原创精选
Selected article

氧化应激在尼古丁与不明原因复发性流产的中介效应

李丹丹[1]，孟中华[2]，曲英莉[1]，李园园[3]，朱会卷[4]，刘仲[2]，赵峰[1]

1. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所，北京 100050
2. 山东省济南市疾病预防控制中心理化检验所，山东 济南 250021
3. 北京市通州区疾病预防控制中心大数据办公室，北京 101199
4. 国家药品监督管理局药品评价中心化学药品监测和评价二部，北京 100022

摘要：

[背景] 既往研究已证实，尼古丁暴露是流产的独立危险因素，然而关于尼古丁是否通过氧化应激引起不明原因复发性流产（URSA）尚不明确。

[目的] 探究氧化应激在尼古丁暴露与 URSA 之间的中介作用。

[方法] 采用 1∶1 配对的病例对照研究方法，选取 2018 年 4—10 月在首都医科大学附属北京妇产医院就诊的 88 名 URSA 患者作为病例组，既往无不良妊娠结局且去该医院门诊做人工流产的 88 名妊娠妇女作为对照组。采用酶联免疫吸附测定法分别测定尿中 8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）和 8-异前列腺素 F2α（8-iso-PGF2α）水平；采用气相色谱-质谱联用技术测定尿中尼古丁水平。采用多因素条件 logistic 回归模型分析尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 与 URSA 风险的关联，采用多元线性回归分析尼古丁与 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的关联，并采用二分应变量中介模型探索氧化应激在尼古丁暴露对 URSA 影响的中介作用。

[结果] 病例组尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的质量分数中位数分别是 7.78、4.84、44.10 $\mu g \cdot g^{-1}$（肌酐校正），对照组分别是 6.48、3.34、29.39 $\mu g \cdot g^{-1}$（肌酐校正），病例组尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的质量分数均高于对照组（均 $P<0.05$）。条件 logistic 回归结果显示：调整混杂因素后，与 Q_1 组相比，尼古丁和 8-iso-PGF2α 的 Q_4 组 URSA 的 *OR*（95%*CI*）分别是 4.20（1.33~13.29）和 6.25（1.66~23.59）；与 8-OHdG 的 Q_1 组相比，Q_2、Q_3 和 Q_4 组 URSA 的 *OR*（95%*CI*）分别是 5.47（1.43~20.93）、4.24（1.28~14.07）和 6.36（1.82~22.28）。多元线性回归结果显示：校正混杂因素后，病例组和对照组尿中尼古丁与 8-OHdG 质量分数均呈正向关联，*b*（95%*CI*）分别是 0.76（0.67~0.86）和 0.81（0.67~0.95），病例组和对照组尿中尼古丁与 8-iso-PGF2α 质量分数均呈正向关联，*b*（95%*CI*）分别是 0.65（0.55~0.75）和 0.76（0.64~0.87）。二分应变量中介结果显示：8-iso-PGF2α 在尼古丁内暴露水平与 URSA 之间的中介效应大小及其 95%*CI* 是 1.518（0.749~2.311）。

[结论] 尼古丁内暴露是 URSA 的危险因素，与氧化应激存在正向关联，可能通过脂质过氧化损伤而导致 URSA 的发生。

关键词： 尼古丁；不明原因复发性流产；中介效应；8-羟基脱氧鸟苷；8-异前列腺素 F2α

Mediating effect of oxidative stress on association between nicotine and unexplained recurrent spontaneous abortion LI Dandan[1], MENG Zhonghua[2], QU Yingli[1], LI Yuanyuan[3], ZHU Huijuan[4], LIU Zhong[2], ZHAO Feng[1] (1. National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2. Physical and Chemical Laboratory, Shandong Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan, Shandong 250021, China; 3. Big Data Office, Beijing Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101199, China; 4. Second Department of Chemical Drug Monitoring and Evaluation, Center for Drug Reevaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

Abstract:

[Background] Previous studies have confirmed that nicotine exposure is an independent risk factor for miscarriage, but it is not clear whether nicotine causes unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) through oxidative stress.

CC BY NC ND

DOI 10.11836/JEOM21446

基金项目
北京市自然科学基金项目（7182119）

作者简介
李丹丹（1995—），女，硕士生；
E-mail：lidandan@nieh.chinacdc.cn

通信作者
刘仲，E-mail：liuzhong000@163.com
赵峰，E-mail：zhaofeng@nieh.chinacdc.cn

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2021-09-21
录用日期 2022-04-16

文章编号 2095-9982(2022)05-0512-08
中图分类号 R17
文献标志码 A

▸引用
李丹丹，孟中华，曲英莉，等. 氧化应激在尼古丁与不明原因复发性流产的中介效应 [J]. 环境与职业医学，2022，39（5）：512-518, 526.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21446

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LIU Zhong, E-mail: liuzhong000@163.com
ZHAO Feng, E-mail: zhaofeng@nieh.chinacdc.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2021-09-21
Accepted 2022-04-16

▸ To cite
LI Dandan, MENG Zhonghua, QU Yingli, et al. Mediating effect of oxidative stress on association between nicotine and unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 512-518, 526.

▸ Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21446

[Objective] To explore potential mediating effect of oxidative stress on the relationship between nicotine exposure and URSA.

[Methods] Using a 1∶1 matched case-control study, 88 patients with URSA visiting Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital affiliated to Capital Medical University from April to October in 2018 were selected as the case group, and 88 pregnant women without adverse pregnancy outcomes and seeking induced abortion in the outpatient clinic of the same hospital were selected as the control group. The levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and 8-iso-prostaglandin F2α (8-iso-PGF2α) in urine were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the level of urinary nicotine was determined by gas chromatography-mass spectrometry. Conditional logistic regression was used to analyze the associations of nicotine, 8-OHdG, and 8-iso-PGF2α with the risk of URSA. Multiple linear regression was used to analyze the association of nicotine with 8-OHdG and 8-iso-PGF2α. The potential mediating effect of oxidative stress on URSA after nicotine exposure was explored by dichotomous mediating model.

[Results] The median concentrations (creatinine corrected) of nicotine, 8-OHdG, and 8-iso-PGF2α in urine of the case group were 7.78, 4.84, and 44.10 $\mu g \cdot g^{-1}$, respectively, while those of the control group were 6.48, 3.34, and 29.39 $\mu g \cdot g^{-1}$, respectively. The concentrations of nicotine, 8-OHdG, and 8-iso-PGF2α in urine of the case group were all higher than those of the control group ($P < 0.05$). The results of conditional logistic regression model showed that after adjusting selected confounding factors, compared with the Q_1 groups of nicotine and 8-iso-PGF2α, the *OR* (95%*CI*) values of URSA in the Q_4 groups were 4.20 (1.33-13.29) and 6.25 (1.66-23.59), respectively. Compared with the Q_1 group of 8-OHdG, the *OR* (95%*CI*) values of URSA in the Q_1, Q_2, and Q_3 groups were 5.47 (1.43-20.93), 4.24 (1.28-14.07), and 6.36 (1.82-22.28), respectively. The results of multiple linear regression showed that after adjusting confounding factors, there was a positive correlation between urinary nicotine and 8-OHdG in both the case group and the control group, and the *b* (95%*CI*) values were 0.76 (0.67-0.86) and 0.81 (0.67-0.95) respectively; there was a positive correlation between urinary nicotine and 8-iso-PGF2α in both the case group and the control group, and the *b* (95%*CI*) values were 0.65 (0.55-0.75) and 0.76 (0.64-0.87), respectively. The results of dichotomous mediating analysis showed that the mediating effect of 8-iso-PGF2α and its 95%*CI* on the relationship between nicotine exposure and URSA was 1.518 (0.749-2.311).

[Conclusion] Internal nicotine exposure is a risk factor for URSA and is positively correlated with oxidative stress, and it may lead to URSA through lipid peroxidation damage.

Keywords: nicotine; unexplained recurrent spontaneous abortion; mediating effect; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-iso-prostaglandin F2α

复发性流产（recurrent spontaneous abortion, RSA）是指与同一性伴侣连续 2 次及以上在妊娠 20 周之前发生的自然流产，在自然流产发生率中占 1%~5%[1]。2013—2018 年在广州市妇幼保健中心就诊的 RSA 患者数量持续上升，平均每年有 41.83%的新发 RSA 患者[2]。RSA 病因极其复杂且具有明显的异质性，在诊断和治疗方面存在很大争议，目前 RSA 的主要病因有夫妻双方或胚胎的遗传染色体异常、母体生殖道畸形、内分泌功能紊乱、凝血功能异常和自身免疫因素异常[3]。然而，在排除上述明确的病因后，仍有大约 50%的 RSA 患者未找到确切病因[4]，称为不明原因复发性流产（unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA）。研究显示年龄、体重指数（body mass index, BMI）、吸烟、饮酒和教育水平是 URSA 的危险因素[5]。另外，某些环境化合物暴露可能与流产风险增加存在关联[6–7]，但这些物质引起流产的发病机制尚未阐明。

尼古丁，又名烟碱，是烟草烟雾中的主要成分。人类接触尼古丁主要是通过使用烟草产品、接触环境中的烟草烟雾和接受尼古丁替代疗法。尼古丁进入机体内会迅速被循环系统吸收，在肝脏中代谢，对心血管、内分泌、消化、呼吸、免疫和生殖等系统产生严重的健康影响[8]。动物实验研究发现，尼古丁暴露改变 Wistar 大鼠妊娠早期孕酮和雌二醇水平，影响卵巢形态并阻滞卵母细胞的产生，引起卵母细胞成熟失调[9]；流行病学研究发现，尼古丁暴露也会导致胎儿宫内生长迟缓[10]、流产[11–12]和死产[13–14]等风险增加，这说明尼古丁暴露可能是育龄妇女不良妊娠结局的危险因素。尼古丁暴露会导致机体内的氧化损伤水平升高[15–16]，诱导氧化应激的发生。8-羟基脱氧鸟苷（8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG）和 8-异前列腺素 F2α（8-iso-prostaglandin F2α, 8-iso-PGF2α）是目前国际上公认的评价机体氧化应激状态的敏感指标和生物标志物[17–18]。而且，已有大量研究结果证实不良妊娠结局（如先兆子痫[19]、胎儿宫内生长迟缓[20]、早产[21]）均与氧化应激指数升高和总抗氧化能力下降存在显著关联。但氧化应激是否在尼古丁暴露导致 URSA 的过程中发挥潜在作用尚不清楚。

因此，本研究的目的是探讨氧化应激是否在尼古丁暴露与 URSA 关系中存在中介作用。研究假设：（1）尿中高浓度的尼古丁可能增加 URSA 风险；（2）氧化应激与 URSA 风险增加有关；（3）氧化应激在尼古丁暴露与 URSA 的关系中起中介作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

采用 1∶1 配对的病例对照研究方法，选择 2018 年 4—10 月在首都医科大学附属北京妇产医院计划生育科就诊的 RSA 患者纳入本研究。病例组纳入标准为临床上确认与同一配偶连续 2 次及以上妊娠 20 周之前发生自然流产的育龄妇女，排除由遗传染色体或基因异常、母体生殖道解剖结构异常、自身免疫因素异常、凝血功能异常和内分泌功能紊乱等已知病因的 RSA 患者；对照组根据病例组的年龄和 BMI（匹配容差 0.08）进行 1∶1 匹配，纳入标准是有生育史且去该医院做人工流产的妊娠妇女，排除既往死胎、宫外孕、出生缺陷儿、早产和低出生体重儿等不良妊娠结局的孕妇。所有调查对象均为北京市常住人口（≥12 个月），排除职业性环境化学物暴露、实验室检测数据缺失、临床检查结果不全和不能单独完成问卷调查的人员。本研究通过了中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所伦理委员会批准（批号：201812），所有调查对象在参与该调查之前均由本人同意并签署了知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 问卷调查　问卷设计经过多次专家论证会讨论和前期预调查，由经过培训的调查员对调查对象以面对面访谈方式进行问卷调查，收集调查对象一般人口学资料和可能影响氧化应激和 URSA 的因素，包括年龄、身高、体重、教育水平、职业、家庭年总收入、被动吸烟和饮酒情况。BMI=体重（kg）/身高^2（m^2），BMI < 18.5 kg·m^{-2} 为体重过低，18.5 kg·m^{-2} ≤BMI < 24.0 kg·m^{-2} 为体重正常，BMI≥24.0 kg·m^{-2} 为超重[22]；被动吸烟，指由卷烟或其他烟草产品燃烧释放出的及由吸烟者呼出的烟草烟雾所形成的混合烟雾，不吸烟者每周至少有 1 d 吸入混合烟雾超过 15 min[23]；饮酒，指过去 1 年至少有一次喝过 1 标准杯以上的酒或酒精饮料（任意一种或多种），1 标准杯为 25 g 的 50 度白酒、100 g 的果酒或 350 g 的啤酒[24]。

1.2.2 尿样采集　采用一次性无菌、独立包装的聚丙烯尿杯采集随机中段尿，尿样本量不少于 50 mL。尿样采集均在每天上午 8 点至 11 点。尿样采集完成后以 4.5 mL 等份进行现场分装，使用保温箱冷藏运输至实验室并储存在−80°C 冰箱，后续用于测定尼古丁和氧化应激生物标志物的浓度。尿样采集过程中调查员核对调查对象的姓名，并发放贴有标签的尿杯，提醒调查对象将尿杯盖口向上放置，手不接触尿杯内壁，留取中段尿液，以防污染尿样。

1.2.3 尼古丁浓度测定　取解冻后的尿液 2 mL 于玻璃试管中，加入 100 μL 的 NaOH 溶液，1 mL 含有内标物二苯胺的三氯甲烷，在涡旋混合器（QL-861，德国 IKA）上充分混合 75 s（先混合 40 s，再混合 35 s），用台式冷冻离心机（Micro 17 R，美国 Thermo）将混合液以 7000 r·min^{-1} 离心 5 min，离心半径 10 cm，静置分层后弃去上层水相，下层有机相待仪器分析。使用气相色谱-串联质谱仪（TQS 型，带四级杆质量分析器，美国 Thermo）测量提取液中尼古丁代谢物的浓度。在 DB-5 MS 毛细管色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）上分离所有分析物，仪器分析条件设置如下：进样口温度 250 °C；载气（He）流量 1 mL·min^{-1}；分流比 10∶1；柱温箱程序升温，初始温度 50 °C，保持 1 min 后，以5 °C·min^{-1} 升到 180 °C，保持 3 min，再以 30 °C·min^{-1} 升到 230 °C，保持 5 min；离子源温度 230 °C；四级杆温度 150 °C；接口温度 280 °C；溶剂延迟 3 min。选择性离子检测（selected ion monitor, SIM）采集数据，尼古丁特征离子质荷比（m/z）分别为 162、133、84、42，其中 m/z=84 为定量离子。

用于计算尿液样品中尼古丁代谢物质量浓度的校准标准品的质量浓度范围为 0.5~5.0 μg·mL^{-1}，校准曲线的回归系数 > 0.999。连续测定 10 次接近空白质量浓度的尼古丁溶液（约 50 ng·mL^{-1}），计算响应值的平均值和标准差，以 3 倍标准差所对应的待测物浓度为检出限，以 10 倍标准差所对应的待测物浓度为测定下限。尼古丁的检出限为 0.006 μg·mL^{-1}，测定下限为 0.020 μg·mL^{-1}，本底值低于检出限。检测 3 种不同浓度的加标样品（基质为含量低于检出限的空白尿液），并为每个浓度设置 6 个平行样品，3 种浓度的加标样品的回收率达到 82.00%~105.90%，精密度为 1.10%~7.25%。

1.2.4 氧化应激生物标志物浓度测定　采用碱性苦味酸法测定尿肌酐，使用肌酐测定试剂盒（中国长春汇力生物技术有限公司）和 pors-15 型便携式分光光度计（中国北京普析通用仪器有限公司）进行测定。采用酶联免疫吸附测定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）测定尿中氧化应激生物标志物 8-OHdG 和8-iso-PGF2α 的水平。先将冷冻的尿液样品放置到室温自然解冻，在漩涡振荡器上混匀 1 min，随后用加样枪取1 mL 尿液样本移至 2 mL 无菌离心管中，以 1000 r·min^{-1} 离心 20 min，离心半径为 6 cm，取上清液进行检测。使用人 8-OHdG ELISA试剂盒（美国 TSZ）、人 8-iso-PGF2α ELISA

试剂盒(美国 TSZ)和酶标仪(美国 Thermo)进行测定。试剂盒最低检测值低于 1.0 pg·mL^{-1}，标准品线性回归与预期浓度相关系数均为 0.99 以上，样品孔均有 2 个平行样，相对偏差不超过 9%。

1.3 统计学分析

采用 EpiData 3.1 双录入数据，建立数据库。采用 SPSS 22.0 构建倾向性评分模型，统计分析使用 SAS 9.4 和 R 4.1.1 软件 RMediation 包。描述病例组和对照组的基本特征，定量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验；定性资料以频数和百分比(%)表示，组间比较采用 Pearson χ^2 检验。纳入分析的数据均是经尿肌酐校正后的尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 水平，将自然对数转换后的水平以连续变量或分类变量作为自变量(按对照组人群的四分位数水平分为 Q_1~Q_4 组，以 Q_1 组作为参照组)，以 URSA 为应变量，调整年龄、教育水平、职业、家庭年收入、被动吸烟、饮酒和 BMI，进行多因素条件 logistic 回归模型分析。采用多元线性回归分析尿中尼古丁水平与 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的关联。

本研究采用方杰等[25]提出的二分应变量中介模型，分析氧化应激生物标志物水平(自变量，M)在尼古丁水平(自变量，X)与 URSA(应变量，Y)关系中的中介作用。Y 为是否 URSA 患者，1 表示是 URSA 患者，0 表示不是 URSA 患者。首先做 Y 对 X 的 logistic 回归，得到回归系数 c 和标准误 S_c；再做 M 对 X 的线性回归，得到回归系数 a 和标准误 S_a；最后做 Y 对 X 和 M 的 logistic 回归，得到回归系数 b、c'和标准误 S_b、$S_{c'}$。为了使回归系数 a 和 b 具有可比性，将其进行转换，使两者在相同尺度上。采用 t 检验回归系数 a 的显著性，$t_a=a/S_a$，即有 $Z_a=a/S_a$；采用 Wald χ^2 检验回归系数 b 的显著性，$\chi^2=(b/S_b)^2$，即有 $Z_b=b/S_b$。因此，二分应变量中介模型的中介效应大小为 $Z_a \times Z_b$。采用乘积分步法检验 $Z_a \times Z_b$ 的显著性。年龄、BMI 作为连续变量纳入分析，所有统计检验均为双侧检验，检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 研究对象基本情况

共纳入 176 名研究对象，病例组和对照组分别是 88 人，平均年龄为 31.5(28.0, 35.0)岁。除 BMI 外($P<0.05$)，病例组和对照组人群的一般人口学特征均满足均衡性检验(均 $P>0.05$)。病例组尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的质量分数中位数分别是 7.78、4.84、44.10 μg·g^{-1}(肌酐校正)，对照组分别为 6.48、3.34、29.39 μg·g^{-1}(肌酐校正)，病例组尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的质量分数均高于对照组(均 $P<0.05$)。详见表 1。

表 1 研究对象的基本特征与尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 质量分数分布情况 [n(%)或 $M(P_{25}, P_{75})$]

Table 1 General characteristics and urinary concentrations of nicotine, 8-OHdG, and 8-iso-PGF2α in the study population [n (%) or M (P_{25}, P_{75})]

变量 Variable	总人群 (n=176) Total	病例组 (n=88) Case group	对照组 (n=88) Control group	χ^2/Z	P
年龄/岁 Age/years	31.5(28.0, 35.0)	32.0(30.0, 35.0)	31.0(27.5, 35.0)	−1.41	0.158
教育水平 Education level				5.02	0.081
大专及以下 College and below	62(35.2)	24(27.3)	38(43.2)		
本科 Undergraduate	80(45.5)	44(50.0)	36(40.9)		
研究生及以上 Postgraduate and above	34(19.3)	20(22.7)	14(15.9)		
职业(Occupation)				6.94	0.074
办事人员(Clerk)	45(25.6)	28(31.8)	17(19.3)		
专业技术人员 Professional	43(24.4)	24(27.3)	19(21.6)		
服务业人员 Service personnel	24(13.6)	8(9.1)	16(18.2)		
其他(Others)	64(36.4)	28(31.8)	36(40.9)		
家庭年收入/元 Family annual income/yuan				7.55	0.056
<35 000	56(31.8)	23(26.1)	33(37.5)		
35 000~	26(14.8)	12(13.6)	14(15.9)		
65 000~	59(33.5)	38(43.2)	21(23.9)		
100 000~	35(19.9)	15(17.1)	20(22.7)		
被动吸烟 Passive smoking				1.55	0.213
否(No)	110(62.5)	51(58.0)	59(67.0)		
是(Yes)	66(37.5)	37(42.0)	29(33.0)		
饮酒 Alcohol consumption				0.21	0.643
否(No)	107(60.8)	55(62.5)	52(59.1)		
是(Yes)	69(39.2)	33(37.5)	36(40.9)		
BMI				6.14	**0.046**
体重过低(Underweight)	23(13.1)	8(9.1)	15(17.0)		
体重正常(Normal)	115(65.3)	55(62.5)	60(68.2)		
超重(Overweight)	38(21.6)	25(28.4)	13(14.8)		
$\omega_{尼古丁}(\omega_{nicotine})$/(μg·g^{-1})	7.32(4.71, 14.36)	7.78(5.12, 16.42)	6.48(4.00, 12.48)	−2.28	**0.023**
$\omega_{8\text{-OHdG}}$/(μg·g^{-1})	3.99(2.53, 8.17)	4.84(2.86, 9.29)	3.34(2.26, 6.72)	−2.86	**0.004**
$\omega_{8\text{-iso-PGF2}\alpha}$/(μg·g^{-1})	35.02(22.04, 64.89)	44.10(28.86, 81.42)	29.39(17.65, 48.27)	−4.04	**<0.001**

2.2 尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 质量分数与 URSA 风险的关系

条件 logistic 回归分析结果显示：调整混杂因素

后，与尿中尼古丁 Q_1 组相比，Q_4 组 URSA 风险增加（$P_{趋势}$=0.038），*OR*（95%*CI*）是 4.20（1.33~13.29）；与尿中 8-OHdG 的 Q_1 组相比，Q_2、Q_3 和 Q_4 组 URSA 风险增加（$P_{趋势}$=0.035），*OR*（95%*CI*）分别是 5.47（1.43~20.93）、4.24（1.28~14.07）、6.36（1.82~22.28）；与尿中 8-iso-PGF2α 的 Q_1 组相比，Q_4 组 URSA 风险增加（$P_{趋势}$=0.008），*OR*（95%*CI*）是 6.25（1.66~23.59）。详见表 2。

表 2 尿中尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 质量分数与 URSA 的关系

Table 2 Relationships of nicotine, 8-OHdG, and 8-iso-PGF2α concentrations in urine with URSA

指标质量分数/(μg·g^{-1}) Index concentration/(μg·g^{-1})	粗*OR*(95%*CI*) Crude *OR* (95%*CI*)	调整*OR*(95%*CI*)[a] Adjusted *OR* (95%*CI*)[a]
尼古丁(Nicotine)		
Q_1(<4.00)	1.00	1.00
Q_2(4.00~<6.48)	2.52(0.92~6.91)	3.01(0.89~10.18)
Q_3(6.48~<12.48)	2.83(1.06~7.54)*	1.89(0.54~6.64)
Q_4(≥12.48)	3.25(1.24~8.57)*	4.20(1.33~13.29)*
总体(Total)#	1.62(1.07~2.46)*	1.87(1.10~3.17)*
$P_{趋势}$(P_{trend})	0.099	**0.038**
8-OHdG		
Q_1(<2.26)	1.00	1.00
Q_2(2.26~<3.34)	2.83(1.01~7.95)*	5.47(1.43~20.93)*
Q_3(3.34~<6.72)	3.35(1.26~8.89)*	4.24(1.28~14.07)*
Q_4(≥6.72)	3.58(1.40~9.15)*	6.36(1.82~22.28)*
总体(Total)#	1.85(1.18~2.89)*	2.21(1.27~3.87)*
$P_{趋势}$(P_{trend})	0.062	**0.035**
8-iso-PGF2α		
Q_1(<17.65)	1.00	1.00
Q_2(17.65~<29.39)	2.17(0.75~6.32)	3.21(0.72~14.36)
Q_3(29.39~<48.27)	3.37(1.20~9.47)*	2.74(0.73~10.29)
Q_4(≥48.27)	4.37(1.58~12.05)*	6.25(1.66~23.59)*
总体(Total)#	2.59(1.53~4.39)*	2.76(1.49~5.12)*
$P_{趋势}$(P_{trend})	**0.007**	**0.008**

[注]a：模型调整了年龄、教育水平、职业、家庭年收入、被动吸烟、饮酒和 BMI，BMI 和年龄为连续变量。*：P < 0.05；#：尼古丁、8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 浓度经自然对数转换后以连续变量作为自变量纳入模型；$P_{趋势}$：基于每四分位数的中位数值的趋势检验。

[Note] a: The model is adjusted for age, education level, occupation, annual family income, passive smoking, alcohol consumption, and BMI, where BMI and age enter as continuous variables. *: P < 0.05; #: Nicotine, 8-OHdG and 8-iso-PGF2α concentrations enter the model after natural logarithmic transformation in form of continuous variables as independent variables; P_{trend}: Test for trend based on variable containing median value for each quartile.

2.3 尿中尼古丁与 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 的关系

多元线性回归分析结果显示：调整年龄、教育水平、职业、家庭年收入、被动吸烟、饮酒和 BMI 后，病例组和对照组尿中尼古丁与 8-OHdG 浓度均呈正向关联，*b*（95%*CI*）分别是 0.76（0.67~0.86）和 0.81（0.67~0.95）；两组尿中尼古丁与 8-iso-PGF2α 浓度均呈正向关联，*b*（95%*CI*）分别是 0.65（0.55~0.75）和 0.76（0.64~0.87）。

2.4 氧化应激标志物水平在尼古丁暴露和 URSA 之间的中介作用

二分应变量中介分析结果显示：对于中介变量 8-OHdG，中介效应大小（Z_a×Z_b）及其 95%*CI* 是 0.665（−0.012~1.351），中介效应不具有统计学意义，即 8-OHdG 不是尼古丁暴露致 URSA 的中介变量；对于中介变量 8-iso-PGF2α，中介效应大小（Z_a×Z_b）及其 95%*CI* 是 1.518（0.749~2.311），中介效应具有统计学意义，即 8-iso-PGF2α 在尼古丁暴露致 URSA 中起中介作用。尼古丁暴露与 URSA 相关，尿中尼古丁质量分数每增加 1 μg·g^{-1}，URSA 风险随之增加 55.4%[β(c)=0.554，S_β(c)=0.229，χ^2(c)=5.843，P=0.016]。尿中尼古丁与 8-iso-PGF2α 质量分数呈正向关联 [β(a)=0.724，S_β(a)=0.038，t(a)=19.292，P < 0.001]。在控制尼古丁对 URSA 的影响后，尿中 8-iso-PGF2α 对 URSA 的影响存在统计学意义 [β(b)=2.097，S_β(b)=0.538，χ^2(b)=15.164，P < 0.001]。尼古丁暴露对 URSA 的校正效果具有统计学意义 [β(c')=−0.937，S_β(c')=0.450，χ^2(c')=4.341，P=0.037]。详见表 3。

表 3 氧化应激在尼古丁与 URSA 之间的中介作用

Table 3 Mediation effects of oxidative stress on nicotine and URSA

方程参数(Equation parameter)	β	S_β	χ^2/t	P
8-OHdG				
c	0.554	0.229	5.843	**0.016**
a	0.798	0.040	19.771	**<0.001**
b	0.833	0.433	3.693	0.055
c'	−0.109	0.407	0.072	0.788
Z_a×Z_b (95%*CI*)	0.665(−0.012~1.351)			
8-iso-PGF2α				
c	0.554	0.229	5.843	**0.016**
a	0.724	0.038	19.292	**<0.001**
b	2.097	0.538	15.164	**<0.001**
c'	−0.937	0.450	4.341	**0.037**
Z_a×Z_b (95%*CI*)	1.518(0.749~2.311)			

[注] 调整了年龄、教育水平、职业、家庭年收入、被动吸烟、饮酒和 BMI。

[Note] Adjusting for age, education level, occupation, annual family income, passive smoking, alcohol consumption, and BMI.

3 讨论

本研究结果表明，尼古丁暴露可能增加 URSA 风险，氧化应激生物标志物 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 均与 URSA 风险存在关联，尿中尼古丁浓度与 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 浓度均呈正向关联，且 8-iso-PGF2α 在尼古丁暴露与 URSA 关系中起中介作用。

被动吸烟已成为重要的公共卫生问题和社会问题。2013 年中国 15 岁及以上人口的吸烟率为 25.2%，男性吸烟率为 47.2%，40 岁以下女性吸烟率从 2003 年的 1.0%增长到 2013 年的 1.6%[26]。中国慢性病前瞻性研究项目中 10 个地区 317 486 名 30~79 岁非吸烟者的标准化被动吸烟率为 56.7%，其中女性被动吸烟率是 63.7%[23]，说明女性在日常生活和工作中更容易暴露于环境烟草烟雾中。即使大多数孕妇有意识地避免主动吸烟，但被动吸烟常不可避免。孕妇孕期吸烟与流产的系统评价和 meta 分析结果显示，吸烟与流产风险增加相关（总相对风险比=1.23，95%*CI*：1.16~1.30，50 项研究），且流产风险随着吸烟量的增加而增加（每天每吸 1 支烟的相对风险增加 1%）；怀孕期间二手烟暴露会使流产风险增加 11%[27]。Zhao 等[28]发现尼古丁暴露与稽留流产风险增加相关 [*OR*（95%*CI*）= 8.347（1.707~40.418）]。在本研究中尿中尼古丁水平的增加与 URSA 风险增加存在关联。孕妇吸烟和孕期二手烟暴露是导致流产的主要可预防原因。

氧化应激反映了活性氧（reactive oxygen species, ROS）产生和抗氧化防御系统之间的平衡失调，当 ROS 浓度过高时，会对蛋白质、脂质和脱氧核糖核酸造成氧化损伤，从而导致细胞结构和功能的变化[29]。8-OHdG 是羟基自由基（最重要的氧自由基）攻击 DNA 链的碱基（如鸟嘌呤）第 8 位碳原子并与之结合形成的，在人体内的含量极其稳定，其排泄量与 DNA 氧化损伤率相当，因此，8-OHdG 尿中的排泄量可以反映整个机体 DNA 的平均氧化损伤水平，从而作为 DNA 氧化损伤的生物标志物[18]。一项 meta 分析发现 BMI≤ 25 $kg·m^{-2}$ 的健康成人尿中 8-OHdG 质量分数的几何均数是 3.9 $μg·g^{-1}$，且吸烟和尿 8-OHdG 水平之间存在具有统计学意义的正向关联[18]。本研究尿中 8-OHdG 水平及其和尼古丁水平之间的关联与上述研究结果一致。8-iso-PGF2α 是在自由基催化下由膜磷脂和低密度脂蛋白通过花生四烯酸的过氧化作用形成的，酯化的 8-iso-PGF2α 被磷脂酶切割，在血液中循环，并被认为是有害的氧化修饰脂质通过肾脏排入尿液[30]，能够特异、准确地反映氧化应激后的脂质过氧化作用，是脂质过氧化损伤的生物标志物[17, 31]。研究发现吸烟导致 8-iso-PGF2α 水平增加[32]，且本研究发现尿中 8-iso-PGF2α 的水平与尼古丁水平呈正向关联，这提示尼古丁暴露可能导致脂质过氧化损伤。

不良妊娠结局的育龄妇女体内存在氧化/抗氧化系统的平衡失调。一项关于 989 名城市低收入孕妇的队列研究表明，尿 8-iso-PGF2α 水平与先兆子痫风险有关，*OR*（95%*CI*）为 4.96（1.54~15.95）；8-OHdG 与新生儿体重下降、怀孕周期缩短呈正相关[33]。许多研究表明 RSA 患者生物样本中的谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性降低，脂质过氧化物丙二醛水平升高，氧化应激指数升高，总抗氧化能力下降，且脂质过氧化水平在流产前达到非常高的水平[34–36]。在本研究中，URSA 风险随着 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 浓度的增加而增加，这提示 URSA 可能与氧化应激存在关联。

前列腺素 F2α（prostaglandin F2α, PGF2α）对于胚胎植入和着床至关重要，而异常植入会增加流产风险[37]。在怀孕期间，子宫内膜的 PGF2α 会增加基质金属蛋白酶活性，增强细胞因子活性，增加催产素及其受体的表达，降低孕酮反应性，并可能增强血管内皮生长因子的表达[38]。另外，子宫内膜的 PGF2α 水平需要控制在一定范围内，因为其水平的增加可能会启动不良妊娠结局的级联反应，即子宫内膜的基底层是启动子宫收缩和蠕动的区域，而增高的 PGF2α 将被输送到子宫内膜基底层，引起子宫收缩，导致子宫内容物排出[39]。8-iso-PGF2α 作为 PGF2α 的亚型，在 URSA 患者体内的质量分数有显著增加，故其可作为一种与 URSA 相关的氧化应激潜在因子。同时，本研究也发现尿中尼古丁水平与 8-iso-PGF2α 水平存在关联，且 8-iso-PGF2α 作为尼古丁与 URSA 关联的中介变量。因此，尼古丁内暴露水平、8-iso-PGF2α 和 URSA 之间可能有一定的病因学关联。

本研究局限之处主要有以下几点：第一，未在不同时间点收集尿样本，因尿液浓缩和稀释具有高变异性，单次尿液检测不能准确反映个体尼古丁内暴露水平和氧化应激标志物水平；第二，未收集调查对象的孕周变量，不能根据孕周进行病例组和对照组的匹配；第三，使用的烟草代谢产物是尼古丁，需要更具代表性的烟草代谢产物可替宁进行研究；第四，需要前瞻性研究和更大的样本量对本研究的结论进行验证。此外，由于 8-OHdG 和 8-iso-PGF2α 分别反映整个身体的总 DNA 氧化损伤和脂质过氧化损伤的水平，而不是子宫或卵巢的氧化水平，为了明确其病因途径，有必要鉴定更多特异性的生物标志物。

综上所述，尼古丁内暴露水平是 URSA 的危险因素，与氧化应激存在关联，可能通过脂质过氧化损伤而导致 URSA 的发生。在今后的研究中，可建立更为全面的前瞻性队列研究以明确其因果关联，并通过动物和体外实验进一步探索 URSA 的可能机制。

参考文献

[1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2020, 113(3): 533-535.

[2] FAN T, ZHONG XM, WEI XC, et al. The alteration and potential relationship of vaginal microbiota and chemokines for unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(51): e23558.

[3] DIMITRIADIS E, MENKHORST E, SAITO S, et al. Recurrent pregnancy loss[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 98.

[4] GUPTA S, AGARWAL A, BANERJEE J, et al. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review[J]. Obstet Gynecol Surv, 2007, 62(5): 335-347.

[5] 钟丽荣. 不明原因复发性流产的影响因素分析[J]. 现代诊断与治疗, 2020, 31(21): 3431-3433.
ZHONG LR. Analysis of influencing factors of unexplained recurrent abortion[J]. Modern Diagnosis & Treatment, 2020, 31(21): 3431-3433.

[6] KRIEG SA, SHAHINE LK, LATHI RB. Environmental exposure to endocrine-disrupting chemicals and miscarriage[J]. Fertil Steril, 2016, 106(4): 941-947.

[7] AO J, HUO X, ZHANG J, et al. Environmental exposure to bisphenol analogues and unexplained recurrent miscarriage: a case-control study[J]. Environ Res, 2022, 204(Pt C): 112293.

[8] PRICE LR, MARTINEZ J. Cardiovascular, carcinogenic and reproductive effects of nicotine exposure: a narrative review of the scientific literature[J]. F1000 Res, 2019, 8: 1586.

[9] ADEYEMI DH, OYEYIPO IP, AKANBI KA, et al. Nicotine alters progesterone and estradiol levels during the first trimester of pregnancy in Wistar rats[J]. JBRA Assist Reprod, 2018, 22(2): 78-81.

[10] CHEN M, WANG T, LIAO ZX, et al. Nicotine-induced prenatal overexposure to maternal glucocorticoid and intrauterine growth retardation in rat[J]. Exp Toxicol Pathol, 2007, 59(3/4): 245-251.

[11] OLSSON CA, HORWILL E, MOORE E, et al. Social and emotional adjustment following early pregnancy in young Australian women: a comparison of those who terminate, miscarry, or complete pregnancy[J]. J Adolesc Health, 2014, 54(6): 698-703.

[12] ARFFIN F, AL-BAYATY FH, HASSAN J. Environmental tobacco smoke and stress as risk factors for miscarriage and preterm births[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(5): 1187-1191.

[13] YAYA S, BISHWAJIT G. Exposure to second-hand smoking as a predictor of fetal loss: Egypt Demographic and Health Survey 2014[J]. Int Health, 2019, 11(6): 561-567.

[14] LEVY D, JIANG M, SZKLO A, et al. Smoking and adverse maternal and child health outcomes in Brazil[J]. Nicotine Tob Res, 2013, 15(11): 1797-1804.

[15] YARAHMADI A, ZAL F, BOLOUKI A. Protective effects of quercetin on nicotine induced oxidative stress in 'HepG2 cells'[J]. Toxicol Mech Methods, 2017, 27(8): 609-614.

[16] KHADEMI F, TOTONCHI H, MOHAMMADI N, et al. Nicotine-induced oxidative stress in human primary endometrial cells[J]. Int J Toxicol, 2019, 38(3): 202-208.

[17] XIAO Y, FU X, PATTENGALE P, et al. A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of urinary 8-*iso*-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-*iso*-$PGF_{2\alpha}$) including pediatric reference interval[J]. Clin Chim Acta, 2016, 460: 128-134.

[18] GRAILLE M, WILD P, SAUVAIN JJ, et al. Urinary 8-OHdG as a biomarker for oxidative stress: a systematic literature review and meta-analysis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3743.

[19] SIDDIQUI IA, JALEEL A, TAMIMI W, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Arch Gynecol Obstet, 2010, 282(5): 469-474.

[20] SIMON-SZABO Z, FOGARASI E, NEMES-NAGY E, et al. Oxidative stress and peripartum outcomes (Review)[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(1): 771.

[21] ROSEN EM, VAN'T ERVE TJ, BOSS J, et al. Urinary oxidative stress biomarkers and accelerated time to spontaneous delivery[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130: 419-425.

[22] CHEN C, LU F C, Department of Disease Control Ministry of Health, PR China. The guidelines for prevention and control of overweight and obesity in Chinese adults[J]. Biomed Environ Sci, 2004, 17 Suppl: 1-36.

[23] 刘琪, 李嘉琛, 杜怀东, 等. 中国10个地区30~79岁成年人被动吸烟行为特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(10): 1668-1673.
LIU Q, LI JC, DU HD, et al. Regional and demographic differences on passive smoking among non-smokers aged 30-79 years in 10 regions of China[J]. Chin J Epidemiol, 2020, 41(10): 1668-1673.

[24] 钟丽, 张涛. 饮酒模式的评估及分类[J]. 四川精神卫生, 2015, 28(5): 485-488.
ZHONG L, ZHANG T. Evaluation and classification of drinking patterns[J]. Sichuan Mental Health, 2015, 28(5): 485-488.

[25] 方杰, 温忠麟, 张敏强. 类别变量的中介效应分析[J]. 心理科学, 2017, 40(2): 471-477.
FANG J, WEN ZL, ZHANG MQ. Mediation analysis of categorical variables[J]. J Psychol Sci, 2017, 40(2): 471-477.

[26] WANG M, LUO X, XU S, et al. Trends in smoking prevalence and implication for chronic diseases in China: serial national cross-sectional surveys from 2003 to 2013[J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(1): 35-45.

[27] PINELES BL, PARK E, SAMET JM. Systematic review and meta-analysis of miscarriage and maternal exposure to tobacco smoke during pregnancy[J]. Am J Epidemiol, 2014, 179(7): 807-823.

[28] ZHAO R, WU Y, ZHAO F, et al. The risk of missed abortion associated with the levels of tobacco, heavy metals and phthalate in hair of pregnant woman: a case control study in Chinese women[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(51): e9388.

[29] LUSHCHAK VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification[J]. Chem Biol Interact, 2014, 224: 164-175.

[30] VERNUNFT A, VIERGUTZ T, PLINSKI C, et al. Postpartum levels of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ in plasma and milk phospholipid fractions as biomarker of oxidative stress in first-lactating dairy cows[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2014, 112: 34-38.

[31] DARENSKAYA M, KOLESNIKOVA L R, RYCHKOVA L V, et al. Lipid peroxidation parameters in different stages of stress-reaction at the inherited stress-induced arterial hypertension rats[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 128 Suppl 1: S116-S117.

[32] CARNEVALE R, SCIARRETTA S, VIOLI F, et al. Acute impact of tobacco vs electronic cigarette smoking on oxidative stress and vascular function[J]. Chest, 2016, 150(3): 606-612.

[33] STEIN TP, SCHOLL TO, SCHLUTER MD, et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome[J]. Free Radic Res, 2008, 42(10): 841-848.

[34] AL-GUBORY KH, FOWLER PA, GARREL C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(10): 1634-1650.

（下转第 526 页）