

偏最小二乘判别分析法在九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎中的安全性分析

叶媚娜¹ 杨 铭² 程亦勤¹ 王 冰¹ 朱 滢¹ 夏亚茹¹
孟 焜¹ 陈 豪¹ 陈莉颖¹ 陈红凤¹

摘要 **目的** 应用偏最小二乘判别分析(partial least-squares discriminant analysis,PLSDA)法评估九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎的安全性及其临床价值。**方法** 观察 50 例九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎患者在用药前、用药后第 4 天、停药第 1、14 天检测的血尿生化指标;在用药前、用药后第 1、4、7 天、停药第 1、14 天检测患者血汞、尿汞,并于停药第 28 天和停药 3 个月检测患者尿汞含量。并在用药前、用药后第 1、4、7 天及停药第 1 天记录创面情况,用药量及用药天数。在筛选到有重要影响的安全性指标后,PLSDA 建立影响因素的潜在安全性判别模型,采用 ROC 曲线下面积评估模型的适用性,并使用变量重要性投影(variable importance in the projection,VIP)评价潜在的重要影响因素。**结果** 九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎对尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、尿 N-乙酰- β 氨基葡萄糖苷酶(NAG)、24 h 尿蛋白及 α_1 微球蛋白(α_1 -MG)影响较大;PLSDA 判别模型预测准确率为 74.00%,模型的特异度、灵敏度及 ROC 曲线下面积分别为 0.7826、0.7037 及 0.8084。通过模型筛选到 3 个对潜在安全性具有较大影响的因素:用药前疮腔体积、用药天数和用药量。**结论** PLSDA 法能够用于分析中医临床的相关信息,筛选出九一丹外用安全性监测的主要指标为尿 β_2 -MG 和尿 NAG;用药量和用药时间是影响血汞、尿汞的最主要因素,依据这两大因素建立的九一丹治疗浆细胞性乳腺炎安全性分级仿真模型能在一定程度上评估临床九一丹外用的安全性。

关键词 浆细胞性乳腺炎;九一丹;外治法;模型;偏最小二乘判别分析

External Therapy of Plasma Cell Mastitis by Jiuyi Powder Using Partial Least-Squares Discriminant Analysis: a Safety Analysis YE Mei-na¹, YANG Ming², CHENG Yi-qin¹, WANG Bing¹, ZHU Ying¹, XIA Ya-ru¹, MENG Tian¹, CHEN Hao¹, CHEN Li-ying¹, and CHEN Hong-feng¹ 1 Department of Breast Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032), China; 2 Department of Pharmacy, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032), China

ABSTRACT **Objective** To evaluate the safety and the clinical value of external use of Jiuyi Powder (JP) in treating plasma cell mastitis using partial least-squares discriminant analysis (PLSDA). **Methods** Totally 50 patients with plasma cell mastitis treated by external use of JP were observed and biochemical examinations of blood and urine detected before application, at day 4 after application, at day 1 and 14 after discontinuation. Blood mercury and urinary mercury were detected before application, at day 1, 4, and 7 after application, at day 1 and 14 after discontinuation. Urinary mercury was also detected at 28 after discontinuation and 3 months after discontinuation. The information of wound, days of external application and the total dosage of external application were recorded before application, at day 1, 4, and 7 after application, as well as at day 1 after discontinuation. Then a discriminant model covering potential safety factors was set up by PLSDA after screening safety indices with important effects. The applicability of the model was assessed using area under ROC curve. Potential safety factors were as-

基金项目:顾氏外科流派传承研究(No. ZYSNXD-CC-APGC-JD002);国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目(No. 2008BAI53B083)

作者单位:1. 上海中医药大学附属龙华医院乳腺科(上海 200032);2. 上海中医药大学附属龙华医院药剂科(上海 200032)

通讯作者:陈红凤, Tel:021-64385700, E-mail: chhfluk@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0429

essed using variable importance in the projection (VIP). Results Urinary β_2 -microglobulin (β_2 -MG), urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), 24 h urinary protein, and urinary α_1 -microglobulin (α_1 -MG) were greatly affected by external use of JP in treating plasma cell mastitis. The accuracy rate of PLSDA discriminate model was 74.00%. The sensitivity, specificity, and the area under ROC curve was 0.7826, 0.7037, and 0.8084, respectively. Three factors with greater effect on the potential safety were screened as follows: pre-application volume of the sore cavity, days of external application, and the total dosage of external application. Conclusions PLSDA method could be used in analyzing bioinformation of clinical Chinese medicine. Urinary β_2 -MG and urinary NAG were two main safety monitoring indices. Days of external application and the total dosage of external application were main factors influencing blood mercury and urine mercury. A safety classification simulation model of treating plasma cell mastitis by external therapy of JP was established by the two factors, which could be used to assess the safety of external application of JP to some extent.

KEYWORDS plasma cell mastitis; Jiuyi Powder; external therapy; model; partial least-squares discriminant analysis

九一丹在中医外科临床应用历史悠久,但近年来因其含汞制剂应用的安全性存在较大争议,为使九一丹这一中医外科传统外用制剂得以保存,其安全性得以客观评价,本院开展了九一丹外用治疗乳腺炎的安全性和规范性的实验研究。研究以浆细胞性乳腺炎这一非哺乳期、非妊娠期乳腺炎为对象,观察患者临床症状、体征并对实验室指标进行整合,运用偏最小二乘判别分析(partial least-squares discriminant analysis, PLSDA)法建立九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎的安全性判别方程,提高中医症状、体征及实验室指标等临床信息的利用度,为含汞制剂及其他含重金属制剂的外用制剂的安全性分析的研究模式提供了可行性的模式与方法。

资料与方法

1 诊断标准 西医诊断标准参照《外科诊疗常规》^[1]“非哺乳期乳腺炎”的诊断标准。中医诊断标准参照中华人民共和国国家标准 GB/T 16751.1-1997《中医临床诊疗术语疾病部分》^[2]、《上海市中医病证诊疗常规》^[3]“粉刺性乳痈”的诊断标准。

2 纳入标准 符合中西医诊断标准;年龄 20~50 岁女性,具有脓腐未脱的疮面;签署知情同意书。

3 排除标准 过敏体质者;曾接受过化学治疗或放射性治疗者;合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病,影响生存的严重疾病或精神病患者;合并严重感染,病情危重者;结核性溃疡、动脉缺血性溃疡、骨髓炎性溃疡、神经营养性溃疡、癌性溃疡、糖尿病性坏疽、动脉硬化性闭塞症、血栓闭塞性脉管炎;血常规、肝肾功能、尿汞超出正常

范围 >20% 者;有长期化学物品及重金属接触史者;妊娠期、哺乳期妇女;已知对该类药物过敏者。

4 一般资料 收集 2010 年 3 月—2011 年 11 月上海中医药大学附属龙华医院的住院女性患者 50 例,年龄 22~53 岁,平均(32.28±5.51)岁,病程 1~72 个月,平均(9.07±14.2)个月。患者均为非哺乳期、非妊娠期发病,其中发病年龄 25~35 岁(35 例)占 70%;>35 岁(12 例)占 24%;<25 岁(3 例)占 6%。该临床试验经上海中医药大学附属龙华医院伦理委员会审查同意,批准文号为 2009lcsy0017;该临床试验已完成临床试验注册,注册号:ChiCTR-TNC-11001366。

5 给药方法 九一丹[由红升丹(即氧化汞)与煅石膏(硫酸钙)以 1:9 比例配制而成,上海华宇药业有限公司提供,批号:20090718]外用的给药剂量约为 1.5 mg/cm²,将九一丹均匀布撒至患者创面处,再盖贴或填塞凡士林油纱布,每天换药 1 次。第 2 天换药时先用生理盐水冲洗创面除尽残留药粉,再均匀布撒九一丹。根据创面脓腐脱落情况分别给药第 7~14 天至脓腐脱尽。

6 观察指标及检测方法

6.1 标本的采集 (1)患者分别于用药前、用药后第 4 天、停药第 1、14 天检测患者血常规(包括白细胞、中性白细胞、血红蛋白、红细胞、血小板)、肝功能(包括 ALT、AST)、肾功能(包括血清肌酐)、尿 α_1 微球蛋白(α_1 -MG)、尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、尿 N-乙酰- β 氨基葡萄糖苷酶(NAG)及 24 h 尿蛋白。(2)患者分别于用药前、用药后第 1、4、7 天、停药第 1、14 天检测患者血汞、尿汞(冷原子吸收光谱法),并于停药

第 28 天和停药 3 个月检测患者尿汞含量。(3) 患者在用药前、用药后 1、4、7 天及停药第 1 天拍摄创面照片,记录创面面积、脓腐变化,用量及用药天数。

6.2 潜在安全性指标的筛选 采用均方 (mean square, MS) 作为衡量指标波动的程度,对 12 个生化指标进行检测。一般认为在用药期间,所有安全性指标的异常波动都可能是用药引起的,MS 按下式计算:

$$MS = S^2(x_i - x_0)/x_0 n$$

其中 x_0, x_i 分别为用药前该指标的检测值及用药后第 i 个时刻的检测值, n 为用药后该指标检测的时刻点数, S^2 是求方差函数。可见指标的 MS 越大,则该指标的波动越大,预示用药后对该指标的影响越大。在后续分析中将对这些安全性指标进行变量处理,筛选出用药后波动异常的指标作为划分安全性分级的依据。即临床应用安全(0 级)与可能存在安全性问题(1 级)。

6.3 安全等级中各因素的影响 以用药后影响较大的指标作为潜在安全性指标,以年龄、病程、用药前疮腔体积、停药第 1 天疮腔体积、用药前疮口面积、停药第 1 天疮口面积、用药天数、用药量、血汞水平及尿汞水平作为影响因素,比较各因素在安全等级中的影响。其中血汞及尿汞水平以用梯形法计算的浓度—曲线下面积进行表征,各影响因素标准化后(减去均数除以标准差)建立 PLSDA 判别模型^[4-7]。

6.4 PLSDA 模型的优化及评估 本文随机将样本按 7:3 的比例划分为校正集与预测集,在校正集数据上应用留一验证法(Leave-One-Out Validation)优化 PLSDA 的潜变量个数,以预测集的预测准确率及在整个样本集上的准确率及其特异度、灵敏度及 ROC 曲线下面积来评估模型的适用性。并使用变量重要性投影 (Variable importance in the projection, VIP)^[8,9] 评价潜在的重要影响因素。VIP 值通过下式计算:

$$VIP = (k \sum_{a=1}^A w_{ak}^2 SS_a / \sum_{a=1}^A SS_a)^{1/2}$$

其中 A 是 PLSDA 的潜变量数, k 为变量的数量, w_{ak} 为变量载荷, SS_a 是第 a 个 PLS 维度能够解释前面所有维度的残差平方和。同一维度上所有变量的 VIP 参数的平方和为 K , 因此 VIP 值 > 1 可说明变量对于样本分类有相对较大的贡献,即可认为是重要的影响因素。

6.5 模拟分析 通过判别模型可对重要影响因素进行模拟分析,得到具有实践意义的安全性分级

提示。

6.6 不良反应和相应处理 不良反应观察和判断参照 GBZ89-2007《中华人民共和国国家职业卫生标准·职业性汞中毒诊断标准》^[10]。外用九一丹期间若尿汞值升高至正常值 10 倍,或出现急性或慢性汞中毒临床表现者,则立即停止用药,并考虑驱汞等治疗;若停药 2 周后尿汞值仍超过正常值 2 倍则可考虑驱汞试验。

7 统计学方法 本研究所有统计及建模分析均采用基于 MATLAB 的统计分析工具箱及 PLSDA 分析工具箱。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 潜在安全性指标的筛选(图 1) 12 个一般安全性指标的 MS 均值及其 95% 置信区间显示,血液生化指标如白细胞、中性白细胞、血红蛋白、红细胞、血小板、ALT、AST 及血清肌酐等的 MS 均值均较低;而一些尿生化指标如尿 β_2 -MG、尿 NAG、24 h 尿蛋白及尿 α_1 -MG 均显示了较高的 MS 值,其中尿 β_2 -MG 的波动较大,明显不为 0,即其 MS 值的 95% 置信区间在 0 的右侧。故按上述波动较大的重点监测指标:尿 β_2 -MG、尿 NAG、24 h 尿蛋白及尿 α_1 -MG 的值将安全性划分为两个等级,本研究认为可能存在安全性问题,并将此患者记为 1 级,否则记为 0 级。本研究 50 例患者共有 27 例 1 级,23 例 0 级。

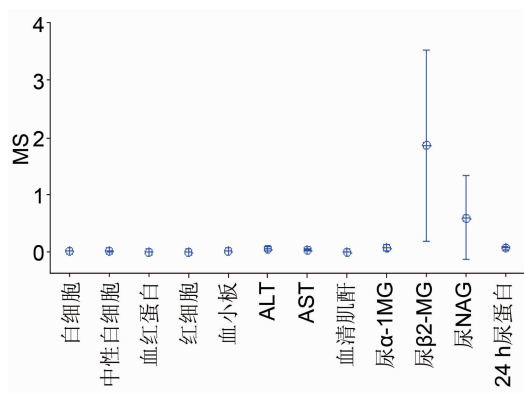


图1 各监测指标的 MS 均值及其 95% 置信区间图

2 安全等级中各影响因素的比较(表 1) 通过单因素方差分析发现:用药天数与用药量是显著的影响因素,与安全性等级 0 级比较,安全性等级 1 级患者的用药天数及用药量增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各因素在不同安全性等级中的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	安全性等级	
	0 级(23 例)	1 级(27 例)
年龄(岁)	31.870 ± 5.554	32.963 ± 6.334
病程(月)	8.209 ± 12.216	9.796 ± 15.923
用药前疮腔体积(cm ³)	24.173 ± 17.004	24.759 ± 18.339
停药第 1 天疮腔体积(cm ³)	14.255 ± 10.644	17.222 ± 13.554
用药前疮口面积(cm ²)	5.633 ± 4.471	6.110 ± 3.848
停药第 1 天疮口面积(cm ²)	4.455 ± 3.659	5.506 ± 3.860
用药天数(天)	8.435 ± 1.037	9.074 ± 0.874 *
用药量(g)	0.540 ± 0.291	0.831 ± 0.444 *
血汞 AUC(μmol/L × 用药天数)	0.565 ± 0.114	0.592 ± 0.086
尿汞 AUC(μmol/gCr × 用药天数)	0.776 ± 0.119	0.812 ± 0.094

注:与 0 级比较, *P < 0.05; AUC:曲线下面积

3 PLSDA 模型的优化及评估(图 2) 通过留一验证法优化得到的 PLSDA 的潜变量个数为 5, 以此建立的 PLSDA 判别模型在校正集、预测集及全集上对两个类别的判别准确率分别为 75.00% 和 73.68%, 71.43% 和 75.00%, 73.91% 和 74.07%。模型总的预测准确率为 74.00%, 特异度、灵敏度及 ROC 曲线下面积分别为 0.7826、0.7037 及 0.808。

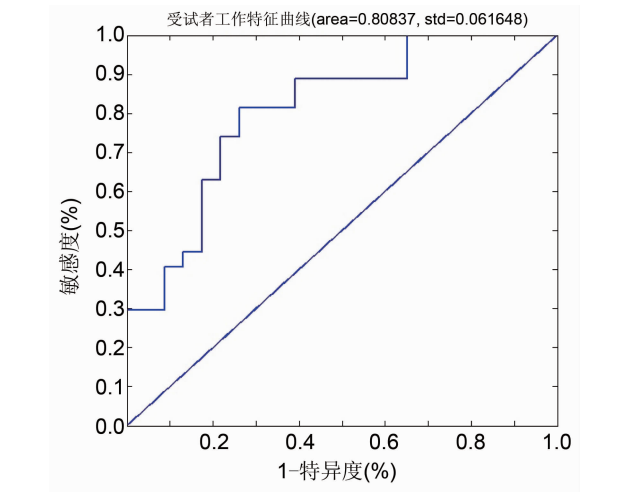


图 2 PLSDA 模型分类 ROC 曲线图

4 各因素 VIP 分析结果的比较(图 3) VIP 分析显示:用药量、用药天数及用药前疮腔体积对模型的分类具有重要影响。其余各因素的 VIP 值均 < 1, 对模型的分类影响不大, 分析结果与单因素方差分析的结果基本一致。

5 不同用量及用药时间对安全性等级的影响(图 4) 对用量在 0.1 ~ 1.85 g, 用药时间在 7 ~ 11 天的范围内进行仿真模拟, 结果显示:九一丹外用的安全性同时受用药时间及用量的影响, 较高的用量意味着需严格控制用药时间, 而更长的用药时间则必须通过减少用量以保证用药安全。

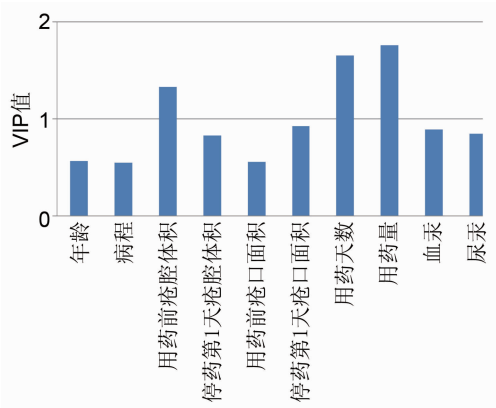
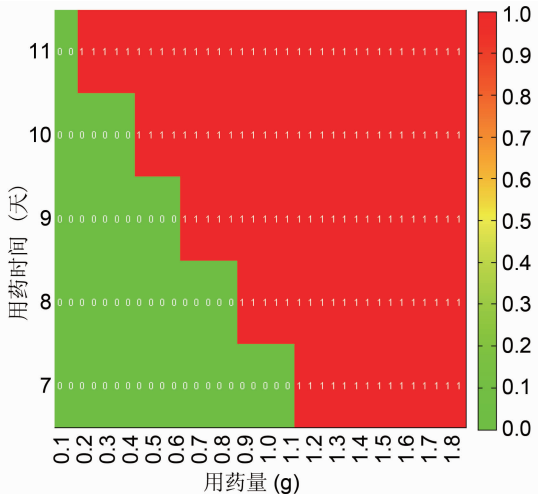


图 3 各因素 VIP 分析结果图



注:红色区域为模型判定为安全性等级 = 1; 绿色区域则判定为安全性等级 = 0

图 4 不同用量及用药时间对安全性等级的影响

6 不良反应 用药期间患者血汞水平平均明显上升, 但无 1 例超过正常参考值 10 倍以上, 且在停药后即明显下降。在整个用药及停药随访期均未出现任何急性或慢性汞中毒的临床表现。

讨 论

PLSDA 是一种基于偏最小二乘回归 (partial least-squares-regression, PLSR) 的分类模型, 因其更佳的筛选能力, PLSDA 被广泛应用于生物医学和药学的各领域^[5-9], 但在中医临床研究领域罕有报道。本研究应用 PLSDA 对中医外科传统外用制剂九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎的安全性进行分析。首先通过计算 12 个一般安全性指标的 MS 均值及其 95% 置信区间筛选出潜在安全性指标尿 β₂-MG、尿 NAG, 24 h 尿蛋白和尿 α₁-MG 作为评估潜在安全性的重点监测指标。由于在整个试验过程中, 所有的患者均未

表现出明显的中毒症状,为了摸索在临床上应用汞制剂的安全性预警机制,本实验按上述波动较大的重点监测指标的值将安全性划分为两个等级,即临床应用安全(0 级)与可能存在安全性问题(1 级)。若所有重点监测指标(尿 β_2 -MG、尿 NAG、24 h 尿蛋白,尿 α_1 -MG)的至少 3 个时刻点的测量值相对于用药前的水平均在正常范围(注:各指标的正常范围为)之外或者均超过用药前水平的 180%,认为可能存在安全性问题,并将此患者记为 1 级,否则记为 0 级。结果显示:50 例患者共有安全性分级 1 级 27 例,安全性分级 0 级 23 例。随后进行判别分析,进行 PLSDA 建模,并对预测集与全集进行预测。为了考察最重要的两个因素用量及用药天数对安全性等级判别的影响,本研究将其他因素固定在平均水平,用已建立的 PLSDA 模型对用量和用药时间进行仿真模拟,从图 4 模型中可见较低的用量即使在最大的用药时间也可能显示较好的安全性(模型判定的安全性等级=0),相反,用量在 ≥ 1.15 g 上即使是最低的用药时间也可能显示有潜在的安全性问题。为了在临床上更安全的使用汞制剂,本研究推荐使用在绿色区域的用量与用药时间的组合。如本研究的患者平均用量在约 0.8 g,那么安全的使用时间在 7~8 天,如果用药时间为 10 天,模型推荐的用量为 <0.45 g,若用药时间进一步延长,用量要明显减少,提示临床外用九一丹应在短时间内应用,用药时间应与用量成反比。因此大疮面应用用量较大,更应短期应用,中病即止;而小疮面、脓腐难脱者用药时间可略长,但也应尽量控制在 10 天内,方能确保九一丹外用的安全性。

九一丹由升丹(HgO)和煅石膏以 1:9 的比例配制而成。为了能客观评价九一丹的安全性,使九一丹这一简、便、验、廉的传统制剂能真正发挥作用,在临床得以合理应用。本研究以青壮年患病年龄为主,无基础疾病,病灶局限于乳房部的浆细胞性乳腺炎为研究对象,通过观察九一丹外用前后不同时间各安全性指标的变化,结合临床症状的观察,评估九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎的安全性。研究发现给药前后检测的安全性指标除血汞、尿汞水平变化与用药有明显的相关性,其他常规安全性指标如血常规、肝肾功能等均变化极小,而反映肾小管早期损伤的敏感性指标如尿 β_2 -MG、尿 NAG、24 h 尿蛋白,尿 α_1 -MG 则波动较大,可以作为九一丹外用安全性监测指标,尤其是尿 β_2 -MG 和尿 NAG,可以作为九一丹外用安全性监测的主要指标。

由于在整个观察期内 50 例患者均未能观察到汞

中毒的临床迹象,传统的统计分析方法难以有效利用现有的生物信息,对九一丹外用的安全性做出合理评价。因此本研究尝试运用偏最小二乘法建立九一丹外用治疗浆细胞性乳腺炎的安全性判别方程,发现用药量和用药时间是影响血汞、尿汞的最主要因素,而基于这两大因素建立的安全性分级仿真模型更揭示了临床外用九一丹治疗浆细胞性乳腺炎的用量和用药时间的安全区间,使临床外用九一丹时相对有据可循,为九一丹外用的安全性提供了一定的保障。

参 考 文 献

- [1] 上海市卫生局. 外科诊疗常规[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:14.
- [2] 国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准中医临床诊疗术语疾病部分[S]. 北京:中国标准出版社,1997:9.
- [3] 上海市卫生局. 上海市中医病证诊疗常规[M]. 第 2 版. 上海:上海中医药大学出版社,2003:156-157.
- [4] Perez-Enciso M, Tenenhaus M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach[J]. Hum Genetics, 2003, 112(5-6): 581-592.
- [5] Karp NA, Griffin JL, Lilley KS. Application of partial least squares discriminant analysis to two-dimensional difference gel studies in expression proteomics[J]. Proteomics, 2005, 5(1): 81-90.
- [6] Lutz U, Lutz RW, Lutz WK. Metabolic profiling of glucuronides in human urine by LC-MS/MS and partial least-squares discriminant analysis for classification and prediction of gender[J]. Analytical Chem, 2006, 78(13): 4564-4571.
- [7] Seo Y, Lee S, Koh D, et al. Partial least squares-discriminant analysis for the prediction of hemodynamic changes using near infrared spectroscopy[J]. J Optical Society Korea, 2012, 16(1): 57-62.
- [8] Song H, Peng JS, Yao DS, et al. Metabolic disorders of fatty acids and fatty acid amides associated with human gastric cancer morbidity[J]. Chin Med J, 2012, 125(5): 757-763.
- [9] Yue RC, Zhao L, Hu YH, et al. Metabolomic study of collagen-induced arthritis in rats and the interventional effects of Huanglian Jiedu Tang, a traditional Chinese medicine[J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2013, Article ID: 439690.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 职业性汞中毒诊断标准 GBZ 89-2007[S]. 上海:人民卫生出版社,2007:1-2.

(收稿:2013-12-23 修回:2014-08-15)