DOI:10.16016/j.1000-5404.202009207

重庆市大学生 PAEs 低剂量暴露与精液参数、性激素水平的关联分析及安全限值比较

王艺蒙,陈 卿,刘 坤,杨 桓,周妮娅,孙 磊,邹 鹏,凌 曦,敖 琳,刘晋祎,曹 佳 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所

[**摘要**] **目的** 分析增塑剂邻苯二甲酸酯类(phthalates,PAEs)中具有参考剂量值(reference doses, RfD)的邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二正丁酯(DnBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBzP)与男性精液参数和性激素水平的关联,并对 RfD 的安全性进行评估。**方法** 研究对象来源于 2013 年重庆大学生男性生殖健康研究队列(male reproductive health in Chongqing college students, MARHCS)。检测 796 名研究对象尿中 PAEs 代谢产物,估算 PAEs 摄入量,采用最优尺度回归分析其与精液参数、性激素水平的关联;Joinpoint 回归模型分析上述关联中是否存在拐点,并与 RfD 比较。**结果** 除 BBzP 代谢产物在大部分个体低于检出限外,其余 3 种 PAEs(DEP、DnBP、DEHP)暴露中位数分别为 0.1、1.0、4.3 μg/(kg·d),低于相应 RfD[800、100、20 μg/(kg·d)]和健康指导值[30、10、50 μg/(kg·d)]。DEP 的代谢产物 MEP 与精子前向运动、正常形态率和睾酮水平相关($P<0.01$);DnBP 的代谢产物 MnBP 与精子正常形态率相关($P<0.05$);DEHP 的 4 种代谢产物中,MEHHP 和 MECPP 与雌激素水平相关($P<0.05$),MEOHP 和 MEHP 与雌激素和孕酮水平相关($P<0.01$);其中仅 DEHP 与部分参数关联中存在拐点[阈剂量为 2.9~3.6、5.0~5.8 μg/(kg·d)]。**结论** 重庆市大学生 PAEs 暴露与精液参数和性激素水平存在 12 项关联,PAEs 低于 RfD 仍可能导致男性生殖损害。

[**关键词**] 邻苯二甲酸酯;精液参数;性激素水平;参考剂量;MARHCS 队列
[**中图法分类号**] R181.37; R698; R994.6 [**文献标志码**] A

Analysis of semen parameters and sex hormones under low-dose PAEs exposure in Chongqing college students and comparison with reference dose

WANG Yimeng, CHEN Qing, LIU Kun, YANG Huan, ZHOU Niya, SUN Lei, ZOU Peng, LING Xi, AO Lin, LIU Jinyi, CAO Jia Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the associations of diethyl phthalate (DEP), di-n-butyl phthalate (DnBP), di(2-ethyl)hexyl phthalate (DEHP) and butyl benzyl phthalate (BBzP) [which have reference doses (RfD) in the plasticizer, phthalates (PAEs)] with semen parameters and sex hormone levels in the young male adults, and evaluate the safety of RfD. **Methods** A total of 796 subjects were sampled from our previously established cohort of the male reproductive health in Chongqing college students (MARHCS) study. The contents of PAEs metabolites were detected in the urine samples of the subjects to estimate the daily intake of PAEs. Optimal scaling regression analysis was used to test their associations of the contents with semen parameters and sex hormone levels. Joinpoint regression model was applied to explore whether there were inflection points in the above associations, and the results were compared with RfD. **Results** Except for the metabolite of BBzP (MBzP) below the detection limit in the most individuals, the median daily intake of the other 3 PAEs was 0.1, 1.0 and 4.3 μg/(kg·d) for DEP, DnBP and DEHP, which were all significantly lower than the corresponding RfD [800, 100 and 20 μg/(kg·d)] and health guidance values [30, 10 and 50 μg/(kg·d)]. The metabolite of DEP (MEP) was correlated with the progressive motility, normal sperm morphology, and testosterone level ($P<0.01$); DnBP metabolite (MnBP) was correlated with

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81630087);国家重点研发计划(2017YFC1002001)
[**通信作者**] 曹 佳,E-mail: caojia1962@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

normal sperm morphology ($P<0.05$). Among the 4 metabolites of DEHP, MEHHP and MECPP were related to estrogen level ($P<0.05$), and MEOHP and MEHP to estrogen and progesterone levels ($P<0.01$). But, inflection points were only observed in the correlations between DEHP and some parameters [threshold doses are 2.9~3.6 and 5.0~5.8 μg/(kg·d)]. **Conclusion** There are 12 kinds of associations of PAEs exposure with semen parameters and sex hormone levels in college students in Chongqing. PAEs, though below RfD, can still causes male reproductive damage.

[**Key words**] phthalates; semen parameters; sex hormone level; reference dose; MARHCS cohort

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81630087) and the National Key R&D Program of China (2017YFC1002001).
Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

邻苯二甲酸酯(phthalates,PAEs)是一类重要的环境污染物,主要包括邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[di(2-ethylhexyl) phthalate,DEHP]、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate,DBP)、邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate,DEP)等十多种,是一类广泛存在于环境中的化合物[1]。PAEs 的代谢产物可以在血液、尿液和精液中检测出来,尿液排泄是 PAEs 的主要排泄途径之一。PAEs 的环境健康危害近年来受到了广泛关注。很多研究发现其对人类和动物的危害,例如 DEHP 能干扰脂肪代谢[2]、引起肝脏和生殖发育毒性等[3];DBP 可以诱导生精细胞的氧化应激和线粒体途径的凋亡[4]。一些研究也发现了 PAEs 能引起人类男性生殖损害,WANG 等[5]发现在不育男性尿液中 PAEs 代谢产物含量高于对照组男性;BLOOM 等[6]发现在普通男性群体中,PAEs 代谢产物与精子总数减少有关。由于 PAEs 具有较强的危害性,多个机构都制定了相应的安全摄入限值。美国环境保护局提出了用于预防人群在终身暴露于 PAEs 情况下,发生非致痛或非致突变有害效应的危险度低至不能检出的程度的值——参考剂量(reference doses, RfD)。DEHP、DEP、邻苯二甲酸二正丁酯(DnBP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBzP)的 RfD 分别为 20、800、100、200 μg/(kg·d)[7-8];欧洲食品安全局发布了对于 DEHP 和 DnBP 的每日可容忍摄入量分别为 50、10 μg/(kg·d)[9]。我国国家食品安全风险评估专家委员会则参考各组织的安全限值,规定了用于 DEHP、DEP、DnBP 的健康指导值为 50、30、10 μg/(kg·d)[10-11]。目前,安全限值的制定方法主要基于动物实验,缺少人群研究的验证,并且没有充分考虑生殖损害方面的影响。同时,PAEs 的暴露对男性生殖损害的人群研究中,主要关注其引起的靶器官功能的损害及机制,很少关注引起生殖健康损害的拐点。因此,采用现有 PAEs 的安全限值用于保护生殖系统可能存在缺陷,需要从人群的角度出发,探究 PAEs 在生殖系统是否存在安全限值并验证目前的安全限值是否有效。

本研究检测具有 RfD 的 4 种 PAEs(DEP、DnBP、DEHP、BBzP)在尿液中的 7 种代谢产物:monoethyl phthalate (MEP), mono-n-butylphthalate (MnBP), mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP), mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP), mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP), mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), monobenzyl phthalate (MBzP),估算人群中 PAEs 暴露水平,并分析其与精液参数和性激素水平等结局指标的关联,进而采用 Joinpoint 回归模型分析在 PAEs 暴露水平与精液参数和性激素的关联中是否存在拐点(阈剂量),并与 RfD 和健康指导值进行比较,为重新制定参考值提供研究数据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究的调查人群来源于重庆大学生男性生殖健康研究队列(male reproductive health in Chongqing college students, MARHCS)。MARHCS 队列旨在研究环境等因素与男性生殖健康的关系,研究设计和实施的相关细节见前期研究[12]。2013 年 6 月,在重庆大学城地区男性在读大学生中招募志愿者,纳入标准:①禁欲时间为 2~7 d;②年龄≥18 岁;③在重庆大学城就读的健康男性大学生。排除标准:①患有泌尿生殖系统疾病(附睾炎、睾丸损伤、泌尿生殖系统炎症、睾丸下降不全、精索静脉曲张);②在调查现场由医师诊断的下述任一情况:隐睾、附睾结节、乳腺发育异常、喉结发育异常、阴茎异常、阴毛发育异常;③其他遗传病史或严重疾病。共有 796 名志愿者符合标准并纳入研究。全部志愿者完成了采集年龄、吸烟、饮酒及禁欲天数信息的调查问卷,同时测量身高和体质量并计算体质量指数(BMI)。本研究通过第三军医大学伦理委员会审查(1.0/2013.4-12),所有志愿者被告知本研究的目的、性质、方法及可能的不良反应等信息并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 尿液样本中邻苯二甲酸酯代谢产物的检测

用玻璃试管采集志愿者的中段尿样本,并采用高效

液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法对尿液中 PAEs 代谢产物(包括 MEP、MnBP、MBzP、MEHHP、MECPP、MEOHP、MEHP)的浓度进行检测。该检测委托中国测试技术研究院生物研究所完成。各代谢物检出限分别为 MEP:0.33,MnBP:0.63,MBzP:0.09,MEHHP:0.13,MECPP:0.27,MEOHP:0.07,MEHP:0.42,单位:ng/mL。同时采用自动生化检测仪 CL8000(Shimazu,日本)测定尿中肌酐浓度用于校正尿浓缩程度对 PAEs 浓度的影响,从而计算尿液样本中 PAEs 代谢产物的浓度,结果表示为代谢产物/肌酐浓度[13]。DEHP 代谢产物总浓度的计算公式如下。

$$\Sigma DEHPm = MEOHP + MECPP + MEHHP + MEHP$$

用 WITTASSEK 等[14]的方法将肌酐校正后的 PAEs 代谢产物浓度换算成 PAEs 原型的暴露量,并与 RfD 进行比较。

1.2.2 精液参数检测 志愿者通过 WHO 推荐的手淫法采集精液样本。具体的采集与检测步骤见前期研究[15-16]。精液体积采用称量法测量(根据世界卫生组织标准,计 1 g=1 mL),随即将精液置于 37 ℃恒温孵育箱液化,将液化后的精液混匀并取 10 μL 置于人类精子专用玻片,采用计算机辅助分析系统(CASA System; Microptic S L, 西班牙)分析报告精子浓度(10^6/mL)和前向运动(%)。通过将精液体积和精子浓度相乘得到精子总数。另取 10 μL 精液样本涂片,用无水乙醇固定 30 min 后,采用 Diff-Quick 染色法分析精子形态学指标,每张涂片至少观察 200 个精子,以头部和尾部都正常的精子为正常精子,报告精子正常形态率。为保证结果准确性和同质性,整个精液分析过程都基于《WHO 人类精液检验与处理实验室手册》(2010 年第 5 版)的要求,由经过培训的同一名专业技术人员采用同一台经过校正的仪器完成。

1.2.3 血清性激素检测 采集志愿者静脉血 5 mL,分离得到血清后,交由本校第一附属医院检验科采用全自动免疫分析仪(Bechman Counter Inc,美国)进行检测,检测方法为微粒子酶促发光法。共检测了 6 种性激素:雌激素、卵泡刺激素、黄体生成素、泌乳素、孕酮、睾酮。

1.3 统计学分析

采用中位数(四分位数)[$M(P_{25},P_{75})$]或例数(%)形式描述数据分布。对于检出率>80%的 PAEs 代谢产物,分析其与各结局指标(精液参数和性激素水平)的关联。由于精液参数和激素水平是非正态分布的,故进行自然对数变换进行后续分析。将邻苯二甲酸酯代谢产物按照等间距分 10 组。将污染物暴露水平转换为分组变量是环境流行病学分析的常用方法,有利于减小污染物测量中的随机误差对分析结果的影响,提高分析结果的可靠性。采用最优尺度回归模型分析 PAEs 与结局指标的关系,并且校正年龄、禁欲天数、BMI、吸烟和饮酒情况。由于本研究中涉及较多个结局指标的分析,为避免多次统计检验导致的假阳性,采用错误发现率方法(false discovery rate, FDR)[17]对 P 值进行校正。在最优尺度回归模型中发现的有统计学意义的关联,进一步采用 Joinpoint 回归模型的方法探究此关联中是否存在拐点。上述统计分析使用 SPSS 21.0、R 4.0.1 以及 Joinpoint Regression Program 4.7.0.0 软件完成。

2 结果

2.1 人群基本特征

796 名男性大学生志愿者年龄为 20(20,21)岁,禁欲天数为 4(3, 6)d。志愿者精子总数、前向运动、正常形态率为:183.6(97.7,300.6)×10^6、88.5(79.7,94.8)%、8.4(6.4,10.3)%;血清性激素水平分别为雌激素:19.0(10.0,27.0)pg/mL,卵泡雌激素:3.5(2.6,4.7)mIU/mL,黄体生成素:4.0(3.1,5.1)mIU/mL,泌乳素:10.1(8.1,13.7)ng/mL,孕酮:0.5(0.3,0.8)ng/mL,睾酮:4.3(3.5,5.1)ng/mL(表 1)。

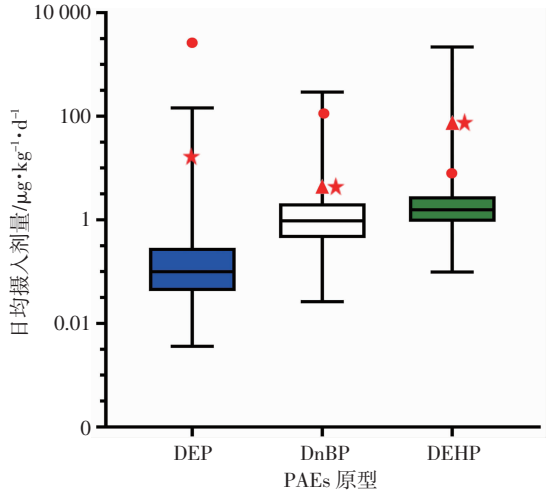
表 1 研究对象的人口学信息、精液参数和性激素水平
[$M(P_{25},P_{75})$,例(%)]

变量	数据分布
年龄/岁	20(20,21)
禁欲时间/d	4(3,6)
BMI/kg·m^{-2}	
<18.5	90(11.3)
18.5~<24.0	597(75.1)
24.0~<28.0	87(10.9)
≥28.0	21(2.7)
吸烟	
从不吸烟	593(74.7)
已戒烟	30(3.8)
吸烟	171(21.5)
饮酒	
不饮酒	409(51.6)
已戒酒	10(1.2)
饮酒	374(47.2)
精子总数(×10^6)	183.6(97.7,300.6)
前向运动(%)	88.5(79.7,94.8)
正常形态率(%)	8.4(6.4,10.3)
雌激素/pg·mL^{-1}	19.0(10.0,27.0)
卵泡刺激素/mIU·mL^{-1}	3.5(2.6,4.7)
黄体生成素/mIU·mL^{-1}	4.0(3.1,5.1)
泌乳素/ng·mL^{-1}	10.1(8.1,13.7)
孕酮/ng·mL^{-1}	0.5(0.3,0.8)
睾酮/ng·mL^{-1}	4.3(3.5,5.1)

2.2 PAEs 暴露分析

共检测 4 种具有 RfD 的 PAEs(DEP、DnBP、DEHP、BBzP)的 7 种代谢产物。除 BBzP 的代谢产物 MBzP 的检出率(35.6%)较低外,DEP、DnBP、DEHP 的 6 种代谢产物的检出率分别为 MEP(99.6%)、MnBP(100%)、MEHHP(97.3%)、MECPP(99.9%)、MEOHP(97.2%)、MEHP(100%)。由于 MBzP 的检出率过低,检测结果无法准确定量反映研究人群的暴露水平,因此最终纳入了其余 6 种代谢产物用于后续的分析。采用"中位数(四分位数)"形式对 6 种代谢产物进行统计学描述,分别为 MEP:7.6(3.2, 21.8)μg/g 肌酐、MnBP:16.0(8.3, 32.9)μg/g 肌酐、MEHHP:2.8(1.3, 6.0)μg/g 肌酐、MECPP:43.5(20.3, 95.6)μg/g 肌酐、MEOHP:2.1(1.0, 4.1)μg/g 肌酐、MEHP:6.1(3.6, 11.1)μg/g 肌酐。DEHP 的 4 种代谢物总浓度(DEHPm)为 28.7(15.6, 54.6)μg/g 肌酐。

根据 PAEs 代谢产物浓度推算其 3 种原型 DEP、DnBP、DEHP 的暴露水平,分别为:0.1(0.04, 0.3)、1.0(0.6, 2.10)、4.3(2.5, 7.8)μg/(kg·d),与 RfD、每日可容忍摄入量和健康指导值进行比较,结果显示:人群中 3 种 PAEs 暴露水平高于 RfD 的比例为 DEP: 0、DnBP:0.08%、DEHP:1.60%;高于每日可容忍摄入量的比例为 DnBP:2.3%,DEHP:0.6%;高于健康指导值的比例为 DEP: 0.2%;DnBP:2.3%;DEHP:0.6%(图 1)。

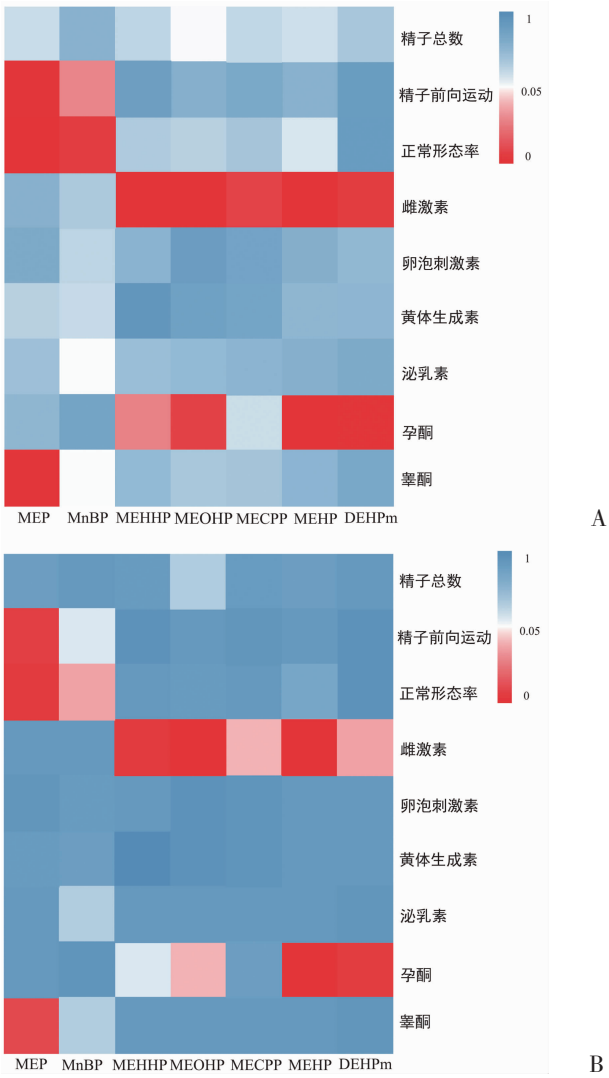


采用 WITTASSEK 等[14]的方法换算 3 种 PAEs 原型的外暴露水平,红色圆点表示美国环保局制定的 RfD;红色三角表示欧洲食品安全局制定的每日可容忍摄入量;红色五角星表示中国国家食品安全风险评估专家委员会制定的健康指导值;纵坐标由对数分布形式表示;BBzP 的代谢产物 MBzP 因检出率过低(35.6%)未在图中展示

图 1 3 种 PAEs 原型的分布

2.3 PAEs 与精液参数及性激素水平的关联分析

DEP 的代谢产物 MEP 与 3 种精液参数/性激素水平相关,分别是精子前向运动、正常形态率和睾酮水平($P<0.01$);DnBP 的代谢产物 MnBP 与精子前向运动比和正常形态率相关($P<0.05$);DEHP 的 4 种代谢产物与两种性激素水平相关,其中 MEHHP 与雌激素和孕酮水平相关($P<0.05$),MECPP 与雌激素水平相关($P<0.01$),MEOHP 与雌激素和孕酮水平相关($P<0.01$),MEHP 与雌激素和孕酮水平相关($P<0.01$);DEHP 总代谢产物雌激素和孕酮水平相关($P<0.01$,图 2A)。采用 FDR 法进行多重检验的校正后,除 MEHHP 与孕酮水平、MnBP 与精子前向运动的关联不再有统计学意义,其他 12 项关联仍然存在(图 2B)。



结果采用最优回归分析方法得出,校正了年龄、BMI、禁欲天数、吸烟、饮酒等潜在混杂因素,其中具有统计学意义的关联($P<0.05$)以红色标记

A:未经 FDR 多重检验校正;B:以 FDR 法进行多重检验校正

图 2 PAEs 与精液参数和激素水平的关联分析

2.4 PAEs 与精液参数及性激素水平关联的阈值分析

Joinpoint 回归模型分析结果显示:随着 DEHP 总代谢产物浓度的升高,雌激素水平呈现先升高后下降的变化趋势(图 3A),拐点数量为 1,出现在 DEHP 总代谢产物浓度为 20~25 μg/g 肌酐时(表 2),对应的 DEHP 日均摄入量为 2.9~3.6 μg/(kg·d);MEHP 与雌激素的关系同样呈现先升高后下降的趋势,拐点位置出现在 8~10 μg/g 肌酐时(图 3B),对应的 DEHP 日均摄入量与前述水平相同[2.9~3.6 μg/(kg·d)];孕酮水平呈现先降低后升高的趋势,拐点位置在 14~16 μg/g 肌酐,逆推 DEHP 日均摄入量为 5.0~5.8 μg/(kg·d)(图 3C)。上述拐点剂量明显小于 RfD[20 μg/(kg·d)],更低于欧洲食品安全局制定的每日可容忍摄入量和中国国家食品安全风险评估专家委员会制定的健康指导值[50 μg/(kg·d)]。

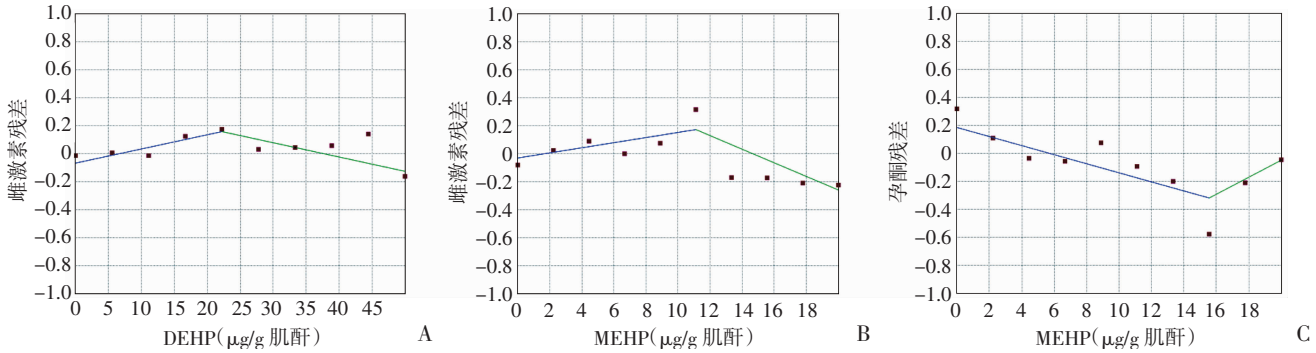
表 2 PAEs 与精液参数及性激素水平的拐点分析

PAEs	结局指标	*P* 值	拐点数量
MEP	精子前向运动	0.826	0
	正常形态率	0.598	0
	睾酮	0.410	0
MnBP	精子前向运动	0.914	0
	正常形态率	0.726	0
MEHHP	雌激素	0.146	0
	孕酮	0.473	0
MECPP	雌激素	0.146	0
MEHP	雌激素	0.050	1
	孕酮	0.081	1
DEHPm	雌激素	0.047	1
	孕酮	0.158	0

3 讨论

PAEs 作为地表污染最广泛的环境毒物,目前其安全限值的制定方法主要是基于动物实验得到的未观察到有害作用的剂量(no observable adverse effect level,NOAEL)或观察到有害作用的最低剂量(lowest observed adverse effect level, LOAEL)除以一定的不确定/安全系数的值,在限值的制定过程中缺少人群研究的验证,并且没有充分考虑生殖损害方面的影响。本研究在 796 名男性大学生尿液中分析 4 种具有安全限值的 PAEs 的代谢产物,结果提示:除 BBzP 的代谢产物 MBzP 检出率较低外,其余 3 种 PAEs 的 6 种代谢产物具有较高的检出率,且与多种精液参数和性激素水平存在关联。DEHP 与雌激素及孕酮的关联中存在拐点,拐点处暴露水平分别为 2.9~3.6、5.0~5.8 μg/(kg·d),明显低于 RfD[20 μg/(kg·d)]和中国的健康指导值[50 μg/(kg·d)]。更值得关注的是,大部分 PAEs 与精液参数和激素水平的关联中并不存在拐点,提示在本研究检测到的较低浓度的 PAEs 暴露水平下,其对于男性生殖的损害作用已经存在。

相比于普通线性回归模型,最优尺度回归分析的优点在于可以将分类变量的取值进行量化处理,提高回归分析的效能,是一种用于处理有序分类变量的常用回归分析方法。最优尺度回归分析方法本身没有适宜的用于估算样本量的公式,但与先前的阳性结果相比[18-19],本研究的样本量相对较大,且在经过多重检验校正之后,PAEs 与结局指标间的关联仍然存在,提示现有的样本量具有足够的统计效能。在 PAEs 代谢产物与结局指标存在关联的情况下,采用 Joinpoint 回归模型进行拐点的探究,Joinpoint回归模型是通过将



横坐标为 PAEs 代谢产物的浓度;纵坐标为经过最优尺度回归校正的性激素水平;校正因素包括年龄、BMI、吸烟、饮酒、禁欲天数
A:DEHP 总代谢物与雌激素的关系;B:MEHP 与雌激素的关系;C:MEHP 与孕酮的关系

图 3 DEHP 暴露剂量与雌激素及孕酮关联的拐点分布

趋势变化分成若干有统计学意义的趋势区段,能探索一般线性回归不能发现的非线性变化趋势,可识别PAEs导致结局指标发生变化的拐点。

本研究发现PAEs与多种精液参数相关,这与其他人群报道相似。例如,WIRTH等[20]报道密歇根州男性尿液中DnBP浓度与精子前向运动呈现负相关;SPECHT等[21]在对589名男性的研究中发现DEHP与雌激素水平相关等。不同之处在于,本研究从评估PAEs引起损害作用的拐点出发,通过逆推引起生殖损害作用的暴露水平并与RfD和健康指导值进行比较,评估现有安全限值的可靠性。此外,其他研究主要以不育男性为研究对象,而本课题的研究对象为健康男性大学生,更能代表普通人群暴露于PAEs产生的影响,且人群内同质性较好,有利于排除职业暴露、受教育程度等混杂因素的影响。PAEs引起精液参数和激素水平紊乱的机制较为复杂。有研究指出:PAEs可通过诱导氧化应激反应抑制睾酮的生成[22];也可通过引起表观遗传修饰(例如甲基化改变)从而引起精子前向运动能力改变[23];还可通过诱导细胞凋亡引起睾丸功能的损害等[24]。本研究发现暴露于PAEs能引起性激素水平的改变,且其剂量-反应关系可能并非简单的线性形式,而是可能存在低剂量兴奋效应,这也与最新的动物和细胞研究发现相似[25]。

本研究也存在几点不足:①本研究属于观察性研究,无法探究PAEs与精液参数和性激素水平的确切因果关系,需要进一步验证目前发现的PAEs对精液参数和性激素的效应;②本研究的抽样方式属于方便抽样,虽然具有一定样本量,但不能排除存在选择偏倚的可能性;③精液参数存在一定的个体内部变异,而本研究中对每名研究对象只检测1次精液参数,这可能增加本研究中的无差异性错分,从而降低发现PAEs与精液参数关联的统计效能;④研究表明精液参数和激素水平受环境多方面因素的影响,本研究按照一般研究的做法[26-27],校正了年龄、禁欲天数、吸烟、饮酒等混杂因素,但本研究可能存在未知的混杂因素,需要独立研究进行验证。

综上所述,本研究分析了4种PAEs与精液参数和性激素水平的关联性,除BBzP代谢产物因检出率较低无法进行后续分析外,其余3种PAEs与多种精液参数和性激素水平存在关联。DEHP与性激素水平的关联存在拐点,但对应的暴露水平低于RfD和我国的健康指导值;而其他PAEs在远低于RfD和健康指导值的情况下仍与精液参数和性激素水平相关,且未发现拐点。这提示现有的安全限值可能不足以用于预防PAEs对男性生殖系统产生的影响。

参考文献:

[1] 王文枝, 国伟, 孙利, 等. 食品包装材料中DEHP的危害及其在食品中的暴露评估[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 166-168.
WANG W Z, GUO W, SUN L, *et al*. The hazard and exposure assessment of DEHP in food contact materials[J]. Food Sci Technol, 2008, 33(4): 166-168.

[2] CHIANG H C, KUO Y T, SHEN C C, *et al*. Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(3): 589-601. DOI:10.1007/s00204-014-1446-9.

[3] KARABULUT G, BARLAS N. Genotoxic, histologic, immunohistochemical, morphometric and hormonal effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on reproductive systems in pre-pubertal male rats[J]. Toxicol Res, 2018, 7(5): 859-873. DOI:10.1039/c8tx00045j.

[4] ZHANG G, YANG W, JIANG F, *et al*. PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells[J]. Toxicol Lett, 2019, 308: 24-33. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.03.007.

[5] WANG S Y, WANG Y, XIE F Q, *et al*. Analysis of PAEs in semen of infertile men[J]. Int J Occup Environ Health, 2015, 21(1): 40-48. DOI: 10.1179/2049396714y.0000000088.

[6] BLOOM M S, WHITCOMB B W, CHEN Z, *et al*. Associations between urinary phthalate concentrations and semen quality parameters in a general population[J]. Hum Reprod, 2015, 30(11): 2645-2657. DOI: 10.1093/humrep/dev219.

[7] STRASSLE P D, SMIT L, HOPPIN J A. Endotoxin enhances respiratory effects of phthalates in adults: Results from NHANES 2005-6[J]. Environ Res, 2018, 162: 280-286. DOI:10.1016/j.envres.2018.01.017.

[8] JOHNS L E, COOPER G S, GALIZIA A, *et al*. Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates[J]. Environ Int, 2015, 85: 27-39. DOI: 10.1016/j.envint.2015.08.005.

[9] SILANO V, BARAT B J, BOLOGNESI C, *et al*. Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials[J]. EFSA J, 2019, 17(12): e5838. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5838.

[10] 王彝白纳, 蒋定国, 杨大进, 等. 中国居民邻苯二甲酸二丁酯膳食摄入水平及其风险评估[J]. 中国食品卫生

杂志, 2016, 28(6): 800-804.
WANG Y B N, JIANG D G, YANG D J, *et al*. Dietary intake and risk assessment of dibutyl phthalate in Chinese population[J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(6): 800-804.

[11] 隋海霞, 蒋定国, 吴平谷, 等. 中国居民邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯膳食摄入水平及其风险评估[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(3): 218-222.
SUI H X, JIANG D G, WU P G, *et al*. Dietary intake and risk assessment of diethylhexyl phthalate in Chinese populations[J]. Chin J Prev Med, 2015, 49(3): 218-222.

[12] YANG H, CHEN Q, ZHOU N, *et al*. Lifestyles associated with human semen quality: results from MARHCS cohort study in Chongqing, China[J]. Medicine (Madr), 2015, 94(28): e1166. DOI:10.1097/md.0000000000001166.

[13] CHEN Q, YANG H, ZHOU N, *et al*. Phthalate exposure, even below US EPA reference doses, was associated with semen quality and reproductive hormones: Prospective MARHCS study in general population[J]. Environ Int, 2017, 104: 58-68. DOI:10.1016/j.envint.2017.04.005.

[14] WITTASSEK M, KOCH H M, ANGERER J, *et al*. Assessing exposure to phthalates—The human biomonitoring approach[J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(1): 7-31. DOI:10.1002/mnfr.201000121.

[15] LIU K, HOU G, WANG X, *et al*. Adverse effects of circadian desynchrony on the male reproductive system: an epidemiological and experimental study[J]. Hum Reprod, 2020, 35(7): 1515-1528. DOI: 10.1093/humrep/deaa101.

[16] WANG X, CHEN Q, ZOU P, *et al*. Sleep duration is associated with sperm chromatin integrity among young men in Chongqing, China[J]. J Sleep Res, 2018, 27(4): e12615. DOI:10.1111/jsr.12615.

[17] BENJAMINI Y, HOCHBERG Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing[J]. J R Stat Soc Series B Stat Methodol, 1995, 57(1): 289-300. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

[18] AL-SALEH I, COSKUN S, AL-DOUSH I, *et al*. The relationships between urinary phthalate metabolites, reproductive hormones and semen parameters in men attending in vitro fertilization clinic[J]. Sci Total Environ, 2019, 658: 982-995. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.12.261.

[19] THURSTON S W, MENDIOLA J, BELLAMY A R, *et al*. Phthalate exposure and semen quality in fertile US men[J]. Andrology, 2016, 4(4): 632-638. DOI:10.1111/andr.12124.

[20] WIRTH J J, ROSSANO M G, POTTER R, *et al*. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality[J]. Syst Biol Reproductive Med, 2008, 54(3): 143-154. DOI: 10.1080/19396360802055921.

[21] SPECHT I O, TOFT G, HOUGAARD K S, *et al*. Associations between serum phthalates and biomarkers of reproductive function in 589 adult men[J]. Environ Int, 2014, 66: 146-156. DOI:10.1016/j.envint.2014.02.002.

[22] 杨敏, 魏丽, 刘长江. DEHP对大鼠睾丸氧化应激和血清睾酮水平影响[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(11): 1599-1602.
YANG M, WEI L, LIU C J. DEHP-induced testicular oxidative stress and down-regulated serum testosterone in rats[J]. Chin J Public Heal, 2017, 33(11): 1599-1602.

[23] TIAN M P, LIU L P, ZHANG J, *et al*. Positive association of low-level environmental phthalate exposure with sperm motility was mediated by DNA methylation: a pilot study[J]. Chemosphere, 2019, 220: 459-467. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.12.155.

[24] KIJIMA K, TOYOSAWA K, YASUBA M, *et al*. Gene expression analysis of the rat testis after treatment with di(2-ethylhexyl) phthalate using cDNA microarray and real-time RT-PCR[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 200(2): 103-110. DOI:10.1016/j.taap.2004.03.015.

[25] ZHANG Q, HAO L C, HONG Y. Exposure evaluation of diisononyl phthalate in the adults of Drosophila melanogaster: Potential risks in fertility, lifespan, behavior, and modes of action[J]. Comp Biochem Phys C, 2020, 238: 108847. DOI:10.1016/j.cbpc.2020.108847.

[26] AXELSSON J, RYLANDER L, RIGNELL-HYDBOM A, *et al*. Phthalate exposure and reproductive parameters in young men from the general Swedish population[J]. Environ Int, 2015, 85: 54-60. DOI:10.1016/j.envint.2015.07.005.

[27] HUANG L P, LEE C C, HSU P C, *et al*. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air[J]. Fertil Steril, 2011, 96(1): 90-94. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.093.

(**收稿**:2020-09-24;**修回**:2020-10-08)
(编辑 张 维)