

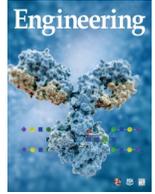


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glycomedicine—Article

血清 N-聚糖生物标志物诊断 ALT 水平正常慢性乙型肝炎患者显著肝纤维化和肝硬化的临床意义

王林^{a, #}, 刘艺琪^{b, #}, 顾启馨^a, 张驰^b, 徐蕾^c, 王蕾^c, 陈翠英^c, 刘学恩^{a, *}, 赵鸿^{b, *}, 庄辉^{a, *}

^a Department of Microbiology & Center of Infectious Diseases, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

^b Department of Infectious Disease, Center for Liver Disease, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

^c Sysdiagno (Nanjing) Biotechnology Company Limited, Nanjing 211800, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2022

Revised 9 February 2023

Accepted 1 March 2023

Available online 20 April 2023

关键词

肝纤维化

慢性乙型肝炎

血清 N-聚糖

N-聚糖模型

丙氨酸转氨酶水平

摘要

本研究的目的是探讨血清 N-聚糖模型在 285 例丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平正常 ($< 40 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$) 的慢性乙型肝炎 (慢性乙肝) 患者中诊断显著肝纤维化和肝硬化的临床意义。对每位入组患者进行肝脏组织活检, 并使用 Ishak 评分系统评估患者肝脏组织纤维化程度。应用基于 DNA 测序仪的荧光糖电泳技术检测患者血清 N-聚糖图谱, 每例患者的血清样本中共鉴定出 9 个 N-聚糖峰。利用机器学习算法, 即随机森林 (random forest, RF) 构建更理想的血清 N-聚糖模型, 以诊断显著肝纤维化 ($\geq \text{F3}$) 和肝硬化 ($\geq \text{F5}$), 并比较血清 N-聚糖模型和其他纤维化标志物的诊断效能。肝脏组织活检结果显示, 有显著肝纤维化和肝硬化的患者分别占 63.86% (182/285) 和 16.49% (47/285), 有显著炎症的患者为 4.91% (14/285)。血清 N-聚糖 RF-A 模型具有很好的诊断显著肝纤维化 ($\geq \text{F3}$) 的效能, 其受试者工作特征曲线下面积 (area under receiver operating characteristic curve, AUROC) 为 0.94, 与肝脏组织活检的符合率为 90.45%。在诊断肝硬化 ($\geq \text{F5}$) 时, 血清 N-聚糖 RF-B 模型的 AUROC 为 0.97, 与肝脏组织活检的符合率为 88.94%。血清 N-聚糖模型 (RF-A 和 RF-B) 的诊断效能优于肝硬度值测量 (liver stiffness measurement, LSM)、基于 4 因子的纤维化指数 (fibrosis index based on the four factors, FIB-4) 和天冬氨酸转氨酶与血小板比率指数 (aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index, APRI)。在 ALT 水平正常的慢性乙肝患者中, 血清 N-聚糖模型可作为诊断显著肝纤维化或肝硬化的潜在生物标志物。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

乙型肝炎 (乙肝) 病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是全球的公共卫生问题[1], 据估计, 全球有 2.96 亿慢性乙型肝炎 (慢性乙肝) 患者, 其中我国约有 8600 万[2]。慢性乙肝可发展为肝纤维化、肝硬化, 并最终发展为肝衰

竭或肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。临床上, 慢性乙肝患者抗病毒治疗的研究提供了令人信服的肝纤维化逆转证据[3–4]。因此, 如果患者能够得到及时有效的治疗, 就有可能实现肝纤维化逆转。

在慢性乙肝患者中, 抗病毒治疗的临床指征包括患者肝脏组织学进展情况、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotrans-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: xueenliu@bjmu.edu.cn (X. Liu), zhaohong_pufh@bjmu.edu.cn (H. Zhao), zhuangbmu@126.com (H. Zhuang).

These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: Engineering 2023, 26(7): 151–158

引用本文: Lin Wang, Yiqi Liu, Qixin Gu, Chi Zhang, Lei Xu, Lei Wang, Cuiying Chen, Xueen Liu, Hong Zhao, Hui Zhuang. Serum N-Glycan Markers for Diagnosing Significant Liver Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients with Normal Alanine Aminotransferase Levels. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.03.008>

ferase, ALT) 和 HBV DNA 的水平[5–6]。慢性乙肝防治指南推荐, 对 ALT 水平正常 ($< 40 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$) 且伴有显著肝纤维化和 (或) 显著炎症的慢性乙肝患者进行抗病毒治疗[6–7]。因此, 如果有标志物能够诊断显著肝纤维化 (Ishak 评分, $\geq \text{F3}$) 和无或轻微肝纤维化 (Ishak 评分, $< \text{F3}$), 将有助于确定是否将 ALT 水平正常的慢性乙肝患者纳入抗病毒治疗。肝脏组织活检病理学诊断仍是肝纤维化分期的“金标准”。然而, 作为一项有创性检查方法, 无法在临床上广泛开展肝脏组织活检[8]。因此, 迫切需要无创性诊断标志物来评估 ALT 水平正常的慢性乙肝患者是否存在显著肝纤维化。

目前, 评估肝纤维化程度的无创性诊断工具主要是影像学 and 血清学诊断方法。影像学最新检查技术主要包括超声、计算机断层扫描 (computed tomography, CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 和弹性成像, 这些技术诊断肝硬化的灵敏度和特异度分别为 82% 和 80%、77% 和 68%、85% 和 100%, 以及 83% 和 89% [9]。超声、CT 和 MRI 是临床上广泛使用的传统影像学方法。然而, 这些传统影像学方法只是定性判断肝纤维化程度, 其评估标准具有高度的主观性, 因此无法准确诊断肝纤维化程度[9–11]。瞬时弹性成像 (transient elastography, TE) 是一种无创评估肝脏硬度的方法[12]。然而, TE 测量肝脏硬度需要昂贵的设备和专业的操作人员, 肝脏硬度检测值会受到多种因素影响, 因此限制该技术在临床上的应用[13]。肝纤维化的血清学生物标志物包括天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 与血小板 (platelet, PLT) 比率指数 (AST-to-platelet ratio index, APRI) 以及基于 4 因子的纤维化指数 (fibrosis index based on the four factors, FIB-4) 等, 已被推荐应用于临床, 但其对肝纤维化程度的诊断效能有待于进一步研究[9]。在排除患者肝硬化的诊断时, 影像学 and 血清学无创诊断标志物均表现出较高的诊断准确度。然而, 这些方法对显著肝纤维化的诊断效果仍不够理想, 特别是对早期肝纤维化的诊断效能不高[9–11,14]。在 ALT 水平正常的慢性乙肝患者中, 影像学 and 血清学标志物评估肝纤维化的诊断价值仍有待进一步研究。

糖基化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰形式。糖基化对机体内环境变化高度敏感, 异常的糖基化修饰与许多疾病有关[15]。在不同的肝脏疾病状态下, 血清 N-聚糖的结构和功能均发生了变化。Callewaert 等[16]开发了一种快速、便捷、高通量的血清 N-聚糖图谱分析技术, 即基于 DNA 测序仪的荧光糖电泳技术 (DNA sequencer-assisted fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis,

DSA-FACE)。随后, 在病毒性肝炎患者中, 构建了肝纤维化检测标志物 (GlycoFibroTest)、肝硬化检测标志物 (GlycoCirrhoTest) 和 HCC 检测标志物 (GlycoHCCTest) [17–18]。以往的研究已经表明, 血清 N-聚糖模型是诊断肝纤维化、肝硬化和 HCC 的潜在生物标志物[19–21]。然而, 目前还没有研究探索血清 N-聚糖生物标志物对 ALT 水平正常的慢性乙肝患者肝纤维化的诊断价值。

本研究评估了血清 N-聚糖模型对 285 名 ALT 水平正常的慢性乙肝患者显著肝纤维化的诊断效能, 并将与其他肝纤维化标志物进行比较, 以便发现用于诊断 ALT 水平正常的慢性乙肝患者肝纤维化的更加可靠的标志物。因患有肝硬化的慢性乙肝患者需要长期抗病毒治疗, 本研究还构建了诊断肝硬化的血清 N-聚糖模型。

2. 方法

2.1. 患者

本研究为回顾性研究, 采用了 2013—2020 年在全国 33 个医院招募的慢性乙肝患者队列。纳入标准: ①乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 阳性至少 6 个月, 或肝脏组织病理学诊断为慢性 HBV 感染的患者; ②HBV DNA 阳性; ③未接受抗病毒治疗的患者。排除标准如下: ①ALT 水平升高 ($\geq 40 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$); ②合并甲型、丙型、丁型和戊型肝炎病毒感染或人类免疫缺陷病毒感染的患者; ③其他慢性肝病 (非酒精性脂肪肝、酒精性肝病、药物性肝损伤、自身免疫性肝炎和遗传性肝病); ④不稳定型糖尿病患者; ⑤服用任何药物的患者。本研究共纳入 285 例 ALT 水平正常 ($< 40 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$) 且未经治疗的慢性乙肝患者 (图 1)。所有入组患者都签署知情同意书。本研究经北京大学第一医院伦理委员会批准, 符合《赫尔辛基宣言》的伦理准则。

2.2. 数据收集和实验室检测

慢性乙肝患者的临床资料由各个医院负责采集, 包括年龄、性别、体质指数 (body mass index, BMI)、ALT、AST、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase, GGT)、PLT、甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP)、总胆红素 (total bilirubin, Tbil)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBil) 和肝脏硬度值测量 (liver stiffness measurement, LSM) (FibroScan; Echosens, France)。使用罗氏 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) 试剂盒检测 HBsAg、乙肝 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)、乙肝核心抗原抗体 (antibody against hepa-

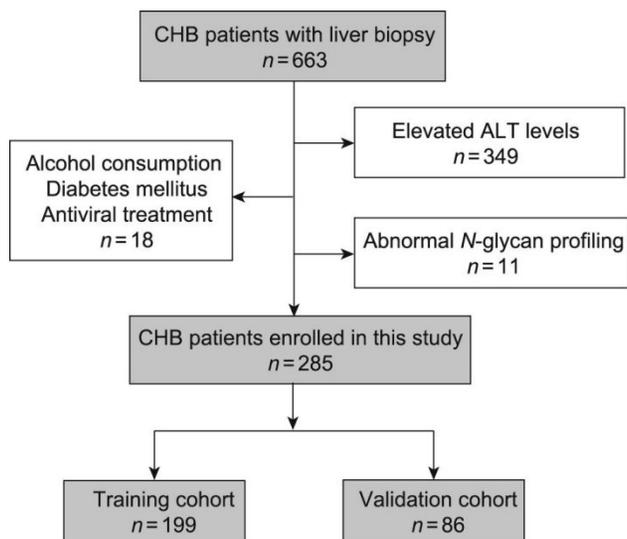


图1. 患者选择流程图。CHB: 慢性乙型肝炎。

titis B core antigen, anti-HBc)、HBsAg 抗体 (antibody against HBsAg, anti-HBs) 和 HBeAg 抗体 (antibody against HBeAg, anti-HBe)。采用 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 试剂定量检测血清 HBV DNA 的水平, 检测下限为 $20 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。如果 HBV DNA 水平高于 $1.7 \times 10^8 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 则按比例稀释样品, 再次检测。

FIB-4 和 APRI 的计算公式如下: $\text{FIB-4} = [\text{年龄 (岁)} \times \text{AST (IU}\cdot\text{L}^{-1})] / \{\text{PLT 计数 (} 10^9 \text{ L}^{-1}) \times [\text{ALT (IU}\cdot\text{L}^{-1})]^{1/2}\}$; $\text{APRI} = [\text{AST (IU}\cdot\text{L}^{-1}) / \text{AST 正常值上限}] / \text{PLT 计数 (} 10^9 \text{ L}^{-1}) \times 100$ 。

2.3. 肝脏组织学检查

肝脏组织活检指征包括血清 HBV DNA 水平不低于 $2000 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、ALT 水平正常、患病时间不低于 30 年。在获得入组慢性乙肝患者 (285 例) 的知情同意后, 按照医院的标准化方案进行超声引导下的肝脏组织活检。活检的肝脏组织用福尔马林固定, 用石蜡包埋, 用 Masson 三色、苏木精-伊红和网状纤维染色。肝脏纤维化程度和炎症的组织学评估由两名病理学专家进行盲法判读, 两位病理专家的判读一致率高于 90%。如果两位专家的读片结果不一致或与临床信息严重不符, 需由第三位资深病理学专家进行判读。利用 Ishak 评分系统 (F0~F6) 评估肝纤维化程度, 利用 Ishak 的组织学活动指数 (histology activity index, HAI; 0~18) 分级系统评估肝脏组织炎症活动度。肝纤维化分期定义为无肝纤维化 (Ishak 评分, F0)、早期肝纤维化 (Ishak 评分, F1 和 F2)、显著肝纤维化 (Ishak 评分, F3 和 F4) 和肝硬化 (Ishak 评分, F5 和 F6) [22]。肝脏炎症程度定义为无显著肝脏组织炎症 (HAI < 9) 和

显著肝脏组织炎症 (HAI ≥ 9) [5]。如果 Ishak 纤维化分期 $\geq \text{F3}$ 和 (或) HAI ≥ 9 , 则认为患者伴有显著的肝脏组织学损伤。

2.4. 血清 N-聚糖图谱检测

用之前文献报道的方法进行血清 N-聚糖检测 [19]。首先, 使用肽 N-糖苷酶-F (PNGaseF; New England Biolabs, USA) 释放 $2 \mu\text{L}$ 血清中糖蛋白的 N-聚糖。然后, 加入 8-氨基苊-1,3,6-三磺酸 (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid, APTS) (Invitrogen, USA) 以标记游离 N-聚糖, 并用含唾液酸酶的溶液 (New England Biolabs) 去除唾液酸。最后, 使用 ABI 3500 DX 基因分析仪 (Applied Biosystems, USA) 检测处理过的样品, 使用 GeneMapper 软件 (4.1 版) 分析血清 N-聚糖图谱数据。每份样品可以检测到 9 个特异性的血清 N-聚糖峰 (图 2), 用单个 N-聚糖峰高与全部 N-聚糖峰高比值来计算 N-聚糖峰的相对含量。这种标准化方法有助于纠正批次效应的影响, 其重复性 [即变异系数 (coefficient of variation, CV)] 实验表明, 对 10 份血清样本检测 10 次, 总 CV 值小于 2%。血清 N-聚糖图谱分析时, 研究人员并不知晓入组患者的人口统计学和临床数据。

2.5. 统计分析

计量资料以均值 \pm 标准差 (standard deviation, SD) 表

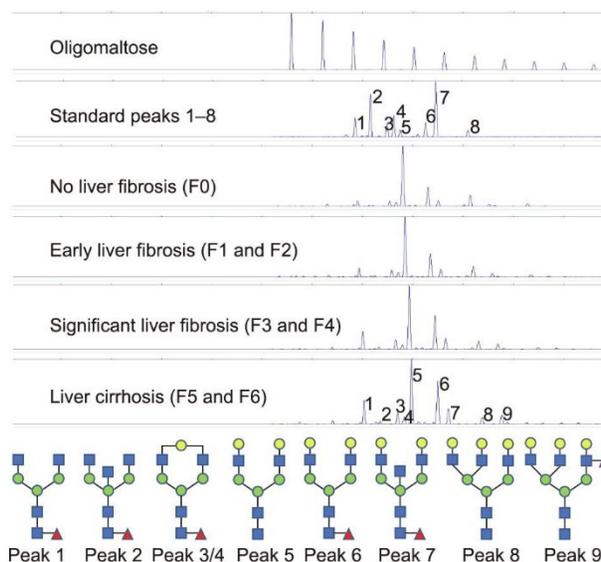


图2. 不同肝纤维化分期的代表性血清 N-聚糖图谱和聚糖峰的结构。峰 1: 二天线无半乳糖基核心 α -1,6 岩藻糖基化 N-聚糖 (NGA2F); 峰 2: 二天线无半乳糖基核心 α -1,6 岩藻糖基化平型 N-聚糖 (NGA2FB); 峰 3/峰 4: 二天线核心 α -1,6 岩藻糖基化单支链半乳糖基 N-聚糖 (NG1A2F); 峰 5: 二天线 N-聚糖 (NA2); 峰 6: 二天线核心 α -1,6 岩藻糖基化 N-聚糖 (NA2F); 峰 7: 二天线平型核心 α -1,6 岩藻糖基化 N-聚糖 (NA2FB); 峰 8: 三天线 N-聚糖 (NA3); 峰 9: 三天线支链 α -1,3 岩藻糖基化 N-聚糖 (NA3Fb)。

示, 利用 t 检验和 Mann-Whitney 检验进行比较分析。分类变量用计数和百分比表示, 比较分析采用 χ^2 检验。入组慢性乙肝患者按照性别和年龄进行分层分析, 随机分为建模组 (199 例) 和验证组 (86 例)。采用随机森林 (random forest, RF)、支持向量机 (support vector machine, SVM) 和二元逻辑回归 (logistics regression, LR) 分析方法构建血清 N-聚糖模型, RF 和 SVM 方法利用 9 个血清 N-聚糖峰建模, LR 方法利用多因素 LR 分析确定的独立预测因子建模。利用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 评估血清 N-聚糖模型和其他肝纤维化标志物 (LSM、APRI 和 FIB-4) 诊断肝纤维化的效能。在最佳截断值时, 计算每种诊断模型的灵敏度、特异度、阳性预测值 (positive predict value, PPV)、阴性预测值 (negative predict value, NPV) 和符合率。使用 SPSS 20.0 (SPSS, USA) 和 MATLAB R2016b (MathWorks, USA) 软件进行统计分析。使用 Benjamini-Hochberg 方法对 P 值进行调整, 调整后的 P (adj- P) 值低于 0.05 时被认为具有统计学意义, 统计分析均采用双侧检验。

3. 结果

3.1. 患者的人口统计学和临床特征

285 例 ALT 水平正常的慢性乙肝患者的人口统计学和临床特征总结于表 1。肝脏组织活检的结果显示, 显著肝纤维化 ($\geq F3$) 和肝硬化 ($\geq F5$) 的慢性乙肝患者分别为

182 例 (63.86%) 和 47 例 (16.49%), 显著肝脏组织炎症 (HAI ≥ 9) 的患者有 14 例 (4.91%), 显著肝脏组织学病变的患者有 182 例 (63.86%)。如表 1 所示, 患者的年龄、LSM、ALT、AST、GGT、AFP、Tbil 和 Dbil 随肝纤维化程度的加重而显著增加, 而 HBV DNA 和 PLT 则显著降低。

3.2. 血清 N-聚糖丰度在不同肝纤维化程度的变化

本研究应用 DSA-FACE 技术检测血清 N-聚糖图谱, 每例患者血清样本中均检出 9 个 N-聚糖峰。不同肝纤维化分期的代表性血清 N-聚糖图谱和聚糖峰的结构如图 2 所示。血清 N-聚糖峰的相对含量由单个 N-聚糖峰的峰高与所有 N-聚糖峰的峰高之和的比值计算得到。血清 N-聚糖丰度在不同肝纤维化分期之间的差异见表 2 所示。血清 N-聚糖丰度与肝纤维化程度显著相关, 不同肝纤维化分期出现了显著性改变。峰 5 (NA2) 和峰 8 (NA3) 的相对含量随着肝纤维化程度的增加而降低, 而其他 N-聚糖峰相对含量则随着肝纤维化程度的增加而增加。

3.3. 构建血清 N-聚糖模型

建模组和验证组中 285 例 ALT 水平正常慢性乙肝患者的临床特征如附录 A 中的表 S1 所示, 两组间临床特征无显著性差异。血清 N-聚糖 RF 和 SVM 模型纳入 9 个 N-聚糖峰, LR 模型纳入的是由多因素 LR 分析确定的独立预测因子。构建血清 N-聚糖模型 RF-A、SVM-A 和 LR-A, 用来区分诊断显著肝纤维化 ($\geq F3$), 构建 RF-B、SVM-B 和

表 1 285 例 ALT 水平正常的不同肝纤维化程度慢性乙肝患者的临床特征

Variables	Total	Fibrosis stage			adj- P value
		F0-F2	F3 and F4	F5 and F6	
Case number, n (proportion)	285 (100.00%)	103 (36.14%)	135 (47.37%)	47 (16.49%)	—
Male gender, n (proportion)	162 (56.84%)	50 (48.54%)	83 (61.48%)	29 (61.70%)	0.121
Age (years)	43.01 \pm 10.17	42.08 \pm 9.54	42.04 \pm 10.54	47.87 \pm 9.20	0.003
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	23.43 \pm 3.28	23.51 \pm 3.18	23.21 \pm 3.40	23.88 \pm 3.17	0.495
HBV DNA ($\text{lg}(\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1})$)	4.64 \pm 2.02	4.70 \pm 2.30	4.63 \pm 1.90	4.56 \pm 1.69	0.044
HBeAg positive, n (proportion)	91 (31.93%)	31 (30.10%)	43 (31.85%)	17 (36.17%)	0.921
LSM (kPa)	9.44 \pm 7.01	6.67 \pm 3.01	9.84 \pm 6.82	14.15 \pm 10.22	< 0.001
ALT ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	26.36 \pm 7.63	24.78 \pm 7.38	27.10 \pm 7.42	27.67 \pm 8.32	0.044
AST ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	25.96 \pm 7.78	23.59 \pm 5.70	26.62 \pm 8.16	29.26 \pm 9.09	< 0.001
ALP ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	61.88 \pm 23.96	63.54 \pm 23.40	63.28 \pm 21.72	54.26 \pm 29.68	0.073
GGT ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	28.42 \pm 24.57	22.94 \pm 13.79	27.77 \pm 25.56	42.32 \pm 33.70	< 0.001
PLT (10^9L^{-1})	186.22 \pm 59.08	203.97 \pm 54.99	185.76 \pm 58.94	148.64 \pm 50.73	< 0.001
AFP ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	8.84 \pm 39.83	4.81 \pm 11.68	7.20 \pm 26.27	22.19 \pm 84.68	0.052
Tbil ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	15.12 \pm 7.90	13.98 \pm 5.41	14.99 \pm 6.91	18.00 \pm 13.04	0.028
Dbil ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.35 \pm 3.14	3.71 \pm 1.90	4.44 \pm 2.66	5.51 \pm 5.46	0.009
Significant inflammation, n (proportion)	14 (4.91%)	0 (0)	9 (6.67%)	5 (10.64%)	—

表2 ALT水平正常慢性乙肝患者不同肝纤维化分期的血清N-聚糖水平比较(均值±SD)

Peak	Total	Fibrosis stage			<i>r</i>	<i>P</i> value	adj- <i>P</i> value	
		F0-F2	F3 and F4	F5 and F6			< F3 vs ≥ F3	< F5 vs ≥ F5
Peak 1	4.55 ± 1.71	3.80 ± 1.09	4.73 ± 1.63	5.67 ± 2.23	0.38	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 2	0.87 ± 0.33	0.78 ± 0.29	0.86 ± 0.31	1.10 ± 0.35	0.31	< 0.001	0.001	< 0.001
Peak 3	4.27 ± 1.03	3.94 ± 0.86	4.34 ± 0.97	4.79 ± 1.28	0.28	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 4	3.23 ± 0.76	2.92 ± 0.62	3.34 ± 0.75	3.60 ± 0.81	0.33	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 5	53.89 ± 4.46	55.45 ± 3.53	53.72 ± 4.10	50.96 ± 5.68	-0.34	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 6	16.30 ± 2.66	15.86 ± 2.45	16.37 ± 2.60	17.04 ± 3.11	0.15	0.010	0.036	0.042
Peak 7	4.65 ± 1.21	4.28 ± 1.14	4.67 ± 1.04	5.43 ± 1.42	0.31	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 8	8.69 ± 2.08	9.78 ± 1.99	8.22 ± 1.79	7.62 ± 2.01	-0.40	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Peak 9	3.56 ± 1.57	3.19 ± 1.47	3.76 ± 1.63	3.79 ± 1.50	0.16	< 0.001	0.003	0.273

LR-B模型来区分诊断肝硬化(≥F5)。利用MATLAB和SPSS软件统计分析血清N-聚糖模型的诊断效能。在诊断显著肝纤维化和早期及无肝纤维化时,RF-A和SVM-A模型的诊断ROC曲线下面积(area under ROC, AUROC)分别为0.94和0.97,高于LR-A模型(0.80)。在最佳截断值时,无论在建模组或验证组,RF-A模型(90.45%和83.72%)和SVM-A模型(89.45%和81.40%)与肝脏组织活检病理学诊断的符合率相近,均优于LR-A模型(70.35%和68.60%)(见附录A中的表S2和表S3)。血清N-聚糖RF-B(0.97)和SVM-B(0.99)模型诊断肝硬化的AUROC也高于LR-B(0.77)模型。在最佳截断值下,建模组RF-B和SVM-B模型与肝脏组织活检的符合率分别为88.94%和90.45%;在验证组中,与肝脏组织活检的符合率分别为86.05%和87.21%,均优于LR-B模型(62.81%和58.14%)(见附录A中的表S2和表S3)。在评估ALT水平正常慢性乙肝患者肝纤维化分期时,血清N-聚糖RF和SVM模型的诊断效果较好。本研究选择血清N-聚糖RF模型与其他肝纤维化无创诊断标志物进行比较。

3.4. 血清N-聚糖模型与其他肝纤维化标志物诊断效能比较 本研究评估和比较了N-聚糖模型与影像学(LSM)

和血清学(APRI和FIB-4)肝纤维化标志物的诊断效能。在ALT正常的慢性乙肝患者中,血清N-聚糖RF-A模型对显著肝纤维化(≥F3)表现出较好的诊断效能,诊断AUROC为0.94,高于LSM(0.72)、APRI(0.67)和FIB-4(0.64)[图3(a)]。在最佳截断值时,建模组血清N-聚糖RF-A模型的诊断灵敏度、特异度、PPV、NPV和符合率分别为94.49%、83.33%、90.91%、89.55%和90.45%(表3),且与肝脏组织活检的符合率优于LSM(69.79%)、APRI(60.80%)和FIB-4(54.77%)(图3和表4)。在验证组中,血清N-聚糖RF-A模型与肝脏组织活检的诊断符合率(83.72%)也高于LSM(71.43%)、APRI(58.14%)和FIB-4(58.14%)(表5)。研究结果表明,血清N-聚糖RF-A模型对区分ALT水平正常慢性乙肝患者的显著肝纤维化(≥F3)具有更高的诊断效能。

在诊断肝硬化时,血清N-聚糖RF-B模型的AUROC高达0.97,显著高于LSM(0.73)、APRI(0.76)和FIB-4(0.79)[图3(b)]。在最佳截断值时,血清N-聚糖RF-B模型的诊断灵敏度、特异度、PPV、NPV和符合率分别为36.36%、99.40%、92.31%、88.71%和88.94%(表3),血清N-聚糖RF-B模型与肝脏组织活检的符合率优于LSM(83.42%)、APRI(65.83%)和FIB-4(66.83%)(表4)。

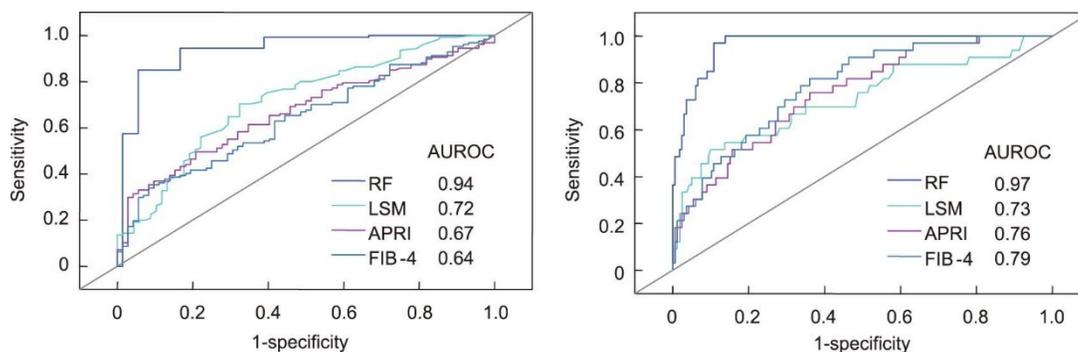


图3 ALT正常慢性乙肝患者血清N-聚糖RF模型与其他肝纤维化诊断标志物的ROC曲线。(a)区分诊断显著肝纤维化(≥F3);(b)区分诊断肝硬化(≥F5)。

表3 建模组ALT正常慢性乙肝患者血清N-聚糖RF模型的诊断效能

RF model	Biopsy result		Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Coincidence rate (%)
	Positive	Negative						
≥ F3	120	12	132	94.49	83.33	90.91	89.55	90.45
< F3	7	60	67					
Total	127	72	199					
≥ F5	12	1	13	36.36	99.40	92.31	88.71	88.94
< F5	21	165	186					
Total	33	166	199					

表4 建模组ALT正常慢性乙肝患者血清N-聚糖RF模型和其他肝纤维化标志物的诊断效能比较

Fibrosis stage	Fibrosis markers	Cutoff	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Coincidence rate (%)
≥ F3 vs < F3	RF-A	0.50	94.49	83.33	90.91	89.55	90.45
	LSM	6.75	71.77	66.18	79.46	56.25	69.79
	APRI	0.34	49.61	80.56	81.82	47.54	60.80
	FIB-4	1.04	64.57	37.50	64.57	37.50	54.77
≥ F5 vs < F5	RF-B	0.50	36.36	99.40	92.31	88.71	88.94
	LSM	12.95	51.52	90.00	51.52	90.00	83.42
	APRI	0.37	75.76	63.86	29.41	92.98	65.83
	FIB-4	1.23	31.03	94.64	81.82	63.86	66.83

表5 验证组ALT正常慢性乙肝患者血清N-聚糖RF模型和其他肝纤维化诊断标志物的诊断效能比较

Fibrosis stages	Fibrosis markers	Cutoff	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Coincidence rate (%)
≥ F3 vs < F3	RF-A	0.50	89.09	74.19	85.96	79.31	83.72
	LSM	6.75	71.70	70.97	80.85	59.46	71.43
	APRI	0.34	49.09	74.19	77.14	45.10	58.14
	FIB-4	1.04	63.64	48.39	68.63	42.86	58.14
≥ F5 vs < F5	RF-B	0.50	21.43	98.61	75.00	86.59	86.05
	LSM	12.95	21.43	89.86	30.00	84.93	78.31
	APRI	0.37	71.43	61.11	26.32	91.67	62.79
	FIB-4	1.23	64.29	52.78	20.93	88.37	54.65

在验证组中,血清N-聚糖RF-B模型(86.05%)也显示出最高的诊断符合率(表5)。

4. 讨论

慢性乙肝仍然是一个重要的全球公共卫生问题。研究表明,慢性乙肝患者接受及时有效的治疗,可以防止疾病进展为肝硬化和HCC。在未经治疗的慢性乙肝患者中,不伴有肝硬化的患者每年发生HCC的风险约为0.5%,存在代偿期肝硬化患者每年发生HCC的风险为2%~3%[23]。基于肝脏病变组织学进展、ALT和HBV DNA的水平对慢性乙肝患者进行抗病毒治疗,ALT水平升高是开始治疗的主要决定因素[5]。ALT水平正常的慢性乙肝患者伴显著肝脏组织学病变也需要进行抗病毒治疗[5-6]。多

项研究表明,20.7%~53.2%的ALT水平持续正常慢性乙肝患者伴有显著肝纤维化和(或)肝脏组织炎症[24-26]。一项研究纳入327名HBsAg阴性的慢性乙肝患者,研究发现53.2%的ALT水平正常($\leq 40 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$)的患者伴有显著肝纤维化[27]。本研究也发现,63.86%(182/285)患者伴有显著肝纤维化,16.49%(47/285)伴有肝硬化,4.91%(14/285)伴有显著肝脏组织炎症。本研究纳入的患者是33家医院的门诊或住院患者,多数患者HBsAg阳性时间超过30年,患者的年龄相对较大[平均年龄:(43.01 ± 10.17)岁],病程较长。因此,显著肝纤维化和肝硬化的比例相对较高。Sonneveld等[28]研究发现,在患者不伴有显著肝纤维化的情况下,ALT水平正常的慢性乙肝患者出现显著炎症的概率非常低(3.6%),这与本研究的结果(0)相近。上述研究表明,进一步评估ALT水平正常慢性乙肝患者是否存在显著肝纤维化是很有必要

的, 这将有助于确定这些患者是否需要抗病毒治疗。肝脏组织活检仍然是诊断肝纤维化程度的金标准, 但该操作存在发生严重并发症的风险, 包括出血、疼痛、穿孔、感染甚至死亡, 而且肝脏组织活检的结果准确度通常会受到取样错误、样本量小和组织学评估的限制[8]。因此, 在ALT水平正常的慢性乙肝患者中, 非常有必要研究显著肝纤维化的无创性诊断标志物。

糖基化修饰是蛋白质最为常见的一种翻译后修饰形式之一。在糖基转移酶的作用下, 聚糖与蛋白质的共价结合形成糖蛋白。聚糖与蛋白质结合后, 聚糖会影响蛋白质的结构、功能、稳定性、折叠、半衰期、运输、溶解性以及与其他蛋白质的相互作用[29]。糖基化和糖化是聚糖与蛋白质结合的两种主要类型。N-糖基化和糖化之间的主要区别在于, 前者是由糖基转移酶催化的酶促反应, 而后者是游离糖自发地连接到蛋白质中的非酶反应[30]。

糖组学广泛应用于疾病相关生物标志物的研究和开发[18]。糖蛋白中的聚糖参与了许多关键的生物学过程, 包括受体激活、分子转运、细胞黏附和信号转导[31]。肝脏是糖蛋白的主要来源之一, 肝脏中的去唾液酸糖蛋白受体和甘露糖/N-乙酰氨基葡萄糖受体在清除异常糖基化蛋白过程中发挥重要作用[32]。肝脏生理学和病理生理学的变化会引起血清N-聚糖水平的变化, 因此血清N-聚糖生物标志物具有对不同肝脏疾病进行无创评估的潜力[19–20]。高通量的糖组检测技术(如DSA-FACE)使糖生物学的广泛探索和临床应用成为现实[16]。

基于高通量的DSA-FACE糖组检测技术, 血清N-聚糖生物标志物研究变得可行和可靠。随着检测技术的优化, 检测所需血清量降低至2 μ L, 检测时间缩短至6 h。本研究和之前的研究发现, 作为一种生物标志物, 血清N-聚糖在特定的储存条件下是稳定的, 其CV值非常低[33]。研究表明, 血清N-聚糖模型GlycoFibroTest [lg(peak2/peak8)]和GlycoCirrhoTest [lg(peak7/peak8)]对肝纤维化或肝硬化具有较好的区分诊断价值; GlycoFibroTest区分诊断HCV感染相关显著肝纤维化的AUROC为0.79 [17–18]。本课题组之前的研究纳入432例慢性乙肝患者, 利用血清N-聚糖峰1、峰3、峰4和峰8(NGA2F、NG1A2F和NA3)构建了多参数血清N-聚糖诊断模型, 其中大多数入选患者的ALT水平较高[19]。结果表明, 血清N-聚糖模型可以用于区分诊断不同肝纤维化分期, 血清N-聚糖模型A的诊断AUROC为0.890, 其区分诊断显著肝纤维化效能优于GlycoFibroTest (AUROC: 0.538)和GlycoCirrhoTest (AUROC: 0.644) [19]。

以往研究结果表明, 血清N-聚糖肝纤维化诊断模型

具有潜在的临床应用价值, 有望成为肝纤维化无创诊断的新方法, 并发现ALT水平会影响血清N-聚糖的表达水平[18–19,33]。然而, 目前关于血清N-聚糖生物标志物对ALT水平正常的慢性乙肝患者肝纤维化的区分诊断价值还没有相关研究。本研究纳入285例ALT水平正常的慢性乙肝患者, 研究血清N-聚糖模型对于显著肝纤维化(\geq F3)的诊断价值。研究结果表明, GlycoFibroTest、GlycoCirrhoTest和血清N-聚糖模型A的诊断效能均不够理想, 诊断AUROC均低于0.80, 在最佳截断值时, 建模组和验证组的N-聚糖模型与肝脏组织活检的符合率均小于75% (数据未提供)。因此, 在ALT水平正常慢性乙肝患者中, 仍然需要构建更理想的肝纤维化血清N-聚糖模型。

随着人工智能技术的发展, 机器学习方法被广泛用于各个不同领域来构建诊断和预测模型。机器学习算法SVM和RF在生物医学领域有重要的应用价值, 如蛋白质结构预测、基因鉴定和肝纤维化分期等[34–35]。一项研究纳入144例慢性乙肝患者, 使用机器学习方法分析多参数超声数据来评估肝脏纤维化程度[35]。结果表明, RF和SVM方法在评估肝纤维化分期时表现最佳, 具有更高和更稳定的诊断效能(均值AUROC = 0.85) [35]。为了构建更理想的血清N-聚糖模型, 进一步提高其对ALT水平正常慢性乙肝显著肝纤维化的区分诊断效能, 本研究分别利用RF、SVM和LR方法构建了血清N-聚糖模型。在建模组中, RF和SVM方法对显著肝纤维化的诊断效能较好, 均优于LR-A模型(见附录A中的表S2)。由于统计方法的局限性, RF-A和SVM-A的诊断效能验证组中略有下降, 但均优于LR-A模型(见附录A中的表S3)。为了便于后续的分析, 本研究选择了血清N-聚糖RF模型与其他肝纤维化诊断标志物进行比较。

近期, 包括APRI和FIB-4在内的血清学生物标志物和影像学标志物LSM被中国《慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)》和世界卫生组织推荐为肝脏组织活检的无创替代标志物[7]。肝纤维化的血清学标志物包括直接和间接标志物, 直接血清学标志物主要反映肝脏中细胞外基质的生成或降解的程度; 间接血清学标志物主要反应肝脏组织的功能[36]。基于间接血清生物标志物, 近年来已经构建用于评估肝纤维化分期的血清学诊断模型, 并应用于临床[37]。然而, 炎症活动、免疫反应性和变化的自然史可能会影响当前血清学标志物的可靠性[38]。TE是一种代表性的影像学检查方法, 该方法通过测量肝脏组织硬度来区分诊断肝纤维化程度。尽管肝脏硬度检测值会受到一些因素如ALT水平、腹水、肥胖、肋间狭窄和测量部位等[39]的影响, 但TE对肝硬化的诊断准确性普遍较高[40]。

一项研究报道,在ALT水平持续正常的慢性乙肝患者中,APRI和FIB-4对肝纤维化程度的诊断效果并不理想;由于肝脏炎症和坏死的影响,LSM区分诊断肝纤维化的效果要优于APRI和FIB-4[41]。本研究评估了LSM、APRI和FIB-4对ALT水平正常慢性乙肝患者肝纤维化的诊断效能,并与血清N-聚糖模型进行了比较分析。建模组和验证组的血清N-聚糖RF-A模型区分诊断显著肝纤维化的效能均显著高于LSM、APRI和FIB-4(表4和表5)。本研究结果表明,在ALT水平正常的慢性乙肝患者中,血清N-聚糖模型是有潜力的显著肝纤维化无创诊断标志物,且优于目前使用的影像学和血清学无创诊断标志物(LSM、FIB-4和APRI)。

患有肝硬化的慢性乙肝患者需要长期接受抗病毒治疗。研究表明,患有肝硬化的慢性乙肝患者接受长期抗病毒治疗可以产生持续的病毒学抑制和组织学改善[42]。本研究中,16.49%的慢性乙肝患者患有肝硬化。肝硬化的早期诊断和早期治疗将对慢性乙肝患者大有裨益。因此,本研究构建并评估了血清N-聚糖模型区分诊断肝硬化的效能,并与其他无创诊断标志物进行了比较分析。结果表明,建模组和验证组的血清N-聚糖RF-B模型对肝硬化的区分诊断效能均显著高于LSM、APRI和FIB-4(表4和表5)。因此,血清N-聚糖RF模型为ALT水平正常慢性乙肝患者提供了一种简便且准确的肝硬化无创诊断评估方法。

5. 结论

本研究发现,在区分诊断ALT水平正常慢性乙肝患者显著肝纤维化和肝硬化时,血清N-聚糖模型是具有创新性和有前途的生物标志物,优于影像学(LSM)和血清学(APRI和FIB-4)无创诊断标志物。未来,仍然需要更大规模的研究队列来独立验证血清N-聚糖生物标志物的诊断价值。随着DSA-FACE技术的发展,更方便、更快捷的诊断试剂盒将进一步促进血清N-聚糖生物标志物的广泛临床应用,将有助于判定是否将ALT水平正常患者纳入抗病毒治疗。

致谢

感谢周郁文博士[先思达(南京)生物科技有限公司]在统计分析方面提供的技术咨询帮助。本研究得到了国家“十三五”科技重大专项(2018ZX10732401-003-015)和国家科技重大专项(2013ZX10002005和2017ZX10203202)的

资助。

Compliance with ethics guidelines

Lei Xu, Lei Wang, and Cuiying Chen are from Sysdi-agn (Nanjing) Biotechnology Company Limited. Lin Wang, Yiqi Liu, Qixin Gu, Chi Zhang, Xueen Liu, Hong Zhao, and Hui Zhuang declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.03.008>.

References

- [1] World Health Organization. Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019. Accountability for the global health sector strategies, 2016–2021. Geneva: World Health Organization; 2021.
- [2] Razavi-Shearer D, Gamkrelidze I, Nguyen MH, Chen DS, Van Damme P, Abbas Z, et al.; the Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018;3(6):383–403.
- [3] Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* 2020;9(4):875.
- [4] Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J Intern Med* 2017;32(2):213–28.
- [5] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 2018;67(4):1560–99.
- [6] Kao JH, Hu TH, Jia J, Kurosaki M, Lim YS, Lin HC, et al. East Asia expert opinion on treatment initiation for chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;52(10):1540–50.
- [7] Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Society of Hepatology. The guidelines of prevention and treatment for chronic hepatitis B (2019 version). *Chin J Hepatol* 2019;27(12):938–61. Chinese.
- [8] Agbim U, Asrani SK. Non-invasive assessment of liver fibrosis and prognosis: an update on serum and elastography markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;13(4):361–74.
- [9] Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20(45):16820–30.
- [10] Caballeria L, Torán P, Caballeria J. Markers of hepatic fibrosis. *Med Clin* 2018;150(8):310–6.
- [11] Guha IN, Rosenberg WM. Noninvasive assessment of liver fibrosis: serum markers, imaging, and other modalities. *Clin Liver Dis* 2008;12(4):883–900.
- [12] Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134(4):960–74.
- [13] Yu JH, Lee JI. Current role of transient elastography in the management of chronic hepatitis B patients. *Ultrasonography* 2017;36(2):86–94.
- [14] Patel K, Sebastiani G. Limitations of non-invasive tests for assessment of liver fibrosis. *JHEP Rep* 2020;2(2):100067.
- [15] An HJ, Kronewitter SR, de Leoz ML, Lebrilla CB. Glycomics and disease markers. *Curr Opin Chem Biol* 2009;13(5–6):601–7.
- [16] Callewaert N, Geysens S, Molemans F, Contreras R. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology* 2001;11(4):275–81.
- [17] Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J,

- Contreras R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med* 2004;10(4):429–34.
- [18] Vanderschaeghe D, Laroy W, Sablon E, Halfon P, Van Hecke A, Delanghe J, et al. GlycoFibroTest is a highly performant liver fibrosis biomarker derived from DNA sequencer-based serum protein glycomics. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(5):986–94.
- [19] Cao X, Shang QH, Chi XL, Zhang W, Xiao HM, Sun MM, et al. Serum N-glycan markers for diagnosing liver fibrosis induced by hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2020;26(10):1067–79.
- [20] Liu XE, Desmyter L, Gao CF, Laroy W, Dewaele S, Vanhooren V, et al. N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus. *Hepatology* 2007;46(5):1426–35.
- [21] Cong M, Ou X, Huang J, Long J, Li T, Liu X, et al. A predictive model using N-glycan biosignatures for clinical diagnosis of early hepatocellular carcinoma related to hepatitis B virus. *OMICS* 2020;24(7):415–23.
- [22] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(6):696–9.
- [23] Raffetti E, Fattovich G, Donato F. Incidence of hepatocellular carcinoma in untreated subjects with chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Liver Int* 2016;36(9):1239–51.
- [24] Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007;47(6):760–7.
- [25] Chao DT, Lim JK, Ayoub WS, Nguyen LH, Nguyen MH. Systematic review with meta-analysis: the proportion of chronic hepatitis B patients with normal alanine transaminase \leq 40 IU/L and significant hepatic fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39(4):349–58.
- [26] Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology* 2008;134(5):1376–84.
- [27] Duan M, Chi X, Xiao H, Liu X, Zhuang H. High-normal alanine aminotransferase is an indicator for liver histopathology in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2021;15(2):318–27.
- [28] Sonneveld MJ, Brouwer WP, Hansen BE, Chan HL, Piratvisuth T, Jia JD, et al.; the SONIC-B Study Group. Very low probability of significant liver inflammation in chronic hepatitis B patients with low ALT levels in the absence of liver fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;52(8):1399–406.
- [29] Wang W. Glycomedicine: the current state of the art. *Engineering*. In press.
- [30] Taniguchi N, Takahashi M, Kizuka Y, Kitazume S, Shuvaev VV, Ookawara T, et al. Glycation vs. glycosylation: a tale of two different chemistries and biology in Alzheimer's disease. *Glycoconj J* 2016;33(4):487–97.
- [31] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;126(5):855–67.
- [32] Qu Y, Gao CF, Zhou K, Zhao YP, Xu MY, Lu LG. Serum N-glycomic markers in combination with panels improves the diagnosis of chronic hepatitis B. *Ann Hepatol* 2012;11(2):202–12.
- [33] Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* 2009;19(12):1547–53.
- [34] Bao L, Sun Z. Identifying genes related to drug anticancer mechanisms using support vector machine. *FEBS Lett* 2002;521(1–3):109–14.
- [35] Li W, Huang Y, Zhuang BW, Liu GJ, Hu HT, Li X, et al. Multiparametric ultrasonomics of significant liver fibrosis: a machine learning-based analysis. *Eur Radiol* 2019;29(3):1496–506.
- [36] Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11567–83.
- [37] Castera L, Pinzani M. Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut* 2010;59(7):861–6.
- [38] Castera L. Hepatitis B: are non-invasive markers of liver fibrosis reliable? *Liver Int* 2014;34(Suppl 1):91–6.
- [39] Kim SU, Kim DY, Park JY, Lee JH, Ahn SH, Kim JK, et al. How can we enhance the performance of liver stiffness measurement using FibroScan in diagnosing liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B? *J Clin Gastroenterol* 2010;44(1):66–71.
- [40] Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ, West CP, Montori VM. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(10):1214–20.
- [41] Tan YW, Zhou XB, Ye Y, He C, Ge GH. Diagnostic value of FIB-4, aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index and liver stiffness measurement in hepatitis B virus-infected patients with persistently normal alanine aminotransferase. *World J Gastroenterol* 2017;23(31):5746–54.
- [42] Xu Y, Zhang YG, Wang X, Qi WQ, Qin SY, Liu ZH, et al. Long-term antiviral efficacy of entecavir and liver histology improvement in Chinese patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21(25):7869–76.