

步进法筛选心绞痛患者血清炎症因子 建立判别函数的研究

陈志斌 梁艳冰 唐皓 王中华 曾丽金 吴敬国 李振宇 马中富

【摘要】 目的 采用步进法(stepwise)判别分析(discriminant analysis)建立基于稳定型心绞痛(SAP)及不稳定型心绞痛(UAP)患者血清超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、白细胞介素(IL-4、IL-10)水平的判别函数(discriminant functions),在控制成本的前提下协助对心绞痛患者进行分型。**方法** 选择 39 例 SAP 患者、47 例 UAP 患者及 39 例健康志愿者以构成训练样本(training samples),采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 hs-CRP、MIF、IL-4 及 IL-10 水平,分别采用传统的纳入全变量方式及步进法对结果进行判别分析,根据函数考核结果对两种方法建立的判别函数的判别效率进行评估。**结果** 根据纳入全变量的方式对训练样本的年龄以及 hs-CRP、MIF、IL-4、IL-10 等生物标志物进行判别分析获得判别函数:健康对照组 = $-129.858 + 2.869 \times \text{年龄} - 2.451 \times \text{hs-CRP} + 1.393 \times \text{MIF} + 6.001 \times \text{IL-4} + 4.848 \times \text{IL-10}$; SAP 组 = $-161.037 + 2.896 \times \text{年龄} - 2.022 \times \text{hs-CRP} + 1.662 \times \text{MIF} + 6.703 \times \text{IL-4} + 6.287 \times \text{IL-10}$; UAP 组 = $-199.087 + 2.468 \times \text{年龄} - 1.440 \times \text{hs-CRP} + 3.404 \times \text{MIF} - 13.875 \times \text{IL-4} + 7.752 \times \text{IL-10}$ 。对上述函数进行回顾性考核的总错判率为 4.8%,交互验证考核的总错判率为 5.6%。再采用步进法筛选上述指标,程序建议纳入年龄、MIF 及 IL-10 并建立判别函数:健康对照组 = $-125.218 + 2.659 \times \text{年龄} + 0.599 \times \text{MIF} + 5.040 \times \text{IL-10}$; SAP 组 = $-157.864 + 2.721 \times \text{年龄} + 1.008 \times \text{MIF} + 6.468 \times \text{IL-10}$; UAP 组 = $-197.327 + 2.360 \times \text{年龄} + 2.932 \times \text{MIF} + 7.640 \times \text{IL-10}$ 。对步进法建立函数进行回顾性考核及交叉验证考核的总错判率均为 6.4%。两种方法所建立的判别函数对 SAP 及 UAP 患者的判别正确率相当,均达 100%。**结论** 步进法判别分析筛选后建立的基于年龄、血清 MIF、IL-10 的判别函数可协助判别不典型的 SAP 与 UAP 患者,具有较优的成本效益。

【关键词】 心绞痛; 超敏 C-反应蛋白; 巨噬细胞移动抑制因子; 白细胞介素; 步进法判别分析

The research of establishing discriminant function for patients with angina pectoris by stepwise analysis based on serum inflammatory factors CHEN Zhi-bin, LIANG Yan-bing, TANG Hao, WANG Zhong-hua, ZENG Li-jin, WU Jing-guo, LI Zhen-yu, MA Zhong-fu. Department of General Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of SUN Yet-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China
Corresponding author: MA Zhong-fu, Email: ma_zf@tom.com

【Abstract】 Objective To improve cost-efficiency, discriminant functions in stepwise method was founded for the differential diagnosis of angina pectoris by detecting the serum level of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), macrophage migration inhibitory factor (MIF), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) in patients with stable angina pectoris (SAP) and unstable angina pectoris (UAP). **Methods** Thirty-nine SAP patients and 47 UAP patients were enrolled into the study, while 39 healthy volunteers were enrolled into the controlled group forming the entire set of training samples. The serum levels of hs-CRP, MIF, IL-4 and IL-10 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Data was analyzed by software to define discriminant functions in the ways of "entering" and "stepwise". Both functions were evaluated by the results of validation. **Results** By the way of "enter independent together", the following discriminant functions were defined based on the data of training samples' age, hs-CRP, MIF, IL-4, IL-10: healthy control group = $-129.858 + 2.869 \times \text{age} - 2.451 \times \text{hs-CRP} + 1.393 \times \text{MIF} + 6.001 \times \text{IL-4} + 4.848 \times \text{IL-10}$; SAP group = $-161.037 + 2.896 \times \text{age} - 2.022 \times \text{hs-CRP} + 1.662 \times \text{MIF} + 6.703 \times \text{IL-4} + 6.287 \times \text{IL-10}$; UAP group = $-199.087 + 2.468 \times \text{age} - 1.440 \times \text{hs-CRP} + 3.404 \times \text{MIF} - 13.875 \times \text{IL-4} + 7.752 \times \text{IL-10}$. Retrospective validation showed 4.8% of total miss-grouping, while cross-validation showed 5.6% of total miss-grouping. By the way of "stepwise", the above data was screened by software and training samples' age, MIF and IL-10 were suggested to define the following functions: healthy control group = $-125.218 + 2.659 \times \text{age} + 0.599 \times \text{MIF} + 5.040 \times \text{IL-10}$; SAP group = $-157.864 + 2.721 \times \text{age} + 1.008 \times \text{MIF} + 6.468 \times \text{IL-10}$; UAP group = $-197.327 + 2.360 \times \text{age} + 2.932 \times \text{MIF} + 7.640 \times \text{IL-10}$. Both retrospective and cross validation showed 6.4% of total miss-grouping. Both sets of discriminant functions had the same efficiency (100%) for differential diagnosis of SAP and UAP. **Conclusion** The discriminant functions based on samples' age, MIF and IL-10, which were screened and suggested by stepwise method, may contribute to the differential diagnosis of atypical SAP and UAP, and therefore demonstrate better cost-efficiency.

【Key words】 Angina pectoris; High-sensitivity C-reactive protein; Macrophage migration inhibitory factor; Interleukin; Stepwise discriminant analysis

临床心绞痛主要分为稳定型心绞痛(SAP)及不稳定型心绞痛(UAP),患者容易进展为心肌梗死,需要及时强化药物治疗甚至血管重建,因此,正确的临床分型有助于个体化治疗。但经典的分型方式是依据患者临床症状出现的频率、症状严重程度等主观表现来划分,在糖尿病、脑血管意外后遗症或老年患者等高危人群中,由于痛觉减退等因素可能导致错误的临床分型。目前已发现多种生物学标志物有助于临床分型,如血清超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、白细胞介素(IL-4、IL-10)与心绞痛相关,然而不同指标与疾病的相关程度有所差异,全部进行检测将导致医疗成本上升。本研究中采用步进法判别分析的思想,通过对 hs-CRP、MIF、IL-4、IL-10 等指标进行检测及筛选,基于相关结果所得到的训练样本资料建立判别分析方程,以在保证判别正确率的前提下同时提高成本效益,并指导临床心绞痛患者的分型。

1 资料和方法

1.1 研究对象:采用前瞻性研究方法,选择中山大学附属第一医院急诊科及普内科 2010 年 7 月至 2011 年 6 月收治的 86 例患者,其中 39 例 SAP 患者年龄 55~73 岁,平均(64.1±4.7)岁;47 例 UAP 患者年龄 54~75 岁,平均(64.2±5.1)岁。SAP 及 UAP 的诊断及分型参照传统临床分型标准。剔除标准:年龄>75 岁,接受抗肿瘤药物/放射治疗、免疫抑制剂治疗及器官移植术后患者,人类免疫缺陷病毒感染(艾滋病)、粒细胞缺乏、糖尿病、脑血管疾病后遗症及长期透析患者。以同期 39 例健康志愿者作为对照组,年龄 53~74 岁,平均(63.0±5.6)岁。

本研究符合医学伦理学标准,经医院伦理委员会批准,所有检测获得受试者或家属知情同意。

1.2 研究方法:采集研究对象空腹 12 h 后清晨外周静脉血 3.5 ml,肝素锂抗凝,离心 10 min 取上清液待检。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 hs-CRP、MIF、IL-4、IL-10 水平,hs-CRP 试剂盒由美国 E&E 公司生产,MIF 试剂盒由美国 R&D 公司生产,IL-4 试剂盒由美国 BD 公司生产,IL-10 试剂盒由美国 RayBiotech 公司生产,操作过程严格按照说明书进行,每份标本进行重复检测并取平均值作为分析数据。

1.3 统计学分析:使用 IBM SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析法判断各组资料均数的同质性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;然后对训练样本的资料进行基于 Bayes 法的判别分析,分别采用纳入全部变量方式纳入全部已知变量及步进法筛选变量,分别建立判别函数,获得的判别函数最终采用回顾法及交互验证考核其错判率。

2 结果

2.1 各组血清 hs-CRP、MIF、IL-4 及 IL-10 水平比较(表 1):UAP 组患者血清 hs-CRP、MIF 水平明显高于健康对照组及 SAP 组(均 $P < 0.05$);SAP 组与健康对照组 hs-CRP、MIF 水平比较则差异无统计学意义。SAP 组、UAP 组血清 IL-4 水平明显高于健康对照组;且 SAP 组 IL-4 明显高于 UAP 组(均 $P < 0.05$)。SAP 组及 UAP 组血清 IL-10 水平明显高于健康对照组(均 $P < 0.05$);而 SAP 组与 UAP 组 IL-10 水平比较差异无统计学意义。

表 1 各组心绞痛患者血清炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	hs-CRP (mg/L)	MIF (μg/L)	IL-4 (ng/L)	IL-10 (ng/L)
健康对照组	39	3.50±1.00	8.38±1.32	0.15±0.05	15.00±2.41
SAP 组	39	4.48±0.97	9.80±1.45	0.21±0.06 ^a	19.98±1.87 ^a
UAP 组	47	12.34±2.87 ^{ab}	31.19±5.91 ^{ab}	0.18±0.03 ^{ab}	19.57±2.10 ^a

注:SAP:稳定型心绞痛,UAP:不稳定型心绞痛,hs-CRP:超敏 C-反应蛋白,MIF:巨噬细胞移动抑制因子,IL-4 和 IL-10:白细胞介素-4 和 -10;与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与 SAP 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 判别分析方程建立:基于年龄、hs-CRP、MIF、IL-4 及 IL-10 等变量资料,采用 Bayes 法经判别分析过程获得判别函数,所获得函数的系数及常数(表 2)为非标准化数据专用,可以直接代入新样本资料进行判别,而无需对资料进行标准化变换:健康对照组 = -129.858 + 2.869 × 年龄 - 2.451 × hs-CRP + 1.393 × MIF + 6.001 × IL-4 + 4.848 × IL-10。SAP 组 = -161.037 + 2.896 × 年龄 - 2.022 × hs-CRP + 1.662 × MIF + 6.703 × IL-4 + 6.287 × IL-10。UAP 组 = -199.087 + 2.468 × 年龄 - 1.440 × hs-CRP + 3.404 × MIF - 13.875 × IL-4 + 7.752 × IL-10。

根据步进法进行变量筛选,应用 SPSS 系统逐步将判别分析贡献最大的变量年龄、MIF 及 IL-10 纳入判别分析方程,获得如下判别函数:健康对照组 = -125.218 + 2.659 × 年龄 + 0.599 × MIF +

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1003-0603.2012.12.004

基金资助:广东省科技项目(2009B080701004, 2009B080701070)

作者单位:510080 广东广州,中山大学附属第一医院普内科

通信作者:马中富, Email: ma_zf@tom.com

$5.040 \times \text{IL-10}$ 。SAP 组 $= -157.864 + 2.721 \times \text{年龄} + 1.008 \times \text{MIF} + 6.468 \times \text{IL-10}$ 。UAP 组 $= -197.327 + 2.360 \times \text{年龄} + 2.932 \times \text{MIF} + 7.640 \times \text{IL-10}$ 。方程中包含各项判别函数的系数及常数见表 3。

表 2 各组心绞痛患者各炎症指标的非标准化判别函数系数及常数

组别	判别函数系数					方程常数
	年龄	hs-CRP	MIF	IL-4	IL-10	
健康对照组	2.869	-2.451	1.393	6.001	4.848	-129.858
SAP 组	2.896	-2.022	1.662	6.703	6.287	-161.037
UAP 组	2.468	-1.440	3.404	-13.875	7.752	-199.087

注:SAP:稳定型心绞痛,UAP:不稳定型心绞痛,hs-CRP:超敏 C-反应蛋白,MIF:巨噬细胞移动抑制因子,IL-4 和 IL-10:白细胞介素-4 和 -10

表 3 各组心绞痛患者年龄、MIF、IL-10 的非标准化步进法判别函数系数及常数

组别	判别函数系数			方程常数
	年龄	MIF	IL-10	
健康对照组	2.659	0.599	5.040	-125.218
SAP 组	2.721	1.008	6.468	-157.864
UAP 组	2.360	2.932	7.640	-197.327

注:SAP:稳定型心绞痛,UAP:不稳定型心绞痛,MIF:巨噬细胞移动抑制因子,IL-10:白细胞介素-10

应用上述方程时将待判别的新样本相应资料分别代入 3 个方程中,所得值最大者即该样本属于该类的概率最大。

2.3 对判别函数方程效度的回顾性考核及交互验证考核(表 4~5):考核判别函数并得到相应的错判率是判断判别方程效度的重要步骤。回顾性考核是将训练样本变量资料代入方程计算错判率,交互验证考核是剔除已知样本中 1 例,以剩余 $n-1$ 样品建立判别方程,再根据新获得方程对被剔除的样本进行考核,如此类推最后获得相应的错判率。对两种判别方法进行考核,纳入全部变量时回顾性考核中总错判率为 4.8%,而交互验证考核的总错判率为 5.6%;步进法判别时的回顾性考核及交叉验证考核的总错判率均为 6.4%。两种方法对 SAP 及 UAP 的判别正确率相当,均达 100%。

3 讨论

本研究中通过对 SAP 及 UAP 患者与健康志愿者的外周血生物标志物进行 ELISA 检测,基于判别分析的思想,利用不同生物标志物的水平建立判别函数。判别分析的特征是利用已知分组的训练样本,建立判别样本分组的判别函数,后续样本只需获知其相应变量的取值,代入判别函数后即可评估

表 4 回顾性及交互验证考核纳入全部变量下

		判别方程的效度			
考核方式	组别	例数	依函数计算的预测分组[例(%)]		
			健康对照组	SAP 组	UAP 组
回顾性考核	健康对照组	39	35(89.7)	4(10.2)	0(0)
	SAP 组	39	2(5.1)	37(94.9)	0(0)
	UAP 组	47	0(0)	0(0)	47(100.0)
交叉验证考核	健康对照组	39	35(89.7)	4(10.2)	0(0)
	SAP 组	39	3(7.7)	36(92.3)	0(0)
	UAP 组	47	0(0)	0(0)	47(100.0)

注:SAP:稳定型心绞痛,UAP:不稳定型心绞痛

表 5 回顾性及交互验证考核步进法建立判别方程的效度

		判别方程的效度			
考核方式	组别	例数	依函数计算的预测分组[例(%)]		
			健康对照组	SAP 组	UAP 组
回顾性考核	健康对照组	39	34(87.2)	5(12.8)	0(0)
	SAP 组	39	3(7.7)	36(92.3)	0(0)
	UAP 组	47	0(0)	0(0)	47(100.0)
交叉验证考核	健康对照组	39	34(87.2)	5(12.8)	0(0)
	SAP 组	39	3(7.7)	36(92.3)	0(0)
	UAP 组	47	0(0)	0(0)	47(100.0)

注:SAP:稳定型心绞痛,UAP:不稳定型心绞痛

样本的分组。然而在判别分析中并非所有变量均对分组的确定产生同样的贡献,为此引入了步进法判别分析,可筛选对分组贡献最大的数个变量,在保证判别效率的同时可以压缩所需要检测的变量^[1],特别对临床医学而言,一种疾病可以具有多种特征或多种生物标志物,全部检测固然可以全面反映疾病的特点,然而在医疗费用高涨的背景下,在不影响对疾病判断的基础上压缩检测项目,将有助于控制医疗成本。本研究中通过对年龄、hs-CRP、MIF、IL-4、IL-10 等变量的筛选,获得含有年龄、MIF 及 IL-10 的判别函数,其对 SAP 及 UAP 患者的判别正确率可以达到 100%,与纳入全部变量时判别函数的判别正确率相当,因此可以在保证判别效率的前提下提高成本效益。

近年来针对 SAP 患者的临床干预策略已经成为冠心病治疗领域中的重要争议热点。有学者认为对于持续性隐性缺血的 SAP 患者仍需考虑进行经皮冠状动脉介入治疗(PCI)^[2]。也有学者认为给予心绞痛患者最佳化的治疗手段,包括正确应用硝酸酯类、 β 受体阻滞剂、钙离子通道阻滞剂、抗血小板聚集药物等,可以充分发挥其控制 SAP 发作的作用,PCI 等血管重建手段在常规药物治疗失败或患者发生急性冠脉综合征(ACS)的情况下作为补充手段而实行,但不作为首选策略^[3]。特别是对经皮冠状动脉血管重建术与指南指导积极药物治疗的预后比较评估(COURAGE)试验的结果发表后,临床上针对

SAP 患者进行 PCI 的比例在国外已有明显下降^[4]。然而传统上患者目前仍然主要采用基于症状学的手段进行鉴别诊断,进一步结合生物标志物指标的鉴别诊断手段可能提高诊断效率,协助临床医师识别高危患者并确立治疗策略。

hs-CRP 是近年来研究较集中的急性期蛋白,被认为是循环中反映血管炎症反应的重要标志物,对心血管病危险具有独立预测作用。研究显示 ACS 患者 hs-CRP 水平明显高于 SAP 患者,并且与基质金属蛋白酶 9(MMP-9)水平呈正相关,提示 hs-CRP 可作为斑块损伤的标志^[5],然而 hs-CRP 的特异性较低,容易受到其他急性慢性炎症性疾病的影响^[6]。

MIF 是一种重要的非特异性促炎因子,既往研究显示,MIF 在盲肠结扎穿孔术(CLP)所致脓毒症小鼠体内及组织中动态升高,采用 MIF 拮抗剂可以降低脓毒症小鼠的死亡率^[7];而在慢性血管炎症性疾病如冠心病、动脉粥样硬化中也有明显升高^[8]。冠心病患者血浆 MIF 水平与冠状动脉受损程度呈正相关^[9]。

IL-4 及 IL-10 均是公认的重要的抗炎因子,实验研究显示,血必净注射液可改善脂多糖(LPS)所致急性肺损伤(ALI)动物的肺病变情况,同时动物体内 γ -干扰素(IFN- γ)/IL-4 比值下降,提示 IFN- γ /IL-4 平衡有助于减轻 LPS 所致 ALI^[10]。而另一项研究结果显示,IL-10 在脓毒症中呈持续升高趋势,可能显示机体抗炎反应激活过程^[11]。多数研究显示,在冠心病患者循环中 IL-4、IL-10 水平升高,而且与患者预后相关^[12-13];部分学者认为这种升高反映了在冠心病患者中抗炎反应的激活,然而尽管抗炎反应激活,但由于与炎症反应程度不平衡,因而无法拮抗炎症反应过程带来的损伤^[14]。

本研究显示,同步纳入 hs-CRP、MIF、IL-4、IL-10 的判别函数对判断健康者及 SAP、UAP 患者时具有较佳的判别正确率,提示在总括考虑这些生物标志物的情况下能够较好地协助鉴别诊断。但考虑到本研究中的主要目标是鉴别诊断 SAP 和 UAP,步进法判别分析所得函数与纳入全部变量的函数在评估 SAP 和 UAP 患者方面具有一致的正确率,因此,完全可以在减少变量、控制成本的基础上采用步进法判别分析所得函数进行心绞痛临床分型的鉴别诊断。

判别分析所得函数的拟合程度取决于训练样本的数量,为进一步提高判别函数的正确率,将采

用多中心研究手段获得大规模的训练样本,以获得具有更好拟合度的判别函数。

参考文献

- [1] Schüürmann G, Aptula AO, Kühne R, et al. Stepwise discrimination between four modes of toxic action of phenols in the Tetrahymena pyriformis assay. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16: 974-987.
- [2] Stankovic G. Percutaneous coronary intervention for stable patients: is there any benefit beyond symptom relief?. *Arq Bras Cardiol*, 2009, 93: 196-199.
- [3] Kones R. Recent advances in the management of chronic stable angina II: anti-ischemic therapy, options for refractory angina, risk factor reduction, and revascularization. *Vasc Health Risk Manag*, 2010, 6: 749-774.
- [4] Ahmed B, Dauerman HL, Piper WD, et al. Recent changes in practice of elective percutaneous coronary intervention for stable angina. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2011, 4: 300-305.
- [5] 马承泰, 蒋艳霞, 顾华丽, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶-9 和超敏 C-反应蛋白水平及其相关性分析. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 367-369.
- [6] Agarwal A, Kamath N, Baliga S. High sensitivity C reactive protein in classical Kawasaki disease. *Indian Pediatr*, 2011, 48: 330-331.
- [7] 张振辉, 陈晓辉, 林佩仪, 等. 巨噬细胞移动抑制因子在脓毒症小鼠中的作用及其干预研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 481-484.
- [8] Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19: 76-86.
- [9] 杨丽霞, 郭瑞威, 齐峰, 等. 巨噬细胞游走抑制因子及其下游信号通路血浆水平与冠状动脉病变程度的相关性. *中华心血管病杂志*, 2008, 36: 912-915.
- [10] 何国鑫, 范丽娟, 罗文朝, 等. 血必净注射液对内毒素诱导急性肺损伤大鼠 γ -干扰素/白细胞介素-4 失衡的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 102-104.
- [11] 孙荣青, 张少雷. 脓毒症早期血清白细胞介素-18 和 10 在疾病严重程度及预后评估中的价值研究. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 299-301.
- [12] Sisakian AS, Davtian AR, Pepoian SK, et al. The influence of beta-adrenoblocking therapy on the markers of systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Klin Med (Mosk)*, 2011, 89: 56-59.
- [13] Mälarstig A, Eriksson P, Hamsten A, et al. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart*, 2008, 94: 724-729.
- [14] Szodoray P, Timar O, Veres K, et al. TH1/TH2 imbalance, measured by circulating and intracytoplasmic inflammatory cytokines—immunological alterations in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Scand J Immunol*, 2006, 64: 336-344.

(收稿日期: 2012-06-02)

(本文编辑: 李银平)