

苏州大学

硕士学位论文

(2009 届)

双酚 A、雌激素受体基因多态性对女性职业暴露人群生殖功能影响研究

Evaluation on the Reproductive Effects in Occupational Women Exposed to Bisphenol A and Estrogen Receptor Genetic Polymorphisms

研究生姓名 贺天锋

指导教师姓名 沈月平 (副教授)

专业名称 流行病学与卫生统计学

研究方向 生殖健康流行病学

论文提交日期 2009 年 5 月

苏州大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

研究生签名： 贺天峰 日期： 2009.5.22

学位论文使用授权声明

苏州大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、清华大学论文合作部、中国社科院文献信息情报中心有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。论文的公布（包括刊登）授权苏州大学学位办办理。

研究生签名： 贺天峰 日期： 2009.5.22

导师签名： 沈明 日期： 2009.5.22

目 录

一	前 言	1
	1.1 研究背景	1
	1.2 研究意义和研究目的	3
二	对象和方法	6
	2.1 研究对象	6
	2.2 研究内容	6
	2.3 实验研究方法	7
	2.4 质量控制	13
	2.5 数据录入与统计分析	13
三	结果与分析 第一部分 双酚 A 暴露对研究人群的影响及基因多态性分布	15
	3.1 研究对象的一般背景特征	15
	3.2 双酚 A 暴露对月经周期及性功能的影响	17
	3.3 研究对象子代的发育情况	19
	3.4 <i>ER PvuII</i> 、 <i>ER XbaI</i> 、 <i>ER Codon594</i> 及 <i>ER Codon325</i> 多态分型在人群中的分布及比较	21
四	结果与分析 第二部分 基因多态与双酚 A 暴露的联合危险度估计	23
	4.1 双酚 A 暴露组与对照组中不同基因分型频率分布	23
	4.2 <i>ER PvuII</i> 、 <i>ER XbaI</i> 、 <i>ER Codon594</i> 及 <i>ER Codon325</i> 多态分型与月经周期相关指标改变的关系	24
	4.3 <i>ER PvuII</i> 、 <i>ER XbaI</i> 、 <i>ER Codon594</i> 及 <i>ER Codon325</i> 多态分型与性功能相关指标改变的关系	28
	4.4 基因位点多态与双酚 A 暴露的联合危险度估计	35
五	讨 论	45
	5.1 <i>ER</i> 各位点多态分布	45
	5.2 双酚 A 暴露对女性月经周期及性功能的影响	46
	5.3 双酚 A 暴露对子代生长发育的影响	46
	5.4 基因分型与生殖功能异常易感性的关系	47

5.5 双酚 A 暴露与基因联合作用对生殖功能的影响	47
5.6 创新和意义	48
5.7 研究的有效性和局限性	49
六 小 结	50
七 参考文献	52
八 发表论文	58
九 中英文缩语对照表	59
十 综 述	60
十一 致 谢	69

中文摘要

【研究背景】双酚 A(Bisphenol A ,BPA)是合成树脂的主要单体材料,被广泛应用于人类日常生活用品如婴儿奶瓶、塑料杯等的制造。大量研究表明:双酚 A 具有强抗雄激素作用及弱雌激素样作用,被高度怀疑是人类内分泌干扰物。但目前几乎没有研究证据支持双酚 A 暴露影响人类生殖功能。

近年来,关于双酚 A 对生殖功能影响的研究已经从传统形态学和性激素水平的生殖结局指标向与生长发育有关的调控基因和大分子蛋白指标转变,其中基因多态性是目前国内外研究的热点。基因组中某些位点多态会导致不同个体对某些疾病易感性的不同。因此研究双酚 A 暴露的影响时,仅考虑双酚 A 的毒性还很难客观的评估其对人体的损害效应。目前雌激素相关基因位点多态与双酚 A 的联合作用关系还没有文献报道,因此我们假设雌激素受体基因多态性可能在双酚 A 对生殖功能的影响中发挥作用。

【目的】研究双酚 A 暴露与雌激素受体基因多态对女性生殖功能的联合作用。

【方法】采用流行病学回顾性队列研究的方法,于2006年10月至2008年4月在浙江省宁波市、湖南省岳阳市、江苏省无锡市、宜兴市四个研究中心进行,匹配条件是年龄、工龄,共获得样本432例(双酚A暴露女工125例,对照307例)。

采用结构式调查问卷调查女工月经史、生育史、性生活史、工作暴露史等资料,同时对女工子代进行体格检查及发育状况调查。对女工收集5ml静脉血,PCR-RFLP及荧光定量PCR-分子信标技术检测*ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594*及*ER Codon325*的基因分型。

采用的主要统计方法为 *t* 检验、 χ^2 检验、Hardy-Weinberg 平衡检验、协方差分析、Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 危险因素联合作用相加效应模型等。统计软件为 SAS 8.1。

【结果】(1) 最近 6 个月月经周期最长天数双酚 A 暴露组 (30.47 ± 5.40) 小于对照组 (31.89 ± 6.54), 差别有统计学意义($t=-2.12, P=0.0353$)。未发现月经周期是否规则、月经周期平均天数、最长月经周期天数、平均行经天数四个指标及性生活中的满意度、性享受程度、性兴奋程度、性高潮程度、性功能综合指标以及性幻想频率(次/月)在暴露组与对照组间的差异。

(2) 男性子代在开始长阴毛、腋毛及发育至 Tanner 1 期、Tanner 2 期、Tanner 3 期、Tanner 4 期的年龄暴露组均晚于对照组。而女性子代乳房发育及发育至 Tanner 5 期的年龄暴露组早于对照组。

(3) 四个位点各基因型在中国女性人群中的分布频率为：*ER PvuII* 位点：pp 型：38.93%，Pp 型：44.76%，PP 型：16.32%；*ER XbaI* 位点：xx 型：45.45%，Xx 型：41.49%，XX 型：13.05%；*ER Codon594* 位点：GG 型：60.84%，GA 型：32.87%，AA 型：6.29%；*ER Codon325* 位点 CC 型：24.82%，CG 型：55.19%，GG 型：21.99%。均符合 H-W 平衡。*ER PvuII*、*ER XbaI* 及 *ER Codon325* 多态性分布存在种族性差异，未发现 *ER Codon594* 在不同种族人群间的差异。

(4) 双酚 A 暴露组与对照组 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594*、*ER Codon325* 四个位点各基因型在月经周期、性功能各指标不同组别间的分布差异无统计学意义。

(5) 基因与双酚 A 暴露对月经周期影响的联合作用分析显示：在模型 1 中，Cochran-Armitage 检验发现 *ER PvuII*、*ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短有联合作用的趋势 (P 分别为 0.0416、0.0155)，暴露于双酚 A 又携带突变基因的 RR 分别为 1.93 (95%CI: 1.01-3.67)、1.91 (95%CI: 0.97-3.75)。但 Rothman 方法未发现基因多态与双酚 A 暴露有相加效应。

在模型 2 中，Cochran-Armitage 检验发现：*ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短的危险有联合作用的趋势($P=0.0049$)，既暴露于双酚 A 又携带突变纯合子人群月经周期最长天数变短的 RR 为 2.12 (1.35-3.31)。Rothman 方法未发现基因多态与双酚 A 暴露的联合作用。

(6) 基因与双酚 A 暴露对性功能的联合危险度分析显示：在模型 1 中，Rothman 方法计算发现：*ER PvuII* 的 Pp 或 pp 基因型与双酚 A 暴露对性功能减弱有负相加模型效应 ($S=-0.05, P=0.048$)，与参照组相比 RR 值为 1.05 (95%CI: 0.44-2.55)。*ER Codon325* 的 CC 或 GG 基因型与双酚 A 暴露对性生活满意度减弱有负相加模型效应 ($S=0.21, P=0.01$)，与参照组相比 RR 值为 1.60 (95%CI: 0.61-4.23)。但 Cochran-Armitage 检验未发现基因多态与双酚 A 暴露有联合作用的趋势。

在模型 2 中，Cochran-Armitage 趋势检验发现 *ER PvuII* 位点多态与双酚 A 暴露对性生活中享受程度减弱有联合作用的趋势 ($P=0.0132$)，暴露于双酚 A 又携带 pp 基因型的 RR 为 4.42 (1.25-15.68)。Rothman 方法计算四个位点均未发现基因与

双酚 A 暴露对性功能减弱的联合作用。

【结论】双酚 A 职业暴露可能对女性人群生殖功能的影响较弱，对其子代的生长发育可能具有延缓作用。ER_α 基因多态位点分布频率在不同种族间有一定的差异。ER_α 基因多态与双酚 A 暴露可能对女性生殖功能改变呈弱的负相加效应。以上结论尚需大样本流行病学及实验室研究结果来证实。

【关键词】双酚 A；雌激素受体；基因多态性；生殖功能；

作 者：贺天锋

指导老师：沈月平 副教授

Evaluation on the Reproductive Effects in Occupational Women Exposed to Bisphenol A and Estrogen Receptor Genetic Polymorphisms

Abstract

[Background] As the main material of synthetic resin, Bisphenol A (BPA) is widely used in the manufacture of daily living equipments, such as babies' bottles, plastics cup. Massive animal experiments had shown that it could perform the strong anti-androgen and weak estrogen function. Hence, it had been highly suspected as the human endocrine disrupter (ED_s). However, no evidences showed that BPA exposure can affect human reproductive function now.

In the last few years, the study about BPA on the reproductive function had changed from reproductive outcome indicators of traditional morphology and sex hormone levels to controlled genes related to growth and development and macromolecular protein indicators, especially the study on genetic polymorphism, which attracted considerable attention of the whole world. Many studies had found that the some genetic loci would cause different susceptibility to certain diseases of different individuals. Therefore, in the study of BPA exposure on human reproductive function, the exploration on the effectiveness of BPA itself was still hard to objectively evaluate its effects on the damage of human body. But up until now, the combined effect between estrogen-related gene locus and BPA has not been reported. So we assumed that genetic polymorphisms of estrogen receptor and BPA exposure may have a joint effect on the human reproductive funtion.

[Objective] To explore the joint reproductive effects in women exposed to BPA and ER genetic polymorphisms.

[Methods] Epidemiological retrospective cohort study was conducted in Ningbo city (Zhejiang province), Yueyang city (Hunan province), Wuxi and Yixing city (Jiangsu province) between October, 2006 and April, 2008. Considering age, working years as main matching conditions, a total of 125 female workers exposed to BPA and 307

control female workers were included in our study at last.

Menstrual history, reproductive history, sexual history, work exposure history, and their offspring development were investigated by structure questionnaire. 5ml vein blood was collected from women workers. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and fluorescence quantitative PCR detection of molecular beacon technology were used to detect the genotypes of *ER PvuII*, *ER XbaI*, *ER Codon594* and *ER Codon325*. The main statistical methods included t-test, chi-square test, Hardy-Weinberg balance test, analysis of covariance, Armitage trend test and Rothman additive effects test. All statistical analysis were performed using SAS version 8.1 software.

[Results] (1) BPA exposure may shorten menstrual cycle of female when compared with the control group ($t=-2.12$, $P=0.0353$). No differences were found between BPA exposure group and control group on other indicators of the menstrual cycle, degree of sexual satisfaction, sexual enjoyment, sexual excitement, extent of sexual climax, the comprehensive index combined the three sexual enjoyment issues and the monthly frequency of sexual fantasies.

(2) The time for male offspring began to grow pubescence, armpit hair, and developed to Tanner 1 period, Tanner 2 period, Tanner 3 period, and Tanner 4 period in BPA exposure group was later than the control group. But female offspring adolescent mammoplasia and development to Tanner 5 period in BPA exposure group was earlier than the control group.

(3) Four gene frequency distribution was showed as follows: *ER PvuII*: Pp: 44.76%, pp: 38.93%, PP: 16.32%; *ER XbaI*: xx: 45.45%, Xx: 41.49%, XX: 13.05%; *ER Codon594*: GG: 60.84%, GA: 32.87%, AA: 6.29%; *ER Codon325*: CG: 55.19%, CC: 24.82%, GG: 21.99%. The heredity equilibrium law was not refused by the Hardy-Weinberg test on these four loci. There were obvious racial differences in the polymorphisms distribution of *ER PvuII*, *ER XbaI* and *ER Codon 325*, but no significant difference was identified on *ER Codon594* locus between Chinese and other race population.

(4) No differences were found between BPA exposure group and control group in menstrual cycle and sexual function indicators of *ER PvuII*, *ER XbaI*, *ER Codon594*, *ER*

Codon325 gene frequency distribution.

(5) The results of the combined effects between gene and BPA exposure on the impact of the menstrual cycle showed that: In model 1, the results with Armitage test showed that *ER PvuII*, *ER XbaI* polymorphism and BPA exposure had the joint effect on shortening the longest days of the menstrual cycle ($P=0.0416$, $P=0.0155$, respectively), the RR for the population both suffering BPA exposure and carrying homozygous mutation was 1.93 (95%CI: 1.01-3.67) and 1.91(95%CI: 0.97-3.75), respectively. No joint effect was found between BPA exposure and polymorphisms on shortening the longest days of the menstrual cycle by Rothman calculated method.

In model 2, *ER XbaI* polymorphism and BPA exposure had the joint effect on shortening the longest days of the menstrual cycle (Armitage trend test $P=0.0049$), the RR for the population both suffering BPA exposure and carrying homozygous mutation was 2.12 (95%CI: 1.35-3.31). No joint effect was found between BPA exposure and polymorphisms by Rothman calculated method.

(6) The analytic results of the combined effects between gene and BPA exposure on the impact of the sexual function indicated that: In model 1, the joint effect was found between *ER PvuII* the Pp or pp genotypes and BPA exposure on weakening the extent of comprehensive index combined the three sexual enjoyment issues ($S=-0.05$, $P=0.048$), RR was 1.05 (95% CI :0.44-2 .55), comparing with the reference group. *ER Codon325* the CC or GG genotypes and BPA exposure had the joint role on weakening sexual satisfaction ($S=0.21$, $P=0.01$). RR was 1.60 (95% CI :0.61-4 .23). But no joint effect trend was found by Cochran-Armitage test.

In model 2, in Cochran-Armitage test, the analytic results indicated that *ER PvuII* polymorphism and BPA exposure had the joint effect on weakening of degree of sexual satisfaction ($P=0.0132$), the RR for the population both suffering BPA exposure and carrying homozygous mutation was 4.42 (1.25-15.68), No joint effect was found between BPA exposure group and polymorphisms on weakening of the sexual function by Rothman calculated method.

[Conclusion] Occupational exposure to BPA may perform weaker effect on the reproductive function changing of female population, and may delay the growth and

development indexes of their offspring. There were racial differences in the polymorphisms distribution frequency of ER α genes. ER α genetic polymorphisms and BPA exposure may show a weak joint effect on modifying the female reproductive functions. These findings should be confirmed by further epidemiological and experimental studies of large sample size.

[Keywords] BPA, Estrogen receptor, Gene polymorphism, Reproductive function.

Written by Tian-feng He

Supervised by Prof. Yue-ping Shen

一 前 言

1.1 研究背景

1.1.1 双酚 A 介绍

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 学名 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷, 外观呈白色棱形结晶(稀乙醇中)或针状结晶(水中)或片状、粉末。分子量为 228, 溶于乙醇、丙酮等, 微溶于四氯化碳, 几乎不溶于水。其结构式见图 1, 图 2 为其立体图。

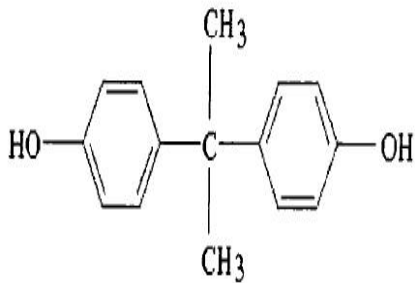


图 1 双酚 A 结构式

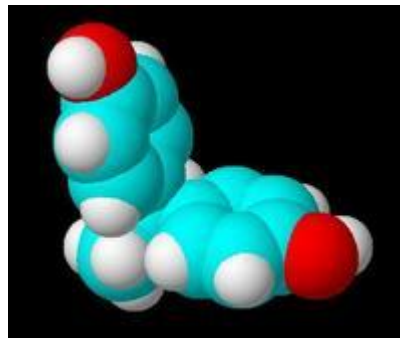


图 2 双酚 A 结构式立体图

据美国加利福尼亚州 Menlo Park 的 SRI 咨询公司估算, 2007 年双酚 A 全球需求量约 400 万吨, 是世界上应用最广泛的工业化合物之一。双酚 A 是聚碳酸酯和环氧树脂的重要单体。聚碳酸酯广泛应用于多种生活消费品的制造, 如水杯、婴儿奶瓶、医疗器械和家用电器等。环氧树脂通常用于一些食品和饮料罐的内涂层及制作胶片、地板胶、水管、汽车零件等。

双酚 A 相关产品的广泛应用, 使得人类对双酚 A 的暴露几乎无处不在。1993 年, Krishnan 等报道了高压灭菌时双酚 A 能够从聚碳酸酯塑料瓶中扩散出来^[1], 1995 年 Brotons 等也发现食品包装容器或塑料薄膜中的双酚 A 可以渗入食品或饮料, 释放量最多可以达到 23ug/can^[2]。2001 年 FSA (Food Standards Agency UK) 对罐装食品的检测中也检出了双酚 A^[3,4]。还有研究发现对罐头食品或聚碳酸酯塑料罐头进行加热消毒及反复冲洗时, 酸性的食品或饮料都会增加双酚 A 的溶解释放^[5-10]。此外, 人类也有可能通过接触或引用双酚 A 污染的水源而暴露, 有研究^[11,12]从水体和水生生物体内检测出双酚 A, Yamamot 等在垃圾处理厂附近的地下水中也

检出了双酚 A^[13]。

1.1.2 双酚 A 在人体中的存在及影响

已有研究显示:在普通人群中使用塑料食品容器双酚 A 的暴露量约为 6.3mg/d, 饮料罐为 0.75 mg/d,使用牙科密封圈后最初 1 小时双酚 A 的暴露剂量为 90-931 mg^[14]。Calafat 等人发现双酚 A 在普通人群中广泛暴露, 美国 CDC 抽检发现尿样双酚 A 浓度的 P₁₀-P₉₅ 在 0.4-8ppb 之间; 中位数为 1.3ppb^[15]。国内的一项在 20 个健康人(10 份男性, 10 份女性)中进行的研究表明:尿液中的双酚 A 水平男性为 1.22±1.38mg/L, 检出率为 60%; 女性为 1.29±1.22 mg/L, 检出率为 100%^[16, 17]。孕妇的羊水、绒毛膜、胎盘中普遍可以检出 ng 级的双酚 A, 经口摄入的双酚 A 可直接通过胎盘进入胎儿体内^[18, 19], 胎盘对双酚 A 几乎没有屏障作用。

人类暴露双酚 A 的途径是连续的和多来源的。以双酚 A 生产者和环氧树脂生产者这类职业人群暴露为主。一般人群主要是由于生活消费品(婴儿奶瓶、食品罐和牙科密封圈等)的加热消毒、反复冲洗、酸、碱腐蚀等使双酚 A 溶解释放而暴露。职业暴露人群主要通过呼吸道尘埃吸入和经皮肤吸收^[20], 低剂量的双酚 A 在体内的半衰期为 6 小时。尽管双酚 A 暴露水平和生物蓄积作用较低, 但是由于它具有激素活性, 故极低的暴露水平仍可能对人体健康产生影响。

双酚 A 被美国国家毒理学项目(NTP)的 RACB(Reproductive Assessment by Continuous Breeding)草案认定是可疑的内分泌干扰物^[20, 21, 22]。在大规模的动物模型中, 可以观察到它可以引起激素分泌紊乱、生殖器官形态学和功能及性发育的异常^[20,21,23,24]。2008年10月加拿大联邦政府正式宣布将双酚A列入有毒物质列表中。2008年9月《美国医学协会杂志》上发表的一项研究认为, 双酚A与成年人的心脏病、糖尿病、肝功能不正常等有关联。双酚A对人类生殖功能的影响, 除1999年复旦大学与上海市计划生育研究所进行了一些预研究提示其会影响男性的生殖功能外^[25], 目前仍然没有在人类中开展的关于双酚A对生殖健康影响效应的研究。

1.1.3 雌激素受体基因多态

近年来, 随着分子遗传学和人类基因组流行病学(Human Genome Epidemiology, HuGE)的发展, 关于双酚 A 对生殖功能影响的研究已经从传统的形态学和性激素水平的生殖结局指标向与生长发育有关的调控基因和大分子蛋白指标转变, 其中基因多态性的研究是目前国内外研究的热点。多项研究发现基因组中某些位点上的多态性会对其基因产物的生成和功能造成不同程度的影响, 进而

导致不同生物个体在这些基因产物的效应方面存在差异，或者导致不同个体对某些疾病易感性的不同。还有研究认为雌激素受体可能是双酚 A 发挥作用的中介物质，双酚 A 可能通过与相关激素受体结合，影响激素调节机制。因此，从新的视角来研究双酚 A 对人类的影响，是客观评估双酚 A 毒性作用的迫切问题。

雌激素受体(Estrogen receptor,ER)分两型， ER_{α} 和 ER_{β} 。 ER_{α} 和 ER_{β} 同属于配体介导型的核受体超家族成员，是配体介导的转录因子。1986年Green等人从乳腺癌细胞中纯化出 ER_{α} ，并报道了其cDNA序列， ER_{α} 基因位于6号染色体的6q25.1区，由140 kb碱基构成，有8个外显子和7个内含子，分子量为66 kD^[26]。其基本结构包括DNA结合区、转录调节区和类固醇激素结合区三部分。 ER_{α} 在多种器官如乳腺、卵巢和子宫等组织表达^[27, 28]（下文中如无特殊标记,ER都指 ER_{α} ）。

许多研究已发现在ER上存在有众多的多态位点，如ER基因1号内含子的两个限制性内切酶*ER PvuII* (PP、Pp、pp)、*ER XbaI* (XX、Xx、xx)识别位点^[29, 30]、第4号外显子区域内325号密码子上的多态位点(*ER codon325*)^[31]、第8外显子594位密码子上的多态位点(*ER codon594*)^[32]等,这些位点都与人类生殖功能相关因素密切相关。目前关于*ER PvuII*、*ER XbaI*多态位点与雌激素相关生殖系统肿瘤疾病关系的研究开展较多^[33-38]。但对*ER codon594*、*ER codon325*位点在国内的研究较少，并且目前还没有在中国人群中进行的大样本的关于*ER codon594*多态位点频率的报道。

本研究是中美协作项目“双酚 A 对人类生殖功能影响研究”的子项目，关于双酚 A 对男性及女性生殖功能影响的其它研究结果，本课题组有另文报道。本论文重点是从基因多态的角度，探索双酚 A 暴露与雌激素受体基因多态性对女性生殖功能的联合危险作用。

1.2 研究意义和研究目的

本研究的意义在于：从事双酚A相关职业的人群将暴露于较高水平双酚A中，而基因多态可能导致个体对潜在的环境不良物质及某些疾病易感性的差异。因此，在研究双酚A暴露对人类生殖功能的影响时，仅考虑双酚A的毒性还很难客观的评估其对人体的损害效应，如果同时考虑基因易感性及双酚A这两个因素，可能会有一些新的发现。目前，还没有文献报道关于雌激素相关基因位点与双酚A联合作用的研究。

由于双酚A职业暴露者的暴露水平要明显高于日常暴露水平。因此，我们将双

酚A对女性生殖影响的研究从以往对性和生育情况及雌激素潜在影响扩大到对生殖功能的影响，并通过与对照人群比较以分析双酚A暴露的生殖毒性并给予客观的评估。

本研究的总目标是：

报道 ER 基因多态位点在中国女性人群中的分布频率，并用回顾性队列研究的方法在人群中探索双酚 A、雌激素受体基因多态性对职业暴露人群生殖功能影响的联合作用。

具体研究目标是：

1.探索双酚 A 对职业暴露女性生殖功能的影响，并报道 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个基因多态位点不同基因分型在中国女性人群中的分布频率；

2.探索 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个基因位点多态与月经周期、性功能变化的关系；

3.探索雌激素基因位点多态与双酚 A 暴露对生殖功能影响的联合危险作用；

研究流程图

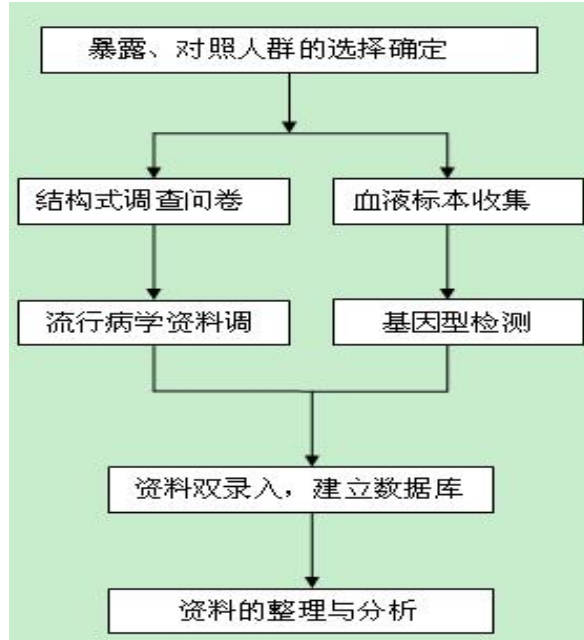


图 3 研究流程图(A)

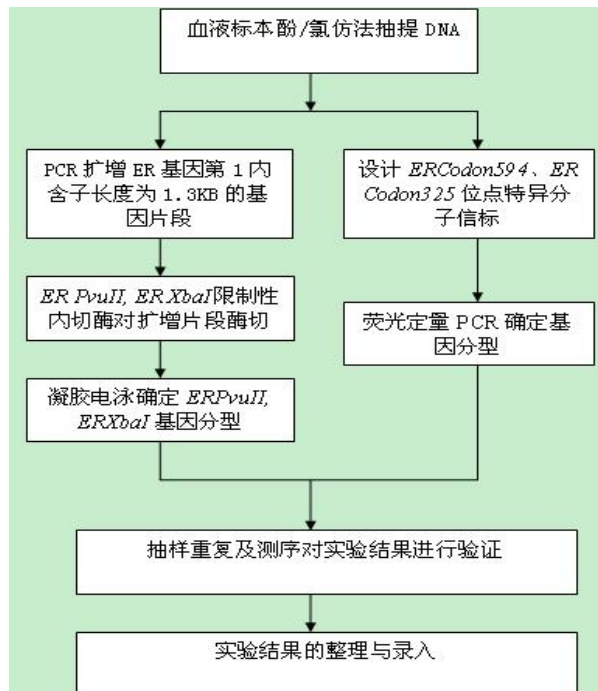


图 4 研究流程图(B)

二 对象和方法

2.1 研究对象

2.1.1 暴露组的选取

本研究中的双酚 A 暴露人群在中国浙江省宁波市、湖南省岳阳市、江苏省无锡市和宜兴市的环氧树脂厂进行选择，这几家环氧树脂厂均使用双酚 A 生产各种类型的环氧树脂及其它特种树脂，投料车间和包装车间是工人的主要暴露点。主要工种为投料工、操作工、粉碎工和包装工等。

双酚 A 职业暴露对象为现在暴露者，定义为：在本次调查时仍在岗的双酚 A 职业暴露工人。本研究中共获得女性暴露对象 125 例。

2.1.2 对照组的选取

首先在当地选取与双酚 A 环氧树脂厂生产史相似的机械厂、编织厂等，从员工名单中排除不合格者，而后挑选合适对照对象。按照与双酚 A 职业暴露者同性别、同居住地，按年龄、工龄等特征进行匹配，且在岗位上无双酚 A 暴露，挑选对照对象。尽管对照厂的工人在调查时仍收集其工作史资料，并通过查阅工厂生产记录以确认是否存在可能的双酚 A 暴露，剔除那些疑似暴露者，并另寻对照。最终本研究确定对照为 307 例。

2.2 研究内容

取得研究对象的知情同意，分别对暴露组和对照组工人进行问卷调查，收集血液样本用于基因分型的测定。此外，动员研究对象的子女及配偶也参与研究，并进行相应的问卷调查和生物学采样。

2.2.1 研究对象的结构式问卷调查

资料的收集主要通过个人访谈结构式问卷调查获得。调查表内容主要包括：
①一般人口学特征：年龄、民族、职业、收入状况、受教育程度、婚姻状况、宗教信仰等；
②既往疾病史和用药史等；
③月经史、生育史和性生活史（包括入厂前后不同阶段的情况）；
④生活习惯及方式：吸烟、饮酒、维生素服用等习惯；
⑤工作暴露史：既往从事的职业、各岗位的工作年限，双酚 A、有机溶剂和其它化学物质的暴露情况（包括暴露年限、时期和频率等），工作环境是否有通风吸尘设

备，是否有劳动防护用品、是否遵守劳动规程等情况；⑥与工作暴露史有关的卫生情况及行为习惯：在工作车间是否吃东西或喝水、工作服的换洗频率、上下班前的卫生习惯等。

2.2.2 研究对象配偶及子代的调查

包括问卷调查、体格检查两个部分。根据研究目的对研究对象配偶及子代设计对应的调查问卷。子代的问卷由父母代为回答，同时参考子代的回答。男性子代体格检查包括检查对象的阴茎、阴囊、睾丸、附睾是否正常。用Tanner图来调查子代的不同阶段发育年龄。

2.3 实验研究方法

2.3.1 外周全血的采集及保存

a) 采样前，准备 1 支已消毒的装有依地酸二钠（EDTA- Na_2 ）抗凝剂的 5ml 冻存管。

b) 取 5ml 调查对象的外周全血放入冻存管中。

c) 注明研究对象的编号。

d) 将获得的标本置于 -80°C 冰箱保存。

2.3.2 非抗凝血中 DNA 的提取

外周全血 DNA 的抽提采用 DNA 提取试剂盒“QIAamp DNA Mini Kit (100)”（北京天根公司）提取，方法按试剂盒说明进行。具体步骤如下：

a) 将血凝块转移至组织匀浆器，加入红细胞裂解液，将血凝块研磨成匀浆。

b) 将匀浆转移至离心管中，加适量红细胞裂解液，将管子颠倒数次，13000 rpm 离心 5 分钟。轻轻倒掉上清液。重复 1 次。

c) 沉淀用 0.5ml 红细胞裂解液悬浮，移入 1.5ml Eppendorf 管，13000 rpm 离心 5 分钟，弃上清。

d) 向沉淀中加入 20 μl 蛋白酶 K 和 200 μl GA 液，颠倒离心管数次，混匀尽量将酶混入溶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜，期间不时旋动。

e) 向溶液中加入等体积饱和平衡酚（约 400 μl ），缓慢地来回颠倒离心管，混匀形成乳浊液。室温 13000rpm 离心 5 分钟，使两相分开。

f) 取上层水相（约 400 μl ）加入等体积 24:1 氯仿: 异戊醇，颠倒混匀，13000rpm 离心 5 分钟。

g) 取上层水相（约 400 μl ）加入 1/10 体积（40-50 μl ）3M NaAc 和 2 体积（1ml

左右) 无水乙醇, 室温下轻摇混匀, 置于-20℃2 小时。

h) 取出溶液, 14000-15000rpm 离心 10 分钟, 弃上清。

i) DNA 沉淀用 70%乙醇悬浮 (500μl) 离心同上, 弃上清。将 EP 管倒置于纸巾上几分钟, 尽可能除去 70%乙醇。将离心管敞开放于 37℃水浴锅干燥, 直至乙醇完全挥发, 用 50-100μlTE 溶解, 置-20℃冰箱备用。

2.3.3 ER 基因 ER PvuII、ER XbaI 的基因多态性检测 (PCR - RFLP 法)

本研究对 *ER PvuII*、*ER XbaI* 两个多态位点采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术检测 (PCR-RFLP)。

根据 Gene Bank 中 ER 基因序列设计上、下游引物。

上游引物: 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3'

下游引物: 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'

PCR 扩增体系如下 (25μl):

DNA 模板	3μl
上游引物(20μM)	0.5μl
下游引物(20μM)	0.5μl
Taq Master Mix (TaKaRa 公司)	12.5μl
ddH ₂ O	8.5μl

PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 35 个循环为 94℃ 变性 30s, 61℃退火 40s, 72℃延伸 90 s; 最后 72℃延伸 10 min。扩增产物长度为 1.3kb。

ER PvuII 酶切体系如下 (20μl):

PCR 产物	8μl
PvuII(10u/μl) (Promega 公司)	0.5μl
10×buffer	2μl
ddH ₂ O	9.5μl

37℃水浴 4h 后, 取 5μl 酶切产物 1.5%琼脂糖进行凝胶电泳。根据电泳图谱可判定为 PP 野生型 (1300bp)、Pp 杂合型 (1300bp、850bp 和 450bp) 和 pp 纯合突变型 (850bp 和 450bp) (图 5A)。

ER XbaI 酶切体系如下 (20μl):

PCR 产物	8 μ l
XbaI(10u/ μ l) (Promega 公司)	0.5 μ l
10 \times buffer	2 μ l
ddH ₂ O	9.5 μ l

37 $^{\circ}$ C水浴 4h 后, 取 5 μ l 酶切产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。根据电泳图谱可判定为 XX 野生型 (1300bp)、Xx 杂合型 (1300bp、910bp 和 390bp) 和 xx 纯合突变型 (910bp 和 390bp) (图 5B)。

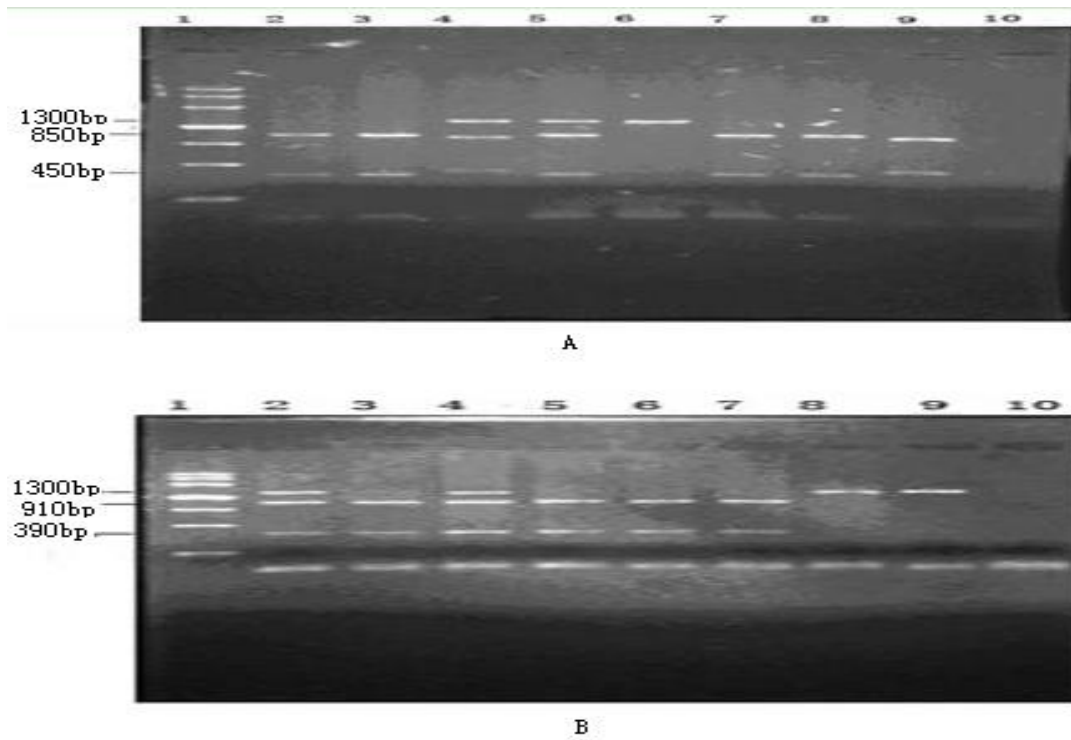


图 5 ER 基因 *ER PvuII*、*ER XbaI* 位点 RFLP 电泳图谱

(图 5A 为 *ER PvuII* 的 RFLP 电泳图谱, 其中 1 为 marker,10 为空白对照,2、3、7、8、9 为 pp 基因型,4、5 为 Pp 基因型,6 为 PP 基因型; 图 5B 为 *ER XbaI* 的 RFLP 电泳图谱, 其中 1 为 marker,10 为空白对照,2、4 为 Xx 基因型,3、5、6、7 为 xx 基因型,8、9 为 XX 基因型)

2.3.4 *ER Codon325* 位点多态的检测 (荧光定量 PCR 分子信标法)

根据 Gene Bank 上 ER 基因序列 (No. M12674) 设计上、下游引物和分子信标:

上游引物: 5'-CAG ATG GTC AGT GCC TTG TTG GA-3'.

下游引物: 5'-CGA AGC TTC ACT GAA GGG TCT GG-3'.

分子信标 C—等位基因：5'-FAM-cca agc GAG CCC CCC ATA CTC TA gct tgg-DABCYL-3'.

分子信标 G—等位基因：5'-TET-cca agc GAG CCC CCC ATA CTC TA gct tgg-DABCYL-3'.

定量 PCR 反应体系如下 (20 μ l):

DNA 模板	3 μ l
上游引物(20 μ M)	0.4 μ l
下游引物(20 μ M)	0.4 μ l
分子信标 C(20 μ M)	0.2 μ l
分子信标 G(20 μ M)	0.2 μ l
Ex Taq TM Hot Start	10 μ l
ddH ₂ O	5.8 μ l

PCR 扩增程序如下 (MJ chromo4 荧光定量 PCR 仪):

预变性	95 $^{\circ}$ C	10 s	
45 循环			
变性	95 $^{\circ}$ C	10 s	
退火	49 $^{\circ}$ C	60 s	荧光检测
延伸	72 $^{\circ}$ C	45 s	

根据得到的 FAM 和 TET 荧光信号的比值判定基因型。当比值为>5, 2-5 之间及<2 时, 基因型分别为 CC 野生型、CG 杂合型及 GG 纯合突变型 (图 6)。

2.3.5 *ER Codon594* 位点多态的检测 (荧光定量 PCR 分子信标法)

根据 Gene Bank 上 ER 基因序列设计 *ER Codon594* 位点上、下游引物和分子信标:

上游引物: 5'-ACT GCG GGC TCT ACT TCA CA-3'

下游引物: 5'-GTG TAT GCA GGA GAC AGA ATT TG-3'

分子信标 G—等位基因: 5'-HEX -CAG CG T TCC CTG CCA CGG TCT GAG AGC TC C GCT G-DABCYL-3'.

分子信标 A—等位基因: 5'-FAM -CAG CG T TCC CTG CCA CAG TCT GAG AGC TC C GCT G-DABCYL-3'.

定量 PCR 反应体系如下 (20 μ l):

DNA 模板	2 μ l
上游引物(20 μ M)	0.8 μ l
下游引物(20 μ M)	0.8 μ l
分子信标 G(25 μ M)	0.3 μ l
分子信标 A(25 μ M)	0.3 μ l
art Fluo-PCR mix	12 μ l
ddH ₂ O	8.8 μ l

PCR 扩增程序如下 (MJ chromo4 荧光定量 PCR 仪):

预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min
 40 循环
 变性 94 $^{\circ}$ C 20 s
 退火 62 $^{\circ}$ C 20 s 荧光检测
 延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s

根据得到的 FAM 和 HEX 荧光信号的比值判定基因型。当比值为 >4 , 1.5-4 之间及 <1.5 时, 基因型分别为 AA 野生型、GA 杂合型及 GG 纯合突变型 (图 7)。抽取 15 份样本用测序的方法对 *ER Codon594* 位点荧光定量 PCR 结果进行验证 (图 8-10)。

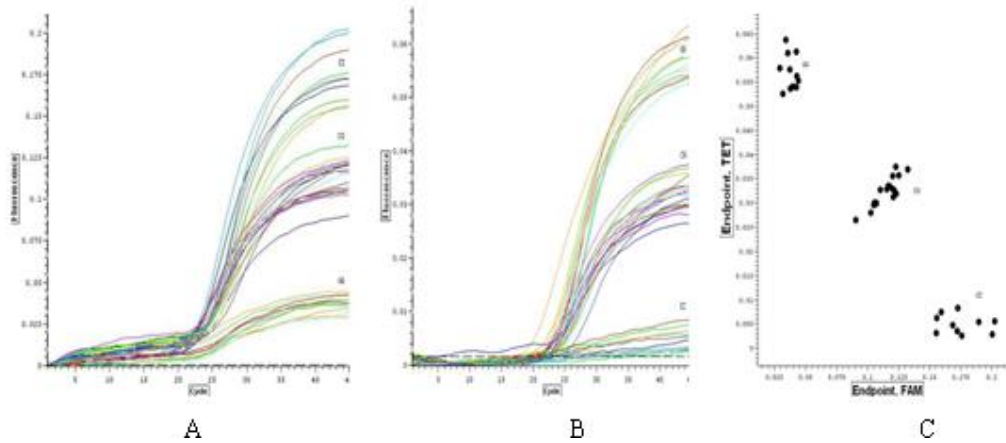


图 6 ER 基因 *Codon325* 荧光定量 PCR 图谱

图 6A: PCR 循环中 FAM 荧光值, 代表 C 等位基因; 图 6B: PCR 循环中 TET 荧光值, 代表 G 等位基因; 图 A 与图 B 的同一颜色的曲线代表同一样本。图 6C: 横轴代表 FAM 值, 纵轴代表 TET 值。FAM 值高, TET 值低, 即为 CC 基因型; FAM 值低, TET 值高, 即为 GG 基因型; FAM 和 TET 值均处于中间水平, 即为 CG 基因型。

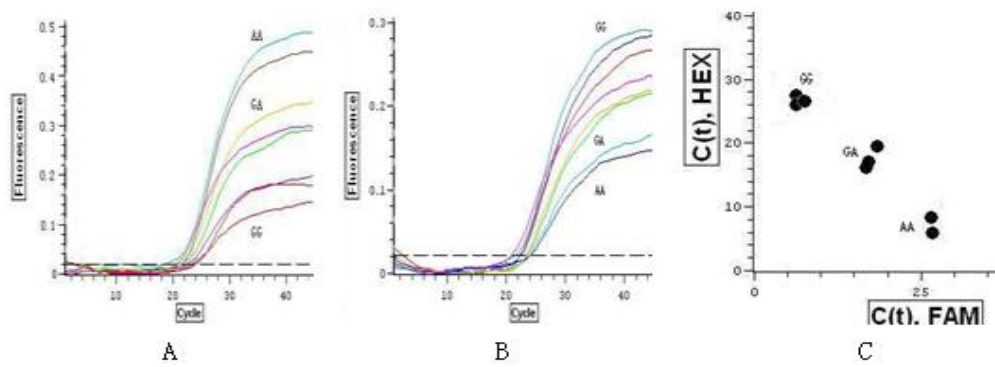


图 7 ER 基因 *Codon594* 荧光定量 PCR 图谱

图 7A: PCR 循环中 FAM 荧光值, 代表 A 等位基因; 图 7B: PCR 循环中 HEX 荧光值, 代表 G 等位基因; 图 7C: 横轴代表 FAM 值, 纵轴代表 HEX 值。FAM 值高, HEX 值低, 即为 AA 基因型; FAM 值低, HEX 值高, 即为 GG 基因型; FAM 和 HEX 值均处于中间水平, 即为 GA 基因型。

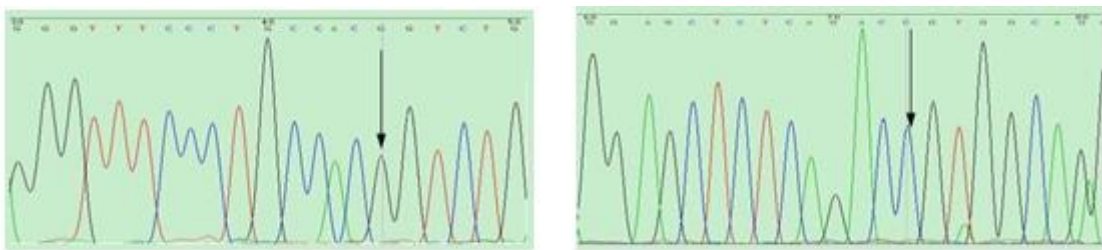


图 8 ER 基因 *Codon594* 测序图 (GG 型)

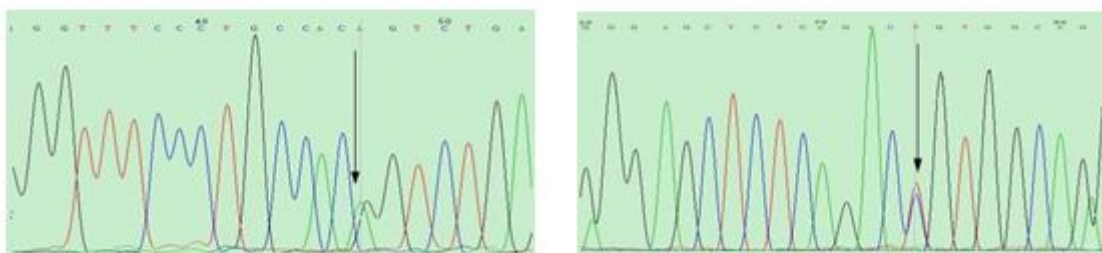


图 9 ER 基因 *Codon594* 测序图 (AA 型)

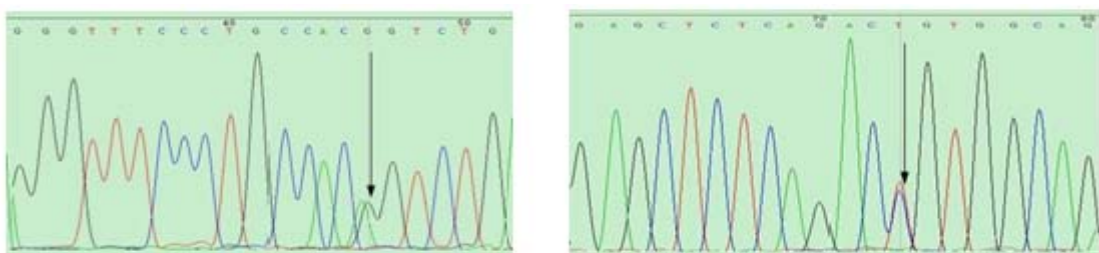


图 10 ER 基因 *Codon594* 测序图 (GA 型)

2.4 质量控制

2.4.1 现场调查工作质量控制

2.4.1.1 因调查中涉及到许多敏感性问题，为提高应答率及准确率，本研究中调查员均为文化程度较好的女性退休医务工作者，在调查之前，都进行统一的培训，传授隐私问题的询问技巧，考核合格后参加调查工作。

2.4.1.2 在调查开始之前，在工厂内进行广泛宣传，积极动员，使研究对象了解研究内容和研究对自身的利益及重要性；保持调查现场有序，问卷调查均在单独房间内采取一对一的方式进行；调查员提供月历卡以便研究对象回顾其一生中的重大生活事件。

2.4.1.3 调查结束后及时核查调查表，纠错补漏，保证调查表的完整性和准确性。

2.4.1.4 所有数据资料均输入计算机建立数据库，采用双人双遍核查录入，对两次录入的数据由第三人进行核对。如果发现有不一致的数据，由课题组织者统一查阅原始记录予以校正。

2.4.2 实验室工作质量控制

我们对 40 例标本 *ER PvuII*、*ER XbaI* 两个位点的 PCR 成功标本进行重复实验，对 15 个标本的 *ER Codon594* 位点进行测序。结果发现相同实验条件下的实验结果前后一致，测序结果与荧光定量 PCR 分子信标法检测结果亦一致。

2.5 数据录入与统计分析

用 Epidata 3.02 软件建立数据库，对现场数据和实验数据进行双遍录入并校对。之后应用 SAS 8.1 进行分析。

所有的资料分析采用双侧检验，第一类错误的概率都是 0.05（除非特别说明）。首先对双酚 A 职业暴露者和对照者的一般情况和职业因素进行描述，比较两组人群的一般人口学特征和暴露特征。对雌激素受体基因各位点进行 Hardy-Weinberg 检验。用 *t* 检验、秩和检验、协方差分析、卡方检验等方法分析双酚 A 暴露及基因多态对女性月经周期、性功能及女工子代生长发育的影响。研究变量的分组参考生物学逻辑截点或对照组四分位分布。

分析基因多态与双酚 A 暴露的联合危险度，将基因位点与是否双酚 A 暴露组合成两个模型。模型 1 中，基因分型设野生型为一个组合，突变杂合子和突变纯合子基因型为一个组合；在模型 2 中，基因分型以野生基因型和突变杂合子基因

型为一个组合，突变纯合子基因型为一个组合。模型 1 即野生型+对照组、野生型+双酚 A 暴露组、突变纯合子+突变杂合子+对照组、突变纯合子+突变杂合子+双酚 A 暴露组，分别估计其它三组与野生型+对照组（参比组）的相对危险度（RR）和 95%CI。模型 2 即野生型+突变杂合子+对照组、野生型+突变杂合子+双酚 A 暴露组、突变纯合子+对照组、突变纯合子+双酚 A 暴露组，分别估计其它三组与野生型+突变杂合子+对照组（参比组）的 RR 值和 95%CI。

采用 Cochran-Armitage 趋势检验对双酚 A 和基因多态联合作用对生殖功能减弱危险的 RR 变化趋势进行检验。再用 Rothman 的方法对双酚 A 和基因多态相加模型对生殖健康结局的协同作用进行检验，并计算相应的协同效应指数（S）。

$$S = \frac{R(AB) - R(\bar{A}\bar{B})}{[R(A\bar{B}) - R(\bar{A}\bar{B})] + [R(\bar{A}B) - R(\bar{A}\bar{B})]}$$

交互作用的显著性检验：设两暴露因素 A、B 之间的交互效应量为 T，根据相加模型，则 $T = R(AB) - R(A\bar{B}) - R(\bar{A}B) + R(\bar{A}\bar{B})$ 。如果 $T=0$ ，说明 A、B 两因素之间无相加模型交互作用；如果 $T \neq 0$ ，则说明 A、B 两因素之间存在相加模型交互作用。因此，交互作用显著性检验的无效假设为 $T=0$ ，显著性检验用下

$$U = \frac{T - 0}{\sqrt{\text{Var}(T)}}$$

$\text{Var}(T)$ 为 T 的方差，由下式计算：

$$\text{Var}(T) = \sum_{i=0}^1 \sum_{j=0}^1 \frac{R_{ij}(1 - R_{ij})}{N_{ij}}$$

式中 R_{ij} 为 A、B 两暴露因素各种不同暴露组合下的率， N_{ij} 为 A、B 两暴露因素各种不同暴露组合下的观察人数。

三 结果与分析

第一部分 双酚 A 暴露对研究人群的影响及基因多态性分布

本部分的研究内容：

- ◆研究对象的一般背景特征分析；
- ◆双酚 A 暴露对月经周期及性功能的影响；
- ◆双酚 A 暴露对子代发育的影响；
- ◆报告中国女性一般人群中 ER *PvuII*、ER *XbaI*、ER *Codon594* 及 ER *Codon325* 基因多态的分布频率；

3.1 研究对象的一般背景特征

本研究在浙江省宁波市、湖南省岳阳市、江苏省无锡市、宜兴市四个研究中心共招收到 432 名女性工人，其中双酚 A 暴露组 125 名，对照组 307 名。暴露组平均年龄为 34.58 ± 6.32 岁，平均工龄为 11.98 ± 7.48 年；对照组平均年龄为 35.30 ± 6.54 岁，平均工龄 12.77 ± 7.27 年，差别无统计学意义。表 3-1 显示：暴露组与对照组相比，在婚姻状况、人均月收入、疾病史等情况差别均无统计学意义，两组均衡可比。但暴露组与对照组的文化程度差异有统计学意义 ($\chi^2=6.93$, $P=0.0313$)，暴露组的文化程度高于对照组。

表 3-1 暴露组与对照组研究对象人口学特征比较

变量	对照 N (%)	暴露 N (%)	χ^2 值	P 值
研究中心				
宁波	1(0.32)	1(0.81)	5.65	0.1297
无锡	56(18.12)	25(20.33)		
岳阳	125(40.45)	61(49.59)		
宜兴	127(41.10)	36(29.27)		
年龄 (岁)				
<30	84(27.18)	34(27.64)	0.48	0.9227
30-35	75(24.27)	32(26.02)		
35-40	72(23.30)	25(20.33)		
>40	78(25.24)	32(26.02)		
文化程度				
小学及以下	25(8.14)	2(1.65)	6.93	0.0313*
初中、高中及中专	246(80.13)	100(82.64)		
大专及以上	36(11.73)	19(15.70)		
婚姻状况				
未婚	28(9.09)	9(7.32)	1.67	0.4332
在婚/同居	262(85.06)	110(89.43)		
丧偶/离异/分居	18(5.84)	4(3.25)		
工龄(年)				
≤3	64(21.62)	32(26.45)	4.05	0.2564
3-9	88(29.73)	42(34.71)		
9-14	78(26.35)	22(18.18)		
>14	66(22.30)	25(20.66)		
人均月收入 (元)				
≤300	148(47.90)	58(47.15)	0.69	0.8753
300-600	79(25.57)	28(22.76)		
600-1000	49(15.86)	22(17.89)		
>1000	33(10.68)	15(12.20)		
疾病史				
否	270(94.08)	114(92.68)	0.28	0.5957
是	17(5.92)	9(7.32)		

* $P < 0.05$

3.2 双酚 A 暴露对月经周期及性功能的影响

3.2.1 双酚 A 暴露对研究对象月经周期的影响

为更准确了解双酚 A 暴露对研究对象月经周期的影响，我们选择了最近 6 个月的月经周期是否规则、月经周期平均天数、月经周期最长天数、平均行经天数四个指标，与对照组进行比较分析。

3.2.1.1 月经周期规律性及平均天数的变化

把月经周期平均天数分为 ≤ 24 天、25-32天、33-40天及 ≥ 41 天四个组别。表 3-2 提示，最近 6 个月暴露组与对照组的月经周期是否规则的分布及月经周期平均天数差别无统计学意义。

表 3-2 对照组与暴露组研究对象月经周期是否规则及平均天数分布比较

变量	分组	对照组 N (%)	暴露组 N (%)	χ^2 值	P 值
月经周期是否规则	是	252(87.20)	99(86.09)	0.09	0.7655
	否	37(12.80)	16(13.91)		
月经周期平均天数	≤ 24	12(10.43)	28(9.69)	0.58	0.8999
	25-32	91(79.13)	223(77.16)		
	33-40	9(7.83)	29(10.03)		
	≥ 41	3(2.61)	9(3.11)		

3.2.1.2 月经周期最长天数及平均行经天数的变化

表 3-3 显示：最近 6 个月对照组的月经周期最长天数（ 31.89 ± 6.54 ）高于暴露组（ 30.47 ± 5.40 ），差别有统计学意义（ $t = -2.12, P = 0.0353$ ）。平均行经天数在暴露组与对照组之间差异无统计学意义。

表 3-3 对照组与暴露组研究对象月经周期最长天数及平均行经天数情况比较

变量	对照组 $\bar{x} \pm s$ (N)	暴露组 $\bar{x} \pm s$ (N)	t 值	P 值
月经周期最长天数	$31.89 \pm 6.54(278)$	$30.47 \pm 5.40(100)$	-2.12	0.0353*
平均行经天数	$5.49 \pm 1.60(284)$	$5.55 \pm 1.58(110)$	0.36	0.7163

* $P < 0.05$

3.2.2 双酚 A 暴露对研究对象性功能的影响

用最近 6 个月研究对象性生活中的相关感受度变化及性幻想次数来评估研究对象的性功能情况。

3.2.2.1 性生活中的相关感受度变化情况

表 3-4 显示:最近 6 个月暴露组与对照组研究对象性生活满意度变化差别无统计学意义。

性生活中享受程度的衡量标准为:以 0-5 为尺度,0 为根本没有,5 为非常享受。性享受程度变化定义为 0-2 为减弱,3-5 为不变或增强。未发现最近 6 个月暴露组与对照组研究对象性生活满意度变化之间的差别。

性生活中兴奋度的衡量标准为:以 0-5 为尺度,0 为根本没有,5 为非常兴奋;性兴奋度变化定义为 0-2 为减弱,3-5 为不变或增强。结果显示最近 6 个月暴露组与对照组研究对象性生活中的兴奋度变化差别无统计学意义。

性生活中性高潮的衡量标准为:以 0-5 为尺度,0 为根本没有,5 为非常强烈;性高潮的变化定义为 0-2 为减弱,3-5 为不变或增强。结果表明最近 6 个月暴露组与对照组研究对象性高潮变化差别未达到显著水平。

把性生活享受程度、兴奋度、高潮程度综合成一项指标,来综合衡量研究对象的性功能整体变化情况。定义为这三项指标中任一指标为弱则性功能定义为弱,3 项均强则性功能定义为强。表 3-4 显示:综合性功能的变化在暴露组和对照组间差别均无统计学意义。

表 3-4 对照组及暴露组研究对象性生活享受度变化情况比较

变量	组别	对照组 N(%)	暴露组 N(%)	χ^2 值	P 值
性生活满意度	不变或增强	202(85.23)	85(80.95)	0.99	0.3204
	减弱	35(14.77)	20(19.05)		
性生活享受度	不变或增强	225(94.94)	97(91.51)	1.50	0.2212
	减弱	12(5.06)	9(8.49)		
性生活兴奋度	不变或增强	220(93.22)	95(90.48)	0.78	0.3781
	减弱	16(6.78)	10(9.52)		
性高潮	不变或增强	291(92.41)	91(85.85)	3.62	0.0571
	减弱	18(7.59)	15(14.15)		
综合性功能	强	214(70.16)	91(29.84)	1.77	0.1837
	弱	22(59.46)	15(40.54)		

3.2.2.2 研究对象的性幻想频率(次/月)比较

表 3-5 显示：调整女工年龄及工龄，未发现最近 6 个月暴露组与对照组研究对象每月性幻想次数差异有统计学意义。

表 3-5 对照组及暴露组研究对象每月性幻想次数比较

对照组 $\bar{x} \pm s$ (N)	暴露组 $\bar{x} \pm s$ (N)	t 值	P 值	F*值	P*值
2.46 ± 3.60(146)	2.73 ± 3.83(98)	0.55	0.5807	0.06	0.8054

* 调整了年龄、工龄

3.3 女工子代的发育情况

子代暴露组与对照组的定义：若暴露组女工在孩子出生前 1 年已开始接触双酚 A 相关作业，且至调查时其子代已进入发育期，则将其设为暴露组；若调查时对照组女工的子代已进入发育期，则为对照组。

3.3.1 研究对象子代的性别分布

本研究中对照组女工子代共计 265 例，其中男性子代 147 例，女性子代 118 例；暴露组子代共计 115 例，男性子代 66 例，女性子代 49 例。子代性别分布在两组间差别无统计学意义(表 3-6)。

表 3-6 暴露组及对照组子代性别分布比较

性别	对照组 N(%)	暴露组 N(%)	χ^2 值	P 值
男	147(69.01)	66(30.99)	0.12	0.7291
女	118(70.66)	49(29.34)		

3.3.2 子代男孩的生理发育情况

比较暴露组和对照组子代中男孩的生理发育情况，调整子代的年龄。表 3-7 显示：暴露组与对照组子代男孩在开始长胡子、开始变声、遗精的年龄无显著性差异，但在开始长腋毛的年龄差异有统计学意义 ($P=0.0083$)，开始长阴毛的年龄差异也接近统计学水平 ($P=0.0805$)，暴露组的年龄晚于对照组。对 Tanner 图的分析显示，发育至 Tanner 1 期、Tanner 2 期、Tanner 3 期 及 Tanner 4 期的年龄两组之间差异有统计学意义(P 值分别为：0.0012、0.0298、0.0248、0.0466)，暴露组均晚于对照组，但发育至 Tanner 5 期的年龄在两组间无显著性差异。

表 3-7 女工子代的男孩发育年龄的比较

变量	对照组 $\bar{x} \pm s$ (N)	暴露组 $\bar{x} \pm s$ (N)	P 值	P*值
开始长阴毛 (岁)	14.52±1.66(25)	15.41±1.65(22)	0.0730	0.0805
开始长腋毛 (岁)	15.00±1.73(27)	16.50±1.69(18)	0.0063	0.0083*
开始长胡子 (岁)	16.70±2.18(47)	17.05±1.57(20)	0.5208	0.4303
开始变声 (岁)	14.90±1.73(61)	15.48±1.45(25)	0.1445	0.1253
开始遗精 (岁)	16.24±1.60(17)	16.85±2.27(13)	0.3941	0.2416
Tanner 1 期 (岁)	10.45±2.78(20)	14.40±1.80(15)	<0.0001	0.0012*
Tanner 2 期 (岁)	13.50±2.06(20)	15.07±1.21(14)	0.0157	0.0298*
Tanner 3 期 (岁)	14.77±1.56(17)	15.93±1.38(14)	0.0383	0.0248*
Tanner 4 期 (岁)	15.87±1.55(15)	17.10±1.29(10)	0.0491	0.0466*
Tanner 5 期 (岁)	17.50±1.65(10)	18.00±1.50(9)	0.5006	0.4448

* $P < 0.05$ 调整了子代的年龄

3.3.3 子代女孩的生理发育情况

表 3-8 显示：调整子代的年龄因素后，暴露组与对照组子代女孩在月经初潮、开始长阴毛、开始长腋毛、发育至 Tanner 1 期、Tanner 2 期、Tanner 3 期、Tanner 4 期的年龄差异均无统计学意义，但乳房发育及发育至 Tanner 5 期的年龄两组间差异接近统计学水平（ P 值分别为 0.0881 和 0.0753），暴露组的年龄早于对照组。

表 3-8 女工子代的女孩发育年龄的比较

变量	对照组 $\bar{x} \pm s$ (N)	暴露组 $\bar{x} \pm s$ (N)	P 值	P*值
月经初潮 (岁)	13.71±1.97(48)	13.61±1.46(18)	0.8495	0.8626
乳房发育 (岁)	12.88±2.07(50)	12.00±1.41(20)	0.0856	0.0881
开始长阴毛 (岁)	14.11±1.54(37)	14.07±1.71(15)	0.9325	0.7873
开始长腋毛 (岁)	14.82±1.72(33)	14.36±2.11(11)	0.4777	0.7775
Tanner 1 期 (岁)	11.54±1.70(35)	12.00±1.65(15)	0.3844	0.4455
Tanner 2 期 (岁)	13.27±1.52(34)	13.44±1.89(18)	0.7111	0.5876
Tanner 3 期 (岁)	15.07±1.60(30)	14.75±1.82(12)	0.5794	0.4351
Tanner 4 期 (岁)	17.05±1.87(19)	16.40±1.65(10)	0.3612	0.2746
Tanner 5 期 (岁)	19.50±3.06(12)	17.83±1.33(6)	0.2254	0.0753

* 调整了子代的年龄

3.4 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态分型在人群中的分布及比较

表 3-9 显示：经检验四个位点基因频率分布均不拒绝 H-W 遗传平衡假设，具有群体代表性。*ER PvuII* 位点 Pp 基因型频率为 44.76%，pp 为 38.93%，PP 为 16.32%；*ER XbaI* 位点 xx 型为 45.45%，Xx 型为 41.49%，XX 型为 13.05%；*ER Codon594* 位点 GG 型为 60.84%，GA 型为 32.87%，AA 型为 6.29%；*ER Codon325* 位点 CG 型为 55.19%，CC 型为 24.82%，GG 型为 21.99%。

表 3-9 本研究人群 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 频率分布

基因位点	样本量	基因频率 N(%)			等位基因频率 N(%)		H-W 检验	
		PP	Pp	pp	P	p	χ^2	P 值
<i>ER PvuII</i>	429	70 (16.32)	192 (44.76)	167 (38.93)	166 (38.70)	263 (61.30)	1.38	0.24
<i>ER XbaI</i>	429	XX 56 (13.05)	Xx 178 (41.49)	xx 195 (45.45)	X 145 (33.80)	x 284 (66.20)	2.28	0.13
<i>ER Codon594</i>	429	GG 261 (60.84)	GA 141 (32.87)	AA 27 (6.29)	G 331 (77.28)	A 98 (22.72)	1.77	0.18
<i>ER Codon325</i>	423	CC 105 (24.82)	CG 225 (53.19)	GG 93 (21.99)	C 217 (51.42)	G 206 (48.58)	1.78	0.18

表 3-10 显示：中国人群与日本、匈牙利及美国人群 *ER PvuII* 多态位点分布差异有统计学意义。但 Pp 及 PP 基因型所占比例与中国女性人群接近；*ER XbaI* 多态位点在中国女性人群中以 GG 基因型最高，AA 基因型最低，未发现与美国人群的分布差异，与匈牙利、日本人群分布频率差异显著。中国女性人群 *ER Codon594* 位点的多态分布与美国、德国、日本人群相比差异无统计学意义；*ER Codon325* 位点中国人群与日本、美国、德国人群分布频率差异均有统计学意义。

表 3-10 不同人群 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 频率分布比较

位点	人群 (N)	基因频率 N(%)			<i>P</i> * 值	等位基因 N(%)	
		PP	Pp	pp		P	p
<i>ER PvuII</i>							
		PP	Pp	pp		P	p
	日本(238) ^[52]	46(19.3)	122(51.3)	70(29.4)	0.0480	107(45.0)	131(55.0)
	美国(448) ^[53]	100(22.4)	207(46.3)	140(31.3)	0.0196	204(45.6)	244(54.4)
	匈牙利(138) ^[54]	30(22.0)	78(56.0)	30(22.0)	0.0011	69(50.0)	69(50.0)
	中国(429)	70(16.3)	192(44.8)	167(38.9)		166(38.7)	263(61.3)
<i>ER XbaI</i>							
		XX	Xx	xx		X	x
	日本(318) ^[55]	9(2.8)	98(30.8)	211(66.4)	<0.0001	58(18.2)	260(81.8)
	美国(448) ^[53]	68(15.2)	191(42.6)	189(42.2)	0.5215	164(36.5)	284(63.5)
	匈牙利(138) ^[54]	19(14.0)	89(64.0)	30(22.0)	<0.0001	63(46.0)	75(54.0)
	中国(429)	56(13.1)	178(41.5)	195(45.4)		145(33.8)	284(66.2)
<i>ER Codon594</i>							
		GG	GA	AA		G	A
	日本(200) ^[56]	129(64.5)	55(27.5)	16(8.0)	0.3436	313(78.3)	87(21.3)
	美国(200) ^[56]	119(59.5)	62(31.0)	19(9.5)	0.3490	300(75.0)	100(25.0)
	德国(112) ^[56]	69(61.6)	33(29.5)	10(8.9)	0.5407	171(76.3)	53(23.7)
	中国(429)	261(60.8)	141(32.9)	27(6.3)		331(77.3)	98(22.7)
<i>ER Codon325</i>							
		CC	CG	GG		C	G
	日本(200) ^[56]	53(26.5)	87(43.5)	60(30.0)	0.0440	193(48.2)	207(51.8)
	美国(200) ^[56]	95(47.5)	86(43.0)	19(9.5)	<0.0001	276(69.0)	124(31.0)
	德国(112) ^[56]	39(34.8)	46(41.1)	27(24.1)	0.0489	124(55.4)	100(44.6)
	中国(423)	105(24.8)	225(53.2)	93(22.0)		217(51.4)	206(48.6)

*中国人群各位点基因分型频率为本研究数据；均以中国人群分布频率与其它人群进行比较

四 结果与分析

第二部分 基因多态与双酚 A 暴露的联合危险度估计

本部分的研究内容是：

- ◆分析四个位点多态与月经周期、性功能的关系；
- ◆分析基因位点多态与双酚 A 暴露对生殖功能影响的联合危险度，分别用 Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 方法进行检验；

4.1 双酚 A 暴露组与对照组中不同基因分型频率分布

表 4-1 显示：双酚 A 暴露组与对照组中 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个多态位点不同基因分型频率分布差别无统计学意义；经 Hardy-Weiberg 平衡定律检验，四个位点基因在暴露组及对照组中频率分布均不拒绝 H-W 遗传平衡的假设，具有群体代表性。

表 4-1 双酚 AA 暴露组与对照组中各多态位点基因分型的频率分布

多态位点	BPA 暴露	基因型频率 N(%)			H-W 比例 (<i>P</i> 值)	基因型分布 (<i>P</i> 值) *
		PP	Pp	pp		
<i>ER PvuII</i>	是	18(14.63)	57(46.34)	48(39.02)	0.8718	0.8201
	否	52(16.99)	135(44.12)	119(38.89)	0.2003	
<i>ER XbaI</i>		XX	Xx	xx		
	是	13(10.57)	55(44.72)	55(44.72)	0.8911	0.5305
否	43(14.05)	123(40.20)	140(45.75)	0.0630		
<i>ER Codon594</i>		GG	GA	AA		
	是	70(56.91)	41(33.33)	12(9.76)	0.1135	0.1546
否	191(62.42)	100(32.68)	15(4.90)	0.6836		
<i>ER Codon325</i>		CC	CG	GG		
	是	31(25.20)	64(52.03)	28(22.76)	0.6472	0.9504
否	74(24.67)	161(53.67)	65(21.67)	0.1981		

* BPA 暴露组和对照组的基因型分布的比较

4.2 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态分型与月经周期相关指标的关系

我们用最近 6 个月的月经相关指标，分别分析双酚 A 暴露组与对照组月经周期相关指标变化与基因分型分布之间的关系。表 4-2 至表 4-9 显示：未发现双酚 A 暴露组与对照组的 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态位点基因型分布在月经周期是否规则、月经周期平均天数、最长月经周期天数及平均月经天数的差别有统计学意义。

表 4-2 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月月经周期是否规则的关系

多态位点	月经周期是否规则	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	否	3(18.75)	8(50.00)	5(31.25)	0.40	0.8172
	是	14(14.14)	47(47.47)	38(38.38)		
<i>ER XbaI</i>	否	2(12.50)	7(43.75)	7(43.75)	0.19	0.9090
	是	9(9.09)	44(44.44)	46(46.46)		
<i>ER Codon594</i>	否	12(75.00)	0(0.00)	4(25.00)	3.43	0.1803
	是	53(53.54)	12(12.12)	34(34.34)		
<i>ER Codon325</i>	否	5(31.25)	3(18.75)	8(50.00)	0.26	0.8770
	是	25(25.25)	21(21.21)	53(53.54)		

表 4-3 对照组基因多态与最近 6 个月月经周期是否规则的关系

多态位点	月经周期 是否规则	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	否	6(16.22)	16(43.24)	15(40.54)	0.10	0.9515
	是	44(17.60)	111(44.40)	95(38.00)		
<i>ER XbaI</i>	否	4(10.81)	16(43.24)	17(45.95)	0.66	0.7195
	是	38(15.20)	95(38.00)	117(46.80)		
<i>ER Codon594</i>	否	27(72.97)	3(5.41)	8(21.62)	2.40	0.3017
	是	152(60.80)	12 (4.80)	86(34.40)		
<i>ER Codon325</i>	否	8(21.62)	6(16.22)	23(62.16)	1.20	0.5477
	是	63(25.71)	53(21.63)	129(52.65)		

表 4-4 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月月经周期平均天数的关系

多态位点	月经周期 平均天数	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	<=24	5(41.67)	4(33.33)	3(25.00)	11.89	0.0644
	25-32	10(10.99)	48(52.75)	33(36.26)		
	33-40	2(22.22)	2(22.22)	5(55.56)		
	>=41	0(0.00)	1(33.33)	2(66.67)		
<i>ER XbaI</i>	<=24	3(25.00)	4(33.33)	5(41.67)	8.23	0.2215
	25-32	8(8.79)	43(47.25)	40(43.96)		
	33-40	0(0.00)	2(22.22)	7(77.78)		
	>=41	0(0.00)	2(66.67)	1(33.33)		
<i>ER Codon594</i>	<=24	5(41.67)	3(25.00)	4(33.33)	7.38	0.2872
	25-32	53(58.24)	7(7.69)	31(34.07)		
	33-40	4(44.44)	2(22.22)	3(33.33)		
	>=41	3(100.00)	0(0.00)	0(0.00)		
<i>ER Codon325</i>	<=24	2(16.67)	2(16.67)	8(66.67)	10.02	0.1236
	25-32	23(25.27)	20(21.98)	48(52.75)		
	33-40	5(55.56)	0(0.00)	4(44.44)		
	>=41	0(0.00)	2(66.67)	1(33.33)		

表 4-5 对照组基因多态与最近 6 个月月经周期平均天数的关系

多态位点	月经周期 平均天数	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	<=24	6(21.43)	9(32.14)	13(46.43)	4.46	0.6148
	25-32	38(17.27)	96(43.64)	86(39.09)		
	33-40	4(13.79)	17(58.62)	8(27.59)		
	>=41	2(20.00)	5(50.00)	3(30.00)		
<i>ER XbaI</i>	<=24	2(7.14)	16(57.14)	10(35.71)	7.59	0.2694
	25-32	37(16.82)	80(36.36)	103(46.82)		
	33-40	3(10.34)	11(37.93)	15(51.72)		
	>=41	0(0.00)	5(50.00)	5(50.00)		
<i>ER Codon594</i>	<=24	18(64.29)	1(3.57)	9(32.14)	3.37	0.7611
	25-32	141(64.09)	10(4.55)	69(31.36)		
	33-40	16(55.17)	2(6.90)	11(37.93)		
	>=41	4(40.00)	1(10.00)	5(50.00)		
<i>ER Codon325</i>	<=24	7(25.93)	9(33.33)	11(40.74)	3.73	0.7135
	25-32	55(25.46)	41(18.98)	120(55.56)		
	33-40	7(24.14)	7(24.14)	15(51.72)		
	>=41	2(20.00)	2(20.00)	6(60.00)		

表 4-6 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月最长月经周期天数 (天) 的关系

多态位点	$\bar{x} \pm s$ (N)	F 值	P 值	
<i>ER PvuII</i>	PP	30.33 ± 4.85(15)	0.33	0.8500
	Pp	30.78 ± 6.52(45)		
	pp	30.18 ± 4.19(40)		
<i>ER XbaI</i>	XX	29.33 ± 4.27(9)	0.98	0.6107
	Xx	31.17 ± 6.40(47)		
	xx	29.95 ± 4.36(44)		
<i>ER Codon594</i>	GG	30.85 ± 6.13(61)	0.76	0.6832
	GA	30.10 ± 9.97(31)		
	AA	29.00 ± 4.41(8)		
<i>ER Codon325</i>	CC	30.38 ± 4.36(26)	0.61	0.7378
	CG	30.81 ± 5.82(54)		
	GG	29.65 ± 5.62(20)		

表 4-7 对照组基因多态与最近 6 个月最长月经周期天数（天）的关系

多态位点		$\bar{x} \pm s$ (N)	F 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	PP	31.94 ± 7.13(48)	3.52	0.1721
	Pp	32.51 ± 6.52(122)		
	pp	31.20 ± 6.36(105)		
<i>ER XbaI</i>	XX	31.12 ± 4.06(41)	0.33	0.8460
	Xx	32.09 ± 6.85(105)		
	xx	32.02 ± 7.00(129)		
<i>ER Codon594</i>	GG	31.69 ± 6.29(171)	0.78	0.6776
	GA	31.69 ± 5.99(90)		
	AA	36.00 ± 11.34(14)		
<i>ER Codon325</i>	CC	32.21 ± 7.09(67)	0.36	0.8372
	CG	32.04 ± 6.81(146)		
	GG	31.47 ± 5.54(57)		

表 4-8 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月平均行经天数的关系

多态位点		$\bar{x} \pm s$ (N)	F 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	PP	5.29 ± 1.21(17)	1.19	0.5509
	Pp	5.62 ± 1.84(53)		
	pp	5.36 ± 1.66(42)		
<i>ER XbaI</i>	XX	4.91 ± 1.38(11)	3.89	0.1429
	Xx	5.35 ± 1.59(49)		
	xx	5.71 ± 1.82(52)		
<i>ER Codon594</i>	GG	5.15 ± 1.72(62)	5.68	0.0585
	GA	5.87 ± 1.66(38)		
	AA	5.92 ± 1.31(12)		
<i>ER Codon325</i>	CC	5.53 ± 1.38(30)	0.07	0.9646
	CG	5.50 ± 1.58(58)		
	GG	5.33 ± 2.26(24)		

表 4-9 对照组基因多态与最近 6 个月平均行经天数的关系

多态位点		$\bar{x} \pm s (N)$	F 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	PP	5.32 ± 1.53(50)	0.26	0.8798
	Pp	5.43 ± 1.53(124)		
	pp	5.55 ± 1.81(110)		
<i>ER XbaI</i>	XX	5.61 ± 1.58(41)	0.58	0.7479
	Xx	5.33 ± 1.61(111)		
	xx	5.51 ± 1.68(132)		
<i>ER Codon594</i>	GG	5.37 ± 1.66(177)	1.40	0.4967
	GA	5.56 ± 1.63(94)		
	AA	5.77 ± 1.36(13)		
<i>ER Codon325</i>	CC	5.24 ± 1.30(71)	2.12	0.3469
	CG	5.62 ± 1.68(150)		
	GG	5.36 ± 1.84(58)		

4.3 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态分型与性功能相关指标变化的关系

表 4-10 至表 4-17 显示：最近 6 个月双酚 A 暴露组及对照组的 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 位点基因分型在研究对象性生活满意度、性生活中的享受程度、兴奋度、性高潮变化程度间的分布差别均无统计学意义。

表 4-18 显示：在双酚 A 暴露组，*ER PvuII* 位点 PP 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 6.67%和 15.38%；Pp 基因型在两组中的频率分别为 40.00%和 50.55%；pp 基因型在两组中频率分别为 53.33%和 34.07%。*ER XbaI* 位点 XX 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 6.67%和 9.89%；Xx 基因型在两组中的频率分别为 46.67%和 43.96%；xx 基因型在两组中频率分别为 46.67%和 46.15%。*ER Codon594* 位点 AA 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 0%和 10.99%；AG 基因型在两组中的频率分别为 40.00%和 31.87%；GG 基因型在两组中频率分别为 60.00%和 57.14%。*ER Codon325* 位点 CC 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 33.33%和 19.78%；CG 基因型在两组中的频率分别为 40.00%和 53.85%；GG 基因型在两组

中频率分别为 26.67%和 26.37%。差别无统计学意义。

表 4-19 显示：对照组的 *ER PvuII* 位点 PP 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 27.27%和 15.57%；Pp 基因型在两组中的频率分别为 27.27%和 43.87%；pp 基因型在两组中频率分别为 45.45%和 40.57%。*ER XbaI* 位点 XX 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 9.09%和 13.21%；Xx 基因型在两组中的频率分别为 27.27%和 40.57%；xx 基因型在两组中频率分别为 63.64%和 46.23%。*ER Codon594* 位点 AA 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 0%和 5.19%；AG 基因型在两组中的频率分别为 31.82%和 33.49%；GG 基因型在两组中频率分别为 68.18%和 61.32%。*ER Codon325* 位点 CC 基因型在综合性功能评估减弱组和增强组中的频率分别为 33.33%和 20.19%；CG 基因型在两组中的频率分别为 42.86%和 54.33%；GG 基因型在两组中频率分别为 25.48%和 23.81%。差别均未达到显著性水平。

表 4-20 及表 4-21 表明：调整了研究对象的年龄后，在双酚 A 暴露组及对照组，*ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态位点不同基因分型在研究对象性幻想次数的分布上差别无统计学意义。

表 4-10 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月性生活满意度的关系

多态位点	性生活满意度变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	12(14.12)	43(50.59)	30(35.29)	0.79	0.6729
	减弱	3(15.00)	8(40.00)	9(45.00)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	9(10.59)	36 (42.35)	40(47.06)	1.29	0.5257
	减弱	1(5.00)	11(55.00)	8(40.00)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	9(10.59)	27(31.76)	49(57.65)	0.88	0.6440
	减弱	1(5.00)	8(40.00)	11(55.00)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	17(20.00)	45(52.94)	23(27.06)	2.16	0.3402
	减弱	7(35.00)	8(40.00)	5(25.00)		

表 4-11 对照组基因多态与最近 6 个月性生活满意度的关系

多态位点	性生活满意度变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	34(17.00)	82(41.00)	84(42.00)	0.32	0.8523
	减弱	5(14.29)	16(45.71)	14(40.00)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	24(12.00)	79(39.50)	97(48.50)	0.17	0.9192
	减弱	5(14.29)	13(37.14)	17(48.57)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	9(4.50)	71(35.50)	120(60.00)	3.23	0.1991
	减弱	2(5.71)	7(20.00)	26(74.29)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	45(22.96)	101(51.53)	50(25.51)	1.53	0.4665
	减弱	5(14.71)	21(61.76)	8(23.53)		

表 4-12 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月性生活中性享受程度的关系

多态位点	性享受程度变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	14(14.43)	49(50.52)	34(35.05)	1.50	0.4721
	减弱	1(11.11)	3(33.33)	5(55.56)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	9(9.28)	44(45.36)	44(45.36)	0.48	0.7854
	减弱	1(11.11)	3(33.33)	5(55.56)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	10(10.31)	30(30.93)	57(58.76)	2.73	0.4130
	减弱	0(0.00)	5(55.56)	4(44.44)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	20(20.62)	53(54.64)	24(24.74)	3.49	0.1745
	减弱	3(33.33)	2(22.22)	4(44.44)		

*性生活中享受程度的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常享受；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-13 对照组基因多态与最近 6 个月性生活中性享受程度的关系

多态位点	性享受程 度变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	37(16.59)	97(43.50)	89(39.91)	3.92	0.1408
	减弱	2(16.67)	2(16.67)	8(66.67)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	30(13.45)	88(39.46)	105(47.09)	2.63	0.2683
	减弱	0(0.00)	4(33.33)	8(66.67)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	11(4.93)	73(32.74)	139(62.33)	0.89	0.6393
	减弱	0(0.00)	5(41.67)	7(58.33)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	46(21.00)	118(53.88)	55(25.11)	1.76	0.4144
	减弱	4(36.36)	4(36.36)	3(27.27)		

*性生活中享受程度的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常享受；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-14 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月性生活中兴奋度的关系

多态位点	兴奋度 变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	14(14.74)	48(50.53)	33(34.74)	2.48	0.2892
	减弱	1(10.00)	3(30.00)	6(60.00)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	9(9.47)	44(46.32)	42(44.21)	1.03	0.5963
	减弱	1(10.00)	3(30.00)	6(60.00)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	10(10.53)	29(30.53)	56(58.95)	2.24	0.3268
	减弱	0(0.00)	5(50.00)	5(50.00)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	19(20.00)	52(54.74)	24(25.26)	2.23	0.3286
	减弱	3(30.00)	3(30.00)	4(40.00)		

*性生活中兴奋度的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常兴奋；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-15 对照组基因多态与最近 6 个月性生活中兴奋度的关系

多态位点	兴奋度 变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	36(16.51)	94(43.12)	88(40.37)	0.88	0.6446
	减弱	3(18.75)	5(31.25)	8(50.00)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	30(13.76)	86(39.45)	102(46.79)	2.98	0.2248
	减弱	0(0.00)	6(37.50)	10(62.50)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	11(5.05)	72(33.03)	135(61.93)	0.89	0.6384
	减弱	0(0.00)	6(37.50)	10(62.50)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	42(19.63)	117(54.67)	55(25.70)	6.16	0.0594
	减弱	7(46.67)	5(33.33)	3(20.00)		

*性生活中兴奋度的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常兴奋；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-16 双酚 A 暴露组基因多态与最近 6 个月性生活中性高潮的关系

多态位点	性高潮 变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	14(15.38)	46(50.55)	31(34.07)	2.28	0.3193
	减弱	1(6.67)	6(40.00)	8(53.33)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	9(9.89)	40(43.96)	42(46.15)	0.16	0.9213
	减弱	1(6.67)	7(46.67)	7(46.67)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	10(10.99)	29(31.87)	52(57.14)	1.92	0.3820
	减弱	0(0.00)	6(40.00)	9(60.00)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	18(19.78)	49(53.85)	24(26.37)	1.57	0.4569
	减弱	5(33.33)	6(40.00)	4(26.67)		

*性生活中性高潮的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常强烈；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-17 对照组基因多态与最近 6 个月性生活中性高潮的关系

多态位点	性高潮 变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	不变或增强	33(15.21)	94(43.32)	90(41.47)	4.27	0.1182
	减弱	6(33.33)	5(27.78)	7(38.89)		
<i>ER XbaI</i>	不变或增强	28(12.90)	87(40.09)	102(47.00)	1.37	0.5032
	减弱	2(11.11)	5(27.78)	11(61.11)		
<i>ER Codon594</i>	不变或增强	11(5.07)	71(32.72)	135(62.21)	1.10	0.5751
	减弱	0(0.00)	7(38.89)	11(61.11)		
<i>ER Codon325</i>	不变或增强	45(21.13)	115(53.99)	53(24.88)	1.11	0.5733
	减弱	5(29.41)	7(41.18)	5(29.41)		

*性生活中性高潮的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常强烈；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强

表 4-18 双酚 A 暴露组基因多态与综合性功能的关系

多态位点	性功能 变化	野生型 N(%)	杂合子 N(%)	纯合子 N(%)	χ^2 值	P 值
<i>ER PvuII</i>	强	14(15.38)	46(50.55)	31(34.07)	2.28	0.3193
	弱	1(6.67)	6(40.00)	8(53.33)		
<i>ER XbaI</i>	强	9(9.89)	40(43.96)	42(46.15)	0.16	0.9213
	弱	1(6.67)	7(46.67)	7(46.67)		
<i>ER Codon594</i>	强	10(10.99)	29(31.87)	52(57.14)	1.92	0.3820
	弱	0(0.00)	6(40.00)	9(60.00)		
<i>ER Codon325</i>	强	18(19.78)	49(53.85)	24(26.37)	1.56	0.4569
	弱	5(33.33)	6(40.00)	4(26.67)		

*把性生活享受程度、兴奋度、高潮程度汇合成一项综合性功能指标，3 项指标中任一指标为弱的定义为弱，3 项均强的定义为强

表 4-19 对照组基因多态与综合性功能的关系

多态位点	性功能	野生型	杂合子	纯合子	χ^2 值	P 值
	变化	N(%)	N(%)	N(%)		
<i>ER PvuII</i>	强	33(15.57)	93(43.87)	86(40.57)	3.05	0.2174
	弱	6(27.27)	6(27.27)	10(45.45)		
<i>ER XbaI</i>	强	28(13.21)	86(40.57)	98(46.23)	2.42	0.2980
	弱	2(9.09)	6(27.27)	14(63.64)		
<i>ER Codon594</i>	强	11(5.19)	71(33.49)	130(61.32)	1.30	0.5195
	弱	0(0.00)	7(31.82)	15(68.18)		
<i>ER Codon325</i>	强	42(20.19)	113(54.33)	53(25.48)	2.03	0.3621
	弱	7(33.33)	9(42.86)	5(23.81)		

*把性生活享受程度、兴奋度、高潮程度汇合成一项综合性功能指标，3 项指标中任一指标为弱的定义为弱，3 项均强的定义为强

表 4-20 双酚 A 暴露组不同基因分型研究对象最近 6 个月性幻想次数比较

多态位点	野生型	杂合子	纯合子	P 值	P* 值
	$\bar{x} \pm s$ (N)	$\bar{x} \pm s$ (N)	$\bar{x} \pm s$ (N)		
<i>ER PvuII</i>	1.79 ± 2.94(14)	2.42 ± 4.02(48)	3.50 ± 3.81(36)	0.2725	0.2948
<i>ER XbaI</i>	3.80 ± 6.21(10)	2.62 ± 3.45(44)	2.59 ± 3.57(44)	0.9405	0.6341
<i>ER Codon594</i>	2.42 ± 3.19(10)	2.28 ± 3.08(33)	3.05 ± 4.33(55)	0.8763	0.6317
<i>ER Codon325</i>	2.79 ± 4.29(22)	2.90 ± 3.96(52)	2.29 ± 3.16(24)	0.8371	0.8320

*调整了年龄

表 4-21 对照组不同基因分型研究对象最近 6 个月性幻想次数比较

多态位点	野生型	杂合子	纯合子	P 值	P* 值
	$\bar{x} \pm s$ (N)	$\bar{x} \pm s$ (N)	$\bar{x} \pm s$ (N)		
<i>ER PvuII</i>	2.56 ± 2.18(24)	2.08 ± 2.76(63)	2.83 ± 4.70(59)	0.3607	0.5541
<i>ER XbaI</i>	3.29 ± 3.34(14)	2.50 ± 4.56(52)	2.29 ± 2.89(80)	0.3391	0.6423
<i>ER Codon594</i>	3.02 ± 4.64(8)	2.94 ± 4.86(50)	2.14 ± 2.51(88)	0.9390	0.4244
<i>ER Codon325</i>	2.53 ± 2.59(32)	2.79 ± 4.42(74)	1.90 ± 2.43(37)	0.5010	0.4670

* 调整了年龄

4.4 基因位点多态与双酚 A 暴露的联合危险度估计

本部分主要估计 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 单个基因位点多态与双酚 A 暴露对生殖功能指标的联合危险度。进行 Cochran-Armitage 趋势检验，并用 Rothman 的方法计算相加模型交互作用测量指标（效应指数 S 值）并对其进行显著性检验。

4.4.1 基因多态与双酚 A 暴露对月经周期改变的联合危险度估计

估计基因多态与双酚 A 暴露对月经周期不规则的联合相对危险度。表 4-22 显示：在模型 1 中，Cochran-Armitage 检验四个位点多态与双酚 A 暴露对月经周期不规则的影响均无联合作用的趋势；Rothman 方法计算基因 *ER Codon594* 位点 GA 或 AA 基因型与双酚 A 暴露有联合作用，与参照组相比 RR 值为 1.09（95%CI：0.28-4.24），效应指数 S 值为-0.09，相加模型检验有统计学意义（ $P=0.03$ ）。未发现双酚 A 暴露与其它位点基因型对月经周期不规律的联合危险作用。

在模型 2 中，Cochran-Armitage 检验 *ER Codon594* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期不规律的危险有联合作用的趋势（ $P=0.0425$ ）。仅暴露于双酚 A 的 RR 为 0.86（0.28-2.62），携带突变纯合子的 RR 为 1.63（0.82-3.23），既暴露于双酚 A 又携带突变纯合子人群月经周期不规律的 RR 为 1.99（0.91-4.35）。Rothman 方法计算均未发现双酚 A 暴露与四个位点基因型对月经周期不规律有联合作用。

表 4-22 多态位点与双酚 A 暴露对月经周期性的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.09(0.48-2.47)	1.00(ref)	1.10(0.60-2.02)
<i>PvuII</i>	暴露组	1.47(0.41-5.29)	1.11(0.45-2.73) ^a	1.23(0.63-2.40)	0.94(0.38-2.33) ^b
	趋势检验		$P=0.9329$		$P=0.9455$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.41(0.53-3.79)	1.00(ref)	0.97(0.53-1.77)
<i>XbaI</i>	暴露组	1.91(0.40-9.10)	1.41(0.49-4.05) ^c	1.11(0.54-2.30)	1.01(0.45-2.25) ^d
	趋势检验		$P=0.6209$		$P=0.9494$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.90(0.24-3.36)	1.00(ref)	1.63(0.82-3.23)
<i>Codon</i> <i>594</i>	暴露组	-	1.09(0.28-4.24) ^e	0.86(0.28-2.62)	1.99(0.91-4.35) ^f
	趋势检验		$P=0.3897$		$P=0.0425$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.37(0.60-3.12)	1.00(ref)	0.82(0.39-1.71)
<i>Codon</i> <i>325</i>	暴露组	1.23(0.33-4.52)	1.40(0.57-3.49) ^g	0.94(0.49-1.80)	1.21(0.51-2.89) ^h
	趋势检验		$P=0.6259$		$P=0.7227$

* Rothman 方法计算及检验 a :S=0.18, u=-0.64,P=0.26
 c: S=0.30, u=-0.83,P=0.20
 e: S=-0.09, u=1.87,P=0.03
 g: S=0.69, u=-0.26,P=0.40

b: S=-0.19,u=-0.80,P=0.21
 d: S=0.13, u=-0.16,P=0.44
 f: S=2.06, u=0.83,P=0.20
 h: S=-0.94,u=0.88,P=0.19

参照对照组最近 6 个月月经周期平均天数的分布，以 25 天为截断点，把最近 6 个月月经周期平均天数转换为两分类变量，估计基因多态与双酚 A 暴露对月经周期平均天数变短的联合相对危险度。表 4-23 显示：在模型 1 中，Cochran-

Armitage 检验四个位点多态与双酚 A 暴露对月经周期平均天数的影响均无联合作用的趋势；Rothman 方法计算发现基因 *ER PvuII* 的基因型 Pp 或 pp 及 *ER XbaI* 位点基因型 Xx 或 xx 与双酚 A 暴露有联合作用。与参照组相比 *ER PvuII* 位点的 RR 值为 0.70 (95%CI: 0.23-2.09)，效应指数 S 值为-0.13，相加模型检验有统计学意义 ($P=0.01$)。与参照组相比 *ER XbaI* 位点的 RR 值为 1.82 (95%CI: 0.41-8.06)，效应指数 S 值为 0.11，相加模型检验有统计学意义 ($P=0.01$)。其它两个位点未发现与双酚 A 暴露对月经周期天数有联合作用。

在模型 2 中，四个位点多态与双酚 A 暴露对月经周期平均天数变短均未发现

有联合作用的趋势；Rothman 方法计算发现基因 *ER PvuII* 的基因型 pp 基因型与双酚 A 暴露对月经周期平均天数变短有联合作用。与参照组相比 RR 值为 0.87 (95%CI: 0.26-2.90)，效应指数 S 值为 -0.12，相加模型检验达到显著水平 ($P=0.049$)。未发现其它位点与双酚 A 暴露对月经周期天数改变有联合作用。

表 4-23 多态位点与双酚 A 暴露对月经周期天数的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER PvuII</i>	对照组	1.00(ref)	0.91(0.36-2.29)	1.00(ref)	1.48(0.72-3.02)
	暴露组	2.88(0.95-8.75)	0.70(0.23-2.09) ^a	1.56(0.71-3.45)	0.87(0.26-2.90) ^b
	趋势检验		$P=0.2248$		$P=0.6411$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER XbaI</i>	对照组	1.00(ref)	2.16(0.53-8.78)	1.00(ref)	0.67(0.32-1.42)
	暴露组	5.73(1.09-30.17)	1.82(0.41-8.06) ^c	1.01(0.44-2.31)	0.84(0.33-2.17) ^d
	趋势检验		$P=0.8220$		$P=0.3980$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER Codon 594</i>	对照组	1.00(ref)	1.34(0.20-9.20)	1.00(ref)	1.20(0.56-2.58)
	暴露组	3.50(0.42-29.39)	1.22(0.17-8.94) ^e	1.66(0.66-4.21)	0.91(0.32-2.61) ^f
	趋势检验		$P=0.5693$		$P=0.9238$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER Codon 325</i>	对照组	1.00(ref)	0.50(0.24-1.07)	1.00(ref)	0.90(0.38-2.15)
	暴露组	0.55(0.13-2.34)	0.72(0.31-1.67) ^g	1.24(0.60-2.53)	0.70(0.17-2.85) ^h
	趋势检验		$P=0.3520$		$P=0.6900$

* Rothman 方法计算及检验 以最近 6 个月月经周期平均天数小于 25 天为异常，以大于等于 25 天为正常

a: S=-0.13, u=-2.49, P=0.01

b: S=-0.12, u=-1.65, P=0.05

c: S=0.11, u=-2.24, P=0.01

d: S=0.50, u=-0.31, P=0.38

e: S=-0.07, u=-1.69, P=0.05

f: S=-0.09, u=-1.36, P=0.09

g: S=0.30, u=1.49, P=0.07

h: S=-2.04, u=-0.70, P=0.24

参照对照组最近 6 个月月经周期最长天数的分布，以 30 天为截断点，把最近 6 个月月经周期最长天数转换为两分类变量，估计基因多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短的联合相对危险度。表 4-24 显示：在模型 1 中，*ER PvuII*、*ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短有联合作用的趋势，暴露于双酚 A 又携带突变杂合子或突变纯合子的 RR 分别为 1.93(1.01-3.67)、1.91(0.97-3.75)，Armitage 趋势检验 P 值分别为 0.0416、0.0155，但相加模型检验未达到显著性水平。*ER Codon594*、*ER Codon325* 位点未发现多态与双酚 A 暴露的联合作用趋势。

在模型 2 中，ER XbaI 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短的危险有联合作用的趋势，趋势检验 $P=0.0049$ ，仅暴露于双酚 A 的 RR 为 1.41 (0.85-2.32)，携带突变纯合子的 RR 为 1.37 (0.91-2.06)，既暴露于双酚 A 又携带突变纯合子人群月经周期最长天数变短的 RR 为 2.12 (1.35-3.31)。但相加模型检验无统计学意义。其余位点在模型 2 中未发现与双酚 A 暴露有危险联合作用的趋势，相加模型检验也未达到显著性水平。

表 4-24 多态位点与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
ER	对照组	1.00(ref)	1.35(0.72-2.51)	1.00(ref)	1.11(0.73-1.68)
PvuII	暴露组	1.67(0.66-4.20)	1.93(1.01-3.67) ^a	1.69(1.13-2.52)	1.27(0.75-2.19) ^b
	趋势检验		$P=0.0416$		$P=0.4262$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
ER	对照组	1.00(ref)	1.34(0.69-2.58)	1.00(ref)	1.37(0.91-2.06)
XbaI	暴露组	1.67(0.55-5.07)	1.91(0.97-3.75) ^c	1.41(0.85-2.32)	2.12(1.35-3.31) ^d
	趋势检验		$P=0.0155$		$P=0.0049$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
ER	对照组	1.00(ref)	0.71(0.34-1.47)	1.00(ref)	0.83(0.55-1.26)
Codon 594	暴露组	1.40(0.52-3.76)	1.03(0.48-2.18) ^e	1.28(0.76-2.15)	1.34(0.86-2.08) ^f
	趋势检验		$P=0.1381$		$P=0.7276$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
ER	对照组	1.00(ref)	0.89(0.55-1.46)	1.00(ref)	0.86(0.52-1.43)
Codon 325	暴露组	1.44(0.72-2.86)	1.34(0.80-2.25) ^g	1.41(0.96-2.06)	1.52(0.89-2.60) ^h
	趋势检验		$P=0.4972$		$P=0.4423$

* Rothman 方法计算及检验 以最近 6 个月月经周期最长天数小于 30 天为异常，以大于等于 30 天为正常

a: $S=0.92, u=-0.13, P=0.45$

b: $S=0.35, u=-1.31, P=0.09$

c: $S=7.07, u=1.43, P=0.08$

d: $S=1.44, u=0.78, P=0.22$

e: $S=0.25, u=-0.15, P=0.44$

f: $S=2.88, u=0.63, P=0.26$

g: $S=1.02, u=0.02, P=0.49$

h: $S=1.92, u=0.60, P=0.28$

参照对照组最近 6 个月平均行经天数的分布，把最近 6 个月月经周期平均行经天数转换为两分类变量，以小于 4 天或大于 8 天为异常，其余为正常，估计基因多态与双酚 A 暴露对平均行经天数长短变化的联合相对危险度。表 4-25 显示：在模型 2 中，Rothman 方法计算发现基因 *ER PvuII* 的 pp 基因型与双酚 A 暴露有联合作用。与参照组相比 RR 值为 0.76 (95%CI: 0.28-2.09)，效应指数 S 值为-0.25，相加模型检验达到显著水平 ($P=0.01$)，说明基因型 pp 与双酚 A 暴露有负相加模型交互作用。Cochran-Armitage 趋势检验未发现该位点与双酚 A 暴露对行经天数有联合作用趋势。

其它位点在模型 1 及模型 2 中 Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 方法计算均未发现基因与双酚 A 暴露对行经天数异常有联合作用。

表 4-25 多态位点与双酚 A 暴露对月经周期行经天数的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.61(0.67-3.87)	1.00(ref)	1.51(0.87-2.60)
<i>PvuII</i>	暴露组	0.58(0.07-4.59)	1.58(0.61-4.09) ^a	1.36(0.71-2.59)	0.76(0.28-2.09) ^b
	趋势检验		$P=0.2415$		$P=0.5837$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.67(0.63-4.41)	1.00(ref)	1.01(0.58-1.75)
<i>XbaI</i>	暴露组	1.86(0.39-8.88)	1.45(0.51-4.14) ^c	1.09(0.55-2.16)	0.79(0.34-1.82) ^d
	趋势检验		$P=0.6014$		$P=0.7051$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	2.04(0.30-13.67)	1.00(ref)	1.27(0.71-2.30)
<i>Codon</i> <i>594</i>	暴露组	-	2.12(0.31-14.71) ^e	0.62(0.22-1.80)	1.50(0.74-3.04) ^f
	趋势检验		$P=0.2636$		$P=0.1597$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.74(0.40-1.37)	1.00(ref)	0.47(0.21-1.07)
<i>Codon</i> <i>325</i>	暴露组	1.16(0.45-2.95)	0.64(0.30-1.37) ^g	0.90(0.51-1.61)	0.56(0.18-1.69) ^h
	趋势检验		$P=0.6910$		$P=0.0536$

* Rothman 方法计算及检验 以最近 6 个月月经行经天数小于 4 天或大于 8 天为异常，其它为正常

a: S=2.53, u=0.54, P=0.30

b: S=-0.25, u=-2.32, P=0.01

c: S=0.28, u=-1.01, P=0.16

d: S=-1.93, u=-0.78, P=0.22

e: S=5.83, u=1.03, P=0.15

f: S=-7.74, u=1.29, P=0.10

g: S=3.99, u=-0.63, P=0.27

h: S=0.71, u=0.51, P=0.30

4.4.2 基因多态与双酚 A 暴露对性功能相关指标改变的联合危险度估计

以性生活满意度是否改变为估计指标，分为满意度减弱与不变或增强，估计基因多态与双酚 A 暴露对性生活满意度减弱的联合相对危险度。表 4-26 显示：在模型 1 中，Cochran-Armitage 趋势检验四个位点均未发现与双酚 A 暴露有联合作用趋势。Rothman 方法计算发现基因 *ER Codon325* 的 CC 或 GG 基因型与双酚 A 暴露有联合作用，与参照组相比 RR 值为 1.60 (95%CI: 0.61-4.23)，效应指数 S 值为 0.21，相加模型检验达到显著水平 ($P=0.01$)，说明基因型 pp 与双酚 A 暴露有负相加模型交互作用。其它三个位点在模型 1 中 Rothman 方法未发现多态与双酚 A 暴露的联合作用。

在模型 2 中，Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露对性生活满意度减弱的联合作用。

表 4-26 多态位点与双酚 A 暴露对性生活满意度减弱的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.19(0.49-2.88)	1.00(ref)	0.93(0.50-1.74)
<i>PvuII</i>	暴露组	1.56(0.42-5.73)	1.47(0.59-3.71) ^a	1.09(0.75-3.02)	1.51(0.75-3.02) ^b
	趋势检验		$P=0.4509$		$P=0.5170$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.84(0.36-2.00)	1.00(ref)	1.00(0.54-1.85)
<i>XbaI</i>	暴露组	0.58(0.08-4.39)	1.16(0.47-2.83) ^c	1.42(0.73-2.74)	1.12(0.52-2.40) ^d
	趋势检验		$P=0.5049$		$P=0.9351$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.81(0.22-2.95)	1.00(ref)	1.76(0.87-3.58)
<i>Codon</i> <i>594</i>	暴露组	0.55(0.06-5.18)	1.10(0.29-4.10) ^e	1.98(0.84-4.63)	1.81(0.80-4.11) ^f
	趋势检验		$P=0.3774$		$P=0.1502$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.61(0.66-3.95)	1.00(ref)	0.91(0.44-1.90)
<i>Codon</i> <i>325</i>	暴露组	2.92(1.03-8.25)	1.60(0.61-4.23) ^g	1.29(0.72-2.29)	1.18(0.50-2.82) ^h
	趋势检验		$P=0.4735$		$P=0.8404$

* Rothman 方法计算及检验 a: S=0.63, u=-0.37, P=0.35 b: S=25.88, u=1.13, P=0.13
c: S=-0.31, u=1.31, P=0.10 d: S=0.27, u=-0.70, P=0.24
e: S=-0.17, u=1.12, P=0.13 f: S=0.46, u=-1.34, P=0.09
g: S=0.21, u=-2.48, P=0.01 h: S=0.86, u=-0.06, P=0.48

以性生活中的享受程度为估计指标，以享受程度减弱为异常，不变或增强为

正常，转换为两分类变量，估计基因多态与双酚 A 暴露对性生活享受程度减弱的联合相对危险度。表 4-27 显示：在模型 1 中，Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露对享受程度减弱的联合作用。

在模型 2 中，Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露对享受程度减弱的联合作用。Cochran-Armitage 趋势检验发现 *ER PvuII* 位点多态与双酚 A 暴露对享受程度减弱有联合作用的趋势，暴露于双酚 A 又携带 pp 基因型的 RR 分别为 4.42 (1.25-15.68)，P 值为 0.0132。其它三个位点未发现多态与双酚 A 暴露的联合作用趋势。

表 4-27 多态位点与双酚 AA 暴露对性生活享受度减弱的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.99(0.23-4.37)	1.00(ref)	2.85(0.88-9.18)
<i>PvuII</i>	暴露组	1.30(0.13-13.3)	1.71(0.38-7.71) ^a	2.06(0.53-7.98)	4.42(1.25-15.68) ^b
	趋势检验		<i>P</i> =0.4222		<i>P</i> =0.0132
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	2.16(0.67-6.98)
<i>XbaI</i>	暴露组	-	- ^c	2.14(0.56-8.25)	3.11(0.87-11.11) ^d
	趋势检验		-		<i>P</i> =0.0793
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	0.85(0.28-2.61)
<i>Codon594</i>	暴露组	-	- ^e	1.98(0.60-6.48)	1.17(0.33-4.17) ^f
	趋势检验		-		<i>P</i> =0.8282
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.49(0.15-1.59)	1.00(ref)	1.11(0.31-4.05)
<i>Codon325</i>	暴露组	1.63(0.40-6.70)	0.90(0.27-3.05) ^g	1.38(0.47-4.08)	3.07(0.99-9.53) ^h
	趋势检验		<i>P</i> =0.5236		<i>P</i> =0.1345

* Rothman 方法计算及检验 性生活中享受程度的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常强烈；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强。

a: S=2.48, u=-0.30, P=0.38

b: S=1.25, u=0.33, P=0.37

c: 缺失

d: S=0.95, u=-0.06, P=0.47

e: 缺失

f: S=0.19, u=-0.72, P=0.24

g: S=-0.55, u=-0.28, P=0.39

h: S=4.63, u=1.13, P=0.13

最近 6 个月性生活中兴奋程度为估计指标。以兴奋度减弱为异常，不变或增强为正常，转换为两分类变量，估计基因多态与双酚 A 暴露对兴奋度减弱的联合相对危险度。表 4-28 显示：在模型 1 及模型 2 中，Cochran-Armitage 趋势检验及

Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露对对兴奋度减弱的联合作用。

表 4-28 多态位点与双酚 A 暴露对性生活中兴奋度减弱的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.87(0.26-2.90)	1.00(ref)	1.44(0.56-3.70)
<i>PvuII</i>	暴露组	0.87(0.10-7.69)	1.30(0.37-4.54) ^a	1.05(0.33-3.35)	2.65(0.98-7.19) ^b
	趋势检验		<i>P</i> =0.6039		<i>P</i> =0.0773
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	1.82(0.68-4.83)
<i>XbaI</i>	暴露组	-	- ^c	1.43(0.42-4.86)	2.54(0.86-7.49) ^d
	趋势检验		-		<i>P</i> =0.0788
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	1.02(0.39-2.72)
<i>Codon</i> <i>594</i>	暴露组	-	- ^e	1.69(0.54-5.22)	1.22(0.39-3.81) ^f
	趋势检验		-		<i>P</i> =0.9468
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.31(0.12-0.82)	1.00(ref)	0.74(0.22-2.52)
<i>Codon</i> <i>325</i>	暴露组	0.95(0.27-3.35)	0.59(0.22-1.58) ^g	1.11(0.43-2.85)	2.04(0.71-5.87) ^h
	趋势检验		<i>P</i> =0.1108		<i>P</i> =0.4952

* Rothman 方法计算及检验 性生活中性高潮的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常强烈；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强。

a: $S=-1.17, u=0.58, P=0.28$

b: $S=3.72, u=1.13, P=0.13$

c: 缺失

d: $S=1.30, u=0.30, P=0.38$

e: 缺失

f: $S=0.29, u=0.57, P=0.28$

g: $S=0.58, u=0.54, P=0.29$

h: $S=-7.67, u=1.21, P=0.11$

最近 6 个月性生活中性高潮程度为估计指标。以性高潮程度减弱为异常，不变或增强为正常，转换为两分类变量，估计基因多态与双酚 A 暴露对性高潮减弱的联合相对危险度。表 4-29 显示：在模型 1 中，Cochran-Armitage 趋势检验未发现四个位点基因多态与双酚 A 暴露对对性高潮减弱的联合作用。Rothman 方法计

算发现基因 *ER PvuII* 的 Pp 或 pp 基因型与双酚 A 暴露有联合作用，与参照组相比 RR 值为 1.00 (95%CI: 0.41-2.41)，效应指数 S 值为 0.00，相加模型检验达到显著水平 ($P=0.02$)，说明 Pp 或 pp 基因型与双酚 A 暴露有负相加模型交互作用。其它位点未发现基因多态与双酚 A 暴露的联合作用。模型 2 中，Cochran-Armitage 趋势检验及 Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露对性高潮程度减弱的联合作用。

表 4-29 多态位点与双酚 A 暴露对性高潮减弱的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER PvuII</i>	对照组	1.00(ref)	0.40(0.16-0.99)	1.00(ref)	0.91(0.36-2.25)
	暴露组	0.43(0.06-3.30)	1.00(0.41-2.41) ^a	1.31(0.53-3.23)	2.57(1.11-5.95) ^b
趋势检验			$P=0.8030$		$P=0.1477$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER XbaI</i>	对照组	1.00(ref)	1.17(0.28-4.84)	1.00(ref)	1.70(0.68-4.23)
	暴露组	1.50(0.15-14.83)	2.19(0.53-9.08) ^c	2.45(0.93-6.42)	2.49(0.92-6.73) ^d
趋势检验			$P=0.1428$		$P=0.1159$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER Codon 594</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	0.96(0.39-2.38)
	暴露组	-	- ^e	1.70(0.61-4.75)	1.88(0.74-4.77) ^f
趋势检验			-		$P=0.4201$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER Codon 325</i>	对照组	1.00(ref)	0.67(0.25-1.80)	1.00(ref)	1.24(0.45-3.36)
	暴露组	2.17(0.70-6.78)	1.20(0.44-3.32) ^g	2.02(0.93-4.38)	2.05(0.71-5.90) ^h
趋势检验			$P=0.8152$		$P=0.2226$

* Rothman 方法计算及检验 性生活中性高潮的衡量标准为：以 0-5 为尺度，0 为根本没有，5 为非常强烈；0-2 为减弱，3-5 为不变或增强。

a: $S=0.00$, $u=2$, $P=0.02$

c: $S=1.77$, $u=0.34$, $P=0.37$

e: 缺失

g: $S=0.24$, $u=-0.66$, $P=0.25$

b: $S=7.28$, $u=1.42$, $P=0.08$

d: $S=0.70$, $u=-0.52$, $P=0.30$

f: $S=1.34$, $u=0.24$, $P=0.40$

h: $S=0.83$, $u=-0.18$, $P=0.43$

性生活享受程度、兴奋度、性高潮程度汇合成一项指标，3项指标中任一指标为弱的定义为弱，3项均强的定义为强，转换为两分类变量，估计基因多态与双酚A暴露对性功能减弱的联合相对危险度。表4-30显示：Cochran-Armitage趋势检验在模型1及模型2中均未发现四个位点基因多态与双酚A暴露对性功能减弱的联合作用。Rothman方法计算发现基因*ER PvuII*的Pp或pp基因型与双酚A暴露有联合作用，与参照组相比RR值为1.05（95%CI：0.44-2.55），效应指数为-0.05，相加模型检验接近显著水平（ $P=0.05$ ），说明Pp或pp基因型与双酚A暴露有负相加模型交互作用。其它位点未发现基因多态与双酚A暴露的联合作用。

表 4-30 多态位点与 BPA 暴露对性功能减弱影响的联合危险度估计

位点	组别	模型 1		模型 2	
		PP	Pp 或 pp	PP 或 Pp	pp
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.55(0.23-1.33)	1.00(ref)	1.23(0.55-2.73)
<i>PvuII</i>	暴露组	0.47(0.06-3.56)	1.05(0.44-2.55) ^a	1.27 (0.52-3.08)	2.37(1.04-5.42) ^b
	趋势检验		$P=0.7480$		$P=0.0940$
		XX	Xx 或 xx	XX 或 Xx	xx
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	1.45(0.36-5.90)	1.00(ref)	1.88(0.82-4.33)
<i>XbaI</i>	暴露组	1.55(0.16-15.34)	2.41(0.53-9.21) ^c	2.19(0.87-5.55)	2.22(0.85-5.81) ^d
	趋势检验		$P=0.0945$		$P=0.0962$
		GG	GA 或 AA	GG 或 GA	AA
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	-	1.00(ref)	1.29 (0.55-3.04)
<i>Codon</i> <i>594</i>	暴露组	-	- ^e	1.71(0.61-4.81)	1.91(0.75-4.85) ^f
	趋势检验		-		$P=0.2322$
		CC	CG 或 GG	CC 或 CG	GG
<i>ER</i>	对照组	1.00(ref)	0.56(0.24-1.31)	1.00(ref)	0.95(0.37-2.49)
<i>Codon</i> <i>325</i>	暴露组	1.61(0.57-4.56)	0.87(0.35-2.15) ^g	1.57(0.76-3.22)	1.55(0.56-4.32) ^h
	趋势检验		$P=0.3879$		$P=0.3536$

* Rothman 方法计算及检验 性生活享受程度、兴奋度、高潮程度汇合成一项指标，3指标中任一指标为弱的定义为弱，3项均强的定义为强。

a: S=-0.05, u=1.66, P=0.05

c: S=1.59, u=0.35, P=0.36

e: 缺失

g: S=-0.74, u=-0.41, P=0.34

b: S=2.75, u=0.94, P=0.17

d: S=0.59, u=-0.75, P=0.23

f: S=0.79, u=-0.25, P=0.40

h: S=1.32, u=0.19, P=0.42

五 讨 论

双酚 A 为环境内分泌干扰物，化学结构与雌激素类似，是在动物实验中已经明确的一种激素活性物质。在体外实验的酵母重组系统中发现双酚 A 具有微弱的类雌激素作用（比雌激素弱 10,000 倍）及较强的抗雄激素样作用^[39]。双酚 A 的体内药物代谢动力学与雌激素的代谢方式相类似^[18]。极低水平的双酚 A 暴露即会对人体的健康产生显著影响。早在 20 世纪 30 年代，就有学者提出双酚 A 具有类雌激素活性^[40]，可造成雄性的精子数量减少及生育力降低^[41-45]，但这些资料多来自体外试验和动物实验，且多数样本量较小，大样本的双酚 A 暴露对人类生殖功能影响的研究目前在国内外仍是空白。

我们的假设是雌激素受体基因多态性可能在双酚 A 对生殖功能的影响中发挥作用。选择的 *PvuII*、*XbaI*、*Codon594* 及 *Codon325* 这四个多态位点，均为雌激素受体基因多态位点，因为雌激素对靶细胞产生生理和病理作用离不开雌激素受体^[46,47,48,49]，并且雌激素是影响机体生殖功能状态的一个比较肯定的因素。

5.1 ER 各位点多态分布

本研究所估计的中国一般女性人群 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 多态位点各基因型分布频率与国内外的相关报道结果基本一致^[50-61]，也符合 Hardy-Weiberg 平衡定律，具有群体代表性。

多项研究证明了基因多态性分布在性别间不具有差异，因此参考相关的研究结果^[52-59]，用本研究结果与其进行比较。*ER PvuII* 多态性分布中国人群与日本、美国 and 匈牙利人群不同。*ER XbaI* 多态性分布与匈牙利人群差异显著，与美国人群分布频率差异无统计学意义，虽然与日本人群各基因型分布的趋势一致，但分布频率上也存在差异，这也得到相关研究的佐证^[9]。*ER Codon594* 在中国人群中进行的研究还未见报道，但国际人类基因组单体型图计划（The International HapMap Project,HapMap）提供的北京汉族人群分布频率 GG 基因型 73.3%，AG 基因型 24.4%，AA 基因型 2.2%，样本量为 90 例。本研究结果与此分布频率及美国、德国、日本人群比较比较，差异均无统计学意义。*ER Codon325* 位点中国人群同日本、美国、德国人群分布频率差异有统计学意义。可见，不同基因位点随种族、地区等因素的不同，其分布频率也有差异。因而，建立完善的多态基因谱，对于疾病

易感性的研究具有重要意义。

5.2 双酚 A 暴露对女性月经周期及性功能的影响

月经是女性特有的生理现象，月经周期既反映了女性生殖器官功能的变化，也反映了与生殖功能有关的心理活动和行为的变化。适当水平的雌激素是维持女性生殖健康的关键，异常水平的雌激素刺激，会导致月经周期的紊乱及生殖功能的变化。本研究结果表明双酚 A 暴露女工的月经周期最长天数与对照组相比有所缩短，提示双酚 A 暴露可能使月经周期出现紊乱。这与相关研究结果基本一致。如人群流行病学调查资料显示，汞或锰的暴露可使女性月经周期出现紊乱^[62]。赵荣秀等^[63]研究也认为，长期接触农药可使女性月经周期异常。国外也有研究发现接触杀虫剂使月经周期紊乱的可能性增加^[64]。张霜红等^[65]研究发现内分泌干扰物暴露女工的月经异常患病率、经期异常率、月经周期异常率和痛经率高于对照组，且暴露女工月经周期异常率随接触工龄增加有线性增高的趋势。

女性月经功能主要受卵巢内分泌功能的调节，卵巢分泌的性激素与下丘脑—垂体系一起调节正常的月经周期，内分泌干扰物可能通过干扰内分泌激素的合成和分泌而导致接触女工月经周期异常。虽然卵巢有自我修复的功能，但是如果长期接触低浓度职业环境内分泌干扰物，使卵巢激素分泌的平衡持续遭受损伤，缺乏休整、调节和恢复的机会，就可造成卵巢内分泌功能的明显损害，出现月经周期异常率增高。但本研究选择的其它月经周期指标未发现在双酚 A 暴露组与对照组间的差别。

环境雌激素对性功能的影响临床表现为性生活周期和性腺活动紊乱、性欲降低等。A smathbanu 等提出杀虫剂可降低女性动情周期次数及动情周期各阶段的持续时间。目前还没有关于环境雌激素暴露对女性性功能影响的研究报道。我国学者王旭平等^[25]通过对男性双酚 A 暴露工人的调查发现，接触双酚 A 的男工性欲低下，妻子从结婚到第一次怀孕时间较对照组长，但无显著性差异。本研究中性生活各指标也未发现双酚 A 暴露组与对照组间的差别。

5.3 双酚 A 暴露对研究对象子代生长发育的影响

雌、雄激素是人体发育过程中不可缺少的激素。男性儿童进入青春期后，睾丸开始分泌雄激素，刺激雄性副性器官使其发育成熟及促进第二性征的形成。女性儿童乳腺及其它第二性征的发育也与卵巢的雌激素及孕激素分泌密切相关。因

此，过高或过低水平的雌、雄激素都会导致儿童发育过程的异常。双酚A具有潜在的遗传毒性和胚胎毒性^[66]。当母亲妊娠期暴露于双酚A时，双酚A的类雌激素作用及强抗雄激素样作用就可能影响子代的发育。本研究结果发现双酚A暴露组的男性子代在开始长阴毛、腋毛及发育至Tanner 1期、Tanner 2期、Tanner 3期及Tanner 4期的年龄均晚于对照组。而双酚A暴露组女工女性子代乳房发育及发育至Tanner 5期的年龄早于对照组。这也与相关研究结果一致，有研究认为环境内分泌干扰物可通过模拟或拮抗雌激素作用干扰体内雌激素水平，使女性出现月经初潮和乳腺发育过早^[62,63]。

5.4 基因型分布与生殖功能改变易感性的关系

基因多态是人类基因组中普遍存在的现象，但是基因组中某些位点上的多态性会对其基因产物的生成和功能造成不同程度的影响，进而导致不同生物个体在这些基因产物的效应方面存在差异。如 ER 基因的 1 号内含子内具有该基因的增强子和启动子等与基因转录调控密切相关的重要调节序列，因此，这些多态性的发生可能直接影响到 ER 基因的转录能力。1997 年 Collins 等^[67]提出了“常见疾病，常见变异(Common disease,Common variant,CD-CV)”的假说，认为常见疾病的易感性是由于人群中某些位点特别是在基因的编码区或调控区的常见变异引起的。因此，在某一疾病患者人群和正常对照人群中进行 SNPs 对比研究，可以确定 SNPs 位点和/或其邻近变异与疾病发生风险的关系。

我们分析了 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个多态位点各基因分型与月经周期相关指标及性功能相关指标的关系，未发现 ER 基因四个多态位点基因型分布与生殖功能相关指标减弱的易感性相关。

5.5 双酚 A 暴露与基因多态联合作用对生殖功能的影响

我们采用两种不同组合模型来估计基因多态与双酚 A 暴露的联合相对危险度，模型 1 以野生基因型+对照组为参比组，模型 2 以（野生基因型+突变杂合子）+对照组为参比组。并采用 Cochran-Armitage 趋势检验和 Rothman 方法分别探索其联合作用。

当基因多态和双酚 A 暴露两个因素同时存在时所致的效应（即两因素同时存在时的效应与本底效应之差）不等于两因素单独存在时所致的效应（即因素单独存在时的效应与本底效应之差）之和时，认为两因素存在相加模型交互作用。AP

值为两因素联合效应中归因交互效应所占的比重。效应指数 S 用于交互作用的定性分析及定量测量,若 S 等于 1,说明两因素之间无相加模型交互作用。若 S 不等于 1,则表明两因素之间存在相加模型交互作用,此时,若 $S>1$,说明两因素之间具有正相加模型交互作用,即两因素用时存在时效应增强;若 $S<1$,则说明两因素之间具有负相加模型交互作用,即两因素同时存在时效应较弱。 S 绝对值越大,则说明因素之间交互作用越强^[68]。

在单因素分析中我们发现,最长月经周期天数在双酚 A 暴露组与对照组间存在差异,双酚 A 暴露组最长月经周期天数短于对照组,因此,我们分析了双酚 A 暴露与基因多态对月经最长天数变短的联合危险作用。进行 Cochran-Armitage 趋势检验,在模型 1 中发现 *ER PvuII*、*ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经最长天数变短有联合作用的趋势,模型 2 也显示 *ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经最长天数变短有联合作用的趋势,但 Rothman 方法计算均未发现基因多态与双酚 A 暴露的相加模型效应。

模型 1 提示 ER 基因多态与双酚 A 暴露可能对女性生殖功能改变有弱的负相加模型交互作用(效应指数远远小于 1),即基因突变与双酚 A 暴露同时存在时对性功能改变的效应低于两因素单独存在时的效应。但趋势检验未达到显著水平。

通过以上分析可见,对于基因多态与双酚 A 暴露的联合作用,Armitage 趋势检验和 Rothman 方法检验的结果不完全一致。做为一种探索性研究,我们综合了两种分析方法的结果,认为基因多态与双酚 A 暴露对生殖功能改变呈负相加模型效应,但交互作用较弱。

5.6 创新和意义

(1) 本研究是首次通过双酚 A 职业暴露人群探讨双酚 A 暴露与基因多态对人类生殖功能的影响,通过问卷调查和生物学检测等方法,分析了双酚 A 暴露和遗传基础因素对女性人群及其子代的影响,对照组的设立,排除了其它可能干扰研究目的的影响因素。

(2) 尽管双酚 A 职业暴露者的生殖功能还有可能同时还受其他化学物质的影响,本研究在设计时已考虑到了各种混杂因素的潜在影响,调查了对象的个人生活习惯、职业暴露状况、有毒有害物质暴露史、疾病史和用药史等背景资料,比较细致地深入评价双酚 A 职业暴露与女性生殖功能影响的关系,以期获得了双酚 A 职业暴露对女性性功能的真实影响。

(3) 目前已普遍认识到遗传多态性研究最有可能揭示肿瘤等疾病易感的本质,SNPs 进行的许多疾病遗传易感性研究正处于起步阶段, 逐个基因逐个 SNP 的功能性研究就显得十分重要。本研究对基因部分位点的研究, 将为高通量获得的群体性研究提供线索, 并为找出疾病的遗传易感 SNPs 谱系奠定基础。

5.7 研究的有效性和局限性

(1) 作为一项大型的流行病学研究, 不可避免地存在一些偏倚。在收集调查表资料时, 有些需工人回忆很多年前的生活习惯、工作、避孕、性功能等情况, 可能会存在回忆偏倚。在分析数据过程中, 有些变量由于样本量的限制, 无法进一步进行分层分析或调整混杂因素; 但我们已尽量调整了比较重要的混杂因素, 以减少混杂偏倚。

(2) 与许多研究一样, 本研究的样本量不大, 再加上有些基因分型在人群中的比例较小, 从而导致在探索双酚 A 暴露及估计基因与双酚 A 暴露联合时, 可能发现不了组间的差异。

(3) 由于生殖科学的复杂性, 特别是对于女性人群生殖功能评价指标的选择, 就特别困难。本研究中选择了月经周期变化、性生活中的一些自我感受、子代的发育情况来评价女性生殖功能, 这些指标是否能全面反映女性生殖功能状态, 还有待商榷。且我们对基因与环境交互作用对生殖功能指标及分析方法的选择, 也只是一种探索性研究, 因此结论的确定, 仍需谨慎。

六 小 结

本研究通过对 125 名双酚 A 暴露女工及 307 名对照组女工进行流行病学问卷调查及对雌激素受体四个多态位点检测, 来探索双酚 A 暴露及基因多态对女性人群生殖功能的影响。现小结如下:

(1) 最近 6 个月的月经周期最长天数双酚 A 暴露组 (30.47 ± 5.40) 短于对照组 (31.89 ± 6.54), 差别有统计学意义 ($t = -2.12, P = 0.0353$)。未发现月经周期是否规律、月经周期平均天数、最长月经周期天数、平均行经天数四个指标在暴露组与对照组间的差异。

性生活中的满意度、性享受程度、性兴奋程度、性高潮程度、性功能综合指标以及性幻想频率(次/月)在双酚 A 暴露组与对照组间差别无统计学意义。

(2) 暴露组研究对象的男性子代在开始长阴毛、腋毛及发育至 Tanner 1 期、Tanner 2 期、Tanner 3 期及 Tanner 4 期的年龄均晚于对照组的男性子代。而女性子代乳房发育及发育至 Tanner 5 期的年龄早于对照组。

(3) *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个多态位点基因频率分布如下。*ER PvuII* 位点: Pp 型为 44.76%, pp 为 38.93%, PP 为 16.32%; *ER XbaI* 位点: xx 型为 45.45%, Xx 型为 41.49%, XX 型为 13.05%; *ER Codon594* 位点 GG 型为 60.84%, GA 型为 32.87%, AA 型为 6.29%; *ER Codon325* 位点 CG 型为 55.19%, CC 型为 24.82%, GG 型为 21.99%。

(4) 双酚 A 暴露组与对照组 *ER PvuII*、*ER XbaI*、*ER Codon594* 及 *ER Codon325* 四个位点各基因型在月经周期、性功能各指标不同分组间的分布频率差别无统计学意义。

(5) 基因与双酚 A 暴露对月经周期的联合分析显示: 在模型 1 中, Cochran-Armitage 趋势检验发现 *ER PvuII*、*ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短有联合作用的趋势, 暴露于双酚 A 又携带突变杂合子或突变纯合子的 RR 分别为 1.93 (1.01-3.67)、1.91 (0.97-3.75), *P* 值分别为 0.0416、0.0155。但 Rothman 方法未发现基因多态与双酚 A 暴露有相加模型效应。

在模型 2 中, Cochran-Armitage 检验发现: *ER XbaI* 位点多态与双酚 A 暴露对月经周期最长天数变短的危险有联合作用的趋势 ($P = 0.0049$), 既暴露于双酚 A 又携

带突变纯合子人群月经周期最长天数变短的 RR 为 2.12 (1.35-3.31)。Rothman 方法计算未发现基因多态与双酚 A 暴露的联合作用。

(6) 基因与双酚 A 暴露对性功能的联合危险度分析显示：在模型 1 中，Rothman 方法计算发现：*ER PvuII* 的 Pp 或 pp 基因型与双酚 A 暴露对性功能减弱有负相加模型效应，与参照组相比 RR 值分别 1.05(95%CI:0.44-2.55)。*ER Codon325* 的 CC 或 GG 基因型与双酚 A 暴露对性生活满意度减弱有负相加模型效应，与参照组相比 RR 值为 1.60 (95%CI: 0.61-4.23)。但 Cochran-Armitage 检验未发现基因多态与双酚 A 暴露有联合作用的趋势。

在模型 2 中，Cochran-Armitage 趋势检验发现 *ER PvuII* 位点多态与双酚 A 暴露对享受程度减弱有联合作用的趋势，暴露于双酚 A 又携带 pp 基因型的 RR 分别为 4.42 (1.25-15.68)，P 值为 0.0132。其它三个位点未发现多态与双酚 A 暴露的联合作用趋势。Rothman 方法计算四个位点均未发现多态与双酚 A 暴露对性生活减弱的联合作用。

总之，本研究通过对流行病学资料及实验室检测结果的综合分析，认为双酚 A 暴露的激素效应对女性人群生殖功能的影响可能较弱，但对子代的生长发育可能具有延缓作用。ER_α 基因多态位点分布频率在不同种族间有一定的差异。ER_α 基因多态与双酚 A 暴露可能呈弱的负相加模型效应。当然以上结论尚需未来更多的流行病学和实验室研究结果来证实。

七 参考文献

1. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, et al. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 1993, 132(6): 2279-2286.
2. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, et al. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Persp*, 1995, 103(6): 608-612.
3. FSA (Food Standards Agency UK), Survey of Bisphenols in Canned Foods (Number 13/01). UK, 19 March 2001. <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis-2001/bisphenols>.
4. Kawamura Y, Koyama Y, Takeda Y, et al. Migration of bisphenol A from polycarbonate products. *Journal of food hygienic society of Japan*, 1998, 99: 206-212.
5. Consum Rep. Baby alert. New findings about plastics: parents may want to replace some baby bottles and teethingers. 1999, 64(5): 28-29.
6. Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, et al. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect*. 2003, 111(9): 1180-1187.
7. Kang JH, Kondo F. Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Res Vet Sci*. 2002, 73(2): 177-182.
8. Kang JH, Kito K, Kondo F. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J Food Prot*. 2003, 66: 1444-1447.
9. Olea N, Pulgar R, Perez P, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*. 1996, 104: 298-305.
10. Raloff J. Food for thought: what's coming out of baby's bottle? *Science News Online*. 1999, 156: 1-4. Available: http://www.sciencenews.org/sn_arc99_8799/food.htm.
11. Frommea H, Kuchlerb T, Otto T, et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and in the Environment. *Water Res*, 2002, 36: 1429-1438.
12. Belfroid A, Velzen M, Horst B, et al. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere*, 2002, 49: 97-103.

13. Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere*, 2002, 46:1215-1223.
14. National Research Council. *Hormonally active agents in the environment*. 1999; Washington, D.C :National Academy Press. 1-9, 68, 76-77, 299, 304-309.
15. Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005, 113:391-395.
16. 毛丽莎, 刘红河, 林凯, 等. 人血清中环境雌激素的柱前荧光衍生-高效液相色谱测定法. *职业与健康*, 2007, 23(22):2022-2024.
17. 毛丽莎, 孙成均, 李永新, 等. 柱前荧光衍生-高效液相色谱测定法测定尿和血清中的环境雌激素. *分析化学研究报告*, 2005, 33(1):33-36.
18. Takahashi O, Oishi S. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ. Health Perspect*. 2000, 108:931-935.
19. Miyakoda H, Tabata M, Onodera S, et al. Passage of bisphenol A into the fetus of the pregnant rat. *Journal of Health Science* 1999, 45:318-323.
20. Chapin RE, Sloane RA. Reproductive assessment by continuous breeding: evolving study design and summaries of ninety studies. *Environ. Health Perspect*. 1997, 105 Suppl 1:199-205.
21. Moorman WJ, Ahlers HW, Chapin RE, et al. Prioritization of NTP reproductive toxicants for field studies. *Reprod. Toxicol*. 2000, 14:293-301.
22. Morrissey RE, Lamb JC, Morris RW, et al. Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundam. Appl. Toxicol*. 1989, 13:747-777.
23. European Commission. *European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife*. 1997; Brussels: European Commission. European Commission Report No. EUR 17549:
24. Vom SF, Timms BG, Montano MM, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high

doses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997,94:2056-2061.

25.Wang XP, Ren DF, Peng B,et al.Report of the estrogenic effect on male workers exposed to biphenol A. *Occup Health Emerg Rescue* 1999, 3:15-16.

26.Greene GL,Gilna P,Wateefield M,et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*.1986,231(4742):1150-1153.

27.Leclercq G. Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer. *Steroid Biochem Mol Biol.* 2002,80(3):259-272.

28.Albertazzi P, Purdie DW. The life and times of the estrogen receptors: an interim report. *Climacteric.* 2001,4(3):194-202.

29.Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, ,et al.Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *Rheumatol.* 1998,25(1):134-137.

30.Carling T,Rastad J, Kindmark A,et al.Estrogen receptor gene polymorphism in postmenopausal primary hyperparathyroidism. *Surgery.* 1997,(6):1101-1105.

31.Roodi N,Bailey LR,Kao WY,et al. Estrogen receptor gene analysis on estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *JNCI.* 1995,87(6): 446-451.

32.Joanne EC,Rod AL,Rutherford S,et al. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer.* 2001,95(4):271-275.

33.Parl FF,Cavener DR,Dupont WD.Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1989,14:57-64.

34.Yaich L,Dupont WD,Cavener DR,et al. Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res.* 1992,52: 77-83.

35.Cai QY,Shu XO,Jin F,et al. Genetic Polymorphisms in the Estrogen Receptor Gene and Risk of Breast Cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2003,12:853-859.

36.Andersen TI,Heimdal KR,Skrede M,et al. Oestrogen receptor polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet.* 1994,94: 665-670.

37.Shin A,Kang D,Nishio H,et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms

and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2003,80(1):127-31.

38. Shen YP, Li DK, Wu JQ, et al. Joint Effects of the CYP1A1 MspI, ERα PvuII, and ERα XbaI Polymorphisms on the Risk of Breast Cancer: Results from a Population-Based Case-Control Study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006,15(2):342-347.

39. Della Seta D, Minder I, Belloni V, et al. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav.* 2006,19. [Epub ahead of print].

40. Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, et al. Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci Lett.* 2006, 402 (3):249-252.

41. 王薛君, 张玉敏, 李海山, 等. 双酚 A 对小鼠生殖和发育毒性的研究. *中国职业医学*, 2005, 32(3):37-39.

42. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM. Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci.* 2004, 112(3) 267-272.

43. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology.* 2003, 185(1-2):119-127.

44. Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, et al.. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J Occup Health.* 2001, 43(1-2):185-190.

45. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health.* 1998, 14(1-2):239-260.

46. Gordon MS, Notides AC, Computer modeling of estradiol interactions with the estrogen receptor. *Steroid Biochem.* 1996, 25(2):177-181.

47. Linstedt AD, West NB, Brenner RM. Analysis of monomeric-dimeric states of the estrogen receptor with monoclonal antiestrogens. *Steroid Biochem.* 1986; 24 (3): 677-686.

48. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, et al. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in

transfected human cells.cell. 1986,46(7):1053-1061.

49.Elliston JF,Fawell SE,Klein-Hitpass L,et al.Mechanism of estrogen receptor-Dependent transcription in a cell-free system.Mol Cell Biol.1990, 10(12):6607-6612.

50.山丹,郭燕燕,鄂文.雌激素受体基因多态性与子宫内膜癌的关系.中华妇产科学,2003,36(9):576-577.

51.赵晖,王介东.雌激素受体 A 基因多态性的研究进展.国外医学计划生育/生殖健康分册,2007,26(2):89-92.

52. Kobayashi S,Inoue S,Hosoi T,et al.Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene.J Bone Miner Res,1996,11(3):306-311.

53. Salamone L,Wolf R,Black D,et al.Association between bone mineral density and the estrogen receptor genotype in premenopausal women.J Bone Miner Res,1999, 14(suppl 1):SA097.

54. Bori Z,Speer G,Takacs I,et al.Interactive effect of vitamin D and estradiol receptor genotype as a determinant of bone mineral density.J Bone Miner Res,1999,14 (suppl 1):SA100.

55 Ushlyama T,Uoyama H,InoueK ,et al.Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis.J Pdaenmatolt ,1998,25:134-137.

56.Masahiro Sasaki,Yuichiro Tanaka,Noriaki Sakuragi,et al.Six polymorphisms on estrogen receptor 1 gene in Japanese, American and German populations. Eur J Clin Pharmacol, 2003, 59:389-393.

57.靳雅丽,沈月平,陈锦玲,等.ER codon325、PR +331G/A 与乳腺癌关系的病例对照研究.肿瘤,2008,28(10):859-863.

58.刘浩,刘志红,陈朝红等.雌激素受体基因多态性在中国汉族人群中的分布特点.肾脏病与透析肾移植杂志,1999,8(2):105-108.

59.Reich DE,Cargill M,Bolk S,et al. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia Human Molecular Genetics, 2008, 17(15):2293-2309.

60.Southey MC,Batten LE,McCredie MR,et al. Estrogen receptor polymorphism at codon 325 and risk of breast cancer in women before age forty. Natl Cancer Inst. 1998,90(7):532-536.

- 61.Hsiao WC,Young KC,Lin SL,et al. Estrogen receptor- α polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2004,6:180-186.
- 62.孙莹,张丹,贾海军.环境内分泌干扰物与女性生殖健康.中华妇幼临床医学杂志(电子版),2007,3(3):177-180.
- 63.赵荣秀,肖树芹,郭中锋.长期接触农药对女性生殖功能的影响.中国妇幼保健, 2004, 19: 112-113.
- 64.Farr SL,Cooper GS,Cai J,et al.pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the agricultural health study.*Am J Epidemiol*, 2004, 160:1194-1204.
- 65.张霜红.职业环境内分泌干扰物对女工生殖系统的损害.硕士学位论文,2005
- 66.Caroline M.,Beverly SM.,Ana MR ,et al.Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Steroid Biochem*,2002, 83:235-244.
- 67.Collins FS,Guyer MS,Charkravarti A.Variations on a theme:cataloging human DNA sequence variation. *Science*,1997,278(5343):1580-1581.
- 68.赵仲堂主编.流行病学研究方法与应用.第1版,北京:科学出版社. 2000:525-530.

八 发表论文

- 1.贺天锋,沈月平.三种模型预测疟疾在中国未来的发病趋势.上海预防医学杂志,2008,20(2):57-60.
- 2.贺天锋,沈月平,袁伟,等.中国职业女性人群雌激素受体基因多态性分布研究.环境与职业医学(已录用待发表).
- 3.贺天锋,沈月平.我国1984-2007年疟疾变化趋势分析及未来发病预测.现代预防医学(已录用待发表).
- 4.贺天锋,沈月平,等.1984-2006年中国疟疾流行病学特征分析及发病趋势预测.苏州大学学报(医学版),第28卷研究生论文集(下),268-271.
- 5.贺天锋,沈月平.1984-2006年中国疟疾流行病学分析.苏州大学学报(哲学社会科学版),2007年研究生论文集(下),119-121.
- 6.贺天锋,沈月平.应用 ODS 过程控制 SAS 统计结果输出.苏州大学学报(哲学社会科学版),2008年研究生论文集(下),209-210.
- 7.周亮,贺天锋,沈月平,等.女性乳腺癌危险因素的病例对照研究.中国肿瘤,2009,18(1):27-30.
- 8.刘娜,沈月平,贺天锋,等.中国人群饮酒嗜好与胃癌关系的 Meta 分析.2008年研究生论文集(下),211-214.
- 9.靳雅丽,沈月平,贺天锋,等. ER codon325、PR+331G/A 与乳腺癌关系的病例对照研究.肿瘤,2008,28(10):859-863.
- 10.刘娜,沈月平,贺天锋,等.高盐饮食及腌制食品与胃癌关系的 Meta 分析.环境与职业医学(已录用待发表).
- 11.殷淑琴,马雅娜,贺天锋.湖州市参保病人与非参保病人住院费用的比较分析.中国卫生事业管理,2008,(10):674-675.

九 中英文缩写词语对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
BPA	Bisphenol A	双酚 A
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
bp	Base pair	碱基对
CI	Confidence interval	可信区间
RR	Relative risk	相对危险度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
ERE	Estrogen response element	雌激素反应元件
S	Synergy index	效应指数

十 综 述：双酚 A 的生殖毒性研究进展

贺天锋 沈月平

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 学名 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷, 白色晶体。可燃, 微带苯酚味, 分子量为 228, 溶于乙醇、丙酮等, 是工业生产聚碳酸酯、环氧树脂的前体物质, 广泛应用于生产食品和饮料的容器、食品罐头的内壁涂料、牙齿密封剂、婴儿奶瓶及某些家庭用具等工业过程, 当这些生活用品不完全聚合或暴露于高温、酸、碱等环境中时, 双酚 A 就会释放或溶出, 通过皮肤、呼吸道等途径进入人体。

双酚 A 化学结构与雌激素类似, 具有弱雌激素活性和强抗雄激素活性, 能直接或通过其衍生物干扰生物的正常内分泌功能^[1]。早在 1936 年, Dodds 等学者就认为双酚 A 具有雌激素活性, 1999 年美国国家研究委员会 (NRC) 在报告中将双酚 A 称为“环境中活跃的激素因子”。

大量证据表明, 环境内分泌干扰物对动物雌激素、甲状腺素、儿茶酚胺、睾酮等呈现显著的干扰效应, 而临床上则主要以生殖障碍、发育异常、代谢紊乱以及某些癌症为特征。人群流行病学调查显示: 人类生殖障碍、发育异常及某些癌症如乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌等都与内分泌干扰有关。目前, 关于内分泌干扰物和环境雌激素对生殖系统的影响研究已成为国际性热点问题^[2-5]。

本文就双酚 A 的生殖毒性及毒作用机制进行综述, 为进一步揭示环境雌激素的健康危害效应及深入研究提供支持。

1. 雄性生殖毒性

1.1 对精子及睾丸的损伤

双酚 A 对雄性动物精子的毒性作用主要表现在使其数量减少、运动能力下降及精子畸形。Tyl 等^[6]研究发现: 经口染毒 50 mg/(ks.d) 的双酚 A 对成年大鼠未产生不良的生殖效应; 经口染毒 50g/d 双酚 A 的小鼠可出现精子活动率降低、畸形率升高^[7]。腹腔注射 1000g/kg 双酚 A 组的 KM 雄性小鼠其精子畸形率明显高于腹腔注射 500g/kg 双酚 A 组及对照组^[8]。Ashby 等^[9]给 SD 大鼠喂食 20ug/kg、2 或

200mg/kg 的 BPA, 5 周后发现, 每日生精量与睾丸重量(g)的比值下降。给成年大鼠喂食 25 和 100 ug/kg 的双酚 A 可导致其附睾的精子计数减少、睾丸和精囊的绝对重量减少^[10]。桂军红、吕毅等的研究也报道了双酚 A 可使大鼠及小鼠精子计数减少^[11,12]。

双酚 A 染毒可使动物睾丸重量减轻^[13], 未成熟大鼠的睾丸滋养细胞的退化和数量的减少^[14]。腹腔注射 25mg/kg 剂量的双酚 A 还可使 Wistar 大鼠睾丸和附睾湿重下降, 睾丸/体重比值升高^[11]。但也有研究认为, 双酚 A 的不良作用是可逆的。双酚 A 和雌二醇、17 β 雌二醇对睾丸作用相似, 给大鼠和小鼠皮下注射双酚 A 到青春期后, 顶体颗粒和顶体核畸形依次出现在初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子; Sertoli 细胞和精细胞也同样受到影响; 而精细胞分化出现部分或完全消失; 但当动物发育成熟后, BPA 不再对睾丸有影响, 并且这些动物仍可生育, 故认为双酚 A 的雌激素样作用到其成年期后仍可逆转^[15]。Toyama 等^[16]给成年小鼠或大鼠皮下注射 20 或 200 ug/kg 的双酚 A, 发现精子顶体囊泡、顶体帽、顶体和顶体核及精囊严重畸形, 停止染毒 2 个月后, 其睾丸组织学形态和生育力恢复正常, 提示双酚 A 的不良作用较短暂。

1.2 对性激素水平的影响

双酚 A 对性激素水平的影响, 国内外都已经开展了相关的研究, 但结论存在差别。Akingbemi 等^[17]研究发现: 大鼠暴露于 2.4ug/(kg.d)剂量的双酚 A, 血清黄体生成素 (LH)、睾酮浓度下降。Tsutsui T^[18]等体外研究发现双酚 A 可以与雌激素受体结合, 促使人类子宫内膜癌细胞和 MCF-7 细胞上的孕酮水平升高。在对雄性幼鸡的研究中也发现: 即使喂饲 2ug/kg 这样一个剂量, 雄鸡的鸡冠和睾丸发育依然受到影响, 并且呈现剂量效应关系^[19]。有学者对造纸厂排出污水的实验室研究和调查显示, 其中的双酚 A 可导致红鳟鱼和蟾蜍雄体内卵黄素水平升高^[20]。Steinmetz R 等^[21]的研究也证实了 BPA 可以引起啮齿类动物催乳素水平的升高。人群流行病学调查也发现长期接触高浓度双酚 A 的男性工人尿中睾酮含量存在降低趋势^[22,23]。

但邓茂先等^[24]给予 SD 大鼠 250mg/(kg.d) (经口摄入) 双酚 A, 连续饲养 14 日, 未观察到双酚 A 暴露组血清雌二醇和睾酮浓度与对照组间的区别。桂军红等^[11]给予 Wistar 大鼠腹腔注射 1mg/kg、25mg/kg 剂量的双酚 A, 未发现睾酮、雌二醇、孕酮、卵泡雌激素、黄体生成素在不同剂量间的水平变化。肖国兵等^[25]在男性人群中的研究(双酚 A 暴露 33 名, 对照 43 名, 暴露组血清双酚 A 水平 30.6ug/L)

也认为睾酮、雌二醇、卵泡雌激素、雄烯二醇的水平与双酚 A 水平无关联。

1.3 对男性其它生殖器官的影响

在啮齿类动物的毒理学研究中，肛门和生殖器之间的距离是作为发育期抗雄性激素反应的敏感标志。2005 年 Swan 等^[26]人研究发现出生前暴露于邻苯二甲酸盐的男性婴儿肛门和生殖器间的距离与暴露之间的关系有统计学意义。Gray 等^[27]的研究也发现，暴露于邻苯二甲酸盐的动物会出现睾丸、附睾、和睾丸引带发育不全。这类邻苯二甲酸盐症状在暴露于双酚 A 时也同样出现。在对妊娠 16-18 天暴露于双酚 A 时的雄性小鼠研究发现，肛门和生殖器之间的距离增加，附睾重量减轻，这些改变在成年后持续出现，雄性胎儿也表现出前列腺腺腔数量的增加，在成年期，这些动物表现为每日产生的精子的数量减少和前列腺的增大。尿道畸形也会出现，膀胱的发育也受到限制。Vom Saal^[28]等人研究也发现低剂量的双酚 A 作用于怀孕期的小鼠，发现其雄性后代生殖器明显变小。Susan CN 等^[29]报道，妊娠 11d 的小鼠连续 7d 灌胃染毒 BPA，子代雄鼠前列腺重量、睾丸重量及睾丸肾重量比明显改变。Hardin 等^[30]研究还发现 SD 大鼠第 1-15 天腹腔注射 85mg/kg 双酚 A 能引起胎仔骨化不全，腹腔注射 125mg/kg 能引起胎仔的肛门闭锁、脑室扩大等畸形。

2. 雌性生殖毒性

2.1 对雌性生殖器官的影响

Matthews 等^[31]研究发现双酚 A 能使大鼠子宫湿重增加,子宫/体重比增高,滑肌厚度增加, 宫腔上皮高度也增加, 阴道开口时间提前, 并有明显的剂量效应关系。体内实验也表明^[32], 双酚 A 引起切除卵巢的小鼠阴道角质化, 引起子宫糖原浓度升高。Ashby 等^[9]的研究也发现所有剂量组染毒雌性 AP 大鼠的子宫干重和湿重与阴性对照组相比均显著增加, 且皮下注射 600 mg/kg 及以上剂量组出现了早熟的阴道开口。还有研究发现, 在围产期暴露于 BPA 化合物的老鼠中, 双酚 A 可以改变其发情期的周期, 改变血清黄体生成素水平, 增加体重。在对妊娠期或围产期暴露于低剂量的 BPA 的老鼠的研究显示, 其可使老鼠发情期提前, 生殖道开口期提前, 并且使 3-4 个月龄的老鼠发情期改变。王薛君等^[33]研究发现染毒双酚 A 达 48mg/kg 或以上剂量, 各剂量组黄体数、着床数、各组雌鼠的生育指数、妊娠率均随剂量增加而下降。BPA 还可通过干扰大鼠的胎盘功能导致生殖系统疾病^[34]。暴露于 10g/(kg.d) 双酚 A (低于人类孕妇的暴露水平)的怀孕小鼠产下的雄性小鼠

其背外侧前列腺管的数目和大小及整个前列腺管体积增加，胎儿期暴露于环境内分泌干扰物可永久干扰细胞调控系统而导致大鼠前列腺上皮过度增殖，到成年期易引起前列腺疾病^[35]。Markey 等^[36]研究认为，出生前暴露于 25 或 250ng/kg/day 双酚 A 可以引起小鼠卵巢解剖结构的变化，同时使卵母细胞排卵数量减少，出生前暴露于双酚 A 也可使单个或两个卵巢囊充血量有明显的增加。

2.2 对激素分泌及性腺发育的影响

研究发现环境内分泌干扰物的雌激素作用能影响女性内分泌系统，引起女性青春期提前，出现早熟等性发育提前的现象^[37]。

Stoker 等^[38]学者发现，双酚 A 高剂量的暴露，可以导致子代性比例的失调和性腺组织的变化。凯门鳄鱼卵暴露于 140ppm 双酚 A 时，其子代雌性的比例达到 100%，在相同的发育温度条件下（33⁰C），对照组和低剂量双酚 A 暴露（1.4ppm）组子代雄性的比例却为 100%。Kloas 等^[19]的研究证明，双酚 A 可致红鳟鱼和蟾蜍的异性化。对日本鲭鱼的研究也表明，高剂量双酚 A 暴露使得日本鲭鱼 F1 子代的睾丸—卵巢化的比例增高^[39]。有研究显示^[40]：从双酚 A 染毒对遗传学雌性比目鱼性别的影响的结果得出：当给予遗传学雌性比目鱼幼鱼正常食料喂养并控制温度于 18⁰C 的普通水温时，组织学检查发现生殖腺分化为生殖腺分化为椭圆的卵巢，且见到了卵巢腔，说明几乎所有幼鱼都发育成正常雌鱼（雌性占 96.3%）。然而，当幼鱼被喂养在 27⁰C 高水温时，它们都发育成表现型的雄鱼（雌性占 0%），可见到生殖腺发育成狭长的精巢，没有卵巢腔。而雌二醇（E₂）阳性对照组和双酚 A 虽然也饲养在 27⁰C 水温中，但幼鱼却被全部和部分诱导为雌性，E₂ 组雌性占 100%，BPA 组雌性占 57.1%，组织学检查中也没有发现卵巢-精巢同体的比目鱼。这些结果说明双酚 A 对于日本比目鱼的生殖腺性分化过程具有雌激素样干扰作用。但也显示双酚 A 只能在一定程度上抑制 27⁰C 较高水温对遗传学雌性比目鱼幼苗的雄性化作用，对生殖腺性分化具有一定的雌激素样作用。

3. 双酚 A 的毒作用机理

3.1 直接毒性作用

双酚 A 能透过血睾屏障，以其原形或代谢产物的形式进入睾丸组织直接对生精细胞、支持细胞、初级精母细胞和 Leyding 细胞等产生毒性损伤作用。阻碍或干扰精子的发育和成熟；或者通过对精子的直接毒性，导致精子数量减少、活力降低或畸形。环境雌激素的这种直接毒性作用还可导致一些内分泌细胞数量减少和

结构功能异常，并使相关激素水平紊乱。

3.2 通过受体介导发挥作用，抑制基因表达

双酚 A 具有弱的雌激素活性和强的抗雄激素活性，可模拟正常的内源性激素作为配体与雌激素受体或雄激素受体结合，形成配体-受体复合物，复合物再结合到细胞核内 DNA 结合域的雌激素反应元件(estrogen response element ,ERE) 上，促进（或抑制）相邻的基因转录，通过 mRNA 翻译相应的功能蛋白，到达靶细胞，对相应的靶器官生殖功能产生影响。

3.3 作用于信使系统，抑制信号转导及某些特殊的细胞信号传递

双酚 A 可以作用于第一信使和第二信使，抑制信号转导及某些特殊的细胞信号传递。通过与第一信使的竞争，改变激素对垂体、下丘脑等的反馈调节，使下丘脑-垂体-睾丸性腺轴的生殖内分泌平衡与正常调节紊乱。Michelangeli 等研究发现未成年大鼠睾丸微粒体膜上 Ca^{2+} 泵蛋白的表达较成年大鼠高至少两倍以上，提示了 Ca^{2+} 泵在睾丸发育中的作用，并且发现低浓度的双酚 A、壬基酚等可以抑制睾丸微粒体 Ca^{2+} -ATP 酶活性从而对细胞内的钙稳态产生干扰。Nikula 等曾通过检测 mLTC21 细胞的受体介导的 cAMP 和孕酮(P) 的水平来分析环境雌激素 BPA 和辛基酚对间质细胞激素合成影响，发现 BPA 和辛基酚可通过阻止 LH 受体和腺苷酸环化酶的偶联，抑制 hCG 刺激的小鼠间质细胞的 cAMP 和孕酮的合成，提示一些环境雌激素可直接干扰甾体激素的合成而发挥作用。

3.4. 抑制某些特殊蛋白表达

双酚 A 可以抑制波形蛋白 (Vimentin)基因的转录，使睾丸支持细胞中 Vimentin 消失。支持细胞对雄性生殖机能起着决定性的作用，其数量决定睾丸的大小和精子的产生，任何影响 Vimentin 表达、结构、降解的因素都必将影响支持细胞的功能，进而干扰精子的发生和成熟。

3.5 其它可能的作用机制

作用于细胞膜水平而发挥作用。有学者^[25]通过对壬基酚 (NP) 的研究发现，NP 可能通过干扰生殖细胞的细胞膜，影响对肽类激素的感受性而抑制睾丸细胞增殖。由于 NP 与双酚 A 的相似性，作用于细胞膜水平而发挥作用也可能为双酚 A 的一种作用机制。通过调节 hPR 信号通路来发挥其雌激素活性。还有研究表明双酚 A 可以通过对 DNA 的作用来影响类固醇激素合成过程中某些重要酶的活性，使其合成发生障碍。

4. 目前研究的缺陷

4.1 以往对双酚 A 的研究,大多以动物和体外实验为主,在人群中的研究很少。由于种属、生理、多重暴露及体内某些激素含量等方面的差异,动物实验所探讨的机制是否适合于人类还有待确认。有学者研究了双酚 A 对淡水和海水中的微生物和鱼类的影响,认为①双酚 A 对鱼类的毒性为轻微至中等程度;②对生物的影响程度随营养级别降低而减小;③不同生物对双酚 A 的敏感度存在差别。

4.2 人类并不单一的暴露于一种化学物。不同化学物之间的相互作用,都会在不同个体上产生不同效应,但目前还没有单独一种化学复合物能取代其它化学物,因此双酚 A 单独的损伤效应还有待于进一步确认。

4.3 在人类的生活环境中,除化学雌激素外,也大量存在着植物雌激素,但目前的研究结果中都未提及植物雌激素可能的混杂作用。

5. 建议

① 加强环境内分泌干扰物暴露的人群流行病学调查研究,进一步建立相关的基线资料以及确认内分泌干扰物暴露与有关疾病的相关程度。

② 建立客观的环境内分泌干扰物的评价标准及改进或探索环境内分泌干扰物的定量方法。这是进行环境内分泌干扰物污染状况调查及人群暴露研究的基础。

③ 进一步加强内分泌干扰物在不同物种间的生殖与发育毒性、致癌性、神经毒性及免疫毒性的机制研究。

参考文献

1.Takemura H, Ma J, Sayama K, et al. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, 2005, 207(2): 215-221.

2. Carlsen E, Gwercman A, Keiding N, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 1992, 305: 609-613.

3. Mariscal-Arcas M, Rivas A, Granada A, et al. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47: 506-510.

4. Burkhart J, Ankley G, Bell H, et al. Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(1): 83-90.

5. 王佳. 双酚 A 对机体影响及其机制的研究进展. *预防医学情报杂志*, 2005, 21

(5):541-544.

6. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 2002, 68: 121-146.

7. Aikawa H, Koyama S, Matsuda M, et al. Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res*. 2004, 315: 119-124.

8. 孙延霞, 刘基芳, 宋祥福, 等. 双酚 A 对雄性小鼠生殖毒性的影响. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(7): 33-35.

9. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, et al. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci*, 2003, 74: 129-138.

10. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci*. 2002, 110: 163-167.

11. 桂军红, 陆付耳. 双酚 A 对雄性大鼠生殖系统的影响. *中国公共卫生*, 2005, 21(6): 696-698.

12. 吕毅, 吕海霞, 王洪涛, 等. 双酚 A 对雄性仔鼠生殖功能的影响. *吉林大学学报(医学版)*, 2008, 34(4): 618-620.

13. 龙鼎新. 环境雌激素对生殖和发育毒性的分子机理. *卫生研究*, 2002, 31(2): 139-142.

14. 邓茂先, 吴德生, 陈祥贵, 等. 双酚 A 对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白影响的体外实验研究. *环境与健康杂志*, 2002, 19(1): 14-16.

15. Toyama Y, Yuasa S. Effects of neonatal administration of 17 beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rats spermatogenesis. *Reprod Toxicol*, 2004, 19: 181-188.

16. Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, et al. Adverse effects of bisphenol A on spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol*, 2004, 67: 373-381.

17. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, et al. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 2004, 145: 592-603.

18. Tsutsui T, Tamura Y, Suzuki A, et al. Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. *Int J Cancer*, 2000, 86(2):151-154.
19. Masaru F, Kazuhide A, Sachi K, et al. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. *Life Sciences*, 2006, (78), 1767-1776.
20. Kloas W, Lutz I, Einspanier R. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemical in vitro and in vivo. *Sci Total Environ*, 1999, 225:59-68.
21. Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, et al. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 1997, 138(5):1780-1786.
22. Brelons JA, Olea-Serrano MF, Vilobes M, et al. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ Health Perspect*, 1995, 103(6):608-612.
23. 王旭平, 任道风, 逢兵, 等. 男工接触双酚 A 的雌激素样作用调查报告. *职业卫生与应急救援*, 1999, 17(1):15-16.
24. 邓茂先, 吴德生, 陈祥贵, 等. 双酚 A 对雄性生殖毒性的体内外实验研究. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(6):383-387.
25. 肖国兵, 石峻岭, 何国华, 等. 环氧树脂生产工人血清双酚 A 与性激素水平的调查. *环境与职业医学*, 2005, 22(4):295-298.
26. Swan, S.H, Main K.M, Liu F, et al. The study for future Families Research Team, Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect*. 2005, 113, 1056-1061.
27. Gray L.E, Foster, P.M.D. 2003 Significance of experimental studies for assessing adverse effects of endocrine-disrupting chemicals. *Pure Appl. Chem*. 2003, 75, 2125-2141.
28. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. *Toxicol Ind Health*, 1998, 4(1-2):239-260.
29. Susan CN, Frederick S, Kfistina A, et al. Relative binding affinity-serum modified access (RBA- SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 1997, 105:70-76.
30. Hardin BD, Bond GP, Sikov MR, et al. Testing of select workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand J work Environ Health*, 1981, 7(supp14):66-75.

31. Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interaction of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(2): 149-157.

32. Anonymous. Reproductive toxicology. Bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(1): 273-274

33. 王薛君, 张玉敏, 李海山, 等. 双酚 A 对小鼠生殖和发育毒性的研究. *中国职业医学*, 2005, 32(3), 37-39.

34. Lee CK, Kim SH, Moon DH, et al. Effects of bisphenol A on the placental function and reproduction in rats. *J Prey Med Pub Health*, 2005, 38: 330-336.

35. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, et al. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 7014-7019.

36. Markey, C.M, Coombs, M.A, Sonnenschein, C, et al. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol. Dev.* 2003, 5, 1-9.

37. Colon I, Caro D, Bourdony CJ, et al. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environment Health Perspect*, 2000, 108 (9): 895-900.

38. Stoker C, Rey F, Rodriguez H, et al. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol*. 2003; 133(3): 287-96.

[39] Tanaka H. Gonadal sex differentiation in flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull Natl Res Inst Aquaculture*, 1987, 11; 7-19.

[40] 杨隽, 郭红卫, 仲伟鉴, 等. 双酚 A 对硬骨鱼性腺分化的作用机制研究. *上海预防医学杂志*, 2006, 18(8): 363-365.

十一 致谢

值此硕士论文完成之际，我要向在我攻读硕士期间给予我指导、帮助和关心的导师、家人、朋友及同学表示衷心的感谢！

首先感谢导师沈月平副教授及上海市计划生育科学研究所袁伟研究员的精心指导，是他们给予我许多难得的学习和锻炼机会，使我开阔了眼界，增长了见识。在课题的设计、项目实施以及论文撰写的每一个环节，无不凝聚着两位导师的心血。沈老师治学严谨，学识渊博，并以身作则，使我不仅接受了全新的思想观念，领会了基本的思考方式，而且还明白了许多为人处世的道理。袁老师严谨务实，思维敏锐，做事耐心细致，是我永远学习的榜样。三年来，学业上导师对我严格要求，使我在专业知识、技能与科研能力等方面有了长足的提高；在生活上，导师对我关怀备至，令我终生难忘。

特别感谢我的父母和姐姐。是他们对我无私的支持和关爱，使得我的学业得以完成，我会加倍努力，以出色的成绩来报答你们。

流行病学与卫生统计学教研室严谨的科研态度、融洽的同事关系，为我营造了一个良好的学习氛围。我要感谢高歌、张永红、滕国兴、郭志荣、刘清芳等老师对我的指导和关心。

感谢上海市计划生育科学研究所沈维雄老师、苗茂华博士、朱虔兮博士、梁敏红同学在课题上的帮助。

感谢好友及同学：陈沛帅、俄辰、胡文斌、张薇、庄晓伟、郭璐、郑传城、武彦文、程庆林、王宁、张欢、殷淑琴、苟勇、孙难民、刘娜、余浩、刘银梅、李清华等的关心。