

# 自控式缓释系统治疗大鼠体内铬、钴离子异常增高的实验研究

陈桂文,葛雨庆,刘 杨,刘 锋\*

南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:构建一种自控式缓释系统,能持续、有效地控制大鼠体内异常增高的铬、钴离子。方法:制备负载乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的缓释系统。通过膝关节腔注射铬钴钼(CoCrMo)纳米微粒悬液构建体内铬、钴离子升高的大鼠模型。将大鼠模型随机分为4组,分别经腹腔注射生理盐水(生理盐水组)、EDTA溶液(EDTA组)、二氧化硅微球空载体溶液(空载组)及载有EDTA的自控式缓释系统溶液(载药组)。在此过程中继续注射纳米颗粒悬液,观察大鼠血清铬、钴离子浓度的变化。结果:在经过药物治疗之后,短期内EDTA组和载药组金属离子浓度均显著降低。而随着时间延长,EDTA组大鼠血清金属离子浓度迅速回升,载药组则保持相对正常,差异具有统计学意义。结论:这种自控式缓释系统能持续有效降低实验动物体内异常增高的金属离子,为治疗金对金人工关节置换术后金属离子的异常增高提供选择。

**[关键词]** 缓释系统;金属对金属;离子浓度

**[中图分类号]** R687.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)07-940-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180713

## Treatments of chromium and cobalt ion abnormal increase in rats with a self-controlled sustained-release system

Chen Guiwen, Ge Yuqing, Liu Yang, Liu Feng\*

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To construct a sustained-release system to control the abnormally increase of chromium and cobalt ion concentration persistently and effectively in rats. **Methods:** First, a sustained-release system loaded with ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) was constructed. Then, the rat models were established by intra-articular injection of CoCrMo nanoparticles. Afterwards, the rat models were randomly divided into 4 groups, injected intraperitoneally with normal saline, EDTA, silica microsphere empty carrier solution and EDTA-loaded system solution, respectively, during which, the rats were injected with CoCrMo nanoparticles as before. The blood chromium and cobalt ion concentrations were measured. **Results:** After the therapy, the concentration of metal ions in groups receiving EDTA and EDTA-loaded system solution decreased significantly in the short run. However, as the time goes, the concentration of metal ions in group injected with EDTA increased and with EDTA-loaded system solution, stayed low, relatively, there was a statistically significant difference between these 2 groups. **Conclusion:** This sustained release system can effectively reduce the continuous increase of metal ions in the serum of rats, which can offer an alternative treatment for the abnormally increased metal ion after arthroplasties.

**[Key words]** sustained-release system; metal-on-metal; metal ion abnormal increase

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):940-944, 982]

全球每年有100余万患者接受人工全髋关节置换术<sup>[1]</sup>。2005—2006年,美国大约有35%的患者接受了金对金全髋关节置换<sup>[2]</sup>。金对金全髋关节磨损后产生大量纳米级金属微粒,微粒经电解后产生大

量铬、钴离子<sup>[3]</sup>。Dahlstrand等<sup>[4]</sup>发现,金对金全髋关节置换术后2年,患者血清中钴、铬和镍离子浓度分别是对照组的15.3、5.2和2.1倍。Ball等<sup>[5]</sup>研究发现,金对金全髋关节置换术后半年患者血清钴、铬离子浓度是术前的5.8和3.6倍。可见,金对金全髋关节置换后金属离子异常增高已成为事实。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81572136)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: njliuf@hotmail.com

国际癌症研究机构认定6价铬离子是人类确定

(I类)致癌物,钴离子是可疑(II B类)致癌物<sup>[6]</sup>。因此,金对金全髌关节置换术后金属离子异常增高是否增加肿瘤的发生率,值得警惕。此外,Chandran等<sup>[7]</sup>对金对金全髌关节置换后的患者进行了9年的随访,发现14%的患者发生慢性肾功能损害,甚至有6%的患者发生肾功能衰竭。他认为这种肾脏损害与金对金全髌关节置换术存在因果关系。可见金对金全髌关节置换术后,体内金属离子异常增高,尤其铬、钴离子蓄积是一个值得关注的问题。

目前尚无任何治疗方法来解决这一问题。在职业病防治领域,利用金属络合剂结合过量的金属离子是治疗金属离子急性中毒的首选方法。常用的络合剂中,EDTA与铬离子的结合常数最高,是铬离子中毒常用的络合剂<sup>[8]</sup>。但是,在金对金全髌关节置换术后,铬、钴离子的产生是长期、少量和动态变化的过程,显然无法通过短期、大剂量的静脉注射来治疗。另外,EDTA过量使用后不仅络合钴、铬离子,也络合体内其他正常的微量元素,使体内微量元素发生紊乱,引发新的疾病<sup>[9]</sup>。为了既持续有效地降低金对金全髌关节置换术后异常增高的金属离子又减少不良反应,可设计一种自控式缓释系统,即当体内钴、铬离子升高到一定水平时,该缓释系统自动释放EDTA来络合体内过量的钴、铬离子;而当钴、铬离子下降至正常水平时,该缓释系统自动关闭。

近年来,“药物智能控制释放”技术正蓬勃发展,人们设计出一种中空的介孔二氧化硅纳米微球(hollow mesoporous silica nanoparticles, HMSNs)来装载药物<sup>[10-11]</sup>。用HMSNs作为控制药物智能释放的载体,关键需要在微球上“安装”一种“阀门系统”,这种系统由“感受器”与“阀门”组成<sup>[12]</sup>。目前,已有多个领域研制出对pH、温度、光、酶及氧化还原反应等信号响应的“阀门系统”<sup>[13]</sup>。

本研究旨在通过构建对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感并负载EDTA的缓释系统,观察该自控式缓释系统能否持续有效地降低大鼠体内异常增高的钴、铬离子。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

CoCrMo纳米微粒来自陈哲峰主任的馈赠,平均直径为(54.8 ± 22.4)nm<sup>[14]</sup>。将其配制为2.5 mg/mL的纳米微粒生理盐水悬液,以耐高温高压的橡胶塞封闭瓶口,每次注射前均进行灭菌处理。由于纳米颗粒有聚集属性,所以每次向实验动物关节腔注射前,应将装有各浓度微粒悬液的玻璃瓶置于超声仪中

560 W振荡20 min,并在操作过程中维持振荡状态,确保纳米微粒处于良好的分散状态。

100只8周龄清洁级健康雄性SD大鼠,体重(200 ± 10)g(江苏省实验动物中心)。饲养于中心独立通风系统环境下,室温(20 ± 2)℃,相对湿度(60 ± 10)%,光照周期为12 h。所有动物在正式处理前适应性饲养1周。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感并负载EDTA的自控式缓释系统

HMSNs的制备:采用溶胶-凝胶法(Sol-Gel)制备HMSNs,再经超声震荡将EDTA负载,并利用透射电子显微镜(transmission electronic microscope, TEM)观察其颗粒形态及大小。为HMSNs“安装”“阀门”:用苯基硼酸修饰HMSNs并加入IgG,使HMSNs表面的苯基硼酸通过形成酯键与IgG相连。体外检测缓释系统的效能:将制备好的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感的中空IgG-HMSNs负载罗丹明B染色剂后,加入不同浓度(0.5、1.0、2.0 mmol/L)的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液或生理盐水,通过衰减全反射傅里叶变换红外光谱(attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FT-IR)检测罗丹明B的释放量与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度之间的关系,每小时观测1次,持续12 h。

#### 1.2.2 建立体内铬、钴离子异常增高的大鼠模型

80只大鼠采用膝关节腔注射2.5 mg/mL CoCrMo纳米微粒悬液0.1 mL,另20只大鼠注射0.1 mL生理盐水作为对照,每周注射1次,10周后取血,通过电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)检测全部大鼠血清中的铬、钴离子及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度。

#### 1.2.3 应用自控式缓释系统降低大鼠模型体内异常增高的铬、钴离子

将80只体内铬、钴离子升高的模型大鼠随机分为4组(每组20只),分别经腹腔注射生理盐水(生理盐水组)、6 mmol/L的EDTA溶液(EDTA组)、不含EDTA的二氧化硅空载体溶液(空载组)、负载EDTA的二氧化硅纳米微球(载药组)各0.4 mL,每周注射3次,连续2周。自之前造模步骤中取血后每隔4周经内眦静脉采血,利用ICP-MS测量血清铬、钴金属离子浓度,持续24周,在此过程中实验组依然每周1次注射纳米颗粒悬液。最后一次采血结束后,将大鼠处死。

### 1.3 统计学方法

运用SPSS18.0软件进行统计学分析。实验数

据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两分析采用LSD法,两组间比较采用非配对 $t$ 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

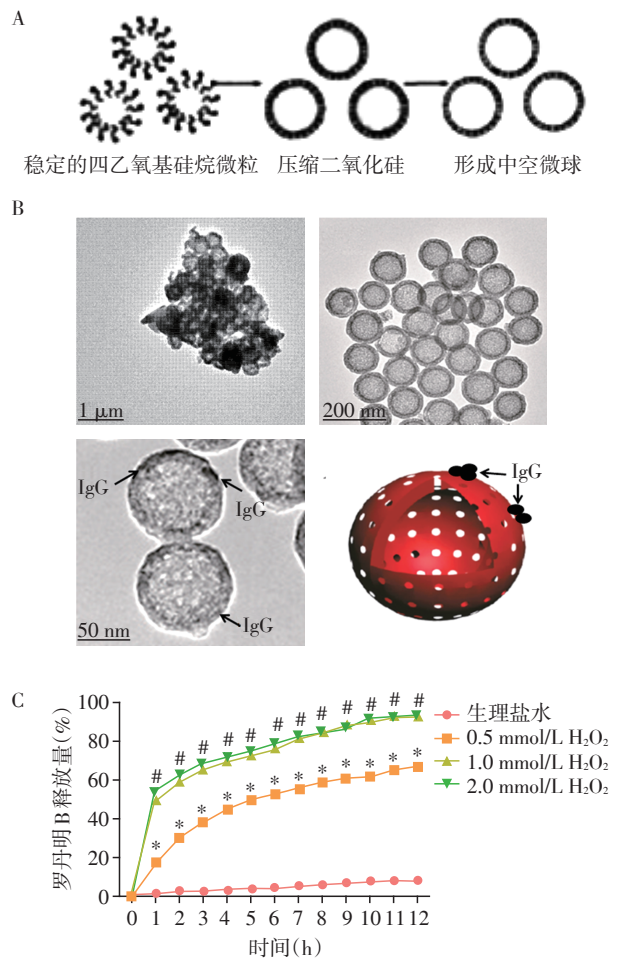
## 2 结果

### 2.1 缓释系统能够在体外实现缓释

制备缓释系统的过程如图1A所示。透射电镜结果显示HMSNs为直径( $84.3 \pm 7.1$ )nm多孔的中空球形,也验证了IgG已成功嫁接到了微球表面(图1B)。罗丹明B释放量与 $H_2O_2$ 浓度之间的关系如图1C所示,生理盐水组的罗丹明B的释放量处于很低的水平,首次观察(1h)仅释放( $1.1 \pm 0.1$ )%,随时间推移变化也不明显,末次观察(12h)也才达到( $8.5 \pm 0.6$ )%;当 $H_2O_2$ 浓度升高到0.5 mmol/L时,可以发现罗丹明B的释放量大大提高,首次观察即达到( $17.4 \pm 1.9$ )%,与生理盐水组相比差异具有统计学意义,随时间推移释放量继续增加,末次观察达到( $66.9 \pm 4.2$ )%,期间每个时间点与生理盐水组都存在统计学差异; $H_2O_2$ 浓度继续升高的1.0 mmol/L组,罗丹明B的释放量在首次观察时就达到了( $49.8 \pm 6.2$ )%,而且随着时间的进展,罗丹明B的释放进一步增加,在末次观察时已达到( $93.5 \pm 8.9$ )%,期间每个时间点与生理盐水组和0.5 mmol/L浓度组都存在统计学差异;2.0 mmol/L组的罗丹明B释放量在观察期间与1 mmol/L组无明显差异。

### 2.2 模型大鼠体内铬、钴离子升高

经过CoCrMo纳米微粒悬液注射后,大鼠的血清金属离子相比对照组有明显升高,铬离子浓度( $13.41 \pm 1.81$ ) $\mu\text{g/L}$ ,钴离子浓度( $0.93 \pm 0.13$ ) $\mu\text{g/L}$ ,对照组分别为( $4.00 \pm 0.35$ ) $\mu\text{g/L}$ 和( $0.42 \pm 0.06$ ) $\mu\text{g/L}$ ,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠血清 $H_2O_2$ 浓度的检测结果也比对照组有明显的升高[( $0.91 \pm 0.15$ )mmol/L vs. ( $0.45 \pm 0.07$ )mmol/L,  $P <$



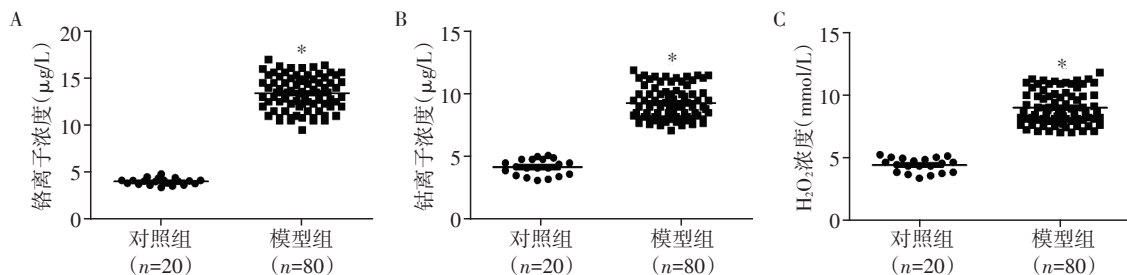
A: 溶胶-凝胶法制备中空介孔二氧化硅微球的过程图; B:  $H_2O_2$ 敏感的中空介孔二氧化硅纳米载体(IgG-HMSNs)的TEM图; C: IgG-HMSNs微粒在不同浓度 $H_2O_2$ 溶液中的释放曲线。与生理盐水组相比, $^*P < 0.05$ ;与0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 组相比, $^*P < 0.05$ ( $n=20$ )。

图1 构建的自控式缓释系统

Figure 1 Construction of the self-controlled sustained-release system

0.05],在此过程中未出现大鼠死亡(图2)。

2.3 缓释系统在模型大鼠体内能够实现EDTA缓释  
经过治疗后发现注射EDTA和载有EDTA的二氧化硅纳米微粒的大鼠血清中铬、钴离子浓度均显

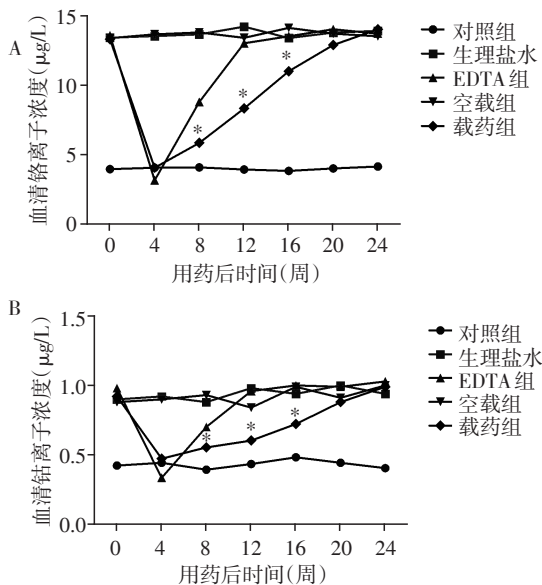


A, B: 模型组与对照组大鼠血清金属离子浓度对比; C: 模型组与对照组大鼠血清 $H_2O_2$ 水平对比。与对照组相比, $^*P < 0.05$ 。

图2 模型大鼠体内铬、钴离子升高

Figure 2 Increased concentration of chromium and cobalt ion in the model rats

著下降。对比EDTA组和载药组可以看出,单独注射EDTA只能在用药后的前4周发挥作用,而4周后离子浓度迅速回升;载药组大鼠第4周时血清铬、钴离子浓度下降小于EDTA组(差异无统计学意义),但在之后的时间内仍保持相对低水平:铬、钴离子浓度在8、12、16周相比EDTA组均具有统计学差异,20周仍低于EDTA组,但差异不具有统计学意义,直到24周实验结束才上升到用药前水平,另外,生理盐水组和空载体组大鼠的血清离子浓度改变没有统计学差异(图3)。



A、B: 经过2周治疗,24周内铬、钴金属离子浓度曲线图。与EDTA组相比,\* $P < 0.05$  ( $n=20$ )。

图3 利用缓释系统实现自控式治疗

Figure 3 A self-controlled treatment with the sustained-release system

### 3 讨论

人工全髋关节置换术是骨科最常见的手术之一<sup>[15]</sup>,目前,临床上最常用的是金属或陶瓷头对高铰链聚乙烯。但由于金属对金属人工髋关节具有不易脱位、耐磨损、活动度大等优点,一度受到众多关节外科医生的青睐。血清金属离子升高是术后的常见表现之一。Hernández-Vaguero等<sup>[16]</sup>发现金对金髋关节置换术后患者血清和尿液中的钴、铬离子浓度均出现升高。本课题组也对32例金对金全髋关节置换患者进行了平均2年的随访研究,结果发现这类患者血清铬、钴离子浓度分别为金属对高铰链聚乙烯全髋关节置换患者的4.33和1.95倍<sup>[17]</sup>。而金对金全髋关节置换患者体内钴、铬离子异常增高会产生一系列危害。有研究发现,金对金全髋关节置换可

造成白细胞和一些淋巴细胞亚群的数量下降<sup>[18]</sup>。本课题组也发现,金对金全髋关节置换患者血清中钴、铬离子浓度升高,T细胞总数以及CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞数均显著降低,细胞免疫功能受到明显抑制<sup>[17]</sup>。本团队曾发现,钴、铬离子的异常增高会引起雄性大鼠的精子数量减少、活动能力降低、异常精子数增加和睾丸细胞氧化损伤<sup>[14]</sup>。Wagner等<sup>[19]</sup>报道金对金全髋关节置换术后患者肿瘤发病率升高,他认为这种现象与体内钴、铬离子浓度增高有关。

根据金对金假体体外磨损实验结果,首个百万周期假体容积磨损量约为2.58 mm<sup>3</sup>,约合21.6 mg/年<sup>[20]</sup>。设定60 kg为成年人平均体重,计算出人关节腔内微粒释放量约为每周8 μg/kg。药理实验中大鼠与人体等效剂量系数为6.3<sup>[21]</sup>,因此得出大鼠关节腔内注射的基础量为每周50 μg/kg。根据报道,大鼠膝关节腔注射容积/体重对应关系为0.04 mL/100 g<sup>[22]</sup>。因此,将0.125 mg/mL设置为基础浓度的金属微粒悬液。考虑到患者术后活动量的不同(如跑步、爬楼等),实际磨损导致的纳米微粒总表面积最大为理想状况下的20倍<sup>[23]</sup>。因此,为了模拟更为严重的假体磨损状况,本研究设置了2.5 mg/mL CoCrMo纳米微粒悬液来处理大鼠。

EDTA作为一种重要的金属离子螯合剂,被广泛应用于工业、医疗、生物工程等诸多领域<sup>[24]</sup>。Najjar等<sup>[25]</sup>利用EDTA的螯合作用来治疗钙化性带状角膜病变。本研究预实验使用了不同体积(0.2、0.4、0.6 mL)6 mmol/L EDTA、不含EDTA的二氧化硅空载体溶液及负载EDTA的二氧化硅纳米微球分别对造模成功的大鼠进行治疗,发现EDTA组在使用高剂量时出现大鼠抽搐死亡案例,而低中剂量未见明显抽搐,空载体和缓释系统组则各剂量均未出现大鼠死亡的案例,因此选择了0.4 mL作为实验剂量。Movahedian等<sup>[27]</sup>利用腹腔注射30 mg/kg大鼠体重的EDTA来进行抗真菌治疗,未见明显不良反应,经计算本研究大鼠使用剂量也在安全范围内。

此次试验中成功制备了载药缓释系统,可以看到随着环境H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高,缓释系统中罗丹明B的释放量以及释放速度都随之升高,确认构建的自控式缓释系统有效。另外,还构建了大鼠的血清金属离子升高的模型,Cr、Co离子浓度均明显高于正常大鼠,提示造模成功,而模型组大鼠血清H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高也表明了利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为感受器的可行性。在缓释系统的使用过程中,发现载药缓释系统的确可以减缓EDTA的释放速度,延长药物的作用

时间,有望为解决关节置换术后患者体内金属离子升高的问题提供方向。然而,该缓释系统也存在一定的不足,首先,药物释放曲线不够平稳,即进入大鼠模型体内后,早期EDTA释放较多,而后释放量逐步减少。其次,药物释放时间仍不够长,可以看到在用药后8周时大鼠体内金属离子开始逐步回升,提示仍需要寻找更为合适的开关来实现缓释系统中EDTA的精准释放,延长缓释系统的作用时间。

另外,虽然此次实验中并未观察到其他金属离子缺乏的症状,但考虑到EDTA和其他络合剂一样,释放后不仅络合铬、钴离子,对铁离子等也具有螯合作用<sup>[27]</sup>,可能会引发其他疾病,因此在应用于临床之前需要更多的试验来评估。

#### [参考文献]

- [1] Kumar N, Arora GN, Datta B. Bearing surfaces in hip replacement - evolution and likely future [J]. *Med J Armed Forces India*, 2014, 70(4): 371-376
- [2] Bozic KJ, Kurtz S, Lau E, et al. The epidemiology of bearing surface usage in total hip arthroplasty in the United States [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 91(7): 1614-1620
- [3] Lainiala O, Reito A, Elo P, et al. Revision of metal-on-metal hip prostheses results in marked reduction of blood cobalt and chromium ion concentrations [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(7): 2305-2313
- [4] Dahlstrand H, Stark A, Anissian L, et al. Elevated serum concentrations of cobalt, chromium, nickel, and manganese after metal-on-metal alloarthroplasty of the hip: a prospective randomized study [J]. *J Arthroplasty*, 2009, 24(6): 837-845
- [5] Ball ST, Severns D, Linn M, et al. What happens to serum metal ion levels after a metal-on metal bearing is removed? [J]. *J Arthroplasty*, 2013, 28(8 suppl): 53-55
- [6] Lamb A, Evans G, King JR. Mathematical modelling of toxicity associated with intracellular chromium reduction [J]. *Bull Math Biol*, 2013, 75(9): 1472-1500
- [7] Chandran SE, Giori NJ. Nine-year incidence of kidney disease in patients who have had total hip arthroplasty [J]. *J Arthroplasty*, 2011, 26(6 Suppl): 24-27
- [8] Iranmanesh M, Fatemi SJ, Ebrahimpour R, et al. Chelation of chromium(VI) by combining deferasirox and deferiprone in rats [J]. *Biometals*, 2013, 26(3): 465-471
- [9] Smith SW. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings [J]. *J Med Toxicol*, 2013, 9(4): 355-369
- [10] Cotf KK, Belowich ME, Liang M, et al. Mechanised nanoparticles for drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2009, 1(1): 16-39
- [11] Wang Y, Zhao Q, Han N, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(2): 313-327
- [12] Mas N, Agostini A, Mondragón L, et al. Enzyme-responsive silica mesoporous supports capped with azopyridinium salts for controlled delivery applications [J]. *Chemistry*, 2013, 19(4): 1346-1356
- [13] Luo Z, Cai K, Hu Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles end-capped with collagen: redox-responsive nanoreservoirs for targeted drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(3): 640-643
- [14] Wang Z, Chen Z, Zuo Q, et al. Reproductive toxicity in adult male rats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles [J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(6): 1020-1026
- [15] Alshryda S, Sukeik M, Sarda P, et al. A systematic review and meta-analysis of the topical administration of tranexamic acid in total hip and knee replacement [J]. *Bone Joint J*, 2014, 96-B(8): 1005-1015
- [16] Hernández-Vaquero D, Delgado-Sevillano R, de la Flor-García MR. Groin pain after metal-on-metal hip resurfacing prosthesis [J]. *SAGE Open Med Case Rep*, 2014, 2: 2050313X14545278
- [17] Chen Z, Wang Z, Wang Q, et al. Changes in early serum metal ion levels and impact on liver, kidney, and immune markers following metal-on-metal total hip arthroplasty [J]. *J Arthroplasty*, 2014, 29(3): 612-616
- [18] Kwon YM, Thomas P, Summer B, et al. Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(4): 444-450
- [19] Wagner P, Olsson H, Ranstam J, et al. Metal-on-metal joint bearings and hematopoietic malignancy [J]. *Acta Orthop*, 2012, 83(6): 553-558
- [20] Leslie I, Williams S, Brown C, et al. Effect of bearing size on the long term wear, wear debris and ion levels of large diameter metal-on-metal hip replacements - An in vitro study [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomed*, 2008, 87(1): 163-172
- [21] Howie DW, Vernon-Roberts B. Long-term effects of intra-articular cobalt-chrome alloy wear particles in rats [J]. *J Arthroplasty*, 1988, 3(4): 327-336
- [22] Bowsher JG, Hussain A, Williams PA, et al. Metal-on-metal hip simulator study of increased wear particle surface area due to 'severe' patient activity [J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2006, 220(3): 279-287
- [23] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗* (下转第982页)

本研究选用经典的由混杂因素人群分层的存在导致LCT基因与身高的虚假关联作为实例验证。直接将混杂因素作为协变量放入RF中rs3754686和rs2322660排在前2位,将节点候选变量数增加为最大值时,rs3754686的排序仍然较靠前,显示出该方法并没有很好地校正人群分层的效应。采用基于广义线性模型残差的方法,rs3754686和rs2322660的排序均非常靠后,从而打破了LCT基因与身高的虚假关联。从模拟实验以及实例验证的结果可见,增加节点候选变量数的方法不能有效校正混杂因素,基于广义线性模型残差的方法在随机森林中能有效调整混杂因素,从而正确地筛选出重要变量。

作为一种数据挖掘方法的RF已经在很多领域中得到较好应用,使用时应注意根据不同的数据设定相应的参数,如决策树的数量等。另外,本研究模拟实验只探讨混杂因素只有1个或2个的情况,更复杂的混杂因素情况还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 宋欠欠,李轶群,侯艳,等. 随机森林的变量捕获方法在高维数据变量筛选中的应用[J]. 中国卫生统计, 2015, 32(1): 49-53

[2] Goldstein BA, Hubbard AE, Cutler A, et al. An application of random forests to a genome-wide association dataset: Methodological considerations & new findings [J]. BMC Genet, 2010, 11(1): 1-13

[3] Kim Y, Wojcieszowski R, Sung H, et al. Evaluation of random forests performance for genome-wide association studies in the presence of interaction effects [J]. BMC Proc, 2009, 3(S7): S64

[4] Nicodemus KK, Malley JD, Strobl C, et al. The behaviour of random forest permutation-based variable importance measures under predictor correlation [J]. BMC Bioinform

atics, 2010, 11(1): 110

[5] Yan VS, Cai Z, Desai K, et al. Classification of rheumatoid arthritis status with candidate gene and genome-wide single-nucleotide polymorphisms using random forests [J]. BMC Proc, 2007, 1(S1): S62

[6] Breiman L. Random forest [J]. Mach Learn, 2001, 45(1): 5-32

[7] 武晓岩,李康. 随机森林方法在基因表达数据分析中的应用及研究进展[J]. 中国卫生统计, 2009, 26(4): 437-440

[8] Nicodemus KK, Malley JD. Predictor correlation impacts machine learning algorithms: implications for genomic studies [J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1884-1890

[9] Zhao Y, Chen F, Zhai R, et al. Correction for population stratification in random forest analysis [J]. Int J Epidemiol, 2012, 41(6): 1798-1806

[10] Campbell CD, Ogburn EL, Lunetta KL, et al. Demonstrating stratification in a European American population [J]. Nat Genet, 2005, 37(8): 868-872

[11] Qin H, Morris N, Kang S J, et al. Interrogating local population structure for fine mapping in genome-wide association studies [J]. Bioinformatics, 2010, 26(23): 2961-2968

[12] Li M, Reilly MP, Rader DJ, et al. Correcting population stratification in genetic association studies using a phylogenetic approach [J]. Bioinformatics, 2010, 26(6): 798-806

[13] Hsieh CH, Lu RH, Lee NH, et al. Novel solutions for an old disease: diagnosis of acute appendicitis with random forest, support vector machines, and artificial neural networks [J]. Surgery, 2011, 149(1): 87-93

[14] Pang H, Lin A, Holford M, et al. Pathway analysis using random forests classification and regression [J]. Bioinformatics, 2006, 22(16): 2028-2036

[收稿日期] 2017-11-21

(上接第944页)

学, 2004, 9(9): 1069-1072

[24] 伍腾飞,彭秀军. EDTA的螯合作用在角膜研究中的应用进展[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(10): 1890-1893

[25] Najjar DM, Cohen EJ, Rapuano CJ, et al. EDTA chelation for calcific band keratopathy: results and long-term follow-up [J]. Am J Ophthalmol, 2004, 137(6): 1056-1064

[26] Hachem R, Bahna P, Hanna H, et al. EDTA as an adjunct

antifungal agent for invasive pulmonary aspergillosis in a rodent model [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5): 1823-1827

[27] Movahedian A, Zolfaghari B, Mirshekari M. Antioxidant effects of hydroalcoholic and polyphenolic extracts of *Peucedanum pastinacifolium* Boiss. & Hausskn [J]. Res Pharm Sci, 2016, 11(5): 405-411

[收稿日期] 2017-12-17