

• 检验技术与方法 •

响应面分析法优化微量清蛋白及糖化血红蛋白检验条件

徐建红

(吴江区第一人民医院检验科,江苏苏州 215200)

摘要:目的 利用响应面分析法对检验尿液中微量清蛋白以及血液中糖化血红蛋白的条件进行优化。方法 随机选择 60 例糖尿病患者分别抽取清晨空腹静脉血 3 mL,同时留取尿标本 6 mL,对不同保存温度、保存时间进行单因素实验。根据中心组合 Box-Behnken 的实验设计原理,在单因素实验的基础上,对样品保存温度、保存时间 2 个影响显著因素采用双因素双水平的响应面分析法优化检验条件,以保存温度 4 ℃、保存时间 3 d 为实验中心点进行响应面分析实验。结果 尿液以及血液测量的最佳保存温度是 4 ℃,最佳保存时间是 1 d,在此条件下尿液中微量清蛋白以及血液中糖化血红蛋白的测量值几乎没有影响,十分接近于稳定情况下的理想值。结论 利用响应面分析法可以优化微量清蛋白及糖化血红蛋白检验条件。

关键词:响应面分析法; 微量清蛋白; 糖化血红蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.21.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)21-2929-03

Optimization of the urine trace albumin and glycosylated hemoglobin measurements by response surface methodology

Xu Jianhong

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Wujiang District, Suzhou, Jiangsu 215200, China)

Abstract: Objective To optimize the measurements of glycosylated hemoglobin and urine trace albumin based on the response surface methodology. **Methods** 60 cases of patients with diabetes were enrolled. All the patients were collected 3 mL fasting blood and 6 mL urine in the morning. The simple factors experiment was taken in different maintain temperatures and times. Based on the Box-Behnken design principles, the temperatures and times were as the factors influencing. The response surface methodology was proceeding centered on the condition that the maintain temperature was 4 ℃ and the maintain time was 3 d. **Results** The best temperature for save urine and blood was 4 ℃ and the best time was 1 d. In this condition, the measured value of glycosylated hemoglobin and urine trace albumin were mostly closed to the ideal value. **Conclusion** Using the response surface methodology, the measure condition of glycosylated hemoglobin and urine trace albumin can be optimized.

Key words: response surface methodology; trace albumin; glycosylated hemoglobin

糖尿病肾病是 2 型糖尿病并发症之一,发病率较高。糖尿病肾病的传统诊断指标是测定肌酐以及尿素氮的浓度,这些指标的测定虽然对医疗条件水平要求不高,但是它们对早期诊断糖尿病肾损伤的作用有限^[1]。近年研究表明,尿微量清蛋白是糖尿病早期肾损伤的灵敏指标^[2]。糖化血红蛋白是高血糖浓度的情况下,血液中存在的血红蛋白所发生的一种连续且缓慢的非酶促糖化反应的产物之一,糖化血红蛋白的合成是相对不可逆的过程,因此糖化血红蛋白的检测水平可以准确反映出患者在近 3 个月以来的血糖水平高低,因此糖化血红蛋白的检测值可以用来作为糖尿病患者的诊断、疗效及预后评估的一个重要依据。此外,糖化血红蛋白检测水平的高低,可以在一方面反映出患者的肾脏内血管损伤的程度。但是如果以不当的方法收集或是保存患者的血液以及尿液,会在很大程度上影响尿微量清蛋白以及血液中糖化血红蛋白的测定结果,从而错失早期治疗的良机^[3]。如何能够快速准确地检验出患者尿液中的微量清蛋白以及血液中糖化血红蛋白的浓度变化,是早期诊断糖尿病肾病的关键^[4]。本研究应用响应面分析法对现有的检测手段进行了分析优化,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取 2012 年 6 月到 2013 年 6 月于本院就诊的 60 例糖尿病患者,其中男 30 例,女 30 例,46~64 岁,平均(54.3±1.8)岁,诊断均符合世界卫生组织的诊断标准,均排除了其他心、肺、肾慢性疾病。

1.2 仪器与试剂 使用 Tosoh Automated Glycohemoglobin Analyzer HLC-723G8 全自动糖化血红蛋白分析仪检测空腹静脉血中糖化血红蛋白浓度;使用 IMMAGE800 仪器用于检测晨尿中尿微量清蛋白。

1.3 标本采集及测定 以上所有研究对象均在清晨于空腹状态下抽取静脉血 3 mL;留取晨尿标本 6 mL,同时在尿液标本中加入 0.15 mL 10% 叠氮钠,180×g 离心 10 min 后,收集上清液,分装于 EP 管中待测。

1.4 响应面分析法对样品的保存条件进行优化

1.4.1 尿液以及血液保存温度的单因素考察 收集好的尿液分装于 EP 管后,加盖储存,分别在室温(20 ℃ 左右)、4 ℃ 以及-20 ℃ 条件下进行保存,并于当天进行检测。储存于-20 ℃ 的标本需在 4 ℃ 条件下进行缓慢解冻,不可反复冻融,测定后即丢弃。所有标本在测定前进行振摇,充分混匀。收集好的血液分别在室温(20 ℃ 左右)以及 4 ℃ 条件下进行保存,并于当天进行检测。所有样品在测定前进行振摇,充分混匀。

1.4.2 尿液以及血液保存时间的单因素考察 收集好的尿液以及血液分装于 EP 管后,加盖于 4 ℃ 条件下储存,分别在第 1、3、7、10、30 天测定尿微量清蛋白浓度及血液中的糖化血红蛋白浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析,尿微量清蛋白数据呈现非正态分布,对数转换之后,用中位数来表示数值,采用 F 检验对各组结果进行比较;糖化血红蛋白

数据呈正态分布,使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多元拟合采用 Design Expert 8.05b 软件进行。

2 结 果

2.1 不同保存温度对尿微量清蛋白与糖化血红蛋白测定结果的影响 在第 1 天检测不同温度下保存的尿微量清蛋白的结果,在室温和 4 ℃保存条件下,尿微量清蛋白浓度均为 19 mg/L 左右,血中糖化血红蛋白的浓度分别为 10.0% 和 11.3%,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明如果当天检测的样品,温度对尿微量清蛋白以及糖化血红蛋白的测量值影响不大。

2.2 不同保存时间对尿微量清蛋白与糖化血红蛋白测定结果的影响 为了检测保存时间对尿微量清蛋白测量值的影响,本研究将尿液样品在温度条件下保存,分别在第 1、3、7、10、30 天进行测量。保存在 4 ℃下,尿微量清蛋白测量值在保存期间无明显变化,保存在室温和 -20 ℃条件下的样品,尿微量清蛋白测量值在第 7 天即出现显著下降 ($P < 0.05$),并且随着时间的延长,测量值下降的越加明显。为了检测保存时间对血液中糖化血红蛋白测量值的影响,本研究将血液样品在室温以及 4 ℃条件下保存,分别在第 1、3、7、10 天进行测量。保存在 4 ℃下的样品,仅在第 10 天进行测量时,糖化血红蛋白浓度较第 1 天出现显著下降 ($P < 0.05$),其余时间的测量值均变化不显著 ($P > 0.05$);保存在室温下的样品测量值在第 3 天开始出现显著下降 ($P < 0.05$)。以上结果提示,尿液以及血液最好在 4 ℃下保存,这样在较长时间之后测量依然不会对结果产生严重影响。

2.3 响应面分析结果 根据单因素试验确定的初步结果,以响应面分析法中的 Box-Behnken 中心组合作为实验设计原理,将保存温度 (A) 和保存时间 (B) 2 个因素作为自变量,2 个因素均取 3 个水平,以 -1、0、1 编码,以测量值为响应值,以保存温度 (4 ℃)、保存时间 (3 d) 为设计点进行响应面分析,进行双因素双水平试验。因素水平见表 1,结果见表 2。使用 Design Expert 8.05b 软件对表 2 中的测量值进行多元回归拟合,得到测量值对编码自变量 A 以及 B 二次多项回归方程: $Y = 10.19 - 0.54A + 0.31B - 0.32AB - 0.57A^2 - 0.39B^2$ 。方差分析以及回归系数的显著性检验结果见表 3。回归方程可信度分析显示,变异系数为 2.13%,拟合系数为 0.974,校正拟合系数为 0.923,预测拟合系数为 0.876,信噪比为 12.134。经过方差分析可得,此模型显著 ($P < 0.05$),模型决定系数 ($r^2 = 0.974$) 以及失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明该方程的拟合度以及可信度均良好,误差较小,因此该模型可用于尿液检验条件的优化分析。由表 3 的结果可以看出,各因素 A、B 对测量值的影响是显著的,二次项 A^2 、 B^2 均影响显著,二次项 AB 影响不显著,表明各影响因素对测量值的影响不是简单的线性关系。根据所得模型,预测稳定状态下尿微量清蛋白和血中糖化血红蛋白的测量值分别为 18.86 mg/L 和 (11.14 ± 1.78)%。优化分析响应面结果,以测量值为评价指标,得到相应的尿液以及血液检验优化条件为:保存温度 (A) 为 4 ℃,保存时间 (B) 为 1 d。

表 1 响应面因素分析

| 因素水平 | 保存时间 (d) | 保存温度 |
|------|----------|-------|
| -1 | 1 | 室温 |
| 0 | 3 | 4 ℃ |
| 1 | 7 | -20 ℃ |

表 2 Box-Behnken 实验设计与分析

| 实验序号 | A | B | 微量清蛋白 (mg/L) | 糖化血红蛋白 (%) |
|------|----|----|--------------|--------------|
| 1 | -1 | -1 | 18.93 | 11.34 ± 1.53 |
| 2 | -1 | 0 | 19.35 | 11.54 ± 1.43 |
| 3 | -1 | 1 | 19.87 | — |
| 4 | 0 | -1 | 17.22 | 9.49 ± 1.87 |
| 5 | 0 | 0 | 19.23 | 11.14 ± 1.09 |
| 6 | 0 | 1 | 18.97 | — |
| 7 | 1 | -1 | 17.53 | 10.05 ± 2.03 |
| 8 | 1 | 0 | 18.89 | 11.04 ± 0.98 |
| 9 | 1 | 1 | 17.74 | — |

—: 无数据。

表 3 方差分析结果

| 来源 | 平方和 (SS) | 自由度 (df) | 均方 (MS) | F | P (Pr > F) |
|-------|----------|----------|---------|-------|------------|
| 模型 | 7.54 | 9 | 0.76 | 21.34 | 0.043 |
| A | 0.87 | 1 | 0.87 | 20.48 | 0.034 |
| B | 0.032 | 1 | 0.032 | 0.05 | 0.041 |
| AB | 0.76 | 1 | 0.76 | 18.87 | 0.490 |
| A^2 | 0.87 | 1 | 0.87 | 22.20 | 0.033 |
| B^2 | 0.83 | 1 | 0.83 | 22.34 | 0.027 |
| 残差 | 0.19 | 7 | 0.049 | — | — |
| 失拟项 | 0.11 | 4 | 0.021 | 0.54 | — |
| 纯误差 | 0.17 | 5 | 0.015 | — | — |
| | 7.89 | 16 | — | — | — |

—: 无数据。

3 讨 论

糖化血红蛋白在人体血液中的可存在 120 d 左右^[5]。血糖浓度与糖化血红蛋白之间呈正比,所以利用糖化血红蛋白的测量值可以观测到患者 120 d 之前的血糖浓度,因此糖化血红蛋白浓度以及血糖浓度已经同时成为了评估糖尿病患者病情的一个“金标准”^[6]。糖化血红蛋白的测试值在一般情况下可以反映出患者在近 8~12 周内的血糖控制情况^[7]。与血糖测定相比,糖化血红蛋白的测定干扰因素更少、稳定性却更强,国际专家委员会在 2010 年 1 月发表声明将糖化血红蛋白作为糖尿病诊断的指标之一,并一致认定糖化血红蛋白浓度大于或等于 6.5% 可作为诊断切点^[8]。糖化血红蛋白自身的特点决定了它在糖尿病监测中的重要意义,糖化血红蛋白自身的特点如下:(1)糖化血红蛋白能够间接反映出患者的血糖控制情况,因为糖化血红蛋白测量值是与血糖值相平行。(2)糖化血红蛋白可在进餐后测定,与血糖不同,糖化血红蛋白的形成是一个十分缓慢的过程,每次抽血检验血糖,只能代表检测当时患者的血糖水平,然而糖化血红蛋白却能够提示患者 8 周甚至是 12 周以前的血糖水平。(3)糖化血红蛋白测量值测定的是其在总血红蛋白中的比例,所以血红蛋白的水平不容易影响到糖化血红蛋白测量值^[9]。

清蛋白存在于健康人的血液中,只有较少量的清蛋白可以出现在健康人的尿液中,如果尿液中清蛋白(下转第 2933 页)

LS 吸光度值)。

2.2 灵敏度 在 PCR 反应体系中, 确定 LS 为 50 copies, HS 为 10 000 copies, 通过加入不同浓度的系列目的模板液, 经检测本试验的最低检测限为 5×10^3 copies/mL。

2.3 特异性 本方法通过特异性免疫磁珠捕获, 再经 PCR 扩增和液相分子杂交, 大大提高了方法的特异性, 其中设计的人型结核分枝杆菌 Mtp40 引物, 可特异性检出人型结核分枝杆菌。而设计的 IS6110 引物可特异性检出结核分枝杆菌复合群细菌。对 102 例临床诊断为肺结核患者的痰标本, 采用本方法与培养法进行平行测试, 结果 102 例均显示为阳性, 与培养法结果完全一致。同时, 用本方法对其他非结核分枝杆菌菌株进行试验, 结果无非特异性反应发生。

3 讨 论

在磁性微粒表面包被抗结核分枝杆菌抗体, 可特异性捕获结核分枝杆菌, 此法快速简便, 对一些培养阴性的标本也能检出^[6]。IMC-PCR-ELISA 法能显著提高目的基因的检出率^[7], 其灵敏度要比单独 PCR 方法增加 8~2 000 倍^[8-9]。同时, 分子杂交技术的运用, 也能大大提高方法的特异性^[10]。此外, 双内标 PCR 技术实现了定量检测目的模板液起始浓度的目的。

本研究首先利用免疫磁珠捕获标本中的结核分枝杆菌并提取 DNA, 再通过双内标 PCR 反应和液相分子杂交-酶免疫显色技术, 建立了定量检测结核分枝杆菌复合群及人型结核分枝杆菌的方法。检测结果显示, 该方法具有快速、灵敏、特异、可定量检测的特点, 可为临床结核病的诊断和治疗效果监测提供实验依据。

参考文献

[1] 廖丽. 我国结核病流行现状及防治工作形势分析[J]. 中外医疗,

(上接第 2930 页)

浓度显著增加, 则提示患者的肾脏出现了蛋白质渗漏的现象^[10]。在糖尿病肾病、高血压、妊娠子痫前期多见尿微量清蛋白的增高, 这是肾损伤早期一个十分敏感的指标。尿微量清蛋白正常值的参考值范围为 0.00~1.25 mg/dL。通常在临幊上多应用尿微量清蛋白这一指标来对肾病的发生进行监测^[11]。结合患者的发病情况、症状、病史、糖化血红蛋白以及尿微量清蛋白的变化, 可以及早发现患者肾微血管病变, 进而尽早采取适当的措施。本研究以保存时间和保存温度为双因素进行响应面分析。根据中心组合 Box-Behnken 的实验设计原理, 在单因素实验的基础上, 对样品保存温度、样品保存时间 2 个影响显著因素采用双因素双水平的响应面分析法优化尿液检验条件, 并建立了二次多项回归模型, 此模型显著, 结果发现尿液以及血液保存在 4 ℃ 条件下、最好在当天对样品施以检测, 否则放置时间过长会增大测量值与稳定状态下期待值的差距。本研究首次报道了利用响应面分析法优化血液以及尿液的检验条件, 条件优化之后, 使得测量值与稳定状态值十分接近, 误差较小, 是较为理想的准确测定尿微量清蛋白以及糖化血红蛋白的方法, 应用响应面分析法优化后的检验条件可最大限度地减小临床测量误差, 从而避免对患者的诊断产生误导, 避免出现延误患者治疗的情况。

参考文献

[1] 彭湘杭, 杨锐, 艾雅琴, 等. 糖化血红蛋白与空腹血糖诊断糖尿病效果比较[J]. 广东医学, 2011, 32(7): 863-865.

2014(3): 129-130.

- [2] 杨江华, 王文杰, 何自芳, 等. 免疫磁珠捕获法分离抗酸杆菌的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(3): 168-169.
- [3] 李春林, 孙峰. 结核分枝杆菌检测方法临床应用的对比研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(17): 2164-2166.
- [4] 邱育森, 黄义德, 张彦定. 双内标 PCR-ELISA 定量检测技术的建立[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(7): 666-668.
- [5] 郑玉群, 许卫国, 陆伟, 等. 免疫磁珠分离涂片和 PCR 检测痰内结核分枝杆菌的诊断价值研究[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(2): 14-17.
- [6] Wilson SM, Lane AR, Stanley CJ, et al. Concentration of Mycobacterium tuberculosis from sputum using ligand-coated magnetic beads[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1164-1168.
- [7] Barletta J, Bartolome A, Constantine NT. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion [J]. J Virol Methods, 2009, 157(2): 122-132.
- [8] Thompson DE, Rajal VB, Batz SD, et al. Detection of Salmonella spp. in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR[J]. J Water Health, 2006, 4(1): 67-75.
- [9] Hwang YC, Leong OM, Chen W, et al. Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription-PCR for the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(7): 2238-2240.
- [10] 高媛, 郑文岭, 马文丽, 等. 基因诊断技术的临床应用进展[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(1): 15-18.

(收稿日期: 2014-01-08)

-
- [2] 王蕾, 孔宪涛. 系列蛋白测定在早期糖尿病肾病中的应用[J]. 海医学检验杂志, 2000, 15(3): 133-134.
 - [3] 邓洪容, 武革, 罗围春, 等. 广东省 1 型糖尿病患者血糖控制现状及相关因素的横断面调查[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(46): 3257-3261.
 - [4] 齐为民, 朱文芳. 单克隆抗体乳胶增强免疫法检测 HbA1c 的评价[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2): 215-217.
 - [5] 涂国华, 姜旭淦, 李礼, 等. 高效液相色谱测定糖化血红蛋白方法的建立与评价[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2011, 21(2): 147-150.
 - [6] 樊黎, 陈敏, 吴晓立, 等. 糖尿病患者糖化血红蛋白浓度与尿微量白蛋白相关性研究[J]. 中外医学研究, 2013, 11(32): 5-6.
 - [7] 瞿良, 王惠英, 朱玉琨, 等. 糖尿病血红蛋白检测的循证检验医学观点[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(10): 718-721.
 - [8] 胡应龙, 徐明星, 雷振山. 糖尿病患者糖化血红蛋白及 C 反应蛋白水平与肾脏微血管病变程度的相关性探讨[J]. 中华医药杂志, 2004, 4(7): 379-379.
 - [9] 魏建伟, 朱飞, 林五弟. 糖尿病肾病患者糖化血红蛋白与尿微量白蛋白的变化相关性研究[J]. 吉林医学, 2010, 31(24): 4057.
 - [10] 罗飞宏. 糖尿病肾病早期检测标志物研究新进展[J]. 国外医学: 儿科学分册, 2003, 30(1): 7-10.
 - [11] 黎桂芳. 尿微量白蛋白与糖化血红蛋白检测在糖尿病肾病诊断中的临床意义[J]. 中外医学研究, 2013, 11(31): 57-58.

(收稿日期: 2014-08-20)