

两因素重复测量方差分析论文分析：低温对缺血期间谷氨酸和 γ -氨基丁酸代谢的影响

菜比徐

April 27, 2025

1 引言

本文分析了论文《The effects of hypothermia on glutamate and γ -aminobutyric acid metabolism during ischemia in monkeys: a repeated-measures ANOVA study》（《低温对缺血期间恒河猴脑内谷氨酸和 γ -氨基丁酸代谢的影响：一项重复测量方差分析研究》），该论文发表于《Scientific Reports》。研究探讨了低温灌注对缺血期间恒河猴脑内谷氨酸（Glu）和 γ -氨基丁酸（GABA）浓度的影响，采用两因素重复测量方差分析方法。Glu 作为兴奋性神经递质，在缺血期间过量释放可能导致兴奋毒性，加重神经损伤；GABA 作为抑制性神经递质，可能对抗 Glu 的毒性效应，增强神经元对缺血的耐受性。

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN

The effects of hypothermia on glutamate and γ -aminobutyric acid metabolism during ischemia in monkeys: a repeated-measures ANOVA study

Bo-hu Liu¹, Jun Pu², Ze-qi Li² & Xiao-ran Zhang^{1✉}

 Check for updates

Figure 1:

2 研究设计

2.1 实验对象

研究使用 9 只健康成年恒河猴，平均体重 8.22 ± 2.15 kg，平均年龄 7.90 ± 1.82 岁。

2.2 实验过程

实验通过以下步骤模拟缺血性脑卒中并研究低温效应：

- **缺血诱导**：通过阻断双侧颈总动脉 10 分钟诱导脑缺血。
- **低温灌注**：随后进行低温灌注 (4.0 ± 0.5 °C，持续 60 分钟)，快速的使得脑温维持在 18 °C。
- **重新升温**：最后升温至 37 °C（持续 60 分钟）。
- **测量时间点**：共 8 个时间点，包括缺血前、缺血 10 分钟、低温灌注 20/40/60 分钟、重新升温 20/40/60 分钟。



Figure 6. Brain temperature dropped below 18 °C.

Figure 2: 终究是恒河猴子扛下了所有

2.3 因素与变量

- **因素**：
 - 时间 (8 水平)：缺血前、缺血 10 分钟、低温灌注 20/40/60 分钟、重新升温 20/40/60 分钟，为组内因素。
 - 温度 (2 水平)：低温灌注、重新升温，为组内因素。
- **因变量**：脑组织细胞外液中的 Glu 和 GABA 浓度（单位： $\mu\text{mol/L}$ ）。

2.4 数据收集

使用微透析技术每 20 分钟采集一次细胞外液，共 8 次。Glu 和 GABA 浓度通过高效液相色谱-紫外 (HPLC-UV) 分析。每只猴子提供 8 个时间点的测量，总计 72 次测量 (9 只猴子 \times 8 个时间点)。

3 统计分析

3.1 方法选择

数据采用重复测量方差分析 (ANOVA) 和 Spearman 相关性分析等统计方法，分析时间和温度对 Glu 和 GABA 浓度的效应，考虑以下效应：

- 时间主效应：不同时间点对浓度的影响。
- 温度主效应：低温灌注与重新升温对浓度的影响。
- 时间 × 温度交互效应：浓度随时间的变化模式是否因温度而异。

由于同一猴子在多个时间点测量，数据具有组内相关性，重复测量方差分析通过建模相关性确保分析准确性。

3.2 假设检验

- **因变量连续性**：Glu 和 GABA 浓度为连续变量，满足要求。
- **组内因素**：时间和温度均为组内因素，设计符合。
- **正态性**：研究通过正态性检验（未提供具体结果），假设数据满足或通过适当方法处理。
- **球形检验**：Mauchly 检验检查球形假设，若 $P < 0.10$ ，则使用 Greenhouse–Geisser 校正。
- **Mauchly 检验与 Greenhouse–Geisser 校正**：Mauchly 检验用于检验协方差矩阵是否满足“球形性”假设，球形性假设 (Sphericity) 指任意两次测量之间的相关程度相同。当数据违反球形性假设时就可以使用 Greenhouse–Geisser 校正。说人话就是：对数据进行测量时时间点之间不存在特殊的、非均匀的相关结构。

3.3 分析过程

- **软件**：使用 SPSS 26.0。
- **模型设置**：
 - 时间：8 水平。
 - 温度：2 水平（低温灌注、重新升温）。
 - 因变量：Glu 和 GABA 浓度。
- **输出**：报告 F 值、P 值，检验主效应和交互效应。
- **其他分析**：单因素方差分析结合 LSD 事后检验比较不同时间点，Spearman 相关分析探索浓度与时间的关系。

3.4 数据描述

下图展示了 Glu 和 GABA 浓度的部分描述性统计（单位：μmol/L）。

Timing	Glu
Before ischemia	150.81 ± 12.02*▲
Ischemia for 10 min	398.99 ± 34.03
Hypothermic 20 min	253.58 ± 19.31*▲
Hypothermic 40 min	137.20 ± 13.42*▲
Hypothermic 60 min	76.32 ± 8.08*
Rewarmed 20 min	169.11 ± 13.02*▲
Rewarmed 40 min	203.80 ± 15.46*▲
Rewarmed 60 min	191.37 ± 94.32*▲
F	279.66
P	0.00

Table 1. Changes in Glu content (μmol/L) in brain extracellular fluid (± s n=9). *Compared with ischemia for 10 min, *P<0.05. ▲Compared with rewarmed 60 min, ▲P<0.05.

Figure 3:

4 结果

4.1 两因素重复测量方差分析

Variation	Sum of squares of deviation (SS)	Degrees of freedom (df)	Mean square	F	P
Time	32,459.595	1.566	20,731.524	124.319	0.000
Temperature	3306.908	1	3306.908	9.797	0.006
Time × temperature	131,298.32	1.566	83,858.541	502.868	0.000

Table 4. Analysis of variance of repeated measurement of Glu.

Figure 4:

- **Glu:**
 - 时间主效应: $F = 124.319$, $P = 0.000$, 表明 Glu 浓度随时间显著变化。
 - 时间 × 温度交互效应: $F = 502.868$, $P = 0.000$, 表明时间对 Glu 浓度的影响因温度而异。
 - 温度主效应: $F = 9.797$, $P = 0.006$, 表明低温灌注与重新升温对 Glu 浓度有显著差异。
- **GABA:**
 - 时间主效应: $F = 85.044$, $P = 0.000$, 表明 GABA 浓度随时间显著变化。
 - 时间 × 温度交互效应: $F = 88.884$, $P = 0.000$, 表明时间对 GABA 浓度的影响因温度而异。
 - 温度主效应: $F = 2.893$, $P = 0.108$, 表明温度对 GABA 浓度的整体影响相对来说不是那么的显著。

4.2 其他分析

- Glu:

- 单因素方差分析: 不同时间点间 Glu 浓度差异显著 ($F = 279.66$)。
- Spearman 相关: Glu 浓度与低温灌注时间负相关 ($r_s = -0.94$, $P = 0.00$), 与重新升温时间正相关 ($r_s = -0.91$, $P = 0.00$)。

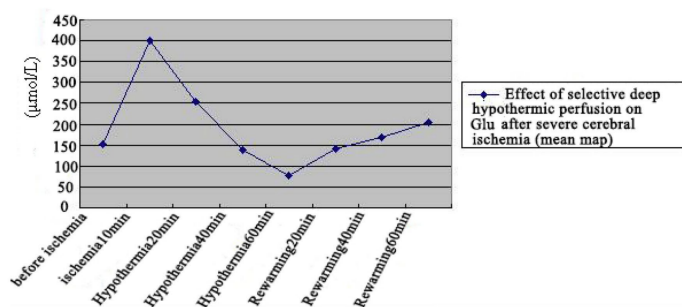


Figure 16. Changes of Glu content in brain extracellular fluid.

Figure 5:

- GABA:

- 单因素方差分析: 不同时间点间 GABA 浓度差异显著 ($F = 351.74$)。
- Spearman 相关: GABA 浓度与低温灌注时间负相关 ($r_s = -0.86$, $P = 0.00$), 与重新升温时间无显著相关 ($r_s = 0.20$, $P = 0.31$)。

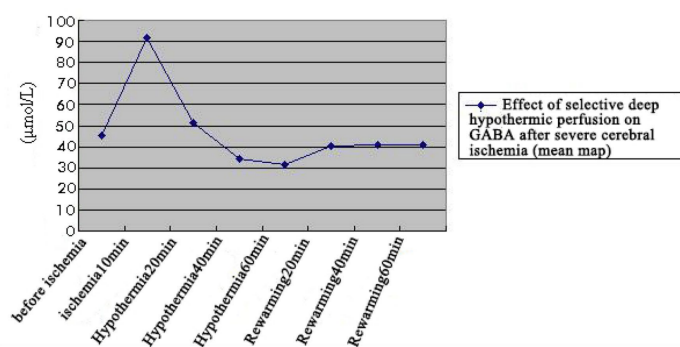


Figure 17. Changes of GABA content in brain extracellular fluid.

Figure 6:

4.3 主要发现

- **Glu**: 缺血 10 分钟时浓度最高 ($398.99 \pm 34.03 \mu\text{mol/L}$)，低温灌注 60 分钟时最低 ($76.32 \pm 8.08 \mu\text{mol/L}$)。低温灌注显著降低 Glu 释放，重新升温后浓度回升。
- **GABA**: 缺血 10 分钟时浓度最高 ($91.66 \pm 4.01 \mu\text{mol/L}$)。低温灌注降低 GABA 浓度，但温度对其整体影响不显著。

5 讨论

5.1 结果解释

- **Glu**: 缺血期间 Glu 浓度显著增加，与神经元去极化和兴奋毒性相关。低温灌注显著抑制 Glu 释放，表明其具有神经保护作用。时间 \times 温度交互作用表明，低温灌注改变了 Glu 随时间的变化模式，尤其在灌注后期效果显著。
- **GABA**: 缺血初期 GABA 浓度增加，可能提供早期神经保护。低温灌注降低 GABA 浓度，但温度主效应不显著，提示低温对 GABA 的调节作用有限。交互作用表明 GABA 浓度的变化模式受温度影响。
- **临床意义**: 低温灌注通过减少 Glu 释放可能减轻缺血性脑损伤，支持其在脑卒中治疗中的潜在应用。GABA 的早期增加可能有助于缓解兴奋毒性，但其长期作用需进一步研究。

5.2 局限性

- **样本量**: 仅 9 只猴子，限制结果的推广性。
- **麻醉影响**: 麻醉剂可能影响神经递质代谢，需谨慎解读。
- **微透析局限**: 微透析反映浓度趋势，但无法精确捕捉变化的关键时间点。
- **统计阈值**: 研究使用 $P < 0.10$ 作为显著性标准，可能增加假阳性风险。

5.3 未来方向

- 增加样本量以提高统计效力。
- 探索不同低温持续时间和温度对神经递质代谢的影响。
- 结合其他技术（如电生理学）验证微透析结果。
- 研究麻醉剂对代谢的潜在干扰。

6 结论

该研究通过两因素重复测量方差分析有效解析了时间和温度对 Glu 和 GABA 浓度的复杂影响。结果表明，低温灌注显著降低 Glu 释放，具有神经保护潜力，而对 GABA 的影响主要体现在时间模式上。这项研究为理解低温治疗在缺血性卒中中的神经保护机制提供了重要的实验依据，特别是揭示了低温对神经递质代谢的影响，有助于进一步优化低温治疗方案，也与威胁人类健康和生命的缺血性卒中息息相关。（所以实验用恒河猴子做实验很有道理，可以帮助探究低温治疗的分子机制，为以后做出更加有效的治疗打下基础）