



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102301237 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 200980155916. 1

*G01N 33/53* (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 01

*C12Q 1/68* (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/119, 077 2008. 12. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/066258 2009. 12. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02010/065541 EN 2010. 06. 10

(71) 申请人 财团法人工业技术研究院

地址 中国台湾

(72) 发明人 曾镛翎 李泓毅 李彦朋 李怀洛

刘怡贞 郑平福 林微雅 叶宏仁

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 陈小雯

(51) Int. Cl.

*G01N 33/68* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 35 页

(54) 发明名称

用于肝纤维化诊断的生物标记

(57) 摘要

鉴定尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (urokinase type plasminogen activator, uPA)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9, MMP9) 和  $\beta$ -2-微球蛋白 ( $\beta$ -2-microglobulin,  $\beta$ -2MG) 为新颖的肝纤维化相关生物标记, 及其在诊断肝纤维化中的用途。

1. 一种在人类受试者中诊断肝纤维化 (fibrosis) 的方法,包括:  
自被怀疑具有肝纤维化的人类受试者获得血样;  
检测该血样中尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (urokinase typeplasminogen activator, uPA)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9, MMP9) 和  $\beta$ -2- 微球蛋白 ( $\beta$ -2-microglobulin,  $\beta$ -2MG) 中的一个或多个的表达水平;  
基于该表达水平计算疾病分数;和  
基于该疾病分数确定该个体是否具有纤维化。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述血样为血清样本。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述人类受试者选自下组:丙肝病毒携带者、乙肝病毒携带者、遭受酒精相关肝病的患者和遭受代谢性肝病的患者。
4. 权利要求 1 的方法,其中该检测步骤藉由检查所述血样中的尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂、基质金属蛋白酶 9 和  $\beta$ -2- 微球蛋白中的两个的表达水平来执行。
5. 权利要求 1 的方法,其中该检测步骤藉由检查所述血样中的尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂、基质金属蛋白酶 9 和  $\beta$ -2- 微球蛋白的表达水平来执行。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述血样为血清样本。
7. 权利要求 5 的方法,其中该计算步骤藉由对尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂、基质金属蛋白酶 9 和  $\beta$ -2- 微球蛋白的表达水平进行判别函数分析 (discriminant function analysis)、对数回归分析 (logistic regression analysis) 或岭回归分析 (ridge regression analysis) 来执行。
8. 权利要求 5 的方法,进一步包括在确认所述受试者具有肝纤维化后,基于该疾病分数与指出不同纤维化阶段的预先确定的截断值 (cutoff-value) 的比较来评估该受试者的疾病阶段。
9. 权利要求 8 的方法,其中该疾病分数藉由判别函数分析、对数回归函数或岭回归函数来计算。
10. 一种在人类受试者中诊断肝纤维化的方法,包括:  
自被怀疑具有肝纤维化的人类受试者获得血样;  
检测下述在血样中的表达水平:(a) 一个或多个选自下组的标记:尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (uPA)、基质金属蛋白酶 9(MMP9) 和  $\beta$ -2- 微球蛋白 ( $\beta$ -2MG), 和 (b) 一个或多个选自下组的标记:谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)、谷氨酸丙酮酸转氨酶 (glutamicpyruvic transaminase, GPT) 和甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP);  
基于所述表达水平计算疾病分数;和  
基于所述疾病分数确定该受试者是否具有纤维化。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述血样为血清样本。
12. 权利要求 10 的方法,其中该计算步骤藉由对所述表达水平进行判别函数分析、对数回归分析或岭回归分析来执行。
13. 一种用于诊断肝纤维化的试剂盒,包含与尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (uPA) 特异性结合的第一抗体、与基质金属蛋白酶 9(MMP9) 特异性结合的第二抗体和与  $\beta$ -2- 微球蛋白 ( $\beta$ -2MG) 特异性结合的第三抗体。

14. 权利要求 13 的试剂盒,进一步包含与谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 特异性结合的抗体、与谷氨酸丙酮酸转氨酶 (GPT) 特异性结合的抗体、与甲胎蛋白 (AFP) 特异性结合的抗体,或其组合。

15. 权利要求 13 的试剂盒,其中所述抗体为完整的免疫球蛋白分子。

16. 一种用于检测肝纤维化的试剂盒,基本上由与尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (uPA) 特异性结合的第一抗体、与基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 特异性结合的第二抗体和与  $\beta$ -2-微球蛋白 ( $\beta$ -2MG) 特异性结合的第三抗体组成。

17. 权利要求 16 的试剂盒,进一步包含与谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 特异性结合的抗体、与谷氨酸丙酮酸转氨酶 (GPT) 特异性结合的抗体、与甲胎蛋白 (AFP) 特异性结合的抗体,或其组合。

18. 一种用于诊断肝纤维化的试剂盒,包含 (a) 与尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (uPA) 特异性结合的抗体、与基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 特异性结合的抗体、与  $\beta$ -2-微球蛋白 ( $\beta$ -2MG) 特异性结合的抗体,或其组合;和 (b) 与谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 特异性结合的抗体、与谷氨酸丙酮酸转氨酶 (GPT) 特异性结合的抗体、与甲胎蛋白 (AFP) 特异性结合的抗体,或其组合。

19. 权利要求 18 的试剂盒,其中所述抗体为完整的免疫球蛋白分子。

20. 一种用于诊断肝纤维化的试剂盒,基本上由 (a) 与尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (uPA) 特异性结合的抗体、与基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 特异性结合的抗体、与  $\beta$ -2-微球蛋白 ( $\beta$ -2MG) 特异性结合的抗体,或其组合;和 (b) 与谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 特异性结合的抗体、与谷氨酸丙酮酸转氨酶 (GPT) 特异性结合的抗体、与甲胎蛋白 (AFP) 特异性结合的抗体,或其组合组成。

## 用于肝纤维化诊断的生物标记

### 【0001】 【相关申请】

【0002】 本申请要求 2008 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 61/119,077 号的优先权,其内容通过全文提述并入本文。

### 【背景技术】

【0003】 肝纤维化涉及细胞外基质蛋白 (extracellular matrix proteins) (例如胶原蛋白) 在肝脏细胞上过度聚集而产生疤痕组织。其发生于大部分慢性肝脏疾病中,例如代谢性肝脏疾病及与那些乙肝或丙肝感染和饮酒 (alcohol consumption) 相关的肝病。较严重的肝纤维化导致肝硬化 (cirrhosis)、肝癌、肝衰竭 (liver failure) 与门静脉高压 (portal hypertension)。

【0004】 目前,肝活检 (biopsy) 是用来侦测肝纤维化和确认其严重度的最适方法。然而,肝活检为有创性 (invasive) 步骤,并非理想诊断方法。

【0005】 基于纤维化相关血清生物标记的无创 (non-invasive) 血清学 (serology) 分析已被开发用来诊断肝脏纤维化。此分析的准确度与灵敏度非常依赖所使用的生物标记。因此,鉴定具高灵敏度以区分纤维化患者与非纤维化人类的可靠生物标记是非常重要的。

### 【发明内容】

【0006】 本发明基于诊断肝纤维化的三种新颖血清生物标记,即尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂 (urokinase type plasminogen activator, uPA)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP9;) 和  $\beta$ -2-微球蛋白 ( $\beta$ -2-microglobulin,  $\beta$ -2MG) 之非预期的鉴定。

【0007】 因此,本发明的一个方面特征为基于上列三种生物标记中一或多个的表达水平,且任选地结合一个或多个其他血清生物标记,例如谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (glutamic oxaloacetic transaminase, GOP)、谷氨酸丙酮酸转氨酶 (glutamic pyruvic transaminase, GPT) 与甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 以供诊断肝纤维化的方法。

【0008】 上述诊断方法包括至少四个步骤:(i) 自被怀疑具有肝纤维化的人类受试者(例如乙肝或丙肝病毒携带者,或具有酒精相关的肝病或代谢性肝病的患者)获得血样,(ii) 检测上述所列生物标记中的一个或多个在该血样中的表达水平,(iii) 基于该表达水平计算其疾病分数,(iv) 基于该疾病分数确定该个体是否具有纤维化。诊断方法在步骤(iv)之后可任选地包括另外的步骤(v):基于该疾病分数与指示不同纤维化阶段(stage)的预先确认的截断值(cutoff value)进行比较来评估该个体的纤维化阶段。本文中使用的术语“诊断”意指确认于受试者(例如,人类)中肝纤维化的存在与否或评估于受试者中的疾病程度。血样可为获得自血液的任何样本,如血清样本或血浆样本。

【0009】 该疾病分数可藉由判别函数分析 (discriminant function analysis)、岭回归分析 (ridge regression analysis) 或对数回归分析 (logistic regression analysis) 对该生物标记表达水平进行分析运算。

[0010] 本发明的另一个方面特征为含有至少两种抗体（例如，完整的免疫球蛋白分子）的诊断试剂盒，两种抗体之一为特异于 uPA、MMP9 或  $\beta$ -2MG 的抗体，而另一个则为特异于 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GOT、GPT 或 AFP 的抗体。此两种抗体具有不同的抗原特异性。优选地，试剂盒基本上由上述提及的抗体所组成，即仅包含特异于待检测抗原（例如，纤维化相关生物标记）的抗体，以供诊断肝纤维化。在一个例子中，试剂盒含有抗-uPA 抗体，抗-MMP9 抗体，以及抗- $\beta$ -2MG 抗体。

[0011] 本发明范围亦包含上述任何抗体在诊断肝纤维化中或在制造肝纤维化诊断试剂盒中的用途。

[0012] 本发明一个或多个实施方案的细节列举于以下的叙述中。自以下数个实施方案的详细叙述，以及自所附的权利要求会彰显本发明的其它特征或优点。

### 【具体实施方式】

[0013] 在一方面，本发明与诊断肝纤维化的方法相关，其基于个体的 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、其组合，或 (a) uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 中一种或多种和 (b) 包括一种或多种其他纤维化生物标记（例如 GOP、GPT 和 AFP）的组合在血液中的浓度。此方法可施用于有需要的人类患者以确认该患者中肝纤维化的存在与否，或他或她的纤维化阶段。人类患者可为乙肝病毒或丙肝病毒的携带者，或具有与酒精相关的疾病（例如，脂肪肝 (fatty liver) 与酒精性肝炎 (alcoholic hepatitis)、代谢性肝病或肝癌的患者。

[0014] 人类 uPA 具有两种同工型 (isoform)，两者皆可用于本发明的诊断方法中。同工型 1 的 GenBank 登录号为 NP\_002649.1 (18-OCT-2009)，而同工型 2 的 GenBank 登录号为 NP\_001138503.1 (18-OCT-2009)。其它两个新颖的标记，MMP9 与  $\beta$ -2MG 的 GenBank 登录号分别为 NP\_004985.2 (22-NOV-2009) 和 NP\_004039.1 (25-OCT-2009)。

[0015] 为了实施本发明的方法，血样可获得自被怀疑具有肝纤维化的人类受试者且可藉由常规方法，例如 ELISA 与 Westernblot 来确定上述提及的生物标记中一个或多个的水平。对生物标记水平的数据进行合适的分析（例如，判别函数分析 (discriminant function analysis)、对数回归分析 (logistic regression analysis)、岭回归分析 (ridge regression analysis) 或主成分分析 (principal component analysis)）以产生能表征其生物标记的血液分布 (blood profile) 的疾病分数（例如藉由数值的数字来表现）。可视需要将临床因素（例如年龄与性别）而置入考虑中。之后将疾病分数与区分肝纤维化有无的截断值 (cutoff-value)，或者与区分不同纤维化阶段的一组截断值进行比较以评估该受试者是否具有肝纤维化，且若有，位于哪个病程中。截断值可藉由使用相同分析方法，分析在无纤维化的受试者中与在不同水平的肝纤维化患者中的相同生物标记的血液分布来确定。例如，其可为介于无纤维化受试者的疾病分数与纤维化患者的疾病分数间的中点 (middle point)。

[0016] 下述为基于被鉴定为与不同程度纤维化相关的因素确定 (determining) 前述截断值的示例性步骤：

[0017] (1) 将肝纤维化患者根据其疾病状况（例如纤维化阶段与风险因素）归类于不同群组；

[0018] (2) 确定在患者中可能与纤维化阶段相关的潜在因素；

[0019] (3) 藉由单变量分析 (univariate analysis) 来鉴定那些在不同患者群组间显著不同的潜在因子；

[0020] (4) 对这些经鉴定的因素进行判别函数分析、对数回归分析、岭回归分析或广义线性模型 (generalized linear model) 以评估在纤维化诊断中的各因素的独立值；

[0021] (5) 基于被鉴定的因素 (包括纤维化相关生物标记, 以及如果适用, 临床因素), 建立判别、岭回归或对数回归模型 (例如, 公式) 以计算疾病分数, 和

[0022] (6) 基于表现各患者群组的疾病分数 (例如, 平均值), 与其它相关因素, 例如敏感性、特异性、阳性预测值 (Positive predictive value, PPV) 与阴性预测值 (Negative predictive value, PPV), 来决定对于各疾病水平的截断值。

[0023] 可藉由接受者操作特征分析 (receiver operating characteristic, ROC) 就其诊断价值评估遵循上述步骤确立的判别、岭回归或对数回归模型以产生 ROC 曲线。在接受者操作特征分析中, 其最佳多变量模型 (multivariable model) 提供大的曲线下面积 (Area under Curve, AUC)。参见叙述于以下实施例 1-3 中的模型。

[0024] 本发明范围亦包含用于上述诊断方法中的试剂盒。此试剂盒包含一个或多个特异于纤维化相关物标记 uPA、MMP9 和  $\beta$ -2MG, 以及视需要, 其他感兴趣的标记 (例如 GOT、GPT 和 AFP) 的抗体。在一个实例中, 试剂盒包括与相同生物标记结合的两种不同抗体 (即涂覆抗体 (coating antibody) 与检测抗体)。通常检测抗体可藉由其本身或是经由与其它试剂结合, 而结合于发射可检测讯号的分子。本文中使用的术语“抗体”意指完整的免疫球蛋白或保留抗原结合活性的其片段, 例如 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub>。其可为自然发生或经遗传工程改造的 (例如, 单链抗体、嵌合抗体 (chimeric antibody) 或人源化抗体)。

[0025] 可自商业制造供货商获得包含于本发明的试剂盒中的抗体。或者, 可藉由常规方法制备出它们。参见, 例如 Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。为了产生抗如上列的特定生物标记的抗体, 可将任选地偶联于载体蛋白 (carrier protein) (例如, KLH) 的标记与佐剂混合并注入宿主动物。之后可藉由亲和层析 (affinity chromatography) 纯化产生于动物中的抗体。一般使用的宿主动物包括兔子、小鼠、豚鼠与大鼠。可被用来增加免疫应答的多种佐剂视宿主种类而定且包括弗氏佐剂 (Freund's adjuvant) (完全与不完全)、矿物胶 (mineral gel) 例如氢氧化铝、CpG、表面活性物质 (surface-active substance), 例如溶血卵磷脂 (lysolecithin)、pluronic 多元醇、聚阴离子 (polyanion)、肽、油乳剂 (oil emulsion)、钥孔虫血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin) 与二硝基酚 (dinitrophenol)。有效的人类佐剂包括 BCG (bacille Calmette-Guerin) 与短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。多克隆抗体, 即抗体分子的异质性群体 (heterogeneous populations) 表达于经免疫的动物的血清中。

[0026] 使用标准杂交瘤技术 (参见, 例如 Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 292; and Hammerling et al. (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N. Y.) 可制备单克隆抗体, 即抗体分子的同质性群体 (homogeneous populations)。特别是, 藉由提供培养连续细胞系 (continuous cell line) 产生抗体的任何技术, 例如叙述于 Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495 和美国专利 4, 376, 110 号; 人 B 细胞杂交瘤技

术 (Kosbor et al. (1983) Immunol Today 4, 72 ; Cole et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026), 和 EBV- 杂交瘤 (EBV-hybridoma) 技术 (Cole et al. (1983) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 可获得单克隆抗体。此种抗体可为任何免疫球蛋白类别, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 与其任何亚类。可在体外或在体内培养本发明产生单克隆抗体的杂交瘤。在体内产生高效价的单克隆抗体的能力使其为特别有效的产生方法。

[0027] 此外, 藉由已知技术可产生抗体片段。例如, 此种片段包括, 但不限于 F(ab')<sub>2</sub> 片段, 其可藉由胃蛋白酶 (pepsin) 消化抗体分子而产生; 和 Fab 片段, 其可藉由还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的双硫键 (disulfide bridge) 产生。

[0028] 无须进一步详细阐述, 相信本领域技术人员可以基于上述, 利用本发明至其最大范围。因此, 下述特定实施方案应视为仅为说明性, 且不得以任何方式限制本公开的其他部分。所有本文中引用的公开文献通过提述并入本文。

#### [0029] 【实施例】

[0030] 实施例 1 : 基于 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 与其它纤维化相关标记的血清浓度在丙肝病毒阳性患者中诊断肝纤维化

#### [0031] 材料与amp;方法

#### [0032] (i) 患者

[0033] 140 个丙肝病毒阳性患者 (通过经由免疫分析 ELISA 或 RIA 的血清测试来确认) 与 93 个健康志愿者参与此研究。患者和健康受试者随机被指派至一训练组 (training set) (n = 148) 与一测试组 (testing set) (n = 85)。所有人均接受例行性实验室测试, 包括肝功能组 (liver panel) (GOT/AST、GPT/ALT、血清总胆红素 (bilirubin)、碱性磷酸酶和血清白蛋白 (albumin))、凝血酶原时间 (Prothrombin Time) / 国际标准化比值 (International normalized ratio, INR)、甲胎蛋白 (AFP)、用于排除肝脏疾病的其它起因的测试、肝脏超声波、上内视镜 (upper endoscopy) 和经调整过的 Skinner 调查 (用于确认饮酒习惯)。

#### [0034] (ii) 活检分析

[0035] 自患者获得肝活检样本, 且根据 METAVR 分数系统来分析其组织学特征。简单而言, 将这些样本 (长度大于 10mm) 固定、以石蜡 (paraffin) 包埋, 且以苏木精伊红番红花 (hematoxylin eosin safran) 与 Masson 氏的三色 (Masson's trichrome) 来染色以鉴定损伤或以苦味酸天狼星红 (Picrosirius-red) 来染色以供检测胶原蛋白。基于下列标准来评估各切片的肝纤维化阶段 (即纤维化的量):

[0036] F0 : 无纤维化

[0037] F1 : 肝门的 (portal) 纤维化无隔膜 (septa)

[0038] F2 : 少数隔膜

[0039] F3 : 为数众多的隔膜无肝硬化 (cirrhosis)

[0040] F4 : 肝硬化

[0041] 亦采用一般方法决定各活检的级别 (grade) (即由丙肝病毒感染导致的发炎水平)。

#### [0042] (iii) 血清学分析

[0043] 自每个患者取得 10mL 的静脉血液, 收集于无添加剂的试管中, 于室温静置 30 分

钟。之后将血样在 4℃ 进行离心 1600g, 15 分钟, 且收集上清血清样本。

[0044] 使用 IMUBIND uPA ELISA 试剂盒 (American Diagnostica Inc), 基于制造商提供的操作指南来测量 uPA 的血清浓度。简单而言, 将血清样本稀释 1/20 于包含于此试剂盒的稀释液中。将 100  $\mu$ L 的 uPA 标准品 (提供于试剂盒中) 或经稀释的样本置于预先以鼠类抗 uPA 单克隆抗体涂覆的微量测试板 (microtestplate) 中。将此板密封, 在 4℃ 过夜培养, 且之后以洗涤缓冲溶液洗涤 4 次。之后将生物素化的 (biotinylated) 抗-uPA 抗体加至板中。在室温培养 1 小时后, 将此盘洗涤且加入链霉亲和素 (streptavidin) 结合的辣根过氧化物酶 (horseradishperoxidase, HRP)。1 小时后, 将含辣根过氧化物酶底物的溶液, 即高硼酸盐 (perborate)/3',3,5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 加至板中, 将其维持于室温 20 分钟以允许酶反应发生。藉由加入 50  $\mu$ L 0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 来终止反应, 且使用 Spectramax M5 (Molecular Devices) 来测量于 450nm 的吸光度。使用四参数拟合 (four-parameter fit) (SoftMax Pro software, Molecular Devices) 建立标准校正曲线 (standard calibration curve)。之后基于吸光度对照标准曲线, 来决定血清 uPA 水平。基于制造商的操作指南, 将所有测量执行三重复。

[0045] 藉由 Quantikine MMP9 免疫分析 (Quantikine MMP9 Immunoassay) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 来决定 MMP9 的血清浓度。此分析设计来测量 MMP9 的总量, 包括其 92kDa 前体与 82kDa 成熟型两者。简单而言, 将经稀释的血清样本 (1 : 100) 置于以抗-人类 MMP9 抗体预涂覆的微孔板中。两小时后, 将此板进行洗涤且加入生物素化的 (biotinylated) 抗-MMP9 抗体。将此板培养于室温 1 小时, 且加入链霉亲和素结合的辣根过氧化物酶后加入 3',3,5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)。藉由 1mol/L 硫酸终止反应且使用微板读数器 (microplate reader) Spectramax M5 (Molecular Devices) 测量在 450nm 与 540nm 的吸光度差值。可利用上述方法基于此吸光度差值来决定血清 MMP9 的浓度。基于制造商的操作指南, 将所有测量执行三重复。

[0046] 使用夹心酶免疫分析试剂盒 (sandwich enzyme immunoassay kit) (GenWay Biotech) 来测量血清的  $\beta$ -2MG 浓度, 如下。将 20  $\mu$ L 的经稀释的血清样本 (1 : 100) 置于以小鼠单克隆抗- $\beta$ -2MG 抗体预涂覆的微孔板中, 且以 200  $\mu$ L 的样本稀释液混合。将混合物于 37℃ 培养 30 分钟。将此板以蒸馏水洗涤 4 次, 且之后加入辣根过氧化物酶结合的绵羊抗- $\beta$ -2MG 抗体。在于 37℃ 培养 30 分钟后, 再次洗涤此板后加入 3',3,5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)。20 分钟后, 藉由 1N HCl 终止酶反应。以 Spectramax M5 (Molecular Devices) 测量在 450nm 的吸光度, 且采用前述方法决定  $\beta$ -2MG 浓度。基于制造商的操作指南, 将所有测量执行三重复。

[0047] 藉由常规方法来决定其它纤维化相关标记, 例如 GOT、GPT 或 AFP 的血清浓度。

[0048] (iv) 确定疾病分数

[0049] 经由判别分析、岭回归分析或对数回归分析, 并当适用时考虑临床因素, 来决定 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 或其组合的表达水平与纤维化阶段的水平间的相关性。基于敏感性、特异性、阳性预测值与阴性预测值来评估对于三个生物标记的每个或其组合的诊断价值。藉由筛选测试来决定其敏感性、特异性、阳性与阴性预测值, 其中, 对应至不同截断值的 ROC 曲线上的点代表测试阳性。统计分析以 R 软件处理。

[0050] 结果

[0051] (i) 患者特征

[0052] 包括获得自上述实验室测试的临床因素与纤维化相关的生物标记的血清水平的患者特征,显示于以下表 1 中。

表1. 患者特征

	训练组 (n=148)	测试组 (n=85)	P-value (单变量分析)
年龄, 平均值(标准差)	45.87 ( 14.53)	50.26 ( 13.61)	0.02
女性, n (%)	84 ( 57%)	43 ( 51%)	0.44
纤维化阶段, n (%)			
无纤维化 (健康,F0)	63(43%)	30(35%)	0.34
纤维化 (F1+F2+F3)	55(37%)	35(41%)	0.64
硬化 (F4)	30(20%)	20(24%)	0.67
[0053] 血清生化标记, 平均值(标准差)			
GOT/AST, IU/L	45.28 ( 51.78 )	57.63 ( 55.94 )	0.11
GPT/ALT, IU/L	57.73 ( 81.9 )	72.95 ( 87.08 )	0.19
总胆红素(T. Bilirubin), μmol/L	15.94 ( 20.55 )	23.76 ( 19.46 )	0.03
白蛋白, g/L	44.6 ( 5.6 )	40.04 ( 6.2 )	0.001
AFP, ng/mL	8.85 ( 17.09 )	19.96 ( 53.74 )	0.11
新颖的血清标记, 平均值(标准差)			
uPA, ng/mL	0.82 ( 0.59 )	0.96 ( 0.78 )	0.13
MMP9, μg/mL	0.22 ( 0.2 )	0.22 ( 0.2 )	0.88
β-2MG, μg/mL	2.17 ( 3.14 )	1.82 ( 0.95 )	0.20

[0054] (ii) uPA、MMP9 或 β-2MG 及其它临床因素与肝纤维化的关联

[0055] 如以下表 2 中所示, uPA、MMP9 或 β-2MG 的血清水平与在训练组及测试组患者两者中的纤维化存在 / 不存在及严重度相关。

[0056]

表 2. 年龄、性别与血清生化标记与肝纤维化的关联

	训练组	测试组
[0057]		

	(n=148)			(n=85)		
	健康~F1 (n=73)	F2~F4 (n=75)	P-value (单变量 分析)	健康~F1 (n=40)	F2~F4 (n=45)	P-value (单变量 分析)
年龄, 平均值 (标准差)	37.59 (11.31)	53.93 (12.7)	7.65E-14	44.1 (9.36)	55.73 (14.52)	3.03E-05
女性, n (%)	46 (63%)	38 (51%)	0.18	17 (43%)	26 (58%)	0.23
GOT/AST, IU/L	21.37 (23.2)	72.98 (61.33)	1.677E-08	28.8 (22.4)	90.57 (64.35)	3.03E-06
GPT/ALT, IU/L	25.96 (48.2)	89.94 (95.7)	1.701E-06	32.38 (44.2)	109.84 (99.7)	1.07E-05
总胆红素, μmol/L	11.18 (4.21)	21.54 (29.11)	0.1	15.18 (13.1)	26.12 (20.42)	0.09
白蛋白, g/L	46.87 (2.6)	36.18 (5.73)	6.505E-07	45 (4.73)	38.55 (5.88)	0.020
AFP, ng/mL	2.98 (2.06)	16.92 (24.1)	0.0001	3.84 (2.78)	40.86 (77.21)	0.019
新颖的血清标记, 平均值(标准差)						
uPA, ng/mL	0.48(0.24)	1.14 (0.64)	3.988E-13	0.49 (0.21)	1.39 (0.85)	8.25E-09
MMP9, μg/mL	0.3(0.2)	0.14 (0.16)	2.653E-07	0.33 (0.24)	0.11 (0.07)	9.77E-07
β-2MG, μg/mL	1.34(0.51)	2.98 (4.25)	0.0013	1.22 (0.38)	2.35 (0.99)	1.99E-09

[0058] 自没有纤维化或具轻度纤维化的患者血清中测得低浓度的 uPA 和 β-2MG, 而这些浓度在具有中度或严重纤维化患者中显著提高。尤其在训练组中, 在 F0、F1、F2、F3 与 F4 中的 uPA 的血清水平平均值被发现分别为 0.46ng/mL、0.61ng/mL、0.75ng/mL、0.86ng/mL 与 1.66ng/mL, 且在 F0、F1、F2、F3 与 F4 中的 β-2MG 的血清水平平均值被发现分别为 1.26 μg/mL、1.86 μg/mL、2.22 μg/mL、2.38 μg/mL 与 4 μg/mL。另一方面, 健康患者或具有轻微纤维

化的患者比起具有中度或严重纤维化的患者有显著较高的 MMP9 的血清浓度。此标记的血清水平平均值被发现分别为 0.33  $\mu\text{g/mL}$ 、0.16  $\mu\text{g/mL}$ 、0.19  $\mu\text{g/mL}$ 、0.14  $\mu\text{g/mL}$  与 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。自测试组获得非常相似的数据。这些结果指出 uPA、MMP9 与  $\beta$ -2MG 均为用于诊断肝纤维化的可靠标记。

[0059] (iii) 用于诊断肝纤维化的二标记模型 (Two-Marker Model)

[0060] 来自此研究的结果指出 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GOT、GPT、AFP 与临床因素的任两个的结合水平可用作于诊断肝纤维化的可靠标记。以下显示为两个示例性二标记模型,即 uPA+MMP9,与 uPA+GPT,其包括基于各二标记对的结合水平以供计算疾病分数的方程式。这些方程式藉由判别函数分析、对数回归分析或岭回归分析来建立。下述亦显示列出对于这些二个-标记模型的截断值、敏感性、特异性、阴性预测值 (NPV) 与阳性预测值 (PPV) 与 ROC 曲线下面积 (area under the ROC curve, AUROC) 的表 (即表 3-8)。

[0061] uPA 和 MMP9

[0062] 判别函数分析:

[0063] 疾病分数 =  $1.4829 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 3.2605 \times \text{基质 MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 5$

[0064]

表 3. 在 uPA + MMP9 判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=148)				测试组 (n=85)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目 (%)	85 (57%)	75 (51%)	52 (35%)	30 (20%)	55 (65%)	45 (53%)	36 (42%)	20 (24%)
	健康 vs. F1~F4	健康 vs. F2~F4	健康 vs. F3~F4	健康 vs. F4	健康 vs. F1~F4	健康 vs. F2~F4	健康 vs. F3~F4	健康 vs. F4
截断值	5.43105	5.62435	5.8955	6.0554	5.43105	5.6243	5.8955	6.0554

[0065]

敏感性 (%)	74	72	71	80	78	80	75	85
特异性 (%)	90	90	90	90	97	95	90	80
NPV (%)	72	76	85	95	71	81	83	95
PPV (%)	91	89	79	67	98	95	84	57
AUROC	0.9	0.89	0.89	0.93	0.98	0.96	0.93	0.91

[0066] uPA 的系数值 (coefficient value) 为 0.741 至 1.763, 优选 1.26 至 1.705 而 MP9 的系数值为 -7.553 至 -2.839, 优选 -3.75 至 -2.771。

[0067] 对数回归分析:

[0068] 疾病分数 =  $\exp(\text{分分对数}(\text{logit})_{\text{值}}) / (1 + \exp(\text{分分对数}_{\text{值}}))$ , 其中

[0069] 分分对数<sub>值</sub> =  $-2.2416 + 3.2059 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 5.6316 \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL})$

[0070]

表 4. 在 uPA + MMP9 对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=148)				测试组 (n=85)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目 (%)	85 (57%)	75 (51%)	52 (35%)	30 (20%)	55 (65%)	45 (53%)	36 (42%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
截断值	0.2704	0.3347	0.4548	0.5594	0.2704	0.3347	0.4548	0.5594
敏感性 (%)	73	72	73	80	78	80	75	85
特异性 (%)	90	90	90	90	97	95	90	80

[0071]

NPV (%)	71	76	86	95	71	81	83	95
PPV (%)	91	89	79	67	98	95	84	57
AUROC	0.9	0.89	0.89	0.93	0.97	0.96	0.94	0.91

[0072] 截距的系数 (coefficient of intercept) 为 -3 至 -1.48, 优选 -2.578 至 -1.905, uPA 的系数为 2.49 至 3.91, 优选 2.725 至 3.687, 而 MMP9 的系数为 -8.01 至 -3.24, 优选 -6.477 至 -4.787。

[0073] 岭回归分析:

[0074] 疾病分数 =  $1.6641 + 1.7227 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) - 1.9821 \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL})$

表 5. 在 uPA + MMP9 岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=148)				测试组 (n=85)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目	85 (57%)	75 (51%)	52 (35%)	30 (20%)	55 (65%)	45 (53%)	36 (42%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
[0075]	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
截断值	2.5222	2.6029	2.9505	3.1213	2.5222	2.6029	2.9505	3.1213
敏感性 (%)	72	75	67	80	73	84	72	85
特异性 (%)	90	90	90	90	97	95	92	85
NPV (%)	70	78	83	95	66	84	82	95
PPV (%)	91	89	78	67	98	95	87	63
[0076] AUROC	0.89	0.89	0.89	0.93	0.97	0.96	0.95	0.92

[0077] 截距的系数为 1.430 至 2.531, 优选 1.414 至 1.914, uPA 的系数为 1.191 至 1.938, 优选 1.464 至 1.895, 而 MMP9 的系数为 -4.428 至 -1.501, 优选 -2.279 至 -1.685。

- [0078] uPA 和 GPT
- [0079] 判别函数分析:
- [0080] 疾病分数 =  $1.5351 \times \text{uPA (ng/mL)} + 0.0083 \times \text{GPT (IU/L)} + 5$

表 6. 在uPA + GPT判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=145)				测试组(n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目 (%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0081] 截断值	6.3072	6.5753	7.1162	7.5766	6.3072	6.5753	7.1162	7.5766
敏感性 (%)	79	71	62	73	80	89	78	80
特异性 (%)	90	90	89	90	90	90	85	84
NPV (%)	77	76	82	93	71	88	84	93
PPV (%)	92	88	76	65	93	91	80	62
AUROC	0.92	0.9	0.88	0.89	0.94	0.94	0.91	0.88

[0082] uPA 的系数为 0.949 至 1.750, 优选 1.305 至 1.719, 而 GPT 的系数为 0.006 至 0.017, 优选 0.007 至 0.01。

[0083] 对数回归分析:

[0084] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数\_值}) / (1 + \exp(\text{分对数\_值}))$ , 其中

[0085] 分对数\_值 =  $-3.7206 + 3.8376 \times \text{uPA (ng/mL)} + (-0.0001) \times \text{GPT (IU/L)}$

表 7. 在uPA + GPT对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=145)				测试组(n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0086] 截断值	0.3333	0.4303	0.4316	0.5143	0.3333	0.4303	0.4316	0.5143
敏感性 (%)	57	50	62	80	67	59	69	85
特异性 (%)	90	90	89	90	93	95	94	88
NPV (%)	62	65	82	94	61	68	80	95
PPV (%)	89	84	76	67	94	93	89	68
AUROC	0.85	0.86	0.88	0.91	0.87	0.92	0.94	0.93

[0087] 截距的系数为 -4.30 至 -3.14, 优选 -4.279 至 -3.274, uPA 的系数为 3.11 至 4.57, 优选 3.262 至 4.413, 而 GPT 的系数为 -0.01 至 0.002, 优选 -0.00012 至 -0.00008。

[0088] 岭回归分析:

[0089] 疾病分数 =  $0.9199 + 1.8321 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) + 0.0034 \times \text{GPT} (\text{IU/L})$

表 8. 在uPA + GPT岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=145)				测试组			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0090] 截断值	2.3701	2.6192	2.9050	3.0855	2.3701	2.6192	2.9050	3.0855
敏感性 (%)	72	64	62	77	74	82	78	80
特异性 (%)	90	90	89	90	93	95	94	83
NPV (%)	71	72	82	94	67	83	85	93
PPV (%)	91	87	76	66	95	95	90	59
AUROC	0.89	0.89	0.88	0.9	0.93	0.94	0.94	0.92

[0091] 截距的系数为 0.705 至 1.281, 优选 0.782 至 1.03, uPA 的系数为 1.303 至 2.052, 优选 1.557 至 2.107, 而 GPT 的系数为 0.002 至 0.009, 优选 0.0029 至 0.0039。

[0092] (iv) 用于诊断肝纤维化的三标记模型 (Three-Marker Model)

[0093] 以下描述为基于 uPA、MMP9、β-2MG、GOT、GPT、AFP 与临床因素的结合血清水平的用于肝纤维化诊断的示例性三标记模型。这些模型藉由判别函数分析、对数回归函数分析与岭回归函数分析来建立。对根据这些三标记模型计算的疾病分数考虑纤维化严重程度来进行分析。发现疾病分数与 METAVIR 纤维化阶段判别有线性相关性。

[0094] 四个指示 (i) 任何纤维化 (健康对 F1-F4); (ii) 中度纤维化 (健康~ F1 对 F2-F4); (iii) 严重纤维化 (健康~ F2 对 F3-F4); 以及 (iv) 肝硬化 (健康~ F3 对 F4) 的截断值在训练组中确定并在测试组中验证。

[0095] uPA、MMP9 和 β-2MG

[0096] 判别函数分析:

[0097] 疾病分数 = 1.4159x uPA(ng/mL) - 3.0399 × MMP9(μg/mL) + 0.0897 × β-2MG(μg/mL) + 5

表 9. 在uPA + MMP9 +  $\beta$ -2MG判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组 (n=148)				测试组 (n=85)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0098]	患者数目	85	75	52	30	55	45	36	20
	(%)	(57%)	(51%)	(35%)	(20%)	(65%)	(53%)	(42%)	(24%)
	健康	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	
截断值	5.5918	5.7362	6.0726	6.2124	5.5918	5.7362	6.0726	6.2124	
敏感性 (%)	74	73	71	83	78	82	75	85	
特异性 (%)	90	90	90	90	97	95	92	85	
NPV (%)	72	77	85	95	71	83	83	95	
PPV (%)	91	89	79	68	98	95	87	63	
[0099]	AUROC	0.91	0.9	0.9	0.94	0.98	0.96	0.94	0.92

[0100] uPA 的系数为 0.389 至 1.604, 优选 1.204 至 1.586、MMP9 的系数为 -7.321 至 -2.302, 优选 -3.496 至 -2.584, 而  $\beta$ -2MG 的系数为 0.048 至 1.114, 优选 0.076 至 0.103。

[0101] 对数回归分析:

[0102] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数\_值}) / (1 + \exp(\text{分对数\_值}))$ , 其中

[0103] 分对数\_值 =  $-3.8614 + 2.8761 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 4.0100 \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 0.7853 \times \beta\text{-2MG}(\mu\text{g/mL})$

表 10. 在uPA + MMP9 +  $\beta$ -2MG对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组 (n=148)				测试组 (n=85)				
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	
患者数目 (%)		85 (57%)	75 (51%)	52 (35%)	30 (20%)	55 (65%)	45 (53%)	36 (42%)	20 (24%)	
[0104]		健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	
		vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	
截断值		0.1962	0.2806	0.4863	0.5961	0.1962	0.2806	0.4863	0.5961	
敏感性 (%)		84	79	69	83	80	82	67	85	
特异性 (%)		90	90	90	90	100	95	94	91	
NPV (%)		80	80	84	95	73	83	79	95	
[0105]		PPV (%)	92	89	78	68	100	95	89	74
		AUROC	0.94	0.93	0.91	0.93	0.99	0.97	0.95	0.95

[0106] 截距的系数为 -4.9 至 -2.28 而 uPA、MMP9 与  $\beta$ -2MG 的系数分别为 2.15 至 3.6、-6.4 至 -1.61 和 0.47 至 1.1, 优选地, 截距、uPA、MMP9 与  $\beta$ -2MG 的系数分别为 -4.441 至 -3.282、2.454 至 3.308、-4.611 至 -3.409 和 0.668 至 0.903。

[0107] 岭回归分析:

[0108] 疾病分数 =  $1.4645 + 1.6683 \times \text{uPA (ng/mL)} - 1.7868 \times \text{MMP9 (\mu g/mL)} + 0.0926 \times \beta\text{-2MG (\mu g/mL)}$

[0109]

表 11. 在uPA + MMP9 +  $\beta$ -2MG岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

	训练组 (n=148)				测试组 (n=85)			
纤维化阶段	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目	85	75	52	30	55	45	36	20
(%)	(57%)	(51%)	(35%)	(20%)	(65%)	(53%)	(42%)	(24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4
截断值	2.4483	2.5196	2.9199	3.0791	2.4483	2.5196	2.9199	3.0791
敏感性 (%)	75	77	69	83	75	87	72	85
特异性 (%)	90	90	90	90	97	95	92	86
NPV (%)	73	80	84	95	67	86	82	95
[0110]								
PPV (%)	91	89	78	68	98	95	87	65
AUROC	0.91	0.9	0.9	0.93	0.97	0.96	0.95	0.92

[0111] 截距的系数为 0.558 至 2.418 (例如 1.245 至 1.684); uPA、MMP9 与  $\beta$ -2MG 的系数分别为 0.818 至 1.907 (例如, 1.418 至 1.835)、-4.677 至 -0.997 (例如, -2.05 至 -1.519) 和 0.076 至 0.825 (例如, 0.079 至 0.106)。

[0112] 下面的表 12 显示根据上述三标记模型, 从测试组获得的结果

表 12. 基于测试组中的uPA、MMP9与 $\beta$ -2MG结合血清浓度的代表不同纤维化阶段的截断值

	AUC	Cut-Off	敏感性	特异性	PPV	NPV
<b>判别模型</b>						
健康 vs. F1~F4	0.98	5.21	0.98	0.83	0.92	0.96
		5.25	0.96	0.93	0.96	0.93
健康, F1 vs. F2~F4	0.96	5.54	0.93	0.90	0.91	0.92
		5.63	0.87	0.90	0.91	0.86
健康, F1~F2 vs. F3~F4	0.94	6.01	0.81	0.90	0.85	0.86
		6.10	0.75	0.92	0.87	0.83
健康, F1~F3 vs. F4	0.92	6.62	0.85	0.91	0.74	0.95
		6.78	0.70	0.92	0.74	0.91
<b>对数回归模型</b>						
健康 vs. F1~F4	0.99	0.09	0.98	0.90	0.95	0.96
		0.11	0.93	0.93	0.96	0.88
健康, F1 vs. F2~F4	0.97	0.28	0.82	0.95	0.95	0.83
		0.35	0.80	0.95	0.95	0.81
健康, F1~F2 vs. F3~F4	0.95	0.50	0.69	0.94	0.89	0.81
		0.54	0.67	0.94	0.89	0.79
健康, F1~F3 vs. F4	0.95	0.75	0.85	0.94	0.81	0.95
		0.85	0.75	0.97	0.88	0.93
<b>岭回归模型</b>						
健康 vs. F1~F4	0.97	2.0	0.96	0.70	0.85	0.91
		2.05	0.95	0.83	0.91	0.89
健康, F1 vs. F2~F4	0.96	2.4	0.91	0.93	0.93	0.90
		2.5	0.87	0.93	0.93	0.86
健康, F1~F2 vs. F3~F4	0.95	2.9	0.75	0.92	0.87	0.83
		3.0	0.72	0.96	0.93	0.82
健康, F1~F3 vs. F4	0.92	3.8	0.75	0.92	0.75	0.92
		3.9	0.70	0.95	0.82	0.91

[0115] 基于上示结果,考虑训练组的敏感性、特异性、PPV 和 NPV,确定对于不同疾病水平的建议的截断值范围(参见下面表 13)。

表 13. 不同肝纤维化阶段的建议的截断值

纤维化阶段	疾病分数 (判别模型)	疾病分数 (对数回归模型)	疾病分数 (岭回归模型)
健康	0 ~ 5.21	0 ~ 0.09	0 ~ 2.00
健康 ~ F1	5.21 ~ 5.26	0.09 ~ 0.11	2.00 ~ 2.05
[0116] F1	5.26 ~ 5.55	0.11 ~ 0.28	2.05 ~ 2.40
F1~F2	5.55 ~ 5.63	0.28 ~ 0.35	2.40 ~ 2.50
F2	5.63 ~ 6.01	0.35 ~ 0.50	2.50 ~ 2.90
F2~F3	6.01 ~ 6.10	0.50 ~ 0.54	2.90 ~ 3.00
F3	6.10 ~ 6.62	0.54 ~ 0.75	3.00 ~ 3.80
F3~F4	6.62 ~ 6.78	0.75 ~ 0.85	3.80 ~ 3.90
F4	6.78 ~	0.85 ~ 1.00	3.90 ~

[0117] uPA、MP9 和 GPT

[0118] 判别函数分析:

[0119] 疾病分数 =  $1.2295 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) + (-2.6571) \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL}) + 0.0072 \times \text{GPT} (\text{IU/L}) + 5$

表 14. 在3标记判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=145)				测试组(n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0120] 截断值	5.4766	5.6061	6.5738	6.6547	5.4766	5.6061	6.5738	6.6547
敏感性 (%)	85	85	56	77	93	91	72	75
特异性 (%)	90	90	89	90	97	83	85	77
阴性预测值 (%)	83	86	79	94	88	89	80	90
阳性预测值 (%)	92	90	74	66	98	85	78	50
ROC 曲线下面积	0.95	0.92	0.89	0.91	0.99	0.96	0.91	0.86

[0121] uPA、MMP9 与 GPT 的系数值分别为 0.539 至 1.456 (例如, 1.045 至 1.414)、-6.988 至 -2.053 (例如, -3.056 至 -2.391) 和 0.004 至 0.014 (例如, 0.006 至 0.008)。

[0122] 对数回归分析:

[0123] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数} - \text{值}) / (1 + \exp(\text{分对数} - \text{值}))$ , 于其中

[0124] 分对数 - 值 =  $-2.1715 + 3.3171 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) + (-6.2008) \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL}) + (-0.0018) \times \text{GPT}(\text{IU/L})$

表 15. 在3标记对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组(n=145)				测试组(n=84)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)		82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
		健康	健康, F1	健康, F1~2	健康, F1~3	健康	健康, F1	健康, F1~2	健康, F1~3
		vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0125] 截断值		0.2803	0.3435	0.4456	0.5320	0.2803	0.3435	0.4456	0.5320
敏感性 (%)		70	71	76	80	70	75	75	85
特异性 (%)		90	90	89	90	96	95	90	81
阴性预测值 (%)		70	76	88	94	64	78	83	95
阳性预测值 (%)		90	88	79	67	97	94	84	58
ROC 曲线下面积		0.88	0.88	0.9	0.93	0.96	0.95	0.93	0.91

[0126] 截距的系数为 -2.95 至 -1.38 (例如, -2.497 至 -1.846), 而 uPA、MMP9 和 GPT 的系数分别为 2.56 至 4.07 (例如, 2.82 至 3.649)、-8.73 至 -3.66 (例如, -7.131 至 -5.271), 和 -0.02 至 0.001 (例如, -0.0021 至 -0.0015)。

[0127] 岭回归分析

[0128] 疾病分数 =  $1.5020 + 1.6479 \times \text{uPA (ng/mL)} - 1.7885 \times \text{MMP9 (\mu g/mL)} + 0.0028 \times \text{GPT (IU/L)}$

表 16. 在3标记岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组(n=145)				测试组(n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3,F4	vs. F4
[0129] 截断值	2.3896	2.5208	2.9041	3.1454	2.3896	2.5208	2.9041	3.1454
敏感性 (%)	77	79	64	80	83	89	81	85
特异性 (%)	90	90	89	90	97	95	90	81
阴性预测值 (%)	75	81	83	94	76	88	86	95
阳性预测值 (%)	91	89	76	67	98	95	85	59
ROC 曲线下面积	0.92	0.9	0.89	0.92	0.97	0.96	0.94	0.92

[0130] 截距的系数为 1.154 至 2.300 (例如, 1.277 至 1.727), 而 uPA、MMP9 与 GPT 的系数分别为 1.075 至 1.941 (例如, 1.401 至 1.895)、-4.192 至 -1.218 (例如, -2.057 至 -1.52), 和 0.001 至 0.007 (例如, 0.0024 至 0.0032)。

[0131] (v) 用于诊断肝纤维化的四标记模型 (Four-Marker Model)

[0132] 自本研究获得的结果表明 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GOT、GPT、AFP 的任意四个因素的组合, 且适用时考虑临床因素, 是用于诊断肝纤维化的可靠标记。以下叙述为由 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 和 GPT 所组成的示例性 4 标记模型。结果显示于表 17-19 中。

[0133] 判别函数分析:

[0134] 疾病分数 =  $1.1645x \text{ uPA}(\text{ng/mL}) - 2.4312x \text{ MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 0.0957x \beta\text{-2MG}(\mu\text{g/mL}) + 0.0073 \times \text{GPT}(\text{IU/L}) + 5$

[0135]

表 17.4 标记判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=145)				测试组 (n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4
截断值	5.6290	5.7334	6.8026	6.9384	5.6290	5.7334	6.8026	6.9384
敏感性 (%)	87	89	56	80	93	93	69	75
特异性 (%)	90	90	89	90	97	85	90	80
NPV (%)	84	89	79	94	88	92	80	91
PPV (%)	92	90	74	67	98	87	83	54
AUROC	0.96	0.93	0.9	0.91	0.99	0.96	0.91	0.87

[0136] uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 与 GPT 的系数值分别为 0.196 至 1.376(例如, 0.99 至 1.339)、-6.684 至 -1.623(例如, -2.796 至 -2.067)、0.055 至 0.974(例如, 0.081 至 0.11) 和 0.004 至 0.012(例如, 0.0062 至 0.0084)。

[0137] 对数回归分析：

[0138] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数\_值}) / (1 + \exp(\text{分对数\_值}))$ ，其中

[0139] 分对数\_值 =  $-3.6742 + 3.0107 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 4.4549 \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 0.7074 \times \beta\text{-2MG}(\mu\text{g/mL}) + -0.0017 \times \text{GPT}(\text{IU/L})$

[0140]

表 18.4 标记对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=145)				测试组 (n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目 (%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4
截断值	0.1905	0.2895	0.4522	0.5775	0.1905	0.2895	0.4522	0.5775
敏感性 (%)	78	76	74	83	74	82	67	85
特异性 (%)	90	90	89	90	100	95	94	89
NPV (%)	76	80	87	95	68	83	79	95
PPV (%)	91	89	79	68	100	95	89	71
AUROC	0.92	0.92	0.92	0.94	0.98	0.96	0.95	0.95

[0141] 截距的系数为 -4.74 至 -2.61 (例如, -4.225 至 -3.123), 且 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 与 GPT 的系数分别为 2.24 至 3.77 (例如, 2.559 至 3.462)、-6.99 至 -1.92 (例如, -5.123 至 -3.787)、0.39 至 1.02 (例如, 0.6013 至 0.8135), 和 -0.004 至 0.001 (例如, -0.002 至 -0.001)。

[0142] 岭回归分析:

[0143] 疾病分数 =  $1.2866 + 1.5874 \times \text{uPA (ng/mL)} - 1.5725 \times \text{MMP9 (\mu g/mL)} + 0.0955 \times \beta\text{-2MG (\mu g/mL)} + 0.0029 \times \text{GPT (IU/L)}$

[0144]

表 19. 4 标记岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=145)				测试组 (n=84)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	82 (57%)	72 (50%)	50 (34%)	30 (21%)	54 (64%)	44 (52%)	36 (43%)	20 (24%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4	vs. F1~F4	vs. F2~F4	vs. F3~F4	vs. F4
截断值	2.3499	2.5306	2.9141	3.0809	2.3499	2.5306	2.9141	3.0809
敏感性 (%)	78	78	68	83	83	86	78	85
特异性 (%)	90	90	89	90	97	95	90	81
NPV (%)	76	80	84	95	76	86	84	95
PPV (%)	91	89	77	68	98	95	85	59
AUROC	0.93	0.91	0.9	0.93	0.98	0.96	0.95	0.92

[0145] 截距的系数为 0.297 至 2.109 (例如, 1.094 至 1.48), 且 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG 与 GPT 的系数为 0.748 至 1.800 (例如, 1.349 至 1.778)、-3.919 至 -0.776 (例如, -1.808 至 -1.337)、0.077 至 0.830 (例如, 0.0812 至 0.1098), 和 0.001 至 0.007 (例如, 0.0025 至 0.0033)。

[0146] (vi) 用于诊断肝纤维化的五标记模型 (Five-Marker Model)

[0147] 自本研究获得的结果表明 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GOT、GPT、AFP 的任意五个因素的组合, 且适用时考虑临床因素, 是用于诊断肝纤维化的可靠标记。以下叙述为由 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GPT 和 GOT 所组成的示例性 5 标记模型。结果显示于表 20-22 中。

[0148] 判别函数分析:

[0149] 疾病分数 =  $1.1009 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) - 2.2941 \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL}) + 0.0974 \times \beta\text{-2MG} (\mu\text{g/mL}) + 0.0065 \times \text{GPT} (\text{IU/L}) + 0.0024 \times \text{GOT} (\text{IU/L}) + 5$

表 20. 在5标记判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=133)				测试组 (n=75)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	70 (53%)	60 (45%)	39 (29%)	19 (14%)	45 (60%)	35 (47%)	27 (36%)	11 (15%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
[0150]	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
截断值	5.6410	5.7987	6.9746	7.0015	5.6410	5.7987	6.9746	7.0015
敏感性 (%)	86	87	46	74	93	91	63	73
特异性 (%)	90	90	90	90	97	85	92	81
NPV (%)	85	89	80	95	91	92	81	95
PPV (%)	91	88	67	56	98	84	81	40
AUROC	0.95	0.92	0.89	0.9	0.99	0.95	0.91	0.88

[0151] uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GPT 和 GOT 的系数值为 -0.070 至 1.512(例如,0.936 至 1.266)、-6.453 至 -1.468(例如, -2.638 至 -1.95)、0.058 至 1.209(例如,0.083 至 0.112)、-0.002 至 0.019(例如,0.0055 至 0.0075), 和 -0.011 至 0.025(例如,0.002 至 0.0028)。

[0152] 对数回归分析:

[0153] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数\_值}) / (1 + \exp(\text{分对数\_值}))$ , 于其中

[0154] 分对数\_值 =  $-3.4751 + 2.7416 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 4.5237 \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 0.6952 \times \beta\text{-2MG}(\mu\text{g/mL}) - 0.0021 \times \text{GPT}(\text{IU/L}) + 0.0007 \times \text{GOT}(\text{IU/L})$

表 21. 在5标记对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=133)				测试组(n=75)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	70 (53%)	60 (45%)	39 (29%)	19 (14%)	45 (60%)	35 (47%)	27 (36%)	11 (15%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
[0155]	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
截断值	0.1948	0.2854	0.4667	0.5551	0.1948	0.2854	0.4667	0.5551
敏感性 (%)	74	72	64	79	69	77	59	82
特异性 (%)	90	90	90	90	100	95	94	89
NPV (%)	76	80	86	96	68	83	80	97
PPV (%)	90	86	74	58	100	93	84	56
AUROC	0.91	0.91	0.9	0.91	0.98	0.95	0.94	0.93

[0156] 截距的系数为 -4.54 至 -2.4 (例如, -3.996 至 -2.954), 且 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GPT 和 GOT 的系数分别为 1.87 至 3.61 (例如, 2.33 至 3.153)、-7.13 至 -1.9 (例如, -5.202 至 -3.845)、0.38 至 1.01 (例如, 0.5909 至 0.799)、-0.01 至 0.01 (例如, -0.0024 至 -0.0018), 和 -0.01 至 0.01 (例如, 0.0006 至 0.0008)。

[0157] 岭回归分析:

[0158] 疾病分数 =  $1.2750 + 1.3505 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) - 1.4346 \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL}) + 0.0978 \times \beta\text{-2MG} (\mu\text{g/mL}) + 0.0004 \times \text{GPT} (\text{IU/L}) + 0.0056 \times \text{GOT} (\text{IU/L})$

表 22. 在5标记岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

纤维化阶段	训练组 (n=133)				测试组 (n=75)			
	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
患者数目(%)	70 (53%)	60 (45%)	39 (29%)	19 (14%)	45 (60%)	35 (47%)	27 (36%)	11 (15%)
	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3	健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
[0159]	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
截断值	2.2006	2.3922	2.9473	3.1712	2.2006	2.3922	2.9473	3.1712
敏感性 (%)	79	77	54	79	87	91	70	82
特异性 (%)	90	90	90	90	97	93	94	81
NPV (%)	79	82	83	96	83	93	85	96
PPV (%)	90	87	70	58	98	91	86	43
AUROC	0.93	0.91	0.89	0.91	0.98	0.96	0.94	0.91

[0160] 所包括的截距的系数为 0.145 至 1.909 (例如, 1.084 至 1.466), 且 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GPT 和 GOT 的系数分别为 0.576 至 1.826 (例如, 1.148 至 1.553)、-3.676 至 -0.603 (例如, -1.65 至 -1.219)、0.077 至 0.862 (例如, 0.0831 至 0.1125)、-0.005 至 0.009 (例如, 0.0003 至 0.0004) 和 -0.008 至 0.021 (例如, 0.0047 至 0.0065)。

[0161] (vii) 用于诊断肝纤维化的六标记模型 (Six-Marker Model)

[0162] 自本研究获得的结果表明 uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、GOT、GPT 和 AFP 的组合, 且适用时考虑临床因素, 是用于诊断肝纤维化的可靠标记。以下所示为基于此组合六个标记的计算疾病分数的方程式 (藉由判别函数分析、对数回归分析或岭回归分析来建立) 及对于不同纤维化阶段的截断值 (参见以下表 23-25)。

[0163] 判别函数分析

[0164] 疾病分数 =  $1.4401 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) - 1.2831 \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL}) + 0.0921 \times \beta\text{-2MG} (\mu\text{g/mL}) - 0.0099 \times \text{AFP} (\text{ng/mL}) + 0.0129 \times \text{GPT} (\text{IU/L}) - 0.0004 \times \text{GOT} (\text{IU/L}) + 5$

表 23. 6 标记判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组 (n=109)				测试组 (n=53)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0165]	患者数目 (%)	46	39	27	16	24	18	14	11
		46(%)	(36%)	(25%)	(15%)	(45%)	(34%)	(26%)	(21%)
		健康	健康,	健康,	健康,	健康	健康,	健康,	健康,
			F1	F1~F2	F1~F3		F1	F1~F2	F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
	截断值	6.1727	6.3100	6.6171	7.7270	6.1727	6.3100	6.6171	7.7270
	敏感性 (%)	89	82	81	75	88	94	86	73
	特异性 (%)	90	90	90	90	93	91	87	86
[0166]	NPV (%)	92	90	94	95	90	97	94	92
	PPV (%)	87	82	73	57	91	85	71	57
	AUROC	0.94	0.9	0.91	0.9	0.98	0.96	0.91	0.89

[0167] uPA、MMP9、 $\beta$ -2MG、AFP、GPT 和 GOT 的系数值分别为 0.141 至 1.923 (例如, 1.224 至 1.656)、-5.052 至 -0.393 (例如, -1.476 至 -1.091)、0.069 至 1.303 (例如, 0.078 至 0.106)、-0.032 至 0.054 (例如, -0.0114 至 -0.0084)、0.002 至 0.032 (例如, 0.011 至 0.0148) 和 -0.023 至 0.021 (例如, -0.00046 至 -0.00034)。

[0168] 对数回归分析

[0169] 疾病分数 =  $\exp(\text{分对数}_\text{值}) / (1 + \exp(\text{分对数}_\text{值}))$ , 其中

[0170] 分对数\_值 =  $-4.1023 + 2.4436 \times \text{uPA}(\text{ng/mL}) - 6.8921 \times \text{MMP9}(\mu\text{g/mL}) + 1.2869 \times \beta\text{-2MG}(\mu\text{g/mL}) - 0.0112 \times \text{AFP}(\text{ng/mL}) - 0.0015 \times \text{GPT}(\text{IU/L}) + 0.0018 \times \text{GOT}(\text{IU/L})$

表 24. 6 标记对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组 (n=109)				测试组 (n=53)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0171]	患者数目 (%)	46	39	27	16	24	18	14	11
		46(%)	(36%)	(25%)	(15%)	(45%)	(34%)	(26%)	(21%)
		健康	健康,	健康,	健康,	健康	健康,	健康,	健康,
			F1	F1~F2	F1~F3		F1	F1~F2	F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
	截断值	0.1569	0.1617	0.3392	0.5628	0.1569	0.1617	0.3392	0.5628
	敏感性 (%)	74	82	81	75	67	89	86	91
	特异性 (%)	90	90	90	90	100	100	95	98
[0172]	NPV (%)	83	90	94	95	78	95	95	91
	PPV (%)	85	82	73	57	100	100	86	98
	AUROC	0.91	0.93	0.94	0.93	0.99	1	0.99	0.98

[0173] 截距的系数为 -5.6 至 -2.61 (例如, -4.718 至 -3.487), 且 uPA、MMP9、β-2MG、GPT、GOT 与 AFP 的系数分别为 1.38 至 3.5 (例如, 2.077 至 2.81)、-10.86 至 -2.92 (例如, -7.926 至 -5.858)、0.82 至 1.75 (例如, 1.0939 至 1.4799)、-0.01 至 0.01 (例如, -0.0017 至 -0.0012)、-0.01 至 0.01 (例如, 0.0015 至 0.002), 和 -0.01 至 0.02 (例如, -0.01 至 -0.0095)。

[0174] 岭回归分析:

[0175] 疾病分数 =  $0.9632 + 1.4215 \times \text{uPA} (\text{ng/mL}) - 1.0722 \times \text{MMP9} (\mu\text{g/mL}) + 0.0986 \times \beta\text{-2MG} (\mu\text{g/mL}) - 0.0053 \times \text{AFP} (\text{ng/mL}) + 0.0019 \times \text{GPT} (\text{IU/L}) + 0.0058 \times \text{GOT} (\text{IU/L})$

表 25. 6 标记岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		训练组(n=109)				测试组(n=53)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4	F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0176]	患者数目(%)	46	39	27	16	24	18	14	11
		46(%)	(36%)	(25%)	(15%)	(45%)	(34%)	(26%)	(21%)
		健康	健康,	健康,	健康,	健康	健康,	健康,	健康,
			F1	F1~F2	F1~F3	vs.	F1	F1~F2	F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.	F1~F4	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4		F2~F4	F3~F4	F4
	截断值	2.0424	2.1525	2.5894	2.9761	2.0424	2.1525	2.5894	2.9761
	敏感性 (%)	76	82	70	81	83	100	93	73
[0177]	特异性 (%)	90	90	90	90	93	94	87	93
	NPV (%)	84	90	90	97	87	100	97	93
	PPV (%)	85	82	70	59	91	90	72	73
	AUROC	0.92	0.91	0.92	0.91	0.99	0.99	0.96	0.95

[0178] 截距的系数为 -0.336 至 1.587 (例如, 0.819 至 1.108), 且 uPA、MMP9、β-2MG、AFP、GPT 和 GOT 的系数分别为 0.396 至 2.024 (例如, 1.208 至 1.635)、-2.763 至 -0.256 (例如, -1.239 至 -0.916)、0.087 至 1.034 (例如, 0.088 至 0.113)、-0.021 至 0.037 (例如, -0.0061 至 -0.0045)、-0.006 至 0.015 (例如, 0.0016 至 0.0021), 和 -0.014 至 0.024 (例如, 0.0049 至 0.0066)。

[0179] 在测试组中验证所有上述的模型, 且观察到相似的结果, 包括截断值、敏感性、特异性、NPV、PPV 和 AUROC。

[0180] 实施例 2: 基于 uPA、MMP9 和 β-2MG 的血清浓度在乙肝病毒阳性患者中诊断肝纤维化

[0181] 在本研究中, 单标记或 3 标记模型也在带有乙肝病毒的 30 个患者与 30 个健康受试者中被验证。下方表 26 列出此数据组的特征。

[0182] 表 26. 患者特征

数据组 (n=60)	
年龄,平均值(标准差)	44.23( 9.27 )
女性, n (%)	17(28%)
血清生化标记, 平均值(标准差)	
GOT/AST, IU/L	54.53( 59.56 )
GPT/ALT, IU/L	87.02( 129.47 )
[0183] 总胆红素, $\mu\text{mol/L}$	21.52( 21.78 )
白蛋白, g/L	42.3( 5.88 )
AFP, ng/mL	8.73( 26.62 )
新颖的血清标记, 平均值(标准差)	
uPA, ng/mL	0.73( 0.6 )
MMP9, $\mu\text{g/mL}$	0.27( 0.22 )
$\beta$ -2MG, $\mu\text{g/mL}$	1.44( 1.16 )

[0184] 如以下表 27 中所示,uPA、MMP9 和  $\beta$ -2MG 的每一个的血清浓度与纤维化严重水平相关:

[0185]

表 27. 乙肝病毒阳性患者中的uPA、MMP9与 $\beta$ -2MG的血清浓度

	uPA ( ng/mL)	MMP9 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\beta$ -2MG ( $\mu\text{g/mL}$ )
健康 ( n=30)	0.46( 0.18 )	0.4( 0.23 )	1.1( 0.18 )
F1 ( n=9)	0.87( 0.53 )	0.18( 0.04 )	1.17( 0.4 )
F2 ( n=3)	0.42( 0.1 )	0.08( 0.01 )	1.13( 0.26 )
F3 ( n=7)	0.77( 0.35 )	0.13( 0.06 )	1.42( 0.42 )
F4 ( n= 11)	1.45( 0.93 )	0.11( 0.05 )	2.68( 2.34 )

[0186] \* 健康的数目 :30 个受试者 ( 测试组 )

[0187] 基于疾病分数的代表不同纤维化阶段的截断值显示于以下表 28-30 中 ( 前述的健康测试提交于本研究 ), 疾病分数采用先前实施例 1 中的 3 标记模型中所述的方程式计算出。

表 28. 对于乙肝病毒阳性患者在3标记判别模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		数据组(n=60)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0188]	患者数目(%)	30 (50%)	21 (35%)	18 (30%)	11 (18%)
		健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3,F4	F4
	截断值	5.5918	5.7362	6.0726	6.2124
	敏感性 (%)	53	57	56	64
	特异性 (%)	97	92	95	92
	NPV (%)	67	80	83	92
	PPV (%)	94	80	83	64
	AUROC	0.96	0.89	0.89	0.88

表 29. 对于乙肝病毒阳性患者在3标记对数回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		数据组(n=60)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
[0189]	患者数目(%)	30 (50%)	21 (35%)	18 (30%)	11 (18%)
		健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3,F4	F4

	截断值	0.1962	0.2806	0.4863	0.5961
	敏感性 (%)	57	52	50	64
[0190]	特异性 (%)	100	95	95	96
	NPV (%)	70	79	82	92
	PPV (%)	100	85	82	78
	AUROC	0.95	0.88	0.89	0.88

表 30. 对于乙肝病毒阳性患者在3标记岭回归模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

		数据组(n=60)			
纤维化阶段		F1~F4	F2~F4	F3~F4	F4
	患者数目(%)	30 (50%)	21 (35%)	18 (30%)	11 (18%)
[0191]		健康	健康, F1	健康, F1~F2	健康, F1~F3
		vs.	vs.	vs.	vs.
		F1~F4	F2~F4	F3,F4	F4
	截断值	2.0620	2.4571	2.4571	2.7726
	敏感性 (%)	90	57	67	73
	特异性 (%)	90	90	90	90
	NPV (%)	90	80	86	94
	PPV (%)	90	75	75	62
	AUROC	0.94	0.85	0.88	0.86

[0192] 实施例 3 :基于 uPA、MMP9 和  $\beta$ -2MG 的血清浓度在具有酒精相关肝脏疾病的患者中诊断肝纤维化

[0193] 53 个具有酒精相关肝病的患者与 30 个健康受试者参与本发明。患者特征列于下面表 31 中。对这些患者进行前述实施例 1 中所述的实验室测试与经修饰的 Skinner 检查以确认其的饮酒习惯。

表 31. 患者特征

数据组 (n=83)	
年龄, 平均值(标准差)	43.83( 9.23 )
女性, n (%)	15(18%)
血清生化标记, 平均值(标准差)	
GOT/AST, IU/L	67.88( 71.87 )
[0194] GPT/ALT, IU/L	46.28( 57.22 )
总胆红素, $\mu\text{mol/L}$	53.31( 50.8 )
白蛋白, g/L	35.02( 7.15 )
AFP, ng/mL	103.81 ( 892.5)
新颖的血清标记, 平均值(标准差)	
uPA, ng/mL	1.11( 1.07 )
MMP9, $\mu\text{g/mL}$	0.3( 0.24 )
$\beta$ -2MG, $\mu\text{g/mL}$	1.77( 1.11 )

[0195] 采用叙述于实施例 1 中的 ELISA 分析, 检验于这些患者中的 uPA、MMP9 和  $\beta$ -2MG 的血清浓度。由此获得的结果显示于下面表 32 中。

[0196]

表 32 在遭受酒精相关疾病的患者中的 uPA、MMP9 与  $\beta$ -2MG 的血清浓度

	uPA ( ng/mL)	MMP9 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\beta$ -2MG ( $\mu\text{g/mL}$ )
健康 ( n =30)	0.46( 0.18 )	0.4( 0.23 )	1.1( 0.18 )
脂肪肝 ( n =15)	0.57( 0.27 )	0.37( 0.28 )	1.84( 0.84 )
肝炎 ( n =7)	1.12( 0.93 )	0.27( 0.19 )	1.91( 0.66 )
F4 ( n = 31)	2( 1.23 )	0.17( 0.17 )	2.36( 1.45 )

[0197] 采用先前实施例 1 中所述的 3 标记方程式来计算的这些患者的疾病分数, 而对于不同纤维化阶段的截断值显示于下面表 33 中。

表 33. 对于酒精相关疾病患者在3标记模型中的代表不同纤维化阶段的截断值

数据组 (n=83)			
	判别模型	对数回归模型	岭回归模型
纤维化阶段	F4		
患者数目 (%)	31(37%)	31(37%)	31(37%)
[0198]	健康, 脂肪肝, 酒精性肝炎 vs. F4		
截断值	5.6430	0.2606	2.5453
敏感性 (%)	90	90	94
特异性 (%)	90	90	90
NPV (%)	94	94	96
PPV (%)	85	85	85
AUROC	0.93	0.94	0.95

[0199] \* 健康的数目 :30 个受试者 (测试组) ;

[0200] 脂肪肝与酒精性肝炎的数目 :22 个受试者

[0201] 其它实施方案

[0202] 可将于本说明书公开的所有特征结合成任何组合。藉由具有相同、等同或类似目的的替代特征可取代公开于本说明书中的各特征。因此,除非相反地明确宣称,所公开的各特征仅为等同或类似特征的一般系列的实例。

[0203] 如上所述,本领域技术人员可容易地确定本发明的必要技术特征,且在不违反本发明精神与范围下,可对本发明进行各种改变与修饰以适应各种用法与情况。因此,其它实施方案也包含于权利要求书范围内。

专利名称(译)	用于肝纤维化诊断的生物标记		
公开(公告)号	<a href="#">CN102301237A</a>	公开(公告)日	2011-12-28
申请号	CN200980155916.1	申请日	2009-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
[标]发明人	曾镛翎 李泓毅 李彦朋 李怀洛 刘怡贞 郑平福 林微雅 叶宏仁		
发明人	曾镛翎 李泓毅 李彦朋 李怀洛 刘怡贞 郑平福 林微雅 叶宏仁		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/70539 G01N2333/96494 G01N2800/085 G01N2333/9723 G01N33/487 G01N33/49 G01N33/50 G01N33/5067 G01N33/53 G01N33/576		
优先权	61/119077 2008-12-02 US		
其他公开文献	CN102301237B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

鉴定尿激酶型血纤蛋白溶解酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP9)和β-2-微球蛋白(β-2-microglobulin, β-2MG)为新颖的肝纤维化相关生物标记, 及其在诊断肝纤维化中的用途。

	训练组 (n=148)	测试组 (n=85)	P-value (单变量分析)
年龄, 平均值(标准差)	45.87 ( 14.53)	50.26 ( 13.61)	0.02
女性, n (%)	84 ( 57%)	43 ( 51%)	0.44
纤维化阶段, n (%)			
无纤维化 (健康,F0)	63(43%)	30(35%)	0.34
纤维化 (F1+F2+F3)	55(37%)	35(41%)	0.64
硬化 (F4)	30(20%)	20(24%)	0.67
血清生化标记, 平均值(标准差)			
GOT/AST, IU/L	45.28 ( 51.78 )	57.63 ( 55.94 )	0.11
GPT/ALT, IU/L	57.73 ( 81.9 )	72.95 ( 87.08 )	0.19
总胆红素(T. Bilirubin), μmol/L	15.94 ( 20.55 )	23.76 ( 19.46 )	0.03
白蛋白, g/L	44.6 ( 5.6 )	40.04 ( 6.2 )	0.001
AFP, ng/mL	8.85 ( 17.09 )	19.96 ( 53.74 )	0.11
新颖的血清标记, 平均值(标准差)			
uPA, ng/mL	0.82 ( 0.59 )	0.96 ( 0.78 )	0.13
MMP9, μg/mL	0.22 ( 0.2 )	0.22 ( 0.2 )	0.88
β-2MG, μg/mL	2.17 ( 3.14 )	1.82 ( 0.95 )	0.20