

# 对照·随机·重复

## ——动物实验设计基础知识

沈孝宙

江腾龙

(中国科学院动物研究所) (江西大学生物系)

动物学研究和其他学科的研究一样,就方法而论,可以大致划分为两种类型:观察性研究与实验性研究。所谓观察性研究是指对自然界已经发生和正在发生的现象进行描述和概括,譬如动物分类学、动物形态学和动物生态学等;而实验性研究则是指对人们有目的的设计条件下所产生的现象进行分析,如动物生理学、动物生物化学和动物遗传学就是以实验研究为主要手段的科学。当然,这样的划分完全是为了方便,事实上形态学和生态学也越来越多地采用了实验手段,而像生理学、生物化学和遗传学这些学科,仍然保留着一些观察性的研究方法。如果追溯一下实验研究方法的历史,可以认为:从十六世纪欧洲文艺复兴以后,许多科学研究领域才从单纯的观察、描述中摆脱出来,走向实验研究的广阔天地,这无疑是自然科学的一次深刻的方法学革命。有了实验研究方法,自然科学才获得今天如此辉煌的成就。

实验研究方法之所以能发挥这么大的作用,主要在于它能够剖解极其复杂的自然现象,暴露其本质,揭示其内在的联系。近代历史上,许多伟大的科学家首先都是优秀的实验家,他们“能把问题化为最简单的要素,然后用最直接

的方法找到答案。”尽管这是一句多少有点文学化了的语言,但却是一个实验研究者所必备的基本素质。

实验科学研究包括许多基本环节,可用下图表示:

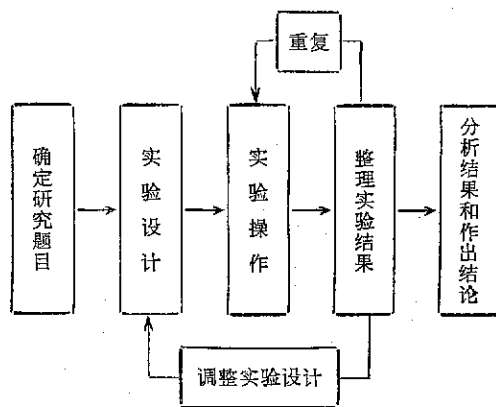


图 实验科学研究的基本环节

实验设计的好坏直接关系到整个实验研究的成败。一个好的、周密的实验设计,不仅可以节省时间,节省人力和物力,而且能够获得可靠的实验结果。计划不周的实验,必然导致实验的失败,任何现代化的仪器设备和严密的数理统计方法都无法弥补。

美国数理统计学家费歇尔 (Fisher), 于 1925 年首次为实验设计方法进行过系统的总结, 提出了“重复、随机、对照”三大原则。它适用于各种实验科学, 并具有重要的指导意义, 简介如下。

## 一、对照 (Controls)

20 年代有一个很引人注目的实验, 即大鼠经过训练后, 趋光速度随着世代递进而加快, 从而认为趋光与获得性遗传有关, 但是, 这个实验没有同时研究不预先训练的大鼠其后代是否也有趋光性增快的现象, 因为没有设置对照组。趋光增快是否与获得性遗传有关, 这个问题很重要, 因此隔了十年之后, 一些科学家又重复了这个实验。他们改变了前人的做法, 在进行给光训练实验的同时, 增设了不经光训练的对照组。以惊人的耐心, 做了近 20 年的实验, 最后证明两组大鼠趋光性均有随世代增强的现象, 与训练无关, 否定了趋光性增强是一种获得性遗传。

“对照”是生物学实验中最重要概念之一。在动物学实验中, 取样后不经实验处理的动物部分, 称对照组。它是与经实验处理的动物(实验组)进行比较的标准。只有通过这种比较, 才能去除各种相应的系统误差(如试验条件、个体、时间、操作方法等方面的不同), 从而确定处理的真正效应, 达到去伪存真的效果。

任何没有对照的实验, 其结果一般说都是不可靠的。对照组设置不适当的实验, 同样也不可靠。有些人习惯于“偏爱”实验组, 以为那才是他们赖以出成果的关键所在。常常精心挑选和护理实验组的动物, 相反, 轻视对照, 把一些零头甚至瘦弱的动物作对照, 有时甚至干脆不用对照。岂知这种挑选正是实验走向失败的开始。在实验中对照组与实验组应具有同样重要的位置。当对照组与实验组个体数量悬殊时, 所得实验结果几乎没有统计学上的价值。对照组与实验组不仅要求数量上相等或接近, 而且除处理因素之外, 其他实验条件(如性别、年龄、体重、品系、营养状态等)应尽可能一

致。当然, 绝对的一致是不存在的, 也没有必要千方百计去做到这一点, 但可以利用增加群组中个体数量的方法, 借助数学的技巧, 来校正群组之间的差异, 提高实验的敏感性。

这里举一个例子, 从中可以反映群组实验条件的一致性与群组数量之间的关系。在新西兰研究乳牛乳脂产量的实验中发现, 需要用 110 头随机取样的母牛(一半作实验, 一半作对照)才能获得可靠的结果, 但如果用同胎双生的母牛, 则只要两头就能得到同样可靠的结果。由此可见选择尽可能“相似”的动物(如同性别、同品系、同窝甚至同胎)作实验, 进行“配对”, 即把它们分别编进实验组和对照组, 可以大大减少实验动物的个体数量, 这对一些珍贵动物的实验尤为重要。数理统计分析证明: 同源配对的效率比随机配对高 5 倍。

动物学实验研究可分为两大类型: 即利用整体动物作实验的“体内实验”(in vivo)和取出动物体内一部分材料在离体条件下进行实验的“体外实验”(in vitro)。体内实验的对照组, 其设置的形式是多种多样的。用另外一群个体作对照是最常见的, 如上所述。在同一个体上, 既可以作实验, 也可以作对照, 有时所得结果更为可靠。例如要研究某种新药物对小白鼠血糖的影响, 可以把动物分成两组: 一组接受药物处理, 另一组用溶解该药的溶剂处理(对照)。然后在同一时间取血分析两组动物血糖的差异。由于血糖水平个体差异很大, 因此必须增加样本数目, 才能剔除个体差异的干扰, 确定药物的真正作用。也可以在同一动物身上进行这种研究, 就是在动物接受药物处理之前先取血样作对照, 与药物处理后的血样同时测定血糖, 再作比较。如果有一批动物接受这样的处理, 其结果一般是可靠的。当然, 作这样的实验还要事先弄清由于取血时间不同, 动物的血糖会不会有明显变化? 血样存放一段时间对糖的定量测定会不会有影响? 这里仍然涉及实验条件的一致性问题。

此外, 同一个体中具有对称性的双侧器官(如哺乳类的子宫、卵巢、睾丸、肾脏、肾上腺、甲

状腺等),也常常用来作同源配对,一侧作实验,一侧作对照。因此,在正式实验之前,也首先要确定实验所要分析的指标在两侧器官之间是否有统计学上的差别。

体外实验是把动物体内的某些器官(如一段迴肠)、组织或组织切片、组织匀浆、游离的细胞(如血球、用酶分散的脂肪细胞)或细胞器(如细胞核、线粒体)分离出来,在离体条件下进行实验。这种方法有许多优点,首先可以消除个体差异,例如把几个动物的血球细胞混合后再分组实验。对照组比较单纯,易于设置。因此,离体实验是生物化学和分子生物学研究的重要方法之一。

## 二、随机(Random)

实验设计是研究者们根据经验(自己的和别人的)所进行的工作计划的构思活动,当在安排动物实验时,应尽可能排除主观的偏向。动物的分组、抽样等,应“按照不依人主观愿望的机遇法则进行分配”,以避免实验结果的偏差。因此在实验设计中,“随机”的概念也是重要的。

随机并不是“随便”、“随手抓来”的意思。譬如有一群实验动物,研究者要把它们分成几组。“挑选”固然是不许可的,但“随手抓来”也是错误的。从表面上看,“随手抓来”虽然没有主观愿望,但在客观上,先抓到的一般都是较迟钝的动物,而动物的迟钝性可能与疾病、体弱有关,这就造成各组之间的不平衡,给实验带来偏差。因此,“随手抓来”并不是随机。

“随机”是一个严格的数理统计概念,它有一定的原则,就是使每个个体应有同等的机会分配到组群之中。根据随机原则分配实验对象

称为“随机化”(Randomisation)。最简单也最通俗的随机化方法是抽签、掷骰子等。不过抽签的方法仍不易做到完全符合数学上的机率的要求,当动物数量大,条件又不一致时,研究人员要花费很多精力进行实验设计的随机化,而且还不一定能使各组群之间的条件趋于一致。所幸的是,数理统计学家根据随机抽样的原则已为我们编制了“随机数字表”(在一些有关数理统计的书籍后面附有)。根据这种表格,实验动物学研究人员可以更迅速、更合理地完成实验动物分组、抽样的随机化。

举一例来说明“随机数字表”的使用方法。如有20只实验动物,要分成两组。先把动物按体重大小依次编号,然后在“随机数字表”中任意从一个数值开始,譬如从第二行第一个数字开始,按次序与动物编号放在一起,将任选随机数目为单数的动物编入甲组,双数编入乙组,则得到下面的结果(见表1)。甲、乙两组动物正好各10只,如果两组数目不等,仍然可以用“随机数字表”来决定哪只动物该换组。

假若能把同性别、同年龄、同体重、甚至同窝的动物分到不同组群中,显然要比随机设计更合理,可以进一步减少实验误差。例如有分成两组的“配偶组设计”、分成三组或更多组的“随机单位组设计”。这些实验设计稍复杂些,但仍可利用“随机数字表”。

过去,实验科学研究非常强调“一次变化一个因素”这个原则。但有了现代数理统计方法,研究者可以在不增加动物数量的基础上,可以同时在一个实验中部署几个变数。这样不仅能节约时间,节省人力和物力,而且还可以观察各因素之间的相互作用。“拉丁方设计”和“正交设计”就是两种比较重要的多因素分析的实

表 1

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
随机数目	97	74	24	67	62	42	81	14	57	20	42	53	32	37	32	27	07	36	07	51
组 别	甲	乙	乙	甲	乙	乙	甲	乙	甲	乙	乙	甲	乙	甲	乙	甲	甲	乙	甲	甲

验设计方法。

### 三、重复 (Replication)

在介绍“重复”这个概念之前，首先要弄清“总体和样本”的含意。动物学实验研究的目的在于认识动物界所存在的总体的客观规律。但实验所涉及的仅仅是一些个体，称此为“样本”，它所归属的那个类群的全体，才称之为“总体”。然而，一般常常是不能用“总体”来做实验，但个别的样本难以排除偶然的误差，并不能代表总体。但只要有足够数量的样本，就可以代表总体，这已为无数实验所证明。问题是需要多少样本才足够代表总体？那就要看实验的结果在各个样品中的“再现性”是否符合统计学的要求。再现程度愈高，实验结果愈可靠。这就是所谓“重复”的概念。“重复”也称“平行实验”。当然，对“重复”的理解还可以引伸到各次实验之间所得结果的再现性。所以说，实验的“重复”就是通过反复实践对客观规律的检验。

也许有人会以为“重复”的数量越多越好。其实也不尽然。从理论上讲，研究人员固然在加大重复的数量时，可以得到提高精密度的好处，但从实际上看，这要耗费更多的人力、物力和时间。假若我们的一些研究不必要那么高的精密度，那就造成浪费。有时由于样品太多，操作就难免粗糙，因而在实验数据中带进一些更大的实验误差，结果适得其反。

样本数量的正确选择是一个比较复杂的问题。一个即使十分有经验的研究人员，也很难一下子就选择得十分合适。一般说，常常需要做几次小试验，可以把它称为“预备实验”。在实验设计中，预备实验很重要，它可以使实验人员能大致了解实验处理的反应程度和误差大小，熟悉一些研究方法和技术，做到心中有数。

然后再根据预备实验所得到的初步数据，来估算样本所需的正式数量。许多因素与样本数量有关，例如实验组与对照组之间实验结果的差别程度(差别若大，样本数量就可少些)、实验误差的大小(误差越大，所需样本就越多)以及对实验精确性的要求等。可以通过一些途径来确定样本的数量，如从专门设计的图表中查找，或利用某些公式估算。这些估算系根据  $t$  检验的原理，其中关于成组比较的实验，实验组与对照组各需的样本数 ( $n$ ) 可从下列公式求得：

$$n = \frac{2t_{0.05}^2\sigma^2}{\delta^2}$$

式中  $\sigma$  为各组的全体标准差， $\delta$  为实验以 0.5 的概率能辨别的全体平均数的差数， $t_{0.05}$  是自由度  $df = n - 1$  时的  $t_{0.05}$  值。一般要求  $n$  不要小于 5。

### 四、结 语

本文围绕“对照、随机、重复”三大原则，简要介绍了在动物学研究所遇到的实验设计的原理与方法。虽然这些原则也是其他生物科学所通用的，但仍要牢记动物学实验还有它自身的特点，例如在实验中能够使用的动物个体数量毕竟比微生物和植物少得多；而动物机体又远比微生物和植物复杂。因此动物实验设计显然要更加困难，研究人员在进行实验设计时要更加周密、谨慎。“对照、随机、重复”这些原则都与数理统计有密切的关系。研究人员在作实验设计的时候，从一开始就要考虑到一个问题，就是按照这样的设计所获得的实验结果是否易于进行统计学处理。实验设计是离不开数理统计知识的，一个完全不懂数理统计的研究人员，几乎很难做出一个出色的实验设计来。