

• 技术与方法 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.08.026

ID-UPLC-MS/MS 检测大鼠尿液 DNA 氧化标志物 8-oxodGuo 方法的建立*

黄斌,赵素玉,林董莉,吴琼碧,吴仙军,张伟,叶玲燕,梅益斌[△]

(浙江省丽水市人民医院心血管内科 323000)

[摘要] **目的** 建立一种快速、高效的同位素稀释超高效液相-串联质谱法(ID-UPLC-MS/MS),用于检测大鼠尿液中 DNA 氧化产物 8-羟基脱氧鸟苷(8-oxodGuo)。**方法** 大鼠尿液经 10 mmol/L 的醋酸铵处理,加入同位素内标 [¹⁵N₅] 8-oxodGuo,置于 37 °C 生化培养箱孵育,离心后以 5 mmol/L 的醋酸铵(含 0.1% 甲酸)和甲醇为流动相,经色谱柱 SB-Aq(3.0 mm×100.0 mm,1.8 μm)分离,在 MRM 模式下监测 m/z 284/168(8-oxodGuo)及 m/z 289/173([¹⁵N₅] 8-oxodGuo),进行内标法定量。**结果** 本检测方法在 0.4~100 ng/mL 线性范围内线性关系良好,相关系数为 0.999 6,定量下限为 0.2 pg,低、中、高 3 个浓度(0.4、10 和 100 ng/mL)的回收率分别为(110.30±7.83)%,(104.37±2.22)%,(99.26±1.18)%,相对标准偏差为 1.1%~7.1%。**结论** 该检测方法简便、灵敏、快速、高效,可较好地应用于评价机体氧化应激所导致的 DNA 氧化损伤。

[关键词] ID-UPLC-MS/MS;大鼠;尿液;8-oxodGuo**[中图分类号]** R446.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)08-1392-05

Determination of DNA oxidation marker 8-oxodGuo in rat urine by ID-UPLC-MS/MS*

HUANG Bin,ZHAO Suyu,LIN Dongli,WU Qiongbai,WU Xianjun,

ZHANG Wei,YE Lingyan,MEI Yibin[△]

(Department of Cardiology,Lishui People's Hospital,Lishui,Zhejiang 323000,China)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid and efficient isotope dilution ultra-high performance liquid-phase tandem mass spectrometry (ID-UPLC-MS/MS) method for the determination of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxodGuo), a DNA oxidation product in rat urine. **Methods** The isotope internal standard [¹⁵N₅] 8-oxodGuo was added to the rat urine after being treated with 5 mmol/L ammonium acetate. After incubated in a biochemical incubator at 37 °C and centrifuged,the analytes were separated on an SB-Aq column (3.0 mm×100.0 mm,1.8 μm) with 5 mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) and methanol as mobile phases. The m/z 284/168 for 8-oxodguo and m/z 289/173 for [¹⁵N₅]8-oxodGuo were monitored in MRM mode for quantification by the internal standard method. **Results** The detection method had a good linear relationship in the range of 0.4–100 ng/mL with the correlation coefficient was 0.999 6. The lower limit of quantification was 0.2 pg,and the recovery rate of the low,medium and high concentrations (0.4,10 and 100 ng/mL) were (110.30±7.83)%,(104.37±2.22)% and (99.26±1.18)%,respectively. The relative standard deviation was 1.1%–7.1%. **Conclusion** The assay is simple,sensitive,rapid and efficient,and can be better applied to evaluate the oxidative DNA damage caused by oxidative stress in the body.

[Key words] ID-UPLC-MS/MS;rat;urine;8-oxodGuo

氧化应激最早源于对衰老的认识,因自由基伤害并不是造成老化的唯一因素,所以在 1990 年美国衰老研究权威专家 Sohal 教授指出了自由基存在的缺陷,并首次提出了氧化应激。氧化应激是指高活性分子如活性氧(reactive oxygen species,ROS)等诱导导

杂反应体系中重要生物分子发生氧化修饰,当不断产生的氧化产物超出了机体的清除能力,就会使得氧化和抗氧化系统失衡,最终导致组织损伤。氧化应激过程中产生的 ROS、自由基等可引起许多生物大分子如核酸、蛋白质及脂质的氧化损伤,而核酸的氧化损伤

相对来说较为重要。核酸的氧化损伤可分为直接氧化损伤和间接氧化损伤,直接氧化损伤是核酸上的碱基发生氧化,间接的氧化损伤是指核苷酸池中的原始核苷酸上碱基发生氧化损伤^[1]。

每个细胞正常代谢所产生的 ROS、自由基每天可修饰大约 10 000 个碱基,AMES 等^[2]认为即使生物体具备完善的氧化修复机制,也会有少量损伤的碱基因为得不到充分修复而发生损伤积累。脱氧核糖核酸(deoxyribo nucleic acid,DNA)氧化损伤与多种疾病密切相关,如慢性肝炎^[3]、非小细胞肺癌^[4]、青光眼^[5-6]、慢性阻塞性肺病^[7]、甲状腺疾病^[8]、冠心病^[9-11]、房颤^[12]等,而 DNA 氧化损伤多种产物中,8-羟基脱氧鸟苷(8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine,8-oxodGuo)是国际公认的 DNA 氧化损伤敏感的生物标志物。

相较于酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)、高效液相色谱电化学检测(high performance liquid chromatography electrochemical detectors,HPLC-ECD)、气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)和液相色谱质谱联用(liquid chromatography mass spectrometry,LC-MS)方法,超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry,UPLC-MS/MS)检测方法因其分离快速、检测灵敏度高等优势,已被广泛应用于 DNA 氧化损伤产物的检测。但已建立的尿液 8-oxodGuo UPLC-MS/MS 检测方法^[13-14],样本处理流程烦琐,应用固相萃取柱费用昂贵,检测时间也较长,本研究引入了同位素内标,建立了一种干扰小,灵敏度高,线性佳,分析快速、准确的 UPLC-MS/MS 检测方法(ID-UPLC-MS/MS),可较好地应用于评价氧化应激所导致的 DNA 氧化损伤。

1 材料与方法

1.1 试剂

8-oxodGuo(纯度大于 98%)购于美国 Sigma-Aldrich 公司;^[15N₅]8-oxodGuo(纯度大于 98%)购于美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;甲酸(HPLC 级)购于德国 Merck 公司;醋酸铵、甲醇(HPLC 级)购于美国 Fisher Scientific 公司。蒸馏水

为屈臣氏蒸馏水。

1.2 仪器

质谱仪:Agilent 6490 Triple Quad MS/MS 三重四极杆质谱仪;超高效液相:Agilent UPLC 1290 超高效液相系统;色谱柱:SB-Aq,3.0 mm×100.0 mm,1.8 μm,600 Bar,以上均为美国 Agilent 公司产品;-80 °C 超低温冰箱(日本 Revco 公司);MilliQ Plus 超纯水机(美国 Milliporegong 公司);520A 型 pH 计(美国 Orion 公司);120S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);Beckman 22R 型台式低温高速离心机(美国 Beckman-Coulter 公司)。

1.3 溶液配制

(1)配置 10 mol/L 醋酸铵:称 38.5g 醋酸铵溶于 50 mL 屈臣氏蒸馏水中,混匀;(2)配制 10 mmol/L 的醋酸铵:取 10 mol/L 醋酸铵 1 mL 用屈臣氏蒸馏水稀释到 1 L,混匀,再调 pH=3.7;(3)配制 5 mmol/L 的醋酸铵(含 0.1% 甲酸):取 10 mol/L 醋酸铵 0.5 mL 用屈臣氏蒸馏水稀释到 1 L,再加入甲酸 1 mL,混匀;(4)工作液:用 10 mmol/L 的醋酸铵(pH=3.7)配制 30% 的甲醇溶液。

1.4 液相及质谱条件

(1)液相条件:水相(A)为 5 mmol/L 的醋酸铵(含 0.1% 甲酸,pH=3.7),有机相(B)为甲醇;平衡时间 1 min;进样体积 5 μL;针位 0 mm;柱温箱温度 35 °C;梯度洗脱条件见表 1。(2)质谱条件:离子源为 Jet Stream ESI 源;离子扫描模式为动态多反应监测正离子扫描模式(Dynamic MRM);干燥气温度为 200 °C;干燥气流量为 16 L/min;雾化气压力为 30 psi;鞘气温度为 400 °C;鞘气流量 12 L/min;毛细管电压 2 000 V;喷嘴电压 0 V;具体离子对信息见表 2。

表 1 尿液 8-oxodGuo 液相梯度洗脱

时间(min)	水相 A (%)	有机相 B (%)	流速 (mL/min)	最大压力 (bar)
0	90.00	10.00	0.40	800.00
3.00	70.00	30.00	0.40	800.00
4.00	2.00	98.00	0.40	800.00
5.00	2.00	98.00	0.60	800.00
5.01	90.00	10.00	0.60	800.00
6.00	90.00	10.00	0.60	800.00

表 2 目标化合物离子对参数

化合物	母离子	四极杆 1 分辨率	子离子	四极杆 2 分辨率	保留时间 (min)	每帧保留时间	碎裂电压	碰撞能
8-oxodGuo	284	Wide	168	Unit	3.69	0.4	380	10
8-oxodGuo	284	Wide	140	Unit	3.69	0.4	380	32
^[15N₅] 8-oxodGuo	289	Wide	173	Unit	3.69	0.4	380	10

1.5 样本收集

SD 大鼠购于中国科学院上海实验动物中心,饲养在温州医科大学 SPF 级动物房中,温度可控、12 h 昼夜交替。动物可自由饮水及进食,全部实验操作依

饲养在温州医科大学 SPF 级动物房中,温度可控、12 h 昼夜交替。动物可自由饮水及进食,全部实验操作依

照国家卫生研究院实验动物保护及使用指南执行。将3月龄大鼠放置于代谢笼中,收集24 h尿样,经过 $8\,000\times g$ 3 min离心后,分装于1.5 mL高压灭菌离心管中,并储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至被分析。

1.6 样品处理

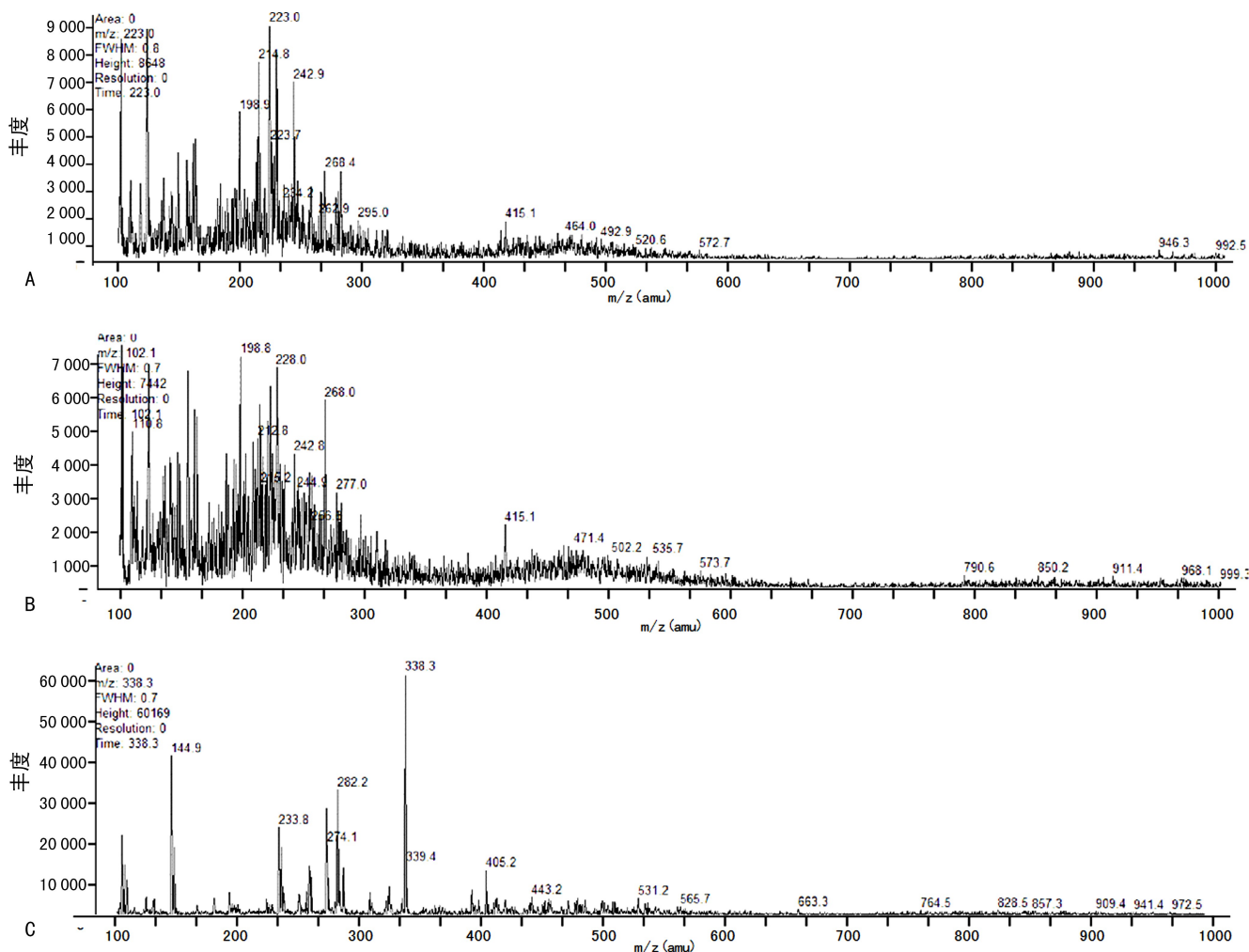
取200 μL 大鼠尿液置于1.5 mL高压灭菌离心管中,加入200 μL 工作液,再加入480 ng/mL的同位素内标和屈臣氏蒸馏水各10 μL ,涡旋仪上涡旋混匀2 min,后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱10 min,再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\,000\times g$ 离心15 min,取上清液100 μL 加入到进样瓶内的一次性内插管中,UPLC-MS/MS进样5 μL 直

接检测或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存待测。

2 结果

2.1 实验溶剂及流动相质谱全扫描

为防止实验溶剂及流动相对检测结果造成影响,本研究对所用实验溶剂和流动相进行了质谱全扫,见图1。由图1可见屈臣氏蒸馏水,流动相水相5 mmol的醋酸铵(含0.1%甲酸,pH 3.7)及有机溶剂甲醇(含0.1%甲酸)对8-oxodGuo的质荷比(mass-to-charge ratio, m/z)分别为284/168和284/140,其对 $[^{15}\text{N}_5]$ 8-oxodGuo的 m/z 289/173的影响可忽略不计。



A:屈臣氏蒸馏水;B:流动相水相;C:甲醇(含0.1%甲酸)。

图1 实验溶剂及流动相质谱全扫描

2.2 DNA氧化损伤标志物8-oxodGuo的色谱图

8-oxodGuo及其内标的出峰时间在第3.75 min,为减少背景噪音对分析物的影响,故大致将2.5 min前及4.0 min后洗脱出的非目标分析物直接排入废液,只分析2.5~4.0 min间洗脱出的8-oxodGuo及其内标。8-oxodGuo及其同位素内标峰形对称,出峰位置干扰少,见图2。

2.3 检测方法的评价

2.3.1 线性关系

本文所建立的ID-UPLC-MS/MS检测方法的最

低检测限为0.2 pg(信噪比=10),在0.4~100.0 ng/mL线性范围内线性关系良好,回归方程为 $Y = 0.0513X - 0.0224$,相关系数为 $r = 0.9996$ 。X为检测物峰面积/内标峰面积,Y为检测物浓度。

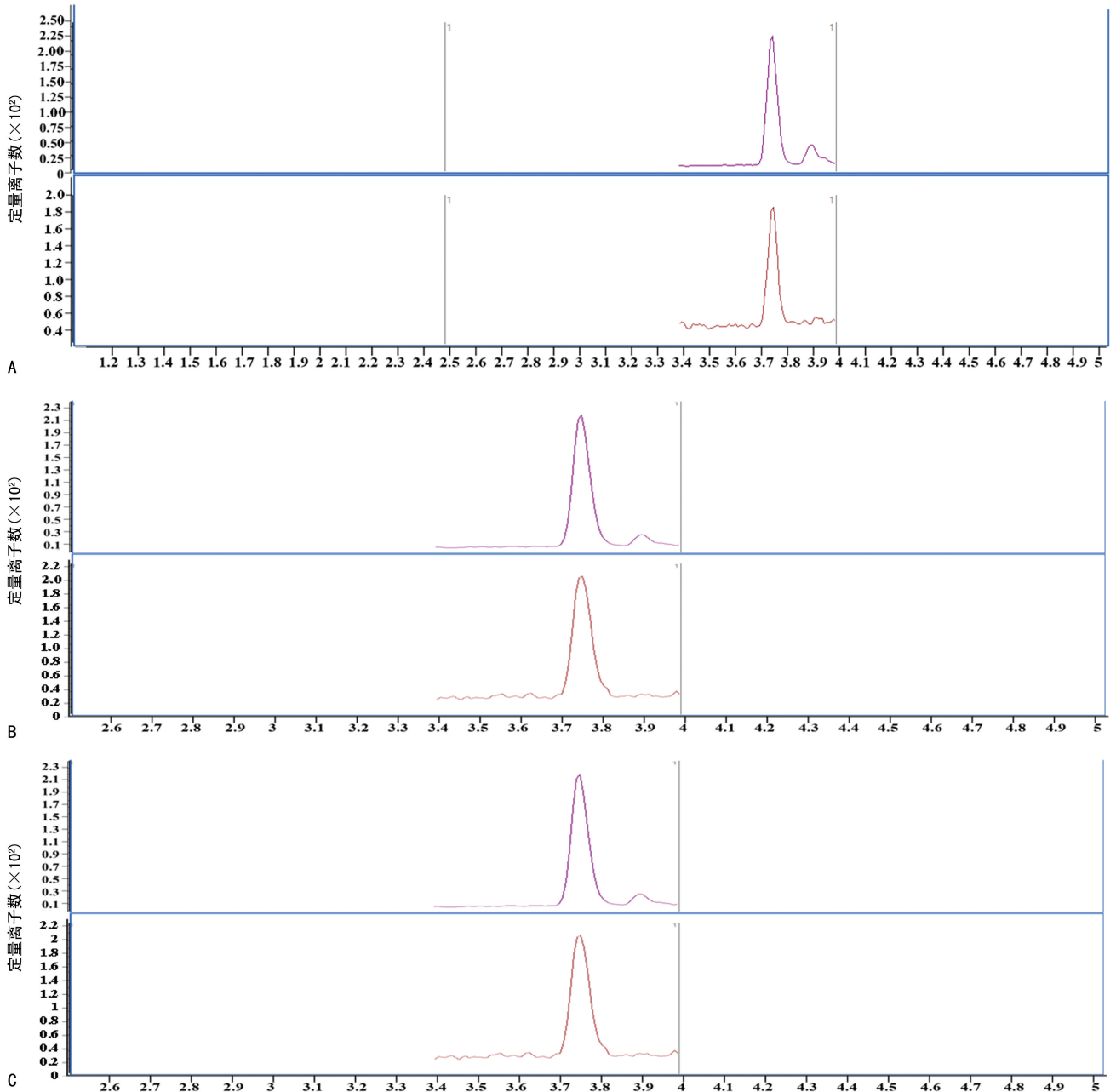
2.3.2 回收率和精密度

通过在已知8-oxodGuo浓度的大鼠尿液100 μL 中分别加入低、中、高3种不同浓度(0.4、10、100 ng/mL)的8-oxodGuo标准品100 μL ,经过样本处理流程及ID-UPLC-MS/MS检测,所得的回收率及精密度见表3。

2.4 大鼠尿液样本 DNA 氧化损伤标志物 8-oxod-Guo 水平

3 月龄大鼠尿液中 DNA 氧化损伤产物 8-oxod-

Guo 的浓度在 4.88~6.66 ng/mL 范围内检测的 5 只大鼠尿液 8-oxodGuo 浓度分别为 5.36、4.88、6.66、6.51、5.93 ng/mL。



A: 样本; B: 标准品 (10 ng/mL); C: 样本 + 标准品 (2 ng/mL)。

图 2 8-oxodGuo 及其内标色谱图

表 3 8-oxodGuo 低、中、高浓度回收率及精密度

尿液浓度	回收率 (%)	精密度 (%)
0.4 ng/mL	110.30 ± 7.83	7.1
10.0 ng/mL	104.37 ± 2.22	2.1
100.0 ng/mL	99.26 ± 1.18	1.2

3 讨论

当前, ELISA^[15-16]、HPLC-ECD^[17-18], GC-MS^[19-20] 和 LC-MS^[21-25] 已经被广泛应用于 DNA 氧化鸟苷的检测。然而 ELISA 常常存在较大的背景干扰

和非特异性染色, HPLC-ECD 对 ECD 要求相对较高, GC-MS 在气化过程中可能有较严重的自动氧化, LC-MS 相对分离时间较长。已建立的尿液 8-oxodGuo UPLC-MS/MS 检测方法^[13-14], 样本处理流程相对烦琐, 应用固相萃取柱费用昂贵, 检测时间也较长, 而本研究建立的 ID-UPLC-MS/MS 检测方法干扰小, 灵敏度高, 线性佳, 分析快速、准确, 并进行了方法学验证。

本研究建立 ID-UPLC-MS/MS 检测方法使用甲醇作为流动相的有机相, 虽然甲醇的洗脱能力较乙腈弱, 但对 8-oxodGuo 的响应比乙腈快, 这可能与甲醇

的离子化能力较强相关,而且尿样相对较脏,受干扰也较大,若响应不够快,则检测结果将有所损失。若尿液前期处理方法不适当,8-oxodGuo 的检测结果将受影响,同时低浓度的回收率波动较大,标准偏差值也相对较大,因此在绝对进样量相同情况下,低浓度大进样体积的结果不如高浓度低进样体积的结果稳定。虽然当前研究样本处理流程相对简单,但相较于用纯甲醇、纯乙腈、与甲醇或乙腈不同比例混合的 10 mmol/L 的醋酸铵混合液进行的样本处理比较,本研究的处理方法 8-oxodGuo 响应相对较快。

当前多项研究证实 DNA 氧化在多种疾病如职业暴露疾病、糖尿病肾病、肿瘤、男性不育、心血管疾病、儿童相关疾病等中发挥了重要作用^[4,7-9,12,17]。尿液作为机体代谢物的集中池,因其无侵入性,收集方便,易被患者所接受,因此尿液中 DNA 氧化损伤的生物标志物 8-oxodGuo 在未来将很可能被广泛用于疾病的监测,本研究建立的 UPLC-MS/MS 检测方法将有助于完善其对疾病的监测。

参考文献

- [1] TADDEI F, HAYAKAWA H, BOUTON M, et al. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage[J]. *Science*, 1997, 278(5335):128-130.
- [2] AMES B N, SHIGENAGA M K, HAGEN T M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(17):7915-7922.
- [3] 徐新民, 翁卿华, 郭杰, 等. 尿液 8-oxo-Gsn 和 8-oxo-dGsn 对 HBV 感染引起肝损伤程度的价值评估[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(2):74-78.
- [4] AN A R, KIM K M, PARK H S, et al. Association between expression of 8-OHdG and cigarette smoking in non-small cell lung cancer[J]. *J Pathol Transl Med*, 2019, 53(4):217-224.
- [5] KONDKAR A A, SULTAN T, AZAD T A, et al. Increased plasma levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in patients with pseudoexfoliation glaucoma[J]. *J Ophthalmol*, 2019, 2019(4):1-7.
- [6] KONDKAR A A, AZAD T A, SULTAN T, et al. Elevated plasma level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is associated with primary open-angle glaucoma[J]. *J Ophthalmol*, 2020, 2020(4):1-8.
- [7] LIU X, DENG K, CHEN S, et al. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Turk J Med Sci*, 2019, 49(1):93-100.
- [8] HALCZUK K M, BOGUSZEWSKA K, URBANI AK S K, et al. 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a cause of autoimmune thyroid diseases (AITD) during pregnancy? [J]. *Yale J Biol Med*, 2020, 93(4):501-515.
- [9] WANG X B, CUI N H, LIU X, et al. Mitochondrial 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1):1-15.
- [10] NAGAO M, KOBASHI G, UMESAWA M, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease incidence in Japan[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(10):1086-1096.
- [11] DI MINNO A, TURNU L, PORRO B, et al. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of the literature [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(10):548-555.
- [12] LI J, ZHANG D, RAMOS K S, et al. Blood-based 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level: a potential diagnostic biomarker for atrial fibrillation[J]. *Heart Rhythm*, 2021, 18(2):271-277.
- [13] 王丽英, 杨立新, 路杨, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定人尿中的 8-羟基脱氧鸟苷[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(23):3370-3372, 3375.
- [14] 谢聪, 丁培丽, 郭成, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿中 8-羟基脱氧鸟苷的含量——对吸烟与结直肠癌相关性的探讨[J]. *理化检验(化学分册)*, 2018, 54(1):44-48.
- [15] YOSHIDA R, OGAWA Y, KASAI H. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine values measured by an ELISA correlated well with measurements by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(10 Pt 1):1076-1081.
- [16] ROSSNER P J, ORHAN H, KOPPEN G, et al. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine analysis by an improved ELISA: an inter-laboratory comparison study [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 95(6):169-179.
- [17] IZZOTTI A, D'AGOSTINI F, BALANSKY R, et al. Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta[J]. *Mutat Res*, 2008, 644(1-2):38-42.
- [18] KAO S H, CHAO H T, CHEN H W, et al. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(5):1183-1190.

- [9] SMITH C, TENG F, BRANCH E, et al. Maternal and perinatal morbidity and mortality associated with anemia in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 2019, 134(6):1234-1244.
- [10] JALEEL R, KHAN A. Post-partum haemorrhage: a risk factor analysis[J]. *Mymensingh Med J*, 2010, 19:282-289.
- [11] 赵豆豆, 单莉, 米阳, 等. 妊娠期糖尿病及孕中期血糖水平与新生儿出生体质量的关联研究: 基于出生人口队列[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2021, 42(2):311-316.
- [12] LI G H, KONG L J, LI Z W, et al. Prevalence of macrosomia and its risk factors in china: a multicentre survey based on birth data involving 101,723 singleton term infants[J]. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2014, 28(4):345-350.
- [13] RUCHAT S M, MOTTOLA M F. The important role of physical activity in the prevention and management of gestational diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013, 29(5):334-346.
- [14] 朱琳, 黄川梦圆, 孟丹, 等. 1 113 例高龄妇女的围产结局分析[J]. *重庆医学*, 2021, 50(3):440-444.
- [15] 宋娟利. 复方丹参注射液联合硫酸镁治疗妊娠期高血压疾病及对患者微炎症状态、肾功能的影响[J]. *陕西医学*, 2016, 37(4):406-407.
- [16] 余琳, 苏日娜, 魏玉梅, 等. 系统整群抽样调查分析北京地区 15 家医院经产妇的临床特征[J]. *中华围产医学杂志*, 2016, 19(2):95-98.
- [17] 包特博沁. 二胎剖宫产产后出血和新生儿窒息危险因素的 Logistic 回归分析及麻醉管理[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [18] 徐铭军, 姚尚龙. 中国分娩镇痛现状与对策[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2018, 39(4):289-293, 337.
- [19] “高龄产妇妊娠期并发症防治策略研究”项目专家组. 高龄妇女瘢痕子宫再妊娠管理专家共识(2021 年版)[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2021, 37(5):558-563.
- [20] SUMIKURA H, NIWA H, SATO M, et al. Rethinking general anesthesia for cesarean section[J]. *J Anesth*, 2016, 30(2):268-273.

(收稿日期:2021-11-23 修回日期:2022-01-18)

(上接第 1396 页)

- [19] CHANG C H, YU C J, DU J C, et al. The associations among organophosphate pesticide exposure, oxidative stress, and genetic polymorphisms of paraoxonases in children with attention deficit/hyperactivity disorder[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 773(6):145604.
- [20] ROUT D, CHANDRA DASH U, KANHAR S, et al. The modulatory role of prime identified compounds in the bioactive fraction of *Homalium zeylanicum* in high-fat diet fed-streptozotocin-induced type 2 diabetic rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260:113099.
- [21] KAHREMANOGLU K, TEMEL E R, KORKUT T E, et al. Development of a solid-phase microextraction LC-MS/MS method for determination of oxidative stress biomarkers in biofluids[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(9-10):1925-1933.
- [22] LEE I, ALAKEEL R, KIM S, et al. Urinary phthalate metabolites among children in Saudi Arabia: occurrences, risks, and their association with oxidative stress markers[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 654(3):1350-1357.
- [23] LIU T, CAI J P, ZHANG L Q, et al. The mechanism of RNA oxidation involved in the development of heart failure[J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(8):910-921.
- [24] SHIH Y M, COOKE M S, PAN C H, et al. Clinical relevance of guanine-derived urinary biomarkers of oxidative stress, determined by LC-MS/MS[J]. *Redox Biol*, 2019, 20(1):556-565.
- [25] SUN Y W, CHEN K M, ATKINS H, et al. Effects of E-cigarette aerosols with varying levels of nicotine on biomarkers of oxidative stress and inflammation in mice[J]. *Chem Res Toxicol*, 2021, 34(4):1161-1168.

(收稿日期:2021-11-23 修回日期:2022-02-23)