

· 基础研究 ·

活骨注射液髋关节腔灌注对兔股骨头坏死模型 血管内皮生长因子表达的动态影响

徐西林¹ 赵永兰¹ 张晓峰¹ 王智¹ 韩雪松² 吕航¹

(1. 黑龙江中医药大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江省大庆市人民医院 黑龙江 大庆 163316)

摘要 目的: 观察活骨注射液髋关节腔灌注对兔股骨头坏死模型血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor ,VEGF) 表达的动态影响。方法: 将 90 只新西兰大白兔随机分为对照组、模型组和实验组, 每组 30 只。对模型组和实验组动物采用液氮冷冻法进行股骨头坏死造模; 造模成功后, 分别以生理盐水和活骨注射液进行髋关节腔灌注。对照组不进行任何干预。药物干预开始后 1、3、6、9、12 周时, 分别从各组随机选取 6 只动物处死后取出股骨头, 采用免疫组化法和实时定量 PCR 法检测 VEGF 表达情况。结果: 药物干预后各时点, 3 组动物股骨头 VEGF 蛋白表达量比较, 组间差异均有统计学意义(490.56 ± 60.62 , 661.99 ± 64.51 , 796.09 ± 86.17 , $F=27.670$, $P=0.000$; 501.41 ± 58.85 , 781.71 ± 87.32 , 854.71 ± 76.97 , $F=36.810$, $P=0.000$; 489.33 ± 53.19 , 592.42 ± 117.35 , 905.51 ± 107.95 , $F=29.930$, $P=0.000$; 498.96 ± 40.37 , 571.31 ± 111.38 , 1158.20 ± 147.35 , $F=65.820$, $P=0.000$; 500.47 ± 33.67 , 508.01 ± 138.76 , 1528.20 ± 146.09 , $F=150.770$, $P=0.000$)。对照组各时点股骨头 VEGF 蛋白表达量均低于实验组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 药物干预后 1、3 周时对照组股骨头 VEGF 蛋白表达量均低于模型组($P=0.001$, $P=0.000$); 药物干预后 1、6、9、12 周时模型组股骨头 VEGF 蛋白表达量均低于实验组($P=0.005$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 其余各时点组间两两比较, 差异均无统计学意义。药物干预后各时点, 3 组动物股骨头 VEGF mRNA 表达量比较, 组间差异均有统计学意义(1.000 ± 0.000 , 1.313 ± 0.380 , 1.546 ± 0.204 , $F=9.650$, $P=0.001$; 1.000 ± 0.000 , 1.412 ± 0.345 , 1.750 ± 0.236 , $F=19.361$, $P=0.000$; 1.000 ± 0.000 , 1.235 ± 0.095 , 1.807 ± 0.211 , $F=35.216$, $P=0.000$; 1.000 ± 0.000 , 1.234 ± 0.250 , 2.691 ± 0.289 , $F=137.743$, $P=0.000$; 1.000 ± 0.000 , 1.113 ± 0.180 , 3.106 ± 0.287 , $F=293.245$, $P=0.000$)。对照组各时点股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于实验组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 药物干预后 1、3、6、9 周时对照组股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于模型组($P=0.020$, $P=0.003$, $P=0.027$, $P=0.046$); 药物干预后 3、6、9、12 周时模型组股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于实验组($P=0.011$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 其余各时点组间两两比较, 差异均无统计学意义。结论: 活骨注射液髋关节腔灌注可持续促进兔股骨头坏死模型坏死股骨头局部 VEGF 表达, 这可能是其治疗股骨头坏死的主要作用机制之一。

关键词 股骨头坏死; 血管内皮生长因子类; 活骨注射液; 模型 动物; 动物实验

Dynamic effect of intra-articular hip injection of Huogu injection on the expression of vascular endothelial growth factor in rabbit models with femur head necrosis

XU Xilin¹ ZHAO Yonglan¹ ZHANG Xiaofeng¹ ,WANG Zhi¹ ,HAN Xuesong² ,LYU Hang¹

1. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine ,Harbin 150001 ,Heilongjiang ,China

2. The People's Hospital of Daqing City ,Daqing 163316 ,Heilongjiang ,China

ABSTRACT Objective: To observe the dynamic effect of intra-articular hip injection of Huogu injection on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in rabbit models with osteonecrosis of the femoral head(ONFH) . **Methods:** Ninety New Zealand white rabbits were randomly divided into control group ,model group and experimental group ,30 cases in each group. The rabbits in model group and experimental group were administrated with liquid-nitrogen refrigeration to build ONFH models ,and then they were intra-articular injected with normal saline and Huogu injection respectively in the hip ,while the rabbits in the control group were not be treated. At 1 ,3 ,6 ,9 and 12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173276) ; 哈尔滨市科技创新人才项目(2011RFXYS070)

通讯作者: 张晓峰 E-mail: zxfeng9919@ 163. com

weeks after the beginning of drug intervention 6 rabbits were randomly selected from each group respectively and were executed, then their femoral heads were fetched out and were sectioned for detecting the expression of VEGF by immunohistochemical method and real-time quantitative PCR method. **Results:** There was statistical difference in the expression of VEGF protein in femoral head between the 3 groups at each timepoint after the beginning of drug intervention (490.56 ± 60.62, 661.99 ± 64.51, 796.09 ± 86.17, $F = 27.670$, $P = 0.000$; 501.41 ± 58.85, 781.71 ± 87.32, 854.71 ± 76.97, $F = 36.810$, $P = 0.000$; 489.33 ± 53.19, 592.42 ± 117.35, 905.51 ± 107.95, $F = 29.930$, $P = 0.000$; 498.96 ± 40.37, 571.31 ± 111.38, 1158.20 ± 147.35, $F = 65.820$, $P = 0.000$; 500.47 ± 33.67, 508.01 ± 138.76, 1528.20 ± 146.09, $F = 150.770$, $P = 0.000$). The expression of VEGF protein in femoral head was lower in control group compared to experimental group at each timepoint after the beginning of drug intervention ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$). The expression of VEGF protein in femoral head were lower in control group compared to model group at 1 and 3 weeks after the beginning of drug intervention ($P = 0.001$, $P = 0.000$) and were lower in model group compared to experimental group at 1, 3, 9 and 12 weeks after the beginning of drug intervention ($P = 0.005$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), while there was no statistical difference between the paired groups at other timepoints. There was statistical difference in VEGF mRNA expression in the femoral head between the 3 groups at each timepoint after the beginning of drug intervention (1.000 ± 0.000, 1.313 ± 0.380, 1.546 ± 0.204, $F = 9.650$, $P = 0.001$; 1.000 ± 0.000, 1.412 ± 0.345, 1.750 ± 0.236, $F = 19.361$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.000, 1.235 ± 0.095, 1.807 ± 0.211, $F = 35.216$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.000, 1.234 ± 0.250, 2.691 ± 0.289, $F = 137.743$, $P = 0.000$; 1.000 ± 0.000, 1.113 ± 0.180, 3.106 ± 0.287, $F = 293.245$, $P = 0.000$). The VEGF mRNA expression in the femoral head was lower in control group compared to experimental group at each timepoint after the beginning of drug intervention ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$) and were lower in control group compared to model group at 1, 3, 6 and 9 weeks after the beginning of drug intervention ($P = 0.020$, $P = 0.003$, $P = 0.027$, $P = 0.046$) and were lower in model group compared to experimental group at 3, 6, 9 and 12 weeks after the beginning of drug intervention ($P = 0.011$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), while there was no statistical difference between the paired groups at other timepoints. **Conclusion:** Intra-articular hip injection of Huogu injection can promote the expression of VEGF in necrotic femoral head of rabbit ONFH model, which may be one of the mechanisms of action for treatment of ONFH.

Key words femur head necrosis; vascular endothelial growth factors; Huogu injection; models; animal; animal experimentation

股骨头坏死致残率高,因此早期明确诊断,进行保留自身股骨头的治疗显得尤为重要。保留自身股骨头治疗的主要目标是重建及改善坏死股骨头的血液循环,加快骨质修复,从而获得相对无痛和功能基本正常的髋关节,从而延缓或避免人工髋关节置换^[1]。其中股骨头内血管再生在股骨头坏死修复过程中起着重要作用。活骨注射液是黑龙江中医药大学附属第二医院研制的治疗股骨头坏死的中药制剂,具有活血化痰、补肾壮骨的功效,能够有效促进股骨头坏死区的修复^[2]。那么在股骨头坏死病程中,活骨注射液能否持续促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达呢?为此我们进行了相关的实验研究,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康 6 月龄清洁级新西兰大白兔 90 只,雌雄各半,体质量(2.1 ± 0.1) kg,实验动物许可证号:SCXK(黑)2006-010。实验方案通过医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验药物和试剂 活骨注射液,药物组成为丹

参 3 g、川芎 2 g、骨碎补 2 g,由黑龙江中医药大学药学院制备,每支 10 mL。多克隆抗兔一抗为 VEGF、胰岛素样生长因子 1、成纤维细胞生长因子 2(ABC公司),兔二抗 PV6001、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),柱式软骨 RNAOUT 试剂盒(北京天恩泽生物技术有限公司),RR037A 逆转录试剂盒、RR820A 实时定量 PCR 试剂盒(TAKARA 公司)。

1.3 实验仪器 LEICA 2135 型组织切片机、LEICA EG1160 型组织包埋机、LEICA ASP300S 型组织脱水机(LEICA 公司),Moticam3000 显微摄影成像系统(Motic 公司),L-6200 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),G80F 医用微波炉(格兰仕集团有限公司),Image-pro plus6.0 病理图像分析系统(Motic 公司),Roche 480 II 实时定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司),EDC811 东胜龙梯度 PCR 仪(北京东胜创新科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 适应性喂养 1 周后,随机选取 30 只动物(对照组)继续正常喂养,其余 60 只采用液氮冷

冻法^[3]进行股骨头坏死造模,造模成功后将其随机分为模型组和实验组,每组 30 只。

2.2 药物干预 造模术后 2 周,对照组不进行任何干预,模型组和实验组分别以生理盐水和活骨注射液进行髋关节腔灌注,每次 0.7 mL,每 3 天 1 次。

2.3 实验观察 分别于药物干预开始后 1、3、6、9、12 周时从各组随机选取 6 只动物以空气栓塞法处死后取出股骨头,沿冠状面剖开,一半取负重区软骨及软骨下骨坏死组织用 4% 多聚甲醛固定后进行 HE 染色及免疫组化检测,另一半置于液氮罐中保存进行实时定量 PCR 检测。免疫组化法操作步骤按兔 VEGF 免疫组化试剂盒说明书进行,以 Motic3000 显微摄影系统于 400 倍下摄片,并采用 Image-pro plus6.0 病理图像分析系统对阳性表达进行定量分析,以积分光密度(integrated optical density, IOD)代表 VEGF 蛋白相对表达量。实时定量 PCR 检测按照柱式软骨 RNAOUT 试剂盒说明书的步骤进行。

2.4 数据统计分析 采用 SPSS19.0 软件对实验数据进行统计学分析,3 组动物药物干预后不同时点股骨头 VEGF 蛋白及 mRNA 表达量的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,检验

水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 HE 染色及免疫组化检测结果 对照组关节软骨表面光滑,各级骨细胞层次清晰;骨小梁排列规则,结构完整,骨小梁中各级骨细胞形态规则且较清晰,可见散在的空骨陷窝,成骨细胞沿骨小梁成串排列分布;骨髓腔内可见正常的红骨髓和脂肪组织,形态正常。模型组关节软骨层变薄,表面粗糙不平,各级骨细胞数量明显减少,层次紊乱;骨小梁稀疏细小且结构紊乱,并可见部分骨小梁断裂,骨细胞数量明显减少,骨细胞形态欠清晰,空骨陷窝数量明显增多;红骨髓数量减少,骨髓腔被大量脂肪细胞填充,脂肪细胞肥大融合成空泡状。上述变化以药物干预开始后 6、9、12 周时最明显,且这 3 个时间点间的病理表现差异不明显。随着干预时间的延长,与模型组相比,实验组关节软骨层逐渐增厚,骨细胞数量不同程度增多,排列较规则;骨小梁结构基本完整,但仍较稀疏,排列欠规整,骨细胞数量有所增加,空骨陷窝数量减少,可见散的圆柱形成骨细胞;骨髓腔内红骨髓明显增多,脂肪细胞数量减少。上述变化以药物干预开始后 12 周时改善最为明显。见图 1、图 2。

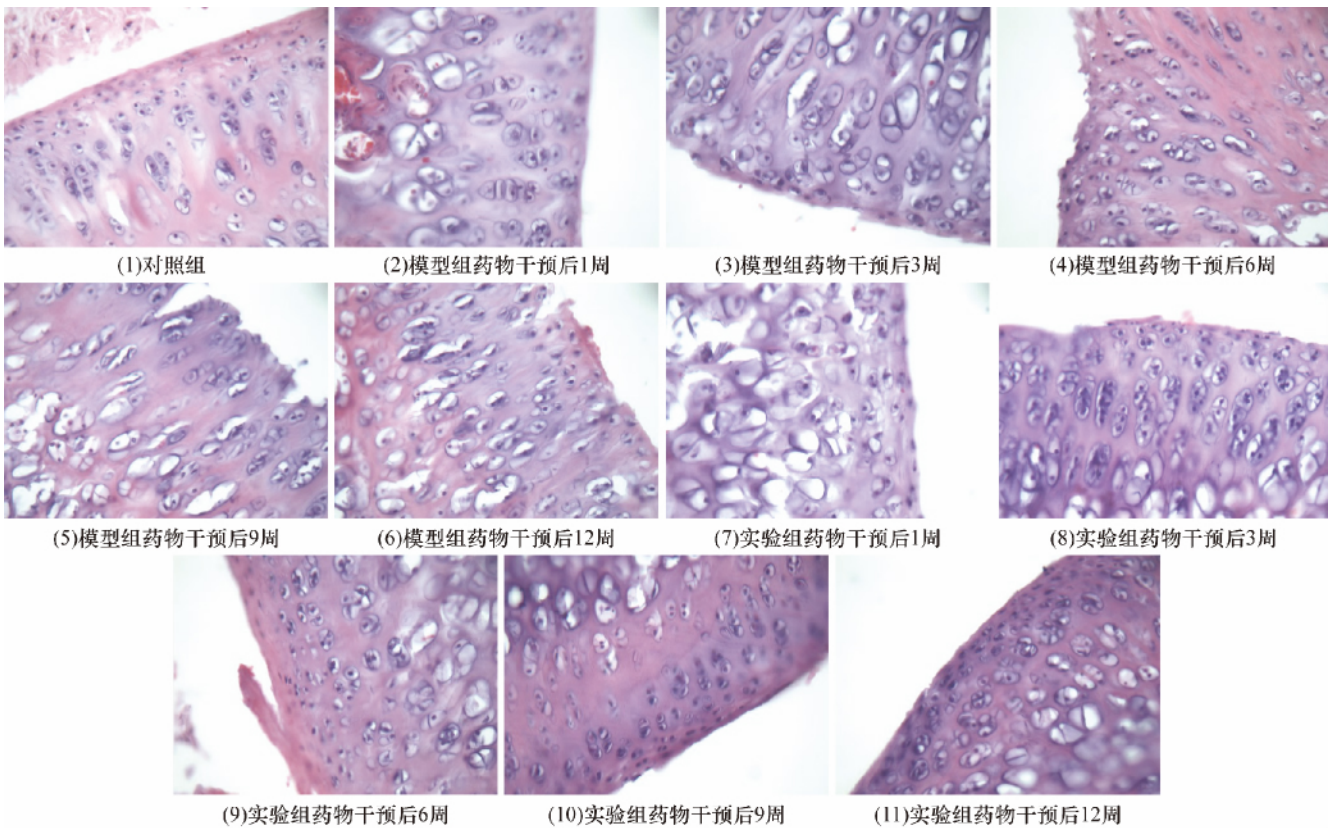


图 1 3 组动物股骨头组织 HE 染色 (×400)

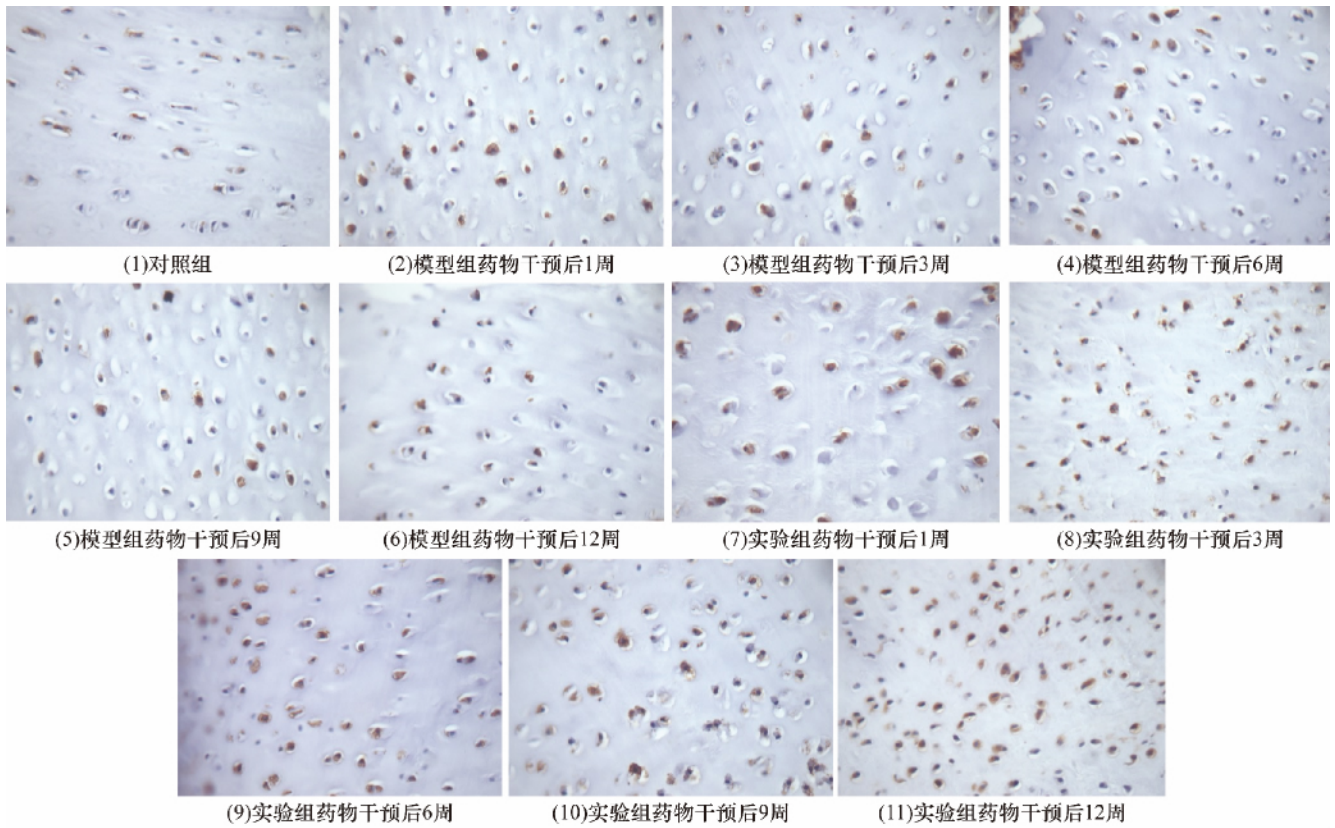


图 2 3 组动物股骨头组织免疫组化染色 (苏木素复染 ×400)

药物干预后各时点 3 组动物股骨头 VEGF 蛋白表达量比较 组间差异均有统计学意义。对照组各时点股骨头 VEGF 蛋白表达量均低于实验组 ($P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$) ; 药物干预后 1、3 周时对照组股骨头 VEGF 蛋白表达

量均低于模型组 ($P = 0.001$ $P = 0.000$) ; 药物干预后 1、6、9、12 周时模型组股骨头 VEGF 蛋白表达量均低于实验组 ($P = 0.005$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$) ; 其余各时点组间两两比较 , 差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 药物干预开始后不同时间 3 组动物股骨头 VEGF 蛋白表达量 (IOD 值)

组别	样本量 (只)	股骨头 VEGF 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)				
		1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
对照组	6	490.56 ± 60.62	501.41 ± 58.85	489.33 ± 53.19	498.96 ± 40.37	500.47 ± 33.67
模型组	6	661.99 ± 64.51	781.71 ± 87.32	592.42 ± 117.35	571.31 ± 111.38	508.01 ± 138.76
实验组	6	796.09 ± 86.17	854.71 ± 76.97	905.51 ± 107.95	1158.20 ± 147.35	1528.20 ± 146.09
F 值		27.670	36.810	29.930	65.820	150.770
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3.2 PCR 检测结果 药物干预后各时点 3 组动物股骨头 VEGF mRNA 表达量比较 组间差异均有统计学意义。对照组各时点股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于实验组 ($P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$) ; 药物干预后 1、3、6、9 周时对照组股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于模型组 ($P = 0.020$ $P = 0.003$ $P = 0.027$ $P = 0.046$) ; 药物干预后 3、6、9、12 周时模型组股骨头 VEGF mRNA 表达量均低于实验组 ($P = 0.011$ $P = 0.000$ $P = 0.000$ $P = 0.000$) ; 其余各时点组间两两比较 , 差异均无统计学

意义。见表 2。

4 讨论

股骨头坏死病因多样 , 病理机制复杂 , 其中缺血是目前各种病因中已经明确的股骨头坏死的共同病理变化^[4]。Kerachian 等^[5]认为血管因素在股骨头缺血性发病机制中占有举足轻重的地位。股骨头坏死后 , 从坏死区周围骨组织开始自发地修复 , 在修复的过程中 , 骨的形成依赖于血管的生成^[6] , 但坏死区周围形成的硬化带阻止了新生血管的长入 , 妨碍了坏死区的血液循环^[7] , 因此常遗留部分骨坏死不能修复。

表 2 药物干预开始后不同时间点 3 组动物股骨头 VEGF mRNA 表达量

组别	样本量 (只)	股骨头 VEGF mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)				
		1 周	3 周	6 周	9 周	12 周
对照组	6	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型组	6	1.313 ± 0.380	1.412 ± 0.345	1.235 ± 0.095	1.234 ± 0.250	1.113 ± 0.180
实验组	6	1.546 ± 0.204	1.750 ± 0.236	1.807 ± 0.211	2.691 ± 0.289	3.106 ± 0.287
F 值		9.650	19.361	35.216	137.743	293.245
P 值		0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

因此,促进股骨头坏死区内的血管修复或再血管化是进行股骨头坏死保留自身股骨头治疗的基本条件^[8]。

血管再生的过程相当复杂。在病理状态下,如果可以使促血管再生因子表达上调,则可使血管再生增强,有利于坏死股骨头的修复。VEGF 是目前已知的最主要的血管生成因子,许多生长因子通过诱导 VEGF 的表达而起作用,故被认为是促进血管再生过程中的中心调节者^[9]。VEGF 能够诱导内皮细胞增殖,从而促进骨细胞分化、迁移、聚集^[10-11]。

药物干预后 1、3 周时,对照组的 VEGF 表达量低于模型组,这可能与股骨头坏死早期坏死股骨头自我修复能力较强有关^[7]。其机制可能是缺氧条件下组织 VEGF 表达上调,导致 VEGF 合成增多^[12-14]。药物干预后 6、9、12 周时,对照组与模型组的 VEGF 表达量比较,差异无统计学意义,这提示股骨头坏死的修复的过程中,细胞因子的增加只是机体对股骨头坏死刺激的应激反应,但这种自我修复的应激反应时间持续不长,不能完成股骨头坏死的修复。崔永峰等^[15]认为,股骨头坏死后,股骨头坏死修复带的前沿为低氧、低营养环境。低氧时成骨细胞活性受到抑制,破骨细胞、成纤维细胞和软骨细胞活性增强,使纤维肉芽组织增生充填骨髓腔。只有在新生血管芽的前端,才有足够的氧促进成骨。同时,在坏死股骨头修复的同时,成纤维细胞在对能量和营养需求的竞争过程中一直处于优势地位,其结果是抑制了其他细胞的生存。而在肉芽组织的外围,形成硬化带,使血管难以长入,且成骨细胞活性降低,主动分泌 VEGF 减少,这也可能是造成修复过程中断的主要原因。

药物干预后 1 周时,实验组 VEGF 表达量高于模型组,但 3 周时组间差异无统计学意义。提示活骨注射液在股骨头坏死早期即可促进 VEGF 表达,而兔股骨头坏死早期的自我修复能力在第 3 周时最强。药物干预后 6、9、12 周时,模型组的 VEGF 表达明显受到抑制,但实验组 VEGF 表达量持续增高,提示活骨

注射液能持续促进 VEGF 表达,药效稳定至 12 周。颜冰等^[16]的研究表明,活血补肾汤能明显促进激素性股骨头坏死兔 VEGF 表达,但早期作用不明显。这与我们的研究结果存在一定的差异,可能是由于我们所采用的中药注射液髋关节灌注更有利于药物到达病变部位发挥疗效。另外,本研究中采用免疫组化和 PCR 两种方法所测定的 VEGF 表达情况略有不同,但总体趋势一致,这可能与两种检测方法的敏感度存在差异有关。

本研究的结果提示,活骨注射液髋关节腔灌注可持续促进兔股骨头坏死模型坏死股骨头局部 VEGF 表达,这可能是其治疗股骨头坏死的主要作用机制之一。

5 参考文献

- [1] 陈卫衡. 股骨头坏死的诊治误区与对策 [J]. 中医正骨, 2013, 25(3): 3-5.
- [2] 徐西林, 张晓峰, 段洪超, 等. 活骨注射液髋关节腔注射对兔 VEGF mRNA 表达影响的研究 [J]. 中医药信息, 2011, 28(5): 64-66.
- [3] 沈霖, 林燕萍, 王拥军. 骨伤科实验研究 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005: 434.
- [4] 凌峰, 王燕, 熊龙, 等. 股骨头坏死病因发病机制的研究进展 [J]. 实用临床医学, 2011, 12(11): 132-134.
- [5] Kerachian MA, Harvey EJ, Cournoyer D, et al. Avascular necrosis of the femoral head: vascular hypotheses [J]. Endothelium, 2006, 13(4): 237-244.
- [6] 刘春辉, 赵德伟, 李志刚, 等. 液氮冷冻犬股骨头坏死过程中细胞因子和组织学的动态变化 [J]. 中国骨与关节外科, 2011, 4(2): 135-140.
- [7] 于潼. 硬化带在股骨头坏死塌陷作用中的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(1): 84-86.
- [8] 周正新, 孙志涛, 丁锴. 骨蚀性胶囊对激素性股骨头坏死患者凝血机制的影响 [J]. 中医正骨, 2013, 25(3): 31-34.
- [9] 蔡源源, 李光早. 血管内皮生长因子的调控及其作用研究进展 [J]. 组织工程与重建外科杂志, 2011, 7(1): 51-54.
- [10] Feng L, Wu H, E L, et al. Effects of vascular endothelial

- growth factor 165 on bone tissue engineering [J]. PLoS One 2013 8(12): e82945.
- [11] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer [J]. Nat Rev Cancer 2010, 10(2): 116-129.
- [12] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. Nat Med 2003 9(6): 677-684.
- [13] Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K, et al. Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release [J]. Oral Oncol 2001 37(1): 77-83.
- [14] Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, et al. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors [J]. Neoplasia 2001 3(6): 500-508.
- [15] 崔永锋, 王利明, 肖鲁伟, 等. 股骨头坏死修复过程中断的原因分析 [J]. 中华中医药杂志 2009 24(11): 1473-1476.
- [16] 颜冰, 王和鸣. 活血补肾汤对兔激素性股骨头坏死 VEGF 的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志 2010 18(5): 1-4.
- (2015-03-27 收稿 2015-05-27 修回)

• 作者须知 •

论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

1 对基线资料进行统计学分析 搜集资料应严密遵守随机抽样设计, 保证样本从同质的总体中随机抽取, 除了对比因素外, 其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近, 以保证组间的齐同可比性。因此, 应对样本的基线资料进行统计学分析, 以证明组间的齐同可比性。

2 选择正确的统计检验方法 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同, 选用的统计检验方法则不同。例如: 2 组计量资料的比较应采用 t 检验; 而多组 (≥ 3 组) 计量资料的比较应采用方差分析 (即 F 检验) 如果组间差异有统计学意义, 想了解差异存在于哪两组之间, 再进一步做 q 检验或 LSD- t 检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两组间 t 检验的方法是错误的。又如: 等级资料的比较应采用 Ridit 分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

3 假设检验的推断结论不能绝对化 假设检验的结论是一种概率性的推断, 无论是拒绝 H_0 还是不拒绝 H_0 , 都有可能发生错误 (I 型错误和 II 型错误)。因此, 假设检验的推断结论不能绝对化。

4 P 值的大小并不表示实际差别的大小 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义, 而不能说明专业上的差异大小。 P 值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达, 应说对比组之间的差异有 (或无) 统计学意义, 而不能说对比组之间有 (或无) 显著的差异。 $P \leq 0.01$ 比 $P \leq 0.05$ 更有理由拒绝 H_0 , 并不表示 $P \leq 0.01$ 时比 $P \leq 0.05$ 时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来, 才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致, 则最终结论也一致; 若统计结论与专业结论不一致, 则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时, 要求在统计学上和专业知识上都有意义。

5 假设检验的结果表达 P 值传统采用 0.05 和 0.01 这 2 个界值, 现在提倡给出 P 的具体数值和检验统计量的具体数值 (小数点后保留 3 位有效数字), 主要理由是: ①以前未推广统计软件之前, 需要通过查表估计 P 值, 现在使用统计软件会自动给出具体的 P 值和检验统计量的具体值 (t 值、 F 值、 χ^2 值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如 $P = 0.051$ 与 $P = 0.049$ 都是小概率, 不能简单地断定 $P = 0.051$ 无统计学意义而 $P = 0.049$ 有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

6 统计学符号的使用 统计学符号的使用应按照 GB3358—82《统计名词及符号》的规定, 具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。

提交论文著作权转让书的提示

凡经本刊通知采用的稿件, 请通讯作者于接到通知后 1 周内, 将由全体作者签名并加盖第一作者单位公章的论文著作权转让书邮寄至本刊编辑部, 并注明稿件编号及第一作者姓名。

论文著作权转让书请寄: 河南省洛阳市启明南路 82 号《中医正骨》编辑部, 邮政编码: 471002。