

分类号: R994.6

单位代码: 10159

密 级: 公开

学 号: 2016140011



中国医科大学

博 士 学 位 论 文

(同等学力人员申请博士学位)

中文题目: 接触锰作业对男工生殖功能的影响及下丘脑源性
PGE₂在其发生机制中的作用

英文题目: Effects of manganese occupational exposure on reproductive
function of male workers and the role of hypothalamic-derived
PGE₂ in its mechanisms

论文作者: 杨海波

指导教师: 邓 宇 教授

学科专业: 劳动卫生与环境卫生学

完成时间: 2019 年 5 月

中国医科大学博士学位论文

接触锰作业对男工生殖功能的影响及下丘脑源性 PGE₂ 在其
发生机制中的作用

Effects of manganese occupational exposure on reproductive
function of male workers and the role of hypothalamic-derived PGE₂
in its mechanisms

论文作者 杨海波 指导教师 邓宇 教授

申请学位 医学博士 培养单位 公共卫生学院

一级学科 公共卫生与预防医学 二级学科 劳动卫生与环境卫生学

研究方向 环境生殖毒理学

论文起止时间 2017 年 3 月—2019 年 3 月

论文完成时间 2019 年 5 月

中国医科大学（辽宁）

2019 年 5 月

中国医科大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：本论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究成果，论文中除加以标注的内容外，不包含其他人或机构已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。对本研究提供贡献的其他个人和集体均已在文中进行了明确的说明并表示谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：杨海波

日期：2019年5月28日

中国医科大学学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的原件、复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权中国医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密（ ），在____年后解密适用本授权书。（保密：请在括号内划“√”）

论文作者签名：杨海波

日期：2019年5月28日

指导教师签名：邓宇

日期：2019年5月28日

摘 要

目的：锰（Manganese, Mn）在生理剂量下可以促进生殖功能，然而过量长期暴露又会产生生殖毒性。虽然人类在减少职业性 Mn 暴露方面已经取得了相当大的进步，但仍然有部分工人长期暴露于高浓度 Mn 的环境中。Mn 的生殖毒性主要在职业活动中有过相关报道，然而现有数据和结果并不一致。Mn 作为一种对神经系统和生殖系统都会产生毒性的重金属元素，可通过血脑屏障被下丘脑星形胶质细胞（astrocyte, Ast）摄取并蓄积。Ast 上 α -氨-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸（ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA）受体是一类离子型谷氨酸受体（Glutamate receptor, GluR），已证明激活的 AMPA 受体可上调环氧合酶-2（cyclooxygenase-2, COX-2）的表达，促进前列腺素 E₂（prostaglandin E₂, PGE₂）的合成。研究发现 PGE₂ 可以旁分泌的方式作用于促性腺激素释放激素（gonadotropin-releasing hormone, GnRH）神经元，刺激其分泌 GnRH 进而影响生殖内分泌激素的合成与分泌，这提示 Mn 可能参与了下丘脑源性 PGE₂ 的合成过程进而调控 GnRH 分泌从而影响生殖功能。因此本研究的目的①研究接触 Mn 作业对男工性功能的影响，②研究接触 Mn 作业对男工生殖内分泌激素及精液质量的影响，③最后采用体内外实验相结合的方法研究 AMPA 受体对 PGE₂ 合成的调控在 Mn 致 GnRH 分泌异常及其诱发生殖毒性中的作用机制。本研究为我国接触 Mn 作业可损害男工生殖功能提供最直接的流行病学证据，为探索 Mn 生殖毒性机制提供实验依据。

研究方法：首先选择 128 名接触 Mn 作业男工和 116 名非 Mn 暴露男工作为调查对象并检测其工作场所空气中 Mn 的浓度，然后利用自制的生殖相关调查问卷对包括性欲、勃起能力、射精功能、性生活满意度及性高潮情况等 5 个方面的性功能情况进行调查，以评价接触 Mn 作业对男工性功能的影响。其次在自愿的基础上测定 84 名接触 Mn 作业男工和 92 名对照组男工血清、尿液、精浆以及头发中 Mn 的含量，检测精液质量及血清生殖内分泌激素水平，并利用多元线性回归分析血清、尿液、精浆以及头发中 Mn 与精液质量和血清生殖内分泌激素之间的线性关系。最后首先体外培养下丘脑 Ast 并分设对照组、Mn 暴露组和 2,3-二羟基-6-硝基氨-磺酰苯喹喔啉（2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)-quinoxaline, NBQX）干预组。对照组和 Mn 暴露组正常培养，NBQX 干预组先

加入 20 $\mu\text{mol/L}$ NBQX 培养 6 h。然后对照组继续正常培养, Mn 暴露组分别加入 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 MnCl_2 , NBQX 干预组加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 MnCl_2 继续培养 24 h 后, 检测各组细胞培养液中 PGE_2 的水平, real time RT-PCR 和 western blot 法检测 AMPA 受体亚基 GluR2 和 COX-2 表达的情况。然后随机将雄性去势昆明小鼠分为对照组、Mn 暴露组、NBQX 干预组、塞来昔布(celecoxib) 干预组和 NBQX + celecoxib 干预组。对照组和 Mn 暴露组给予腹腔注射 0.9% NaCl, NBQX 干预组给予腹腔注射 22.5 mg/kg 的 NBQX, celecoxib 干预组给予腹腔注射 30 mg/kg 的 celecoxib, NBQX + celecoxib 干预组给予腹腔注射 22.5 mg/kg NBQX 和 30 mg/kg celecoxib。2 h 后, 对照组腹腔注射 0.9%NaCl, Mn 暴露组、NBQX 干预组、celecoxib 干预组和 NBQX + celecoxib 干预组腹腔注射 50 mg/kg MnCl_2 。以上注射剂量均为 5 mL/kg。每天干预及染毒 1 次, 一共持续 2 周。然后腹主动脉采血并测定血清 GnRH 和 PGE_2 的含量。采用 real-time RT-PCR 和 western blot 法测定下丘脑 AMPA 受体亚基 GluR2 和 COX-2 的表达情况以研究 AMPA 受体对 PGE_2 合成的调控在 Mn 致 GnRH 分泌异常及其诱发生殖毒性中的作用机制。

结果: 1、调查显示该 Mn 暴露企业部分工作场所空气中 Mn 浓度超标。Mn 暴露组男工勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 患病率为 35.16%, 早泄 (premature ejaculation, PE) 患病率为 40.62%。与对照组比较, Mn 暴露组男工 ED 患病率和 PE 患病率升高而性欲水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 男工对性功能满意度和性高潮情况的差异无统计学意义。同时, Mn 暴露组男工勃起功能和性欲水平评分均下降而 PE 评分上升 ($P < 0.01$), 而男工性交满意度及性高潮情况评分的差异无统计学意义。随着作业环境空气中 Mn 浓度的升高, 接触 Mn 作业男工性欲水平下降, PE 和 ED 患病率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。2、Mn 暴露组男工尿 Mn 和精浆 Mn 的含量高于对照组, 血清 GnRH 和促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平升高而睾酮 (testosterone, TSTO) 水平低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。多元线性回归分析显示男工尿 Mn、精浆 Mn 与血清 GnRH 水平呈线性正相关, 与血清 TSTO 呈线性负相关, 男工尿 Mn 和血清 LH 水平呈线性正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Mn 暴露组男工精子总活力 (sperm total motility, PR+NP) % 和前向运动力 (progressive motility, PR) % 明显低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。多元线性回归分析显示男工尿 Mn 与精子 (PR+NP) % 和 PR % 呈线性负相关, 男工精浆 Mn 与精子 PR % 呈线性负相关 ($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01)。与对照组比较,Mn暴露组男工精子运动速度相关参数曲线速度(curvilinear velocity, VCL)、直线速率(straight-line (rectilinear) velocity, VSL)和平均路径速率(average path velocity, VAP)降低($P < 0.01$)。3、体外实验结果显示,与对照组比较,随着Mn暴露剂量的增加,细胞培养液PGE₂水平升高,GluR2和COX-2表达增高,而与500 μmol/L MnCl₂暴露组比较,应用NBQX提前干预可降低细胞培养液PGE₂的水平,且下调GluR2和COX-2的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。体内实验结果显示,与对照组相比,Mn暴露组小鼠血清GnRH和PGE₂水平明显升高,下丘脑GluR2和COX-2表达上调($P < 0.01$)。NBQX干预组、celecoxib干预组和NBQX + celecoxib干预组与Mn暴露组比较,小鼠下丘脑GluR2和COX-2表达下调,血清GnRH和PGE₂的水平下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且联合应用拮抗剂效果更明显。

结论: 1、接触Mn作业可导致性欲下降,ED和PE患病率升高,男性性功能障碍,且与工作场所空气中Mn的浓度有关。2、接触Mn作业可导致男工血清GnRH水平升高,生殖内分泌激素紊乱和精液质量下降。3、Mn可能通过激活AMPA受体及上调COX-2的表达来促使下丘脑源性PGE₂水平升高,进而促使血清GnRH水平升高,这可能是Mn参与调控生殖功能的机制之一。

关键词: 接触锰作业、男工、生殖功能、下丘脑源性PGE₂、GnRH

课题资助: 国家自然科学基金(NO. 81302406)和辽宁省高等学校基本科研项目青年项目(NO. QNK201735)

Abstract

Objective : Manganese (Mn) has beneficial effects on reproductive function at physiological concentrations, however, excessive long-term exposure can cause reproductive toxicity. Although significant progress has been made in reducing occupational Mn exposure, workers in some areas still experience high levels of Mn. The reproductive toxicity of Mn is mainly reported in the occupational activities, but the existing data and results are not consistent. As a heavy metal element with neurotoxicity and reproductive toxicity, Mn can be taken by astrocyte (Ast) in brain and accumulated in hypothalamus. α -amino-3-hydroxyl - 5- methyl- 4 -isoxazole - propionic acid (AMPA) receptor is a kind of ionic glutamate receptor (GluR) and could be expressed in Ast. It has been demonstrated that activated AMPA receptors can upregulate cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and stimulate secretion of prostaglandin E₂ (PGE₂). PGE₂ can act on the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons through paracrine manner, which stimulate the secretion of GnRH and affect the synthesis and secretion of reproductive endocrine hormones. These suggest that Mn may be involved in the synthesis of hypothalamic-derived PGE₂ and thus regulate the secretion of GnRH and affect reproductive function. So the aim of our work is: Firstly, the effect of Mn occupational exposure on sexual function of male workers was studied. Secondly, the effect of Mn occupational exposure on reproductive endocrine hormones and semen quality of male workers was studied in a cross-sectional study. Finally, the effects of AMPA receptor on PGE₂ synthesis in Mn-induced GnRH secretion abnormality and reproductive toxicity were studied in vivo and in vitro. This study provides the direct epidemiological evidence that Mn occupational exposure can be harmful to the reproductive function of male workers, and experimental basis for exploring the mechanisms of Mn induced reproductive toxicity.

Methods: Firstly, the concentrations of Mn dust in different workplaces were detected to evaluate the external Mn exposure dose of the male workers. The sexual function of 128 Mn exposure male workers and 116 non-Mn exposure male workers were

investigated by the self-made questionnaires to evaluate the effect of Mn exposure on male workers' sexual function. The survey mainly contains five aspects including sexual desire, erectile ability, ejaculation, the satisfaction of the sexual life and orgasm. Secondly, the content of Mn in urine, serum, seminal plasma and hair, reproductive hormones and semen quality were explored in 84 male workers exposure to Mn and 92 referents. Multiple linear regression analyses were used to assess the relationships. Finally, the hypothalamus Ast was cultured in vitro as the control group, Mn exposure group and NBQX intervention group. The control group and the Mn exposure group were normally cultured. NBQX intervention group was incubated with 20 $\mu\text{mol/L}$ NBQX 6 h in advance. Then the control group continued normally culture, Mn group were cultured with 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ and 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 and NBQX intervention group were cultured with 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 for 24 h. The levels of PGE_2 in cell culture medium and the expression of GluR2 and COX-2 were detected by real time RT-PCR and western blot in order to study the effect of AMPA receptor on PGE_2 synthesis in Mn-induced GnRH secretion abnormality and reproductive toxicity. Then, male castrated kunming mice were randomly divided into control group、Mn exposure group、NBQX intervention group、celecoxib intervention group and NBQX + celecoxib intervention group, with 6 rats in each group. The control group and Mn exposure group were given intraperitoneal injection of 0.9%NaCl, the NBQX intervention group was given intraperitoneal injection of 22.5 mg/kg of NBQX. Celecoxib intervention group was given intraperitoneal injection of 30 mg/kg celecoxib, and the NBQX + celecoxib intervention group was given intraperitoneal injection of 22.5 mg/kg NBQX and 30 mg/kg celecoxib. 2 h later, the control group was intraperitoneally injected with 0.9%NaCl, Mn exposed group, NBQX intervention group, celecoxib intervention group and NBQX + celecoxib intervention group were intraperitoneal injection with 50 mg/kg MnCl_2 , once daily for 2 weeks. The above injection doses were all 5 ml/kg. Blood was then collected from the abdominal aorta and serum GnRH and PGE_2 levels were determined. The expression of COX-2 and AMPA receptor GluR2 in the hypothalamus was determined by real time RT-PCR and western blot.

Results: 1、The survey shows that the Mn concentration in part of workplaces of the

enterprise exceed permissible standard. The sexual function survey showed that the prevalence of erectile dysfunction (ED) was 35.16% and 40.62% for premature ejaculation (PE) in Mn exposure group. Compared with the control group, the level of sexual desire was decreased, while the rate of the ED and PE were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). What is more, there was no significant difference in satisfaction with sexual function and orgasm in the Mn exposure group. The score of sexual desire and international index of erectile function-5 (IIEF-5) were decreased, while premature ejaculation diagnostic tool (PEDT) score was increased in the Mn exposure group ($P < 0.01$), while the difference between sexual satisfaction and orgasm score was not statistically significant. With the increase of the concentration of Mn in the working environment, the level of sexual desire, the prevalence of PE and ED of male workers exposed to Mn increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 2、 Compared with the control group, the contents of Mn in urine and seminal plasma were significantly higher, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) levels and luteinizing hormone (LH) levels increased significantly and the levels of testosterone (TSTO) decreased significantly in Mn-exposed group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Multiple linear regression analysis showed that urinary Mn and seminal plasma Mn were positively correlated with serum GnRH, while negatively correlated with TSTO. There was a significant positive linear correlation between urinary Mn and LH ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Sperm progressive motility (PR%) and total motility (PR+NP)% decreased significantly in Mn-exposure group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was a significantly negative linear correlation between urinary Mn and sperm PR% and (PR+NP)%, and a negative linear correlation between seminal plasma Mn and sperm PR% ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the control group, the parameters of sperm motility related to curvilinear velocity (VCL), straight-line (rectilinear) velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were decreased in the Mn exposure group ($P < 0.01$). 3、 In vitro results showed that compared with the control group, with the increased of Mn exposure, the PGE₂ level in the cell culture medium were increased, Ast GluR2 and COX-2 were up-regulated in Mn exposure group. However, the application of the AMPA receptor antagonist NBQX could change that ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of in vivo experiments showed that compared the control group, the levels of

serum GnRH and PGE₂ were significantly higher in the Mn exposed group. Hypothalamic COX-2 and GluR2 were up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the Mn exposure group, hypothalamic COX-2 was significantly down-regulated, and the activation of AMPA receptor was inhibited, and the levels of serum GnRH and PGE₂ were decreased in NBQX intervention group, COX-2 intervention group and especially in NBQX + celecoxib intervention group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion: 1、Mn exposure can lead to the decrease of sexual desire and increased prevalence of ED and PE, causing sexual dysfunction, and it is related with the Mn concentration in the workplaces. 2、Mn exposure was inversely associated with reproductive function of male workers, resulting in the increase of GnRH、abnormality of hormones secretion and decrease of semen quality. 3、Mn may increase the levels of hypothalamic-derived PGE₂ by activating the AMPA receptor and up-regulating the expression of the COX-2, thus lead to elevated GnRH levels in serum, which may be one of the Mn-induced male reproductive toxicity mechanisms.

Key Words: Manganese occupational exposure, Male workers, Reproductive function, Hypothalamic -derived PGE₂, GnRH

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
ALH	amplitude of lateral head displacement	头侧摆幅度
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid	α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸
Ast	astrocyte	星形胶质细胞
BCF	beat-cross frequency	鞭打频率
CASA	computer assisted sperm analysis	计算机辅助精子分析
COX-2	cyclooxygenase-2	环氧合酶-2
E2	estradiol	雌二醇
ED	erectile dysfunction	勃起功能障碍
FSH	follicle stimulating hormone	卵泡刺激素
Glu	glutamate	谷氨酸
GluR2	glutamate receptor 2	谷氨酸受体 2
GnRH	gonadotropin-releasing hormone	促性腺激素释放激素
HPTA	hypothalamic-pituitary-testis axis	下丘脑-垂体-睾丸轴
IIEF-5	international index of erectile function-5	国际勃起功能指数-5
LH	luteinizing hormone	促黄体生成素
LIH	linearity	直线性
Mn	manganese	锰
MAD	mean angular displacement	平均角位移（度）
MnO ₂	manganese dioxide	二氧化锰
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)-quinoxaline	2,3-二羟基-6-硝基氨基—磺酰苯喹喔啉
NP	non-progressive	非前向运动
PC-TWA	permissible concentration-time weighted average	时间加权平均容许浓度
PE	premature ejaculation	早泄
PEDT	premature ejaculation diagnostic tool	早泄诊断工具
PGE ₂	prostaglandin E2	前列腺素 E2

PR	progressive	前向运动
PRL	prolactin	催乳素
STR	straightness	前向性
Mn ₃ O ₄	trimanganese tetraoxide	四氧化三锰
TSTO	testosterone	睾酮
VAP	average path velocity	平均路径速率
VCL	curvilinear velocity	曲线速度
VSL	straight-line (rectilinear) velocity	直线速率
WOB	wobble	摆动性

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	IV
英文缩略词.....	VIII
第一部分：接触锰作业对男工性功能影响的调查研究	
1 前言.....	1
2 材料和方法.....	3
2.1 材料与试剂.....	3
2.1.1 主要试剂.....	3
2.1.2 主要仪器.....	3
2.2 研究方法.....	3
2.2.1 问卷设计.....	3
2.2.2 问卷内容.....	4
2.2.3 性功能评分标准.....	4
2.2.4 问卷预调查.....	4
2.3 研究对象的选择.....	5
2.3.1 男工性功能问卷调查.....	5
2.3.2 男工知情同意原则.....	6
2.4 接触 Mn 作业男工外暴露剂量的评估.....	6
2.4.1 工作场所空气中 Mn 粉尘的采样方法.....	6
2.4.2 工作场所空气中 Mn 浓度的测定.....	6
2.4.3 工作场所空气中 Mn PC-TWA 的计算.....	6
2.5 质量控制.....	7
2.5.1 设计阶段的质量控制.....	7
2.5.2 实施阶段的质量控制.....	7
2.5.3 数据整理与分析阶段的质量控制.....	7
2.6 统计学分析.....	8
3 结果.....	9
3.1 接触 Mn 作业男工外暴露剂量的评估.....	9

3.1.1 一车间作业环境空气中 Mn 浓度的检测结果及结果判定.....	9
3.1.2 二车间作业环境中 Mn 浓度的检测结果及结果判定.....	10
3.1.3 三车间作业环境中 Mn 浓度的检测结果及结果判定.....	10
3.2 问卷回收情况.....	11
3.3 研究对象的基本信息.....	11
3.4 接触 Mn 作业对男工性功能的影响.....	13
3.4.1 接触 Mn 作业对男工性欲水平的影响.....	13
3.4.2 接触 Mn 作业对男工勃起功能的影响.....	13
3.4.3 接触 Mn 作业对男工射精功能（PE 问题）的影响.....	14
3.4.4 接触 Mn 作业对男工性功能满意度的影响.....	14
3.4.5 接触 Mn 作业对男工性高潮情况的影响.....	14
3.4.6 接触 Mn 作业对男工性功能各项目评分的影响.....	15
3.5 不同车间接触 Mn 作业对男工性功能的影响.....	15
3.5.1 不同车间接触 Mn 作业男工的基本信息.....	15
3.5.2 不同车间接触 Mn 作业对男工性欲水平的影响.....	16
3.5.3 不同车间接触 Mn 作业对男工勃起功能的影响.....	17
3.5.4 不同车间接触 Mn 作业对男工射精功能（PE 问题）的影响.....	17
3.5.5 不同车间接触 Mn 作业对男工性功能满意度的影响.....	18
3.5.6 不同车间接触 Mn 作业对男工性高潮情况的影响.....	18
4 讨论.....	19
5 结论.....	23

第二部分：接触锰作业对男工生殖内分泌激素及精液质量的影响

1 前言.....	24
2 材料和方法.....	26
2.1 材料与试剂.....	26
2.1.1 主要试剂.....	26
2.1.2 主要仪器.....	26
2.2 研究对象的选择.....	26
2.3 研究对象基本信息的调查.....	26
2.4 接触 Mn 作业男工内暴露剂量的评估.....	27
2.4.1 精液样品的采集和处理.....	27

2.4.2 发样样品的采集和处理.....	27
2.4.3 血液样品的采集和处理.....	27
2.4.4 尿液样品的采集和处理.....	28
2.4.5 男工精浆、头发、血清和尿液中 Mn 含量的测定.....	28
2.5 精液质量的常规分析.....	28
2.5.1 精液量的测定.....	28
2.5.2 精子浓度、精子总数、精子活动力和精子运动轨迹参数的分析.....	28
2.5.3 精子形态学的检查.....	29
2.5.4 精子存活率的检查.....	30
2.6 血清中生殖内分泌激素水平的测定.....	30
2.6.1 血清 FSH、LH、PRL、E2 和 TSTO 等激素水平的测定.....	30
2.6.2 血清 GnRH 水平的测定.....	30
2.7 质量控制.....	30
2.7.1 设计阶段的质量控制.....	30
2.7.2 实施阶段的质量控制.....	31
2.7.3 数据整理与分析阶段的质量控制.....	31
2.8 统计学分析.....	31
3 结果.....	33
3.1 研究人群的选择及基本信息.....	33
3.1.1 研究人群的选择.....	33
3.1.2 研究对象的基本信息.....	33
3.2 接触 Mn 作业男工内暴露剂量的评估.....	35
3.2.1 接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 的水平.....	35
3.2.2 接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 之间的线性关系.....	35
3.3 接触 Mn 作业对男工生殖内分泌激素的影响.....	36
3.3.1 男工精浆 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系.....	36
3.3.2 男工发 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系.....	37
3.3.3 男工血清 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系.....	38
3.3.4 男工尿 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系.....	38
3.4 接触 Mn 作业对男工精液质量的影响.....	39
3.4.1 男工精浆 Mn 和精液质量参数的线性关系.....	39

3.4.2 男工发 Mn 和精液质量参数的线性关系.....	40
3.4.3 男工血清 Mn 和精液质量参数的线性关系.....	41
3.4.4 男工尿 Mn 和精液质量参数的线性关系.....	42
3.5 接触 Mn 作业对男工精子运动轨迹参数的影响.....	42
3.5.1 男工精浆 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系.....	43
3.5.2 男工发 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系.....	44
3.5.3 男工血清 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系.....	44
3.5.4 男工尿 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系.....	45
4 讨论.....	46
5 结论.....	50

第三部分：下丘脑源性 PGE₂ 在锰致生殖毒性中作用机制的实验研究

1 前言.....	51
2 材料与方法.....	53
2.1 主要试剂和仪器.....	53
2.1.1 主要试剂.....	53
2.1.2 主要仪器.....	54
2.2 体外实验.....	54
2.2.1 Ast 的培养.....	54
2.2.2 不同 Mn 暴露剂量及暴露时间对 Ast 活力的影响.....	54
2.2.3 NBQX 不同时间干预对染 Mn Ast 活力的影响.....	55
2.2.4 细胞分组及处理.....	55
2.2.5 细胞培养液中 PGE ₂ 含量的测定.....	55
2.2.6 Ast 中 COX-2 和 GluR2 mRNA 表达量的检测.....	55
2.2.7 Ast 中 COX-2 和 GluR2 蛋白表达的检测.....	57
2.3 体内实验.....	58
2.3.1 制备小鼠 Mn 中毒模型及分组.....	58
2.3.2 动物处理.....	58
2.3.3 下丘脑组织形态学观察.....	59
2.3.4 血清 GnRH 水平的测定.....	59
2.3.5 血清 PGE ₂ 水平的测定.....	59
2.3.6 小鼠下丘脑 GluR2 和 COX-2 mRNA 表达量的检测.....	59

2.3.7 小鼠下丘脑 GluR2 和 COX-2 蛋白表达量的检测.....	59
2.4 统计学分析.....	59
3 结果.....	61
3.1 体外实验结果.....	61
3.1.1 Mn 暴露剂量及暴露时间的选择.....	61
3.1.2 Mn 暴露对 Ast 形态的影响.....	62
3.1.3 Mn 暴露对 Ast 细胞培养液中 PGE ₂ 水平的影响.....	63
3.1.4 Mn 暴露对 Ast 中 COX-2 mRNA 表达的影响.....	63
3.1.5 Mn 暴露对 Ast 中 COX-2 蛋白表达的影响.....	63
3.1.6 Mn 暴露对 Ast 中 GluR2 mRNA 表达的影响.....	64
3.1.7 Mn 暴露对 Ast 中 GluR2 蛋白表达的影响.....	64
3.1.8 NBQX 干预时间的选择.....	65
3.1.9 NBQX 干预对 Ast 细胞形态的影响.....	65
3.1.10 NBQX 干预对 Ast 中 GluR2 mRNA 表达的影响.....	66
3.1.11 NBQX 干预对 Ast 中 GluR2 蛋白表达的影响.....	67
3.1.12 NBQX 干预对 Ast 中 COX-2 mRNA 表达的影响.....	67
3.1.13 NBQX 干预对 Ast 中 COX-2 蛋白表达的影响.....	68
3.1.14 Mn 暴露对 Ast 细胞培养液 PGE ₂ 水平影响.....	68
3.2 体内实验结果.....	69
3.2.1 Mn 暴露对小鼠下丘脑组织形态的影响.....	69
3.2.2 Mn 暴露对小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 表达的影响.....	69
3.2.3 Mn 暴露对小鼠下丘脑 GluR2 蛋白表达的影响.....	70
3.2.4 Mn 暴露对小鼠下丘脑 COX-2 mRNA 表达的影响.....	71
3.2.5 Mn 暴露对小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达的影响.....	72
3.2.6 Mn 暴露对小鼠血清 PGE ₂ 的影响.....	73
3.2.7 Mn 暴露对小鼠血清 GnRH 的影响.....	74
4 讨论.....	76
5 结论.....	80
附 件 1.....	81
附 件 2.....	88
附 件 3.....	91

本研究创新性的自我评价.....	92
参考文献.....	93
综 述.....	105
攻读学位期间取得的研究成果.....	117
致 谢.....	118
个人简历.....	119

第一部分：接触锰作业对男工性功能影响的调查研究

1 前言

锰 (manganese, Mn) 可以在生殖、消化、骨骼、神经、糖类代谢及酶类形成等方面扮演着重要的角色^[1-3]。然而过量的 Mn 暴露会导致 Mn 中毒^[4], 并会导致各种症状, 包括肝硬化, 肌张力失调, 红细胞增多症, 高 Mn 血症^[5-6]以及众所周知的帕金森氏综合征^[7-9]。人类很容易暴露于空气、土壤、水以及日常生产生活中的 Mn^[10]。Mn 缺乏导致的疾病很少见, 而 Mn 过量导致的中毒较多见于接触 Mn 作业, 且环境污染或人为因素导致的 Mn 中毒时有报道。因具有激活甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MVK) 和法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 的能力, Mn 被认为可以控制胆固醇前体物的合成并参与调控生殖功能^[11]。Mn 在生理剂量下可以促进生殖功能, 然而过量长期暴露又会产生生殖毒性。Mn 可直接通过血睾屏障蓄积在睾丸中, 干扰生殖内分泌功能, 降低精液质量, 导致其妻自然流产率和死胎率升高, 其子睾丸生殖细胞肿瘤的风险也升高, 并且使得男性的性功能出现异常改变, 且性功能出现异常改变常被认为是生殖功能受损的一种预警信号^[12-14]。

男性性过程主要有性欲唤起、阴茎勃起、射精、性高潮和不应期等多个生理环节^[15-16]。每个环节出现问题都可能导致性功能异常如勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED)、射精功能紊乱、性交失败、性交疼痛或性欲改变等。Hatzimouratidis^[17]指出 ED 患病率非常高, 有 20% 的男性饱受中度到重度 ED 的困扰。Hao 等^[18]在 7372 名 15 至 60 岁的中国男性调查过程中发现有 17.1% 的人患有 ED。国外调查显示早泄 (premature ejaculation, PE) 的发病率在 14% - 41% 左右^[19], 而在全球性的调查中发现 24 岁以上男性 PE 的患病率为 22.7%^[20], 40 - 80 岁男性患病率为 33.3%^[21]。更有人指出成年男性患 PE 的比例可达到 50%, 而曾患过 PE 的人数可达到 70% 以上^[22-23]。国内调查数据显示男性 PE 发病率为 25.8%^[24], 患病率在 25% - 40% 之间^[25]。另外也有数据显示男性性欲低下以及性高潮障碍的患病率在 0% - 3% 之间^[26]。

虽然 Mn 对生殖功能影响的研究日渐增多, Mn 暴露对接触男工性功能影响的研究却很少。1993 年, Baranski^[27]发现高浓度 Mn 暴露可能影响男性生殖功能, 工人

发生性功能障碍，出现ED的症状。罗圣庆等^[28]在1988年指出作业场所中Mn浓度为0.81 mg/m³时，平均工龄在20年以上的电焊男工可出现明显的ED、PE、性欲低下、性生活频率和性生活持续时间明显减少等性功能障碍临床表现。还有学者指出职业性暴露于几何均数为1.03 mg/m³（0.18 mg/m³-7.32 mg/m³）的MnO₂时，Mn作业男工出现ED者占4.4%，出现PE者占3.4%，出现性欲减退者占9.9%，出现性反感者占7.1%^[29]。这些研究年代久远，数据陈旧，不能很好的反映出现阶段接触Mn作业对男工性功能的影响。本部分重点研究接触Mn作业对男工性功能的影响，以此提高对接触Mn作业可导致男工性功能下降的重视，同时也为男工生殖功能提供性功能相关基础数据。

2 材料和方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 主要试剂

微孔滤膜（上海摩速科学器材有限公司）

小采样夹（北京华宸智鑫科技有限公司）

空气采样器（BDF-30，中国盐城白洋电子）

控温电热器（深圳市欧斯丹顿科技有限公司）

原子吸收分光光度计（AA240FS，美国VARIAN公司）

2.1.2 主要仪器

高氯酸（天津市鑫源化工有限公司）

硝酸（优级纯，上海安谱实验科技股份有限公司）

盐酸（优级纯，泰兴市扬子医药化工有限公司）

Mn 标准溶液（国家标准物质中心）

2.2 研究方法

2.2.1 问卷设计

本研究主要是对接触Mn作业男工性功能情况进行调查，因此我们在制定调查问卷表时以目前通用的常用问卷如国际勃起功能指数评价表-5（international index of erectile function-5, IIEF-5）、早泄诊断工具（premature ejaculation diagnostic tool, PEDT）、勃起质量量表（quality of erection questionnaire, QEQ）、阿拉伯早泄指数量表（Arabic Index of Premature Ejaculation, AIPE）、性生活质量调查表（sexual life quality questionnaire, SLQQ）和男性性健康调查问卷（male sexual health questionnaire, MSHQ）等为基础自编出一份接触Mn作业男工性功能调查问卷。再通过检索中国知网（China National Knowledge Infrastructure, CNKI）、万方医学网及PubMed等数据库上有关的性功能调查问卷进行修改并最终定稿。

2.2.2 问卷内容

所使用的男工性功能调查问卷主要涉及男工的一些基本信息如一般情况，生活史，疾病史，家族遗传史，接触 Mn 作业职业史，工作环境和生育情况，重点调查性功能中包括性欲、勃起功能、射精情况（PE 问题）、性交满意度和性高潮情况等方面的情况，对于男工的情绪变化，精神状态，劳动强度和配偶之间感情等方面并没有进行过多评价。调查问卷采用结构式问答，问题有开放式的，也有封闭式的，答案有单选、多选和开放式作答等。

2.2.3 性功能评分标准

本研究主要对性功能的性欲、勃起能力、射精情况（PE问题）、性生活满意度及性高潮情况等5个方面进行评分。其评分标准为：

性欲赋分：0分为一点也没有，1分为不强，2分为中等，3分为比较强烈，4分为十分强烈。

IIEF-5中每个问题的答案均对应不同分值的选项，满分为25分。判定标准为勃起功能正常：大于等于22分，轻度ED：12分至21分之间，中度ED：8分至11分之间，重度ED：小于等于7分。

PEDT中每个问题的答案对应不同分值的选项，满分为20分。判定标准为PE：大于等于11分，可能患有PE：9分或10分，不患有PE：小于等于8分。

性功能满意度分值（每个选项分别赋值0 - 4分，问卷时提示近半年内性功能的满意程度以百分比进行评价）：非常不满意为0分（接近0或从不满意），不满意为1分（大约25%），一般为2分（大约50%），满意为3分（大约75%），十分满意为4分（接近或达到100%）。

性高潮情况分值（每个选项分别赋值0 - 4分，问卷时提示近半年内经历的性高潮情况以百分比进行评价）：从不或几乎没有为0分（无或接近0），偶尔为1分（大约25%），有时为2分（大约50%），经常为3分（大约75%），总是为4分（接近或达到100%）。

2.2.4 问卷预调查

随机选择在某医院进行在岗期间职业健康体检的男工，由课题研究者同男工共同完成调查问卷，主要了解答题者对本性功能调查问卷的理解能力和接受情况，并不断调整问卷的内容，填补或删减问题。预调查过程中及时回答男工提出的问题，并将问题做好记录。测试完毕后及时与全体研究人员交流，反复修改，完善

调查问卷，最后交由专业技术人员进行问卷信效度检验，最终得到本次调查研究所用男性生殖功能问卷表（详见附件1）。

2.3 研究对象的选择

从山东省某磁性企业生产车间选择接触Mn作业男工作为Mn暴露组。研究对象纳入标准：自愿参加此项研究，书面签署知情同意书；接触Mn作业男性工人，平均每天工作至少8 h，每周至少4天，工作至少1年；能最终完成此次调查；年龄大于18岁；在此地居住3年以上，且近3年来离开本地区累积时间不超过3个月；既往体健，现场体格检查未见附睾、乳腺、喉结及阴毛发育异常等。排除标准：中途退出者；患有泌尿生殖系统或内分泌系统疾病如睾丸外伤、睾丸炎、附睾炎、精索静脉曲张、睾丸下降不全、隐睾、性传播疾病、糖尿病、甲亢或甲减等；近半年内服用激素类药物或影响性激素及性功能的药物；患有神经或精神类疾病，或服用对中枢、外周神经系统有影响的药物；家族性遗传病或近亲结婚者；暴露于酚类、有机磷农药、多环芳烃、多氯联苯、苯、甲醛、铅或砷等具有生殖毒性的毒物；其他恶性疾病或重大急慢性疾病史者。

对照组选择该Mn暴露企业附近无Mn暴露且无其它任何已知生殖毒性物质暴露的工龄在1年以上的男工。尽量按照Mn暴露组年龄、工龄、工作强度及生活情况等特征进行匹配挑选对照组男工。

2.3.1 男工性功能问卷调查

培训合格后的调查人员于2017年8月15日至10月15日期间，以山东省某磁性企业接触Mn作业男工和临沂市某工程公司非接触Mn作业男工为研究对象，对纳入标准的男工进行性功能问卷调查。问卷调查的前一天对男工进行健康宣传教育，介绍本次研究的主要目的、方法、意义和注意事项等，以提高作业男工对本次调查的认识和依从性。因调查内容的隐私性及敏感性，在调查当天尽量将男工安排在单独的、安静的环境中进行问卷调查。完全遵照《赫尔辛基宣言》相关伦理原则，在临沂市人民医院科研伦理委员会审核通过的范围内开展相关调查。特别强调本调查问卷完全匿名，不要求提供姓名及联系方式，并保证相关资料仅用于医学研究，个人信息绝对保密。男工以自主答卷为主，也可口述和调查人员一同作答，不明白之处可随时向调查人员提问。问卷调查结束后须经核查无误后男工方可离开。

2.3.2 男工知情同意原则

所有男工进入研究前均会书面告知研究内容, 同意调查后书面签署知情同意书 (详见附件2), 然后才允许参加此次调查研究。本次研究得到临沂市人民医院医学伦理委员会的批准, 批准编号为科研伦审第 (20015) 号 (详见附件3)。

2.4 接触 Mn 作业男工外暴露剂量的评估

2.4.1 工作场所空气中 Mn 粉尘的采样方法

在企业日常监测工作基础上, 对接触Mn作业男工的外暴露剂量进行综合分析 与评估。根据企业现场状况、生产工艺、作业环境和工人暴露途径的不同, 使用 BDF-30粉尘采样器分别布点采样, 采集不同Mn作业场所空气中Mn及其化合物。本次采样主要以长时间采样方法, 将微孔滤膜安装在小采样夹里, 采集2 - 8 h的空气, 采样流量为1.0 L/min, 并记录采样时的气温和气压。同时, 在采样地点采集空白空气样品。计算时间加权平均容许浓度 (permissible concentration-time weighted average, PC-TWA)。样品经处理后, 换算成二氧化锰 (manganese dioxide, MnO_2) 来代表工作场所空气中Mn的浓度, 单位为 mg/m^3 。

2.4.2 工作场所空气中 Mn 浓度的测定

采样时气象条件 (在此条件下可不用换算成标准采样体积): 气压 99.2 - 102.6 kPa, 温度 23.6 - 38.2 $^{\circ}\text{C}$, 湿度: 46.2 - 57.3%, 风速 0.5 - 1.7 m/s。

样品的测定: 先将样品放入消化液中加热到200 $^{\circ}\text{C}$ 进行消解, 用盐酸溶解残渣并稀释至10.0 mL。后分别配置含0 g/mL、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mn浓度的标准系列溶液。在279.5 nm波长下使用乙炔-空气火焰原子吸收分光光度计测定吸光度值得到Mn的标准曲线。测定样品溶液和样品空白溶液吸光度值并计算样品Mn的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.4.3 工作场所空气中 Mn PC-TWA 的计算

多个空气样本的 Mn PC-TWA 计算公式见 (1) :

$$\text{PC-TWA} = \frac{C_1 T_1 + C_2 T_2 + C_3 T_3 + \dots C_n T_n}{8} \quad (1)$$

其中, PC-TWA: 男工8 h时间加权平均接触Mn的浓度, 单位为 mg/m^3 ; C_1 、 C_2 、 C_n : 测得各个工作场所中Mn的浓度, 单位为 mg/m^3 ; T_1 、 T_2 、 T_n : 男工在相应Mn浓度下的暴露时间,

单位为h; 8: 时间加权平均容许浓度规定的8 h。当C₁、C₂或C_n的检测结果低于最低定量浓度时, 取值为最低定量浓度值。根据《中华人民共和国国家职业卫生标准》(GBZ 2.1-2007)中规定我国Mn及其化合物(按MnO₂计)职业接触限值标准PC-TWA为0.15 mg/m³。

2.5 质量控制

2.5.1 设计阶段的质量控制

在设计研究阶段, 参考国内外相关文献并邀请有关专家对自制的问卷进行评价及修改, 得到初步的调查问卷。全体调查人员经过研究讨论和预调查, 检验问卷的可行性并结合实际情况最终得到较为可行的调查问卷。选取中级及以上职称医师参与体格检查, 对调查问卷人员在调查前进行统一培训, 明确调查目的、标准和技巧, 并统一调查步骤, 统一使用调查用语, 统一填写方式, 着重培训隐私问题调查技巧, 降低调查者的偏倚。在Mn暴露组选择方面, 尽量选择单一接触Mn作业的男工, 尽量排除外界因素和内在因素对男工生殖功能的影响。在对照组选择方面, 对男工生活环境、工作场所和工作强度等因素尽量进行匹配。对全部作业男工进行宣传教育和相关知识培训, 以提高男工的依从性及作答的准确性。与卫生行政执法部门、被调查企业职业卫生专职人员以及参与本次调查的医务人员联系沟通, 相互配合, 保证调查现场有序开展。

2.5.2 实施阶段的质量控制

环境检测人员严格按照职业卫生标准《工作场所空气中有毒物质测定 第17部分: 锰及其化合物》进行空气中Mn样品采集、保存、运输和检测工作, 检测仪器使用前经过了校准和检定。

Mn暴露组及对照组男工严格按照各组设定的纳入标准和排除标准进行选择。作业男工体格检查由生殖医师一人独立操作完成, 尤其对生殖系统进行详细的检查并记录检查结果。

作业男工以自主快速作答为主, 不明白之处可向调查人员询问并正确理解后再进行作答。为减少作业男工的顾虑, 明确说明所答问卷一律无对错之分, 作业男工不要求提供姓名, 个人信息绝无泄露。调查人员不清楚作业男工的分组状况, 调查结束后及时检查问卷质量, 纠正错项和补充漏项, 减少信息偏倚。

2.5.3 数据整理与分析阶段的质量控制

数据整理与分析之前, 再次检查调查问卷并除去不合格的调查问卷。问卷所答结果均录入计算机系统, 并由第三人核对录入结果, 不一致处统一查阅原始问

卷，做到无错项，无不符合逻辑的应答，减少信息偏倚。采用描述性统计分析方法对各组男工的基本资料进行分析以了解其分布情况，并对所得数据进行相关分析检验。

2.6 统计学分析

采用均数±标准偏差表示连续变量，率或构成比表示分类变量。利用Kolmogorov-Smirnov方法对数值进行正态性检验。利用独立样本T检验（Independent-Samples T Test）方法对两组之间均数进行比较，利用 χ^2 检验（Chi-Square test）方法对各组的计数资料进行比较，如有1/5格子以上的理论数小于5，或有1个格子理论数小于1，则使用Kruskal-Wallis test 非参数检验法。数据的整理和分析使用IBM SPSS Statistics 22.0统计软件， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 均认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 接触 Mn 作业男工外暴露剂量的评估

Mn 暴露企业概况：该企业始建于 2002 年，主要经营磁性材料制品（Mn Zn 软磁铁氧体）及相关电子产品的研发、生产和销售业务，年产能力达到 3 万余吨，是目前国内最大的高磁导率 MnZn 铁氧体生产商。主要原料为三氧化二铁（iron(III) oxide, Fe_2O_3 ）、氧化锌（zinc oxide, ZnO ）以及四氧化三锰（trimanganese tetraoxide, Mn_3O_4 ）。主要生产设备有球磨机、回转窑、黑振机、砂磨机和造粒包装系统等。该厂共三条生产线分属三个车间，生产工艺基本相同，主要生产工艺大致分为：原材料→干混→红振→预烧→黑振→砂磨→造粒包装→产品成型（粉料）。其中一车间生产线为半自动生产线，设备陈旧，濒临淘汰。二车间和三车间生产线为全自动生产线，自动化程度较高，生产设备基本相同。三个车间原料的投放及混匀均需人工操作，工人主要采用车推、锹铲或肩扛等人力的方式将原料送入生产车间，人工加料搅拌入炉作业。干混作业均为开放式，红振作业、预烧作业、黑振作业、砂磨作业及造粒包装作业等车间主要以自然通风为主，无专门通风除尘吸尘设施。现有职工 187 人，其中接触 Mn 作业男工 152 人。作业人员统一配发棉质口罩、防滑手套和工作服装等劳保用品。该企业 24 h 运行，每个生产车间实行“三八”工作制度，即每天分 3 个工作班，每班时间为 8 h。

3.1.1 一车间作业环境空气中 Mn 浓度的检测结果及结果判定

如表 1.1 所示，一车间 MnO_2 PC-TWA 在 $0.13 - 0.29 \text{ mg/m}^3$ 之间，均值为 $(0.20 \pm 0.059) \text{ mg/m}^3$ ，除预烧作业外，干混作业、红振作业、黑振作业、砂磨作业和造粒包装作业等环境空气中 Mn 粉尘浓度均超标。

表1.1 一车间作业环境空气中Mn浓度的检测结果及结果判定

工作场所	工作岗位	暴露人数	暴露时间(h/班)	PC-TWA (mg/m ³)	结果判定
一车间	干混作业	18	4	0.29	超标
	红振作业	9	5	0.24	超标
	预烧作业	6	6	0.13	不超标
	黑振作业	6	6	0.16	超标
	砂磨作业	6	6	0.18	超标
	造粒包装作业	14	5	0.22	超标

PC-TWA: 时间加权平均容许浓度, Mn职业接触限值 (MnO₂ PC-TWA): 0.15 mg/m³。

3.1.2 二车间作业环境中 Mn 浓度的检测结果及结果判定

如表1.2所示, 二车间MnO₂ PC-TWA在0.05 - 0.21 mg/m³之间, 均值为(0.12 ± 0.66) mg/m³, 其中干混作业和造粒包装作业环境空气中Mn粉尘浓度超标, 红振作业、预烧作业、黑振作业和砂磨作业等环境空气中Mn粉尘浓度不超标。

表 1.2 二车间作业环境空气中Mn浓度的检测结果及结果判定

工作场所	工作岗位	暴露人数	暴露时间(h/班)	PC-TWA (mg/m ³)	结果判定
二车间	干混作业	12	6	0.21	超标
	红振作业	6	7	0.13	不超标
	预烧作业	6	7	0.10	不超标
	黑振作业	6	7	0.06	不超标
	砂磨作业	6	7	0.05	不超标
	造粒包装作业	12	6	0.19	超标

PC-TWA: 时间加权平均容许浓度, Mn职业接触限值 (MnO₂ PC-TWA): 0.15 mg/m³。

3.1.3 三车间作业环境中 Mn 浓度的检测结果及结果判定

如表1.3所示, 三车间MnO₂ PC-TWA在0.04 - 0.16 mg/m³之间, 均值为(0.09 ± 0.54) mg/m³, 干混作业Mn粉尘浓度超标, 红振作业、预烧作业、黑振作业、砂磨作业和造粒包装作业等环境空气中Mn粉尘浓度不超标。

表 1.3 三车间作业环境空气中Mn浓度的检测结果及结果判定

工作场所	工作岗位	暴露人数	暴露时间 (h/班)	PC-TWA (mg/m ³)	结果判定
三车间	干混作业	9	6	0.16	超标
	红振作业	6	7	0.11	不超标
	预烧作业	6	7	0.04	不超标
	黑振作业	6	7	0.05	不超标
	砂磨作业	6	7	0.04	不超标
	造粒包装作业	12	6	0.14	不超标

PC-TWA: 时间加权平均容许浓度, Mn职业接触限值 (MnO₂ PC-TWA): 0.15 mg/m³

Mn 暴露组男工工作场所空气中 Mn PC-TWA 范围为 0.04 至 0.29 mg/m³。其中, 一车间 Mn PC-TWA 最高, 三车间最低, 三个车间 Mn PC-TWA 的检测结果进行比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组男工工作场所空气中 Mn PC-TWA 范围为 0.00 - 0.02 mg/m³, 这些浓度可以忽略不计, 因为这些浓度远低于 Mn 的职业接触限值。

3.2 问卷回收情况

本次研究中 Mn 暴露组共纳入 152 人, 对照组共纳入 206 人。向男工总共发放 358 份调查问卷并收回问卷 296 份, 其中有效问卷 244 份, 有效应答率为 68.16%。Mn 暴露组有效问卷 128 份, 有效应答率为 84.21%, 对照组有效问卷 116 份, 有效应答率为 56.31%。

3.3 研究对象的基本信息

Mn 暴露组和对照组研究对象在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间等基本信息见表 2。Mn 暴露组平均年龄为 33.47 ± 6.14 岁, 平均工龄为 8.76 ± 2.32 年。对照组男工平均年龄为 34.42 ± 7.51 岁, 平均工龄为 8.05 ± 2.43 年; Mn 暴露组与对照组在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间方面差异无统计学意义。

表 2 Mn暴露组和对照组男工的基本信息

项目	Mn 暴露组(n = 128)	对照组(n= 116)	P 值
年龄(岁)			0.755
18 - 29	56(48.28%)	52(44.83%)	
30 - 39	39(33.62%)	35(30.17%)	
40 - 49	27(23.28%)	25(21.55%)	
≥ 50	6(5.17%)	4(3.45%)	
工龄(年)	8.76 ± 2.32	8.05 ± 2.43	0.614
BMI (kg/m ²)			0.927
< 24	36(31.03%)	31(26.72%)	
24 – 28	52(44.83%)	48(41.38%)	
≥ 28	40(34.48%)	37(31.90%)	
吸烟情况			0.217
偶尔或不吸烟	70(60.43%)	58(50.0%)	
中等(< 10 只/天)	37(31.90%)	35(30.17%)	
经常(≥ 10 只/天)	17(14.66%)	14(16.38%)	
戒烟	4(3.45%)	3(3.45%)	
饮酒情况			0.825
很少或不喝	64(55.17%)	64(50.00%)	
中等(< 250g/天)	39(33.62%)	39(30.47%)	
经常(≧ 250g/天)	25(21.55%)	25(19.53%)	
受教育程度			0.734
小学或者更低	24(20.69%)	23(19.83%)	
初中	32(27.59%)	28(27.14%)	
高中或中专	58(50.00%)	54(46.55%)	
大学或以上	14(12.07%)	11(9.48%)	
子女出生体重(kg)	3.68 ± 1.22	3.41 ± 1.08	0.268
禁欲时间(天)	4.23 ± 1.62	3.89 ± 1.57	0.415

3.4 接触 Mn 作业对男工性功能的影响

3.4.1 接触 Mn 作业对男工性欲水平的影响

如表3.1所示, 对照组男工性欲水平一点也没有占5.17%, 不强占12.07%, 中等占58.62%, 比较强烈占17.24%, 十分强烈占6.90%。Mn暴露组男工性欲水平一点也没有占8.59%, 不强占19.53%, 中等占60.16%, 比较强烈占10.16%, 十分强烈占1.56%。卡方检验显示Mn暴露组和对照组比较男工性欲水平下降且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3.1 Mn暴露组和对照组男工性欲水平的比较

项目	对照组 (n=116)	Mn暴露组 (n=128)	卡方值	P值
性欲水平			9.650	0.047
一点也没有	6(5.17%)	11(8.59%)		
不强	14(12.07%)	25(19.53%)		
中等	68(58.62%)	77(60.16%)		
比较强烈	20(17.24%)	13(10.16%)		
十分强烈	8(6.90%)	2(1.56%)		

$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3.4.2 接触 Mn 作业对男工勃起功能的影响

如表3.2所示, 本次调查中我们发现对照组男工勃起功能正常占84.48%, 轻度ED占8.62%, 中度ED占5.17%, 重度ED占1.72%, ED患病率为15.52%。Mn暴露组男工勃起功能正常占64.84%, 轻度ED占19.53%, 中度ED占10.94%, 重度ED占4.69%, ED患病率为35.16%。卡方检验显示Mn暴露组ED患病率高于对照组患病率且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 3.2 Mn暴露组和对照组男工勃起功能的比较

项目	对照组 (n=116)	Mn暴露组 (n=128)	卡方值	P值
勃起功能			12.680	0.005
勃起功能正常(%)	98(84.48%)	83(64.84%)		
轻度ED(%)	10(8.62%)	25(19.53%)		
中度ED(%)	6(5.17%)	14(10.94%)		
重度ED(%)	2(1.72%)	6(4.69%)		
ED患病率(%)	18(15.52%)	45(35.16%)		

$P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.4.3 接触 Mn 作业对男工射精功能（PE 问题）的影响

如表3.3所示，本次调查中我们发现对照组男工无PE占77.59%，可能存在PE占14.66%，PE占7.76%，PE患病率为22.42%，Mn暴露组男工无PE占59.38%，可能存在PE占27.34%，PE占13.28%，PE患病率为40.62%。卡方检验显示Mn暴露组PE患病率高于对照组患病率且差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

表 3.3 Mn暴露组和对照组男工射精功能（PE问题）的比较

项目	对照组(n=116)	Mn暴露组(n=128)	卡方值	P值
PE			9.305	0.010
无PE (%)	90(77.59%)	76(59.38%)		
可能存在PE (%)	17(14.66%)	35(27.34%)		
PE (%)	9(7.76%)	17(13.28%)		
PE患病率 (%)	26(22.42%)	52(40.62%)		

$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3.4.4 接触 Mn 作业对男工性功能满意度的影响

如表3.4所示，对照组男工对性功能非常不满意占10.34%，不满意占14.66%，一般占44.83%，满意占19.83%和非常满意占10.34%。Mn暴露组男工对性功能非常不满意占10.16%，不满意占17.19%，一般占42.19%，满意占23.44%和非常满意占7.03%。Mn暴露组男工性功能满意程度与对照组比较差异无统计学差异。

表 3.4 Mn暴露组和对照组男工对性功能满意度的比较

项目	对照组(n=116)	Mn暴露组(n=128)	卡方值	P值
性功能满意度			1.485	0.829
非常不满意 (%)	12(10.34%)	13(10.16%)		
不满意 (%)	17(14.66%)	22(17.19%)		
一般 (%)	52(44.83%)	54(42.19%)		
满意 (%)	23(19.83%)	30(23.44%)		
非常满意 (%)	12(10.34%)	9(7.03%)		

3.4.5 接触 Mn 作业对男工性高潮情况的影响

如表3.5所示，对照组男工性高潮从不或几乎没有占2.59%，偶尔占7.76%，有时占9.48%，经常占18.97%，总是占61.21%。Mn暴露组男工性高潮从不或几乎没

有占3.91%，偶尔占12.50%，有时占10.16%，经常占14.84%，总是占58.59%。Mn暴露组男工性高潮情况与对照组比较差异无统计学意义。

表 3.5 Mn暴露组和对照组男工性高潮情况的比较

项目	对照组(n=116)	Mn暴露组(n=128)	卡方值	P值
性高潮情况			2.371	0.680
从不或几乎没有	3(2.59%)	5(3.91%)		
偶尔	9(7.76%)	16(12.50%)		
有时	11(9.48%)	13(10.16%)		
经常	22(18.97%)	19(14.84%)		
总是	71(61.21%)	75(58.59%)		

3.4.6 接触 Mn 作业对男工性功能各项目评分的影响

如表3.6所示，将男性性功能各项目进行量化赋分后发现Mn暴露组勃起功能IIEF-5评分为（20.24 ± 5.59），射精功能PEDT评分为（5.63 ± 3.63）以及性欲水平评分为（1.77 ± 0.81）。与对照组相比，Mn暴露组IIEF-5评分和性欲水平评分均下降，PEDT评分上升，差异具有统计学意义（ $P < 0.01$ ），而性交满意度及性高潮评分的差异无统计学意义。

表 3.6 Mn暴露组和对照组男工性功能各项目评分的比较

项目	对照组(n=116)	Mn暴露组(n=128)	P值
勃起功能(IIEF-5评分)	22.17 ± 4.11	20.24 ± 5.59	0.003
射精功能（PEDT评分）	5.63 ± 3.63	7.02 ± 3.76	0.004
性欲水平	2.09 ± 0.88	1.77 ± 0.81	0.003
性功能满意度	2.05 ± 1.09	2.00 ± 1.05	0.706
性高潮情况	3.28 ± 1.09	3.12 ± 1.24	0.265

$P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.5 不同车间接触 Mn 作业对男工性功能的影响

3.5.1 不同车间接触 Mn 作业男工的基本信息

三个车间男工年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间等基本信息见表4。三个车间男工在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间方面的差异无统计学意义。

表 4 研究对象的基本信息

项目	一车间(n = 45)	二车间(n = 42)	三车间(n = 41)	P 值
年龄(岁)				0.571
18 - 29	17(37.78%)	19(45.24%)	20(48.78%)	
30 - 39	14(31.11%)	12(28.57%)	13(31.71%)	
40 - 49	11(24.44%)	9(21.43%)	7(17.03%)	
≥ 50	3(6.67%)	2(4.76%)	1(2.44%)	
工龄(年)	8.23 ± 2.56	8.04 ± 2.13	7.92 ± 3.81	0.737
BMI (kg/m ²)				0.853
< 24	12(26.67%)	10(23.81%)	14(34.15%)	
24 - 28	18(40.00%)	19(45.24%)	15(36.59%)	
≥ 28	15(33.33%)	13(30.95%)	12(29.27%)	
吸烟情况				0.238
偶尔或不吸烟	23(51.11%)	24(57.14%)	23(56.10%)	
中等(< 10 只/天)	14(31.11%)	12(28.57%)	11(26.83%)	
经常(≥ 10 只/天)	6(13.33%)	5(11.90%)	6(14.63%)	
戒烟	2(4.44%)	1(2.38%)	1(2.44%)	
饮酒情况				0.276
很少或不喝	24(53.33%)	21(50.00%)	19(46.34%)	
中等(< 250g/天)	13(28.89%)	12(28.57%)	14(34.15%)	
经常(≥ 250g/天)	8(17.78%)	9(21.43%)	8(19.51%)	
受教育程度				0.932
小学或者更低	9(20.00%)	8(19.05%)	7(17.07%)	
初中	11(24.44%)	10(23.81%)	11(26.83%)	
高中或中专	20(44.44%)	20(47.62%)	18(43.90%)	
大学或以上	5(11.11%)	4(9.52%)	5(12.20%)	
子女出生体重(kg)	3.24 ± 1.87	3.15 ± 2.03	3.42 ± 1.99	0.318
禁欲时间(天)	3.87 ± 2.62	3.66 ± 2.06	3.71 ± 1.87	0.723

3.5.2 不同车间接触 Mn 作业对男工性欲水平的影响

如表 5.1 所示, 我们发现一车间男工性欲水平一点也没有占 15.56%, 二车间

为 9.52%，三车间为 0；不强一车间为 28.89%，二车间为 16.67%，三车间为 12.20%。随着车间空气中 Mn 浓度的升高，性欲水平下降。卡方检验显示三个车间男工性欲水平的比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 5.1 不同车间男工性欲水平的比较

项目	一车间(n=45)	二车间(n=42)	三车间(n=41)	卡方值	P值
性欲水平				11.129	0.004
一点也没有	7(15.56%)	4(9.52%)	0		
不强	13(28.89%)	7(16.67%)	5(12.20%)		
中等	22(48.89%)	24(57.14%)	31(75.61%)		
比较强烈	3(6.67%)	6(14.29%)	4(9.76%)		
十分强烈	0	1(2.38%)	1(2.44%)		

$P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.5.3 不同车间接触 Mn 作业对男工勃起功能的影响

如表5.2所示，我们发现一车间男工ED患病率为53.33%，二车间为30.95%，三车间为19.51%。随着车间空气中Mn粉尘浓度的升高，ED患病率升高。卡方检验显示三个车间男工ED患病率的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 5.2 不同车间男工勃起功能的比较

项目	一车间(n=45)	二车间(n=42)	三车间(n=41)	卡方值	P值
勃起功能				8.479	0.014
勃起功能正常 (%)	21(46.67%)	29(69.05%)	33(80.49%)		
轻度ED (%)	12(26.67%)	7(16.67%)	6(14.63%)		
中度ED (%)	8(17.78%)	4(9.52%)	2(4.88%)		
重度ED (%)	4(8.89%)	2(4.76%)	0		
ED患病率	53.33%	30.95%	19.51%		

$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3.5.4 不同车间接触 Mn 作业对男工射精功能 (PE 问题) 的影响

如表5.3所示，我们发现一车间男工PE患病率为77.78%，二车间为26.19%，三车间为14.63%。随着车间空气中Mn粉尘浓度的升高，PE患病率升高。卡方检验显示三个车间男工PE患病率的比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 5.3 不同车间男工射精功能(PE问题)的比较

项目	一车间(n=45)	二车间(n=42)	三车间(n=41)	卡方值	P值
PE				36.269	0.000
无PE (%)	10(22.22%)	31(73.81%)	35(85.37%)		
可能存在PE (%)	24(53.33%)	7(16.67%)	4(9.76%)		
PE (%)	11(24.44%)	4(9.52%)	2(4.89%)		
PE患病率	77.78%	26.19%	14.63%		

$P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.5.5 不同车间接触 Mn 作业对男工性功能满意度的影响

如表5.4所示, 三个车间男工性功能满意程度之间的差异无统计学意义。

表 5.4 不同车间男工性功能满意度的比较

项目	一车间(n=45)	二车间(n=42)	三车间(n=41)	卡方值	P值
性功能满意度				0.507	0.776
非常不满意(%)	4(8.89%)	5(11.90%)	4(9.75%)		
不满意(%)	9(20.0%)	8(19.05%)	5(12.20%)		
一般(%)	20(44.44%)	17(40.48%)	17(41.46%)		
满意(%)	8(17.78%)	9(21.43%)	13(31.71%)		
非常满意(%)	4(8.89%)	3(7.14%)	2(4.88%)		

3.5.6 不同车间接触 Mn 作业对男工性高潮情况的影响

如表5.5所示, 三个车间男工性高潮情况之间的比较差异无统计学意义。

表 5.5 不同车间男工性高潮情况的比较

项目	一车间(n=45)	二车间(n=42)	三车间(n=41)	卡方值	P值
性高潮情况				0.143	0.931
从不或几乎没有	2(4.44%)	2(4.76%)	1(2.44%)		
偶尔	7(15.56%)	5(11.90%)	4(9.78%)		
有时	5(11.11%)	4(9.52%)	4(9.76%)		
经常	8(17.78%)	6(14.29%)	5(12.20%)		
总是	23(51.11%)	25(59.52%)	27(65.86%)		

4 讨论

美国国家职业安全与健康研究所（National Institute of Occupational Safe and Health, NIOSH）确定的Mn PC-TWA为 $1\text{mg}/\text{m}^3$ 或短期暴露限值（15 min）为 $3\text{mg}/\text{m}^3$ ，而2015年美国职业安全卫生管理局（Occupational Safety and Health Administration, OSHA）的推荐性接触限值（recommended exposure limits, RELs）为 $5\text{mg}/\text{m}^3$ ^[30]。2011年欧盟职业接触限值科学委员会（the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits, SCOEL）推荐的将Mn-TWA拆分为可呼吸性的（ $0.05\text{mg}/\text{m}^3$ ）和可吸入性的（ $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ ）方法最受推崇^[31]。在本研究中，该企业男工工作场所空气中Mn PC-TWA范围为 0.04 至 $0.29\text{mg}/\text{m}^3$ ，平均值为 $0.13\text{mg}/\text{m}^3$ ，其中Mn粉尘超标的作业环境主要集中在干混作业及造粒包装作业。一车间 MnO_2 PC-TWA在 $0.13 - 0.29\text{mg}/\text{m}^3$ 之间，均值为 $(0.20 \pm 0.59)\text{mg}/\text{m}^3$ ，二车间 MnO_2 PC-TWA在 $0.05 - 0.21\text{mg}/\text{m}^3$ 之间，均值为 $(0.12 \pm 0.66)\text{mg}/\text{m}^3$ ，三车间 MnO_2 PC-TWA在 $0.04 - 0.16\text{mg}/\text{m}^3$ 之间，均值为 $(0.09 \pm 0.54)\text{mg}/\text{m}^3$ ，三个车间空气中Mn粉尘浓度均值的比较差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。一车间Mn PC-TWA除了预烧作业外均高于国家职业接触限值标准（ $0.15\text{mg}/\text{m}^3$ ，以 MnO_2 计算），表明一车间工作场所空气中Mn浓度控制工作不到位。究其原因，考虑此生产线采用开放式作业，工作年限较长，车间空间狭小，生产工艺落后，又无通风除尘措施，男工也无专门针对Mn暴露的防护措施，建议尽早淘汰旧的生产线，更新设备，并提高企业职工个体防护意识。二车间干混作业和造粒包装作业工作环境空气中Mn浓度超标，三车间干混作业工作环境空气中Mn浓度超标，这两个车间考虑是自动化程度不高，密闭程度不高且通风不够所致，建议采用自动化加料装置，在密闭的空间进行搅拌，并且增加通风除尘装置。综合考虑，建议该企业积极推进技术和工艺改革，提高生产的自动化和密闭化，尽早淘汰旧的生产线，从源头上减少Mn的产生。不断完善职业卫生管理工作，改善劳动环境，合理安排工作时间，减少工人暴露时间。检修职业病防护设施及应急救援设施，确保其正常运行。同时加强职业卫生知识宣传与教育工作，提高工人职业卫生防护意识。指导劳动者正确佩戴防护用品，督促劳动者遵守职业卫生操作规程及做好个人卫生工作。同时定期对Mn作业场所进行环境检测，及时组织工人进行职业健康体检等工作以保护劳动者健康。

性是人类繁衍生息的最基础保障，也是健康生活及幸福生活不可缺少的重要

保障。性功能对于增进与配偶之间的感情以及维护家庭和睦具有较好的促进作用。在中国,性有着更深层次的文化和精神内涵。在日益增长的精神需求下,性功能质量的问题也日益凸显。心理、生理、病理、环境和不良刺激等均可对性功能造成影响,引起性功能障碍。性功能障碍严重影响男性的生殖功能,损害男性生活和工作的稳定与发展。然而临床上尚未有客观性量化指标对男性性功能状况进行统一诊断及评价,目前主要依赖于男性的主诉及相关自评量表的评估。自评量表是一种依靠主观性的评估来反映性功能的方法,具有无创、高效、廉价、相对自由等特点并且能够较客观地反映男性的性功能,在临床上已被用于诊断男性性功能和评估治疗效果等。PE和ED患病率较高,相关研究开展的较为完善,用于诊断和筛查的量化指标相对其他性功能指标客观,常被用来评价男性性功能的状况。

性欲是想要进行性生活的一种欲望,是发生性交行为的初始动力,也是反映生殖功能的重要指标。性欲出现问题主要表现为性欲低下、性欲亢进或性取向异常等。王禅等^[32]人发现在几何平均浓度为 0.03 mg/m^3 的 MnO_2 作业环境下,电焊工性欲减退阳性率就会出现明显增高。马勇等^[33]在300名电焊作业男工人群中发现男性性功能障碍发生率为13.0%,而男工性欲减退或无性兴奋性者占11.0%。本研究中,Mn暴露组性欲一点也没有占8.59%,不强占19.53%,中等占60.16%,比较强烈占10.16%,十分强烈占1.56%。卡方检验显示Mn暴露组男工性欲水平与对照组男工性欲水平比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Mn暴露组性欲得分(1.77 ± 0.81)低于与对照组性欲得分($P < 0.01$)。我们又对三个车间接触Mn作业男工性欲水平进行比较,发现男工性欲水平一点也没有在一车间为15.56%,二车间为9.52%,三车间为0;不强一车间为28.89%,二车间为16.67%,三车间为12.20%。三个车间男工性欲水平之间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示接触Mn作业可导致该企业男工性欲下降,且随着作业场所空气中Mn粉尘浓度升高,性欲水平越低。

勃起能力是性行为的基础并决定着能否完成性交。勃起能力不仅影响到男性的生殖功能,而且会给性伴侣的生活方式和关系带来影响。流行病学分析显示,在美国44%的60 - 69岁男性和将近70%的70岁以上的男性有勃起功能异常的症状,40岁以下的男性有5%的人患有ED^[34]。ED严重影响男性的生育功能,也会造成男性自信心不足,降低生活满意度。ED还对自身及其配偶的心理及精神状态产生不良影响,威胁家庭和睦,而且还有可能影响社会稳定。此外,ED也可早期预警某些慢性疾病如高血压、冠心病及糖尿病等^[35-36]。IIEF-5能较为客观的量化和评价ED的严重程度,可对ED做出有效和准确的评估,临床上常用于筛查ED病人,也可用

于判定ED治疗效果^[37]。本次研究显示对照组男工ED患病率为15.52%，与Hao等人的调查结果相一致^[18]。Mn暴露组勃起功能正常占64.84%，轻度ED占19.53%，中度ED占10.94%，重度ED占4.69%，接触Mn作业男工ED患病率为35.16%，男工勃起功能评分为 (20.24 ± 5.59) 低于对照组评分且差异均具有统计学意义 $(P < 0.01)$ 。我们又对三个车间男工的勃起功能进行比较，发现一车间男工ED患病率为53.33%，二车间为30.95%，三车间为19.51%，三个车间男工ED患病率之间的差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。提示接触Mn作业可对男工勃起功能产生影响，导致男工ED患病率升高，且随着工作场所空气中Mn粉尘浓度的升高，ED患病率越高。

射精是性生活的最终阶段和生育能力的决定因素。PE是临床上一种常见的射精功能障碍且经常伴随着ED等其他性功能障碍疾病。PE严重打击男性自信心，使得男性心里压力过大，影响与其配偶的性关系，破坏家庭和谐。PE还不利于生育，降低生活质量，严重者可导致精神心理疾病的发生^[38-39]。然而多数患者由于种种顾虑或害羞，讳疾忌医，从而加重了病情。研究显示，PE并不会受到年龄、婚姻状况和收入水平的影响^[40]。PEDT是目前评价PE较为常用的一种问卷量表。有研究证实PEDT诊断PE误诊率仅为14%而漏诊率仅为7%左右^[41]，因而常被应用于诊断PE。在本次调查中，我们也未发现PE之外的其他射精功能障碍，因此我们以PE问题反映男工的射精情况。本研究发现，对照组PE患病率为22.42%，和国内郭军等^[25]人的调查结果基本吻合，而Mn暴露组无PE占59.38%，可能存在PE占27.34%，PE占13.28%，PE患病率为40.62%远高于对照组患病率 $(P < 0.05)$ 。Mn暴露组PEDT评分 (7.02 ± 3.76) 低于对照组PEDT评分 (5.63 ± 3.63) $(P < 0.01)$ 。我们又对三个车间男工PE患病率进行比较，发现一车间男工PE患病率为77.78%，二车间为26.19%，三车间为14.63%，三个车间PE患病率的比较差异有统计学意义 $(P < 0.01)$ 。这些均表明接触Mn作业可对男工射精功能产生不良影响，导致男工PE患病率升高，且随着工作场所空气中Mn粉尘浓度升高，PE患病率越高。

性生活满意度与性高潮情况同样是评价男性性功能的重要指标。它们均是主观性指标，评判标准千差万别，受男性年龄、性经验、社会环境、审美、宗教信仰和文化程度等多方面的影响。本研究中Mn暴露组男工对性功能非常不满意占10.16%，不满意占17.19%，一般占42.19%，满意占23.44%和非常满意占7.03%，性功能满意度评分为 (2.00 ± 1.05) 。男工性高潮从不或几乎没有占3.91%，偶尔占12.50%，有时占10.16%，经常占14.84%，总是占58.59%，性高潮情况评分为 (3.12 ± 1.24) 。Mn暴露组男工性高潮情况及性功能满意度与对照组男工比较，差异均无

统计学意义。三个车间男工性功能满意度和性高潮情况的比较差异也无统计学意义，提示我们接触Mn作业对男工性功能的主观感受没有产生明显的影响。

尽管本次研究存在一定的局限性，如样本量较少，对男工性功能的评估缺少诊断的金标准。另外，由于“性”在国人中的敏感性及其他外界因素的干扰，不能排除被调查者有所隐瞒或做出错误的评估。本研究的有些结果及观点有待更多基础和临床的研究来进一步论证。但是我们的结果显示接触Mn作业可导致男工性功能障碍，无论是从性欲、勃起功能还是射精功能（PE问题）方面都存在不同程度的下降。这些均提示我们应加强对接触Mn作业可导致男工性功能障碍的认识，及时对男工进行性心理疏导，缓解不良情绪，普及性知识，积极开展性健康教育，保护劳动者的生殖健康。

5 结论

1. 接触 Mn 作业可导致男工 PE 和 ED 患病率升高，性欲水平下降。
2. 男工性功能障碍可能与工作场所空气中 Mn 的浓度有关。

第二部分：接触锰作业对男工生殖内分泌激素及精液质量的影响

1 前言

职业性 Mn 暴露可以发生在不同的职业环境中,例如采矿、钢铁合金生产或加工、焊接、冶炼、干电池制造和农用化学品等^[42]。据报道,在全球范围内仅和 Mn 合金生产直接相关的工作岗位就有 6.7 - 8.6 万个(总产值估计为每年 6.13 - 7.96 亿美元),另外间接的和由此带来的产业又创造了 21.7 - 2.78 万个就业岗位^[43]。虽然人类在减少职业暴露方面已经做出了相当大的进步,但在一些地方工人仍然会暴露于高浓度的 Mn。Mn 的生殖毒性主要在职业活动中有过相关报道^[44-45],且因人为事故或环境污染导致的生殖功能受损的情况时有发生。

人群流行病学研究显示 Mn 暴露可导致男性生殖功能受损,出现生殖内分泌紊乱及精液质量下降。例如, Wang 等^[46]人发现长期暴露于低浓度的 Mn 会影响神经内分泌激素的代谢并且导致电焊工人血清中泌乳素(prolactin, PRL),促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)水平降低。此外, Ou 等^[47]人也发现暴露于 Mn 环境的 48 名冶炼厂男工血清 PRL,睾酮(testosterone, TSTO)和卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)水平下降。人群流行病学调查显示,血清 Mn 浓度>19.40 $\mu\text{g/L}$ (P80)就会对精液浓度、精子形态、精子活动力以及精子运动学相关参数产生不良影响^[48]。Telisman 等^[49]人更直接指出男性精液质量的下降和生殖内分泌功能的紊乱与 Mn 的暴露有直接的关系。研究发现 Mn 可通过血睾屏障直接损伤男性(雄性)睾丸,延长精液液化时间及降低精子活动力从而使得精液质量下降,最终导致男性生育能力降低以及异常胎儿的出生^[50]。Mn 还可通过氧化应激、细胞凋亡以及干扰生殖内分泌功能等途径最终造成精子质量的下降和男性生育力的降低^[51-52]。

男性生殖毒理学的研究一般集中在毒物对生殖内分泌激素和精液质量的影响^[53-54]。生殖内分泌激素在维持及调节机体的生殖功能方面起到重要的作用,而精液质量可反映生殖毒性的最终效应。两者都是描述毒物生殖毒性最常用的指标。然而,很少有资料阐明高 Mn 暴露尤其是职业暴露人群和男性生殖毒性之间的关系。

本研究以山东省某磁性企业接触 Mn 作业男工为研究对象,通过评估 Mn 作业男工内暴露剂量和血清生殖内分泌激素水平及精液质量并分析其线性关系,为接触 Mn 作业可导致男工生殖毒性提供基础的职业人群资料。

2 材料和方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 主要试剂

硝酸（优级纯）（德国merck公司）

橙黄 G6（国药集团化学试剂有限公司）

GnRH 试剂盒（上海江莱生物公司）

过氧化氢（苏州斌顺化工有限公司）

伊红-苯胺黑试剂（常州贝源鑫生物科技有限公司）

巴氏染色试剂（深圳市鹏一医疗仪器有限公司）

2.1.2 主要仪器

光学显微镜（日本Olympus公司）

分光光度计（美国Bio-Tek Instruments公司）

电感耦合等离子体质谱（NexION 350，美国PerkinElmer公司）

生物安全柜（HF safe-900 LC，上海利康）

全自动彩色精子质量分析系统（WLJY-9000型，北京伟力技贸公司）

全自动化学发光免疫分析仪（Centaur xp，德国西门子）

精子计数板（MACRO，南京市玄武区宇宸光学器材经营部）

2.2 研究对象的选择

同第一部分研究对象的选择，且充分考虑研究对象的自主选择权，对于未提供生物样本的作业男工均纳入排除标准。

2.3 研究对象基本信息的调查

所有参与调查的男工均进行了完整的常规临床体格检查，尤其对生殖系统进行详细的检查，并完成了一份包括个人一般情况、生活史、疾病史、家族遗传史、职业史、工作环境和生育情况等基本信息的调查问卷。调查内容主要包括：（1）一般情况：出生日期、身高、体重、民族、宗教信仰、文化程度、婚姻状况和居

住状况等；（2）生活史：饮食习惯、服用药物史、X光检查和卫生习惯等；（3）疾病史；（4）家族遗传史；（5）接触Mn作业职业史及工作环境：工种、工作时长、暴露时长、暴露方式、个人防护情况和非接触Mn作业外的一般暴露情况等；（6）生育情况：生育子女性别、出生体重，有无出生缺陷，身体发育、智力状况等。

2.4 接触 Mn 作业男工内暴露剂量的评估

2.4.1 精液样品的采集和处理

所有男工原则上均需禁欲2-7天，但在本次研究中，禁欲时间超过7天的男工也同样收集其精液。在室温25-30℃的取精室内，采用手淫取精的方法，收集一次射精的全部精液于无菌精液采集盒中（专用精液采集盒，对精子质量无任何影响）。然后立即移送至恒温实验室，标明编号，标本采集日期（具体到min），禁欲天数，标本的完整性，获取标本所遇到的困难以及精液采集与开始分析的时间间隔等信息，放在37℃恒温水浴箱中自行液化，并记录液化时间。

2.4.2 发样样品的采集和处理

用不锈钢剪刀采集男工头枕部距头皮1-2厘米左右处头发约5厘米长，重约1g(尽量选择未烫，未染，未漂白，未经发胶、发油或发乳等处理过的头发)。将采集的发样剪碎后浸入中性洗发水中搅拌浸泡过夜后，自来水冲洗干净，去离子水冲洗4-6次，在60℃干燥箱中干燥30 min。准确称取发样0.25 g置于消解罐中，加入适量的9:1的混合液（硝酸：高氯酸）消化至无色透明，放置在电热板上120℃赶酸蒸干，用2%的硝酸洗涤表面器皿及样品残渣，并定容至7ml。

2.4.3 血液样品的采集和处理

所有男工在体检当天空腹采集10 ml静脉血，采集血液所用采血针管为一次性使用产品，均经环氧乙烷灭菌，符合消毒灭菌有关标准。遵循实验室有关无菌样品采集的要求，碘伏清洁采血部位，使用2支5 ml金色安全头盖的真空采血管（含分离胶/二氧化硅）收集血液样品，记录编号及采集时间等信息。采集到的血液室温自然凝固10-20 min，然后以3000 rpm离心5 min分离出血清。一份血清用于性激素的检测分析，另一份血清直接保存于-80℃冰箱用于以后血清Mn的测定。

2.4.4 尿液样品的采集和处理

所有男工均在体检当日清晨留取 10 ml 晨尿于螺口尿测定管（配盖）中，每份样品中加入 2 滴浓硝酸防腐，-20℃冰箱冷冻保存。

2.4.5 男工精浆、头发、血清和尿液中 Mn 含量的测定

以尿Mn的测定为例：

尿液收集后置于-80℃条件下保存，测定时室温融化离心，100 μ L上清尿液用 1.9 mL 0.5% (v/v) HNO_3 室温消化过夜。样品在40℃下超声消化1 h，然后用去离子水稀释至7 mL。同时做试剂空白对照与标准溶液。测定尿液中Mn的含量采用电感耦合等离子体质谱法（inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS）法。

NexION 350型ICP-MS仪器工作条件设定为：雾化器流量：0.98 L/min；辅助气体流量：1.65 L/min；等离子气体流量：16 L/min；ICP射频功率：1550 W；采样进深：10 mm；采样摄取速率：1.1 mL/min；扫描模式：跳峰；停留时间：50 ms；扫描次数：20次；重复测定：3次。以10 $\mu\text{g/L}$ ^{59}Co 作为内标溶液并制备0、10、20、50和100 $\mu\text{g/L}$ Mn系列标准溶液，以降低离子化过程中基质效应。标准曲线的测定范围在0 - 100 $\mu\text{g/L}$ 之间，方法的回收率在85 - 115%之间，相对标准偏差在0.9 - 4%之间。本实验中，尿Mn的最低检出限为0.065 $\mu\text{g/L}$ ，血清Mn的最低检出限为0.022 $\mu\text{g/L}$ ，发Mn的最低检出限为0.016 $\mu\text{g/L}$ ，精浆Mn的最低检出限为0.028 $\mu\text{g/L}$ 。当检测结果低于最低检出限时，将结果取值为最低检出限值。

2.5 精液质量的常规分析

精液液化后，使用计算机辅助精液分析（computer-aided semen analysis, CASA）系统与人工辅助检查分析相结合的方法进行精液质量的常规分析。

2.5.1 精液量的测定

用含有刻度的吸管测量精液体积。

2.5.2 精子浓度、精子总数、精子活动力和精子运动轨迹参数的分析

使用 CASA 系统对精子浓度、精子总数、精子活动力和精子运动轨迹参数进行分析。

精子浓度和精子总数：

取10 μL 混匀液化后的精液置于精子检测计数板上，盖上盖玻片，在至少5个不

同视野中评估200个以上的精子，待计算机输出结果后，保存并记录数据。重复操作3次取平均值。每份精液需在5 min内检测完成。如果测得的精子浓度在 $2 - 50 \times 10^6/\text{ml}$ 之间，可直接记录现有检测结果。每个视野下当精子数目过多时，用生理盐水稀释，根据稀释倍数计算精子浓度；当精子数目过少时，可适当减少稀释的倍数或增加检测精液的总体积；如果视野中数目差异较大，应重新取标本再行检测；当未发现精子时应离心后再计算。

精子活动力：

前向运动的精子(progressive, PR)、非前向运动的精子(non-progressive, NP)和不动精子(immotility, IM)。精子总活力为PR%和NP%之和。

精子运动轨迹参数：

精子运动速度参数：曲线速率（curvilinear velocity, VCL）、直线速率（straight-line (rectilinear) velocity, VSL）和平均路径速率（average path velocity, VAP）。

精子空间位移程度参数：精子头侧摆幅度（amplitude of lateral head displacement, ALH）、鞭打频率（beat-cross frequency, BCF）和平均角位移（mean angular displacement, MAD）。

精子运动方式参数：直线性（linearity, LIN）、前向性（straightness, STR）和摆动性（wobble, WOB）。

2.5.3 精子形态学的检查

精子形态学检查主要是区分正常精子（头部和尾部均正常的精子才能认为是正常精子）和异常精子（非正常精子），然后计数并计算百分比。

制备涂片并选用改良巴氏染色法进行染色：先将涂片浸入95%的乙醇至少15 min以固定涂片，再按步骤浸入以下溶液中：80%乙醇（v/v）30 s→50%乙醇（v/v）30 s→纯水30 s→Harris's 苏木精4 min→纯水30 s→酸性乙醇浸4-8次（浸1次约1 s）→冷流水冲洗5 min→50%乙醇（v/v）30 s→80%乙醇（v/v）30 s→95%乙醇（v/v）至少15 min→橙黄G6 1 min→95%乙醇（v/v）30 s→95%乙醇（v/v）30 s→95%乙醇（v/v）30 s→EA-50绿染1 min→95%乙醇（v/v）30 s→95%乙醇（v/v）30 s→100%乙醇15 s→100%乙醇15 s，涂片上的乙醇未干时，滴加2 - 3滴封片剂，晾干后亮视野1000倍油镜下观察精子的形态并计算精子正常形态率，重复一次，取平均值。

2.5.4 精子存活率的检查

各取50 μ l的精液标本和伊红-苯胺黑悬液，充分混匀并静置染色30 s。重复取样前，再次混匀精液，再各取50 μ l的精液与伊红-苯胺黑悬液，充分混匀并静置染色30 s。然后制成涂片，利用空气干燥法干燥后，立即在亮视野1000倍油镜下观察每张玻璃片。利用实验室计数器分别计数染色精子（死精子）和非染色精子（活精子）。每个样品评估200个以上的精子。

2.6 血清中生殖内分泌激素水平的测定

2.6.1 血清 FSH、LH、PRL、E2 和 TSTO 等激素水平的测定

分离的血清立即转送至山东省临沂市人民医院核医学实验室使用分解免疫荧光测定方法测定血清FSH、LH、PRL、E2和TSTO等激素水平，检测过程严格按照机器的操作规范执行。每个样品重复测量2次，取平均值。FSH和LH水平的测定差异组间与组内< 5%，E2、PRL和TSTO < 8%。

2.6.2 血清 GnRH 水平的测定

GnRH采用江莱生物公司提供的Elisa试剂（货号：JL10520）检测男工血清中GnRH含量。首先加入50 μ L浓度依次为：0、10、20、40、80、160 pg/mL的标准品，并空置出不加样品和酶标试剂的空白孔。样品孔中加40 μ l稀释液和10 μ l待测样品，后加入100 μ l酶标试剂37℃温育1h后，再用稀释过的浓缩洗涤液洗涤5次，甩干后每孔各加入50 μ l显色剂A和显色剂B。避光显色15 min后加50 μ l终止液终止。450 nm波长下测定各孔的吸光度（空白孔调零），根据标准曲线得到样品的实际浓度。

2.7 质量控制

2.7.1 设计阶段的质量控制

考虑到影响生殖的因素众多，因此我们制定了严格的男工纳入标准和排除标准。挑选中级及以上职称人员参加体格检查及实验室技术分析，对所有参与本次调查人员在调查前进行培训以明确此次调查相关定义、目的以及意义，掌握调查标准和技巧。在Mn暴露企业附近选取地理位置、劳动强度、作息时间等条件相似的非Mn暴露企业作业男工作为对照组。

2.7.2 实施阶段的质量控制

严格按照既定的规范流程进行问卷的调查，做到统一调查步骤，统一调查用语，统一填写方式。发放问卷时再次说明此研究的目的及意义，男工独立回答问卷，不明白之处可随时向调查人员求助，收集调查表时对每份调查表进行核对，确认问卷填写完整无误后再让男工离开。

生殖医师一人独立对男工进行常规体格检查，尤其对生殖系统进行详细的检查等。检验技师严格按照临沂市人民医院检验标本采集手册 第5版（LJZX-SPM）采集、分装、运送和保存样品。标本的测定均严格按照检验标准操作规范进行，采用同一试剂批次，同一检测方法和同一判断标准，标本的检测均在不清楚分组的情况下由同一检验技师在同一台仪器上连续独立操作。一般多次测量，以其平均值作为该样品的最终检测结果。

2.7.3 数据整理与分析阶段的质量控制

在数据整理与分析前，将不合格的问卷剔除。问卷调查表和实验室检测数据经统一编码后，采用双人双录入的方式，建立Excel 2007数据库，再次进行异常结果的剔除并对问卷逻辑性进行检查，不一致处翻阅调查问卷予以确定，确保准确性，做到无错项，无不符合逻辑的应答。数据分析时，分别对Mn暴露组和对照组研究对象参加者和拒绝者在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度和禁欲时间等基本特征分布情况进行统计学分析，若差异有统计学意义，采取增大样本量等方法继续进行调查。最后所得数据可采用多元线性回归分析等统计方法控制混杂因素的影响。完成分析后封存调查表，妥善保管。

2.8 统计学分析

收集数据后首先进行描述性分析。连续变量以平均值±标准偏差表示而分类变量则采用率或构成比表示。此外，用百分位数（25th，50th和75th）表示发Mn、精浆Mn和部分精液质量相关参数分布情况。运用Kolmogorov-Smirnov检验数据正态性，符合正态分布的两组均数之间的比较采用独立样本t检验（Independent-Samples T Test），两组之间计数资料的比较采用 χ^2 检验（Chi-Square test），不符合正态分布的采用Mann-Whitney U检验方法测定（如精浆Mn、发Mn、精子总数和精子密度），采用Pearson相关分析方法分析血清Mn、发Mn、精浆Mn和尿Mn之间的线性关系，使用多元线性回归来分析尿Mn、血清Mn、

发 Mn 及精浆 Mn 和精液质量相关参数与生殖内分泌激素之间的关系,并将混杂因素如年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、教育程度和禁欲时间引入多元线性回归分析中进行校正。在统计学分析中我们将发 Mn、精浆 Mn、精子总数和精子密度等指标进行对数转换,使之呈近似正态分布。数据的整理和分析使用 IBM SPSS Statistics 22.0 统计软件, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 均认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 研究人群的选择及基本信息

3.1.1 研究人群的选择

所研究的 Mn 暴露企业接触 Mn 作业男工共 152 名，其中 53 名男工拒绝或未能收集到调查问卷、血液、尿液、头发或精液样品，另外有 15 名男工纳入排除标准（2 名男工由于身体情况；13 名男工曾经或目前接触苯、铅、甲醛或其他生殖毒物）。最终共 84 名男工（55.26%）纳入 Mn 暴露组。而非 Mn 暴露企业有 109 名男工拒绝或未能收集到调查问卷、血液、尿液、精液或发样样品。另有 5 名男工纳入排除标准，最终只有 92 名（44.66%）男工符合条件并作为对照组，人群选择详见图 1。

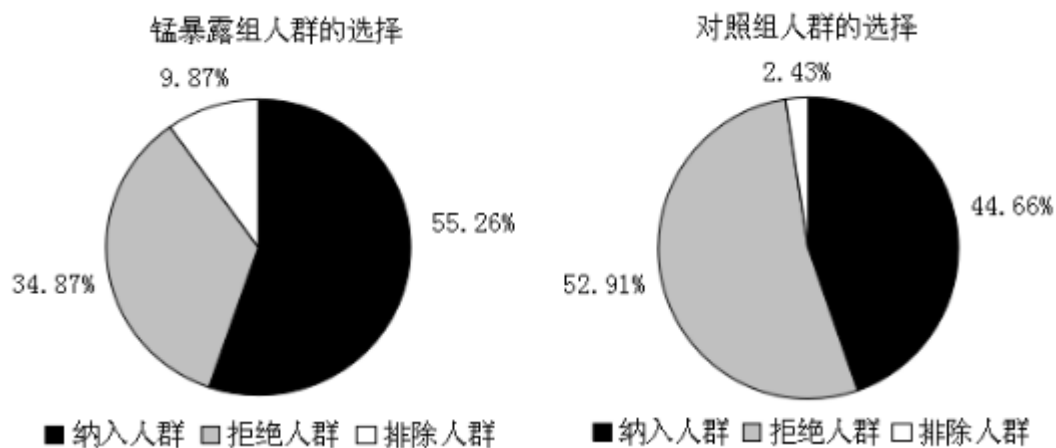


图 1 研究人群的选择

3.1.2 研究对象的基本信息

Mn 暴露组和对照组研究对象在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间等基本信息见表 1。Mn 暴露组与对照组在年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、受教育程度、子女出生体重和禁欲时间方面的差异无统计学意义。

表1 Mn暴露组和对照组男工的基本信息

项目	对照组(n = 92)	Mn 暴露组(n = 84)	P 值
年龄(岁)			0.828
18 - 29	47(51.1%)	38(45.2%)	
30 - 39	22(23.9%)	25(29.8%)	
40 - 49	20(21.7%)	18(21.4%)	
≥ 50	3(3.3%)	3(3.6%)	
工龄(年)	8.57±2.59	8.56±3.31	0.961
BMI (kg/m ²)			0.890
< 24	27(29.3%)	22(26.2%)	
24 - 28	36(39.1%)	35(41.7%)	
≥ 28	29(31.5%)	27(32.1%)	
吸烟情况			0.539
偶尔或不吸烟	53(57.6%)	42(50.0%)	
中等(< 10 只/天)	26(28.3%)	25(29.8%)	
经常(≥ 10 只/天)	9(9.8%)	14(16.7%)	
戒烟	4(4.3%)	3(3.6%)	
饮酒(饮酒量/天)			0.216
很少或不喝	58(63.0%)	44(52.4%)	
中等(< 250g/天)	25(27.2%)	25(29.8%)	
经常(≥ 250g/天)	9(9.8%)	15(17.9%)	
受教育程度			0.525
小学或者更低	15(16.3%)	17(20.2%)	
初中	26(28.3%)	20(23.8%)	
高中或中专	37(40.2%)	39(46.4%)	
大学或以上	14(15.2%)	8(9.5%)	
子女出生体重(kg)	3.55±1.00	3.38±0.96	0.397
禁欲时间(天)	3.99±1.52	3.74±1.61	0.433

3.2 接触 Mn 作业男工内暴露剂量的评估

3.2.1 接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 的水平

接触 Mn 作业男工精浆、头发、血清及尿液中 Mn 的水平见表 2。与对照组比较，接触 Mn 作业男工尿 Mn (15.92 ± 8.49) $\mu\text{g/L}$ 和精浆 Mn 509.10(158.76, 676.17) $\mu\text{g/L}$ 水平显著升高 ($p < 0.01$)。在本研究中，男工血清 Mn 和发 Mn 水平与对照组比较差异无统计学意义。

表 2 Mn 暴露组和对照组男工精浆、头发、血清及尿液中 Mn 水平的比较

组别	精浆Mn($\mu\text{g/L}$)	发Mn($\mu\text{g/g}$)	血清Mn($\mu\text{g/L}$)	尿Mn($\mu\text{g/L}$)
对照组	43.38(12.80, 93.05)	3.85(2.67, 5.53)	22.57 \pm 15.94	8.03 \pm 3.88
Mn 暴露组	509.10(158.76, 676.17)	2.83(4.57, 6.30)	24.74 \pm 16.67	15.92 \pm 8.49
<i>P</i> 值	0.000	0.215	0.377	0.000

精浆 Mn 和发 Mn 数据以 50th (25th – 75th) 表示。

$P < 0.01$ 认为差异具有统计学意义。

3.2.2 接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 之间的线性关系

接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 的之间线性关系见表 3。经 Pearson 相关检验分析，男工精浆 Mn 和尿液 Mn 呈线性正相关 ($r = 0.350, p < 0.01$)。

表 3 接触 Mn 作业男工精浆 Mn、发 Mn、血清 Mn 及尿 Mn 之间的线性关系

组别		精浆Mn($\mu\text{g/L}$)	发Mn($\mu\text{g/g}$)	血清Mn($\mu\text{g/L}$)	尿Mn($\mu\text{g/L}$)
精浆Mn($\mu\text{g/L}$)	<i>r</i>	1	0.064	0.043	0.350
	<i>P</i> 值	-	0.402	0.573	0.000
发Mn($\mu\text{g/g}$)	<i>r</i>	0.064	1	0.04	0.001
	<i>P</i> 值	0.402	-	0.958	0.993
血清Mn($\mu\text{g/L}$)	<i>r</i>	0.043	0.004	1	0.072
	<i>P</i> 值	0.573	0.958	-	0.342
尿Mn($\mu\text{g/L}$)	<i>r</i>	0.350	0.001	0.072	1
	<i>P</i> 值	0.000	0.993	0.342	-

对精浆 Mn 和发 Mn 进行对数转换使其服从正态分布。

$P < 0.01$ 认为差异具有统计学意义。

3.3 接触 Mn 作业对男工生殖内分泌激素的影响

与对照组相比, Mn 暴露组男工血清 TSTO (256.56 ± 78.34) ng/dl 水平降低, 血清 GnRH (33.65 ± 8.80) ng/L、FSH (6.59 ± 2.43) mIU/ml 和 LH (6.11 ± 2.22) mIU/ml 水平升高 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$) (详见表 4)。而男工血清 PRL、E2 水平与对照组比较差异无统计学意义。

表 4 Mn 暴露组和对照组男工生殖内分泌激素水平的比较

组别	对照组(n=92)	Mn 暴露组(n=84)	P 值
GnRH (ng/L)	26.72 ± 7.00	33.65 ± 8.80	0.000
TSTO(ng/dl)	289.68 ± 83.86	256.56 ± 78.34	0.008
FSH(mIU/ml)	6.19 ± 2.59	6.59 ± 2.43	0.289
LH(mIU/ml))	5.47 ± 1.87	6.11 ± 2.22	0.038
PRL(ng/ml)	8.02 ± 3.37	8.35 ± 3.23	0.507
E2(pg/ml)	18.08 ± 7.81	17.61 ± 6.70	0.668

$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.3.1 男工精浆 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系

如表 4.1 所示, 通过多元线性回归对男工精浆 Mn 与血清 TSTO、E2、FSH、PRL、GnRH 和 LH 的关系进行分析, 结果显示男工精浆 Mn 和 TSTO 呈线性负相关 ($\beta = -0.001, p < 0.05$), 精浆 Mn 和 GnRH 呈线性正相关 ($\beta = 0.024, p < 0.01$), 在校正年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、教育程度和禁欲时间后, 男工精浆 Mn 和 TSTO 呈线性负相关 ($\beta = -0.001, p < 0.05$), 与 GnRH ($\beta = 0.026, p < 0.01$) 呈线性正相关的关系仍然存在。

表 4.1 男工精浆Mn和生殖内分泌激素的线性关系

变量	精浆 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
GnRH(ng/L)	0.024	(0.013, 0.036)	0.000	0.026	(0.014, 0.038)	0.000
TSTO(ng/dl)	-0.001	(-0.003, 0.000)	0.026	-0.001	(-0.003, 0.000)	0.024
FSH(mIU/ml)	-0.006	(-0.045, 0.034)	0.771	-0.006	(-0.046, 0.034)	0.761
LH(mIU/ml)	0.008	(-0.040, 0.056)	0.748	0.011	(-0.037, 0.060)	0.647
PRL(ng/ml)	0.019	(-0.011, 0.049)	0.215	0.026	(-0.005, 0.057)	0.101
E2(pg/ml)	0.000	(-0.014, 0.013)	0.953	-0.002	(-0.016, 0.011)	0.725

对精浆 Mn 进行对数转换使其服从正态分布。

$p < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.3.2 男工发 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系

通过多元线性回归对男工发 Mn 与血清 TSTO、E2、FSH、PRL、GnRH 和 LH 的关系进行分析。结果显示在校正混杂因素前后,男工发 Mn 与血清 GnRH、TSTO、FSH、LH、PRL 和 E2 并无线性关系。

表4.2 男工发Mn和血清生殖内分泌激素的线性关系

变量	发 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
GnRH(ng/L)	-0.003	(-0.010, 0.005)	0.493	-0.001	(-0.009, 0.006)	0.726
TSTO(ng/dl)	0.000	(-0.001, 0.001)	0.774	0.000	(-0.001, 0.001)	0.812
FSH(mIU/ml)	-0.006	(-0.031, 0.020)	0.657	-0.001	(-0.026, 0.025)	0.968
LH(mIU/ml)	0.011	(-0.020, 0.042)	0.483	0.014	(-0.016, 0.045)	0.360
PRL(ng/ml)	-0.005	(-0.024, 0.014)	0.603	-0.008	(-0.028, 0.012)	0.449
E2(pg/ml)	-0.007	(-0.016, 0.002)	0.120	-0.007	(-0.016, 0.002)	0.124

对发 Mn 进行对数转换使其服从正态分布。

3.3.3 男工血清 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系

通过多元线性回归对男工血清 Mn 与血清 TSTO、E2、FSH、PRL、GnRH 和 LH 的关系进行分析。结果显示在校正混杂因素前后,男工血清 Mn 与血清 GnRH、TSTO、FSH、LH、PRL 和 E2 并无线性关系。

表4.3 男工血清Mn和血清生殖内分泌激素的线性关系

变量	血清 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
GnRH(ng/L)	0.235	(-0.049, 0.518)	0.105	0.236	(-0.050, 0.523)	0.105
TSTO(ng/dl)	0.005	(-0.024, 0.035)	0.714	0.007	(-0.024, 0.038)	0.651
FSH(mIU/ml)	0.245	(-0.729, 1.219)	0.620	0.327	(-0.670, 1.324)	0.518
LH(mIU/ml)	-0.657	(-1.839, 0.525)	0.274	-0.773	(-1.960, 0.414)	0.200
PRL(ng/ml)	0.281	(-0.462, 1.024)	0.456	0.352	(-0.419, 1.122)	0.369
E2(pg/ml)	0.247	(-0.088, 0.582)	0.147	0.307	(-0.036, 0.649)	0.079

3.3.4 男工尿 Mn 和生殖内分泌激素的线性关系

如表 4.4 所示,通过多元线性回归对男工尿 Mn 与血清 TSTO、E2、FSH、PRL、GnRH 和 LH 的关系进行分析,结果显示男工尿 Mn 和 TSTO 呈线性负相关 ($\beta = -0.023, P < 0.01$),尿 Mn 和 GnRH ($\beta = 0.256, P < 0.01$) 及 LH ($\beta = 0.517, P < 0.05$) 呈线性正相关。在校正年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、教育程度和禁欲时间后,男工尿 Mn 和 TSTO ($\beta = -0.025, P < 0.01$) 呈线性负相关,和 GnRH ($\beta = 0.255, P < 0.01$) 与 LH ($\beta = 0.538, P < 0.05$) 呈线性正相关的关系仍然存在。

表 4.4 男工尿Mn和生殖内分泌激素的线性关系

变量	尿 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
GnRH(ng/L)	0.256	(0.135, 0.378)	0.000	0.255	(0.132, 0.379)	0.000
TSTO(ng/dl)	-0.023	(-0.036, -0.011)	0.000	-0.025	(-0.039, -0.012)	0.000
FSH(mIU/ml)	0.023	(-0.393, 0.440)	0.912	0.049	(-0.378, 0.475)	0.823
PRL(ng/ml)	0.141	(-0.176, 0.459)	0.380	0.175	(-0.157, 0.507)	0.299
LH(mIU/ml)	0.517	(0.012, 1.022)	0.045	0.538	(0.025, 1.050)	0.040
E2(pg/ml)	-0.128	(-0.271, 0.016)	0.081	-0.136	(-0.283, -0.011)	0.070

$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.4 接触 Mn 作业对男工精液质量的影响

如表 5 所示, Mn 暴露组男工精子 PR (%) 降低到 38.27% (30.22% - 46.32%) 以及精子 (PR + NP) %降低到 49.42% (38.42% - 60.17%), 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。然而 Mn 暴露组男工精液量, 精子浓度, 精子总数, 精子存活率和正常形态率和对照组比较差异无统计学意义。

表 5 Mn暴露组和对照组男工精液质量的比较

变量	对照组(n=94)	Mn 暴露组(n=84)	<i>P</i> 值
精液量(ml)	3.28(2.53 - 3.96)	3.03(2.23 - 3.70)	0.115
精子总数(10^6)	156.79(110.72 - 194.75)	146.50(82.37 - 214.74)	0.492
精子浓度($10^6/\text{ml}$)	73.82(41.17 - 109.35)	82.32(53.71 - 112.81)	0.112
精子存活率(%)	67.60(60.60 - 74.73)	65.81(59.66 - 70.95)	0.125
(PR+NP)%	55.04(42.00 - 67.86)	49.42(38.42 - 60.17)	0.015
PR(%)	45.77(33.85 - 56.65)	38.27(30.22 - 46.32)	0.000
正常形态率(%)	5.77(4.58 - 6.80)	5.41(4.57 - 6.58)	0.066

$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.4.1 男工精浆 Mn 和精液质量参数的线性关系

如表 5.1 所示, 多元线性回归分析显示男工精浆 Mn 和精子 PR (%) 呈线性负

相关 ($\beta = -1.228, P < 0.01$)，在校正年龄、工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、教育程度和禁欲时间后，男工精浆 Mn 和精子 PR (%) 呈线性负相关的关系仍然存在 ($\beta = -1.192, P < 0.01$)。然而，男工精浆 Mn 与精液量、精子总数、精子浓度、精子存活率、(PR + NP) % 和精子正常形态率并无线性关系。

表 5.1 男工精浆Mn和精液质量参数的线性关系

变量	精浆 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	P 值	β	95% CI	P 值
精液量(ml)	-0.088	(-0.215, 0.040)	0.175	-0.100	(-0.230, 0.031)	0.133
精子总数(10^6)	-0.066	(-0.522, 0.654)	0.825	-0.034	(-0.564, 0.632)	0.911
精子浓度($10^6/\text{ml}$)	-0.246	(-0.841, 0.348)	0.414	-0.279	(-0.886, 0.328)	0.366
存活率(%)	-0.877	(-2.232, 0.478)	0.203	-0.758	(-2.156, 0.639)	0.286
(PR+NP)%	-0.203	(-0.873, 0.467)	0.550	-0.208	(-0.900, 0.484)	0.553
PR(%)	-1.228	(-2.016, -0.439)	0.002	-1.192	(-2.000, -0.384)	0.004
正常形态率(%)	-2.301	(-10.178, 5.575)	0.565	-1.510	(-9.680, 6.659)	0.716

对精浆 Mn、精子总数和精子浓度进行对数转换使其服从正态分布。

$P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.4.2 男工发 Mn 和精液质量参数的线性关系

通过多元线性回归对男工发 Mn 与精液质量参数的线性关系进行分析。结果显示在校正混杂因素前后，男工发 Mn 与精液量、精子总数、精子浓度、精子存活率、PR (%)、(PR + NP) % 和精子正常形态率并无线性关系。

表5.2 男工发Mn和精液质量参数的关系

变量	发 Mn($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	P 值	β	95% CI	P 值
精液量(ml)	-0.003	(-0.082, 0.076)	0.937	-0.009	(-0.089, 0.070)	0.819
精子总数(10^6)	-0.166	(-0.531, 0.199)	0.371	-0.181	(-0.546, 0.185)	0.330
精子浓度($10^6/\text{ml}$)	-0.017	(-0.353, 0.386)	0.929	-0.015	(-0.356, 0.385)	0.938
存活率(%)	0.631	(-0.210, 1.472)	0.141	0.727	(-0.137, 1.591)	0.098
(PR+NP)%	-0.140	(-0.556, 0.276)	0.507	-0.093	(-0.521, 0.336)	0.670
PR(%)	-0.053	(-0.436, 0.543)	0.830	-0.040	(-0.459, 0.538)	0.875
正常形态率(%)	3.616	(-1.275, 8.507)	0.146	3.640	(-1.348, 8.629)	0.151

对精浆 Mn、精子总数和精子浓度进行对数转换使其服从正态分布。

3.4.3 男工血清 Mn 和精液质量参数的线性关系

通过多元线性回归对男工血清 Mn 与精液质量参数的线性关系进行分析。结果显示在校正混杂因素前后，男工血清 Mn 与精液量、精子总数、精子浓度、精子存活率、PR (%)、(PR + NP) %和精子正常形态率并无线性关系。

表5.3 男工血清Mn和精液质量参数的线性关系

变量	血清 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	P 值	β	95% CI	P 值
精液量(ml)	-2.094	(-5.144, 0.956)	0.177	-1.957	(-5.065, 1.151)	0.215
精子总数(10^6)	-0.945	(-15.007, 13.117)	0.895	-1.302	(-15.533, 12.928)	0.857
精子浓度($10^6/\text{ml}$)	-2.443	(-16.667, 11.780)	0.735	-1.030	(-15.465, 13.406)	0.888
存活率(%)	-4.353	(-36.750, 28.044)	0.791	-0.185	(-33.843, 33.473)	0.991
(PR+NP)%	-15.613	(-31.632, 0.406)	0.056	-14.251	(-30.950, 2.449)	0.094
PR(%)	-4.450	(-23.302, 14.402)	0.642	-5.455	(-24.879, 13.969)	0.580
正常形态率(%)	-143.712	(-332.057, 44.633)	0.134	-131.849	(-326.212, 62.515)	0.182

对精子总数和精子浓度进行对数转换使其服从正态分布。

3.4.4 男工尿 Mn 和精液质量参数的线性关系

如表 5.4 所示,多元线性回归分析显示男工尿 Mn 分别与 PR (%) ($\beta = -14.156$, $P < 0.01$) 和 (PR + NP) % ($\beta = -8.472$, $p < 0.05$) 呈线性负相关,在校正年龄,工龄、BMI、吸烟情况、饮酒情况、教育程度和禁欲时间后,男工尿 Mn 依然与 PR (%) ($\beta = -14.346$, $P < 0.01$) 和 (PR+NP) % ($\beta = -8.486$, $P < 0.05$) 呈线性负相关。而男工尿 Mn 与精液量、精子总数、精子浓度、精子存活率和精子正常形态率无线性关系。

表5.4 男工尿Mn和精液质量参数的线性关系

变量	尿 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	P 值	β	95% CI	P 值
精液量(ml)	-0.582	(-1.633, 0.469)	0.276	-0.520	(-1.585, 0.546)	0.337
精子总数(10^6)	-1.263	(-6.420, 3.893)	0.629	-0.938	(-6.192, 4.316)	0.725
精子浓度($10^6/\text{ml}$)	-2.025	(-6.579, 2.530)	0.381	-2.124	(-6.762, 2.513)	0.367
存活率(%)	-6.583	(-21.069, 7.904)	0.371	-6.808	(-21.636, 8.021)	0.366
(PR+NP)%	-8.472	(-15.648, -1.295)	0.021	-8.486	(-15.848, -1.124)	0.024
PR(%)	-14.156	(-22.663, -5.649)	0.001	-14.346	(-22.993, -5.698)	0.001
正常形态率(%)	-15.023	(-100.032, 69.986)	0.728	-28.156	(-115.568, 59.255)	0.526

对精子总数和精子浓度进行对数转换使其服从正态分布。

$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

3.5 接触 Mn 作业对男工精子运动轨迹参数的影响

表 6 显示 Mn 暴露组男工精子 VCL 为 $(43.73 \pm 11.76) \mu\text{m/s}$ 、VSL 为 $(26.64 \pm 7.91) \mu\text{m/s}$ 和 VAP 为 $(34.24 \pm 8.25) \mu\text{m/s}$, 与对照组比较降低且差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而男工精子 LIN、WOB、STR、MAD、ALH 和 BCF 等精子运动轨迹参数与对照组比较差异均无统计学意义。

表6 接触Mn作业对男工精子运动轨迹参数的影响

参数	对照组(n=92)	Mn 暴露组(n=84)	P 值
VCL($\mu\text{m/s}$)	49.22 \pm 9.57	43.73 \pm 11.76	0.001
VSL($\mu\text{m/s}$)	29.98 \pm 8.05	26.64 \pm 7.91	0.006
LIN(%)	63.38 \pm 22.32	67.09 \pm 32.03	0.371
VAP($\mu\text{m/s}$)	37.52 \pm 7.73	34.24 \pm 8.25	0.007
WOB(%)	79.00 \pm 21.40	86.13 \pm 38.99	0.130
STR(%)	84.54 \pm 33.46	83.84 \pm 35.37	0.892
MAD($^{\circ}$)	53.25 \pm 7.53	53.95 \pm 10.33	0.606
ALH(μm)	3.41 \pm 1.18	3.58 \pm 1.15	0.320
BCF(Hz)	5.68 \pm 2.29	5.82 \pm 2.31	0.675

$p < 0.01$ 认为有统计学意义。

3.5.1 男工精浆 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系

多元线性回归分析显示在校正混杂因素前后,男工精浆 Mn 与男工精子运动轨迹参数 VCL、VSL、LIN、VAP、WOB、STR、MAD、ALH 和 BCF 并无线性关系。

表6.1 男工精浆Mn和精子运动轨迹参数的线性关系

参数	精浆 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	P 值	β	95% CI	P 值
VCL($\mu\text{m/s}$)	-0.008	(-0.029, 0.014)	0.477	-0.009	(-0.031, 0.014)	0.443
VSL($\mu\text{m/s}$)	-0.028	(-0.079, 0.022)	0.271	-0.031	(-0.083, 0.021)	0.246
LIN(%)	0.001	(-0.017, 0.019)	0.878	0.002	(-0.016, 0.021)	0.803
VAP($\mu\text{m/s}$)	-0.005	(-0.048, 0.038)	0.812	-0.003	(-0.047, 0.042)	0.911
WOB(%)	0.001	(-0.013, 0.015)	0.883	0.000	(-0.014, 0.014)	0.991
STR(%)	0.004	(-0.006, 0.014)	0.420	0.004	(-0.006, 0.015)	0.406
MAD($^{\circ}$)	-0.003	(-0.014, 0.009)	0.623	-0.003	(-0.015, 0.008)	0.565
ALH(μm)	0.036	(-0.053, 0.124)	0.428	0.048	(-0.044, 0.140)	0.302
BCF(Hz)	0.025	(-0.020, 0.069)	0.279	0.023	(-0.022, 0.069)	0.313

对精浆 Mn 进行对数转换使其服从正态分布。

3.5.2 男工发 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系

多元线性回归分析显示在校正混杂因素前后,男工发 Mn 与精子运动轨迹参数 VCL、VSL、LIN、VAP、WOB、STR、MAD、ALH 和 BCF 并无线性关系。

表6.2 男工发Mn和精子运动轨迹参数的线性关系

参数	发 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
VCL($\mu\text{m/s}$)	-0.004	(-0.018, 0.009)	0.522	-0.005	(-0.018, 0.009)	0.507
VSL($\mu\text{m/s}$)	0.023	(-0.009, 0.055)	0.162	0.020	(-0.012, 0.052)	0.223
LIN(%)	-0.009	(-0.020, 0.002)	0.109	-0.008	(-0.019, 0.003)	0.165
VAP($\mu\text{m/s}$)	-0.007	(-0.034, 0.020)	0.587	-0.006	(-0.034, 0.022)	0.674
WOB(%)	0.004	(-0.004, 0.013)	0.319	0.004	(-0.005, 0.013)	0.370
STR(%)	0.000	(-0.007, 0.006)	0.889	0.000	(-0.007, 0.006)	0.935
MAD($^{\circ}$)	-0.006	(-0.013, 0.002)	0.131	-0.005	(-0.013, 0.002)	0.141
ALH(μm)	0.015	(-0.041, 0.071)	0.596	0.022	(-0.035, 0.079)	0.451
BCF(Hz)	-0.001	(-0.029, 0.027)	0.948	-0.002	(-0.030, 0.026)	0.881

对发 Mn 进行对数转换使其服从正态分布。

3.5.3 男工血清 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系

多元线性回归分析显示在校正混杂因素前后,男工血清 Mn 与精子运动轨迹参数 VCL、VSL、LIN、VAP、WOB、STR、MAD、ALH 和 BCF 并无线性关系。

表6.3 男工血清Mn和精子运动轨迹参数的线性关系

参数	血清 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
VCL($\mu\text{m/s}$)	0.247	(-0.285, 0.778)	0.360	0.275	(-0.263, 0.813)	0.315
VSL($\mu\text{m/s}$)	0.135	(-1.114, 1.384)	0.832	0.318	(-0.948, 1.584)	0.620
LIN(%)	0.001	(-0.440, 0.442)	0.996	-0.026	(-0.474, 0.421)	0.907
VAP($\mu\text{m/s}$)	-0.397	(-1.452, 0.658)	0.459	-0.587	(-1.674, 0.501)	0.288
WOB(%)	0.077	(-0.259, 0.414)	0.651	0.113	(-0.230, 0.456)	0.517
STR(%)	-0.112	(-0.360, 0.136)	0.373	-0.152	(-0.403, 0.099)	0.234
MAD($^{\circ}$)	0.135	(-0.147, 0.418)	0.345	0.156	(-0.131, 0.442)	0.285
ALH(μm)	-0.408	(-2.585, 1.770)	0.712	0.059	(-2.179, 2.297)	0.958
BCF(Hz)	0.137	(-0.957, 1.231)	0.805	0.132	(-0.975, 1.239)	0.815

3.5.4 男工尿 Mn 和精子运动轨迹参数的线性关系

多元线性回归分析显示在校正混杂因素前后, 男工尿 Mn 与精子运动轨迹参数 VCL、VSL、LIN、VAP、WOB、STR、MAD、ALH 和 BCF 无线性关系。

表 6.4 男工尿Mn和精子运动轨迹参数的线性关系

参数	尿 Mn ($\mu\text{g/L}$)					
	未调整前			调整后		
	β	95% CI	<i>P</i> 值	β	95% CI	<i>P</i> 值
VCL($\mu\text{m/s}$)	-0.082	(-0.328, 0.163)	0.508	-0.083	(-0.334, 0.169)	0.517
VSL($\mu\text{m/s}$)	-0.316	(-0.893, 0.260)	0.281	-0.309	(-0.900, 0.282)	0.303
LIN(%)	0.124	(-0.080, 0.327)	0.232	0.124	(-0.085, 0.332)	0.245
VAP($\mu\text{m/s}$)	0.143	(-0.344, 0.630)	0.563	0.148	(-0.359, 0.656)	0.565
WOB(%)	-0.132	(-0.288, 0.023)	0.094	-0.133	(-0.293, 0.027)	0.102
STR(%)	-0.009	(-0.123, 0.106)	0.881	-0.013	(-0.131, 0.104)	0.821
MAD($^{\circ}$)	0.037	(-0.093, 0.167)	0.576	0.051	(-0.083, 0.185)	0.453
ALH(μm)	0.539	(-0.466, 1.545)	0.291	0.523	(-0.521, 1.568)	0.324
BCF(Hz)	-0.070	(-0.575, 0.435)	0.783	-0.036	(-0.552, 0.481)	0.891

4 讨论

Mn处于地球上最丰富元素的第12位，在环境中主要以MnO₂或Mn₃O₄形式存在。Mn及其化合物可广泛应用于钢铁、电子、冶金、化工、电池、农药、医疗等领域。过量Mn暴露会对体内的多器官多系统产生毒性。绝大多数关于Mn中毒的证据来自职业接触，而且即使低浓度职业暴露，例如空气中Mn浓度等于或低于职业标准，也有可能产生毒性^[55]。在过去数十年间，Mn毒性机制的研究领域取得了很大进展，但主要集中在神经系统领域，而针对Mn的生殖毒性机制仍然不明确。在本调查研究中我们发现该Mn企业空气中Mn PC-TWA在0.04 - 0.29 mg/m³之间，接触Mn作业男工尿Mn浓度为(15.92 ± 8.49) µg/L，而男工精浆Mn为509.10 (158.76, 676.17) µg/L，与对照组比较均升高 ($P < 0.05$)。在此暴露剂量下，我们尝试通过检测生殖内分泌激素及精液质量来评估男工的生殖功能。

下丘脑-垂体-睾丸轴(hypothalamic-pituitary-testis axis, HPTA)分泌的GnRH、LH、FSH、PRL、E2和TSTO等激素通过一系列正负反馈作用^[56]，处于相对稳定的水平，共同调节着男性的生殖功能。GnRH是HPTA的重要环节，在维持正常的内分泌和生殖系统功能方面起着决定性的作用^[57-58]。GnRH不仅可以影响LH和FSH的合成和分泌，还可参与性别分化、性腺发育以及性活动等。作为活性最高的雄性激素，TSTO在维持生殖器官的生长发育并调控精子的形成和成熟，维持雄性第二性征，并在性功能方面起到重要的调节作用。LH可维持睾丸内TSTO处于正常水平以保障精子生成。FSH可反映睾丸的生精功能，是诊断无精症或少精症的主要临床依据。Cantoro等还建议用血清FSH的变化来评估不育患者治疗前后睾丸的生精能力^[59]。作为一种生殖内分泌激素，PRL可增强LH对间质细胞的调控作用从而促进睾丸合成TSTO。E2主要是在雄性体内TSTO芳香化后形成的雌激素，可以反馈性的抑制TSTO的生物合成。在本研究中，与对照组相比，Mn暴露组男工血清TSTO水平下降 ($P < 0.01$)，血清LH和GnRH水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而血清FSH、PRL和E2水平与对照组比较差异无统计学意义。由于GnRH在生殖内分泌和生殖功能的重要作用，Mn暴露组男工血清GnRH水平升高，提示Mn致GnRH分泌增加可能是生殖功能受损的重要原因之一。在动物实验中，Pine等^[60]已证实环境中Mn暴露能够激活下丘脑GnRH的特定上游基因如IGF-1和COX-2，从而使得GnRH的释放增加。Srivastava等^[61]发现雌性大鼠幼仔从出生后第12天到第22或29天接受每日剂

量为10 mg/kg的MnCl₂染毒时, 在第29天发现视前区和下丘脑端GnRH基因表达增加。Lee等^[62]发现15日龄的大鼠以25 mg/kg MnCl₂灌胃40天后发现其血清LH, FSH和TSTO水平均明显升高, 并且认为Mn²⁺是GnRH及LH分泌的直接刺激因子, 可有助于雄性的正常发育。研究证实饮食中添加低剂量的Mn补充剂可加速促进人促黄体激素释放激素 (Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) 的释放并可引起大鼠血清LH分泌增加^[63]。然而也有不同结论, 如食物中添加Mn后, 50日龄雄性Hyline公鸡的TSTO, LH和FSH含量显著降低, LH受体和FSH受体mRNA表达水平显著降低^[14]。在人群研究中, Kim等^[64]人的调查发现当作业环境中Mn粉尘的浓度均值在 (0.4 ± 3.84) mg/m³和Mn的累积暴露指数 (Cumulative Exposure Index, CEI) 在 (1.4 ± 1.1) mg/m³时电焊工血清LH含量明显升高。研究发现接触Mn作业工龄<5年时男工血清LH和FSH水平明显降低而TSTO水平明显升高, 接Mn工龄5 - 10年时男工血清LH水平明显降低, 而接Mn工龄 ≥ 10 年时男工血清PRL和LH水平均明显降低^[46]。无论与对照男工或者电焊男工相比, 来自同一工厂的暴露于几何均值为273.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Mn环境中的冶炼工血清TSTO和FSH水平均明显下降^[47]。Mutti等^[65]调查发现在铁合金作业环境空气中MnO₂平均浓度为0.55 (0.28 - 0.98 mg/m³) 时, 工人血清PRL水平明显升高。而Niu等^[66]人发现在MnO₂平均浓度为0.18 (0.09 - 0.36 mg/m³) 下作业, 电焊工人血清PRL水平也会明显升高。Ellingse等人发现100名铁合金工人血清PRL的几何均值高于对照组, 且与Mn的暴露时间有关^[67]。另外Roels等^[68]在研究92例干电池生产工人时发现血清PRL水平并未出现明显改变。总之, 本次研究中我们发现接触Mn作业可导致男工血清TSTO降低而血清LH和GnRH水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。这表明高Mn暴露可促使血清GnRH水平升高, 导致HPTA功能调节紊乱继而生殖内分泌激素异常, 从而对生殖功能产生影响。

在过去的数十年间, 精子质量下降的问题已引起科学界、政府乃至全社会的关注^[69-70]。随着越来越多的环境化学物质发现对精子产生影响^[71], 环境因素致男性精子质量下降已是公共卫生不可忽视的一个问题。精子浓度可直接与受精率相关。精子总数减少 30%左右就可以引起男性生育力的下降^[72]。精子正常形态率可判断男性生育力的情况。精子的活动力可作为毒物生殖毒性的敏感性指标^[73]。精子正常形态率与女性妊娠有着最为直接的关系^[74]。精子存活率可以对精液质量的评价进行准确性判断。随着科学技术的不断发展, CASA 系统克服了传统精液分析计数不准确、活力判断主观性太强而重复性较差、人为影响因素过多等不利因素, 采用动态图像客观地反映精子的情况, 还可显示精子的运动轨迹, 快速、准确和

客观地评价精子相关运动参数，为分析精液质量提供了较为快捷的操作方式^[75]。Agarwal 等^[76]认为 CASA 系统中精子运动学参数是综合评估精液质量的一项重要指标。它可量化反映精子的运动性能，可综合体现精子的结构及功能，并且预测精子的受精能力，是现代衡量精液质量的主要指标之一^[77]。精子运动轨迹参数如 VCL、VSL 和 VAP 可反映精子的运动速度，ALH、BCF 和 MAD 可反映精子的空间位移程度，LIN、STR 和 WOB 可反映精子的运动方式。相对于精子存活率、精子 PR%与 (PR+NP) %等传统指标，它们能更加详细地评价精子微细运动能力^[78]，能提供更多有关精子运动特征的信息，反映精子运动特征参数会更敏感^[79-80]。在本研究中与对照组相比，Mn 暴露组男工精子 PR%与 (PR+NP) %降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，男工精子运动轨迹相关参数 VCL、VSL 和 VAP 降低 ($P < 0.01$)。我们的结果表明精子活动力可能比其他精液参数对接触 Mn 作业更敏感。此外还有研究发现暴露于 Mn 粉尘浓度为 0.14 mg/m^3 的电焊男工精液液化时间缩短，精子数量和具有生育能力的精子百分比降低^[14]。Meo 等^[82]报道电焊工人的精子数量减少，精子活动力不足以及由此带来的不孕问题日渐凸显。Adejuwon 等^[83]还发现患有少精症或者无精症的男性其血清 Mn 一直处于很低的水平。在 200 名不孕不育男性患者中，Wirth 等^[84]发现血 Mn 水平的升高和精子的低活动力有关 (OR = 5.4, 95% CI: 1.6 - 17.6)，同时也和精子浓度的下降有关 (OR = 2.4, 95% CI: 1.2 - 4.9)。zhou 等^[84]发现不育男性尿 Mn 可能与精子 DNA 损伤增加有关。Wang 等^[85]人也发现 Mn 浓度的升高可导致精子膜联蛋白 V⁺/PI-百分比增加，有力的支持了 Mn 可诱导精子凋亡。

目前还没有明确的、可靠的生物标志物（或生物学指标）来评估人体中 Mn 的暴露水平^[86-87]。血液（全血、血浆、血清和血细胞）、尿液、脑脊液、唾液、牙齿、手或脚指甲、头发以及骨骼等都曾作过 Mn 的生物标记物。但是都存在一定的缺陷，如指甲中 Mn 含量的检测容易受到样品的污染^[86]，唾液中 Mn 含量的检测结果较不稳定^[88]，全血 Mn 由于在机体内代谢的半衰期大约为 2h，因而个体差异较大，特异性不强^[89]。Donald^[90]报道过即使 Mn 中毒的患者其血 Mn 水平仍有可能处于正常范围。但实际工作中也经常将血浆或血清 Mn 的含量作为评估体内近期 Mn 暴露的水平^[91-92]。而对于效应生物指标诸如高香草酸^[93]，血清多巴胺-β-脱氧酶^[94]，以及易感性生物标志物比如细胞色素 P450 2D6 (cytochrome P450 2D6, CYP2D6)^[95]等存在技术要求较高或费用昂贵等问题，在本次研究中我们发现 Mn 暴露组男工尿 Mn 和精浆 Mn 水平高于对照组 ($P < 0.01$)，而发 Mn 及血清 Mn 水平与对照组比较差异无统

计学意义。尿Mn水平是近期Mn暴露最灵敏的指标，因为它可以相对较快的排出体外并且与年龄和性别无关^[96-97]。Lucchini等^[98]人发现即使Mn停止暴露1-28 (13 ± 7)年后，个体尿Mn水平也与Mn的暴露水平呈正相关，可作为近期Mn暴露的接触指标。不过也有报道称尿Mn和Mn外暴露剂量存在相关性较差的问题^{[87][99]}。在本研究中，我们的结果显示精浆Mn和尿液Mn呈正相关 ($r = 0.350$, $p < 0.01$)，提示精浆Mn和尿液Mn有一定的相关性，可作为接触Mn作业男工的内暴露指标。由于年龄、工龄、BMI、教育程度、饮酒和吸烟情况等人口学特征与生殖功能密切相关^[100]，我们在校正了这些混杂因素前后，尿Mn及精浆Mn与TSTO呈线性负相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，而与血清GnRH呈线性正相关 ($P < 0.01$)，并且还发现尿Mn和血清LH水平呈线性正相关 ($P < 0.05$)。此外，Rotter等人^[101]发现TSTO与游离雄激素指数 (free androgen index, FAI) 水平和血Mn水平呈负相关，并且发现老年男性中性激素结合球蛋白 (sex hormone binding globulin, SHBG) 与Mn水平呈正相关。然而，来自不孕不育诊所的118名男性资料显示，血清TSTO的合成和尿Mn的升高呈反比^[76]。有趣的是在125名糖尿病患者中，Ubajaka等发现血Mn与TSTO呈正相关 ($r = 0.350$, $P < 0.05$)^[103]。另外发现铁合金作业工人血清中PRL水平与尿Mn、血Mn含量呈正相关^[65]。另外在本研究中，我们发现精浆Mn和精子PR (%) 呈线性负相关 ($P < 0.05$)，而尿Mn与精子PR (%) 和 (PR+NP) % 呈线性负相关 ($P < 0.05$)。在非职业性锰暴露的研究中，杨智敏等^[104]发现男性精液Mn浓度与精子密度、精子活力和正常形态精子百分比均呈负相关，还发现精子活力对精液高Mn水平最敏感。Wan等^[105]人在746名男性志愿者中发现精浆Mn与LIN成负向剂量依赖关系，并且指出尿Mn水平和精子运动参数无相关性。本研究提示尿Mn和精浆Mn可部分的评估Mn暴露以及监测Mn暴露导致的生殖毒性。

本研究中有许多不足之处。尽管我们排除了诸多混杂因素，但我们仍然不能排除Mn之外其他具有生殖毒性因素的影响。本研究中能够纳入接触Mn作业男工人数过少使得样本量较小，尿Mn、精浆Mn和生殖激素及精液质量相关指标的关系存在一定的假阳性，可能并非真实的生物学关系。尿Mn和精浆Mn可能不是最准确的Mn内暴露生物标记物，临床上它们也不是Mn生殖毒性诊断的金标准。因此，在以后的研究中，仍然需要寻找能特异性的反映Mn暴露致生殖毒性的简单、快速和准确的生物标志物，完善Mn暴露评估机制，满足预防及诊断Mn生殖毒性的需要。

5 结论

1. 接触 Mn 作业可导致男工生殖内分泌激素紊乱，精液质量下降，生殖功能受损。
2. Mn 致血清 GnRH 水平升高可能是生殖功能受损的重要原因之一。

第三部分：下丘脑源性 PGE₂ 在锰致生殖毒性中作用机制的实验研究

1 前言

锰 (Manganese, Mn) 作为一种具有神经毒性和生殖毒性的重金属元素, 是否通过改变脑内某个部位的结构或功能进而影响生殖功能呢? Mn 进入脑内可由星形胶质细胞 (astrocyte, Ast) 摄取, 蓄积于人体生殖内分泌轴的起始部位-下丘脑。在我们前期的研究中发现暴露于高 Mn 环境中的 Ast 摄取谷氨酸 (Glutamate, Glu) 会发生障碍, 导致胞外 Glu 浓度增高, 谷氨酸受体 (Glutamate receptor, GluR) 激活^[106]。其中 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA) 受体是一种重要的离子型 GluR。已证实激活的 AMPA 受体可通过金属蛋白酶反式激活 Ast 上的 ErbB 受体^[107], ErbB 受体在 Ast 中的表达增加^[108], 而 ErbB 受体再进一步通过自身酪氨酸磷酸化上调环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达^[109], 进而刺激 Ast 分泌前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂), 而 COX-2 是 PGE₂ 合成的关键性限速酶^[110-111]。Clasadonte 等^[112]进一步发现 PGE₂ 可与相邻的促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 神经元上的 PGE₂ 受体 (E-prostanoid receptors, EP) 相结合, 而这种结合会激活诸如 cAMP/PKA 等相关信号通路从而影响 GnRH 的释放^[113]。GnRH 是下丘脑-垂体-睾丸轴 (hypothalamic-pituitary-testis axis, HPTA) 的启动因子^[114-115], 同时也是神经生殖内分泌激素的调控中心^[116]。GnRH 主要参与调节垂体功能, 对 FSH 和 LH 的合成及分泌有着决定性的作用。同时, GnRH 可促进男性性腺发育, 还可促进精子的分化和成熟, 提高精子的密度及活动力, 改善精子的形态。另外 GnRH 还在男性性功能方面起到重要的作用, 是性行为的主要发起者^[117-118]。这表明 Mn 有可能通过下丘脑源性 PGE₂ 影响 GnRH 的水平从而发挥调节生殖功能的作用。

本研究首先运用体外实验的方法培养下丘脑 Ast 并给予 MnCl₂ 染毒, 通过检测细胞活力、细胞形态、细胞培养液中 PGE₂ 的水平、细胞中 AMPA 受体亚基 GluR2 及 PGE₂ 的限速酶 COX-2 的表达情况, 并应用 NBQX 提前干预来研究 Mn 对 Ast 产生 PGE₂ 的影响。其次我们采用体内实验的方法用 MnCl₂ 处理雄性去势小鼠建立

Mn 暴露模型，研究 Mn 暴露对生殖内分泌激素关键指标 PGE₂ 和 GnRH 的影响，观察下丘脑的组织形态、GluR2 及 COX-2 表达情况及提前应用 AMPA 受体拮抗剂 2,3-二羟基-6-硝基氨-磺酰苯喹啉啉（2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)-quinoxaline, NBQX）和 COX-2 拮抗剂塞来昔布（celecoxib）以及联合应用这两种拮抗剂来干预 Mn 中毒小鼠。本研究采用体内外实验相结合的方法共同阐述 Mn 暴露导致生殖毒性的可能机制，为下丘脑源性 PGE₂ 在 Mn 致生殖毒性中的作用机制提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 主要试剂

NBQX (美国 Tocris 公司)

Celecoxib (大连美仑生物技术有限公司)

RNA 提取试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)

荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)

PGE₂ Elisa 试剂盒 (江苏宝莱生物)

RNase-free water (日本 TaKaRa 公司).

蛋白提取试剂盒 (北京 Solarbio 科技有限公司)

RIPA 裂解液 (美国 Santa Cruz 公司)

蛋白 Marker (上海 life sciences 公司)

ECL 化学发光检测试剂盒 (南京凯基生物发展有限公司)

MnCl₂(MnCl₂·4H₂O) (美国Sigma公司)

鼠GAPDH抗体 (美国Santa Cruz 公司)

DMEM 高糖 (美国 Hyclone 公司)

Tween-20 (美国 Sigma 公司)

Tris (北京 Solarbio 科技有限公司)

DMEM (美国 Thermo 公司)

DAPI (碧云天生物技术研究)

胎牛血清 (美国 Thermo 公司)

0.25%胰蛋白酶 (北京 Solarbio 科技有限公司)

0.015%多聚赖氨酸 (美国 Sigma 公司)

D-Hank's (北京 Solarbio 公司)

GluR2 大鼠抗小鼠单克隆抗体 (英国 abcam 公司)

COX-2 多克隆抗体 (美国 Abbkine 公司)

CCK-8试剂盒 (碧云天生物技术研究)

BCA蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究)

辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG（北京中杉金桥生物技术公司）

超敏 ECL 化学发光试剂盒（美国 Bio-Rad 公司）

PVDF（美国 Millipore 公司）

2.1.2 主要仪器

多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）

MCO-15AC CO₂ 培养箱（日本 Sanyo 公司）

7500 Real time PCR 扩增仪（美国 Applied Biosystems 公司）

VE-180垂直电泳槽（上海天能科技有限公司）

EPS-300电泳仪（上海天能科技有限公司）

GDS-8000电泳凝胶成像分析系统（美国UVP公司）

96孔酶标板（美国Corning公司）

一次性细胞培养瓶（75 cm²）（美国Thermo公司）

单孔细胞培养板（35 mm）（美国Corning公司）

实时荧光定量PCR仪（美国BIO RAD公司）

倒置显微镜（日本 OLYMPUS 公司）

24 孔培养板（美国 Corning 公司）

2.2 体外实验

2.2.1 Ast 的培养

冰上低温麻醉出生 24 h 之内的昆明小鼠，然后浸泡在 75%酒精中消毒，5 min 后用眼科剪取出下丘脑部分，剥离残余的脑膜或血管。加入 0.25%胰蛋白酶液消化 20 min 后，加入等体积含 20%胎牛血清的 DMEM 终止消化。再离心，弃上清液，加入含 10%胎牛血清的 DMEM 轻轻吹打以分离细胞。然后过滤细胞再离心后弃上清，加入适量含 20%胎牛血清的 DMEM 种植于培养皿中，1 h 差速贴壁并将细胞浓度调整为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 后移入到经 0.015%多聚赖氨酸处理过的细胞培养瓶中。细胞 37℃培养 24 h 后，用 D-Hank's 洗涤细胞以便去除细胞碎片和死亡细胞并更换含血清培养基。然后每 3 天换液一次，待细胞铺满瓶底后封口并振摇过夜。次日离心去上清，用含 10%胎牛血清的 DMEM 将细胞密度调整为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 并继续培养。

2.2.2 不同 Mn 暴露剂量及暴露时间对 Ast 活力的影响

收集对数期细胞，将细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ /孔接种在96孔板上（边缘用无菌PBS填

充)，在细胞培养箱中孵育至细胞单层长满孔底。取出孔板，向培养板中分别加入浓度为0 $\mu\text{mol/L}$ 、62.5 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 和1000 $\mu\text{mol/L}$ 的含 MnCl_2 的DMEM完全培养基10 μL ，然后在培养箱孵育6 h、12 h、24 h和48 h后，再各加入CCK-8溶液10 μL 。另设置仅加入10 μL 的DMEM完全培养基和CCK-8溶液而未加细胞的孔作为空白孔。继续培养1 h后在450 nm下测定各孔的吸光度值。细胞活力(%)计算公式为：(实验孔吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照孔吸光度值-空白孔吸光度值) $\times 100\%$ 。实验重复3次，取平均值。

2.2.3 NBQX 不同时间干预对染 Mn Ast 活力的影响

向培养于96孔板的Ast加入浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ ^[119]的NBQX提前干预1 h、3 h、6 h和12 h后，于各孔中加入500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 继续培养24 h后测定各孔细胞活力。

2.2.4 细胞分组及处理

分离纯化后的Ast设置对照组、Mn暴露组和NBQX干预组，以每孔 1×10^4 个接种于96孔板中继续培养24 h后。NBQX干预组加入20 $\mu\text{mol/L}$ NBQX预处理，对照组和Mn暴露组给予等量的DMEM完全培养基。6 h后，对照组给予DMEM完全培养基换液，Mn暴露组和NBQX干预组给予含500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 的DMEM完全培养基换液，继续培养24 h后进行后续指标的测定。

2.2.5 细胞培养液中 PGE_2 含量的测定

经 Mn 暴露及 NBQX 干预 24 h 后，收集细胞培养液，测定培养液中 PGE_2 的水平。首先配置浓度分别为 480 ng/L、240 ng/L、120 ng/L、60 ng/L 和 30 ng/L 的 PGE_2 标准品。其次酶标包被板上每孔加 10 μL 样品和 40 μL 样品稀释液，而标准孔中加 50 μL 浓度为 960 ng/L 的标准品，37 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇 30 min 后用洗涤液冲洗 5 次，加 50 μL 酶标试剂（不加空白孔），在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后再用洗涤液冲洗 5 次。最后加入 50 μL 显色剂 A 和 50 μL 显色剂 B，显色反应 15 min 后加 50 μL 终止液终止。在 450 nm 下测定各孔的吸光度值（空白孔调零）并根据标准曲线计算样品 PGE_2 的实际浓度。

2.2.6 Ast 中 COX-2 和 GluR2 mRNA 表达量的检测

总RNA的提取：

在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将细胞连同培养液8000 rpm离心2 min，去上清。使用1 \times PBS洗涤细胞后再次离心，去上清。然后加入350 μL 的裂解液Buffer RL（已加入50 \times DTT Solution）

裂解至无明显沉淀。离心留上清并转移到1.5 mL的RNase Free Tube。将上清液转移到gDNA Eraser Spin Column（已安放到2 mL的Collection Tube）中然后离心并保留2 mL Collection Tube中的滤液。加入等体积的70%乙醇，充分混匀后转入到RNA Spin Column（含2 mL Collection Tube）中离心并弃滤液。将500 μ L的Buffer RWA加入到RNA Spin Column（已放回到2 mL Collection Tube）中离心并弃滤液。再将600 μ L的Buffer RWB（已加入了600 μ L的100%乙醇）加入到RNA Spin Column中离心并弃滤液。重复1次后，将RNA Spin Column再安放在2 mL Collection Tube后离心。将RNA Spin Column再安放在1.5 mL的RNase Free Collection Tube上，膜中央处加100 μ L的RNase Free dH₂O，离心以洗脱RNA。

RNA纯度检验：

分别在260 nm和280 nm下测定吸光度并计算其比值。比值在1.8 - 2.0之间的RNA其纯度可适合用于后续实验。

去除基因组DNA反应：

首先按反应数+2配制Master Mix反应液10 μ L（冰上取1.0 μ L Prime Script RT Enzyme Mix I, 1.0 μ L RT Primer Mix, 4.0 μ L 5 \times PrimeScript Buffer 2（for Real Time）和4.0 μ L RNase free dH₂O充分混匀），然后取2.0 μ L 5 \times gDNA Eraser Buffer和1.0 μ L gDNA Eraser到反应管中，再加入1.0 μ g Total RNA，最后用RNase Free dH₂O定容至10 μ L。在42 $^{\circ}$ C水浴条件下2 min后4 $^{\circ}$ C下分装到各个反应管中。

反转录反应：

在冰面上配制反应液20 μ L：分别加入10.0 μ L的上一步骤的反应液和10 μ L的Master Mix反应液。充分混匀放入PCR反应仪中，后37 $^{\circ}$ C下15 min，然后85 $^{\circ}$ C下5 s，转到4 $^{\circ}$ C后分装到每个反应管，每管10 μ L。将cDNA冻存于-20 $^{\circ}$ C保存。

Real time RT-PCR

引物合成：

根据目的基因的 Genbank 登录号，得到相应的 cDNA 序列。使用 GAPDH 作为内参，各引物序列及扩增片段长度具体见表 1：

表 1 各引物序列及扩增片段长度

Name	Oligo	Primer sequence	Predicted size (bp)
GAPDH	Forward	5'-GGGGCTCTCTGCTCCTCCCTG-3'	107
	Reverse	5'-CGGCCAAATCCGTTACACCG-3'	
GluR2	Forward	5'-CAAG TTCGCATACCTCTA-3'	207

	Reverse	5'-TTATCCCT TTCACAGTCC-3'	
COX-2	Forward	5'- TGACAGCCCCACCAACTTACA-3'	100
	Reverse	5'- ATCAGCCACAGGAGGAAGG-3'	

配置PCR反应液:

选择SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 进行Real time RT-PCR。在冰上配制PCR反应液或者混池: 分别加入10 µl SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2×), 0.8 µL PCR Forward Primer(10 µM), 0.8 µL PCR Reverse Primer(10 µM), 0.4 µL ROX Reference Dye II(50×), 2 µL RT反应液(cDNA溶液)和6 µL dH₂O(灭菌蒸馏水)并充分混匀。

Real time RT-PCR 反应:

选用 GAPDH 作为内参基因, 采用两步法 PCR 反应程序, 其扩增标准程序为预变性: 95℃下 30 s, 循环 1 次, PCR 反应: 95℃下 5 s 使其变性然后转 60℃下 34 s 退火延伸, 循环 40 次, 最后分离断开。

2.2.7 Ast 中 COX-2 和 GluR2 蛋白表达的检测

Ast 前处理:

每组细胞设 3 个平行样, PBS 洗涤细胞 3 次后再加入胰蛋白酶消化, 含血清培养液终止消化后 4℃下 12000 rpm 离心 5 min。弃上清, 用 100 µL 细胞裂解液裂解 30 min。再次离心后分装上清液。

BCA 法测蛋白浓度:

首先配制蛋白标准溶液(终末浓度为 0.5 mg/mL)及 BCA 工作液(BCA 试剂 A: B 体积比为 50:1)。分别取 0 µL、2 µL、4 µL、8 µL、12 µL、16 µL 和 20 µL 体积的蛋白标准溶液加入 96 孔酶标板中, PBS 补充至 20 µL。样品孔分别加入 10 µL 样品及 10 µL PBS。最后样品孔和标准品孔均加入 200 µL BCA 工作液混匀。37℃下水浴放置 30 min 后在波长 562 nm 下测定各孔吸光度并通过标准曲线得出样品蛋白浓度。

根据所测样品蛋白浓度用 0.9% NaCl 稀释成 6 µg/µL 后加入等量 2*SDS 加样缓冲液稀释混匀后, 将样品于 95℃煮沸 10 min 后冻于-20℃保存待用。

SDS-PAGE 电泳:

首先制备 8%的聚丙烯酰胺分离胶和 5%聚丙烯酰胺浓缩胶。安装好电泳装置后加 4 µL 预染的 Marker 及上样 10 µL 样品。80V 恒压电泳 30 min 左右, 待条带扩散到分离胶位置并条带规整时, 转为恒压 120V。当溴酚蓝染料到达分离胶底部

约 1 cm 处时, 停止电泳。取所需凝胶部分按顺序固定放置在电转移槽中, 注满转膜缓冲液, 在 90V 恒压下转膜 150 min。取出 PVDF 膜, 在含 3%BSA 的 TBST 中封闭 2 h。再将 PVDF 膜放入封闭液稀释的一抗 (GluR2 稀释比例为 1:2000; COX-2 稀释比例为 1:1000, GAPDH 稀释比例为 1:3000), 4℃振摇过夜。回收一抗抗体, TBST 洗膜 3 次后放入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗中。室温下于摇床上振摇 2 h 后吸除二抗, 再次洗膜后滴加 ECL 显影液, 暗箱曝光。保存条带图像并使用 Image J 软件测定各条带的吸光度值并计算目的蛋白的相对表达量。

2.3 体内实验

2.3.1 制备小鼠 Mn 中毒模型及分组

由中国医科大学实验动物中心提供的健康清洁级昆明雄性小鼠 30 只 (体重 30.25 ± 2.36 g), 动物许可证编号 (NO.SCXK 2013-0001)。动物的照明时间为每天 12 h, 动物室温度控制在 22℃, 相对湿度为 50-60%。所有小鼠在试验前需适应性饲养 1 周, 各组小鼠活动、饮食、进水和大小便均无异常后开始试验。使用 5% 水合氯醛麻醉, 无菌条件下行小鼠双侧睾丸切除手术, 手术当日及术后给予肌肉注射庆大霉素 5 万 U/(kg/d)。待伤口完全愈合无异常 1 周后随机分为 5 组, 分别为对照组、Mn 暴露组、NBQX 干预组、celecoxib 干预组、NBQX + celecoxib 干预组, 每组 6 只。对照组和 Mn 暴露组给予腹腔注射 0.9% NaCl, NBQX 干预组给予腹腔注射 22.5 mg/kg 的 NBQX, celecoxib 干预组给予腹腔注射 30 mg/kg 的 celecoxib, NBQX + celecoxib 干预组给予腹腔注射 22.5 mg/kg NBQX 和 30 mg/kg celecoxib。2 h 后, 对照组腹腔注射 0.9% NaCl, Mn 暴露组、NBQX 干预组、celecoxib 干预组和 NBQX + celecoxib 干预组腹腔注射 50 mg/kg $MnCl_2$ 。以上注射剂量均为 5 ml/kg。每天干预及染毒 1 次, 一共持续 2 周。所有操作均在中国医科大学实验动物伦理审核范围内开展实验, 实验过程中尽量做到减少小鼠数量及所承受的痛苦。

2.3.2 动物处理

在最后一次染 Mn 24 h 后, 禁止小鼠饮食饮水, 称重后按照 5 ml/kg 的剂量腹腔注射 5% 水合氯醛溶液进行麻醉。腹主动脉采血, 3000 rpm 4℃离心 10 min, 取血清冻存于 -80℃冰箱, 用于后续血清 GnRH 及 PEG₂ 的测定。每组取 4 只小鼠在冰面上取出下丘脑组织, 放在生理盐水中, 洗净, 称重并记录。将其中 2 只小鼠

下丘脑放入 EP 管，加入 RNAiso 用于提取 RNA，另外 2 只小鼠下丘脑用于提取蛋白。剩余 2 只小鼠剪开上腹部露出心脏，先用生理盐水灌流，待流出液体清凉无血色后，再次用 4%多聚甲醛灌流直至小鼠抽搐死亡，并快速剥离下丘脑组织。将剥离的下丘脑用预冷的生理盐水洗净，之后放入 4%多聚甲醛中固定。

2.3.3 下丘脑组织形态学观察

将 2.3.2 中固定 24 h 之后的下丘脑组织包埋，纵向连续切片（5 μm ）。HE 染色，58℃烤箱烤片 30 min，将切片放入二甲苯中，脱蜡 10 min，之后再次放入二甲苯中脱蜡 10 min，将切片放入无水酒精中 10 min，两次。然后分别在 95%酒精，85%酒精，70%酒精和 50%酒精分别放置 5 min。用蒸馏水漂洗后，将切片浸泡于苏木素染液中，再用蒸馏水漂洗后用盐酸酒精脱色，自来水返蓝。放置一中午后在低倍镜下观察核是否蓝染，若不是则返回苏木素再染。若核蓝染则继续用伊红染色 1 - 2 min 后，用 85%酒精和 95%酒精各脱水 5 s，然后放入无水酒精中 10 min，两次；最后放入二甲苯透明，封片。晾干后在显微镜下观察并拍照。

2.3.4 血清 GnRH 水平的测定

使用血清 GnRH 试剂盒进行血清 GnRH 水平的测定，具体操作步骤同第二部分 2.6.2。

2.3.5 血清 PGE₂ 水平的测定

血清 PGE₂ 水平的测定具体操作步骤同第三部分 2.2.5。

2.3.6 小鼠下丘脑 GluR2 和 COX-2 mRNA 表达量的检测

往新鲜的 10 mg 下丘脑加入 350 μL 的裂解 Buffer RL（用 50 \times DTT Solution 稀释至终浓度为 2%），制成匀浆，其余步骤同第三部分 2.2.6。

2.3.7 小鼠下丘脑 GluR2 和 COX-2 蛋白表达量的检测

将下丘脑与 RIPA 蛋白变性裂解液按照每 20 mg 组织加入 150 - 250 μL 裂解液（总蛋白提取液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂按 250:1:1 比例混匀），冰上或低温超声裂解 3 s，间隔 15 s。多次裂解后 12000 g 4℃下离心 10 min，取上清，其余步骤同第三部分 2.2.7。

2.4 统计学分析

本研究中数据采用均数±标准差来表示，样本均数的比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）的方法，其中两两比较使用 SNK（Students-Newman-Keuls）法。数据的整理和分析使用 IBM SPSS Statistics 22.0 统计软件， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 均认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体外实验结果

3.1.1 Mn 暴露剂量及暴露时间的选择

如图 1 所示,随着 Mn 暴露浓度的升高和暴露时间的延长,Ast 活力不断降低。与对照组相比,分别用 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 和 1000 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 处理 Ast 24 h 和 48 h 后细胞活力均降低且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中暴露在 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 24 h 后 Ast 活力降低到 52.10%, 接近半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

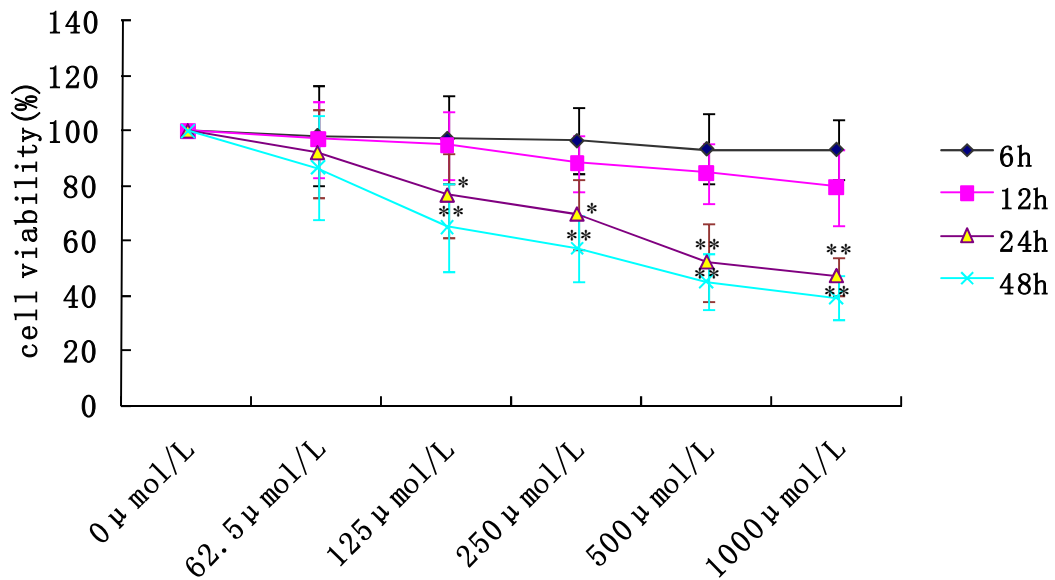


图 1 不同剂量及时间 MnCl_2 暴露下Ast活力的变化

*与对照组相比, $P < 0.05$, **与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.2 Mn 暴露对 Ast 形态的影响

如图 2 所示, 对照组 Ast 胞核多位于胞体, 呈圆形或卵圆形, 细胞突起细长, 细胞紧密连接交织成网状。与对照组相比, 随着 Mn 暴露浓度的升高, Ast 数量明显降低, 细胞稀疏, 胞体收缩, 突起断裂或消失, 细胞间隙变大。

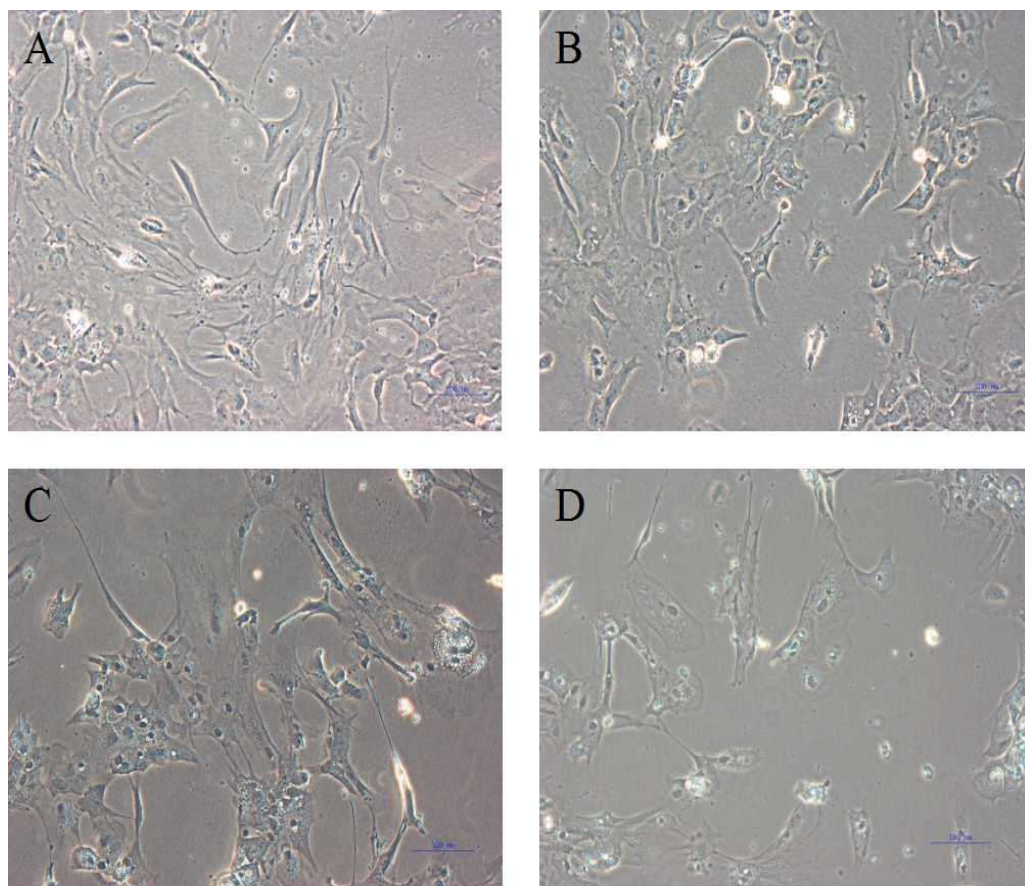


图 2 各组Ast的细胞形态

A: 对照组细胞形态; B: 125 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组细胞形态; C: 250 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组细胞形态; D: 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组细胞形态。

3.1.3 Mn 暴露对 Ast 细胞培养液中 PGE₂ 水平的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组培养液中 PGE₂ 的水平均升高 ($P < 0.01$)。

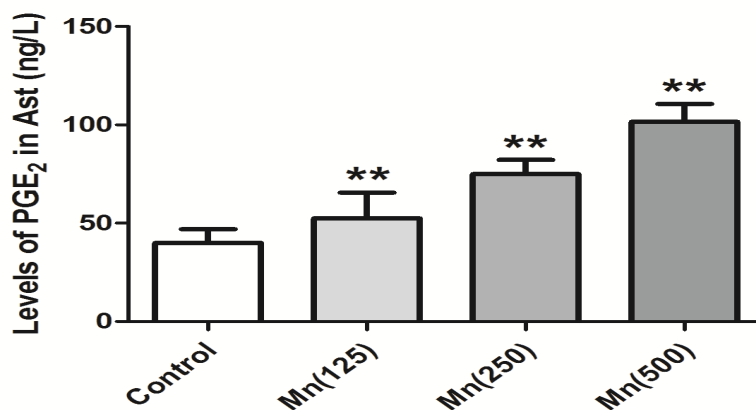


图 3 各组Ast细胞培养液中PGE₂水平

**与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.4 Mn 暴露对 Ast 中 COX-2 mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组 COX-2 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.01$)。

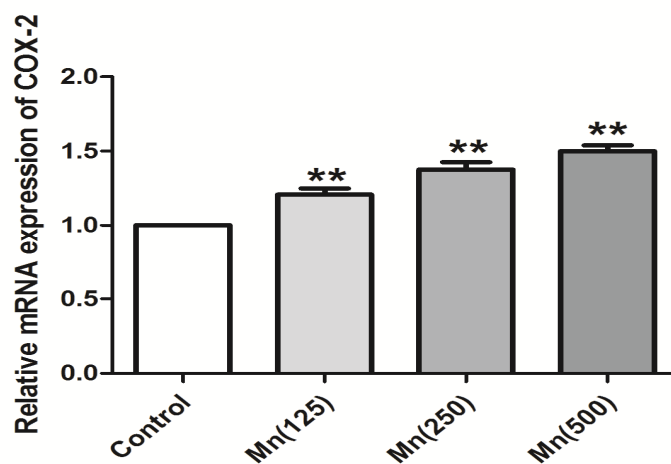


图 4 各组Ast中COX-2 mRNA表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.5 Mn 暴露对 Ast 中 COX-2 蛋白表达的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2

组 COX-2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.01$)。

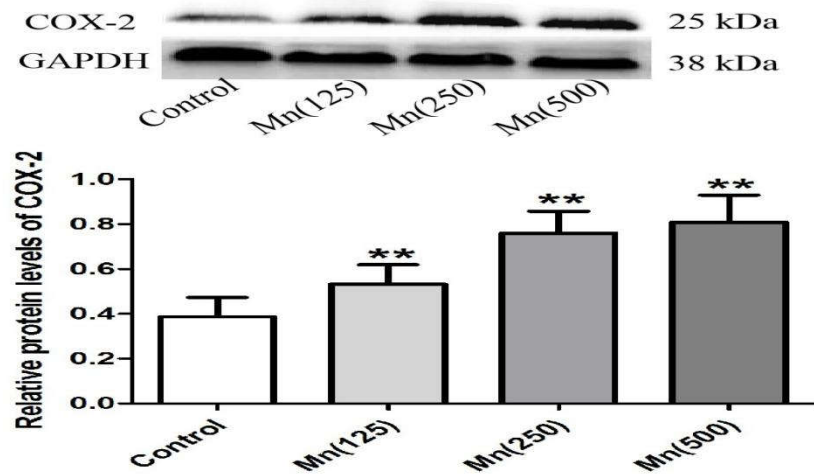


图 5 各组Ast中COX-2蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.6 Mn 暴露对 Ast 中 GluR2 mRNA 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组 GluR2 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.01$)。

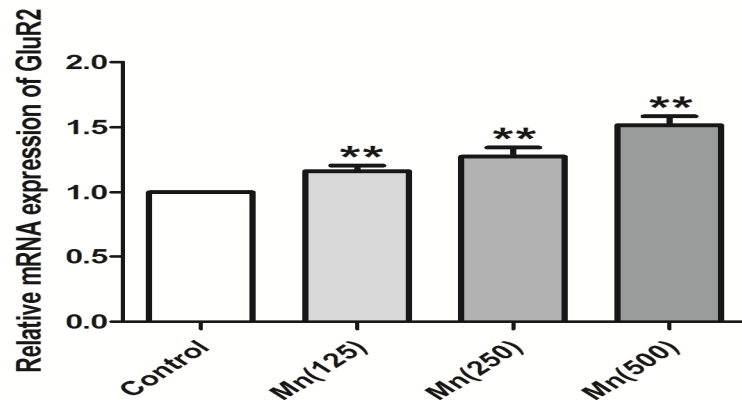


图 6 各组Ast中GluR2 mRNA表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.7 Mn 暴露对 Ast 中 GluR2 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组 GluR2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.01$)。

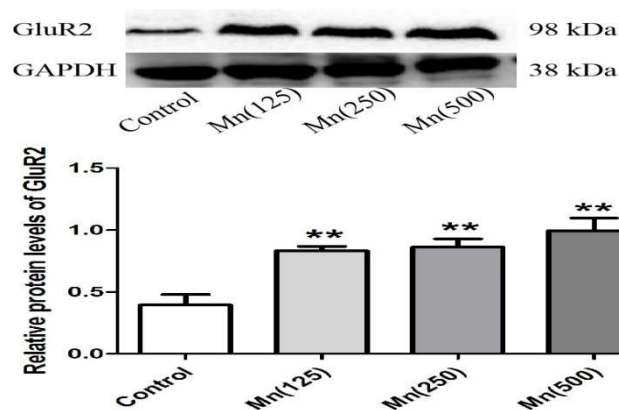


图 7 各组Ast中GluR2蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.8 NBQX 干预时间的选择

如图8所示,与暴露于500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast活力相比,给予20 $\mu\text{mol/L}$ NBQX提前干预3 h、6 h和12 h后,Ast活力均升高且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中NBQX提前干预6 h后细胞活力可恢复到73.27%。

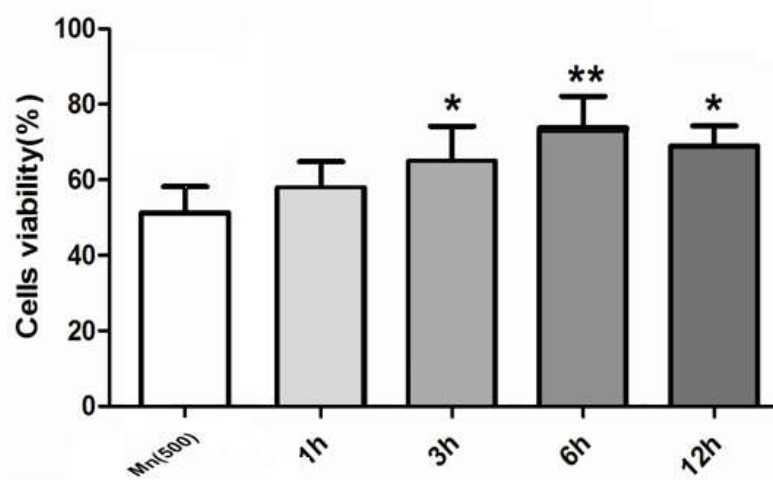


图 8 NBQX在不同时间下干预对Ast活力的影响

*与对照组相比, $P < 0.05$ 。 **与对照组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.9 NBQX 干预对 Ast 细胞形态的影响

如图9所示,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast细胞稀疏,数量减少,部分细胞收缩成圆形或椭圆形,突起成毛刺状或消失,细胞间隙变大,细胞形态受损。NBQX干预后可使Ast细胞形态明显好转。

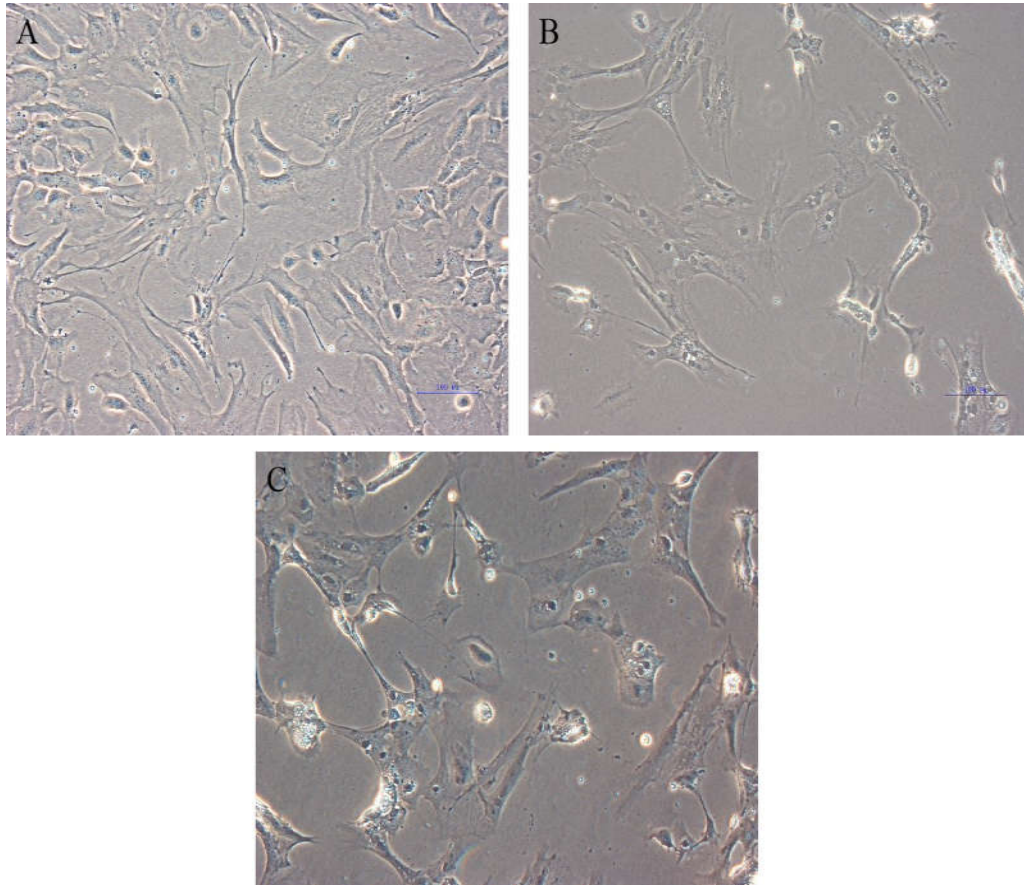


图 9 各组Ast的细胞形态 (200×)

A: 对照组; B: 500 μmol/L MnCl₂组; C: NBQX干预组。

3.1.10 NBQX 干预对 Ast 中 GluR2 mRNA 表达的影响

由图10可见, 与对照组相比, 500 μmol/L MnCl₂组Ast中GluR2的mRNA表达水平升高 ($P < 0.01$); 而与500 μmol/L MnCl₂组相比, 使用NBQX干预后, Ast中GluR2的mRNA表达水平降低 ($P < 0.01$)。

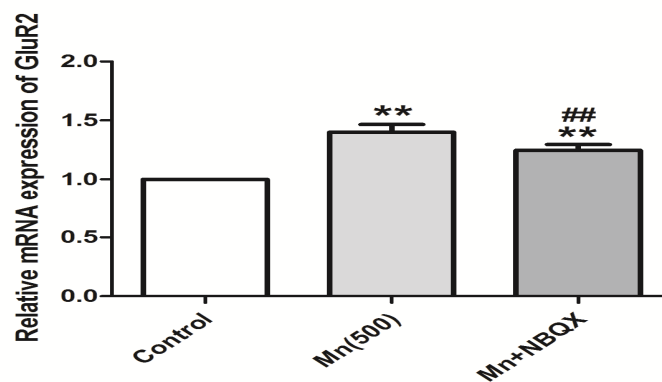


图 10 各组Ast中GluR2 mRNA表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.11 NBQX 干预对 Ast 中 GluR2 蛋白表达的影响

由图11可见,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast中GluR2的蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$);而与对照组和500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比,使用NBQX干预后,Ast中GluR2的蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。

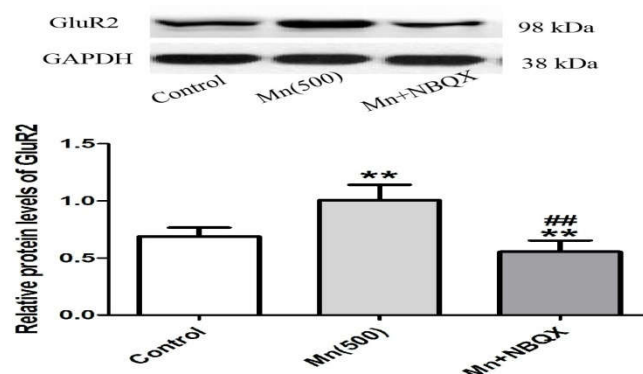


图 11 各组Ast中GluR2蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.12 NBQX 干预对 Ast 中 COX-2 mRNA 表达的影响

由图12可见,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast中COX-2的mRNA表达水平升高 ($P < 0.01$);而与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比,使用NBQX干预后,Ast中COX-2的mRNA表达水平降低 ($P < 0.01$)。

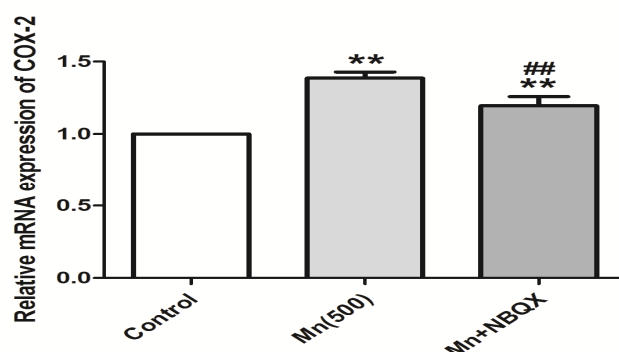


图 12 各组Ast中COX-2 mRNA表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.13 NBQX 干预对 Ast 中 COX-2 蛋白表达的影响

由图13可见,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast中COX-2的蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$);而与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比,使用NBQX干预后,Ast中COX-2的蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。

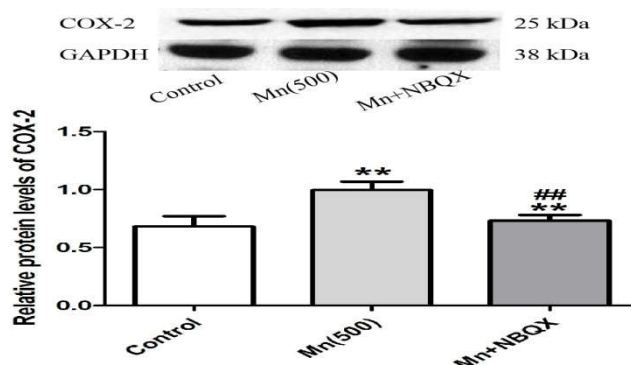


图 13 各组Ast中COX-2蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比, $P < 0.01$ 。

3.1.14 Mn 暴露对 Ast 细胞培养液 PGE_2 水平影响

由图14可见,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组Ast细胞培养液 PGE_2 水平升高 ($P < 0.01$);而与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比,使用NBQX干预后,Ast细胞培养液 PGE_2 水平降低 ($P < 0.05$)。

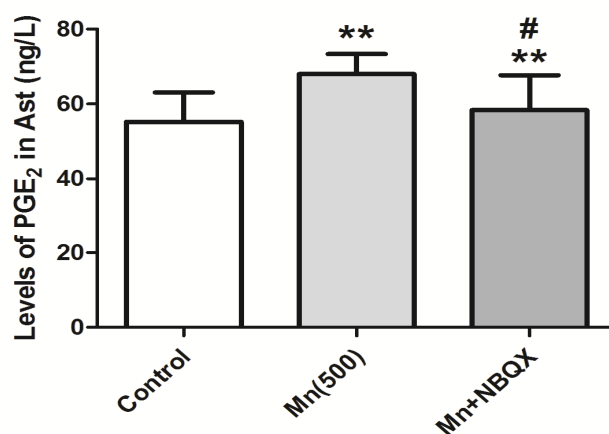


图 14 Mn暴露对Ast细胞培养液 PGE_2 水平的影响

**与对照组相比, $P < 0.01$; #与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组相比, $P < 0.05$ 。

3.2 体内实验结果

3.2.1 Mn 暴露对小鼠下丘脑组织形态的影响

由图15可见，对照组小鼠下丘脑组织排列整齐，细胞核深染，核仁清晰。50 mg/kg MnCl₂组小鼠下丘脑组织排列不规律，细胞核固缩，核仁模糊，细胞数量减少。NBQX干预组和celecoxib干预组小鼠下丘脑组织排列相对规律，细胞形态较清晰，细胞数量升高。此外，NBQX + celecoxib干预组下丘脑组织形态接近对照组。

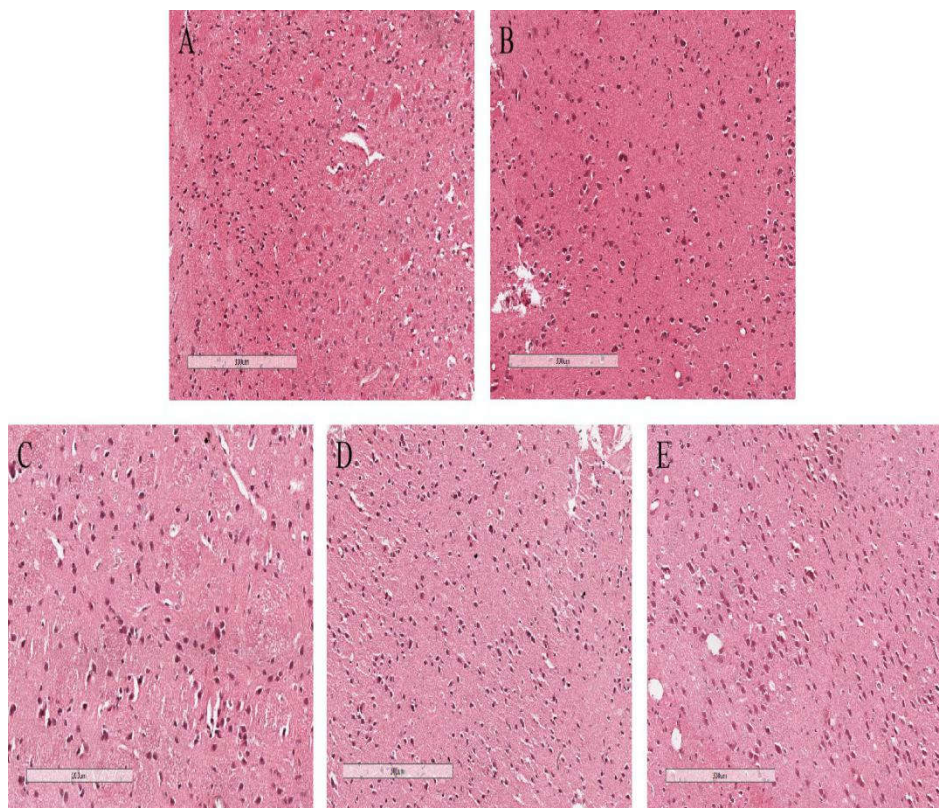


图 15 各组小鼠下丘脑组织 (HE 染色, 200×)

A: 对照组; B: 50 mg/kg MnCl₂ 组; C: NBQX 干预组; D: celecoxib 干预组; E: NBQX + celecoxib 干预组。

3.2.2 Mn 暴露对小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 表达的影响

如图 16 所示，与对照组相比，50 mg/kg MnCl₂ 组、NBQX 干预组、celecoxib 干预组以及 NBQX + celecoxib 干预组小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 表达水平均上升 ($P < 0.01$)。而与 50 mg/kg MnCl₂ 组相比，分别使用 NBQX 及 celecoxib 和联合使用 NBQX + celecoxib 干预后，小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 表达水平均下降 ($P < 0.01$)。此外，与 NBQX 干预组和 celecoxib 干预组相比，NBQX + celecoxib 干预组小鼠下

丘脑 GluR2 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$)。

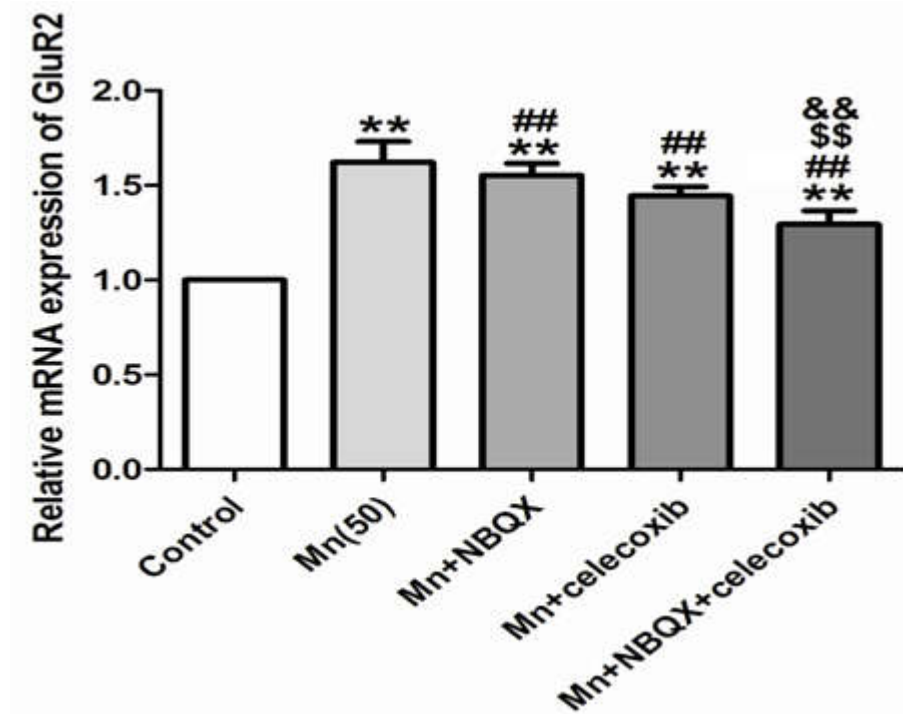


图 16 各组小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl_2 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &&与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.01$ 。

3.2.3 Mn 暴露对小鼠下丘脑 GluR2 蛋白表达的影响

如图17所示, 与对照组相比, 50 mg/kg MnCl_2 组小鼠下丘脑GluR2蛋白表达水平上升 ($P < 0.01$), 而NBQX干预组、celecoxib干预组和NBQX + celecoxib干预组 GluR2蛋白表达水平均下降 ($P < 0.01$)。与50 mg/kg MnCl_2 组相比, 分别使用NBQX及celecoxib和联合使用NBQX + celecoxib干预后, 小鼠下丘脑GluR2蛋白表达水平均下降 ($P < 0.01$)。此外, 与NBQX组和celecoxib干预组相比, NBQX + celecoxib干预组小鼠下丘脑GluR2蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。

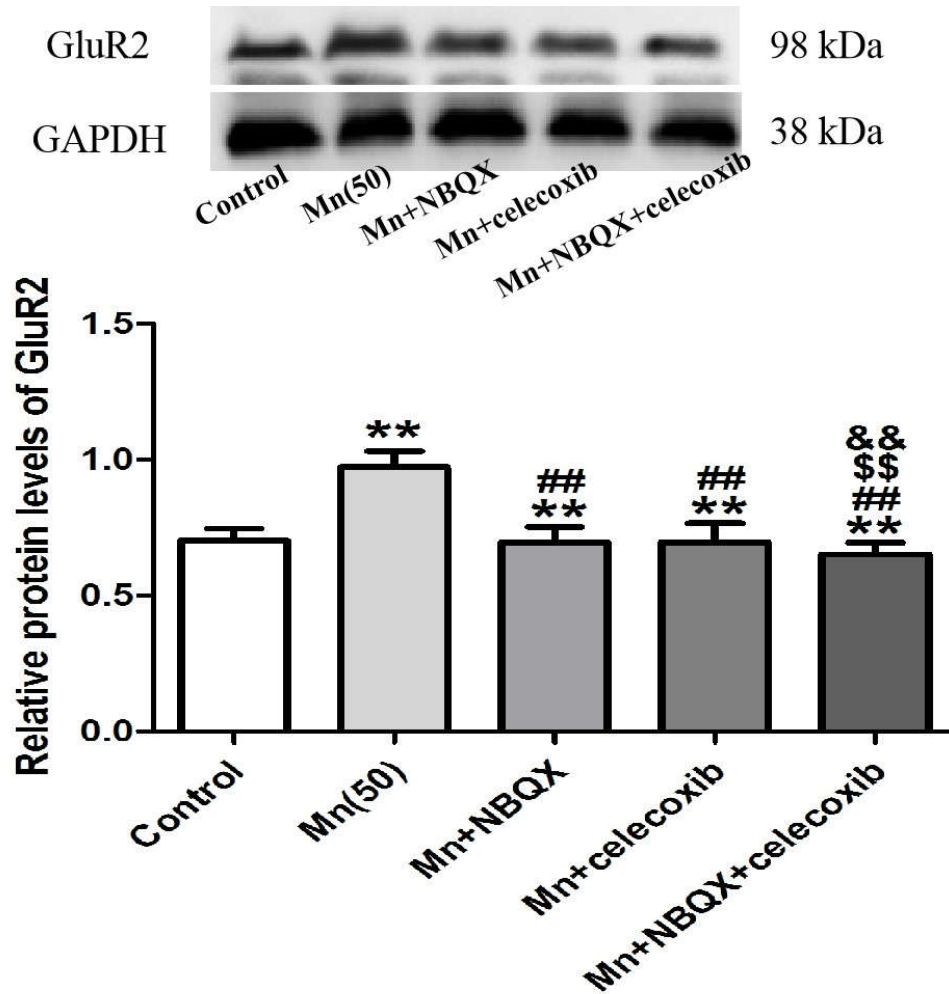


图 17 各组小鼠下丘脑 GluR2 蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl_2 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &&与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.01$ 。

3.2.4 Mn 暴露对小鼠下丘脑 COX-2 mRNA 表达的影响

如图18所示, 与对照组相比, 50 mg/kg MnCl_2 组、NBQX干预、celecoxib干预组以及NBQX + celecoxib干预组小鼠下丘脑COX-2 mRNA表达水平均升高 ($P < 0.01$)。而与50 mg/kg MnCl_2 组相比, 分别使用NBQX及celecoxib和联合使用NBQX + celecoxib干预后, 小鼠下丘脑COX-2 mRNA表达水平均下降 ($P < 0.01$)。此外, 与NBQX组和celecoxib干预组相比, NBQX + celecoxib干预组小鼠下丘脑COX-2 mRNA表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

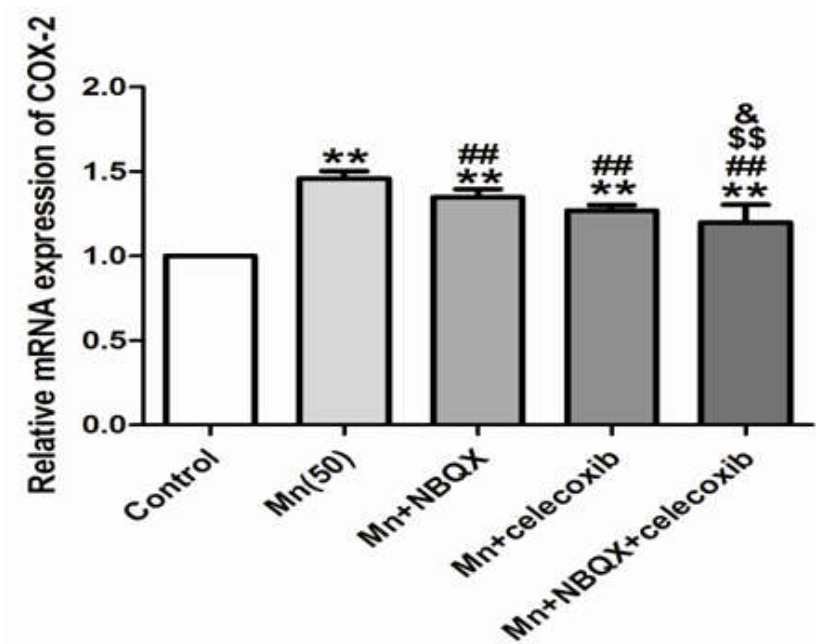


图 18 各组小鼠下丘脑 COX-2 mRNA 表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl_2 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.05$ 。

3.2.5 Mn 暴露对小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达的影响

如图 19 所示,与对照组相比,50 mg/kg MnCl_2 组小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达水平上升 ($P < 0.01$),而 NBQX 干预组、celecoxib 干预组以及 NBQX + celecoxib 干预组小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.01$)。与 50 mg/kg MnCl_2 组相比,分别使用 NBQX 及 celecoxib 和联合使用 NBQX + celecoxib 干预后,小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.01$)。此外,与 NBQX 干预组和 celecoxib 干预组相比, NBQX + celecoxib 干预组小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。

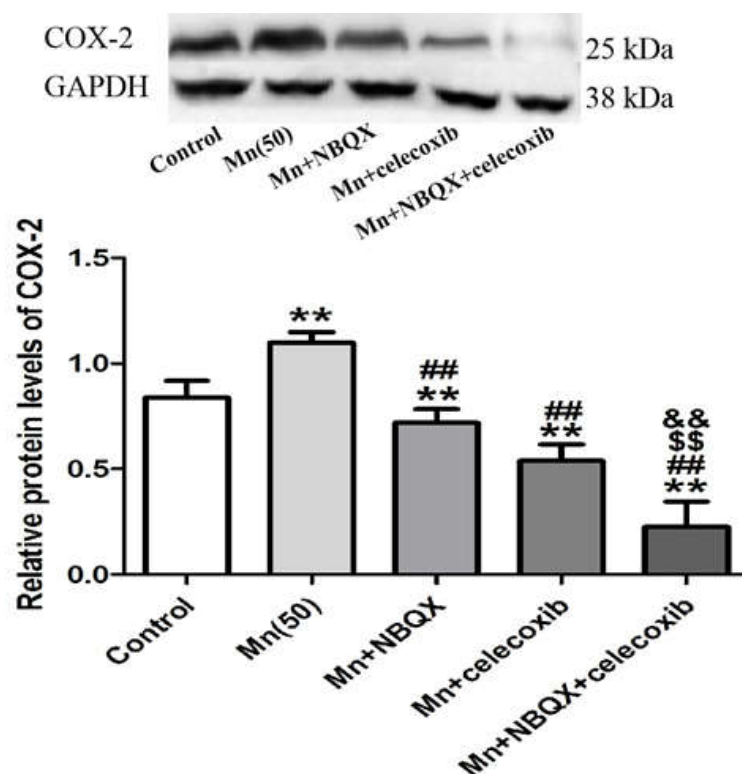


图 19 各组小鼠下丘脑 COX-2 蛋白表达水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl_2 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &&与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.01$ 。

3.2.6 Mn 暴露对小鼠血清 PGE_2 的影响

如图20所示, 与对照组相比, 50 mg/kg MnCl_2 组、NBQX干预组、celecoxib干预组以及NBQX + celecoxib干预组小鼠血清 PGE_2 水平均上升 ($P < 0.01$)。而与50 mg/kg MnCl_2 组相比, 分别使用NBQX及celecoxib和联合使用NBQX + celecoxib干预后, 小鼠血清 PGE_2 水平均下降 ($P < 0.01$)。此外, 与NBQX干预组和celecoxib干预组相比, NBQX + celecoxib干预组小鼠血清 PGE_2 水平降低 ($P < 0.01$)。

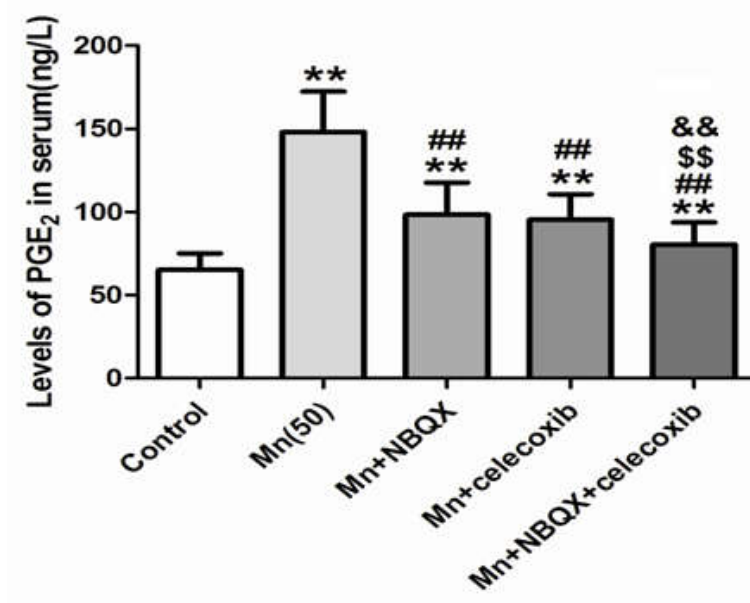


图 20 各组小鼠血清 PGE₂ 水平

**与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl₂ 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &&与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.01$ 。

3.2.7 Mn 暴露对小鼠血清 GnRH 的影响

如图 21 所示,与对照组相比,50 mg/kg MnCl₂ 组、NBQX 干预组以及 celecoxib 干预组小鼠血清 GnRH 水平上升 ($P < 0.01$),而 NBQX + celecoxib 干预组小鼠血清 GnRH 水平下降 ($P < 0.05$)。与 50 mg/kg MnCl₂ 组相比,分别使用 NBQX 及 celecoxib 和联合使用 NBQX + celecoxib 干预后,小鼠血清 GnRH 水平均下降 ($P < 0.01$)。此外,与 NBQX 干预组和 celecoxib 干预组相比,NBQX + celecoxib 干预组小鼠血清 GnRH 水平降低 ($P < 0.01$)。

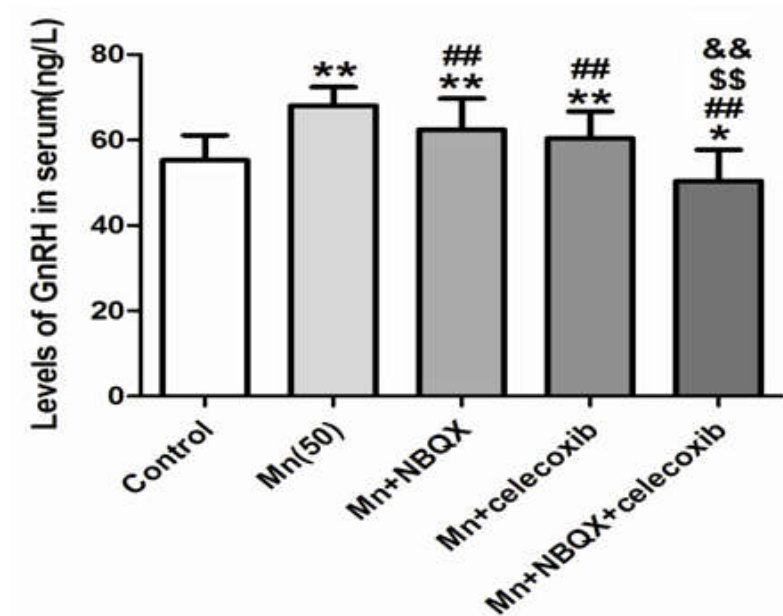


图 21 各组小鼠血清 GnRH 水平

*与对照组相比, $P < 0.05$, **与对照组相比, $P < 0.01$; ##与 50 mg/kg MnCl_2 组相比, $P < 0.01$; \$\$与 NBQX 干预组相比, $P < 0.01$; &&与 celecoxib 干预组相比, $P < 0.01$ 。

4 讨论

在本次体外实验中我们首先检测不同暴露剂量和不同暴露时间下Mn暴露对Ast的活力的影响。将Ast暴露于125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 24 h和48 h后,结果显示随着Mn暴露浓度的升高和暴露时间的延长,Ast活力不断降低。其中暴露在500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 24 h后Ast活力降低到52.10%,接近 IC_{50} 。有实验指出Ast暴露于低剂量的Mn(小于0.01 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 24 h不会出现细胞凋亡及形态学上的改变,但是高于0.02 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 时会出现时间依赖的细胞损伤效应^[120]。我们还发现随着Mn暴露浓度的升高,Ast数量明显降低,细胞稀疏,胞体收缩,突起断裂或消失,细胞间隙变大,细胞形态受损严重。细胞培养液 PGE_2 的水平上升,而选用AMPA受体拮抗剂NBQX提前6 h干预后与500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组比较,Ast细胞形态明显改善,细胞培养液 PGE_2 的水平下降。同样,我们将去势小鼠腹腔注射50 mg/kg MnCl_2 发现小鼠下丘脑组织排列不规律,细胞核固缩,核仁模糊,细胞数量减少,血清 PGE_2 水平上升。使用NBQX及COX-2拮抗剂celecoxib提前干预会改善小鼠下丘脑组织形态,血清 PGE_2 的水平降低,这说明Mn可能通过AMPA受体及COX-2的表达从而对下丘脑源性 PGE_2 的合成产生影响。

PGE_2 是花生四烯酸或其他二十碳不饱和脂肪酸的代谢产物,可通过影响下丘脑功能和GnRH神经元的活性刺激腺垂体合成和分泌LH、FSH从而调控生殖功能^[110]。 PGE_2 可通过激活 PGE_2 受体(E-prostanoid receptors, EP)从而调节GnRH神经元及下丘脑的功能。研究发现Ast产生的 PGE_2 作用于GnRH神经元,可通过激活EP1型受体和/或调节细胞内外 Ca^{2+} 的浓度^[121],也可与EP2结合并通过激活cAMP/PKA信号通路进而诱导GnRH神经元释放GnRH^[112]。我们的实验表明暴露于125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 24 h后Ast细胞培养液中 PGE_2 水平升高,暴露于50 mg/kg的 MnCl_2 小鼠中血清 PGE_2 水平与对照组比较明显上升,表明Mn可影响下丘脑源性 PGE_2 的合成及分泌。Clasadonte^[110]指出GnRH神经元胞体周围的下丘脑Ast可能通过激活erbB受体酪氨酸激酶信号通路从而对神经元活动作出反应,释放 PGE_2 ,进而反馈调节GnRH神经元的活动。Ma等人^[122]还指出Ast中erbB-2和erbB-4受体可能参与了这一过程,并最终导致 PGE_2 的释放。更有研究发现MAPKs, NF- κB 、AP-1、AKT和蛋白激酶Ca等信号通路均与Mn激活Ast并促使其合成并释放 PGE_2 有关^[123]。Milatovic等^[124]用500 μM Mn处理原代皮质神经元发现 PGE_2 呈时间依赖性升高。暴

露于 500 $\mu\text{mol/L}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的原代海马神经元合成分泌的 PGE_2 水平也随时间的延长而进行性增多^[125]。 PGE_2 与生殖功能密切相关，在临床上经常用于卵巢良恶性肿瘤的鉴别与诊断、流产、避孕及催产等。 PGE_2 还会对精子生成和运动性能产生影响^[126]。研究发现 PGE_2 还具有其他生理功能，如参加炎症反应，降低血压，促进胃肠道蠕动，并可参与慢性炎症相关的肿瘤发生发展等^[127]。

环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 又称前列腺素 H 合成酶 (prostaglandin H synthase, PGHS) 或前列腺素内过氧化物合成酶 (prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS) 是分解花生四烯酸生成 PGE_2 的前体-前列腺素 H_2 的关键酶。正常状态下，COX-2 蛋白仅存在于大脑部分组织如下丘脑、大脑皮层、杏仁核和海马区域^[128]。在中枢神经系统中 COX-2 可参与突触可塑性、记忆巩固、功能性充血等生理功能以及兴奋性神经毒性和各种急慢性疾病所致的神经系统病变等病理过程^[129]。研究发现 COX-2 和 PGE_2 两者相互作用并参与中枢神经系统的免疫调节、神经内分泌、神经生化、神经行为改变、突触和神经可塑性调节以及神经退行性病变等发生发展过程^[130-131]。Ast 合成的 PGE_2 可通过上调 COX-2 的表达来实现^[132]。Lin 等^[133]人进一步指出 Ast 可通过 ERK 和 JNK 等途径上调 COX-2 的表达从而促进下丘脑源性 PGE_2 的合成和释放。本次试验中我们发现与对照组相比，暴露于 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 的 Ast 中 COX-2 mRNA 和蛋白表达增加。提前应用 AMPA 受体拮抗剂 NBQX 干预可下调 Ast 中 COX-2 的表达，NBQX 干预也可下调小鼠下丘脑 COX-2 的表达，这提示 GluR2 对 COX-2 具有正向调控作用。研究发现无毒剂量下，Mn 能通过 LPS/干扰素- γ 激活 Ast，使得 COX-2 的表达上调以及 PGE_2 的释放增加，并且发现活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生在其中起到重要的作用^[123]。同样，王晓静等^[134]将小鼠小胶质细胞 BV2 细胞分别暴露于 50 μM 和 100 μM Mn 24 h 后发现 COX-2 mRNA 和蛋白水平表达均明显增加，认为 Mn 上调 COX2 的表达从而参与了小胶质细胞的活化，进而导致神经毒性的发生。Jang 等^[135]人还发现 Mn 可以通过多种信号转导通路和 GSH 耗竭的共同作用，上调 A549 人肺上皮细胞 COX-2 的表达。暴露于 50 mg/kg 的 MnCl_2 小鼠下丘脑中 COX-2 mRNA 及蛋白的表达升高，提前应用 COX-2 拮抗剂 celecoxib 可下调 COX-2 的表达，说明 Mn 可上调小鼠下丘脑 COX-2 的表达从而促进下丘脑源性 PGE_2 的合成增加，从而影响小鼠的生殖功能。同样，Li 等^[136]对雄性 SD 大鼠腹腔注射 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (15 mg/kg) 12 周后发现亚慢性 Mn 暴露可激活大脑皮层、海马和丘脑 Ast，上调 COX-2 的转录水平还能增加脑区炎症细胞因子，并伴随着

MAPK 信号和 COX-2 同一脑区域的表达增强。

作为中枢神经系统中一种重要的神经递质,谷氨酸 (glutamate, Glu) 是兴奋性突触的主要递质,可在认知、学习、行为、记忆、以及神经退变性病变中发挥着重要的作用。在正常状态下, Glu 由突触前膜囊泡释放到突触间隙,并决定着谷氨酸受体 (glutamate receptor, GluR) 的激活程度,进而对突触后膜神经细胞的兴奋性产生影响。如果间隙的 GluR 持续激活会导致 Glu 兴奋性神经毒性^[137-138]。AMPA 受体是中枢神经系统兴奋性突触后电流的主要成分,参与快速传递兴奋性 Glu^[139-140],并且与学习和联想记忆密切相关^[141-142]。AMPA 受体属离子型谷氨酸受体 (ionotropic glutamate receptor, iGluR),由 GluR1、GluR2、GluR3 和 GluR4 四种亚基组成的同四聚体或异四聚体,可包含 4 或 5 个亚基^[143-144]。其中 GluR2 决定着 AMPA 受体的主要特征^[145]。GluR2 不允许 Ca^{2+} 通过,可保持对细胞外 Ca^{2+} 的低通透性及受体的线性或外向整流 I/V 关系,是钙离子非通透性受体^[146-148]。Glu 过量可以激活与 erbB-1 和 erbB-4 受体有关的 AMPA 受体,其中主要是 GluR2 和 GluR3^[108],而激活的 AMPA 受体会导致 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Cl^{-} 及 H_2O 等内流,从而产生兴奋性神经毒性^[149],进而导致各种神经系统疾病,并且 AMPA 受体数量或功能的改变与肿瘤、心血管、呼吸和内分泌等系统疾病的发生发展有关。本次试验中我们发现与对照组相比,暴露于 125 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 的 Ast 中 GluR2 mRNA 和蛋白表达增加。而与 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 组比较,应用 AMPA 受体拮抗剂 NBQX 提前干预可下调 Ast 中 AMPA 受体 GluR2 的表达。这说明 Mn 可通过激活 AMPA 受体从而促使 Ast 合成 PGE_2 。同样,暴露于 50 mg/kg 的 MnCl_2 小鼠下丘脑 GluR2 mRNA 及蛋白的表达升高,提前应用 NBQX 可下调 GluR2 的表达,这提示下丘脑 AMPA 受体可对血清 PGE_2 以及 GnRH 水平都会产生影响。此外,研究人员发现通过 NBQX 能够拮抗 GluR2 亚单位缺失导致的细胞内 Ca^{2+} 超载及一系列级联反应,从而避免因全脑缺血而造成的海马神经元死亡^[147]。研究还发现 NBQX 不仅能够保护少突胶质细胞的轴突结构和功能活性,也可抑制糖氧剥夺 (Oxygen-glucose deprivation, OGD) 下诱导的 Ca^{2+} 内流^[150]。

本次体内实验发现暴露于 50 mg/kg 的 MnCl_2 小鼠中血清 GnRH 与对照组比较水平上升,而 GnRH 是 HPTA 的启动因子,是生殖内分泌激素的调控中心,这提示 Mn 可影响 GnRH 的分泌进而影响雄性小鼠的生殖功能。进一步研究发现暴露于 50 mg/kg 的 MnCl_2 小鼠中血清 PGE_2 与对照组比较明显上升,表明 Mn 可影响小鼠血清 PGE_2 的水平从而对 GnRH 的合成和分泌产生影响。李少军等^[151]腹腔注射

15 mg/kg MnCl_2 4 周和 8 周后均发现雄性成年 SD 大鼠血清 PGE_2 含量升高。Milatovic 等^[124]人对 C57Bl/6 雌性小鼠在第 1、4 和 7 天分别皮下注射 100 mg/kg MnCl_2 后, 大脑内 PGE_2 水平在最后一次注射 24 h 后增加。本实验中应用 AMPA 拮抗剂 NBQX 和 COX-2 拮抗剂 celecoxib 均能改善 Mn 中毒的状态, 使得小鼠血清 GnRH 和 PGE_2 水平下降, 而且这两个拮抗剂联合应用改善效果更明显。这表明 Mn 可通过激活 AMPA 受体及 COX-2 的表达影响下丘脑源性 PGE_2 从而调控 GnRH 的水平进而影响生殖功能。实验证实 NBQX 可在中风、癫痫和帕金森病等神经系统疾病中发挥较好的神经保护作用。如静脉注射 2 mg/kg 的 NBQX 可以降低帕金森病模型大鼠内侧前额叶皮层锥体神经元的爆发式放电比例, 对锥体神经元的电活动增强有恢复作用^[152]。应用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NBQX 还可阻断海马神经元细胞内 Ca^{2+} 超载的现象从而明显降低可持续的癫痫样放电^[153]。研究发现 celecoxib 可通过下调 COX-2 蛋白的表达抑制颅脑内的炎性反应和细胞凋亡从而改善脑损伤后的学习、记忆障碍^[154]。Celecoxib 还发现既可以修补电压依赖的钾离子通道亚家族 A (voltage-gated potassium channel subfamily A, Kv1) 的功能缺陷, 也可降低锥体神经元的兴奋性, 还能缓解富含亮氨酸的胶质瘤失活基因 1 (leucine-rich glioma inactivated gene 1, Lgi1) 敲除小鼠癫痫的发病情况, 延长生命周期^[155]。

本部分我们发现 Mn 暴露可导致 AMPA 受体 GluR2 以及 COX-2 的表达升高, PGE_2 合成增加, GnRH 水平升高, 而应用相应的 AMPA 拮抗剂 NBQX 以及 COX-2 拮抗剂 celecoxib 可明显下调 GluR2 以及 COX-2 的表达, 使得 PGE_2 合成减少, 血清 GnRH 水平下降, 由此我们推断 Mn 可以激活 AMPA 受体, 上调 COX-2 的表达, 最终促进下丘脑源性 PGE_2 的升高, 血清 GnRH 水平升高, 这可能是 Mn 参与调控生殖功能的机制之一。

5 结论

1、Mn 可上调 AMPA 受体 GluR2 和 COX-2 表达,并可致血清 PGE₂ 和 GnRH 水平升高。

2、GluR2 对 COX-2 具有正向调控作用。

3、Mn 可能通过激活 AMPA 受体及上调 COX-2 的表达来促使下丘脑源性 PGE₂ 水平升高,进而促使血清 GnRH 水平升高,这可能是 Mn 参与调控生殖功能的机制之一。

附件 1

量表编号: _____

男性生殖功能问卷表

尊敬的先生您好!我们正在开展一项关于“接触锰作业对男工生殖功能的影响”的调查研究。为了更好的了解您所在的工作环境与您的生殖功能状态以便更好的保护您的健康,需要您完成一份有关您最近的医学信息,锰作业史,性功能情况以及其它有关生殖功能的问题。您的回答没有对错之分,关于您的所有信息将严格保密,妥善保管。特别说明本调查研究在临沂市人民医院科研伦理委员会的审核批准范围内开展。感谢您的合作!

一、一般情况

1. 出生日期: (公历)_____年_____月, 身高_____ 米 体重_____ 公斤, 在本地区生活_____ 年(外出学习或工作_____年)
2. 民族: ☐汉, ☐其他_____, 宗教信仰_____
3. 文化程度: ☐文盲, ☐小学, ☐初中, ☐高中, ☐大学, ☐研究生
4. 婚姻状况: ☐未婚, ☐已婚, ☐离婚, ☐再婚, ☐丧偶
- 4.1. 结婚日期: _____年_____月
- 4.2. 是否近亲结婚 ☐是, ☐否

二、生活史

5. 是否吸烟: ☐不吸烟, ☐吸烟, ☐已戒烟

如吸烟, 请回答:

- 5.1. 平均每天_____支
- 5.2. 共_____年
- 5.3. 开始吸烟时间_____年_____月

若已戒烟, 请回答:

- 5.4. 戒烟日期_____年_____月
- 5.5. 被动吸烟情况

被动吸烟(吸入累计15分钟以上算一次)的情况?

☐几乎没有, ☐偶尔, ☐经常, ☐每天

6. 是否饮酒: ☐从未饮过, ☐偶尔饮, 每周少于2次, ☐经常饮酒, ☐已戒

若经常饮酒, 请回答:

6.1 平均每天____两

6.2 共____年

6.3 饮酒类型: ☐啤酒, ☐白酒, ☐红酒, ☐米酒, ☐果酒, ☐混合酒

6.4 开始饮酒时间: ____年____月

若已戒酒, 请回答:

6.5 戒酒时间: ____年____月

7 您是否喝茶?

☐基本不喝, ☐偶尔喝, ☐经常喝, 茶叶品种为: _____

8. 您是否喝咖啡?

☐基本不喝, ☐偶尔喝, ☐经常喝

9. 目前是否有长期服药史(连续服药物3个月以上)? ☐是, ☐否

若是, 服用以下何种药物:

请填写具体药名及用法用量_____。

10. 您半年内是否做过X光透射检查? ☐是, ☐否

11. 是否经常穿紧身内衣: ☐是, ☐否

12. 是否熬夜: ☐从不, ☐偶尔, ☐经常

13. 您平时接听电话累计时间

☐半个小时内, ☐1-2小时, ☐2小时以上

14. 您每天使用手机多长时间?

☐半个小时内, ☐1小时内, ☐3小时内, ☐6小时内, ☐12小时内, ☐基本不离手

15. 每日看电视时间: ☐1小时内, ☐1-3小时, ☐3小时以上

16. 每日使用电脑时间: ☐1小时内, ☐1-3小时, ☐3小时以上

17. 近半年内您平均每天睡眠大约多少小时?

☐小于4小时, ☐4-6小时, ☐6-8小时, ☐8小时以上

18. 您每天久坐的时间(包括工作时间和休息时间)平均多少小时?

☐小于1小时, ☐1-3小时, ☐3-5小时, ☐5小时以上

19. 是否经常洗澡: ☐是, ☐否

如是, 请回答:

19.1 洗澡的方式: ☐淋浴, ☐盆浴, ☐两者皆有

19.2 水温：☐凉水（10℃-30℃）☐温水（30℃-40℃），☐热水（40℃-55℃）

20. 您认为可能影响您生殖功能的生活方式及接触时间：

三、疾病史

21. 您以前或现在患过较重大的疾病或慢性病吗？如有，请写出具体疾病名称_____。

22. 是否患有生殖系统疾病 ☐否，☐是

22.1 若患有生殖系统疾病请写出具体疾病名称_____。

22.2 您是否做过泌尿生殖系统手术：☐无 ☐有 做过的手术名称_____。

23. 您现在是否有以下泌尿生殖症状或体征？☐无， ☐有

若有，请选择（可多选）：

☐下腹部坠胀、隐痛，☐尿道口有痛感，☐尿道口红肿，☐尿道口分泌物，☐睾丸或会阴区疼痛，☐会阴潮湿，☐尿急，☐排尿频繁，☐排尿困难，☐排尿有痛感，☐排尿不尽，☐生殖器周围出现斑丘疹、脓包、皮肤粘膜溃疡等异样改变，☐其他症状或体征：请写出_____。

四、家族遗传史

24. 家族中有无出生缺陷：☐是，☐否

若有，请回答：是何种出生缺陷_____。

五、职业史及工作环境

25. 您是什么工种？_____。从事该工作为_____年，每天工作为_____小时，每日工作时间为_____天。

26. 您是否接触锰作业？☐是，☐否

26.1 若接触锰作业

您接触锰作业_____年，每日接触时间为_____小时，每周工作时间为_____天。

27. 您是否接触其他有毒有害物质作业？☐是，☐否

如有，该物质是_____，接触作业_____年，您每日接触时间_____小时，每周工作时间_____天。

28. 近30天来您工作的类型是

☐常白班，☐常夜班，☐倒班，☐其他_____。

29. 您在工作时穿工作服吗？☐从来不穿，☐偶尔穿，☐总是穿
30. 您在工作时戴口罩吗？☐从来不戴，☐偶尔戴，☐总是戴
31. 您是否经常处于以下环境中？
☐噪声，☐振动，☐高温，☐高湿，☐其他_____。
32. 是否经常接触电离辐射（锅炉或压力容器检测、放射线材料等）？☐是，☐否
33. 工作环境中是否接触以下物质（可多选）：
☐锰以外的其他重金属，☐有机溶剂，☐农药，☐邻苯二甲酸酯，☐多环芳烃，☐消毒剂或洗涤剂，☐酚类，☐多氯联苯，☐甲醛，☐其他_____。
34. 您认为其他可能影响您生殖功能的职业接触方式及接触时间
-
-

六、性生活状况

35. 您和您的性伴侣感情如何？
☐非常好，☐好，☐一般，☐接近破裂
36. 过去30天内，您是否有紧张、悲伤、焦虑、抑郁、烦躁或消沉等情绪问题：
☐是，☐否
37. 您的工作会让您感到疲劳吗？
☐不疲劳，☐有点疲劳，☐经常感到疲劳
38. 您有性生活史____年，最近一次性生活在几天前，即禁欲_____天
39. 性生活是否正常：☐正常，☐不正常
40. 您对性有厌恶感吗？☐无，☐有
41. 您经常能够完成性行为吗？☐能，☐不能
如不能，请写明原因_____
42. 您1周有几次性行为？
☐1周不到1次，☐1周1次或者2次，☐1周三次或者更多
43. 在过去的30天内，您想要进行性生活的欲望有几天？
☐几乎没有（0分），☐少数几天（1分），☐有些天（2分），☐绝大多数（3分），
☐几乎每天都有（4分）
44. 在过去的30天内，你怎样评价你的性欲水平？
☐一点也没有（0分），☐不强（1分），☐中等（2分），☐比较强烈（3分），☐十分强烈（4分）

45. 您对于自己能够圆满地完成性生活自信程度为？

☐很自信, ☐一般, ☐不太自信, ☐根本不自信

46. 您性生活过程中存在焦虑、紧张或不安等情绪的次数多吗？

☐几乎总是（0 分），☐多数时候（1 分），☐一般（2 分），☐少数几次（3 分），
☐几乎没有（4 分）

47. 下面的表格可评价过去 6 个月内您阴茎勃起功能的情况，请对以下内容进行打分：

项目\评分标准	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分	得分
1.您对获得勃起和维持勃起的自信程度如何？	无	很低	低	中等	高	很高	
2.您阴茎的硬度有多少次可以插入阴道？	无	0 或几乎没有	远少于 50% 或少数几次	约 50% 或有时	远多于 50% 或大多数时候	100% 或几乎总是	
3.从插入阴道到完成射精前，阴茎有多少次是保持着勃起状态？	没有	0 或几乎没有	远少于 50% 或少数几次	约 50% 或有时	远多于 50% 或大多数时候	100% 或几乎总是	
4.阴茎勃起至性交完成，困难大吗？	没有困难尝试	困难极大	困难很大	困难	有点困难	不困难	
5.对于阴茎的勃起功能，您有多少次能获得满足？	没有满足	0 或几乎没有	远少于 50% 或少数几次	约 50% 或有时	远多于 50% 或大多数时候	100% 或几乎总是	
总分：							

48. 请问您 1 次性生活有多长时间？

☐1 分钟或更少, ☐1-2 分钟, ☐2-3 分钟, ☐3-5 分钟, ☐5-10 分钟之间, ☐10-20 分钟, ☐20 分钟以上

49. 请问 30 天内您的射精状况怎样：

☐非常有力, ☐一般, ☐很少有力, ☐无力

50. 您在性生活过程中是否遇到过以下射精功能障碍：

☐不射精, ☐逆行射精, ☐遗精, ☐早泄, ☐射精痛, ☐射精延迟

51. 在过去的 30 天内，您射精很困难吗？

☐不能射精（0 分），☐很困难（1 分），☐有些困难（2 分），☐有一点困难（3 分），☐没有困难（4 分）

52. 下面的表格可较全面评价您的射精功能，每一个问题的答案都对应相应的分值，请从每个问题中选择最符合您实际情况的答案，并将对应的分值填写在得分栏内。

问题	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	得分
1.想延迟射精的困难程度	一点都不困难	有点困难	中等困难	很困难	极度困难	
2.射精发生在想射精之前？	几乎没有或没有	少于一半的次数	大约一半的次数	多于一半的次数	几乎总是	
3.很小的性刺激就会让你射精吗？	几乎没有或没有	少于一半的次数	大约一半的次数	多于一半的次数	几乎总是	
4.过早射精而感到挫败？	从不	轻度	中度	重度	极重度	
5.担心射精时间会让伴侣不满意？	从不	轻度	中度	重度	极重度	
总分：						

53. 在过去的 30 天内，您体验过性快感吗？

☐有 ☐无

如选择有

请回答在过去的 30 天内，您经历性高潮的情况？（选项后对应的是其得分，最低为 0 分，最高为 4 分）

☐从不或几乎没有（0 分），☐偶尔（大约 25%，1 分），☐有时（大约 50%，2 分），☐经常（大约 75%，3 分），☐总是（每次都经历，4 分）

54. 在过去的 30 天内，您在性生活过程中或结束后是否有疼痛或者不适的经历？

☐有，☐无

如选择无，请评价您的性功能？

☐很不满意（0 分），☐不满意（1 分），☐一般（2 分），☐满意（3 分），☐非常满意（4 分）

55. 至此，请您对自己的性功能做一个总体的评价？

☐正常，☐性功能下降，☐性功能亢奋

七、生育情况（如您未有孩子，跳至60题）

56. 您共生育_____个孩子？请分别写出其性别与出生体重

57. 您的孩子有无出生缺陷：☐有，☐无

如有，请写出是何种出生缺陷：_____。

58. 与其他同年龄儿童比较，

58.1 您觉得您的子女身体发育：☐超过大多数，☐与大多数一般，☐发育迟缓

58.2 您觉得您的子女智力发育：☐超过大多数，☐与大多数一般，☐较迟钝

59. 您和配偶在未采取任何措施下，怀上第一个小孩用了多长时间？

☐小于半年，☐半年到1年，☐1-2年，☐2-3年，☐3年以上

60. 如您的配偶迄今为止没有怀上孩子，原因是：

☐不孕，请写明具体不孕原因_____ ☐不想要，☐未婚，☐其他_____。

问题到此结束，感谢您的配合！

调查日期_____调查人员_____审核人员_____

附件 2

知情同意书

尊敬的先生：

我们诚挚的邀请您参加本次关于“接触锰作业对男工生殖功能的影响”的调查研究。在调查之前，请您详细的阅读本知情同意书。它可以帮助您了解该调查的目的、内容、意义，以及可能的风险和收益。只有您作出最终决定并在此知情同意书上签字才能参加本次调查研究。特别说明本调查研究已通过临沂市人民医院科研伦理委员会的审查。

一、调查目的及意义

本调查的目的主要是为了研究“接触锰作业对男工生殖功能的影响”。我们希望通过您的参与来了解更多有关接触锰作业男工生殖功能现况的重要信息。您的参与将有助于全面了解您的生殖功能状况，有助于提高关于接触锰作业对男工生殖功能影响的认识，惠及包括您和家人在内的所有锰作业劳动者。

二、调查内容

在本次调查中，我们将向您提供一份问卷，这份问卷涉及您个人的一般情况、生活史、疾病史、遗传史、生育情况、锰接触史以及性功能的相关调查。同时我们的医生会对您的生殖系统进行必要的医学检查。此外，您还需要提供少许血液、尿液和一次全部的精液用于常规测定。本次调查所需时间大约 3 小时。

三、可能的风险

本次的调查研究类似于职业健康体检，您的健康不会受到任何伤害。我们所使用的采样器具均为一次性耗材或经消毒处理，不会传播任何疾病。

四、可能的收益

此次调查可以让您了解生殖系统的相关知识，提高接触锰作业对男性生殖功能影响的认识。对异常检查结果者，我们将给您提供进一步的医学检查或健康建议。

五、有关费用

本调查中您无需承担任何费用。

六、保密性

除了本知情同意书出现您的名字，其他任何资料都没有您的信息，在我们的调查结果中出现的也仅仅是一匿名的资料。该知情同意书需要您的签字，其他资料并不要求您提供任何个人信息且均是匿名保存的。您的相关资料将被妥善保存，且仅在本次研究中使用。

七、相关报酬

本次调查没有任何报酬。

八、自愿参加调查和中途退出调查

您的选择是自由的。您可以拒绝调查，可以拒绝回答任何问题，还可以随时退出。我们保证您不会受任何影响。不过当调查工作人员认为您最好退出时我们可能会请您退出调查。

九、我们承诺

1. 整个调查研究在临沂市人民医院科研伦理委员会的审核批准范围内开展。
2. 未经您的允许，本次调查所收集到的信息不会用于其他研究。
3. 调查过程中所收集到的相关资料及生物样品均匿名使用。
4. 对您的权利和福祉无不良影响。

十、其他

如果您有问题或想了解更多信息，请与以下人员联系：

联系人：杨海波

电话：0539-8090080

地址：临沂市人民医院职业病科

签字前，我确认以下事实：

1. 我已经阅读并理解了关于上述知情同意书的内容。
2. 我充分明白了此次调查的目的、内容、风险、收益和报酬等。
3. 我可以提出任何有关本次调查的疑问并且我已经得到了满意的答复。
4. 我自愿参加此次调查，并不意味着我放弃其他权利，并可随时无理由退出。
5. 我的相关资料及生物样品可用于本次研究，且均被匿名使用。

因此，我同意参加此次调查。

被调查人员签字： 日期： 年 月 日

现证明：

双方已完全理解本调查的目的、意义、内容以及可能的风险和收益，特签字证明。

调查人员签字： 日期： 年 月 日

注：本知情同意书一式两份，调查人员和接受调查人员各留一份。

附件 3

临沂市人民医院科研伦理审批件

Approval Form of Science Research Ethics Committee. Linyi People's Hospital

科研伦审第(20015)号

项目 名 称	接触锰作业对男工生殖健康的影响及下丘脑源性 PGE2 在其发生机制中的作用				
项目 负 责 人	杨海波	职称	医师	承担单位/科室	职业病科
主要参加单位	中国医科大学				
审 查 目 的	<input type="checkbox"/> 纵向课题 <input checked="" type="checkbox"/> 临床科研及多中心合作 <input type="checkbox"/> 论文				
审 查 方 式	<input type="checkbox"/> 会议审查 <input type="checkbox"/> 紧急会议审查 <input checked="" type="checkbox"/> 快速审查				
审 查 材 料	<input checked="" type="checkbox"/> 伦理审查申请表 <input checked="" type="checkbox"/> 研究方案				
结 论	<input checked="" type="checkbox"/> 通过 Approval <input type="checkbox"/> 修改后通过 Conditional Approval				
	<input type="checkbox"/> 不通过 Disapproval				
评审意见 Evaluation Comments: 接受研究者的申请, 本伦理委员会对申报项目的研究方案、知情同意书等资料进行了伦理审查, 其研究方案充分考虑了安全性和公平性原则, 研究者保证遵守世界医学协会(WMA)通过《赫尔辛基宣言》(2008 年修订版)所阐述的原则, 世界卫生组织(WHO)国际医学科学理事会(GIOMS)合作的《涉及人的生物医学研究的国际伦理准则》(2002), 以及联合国教科文组织(UNESCO)《世界人类基因组与人权宣言》(1997)中规定的伦理要求。遵循国家食品药品监督管理局的《药物临床试验质量管理规范》(2003 年 9 月 1 日和卫生部的《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》(2007 年 1 月 11 日), 及临沂市人民医院相关的医学伦理规定, 申请所述内容如实且与研究过程如所述内容一致, 如有违反学术不端、未及时备案研究内容改动并造成严重后果, 愿意承担相应责任, 尊重受试者的知情同意权利, 并尽最大限度保护受试者的隐私和权益。 经本伦理委员会评议, 从科研伦理方面同意该项目的开展实施, 并对其进行相应的伦理监督。 <div>主任委员签名 Signature of EC Chairperson</div> <div>临沂市人民医院医学伦理委员会 Medical Ethics Committee, linyi People's Hospital</div> <div>日期 Date</div> <div>2017. 08. 14</div>					

科研管理办公室

本研究创新性的自我评价

本研究从职业暴露人群角度发现接触Mn作业可导致男工性功能障碍,生殖内分泌激素的紊乱和精液质量下降,男工生殖功能受损,这为高Mn暴露可导致男工生殖毒性提供了基础的职业人群资料。

用体内实验和体外实验相结合的方法证实 Mn 可能通过激活 AMPA 受体及上调 COX-2 的表达促使下丘脑源性 PGE₂ 水平升高,进而促进 GnRH 水平升高,从而对生殖功能产生影响,这为研究 Mn 生殖毒性的作用机制及下丘脑源性 PGE₂ 在其中的重要作用提出了新的研究方向。

参考文献

- [1] Haynes EN, Beidler C, Wittberg R, *et al.* Developing a Bidirectional Academic-Community Partnership with an Appalachian-American Community for Environmental Health Research and Risk Communication. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(10): 1364-72.
- [2] Tuschl K, Mills PB, Clayton PT. Manganese and the brain. *Int Rev Neurobiol*, 2013, 110: 277-312.
- [3] Henn BC, Bellinger DC, Hopkins MR, *et al.* Maternal and Cord Blood Manganese Concentrations and Early Childhood Neurodevelopment among Residents near a Mining-Impacted Superfund Site. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(6): 067020.
- [4] Chen P, Bornhorst J, Aschner M. Manganese metabolism in humans. *Frontiers in Bioscience*, 2018, 23(9): 1655-79.
- [5] Chen P, Parmalee N, Aschner M. Genetic Factors and Manganese-Induced Neurotoxicity. *Front Genet*, 2014, 5: 265.
- [6] DeWitt MR, Chen P, Aschner M. Manganese efflux in Parkinsonism: Insights from newly characterized SLC30A10 mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(1): 1-4.
- [7] Park RM. Neurobehavioral Deficits and Parkinsonism in Occupations with Manganese Exposure: A Review of Methodological Issues in the Epidemiological Literature. *Saf Health Work*, 2013, 4(3): 123-35.
- [8] Peres TV, Schettinger MRC, Chen P, *et al.* Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2016, 17: 57.
- [9] Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed*, 2014, 17(8): 544-53.
- [10] Chen P, Chakraborty S, Peres TV, *et al.* Manganese-induced Neurotoxicity: From *C. elegans* to Humans. *Toxicol Res (Camb)*, 2015, 4(2): 191-202.
- [11] Xie J, Tian C, Zhu Y, *et al.* Effects of inorganic and organic manganese supplementation on gonadotropin-releasing hormone-I and follicle-stimulating hormone expression and reproductive performance of broiler breeder hens. *Poult Sci*, 2014, 93(4): 959-69.
- [12] 岑语燕, 李岩. 锰的雄性生殖毒性研究进展[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(10): 933-7.
- [13] 张敏建, 常德贵, 贺占举, 等. 勃起功能障碍中西医结合诊疗指南(试行版) [J]. 中华男

科学杂志, 2016, 22(8):751-7.

- [14] Ellingsen DG, Chashchin V, Haug E, *et al.* An epidemiological study of reproductive function biomarkers in male welders. *Biomarkers*, 2007, 12(5): 497-509.
- [15] Tsertsvadze A, Yazdi F, Fink HA, *et al.* Diagnosis and treatment of erectile dysfunction. Vol 171. Agency for Healthcare Research and Quality (US); Rockville: 2009.
- [16] Schrader SM, Marlow KL. Assessing the reproductive health of men with occupational exposures. *Asian J Androl*, 2014, 16:23-30.
- [17] Hatzimouratidis K, Amar E, Eardley I, *et al.* Guidelines on male sexual dysfunction: Erectile dysfunction and premature ejaculation. *Eur Urol*, 2010, 57(5):804-14.
- [18] Hao ZY, Li HJ, Wang ZP, *et al.* The Prevalence of Erectile Dysfunction and Its Relation to Chronic Prostatitis in Chinese Men. *J Androl*, 2011, 32(5):496-501.
- [19] Metz M, Pryor J, Nesvacil L, *et al.* Premature ejaculation: a psychophysiological review. *J Sex Marital Ther*, 1997, 23(1):3-23.
- [20] Porst H, Montorsi F, Rosen RC, *et al.* The Premature Ejaculation Prevalence and Attitudes (PEPA) survey: prevalence, comorbidities, and professional help-seeking. *Eur Urol*, 2007, 51(3):816-23.
- [21] Laumann EO, Nicolosi A, Glasser DB, *et al.* Sexual problems among women and men aged 40-80 y: prevalence and correlates identified in the Global Study of Sexual Attitudes and Behaviors. *Int J Impot Res*, 2005, 17(1):39-57.
- [22] Figueira I, Possidente E, Marques C, *et al.* Sexual dysfunction: a neglected complication of panic disorder and social phobia. *Arch Sex Behav*, 2001, 30(4):369-77.
- [23] Jannini EA, Simonelli C, Lenzi A. Disorders of ejaculation. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25(11):1006-19.
- [24] Gao J, Zhang X, Su P, *et al.* Prevalence and factors associated with the complaint of premature ejaculation and the four premature ejaculation syndromes: a large observational study in China. *J Sex Med*, 2013, 10(7): 1874-81.
- [25] 郭军, 张春影, 吕伯东. 早泄诊断与治疗. 北京:人民军医出版社, 2011:26-33.
- [26] Simons JS, Carey MP. Prevalence of sexual dysfunctions: results from a decade of research. *Arch Sex Behav*, 2001, 30(2):177-219.
- [27] Baranski B. Effects of the workplace on fertility and related reproductive outcomes. *Environ Health Perspect*, 1993, 101 Suppl 2:81-90.

- [28] 罗圣庆, 焦蔚然, 刘淑云, 等. 对锰作业工人性功能异常改变的探讨[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1998, 22(6):9-11.
- [29] 吴卫平, 蒋学之, 王簪兰. 锰作业工人性机能的损伤[J]. 工业卫生与职业病, 1992, 18(5):272-4.
- [30] Deveau M, Maier A, Krewski D. Application of a framework for the selection of an appropriate occupational exposure limit for manganese. *Neurotoxicology*, 2017, 58: 249-56.
- [31] Bevana R, Ashdownb L, McGoughc D, *et al.* Setting evidence-based occupational exposure limits for manganese. *Neurotoxicology*, 2017, 58:238-48.
- [32] 王禅, 陆继培, 姜岳明, 等. 低水平锰接触对焊工血清神经内分泌激素水平的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(2):94-7.
- [33] 马勇, 陈晓霞. 电焊男工性机能损伤与生殖结局的流行病学研究[J]. 职业医学, 1995, 22(4):4-6.
- [34] Selvin E, Burnett AL, Platz EA. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. *Am J Med*, 2007, 120(2):151-7.
- [35] Gandaglia G, Briganti A, Jackson G, *et al.* A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Eur Urol*, 2014, 65(5): 968-78.
- [36] Al-Hunayan A, Al-Mutar M, Kehinde EO, *et al.* The prevalence and predictors of erectile dysfunction in men with newly diagnosed with type 2 diabetes mellitus. *BJU Int*, 2007, 99(1): 130-4.
- [37] Rhoden EL, Telöken C, Sogari PR, *et al.* The use of the simplified International Index of Erectile Function (IIEF-5) as a diagnostic tool to study the prevalence of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 2002; 14(4): 245-50.
- [38] Graziottin A, Althof S. What does premature ejaculation mean to the man, the woman, and the couple? *J Sex Med*, 2011, Suppl 4: 304-9.
- [39] McCabe M, Althof SE, Assalian P, *et al.* Psychological and interpersonal dimensions of sexual function and dysfunction. *J Sex Med*, 2010, 7(1 Pt 2): 327-36.
- [40] 王福, 高庆和, 韩强, 等. 《EAU(2015年版)早泄诊治指南》解读[J]. 中国性科学, 2016, 25(2): 9-11.
- [41] Symonds T, Perelman M, Althof S, *et al.* Further evidence of the reliability and validity of the premature ejaculation diagnostic tool. *Int J Impot Res*, 2007, 19(5): 521-5.
- [42] Levy BS, Nassetta WJ. Neurologic effects of manganese in humans: a review. *Int J Occup*

- Environ Health, 2013, 9(2): 153-63.
- [43] Clarke C, Upson S. A global portrait of the manganese industry-A socioeconomic perspective. Neurotoxicology, 2017, 58: 173-9.
- [44] Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56 (2): 147-67.
- [45] Egorova AM. A reproductive function in metallurgists. Urologiia, 2009, (2): 65-8.
- [46] Wang C, Lu J P, Jiang Y M, *et al.* Effects of low level manganese exposure on the serum neuroendocrine hormones in the welders. Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi, 2011, 29(2): 94-7.
- [47] Ou SY, Luo HL, Mailman RB, *et al.* Effect of manganese on neural endocrine hormones in serum of welders and smelters. J Trace Elem Med Biol. 2018, 50:1-7.
- [48] Li YY, Wu JQ, Zhou WJ, *et al.* Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. BMC Public Health, 2012, 12: 919.
- [49] Telisman S, Cvitkovi P, Jurasovic J, *et al.* Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cad, mium zinc, and copper in men. Environ Health perspect, 2000, 108(1): 45-53.
- [50] Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. NMR Biomed. 2004, 17(8):544-53.
- [51] Gomes Silva AP, da Silva Araujo Santiago M, Maranhão LA, *et al.* Could male reproductive system be the main target of subchronic exposure to manganese in adult animals? Toxicology, 2018, 409: 1-12.
- [52] Liu XF, Zhang LM, Guan HN, *et al.* Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. Food Chem Toxicol, 2013. 60:168-76.
- [53] Jensen TK, Bonde JP, Joffe M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. Occup Med (Lond), 2006, 56(8): 544-53.
- [54] Oiiiva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. Hum Reprod, 2001, 16(8): 1768-76.
- [55] O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. Curr Environ Health Rep. 2015, 2(3):315-28.
- [56] Bauman WA, La Fountaine MF, Cirnigliaro CM, *et al.* Provocative stimulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in men with spinal cord injury. Spinal Cord, 2016,

- 54(11): 961-6.
- [57] Jin JM, Yang WX. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*. 2014, 551(1):15-25.
- [58] Whitlock KE, Postlethwait J, Ewer J. Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) dispensable? *Front Neuroendocrinol*. 2019, pii: S0091 - 3022(19)30008-1.
- [59] Cantoro U, Catanzariti F, Lacetera V, *et al*. Percentage change of FSH value: new variable to predict the seminal outcome after varicocelelectomy. *Andrologia*, 2014, (4): 3-7.
- [60] Pine M, Lee B, Dearth R, *et al*. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: A potential influence on female pubertal development. *Toxicol Sci*, 2005, 85: 880-5.
- [61] Srivastava VK, Hiney JK, Dees WL. Early Life Manganese Exposure Upregulates Tumor-Associated Genes in the Hypothalamus of Female Rats: Relationship to Manganese-Induced Precocious Puberty. *Toxicol Sci*, 2013, 136(2): 373-81.
- [62] Lee B, Pine M, Johnson L, *et al*. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reprod Toxicol*, 2006, 22(4): 580-5.
- [63] Hiney JK, Srivastava VK, Dees WL. Manganese induces IGF-1 and cyclooxygenase-2 gene expressions in the basal hypothalamus during prepubertal female development. *Toxicol Sci*, 2011, 121(2): 389-96.
- [64] Kim EA, Cheong HK, Joo KD, *et al*. Effect of manganese exposure on the neuroendocrine system in welders. *Neurotoxicology*, 2007, 28(2): 263-9.
- [65] Mutti A, Bergamaschi E, Alinovi R, *et al*. Serum prolactin in subjects occupationally exposed to manganese. *Ann Clin Lab Sci*, 1996, 26: 10-17.
- [66] Niu Q, Shuchang H, Sheng W, *et al*. Neurobehavioral functions, serum prolactin and plasma renin activity of manganese-exposed workers. *Int J Immimopathol Pharmacol*, 2004, 17(2): 17-24.
- [67] Ellingsen DG, Haug E, Gaarder PI, *et al*. Endocrine and immunologic markers in manganese alloy production workers. *Scand J Work Environ Health*, 2003, 29: 230-38.
- [68] Roels HA, Ghyselen P, Buchet JP, *et al*. Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust. *Br J Ind Med*. 1992, 49(1): 25-34.
- [69] Betancourt M, Reseniz A, Fieero, EC. Effect of two insecticide and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro.

- Reprod Toxicol, 2006, 22(3): 508-12.
- [70] Rolland M, Le Moal J, Wagner V, *et al.* Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. Hum Reprod, 2013, 28(2): 462-70.
- [71] Chavarro JE, Toth T L, Sadio S M, *et al.* Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. Hum Reprod, 2008, 23: 2584-90.
- [72] Boekelheide K, Darney SP, David RM, *et al.* NTP-CERHR Expert Panel Report on the reproductive and developmental toxicity of 2-bromopropane. Reprod Toxicol, 2004, 18: 189-217.
- [73] Wang HX, Li HC, Lv MQ, *et al.* Associations between occupation exposure to Formaldehyde and semen quality, a primary study. Sci Re, 2015, 5, 15874.
- [74] Sallam HN, Ezzeldin F, Sallam A, *et al.* Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo-osmotic swelling test as predictors of fertilization potential: experience from the IV model. Int J Fertil Womens Med, 2003, 48(2): 88-95.
- [75] Youn JS, Cha SH, Park CW, *et al.* Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. Clin Exp Reprod Med, 2011, 38(1): 47-52.
- [76] Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. J Androl, 2003, 24(3): 343-52.
- [77] Nikmehr B, Bazrafkan, Hassanzadeh G, *et al.* The correlation of gene expression of inflammasome indicators and impaired fertility in rat model of spinal cord injury: a time course study. Urol J, 2017, 14(6): 5057-63.
- [78] Garolla A, Maiorino M, Roverato A, *et al.* Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. Fertil Steril, 2005, 83(2): 355-61.
- [79] Alipour H, Van Der Horst G, Christiansen OB, *et al.* Improved sperm kinematics in semen samples collected after 2 h versus 4-7 days of ejaculation abstinence. Hum Reprod, 2017, 32 (7): 1364-72.
- [80] Goodson SG, White S, Stevans AM, *et al.* CASAnova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. Biol Reprod, 2017, 97(5): 698-708.

- [81] Meo SA, Al-Khlaiwi T. Health hazards of welding fumes. *Saudi Med J*, 2003, 24(11): 1176-82.
- [82] Adejuwon CA, Ilesanmi AO, Ode EO, *et al.* Biophysical and bio-chemical analysis of semen in infertile Nigerian males. *Afr J Med Sci*, 1996, 25(3): 217.
- [83] Wirth JJ, Rossano MG, Daly DC, *et al.* Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. *Epidemiology*, 2017, 18(2): 270-3.
- [84] Zhou Y, Fu XM, He DL, *et al.* Evaluation of urinary metal concentrations and sperm DNA damage in infertile men from an infertility clinic. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 68-73.
- [85] Wang YX, Sun Y, Huang Z, *et al.* Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. *Environ Int*, 2016, 94: 177-88.
- [86] Eastman RR, Jursa TP, Benedetti C, *et al.* Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(3): 1629-37.
- [87] Smith D, Gwiazda R, Bowler R, *et al.* Biomarkers of Mn exposure in humans. *Am J Ind Med*, 2007, 50(11): 801-11.
- [88] Wang DX, Du XQ, Zheng W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicol Lett*, 2008, 176(1): 40-7.
- [89] Zheng W, Kim H, Zhao Q. Comparative toxicokinetics of manganese chloride and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 2000, 54(2): 295-301.
- [90] Donald GB. Manganese. *Clinical Toxicology*, 1999, 37: 293-307.
- [91] Lu L, Zhang L L Li G J, *et al.* Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders. *Neurotoxicology*, 2005, 26(2): 257-65.
- [92] Foster M L, Bartnikas T B, Johnson L C, *et al.* Pharmacokinetic evaluation of the equivalency of gavage, dietary, and drinking water exposure to manganese in 344 rats. *Toxicol Sci*, 2015, 145(2): 244-51.
- [93] Buchet JP, Magos C, Roels H, *et al.* Urinary excretion of homovanillic acid in workers exposed to manganese. *Int Arch Occup Environ Health*, 1993, 65(2): 131-3.
- [94] Smargiassi A, Mergler D, Bergamaschi E, *et al.* Peripheral markers of catecholamine metabolism among workers occupationally exposed to manganese (Mn). *Toxicol Lett*. 1995, 77(1-3): 329-33.

- [95] 郑玉新, 何凤生, 陈彪. 慢性锰中毒易感性与基因多态性的病例对照研究[J]. 中华预防医学杂志, 1999, 33(2): 78-80.
- [96] Wu C, Woo JG, Zhang N. Association between urinary manganese and blood pressure: Results from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2011-2014. PLoS ONE, 2017, 12(11): e0188145.
- [97] Williams M, Todd GD, Roney N, *et al.* Toxicological Profile for Manganese. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). 2012.
- [98] Lucchini A, Selis L, Folli D, *et al.* Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. Scand J Work Environ Health, 1995, 21(2): 143-9.
- [99] Zheng W, Fu SX, Dydak U, *et al.* Biomarkers of manganese intoxication. Neurotoxicology, 2011, 32(1): 1-8.
- [100] Baste V, Moen B E, Riise T, *et al.* Infertility and Spontaneous Abortion Among Female Hairdressers: The Hordaland Health Study. J Occup Environ Med, 2008, 50(12):1371-7.
- [101] Rotter I, Kosik-Bogacka DI, Dołęgowska B, *et al.* Analysis of the relationship between the blood concentration of several metals, macro- and micronutrients and endocrine disorders associated with male aging. Environ Geochem Health, 2016, 38(3):749-61.
- [102] Zeng Q, Zhou B, Feng W, *et al.* Associations of urinary metal concentrations and circulating testosterone in Chinese men. Reprod Toxicol, 2013, 41:109-14.
- [103] Ubajaka CF, Meludu SC, Dioka CE, *et al.* Evaluation of male sex hormones and trace elements in male type 2 diabetic patients attending nnamdi azikiwe university teaching hospital diabetic clinics. Niger J Med, 2015, 24(2):162-8.
- [104] 杨智敏, 范奇元, 周希雷. 非职业锰暴露男性精液锰浓度及精液质量的调查[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(10):903-5.
- [105] Wan ZZ, Chen HG, Lu WQ, *et al.* Metal/metalloid levels in urine and seminal plasma in relation to computer-aided sperm analysis motion parameters. Chemosphere, 2019, 214:791-800.
- [106] Song, Q, Deng, Y, Yang, X. *et al.* Manganese-Disrupted Interaction of Dopamine D1 and NMDAR in the Striatum to Injury Learning and Memory Ability of Mice, Mol Neurobiol, 2016 53(10): 6745-58.
- [107] Fenster C, Vullhorst D, Buonanno A. Acute neuregulin-1 signaling influences AMPA receptor

- mediated responses in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Bull*, 2012, 87(1): 21-9.
- [108] Dziedzic B, Prevot V, Lomniczi A, *et al.* Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates ErbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci*, 2003, 23(3): 915-26.
- [109] Hart MR, Su HY, Broka D, *et al.* Inactive ERBB receptors cooperate with reactive oxygen species to suppress cancer progression. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 1996-2007.
- [110] Clasadonte J, Sharif A, Baroncini M, *et al.* Gliotransmission by prostaglandin e(2): A prerequisite for GnRH neuronal function? *Front Endocrinol*, 2011; 1(2): 91.
- [111] Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, *et al.* Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem*, 2012; 9(287): 6454-68.
- [112] Clasadonte J, Poulain P, Hanchate NK, *et al.* Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 38(108): 16104-9.
- [113] Fiebich BL, Schleicher S, Spleiss O, *et al.* Hull M. Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: Possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Neurochem*, 2001, 5(79): 950-8.
- [114] Bedecarrats GY. Control of the reproductive axis: Balancing act between stimulatory and inhibitory inputs. *Poult Sci*, 2015, 94(4): 810-5.
- [115] Xia L, Chen GH, Li ZH, *et al.* Alterations in hypothalamus-pituitary-adrenal/thyroid axes and gonadotropin-releasing hormone in the patients with primary insomnia: a clinical research. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71065.
- [116] Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, *et al.* Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 109 (3-5): 323-30.
- [117] 朱通, 李彦锋, 廖良功, 等. 促性腺激素释放激素泵治疗成年男性特发性低促性腺激素性性腺功能减退症的临床疗效与安全性观察[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 27(4): 261-7.
- [118] 肖帮惠, 时立新, 彭年春, 等. 特发性低促性腺激素性性腺功能减退症 4 例[J]. *贵阳医学院学报*, 2013, 38(3): 335-6.
- [119] David JC, Yamada KA, Bagwe MR, *et al.* AMPA receptor activation is rapidly toxic to cortical astrocytes when desensitization is blocked. *J Neurosci*, 1996, 16(1):200-9.
- [120] Rama Rao KV, Reddy PV, Hazell AS, *et al.* Manganese induces cell swelling in cultured

- astrocytes. *Neurotoxicology*, 2007, 28(4): 807-12.
- [121] Kuo J, Micevych P. Neurosteroids, trigger of the LH surge. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, (1-2): 57-65.
- [122] Ma YJ, Hill DF, Creswick KE, *et al.* Neuregulins signaling via a glial erbB-2/erbB-4 receptor complex contribute to the neuroendocrine control of mammalian sexual development. *J Neurosci*, 1999, 19: 9913-27.
- [123] Liao SL, Ou YC, Chen SY, *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem Int*, 2007, 50(7-8): 905-15.
- [124] Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, *et al.* Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 240(2): 219-25.
- [125] 王芳, 王禅, 姜岳明, 等. 对氨基水杨酸钠干预锰致大鼠海马神经元损伤的体外研究[J]. *工业卫生与职业病*, 2011, 02: 82-5.
- [126] Katzenwadel A, Wolf P. Androgen deprivation of prostate cancer: Leading to a therapeutic dead end. *Cancer Lett*, 2015, 367(1): 12-7.
- [127] Iuanow E, Kettler M, Slanetz PJ. Spectrum of disease in the malebreast. *Am J Roentgenol*, 2011, 196 (3): 247-59.
- [128] Yasojima K, Schwab C, Mc Geer EG, *et al.* Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 m RNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res*, 1999, 830: 226-36.
- [129] Hewett SJ, Bell SC, Hewett JA. Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system. *Pharmacol Ther*, 2006, 112: 335-57.
- [130] Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(9): 901-10.
- [131] Müller N, Riedel M, Schwarz MJ. Psychotropic effects of COX-2 inhibitors-a possible new approach for the treatment of psychiatric disorders. *Pharmacopsychiatry*, 2004, 37(6): 266-9.
- [132] Font-Nieves M, Sans-Fons M G, Gorina R, *et al.* Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6454-68.
- [133] Lin CC, Hsieh HL, Liu SW, *et al.* BK Induces cPLA2 Expression via an Autocrine Loop Involving COX-2-Derived PGE₂ in Rat Brain Astrocytes. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1103-15.
- [134] 王晓静, 曹子鹏, 赵芳, 等. 锰暴露诱导 BV2 小胶质细胞环氧合酶 2 表达变化[J]. *实*

- 用预防医学, 2016, 23(5): 535-9.
- [135] Jang BC. Induction of COX-2 in human airway cells by manganese: role of PI3K/PKB, p38 MAPK, PKCs, Src, and glutathione depletion. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(1): 120-6.
- [136] Li SJ, Qin WX, Peng DJ, *et al.* Sodium P-aminosalicylic acid inhibits sub-chronic manganese-induced neuroinflammation in rats by modulating MAPK and COX-2. *Neurotoxicology*, 2018, 64: 219-29.
- [137] Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 2001, 65(1): 1-105.
- [138] Lee BK, Jung YS. The Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor cariporide prevents glutamate-induced necrotic neuronal death by inhibiting mitochondrial Ca²⁺ overload. *J Neurosci Res*, 2012, 90(4):860-9.
- [139] Stornetta RL, Zhu JJ. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist*, 2011, 17(1): 54-78.
- [140] Lu W, Isozaki K, Roche KW, *et al.* Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMK II site in the first intracellular loop of GluA1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(51): 22266-71.
- [141] Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 2013, 80(3): 704-17.
- [142] Nicoll RA. A brief history of long-term potentiation. *Neuron*, 2017, 93(2): 281-90.
- [143] Boehm J, Kang MG, Johnson RC, *et al.* Synaptic Incorporation of AMPA Receptors during LTP Is Controlled by a PKC Phosphorylation Site on Glu R1. *Neuron*, 2006, 5(1): 213-225.
- [144] Hoze N, Nair D, Hosy E, *et al.* Heterogeneity of AMPA receptor trafficking and molecular interactions revealed by superresolution analysis of live cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(42): 17052-7.
- [145] Liu SJ, Savtchouk I. Ca²⁺ permeable AMPA receptors switch allegiances: mechanisms and consequences. *J. Physiol*, 2012, 590(1): 13-20.
- [146] Ogoshi F, Weiss JH. Heterogeneity of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channel expression in hippocampal pyramidal neurons: fluorescence imaging and immunocytochemical assessment. *J Neuro sci*, 2003, 23 (33): 10521-30.
- [147] Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 1998, 54(5): 581-618.
- [148] Noh KM, Yokota H, Mashiko T, *et al.* Blockade of calcium-permeable AMPA receptors

- protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *P Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(34): 12230-5.
- [149] Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends neurosci*, 1995, 18(2): 58-60.
- [150] Song M, Yu SP. Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(1): 17-27.
- [151] 李少军. PAS-Na 对染锰大鼠脑炎症反应的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [152] 王爽, 高捷, 王军, 等. NBQX 对帕金森病模型大鼠内侧前额叶皮层锥体神经元电活动及 5-羟色胺受体的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(2): 372-3.
- [153] 张进, 丁美萍, 刘照, 等. 持续癫痫样放电导致海马神经元钙离子动力学变化的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(2): 200-3.
- [154] 张涛, 国建飞, 邢琳琳, 等. 塞来昔布下调 Apaf-1 蛋白表达促进大鼠颅脑损伤后学习记忆功能恢复的研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(13):1732-5.
- [155] 周琳. Cox-2 在 Lgi1 缺失造成的癫痫小鼠模型中的功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.

综 述

锰致雄性生殖毒性机制的研究进展

锰 (manganese, Mn) 及其化合物作为重要的工业原料, 被广泛应用于制造各种工业产品及日常生活用品中。Mn也是一种大气污染物和职业病危害因素, 随着汽车尾气排放量的增加, 以及Mn矿的开采、电焊烟尘、冶炼、干电池制造和农用化学品合成等职业接触, 人类暴露于Mn的范围不断扩大^[1]。过量Mn暴露可能会导致Mn中毒并出现包括肝硬化, 肌张力障碍, 多胞症, 高Mn血症以及类似于帕金森氏综合征等临床症状^[2]。

Mn对于维持雄性生殖功能至关重要, 在生理剂量下可以促进生殖内分泌激素的合成与分泌, 还对生殖器官及其性腺的发育起到重要的作用, 然而过量暴露又会产生生殖毒性, 使得生殖内分泌发生紊乱, 精液质量下降, 并且还会对性功能产生影响。Mn缺乏的情况很少见, 而Mn过量暴露的情况时有发生。随着研究的深入, Mn导致的生殖毒性也在引起人们的广泛关注, 但是其生殖毒性机制尚未被完全阐明。因此本文拟从人群流行病学调查谈起, 对Mn致生殖细胞结构、生殖相关酶类、生殖内分泌功能的改变、细胞凋亡、线粒体损伤和氧化应激等毒性机制方面的研究进展进行综述, 进一步探讨Mn致雄性生殖毒性机制以期发现新的研究方向。

1. Mn与生殖功能的人群流行病学调查

人群流行病学研究已经显示Mn与男性生殖功能息息相关。例如, 暴露于Mn粉尘浓度为 0.14 mg/m^3 的电焊男工发现精液液化时间减短, 精子数量和具有繁殖能力的精子降低^[3]。非职业流行病学研究表明, 血清Mn浓度 $> 19.40\text{ }\mu\text{g/L}$ (P80) 时对健康男性精子形态有不良影响^[4]。在对200名不育男性的调查研究中, 血Mn水平偏高的男性其精子活动力降低的危险性为血Mn正常男性的5.4倍 (OR = 5.4, 95%CI: 1.6 - 17.6), 精子浓度低的危险性为2.4倍 (OR = 2.4, 95%CI: 1.2 - 4.9) ^[5]。Rotter等^[6]人指出30岁以上的男性中血清睾酮 (testosterone, TSTO) 与游离雄激素指数 (free androgen index, FAI) 水平和Mn水平呈负相关, 血清性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 与Mn水平呈正相关。同样, Zeng等^[7]人发现不孕不育诊所的118名男性尿Mn水平与血清TSTO水平呈负相关。相反, 在125名糖尿病

受试者中,血Mn与血清TSTO呈正相关($r = 0.350, P < 0.05$)^[8]。此外Jain等^[9]人还发现无精子症和少精子症的男性患者其血清Mn的含量可是正常人群的3.43倍。

2. Mn对睾丸生殖细胞结构的影响

Mn可直接对睾丸产生生殖毒性使得睾丸和附睾等组织的生长发育与成熟延迟,睾丸脏器系数降低,产生生殖毒性^[10]。高Mn暴露一方面可直接影响各级生精细胞,造成细胞膜皱缩或形态不规整、核固缩或出现空泡,微核增加等,Mn可以使生精小管直径狭窄、生精上皮细胞、精原细胞、精母细胞及间质细胞管间区发生改变^[11],Mn还会破坏精子细胞和精子头周围的线粒体,造成部分精子变性坏死,精子数量减少或无精子等。高Mn暴露另一方面也可促使支持细胞结构发生变化,出现脱落现象,核染色质出现异常聚集或空泡化,核膜溶解等,还可使支持细胞与生精细胞之间的间隙显著增宽增大,紧密连接遭到破坏,精子不能正常生长发育,导致生殖毒性^[12]。

3. Mn对生殖相关酶类的影响

Mn虽然在体内是各种酶的组成成分,是酶的激活剂,但是在高剂量暴露下依然会对生殖相关酶类产生影响,进而对睾丸产生影响,最终使得精子生成过程受损,造成生殖毒性。

3.1 Mn对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的影响。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PD)作为能量代谢相关酶类可存在于睾丸间质细胞、支持细胞及精细胞中。如果活力发生改变可致TSTO分泌异常,生精功能受损,精子发生障碍^[13]。Dequchi^[14]等人每日给家兔静脉注射3.5 mg/kg MnCl₂,15天后发现家兔曲细精管上皮中的G-6-PD活性明显降低,而间质组织中G-6-PD活性升高。

3.2 Mn对酸性磷酸酶的影响。酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)可参与蛋白质的合成及葡萄糖的再利用过程并清除细胞内损伤物质,常与睾丸受损相关,其活性水平可作为衡量精子受损的重要指标。若该酶活力降低还可产生抗精子抗体,从而导致男性不育。ACP活性的改变会导致睾丸每日产精量的减少,从而精子细胞数量降低^[15]。以15 mg/kg的剂量Mn灌胃大鼠连续55天后发现大鼠睾丸中ACP的活性显著降低,而维持ACP酶的活性能够有效减轻大鼠的生殖毒性^[16]。

3.3 Mn对乳酸脱氢酶的影响。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)与精子能量代谢密切相关,睾丸中LDH活性的下降表明乳酸代谢受到抑制,最终可能导致生精细胞缺乏ATP。Mn可通过抑制其活性,使得精子能量代谢发生障碍,进

而影响精子的质量^[17]。Piasek等^[18]人用40 mg/g MnCl_2 染毒30天后发现大鼠血清和睾丸匀浆中LDH活力均明显降低。另有研究者给SD大鼠腹腔注射 MnCl_2 ，4周和6周后发现大鼠睾丸LDH降低而血清LDH活力升高，提示Mn可影响LDH的活力从而影响精子的凋亡^[19]。

3.4 Mn对 3β -羟基类固醇脱氢酶的影响。 3β -羟基类固醇脱氢酶（ 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD）可用于评价睾丸间质细胞的功能，可决定着TSTO的合成速率^[20]。研究发现 MnCl_2 浓度低于100 $\mu\text{mol/L}$ 时， 3β -HSD的活性在细胞内随着Mn浓度的增加而增加；然而当 MnCl_2 超过100 $\mu\text{mol/L}$ 后，随着Mn浓度的升高，其活性降低，表达量下降^[21]。也有研究发现Mn可改变 3β -HSD基因的表达及蛋白合成，从而影响TSTO的水平进而产生生殖毒性^[22]。

3.5 Mn对腺苷三磷酸酶的影响。腺苷三磷酸酶（adenosine triphosphatases, ATPase）是细胞利用能量的酶，参与维持细胞膜的完整性，还与精子的运动息息相关^[23]。大鼠每天腹腔注射15 mg/kg的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1次，连续12周后发现Mn可抑制大鼠睾丸细胞内质膜、线粒体及微粒体上的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase和 Ca^{2+} -ATPase的活性，使酶活性下降10%以上^[24]。

3.6 Mn对一氧化氮合酶的影响。一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOS）分布在睾丸间质细胞和支持细胞中，其作用是参与调节精子分化成熟^[25]。亚急性染毒 MnCl_2 可使大鼠睾丸匀浆中NOS活力升高^[26]。Bae等^[27]则进一步证实高浓度的Mn暴露可以通过激活MAP激酶和PI3K/Akt通路刺激产生诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase, iNOS）。

4. Mn对生殖内分泌功能的影响

下丘脑-垂体-睾丸轴（hypothalamic-pituitary-testis axis, HPTA）的多级调控机制可以保证机体内生殖内分泌激素的相对稳定，是精子发生发展的必备条件，而Mn可对HPTA的多个部位及其合成分泌的激素产生影响，导致生殖毒性的发生^[28]。

4.1 Mn对下丘脑合成的激素的影响。已证明在青春前期Mn能够调节下丘脑促性腺激素释放激素（gonadotropin releasing hormone, GnRH）的特定上游基因从而释放GnRH^[29-30]。Lee等人^[31]也表明，在青春前期 Mn^{2+} 是GnRH/促黄体生成素（luteinizing hormone, LH）的直接刺激因子，可有助于男性青春期的正常发育。研究证实Mn通过脂多糖或干扰素- γ -活化星形胶质细胞（astrocyte, Ast）特异性的增强COX-2的表达和释放前列腺素E2（prostaglandin E2, PGE_2 ）^[32]，而 PGE_2 在GnRH生成以及生殖系统中都有着重要的作用^[33]。

4.2 Mn 对垂体合成激素的影响。泌乳素 (prolactin, PRL) 可增强 LH 对间质细胞的调控作用从而促进睾丸合成 TSTO^[34]。Niu 等^[35]对 56 名 Mn 暴露工人的调查中发现其血清 PRL 水平明显升高。在土耳其, 研究发现 179 名 Mn 作业男工血清 PRL 水平明显升高, 且血清 PRL 含量与全血 Mn 水平成正相关($r = 0.860, P < 0.05$)^[36]。Mutti 等^[37]则认为血清 PRL 和尿 Mn 也相关。然而, 王禅等^[38]发现, 接触 Mn 工龄在 10 年以上的男性焊工其血清中 PRL 水平低于对照组。还有 Roels 等^[39]人发现 92 名干电池生产工人暴露于 0.22 mg/m^3 的 Mn 作业环境中, 其血清 PRL 水平未见明显改变。在一些动物实验中, 人们发现 Mn 暴露也可直接导致生殖内分泌激素的紊乱, 例如, 给予 15 天雄性幼仔大鼠灌胃 25 mg/kg MnCl_2 , 55 天后发现大鼠血清 LH 和 FSH 水平升高^[31]。然而也有不同结论, 如冶炼厂的男工暴露于浓度为 $273.1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ 的 Mn 环境中发现其血清中 PRL 和 FSH 浓度低于对照组^[40], 食物中添加 Mn 后, 50 日龄雄性 Hyline 公鸡的 TSTO、LH 和 FSH 含量显著降低, 且黄体生成素受体 (LHR) 和促卵泡激素受体 (FSHR) mRNA 表达水平均显著降低^[41]。

4.3 Mn对睾丸合成激素的影响。Mn可以直接作用于睾丸间质细胞从而对TSTO的合成及分泌产生影响^[42]。Cheng等^[43]实验结果表明, 体外培养的睾丸间质细胞在暴露Mn 2 h或4 h后, 可破坏类固醇急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、线粒体功能和钙稳态。在暴露24 h或48 h后, Mn可通过下调StAR基因的表达和降低胆固醇侧链裂解酶 (P450 side-chain cleavage enzyme, CYP11A1) 和 3β -HSD的活性从而损伤睾丸间质细胞, 进而影响TSTO的合成和分泌。

4.4 Mn通过神经系统对HPTA产生的影响。Mn对神经系统和生殖系统都可产生毒性作用。研究发现短期Mn暴露(4周)可改变中枢神经系统中谷氨酸 (glutamate, Glu) 循环从而影响GABA能系统^[44]。GABA能系统与生殖功能密切相关, 可负反馈调控激素的合成及分泌情况^[45-47], 也可通过自分泌和或旁分泌机制来调控睾丸间质细胞功能, 进而影响精子的质量^[48]。Mn还能够引起多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的DA自氧化, 引起5-羟色胺 (5-serotonin, 5-HT) 和DA含量减少^[49], 从进而负反馈作用给HPTA, 从而对生殖功能产生影响。

5. Mn 通过细胞凋亡途径产生生殖毒性

5.1 Mn对凋亡相关通路的影响。Mn可激活包括ERK、JNK和p38在内的MAPK通路, 还可通过上调Bax和p53表达和下调Bcl-2的表达, 促进细胞凋亡^[50]。作为细胞凋亡的早期分子标志, 多聚ADP核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase,

PARP)常与 DNA 紧密结合,可通过参与 DNA 的重组与修复参与调节细胞凋亡^[42]。染 Mn 后可使大鼠生精细胞 PARP 表达水平降低并且使得半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteinyl aspartate specific proteinase, caspase) 家族中的 caspase-3 mRNA 表达水平升高从而促使生精细胞凋亡^[51]。作为凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员之一, X 连锁凋亡抑制蛋白 (X chromosome linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 可同时抑制 caspase-9 和 caspase-3 等 caspase 家族^[52-53]。染 Mn 后, 郭海等^[54]发现大鼠生精细胞 15 mg/kg 和 30 mg/kg MnCl₂ 4 周和 6 周后, 均发现 XIAP 的表达下降, caspase-9 表达增加, 最终导致生精细胞发生凋亡。而伍冬梅^[55]等发现分别用剂量为 15 mg/kg 或者 30 mg/kg MnCl₂ 连续染毒 6 周后, 大鼠睾丸生精细胞 livin 的阳性细胞率随着染 Mn 剂量的加大而降低。

5.2 Mn 对线粒体通路的影响

5.2.1 Mn 在线粒体内过量蓄积。通过特殊的亲和力, Mn 可过量的蓄积在线粒体内^[56], 通过降低视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, Opa1) 和增加动力相关蛋白 1 (dynamin related protein 1, Drp1) 的表达, 线粒体融合及分裂功能受损, 线粒体膜电位发生改变, 线粒体趋向分裂, 并且使得细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 与 caspase-9 和凋亡蛋白酶激活因子-1 结合并促进 caspase-3 的表达从而引发生精细胞发生凋亡^[57-58]。毕明玉等^[59]将鸡支持-生精细胞暴露于 0、2、3、4 mmol/L 的 MnCl₂ 24 h 后, 发现随着暴露剂量的增加, 细胞线粒体膜电位逐渐降低, 胞浆中 Cyt C、Caspase-9 和 Caspase-3 的表达以及细胞凋亡指数逐渐升高。

5.2.2 Mn 干扰线粒体内钙稳态。Mn 还可占据线粒体内 Ca²⁺ 的结合位点, 从而干扰体内钙离子的稳态, 线粒体跨膜电位发生改变, 线粒体内膜通透性也随之发生改变并最终引起细胞发生凋亡^[60-61]。

5.2.3 Mn 还能通过多个途径阻断能量转换使得细胞发生凋亡。Mn 可以破坏三羧酸循环, 可以通过影响呼吸链酶的活力而干扰氧化磷酸化过程, 使得能量转换受阻从而 ATP 合成发生障碍^[62-63]。Mn 还可破坏碱基及氢键系统, 降低 DNA 稳定性, 使得线粒体上基因发生突变^[64]从而能量代谢发生障碍。

总之, Mn 可以通过多种途径激活凋亡相关通路, 还可通过损伤线粒体途径促使细胞发生凋亡最终导致生精细胞破坏, 产生生殖毒性^[65-66]。

6. Mn 通过氧化应激途径产生生殖毒性

氧化应激是 Mn 生殖毒性的重要机制之一, 这是因为睾丸等生殖器官含有大量的多不饱和脂肪酸且抗氧化系统非常薄弱。正常情况下, 多巴胺在代谢过程中产

生的各种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可被各种酶类及非酶类抗氧化物质清除, 因而体内ROS的生成与清除处于一种相对稳定的状态, 机体免于过氧化和抗氧化失衡的氧化应激状态。前期研究已表明, 高浓度Mn暴露会通过加速DA等儿茶酚胺类的氧化过程从而产生过多ROS^[67-68]。过多的ROS导致的氧化应激是产生生殖毒性的重要影响因素^[69]。Mn可以通过影响细胞色素氧化酶P450以及合成GSH关键酶的活性, 使得机体内抗氧化剂GSH的含量降低^[70-71]。小鼠腹腔注射50 mg/kg MnCl₂后发现Mn可通过抑制核转录因子NF-E2相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2) 对SOD和GPx-1的转录调节作用使得其蛋白表达水平下降从而破坏睾丸的抗氧化功能, 从而产生生殖毒性作用^[72]。Mn一方面降低抗氧化物质的含量和抗氧化酶的活性, 一方面又通过从而产生大量的ROS使得精子细胞不能有效的清除过量的ROS, 从而使得精子细胞处于氧化应激状态, 细胞核和线粒体DNA遭到破坏, 染色体异常, 精子质膜的流动性和完整性遭到破坏, 胞内外离子浓度失去平衡, 精子发生凋亡, 精子畸形率升高, 精子活力及精液质量下降^[73-74]。谭迎春等^[75]还发现氧化应激损伤后早期下降的线粒体膜电位及线粒体活性, 以及最终质量下降的精子。

7. Mn 干扰其他重要金属元素

许多金属元素参与调控机体的正常生理过程, 其含量的高低能影响性器官的发育以及精子的形成。Mn 作为体内的一种重要的金属元素, 也会通过干扰一些重要金属元素的吸收和代谢从而影响生殖功能。例如, 高 Mn 暴露可破坏铁、铜、镁、钙和锌等金属在体内各个器官或组织的平衡分布^[76]。在染 Mn 大鼠中, 研究者发现血清和前列腺腹叶及侧叶中均发现流失严重的锌元素^[77]。而锌可参与精子生长发育的全过程并影响性激素的合成及分泌, 研究证实锌的缺乏可导致男性不育症的发生^[78]。

8. 总结与展望

Mn 致雄性生殖毒性的过程是极其复杂的, 其毒性作用机制尚不明确, 这可能涉及到生殖相关酶类, 生殖内分泌功能, 细胞凋亡, 氧化应激和其它重金属元素等。在不孕不育率居高不下及 Mn 暴露范围不断扩大的大环境下, 积极做好预防工作以保障人群尤其是职业男工人群的生殖功能也显的尤为重要。Mn 作为一种对神经系统和生殖系统均具有毒性的重金属, 进一步挖掘神经毒性和生殖毒性之间的联系可能是 Mn 的下一个研究方向。

参考文献

- [1] Ali S, Chaspoul F, Anderson L, *et al.* Mapping Fifteen Trace Elements in Human Seminal Plasma and Sperm DNA. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 175(2): 244-53.
- [2] Chen P, Bornhorst J, Aschner M. Manganese metabolism in humans. *Frontiers in Bioscience*, 2018, 23(9): 1655-79.
- [3] Ellingsen DG, Chashchin V, Haug E, *et al.* An epidemiological study of reproductive function biomarkers in male welders. *Biomarkers*, 2007, 12(5): 497-509.
- [4] Li YY, Wu JQ, Zhou WJ, *et al.* Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. *BMC Public Health*, 2012, 12: 919.
- [5] Wirth JJ, Rossano MG, Daly DC, *et al.* Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. *Epidemiology*, 2007, 18(2): 270-3.
- [6] Rotter I, Kosik-Bogacka DI, Dołęgowska B, *et al.* Analysis of the relationship between the blood concentration of several metals, macro- and micronutrients and endocrine disorders associated with male aging. *Environ Geochem Health*, 2016, 38(3): 749-61.
- [7] Zeng Q, Zhou B, Feng W, *et al.* Associations of urinary metal concentrations and circulating testosterone in Chinese men. *Reprod Toxicol*, 2013, 41: 109-114.
- [8] Ubajaka CF, Meludu SC, Dioka CE, *et al.* Evaluation of male sex hormones and trace elements in male type 2 diabetic patients attending nnamdi azikiwe university teaching hospital diabetic clinics. *Niger J Med*, 2015, 24(2): 162-8.
- [9] Jain M, Kalsi AK, Srivastava A, *et al.* High Serum Estradiol and Heavy Metals Responsible for Human Spermiation Defect-A Pilot Study. *J Clin Diagn Res*. 2016, 10(12):RC09-RC13.
- [10] Gomes Silva AP, da Silva Araujo Santiago M, Maranhão LA. Could male reproductive system be the main target of subchronic exposure to manganese in adult animals? *Toxicology*. 2018, 409: 1-12.
- [11] Mohammed AT, Ebraheim LLM, Metwally MMM. Ebselen can Protect Male Reproductive Organs and Male Fertility from Manganese Toxicity: Structural and Bioanalytical Approach in a Rat Model. *Biomed Pharmacother*. 2018, 102: 739-48.
- [12] 郭海, 宋爽, 才秀莲, 等. 锰对大鼠睾丸支持细胞骨架蛋白及紧密连接相关蛋白表达的抑制作用[J]. *解剖学研究*, 2017, 39(1): 18-21.
- [13] Marchlewica M, Michalska T, Wismiewska B. Detection of lead induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere*, 2004, 57(10): 1553.

- [14] Dequchi T, Matsubara M, Nishida T. NADH oxidation by manganese peroxidase with or without alpha-hydroxy acid. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(4): 717-21.
- [15] Nkpaa KW, Amadi BA, Adedara IA, *et al.* Ethanol exacerbates manganese - induced functional alterations along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of male rats. *Neurosci Lett*, 2018, 684:47-54.
- [16] Adedara I A, Subair I T, Ego V C, *et al.* Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brainpituitary- testicular axis in rats. *Chem Biol Interact*, 2017, 263: 88-98.
- [17] Wang C, Lu JP, Jiang YM, *et al.* Effects of low level manganese exposure on the serum neuroendocrine hormones in the welders. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2011, 29(2): 94-7.
- [18] Piasek M, Laskey JW. Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *Appl Toxicol*, 1999, 19(3): 211-7.
- [19] 郭海, 李宁宁, 王国秀, 等. 锰诱导大鼠生精细胞凋亡过程中生殖激素和乳酸脱氢酶及 PARP 的作用[J]. 解剖学研究, 2016, 38(02): 100-3.
- [20] 王威仪, 张彬, 徐国恒. 3β -羟基类固醇脱氢酶在甾体激素生成组织中的功能[J]. 生理科学进展, 2015, 46(3): 215-9.
- [21] 纪海续, 孙合涛, 范奇元. $MnCl_2$ 对体外培养 Leydig 细胞 3β -HSD 的影响[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(5): 325-8.
- [22] 丁宏伟, 阳志文, 胡曦尹. 利谷隆对大鼠 Leydig 细胞睾酮合成影响及其机制研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(18): 2535-8.
- [23] Brenker C, Zhou Y, Müller A, *et al.* The Ca^{2+} -activated K^+ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife*, 2014, 3: e01438.
- [24] 鲁力, 陆继培, 农清清, 等. 对氨基水杨酸钠对染锰大鼠睾丸细胞内钙离子调节酶的影响[J]. 中国职业医学, 2000, 27(2): 16-8.
- [25] Zini A, Scbulsinger D. Local iat ion of inducible nitric oxide synthaes in the normal postischemic rat testis. *Fertil Seril*, 1996, 66: 205-9.
- [26] 武英, 崔金山, 张玉敏, 等. 氯化锰对雄性大鼠亚急性生殖毒性机制研究[J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17(3): 183-5.
- [27] Bae JH, Jang BC, Suh SI, *et al.* Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells.

- Neurosci Lett, 2006, 398: 151-4.
- [28] Silva Kida BM, Abdalla RP, Moreira RG. Effects of acidic water, Aluminum, and Manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiol Biochem*, 2016, 42(5): 1347-56.
- [29] Srivastava VK, Hiney JK, Dees WL. Early Life Manganese Exposure Upregulates Tumor-Associated Genes in the Hypothalamus of Female Rats: Relationship to Manganese-Induced Precocious Puberty. *Toxicol Sci*, 2013, 136(2): 373-81.
- [30] Pine M, Lee B, Dearth R, *et al.* Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: A potential influence on female pubertal development. *Toxicol Sci*, 2005, 85: 880-5.
- [31] Lee B, Pine M, Johnson L, *et al.* Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reprod Toxicol*, 2006, 22(4): 580-5.
- [32] Liao SL, Ou YC, Chen SY, *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem Int*, 2007, 50(7-8): 905-15.
- [33] Clasadonte J, Poulain P, Hanchate NK, *et al.* Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38): 16104-9.
- [34] Reis LO, Favaro WJ, Barreiro GC, *et al.* Erectile dysfunction and hormonal imbalance in morbidly obese male is reversed after gastric bypass surgery: a prospective randomized controlled trial. *Int J Androl*, 2010, 33(5): 736-44.
- [35] Niu FQ, Shuchang H, Sheng W, *et al.* Neurobehavioral functions, serum prolactin and plasma renin activity of manganese-exposed workers. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2004, 17(2): 17-24.
- [36] Tutkun E, Abuşoglu S, Yilmaz H, *et al.* Prolactin levels in manganese-exposed male welders. *Pituitary*, 2014, 17(6): 564-8.
- [37] Mutti A, Bergamaschi E, Alinovi R, *et al.* Serum prolactin in subjects occupationally exposed to manganese. *Ann Clin Lab Sci*, 1996, 26: 10-7.
- [38] 王禅, 陆继培, 姜岳明, 等. 低水平锰接触对焊工血清神经内分泌激素水平的影响[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2011, 29(2): 94-7.
- [39] Roels HA, Ghyselen P, Buchet JP, *et al.* Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust. *Br J Ind Med*. 1992, 49(1): 25-34.

- [40] Ou SY, Luo HL, Mailman RB, *et al.* Effect of manganese on neural endocrine hormones in serum of welders and smelters. *J Trace Elem Med Biol.* 2018, 50:1-7.
- [41] Liu XF, Zhang LM, Zhang Z, *et al.* Manganese-induced effects on testicular trace element levels and crucial hormonal parameters of Hyline cocks. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 151(2): 217-224.
- [42] 朱长才, 张本延, 叶方立, 等. 锰对接触男工性激素的影响[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(1): 63-64.
- [43] Cheng J, Fu J, Zhou Z. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. *Toxicology*, 2005, 211(1): 1-11.
- [44] 施文祥, 李少军, 李胜联, 等. 短期锰暴露对成年雄性大鼠睾丸内氨基酸类神经递质的影响[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(6): 493-5.
- [45] Oberlander JG, Porter DM, Penatti CA, *et al.* Anabolic androgenic steroid abuse: multiple mechanisms of regulation of gabaergic synapses in neuroendocrine control regions of the rodent forebrain. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24: 202-14.
- [46] Casoni F, Hutchins BI, Donohue D, *et al.* SDF and GABA interact to regulate axophilic migration of GnRH neurons. *J Cell Sci*, 2012, 125: 5015-25.
- [47] Kanbara K, Mori Y, Kubota T, *et al.* Expression of the GABAA receptor/chloride channel in murine spermatogenic cells. *Histol Histopathol*, 2011, 26(1): 95-106.
- [48] Geigerseder C. Doepner RF. Thalhammer A, *et al.* Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABA(A) receptors: a new role for testicular GABA. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 13-24.
- [49] Vorhees CV, Graham DL, Amos-Kroohs RM, *et al.* Effects of developmental manganese, stress, and the combination of both on monoamines, growth, and corticosterone. *Toxicol Rep*, 2014, 1: 1046-61.
- [50] Li SJ, Qin WX, Peng DJ, *et al.* Sodium P-aminosalicylic acid inhibits sub-chronic manganese-induced neuroinflammation in rats by modulating MAPK and COX-2. *Neurotoxicology*, 2018, 64: 219-29.
- [51] 郭海, 才秀莲, 王国秀. Caspase-3 mRNA 与 PARP 在染锰大鼠生精细胞中表达变化, 解剖科学进展[J]. 2015, 21(6): 582-5.
- [52] Mace PD, Shirley S, Day EL. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ*, 2010, 17(1): 46-53.
- [53] Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(7): 550-6.

- [54] 郭海, 宋爽, 才秀莲. Caspase-9 与 Apaf-1 在锰中毒大鼠生精细胞表达及 XIAP 与 Smac 的调控作用[J]. 解剖学研究, 2017, 39(2): 97-101.
- [55] 伍冬梅, 才秀莲, 陈玮. 锰对大鼠生精细胞半胱氨酸天冬氨酸酶-9 和凋亡抑制蛋白表达的影响[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(1): 63-5.
- [56] Alaimo A, Gorojod RM, Beauquis J, *et al.* Deregulation of mitochondria-shaping proteins Opa-1 and Drp-1 in manganese-induced apoptosis. PLoS One, 2014, 9(3): e91848.
- [57] Ryu HW, Shin DH, Lee DH *et al.* HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis. Cancer Letters, 2017, 391: 162.
- [58] 王乾兴, 褚慧, 于明明, 等. 长期低剂量锰染毒对子代大鼠睾丸生精细胞线粒体状态和细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2018, 47(3): 333-6.
- [59] 毕明玉, 李金龙, 李术, 等. 线粒体凋亡途径在锰致鸡支持-生精细胞凋亡中的作用[J]. 畜牧兽医学报. 2010, 41(4): 500-4.
- [60] Farina M, Avila DS, Rocha JB TD, *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. Neurochem Int, 2013, 62(5): 575-94.
- [61] Tarale P, Chakrabarti T, Sivanesan S, *et al.* Potential Role of Epigenetic Mechanism in Manganese Induced Neurotoxicity. BioMed Research International, 2016, 2016: 2548792.
- [62] Malthankar GV, White BK, Bhushan A, *et al.* Differential lowering by manganese treatment of activities of glycolytic and tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes investigated in neuroblastoma and astrocytoma cells is associated with manganese-induced cell death. Neurochem Res, 2004, 29(4): 709-17.
- [63] Ha Mai D, Campbell A, Bondy SC. Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. Free Radic Biol Med, 2001, 31(6): 763-8.
- [64] Sloot WN, Korf J, Koster JF, *et al.* Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation in vivo. Exp Neurol, 1996, 138(2): 236-45.
- [65] Lee H, Yoon Y. Transient contraction of mitochondria induces depolarization through the inner membrane dynamin OPA1 protein. J Biol Chem, 2014, 289(17): 11862-72.
- [66] Varanita T, Soriano ME, Romanello V, *et al.* The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. Cell Metab, 2015, 21(6): 834-844.
- [67] Deng Y, Xu Z, Xu B, *et al.* The protective effects of riluzole on manganese-induced disruption

- of glutamate transporters and glutamine synthetase in the cultured astrocytes. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 148(2): 242-9.
- [68] Deng Y, Xu Z, Xu B, *et al*. The protective effect of riluzole on manganese caused disruption of glutamate-glutamine cycle in rats. *Brain Res*, 2009; 1289: 106-17.
- [69] Bilal M, Iqba HM, Hu H *et al*. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *J Environ Manage*. 2017, 188: 137-43.
- [70] 宋奇繁, 邓宇, 徐斌, 等. 锰对小鼠黑质 GSH 合成相关酶 γ -GCS 和 GSS 的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2015, 28(6): 406-9.
- [71] Martinez-Finley EJ, Gavin CE, Aschner M, *et al*. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62(9): 65-75.
- [72] 史鹏程, 吴凤迪, 杨欣欣, 等. Nrf2 信号通路在锰致雄性小鼠生殖毒性中的作用[J]. 中国工业医学杂志, 2018, 31(3): 163-7.
- [73] Venkatesh S, Riyaz AM, Shamsi MB, *et al*. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. *Androloga*, 2009, 41(4): 251-6.
- [74] Liu XF, Zhang LM, Guan HN, *et al*. Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 168-76.
- [75] 谭迎春, 陈子江, 卢少明, 等. 用荧光探针 JC-1 检测氧化应激对精子线粒体膜电位的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2006, 44(5): 447-50.
- [76] Yuan ZX, Chen HB, Li SJ, *et al*. The influence of manganese treatment on the distribution of metal elements in rats and the protection by sodium para-amino salicylic acid. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 36: 84-9.
- [77] Nenkova G, Petrov L, Alexandrova A. Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm. *Balkan Med J*, 2017, 34(4): 343-8.
- [78] Zhao J, Dong X, Hu X, *et al*. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2016, 6:22386.

攻读学位期间取得的科研成果

一、发表论文

1. **Yang Haibo**, Wang Jifeng, Yang Xinxin, Wu Fengdi, Qi Zhipeng, Xu Bin, Liu Wei, Deng Yu. Occupational manganese exposure, reproductive hormones and semen quality in male workers: a cross-sectional study. *Toxicol Ind Health*. 2019, 35(1):53-62.
2. Yang Xinxin, **Yang Haibo**, Wu Fengdi, Qi Zhipeng, Li Jiashuo, Xu Bin, Liu Wei, Xu Zhaofa, Deng Yu. Mn Inhibits GSH Synthesis via Downregulation of Neuronal EAAC1 and Astrocytic xCT to Cause Oxidative Damage in the Striatum of Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, 2018:4235695.

致 谢

真诚地向三年来悉心指导我研究学习的邓宇教授致以最诚挚的谢意！是您帮我实现了读博的梦想，是您指明了我继续走科研的道路。导师在本研究的选题、设计、实施以及本学位论文撰写方面耗费了大量的心血，给予了许多建设性意见，使我能够最终完成研究并完成此论文。您是我一生都需要感激的人！

同时，衷心感谢刘扬教授、席淑华教授、郭晓英教授、姜泓教授、逯晓波教授、徐斌教授、贺淼副教授和刘巍副教授等人在开题设计及论文预答辩过程中给予的悉心指导和帮助。

感谢杨天瑶、杨欣欣、吴凤迪、齐志鹏和好兄弟张鹏等人在学校为我做的一切，滴水之恩，永志不忘！

感谢我的妻子、父母、子女、亲戚和同事们给予生活及工作上的帮助与忍让。感谢在这三年的时光中参与过或帮助过我的人们。

最后，感谢中国医科大学培养了我，向我的母校致以最真诚的谢意！

杨海波
2019 年 5 月

个人简历

姓名：杨海波

性别：男

民族：汉族

学习经历：

2004年9月-2009年7月 济宁医学院 医学检验专业 本科

2009年9月-2012年7月 中国医科大学大学公共卫生学院 劳动卫生与环境卫生学专业 硕士研究生

2016年9月-2019年7月 中国医科大学大学公共卫生学院 劳动卫生与环境卫生学专业 攻读博士学位

工作经历：

2012年11月至今 在临沂市人民医院职业病科工作