arXiv:2303.05817v1 [stat.AP] 10 Mar 2023

存在多重随机化限制时微孔板测定的设计与分析

Alexandre Bohyn [1]，Eric D. Schoen [1]，Chee Ping Ng，Kristina Bishard[2]，Manon Haarmans[2]，Sebastian J.Trietsch[2]，和 Peter Goos [1]

[1]鲁汶大学生物科学工程学院生物系统系，比利时鲁汶[2]Mimetas BV，荷兰莱顿[3]安特卫普大学商学与经济学院工程管理系，比利时安特卫普

2023年3月13日

摘要

采用多步骤方案的实验通常涉及多项随机化限制。针对微孔板上的体外测试这一具体应用，需要一种同时具有裂区结构和条带区结构的设计。除两水平处理因子和界定随机化限制的因子外，还必须加入一个多水平固定区组因子，且该因子不涉及进一步的随机化限制。我们提出一种逐步方法，用于构建微孔板实验的设计并分析响应。为完善这一方法，我们研究了该实验的各种替代情景。

关键词：裂区实验；条带区实验；区组化；混合模型；正规两水平设计

1 引言

实证研究和开发项目经常采用两水平筛选设计，以识别设计中的哪些因子有效、哪些无效（参见 Box 等，1978年；Mee，2009年；Wu 和 Hamada，2009年；Montgomery，2019年等教科书）。这类设计的一大优点是试验次数经济性高。事实上，在 N 次试验运行中纳入多达 $N-1$ 个因子是可行的，其中 N 是 4 的倍数。两水平筛选设计的另一大优点是能够在随机化中纳入限制，同时仍可对数据进行简单分析。关于涉及嵌套随机因子的限制，已有大量文献。这些限制会产生区组设计（参见上述教科书，以及 Sartono 等，2015a）、行列设计（Vo-Thanh 等，2020年）、裂区设计（Huang 等，1998年；Bingham 和 Sitter，1999年、2001年；Bingham 等，2004年；Sartono 等，2015b）以及裂裂区设计（Schoen，1999年；Jones 和 Goos，2009年）。另有论文探讨了涉及交叉随机因子的条区设计（参见 Miller，1997年；Mee 和 Bates，1998年；Vivacqua 和 Bisgaard，2004年）。

Bingham 等人（2008）以及 Cheng 和 Tsai（2011）探讨了在同时存在区组限制、裂区限制和条区限制的情况下构建设计的方法。然而，当设计除了包含两水平处理因素和界定随机化限制的因子外，还要求设置一个多水平固定区组因子时，如何运用他们的方法并不明确。本文核心的微孔板实验就是这样一个案例。该实验涉及在具有八列孔的板上培养细胞。实验包含八个两水平处理因素。实验安排了两周，其中一个处理因素在不同周之间变化。每周可处理两块板；第二个处理因素则在同一周内的不同板之间变化。随后，每周都需要制备八支装有细胞外物质的试管，每支试管均用于该周的两块板。共有四个因子决定试管中的内容物。此外，还有两个处理因素作用于板的各列。最后，我们需要确保所有处理因素均与一个八水平因子正交，该因子表示板上的列位置。

本文旨在提供一种逐步方法，用于设计具有多重随机化限制和一个额外多水平因子的分数因子试验。第 2 节介绍微孔板实验。第 3 节介绍实验实施方案。随后，我们讨论该实验的具体随机化限制，并概述为该实验构建合适设计的逐步方法。第 4 节中，我们首先通过识别活性效应分析实验结果，然后建立一个能够体现误差结构全部复杂性的模型。第 5 节中，我们重新审视逐步方法，考察该实验的四种替代情形。最后，第 6 节给出一些总结性意见。

2 微孔板实验

器官芯片系统由在微流控芯片内培养的微型化组织构成。过去十年间，这类系统迅速受到欢迎，因为它们能够模拟体外 细胞的形态，因此在生理相关性方面优于二维细胞培养（Sung 等人，2009年；van Duinen 等人，2015年；Leung 等人，2022年）。然而，直到最近，这些系统的可扩展性仍然有限，因为大多数装置仅使用单个芯片。此外，大多数系统使用可渗透膜来培养细胞，这可能在生物变异之外成为额外的变异来源。最近，总部位于荷兰莱顿的 Mimetas BV 公司推出了 OrganoPlate®，这是一种微流控多芯片微孔板，其中细胞直接在细胞外基质（ECM）上生长，无需使用人工膜。

OrganoPlate® 由一块微孔板和64个微流控芯片组成，每个芯片包含六个互连孔；见图1。64个芯片排列成八行八列。插图显示，单个芯片包含三个通道：中央细胞外基质通道和两个灌流通道，它们在芯片中央汇合。为实验准备一块板时，首先单独将细胞外基质制备成凝胶，然后通过凝胶入口A2将其加载到芯片上。凝胶凝固后，实验人员可以选择研究细胞外基质两侧的细胞，也可以只研究一侧的细胞。为此，需要制备含有细胞的培养液，并通过灌流入口A1和A3将其注入芯片的一个或两个灌流通道，

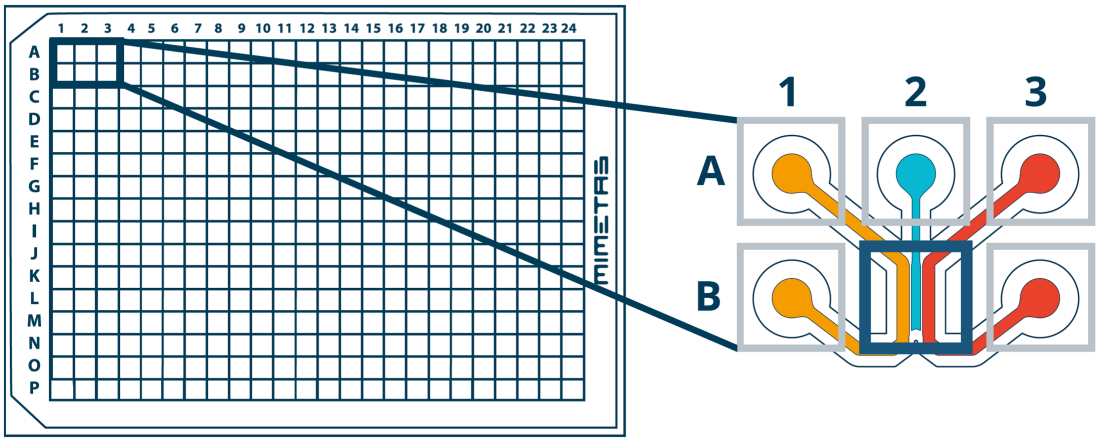


图 1： 含有 64 个芯片的 OrganoPlate® 示意图。插图展示了一个由六个孔组成的单个芯片：(A1) 左侧灌流入口、(B1) 左侧灌流出口、(A2) 凝胶入口、(B2) 观察窗、(A3) 右侧灌流入口和 (B3) 右侧灌流出口。每个芯片包含三个通道：一个中央细胞外基质通道（蓝色）和两个灌流通道（红色和橙色）。

分别通过灌流入口A1和A3注入。细胞充分生长后，板即可用于测试。所有测量均在芯片的观察窗B2中进行。因此，每块板可提供64个观测单元。

细胞外基质是由不同聚合物混合形成的大分子复杂网络。细胞外基质中使用的主要聚合物是I型胶原，因为它能够形成独特的几何结构。这些几何结构模拟体内的三维（3D）组织，并为周围的细胞提供支撑（Theocharis 等，2016年）。然而，胶原蛋白的物理性质会受到其聚合条件（如 pH 和温度）的显著影响（Roeder 等，2002年）。为了使这一三维系统成为可靠的培养平台，板内的结果必须保持一致，并且不同板之间以及不同实验室之间的结果也必须具有可重复性。因此，Mimetas 希望找出影响其细胞外基质质量的因子。具体而言，这项实验研究旨在确定哪些因子能够最大限度地减少细胞外基质质量的差异。对于 OrganoPlate® ，另一项具体目标是确定能够最大限度提高质量的因子设置。

3 设计构建

本节介绍制备和装载细胞外基质凝胶的实验方案，并列出该方案中考虑的因子。随后，我们将详细说明实验中的随机化限制，并解释如何构建一个符合所有这些限制的合适实验设计。

3.1 处理因子

我们确定了八个可能影响细胞外基质凝胶质量的因子，如表1所示。细胞外基质凝胶通过在 Eppendorf 管中混合多种成分制备。正式混合前，将试管置于冰浴中冷却 1 或 30 分钟（因子 **h**）。加入试管中的胶原蛋白溶液取自一大批溶液，并经等分处理，即分成若干小批。所用等分样品可以取自原始批次的开头，也可以取自末尾。等分样品的来源由一个具有“早期”和“晚期”两个水平的二水平分类因子表示（因子 **a**）。每份等分样品中可取 100 µl 或 300 µl 胶原蛋白加入混合物（因子 **b**）。接下来，用移液器将混合物均质化，可重复 20 次或 50 次（因子 **c**）。已知 pH 值会影响胶原纤维的结构，可通过改变基础溶液中的 $NaHCO_3$ 浓度进行调节。凝胶的最终 pH 值为 7.1 或 8.3（因子 **d**）。制备完成后，混合物需静置 10 或 60 分钟（因子 **g**），然后再用移液器将其加入板中。最后，凝胶装入板中并经过一段时间聚合后，在凝胶入口处加入 50 µl 汉克斯平衡盐溶液（HBSS），其中 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的含量可为低或高（因子**e**），以防止凝胶变干。在接种细胞之前，可以选择移除 HBSS，也可以不移除。此项通过另一个具有“否”和“是”两个水平的二水平因子进行研究（因子 **f**）。

3.2 随机化限制

进行实验时，共有四块板可用。每块板上有 64 个芯片，因此总计有 256 个独立芯片。出于物流方面的原因，因子 **g** 和**h** 只能在不同板之间改变

表1： 实验因子及其设置。

阶段	标签	因子	设置	
混合	**a**	等分样品	早期	Late
	b	胶原凝胶体积 (μL)	100	300
	c	混合量	20	50
	d	溶液 pH	7.1	8.3
时间安排	**g**	开始时间（分钟）	10	60
	h	冰上时间（分钟）	1	30
加载后	**e**	HBSSCa^{++} 和Mg^{++} 含量低		High
	f	移除HBSS	No	Yes

。由于细胞外基质凝胶是在 Eppendorf 管中制备的，因此因子 **a**,**b**,**c** 和 **d** 均施加到单个试管中。不过，细胞外基质凝胶是用微量移液器加载到板上的，每次填满板的一整列，因此这些因子只能按整列改变。因子 **e** 和**f**的情况也相同，但由于这些因子是在加载后阶段施加的，因此它们不是施加到单个试管中，而是施加到板的各列中。因此，单块板上只能施加因子 **a** 至**f** 的八种不同组合，因此该实验包含 32 种不同的处理组合或实验运行。

手动处理一块包含许多处理组合的板非常耗时。因此，每周只能处理两块板，实验需持续两周，且板嵌套于周中。由于装入板上同一列所有芯片中的细胞外基质凝胶是在 Eppendorf 管中制备的，一种自然的实验设置是使用 32 个不同的试管，每个试管对应一列和一块板的组合。然而，每周只能制备八个试管，因此每个试管在一周内必须使用两次。我们的解决方案是将试管与板交叉，并将其嵌套于周中。我们将在第5.2节讨论在同一块板上两次使用试管这一选项。图2中的示意图总结了实验布局。

Week	板	Tube															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1	•	•	•	•	•	•	•	•								
	2	•	•	•	•	•	•	•	•								
2	3									•	•	•	•	•	•	•	•
	4									•	•	•	•	•	•	•	•

图2： 试管在各周和各板上的分布示意图。第 i 行、第 j 列中的黑点表示第 j 根试管用于第 i 块板。第1块板和第2块板在第1周处理，第3块板和第4块板在第2周处理。

从实际操作角度看，将因子 **g** 和 **h** 分别在整块板之间变动较为方便：一个因子在不同周之间变动，另一个因子则在同一周的两块板之间变动。因此，因子 **g** 和 **h** 各水平的四种组合确定了四块板，而**g**的主效应、**h**的主效应以及交互效应 **gh** 与板间或周间的随机变异相混杂。在随机化限制下，这是不可避免的。其余六个因子中，四个（**a** 至**d**）在试管之间变动，另外两个（**e** 和**f**）则在板的各列之间变动。

按照试验设计术语，板嵌套于周内，且一个因子作用于周、另一个因子作用于单块板，这构成了裂区设计。在这里，周是整区；在每个整区内，试管和板都是副区。此外，板与试管交叉，使得两个周各自形成条区设计。因此，该设计是裂条区设计。

微孔板测定中一个常见的不必要变异来源是“边缘效应”，因此，来自板边缘芯片的测量结果可能与来自板中心芯片的测量结果不同。板上实验条件不均一可能导致边缘效应，例如热梯度或蒸发速率差异。为了尽量降低边缘效应对因子效应估计值的影响，我们希望确保在四块板上，各因子的水平

a、**b**、**c**、**d**、**e** 和**f** 在八个列位置上均衡分布。因此，实验应分为八个区组，每个区组包含四个实验单位。

3.3 处理设计

我们的挑战是创建一个32次运行设计，包含表1中的八个二水平因子，以及一个与板内列位置相对应的八水平区组因子，并遵循所有物流限制。为创建该设计，我们分四步进行：（1）为在板的各列之间变化的六个因子**a** 至**f** 创建设计；（2）将设计安排为八个区组，分别对应板的八个列位置；（3）添加另外两个因子**g** 和**h** ，分别使其在不同板和不同周之间变化；（4）确保每周使用八支不同的试管。

在步骤 1中，我们选择六个因子**a** 至**f** 的分辨率 VI 2^{6-1} 设计，并以**f** =**abcde**为生成元，确定在板的各列之间变化的因子的处理。

在步骤 2中，我们将 2^{6-1} 设计的32种处理安排到八个区组中，使与区组混杂的二因子交互作用数量最少。八水平区组因子可通过取 2^{6-1} 设计的三个相互独立的因子效应来定义。这样，这三个效应、每一对效应的乘积以及三个效应的乘积都会与区组混杂，共计七个混杂效应。我们将这七个效应称为“伪因子”。选择ab、ce和acf（与bde混杂）作为独立效应，可使与区组混杂的二因子交互作用数量最少（Xu和Lau，2006年）。表2展示了由此得到的七个伪因子分别与因子a – f之间的二因子和三因子交互作用的混杂关系。伪因子p_1，p_2 和p_3 对应三个独立因子效应，即$p_4 = p_1p_2$，$p_5 = p_1p_3$，$p_6 = p_2p_3$ 和$p_7 = p_1p_2p_3$。根据表3所示的分组方案确定的列位置，现在针对因子a – f 的主效应实现了正交分区。

在步骤 3中，我们使用 Eendebak 和 Vazquez（2019年）的 OA软件包，生成向包含一个八水平区组的设计中添加正交四水平因子的所有可能方式

表2： 伪因子 $\mathbf{p_i}$($i = 1, \ldots, 7$)的混杂，定义列位置；这些混杂涉及设计中六个二水平因子**a** –**f** 之间的交互作用。

伪因子	混杂
$\mathbf{p_1}$	**ab**
$\mathbf{p_2}$	**ce**
$\mathbf{p_3}$	**acf** +**bde**
$\mathbf{p_4}$	**df**
$\mathbf{p_5}$	**ade** + **bcf**
$\mathbf{p_6}$	**aef** +**bcd**
$\mathbf{p_7}$	**acd** + **bef**

表3： 将处理组合分配到板的八个列位置所采用的分组方案。

$\mathbf{p_1}$ =**ab**	$\mathbf{p_2}$ =**ce**	$\mathbf{p_3}$ =**acf** 列位置	
−	+	−	1
−	−	+	2
−	−	−	3
−	+	+	4
+	−	−	5
+	−	+	6
+	+	−	7
+	+	+	8

表4： 因子 **g** 和 **h** 及其交互作用 **gh** 在向 2^{6-1} 设计中添加四水平因子的三个选项下的混杂情况。

选项	因子	混杂
1	**g**	**ace +bdf**
	h	**abc +def**
	gh	**be**
2	**g**	**cd**
	h	**ad**
	gh	**ac**
3	**g**	**ef**
	h	**ad**
	gh	**ce**

因子和六个二水平因子，其中新因子的四个水平分别对应四块板，因而对应于因子**g** 和**h**的四种水平组合。我们得到了三种不同的设计，其中六个二水平因子的效应与新四水平因子正交，或与其完全混杂。表**4**显示了使因子**g** 和**h** 的主效应与其他因子之间的二因子或三因子交互作用的混杂程度最小的分配。选项**1**是三种设计中最佳的，因为**g** 或**h** 的主效应均未与二因子交互作用混杂。

在设计创建的最后一步，我们需要将因子**a** **–d** 的 **16** 种可能水平组合分别分配给可用的 **16** 支试管，并确保其中 **8** 支分配到一周，剩余 **8** 支分配到另一周。步骤 **1** 中的设计包含因子**a** **–** **d**的全部 **16** 种水平组合，因此该实验需要 **16** 支试管。要定义周次，我们可以使用因子**g** **= ace + bdf**，也可以使用因子**h** **= abc + def**。如果使用因子**g**，就不会对试管因子**a** **–d**施加额外限制，因此 **16** 支试管每周各使用一次。然而，如果使用因子**h**，则**abc** $= -1$ 对应的 **8** 支试管会在第一周内各使用两次，其余 **8** 支试管会在第二周内各使用两次。因此，使用因子**h** 来标识

表5： 使用因子的编码水平定义试管编号**a**、**b**、**c** 和**d**。垂直虚线表示两周中使用的两个子设计。

Week	1								2							
Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
a	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
b	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+
c	−	−	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	+	+
d	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
h	−								+							

周次，并使用**g** 来标识每周的板，即可满足每周使用 8 支试管的要求。如表5所示。最后，完整的实验设计见表6。

基于因子**a** 至**f**的 2^{6-1} 设计，以及伪因子$\mathbf{p_i}(i = 1、.....、 7)$ 和因子**g** 与**h** 相对于 2^{6-1} 设计中各因子的混杂关系，我们可以计算所有主效应、二因子交互作用以及与列位置对应的伪因子之间的混杂关系。完整的混杂模式见表7。此外，由于我们知道处理在试管、板和周之间的分配方式，因此可以根据处理单位对因子效应进行分组，进而根据它们所受的随机误差进行分组。这些组称为“层”，本实验中共有四组： $Week$、 $Plate$、 $Tube$ 和 $Unit$。 $Plate$和 $Tube$均嵌套于 $Week$中，而 $Plate$与 $Tube$交叉。最后，$Unit$ 对应于最小的处理单位，即板内的列。

4 分析与解读

本节将介绍分析中使用的响应变量，接着阐述我们的分析策略。由于我们有八个因子，包含截距、所有主效应和所有交互作用的模型将包含 37 项。然而，只有 32 次试验可用。因此，我们必须分两步进行分析。首先，我们识别每个

表6： 最终的32次运行实验设计，以及每次实验运行对应的周、板、试管和列。

周	板	列	试管	a	b	c	d	e	f	g	h
1	1	1	3	−	+	+	−	+	+	−	−
1	1	2	6	+	−	+	+	−	+	−	−
1	1	3	5	+	−	+	−	−	−	−	−
1	1	4	4	−	+	+	+	+	−	−	−
1	1	5	7	+	+	−	−	+	+	−	−
1	1	6	8	+	+	−	+	+	−	−	−
1	1	7	1	−	−	−	−	−	−	−	−
1	1	8	2	−	−	−	+	−	+	−	−
1	2	1	6	+	−	+	+	+	−	+	−
1	2	2	3	−	+	+	−	−	−	+	−
1	2	3	4	−	+	+	+	−	+	+	−
1	2	4	5	+	−	+	−	+	+	+	−
1	2	5	2	−	−	−	+	+	−	+	−
1	2	6	1	−	−	−	−	+	+	+	−
1	2	7	8	+	+	−	+	−	+	+	−
1	2	8	7	+	+	−	−	−	−	+	−
2	3	1	12	−	+	−	+	−	−	−	+
2	3	2	13	+	−	−	−	+	−	−	+
2	3	3	14	+	−	−	+	+	+	−	+
2	3	4	11	−	+	−	−	−	+	−	+
2	3	5	16	+	+	+	+	−	−	−	+
2	3	6	15	+	+	+	−	−	+	−	+
2	3	7	10	−	−	+	+	+	+	−	+
2	3	8	9	−	−	+	−	+	−	−	+
2	4	1	13	+	−	−	−	−	+	+	+
2	4	2	12	−	+	−	+	+	+	+	+
2	4	3	11	−	+	−	−	+	−	+	+
2	4	4	14	+	−	−	+	−	−	+	+
2	4	5	9	−	−	+	−	−	+	+	+
2	4	6	10	−	−	+	+	−	−	+	+
2	4	7	15	+	+	+	−	+	−	+	+
2	4	8	16	+	+	+	+	+	+	+	+

表7： 列位置的主效应、二因子交互作用、部分三因子交互作用和伪因子的混杂，以及估计各效应所在的层和每层的自由度总数。

Week	*Plate*	*Tube*	*Unit*
h	**g**	**a**	**e**
	gh + **be b**		**f**
		c	$\mathbf{p_2}$ +**ag** +**ce**
		d	$\mathbf{p_3}$
		$\mathbf{p_1}$ + **ab** + **ch**	$\mathbf{p_4}$ +**bg** +**df** +**eh**
		$\mathbf{p_6}$	$\mathbf{p_5}$
		$\mathbf{p_7}$	**ae** + **cg**
		交流 + **行为** + **实验分析**	
		ad	**设计** +**随机化**
		在 +**存在**	**cf**
		限制 +**多个**	**微孔板** + **测定**
		cd	**agh**
		分析 +**解释**	**adg**
		abd	**cgh**
1 df	2 df	14 个自由度	14 个自由度

误差层。接下来，我们使用活性效应构建最终模型并解释结果。

4.1 响应变量

芯片中央通道中细胞外基质的一个重要特征是基质中胶原蛋白网络的纤维化程度。为评估本实验中细胞外基质的纤维化程度，我们从每个芯片的中央通道中采集少量细胞外基质样本，并使用纹理分析测量其纤维化程度（Mosta co-Guidolin 等，2013），测量结果为无量纲响应值。测量值越高，表示纤维化程度越低，因此该响应值与芯片的纤维化程度呈负相关。在 OrganoPlate® 的应用中，低纤维化程度甚至无纤维化的细胞外基质更为理想，这意味着响应值越高越好。本实验的主要目的是确定哪些因子对纤维化程度的影响最大，从而限制测得响应值的变异。

在 256 个芯片中测量了纤维化程度。然而，其中 17 个芯片的细胞外基质凝胶未能正确填满中央通道。因此，这些芯片未纳入分析。最终数据集包含 239 个观测值，响应范围为 244 至 378，均值为 329。本文补充材料中提供了包含全部 256 个芯片纤维化程度测量值及实验设计的完整数据集。用于分析和生成图表的代码可在 GitHub 仓库 `https://github.com/ABohynDOE/microplate_assays` 中获取。

4.2 第一阶段：活性效应的识别

所有板上共有八行，其中有两行不包含被排除的芯片。我们对实验的全部 32 列，分别计算这两行的纤维化反应均值，并在分析中使用这 32 个均值来识别活性因子效应。

表 8 按绝对值从大到小展示了各层的纤维化程度效应量。对于 $Tube$ 和 $Plate$ 层，表中给出了 PSE(50)（Schoen 和 Kaul，2000年）效应稳健标准误的估计值，以及用于判定效应是否为活性效应的阈值

（$\alpha = 10\%$）。由于 $Week$ 和 $Plate$ 层分别只有一个和两个自由度，因此无法为这些层计算稳健标准误估计值，也无法确定识别活性效应的阈值。我们还发现， $Tube$ 层的稳健标准误低于 $Unit$ 层。这表明，板的各列之间的随机变异大于一周内使用的不同试管之间的变异。

鉴于它们的大小，我们暂且假设因子**g** 和**h** 及其交互作用**gh** 是活性效应。在 $Tube$层中，**cd**、**a**、**d**、**ah** 和**c** 的估计值具有统计显著性；在 $Plate$ 层中，$\mathbf{p_5}$ 和$\mathbf{p_3}$ 的估计值具有统计显著性，这表明列位置也具有显著性。表7显示，具有显著性的二因子交互作用**ah** 与二因子交互作用**bc**存在混杂。不过，考虑到相应主效应的效应大小，根据遗传原则，**ah** 比**bc**更可能是活性效应（Wu 和 Hamada，2009年，第8章）

4.3 第二阶段：模型构建与数据分析

现在我们已经识别出活性效应，可以在单个芯片层面为数据构建模型。这样做还有一个额外好处，即可以评估行位置对纤维化程度的影响。

实验持续了两周。我们用索引 i（取值为1或2）表示周数。每周有两块板和八根试管。我们用索引 j（取值为1或2）表示每周的板，用索引 k（取值为1至8）表示每周的试管。不过，每周的每种板与试管组合也对应板上的特定一列（完整设计见表6和图2）。因此，板上的八列由索引 i、 j和 k定义。每块板还包含八行，我们用索引l及$, \ldots, 8$来定义板上的八行。因此，实验中使用的256个芯片可由索引 i、 j、 k和 l唯一标识；我们可以用 Y_{ijkl} 表示第 i周、 j号板、第 ijk 列和第 l行中测得的纤维化程度，其细胞外基质凝胶来自第 ik根试管。纤维化程度的适当模型形式如下

表 8： 各层纤维化程度的效应大小。效应按绝对大小递减排列。对于 $Tube$ 和 $Unit$ 层，括号中的数值分别为稳健标准误，以及对应于 10% 显著性水平的临界值。

$Week$	
效应	估计值
h	−13.83
$Plate$	
效应	估计值
gh	16.27
g	5.39

$Tube$ (0.9, 1.55)	
效应	估计值
cd	−5.45
a	−4.89
d	−4.55
ah	−3.02
c	2.27
fg	−1.45
$\mathbf{p_7}$	1.42
b	0.77
eg	−0.61
ad	0.58
$\mathbf{p_1}$	−0.55
dh	0.39
$\mathbf{p_6}$	−0.30
abd	−0.27

$Unit$ (1.32, 2.26)	
效应	估计值
$\mathbf{p_5}$	5.20
$\mathbf{p_3}$	−2.77
cgh	−1.95
cg	−1.33
cf	−1.27
agh	1.02
adg	0.92
fh	0.89
f	−0.80
$\mathbf{p_2}$	0.70
$\mathbf{p_4}$	−0.58
af	−0.42
dg	−0.39
e	−0.14

$$Y_{ijkl} = \beta_0 + \mathbf{x}'_{ijkl}\boldsymbol{\beta} + \delta_i + \gamma_{ij} + \lambda_{ik} + \phi_{ijk} + \rho_{ijl} + \epsilon_{ijkl}, \quad (1)$$

其中，β_0 是固定截距，$\mathbf{x}^{ijkl}$ 表示芯片 $ijkl$ 上各处理因子水平的模型展开，$\boldsymbol{\beta}$ 是固定参数向量，$\delta_i \sim N(0, \sigma_\delta^2)$ 是周的随机效应，$\gamma_{ij} \sim N\left(0, \sigma_\gamma^2\right)$ 是板的随机效应，$\lambda_{ik} \sim N(0, \sigma_\lambda^2)$ 是试管的随机效应，$\phi_{ijk} \sim N\left(0, \sigma_\phi^2\right)$ 是板列的随机效应，$\rho_{ijl} \sim N\left(0, \sigma_\rho^2\right)$ 是板行的随机效应，$\epsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma_\epsilon^2)$ 是每个芯片上单次测量的随机误差。为了估计方程 (1) 中线性混合模型的方差分量，我们采用限制性最大似然法（更多详情见 Goos 等（2006））。

向量 $\mathbf{x}^{ijkl}$ 表示芯片 $ijkl$ 的处理因子各水平的模型展开，包含因子 **a**、**c**、**d**、**g** 和 **h** 的各水平，以及对应于交互作用 **ah**、**cd** 和 **gh**的交叉乘积。为考虑潜在的边缘效应，我们还加入八个列位置的主效应（表示为$\mathbf{p}_1$ 至 $\mathbf{p}_{7,}$），以及八个行位置的主效应（表示为$\mathbf{q}_1$ 至 $\mathbf{q}_7$）。

共有五个方差分量，其中两个（σ_δ^2 和 σ_γ^2）无法估计，因为对应的层自由度不足。三个可估计方差分量的估计值——管方差 σ_λ^2、列方差 σ_ϕ^2和误差方差 σ_ϵ^2——列于表 9。总方差主要由误差分量 σ_ϵ^2 构成。这表明，随机变异的主要来源与单个芯片层面的测量或这些芯片之间的变异有关。

使用 F 检验计算固定效应的 p 值；见表 10。由于效应**g**、**h**和**gh** 无法检验，因此未在表中列出。可以看到，除**行**因子外，所有效应在 10 % 的显著性水平上均显著。

列因子的 p 值较小，而行因子的 p 值较大，这表明板的边缘效应似乎只出现在列上。为直观展示行位置和列位置的效应大小，我们计算了每个行位置和列位置的拟合均值，以及 10% 显著性水平下的最小显著差异（LSD）；见图3。行位置的拟合均值之间均无显著差异。

表 9: 方程 (1) 中模型五个方差分量的点估计和标准误。

层	方差分量	估计值	标准误
Week	σ^2_δ	–	–
板	σ^2_γ	–	–
Tube	σ^2_λ	2.5	12.1
列	σ^2_ϕ	6.2	13.6
Row	σ^2_ρ	1.9	8.3
误差	σ^2_ϵ	179.8	18.7

表 10: 固定效应的显著性检验。

效应	分子自由度	分母自由度	F统计量	p值
a	1	5.8	8.59	0.027
c	1	5.9	3.88	0.097
d	1	5.9	10.97	0.017
cd	1	5.9	36.13	0.001
ah	1	5.8	10.71	0.018
row	7	20.1	0.46	0.850
列	7	9.9	3.17	0.049

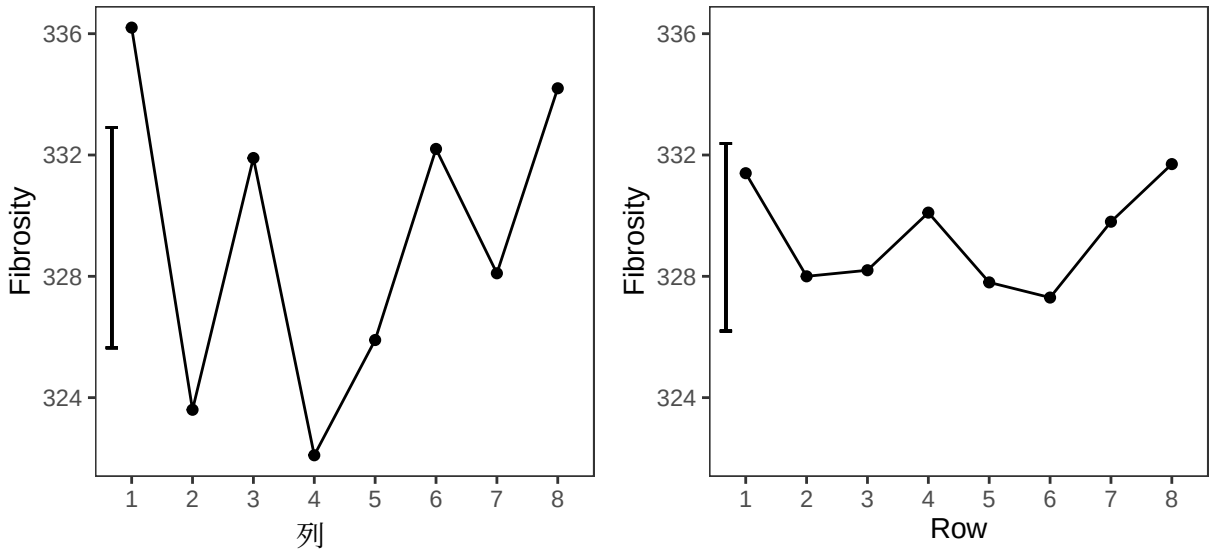
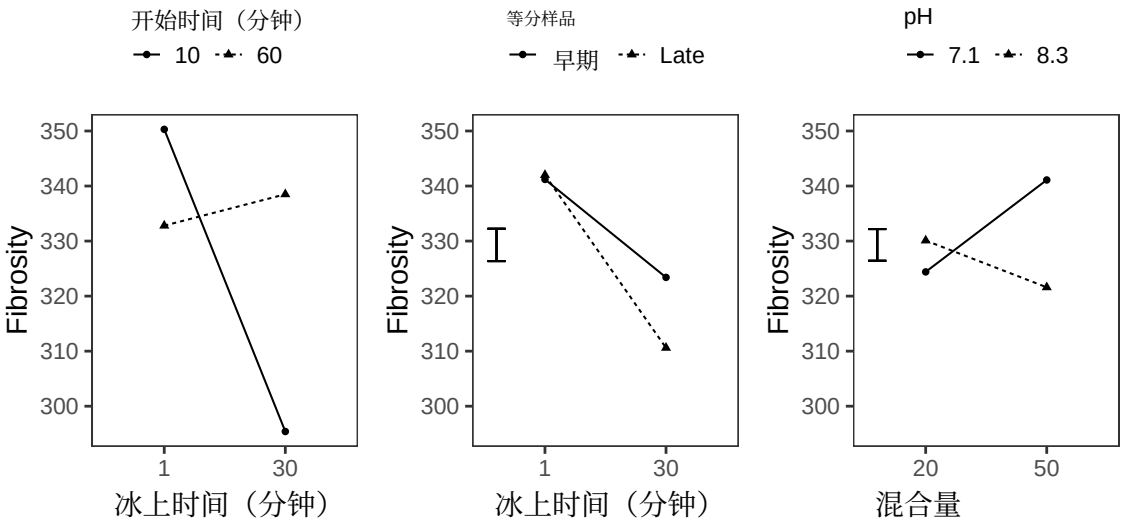


图3： 列位置和行位置的拟合均值，误差线表示最小显著差异 $(\alpha = 10\%)$。

这证实了板的各行似乎不存在边缘效应。不过，列位置的均值之间存在显著差异，但边缘列2和23与其余列之间没有明显的区分。

图4展示了交互作用 **cd**、**ah** 和 **gh** 的交互作用图，并给出了**cd** 和 **ah**在 10% 水平下的最小显著差异。图4a展示的第一个交互作用是**gh**，即开始时间与冰上时间之间的交互作用。这是三种交互作用中最强的。然而，由于它是在 $Plate$ 层中估计的，我们无法确定该交互作用的最小显著差异。可以看到，开始时间为 10 分钟且冰上时间为 1 分钟时，纤维化反应达到最大值。不过，开始时间为 1 分钟时，响应对冰上时间的水平非常敏感。因此，开始时间为 60 分钟时，冰上时间对纤维化反应的效应最小。图4b展示的第二个交互作用是**ah**，即等分样品与冰上时间之间的交互作用。可以看到，只有当冰上时间为 30 分钟时，因子等分样品的水平才会产生影响；与图4a所示的情况一样，冰上时间为 1 分钟时，纤维化反应达到最大值。这与表 8 中给出的结果一致，其中冰上时间的效应量估计值为显著负值。

最后，对于图4c所示的第三个交互作用**cd**，即混合量与 pH 之间的交互作用，可以看到，pH 为 7.1 且混合量为 50 次搅拌时，纤维化反应达到最大值；但 pH 为 8.3 时，该响应的变化幅度较小。



(a) gh交互作用　　**(b) ah**交互作用　　**(c) cd**交互作用

图4： 交互作用图，左侧以误差棒表示其最小显著差异（$\alpha = 10\%$）。由于无法估计方差分量 σ_δ^2 和 σ_γ^2，因此无法确定第一个交互作用的最小显著差异。

4.4 纤维化程度响应的结论

本研究旨在确定哪些因子能够最大限度地降低细胞外基质纤维化程度的变异。针对 OrganoPlate®，另一项具体目标是确定能够使响应值较高的因子设置（这有助于降低纤维化程度；见第 4.1 节）。根据我们的分析，我们建议采用两种处理组合，具体取决于哪一项目标更重要。若要尽量降低纤维化程度的变异，可将冰上时间设为一分钟、开始时间设为 60 分钟，使用早期等分样品，将 pH 设为 8.3，并将制备物混匀 20 次。若要使纤维化反应最大化，可将冰上时间设为一分钟、开始时间设为 10 分钟，使用早期等分样品，将 pH 设为 7.1，并将制备物混匀 50 次。我们观察到列位置对结果有显著影响，在进行测定时应将其

考虑在内。因此，务必在不同列位置重复使用处理组合。

5 替代情景

本节讨论该实验的四种替代情景。对于每种情景，我们说明其合理之处，描述实验的随机化限制将如何改变，并解释我们会考虑采用哪种实验设计。每种替代情景的最终设计见补充材料。

考虑的四种情景如下：

1. 每个可用的 16 根试管在同一块板上使用两次，而不是在一周内的每块板上各使用一次。在同一块板上重复使用一根试管，会形成裂裂裂区结构，而非当前的裂带区结构。2. 可用试管数量为 32 根，而不是 16 根，因此每一列都可以使用各自的试管，而不必与另一块板上的一列共用试管。3. 所有因子都可以在板内变化。目前，由于后勤限制，因子 **g** 和**h** 分别在板间和周间变化。若没有这些限制，所有因子都可以在各列之间变化。4. 对应列位置的区组因子有四个水平。可以设想，距板最左边缘和最右边缘相同的列彼此相似。在这种情况下，潜在的边缘效应将呈对称分布，四水平的区组因子足以捕捉列位置的效应。

在考虑四种备选情景之前，我们先概述为实际实验生成实验设计所采用的流程。

5.1 初始设计

初始设计　　该设计生成过程可归纳为四个步骤（见第 3.3 节）：

1. 为因子 **a** 至**f**寻找一个涉及32次试验的 2^{6-1} 设计。为此，我们选择了带有**f** = **abcde**的最小混杂设计。

2. 按照 Xu 和 Lau（2006）的区组方案，将设计安排为八个正交区组，分别对应板上的八个列位置。在我们的案例中，三个定义伪因子分别为 $\mathbf{p_1} = \mathbf{ab}$、$\mathbf{p_2} = \mathbf{ce}$ 和 $\mathbf{p_3} = \mathbf{acf}$。

3. 添加一个四水平因子，使其与因子 **a** –**f** 以及八水平区组因子正交；该因子的两个独立伪因子定义因子**g** 和 **h**。我们考察了所有具有正则混杂的选项，并选出一个使六个二水平因子 **a** 至 **f**之间的交互作用，以及因子 **g** 和 **h**的主效应与二因子交互作用之间的混杂最小的选项。在我们的案例中，另外两个因子由以下关系定义：**g** =**ace** 和 **h** =**abc**。

4. 确保每周使用八支试管。在我们的案例中，这是通过选择因子 **h** 来定义周次实现的。

现在，我们将讨论在考虑另一种情景时这四个步骤各自如何变化，以及如何将因子效应分配到不同的误差层。

5.2 情景 1：每块板上试管使用两次

如果每根试管在同一块板上使用两次，那么针对八个列位置的区组以及因子**g** 和**h** 的后勤限制仍然适用。这意味着设计生成过程的步骤1至3将与初始设计相同，只有步骤4中试管分配到各板和各周的方式会改变，因为现在需要将16根试管分成四组，分别对应四块板。我们仍将使用**h** =**abc** 来定义各周，但不再使用因子**a**、**b**、**c** 和**d** 的组合来作为四个试管因子（见表5），而改用因子**a**、**b**、**c** 和**e**。用这四个因子定义试管，意味着试管会与各周（由**h** = **abc**定义）以及各板（由**g** =**ace**定义）混杂，因此16根试管将分成四组，每组四根，分别对应四块板。

在这种情形下， $Week$层和 $Plate$层仍将包含因子**g**、**h**及其交互作用**gh**。然而， $Tube$层将包含12个自由度，而非14个； $Unit$ 层将包含16个自由度，而非14个。这会使 $Tube$ 层中的效应更难检测。 $Tube$层和 $Unit$层所包含的效应列于表 13 的第一栏，同时列出八个因子**a** 至**h** 的主效应和二因子交互作用与列位置伪因子之间的混杂关系。

5.3 情景 2：有 32 支试管

如果有 32 支试管，关于因子 **g** 和 **h** 的后勤限制仍然适用，设计生成过程的步骤 1 至 3 也与当前设计相同。现在有 32 支试管，我们需要确保每周都使用试管因子 **a** –**d** 的全部 16 种水平组合。在原始设计中，**h** = **abc** 用于划分周次。这对试管因子 **a**、**b** 和 **c**的水平组合施加了限制，使其中一半对应一周，另一半对应另一周。对于有 32 支试管的设计，我们使用 **g** =**ace** 来划分周次，因此不会对试管因子的水平组合施加限制。因子**h**现在用于定义每周内的板。

新的安排不会改变处理因子及其交互作用的混杂，但会改变实验的随机化结构。由于现在有三个嵌套误差层，这是一个裂区-裂区设计。事实上， $Tube$ 层与 $Unit$ 层合并了，因为没有因子仅在试管层级变化；这些因子分别都在周、板或列位置之间变化。主效应、二因子交互作用和伪因子的混杂情况及其在各误差层中的分配表，与表7类似，但 $Tube$ 列和 $Unit$列合并了。原则上， $Unit$ 层中的28个效应相比14个效应的情况，可以得到更有效的稳健标准误估计。不过，该层中效应的方差现在比之前更大，但仍小于原始设计的 $Tube$ 层中效应的误差方差。这有利于检测原 $Tube$层中的效应，却不利于检测原 $Unit$ 层中的效应。

5.4 Scen情景 3：处理因素没有后勤限制 s

在这种情形下，所有因子都可以在每块板上逐列变化。步骤 1 中，我们会考虑一个针对因子 a 至 h 的 2^{8-3} 设计。具体而言，我们会采用最小混杂设计，其中 f = abcd、g = abe，且 h = ace。步骤 2 中，为了对设计进行区组化，我们会采用 Xu 和 Lau（2006）的区组方案，其中 p_1 = abc、p_2 =ad，且 p_3 =ae。步骤 3 中，我们需要添加一个定义四块板和两个周的四水平因子。该因子的四个水平可以分解为两个相互独立的伪因子 b_1 和 b_2，，并将它们的交互作用定义为 b_3 =b_1b_2。显然，我们仍需考虑添加四水平因子的所有可能方式。表 11 展示了具有正则混杂（效应要么完全混杂，要么正交）的三个选项。选项 1 最佳，因为与选项 2 和 3 的四个和六个相比，只有三个二因子交互作用与列位置的伪因子混杂。现在，32 个处理组合在各列中的分配由八水平区组因子的八个水平确定，但我们仍需将实验运行分配到四块板、两个周和16支试管中。为了将每周的试管数限制为八支，我们仍需在每周内采用针对因子 a、b、c 和 d 的 2^4 设计的半分数。用第二个伪因子 b_2 =abd 定义周，可确保因子 a、b 和 d 的一半处理组合出现在一周，另一半出现在另一周。因此，因子 a、b 和 d 的八个水平组合定义了每周的八支试管。最后，我们用第一个伪因子 b_1 =ade 来定义板。

这种情景不会改变实验的随机化结构。不过，效应分配到误差层的方式有所不同。前两个层，即 $Week$和 $Plate$，将包含交互作用 **ade**、**cf** 和 **ag** ，而不是因子 **g**、**h** 及其交互作用 **gh**。$Tube$和 $Unit$层所包含的效应见表 13 的第二个面板，其中还列出了八个因子 **a** 至 **h** 的主效应和二因子交互作用与列位置伪因子之间的混杂。这种分配的主要优点是，现在八个因子的所有主效应都可以用稳健标准误进行检验。

表 11： 三个伪因子（$\mathbf{b_i}$与 $i = 1$，.....，3）的混杂；这三个伪因子定义了周和板，并与情景 3 中采用三种区组选择的 2^{8-3} 设计的八个因子发生交互作用。

选项	因子	混杂
1	$\mathbf{b_1}$	**ade** + **bdg** + **cdh**
	$\mathbf{b_2}$	**cf** +**abd** +**deg**
	$\mathbf{b_3}$	**ag** + **be** +**dfh**
2	$\mathbf{b_1}$	**bc** +**gh** +**adf**
	$\mathbf{b_2}$	**cf** +**abd** +**deg**
	$\mathbf{b_3}$	**bf** + **acd** + **deh**
3	$\mathbf{b_1}$	**bc** +**gh** +**adf**
	$\mathbf{b_2}$	**ac** + **eh** + **bdf**
	$\mathbf{b_3}$	**ab** +**eg** +**cdf**

5.5 情景 4：四个不同的列位置

如果由于边缘效应的对称性，列位置不是八个而是四个不同位置，那么设计过程的第二步就会改变，因为我们需要将设计安排在四个区组中，而不是八个。采用 Xu 和 Lau（2006）的区组方案，构成四水平因子的两个独立伪因子为$\mathbf{p_1}$ =**ab** 和 $\mathbf{p_2}$ = **acd**。在步骤 3 中，添加一个四水平因子仍有三个常规选项。这些选项均列于表 12 中。在第一个选项中，用于定义因子**g** 和**h**的交互作用 **abd**和 **abc** 将 16 个试管分为四组，每组四个试管，因此每个试管在一块板上使用两次。这个选项可行，但正如情景 1 所示，$Tube$和 $Unit$层的自由度分别为 12 和 16。我们更倾向于选择这两个层中自由度相等的选项。

对于表 12 中的第二个选项，因子**h** 的主效应与二因子交互作用**ac**混杂。这会形成一个 III 分辨率设计，这是不理想的。通过重新标记因子，我们可以采用 **h** = **abe**、**gh** = **ac**和**g** = **adf**，从而构成

表 12： 情景 4 中将一个四水平因子添加到 2^{6-1} 设计的三种选项下，两个二水平因子 g 和 h及其交互作用gh的混杂情况；四水平因子足以对列位置建模。

选项	因子	混杂
1	g	**abd** + **cef**
	h	**abc** + **def**
	gh	**cd**
2	g	**adf** + **bce**
	h	**ac**
	gh	**abe** + **cdf**
3	g	**abe** + **cdf**
	h	**abc** + **def**
	gh	**ce**

一个分辨率 IV 设计。不过，因子g 和h 都不能用于定义涉及 16 个试管中的 8 个的周。

最后，表 12 中的第三个选项适用于我们的目的。它保持了 IV 分辨率，而且由于 $\mathbf{h} = \mathbf{abc}$，每周试管数量限制为 8。在此情景下，随机化结构和因子效应的分配都将与实际采用的设计相似。主要区别在于，列位置效应现在由三个而非七个伪因子建模，因此能够得到更精确的估计。

在此情景下， $Week$和 $Plate$层仍将包含因子 g、h及其交互作用 gh。 $Tube$和 $Unit$层中包含的效应列于表 13 的第三个面板中，同时还列出了八个因子 a 至 h 的主效应和两因子交互作用与四个列位置的伪因子之间的混杂关系。

Table 13: Aliasing of main effects, two-factor interactions, some three-factor interactions and pseudo-factors of the column positions, in the *Tube* and *Unit* strata, for Scenarios 1, 3, and 4.

Scenario 1: each tube is used twice on a single plate.

Tube	*Unit*
a	**d**
b	**f**
c	$\mathbf{p_3}$
e	$\mathbf{p_5}$
$\mathbf{p_1 + ab + ch}$	$\mathbf{p_6}$
$\mathbf{p_2 + ag + ce}$	$\mathbf{p_7}$
$\mathbf{p_4 + bg + df + eh}$	**ad**
ac + bh + eg	**af**
ae + cg	**bd + fg**
ah + bc	**bf + dg**
abe	**cd**
abg	**cf**
	de + fh
	dh + ef
	abd
	abf
12 df	16 df

Scenario 3: all factors can be varied within plates.

Tube	*Unit*
a	**e**
b	**g**
c	**h**
d	$\mathbf{p_3 + ae + bg + ch}$
f	$\mathbf{p_5}$
$\mathbf{p_1 + df}$	$\mathbf{p_6 + de}$
$\mathbf{p_2 + ad}$	$\mathbf{p_7 + ef}$
$\mathbf{p_4 + af}$	**ah + ce**
ab + eg	**bh + cg**
ac + eh	**dg**
bc + gh	**dh**
bd	**fg**
bf	**fh**
cd	**aef**
14 df	14 df

Scenario 4: the blocking factor corresponding to the column positions has four levels.

Tube	*Unit*
a	**e**
b	**f**
c	**ae + bg**
d	**af**
p1 + ab + ch + eg	**ag + be**
p2	**bf**
p3	**cf + dg**
ac + bh	**cg + df + eh**
ad	**de + fh**
ah + bc	**abf**
bd	**ace**
cd	**acf**
dh + ef	**acg**
abd	**ade**
14 df	14 df

5.6 替代情景的结论

每个替代情景都有其独特之处，因此与原始情景有所不同。在情景 1 中，一些自由度从 $Tube$ 层转移到了$Unit$ 层，因此，与原始情景相比，在 $Unit$层估计的效应更多，而在 $Tube$层估计的效应更少。这使得试管层中的效应更难检测。在情景 2 中，来自$Tube$和 $Unit$层的 14 个自由度被合并，因此，试管因子的效应比之前估计得更精确，而该层中其余效应的估计精度则有所降低。然而，这两个情景的主要问题是，因子**g** 和**h**与周和板的效应完全混杂。情景 3 可以解决这个问题，因为所有八个因子的主效应都位于具有 14 个自由度的层中。因此，可以使用稳健标准误对它们进行评估。最后，情景 4 提供了更多关于因子效应的信息，因为只需考虑四个列位置。总体而言，所考虑的四种情景均表明，所采用的方法会如何随着不同限制而改变初始设计。

6 结论

本文指出，在随机化存在多重限制的情况下，为小型八因子实验进行设计可能颇具挑战。虽然裂区设计、条带区设计和区组化各自都相当常见，但将三者结合于同一设计中并不多见。由于没有针对具有类似随机化限制的设计目录或模板，设计的生成过程因此更加复杂。我们开发了一种循序渐进的方法，在考虑这些限制的同时创建良好的实验设计。借助这种方法，我们解决了纳入一个与主要随机化结构正交的额外多水平因子这一问题。

该设计使我们能够检测微孔板测定实验方案中的活性效应，并估计这些效应对微孔板最终质量的贡献。这些见解将用于改进 OrganoPlate® 的实验方案。

第 5 节中的替代情景应有助于实践者应用这一方法

逐步在自己的实验中为随机化加入多重限制。

补充材料

数据表.csv： 包含全部 256 个芯片纤维度测量数据的文件。

替代方案.xlsx： 包含第 5 节所述四种替代方案各自最终选定设计的电子表格。（Excel 文件）

致谢

本研究获得了 Fonds Wetenschappelijk Onderzoek（FWO，佛兰德，比利时）的经费支持。

参考文献

Bingham, D., Sitter, R., Kelly, E., Moore, L., and Olivas, J. D.（2008年）。多级随机化析因设计。《中华统计学志》，18(2):493–513。

Bingham, D.和Sitter, R.R.（1999年）。最小混杂两水平分部因子裂区设计。《技术计量学》，41(1):62–70。

Bingham, D. R., Schoen, E.D., 和Sitter, R. R.（2004年）。在整区因子较少时设计分部因子裂区试验。《皇家统计学会会刊：*C*辑（应用统计）》，53(2):325–339。

Bingham, D. R. 和Sitter, R. R.（2001年）。分部因子裂区试验中的设计问题。《质量技术期刊》，33(1):2–15。

Box, G. E., Hunter, W. H., and Hunter, S. (1978). 《实验者统计学》，第 664 卷。约翰·威立父子公司，纽约。

Cheng, C.-S. 和 Tsai, P.-W. (2011). 多层分部因子设计。《中华统计学志》，21(3):1001–1021。

Eendebak, P. 和 Vazquez, A. (2019). OApackage：用于生成和分析正交数组、最优设计和会议设计的 Python 软件包。《开放源代码软件期刊》，4(34):1097。Goos, P.、Langhans, I. 和 Vandebroek, M. (2006). 工业裂区设计的实用推断。《质量技术期刊》，38(2):162–179。Huang, P.、Chen, D. 和 Voelkel, J. O. (1998). 最小混杂二水平裂区设计。《技术计量学》，40(4):314–326。Jones, B. 和 Goos, P. (2009). 裂裂区试验的 D-最优设计。《生物统计学》，96(1):67–82。Leung, C. M.、de Haan, P.、Ronaldson-Bouchard, K.、Kim, G.-A.、Ko, J.、Rho, H. S.、Chen, Z.、Habibovic, P.、Jeon, N. L.、Takayama, S.、Shuler, M. L.、Vunjak-Novakovic, G.、Frey, O.、Verpoorte, E. 和 Toh, Y.-C. (2022). 器官芯片指南。《自然综述：方法入门》，2(1):1–29。Mee, R. W. (2009).《因子二水平试验综合指南》。施普林格，多德雷赫特。Mee, R. W. 和 Bates, R. L. (1998). 分批设计：多阶段批处理过程的实验。《技术计量学》，40(2):127–140。Miller, A. (1997). 部分因子设计的条带图配置。《技术计量学》，39(2):153–161。Montgomery, D. C. (2019).《实验设计与分析》，第9版。Mosta‐co-Guidolin, L. B.、Ko, A. C.-T.、Wang, F.、Xiang, B.、Hewko, M.、Tian, G.、Major, A.、Shiomi, M. 和 Sowa, M. G. (2013). 胶原形态与纹理分析：从统计到分类。《科学报告》，3:2190。Roeder, B. A.、Kokini, K.、Sturgis, J. E.、Robinson, J. P. 和 Voytik-Harbin, S. L. (2002). 微观结构各异的三维I型胶原细胞外基质的拉伸力学性能。《生物力学工程期刊》，124(2):214–222。

Sartono, B., Goos, P., and Schoen, E. (2015a). 使用混合整数线性规划对正交设计进行区组化。《技术计量学》, 57(3):428–439. Sartono, B., Goos, P., and Schoen, E. (2015b). 构造一般正交分部因子裂区设计。《技术计量学》, 57(4):488–502. Schoen, E. D. (1999). 采用嵌套误差结构设计分部二水平试验。应用统计学杂志, 26(4):495–508. Schoen, E. D. and Kaul, E. A. A. (2000). 用三种稳健尺度估计量评判未重复实验。《质量技术期刊》, 32(3):276–283. Sung, K. E., Su, G., Pehlke, C., Trier, S. M., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., Friedl, A., and Beebe, D. J. (2009). 控制三维胶原基质聚合, 以便在微流控器件中实现可重复的人乳腺成纤维细胞培养。生物材料, 30(27):4833–4841. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. (2016). 细胞外基质结构。*Advanced Drug Delivery Reviews*, 97:4–27. van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J., Vulto, P., and Hankemeier, T. (2015). 微流控三维细胞培养: 从工具到组织模型。*Current Opinion in Biotechnology*, 35:118– 126. Vivacqua, C. A. and Bisgaard, S. (2004). 用于过程改进和稳健性的条带-区组试验。质量工程, 16(3):495–500. Vo-Thanh, N., Schoen, E. D., and Goos, P. (2020). 正规与非正规分部因子二水平设计的行列排列。《质量技术期刊》, 52(3):304–322. Wu, C. F. J. and Hamada, M. (2009). 《试验：规划、分析与优化》. Wiley概率与统计丛书. Wiley, 新泽西州霍博肯, 第2版版. Xu, H. and Lau, S. (2006). 二水平和三水平分部因子设计的最小混杂区组方案。统计规划与推断杂志, 136(11):4088– 4118.