

《药物流行病学研究方法学指南（第2版）》及其系列解读（12）：阴性对照方法的应用与案例解读



蒋保源¹, 詹思延^{2, 3, 4}, 孙 凤^{2, 3, 5, 6, 7}, 杨智荣^{8, 9}, 武珊珊¹

1. 首都医科大学附属北京友谊医院临床流行病学与循证医学研究室（北京 100050）
2. 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系（北京 100191）
3. 重大疾病流行病学教育部重点实验室（北京大学）（北京 100191）
4. 北京大学第三医院临床流行病学研究中心（北京 100191）
5. 北京大学第三医院眼科（北京 100191）
6. 新疆医科大学中医学院（乌鲁木齐 830017）
7. 新疆石河子大学公共卫生学院（新疆石河子 832000）
8. 深圳理工大学计算机科学与控制工程学院计算生物与医疗大数据系（广东深圳 518107）
9. 深圳理工大学人工智能研究院循证医学与人工智能中心（广东深圳 518107）

【摘要】 未测量偏倚是药物流行病学研究中的常见挑战，阴性对照可用来检测研究是否存在未测量偏倚，从而验证研究结果的可靠性。该研究基于《药物流行病学研究方法学指南（第2版）》，对阴性对照方法的应用及相关案例进行系统解读。首先，介绍阴性对照的定义与主要类型，包括阴性对照暴露、阴性对照时期和阴性对照结局，阐明其基本概念与适用情境。其次，阐述该方法的主要用途，即识别和校正未测量偏倚。然后，概述其实施步骤与统计分析方法，涵盖研究设计阶段的选择依据与统计分析阶段的偏倚检测策略。最后，通过对四类典型案例的详细解析，展示阴性对照在评估药物安全性、有效性的研究中识别和校正未测量混杂的实际应用价值。阴性对照虽不一定能完全消除偏倚，但作为一项补充分析工具，与其他流行病学方法结合使用，可有效提升观察性研究的因果推断质量。本文为在药物流行病学实践中合理选择与应用阴性对照提供了方法学参考，有助于推动高质量研究的开展。

【关键词】 药物流行病学；方法学；指南；阴性对照；未测量偏倚

【中图分类号】 R 181.3+5 **【文献标识码】** A

Guide on Methodological Standards in Pharmacoepidemiology (2nd edition) and their series interpretation (12): applications of negative control methods and case analysis

JIANG Baoyuan¹, ZHAN Siyan^{2,3,4}, SUN Feng^{2,3,5,6,7}, YANG Zhirong^{8,9}, WU Shanshan¹

1. Department of Clinical Epidemiology and Evidence-based Medicine, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202511138

基金项目：国家自然科学基金面上项目（72274193、82570631）；国家自然科学基金国际（地区）合作与交项目（72361127500）；海南省科学技术厅重点研发专项（ZDYF2024LCLH002）

通信作者：武珊珊，博士，研究员，教授，博士研究生导师，Email: shanshanwu@ccmu.edu.cn

杨智荣，博士，助理教授，博士研究生导师，Email: yangzhirong@suat-sz.edu.cn

<https://ywlbxb.whuzhmedj.com/>

2. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China
 3. Key Laboratory of Epidemiology of Major Diseases (Peking University), Ministry of Education, Beijing 100191, China
 4. Research Center of Clinical Epidemiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
 5. Department of Ophthalmology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
 6. School of Translational Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China
 7. School of Public Health, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
 8. Department of Computational Biology and Medical Big Data, Faculty of Computer Science and Control Engineering, Shenzhen University of Advanced Technology, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China
 9. Center for AI in Medicine, Artificial Intelligence Research Institute, Shenzhen University of Advanced Technology, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China
- Corresponding authors: WU Shanshan, Email: shanshanwu@ccmu.edu.cn; YANG Zhirong, Email: yangzhirong@suat-sz.edu.cn

【Abstract】 Unmeasured confounding is a common challenge in pharmacoepidemiological studies. Negative controls can be used to detect potential unmeasured confounding and thereby validate the reliability of study. Based on the *Guidelines for Pharmacoepidemiological Research Methodology (2nd edition)*, this study systematically interprets the application of the negative control methods and related case studies. First, the definition and main types of negative controls are introduced, including negative exposure control, negative period control, and negative outcome control, clarifying their basic concepts and applicable scenarios. Second, it elaborates the primary purpose of this method, which is to identify and adjust for unmeasured confounding. Then, the implementation steps and statistical analysis methods are outlined, covering selection criteria during the study design phase and bias detection strategies during the statistical analysis phase. Finally, through detailed analysis of four types of typical cases, the practical application value of negative controls is demonstrated in areas such as verifying drug safety, evaluating effectiveness, and identifying and adjusting for unmeasured confounding. The study emphasizes that while negative controls may not eliminate bias, they serve as a supplementary analytical tool, when combined with other epidemiological methods, can effectively enhance the quality of causal inference in observational studies. This research provides methodological references for the appropriate selection and application of negative controls in pharmacoepidemiological practice, thereby contributing to the advancement of high-quality researches.

【Keywords】 Pharmacoepidemiology; Methodology; Guidelines; Negative controls; Unmeasured confounding

药物流行病学主要研究药物在人群中的使用情况、有效性及安全性,旨在评估其获益与风险,为临床实践和公共卫生政策提供关键证据^[1-2]。方法学指南对于规范该学科发展具有重要作用。2019年,中国药学会发布了《药物流行病学研究方法学指南(第1版)》(以下简称“指南第1版”)^[3],为国内药物流行病学研究提供了初步方法学指导。近年来药物流行病学发展迅速,研究设计类型不断丰富,应用范围日益广泛。鉴于此,中国药学会结合国内外药物流行病学发展现

状制定了《药物流行病学研究方法学指南(第2版)》(以下简称“指南第2版”)^[4],在研究设计、数据源、应用场景等方面对指南第1版做了重要扩充,特别增设了阴性对照的内容,为识别和校正由未测量混杂因素所引致的偏倚提供了关键的方法学指导和规范。

本文主要针对指南第2版涉及的阴性对照方法进行解读,重点阐述其基本原理、分类、实施步骤,并结合典型案例剖析其应用场景,为今后开展药物流行病学研究提供方法学参考。

1 阴性对照的定义及主要类型

1.1 阴性对照的定义

阴性对照是指一种理论上与研究目标暴露(或结局)在因果上独立,但与研究中潜在的未测量混杂因素共享相似偏倚结构的变量,可用于检测或校正未测量偏倚和其他偏倚^[5]。阴性对照本身不参与待研究的因果假设,而是作为偏倚结构的“镜像”或“参照”,帮助识别研究结果中是否存在系统性偏倚。其核心逻辑是,若该阴性对照仍出现显著的统计学关联,则提示原研究中可能存在未测量混杂或其他偏倚。阴性对照主要分为阴性对照暴露、阴性对照时期和阴性对照结局。

1.2 主要类型

1.2.1 阴性对照暴露

阴性对照暴露是指通过设置一个在理论上不应影响研究结局,但与真实暴露共享相似(包括未测量)混杂结构的“阴性暴露”作为对照,用于检测观察性研究中是否存在未测量偏倚的方法(有向无环图见图1)^[5]。若阴性暴露与结局之间仍显示存在显著的统计学关联,则提示研究中

可能存在未测量偏倚;反之,若阴性对照暴露与结局无显著关联,则可降低对未测量偏倚的担忧,增强暴露-结局因果推断的可信度。如Cohen等^[6]在治疗注意力缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)的精神兴奋剂使用与胎盘相关不良妊娠结局的关联研究中,将服用精神兴奋剂(苯丙胺-右旋苯丙胺或哌醋甲酯)的患者作为暴露组,将服用非兴奋剂托莫西汀作为阴性对照暴露。结果显示,精神兴奋剂的使用与胎盘相关不良妊娠结局风险增加有关,而托莫西汀使用则未观察到此类关联,提示该研究中暴露与结局的关联不太可能受到未测量混杂因素的显著影响,从而提高了研究结果的可信度。

1.2.2 阴性对照时期

阴性对照时期是指在某一特定时间窗口内,根据已知的生物学机制或暴露-结局作用过程,研究暴露理论上不可能对结局产生因果效应(有向无环图见图2)。然而,在该时间段内,暴露与结局之间的潜在未测量混杂或其他偏倚依然存在。若在阴性对照时期仍观察到暴露与结局的关联,则提示研究结果可能受到潜在偏倚的影响^[7]。

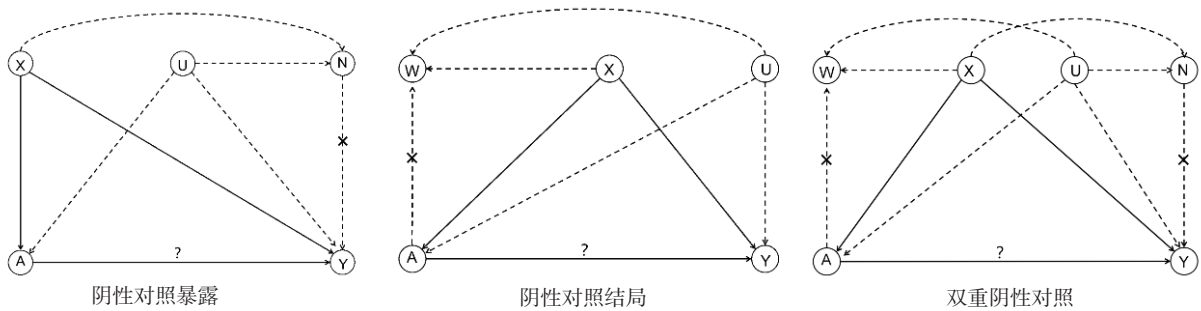


图1 阴性对照暴露、阴性对照结局、双重阴性对照的有向无环图

Figure 1. Directed acyclic diagram of negative control exposure, negative control outcome, and double negative control
注: X. 已测量混杂因素; U. 未测量混杂因素; A. 目标暴露; Y. 目标结局; N. 阴性对照暴露; W. 阴性对照结局。

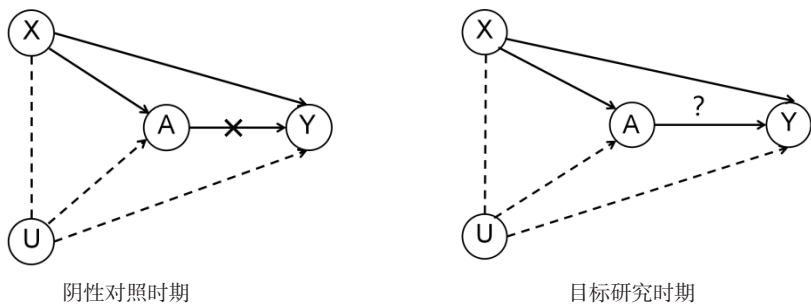


图2 阴性对照时期的有向无环图

Figure 2. Directed acyclic graph of the negative temporal control

注: X. 已测量混杂因素; U. 未测量混杂因素; A. 目标暴露; Y. 目标结局。

例如,在研究老年人接种流感疫苗与全因死亡风险的关联时,可将流感流行季节开始前的时期作为阴性对照时期。在此阶段,流感病毒尚未广泛传播,疫苗尚未发挥保护作用,因此理论上疫苗接种不应降低死亡风险。然而,若在该时期仍观察到接种者死亡风险显著低于未接种者,则表明研究中可能存在健康使用者偏倚,即倾向于接种疫苗的个体通常健康状况更好、健康意识更强、医疗可及性更高,从而本身具有更低的死亡风险^[8-9]。这种偏倚若未被充分控制,可能导致对疫苗保护效应的高估。

1.2.3 阴性对照结局

阴性对照结局,即根据已知事实、先验知识和生物学机制上与研究暴露不存在因果效应的结局,但其与主要研究结局共享相似的(包括未测量)混杂结构,用于检测观察性研究中可能存在的未测量混杂、选择偏倚或信息偏倚(有向无环图见图1)^[5]。如 McGrath 等^[10]在评估美国骨质疏松症女性患者治疗效果的研究中,将褥疮、痴呆诊断、输血、事故、健康访问、莫氏手术、视力检查、流感疫苗、带状疱疹疫苗、盆腔筛查和结肠癌筛查这11种事件作为阴性对照结局。若骨质疏松治疗药物使用与这些理论上无因果关系的结局出现关联,则提示该研究存在潜在偏倚。

1.2.4 双重阴性对照

双重阴性对照是指同时应用阴性对照暴露和阴性对照结局,或在不同时间点(如过去结局和未来暴露)构建阴性对照,形成“双重阴性”设计(有向无环图见图1)。这种方法通过双向锚定未测量混杂,能更精确地识别和校正偏倚。目前双重阴性对照的应用仍处于探索阶段^[11]。

2 阴性对照的用途

阴性对照在满足一定前提假设的情况下,可用于检测偏倚、校正偏倚和校准 P 值与置信区间(confidence interval, CI)。

2.1 检测偏倚

阴性对照最常见的用途是检测偏倚,包括选择偏倚、信息偏倚和混杂偏倚。

在选择偏倚检测方面, Ivers 等^[12]在反应性口服霍乱疫苗接种的有效性研究中,将非霍乱性腹泻作为阴性对照结局,检测该研究是否存在选

择偏倚。若观察到疫苗接种与非霍乱性腹泻有关,则提示可能存在选择偏倚,可能是因为愿意接种疫苗的人更倾向于患病时去医院治疗。在信息偏倚检测方面, Ercumen 等^[13]在管井水源污染与家庭污染对孟加拉国农村儿童腹泻的影响性研究中,将皮疹和耳部感染作为阴性对照结局,这些症状不会受到饮用水干预的影响,用于检测与非盲干预措施的主观自我报告结果之间的潜在报告偏倚。在混杂偏倚检测方面, Danaei 等^[14]在他汀类药物使用与糖尿病风险的研究中,将消化性溃疡作为阴性对照结局,若他汀类药物与消化性溃疡存在关联,则提示可能存在未测量的混杂偏倚。

阴性对照检测偏倚的根本机制建立在 U 可比性(U -comparable)假设上。该假设要求在调整已知协变量后,阴性对照与目标暴露(或结局)所受到的未测量混杂影响是可比的。若目标暴露与阴性对照结局(阴性对照暴露与目标结局)之间存在统计关联,且该关联不能由已知因果机制解释,则强烈提示存在未测量混杂。需要注意的是 U 可比性等假设往往不可直接验证,因此阴性对照的分析结果不能证明不存在偏倚,而主要作为存在偏倚的证据。

2.2 校正偏倚

利用阴性对照进行偏倚校正,是当前阴性对照方法发展最为迅速的领域。其中,对照结局校准方法(control outcome calibration approach, COCA)是其较为成熟且应用较多的代表性方法之一^[15]。COCA是一种基于反事实框架的参数校准方法。其核心思想是利用阴性对照结局的观测数据来反推未测量混杂的分布,通过构建混杂平衡权重或参数约束来实现暴露-结局关联性估计校准。COCA的偏倚校正依赖数项关键假设,包括:①一致性假设,即潜在结局与观测结局在相应暴露水平下保持一致;②阴性对照结局必须不受暴露影响;③主结局与阴性对照结局共享相同的混杂结构。值得注意的是,COCA并不要求目标结局与阴性对照结局分别与目标暴露的关联性具有完全相同的混杂效应大小,这也是其区别于等混杂假设方法的特点,使其在实践中的应用更具灵活性。

2.3 P 值和CI校准

在观察性研究中,未测量和残余混杂等偏倚普遍存在,导致传统的 P 值和CI容易出现系

统性偏倚。为解决这一问题, Schuemie 等^[16]提出了一种基于阴性对照的经验校准方法, 通过利用一组已知“无因果关系”的暴露-结局对, 估计研究中真实存在的系统误差分布, 并据此对统计推断进行校正。该方法包含 3 个主要步骤: ①构建阴性对照集合。选择一组可以确定不会产生因果效应的暴露-结局对。例如, 应确保这些对照在文献、药品说明书、信号监测系统以及专家判断中均不支持存在关联。此外, 理想的阴性对照应与研究问题具有相似的流行病学特征, 使其偏倚结构尽可能可比。②估计经验零分布。使用与主要分析完全相同的研究设计和分析流程, 对每个阴性对照估计效应值及其不确定性。通过这些阴性对照的结果, 可以反推研究中系统性偏倚的平均水平及其变异程度, 从而得到反映“实际误差分布”的经验零分布。③进行留一法校准。为避免过拟合, 每次从阴性对照集合中留出一个, 利用剩余对照重新估计经验零分布, 并检验被留出对照的效应估计在该分布中有多极端。由此得到的“校准 P 值”能够反映在现实偏倚背景下效应估计的真实显著性, 从而比传统 P 值更可靠。Schuemie 等^[16]进一步将校准框架扩展至 CI。

3 阴性对照方法的实施步骤

3.1 研究设计阶段

首先明确主要分析的暴露和结局以外, 还要确定具体的阴性对照。阴性对照的选择应依据先验知识、已知生物学知识、已发表文献等判断。阴性对照不参与研究的因果假设但具有与研究的暴露-结局关联相似的偏倚结构。例如, 在儿童早期抗菌药物暴露和慢性儿科疾病的关联性研究中, 已知骨折与儿童早期抗菌药物暴露不存在关联, 将前臂骨折作为阴性对照结局, 以检测该研究是否存在未测量混杂因素。此外, 还需注意所选数据库应能同时提供待研究暴露和结局以及阴性对照暴露(结局)的信息。

3.2 统计分析阶段

在统计分析阶段, 可以使用常规模型(如 Cox 模型、Logistic 模型)估计待研究暴露与目标结局的效应值[风险比(hazard ratio, HR), 比值比(odds ratio, OR), 相对危险度(relative risk, RR)]。然后采用相同模型估计阴性对照暴

露(结局)与目标结局(暴露)的关联, 若分析结果显示阴性对照组与结局之间有关联, 则提示待研究暴露与结局之间存在未知偏倚影响, 研究结果不可靠, 需进一步检测探究偏倚类型并进行校正。如校准方法可以采用 COCA^[15], P 值和 CI 校准可用 Schuemie 法^[16]。

4 阴性对照案例解读

目前, 国内外有许多研究采用阴性对照检测或校正偏倚^[10, 17-19], 本文分别针对 3 种类型及其主要用途选取典型研究案例进行详细解读(见表 1)。

4.1 案例一(阴性对照暴露与偏倚检测)

以产前暴露于托吡酯、丙戊酸盐和拉莫三嗪后子代的孤独症风险性研究^[20]为例。

大多数患有癫痫的女性在孕期会接受抗癫痫药物治疗, 但多项研究^[21-24]发现母亲产前使用丙戊酸盐与子代神经发育障碍风险增加相关, 临床指南已经建议孕妇避免使用该药物。然而, 对于其他抗癫痫药物如托吡酯, 其安全性证据并不充分^[25-27]。该案例为回顾性队列研究, 旨在探究产前暴露于托吡酯与子代孤独症风险增加是否存在关联。将产前丙戊酸盐暴露的孕妇作为阳性对照, 拉莫三嗪暴露的孕妇作为阴性对照, 探究产前暴露于托吡酯是否对子代孤独症风险有影响。设置拉莫三嗪作为阴性对照原因如下: 多项研究并未发现产前暴露于拉莫三嗪与子代孤独症风险增加存在显著关联, 若阴性对照暴露分析结果显示两者存在关联, 则提示该研究可能存在未测量偏倚, 如疾病的严重程度、药物使用情况等^[22-23, 25, 28-29]。结果显示, 产前暴露于托吡酯或拉莫三嗪后, 孤独症谱系障碍的风险未显著增加, 丙戊酸盐暴露组中子代孤独症风险显著增加。如果研究受到较强的未测偏倚影响, 则阴性对照结果也应显示风险增高; 但阴性对照结果显示拉莫三嗪暴露与孤独症风险增加无关, 因此未测量混杂因素在该研究中影响有限, 即阴性对照结果支持该研究主要结论。

综上所述, 这项研究通过阴性对照和多种偏倚控制方法, 提供了孕期使用托吡酯与子代孤独症风险增加无关的证据, 同时再次证实了丙戊酸盐暴露会增加子代孤独症的风险。阴性对照的应

表1 4种阴性对照方法的案例分析
Table 1. Cases of four types of negative control methods

研究案例	研究类型	研究对象	样本量	暴露	阴性对照	结局	研究结果	研究结论
Hernández-Díaz ^[20]	回顾性队列研究	孕期妇女	8 492 335	托吡酯	拉莫三嗪	孤独症谱系障碍	产前暴露于托吡酯或拉莫三嗪后，孤独症谱系障碍的风险没有显著增加，提示托吡酯-孤独症的关联不太可能受到未测量偏倚的影响	孕期使用托吡酯与子代孤独症风险增加无关
Eilertsen ^[30]	前瞻性队列研究	儿童	114 247	孕期饮酒	孕前饮酒	ADHD	母亲孕期饮酒与子代ADHD发病风险存在显著关联。母亲孕期饮酒与子代ADHD也存在显著关联，提示该研究可能受到未测量偏倚的影响	母亲孕期饮酒可能增加子代患ADHD风险
Yang ^[33]	回顾性队列研究	18岁以上突发中风患者	33 190	他汀类药物	骨折、消化性溃疡	中风后痴呆	与未使用他汀类药物相比，他汀类药物使用与痴呆和骨折风险降低有关，与消化性溃疡无显著关联；间接调整未测量偏倚后，他汀类药物与痴呆的相关性虽然有所减弱，但仍显著	未测量混杂因素的存在可能导致他汀类药物与痴呆的关联被高估，还需更多研究予以证实他汀类药物在预防中风后痴呆方面的潜在影响
You ^[40]	回顾性队列研究	诊断为ACS后首次接受PCI的成年患者	183 579	替格瑞洛或氯吡格雷	异常反射、酗酒等84个阴性结局	净不良临床事件（包括缺血性事件和出血性事件）	替格瑞洛和氯吡格雷组在第12个月净不良临床事件无显著差异。阴性对照结果显示，95.2%（80/84）的95%CI包含1；校正后，96.4%的95%CI包含1，提示该研究受到未测量偏倚影响较小	在常规临床实践中接受PCI的ACS患者中，替格瑞洛与氯吡格雷相比，与12个月时净不良临床事件风险无显著差异

注：ADHD. 注意力缺陷多动障碍（attention deficit hyperactivity disorder）；ACS. 急性冠脉综合征（acute coronary syndrome）；PCI. 经皮冠状动脉介入治疗（percutaneous coronary intervention）。

用增强了结论的可靠性，提示未测量混杂的影响较小。

4.2 案例二（阴性对照时期与偏倚检测）

以母亲孕期饮酒与子代 ADHD 之间的关联性研究^[30]作为阴性对照时期案例。

目前，ADHD 全球合并患病率已超过 5%，是儿童青少年常见的行为障碍之一^[31]。既往研究^[32-34]表明，母亲怀孕期间饮酒可能与子代 ADHD 风险增加有关，但是否属于因果关联仍存在争议。该案例基于挪威的一项出生队列研究，以探究母亲孕期饮酒与子代 ADHD 风险增加是否存在关联。选择母亲孕前饮酒作为阴性对照时期，因为母亲孕前饮酒与孕期饮酒所受环境、行为方式等因素影响相似，但孕前饮酒不会直接通过生理途径影响胎儿神经发育。因此，如研究结果显示母亲孕前饮酒与子代 ADHD 症状有关时，则提示孕期饮酒与子代 ADHD 之间可能存在相似未测量混杂因素影响。结果显示，在调整协变量（父母收入、母亲孕期吸烟、儿童性别年龄等）后，目前孕期饮酒与子代 ADHD 发生存在显著关联。阴性对照时期分析结果显示母亲孕前饮酒与子代 ADHD 也存在显著关联，提示该研究可能存在未测量混杂，可能导致两者之间的关联被高估，因此还需要进一步发现并控制更多混杂因素。

4.3 案例三（阴性对照结局与偏倚校正）

以他汀类药物治疗与卒中患者痴呆风险的研究^[35]作为阴性对照结局案例。

他汀类药物可降低低密度脂蛋白，进而减少各种心血管疾病发生风险，目前已被广泛用于缺血性中风患者^[36-37]。然而，他汀类药物对中风后患者的认知功能具有保护作用还是潜在危害，目前证据尚不明确。该案例采用回顾性队列设计，探讨他汀类药物使用与中风后痴呆风险之间的关系。该研究将骨折和消化性溃疡作为阴性对照结局，检测研究是否存在未知偏倚影响。选择两者作为阴性对照原因：①他汀类药物使用与每个对照结局之间的关系以及他汀类药物使用与痴呆之间的关系共享一组类似的混杂因素，而来自随机对照试验的高质量证据已经确定，他汀类药物使用与骨折^[37-39]和消化性溃疡^[40]之间不存在关联。如果阴性对照分析结果显示他汀类药物使用与骨折和消化性溃疡有关，则提示可能存在未测量混

杂因素，如生活方式、健康使用者偏倚等的影响。结果显示，与未使用他汀类药物相比，他汀类药物使用可使痴呆风险降低 30%。阴性对照分析显示，他汀类药物使用与骨折风险降低有关，与消化性溃疡无显著关联，提示可能存在未测量偏倚的影响。因此，为校正未知偏倚，假设未测量混杂因素对他汀类药物使用相关的痴呆风险影响与骨折相似，将骨折纳入痴呆的完全调整模型，间接调整未测量混杂后，他汀类药物与痴呆的关联虽然有所减弱，但仍显著。这说明未测量混杂因素的存在可能导致他汀类药物与痴呆的关联被高估。

4.4 案例四（阴性对照结局与P值或CI校准）

以两类血小板聚集抑制剂（替格瑞洛与氯吡格雷）与接受经皮冠状动脉介入治疗的急性冠脉综合征（acute coronary syndrome, ACS）患者发生净不良临床事件的关联性研究^[41]为案例。

目前指南^[42-44]建议 ACS 患者应优先使用替格瑞洛联合阿司匹林，而不是氯吡格雷。然而，来自北美和亚洲的相关研究^[45]显示患者获益并不明显，替格瑞洛的疗效仍然存在疑问。研究结果显示，在接受介入治疗的 ACS 患者中，替格瑞洛组和氯吡格雷组在第 12 个月的总体净不良临床事件无显著差异[HR=1.05, 95%CI(1.00, 1.10)]。为了增强研究结果的可信度，研究设置了 84 种阴性对照结局以检测未测量偏倚。阴性对照结果显示，有 95.2% (80/84) 的阴性对照的 95%CI 包含 1，说明该研究受到未测量偏倚的影响较小，但仍有 4.8% 的结果存在统计学意义。然后，基于阴性对照对 CI 进行经验校准后，结果显示 96.4% (81/84) 阴性对照的 95%CI 包含 1，提示该研究受未测量偏倚的影响进一步减少。校准后的主要研究结果变化不大（具体可见原文附件 eFigure 5）。但值得注意的是，选择合适的阴性对照十分重要，如果阴性对照选择不当可能会导致经验性校准的有效性降低。

5 讨论

阴性对照主要应用场景包括验证药物安全性、评估药物有效性和关联结果的可信度，为真实世界证据的因果推断提供补充性支持。选择合适的阴性对照变量，首先需要在研究设计阶段根

据研究目的和现有数据类型来确定合适的阴性对照类型，其次可通过理论逻辑论证和现有数据进行验证，来证明所选阴性对照变量与主要研究变量之间不存在已知的因果关系，最后要谨慎应用阴性对照，说明选择理由，并将该方法结合其他流行病学方法使用，阐明阴性对照分析结果并进行正确解读。研究者在选择阴性对照时应注意以下几点：①阴性对照的暴露（或结局）变量在因果机制上不应影响目标结局（或暴露）；②阴性对照的未知偏倚结构应与研究中主要暴露和结局的偏倚结构尽可能相似，这一假设是阴性对照方法得以推断偏倚的重要前提，但通常不可直接验证；③所选择的阴性对照应有足够的样本量，以便在统计分析中具有足够效能来检测可能存在的偏倚。

此外，孟德尔随机化法也是控制未测量偏倚的常用方法之一，该方法基于已测量的基因变异（即作为工具变量）来研究暴露与结局之间是否存在因果关系。孟德尔随机化法需满足三个前提假设：工具变量仅与暴露因素相关；与结局无关且仅能通过暴露因素来影响结局；独立于所有混杂因素。该方法虽然可较好地控制未测量混杂偏倚、排除反向因果关系，但也存在一定局限性，比如在某些情况下选取合适的工具变量比较困难，弱工具变量可能使估计系数波动较大等。相比于孟德尔随机化等方法，阴性对照在因果推断上具有明显的优点：它可以提示观察性研究中未知偏倚的存在，增强结果可信度；概念直观易于理解；适用于多种研究设计；不需要收集额外数据，可在现有数据库中选取。但阴性对照方法也具有一定的局限性：阴性对照的选取通常依赖研究者的先验知识与文献证据，所依赖的可比性假设难以完全验证；阴性对照不能证伪偏倚，仅能提示其是否可能存在，错误选择阴性对照可能会引入额外的偏倚；若偏倚结构不同，阴性对照分析可能会失效；若数据中存在差异性的测量误差或选择机制（如电子病历中的暴露/结局错分、就诊相关的选择偏倚），也会在一定程度上干扰阴性对照的解释。为平衡阴性对照的优缺点，其分析结果应被视为证据链的重要组成部分，与研究设计（如新使用者活性药物比较设计）、传统混杂控制方法以及敏感性分析等其他环节

一并综合评估。

近年来,阴性对照虽发展迅速,方法学不断完善,但仍存在较多问题待解决。未来方法学的发展方向包括:标准化阴性对照的选择;适当放宽严苛的假设条件,开发在更弱、更现实的假设下仍能生效的方法;探索能够同时处理多种偏倚的综合性框架;优化多重阴性对照的使用以说明结果的可靠性和稳定性;提高该方法的可用性及普及度,不断扩大应用范围。未来研究也可探索如何将机器学习、因果推断模型(如目标实验模拟,双重稳健估计)与阴性对照方法结合起来,以实现更系统的偏倚校正与因果效应估计^[46]。

综上,阴性对照是指南第2版推荐的重要方法学工具之一,为增强观察性研究因果推断的可靠性提供了有力手段。其成功应用高度依赖基于知识的、合理的阴性对照选择。同时,值得注意的是,应将阴性对照分析方法作为补充分析工具,与其他流行病学研究方法结合使用,并根据研究背景进行综合判断,透明报告阴性对照选取的理由,谨慎解读阴性对照结果。

利益冲突声明: 作者声明本研究不存在任何经济或非经济利益冲突。

参考文献

- 1 Sabaté M, Montané E. Pharmacoepidemiology: an overview[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(22): 7033. DOI: [10.3390/jcm12227033](https://doi.org/10.3390/jcm12227033).
- 2 Montastruc JL, Benevent J, Montastruc F, et al. What is pharmacoepidemiology? Definition, methods, interest and clinical applications[J]. *Therapie*, 2019, 74(2): 169–174. DOI: [10.1016/j.therap.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.therap.2018.08.001).
- 3 中国药学会药物流行病学专业委员会. 中国药物流行病学研究方法学指南(T/CPHARMA 002-2019)[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(10): 1180–1185. DOI: [10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.10.002](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.10.002).
- 4 吴昀效, 颜济南, 聂晓璐, 等. 《中国药物流行病学研究方法学指南(第2版)》及其系列解读(1): 概述[J]. *药物流行病学杂志*, 2025, 34(1): 2–11. [Wu YX, Yan JN, Nie XL, et al. Guide on Methodological Standards in Pharmacoepidemiology in China (2nd edition) and their series interpretation (1): an overview[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2025, 34(1): 2–11.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202412131](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202412131).
- 5 Lipsitch M, Tchetgen Tchetgen E, Cohen T. Negative controls: a tool for detecting confounding and bias in observational studies[J]. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*, 2010, 21(3): 383–388. DOI: [10.1097/EDE.0b013e3181d61eeb](https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181d61eeb).
- 6 Cohen JM, Hernández-Díaz S, Bateman BT, et al. Placental complications associated with psychostimulant use in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 2017, 130(6): 1192–1201. DOI: [10.1097/aog.0000000000002362](https://doi.org/10.1097/aog.0000000000002362).
- 7 Groenwold RH. Falsification end points for observational studies[J]. *JAMA*, 2013, 309(17): 1769–1770. DOI: [10.1001/jama.2013.3089](https://doi.org/10.1001/jama.2013.3089).
- 8 Groenwold RH, Hoes AW, Hak E. Impact of influenza vaccination on mortality risk among the elderly[J]. *The Eur Respir J*, 2009, 34(1): 56–62. DOI: [10.1183/09031936.00190008](https://doi.org/10.1183/09031936.00190008).
- 9 Jackson LA, Jackson ML, Nelson JC, et al. Evidence of bias in estimates of influenza vaccine effectiveness in seniors[J]. *Int J Epidemiol*, 2006, 35(2): 337–344. DOI: [10.1093/ije/dyi274](https://doi.org/10.1093/ije/dyi274).
- 10 McGrath LJ, Spangler L, Curtis JR, et al. Using negative control outcomes to assess the comparability of treatment groups among women with osteoporosis in the United States[J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2020, 29(8): 854–863. DOI: [10.1002/pds.5037](https://doi.org/10.1002/pds.5037).
- 11 Shi X, Miao W, Tchetgen ET. A selective review of negative control methods in epidemiology[J]. *Curr Epidemiol Rep*, 2020, 7(4): 190–202. DOI: [10.1007/s40471-020-00243-4](https://doi.org/10.1007/s40471-020-00243-4).
- 12 Ivers LC, Hilaire IJ, Teng JE, et al. Effectiveness of reactive oral cholera vaccination in rural Haiti: a case-control study and bias-indicator analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2015, 3(3): e162–168. DOI: [10.1016/s2214-109x\(14\)70368-7](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(14)70368-7).
- 13 Ercumen A, Naser AM, Unicomb L, et al. Effects of source-versus household contamination of tubewell water on child diarrhea in rural Bangladesh: a randomized controlled trial[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121907. DOI: [10.1371/journal.pone.0121907](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121907).
- 14 Danaei G, García Rodríguez LA, Fernandez Cantero O, et al. Statins and risk of diabetes: an analysis of electronic medical records to evaluate possible bias due to differential survival[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(5): 1236–1240. DOI: [10.2337/dc12-1756](https://doi.org/10.2337/dc12-1756).
- 15 Tchetgen Tchetgen E. The control outcome calibration approach for causal inference with unobserved confounding[J]. *Am J Epidemiol*, 2014, 179(5): 633–640. DOI: [10.1093/aje/kwt303](https://doi.org/10.1093/aje/kwt303).
- 16 Schuemie MJ, Ryan PB, DuMouchel W, et al. Interpreting observational studies: why empirical calibration is needed to correct *P*-values[J]. *Stat Med*, 2014, 33(2): 209–218. DOI: [10.1002/sim.5925](https://doi.org/10.1002/sim.5925).
- 17 Cohen JM, Wood ME, Hernández-Díaz S, et al. Paternal antidepressant use as a negative control for maternal use: assessing familial confounding on gestational length and anxiety traits in offspring[J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(5): 1665–1672. DOI: [10.1093/ije/dyz170](https://doi.org/10.1093/ije/dyz170).
- 18 Yang Z, Edwards D, Burgess S, et al. Association of major blood lipids with post-stroke dementia: a community-based cohort study[J]. *Eur J Neurol*, 2022, 29(4): 968–979. DOI: [10.1111/ene.15219](https://doi.org/10.1111/ene.15219).
- 19 Takeuchi M, Shinozaki T, Kawakami K. Universal health

- checkups and risk of incident diabetes and hypertension[J]. *JAMA Netw Open*, 2024, 7(12): e2451813. DOI: [10.1001/jamanetworkopen.2024.51813](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.51813).
- 20 Hernández-Díaz S, Straub L, Bateman BT, et al. Risk of autism after prenatal topiramate, valproate, or lamotrigine exposure[J]. *New Engl J Med*, 2024, 390(12): 1069–1079. DOI: [10.1056/NEJMoa2309359](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309359).
- 21 Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism[J]. *JAMA*, 2013, 309(16): 1696–1703. DOI: [10.1001/jama.2013.2270](https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270).
- 22 Bjørk MH, Zoega H, Leinonen MK, et al. Association of prenatal exposure to antiepileptic medication with risk of autism and intellectual disability[J]. *JAMA Neurol* 2022, 79(7): 672–681. DOI: [10.1001/jamaneurol.2022.1269](https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.1269).
- 23 Wiggs KK, Rickert ME, Sujan AC, et al. Antiepileptic medication use during pregnancy and risk of ASD and ADHD in children[J]. *Neurology*, 2020, 95(24): e3232–e3240. DOI: [10.1212/wnl.00000000000010993](https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000010993).
- 24 Wood AG, Nadebaum C, Anderson V, et al. Prospective assessment of autism traits in children exposed to antiepileptic drugs during pregnancy[J]. *Epilepsia*, 2015, 56(7): 1047–1055. DOI: [10.1111/epi.13007](https://doi.org/10.1111/epi.13007).
- 25 Blotière PO, Miranda S, Weill A, et al. Risk of early neurodevelopmental outcomes associated with prenatal exposure to the antiepileptic drugs most commonly used during pregnancy: a French nationwide population-based cohort study[J]. *BMJ Open*, 2020, 10(6): e034829. DOI: [10.1136/bmjopen-2019-034829](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034829).
- 26 Rihtman T, Parush S, Ornoy A. Preliminary findings of the developmental effects of in utero exposure to topiramate[J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(3): 308–311. DOI: [10.1016/j.reprotox.2012.05.038](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.038).
- 27 Bromley RL, Calderbank R, Cheyne CP, et al. Cognition in school-age children exposed to levetiracetam, topiramate, or sodium valproate[J]. *Neurology*, 2016, 87(18): 1943–1953. DOI: [10.1212/wnl.00000000000003157](https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000003157).
- 28 Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(6): 637–643. DOI: [10.1136/jnnp-2012-304270](https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304270).
- 29 Baker GA, Bromley RL, Briggs M, et al. IQ at 6 years after in utero exposure to antiepileptic drugs: a controlled cohort study[J]. *Neurology*, 2015, 84(4): 382–390. DOI: [10.1212/wnl.00000000000001182](https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000001182).
- 30 Eilertsen EM, Gjerde LC, Reichborn-Kjennerud T, et al. Maternal alcohol use during pregnancy and offspring attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): a prospective sibling control study[J]. *Int J Epidemiol*, 2017, 46(5): 1633–1640. DOI: [10.1093/ije/dyx067](https://doi.org/10.1093/ije/dyx067).
- 31 Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, et al. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis[J]. *Am J Psychiatry*, 2007, 164(6): 942–948. DOI: [10.1176/ajp.2007.164.6.942](https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.6.942).
- 32 Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence[J]. *Am J Psychiatry*, 2003, 160(6): 1028–1040. DOI: [10.1176/appi.ajp.160.6.1028](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.6.1028).
- 33 O'Connor MJ, Paley B. Psychiatric conditions associated with prenatal alcohol exposure[J]. *Dev Disabil Res Rev*, 2009, 15(3): 225–234. DOI: [10.1002/ddrr.74](https://doi.org/10.1002/ddrr.74).
- 34 Gronimus R, Ridout D, Sandberg S, et al. Maternal alcohol consumption[J]. *London J Prim Care*, 2009, 2(1): 28–35. DOI: [10.1080/17571472.2009.11493239](https://doi.org/10.1080/17571472.2009.11493239).
- 35 Yang Z, Toh S, Li X, et al. Statin use is associated with lower risk of dementia in stroke patients: a community-based cohort study with inverse probability weighted marginal structural model analysis[J]. *Eur J Epidemiol*, 2022, 37(6): 615–627. DOI: [10.1007/s10654-022-00856-7](https://doi.org/10.1007/s10654-022-00856-7).
- 36 Collins R, Armitage J, Parish S, et al. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2003, 361(9374): 2005–2016. DOI: [10.1016/s0140-6736\(03\)13636-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13636-7).
- 37 Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 360(9326): 7–22. DOI: [10.1016/s0140-6736\(02\)09327-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09327-3).
- 38 Peña JM, Asperger S, MacFadyen J, et al. Statin therapy and risk of fracture: results from the JUPITER randomized clinical trial[J]. *JAMA Intern Med*, 2015, 175(2): 171–177. DOI: [10.1001/jamainternmed.2014.6388](https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.6388).
- 39 Toh S, Hernández-Díaz S. Statins and fracture risk. A systematic review[J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2007, 16(6): 627–640. DOI: [10.1002/pds.1363](https://doi.org/10.1002/pds.1363).
- 40 Reith C, Staplin N, Herrington WG, et al. Effect on non-vascular outcomes of lowering LDL cholesterol in patients with chronic kidney disease: results from the Study of Heart and Renal Protection[J]. *BMC Nephrol*, 2017, 18(1): 147. DOI: [10.1186/s12882-017-0545-2](https://doi.org/10.1186/s12882-017-0545-2).
- 41 You SC, Rho Y, Bickdeli B, et al. Association of ticagrelor vs clopidogrel with net adverse clinical events in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *JAMA*, 2020, 324(16): 1640–1650. DOI: [10.1001/jama.2020.16167](https://doi.org/10.1001/jama.2020.16167).
- 42 Levine GN, Bates ER, Bittl JA, et al. 2016 ACC/AHA guideline focused update on duration of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 152(5): 1243–1275. DOI: [10.1016/j.jtcvs.2016.07.044](https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.07.044).
- 43 Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, et al. 2017 ESC focused

- update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: the task force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the european society of cardiology (ESC) and of the european association for cardio-thoracic Surgery (EACTS)[J]. *Eurn Heart J*, 2018, 39(3): 213–260. DOI: [10.1093/eurheartj/ehx419](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx419).
- 44 Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes[J]. *New Engl J Med*, 2009, 361(11): 1045–1057. DOI: [10.1056/NEJMoa0904327](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904327).
- 45 Mahaffey KW, Wojdyla DM, Carroll K, et al. Ticagrelor compared with clopidogrel by geographic region in the Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial[J]. *Circulation*, 2011, 124(5): 544–554. DOI: [10.1161/circulationaha.111.047498](https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.047498).
- 46 Yang Q, Yang Z, Cai X, et al. Advances in methodologies of negative controls: a scoping review[J]. *J Clin Epidemiol*, 2024, 166: 111228. DOI: [10.1016/j.jclinepi.2023.111228](https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2023.111228).

收稿日期: 2025 年 11 月 29 日 修回日期: 2025 年 12 月 05 日
本文编辑: 冼静怡 杨 燕