



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103430022 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201280013283. 2

G01N 33/574 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 01. 31

G01N 33/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

1101667. 2 2011. 01. 31 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 09. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2012/000100 2012. 01. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02012/104585 EN 2012. 08. 09

(71) 申请人 帝国创新有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 西蒙·D·泰勒-罗宾森

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 安佳宁

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006. 01)

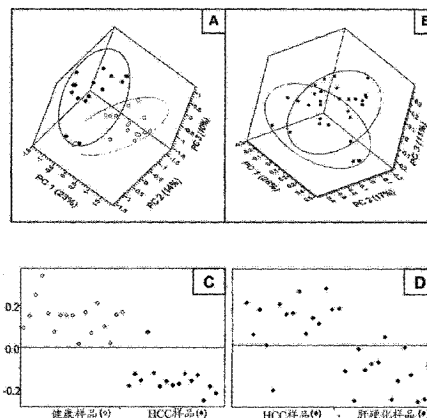
权利要求书2页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

诊断方法

(57) 摘要

本文公开了诊断肝癌的方法,其包括分析样品,测定选自甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐中的至少一种化合物的水平并将样品中的该水平与对照水平进行比较。样品的分析涉及确定样品的特征谱。所公开的方法可用于将患有肝癌的患者与患有肝硬化的患者相区分。



1. 分析来自受试个体的样品的方法,其包括:
  - i) 测定在来自所述受体个体的样品中的选自甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐中的至少一种化合物的水平;以及
  - ii) 将步骤 i) 中测定的所述至少一种化合物的水平与至少一种对照水平进行比较,其中所述至少一种化合物的水平表示个体是否患有肝癌。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述对照水平由来自健康个体的样品确定,其中与所述对照水平相比为降低的水平表示肝癌。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述对照水平由来自肝癌患者的样品确定,其中与所述对照水平相比为近似的水平表示肝癌。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的方法,其包括测定样品中选自甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐中的至少两种化合物的水平。
5. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的方法,其包括测定样品中选自甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐中的至少三种化合物的水平。
6. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的方法,其包括测定样品中甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平。
7. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其包括使用所述至少一种化合物的水平确定来自所述受体个体的样品的特征谱;以及将来自所述受体个体的样品的特征谱与使用至少一种对照水平而确定的对照特征谱进行比较,所述至少一种对照水平由来自健康个体的样品所确定。
8. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其还包括:
  - a) 测定选自肌酸酐、肌氨酸、肉毒碱和丙酮中的至少一种其它化合物的水平;以及
  - b) 将在步骤 a) 中测定的所述至少一种化合物的水平与由来自健康个体的样品所测定的对照水平进行比较;其中
    - i) 肌酸酐和 / 或丙酮的水平降低,和 / 或
    - ii) 肌氨酸和 / 或肉毒碱水平的增加,表示肝癌。
9. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其中所述样品得自哺乳动物。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述哺乳动物为人。
11. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清、脑脊髓液、胆汁酸、唾液、滑液、胸膜液、心包液、腹膜液、粪便、鼻液、眼部液体、细胞内液、细胞间液、淋巴液和尿。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述样品为尿。
13. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其中所述肝癌为肝细胞癌。
14. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其中测定化合物的水平包括使所述样品与特异性结合所述化合物的抗体接触。
15. 如权利要求 1 至 13 中任一权利要求所述的方法,其中所述测定化合物的水平包括对所述样品进行比色测定法或分光光度测定法。
16. 如前述权利要求中任一权利要求所述的方法,其中所述方法能将患有肝癌的患者与患有肝硬化的患者相区分。

17. 用于诊断肝癌的试剂盒,所述试剂盒包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少一种试剂。

18. 如权利要求 17 所述的试剂盒,其包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少两种试剂。

19. 如权利要求 17 所述的试剂盒,其包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少三种试剂。

20. 如权利要求 17 所述的试剂盒,其包括用于测定甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平的试剂。

21. 如权利要求 17 至 20 中任一权利要求所述的试剂盒,其中用于测定所述至少一种化合物的水平的所述试剂在测定法中引起取决于所述至少一种化合物水平的颜色变化。

22. 如权利要求 17 至 20 中任一权利要求所述的试剂盒,其中用于测定所述至少一种化合物的水平的所述试剂包括与所述至少一种化合物特异性结合的至少一种抗体。

## 诊断方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于鉴定个体患有肝癌的的诊断方法。

[0002] 发明背景

[0003] 肝癌可以表现为原发性肝癌或继发性肝癌的形式,所述原发性肝癌被认为是起源于肝部的癌症,在所述继发性肝癌中,癌症起源于肝部并转移至其它器官。肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌的最常见形式,并且是世界范围内癌症死亡的第三种最常见诱因<sup>1,2,3</sup>。该疾病在发展中国家、并且特别在撒哈拉以南的非洲地区和亚洲地区是尤其普遍的<sup>4</sup>,其中许多国家表现出每100,000人中超过20例的高发病率。如果癌症不能被完全去除,则该疾病通常在3至6个月内变成致命的<sup>5</sup>。HCC的症状能变得非常严重并且包括黄疸、源自腹水的腹胀、源自凝血异常的易发瘀斑、食欲不振、无故消瘦、腹痛(特别是在右上部)、恶心、呕吐和疲劳<sup>6</sup>。

[0004] 目前的诊断方法包括使用血清 $\alpha$ -胎蛋白(AFP)对HCC进行筛查,血清 $\alpha$ -胎蛋白是通常在出生之后不久便为不可检测的胎糖蛋白。大部分的HCC分泌AFP,但AFP具有不良灵敏度以及小于70%的特异性<sup>7,8,9,10</sup>。此外,血清的AFP测试过于昂贵,并因此在非洲和亚洲的部分国家是不可行的。包括脱- $\gamma$ -羧基凝血酶原、抗-p53、 $\gamma$ -谷氨酰基-转肽酶和异铁蛋白在内的许多其它血清标记物也用于筛查HCC,但和AFP一样,表现出低程度的灵敏度和特异性<sup>11,12</sup>。

[0005] 下列事实进一步加深了用于HCC的血清标记物的灵敏度和特异性的问题,所述事实为使用目前的方法难以将患有肝硬化的患者与患有HCC的患者相区分。HCC的早期诊断非常重要,因为小于2cm的病灶损害能通过切除术或移植来治愈。因此,在本领域中亟需开发具有足够高水平的灵敏度和特异性、能将患有HCC的患者、肝硬化的患者与健康对照相区分、甚至在疾病早期时就能区分的测试。

[0006] 除了与血清标记物的低灵敏度和特异性相关的问题之外,在该疾病最普遍的区域出现了伦理注意事项。在许多非洲和亚洲国家中,宗教信仰禁止在疾病的筛查过程中使用侵入技术。还重要的是,来自测试的信息在实施测试之后可迅速获得,因为发展中国家的患者可能需要花费许多天的行程来往于保健诊所。

[0007] 使用CT扫描、MRI扫描和活组织检查能更精确地诊断HCC<sup>13</sup>。然而,与这些技术相关的成本和时间以及活组织检查的侵入性质意味着这些测试不适用于疾病最普遍的发展中地区。

[0008] 因此,存在对开发用于诊断HCC的方法的需求,所述方法是特异性的和灵敏的,以及对于在发达国家和发展中国家的应用是实用且可行的。灵敏且特异性的测试将允许在早期检测疾病,显著改善了HCC患者的预后。

### 发明内容

[0009] 因此,本发明提供了用于分析来自受试个体的样品的方法,其包括:

[0010] i) 在来自所述受体个体的样品中测定选自甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐

和柠檬酸盐的至少一种化合物的水平;以及

[0011] ii) 将步骤 i) 中测定的所述至少一种化合物的水平与至少一种对照水平进行比较,其中所述至少一种化合物的水平表示个体是否患有肝癌。

[0012] 令人惊讶地,发明人已发现与采集自健康个体的样品相比,在采集自患有肝癌的个体的样品中甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平显著更低。这类化合物的水平在以前从未作为用于诊断肝癌的方法的一部分而被测量。这些特定化合物的水平的测量允许用于肝癌的灵敏且特异性的筛查,并且可以使用广泛的简单分析来测量该化合物的事实将有助于在该疾病最普遍的发展中国家诊断肝癌。

[0013] 本发明的方法可以包括 i) 测定来自受试个体的样品中的甘氨酸水平,以及将步骤 i) 中测定的甘氨酸水平与对照水平进行比较。

[0014] 本发明的方法可以包括 i) 测定来自受试个体的样品中的三甲胺 -N- 氧化物水平,以及将步骤 i) 中测定的三甲胺 -N- 氧化物水平与对照水平进行比较。

[0015] 本发明的方法可以包括 i) 测定来自受试个体的样品中的马尿酸盐水平,以及将步骤 i) 中测定的马尿酸盐水平与对照水平进行比较。

[0016] 本发明的方法可以包括 i) 测定来自受试个体的样品中的柠檬酸盐水平,以及将步骤 i) 中测定的柠檬酸盐水平与对照水平进行比较。

[0017] 本发明的方法可以包括测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的至少两种化合物的水平以及将所述至少两种化合物的水平与对照水平进行比较。在一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸和三甲胺 -N- 氧化物的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸和马尿酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定三甲胺 -N- 氧化物和马尿酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定三甲胺 -N- 氧化物和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定马尿酸盐和柠檬酸盐的水平。

[0018] 本发明的方法可以包括测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的至少三种化合物的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物和马尿酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在一实施方案中,所述方法可以包括测定三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。在另一实施方案中,所述方法可以包括测定甘氨酸、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。

[0019] 本发明的方法可以包括测定甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。

[0020] 任选地,本发明的所述方法可以包括测定一种或多种其它标记物的水平以及将所述水平与对照水平进行比较。

[0021] 在上述任何方法中对照水平可以由来自健康个体的样品而确定。根据本实施方

案,与所述对照水平相比,至少一种化合物的水平为降低的,这表示肝癌。

[0022] 或者,对照水平可以由来自患有肝癌的个体的样品而确定。根据本实施方案,与所述对照水平相比,至少一种化合物的水平为近似的,这表示肝癌。

[0023] 尽管来自对照个体的样品可以与来自受试个体的样品平行分析,但可以更方便地使用基于经验数据的绝对对照水平。绝对对照水平提供了诸如至少一种化合物的阈值水平的阈值或者阈值特征谱水平 (threshold profile level)。至少一种化合物的水平,或来自受试个体的样品的特征谱水平 (profile level) 可以与阈值绝对对照水平进行比较,其中比绝对对照值更高或更低的水平表示肝癌。

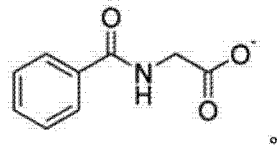
[0024] 本发明的方法可以用于在两个或更多个不同的时间点采集的来自相同个体的试样。对相同个体随时间进行多次测试允许检测疾病的严重性,例如观察疾病是否恶化。或者,多次测试可以允许监测药物随时间的有效性。

[0025] 甘氨酸表示具有式  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  的化合物或其任何天然存在的变体。

[0026] 三甲胺 -N- 氧化物表示具有式  $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$  的化合物或其任何天然存在的变体。

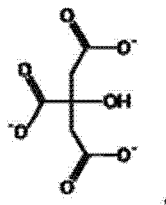
[0027] 在本文中,马尿酸盐表示具有下列式的化合物或其任何天然存在的变体:

[0028]



[0029] 在本文中,柠檬酸盐表示具有下列式的化合物或其任何天然存在的变体:

[0030]



[0031] 在任一上述化合物是离子的情况下,抗衡离子可以为任何离子。优选地,上述化合物为中性形式。

[0032] 肝癌

[0033] 可以由本发明方法检测的肝癌可以包括任何的肝部癌症。肝癌可以包括原发性肝癌,其包括但不限于肝细胞癌 (HCC)、纤维板层肝细胞癌、肝外胆管癌、血管肉瘤 (或血管肉瘤 (haemangiosarcoma)) 以及肝母细胞瘤。或者,肝癌可以包括继发性肝癌,其包括已经从肝部转移至其它器官的癌症,所述其它器官包括但不限于肺部、肾脏、乳腺、胃部和结肠、皮肤 (例如,黑色素瘤)、前列腺、胰腺以及子宫颈。

[0034] 个体

[0035] 个体可以为任何动物,例如脊椎动物或非脊椎动物。脊椎动物可以为哺乳动物。脊椎哺乳动物可以为人。哺乳动物的实例包括但不限于小鼠、大鼠、猪、狗、猫、兔子、灵长类动物等。个体可以为灵长类动物。优选地,个体为人。

[0036] 受试个体为进行诊断的个体。受试个体可以为被认为处于患有肝癌风险的个体。例如,受试个体可以表现出肝癌的症状,例如,黄疸、源自腹水的腹胀、源自凝血异常的易发

瘀斑、食欲不振、无故消瘦、腹痛、特别是在右上部的腹痛、恶心、呕吐和疲劳。或者，受试个体可以被认为处于患有肝癌的风险，因为他们表现出具有与肝癌的已知关联的基因标记物。或者，受试个体可以被认为处于患有肝癌的风险，因为其血清  $\alpha$ -胎蛋白测试呈阳性。

[0037] 本发明的方法可以用于分析来自非人类动物的个体的样品，其中所述动物用于筛选用于肝癌的药物。潜在药物对至少一种化合物水平的效用可以表示该潜在药物是否为有效的。

[0038] 对照个体为与受试个体进行比较的个体。对照个体可以为患有肝癌的个体，在该情况中，表现出与对照特征谱 (profile) 相近似的特征谱的受试个体会被诊断为患有肝癌。或者，对照个体可以为健康个体，在该情况中，表现出与对照特征谱不同的特征谱的受试个体会被诊断为患有肝癌。优选地，对照个体为健康个体。

[0039] 健康个体可以为不患有肝癌的任何个体。在优选实施方案中，本发明的方法能区分患有肝癌的患者与患有肝硬化的患者。通过考虑至少一种化合物的水平确定个体的特征谱，本发明的方法允许高度灵敏且特异性的测试，其能区分患有肝癌的患者与患有肝硬化的患者。

[0040] 样品

[0041] 本发明方法中测试的样品可以为从个体获得的任何生物样本。样品可以为组织样品。样品可以通过最小创伤侵入形式或非侵入形式获得，例如，样品可以为或可以从自血液、血浆、血清、唾液、尿、大便、眼泪、任何其它体液、组织样品（例如，活组织检查）及其细胞提取物（例如，红血球提取物）。本领域技术人员将认识到诸如血清样品的样品能在分析所述化合物水平之前被稀释。

[0042] 优选地，样品为尿样品。在本发明方法中使用尿样品是特别有利的，因为从个体获得该样品是完全非侵入的。当个体例如出于伦理或宗教原因而不愿意进行侵入式程序以测试肝癌时，这是有用的。此外，使用尿样品意味着以直接的方式获得样品，并且在一些实施方案中，上述本发明的方法或下述试剂盒可以用于进行自测。

[0043] 其它化合物

[0044] 本发明的方法还可以包括测定样品中选自血清  $\alpha$ -胎蛋白、肌酸酐、肌氨酸、肉毒碱、丙酮、乳酸盐、谷氨酸（盐）、亮氨酸、丙氨酸、胆碱、磷酸乙醇胺、甘油三酯、葡萄糖、糖原、乙酸盐、N-乙酰糖蛋白、丙酮酸盐、谷氨酰胺、 $\alpha$ -酮戊二酸、甘油、酪氨酸、1-甲基组氨酸、苯丙氨酸、低密度脂蛋白、异亮氨酸、缬氨酸和乙酰乙酸盐或它们的任何天然存在的变体中的至少一种化合物的水平，并且将所述至少一种化合物的水平与至少一种对照水平进行比较。

[0045] 作为本发明方法的一部分的测量其它化合物允许可能产生更精确的样品的特征谱，并且由此增加方法的灵敏度和特异性。受试化合物的水平越多，则所述方法辨别表现出与患有肝癌的个体相似的特征谱但不患有肝癌、例如患有肝硬化的个体的能力越强。

[0046] 在一实施方案中，本发明的方法包括测定肌酸酐的水平并将肌酸酐的水平与对照水平进行比较，其中由来自健康个体的样品 a) 测定对照水平，其中与所述对照水平相比为降低的水平表示肝癌；和/或由来自患有肝癌的个体的样品 b) 测定对照水平，其中与所述对照水平相比为近似的水平表示肝癌。

[0047] 在一实施方案中，本发明的方法包括测定肌氨酸的水平并将肌氨酸的水平与对照

水平进行比较,其中由来自健康个体的样品 a) 测定对照水平,其中与所述对照水平相比为增加的水平表示肝癌;和/或由来自患有肝癌的个体的样品 b) 测定对照水平,其中与所述对照水平相比为近似的水平表示肝癌。

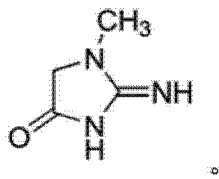
[0048] 在一实施方案中,本发明的方法包括测定肉毒碱的水平并将肉毒碱的水平与对照水平进行比较,其中由来自健康个体的样品 a) 测定对照水平,其中与所述对照水平相比为增加的水平表示肝癌;和/或由来自患有肝癌的个体的样品 b) 测定对照水平,其中与所述对照水平相比为近似的水平表示肝癌。

[0049] 在优选实施方案中,本发明的方法包括测定来自受试个体的样品中的甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐、柠檬酸盐、肌酸酐、肌氨酸和肉毒碱的水平,并将所述化合物的水平与对照水平进行比较,其中所述对照水平由来自健康个体的样品而确定,其中与所述对照水平相比为降低的水平表示肝癌。

[0050] 在另一优选实施方案中,本发明的方法包括测定来自受试个体的样品中的甘氨酸、三甲胺-N-氧化物、马尿酸盐、柠檬酸盐、肌酸酐、肌氨酸和肉毒碱的水平,并将所述化合物的水平与对照水平进行比较,其中所述对照水平由来自肝癌患者的样品而确定,其中与所述对照水平相比为近似的水平表示肝癌。

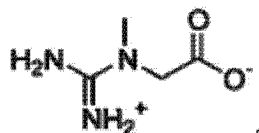
[0051] 在此,肌酸酐表示具有下列式的化合物或其任何天然存在的变体:

[0052]

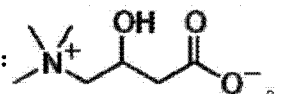


[0053] 在此,肌氨酸表示具有下列式的化合物或其任何天然存在的变体:

[0054]



[0055] 在此,肉毒碱表示具有下列式的化合物或其任何天然存在的变体:



在一实施方案中,肉毒碱是 L-肉毒碱对映异构体。

[0056] 在任一上述化合物是离子的情况下,抗衡离子可以为任何离子。优选地,上述化合物为中性形式。

[0057] 测定化合物的水平

[0058] 在此,测定化合物的水平可以通过使用本领域已知的任何定量或定性方法来实现,由此来自受试样品的至少一种化合物的水平能与来自对照样品的至少一种化合物的水平进行比较。

[0059] 可以通过使用单个方法或多种方法的组合来实现至少一种水平的测定。

[0060] 化合物水平的测定可以包括测定化合物的浓度,或者可以包括测定化合物基于相对标度的水平。

[0061] 可以用于测定至少一种化合物水平的方法可以包括但不限于液相色谱法、气相色谱

谱法、高效液相色谱法 (HPLC)<sup>14</sup>、毛细管电泳、以及这些技术之一与质谱法的组合,即,液相色谱-质谱法<sup>15</sup>、气相色谱-质谱法<sup>16</sup>、高效液相色谱-质谱法、毛细管电泳-质谱法<sup>17</sup>。

[0062] 可以用于测定至少一种化合物水平的其它方法可以包括热解质谱法、折射率光谱法 (RI)、紫外光谱法 (UV)、近红外光谱法 (Near-IR)、微波波谱法、核磁共振波谱法 (NMR)<sup>18</sup>、拉曼光谱法、光散射分析 (LS)、薄层色谱法 (TLC)、电化学分析、荧光分析、放射化学分析、比浊法、浊度分析法、电阻分析、基于液-固相互作用的检测、分光光度法、比色法、光学反射法、燃烧热分析、免疫测定法、免疫组织化学测定法以及本领域已知的其它方法。

[0063] 在一实施方案中,将使用分光光度测定法来实现至少一种化合物水平的测定。分光光度测定法可以为其中可以通过测量包含特定化合物的溶液吸收特定波长的光的能力来测定该物质的数量的任何测定法。分光光度测定法可以包括直接检测样品中存在的化合物,其中所述化合物根据所存在的该化合物水平而在已知波长下提供不同的吸光度。或者,所述测定法可以包括添加在特定化合物的存在下经历吸光度变化的试剂。可以测量这种吸光度的变化以测定所关注的特定化合物的水平。

[0064] 比色测定法

[0065] 在一实施方案中,可以使用比色测定法来实现至少一种化合物水平的测定。比色测定法可以为其中通过测量或观察颜色变化而测定化合物水平的任何测定法。比色测定法可以为分光光度测定法,其中测量物质吸光度的波长在电磁波谱的可见区域内。比色测定法可以包括样品的颜色与比色图表的比较。比色测定法可以包括添加在特定化合物的存在下经历可测量的颜色变化的试剂。

[0066] 可以使用单独的比色测定法来测定至少一种化合物中的每一种的水平。任何比色测定法可以用于测定化合物的水平,其中所述测定法导致仅取决于样品中化合物水平的并且不在显著程度上取决于任何其它变量的颜色变化。

[0067] 任何本领域已知的测定法可以用于检测样品中至少一种化合物的水平。可以使用的测定法的实例为:

[0068] 柠檬酸盐测定法,例如商购自 AbCam 的那些(产品代码-ab83396),其涉及通过草酰乙酸盐将柠檬酸盐转化为丙酮酸盐。丙酮酸盐随后将无色探针转变成可容易检测的强烈着色 ( $L_{\lambda \max}=570\text{nm}$ ) 的且荧光的 (Ex/Em, 535/587nm) 产物。

[0069] 甘氨酸测定法,其涉及通过氯胺 T 将甘氨酸降解成甲醛。然后,甲醛可以通过乙酰丙酮和氨为反应物的 Hantzsch 反应被转化为 3,5-二乙酰基-1,4-二氢二甲基吡啶。能使用荧光测定法测量低范围(甘氨酸水平为 0.1  $\mu\text{g}$  至 3  $\mu\text{g}$ ) 内的这种反应产物,然而,在更高范围内,可以使用比色分析<sup>19</sup>。

[0070] TMAO 测定法,其涉及通过在乙酸盐缓冲液 (0.8M, pH4.5) 中的硫酸亚铁 ( $\text{FeSO}_4$ ) 和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 的等摩尔混合物 (0.1M) 而被还原为 TMA,然后将苦味酸盐用作发色团<sup>20,21</sup>。

[0071] 人或机械可读条带

[0072] 可以通过使用人或机械可读条带来测定至少一种化合物的水平,其中可以通过测量在所述人或机械可读条带的变化而测定所述至少一种化合物的水平。人或机械可读条带的变化可以为通过在所述人或机械可读条带之中或之上存在的反应试剂与所述至少一种化合物之间的化学反应而发生的该人或机械可读条带的变化。例如,人或机械可读条带可

以包括用于实施至少一种比色测定法以测定至少一种化合物水平的试剂。

[0073] 人或机械可读条带可以包括多种试剂,其中在每一区域中进行单独的化学反应。在每一区域中的化学反应可以用于检测至少一种化合物中的一种。当与样品接触时,在每一区域中存在的试剂能经历与该样品中存在的化合物的化学反应。然后,可以根据变化程度、例如在人或机械可读条带的每一区域中已经发生的颜色变化来测定至少一种化合物中每一种化合物的水平。

[0074] 在一实施方案中,在人或机械可读条带的变化为颜色变化的情况下,可以由人来读取人或机械可读条带,其将该人或机械可读条带与显示颜色变化程度并将该颜色变化程度归结于化合物的特定水平的图表进行比较。

[0075] 在另一实施方案中,可以由机械读取人或机械可读条带,其通过测量溶液在特定波长下的吸光度或通过任何其它手段来计算每一区域中的人或机械可读条带中已发生的变化程度、例如颜色变化。

[0076] 在人或机械可读条带的每一区域中提供的测定法可以为涉及在人或机械可读条带的区域中出现的变化的任何测定法,其中所述变化仅取决于至少一种化合物的水平。

#### [0077] 结合测定法

[0078] 可以通过涉及结合测定法的方法来测定至少一种化合物的水平。结合测定法可以是其中至少一种化合物之一被一种或多种其它分子特异性结合的任何测定法,其中所述一种或多种其它分子可以随后被检测到。在一实施方案中,所述一种或多种其它分子可以为一种或多种蛋白质。可以随后使用对该一种或多种蛋白质特异的抗体来检测特异性结合至少一种化合物中的一种化合物的蛋白质。

[0079] 在一实施方案中,一种或多种其它分子可以为与至少一种化合物中的一种化合物特异性结合的抗体。

[0080] 抗体可以为单克隆的或多克隆的抗体或其片段。

[0081] 可以使用免疫测定法或免疫组织化学测定法来测定至少一种化合物的水平。适用于本发明方法的免疫组织化学测定法的实例包括但不限于免疫荧光测定法,例如直接荧光抗体测定法、间接荧光抗体(IFA)测定法、抗补体免疫荧光测定法以及抗生物素蛋白-生物素免疫荧光测定法。其它类型的免疫组织化学测定法包括免疫过氧化物酶测定法。

[0082] 可以使用特异性结合所述化合物的抗体来测定至少一种化合物的水平,并且所述抗体可以通过本领域已知的比色手段或其它辐射测量手段而检测到。在一实施方案中,可以使用夹心测定法测定至少一种化合物之一的水平,其中至少一种化合物之一被一种蛋白特异性结合并且被第二种蛋白特异性检测到。

[0083] 可以通过提供已知与所述化合物特异性结合的结合蛋白来测定该化合物的水平。所述结合蛋白可以随后被对该结合蛋白特异的抗体检测到。

#### [0084] 样品谱分析

[0085] 可以通过分析至少一种化合物的水平来确定样品的特征谱。样品谱分析允许个体的组间差异由代谢物比的组合(“代谢特征谱”)而非单个代谢物来表征。

[0086] 样品的特征谱可以基于至少一种化合物的水平用于确定个体是否患有肝癌。样品的特征谱允许来自受试个体的样品以及来自对照个体的样品中的化合物水平的全面比较。

[0087] 谱分析可以包括归一化,其可以包括相对于外部化合物、例如尿肌酐,来考虑至少

一种化合物的水平。这可以例如通过比较与健康个体相比在患有肝癌的个体中不改变的其它化合物的水平而将取决于样品的稀释的水平归一化。或者,谱分析可以包括计算至少一种化合物的比。谱分析可以与其它化合物相比更强调至少一种化合物中的某些化合物。

[0088] 试剂盒

[0089] 本发明提供了用于诊断肝癌的试剂盒,所述试剂盒包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少一种试剂。

[0090] 本发明的试剂盒可以包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少两种试剂。

[0091] 本发明的试剂盒可以包括用于测定选自甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的化合物的水平的至少三种试剂。

[0092] 本发明的试剂盒可以包括用于测定甘氨酸、三甲胺 -N- 氧化物、马尿酸盐和柠檬酸盐的水平试剂。

[0093] 在用于测定至少一种化合物的水平的本发明试剂盒中使用的试剂可以引起在测定中取决于至少一种化合物的水平的颜色变化。

[0094] 在用于测定至少一种化合物的水平的本发明试剂盒中使用的试剂可以包括与该至少一种化合物特异性结合的至少一种抗体。

[0095] 本发明的试剂盒还可以包括使用说明。

[0096] 本发明的试剂盒可以包括在测试条带上放置的用于测定至少一种化合物的水平的试剂。测试条带的不同区域可以包括用于测定多种化合物的水平的试剂,因此可以在测试条带的不同区域中实施不同的测定法。

[0097] 在一实施方案中,本发明的试剂盒可以包括包含用于测定至少一种化合物水平的试剂的测试条带以及对比图表。针对能测量到在测试条带上出现的颜色,对比图表可以示出颜色的变化程度。对比图表可以将可以在测试条带上出现的颜色的变化程度归结于化合物的特定水平。

[0098] 附图的简要说明

[0099] 图 1 :来自 A. 患有 HCC 的患者 ;B. 患有肝硬化的患者以及 C. 健康对照的中值 <sup>1</sup>H NMR 谱。

[0100] 图 2A :HCC 个体对健康对照的主成分分析 (PCA) 的分数图。

[0101] 图 2B :HCC 对肝硬化个体的主成分分析 (PCA) 的分数图。

[0102] 图 2C :健康个体对 HCC 个体的正交信号校正 - 偏最小二乘法判别分析 (OSC-PLS-DA)。

[0103] 图 2D :HCC 个体对肝硬化个体的正交信号校正 - 偏最小二乘法判别分析 (OSC-PLS-DA)。

[0104] 图 3 :在来自健康个体、肝硬化个体和 HCC 个体的样品中 A. 肌酸酐 ;B. 柠檬酸盐 ;C. 肉毒碱 ;D. 肌氨酸 ;E. 马尿酸盐 ;F. 甘氨酸 ;G. 三甲胺 -N- 氧化物的积分中值。

## 实施例

[0105] 实施例 1 :患者挑选

[0106] 从参加 National liver Institute, Menoufiya University, Shbeen El Kom, Egypt

(全国肝病研究所, Menoufiya 大学, Shbeen El Kom, 埃及) 的患者中采集埃及人的尿和血清样品。由在 National Liver Institute, Menoufiya University 和 Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London (帝国理工学院, 伦敦) 的研究伦理委员会授予伦理许可。

[0107] 为了该研究, 招募了共计 58 名患者: 18 名患者患有 HCC (由显示早期动脉增强和门静脉期中快速冲刷的两种成像技术诊断, 或由具有血清 AFP > 400 ng mL<sup>-1</sup> 的一种成像来诊断); 20 名患者患有临床或组织学确认的肝硬化疾病; 以及 20 名健康的埃及人对照个体。根据主成分分析 (PCA)、即多变量分析技术, 将来自所有三个同群的十一个样品鉴别为“离群值”。这表示不适当影响多变量数据的异常光谱结果, 并且从进一步分析中排除这些样品。这在 HCC 组中剩余 16 个样品, 在肝硬化组中剩余 14 个样品并且在健康对照组中剩余 17 个样品。HCC 组的平均年龄与肝硬化组相比并非明显更大 ( $p=0.37$ ), 但与健康对照组相比明显更大 ( $p=0.01$ )。与健康对照组 (9/17) 相比, HCC 组 (15/16) 存在明显更多的男性 ( $p=0.02$ ), 但与肝硬化组 (11/14) 相比则不然 ( $p=0.32$ )。HCC 期的分期 (staging) 是依据 Okuda 分期体系, 其基于肿瘤体积和肝功能代偿不全, I 期表示早期疾病而 III 期表示晚期疾病 (28)。HCC 个体之一具有 I 期疾病, 10 个具有 II 期以及 5 个具有 III 期。患有 HCC 的大部分患者和患有肝硬化的 50% 患者为 HCV 抗体阳性: 分别为 11/16 (69%) 和 7/14 (50%)。患有 HCC 的其余患者或患有肝硬化的其余患者具有不同的病原学。任何健康对照具有埃及人血统并没有肝部疾病历史。

#### [0108] 实施例 2: 尿样品采集

[0109] 将随机的 5 mL 尿样品采集到光滑玻璃管中, 并且在埃及采集之后在 -80 °C 下贮存 2 小时至 4 小时, 直至由 A. I. G, M. M. E. C 和 S. D. T-R 在干冰上空运至英国。将样品在伦敦解冻并根据标准方法学制备<sup>22</sup>: 将 400  $\mu$  L 的尿与 200  $\mu$  L 的缓冲溶液 (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 混合, 并添加 60  $\mu$  L 的 3-三甲基甲硅烷基-(2, 2, 3, 3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-1-丙酸盐 (TSP)/D<sub>2</sub>O 溶液 (TSP 的终浓度 = 1 mM)。TSP 用作内部化学转移参照 ( $\delta$  0.00 ppm) 并且 D<sub>2</sub>O 提供场锁定。将缓冲的尿样品保持静置 10 分钟, 然后在 13,000g 下离心 10 分钟。将 550  $\mu$  L 上清液转移入 5 mm 直径的 NMR 玻璃管中 (Wilma LabGlass™, New Jersey, USA) 以用于质子核磁共振 (<sup>1</sup>H NMR) 波谱法。样品保持在 NMR 自动分析仪上的样品队列 (sample queue) 中高达 4 小时, 直至获得数据。

#### [0110] 实施例 3: 血清实验室测试

##### [0111] 方法

[0112] 使用 Cobas Integra400- 自动分析仪 (Roche, Rotkreuz, Switzerland), 在埃及采集尿样品时测量血清 AFP、肌酸酐、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、胆红素和白蛋白。

##### [0113] 结果

[0114] 在表 1 中显示出研究个体的血清 AFP、肌酸酐、ALT、AST、胆红素和白蛋白的中值 (范围) 汇总。仅在肝硬化和 HCC 组中测量血清 AFP 水平。尽管中值血清 AFP 在 HCC 患者中显著更高 (745 IU mL<sup>-1</sup> 对 77 IU mL<sup>-1</sup>,  $p < 0.001$ ), 但是肝硬化组中的最低血清 AFP 为 20 IU mL<sup>-1</sup>, 并且使用 20 IU mL<sup>-1</sup> 的截止。基于血清 AFP 水平, 所有肝硬化患者将会被错误地分类为 HCC。与对照相比, 中值血清肌酸酐在 HCC 组中显著更高 (106 mmol L<sup>-1</sup> 对 62 mmol L<sup>-1</sup>,  $p < 0.001$ ), 但这未与肝硬化个体显著不同 (106 mmol L<sup>-1</sup> 对 150 mmol L<sup>-1</sup>,  $p = 0.16$ )。与健康对照相比, 血

清 ALT、AST 和胆红素水平在 HCC 组中均显著更高,但与肝硬化个体相比则不然。与健康对照相比,血清白蛋白在 HCC 组中显著更低,但与肝硬化患者相比则不然。

[0115] 表 1

[0116]

	HCC (范围)	肝硬化 (范围)	健康对照 (范围)	p- 值 (Mann-Whitney)
血清样品 (n)	16	14	17	-
AFP (IU mL <sup>-1</sup> )	745 (174-5000)	77 (20-174)	-	<sup>b</sup> < 0.001
肌酸酐 (mmol L <sup>-1</sup> )	106 (44-318)	150* (97-229)	62 (44-80)	<sup>a</sup> < 0.001 和 <sup>b</sup> 0.16
ALT (IU L <sup>-1</sup> )	56 (11-164)	30 (16-119)	12 (9-18)	<sup>a</sup> < 0.001 和 <sup>b</sup> 0.36
AST (IU L <sup>-1</sup> )	79 (22-224)	51 (31-190)	15 (11-20)	<sup>a</sup> < 0.001 和 <sup>b</sup> 0.44
胆红素 (μmol L <sup>-1</sup> )	63 (17-54)	48 (14-156)	12 (0.7-19)	<sup>a</sup> < 0.001 和 <sup>b</sup> 0.19
白蛋白 (g L <sup>-1</sup> )	30 (19-34)	29 (23-35)	40 (38-44)	<sup>a</sup> < 0.001 和 <sup>b</sup> 0.79

[0117] \* 两个样品未进行血清肌酸酐水平测量

[0118] 关键词: <sup>a</sup> HCC 对健康对照; <sup>b</sup> HCC 对肝硬化

[0119] 实施例 4: <sup>1</sup>H NMR 波谱学的谱获取和处理

[0120] 将样品以随机、非分组顺序运行。使用具有水预饱和的脉冲采集序列 (JEOL500MHz Eclipse+NMR 光谱仪) 来获得 <sup>1</sup>H MR 谱。将 16 个数据采集求和。90° 脉冲角与 18.7s 的总重复时间一起使用,从而获得全弛豫数据。获得时间为 8.7s。将数据收集入 64K 点。使用 KnowItAll™ Informatics System v7.8 (Bio-Rad, Philadelphia, USA) 处理 MR 谱。在傅立叶转换之前,自由感应衰减被两倍地以零填充 (zero-filled), 并乘以具有 0.3Hz 谱线增宽因子的指数窗函数。所有 MR 谱进行相位调整并且应用基线校正。所有谱参照 TSP (δ 0.00ppm), 并且甲基-肌酸酐峰校正为 δ 3.05ppm。根据文献<sup>23,24,25</sup> 分配 MR 谱共振。MR 谱分析包括 δ 0.20-10.00ppm 的范围,排除 δ 4.50-6.40ppm 的区域,从而去除残余的水信号以及由于溶剂内的质子交换而产生的尿信号变化。

[0121] 实施例 5: 多变量统计学分析

[0122] 方法

[0123] 使用代谢物比的组合 (“代谢特征谱”) 而非单个代谢物来表征患者组之间的差异。主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 形式的多变量统计分析用于初始分析<sup>26</sup>。PCA 是无监督分析工具,其通过协方差结构的检查、突显样品离群值以及聚类来提供复杂数据的概观。PLS-DA 是监督分析方法,其使代谢物数据与种类隶属关系相关联,阐述组之间的分离。使用软件应用 KnowItAll Informatics System v7.8 (Bio-Rad, Philadelphia, USA) 中的 “智能桶装 (intelligent bucketing)” 算法,将复杂的谱划分为更小的区域或 0.02+/-0.01ppm 的 “桶”,表示具体的代谢物峰。然后,在多变量分析前,将这些区域积分、归一化为总谱积分的总和以及求数据的平均 - 中心 (data

mean-centred)。尽管结果与平均 - 中心的数据类似并具有模拟谱噪声的倾向,但仍使用 Pareto- 规模的数据,因此,仅有平均 - 中心的数据用于所有分析。使用相同软件进行 PCA 以突显聚类 and 离群值。然后,通过使用 Pirouette v4.0 (Infometrix, Washington, USA) 的 PLS-DA 来分析数据。正交信号校正 (OSC) 的数据过滤技术用于除去谱中与正被研究的生理状态不直接相关的变化,并且使个体间变化的可能影响最小化<sup>27,28</sup>。对于每一分析,除去一个 OSC 成分以进行模型生成。使用两种技术来确认每一模型的辨识能力。第一种,留一法交叉验证,通过此方法将每一样品依次从分析中排除,由剩余样品产生模型,并且预测被排除的样品的种类隶属关系<sup>29</sup>。第二种,完整的外部验证,其中由训练集 (70% 的样品,随机选择) 产生模型,并且使用独立的“测试”集 (保留的 30% 的样品) 测试它们的预测性能力。重复三次完整的外部验证,排除 30% 的样品的不同集并采用均值。对于两种技术,模型的误分类矩阵描述了正确预测的样品的数量,并且由此可以计算模型的灵敏度和特异性。

#### [0124] 结果

[0125] 来自三个个体同群的典型的尿谱在图 1 中示出。十一个样品被 PCA 鉴别为“离群值”并从进一步的分析中排除。这些包括来自 HCC 组的两个样品谱:其中之一显示出主要的葡萄糖代谢物,这表明可能归因于未确诊的糖尿病的糖尿,以及一个样品不能适当相位调整;来自肝硬化组的六个谱:其中三个显示了明显的葡萄糖代谢物,一个不能适当相位调整,一个具有主要的乳酸盐峰,并且一个样品在  $\delta$  1.45ppm 和  $\delta$  1.60ppm 处显示出显著的未鉴别的峰,其强烈地影响乐多变量分析;以及来自健康对照组的三个谱,所有均显示出主要的葡萄糖代谢物,这表明糖尿。所得组的 PCA 分数图表明 HCC 对健康对照样品的明显聚类 (图 2A)。使用留一法算法 ( $R^2=0.8$ ,  $Q^2=0.74$ ), OSC-PLS-DA 以 100% 的灵敏度和 94% 的特异性区分了 HCC 组与健康对照组 (图 2C)。使用完整的外部验证范例,区分灵敏度为 100% 以及特异性为 93%。主要有助于 PLS-DA 模型的共振为甘氨酸 ( $\delta$  3.57ppm)、三甲胺 -N-氧化物 (TMAO) ( $\delta$  3.27ppm)、马尿酸盐 ( $\delta$  3.96ppm)、柠檬酸盐 ( $\delta$  2.66ppm)、肌酸酐 ( $\delta$  3.05ppm)、肌氨酸 ( $\delta$  3.93ppm) 和肉毒碱 ( $\delta$  3.23ppm)。

[0126] HCC 对肝硬化样品的 PCA 分数图显示了较差的组聚类 (图 2B)。使用留一法算法 ( $R^2=0.54$ ,  $Q^2=0.25$ ), OSC-PLS-DA 以 81% 的灵敏度和 71% 的特异性区分了 HCC 组与肝硬化组 (图 2D)。使用完整的外部验证范例,区分灵敏度为 75% 以及特异性为 67%。最强地有助于 PLS-DA 区分的共振为 TMAO ( $\delta$  3.27ppm)、肌氨酸 ( $\delta$  3.93ppm) 和肉毒碱 ( $\delta$  3.23ppm)。

[0127] 由于肝部疾病组的样品中男性占主要部分,所以仅进行男性分析以确认结果归因于 HCC 的作用而非性别。男性 HCC 尿能以 100% 的灵敏度和 93% 的特异性与健康对照尿相区分,以及以 80% 的灵敏度和 55% 的特异性与患有肝硬化的患者的尿相区分。有辨识力的代谢物与组合的性别比较相类似:甘氨酸、TMAO、马尿酸盐、柠檬酸盐、肌酸酐、肌氨酸和肉毒碱。

#### [0128] 实施例 6:单变量统计学分析

##### [0129] 方法

[0130] 将由 PLS-DA 载荷图确定的最重要的有辨识力的代谢物共振积分并归一化为整个谱积分的总和。值表达为相对于总谱积分的百分比指数。使用 GraphPad Prism v5.01 (California, USA), 利用 Mann-Whitney 检测,假定非正态数据分布,分析 HCC、肝硬化和健康对照组之间的差异,认为  $p$ -值  $<0.05$  是显著的。

**[0131] 结果****[0132] 在 HCC 个体的尿中的代谢物降低**

[0133] 与健康对照相比,在 HCC 个体的尿中尿甘氨酸水平(表达为%,用总谱积分归一化)为显著降低的:中值[四分位数差]0.46[0.24-0.71]和 2.41[1.30-2.95] ( $p < 0.001$ ),但与肝硬化个体相比不为显著降低的:0.53[0.13 - 1.27] ( $p = 0.88$ ) (图 3F)。与健康对照相比,HCC 个体尿中的尿 TMAO 水平为显著降低的:1.17[0.47 - 1.56]和 3.98[2.69 - 4.67] ( $p < 0.001$ ),但与肝硬化个体相比不为显著降低的:2.03[0.47 - 3.07] ( $p = 0.18$ ) (图 3G)。与健康个体相比,HCC 个体中的尿马尿酸盐水平为显著降低的:0.53[0.23 - 0.98] and 1.62[1.08 - 1.88] ( $p < 0.001$ ),但与肝硬化个体相比不为显著降低的 0.66[0.0 - 0.89] ( $p = 0.65$ ) (图 3E)。与健康个体相比,尿柠檬酸盐为显著降低的:0.04[0.0 - 0.84] and 1.68[1.06 - 2.74] ( $p < 0.001$ ),并且与肝硬化个体相比降低的趋势趋于显著 0.91[0.09 - 1.36] ( $p = 0.12$ ) (图 3B)。与健康对照和肝硬化个体相比,在 HCC 尿中的尿肌酸酐的水平降低,但未达到显著性水平 13.7[11.59 - 18.69]、17.49[13.82 - 24.11]和 17.71[11.78 - 22.28] (分别地,  $p = 0.12$  和 0.33) (图 3A)。

**[0134] 在 HCC 个体的尿中的代谢物升高**

[0135] 与健康个体和肝硬化个体相比,HCC 个体的尿中的尿肌氨酸水平为显著升高的:1.5[0.92 - 3.32]; 0.54[0.04 - 1.28] 和 0.26[0.12-0.39] (分别地,  $p = 0.003$  和  $p < 0.001$ ) (图 3D)。与健康个体和肝硬化个体相比,HCC 个体的尿中的尿肉毒碱水平为不显著升高的:1.16[0.25 - 2.59]; 0.58[0.36 - 0.86] 和 0.39[0.29 - 0.97] (分别地,  $p = 0.29$  和  $p = 0.30$ ) (图 3C)。

**[0136] 参考文献**

[0137] <sup>1</sup>El-Serag, H. B. *Hepatol. Res. (Suppl. 2)* S88-S94

[0138] <sup>2</sup>Taylor-Robinson, S. D. 等人, *Lancet* 1997, 350(9085), 1142-1143

[0139] <sup>3</sup>Khan, S. A, 等人, *J. Hepatol.* 2002, 37(6), 806-813

[0140] <sup>4</sup>Shariff MI 等人, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009, 3(4), 353-367

[0141] <sup>5</sup>[www.hepatocellular.org](http://www.hepatocellular.org)

[0142] <sup>6</sup>Chien-Jen Chen 等人, *JAMA* 2006, 295(1): pp. 65-73.

[0143] <sup>7</sup>Furui J, Furukawa M, Kanematsu T. The low positive rate of serum alpha-fetoprotein levels in hepatitis C virus antibody-positive patients with hepatocellular carcinoma (相对于患有肝细胞癌的抗体-阳性患者,在 C 型肝炎中血清  $\alpha$ -胎蛋白水平的低阳性率). *Hepatogastroenterology* 1995 Sep; 42(5): 445-449.

[0144] <sup>8</sup>Nguyen MH, Keeffe EB. Screening for hepatocellular carcinoma(肝细胞癌的筛查). *J Clin Gastroenterol* 2002 Nov; 35(5 Suppl 2): S86-S91.

[0145] <sup>9</sup>Peng YC, Chan CS, Chen GH. The effectiveness of serum alpha-fetoprotein level in anti-HCV positive patients for screening hepatocellular carcinoma (在抗-HCV 阳性患者中,血清  $\alpha$ -胎蛋白水平用于筛查肝细胞癌的的有效性). *Hepatogastroenterology* 1999 Nov; 46(30): 3208-3211.

[0146] <sup>10</sup>Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma (肝细胞癌的早期

诊断的现状和未来可能性). World J Gastroenterol 2010 Jan 28; 16(4): 418-424.

[0147] <sup>11</sup>Raedle, J. 等人, C. Dig. Dis. Sci 1995, 40(12), 2587-2594.

[0148] <sup>12</sup>Gomaa 等人, World J. Gastroenterol., in press.

[0149] <sup>13</sup>El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR (May 2008). "Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma" (肝细胞癌的诊断和治疗). Gastroenterology 134(6): 1752-63.

[0150] <sup>14</sup>Yang J., 等人 J. Chromatogr. B, 2004, 813, 1-2, 59-65

[0151] <sup>15</sup>Lu, X. 等人, J. Chromatogr. B, 2008, 866, 64

[0152] <sup>16</sup>Pasikanti, K. K. 等人, J. Chromatogr. B, 2008, 871, 202

[0153] <sup>17</sup>Benavente F. 等人, Electrophoresis, 2006, 27, 4570

[0154] <sup>18</sup>Hollywood, K. 等人, Proteomics 6, 2006, 4716

[0155] <sup>19</sup>Sardesai M., 等人, Clinica Chimica Acta, 1970, 29, 1, 67-71

[0156] <sup>20</sup>Barnes and Blackstock, 1974

[0157] <sup>21</sup>Wekell J. C. 等人, Journal of food science, 1991, 56(1), 132-135

[0158] <sup>22</sup>Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, 等人 Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts (尿、血浆、血清和组织提取物的 NMR 波谱学的代谢谱分析、代谢组学和代谢组学程序). Nat Protoc 2007; 2(11): 2692-2703.

[0159] <sup>23</sup>Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Nicholson JK, Lindon JC. 750MHz 1H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease (来自患有先天性代谢障碍的患者的尿的复杂代谢图的 750MHz 1H NMR 波谱学表征: 2-羟基戊二酸尿症和枫糖尿症). J Pharm Biomed Anal 1997 Jul; 15(11): 1647-1659.

[0160] <sup>24</sup>Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. NMR spectroscopy of biofluids (生物流体的 NMR 波谱学). Annu Rep NMR Spectrosc 1999; 6(2): 1-88.

[0161] <sup>25</sup>Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, 等人 HMDB: the Human Metabolome Database (人代谢组数据库). Nucleic Acids Res 2007 Jan; 35(Database issue): D521-D526

[0162] <sup>26</sup>Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics (代谢组学中的化学计量学). J Proteome Res 2007 Feb; 6(2): 469-479.

[0163] <sup>27</sup>Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, Seferiadis KI, Bairaktari ET. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics (通过基于 NMR 的代谢组学, 健康个体的性别-相关和年龄相关的尿分析). NMR Biomed 2008 Mar; 21(3): 195-207.

[0164] <sup>28</sup>Westerhuis J, Hoefsloot H, Smit S, Vis D, Smilde A, van Velzen J, 等人 Assessment of PLS-DA cross validation [Abstract] (PLS-DA 交叉验证的评价 [摘要]). Metabolomics 2008 Mar 24; 4(1): 81-89.

[0165] <sup>29</sup>Mahadevan S, Shah SL, Marrie TJ, Slupsky CM. Analysis of metabolomic

---

data using support vector machines (使用支持向量机的代谢数据分析). Anal Chem 2008 Oct 1; 80(19):7562-7570

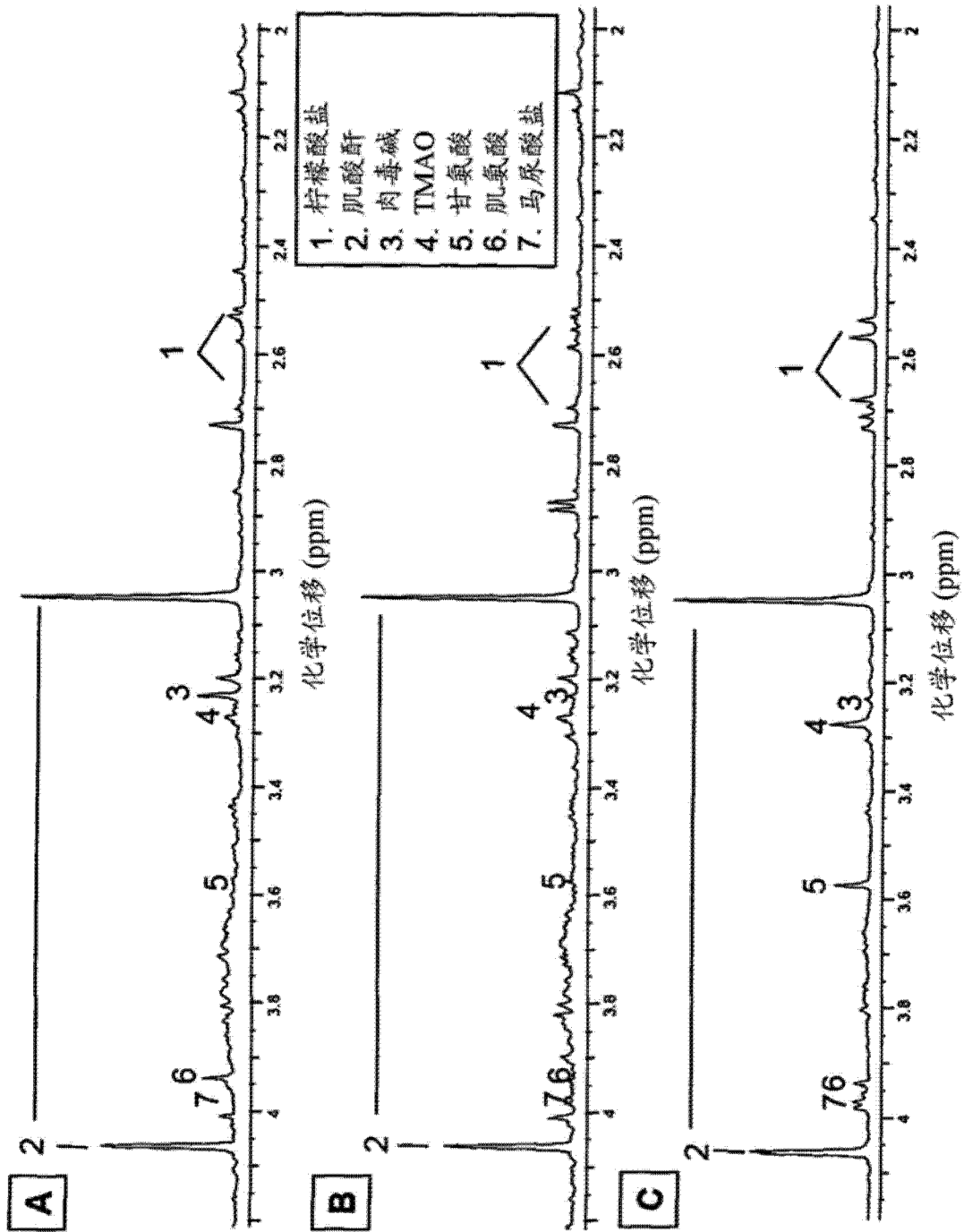


图 1

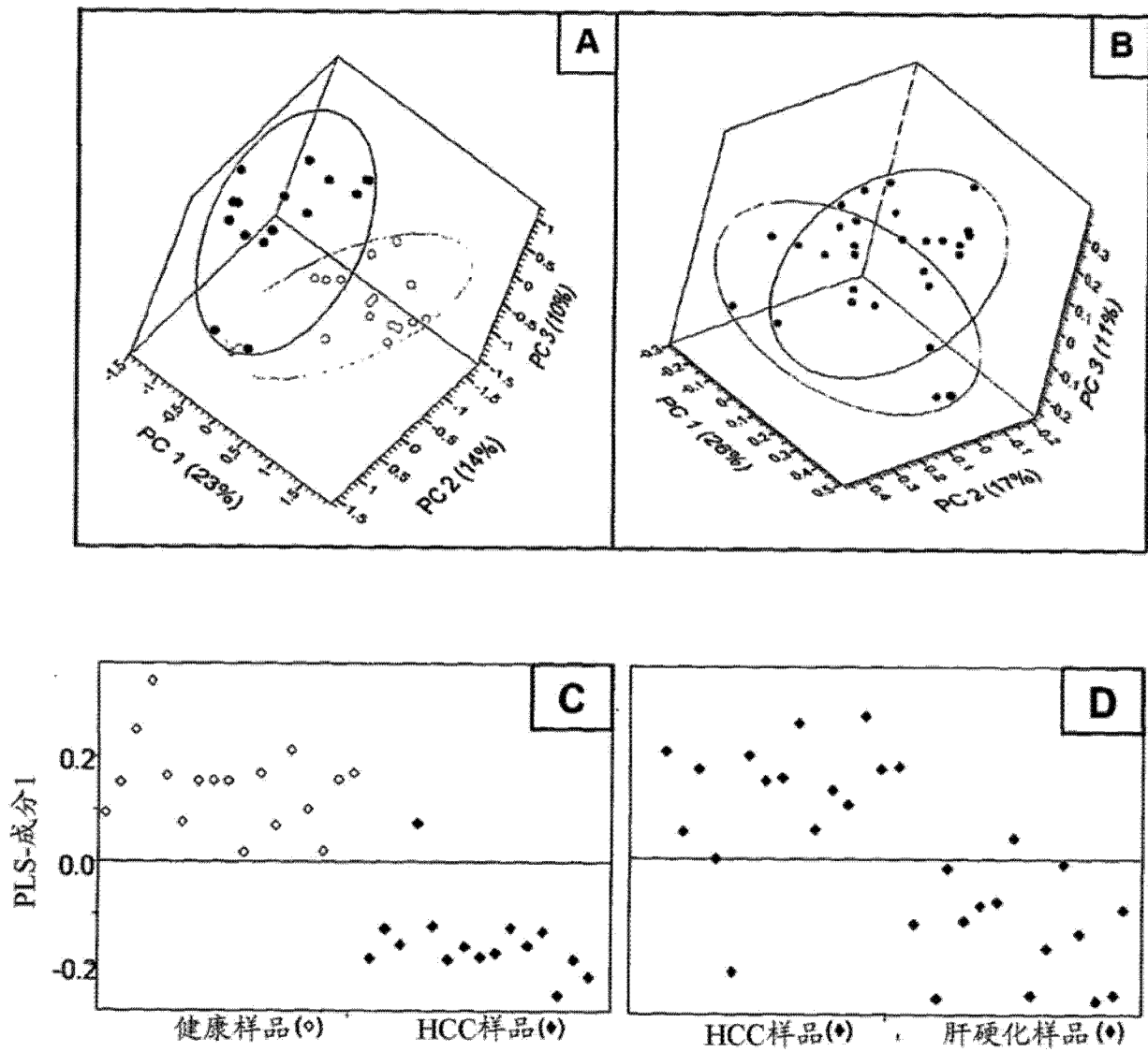
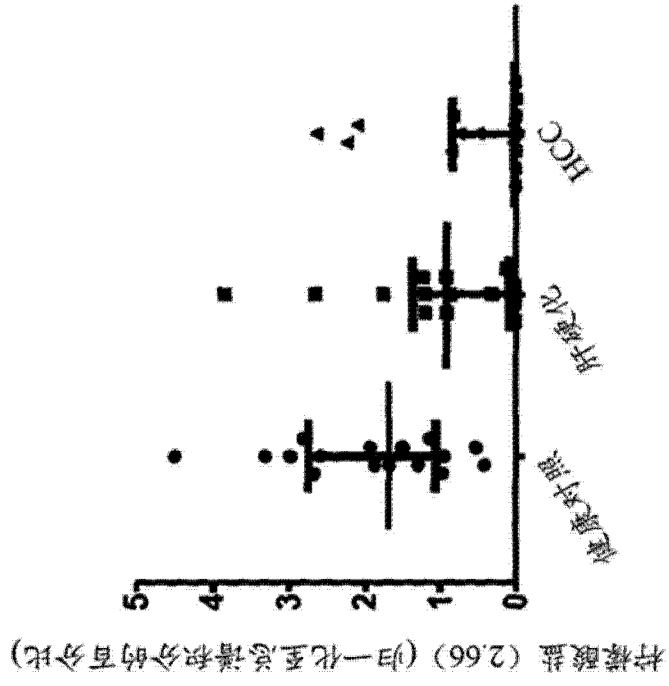


图 2

B



A

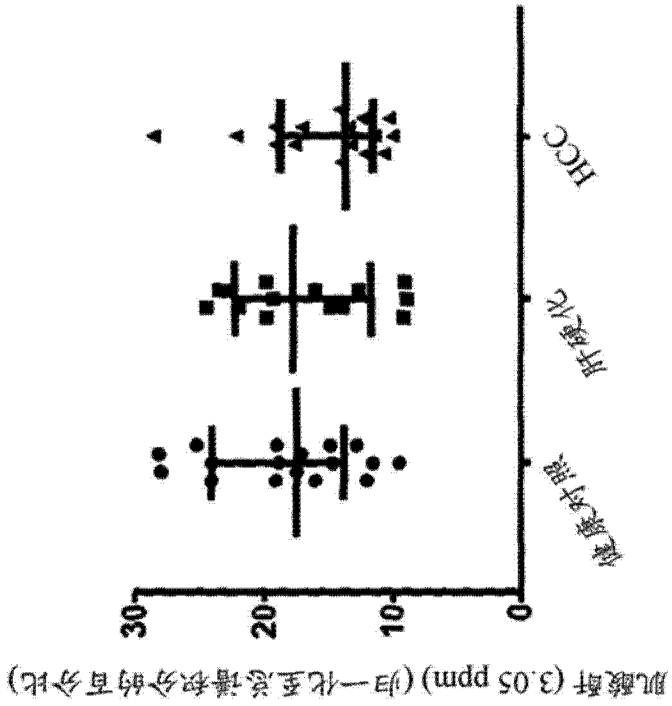
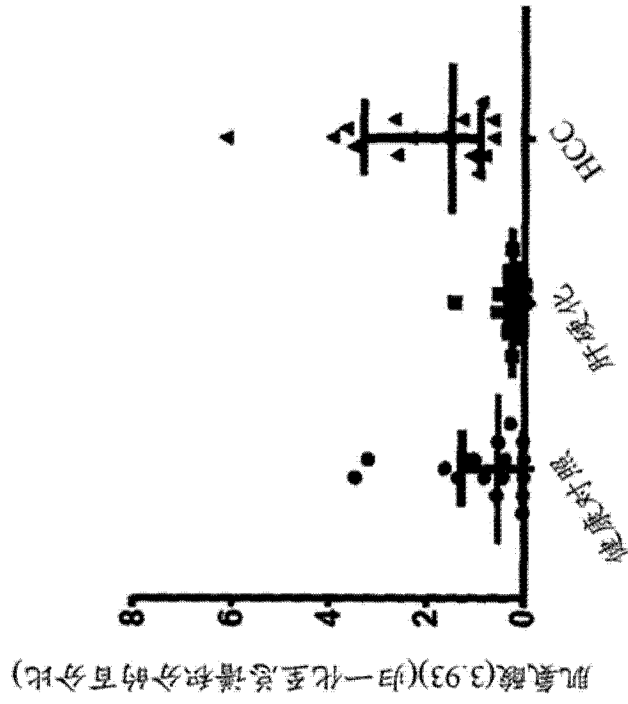


图 3

D



C

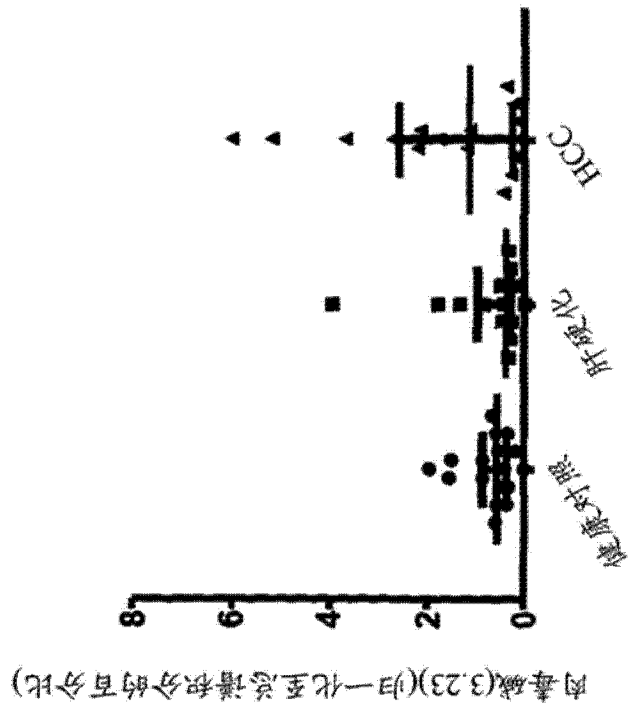
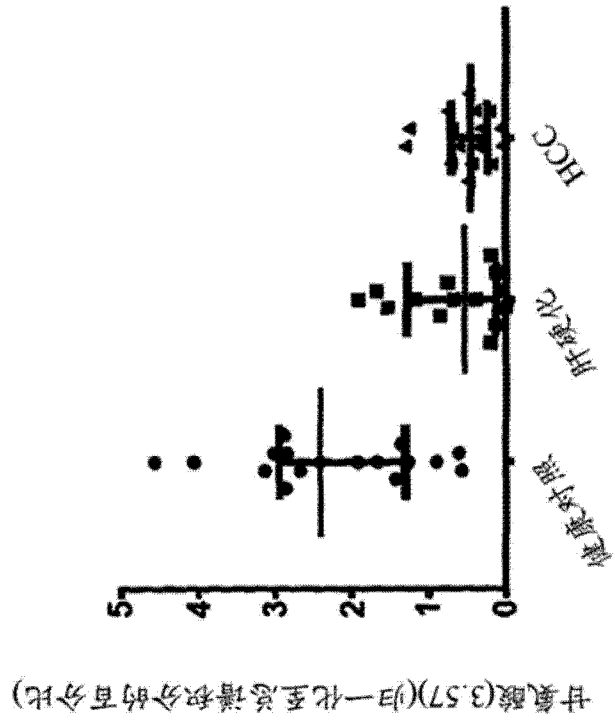


图3(续)

F



E

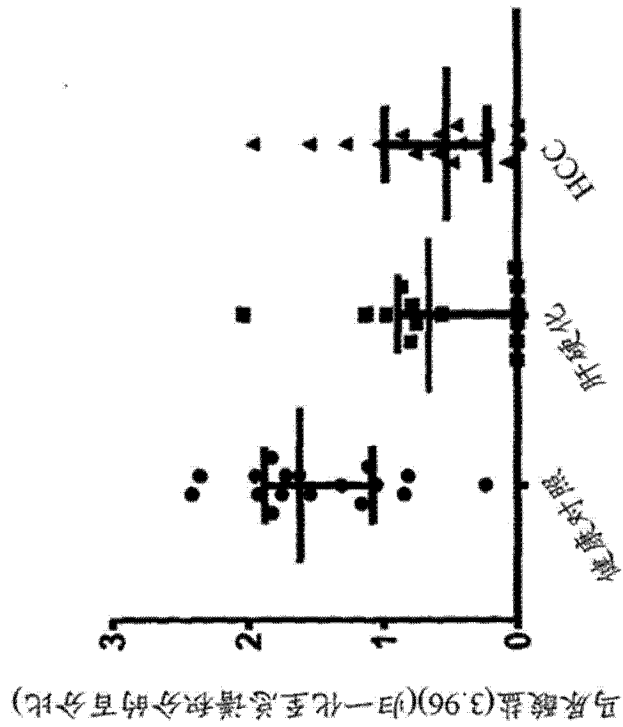
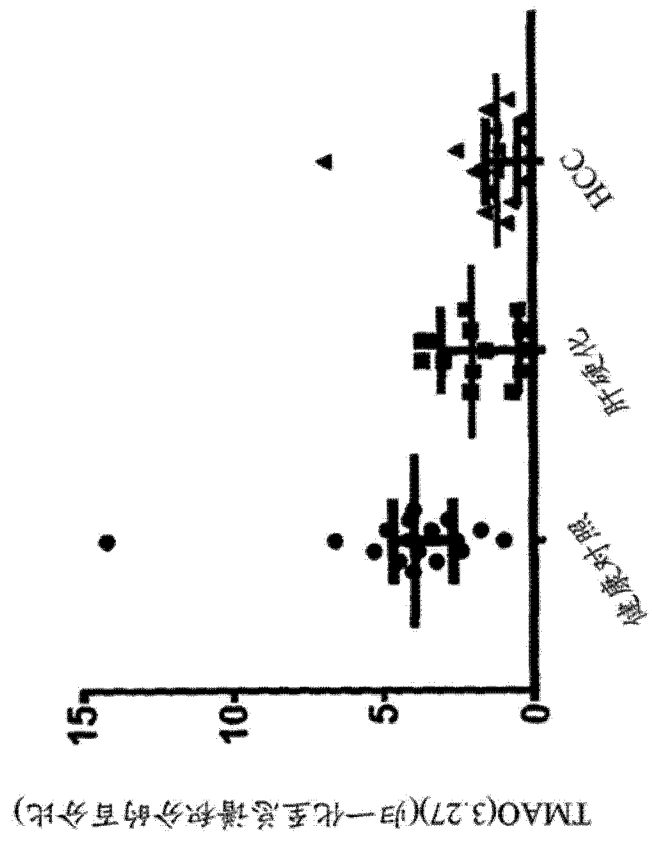


图3(续)



C

图3(续)