

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580019516.X

[51] Int. Cl.

A01N 1/02 (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1968601A

[22] 申请日 2005.6.15

[21] 申请号 200580019516.X

[30] 优先权

[32] 2004.6.15 [33] US [31] 10/868,437

[86] 国际申请 PCT/US2005/021002 2005.6.15

[87] 国际公布 WO2006/009702 英 2006.1.26

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.14

[71] 申请人 拜尔健康护理有限责任公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 M·福尔克 M·贝卡 W·克罗尔

A·克诺尔 S·昂格尔

M·格尔曼 G·亨尼希

E·-R·伯查特 M·J·阿图尔

A·D·伯特 M·平扎尼

D·舒潘 R·P·蒂尔

C·佩特里 W·罗森伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 梁 谋

权利要求书5页 说明书74页 附图11页

[54] 发明名称

与肝病相关的方法和系统

[57] 摘要

本发明提供使用包含了血清和血浆标记值的多个血液标记值的诊断方法、试剂盒、系统以及相关的计算机可读介质,来辅助诊断患者中肝病的状况或进展。本发明也提供使用包含了血清和血浆标记值的血液标记值的方法和系统以及相关的计算机可读介质:(1)来筛选用于肝病治疗的活性成分;(2)来辅助选择用于易感染或患有肝病的患者的治疗方法;以及(3)来辅助设计用于在一个或多个患者中监测肝病的状况或进展的临床程序。

1.一种方法,它包括通过在一个或多个时间点测定每个时间点的预测值来辅助诊断患者中肝病的状况或进展,其中将在一个或多个时间点的预测值的比较和比较数据组用于确定患者肝病的状况或进展,并且其中通过将反映两个或多个血液标记和任选的一个或多个辅助标记的值的的数据输入通过将参照肝组织病理学数据与血液标记数据相关联而导出的线性或非线性函数算法中,来计算患者的预测值。

2.权利要求1中所述的方法,其中比较数据组包括与肝病相关的一个或多个数值、或数值范围,并且所述血液标记是血清标记。

3.权利要求3中所述的方法,其中比较数据组包括与由下列一个或多个测试所测定的值对应的值: Scheuer 得分(0-4)、改进的 Ishak 得分(HAI) A-接触性肝炎(0-4)、改进的 Ishak 得分(HAI) B-融合性坏死(0-6)、改进的 Ishak 得分 (HAI) C-点状坏死(0-4)、改进的 Ishak 得分 (HAI) D-门炎症(0-4)、以及改进的 HAI 得分(Ishak 得分)(0-6)。

4.权利要求1中所述的方法,其中血液标记是选自下列中的至少两个或多个的血清标记: N末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 复合物、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。

5.权利要求4中所述的方法,其中通过输入反映两个或多个血液标记值以及任选的选自下列的一个或多个辅助标记值的数据而计算预测值: 患者的体重、性别、年龄以及血清转氨酶水平。

6.权利要求1中所述的方法,其中使用判别函数分析法或非参数回归分析法,通过将参照的肝组织病理学数据与血液标记数据相关联来导出线性或非线性函数算法。

7.权利要求6中所述的方法,其中参照肝组织病理学数据和血液标记数据包括指示纤维发生或纤维裂解、指示提高的肝病的血清标记水平或指示其它肝病临床症状的数据。

8.权利要求7中所述的方法,其中参照肝组织病理学的数据和血液标记的数据是以测定的一个或多个受检者而不是患者的数据为基础的。

9.权利要求7中所述的方法,其中参照肝组织病理学的数据和血液标记的数据是以与患者有关的数据为基础的。

10.权利要求 9 中所述的方法，其中参照肝组织病理学的数据和血液标记的数据是以与患者以及一个或多个受检者而不是患者有关的数据为基础的。

11.权利要求 1 中所述的方法，其中通过下列步骤导出线性或非线性函数算法：

(a)编辑包含第一组受检者的血液标记数据和组织病理学数据的数据组；

(b)通过使用选自判别函数分析法、非参数回归分析法、分类树和神经网络中的至少一种分析方法，从编辑的数据组导出线性或非线性函数算法；

(c)通过将包含第二组受检者的血液标记值的数据输入步骤(b)中导出的算法，计算第二组受检者的有效活组织检查得分值；

(d)比较步骤(c)中计算出的有效活组织检查得分值与第二组受检者的肝组织病理学得分；以及

(e)如果在临床上可接受的耐受水平中，步骤(c)中测定的有效活组织检查得分与第二组受检者的肝组织病理学得分不相关，则实施下列(i)-(iii)直至所述的耐受性被满足：(i)在一种基础或几种基础上修改算法，包括(1)修正第一组受检者的数据组，和(2)修正或改变分析方法；(ii)通过将包括第二组受检者的血液标记值输入修改的算法，来计算第二组受检者的有效活组织检查得分值；(iii)在临床上可接受的耐受水平中，使用修改的算法，评价计算出的有效活组织检查得分值是否与第二组受检者的肝组织病理学得分相关。

12.权利要求 11 中所述的方法，其中通过使用判别函数分析法或神经网络来导出算法，并且所述的血液标记值是血清标记值。

13.权利要求 1 中所述的方法，其中在两个或多个时间点测定患者预测值。

14.权利要求 13 中所述的方法，其中比较在两个或多个时间点所测定的患者预测值，来确定患者中肝病的状况或进展。

15.权利要求 13 中所述的方法，其中患者预测值是判别得分，并且在每个时间点测定多个判别得分，以及选择最高的判别得分作为每个时间点的预测值。

16.权利要求 5 中所述的方法，其中转氨酶水平包括丙氨酸转氨酶

(ALT)水平和天冬氨酸转氨酶(AST)水平。

17.权利要求 12 中所述的方法,其中使用神经网络导出线性或非线性函数算法。

18.一种其上储存数据结构的计算机可读介质,其包含含有代表由下列血清标记中的两个或多个的浓度值所定义的线性或非线性函数算法的数据的数据区: N 末端原胶原 III(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 复合物、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。

19.权利要求 18 中所述的计算机可读介质,其中通过下列步骤导出线性或非线性函数算法:

(a)编辑包含第一组受检者的血液标记数据和组织病理学数据的数据组;

(b)通过使用选自判别函数分析法、非参数回归分析法、分类树和神经网络的分析方法,从编辑的数据组导出线性或非线性函数算法;

(c)通过将包括第二组受检者的血液标记值的数据输入步骤(b)中导出的算法,计算第二组受检者的有效活组织检查得分值;

(d)比较步骤(c)中计算出的有效活组织检查得分值与第二组受检者的肝组织病理学得分;以及

(e)如果在临床上可接受的耐受水平中,步骤(c)中测定的有效活组织检查得分与第二组受检者的肝组织病理学得分不相关,则实施下列(i)-(iii)直至所述的耐受性被满足: (i)在一种基础或几种基础上修改算法,包括(1)修正第一组受检者的数据组,和(2)修正或改变分析方法; (ii)通过将包括第二组受检者的血液标记值输入修改的算法,来计算第二组受检者的有效活组织检查得分值; (iii)在临床上可接受的耐受水平中,使用修改的算法,评价计算出的有效活组织检查得分值是否与第二组受检者的肝组织病理学得分相关。

20.一种存储在计算机可读介质中的数据结构,其中所述的数据结构可以通过微处理器被读取并且包括至少一种代码,该代码唯一地鉴定由下列血清标记中的两个或多个的浓度值所定义的线性或非线性函数算法: N 末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。

21.一种存储在计算机可读介质中的数据结构，其中所述的数据结构可以通过微处理器被读取并且包括至少一种代码，该代码唯一地鉴定由根据权利要求1的预测值函数所导出的预测值函数和预测值。

22.一种诊断试剂盒，包括：

(a)存储在计算机可读介质中的数据结构，其中所述的数据结构可以通过微处理器被读取并且包含至少一种代码，该代码唯一地鉴定根据权利要求1的预测值函数所导出的预测值函数和预测值；和

(b)一种或多种检测和测定患者诊断的标记值的免疫测定法，所述的标记包含下列中的至少两种或多种的患者水平：N末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物。

23.权利要求 22 中所述的诊断试剂盒，其中计算机可读介质是 ROM、EEPROM、软盘、硬盘驱动器、CD-ROM、或数字或模拟通信连线。

24.权利要求 22 中所述的诊断试剂盒，包括鉴定由根据权利要求 1 的预测值函数导出的预测值函数和预测值的说明书。

25.一种诊断试剂盒，包括：

(a)仅仅鉴定由根据权利要求 1 的预测值函数导出的预测值函数和预测值的说明书；和

(b)一种或多种检测和测定患者诊断的标记值的免疫测定法，所述的标记包含下列中的至少两种或多种患者水平：N末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物。

26.一种诊断系统，包括：

(a)存储在计算机可读介质中的数据结构，其中所述的数据结构可以通过微处理器被读取并且包含至少一种代码，该代码唯一地鉴定根据权利要求 1 的预测值函数所导出的预测值函数和预测值；和

(b)一种或多种检测和测定患者诊断的标记值的免疫测定法，所述的标记包含下列中的至少两种或多种患者水平：N末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物。

27.权利要求 26 中所述的系统，其中所述系统是护理系统或远程系

统的一个点。

28.权利要求 26 中所述的系统,其中所述系统还包括用于输入下列中的至少两个或多个患者水平的工具: N 末端原胶原 III 前肽 (PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物。

29.权利要求 26 中所述的系统,其中所述系统包括处理器、存储器、输入器以及显示器。

30.权利要求 26 中所述的系统,其中所述处理器是微处理器。

31.一种通过权利要求 1 所述的方法评价在一个或多个时间点所测定两个或多个患者的预测值从而辅助诊断患者中肝病的状况或进展的方法。

32.权利要求 31 中所述的方法,其中所述方法包括基于患者的预测值,辅助选择适于患者的疗程。

33.权利要求 31 中所述的方法,其中所述方法包括辅助把患者类型归入基于患者预测值的一种或多种疾病类型中。

34.一种包括评价用于肝病治疗的化合物的方法,包括对患有肝病的患者施用化合物,和随后评价根据权利要求 1 中所述的方法所测定的预测值。

与肝病相关的方法和系统

本申请要求 2004 年 6 月 15 日提交的美国专利申请系列号 10/868,437 的优先权。

发明领域

本发明提供辅助诊断患者的肝脏疾病的状况或进展的诊断方法、试剂盒、系统以及相关的计算机可读性介质，其中使用多个血液特征值，包括血清和血浆特征值。

本发明也提供使用血液标记值（包括血清和血浆标记值）的方法和系统、以及相关的计算机可读性介质：(1)来筛选用于治疗肝脏疾病的活性成分；(2)来辅助选择用于易感染或患有肝脏疾病的患者的治疗方案；和(3)来辅助设计用于在一个或多个患者中监测肝脏疾病状况或进展的临床程序。

发明背景

渐进性肝纤维化病是全世界主要的死亡原因。在肝中纤维化发病过程关键依赖于可合成和分泌过量细胞外基质蛋白质的肝星状细胞（也称为脂肪细胞，或储脂细胞或伊藤细胞）和其它产生肝胞外基质的细胞（即，门肌成纤维细胞）的增殖和激活(1)。该过程对于肝脏疾病的所有病因学是共同的。慢性乙型和丙型病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病和自身免疫以及遗传性肝病都必须有渐进性肝纤维化的共同最终路径和肝硬化的最终发育。

肝纤维化是胞外基质响应于结节还没有发展的慢性损伤的可逆累积作用，然而肝硬化意味着该过程中临床上通常是但不始终是不可逆的重要时期，该时期中基质粗带完全地环绕实质并形成结节。肝硬化与肝功能衰竭、肝癌以及死亡的增长风险有关。因此，对有效性而言，任何肝病疗法必须针对患有可逆疾病的患者，该疗法需要早期鉴定和监测处于危险中的患者(2)。

通常通过肝活组织检查的组织学分析来实施肝纤维化的诊断。单一活组织检查在确定诊断、预后和适当控制中是非常有益的(1A;2A)。

还不能确定替代标记在肝纤维化的检测中的作用。因此，肝活组织检查是目前被认为是肝纤维化的“参照-标准”指数。

然而，实施活组织检查费用高昂(3A)，并伴随疼痛(4A)、出血、或死亡(5A;6A)。活组织检查过程是费时费力的。尽管监测疾病的进展或治疗的应答需要重复的活组织检查，但出于所有这些原因，对患者和医生同样而言，频繁重复的肝活组织检查被认为是不可接受的。

由于穿刺活检的范围小和许多肝病的扩散天性，活组织检查不能得到真正代表患者疾病状况特征的结果(7A)。活组织检查的组织分析需要经验和技能，但仍然是主观的并倾向于在观察者内部和之间存在变化(8A;9A)。

现在存在重要的临床需要来鉴定肝纤维化的替代标记。所述的标记可用于代替活组织检查来评价纤维化程度，或者它们可用于联合单一肝活组织检查来跟踪纤维化的进展或衰退，以及对生活方式或抗纤维化、抗病毒剂，或其它疗法中的变化的响应。理想地是，所述的标记是以精确的和可再现的测试为基础，所述测试对于患者是几乎无伤害的、并可进行自动化和重复性实施。

已经研究了在许多研究中作为肝纤维化的替代标记的血清分析，其中血清分析适于这些方法中涉及的基质合成的或降解的产物以及酶(10A-19A)。尽管个体分析中某些标记在检测肝硬化(20A:21A)、酒精性肝病(透明质酸)(22A)、或非酒精性脂肪性肝病中的轻微纤维化(NAFLD)(YKL-40)(23A)是有希望的，但通常这些标记的诊断性能是令人失望的。据报导其它标记可反映由于抗病毒治疗的肝组织结构中的变化(11A;24A;25A)。

活组织检查和血清标记比较不同的特征：血清参数鉴定肝中的动态过程，而活组织检查鉴定固定时间点的纤维化症状。尽管还未研究纤维化组织，但在肝中可能有高度活性的纤维化过程。相反，在肝中可能有大簇的纤维化组织，但暂时终止或中止了纤维化作用。

另一种方法是联合许多血清标记，以产生能评价纤维化的严重程度算法。在慢性丙型肝炎(CHC)(18A;26A)和慢性乙型肝炎中，已经鉴定了可检测具有80%正预测值(PPV)的显著性纤维化的五个参量。然而，在约50%患者中这些方法不能测定纤维化的严重程度，并且随后独立的验证置疑了这些标记的应用(Rossi等, *Clinical Chemistry*。

49(3):450-4, 2003 年 3 月)。

以前的研究已提出胞外基质蛋白质（或其剪切片段）的血清水平可用于评估肝纤维化的严重程度和进展（美国专利号 5,316,914 和 EP0283 779）。已经研究了不同的血清标记，并已发现肝活组织检查与肝病严重程度的相关性(6)。已被用于评价肝纤维化的一些工具是 PIIINP、层粘连蛋白、透明质酸、胶原 IV、TIMP-1、肌腱蛋白、MMP-2 和粘连蛋白。已测量这些标记，并已显示它们评估肝纤维化的能力。然而，诊断准确性或诊断标记的特异性都不足以预测具有足够临床应用的纤维化得分。

标记组合已经用于致力于提高单一生物指标 PGA（其中包括凝血酶原时间(PT)、血清 γ -谷氨酰基转肽酶(GGT)、载脂蛋白 A1(Apo A1)）的诊断意义，并且已经描述了指标 PGAA（其中将 α -2-巨球蛋白(A2M) 加到 PGA 指标）用于在饮酒者中诊断酒精性肝病(7,8)。尽管已经将 PGA 和 PGAA 指标与单个血清标记(9, 10)结合，但是所述的血清标记还不能提供评估肝病的可靠方法。

近年来， α 2-巨球蛋白、 α 2-球蛋白（或亲血球蛋白）、 γ -球蛋白、载脂蛋白-A1、 γ -谷氨酰基转运肽酶以及总胆红素已经被联合用于评估肝纤维化的状况(11)。衍生的标记算法对纤维化范围的每个结果显示突出的诊断性能 - 或者用于鉴定纤维化、或者用于排除严重的或相对轻的纤维化。该算法不提供用于鉴定患有中度纤维化的患者的诊断工具。

Pilette 等 (*J.Hepatol., Vol. 28, No. 3, 1998, pages 439-446 (Chemical Abstracts, Vol. 130, NoJ, February 15, 1999 (Columbus, Ohio, U.S.; abstract no. 78389))* ("Pilette")) 通过用于组织病理学评价肝纤维化的数学算法，公开了透明质酸盐、前胶原 III 的 N 末端肽、层粘连蛋白诊断标记与其它血清标记的相关性。Pilette 确定了用于评价肝纤维化但不联合算法标记的最适的形态测量法，来获得优于仅使用透明质酸的测量法的诊断系统或方法。

Guechot 等 (*Clinical Chemistry, Vol. 42, No. 4 (April 1996) pp. 558-563 (XP002 1 49459 Winston; U.S.)* ("Guechot")), 提供了作为血清标记的透明质酸和 PIIINP 的性能的比较评价法来评估肝病。然而，Guechot 没有尝试联合透明质酸和 PIIINP 的结果以便得到基于血清标

记的肝纤维化评价法，该方法将优于单独使用两种标记的任何一种

因此，一直需要准确的可再现的可计算机实施的方法、系统、试剂盒以及介质，它们使用两种或多种与肝病相关的血液标记（如血浆或血清标记），来有利于测定患者的肝病的状况或进展。所述的方法、系统、试剂盒以及介质能使保健护理提供者确定患者的肝病在两个或多个时间点的状况或进展，而使患者不遭受活组织检查的风险。

另外，所述的方法、系统、试剂盒以及介质将会证明可用于肝病相关的临床试验的设计或监测，并筛选可用于肝病治疗的制剂。

发明概述

本发明提供诊断方法、试剂盒、系统以及相关的计算机可读介质，它们使用多个血液标记值，包括血清和血浆标记值，来辅助诊断患者肝病的状况或进展。

本发明也提供方法和系统以及相关的计算机可读介质，它们使用血液标记值，包括血清和血浆标记值：(1)来筛选用于治疗肝脏疾病的活性成分；(2)来辅助选择用于易感染或患有肝脏疾病的患者的治疗方案；和(3)来辅助设计用于在一个或多个患者中监测肝脏疾病状况或进展的临床程序。

本发明方便肝病的护理或远程诊断的点，并协助保健护理提供者在两个或多个时间点监测肝病的状况或进展。重要地是，采用可能的不准确和危险的肝活组织检查的替代方法，本发明可提供保健护理的判定程序。

本发明采用利用了两个或多个肝病相关的标记值的可计算机实施的算法。在临床研究中已经证实了可监测肝病的状况或进展的本发明的预测值。这些临床试验在横截面基础上证实了本发明，其中在离散时间点实施分析，以及纵向地进行，其中在两个或多个时间点实施分析。

因此，本发明可用于：(a)测量细胞外基质合成（纤维发生）和细胞外基质裂解（纤维裂解）的动态过程；和(b)通过预测肝纤维化组织学得分，获得可反映肝组织中发生的纤维化程度和动态变化。

本发明特别适于辅助对那些肝活组织检查是非常危险的患者进行诊断和治疗。所述的患者可能患有凝血病，并不乐意进行活组织检

查，或不可能接触到组织病理学专家。此外，保健护理判定者可使用本发明来评估与慢性肝病有关的肝纤维化，例如遗传性血色素沉积症 (haemochromatosis)、原发性胆汁性肝硬变和原发性硬化性胆管炎。另外，本发明特别适于那些纤维化可能是不均匀分布的以及取样误差引起显著问题的情况。

在一个实施方案中，本发明提供包括通过在一个或多个时间点测定每个时间点的预测值，来辅助诊断患者中肝病的状况或进展的方法，其中保健护理判定者使用在一个或多个时间点的预测值的比较法和比较数据组来确定患者肝病的状况或进展，和其中通过将适于两个或多个血液标记（如，两个或多个血浆或血清标记和任选的一个或多个辅助标记）的数据，输入通过将参照肝组织病理学数据与血液标记数据（如血浆或血清标记数据）相关联而导出的线性或非线性函数公式中，来计算患者的预测值。

“比较数据组”包括反映指示组织病理学条件的任何定性或定量标记的任何数据。在一个实施方案中，比较数据组包括与组织病理学条件有关一个或多个数值、或数值范围。例如，比较数据组包括各种整数组例如 0 到 5 的整数，其中那些由六个整数组成的不同组与不同肝病状况相关联，如 0-1 与轻微疾病状况相关，2-3 与中度疾病状况相关，以及 4-5 与严重疾病状况相关。因此，比较数据组与建立的肝活组织检查记分系统相关，如 Scheuer 记分系统(0-4)和改进的 Histological Activity ("HAI") 纤维化记分系统 (Ishak 得分) (0-6)。

在一个优选的实施方案中，血液标记是选自下列中的至少两个或多个血清标记：N 末端原胶原 III 前肽(PIHNP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 复合物、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。辅助标记包括但不限于患者的体重、性别、年龄和转氨酶水平。

在本发明的另一个实施方案中，使用判别函数分析或非参数回归分析，将参照肝组织病理学数据与血液标记数据（如血浆和血清标记数据）相关联而导出线性或非线性函数公式。参照肝组织病理学和血液标记数据例如血浆和血清标记数据，包括指示纤维发生或纤维裂解的、增加肝病血清标记或其它肝病临床症状的数据。

在一个实施方案中，参照肝组织病理学和血液标记数据例如血浆

和血清标记数据，是基于与一个或多个受检者而不是受诊断的患者有关的数据。I 在另一个实施方案，参照肝组织病理学和血液标记数据例如血浆和血清标记数据，是基于以前从受诊断的患者中获得的数据，并也任选是基于从一个或多个其它受检者中获得的数据。

在一个实施方案中，通过将参照肝组织病理学数据与血液标记数据例如血浆和血清标记数据相关联，并通过下列步骤导出线性或非线性函数公式：(a)编辑包括第一组受检者的血液标记（例如血浆或血清标记）数据和组织病理学数据的数据集；(b)使用分析方法，从编辑的数据组导出线性或非线性函数公式；(c)通过将包括第二组受检者的血液标记（例如血浆或血清标记）的数据和数值输入步骤(b)中导出的算法中，计算第二组受检者的有效活组织检查得分值，和；(d)比较步骤(c)中算出的有效活组织检查得分值与第二组受检者的肝组织病理学得分；以及(e)如果在临床上可接受的耐受水平中，步骤(c)所测定的有效活组织检查得分与第二组受检者的肝组织病理学得分不相关，则实施下列操作(i)-(iii)直至所述的耐受性被满足：(i)在一种基础或几种基础上修改算法，包括(1)修正第一组受检者的数据组，和(2)修正或改变分析方法；(ii)通过将包括第二组受检者的血液标记值（例如血浆或血清标记数据值）输入修改的算法，来计算第二组受检者的有效活组织检查得分值；(iii)在临床上可接受的耐受水平中，使用修改的算法，评价计算出的有效活组织检查得分值是否与第二组受检者的肝组织病理学得分相关。

分析方法包括统计学方法，其包括判别函数分析法和非参数回归分析法，以及例如分类树或神经网络的技术。

在另一个实施方案中，本发明提供保存在计算机可读介质中的数据结构，该介质可通过微处理器被读取，并包括至少一种唯一地鉴定根据本文所述方法导出的线性或非线性函数算法的代码。

在另一个实施方案中，本发明提供诊断试剂盒，包括：(a)保存在计算机可读介质中的数据结构，该介质可通过微处理器被读取，并包括至少一种唯一地鉴定根据本文所述方法导出的线性或非线性函数公式的代码；和(b)一种或多种检测和测定患者血清标记值的免疫测定法。

在另一个实施方案中，本发明提供用于测定组合物是否可用于肝

病治疗的可计算机实施的方法和系统，包括在用该组合物处理的患者中，评价用于诊断肝病状况或进展的数据，其中：(a)通过保健护理提供者在一个或多个时间点计算测定每个时间点的预测值，来实施诊断；(b)在一个或多个时间点比较预测值，并且保健护理提供者使用该比较数据组来确定患者肝病的状况或进展；和(c)通过将适于两个或多个血液标记（如，两个或多个血浆或血清标记）的数据，输入通过将肝组织病理参照数据与血液标记（如血浆或血清标记）的数据相关联而导出的线性或非线性函数公式中，来计算患者的预测值。

保健护理提供者也可使用本发明上述的方法、系统和试剂盒来：(1)确定用于易感染或患有肝病的患者的治疗方法；和(2)设计用于监测一个或多个患者的肝病状况或进展的程序。

在本发明的详细说明中，进一步描述了本发明的这些方面和其它方面。

附图简述

图 1 举例说明在发明详述中参照的 ELF 研究中，描述受检者的募集和参与的流程图。

图 2：图 2a 描述针对判别得分的累积 p 得分图，并反映根据本发明方法所确定的 Scheuer 阶段得分的累积分布。图 2b 描述针对判别得分的累积 p 得分图，并反映根据本发明方法所确定的 Ishak 阶段得分的累积分布。

图 3：图 3a 举例说明根据本发明所测定的受检者工作特性曲线-Scheuer 改良的记分系统有效数据。图 3b 说明根据本发明所测定的受检者工作特性曲线-Ishak 改良的记分系统有效数据。

图 4：图 4 说明用于有效数据组(Gv)的盒状和虚线状曲线图，其显示根据本发明所测定的 Scheuer 纤维化得分与判别得分。

图 5 描述人 TEMPI mRNA 的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。

图 6 描述人 MMP2 mRNA 的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。

图 7 描述人 MMP9 mRNA 的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)。

发明详述

如文中所用的，下列术语具有下列各自的意义。

“抗体”指结合患者诊断血清标记表位的任何抗体，包括多克隆抗体或单克隆抗体或其任何片段。单克隆抗体和/或多克隆抗体可用于本发明的方法和系统。如本文所用的“抗体”或其它相似术语，包括单克隆或多克隆的全免疫球蛋白，以及特异结合标记的免疫活性片段，包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 以及 F(v)。术语“抗体”也包括结合蛋白，特别是透明质酸结合蛋白(HABP)。以下描述优选的血清标记抗体。

用于本发明分析的人流体样品可以是含有患者诊断标记（例如血液、血清、血浆、尿液、唾液或支气管肺泡灌洗液(BAL)）的任何样品，或任何其它体液。通常，使用血清或血浆样品。

用于本发明的抗体可通过本领域公知的技术进行制备，并通常用于生成标记样品 - 或是分离的天然存在的蛋白质、或是重组表达的蛋白质或是代表天然蛋白质抗原性部分的合成肽。二级抗体缀合于检测剂组，例如通常用于在诊断试验中检测生物分子的碱性磷酸酶、辣根过氧化酶、荧光染料或任何其它标签部分。通过本领域公知的技术进行缀合。

通过用结合血清标记的抗体与样品反应，“免疫测定法”可确定生物标本中病人诊断血清标记的存在，其中在允许形成抗体和血清标记之间的免疫复合物的条件下实施反应一段时间，然后定量测定所述的免疫复合物。

在一种方案中，使用的抗体是通过对哺乳动物（如，兔、羊、鼠、猪等等）施用免疫原（血清标记、血清标记的免疫原性片段、或结合抗血清标记的独特型抗体）而制备的。

使用被标记并结合一级抗体的二级抗体，优选的免疫测定法检测血清标记和血清标记结合抗体之间的固定复合物。或者，第一种方案的特征在于二级抗体也结合血清标记的夹心形式。在夹心式免疫测定法中，结合血清标记的抗体可以是附着于不溶性物质的捕获抗体，结合血清标记的二级抗体可以是标记抗体。上述夹心式免疫测定法可与下列所述的抗体一起使用。

本发明所用的测试法可用于在包括尿液、血浆、血清、腹膜液或淋巴管液的样品中测定血液标记，例如血浆或血清标记。用于检测血清标记的免疫测定试剂盒也可用于本发明，并包括结合血清标记的抗体和用于测定生物样品中抗体对血清标记的结合的装置。在优选实施

方案中，试剂盒包括上述二级抗体或完全抗原的一种。

前文中已经定义了“比较数据组”。

“参照肝组织病理学和血液标记数据”以及“组织病理学数据”包括但不限于可指示纤维发生或纤维裂解、接触性(interface)肝炎、坏死、炎症、坏死性炎症、提高的肝病血清标记或其它肝病的临床症状的血清或血浆数据。因此，参照肝组织病理学和血清标记数据包括但不限于反映一种或多种使用了 Scheuer 得分(0-4)和 HAI 得分(Ishak 得分)(0-6)的肝活组织检查测试法的用途的数据。其它参照肝组织病理学和血清标记数据涉及改进的 Ishak 得分(HAI) A-接触性肝炎(0-4)、改进的 Ishak 得分(HAI) B 融合性坏死(0-6)、改进的 Ishak 得分(HAI) C-点状坏死(0-4)以及改进的 Ishak 得分(HAI) D-门炎症(0-4)。

这些和其它合适的记分系统对于本领域技术人员而言是众所周知的。参见，如，Scheuer, 等, "*Liver Biopsy Interpretation*" (W. B. Saunders 2000); Scheuer, J. *Hepatol.* 1991; 13:372-374; Ishak, 等, J. *Hepatol.* 1995;22:696-699。由于关于疾病（例如酒精性肝病）的纤维化模式中存在的差异，必须修改记分系统以适于在非病毒性肝病病例中赋予分值的目。

“参照肝组织病理学和血液标记数据”包括可反映从所有这些改进的得分和记分系统而确定的分值的的数据。参照肝组织病理学和血液标记（例如血浆和血清标记）数据包括但不限于，可反映转氨酶（例如丙氨酸-转氨酶(ALT)和天冬氨酸-转氨酶(AST)）血清水平提高的数据，和可定性或定量评价病征（例如黄疸）的数据。

“活组织检查有效得分”是通过将肝组织病理和血清标记数据值输入算法而测定的值。

“判别函数分析”是用于确定哪些参数能在两个或多个天然存在的互相排斥组之间作出区分的技术。基于判别函数分析的基本思想在于测定组群与可以或不可以彼此独立的预测值变量组是否不一致，并然后使用那些变量来预测组成员关系（例如，新病例的组成员关系）。

以分类的结果变量（两个或多个互相排斥的水平）开始判别函数分析法。该模型假定这些水平可通过类似于 ANOVA（方差分析）的一组预测值变量而辨别，并且模型是连续的或分类的（但优选是连续的），以及类似于 ANOVA，该模型假定所基于的判别函数是线性的。

判别分析不会“分割偏差”。它寻找该预测值变量组之中的正则相关性，并使用这些相关性来建立可解释所有预测值变量的总偏差占结果变量总水平的百分率的本征函数。

分析法输出量是使用预测值变量组合来产生“判别得分”而不考虑结果变量水平的一组线性判别函数（本征函数）。设定各个函数的总偏差百分率。此外，对于各个本征函数，开发了基于在各种水平的结果变量中预测值变量组合而产生判别得分的一组 Fisher 判别函数。

通常，一些变量被包括在研究中，以便查看哪一个（组）有利于组之间的鉴定。在那种情况下，产生了总方差和协方差的矩阵。同样地，产生了汇合的组内方差和协方差的矩阵。通过多变量 F 检验法实施这两种矩阵的比较，以便测定在两组之间是否存在或不显著性差异（对于所有变量）。该方法与多元方差分析或 MANOVA 相同。至于在 MANOVA 中，研究者可首先实施多变量测试，如果是统计上显著的，则继续查找该组中变量具有显著不同平均值的方差。

对于含有一种或多种数量变量的观测值组和观测值分级变量定义组，鉴定法开发出一种判别标准来将每种观测值归入一组中。为了解判别标准“实施”的程度，必须对不同情况进行分类（推定的），即不用于评价判别式标准的情况。新情况的分类仅仅能评价判别标准的预测效果。

为了确认衍生的标准，可以将分类法用于其它数据组。用于导出判别标准的数据组被称为训练数据(training data)或校准数据组，或患者训练组(training cohort)。用于确认判别标准特性的数据组被称为有效数据(validation data)或有效组(validation cohort)。判别标准（函数或算法）测定通用正方化距离的尺寸。这些距离是以汇合的协方差矩阵组为基准的。Mahalanobis 距离或欧氏距离可用于测定接近度。这些距离可用于鉴定结果水平的分组，并因此可测定变量水平的可能的减少。

“协方差矩阵组”是通过在分析中将每个亚组的协方差矩阵分量加在一起而形成的数字矩阵。

“预测值”是可应用于本征函数来产生因变量或反应变量或“预测值”的任何变量。在本发明的在一个实施方案中，预测值可以是经过患者的两个或多个血液标记（例如血浆或血清标记）的判别函数分析

而测定的判别得分。例如，线性模型规定了因变量（或应答变量） Y 与一组预测值变量 X 之间的(线性)关系,使得 $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+\dots+b_kX_k$

在该方程式中, b_0 是截距的回归系数, b_1 值是由数据所计算的回归系数(变量 1 直到 k)。

“分类树”用于从一种或多种预测值变量的测量值预测依赖于分类的变量类别中情况或对象的从属关系。分类树分析是一种主要用于所谓的数据采集(Data Mining)的技术。分类树的目的在于预测或解释对依赖于分类的变量的应答,因而可利用的技术与判别分析(Discriminant Analysis)、集群分析(Cluster Analysis)、非参数统计(Nonparametric Statistics)以及非线性估计(Nonlinear Estimation)的多种传统方法中使用的技术有许多共同之处。

分类树的灵活性使得它们成为很有吸引力的分析选项,但这不可说推荐它们的用途来排除更多的传统方法。实际上,当通常更多传统方法的严谨理论和分布假设符合要求时,可优选传统方法。但是当传统方法失效时,根据许多研究人员的看法,作为探测技术或最后手段的技术,分类树是非常卓越的。分类树广泛地用于各种的应用领域,如药品(诊断)、计算机科学(数据结构)、植物学(分类)以及心理学(决策论)。分类树容易通过图解进行自身展示、有助于使它们便于解释而不是只要严谨的数值解释是可能的,它们就将如此。

“神经网络”是在认知系统和脑神经病学功能中学习过程(假说)之后模型化的分析技术,并在实施所谓的从现有数据学习方法之后,能从其它观测值(针对相同或其它变量)预测新的观测值(针对特殊变量)。神经网络是一种数据采集技术。第一步是设计特殊的网络体系结构(包括特殊号码的“层”,每个由一定数目的“神经元”组成)。网络的尺寸和结构必须与所研究的现象的特性(例如,形式复杂度)匹配。由于早期中显然没有充分了解后者,这项工作是不容易的,经常包括多次“试验和误差”。

然后将“神经网络”进行“训练(training)”加工。在该阶段,计算机存储器充当神经元,它可将迭代法应用到输入的数值(变量)中来调节网络权值,以便最佳地预测对其实施“训练”的样品数据。在学习了现有数据集的阶段之后,新网络是现成的,然后该网络用于产生预测值。

在本发明的一个实施方案中，神经网络包括一台或多台个人计算机或计算机主机或维护装置的计算机化终端的存储器。

“计算机”指特殊计算机硬件系统和特别软件操作系统的组合。本发明的计算机或计算机化系统包括袖珍计算器。有用的硬件系统实例包括具有任何类型的合适数据处理机的系统。术语“计算机”也包括但不限于：具有操作系统例如 DOS、Windows®、OS/2R 或 LinuxR 的个人计算机(PC)；MacintoshR 计算机；具有以 JAVAR -OS 作为操作系统的计算机；和图形工作站例如 Sun MicrosystemsR 和 Silicon GraphicsR 的计算机，和其它具有某些版本 UNIX 操作系统例如 AIXR 或 Sun MicrosystemsR 的 SOLARISR 的计算机；执行控制程序的嵌入式计算机，如具有薄型操作系统的手提装置；具有任何其它已知特征的装置和可利用的操作系统；以及具有某些类型的数据处理机与相关存储器的任何类型的装置。

当在个人计算机上运行的计算机程序的计算机可执行指令的一般范围中描述本发明时，本领域技术人员理解也可联合其它程序模块来实施本发明。通常，程序模块包括执行特定任务或实现特定抽象数据类型的例程(routine)、程序、组件以及数据结构。此外，本领域技术人员将理解：通过其它的计算机系统配置（包括掌上型器材、多处理机系统、基于或编程式消费电子学(consumer electronics)的微处理器、微型计算机、大型计算机，等等）可实施本发明。也可在通过由通信网络连接的远程处理装置执行任务的分布计算环境中实施本发明。在分布计算环境中，程序模块位于本地存储器和远程存储器的存储装置中。

纯粹举例说明的、用于实施本发明的系统包括常规个人计算机，其包含处理部件、系统存储器、连接不同系统部件（包含处理部件的系统存储器）的系统总线。系统总线可以是任何几种类型的总线结构，包括存储器总线或存储控制器、外围总线以及使用任何多种的常规总线结构（仅举几个例子，例如 PCI、VESA、MicroChannel、ISA 和 EISA）的局域总线。系统存储器包括只读存储器(ROM)和随机存取存储器(RAM)。ROM 中储存了基本输入/输出系统(BIOS)，其含有例如在启动期间有助于在个人计算机内部的元件之间传递信息的基本例程。

个人计算机还包括硬盘驱动器、例如读取或写入移动磁盘的磁盘驱动器、例如读取光驱(CD-ROM)磁盘或者读取或写入其它光学介质的光盘驱动器。硬盘驱动器、磁盘驱动器和光盘驱动器分别通过硬盘驱动器接口(interface)、磁盘驱动器接口以及光驱接口连接于系统总线。驱动器及其相关的计算机可读介质提供用于个人计算机的资料、数据结构、计算机执行指令等等的永久性存储器。尽管上述的计算机可读介质指硬盘、移动磁盘和光盘(CD),本领域技术人员应当理解通过计算机读取的其它类型的介质,例如磁带盒、闪存卡(flash memory card)、数字视频磁盘、Bernoulli 盒式磁带等等,也可用于示范性操作环境。

许多程序模块包括操作系统、一种或多种应用程序、其它程序模块以及程序数据,可被保存在驱动器 RAM 中。通过键盘和定点设备例如鼠标,用户可将指令和信息输入个人计算机中。其它输入装置包括麦克风、操纵杆、游戏手柄、附属天线、扫描器等等。这些和其它输入装置通常通过连接系统总线的串行端口接口连接到处理部件,但可通过其它接口例如并行端口、游戏端口或通用串行总线(USB)进行连接。监视器或其它类型的显示器也可通过接口例如视频接合器连接到系统总线。除监视器之外,个人计算机典型地包括其它外围输出设备(未公开),例如扬声器和打印机。

使用一台或多台远程计算机的逻辑连接,可在网络环境(例如远程计算机)中操作个人计算机。远程计算机可以是服务器、路由器、同等装置(peer device)或其它公用网络结点,以及典型地包括描述的与个人计算机有关的许多或所有元件。逻辑连接包括局域网(LAN)和广域网(WAN)。所述的网络环境在办公室、企业范围的计算机网络(例如医院计算机)、内部网以及国际互连网中是很普遍的。

当用于 LAN 网络环境中,个人计算机通过网络接口或接合器连接到本地网。当用于 WAN 网络环境时,个人计算机通常包括调制解调器或其它适于在广域网例如国际互连网中建立连接的装置。调制解调器(可以是内置或外置的),经串行端口接口连接到系统总线上。在网络环境中,所述与个人计算机相关的程序模块或其部分可存储在远程存储设备中。应当理解,所示的网络连接是示范性的,并可使用是在计算机之间建立通信链接的其他装置。

本发明的一个纯粹说明性的实施平台是：使用作为用户界面的微软视窗(Microsoft Windows)和任何种类的数据库管理软件(包括Paradox)，在具有至少八兆字节(Mb)内存和千兆字节(G)硬盘驱动器的IBM兼容型个人计算机上实施的系统。执行预测功能的应用软件可写成任何种类的语言(包括但不限于C++)，并可存储在如下所述的计算机可读介质中。通过键盘和定点设备例如鼠标，用户可将反映病人诊断标记的指令和信息输入个人计算机中。

在优选的实施方案中，本发明提供存储在计算机可读介质中并通过微处理器被读取的数据结构，包括可只鉴定如下所述的预测值函数和导出值的至少一个代码。优选的计算机可用性介质的实例包括：永久性固定编码型介质例如只读存储器(ROM)，或可擦式电子编程只读存储器(EEPROM)，可记录型介质例如软盘、硬盘驱动器和CD-ROM，以及传输型介质例如数字和模拟通信连线。

“数据结构”包括相关数据的元件集合和反映元件之间关系的操作组。数据结构被认为反映数据的组织及其在装置例如计算机中的存储分配。

因此，数据结构包括通常在存储器中用于最适算法效率的信息结构，例如队列(queue)、堆栈(stack)、链接表(linked list)、堆(heap)、词典和目录树(tree)，或者概念单位，例如个人姓名和地址。它包括多余信息，例如子目录树中列表长度或结点数目。数据结构可以是外部数据结构，其中即使当在例如磁盘上存取大部分数据是很缓慢的情况下，所述的外部数据结构也是高效率的。与主动式数据结构对比，一种数据结构可以是仅仅受外部线程或程序而改变的被动式数据结构。主动式或功能式数据结构具有可执行内部操作来赋予另外的(通常更多普通的)数据结构的外部特性的相关线程或程序。数据结构也可以是保持其原有版本(即所查询增补到最新版本的上述版本)的不变数据结构。数据结构可以是部分地由相同数据结构的更小的或更简单的实例组成的递归数据结构。数据结构还可以是抽象数据类型，即准确地不依赖于任何特定实现(implementation)而指定的数据值组和相关操作。

这些数据结构的实例和本文中所有举例说明的实施方案，仅仅是用于举例说明而绝非用于限制。

本发明的诊断系统包括用于护理应用点(point)的手提式装置,或可以从病人监护点远程操作的系统。在两种情况中,系统包括以任何有用的语言编程的附属软件,来根据本文所述的算法或其它分析法来执行本发明的诊断方法。

“护理测试点”是指在短时限中实施的实时诊断测试,以致于进行结果测试远远快于不使用该系统的比较性测试。可迅速和就地实施护理测试点,例如在医生办公室中、在床边、在统计实验室中、在急救室或其它这样的场所中,特别是要求迅速和精确结果的场所。病人可以在场,但这样的在场不是必要的。护理地点包括但不限于:急救室、手术室、医院实验室及其他临床实验室、医生办公室、野外,或在要求迅速和准确结果的任何地点。

术语“患者”是指动物、优选是哺乳动物、最优选是人。“保健护理提供者”或“保健护理判定者”包括被批准来诊断或治疗患者、或者协助患者的诊断或治疗的个体。在鉴定用于治疗肝病的新药的范围中,保健护理提供者可以是没有被批准来诊断或治疗患者、或者来协助患者的诊断或治疗的个体。“血液标记物”、“血液标记”以及“血液标记,例如血浆和血清标记”包括但不限于:血清标记 N 末端原胶原蛋白 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物。“血液标记,例如血浆和血清标记”可交换地是指“肝病血清标记基因多肽”。“辅助标记”包括但不限于患者体重、性别、年龄,以及患者的丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的血清水平。

“肝病”包括与肝纤维发生或纤维裂解相关的任何疾病。所述的疾病包括但不限于肝硬化、酒精性肝病、肝脂质沉着症、肝脏脂肪变性、包括非酒精性肝脏脂肪变性的非酒精性肝病、由病毒感染引起的肝传染病(例如乙型肝炎和丙型肝炎传染病)、对其它病原体例如血吸虫病的应答、遗传性血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬变和原发性硬化性胆管炎、对例如氨甲蝶呤的药物的反应症、以及先天性紊乱例如胆道闭锁。

“有效组标记分值”是指从分辨函数权值的线性组合导出的数值得分,其中从训练组和有效组中各个患者的标记值可获得分辨函数权值。

“患者诊断标记截止值”是指达到预定的灵敏度或特异性的组合标记的标记值。“受检者工作特性曲线-Scheuer改良的记分系统有效数据”：使用在基于分叉的Scheurer记分系统的有效组中产生的数据，所生成的受检者工作特性曲线。“受检者工作特性曲线-Ishak改良的记分系统有效数据”：使用在基于分叉的Ishak记分系统的有效组中产生的数据，所生成的受检者工作特性曲线。“负预测力”("NPV")：假定标记值（或标记值组）不高于规定的截止值时未患病的概率。

“正预测值”("PPV")：是指假定标记值（或标记值组）高于规定的截止值时所患病的概率。

“受检者工作特性曲线”("ROC")：在病人组和非病人组中标记的灵敏度和1-特异性值的分配之间的函数关系的图解表示。

“曲线下的面积”("AUC")是表示受检者工作特性曲线下的面积的数值。该数值越接近于1，标记值越可区分患病组和非患病组。

“McNemar卡平方测验”（“McNemar χ^2 测验”）是用于测定两种相关的比例（共有相同分子但不同分母的比例）是否彼此显著地不同的统计测验。

“非参数回归分析”是允许对二元变量数据进行拟合的一组统计技术，其中所述的二元变量数据几乎没有或没有产生有关每个变量的分配或在每个变量的评价中误差的假定。其实例是：位置的Theil估计量、Passing-Bablok回归以及Deming回归。

“截止值”是定义特定灵敏度或特异性的标记（或标记组）的数值。

目前用于评价肝纤维化的参照标准是肝活组织检查。在活组织检查中，将从肝中随机取出的组织样品切成薄片供专家用显微镜进行检查。

对于肝活组织检查存在很多问题，包括下列不确定因素：肝（其中存在成群的纤维化，针头可触到未受纤维化影响的肝区）中纤维化的分布、失效的样品制备（例如没有足够的组织材料）、和病理学家的主观性。此外，通常使用得分来描述肝纤维化状况，但存在许多不同的并可能矛盾的记分系统（例如Scheuer得分、Ishak得分s，等等）。例如，使用两种不同的记分系统，两位独立的病理学家不得不在不同时间点对同一患者的相同活组织检查样品记分。在这种情况下，两位病理学家获得相同结果的评价数量范围仅在36%至46%。

针对核苷酸序列的术语“等价物”被理解为包括编码功能等效多肽的核苷酸序列。核苷酸序列等价物包括相差一个或多个核苷酸替换、增加或删除的序列，例如等位基因变体，因此其包括由于遗传密码简并性而不同的序列。“等价物”也用于指与血液（例如血清）标记蛋白质的哺乳动物同系物的氨基酸序列在功能上是等价的、但具有不同氨基酸序列的氨基酸序列，例如相差至少一个、但少于 30、20、10、7、5 或 3 个差别（例如替换、添加或删除）。

如本文所述的，术语“肝病血清标记基因”是指下列：(1)编码肝病血液（例如血清）标记蛋白质，包括本文所鉴定的肝病血清标记蛋白质的核酸；和(2)与包括外显子和（任选地）内含子序列在内的开放阅读框相关的核酸。“肝病血清标记基因”包含外显子序列，尽管它任选地包含衍生于例如相关的或不相关的染色体基因的内含子序列。术语“内含子”是指存在于不被翻译成蛋白质并通常被发现于外显子之间的特定基因中的 DNA 序列。该基因还包含调控序列，例如启动子、增强子等等。“肝病血清标记基因”包含但不限于与本文的 SEQ ID NOS:1-3 互补的、等价的或同源的核苷酸序列。

“同源性”、“的同系物”、“同源的”或“同一性”或“相似性”是指在两种多肽之间或在两种核酸分子之间具有相似性的序列，其中同一性是更加严格的比较。通过比较出于比对目的而对齐的每条序列中的位点来各自确定同源性和同一性。当比对序列中的位点被相同碱基或氨基酸填满时，那么分子在该位点是相同的。在核酸序列之间的同源性或相似性或同一性的程度是在核酸序列共有位点上相同或匹配的核苷酸数目的函数。

术语“同一性百分率”是指在两种氨基酸序列之间或在两种核苷酸序列之间的序列同一性。通过比较出于比对目的而对齐的每条序列中的位点来各自确定同一性。当在比对序列中等价位点被相同碱基或氨基酸填满时，那么分子在该位点是相同的；当等价位点被相同或相似的氨基酸残基（例如，在空间的和/或电子特性中相似的）填满时，那么分子被认为在该位点是同源的（相似的）。同源性、相似性或同一性百分率方式的表达式被称为在比对序列共有位点上相同或相似氨基酸数目的函数。可使用各种对比算法和/或程序，包括 FASTA、BLAST 或 ENTREZ。作为 GCG 序列分析程序包(威斯康星大学，

Madison, 威斯康星州)的一部分, 可使用 FASTA 和 BLAST, 例如通过设置默认值进行使用。通过国立生物技术信息中心(NCBI) (国家卫生研究所, 国家医学图书馆, Bethesda, 马里兰州)可使用 ENTREZ。在一个实施方案中, 通过设定了缺口权值(gap weight)为 1 的 GCG 程序来测定两种序列的同一性百分率, 例如, 如果在两种序列之间是单个氨基酸或核苷酸错配, 那么对每个氨基酸缺口加权。其它用于测定序列同一性的方法在本领域中是众所周知的并被描述了。

在本发明所用中的优选的核酸, 与肝病血清标记基因的哺乳动物同系物核酸序列具有至少 70%、更优选 80%和更优选 90%和甚至更优选 95%相同的、或互补的序列。在本发明所用的特别优选的核酸, 与肝病血液(例如血清)标记基因的哺乳动物同系物核酸序列具有至少 70%、更优选 80%和更优选 90%和甚至更优选 95%相同的、或互补的序列。

免疫测定

选择血清免疫测定法来检测和测量 N 末端原胶原 III 前肽(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 复合物的水平。在既往病史期间收集的其它诊断标记包括体重、性别、年龄, 以及类似于丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的转氨酶的血清水平。

使用夹心式免疫测定法来测量(PIIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 以及 MMP-9/TIMP-1 的水平。在一个实施方案中, 实施本发明的免疫测定包括用人体液样品与两种抗体反应, 其中俘获抗体特异结合标记的一个表位。具有不同表位特异性的二级抗体被用来检测该复合物。尽管也可使用多克隆抗体, 抗体优选是单克隆抗体。测定中使用的两种抗体都特异性地结合被分析物蛋白。

测量从人体液获得的患者诊断标记浓度, 并且将方法和系统进行导出用于评价纤维化程度。

以下概括了制备用于检测各种血清标记的抗体的来源或方法。

血清测定中使用的代表性的抗标记抗体

测试试剂	克隆	抗体供应商/参考文献
胶原 IV R1	IV-4H12	Fuji/保藏号 FERM BP-2847 (参见美国专利号 5,316,914)
胶原 IV R2	T59106R	Biodesign Int'l Corp./Biodesign 目录号#.A33125H
PIIINP R1	P3P296/3/27	Hoechst/ 保藏号 ECCAC 87042308
PIIINP R2	35J23	Bayer(ATCC 保藏号_____)

代表性的抗原来源

胶原 VI	Rochland Immunochemicals Inc.(Gibertsville, PA)(目录号 009-001-108)
肌腱蛋白	Chemicon Int'l Inc. (Temecula, CA)(目录号 CC065)
层粘连蛋白	Sigma (目录号 L6274)
透明质酸 (HA)	牛鼻柱骨/Tengblad, <i>Biochemica et Biophysica Acta</i> , 1979, 578, 281-289

典型核酸序列

人 TIMP1 Mrna	SEQ ID NO:1
人 MMP2 Mrna	SEQ ID NO:2
人 MMP9 Mrna	SEQ ID NO:3

用于检测肝纤维化的血清标记的抗体对。

由于无法生产抗 HA 的抗体, 根据上表中引用的参考文献, HA 测定法使用分离自牛鼻柱骨的特异性 HA 结合蛋白(HABP)。HA 具有高度重复的结构, 并且 HA 特异性核心蛋白可被用于夹心式测定法形式中。为了俘获 FTTC 缀合的核心蛋白和检测, 将生物素化核心蛋白与具有碱性磷酸酶的抗生物素标记的单克隆抗体组合使用。

对于胶原 IV 的测定法使用来自 Fuji(IV-4H12) (保藏号 FERM BP-2847) 的单克隆抗体和与之配套的来自 Biodesign(T59106R) (Biodesign 目录号:T59106R) 的多克隆抗体。所有测定法都是使用

磁性粒子分离技术的多相的免疫测定法。

对于 PIINP 的测定法，使用根据布达佩斯条约于 2004 年 5 月 24 日保藏的 Bayer 单克隆抗体（美国典型培养物保藏中心,10801 University 134, Boulevard, Manassas, VA 20110-2209(ATCC PTA-____)）和与之配套的来自 Hoechst 的单克隆抗体（保藏号 ECCAC 87042308）。

通过从来自于上表中列出来源的这些血清标记而获得对应的抗原，并根据下文详述的杂交瘤研制方法使用所述的抗原作为血清标记，来制备用于检测胶原 VI、层粘连蛋白和肌腱蛋白的抗体。

通过以下制备用于检测 TIMP-1、MMP-2 以及 MM-9 的抗体：(1) 根据下文详述的多核苷酸的表达方法，通过表达与上表中所列的标记 mRNA 序列互补的 DNA 序列，来生产用于这些标记的抗原；以及(2) 根据下文详述的杂交瘤研制方法，使用所述的抗原作为血清标记。

在下文给出的引文章节中，分别列出了杂交瘤研制方法和多核苷酸的表达方法中的引文。

多核苷酸的表达：

图 5 描述了人 TIMP1 mRNA(SEQ ID NO:1)的核苷酸序列。

图 6 描述了人 MMP2 mRNA(SEQ ID NO:2)的核苷酸序列。

图 7 描述了人 MMP9 mRNA(SEQ ID NO:3)的核苷酸序列。

为了表达这些和其它肝病血清标记基因，将基因插入包含用于插入编码序列的转录和翻译的必需元件的表达载体中。使用本领域技术人员公知的方法，来构建包含编码肝纤维化血清标记多肽的序列与适宜的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、人工合成技术以及活体内基因重组。例如，Sambrook 等人(3) 和 Ausubel 等人(4)描述了所述的技术。

可使用各种表达载体/宿主系统，来包含和表达编码肝病血清标记多肽的序列。这些系统包括但不限于，微生物，例如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌；用酵母表达载体转化的酵母；用病毒表达载体（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；用病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒 CaMV；烟草花叶病毒 TMV）或用细菌表达载体（例如 Ti 或 pBR322 质粒）转化的植物细胞系统；或动物细胞

系统。

控制元件或调控序列是载体增强子和启动子的那些区域、以及影响宿主细胞蛋白来完成转录和翻译的 5'和 3'非翻译区。所述的元件在它们的强度和特异性方面不同。根据所用的载体系统和宿主,可使用许多合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。例如,当被克隆入细菌系统时,可使用诱导型启动子,例如 BLUESCRIPT 噬菌粒(Stratagene, LaJolla, Calif)或 pSPORT1 质粒(Life Technologies)的杂合型 lacZ 启动子,等等。在昆虫细胞中可使用杆状病毒多角体蛋白启动子。将从植物细胞基因组(例如,热休克基因, RUBISCO 基因以及贮藏蛋白基因)衍生的或来自植物病毒(例如,病毒启动子或前导序列)的启动子或增强子克隆入载体中。在哺乳动物细胞系统中,优选是来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。如果需要制备含有编码"肝纤维化基因"多肽的多拷贝核苷酸序列的细胞系,可使用具有合适选择标记的、基于 SV40 或 EBV 的载体。

细菌和酵母表达系统:

在细菌系统中,根据适于肝病血清标记多肽的用途,可选择许多表达载体。例如,当需要大量肝病血清标记多肽来用于诱导抗体时,使用能指导高水平表达的易于纯化的融合蛋白的载体。所述的载体包括但不限于,多功能的大肠杆菌克隆和表达载体,例如 BLUESCRIPT (Stratagene)。在 BLUESCRIPT 载体中,将编码肝病血清标记多肽的序列连接进载体的 β -半乳糖苷酶的氨基末端 Met 和后面的 7 个残基的读码框中,以便生产杂合蛋白。也可使用 pIN 载体[Van Heeke & Schuster,(17)]或 pGEX 载体(Promega Madison,Wis),来表达外源多肽,如具有谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常,所述的融合蛋白是可溶的,从裂解的细胞中通过吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠上并随即在游离的谷胱甘肽的存在下进行洗脱,可容易地纯化融合蛋白。所述系统制备的蛋白可被设计成含有肝素、凝血酶、或凝血因子 Xa 蛋白酶裂解位点,以便任意地从 GST 部分中释放克隆的目的多肽。

在酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可使用许多含有组成型或诱导型启动子(例如 α 因子、醇氧化酶以及 PGH)的载体。作为参考,参见 Ausubel 等(4)和 Grant 等(18)。

植物和昆虫表达系统:

如果使用植物表达载体,可通过任何一些启动子来驱动编码肝病血清标记多肽的序列的表达。例如,可单独或联合来自 TMV 的 Ω 前导序列[Takamatsu,(19)]使用病毒启动子,例如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子。或者,可使用植物启动子,例如 RUBISCO 的小亚基或热休克启动子[Coruzzi 等(19);Broglie 等(21);Winter 等(22)]. 通过直接 DNA 转化法或通过病原体介导的转染法,将这些构建体导入植物细胞。在一些常规可用的综述(例如, *Hobbs 或 Murray, McGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY(23)*]中,描述了所述的技术。

昆虫系统也可用于表达肝病血清标记多肽。例如,在一个所述的系统中,将苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)作为载体来在秋粘虫(*Spodoptera frugiperda*)细胞中或在粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)幼虫中表达外源基因。将编码肝病血清标记多肽的序列克隆入病毒的非必需区域,例如多角体蛋白基因和受多角体蛋白启动子控制的位置。肝病血清标记多肽的有效插入,可使多角体蛋白基因失活,并产生缺乏外壳蛋白的重组体病毒。然后重组体病毒可用于感染表达肝病血清标记多肽的秋粘虫细胞或粉纹夜蛾幼虫[Engelhard 等(24)].

哺乳动物表达系统:

许多基于病毒的表达系统可用于在哺乳动物宿主细胞中表达肝病血清标记多肽。例如,如果腺病毒作为表达载体,可将编码肝病血清标记多肽的序列连接进包含晚期启动子和三联前导序列的腺病毒转录/翻译复合物。在病毒基因组的非必需 E1 或 E3 区域的插入物,可用于获得有活力的病毒,所述的病毒能在感染的宿主细胞中表达肝纤维化血清标记多肽[Logan & Shenk (25)]. 如果需要,转录增强子例如劳氏肉瘤病毒(RSV)增强子,可用于提高在哺乳动物宿主细胞中表达。

除了被包含在质粒中并被其表达之外,人工染色体(HACs)也可用于传递较大的 DNA 片段。构建 6M 至 10M 的 HAC,并经过常规的传递方法(例如脂质体、聚阳离子氨基聚合物或泡囊)传递给细胞。

特殊起始信号也可用于实现更高效地翻译肝病血清标记多肽的编码序列。所述的信号包括 ATG 起始密码子和邻近的序列。如果将编码肝病血清标记多肽的序列和其起始密码子以及上游序列插入合适的表达载体,则不需要额外的转录或翻译控制信号。然而,如果仅仅插入编码序列或其片段,则应当提供外源的翻译控制信号(包括 ATG 起始密码子)。起始密码子应该位于正确的读码框中,以保证全部插入物的翻译。外源的翻译元件和起始密码子可具有各种天然的和人工的来源。通过适于所用的特定细胞系统的增强子内含物,可提高表达效率[Scharf 等(26)]。

宿主细胞:

根据能调节插入序列的表达或能将表达的肝纤维化血清标记多肽加工成期望的形式的能力,来选择宿主细胞株。所述的多肽修饰包括,但不限于,乙酰化作用、羧化作用、糖基化作用、磷酸化作用、脂质化(lipidation)作用以及酰化作用。切割“前原(prepro)”形式蛋白的翻译后加工也可以用来有助于正确插入、折叠和/或发挥功能。从美国典型培养物保藏中心(ATCC;10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209),可获得具有用于翻译后活性的特异性的细胞装置和特征性机制的不同的宿主细胞(例如 CHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293 和 WI38),并可被选择来确保外源蛋白的正确修饰和加工。

为了长期高产量的生产重组蛋白,优选稳定的表达系统。例如,使用含有在同一个或单独的载体上的病毒复制原点和/或内源表达元件以及选择标记基因的表达载体,转化了可稳定表达肝病血清标记多肽的细胞系。在导入载体之后,在转入选择性培养基之前将细胞在滋养培养基中生长 1-2 天。选择标记的目的在于提供选择抗性,它的存在允许可成功表达导入的肝纤维化血清标记多肽基因序列的细胞的生长和回收。使用适于细胞型的组织培养技术,来增殖稳定转化的抗性克隆。参见,例如, R.I.Freshney(27)。

可使用任何数量的选择系统来回收转化的细胞系。这些包括但不限于,分别用于 tk 或 aprt 细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等(28))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶[Lowy 等(29)]基因。代谢拮抗剂、抗生素或除草剂抗性也可用作选择的基础。例如, dhfr 提供了对氨基蝶

吟的抗性[Wigler 等(30)]; npt 提供了对氨基糖苷类、新霉素和 G-418 的抗性[Colbere-Garapin 等(31)]; 以及 als 或 pat 分别提供了对绿黄隆(chlorsulfuron)和膦丝菌素乙酰转移酶的抗性。已经描述了另外的选择基因。例如, trpB 允许细胞利用吲哚代替色氨酸, 或 hisD 允许细胞利用组氨酸(histinol)代替组氨酸[Hartman & Mulligan(32)]。可视标记, 例如花色素苷、 β -葡糖醛酸酶及其底物 GUS 和荧光素酶及其底物荧光素, 可用于鉴定转化体, 和定量归因于特定载体系统的蛋白瞬时或稳定的表达量[Rhodes 等(33)]。

表达和基因产物的检测:

尽管标记基因表达的存在提示肝病血清标记多肽基因也存在, 需要证实其存在和表达。例如, 如果编码肝病血清标记多肽的序列被插入标记基因序列内部, 通过缺失标记基因的功能可鉴定含有编码肝病血清标记多肽的序列的转化细胞。或者, 可将标记基因与编码肝纤维化血清标记多肽的序列串联置于单个启动子的调控下。标记基因响应诱导或选择的表达, 通常指示肝纤维化血清标记多肽的表达。

或者, 通过本领域技术人员所知的各种方法, 可鉴定含有肝病血清标记多肽并表达肝纤维化血清标记多肽的宿主细胞。这些方法包括但不限于, DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交和蛋白生物测定或免疫测定技术, 其包括基于膜、溶液或芯片的、用于检测和/或定量核酸或蛋白的技术。例如, 使用探针或片段或编码肝病血清标记多肽的多核苷酸片段, 通过 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交或扩增, 可检测编码肝病血清标记多肽的多核苷酸序列的存在。基于核酸扩增的测定法包括: 使用选自编码肝纤维化标记多肽的序列的寡核苷酸, 来检测含有肝纤维化血清标记多肽的转化体。使用了特异于多肽的多克隆或单克隆抗体, 用于检测并测量肝纤维化血清标记多肽的表达的各种方法, 是本领域已知的。其实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)以及荧光激活细胞分类术(FACS)。可使用基于两种位点单克隆抗体的免疫测定法, 或可使用竞争性结合测定法, 其中所述的免疫测定法使用与肝病血清标记多肽上的两种互不干扰的表位反应的单克隆抗体。在 Hampton 等(34)和 Maddox 等(35)中描述了这些和其它测定法。

各种标记和缀合技术是本领域技术人员已知的, 并可用于各种核

酸和氨基酸测定中。用于生产杂交标记的方法或用于检测与编码肝纤维化血清标记多肽的多核苷酸相关的 PCR 探针，包括寡标记、缺口翻译、末端标记或使用标记核苷酸进行 PCR 扩增。或者，可将编码肝病血清标记多肽的序列克隆入载体用于生产 mRNA 探针。所述的载体是本领域已知的和可从商业上得到，并通过添加标记的核苷酸和合适的 RNA 聚合酶例如 T7、T3 或 SP6，可用于体外合成 RNA 探针。使用各种商业化试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech, Promega 以及 US Biochemical)，可实施这些方法。便于检测的可使用的合适报道分子或标记包括放射性核素、酶、荧光素、化学发光剂或显色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等等。

多肽的表达和纯化：

在适于从细胞培养物表达和回收蛋白质的条件下，培养用编码肝病血清标记多肽转化的宿主细胞。根据所用的序列和/或载体，转化细胞产生的多肽可被分泌在或贮藏细胞内。如本领域技术人员所理解的，将含有编码肝纤维化血清标记多肽的多核苷酸的表达载体，可被设计成含有可指导编码可溶性肝纤维化血清标记多肽通过原核或真核细胞膜进行分泌的、或可指导结合膜的肝纤维化血清标记多肽进行膜插入的信号序列。

如上所述的，其它构建体可用于连接编码肝病血清标记多肽与编码促进可溶性蛋白质纯化的多肽结构域的核苷酸序列。所述的促进纯化的结构域包括但不限于，金属螯合肽，例如允许在固定金属上纯化的组氨酸-色氨酸组件，允许在固定免疫球蛋白上纯化的蛋白 A 结构域，以及在 FLAGS 延伸/亲和纯化系统(Immunex Corp., Seattle, Wash.) 中使用的结构域。在纯化结构域与肝病血清标记多肽之间的可裂解的接头序列内含物，例如凝血因子 Xa 或肠激酶(Invitrogen, San Diego CA)，也可用于促进纯化。一个所述的表达载体提供融合蛋白的表达，其中所述的融合蛋白含有肝病血清标记多肽和硫氧还蛋白或肠激酶裂解位点之前的 6 个组氨酸残基。组氨酸残基促进在 IMIAC(固定化金属离子亲和层析，如 Porath 等(36)所述的)上纯化，同时肠激酶裂解位点提供了用于纯化来自融合蛋白的“肝纤维化基因”的多肽。Kroll 等(37)公开了含有融合蛋白的载体。

化学合成:

使用本领域中众所周知的化学方法(参见 Caruthers 等(38)和 Horn 等(39)),可全部或部分地合成编码肝病血清标记多肽的序列。或者,使用化学方法合成氨基酸序列,可生产肝病血清标记多肽本身,例如通过使用固相技术[Merrifield(40)和 Roberge 等(41)]指导肽的合成。使用手动的技术或通过自动操作,可进行蛋白质合成。例如,使用 Applied Biosystems 43 IA 肽合成仪(Perkin Elmer),可实现自动的合成。任选地,可单独地和联合使用生产全长分子的化学方法来合成肝纤维化血清标记多肽片段。

通过制备性高效液相色谱法[Creighton(42)],可基本上纯化新合成的肽。通过氨基酸分析或测序(例如,Edman 降解法;参见 Creighton (42)),可以确定合成的肝病血清标记多肽的成分。另外,在直接合成期间可改变肝病血清标记多肽的氨基酸序列的任何部分,和/或使用化学方法将其与来自其它蛋白的序列进行组合,以生产变体多肽融合蛋白。

杂交瘤发展方法

时期 I: 免疫接种

用一种上述鉴定的肝病血清标记(不同剂量)对 BALB/c 鼠和 Swiss Webster 鼠(每组五只)进行腹膜内免疫,其中用完全弗氏佐剂(CFA)对所述的标记进行乳化、随即用弗氏不完全佐剂乳化的免疫原(以两周的间隔)进行三次加强免疫。每次加强免疫一周后,将老鼠放血,在酶联免疫吸附中针对免疫原进行血清滴定。选择具有最高滴定度的小鼠用于融合。

时期 II: 细胞融合和杂交瘤选择。

用上述免疫接种中使用的相同剂量抗原来对被选择用于融合的小鼠进行加强免疫。在脾切除和细胞融合之前的四天,实施加强免疫。腹膜内产生无佐剂的抗原制剂。

在融合当天,杀死小鼠,并无菌除去脾。用钳子粉碎脾并通过筛子过滤。用 Iscove 改良的 Eagle 培养基(IMDM)洗涤细胞两次,并用

血球计计数。

从静止的、对数期培养物中除去小鼠骨髓瘤细胞系 P3x63Ag8.653, 用 IMDM 洗涤并用血球计计数。

以 1:5 比例混合骨髓瘤和脾细胞并进行离心。弃去上清液。通过轻拍试管底部, 轻柔地将细胞沉淀重悬浮。在 30 秒内, 一滴滴地加入一毫升 50% 的 PEG 溶液(MW 1450)。用移液管将沉淀轻柔混合 30 秒。将得到的细胞悬浮液静止放置另一个 30 秒。在 90 秒内加入 5 毫升 IMDM, 随即立即加入另外 5 毫升。将得到的细胞悬浮液保持静止 5 分钟。旋转细胞悬液, 并将沉淀重悬浮于 HAT 培养基中(含有 10% 的 FBS、2 mM 的 L-谷氨酰胺、0.6% 的 2-巯基乙醇(0.04% 溶液)、次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷以及 10% 的 Origen 生长因子)。将细胞重悬浮至每毫升 5×10^5 个细胞。将细胞平铺到 96 孔板中。每孔加入 200 微升或 5×10^5 个细胞。

在 37°C 下, 将平板在 100% 湿度的 7% CO₂ 空气中温育。融合七天后, 除去培养基, 并用 IMDM 培养基(含有 10% 的 FBS、2 mM 的 L-谷氨酰胺、0.6% 的 2-巯基乙醇储备液(0.04% 溶液)、次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷以及 10% 的 Origen 生长因子)代替。一般地, 融合约七天后, 在显微镜下可看见杂交瘤的生长集落。融合后大约 10-14 天, 肉眼可见这些集落。

融合后 10 至 14 天, 从孔中取出具有杂交瘤生长集落的上清液。上清液体积大约是 150-200 微升, 并且每毫升含有 10-100 微克抗体。使用用于筛选血清的相同测定法(测试法), 测试这些上清液的特异性抗体。将阳性杂交瘤集落从 96 孔板移到 24 孔板。三至五天后, 测试 24 孔板的上清液, 来确定特异性抗体的存在。24 孔板中一孔的上清液体积大约是 2 mL, 并含有 10-100 微克/毫升的抗体。将阳性孔的细胞在 T-25 和 T-75 烧瓶中进行扩增。在 T-75 烧瓶中冷冻细胞。也可通过有限稀释来克隆阳性孔的细胞。将杂交瘤细胞以每孔 0.25 个细胞或每 4 个孔中一个细胞的密度铺在 96 孔板上。10-14 天后, 使用用于最初选择杂交瘤的测定法(测试法), 来测试生长集落。扩展和冷冻了阳性克隆。

时期 III: 生产

将杂交瘤细胞扩展到 T-162 烧瓶，随即将它们转入滚瓶以用于生产细胞上清液。将细胞在滚瓶中生长约两周，直至有活力的细胞小于 10%。从滚瓶收集培养物上清液以用于纯化。

免疫测定概述

所有抗体是适于 Bayer Immuno 1 系统的异源 ELISA 型测定形式的。该系统使用荧光素标记的俘获抗体（称为 R1）和碱性磷酸酶标记的标签抗体（称为 R2）。将抗体缀合物以 2 至 50 mg/L 的浓度溶于生理缓冲液。将免疫活性试剂与含有待测抗原的患者定量样品一起温育。总是首先将患者样品移入反应比色杯中，随即三十秒后加入 R1。加入 R1 30 秒到 20 分钟后，通常加入 R2。尽管免疫测定的其它实施方案要求更长或更短的温育时间，还是将混合物温育最多 20 分钟。随后，将免疫磁性粒子加入混合物。粒子由含有聚丙烯酰胺珠的氧化铁与缀合到粒子表面的抗荧光素抗体组成。可从 Bayer HealthCare Diagnostics 商业购买粒子。一旦免疫磁性粒子与由抗原和 R1 与 R2 轭合物形成的夹心式免疫复合物进行温育，免疫磁性粒子上的抗荧光素抗体通过 R1 抗体的荧光素标记可捕捉夹心式免疫复合物。通过外部磁场可沉淀所形成的超级复合物。洗涤除去所有未结合的物质，特别是 R2 碱性磷酸酶缀合物。然后将洗过的复合物重悬浮于对-硝基苯酚磷酸盐溶液中。形成颜色的比率与比色杯中剩余磷酸酶数量成比例，其中所述的磷酸酶又与抗原数量成比例。通过记录六点校准曲线和由三次曲线回归或 Rodbard 拟合建立的校准曲线，来实现定量分析。

(a)测定性能。

单独测定每种测试法的性能。测定每种免疫测定法的灵敏度和特异性、测定法之间和内部的测定差异、干扰、线性度和平行度。所有测定法都显示满足临床化学高标准。测定从健康的男女受检者获得的结果范围和 18 岁至 75 岁的年龄范围，以建立“标准”值。将测定法应用于患有病理紊乱范围的受检者。

(b)统计本底。

在 1,021 个受检者中进行肝纤维化的观察研究("欧洲人肝纤维化")

或"ELF"研究)，并分析所得数据。使用的肝纤维化记分系统是：

-Scheuer 得分(0-4)，

改进的 Ishak 得分(HAI) A-接触性肝炎(0-4)，

改进的 IshBk 得分(HAI) B-融合性坏死(0-6)，

改进的 IshCk 得分(HAI) C-点状坏死(0-4)，

改进的 IshCk SDore(HAI) D-门炎症(0-4)，

改进的 HAI 得分 (Ishak 得分)(0-6)。

使用逐步判别分析法；表 1 中下列血清参数函数对于相应的记分类型具有较大影响。

表 1

记分类型	指标参数		
Scheurer 得分:	$Ln(TIMP-1)$	$l_n(\text{胶原 VI/透明质酸})$	$l_n(\text{透明质酸/层粘连蛋白})$
改进的 Ishak 得分 A-接触性肝炎	$Ln(TIMP-1)$	$l_n(\text{胶原 VI/透明质酸})$	$l_n(\text{胶原 VI/肌腱蛋白})$
改进的 Ishak 得分 B-融合性坏死	$Ln(\text{透明质酸})$	$l_n(\text{胶原 VI/MMP-2})$	
改进的 Ishak 得分 C-点状坏死	$Ln(\text{透明质酸})$	$l_n(\text{MMP-9/TIMP-1/复合物肌腱蛋白})$	
改进的 Ishak 得分 D-门炎症	$Ln(\text{层粘连蛋白})$	$l_n(\text{胶原 VI/TIMP-1})$	
改进的 Ishak 得分-Stage	$Ln(TIMP-1)$	$l_n(\text{胶原 VI/透明质酸})$	$l_n(\text{透明质酸/层粘连蛋白})$

相应的判别分析产生线状判别函数，这可用于计算和预测活组织检查得分。导出出的算法可用于各种已知的记分系统（例如 Scheuer 得分、Ishak 得分、Metavir 得分、Ludwig 得分、HAI 得分）。例如，算法可用于预测患者的活组织检查得分（例如记分 0、1、2、3...）或预测患者所属的得分组（类别）（例如轻度纤维化；记分 0 至 1）。

所用的判别函数包括来自列表的标记组合，其中标记选自 N 末端胶原 IE 前肽(PIINP)、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、

透明质酸、MMP-2、TIMP-1 和 MMP-9/TIMP-1 复合物以及患者的年龄、性别和联合了被称为乘数和被加数或其组合的数值因子的转氨酶（最特别是 ALT(丙氨酸转氨酶)、AST(天冬氨酸转氨酶) 和 GLDH(谷氨酸脱氢酶))水平,其中这些数值因子具有-1000 至+1000 纳克/ml(ng/ml)之间的值。

除非另外指出,本文所提供的值以纳克/毫升(ng/ml)为单位。本领域技术人员很容易地将所述的值转换为任何其它有用的单位,并因此修改本文所述算法中使用的值。

使用不同的记分系统来预测所鉴定的活组织检查得分,这需要使使用不同标记的组合来研究不同的算法,这些标记选自 PIINP1 胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 和 MMP-9/TIMP-1 复合物连同年龄、性别以及联合了不同数值因子的转氨酶值。

判别函数作为具有用于比较的组织病理学得分的许多不同函数阵列(参见算法 1、2、3、4、5、6、1b、2b、3b、4b、5b、6b),或称作一种单一的判别函数,经常也称为逻辑回归(参见算法 4a、5a、6a、4c、5c、6c、7、7a、8、8a、9、10、11、12)而被建立。当判别函数实质上产生计算生物标记所导出的肝分值时,逻辑回归需要一种或多种、根据其作为评价二元结果的工具用途或作为计算标记得分的工具用途的截止值。为了产生标记得分,判别函数需要与可降低疾病等级的一样多的不同截止值。

为了计算组织病理学得分,不得不将个体血清标记的结果或其它参数引入各自的公式中,来计算判别得分。如果使用几个判别函数组的模型,则每个函数代表不同的得分。函数在具有引入值的计算中产生最高判别得分数值,这导致它的相关疾病得分作为生物标记导出的肝病计算得分。

(c) Scheuer 得分算法。

通过将根据 Scheuer 记分系统评估的活组织检查与患有肝病的患者组的血清标记浓度相关联来计算下列算法 1 至 6 和 4a 至 6a。使用来自一组患者(标记定位组)的标记结果和病理学得分导出所有算法,然后将其用于在患者的独立组(有效组)中预测活组织检查得分(计

算的得分)。将算出的得分与通过单个病理学家(B情况)测定的得分、与三位病理学家的一致得分(C情况)以及与所有病理学家的覆盖范围(A情况)进行比较。计算 Kappa 值来评价算法的效率。为了能使用通常用于评价新诊断法的效率的标准(灵敏度、特异性、正预测值(PPV)、负预测值(NPV)以及受检者工作特征分析曲线(ROC AUC)之下的面积),将从组织分析导出的肝病得分和从血清标记算法导出的计算得分分成两部分(dichotomize),得分 0 至 1 称为阴性判读,得分 2 至 4 称为阳性判读(Scheuer 得分)。因此,用真阳性、真阴性、假阴性和假阳性所表示的两种方法的协调,可评价每个算法产生的灵敏度、特异性、NPV、PPV 和 ROC AUC。参见算法 4a、5a、6a。在任何情况下,活组织检查结果作为金标准来评价每个不同的算法。

算法中使用的简写:

缩写词

CoI IV 或 COLJV:
 Col VI 或 COLJVI:
 Hya 或 HYA 或 HA:
 TIMP-1 或 TIMP1:
 Lam 或 LAM:
 PIIIINP:
 MMP2:
 MMP9 或 MMP9/TIMP1:
 Ten 或 TEN:
 CRATIO:

标记

IV 型胶原
 VI 型胶原
 透明质酸
 1 型基质金属蛋白酶抑制子
 层粘连蛋白
 III 型原胶原氨基末端前肽
 2 型基质金属蛋白酶
 9 型基质金属蛋白酶(MMP9); 和与
 TIMP-1 复合的 MMP9 (MMP9/TIMP1)
 肌腱蛋白
 IV 型胶原的分析值[ng/mL]除以 VI 型
 胶原的分析值。

算法 1: (使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-1)

- [0] : $-108.861+0.283*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.050*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.372*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $-114.231+0.195*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.654*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.158*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] : $-120.649-0.998*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.102*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.925*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $-123.672-1.281*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.344*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+37.163*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] : $-133.207-2.186*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.602*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+38.188*\text{LOG}(\text{TIMP1})$

算法 2: (使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白、TIMP-1)

- [0] : $-75.18797+23.04542*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.583641*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.140956*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [1] : $-76.1526+23.15895*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.963402*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.009472*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [2] : $-78.62662+23.32161*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.227332*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.067969*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [3] : $-83.09285+23.64493*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.181493*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.300241*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [4] : $-93.89732+24.86246*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.841299*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.136885*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$

算法 3: (使用 Col VI 与透明质酸、Col IV 和 PIINP)

- [0] : $-95.39661+17.66025*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.820836*\text{LOG}(\text{COL_IV})+0.245778*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})-17.79663*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.96754*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.279356*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
- [1] : $-95.84457+17.62365*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.667854*\text{LOG}(\text{COL_IV})+0.155707*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})-18.0407*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.42688*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.554323*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
- [2] : $-99.13575+17.76656*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.978731*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.12995*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})-18.69948*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.49353*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.647247*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
- [3] : $-104.4554+18.38886*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.202832*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.157058*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})-18.70409*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.49716*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.340197*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
- [4] : $-119.8887+20.14719*\text{LOG}(\text{HYAL})+0.959792*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.80876*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})-18.69873*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-15.57103*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.229757*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$

算法 4(使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-1)

- [0] $-84.8884+1.314094*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.163728*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+26.86543*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] $-87.1291+1.152303*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.507536*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.13607*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] $-89.7304+0.766894*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.361471*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.43159*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] $-94.3078-0.074816*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.251909*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.81493*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] $-104.774-1.087963*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.110437*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+28.88894*\text{LOG}(\text{TIMP1})$

算法 4a(使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-1 的二元算法)

$$\text{Logit} = -8.33001 - 1.104523 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) - 0.127521 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 0.841806 * \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

算法 5(使用 Col VI 与透明质酸、Col IV、PIIINP、MMP2)

-
- [0]
$$-510.728 + 22.96526 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 66.83994 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 114.5438 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - 8.772354 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.61084 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.1575 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 523.6594 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 184.6677 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$
- [1]
$$-507.105 + 21.13922 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 64.02849 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 116.0789 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - 8.710835 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 28.83564 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.0848 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 513.7398 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 174.771 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$
- [2]
$$-517.258 + 21.9922 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 67.10076 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 122.2884 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - 7.559512 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.00615 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 156.4279 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 527.1177 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 182.0914 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$
- [3]
$$-521.186 + 17.72648 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 61.20226 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 120.3493 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - 7.928957 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.4852 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.6176 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 493.4266 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 146.0582 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$
- [4]
$$-562.9 + 30.0182 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 71.36396 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 124.3929 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - 7.39815 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 31.28702 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 160.534 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 566.915 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 223.449 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$
-

算法 5a(使用 Col VI 与透明质酸、Col IV、PIIINP、MMP2 的二元算法)

$$\text{Logit} = -19.3878 + 2.217337 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 2.493531 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - 6.686058 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 1.04518 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 1.356867 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 2.546269 * (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 16.17252 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 11.51533 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

算法 6(使用透明质酸与 Col VI、PIINP、TIMP-1)

[0]	$-139.611-0.550172*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.12324*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.36457*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+24.38884*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[1]	$-142.886-0.287819*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.77958*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.39204*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+24.28051*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[2]	$-141.391-0.36426*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+30.81993*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.4064*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+24.5837*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[3]	$-148.365+0.453879*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.74657*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.61532*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+24.50483*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[4]	$-164.746+1.023888*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+33.94289*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.35512*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+24.66699*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$

算法 6a(使用透明质酸与 Col VI、PIINP、TIMP-1 的二元结果)

Logit	$-19.3878+2.217337*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-2.493531*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $6.686058*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+1.04518*(\text{LOG}(\text{PIINP}))+1.356867*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+2.546269*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+16.17252*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-$ $11.51533*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
-------	--

下列表 2 显示了算法 1、2 和 3 的诊断表现。C 栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定算法产生的标记的结果之间的比较结果；A 栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果；B 栏表示在研究中心病理学家（单个病理学家）所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果。命中率是所报导的得分与基于标记的算法和病理学家的 Scheurer 得分相同的百分率；Kappa 值反映在结果组、L_Kappa 和 U_Kappa 给出的 Kappa 值的下限和上限置信度(95% CI)之间的吻合度；NPV 是对分记分系统的负预测值；PPV 是对分系统的正预测值。

下列表 3 显示了算法 4、5 和 6 的诊断表现。C 栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定算法产生的标记的结果之间的比较结果；A 栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果；B 栏表示在研究中心病理学家（单个病理学家）所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果；命中率是所报导的得分与基于标记的算法和病理学家的 Scheurer 得分相同的百分率；Kappa

值反映在结果组、L_Kappa 和 U_Kappa 给出的 Kappa 值的下限和上限置信度(95% CI)之间的吻合度; NPV 是对分记分系统的负预测值; PPV 是对分系统的正预测值。

表 2

	算法 1			算法 2			算法 3		
	C	A	B	C	A	B	C	A	B
命中率(%) [0]	33.3	38.9	35.0	17.1	40.0	13.7	20.0	41.4	16.8
命中率(%) [1]	36.8	42.7	36.0	80.7	81.6	75.8	74.6	77.2	71.7
命中率(%) [2]	25.8	42.4	19.0	0.0	36.8	0.0	0.0	34.2	5.1
命中率(%) [3]	26.1	34.8	22.2	6.4	17.0	5.2	12.8	21.3	9.3
命中率(%) [4]	63.0	63.0	55.9	62.5	62.5	52.9	43.8	43.8	47.1
命中率(%) All	35.9	42.9	33.8	42.2	54.2	36.7	39.5	51.2	36.7
N	468	468	793	301	301	626	301	301	626
Kappa	0.175	0.268	0.151	.	0.199	.	0.124	0.310	0.121
L_Kappa	0.119	0.211	0.109	.	0.134	.	0.056	0.235	0.077
U_Kappa	0.231	0.325	0.192	.	0.265	.	0.191	0.385	0.165
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	.	<0.0001	.	<0.0001	<0.0001	<0.0001
NPV (%) [0-1]	61.6	63.8	62.8	91.8	92.4	85.5	88.0	89.1	81.6
PPV (%) [2-4]	66.1	75.1	66.3	31.6	46.2	35.4	35.0	48.7	39.0
命中率(%)全部	63.5	68.4	64.2	68.4	74.4	65.8	67.4	73.4	64.9
Kappa	0.268	0.372	0.280	0.261	0.417	0.226	0.252	0.404	0.219
L_Kappa	0.182	0.291	0.214	0.160	0.315	0.152	0.146	0.299	0.142
U_Kappa	0.354	0.454	0.346	0.363	0.520	0.300	0.358	0.508	0.295
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
敏感度	0.539	0.584	0.540	0.712	0.794	0.613	0.651	0.740	0.578
特异性	0.729	0.791	0.739	0.679	0.730	0.671	0.681	0.732	0.674

表 3

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg.4	Alg.5	Alg.6	Alg.4	Alg.5	Alg.6	Alg.4	Alg.5	Alg.6
命中率(%)全部	32.8	36.1	34.4	35.8	35.5	34.3	43.1	45.8	44.1
命中率(%) [0]	53.6	43.5	47.8	52.3	43.2	45.8	62.2	50.7	56.7
命中率(%) [1]	18.6	35.4	33.6	24.9	30.6	27.8	27.9	43.4	42.1
命中率(%) [2]	15.8	13.2	15.8	18.2	20.8	20.8	29.4	35.9	35.7
命中率(%) [3]	27.7	38.3	25.5	31.9	36.3	29.7	37.8	50.0	34.1
命中率(%) [4]	65.6	46.9	43.8	57.4	48.5	50.0	71.4	50.0	48.6
N	299	299	299	600	600	600	299	299	299

表 3 (续)

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg.4	Alg. 5	Alg. 6	Alg. 4	Alg. 5	Alg. 6	Alg. 4	Alg 5	Alg 6
Kappa	0.146	0.176	0.154	0.174	0.176	0.164	0.274	0.302	0.280
L_Kappa	0.079	0.107	0.086	0.125	0.127	0.116	0.204	0.230	0.209
U_Kappa	0.213	0.246	0.223	0.223	0.225	0.212	0.344	0.374	0.351
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
二元结果:	Alg 4b	Alg 5b	Alg6b	Alg4b	Alg5b	Alg6b	Alg4b	Alg5b	Alg6b
PPV (%) [2-4]	57.1	55.8	55.7	61.5	57.1	55.8	59.4	57.8	58.6
NPV (%) [0-1]	75.3	77.0	75.5	77.3	78.8	77.4	78.9	80.3	77.4
命中率(%)全部	67.2	66.6	66.2	70.5	67.8	66.5	70.2	69.2	68.6
Kappa	0.328	0.329	0.315	0.391	0.358	0.331	0.389	0.382	0.363
L_Kappa	0.221	0.224	0.208	0.317	0.285	0.258	0.284	0.280	0.258
U_Kappa	0.436	0.434	0.422	0.466	0.431	0.405	0.493	0.485	0.468
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
敏感度	65.0	70.1	66.7	66.9	73.3	71.6	69.3	73.9	69.5
特异性	68.7	64.3	65.9	72.8	64.3	63.2	70.8	66.3	68.0
N(AUC)	299	299	299	600	600	600	299	299	299
AUC(ROC)	0.748	0.756	0.768	0.765	0.765	0.771	0.839	0.846	0.860

(d) Ishak 得分 D 算法.

通过将根据 Ishak 记分系统评估的活组织检查与患有肝病的患者组的血清标记浓度相关联, 来计算下列算法 1b、2b、3b、4b、5b、6b、4c、5c 和 6c。

使用来自一组患者（标记定位组）的标记结果和病理学得分导出所有算法，然后将其用于在患者的独立组（有效组）中预测活组织检查得分（计算得分）。将算出的得分与通过单个病理学家（B 情况）测定的得分、与 3 位病理学家的一致得分（C 情况）以及与所有病理学家的覆盖范围（A 情况）进行比较。计算 Kappa 值来评价算法的效率。

为了能使用通常用于评价新诊断法的效率的标准（灵敏度、特异性、正预测值(PPV)、负预测值(NPV)以及受检者工作特征分析曲线(ROC AUC)之下的面积），将从组织分析导出的肝病得分和从血清标记算法导出的计算得分分成两部分，得分 0 至 2 称为阴性判读，得分 3 至 6 称为阳性判读(Ishak 得分)。因此，用真阳性、真阴性、假阴性和假阳性所表示的两种方法的协调，可评价每个公式产生的灵敏度、特异性、NPV、PPV 和 ROC AUC。参见算法 4a、5a、6a。在任何情况下，活组织检查结果作为金标准来评价每个不同的算法。

算法 1b: (使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-1)

- [0] : $-107.752-0.347*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.493*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+34.879*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $-112.550-0.301*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.086*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.617*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] : $-114.626-0.760*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.270*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.819*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $-121.339-2.065*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.910*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.593*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] : $-119.289-1.009*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.271*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.449*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [5] : $-125.551-2.966*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.536*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.797*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [6] : $-133.055-3.256*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.329*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+37.695*\text{LOG}(\text{TIMP1})$

算法 2b: (使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-2b)

- [0] : $-75.94035+23.20826*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.911827*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.295297*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [1] : $-76.0885+23.14058*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.221511*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.155608*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [2] : $-80.17664+23.6506*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.41651*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.210415*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [3] : $-79.12945+23.42277*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.582733*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.175959*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [4] : $-83.24617+23.7777*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.174834*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.311583*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [5] : $-89.60186+24.2615*\text{LOG}(\text{TIMP1})-3.237993*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.914309*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [6] : $-95.5774+25.11333*\text{LOG}(\text{TIMP1})-3.293235*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.347014*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$

算法 3b: (使用 Col VI 与透明质酸、Col IV 和 PIINP)

- [0] : $-100.6452+17.18813*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.20461*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.515498*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+3.309452*\text{LOG}(\text{LAM})-15.47806*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.50773*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [1] : $-98.87092+17.18161*\text{LOG}(\text{HYAL})+14.7876*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.530071*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+3.067209*\text{LOG}(\text{LAM})-14.74001*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.62455*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [2] : $-104.8869+17.78543*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.25944*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.352181*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+3.175207*\text{LOG}(\text{LAM})-15.56044*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.97986*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [3] : $-102.8131+17.32281*\text{LOG}(\text{HYAL})+14.69307*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.176959*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+2.822227*\text{LOG}(\text{LAM})-15.15272*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.37351*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [4] : $-109.2574+18.44309*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.53464*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})-0.152374*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+2.957847*\text{LOG}(\text{LAM})-15.02773*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.59138*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [5] : $-116.8556+19.00778*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.47539*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.436656*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+3.995456*\text{LOG}(\text{LAM})-15.54302*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.53013*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [6] : $-127.2084+21.66093*\text{LOG}(\text{HYAL})+17.77795*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})-0.631902*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIINP})$
 $+3.589129*\text{LOG}(\text{LAM})-16.1393*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.40445*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$

算法 4b(使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-2b)

-
- [0] : $85.3739+0.961665*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+1.975774*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+26.93966*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $86.2963+0.913679*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.357299*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.03427*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] : $89.8724+0.593663*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.211646*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.50832*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $90.0047+0.396858*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.230884*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.45883*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] : $-94.3636-$
 $0.0239*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.264267*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.95567*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
-

[5]	-98.1958-
	$1.374361 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 1.418031 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 28.09921 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
[6]	-106.131-
	$1.60933 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 1.83107 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 29.03373 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$

算法 4c(使用 Col VI 与透明质酸、层粘连蛋白和 TIMP-1 的二元结果)

Logit	$-8.5031 - 1.124282 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) - 0.111367 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 0.853129 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
-------	---

算法 5b(使用 Col VI 与透明质酸、Col IV、PIIINP、MMP2)

[0]	$-509.93 + 21.03464 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 65.28201 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})) -$ $115.3817 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) -$ $7.871581 \cdot (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.02069 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.8779 \cdot (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 510.2511 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 169.4857 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
[1]	$-503.533 + 19.84081 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 62.38579 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})) -$ $116.4901 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) -$ $8.121259 \cdot (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.14816 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 153.1154 \cdot (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 502.5139 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 163.8827 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
[2]	$-510.288 + 18.37673 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 62.65484 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})) -$ $117.3728 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) -$ $7.333193 \cdot (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.35728 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.7774 \cdot (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 497.5602 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 153.9391 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
[3]	$-516.935 + 20.14755 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 65.87736 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})) -$ $123.3229 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) -$ $6.496054 \cdot (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.54844 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 156.3209 \cdot (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 514.0645 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 166.8154 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
[4]	$-522.377 + 14.67237 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 59.18186 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})) -$ $122.7296 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) -$ $6.823173 \cdot (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.7857 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.904 \cdot (\text{LOG}(\text{MMP2})) + 478.6378 \cdot (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 127.6343 \cdot (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$

[5]	$-526.233+18.20806*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-61.05469*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $120.2586*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))-$ $7.691697*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+31.24435*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+155.7383*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+489.0154*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-140.9856*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
[6]	$-563.804+28.52903*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-70.11008*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $125.5272*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))-$ $6.321247*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+31.79617*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+160.3625*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+555.8114*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-210.7424*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$

算法 5c(使用 Col VI 与透明质酸、Col IV、PIIINP、MMP2 的二元结果)

Logit	$-20.8717+2.11973*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-2.531717*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $7.252597*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+1.083647*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+1.493234*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+2.794571*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+16.07724*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-$ $10.7448*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
-------	--

公式 6b(使用透明质酸与 Col VI、PDINP、TIMP-1)

[0]	$-140.369-0.35106*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.3799*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.39524*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.34635*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[1]	$-143.724-0.15137*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+32.39861*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.67661*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.06137*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[2]	$-143.915+0.002613*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.49065*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.03323*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.55546*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$

[3]	$-141.045-0.097252*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+30.88321*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.27152*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.43888*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[4]	$-148.921+0.314333*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+32.14539*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.54838*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.51316*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[5]	$-154.316+1.19843*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+32.1963*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.33983*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.91516*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[6]	$-166.646+1.258962*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+34.30716*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.25685*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.63731*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$

公式 6c(使用透明质酸与 Col VI、PIIINP、TIMP-1 的二元结果)

Logit	$-7.86615+0.590389*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+0.329412*$ $(\text{LOG}(\text{COL_IV}))+0.981143*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+0.314869*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
-------	---

下列表 2 显示算法 1a、2a 和 3a 的诊断表现。C 栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定公式产生的标记的结果之间的比较结果；A 栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果；B 栏表示在研究中心病理学家（单个病理学家）所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果。Kappa 值报导在结果组之间的吻合度。L_Kappa 和 U_Kappa 给出的 Kappa 值的下限和上限置信度(95% CI)之间的吻合度；NPV 是对分记分系统的负预测值；PPV 是对分系统的正预测值。

表 4

	算法 1a			算法 2a			算法 3a		
	C	A	B	C	A	B	C	A	B
命中率 (%) [0]	28.7	31.5	29.5	45.7	58.6	41.0	45.7	57.1	39.8
命中率 (%) [1]	25.0	34.0	29.2	50.8	60.7	50.8	27.9	41.0	37.7
命中率 (%) [2]	10.7	24.0	9.7	0.0	22.4	1.1	1.7	15.5	1.1
命中率 (%) [3]	23.0	27.9	20.2	0.0	3.1	0.0	9.4	12.5	6.9
命中率 (%) [4]	22.2	37.8	25.6	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	3.3
命中率 (%) [5]	32.0	44.0	24.4	4.5	18.2	2.6	0.0	18.2	2.6
命中率 (%) [6]	57.4	57.4	51.1	71.9	71.9	60.9	43.8	43.8	52.2
命中率 (%) All	27.1	34.6	27.3	28.9	39.5	28.1	22.3	32.6	25.2
N	468	468	794	301	301	627	301	301	627
Kappa	0.138	0.228	0.136	.	.	.	0.031	0.093	0.041
L_Kappa	0.090	0.177	0.100	.	.	.	-0.02	0.039	0.006
U_Kappa	0.186	0.279	0.173	.	.	.	0.084	0.147	0.076
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	.	.	.	0.2293	0.0003	0.0152
NPV (%) [0-2]	57.2	59.4	59.1	89.9	91.0	83.9	77.8	80.4	75.1
PPV (%) [3-6]	71.9	79.5	74.2	40.2	50.9	41.5	47.3	55.4	48.1
Hit-Rate (%) All	63.0	67.3	65.0	71.4	76.1	67.6	66.4	71.1	64.8
Kappa	0.274	0.362	0.312	0.330	0.450	0.271	0.259	0.366	0.238
L_Kappa	0.191	0.283	0.249	0.223	0.346	0.195	0.147	0.257	0.160
U_Kappa	0.356	0.441	0.374	0.437	0.554	0.347	0.371	0.475	0.316
P(Kappa=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
敏感度	0.524	0.561	0.537	0.703	0.770	0.617	0.558	0.626	0.547
特异性	0.757	0.816	0.781	0.717	0.758	0.697	0.714	0.752	0.699

下表 5 显示了算法 4b、5b 和 6b 的诊断表现。C 栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定公式产生的标记的结果之间的比较结果；A 栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果；B 栏表示在研究中心病理学家（单个病理学家）所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果；命中率是所报导的得分与基于标记的公式和病理学家的 Scheurer 得分相同的百分率；Kappa 值反映在结果组、L_Kappa 和 U_Kappa 给出的 Kappa 值的下限和上限置信度(95% CI)之间的吻合度；NPV 是对分记系统的负预测值；PPV 是对分系统的正预测值。在所有表中，“二元结果”指生成可指示作为“阴性”的低标记得分组和作为“阳性”的高标记得分组的标记得分组。使用该办法，可以定义二元或二分结果以允许对灵敏度、特异性、NPV、PPV 和 ROC AUC 进行统计分析。

表 5

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg 6b	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg. 6b	Alg. 4b	Alg.5b	Alg 6b
命中率(%)全部	27.4	28.4	28.1	28.8	26.6	28.5	38.1	39.1	39.8
命中率(%) [0]	44.9	34.8	43.5	43.9	29.0	41.9	54.8	40.9	50.7
命中率(%) [1]	21.7	41.7	40.0	31.2	32.8	30.4	37.7	52.9	53.5
命中率(%) [2]	3.4	12.1	6.9	6.7	12.2	8.9	9.3	21.4	14.3
命中率(%) [3]	12.5	12.5	9.4	5.7	17.1	15.7	21.9	31.3	31.4
命中率(%) [4]	26.9	15.4	11.5	27.3	14.5	10.9	36.0	36.0	28.0
命中率(%) [5]	18.2	45.5	40.9	12.8	35.9	33.3	26.3	55.0	47.6
命中率(%) [6]	65.6	34.4	34.4	53.7	43.3	44.8	71.4	37.5	38.7
N	299	299	299	601	601	601	299	299	299
Kappa	0.129	0.098	0.147	0.137	0.133	0.148	0.253	0.182	0.281
L_Kappa	0.070	0.043	0.089	0.095	0.092	0.106	0.189	0.124	0.217
U_Kappa	0.188	0.152	0.205	0.180	0.174	0.189	0.318	0.241	0.345
P(Kappa=0)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

表 5 (续)

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg 6b	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg. 6b	Alg. 4b	Alg.5b	Alg 6b
二元结果:	Alg. 4c	Alg. 5c	Alg 6c	Alg 4c	Alg 5c	Alg 6c	Alg. 4c	Alg. 5c	Alg. 6c
PPV (%) [3-6]	54.8	56.0	54.7	60.7	56.4	55.1	55.6	57.4	56.8
NPV (%) [0-2]	74.9	79.1	77.5	76.6	78.4	78.5	76.0	82.3	79.4
命中率(%)全部	66.6	68.2	66.9	70.2	67.7	66.7	67.6	70.6	68.9
Kappa	0.301	0.355	0.326	0.376	0.350	0.336	0.321	0.402	0.367
L_Kappa	0.192	0.251	0.220	0.301	0.276	0.263	0.212	0.300	0.262
U_Kappa	0.411	0.460	0.432	0.452	0.423	0.409	0.430	0.504	0.471
P(Kappa=0)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
敏感度	60.7	70.5	67.9	63.6	71.0	72.3	62.2	74.3	70.5
特异性	70.1	66.8	66.3	74.3	65.7	63.2	70.7	68.4	67.9
N(AUC)	299	299	299	601	601	601	299	299	299
AUC(ROC)	0.756	0.764	0.775	0.769	0.769	0.775	0.840	0.846	0.862

(e)用于 Scheuer 得分的受检者工作特性(ROC)曲线。

将患者分组为用于 Scheuer 得分的无/轻度纤维化 (得分 0-1) 类别和中度/重度纤维化 (得分 2 - 4) 类别, 并计算分成两部分的结果来产生下列结果:

算法 7:

LOGIT =

7.11957755-0.67952658

LOG(TIMPI)+1.01832374*LOG(COL_VI/HYAL)+0.09461778*LOG(HYAL/LAM)

算法 8:

LOGIT =

8.6908419-0.76944684*LOG(HYAL)-0.47836706*LOG(COL_IV)+0.43870798*LOG(COL_VI/PIIINP)

+0.74453459*LOG(COL_VI/TIMPI)+0.05605262*LOG(HYAL/MMP2)-

0.01871531*LOG(LAM/MMP9T)

该算法用来计算用于无/轻度纤维化 (得分 0-1) 的接收者工作特性曲线和用于 Scheuer 得分的中度/重度纤维化 (得分 2 - 4)。 将算出的得分与通过单个病理学家 (B 情况) 测定的得分、与 3 位病理学家的一致得分 (C 情况) 以及与所有病理学家的覆盖范围 (A 情况) 进行比较。 计算了低于曲线(AUC)值的面积。

下表 6 显示了算法 7 和 8 的诊断表现。 C 栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定公式产生的标记的结果之间的比较结果; A 栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果; B 栏表示在研究中心病理学家 (单个病理学家) 所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果; 表中概括了: “二元结果”是指生成可指示作为“阴性”的得分 0 和 1 组和作为“阳性”(Scheurer) 的得分 2 至 4 组的标记得分组。 AUC 表示受检者工作特征分析曲线以下的面积。 N 是研究对象的数目。

表 6

	<u>算法 7</u>			<u>算法 8</u>		
	C	A	B	C	A	B
AUC	0.759	0.899	0.759	0.746	0.871	0.756
N	295	295	569	291	291	562

(f)用于 Ishak 得分的受检者工作特性(ROC)曲线。

将患者分组为用于 Ishak 得分的无纤维化/轻度纤维化(得分 0-2)类别和中度纤维化/严重纤维化(得分 3-6)类别,并计算分成两部分的结果来产生下列结果:

算法 7a:

LOGIT =

$$7.22920269 - 0.68033581 * \text{LOG}(\text{TIMP1}) + 1.04300795 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 0.08483109 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$$

算法 8a:

LOGIT =

$$8.92321331 - 1.28340678 * \text{LOG}(\text{HYAL}) - 0.54350583 * \text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL}) + 0.47836792 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP}) + 0.02076678 * \text{LOG}(\text{LAM}) + 0.07719237 * \text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2}) + 0.76194671 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$$

该算法用来计算用于无/轻度纤维化(得分 0-2)的接收者工作特性曲线和用于 Ishak 得分的中度/重度纤维化(得分 3-6)。将算出的得分与通过单个病理学家(B情况)测定的得分、与3位病理学家的一致得分(C情况)以及与所有病理学家的覆盖范围(A情况)进行比较。如表7所示,计算了低于曲线(AUC)值的面积。

下表7显示了算法7a和8a的诊断表现。C栏表示在三位病理学家的一致得分与基于给定公式产生的标记的结果之间的比较结果;A栏表示在通过三位不同病理学家所报导的得分范围和基于标记的结果之间的比较结果;B栏表示在研究中心病理学家(单个病理学家)所报导的得分与基于标记的结果之间的比较结果;表中概括了:“二元结果”是指生成可指示作为“阴性”的得分0和2组和作为“阳性”(Ishak)的得分3至6组的标记得分组。AUC表示受检者工作特征分析曲线以下的面积。N是所研究受检者的数目。

表 7

	算法 7a			算法 8a		
	C	A	B	C	A	B
AUC	0.763	0.887	0.763	0.751	0.861	0.757
N	295	295	570	292	292	564(g)

分组得分和多重标记。

通过将 Ishak 得分 s 分组为下列三组，肝纤维化血清标记 PIINP、胶原 IV、胶原 VI、肌腱蛋白、层粘连蛋白、透明质酸、MMP-2、TIMP-1 和 MMP-9/TIMP-1 复合物连同年龄、性别和转氨酶值，也用于将患者分成无/轻度纤维化组、中度纤维化组和重度纤维化组：组 1: Ishak 得分 0 和 1；组 2: Ishak 得分 2、3 和 4；以及组 3: Ishak 得分 5 和 6。尽管类似于透明质酸、PIINP、MMP2、胶原 IV 和 TIMP-1 的单个标记与肝纤维化的强度相互关联，标记组合可产生清晰优越的诊断性能。这方面的研究结果显示当算法 9、10、和 11 举例说明通过在算法中联合多于一个标记而实现的改进时，单个标记与由分组的得分所评估的肝纤维化强度的相互关系。

透明质酸

透明质酸曾经显示了与肝纤维化阶段的最好联系。根据也被用来所有其它算法研究的训练组，研究用于透明质酸的判别函数（以自然对数单位）。通过 $D_{HA} = -3.97 + 1.016 \ln(HA)$ ，产生判别得分 (D_{HA})。

判别得分与活组织检查读数的比较检查表明根据将 Ishak 得分分组如下：

Ishak 得分	疾病状况
0-1	无或轻度纤维化
2-4	中度纤维化
5-6	重度纤维化

以上述方式修改 Ishak 系统，产生了下列训练组判别函数：

$$D_{HA} = -3.70 + 0.992 \ln(HA)$$

对于由被用于确认所有标记的有效组引起的透明质酸标记进行处理，表明基于该单个标记的三组的清晰明显的分离。挑选达到 85% 灵敏度的截止值，来检测重度和中度纤维化。计算从无/轻度纤维化组中区分这些组的特异性。下列表 7a 显示具有各自特异性的截止值。

表 7a 与无或轻度纤维化比较, 在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

透明质酸

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.135	43.1%
中度纤维化	-1.23	22.9%

3 型原胶原的氨基末端前肽(PDINP)

用于在训练组中测定的标记的判别函数是:

$$D_{PIIINP} = -2.657 + 1.646 * \ln(PIIINP)$$

计算有效组中来自 PIIINP 浓度的判别得分, 表明在所述组之间有清晰的分离。下表 7b 中描述了标记 PHINP 以 85%敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的特异性。

表 7b

与无或轻度纤维化比较, 在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

PIIINP

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.135	65.3%
中度纤维化	-0.855	30.5%

2 型基质金属蛋白酶(MMP2)

在训练组中用于测试并再次测定的判别函数是:

$$D_{MMP2} = -15.0 + 2.354 \ln(MMP2)$$

计算有效组中来自 MMP2 浓度的判别得分, 表明在该组之间有清晰的分离。下表 7c 中描述了标记 MMP2 以 85%敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的特异性。

表 7c

与无或轻度纤维化比较，在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

MMP2

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.276	43.3%
中度纤维化	-0.664	12.7%

胶原 IV

在训练组中用于测试 IV 型胶原并再次进行评价的判别函数是：

$$D_{col4} = -11.341 + 2.273 \ln(\text{胶原 IV})$$

计算有效组中来自胶原 IV 浓度的判别得分，表明在该组之间有清晰的分离。下表 7d 中描述了标记胶原 IV 以 85%敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的特异性。

表 7d

与无或轻度纤维化比较，在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

胶原 IV

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.421	52.6%
中度纤维化	-0.887	22.6%

1 型金属蛋白酶的抑制剂(TIMP-1)

唯一其它的明显区别 Ishak 类型组的单个标记是 TIMP-1。该判别函数是

$$D_{TIMP1} = -13.289 + 2.036 * \ln(\text{TIMP-1})$$

计算有效组中来自胶原 IV 浓度的判别得分，表明在该组之间有清晰的分离。下表 7e 中描述了标记 TIMP-1 以 85%敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的特异性。

表 7e

与无或轻度纤维化比较，在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

TMP-1

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.673	34.1%
中度纤维化	-1.014	21.1%

(h) 多重标记

该研究方面显示通过在诊断算法中联合使用多于一个血清标记而获得的改进。

算法 9 包括 PIINP 和胶原 IV。来自标记发现组的判别函数是：

$$D_{MI} = -7.522 + 1.21 \ln(\text{胶原 IV}) + 0.947 \ln(\text{PIINP})$$

计算有效组中来自算法 9 的判别得分，表明在该组之间有清晰的分离。下表 7f 中描述了通过以 85%敏感水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的算法 9 而获得的特异性。

表 7f

与无或轻度纤维化比较，在 85%灵敏度时具有特异性的截止值。

算法 9

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.074	71.9%
中度纤维化	-0.862	24.8%

尽管该图显示与单独用于重度疾病的算法 9 和 PTTNP 的特异性比较，在 85%敏感水平特异性有明显的增加，但相关比例的 McNemar 测试表明以 0.05 水平的增加是没有意义的。应当指出恰好 0.07 的 p 倾向于有意义。尽管表明算法 9 性能优于从 Ishak 得分 s 导出出的所有单个标记，但是在 0.1 水平是有意义的。与中度疾病组相比，在特异性方面并没有显著性增加。

算法 10

通过标记发现组将透明质酸引入算法 9，得到下列判别函数：（算法 10）。

$$D_{\text{modell}} = -6.704 + 0.749 \ln(\text{胶原 IV}) + 0.607 \ln(\text{透明质酸}) + 0.436 \ln(\text{PIIINP})$$

计算有效组中来自算法 10 的判别得分，表明在该组之间有清晰的分离。下表 7g 中描述了通过以 85% 敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的算法 10 而获得的特异性。

表 7g

与无或轻度纤维化比较，在 85% 灵敏度时具有特异性的截止值。

算法 10

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.080	79.3%
中度纤维化	-0.919	31.4%

McNemar χ^2 是高度显著的，表明了算法 10 的特异性远远胜过单个的 PIIINP 或任何其它单个的标记。在 0.05 显著性水平，算法 10 也胜过算法 9。

算法 11 (PIIINP.、胶原 IV.、透明质酸和 MMP2)

计算有效组中来自算法 11 的判别得分，表明在该组之间有清晰的分离。下表 7h 中描述了通过以 85% 敏感度水平分别区分无/轻度和中度以及重度疾病的算法 11 而获得的特异性。

表 7h

与无或轻度纤维化比较，在 85% 灵敏度时具有特异性的截止值。

算法 11

疾病状况	截止值	特异性
重度纤维化	-0.229	80.6%
中度纤维化	-0.662	32.5%

尽管与每个单个标记的结果比较，算法 11 在 85% 敏感度水平时显示出特异性改进，但算法 11 的改进对于算法 10 在所研究的样品大小中并没有达到显著性：McNemar $\chi^2=2.18$, $p=0.14$ 。至于所有其它的未

达到敏感度的性能改进，很有可能的是调查曾经是较大的患者组。

2.肝病进展的纵向监测

通过在研究初期和末期进行肝活组织检查，对八十五例患者进行两年多的监测。在研究期间，在一个至八个不同的时间点采集所有患者的血清。

根据下列逻辑回归算法，计算标记的导出计算的病理学得分：

$$D = -10.06 + 0.814 \ln(\text{CRATIO}) + 0.640 \ln(\text{HYALURON}) \\ + 0.639 \ln(\text{MMP2}) + 0.431 \ln(\text{P3NP})$$

(算法 12)

在算法 12 中，CRATIO 意味着胶原 VI 和胶原 IV 的血清值的比率。

下列表 8 概括了来自患者和来自测试有效组的判别得分(算法 12)如何簇集在它们的相应组织病理学得分的周围：

表 8

Ishak 得分	n	平均值	SD	SE	平均值的 95%CI		中值	中值的 95%CI	
0	155	-0.770	0.823	0.066	-0.900	-0.639	-0.890	-1.040	-0.730
1	125	-0.612	0.795	0.071	-0.753	-0.471	-0.620	-0.820	-0.480
2	90	-0.203	1.041	0.109	-0.421	0.016	-0.325	-0.500	-0.090
3	70	-0.001	1.102	0.132	-0.264	0.261	-0.220	-0.400	0.280
4	55	0.291	1.126	0.152	-0.013	0.596	0.170	-0.190	0.550
5	39	0.907	1.176	0.188	0.526	1.288	0.690	0.260	1.290
6	67	1.538	1.396	0.171	1.197	1.878	1.520	1.310	1.890

通过对用于分离的相应的判别得分取平均值，来建立可允许访问单个得分的截止值。使用计算出的肝病得分，计算非参数回归来获得斜率（疾病强度的严重程度与时间；回归系数的 Theil 估计量）。通

过用于每个斜率的置信度变量 v ，计算 95% 置信区间。 v 具有下列值：

- $v =$
- 1 (正)：如果该斜率 > 0 并且其 95% CI 不包括零；
 - 0：如果该斜率的 95% CI 包括零；
 - 1 (负)：如果该斜率是负的并且其 95% CI 不包括零；

因此，将 w 定义为：

- $w =$
- 1 (改进)：如果 Ishak 得分减少至少 2 个水平；
 - 0 (无变化)：如果 Ishak 得分是 ± 1 ；
 - 1 (增进的)：如果 Ishak 得分增加至少 2 个水平。

采用上述两个定义，建立了适于 85 例患者结果的 3×3 协调表，得到如表 9 所示的下列结果。

表 9

斜率(v)	病理学变化(w)			总计
	-1	0	1	
-1	1	11	0	12
0	6	41	7	54
1	1	13	5	19
总计	8	65	12	85

表 9 表明对于发生疾病进展的 12 例患者（通过病状评价的），没有患者具有下降的判别得分。此外，对于在各自疾病中具有改善的那些患者，仅仅一个患者有正斜率。总的说来，在 0.1 水平上的协调是显著的，这证明了基于血清标记的算法纵向地监测肝病进展和衰退的能力。

另外分析了多中心（“ELF”）研究。

使用适于数据统计分析的替代方法，再分析了 ELF 研究中收集的数据。

在 ELF 研究中，将本发明的实施方案的性能与两个广泛采纳的组织分期系统进行比较。公认的是组织分期以缺陷假设为基础。首先，

所有分期系统需要病理学家来对活组织检查赋予绝对值，以便区分代表纤维化从“无”到“肝硬化”范围的时期。该病理学范围通过连续变量得分而被更加准确地表示。其次，Scheuer 和 Ishak 组织分期系统都假定了阶段之间的线性进展，但广泛公认的是阶段 4 不一定比阶段 2 差两倍(30A;31A)

为了回答第二种假设，本发明的实施方案被用于测定算法得分在纤维化区域的分布，以便测定得分如何随组织疾病严重程度而变化。根据专家的意见和假定经过组织阶段的进展是线性的，上述的替代标记的研究任意地将组织阶段二分为代表“无或轻度纤维化”和“中度或重度纤维化”的两组。然后将二分的阶段用于比较组织结构性能与血清标记得分。

在目前的分析中，没有提出关于肝组织阶段的分组及其与标记得分的相互关系的假设。绘制了标记数据图，通过清楚的分界线而显示两种天然组，其中分界线与在 Scheuer 阶段 2 和 3 之间、以及 Ishak 阶段 3 和 4 之间的位点上分为两阶段的组织结构阶段相互关联。数据表明在阶段中的这些变化代表疾病进展中生物学上有意义的阶跃点(step point)。

具体地说，通过对 1,021 例受检者的肝活组织检查进行组织学检查，评价在九种血清纤维化标记水平和肝纤维化水平之间的关系，其中肝活组织检查是作为在所述 ELF 研究中慢性肝病在 13 个中心的调查的部分而获得的。在图 1 中显示研究中患者的募集。

在 ELF 研究中，如果受检者因为经受用于慢性肝病调查的肝活组织检查（定义为异常生物化学肝功能试验持续超过 6 个月），则认为受检者是合格的。另外的内在标准(inclusion criteria)是对年龄大于 18 岁并小于 75 岁的患者提供知情同意的能力。患者属于下列情况则被排除在研究之外：如果年龄超出该范围；如果他们患有与肝外纤维化相关的任何紊乱症，包括风湿病、肾病或肺病；如果他们患有心血管疾病或癌，或通过代谢失调证明的晚期肝硬化(Child-Pugh 分类法 C)；或定期服用阿斯匹林；或患有肝细胞癌或药物诱发的肝病。

在所募集的 1,021 例受检者中，各个诊断种类的数目是：慢性丙型肝炎 496 例；酒精性肝病 64 例；原发性胆汁性肝硬变或原发性硬化性胆管炎 53 例；脂肪肝 61 例；乙型肝炎 61 例；肝移植后循环疾病 48

例；自身免疫肝炎 45 例；血色素沉着症 32 例；隐源性肝硬化 19 例；乙型肝炎和丙型肝炎 4 例；其它（包括未知病原的肉芽肿性疾病）和正常 138 例。男人占样品的 63%；平均年龄是 44.1 岁，标准偏差=12.8 岁、范围=19-25 岁。在 GA、GT、GV 或形态测量组之间没有显著性差异。

除常规血液测试之外，在肝活组织检查的时候获得血清样品，并立即进行加工。开发了九种不同的免疫测定法，来运行 Bayer BMMUNO 1™ 系统。使用本文前述的适于 Bayer Immuno 1 系统的异源 ELISA 型测定形式。根据对肝纤维化所涉及的基础机理的认识，选择全长靶分子作为基质合成或裂解的替代标记。测试中所用的抗体对其来源，与前文所述的连同本文关于使用判别函数分析来测定可辨别不同肝纤维化得分的变量的讨论中的抗体对其来源是相同的。认为无血清标记得分是不确定的。

在本地并通过一位中心病理学家(A)分析所有的活组织检查。对于 45 例受检者来说，临床详情或生物化学样品是不全的，并认为在剩余 976 例活组织检查中的 55 例对于完全组织分析是不充分的，这由于长度不足(<12mm)或门导管太少。活组织检查、血清样品以及临床详情可用于被归入最终分析构成组 G_A 的 921 例受检者。

三位肝病理学专家参加了该研究。中心病理学家(A)使用 Scheuer(27)和 Ishak(28)分期系统评价了 921 例活组织检查。除了慢性病毒或免疫肝炎修饰的情况，制定基准指令来反映纤维化的分布（例如，在酒精性和非酒精性肝脏脂肪变性中、在静脉周围和在细胞周围的纤维化取代了门以及门管周围的纤维化中）。该组表示为 G_A，它来自导出的测试组和有效组的样品组。在评价活组织检查研究之前，病理学家 A 和 B 使用反映了研究中所代表的慢性肝病范围的幻灯片的“教练”组，来开始协调它们的得分。病理学家 C 使用与 A 和 B 同样的、用于 Ishak 和 Scheuer 系统的描述信息，但没有经历“教练”而进行分期活组织检查。病理学家 A 对包括 620 个称为 G_c 的“一致组”在内的所有 921 例活组织检查进行再分期，其中“一致组”也已分别被病理学家 B 和 C 进行分期。记录个体的纤维化阶段（Scheuer 0-4 和 Ishak 0-6）。

根据该方式产生四个连续的时期组。中心病理学家中的成员称为

R_{A1} 和 R_{A2} ，病理学家 B 中的成员称为 R_B ，病理学家 C 中的成员称为 R_C 。这些时期的比较，允许对反映研究设置的"教练的"病理学家之间的观察者内部的变化 (R_{A1} 对 R_{A2})、观察者之间的变化 (R_{A1} 对 R_B) 以及在独立工作的但使用共有记分系统的肝病理学专家之间的观察者之间的变化 (R_{A1} 对 R_C ，和 R_B 对 R_C) 进行研究。这些后面的比较准确地反映关于临床实践中的处境。

(a) 分析技术

为了导出联合血清标记的算法，从经历了活组织检查的 921 例患者中随即选出 400 例(G_T)。如果引入算法可在组之间提高总的广义距离，则通过包括标记而发展了算法。也以该方式检查临床化学和血液学的试验结果。选择最佳算法，然后使用病理学家 A 指定的时期，在来自 GA (称为有效组(G_V)) 的 521 例活组织检查的剩余组中，确认该算法的性能。对该算法性能特征的分析与其辨别组织纤维化时期的能力有关，可用于鉴定能辨别具有较高组织纤维化时期至较低组织纤维化时期的病例的拐点，从而建立可反映肝纤维化的真实生物进展的二元结果。该方法避免了关于纤维化进展的线性的假设。通过测定针对病理学家 B 和 C 所指定的活组织检查时期的性能，评价了算法性能的再现性。

在用 Pico Sirius Red/Fast Green 染色 836 例适宜的活组织检查样品后，使用允许野外检查的 Kontron 图像分析仪和人机对话程序实施形态测量图像分析，来测量纤维化面积占所检测的总肝组织的百分率。在任何情况下测定全部切片的纤维化组织染色阳性的百分比，得到平均值(20A)。

应用的统计法包括方差分析(ANOVA)、判别分析和用于二元分组的活组织检查时期的逻辑回归。计算 Kappa 统计值，来测定在病理学家之间的一致性。使用 ROC 分析法，评价用于二元结果的敏感度、特异性、正预测值(PPV)、负预测值(NPV)以及发病率。使用 SPSS® 软件包(SPSS, Inc., Chicago, BL, USA)，实施所有分析。

(b) 结果。

就一切情况而论，Scheuer 分期法在病理学家之间的一致性超过 Ishak 分期法的一致性。在由病理学家 A (RA1 和 RA2) 指定的两组分期之间的一致性水平是高的 (Scheuer 的 $\kappa > 0.9$; Ishak 的 $\kappa > 0.76$)。

该研究的主要目的在于调查血清标记鉴定显著的组织纤维化的能力。测定 G_T 和 G_V 中每个标记的平均值、中值以及平均值的标准误差 (SEM)。多变量 ANOVA 表明对于所有联合使用的标记 (Hotelling's $T=0.01$, $F=1.14$, $df_1=9$, $df_2=911$, $p=0.33$) 而言, 在组之间不存在差异。相关个体的 t-检验的检查显示对于任何单个标记而言, 在组之间没有显著性差异。卡平方分析表明在各组的发病机理分析中, 不存在差异。(概率比卡平方=6.34、 $df=6$ 、 $p=0.38$) (数据未显示)。

对于每种记分系统, 在 G_T 组中评价联合血清标记的算法在活组织检查时期之间的辨别能力。

通过以变化的组合掺入透明质酸、胶原 IV、胶原 VI、层粘连蛋白、原胶原 III 的氨基末端肽 (PIIINP)、金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (TIMP-1) 以及基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的算法, 发现相似的性能特征。附加的其它血清标记、包括肝功能试验的临床化学测验结果、或包括血小板计数和前凝血酶时间的血液学指标, 不能改进算法的性能。

我们描述了在整个时期中 (Scheuer 时期 0-4, Ishak 时期 0-6), 产生活组织检查组的最大分离的算法的结果。来自所有相似组合的结果表明在每个规模中, 活组织检查时期可以被分为两部分。图 2a 显示对于 Scheuer 分期系统, 3 种标记的“最佳拟合”模型的累积分布曲线。图 2b 显示在 Ishak 系统中模型的累积分布曲线。该模型包括透明质酸、原胶原 III 氨基末端肽 (PIIINP)、金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (TIMP-1) 以及年龄的数值。以下是这些算法的公式。如下所示用于这些分析中的算法的公式:

Scheuer:

$$\text{得分} = 1 / (1 + e^{-Z})$$

$$Z = -0.132 \ln(\text{年龄}) + 0.97 \ln(\text{透明质酸}) + 0.772 \ln(\text{PIIINP}) + 0.477 \ln(\text{TIMP1}) - 8.821$$

Ishak:

$$\text{得分} = 1/(1+e^{-z})$$

同时

$$Z = -0.196 \cdot \ln(\text{年龄}) + 0.959 \cdot \ln(\text{透明质酸}) + 0.761 \cdot \ln(\text{PIIINP}) + 0.539 \cdot \ln(\text{TIMPI}) - 8.92$$

分布状况的检查表明在 Ishak 时期 3 和在 Scheuer 时期 2 的自然分区。通过对于每种系统检查各时期之间的广义距离（数据未显示），来证实自然分区，其中所述的系统可产生分别对应于 Scheuer 0-2、ishak 0-3 以及 Scheuer 3-4、Ishak 4-6 的两种“无/轻度”和“中度/重度”纤维化（参见图 4）。对于前述模型的每种系统，逻辑回归被用于拟合被二分为两部分的时期。在测试组(G_T)和有效组(G_V)中，得到患者的逻辑得分。表 10(a)显示了两组中每种二分的系统的 AUC。就 AUC 而言，两种系统都产生相同的结果。对于 G_V 组，Scheuer 的 AUC 是 0.804、SE=0.023、 $p < 0.0001$ 、95%CI=0.758 至 0.851；Ishak 的 AUC 是 0.804、SE=0.023、 $p < 0.0001$ 、95%CI=0.758 至 0.850。

关于图 1，中间的水平线是中值，凹口区域表示所估计的中值的 95% CI。末端线是按第 25% 和第 75%。虚线表示数据的“可接受范围”。十字和圆圈表示可能的“异常值”。数据图显示活组织检查的 Scheuer 时期 0-2 和 3-4 的判别得分的分布。

评价算法在特异性慢性肝病中的性能。对于 Scheuer 和 Ishak 分期系统，表 10(a)和表 10(b)中也显示了该组中三种最常见肝病的 AUC。数据代表：对于来自患有各种慢性肝病的全部患者组的 400 例测试(G_T)样品和 521 例有效(G_V)样品，以及对于患有丙型肝炎、非酒精性脂肪肝病和酒精性肝病的患者，算法在检测分为两部分的结果（Scheuer 是 0、1、2、3、4，Ishak 是 0、1、2、3、4、5、6）中的性能。显示受检者工作特性曲线下方的面积、标准误差(SE)、相关的 p 值以及 AUC 的 95% 置信区间。

表 10(a)
受检者工作特性曲线下方的面积
根据组和系统划分

组	系统	面积	SE	p	面积的 95% CI
G _T	Scheuer**	0.863	0.0212	<0.0001	0.822 至 0.905
G _V	Scheuer**	0.804	0.0235	<0.0001	0.758 至 0.851
G _T	Ishak*	0.860	0.0211	<0.0001	0.818 至 0.901
G _V	Ishak*	0.804	0.0234	<0.0001	0.758 至 0.850

表 10(b)

亚组中的性能					
组	系统	面积	SE	p	面积的 95% CI
丙型肝炎 G _V	Scheuer**	0.773	0.0386	<0.0001	0.697 至 0.848
丙型肝炎 G _V	Ishak*	0.842	0.0391	<0.0001	0.765 至 0.919
NAFLD G _V	Scheuer**	0.870	0.1040	0.0002	0.666 至 1.000
NAFLD G _V	Ishak*	0.931	0.0373	<0.0001	0.858 至 1.000
酒精性 G _V	Scheuer**	0.944	0.0555	<0.0001	0.836 至 1.000
酒精性 G _V	Ishak*	0.923	0.0671	<0.0001	0.792 至 1.000

*分为两部分的(0,1,2,3):(4,5,6)

**分为两部分的(0,1,2):(3,4)

使用 Scheuer 分期系统, 对于丙肝: AUC=0.773, SE=0.0386, p<0.0001, 95%CI=0.697 至 0.848; 对于 NAFLD: AUC=0.870, SE=0.104, p<0.0002, 95%CI=0.666 至 1.000; 对于酒精性肝病(ALD): AUC=0.944, SE=0.0555, p<0.0001, 95%CI=0.836 至 1.000.

表 11a 和表 11b 显示有效(Gv)曲线在 Ishak(11a)和 Scheuer(11b)系统的不同得分阈值处的特异性坐标。

表 11(a)
在 Gv 中 ROC 曲线的特异性坐标

Ishak 记分系统 - 算法: 病理学家 A				
得分	敏感度	特异性	正预测力	负预测力
0.066	95%	25%	31%	93%
0.102	90%	41%	35%	92%
0.130	85%	52%	39%	91%
0.178	80%	66%	46%	90%
0.241	69%	80%	56%	88%
0.285	63%	85%	60%	86%
0.364	53%	90%	66%	84%
0.468	44%	95%	76%	83%
0.820	19%	99%	90%	77%
相对于病理学家 B 和 C, 算法的性能				
0.102 ^B	87.9%	42.8%	37.2%	90.2%
0.102 ^C	89.3%	42.2%	34.2%	92.2%

表 11(b)
在 Gv 中 ROC 曲线的特异性坐标

Scheuer 记分系统 - 算法: 病理学家 A				
得分	敏感度	特异性	正预测力	负预测力
0.063	95%	24%	31%	93%
0.102	90%	41%	35%	92%
0.130	85%	53%	40%	91%
0.179	80%	67%	46%	90%
0.238	69%	80%	55%	88%
0.273	64%	85%	60%	87%
0.358	54%	90%	65%	84%
0.457	47%	95%	75%	83%
0.507	44%	96%	80%	83%
0.826	19%	99%	90%	77%
相对于病理学家 B 和 C, 算法的性能				
0.102 ^B	86.7%	51.2%	40.7%	90.9%
0.102 ^C	86.5%	49.5%	36.2%	91.7%

表中显示了对于 Gv 组, ROC 曲线的特异性坐标。对于算法阈值得分范围, 计算了敏感度、特异性、正预测值以及负预测值。另外, 使用 0.102 的算法阈值得分, 显示出算法与由病理学家 B 和 C 指定的分期相比的性能特征, 其中在由病理学家 A 指定的系列时期中, 在检测

显著性纤维化中得分给出了 90%的敏感度。显示出的数据用于与 Ishak 分期法(12a)和 Scheuer 分期法(12b)比较。

除敏感度和特异性之外，显示出正和负的预测值。在得到 NPV=92%的算法阈值得分 0.102 时，检测 Scheuer 时期 3 或时期 4 纤维化的敏感度是 90%。在得到 PPV=90%的阈值得分 0.82 时，特异性是 99%。在阈值 0.102 时，Ishak 时期 4-6 的对应值是 90%和 92%。

通过与由其他两位病理学家使用阈值得分 0.102 而指定的活组织检查时期相比，评价了算法的性能。在可分别得到 NPV=92%和 91.7%的算法阈值得分 0.102 时，B 和 C 检测 Scheuer 时期 3 或时期 4 纤维化的敏感度分别是 86.7%和 86.5%。使用阈值算法得分 0.102，B 在 Ishak 时期 4-6 的对应值是敏感度=87.9%、NPV=90.2%，C 的对应值是敏感度=89.3%、NPV=92.2%。

在表 12a 和表 12b 中显示了在三种最普遍的慢性肝病中算法的性能结果，其中被病理学家 A 分期的 G_v 组的三种肝病是慢性丙型肝炎 (CHC)、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和酒精性肝病 (ALD)。这些表显示了算法得分阈值获得超过 90%的结果时的 ROC 坐标、敏感度、特异性以及负和正预测值。

表 12a
Gv 患者中的敏感度和特异性

Scheuer 分期法					
疾病	得分	敏感度	特异性	PPV	NPV
丙型 肝炎	0.063	95%	29%	27.7%	94.9%
	0.067	90%	31%	27.5%	92.3%
	0.090	85%	43%	29.9%	91.1%
	0.126	80%	58%	35.2%	91.0%
	0.190	63%	80%	47.9%	88.5%
	0.219	52%	85%	50.0%	86.2%
	0.268	47%	90%	57.8%	85.6%
	0.426	38%	95%	70.0%	84.3%
	0.564	30%	99%	89.5%	83.3%
NAFLD	0.375	89%	96%	80%	98%
	0.462	78%	98%	87%	96%
ALD	0.087	100.0%	16.7%	75.0%	100.0%
	0.431	93.3%	100.0%	100.0%	85.7%

表 12b

Ishak 分期法					
疾病	得分	敏感度	特异性	PPV	NPV
丙型 肝炎	0.065	100%	28%	19.2%	100.0%
	0.067	95%	29%	18.5%	96.8%
	0.076	91%	33%	19.0%	95.9%
	0.130	86%	56%	25.2%	96.0%
	0.177	80%	72%	32.9%	95.6%
	0.196	77%	80%	40.0%	95.5%
	0.230	69%	85%	44.6%	94.2%
	0.286	61%	90%	51.2%	93.1%
	0.418	50%	95%	62.1%	91.7%
	0.710	30%	99%	84.6%	89.3%
NAFLD	0.381	100%	88%	40%	100%
	0.462	75%	90%	37%	98%
	0.855	25%	98%	49%	94%
ALD	0.092	100.0%	12.5%	83.8%	100.0%
	0.447	92.3%	87.5%	97.1%	71.5%
	0.621	84.6%	100.0%	100.0%	59.0%

表中显示对于 G_v 组, ROC 曲线的特异性坐标。对于算法得分范围, 计算了敏感度、特异性、正预测值以及负预测值。显示出的数据用于比较 Scheuer 分期法(12a)和 Ishak 分期法(12b)。在任何情况下,

表(a)是指 Scheuer 分期法, 并且(b)是指 Ishak 分期法。在阈值为 0.065 时, Ishak 纤维化时期 4-6 的敏感度=100%, 负预测值=100%。

与 Scheuer 系统相比, 使用算法 0.375 的得分阈值时, NAFLD 的纤维化时期 3 或 4 的敏感度=89%、特异性=96%、PPV=80%以及 NPV=98%。在酒精性肝病中, 使用 0.087 的阈值得分时, 检测 Scheuer 纤维化时期 3 或 4 的敏感度=100%和 NPV=100%, 而 0.431 的阈值得到敏感度=93.3%, 特异性=100%, PPV=100%以及 NPV=85.7%。

按照惯例, 临床医师和病理学家将三类别的肝纤维化区分为“轻度”、“中度”以及“重度”纤维化, 其对应于 Scheuer 时期 0,1、2,3 和 4。经常认为从轻度纤维化到中度纤维化的转变是疾病进展中显著的进程, 这可反映对预后具有重要性的里程碑并影响病人管理的决策。因此, 使用在 Scheuer 时期 0,1 和 2,3,4 之间的二分点而不是根据在时期 0,1,2 和 3,4 之间的算法判别得分分布的分支点, 来分析数据。

结果显示可比较的性能水平。在以下表 13 中, 显示了对于 Scheuer 时期 0,1:2,3,4(A)和 0,1,2:3,4(B)之间的分支点, 所产生的检测中度/重度纤维化的 90%敏感度的结果。也分析了数据, 用于检测具有 90%敏感度(C)的时期 4 纤维化(肝硬化)的能力。

表 13

Scheuer 得分	AUC	SE	P	面积的 95%CI	DST	敏感度	特异性
A=0,1对2,3,4	0.782	0.0213	<0.0001	0.740至0.823	-0.864	90.3%	29.6%
B=0,1,2对3,4	0.804	0.0236	<0.0001	0.757至0.850	-0.671	90.5%	37.5%
C=0,1,2,3对4	0.887	0.0256	<0.0001	0.837至0.937	0.025	90.7%	69.2%

表 13 中的数据代表: 对于来自患有各种慢性肝病的全部患者组的 400 例测试(GT)样品和 521 例有效(GV)样品, 算法在检测分为两部分的结果(对于 Scheuer 系统, A=0,1:2-4; B=0,1,2:3,4 以及 C=0,1,2,3:4)中的性能。所显示的结果包括受检者工作特性曲线(AUC)以下的面积、相关的标准误差以及具有 95%置信区间的 p 值。显示了纤维化的检测敏感度和特异性的特异性判别得分阈值(DST)。“A”表示通常用

于从中度和重度肝纤维化中辨别轻度纤维化的分支点。“B”是来自对组中得分分布的分析的、表示在轻度纤维化和中度纤维化之间的区别而暗示的分支点。“C”表示在重度纤维化/肝硬化和轻度/中度纤维化之间的区别。

(d)结论。

对 ELF 研究的分析证实，组合的肝纤维化血清标记的本发明实施方案可用于在患有慢性肝病范围的患者中以 90%敏感度来鉴定显著的肝纤维化。当与三位不同病理学家的记分法相比时，本发明提供了相似水平的敏感度，表明它以相似的准确度被用于在不同的设置中。

通过评价病理学专家之间的一致性、图像分析的一致性、纤维化单个标记的性能以及本发明在诊断慢性肝病范围（包括我们临床实践中三种最常见的疾病）中的性能，已经确认本发明的实施方案。

患者测试组包括遭受各种各样的慢性肝病的患者。本发明实施方案在评价这些组中的性能，表明它可用于在各种肝病中鉴定患有严重程度纤维化的患者。在敏感度和特异性中的变化连同在算法阈值得分中的变化显示：根据所用的测试阈值，本发明以高度准确性被用于检测显著肝纤维化的存在或不存在。

此外，即时结果表明本发明在患有渐进性慢性肝病的患者中预防纤维化中，可用于监测定向的治疗性干涉。关于肝纤维化是可逆过程的认识在抗纤维化治疗的研究中带来相当大的兴趣。对抗纤维化药物的评价，取决于可允许研究者来测定药物功效的诊断性试验的用途。重复地和频繁地使用肝活组织检查既不符合伦理又是不切合实际的；在分析中，活组织检查也易受抽样误差和变化性的影响。本发明提供了更加实际的和可行的选择，来评价在组织时期的变化，其中所述的变化作为用于评价新的抗纤维化治疗的测量结果。

另外，我们已经显示了本发明的实施方案用于监测疾病进展或对于生活方式改变的应答，例如在丙型肝炎或酒精性肝病中减少饮用量，以及在 NAFLD 和丙型肝炎中体重减轻都是有用的。

上述结果显示本发明的实施方案特别适于诊断丙型肝炎、NAFLD 和酒精性肝病（即，在临床肝脏病学实践中遇到的三种最常见的病例）的状况和进展。在这些病例的每一种之中，通过选择合适的测验阈值

可获得超过 90% 的 PPV 或 NPV, 这表明本发明在患有这些病症的患者中确定或排除显著纤维化的存在的临床实践中, 具有重大的用途。

在丙型肝炎中, 对于组合了容易可用的生物化学和血液学测验的标记, 最新的研究已经报导了相似的性能水平。 *Font* 等, *Hepatology* 2002;36:986-992; *Wai* 等, *Hepatology* 38, 518-526. 2003。 这些研究提出了关于其中纤维化变得显著的位点的假设, 并使用二元变量逻辑回归来导出算法, 而不是在纤维化中从测试组中的数据分析来导出阶跃点。

在诊断丙型肝炎的状况或进展中, 本发明可用于测定抗病毒治疗的可能益处和时机。 我们的分析表明在患有非酒精性脂肪肝病的患者中, 本发明可用于从具有相对良性的脂肪变性而没有显著纤维化的多数人中辨别处于显著纤维化危险中的少数患者(32A)。

在患有酒精性肝病的患者中, 我们的结果表明以最高水平实施本发明实施方案, 可获得 100% 的敏感度和特异性。

这些数据表明: 本发明的实施方案既可用于鉴定处于显著纤维化危险中的那些患者, 又可用于鉴定很少患有肝纤维化但患有酒精性肝病的大多数患者。

引用文献:

1. Friedman SL
The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanism and treatment strategies.
N Engl J Med 1993; 328: 1828-1835
2. Friedman SL
Molecular mechanism of hepatic fibrosis and principle of therapy
J Gastroenterol 1997; 32: 424-430
3. Hayasaka A, Saisho H
Serum markers as tools to monitor liver fibrosis
Digestion 1998; 59: 381-384

4. Schuppan D, Stolzel U, Oesterling C, Somasundaram R
Serum assays for liver fibrosis.
J Hepatol 1995; 22 (Suppl 2): 82-88
5. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H
Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis C:
A comparative analysis.
J Hepatol 1995; 23: 145-152
6. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DGD, Petrik J, Alexander GJM
Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C
virus infection
J Viral Hepatitis 1998; 5: 187-192
7. Poynard T, Aubert A, Bedossa P, Abella A, Naveau S, Paraf F, Chaput JC
A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers
Gastroenterology 1991; 100: 1397-1402
8. Naveau S, Poynard T, Benattat C, Bedossa P, Chaput JC
Alpha-2 macroglobulin and hepatic fibrosis:diagnostic interest
Dig Dis Sci 1994; 11: 2426-2432
9. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y,
Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P
Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis
Gastroenterology 1997; 113: 1609-1616
10. Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Catterall AP, Murray-Lyon IM,
Peters TJ, Williams R, Thompson RPH
The Lancet 1993; 342: 895-898
11. *Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T,
Lancet* 2001; 357: 1069-75.

涉及 ELF 研究的引用文献:

- 1A. Desmet V, Fevery J. Liver biopsy. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995;9:811-828.
- 2A. Scheuer PJ. Chronic hepatitis: what is activity and how should it be assessed? *Histopathology* 1997;30:103-105.
- 3A. Pasha T, Gabriel S, Therneau T, Dickson ER, Lindor KD. Cost-effectiveness of ultrasound-guided liver biopsy. *Hepatology* 1998;27:1220-1226.
- 4A. Gilmore IT, Burroughs A, Murray-Lyon IM, Williams R, Jenkins D, Hopkins A. Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London. *Gut* 1995;36:437-441.
- 5A. McGill DB, Rakela J, Zinsmeister AR, Ott BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology* 1990;99:1396-1400.
- 6A. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system*. 10 ed. London: Blackwell Scientific, 1997.
- 7A. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2614-2618.
- 8A. Theodossi A, Skene AM, Portmann B, Knill-Jones RP, Patrick RS, Tate RA, Kealey W, Jarvis KJ, O'Brian DJ, Williams R. Observer variation in assessment of liver biopsies including analysis by kappa statistics. *Gastroenterology* 1980;79:232-241.
- 9A. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. *Liver biopsy interpretation*. 6 ed. London: W.B.Saunders, 2002.

- 10A. Yamauchi M, Mizuhara Y, Maezawa Y, Toda G. Serum tenascin levels in chronic liver disease. *Liver* 1994;14:148-153.
- 11A. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2000;15:945-951.
- 12A. Hayasaka A, Schuppan D, Ohnishi K, Okuda K, Hahn EG. Serum concentrations of the carboxyterminal cross-linking domain of procollagen type IV (NC1) and the aminoterminal propeptide of procollagen type III (PIIP) in chronic liver disease. *J Hepatol* 1990;10:17-22.
- 13A. Schuppan D, Cantaluppi MC, Becker J, Veit A, Bunte T, Troyer D, Schuppan F, Schmid M, Ackermann R, Hahn EG. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem* 1990;265:8823-8832.
- 14A. Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Kawasaki H. Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: relationship to liver histology. *Hepatology* 1994;20:780-787.
- 15A. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997;26:574-583.
- 16A. Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;31:474-481.
- 17A. Trinchet JC. Clinical use of serum markers of fibrosis in chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:89-95.

- 18A. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
- 19A. Castera L, Hartmann DJ, Chapel F, Guettier C, Mall F, Lons T, Richardet JP, Grimbert S, Morassi O, Beaugrand M, Trinchet JC. Serum laminin and type IV collagen are accurate markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000;32:412-418.
- 20A. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology* 1998;28:439-446.
- 21A. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996;42:558-563.
- 22A. Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Nishimura Y, Kawasaki H. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:459-465.
- 23A. Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, Bendtsen F. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32:911-920.
- 24A. Nojgaard C, Johansen JS, Krarup HB, Holten-Andersen M, Moller A, Bendtsen F, Danish Viral Hepatitis Study Group. Effect of antiviral therapy on markers of fibrogenesis in patients with chronic hepatitis C. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2003;38:659-665.
- 25A. Patel K, Lajoie A, Heaton S, Pianko S, Behling CA, Bylund D, Pockros PJ, Blatt LM, Conrad A, McHutchison JG. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003;18:253-257.

- 26A. Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, Thibault V, Bochet M, Charlotte F, Ratziu V, Bricaire F, Katlama C, Poynard T. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. *AIDS* 2003;17:721-725.
- 27A. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.
- 28A. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
- 29A. Bedossa P, Poynard T, Naveau S, Martin ED, Agostini H, Chaput JC. Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1988;12:173-178.
- 30A. Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1525-1528.
- 31A. Rosenberg WM. Rating fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology* 2003;38:357-360.
- 32A. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995;22:1714-1719.
- 33A. Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000;46:183-192.
- 34A. Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C, Barjoan EM, Demuth N, Longo F, Rampal P. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:989-993.

- 35A. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J, David V, Brissot P, Adams P, Deugnier Y. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;115:929-936.
- 36A. Beaton M, Guyader D, Deugnier Y, Moirand R, Chakrabarti S, Adams P. Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology* 2002;36:673-678.

引用出版物：多核苷酸和杂交瘤的研制方法：

- (1) Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2d ed., (1989)
- (2) Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1989).
- (3) Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, (1989)
- (4) Grant et al., *Methods Enzymol.* 153, 516-544, (1987)
- (5) Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, (1987)
- (6) Coruzzi et al., *EMBO J.* 3, 1671-1680, (1984)
- (7) Broglie et al., *Science* 224, 838-843, (1984)
- (8) Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, (1991)
- (9) *MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, (1992)
- (10) Engelhard et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, (1994)
- (11) Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, (1984)
- (12) Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, (1994)
- (13) Freshney R.I., ed., *ANIMAL CELL CULTURE*, (1986)
- (14) Wigler et al., *Cell* 11, 223-232, (1977)
- (15) Lowy et al., *Cell* 22, 817-823, (1980)
- (16) Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-3570, (1980)
- (17) Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150, 114, (1981)
- (18) Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-8051, (1988)
- (19) Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, (1995)
- (20) Hampton et al., *SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL*, APS Press, St. Paul, Minn., (1990)
- (21) Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, (1983)

-
- (22) Porath et al., *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, (1992)
 - (23) Kroll et al., *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, (1993)
 - (24) Caruthers et al., *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, (1980)
 - (25) Horn et al. *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, (1980)
 - (26) Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, (1963)
 - (27) Roberge et al., *Science* 269, 202-204, (1995)
 - (28) Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH and Co., New York, N.Y., (1983)

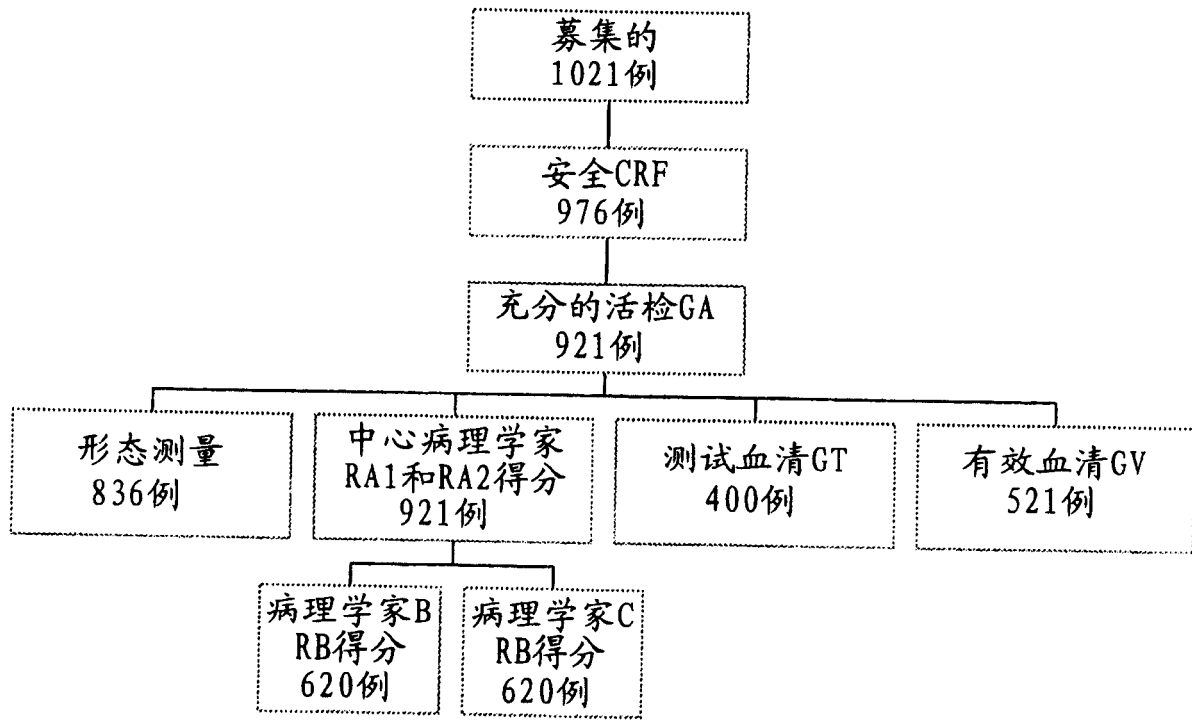


图 1

Scheuer等级分的累积分布

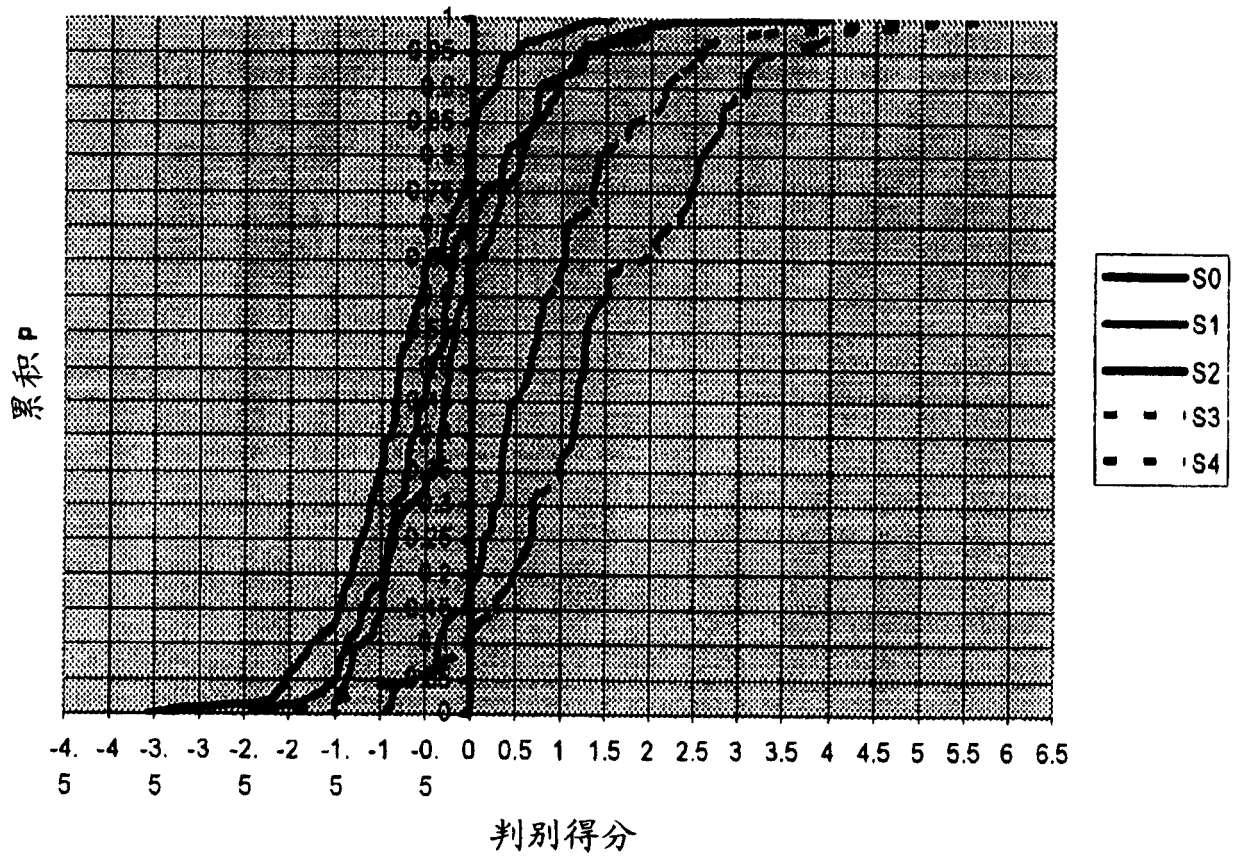


图 2a

Ishak等级分的累积分布

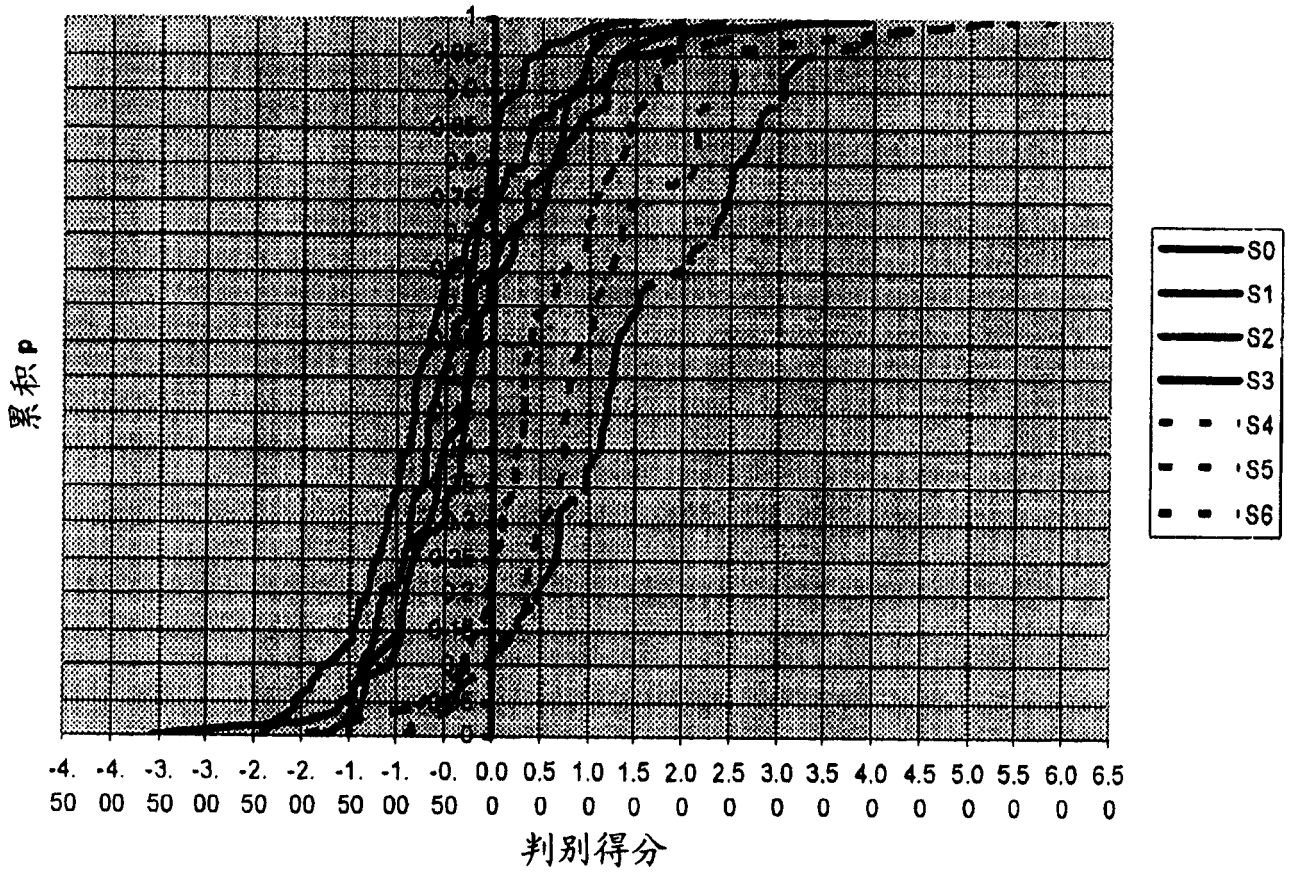


图 2b

受检者工作特性曲线
Scheuer改进的记分系统
有效数据

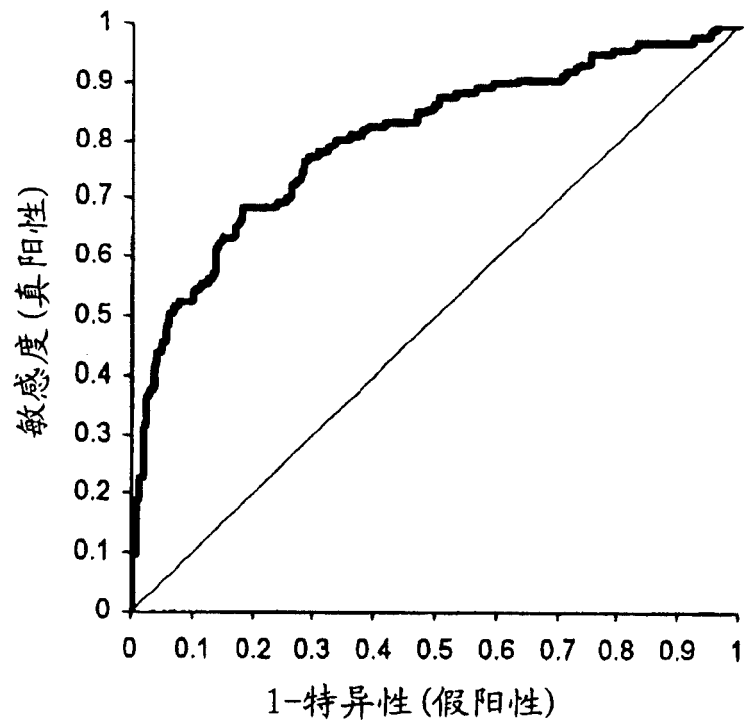


图 3a

受检者工作特性曲线
Scheuer改进的记分系统
有效数据

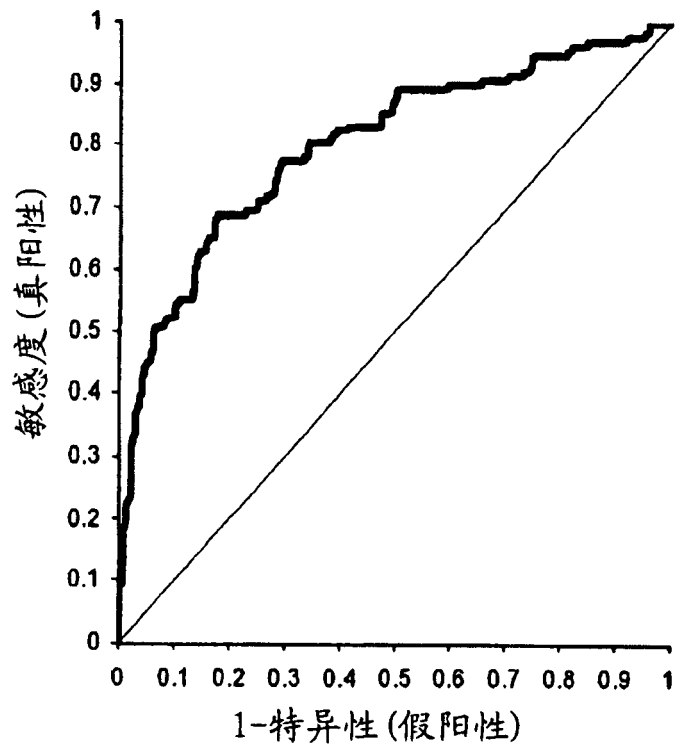


图 3b

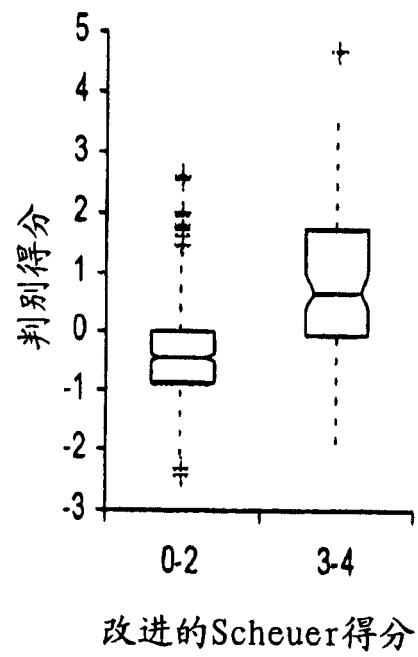


图 4 有效数据组 (G_V) 的盒状和触须状曲线图, 显示Scheuer纤维值得分与判别得分

图5 (SEQ ID NO: 1)

参考|NM_003254.1|人金属蛋白酶1的组织抑制剂(红细胞强化活性, 胶原酶抑制剂)(TIMP1), mRNA

AGGGGCCTTAGCGTGCCGCATCGCCGAGATCCAGCGCCCAGAGAGACACCAG
AGAACCCACCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTGGCTTCTGGCATCCTGTTGTTGC
TGTGGCTGATAGCCCCAGCAGGGCCTGCACCTGTGTCCCACCCCACCCACA
GACGGCCTTCTGCAATTCCGACCTCGTCATCAGGGCCAAGTTCGTGGGGACAC
CAGAAGTCAACCAGACCACCTTATACCAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAA
GATGTATAAAGGGTTCCAAGCCTTAGGGGATGCCGCTGACATCCGGTTCGTCT
ACACCCCCGCCATGGAGAGTGTCTGCGGATACTTCCACAGGTCCCACAACCG
CAGCGAGGAGTTTCTCATTGCTGGAAAACCTGCAGGATGGACTCTTGACATC
ACTACCTGCAGTTTTCGTGGCTCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGCCG
GGGCTTCACCAAGACCTACACTGTTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTTCCCT
GTTTATCCATCCCCTGCAAACCTGCAGAGTGGCACTCATTGCTTGTGGACGGAC
CAGCTCCTCCAAGGCTCTGAAAAGGGCTTCCAGTCCCGTCACCTTGCCTGCCT
GCCTCGGGAGCCAGGGCTGTGCACCTGGCAGTCCCTGCGGTCCCAGATAGCC
TGAATCCTGCCCGGAGTGGAACCTGAAGCCTGCACAGTGTCCACCCTGTTCCCA
CTCCCATCTTTCTTCCGGACAATGAAATAAAGAG TTACCACCCAGC

图6(第1页)(SEQ ID NO: 2)

参考|NM_004530.1|人基质金属蛋白酶2(明胶酶A, 72kDa
明胶酶, 72kDa IV型胶原酶)(MMP2), mRNA

TGTTCCGCTGCATCCAGACTTCCTCAGGCGGTGGCTGGAGGCTGCGCATCTG
GGGCTTTAAACATACAAAGGGATTGCCAGGACCTGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GCGGGGGCTGGGGCGCGGGGGCCGGACCATGAGCCGCTGAGCCGGGCAAAC
CCCAGGCCACCGAGCCAGCGGACCCTCGGAGCGCAGCCCTGCGCCGCGGACC
AGGCTCCAACCAGGCGGCGAGGCGGCCACACGCACCGAGCCAGCGACCCCC
GGGCGACGCGCGGGGCCAGGGAGCGCTACGATGGAGGCGCTAATGGCCCGG
GGCGCGCTCACGGGTCCCCTGAGGGCGCTCTGTCTCCTGGGCTGCCTGCTGAG
CCACGCCGCCGCCGCGCCGTCGCCATCATCAAGTTCCCCGGCGATGTCGCCC
CCAAAACGGACAAAGAGTTGGCAGTGCAATACCTGAACACCTTCTATGGCTG
CCCCAAGGAGAGCTGCAACCTGTTTGTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGATG
CAGAAGTTCTTTGGACTGCCCCAGACAGGTGATCTTGACCAGAATACCATCG
AGACCATGCGGAAGCCACGCTGCGGCAACCCAGATGTGGCCAACTACAACCT
CTTCCCTCGCAAGCCCAAGTGGGACAAGAACCAGATCACATACAGGATCATT
GGCTACACACCTGATCTGGACCCAGAGACAGTGGATGATGCCTTTGCTCGTGC
CTTCCAAGTCTGGAGCGATGTGACCCCACTGCGGTTTTCTCGAATCCATGATG
GAGAGGCAGACATCATGATCAACTTTGGCCGCTGGGAGCATGGCGATGGATA
CCCCTTTGACGGTAAGGACGGACTCCTGGCTCATGCCTTCGCCCCAGGCACTG
GTGTTGGGGGAGACTCCCATTTTGTATGACGATGAGCTATGGACCTTGGGAGA
AGGCCAAGTGGTCCGTGTGAAGTATGGCAACGCCGATGGGGAGTACTGCAAG
TTCCCTTCTTGTTCATGGCAAGGAGTACAACAGCTGCACTGATACTGGCCG
CAGCGATGGCTTCCTCTGGTGTCCACCACCTACAACCTTTGAGAAGGATGGCA
AGTACGGCTTCTGTCCCATGAAGCCCTGTTCACCATGGGCGGCAACGCTGAA
GGACAGCCCTGCAAGTTTCCATTCCGCTTCCAGGGCACATCCTATGACAGCTG
CACCCTGAGGGCCGCACGGATGGCTACCGCTGGTGGCGCACCACTGAGGAC
TACGACC GCGACAAGAAGTATGGCTTCTGCCCTGAGACCGCCATGTCCACTGT
TGGTGGGA ACTCAGAAGGTGCCCCCTGTGTCTTCCCCTTCACTTTCCTGGGCA
ACAAATATGAGAGCTGCACCAGCGCCGGCCGAGTGACGGAAAGATGTGGTG
TGCGACCACAGCCAACTACGATGACGACCGCAAGTGGGGCTTCTGCCCTGAC
CAAGGGTACAGCCTGTTCCCTCGTGGCAGCCCACGAGTTTGGCCACGCCATGG
GGCTGGAGCACTCCCAAGACCCTGGGGCCCTGATGGCACCCATTTACACCTA
CACCAAGA ACTTCCGTCTGTCCAGGATGACATCAAGGGCATT CAGGAGCTC
TATGGGGCCTCTCCTGACATTGACCTTGGCACCGGCCCCACCCCACTGGG
CCCTGTC ACTCCTGAGATCTGCAAACAGGACATTGTATTTGATGGCATCGCTC
AGATCCGTGGTGAGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGTTTCATTT

图6(第2页)(SEQ ID NO: 2)(续)

参考|NM_004530.1|人基质金属蛋白酶2(明胶酶A, 72kDa
明胶酶, 72kDa IV型胶原酶)(MMP2), mRNA(续)

GGCGACTGTGACGCCACGTGACAAGCCCATGGGGCCCCTGCTGGTGGCCAC
ATTCTGGCCTGAGCTCCCGGAAAAGATTGATGCGGTATACGAGGCCCCACAG
GAGGAGAAGGCTGTGTTCTTTGCAGGGAATGAATACTGGATCTACTCAGCCA
GCACCCTGGAGCGAGGGTACCCCAAGCCACTGACCAGCCTGGGACTGCCCC
TGATGTCCAGCGAGTGGATGCCGCCTTTAACTGGAGCAAAAACAAGAAGACA
TACATCTTTGCTGGAGACAAATTCTGGAGATACAATGAGGTGAAGAAGAAAA
TGGATCCTGGCTTTCCCAAGCTCATCGCAGATGCCTGGAATGCCATCCCCGAT
AACCTGGATGCCGTCGTGGACCTGCAGGGCGGCGGTCACAGCTACTTCTTCA
AGGGTGCCTATTACCTGAAGCTGGAGAACCAAAGTCTGAAGAGCGTGAAGTT
TGGAAGCATCAAATCCGACTGGCTAGGCTGCTGAGCTGGCCCTGGCTCCCAC
AGGCCCTTCCCTCTCCACTGCCTTCGATACACCGGGCCTGGAGA ACTAGAGAA
GGACCCGGAGGGGCCTGGCAGCCGTGCCTTCAGCTCTACAGCTAATCAGCAT
TCTCACTCCTACCTGGTAATTTAAGATTCCAGAGAGTGGCTCCTCCCGGTGCC
CAAGAATAGATGCTGACTGTACTCCTCCAGGCGCCCCTTCCCCCTCCAATCC
CACCAACCCTCAGAGCCACCCCTAAAGAGATCCTTTGATATTTTCAACGCAGC
CCTGCTTTGGGCTGCCCTGGTGTGCTGCCACACTTCAGGCTCTTCTCCTTTCACAA
CCTTCTGTGGCTCACAGAACCCTTGGAGCCAATGGAGACTGTCTCAAGAGGG
CACTGGTGGCCCGACAGCCTGGCACAGGGCAGTGGGACAGGGCATGGCCAG
GTGGCCACTCCAGACCCCTGGCTTTTCACTGCTGGCTGCCTTAGAACCTTTCTT
ACATTAGCAGTTTGCTTTGTATGCACTTTGTTTTTTCTTTGGGTCTTGTTTTT
TTTTCCACTTAGAAATTGCATTTCTGACAGAAGGACTCAGGTTGTCTGAAGT
CACTGCACAGTGCATCTCAGCCACATAGTGATGGTTCCCTGTTCACTCTAC
TTAGCATGTCCCTACCGAGTCTCTTCTCCACTGGATGGAGGAAAACCAAGCCG
TGGCTTCCCGCTCAGCCCTCCCTGCCCTCCC
TTCAACCATTCCCCATGGGAAATGTCAACAAGTATGAATAAAGACACCTACT
GAGTGCC

图7(第1页) (SEQ ID NO: 3)

参考|NM_004994.1|人基质金属蛋白酶9(明胶酶B, 92kDa
明胶酶, 92kDa IV型胶原酶) (MMP9), mRNA

AGACACCTCTGCCCTCACCATGAGCCTCTGGCAGCCCCTGGTCCTGGTGCTCC
TGGTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTGCCCCAGACAGCGCCAGTCCACCCTTGTG
CTCTTCCCTGGAGACCTGAGAACCAATCTCACCGACAGGCAGCTGGCAGAGG
AATACCTGTACCGCTATGGTTACACTCGGGTGGCAGAGATGCGTGGAGAGTC
GAAATCTCTGGGGCCTGCGCTGCTGCTTCTCCAGAAGCAACTGTCCCTGCCCCG
AGACCGGTGAGCTGGATAGCGCCACGCTGAAGGCCATGCGAACCCCACGGTG
CGGGTCCCAGACCTGGGCAGATTCCAAACCTTTGAGGGCGACCTCAAGTGG
CACCACCACAACATCACCTATTGGATCCAAACTACTCGGAAGACTTGCCGC
GGGCGGTGATTGACGACGCCTTTGCCCGCGCCTTCGCACTGTGGAGCGCGGT
GACGCCGCTCACCTTCACTCGCGTGTACAGCCGGGACGCAGACATCGTCATC
CAGTTTGGTGTGCGGGAGCACGGAGACGGGTATCCCTTCGACGGGAAGGACG
GGCTCCTGGCACACGCCTTTCCTCCTGGCCCCGGCATTACAGGGAGACGCCAT
TTCGACGATGACGAGTTGTGGTCCCTGGGCAAGGGCGTCGTGGTTCCAACCTCG
GTTTGGAAACGCAGATGGCGCGGCCTGCCACTTCCCCTTCATCTTCGAGGGCC
GCTCCTACTCTGCCTGCACCACCGACGGTCGCTCCGACGGCTTGCCCTGGTGC
AGTACCACGGCCAACTACGACACCGACGACCGGTTTGGCTTCTGCCCCAGCG
AGAGACTCTACACCCGGGACGGCAATGCTGATGGGAAACCCTGCCAGTTTCC
ATTCATCTTCCAAGGCCAATCCTACTCCGCCTGCACCACGGACGGTCGCTCCG
ACGGCTACCGCTGGTGCGCCACCACCGCCAACTACGACCGGGACAAGCTCTT
CGGCTTCTGCCCCACCCGAGCTGACTCGACGGTGATGGGGGGCAACTCGGCG
GGGGAGCTGTGCGTCTTCCCCTTCACTTTCCTGGGTAAGGAGTACTCGACCTG
TACCAGCGAGGGCCGCGGAGATGGGCGCCTCTGGTGCCTACCACCTCGAAC
TTTGACAGCGACAAGAAGTGGGGCTTCTGCCCGGACCAAGGATACAGTTTGT
TCCTCGTGGCGGCGCATGAGTTCGGCCACGCGCTGGGCTTAGATCATTCTCA
GTGCCGGAGGCGCTCATGTACCCTATGTACCGCTTCACTGAGGGGCCCCCTT
GCATAAGGACGACGTGAATGGCATCCGGCACCTCTATGGTCCTCGCCCTGAA
CCTGAGCCACGGCCTCCAACCACCACCACCCGACGCCACGGCTCCCCCGA
CGGTCTGCCCCACCGGACCCCCACTGTCCACCCCTCAGAGCGCCCCACAGCT
GGCCCCACAGGTCCCCCTCAGCTGGCCCCACAGGTCCCCCACTGCTGGCCC
TTCTACGGCCACTACTGTGCCTTTGAGTCCGGTGGACGATGCCTGCAACGTGA
ACATCTTCGACGCCATCGCGGAGATTGGGAACCAGCTGTATTTGTTCAAGGAT
GGGAAGTACTGGCGATTCTCTGAGGGCAGGGGGAGCCGGCCGCAGGGCCCCCT
TCCTTATCGCCGACAAGTGGCCCCGCGCTGCCCCGCAAGCTGGACTCGGTCTTT
GAGGAGCCGCTCTCCAAGAAGCTTTTCTTCTTCTCTGGGCGCCA

图7(第2页)(SEQ ID NO: 3)(续)

参考|NM_004994.1|人基质金属蛋白酶9(明胶酶B, 92kDa
明胶酶, 92kDa IV型胶原酶)(MMP9), mRNA(续)

GGTGTGGGTGTACACAGGCGCGTCGGTGCTGGGCCCGAGGCGTCTGGACAAG
CTGGGCCTGGGAGCCGACGTGGCCCAGGTGACCGGGGCCCTCCGGAGTGGCA
GGGGGAAGATGCTGCTGTTTCAGCGGGCGGCGCCTCTGGAGGTTTCGACGTGAA
GGCGCAGATGGTGGATCCCCGGAGCGCCAGCGAGGTGGACCGGATGTTCCCC
GGGGTGCCTTTGGACACGCACGACGTCTTCCAGTACCGAGAGAAAGCCTATT
TCTGCCAGGACCGCTTCTACTGGCGCGTGAGTTCCCGGAGTGAGTTGAACCAG
GTGGACCAAGTGGGCTACGTGACCTATGACATCCTGCAGTGCCCTGAGGACT
AGGGCTCCCGTCCTGCTTTGCAGTGCCATGTAAATCCCCACTGGGACCAACCC
TGGGGAAGGAGCCAGTTTGCCGGATAAACTGGTATTCTGTTCTGGAGGAA
AGGGAGGAGTGGAGGTGGGCTGGGCCCTCTCTTCTCACCTTTGTTTTTTGTTG
GAGTGTTTCTAATAAACTTGGATTCTCTAACCTTT

专利名称(译)	与肝病相关的方法和系统		
公开(公告)号	CN1968601A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200580019516.X	申请日	2005-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
[标]发明人	M福尔克 M贝卡 W克罗尔 A克诺尔 S昂格尔 M格尔曼 G亨尼希 E R伯查特 MJ阿图尔 AD伯特 M平扎尼 D舒潘 RP蒂尔 C佩特里 W罗森伯格		
发明人	M·福尔克 M·贝卡 W·克罗尔 A·克诺尔 S·昂格尔 M·格尔曼 G·亨尼希 E· - R·伯查特 M·J·阿图尔 A·D·伯特 M·平扎尼 D·舒潘 R·P·蒂尔 C·佩特里 W·罗森伯格		
IPC分类号	A01N1/02 A61K31/765 C12M1/00 G01N31/00 G01N33/53 G01N35/00 G06F19/24		
CPC分类号	G01N33/6893 G06F19/345 G01N2800/085 G06F19/24 C12Q1/6883 G16B40/00 G16H50/20 Y02A90/26		
代理人(译)	梁谋		
优先权	10/868437 2004-06-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明提供使用包含了血清和血浆标记值的多个血液标记值的诊断方法、试剂盒、系统以及相关的计算机可读介质，来辅助诊断患者中肝病的状况或进展。本发明也提供使用包含了血清和血浆标记值的血液标记值的方法和系统以及相关的计算机可读介质：(1)来筛选用于肝病治疗的活性成分；(2)来辅助选择用于易感染或患有肝病的患者的治疗方法；以及(3)来辅助设计用于在一个或多个患者中监测肝病的状况或进展的临床程序。

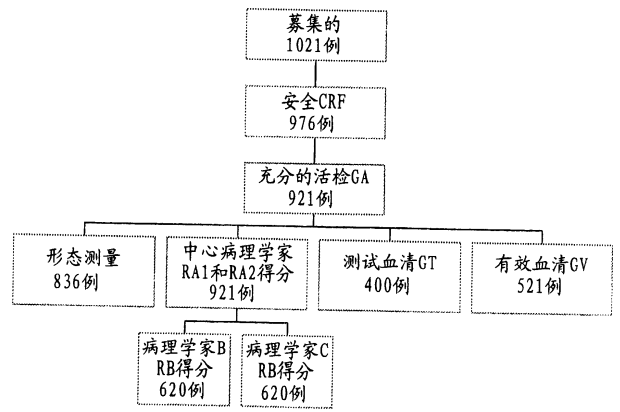


图 1