

五子衍宗丸通过下调IL-17通路减少细胞凋亡治疗少弱精子症

毛静, 张立新, 王文凯, 陈霞*

南通大学医学院, 江苏南通 226019

摘要: 目的 探究五子衍宗丸(WZYZP)治疗少弱精子症(OAS)的药效与作用机制。方法 应用环磷酰胺(CTX)诱导的SD大鼠作为OAS的体内模型,通过ig 0.5、1.5 g·kg⁻¹ WZYZP探究其治疗OAS大鼠的体内药效与作用机制。通过全自动精子分析系统检测大鼠精子参数;应用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中睾酮的量,通过HE染色法观察给药后OAS大鼠睾丸组织形态学改变。采用网络药理学预测WZYZP治疗OAS的具体靶点。应用酶联免疫吸附法测定大鼠睾丸组织炎症因子白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;通过TUNEL染色测定大鼠睾丸组织中细胞凋亡情况;免疫组织化学染色检测睾丸组织白细胞介素17(IL-17)表达情况;Western blotting检测Caspase-3、热休克蛋白90AA1(HSP90AA1)、磷酸化核因子 κ B(p-NF- κ B)、核因子 κ B(NF- κ B)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)、细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、p-p38和p38的表达水平。使用HPLC检测WZYZP中的主要活性成分并与网络药理学所得靶点进行分子对接模拟以探索其具体机制。结果 体内实验结果表明,WZYZP可显著改善CTX诱导的OAS大鼠精子参数、血清睾酮水平($P < 0.001$)和睾丸组织形态学。网络药理学结果表明WZYZP与OAS的关键通路为IL-17,关键靶点为Caspase3、p38、NF- κ B、HSP90和ERK1/2。TUNEL染色结果表明,1.5 g·kg⁻¹ WZYZP可显著降低OAS大鼠睾丸组织细胞凋亡($P < 0.05$)。Western Blotting结果显示,与模型组相比,1.5 g·kg⁻¹ WZYZP组Caspase-3($P < 0.001$)和HSP90AA1($P < 0.01$)的表达水平明显降低,NF- κ B($P < 0.05$)、ERK1/2($P < 0.05$)和p38($P < 0.05$)磷酸化水平明显降低。分子对接模拟结果发现,8种主要活性成分(槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸)和IL-17通路5种相关靶点(HSP90AA1、ERK、p38、NF- κ B和Caspase3)的结合能均小于-20.92 kJ·mol⁻¹,具有较好的结合亲和力。结论 WZYZP可通过下调IL-17通路减少细胞凋亡发挥治疗OAS作用。

关键词: 五子衍宗丸;少弱精子症;白细胞介素;细胞凋亡;分子对接;五味子醇甲;金丝桃苷;紫云英苷;五味子甲素
中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1540-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.013

Wuziyanzong Pills reduce apoptosis of oligoasthenozoospermia via down-regulating IL-17 pathway

MAO Jing, ZHANG Lixin, WANG Wenkai, CHEN Xia

Medical College of Nantong University, Nantong 226019, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy and mechanism of action of Wuziyanzong Pill (WZYZP) in treatment of oligoasthenozoospermia (OAS). **Methods** Cyclophosphamide (CTX)-induced SD rats were used as an *in vivo* model of OAS, and the *in vivo* efficacy and mechanism of action of WZYZP were investigated by ig 0.5 and 1.5 g·kg⁻¹ WZYZP. The sperm parameters of rats were detected by automatic sperm analysis system; the amount of testosterone in serum of rats was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and the histomorphometric changes of testes of OAS rats were observed by HE staining after drug administration. Network pharmacology was used to predict the specific targets of WZYZP in the treatment of OAS. The levels of inflammatory factors interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in rat testicular tissue were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); apoptosis in rat testicular tissue was determined by TUNEL staining; the expression of interleukin 17 (IL-17) in testicular tissue was detected by immunohistochemical staining; and the expression of cysteine-containing cells in testicular tissue was detected by western blotting. Blotting was performed to detect the expression of Caspase-3, heat shock protein 90AA1 (HSP90AA1), phosphorylated nuclear factor κ B (p-NF- κ B), nuclear factor κ B (NF- κ B),

收稿日期: 2024-01-25

基金项目: 南通市科技计划项目(JC2021011)

第一作者: 毛静, 硕士研究生, 主要从事中医药治疗不育症的研究。E-mail: 1987489271@qq.com

*通信作者: 陈霞, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: chenxia14418@163.com

phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, p-p38 and p38 expression levels. The main active components in WZYYP were detected using HPLC and molecular docking simulations with targets obtained from network pharmacology were performed to explore the specific mechanisms. **Results** The results of *in vivo* experiments showed that WZYYP significantly improved sperm parameters, serum testosterone levels ($P < 0.001$) and testicular histomorphometry in CTX-induced OAS rats. The results of network pharmacology showed that the key pathway of WZYYP with OAS was IL-17, and the key targets were Caspase-3, p38, NF- κ B, HSP90 and ERK1/2. TUNEL staining results showed that 1.5 g·kg⁻¹ WZYYP significantly reduced apoptosis in testicular tissues of OAS rats ($P < 0.05$); Immunohistochemistry results showed that 1.5 g·kg⁻¹ WZYYP significantly reduced testicular IL-17 expression in OAS rats ($P < 0.001$); ELISA results showed that IL-1 β ($P < 0.05$) in the testicular tissues of rats in the 1.5 g·kg⁻¹ WZYYP group compared with the model group, IL-6 ($P < 0.01$) and TNF- α ($P < 0.01$) were significantly lower in the testicular tissues of rats in the 1.5 g·kg⁻¹ WZYYP group compared with the model group; the results of Western Blotting showed that the expression levels of Caspase-3 ($P < 0.001$) and HSP90AA1 ($P < 0.01$) were significantly lower in the 1.5 g·kg⁻¹ WZYYP group compared with the model group, and the expression level of NF- κ B ($P < 0.05$), ERK1/2 ($P < 0.05$) and p38 ($P < 0.05$) phosphorylation levels were significantly reduced. Molecular docking simulations revealed that the binding energies of the eight main active ingredients (quercetin, schisandrin A, chrysin, kaempferol, zingiber officinale, schisandrin, isoquercitrin, and chlorogenic acid) and the five relevant targets of the IL-17 pathway (HSP90AA1, ERK, p38, NF- κ B, and Caspase3) were all less than -20.92 kJ·mol⁻¹, with good binding. **Conclusion** WZYYP can reduce apoptosis by down-regulating IL-17 pathway to treat OAS.

Key words: Wuziyanzong Pills; oligoasthenospermia; IL-17; apoptosis; molecular docking; schisandrin A; chrysin; zingiber officinale; schisandrin

20世纪的流行病学统计结果显示,不孕不育症持续影响着全球15%的夫妻^[1],目前仍是一个关系人类社会发展的社会性问题。研究结果显示,全球40%的不孕症由男性引起,包括少精子症和弱精子症等^[2-3]。男性不育症的因素多种多样,包括代谢、毒素、其他疾病等,其中特发性的精子异常约占30%^[4]。由于其复杂的发病机制和医学技术的治疗效果不佳,致使男性精液质量下降呈逐渐上升的趋势^[5]。少弱精子症(OAS)系指根据世界卫生组织《人类精液手册》的标准,精子数量减少,运动能力下降的病症^[6]。目前西医临床上主要是通过给予维生素E、左卡尼汀等药物抗氧化治疗,并无足够有效的治疗方案^[7]。

五子衍宗丸(WZYYP)起源于唐代道藏《悬解录》,由五味子、枸杞子、覆盆子、菟丝子和车前子5味中药组成^[8],是收录于《中国药典》的一剂补益类经典名方,主治肾虚精亏,被称为“古今种子第一方”^[9]。尽管WZYYP已在中国临床上广泛应用于治疗少精子症和弱精子症且得到良好的临床疗效^[10-12],也有研究人员报道过该方的药效物质基础和机制研究^[13-14]。但由于中药方剂过于复杂的成分和内部协同作用,目前的基础研究局限于WZYYP中某味中药或药对中,并未能体现WZYYP作为中医药多靶点、整体性特点的系统药理学研究,对于WZYYP治疗OAS的分子机制仍认知有限^[15]。因此,本研究采用现代系统药理学和生物信息学方法,通过网络药理学预测WZYYP治疗OAS的具体

靶点并于环磷酰胺(CTX)诱导的特发性OAS模型大鼠上进行体内药效和机制验证,并通过HPLC测定其主要活性成分,采用分子对接探究其具体活性成分与整体靶点的分子机制关联,试图挖掘WZYYP治疗OAS的作用靶点和活性组分,为提高WZYYP的国际认知提供理论基础和数据支撑。

1 材料

1.1 药品与试剂

CTX,阿拉丁生化科技有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),上海源叶生物科技有限公司;大鼠睾酮、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定试剂盒,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;左卡尼汀,美国默克Sigma公司;苏木素&伊红(HE)染色试剂盒、4%多聚甲醛固定液、DAB辣根过氧化物酶(HRP)显色试剂盒、一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光),碧云天生物技术有限公司;兔抗白细胞介素-17(IL-17)、兔抗热休克蛋白90(HSP90)、兔抗Caspase-3、兔抗核因子- κ B(NF- κ B)、兔抗磷酸化细胞外调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)、兔抗细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、兔抗p-p38、兔抗p38, Proteintech Group, Inc;兔抗磷酸化核因子- κ B(p-NF- κ B), Affinity Biosciences Ltd.;兔抗 β -actin, Bioworld;WZYYP(批号Z11020188,每袋装6g),北京同仁堂有限公司;对照品绿原酸(CAS327-97-9)、金丝桃苷(CAS482-36-0)、异槲皮苷(CAS482-35-9)、紫云英苷(CAS480-10-4)、槲皮素(CAS117-39-5)、山

柰酚(CAS520-18-3)、五味子醇甲(CAS7432-28-2)、五味子甲素(CAS61281-38-7)均购于成都埃法生物科技有限公司;乙腈,色谱纯,国药试剂公司;甲醇,分析纯,上海凌峰公司;磷酸,分析纯,上海晶纯生化科技股份有限公司。

1.2 仪器

Scientz-48高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司;SpectraMax iD5多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司;Fresco17高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific公司;SC-153数控超级恒温槽,宁波新芝生物科技股份有限公司;AUY120精密分析天平,日本岛津仪器公司;Amersham Imager600凝胶成像分析系统,美国GE集团;TUS-200振荡型恒温金属浴,上海一恒科技有限公司;Milli-Q Integral超纯水系统,美国Millipore公司;UltiMate 3000高效液相色谱仪,Thermo Fisher Scientific公司;HistoCore Arcadia全自动组织包埋仪、HistoCore AUTOCUT全自动石蜡切片机、HistoCore SPECTRA染色和封片工作站、DM2000正置光学显微镜、DMI8倒置荧光显微镜,德国Leica公司;TOX IVOS精子分析系统,Hamilton Thorne Biosciences。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 动物饲养及给药 75只8周龄SPF级雄性SD大鼠饲养于江苏卫生健康职业学院中心实验室动物房,在12 h光照/12 h黑暗循环下自由饮水和饮食,饲养温度为 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $(60\pm 10)\%$ 。实验动物生产许可证号(SCXK)沪2018-0006,所有动物均取得江苏省实验动物伦理委员会伦理证明,伦理合格证号为JHVC-IACUC-2023-B019。适应性喂养1周后,随机分为5组,其中4组ip CTX($35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,5 d)诱导OAS模型,另一组ip 0.9%生理盐水连续5 d作为对照,于1周后眼内眦取血检测血清睾酮含量用以确定模型成立。WZYZP和左卡尼汀溶于 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠溶液(CMCC-Na)中用于ig给药,分组及给药:对照组和模型组均ig $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CMCC-Na, $2\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$, WZYZP低、高剂量组分别ig WZYZP 0.5 、 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,阳性对照组ig左卡尼汀 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,各组均连续给药21 d。

2.1.2 精子参数检测 实验期间,所有大鼠自由饮水和饮食,每天固定时间ig给药。于干预21 d后结束实验,麻醉后腹主动脉取血,并取双侧睾丸和附

睾组织,左侧睾丸置于4%多聚甲醛中固定,右侧睾丸冻存于 -80°C 冰箱。将双侧附睾放入水浴箱中预热的Hams' F10培养基中, 37°C 培养30 min,直至附睾精子完全解离。采用WLJY-9000伟力数码彩色精子质量检测系统检测精子活力。从输精管获得精子细胞,并轻轻混合,使用精子分析系统评估精子活力的运动学参数。

2.1.3 酶联免疫吸附实验 大鼠血液样本经室温静置3 h后于低温高速离心机 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上层血清作为样本进行睾酮检测。睾丸组织经研磨后进行IL-1 β 、IL-6和TNF- α 测定。所有测定方法均按照市场现售试剂盒说明书进行,并在多功能酶标仪中进行检测。

2.1.4 HE染色 将置于4%的多聚甲醛固定液中的睾丸组织固定72 h,用石蜡进行包埋后,制作 $5\ \mu\text{m}$ 的切片,用HE染色法进行染色,在正置光学显微镜下观察睾丸组织病理变化及生精细胞与间质细胞面积并拍摄结果。

2.1.5 免疫组织化学染色 将置于4%的多聚甲醛固定液中的睾丸组织固定72 h,用石蜡进行包埋后,制作 $5\ \mu\text{m}$ 的切片。石蜡切片使用乙醇梯度洗脱脱蜡,经历抗原修复和DNA变性后使用3%过氧化氢溶液避光孵育30 min阻断内源性过氧化物酶,并以3%的牛血清白蛋白(BSA)溶液作为封闭液室温孵育30 min。石蜡切片与配制好的兔源IL-17混合一级抗体置于湿盒中 4°C 孵育过夜。使用HRP标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)配制混合二抗,将孵育完成一级抗体的切片置于湿盒中并在切片圈里滴加混合二抗室温孵育1 h后进行二氨基联苯胺(DAB)显色。显色完成后使用苏木素复染细胞核,使用甘油封片后在显微镜下观察染色情况并使用Image J分析阳性面积。

2.1.6 TUNEL染色 睾丸组织石蜡切片脱蜡后依据TUNEL染色试剂盒说明书进行染色,并使用抗荧光淬灭封片液封片,立即于倒置荧光显微镜下观察染色结果并拍照,使用Image J分析阳性面积(绿色荧光)。

2.1.7 Western blotting检测蛋白表达情况 睾丸组织使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2遍后,加入含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解液裂解细胞(10 mg 组织加入 $100\ \mu\text{L}$ RIPA裂解液),组织研磨仪研磨5 min后,于冰上裂解30 min,BCA定量后加入上样缓冲液并于 100°C 恒温金属浴变性10 min后使用Western blotting法检测蛋白表达情

况。取30 μg蛋白质加样于10%的预制凝胶上负载,恒压电泳160 V、45 min后将目标蛋白所属位置裁剪并转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。使用5% BSA室温摇床孵育2 h封闭PVDF膜后,将其在4 °C与一级抗体(1:1 000)孵育过夜。次日使用TBST清洗后,于常温和HRP标记的二级抗体(1:2 000)孵育2 h,清洗后使用ECL发光液于凝胶成像系统成像。成像结果使用ImageJ进行灰度积分并分析。

2.1.8 数据处理 使用Graphpad prism 8.3.0进行统计学和可视化处理,两组和多组间使用单因素方差分析和 t 检验进行差异性分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 呈现。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 WZYZP活性成分信息 分别以WZYZP中5种组成中药五味子、枸杞子、菟丝子、覆盆子和车前子为关键词,在中药系统药力学分析平台(TCMSP)(<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)中检索WZYZP的主要活性成分,根据研究结果^[16],以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18为限制条件进行筛选,并对其编号,得到WZYZP的活性成分信息。

2.2.2 OAS靶点信息 设置检索词为“oligoasthenospermia”“asthenospermia”和“asthenozoospermia”于人类基因的综合数据库GeneCards(<https://www.genecards.org/>)和在线人类孟德尔遗传数据库Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM,<https://www.omim.org/>)中进行检索,并将得到的基因靶点通过UniProt Knowledgebase(Uniprot,<https://www.uniprot.org/>)转化为Official Gene Symbol,并统一进行查重处理,得到OAS的靶点信息。

2.2.3 活性成分靶点预测 将从TCMSP中得到的WZYZP化合物信息通过有机小分子生物活性数据库(PubChem,<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)转化为Isomeric SMILES结构式输入SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行靶点预测,无法得到Isomeric SMILES结构式的化合物通过SwissTargetPrediction的在线手绘工具进行手绘。根据预测的结果,以拟合度前100对靶点进行筛选,并将得到的基因靶点通过Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)转化为Official Gene Symbol,得到WZYZP活性成分的靶点信息。

2.2.4 药物与疾病的共同靶点筛选 将与化合物对应的靶点信息和OAS的靶点信息统一整合到同一个Excel表中,利用VLOOKUP函数在OAS的靶点中检索化合物的靶点是否匹配,并对检索结果进行排序,删除无效值后得到WZYZP与OAS的共同靶点,并将化合物靶点信息和OAS靶点信息导入微生物信网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化处理。

2.2.5 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将所得到的活性成分-疾病交集靶点导入蛋白质相互作用数据库(String,<https://cn.string-db.org/>)进行PPI分析,将物种设定为Homo sapiens,完成PPI网络分析,并将所得到的结果导入网络拓扑软件Cytoscape3.9.1中进行可视性优化,得到PPI网络图谱。

2.2.6 WZYZP治疗OAS潜在靶点的基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析 将所得到的WZYZP治疗OAS的潜在靶点导入David数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>),并选取Homo sapiens作为物种进行GO和KEGG富集分析,根据富集结果筛选富集程度前25的通路和富集程度前10的GO信息于微生物信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)平台对GO和KEGG结果进行可视化处理。

2.2.7 “药物-成分-靶点-通路”网络构建 将GO分析和KEGG通路分析所得的关键通路及其关键靶点与对应的活性成分和药物信息导入网络拓扑软件Cytoscape3.9.1中进行网络构建,并进行可视化分析处理,并综合考虑关键靶点及其通路。

2.3 主要成分分析

2.3.1 供试品溶液的制备 取WZYZP 40粒,研细,精密称量取约2.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,密塞,超声(200 W, 40 kHz)处理80 min,取出摇匀,用70%甲醇补足50 mL后,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚、五味子醇甲、五味子甲素对照品适量,加70%甲醇溶解后置于统一量瓶中,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 AgilentExtend-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~7 min,10%乙腈;7~15 min,10%~14%乙腈;15~25 min,14%~45%乙腈;25~35 min,

45%~65% 乙腈; 35~50 min, 65% 乙腈; 50~55 min, 65%~85% 乙腈; 55~70 min, 85%~10% 乙腈; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 250 nm; 进样 10 μL。

2.3.4 方法学考察 (1)精密度试验:取同一供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件,每次进样 10 μL,连续进样 6 次,记录 HPLC 色谱图,以金丝桃苷为参照峰,计算得到 8 个成分色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.151%~0.502%,相对峰面积的 RSD 值为 0.724%~1.219%,表明该仪器精密度良好。

(2)重复性试验:按“2.3.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.3.3”项下色谱条件,分别进样 10 μL,记录 HPLC 色谱图,以金丝桃苷为参照峰,计算得到 8 个成分色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.086%~0.408%,相对峰面积的 RSD 值为 0.458%~1.470%,表明该方法重复性良好。

(3)稳定性试验:取同一供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件,依次于供试品溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL,记录 HPLC 色谱图,以金丝桃苷为参照峰,计算得 8 个成分色谱峰相对保留时间的

RSD 值为 0.308%~0.724%,相对峰面积的 RSD 值为 0.371%~1.370%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

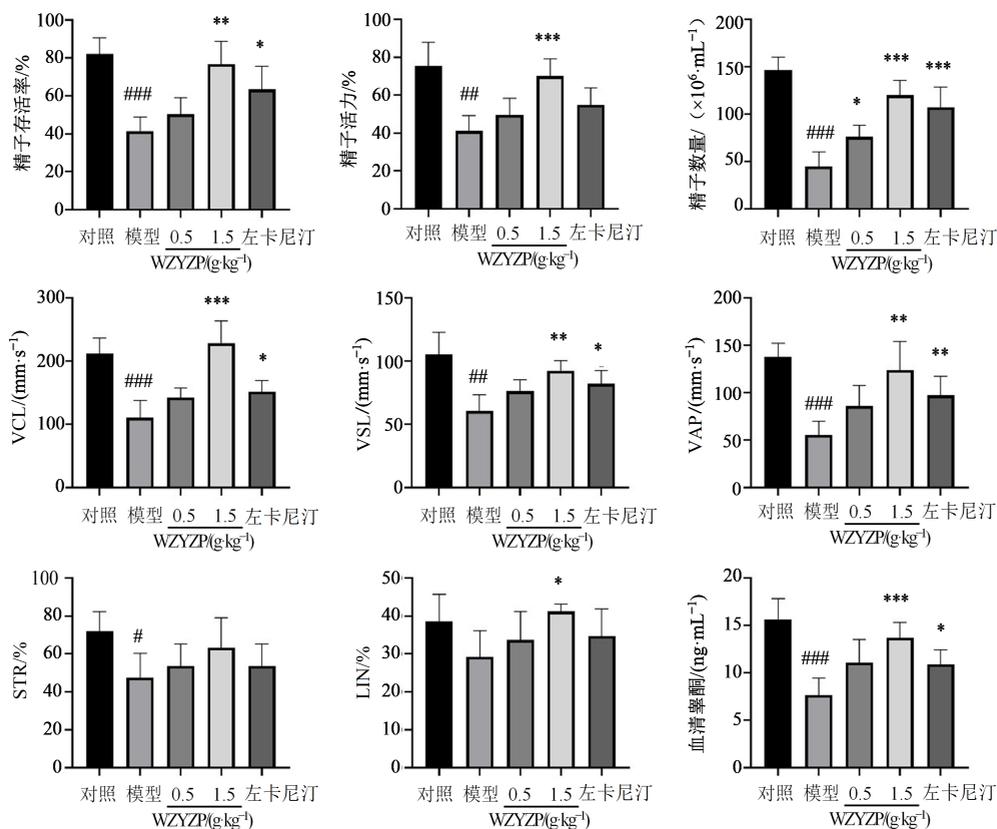
2.4 分子对接

于 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸的结构式, HSP90 (PDB 编号 5NJX)、ERK (PDB 编号 6SLG)、p38 (PDB 编号 6SFO)、NF-κB (PDB 编号 1A3Q) 和 Caspase-3 (PDB 编号 2J31) 的蛋白结构由 PDB 数据库 (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/>) 采取,应用 Autodock tools 1.5.6 进行蛋白结构处理并使用 Autodocking vina 1.2.0 进行分子对接。对接结果导入 Pymol 进行可视化处理。

3 结果

3.1 WZYZP 对 OAS 模型大鼠精子质量、睾酮水平及睾丸组织形态的影响

通过检测精子运动参数、精子存活率、精子活力和精子数量来评价 WZYZP 对 OAS 大鼠的精子质量的影响。由图 1 可知,模型组比对照组的精子存



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图1 WZYZP 对 OAS 大鼠精子参数及血清睾酮的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of WZYZP on sperm parameters and serum testosterone in OAS rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

活率、精子数量以及精子活力显著降低($P < 0.01$ 、 0.001), WZYZP $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组显著升高($P < 0.01$ 、 0.001)并且呈明显的剂量相关性。精子曲线速度(VCL)、精子直线速度(VSL)、精子平均路径速度(VAP)的检查结果也是如此。表明WZYZP可提高OAS大鼠的精子质量,且WZYZP $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组大鼠的精子质量明显优于阳性对照组。性激素检测结果表明,模型组大鼠的睾酮水平显著降低($P < 0.001$),而WZYZP可逆转这种现象($P < 0.001$)。

通过HE染色检测了大鼠睾丸组织的形态学改变(图2)。结果表明,模型组大鼠睾丸较对照组生精小管明显萎缩,小管间隙增大,生精细胞和间质

细胞数量降低($P < 0.05$)。给予WZYZP干预后,上述情况得到明显缓解。生精小管间隙变小,生精细胞和间质细胞数量恢复($P < 0.05$),排列更加紧密。说明WZYZP可改善大鼠OAS。

3.2 WZYZP通过下调IL-17通路减少凋亡治疗CTX诱导大鼠的OAS

3.2.1 WZYZP治疗OAS的网络药理学分析

通过检索TCMSP数据库共得到WZYZP成分512个,其中五味子130个、枸杞子188个、菟丝子29个、覆盆子110个、车前子55个,通过筛选得到主要活性成分80个,其中五味子8个、枸杞子45个、菟丝子11个、覆盆子7个、车前子9个,结果见表1。

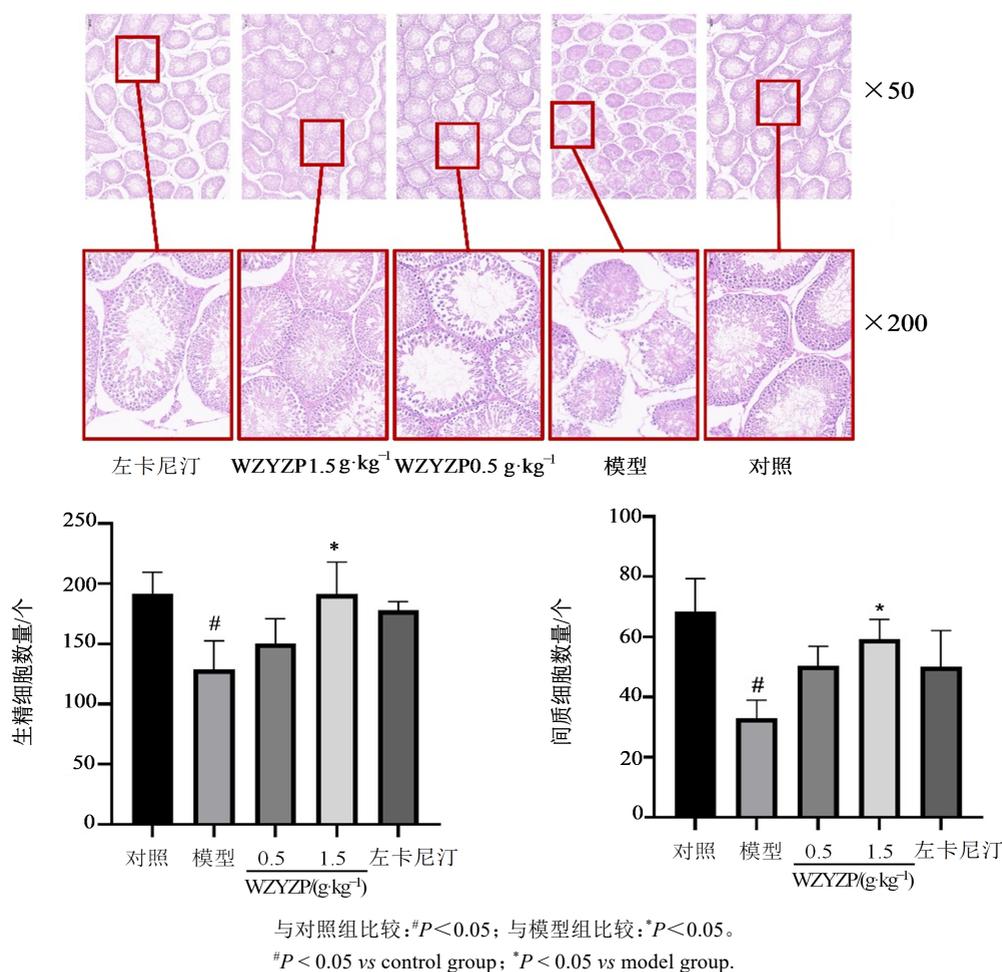


图2 WZYZP对OAS大鼠睾丸组织形态学的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of WAYZP on testicular histomorphology in OAS rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

将所得的WZYZP活性成分结构式导入SwissTargetPrediction数据库进行靶点预测,选取可靠性前100的靶点作为WZYZP活性成分的潜在靶点,共得到6960个靶点,其中五味子靶点727个,枸杞子靶点3932个,菟丝子靶点1100个,覆盆子靶点501个,车前子靶点700个,删除重复值后得到959个

靶点。以“asthenospermia”和“asthenozoospermia”为疾病名称检索上述2个数据库后,OMIM得到620个靶点, Gene Cards得到637个靶点,合并删除重复值后共得到643个OAS相关靶点。使用excel检索靶点信息,得到67个WZYZP和OAS共同靶点。

表1 WZYZP主要活性成分
Table 1 Active ingredients of WZYZP

来源	编号	名称	相对分子质量	OB/%	DL
五味子	SCF-1	gomisin-A	416.51	30.69	0.78
	SCF-2	schizandrer B	514.62	30.71	0.83
	SCF-3	angeloylgomisin O	498.62	31.97	0.85
	SCF-4	gomisin G	508.61	32.68	0.83
	SCF-5	gomisin R	400.46	34.84	0.86
	SCF-6	deoxyharringtonine	515.66	39.27	0.81
	SCF-7	wuweizisu C	384.46	46.27	0.84
	SCF-8	longikaurin A	348.48	47.72	0.53
枸杞子	LF-1	delta-carotene	536.96	31.80	0.55
	LF-2	lanost-8-enol	428.82	34.23	0.74
	LF-3	lanost-8-en-3beta-ol	428.82	34.23	0.74
	LF-4	14b-pregnane	288.57	34.78	0.34
	LF-5	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
	LF-6	daucosterol_qt	414.79	36.91	0.75
	LF-7	24-ethylcholest-22-enol	414.79	37.09	0.75
	LF-8	24-methylenecycloartan-3beta,21-diol	456.83	37.32	0.80
	LF-9	campesterol	400.76	37.58	0.71
	LF-10	4,24-methyllophenol	414.79	37.83	0.75
	LF-11	CLR	386.73	37.87	0.68
	LF-12	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	428.82	38.00	0.75
	LF-13	lophenol	400.76	38.13	0.71
	LF-14	31-norlanost-9(11)-enol	414.79	38.35	0.72
	LF-15	lantadene A	552.87	38.68	0.57
	LF-16	31-norcyclolaudenol	440.83	38.68	0.81
	LF-17	cycloartenol	426.80	38.69	0.78
	LF-18	4alpha,14alpha,24-trimethylcholesta-8,24-dienol	426.80	38.91	0.76
	LF-19	methyl (1R,4aS,7R,7aS)-4a,7-dihydroxy-7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,5,6,7a-tetrahydrocyclopenta[d]pyran-4-carboxylate	406.43	39.43	0.47
	LF-20	cycloeucalenol	426.80	39.73	0.79
	LF-21	7-O-methyluteolin-6-C-beta-glucoside_qt	318.30	40.77	0.30
	LF-22	mandenol	308.56	42.00	0.19
	LF-23	(E,E)-1-ethyl octadeca-3,13-dienoate	308.56	42.00	0.19
	LF-24	LAN	426.80	42.12	0.75
	LF-25	atropine	289.41	42.16	0.19
	LF-26	31-norlanosterol	412.77	42.20	0.73
	LF-27	4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	426.80	42.30	0.78
	LF-28	24-methylenelanost-8-en-3beta-ol	440.83	42.37	0.77
	LF-29	obtusifoliol	426.80	42.55	0.76
	LF-30	4alpha,24-dimethylcholesta-7,24-dienol	412.77	42.65	0.75
	LF-31	sitosterol alpha I	426.80	43.28	0.78
	LF-32	6-fluoro-7-dehydrocholesterol	402.70	43.73	0.72
	LF-33	fucosterol	412.77	43.78	0.76
	LF-34	stigmasterol	412.77	43.83	0.76

表1 (续)

来源	编号	名称	相对分子质量	OB/%	DL
	LF-35	24-ethylcholesta-5,22-dienol	412.77	43.83	0.76
	LF-36	physcion-8-O-beta-D-gentiobioside	608.60	43.90	0.62
	LF-37	24-methylidenelophenol	412.77	44.19	0.75
	LF-38	atropine	289.41	45.97	0.19
	LF-39	ethyl linolenate	306.54	46.10	0.20
	LF-40	(24R)-4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,25-dien-3beta-ylacetate	482.87	46.36	0.84
	LF-41	quercetin	302.25	46.43	0.28
	LF-42	cryptoxanthin monoepoxide	568.96	46.95	0.56
	LF-43	cyanin	411.66	47.42	0.76
	LF-44	glycitein	284.28	50.48	0.24
	LF-45	physalin A	526.58	91.71	0.27
菟丝子	CS-1	sesamin	354.38	56.55	0.83
	CS-2	NSC63551	412.77	39.25	0.76
	CS-3	isorhamnetin	316.28	49.60	0.31
	CS-4	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
	CS-5	kaempferol	286.25	41.88	0.24
	CS-6	campest-5-en-3beta-ol	400.76	37.58	0.71
	CS-7	isofucosterol	412.77	43.78	0.76
	CS-8	matrine	248.41	63.77	0.25
	CS-9	sophoranol	264.41	55.42	0.28
	CS-10	CLR	386.73	37.87	0.68
	CS-11	quercetin	302.25	46.43	0.28
覆盆子	RF-1	ellagic acid	302.20	43.06	0.43
	RF-2	ammidin	270.30	34.55	0.22
	RF-3	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
	RF-4	sitosterol	414.79	36.91	0.75
	RF-5	kaempferol	286.25	41.88	0.24
	RF-6	fupenzic acid	484.74	51.16	0.72
	RF-7	quercetin	302.25	46.43	0.28
车前子	PS-1	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	456.78	32.03	0.76
	PS-2	dinatin	300.28	30.97	0.27
	PS-3	sitosterol	414.79	36.91	0.75
	PS-4	daucostero_qt	414.79	36.91	0.75
	PS-5	dihydrotricetin	304.27	58.12	0.28
	PS-6	hypolaetin	302.25	33.24	0.28
	PS-7	orobanchoside_qt	476.47	55.99	0.82
	PS-8	scutellarein	288.27	54.04	0.24
	PS-9	quercetin	302.25	46.43	0.28

将得到的67个靶点导入String数据库,获取PPI网络图谱,并下载相关的csv格式文件导入Cytoscape3.9.1中进行拓扑分析,见图3。图中共含有67个节点,除去4个与其他蛋白无关联性的节点外有63个重要节点,共有401条边,连接度的阈值

为12,平均聚类系数为0.568,连接度前15的靶点见表2,说明各靶点之间关联性很强。利用Cytoscape3.9.1中的“Analyze Network”对各个节点进行关联度分析,关联度较大的节点颜色深且节点大,得到其中关键节点为雄激素受体(AR)、IL6、缺

氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、IL1 β 、血管紧张素转换酶(ACE)、HSP90AA1、ESR1和Caspase-3,关键信号为IL家族介导的炎症信号、肿瘤信号和脂代谢信号。

表2 WZY郑治疗OAS的潜在靶点

Table 2 Potential targets of WZY郑 in treatment of OAS

编号	蛋白名称	度值
1	TNF	40
2	IL6	39
3	ESR1	37
4	CASP3	33
5	IL1B	33
6	HIF1A	30
7	NFKB1	30
8	PTGS2	30
9	HSP90AA1	29
10	HSP90AB1	25
11	PGR	22
12	GSK3B	21
13	MAPK1	21
14	MAPK14	21
15	SIRT1	21

将WZY郑治疗OAS的潜在靶点导入David数据库进行GO分析和KEGG通路分析,根据Term P值越小,Term可靠性越高的原则,选取KEGG前25条信号通路,GO每组前10条生物过程的数据导入微生信网站进行作图,见图4、5。

KEGG结果表明这些基因主要参与IL-17信号通路、脂代谢和动脉粥样硬化信号通路以及肿瘤信号通路。GO分析结果表明其主要参与RNA剪切酶II启动子的转录、炎症反应、凋亡过程负向调控和细胞对脂多糖的反应,影响机体内酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白同型二聚化活性、蛋白激酶活性、血红素结合等生物功能,涉及的细胞组分主要为细胞外区域、外泌体、细胞外空间、线粒体和蛋白质复合物。

利用Cytoscape3.9.1构建“药物-成分-靶点-通路”网络图,结果见图6。其中黄色三角形节点表示疾病,棕色长方形节点表示5种中药的名称,菱形节点表示其主要活性成分,蓝色六边形节点表示相关的潜在靶点,粉色椭圆形节点表示潜在靶点的相关通路。结合图4~6的结果,选取KEGG分析和GO分析中富集程度较高的IL-17通路作为主要治疗机制进行验证,通路靶点见图7。

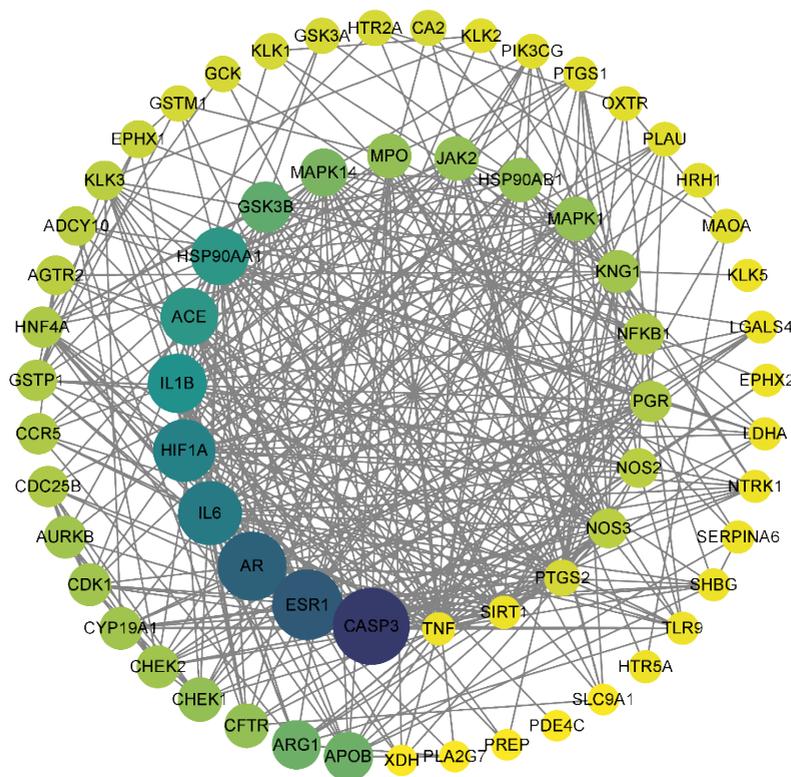


图3 WZY郑治疗OAS潜在靶点的PPI网络

Fig. 3 PPI network of potential targets of WZY郑 in treatment of OAS

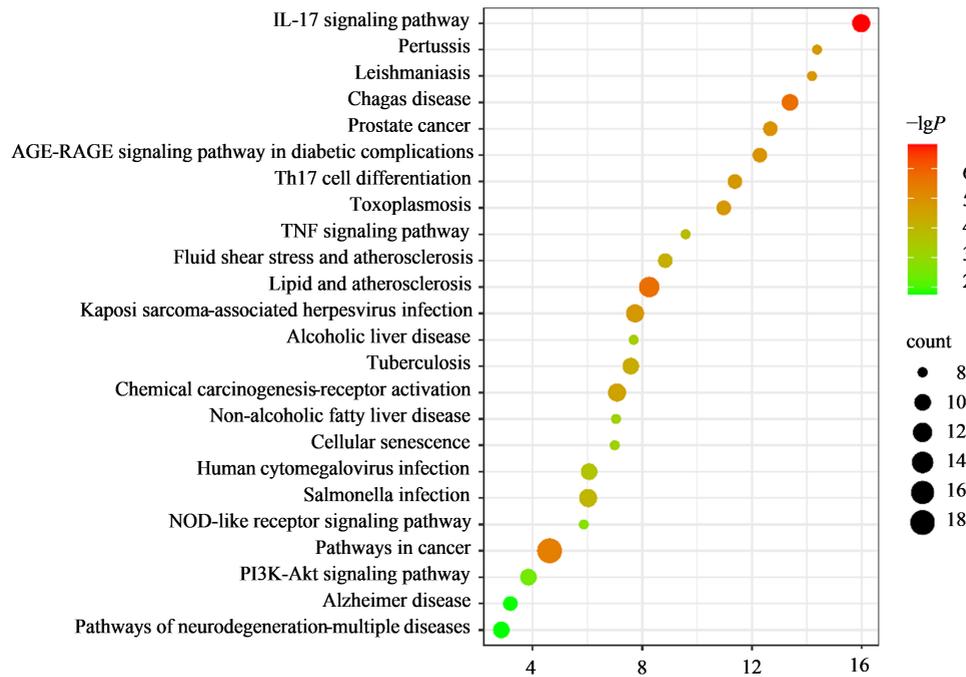


图 4 WZYZP 治疗 OAS 潜在靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of potential targets of WZYZP in the treatment of OAS

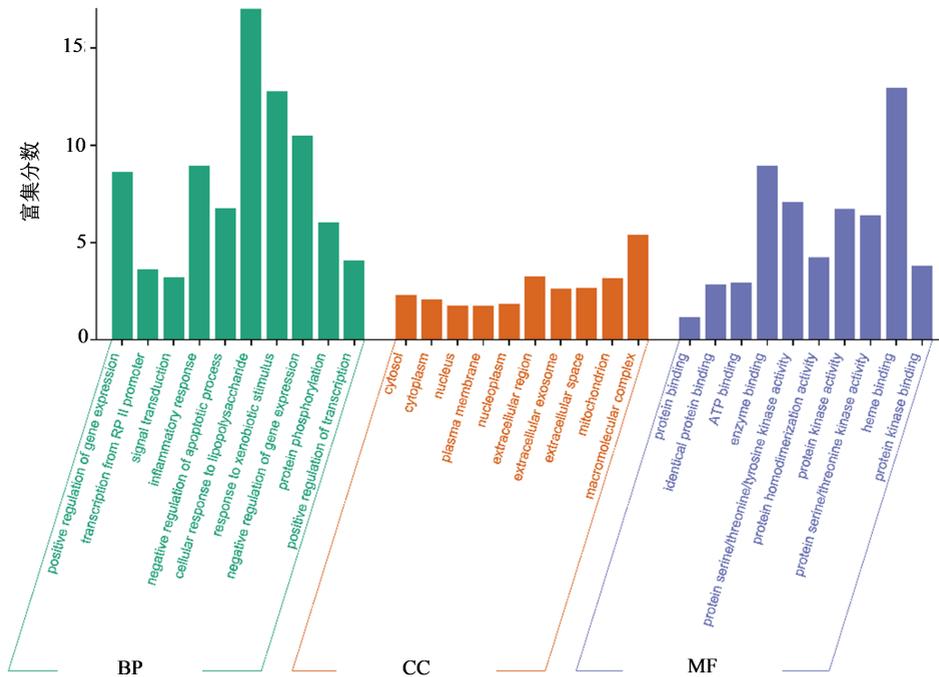


图 5 WZYZP 治疗 OAS 潜在靶点的 GO 分析

Fig. 5 GO analysis of potential targets of WZYZP in the treatment of OAS

3.2.2 WZYZP 可通过减少凋亡治疗 CTX 诱导的大鼠 OAS 为了探究 WZYZP 对 CTX 诱导的 OAS 大鼠睾丸组织细胞凋亡的调控作用,检测了睾丸组织细胞凋亡情况以及凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达。TUNEL 染色结果显示,大鼠经 CTX 诱导后,睾丸组

织的凋亡细胞显著增多($P < 0.05$),凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达显著升高($P < 0.001$)。1.5 g·kg⁻¹ WZYZP 可显著降低 OAS 大鼠睾丸组织中的凋亡细胞数量($P < 0.05$),下调 Caspase-3 表达($P < 0.001$)见图 8,表明 WZYZP 可抑制 OAS 大鼠睾丸的细胞凋亡。

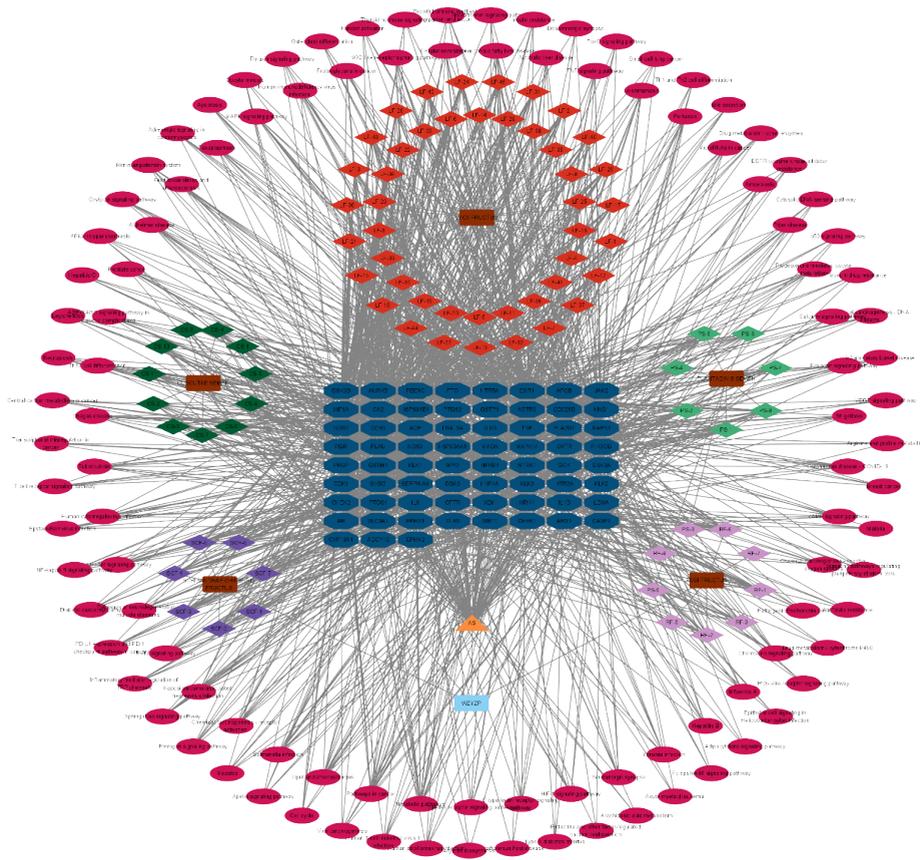


图 6 WZYYP 治疗 OAS 的“药物-靶点-通路”网络

Fig. 6 "Drug-target-pathway" network of WZYYP in treatment of OAS

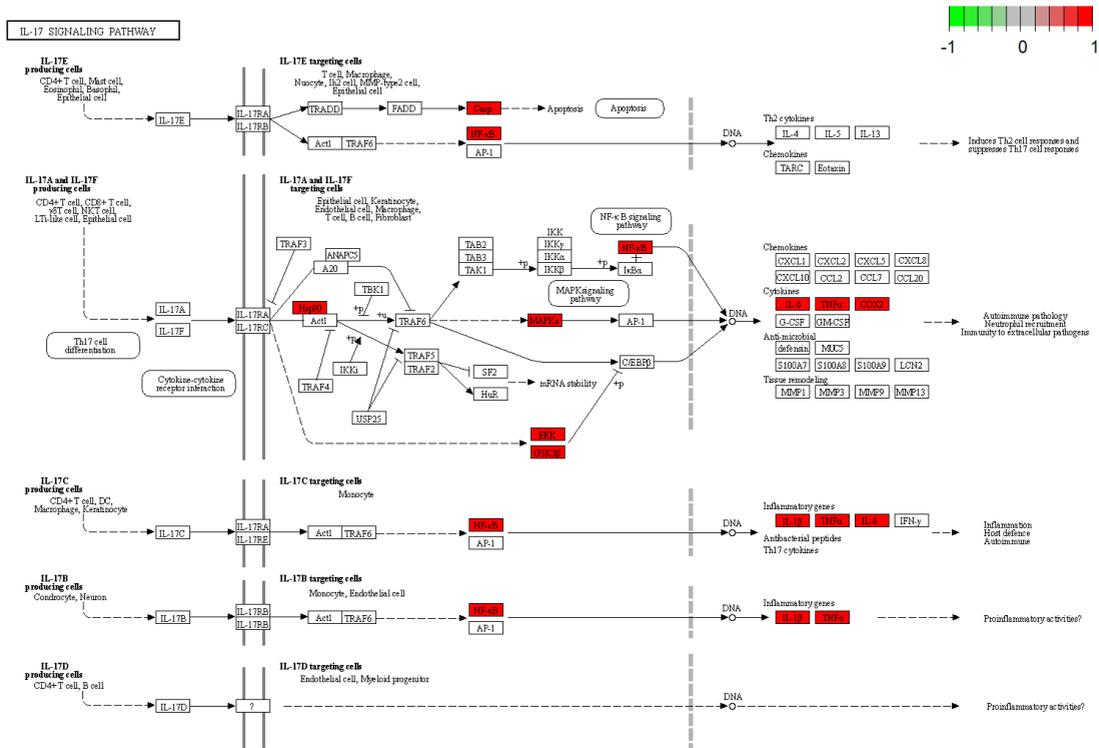
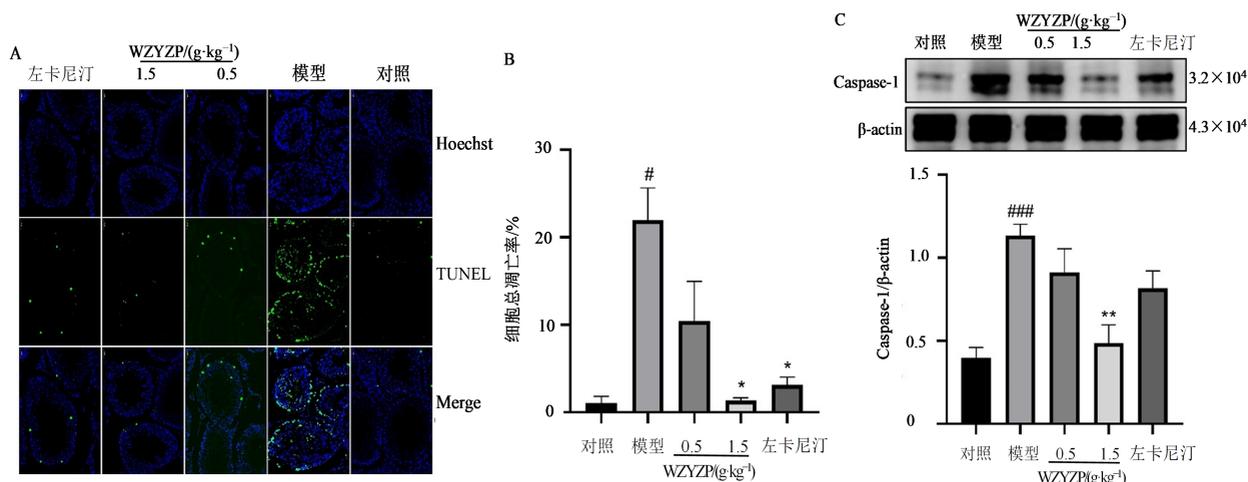


图 7 WZYYP 治疗 OAS 的 IL-17 通路相关靶点

Fig. 7 IL-17 pathway-related targets of WZYYP in treatment of OAS



与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group.

图8 WZYZP对OAS大鼠睾丸组织TUNEL染色(A)、细胞凋亡(B)及Caspase-3表达(C)的影响($n=3$)

Fig. 8 Effect of WZYZP on TUNEL staining of testicular tissue (A), apoptosis of testicular tissue cells (B), and testicular Caspase-3 expression (C) in OAS rats ($n=3$)

3.2.3 WZYZP可通过下调IL-17通路治疗CTX诱导的大鼠OAS 为了探究WZYZP对CTX诱导的OAS大鼠的作用机制,检测了大鼠睾丸组织中IL-17通路相关蛋白的表达情况,结果见图9-A。免疫组化结果表明,模型组大鼠睾丸组织IL-17显著上调($P < 0.01$),且阳性位置多聚焦于生精小管的生精细胞和精子细胞中(箭头);WZYZP 1.5 g·kg⁻¹组大鼠的睾丸组织IL-17较模型组显著降低($P < 0.001$),阳性面积和阳性强度均下降;左卡尼汀组较模型组睾丸组织IL-17同样显著降低($P < 0.05$),但阳性面积与阳性强度与WZYZP 1.5 g·kg⁻¹组相比较为高。

除IL-17外,还用ELISA检测了其他3种炎症因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)在大鼠睾丸组织中的表达。结果表明,与对照组相比,CTX诱导的大鼠睾丸组织IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6($P < 0.05$)和TNF- α ($P < 0.01$)表达显著升高;在给予0.5 g·kg⁻¹WZYZP干预后,IL-1 β ($P < 0.05$)和TNF- α ($P < 0.01$)表达显著降低,IL-6有降低但未呈现显著差异;WZYZP 1.5 g·kg⁻¹组大鼠与模型组相比其睾丸组织中IL-1 β ($P < 0.05$)、IL-6($P < 0.01$)和TNF- α ($P < 0.01$)均显著降低(图9-B)。表明WZYZP可降低OAS大鼠睾丸组织的炎症因子表达。

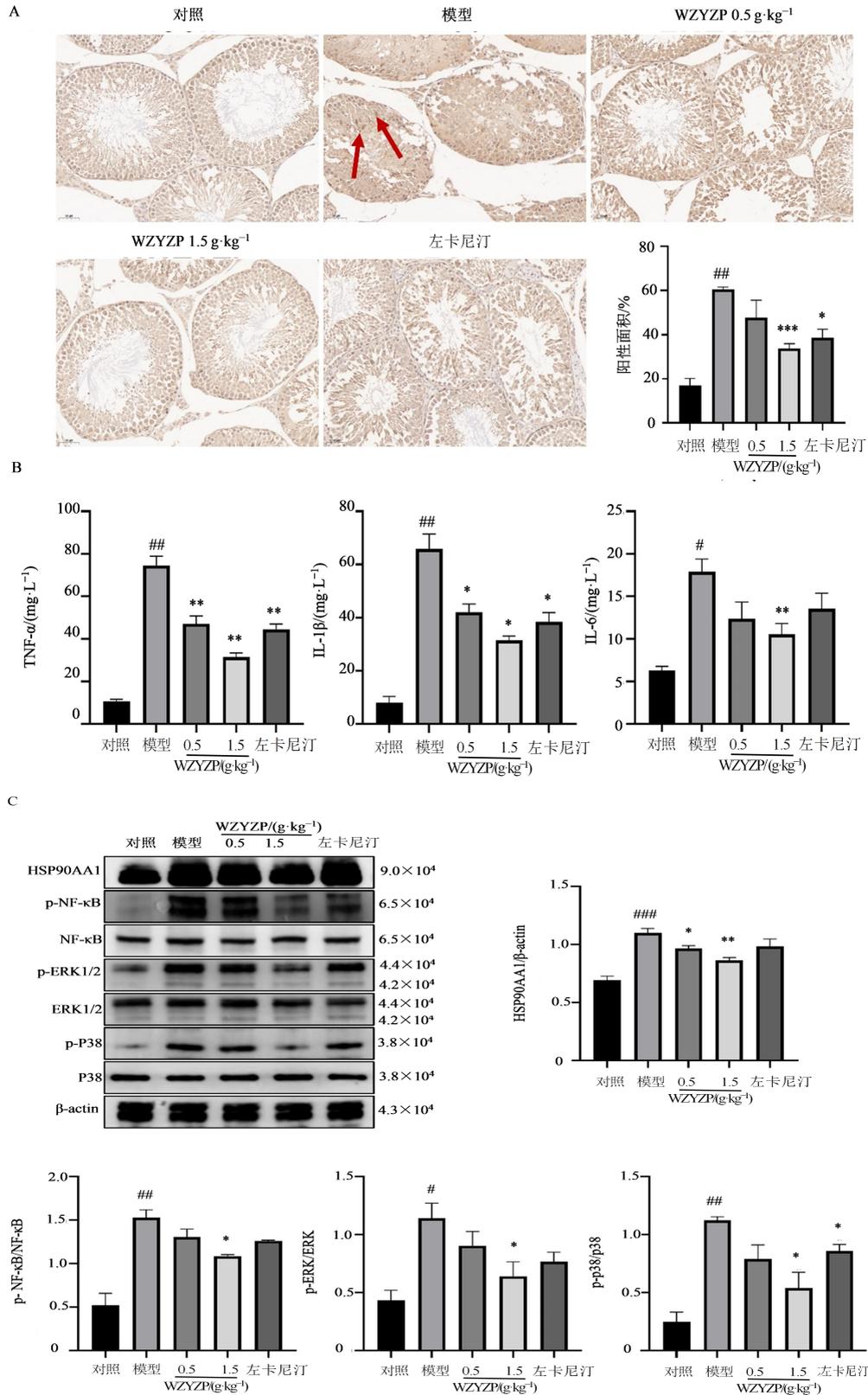
为进一步探究WZYZP治疗OAS大鼠的作用机制,通过Western blotting对预测出的IL-17通路相关靶点进行验证。结果表明,模型组大鼠睾丸组织中HSP90AA1表达显著升高($P < 0.001$),NF- κ B($P < 0.01$)、ERK1/2($P < 0.05$)和p38($P < 0.01$)的磷酸化

水平显著升高;WZYZP 1.5 g·kg⁻¹组较模型组HSP90AA1表达水平显著降低($P < 0.01$),NF- κ B($P < 0.05$)、ERK1/2($P < 0.05$)和p38($P < 0.05$)的磷酸化水平均显著降低(图9-C)。表明WZYZP可下调CTX诱导的OAS大鼠睾丸组织IL-17通路。

3.3 WZYZP成分分析及分子对接

3.3.1 WZYZP中主要成分分析 为进一步探索WZYZP如何下调IL-17通路治疗OAS,首先通过HPLC检测了WZYZP的主要活性成分。结果见图10,WZYZP供试品溶液中主要成分为槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸8种化合物。

3.3.2 分子对接 通过分子对接探索了WZYZP中8种主要活性成分(槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸)和IL-17通路5种相关靶点(HSP90AA1、ERK、p38、NF- κ B和Caspase-3)的结合效果以进一步阐释WZYZP治疗OAS的作用机制。结果40组结合的结合能均小于-20.92 kJ·mol⁻¹,表明WZYZP的8种主要活性成分与IL-17通路5个关键靶点均具有自发结合;其中除Caspase-3外其余4个关键靶点与WZYZP主要成分的结合能均小于-29.29 kJ·mol⁻¹,表明其结合活性很强;部分对接构象见图11。分子对接的结果表明,WZYZP中的8种主要活性成分槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸均可与IL-17通路靶点HSP90AA1、ERK、p38、NF- κ B和Caspase-3形成自发结合,治疗OAS。

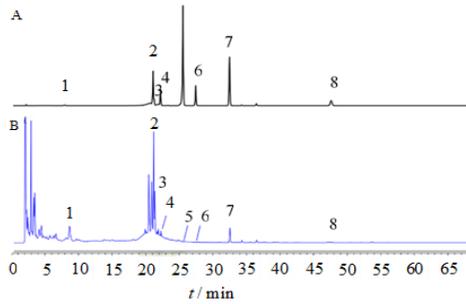


A-免疫组化结果;B-OAS大鼠睾丸组织中炎症因子水平;C-Western blotting 检测结果;与对照组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

A-immunohistochemistry results; B-the level of inflammatory factors in testicular tissues of OAS rats; C-the results of Western blotting assay; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图9 WZYZP对OAS大鼠睾丸组织IL-17通路相关蛋白靶点表达的影响($n=3$)

Fig. 9 Effect of WZYZP on expression of IL-17 pathway-related protein targets in testicular tissue of OAS rats ($n=3$)



1-绿原酸;2-金丝桃苷;3-异槲皮苷;4-紫云英苷;5-槲皮素;6-山柰酚;7-五味子醇甲;8-五味子甲素。

1- chlorogenic acid; 2- hyperoside; 3- isoquercitrin; 4- astragalin; 5- quercetin; 6- kaempferol; 7- schisandrin A; 8- deoxyschisandrin.

图10 混合对照品溶液(A)、WZYZP供试品溶液(B)高效液相色谱图

Fig. 10 HPLC of mixed control solution (A) and test solution of WZYZP (B)

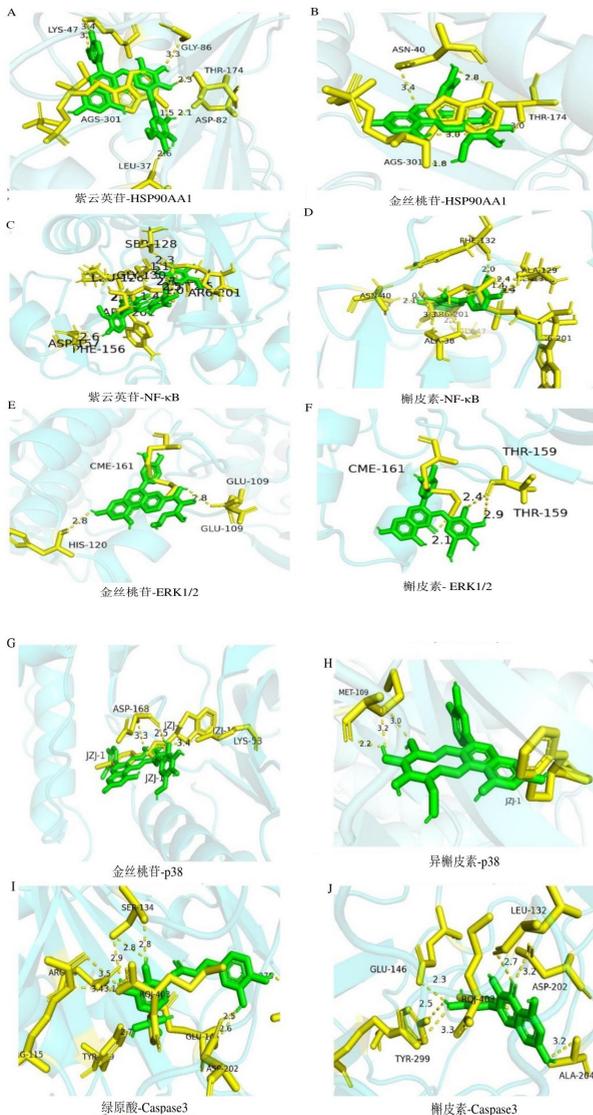


图11 部分分子对接构象图

Fig. 11 Partial molecular docking conformation

4 讨论

WZYZP是中国治疗男性精子质量不佳的经典名方,现代中医临床上通常以加减对症治疗OAS,由于其疗效明确,WZYZP现已成为中医临床治疗OAS的常用方剂^[17-18]。但目前针对WZYZP治疗OAS的研究仍局限于临床层面,基础研究较少。本研究通过系统药理学的方法研究了WZYZP中的主要活性成分并加以体内验证,通过分子对接预测其作用方式,为WZYZP治疗OAS提供系统的理论依据。

高达15%的男性不育症病例与男性生殖器官慢性炎症密切相关,其中睾丸慢性炎症是精子发生和精子功能受损的直接原因之一^[19-21]。2015年有研究者发现在无精子症的男性患者中IL-17与慢性睾丸炎症呈正相关,预示着IL-17或许可作为慢性睾丸炎的潜在治疗靶点^[22]。IL-17在睾丸的过表达可诱导多方面的细胞和组织功能损伤和障碍。IL-17与受体结合后可通过活化Caspase-3和Caspase-9诱导细胞凋亡^[23],这可能是本研究中生精细胞和精子细胞层出现空泡化和细胞脱落的原因。HSP90是细胞内一种高度保守的保护性蛋白,可通过帮助其他蛋白分子的翻译后修饰调节下游蛋白通路,在IL-17高表达的环境中大量激活^[24]。过度激活的HSP90可通过促进下游p38、ERK1/2和NF-κB的磷酸化激活胞内炎症反应,从而正反馈IL-17的表达以及其他炎症因子的释放^[25-26]。已有研究表明,抑制胞内ERK1/2、NF-κB、HSP90、Caspase-3和IL-17的表达均可减缓体内的炎症反应^[27-31],表明通过对IL-17通路多靶点的治疗方案是一种可行的策略。

在本研究中,通过HPLC定性了WZYZP中的主要活性成分为槲皮素、五味子醇甲、金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷、五味子甲素、异槲皮素和绿原酸,与刘伟等^[32]的研究结果基本一致。已有研究发现,绿原酸可通过调节Th-17细胞对IL-17的分泌改善小鼠变应性鼻炎^[33],还可通过抑制p38和ERK1/2的磷酸化减轻小鼠溃疡性结肠炎^[32],与本实验分子对接结果一致。2020年的研究表明,同样含有金丝桃苷、槲皮素和异槲皮苷的海参叶总黄酮可通过下调IL-17通路预防小鼠食道癌^[34],侧面印证了本研究的结论。分子对接结果表明,紫云英苷及其苷元山柰酚均可与IL-17通路几个关键靶点形成自主结合,与李娜等^[35]的研究结果一致。五味子作为一味治疗精液异常的常用中药,同样被报道过具有IL-17通路和Caspase-3的抑制活性^[36-37]。本实验研究

结果发现五味子的特征成分五味子醇甲和五味子甲素和 IL-17 通路的几个关键靶点均有强结合效应,同样印证了五味子对 OAS 的治疗效果。

综上所述,本研究系统地验证了 WZYZP 治疗 OAS 的作用机制,为 WZYZP 的临床应用提供了研究基础。但本研究仍有一定的不足之处:(1)分子机制研究只停留于分子对接层面,并未通过体外实验进行验证;(2)WZYZP 作为一种上市的药物已经应用于临床,而本研究仅停留于大鼠层面,其药效可能存在一定的差异性,后续工作将与医院合作进行相关的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. A unique view on male infertility around the globe [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 37.
- [2] Jiang Q K, Maresch C C, Petry S F, et al. Elevated CCL2 causes Leydig cell malfunction in metabolic syndrome [J]. *JCI Insight*, 2020, 5(21): e134882.
- [3] Boivin J, Bunting L, Collins J A, et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(6): 1506-1512.
- [4] Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenozoospermia [J]. *Asian J Androl*, 2006, 8(2): 143-157.
- [5] Matzuk M M, Lamb D J. The biology of infertility: Research advances and clinical challenges [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1197-1213.
- [6] Björndahl L, Barratt C L R, Mortimer D, et al. Standards in semen examination: Publishing reproducible and reliable data based on high-quality methodology [J]. *Hum Reprod*, 2022, 37(11): 2497-2502.
- [7] Bracke A, Peeters K, Punjabi U, et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2018, 36(3): 327-339.
- [8] 孟乃昌. 五子衍宗丸的历史起源 [J]. *中成药研究*, 1985, 7(2): 29.
Meng N C. The historical origin of Wuzi Yanzong pill [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 1985, 7(2): 29.
- [9] 许继祥. 久泻治肾话五子 [J]. *中医杂志*, 1987, 28(3): 70.
Xu J X. Treating five sons of kidney words with prolonged diarrhea [J]. *J Tradit Chin Med*, 1987, 28(3): 70.
- [10] 周伟强. 五子衍宗软胶囊治疗肾虚精亏证男性少精、弱精不育症研究分析 [J]. *中医临床研究*, 2011, 3(20): 83-84.
- [11] Zhou W Q. Research and analysis of treating kidney essence deficiency permits men less refined and weak sperm infertility with Wuzi Yanzong soft capsules [J]. *Clin J Chin Med*, 2011, 3(20): 83-84.
- [12] 徐虎军, 刘巧, 郭延丽, 等. 五子衍宗丸治疗男性不育少弱精子症研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(7): 149-153.
Xu H J, Liu Q, Guo Y L, et al. Research progress of Wuzi Yanzong pill in the treatment of male infertility with oligoasthenospermia [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2020, 22(7): 149-153.
- [13] Yong S S, Yang Y L, Li F H, et al. Wuzi Yanzong Pill for the treatment of male infertility: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine*, 2020, 99(33): e21769.
- [14] 邹迪新, 张岳阳, 孟雪丹, 等. 经典名方五子衍宗丸干预半去势雄性小鼠生精功能的转录组学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(1): 61-69.
Zou D X, Zhang Y Y, Meng X D, et al. Transcriptomic analysis of Wuzi yanzongwan on testicular spermatogenic function in semi-castrated male mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(1): 61-69.
- [15] 童欢, 张明伟, 张炳武, 等. 基于指纹图谱、含量测定和化学模式识别的五子衍宗丸质量评价研究 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(1): 103-112.
Tong H, Zhang M W, Zhang B W, et al. Study on quality evaluation of Wuziyanzong pills based on HPLC fingerprint, assay and chemical pattern recognition [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(1): 103-112.
- [16] Chen Z M, Mingyue A O, Liao Y J, et al. Wuzi Yanzong prescription from Traditional Chinese Medicine for male infertility: A narrative review [J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2023, 43(2): 416-428.
- [17] 杨静容, 翁丽丽, 方晶, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨升降散治疗急性肺损伤作用及机制 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(4): 687-700.
Yang J R, Weng L L, Fang J, et al. To explore effect and mechanism of Shengjiang Powder in treatment of acute lung injury based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(4): 687-700.
- [18] 史亚磊, 张敏建, 程宛钧. 五子衍宗汤与五子衍宗丸治疗弱精症临床对照研究 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(12): 73-75.
Shi Y L, Zhang M J, Cheng W J. Clinical efficacy of Wuzi Yanzong Decoction and Wuzi Yanzong Pillin the treatment of asthenospermia [J]. *Chin J Hum Sex*, 2017, 26(12): 73-75.

- [18] 吴胜年. 以五子衍宗汤为主方加减治疗少弱精症 [J]. 中国社区医师, 2020, 36(19): 95-96.
Wu S N. The main prescription of modified Wuzi Yanzong Decoction in the treatment of oligospermia and asthenospermia [J]. Chin Community Dr, 2020, 36(19): 95-96.
- [19] Dohle G R, Colpi G M, Hargreave T B, et al. EAU guidelines on male infertility [J]. Eur Urol, 2005, 48(5): 703-711.
- [20] Haidl G, Allam J P, Schuppe H C. Chronic epididymitis: Impact on semen parameters and therapeutic options [J]. Andrologia, 2008, 40(2): 92-96.
- [21] Schuppe H C, Meinhardt A, Allam J P, et al. Chronic orchitis: A neglected cause of male infertility? [J]. Andrologia, 2008, 40(2): 84-91.
- [22] Chen S J, Duan Y G, Haidl G, et al. Predominance of IL-17-producing tryptase-positive/chymase-positive mast cells in azoospermic chronic testicular inflammation [J]. Andrologia, 2016, 48(6): 617-625.
- [23] Zhu F L, Wang Q, Guo C, et al. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: A potential mechanism for human acute coronary syndrome [J]. Clin Immunol, 2011, 141(2): 152-160.
- [24] Czajkowski R, Kaszewski S, Tadrowski T, et al. Does HSP90 play an important role in psoriasis? [J]. Postepy Dermatol Alergol, 2021, 38(2): 319-326.
- [25] Na B H, Hoang T X, Kim J Y. Hsp90 inhibition reduces TLR5 surface expression and NF- κ B activation in human myeloid leukemia THP-1 cells [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4319369.
- [26] Sun P B, Wang Y Y, Gao T, et al. Hsp90 modulates human sperm capacitation via the Erk1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2021, 19(1): 39.
- [27] Meng A H, Zhang X P, Wu S Y, et al. *In vitro* modeling of COPD inflammation and limitation of p38 inhibitor - SB203580 [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 11: 909-917.
- [28] Pezzulo A A, Tudas R A, Stewart C G, et al. HSP90 inhibitor geldanamycin reverts IL-13- and IL-17-induced airway goblet cell metaplasia [J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 744-758.
- [29] Morris E J, Jha S, Restaino C R, et al. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors [J]. Cancer Discov, 2013, 3(7): 742-750.
- [30] Ma J, Zhang Y Y, Sugai T, et al. Inhibition of cellular and animal inflammatory disease models by NF- κ B inhibitor DHMEQ [J]. Cells, 2021, 10(9): 2271.
- [31] Koenders M I, van den Berg W B. Secukinumab for rheumatology: Development and its potential place in therapy [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 2069-2080.
- [32] 刘伟, 周建良, 陈碧莲, 等. 五子衍宗丸高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 医药导报, 2014, 33(10): 1360-1364.
Liu W, Zhou J L, Chen B L, et al. HPLC fingerprint analysis of Wuzi Yanzong pills [J]. Her Med, 2014, 33(10): 1360-1364.
- [33] Shi Z H, Jiang W H, Chen X D, et al. Chlorogenic acid ameliorated allergic rhinitis-related symptoms in mice by regulating Th17 cells [J]. Biosci Rep, 2020, 40(11): BSR20201643.
- [34] Jia X B, Zhang Q, Xu L, et al. Effect of *Malus asiatica* nakai leaf flavonoids on the prevention of esophageal cancer in C57BL/6J mice by regulating the IL-17 signaling pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 6987-6996.
- [35] Li N, Chen S L, Deng W Q, et al. Kaempferol attenuates gouty arthritis by regulating the balance of Th17/treg cells and secretion of IL-17 [J]. Inflammation, 2023, 46(5): 1901-1916.
- [36] 朱春园. 中药治疗精液异常致不育经验介绍 [J]. 中国乡村医药, 2010, 17(9): 40.
Zhu C Y. Experience of treating infertility caused by abnormal semen with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Rural Med Pharm, 2010, 17(9): 40.
- [37] Su J, Morgani S M, David C J, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1 [J]. Nature, 2020, 577(7791): 566-571.

[责任编辑 袁永兵]