定值, X : 离子交换高效液相色谱法测定值; $Y = 0.986X + 0.713$, $r = 0.998$, $n = 109$), 可溯源至 IFCC, 且有一定的抗干扰能力(胆红素 < 264.9 mg/L, 三酰甘油 < 991 g/L).

5 即时检测(POC)法

II型糖尿病患者占糖尿病总人数的85%~95%(在中等、低收入国家可能更高),多为中老年患者,但发病人群趋向于年轻化,体现为儿童和青少年发病率逐渐升高。II型糖尿病患者前期病情相比于I型较缓和,具有隐蔽性,病症不明显,不易被患者察觉。但同时,高血糖所带来的损伤在逐步加深,一旦发展至后期,相关并发症的产生将导致患者身体机能的损坏,引发严重的后果。糖尿病所引发的心血管疾病,是导致糖尿病患者致残致死的最主要并发症;肾脏病变的一个重要原因便是长期的高血糖引发的血管损伤,导致肾脏机能受损;此外,糖尿病还会引起眼部疾病,下肢感染溃疡,导致患者失明和截肢;而高血糖所带来的神经性损伤,同样具有巨大的危害性。II型糖尿病的早期诊断,能够有效地帮助患者了解自身病情,通过遵从医生的针对性指导,以避免糖尿病的进一步恶化,预防和避免相关并发症的发生和发展。

HbA_{1c}作为糖尿病诊断的新标准及糖尿病相关并发症发生风险的评估参数,能够准确反映糖尿病患者2~3个月内的血糖控制状况,帮助患者更好地调控自身血糖水平。目前,在IFCC和NGSP等HbA_{1c}标准化工作组的努力下,基于临床实验室条件,通过IFCC认证的HbA_{1c}检测方法测定HbA_{1c}含量已经具备良好的精密度和准确度。然而,这些方法都需要专业仪器设备,并需要具备专业知识经验的人员进行操作,只适用于大型医疗组织或研究机构,不适合大规模普及。同时,患者在大型医疗组织做检测,需要一定等待时间获得检测结果,无法及时获得反馈信息,可能导致糖尿病的诊断和治疗的延误,加重患者的病情。

近年来,随着微电子机械系统的发展,小型自动化检测设备的流行,HbA_{1c}的即时检测(POC)法成为目前发展的趋势,市面上已陆续出现多款HbA_{1c}的即时检测设备。相较实验室的检测方法,即时检测法具有高度自动化、操作简便、检测耗时短、无需利用实验室设备、能够随时随地开展等优点。临床采用HbA_{1c}的即时检测法,有助于医生即时获悉患者血糖水平,并及时给予患者医疗指导,以避免糖尿病诊断和治疗的延误。同时,家用HbA_{1c}即时检测仪的引入,使得患者的自我诊断成为可能,降低患者的就医频率,节省就医成本,同时减轻医院的负担。目前,市场化的HbA_{1c}即时检

测设备的主要测定原理大致可以分为亲和色谱法和免疫法,In2it™(Bia-Rad)、Afinion™及Nycocard(Axis-Shield)、Clover(Inforpia)和Quo-Test™(Quotient Diagnostics)等采用亲和色谱法测定HbA_{1c}含量,而DCA系列(Siemens)、InnovaStar(DiaSys)、A1CNow系列(Bayer)等采用免疫法。

Siemens公司的DCA系列分析仪是最早的HbA_{1c}即时检测设备之一。早在1993年,Thai等^[58]通过将DCA 2000型号的分析仪与实验室离子交换HPLC进行对比,证实该型号所采用方法在3.9%~13.2%的HbA_{1c}浓度范围内,检测结果与实验室法有着优异的相关性($Y=1.03X+0.103\%$, $r=0.99$),具备良好的批内和批间精度(分布范围1.3%~3.7%)。2014年,Zhou等^[59]通过使用IFCC认证的离子交换HPLC对DCA系列分析仪进行校准,分析校准后的HbA_{1c}测定结果,证实校准后的DCA分析仪的测定结果具备良好的溯源性,满足临床应用要求。

Bayer公司的A1CNow系列分析仪则是一种体积小,方便家庭使用的HbA_{1c}检测仪器,2006年John等^[60]通过与实验室亲和色谱HPLC方法进行对比,比较了四种不同的商业化HbA_{1c}即时检测分析仪(包括DCA 2000和第1代A1CNow)的检测能力。实验结果显示,第1代A1CNow与该HPLC方法具有良好的相关性($r=0.93$),但其批内和批间CV均大于5%,而DCA 2000与HPLC方法的相关性($r=0.98$)和批内、批间精密度(CV均小于5%)均好于A1CNow。A1CNow+分析仪作为第2代产品,相比于第1代,更加简化了操作步骤,减少了样品血液的需求量,缩短了检测时间,同时通过改进自动化控制,提高了检测的准确度和精密度。其检测结果与NGSP的标准实验室测定结果相比,其相关性($r=0.988$)和精密度(CV小于5%)有较大提高^[61]。

2009年,Selvin等^[62]对从1999~2006年间总计15934名具有代表性成年人HbA_{1c}的测量结果进行统计分析,研究预计美国HbA_{1c}含量大于6.0%的人数约为710万,大于6.5%的约为240万,大于7%的约为150万。这些结果说明在检测阈值附近,HbA_{1c}含量变化0.5%即可极大影响糖尿病的确诊人数。目前,市场化的HbA_{1c}即时检测设备相较于实验室测定方法,其精密度和准确度仍然存在差距,而这些测定偏差很有可能造成糖尿病的诊断出现误诊或漏诊。2010年,Westra等^[63]将8种HbA_{1c}的即时检测仪与3种采用不同分离原理,经

IFCC 认证的实验室检测设备的检测能力进行对比评估(评估结果见表 4)。依据 NGSP 认证标准, 仅有 DCA Vantage™ 分析仪和 Afinion™ 分析仪能够达到标准, 满足临床应用的需要。因此, 现有的即时检测设备还无法替代实验室法用于糖尿病的诊断,

美国糖尿病协会(ADA)在 2010 年发表的关于糖尿病诊疗指南中, 提到以 $HbA_{1c} \geq 6.5\%$ 为糖尿病诊断切点, 而这个测定值必须是在 NGSP 认证的实验室中测得, 因现有的即时检测仪器所测结果还不够准确, 不足以用于糖尿病的诊断^[61]。

Table 4 Comparison of several commercialized HbA_{1c} POC devices

表 4 几种商业化 HbA_{1c} 即时检测仪比较

仪器	公司	测定原理	样品量/μl	检测时间/min	特点
In2it™	Bia-rad	硼酸亲和色谱分离	10	10	受 HbC、HbE 干扰, 不受 HbS 和 HbD 干扰
Afinion™	Axis-Shield	硼酸亲和色谱分离	1.5	5	昂贵, 需定期维护 ^[61]
Nycocard	Axis-Shield	硼酸亲和色谱分离	5	3	操作繁琐 ^[60]
Clover	Inforpia	硼酸亲和色谱分离	4	5	光谱法定量
Quo-Test™	Quotient Diagnostics	硼酸亲和色谱分离	10	3	荧光光谱定量
DCA 系列	Siemens	免疫凝集法	1	6	设备较大、昂贵、易操作 ^[60]
InnovaStar	DiaSys	免疫凝集法	10	6.5	易操作、全自动
A1cNow 系列	Bayer	免疫层析法	5	5	设备小型、便宜、易操作 ^[60]

虽然现有的即时检测仪器无法满足糖尿病诊断要求, 但相信随着科学技术的发展, 即时检测仪器必定能够在其测定准确度和精密度方面有着显著提高, 进而满足临床应用的要求。另外, 即时检测仪器具备快速、便捷、易操作等优点, 能够很好地应用于患者的自我诊断和监控。对可能患有糖尿病的患者起到预警作用, 以提醒患者前往医院进行进一步检查, 避免病情的延误; 对已患有糖尿病的患者, 帮助其定期监控血糖控制水平, 以便针对其自身病况采取治疗措施, 预防和延缓相关并发症的发生和发展。

Cagliero 等^[64]通过将 201 例 I 型糖尿病人和 II 型糖尿病患者分为即时反馈 HbA_{1c} 含量组(POC 检测法)和常规检查组(实验室检测法), 采用随机对照实验, 在一年的时间内监控 HbA_{1c} 含量的变化, 证实了 HbA_{1c} 含量的及时反馈有助于糖尿病人血糖水平的控制。实验结果显示, 相比于对照组, 即时反馈组的患者能够及时获悉自身血糖控制状况, 并根据医嘱及时调节胰岛素的摄入量、转变生活方式, 从而大幅度降低体内 HbA_{1c} 含量。Miller 等^[65]将 597 例糖尿病患者随机分为常规组和快速组(即时反馈 HbA_{1c} 含量), 在 6 个月内监控 HbA_{1c} 含量的变化, 并统计比较了加强血糖控制的人数比例。实验结果显示, HbA_{1c} 含量的及时反馈, 促使患者更加重视血糖控制, 采取合理的调控方法控制血糖水平, 相

比于对照组, HbA_{1c} 的下降幅度更大。上述两者的研究, 证实了即时检测仪器在 HbA_{1c} 含量的即时反馈方面发挥的重要作用, 能够有效地帮助患者控制自身血糖水平, 降低 HbA_{1c} 含量。

6 结论与展望

糖尿病已逐渐成为世界范围内主要威胁人们健康的非传染流行病之一, 其后期并发症的恶化具有严重的危害性。HbA_{1c} 作为新的糖尿病诊断标准, 能够有效的指示糖尿病人血糖控制水平, 预示糖尿病并发症的发生风险。IFCC、NGSP、JDS/ISCC、以及 Mono S 等机构关于 HbA_{1c} 检测方法的标准化工作, 促进了世界范围内 HbA_{1c} 作为糖尿病诊断控制标准的普及。亲和法、免疫法的应用, 为 HbA_{1c} 检测的临床普及提供了基础。传感器以及新型酶法的提出, 为 HbA_{1c} 检测设备的设计提供了新方向。HbA_{1c} 即时检测设备的使用, 为糖尿病患者提供了自身血糖水平的即时反馈, 有助于患者针对性地采取治疗措施, 延缓和避免病情的恶化。

目前, 市场化的 HbA_{1c} 即时检测仪器还处于发展阶段, 已商业化的该类产品中大部分不适合家庭使用。HbA_{1c} 含量的检测更多地还是依赖于医疗机构, 随着糖尿病患者人数逐年激增, 已给公众医疗资源带来巨大的负担。家用 HbA_{1c} 即时检测仪器的普及, 能够更有效地帮助人们监控自身血糖水平,

降低就诊频率,减轻医疗机构的负担.更为重要的是,凭借其即时反馈的特点,能够避免糖尿病病情的诊断和治疗的延误.由此可见,家用 HbA_{1c} 的即时检测仪具有良好的市场前景和发展潜力,必定会在今后的糖尿病诊断技术中占据一席之地.我们认为,从结构出发,基于 HbA_{1c} 的结构功能学信息,可以为家用 HbA_{1c} 即时检测仪的设计提供有效的新思路.

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th edn, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2013
- [2] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med*, 1993, **329**(14): 977-986
- [3] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPDS 33). *Lancet*, 1998, **352**(9131): 837-853
- [4] Shapiro R, McManus M J, Zalut C, *et al.* Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem*, 1980, **255**(7): 3120-3127
- [5] Allen D W, Schroeder W A, Balog J. Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *J Am Chem Soc*, 1958, **80**(7): 1628-1634
- [6] Bunn H F, Haney D N, Gabbay K H, *et al.* Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975, **67**(1): 103-109
- [7] Koenig R J, Peterson C M, Kilo C, *et al.* Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes*, 1976, **25**(3): 230-232
- [8] Gabbay K H, Hasty K, Breslow J L, *et al.* Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocr Metab*, 1977, **44**(5): 859-864
- [9] Jeppsson J O, Kobold U, Barr J, *et al.* Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med: CCLM / FESCC*, 2002, **40**(1): 78-89
- [10] Goodall I. HbA_{1c} standardisation destination--global IFCC Standardisation. How, why, where and when--a tortuous pathway from kit manufacturers, *via* inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *Clin Biochem Rev*, 2005, **26**(1): 5-19
- [11] Little R R, Rohlfing C L, Wiedmeyer H M, *et al.* The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. *Clin Chem*, 2001, **47**(11): 1985-1992
- [12] Weykamp C, John W G, Mosca A, *et al.* The IFCC Reference Measurement System for HbA_{1c}: a 6-year progress report. *Clin Chem*, 2008, **54**(2): 240-248
- [13] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010, **33**(Suppl 1): S62-S69
- [14] World Health Organization. Use of glycosylated Haemoglobin (HbA_{1c}) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. Geneva, 2011: 1-25
- [15] Tankova T, Chakarova N, Dakovska L, *et al.* Assessment of HbA_{1c} as a diagnostic tool in diabetes and prediabetes. *Acta Diabetol*, 2012, **49**(5): 371-378
- [16] 纪立农, 宁 光. 糖化血红蛋白. 人民卫生出版社, 2013
Ji L N, Ning G. Glycosylated Hemoglobin, 2nd. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013
- [17] Little R R, Rohlfing C L. The long and winding road to optimal HbA_{1c} measurement. *Clinica Chimica Acta*, 2013 (15 March), **418**: 63-71
- [18] 郑 彤, 刘洪斌, 戴友良, 等. 乳胶凝集透射终点法测定糖化血红蛋白. *上海医学检验杂志*, 2001, **16**(4): 231
Zheng T, Liu H B, Dai Y L, *et al.* *Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences*, 2001, **16**(4): 231
- [19] 曹友德, 段 贞, 谭黎明. 免疫比浊法检测糖化血红蛋白及其临床应用价值. *医学临床研究*, 2004, **21**(9): 1045-1046
Cao Y D, Duan Z, Tan L M. *Journal of Clinical Research*, 2004, **21**(9): 1045-1046
- [20] 边 超, 屈 岚, 薛茜男, 等. 快速检测糖化血红蛋白的免疫微传感器. *纳米技术与精密工程*, 2010, **8**(1): 20-24
Bian C, Qu L, Xue Q N, *et al.* *Nanotechnology and Precision Engineering*, 2010, **8**(1): 20-24
- [21] Stöllner D, Stocklein W, Scheller F, *et al.* Membrane-immobilized haptoglobin as affinity matrix for a hemoglobin-A_{1c} immunosensor. *Anal Chim Acta*, 2002, **470**(2): 111-119
- [22] Tsugawa W, Ishimura F, Ogawa K, *et al.* Development of an enzyme sensor utilizing a novel fructosyl amine oxidase from a marine yeast. *Electrochemistry*, 2000, **68**(11): 869-871
- [23] Hirokawa K, Nakamura K, Kajiyama N. Enzymes used for the determination of HbA_{1c}. *Fems Microbiol Lett*, 2004, **235**(1): 157-162
- [24] Linters-Westra E, Slingerland R J. Six of eight hemoglobin A_{1c} point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clin Chem*, 2010, **56**(1): 44-52
- [25] Yi J, Thomas L M, Musayev F N, *et al.* Crystallographic trapping of heme loss intermediates during the nitrite-induced degradation of human hemoglobin. *Biochemistry-U S*, 2011, **50**(39): 8323-8332
- [26] Yi J, Ye G, Thomas L M, *et al.* Degradation of human hemoglobin by organic C-nitroso compounds. *Chem Commun*, 2013, **49**(95): 11179-11181
- [27] 王冬环, 陈文祥. 糖化血红蛋白应用的标准化和实用化进程. *中国糖尿病杂志*, 2012, **4**(7): 389-393
Wang D H, Chen W X. *Chinese Journal of Diabetes Mellitus*, 2012, **4**(7): 389-393
- [28] Huang H, Peng G C, Lin M H, *et al.* The diagnostic threshold of HbA_{1c} and impact of its use on diabetes prevalence-A population-based survey of 6898 Han participants from southern

- China. *Prev Med*, 2013, **57**(4): 345-350
- [29] Higgins T. HbA_{1c} - An analyte of increasing importance. *Clinical Biochemistry*, 2012, **45**(13-14): 1038-1045
- [30] Little R R, Wiedmeyer H M, England J D, *et al.* Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. *Clin Chem*, 1992, **38**(12): 2472-2478
- [31] Trivelli L A, Ranney H M, Lai H T. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *New Engl J Med*, 1971, **284**(7): 353-357
- [32] Schifreen R S, Hickingbotham J M, Bowers G N Jr. Accuracy, precision, and stability in measurement of hemoglobin A1c by "high-performance" cation-exchange chromatography. *Clin Chem*, 1980, **26**(3): 466-472
- [33] The DCCT Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycated hemoglobin in the Diabetes Control and Complications Trial: a multicenter study. *Clin Chem*, 1987, **33**(12): 2267-2271
- [34] 涂国华. 糖化血红蛋白 A1c 的 HPLC 测定方法建立与多克隆抗体的制备. 江苏省硕士研究生学位论文, 2011
- Tu G H. Establishment of High Pressure Liquid Chromatography Method and Preparation of Polyclonal Antibody for Glycosyted Hemoglobin A1c. Jiangsu: School of medicine, Jiangsu University, 2011
- [35] National Glycohemoglobin Standardization Program. HbA1c methods: Effects of Hemoglobin Variants (HbC, HbS, HbE and HbD traits) and Elevated Fetal Hemooglobin (HbF). National Glycohemoglobin Standardization Program. 2014(September). <http://www.ngsp.org/factors.asp>
- [36] Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson J O, *et al.* IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem*, 2004, **50**(1): 166-174
- [37] Jeppsson J O, Jerntorp P, Sundkvist G, *et al.* Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. *Clin Chem*, 1986, **32**(10): 1867-1872
- [38] GE. Hemoglobin A1c measurement with mono S method. GE Ion exchange chromatography. 2004 (June): 1-3. http://www.gelifsciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18116792_20140411171923.pdf
- [39] Geistanger A, Arends S, Berding C, *et al.* Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for hemoglobin A1c and the designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clin Chem*, 2008, **54**(8): 1379-1385
- [40] Yatscoff R W, Tevaarwerk G J, Clarson C L, *et al.* Interference of fetal hemoglobin and labile glycosylated hemoglobin with measurements of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem*, 1983, **29**(3): 543-545
- [41] Weykamp C W, Penders T J, Siebelder C W, *et al.* Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem*, 1993, **39**(1): 138-142
- [42] Klenk D C, Hermanson G T, Krohn R I, *et al.* Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. *Clin Chem*, 1982, **28**(10): 2088-2094
- [43] Little R R, England J D, Wiedmeyer H M, *et al.* Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. *Clin Chem*, 1983, **29**(6): 1113-1115
- [44] Middle F A, Bannister A, Bellingham A J, *et al.* Separation of glycosylated haemoglobins using immobilized phenylboronic acid. Effect of ligand concentration, column operating conditions, and comparison with ion-exchange and isoelectric-focusing. *Biochem J*, 1983, **209**(3): 771-779
- [45] 刘蔚, 纪立农. 2011 年全国糖化血红蛋白检测仪器现状调查. *中国糖尿病杂志*, 2013, **21**(8): 682-685
- Liu W, Ji L N. National survey of HbA_{1c} measurement instruments in 2011. *Chinese Journal of Diabetes*, 2013, **21**(8): 682-685
- [46] 赵锐, 黄新成, 吴丽琴, 等. 糖化血红蛋白检测方法的研究进展. *实用医技杂志*, 2014, **21**(2): 167-168
- Zhao R, Huang X C, Wu L Q, *et al.* *Journal of Practical Medical Techniques*, 2014, **21**(2): 167-168
- [47] 刘阳, 李英杰, 喻红波. 乳胶增强免疫比浊法测定糖化血红蛋白的方法学评价. *现代检验医学杂志*, 2013, **28**(6): 101-103
- Liu Y, Li Y J, Yu H B. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2013, **28**(6): 101-103
- [48] 时勇. 两种检测糖化血红蛋白方法的方法学比较. *国际检验医学杂志*, 2013, **34**(14): 1858-1859
- Shi Y. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2013, **34**(14): 1858-1859
- [49] 林天浩, 莫恒勤. 免疫比浊法检测糖化血红蛋白的性能评价. *现代医院*, 2013, **13**(11): 60-62
- Lin T H, Mo H Q. *Modern Hospital*, 2013, **13**(11): 60-62
- [50] 王建柱, 贾兴旺, 董振南, 等. 免疫比浊法测定糖化血红蛋白的方法评价. *标记免疫分析与临床*, 2011, **18**(5): 334-336
- Wang J Z, Jia X W, Dong Z N, *et al.* *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2011, **18**(5): 334-336
- [51] Xue Q N, Bian C, Tong J H, *et al.* CMOS and MEMS based micro hemoglobin-A1c biosensors fabricated by various antibody immobilization methods. *Sensor Actuat a-Phys*, 2011, **169**(2): 282-287
- [52] Xue Q N, Bian C, Tong J H, *et al.* Antibody immobilization based on nano spheres modified by mixed SAMs and SPA for immuno-FET sensor fabrication. *Nanotechnology and Precision Engineering*, 2011, **9**(6): 477-482
- [53] Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, *et al.* New enzymatic assay for glycohemoglobin. *Clin Chem*, 2003, **49**(2): 269-274
- [54] Nanjo Y, Hayashi R, Yao T. An enzymatic method for the rapid measurement of the hemoglobin A1c by a flow-injection system comprised of an electrochemical detector with a specific

- enzyme-reactor and a spectrophotometer. *Anal Chim Acta*, 2007, **583**(1): 45–54
- [55] Hirokawa K, Shimoji K, Kajiyama N. An enzymatic method for the determination of hemoglobinA_{1c}. *Biotechnol Lett*, 2005, **27** (14): 963–968
- [56] 李义龙, 单战海, 韩冰, 等. 酶法糖化血红蛋白试剂盒方法学对比评价. *中国实验诊断学*, 2010, **14**(8): 1336–1338
Li Y L, Shan Z H, Han B, *et al.* *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2010, **14**(8): 1336–1338
- [57] Jaisson S, Desmons A, Renard B, *et al.* Analytical performances of a new enzymatic assay for hemoglobin A1c. *Clin Chim Acta*, 2014, **434**(1 July): 48–52
- [58] Thai A C, Ng W Y, Lui K F, *et al.* Rapid desktop method for the measurement of glycosylated haemoglobin HbA_{1c}. *Singap Med J*, 1993, **34**(6): 493–495
- [59] Zhou R, Tong Q, Zuo C, *et al.* Point-of-care testing of HbA_{1c} is traceable to IFCC reference method by external calibration. *Clin Chim Acta*, 2014, **433**(10 June): 249–253
- [60] St John A, Davis T M E, Goodall I, *et al.* Nurse-based evaluation of point-of-care assays for glycosylated haemoglobin. *Clin Chim Acta*, 2006, **365**(1–2): 257–263
- [61] Bode B W, Irvin B R, Pierce J A, *et al.* Advances in hemoglobin A1c point of care technology. *J Diabetes Sci Technol*, 2007, **1**(3): 405–411
- [62] Selvin E, Zhu H, Brancati F L. Elevated A1C in adults without a history of diabetes in the U.S. *Diabetes Care*. 2009, **32**(5): 828–833
- [63] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care*. 2010, **33**(Suppl 1): S11–61
- [64] Cagliero E, Levina E V, Nathan D M. Immediate feedback of HbA_{1c} levels improves glycemic control in type 1 and insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 1999, **22**(11): 1785–1789
- [65] Miller C D, Barnes C S, Phillips L S, *et al.* Rapid A1c availability improves clinical decision-making in an urban primary care clinic. *Diabetes Care*, 2003, **26**(4): 1158–1163

Standardization and Technology Development of Measurement of Glycated Human Hemoglobin*

ZHOU Wen-Juan, WU Yun-Xiang, YI Jun**

(School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract According to the latest IDF Diabetes Atlas, diabetes mellitus (DM) caused an estimated 5.1 million deaths worldwide in 2013. In other words, a person died from this epidemic disease every six seconds. DM has become one of three major causes of human death after cardiovascular disease and cancers. Glycated human hemoglobin HbA_{1c} is generated by the irreversible, non-enzymatic glycation reactions on the α -amino groups of N-terminal residue Val1 in one or both beta subunits of tetrameric Hb. Due to the direct correlation of HbA_{1c} with ambient glycemic concentration over a prolonged period of time, HbA_{1c} could be useful in assessing diabetic control for the long-term, and is also an important predictor of potential risks to diabetes complications. Therefore, ADA and WHO recommended HbA_{1c} with a diagnostic cut point of $\geq 6.5\%$ as a new diagnostic criterion for diabetes in 2010 and 2011, respectively. In this review, we summarize: (1) the standardization of HbA_{1c} from the global IFCC reference method and designated comparison methods in the United States, Japan and Sweden; (2) the basic principles of HbA_{1c} detection methods commonly used in clinic including affinity chromatography, immunoassay and enzymatic analysis, and their application limitations; (3) the development of POC technology for HbA_{1c} measurement.

Key words diabetes mellitus, glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), clinic diagnose, point-of-care (POC)

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0281

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21271104, 31200555) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (30920140111011).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-84303273, E-mail: yijun@njust.edu.cn

Received: October 5, 2014 Accepted: March 23, 2015