

血清“肝纤四项”联合检测诊断模型的建立

魏梅娟, 张纯瑜, 肖子鸿, 张小曼, 何彩婷, 魏开鹏, 潘兴南(解放军第180医院 南京军区肝病中心, 福建泉州 362000)

摘要: 目的 构建以“肝纤四项”为变量的诊断模型, 并探讨该诊断模型对明显肝纤维化的诊断效能。方法 选取485例乙型病毒性肝炎患者, 随机分为建模组324例和验证组161例, 采用放射免疫分析法检测建模组和验证组患者血清中HA、LN、PIIINP、CIV的含量; 采用二元Logistic回归分析法, 以肝组织活检作为“金标准”, 构建以“肝纤四项”为变量的诊断模型; 采用受试者工作特征(ROC)曲线, 评价该诊断模型的诊断效能; 用独立的验证组检验该模型的诊断效率。结果 在二元Logistic回归分析中, 确定了3项与研究终点相关的独立预测指标(HA、PIIINP和CIV), 由这3个指标建立了诊断模型FSM, $FSM = 1.56 \ln(HA) + 0.92 \ln(PIIINP) + 1.90 \ln(CIV) - 8.18$ 。FSM用于预测明显肝纤维化具有较高的诊断价值, ROC曲线下面积(AUC)为0.85。该模型应用于验证组, 其诊断明显肝纤维化的AUC同样为0.85。根据ROC曲线, 用于预测明显肝纤维化时, FSM取10.8为排除界值, 敏感性和阴性预测值分别为88.31%和69%; 取12.6为诊断界值, 特异性和阳性预测值分别为93.55%和95.3%。比较FSM模型与HA的诊断效能, FSM模型的约登指数、阳性似然比、敏感性、特异性和准确率均高于HA, 两者的AUC差异有统计学意义($Z = 2.06, P < 0.05$)。结论 本研究所建立的“肝纤四项”联合检测FSM模型, 一定程度上提高了诊断效能。将该模型应用于预测明显肝纤维化, 可使65%~70%无或轻度肝纤维化乙型肝炎患者避免“肝组织活检”。作为一种非创伤性检查手段, 该模型可用于动态监测乙型肝炎患者肝纤维化进程。

关键词: 肝纤维化; 二元Logistic回归; 诊断模型

Establishment of diagnosis model combining four serum markers of hepatic fibrosis

WEI Mei-juan, ZHANG Chun-yu, XIAO Zi-hong, ZHANG Xiao-man, HE Cai-ting, WEI Kai-peng, PAN Xing-nan
(Live Disease Center of Nanjing Military Command, The 180th Hospital of PLA, Quanzhou 362000, China)

Abstract: Objective To establish a diagnosis model combining four serum markers of hepatic fibrosis (HA, LN, PIIINP, CIV) and assess the diagnostic performance of model aimed to discriminate between patients with and without significant hepatic fibrosis in patients with hepatitis B. **Methods** Total of 485 patients with hepatitis B were randomly divided into an estimation group (324 cases) and a validation group (161 cases). The serum levels of HA, LN, PIIINP and CIV were measured by radiomunoassay in all patients and liver biopsy was used as the gold standard. A binary logistic regression model was established combining four serum markers and applied to the validation group to test its accuracy. The diagnostic value of the model was assessed by the receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** Binary logistic regression identified HA, PIIINP and CIV as independent predictors of fibrosis. We constructed a model named FSM combining HA, PIIINP and CIV that proved useful to identify patients with or without significant hepatic fibrosis in patients with hepatitis B. $FSM = 1.56 \times \ln(HA) + 0.92 \times \ln(PIIINP) + 1.9 \times \ln(CIV) - 8.18$. The area under the ROC curve (AUC) was 0.85 for predicting significant fibrosis. In validation group, the AUC was also 0.85 for predicting significant fibrosis. Using optimized cutoff values, the sensitivity and negative predictive value of predicting the absence of significant fibrosis ($FSM < 10.8$) were 88.31% and 69%.

while the specificity and positive predictive value of predicting the presence of significant fibrosis ($FSM \geq 12.6$) were 93.55% and 95.3%. Comparing the FSM diagnostic model and HA, the Youden's index, positive likelihood ratio, sensitivity, specificity and accuracy of FSM model were higher than those of HA, and AUC had significant difference between the two ($Z = 2.06, P < 0.05$). **Conclusions** The FSM model established in this study improved the diagnostic performance. It can make the 65%-70% patients without significant hepatic fibrosis to avoid "liver biopsy". As a noninvasive method, it can be employed for monitoring the progression of hepatic fibrosis.

Key words: Hepatic fibrosis; Binary logistic regression; Diagnosis model

乙型肝炎病毒(HBV)感染仍是全球最主要的公共健康问题之一。据世界卫生组织报道,全球有近20亿人被HBV感染,其中3.5亿以上发展成慢性感染,成为肝硬化、肝衰竭甚至肝癌的高危人群^[1]。肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化的必经病理阶段。此阶段是可逆转的,早诊断早治疗可最大程度阻断肝硬化的发生。目前肝组织活检仍是评价肝脏炎症坏死及纤维化程度的“金标准”,但因其有创性,患者依从性差,难以动态观察和重复进行等诸多不足限制了其广泛应用。近年来,组合各项血清学指标建立肝纤维化无创性诊断模型已成为研究热点。较具代表性的包括适用于慢性丙型肝炎的Fibrotest模型^[2]、Hepascore模型^[3]、APRI指数^[4]和Forns指数^[5]等。而针对HBV感染的诊断模型主要有国内学者所建的SLFG模型^[6]、NDMF模型^[7]、Fibromodel模型^[8]、S指数^[9]等。但这些模型研究的参数和结果差异较大,诊断价值尚缺乏有效的验证,至今未能在临床上普及应用。有研究表明,血清中透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、三型前胶原N-端肽(procollagen type III N-terminal endopeptidase, PIIINP)及IV型胶原(collagen type IV, CIV)的水平变化可反映肝纤维化的程度^[10,11],统称“肝纤四项”。目前国内使用最广泛的肝纤维化血清学指标就是“肝纤四项”,但其联合检测的诊断模型尚未见报道。本文作者在前期研究中已证实血清中HA、LN、PIIINP、CIV的含量与肝纤维化分期呈正相关,对肝纤维化的诊断有一定的价值^[12]。本文在扩大纳入样本量的基础上,以肝组织活检作为“金标准”,采用二元Logistic回归分析法,构建以“肝纤四项”为变量的诊断模型,并评价该诊断

模型对明显肝纤维化的诊断效能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2005~2012年在本院诊治的乙型病毒性肝炎患者625例,诊断符合中华医学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南(2010版)》标准^[13],排除标准:HIV、甲型、丙型、丁型、戊型肝炎及合并酒精性肝炎、脂肪肝、自身免疫性肝炎;肝组织活检不符合标准。最终筛选出符合标准的病例485例,包括男性417例(85.98%),女性68例(14.02%),年龄17~73岁,中位年龄33岁。

1.2 仪器及试剂 应用科大创新股份有限公司中佳分公司生产的GC-1200 γ 放射免疫计数器,试剂盒均由上海海研医学生物技术有限公司提供。

1.3 方法 受检对象均于肝组织活检前1周内取静脉血检测相关指标。HA、LN、PIIINP、CIV检测均采用放射免疫分析法。

1.4 肝组织病理学检查 在患者签署知情同意后,在彩超定位引导下行肝脏穿刺术,采用BARD 16G一次性活检针经皮穿刺采集肝组织,至少包括6个以上汇管区,标本长度为15~20 mm,肝组织标本采用常规HE染色和网状纤维染色,由两名病理医师依据2000年病毒性肝炎防治方案^[14]对肝组织纤维化程度进行分期。 S_0 :无纤维化; S_1 :汇管区纤维化扩大,局部窦周及小叶内纤维化; S_2 :汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留; S_3 :纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化; S_4 :假小叶形成,早期肝硬化。

1.5 统计学处理 应用MedCalc 13.0软件进行统计学分析。各指标数据分别采用中位数(四分位数)或计数(百分比)表示。采用随机分组法,将所收集病例随机分为建模组和验证组,组间比较时,

计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。二元Logistic回归分析采用逐步向前法,根据相应的回归系数,建立“肝纤四项”联合检测诊断模型。绘制受试者工作特征曲线(ROC),计算曲线下面积(AUC)和约登指数(YI),判断模型预测明显肝纤维化的能力,根据ROC曲线确定阈值,并根据阈值计算其敏感性(Sen)、特异性(Spe)、阳性似然比(LR+)、阴性似然比(LR-)、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)等。采用ROC曲线比较单项检测指标与联合检测诊断模型的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者概况 采用随机分组法,将所收集病例随机分为建模组和验证组,入选建模组的324例慢性HBV感染患者与验证组161例患者的一般资料及病理参数见表1。建模组与验证组病例间各指标差异无统计学意义。

2.2 模型的建立 本课题组在前期研究工作中已证实血清中HA、LN、PIIINP、CIV的含量与肝纤维化分期呈正相关,相关系数由高至低分别为HA($r = 0.687$)、PIIINP($r = 0.490$)、CIV($r = 0.406$)、LN($r = 0.392$)。以病理学肝纤维化分期 S_2 作为分

界将建模组病例分成轻度肝纤维化(S_{0-1})和明显肝纤维化(S_{2-4})两组,采用逐步向前法,将这4个指标实测值做自然对数转换后,引入二元Logistic回归分析(引入: $P < 0.05$;剔除: $P > 0.10$),最终确定了3项与研究终点相关的独立预测指标(HA、PIIINP和CIV),根据这3个变量的回归系数建立数学诊断模型FSM: $FSM = 1.56 \ln(HA) + 0.92 \ln(PIIINP) + 1.90 \ln(CIV) - 8.18$,见表2。

2.3 模型预测明显肝纤维化的界值选择及诊断效能评价 采用ROC曲线评价FSM模型预测明显肝纤维化($S \geq 2$)的诊断效能。结果显示,在建模组中,FSM用于预测明显肝纤维化具有较高的诊断价值,ROC曲线下面积(AUC)为0.85。根据ROC曲线,用于预测明显肝纤维化时,当 $FSM = 10.8$,具有较高的敏感性(88.31%),即在231例明显肝纤维化病例中,仅27例因小于10.8被误判,因此取10.8为排除界值,即 $FSM < 10.8$ 时,判断为无明显肝纤维化;当FSM取12.6,具有较高的特异性(93.55%),即在93例无明显肝纤维化病例中,仅 S_1 期7例因大于12.6被误判,因此取12.6为诊断界值,即 $FSM > 12.6$ 时,判断为有明显肝纤维化。将模型应用于验证组病例,取同样的界值,仍能保持

表 1 入组患者一般资料情况

参数	建模组 (n = 324)	验证组 (n = 161)	合计 (n = 485)
年龄 (岁, 95%CI)	33 (25.00 ~ 40.25)	35 (26.50 ~ 44.00)	33 (26.00 ~ 41.00)
男性[例 (%)]	273 (84.26)	144 (89.44)	417 (85.98)
HA (ng/ml, 95%CI)	126.27 (79.26 ~ 259.23)	120.58 (79.74 ~ 254.41)	125.13 (79.39 ~ 254.41)
LN (ng/ml, 95%CI)	117.01 (106.43 ~ 128.69)	117.38 (108.02 ~ 127.72)	117.13 (106.79 ~ 128.51)
PIIINP (ng/ml, 95%CI)	129.40 (86.24 ~ 172.56)	126.27 (92.47 ~ 171.18)	127.85 (89.11 ~ 171.79)
CIV (ng/ml, 95%CI)	77.65 (58.99 ~ 93.56)	78.29 (61.34 ~ 93.00)	77.93 (60.11 ~ 93.43)
肝纤维化分期[例 (%)]			
S_0	34 (10.49)	19 (11.80)	53 (10.93)
S_1	59 (18.21)	33 (20.50)	92 (18.97)
S_2	84 (25.92)	40 (24.84)	124 (25.57)
S_3	75 (23.15)	30 (18.63)	105 (21.65)
S_4	72 (22.22)	39 (24.22)	111 (22.89)

表 2 建模组二元Logistic回归分析结果

变量	回归系数 (b)	标准差 (SE)	Wald值	P	OR (95%CI)
$\ln(HA)$	1.56	0.34	21.30	< 0.001	4.75 (2.45 ~ 9.21)
$\ln(LN)$	-2.25	1.86	1.47	0.230	0.11 (0.01 ~ 4.03)
$\ln(PIIINP)$	0.92	0.40	5.26	0.020	2.50 (1.14 ~ 5.48)
$\ln(CIV)$	1.90	0.68	7.85	0.010	6.68 (1.77 ~ 25.20)

良好的诊断效能，其诊断明显肝纤维化的AUC同样为0.85。当FSM = 10.8时，预测明显肝纤维化的敏感性为89.91%；当FSM = 12.6时，预测明显肝纤维化的特异性为94.23%。诊断效能评价指标见表3。

2.4 单项检测指标与联合检测诊断模型诊断效能的比较 采用ROC曲线比较HA、LN、PIIINP、CIV、FSM模型用于预测明显肝纤维化的诊断效能，见图1。根据ROC曲线，取YI最大时的值为阈值，计算敏感性、特异性和准确率（DA）。结果显示，单项诊断指标用于预测是否存在明显肝纤维化时，HA的诊断价值、敏感性及准确率最高（AUC = 0.82，Sen = 80.95%，DA = 76.85%），PIIINP、CIV的诊断效能相当，两者的AUC差异无统计学意义（ $Z = 0.09$ ， $P = 0.93$ ），LN的诊断价值、敏感性、及准确率最低（AUC = 0.69，Sen = 62.34%，DA = 64.81%）；联合检测所构建的FSM模型提高了诊断价值及准确率（AUC = 0.85，DA = 81.79%）。比较FSM模型与HA的诊断效能，两者的AUC差异有统计学意义（ $Z = 2.06$ ， $P < 0.05$ ），FSM模型的约登指数、阳性似然比、敏感性、特异性和准确率均比HA高，表明采用二元Logistic回归所建立的多指标联合检测诊断模型较好的提高了诊断效能，且能够达到同时提高敏感性和特异性的效果。诊断效能评价指标见表4。

3 讨论

肝纤维化是肝细胞发生炎症和坏死刺激时，以胶原纤维为主的细胞外基质（extracellular matrix，

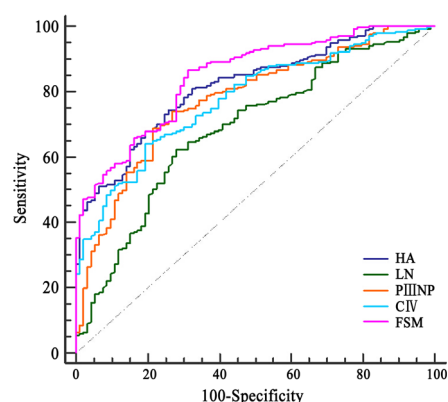


图1 肝纤维化指标诊断乙型肝炎明显肝纤维化的ROC曲线

ECM）弥漫性增生，且降解不足，出现肝脏纤维结缔组织过度沉积的结果。血清“肝纤四项”（HA、LN、PIIINP、CIV）的含量已被证实与肝脏受损程度及肝纤维化程度有关。HA是一种最简单的蛋白多糖，是细胞外基质的重要成分，其含量反映了内皮细胞功能及肝硬化程度。肝病患者（尤其是肝硬化患者）体内，肝间质细胞HA的合成增多，但肝窦内皮细胞受损，摄取及分解HA的能力降低，导致血清中HA含量明显升高，肝脏受损程度越严重，血清中HA水平越高^[15]。LN是非胶原性结构糖蛋白，主要由上皮细胞和内皮细胞合成，存在于胆管、淋巴管和血管的基底膜中，肝窦内没有沉积。当肝纤维化发生时，肝窦内LN明显沉积并释放入血，使血清中LN含量升高^[16]。PIIINP是在基底膜的胶原纤维形成过程中，分泌到细胞外的III前胶原向III胶原转化时，氨基端前胶原肽被N-末端酶裂解后进入外周血中，并随着肝纤维合成的活跃而

表3 FSM模型对明显肝纤维化的诊断效能评价指标

研究终点	分组	AUC (95%CI)	YI	阈值	Sen (%)	Spe (%)	LR +	LR -	PPV (%)	NPV (%)
明显肝纤维化 ($S \geq 2$)	建模组	0.85 (0.80 ~ 0.89)	0.55	10.80	88.31	64.52	2.49	0.18	86.1	69.0
				12.60	52.81	93.55	8.19	0.50	95.3	44.4
	验证组	0.85 (0.79 ~ 0.91)	0.63	10.80	89.91	51.92	1.87	0.19	79.7	71.1
				12.60	54.13	94.23	9.38	0.49	95.2	49.5

表4 单项检测指标与FSM模型的诊断效能评价指标

指标	AUC (95%CI)	YI	阈值	Sen (%)	Spe (%)	LR +	LR -	DA (%)
HA	0.82 (0.77 ~ 0.86)	0.49	89.72	80.95	67.74	2.51	0.28	76.85
LN	0.69 (0.66 ~ 0.74)	0.34	116.30	62.34	72.04	2.23	0.52	64.81
PIIINP	0.77 (0.72 ~ 0.83)	0.47	120.43	68.83	78.49	3.20	0.40	71.30
CIV	0.78 (0.72 ~ 0.83)	0.45	76.13	64.07	80.65	3.31	0.45	68.52
FSM模型	0.85 (0.80 ~ 0.89)	0.55	10.98	86.15	68.82	2.76	0.20	81.79

增多,其与肝纤维化形成的活动程度相关^[17]。CIV为肝血窦基底膜的主要成分,在肝纤维过度增生时,CIV的合成和降解均处于较高水平,与LN结合形成连续基底膜,即“肝窦毛细血管化”。由于其合成和沉积更为明显,其血清含量似乎更是反映胶原生成而非降解的指标^[18]。

国内已有很多学者对“肝纤四项”展开了一系列研究,证实“肝纤四项”对肝纤维化有一定诊断价值。但“肝纤四项”的联合检测模型尚未建立,联合检测的模式尚未形成标准,且检测方法上的差异使得各个研究得出的结果存在差异。本文采用二元Logistic回归分析,建立了“肝纤四项”联合检测的诊断模型FSM,LN因回归系数Wald检验时, $P > 0.1$ 被剔除,仅纳入了3个指标。ROC曲线分析结果显示,FSM模型用于预测明显肝纤维化的AUC > 0.8 ;当FSM = 10.8为明显肝纤维化的排除界值时,可使65%~70%的无或轻度肝纤维化患者避免“肝组织活检”,敏感性达88.31%。将FSM模型应用于验证组病例,可得到较好的重复性,表明该模型的稳定性较好。ROC曲线分析单项诊断指标用于预测是否存在明显肝纤维化时,HA的诊断效能最高,PIIINP、CIV的诊断效能相当,LN的诊断效能最低。该结果与丁贤君等^[19]的报道一致,但与Chen等^[20]的报道不一致,可能与检测方法不同有关。与HA相比,FSM模型的约登指数、阳性似然比、敏感性、特异性和准确率均得到提高,且两者的AUC差异有统计学意义($Z = 2.06, P < 0.05$),表明FSM模型确实提高了诊断效能。

综上所述,本研究所建立的“肝纤四项”联合检测FSM模型,具有较好的诊断价值,一定程度上提高了诊断效能。将该模型应用于预测明显肝纤维化,可使相当一部分无或轻度肝纤维化乙型肝炎患者避免肝组织活检。作为一种非创伤性检查手段,可用于动态监测乙型肝炎患者肝纤维化进程、长期监测和评估抗纤维化治疗的疗效,指导临床治疗和随访病情转归。

参考文献

[1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment,

and current and emerging prevention and control measures[J]. J Viral Hepat,2004,11:97-107.

- [2] Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study[J]. Lancet,2001,357:1069-1075.
- [3] Adams LA, Bulsara M, Rossi E, et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection[J]. Clin Chem,2005,51:1867-1873.
- [4] Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C[J]. Hepatology,2003,38:518-526.
- [5] Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model[J]. Hepatology,2002,36:986-992.
- [6] Zeng MD, Lu LG, Mao YM, et al. Prediction of significant fibrosis in HBeAg positive patients with chronic hepatitis B by a noninvasive model[J]. Hepatology,2005,42:1437-1445.
- [7] 蒋忠胜,温小凤,陈念,等.慢性肝脏疾病肝纤维化非创伤性诊断模型的研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2009,06:531-534.
- [8] Hui AY, Chan HL, Wong VW, et al. Identification of chronic hepatitis B patients without significant liver fibrosis by a simple noninvasive predictive model[J]. Am J Gastroenterol,2005,100:616-623.
- [9] 周琨,郑瑞丹,咸建春,等.从常规指标中建立肝纤维化非创伤性诊断模型[J].肝脏,2008,05:362-367.
- [10] 洪小飞,虞朝辉,厉有名.非酒精性脂肪性肝炎患者血清肝纤维化指标的变化[J].中华肝脏病杂志,2007,15:229-230.
- [11] Chen J, Liu C, Chen H, et al. Study on noninvasive laboratory tests for fibrosis in chronic HBV infection and their evaluation[J]. J Clin Lab Anal,2013,27:5-11.
- [12] 魏梅娟,魏开鹏,张小曼,等.血清肝纤维化指标与肝纤维化病理改变的相关性研究[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2013,6:860-864.
- [13] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中国肝脏病杂志(电子版),2011,3:40-56.
- [14] 中华医学会传染病与寄生虫病学会,肝病学会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝脏病杂志,2000,7:2740-2745.
- [15] Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, et al. Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C[J]. Am J Gastroenterol,2008,103:928-936.
- [16] 龙大碧,李晓兰,李远.肝纤维化无创诊断与监测技术研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,11:1045-1046.
- [17] 王继贵.肝纤维化生物标志物研究的进展[J].实验与检验医学,2011,29:138-141.
- [18] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med,2006,10:76-99.
- [19] 丁贤君,李世波,李绍佐,等.慢性肝病患者肝纤维化血清学指标与肝组织纤维化分期的量化关系[J].中华肝脏病杂志,2005,12:911-914.
- [20] Chen J, Liu C, Ou Q. Study on noninvasive laboratory tests for fibrosis in chronic HBV infection and their evaluation[J]. J Clin Lab Anal,2013,27:5-11.

收稿日期:2014-08-25