

·方法学研究·

基于因子分析方法筛选大鼠溃疡性结肠炎的敏感指标

赵 益¹, 李冰涛², 刘 燕¹, 赖小东¹, 刘红宁¹, 徐国良¹ (1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西 南昌 330034; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410000)

摘要: **目的** 运用因子分析方法探讨三硝基苯磺酸(TNBS)+乙醇诱导的溃疡性结肠炎(UC)的敏感性指标。**方法** SD大鼠随机分为正常对照组、模型组;以TNBS+乙醇诱导UC模型,模型复制5d后测定大鼠体质量、隐血、稀便情况,计算疾病活动指数(DAI指数)和肠指数;比色法检测结肠组织匀浆上清液髓质过氧化酶(MPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)含量;酶联免疫吸附(ELISA)法检测血浆中白介素(IL)-4、IL-18、P-选择素含量。通过因子分析法评价各指标的主成分,并进一步计算出判别标准b值,以确定敏感指标。**结果** UC在炎症和氧化方面指标经因子分析后,用主成分提取得到4个成分,特征指数 $1.382>1$,判别标准b值的排序为DAI指数>肠指数>MPO>肠质量>MDA。**结论** 利用因子分析可以指导UC大鼠模型敏感指标的筛选,可选取DAI指数、肠指数、MPO等作为大鼠UC敏感性指标。

关键词: 因子分析;三硝基苯磺酸;溃疡性结肠炎;敏感指标

中图分类号: R574.621; R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0756-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.027

Screening of Sensitive Indexes of TNBS-induced Ulcerative Colitis in Rats by Factor Analysis

ZHAO Yi¹, LI Bingtao², LIU Yan¹, LAI Xiaodong¹, LIU Hongning¹, XU Guoliang¹ (1. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330034 Jiangxi, China; 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the sensitive indexes of rat ulcerative colitis model induced by trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) and ethanol-induced using the method of factor analysis. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group and model group. Rat model of ulcerative colitis was induced by TNBS and ethanol. Five days after the modeling, we examined rat body weight, occult blood and loose stool, and calculated disease activity index (DAI) and colon index. The contents of medullary peroxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO) in colon tissue homogenate were detected by colorimetric method. The interleukin 4 (IL-4), IL-18, P-selectin levels of plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Factor analysis method was used to evaluate the principal components of each index, and then the discriminant criteria b value was calculated for defining the sensitive index. **Results** After factor analysis, 4 principal components of inflammation and oxidation were extracted, and the characteristic exponent was $1.382(>1)$. The discriminant criteria b value for DAI, colon index, MPO, intestinal weight, MDA was in decreasing sequence. **Conclusion** The factor analysis method can be used for the screening of the sensitive indexes to evaluate rat ulcerative colitis induced by TNBS+ethanol, and DAI, colon index, MPO, intestinal weight, MDA can be used as the sensitive indexes of UC rats.

Keywords: Factor analysis; Trinitro-benzene-sulfonic acid; Ulcerative colitis; Sensitive indexes

收稿日期: 2014-05-23

作者简介: 赵益, 女, 讲师, 研究方向: 中药药理学。Email: zhysyz2008@163.com。通讯作者: 徐国良, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理与药代动力学。Email: xuguoliang6606@126.com。

基金项目: 国家 973 计划课题(2010CB530603)。

目前, 溃疡性结肠炎(UC)的致病因素和发病机制尚未完全明确, 多数学者认为本病是由多因素作用所致, 包括免疫、感染、遗传及精神心理等因素^[1]。三硝基苯磺酸(TNBS)加乙醇诱导的 UC 模型是一种常见的动物模型^[2], 简单易行, 重复性好, 可以诱导大鼠结肠炎症伴见溃疡形成, 且溃疡仅局限在黏膜层, 与人类的 UC 病理特点类似, 诱导 1 周后多为急性期改变, 以大量炎细胞浸润为主^[3]。Shi XZ 等^[4]研究 TNBS 诱导的 UC 模型, 发现诱导第 5 天, 黏膜层、黏膜下层以及肌层的氧化应激反应以及细胞因子的含量发生变化。但是哪种指标是 TNBS 加乙醇诱导的 UC 模型的敏感指标, 能够反映 UC 的本质尚不清楚。本文基于数据分析方法——因子分析, 寻找本模型的敏感指标, 为 UC 药物的作用机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量(200 ± 20) g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药物及试剂 三硝基苯磺酸(TNBS), 美国 Sigma 公司, 批号: 201210; 隐血测试盒, 南京建成生物工程研究所, 批号: 20121221; 髓质过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20121206, 20121221, 20121217, 20121212; 考马斯亮兰, 南京建成生物工程研究所, 批号: 20121109; 大鼠白介素(IL)-4、IL-18、大鼠 P-选择素(P-selectin)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒, 上海西塘生物科技有限公司, 批号分别为: 1211121, 1212131, 1212171。

1.3 仪器 SpectraMax Plus384 全波长酶标仪, 美国 Thermo 公司; U-3010 紫外分光光度计, 日本日立公司。

1.4 动物模型复制及处理 20 只大鼠适应性饲养 1 周后, 随机平均分为正常对照组和模型组, 每组 10 只。正常对照组常规饲养。模型组禁食不禁水 24 h 后, 给予 2% 戊巴比妥钠(45 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 用注射器抽吸 5% TNBS 原液 1 mL, 再抽吸 0.25 mL 的 50% 乙醇混合, 用 10# 胃管(裁剪成长 12 cm, 用前液体石蜡浸润)插入肛门上段 8 cm 一次性注入混合试剂, 再吸 0.5 mL 空气, 注入胃管, 尽量将胃管药液注入肠腔。轻揉大鼠腹部 1 min, 使 TNBS 和乙醇液均匀地与大鼠结肠黏膜接触。然后将大鼠头向下, 身体倾斜 45 °C, 放置至自然清醒。模型复制后第 2 天所有大鼠眼眶取血, 比色法测定 MPO 含量, 检测大便隐血情况, 确定模型复制成功后, 以隐血及体质量

为依据, 遴选出合格的模型动物作为模型组。5 d 后, 测定大鼠体质量、隐血、稀便情况, 计算疾病活动指数(DAI 指数), 取溃疡组织, 称质量, 并测量结肠长度, 计算肠指数, 之后制成 10% 的匀浆液, 比色法检测匀浆上清液 MPO、MDA、SOD、NO 含量; ELISA 法检测血浆中 IL-4、IL-18、P-选择素含量, 通过因子分析法评价各指标对 UC 的敏感度, 确定敏感指标。

1.5 因子分析与敏感指数计算

1.5.1 数据归一化处理 由于各指标的单位不同、变化范围不同, 因此首先对实验所得的指标值进行归一化处理。

1.5.2 因子相关性的检验 应用 SPSS20.0 统计软件, 选用 KMO 检验和巴雷特检验, KMO 值大于 0.7, 且概率小于显著性水平 0.05, 则通过检验。

1.5.3 因子提取和因子载荷矩阵的求解 选择以主成分法作为因子提取方法, 得到 UC 相关指标因子分析的特征值和方差贡献率。按照因子提取标准: 特征值 ≥ 1, 方差累计贡献率达到 70% 以上。

1.5.4 因子旋转 当一个因子不能单独代表原有的一个变量, 因子模糊不清, 这时因子就要进行旋转, 尽量使一个变量在较少的几个因子上有比较高的载荷。

1.5.5 敏感性指标确定与排序^[5] 将正常对照组和模型组 12 个指标数据进行敏感性评价, 需要给出一个判别敏感性的标准。模型组与正常对照组同一指标的样本数据之间的差异越大, 说明这个指标的变化越大, 即此指标越敏感。在数理统计中判别两组数据的差异

性常用统计量 T 衡量, $T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{Sw \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$, 其中 $\bar{X}_1, \bar{X}_2$

分别为两组数据的均数, $Sw = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$,

为样本合并方差, n_1, n_2 为样本容量, S_1, S_2 是正常组和模型组某个指标的标准差。但是因为每个指标数据的变化范围不同, 所以不能仅比较绝对的差异, 应

该考虑相对变化率。定义相对变化率 $m = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{\bar{X}_1}$, 其

中, $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ 分别为正常组和模型组的某个指标数据的均数。在此基础上构造一个新的判别标准 $b = T \times m$ 。b 越大排序越靠前, 说明越敏感。

2 结果

2.1 模型复制结果 模型复制后第 2 天, 模型组大鼠均出现泄泻, 隐血测定为阳性, 表明模型复制成功。

2.2 因子相关性检验与因子提取 应用 SPSS20.0 统计软件, 本实验 KMO 为 0.882, 接受原假设, 说明适合因子分析。进而选择以主成分法作为因子提取方法, 当提取 4 个公因子时, 其因子提取的特征值为 1.382, 方差累计贡献率达到 88.537 %, 符合因子提取的要求。因此提取这 4 个因子, 便能较好的代表了绝大部分信息, 能够对所分析的问题进行较好的解释, 见表 1、图 1。

表 1 UC 相关指标因子分析的特征值及方差贡献率
Table 1 Eigenvalues of ulcerative colitis and related indicators of factor analysis of variance contribution rate

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率 /%	累积贡献率 /%	合计	方差贡献率 /%	累积贡献率 /%
1	4.794	39.948	39.948	4.794	39.948	39.948
2	2.527	21.058	61.006	2.527	21.058	61.006
3	1.922	16.018	77.024	1.922	16.018	77.024
4	1.382	11.513	88.537	1.382	11.513	88.537
5	0.829	6.910	95.447			
6	0.400	3.330	98.777			
7	0.147	1.223	100.000			
8	1.822 × 10 ⁻⁶	1.518 × 10 ⁻⁵	100.000			
9	5.161 × 10 ⁻⁷	4.301 × 10 ⁻⁶	100.000			
10	4.232 × 10 ⁻⁸	3.527 × 10 ⁻⁷	100.000			
11	-1.568 × 10 ⁻⁶	-1.307 × 10 ⁻⁵	100.000			
12	-4.130 × 10 ⁻⁶	-3.442 × 10 ⁻⁵	100.000			

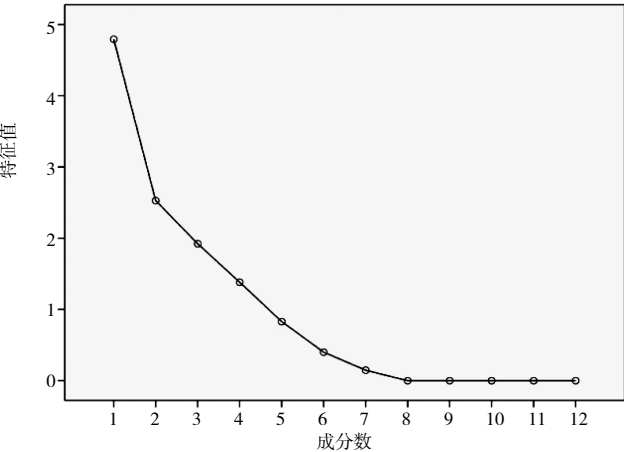


图 1 各指标因子成分特征值的碎石图
Figure 1 The scree plot of components of each index factor eigenvalues

2.3 主成分分析法计算各因子成分矩阵结果 经软件求得各因子成分矩阵, 若以各变量的成分得分大于 0.7 为依据, 那 DAI 指数这个变量都不在这 4 个成分中, 说明指标间有相当程度的成分矩阵难以合理解释其实际意义, 需要进行因子旋转, 见表 2。进一步用方差最大化方法进行因子旋转, 得到因子旋转成分矩阵。

所有指标数据进行正交旋转后, 根据因子成分矩阵可分为 4 个组, 第 1 组: DAI 指数、MDA、NO、IL-4、IL-18; 第 2 组: 肠指数、SOD、肠质量; 第 3 组: MPO、P 选择素; 第 4 组: 肠长度、体质量。成分值越大, 表明指标之间相关性越强, 见表 3。

表 2 主成分分析法计算的各因子成分矩阵
Table 2 Each factor matrix of each component

指标	成分			
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组
肠指数	0.413	-0.871	-0.102	0.089
DAI 指数	0.536	0.278	0.384	0.035
MPO	-0.285	-0.258	0.854	-0.100
MDA	0.789	0.096	0.573	0.053
SOD	0.783	-0.235	-0.381	0.305
NO	0.946	0.249	-0.022	-0.068
IL-4	0.779	0.341	-0.016	-0.284
IL-18	-0.776	-0.447	-0.143	0.276
P 选择素	-0.143	0.713	-0.555	0.298
肠长度	-0.733	0.338	0.413	0.382
肠质量	0.564	-0.602	0.043	0.549
体质量	0.196	0.443	0.246	0.754

表 3 因子旋转后各成分的矩阵
Table 3 Ingredients rotation matrix

指标	成分			
	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组
肠指数	-0.056	<u>0.900</u>	0.197	-0.310
DAI 指数	<u>0.650</u>	0.033	0.153	0.258
MPO	-0.101	-0.153	<u>0.916</u>	0.120
MDA	<u>0.831</u>	0.273	0.359	0.261
SOD	0.385	<u>0.776</u>	-0.396	0.015
NO	<u>0.906</u>	0.298	-0.229	0.006
IL-4	<u>0.862</u>	0.052	-0.200	-0.136
IL-18	<u>-0.941</u>	0.049	0.104	0.032
P 选择素	-0.050	-0.370	<u>-0.819</u>	0.342
肠长度	-0.473	-0.544	0.252	<u>0.620</u>
肠质量	0.095	<u>0.953</u>	0.113	0.233
体质量	0.208	0.056	-0.124	<u>0.896</u>

注: 提取方法: 主成分; 旋转法: 具有 Kaiser 标准化的正交旋转法, 旋转在 6 次迭代后收敛; 同一列有下划线的指标属于同一组。

2.4 敏感性指标与排序 经计算 b 值, 排名前 5 名的指标是 DAI 指数、肠指数、MPO、肠质量、MDA, 故选择其为敏感性指标评价 UC 大鼠模型, 见表 4。

3 讨论

在多指标综合评价方法中, 传统方法对于权重的设置往往带有一定的主观随意性, 将多元统计引入综合评价方法, 如因子分析法, 可以克服人为确定权数的缺陷, 并可简化数据, 通过较少的公共因子反映复

表 4 UC 12 个指标敏感性排序

Table 4 The sort of 12 sensitivie index in ulcerative colitis

指标	b 值	排序
肠指数	24.1389	2
DAI 指数	33.5503	1
MPO	23.9775	3
MDA	6.2955	5
SOD	3.2103	6
NO	0.4286	7
IL-4	0.0381	12
IL-18	0.3068	8
P- 选择素	0.2221	9
肠长度	0.1850	10
肠质量	11.4648	4
体质量	0.1446	11

杂现象的基本结构，可使综合评价结果唯一，而且客观合理。使用因子分析法的前提条件是评价指标之间应该有较强的相关关系。如果指标之间的相关程度很小，指标不可能共享公共因子，公共因子对于指标的综合能力就偏低^[6]。本实验利用因子分析法将 UC 反映出来的多种病理指标进行归纳、分类，以期找出其“黄金指标”，弥补传统加权平均法、专家经验法等综合评价方法的不足。

目前因子分析广泛应用于证候分类、证候分布、证型规律等方面的研究，如李毅等^[7]采用因子分析，将消化性溃疡的中医证候进行分类，将中医证候分成 5 类：脾胃虚寒证、肝胃气滞证、瘀阻胃络证、胃热炽盛证、胃阴亏虚证，并得出证型的分布情况以及所占比例大小；查青林等^[8]对类风湿性关节炎主观症状进行因子分析，并探讨其结果与免疫指标的关系。这些研究更加规范了症状的分类，而且用因子分析的结果与传统证候分型进行比对，显示出一致性。其次，因子分析还用于药物作用机制以及药物的质量评价研究，如张磊等^[9]用因子分析探讨定经汤调节卵巢早衰的生物学机制，得到 IL-1 是定经汤干预生殖内分泌网络主调控因子与其他公共因子的共有生物分子。李睿等^[10]将因子分析统计技术引入茵栀黄注射液的评价性抽样结果分析，对进一步利用评价性抽样数据进行药品质量综合评价作了有效的尝试。

本实验从氧化应激和细胞因子变化两个方面，评价 TNBS 诱导的 UC 的病理变化，进行因子分析后得到 4 个公共因子。再将这 4 个公因子里代表的指标进行敏感性评价^[5]，最终选取 DAI 指数、肠指数、MPO、肠质量、MDA 作为敏感性指标评价 UC。

DAI 指数是对疾病的活动性进行量化处理，从而

客观准确地反映疾病的活动性，帮助临床医师作出正确的医疗决策^[11]。在动物实验中，DAI 指数是 UC 疾病及其药物评价的常用指标。肠指数、肠重量能反映 UC 的严重程度，是全面反映 UC 模型的常用指标。MPO 是一种存在于髓系细胞（主要是中性粒细胞和单核细胞）的嗜苯胺蓝颗粒中，为一种重要的含铁溶酶体，作为中性粒细胞的功能标志和激活标志，其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞(PMN)的功能和活性状态，是中性粒细胞浸润的重要指标^[12]，其表达与组织炎症的严重程度呈正相关，可作为监测指标反映 UC 病人病情的严重程度。MDA 的含量可评价组织中氧自由基的量和脂质过氧化的强度，可间接评价细胞、组织受损的程度^[13]。因此，DAI 指数、肠指数、MPO、肠质量、MDA 都一定程度上反映出 UC 模型的病理状况及严重程度，佐证了本研究筛选出的敏感指标的合理性。

参考文献：

[1] 王宇华, 马世平, 戴岳. 溃疡性结肠炎的病理机制和治疗药物[J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12 (2): 31-34.

[2] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96: 795-803.

[3] 张涛, 谢建群. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(4): 240-241.

[4] Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300: 41-51.

[5] 李静. 基于均匀设计的三首补肾阳类方的配伍优化研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011: 32-36.

[6] 游家兴. 如何正确运用因子分析法进行综合评价[J]. 统计教育, 2003, 11(5): 11-12.

[7] 李毅, 张小萍. 消化性溃疡中医证候的因子分析[J]. 时珍国医国药, 2010, 12(20): 3379-3380.

[8] 查青林, 何羿婷, 闰小萍, 等. 类风湿性关节炎主观症状因子分析及其与免疫指标的关系[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11 (11): 839-841.

[9] 张磊, 邓树泳, 张琰, 等. 基于因子分析的定经汤调节卵巢早衰生物学机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 237-240.

[10] 李睿, 曹玲, 王玉, 等. 基于因子分析的茵栀黄注射液质量评价[J]. 上海医药, 2011, 32(9): 449-453.

[11] 谢艳, 魏兵, 欧阳钦. 疾病活动指数在炎症性肠病诊治中的应用[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(9): 559-560.

[12] 范晓红, 李治建, 斯拉甫·艾白, 等. 没食子有效部位抗溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (12): 26-28.

[13] 黄俊, 罗和生, 李颖. 大鼠实验性溃疡性结肠炎中 NO、MDA、SOD 的变化[J]. 医学文选, 2001, 12, 20(6): 795-797.

(编辑：梁进权)