

如何正确进行生物医学科研设计

III. 如何合理选择两因素设计

李长平, 胡良平

编者按

生物医学科研的研究对象是生物体, 而生物体具有极大的变异性。科研的目的就是要从表面上看似杂乱无章的事物或现象中找出规律性的东西来, 以便正确地解释和揭示事物或现象的变化、发展乃至消亡的规律, 从而达到认识人类社会并促进其发展、认识自然、改造自然以至于征服自然之目的。人类要完成此重任, 仅靠热情和苦干是不够的, 必需加上巧干。所谓巧干, 就是要充分利用人类已经积累起来的宝贵经验, 加上人类特有的创造性思维和勇于实践的精神, 在确立了可行的奋斗目标之后, 对未知事物或现象进行调查或试验。要想使调查或试验得出的结论真实可信, 同时, 花费的人力、物力、财力和时间又比较少, 就需要有科学完善严谨的科研设计方案的指导。本刊特邀军事医学科学院生物医学统计学咨询中心主任胡良平教授, 以“如何正确进行生物医学科研设计”为题, 撰写系列统计学讲座。希望该系列讲座能对生物医学科研工作者制定科研设计方案有所帮助。

在本系列讲座第一讲中提到, 实验研究中的因素一般有两种含义, 一是研究者希望着重考察的实验因素, 一是对观测结果可能有影响但研究者并不想关心的因素, 后者被称为重要非实验因素, 常简称为区组因素。上一讲中对如何合理选用单因素设计作了介绍, 强调合理选择实验设计的关键在于从研究目的出发, 把专业知识和实验设计的统计学知识结合起来, 将实验设计三要素、四原则和实验设计类型在具体实施过程中综合考虑。那么在实际科研中如果要进行某项实验研究而该实验涉及两个因素时, 可供选择的两因素实验设计类型有哪些? 怎样从这些实验设计中选出最适合本次实验目的和条件的设计类型呢? 在本讲中将围绕如何合理选择两因素实验设计问题进行介绍。

1 与两因素实验设计相关的概念

1.1 两因素实验设计的概念及类型

简单地说, 两因素实验设计就是实验中涉及到两个因素, 这两个因素可以同时是实验因素, 也可以是一个因素为实验因素, 另一个因素为区组因素。两因素实验设计包含的具体类型很多, 可以从是否考虑交互作用、是否含有区组因素、因素在实验中的作用地位是否平等、是否要进行独立重复实验等方面来区分具体的类型^[1]。

(1)当欲考察的两个实验因素之间的交互作用不容忽视、且两个实验因素各种组合条件下均可进行2次或以上独立重复实验时, 可供选择的具体的实验设计类型可能有: 两因素析因设计、两因素分割(或裂区)设计、两因素正交设计、两因素均匀设计、两因素反应曲面设计等。

(2)当欲考察的两个实验因素之间的交互作用可以忽略(已通过预实验或从专业上确定)时, 从两个实验因素各水平全面组合下任取一种作为实验条件, 都有理由保证多次独立重复实验结果之间的精确度很高, 即重现性好时, 若人力、

时间、财力不允许在各种水平组合下做独立重复实验, 则可采用无重复实验的两因素设计。

(3)当实验因素与重复测量(例如在几个不同的时间点上从同一个受试对象身上重复获得某一定量指标的观测值或从同一个体的不同部位或组织上重复获得某一定量指标的观测值)有关时, 可能的实验设计类型有具有一个重复测量的单因素设计(注意: 重复测量设计中隐含一个“区组因素”)。

(4)若在两个因素中有一个为实验分组因素, 另一个为区组因素, 则可供选择的实验设计类型为随机区组设计。若欲考察的两个因素均为实验因素, 且这两个实验因素在专业上对实验结果的影响作用分主次, 其交互作用可以忽略不计, 则可供选择的实验设计类型为两因素系统分组(或嵌套)设计。

本文主要针对结果变量是定量变量的两因素实验设计进行介绍, 若结果变量是定性变量的两因素实验设计, 人们习惯将资料整理成列联表资料, 只是资料表达的形式不同和称呼不同而已。

下面从研究的目的出发, 结合具体实例, 着重介绍较常见的两因素析因设计、两因素系统分组(或嵌套)设计、两因素分割(或裂区)设计、具有一个重复测量的单因素设计。

1.2 适合选用两因素析因设计的场合

当欲考察的两个实验因素对观测结果的影响地位平等且两个因素间的交互作用不可忽视时, 若两因素是同时施加于受试对象的, 在研究者的人力、时间、财力等条件允许的情况下, 宜选择两因素析因设计。

例1 某人欲研究人参茎叶皂苷(GSS)对热损伤大鼠脑糖

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院生物医学统计学咨询中心
通讯作者: 胡良平, Email: lphu812@sina.com

皮质激素受体（GR）的影响。根据研究目的可知该研究的实验因素是“温度的影响”及“药物的影响”。“温度影响”考虑热损伤下和常温下两种水平，“药物的影响”则考虑以蒸馏水为对照，研究 GSS 对热损伤大鼠脑 GR 的作用。在专业上认为两实验因素对结果的影响不分主次，且两因素之间的交互作用不能忽视。现有 32 只健康状况相近的雄性大鼠，观测指标为 GR 含量（fmol/mg 蛋白）。请根据提供的背景资料，选择恰当的实验设计类型。

设计类型的判定：在该研究中涉及了两个实验因素：“热损伤施加与否”和“GSS 使用与否”。依据专业知识，“热损伤施加与否”可以考虑“施加（高温损伤）与不施加（常温处理）”，“GSS 使用与否”可以考虑“用（服用 GSS）与不用（服用蒸馏水）”，它们的全面组合有 4 种。由于两实验因素作用地位相等且两实验因素之间的交互作用不容忽视，所以各种组合下均需要做 2 次或以上的独立重复实验。故该实验宜采用两因素析因设计。可将 32 只健康状况相近的雄性大鼠完全随机地均分到 4 种组合条件中去，每组 8 只。接受相应的处理后观测 GR 含量。实验设计的原型及标准型如表 1 所示。

表 1 GSS 对热损伤大鼠脑 GR 含量的影响			
热损伤施加与否	GR 含量（fmol/mg 蛋白）		
	GSS 使用与否：	不用	用
不施加
施加

在该研究中定量的观测指标为“GR 含量”。在进行统计分析时，若资料满足参数检验的前提条件，则可采用两因素析因设计一元定量资料的方差分析，既可以分析两个因素的主效应，又可以分析两因素间交互作用的效应大小。

1.3 适合选用两因素系统分组（或嵌套）设计的场合

此类设计主要用于实验因素对观测结果的影响有主次之分的研究中。当两个实验因素作用地位不相等，也就是说对观测指标的影响有主次之分（以专业知识为依据），主要因素（A 因素）各水平之下嵌套着次要因素（B 因素）的各水平，此时可采用两因素系统分组设计。在此设计中，B 因素可以取不同的水平，B 水平之下（即每种实验条件下）可以重复作 2 次或以上不同数目的独立重复实验。

例 2 某研究者欲分析某化合物转化率的影响因素。由专业知识可知影响因素涉及到催化剂的种类和温度，且催化剂对该化合物转化率的影响大于温度。研究中欲考察的催化剂种类为甲、乙、丙 3 种，3 种催化剂要求的温度范围不同，甲要求 70、80、90℃，乙要求 55、65、75℃，丙要求 90、95、100℃。预计每种组合下做 2 次独立重复实验，观测指标为“转化率（%）”。请根据提供的背景资料，选择恰当的实验设计类型。

设计类型判定：该研究涉及到两个实验因素：“催化剂的种类”和“温度”。依据研究目的可知，欲研究的催化剂

种类可考虑甲、乙、丙 3 个水平，不同的催化剂对应的温度也各有 3 个水平，因此共有 9 种组合。根据专业可知，两因素对转化率的作用地位不平等：催化剂的作用大于温度的作用。将催化剂作为主要实验因素，温度作为次要实验因素。因此该实验可采用两因素系统分组（嵌套）设计。本实验设计的原型及标准型如表 2 所示。

表 2 不同催化剂在不同温度下对某化合物转化率影响的观测结果

实验批次	催化剂与温度（℃）：	转化率（%）								
		甲			乙			丙		
		(70	80	90)	(55	65	75)	(90	95	100)
1
2

该定量观测指标为“转化率”，若资料满足方差分析的前提条件，资料分析可采用两因素系统分组（或嵌套）设计一元定量资料的方差分析。

1.4 适合选用两因素分割（或裂区）设计的场合

当依据专业知识需要将整个实验过程分为若干阶段且两个实验因素是分期分批进入实验研究过程时，就可选用两因素分割（或裂区）设计。需要指出的是，实验中各阶段涉及的实验因素彼此不同，但需要等整个实验过程结束后，才能观测定量指标的结果。

在第一个阶段，通常由先进入的第一个实验因素 A 构成单因素多水平设计，或由实验因素 A 与区组因素 B 构成 m 次独立重复实验的随机区组设计；再把第一阶段的受试对象随机地分配到第二阶段接受第二个实验因素 C 各水平的处理。

例 3 某研究者欲研究不同瘤株的生瘤效果和不同浓度蛇毒的抑瘤作用。根据专业知识和研究目的可知，首先需要观察 3 种不同瘤株的生瘤效果，即要将瘤株接种在动物身上，每只动物接种 1 种瘤株，经过 1 d 后，再随机接受 3 种浓度蛇毒中任一种浓度蛇毒的处理。连续用蛇毒抑瘤 10 d 后观察瘤重（g）。欲选取 27 只体重、健康状况相近的小鼠作为受试对象。请根据提供的背景资料（表 3），选择恰当的实验设计类型。

表 3 不同瘤株与不同浓度的蛇毒共同作用后对小鼠抑瘤效果的影响

瘤株 A	蛇毒浓度 B	瘤重（g）		
A ₁	B ₁
	B ₂
	B ₃
A ₂	B ₁
	B ₂
	B ₃
A ₃	B ₁
	B ₂
	B ₃

设计类型判定：该研究中涉及“瘤株种类(A)”和“蛇毒浓度(B)”两个实验因素。“瘤株种类”考虑 3 种，记为 A_1 、 A_2 、 A_3 ，“蛇毒浓度”考虑 3 种，记为 B_1 、 B_2 、 B_3 。首先进入研究的实验因素是“瘤株”，即先将 27 只体重、健康状况相近的小鼠随机地分配到 3 种瘤株组中去接种相应的瘤株，每组 9 只。1 d 后，再将每组中的 9 只小鼠随机地均分到 3 种蛇毒浓度组中去，每种浓度组 3 只小鼠，然后观测瘤株的重量。因此该实验适合采用的实验设计类型是两因素分割(或裂区)设计，具体实验设计的原型及标准型如表 3 所示。

定量的观测指标为“瘤重”，若资料满足方差分析的前提条件，资料分析可采用两因素分割(或裂区)设计一元定量资料的方差分析。

1.5 适合选用具有一个重复测量的单因素设计的场合

当某项实验研究中，从专业上需要了解定量观测指标随时间推移或部位改变的动态变化时，需要选用重复测量设计。所谓重复测量设计就是同一个受试对象(如个体、标本等)在接受某种处理后，在几个不同的时间点上重复获得某一个定量指标的观测值或是从一个个体的不同部位(或组织)上重复获得某一个定量指标的观测值。当实验中涉及一个实验因素，该因素同时也是重复测量因素时，就可选用具有一个重复测量的单因素实验设计。

例 4 某外科医生在每例病人手术过程中的 3 个不同阶段测得患者门静脉压力(表 4)，请问该资料所代表的实验属于什么实验设计类型？

表 4 10 例患者在手术过程中的 3 个不同阶段门静脉压力的测定结果

病例号	门静脉压力 (cm H ₂ O)			
	A (阶段):	A ₁	A ₂	A ₃
1		40	36	36
2		19	17	18
:		:	:	:
:		:	:	:
10		36	37	38

设计类型判定：本例仅涉及一个实验因素，即“阶段”，有 3 个水平，因此很容易被误认为是单因素 3 水平设计。事实上，观测指标在同一例患者不同阶段的观测值是不独立的，如果按单因素 3 水平设计处理资料，则人为地割裂了各水平之间的联系，不但不能充分利用资料所提供的信息，还会使统计分析的结论变得不可信，甚至有可能得出错误的结论。由于是在不同阶段从同一例患者身上重复测得其门静

脉压力，所以“阶段”是一个重复测量因素，该资料所代表的实验设计类型属于具有一个重复测量的单因素设计。在本例中，受试对象为“患者”，“病例号”为区组因素，实验因素为“观测阶段”，定量的观测指标为“门静脉压力”。

进行统计分析时，若该资料满足参数检验的前提条件和球形对称性检验，可采用具有一个重复测量的单因素设计一元定量资料的方差分析；若重复测量所产生的数据之间的相关性很低时，也可采用随机区组设计定量资料一元方差分析。

1.6 适合选用随机区组设计的场合

在例 4 中，若同一行上不是同一例患者而是条件非常接近的 3 例患者(例如病情、病程、手术难度、性别、年龄等都十分接近或相同)，每行上的 3 例患者被随机地分配进入某个阶段，此时的设计就叫做随机区组设计，处理资料的方法有随机区组设计定量资料的一元方差分析(若定量资料符合参数检验的前提条件)或 Friedman 秩和检验。

2 统计方法中仅描述“两因素设计方差分析”或“two-way ANOVA”的错误实质^[2]

在描述采用何种统计方法分析资料时，经常会看到以下说法：“资料采用两因素方差分析(或 two-way ANOVA)进行处理”。这种描述是不恰当的，因为读者搞不清楚作者是否选择了正确的统计分析方法。其错误的实质是没有交代具体的实验设计类型。由于对不同的两因素实验设计类型进行方差分析时对应的离均差平方和的分解以及计算统计量时所采用的误差均方是不同的，因此不能笼统地说“两因素设计方差分析”或“two-way ANOVA”。正确的统计方法描述为：“因为该定量资料满足定量资料参数检验的前提条件，故采用了两因素 $\times \times$ 设计定量资料的 \times 元方差分析”。例如：因为本资料满足参数检验的前提条件，故采用两因素析因设计定量资料的一元方差分析进行处理。可见正确判断实验设计类型是正确选择统计分析方法的关键。

参考文献

[1] Hu LP. Application of triple-type theory of statistics in experimental design. Beijing: People's Military Medical Press, 2006: 64-65, 85-120. (in Chinese)
胡良平. 统计学三型理论在实验设计中的应用. 北京: 人民军医出版社, 2006: 64-65, 85-120.
[2] Hu LP. Modern statistics and the application of SAS. Beijing: Press of Military Medical Science, 2000:117. (in Chinese)
胡良平. 现代统计学与 SAS 应用. 北京: 军事医学科学出版社, 2000:117.