

基于统计建模的壮骨关节丸诱发特异质肝损伤相关 易感性细胞因子分析

唐进法^{1,2}, 王晓艳^{1,2}, 杨伟³, 李伟霞^{1,2}, 李宇辉²,
柏兆方⁴, 王伽伯^{4*}, 肖小河⁴

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008;
3. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700; 4. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039)

摘要: 利用数据建模的方式筛选壮骨关节丸 (Zhuangguguanjie wan, ZGW) 特异质肝损伤相关易感性细胞因子。以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)+ZGW 大鼠肝脏组织中 27 种细胞因子水平作为数据源, 以肝功能指标谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活力值高低作为肝损伤结局的评价指标, 采用 Logistic 回归法、分类树及随机森林法、LASSO Logistics 回归法、规则发现算法与 LASSO 相结合的变量筛选方法, 筛查 ZGW 特异质肝损伤相关易感性细胞因子, 并在 THP1 细胞上进行再评价。结果表明, 初步筛选分析得到 ZGW 特异质肝损伤密切相关的易感性细胞因子组合为白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-18 (interleukin-18, IL-18) 和表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF), ZGW 醇提物 (ethanolic extract of ZGW, EtZ) 联合 IL-1 β 或 IL-18 协同增强 THP1 细胞肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 分泌, EtZ 联合 IL-1 β 协同增强 THP1 细胞白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的分泌, 但 EtZ 联合 EGF 协同抑制 THP1 细胞 IL-6 的分泌。上述结果表明, 能表征 ZGW 特异质肝损伤相关易感性细胞因子为 IL-1 β 和 IL-18, 为临床 ZGW 特异质肝损伤患者的筛查提供依据, 为 ZGW 临床安全用药及风险防控提供了新的实验证据。

关键词: 壮骨关节丸; 特异质肝损伤; 细胞因子; Logistic 回归; 随机森林法; LASSO 回归法

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0574-11

Cytokine analysis of Zhuangguguanjie wan-induced idiosyncratic liver injury based on mathematical modeling

TANG Jin-fa^{1,2}, WANG Xiao-yan^{1,2}, YANG Wei³, LI Wei-xia^{1,2}, LI Yu-hui²,
BAI Zhao-fang⁴, WANG Jia-bo^{4*}, XIAO Xiao-he⁴

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China)

Abstract: In this study, we used a mathematic-based modeling system to screen the cytokines that are sensitive to Zhuangguguanjie wan (ZGW)-induced idiosyncratic liver injury. The values of 27 cytokines were used as the data source in rat liver of lipopolysaccharide (LPS) + ZGW group. The alanine aminotransferase

收稿日期: 2018-01-03; 修回日期: 2018-01-16.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2015ZX09501-004-001-008); 国家自然科学基金重点资助项目 (81630100); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81502898); 河南省中医药科学研究专项 (2016ZY2057).

*通讯作者 Tel: 86-10-66933323, Fax: 86-10-66933325, E-mail: wjb0128@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0008

(ALT) activity value of liver function indexes was used as the outcome evaluation index of liver injury. Cytokines of ZGW-induced idiosyncratic liver injury were screened using Logistic regression, random forest method, LASSO Logistic regression and method of combining rule discovery algorithm with LASSO, and cytokines filtered out were revalued in THP1 macrophage. Susceptible cytokine combinations: interleukin-1 β (IL-1 β), epidermal growth factor (EGF) and interleukin-18 (IL-18) closely related to ZGW-induced idiosyncratic liver injury were obtained after preliminary screening analysis. The result of revalued in THP1 showed that the ethanolic extract of ZGW (EtZ) combined with IL-1 β or IL-18 synergistically enhanced tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion in THP1 macrophage, and EtZ combined with IL-1 β significantly enhanced interleukin-6 (IL-6) secretion in THP1 macrophage, but EtZ combined with EGF markedly inhibited IL-6 secretion in THP1 macrophage. The results suggest that the sensitive cytokines that can be characterized in the ZGW-induced idiosyncratic liver injury are IL-1 β and IL-18, which provides a basis for screening the ZGW-induced idiosyncratic liver injury patients, and a new experimental evidence for clinical safety medication and risk prevention of ZGW.

Key words: Zhuangguguanjie wan; idiosyncratic hepatotoxicity; cytokine; Logistic regression; Random forest method; LASSO regression

壮骨关节丸 (Zhuangguguanjie wan, ZGW) 由熟地、补骨脂、淫羊藿、狗脊、独活、续断、鸡血藤、桑寄生、木香、骨碎补、乳香和没药共 12 味中药组成。用于肝肾不足、血淤气滞、脉络闭阻所致的骨性关节炎和腰肌劳损。上市以来, 虽然临床疗效较好, 但国家药品不良反应监测中心分别于 2001 年和 2008 年报道了 ZGW 的肝损伤现象。药物性肝损伤分为固有型肝损伤和特异质肝损伤, 而特异质肝损伤又可分为免疫特异质和代谢特异质^[1, 2]。课题组前期基于中药特异质肝损伤“免疫应激三因致毒”机制的观点^[3, 4], 利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 介导的药物特异质肝损伤模型阐明了 ZGW 致肝损伤与何首乌诱导的特异质肝损伤一致^[5, 6], 为免疫特异质肝损伤^[7]。近年来, 诸多研究发现许多细胞因子介导或参与免疫性肝损伤过程, 例如, 在刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 诱导的急性免疫性肝损伤中, 则主要是由 Th1 类细胞、巨噬细胞和 Th2 类细胞分泌的炎性细胞因子所造成的^[8], 肝损伤小鼠血清中白介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN γ) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α) 含量较正常对照组明显升高^[9, 10]。但特异质肝损伤相关细胞因子鲜有人报道, 尤其是 ZGW 特异质肝损伤相关细胞因子。本文旨在通过统计建模的方法筛选 ZGW 特异质肝损伤相关易感细胞因子, 并在 THP1 巨噬细胞上进行再评价, 以期对 ZGW 的风险评估及合理用药提供参考。

材料与方法

动物 SD 大鼠, SPF 级, 体重 180~190 g, 雄性, 购自军事医学科学院实验动物中心, 合格证号为 SCXK-(军) 2012-0004。

细胞株 THP1 细胞 (人白血病单核细胞), 来自解放军 302 医院全军中医药研究所。

药物与试剂 ZGW (批号: 1512007S, 华润三九医药股份有限公司); LPS (批号: 046M4045V)、豆蔻酸佛波乙酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 批号: MKCC8966) (Sigma 公司); 水合氯醛 (批号: 20150923, 宇龙海藻有限公司); Protease Inhibitor Cocktail I (20-201)、BCA Protein Assay Kit (71285-3CN)、MILLIPLEX MAP Lysis buffer for Multiplexing (43-040)、MILLIPLEX Catalog ID (RECYTMAG-65K-27.Rat) [默克化工技术 (上海) 有限公司]; 表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF, 批号: 1116AFC05)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号: 0103B95R1) (Peprotech 公司); 白介素-18 (interleukin-18, IL-18, 批号: EHK0317012, R&D Systems 公司); IL-6、TNF- α 酶联免疫试剂盒 (批号: 11/2017, 上海酶联生物科技有限公司)。

仪器 FW-500 高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); ME204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 迈瑞 BS-300 全自动生化分析仪 (上海富众生物科学有限公司); Neofuge1600R 低温台式高速离心机 (上海力申科学仪器有限公司); Luminex 200 蛋白芯片多功能液相芯片分析仪 [美国默克化工技术 (上海) 有限公司]; Milliplex 磁珠检测系统、

Milliplex 多功能液相芯片分析平台、Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

药物制备 ① 动物实验所需 ZGW 制备方法: 将 ZGW 用粉碎机粉碎, 过筛 (100 目) 备用, 实验时用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC) 配制为混悬液, 备用。② 细胞实验所需 ZGW 醇提物 (EtZ) 制备方法: 取 ZGW 200 g, 粉碎, 用 5 倍量 75% 乙醇浸泡 0.5 h, 回流提取 2 次, 合并提取液, 回收乙醇, 浸膏进行冷冻干燥后, 称重, 得到 ZGW 醇提物粉末 (EtZ) 56.3 g, 即 $3.55 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ZGW 成方 (每克提取物相当于 3.55 克 ZGW 原药), 实验时用细胞培养基溶解即可。

动物模型制备及给药 实验前将 SD 大鼠禁食 12 h, 实验分为 2 组, 正常对照组和 ZGW ($3.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS ($2.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。对照组灌胃 0.5% CMC, ZGW + LPS 组灌胃 ZGW (0.5% CMC 配制的 ZGW 混悬液), 2 h 后对照组尾静脉注射生理盐水, ZGW + LPS 组尾静脉注射 LPS, 10 h 后采用 10% 水合氯醛 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 低温离心 ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液。取血后, 立即剪取大鼠肝脏组织, 放入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存, 备用。

肝功能指标检测 利用全自动生化分析仪按照使用说明书测定血清谷丙转氨酶 (ALT) 活性。

细胞因子检测 将肝组织从 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出, 冰上操作, 剪取一定重量肝组织, 加入含蛋白抑制剂的裂解液 (9 mL : 1 g), 利用高速粉碎机粉碎为匀浆液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\ 500 \times \text{g}$, 离心 20 min, 取上清液。按照 BCA 试剂盒说明书进行蛋白定量并进行蛋白调平, 采用 Milliplex 蛋白芯片 Kit 对大鼠肝组织裂解液中的嗜酸性粒细胞趋化因子 (eotaxin)、趋化因子-10 (interferon-inducible protein-10, IP-10)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、调节活化正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, RANTES)、嗜中性趋化因子 (GRO/KC)、CX3CL1 趋化因子 (fractalkine)、脂多糖诱导的 cxc 趋化因子 (LIX)、巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α)、MIP-2、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、

白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-17A、IL-18、 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN γ) 和瘦素 (leptin) 等 27 种细胞因子进行检测与筛选。

易感细胞因子再评价 THP1 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 1640 培养液, 置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。取对数生长期的 THP1 细胞制成悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板, 实验前将 THP1 细胞先用 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMA 处理 72 h, 诱导其为巨噬细胞。EtZ 浓度取无毒剂量, IL-1 β ^[11]、IL-18^[12]和 EGF^[13]参考文献浓度设置 3 个剂量, 每孔加入 200 μL 不同质量浓度的药物溶液, 分别为 EtZ ($2.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-18 ($1/10/100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-18 ($1/10/100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-18 ($1/10/100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); EtZ ($2.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + EGF ($1/10/200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + EGF ($1/10/200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + EGF ($1/10/200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); EtZ ($2.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-1 β ($0.1/1/2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-1 β ($0.1/1/2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EtZ ($250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + IL-1 β ($0.1/1/2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); 对照组 EtZ ($2.5/25/250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), IL-18 ($1/10/100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), EGF ($1/10/200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), IL-1 β ($0.1/1/2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后收集细胞上清液, 采用 ELISA 方法检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量。

统计学分析

建模数据分析方法 运用 R3.2.4 软件, 数据中主要包括计量资料, 根据它们的分布特征选用恰当的检验方法。每个变量的具体分布特征见如下分析。组间差异比较采用 3 种方式及检验方法: ① 正态分布连续变量用均值 (标准差) 描述, 两组比较用 t 检验, 多组比较用方差分析 (ANOVA), 成组多重比较采用 Tukey HSD 检验法 (Tukey honestly significant differences testing); ② 非正态分布连续变量或等级 (有序) 变量用中位数 (下四分位数; 上四分位数) 描述, 组间比较用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验; 成组多重比较采用 Benjamini-Hochberg 检验法; ③ 如果无法确定连续变量是否正态分布, 则利用 Shapiro-Wilk 检验是否服从正态分布, 取显著水平为 0.01, 然后再根据 ① 和 ② 方法进行统计学检验; ④ 模型主要采用多元 Logistic 回归、分类树及随机森林、LASSO Logistics 回归法、规则发现算法与 LASSO 相结合的变量筛选方法^[14]。

再评价数据分析方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 剂量资料多组间比较采用单因素方差分

析 (one-way ANOVA), 两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

结果

1 ZGW+LPS 组各原始指标在肝损伤结局之间的差异

肝损伤动物的各指标以 ALT 高于 2 倍正常值为肝损伤, 取值为 1, 低于 2 倍正常值为未发生肝损伤, 取值为 0; 以是否肝损伤为结局变量, 对与肝损伤可能相关的肝细胞因子进行分析。在 ZGW+LPS 组中, 对各原始指标在肝损伤结局之间的差异, 采用“统计学分析”中的第①种方法进行统计学检验, 以均值 (标准差) 的形式表示, 结果见表 1。

用“统计学分析”中的第③种方法进行统计学

检验, 以均值 (标准差) 或中位数 (下四分位数, 上四分位数) 的形式表示, 结果见表 2。

在 ZGW+LPS 组中, 对各指标标度转换后在肝损伤结局之间的差异, 采用“统计学分析”中的第①种方法进行统计检验, 以均值 (标准差) 的形式表示, 结果见表 3。

采用“统计学分析”中的第③种方法进行统计学检验, 以均值 (标准差) 或中位数 (下四分位数, 上四分位数) 的形式表示, 结果见表 4。

2 结局间各指标差异的可视化分析

根据以上相关系数及结局间比较的检验结果, 利用散点图、叠加密度图和箱线图 (图 1~3), 对可能与肝损伤结局有较显著相关性的原始指标及标度转化后进行可视化分析。

Table 1 The comparison 1 of original indexes between liver injury groups. $\bar{x} \pm s$. 0 represent samples in the Zhuangguguanjie wan (ZGW)+lipopolysaccharide (LPS) group with alanine aminotransferase (ALT) activity less than 2 times when compared with that of the normal group. 1 represent samples in the ZGW+LPS group with ALT activity more than 2 times when compared with that of the normal group. IP-10: Interferon-inducible protein-10; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; RANTES: Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor; MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α ; MIP-2: Macrophage inflammatory protein-2; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; EGF: Epidermal growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; IL-1 α : Interleukin-1 α ; IFN γ : Interferon- γ

Cytokine	All ($n = 46$)	0 ($n = 31$)	1 ($n = 15$)	P
G-CSF	3.80 \pm 0.92	3.84 \pm 0.99	3.73 \pm 0.78	0.690
Eotaxin	74.65 \pm 8.37	75.16 \pm 9.53	73.60 \pm 5.35	0.484
Gm-CSF	136.37 \pm 61.95	137.14 \pm 70.52	134.79 \pm 40.90	0.888
IL-1 α	476.22 \pm 145.41	432.66 \pm 109.41	566.26 \pm 171.53	0.012
Leptin	1 677.78 \pm 185.85	1 665.48 \pm 210.94	1 703.20 \pm 121.05	0.447
MIP-1 α	59.48 \pm 23.88	52.85 \pm 15.94	73.18 \pm 31.46	0.030
IL-4	266.74 \pm 35.35	272.62 \pm 38.89	254.60 \pm 23.26	0.057
IL-1 β	827.16 \pm 125.76	793.65 \pm 110.99	896.43 \pm 129.66	0.014
IL-2	81.85 \pm 18.63	83.91 \pm 18.34	77.60 \pm 19.13	0.298
IL-6	4 252.76 \pm 664.50	4 259.48 \pm 707.13	4 238.87 \pm 589.49	0.918
EGF	1.31 \pm 0.34	1.31 \pm 0.35	1.32 \pm 0.32	0.917
IL-13	31.68 \pm 15.29	32.57 \pm 17.90	29.85 \pm 7.68	0.475
IL-10	168.95 \pm 22.26	168.41 \pm 25.68	170.08 \pm 13.33	0.773
IL-12p70	87.83 \pm 15.25	90.50 \pm 14.82	82.30 \pm 15.10	0.093
IFN γ	964.70 \pm 171.67	953.19 \pm 189.16	988.48 \pm 130.96	0.466
IL-5	68.19 \pm 23.49	63.49 \pm 19.28	77.89 \pm 28.77	0.094
IL-17A	40.61 \pm 10.07	41.20 \pm 10.46	39.39 \pm 9.43	0.560
IL-18	585.20 \pm 199.43	520.51 \pm 135.56	718.90 \pm 245.04	0.009
MCP-1	883.82 \pm 113.44	904.86 \pm 118.21	840.33 \pm 91.72	0.050
IP-10	845.94 \pm 198.89	796.40 \pm 178.11	948.32 \pm 206.17	0.022
GRO	228.54 \pm 22.60	228.89 \pm 25.56	227.83 \pm 15.53	0.863
VEGF	29.96 \pm 10.85	27.22 \pm 8.10	35.63 \pm 13.66	0.040
Fractalkine	68.88 \pm 10.47	69.55 \pm 10.92	67.50 \pm 9.68	0.524
LIX	215.41 \pm 30.44	214.73 \pm 35.56	216.80 \pm 16.28	0.788
MIP-2	110.35 \pm 55.37	108.96 \pm 64.17	113.24 \pm 31.91	0.764
TNF- α	8.56 \pm 1.70	8.67 \pm 1.84	8.33 \pm 1.39	0.493
RANTES	60.41 \pm 25.38	62.05 \pm 29.30	57.01 \pm 14.53	0.440

Table 2 The comparison 2 of original indexes between liver injury groups

Cytokine	All (n = 46)	0 (n = 31)	1 (n = 15)	P
G-CSF	3.80 ± 0.92	3.84 ± 0.99	3.73 ± 0.78	0.690
Eotaxin	74.65 ± 8.37	75.16 ± 9.53	73.60 ± 5.35	0.484
Gm-CSF	132.44 [94.35, 163.06]	125.09 [94.35, 163.06]	142.08 [99.50, 165.34]	0.787
IL-1α	476.22 ± 145.41	432.66 ± 109.41	566.26 ± 171.53	0.012
Leptin	1 677.78 ± 185.85	1 665.48 ± 210.94	1 703.20 ± 121.05	0.447
MIP-1α	56.61 [43.24, 62.14]	51.90 [41.67, 59.47]	60.50 [53.88, 95.25]	0.045
IL-4	262.99 [240.70, 282.90]	264.11 [249.87, 283.71]	248.14 [236.41, 270.53]	0.125
IL-1β	827.16 ± 125.76	793.65 ± 110.99	896.43 ± 129.66	0.014
IL-2	81.85 ± 18.63	83.91 ± 18.34	77.60 ± 19.13	0.298
IL-6	4 252.76 ± 664.50	4 259.48 ± 707.13	4 238.87 ± 589.49	0.918
EGF	1.25 [1.06, 1.48]	1.23 [1.04, 1.50]	1.31 [1.08, 1.48]	0.769
IL-13	29.45 [21.14, 35.44]	29.81 [20.04, 35.09]	29.10 [25.15, 35.44]	0.860
IL-10	165.24 [155.40, 177.63]	162.93 [149.77, 176.37]	174.38 [160.21, 178.66]	0.303
IL-12p70	87.83 ± 15.25	90.50 ± 14.82	82.30 ± 15.10	0.093
IFNγ	964.70 ± 171.67	953.19 ± 189.16	988.48 ± 130.96	0.466
IL-5	61.19 [50.90, 84.69]	58.02 [49.41, 81.03]	68.48 [58.02, 96.00]	0.096
IL-17A	40.61 ± 10.07	41.20 ± 10.46	39.39 ± 9.43	0.560
IL-18	558.12 [451.27, 645.14]	527.92 [427.64, 598.77]	675.68 [538.09, 827.51]	0.005
MCP-1	883.82 ± 113.44	904.86 ± 118.21	840.33 ± 91.72	0.050
IP-10	845.94 ± 198.89	796.40 ± 178.11	948.32 ± 206.17	0.022
GRO	228.54 ± 22.60	228.89 ± 25.56	227.83 ± 15.53	0.863
VEGF	29.96 ± 10.85	27.22 ± 8.10	35.63 ± 13.66	0.040
Fractalkine	68.88 ± 10.47	69.55 ± 10.92	67.50 ± 9.68	0.524
LIX	215.16 [192.95, 230.50]	209.36 [190.94, 232.45]	218.92 [208.00, 227.35]	0.439
MIP-2	95.66 [80.64, 123.86]	92.16 [74.14, 108.25]	123.24 [87.78, 127.29]	0.103
TNF-α	8.56 ± 1.70	8.67 ± 1.84	8.33 ± 1.39	0.493
RANTES	54.91 [44.65, 68.87]	54.73 [43.99, 69.34]	55.08 [47.25, 65.19]	0.991

Table 3 The comparison 1 of converted data between liver injury groups. $\bar{x} \pm s$

Cytokine	All (n = 46)	0 (n = 31)	1 (n = 15)	P	Cytokine	All (n = 46)	0 (n = 31)	1 (n = 15)	P
G-CSF	0.96 ± 0.23	0.97 ± 0.25	0.94 ± 0.20	0.690	IFNγ	0.97 ± 0.17	0.96 ± 0.19	1.00 ± 0.13	0.466
Eotaxin	0.98 ± 0.11	0.99 ± 0.13	0.97 ± 0.07	0.484	IL-5	0.94 ± 0.32	0.87 ± 0.26	1.07 ± 0.40	0.094
Gm-CSF	0.90 ± 0.41	0.91 ± 0.47	0.89 ± 0.27	0.888	IL-17A	0.96 ± 0.24	0.97 ± 0.25	0.93 ± 0.22	0.560
IL-1α	0.95 ± 0.29	0.86 ± 0.22	1.13 ± 0.34	0.012	IL-18	0.94 ± 0.32	0.83 ± 0.22	1.15 ± 0.39	0.009
Leptin	0.98 ± 0.11	0.98 ± 0.12	1.00 ± 0.07	0.447	MCP-1	0.98 ± 0.13	1.00 ± 0.13	0.93 ± 0.10	0.050
MIP-1α	0.92 ± 0.37	0.82 ± 0.25	1.13 ± 0.49	0.030	IP-10	0.96 ± 0.23	0.91 ± 0.20	1.08 ± 0.23	0.022
IL-4	0.98 ± 0.13	1.00 ± 0.14	0.94 ± 0.09	0.057	GRO	0.98 ± 0.10	0.99 ± 0.11	0.98 ± 0.07	0.863
IL-1β	0.98 ± 0.15	0.94 ± 0.13	1.06 ± 0.15	0.014	VEGF	0.93 ± 0.34	0.85 ± 0.25	1.11 ± 0.42	0.040
IL-2	0.96 ± 0.22	0.99 ± 0.22	0.91 ± 0.23	0.298	Fractalkine	0.98 ± 0.15	0.99 ± 0.16	0.96 ± 0.14	0.524
IL-6	0.98 ± 0.15	0.98 ± 0.16	0.97 ± 0.14	0.918	LIX	0.98 ± 0.14	0.98 ± 0.16	0.99 ± 0.07	0.788
EGF	0.96 ± 0.25	0.96 ± 0.26	0.96 ± 0.24	0.917	MIP-2	0.89 ± 0.44	0.87 ± 0.52	0.91 ± 0.26	0.764
IL-13	0.89 ± 0.43	0.92 ± 0.50	0.84 ± 0.22	0.475	TNF-α	0.97 ± 0.19	0.98 ± 0.21	0.94 ± 0.16	0.493
IL-10	0.98 ± 0.13	0.98 ± 0.15	0.99 ± 0.08	0.773	RANTES	0.91 ± 0.38	0.94 ± 0.44	0.86 ± 0.22	0.440
IL-12p70	0.97 ± 0.17	1.00 ± 0.16	0.91 ± 0.17	0.093					

3 细胞因子筛选

3.1 Logistic 回归法 假定一组协变量 X, 对 $p(X) = P(Y = 1|X)$ 进行建模, 利用链接函数 Logit, 即 $\log \frac{p(X)}{1-p(X)} = \frac{P(Y=1|X)}{1-P(Y=1|X)}$, 以最大似然估计来拟合

此模型, 通过简单变换, $\frac{p(X)}{1-p(X)} = e^{b_0+b_1X}$ 称其为优势 (odds), 且进一步由 $\log(\frac{p(X)}{1-p(X)}) = b_0 + b_1X$, 其中 $p(X) = P(Y = 1|X) = \frac{e^{b_0+b_1X}}{1+e^{b_0+b_1X}}$ 则获得 Logistic 回归方

$$\text{程: } \log \frac{p(X)}{1-p(X)} = b_0 + b_1 X。$$

以是否肝损伤为结局, 27 种肝脏细胞因子为预

测变量或影响因素。利用标度转换后的各指标数据进行 Logistic 回归模型分析。设定显著水平为 0.2, 则单因素分析结果显示, 系数不为 0 的 Wald 检验 *P* 值小

Table 4 The comparison 2 of converted data between liver injury groups

Cytokine	All (n = 46)	0 (n = 31)	1 (n = 15)	<i>P</i>
G-CSF	0.96 ± 0.23	0.97 ± 0.25	0.94 ± 0.20	0.690
Eotaxin	0.98 ± 0.11	0.99 ± 0.13	0.97 ± 0.07	0.484
Gm-CSF	0.88 [0.62, 1.08]	0.83 [0.62, 1.08]	0.94 [0.66, 1.09]	0.787
IL-1α	0.95 ± 0.29	0.86 ± 0.22	1.13 ± 0.34	0.012
Leptin	0.98 ± 0.11	0.98 ± 0.12	1.00 ± 0.07	0.447
MIP-1α	0.87 [0.67, 0.96]	0.80 [0.64, 0.92]	0.93 [0.83, 1.47]	0.045
IL-4	0.97 [0.88, 1.04]	0.97 [0.92, 1.04]	0.91 [0.87, 0.99]	0.125
IL-1β	0.98 ± 0.15	0.94 ± 0.13	1.06 ± 0.15	0.014
IL-2	0.96 ± 0.22	0.99 ± 0.22	0.91 ± 0.23	0.298
IL-6	0.98 ± 0.15	0.98 ± 0.16	0.97 ± 0.14	0.918
EGF	0.91 [0.77, 1.08]	0.90 [0.76, 1.09]	0.95 [0.79, 1.08]	0.769
IL-13	0.83 [0.60, 1.00]	0.84 [0.56, 0.99]	0.82 [0.71, 1.00]	0.860
IL-10	0.96 [0.90, 1.03]	0.95 [0.87, 1.02]	1.01 [0.93, 1.04]	0.303
IL-12p70	0.97 ± 0.17	1.00 ± 0.16	0.91 ± 0.17	0.093
IFNγ	0.97 ± 0.17	0.96 ± 0.19	1.00 ± 0.13	0.466
IL-5	0.84 [0.70, 1.16]	0.80 [0.68, 1.11]	0.94 [0.80, 1.32]	0.096
IL-17A	0.96 ± 0.24	0.97 ± 0.25	0.93 ± 0.22	0.560
IL-18	0.89 [0.72, 1.03]	0.85 [0.68, 0.96]	1.08 [0.86, 1.33]	0.005
MCP-1	0.98 ± 0.13	1.00 ± 0.13	0.93 ± 0.10	0.050
IP-10	0.96 ± 0.23	0.91 ± 0.20	1.08 ± 0.23	0.022
GRO	0.98 ± 0.10	0.99 ± 0.11	0.98 ± 0.07	0.863
VEGF	0.93 ± 0.34	0.85 ± 0.25	1.11 ± 0.42	0.040
Fractalkine	0.98 ± 0.15	0.99 ± 0.16	0.96 ± 0.14	0.524
LIX	0.98 [0.88, 1.05]	0.95 [0.87, 1.06]	1.00 [0.95, 1.03]	0.439
MIP-2	0.77 [0.65, 0.99]	0.74 [0.60, 0.87]	0.99 [0.70, 1.02]	0.103
TNF-α	0.97 ± 0.19	0.98 ± 0.21	0.94 ± 0.16	0.493
RANTES	0.83 [0.68, 1.04]	0.83 [0.67, 1.05]	0.83 [0.71, 0.99]	0.991

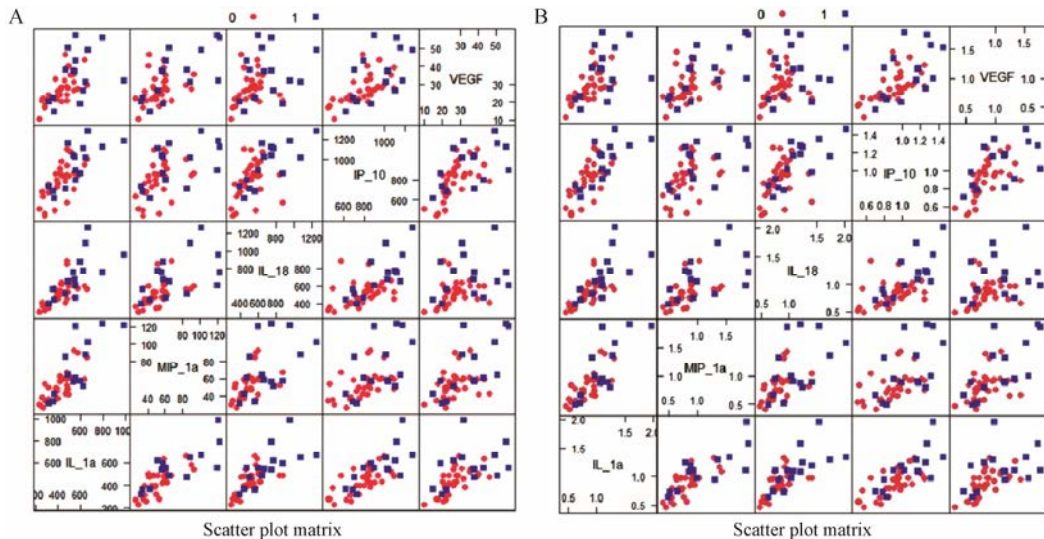


Figure 1 Scatter plot of significant correlation cytokines from raw data without (A) or with (B) conversion. The red dots represent samples in the ZGW+LPS group with ALT activity less than 2 times when compared with that of the normal group. The blue square represent samples in the ZGW+LPS group with ALT activity more than 2 times when compared with that of the normal group

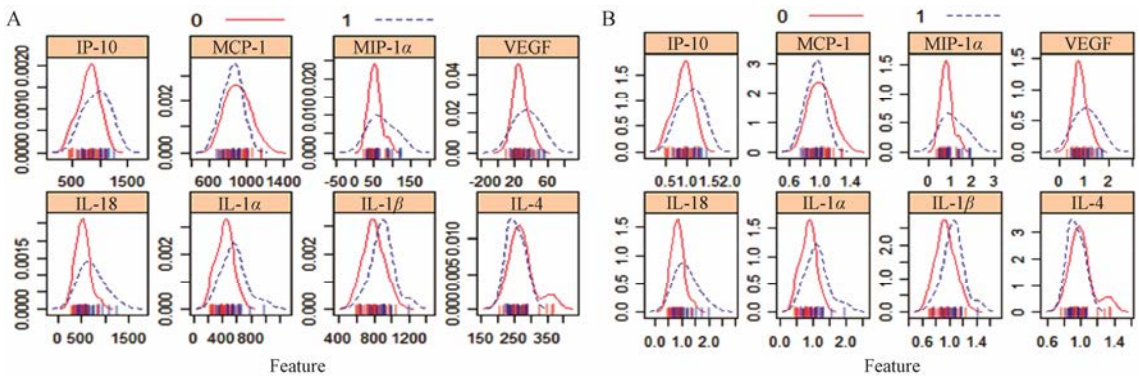


Figure 2 Overlap density map of significant correlation cytokines from raw data without (A) or with (B) conversion. Red solid line represent samples in the ZGW+LPS group with ALT activity less than 2 times when compared with that of the normal group. Blue dotted line represent samples in the ZGW+LPS group with ALT activity more than 2 times when compared with that of the normal group

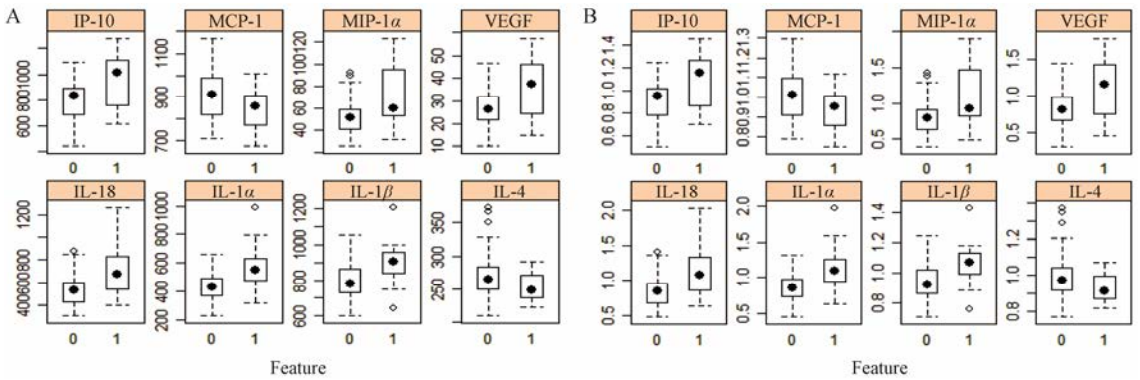


Figure 3 Box chart of significant correlation cytokines from raw data without (A) or with (B) conversion

于 0.2 的指标如下: IL-1 α 、MIP-1 α 、IL-4、IL-1 β 、IL-2、IL-12p70、IL-18、MCP-1、IP-10 和 VEGF。然后再放入多因素 Logistic 回归模型中,采用逐步回归法,根据 AIC 评分准则,选择最优模型筛选易感细胞因子,结果见表 5。

3.2 分类树及随机森林法 采用分类树模型对此数据进行分析,从各肝细胞因子中推理出合理树结构的表示形式。随机森林是利用 bootstrap 方法,在分类树模型的基础上,同时不断随机抽取样本,以构建新的树,构造一定数量的分类树后,将得到的多棵树组合,对模型进行综合评价的方法,它能够大大提高预测精度。本数据采用随机森林的方法对变量进行建模。以是否肝损伤为结局,27 种肝脏细胞因子为预测变量或影响因素。将数据随机分为训练集和测试集,比例为 8 : 2,训练集中的数据用来建立模型,测试集的数据用来检验预测效果,对训练集重复抽样 10-折交叉验证,选出最优模型和重要变量。随机森林选取算法特征重要性的排序结果见图 4。

3.3 LASSO Logistics 的变量选择法 对 27 种肝脏细胞因子与肝损伤的关系进行分析,主要应用带 LASSO 惩罚的 Logistics 回归模型。此处也对原始指

标进行标度转换,采用重复抽样 10-折交叉验证技术筛选并构建模型。筛选出具有主效应的指标变量及其系数估计,结果见表 6。

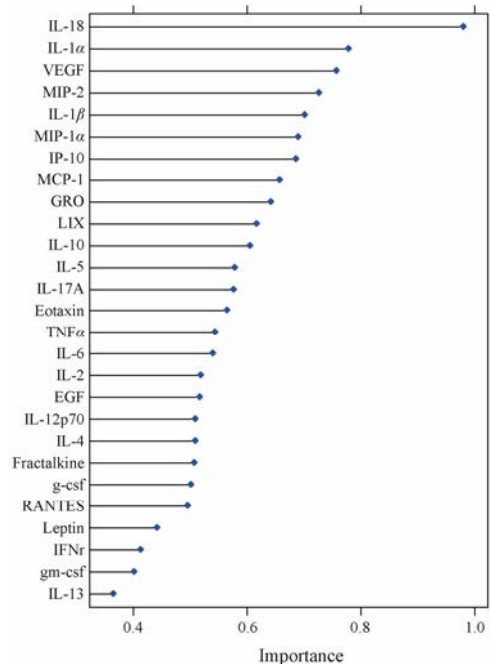


Figure 4 The importance of 27 cytokines for liver injury

Table 5 Optimal model by Logistic regression method

Variable	<i>n</i>	Beta (SE)	95% CI for Beta	OR	95% CI for OR	<i>P</i>
Intercept	37	8.01 (6.05)	-3.85, 19.86	-	-	0.186
IL-12p70		-8.77 (4.44)	-17.46, -0.07	0.00	0.00, 0.93	0.048
IL-18		3.24 (2.04)	-0.76, 7.23	25.45	0.47, 1 385.85	0.113
MCP-1		-8.53 (6.84)	-21.95, 4.88	0.00	0.00, 131.30	0.212
VEGF		4.95 (2.43)	0.18, 9.71	140.67	1.20, 16 495.72	0.042

Table 6 The variable and coefficient estimation of the main effective indexes

Main effect indicator	Main effect coefficient estimation
IL-12p70	-1.510
IL-18	1.978
VEGF	3.647
G-CSF	4.266
GRO	47.612
IL-1 α	3.527
MIP-1 α	-4.394
EGF	-4.424
IL-1 β	22.279
MCP-1	16.233
RANTES	8.882

3.4 规则发现算法与 LASSO 相结合变量筛选 利用随机森林的规则发现优势与 LASSO 的变量筛选优势相结合的模型对此数据进行规则发现和变量筛

选^[14], 结果见表 7。由表中可以清晰看到, 规则 1 中的系数为正值最大值 (0.863 1), 贡献度最高。

4 易感细胞因子再评价

与空白对照组相比, 单独给予 EtZ 和 IL-1 β 对 TNF- α 含量无明显影响; 与 EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (0.1/1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 TNF- α 含量; 与 IL-1 β (0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 TNF- α 含量; 与 IL-1 β (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5/25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均可显著增加 TNF- α 含量。结果见图 5A。

与空白对照组相比, 单独给予 EtZ 和 IL-1 β 对 IL-6 含量无明显影响; 与 EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (0.1/1/2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均可显著增加 IL-6 含量; 与 EtZ (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ

Table 7 Regular discovery and variable screening table of the data analyzed by combined model between random forest and LASSO methods

Rule	Variable	Range	Support	Coeff	Importance	
Rule 1	3	IL-1 β :	834.3 - 0.990 0E+36	0.255 8	0.863 1	74.86
		EGF:	0.9700 - 0.990 0E+36			
		IL-18:	604.3 - 0.990 0E+36			
Rule 2	3	MIP-1 α :	34.27 - 97.40	0.488 4	-1.006	100.0
		IL-4:	239.7 - 0.990 0E+36			
		IFN γ :	-0.990 0E+36 - 1174			
Rule 3	3	IL-18:	-0.990 0E+36 - 640.6	0.465 1	-0.967 2	95.90
		GRO:	-0.990 0E+36 - 250.4			
		TNF α :	6.770 - 0.990 0E+36			
Rule 4	3	IL-1 α :	-0.990 0E+36 - 485.7	0.465 1	-0.558 9	55.41
		MIP-1 α :	34.59 - 0.990 0E+36			
		EGF:	0.930 0 - 0.990 0E+36			
Rule 5	2	IL-1 α :	-0.990 0E+36 - 543.9	0.651 2	-0.309 8	29.35
		EGF:	0.930 0 - 0.990 0E+36			
Rule 6	2	IL-18:	-0.990 0E+36 - 640.6	0.627 9	-0.212 8	20.45
		TNF- α :	6.770 - 0.990 0E+36			
Rule 7	2	IL-1 β :	-0.990 0E+36 - 990.1	0.534 9	-0.164 1	16.27
		VEGF:	20.12 - 36.41			
Rule 8	1	LIX:	210.0 - 231.0	0.325 6	0.769 2E-01	7.165
Rule 9	3	IL-18:	-0.990 0E+36 - 640.6	0.465 1	-0.352 4E-01	3.494
		GRO:	-0.990 0E+36 - 250.4			
		TNF- α :	6.770 - 0.990 0E+36			
Rule 10	1	Leptin:	1 523 - 1 802	0.604 7	0.139 1E-01	1.352

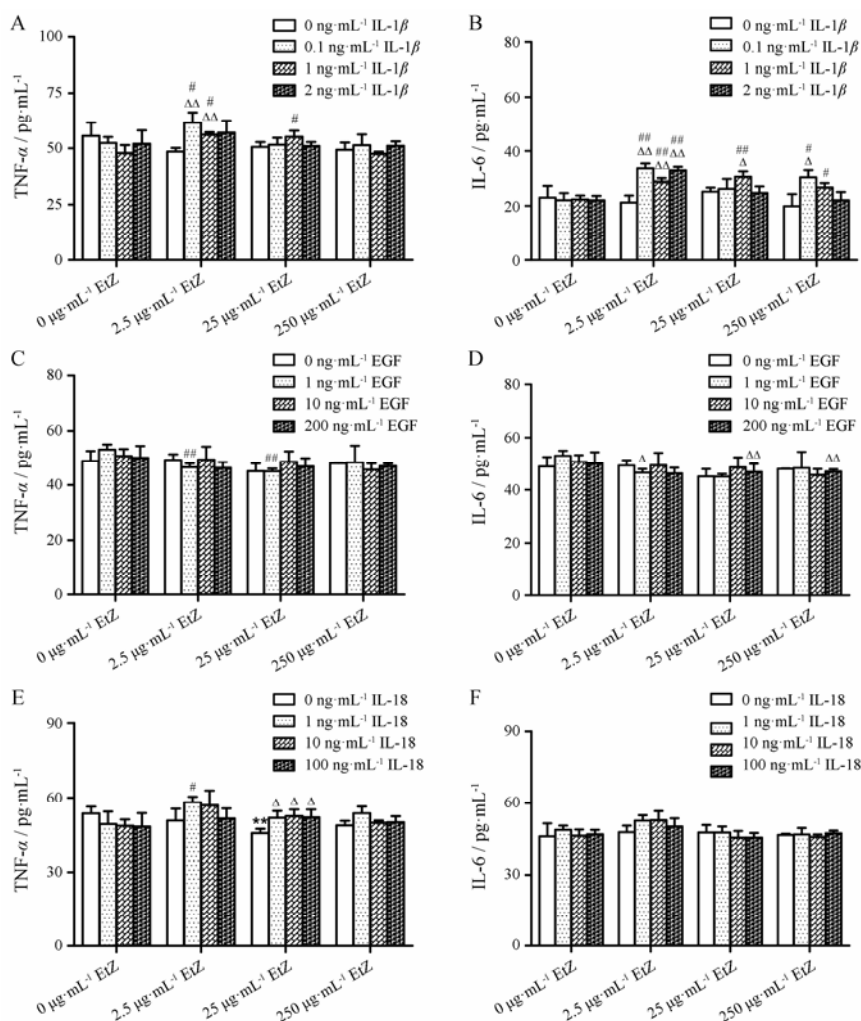


Figure 5 Influence of co-treatment with EtZ and IL-1 β , EGF, IL-18 on TNF- α and IL-6 in the THP1 macrophages. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs EtZ (2.5/25/250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EtZ); # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs cytokines (IL-1 β , EGF, IL-18). A, C and E represent the contents of TNF- α after different treatment with EtZ and IL-1 β , EGF, IL-18; B, D and F represent the contents of IL-6 after different treatment with EtZ and IL-1 β , EGF, IL-18

(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+IL-1 β (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 IL-6 含量; 与 EtZ (250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+IL-1 β (0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 IL-6 含量; 与 IL-1 β (0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5/250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 IL-6 含量; 与 IL-1 β (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5/25/250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-1 β (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 均可显著增加 IL-6 含量; 与 IL-1 β (2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+IL-1 β (2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 IL-6 含量。结果见图 5B。

与空白对照组相比, 单独给予 EtZ 和 EGF 对 TNF- α 含量无明显影响; 与 EtZ 相比, EtZ+EGF 对 TNF- α 含量无明显影响; 与 EGF (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5/25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+EGF (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 TNF- α 含量。结果见图 5C。

与空白对照组相比, 单独给予 EtZ 和 EGF 对 IL-6

含量无明显影响; 与 EtZ 相比, EtZ+EGF 对 IL-6 含量无明显影响; 与 EGF (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + EGF (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著降低 IL-6 含量; 与 EGF (200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (25/250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + EGF (200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著降低 IL-6 含量。结果见图 5D。

与空白对照组相比, 单独给予 IL-18 对 TNF- α 含量无明显影响, 单独给予 EtZ (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著降低 TNF- α 含量; 与 EtZ (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + IL-18 (1/10/100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 TNF- α 含量; 与 IL-18 (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, EtZ (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+IL-18 (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可显著增加 TNF- α 含量。结果见图 5E。

与空白对照组比, 单独给予 EtZ 和 IL-18 对 IL-6 含量无明显影响; 与 EtZ/IL-18 相比, EtZ+IL-18 对 IL-6

含量无明显影响。结果见图 5F。

讨论

药物肝损伤包括固有型和特异质肝损伤两类^[15, 16], 而药物特异质肝损伤又分免疫特异质和代谢特异质两种类型, 前者与机体的免疫应激状态有关^[17, 18]。诸多研究表明免疫细胞分泌的细胞因子在免疫性肝损伤过程中发挥重要作用。IL-1 β 由单核巨噬细胞分泌的促炎细胞因子, 是 IL-1 的主要分泌形式, 与肝纤维化密切相关^[19]。IL-2 由 CD4+T (Th1) 细胞分泌, 是免疫调节网络中的核心物质, 其在重型肝炎患者血清中的水平显著下降^[20]; IL-6 即是免疫调节因子, 又是炎症介质, 参与炎症反应过程, 其在慢性肝病和重型肝炎患者血清中处于高活性状态^[21]; IL-10 是由 Th2 细胞分泌, 是重要的抗炎细胞因子和免疫抑制因子, 其水平在慢性肝炎患者的肝纤维化程度中随之降低; IL-18 由活化的巨噬细胞、B 细胞、Th1 细胞和 NK 细胞等多种细胞产生的一种细胞因子^[22], 可刺激和促进外周单核细胞产生 IFN γ 、IL-2、G-CSF 和 GM-CSF 等细胞因子, 促进 T 细胞和 NK 细胞增殖, 并诱导 Th1 细胞分化成熟, 促进炎症的发展; G-CSF 可抑制 IL-1 β 、IL-12、IFN γ 、IL-18 及 TNF- α 的产生和分泌, 在体内具有较强的抗炎、抑制免疫效应^[23], 健康人体内 G-CSF 可动员树突状淋巴系细胞 (DC2), 进而促进 T 细胞产生 IL-4 和 IL-10, 并促进血清肝细胞生长因子水平升高, 在自身免疫性肝病中有重要的调节作用。

本研究利用 R3.2.4 中软件包 CompareGroups、AppliedPredictiveModeling^[24]、caret、glimnet 和 RuleFit 等对所得数据进行分析与模型构建。利用 Logistics 回归构建筛选模型, 其模型简单且解释性较好^[25], 但只能考虑较少的变量, 且假定结局变量与预测变量之间是线性关系。进而采用分类树构建预测模型, 分类树算法对于数据假设很少, 适用面广泛, 且模型的结果非常适合用于解释变量之间的关系, 是一种常见且有效的非线性关系模型, 计算量相对较小且易解释。但此模型易过度拟合且只有随机单棵树, 缺乏伸缩性, 难于处理大数据集, 即使改进算法也降低了分类的准确性。而随机森林是一个包含多个分类树的模型^[26], 其预测结果是由单棵树输出类别的众数而定, 它是利用 bootstrap 方法, 在分类树模型的基础上, 不断随机抽取样本, 以构建新的树, 构造一定数量的分类树后, 将得到的多棵树组合, 对模型进行综合评价的方法, 能够大大提高筛选精度。而且,

随机森林适合做多分类问题, 训练和预测速度快, 能有效估计缺失值, 有效处理大数据集, 在不做特征选择的情况下处理高维数据, 识别指标之间的相互影响及重要性程度, 还不易过度拟合。但此模型已经被证明在某些噪音较大的分类或回归问题上会过度拟合, 对于有多个不同取值的指标数据, 取值划分较多的指标会对随机森林产生更大的影响。因此, 根据 27 种指标的不同范围的取值, 利用随机森林先作为指标范围组合的发现算法, 对这些指标范围进行彻底搜索候选组合, 对其形成的有可能是多余且可能与结局变量不相关的组合 (即所谓的过拟合问题), 再利用 LASSO (稀疏) 回归等变量选择方法选择最小风险组合集, 最后使用筛选的重要指标组合作为变量。

以是否肝损伤为结局, 27 种细胞因子为变量或影响因素。直接利用标度转换后的各指标数据进行 Logistic 回归模型分析。设定显著水平为 0.2, 先进行单因素分析, 纳入系数 Wald 检验 P 值小于 0.2 的指标放入多因素 Logistic 回归模型中, 采用逐步回归法, 根据 AIC 评分准则, 选择最优模型的系数估计结果如表 5。利用 10-折交叉验证法, 筛选出最优随机森林模型, 根据各指标对模型 Gini 系数整体改善的贡献, 每个指标对肝损伤的重要程度如图 4 所示, 可看出 IL-18、IL-1 α 、VEGF、MIP-2、IL-1 β 、IL-10 和 MIP-1 α 对是否肝损伤具有很强的相关性。最后, 采用随机森林与 LASSO 相结合的模型对此数据进行变量筛选, 筛选出的易感细胞因子规则见表 7, 根据系数 $\text{coeff} = 0.8631 > 0$ 和 $\text{importance} = 74.86$, 可认为此项指标取值组合是 ZGW 特异质肝损伤的易感细胞因子组合: IL-1 β > 834.3、EGF > 0.9700 和 IL-18 > 604.3。

TNF- α 和 IL-6 合为机体的正性致炎因子, 使细胞发生趋化运动, 激活中性粒细胞释放弹性蛋白, 生成活性氧代谢物及引起组织浸润反应。已有研究表明, TNF- α 和 IL-6 在一定程度上可以反映肝损伤的程度^[27]。本研究在 THP1 细胞水平上针对上述方法筛选得到的 IL-1 β 、EGF 和 IL-18 细胞因子进行再评价, 联合 3 种细胞因子和 ZGW 的醇提物 (EtZ) 给予 THP1 细胞, 检测其细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量。结果发现, EtZ 联合 IL-1 β 或 IL-18 协同增强 THP1 细胞 TNF- α 分泌, EtZ 联合 IL-1 β 协同增强 THP1 细胞 IL-6 的分泌, 但 EtZ 联合 EGF 协同抑制 THP1 细胞 IL-6 的分泌, 说明运用上述筛选与 ZGW 特异质肝损伤相关细胞因子的方法可靠, 筛选出的相关易感细胞因子 (IL-1 β 和 IL-18) 可信, 可作为 ZGW 特异质肝损伤风险评估及合理用药的参考指标。

References

- [1] Amacher DE. The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8: 335–347.
- [2] Zhang X, Liu F, Chen X, et al. Involvement of the immune system in idiosyncratic drug reactions [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26: 47–59.
- [3] Wang JB, Cui HR, Bai ZF, et al. Precision medicine-oriented safety assessment strategy for traditional Chinese medicines: disease-syndrome-based toxicology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1681–1688.
- [4] Wang JB, Li CY, Zhu Y, et al. Integrated evidence chain-based identification of Chinese herbal medicine-induced hepatotoxicity and rational usage: exemplification by *Polygonum multiflorum* (He shou wu) [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2016, 61: 971–980.
- [5] He LZ, Meng YK, Zhang ZF, et al. Protective effect of Liuweiwuling tablets on idiosyncratic liver injury induced by *Polygonum multiflorum* in rats based on immunomodulation [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs (中草药)*, 2017, 48: 136–142.
- [6] Li CY, Li XF, Tu C, et al. The idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* based on endotoxin model [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 28–33.
- [7] Tang JF, Wang XY, Wen Q, et al. Idiosyncratic hepatotoxicity evaluation of Zhuangguguanjie wan mediated by immune stress [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 1033–1040.
- [8] Hei CC, Ma NF, Wang YR. The effect of Th1/Th2 cytokines on the mice with autoimmune acute liver injury [J]. *J Histochem Cytochem (中国组织化学与细胞化学杂志)*, 2011, 20: 634–641.
- [9] Li J, Wang XF. Liver-targeted expression of chemokine CXCL10 inhibits Con A-induced liver injury [J]. *Chin J Immun (中国免疫学杂志)*, 2017, 33: 828–832.
- [10] Xu JL, Zhang YC, Sheng GG, et al. Effect of Haizhu Yigan Jiawei formula on cell factor in immunity hepatic injury mice [J]. *Chin J Integrat Tradit Western Med Liver Dis (中西医结合肝病杂志)*, 2017, 27: 168–169.
- [11] Sahni A, Guo M, Sahni SK, et al. Interleukin-1 β but not IL-1 α binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form [J]. *Blood*, 2004, 104: 409–414.
- [12] Valente AJ, Yoshida T, Izadpanah R, et al. Interleukin-18 enhances IL-18R/Nox1 binding, and mediates TRAF3IP2-dependent smooth muscle cell migration. Inhibition by simvastatin [J]. *Cell Signal*, 2013, 25: 1447–1456.
- [13] Xu Z, Zhang Y, Jiang J, et al. Epidermal growth factor induces HCCR expression via PI3K/Akt/mTOR signaling in PANC-1 pancreatic cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 161.
- [14] Friedman JH, Popescu BE. Predictive learning via rule ensembles [J]. *Ann Appl Stat*, 2008, 2: 916–954.
- [15] Zhang SY, Zhu XG, Zhang GP, et al. Study on acute and chronic toxicities of *Polygonum litiflori* Radix praeparata extracts [J]. *J Toxicol (毒理学杂志)*, 2013, 27: 261–264.
- [16] Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity [J]. *New Engl J Med*, 2006, 354: 731–739.
- [17] Tailor A, Faulkner L, Naisbitt DJ, et al. The chemical, genetic and immunological basis of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34: 1310–1317.
- [18] Woodhead JL, Watkins PB, Howell BA, et al. The role of quantitative systems pharmacology modeling in the prediction and explanation of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 32: 40–45.
- [19] Kamari Y, Shaish A, Vax E, et al. Lack of Interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice [J]. *J Hepatol*, 2011, 55: 1086–1094.
- [20] Wang M, Shi Q, Zhang R, et al. Herbal compound “Jiedu Huayu” reduces liver injury in rats via regulation of IL-2, TLR4, and PCNA expression levels [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 9819350.
- [21] Zhao D, Wu T, Yi D, et al. Dietary supplementation with *Lactobacillus casei* alleviates lipopolysaccharide-induced liver injury in a porcine model [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2535.
- [22] Denton AE, Doherty PC, Turner SJ, et al. IL-18, but not IL-12, is required for optimal cytokine production by influenza virus-specific CD8 $^{+}$ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 368–375.
- [23] Rutella S, Zavala F, Danese S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance [J]. *J Immunol*, 2005, 175: 7085–7091.
- [24] Kuhn M, Johnson K. *Applied Predictive Modeling* [M]. New York: Springer, 2013: 27–35.
- [25] Hyndman RJ, Athanasopoulos G. *Forecasting: Principles and Practice* [M]. London: Bowker-Saur, 2014: 1–10.
- [26] Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package [J]. *J Stat Softw*, 2008, 28: 1–26.
- [27] Yeo W, Mo FKF, Chan SL, et al. Hepatitis B viral load predicts survival of HCC patients undergoing systemic chemotherapy [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 1382–1389.