



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1759320 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 15

(21) 申请号 200480006752. 3

(22) 申请日 2004. 01. 14

(30) 优先权数据

03100058. 1 2003. 01. 14 EP

03104651. 9 2003. 12. 11 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2005. 09. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2004/050018 2004. 01. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02004/063753 EN 2004. 07. 29

(73) 专利权人 VIB 研究所

地址 比利时兹威纳尔德

专利权人 根特大学

(72) 发明人 R·康特里拉斯 N·卡勒瓦特

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int. Cl.

G01N 33/66 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 03087833 A, 2003. 10. 23, 摘要、说明书第 3-21 页、附图。

US 5831037 A, 1998. 11. 03, 摘要、说明书第

5-10 栏、附图 1-3.

W0 0216949 A, 2002. 02. 28, 全文。

Miyamoto Makoto et al.. Characteristics of lectin staining patterns assessed by a modified sensitive thermo-method in rat livers with heterologous serum-induced fibrosis. Journal of Veterinary Medical Science 60 8. 1998, 60(8), 953-960.

Gebo Kelly A. et al.. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: A systematic review. Hepatology 36 5. 2002, 36(5), S161-S172.

Matsumoto Kojiro et al.. Alteration of asparagine-linked glycosylation in serum transferring of patients with hepatocellular carcinoma. Clinica Chimica Acta 224. 1994, 2241-8.

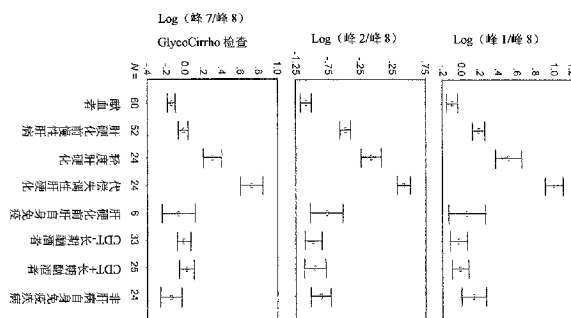
审查员 石剑平

(54) 发明名称

检测肝纤维化的血清标记

(57) 摘要

本发明提供检测哺乳动物中肝纤维化或肝纤维化级别变化的方法和试剂盒。诊断标记基于存在于体液例如血清中的诊断性碳水化合物的分布图以及对这些碳水化合物的鉴定。



1. 至少一种 N- 连接的碳水化合物在产生用于检测哺乳动物肝硬化前肝纤维化或肝硬化前肝纤维化级别的变化碳水化合物的分布图中的用途, 其中所述 N- 连接的碳水化合物从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的总糖蛋白混合物中获得, 其中所述至少一种 N- 连接的碳水化合物选自:

i) 聚糖 1, 其是  $\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$ ,

ii) 聚糖 2, 其是  $\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)][\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$ ,

iii) 聚糖 7, 其是  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)][\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$ ,

iv) 聚糖 8, 其是  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)]\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}$ 。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述哺乳动物是人。

3. 权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述体液是血清或血浆。

## 检测肝纤维化的血清标记

### 技术领域

[0001] 本发明提供了检测哺乳动物中肝纤维化或肝纤维化级别改变的方法和试剂盒。诊断标记基于对存在于体液（如血清）中的诊断性碳水化合物所做的分布图以及鉴定。

### 背景技术

[0002] 肝纤维化的特征是胶原蛋白和其它胞外基质蛋白的沉积以及它们组成复杂的聚合物,这些聚合物不溶于水并且引起肝脏结构的损失。形成纤维化的胶原蛋白和基质蛋白大多是由激活的肝脏星状细胞所产生。休眠的星状细胞为脂细胞表型,经激活而表现出成纤维细胞的表型。激活的过程分为2个阶段:起初,星状细胞由炎症过程所诱导产生的细胞因子(尤其是TGF- $\beta$ )、趋化因子和其它信号分子所激活;随后,星状细胞转化为肌成纤维细胞表型,处于这一表型的细胞能够增殖、吸引白细胞、并产生胞外胶原蛋白和基质蛋白。在所有形式的慢性肝炎中,活跃的纤维化始于门静脉周围区域(门静脉周围区或1区纤维化, Metavir 纤维化第1阶段),并逐渐向外进入小叶向中央静脉延伸(3区),同时伴随有分隔的形成(Metavir 纤维化第2阶段)。然后,发生桥连(Metavir 纤维化第3阶段)。纤维化的最终阶段(Metavir 纤维化第4阶段)就是早期的肝硬化:连接门静脉区和中央区域的大范围纤维化,同时伴随有肝脏薄壁组织的结节性再生。除了Metavir系统以外,也经常使用其它一些组织学评分,如HAI评分。HAI评分对不出现纤维化(0级)与较轻且无桥连的纤维化(1级)加以区分;也将桥连的纤维化(3级)和早期肝硬化(4级)加以区别。大多数的慢性肝病都伴随有肝纤维化,其特征为在功能性的肝组织之间长出疤痕组织。虽然,像这样的结缔组织的生长是组织损伤的正常反应,但是该组织可能会“过度(overshoot)”,从而引发肝纤维化。纤维化的进展速度是慢性肝脏疾病的疾病评定标准,因为正是纤维化的进程最终导致肝脏结构的畸变,并导致肝硬化。对纤维化的阶段以及纤维化进展速度的评估是十分重要的,这是因为一些患有慢性肝病的患者进展迅速,最终发展成肝硬化和相关的危及生命的并发症,而另一些患者的病情即使有进展也非常缓慢,而且可能永远也不会罹患与肝脏相关的并发症。因此,通常对新诊断的慢性肝病患者实施肝脏活检。然而,这种诊断技术是侵入性的,通常还给患者带来痛苦,有时还会伴随发生严重的并发症。另外,尽管肝脏活检被认为是判断纤维化的“金标准”,然而由于该技术仅仅探测一小部分区域,因而可能会导致对肝病真实状态的采样不够充分。因此,活检并不是十分适合作为常规的进度检查工具。理想的肝纤维化进度检查工具应当是非侵入性的临床标记,该标记的测量值应当与纤维化的阶段(肝纤维化的级别)相关联。为此,已经对多种标记和标记组进行了评估,却没有一个完全满足这些要求。例如,曾经使用过血清中的胞外基质组分,其中最可靠的明显是血清透明质酸。然而,使用该标记的多项研究似乎达成了这样的共识,即该标记可以相当可靠地排除很多患者的肝硬化(也就是具有较高的阴性预测值),而该标记在检测肝硬化中的准确率却较低(灵敏度约为30%)。最近,为了满足上述的标准,研究较多的是基于一系列临床化学分析物的二元对数回归模型(纤维测试)(fibrotest)(文献14、15和W00216949)。为了要能够排除慢性肝病患者接受活检的必要性,或在进度检查中可靠地检

测出早期肝硬化的发生,就必须达到 $> 95\%$ 的特异性水平,然而在该水平下,这些标记的灵敏度却很低。显然,需要的是拥有高特异性和良好灵敏度的额外血清标记,以便将其用于肝纤维化及其进程的非侵入性监测。在本发明中,我们开发了一种“临床糖组学 (glycomics)”方法,该方法使用标准 PCR 热循环仪和自动化 DNA 测序仪 / 片段分析仪,来快速地产生产高分辨率的存在于患者血清蛋白上的 N- 聚糖翻译后修饰的分布图。我们证明,血清 N- 糖组 (glycome) 可作为生物标记,它可将早期肝硬化患者与纤维化肝病患者加以区分,其灵敏度达到  $79\%$ ,特异性达到  $86\%$ 。重要的是,当我们的新型生物标记与其它临床使用的基于化学的 { 纤维测试 (Fibrotest) } 生物标记 ( 在我们的发明中,其检测早期肝硬化的灵敏度为  $92\%$ ,特异性为  $76\%$  ) 联用时,对纤维化和早期肝硬化病例的区分特异性提高到了  $100\%$ ,而灵敏度也同时保持在  $75\%$ 。

#### [0003] 附图和附表的简要说明

[0004] 图 1 总血清蛋白 N- 聚糖分布图的实例。

[0005] 上面一张图包含麦芽寡糖作为参照。第二张图显示由对照血清样品中的蛋白质衍生而来的去唾液酸化的 N- 聚糖的典型电泳图谱。在全部的检测范围内共有 9 个明显可见的峰,在电泳图谱后面部分的  $10\times$  放大图中还有另外 5 个峰。用这 14 个峰的高度来得到本研究中所有样品分布图的数值描述。第三张图表示来自肝硬化病例的代表性电泳图谱。与本研究相关的 N- 聚糖的结构显示于图下方,而所发现的与肝硬化标记尤为相关的峰用框标出。单糖单元符号 ( 同样适用于图 5 ) :  $\bigcirc$   $\beta$ -连接的 GlcNAc ;  $\bullet$   $\beta$ -连接的 Gal ;  $\square$   $\alpha$ -连接的 Man ;  $\blacksquare$   $\beta$ -连接的 Man ;  $\triangle$   $\alpha$ -1,6-连接的 Fuc。

[0006] 图 2 衍生诊断变量的趋势图。

[0007] 将血清样品分成 9 个临床相关组。从图 1 显示的分布图中得到 3 个诊断变量 :  $\text{Log}(\text{峰 } 1 / \text{峰 } 8)$ ,  $\text{Log}(\text{峰 } 2 / \text{峰 } 8)$  和  $\text{Log}(\text{峰 } 7 / \text{峰 } 8)$ 。因为后者对肝硬化的诊断具有很高的效率,所以将其重新命名为 GlycoCirrho 检查。注意 : 纵坐标是以对数值表示的。随着肝病严重程度的增加,尤其是在肝硬化的情况下,这 3 个变量的平均值也都表现出明显的上升趋势 ( 误差棒表示平均值  $95\%$  的置信区间 )。

[0008] 图 3 使用 ROC 分析 3 个衍生变量的分类效率。

[0009] a) 运用 ROC 曲线分析,来评估图 2 所示 3 个变量对较轻的肝硬化样品组与肝硬化前慢性肝病组的区分效率。将由 GlycoCirrho 检查和 { 纤维测试 } ROC 曲线所确定的截断 (cut-off) 值用于本图的 b 部分,将二维散点图区域分成四个部分。b) 二维散点图,它用于对肝硬化样品组和肝硬化前慢性肝病组加以分类。上图 : 加 / 不加 HCC 下,生化代偿性肝硬化病例的检测灵敏度为  $75\%$ ,特异性为  $100\%$ 。中图 : 加 / 不加 HCC 下,生化代偿失调性肝硬化病例的检测灵敏度为  $100\%$ 。c) 对普通人群样品 ( 红十字献血者 ) 以及非肝脏自身免疫疾病患者样品所进行的 GlycoCirrho 检查截断值试验。解释参见说明书。这些个体通常都不是活检的候选对象,而研究他们是为了了解 IgG 糖基化改变的可能干扰因素,这在某些自身免疫疾病中是典型的。

[0010] 图 4 一些糖组标记的值随纤维化阶段的改变而逐渐升高。

[0011] 用 3 个糖组衍生标记的数据对纤维化阶段进行绘图。将 F0 和 F1 阶段的病例 ( 没有纤维化或者只有门静脉纤维化 ) 归为一组,原因在于只有 4 个 F0 病例,还因为这样分组临床上很重要,因为一般没有开始对这些患者进行抗 HCV 治疗。阶段 F4+ 代表生化代偿失

调性肝硬化。用非参数 Lowess 回归来产生趋势线。下面 2 张图中的水平线代表由 ROC 确定的用于检测肝硬化的截断值。注意：从 F0/F1 到 F3 GlycoCirrho 检查相对稳定, 仅从 F4 才有所增加。同样注意 { 纤维测试 } 模型预期的反曲行为。有趣的是, 随着纤维化阶段的改变,  $\text{Log}(\text{峰 } 1 / \text{峰 } 2)$  和  $\text{Log}(\text{峰 } 2 / \text{峰 } 8)$  尤其是后者的值逐渐增加。对于  $\text{Log}(\text{峰 } 2 / \text{峰 } 8)$ , 用线性 Spearman 等级相关分析得到 0.76 的高相关系数。

[0012] 图 5 以不同方式调控的 N- 聚糖的部分结构分析。

[0013] 图中的 3 列代表将 3 个血清样品中的糖蛋白衍生的 N- 聚糖进行外切糖苷酶阵列测序的结果。选择这些样品来反映本研究中观察到的改变的数量范围。最左边的测序列得自对患有慢性肝炎的样品进行的分析, 代表对照分布图。中间的一列代表相对中等的改变, 已经进入了本文所述的所有 3 个肝硬化诊断变量的截断值。右面一列是对病症最严重的样品之一进行分析所得的结果。将实施方式 9 中所述的峰与这 3 列加以比较是十分有用的, 而且能够进行这一比较将显著地简化在外切糖苷酶测序图谱中对峰的跟踪。绘成黑色的峰不带有等分的 (bisecting) GlcNAc 残基。在这种意义上, 它们都可以看做是三甘露糖基 -GlcNAc<sub>2</sub> 核心寡糖的衍生物。绘成灰色的峰都由等分的 GlcNAc 残基所修饰, 因而, 它们都可以看做是等分 GlcNAc 取代的三甘露糖基 -GlcNAc<sub>2</sub> 核心寡糖的衍生物。测序列下面的中间和右方的参考图是从不同的电泳图谱组合而来, 每一张图谱都是对已知结构的参考聚糖用特殊的外切糖苷酶消化而得到。使用的参考聚糖是: 1) 三唾液酸, 三半乳糖, 三触角 (triantennary); 2) 具有核心 - $\alpha$ -1,6- 连接岩藻糖的双唾液酸, 双半乳糖, 双触角 (biantennary) (在中间列下面的参考图) 和 3) 具有核心 - $\alpha$ -1,6- 连接岩藻糖和等分 GlcNAc 的单唾液酸, 双半乳糖, 双触角 (在最右侧列下面的参考图)。

[0014] 图 6 血清 N- 糖组分布图中显示期望趋势的 5 个峰的数据偏差: 随着肝病严重程度的增加, 其值逐渐增加或降低。

[0015] 分组与图 1 所示一致。这些峰进一步用来产生文中所述的诊断变量。

[0016] 图 7 基于稳定素 -P 板的样品制备方法测得的肝硬化测定参数和基于新型热循环仪的方法测得的参数之间的严格线性关联。

[0017] 从慢性肝病组和健康对照组中随机选取 20 个样品, 用两种样品制备方法进行分析。3 个诊断参数, 即  $\text{Log}(\text{峰 } 1 / \text{峰 } 8)$ ,  $\text{Log}(\text{峰 } 2 / \text{峰 } 8)$  和  $\text{Log}(\text{峰 } 7 / \text{峰 } 8)$ , 在两种方法中表现出几乎完全的线性关联 (Pearson's  $r \geq 0.98$ )。这表示不管样品制备方法如何, 诊断的结果都具备有效性。

[0018] 图 8 用 ABI310 分析所得的总血清蛋白质 N- 聚糖分布图。

[0019] 用基于毛细管电泳的 ABI310DNA 分析仪重新分析图 5 中的 2 个肝硬化样品。将本图的葡聚糖水解产物电泳图谱与图 5 相比较, 可以发现在 ABI310 上进行的分析其分辨率显著优于在 ABI377 胶上进行的分析。在 2 种方法中, N- 聚糖的相对迁移行为有些不同, 推测可能是因为毛细管方法用线性聚丙烯酰胺作为分离基质, 而不是使用交联的聚丙烯酰胺凝胶。

[0020] 图 9 从总血清糖蛋白的唾液酸化 N- 聚糖分布图中获得的纤维化标记。

[0021] 对存在于研究中所有 N- 聚糖分布图的 7 个主要的、分辨清晰的峰的峰高进行定量, 并用各分布图中定量峰的总丰度对这些峰高进行标准化。峰 1 和峰 5 与 HAI 纤维化阶段关联性最好 (用 Spearman 等级相关试验检测,  $\rho$  分别为 -0.696 和 0.762)。95% 的

置信区间显示于图 A 和 B 中。而且,峰 1 和峰 5 的峰高有较高的相互关联度 (Pearson  $r = -0.827$ )。因此,我们计算了两峰间的比例,并将该值进行对数转化使分布标准化。这就使试验更为简单,因为只要对 2 个峰进行定量,而不用对整个分布图定量。所得参数对数值的 95% 的置信区间 (sia5 到 sia1) 显示于图 C 中。这一参数与 HAI 纤维化阶段具有很好的关联度 (Spearman  $\rho = 0.765$ )。Sia5 和 sia1 是指唾液酸化的聚糖峰 1 和 5。唾液酸化分布图中的峰 5 与去唾液酸化的分布图中的峰 1 具有相同的结构 (参见,实施方式 9)。唾液酸化分布图中的峰 1 与去唾液酸化的分布图中的峰 3 具有相同的结构 (参见,实施方式 9)。注意:与去唾液酸化的结构相比,唾液酸化的结构具有 2 个额外的  $\alpha$ -2,6-N-乙酰神经氨酸。

#### [0022] 目的及详细说明

[0023] 目前,对首次表现出症状的慢性肝病患者所进行的诊断检查需要进行肝活检来评估纤维化阶段和活跃度,以及检测早期肝硬化的发生<sup>10</sup>。然而,在一个大的慢性肝病患者群中 (主要罹患慢性病毒性肝炎、遗传造成的或与酗酒相关的肝病),纤维化向肝硬化的发展速度不尽相同,而向肝硬化的发展最终将会导致严重的并发症<sup>11</sup>以及高死亡率,而且这也是肝细胞癌 (HCC) 发生的主要危险因素。由于肝活检给患者带来很大的不适,而且还有引发并发症的危险<sup>13</sup>,因此,不适宜将该方法并入常规的 (通常是每年进行的) 慢性肝病患者的进度检查中。因此,临床上需要可以常规地评估肝纤维化进程和可靠地检测早期肝硬化阶段的标记,而肝硬化与最严重的病状相关。在本发明中,我们满足了这一需求,建立了将临床糖组应用于已诊断患有肝纤维化的患者以检测肝纤维化和肝纤维化级别变化的技术平台。我们定量地做出由存在于血清中的糖蛋白衍生而来的碳水化合物结构的分布图,也已经确定了这些参数衍生而来的数量参数与研究的患者中组织学肝纤维化阶段的统计学相关性。换言之,本发明惊奇地发现诊断性碳水化合物的数量或所述碳水化合物之间的相对数量与肝纤维化的严重性相关。

[0024] 在第一个实施方式中,本发明提供了一种检测哺乳动物体内肝纤维化或肝纤维化级别变化的方法,包括:a) 做以下物质的分布图:碳水化合物或其衍生的片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征 (feature);所述碳水化合物或所述片段存在于复合糖混合物,或者从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的复合糖混合物中获得,以及 b) 测定步骤 a) 的分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的数量,或者测定存在于所述碳水化合物分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段的特征,以及 c) 将步骤 b) 中所得测量数据与从未患肝纤维化的哺乳动物的分布图中获得的测量数据相比较,用以检测肝纤维化,或者,将步骤 b) 中所得数据与先前在所述哺乳动物中测定的数据相比较,用以检测肝纤维化的级别变化,和 d) 对步骤 c) 中所得的比较结果进行归因 (attributing),以检测哺乳动物的肝纤维化或肝纤维化级别的变化。

[0025] 术语“一种检测肝纤维化的方法”可以广泛地理解为肝纤维化的筛选方法、诊断方法或预后 (或监测) 方法。术语“肝纤维化级别的变化”是指随着时间推移而发生的肝纤维化的进展,这可能意味着肝硬化阶段的改善 (例如,从 Metavir 第 3 阶段降至 Metavir 第 2 阶段),或者意味着肝纤维化阶段的稳定或肝纤维化阶段的恶化。换言之,一种检测肝纤

维化级别的方法就是可以对先前诊断罹患肝纤维化的患者（或患者群）做出预后的监测仪器。术语“对得到该比较结果进行归因”是指可能获得的不同形式的结果。“结果”可以包括数值的增加、数值的减少、数值的稳定。或者，“结果”可以落于一个数值范围内（例如，95%置信区间，标准差），该“结果”来源于，例如，对组织学上确定为某一特殊纤维化阶段的一组患者的分析。在本发明中，Metavir 第 4 阶段（IV）是指早期肝硬化或晚期纤维化，该术语意味着早期肝硬化或晚期纤维化或等价的意思。同样，术语“肝硬化前”是指纤维化的第 1、或第 2、或第 3 阶段。

[0026] 在另一个实施方式中，碳水化合物的分布图用于制备检测肝纤维化的诊断试验，所述的诊断试验包括以下步骤：a) 做以下物质的分布图：碳水化合物或其衍生的片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征；所述碳水化合物或所述片段存在于复合糖混合物，或者从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的复合糖混合物中获得，以及 b) 测定步骤 a) 的分布图中至少一种碳水化合物或由其衍生片段或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的数量，或者测定存在于所述碳水化合物分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段的特征，以及 c) 将步骤 b) 中所得的测量数据与从未患肝纤维化的哺乳动物的分布图中获得的测量数据相比较，用以检测肝纤维化，或者，将步骤 b) 中所得数据与先前在所述哺乳动物中测定的数据相比较，用以检测肝纤维化的级别变化，和 d) 对步骤 c) 中所得的比较结果进行归因，以检测哺乳动物的肝纤维化或肝纤维化级别的变化。

[0027] 术语“存在于……中的复合糖”指的是不经过所述碳水化合物的分离步骤而在复合糖上检测到的碳水化合物；因此，样品就这样使用，而不包含任何分离步骤，而术语“分离自体液样品”指碳水化合物是从存在于样品中的复合糖中分离得到。

[0028] 在具体实施方式中，本发明的方法可以用来监测对患有肝纤维化的哺乳动物所施用的疗法其效果如何。在另一个具体实施方式中，本发明的方法特异性地检测肝纤维化。术语“特异性地”指肝纤维化可以区别于其它肝病（包括早期肝硬化和晚期肝硬化）而得到诊断。

[0029] 术语“碳水化合物”可以理解为以复合糖结构存在的聚糖或由复合糖衍生而来的聚糖，包括本领域所知的聚糖类别，如蛋白质中天冬氨酸连接的聚糖（也称为 N-聚糖）或丝氨酸 / 苏氨酸连接的聚糖（也称为 O-聚糖）或葡糖胺聚糖或由蛋白聚糖衍生而来的聚糖，存在于或衍生自糖脂的聚糖以及 GPI 锚衍生而来的碳水化合物。在优选的实施方式中，碳水化合物为 N-聚糖。术语“聚糖”和“碳水化合物”可互换使用。“复合糖”指含有碳水化合物部分的任何化合物（例如，蛋白质或脂类）。术语“复合糖混合物”是指含有至少 2 种（至少 3 种，至少 4 种，至少 5 种或更多种）所述复合糖的组合物，还可能含有非复合糖物质，如蛋白质、脂类、盐或水。术语“碳水化合物或其衍生片段”是指可以将碳水化合物片段化，而在片段化处理的产物中至少有 1 种寡糖或其衍生物。该片段化过程的其它产物可以包括单糖和寡糖或其衍生物。寡糖是指其化学结构由至少 2 个化学连接单元即本领域所称的单糖组成。所述的片段化过程可包括酶、化学和物理处理。例如，可以用糖苷酶处理（或消化）碳水化合物，（例如，用唾液酸酶从碳水化合物上除去唾液酸残基，或用岩藻糖酶从碳水化合物上除去岩藻糖残基），这样所得的分布图由碳水化合物的片段组成。进行糖苷酶

消化可以是为了,例如,得到更简单的分布图。也可以用化学方法用弱酸水解碳水化合物去除唾液酸。在质谱分析方法中,术语“片段”是指在分析过程中(例如,在碰撞引发解离的过程中)碳水化合物常常被片段化,这种情况下,片段化产物也可产生由与1个或多个单糖残留物相连的寡糖组成的寡糖衍生物,在片段化发生前这些单糖是碳水化合物结构的一部分。由质谱片段化过程所产生的寡糖衍生物的一个实例在本领域中称为交叉环切割产物离子。“所述碳水化合物的特征”是指任何可测量的参数,其特征和/或数量是由碳水化合物的结构所决定的。这些可计量的参数有,例如,核磁共振参数:诸如化学位移、同核和异核的耦合常数、核奥佛好塞效应以及残基偶极耦合。或者,这些可计量的参数可以是所述碳水化合物与其它分子(如识别碳水化合物中特异结构决定簇或其组合的凝集素和抗体)的结合程度。还有其它这类可计量的参数可以是碳水化合物作为(特异性修饰某些碳水化合物例如糖基转移酶和糖苷酶的)酶底物而发挥功能的能力。

[0030] 术语“存在于复合糖混合物中或得自复合糖混合物的所述碳水化合物或所述片段”是指“碳水化合物或其衍生片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所决定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征的分布图”,可以是分析仍旧以化学键与混合物中的复合糖相连的碳水化合物而得到,或者是分析已经用酶、化学或物理方法从复合糖上释放(分离)出来的碳水化合物而得到的。在一个优选的实施方式中,N-聚糖是用肽N-糖苷酶F或其它本领域已知的内切糖苷酶用酶消化的方式从混合物中的糖蛋白上释放出来。在另一个实施方式中,可以用本领域技术人员已知的方法用胍将N-和O-聚糖释放出来。在另一个实施方式中,可以根据公知的程序,用碱性条件下的 $\beta$ -消除方法选择性地释放O-聚糖。如果分布图得自仍然以化学键与混合物中的复合糖相连的碳水化合物,一个实施方式包括在得到分布图之前,用酶或化学程序来修饰复合糖的非聚糖部分,如用蛋白水解酶或用修饰糖脂中脂质部分的酶。术语“碳水化合物分布图”是指包含所述碳水化合物和/或量信息的任何实体。例如,这可以意味着所述碳水化合物的电泳或色谱图谱。在具体实施方式中,分布图是所述碳水化合物的质谱图。或者,分布图可以由核磁共振分析得到的信息。在另一个实施方式中,分布图可以是描述与碳水化合物结合的凝集素的质或量方面的信息。或者,分布图可以是描述在多大程度上碳水化合物可作为特异性酶(如糖基转移酶或糖苷酶)的底物的信息。这类信息可以包括计量这类酶反应副产物的读数,如在糖基转移酶反应中所释放的核苷酸的当量。在具体实施方式中,术语“产生碳水化合物的分布图”或“做碳水化合物分布图”也可以表示分离出并随后测定聚糖结构。通常在碳水化合物分布图中可以鉴定很多碳水化合物。通常,碳水化合物存在于复杂的混合物中,要进行有效的检测,必须将其分离。可用的分离方法包括电泳和色谱方法。可用的检测方法包括抗体检测、凝集素检测、NMR、质谱和荧光检测。在具体实施方式中,有必要在做聚糖分布图之前用化学和/或酶方法从糖蛋白中去除聚糖。从糖蛋白中制备聚糖的方法是本领域熟知的。在另一个具体实施方式中,有必要在分离与检测之前制备聚糖的衍生物。在一种方法中,本发明做聚糖分布图的方法(包括分离和检测)可以与DNA-测序仪联用。然而,对本领域技术人员很显然的是,该方法也可以与适用于激光感生荧光检测仪的毛细管电泳系统联用。这类系统,例如,包括P/ACE系列的毛细管电泳系统(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.)。本发明也可以与适用于激光感生荧光检测仪的任何毛细管电泳系统联用。在另一个实施方式中,还可以

使用质谱检测方法,如MALDI-TOF-MS,来测定至少一种碳水化合物或其衍生片段的数量。在质谱方法中,碳水化合物常常是片段化的,因此所述方法中检测的是碳水化合物片段。

[0031] 在另一个实施方式中,可以用微流体学的方法来做分布图。微流体学是正在迅速发展的领域,该学科基于液体通过孔径狭窄的通道所进行的迁移,孔径狭窄的通道是借用微芯片工业的(光蚀刻和化学湿蚀刻)技术在固体基质(大多是硅晶片或高纯度玻璃板)上产生的。液体可以通过毛细作用或主动泵送而迁移通过这些通道,而分析物则可以在充满液体的通道中通过电泳作用进行迁移(Schmalzing等(2001)Methods Mol.Biol.163, 163-173)。在另一个实施方式中,可以通过色谱分离方法,包括薄层层析(TLC)、高效液相色谱或气相色谱,来分离碳水化合物。

[0032] 术语“至少一种碳水化合物”是指测定存在于碳水化合物分布图中至少一种碳水化合物的数量,该碳水化合物对肝纤维化的检测具有诊断相关作用(因此,所述的至少一种碳水化合物可以称为至少一种诊断性碳水化合物)。在一个实施方式中,对于一种碳水化合物的计量足以诊断肝纤维化。这就意味着在一种具体情况下,一种碳水化合物存在于罹患纤维化的哺乳动物中,而在不患纤维化的哺乳动物体内却没有;在另一种具体情况下,一种碳水化合物存在于不患纤维化的哺乳动物体内,却不存在于患纤维化的哺乳动物体内。在另一个具体实施例中,一种碳水化合物的不同数量足以区分罹患和不患纤维化的哺乳动物。在优选的实施方式中,测定了1种、2种或者甚至更多(诊断性)碳水化合物的数量。在分布图的制作方法中,(诊断性)碳水化合物的数量可以用,例如,计算峰高或峰表面积的方法来测定。将存在于患者样品中的至少一种(诊断性)碳水化合物的数量与存在于不患肝纤维化的个体内对应的诊断性碳水化合物的水平相比较,就可以诊断是否存在肝纤维化。本发明可以用于来自哺乳动物如人的样品。诊断性碳水化合物可以是寡糖、或多糖。诊断性碳水化合物可以是分支的或不分支的。从一个罹患肝纤维化的个体身上取得的样品中,诊断性碳水化合物存在的丰度(数量)始终高于或始终低于从不罹患(没有肝纤维化)的个体身上所取得的样品。

[0033] 术语“所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物”是指用试剂标记过的碳水化合物,这样就能有效地检测到该碳水化合物。所述标记碳水化合物也称为衍生碳水化合物。作为实例,发荧光的化合物可以用于碳水化合物的标记。所述发荧光的化合物优选地带有电荷,这样,衍生化合物可以在电泳条件下发生迁移。当荧光团标记不带有电荷时,可以将其与传递电荷的物质相耦合。所述荧光团标记也使得衍生碳水化合物的数量可以通过荧光来定量测定。诸如9-氨基芘-1,4,6-三磺酸(APTS)和8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)等的发荧光化合物尤其适用于衍生碳水化合物的电泳分离。其它用作碳水化合物荧光标记的化合物包括:2-氨基吡啶(AP)、5-氨基萘-2-磺酸盐(ANA)、1-氨基-4-萘磺酸(ANSA)、1-氨基-6,8-二磺酸(ANDA)、3-(4-羧基苯甲酰)-2-喹啉羧醛(CBQCA)、荧光黄、2-氨基吡啶酮和4-氨基苄腈(ABN)。

[0034] 在具体实施方式中,可以用本领域已知的任何检测方法检测荧光标记的碳水化合物,但是优选激光检测,如二极管激光、He/Cd激光或氩离子激光。在具体实施方式中,用基于电荷耦合装置(CCD)照相机的成像系统对电泳分离的标记碳水化合物条带图谱进行显影。从CCD照相机而来的信息可以以数字形式存储并用各种计算机程序进行分析,从而将个体间和参考标准间的诊断性碳水化合物模式加以比较。在另一个具体实施方式中,可

以将凝胶分离的诊断性碳水化合物转移至固定化膜上,也就是印记,然后,再用各种诊断性碳水化合物特异性的试剂进行探测,如凝集素或所述诊断性碳水化合物特异性的单克隆或多克隆抗体。在具体实施方式中,本发明提供了一种检测哺乳动物体内肝纤维化的方法,该方法包括:使用特异地与所述至少一种聚糖结构和/或复合糖相结合的配体,对来源于罹患和不患纤维化个体的样品中丰度有所不同的至少一种聚糖结构和/或复合糖进行计量和检测。配体包括凝集素和抗体。例如,可以用特异性识别以等分 GlcNAc 修饰的聚糖(或其复合物)的凝集素检测体液样品中具有“等分 GlcNAc”残基(GnT-III 产物)的 N-聚糖结构(或其复合物)丰度的增加,这样的凝集素例如来自菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的红细胞凝集素(E-PHA)或其突变体,该突变体具有,例如,对这种修饰聚糖更高的特异性或抗体特异性。或者,可用只能和未用等分 GlcNAc 残基取代的 N-聚糖(或其复合物)相结合的凝集素与 N-聚糖(或其复合物)结合的减少来检测具有“等分 GlcNAc”残基的 N-聚糖结构(或其复合物)丰度的提高。这类凝集素的一个实例是来自 *Canavalia ensiformis* (Con A) 的凝集素。观察到的血清糖蛋白 N-聚糖的低半乳糖苷化可以用末端 GlcNAc 结合凝集素进行检测,如 *Griffonia simplicifolia* II (GS-II) 凝集素。或者,低半乳糖苷化可以用末端半乳糖结合凝集素如来自 *Erythrina cristagalli* 的凝集素进行检测,其结合的减少则代表低半乳糖苷化。

[0035] 在具体实施方式中,对作为特异的糖基转移酶底物的碳水化合物的特征进行检测而得到“由碳水化合物结构决定的特征分布图”。在优选的实施方式中,这一糖基转移酶是  $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶,而碳水化合物存在于血清或血浆全部蛋白质的混合物中。该反应的另一底物是 UDP-半乳糖,该反应产出化学计量的 UDP。因此,可以通过测量反应前后去唾液酸蛋白质的半乳糖基化程度的差异而得到分布图,例如,用糖蛋白与末端  $\beta$ -半乳糖特异性的凝集素相结合的方法(如,本领域已知的来自 *Ricinus communis* 和 *Erythrina cristagalli* 的凝集素,或者半乳糖凝集素(galectin),如来自 *Coprinus cinereus*)。或者,可以测量  $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶在血清或血浆蛋白质混合物中的反应所产生的 UDP 数量,从而获得分布图,例如,用 HPLC 的方法。可以用耦合的酶反应来测量 UDP 的数量,所用的酶是核苷酸代谢中已知的 1 种或多种酶,例如,核苷酸二磷酸酯酶,如酵母的高尔基 GDPase,它对 UDP 也表现出很高的水解活性。在后面这种情况下,可以用熟知的技术通过测量 UMP 或磷酸盐而得到分布图。还有一个测量 UDP 的实施例,包括使用本领域已知的对 UDP-Gal 和 UDP 具有不同亲和度的超大分子膜孔。这样得到的分布图可以,例如,对存在于血清或血浆样品中的蛋白质或碳水化合物的总量进行标准化。在另一个实施方式中,可以将存在于血清或血浆蛋白质混合物中的碳水化合物用作  $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶的底物,以 UDP-半乳糖和 CMP-N-乙酰神经氨酸作为糖供体底物而得到分布图。在该实施方式中,分布图可以由反应前后结合唾液酸的凝集素(如,本领域熟知的来自 *Maackia amurensis* 或 *Sambucus nigra* 的凝集素)与糖蛋白结合的不同情况所组成,或者可以由用本领域已知方法测量反应中释放的 UDP 和/或 CMP 所得的数量组成。

[0036] 在另一个实施方式中,碳水化合物分布图方法可以在电泳之前补充一个步骤,即用与连接于碳水化合物分析物的标记所不同的发色团或荧光团标记 1 个或多个内标。通过将衍生碳水化合物电泳迁移率参考于内标混合物组分的迁移率,内标可以使得衍生碳水化合物电泳迁移率得到精确而可重复的测定。例如,可以在做分布图之前,向衍生聚糖中加入

罗丹明标记的寡核苷酸标准 Genescan™500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 或罗丹明标记的 6-、18-、30- 和 42- 寡核苷酸的混合物。可以在对分析样品进行标记之前, 先对诊断标准进行标记; 然而, 优选的是同时标记诊断标准与分析标准。而且, 优选地对标准中的诊断性碳水化合物加以定量, 来和分析样品中的诊断性碳水化合物的数量做量和质的比较。

[0037] 术语“体液”包括, 血液、血清、血浆、唾液、尿液、骨髓液、脑脊液、滑膜液、淋巴液、羊膜液、乳头吸取液等。优选的用于分析的体液是可以方便地从患者身上取得的体液, 尤其优选的体液包括血清和血浆。

[0038] 尽管在实施本发明时, 对(衍生)聚糖做分布图之前可以不对样品进行预处理, 在具体实施方式中, 在对诊断性碳水化合物分离和定量之前, 分析样品可能要求先进行加工。采用的样品加工的具体方法可以根据多种(由样品体液的选择和诊断性碳水化合物的识别而带来的不同)因素而有所改变; 这些因素包括: 诊断性碳水化合物的丰度、背景碳水化合物的浓度、干扰分子的存在情况(例如, 减慢碳水化合物条带的迁移率的分子或减弱诊断性碳水化合物荧光标记的分子)、以及荧光标记是否必需与衍生的诊断性碳水化合物分离。合适的样品加工或预处理方法包括: 透析, 来去除干扰分子(例如, 去除盐类, 使质谱检测效率更高); 超滤, 来浓缩诊断性碳水化合物并除去干扰分子; 离心, 来去除干扰粒子或浓缩细胞; 沉淀, 来去除干扰分子, 从血清中除去白蛋白而富集糖基化的蛋白质, 并因此富集低丰度的聚糖; 用糖苷酶去糖基化(例如, 用唾液酸酶消化聚糖)而产生更简单的聚糖分布图; 色谱方法, 如亲和色谱, 用来, 例如, 从血清中去除白蛋白。

[0039] 在另一个实施方式中, 本发明提供了一种检测哺乳动物体内肝纤维化或肝纤维化级别变化的方法, 包括: a) 做以下物质的分布图: 碳水化合物或其衍生的片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征; 所述碳水化合物或所述片段存在于复合糖的混合物中, 或者是从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的复合糖混合物中获得, 以及 b) 测定步骤 a) 的分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的数量, 或者测定存在于所述碳水化合物分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段的特征, 以及 c) 将步骤 b) 中所得的测量数据与从未患肝纤维化的哺乳动物的分布图中获得的测量数据相比较, 用以检测肝纤维化, 或者, 将步骤 b) 中所得数据与先前在所述哺乳动物中测定的数据相比较, 用以检测肝纤维化的级别变化, 和 d) 对步骤 c) 中所得的比较结果进行归因, 以检测哺乳动物的肝纤维化或肝纤维化级别的变化。术语“检测相对数量”是指至少一种碳水化合物或片段(例如, 一种特殊的碳水化合物或片段)的数量可以在 2 个分布图中进行测定, 其中, 一张分布图来自未患肝纤维化的哺乳动物, 而另一张分布图则来自可能罹患肝纤维化而需要诊断是否患病的哺乳动物。或者, 可以从未患肝纤维化的哺乳动物中获得特定碳水化合物的平均参考范围, 将其与需要诊断是否罹患肝纤维化的哺乳动物中所述的特定碳水化合物的测量数量加以比较。在另一个实施方式中, “检测相对数量”是指测量存在于动物体液样品的一个碳水化合物分布图中的至少 2 种碳水化合物或其衍生片段的相对数量, 或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的相对数量, 或所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征的相对数量。

[0040] 在本发明的另一个实施方式中, 为了能够测定碳水化合物的相对数量, 还在用以

分析对象样品中诊断性碳水化合物的凝胶中加入了诊断标准；然而，由诊断标准所体现的信息，例如，条带迁移距离和条带强度，也可以用如下方法获得：即在测定前，将诊断标准置于和分析样品所处的分析条件相类似的条件下，进行荧光团辅助碳水化合物电泳，并将结果存储下来，然后在测定时将所得的结果与该存储记录相比较。诊断标准可以是阳性标准，也就是对应于患病个体的完整的碳水化合物模式，或者，诊断标准可以是阴性，也就是对应于未患病个体的模式。诊断标准的组成可以与分析样品相似，就是它们可以同时含有与实际样品中所发现的具有相似组分的诊断性碳水化合物和背景碳水化合物。诊断标准可以是来自患病个体的样品和来自非患病个体的样品。或者，诊断标准可以不含背景碳水化合物而包含 1 种或更多种诊断性碳水化合物。

[0041] 在具体实施方式中，检测肝纤维化或肝纤维化级别变化的诊断技术不要求事先详细了解碳水化合物的结构。

[0042] 因此，在另一个实施方式中，本发明提供了检测哺乳动物体内肝纤维化或肝纤维化级别改变的方法，包括：a) 做以下物质的分布图：碳水化合物或其衍生的片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征；所述碳水化合物或所述片段存在于复合糖的混合物中，或者是从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的复合糖混合物中获得，以及 b) 测定步骤 a) 的分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的数量，或者测定存在于所述碳水化合物分布图中至少一种碳水化合物或其衍生片段的一个特征，其中所述的至少 1 种碳水化合物选自：

[0043] i)  $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$  (聚糖 1)，

[0044] ii)  $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$  (聚糖 2)，

[0045] iii)  $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$  (聚糖 7)，

[0046] iv)  $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)]\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}$  (聚糖 8)，

[0047] v) 聚糖 1、2、7 或 8 的衍生片段，

[0048] vi) 聚糖 1、2、7 或 8 的唾液酸化衍生物，

[0049] vii) 聚糖 1、2、7 或 8 或其衍生物或其片段的特征。

[0050] 以及 c) 将步骤 b) 中所得的测量数据与从未患肝纤维化的哺乳动物的分布图中获得的测量数据相比较，用以检测肝纤维化，或者，将步骤 b) 中所得数据与先前在所述哺乳动物中测定的数据相比较，用以检测肝纤维化的级别变化，和 d) 对步骤 c) 中所得的比较结果进行归因，以检测哺乳动物的肝纤维化或肝纤维化级别的变化。

[0051] 为了表示清楚，峰 1、2、7 和 8 的结构与图 1 的碳水化合物分布图相对应，也与图 5 中用图形表示的这些结构相对应。所述碳水化合物分布图是去唾液酸的分布图（聚糖上没有唾液酸），这就意味着峰 1、2、7 和 8 的结构是严格意义上的碳水化合物片段（丢失了唾

液酸结构)。本文中碳水化合物的表示方法参照 IUPAC 的命名规则 (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/38.html>), 对应于本发明图 1 的峰已经过鉴定, 并且以它们的缩写和扩展命名加以表示。在权利要求书中使用的是缩写命名。4 个结构的命名归纳如下:

[0052] 图 1 中峰 1 的去唾液酸聚糖结构:

[0053] 缩写命名:

[0054]  $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$

[0055] 扩展命名:

[0056]  $\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)}-[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}-[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\text{D-GlcpNAc}$

[0057] 图 1 中峰 2 的去唾液酸聚糖结构:

[0058] 缩写命名:

[0059]  $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$

[0060] 扩展命名:

[0061]  $\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)}-[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}][\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}-[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\text{D-GlcpNAc}$

[0062] 图 1 中峰 7 的去唾液酸聚糖结构:

[0063] 缩写命名:

[0064]  $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$

[0065] 扩展命名:

[0066]  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)}-[\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}][\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}-[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\text{D-GlcpNAc}$

[0067] 图 1 中峰 8 的去唾液酸聚糖结构:

[0068] 缩写命名:

[0069]  $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)]\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}$

[0070] 扩展命名:

[0071]  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}]-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)}-[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{2)}-\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}]-\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)}-\text{D-GlcpNAc}$

[0072] 在另一个实施方式中, 本发明提供了一种检测哺乳动物体内肝纤维化或肝纤维化级别变化的方法, 包括: a) 做以下物质的分布图: 碳水化合物或其衍生的片段、或所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构所确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征; 所述碳水化合物或所述片段存在于复合糖的混合物中, 或者是从存在于或分离自所述哺乳动物体液样品中的复合糖混合物中获

得,以及 b) 测定聚糖结构 1 或其片段与聚糖结构 8 或其片段、唾液酸衍生物或其特征之间的相对数量和 / 或聚糖结构 2 或其片段与聚糖结构 8 或其片段、唾液酸衍生物或其特征之间的相对数量和 / 或聚糖结构 7 或其片段与聚糖结构 8 或其片段、唾液酸衍生物或其特征之间的相对数量,以及 c) 将步骤 b) 中所得的测量数据与从未患肝纤维化的哺乳动物的分布图中获得的测量数据相比较,用以检测肝纤维化,或者,将步骤 b) 中所得数据与先前在所述哺乳动物中测定的数据相比较,用以检测肝纤维化的级别变化,和 d) 对步骤 c) 中所得的比较结果进行归因,以检测哺乳动物的肝纤维化或肝纤维化级别的变化。

[0073] 在另一个实施方式中,本发明还包括一种用于诊断肝纤维化或用于检测肝纤维化级别变化的诊断试剂盒。例如,可以制备用于荧光团辅助碳水化合物电泳诊断肝纤维化的试剂盒。作为另一个实施例,可以制备用质谱来诊断肝纤维化的试剂盒。荧光团辅助碳水化合物电泳诊断试剂盒提供了进行肝纤维化诊断所需的试剂组。合适的试剂盒使得实验室可以方便地进行荧光团辅助碳水化合物电泳诊断。试剂盒可以包括鉴定肝纤维化试验所需的试剂。试剂盒可以包括诊断标准,荧光标记,印记和结合材料,例如,膜、碳水化合物特异性结合试剂、凝集素、使用说明、样品容器、和聚丙烯酰胺凝胶试剂、预凝的凝胶、酶类的缓冲液、还原试剂(用于碳水化合物的荧光团标记),和能够催化诊断性碳水化合物结构改变反应的糖苷酶(例如,唾液酸酶、半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶)。更完整的试剂盒可以包括进行荧光团辅助碳水化合物电泳所用的仪器,如聚丙烯酰胺凝胶装置、CCDs、激光、DNA 测序仪、计算机、软件等等。优选地,在荧光团辅助碳水化合物电泳诊断试剂盒中的试剂以预测量的数量提供。优选地,试剂盒包括实施本发明的荧光团辅助碳水化合物电泳方法的使用说明。

[0074] 诊断试验在实践中很有用,因为很容易由经过普通训练的实验室人员进行大规模的应用。而且,由于基于电泳技术的高分辨率和高灵敏度的 DNA 测序和突变检测分析仪已经以很快的增长速度出现于越来越多的临床实验室中,或者已经是大多数实验室可以购置得起的,因此,可以在这些仪器上进行新型的肝纤维化检测的诊断糖组学。而且,可获得的 DNA 分析仪的分析范围很宽,根据每个实验室的需求可以使分析样品的通量从仅仅几个样品提升至每天每台仪器分析几百个样品。DNA 分析仪器还有另一个优势,即自动化,这就降低了整个分析过程的复杂程度。对整个糖蛋白混合物做分布图就使试验更有可能检测到混合物中每种糖蛋白的丰度和糖基化模式的个体间差异。这样的检测就比目前使用的研究纯化糖蛋白糖基化模式的经典方法更强有力。

[0075] 在另一个实施方式中,检测肝纤维化的方法还包括临床化学参数和 / 或组织学数据。因此,本发明也可以方便地与临床化学参数和 / 或组织学和 / 或成像参数联用。临床化学参数的测量包括检测胆红素和 / 或白蛋白和 / 或凝血酶原时间和 / 或 C- 反应性蛋白和 / 或 IgA 丰度和 / 或血清透明质酸浓度和 / 或氨基转移酶和 / 或几个本领域已知的肝脏代谢试验的水平。在具体实施方式中,如 W00216949 所述对纤维测试 (fibrotest) 的二元对数回归模型进行计算并与本发明的诊断试验联用。

[0076] 组织学包括肝活检。成像包括超声和 / 或 CT 扫描和 / 或 MRI 扫描和 / 或肝脏特异性的放射性示踪剂成像。

[0077] 给出以下的实施例作为对某些实施方式的描述,因此,它们仅仅作为示范之用,而不对其本质做任何限制。

[0078] 实施方式

### [0079] 1. 数据收集与处理

[0080] 对所研究的 248 个对象血清样品做了去唾液酸化 N- 聚糖分布图 (图 1) (参见血清样品及临床诊断, 表 1), 我们对所有样品中均能检测到的 14 个峰进行了定量。根据这 14 个峰的总峰高强度对它们的丰度进行了标准化。在此, 轻度肝硬化定义为具有经典 Child-Pugh 肝硬化分类法的 3 个生化组分 (血清白蛋白、总胆红素和国际标准化比例, 后一个测量凝血速度) 参照范围内的值的病例。这 3 个标记中的 1 个或多个值超出参照范围的病例定义为“代偿失调性”肝硬化。因此, 以目前的生化肝硬化评估方法进行评估, “轻度肝硬化”病例组会被错误地归到“非肝硬化”组, 显然, 对于这一亚组的评估, 新型的生物标记意味着真正的改善。我们发现, 在血清 N- 糖组的 14 个峰中, 有 5 个峰表现出期望的趋势, 即按照以下顺序, 其丰度逐渐升高或降低: 健康的献血者 </> 非肝硬化慢性肝病 </> 轻度肝硬化 </> 代偿失调性肝硬化, 而对照组的丰度则相对“正常” (图 6)。峰 1、2 和 7 丰度的增加与峰 3 和 8 丰度的降低呈现负相关 (Pearson's  $r$  值在  $-0.5$  至  $-0.8$  之间变动, 对所用值:  $P < 0.0001$ )。因此, 通过计算峰 1、2 和 7 的增加的丰度对峰 8 降低的丰度的比值, 我们建立了 3 个变量 (图 2), 随后将这些新型变量进行对数转换, 而将其分布标准化。用这种方法, 我们归纳了所关心的 3 个变量数据的变化趋势, 于是只需要对血清 N- 糖组分布图中的 4 个峰进行计量即可 (这 4 个峰在图 1 中用框标识出来; 根据以下所述的评估, 再将峰 3 纳入考虑范围并不会增加额外的诊断信息)。

### [0081] 2. 肝硬化的检测

[0082] 对于这 3 个新型变量中的 1 个 [ $\text{Log}(\text{峰 7/峰 8})$ ]; 本文重新命名为 GlycoCirrho 检查, 在 0.005 的显著性水平下 (ANOVA, Tukey's HSD), 轻度肝硬化组 (包括那些并发有肝细胞癌的轻度肝硬化) 的平均值与所有其它样品组的平均值显著不同。其它 2 个由血清糖组衍生而来的变量, 其平均值也与所有其它样品组的平均值显著不同, 但是显著性水平较低 ( $\alpha_{\text{FW}} = 0.05$ )。用非参数受试者操作特征 (Receiver Operating Characteristic) (ROC) 曲线分析<sup>16,17</sup> 评估了三种聚糖参数和 {纤维测试 (Fibrotest)} 对于轻度肝硬化患者 (如上定义) 和肝硬化前慢性肝病患者的区别能力。ROC 分析的结果表明如曲线下面积 (AUC) 测量所得的 GlycoCirrho 检查和 {纤维测试 (Fibrotest)} 的分类效率均为 85–90% (图 3a, 上图)。其它 2 个血清糖组衍生参数的分类效率稍低 ( $\text{Log}(\text{峰 1/峰 8})$  的  $\text{AUC} = 0.81 \pm 0.07$ , 而  $\text{Log}(\text{峰 2/峰 8})$ , 图 3a, 下图) 的  $\text{AUC} = 0.81 \pm 0.06$ )。然后, 我们计算了 ROC 曲线的截断值, 并以这些截断值用二维散点图将患者分类 (图 3b, 上图)。将本研究中 2 个表现最佳的肝硬化诊断生物标记 (基于糖组的 GlycoCirrho 检查和 {纤维测试 (Fibrotest)}) 二元对数回归模型) 联用所得到的对轻度肝硬化的检测特异性为 100%, 灵敏度为 75% (18/24)。整体分类效率为 93% (76/82)。对至少有 1 个肝硬化经典生化标记 (白蛋白、胆红素、INR) 代偿失调的慢性肝病患者组, 也用上面计算所得的截断值对其进行分类 (图 3b, 中图), 结果显示对于此类晚期肝硬化的灵敏度达到 100%。

[0083] 所以, 用我们的新型肝硬化诊断标记组合对诊断患有慢性肝病而成为肝活检候选者的患者组进行诊断, 未得出假阳性结果, 对生化代偿性肝硬化病例的检测灵敏度为 75%, 而对生化代偿失调性病例, 灵敏度达到 100%。

### [0084] 3. 在肝硬化前纤维化阶段, 诊断变量的行为

[0085] 将所得数据根据组织学确定的肝纤维化阶段做图<sup>18</sup> (图 4), 数据的趋势即说明

GlycoCirrho 检查比其它 2 个血清糖组衍生生物标记具有更优越的分类效率。从 F0/F1 阶段开始,随着纤维化阶段的升高,Log(峰 1/峰 8),尤其是 Log(峰 2/峰 8) 的值逐渐上升,而 GlycoCirrho 检查则保持稳定,或者甚至从 F0/F1 至 F3 阶段有点下降,仅在肝硬化阶段才上升。很显然,纤维化阶段与 Log(峰 2/峰 8) 的值接近线性关联(Spearman 等级相关, $p = 0.76$ ),这就使其很有希望成为纤维化进程(或纤维化不再继续发展)的进度检查标记。对于{纤维测试(Fibrotest)}模型,观察到随着纤维化阶段的升高,{Fibro 检查}值呈现 S 型增长。正如预计的那样(二元对数回归模型以 0-1 的间隔回归,接着是在两端的渐进行为)。在以前的研究中<sup>14</sup>,报道的 S 型曲线的转变发生在大约 F2 阶段。在我们的研究中,我们发现转变发生在 F3 阶段。还不清楚这一差异的原因所在。

#### [0086] 4. 在其它疾病和普通群体样品中评估 GlycoCirrho 检查

[0087] 为了更广泛地了解新型 GlycoCirrho 检查的特性,我们分出了一组红十字献血者对照组(普通群体样品,HBV、HCV 和 HIV 阴性),其截断值最适用于肝硬化的检测。只有 2 个病例(总共 60 ;3%) 评分为轻度阳性结果(图 3b,下图)。定期饮酒并不属于献血排除标准(因而,在这种设置中,酗酒可能不被注意到),而这正是开展研究的 HCV 低发率地区(如佛兰德斯和比利时)发生肝硬化的主要原因。与这一组相当高的中位数年龄(61 岁)结合起来看,2-3%的代偿性肝硬化的发生率是在期望范围之内的<sup>19</sup>。我们还纳入了一组由 24 个自身免疫病患者组成的对照组,因为在大部分这些疾病尤其是类风湿性关节炎中<sup>20</sup>,都大量记录了血清 IgG 的低半乳糖苷化。显然,由于血清中 IgG 的存在量大约为 11g/l,并且 IgG 是该体液中主要的非肝脏产生的糖蛋白,因此,IgG 聚糖的修饰情况可以由总血清糖蛋白的聚糖模式反映出来。这样,我们使用蛋白 L 亲和层析从这 24 个患者和健康献血组的 6 个成员的血清中微量纯化了免疫球蛋白,并获得了这些纯化的免疫球蛋白制品的 N-聚糖分布图。正如所预期的那样,在自身免疫病组中检测到相对强的低半乳糖苷化,这主要是由非半乳糖苷化的核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖基化聚糖丰度的升高反映出来(图 1 中的结构 1,比对照平均高出 55%, $P = 0.01$ )。而且,图 1 中结构 7 聚糖的丰度平均增长了 1 倍( $P < 0.0001$ ),由此,我们发现免疫球蛋白的 N-聚糖被等分 GlcNAc 残基取代的水平大大提高。然而,这些增长在大多数的病例中不足以强烈地扰乱总血清糖蛋白的 N-聚糖模式而使他们在 GlycoCirrho 检查中得到阳性评分(4/24 阳性)。由于没有获得足够的血清,我们不能评估纤维测试在这些患者中的效果。为了评估升高的血清碳水化合物缺乏转铁蛋白<sup>21</sup>(CDT)水平是否影响血清 N-糖组肝硬化诊断参数,我们从 CDT 水平升高和未升高的长期酗酒患者体内取得血清样品。CDT 阳性组中,上述 3 个肝硬化诊断参数的平均值并没有显著区别于 CDT 水平正常组的平均值( $P > 0.1$ , Student's t- 测验),这表明 CDT 水平的不同并不影响我们的肝硬化标记。

#### [0088] 5. 丰度不同的 N-聚糖的部分结构分析

[0089] 一篇文献报道描述了对存在于“健康”人体血清中糖蛋白上的 N-聚糖进行三维 HPLC 做图<sup>22</sup>,借助于该文献,我们能够得到大量关于肝硬化中调控方式不同的血清 N-聚糖的结构信息。而且,在我们的诊断研究中,所得样品中感兴趣峰的数值范围很宽。这对于在后-外切糖苷酶-微阵列分布图中“跟踪”感兴趣峰有很大帮助。图 5 显示了其中 3 个样品的外切糖苷酶测序。在实施例 9 中有对结构分析的完整描述。结构分析归纳所得的结论是:在肝硬化中,低半乳糖苷化的 N-聚糖(峰 1 和 2) 丰度增加,等分 N-乙酰氨基葡萄

糖 (GlcNac) 残基修饰的 N- 聚糖 (峰 2 和 7) 增加, 而完全半乳糖苷化的二触角和三触角的 N- 聚糖 (峰 3 和 8) 降低。

[0090] 6. 发展在常规分子诊断实验室中实施该方法的技术

[0091] 6.1 仅用 PCR 热循环仪制备样品:

[0092] 获得以上血清 N- 糖组分布图具有诊断应用价值的证据以后, 我们进一步介绍样品制备方案的简化程序。使用标准的热盖 PCR 热循环仪, 我们发展了在 8 小时内就能从血清中产出可直接用于分析的标记 N- 聚糖的程序, 该程序包括液体添加 / 去除和稀释步骤, 而且人为操作时间极少 (参见方法部分)。所得的方案基于血清糖蛋白浓度很高, 以及我们的聚糖分析方法十分灵敏 (可以容易地检测到 15fmol)。因此, 在少量血清样品中可获得的 N- 聚糖量与分析所需量之间有很大的空间。于是, 我们可利用这种很大的空间在样品制备方案中降低一些步骤的效率, 但却使操作更简便。在 20 个先前曾用我们的标准样品制备方法分析过的血清样品上测试了这一方案。用这 2 种技术确定的先前描述的 3 个诊断变量值表现出很强的线性关联 (Pearson's  $r \geq 0.98$ ; 图 7), 这就表明新型的基于热循环仪的方法可以取代过去使用的更费力的基于稳定素 P 板的样品制备程序。在我们目前的实验室操作中, 我们已经将用于这一方案的所有试剂都以试剂盒的形式装配到一起, 这样可以平行制备 48 或 96 个样品。

[0093] 6.2 用 ABI 310DNA 分析仪制作血清 N- 糖组毛细管凝胶电泳分布图

[0094] 在分子病理实验室中已经广泛地使用基于毛细管凝胶电泳的 DNA 分析仪, 这些分析仪用于诊断试验, 包括 DNA 测序或高分辨率 DNA 片段分析 (实体瘤分析、传染性疾病诊断, …)。由于其自动化水平高、使用方便, 使它们更适用于临床诊断实验室的操作, 因此, 这些分析仪正在迅速取代以往使用的基于凝胶的 DNA 分析仪。因此, 为了能在分子病理实验室的标准配置中完全实施我们的糖组学试验, 我们在 ABI310 单毛细管 DNA 分析仪上优化了去唾液酸化总血清 N- 聚糖的分析步骤。只需对标准的 DNA 分析程序做少量的修改就能在 18min 内获得更好的分布图, 甚至比用基于凝胶的 ABI377 获得的结果具有更高的分辨率 (图 8)。这样, 在没有人为操作的情况下, 一次过夜运行就能分析 48 个 APTS 标记的血清聚糖样品。与基于热循环仪的样品制备方法联用, 我们对 48 个样品的完成时间为 24h, 而且, 所需的人工干预并不比在分子病理实验室中进行的典型 DNA 片段分析反应多。由于已经有售多毛细管测序仪, 因此, 需要的话还可以方便地提高通量。

[0095] 7. 血清样品和临床诊断

[0096] 所研究的患有慢性肝病的患者组由根特大学医院的肠胃病及肝脏病学系的肝活检候选患者组成, 不论他们潜在的病因 (病毒性的、酒精性的、自身免疫性的、病源不明的, 参见下文)。得到以下数据: 患者的年龄和性别、血清白蛋白、总胆红素、INR、AST、ALT、GGT、总血清蛋白、 $\alpha_2$ - 巨球蛋白、结合珠蛋白和载脂蛋白 A1。血清白蛋白、总胆红素、INR、AST、ALT、GGT 和总血清蛋白用模块分析仪进行检测 (Roch Diagnostics, Basel, 瑞士)。结合珠蛋白、 $\alpha_2$ - 巨球蛋白和载脂蛋白 A1 在 BNII 分析仪上用固定时间免疫散射测浊法进行检测 (Dade Behring, Marburg, 德国)。 $\alpha_2$ - 巨球蛋白和结合珠蛋白试验以国际 CRM 470 参照材料进行定标 (Dati, F. 等 (1996) Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 34, 517-520)。根据 IFCC 标准对载脂蛋白 A1 进行标准化 (Albers, J. J. & Marcovina, S. M. (1989) Clin. Chem. 35. 1357-1361)。上述的一个或多个数据点缺失的患者排除于研究之外。根

据  $\alpha_2$ -巨球蛋白、结合珠蛋白、GGT、年龄、胆红素、载脂蛋白 A1 和性别, 计算出一个分数用于 { 纤维测试 } 二元对数回归模型。这一称为纤维测试的二元对数回归模型是由 Dr. T. Poynard 创立的 ( 参考材料 14、15 以及 W00216949)。我们在本发明中使用以下公式 ( 来源于 W00216949) :  $f = 4.467 \times \text{Log}[\alpha_2\text{-巨球蛋白 (g/l)}] - 1.357 \times \text{Log}[\text{结合珠蛋白 (g/l)}] + 1.017 \times \text{Log}[\text{GGT (IU/l)}] + 0.0281 \times [\text{年龄 (年)}] + 1.737 \times \text{Log}[\text{胆红素 (}\mu\text{mol/l)}] - 1.184 \times [\text{载脂蛋白 A1 (g/l)}] + 0.301 \times \text{性别 (女性 = 0, 男性 = 1)} - 5.540$ 。在此, 我们所说的二元对数回归模型是如 W00216949 中所采用的模型。根据 Child-Pugh 分类法基于生化标准患有代偿失调性肝硬化的患者 ( 至少达到以下一个标准 : 血清白蛋白  $< 3.5\text{g/dl}$ , 血清总胆红素  $> 2\text{mg/dl}$ , 国际标准比例  $> 1.7$ ) 分类至“代偿失调性肝硬化”组 ( $N = 24$ ), 并且不进行活检从而避免对这些参与者造成不必要的与研究相关的危险。在 82 个其他患者中, ( 没有信息显示不应当进行肝脏活检), 用穿过皮肤的肝活检来评估肝纤维化阶段, 并由不知道 GlycoCirrho 检查和 { 纤维测试 } 结果的病理学家根据 METAVIR 标准进行评分。拒绝接受活检的患者、或者不能达到可判断的活检结果的患者排除在本研究之外。所有收集到的有关上述 106 位患者的数据及其慢性肝病的病因列于表 1 中。

[0097] 表 1 数据是中位数 ( 四分位数间距 ) 或病例数 (N%)

[0098] 研究的 106 位慢性肝病患者的特征

[0099]

| 特征                   | 研究组(N = 82)      | 生化代偿失调性肝硬化(N=24) |
|----------------------|------------------|------------------|
| 年龄, 年                | 42 (35-60)       | 58 (52-62)       |
| 男性性别                 | 45 (55%)         | 19 (79%)         |
| <b>病因</b>            |                  |                  |
| 长期酗酒                 | 4 (5%)           | 12 (50%)         |
| HCV                  | 63 (77%)         | 8 (33%)          |
| HBV                  | 6 (7%)           | 2 (8%)           |
| 自身免疫                 | 7 (9%)           | 1 (4%)           |
| 病因不明                 | 2 (2%)           | 1 (4%)           |
| <b>纤维化阶段</b>         |                  |                  |
| 未纤维化(F0)             | 4 (5%)           | /                |
| 门静脉纤维化(F1)           | 24 (29%)         | /                |
| 少数隔片区(F2)            | 20 (24%)         | /                |
| 很多隔片区(F3)            | 10 (12%)         | /                |
| 肝硬化(F4)              | 19 (23%)         | 15 (62%)         |
| F4 + HCC             | 5 (7%)           | 9 (38%)          |
| <b>生化标记</b>          |                  |                  |
| INR                  | 1.07 (1.00-1.18) | 1.4 (1.24-1.54)  |
| 白蛋白(g/dl)            | 4.2 (3.9-4.6)    | 2.7 (2.5-3.2)    |
| 总胆红素( $\mu$ mol/l)   | 9 (5-14)         | 55 (24-92)       |
| 总血清蛋白(g/dl)          | 7.5 (7.0-8.0)    | 6.7 (6.3-7.1)    |
| ALT (IU/l)           | 23 (14-38)       | 10 (7-15)        |
| AST (IU/l)           | 30 (16-47)       | 27 (19-62)       |
| GGT (IU/l)           | 45 (22-128)      | 138 (47-224)     |
| $\alpha$ 2-巨球蛋白(g/l) | 1.98 (1.54-2.49) | 1.77 (1.09-2.37) |
| 载脂蛋白 A1 (g/l)        | 1.34 (1.06-1.65) | 0.46 (0.28-0.84) |
| 结合珠蛋白(g/l)           | 0.73 (0.36-1.06) | 0.01 (0.01-0.40) |

[0100] 6 个月的时间内, 在血液中存在可检测到的 hepBsAg 和 HBV DNA 或可检测到的抗 HCV 抗体和 HCV RNA, 至少 2 份血液样品中的 ALT 水平上升 (高于正常水平的上限), 则诊断患有慢性乙型肝炎和丙型肝炎。根据国际自身免疫肝炎组织出版的标准 (Johnson, J. L. &McFarlane, I. G. (1993) Hepatology 18, 998-1005) 对自身免疫肝炎进行诊断。通过临床交谈来建立慢性酗酒史。

[0101] 在患有肝硬化的患者中, 将检测到  $\alpha$ -胎儿蛋白的升高以及利用一种成像技术 (CT 或 MRI) 发现血管过度生长病变的病例诊断为肝细胞癌 (HCC)。在未检测到  $\alpha$ -胎儿蛋白升高的情况下, 将 2 种成像技术都显示出血管过度生长病变的病例诊断为 HCC。对诊断结果有所怀疑的患者, 则对病灶区域实施 Trucut 针活检。进行这些诊断的临床中心是佛兰德斯地区的 HCC 参考中心, 该地区拥有大约 6 百万居民 (主要是高加索人), 是 HCC 的低发地区。

[0102] 我们分析了 58 个怀疑为长期酗酒并且因此获准进入安特卫普 Stuivenberg 科学医院 (Academic Hospital Stuivenberg) 的精神病学系 (安特卫普是佛兰德斯地区的主要城市) 的患者的样品。用 % CDT-TIA 测验 (AxisBiochemicals, Oslo, Norway) 测定了碳水化合物缺乏转铁蛋白, 并将样品组分成了 2 个亚群, 一个是 CDT 测验阳性亚群 (高于 6% CDT), 而另一个是阴性亚群。精神病临床设置规定不允许对这一患者组获得更多详细信息,

所以我们不能评估肝病阶段,而只能将此患者组用于研究 CDT 水平升高对我们肝硬化诊断标记的影响。我们将 24 个患者样品纳入研究范围,这些患者由根特大学医院的风湿病学系的专科临床医师诊断患有类风湿性关节炎、或强直性脊柱炎或节段性肠炎。

[0103] 为了建立所测聚糖的参考值,我们研究了由 60 名符合红十字健康标准 (HBV、HCV 和 HIV 阴性) 的献血者组成的对照组。这些样品取自比利时根特的红十字输血中心。

[0104] 8. 使用蛋白质 L 亲和层析纯化血清免疫球蛋白,并对制备产物做 N-聚糖分布图

[0105] 将 5  $\mu$ l 血清与 130  $\mu$ l 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 相混合,并与 40  $\mu$ l 蛋白质 L-琼脂糖亲和树脂 (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) 在旋转装置上共同培养 1h。然后,用铺有 Durapore 膜的 96 孔板 (Millipore, Bedford, Massachusetts) 捕获树脂,并且用 300  $\mu$ l PBS 洗涤 8 次。接着,用 250  $\mu$ l 0.1M 甘氨酸 (pH = 2.0) 对结合的免疫球蛋白洗脱 2 次。制品中的免疫球蛋白结合在 96 孔板中的稳定素 P 上,其余的 N-聚糖分析步骤如 (Callewaert, N. 等 (2001) Glycobiology 11, 275-281) 所述。分布图中 7 个最显著的峰 (未显示) 在总信号强度中占有高于 % 的信号强度,对这些峰进行计量,并根据总信号强度进行标准化。与本研究相关的峰 1 和 7 的数据列在下面 (表 2)。

[0106] 表 2 纯化的免疫球蛋白上相关 N-聚糖的定量

[0107]

| 患者识别标记 | 临床诊断    | 峰 1 在免疫球蛋白<br>N-聚糖分布图中的% | 峰 7 在免疫球蛋白<br>N-聚糖分布图中的<br>% |
|--------|---------|--------------------------|------------------------------|
| CD5    | 节段性肠炎   | 12.80                    | 15.40                        |
| CD7    | 节段性肠炎   | 10.53                    | 17.10                        |
| CD9    | 节段性肠炎   | 26.26                    | 12.01                        |
| CD14   | 节段性肠炎   | 22.74                    | 17.68                        |
| CD17   | 节段性肠炎   | 20.05                    | 15.03                        |
| CD19   | 节段性肠炎   | 17.05                    | 22.53                        |
| CD22   | 节段性肠炎   | 14.67                    | 22.15                        |
| CD31   | 节段性肠炎   | 22.22                    | 16.84                        |
| AS1    | 强直性脊椎炎  | 32.31                    | 13.61                        |
| CS70   | 强直性脊椎炎  | 30.33                    | 14.10                        |
| AS2    | 强直性脊椎炎  | 31.76                    | 12.06                        |
| AS3    | 强直性脊椎炎  | 28.90                    | 15.26                        |
| CS17   | 强直性脊椎炎  | 39.56                    | 12.59                        |
| CS13   | 强直性脊椎炎  | 31.58                    | 17.50                        |
| AS4    | 强直性脊椎炎  | 17.57                    | 13.16                        |
| CS28   | 强直性脊椎炎  | 29.43                    | 16.54                        |
| RA146  | 类风湿性关节炎 | 35.66                    | 9.16                         |
| RA248  | 类风湿性关节炎 | 40.29                    | 13.57                        |
| RA212  | 类风湿性关节炎 | 16.30                    | 15.59                        |
| RA226  | 类风湿性关节炎 | 19.10                    | 10.14                        |
| 61.00  | 类风湿性关节炎 | 34.32                    | 22.63                        |
| RA99   | 类风湿性关节炎 | 19.98                    | 21.16                        |
| RA117  | 类风湿性关节炎 | 21.33                    | 15.24                        |
| 85.00  | 类风湿性关节炎 | 33.62                    | 12.46                        |

[0108]

|           |       |              |              |
|-----------|-------|--------------|--------------|
| 平均值+/- SD |       | 25.3 +/- 8.6 | 15.6 +/- 3.7 |
| 74M       | 健康献血者 | 18.00        | 5.01         |
| 65M       | 健康献血者 | 17.36        | 10.92        |
| 67M       | 健康献血者 | 18.68        | 7.29         |
| 80M       | 健康献血者 | 17.49        | 8.02         |
| 50M2      | 健康献血者 | 15.45        | 8.22         |
| 56M1      | 健康献血者 | 10.89        | 7.13         |
| 平均值+/- SD |       | 16.3 +/- 2.9 | 7.8 +/- 1.9  |

[0109] 9. 以不同方式调控的 N-聚糖的部分结构分析 (参见图 5)

[0110] 在一项平行研究中 (Callewaert, N. 等 (2003) *Glycobiology* 13, 367-375), 我们已经指定了健康血清分布图中 4 个主要峰的结构 (结构及其外切糖苷酶产物在图 5 中表示为黑色峰)。得到这些结构大大简化了在分布图中跟踪剩余的、以不同方式调控的峰这一任务。用不同的外切糖苷酶混合物消化购得的 (Glyko, Novato, California) 高度纯化的具有去唾液酸结构 6、7 和 8 (图 5 中的编号) 的参考聚糖, 即得到图 5 中的参考图 (在第 2 和第 3 列下方的图)。在所有情况下中均得到了期望的消化产物。为了压缩图 5 的大小, 结构 6 和 8 的消化电泳图谱合并在一张图中, 显示在图 5 第 2 列的下方。结构 7 (带有等分 GlcNAc 残基) 的消化反应电泳图谱合并显示在图 5 第 3 列的下方图中。不同的峰并不是以数字顺序加以讨论的, 而是以便于论证的顺序加以讨论。

[0111] 峰 3

[0112] 所确定的峰 3 的结构 (Callewaert, N. 等 (2003) *Glycobiology* 13, 367-375) 是双触角的二- $\beta$ -1,4-半乳糖苷化结构。在 HCC 和 / 或肝硬化中, 这一聚糖水平下调, 这与其低半乳糖苷化对应物丰度的增加以及其它双触角聚糖的增加相一致, 这一基本的双触角底物是其它双触角聚糖的前体。

[0113] 峰 8

[0114] 确定的峰 8 的结构是 2,4-分支的三触角三- $\beta$ -1,4-半乳糖苷化聚糖结构 (Callewaert, N. 等 (2003) *Glycobiology* 13, 367-375)。

[0115] 峰 7

[0116] 在慢性肝炎患者的血清分布图中 (图 5 的左侧测序列中第 2 张图的第 3 个箭头) 以及正常人的血清分布图中 (未显示), 这个峰也以相对较低的丰度存在。可以非常容易地在第 3 张测序列中跟踪其序列分析, 该测序列表示的是我们所收集的患病最严重的血清之一。峰 7 是这张分布图中丰度排在第 3 的聚糖, 而且该峰和其任何的消化产物都不与上述的任何参考聚糖或它们的消化产物共同迁移。由于对于 4 个外切糖苷酶的联合消化不显示出共迁移, 这就意味着存在着不包含这些参考聚糖的取代物。在 4 个糖苷酶联合消化后, 峰 7 的消化产物比三甘露糖核心寡糖的迁移慢一个葡萄糖单位, 这意味着在这个三甘露糖核心中存在一个单糖大小的取代物。考虑到对健康血清总糖蛋白 N-聚糖所做的 3D HPLC 图谱 (Nakagawa H. 等 (1995) *Anal. Biochem.* 226, 130-138), 这只能是一个等分的 GlcNAc。

在此处所用的条件下,这一取代物不能被 Jack Bean  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶消化。等分的双触角核心岩藻糖基化参考聚糖上的等分 GlcNAc 残基也能抵抗  $\beta$ -N-乙酰氨基己糖苷酶,这就证实了上述的说法,(参见图 5,第 3 个测序列下方的参考图)。岩藻糖苷酶消化使峰 7 的迁移位置移动了 1.2 个葡萄糖单位,这表明存在有核心- $\alpha$ -1,6-连接岩藻糖残基。再用  $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶进一步消化则使峰又移动了 2 个葡萄糖单位,这就表明存在 2 个  $\beta$ -1,4-半乳糖残基。因此,我们得出的结论是,峰 7 代表等分的双触角、二- $\beta$ -1,4-半乳糖苷化、核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖苷化聚糖结构。该结论由以下实验结果得到证实,即所有的峰 7 的消化产物都与具有这一结构的参考聚糖的对应消化产物一同被洗脱(图 5 的第 3 个测序列底部的图片)。这一等分 GlcNAc 取代物是 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III (GnT-III) 对峰 6 所代表结构、峰 3 的核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖变异体作用的产物(峰 6 的结构由附属研究所确定 (Callewaert, N. 等 (2003) *Glycobiology* 13, 367-375))。

#### [0117] 峰 1

[0118] 用岩藻糖苷酶消化后,峰 1 迁移了 1.2 个葡萄糖单位,移动到单半乳糖双触角参考聚糖的位置(中间测序列底部参考图中的第一个峰)。而且,用半乳糖苷酶消化后,该位置的峰达到很高的峰强度,这是因为峰 6 移动到了这个位置(峰 6 的结构:二半乳糖核心-岩藻糖苷化双触角聚糖)。将这些数据一起考虑,则表明峰 1 是双触角、单半乳糖核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖苷化聚糖。因此,在 HCC 和/或肝硬化样品组中,该峰的上调代表了血清糖蛋白低半乳糖苷化和核心岩藻糖苷化增加的共同结果。

#### [0119] 峰 2

[0120] 由于其丰度相对较低,该峰的鉴别更加困难。然而,可以获得足够的信息来断定其结构:用唾液酸酶和  $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶双酶消化得到的分布图中,唾液酸图中峰 7 的产物完全与峰 2 的产物共迁移。随后,由于在该尺度下左侧测序列(肝炎样品)中并未观察到峰 2,我们可以在可检测到峰 2 的唾液酸+岩藻糖苷酶对其它 2 个样品的双酶消化模式中鉴别其外切糖苷酶产物。用岩藻糖消化后,在峰 2 的位置上没有任何峰存在,而且只有一个新出现的峰可能是消化产物(用灰色高亮,中间测序列的唾液酸+岩藻糖苷酶分布图中的第 1 个箭头)。在三酶消化分布图中(再用  $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶进行消化),该峰强度更大,这是因为峰 7 的消化产物与其共迁移。再用氨基己糖苷酶补充消化,则在这个位置不再留下任何峰的痕迹。据此,我们得出的结论是,峰 2 代表双触角、单半乳糖核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖苷化结构。因此,该峰结合了峰 3 和峰 7 的结构改变,也就是,它是非半乳糖苷化的并且具有等分 GlcNAc 残基。

#### [0121] 峰 9

[0122] 过去对峰 9 已经进行过鉴定 (Callewaert, N. 等 (2003) *Glycobiology* 13, 367-375),它是一个三触角三半乳糖结构的分支岩藻糖苷化衍生物。

[0123] 总的说来,在肝硬化中,低半乳糖苷化的 N-聚糖(峰 1 和 2)的丰度增加,等分 N-乙酰葡萄糖氨 (GlcNAc) 残基修饰的 N-聚糖(峰 2 和 7)增加,而完全半乳糖苷化的双触角和三触角 N-聚糖(峰 3 和 8)降低。

#### [0124] 10. 用唾液酸化的 N-聚糖分布图检测纤维化

[0125] 获得了存在于 131 个血清样品中的总蛋白混合物的唾液酸化 N-聚糖分布图。60 个样品由健康献血者提供,HBV 和 HCV 阴性。假定这个组没有严重的肝纤维化 (HAI 纤维化

级别 0), 虽然这可能稍微低估了他们的纤维化情况。12 位患者经组织学检测确定仅患有门静脉纤维化而没有发生桥连 (HAI 纤维化级别 1)。4 位患者罹患桥连的纤维化 (HAI 纤维化级别 3), 而 45 位患者患有纤维化 (HAI 纤维化级别 4)。该实验的详细解释可以参见图 9 的图例。N-聚糖的加工方法如材料和方法中所述, 除了其中的唾液酸酶消化步骤在此被省略。

#### [0126] 材料和方法

##### [0127] 1. 血清样品和临床诊断

[0128] 临床研究得到 Ghent 大学医院地方道德伦理委员会的批准, 并得到所有血清提供者的知情允诺。下面的患者的详细特征和临床诊断程序可以在实施例 7 中找到。

##### [0129] 2. 血清蛋白 N-糖组样品处理

[0130] 取 5  $\mu$ l 血清 (总共 248), 在其中的蛋白质结合到铺有稳定素 P 的 96 孔板后, 将存在于蛋白质上的 N-聚糖释放出来, 用 8-氨基苣 -1,3,6-三磺酸制备衍生物, 去唾液酸, 在 ABI 377A DNA 测序仪<sup>5</sup> (Applied Biosystems, Foster City, California) 上进行分析。最有利于聚糖释放和标记的使用 PCR 热循环仪的优化方案如下: 往含有 5  $\mu$ l 血清的 PCR 小管中加入 1  $\mu$ l 含有 10% SDS 的 20mM 的  $\text{NH}_4\text{Ac}$  缓冲液 ( $\text{pH} = 7$ )。将这些小管放入有热盖的标准 PCR 热循环仪中, 95°C 条件下加热 5min。冷却后, 加入 1  $\mu$ l 10% 的 NP-40 溶液, 用以中和 SDS 对肽 N-糖苷酶 F (PNGase F, Glyko, Novato, California) 的变性效果。加入 1IU BMB mU PNGase F 后, 关上管盖, 并将它们置于热循环仪中, 37°C 孵育 3h。然后, 加入 8  $\mu$ l 50mM 的 NaAc ( $\text{pH} 5.0$ ), 再加入 2  $\mu$ U 的 *A. ureafaciens* 唾液酸酶 (Glyko, Novato, California) 并且将小管置于热循环仪中, 37°C 孵育 3h。转移 1  $\mu$ l 所得溶液至一个新的 PCR 小管, 并在 65°C 的条件下打开热循环仪的盖子和管盖, 直至小管中液体蒸发至干燥。这一蒸发过程在 5min 之内完成, 然后, 往管底加入 1.5  $\mu$ l 标记溶液<sup>5</sup>。将盖紧的小管在 90°C 条件下加热 1h。(升高温度可以确保有较快的反应动力学)。往每个小管中加入 150  $\mu$ l 水以终止反应, 并且将标记稀释至约 100pmol/ $\mu$ l。所得溶液在 ABI 377 上进行分析, 方法如上所述, 或者在装备有标准 47cm ABI DNA-分析毛细管的 ABI 310 仪器上进行分析, 其方法如下所述: 我们使用遗传分析缓冲液以 1 : 3 的稀释度稀释专卖的 POP6 聚合物 (所有材料均购自 Applied Biosystems), 将其作为分离基质。将 APTS-衍生的血清聚糖溶液以 1 : 25 的稀释度稀释于去离子的甲酰胺中 (参见上面段落) 而制备成注射混合物。注射条件为 15kV, 5 秒, 然后在 15kV 和 30°C 的条件下分离 18 分钟。根据生产商的说明, 将罗丹明标记的 Genescan2500 (ABI) 参考梯度用于稀释液中, 作为内标。进行这些分析, 除了如前所述<sup>5</sup> 将外部冷却水浴与 ABI 377 联合外, 不需要对测序仪的硬件和软件 (参见下文) 做任何改动。

##### [0131] 3. 数据处理

[0132] 使用 Genescan 3.1 软件 (Applied Biosystems) 进行数据分析。我们对在所有样品中均能检测到的 14 个峰的高度进行定量, 而获得对分布图的数字描述, 用 SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) 分析这些数据。用 Kolmogorov-Smirnov 测验在 0.05 这一显著水平评估所研究人群中变量的常态分布假设。先对变量进行单向分析, 然后在  $\alpha_{FW} = 0.0001$  的水平下进行 Tukey's 真实显著性差异检测。我们在 SPSS 11.0 中使用受试者操作特征 (Receiver Operating Characteristic) (ROC) 曲线分析来评估候选诊断变量的分类效率。图 4 中的曲线是用非参数 Lowess 回归得到的。

[0133] 4. 用外切糖苷酶阵列测序分析 N- 聚糖库的部分结构

[0134] 根据上述程序制得的 APTS 标记的 N- 聚糖以每组 1  $\mu$  l 的批量用不同的外切糖苷酶的混合物在 20mM NaAc pH5.0 中进行消化。所用的酶是 :Arthrobacter ureafaciens 唾液酸酶 (2U/ml, Glyko)、肺炎双球菌  $\beta$ -1,4- 半乳糖苷酶 (1U/ml, Boehringer, Mannheim, 德国)、Jack bean  $\beta$ -N- 乙酰氨基己糖苷酶 (30U/ml, Glyko) 和牛附睾  $\alpha$ - 岩藻糖苷酶 (0.5U/ml, Glyko)。酶单位的定义根据酶供应商的说明。消化完成后,将样品蒸发至干燥,在 1  $\mu$  l 水中重建,并以如上所述的方法在 ABI377 上进行分析。

[0135] 参考文献

[0136] 1. Staudt L. M. 血液癌症的分子诊断 . N. Engl. J. Med. 348,1777-1785 (2003).

[0137] 2. Wulfkuhle, J. D., Liotta, L. A. & Petricoin, E. F. 应用于癌症早期诊断的蛋白质组学 . Nat. Rev. Cancer 3,267-275 (2003).

[0138] 3. Hanash S. 疾病蛋白质组学 . Nature 422,226-232 (2003).

[0139] 4. Brindle, J. T. 等,使用基于  $^1\text{H}$ -NMR 的代谢组学对冠心病的存在情况及严重程度进行快速和非侵入性诊断 . Nat. Med. 8,1439-1444 (2002).

[0140] 5. Callewaert, N., Geysens, S., Molemans, F. & Contreras, R. 使用标准 DNA- 测序仪器对 N- 连接寡糖进行超灵敏特征分析及测序 . Glycobiology 11,275-281 (2001).

[0141] 6. Opanasopit, P. 等,应用肝脏甘露糖受体以及甘露糖结合蛋白对甘露糖化的蛋白质进行体内识别 . Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 280,6879-889 (2001).

[0142] 7. Lee, S. J. 等,甘露糖受体介导的血清糖蛋白内稳态的调节 . Science 295,1898-1901 (2002).

[0143] 8. Ashwell, G. & Harford, J. 肝脏碳水化合物特异性受体 . Annu. Rev. Biochem. 51,531-554 (1982).

[0144] 9. Parekh, R. B. 等,类风湿性关节炎和原发性骨关节炎与总血清 IgG 糖基化模式改变的关联 . Nature 316,452-7 (1985).

[0145] 10. Cadranel, J. F., Rufat, P. & Degos, F. 法国肝活检实验 : 一项前瞻性全国调查的结果 . Hepatology 32,477-481 (2000).

[0146] 11. Menon, K. V. & Kamath, P. S. 肝硬化并发症的处理 . Mayo Clin. Proc. 75,501-509 (2000).

[0147] 12. Kuper, H. 等,慢性病毒性肝炎、酒精中毒、或肝硬化患者发生肝脏和胆管癌症的危险性 . Hepatology 34,714-718 (2001).

[0148] 13. Piccinino, F., Sagnelli, E., Pasquale, G. & Giusti, G. 经皮肝脏活检后的并发症 . 对 68,276 起活检的多方面回顾性研究 . J. Hepatol. 2,165-173 (1986).

[0149] 14. Imbert-Bismut, F. 等,丙型肝炎病毒感染的患者体内肝纤维化的生化标记 : 一项前瞻性研究 . Lancet 357,1069-1075 (2001).

[0150] 15. Poynard, T. 等,丙型肝炎病毒感染的患者体内肝纤维化的生化标记 : 随机试验中的纵向验证 . J. Viral. Hepat. 9,128-133 (2002).

[0151] 16. Henderson, A. R. 试验准确度及其临床重要性的评估 : 小论 (a primer for) 受试者操作特征 (receiver operating characteristic) 曲线分析 . Ann. Clin. Biochem. 30,521-539 (1993).

- [0152] 17. Noe, D. A. 使用受试者操作特征 (receiver operating characteristic) 曲线来选择诊断研究的截断值 Clin. Chem. 29, 571-572 (1983).
- [0153] 18. METAVIR 合作组织. 慢性丙型肝炎的肝活检评估中观察者内和观察者间的差异. Hepatology 20, 15-20 (1994).
- [0154] 19. Bellentani, S. 等, 意大利北部普通人群中慢性肝脏疾病的流行情况: Dionysos 研究. Hepatology 20, 1442-1449 (1994).
- [0155] 20. Parekh, R. B. 等, 类风湿性关节炎和原发性骨关节炎与总血清 IgG 糖基化模式改变的关联. Nature 316, 452-7 (1985).
- [0156] 21. Stibler, H. 血清中碳水化合物缺陷转铁蛋白: 检查酒精消耗的潜在危险的新型指标. Clin. Chem. 37, 2029-37 (1991).
- [0157] 22. Nakagawa, H. 等, 使用三种高效液相色谱对人血清糖蛋白中中性和唾液酰 N- 连接寡糖结构的鉴定. Anal. Biochem. 226, 130-138 (1995).
- [0158] 23. Miyoshi, E. 等, N- 乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 和 V 的基因表达: 对肝再生的可能提示. Hepatology 22, 1847-1855 (1995).
- [0159] 24. Ishibashi, K. 等, 人血清和肝细胞瘤组织中的 N- 乙酰氨基葡萄糖转移酶 III- 在肝硬化和肝细胞瘤患者体内活性升高. Clin. Chim. Acta 185, 325-332 (1989).
- [0160] 25. Sawamura, T. 等, 慢性肝脏疾病和 / 或肝细胞癌患者的高唾液酸糖蛋白症. 肝硬化和肝细胞瘤中的唾液酸糖蛋白受体. Gastroenterology 87, 1217-1221 (1984).
- [0161] 26. Ise, H., Sugihara, N., Negishi, N., Nikaido, T. & Akaike, T. 低表达的唾液酸糖蛋白受体作为具有高度增殖潜力的肝细胞的指标. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285, 172-182 (2001).
- [0162] 27. Poynard, T. 等, 长效干扰素  $\alpha$ -2b 和利巴韦林对慢性丙肝患者体内肝纤维化的影响. Gastroenterology 122, 1303-1313 (2002).

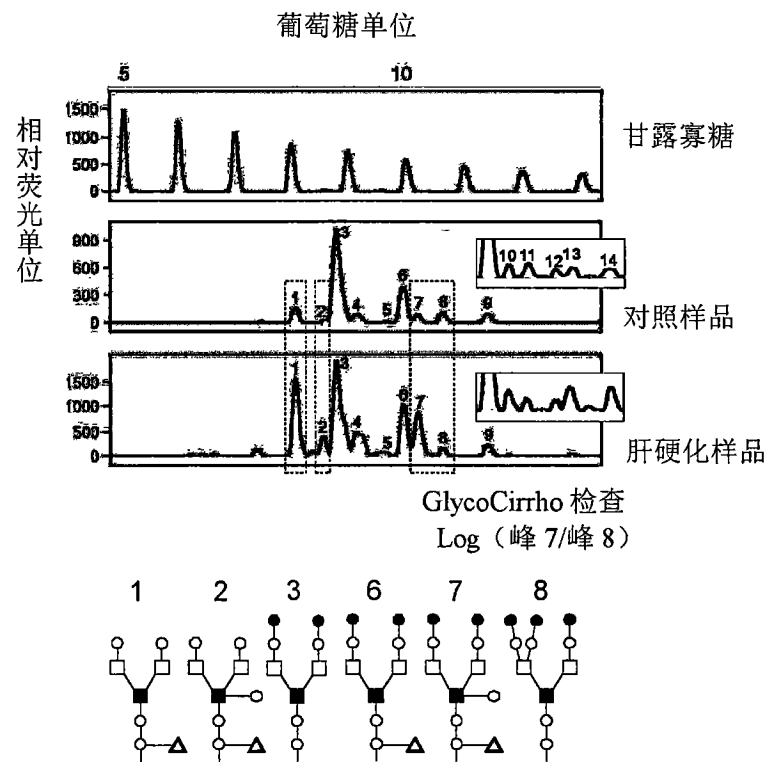


图 1

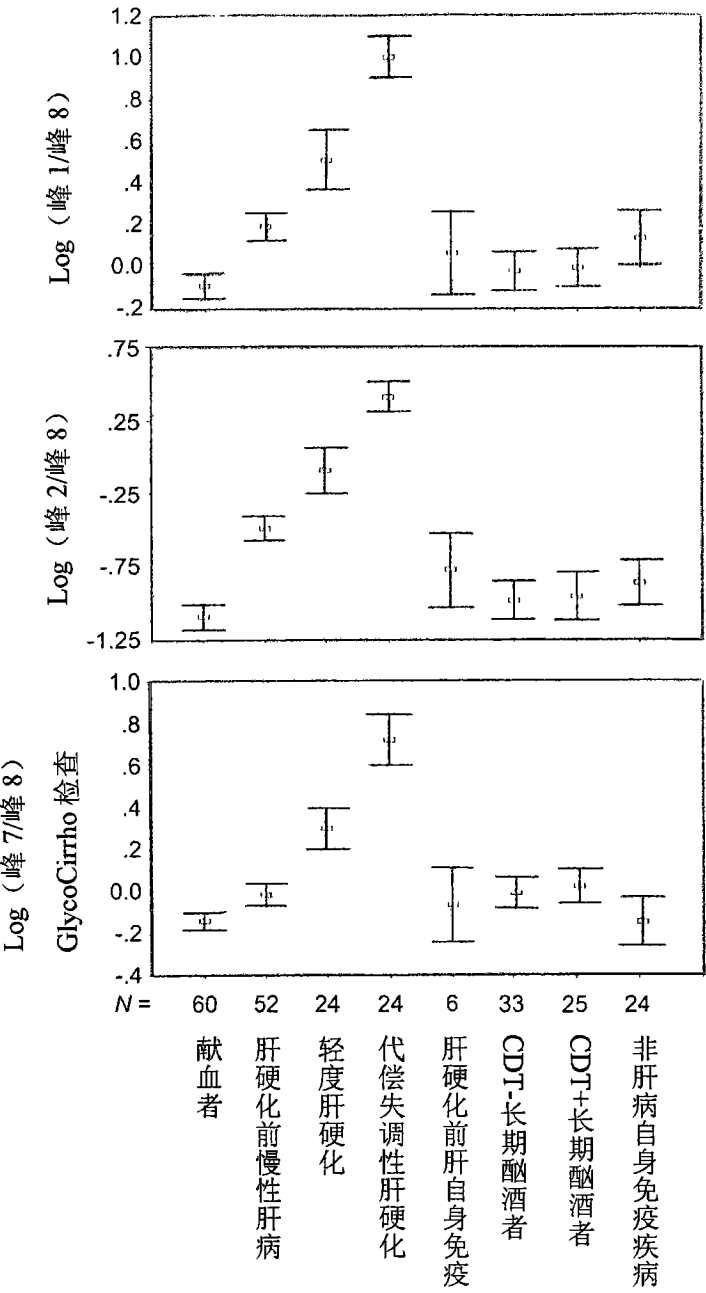
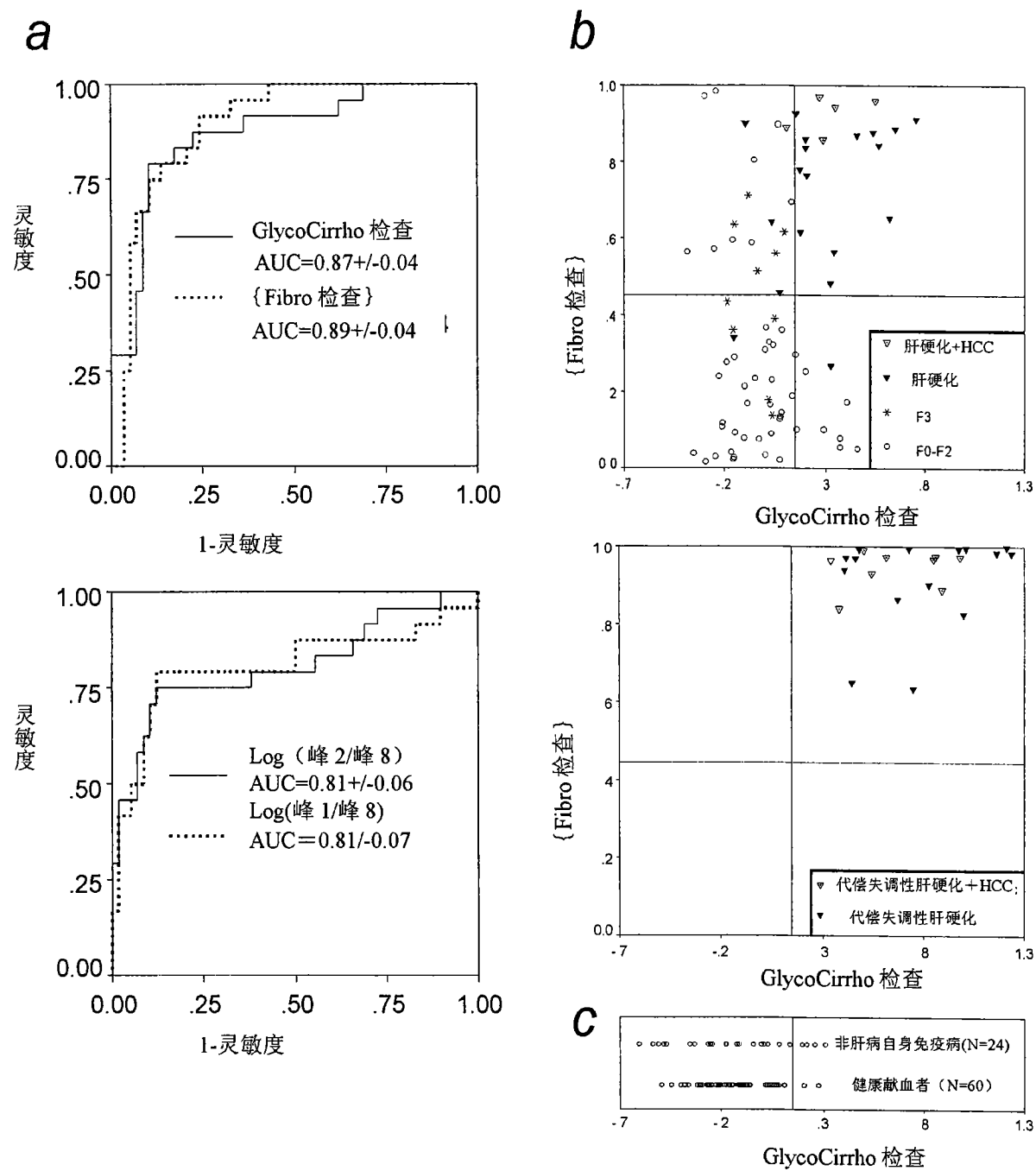


图 2



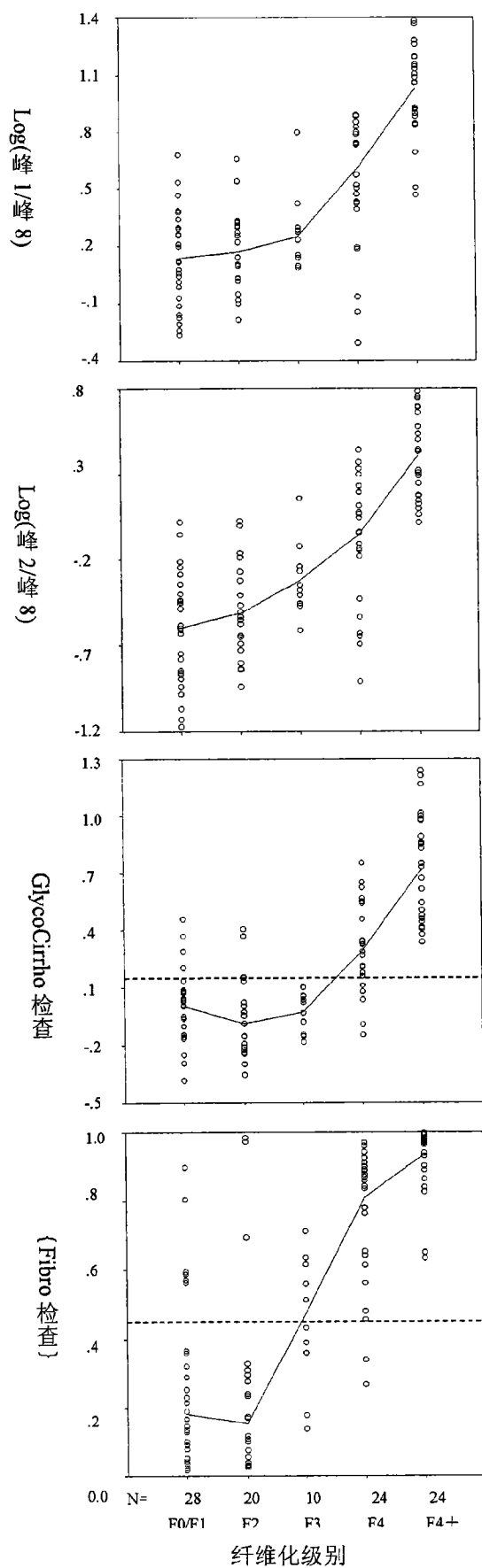


图 4

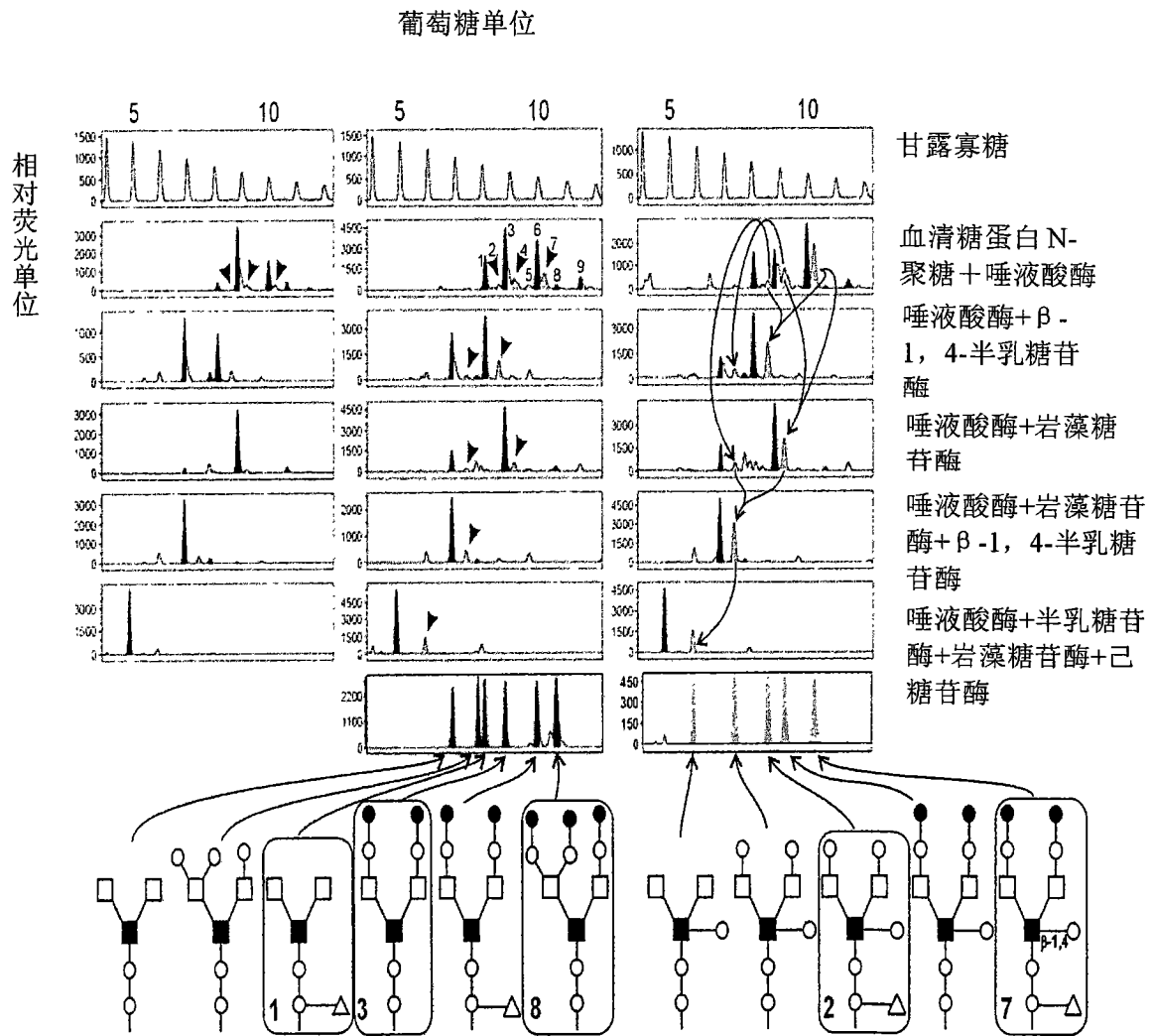


图 5

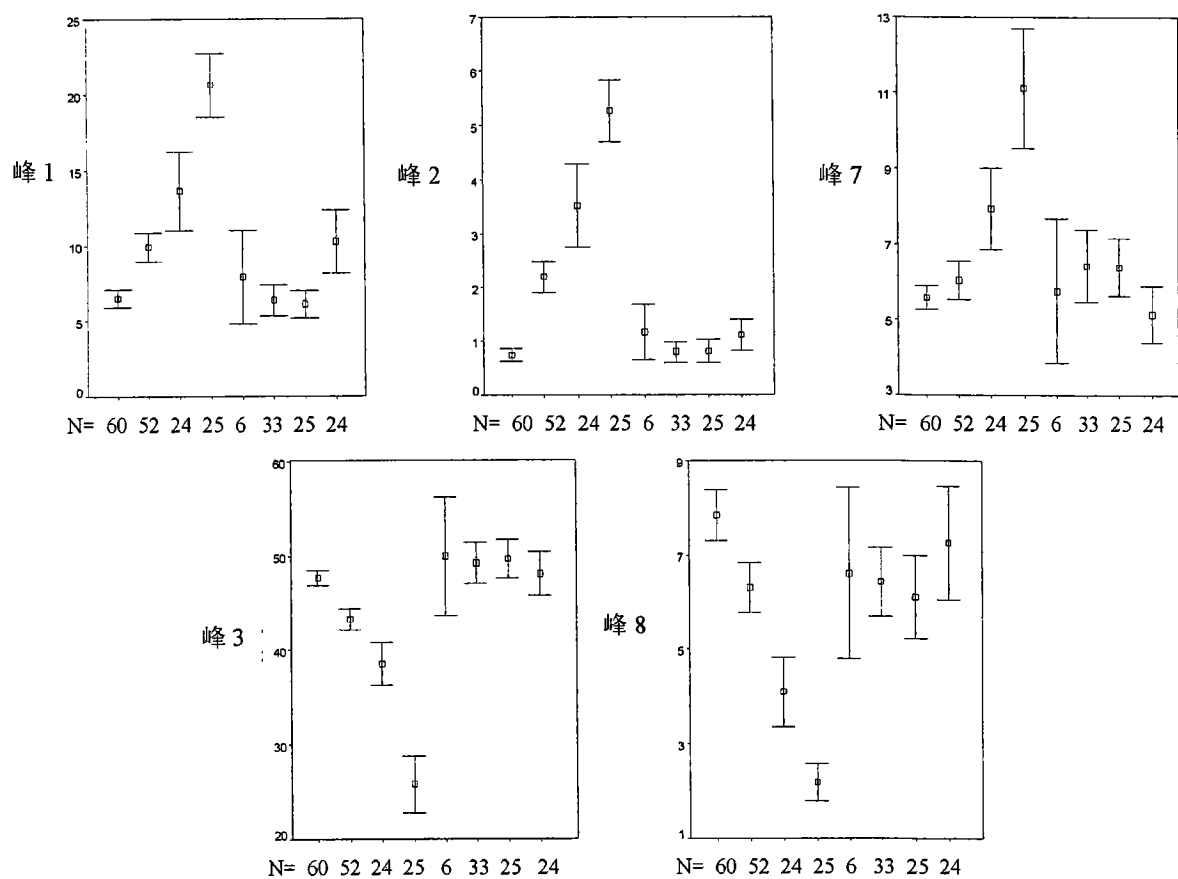


图 6

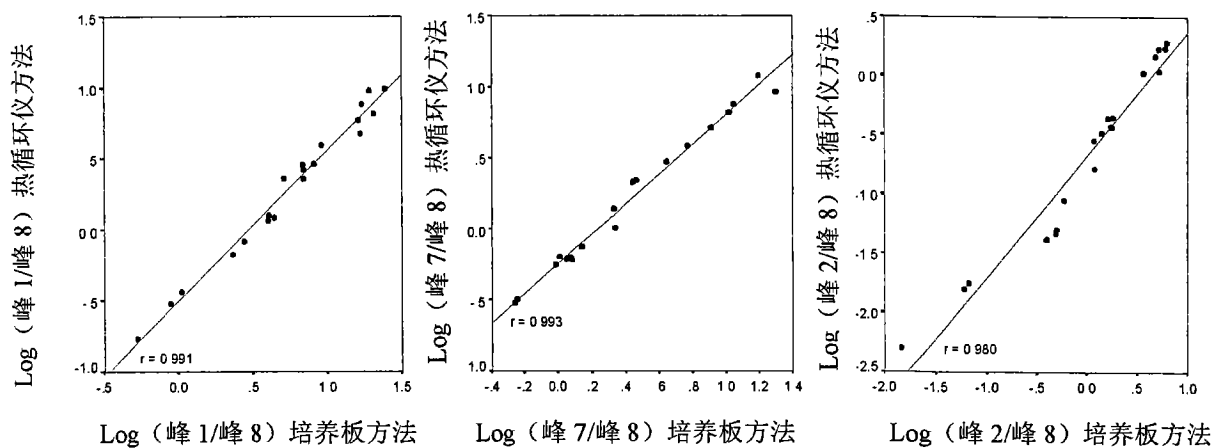


图 7

葡萄糖单位

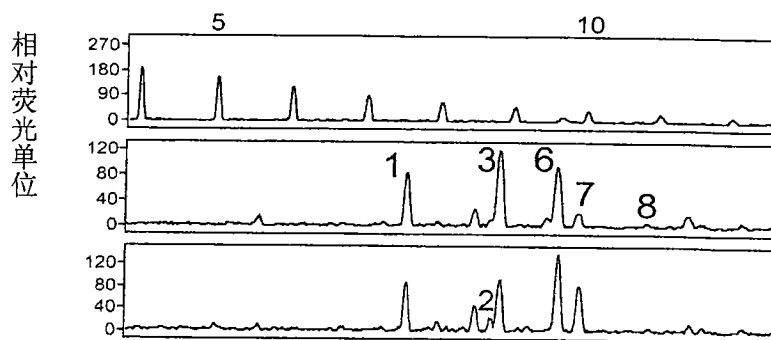


图 8

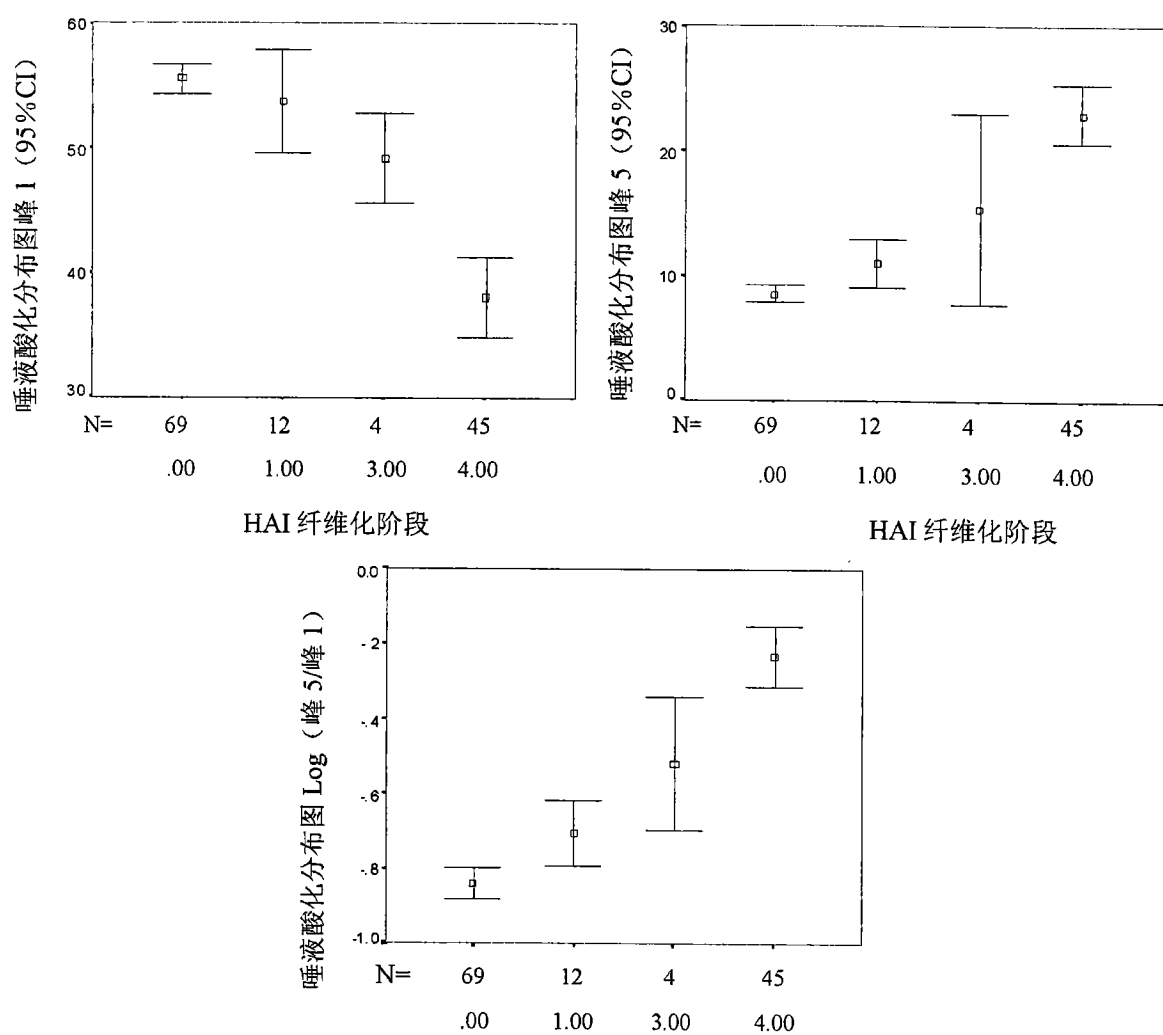


图 9