

# 电针治疗大鼠弱精子症的实验研究

金滋润<sup>1</sup> 柳博珩<sup>1</sup> 蔡捷<sup>1</sup> 景向红<sup>2</sup> 朱兵<sup>2</sup> 邢国刚<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>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;

<sup>2</sup>中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

**【摘要】** 目的:研究不同电针参数对大鼠弱精子症的治疗作用。方法:将 105 只雄性 SD 大鼠随机分为 2 Hz-每日电针组 9 只、假电针组 10 只、模型组 10 只, 2 Hz-隔日电针 5 d 组、假电针组、模型组各 8 只, 2 Hz-隔日电针 9 d 组、假电针组、模型组各 10 只, 100 Hz-隔日电针组 7 只、假电针组 8 只、模型组 7 只。采用奥硝唑灌胃法建立弱精子症大鼠模型。各电针组电针双侧“足三里”“肾俞”穴, 各假电针组予常规针刺。2 Hz-每日电针组, 每日治疗 1 次, 共 3 次; 2 Hz-隔日电针 5 d 组, 隔天治疗 1 次, 共 3 次; 2 Hz-隔日电针 9 d 组, 隔天治疗 1 次, 共 5 次; 100 Hz-隔日电针组, 隔天治疗 1 次, 共 5 次。通过计算机辅助精子分析系统观察电针对精子密度、活率、活力、A 级精子数以及 A+B 级精子数的影响。结果: 2 Hz-每日电针组: 与模型组及假电针组相比, 2 Hz-每日电针治疗对弱精子症大鼠精子运动的各项指标均没有明显改善作用 ( $P > 0.05$ )。2 Hz-隔日电针 5 d 组: 与模型组相比, 2 Hz-隔日电针 5 d 治疗可以增加大鼠精子的活力、A 级精子数以及 A+B 级精子数 ( $P < 0.05$ ); 而与假电针组相比, 2 Hz-隔日电针 5 d 治疗只增加了 A+B 级精子数 ( $P < 0.05$ )。2 Hz-隔日电针 9 d 组: 与模型组及假电针组相比, 电针后弱精子症大鼠精子的活率、活力、A 级精子数、A+B 级精子数均显著升高 ( $P < 0.001$ )。100 Hz-隔日电针组: 与模型组及假电针组相比, 100 Hz-隔日电针 5 次治疗可提高大鼠精子的活率 ( $P < 0.001, P < 0.05$ )、活力 ( $P < 0.001, P < 0.01$ )、A 级精子数及 A+B 级精子数 ( $P < 0.01$ )。各电针参数对弱精子症大鼠的精子密度无明显影响 ( $P > 0.05$ )。结论: 2 Hz-隔日电针 9 d 或 100 Hz-隔日电针 9 d 都可以提高弱精子症大鼠的精子活率和活力, 提升精子运动能力, 对弱精子症有一定的治疗作用。

**【关键词】** 弱精子症; 电针; 计算机辅助精子分析; 精子运动

**【中图分类号】** R 245.9<sup>+</sup>7 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.13702/j.1000-0607.2017.02.004

## Experimental Study for the Treatment of Asthenozoospermia by Electroacupuncture in Rats

JIN Zi-run<sup>1</sup>, LIU Bo-heng<sup>1</sup>, CAI Jie<sup>1</sup>, JING Xiang-hong<sup>2</sup>, ZHU Bing<sup>2</sup>, XING Guo-gang<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Neuroscience Research Institute of Peking University, Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; <sup>2</sup>Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

**【ABSTRACT】 Objective** To investigate the effects of different electroacupuncture (EA) parameters for the treatment of asthenozoospermia in rats. **Methods** One hundred and five male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 Hz-EA treatment daily in 3 d group ( $n=9$ ), sham-EA group ( $n=10$ ), model group ( $n=10$ ); 2 Hz-EA treatment every other day in 5 d group, sham-EA group, model group (8 rats in each group); 2 Hz-EA treatment every other day in 9 d group, sham-EA group, model group (10 rats in each group); 100 Hz-EA treatment every other day in 9 d group ( $n=7$ ), sham-EA group ( $n=8$ ), model group ( $n=7$ ). Asthenozoospermia model was established by intragastric administration of ornidazole (ORN, 400 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) once daily till the end of treatment. EA treatments (2 Hz or 100 Hz) were applied to “Shenshu” (BL 23, bilateral), “Zusanli” (ST 36, bilateral) for 30 min, intensity of 1–2–3 mA (increasing 1 mA per 10 min), once a day or once every other day for 3 times or 5 times. Sham-EA groups were treated with similar procedure except that the output leads of the stimulator were disconnected. The sperm density, viability, motility, the number of grade A sperm, and grade A+B sperm were examined by computer-assisted sperm analysis. **Results** (1) 2 Hz-EA treatment daily in 3 d: compared with the model group and the sham-EA group, 2 Hz-EA

项目来源: 国家卫生和计划生育委员会行业专项基金 (No. 201302013-01); 中国中医科学院针灸研究所开放选题项目 (No. ZZ 04004); 国家自然科学基金项目 (No. 81371237, 81072951, 61527815); 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) 课题 (No. 2013 CB 531905)

第一作者: 金滋润, 硕士研究生, 研究方向: 弱精子症的发病机制。E-mail: 18704032913@163.com

通信作者: 邢国刚, 博士, 博士后, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针灸神经生物学机制。E-mail: ggxing@bjmu.edu.cn

treatment once daily had no significant effect on all of the sperm motility indexes in the asthenozoospermic rats ( $P>0.05$ ). (2) 2 Hz-EA treatment every other day in 5 d: compared with the model group, EA treatment could increase the sperm motility ( $P<0.05$ ), the number of grade A sperm ( $P<0.05$ ), and the number of grade A+B sperm ( $P<0.05$ ) in the asthenozoospermic rats. However, compared with the sham-EA group, EA treatment could only improve the number of grade A+B sperm ( $P<0.05$ ). (3) 2 Hz-EA treatment every other day in 9 d: compared with both the model group and the sham-EA group, EA treatment could markedly improve the sperm viability ( $P<0.001$ ), the sperm motility ( $P<0.001$ ), the number of grade A sperm ( $P<0.001$ ), and the number of grade A+B sperm ( $P<0.001$ ) in the asthenozoospermic rats. (4) 100 Hz-EA treatment every other day in 9 days: compared with both the model group and the sham-EA group, all of the sperm indexes in the asthenozoospermic rats including the sperm viability ( $P<0.001$  vs. the model group,  $P<0.05$  vs. the sham-EA group), the sperm motility ( $P<0.001$  vs. the model group,  $P<0.01$  vs. the sham-EA group), the number of grade A sperm ( $P<0.01$ ) and the number of grade A+B sperm ( $P<0.01$ ) also could be improved after EA treatment. Unexpectedly, none of the EA treatment had significant influence on the sperm density in the asthenozoospermic rats. **Conclusion** Both 2 Hz-EA and 100 Hz-EA treatment once every other day for 5 times in 9 d had a therapeutic effect on asthenozoospermia by improving the sperm viability and the sperm motility in the rats.

**【KEYWORDS】** Asthenozoospermia; Electroacupuncture; Computer-assisted sperm analysis; Sperm motility

弱精子症是指以精子活力下降为主要表现,其他精液参数正常的病症,是引起男性不育的常见病因之一<sup>[1]</sup>。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。利用基础研究探索弱精子症的病因及发病机制可以为弱精子症的治疗提供有效的理论依据。前期的实验研究结果表明,生精散可以显著提高弱精子症大鼠的精子活率、活力及运动速度<sup>[2]</sup>。而对针刺等传统中医疗法治疗弱精子症的效果研究,有动物实验研究表明,电针“关元”“肾俞”“三阴交”穴可以改善腺嘌呤所致睾丸功能损害大鼠精子的密度、活率及前向运动精子比例<sup>[3]</sup>。同时电针治疗可以增加阴囊热损伤大鼠的精子发生<sup>[4]</sup>。但是电针对弱精子症模型大鼠的治疗效果目前并不清楚,而且电针治疗弱精子症的具体治疗方法也不明确。本研究系统地观察了2 Hz电针及100 Hz电针对弱精子症大鼠精子的密度、活率、活力等指标的影响,旨在探讨其对弱精子症大鼠的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

105只健康成年雄性SD大鼠,体质量200~230 g,由北京大学医学部实验动物中心提供,合格证号:SCXK(京)2006-0008。将大鼠按体质量随机分为2 Hz-每日电针组9只及假电针组10只、模型组10只,2 Hz-隔日电针5 d组及假电针组、模型组各8只,2 Hz-隔日电针9 d组及假电针组、模型组各10只,100 Hz-隔日电针组7只及假电针组8只、模型组7只。

### 1.2 主要试剂与仪器

奥硝唑片(浙江爱生药业有限公司),羧甲基纤

维素钠(化学纯,国药集团化学试剂有限公司),0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司)。无菌针灸针(0.30 mm×25 mm,苏州环球针灸医疗器械有限公司),韩氏穴位神经刺激仪(北京华卫产业开发公司,型号:LH 202),精子计数板(南宁松景天伦生物科技有限公司),水浴锅(北京市长风仪器有限公司),计算机辅助精子分析系统(北京伟力新世纪科技发展有限公司,型号:WLJY-9000)。

### 1.3 造模方法

大鼠适应性饲养1周后,参考文献<sup>[5]</sup>建立弱精子症大鼠模型:奥硝唑溶液灌胃,每次400 mg/kg,每日1次,连续灌胃至电针治疗结束。奥硝唑溶液制备:0.25 g奥硝唑加入1 mL 0.2%羧甲基纤维素钠溶液(0.2 g羧甲基纤维素钠加入100 mL灭菌的双蒸水,同时加入两滴100 μL Tween-20)置于干净研钵中研碎至糊状。以快速前向运动的A级精子数和慢速前向运动的B级精子数之和小于50%,或快速前向运动的A级精子数小于25%作为造模成功的标准。

### 1.4 治疗方法

奥硝唑灌胃第15天开始电针治疗。2 Hz-每日电针组每日治疗1次,治疗3次;2 Hz-隔日电针5 d组隔天治疗1次,治疗3次;2 Hz-隔日电针9 d组隔天治疗1次,治疗5次;100 Hz-隔日电针组隔天治疗1次,治疗5次。将大鼠固定在套筒中,针刺双侧的“足三里”“肾俞”穴,定位参照《实验针灸学》,针刺深度为5~10 mm,同侧穴位连接电针仪一对导线,连续波,2 Hz或100 Hz,强度1~2~3 mA,每10 min递增1 mA,共计30 min,以大鼠腿部微颤为宜。在施针过程中保持安静,避免惊吓大鼠,减少额外刺激。各假电针组处理同相应电

针组但不通电。实验过程遵循科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》，本研究已通过北京大学医学部动物伦理委员会的审批。

### 1.5 标本采集与检测指标

各组大鼠在电针结束后 1 d 腹腔注射过量水合氯醛处死,应用扩散法收集附睾尾精子进行精子活力分析实验,参考文献[6]方法稍加改进。将左侧附睾尾部放入标记好的含 2 mL 37 °C 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,轻轻地剪 3 刀,37 °C 水浴锅中放置 2 min,轻轻混匀,取 20 μL 加到 37 °C 预热的精子计数板上,选取 6 个视野,于 2 min 内完成测试。运用计算机辅助精子分析系统检测精子密度、精子活力、精子活率、A 级精子数及 A+B 级精子数。

### 1.6 统计学分析

所有数据均采用 Prism 5.0 统计软件进行分析。实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组间差异的分析采用单因素方差分析及 Bonferroni *post-hoc* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 2 Hz-每日电针对弱精子症大鼠的治疗效果

与模型组及假电针组相比,2 Hz 每日电针治疗对弱精子症大鼠精子运动的各项指标均没有明显改善作用( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 2 Hz-隔日电针 5 d 对弱精子症大鼠的治疗效果

与模型组相比,2 Hz-隔日电针 5 d 治疗可以增加弱精子症大鼠精子的活力、A 级精子数以及 A+B 级精子数( $P < 0.05$ );而与假电针组相比,2 Hz-隔日电针 5 d 组只增加了 A+B 级精子数( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 2 Hz-隔日电针 9 d 对弱精子症大鼠的治疗效果

与模型组及假电针组相比,电针后弱精子症大鼠精子的活率、活力、A 级精子数、A+B 级精子数均可以得到显著的改善( $P < 0.001$ )。见图 3。

### 2.4 100 Hz-隔日电针 9 d 对弱精子症大鼠的治疗效果

与模型组及与假电针组比较,100 Hz-隔日电针治疗可以显著改善弱精子症大鼠精子的活率( $P < 0.001, P < 0.05$ )、活力( $P < 0.001, P < 0.01$ )、A 级精子数( $P < 0.01$ )、A+B 级精子数( $P < 0.01$ )。

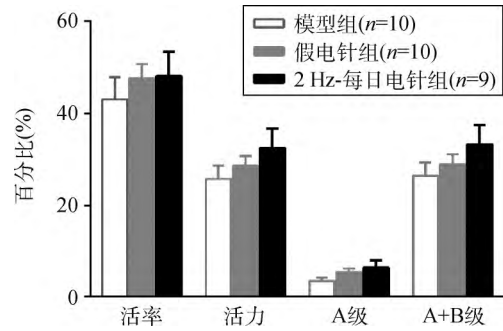


图 1 2 Hz-每日电针对大鼠附睾精子活率、活力、A 级精子数及 A+B 级精子数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

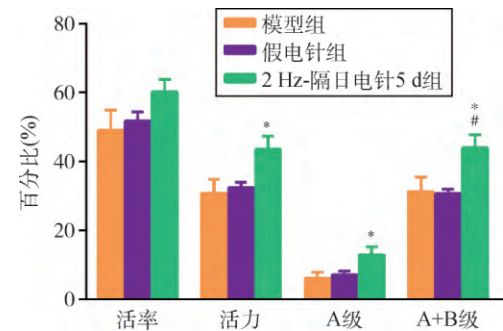


图 2 2 Hz-隔日电针 5 d 对大鼠附睾精子活率、活力、A 级精子数及 A+B 级精子数的影响( $\bar{x} \pm s, 8$  只鼠/组)

注:与模型组比较,\*  $P < 0.05$ ;与假电针组比较,#  $P < 0.05$ 。

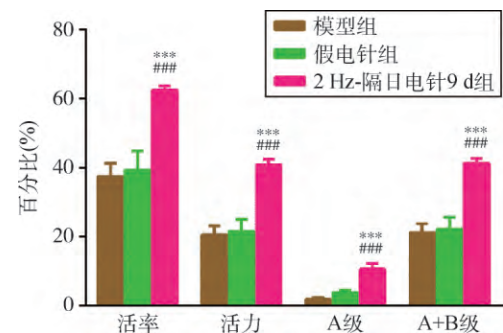


图 3 2 Hz-隔日电针 9 d 对大鼠附睾精子活率、活力、A 级精子数及 A+B 级精子数的影响( $\bar{x} \pm s, 10$  只鼠/组)

注:与模型组比较,\*\*\*  $P < 0.001$ ;与假电针组比较,#\*  $P < 0.001$ 。

见图 4。

### 2.5 不同电针参数对弱精子症大鼠精子密度的影响

各模型组与假电针组比较,大鼠的精子密度无明显变化( $P > 0.05$ );对比所有的电针参数发现,无论哪一种参数的电针治疗对弱精子症大鼠的精子密度都没有明显的影响( $P > 0.05$ )。见图 5。

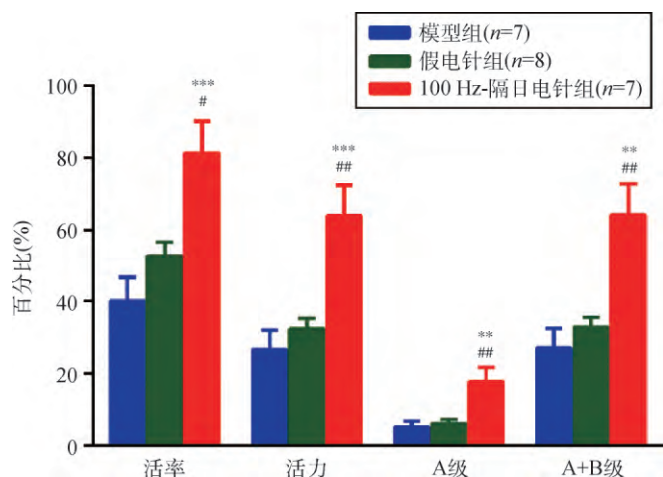


图4 100 Hz-隔日电针9 d对大鼠附睾精子活率、活力、A级精子数及A+B级精子数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

注:与模型组比较,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ;与假电针组比较, #  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ 。

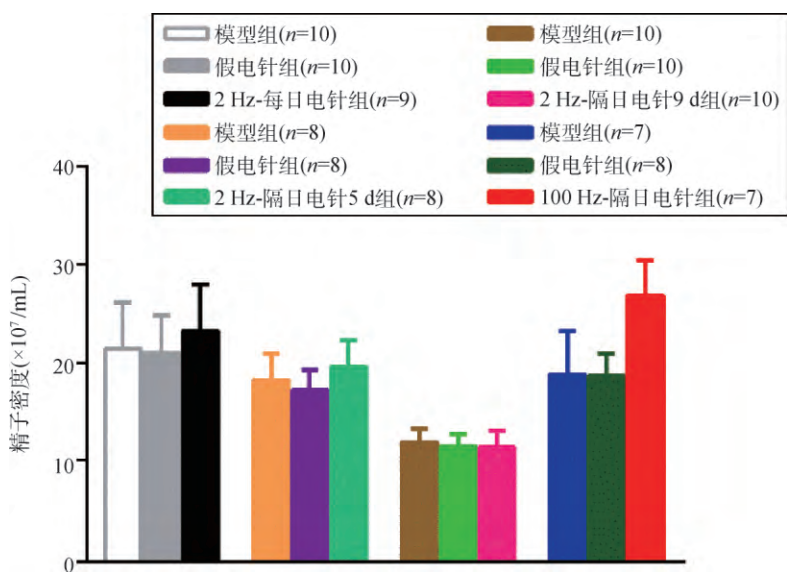


图5 各组大鼠附睾精子密度比较( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

世界卫生组织规定<sup>[7]</sup>,弱精子症指的是精液分析参数中,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)小于50%,或快速前向运动的A级精子数小于25%的病症,正常精液中,精子活力不低于50%,密度不小于 $20 \times 10^6$ /mL,精子存活率不小于75%。弱精子症的主要表现是精子运动能力低下。作为精子最基本的生理功能,精子运动与男性正常生殖功能的维持是密切相关的。精子鞭毛的摆动对于精子的正常运动、超活化运动、趋化作用及顶体反应等4个重要生理功能的发挥是必需的<sup>[8]</sup>。精子功能的主要评价指标包括精子的形态、密度及运动能力等。计算机辅助精液分析是近几年发展起来的一项主要通过检测精子运动指标来反映精子运动能力的技术,具有客观、精度高、效率高的特点<sup>[6]</sup>。故本研究主要通过计算机辅助精

液分析来检测电针治疗对大鼠附睾精子运动参数的影响,从而反映电针对弱精子症模型大鼠的治疗作用。

针刺作为一种传统的中医治疗手段,广泛地应用于多种疾病的治疗。有研究表明:利用传统的针刺中药复合治疗可以在一定程度上增加畸形合并弱精子症患者的精子运动能力并降低精子的畸形率,也可以增加少弱精子症患者的精子数目和精子运动能力<sup>[1,9-10]</sup>。同时针刺治疗对于精液不能液化以及少精子症导致的男性不育症也有一定的治疗作用<sup>[11-12]</sup>。针刺还可以增加精索静脉曲张导致的男性不育症患者的精子数目及精子运动能力<sup>[13]</sup>;而对于其他原因如自身精子抗体导致的不孕不育症患者,针刺也有一定的治疗作用<sup>[14]</sup>。在一些流行病学调查研究中也发现针刺可以增加男性不育症患者的前向运动精子数以及精子密度<sup>[15]</sup>。

电针对弱精子症模型大鼠的治疗效果,目前尚未见报道。本研究发现,即使只是单纯地使用2 Hz或100 Hz的电针治疗,也可以显著提高弱精子症模型大鼠的精子活率及精子运动能力。此外,本研究还发现,并不是每种方式的电针都对弱精子症有治疗作用,只有隔日1次9 d的电针治疗才可以通过增加弱精子症模型大鼠的精子活力、活率从而对弱精子症模型大鼠有一定的治疗作用。有研究表明,大鼠的生精周期约为12.5 d<sup>[16]</sup>。因此我们推测,当给予大鼠隔日1次9 d的电针治疗时,总的治疗周期与大鼠的一个生精周期是相对应的,所以电针的疗程和方式影响了电针对弱精子症模型大鼠的治疗效果。同时有研究表明,不同频率

的电针可以引起不同类型阿片肽的释放<sup>[17]</sup>,而精子上的 $\beta$ -内啡肽可以通过增加精子的顶体反应来增强精子穿透卵细胞的能力<sup>[18]</sup>,同时 $\mu$ 、 $\delta$ 和 $\kappa$ 3种阿片受体在精原细胞、精母细胞、精子细胞和精子上均有表达<sup>[19]</sup>。结合本研究的结果,我们推论:电针治疗可能是通过增加精子阿片肽的释放或者增加阿片肽受体的表达来提高精子的活力,从而达到治疗弱精子症的目的。而不同频率的电针可能是通过引起精子不同阿片肽的释放或导致相应阿片肽受体表达的增加,从而对弱精子症产生有效的治疗作用。

## 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[J]. *Explore (NY)*, 2015, 11(4):320-323.
- [2] 韩彩艳,孙伟,王波,等.生精散治疗大鼠弱精子症的实验研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(4):31-33.
- [3] 李静,赖新生,涂成文.电针治疗对睾丸功能损害雄性大鼠精子数量和质量的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(4):315-317.
- [4] GAO J, ZUO Y, SO K H, et al. Electroacupuncture enhances spermatogenesis in rats after scrotal heat treatment[J]. *Spermatogenesis*, 2012, 2(1):53-62.
- [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]. *J Reprod Fertil*, 1994, 100(2):551-559.
- [6] YUAN C, WANG C, GAO S Q, et al. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis[J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(2):382-386.
- [7] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction[M]. 4th ed, Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 55-60.
- [8] KIRICHOK Y, LISHKO P V. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique[J]. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17(8):478-499.
- [9] JO J, KANG M J. Successful treatment of oligoasthenozoospermia using traditional Korean medicine resulting in spontaneous pregnancy: two case reports[J]. *Explore (NY)*, 2016, 12(2):136-138.
- [10] DIETERLE S, LI C, GREB R, et al. A prospective randomized placebo-controlled study of the effect of acupuncture in infertile patients with severe oligoasthenozoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(4):1340-1343.
- [11] PENG S, ZHENG Y, ZHENG K, et al. Effect of a comprehensive therapy plus Gushenyutai plaster administered at Guanyuan (CV 4) on male infertility associated with semen non-liquefaction [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(6):666-672.
- [12] BIDOUEE F, SHAMSA A, JALALI M. Effect of acupuncture on azoospermic male[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2011, 22(5):1039-1040.
- [13] KUCUK E V, BINDAY I A, BOYLU U, et al. Randomised clinical trial of comparing effects of acupuncture and varicocelectomy on sperm parameters in infertile varicocele patients [J]. *Andrologia*, 2016, 48(10): 1080-1085.
- [14] FU B, LUN X, GONG Y. Effects of the combined therapy of acupuncture with herbal drugs on male immune infertility—a clinical report of 50 cases[J]. *J Tradit Chin Med*, 2005, 25(3):186-189.
- [15] JERNG U M, JO J Y, LEE S, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for poor semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis[J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(6):884-891.
- [16] ASLAM H, ROSIEPEN G, KRISHNAMURTHY H, et al. The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys[J]. *J Endocrinol*, 1999, 161(2):281-288.
- [17] HAN J S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies [J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(1):17-22.
- [18] URIZAR-ARENAZA I, ESTOMBA H, MUNOIA-HOYOS I, et al. The opioid peptide beta-endorphin stimulates acrosome reaction in human spermatozoa[J]. *Andrology*, 2016, 4(1):143-151.
- [19] ESTOMBA H, MUNOIA-HOYOS I, GIANZO M, et al. Expression and localization of opioid receptors in male germ cells and the implication for mouse spermatogenesis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e 0152162.

(收稿日期:2016-04-29 修回日期:2016-08-03)