DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.033

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0314-03

正交试验设计在“胃饲乙醇预处理诱导增强肝脏对缺血-再灌流的耐受性”预试验中的应用

蔡昌启[1],罗明奎[1],冯晓彬[2] (第三军医大学:[1]基础医学部数学教研室;[2]附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院;重庆 400038)

提 要:目的 用正交试验设计安排多因素多水平进行方差分析,确定乙醇诱导肝脏自身保护效应充分表达的最优组合模型。方法 根据正交表$L_{27}(3^{13})$安排“胃饲乙醇预处理诱导增强肝脏对缺血-再灌流的耐受性”试验。应用方差分析给出乙醇诱导肝脏自身保护效应充分表达的适当剂量和喂饲后距缺血手术时间。结果 诱导肝脏自身保护效应充分表达的最优模型为$A_1B_1C_3$,即40%、5 g/kg喂饲后24 h行缺血再灌注手术。结论 用正交试验设计安排多因素多水平进行方差分析,可大大减少实验动物数和实验次数,且能保证试验各因素各种水平搭配均衡。

关键词:正交试验;多因素;最优模型
中图法分类号:R-331;R311;R459.9 文献标识码:A

Application of orthogonal experiment design in “Induction of ischemia-reperfusion tolerance in liver by alcohol preconditioning”

CAI Chang-qi, LUO Ming-kui, FENG Xiao-bin (Department of Mathematics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain the optimum combination of multiple factors and multiple levels in the expression of liver self-pretection by alcohol preconditioning. Methods Multiple factors and multiple levels involved in the experiment of "induction of ischemia-reperfusion tolerance in the liver by alcohol preconditioning" are discussed, which are planned in the experiment by means of orthogonal table $L_{27}(3^{13})$, and related method of analysis of variance is applied. Results The optimum combination among the concentration of alcohol, the dose of alcohol and the time after alcohol administration is available, which makes the expression more sufficient. Conclusion To plan the animal experiment with multiple factors and multiple levels through orthogonal experiment could decrease the number of animals and trials, and also could assure the balance of factors and levels in experiment.

Key words: orthogonal experiment; multiple factor; optimum model

临床医学研究中,经常涉及多因素、多水平同一指标的试验,如果对每个因素的每个水平都互相搭配进行全面试验,需要做的试验次数就会很多。比如对两个7水平的因素,如果两因素的各个水平都互相搭配进行全面试验,要做$7^2=49$次试验,而6个7水平的因素,进行全面试验就要做$7^6=117649$次试验。做这么多次试验,要花费大量的人力、物力,还要用相当长的时间,显然是非常困难的。能否在不影响试验效果的前提下,尽可能地减少试验次数?正交试验设计就是解决这类问题的有效方法。下面以大鼠“胃饲乙醇预处理诱导增强肝脏对缺血-再灌流的耐受性”试验,具体介绍如何应用正交试验设计安排三因素三水平进行方差分析,确定乙醇诱导肝脏自身保护效应充分表达的最优组合模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠27只,体重220~250 g,一级。由重庆中药研究院动物中心提供。

1.2 手术方式

采用大鼠尾叶转流下的原位再灌注模型,于再灌注24h活杀动物,下腔静脉取血标本待检。

1.3 正交表

正交表是正交试验设计的主要工具,它是一种特制的表格。正交表$L_n(m^k)$中的字母L表示正交表;n是表的行数,也就是要安排的试验的次数;k是表中列数,表示因素的个数;m是各因素的水平,见表1。

表1 正交表$L_9(3^4)$

Tab 1 Orthogonal table $L_9(3^4)$

Trial	Column			
	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970727)
作者简介:蔡昌启(1954-),男,湖北省谷城县人,副教授,主要从事医学应用数学方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68752211
收稿日期:2001-08-15;修回日期:2001-10-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$L_9(3^4)$的数字 9 表示这张表共有 9 行, 说明用这张表安排试验要做9 次试验; 数字 4 表示这张表共有4 列, 说明用这张表最多可安排 4 个因素; 数字 3 表示在表中主体部分只出现 1, 2, 3 三个数字, 它们分别代表因素的 3 个水平, 说明各因素都是 3 个水平的。

表 2　因素水平表

Tab 2　Table of level in three factors

Level	Factor		
	A(concentration of alcohol)%	B (dose of gastric gavatge)g/ kg	C (time before operation)h
1	40	5	6
2	30	4	12
3	20	3	24

表 3　正交试验表及试验结果

Tab 3　Orthogonal experiment table and experiment results

trial	Column									
	1 A	2B	$3(AB)_1$	$4(AB)_2$	5C	$6(AC)_1$	$7(AC)_2$	$8(BC)_1$	$11(BC)_2$	AIT x_k%
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.33
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	6.13
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	2.29
4	1	2	2	2	1	1	1	2	3	7.58
5	1	2	2	2	2	2	2	3	1	14.61
6	1	2	2	2	3	3	3	1	2	1.84
7	1	3	3	3	1	1	1	3	2	2.50
8	1	3	3	3	2	2	2	1	3	9.90
9	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1.84
10	2	1	2	3	1	2	3	1	1	5.05
11	2	1	2	3	2	3	1	2	2	4.76
12	2	1	2	3	3	1	2	3	3	1.30
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	8.78
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	7.48
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	5.15
16	2	3	1	2	1	2	3	3	2	4.31
17	2	3	1	2	2	3	1	1	3	9.49
18	2	3	1	2	3	1	2	2	1	9.09
19	3	1	3	2	1	3	2	1	1	3.69
20	3	1	3	2	2	1	3	2	2	6.12
21	3	1	3	2	3	2	1	3	3	5.26
22	3	2	1	3	1	3	2	2	3	9.19
23	3	2	1	3	2	1	3	3	1	8.43
24	3	2	1	3	3	2	1	1	2	4.10
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	7.76
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	4.69
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	9.59
K_1	49.02	36.93	55.36	54.20	51.19	47.19	53.09	46.24	70.17	163.26
K_2	55.41	67.16	57.18	61.99	71.61	67.73	66.82	63.08	42.67	
K_3	58.83	59.17	50.72	47.07	40.46	48.34	43.35	53.94	50.42	
K_1^2	2402.96	1363.82	3064.73	2937.64	2620.42	2226.90	2818.55	2138.14	4923.83	
K_2^2	3070.27	4510.47	3269.55	3842.76	5127.99	4587.35	4464.91	3979.09	1820.73	
K_3^2	3460.97	3501.09	2572.52	2215.58	1637.01	2336.76	1879.22	2909.52	2542.18	
Q	992.69	1041.71	989.64	999.55	1042.82	1016.78	1018.08	1002.97	1031.86	
S	5.51	54.53		14.83		55.64		60.50		60.47

1.4　选用适当的正交表安排试验

为探寻诱导增强肝脏对缺血-再灌流损害耐受性的新途径。通过分析胃饲不同剂量乙 醇预处理与宿主肝脏对缺血－再灌流的耐受性之间的效应关系, 确定乙醇诱导肝脏自身保护效应充分表达的适当剂量。经初步分析, 影响肝功(*ALT*)值主要有3 个因素, 每个因素有 3 个水平, 见表 2, 同一观察指标: 肝功值(*ALT*)。这是一个多因素多水平的试验。各因素不仅各自独立地在起作用, 而且各因素相互搭配在一起起作用。也就是说, 不仅各个因素的水平改变时对试验指标有影响, 而且各因素的联合搭配对试验指标也有影响。这后一种影响就叫因素的交互作用。安排有交互作用的多因素试验, 必须使用交互作用表。许多正交表的后面都附有相应的交互作用表。我们研究的问题中有 3 个因素, 每两个因素的交互作用要占两列, 3 个因素的所有一级交互共有 6 列。连同 3 个因素 A, B, C, 在正交表中共占 9 列。应当选用正交表 $L_{27}(3^{13})$, 查交互作用表对各因素及其交互作用作出安排, 试验结果见表 3。

2　结果

2.1　统计学分析

2.1.1　三因素三水平正交设计的方差分析

2.1.1.1　总离差的平方和 S_T: 用 X_{ij}表示因素的第 i 个水平的第 j 个试验的结果, 假定每个因素有 n_α个水平, 每个水做α 试验 ($i=1, 2\cdots, n_\alpha$; $j=1, 2\cdots, \alpha$), $n=\alpha n_\alpha$。

$$\text{记}\sum_{i=1}^{n_\alpha}\sum_{j=1}^{\alpha}X_{ij}=\sum_{k=1}^{n}X_k,\ \bar{x}=\frac{1}{n}\sum_{k=1}^{n}X_k,\ Q_T=\sum_{k=1}^{n}X_k^2,\ P=\frac{1}{n}\left(\sum_{k=1}^{n}X_k\right)^2,$$

$$S_T=\sum_{k=1}^{n}(X_k-\bar{x})^2=Q_T-P$$

2.1.1.2　各因素离差的平方和: 以计算因素 A 的离差的平方和 S_A为例来说明(其它各因素的离差的平方和的计算完全相同)。

$$\text{记}\kappa_i=\sum_{j=1}^{\alpha}X_{ij},\ (\kappa_i\text{表示因素的第 i 个水平}\alpha\text{次试验结果的和})$$

$$Q_A=\frac{1}{\alpha}\sum_{i=1}^{n_\alpha}K_i^2;\ S_A=\frac{1}{\alpha}\sum_{i=1}^{n_\alpha}\left(\sum_{j=1}^{\alpha}X_{ij}\right)^2-\frac{1}{n}\left(\sum_{i=1}^{n_\alpha}\sum_{j=1}^{\alpha}X_{ij}\right)^2=Q_A-P$$

对于两因素的交互作用, 我们把它当成一个新的因素看待。如果交互作用占两列, 则交互作用的离差的平方和等于这两列的离差的平方和之和。如

$$S_{A\times B}=S_{(A\times B)1}+S_{(A\times B)2}$$

2.1.1.3　试验误差的离差的平方和: 设 $S_{因+交}$为所有因素以及要考虑的交互作用的离差的平方和, 因为

$$S_T=S_{因+交}+S_E$$

$$S_E=S_T-S_{因+交}$$

2.1.1.4　计算自由度

$$\int_{总}=n-1,\ \int_{因}=n_\alpha-1,\ \int_{A\times B}=\int_{A}\times\int_{B},\ \int_{E}=\int_{总}-\int_{因+交}$$

2.1.1.5　计算平均离差平方和(均方)

$$\text{因素的平均离差平方和}=\frac{\text{因素离差的平方和}}{\text{因素的自由度}}=\frac{S_{因}}{\int_{因}}$$

2.1.1.6　计算 F 值

$$F=\frac{\text{因素的平均离差平方和}}{\text{误差的平均离差平方和}}$$

2.1.1.7　方差分析表, 见表 4

表 4　方差分析表

Tab 4　Table of variance analysis

Source of variation	Sum square of deviations	Degrees of freedom	Mean square	F ratio	Critical value	Significance level	Good schem
A	5.51	2	2.76	1.27	$F_{0.01}(2,8)=8.65$		A_1
B	54.53	2	27.26	12.58		**	B_1
C	55.64	2	27.82	12.83		**	C_3
A×B	14.83	4	7.47	3.44	$F_{0.01}(4,8)=7.01$		
A×C	60.50	4	30.25	13.95		**	A_1C_3
B×C	60.40	4	30.20	13.93		**	B_1C_3
residual	17.35	8	2.17				
total	268.94	26					

**: $P<0.01$ vs control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 统计学分析结论

根据表 4 结果，因素 B、C、A×C、B×C 的 F 值都小于对应的临界值（$P<0.01$），所以因素 B、C、A×C、B×C 对试验指标 ALT 影响都非常显著。

3 讨论

目前临床上认为 ALT 值可以较好的反映肝细胞功能状况。对相同的缺血再灌注损伤，由于肝功 ALT 值越小越好，所以最优方案应取各因素 K 中的最小值所对应的水平。从表 3 看出，因素 A 应取第 1 个水平 A_1（K＝40.02），因素 B 应取第 1 个水平 B_1（K＝36.93），因素 C 应取第 3 个水平 C_3（K＝40.46）。交互作 A×C、B×C 也是非常显著，但是 A×C、B×C 都占两列，直观分析有些困难，因此把 A 和 C、B 和 C 的各种组合的试验结果对照起来分析，见表 5、表 6。

从表 5、表 6 看出，当 A 取第 1 个水平、C 取第 3 个水平，B 取第 1 个水平、C 取第 3 个水平时，试验结果为 5.97、8.85 是所有结果中的最小值，因此可取 A_1C_3、B_1C_3，这与单独考虑因素 A、B、C 时所得结论是一致的。于是最优方案为 $A_1B_1C_3$。结论：乙醇诱导肝脏自身保护效应充分表达的适当剂量为：酒精浓度 40%、喂饲剂量 5 g/kg、喂饲后距缺血手术时间 24 h。由表 3 还看出，对肝脏功能影响最大的是 A_3、B_2、C_2。

表 5 A×C 水平组合

Tab 5 A×C level combination

	A		
C	1	2	3
1	12.41	18.14	20.64
2	30.64	21.73	19.19
3	5.97	15.54	18.95

表 6 B×C 水平组合

Tab 6 B×C level combination

	B		
C	1	2	3
1	11.07	25.55	14.57
2	17.01	30.52	24.08
3	8.85	11.09	20.52

综上所述，应用正交试验设计安排多因素多水平进行方差分析，可大大减少实验动物数和实验次数，且能保证试验各因素各种水平搭配均衡。它是寻找最优试验条件的一种好方法。值得广泛推广与应用。

参考文献：

[1] 李 贤，刘桂芳，何大卫. 多因素重复测量设计裂区方差分析[J]. 中国卫生统计，2001，18(1)：22－23.
[2] 陈魁著. 试验设计与分析[M]. 北京：清华大学出版社，1996. 141－150.
[3] 栾军著. 试验设计的技术与方法[M]. 上海：上海交通大学出版社，1987，10.

（编辑 潘式文）

（上接 313 页）

2 结果

CHF 组、对照组各 60 例的 ET，CGRP 及 ET/CGRP 比值结果见表 1。

表 1 两组各 ET、CGRP、ET/CGRP 比值比较（pg/ml）

组别	例数	CHF 组	对照组	P 值
ET	60	70.45±17.23	57.92±14.11	＜0.05
CGRP	60	64.37±13.72	53.79±16.8	＜0.05
ET/CGRP		15.1±0.17	1.14±0.29	＜0.01

3 讨论

ET 是一种由内皮细胞分泌的由 21 个氨基酸组成血管活动性物质，具有强列的动、静脉血管收缩作用，参与血管张力的局部调节，在具有组织缺血、缺氧和血管内皮损伤的疾病中它起着重要的作用，对心肺功能有抑制作用[4,5]。本研究结果显示，CHF 患者血浆内皮素水平明显升高，与文献[4]报道一致。

CGRP 是从人和哺乳动物体内发现的一种神经肽，具有强大的扩张周围血管作用，对缺血心肌细胞有保护作用，对心脏有正性变力和变时效应[6,7]。说明 CGRP 增高对 CHF 患者有血液动力学效应；且心脏功能也能改善。近些年研究显示 CHF 患者血浆 CGRP 水平较正常人显著升高[6]。我们的研究结果与之相符，但其增高的详细机制目前还不大清楚，可能与 CHF 时肾脏功能不全引起 CGRP 排泄减少有关。

大多数研究表明 ET 和 CGRP 在体内心血管领域产生着互相拮抗的效应，所以它们在体内的平衡维持显得非常重要，本研究表明 ET 和 CGRP 水平在 CHF 的病理生理过程中有一种相互制约、相互影响、动态平衡的关系，CHF 患者血浆 ET/CGRP 这种平衡关系被破坏，这对 CHF 的发生、发展和预后起一定的作用；当然 ET/CGRP 的确切关系，尚有待进一步探讨研究。

依照上述的 ET/CGRP 平衡关系，提醒人们在预防、治疗 CHF 时尽量要恢复 ET/CGRP 的这种平衡；一方面可采取抑制 ET 的合成和释放或者阻断其与受体结合的措施；另一方面可促进 CGRP 采释放，并应用 CGRP 制剂以提高其体内浓度以拮抗 ET，纠正 CHF。随着 CGRP 药理机制和临床的深入研究以及拮抗 ET 效应药物的开发应用，对 CHF 的防治将产生重要的影响。

关键词：充血性心力衰竭；内皮素；降钙素；基因
中图法分类号：R541.610.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Yanagisawa M, Kurihara H, kimura S, *et al*. A novel potent vasoconstrictor peptide by vascular endothelial cell[J]. Nature, 1998, 334(3): 411.
[2] 王 宪. 韩启德. 降钙素基因相关肽(CGRP)：一种新发现的有强大心血管作用的神经肽[J]. 生理科学，1989，9(1)：1.
[3] 张云东，邹咏文，许民辉. 内皮素及其 A 受体在兔颅脑创伤后脑血液量变化中的作用及意义[J]. 第三军医大学学报，1999，21(5)：359－362.
[4] Haynes W G, Welb D J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease[J]. Jin Sci, 1993, 84(5): 485.
[5] 唐朝柜，李兆萍，樊 贵，等. 内皮素对离体大鼠心肌细胞的影响[J]. 生理学报，1992，44(1)：15.
[6] Shekhar Y C, Anand I S, Sarma R, *et al*. Effects of prolonged infusion of human Alpha calcitonin gene-related peptide on hemodynamics, renal blood flow and hormone levels in congestive heart failure[J]. Am J Cardiol, 1991, 67(8): 732.
[7] Grossman D, McEwan T, Macdermot J, *et al*. Human calcitonin gene-related peptide activates adenyalte cyclase and releases prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells[J]. Br J pharmacol, 1987, 92(4): 695.

（编辑 冷怀明）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net