

基于相关可视化的壮骨关节丸特异质肝损伤与27种细胞因子的相关性分析

唐进法¹, 王晓艳^{1#}, 李伟霞¹, 李宇辉², 王伽伯³, 柏兆方³, 肖小河^{3,4*}, 杨伟^{5,6*}

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450008

3. 解放军第三〇二医院 全军中医药研究所, 北京 100039

4. 解放军第三〇二医院 中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039

5. 中国中医科学院 中医临床基础医学院研究所, 北京 100700

6. 中央民族大学理学院, 北京 100081

摘要:目的 采用相关可视化的方法, 探讨壮骨关节丸(Zhuangguguanjie Wan, ZGW)特异质肝损伤指标丙氨酸转氨酶(ALT)与27种细胞因子的相关性。方法 SD大鼠禁食12 h后, ig给予ZGW 3.8 g/kg, 2 h后尾iv 2.8 mg/kg的脂多糖(LPS), 给予LPS 10 h后水合氯醛麻醉大鼠, 下腔静脉取血, 采集肝组织样本。检测血清中ALT活力及肝脏组织27种细胞因子水平。R 3.2.4软件分析ALT与27种细胞因子及27种细胞因子之间的相关性。结果 ALT与巨噬细胞炎症蛋白1 α (MIP-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)之间具有较强的正相关性, 白细胞介素-18(IL-18)、趋化因子-10(IP-10)、IL-1 α 和IL-1 β 之间具有很强的相关性, 嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)或调节活化正常T细胞表达和分泌的趋化因子(RANTES)各自具有独立性。结论 ZGW特异质肝损伤与MIP-1 α 和VEGF之间具有较强的正相关性, 为ZGW临床安全用药及风险防控提供新的实验证据。

关键词: 壮骨关节丸; 特异质肝损伤; 细胞因子; 相关可视化; 相关性分析; 丙氨酸转氨酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)07-1624-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.021

Correlation analysis on idiosyncratic hepatotoxicity of Zhuangguguanjie Wan and 27 cytokines based on related visualization

TANG Jin-fa¹, WANG Xiao-yan¹, LI Wei-xia¹, LI Yu-hui², WANG Jia-bo³, BAI Zhao-fang³, XIAO Xiao-he^{3,4*}, YANG Wei^{5,6}

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

3. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

4. Integrative Medicine Center, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

5. Institute of Basic Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

6. College of Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To analyze the correlation of idiosyncratic hepatotoxicity of Zhuangguguanjie Wan (ZGW) with 27 cytokines.

Methods After 12 h fasting, SD rats were ig with ZGW at a single dose of 3.8 g/kg, and injected with lipopolysaccharide (LPS) at a dosage of 2.8 mg/kg via tail vein after 2 h. The rats were anesthetized with chloral hydrate after 10 h LPS administration, and then the blood samples were collected from the inferior vena cava and liver tissue was also obtained. Alanine aminotransferase (ALT) activity in serum and levels of 27 cytokines in liver tissue were tested. Correlation analysis of ALT and cytokines were performed using R 3.2.4

收稿日期: 2017-11-15

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(81630100); 国家自然科学基金委青年科学基金资助项目(81502898)

作者简介: 唐进法(1974—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为临床中药学研究。Tel: (0371)66233562 E-mail: a0519@163.com

*通信作者 肖小河(1963—), 男, 博士, 博士生导师, 研究员, 研究方向为临床中药学研究。Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com
杨伟(1980—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为大规模观察性数据分析方法及因果推断研究。

Tel: (010)64093242 E-mail: yangxq@ruc.edu.cn

#并列第一作者 王晓艳(1988—), 女, 博士, 主管药师, 研究方向为中药药理学研究。Tel: (0371)66233562 E-mail: xiaoyan_wang1988@126.com

software. **Results** Correlation analysis showed that there was a high positive correlation between ALT and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) or vascular endothelial growth factor (VEGF). There was a strong correlation among interleukin-18 (IL-18), interferon-inducible protein-10 (IP-10), interleukin-1 α (IL-1 α), and interleukin-1 β (IL-1 β). However, eotaxin regulated upon activation of normal T cell expression and secreted factor (RANTES), which has their own independence. **Conclusion** Idiosyncratic liver injury induced by ZGW has a strong positive correlation with MIP-1 α and VEGF, which provides a new experimental evidence for clinical medication safety and risk prevention of ZGW.

Key words: Zhuangguguanjie Wan; idiosyncratic hepatotoxicity; cytokine; related visualization; correlation analysis; alanine aminotransferase

药物肝毒性是肝损伤和肝功能失常的常见病因,是药物从市场上撤出的主要原因之一^[1],已经有 900 多种药物被报道会引起肝毒性^[2],而药物的肝毒性可分为固有肝毒性和特异质肝毒性。随着中药在国际上的广泛使用、我国药品不良反应监测体系的不断完善以及民众对药品不良反应关注度的大幅提高,近年来中药不良反应报道呈显著增多之势^[3],特别是传统无毒中药的肝毒性问题屡有报道,引起人们对中药安全性的严重担忧。中国食品药品不良反应监测中心分别于 2001、2008 年通报了壮骨关节丸(Zhuangguguanjie Wan, ZGW)致肝损伤现象,ZGW^[4]由熟地、补骨脂、淫羊藿、鸡血藤、独活、续断、狗脊、骨碎补、桑寄生、木香、乳香、没药共 12 味中药组成,从处方分析来看,增强免疫的补肝肾药占 2/3,而抑制免疫的祛风湿、活血药较少,提示促进免疫的补肝肾药对于免疫异常活化的人群,可能会增加其肝损伤的风险。

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^[5-6],利用脂多糖(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^[7-8],并初步表明 ZGW 在机体免疫活化状态下,可促进 T 淋巴细胞募集至肝脏,导致细胞因子的过度表达和过度炎症反应,从而诱发药物特异质肝损伤^[9]。近年来研究^[10]发现细胞因子与肝损伤的发生、发展有密切关系,但是否与特异质肝损伤存在确切的相关性少有报道。本实验旨在寻找 ZGW 所致的特异质肝损伤与 27 种细胞因子的相关性,以期对 ZGW 的风险评估和合理用药提供新的思路 and 理论支撑。

1 材料

1.1 动物

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

1.2 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, Sigma 公司);水合氯醛(批号 20150923, 宇龙海藻有限公司);蛋白酶抑制剂 Cocktail I、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白裂解液、Milliplex 蛋白芯片试剂盒(美国默克化工技术有限公司)。

1.3 仪器

Luminex 200 蛋白芯片多功能液相芯片分析仪、Milliplex 多功能液相芯片分析平台(美国默克化工技术有限公司);Mettler Toledo AL204 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Neofuge 1600R 低温台式高速离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及给药

实验前将 SD 大鼠(46 只)禁食 12 h,根据前期实验基础^[9],ig 给予 ZGW 3.8 g/kg(羧甲基纤维素钠配制),2 h 后尾 iv LPS 2.8 mg/kg。10 h 后,10% 水合氯醛麻醉大鼠,麻醉剂量为 3 mL/kg,腹主动脉取血,低温离心(4 ℃、3 500 r/min)10 min,取上清。取血后,立即剪取大鼠肝脏组织,放入-80 ℃冰箱冻存,备用。

2.2 检测指标

2.2.1 肝功能指标 利用全自动生化分析仪,按照说明书检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)活力。

2.2.2 肝脏组织细胞因子检测 将肝组织从-80 ℃冰箱中取出,冰上操作,剪取一定质量肝组织,加入含蛋白抑制剂的裂解液,利用高速粉碎机粉碎为匀浆液,4 ℃、15 000 r/min,离心 20 min,取上清。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 蛋白芯片试剂盒对大鼠肝组织裂解液中的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、瘦素(leptin)、巨噬细胞炎

性蛋白 1 α (MIP-1 α)、IL-4、IL-2、IL-6、表皮细胞生长因子 (EGF)、IL-13、IL-10、IL-12p70、 γ 干扰素 (IFN- γ)、IL-5、IL-17A、IL-18、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、趋化因子-10 (IP-10)、嗜中性趋化因子 (GRO/KC)、调节活化正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子 (RANTES)、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-2 (MIP-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 27 种细胞因子进行检测。

2.3 分析方法及软件

以“2.2”项下检测的所有样本 27 种肝脏细胞因子及 ALT 活性为数据来源 (数据中主要包括计量资料), 根据其分布特征进行描述统计分析。正态分布

连续变量用均值、标准差表示, 两组比较采用 t 检验; 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, 组间比较采用 Willcoxon 秩和检验; 利用 Shapiro-Wilk 检验是否服从正态分布, 取显著水平为 0.01。同时, 给出所有指标的分布图、相关系数图、相关系数检验、基于聚类算法产生的相关矩阵图, 所有分析运用 R 3.2.4 软件实现。

3 结果

3.1 全组数据统计描述

对 27 种肝脏细胞因子和肝功能 ALT 指标进行描述统计。各指标数据量纲差异很大, 均值、标准差、中位数等相差较大, 例如 EGF 均值/标准差较小, 仅 1.31/0.34, 而 IL-6 的均值/标准差高达 4 252.76/664.50, 结果见表 1。

表 1 27 种肝脏细胞因子和 ALT 的数据描述

Table 1 Data description of 27 liver cytokines and ALT

细胞因子 及 ALT	均值	标准差	中位数	截断 5% 均值	中位数绝 对偏差	最小值	最大值	全距	偏度	峰度	标准误差
G-CSF	3.80	0.92	3.79	3.75	0.78	2.12	6.63	4.51	0.66	0.56	0.14
eotaxin	74.65	8.37	74.06	74.41	6.70	55.14	102.23	47.09	0.54	1.38	1.23
GM-CSF	136.37	61.95	132.44	131.48	56.47	3.71	341.19	337.48	1.08	2.35	9.13
IL-1 α	476.22	145.41	479.66	467.34	126.69	230.17	986.53	756.36	0.90	1.69	21.44
leptin	1 677.78	185.85	1 676.00	1 665.55	176.43	1 342.00	2 210.00	868.00	0.78	0.93	27.40
MIP-1 α	59.48	23.88	56.61	56.51	15.49	26.27	122.93	96.66	1.16	0.77	3.52
IL-4	266.74	35.35	262.99	262.37	32.39	208.99	372.70	163.71	1.19	1.54	5.21
IL-1 β	827.16	125.76	811.39	823.98	127.01	600.12	1 204.00	603.88	0.39	0.20	18.54
IL-2	81.85	18.63	79.56	81.18	19.83	51.81	121.36	69.55	0.36	-0.92	2.75
IL-6	4 252.76	664.50	4 175.50	4 217.47	595.26	3 163.00	5 923.00	2 760.00	0.45	-0.36	97.98
EGF	1.31	0.34	1.25	1.28	0.34	0.86	2.25	1.39	0.85	-0.07	0.05
IL-13	31.68	15.29	29.45	29.49	10.93	7.90	97.36	89.46	2.02	5.73	2.25
IL-10	168.95	22.26	165.24	166.45	16.78	134.52	247.68	113.16	1.30	2.34	3.28
IL-12p70	87.83	15.25	87.18	87.58	16.43	59.94	121.80	61.86	0.10	-0.73	2.25
IFN- γ	964.70	171.67	966.63	967.18	176.24	469.53	1 320.00	850.47	-0.20	-0.05	25.31
IL-5	68.19	23.49	61.19	66.23	21.95	35.52	127.58	92.06	0.76	-0.26	3.46
IL-17A	40.61	10.07	40.44	40.63	11.80	18.44	57.46	39.02	-0.03	-0.99	1.48
IL-18	585.20	199.43	558.12	563.56	142.23	303.28	1 260.00	956.72	1.24	1.65	29.40
MCP-1	883.82	113.44	872.41	879.38	118.27	676.07	1 167.00	490.93	0.39	-0.27	16.73
IP-10	845.94	198.89	847.39	848.95	214.76	446.27	1 278.00	831.73	-0.04	-0.62	29.33
GRO/KC	228.54	22.60	224.35	227.24	18.98	180.83	307.17	126.34	0.91	1.82	3.33
VEGF	29.96	10.85	27.52	29.10	9.53	10.20	57.24	47.04	0.72	-0.12	1.60
fractalkine	68.88	10.47	67.00	68.35	10.35	48.87	90.40	41.53	0.42	-0.69	1.54
LIX	215.41	30.44	215.16	213.23	24.04	156.96	332.21	175.25	1.14	2.89	4.49
MIP-2	110.35	55.37	95.66	100.24	31.14	34.13	319.09	284.96	2.33	5.94	8.16
TNF- α	8.56	1.70	8.26	8.40	1.85	6.26	13.10	6.84	0.78	-0.08	0.25
RANTES	60.41	25.38	54.91	56.88	16.03	26.20	162.93	136.73	1.85	4.42	3.74
ALT	68.00	23.04	62.00	65.18	17.79	41.00	170.00	129.00	1.98	5.97	3.36

3.2 各指标之间的相关系数

对数据进行标度转换, 利用标准差除以原始数据得到新数据, 再对各指标之间的相关性进行分析, 明确各指标间的相关性, 特别是它们与 ALT 的相关性。结果显示, 多组细胞因子的相关系数较高, 相关系数大于 0.80 的细胞因子组有 IL-1 α /IL-1 β (0.86)、GM-CSF/IL-13 (0.88)、GM-CSF/MIP-2 (0.86)、IL-2/IL-12p70 (0.88)、IL-2/IL-17A (0.92)、IL-2/fractalkine (0.88)、IL-2/TNF- α (0.84)、IL-6/TNF- α (0.87)、IL-13/GM-CSF (0.88)、IL-13/MIP-2 (0.87)、

IL-10/GRO/KC (0.84)、IL-10/LIX (0.86)、IL-10/leptin (0.80) 等, 表明这些细胞因子之间相关性较强。结果见表 2。

3.3 各指标分布图及其相关系数图

各指标的分布图及它们之间的相关系数图见图 1。通过对相关系数矩阵的可视化查看所有指标之间的相关性。变量的顺序是基于聚类算法产生的 (按照 8 大类指标划分), 结果显示一些指标之间具有较强相关性。如 ALT、MIP-1 α 和 VEGF 之间具有较强的正相关性; IL-18、IP-10、IL-1 α 和 IL-1 β

表 2 27 种细胞因子及 ALT 之间的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between 27 cytokines and liver function index ALT

细胞因子 及 ALT	相关系数													
	G-CSF	eotaxin	GM-CSF	IL-1 α	leptin	MIP-1 α	IL-4	IL-1 β	IL-2	IL-6	EGF	IL-13	IL-10	IL-12p70
G-CSF	1.00	0.13	0.68	0.34	0.67	0.22	0.54	0.41	0.72	0.66	0.66	0.57	0.52	0.59
eotaxin	0.13	1.00	0.02	-0.09	0.44	-0.17	0.48	0.01	0.45	0.43	0.17	-0.12	0.69	0.45
GM-CSF	0.68	0.02	1.00	0.15	0.59	0.01	0.56	0.22	0.67	0.59	0.46	0.88	0.40	0.53
IL-1 α	0.34	-0.09	0.15	1.00	0.41	0.79	-0.09	0.86	0.20	0.24	0.45	0.13	0.16	0.08
leptin	0.67	0.44	0.59	0.41	1.00	0.28	0.56	0.54	0.68	0.60	0.63	0.40	0.80	0.49
MIP-1 α	0.22	-0.17	0.01	0.79	0.28	1.00	-0.16	0.70	0.01	0.04	0.31	0.05	-0.05	-0.17
IL-4	0.54	0.48	0.56	-0.09	0.56	-0.16	1.00	0.02	0.58	0.54	0.33	0.59	0.59	0.51
IL-1 β	0.41	0.01	0.22	0.86	0.54	0.70	0.02	1.00	0.24	0.26	0.44	0.17	0.40	0.04
IL-2	0.72	0.45	0.67	0.20	0.68	-0.01	0.58	0.24	1.00	0.80	0.63	0.49	0.59	0.88
IL-6	0.66	0.43	0.59	0.24	0.60	0.04	0.54	0.26	0.80	1.00	0.54	0.41	0.53	0.71
EGF	0.66	0.17	0.46	0.45	0.63	0.31	0.33	0.44	0.63	0.54	1.00	0.32	0.41	0.48
IL-13	0.57	-0.12	0.88	0.13	0.40	0.05	0.59	0.17	0.49	0.41	0.32	1.00	0.20	0.38
IL-10	0.52	0.69	0.40	0.16	0.80	-0.05	0.59	0.40	0.59	0.53	0.41	0.20	1.00	0.47
IL-12p70	0.59	0.45	0.53	0.08	0.49	-0.17	0.51	0.04	0.88	0.71	0.48	0.38	0.47	1.00
IFN- γ	0.72	0.15	0.73	0.31	0.59	0.12	0.45	0.43	0.65	0.52	0.39	0.60	0.48	0.54
IL-5	0.29	-0.08	0.37	0.62	0.38	0.44	0.21	0.53	0.34	0.25	0.53	0.37	0.12	0.22
IL-17A	0.70	0.37	0.70	0.26	0.66	-0.02	0.49	0.27	0.92	0.79	0.58	0.50	0.55	0.88
IL-18	0.16	-0.26	-0.07	0.72	0.13	0.60	-0.33	0.68	0.07	0.06	0.32	-0.08	-0.08	-0.06
MCP-1	0.59	0.23	0.65	0.02	0.43	-0.08	0.73	0.07	0.66	0.58	0.29	0.62	0.41	0.61
IP-10	0.38	0.07	0.34	0.74	0.56	0.56	0.00	0.72	0.37	0.29	0.50	0.24	0.32	0.22
GRO/KC	0.47	0.58	0.45	-0.06	0.68	-0.17	0.72	0.21	0.47	0.43	0.25	0.37	0.84	0.41
VEGF	0.54	-0.04	0.50	0.58	0.55	0.61	0.14	0.50	0.42	0.41	0.53	0.37	0.20	0.29
fractalkine	0.70	0.62	0.58	0.21	0.76	0.02	0.56	0.30	0.88	0.84	0.60	0.34	0.76	0.78
LIX	0.46	0.65	0.56	0.17	0.79	0.01	0.53	0.40	0.63	0.62	0.41	0.36	0.86	0.53
MIP-2	0.60	-0.23	0.86	0.24	0.52	0.23	0.46	0.26	0.41	0.39	0.42	0.87	0.21	0.24
TNF- α	0.74	0.44	0.67	0.34	0.71	0.12	0.58	0.31	0.84	0.87	0.62	0.52	0.63	0.76
RANTES	0.25	-0.24	0.10	0.00	0.16	0.06	0.15	0.11	-0.04	-0.09	0.04	0.20	0.13	-0.05
ALT	0.06	-0.03	0.14	0.43	0.23	0.54	-0.04	0.28	-0.03	0.16	0.07	0.09	-0.03	-0.15

续表 2

细胞因子 及 ALT	相关系数													
	IFN- γ	IL-5	IL-17A	IL-18	MCP-1	IP-10	GRO/KC	VEGF	fractalkine	LIX	MIP-2	TNF- α	RANTES	ALT
G-CSF	0.72	0.29	0.70	0.16	0.59	0.38	0.47	0.54	0.70	0.46	0.60	0.74	0.25	0.06
eotaxin	0.15	0.08	0.37	-0.26	0.23	0.07	0.58	-0.04	0.62	0.65	-0.23	0.44	-0.24	-0.03
GM-CSF	0.73	0.37	0.70	-0.07	0.65	0.34	0.45	0.50	0.58	0.56	0.86	0.67	0.10	0.14
IL-1 α	0.31	0.62	0.26	0.72	0.02	0.74	-0.06	0.58	0.21	0.17	0.24	0.34	0.00	0.43
leptin	0.59	0.38	0.66	0.13	0.43	0.56	0.68	0.55	0.76	0.79	0.52	0.71	0.16	0.23
MIP-1 α	0.12	0.44	-0.02	0.60	-0.08	0.56	-0.17	0.61	0.02	0.01	0.23	0.12	0.06	0.54
IL-4	0.45	0.21	0.49	-0.33	0.73	0.00	0.72	0.14	0.56	0.53	0.46	0.58	0.15	-0.04
IL-1 β	0.43	0.53	0.27	0.68	0.07	0.72	0.21	0.50	0.30	0.40	0.26	0.31	0.11	0.28
IL-2	0.65	0.34	0.92	0.07	0.66	0.37	0.47	0.42	0.88	0.63	0.41	0.84	-0.04	-0.03
IL-6	0.52	0.25	0.79	0.06	0.58	0.29	0.43	0.41	0.84	0.62	0.39	0.87	-0.09	0.16
EGF	0.39	0.53	0.58	0.32	0.29	0.50	0.25	0.53	0.60	0.41	0.42	0.62	0.04	0.07
IL-13	0.60	0.37	0.50	-0.08	0.62	0.24	0.37	0.37	0.34	0.36	0.87	0.52	0.20	0.09
IL-10	0.48	0.12	0.55	-0.08	0.41	0.32	0.84	0.20	0.76	0.86	0.21	0.63	0.13	-0.03
IL-12p70	0.54	0.22	0.88	-0.06	0.61	0.22	0.41	0.29	0.78	0.53	0.24	0.76	-0.05	-0.15
IFN- γ	1.00	0.22	0.69	0.10	0.51	0.41	0.46	0.52	0.57	0.48	0.51	0.57	0.07	0.17
IL-5	0.22	1.00	0.32	0.58	0.23	0.60	0.09	0.48	0.24	0.20	0.43	0.34	0.10	0.36
IL-17A	0.69	0.32	1.00	0.07	0.59	0.43	0.43	0.47	0.85	0.64	0.42	0.84	-0.06	0.00
IL-18	0.10	0.58	0.07	1.00	-0.15	0.61	-0.31	0.35	0.00	-0.09	0.00	0.00	0.09	0.31
MCP-1	0.51	0.23	0.59	-0.15	1.00	0.07	0.46	0.25	0.57	0.43	0.52	0.62	0.17	-0.07
IP-10	0.41	0.60	0.43	0.61	0.07	1.00	0.09	0.63	0.41	0.45	0.28	0.39	-0.09	0.38
GRO/KC	0.46	0.09	0.43	-0.31	0.46	0.09	1.00	0.12	0.62	0.78	0.33	0.48	0.20	-0.02
VEGF	0.52	0.48	0.47	0.35	0.25	0.63	0.12	1.00	0.37	0.31	0.57	0.50	-0.15	0.56
fractalkine	0.57	0.24	0.85	0.00	0.57	0.41	0.62	0.37	1.00	0.81	0.30	0.87	-0.05	0.00
LIX	0.48	0.20	0.64	-0.09	0.43	0.45	0.78	0.31	0.81	1.00	0.34	0.69	-0.03	0.04
MIP-2	0.51	0.43	0.42	0.00	0.52	0.28	0.33	0.57	0.30	0.34	1.00	0.52	0.22	0.27
TNF- α	0.57	0.34	0.84	0.00	0.62	0.39	0.48	0.50	0.87	0.69	0.52	1.00	0.02	0.10
RANTES	0.07	0.10	-0.06	0.09	0.17	-0.09	0.20	-0.15	-0.05	-0.03	0.22	0.02	1.00	-0.08
ALT	0.17	0.36	0.00	0.31	-0.07	0.38	-0.02	0.56	0.00	0.04	0.27	0.10	-0.08	1.00

之间具有很强的相关性；Eotaxin 或 RANTES 各自具有独立性。每项指标之间具体的相关系数及其检验结果见图 2。

通过统计检验，具有显著强相关性（显著水平 < 0.001）的指标关系见表 3（按照 Pearson 系数和显著性水平排序）。同时，考虑成对细胞因子的相关性的绝对值，如果 2 个变量有 1 个高的相关性，则考虑每个变量的平均绝对相关性，并移除具有此最大值的变量。除 ALT 外，相关系数大于 0.75 的细胞因子组共 27 组，包括 IL-2/IL-17(0.917)、IL-2/fractalkine(0.883)、IL-2/IL-12 (0.881)、IL-12/IL-17 (0.876)、GM-CSF/

IL-13 (0.875)、IL-6/TNF- α (0.869)、fractalkine/TNF- α (0.867)、IL-13/MIP-2 (0.865) 等。

4 讨论

药物特异质肝损伤分免疫特异质和代谢特异质 2 种类型，前者与机体的免疫应激状态有关^[11-12]。细胞因子是由免疫细胞（如单核/巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、NK 细胞等）和一些非免疫细胞（如血管内皮细胞、表皮细胞、成纤维细胞等）经刺激而合成、分泌的一类生物活性物质^[13]。免疫细胞及其分泌的细胞因子在免疫特异质肝损伤过程中起到重要作用，淋巴细胞产生的促炎性细胞因子及抗炎性的

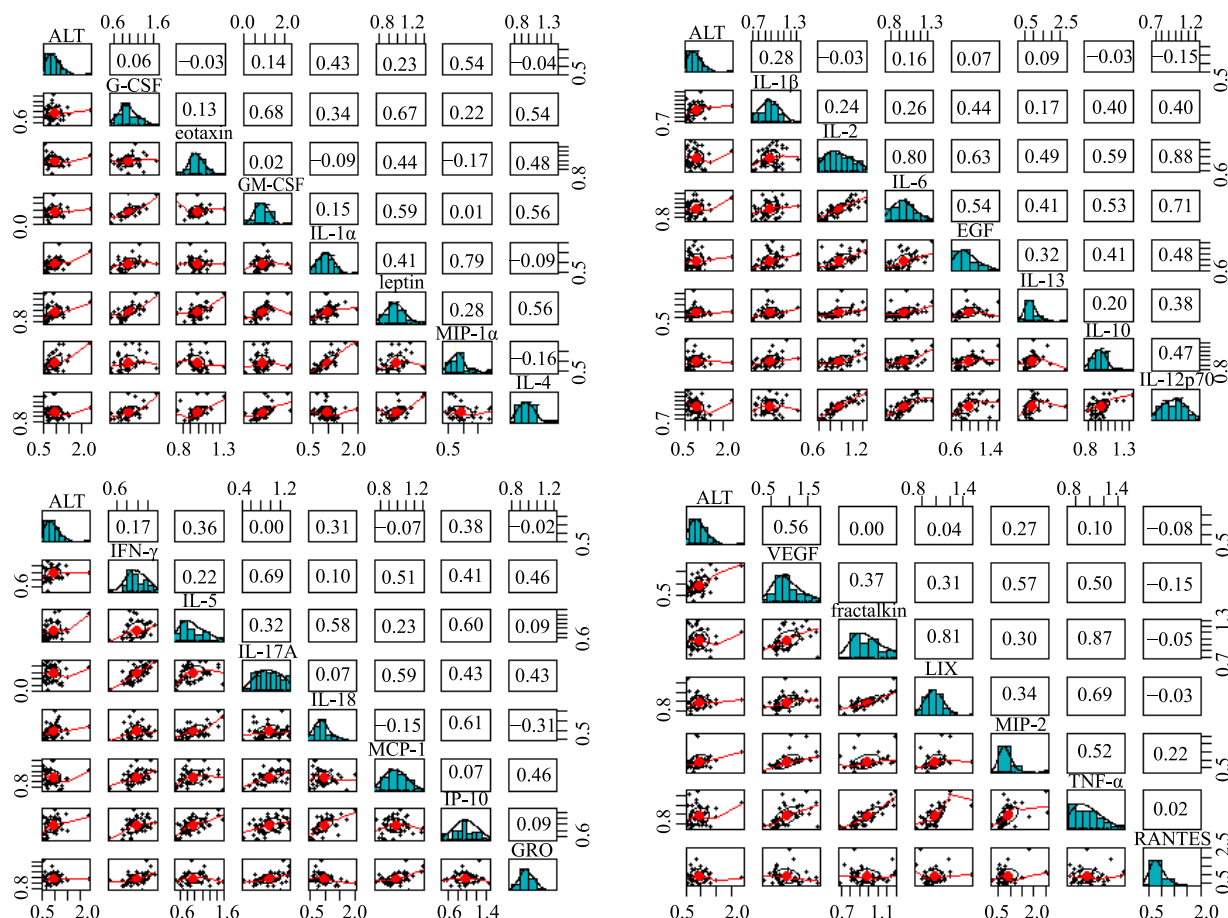


图 1 27 种细胞因子分布图及相关系数图

Fig. 1 Distribution figure of correlation coefficient of 27 cytokines

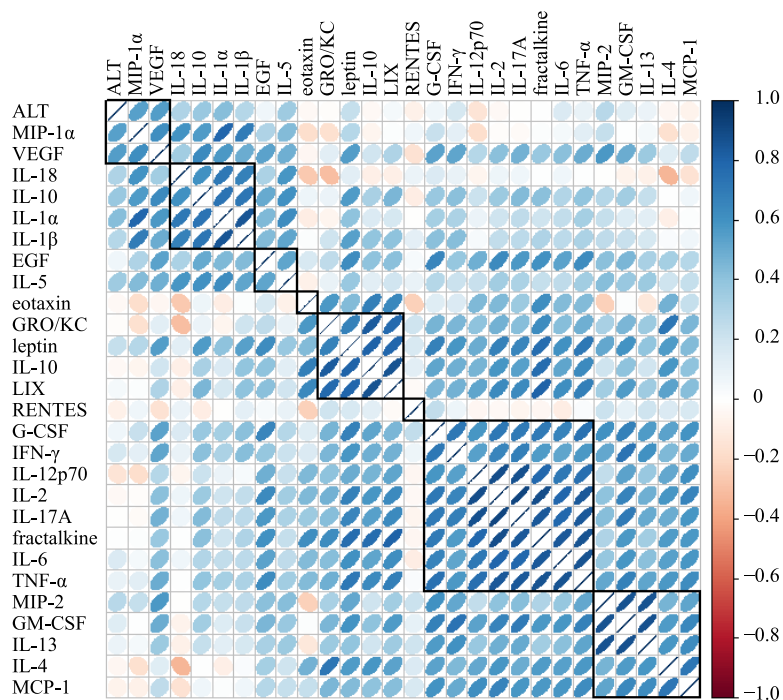


图 2 27 项因子指标之间相关系数矩阵的可视化图形

Fig. 2 Graphical display of correlation matrix of 27 factors

表 3 具有显著相关性的指标
Table 3 Indexes with significant differences

指标	置信区间 下限	<i>r</i>	置信区间 上限	<i>P</i>	指标	置信区间 下限	<i>r</i>	置信区间 上限	<i>P</i>
IL-2/IL-17	0.854	0.917	0.954	0.000	EGF/fractalkine	0.378	0.603	0.760	0.000
IL-2/fractalkine	0.798	0.883	0.934	0.000	leptin/IL-6	0.378	0.602	0.760	0.000
IL-2/IL-12	0.794	0.881	0.933	0.000	IL-13/IFN- γ	0.377	0.601	0.759	0.000
IL-12/IL-17	0.786	0.876	0.930	0.000	IL-5/IP-10	0.376	0.601	0.759	0.000
GM-CSF/IL-13	0.784	0.875	0.929	0.000	MIP-1/IL-18	0.369	0.596	0.755	0.000
IL-6/TNF- α	0.774	0.869	0.926	0.000	G-CSF/MCP-1	0.365	0.593	0.753	0.000
fractalkine/TNF- α	0.771	0.867	0.925	0.000	GM-CSF/leptin	0.366	0.593	0.754	0.000
IL-13/MIP-2	0.768	0.865	0.924	0.000	G-CSF/IL-12	0.361	0.589	0.751	0.000
IL-10/LIX	0.767	0.865	0.923	0.000	IL-4/IL-13	0.359	0.588	0.750	0.000
GM-CSF/MIP-2	0.760	0.860	0.921	0.000	GM-CSF/IL-6	0.357	0.586	0.749	0.000
IL-1 α /IL-1 β	0.756	0.858	0.919	0.000	leptin/IFN- γ	0.357	0.586	0.749	0.000
IL-17/fractalkine	0.739	0.847	0.913	0.000	IL-2/IL-10	0.356	0.586	0.749	0.000
IL-2/TNF- α	0.730	0.842	0.910	0.000	IL-4/IL-10	0.355	0.585	0.748	0.000
IL-6/fractalkine	0.730	0.842	0.910	0.000	IL-17/MCP-1	0.355	0.585	0.748	0.000
IL-17/TNF- α	0.730	0.842	0.910	0.000	IL-6/MCP-1	0.353	0.583	0.747	0.000
IL-10/GRO/KC	0.720	0.835	0.906	0.000	IL-4/IL-2	0.350	0.581	0.746	0.000
fractalkine/LIX	0.674	0.807	0.889	0.000	IL-5/IL-18	0.350	0.581	0.746	0.000
leptin/IL-10	0.669	0.803	0.887	0.000	IL-1 α /VEGF	0.347	0.579	0.744	0.000
IL-2/IL-6	0.662	0.799	0.884	0.000	EGF/IL-17	0.347	0.579	0.744	0.000
leptin/LIX	0.653	0.793	0.881	0.000	eotaxin/GRO/KC	0.346	0.578	0.744	0.000
IL-1 α /MIP-1	0.649	0.791	0.879	0.000	GM-CSF/fractalkine	0.345	0.577	0.743	0.000
IL-6/IL-17	0.646	0.788	0.878	0.000	IL-4/TNF- α	0.342	0.575	0.742	0.000
IL-12/fractalkine	0.638	0.783	0.875	0.000	IFN γ /TNF- α	0.341	0.574	0.741	0.000
GRO/KC/LIX	0.627	0.776	0.870	0.000	MCP-1/fractalkine	0.339	0.573	0.740	0.000
Leptin/fractalkine	0.609	0.764	0.863	0.000	VEGF/MIP-2	0.336	0.571	0.739	0.000
IL-10/fractalkine	0.603	0.760	0.861	0.000	IFN- γ /fractalkine	0.334	0.569	0.738	0.000
IL-12/TNF- α	0.596	0.756	0.858	0.000	G-CSF/IL-13	0.329	0.565	0.735	0.000
G-CSF/TNF- α	0.577	0.743	0.850	0.000	MIP-1/IP-10	0.328	0.565	0.735	0.000
IL-1 α /IP-10	0.569	0.737	0.846	0.000	GM-CSF/IL-4	0.325	0.562	0.733	0.000
GM-CSF/IFN- γ	0.563	0.734	0.844	0.000	GM-CSF/LIX	0.325	0.562	0.733	0.000
IL-4/MCP-1	0.553	0.726	0.840	0.000	leptin/IP-10	0.324	0.561	0.732	0.000
IL-1 β /IP-10	0.548	0.723	0.837	0.000	leptin/IL-4	0.322	0.560	0.732	0.000
IL-4/GRO/KC	0.547	0.722	0.837	0.000	IL-4/fractalkine	0.323	0.560	0.732	0.000
G-CSF/IFN- γ	0.543	0.720	0.836	0.000	VEGF/ALT	0.315	0.560	0.735	0.000
IL-1 α /IL-18	0.543	0.720	0.836	0.000	leptin/VEGF	0.313	0.553	0.727	0.000
G-CSF/IL-2	0.541	0.718	0.835	0.000	leptin/IL-1 β	0.303	0.545	0.721	0.000
leptin/TNF- α	0.534	0.713	0.832	0.000	IL-10/IL-17	0.303	0.545	0.721	0.000
IL-6/IL-12	0.530	0.711	0.830	0.000	MIP-1/ALT	0.294	0.544	0.724	0.000
GM-CSF/IL-17	0.518	0.702	0.825	0.000	IL-4/IL-6	0.298	0.541	0.719	0.000
G-CSF/IL-17	0.516	0.701	0.824	0.000	IL-12/IFN- γ	0.297	0.541	0.718	0.000

续表 3

指标	置信区间 下限	r	置信区 间上限	P	指标	置信区间 下限	r	置信区间 上限	P
G-CSF/fractalkine	0.515	0.701	0.824	0.000	G-CSF/IL-4	0.296	0.540	0.718	0.000
MIP-1/IL-1 β	0.509	0.696	0.821	0.000	G-CSF/VEGF	0.292	0.537	0.715	0.000
LIX/TNF- α	0.497	0.688	0.815	0.000	IL-6/EGF	0.290	0.535	0.715	0.000
eotaxin/IL-10	0.496	0.687	0.815	0.000	EGF/VEGF	0.289	0.534	0.714	0.000
IFN- γ /IL-17	0.494	0.686	0.814	0.000	GM-CSF/IL-12	0.287	0.533	0.713	0.000
leptin/GRO/KC	0.485	0.680	0.810	0.000	IL-4/LIX	0.288	0.533	0.713	0.000
leptin/IL-2	0.481	0.677	0.809	0.000	IL-6/IL-10	0.282	0.529	0.710	0.000
IL-1 β /IL-18	0.480	0.676	0.808	0.000	EGF/IL-5	0.280	0.527	0.709	0.000
G-CSF/GM-CSF	0.479	0.675	0.807	0.000	IL-1 β /IL-5	0.278	0.526	0.708	0.000
G-CSF/leptin	0.472	0.671	0.804	0.000	IL-12/LIX	0.278	0.526	0.708	0.000
GM-CSF/TNF- α	0.471	0.670	0.804	0.000	G-CSF/IL-10	0.277	0.525	0.707	0.000
GM-CSF/IL-2	0.467	0.667	0.802	0.000	IL-6/IFN- γ	0.275	0.523	0.706	0.000
IL-2/MCP-1	0.459	0.662	0.798	0.000	IFN- γ /VEGF	0.275	0.523	0.706	0.000
G-CSF/IL-6	0.459	0.661	0.798	0.000	MCP-1/MIP-2	0.272	0.521	0.705	0.000
leptin/IL-17	0.456	0.659	0.797	0.000	IL-13/TNF- α	0.271	0.520	0.704	0.000
G-CSF/EGF	0.451	0.656	0.795	0.000	leptin/MIP-2	0.267	0.517	0.702	0.000
IL-2/IFN- γ	0.447	0.652	0.793	0.000	MIP-2/TNF- α	0.265	0.516	0.701	0.000
eotaxin/LIX	0.443	0.650	0.791	0.000	IFN- γ /MIP-2	0.264	0.515	0.701	0.000
GM-CSF/MCP-1	0.439	0.647	0.789	0.000	IL-4/IL-12	0.259	0.511	0.698	0.000
IL-17/LIX	0.427	0.638	0.783	0.000	IFN- γ /MCP-1	0.252	0.506	0.694	0.000
IL-2/LIX	0.422	0.635	0.781	0.000	IL-13/IL-17	0.248	0.502	0.692	0.000
IP-10/VEGF	0.420	0.633	0.780	0.000	EGF/IP-10	0.246	0.501	0.691	0.000
IL-10/TNF- α	0.418	0.632	0.779	0.000	IL-1 β /VEGF	0.243	0.499	0.689	0.000
IL-2/EGF	0.417	0.631	0.778	0.000	VEGF/TNF- α	0.244	0.499	0.690	0.000
leptin/EGF	0.413	0.628	0.777	0.000	GM-CSF/VEGF	0.240	0.496	0.687	0.000
EGF/TNF- α	0.408	0.625	0.775	0.000	IL-4/IL-17	0.237	0.494	0.686	0.000
IL-13/MCP-1	0.409	0.625	0.775	0.000	leptin/IL-12	0.234	0.491	0.684	0.001
MCP-1/TNF- α	0.408	0.625	0.774	0.000	IL-2/IL-13	0.231	0.488	0.682	0.001
IL-1 α /IL-5	0.404	0.622	0.772	0.000	IL-10/IFN- γ	0.225	0.484	0.679	0.001
GRO/KC/fractalkine	0.405	0.622	0.773	0.000	IL-5/VEGF	0.224	0.483	0.678	0.001
eotaxin/fractalkine	0.402	0.620	0.771	0.000	GRO/KC/TNF- α	0.223	0.482	0.677	0.001
IL-6/LIX	0.397	0.616	0.769	0.000	EGF/IL-12	0.222	0.481	0.677	0.001
MIP-1/VEGF	0.392	0.613	0.767	0.000	IFN- γ /LIX	0.219	0.479	0.675	0.001
IL-12/MCP-1	0.390	0.611	0.766	0.000	eotaxin/IL-4	0.215	0.476	0.673	0.001
IL-18/IP-10	0.383	0.606	0.762	0.000	IL-2/GRO/KC	0.213	0.474	0.672	0.001
G-CSF/MIP-2	0.381	0.604	0.761	0.000	IL-17/VEGF	0.212	0.473	0.671	0.001

细胞因子发挥着相互调节和制约的作用,维持机体正常稳定的免疫状态,但是当某些致病因素通过各种途径造成这些细胞因子相互调节和相互制约的作

用失去原有的平衡时,则会引起炎症性的疾病和自身免疫性疾病的发生^[14]。ZGW 致肝损伤为免疫特异肝损伤,为了解与 ZGW 所致肝损伤相关细胞

因子,本研究检测了 27 种细胞因子,并通过数据挖掘的方法对其相互之间的相关性以及与 ZGW 特异质肝损伤的相关性进行分析。

本研究所选细胞因子涉及面较广,包括生长因子类(G-CSF、GM-CSF、EGF、VEGF)、白细胞介素类(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-17A、IL-18)、趋化因子类(eotaxin、IP-10、MCP-1、RANTES、GRO/KC、fractalkine、LIX)、炎症介质类(MIP-1 α 、MIP-2、TNF- α 、IFN- γ 、leptin)。这些细胞因子由多种免疫细胞分泌,参与肝损伤的发生发展过程。Th1 细胞分泌的 IL-2、L-12、TNF- α 和 IFN- γ 等促炎细胞因子主要与促进免疫炎症反应有关^[15],其含量与肝脏的炎症程度呈正相关;Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等抗炎细胞因子主要参与体液免疫应答,刺激 B 细胞增殖产生抗体,对肝脏的损伤具有保护作用;Th17 细胞分泌的 IL-17 是一种在多种炎症性疾病中可检测到增高的新型免疫调节因子^[16],在自身免疫性肝炎患者的肝脏组织中,其表达强度与肝脏纤维化程度呈正相关;多种免疫细胞均可产生的 IL-1^[17]、eotaxin^[18]、IP-10^[19]、MCP-1^[20]、MIP-1 α ^[21]、MIP-2、G-CSF^[22]、GM-CSF^[23]等细胞因子,参与机体免疫调节的一系列过程;由脂肪组织分泌的 leptin^[24],主要调节机体固有免疫和适应性免疫的平衡。

为了构建上述细胞因子与肝损伤之间的关系,首先对 27 种细胞因子以及肝功能指标 ALT 进行描述统计,给出各个指标的均值、标准差、最值、中位数、上下四分位数、偏度、峰度等统计量,并通过各指标之间相关系数、分布图及其相关系数图,量化并可视化指标之间的关系。由于各指标数据量纲差异很大,本研究对数据进行了标度转换,利用标准差除以原始数据得到新数据,再对各指标之间的相关性进行分析,明确各指标间的相关性,特别是肝脏各细胞因子与 ALT 之间的相关性。

本研究结果显示,ALT 与 MIP-1 α 和 VEGF 之间具有较强的正相关性,相关系数分别为 0.54 和 0.56。有研究表明,非酒精性脂肪肝患者血清中 VEGF 水平显著增高^[25],MIP-1 α 在刀豆蛋白 A 诱导的肝损伤模型中显著升高^[26]。说明 MIP-1 α 和 VEGF 与 ZGW 特异质肝损伤具有相关性,可为 ZGW 的临床合理用药和诊断提供参考。有文献报道细胞因子间可相互影响,Malefyt 等^[27]发现内源

性和外源性 IL-10 均可显著抑制 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、GM-CSF 和 G-CSF 的合成,从而发挥抗炎的作用。在刀豆蛋白 A 诱导的肝损伤模型中,IL-4 可通过介导信号转导和转录激活蛋白 6 依赖途径诱导趋化因子和 IL-5 的表达,继而嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞被募集到肝脏,最终导致肝损伤^[28]。本研究结果表明 IL-18、IP-10、IL-1 α 和 IL-1 β 之间具有很强的相关性,并通过统计发现 152 对具有显著相关性的细胞因子,除 ALT 外,相关系数大于 0.75 的细胞因子组共 27 组,包括 IL-2/IL-17 (0.917)、IL-2/fractalkine (0.883)、IL-2/IL-12 (0.881)、IL-12/IL-17 (0.876)、GM-CSF/IL-13 (0.875)、IL-6/TNF- α (0.869)、fractalkine/TNF- α (0.867)、IL-13/MIP-2 (0.865) 等。说明 ZGW 特异质肝损伤相关细胞因子之间互相交叉,形成调节网络,一旦其中 1 个发生变化,可能形成连锁反应,但具体的机制尚不清晰,还有待进一步的研究。

综上所述,本研究综合分析了 ZGW 特异质肝损伤与 27 种细胞因子的相关性,所得结论对 ZGW 的临床合理应用具有一定的参考价值和指导意义。

参考文献

- [1] Watkins P B, Seeff L B. Drug-induced liver injury: Summary of a single topic clinical research conference [J]. *Hepatology*, 2006, 43(3): 618-631.
- [2] Grant L M, Rockey D C. Drug-induced liver injury [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(3): 198-202.
- [3] 袁继丽. 中草药致肝损害的研究近况 [J]. *中草药*, 1999, 30(9): 711-714.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 王伽伯, 崔鹤蓉, 柏兆方, 等. 精准医学下的中药安全性评价策略和方法: 病证毒理学 [J]. *药学学报*, 2016, 51(11): 1681-1688.
- [6] 王伽伯, 李春雨, 朱云, 等. 基于整合证据链的中草药肝毒性客观辨识与合理用药: 以何首乌为例 [J]. *科学通报*, 2016, 61(9): 971-980.
- [7] 贺兰芝, 孟雅坤, 张振芳, 等. 基于免疫调控的六味五灵片对何首乌致大鼠特异质肝损伤的防治作用 [J]. *中草药*, 2017, 48(1): 136-142.
- [8] 李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价 [J]. *药学学报*, 2015, 50(1): 28-33.
- [9] 唐进法, 王晓艳, 温强, 等. 免疫应激介导的壮骨关节丸致特异质肝损伤评价 [J]. *药学学报*, 2017, 52(7): 1033-1040.

- [10] 李 静, 王学富. 肝脏靶向表达趋化因子 CXCL10 抑制 ConA 诱导的肝脏损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 828-832.
- [11] Amacher D E. The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8(3): 335-347.
- [12] Zhang X, Liu F, Chen X, *et al.* Involvement of the immune system in idiosyncratic drug reactions [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(1): 47-59.
- [13] 吴正正, 黄秀榕, 祁明信. 中医药与细胞因子研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 871-873.
- [14] Zhang X L, Quan Q Z, Sun Z Q, *et al.* Protective effects of cyclosporine A on T-cell dependent ConA-induced liver injury in Kunming mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(4): 569-571.
- [15] Jutel M, Akdis C A. T-cell subset regulation in atopy [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011, 11(2): 139-145.
- [16] Bettelli E, Korn T, Oukka M, *et al.* Induction and effector functions of T (H)17 cells [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1051-1057.
- [17] Obuchowicz E, Prymus A, Bielecka A M, *et al.* Desipramine administered chronically inhibits lipopolysaccharide-stimulated production of IL-1 β in the brain and plasma of rats [J]. *Cytokine*, 2016, doi: 10.1016/j.cyto.2015.10.012.
- [18] Jones G T, Phillips L V, Williams M J A, *et al.* Two C-C family chemokines, eotaxin and RANTES, are novel independent plasma biomarkers for abdominal aortic aneurysm [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(5): 1-14.
- [19] Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski S J, *et al.* A point of care test for the determination of amniotic fluid interleukin-6 and the chemokine CXCL-10/IP-10 [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2015, 28(13): 1510-1519.
- [20] Vohr H W. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [J]. *Cytokine*, 2016, 60(1): 1-12.
- [21] 孙鑫波, 刘朝东. MIP-1 α 与 MMP-9 在免疫炎症反应中作用及其关系研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(5): 474-477.
- [22] England T J, Gibson C L, Bath P M W. Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: A systematic review [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 62(1): 71-82.
- [23] Montanari E, Stojkovic S, Kaun C, *et al.* Interleukin-33 stimulates GM-CSF and M-CSF production by human endothelial cells [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116(2): 317-327.
- [24] Bennett B D, Solar G P, Yuan J Q, *et al.* A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis [J]. *Curr Biol*, 1996, 6(9): 1170-1180.
- [25] Papageorgiou M V, Hadziyannis E, Tiniakos D, *et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Ann Gastroenterol*, 2017, 30(2): 209-216.
- [26] Qi S, Xi X, Xiao Y, *et al.* Salecan protected against concanavalin A-induced acute liver injury by modulating T cell immune responses and NMR-based metabolic profiles [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.taap.2017.01.007.
- [27] Malefyt R D W, Abrams J, Bennett B, *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(5):1209-1220.
- [28] Njoku D B, Li Z, Washington N D, *et al.* Suppressive and pro-inflammatory roles for IL-4 in the pathogenesis of experimental drug-induced liver injury [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(6): 1652-1663.