



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03813954.5

[43] 公开日 2005年8月31日

[11] 公开号 CN 1662817A

[22] 申请日 2003.4.16 [21] 申请号 03813954.5  
 [30] 优先权  
     [32] 2002.4.16 [33] EP [31] 02076501.2  
 [86] 国际申请 PCT/EP2003/004041 2003.4.16  
 [87] 国际公布 WO2003/087833 英 2003.10.23  
 [85] 进入国家阶段日期 2004.12.16  
 [71] 申请人 福拉姆斯大学生物技术研究所  
     地址 比利时兹威纳尔德  
     共同申请人 根特大学  
 [72] 发明人 N·L·M·卡勒瓦特  
     R·H·康特里拉斯

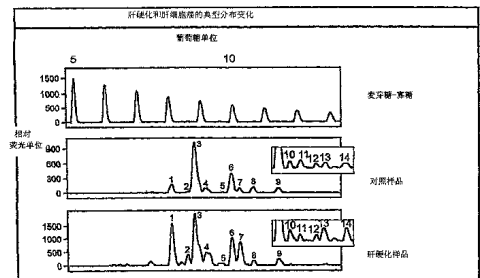
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司  
 代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 9 页

[54] 发明名称 测量肝硬化的标记

[57] 摘要

本发明提供了检测哺乳动物肝硬化的方法和试剂盒。所述诊断测试以体液如血清中诊断碳水化合物的分布和鉴定为基础。



1. 一种检测哺乳动物肝硬化的方法，其特征在于，所述方法包括：

5 a) 生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和

b) 在步骤 a) 的分布中测量至少 1 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、或所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其衍生片段的特征的量，和

10 c) 比较步骤 b) 获得的测量数据和从无肝硬化的哺乳动物分布获得的测量数据，以及

d) 将步骤 c) 所得偏差归于肝硬化。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述至少 1 种碳水化合物选自：

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

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

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

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

25 v)  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)]\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\text{多糖 } 8)$ ，

vi) 衍生自多糖 1、2、3、7 或 8 的片段，

vii) 多糖 1、2、3、7 或 8 的唾液酸衍生物，

viii) 多糖 1、2、3、7 或 8 或其衍生物或片段的特征。

30 3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述量以多糖 1 与多糖 8 和/或多糖 2 与多糖 8 和/或多糖 7 与多糖 8 和/或多糖 1 与多糖 3 和/或多糖 2 与多糖 3 和/

或多糖 7 与多糖 3 间的相对量测量。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述多糖 1 与多糖 8 间的相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 80%。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述多糖 2 与多糖 8 间的相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 100%。

6. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述多糖 7 与多糖 8 间的相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 40%。

7. 如权利要求 1-6 所述的方法，其特征在于，所述哺乳动物是人。

8. 如权利要求 1-7 所述的方法，其特征在于，所述体液是血清或血浆。

10 9. 一种检测肝硬化的诊断试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括执行权利要求 1-8 所述方法的工具。

10. 如权利要求 1-9 所述检测哺乳动物肝硬化的方法，所述方法还包括哺乳动物身体状况的其它定量和定性评估，如临床化学参数和组织学数据。

15 11. 一种检测肝硬化哺乳动物中肝细胞癌存在或倾向的方法，其特征在于，所述方法包括：

a) 生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和

20 b) 在步骤 a) 的分布中测量至少 1 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、或所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其衍生片段的特征的量，和

c) 比较步骤 b) 获得的测量数据和从肝硬化但无肝细胞癌的哺乳动物分布获得的测量数据，以及

25 d) 将步骤 c) 所得偏差归于肝细胞癌的存在。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，步骤 b) 中的二参数分析用衍生自人血清碳水化合物分布的多糖 7 和 14 进行。

13. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述二参数分析是二参数二元逻辑回归分析。

## 测量肝硬化的标记

### 发明领域

本发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法和试剂盒。诊断测试以体液如血清中诊断碳水化合物的分布和鉴定为基础。

### 发明背景

大部分肝损伤的常见原因导致肝硬化。硬化是正常肝组织的损坏，在功能性肝组织周围区域留下无功能疤痕组织，伴随着再生肝结形成。在美国，最常见的硬化原因是酗酒。在 45 到 65 岁的人中，硬化是第三大最普遍的死亡原因，仅次于心脏病和癌症。在亚洲和非洲许多地方，慢性肝炎是硬化的主要原因。许多硬化轻微的人没有症状且似乎健康好几年。另外的人虚弱，食欲差，生病和体重下降。如果慢性阻断胆汁流，人会患黄疸、瘙痒和小黄皮肤结节 (small yellow skin nodule)，特别是在眼睑周围。营养失调通常是由于自食欲差和胆汁盐生成减少导致的脂肪与脂溶性维生素吸收受损。由于出血来自食管末端静脉曲张 (食管血管曲张)，人偶尔可能咳嗽或吐出大量血。从肠到肝的静脉高血压产生这些扩大的血管。这种称为门高血压的高血压也能导致腹部液体积聚 (腹水)。也可能发展肾衰竭和肝脑病。可能发展其它长期存在的肝病症状，如肌肉萎缩、手掌红 (掌红斑)、手指卷起 (Dupuytren 掌挛缩)、皮肤的小蜘蛛样静脉、男性乳房增大 (breast enlargement) (男子乳房发育症)、颊部唾腺扩大、脱发、睾丸收缩 (睾丸萎缩)、外周 (外周神经病) 和中枢神经系统的异常神经功能。目前不能治愈硬化。治疗包括停止使用毒性剂如酒精、接受适当营养包括添加维生素、治疗产生的并发症。肝移植是目前唯一的疗法且有助于患高度硬化的人。此外，硬化的存在增加发展肝细胞癌的风险，比一般人群高约 40 倍，在慢性肝炎和酒精中毒的病原背景中，硬化发展使已增大的病人患肝细胞癌风险分别从 34.4 增加到 119 倍和从 2.4 到 22.4 倍 (Kuper 等, 2001)。通常进行一些血液测试以测量肝功能并协助确定硬化的严重性和原因。指示肝损伤的最重要因素之一是胆红素，它是肝中正常代谢且随后在尿中分泌的红黄色素。在肝炎病人中，肝不能加工胆红素，此物质的血液水平上升，有时导致黄疸。某些肝酶水平也能指示硬化 (如天冬氨酸和丙氨酸转氨

酶水平和一些凝固酶)。然而, 这些肝功能测试结果通常正常, 因为完成必须化学功能仅需要很少百分比的功能性肝细胞。另外, 一些成像测试用于诊断可能的硬化和其并发症。例如, 超声波扫描可显示肝扩大和存在特定损伤如再生结。其它贵许多的成像技术是磁共振成像(MRI)和计算层析 X 射照相术(CT)。在大部分存在一些慢性肝障碍形式的患者中, 进行肝活组织切片以评估纤维化程度和检测硬化存在(Fracanzani 等, 2001)。肝活组织切片是侵入过程, 它一般难以在正常临床环境中的定期跟踪(follow-up)基础上进行。因此检测肝硬化的特定血清标记可对肠胃病学实践有很显著的作用, 能定期跟踪慢性肝病患者和提供硬化发作的早期预警。在特定的慢性酒精中毒病例中, 用于硬化的血清标记能提供重要意见以说服病人停止酗酒。

本领域描述碳水化合物代谢病中诊断多糖的测量应用(W09219975)。在肝障碍领域中, 已知单一糖基化酶活性在肝障碍中改变。例如, 酶 UDP-N-乙酰-葡萄糖胺: 糖蛋白 N-乙酰葡萄糖胺转移酶(GnTIII)活性增加与肝病进展相关(Ishibashi 等, 1989), 这是近来在诊断背景中阐明的一个发现(Mori 等, 1998)。然而, HPLC 分离酶反应产物使这些测定复杂。此外, 在贮存条件下血清中酶的稳定性未知且获得用于血清 GnTIII 活性的值在硬化和慢性肝炎间有较大重叠。也研究纯化蛋白、血清转铁蛋白的糖基化差异, 这些差异用于检测慢性酒精中毒(Matsumoto K. 等, (1994) *Clin. Chim. Acta* 224(1): 1-8)。单一纯化蛋白碳水化合物部分的改变也在人肝硬化腹水中描述(Biou, D. 等(1987) *Biochimica et Biophysica Acta* 913, 308-312。专利 EP0503886 和 DE3838718 描述检测肝病的方法。然而, 后面的专利涉及尿中简单碳水化合物(岩藻糖)的定量。现有领域目前没有能简单测量、可靠的血清标记来区分硬化和其它肝障碍。在本发明中, 我们鉴定了多个诊断碳水化合物参数, 碳水化合物获自硬化病人血清中存在的蛋白库。血清中存在糖基化和未糖基化蛋白的复杂混合物, 它们获自肝和血浆细胞。我们意外发现糖蛋白混合物上存在的相对量诊断碳水化合物用作诊断标记, 用于区分肝硬化病人与慢性肝炎病人以及区分肝硬化与其它非恶性和恶性肝障碍, 糖蛋白存在于总血清。分析总血清糖蛋白库的优势是制备样品所需工作量减少到最小。这可分析临床相关的病人人数。

#### 附图和图表的概述

图1 分布例

上图包含葡聚糖水解脱产物且能用于分配葡萄糖单位值给各峰。第2幅图显示获

自对照血清样品蛋白的 N-多糖的典型电色谱。此检测范围中有 9 个明显可见的峰且它们的高度用于获得此发明所有样品分布的数字描述。第 3 幅图显示获自硬化病例的电色谱。额外峰 10、11、12、13 和 14(见插入框)仅在 10 倍更高 N-多糖浓度后的电色谱中可见, N-多糖获自血清蛋白。一些分布改变明显并形成诊断标记的基础。

#### 图 2 概括数据的框图(boxplot)

样品分成图 1 所示的 7 组(编号 0 到 6), 第 4 列。对于 9 个峰, 这 7 组值的中值由较粗黑线表示且四分位之间的范围由框和误差柱表示。对于峰 1、2、3、7 和 8, 样品组 0 和 2 的内部四分位数间范围与另一边的组 1 不重叠, 计算峰 1、2、7 和峰 8 间的相对量以产生 3 个新变量, 其性质总结于图右列。注意到纵座标刻度是这 3 个新变量的对数。

#### 图 3 用接受操作曲线(ROC)分析和二元逻辑回归评估 3 个变量的诊断效率

第 1 部分: 进行 ROC 分析以评估 3 个变量区分硬化样品组与无硬化的慢性病毒性肝炎组的效率。从这些 ROC 曲线(最优结合的敏感性和特异性)确定的截断值用于此图随后的第 2、3、4、5 和 6 部分以分开象限中的二维散射图区域(右上侧象限是肝硬化阳性象限, 另 3 个象限构成阴性区域)。这些散射图也显示从二元逻辑回归分析获得的回归线, 每次有 2 个变量独立。硬化样品组在各散射图中表示为黑三角。各部分的“阴性”组以圆或正方形表示。第 7 部分: 用 ROC 分析比较硬化样品组和无硬化的慢性病毒性肝炎组间的分类效率, 用变量  $\text{Log}(\text{峰 7}/\text{峰 8})$  和血清白蛋白浓度和总血清胆红素浓度。结果显示获自血清 N-多糖分布的标记在错分类病例中速度减少约 5 倍(约 25 分之一相对约 4 分之 1(胆红素)或 5 分之 1(白蛋白))。第 8 部分: 确认用于血清 N-多糖分布获得标记的 ROC 获得截断值, 这些值用于分类第 2 组有或没有硬化的慢性肝炎病人的独立组。此第 2 组获得的分类效率很类似最优组(见图的第 2 部分)。

#### 图 4 差异调节的 N-多糖的部分结构分析

此图中的 3 列代表对获自 3 个血清样品糖蛋白的 N-多糖进行外切糖苷酶阵列测序的结果。选择这些样品以反映此研究中观察到的变化的定量范围。最左边的测序列从慢性肝炎样品分析中获得且不能与健康对照分布相区分。中间列代表轻微变化, 已违反本文所述全部 3 个变量的截断值。右侧列来自影响最坏样品之一的分析。比较本文所述峰和这 3 列有用, 此比较可能大幅简化外切糖苷酶测序图中的峰追踪。以黑色表示的峰不携带对分的 GlcNAc 残基。在此方面, 能认为它们

是三甘露糖基-GlcNAc<sub>2</sub>核心寡糖的衍生物。发现以灰色表示的峰都用对分 GlcNAc 残基修饰并因此都能认为是对分 GlcNAc 取代的三甘露糖基-GlcNAc<sub>2</sub>核心寡糖的衍生物。中间测序列下的参考图集合自 6 个不同电色谱, 各色谱包含对具已知结构的参考多糖的特异外切糖苷酶消化。所用参考多糖是: 1) 三唾液酸(trisialo), 三半乳糖三触角(trigalacto triantennary); 2) 二唾液酸, 二半乳糖二触角, 有核心- $\alpha$ -1, 6-连接岩藻糖(中间列下的参考图)和 3) 脱唾液酸, 二半乳糖二触角, 有核心- $\alpha$ -1, 6-连接岩藻糖和对分 GlcNAc(最右列下的参考图)。

#### 图 5 核心-岩藻糖基化变量特征

为评估硬化组的核心- $\alpha$ -1, 6-岩藻糖基化是否增加, 通过总和所有携带此修饰的鉴定峰的正常峰高来建立新变量。显示与图 2 类似的框图以及 NOVA 和随后 post hoc 测试的结果。再次留出硬化组作为同型亚组, 因此确认这些疾病中的核心-岩藻糖基化增加。

#### 图 6 区分有和没有肝细胞癌的硬化病例

有和没有肝细胞癌的硬化病例散射图描绘峰 7 相对峰 14 的高度(见图 1), 此图关于血清蛋白 N-多糖分布的总测量峰高标准化。仅有硬化的病例表示为空心三角。有硬化和 HCC 的病例表示为黑色顶向下三角。二元逻辑回归可鉴定 HCC 病例, 其敏感性为 71%且特异性为 90%。该模型的逻辑函数是:  $Z = -0.649[\%峰 7] + 5.722[\%峰 14] + 2.967$ 。图中的对角线是截断线, 线上各点是属于两个区别组中任一组可能性相等的病例。

### 发明的目标和详细描述

复杂多糖研究(糖生物学(Kobata, 2000; Roseman, 2001))开始发展成一种更全面的方法, 可称为糖组学(glycomics)(Hirabayashi 等, 2001; Taniguchi 等, 2001)。与蛋白质组学类似, 糖组学能定义为在定量基础上研究生物样品中所有或特定糖缀合物种类中存在的多糖并比较所得分布以获得生物信息。在基础研究方面, 功能糖(蛋白)组学想要通过检测糖组(glycome)变化来阐明糖缀合物多糖部分在不同生理过程范围中的作用并随后确定携带改变多糖的非多糖部分(大部分是蛋白)特性。在此方面, 其方法与基础蛋白质组学研究类似, 但所用技术一般对于发现基础研究实验室外的应用过于复杂和/或费时。特别是在需要分析数百个样品以获得有意义信息的临床领域, 目前的糖组学方法由于其复杂性有显著的缺点。在本发明中, 我们发展了技术平台用于检测肝硬化的临床糖组学研究。我们获得

碳水化合物结构分布，碳水化合物来自血清中存在的糖蛋白，且鉴定患肝硬化病人和无肝硬化病人间多糖分布的统计学相关差异。换句话说，本发明鉴定诊断碳水化合物量或所述碳水化合物间的相对量与肝硬化存在相关。能完成本发明肝硬化诊断测试所用的碳水化合物分布，例如用 Applied Biosystems 377 凝胶-基础 DNA 测序仪 (Callewaert 等, 2001)。

因此，用本发明诊断方法能可靠区分肝硬化和并发肝细胞癌的肝硬化病人与(1)健康供体、(2)患慢性乙肝或丙肝的病人、(3)患风湿症的病人、(4)怀疑慢性酗酒的病人和(5)无 HCC 转移到肝的病人。另外，发明的诊断方法也能诊断肝硬化背景中肝细胞癌(HCC)的倾向性和存在。我们能区分肝硬化病人与上述 5 个敏感性和特异性从不低于 90%的组，在最相关诊断中(硬化与健康志愿者间的区别和硬化与患慢性肝炎病人间的区别)，敏感性和特异性的值高于 95%。

由于目前没有用于硬化的容易测量和特异血清诊断标记，使用此非侵入性诊断测试可包括硬化治疗中的治疗决定指导(当前仅肝移植能治愈)、接近监控硬化阳性病人的肝细胞癌发展和评估呈现慢性酒精消耗病人的肝损坏程度。此硬化的血清标记也能用于非侵入性研究在疫苗临床试验中慢性感染丙肝病毒的病人转变成硬化的速度，肝硬化发病率减少和/或发作延迟构成重要的临床终点，此终点目前很难估定，因为需要侵入性活组织切片技术。

在第 1 个实施方案中，发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法，包括 a)生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和 b)在步骤 a)的分布中测量至少 1 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、或所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其衍生片段的特征的量，和 c)比较步骤 b)获得的测量数据和从无肝硬化的哺乳动物分布获得的测量数据，以及 d)将步骤 c)所得偏差归于肝硬化。措词‘检测肝硬化的方法’可广泛理解为筛选方法、诊断方法或预测肝硬化的方法。

在另一个实施方案中，碳水化合物分布用于产生检测肝硬化的诊断测定，所述诊断测定包括下列步骤 a)生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段

存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和 b) 在步骤 a) 的分布中测量至少 1 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、或所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其衍生片段的特征的量，和 c) 比较步骤 b) 获得的测量数据和从无肝硬化的哺乳动物分布获得的测量数据，以及 d) 将步骤 c) 所得偏差归于肝硬化。

在又一个实施方案中，发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法，包括 (a) 生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，并比较所述分布的定量和定性方面与从 1 个或多个所述哺乳动物种类个体获得的所述分布的定量或定性方面。

措词‘存在的糖缀合物’指糖缀合物上检测到的碳水化合物，没有任何分离所述碳水化合物的步骤；因而样品如此使用且不含任何分离碳水化合物的步骤，其中措词‘或分离自体液样品’指碳水化合物从样品中存在的糖缀合物分离。

在特定实施方案中，发明方法能用于监控施用给患肝硬化哺乳动物的疗法效果。在另外一个实施方案中，发明方法特定检测肝硬化。术语‘特定’指能差异诊断肝硬化和其它肝障碍，包括患乙肝或丙肝感染的哺乳动物。

术语‘碳水化合物’可理解为糖缀合物结构中存在或获自糖缀合物的多糖，包括本领域已知多糖类别如蛋白的天冬酰胺-连接多糖(也称为 N-多糖)或丝氨酸/苏氨酸-连接多糖(也称为 O-多糖)或来自多糖的粘多糖或蛋白多糖，多糖存在于或获自糖脂和 GPI-锚获得碳水化合物。单词“多糖”和“碳水化合物”可互换。‘糖缀合物’指任何含碳水化合物部分的化合物(如蛋白或脂类)。措词‘糖缀合物混合物’所指组合物含至少 2 种(至少 3 种、至少 4 种、至少 5 种或更多)所述糖缀合物，可能也包括非糖缀合物物质如蛋白、脂类、盐和水。措词‘碳水化合物或其片段’指碳水化合物可片段化以在产物片段化过程中产生至少 1 种寡糖或其衍生物。此片段化方法的其它产物可包括单糖和寡糖或其衍生物。寡糖是碳水化合物，其化学结构由至少 2 个本领域已知作为单糖的化学相连单位组成。所述片段化方法能包括酶、化学和物理处理。例如，处理(或消化)碳水化合物可用糖苷酶(如用于从碳水化合物中取出唾液酸残基的唾液酸酶，或从碳水化合物中取出岩藻糖残基的岩藻糖苷酶)，因此所得分布由碳水化合物片段组成。例如能完成糖苷酶消化

以获得更简单的碳水化合物分布。唾液酸也可以化学方式通过温和酸水解碳水化合物取出。在质谱分析方法中，单词‘片段’指碳水化合物常在分析方法中片段化(例如在碰撞诱导的分离中)，其中产物片段化也能产生寡糖衍生物，它由与1个或多个单糖剩余物化学相连的寡糖组成，这些单糖在片段化发生前是碳水化合物的部分结构。这种寡糖衍生物的例子在本领域已知作为交叉环切割产物离子，此衍生物是质谱片段化方法的产物。‘所述碳水化合物特征’指任何可测量参数，其性质和/或量由碳水化合物结构确定。例如这些可测量参数的例子是核磁共振参数如化学位移、同核和异核偶联常数、核极化效应和剩余偶极偶联。另外，这些可测量参数可以是所述碳水化合物与其它分子如凝集素和抗体的结合程度，抗体识别碳水化合物中的特定结构决定簇或其组合。其它这类可测量参数可以是碳水化合物发挥作为酶底物功能的能力，酶特异修饰某些碳水化合物如糖基转移酶和糖苷酶。

措词‘存在于或获自糖缀合物混合物的所述碳水化合物或所述片段’指‘分布，分布含碳水化合物或其片段或者所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物、或者所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征，特征由所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的结构确定’可获自仍与混合物中糖缀合物化学相连的碳水化合物或来自通过酶、化学或物理方式从糖缀合物释放的碳水化合物。在一个较佳实施方案中，N-多糖通过酶消化从混合物中的糖蛋白释放，酶消化用肽N-糖苷酶F或其它本领域已知的内切糖苷酶。在另一个实施方案中，能释放N-和O-多糖，所用过程包括本领域技术人员已知的胍。在又一个实施方案中，可根据熟知过程用碱性条件下的 $\beta$ 消除来选择性释放O-多糖。在仍与混合物中糖缀合物化学相连的碳水化合物上获得分布的情况中，一个实施方案包括使用酶或化学过程以在获得分布前修饰糖缀合物的非多糖部分，如蛋白酶或修饰糖脂脂部分的酶。措词‘碳水化合物分布’所指实体包括所述碳水化合物的定性和/或定量信息。例如，这可指所述碳水化合物的电泳和/或色谱分布。在一个特定例子中分布是所述碳水化合物的质谱。另外，分布可以通过核磁共振分析获得的信息。在另一个例子中，分布可以是描述结合碳水化合物的凝集素定性或定量方面的信息。另外，分布可以是描述碳水化合物是特定酶底物程度的信息，如糖基转移酶或糖苷酶。这些信息可包括这类酶反应副产物的测量读数，如糖基转移酶反应中以等摩尔量释放的核苷酸。在一个特定实施方案中，措词‘产生碳水化合物分布’或‘描绘碳水化合物分布’也可指分离多糖结构并随后检测。通常在碳水化合物分布中鉴定一些碳

水化合物。碳水化合物一般存在于复杂混合物且有效检测需要分离。能完成分离的方法包括电泳和色谱方法。能完成检测的方法包括抗体检测、凝集素检测、NMR、质谱和荧光。在一个特定实施方案中，在能描绘多糖分布前需要从糖蛋白中化学和/或酶取出多糖。从糖蛋白制备多糖的方法在本领域熟知。在另一个特定实施方案中，分离和检测前需要衍生多糖。在一种方法中，本发明描绘多糖分布的方法(包括分离和检测)能结合 DNA 测序仪完成。然而，对于本领域技术人员显然的是此方法也能结合适应激光诱导荧光检测器的毛细管电泳系统应用。这种系统包括例如 P/ACE 连续毛细管电泳系统(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.)。发明也可与任何适应激光诱导荧光检测器的电泳系统一起应用。在又一个实施方案中，也可使用质谱检测方法如 MALDI-TOF-MS，它用于测量至少 1 种碳水化合物或其片段的量。在质谱方法中，通常片段化碳水化合物，因此所述方法中检测到碳水化合物片段。

在另外一个实施方案中，能用微流控(microfluidics)方法完成分布。微流控是一个迅速发展的领域，以通过固体培养基(大部分是硅薄片或高纯度玻璃板)中产生的狭窄孔通道的流体移动为基础，借助来自微芯片业的技术(影印平版和化学湿蚀刻)。流体能通过毛细管作用或主动抽吸经这些通道移动，分析物可通过电泳在充满流体的通道中移动(Schmalzing 等, (2001) *Methods Mol. Biol.* 163, 163-173)。在另一个实施方案中，完成碳水化合物分离可通过层析分离，方法包括薄层层析(TLC)、高效液相色谱或气相色谱。术语‘至少 1 种碳水化合物’指测量碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物量，分布与肝硬化检测诊断相关(因此所述至少 1 种碳水化合物可命名为至少 1 种诊断碳水化合物)。在一个实施方案中，测量 1 种碳水化合物足以诊断肝硬化。这意味着在一个特定病例中，1 种碳水化合物在患硬化的哺乳动物中存在且在无硬化的哺乳动物中缺乏，在另一个特定病例中，1 种碳水化合物在无硬化的哺乳动物中存在且在患硬化的哺乳动物中缺乏。在又一个特定例子中，不同量的 1 种碳水化合物足以区分患硬化的哺乳动物和无硬化的哺乳动物。在一个较佳实施方案中，测量 1 种、2 种或甚至更多(诊断)碳水化合物。在分布方法中，能测量(诊断)碳水化合物的量，例如通过计算峰高或峰表面。通过比较病人样品中存在的至少 1 种(诊断)碳水化合物量与无肝硬化个体中存在的对应诊断碳水化合物水平相比，可诊断肝硬化的存在或缺乏。发明能用于获自哺乳动物如人的样品。诊断碳水化合物可以是寡糖或多糖。诊断碳水化合物可分支或不分支。来自肝硬化个体样品的诊断碳水化合物存在的丰度(量)恒定高

于或低于来自未患病个体(没有肝硬化)的样品。术语“所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物”指用试剂标记的碳水化合物,试剂导致有效检测碳水化合物。所述标记碳水化合物也称为衍生碳水化合物。例如,发荧光化合物能用于标记碳水化合物。所述发荧光化合物也优选带电,从而衍生化合物可在电泳条件下移动。当荧光标记不带电时,它能偶联带电的传递(imparting)种类。所述荧光团标记也可通过荧光定量测量衍生碳水化合物。发荧光化合物如 9-氨基芘-1,4,6-三磺酸(APTS)和 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)特别适用于电泳分离衍生碳水化合物。其它用于荧光标记碳水化合物的化合物包括 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)。

在一个特定实施方案中,关于检测荧光标记的碳水化合物,可应用本领域已知任何检测方法,但检测优选用激光器完成,如二极管激光器、He/Cd 激光器或氩离子激光器。在一个特定实施方案中,通过电泳分离产生的标记碳水化合物带分布用成像系统呈现,系统以电荷-偶联装置(CCD)照相机为基础。来自 CCD 照相机的信息可随后以数字形式保存并通过多种计算机程序分析,用于比较个体间和参考标准间的诊断碳水化合物模式。在另一个特定实施方案中,凝胶分离的诊断碳水化合物可转至固定膜即印迹,然后用不同诊断碳水化合物-特异试剂探测如凝集素或者特异于所述诊断碳水化合物的单克隆或多克隆抗体。在一个特定实施方案中,发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法,包括测量和检测至少 1 种多糖结构和/或糖缀合物,它们在有和没有硬化的个体样品中丰度不同,使用特异结合所述至少 1 种多糖结构和/或糖缀合物的配基。配基包括凝集素和抗体。例如,体液样品中有‘对分 GlcNAc’残基(GnT-III 产物)的 N-多糖结构(或其缀合物)丰度增加可用特异识别多糖(或其缀合物)的凝集素检测,多糖用对分 GlcNAc 修饰,如来自 *Phaseolus vulgaris* 的红细胞凝集素(E-PHA)。另外,如果 N-多糖不用对分 GlcNAc 残基取代,可通过 N-多糖(或其缀合物)与仅结合 N-多糖(或其缀合物)的凝集素结合减少来检测有‘对分 GlcNAc’残基(或其缀合物)的 N-多糖结构丰度增加。这种凝集素的例子是来自刀豆属(*Canavalia ensiformis*)的凝集素(Con A)。检测观察到的血清糖蛋白 N-多糖半乳糖基化不足可通过末端 GlcNAc 结合凝集素如 *Griffonia simplicifolia* II(GS-II)凝集素。另外,测量半乳糖基化不足可通过末端半乳糖结合凝集素的结合减少,如来自刺桐属(*Erythrina crystagelli*)的凝集素。

在一个特定实施方案中,获得‘由碳水化合物结构确定的特征分布’是通过测

量构成特异糖基转移酶底物的碳水化合物性质。在一个较佳实施方案中，此糖基转移酶是  $\beta$ -1,4-糖基转移酶且碳水化合物存在于血清或血浆蛋白的总混合物中。此反应的另外底物是 UDP-半乳糖，反应产生 stoichiometric 量的 UDP。因此，通过测量反应前和后的唾液酸蛋白半乳糖基化程度差异可获得分布，例如方法包括糖蛋白结合特异于末端  $\beta$ -半乳糖的凝集素(如本领域已知获自蓖麻(*Ricinus communis*)和刺酮 *crystagelli*的凝集素，或 galectins 如获自灰色鬼伞(*Coprinus cinereus*)。另外，通过测量血清或血浆蛋白混合物的  $\beta$ -1,4-糖基转移酶反应产生的 UDP 量可获得分布，例如通过 HPLC。UDP 量也能用偶联酶反应测量，反应与 1 种或多种已知来自核苷酸代谢的酶偶联，例如二磷酸核苷酸如酵母 Golgi GDPase，它也显示对 UDP 的显著水解活性。在后一种情况中，分布可通过测量 UMP 或磷酸盐获得，使用熟知的技术。另一个 UDP 测量例子包括使用超分子膜孔，它在本领域已知对 UDP-Gal 和 UDP 的亲水性不同。因此，例如所得分布能对于血清或血浆样品中存在的蛋白或碳水化合物总量标准化。在又一个实施方案中，获得分布可通过使用血清或血浆蛋白混合物中作为  $\beta$ -1,4-糖基转移酶和唾液酸转移酶底物存在的碳水化合物，UDP-半乳糖和 CMP-N-乙酰神经氨酸作为糖供体底物。在此实施方案中，分布可由反应前和后唾液酸结合凝集素(如本领域熟知的获自 *Maackia amurensis* 或 *Sambucus nigra* 的凝集素)结合糖蛋白的差异组成，或可由测量反应中释放的 UDP 和/或 CMP 量组成，使用本领域已知方法。

在另外一个实施方案中，碳水化合物分布方法能预电泳添加 1 个或多个内部标准，内部标准用不同于碳水化合物分析物附着标记的发色团或荧光团标记。内部标准可精确和重复确定衍生碳水化合物的电泳迁移率，这是通过参考这些迁移率和内部标准混合物中组成的迁移率。例如，描绘分布前，若丹明标记的寡核苷酸标准 Genescan™ 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 或若丹明标记的 6-、18-、30-和 42-聚寡核苷酸的混合物可加入衍生多糖。可加入诊断标准，然后标记用于分析的样品；然而标记诊断标准优选伴随标记标准用于分析。此外，优选定量标准中的诊断碳水化合物以提供与样品中诊断碳水化合物量的定量或定性比较，样品用于分析。术语‘体液’包括血液、血清、血浆、唾液、尿、骨髓液、脑脊髓液、滑液、淋巴液、羊水、乳头吸出液等。用于分析的优选体液是常规获自病人的体液，特定优选体液包括血清和血浆。

尽管完成本发明可在描绘(衍生)多糖分布前不预处理样品，在一个特定实施方案中，用于分析的样品可能需要加工，然后分离和定量诊断碳水化合物。所用样

品加工的精确方法可根据一些因素变化，这些因素可归于样品液选择和诊断碳水化合物特性；这些因素包括：诊断碳水化合物丰度、背景碳水化合物浓度、干扰分子的存在，例如不利影响诊断碳水化合物带迁移率或荧光标记诊断碳水化合物的分子，无论荧光标记是否必须从衍生诊断碳水化合物中分离。用于此加工或预处理样品的适当方法包括：透析，用于去除干扰分子(如用于有效质谱检测的盐)；超滤，用于浓缩诊断碳水化合物和去除干扰分子；离心，用于去除干扰分子或浓缩细胞；沉淀，用于去除干扰分子，从血清中取出白蛋白以富集糖基化蛋白从而用于较低丰度，用糖苷酶去糖基化(如唾液酸酶消化多糖)以产生更简单的多糖分布；层析如亲和层析以取出例如来自血清的白蛋白。

在另外一个实施方案中，发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法，所述方法包括(a)生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和(b)测量所述碳水化合物分布中存在的至少1种碳水化合物或其片段或者所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的相对量。术语‘测量相对量’指可在2个分布间测量至少1种碳水化合物或片段(如1种特定的碳水化合物或片段)的量，1个分布获自无肝硬化的哺乳动物且另1个分布获自可能患肝硬化并待诊断肝硬化的哺乳动物。另外，可在取自无肝硬化的哺乳动物的平均参考范围和待诊断肝硬化哺乳动物中所述特定碳水化合物的测量量间比较1种特定碳水化合物的量。在另一个实施方案中，‘测量相对量’指测量1个碳水化合物分布中存在的至少2种碳水化合物或其片段或者所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的相对量、所述碳水化合物或所述碳水化合物片段的特征，分布获自动物体液样品。

在又一个实施方案中，为了能够测量碳水化合物的相对量，凝胶上包含诊断标准，用于分析受试者样品中的诊断碳水化合物；然而，诊断标准体现的信息如带移动距离和强度，也能通过与保存记录比较来获得，保存记录产生自以前进行过荧光团协助碳水化合物电泳的诊断标准，电泳条件类似用于分析的样品所受到的条件。诊断标准可以都是阳性即对应于患病个体的完整碳水化合物模式，或是阴性即对应于未患病个体。诊断标准的组成可类似于用于分析的样品，它们可包含诊断碳水化合物和背景碳水化合物，背景碳水化合物组成与实际样品中发现的相似。诊断标准能来自患病和未患病个体的样品获得。另外，诊断标准可包含1

种或多种无背景碳水化合物的诊断碳水化合物。

在一个特定实施方案中，测量肝硬化的诊断技术不需要了解碳水化合物结构的现有详细知识。

在另一个特定实施方案中，测量肝硬化的诊断技术使用碳水化合物结构的知识。不同调节多糖的结构分析结果可概括为 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III 产物的峰度增加(对分 GlcNAc，图 1 所示峰 2、4 和 7 的多糖结构)，二触角多糖的半乳糖基化减少(图 1 所示峰 1 和 2 的多糖结构强度提高)，二和三触角充分半乳糖基化多糖结构的峰度降低(图 1 所示峰 3 和 8 的多糖结构)。

在另外一个实施方案中，发明提供检测哺乳动物肝硬化的方法，所述方法包括生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，并测量所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其片段或者所述碳水化合物或所述片段的标记衍生物的相对量、或者至少 1 种碳水化合物或其片段的特征，其中所述至少 1 种碳水化合物选自：

- i)  $\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$  (多糖 1)，
- ii)  $\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)][\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$  (多糖 2)，
- iii)  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}$  (多糖 3)，
- iv)  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)][\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)[\text{Fuc}(\alpha-1, 6)]\text{GlcNAc}$  (多糖 7)，
- v)  $\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)]\text{Man}(\alpha-1, 3)[\text{Gal}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 2)\text{Man}(\alpha-1, 6)]\text{Man}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}(\beta-1, 4)\text{GlcNAc}$  (多糖 8)，
- vi) 衍生自多糖 1、2、3、7 或 8 的片段，
- vii) 多糖 1、2、3、7 或 8 的唾液酸衍生物，
- viii) 多糖 1、2、3、7 或 8 或其衍生物或片段的特征。

为了阐明，峰 1、2、3、7 和 8 的结构对应于图 1 所示碳水化合物分布和图 4 中这些结构的图解。所述碳水化合物分布是脱唾液酸分布(多糖上没有唾液酸)，意味着峰 1、2、3、7 和 8 的结构严格称为碳水化合物片段(缺失唾液酸结构)。本文用 IUPAC 命名规则表示碳水化合物(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/38.html>)，本发明鉴定根据图 1 的峰并通过其精简和扩展命名来表示。在权利要求中，使用精简命名。

来自图 1 的峰 1 的脱唾液酸多糖结构：

精简命名：

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

扩展命名：

$\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→3)-[ $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→6)]- $\beta$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→4)- $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc<sub>D</sub>-(1→6)]-D-Glc<sub>D</sub>NAc

来自图 1 的峰 2 的脱唾液酸多糖结构：

精简命名：

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

扩展命名：

$\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→3)-[ $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→4)] [ $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→6)]- $\beta$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→4)- $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→4)-[ $\alpha$ -L-Fuc<sub>D</sub>-(1→6)]-D-Glc<sub>D</sub>NAc

来自图 1 的峰 3 的脱唾液酸多糖结构：

精简命名：

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

扩展命名：

$\beta$ -D-Gal<sub>D</sub>-(1→4)- $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→3)-[ $\beta$ -D-Gal<sub>D</sub>-(1→4)- $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→6)]- $\beta$ -D-Man<sub>D</sub>-(1→4)- $\beta$ -D-Glc<sub>D</sub>NAc-(1→4)-D-Glc<sub>D</sub>NAc

来自图 1 的峰 7 的脱唾液酸多糖结构：

精简命名：

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

扩展命名:

$\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  4)] [ $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  4)-[ $\alpha$ -L-Fucp-(1  $\rightarrow$  6)]-D-GlcNAc

来自图 1 的峰 8 的脱唾液酸多糖结构:

精简命名:

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

扩展命名:

$\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  4)]- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  3)-[ $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  6)]- $\beta$ -D-Manp-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1  $\rightarrow$  4)-D-GlcNAc

在另外一个实施方案中, 发明提供检测肝硬化的方法, 包括步骤(a)生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布; 所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物, 所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品, 和(b)测量多糖结构 1 或其片段和多糖结构 8 或其片段和/或多糖结构 2 或其片段和多糖结构 8 或其片段和/或多糖结构 7 或其片段和多糖结构 8 或其片段和/或多糖结构 1 或其片段和多糖结构 3 或其片段和/或多糖结构 2 或其片段和多糖结构 3 或其片段和/或多糖结构 7 或其片段和多糖结构 3 或其片段的相对量。

多糖结构 1、2、7 和 8 的平均峰高在不同病人组中计算。硬化组 (n=37) 的这些多糖结构间的平均相对量是: 峰 1/峰 8: 2.444, 峰 2/峰 8: 0.590 和峰 7/峰 8: 1.479。健康对照组 (n=60) 的平均相对量是峰 1/峰 8: 0.809, 峰 2/峰 8: 0.081 和峰 7/峰 8: 0.7234。这意味着当峰 1/峰 8 间的相对量比此健康群体平均值高 3.02 倍时和/或当峰 2/峰 8 间的相对量比此健康群体平均值高 7.28 倍时和/或当峰 7/峰 8 间的相对量比此健康群体平均值高 2.04 倍时, 样品诊断为有硬化。

硬化组 (n=27) 的这些多糖结构间的相对量是: 峰 1/峰 8: 1.21, 峰 2/峰 8: 0.25

和峰 7/峰 8:0.95。这意味着当峰 1/峰 8 间的相对量比此慢性肝炎组平均值高 2.01 倍时和/或当峰 2/峰 8 间的相对量比此慢性肝炎组平均值高 2.36 倍时和/或当峰 7/峰 8 间的相对量比此慢性肝炎组平均值高 1.56 倍时, 样品诊断为有硬化。

完整对照群体 (n=153, 由健康个体、患慢性肝炎的个体和患慢性酒精中毒的个体组成) 的这些多糖结构间的相对量是: 峰 1/峰 8: 0.98, 峰 2/峰 8: 0.115 和峰 7/峰 8:0.87。这意味着当峰 1/峰 8 间的相对量比此完整对照群体平均值高 2.49 倍时和/或当峰 2/峰 8 间的相对量比此完整对照群体平均值高 5.13 倍时和/或当峰 7/峰 8 间的相对量比此完整对照群体平均值高 1.7 倍时, 样品诊断为有硬化。

因此在另一个实施方案中, 当峰 1/峰 8 间的比例(相对量)高于至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%或至少 80%的对照群体平均值相对量时, 样品诊断为获自患肝硬化的哺乳动物。

在一个特定实施方案中, 发明提供检测肝硬化的方法, 包括步骤 (a) 生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布; 所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物, 所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品, 和 (b) 测量多糖结构 1 或其片段和多糖结构 8 或其片段的相对量, 其中所述多糖结构或其片段间的所述相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 80%。

在又一个实施方案中, 当峰 2/峰 8 间的相对量高于至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或至少 100%的对照群体平均值相对量高时, 样品诊断为获自患肝硬化的哺乳动物。

在一个特定实施方案中, 发明提供检测肝硬化的方法, 包括步骤 (a) 生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布; 所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物, 所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品, 和 (b) 测量多糖结构 2 或其片段和多糖结构 8 或其片段的相对量, 其中所述多糖结构或其片段间的所述相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 100%。

在另外一个实施方案中, 当峰 7/峰 8 间的相对量高于至少 20%、至少 30%、至少 40%的对照群体平均值相对量时, 样品诊断为获自患肝硬化的哺乳动物。

在另一个特定实施方案中, 发明提供检测肝硬化的方法, 包括步骤 (a) 生成关

于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或获自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，(b)测量多糖结构 7 或其片段和多糖结构 8 或其片段的相对量，其中所述多糖结构或其片段间的所述相对量比无肝硬化的哺乳动物中所述相对量平均值高至少 40%。

在又一个实施方案中，发明也包括进行肝硬化诊断的试剂盒。例如，能产生进行荧光团协助碳水化合物电泳诊断肝硬化的试剂盒。另一个例子是产生质谱肝硬化诊断的试剂盒。荧光团协助碳水化合物电泳诊断试剂盒提供进行肝硬化诊断所需的试剂组合。适当试剂盒使实验室能方便地进行荧光团协助碳水化合物电泳诊断。试剂盒可包括用于鉴定肝硬化测试的试剂。试剂盒可包括诊断标准，荧光标记，印迹和结合材料如膜、碳水化合物特异结合试剂、凝集素、说明、样品容器、聚丙烯酰胺凝胶试剂、预制凝胶、酶缓冲液、还原剂(用于荧光团标记碳水化合物)和能催化结构性改变诊断碳水化合物反应的糖苷酶(如唾液酸酶、半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶)。更完整的试剂盒能包括进行荧光团协助碳水化合物电泳的装置，如聚丙烯酰胺凝胶设备、CCDs、激光器、DNA 测序仪、计算机、软件等。荧光团协助碳水化合物电泳诊断试剂盒所含试剂优选以预测定量提供。试剂盒优选包括完成本发明荧光团协助碳水化合物电泳方法的说明。

诊断测试用于实践，因为它简单到足以由正常训练的实验室人员大规模应用。此外，由于以电泳为基础的高分辨和高敏感性 DNA 测序和突变检测分析器迅速在越来越多的临床实验室中存在或大部分临床实验室能负担得起，可在它们上面运行新的诊断糖组学测试。此外，可用范围的 DNA 分析器能从每天每台机器几百到数百个样品中容易地测量样品产量，这取决于各实验室需求。此 DNA 分析装置提供自动化、总分析方法复杂性降低的附加优势。总糖蛋白混合物的分布增加测试容许量，测试用于混合物中各单独糖蛋白丰度和糖基化模式的个体间小变化，因而能比目前经典方法更有力测试，经典方法中糖基化在纯化糖蛋白上研究。

在另外一个实施方案中，检测肝硬化的方法进一步包括临床化学参数和/或组织学数据。因此，本发明也能结合临床化学参数和/或组织学和/或成像参数方便地完成。测量临床化学参数包括测量胆红素、白蛋白、凝血酶原时间、C-反应蛋白、IgA 丰度、血清透明质酸浓度、转氨酶和一些本领域已知肝代谢测试的水平。组织学包括肝活组织切片检查。成像包括超声波、CT-扫描、MRI-扫描和特异于肝

的放射性追踪物成像。

在另一个实施方案中，发明提供方法检测肝硬化哺乳动物中肝细胞癌的存在或倾向性，包括(a)生成关于碳水化合物或其片段、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确定的所述碳水化合物或所述碳水化合物片段特征的分布；所述碳水化合物或所述片段存在于或源自糖缀合物混合物，所述糖缀合物存在于或分离自所述哺乳动物体液样品，和 b)在步骤 a)的分布中测量至少 1 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、或所述碳水化合物分布中存在的至少 1 种碳水化合物或其衍生片段的特征的量，和 c)比较步骤 b)获得的测量数据和从肝硬化但无肝细胞癌的哺乳动物分布获得的测量数据，以及(d)将步骤 c)所得偏差归于肝细胞癌的存在。在又一个实施方案中，在检测步骤 c)中肝细胞癌存在或倾向性的方法中，二参数分析用获自人血清碳水化合物分布的多糖 7 和 14 完成。在另外一个实施方案中，所述二参数分析是二参数二元逻辑回归分析。

提供下列例子作为某些实施方案的描述。它们仅用于示范且本身不限制。

### 实施例

#### 数据收集和糖组学血清分布特征

获得完整蛋白收集中存在的 N-多糖库分布，蛋白存在于 214 种人血清，从 5 $\mu$ l 血清起始，没有任何预处理。Applied Biosystems 377 DNA 测序仪用于此研究。14 个峰的峰高在各分析血清样品中定量，占>99%的总观察信号强度。我们将讨论限于 8 到 12 个葡萄糖单位迁移范围中的 9 个峰(图 1)。它们的强度高到足以进行容易的常规定量。

#### 统计加工

由于我们研究的‘omics’设置，我们以纯统计方法处理数据分析，没有偏向所测峰特征。

图 2 概括了 7 个样品组中这 9 个峰的数据特征(中值和四分位间范围)。在分析早期，我们观察到患肝细胞癌病人样品中产生的分布变化很类似于肝硬化病人(此分布变化的一般特征通过比较图 1 下面的 2 个图而明显)。由于此研究中所有患肝细胞癌的病人也有肝硬化(16)，我们决定在进一步的统计分析中将这组样品视作一组(n=37，表 1 中的组 1)，命名为硬化组。组 0 由 60 个来自红十字会血液供体的对照样品组成。来自患慢性乙肝或丙肝且无硬化病人的所有样品一起纳入组 2(n

=27)。组 3 由 8 个无 HCC 转移到肝的病人样品组成。组 4 中，所有样品从怀疑慢性酗酒且碳水化合物缺陷转铁蛋白(CDT)测试结果阳性的病人中集合。血清转铁蛋白的糖基化程度对最近(2-3 周)的酒精摄入做出响应且是目前检测慢性酗酒的最佳血清标记(Anton, 2001; Wuyts 等, 2001)。显然 CDT 的存在能影响本文所测总血清糖蛋白的糖基化分布。为了比较目的，组 5 由 CDT 为负的慢性酗酒者样品(n=33)组成。最后，组 6 由来自自身免疫紊乱病人的样品组成(n=24)。IgG 的糖基化改变(特别是糖基化不足和 $\alpha$ -1, 6-连接的核心岩藻糖存在增加)在风湿性关节炎和强直性脊柱炎中详细记载(Martin 等, 2001; Watson 等, 1999)并也能影响总血清糖蛋白的多糖模式，因为 IgG 是很丰富的血清蛋白。

从图 2 的数据中显然硬化组的峰 1、2 和 7 上调且峰 3 和 8 下调充分，从而硬化组值的内部四分位数间范围不与对照组(组 0)的内部四分位数间范围重叠。此外，如 Spearman 相关性分析(表 2)所示，这些变化高度相关。因此，我们通过按比例测量(scaling)上调峰 1、2 和 7 到下调峰 8 建立了新变量，随后对数转化这些新变量以使分配标准化。考虑不同峰 4 量的分析不提高分类效率(见下)，结合峰 3 下调的分析也不提高效率。图 2 的右图概括了所得 3 个新变量的值。为检测 7 个样品组间这些新变量平均值的显著差异，进行单项变化分析，接着用 2 个不同的多比较检验(Tukey 真实显著差异检验和 Scheffé 比较)以查明特定组间差异。对于所有 3 个变量，familywise 误差率为 0.0001 时，硬化组与所有其它样品组显著不同(表 3)。此差异的分类效率用无参数接受操作曲线(ROC)分析和二元逻辑回归评估。为了最佳临床相关性和在咨询合作肝脏病学者(H. Van Vlierberghe 博士，UZGent)后，这些分类算法用于比较硬化组和患慢性乙肝或丙肝的病人组。在典型的肠胃病学临床环境中，硬化检测在慢性肝炎患者(和有慢性酗酒的病人)中最相关。在我们部署中的慢性酗酒病人样品组关于硬化存在的特征确定不充分，不能将此收集包括在截断值确定中。图 3.1 显示 ROC 分析结果且获得约为 95%的满意分类效率。获自 ROC 曲线的截断值(在此值时达到最高的组合敏感性和特异性)表示为分开象限中图 3 剩余部分的二维散射图的线。将散射图一分为二的斜线是回归线，从 2 个变量的线性二元逻辑回归模型中计算。比较计算截断值与回归线区分硬化组和所有其它样品组的效率有益(图 3.2-6)。一般观察到‘双重 ROC’分类比回归方法特异性高且敏感性低。在区分硬化组和慢性肝炎组中，敏感性和特异性都在 90-98%的范围内。如图 3.3 所见，对于双重 ROC 分类，红十字会健康血液供体的样品组没有(左和右图)或仅有 1 个(60, 中央的图)假阳性，对于回归方法，

没有(右图)或仅有1个(中央和左)假阳性。这接近100%特异性,敏感性约为95%,与区分慢性肝炎所得值很类似,再次表明所测变量指示病理变化,此变化特异于硬化且不随着慢性肝炎发作显著改变(也能获自ANOVA结果)。在结合参数Log(峰7/峰8)的回归分析中特定观察到来自慢性酗酒者的样品组中有更多假阳性(图3.4)。然而,有另2个参数之一的双重ROC分类仍使这些病例保持在‘阳性区’外。在自身免疫疾病组中(图3.5),假阳性主要是由于25%病例的Log(峰1/峰8)值增加和由于17%病例的Log(峰7/峰8)值增加。Log(峰2/峰8)仅在1个病例(4%)中违反截断值。再次,在使这些病例保持在阳性区外上,双重ROC分析比二元逻辑回归更成功。图3.6给出所有这些分析的总图象。总体上,最左侧图中的参数组合产生此‘方便样品’集合的最佳结果,通过二元逻辑回归的敏感性和特异性为95%,通过双重ROC分析的敏感性为92%且特异性为98%。

#### 不同调节N-多糖的结构分析

最后一段所示结果本身对区分硬化病人和慢性肝障碍不太发展的病人有价值。然而,为增加‘omics’方法所得信息对生物问题的可靠性,通常尝试使统计数据加工结果与研究问题的已知方面相关。对于糖组学,能评估这种相关性的一个先决条件是结构分析不同‘表达’的多糖。通过使用外切糖苷酶阵列,我们能获得关于不同调节多糖的足够结构信息。一些另外的要素使它可行:首先,报导‘健康’人血清中存在的N-多糖以三维HPLC方式作图(Nakagawa等,1995)。此研究构成正常血清糖蛋白上存在的N-多糖的真实‘类别’,因此对于我们的研究是可比较值的资源,如蛋白质组学研究中充分注释的蛋白质组。第二,根据我们的诊断研究,样品有广泛定量的感兴趣变化范围。这对于‘追踪’外切糖苷酶后阵列分布中感兴趣的峰很有用。图4显示3个这些样品的外切糖苷酶测序。健康血清分布中的5个主要峰结构(图4中以黑峰显示结构和其外切糖苷酶产物。有这些结构的参考多糖和一些其外切糖苷酶产物的位置示于中间序列的底板。此板集合自单独板,它们各含1个这些峰)。这些结构的有效性显著简化追踪分布中剩余、不同调节峰的任务。

#### 与图1中峰1对应的多糖结构

峰1在岩藻糖苷酶消化时转移2个葡萄糖单位到 $\alpha$ -半乳糖二触角参考多糖的位置(中间测序列底部参考图中的第1个峰)。此外,岩藻糖苷酶消化时,此位置的峰变得很强,因为峰6转移到此位置(峰6:二半乳糖核心-岩藻糖基化二触角多糖的结构)。这些一起证明峰1是二触角、无半乳糖(agalacto)、核心- $\alpha$ -1,6-岩

藻糖基化多糖。因此，它在硬化样品组中上调指示半乳糖基化不足与血清糖蛋白核心岩藻糖基化增加的组合。

#### 与图 1 中峰 2 对应的多糖结构

鉴定此峰更困难，因为它的丰度相对低。然而，能获得足够信息以明确鉴定其结构：在用唾液酸酶和 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶双消化产生的分布中，峰 7 产物与唾液酸酶板中的峰 2 精确共迁移。随后，由于左侧测序列（肝炎样品）中没有观察到峰 2，我们可在另 2 个样品的唾液酸酶+岩藻糖苷酶双消化模式中鉴定其外切糖苷酶产物，其中峰 2 可检测。岩藻糖苷酶消化时峰 2 位置不再存在峰，只有 1 个可能是消化产物的新峰（以灰色突显，中间测序列的唾液酸酶+岩藻糖苷酶分布中第 1 个箭头）。在三消化分布中（添加 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶），此峰更强，因为峰 7 的消化产物与它共迁移。添加己糖胺酶消化在此位置不留下峰痕迹。这使我们得出结论，峰 2 代表对分、无半乳糖的核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖基化结构。因此，此峰携带峰 3 和峰 7 的结构改变组合，即它是非半乳糖基化且具有对分 GlcNAc 残基。

#### 与图 1 中峰 3 对应的多糖结构

这是总血清糖蛋白上最丰富的 N-多糖。唾液酸酶消化后，通过与麦芽糖-寡糖参考梯(ladder)相比较，估计其大小为 9 个单糖单位。唾液酸酶/ $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶消化后，此多糖失去 2 个半乳糖残基且在 $\beta$ -N-乙酰己糖胺酶消化时再失去 2 个 GlcNAc 残基。剩余多糖迁移到  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  核心 N-多糖结构的位置。我们推断多糖 nr. 3 的结构是二触角、二- $\beta$ -1,4-半乳糖基化。此结论通过它与有此结构的参考多糖精确共迁移来确认，未用和用 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶消化。峰 3 在硬化中下调，其半乳糖基化不足的产物(或前体)丰度增加且其它二触角多糖存在增大，此基本二触角底物是这些多糖的前体。

#### 与图 1 中峰 7 对应的多糖结构

此峰也以相对低丰度存在于慢性肝炎病人的血清(图 4 左侧测序列的第 2 个板中第 3 个箭头)和正常血清(未显示)分布。其测序最容易在第 3 个测序列中跟踪，代表我们收集中受影响最严重的血清之一。峰 7 是此分布中第 3 大最丰富多糖，此峰而不是其任何消化产物与上述参考多糖之一或其消化产物共迁移。由于到四重外切糖苷酶消化没有发现共迁移，这最可能意味存在这些参考多糖中没有的取代物。四重消化后，峰 7 消化产物比三甘露糖核心寡糖移动慢 1 个葡萄糖单位，意味着此三甘露糖核心上存在取代物，大小为 1 个单糖。根据总血清糖蛋白 N-多糖的作图研究，它仅可能是所谓的对分 GlcNAc。不预期此取代物抗这些条件中的

伴刀豆 $\beta$ -N-乙酰己糖胺酶消化，因为已知对分 GlcNAc 残基特定抗酶取出(通过参考多糖上此残基对本文所用相同外切糖苷酶的抗性来确认，见图 4，第 3 个测序列下的参考图)。岩藻糖苷酶消化诱导 1.2 个葡萄糖单位转移，这指示核心- $\alpha$ -1,6-连接岩藻糖残基的存在。添加 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶消化转移另 2 个葡萄糖单位给峰，表明存在 2 个 $\beta$ -1,4-半乳糖残基。因此，我们推断峰 7 代表二触角、二- $\beta$ -1,4-半乳糖基化、核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖基化多糖结构。通过所有峰 7 消化产物与有此结构的参考多糖对应消化产物共洗脱确认此结果(右侧测序列的底部板，板集合自不同泳道的电泳图，它们各含 1 个特定外切糖苷酶阵列作用于有结构 7 的参考多糖的消化产物)。此对分 GlcNAc 取代物是 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III(Gn T III)活性作用于峰 6 所示结构的产物，峰 3 的核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖基化变体。

#### 与图 1 中峰 8 对应的多糖结构

对应于峰 8 的多糖比多糖 3 长约 2 个单糖单位，不能被牛肾岩藻糖苷酶消化并与三触角的充分 $\beta$ -1,4-半乳糖基化参考多糖共迁移。此外， $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶取出 3 个半乳糖残基(从多糖)，之后该多糖比多糖 3 剩余物长 1 个单糖单位，当和二触角结构比较时，与三触角多糖预期的 1 个额外 GlcNAc 残基一致。总之，峰 8 代表 2,4-分支三触角、三- $\beta$ -1,4-半乳糖基化多糖结构。

#### 与图 1 中峰 9 对应的多糖结构

此多糖比峰 8 的三触角未岩藻糖基化多糖长 1 个单糖单位，对牛肾和杏仁粉岩藻糖苷酶都敏感，消化后该多糖转变成峰 8。因此，此多糖上存在的岩藻糖残基是 $\alpha$ -1,3/4 连接。我们推断峰 9 的多糖是多糖 8 的分支-岩藻糖基化衍生物。不能用外切糖苷酶消化确定分支岩藻糖残基的确切位置。

#### 与图 1 中其它峰对应的多糖

峰 4 也在硬化组中上调，虽然不足以使四分位范围不与对照组之一重叠。仅用外切糖苷酶难以明确阐明其完全结构，因为它在唾液酸酶-消化分布中的位置与 1 种核心-岩藻糖基化单半乳糖基化二触角多糖重叠。此单半乳糖基化多糖产生正常血清唾液酸酶-消化分布中的大部分峰 4 强度。下列观察提示此结构不是硬化病人血清中存在量增加的结构：添加 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶消化时，峰出现的位置与上述岩藻糖苷酶消化峰 2 时相同。这表明峰 2 的半乳糖基化变体必须存在于患病的唾液酸酶处理分布中，它大 1 或 2 个半乳糖残基。符合这些要求且这里未鉴定的唯一差异调节峰是峰 4。峰 4 和其 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶产物间的距离与二触角、二半乳糖基化多糖和其 $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶产物间的距离相同，这是峰 4 上存在 2 个 $\beta$ -1,4-

连接半乳糖残基的有力证据。因此，我们暂时认为硬化中峰 4 的峰强度增加至少部分来自对分、二半乳糖基化多糖(无岩藻糖基化)。

明确鉴定其它峰需要质谱，其中许多最可能是上述结构的单半乳糖基化变体。

#### 分析核心- $\alpha$ -1,6-岩藻糖基化

报导肝细胞癌中的 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶表达增加(Noda 等, 1998)。由于前面段落中鉴定的一些上调峰(1,2和7)和非差异调节峰6在N-多糖核心近侧GlcNAc上携带 $\alpha$ -1,6-连接岩藻糖残基，研究这4个峰高组成的变量特征很有趣。因此，加入这4个峰的峰高并对上述用于其它变量的相同组进行单向ANOVA，接着以0.0001的familywise误差率进行相同多比较检验。结果示于图5。硬化组平均值与所有其它组的平均值显著不同。当硬化组在有和没有HCC的病例中分开时，没有检测到核心岩藻糖基化程度的显著差异(t-检验,  $P>0.1$ )。

#### 发展临床有用的高通量去糖基化和仅用PCR热循环仪的标记操作

可用的去糖基化和标记操作仍相对是劳动力密集，从血清到用于分析的脱唾液酸标记多糖，它们需要2天半，因而能在3个标准工作日进行完整分析。在基础研究环境中，操作大体上令人满意，但在临床研究实验室中更麻烦，因为一些装置一般不使用(平板和真空离心)。更重要的是操作包括一些管到管转移和手工过程，随着样品跟踪变得相对复杂，这些过程难以确认。同样，参与的劳动力和从样品到结果相当长的时间不利于临床实验室中的简单实行。因此，我们决定从真实应用角度放射性再思考样品制备过程。由于血清糖蛋白浓度很高(几乎所有蛋白被糖基化，除了白蛋白，这意味着每升约35g糖蛋白)，5  $\mu$ l 样品包含约175 $\mu$ g糖蛋白。用50kDa血清糖蛋白的估计平均分子量和每分子3个N-糖基化位置占据进一步计算，大致估计在此5  $\mu$ l 血清样品中获得10nmol N-多糖。已知15 fmol的峰易在DSA-FACE上检测且有相对完整的分布，应能检测代表约0.5%总多糖库的峰，操作的分析阶段需要约5 pmol 标记多糖。这意味着我们已有的N-多糖量和我们实际需要用于分析的量间有3000倍的宽富余。可牺牲此宽富余以使样品制备操作中的一些步骤效率更低但更易应用。寻求可负担和熟悉的设备，设计设备用于处理小体积液体样品而蒸发最小，我们发现用于PCR的有热盖的热循环仪适合。然后，通过仔细考虑随后使用的缓冲液系统，发展的过程仅包括液体加入/去除和稀释，从血清到待分析的标记N-多糖。以PCR机器为基础的血清蛋白N-多糖标记操作是：

1) 加入5微升血清到PCR管(或96孔PCR板的管)和加入1微升含10% SDS的

20mM NH<sub>4</sub>Ac 缓冲液, pH=7。混合并关上管。置于有热盖的热循环仪且 96 度加热 5 分钟。使热循环仪冷却下来(此步骤使糖蛋白变性以增加对 PNGase F 的接近性)。

2) 加入 1 微升 10% NP-40 溶液以中和对 PNGase F 的 SDS-变性效果(用于 PNGase F 消化的标准过程)。加入 2 微升 PNGase F 溶液(1000 个 Biolabs 单位)。关上管并在热循环仪中 37 度加热 3 小时。

3) 转移 1 微升溶液到另一个 PCR 管(或 96 孔 PCR 板), 在脱唾液酸化(步骤 4) 剩余部分中保持此样品。如果需要, 此样品产生唾液酸化多糖的分布。

4) 加入 8 微升 50mM NaAc 缓冲液 pH=5 并混合。(计算此缓冲液量以考虑重碳酸盐基础上的血清缓冲能力且足以补偿此缓冲能力的 2 倍变化, 这比临床观察到的大许多)。加入 2 $\mu$ U(2 微升)产脉节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)唾液酸酶。关上管并在热循环仪中 37°C 加热 3 小时。

5) 取 1 微升且转移到新 PCR 管(或板)。另外(但由于蒸发作用最小而精确性更低), 从管中取出 19 微升并处理剩余的 1 $\mu$ l。同样从步骤 3(唾液酸化多糖)中取出管且 2 个样品进一步的处理类似。

6) 在热循环仪上, 打开管且循环仪的盖开并加热到 65 度。这蒸发样品, 由于体积很小(1 $\mu$ l), 蒸发在不到 5 分钟内完成。

7) 制备标记溶液, 溶液含 0.6M 柠檬酸中的 10mM APTS 和 50%DMSO 中的 0.5M 氰硼氢化钠。加入 1、5 微升此标记溶液到目前干的 PCR 管底部。很好的关上管且热盖开, 90 度加热 1 小时(这是脱唾液酸多糖的快速动力学标记化学。对于唾液酸化多糖, 标记溶液相同但温度应保持在 37 度且反应应过夜完成以防止脱唾液酸)。

8) 加入 150 微升水到各管以终止反应, 稀释标记到约 100 pmol/ $\mu$ l。所得溶液能直接用于在 DNA 测序仪上上样(加入甲酰胺和内部标准后)。在早期实验中, 我们确定 100 pmol 游离标记代表能在测序凝胶泳道上上样而不使凝胶分离能力广泛超负荷的最大容许量。

如上所述分析健康供体的 4 个血清样品。信号强度和数据性质令人很满意, 证明血清 N-多糖样品制备可仅用相对便宜的热循环仪完成, 管转移很少。(半)自动化潜能对读者显然, 与大规模 PCR 设置类似。实行此操作能完成硬化的血清分析, 周转时间为 24 小时(或更短, 如果可使用以毛细管阵列为基础的更快分析器)。我们确信此样品制备过程的改进使肝硬化诊断测试更接近于常规临床化学中的实际使用。

#### 确认单独病人组中的肝硬化诊断

为确认上面研究所得用于硬化检测的截断值，用这些截断值分类有(n=10)或没有(n=13)硬化的单独慢性肝炎病人组。如图3，部分8可见，所有3个参数组合获得91%的分类效率。因此，尽管此第2个受试者组的大小相当小，我们推断获自我们最优组的分类模型没有过分合适且观察到>90%的分类效率。

#### 比较用于肝硬化检测的经典临床化学参数和糖分布

在本发明中，所得参数区分HCC和/或硬化与非硬化慢性乙肝和丙肝的效率用接受操作曲线(ROC)分析评估。ROC分析结果表明分类效率约为95%。ROC分析仅有涉及肝障碍经典临床化学参数的同一样品组(图3，部分7)产生的值为：对于总胆红素为76±6%，对于血清白蛋白为80±5%，其中AST、ALT、GGT和CRP产生非显著AUC值：P>0.05。另外，对于我们硬化研究组中14个‘补偿’硬化病例亚组(硬化病例有正常胆红素和白蛋白水平)，总胆红素和血清白蛋白浓度在参考范围内(总胆红素<1.3 mg/dL且血清白蛋白>3.5 g/dL)，我们评估这些中有多少位于3个标记的阳性区域中，标记获自总血清蛋白的多糖分布(确定阶段是通过ROC分析标记区分无硬化的慢性肝炎和总硬化组(都对于白蛋白和胆红素补偿和去补偿)。对于log(峰1/峰8)，这为12/14(85.7%)；log(峰2/峰8)：11/14(78.5%)；log(峰7/峰8)：11/14(78.5%)。因此，这些标记平均能检测约80%血清白蛋白和血清总胆红素测量都遗漏的硬化病例。这明显证明本发明的糖标记比这些标准临床化学标记的性能更多，后者用于常规评估慢性肝病人。因而，我们的糖分布标记检测疾病较早阶段中的肝硬化。

#### 诊断肝硬化病人中的肝细胞癌(HCC)

迄今为止，所有有HCC的病例与硬化组放在一起，因为他们中除了一个人以外都有潜在的硬化。然而，本领域已知目前在硬化背景上诊断HCC困难且有显著的改进空间。因此，在上述HCC和/或硬化组中，我们筛选能确定HCC病例的血清N-糖组模式改变。ROC分析HCC和/或硬化组中所有14个检测峰(见图1)表明峰5、7和14的丰度有显著区分力(ROC；P<0.05)。我们发现峰7和峰14的二参数分析有最佳分类效率(图6)。这用二参数二元逻辑回归模型评估，其回归线示于图6(在此线上的病例处于2个不同类别的概率相等)。此模型的逻辑函数是： $Z = -0.649[\% \text{峰} 7] + 5.722[\% \text{峰} 14] + 2.967$ 。以此模型为基础的分类检测HCC的敏感性为71%且特异性为91%(总分类效率：82%)。由于丰度低，不能指定峰14的结构。正在进行更多的质谱特征确定。我们推测此多糖是N-乙酰葡萄糖胺转移酶V的产物，因为它跑的位置与四触角多糖一致且GnT-V活性增加是许多肿瘤的特征。

## 材料和方法

### 研究设计

临床研究以方便样品为基础并由 University Hospital Ghent 的本地道德委员会批准。包括 73 个病人的样品(在 University Hospital Ghent 肠胃病系的 1 年阶段(12/2000-12/2001)中呈现出慢性肝障碍症状)。在可检测 hepBsAg 和 HBV DNA 或可检测抗 HCV 抗体和 HCV RNA 存在时,通过至少 2 个血液样品在 6 个月时间段中的 ALT 水平提高(高于正常上限)来诊断慢性乙肝(n=8)和丙肝(n=39)。在无肝活组织切片禁忌征候(凝血紊乱、存在腹水、...)的病人中,这通过经皮肤的肝活组织切片确认。在临床(存在腹水、血管曲张、脑病)和生化背景(白蛋白和胆红素水平, INR)上对硬化补偿不全的病人进行硬化诊断(n=37)。在其他病人中(当肝活组织切片的禁忌征候缺乏时),通过经皮肤的肝活组织切片诊断。硬化的基本病因是慢性酗酒(n=15)和慢性肝炎(n=20)。在一个病例中,硬化病因是自身免疫性肝炎或未知(隐发性硬化)。在硬化病人中,通过超声波、CT 或 MRI 中存在甲胎蛋白上升或存在病灶肝损伤来诊断肝细胞癌(HCC, n=16),使用 HCC 特征;在一些病人中,两者都存在。在没有硬化时和对诊断有怀疑的病人中,进行病灶损伤的真正切割针活组织切片。进行诊断的临床中心是佛兰德斯的 HCC 研究中心,该区 HCC 发病率低,有约 600 万居民,主要是白种人,但也有重要的意大利、土耳其和 Moroccan 社区(约为 15%的人口)。同样,样品包括的 58 个病人怀疑慢性酗酒且由于此原因进入安特卫普(佛兰德斯区的主要城市)的 Academic Hospital Stuivenberg 精神病学系。通过碳水化合物缺陷转铁蛋白测量(%CDT-TIA™, Axis Biochemicals, Oslo, Norway)评估最近的重酒精消费,样品组分成 2 个亚群,1 个对 CDT 测试阳性(大于 6%CDT, n=25)且另一个阴性(n=33)。

24 个样品包括患风湿性关节炎(n=8)、强直性脊柱炎(n=8)或克罗恩氏病(n=8)的病人,这些疾病在 University Hospital Ghent 的风湿病学系诊断。

为确立所测多糖的参考值,研究 60 个血液供体的对照组(其中 26 个女性,女性平均年龄: 60y, 男性: 59y),其中健康状况符合红十字会标准。这些样品获自比利时根特的红十字会输血中心。

表 1 概括了病因、年龄和性别数据。

### 血清诊断糖组

**样品制备过程:** 5 $\mu$ l 血清(总共 215)用 50  $\mu$ l RCM 缓冲液(8M 尿素、360 mM Tris, pH 8.6、3.2 mM EDTA) 50°C 孵育 1 小时以使血清蛋白变性。随后,这些混合物上

样于 Multiscreen-IP 板 (Millipore, Bedford, CA, USA) 的孔, 如上所述制备 (Papac 等, 1998)。根据报导的过程 (同上) 进行还原、碘烷化和去糖基化步骤。

**APTS 衍生反应和清除:** 最近描述了用 8-氨基-1, 3, 6-苊三磺酸衍生 N-多糖和去除过量游离标记 (Callewaert 等, 2001)。简要地, 去糖基化混合物蒸发到干燥, 加入 1 $\mu$ l 1: 1 混合物, 混合物含 1.2 M 柠檬酸中的 20 mM APTS (Molecular Probes, Eugene, CA, USA) 和 DMSO 中的 1 M NaCNBH<sub>3</sub>。衍生可在 37°C 进行 18 小时。此后, 通过加入 10 $\mu$ l DI 水淬灭反应。用 Multiscreen 过滤板 (Millipore, Bedford, CA, USA) 中填充的交联葡聚糖 G10 床去除过量未反应 APTS。应用样品后, 树脂床洗脱 3 次, 这是通过加入 10 $\mu$ l 水和在台式离心机中以 750x g 离心 10 秒, 离心机装备用于处理 96 孔板 (Eppendorf, Hamburg, Germany)。洗脱物蒸发到干燥。蒸发后, 衍生多糖在 5 $\mu$ l 水中复水。

**外切糖苷酶消化:** 1 $\mu$ l 净化衍生 N-多糖批转至 250 $\mu$ l PCR 管或锥形微量滴定板, 用于节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*) 唾液酸酶 (2 U/ml, Glyko, Novato, CA) 处理, 在 10 $\mu$ l 20mM 乙酸钠 pH5.0 中 37°C 过夜。1 单位唾液酸酶是在 25°C 和 pH5.0 时每分钟水解 1 $\mu$ mole N-乙酰神经氨-D-乳糖的酶量。完成消化后, 样品蒸发到干燥并在 1 $\mu$ l 水中复水。

**通过适应 DNA 测序仪的 FACE 分析:** 对于各样品, 加入 0.5 $\mu$ l 若丹明标记的 Genescan™ 500 标准混合物 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) 和 1 $\mu$ l 去离子甲酰胺, 各用于内参和促进样品上样。

所有实验在 Applied Biosystems 377A DNA 测序仪 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) 上进行, 如上所述适于冷却 (Callewaert 等, 2001)。36cm 凝胶包含 10% 的 19: 1 丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 (89mM Tris、89 mM 硼酸盐、2.2mM EDTA) 混合物。以 3000V 预跑 1 小时。分离中的电泳电压为 3500V 且数据收集 3 小时 (分离多糖直到 15 个葡萄糖单位大小)。

**数据加工:** 用 Genescan 3.1 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 进行数据分析。我们选择使用 14 个很好确定的峰高以获得分布的数字描述。这是所观察峰的总数亚集, 因为仅包括在所有样品中可定量的峰。我们选择峰高而不是峰表面, 因为有时峰广泛重叠, 导致后者更难以常规方法定量。这些数据在 MS Excell 中集合并用 SPSS 10.0 统计包 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进一步加工。假定变量对研究群体的常态, 用 Kolmogorov-Smirnov 检验以 0.05 显著水平评估。变量的单向参数分析后是 Tukey 真实显著差异和 Scheffé 多比较检验,

显著水平为 0.0001。接受操作曲线 (ROC) 分析和二元逻辑回归用于评估可能诊断变量的分类效率。

为描绘制备，相同凝胶上的所有泳道与含 APTS-标记麦芽糖-寡糖标准的泳道一起排列，使用内部若丹明-寡核苷酸标准的峰位置。为了阐明，排列过程后省略对应于若丹明-标记内部标准的峰。

#### 外切糖苷酶阵列测序 N-多糖

1 $\mu$ l APTS-标记 N-多糖用高度纯化外切糖苷酶的不同混合物消化，此多糖如段落 8.2.2 所述制备。混合物特性示于图且是下列各项的组合：产脉节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*) 唾液酸酶 (2U/ml, Glyko, Novato, CA)；肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*)  $\beta$ -1,4-半乳糖苷酶 (1U/ml, Boehringer, Mannheim, Germany)；伴刀豆  $\beta$ -N-乙酰己糖胺酶 (30 U/ml, Glyko, Novato, CA, USA) 和牛附睾  $\alpha$ -岩藻糖苷酶 (0.5 U/ml, Glyko, Novato, CA, USA)。单位定义由酶供应商详细说明。完成消化后，样品蒸发到干燥，在 1 $\mu$ l 去离子水中复水并在上述 ABI377 上分析。

表

表 1:

详情	N	组号	年龄(岁)	性别(%男性)
健康对照	60	0	59, 5+/-12, 1	57
HCC+硬化	7	1	60, 0+/-9, 0	70
慢性病毒性肝炎	9			
硬化	8			
慢性病毒性肝炎	11			
自身免疫性肝炎	1			
隐发性	1			
慢性病毒性肝炎	5	2	44, 6+/-17, 3	60
HBV	22			
HCV				
非 HCC 肝转移	8	3	71, 3+/-6, 5	38
慢性酒精中毒	25	4	N. A.	N. A.
CDT+	33	5		
CDT-				
自身免疫疾病	8	6	44, 4+/-13, 5	46
克罗恩氏病	8			
强直性脊柱炎	8			
风湿性关节炎	8			

表 2:

人相关性分析 (n=214)					
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 7	峰 8
峰 1	1	0, 845	-0, 802	0, 418	-0, 596
峰 2		1	-0, 81	0, 551	-0, 609
峰 3			1	-0, 759	0, 533
峰 7				1	-0, 471
峰 8					1
所有相关性在 0.00001 水平时显著 (2-尾)					

表 3:

单向分析 7 个样品组的差异

ANOVA		平方总和	df	均方	F	Sig.
Log(峰 1/峰 8)	组间	21, 47	6	3, 5787	49, 3741	2, 267E-37
	组内	15	207	0, 0725		
	总体	36, 48	213			
Log(峰 2/峰 8)	组间	44, 39	6	7, 399	58, 0935	9, 212E-42
	组内	26, 36	207	0, 1274		
	总体	70, 76	213			
Log(峰 7/峰 8)	组间	13, 85	6	2, 3084	46, 7134	6, 091E-36
	组内	10, 23	207	0, 0494		
	总体	24, 08	213			

多比较检验结果

Log(峰 1/峰 8)		N	用于 $\alpha=.0.001$ 的亚集		
			1	2	
Tukey' s HSD	样品组				
	对照	60	-0, 0918		
	CDT-酒精中毒	33	-0, 0184		
	CDT+酒精中毒	25	-0, 0045		
	非 HCC 肝转移	8	-0, 053		
	慢性肝炎	27	0, 0631		
	自身免疫疾病	24	0, 1381		
	硬化	37		0, 8128	
Sig.			0, 0688	1	
Scheffé 比较	样品组				
	对照	60	-0, 0918		
	CDT-酒精中毒	33	-0, 0184		
	CDT+酒精中毒	25	-0, 0045		
	非 HCC 肝转移	8	0, 053		
	慢性肝炎	27	0, 0631		
	自身免疫疾病	24	0, 1381		
	硬化	37		0, 8128	
Sig.			0, 2413	1	
显示同型亚集的组平均值					
Log(峰 2/峰 8)		N	用于 $\alpha=.0.001$ 的亚集		
			1	2	3
Tukey' s HSD	样品组				
	对照	60	-1, 0926		
	CDT-酒精中毒	33	-0, 9803	-0, 9803	
	CDT+酒精中毒	25	-0, 9537	-0, 9537	
	自身免疫疾病	24	-0, 8616	-0, 8616	
	非 HCC 肝转移	8	-0, 7223	-0, 7223	
	慢性肝炎	27		-0, 5947	
	硬化	37		0, 8128	0, 204

		Sig.	0, 0103	0, 0062	1
Scheffé 比较	对照	60	-1, 0926		
	CDT-酒精中毒	33	-0, 9803		
	CDT+酒精中毒	25	-0, 9537		
	自身免疫疾病	24	-0, 8616		
	非 HCC 肝转移	8	-0, 7223		
	慢性肝炎	27	-0, 5947		
	硬化	37		0, 204	
		Sig.	0, 0022	1	
显示同型亚集的组平均值					

Log(峰 7/峰 8)				
		N	用于 $\alpha = .0.001$ 的亚集	
样品组			1	2
Tukey' s HSD	自身免疫疾病	24	-0, 1435	
	对照	60	-0, 1406	
	非 HCC 肝转移	8	-0, 0848	
	慢性肝炎	27	-0, 0212	
	CDT-酒精中毒	33	-0, 0076	
	CDT+酒精中毒	25	0, 0258	
	硬化	37		0, 5798
		Sig.	0, 1491	1
Scheffé 比较	自身免疫疾病	24	-0, 1435	
	对照	60	-0, 1406	
	非 HCC 肝转移	8	-0, 0848	
	慢性肝炎	27	-0, 0212	
	CDT-酒精中毒	33	-0, 0076	
	CDT+酒精中毒	25	0, 0258	
	硬化	37		0, 5798
		Sig.	0, 3845	1
显示同型亚集的组平均值				

### 参考文献

1. Adam, B. L., Vlahou, A., Semmes, O. J.和小 Wright, G. L., (2001) Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers, *Proteomics*, **1**, 1264-1270.
2. Anton, R. F.(2001) Carbohydrate-deficient transferrin for detection and monitoring of sustained heavy drinking. What have we learned? Where do we go from here?, *Alcohol*, **25**, 185-188.
3. Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Oguro, M., Yokota, T., Mori, S., Suda, T., Isemura, M.和 Asakura, H.(1993) Carbohydrate structures of human alpha-fetoprotein of patients with hepatocellular carcinoma: presence of fucosylated and non-fucosylated triantennary glycans, *Br J Cancer*, **67**, 486-492.
4. Ashwell, G.和 Harford, J.(1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Annu Rev Biochem*, **51**, 531-554.
5. Ashwell, G.和 Steer, C. J.(1981) Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins, *Jama*, **246**, 2358-2364.
6. Burgess, J. B., Baenziger, J. U.和 Brown, W. R.(1992) Abnormal surface distribution of the human asialoglycoprotein receptor in cirrhosis, *Hepatology*, **15**, 702-706.
7. Byrn, R., Thomas, P., Medrek, P., Spigelman, Z.和 Zamcheck, N.(1984) Modified radioassay for measuring asialoglycoprotein in serum, *Clin Chem*, **30**, 1692-1696.
8. Callewaert, N., Geysens, S., Molemans, F.和 Contreras, R.(2001) Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment, *Glycobiology*, **11**, 275-281.
9. Dell, A.和 Morris, H. R.(2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science*, **291**, 2351-2356.
10. Eto, T.和 Takahashi, H.(1999) Enhanced inhibition of hepatitis B virus production by asialoglycoprotein receptor-directed interferon, *Nat Med*, **5**, 577-581.
11. Fracanzani, A. L., Burdick, L., Borzio, M., Roncalli, M., Bonelli, N., Borzio, F., Maraschi, A., Fiorelli, G.和 Fargion, S.(2001) Contrast-enhanced Doppler ultrasonography in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant lesions

in patients with cirrhosis, *Hepatology*, **34**, 1109-1112.

12. Fung, E. T., 小 Wright, G. L.和 Dalmaso, E. A.(2000) Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges, *Curr Opin Mol Ther*, **2**, 643-650.

13. Granovsky, M., Fata, J., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R.和 Dennis, J. W.(2000) Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice, *Nature Medicine*, **6**, 306-312.

14. Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., Prime, S. B.和 Dwek, R. A.(1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles, *Anal Biochem*, **240**, 210-226.

15. Ha-Kawa, S. K., Tanaka, Y., Hasebe, S., Kuniyasu, Y., Koizumi, K., Ishii, Y., Yamamoto, K., Kashiwagi, T., Ito, A., Kudo, M., Ikekubo, K., Tsuda, T.和 Murase, K.(1997) Compartmental analysis of asialoglycoprotein receptor scintigraphy for quantitative measurement of liver function: a multicentre study, *Eur J Nucl Med*, **24**, 130-137.

16. Hirabayashi, J., Arata, Y.和 Kasai, K.(2001) Glycome project: concept, strategy and preliminary application to *Caenorhabditis elegans*, *Proteomics*, **1**, 295-303.

17. Ikeda, Y.和 Taniguchi, N.(2001) Enzymatic properties and biological functions of beta 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **13**, 167-176.

18. Ise, H., Sugihara, N., Negishi, N., Nikaido, T.和 Akaike, T.(2001) Low asialoglycoprotein receptor expression as markers for highly proliferative potential hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 172-182.

19. Ishibashi, K., Nishikawa, A., Hayashi, N., Kasahara, A., Sato, N., Fujii, S., Kamada, T.和 Taniguchi, N.(1989) N-Acetylglucosaminyltransferase-Iii in Human-Serum, and Liver and Hepatoma Tissues -Increased Activity in Liver-Cirrhosis and Hepatoma Patients, *Clinica Chimica Acta*, **185**, 325-332.

20. Johnson, P. J., Poon, T. C., Hjelm, N. M., Ho, C. S., Blake, C.和 Ho, S. K.(2000) Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms, *Br J Cancer*, **83**, 1330-1337.

21. Johnston-Wilson, N. L., Bouton, C. M., Pevsner, J., Breen, J. J., Torrey,

E. F.和 Yolken, R. H.(2001) Emerging technologies for large-scale screening of human tissues and fluids in the study of severe psychiatric disease , *Int J Neuropsychopharmacol*, **4**, 83-92.

22. Kang, R., Ikeda, Y., Miyoshi, E., Wang, W., Li, W., Ihara, Y., Sheng, Y. 和 Taniguchi , N.(2000) Cell cycle-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase-III in a human colon cancer cell line, Colo201, *Arch Biochem Biophys*, **374**, 52-58.

23. Kellner, R.(2000) Proteomics. Concepts and perspectives, *Fresenius J Anal Chem*, **366**, 517-524.

24. Kitada, T., Miyoshi, E., Noda, K., Higashiyama, S., Ihara, H., Matsuura, N., Hayashi, N., Kawata, S., Matsuzawa, Y.和 Taniguchi, N.(2001) The addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin down-regulates the tyrosine phosphorylation of beta-catenin, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 475-480.

25. Kobata, A.(2000) A journey to the world of glycobiology, *Glycoconj J*, **17**, 443-464.

26. Kuper, H., Ye, W., Broome, U., Romelsjo, A., Mucci, L. A., Ekblom, A., Adami, H. O., Trichopoulos, D.和 Nyren, O.(2001) The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis, *Hepatology*, **34**, 714-718.

27. Marshall, J. S., Green, A. M., Pensky, J., Williams, S., Zinn, A.和 Carlson, D. M.(1974) Measurement of circulating desialylated glycoproteins and correlation with hepatocellular damage, *J Clin Invest*, **54**, 555-562.

28. Martin, K., Talukder, R., Hay, F. C.和 Axford, J. S.(2001) Characterization of changes in IgG associated oligosaccharide profiles in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis , and ankylosing spondylitis using fluorophore linked carbohydrate electrophoresis, *J Rheumatol*, **28**, 1531-1536.

29. Matsumoto, K., Maeda, Y., Kato, S.和 Yuki, H.(1994) Alteration of asparagine-linked glycosylation in serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma, *Clin Chim Acta*, **224**, 1-8.

30. Miki, K., Kubota, K., Inoue, Y., Vera, D. R.和 Makuuchi, M.(2001) Receptor measurements via Tc-GSA kinetic modeling are proportional to functional

hepatocellular mass, *J Nucl Med*, **42**, 733-737.

31. Miyoshi, E., Ihara, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T.和 Taniguchi, N.(1995) Transfection of N-acetylglucosaminyltransferase III gene suppresses expression of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line, HB611, *J Biol Chem*, **270**, 28311-28315.

32. Miyoshi, E., Ihara, Y., Nishikawa, A., Saito, H., Uozumi, N., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T.和 Taniguchi, N.(1995) Gene expression of N-acetylglucosaminyltransferases III and V: a possible implication for liver regeneration, *Hepatology*, **22**, 1847-1855.

33. Miyoshi, E., Nishikawa, A., Ihara, Y., Gu, J. G., Sugiyama, T., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T.和 Taniguchi, N.(1993) N-Acetylglucosaminyltransferase-Iii and N-Acetylglucosaminyltransferase-V Messenger-Rna Levels in Lec Rats During Hepatocarcinogenesis, *Cancer Research*, **53**, 3899-3902.

34. Miyoshi, E., Nishikawa, A., Ihara, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T.和 Taniguchi, N.(1994) Selective Suppression of N-Acetylglucosaminyltransferase-Iii Activity in a Human Hepatoblastoma Cell-Line Transfected with Hepatitis-B Virus, *Cancer Research*, **54**, 1854-1858.

35. Miyoshi, E., Noda, K., Ko, J. H., Ekuni, A., Kitada, T., Uozumi, N., Ikeda, Y., Matsuura, N., Sasaki, Y., Hayashi, N., Hori, M.和 Taniguchi, N.(1999) Overexpression of alpha 1-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice, *Cancer Research*, **59**, 2237-2243.

36. Mori, S., Aoyagi, Y., Yanagi, M., Suzuki, Y.和 Asakura, H.(1998) Serum N-acetylglucosaminyltransferase III activities in hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **13**, 610-619.

37. Nakagawa, H., Kawamura, Y., Kato, K., Shimada, I., Arata, Y.和 Takahashi, N.(1995) Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography, *Anal Biochem*, **226**, 130-138.

38. Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao,

C., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, K., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M., Taniguchi, N. 和 Yoshikawa, M.(1998) Gene expression of alpha1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: a possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein, *Hepatology*, **28**, 944-952.

39. Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao, C. X., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, M., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M. 和 Taniguchi, N.(1998) Gene expression of alpha 1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: A possible implication for increased fucosylation of alpha-fetoprotein, *Hepatology*, **28**, 944-952.

40. Opanasopit, P., Shirashi, K., Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y. 和 Hashida, M.(2001) In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **280**, G879-889.

41. Pandey, A. 和 Mann, M.(2000) Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, **405**, 837-846.

42. Papac, D. I., Briggs, J. B., Chin, E. T. 和 Jones, A. J.(1998) A high-throughput microscale method to release N-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis, *Glycobiology*, **8**, 445-454.

43. Paweletz, C. P., Trock, B., Pennanen, M., Tsangaris, T., Magnant, C., Liotta, L. A. 和 Petricoin, E. F., 3rd(2001) Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer, *Dis Markers*, **17**, 301-307.

44. Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C. 和 Liotta, L. A.(2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer, *Lancet*, **359**, 572-577.

45. Roseman, S.(2001) Reflections on glycobiology, *J Biol Chem*, **276**, 41527-41542.

46. Saitoh, A., Aoyagi, Y. 和 Asakura, H.(1993) Structural analysis on the sugar chains of human alpha 1-antitrypsin: presence of fucosylated biantennary glycan in

hepatocellular carcinoma, *Arch Biochem Biophys*, **303**, 281-287.

47. Salas-Solano, O., Schmalzing, D., Koutny, L., Buonocore, S., Adourian, A., Matsudaira, P.和 Ehrlich, D.(2000) Optimization of high-performance DNA sequencing on short microfabricated electrophoretic devices, *Anal Chem*, **72**, 3129-3137.

48. Sawamura, T., Nakada, H., Hazama, H., Shiozaki, Y., Sameshima, Y.和 Tashiro, Y.(1984) Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma, *Gastroenterology*, **87**, 1217-1221.

49. Taniguchi, N., Ekuni, A., Ko, J. H., Miyoshi, E., Ikeda, Y., Ihara, Y., Nishikawa, A., Honke, K.和 Takahashi, M.(2001) A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes, *Proteomics*, **1**, 239-247.

50. Taniguchi, N., Miyoshi, E., Ko, J. H., Ikeda, Y.和 Ihara, Y.(1999) Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1455**, 287-300.

51. Verma, M., Wright, G. L., Hanash, S. M., Gopal-Srivastava, R.和 Srivastava, S.(2001) Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers, *Ann N Y Acad Sci*, **945**, 103-115.

52. Wang, W., Li, W., Ikeda, Y., Miyagawa, J. I., Taniguchi, M., Miyoshi, E., Sheng, Y., Ekuni, A., Ko, J. H., Yamamoto, Y., Sugimoto, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., Grabowski, G. A., Honke, K.和 Taniguchi, N.(2001) Ectopic expression of alpha 1,6 fucosyltransferase in mice causes steatosis in the liver and kidney accompanied by a modification of lysosomal acid lipase, *Glycobiology*, **11**, 165-174.

53. Wassler, M. J., Foote, C. I., Gelman, I. H.和 Shur, B. D.(2001) Functional interaction between the SSECKS scaffolding protein and the cytoplasmic domain of beta1,4-galactosyltransferase, *J Cell Sci*, **114**, 2291-2300.

54. Wassler, M. J. 和 Shur, B. D.(2000) Clustering of cell surface(beta)1,4-galactosyltransferase I induces transient tyrosine phosphorylation of

focal adhesion kinase and loss of stress fibers, *J Cell Sci*, **113**, 237-245.

55. Watson, M., Rudd, P. M., Bland, M., Dwek, R. A.和 Axford, J. S.(1999) Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides, *Arthritis Rheum*, **42**, 1682-1690.

56. Wuyts, B., Delanghe, J. R., Kasvosve, I., Wauters, A., Neels, H.和 Janssens, J.(2001) Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis, *Clin Chem*, **47**, 247-255.

57. Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y.和 Kobata, A.(1989) Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma, *J Biol Chem*, **264**, 2415-2423.

58. Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y.和 Taniguchi, N.(1996) Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis, *J Biol Chem*, **271**, 13811-13815.

59. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S.和 Taniguchi, N.(1995) Suppression of Lung Metastasis of B16 Mouse Melanoma by N-Acetylglucosaminyltransferase-Iii Gene Transfection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 8754-8758.

60. Zhang, S. W., Fu, X. Y., Cao, S. L., Shen, Z. H.和 Gu, J. X.(1999) Down-regulation of beta1,4-galactosyltransferase gene expression by cell-cycle suppressor gene p16, *Biochim Biophys Acta*, **1444**, 49-54.

61. Zhang, S. W., Lin, W. S., Ying, X. L., Zhu, D., Guo, M. Y.和 Gu, J. X.(2000) Effect of suppression of TGF-beta1 expression on cell-cycle and gene expression of beta-1,4-galactosyltransferase 1 in human hepatocarcinoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 833-838.

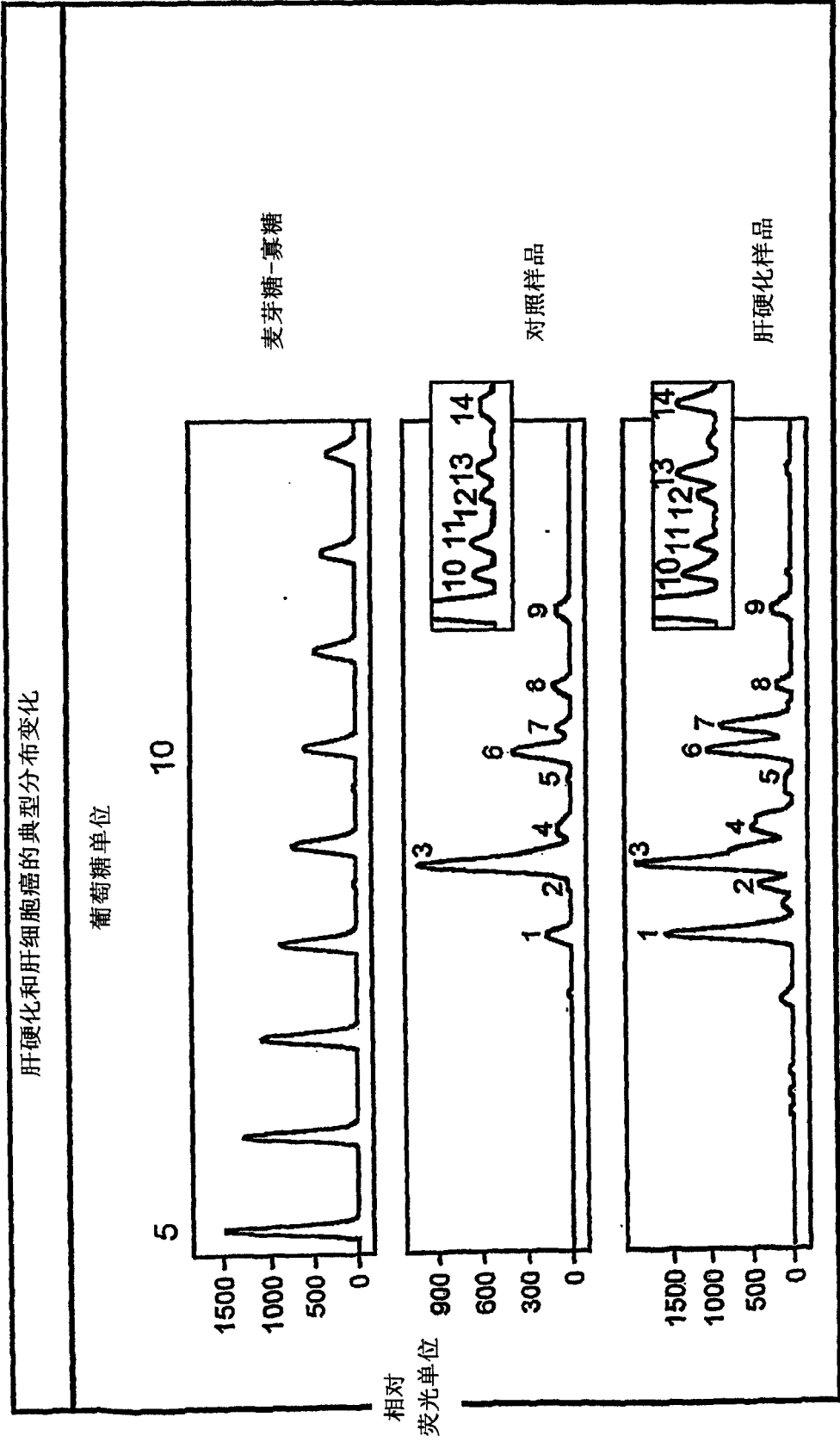
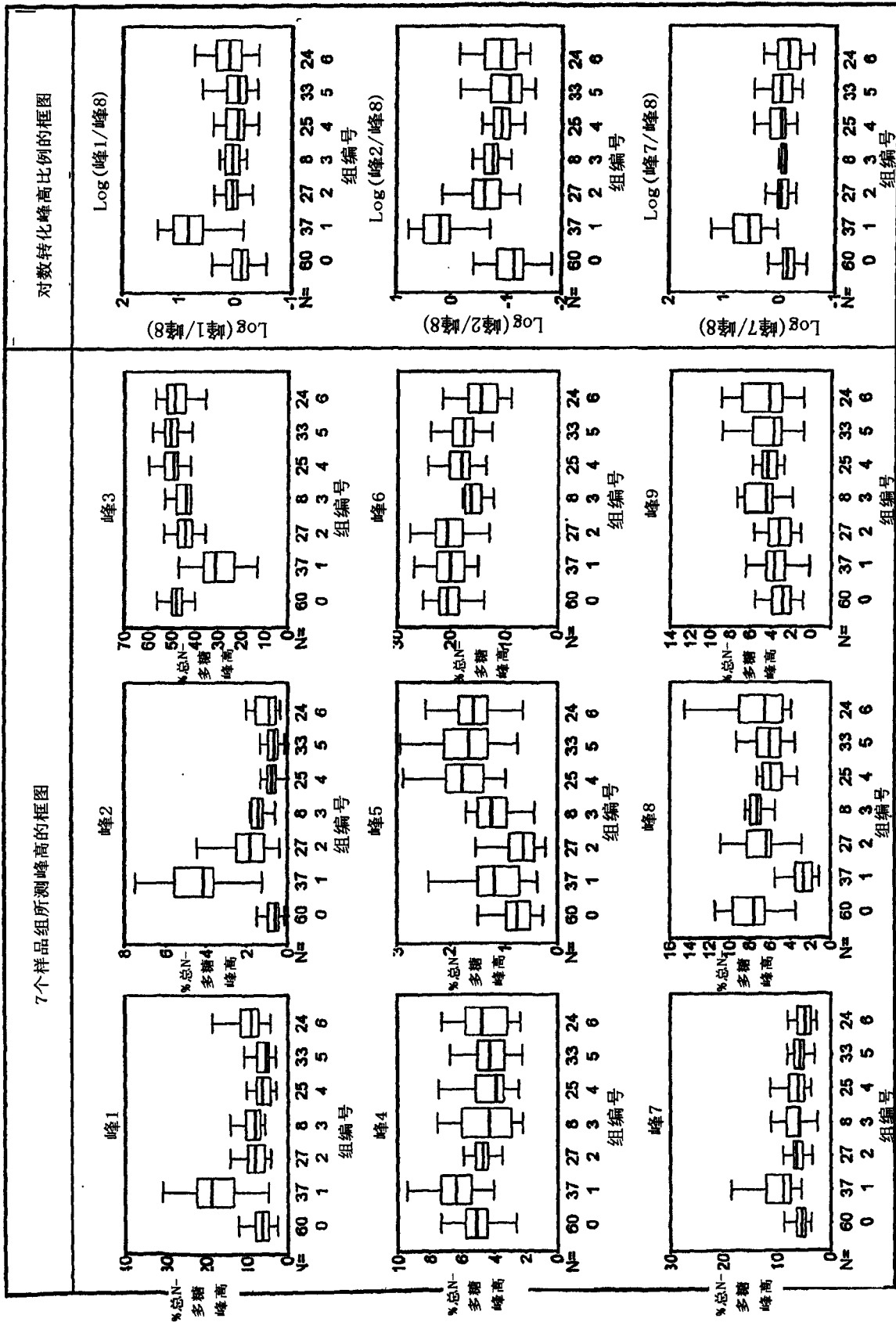


图 1



图

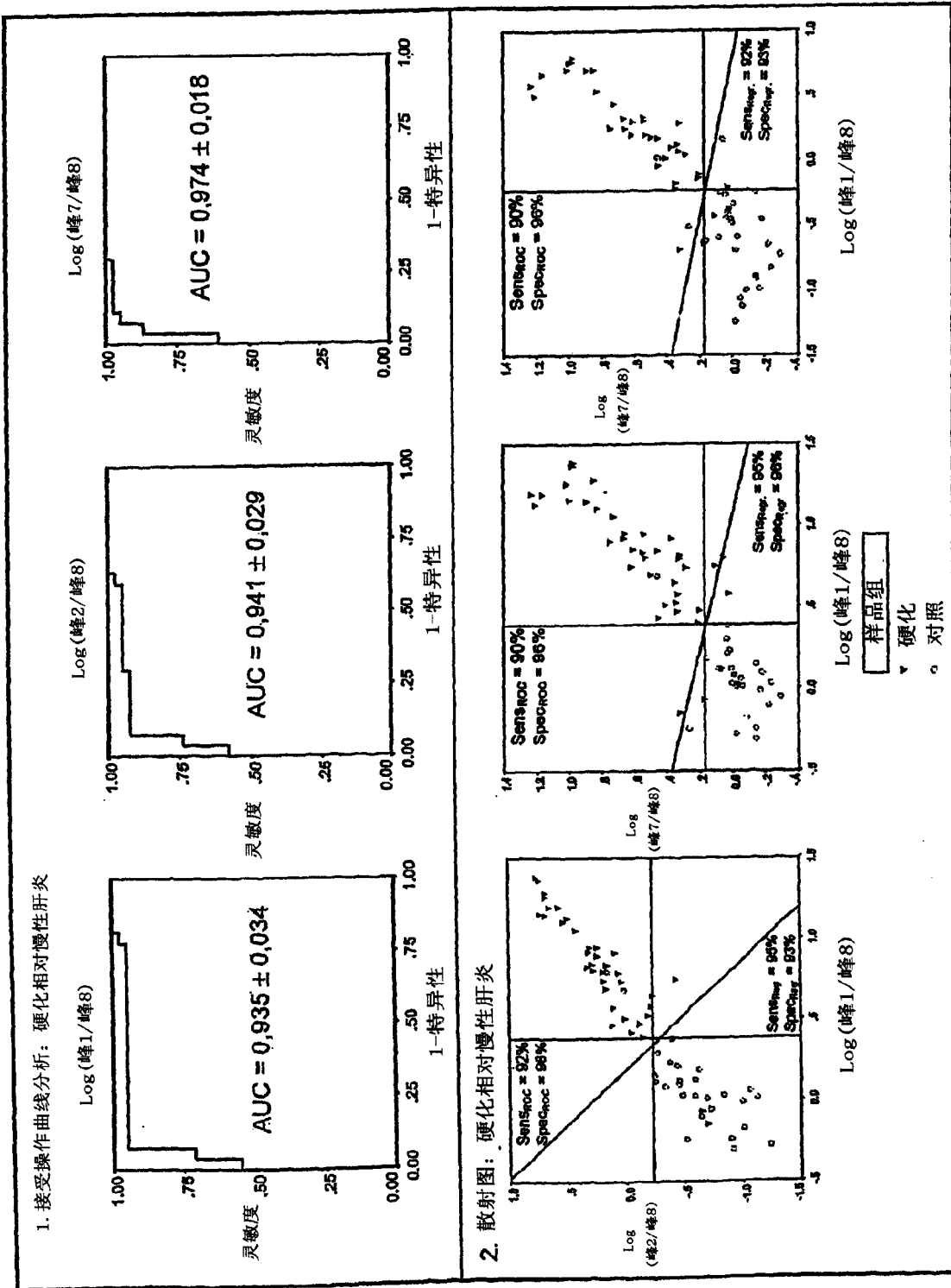


图 3(第1部分)

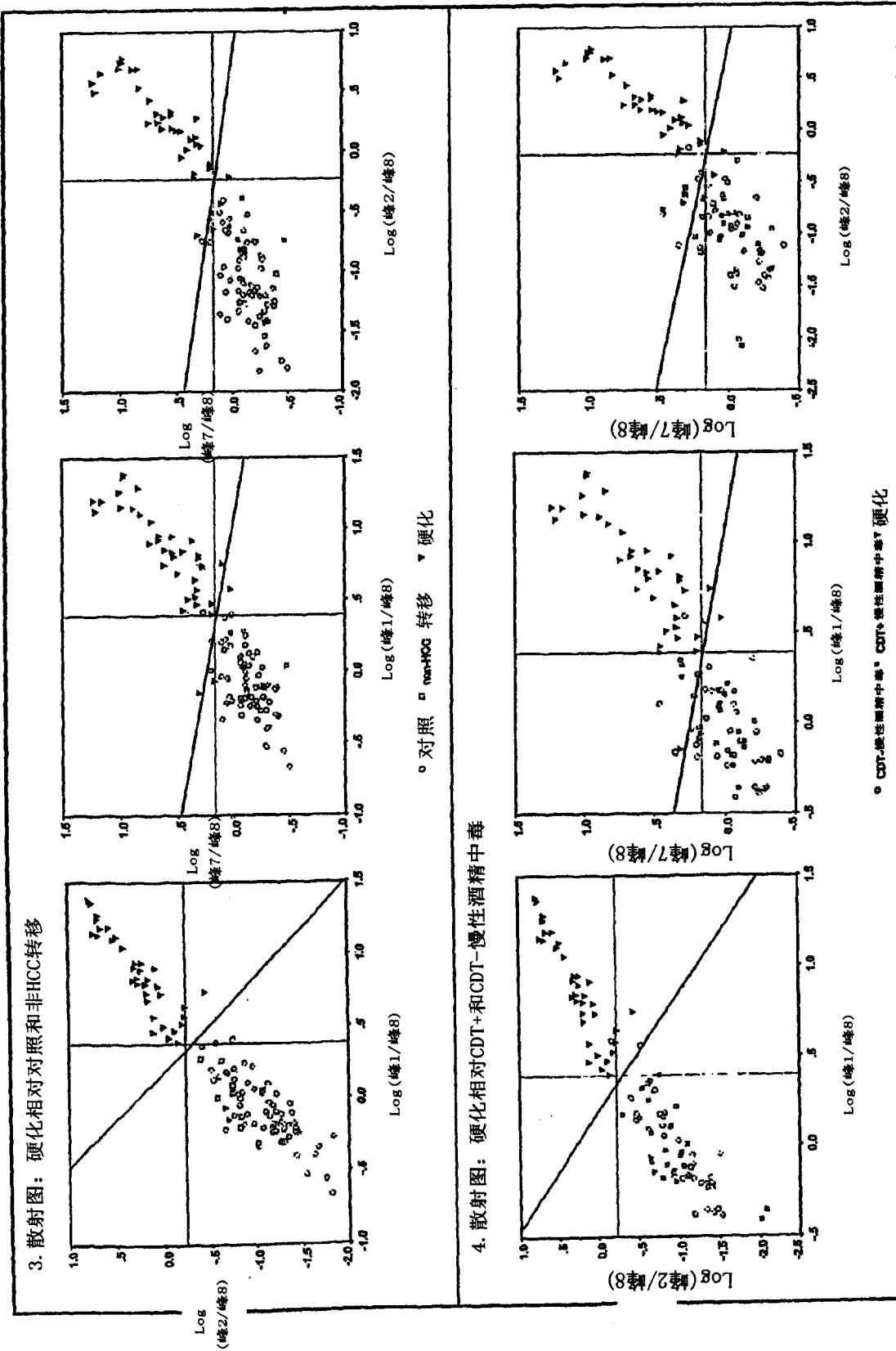


图 3 (第2部分)

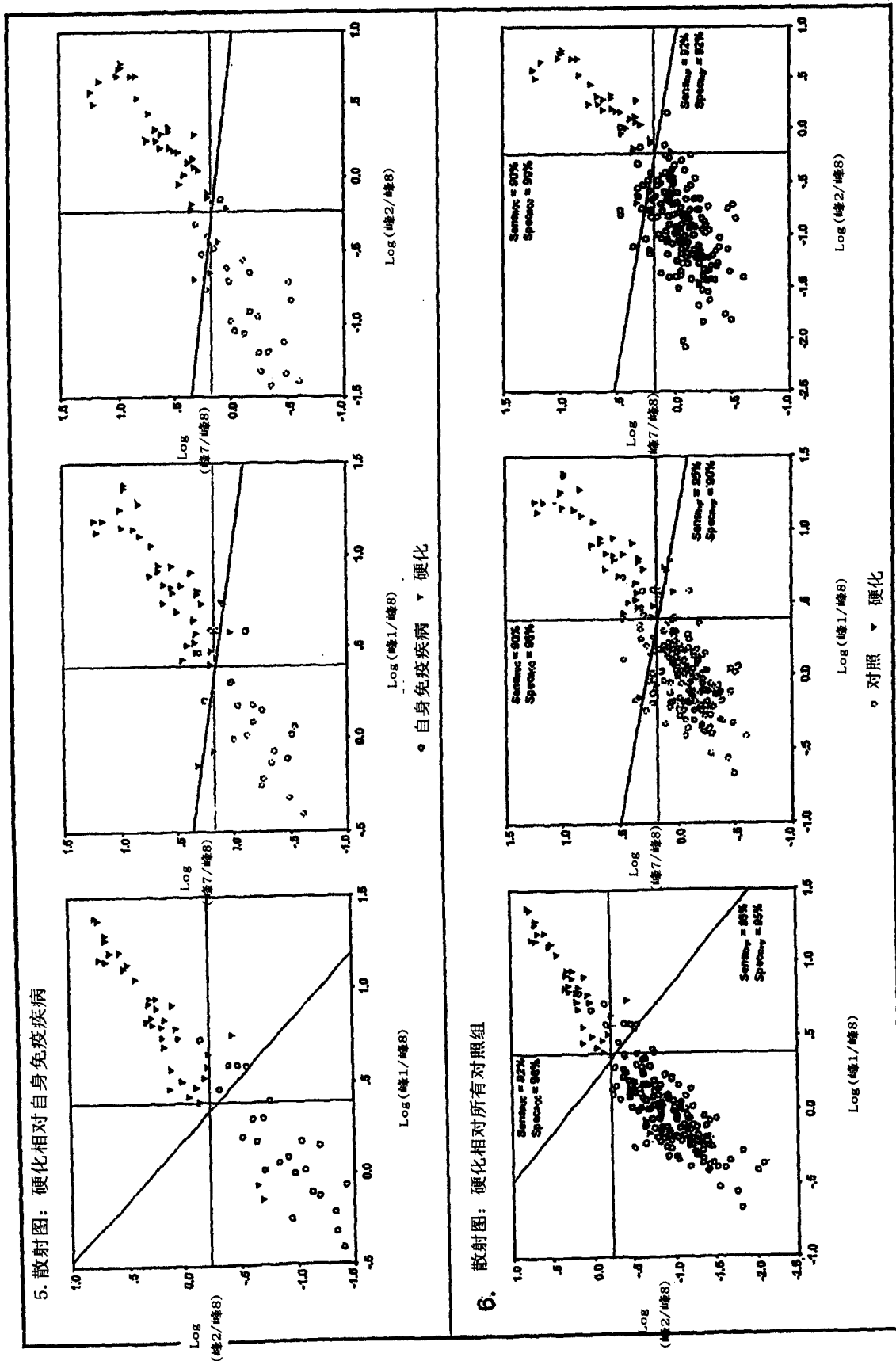
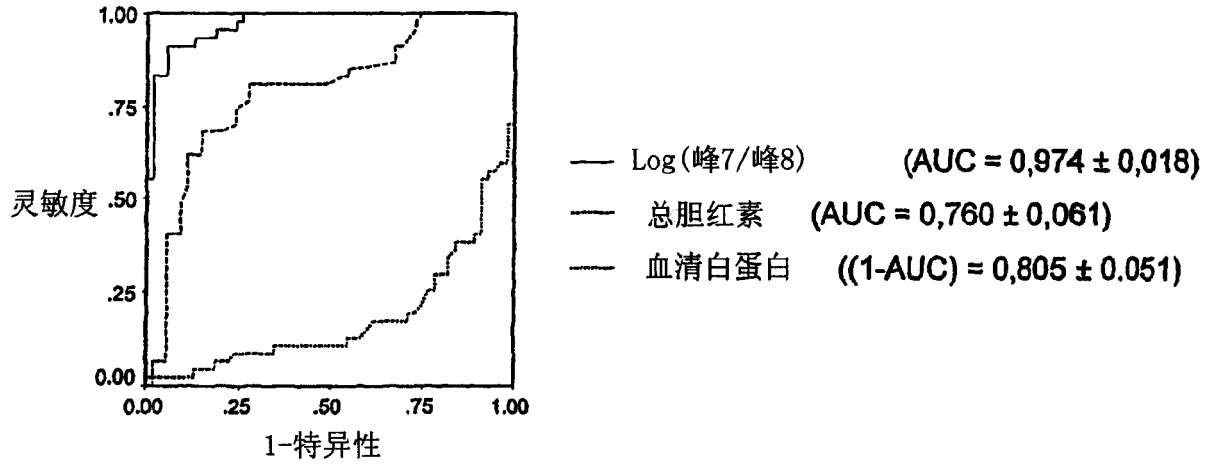


图 3 (第3部分)

7. ROC曲线：糖组硬化标记相对白蛋白和胆红素，



8. 分类确认单独肝病患者组

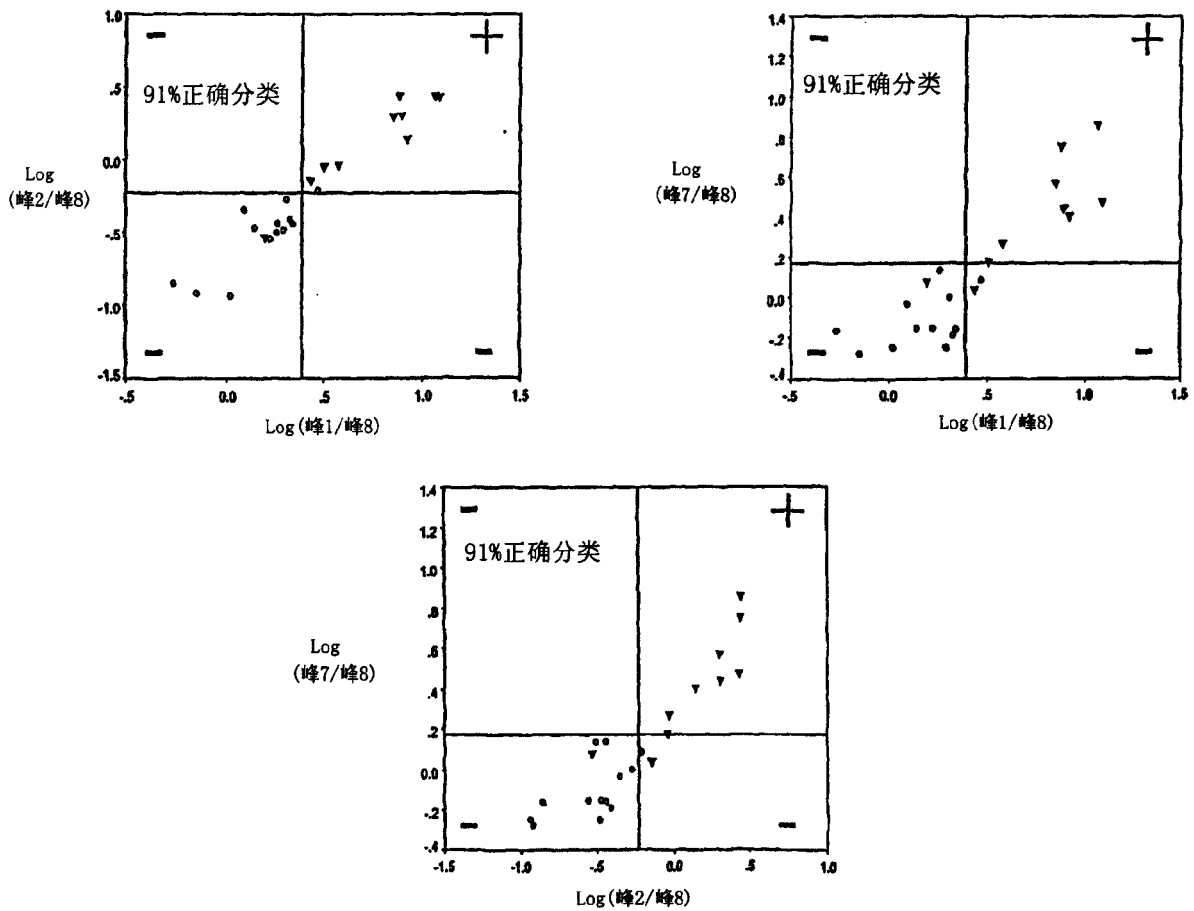


图 3(第4部分)

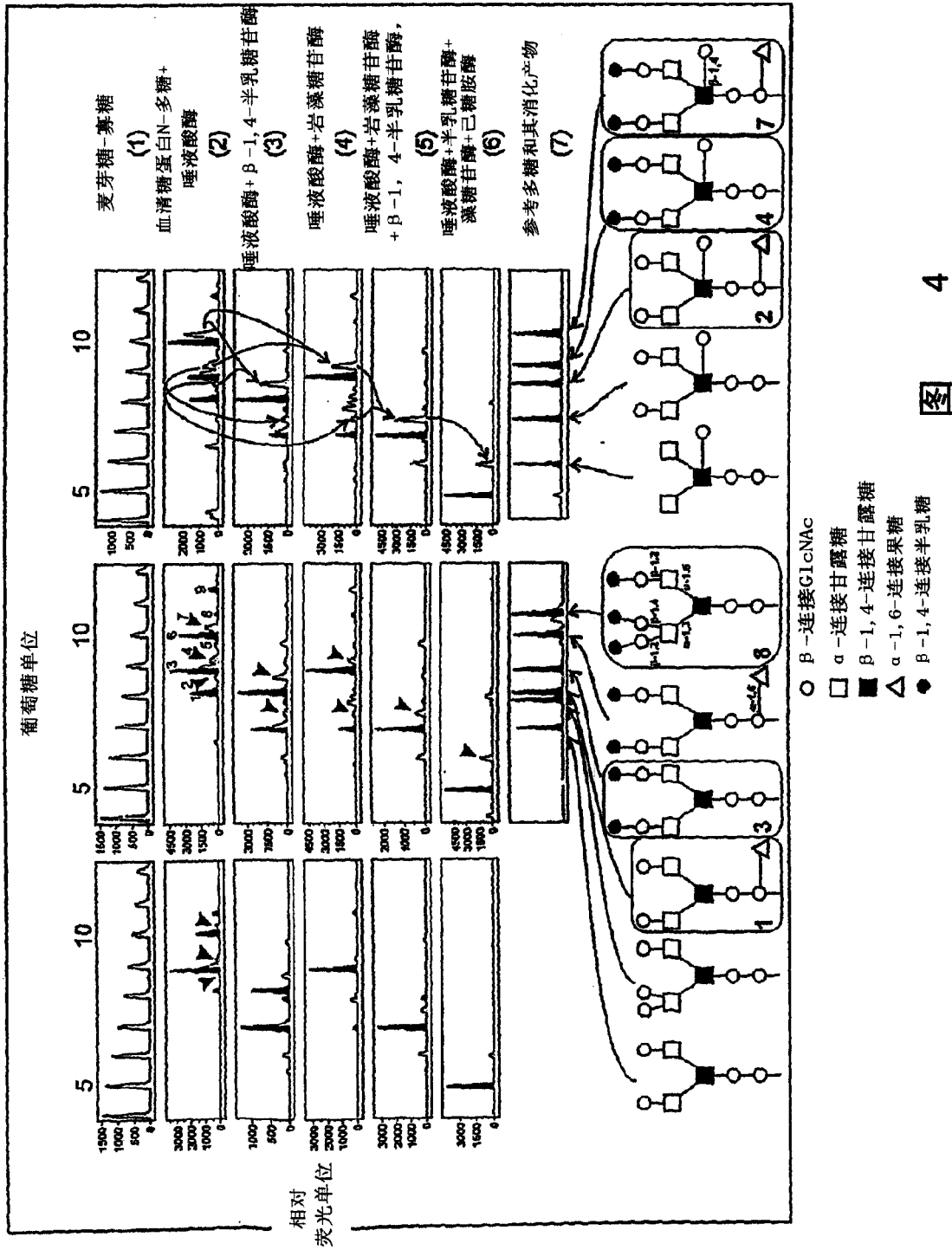
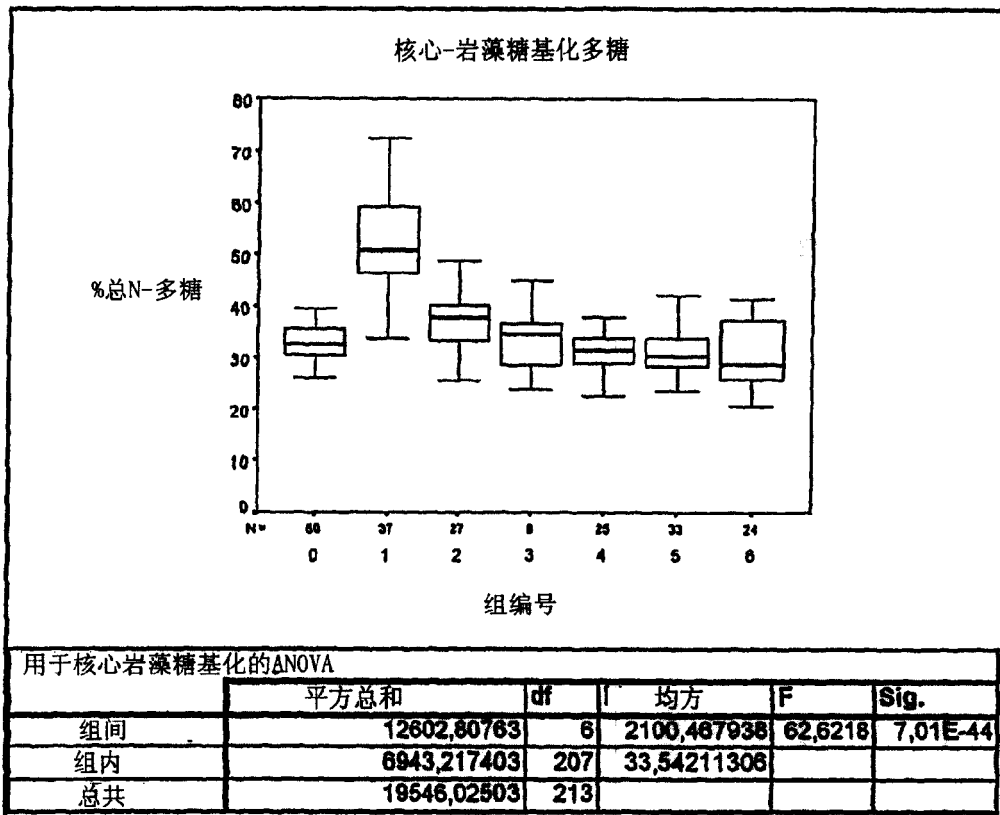


图 4



		N	用于 $\alpha = .0.001$ 的亚集	
			1	2
Tukey's HSD	样品组			
	自身免疫疾病	24	30.92	
	CDT-酒精中毒	33	31.45	
	CDT+酒精中毒	25	31.57	
	对照	60	33.05	
	非 HCC 肝转移	8	33.68	
	慢性肝炎	27	37.13	
	硬化	37		52.63
	Sig.		0.007	1
Scheffé 比较	自身免疫疾病	24	30.92	
	CDT-酒精中毒	33	31.45	
	CDT+酒精中毒	25	31.57	
	对照	60	33.05	
	非 HCC 肝转移	8	33.68	
	慢性肝炎	27	37.13	
	硬化	37		52.63
		Sig.		0.053765023
显示同型亚集的组平均值				

图 5

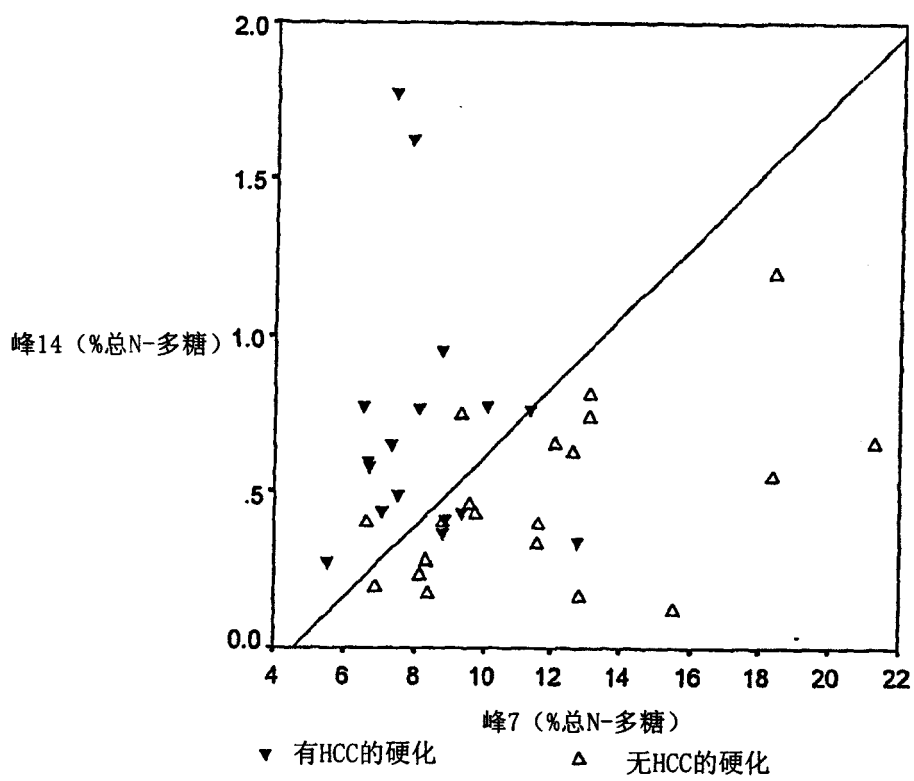


图 6

专利名称(译)	测量肝硬化的标记		
公开(公告)号	<a href="#">CN1662817A</a>	公开(公告)日	2005-08-31
申请号	CN03813954.5	申请日	2003-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	福拉姆斯大学生物技术研究所 根特大学		
申请(专利权)人(译)	福拉姆斯大学生物技术研究所 根特大学		
当前申请(专利权)人(译)	福拉姆斯大学生物技术研究所 根特大学		
[标]发明人	NLM卡勒瓦特 RH康特里拉斯		
发明人	N· L· M· 卡勒瓦特 R· H· 康特里拉斯		
IPC分类号	C08B37/00 G01N33/00 G01N33/53 G01N33/66 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2400/10 G01N2400/02 G01N33/66 G01N2800/085 G01N33/6893 G01N2400/00 Y10T436/142222 Y10T436/143333		
代理人(译)	周承泽		
优先权	2002076501 2002-04-16 EP		
其他公开文献	CN1662817B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了检测哺乳动物肝硬化的方法和试剂盒。所述诊断测试以体液如血清中诊断碳水化合物的分布和鉴定为基础。

