

糖尿病诊断和监测的金标准—HbA1c

沈霞

作者单位:200092 上海市,上海交通大学医学院附属新华医院检验科

【摘要】 糖化血红蛋白是人体血液中葡萄糖与血红蛋白链上的游离氨基酸之间非酶促糖化作用的产物。血红蛋白 A1c(hemoglobin A1c, HbA1c)是糖化血红蛋白的主要成分,既不受胰岛素水平的影响,也不受运动和饮食等因素的影响,能够较准确的反映患者过去 8~12 w 的平均血糖水平。美国糖尿病学会、欧洲糖尿病研究委员会及国际糖尿病协会联合组成的国际专家委员会推荐使用 HbA1c 作为诊断糖尿病的新指标,HbA1c 还是世界卫生组织和许多国家糖尿病协会推荐的糖尿病首选诊断标准。由于 HbA1c 的检测方法众多,不同实验室间的检测结果可因所用的原理、方法学不同,所测组分及 Hb 变异体的差异,均可影响实验样本的稳定性、检测结果的准确性及重复性,导致各实验室之间检测结果差异较大,缺乏可比性和溯源性。目前,国际较公认的 HbA1c 检测标准化参考方法是由国际临床化学联合会(The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC)提出的,该方法已经由包括欧洲、日本和美国在内的 11 家 IFCC 参考实验室验证。我国也于 2011 年颁布了《糖化血红蛋白实验室检测指南》,然而 HbA1c 检测标准化工作仍处于起步阶段,只有积极推动实验室间 HbA1c 检测标准化和质量管理,才可使 HbA1c 定量检测的实验报告能达到结果互认,真正成为糖尿病诊断和监测的金标准。

【关键词】 血红蛋白;糖化血红蛋白;糖尿病;标准化;金标准

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.001

根据国际糖尿病协会统计,2013 年全球 20~79 岁成年人的糖尿病患病率为 8.3%,患者人数达 3.82 亿,到 2035 年该数字将上升至 5.92 亿^[1]。我国糖尿病的发病率也正呈明显上升趋势,由上海交通大学医学院附属瑞金医院宁光教授团队首次应用国际最新临床诊断标准,在全国范围内完成口服葡萄糖耐量试验结合糖化血红蛋白 [即血红蛋白 A1c (hemoglobin A1c, HbA1c)]测定以明确诊断 2 型糖尿病的调查^[2]数据表明,2010 年中国 18 岁及以上成年人糖尿病患病率高达 11.6%、糖尿病前期率为 50.1%。根据研究样本估测,我国成年人中约有 1.139 亿糖尿病患者及 4.934 亿糖尿病前期人群。

长期以来,糖尿病的诊断主要依据空腹血糖和口服葡萄糖耐量试验,现在这种状况将面临改变。由美国糖尿病学会(American Diabetes Association, ADA)、欧洲糖尿病研究委员会及国际糖尿病协会联合组成的国际专家委员会推荐使用 HbA1c 作为糖尿病诊断的新指标,HbA1c 还是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和许多国家糖尿病协会推荐的糖尿病首选诊断标准^[3-5]。本文就 HbA1c 的形成机制、检测方法和标准化等方面做一浅析。

1 血红蛋白(hemoglobin, Hb)及其变异体和糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, GHb)定义

1.1 Hb 成人 Hb 主要由 HbA1 (95.0%~97.0%, 2 α , 2 β)、少量的 HbA2 (2.5%~3.0%, 2 α , 2 δ)和 HbF (0.5%~1.0%, 2 α , 2 γ)组成。HbA 是由 2 条 141 个氨基酸组成的 α A 链和 2 条 146 个氨基酸组成的 β A 链构成的四聚体 2 α A2 β A。HbA 中约 90% 为非 GHb (HbA0), 5%~8% 为 GHb (HbA1), 其中 HbA1 经色谱分析后又分为 HbA1a1、HbA1a2、HbA1b 和 HbA1c 四种成分,HbA1c 约占 80%,是 HbA1 的主要成分。

1.2 Hb 变异体 20 世纪 60 年代,Rahbar 在筛查人群中可能存在的异常 Hb 时发现,糖尿病患者体内存在电泳速度非常快 Hb 成分,并被认为是一种异常的 Hb。次年,Rahbar^[6]研究小组证实这种异常 Hb 在结构上与 HbA1c 相同。之后的研究报道显示 Hb 变异体有数百种,大多数起源于 Hb 的 α 、 β 、 γ 、 δ 链的点突变。临床最常见的 Hb 变异体是 HbF、HbS 和 HbC。HbF 是胚胎时期的 Hb 由两条 α 链和两条 γ 链组成。出生时,70% 的 Hb 是 HbF,6 个月后降到 5% 以下。遗传性 HbF 持续存在的个体其体内浓度可达到总 Hb 的 30%,而 β 地中海贫血和镰状细胞病患者体内 HbF 的浓度占总 Hb 的 2%~

20%。HbS 变异体有明显的地区、种族差异。在美国, HbS 是最常见的 Hb 变异体, 尤其在纯合子镰状细胞病患者体内, 有三分之一可检测出 HbS。HbC 是一种 α 链异常的 Hb, 较正常的 α 链(141 个氨基酸)多了 31 个氨基酸, 共 172 个氨基酸。原因在于 α 基因的终止密码突变为有意义的密码子而形成异常 Hb, 由于突变使 α 链合成延缓, 引起 α 珠蛋白合成障碍性贫血^[7]。该病在东南亚和中国南方均有发现^[8]。

1.3 GHb 定义 GHb 是葡萄糖对 HbA 的遗传修饰, 是人体血液中葡萄糖与 Hb 链上的游离氨基酸之间非酶促糖化作用的产物。Hb 链上有多个游离氨基酸, 其中 β 链 N-末端的缬氨酸氨基暴露于葡萄糖的程度最高, 他们以共价键结合形成稳定的复合物, 其糖化产物是 GHb 的主要成分, 称为 HbA1c^[5,9,10]。未经治疗的糖尿病患者血液中葡萄糖浓度很高, 多余的葡萄糖糖化血液中的 Hb, 从而形成 HbA1c。

2 HbA1c 的形成过程

葡萄糖进入红细胞后, 与 HbA 的 β 链 N 末端缬氨酸残基缩合, 先形成一种不稳定的 Schiff 碱(醛亚胺结构), 即前 HbA1c, 再解离或经 Amodori 分子重排后形成 HbA1c(醛酮结构)。该反应的过程是缓慢而不可逆的, 并且由于红细胞内没有分解醛酮的酶, 因此 HbA1c 的形成过程存在于红细胞的整个生命周期中, 其形成速度与红细胞内的葡萄糖浓度有关, 而与胰岛素水平无关。所以, HbA1c 水平只与红细胞寿命和该时期体内血糖的平均浓度有关, 不受运动和饮食的影响, 能反映过去 8-12 w 的平均血糖浓度, 是目前国际上公认的用于评估糖尿病患者长期血糖状况的理想指标。

3 常用的 HbA1c 测定方法及评价

到目前为止, 有超过 30 种不同的方法用于定量检测 HbA1c^[11-13], 其中常用的检测方法及其性能如下。

3.1 离子交换层析法 基于电荷差异进行分析。葡萄糖与 Hb 的 β 链末端 Val 连接降低了等电点, 导致 HbA1c 带的正电荷比未糖化 Hb 少, 与树脂的附着力小。可以分别用不同离子浓度的缓冲液在不同的时间将 HbA1c 从阳离子交换柱中洗脱下来, 再根据每个峰值下的面积来计算 HbA1c 占总 Hb 的比例。该方法中 Hb 变异体会随 HbA1c 一起被洗脱下来, 影响 HbA1c 值^[12]。

3.2 亲和层析法 基于糖化与非糖化 Hb 结构不同, 凡是糖基化的 Hb 均可以与硼酸盐结合形成可逆的复合物, 未糖化 Hb 先被洗脱后, 再用山梨醇分离复合物, 并将全部 GHb 洗脱出来, 检测结果是总 GHb, 通过换算得出 HbA1c 的量。但该方法对于变异 Hb 和病理 Hb 的影响相对其他方法不敏感, 易造成检测结果不准确^[11]。

3.3 免疫法 采用单克隆抗体特异识别 GHb β 链 N 末端最后 4~6 个氨基酸组成的抗原表位, 在自动生化分析仪上利用抗原、抗体反应的原理进行免疫比浊测定。以 GHb 为标准, 测

定 HbA1c 的含量, 再测定 Hb 的含量, 最后计算出 HbA1c 占总 Hb 的百分数。该方法具有良好的精密度及与其他方法良好的相关性。但当 Hb 发生第 6 位氨基酸变异 (HbS 和 HbC) 时将不会被识别。又因各厂家产品的单抗针对的抗原决定簇不同、亲和力不同等因素将影响检测结果的可比性^[12]。

3.4 均相酶法 其原理是在蛋白酶的作用下, 切断 GHb 的 β 链 N 末端的糖化二肽在果糖基胺氧化酶的作用下生成过氧化氢, 在过氧化氢的存在下与显色剂产生显色反应, 通过测定吸光度值求出 HbA1c 的百分浓度。此法是近几年才推出的快速、均一的反应体系。该方法精密度好, 与高效液相色谱法和免疫法有良好的相关性。但其缺点是也不能识别 Hb 变异体^[14]。

3.5 电泳法 由法国 Sebia 公司推出的 CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING 毛细管电泳分析仪, 其检测原理是利用不同蛋白分子在 pH=9.4 的缓冲条件下, 仪器自动溶血, 并通过毛细管的阳极端吸入进样, 然后在高压条件下, 在电渗流和电场力的作用下的泳动速率不同而进行蛋白质分离, 属液相电泳。并在毛细管阴极端以波长 415 nm 直接检测 Hb(415 nm 是 Hb 特有的吸收峰, 可以准确地对 HbA1c 以及其他 Hb 进行定量)。在使用碱性缓冲液条件下, 正常和异常(或变异体)Hb 按下列顺序检测出来, 从阴极到阳极依次为 HbA2、HbC、HbE、HbS、HbD、HbF、HbA0、其他 Hb 以及 HbA1c。距阴极端最近的是含糖基最少的 HbA1a 和 HbA1b, 处于中间的是 HbA1c, 距阳极端最近的是 Hb 的主要成分、未糖化的 HbA0 和糖化的 HbA2, 同时其对 HbA2 的定量检测又可用于 β 地中海贫血的筛查。该方法是已通过国际临床化学联合会(The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC) 和美国糖化血红蛋白标准化计划组织(National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP) 认证的 HbA1c 检测方法^[15-17]。

3.6 即时检验(point-of-care testing, POCT) 国内目前使用较多的有两种方法, 一种是利用硼酸亲和原理在颜色反射机上进行 HbA1c 的快速检测; 另一种是基于免疫反应原理在荧光分光光度仪上检测含 HbA1c 的荧光染料分子的斑点, 换算成 HbA1c 的百分浓度。POCT 检测 HbA1c 具有便携、快速等优点, 但相当一部分 POCT 方法的精密度尚不能满足临床要求, 且对样本中的 Hb 含量要求有较大限制^[18]。

4 HbA1c 的检测结果报告和临界值

HbA1c 的检测结果将在全球范围内标准化, 实验室的结果报告应以传统单位(%HbA1c)报告, 并同时报告 IFCC 的国际单位(mmol/mol), 再用 NGSP 单位换算公式进行换算后共同报告结果^[5,13]。NGSP 单位换算公式如下

$$\text{NGSP HbA1c} = 0.0915(\text{IFCC HbA1c}) + 2.15\%$$

2009 年, 国际专家委员会一致同意推荐使用 HbA1c 诊

断糖尿病,并发布了工作报告^[3]。2010年,ADA对国际专家委员会的建议给予充分肯定,并正式确定将HbA1c作为糖尿病诊断的标准之一,临界值为HbA1c>6.5%,HbA1c水平在5.7%~6.4%的患者归为“糖尿病高危人群”。2011年,WHO正式推荐以HbA1c>6.5%作为诊断糖尿病的标准^[4,10]。

5 HbA1c检测的标准化和质量控制

不同实验室间的检测结果可因所用的原理、方法学不同,所测组分(HbA1或HbA1c)的差异,再加上Hb变异体(HbS、HbC、HbE和HbF)的影响,而对实验结果的准确性、重复性,甚至样本的稳定性均有影响,导致各实验室之间结果差异较大,很难具有可比性和溯源性^[19]。由于HbA1c测定的准确性直接关系到临床对糖尿病的诊断和疗效评估,因此,对HbA1c检测的标准化和质量控制已受全球关注。

5.1 HbA1c检测的国际标准化和质量控制 1993年,美国临床化学协会建立的NGSP通过参考实验室网络的样本比对来降低室间差异,要求检测实验室应参加能力比对试验。实验室可采用溯源到糖尿病控制与并发症试验(diabetes control and complication trial, DCCT)参考物质的方法,使报告的结果都能溯源到DCCT的结果。1995年,IFCC成立了HbA1c标准化工作组,旨在研究一个可供追溯的参照系统,研发HbA1c参考物质和参考方法^[8,13]。该工作组历时5年的探索,经过多家实验室的努力,于2002年推出了一套HbA1c参考方法,即将待测标本溶血后经胞内蛋白酶酶解,然后应用高效液相色谱串联电喷雾质谱仪或高效液相色谱串联毛细管电泳仪,利用信号比例计算出糖基化的β链N末端六肽片段的比例,从而得出HbA1c在样本中所占的百分比,是检测HbA1c分子浓度的新方法,IFCC推荐的参考方法较NGSP参考方法特异性强,该方法已经由包括欧洲、日本和美国在内的11家IFCC参考实验室验证^[11]。2011年,美国生化科学院发布的HbA1c检测在糖尿病诊断和管理中的应用与建议中指出,HbA1c的室内CV<2%,室间CV<3.5%,并至少需要做两个水平的质控品。

5.2 我国HbA1c检测的标准化和质量控制 国内各实验室采用的HbA1c检测试剂多达60余种,甚至很多实验室仍采用非标准化的方法,缺乏相关的参考实验室网络及正确性验证的途径,检测结果的可比性不容乐观,全国范围内的HbA1c检测标准化面临严重挑战^[11]。2010年卫生部临检中心HbA1c室间质评不同仪器组内CV为4.54%~21.03%^[20]。2011年北京市临检中心HbA1c检测室间质评的结果显示,相同仪器组内CV基本在4%以下,虽显示了很好的精密度,但是不同仪器组内CV仍高达15.8%,检测结果的可比性差,无法达到HbA1c检测结果的互认^[20]。2010年3月,中国HbA1c教育计划在北京启动,该计划是国内首次由内分泌和检验医学界专家共同参与的大型学术活动,旨在提高HbA1c检测的标

准化,以及在糖尿病管理中的地位,以加强临床医师对HbA1c的认识和重视^[20]。上海临床检验中心采用IFCC HbA1c一级参考方法,于2010年完善并获候选参考实验室资格,2011年考核合格,2011年11月1日正式成为包括欧美日12家实验室之后的第13家运行一级参考方法的参考实验室网络中的一员,为中国HbA1c标准化工作走上一个新的台阶^[18]。

HbA1c因其在体内存在时间长,水平较稳定,不受运动或饮食影响的特点,已逐渐成为新的糖尿病诊断和监测指标。目前,由卫生部临床检验中心、国家食品药品监督管理局医疗器械检验所和糖尿病学专家根据我国HbA1c检测现状,结合国内外相关研究进展,共同制定HbA1c实验室检测指南^[5],于2011年经卫生部组织专家讨论并已通过。然而,HbA1c测定标准化工作在我国还处于起步阶段,任重而道远。希望通过我国HbA1c实验室检测指南的出台和贯彻落实,推动HbA1c检测标准化和质量控制更加深入开展,使HbA1c定量检测的实验报告能达到结果互认,真正成为糖尿病诊断和监测的金标准。

6 参考文献

- 1 IDF. IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation, 2014, sixth edition.
- 2 Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. JAMA, 2013, 310: 948-959.
- 3 International Expert Committee. Report in the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care, 2009, 32: 1327-1334.
- 4 World Health Organization. Use of glycosylated hemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. Geneva: WHO, 2011: 1-25.
- 5 王东环, 陈文祥, 张传宝, 等. 糖化血红蛋白实验室检测指南. 中国糖尿病杂志, 2013, 21: 673-678.
- 6 Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin Chem Acta, 1968, 22: 296-298.
- 7 Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, et al. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem, 1993, 39: 1717-1723.
- 8 李友琼, 覃桂芳, 阳文辉, 等. 毛细管电泳检测血红蛋白 Constant Spring. 临床检验杂志, 2012, 30: 31-32.
- 9 IFCC. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". Clin Chem Lab Med, 2007, 45: 1081-1082.
- 10 Hanas R, John G. International HbA1c Consensus Committee. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c Measurement. Clin Chem Lab Med, 2010, 48: 775-776.

11 王冬环,张传宝,陈文祥,等.应重视糖化血红蛋白测定技术及量值溯源.中华检验医学杂志,2008,31:965-968.

12 Gillery P, Delpech M, Garcia I, et al. Evaluation des méthodes de dosage de L'hémoglobine glyque; méthode et paramètre de référence. Ann Biol Clin, 1995, 53: 395-398.

13 Cas Weykamp, W.Garry John, Andrea Mosca. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. J Diabetes Sci Tehnol, 2009, 3: 439-445.

14 Liu L, Hood S, Wang Y, et al. Direct enzymatic assay for % HbA1c in human whole blood samples. Clin Biochem, 2008, 41: 576-583.

15 Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the mesurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med, 2002, 40: 78-89.

16 Jaisson S, Leroy N, Meurice J, et al. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis. Clin Chem Lab Med, 2012, 50: 1769-1775.

17 Weykamp C, Waenink-Wiegers H, Kemna E, et al. HbA1c: performance of the Sebia Capillarys 2 Flex Piercing. Clin Chem Lab Med, 2013, 51: e129-e131.

18 居漪.糖化血红蛋白检测技术和质量管理.检验医学, 2010, 25: 914-917.

19 田京,高洪伟,洪天配.从临床视角谈糖化血红蛋白检测的重要性及其结果判读.中华检验医学杂志, 2012, 35: 505-508.

20 宋智心,徐国宾,马怀安,等.糖化血红蛋白测定的标准化现状.中华检验医学杂志, 2012, 35: 497-500.

(收稿日期:2014-03-27)

(本文编辑:杨军)

消 息

2015(第三届)先进体外诊断技术峰会

近年来,各种新技术、新方法的兴起和融合,促进了体外诊断仪器、试剂的开发应用和更新换代。国家科技基金的支持、上市公司及社会资本的投入、国内基层医疗的改革,使得体外诊断行业迅速壮大,也使得该行业逐渐从分散走向集中。

但是,这个行业还有很大的问题有待解决。虽然生化诊断基本实现国产,但在免疫诊断和分子诊断的高端技术上,仍然很大程度上依赖国外的产品。最近,国内对体外诊断行业的法律法规进行了修订,体外诊断产业链上各类参与者、独立实验室需要明确自己面临的机遇和挑战。体外诊断在肿瘤诊断、产前诊断、遗传病检测、传染病检测方面发展很快,相关企业需要迅速跟上市场的需求,满足临床应用的需要。另外,很多中国体外诊断企业开始尝试开拓海外市场,需要了解欧美注册法规及市场准入标准。

本次会议邀请来自政府机关的领导和专家、国内外龙头企业的高层管理者和国内三甲医院的临床检验医生,讨论政策法规、市场分析、技术、产品、临床应用、投融资、分子诊断、即时检验等诸多方面的话题,力求覆盖体外诊断全行业,探讨如何打造“专精特新”的体外诊断产业链,为广大从业人员提供一个交流的平台,吸引临床检验医师和国内外一二线体外诊断企业参与。

1 会议主题

1.1 新政策 体外诊断产品的监管、认证及相应法规;新版体外诊断试剂注册管理办法的解读;体外诊断与临床检验市场现状与发展趋势;临床检验医保报销支付;体外诊断与社

区健康管理。

1.2 新技术 多重检测技术的新动态;新一代测序技术的发展;单细胞技术;家庭化检验趋势与即时检验;即时检验与移动医疗、云计算;纳米管技术在体外诊断中的应用。

1.3 新产品 质谱技术用于临床检验;生物标志物的临床检验;肿瘤标志物、心脏标志物;免疫磁珠的应用;手持超声与可穿戴设备;PCR与生物芯片产品;生物传感器;微流控技术。

1.4 新应用 无创血糖仪与虹膜光电传感器;产前诊断之无创检测;肿瘤伴随诊断;感染性疾病及毒性物质的临床检验及即时检验诊断;遗传疾病诊断;即时检验的法医、军队应用与灾难应急。

2 会议形式

嘉宾演讲与讨论;听众互动;产品及概念展示和体验;项目路演。

3 会议时间与地点

会议时间:2015-03-26 至 2015-03-27

会议地点:北京

4 联系方式

联系人:张文洋

E-mail:wenyang.zhang@bioon.com

电 话:021-64879183-613;18013122680

传 真:86(21)64879221

地 址:上海市徐汇区中山西路 2020 号华宜大厦 1 号楼 801 室(200235)