DOI:10.16016/j.2097-0927.202212006

重庆市本底砷暴露与男性精子质量及性激素的关联研究

李丽丽[1],杨 桓[2],陈 卿[2],周妮娅[2],周文正[2],陈红燕[2],王艺蒙[2],郭 瑛[1],任 超[2],李 雪[2],曹 佳[2]
030001 太原,山西医科大学公共卫生学院[1];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[2]

[摘要] **目的** 研究青年男性人群尿总砷内暴露水平与精子质量及性激素水平的关联,评估重庆地区本底水平砷暴露对人类精子质量参数及性激素水平的潜在影响。**方法** 采用广义相加模型、递归算法等方法,分析2013-2015年构建的重庆大学生男性生殖健康研究队列中703名男性大学生志愿者(18~22岁)基线尿砷浓度与精液参数、性激素水平间的关联,寻找非线性关系拐点,分析砷暴露阈值效应。横向比较本研究与国内外其他报道的尿砷中位数。**结果** 尿砷水平与精子浓度、精子总数、精子DNA碎片化指数、泌乳素、卵泡刺激素、孕酮之间存在非线性关系,阈值效应分析提示,尿砷浓度与以上指标的关系均存在拐点,分别为15.17、14.17、50.97、57.51、11.36、70.44 μg/L(对数似然比检验 $P<0.05$),阈值剂量以上内暴露水平与精液质量下降显著关联。与国内外相关研究报道相比,本队列人群尿砷处于较低水平。**结论** 与国内外一些地区相比,本研究人群本底尿砷水平较低,其与男性精子质量参数下降及性激素水平改变具有显著关联。

[关键词] 精液质量;性激素;低剂量砷暴露;青年男性;分段线性模型;阈值剂量
[中图法分类号] R181.34; R321.1; R994.6 [文献标志码] A

Association of background-level arsenic exposure with sperm quality and sex hormones in Chongqing males

LI Lili[1], YANG Huan[2], CHEN Qing[2], ZHOU Niya[2], ZHOU Wenzheng[2], CHEN Hongyan[2], WANG Yimeng[2], GUO Ying[1], REN Chao[2], LI Xue[2], CAO Jia[2] [1]School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province, 030001; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To study the relationship of urinary total arsenic exposure level with sperm quality and sex hormone levels in young male population, and evaluate the potential impact of background arsenic exposure on parameters of sperm quality and sex hormone levels in Chongqing. Methods Generalized additive model and recursive algorithm were used to analyze the correlation of the baseline urine arsenic concentration with semen parameters and sex hormone levels in 703 male college students volunteers (18~22 years old) in the cohort of Chongqing college students constructed in 2013-2015. The inflection point of the nonlinear relationship was explored, and the threshold effect of arsenic exposure was analyzed. The median of urinary arsenic in this study was compared with the data from other reports at home and abroad. Results There was a nonlinear relationship of urine arsenic level with sperm concentration, sperm total number, sperm DNA fragment index, and levels of prolactin, follicle-stimulating hormone and progesterone. Further threshold effect analysis showed that there were inflection points of urine arsenic concentration with the above indicators, and the key points were 15.17, 14.17, 50.97, 57.51, 11.36, and 70.44 μg/L, respectively (Log-

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82130097)
[通信作者] 曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

likelihood ratio test $P<0.05$). Compared with relevant literature, the urine arsenic level was at a relatively lower level in this cohort population. **Conclusion** Compared with some regions at home and abroad, the background urine arsenic level of this study population is quite lower, and significant correlation is found in the background level with the decline of sperm quality parameters and changes in sex hormone levels.

[**Key words**] semen quality; sex hormones; low dose arsenic exposure; young men population; piecewise linear model; threshold dose

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82130097). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

砷(arsenic, As)是环境中普遍存在的一种类金属元素,现代工业社会中,燃煤、杀菌剂、除草剂、灭鼠剂应用等人类活动会使 As 进入环境,造成空气、水、土壤污染[1];此外,在许多国家,尤其是亚洲地区,饮用水 As 含量超过了世界卫生组织(WHO)指南推荐的 10 mg/L[2];在我国部分地区,As 的本底暴露水平较高[3]。长期暴露于较高剂量 As 可能对皮肤、心血管、免疫、神经、生殖等系统产生毒性作用,甚至引发功能障碍,导致机体出现多种癌性结局,及心血管疾病、糖尿病、周围神经病变、黑足病、不良妊娠结局等非致癌性健康结局[4]。

男性生殖系统被认为是多种重金属毒性作用的靶器官[5],已有流行病学及实验动物学证据表明 As 暴露可致男(雄)性生殖损伤,但结果存在较大差异。例如,在人类资料研究中,未发现 As 暴露与男性精液质量、性激素水平等的关联[6-7];也有研究显示,接触 As 与男性不育、精液质量差、睾丸激素水平降低等有关[8-13],表明 As 暴露或具有人类生殖毒性。动物实验证实较高剂量 As 具有典型的雄性生殖毒性[14-19]。目前关于 As 对生殖系统毒性效应的研究多见于较高水平暴露、短期暴露的人群研究或体内外模型试验,相比之下,低剂量或环境水平 As 暴露对自然男性人群精液质量、性激素影响的报道还很少。RENU 等[20]研究指出,低剂量 As 暴露能通过睾丸细胞毒性和作为内分泌干扰物(endocrine disrupting chemical, EDC)引起有害生殖结局。然而,低剂量 As 暴露引起男性生殖损害的研究结果并不一致[21-22]。且目前此方面的研究主要集中于暴露引起的功能损害与相关机制。但人群研究报告指出,人类血液、尿液、精浆等生物样本中均有 As 检出[9],其潜在健康风险在近年得到较多关注,尤其是真实世界 As 暴露对健康的影响、敏感靶器官、是否存在致损害阈值及其大小等,成为了重要的公共卫生问题,需要非职业暴露、正常人群的资料。

本研究选取重庆市大学生男性生殖健康队列(male reproductive health in Chongqing college students, MARHCS)志愿者为研究对象,分析尿 As 浓度与男性精子质量参数、性激素水平的关联,研究可能与男性生殖损伤相关联的尿 As 水平;并将本队列人群尿 As 暴露水平与国内外已报道的水平进行横向比较,旨在为环境 As 暴露限值制定提供更新的科学线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为基于队列的横断面研究,选取 2013-2015 年构建的 MARHCS 队列[23]中符合条件的志愿者基线(2013 年)数据。纳入标准:①年龄≥18 岁;②禁欲时间 2~7 d;③在重庆市就读大学的健康男性学生;④尿液 As 水平检测数据符合质量标准。排除标准:①患有睾丸损伤、精索静脉曲张、附睾炎、睾丸下降不全等泌尿生殖系统疾病者;②在调查现场由临床医师诊断为男性性征发育异常:例如隐睾、喉结发育异常、阴毛发育异常、隐睾结节等;③存在其他影响生育的家族遗传疾病或严重疾病者。本研究经第三军医大学伦理委员会审批(1.0/2013.4-12),纳入的研究对象均知情研究,并书面签署知情同意书。最终纳入 703 名研究对象。

1.2 社会-心理-行为调查问卷

以面对面现场问卷调查的方式,收集志愿者的人口学信息、社会-心理-行为方式等信息,现场测定身高与体质量。本研究提取年龄(以身份证号码计算,精确至年)、生活方式包括饮酒(从不饮酒、当前饮酒、曾饮酒)、喝茶(从不喝茶、当前喝茶、曾喝茶)、吸烟(从不吸烟、当前吸烟、曾吸烟)等信息,记录禁欲时间(以 d 为单位),计算体质量指数(body mass index, BMI)。调查现场工作人员经统一培训,采取规范化语言向志愿者说明研究目的、内容、保密性原则,并全程指导志愿者完成问卷填写。

1.3 BMI 计算与分级

在调查现场通过标准方法,采用经过校准的身高、体质量测量仪器测量志愿者的身高、体质量,以公式 BMI=体质量(kg)/身高平方(m^2)计算 BMI。根据 WHO 推荐的 BMI 标准进行分级:消瘦(BMI<18.5 kg/m^2)、正常(BMI:18.5~<24.0 kg/m^2)、超重(BMI:24.0~<28.0 kg/m^2)、肥胖(BMI≥28.0 kg/m^2)。

1.4 研究方法

1.4.1 尿As水平测定 尿As水平为尿液中总As浓度,详细测定步骤见前期研究[24]。尿液标本收集后存储于-80 ℃直至分析。标本自冰箱取出后置于45 ℃水浴中3 min,以12 000 ×*g*离心3 min,取1 mL上清至聚四氟乙烯(PTEE)管中,加入20%浓硝酸3 mL,控制温度消化混合液,即使溶液温度在20 min内逐渐升高至160 ℃并维持30 min,随后在15 min内冷却至70 ℃。将1.5 mL去离子水加入0.5 mL消化后的样品中进行稀释以便下一步检测。

通过iCAP-Q电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS;Thermo Scientific,美国)测定样本中As浓度,最低检测限(limit of detection, LOD)设定为0.002 μg/L,重复分析每50份尿液样本与质控样品,测量值低于LOD的样本值以LOD/替代。

1.4.2 精液标本的采集和指标检测 有关标本采集和指标检测的具体方法见前期研究[25-26]。参照《WHO人类精液检验与处理实验室手册(2010年第5版)》(以下简称"手册")[27]推荐的手淫法,由现场研究人员采取统一、规范化的语言指导志愿者,在私密空间内自行完成精液标本采集,并记录志愿者样本的接收时间、准确的禁欲时间(以d为单位)。标本接收后立即置于37 ℃孵育至完全液化,并参照手册规范完成精液常规分析。所有分析由同一位专业技术人员完成。具体测定指标为:①根据手册推荐的称量法测定精液体积,以电子天平测量装有精液的采精杯的质量,并减去预称量的空杯质量,计算精液质量,精液密度视为1 g/mL,精液体积=精液质量/精液密度;②采用计算机辅助精子分析法,按仪器(CASA System;Microptic SL,西班牙)使用说明,在人类精子CASA分析专用玻片上置入10 μL液化混匀后的精液,检测精子浓度及精子运动能力等参数;③精子总数为精液体积与精子浓度乘积;④根据手册推荐,取10 μL精液标本涂片,用96%的酒精固定0.5 h,以diff-quick法染色,评价精子形态学指标,每份样本涂片3张,每张涂片观察至少200条精子,报告正常形态率;⑤DNA碎片化指数、高DNA染色性均通过精子染色质结构分析法(sperm chromation structure assay, SCSA)评估。

1.4.3 血清性激素检测 血液标本采集、性激素测定的具体方法见前期研究[26]。采集5 mL静脉血标本,避光静置后以1 000 r/min离心10 min,提取0.8 mL血清。委托陆军军医大学第一附属医院临床实验室完成6项性激素水平的测定:包括雌二醇、黄体生成素、泌乳素、卵泡刺激素、孕酮、睾酮,统一使用免疫分析仪(Beckman Unicel Dxi 800,美国)检测。

1.5 统计学分析

精液参数、性激素水平经Kolmogorov-Smirnov正态性检验,对于符合正态分布的连续性资料以$\bar{x}\pm s$描述,否则以中位数(四分位数)[$M(P_{25},P_{75})$]描述;计数资料以例数(%)描述。根据连续变量分布形式,选择Student *t*检验、单因素方差分析、Mann-Whitney *U*检验、Kruskal-Wallis检验分析不同人口学特征、生活行为方式志愿者的精液参数及性激素分布差异;基于广义相加模型(generalized additive models, GAM),在校正年龄、BMI分级、禁欲时间、饮酒、喝茶、吸烟后,拟合尿As水平与精液参数、性激素指标之间的线性或非线性关联;若存在非线性关联,则根据递归算法计算潜在阈值,依据阈值进一步采取分段线性回归模型拟合两者剂量-反应关系。检验水准$\alpha=0.05$。上述分析使用SPSS(V26.0)、EmpowerStats(v4.1)及R(V4.1.2)统计软件完成。

2 结果

2.1 不同人口学特征、生活行为方式志愿者精液参数、性激素水平的差异

703名男性大学生志愿者年龄为20(20,21)岁,禁欲时间3(4,6)d,血清性激素水平:雌二醇19.0(10.0,27.0) pg/mL,黄体生成素4.1(3.1,5.1) mIU/mL,泌乳素10.1(8.7,13.5) ng/mL,卵泡刺激素3.6(2.6,4.9) mIU/mL,孕酮0.5(0.3,0.8) ng/mL,睾酮4.3(3.5,5.1) ng/mL;精子质量参数:精液量3.4(2.5,4.5)mL,精子浓度54.4(31.9,85.6)×10^6/mL,精子总数185.4(98.8,313.0)×10^6,精子活力(56.0±16.6)%,精子活率88.5%(79.6%, 94.8%),正常形态率8.4%(6.4%, 10.3%),DNA碎片化指数12.1%(7.1%,20.8%),高DNA着色性3.9%(2.3%,9.2%)。年龄>20岁的志愿者LH水平高于年龄≤20岁组,差异有统计学意义($P<0.05$);不同BMI分级的志愿者黄体生成素、孕酮、睾酮的差异有统计学意义($P<0.05$);吸烟与否进行组间比较时,精子总数、卵泡刺激素的差异有统计学意义($P<0.05$);孕酮在饮酒与否组间比较、精子活力在喝茶与否组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表 1 不同人口学特征、生活行为方式志愿者精液参数、性激素水平的差异[$M(P_{25}, P_{75})$,$\bar{x}\pm s$]

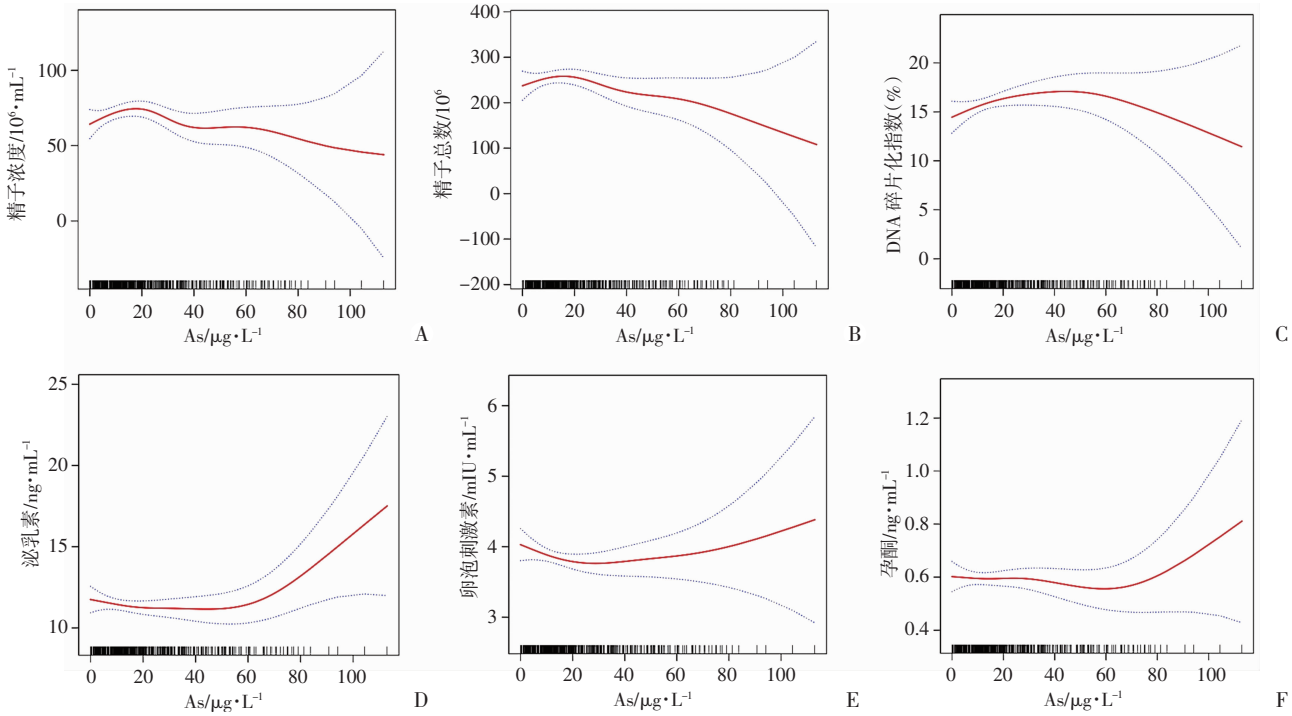
因素	n	精液量/mL	精子浓度/$10^6\cdot mL^{-1}$	精子总数/10^6	精子活力(%)	精子活率(%)	正常形态率(%)	DFI(%)
年龄/岁	703							
≤20	420	3.5(2.5, 4.7)	55.5(32.6, 85.8)	191.9(100.2, 311.2)	56.2±16.5	88.9(79.9, 95.0)	8.5(6.2, 10.4)	11.8(6.8, 19.4)
>20	283	3.3(2.5, 4.2)	52.0(31.2, 85.4)	174.5(97.5, 316.9)	55.6±16.8	88.2(79.1, 94.7)	8.3(6.5, 10.3)	12.8(7.6, 22.1)
P		0.116	0.917	0.749	0.645	0.360	0.674	0.144
BMI[a]/$kg\cdot m^{-2}$	702							
<18.5	80	3.4(2.6, 4.4)	52.4(34.2, 74.7)	189.7(106.3, 295.3)	58.6±15.5	90.5(79.8, 95.3)	8.6(6.9, 10.5)	11.3(6.8, 18.3)
18.5~<24.0	527	3.5(2.5, 4.6)	54.7(31.2, 86.1)	188.7(97.8, 318.2)	55.6±16.8	88.5(79.5, 94.7)	8.4(6.4, 10.4)	12.0(7.0, 20.8)
24.0~<28.0	76	3.1(2.4, 4.3)	47.5(32.1, 86.1)	147.8(98.8, 309.4)	56.6±16.3	87.8(80.8, 94.5)	8.3(6.2, 10.3)	13.1(8.6, 22.1)
≥28.0	19	2.9(2.5, 4.0)	63.7(33.8, 85.5)	170.0(90.4, 241.3)	51.9±16.9	81.3(75.8, 93.4)	7.1(5.0, 7.9)	12.7(6.3, 21.7)
P		0.286	0.953	0.694	0.328	0.376	0.158	0.614
吸烟[a]	701							
否	522	3.4(2.5, 4.7)	55.6(33.5, 88.3)	194.9(103.7, 334.4)	55.5±16.6	88.1(79.5, 94.8)	8.4(6.3, 10.3)	11.8(7.1, 20.6)
是	151	3.4(2.4, 4.1)	50.9(29.6, 77.2)	148.2(85.6, 252.7)	58.0±16.7	89.8(79.3, 95.0)	8.5(6.5, 10.8)	12.9(6.6, 21.1)
曾经吸烟	28	3.8(2.7, 4.8)	54.4(27.8, 90.2)	190.7(129.0, 298.4)	52.9±15.9	86.0(79.0, 93.7)	7.5(6.5, 9.6)	14.0(7.9, 22.9)
P		0.214	0.175	0.011	0.167	0.455	0.434	0.710
饮酒[a]	700							
否	362	3.4(2.4, 4.6)	53.9(33.2, 87.8)	189.1(106.0, 300.3)	55.2±16.6	88.1(79.1, 94.7)	8.3(6.4, 10.3)	11.9(7.1, 19.9)
是	329	3.4(2.5, 4.4)	53.1(31.2, 84.5)	182.0(91.2, 317.2)	57.0±16.5	89.4(80.0, 94.8)	8.5(6.5, 10.5)	12.0(7.0, 21.2)
曾经饮酒	9	3.6(3.0, 5.2)	66.7(17.5, 204.6)	231.4(41.5, 726.2)	48.0±17.6	85.6(72.6, 92.8)	5.9(4.9, 8.4)	21.6(11.5, 29.7)
P		0.751	0.860	0.530	0.132	0.370	0.070	0.186
喝茶[a]	701							
否	461	3.4(2.5, 4.4)	53.1(33.3, 86.4)	183.6(97.3, 300.8)	55.6±16.6	88.3(79.5, 95.1)	8.3(6.2, 10.2)	12.1(7.4, 20.2)
是	138	3.6(2.6, 4.7)	57.0(30.2, 86.7)	205.4(111.7, 356.0)	54.2±16.6	88.0(79.1, 93.1)	8.4(6.5, 10.5)	12.0(7.2, 21.9)
曾经喝茶	102	3.2(2.4, 4.5)	53.3(28.3, 84.2)	176.6(80.4, 303.7)	59.8±16.0	90.8(81.9, 95.1)	8.5(6.8, 10.4)	12.1(5.9, 21.7)
P		0.219	0.458	0.186	0.026	0.195	0.564	0.860

因素	n	HDS(%)	E_2/$pg\cdot mL^{-1}$	FSH/$mIU\cdot mL^{-1}$	LH/$mIU\cdot mL^{-1}$	PRL/$ng\cdot mL^{-1}$	P/$ng\cdot mL^{-1}$	T/$ng\cdot mL^{-1}$
年龄/岁	703							
≤20	420	4.1(2.4,8.6)	20.0(10.0, 29.0)	3.6(2.6, 4.8)	3.8(3.0, 5.0)	10.1(8.1, 13.5)	0.5(0.3, 0.8)	4.3(3.5, 5.1)
>20	283	3.6(2.2, 10.2)	18.0(10.0, 26.5)	3.6(2.6, 4.9)	4.3(3.3, 5.3)	10.2(8.0, 13.5)	0.5(0.3, 0.8)	4.1(3.5, 5.1)
P 值		0.659	0.163	0.986	0.002	0.912	0.871	0.579
BMI[a]/$kg\cdot m^{-2}$	702							
<18.5	80	4.4(2.3, 10.3)	18.0(9.3, 26.8)	3.4(2.5, 4.3)	3.3(2.7, 4.7)	10.2(8.3, 13.2)	0.5(0.3, 0.7)	4.4(3.6, 5.1)
18.5~<24.0	527	3.9(2.3, 8.9)	18.0(10.0, 27.0)	3.6(2.6, 5.1)	4.1(3.1, 5.2)	10.2(8.1, 13.7)	0.5(0.3, 0.8)	4.3(3.7, 5.2)
24.0~<28.0	76	3.4(2.2, 9.3)	22.0(12.0, 27.1)	3.4(2.6, 4.4)	4.1(3.4, 5.1)	9.7(8.2, 12.9)	0.5(0.3, 0.7)	3.4(3.0, 4.5)
≥28.0	19	5.5(2.1, 25.6)	25.0(13.0, 34.0)	3.6(2.4, 4.2)	3.7(3.3, 4.6)	9.7(7.8, 12.2)	0.4(0.2, 0.8)	3.0(2.3, 4.3)
P 值		0.601	0.166	0.246	0.010	0.835	0.018	<0.001
吸烟[a]	701							
否	522	3.9(2.3, 9.8)	18.0(10.0, 27.0)	3.6(2.6, 5.0)	4.1(3.1, 5.2)	10.0(8.1, 13.5)	0.5(0.3, 0.8)	4.1 (3.5, 5.0)
是	151	4.0(2.2, 9.0)	21.0(12.0, 29.0)	3.3(2.4, 4.4)	4.1(3.1, 5.0)	10.4(8.0, 13.4)	0.5(0.3, 0.8)	4.5(3.6, 5.3)
曾经吸烟	28	4.1(2.6, 8.2)	15.5(7.3, 26.8)	4.1(2.9, 5.5)	3.9(3.1, 4.7)	10.6(8.2, 14.4)	0.5(0.3, 0.8)	4.3(3.4, 5.2)
P 值		0.873	0.144	0.020	0.704	0.859	0.618	0.073
饮酒[a]	700							
否	362	4.0(2.4, 10.6)	17.0(9.0, 27.0)	3.6(2.6, 4.9)	4.0(3.1, 5.1)	10.1(8.2, 13.5)	0.5(0.3, 0.8)	4.3(3.5, 5.2)
是	329	3.7(2.2, 8.6)	20.0(11.0, 28.0)	3.6(2.6, 4.9)	4.1(3.1, 5.2)	10.0(8.0, 13.4)	0.5(0.3, 0.8)	4.3(3.5, 5.1)
曾经饮酒	9	3.6(2.0, 18.1)	24.0(15.5, 31.0)	3.3(2.7, 3.6)	3.5(2.4, 5.0)	8.9(7.2, 14.4)	0.2(0.1, 0.4)	3.7(2.6, 5.4)
P 值		0.309	0.155	0.713	0.601	0.605	0.010	0.342
喝茶[a]	701							
否	461	4.1(2.4, 9.3)	19.0(10.0, 28.0)	3.6(2.6, 4.9)	4.1(3.1, 5.1)	9.9(8.0, 13.1)	0.5(0.3, 0.9)	4.3(3.6, 5.1)
是	138	4.3(2.3, 10.1)	20.0(10.0, 27.0)	3.5(2.7, 4.9)	4.1(3.2, 5.2)	10.4(8.7, 13.7)	0.5(0.3, 0.8)	4.0(3.3, 5.0)
曾经喝茶	102	3.1(2.0, 7.6)	19.0(11.0, 26.8)	3.6(2.6, 4.9)	3.9(3.0, 5.1)	11.2(8.1, 14.7)	0.5(0.3, 0.7)	4.1(3.4, 5.1)
P 值		0.149	0.770	0.924	0.779	0.101	0.134	0.126

a:数据存在缺失值;DFI:DNA 碎片化指数;HDS:高 DNA 着色性;E_2:雌二醇;FSH:卵泡刺激素;LH:黄体生成素;PRL:泌乳素;P:孕酮;T:睾酮

2.2 尿 As 浓度与精液参数、性激素水平的关系及阈值效应分析

采用多变量校正的平滑曲线拟合图分析发现,尿 As 水平与精子浓度、精子总数、DNA 碎片化指数呈负相关,与泌乳素、孕酮、卵泡刺激素水平呈正相关,但并非呈简单线性相关关系(图 1)。进一步进行阈值效应分析,结果显示,尿 As 浓度与精子浓度、精子总数、DNA 碎片化指数、泌乳素、卵泡刺激素、孕酮关系均存在拐点(分别为 15.17、14.17、50.97、57.51、11.36、70.44 μg/L;对数似然比检验 $P<0.05$),其中,尿 As 在相对低的水平即可观察到与精子浓度、精子总数及卵泡刺激素的改变显著相关。表 2 显示,尿 As 浓度与精子 DNA 碎片化指数的关联出现了明显拐点,尿 As<50.97 μg/L 时,DNA 碎片化指数具有显著正关联(β=0.09,95%*CI*:0.01~0.16,$P=0.021$),而 As≥50.97 μg/L 时 DNA 碎片化指数随 As 浓度升高而降低(β=−0.21,95%*CI*:−0.41~−0.02,$P=0.036$)。



A~F:分别表示基于 GAM 模型,在调整年龄、禁欲天数、饮酒、喝茶、吸烟、BMI 中国人群分级后,尿 As 和精子质量参数(精子浓度、精子总数、DNA 碎片化指数)及男性性激素(泌乳素、卵泡刺激素、孕酮)的平滑曲线拟合图;其中结局变量和尿 As 数据均采用原始数据;红色曲线表示估计值,两侧的蓝色曲线表示 95% *CI*

图 1 尿 As 与精液参数、性激素关系的平滑曲线拟合图

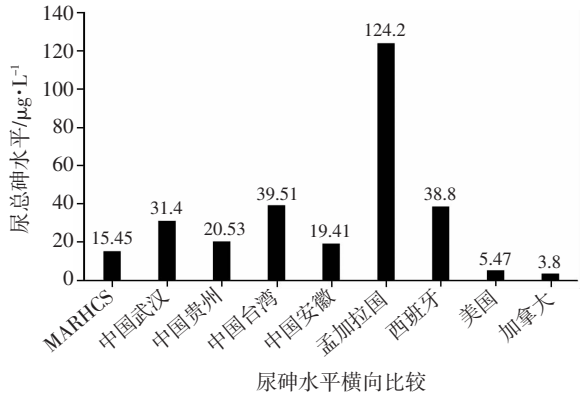
表 2 尿 As 浓度与性激素水平和精液参数的阈值效应分析

模型	精子浓度		精子总数		DNA 碎片化指数		PRL		FSH		P	
	β(95% *CI*)	*P* 值	β(95% *CI*)	*P* 值	β(95% *CI*)	*P* 值	β(95% *CI*)	*P* 值	β(95% *CI*)	*P* 值	β(95% *CI*)	*P* 值
模型 Ⅰ[a]	−0.16 (−0.39,0.07)	0.182	−0.79 (−1.65,0.08)	0.076	0.02 (−0.03,0.08)	0.381	0.01 (−0.02,0.03)	0.601	−0.01 (−0.01,0.01)	0.701	−0.01 (−0.01,0.001)	0.759
模型 Ⅱ[b]												
折点/μg·L⁻¹	15.17		14.17		50.97		57.51		11.36		70.44	
<K 段效应	0.79 (−0.13,1.71)	0.093	2.92 (−0.77,6.61)	0.121	0.09 (0.01,0.16)	0.021	−0.02 (−0.05,0.01)	0.237	−0.05 (−0.09,−0.007)	0.020	−0.01 (−0.01,0.001)	0.233
≥K 段效应	−0.38 (−0.68,−0.07)	0.017	−1.56 (−2.70,−0.42)	0.008	−0.21 (−0.41,−0.02)	0.036	0.14 (0.04,0.25)	0.007	0.01 (−0.01,0.01)	0.298	0.01 (0.01,0.02)	0.042
两段的效应差[c]	−1.17 (−2.27,−0.07)	0.038	−4.48 (−8.81,−0.15)	0.043	−0.30 (−0.54,−0.06)	0.015	0.16 (0.04,0.28)	0.008	0.05 (0.01,0.10)	0.022	0.01 (0.01,0.03)	0.036
P for LRT[d]	0.036		0.041		0.014		0.007		0.021		0.034	

PRL:泌乳素;FSH:卵泡刺激素;P:孕酮;调整变量:年龄、禁欲时间、吸烟、饮酒、喝茶、BMI 中国人群分级;a:模型Ⅰ,线性关系由单变量线性回归模型描述;b:模型Ⅱ,使用两段式线性回归模型来描述非线性关系;对数似然比检验 $P<0.05$,选择模型Ⅱ,否则选择模型Ⅰ;c:分段线性模型两个回归系数之间差异的 Wald 检验;d:LRT,对数似然比检验

2.3 MARHCS 队列尿 As 浓度与国内、国际相关研究尿 As 水平横向比较

MARHCS 队列志愿者未经尿肌酐调整尿 As 浓度的中位数及第 25、75 百分位数分别为 15.45(7.01,28.29)μg/L[24],呈正偏态分布,横向比较结果显示,与国内其他地区相关研究的尿 As 水平相比,本研究人群尿 As 水平处于中等水平,但高于北美国家(美国、加拿大)报道值,低于孟加拉国报道值(图 2)。



中国武汉[28]、中国贵州[29]、中国台湾[30]、中国安徽[31]、孟加拉国[32]、西班牙[33]、美国[34]、加拿大[33]人群中未用尿肌酐调整的尿总 As 浓度

图 2 MARHCS 人群和国内外人群尿 As 中位数

3 讨论

As 作为一种环境内分泌干扰物,已有较多研究发现其倾向于以多种内分泌干扰模式影响男性生殖生理过程。尽管血液、尿液、精浆等生物样本中均能检出 As,但在流行病学研究中,评估 As 暴露与相关健康风险最常用的生物标志物是尿液中的 As,尿液是人类多种化学形式 As 排泄的主要途径,能够较准确地反映个体过去数日内 As 暴露平均水平,且对于暴露源主要是饮用水者,As 暴露水平持续累积,尿 As 可能足以代表长期暴露。研究表明尿肌酐调整并不能改善 As 暴露估计[32,35],故本研究在分析时未采用肌酐校正后的尿 As 浓度。本研究分析 703 名重庆健康男大学生尿总 As 与男性生殖之间的关系,结果显示:人群的尿 As 水平与国内其他地区相比处于相对较低状态;尿 As 水平与自然男性人群多项精液参数(精子总数、精子浓度、DNA 碎片化指数)、性激素(卵泡刺激素、泌乳素、孕酮)存在非线性关联,在尿 As 达到一定浓度后,精子浓度和 DNA 碎片化指数与其均呈显著负向关联,但前期研究表明精子 DNA 碎片化指数与精子浓度呈负相关[36-37],我们推测这或应归结于精子浓度在不同 As 暴露水平间变化所引起的继发效应。尿 As 低于 11.36 μg/L 时,卵泡刺激素水平降低显著,在不低于 11.36 μg/L 时,尿 As 每升高 1 μg/L,卵泡刺激素升高 0.01 mIU/mL,但水平变化不明显。研究显示,低剂量 As 暴露对应于负反馈补偿抑制,该机制抵消了 As 诱导的类固醇生成酶基因表达抑制以维持恒定的性激素稳态[28],而类固醇可能会抑制垂体释放卵泡刺激素和黄体生成素。因此,我们推测低剂量 As 暴露的负反馈调节机制在其中发挥了一定作用,值得进一步研究证实。尤其是在相对更低剂量下,本研究观察到尿 As 与精子浓度、精子总数及卵泡雌激素变化的显著关联,提示以上 3 个指标对 As 暴露更为敏感。

本研究发现,正常环境水平 As 暴露对男性精液参数和性激素具有损害作用,与国内外其他人群研究报道相似[8,22]。既往研究表明,生殖系统对金属及其化合物的作用较为敏感,在其他系统尚未出现反应时,生殖系统已经出现毒性作用和功能障碍[5]。细胞和动物模型研究证明,低水平或环境水平 As 暴露会改变类固醇和甲状腺激素受体介导的基因调节,导致类固醇生成功能障碍,糖皮质激素、雄激素、孕激素、雌激素、视黄酸、甲状腺激素受体等状态改变,进而影响精子质量,严重可致不育[38-39]。但 As 低剂量暴露的效应仍具有争议,一种观点认为,As 暴露可能不存在阈值,任意剂量暴露均可能增加糖尿病、心脏病、癌症等疾病风险[40-41]。但美国生物学教授 COHEN 等[42]认为,As 有阈值剂量,低于该阈值时暴露无害。国外人群研究表明,血 As 水平高于 5.8 μg/L 与精子活力的改变有关,但两者的剂量反应关系在 As 暴露水平分组中不呈线性[43];还有研究指出,As 在不同剂量阈值下的血糖效应相反[44]。基于上述资料,我们分析了环境水平 As 暴露与相关指标是否存在非线性关系,并进一步评估了非线性关系中引起结局指标显著变化的阈值,结果提示尿 As 暴露对男性精子质量和性激素水平作用方向、作用大小可能并不一致,这有助于解释人群流行病学研究中的一些矛盾的结果;另一方面,As 浓度与精子质量和性激素的关联存在阈值效应,且出现损害效应的阈值较低。因此,饮用水 As 含量、尿 As 指导值等的制定或许应增加对男性生殖系统的关注。

与我国其他地区(台湾、贵州、武汉、安徽)前期报道的尿总 As 水平中值相比,本队列研究人群的尿 As 水平中值相对较低,其中 As 暴露一直以来都是台湾地区较为关注的环境问题,其东北沿海、西南沿海为地下

水 As 暴露流行区,慢性 As 暴露导致的外周动脉疾病“黑脚病”也为台湾地区所独有[30]。与欧美国家相比,本队列人群尿 As 暴露水平高于美国 NHANES 2015-2016 年报告的 5.47 μg/L(20 岁以上组)及加拿大 CHMS 2016-2017 年报告的 3.8 μg/L(20~39 岁组)。有研究指出,日本、韩国、中国等东亚国家食用的食物(例如藻类、海藻)中富含二甲基砷酸(dimethyl arsenic acid, DMA),受饮食习惯的影响其尿 As 含量可能高于欧洲或其他西方国家[33]。孟加拉国尿 As 中值(124.2 μg/L)位居首位,其为全球地下水 As 污染最严重的地区之一,其饮用水中 As 暴露水平比 WHO 推荐限值 10 μg/L 高出 100 倍左右,WHO 将孟加拉国的 As 暴露问题描述为“历史上最大规模的人口中毒”[32]。此外,本研究人群尿 As 的几何均数为 13.66 μg/L,低于我国人群尿 As 安全指导限值(32 μg/L)[45]。

本研究存在不足之处:①只检测了尿总 As 水平,而无机砷和有机砷的毒性作用效应和毒性作用机制并不相同。因此,本研究缺乏 As 的形态分析,无法判断对研究人群造成生殖损害的砷物种。②本研究基线阶段血、尿、精液标本仅采集了 1 次,精液参数具有一定内部变异,性激素水平具有时相波动性,在不同的时间段也会存在一定差异。③本研究为基于队列的横断面研究,因此推断强度受限,需进一步验证目前发现 As 阈值剂量对精液参数、性激素的生物学效应。④本研究根据前期研究及相关文献资料校正了年龄、禁欲时间、BMI、吸烟等混杂因素,既往研究表明,精液质量、性激素水平可能受环境、生活行为、心理状态等多种因素影响[46],因此,本研究可能存在未校正的潜在混杂因素,需进一步进行独立研究验证。

综上,本研究分析一般环境 As 暴露的健康男性大学生生殖健康指标与尿 As 水平之间的关系,尿 As 水平与精子总数、精子密度、DNA 碎片化指数、卵泡刺激素、泌乳素、孕酮之间存在非线性关联,且存在阈剂量,其中精子总数、精子密度、卵泡刺激素对应的 AS 阈剂量甚至低于尿 As 水平的中位值,且本研究尿 As 中位值相对于国内其他研究报道较低,几何平均值 13.66 μg/L 也低于我国安全指导值。这提示在制定 AS 安全指导限值时,或应对男性生殖系统损害给予更多关注。

参考文献:

[1] VAHIDNIA A, VAN DER VOET G B, DE WOLFF F A. Arsenic neurotoxicity: a review[J]. Hum Exp Toxicol, 2007, 26(10): 823-832. DOI: 10.1177/0960327107084539.

[2] RODRÍGUEZ-LADO L, SUN G F, BERG M, *et al*. Groundwater arsenic contamination throughout China[J]. Science, 2013, 341(6148): 866-868. DOI: 10.1126/science.1237484.

[3] ZHANG Q, WANG D, ZHENG Q M, *et al*. Joint effects of urinary arsenic methylation capacity with potential modifiers on arsenicosis: a cross-sectional study from an endemic arsenism area in Huhhot Basin, Northern China[J]. Environ Res, 2014, 132: 281-289. DOI: 10.1016/j.envres.2014.04.036.

[4] HONG Y S, SONG K H, CHUNG J Y. Health effects of chronic arsenic exposure[J]. J Prev Med Public Health, 2014, 47(5): 245-252. DOI: 10.3961/jpmph.14.035.

[5] PIZENT A, TARIBA B, ŽIVKOVIĆ T. Reproductive toxicity of metals in men[J]. Arh Hig Rada Toksikol, 2012, 63(Suppl 1): 35-46. DOI: 10.2478/10004-1254-63-2012-2151.

[6] BRANCH F M, PERRY M J, CHEN Z, *et al*. Metal(loid)s and human semen quality: the LIFE study[J]. Reprod Toxicol, 2021, 106: 94-102. DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.10.006.

[7] SHI X, CHAN C P S, MAN G K Y, *et al*. Associations between blood metal/metalloid concentration and human semen quality and sperm function: a cross-sectional study in Hong Kong[J]. J Trace Elem Med Biol, 2021, 65: 126735. DOI: 10.1016/j.jtemb.2021.126735.

[8] SHEN H Q, XU W P, ZHANG J, *et al*. Urinary metabolic biomarkers link oxidative stress indicators associated with general arsenic exposure to male infertility in a Han Chinese population[J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(15): 8843-8851. DOI: 10.1021/es402025n.

[9] WANG X F, ZHANG J, XU W P, *et al*. Low-level environmental arsenic exposure correlates with unexplained male infertility risk[J]. Sci Total Environ, 2016, 571: 307-313. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.169.

[10] WAN Z Z, CHEN H G, LU W Q, *et al*. Metal/metalloid levels in urine and seminal plasma in relation to computer-aided sperm analysis motion parameters[J]. Chemosphere, 2019, 214: 791-800. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.001.

[11] WANG Y X, WANG P, FENG W, *et al*. Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity[J]. Environ Pollut, 2017, 224: 224-234. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.01.083.

[12] MEEKER J D, ROSSANO M G, PROTAS B, *et al*. Multiple metals predict prolactin and thyrotropin (TSH) levels in men[J]. Environ Res, 2009, 109(7): 869-873.

DOI: 10.1016/j.envres.2009.06.004.

[13] LIU P Y, YUAN G X, ZHOU Q, *et al*. The association between metal exposure and semen quality in Chinese males: the mediating effect of androgens[J]. Environ Pollut, 2020, 264: 113975. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.113975.

[14] MOMENI H R, ORYAN S, ESKANDARI N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats[J]. Reproductive Biol, 2012, 12(2): 171-181. DOI: 10.1016/S1642-431X(12)60084-9.

[15] FERREIRA M, MATOS R C, OLIVEIRA H, *et al*. Impairment of mice spermatogenesis by sodium arsenite[J]. Hum Exp Toxicol, 2012, 31(3): 290-302. DOI: 10.1177/0960327111405862.

[16] ZHANG X Y, WANG B, XU S, *et al*. Reactive oxygen species-evoked genotoxic stress mediates arsenic-induced suppression of male germ cell proliferation and decline in sperm quality[J]. J Hazard Mater, 2021, 406: 124768. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124768.

[17] LI Y C, WANG M, PIAO F Y, *et al*. Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice[J]. Toxicol Sci, 2012, 128(2): 482-489. DOI: 10.1093/toxsci/kfs169.

[18] AHANGARPOUR A, OROOJAN A A, ALBOGHOBEISH S, *et al*. Toxic effects of chronic exposure to high-fat diet and arsenic on the reproductive system of the male mouse[J]. J Family Reprod Health, 2019, 13(4): 181-190.

[19] COUTO-SANTOS F, SOUZA A C F, BASTOS D S S, *et al*. Prepubertal exposure to arsenic alters male reproductive parameters in pubertal and adult rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 409: 115304. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115304.

[20] RENU K, MADHYASTHA H, MADHYASTHA R, *et al*. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity[J]. Life Sci, 2018, 212: 37-58. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.09.045.

[21] CASTIELLO F, OLMEDO P, GIL F, *et al*. Association of urinary metal concentrations with blood pressure and serum hormones in Spanish male adolescents[J]. Environ Res, 2020, 182: 108958. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108958.

[22] XU W P, BAO H Q, LIU F, *et al*. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: associations derived from a Chinese cross-sectional study[J]. Environ Health, 2012, 11: 46. DOI: 10.1186/1476-069X-11-46.

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

[24] CHAI Z L, ZHANG G H, LING X, *et al*. Low-level and combined exposure to environmental metal elements affects male reproductive outcomes: prospective MARHCS study in population of college students in Chongqing, China[J]. Sci Total Environ, 2022, 828: 154395. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154395.

[25] LIU K, HOU G Z, WANG X G, *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.

[26] 李雪, 何孟超, 王艺蒙, 等. 重庆市大学生指长比与男性生殖表型的关联研究[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(1): 45-51. DOI:10.16016/j.1000-5404.202009205.
LI X, HE M C, WANG Y M, *et al*. Correlation between second to fourth digit ratio and male reproductive phenotypes in college students in Chongqing[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(1): 45-51. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202009205.

[27] 陆金春,黄宇烽,吕年青.《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》与我国男科实验室现状[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(10): 867-871.
LU J C, HUANG Y F, LU N Q. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China[J]. Natl J Androl, 2010, 16(10): 867-871.

[28] TIAN M P, WANG Y X, WANG X F, *et al*. Environmental doses of arsenic exposure are associated with increased reproductive-age male urinary hormone excretion and *in vitro* Leydig cell steroidogenesis[J]. J Hazard Mater, 2021, 408: 124904. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124904.

[29] WANG D P, LUO P, ZOU Z L, *et al*. Alterations of arsenic levels in arsenicosis residents and awareness of its risk factors: a population-based 20-year follow-up study in a unique coal-borne arsenicosis County in Guizhou, China[J]. Environ Int, 2019, 129: 18-27. DOI: 10.1016/j.envint.2019.05.005.

[30] LIAO K W, CHIEN L C, CHEN Y C, *et al*. Sex-specific differences in early renal impairment associated with arsenic, lead, and cadmium exposure among young adults in Taiwan[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(35): 52655-52664. DOI: 10.1007/s11356-022-19521-3.

[31] JIANG R, ZHANG Q, JI D M, *et al*. Influence of combined exposure levels of total arsenic and inorganic arsenic on arsenic methylation capacity among university students:

findings from Bayesian kernel machine regression analysis [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(19): 28714-28724. DOI: 10.1007/s11356-021-17906-4.

[32] HATA A, YAMANAKA K, HABIB M A, *et al*. Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh[J]. Environ Health Prev Med, 2012, 17(3): 235-245. DOI: 10.1007/s12199-011-0247-5.

[33] NAVARRO SERRANO I, LLORENTE BALLESTEROS M T, SÁNCHEZ FERNÁNDEZ PACHECO S, *et al*. Total and speciated urinary arsenic levels in the Spanish population [J]. Sci Total Environ, 2016, 571: 164-171. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.134.

[34] SUN Y F, ZHOU Q, ZHENG J. Nephrotoxic metals of cadmium, lead, mercury and arsenic and the odds of kidney stones in adults: an exposure-response analysis of NHANES 2007-2016[J]. Environ Int, 2019, 132: 105115. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105115.

[35] STEINMAUS C, YUAN Y, LIAW J, *et al*. Low-level population exposure to inorganic arsenic in the United States and diabetes mellitus: a reanalysis[J]. Epidemiology, 2009, 20(6): 807-815. DOI: 10.1097/EDE.0b013e3181b0fd29.

[36] LU J C, JING J, CHEN L, *et al*. Analysis of human sperm DNA fragmentation index(DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 23. DOI: 10.1186/s12958-018-0345-y.

[37] TVRDÁ E, ARROYO F, ĎURAČKA M, *et al*. Dynamic assessment of human sperm DNA damage Ⅱ: the effect of sperm concentration adjustment during processing[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(4): 799-807. DOI: 10.1007/s10815-019-01423-y.

[38] DAVEY J C, BODWELL J E, GOSSE J A, *et al*. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression *in vivo* and in cell culture [J]. Toxicol Sci, 2007, 98(1): 75-86. DOI: 10.1093/toxsci/kfm013.

[39] DAVEY J C, NOMIKOS A P, WUNGJIRANIRUN M, *et al*. Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor-and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(2): 165-172. DOI: 10.1289/ehp.10131.

[40] NAVAS-ACIEN A, SILBERGELD E K, PASTOR-BARRIUSO R, *et al*. Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults[J]. JAMA, 2008, 300(7): 814-822. DOI: 10.1001/jama.300.7.814.

[41] MOON K A, GUALLAR E, UMANS J G, *et al*. Association between exposure to low to moderate arsenic levels and incident cardiovascular disease. A prospective cohort study [J]. Ann Intern Med, 2013, 159(10): 649-659. DOI: 10.7326/0003-4819-159-10-201311190-00719.

[42] COHEN S M, CHOWDHURY A, ARNOLD L L. Inorganic arsenic: A non-genotoxic carcinogen[J]. J Environ Sci (China), 2016, 49: 28-37. DOI: 10.1016/j.jes.2016.04.015.

[43] MEEKER J D, ROSSANO M G, PROTAS B, *et al*. Cadmium, lead, and other metals in relation to *Semen quality*: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(11): 1473-1479. DOI: 10.1289/ehp.11490.

[44] GONG Y Y, LIU J D, XUE Y F, *et al*. Non-monotonic dose-response effects of arsenic on glucose metabolism[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 377: 114605. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114605.

[45] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 人群尿砷安全指导值: WS/T 665-2019[S]. 2020.
National Health Commission of the People's Republic of China. Safety guidance value of urinary arsenic for population: WS/T 665-2019[S]. 2020.

[46] SKAKKEBAEK N E, LINDAHL-JACOBSEN R, LEVINE H, *et al*. Environmental factors in declining human fertility[J]. Nat Rev Endocrinol, 2022, 18(3): 139-157. DOI: 10.1038/s41574-021-00598-8.

(**收稿**:2022-12-01;**修回**:2023-02-27)

(编辑 张 维)