

不同浓度艾烟对弱精子症大鼠精子参数的影响

刘雅洁¹, 安雨¹, 邢国刚², 金滋润², 西珂², 霍涌玮³, 赵百孝¹

(¹北京中医药大学, 北京 102488; ²北京大学神经科学研究所, 北京大学基础医学院神经生物学系, 北京 100191; ³西安交通大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 西安交通大学基础医学院生殖医学研究中心, 西安 710061)

摘要: 目的: 研究不同浓度艾烟对弱精子症大鼠精子参数的影响。方法: 将40只雄性SD大鼠随机分为溶剂对照组, 模型对照组, 低、中、高浓度艾烟组, 每组8只。使用奥硝唑溶液灌胃建立弱精子症大鼠模型。从奥硝唑溶液灌胃的第11天开始进行艾烟干预。每天干预1次, 每次20min, 每周6d, 共8周。通过计算机辅助精子分析系统观察不同浓度艾烟对弱精子症大鼠精子活力、活率、密度、A级精子数和A+B级精子数的影响。结果: 与溶剂对照组比较, 模型对照组大鼠精子活力、活率、A级精子数和A+B级精子数显著降低 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 低、中、高浓度艾烟组大鼠的精子活力、活率、A级精子数和A+B级精子数显著升高 ($P < 0.01$)。不同浓度艾烟对弱精子症大鼠的精子密度无明显影响。结论: 不同浓度艾烟干预均可提高弱精子症大鼠的精子活力、活率和运动能力, 对弱精子症有一定的治疗作用。

关键词: 弱精子症; 艾烟; 遮光率; 计算机辅助精子分析; 精子运动

基金资助: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81574068, No. 81874503)

通信作者: 赵百孝, 北京市房山区阳光南大街北京中医药大学中医学院, 邮编: 102488, 电话: 010-53912012

E-mail: baixiao100@vip.sina.com

邢国刚, 北京市海淀区学院路38号北京大学神经科学研究所, 邮编: 100191, 电话: 010-82801067, E-mail: ggxing@bjmu.edu.cn

Effects of different concentrations moxa smoke on sperm parameters of asthenozoospermia in rats

LIU Ya-jie¹, AN Yu¹, XING Guo-gang², JIN Zi-run², XI Ke², HUO Yong-wei³, ZHAO Bai-xiao¹

(¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; ²Neuroscience Research Institute of Peking University, Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; ³Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Research Center of Reproductive Medicine, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective: To study the effects of different concentrations of moxa smoke on sperm parameters of asthenozoospermia in rats. Methods: Forty male SD rats were randomly divided into vehicle group, model group, low-concentration moxa smoke group, medium-concentration moxa smoke group and high-concentration moxa smoke group, with 8 rats in each group. Asthenozoospermia model was established by intragastric administration of ornidazole (ORN) once daily till the end of intervention. Smoke intervention was initiated 11 days after intragastric administration of ORN. Rats in the smoke intervention groups underwent 20 minutes smoke exposure per day, 6 days per week for 8 weeks. The effects of different concentrations of moxa smoke on the sperm motility, viability, density, the number of grade A sperm and grade A+B sperm were observed by computer-assisted sperm analysis system. Results: Compared with the vehicle group, the sperm motility, viability, grade A sperm count and grade A+B sperm count had significantly decreased in the ORN-treated group ($P<0.01$). Compared with the model group, the sperm motility, viability, grade A sperm count and grade A+B sperm count in low, medium and high concentrations of moxa smoke group had significantly increased ($P<0.01$). Different concentrations of moxa smoke intervention had no significant effect on sperm density in rats with asthenozoospermia. Conclusion: Different concentrations of moxa smoke intervention have certain therapeutic effects on asthenozoospermia by improving the sperm motility, viability and exercise capacity in rats.

Key words: Asthenospermia; Moxa smoke; Shading rate; Computer-assisted sperm analysis; Sperm motility

Funding: General Program of National Natural Science Foundation of China (No.81574068, No.81874503)

弱精子症以精子活力下降为主要表现，是引起男性不育症的常见病因之一^[1]。近年来，男性不育症的发病率呈全球性增长趋势，这与生活节奏加快、人为不良行为的影响和环境污染等因素有关，造成精子数量、质量的降低和男性生殖能力的下降^[2]。艾灸疗法是一种传统的中医疗法，是应用点燃后的艾绒在体表穴位或特定部位进行烧灼和熏熨，给人以温热和药物刺激，通过经络的传导，激发经气的活动，可温通气血、扶正祛邪，达到防治疾病的作用。艾烟作为具有特殊芳香气味的艾燃燃烧物，具有多种生物活性，已成为艾灸起效的关键环节^[3]。本课题组前期研究发现，艾烟对雄性Wistar大鼠的生殖机能具有促进作用，能够提高大鼠的精子密度、精子活力和前向运动能力，促进睾酮分泌^[4]。本研究系统观察了不同浓度的艾烟对弱精子症大鼠精子活力、活率和密度等指标的影响，旨在探讨艾烟对弱精子症大鼠的治疗作用。

材料与方法

1. 动物与分组 SPF级健康成年雄性SD大鼠40只，体质量200~230g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物许可证号：SCXK(京)2016-0006。适应性饲养1周后，将大鼠按体质量随机分为溶剂对照组，模型对照组，低、中、高浓度艾烟

组，每组8只。实验过程遵循2006年国家科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2. 药物、试剂与仪器 奥硝唑(批号：HWBD017918，规格：500g，北京华威锐科化工有限公司)，羧甲基纤维素钠(批号：RH30501，规格：500g，百奥百乐生物科技有限公司)；清艾条(规格：长20~21cm，直径1.9~2.1cm，湖北李时珍中药饮片有限公司)。Hope-MED 8050型动式染毒柜(天津开发区合普工贸有限公司)，P-5L2C型便携式数字微电脑粉尘仪(北京宾达绿创科技有限公司)，水浴锅(北京市长风仪器有限公司)，精子计数板(南宁松景天伦生物科技有限公司)，计算机辅助精子分析系统(型号：WLJY-9000，北京伟力新世纪科技发展有限公司)。

3. 造模 除溶剂对照组外，其余各组均使用奥硝唑溶液(按照灌胃剂量称取适量的奥硝唑粉末加入1mL 0.2%羧甲基纤维素钠溶液，置于干净研钵中研磨至糊状)灌胃，每日1次，每次400mg/kg，连续灌胃10d，建立弱精子症大鼠模型^[5]。造模后，奥硝唑溶液剂量减半，每次200mg/kg，每日1次，以维持弱精子症模型，至艾烟干预结束。溶剂对照组使用0.2%羧甲基纤维素钠溶液灌胃作为对照。以快速前向运动的A级精子数和慢速前

表1 各组大鼠附睾精子活力、活率、密度、A级精子数和A+B级精子数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	精子活力 (%)	精子活率 (%)	精子密度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	A级精子数 (%)	A+B级精子数 (%)
溶剂对照组	70.75 \pm 7.55	86.00 \pm 5.86	54.00 \pm 24.42	27.03 \pm 7.63	71.30 \pm 7.59
模型对照组	33.63 \pm 8.91**	52.38 \pm 9.13**	32.92 \pm 14.29	7.37 \pm 4.21**	34.05 \pm 8.92**
低浓度艾烟组	58.13 \pm 11.68* $\Delta\Delta$	72.88 \pm 10.48** $\Delta\Delta$	43.89 \pm 14.23	19.42 \pm 9.04 $\Delta\Delta$	58.66 \pm 11.72* $\Delta\Delta$
中浓度艾烟组	65.25 \pm 7.63 $\Delta\Delta$	78.88 \pm 7.43 $\Delta\Delta$	47.72 \pm 20.34	22.36 \pm 7.60 $\Delta\Delta$	65.71 \pm 7.55 $\Delta\Delta$
高浓度艾烟组	66.88 \pm 12.71 $\Delta\Delta$	81.63 \pm 12.12 $\Delta\Delta$	39.42 \pm 13.70	29.50 \pm 13.15 $\Delta\Delta$	67.46 \pm 12.71 $\Delta\Delta$

注:与溶剂对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型对照组比较, Δ $P<0.01$ 。

向运动的B级精子数之和 $<50\%$,或快速前向运动的A级精子数 $<25\%$ 作为造模成功标准[6]。

4. 艾烟干预方法 奥硝唑溶液灌胃第11天开始艾烟干预。参照本课题组前期对京津地区艾灸诊室抽样调查的艾烟浓度[7],设置1、3、9倍临床艾烟浓度作为实验浓度。实验前,采用动式染毒柜分别检测不同倍数的临床艾烟浓度对应的遮光率值,并以此遮光率设置不同的艾烟浓度梯度,分别为低浓度艾烟(1倍临床艾烟浓度)对应光学浓度0.4%,中浓度艾烟(3倍临床艾烟浓度)对应光学浓度2%,高浓度艾烟(9倍临床艾烟浓度)对应光学浓度15%。溶剂对照组0%和模型对照组0%暴露于同一房间的空气。动式染毒柜启动后,设置相应的环境参数值,待艾烟浓度稳定后一次性放入整组大鼠,待浓度再次达到稳定后开始计时。每日1次,每次20min,每周干预6d,共8周。

5. 样本采集与指标检测 各组大鼠在艾烟干预结束后1d,断颈处死,迅速取出双侧附睾组织,应用扩散法收集附睾尾部精子进行精子活力分析实验,参考文献[8]方法稍加改进。将双侧附睾尾部放入标记好的含2mL 37℃预热0.9%氯化钠溶液的一次性培养皿中,用小剪刀在附睾尾部轻轻剪3刀,在37℃水浴锅中放置2min,轻轻混匀,取20 μL 加到精子计数板上,选取6个视野,于2min内完成测试。运用计算机辅助精子分析系统检测精子活力、活率、密度、A级精子数和A+B级精子数。

6. 统计学方法 所有数据均采用SAS 9.4统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间差异的分析采用单因素方差分析及LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

与溶剂对照组比较,模型对照组大鼠的精子活力、活率、A级精子数和A+B级精子数显著降低($P<0.01$),低浓度艾烟组的精子活力、活率和A+B级精子数显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型对照组比较,低、中、高浓度艾烟组大鼠的精子活力、活率、A级精子数和A+B级精子数显著升高($P<0.01$)。不同浓度艾烟对弱精子症大鼠的精子密度均无明显影响。见表1。

讨论

世界卫生组织[9]规定,弱精子症是指精液参数中快速前向运动的A级精子数和慢速前向

运动的B级精子数之和

(A+B级) $<50\%$,或快速前向运动的A级精子数 $<25\%$ 的病症。尽管诊断弱精子症的最新标准是前向运动精子百分率(PR) $<32\%$ 或前向运动与非前向运动精子百分率之和(PR+NP) $<40\%$ [10],但许多地区还是沿用了本文所用的标准。研究表明,弱精子症的比率在精液常规检查结果异常的患者中呈逐年上升趋势,已成为引起不育症的最主要因素,也成为众多专家学者关注的研究热点[11]。计算机辅助精子分析系统能够快速准确地测定精子的活力、活率、密度等参数,还可以提供描述精子运动状态的多种参数[12]。本研究主要通过计算机辅助精子分析系统来检测艾烟对弱精子症大鼠附睾精子运动参数的影响。

弱精子症属于中医学“精清”“精薄”的范畴。“肾藏精,主生殖”,肾脏的精气盛衰直接影响人类的生殖健康。目前,许多医家主张男科病加用灸法治疗,取其温经散寒、活血化瘀、温补肝肾的功用;也有医家主张辨证施治,对于肾阳虚者施加灸法治疗。从临床研究来看,灸法治疗男科病确有较好的临床疗效,痊愈率和总有效率相对于单纯西药或者单纯针刺都体现出明显的优势[13]。

艾灸的治疗作用是一种综合效应,包括艾叶的药性作用,穴位的特异作用、温热效应、光辐射效应、艾燃烧生成物的成分和作用及芳香疗法等[14]。现代研究显示,艾燃烧生成物具有杀菌抗病毒[15],调节免疫[16],清除自由基、抗氧化[17],调节脂质代谢[18],降低炎症反应[19]等多种效果。随着对环境中雾霾毒性的深入研究,艾烟是否安全逐渐引起争议。靳然等[20]采用固相萃取-气相色谱-质谱联用技术对艾烟成分进行定性分析,结果表明,艾燃烧生成物成分多为可用于香精香料的芳香物质,少数成分如苯酚、邻苯二酚、对苯二酚在高浓度时才有一定的毒性。

艾烟对弱精子症大鼠精子质量的影响,笔者尚未见文献报道。本研究将艾烟视为艾灸疗法的起效因素之一,首次观察了艾烟对弱精子症大鼠精子活力的影响,结果显示,低、中、高浓度的艾烟均可显著提高弱精子症模型大鼠的精子活力、活率和运动能力,从而发挥一定的治疗作用。在实验设定的浓度范围内,随着艾烟浓度的升高,精子质量的改善效果呈现递增趋势。

纵观近几年针灸治疗弱精子症的研究报道,发现对于该病的临床研究居多而实验研究较少,针刺研究较多而单纯的艾灸治疗较少。弱精子症的病因和发病机制尚不清楚,在临床上也缺乏有效的治疗措施。因此,利用基础研究探索弱精子症的病因及发病机制,结合现代医学技术和方法进行全方面、多层次地探讨针灸治疗弱精子症的疗效和作用途径,可以为弱精子症的治疗提供有效的理论依据^[21]。由于弱精子症患者的治疗周期较长,而针刺治疗可能产生

疼痛感等,影响患者治疗的依从性和持续性,进而影响针刺疗效的稳定性^[22]。因此,探讨艾灸对弱精子症的治疗作用,对于保证中医药治疗弱精子症的临床疗效具有深远意义。

参 考 文 献

- [1] Jo J, Lee S H, Lee J M, et al. Semen quality improvement in a man with idiopathic infertility treated with traditional Korean medicine: A case report. *Explore (NY)*, 2015, 11 (4) : 320-323
- [2] 任彤彤, 张树成, 王介东. 男性生殖调节与生殖健康: 人类精液质量变化的趋势. *国外医学计划生育/生殖健康分册*, 2006, 25 (1) : 3-6
- [3] Sakagami H, Matsumoto H, Satoh K, et al. Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke. *In Vivo*, 2005, 19 (2) : 391-397
- [4] Wang L, Han L, Liu P, et al. Moxa smoke: Is it a beneficial or hazardous factor for infertility? A preclinical study on sperm parameters and sex hormones in male rats. *European Journal of Integrative Medicine*, 2016, 8 (1) : 28-35
- [5] Oberlander G, Yeung C H, Cooper T G. Induction of reversible infertility in male rats by oral ornidazole and its effects on sperm motility and epididymal secretions. *J Reprod Fertil*, 1994, 100 (2) : 511-559
- [6] 金滋润, 柳博珩, 蔡捷, 等. 电针治疗大鼠弱精子症的实验研究. *针刺研究*, 2017, 42 (2) : 114-118
- [7] 黄茶熙, 赵百孝, 刘平, 等. 京津地区艾灸场所夏季可吸入颗粒物(PM10)的质量浓度及微观形貌分析. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (12) : 3104-3108
- [8] Yuan C, Wang C, Gao S Q, et al. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24 (2) : 382-386
- [9] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 55-60
- [10] 世界卫生组织. 人类精液检查与处理实验室手册. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 17-20
- [11] Tang X, Zhang J, Cai Y, et al. Sperm membrane protein(hSMP-1) and RanBPM complex in the microtubule-organizing centre. *Mol Med*, 2004, 82 (6) : 383-388
- [12] 韦凌娅, 吕中明, 王民生. 计算机辅助精子分析系统在大鼠精子运动能力测定中的应用. *环境与执业医学*, 2007, 24 (6) : 596-598
- [13] 丰晓溟, 龚传宇, 崔云华, 等. 灸法治疗男科病研究进展. 2011中国针灸学会年会论文集(摘要), 2011: 4318-4335
- [14] 许焕芳, 赵百孝. 艾灸疗法作用机理浅述. *上海针灸杂志*, 2012, 31 (1) : 6-8
- [15] 魏孜孜, 卢标清, 孙一帆. 三种外治方法治疗耳真菌病的临床观察. *中国医药导报*, 2010, 7 (2) : 35-38
- [16] 许焕芳, 崔莹雪, 黄茶熙, 等. 艾燃烧生成物对SAMP8小鼠血清Th1/Th2细胞因子的影响. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (5) : 1387-1390
- [17] 刘钧天, 黄畅, 刘耀萌, 等. 艾灸各因素对APP/PS1双转基因AD小鼠脑中DNA、蛋白质、脂质氧化应激的影响. *中华中医药杂志*, 2015, 30 (5) : 1375-1379
- [18] 于梦芸, 哈略, 黄畅, 等. 艾灸对ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠肝脏病理及脂质代谢的作用研究. *世界中医药*, 2016, 11 (8) : 1419-1423
- [19] 刘耀萌, 崔莹雪, 哈略, 等. 艾灸及艾烟对动脉粥样硬化模型小鼠血清TNF- α 、hs-CRP及vWF的影响. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (4) : 1377-1379
- [20] 靳然, 赵百孝, 于密密, 等. 艾燃烧生成物组分固相微萃取气相色谱质谱法定性分析. *北京中医药大学学报*, 2011, 14 (9) : 632-636
- [21] 罗娟娟, 马慧昇, 许建峰. 中医药治疗少弱精子症研究进展. *亚太传统医药*, 2017, 13 (23) : 67-68
- [22] 于瑞雪, 谭文举, 韩雯雯, 等. 中医药治疗少弱精子症近况. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27 (33) : 3755-3758

(收稿日期: 2019年6月25日)