

基于铁死亡途径探讨龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的作用及机制

李 玲¹, 黄家望^{2#}, 冯芷莹¹, 刘卓琳², 王康宇¹, 王 磊³, 何清湖^{2,4,5*}

1. 湖南中医药大学中医学学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

3. 湖南衡阳东健药业有限公司, 湖南 衡阳 421411

4. 湖南医药学院康复医学与保健学院, 湖南 怀化 418000

5. 互联网(中西协同)健康服务湖南省工程研究中心, 湖南 怀化 418000

摘要:目的 通过网络药理学和体内外实验研究,探讨铁死亡在龟鹿二仙胶治疗少弱精子症中的作用。方法 通过 TCMSP 数据库、HERB 数据库、PubChem 数据库和 Swiss 数据库获取龟鹿二仙胶的活性成分和作用靶点, Genecard 数据库和 FerrDb 数据库检索铁死亡基因, GEO 数据库获取少弱精子症差异基因,三者取交集构建蛋白互作网络,进行基因本体(gene ontology, GO)功能和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。使用 H₂O₂ 刺激小鼠睾丸支持细胞构建氧化应激损伤模型,并用龟鹿二仙胶含药血清干预损伤模型细胞,观察细胞形态,检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、总铁和亚铁离子含量,透射电镜观察细胞超微结构, qRT-PCR 和 Western blotting 检测细胞谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)的 mRNA 和蛋白表达。使用环磷酰胺构建小鼠少弱精子症模型, ELISA 检测小鼠性激素水平,苏木素-伊红(HE)染色法观察小鼠睾丸组织病理学改变,免疫组化检测小鼠睾丸组织 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达。**结果** 共获取龟鹿二仙胶 81 个活性成分和 190 个作用靶点, 686 个铁死亡基因和 4777 个少弱精子症差异基因, 龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点共 11 个, GO 富集分析共检测到 869 个条目, KEGG 共有 35 条。体外实验显示, 龟鹿二仙胶含药血清能显著降低细胞内 ROS、LDH、总铁和亚铁离子含量($P<0.05$ 、 0.01), 修复损伤线粒体, 显著降低 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达($P<0.01$), 显著促进 GPX4 的 mRNA 和蛋白表达($P<0.01$)。体内实验发现, 龟鹿二仙胶能改善少弱精子症小鼠血清中性激素水平和睾丸组织病理损伤, 显著降低小鼠睾丸组织中 ACSL4 蛋白表达($P<0.01$), 显著促进睾丸组织中 GPX4 蛋白表达($P<0.01$)。**结论** 龟鹿二仙胶能有效治疗少弱精子症, 拮抗铁死亡的发生可能是龟鹿二仙胶治疗少弱精子症潜在的作用机制。

关键词: 龟鹿二仙胶; 少弱精子症; 铁死亡; 网络药理学; 实验验证

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)20-6722-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.016

Therapeutic effect and mechanism of Guilu Erxian Gel on oligospermia based on iron death pathway

LI Ling¹, HUANG Jia-wang², FENG Zhi-ying¹, LIU Zhuo-lin², WANG Kang-yu¹, WANG Lei³, HE Qing-hu^{2,4,5}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Hengyang Dongjian Pharmaceutical Co., Ltd., Hengyang 421411, China

4. Department of Rehabilitation and Healthcare, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China

5. Hunan Engineering Research Center of Internet-Chinese and Western Medicine Collaboration-Health Service, Huaihua 418000, China

收稿日期: 2023-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973863); 国家级大学生创新创业训练计划项目(S202010541105, S202210541108)

作者简介: 李 玲(1983—), 女, 博士研究生, 高级实验师, 从事中医药防治感染性疾病的研究。E-mail: lilinglei1049@hnuucm.edu.cn

*通信作者: 何清湖(1965—), 男, 博士, 教授, 从事中医药防治男科疾病的研究。E-mail: Hqh19651111@163.com

#共同第一作者: 黄家望(1999—), 男, 硕士研究生, 从事中医药防治感染性疾病的研究。E-mail: 1518522909@qq.com

Abstract: Objective To investigate the role of ferroptosis in the treatment of oligospermia with Guilu Erxian Gel (龟鹿二仙胶, GLEXG) through network pharmacology and *in vivo*, *in vitro* experiments. **Methods** The active ingredients and targets of GLEXG were obtained from TCMSP, HERB, PubChem and Swiss databases, ferroptosis-related genes were retrieved from Genecard and FerrDb databases. The differentially expressed genes in oligospermia were obtained from GEO database, and protein interaction network was constructed by taking the intersection of the three datasets. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed. *In vitro*, an oxidative stress injury model was constructed in H₂O₂-induced mouse testicular sertoli cells, and cells were treated with GLEJ-containing serum. Cell morphology, reactive oxygen species (ROS), lactate dehydrogenase (LDH), total iron and ferrous ion were measured. The ultrastructure of cells was observed by transmission electron microscopy. The mRNA and protein expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) were measured by qRT-PCR and Western blotting. *In vivo*, a mouse model of oligospermia was constructed using cyclophosphamide. The levels of sex hormones were measured by ELISA, and pathological changes in testicular tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expressions of GPX4 and ACSL4 in testicular tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** A total of 81 active ingredients and 190 targets of GLEXG were obtained, along with 686 ferroptosis-related genes and 4777 differentially expressed genes in oligospermia. A total of 11 shared targets were identified for GLEXG and ferroptosis in oligospermia by network pharmacology, and a total of 869 items and 35 KEGG pathways were enriched. *In vitro* experiments showed that GLEXG-containing serum significantly reduced ROS, LDH, total iron, and ferrous ion levels ($P < 0.05$, 0.01), repaired damaged mitochondria, and significantly decreased the mRNA and protein expressions of ACSL4 ($P < 0.01$), significantly promoted the mRNA and protein expressions of GPX4 ($P < 0.01$). *In vivo* experiments showed that GLEXG improved sex hormone levels in serum and pathological damage of testicular tissue, significantly decreased the expression of ACSL4 protein in testicular tissue ($P < 0.01$), and significantly promoted the expression of GPX4 protein in testicular tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** GLEXG can effectively treat oligospermia, and antagonising the occurrence of iron death may be a potential mechanism of action of GLEXG in treatment of oligospermia.

Key words: Guilu Erxian Gel; oligospermia; ferroptosis; network pharmacology; experimental verification

男性不育症是指在定期无保护 1 年后, 因男方因素导致女方无法怀孕^[1]。其中少精子症和弱精子症是男性不育的常见原因, 少精子症指精子密度小于 1.5×10^5 个/mL, 弱精子症指精子总活动力小于 40%^[2-4]。精索静脉曲张、睾丸炎、辐射、生态环境、饮酒和吸烟等因素是少弱精子症的常见诱因^[5]。目前临床上对于少弱精子症的主要治疗策略是药物治疗, 包括雄激素、促性腺激素、皮质类固醇、促黄体生成素、卵泡刺激素和抗氧化剂, 尽管这些药物在临床上应用广泛, 但除促黄体生成素外, 其他疗法均未得到国际指南的推荐^[6-7]。少弱精子症与中医古籍中记载的“精少”“精冷”“精清”相似, 其病机主要是肾精亏损、肾阴肾阳平衡失调, 故本病多以滋肾壮阳、益精填髓治疗为主。龟鹿二仙胶最早记录于中医古籍《医便》, 由龟板胶、鹿角胶、人参和枸杞子 4 味药组成, 共奏补益肝肾、填精益髓、调节阴阳之功效。现代临床研究发现, 龟鹿二仙胶能明显改善男性精液异常患者的精液质量^[8]。铁死亡是一种新型的细胞死亡形式, 细胞内铁的积累促进脂质过氧化, 进而导致细胞死亡^[9], 越来越多研究聚焦于铁死亡靶点^[10]。异常增多的活性氧 (reactive

oxygen species, ROS) 可导致精子 DNA、RNA 转录物和端粒损伤以及精子质膜脂质过氧化损伤, 是引起精子功能缺陷的主要原因, 因此铁死亡可能是少弱精子症发生的潜在作用机制^[11-12]。

网络药理学是一种整体分析的研究方法, 将实验室和临床查询与数据处理相结合, 揭示中药方剂用于治疗疾病的机制, 以指导药物发现和开发^[13-14]。基于此, 本研究通过网络药理学预测铁死亡在龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的作用机制, 探索药物与机体的相关性, 揭示其潜在作用机制, 并通过体内外实验对其进行验证, 以期为临床运用龟鹿二仙胶治疗少弱精子症提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 200~220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物公司, 动物质量许可证 430727221102014186, 于湖南中医药大学动物实验中心适应性饲养 1 周。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批 (批准号 LLBH-202212060003)。

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只, 体质量 20~

25 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物公司, 动物质量许可证号 430727221102777417, 于湖南中医药大学动物实验中心适应性饲养 1 周。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批 (批准号 LLBH-202205310006)。

1.2 细胞

小鼠 TM4 睾丸支持细胞 (批号 70004689) 购自美国细胞培养物收藏中心。

1.3 药材

龟鹿二仙胶由龟甲胶 (湖南东健药业有限公司, 批号 20170901)、鹿角胶 (湖南东健药业有限公司, 20160903)、枸杞子 (恒修堂药业有限公司, 批号 2110027)、人参 (湖南三湘中药饮片有限公司, 批号 2020071606) 组成, 以上药材经湖南中医药大学药学院余娜副教授分别鉴定为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的背甲及腹甲经水煎煮、浓缩制成的固体胶, 鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 已骨化的角或锯茸后翌年春季脱落的角基经水煎煮、浓缩制成的固体胶, 茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实, 五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.4 药品与试剂

胎牛血清 (批号 2232241) 购自美国 Gibco 公司; DMED/F12 基础培养基 (批号 WH2122A281)、磷酸盐缓冲液 (批号 WH0022K191)、青霉素-链霉素混合液 (批号 WHAB23N201)、0.25% 胰蛋白酶溶液 (批号 WH0123X302) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 内源性过氧化氢酶阻断剂 (批号 K177711) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 铁死亡抑制剂 Ferrostain-1 (Fer-1, 批号 347174-05-4)、TRIzol (批号 5301100) 购自美国 Sigma 公司; CCK-8 细胞毒性检测试剂盒 (批号 FU2082F83788)、ROS 荧光法测定试剂盒 (批号 KL054B046842)、细胞总铁比色法测定试剂盒 (批号 AK052DRD5674)、细胞亚铁比色法测定试剂盒 (批号 AK0460Z61078)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 比色法测试盒 (批号 NM10J2D20952)、睾酮 (testosterone, T) ELISA 试剂盒 (批号 E-OSEL-M0003)、雌二醇 (estradiol, E₂) ELISA 试剂盒 (批号 E-OSEL-M0008)、促黄体生成素 (luteotropic hormone, LH) ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-M3053)、促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒

(批号 E-EL-M0511c) 购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (批号 05250410)、qPCR Mix 试剂盒 (批号 05236502) 购自 NovoScript 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; β -actin 抗体 (批号 ab8227)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号 ab125066)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 抗体 (批号 ab155282)、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab150077) 购自英国 Abcam 公司; 环磷酰胺注射液 (批号 0B365A) 购自美国 Baxter 公司; 动物睾丸组织固定液 (批号 CR2202002) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.5 仪器

ST8R 型台式高速冷冻离心机、Fresco21 型微量冷冻离心机、3111 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LM20 型微量移液器 (波兰 HTL 公司); DK-S22 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); JY300HE CFX96 TOUCH 型实时定量 PCR 仪、SDS-PAGE 电泳、转膜设备 (美国 Bio-Rad 公司); Take3 型超微量分光光度计、Synergy HTX 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); AE2000-T 型倒置显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); HT7800 型透射电镜 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 龟鹿二仙胶活性成分、靶点及铁死亡基因获取 在 TCMSP 数据库中以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件检索枸杞子、人参的主要成分, 根据活性成分检索得到枸杞子、人参对应的靶点。鹿角胶、龟板胶均未纳入 TCMSP 数据库, 通过 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Swiss 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 获取鹿角胶、龟板胶主要活性成分及靶点, 运用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 标准化。在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 FerrDb 数据库 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/>) 获取铁死亡相关基因, 整合 2 个数据库基因, 最终获取铁死亡相关基因。

2.1.2 少弱精子症靶点获取 通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 以 “oligospermia” 为检索词, 获取 oligospermia 微阵列表达谱。采用 R

语言 limma 包对检索到的数据集中受损的睾丸样本与功能正常的睾丸样本的表达情况进行比较,以“ $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ ”为筛选条件,鉴定出差异常表达基因(differential expressed genes, DEGs)。

2.1.3 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的铁死亡靶点获取 通过韦恩图在线绘制网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)取“龟鹿二仙胶药物靶点”“oligospermia-DEGs”“铁死亡相关基因”三者交集,获取龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点。

2.1.4 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的铁死亡靶点相关性分析 将得到的龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),获取蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)相关信息,运用 Cytoscape 3.9.0 构建蛋白互作关系。同时采用 Pearson 相关性分析,评价龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点表达的相关性。

2.1.5 基因本体论(gene ontology, GO)功能和基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析 采用 R 语言 cluster Profiler 包对龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点进行 GO、KEGG 富集分析,并对其进行可视化。

2.2 细胞实验

2.2.1 龟鹿二仙胶含药血清的制备 龟鹿二仙胶由湖南中医药大学附属第一医院中药房制备。参考《医便》《医方考》《张氏医通》中方剂配比,取鹿角胶、龟板胶、枸杞子、人参,以蒸馏水煎煮配制成相应质量浓度的药液,4℃冰箱保存备用。以体表面积换算后大鼠每天 ig 剂量分别为龟甲胶 400 mg/kg、鹿角胶 800 mg/kg、枸杞 300 mg/kg、人参 200 mg/kg。采用 UPLC-Q/TOF-MS 法对龟鹿二仙胶的化学成分进行分析,正、负离子模式分别鉴定出 122、66 个化合物^[15]。SD 大鼠随机分为给药组和正常组,每组 15 只,给药组大鼠 ig 5 倍临床剂量的龟鹿二仙胶,连续给药 7 d 后收集大鼠血清,4℃静置 2 h 后,2500 r/min 离心 10 min,收集血清,56℃水浴 30 min 灭活,0.22 μm 滤过除菌,-20℃保存。

2.2.2 细胞培养 TM4 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合液的 DMEM/F12 培养液,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞融合度为 90%时,用 0.25%胰酶消化并传代。

2.2.3 CCK-8 法测定 H₂O₂ 干预浓度及龟鹿二仙胶含药血清干预浓度 待细胞生长至对数期时消化离心,以 5000 个/孔接种至 96 孔板内,分别加入 0(对

照)、100、200、300、400、500 μmol/L H₂O₂,每组设置 4 个复孔,干预 3、6、12 h 后,加入 CCK-8 试剂,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,确定 H₂O₂ 最佳干预浓度及时间。

待 H₂O₂ 浓度及时间确定后,将对数期细胞生长的细胞消化离心接种至 96 孔板内,待细胞贴壁后,先加入 400 μmol/L 的 H₂O₂ 至 96 孔板干预 6 h,随后去上清,再分别加入 0、10%、20%、40%、60%、80%龟鹿二仙胶含药血清,另设置对照组不给予 H₂O₂ 及药物干预,每组设置 4 个复孔。干预 24 h 后弃上清,加入 CCK-8 试剂,采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值,确定龟鹿二仙胶含药血清最佳给药浓度。

2.2.4 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内 ROS 含量 将细胞以 5×10^6 个/mL 接种至 6 孔板,设置对照组(正常大鼠血清)、模型组(正常大鼠血清)及 20%、10%龟鹿二仙胶含药血清组和 Fer-1 (2 μmol/L) 组。细胞融合生长至 70%时,模型组和各给药组均加入 400 μmol/L 的 H₂O₂ 干预 6 h 后,弃上清,龟鹿二仙胶含药血清组分别加入 10%、20%龟鹿二仙胶含药血清干预 24 h, Fer-1 组在造模前 12 h 使用 Fer-1 干预^[16]。收集细胞前 2 h,在阳性对照孔内加入 ROS 阳性对照试剂;收集细胞前 1 h 在各组细胞内加入荧光探针 DCFH-DA 工作液,培养箱内孵育 1 h 后,收集细胞,重悬于 PBS 中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,洗去多余的探针,洗涤 2 次,离心后将细胞重悬于 PBS 中,加入 96 孔酶标板中。使用荧光酶标仪在激发波长为 488 nm、发射波长为 525 nm 处测定 A 值。

2.2.5 比色法检测 LDH 释放量 将细胞接种至 96 孔板内,按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,另设置最大酶活对照孔,在实验结束前 1 h 从细胞培养箱内取出 96 孔板,在最大酶活对照孔中加入阳性对照裂解液试剂,并反复吹打,细胞培养箱内继续培养 1 h 后用移液枪吸打均匀后移至离心管中,400×g 离心 5 min,吸取上清液,各组吸取 50 μL 上清液和 50 μL 反应工作液移至 96 孔酶标板中,37℃孵育 10 min,向各孔中加入反应终止剂,混匀,终止反应,在 450 nm 处测定 A 值。

2.2.6 比色法检测各组细胞内总铁离子和亚铁离子的含量 将细胞接种于 6 孔板中,按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,用胰酶消化并收集细胞到离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清。根据试剂盒说明书检测各组细胞总铁离子的含量和细胞内亚

铁离子的含量。

2.2.7 TEM 观察各组细胞超微结构 将细胞接种于 6 孔板中,按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,用胰酶消化并收集细胞到离心管中,1000 r/min 离心 5 min 弃上清,得到细胞沉淀,加入 PBS 重悬。在直径为 2 nm 的铜网上加入 20 μ L 细胞悬液,用无菌蒸馏水冲洗,然后从滤纸吸收多余液体,在室温下放置 10 min 后,在铜网滴入 30 μ L 的 3%磷钨酸溶液,室温复染 5 min,充分晾干。在 TEM 下观察每组铜网中细胞结构并拍摄照片。

2.2.8 qRT-PCR 检测各组细胞内铁死亡标志基因表达 将细胞接种于 6 孔板中,按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,收集细胞,按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>GPX4</i>	F: ATAAGAACGGCTGCGTGGTGAAG R: TAGAGATAGCACGGCAGGTCCTTC
<i>ACSL4</i>	F: TTGGCTACTTACCTTTGGCTCATGTG R: TACAATCACCTTGCTTCCCTTCTTG
β -actin	F: ACGCCAACACAGTGCTGTCTG R: TGCTTGCTGATCCACATCTGCTG

2.2.9 Western blotting 检测各组细胞内铁死亡标志蛋白表达 将细胞接种于 6 孔板中,按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,收集细胞,使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭,加入一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。ECL 发光后,在化学发光成像仪中显影成像。使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.3 动物实验

2.3.1 给药溶液的制备 龟鹿二仙胶制备方法同“2.2.1”项。按照 60 kg 成人体表换算剂量,龟鹿二仙胶高剂量为 3.6 g/kg、低剂量为 1.8 g/kg。

2.3.2 少弱精子症模型小鼠的制备及分组 将 40 只小鼠随机分为对照组、模型组及龟鹿二仙胶高、低剂量 (3.6、1.8 g/kg) 组和 Fer-1 (0.8 mg/kg) 组,每组 8 只。参考 Cao 等^[17]的造模方法,小鼠连续 3 d ip 环磷酰胺 (75 mg/kg) 构建少弱精子症模型,模型建立后,Fer-1 组小鼠尾 iv Fer-1,龟鹿二仙胶组 ig 0.2 mL 药物,对照组和模型组 ig 等体

积生理盐水,连续给药 4 周后处理动物。

2.3.3 ELISA 法检测小鼠血清性激素水平 收集各组小鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 T、E₂、LH 和 FSH 水平。

2.3.4 苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组小鼠睾丸组织的病理学变化 取小鼠一侧睾丸组织,用动物睾丸组织固定液固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡切片,HE 染色,脱水,透明,封片,于显微镜下观察其病理变化。

2.3.5 免疫组化法检测各组小鼠睾丸组织中 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达情况 取大鼠睾丸组织,用动物睾丸组织固定液固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡切片,脱蜡,抗原修复,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,链霉素-亲和素-生物素孵育 30 min,DAB 溶液显色 30 min 后洗净,苏木素复染,随后脱水,透明,封片,于显微镜下观察睾丸组织染色情况,利用图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 对图像进行分析。

2.3.6 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对样本先进行方差齐性检验,方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验,并用 LSD 法进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,先用 Kruskal-Wallis H test 比较总差异,再用 Mann-Whitney U 进行两组之间比较。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 龟鹿二仙胶成分、靶点获取和铁死亡基因、少弱精子症靶点获取 通过 TCMSP 数据库、HERB 数据库、PubChem 数据库和 Swiss 数据库共获取龟鹿二仙胶 81 活性成分和 190 个作用靶点。从 GeneCards 数据库和 FerrDb 数据库中共获取 686 个铁死亡相关基因。

通过 GEO 数据库筛选得到 GSE145467 数据集,该数据集包含 10 例功能正常的睾丸样本和 10 例生精功能受损的睾丸样本,以“ $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ ”为筛选条件,共获生精功能受损的睾丸样 4777 个 DEGs,其中 1605 个差异上调,3172 个差异下调 (图 1)。

3.1.2 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的铁死亡靶点获取 通过在线韦恩图取交集工具共获取 11 个龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点 (图 2-A),基于 GSE145467 数据集,映射龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点表达谱 (图 2-B、C)。

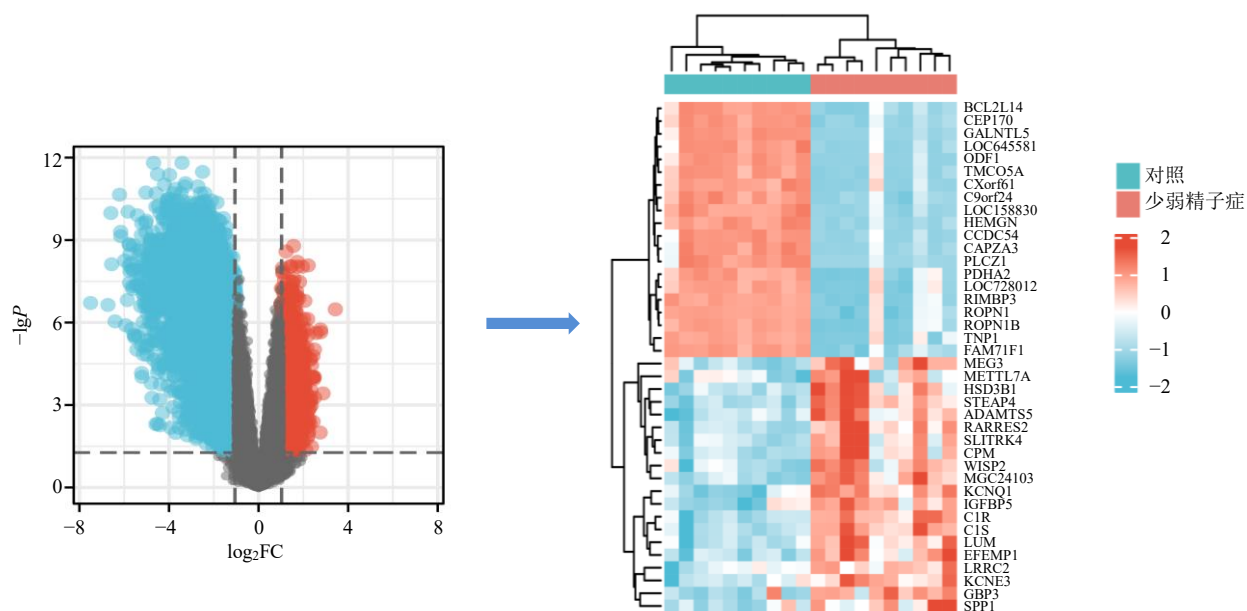


图 1 少弱精子症差异基因表达谱

Fig. 1 Differential gene expression profile for oligospermia

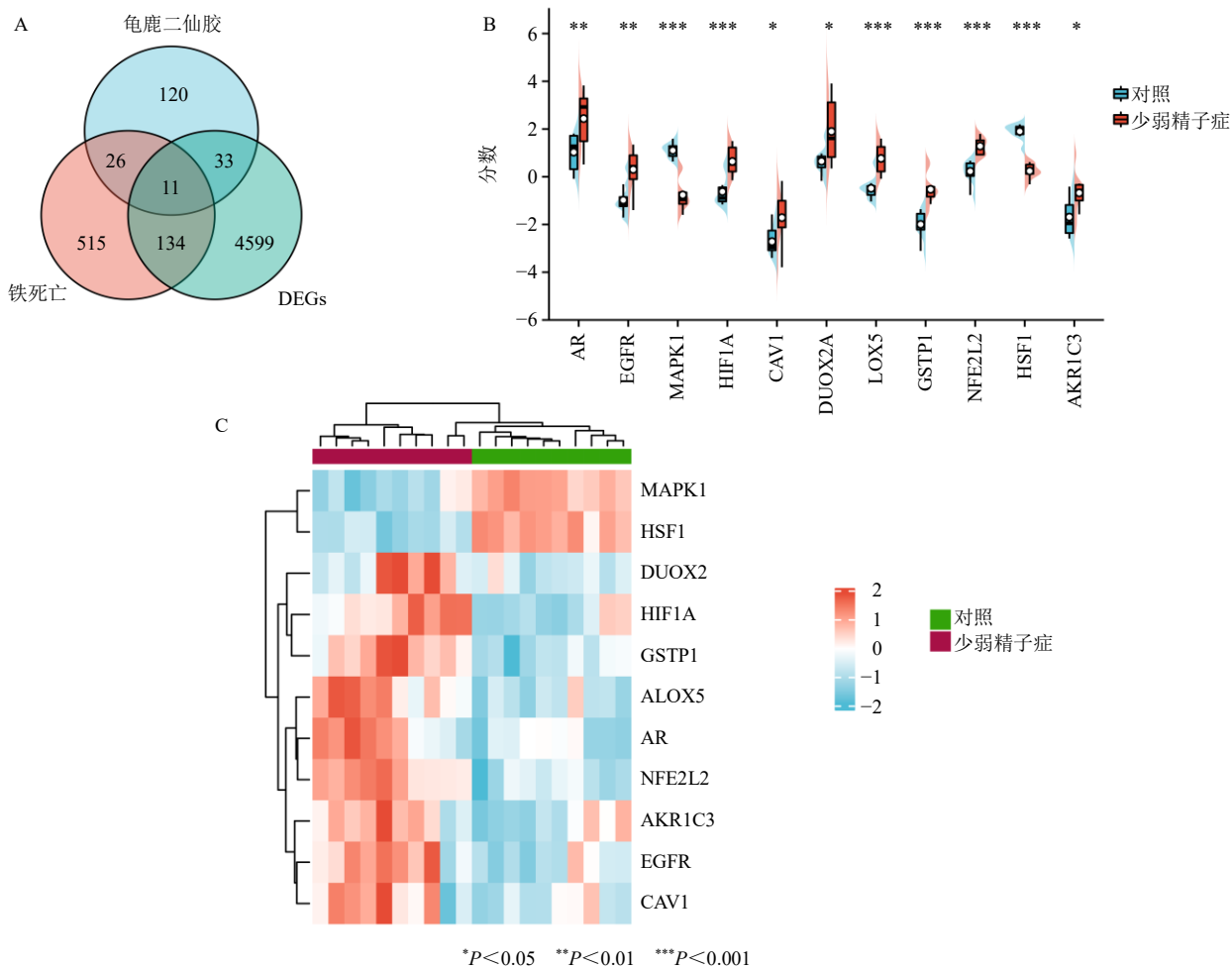


图 2 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症铁死亡靶点 (A) 和表达谱 (B、C)

Fig. 2 Iron death targets (A) and expression profiles (B, C) of Guilu Erxian Gel for treatment of oligospermia

3.1.3 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的铁死亡靶点相关性分析 将 11 个龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络蛋白, 使用 Cytoscape 3.8.0 软件进行美化 (图 3-A), 节点颜色从绿-浅蓝-深蓝, 蛋白互作次数越大, 同时节点越大。基于 GSE145467 数据集, 映射龟鹿二仙胶干预少弱精子症铁死亡靶点表达谱, 采用 Pearson 相关性分析 (图 3-B), 红色表示两基因呈正相关, 蓝色表示两基因呈负相关。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 在满足 $P < 0.05$ 且 $q < 0.2$ 条件下, 生物过程 (biological process, BP) 共有 804 条, 细胞组成 (cell component, CC) 共有 33 条, 分子功能 (molecular function, MF) 共

有 32 条, KEGG 共有 35 条。根据 P 值进行排序, 对 BP、CC、MF 前 10 位及 KEGG 前 20 位进行可视化 (图 4)。

3.2 细胞实验

3.2.1 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞活力的影响 如图 5-A~C 所示, 分别对 TM4 细胞使用不同浓度的 H_2O_2 干预 3、6、12 h, 随着 H_2O_2 浓度和干预时间的增加, 细胞活性降低, 当使用 $400 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预 6 h 时, 细胞抑制率达到 31.38%, 基于这个结果, 后续实验中, TM4 细胞氧化应激模型中, H_2O_2 浓度选择 $400 \mu\text{mol/L}$ 。

如图 5-D 所示, 对 TM4 细胞使用 H_2O_2 干预造模后, 使用不同浓度的龟鹿二仙胶含药血清干预细

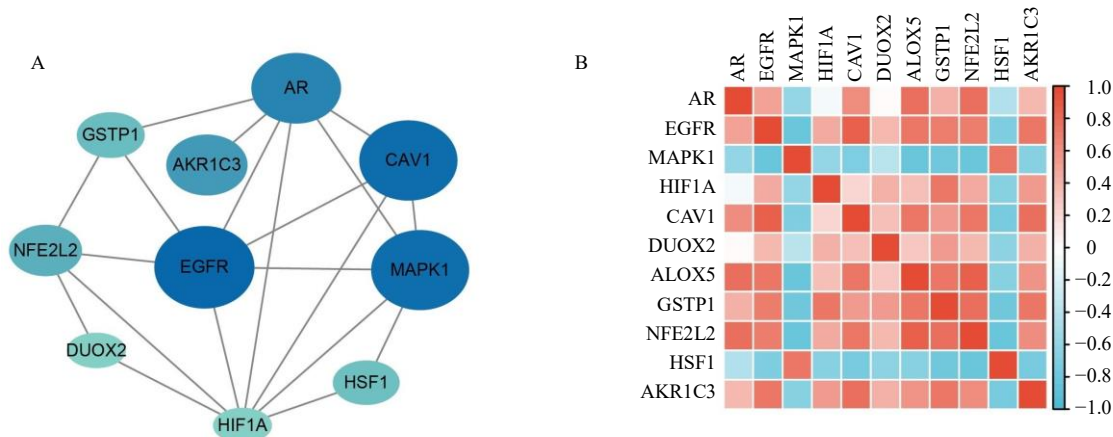


图 3 龟鹿二仙胶治疗少弱精子症铁死亡靶点的 PPI 网络 (A) 和相关性分析 (B)

Fig. 3 PPI network (A) and correlation analysis (B) of ferroptosis targets of Guilu Erxian Gel for treatment of oligospermia

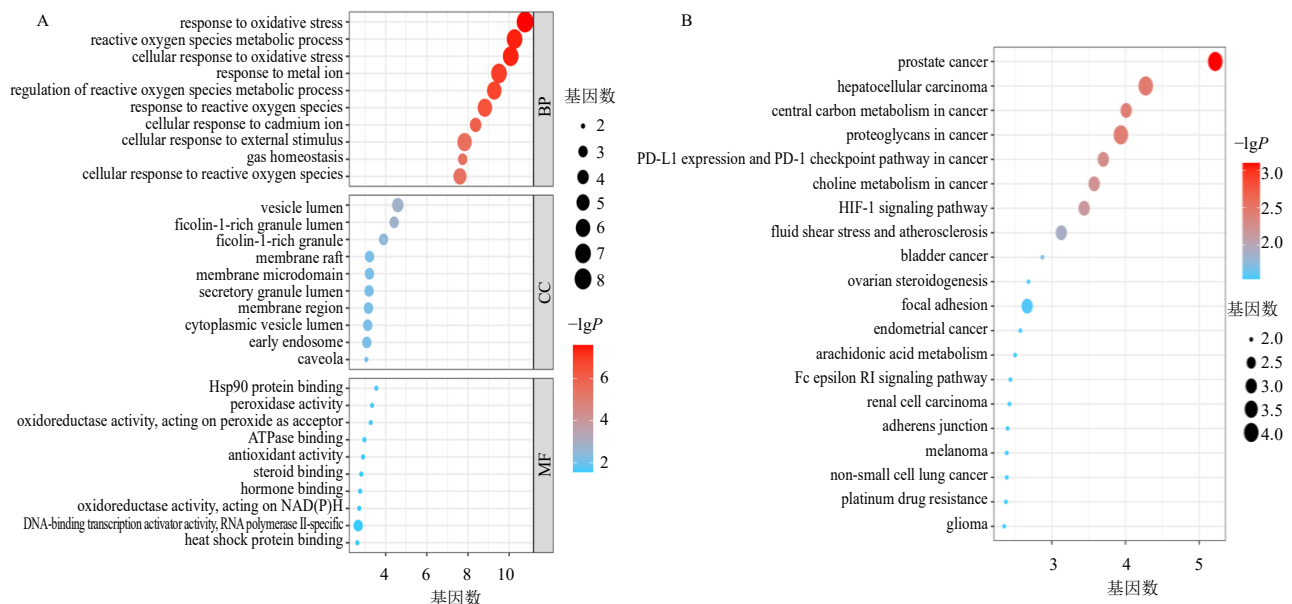
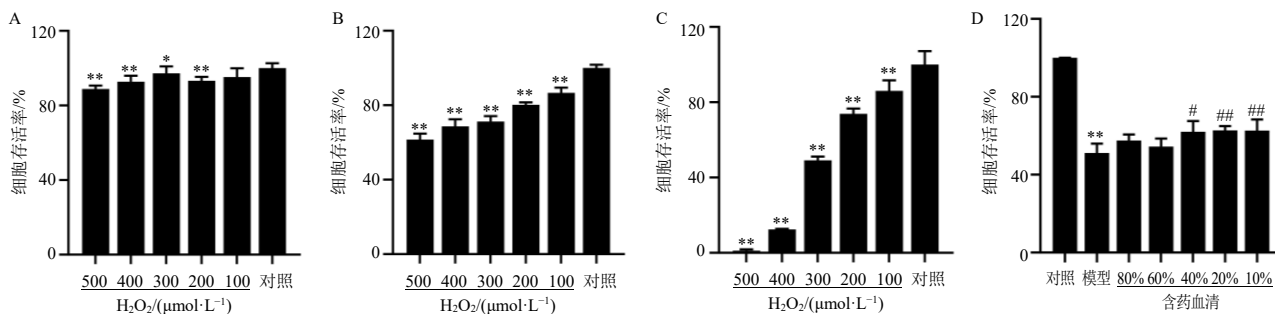


图 4 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis



A- H_2O_2 干预 3 h 对 TM4 细胞活性的影响 B- H_2O_2 干预 6 h 对 TM4 细胞活性的影响 C- H_2O_2 干预 12 h 对 TM4 细胞活性的影响 D-龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞活性的影响 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 下同
A-effect of 3 h intervention with H_2O_2 on viability of TM4 cells B-effect of 6 h intervention with H_2O_2 on viability of TM4 cells C-effect of 12 h intervention with H_2O_2 on viability of TM4 cells D-effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on viability of TM4 cells induced by H_2O_2 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group, same as below figures

图 5 CCK-8 法检测 TM4 细胞活性 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 TM4 cell viability detected by CCK-8 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

胞, 在 20%含药血清干预时细胞增殖率最高, 随着药物浓度增加, 细胞增殖率有所下降, 基于此, 选取 20%和 10%含药血清进行后续实验。

3.2.2 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞形态的影响 如图 6 所示, 对照组细胞上皮样贴壁, 细胞状况良好, 形状呈梭形或多角形, 细胞核明显; 模型组细胞数量显著减少, 细胞变圆、变小, 视野内可见细胞碎片; 各给药组细胞形态大部分恢复, 视野内细胞碎片明显减少, 表明龟鹿二仙胶含药血清能不同程度地改善 H_2O_2 对细胞造成的损伤。

3.2.3 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 ROS、LDH、总铁离子和亚铁离子的影响 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 ROS、LDH、总铁离子和亚铁离子含量均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组以上指标均显著降低 ($P<0.05, 0.01$)。

3.2.4 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞超微结构的影响 如图 8 所示, 模型组细胞线粒体双层膜高度浓缩, 线粒体收缩, 线粒体嵴减少或消失; 龟鹿二仙胶含药血清干预后, 细胞线粒体结构有不同程度的修复。

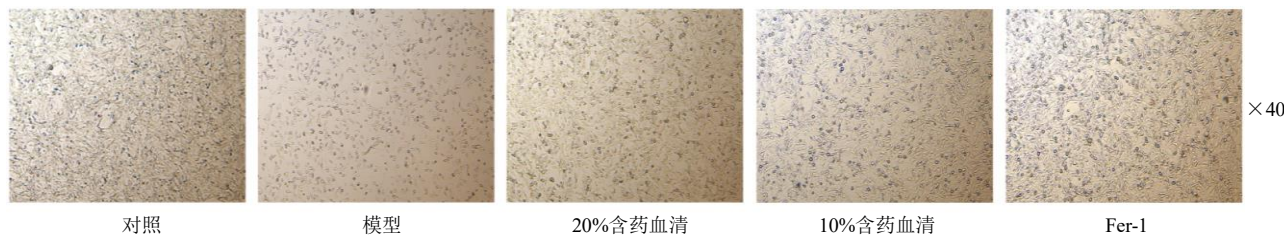


图 6 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞形态的影响

Fig. 6 Effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on morphology of H_2O_2 -induced TM4 cells

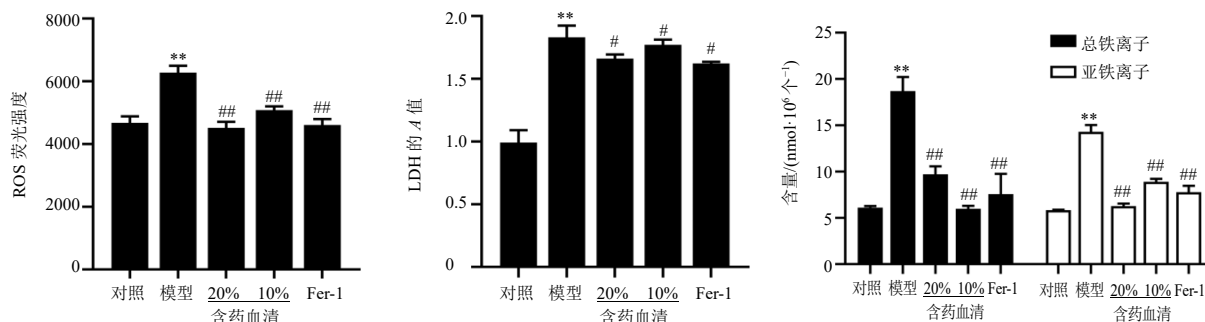
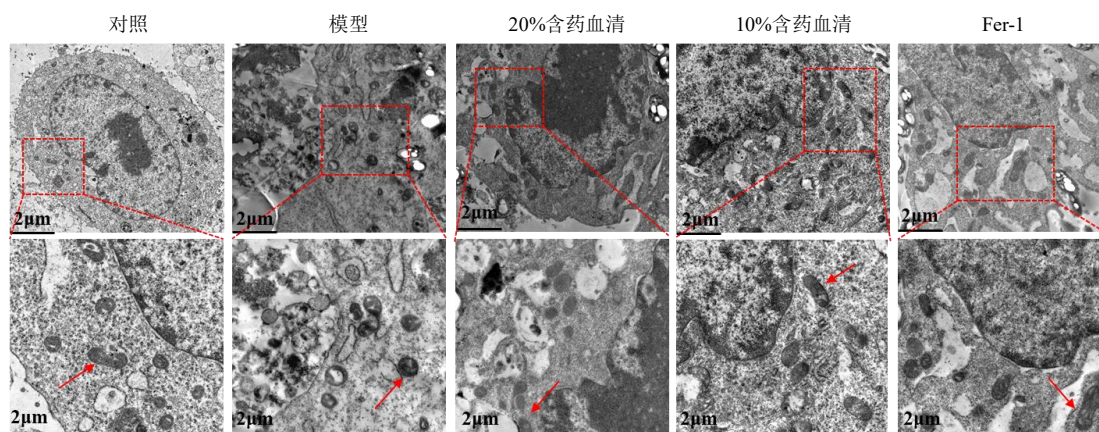


图 7 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 ROS、LDH、总铁离子和亚铁离子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 7 Effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on contents of ROS, LDH, total iron and ferrous ions in H_2O_2 -induced TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)



箭头所指为细胞线粒体的形态
arrow refers to the morphology of cell mitochondria

图 8 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞超微结构的影响

Fig. 8 Effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on ultrastructure of H_2O_2 -induced TM4 cells

3.2.5 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 *GPX4* 和 *ACSL4* mRNA 表达的影响 如图 9 所示,与对照组比较,模型组 *ACSL4* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *GPX4* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 *ACSL4* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *GPX4* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.2.6 龟鹿二仙胶对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 *GPX4* 和 *ACSL4* 蛋白表达的影响 如图 10 所示,与对照组相比,模型组细胞 *ACSL4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *GPX4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 *ACSL4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *GPX4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

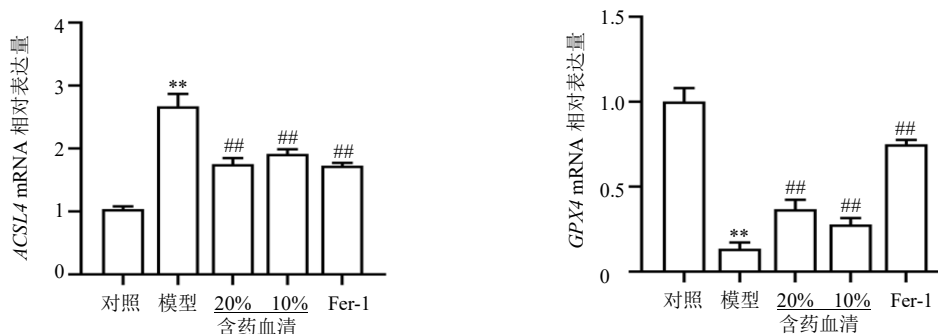


图 9 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 *ACSL4* 和 *GPX4* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on *ACSL4* and *GPX4* mRNA expressions in H_2O_2 -induced TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

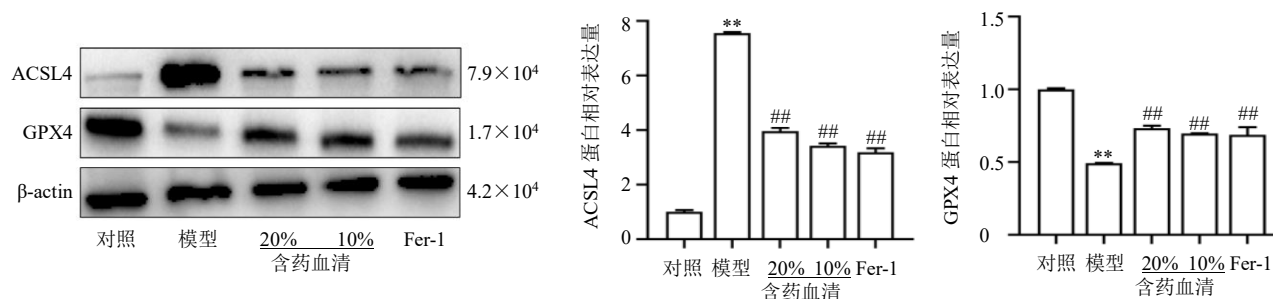


图 10 龟鹿二仙胶含药血清对 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞 *ACSL4* 和 *GPX4* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of Guilu Erxian Gel medicated serum on *ACSL4* and *GPX4* protein expressions in H_2O_2 -induced TM4 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 动物实验

3.3.1 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠血清中性激素分泌的影响 如图 11 所示,与对照组比较,模型组 T 和 E₂ 分泌显著减少 ($P<0.01$), LH 和 FSH 分泌显著增多 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 T 和 E₂ 分泌显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), LH 和 FSH 分泌显著减少 ($P<0.01$)。

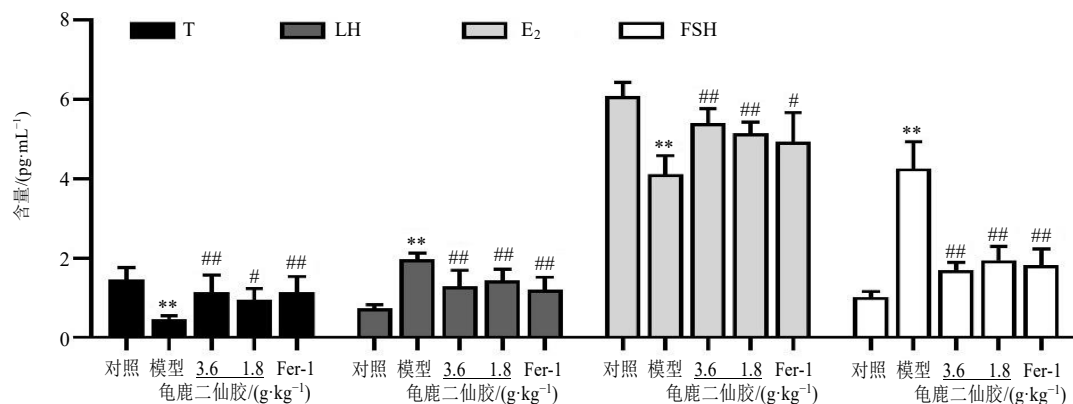


图 11 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠血清中性激素分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 11 Effect of Guilu Erxian Gel on sex hormone secretion in serum of mice with oligospermia ($\bar{x} \pm s, n=5$)

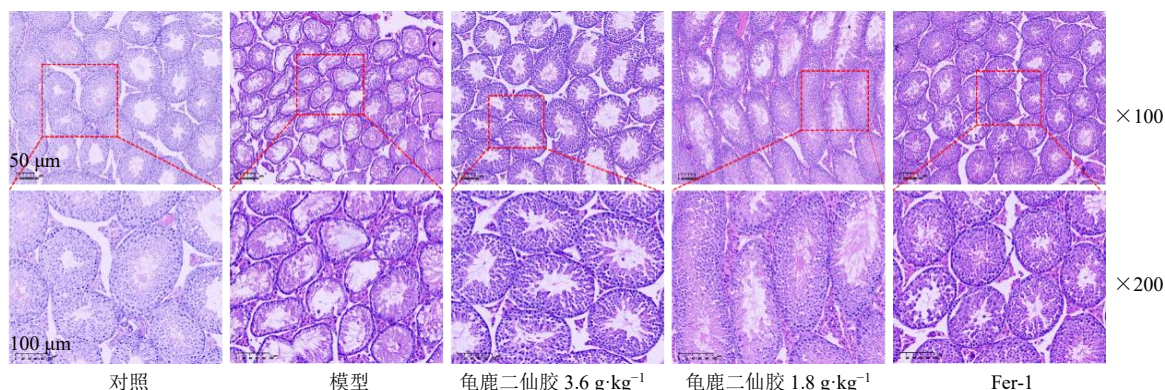


图 12 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠睾丸组织病理变化的影响 (HE)

Fig. 12 Effect of Guilu Erxian Gel on pathological changes of testicular tissue in mice with oligospermia (HE)

3.3.3 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠睾丸组织 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达的影响 如图 13 所示,与对照组比较,模型组小鼠睾丸组织 ACSL4 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠睾丸组织 ACSL4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

不育症是常见的男科疾病之一,国内研究显示,在过去 15 年中,中国男性精子质量随时间呈现下降趋势,随着国家“三孩”政策的放开,整个社会对于生育的需求进一步扩大,男性不育症正成为一

3.3.2 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠睾丸组织病理变化的影响 如图 12 所示,与对照组比较,模型组小鼠睾丸的生精小管和睾丸间质出现了显著病理改变,各级精子细胞出现变性坏死和排列紊乱,支持细胞空泡化,间质水肿和充血。与模型组比较,各给药组能不同程度地改善环磷酰胺诱导的小鼠睾丸组织病理损伤,生精细胞层数和数量明显增多。

项严重的、亟需解决的社会学问题^[18]。铁死亡是近年来发现的一种铁依赖性、以脂质 ROS 堆积为特点的细胞死亡方式。研究发现,白消安诱导少弱精子症小鼠模型睾丸组织表现出典型铁死亡特征,抗氧化剂及铁死亡抑制剂干预可抵抗铁死亡,减轻少弱精子症小鼠睾丸组织病理损伤,并改善附睾精液质量^[19]。中医学认为少弱精子症病位在肾,核心病机之一就是肾阴亏虚、肾阳不足,肾藏精,主生殖,汇聚五藏六腑之精而藏之,为先天之本,是生殖之源,对生殖功能进行调控^[20]。龟鹿二仙胶是临床上常用于治疗经久不孕的中医经典方剂,方中鹿角胶补益肝肾、益精养血,龟板胶滋阴潜阳、补血养血,

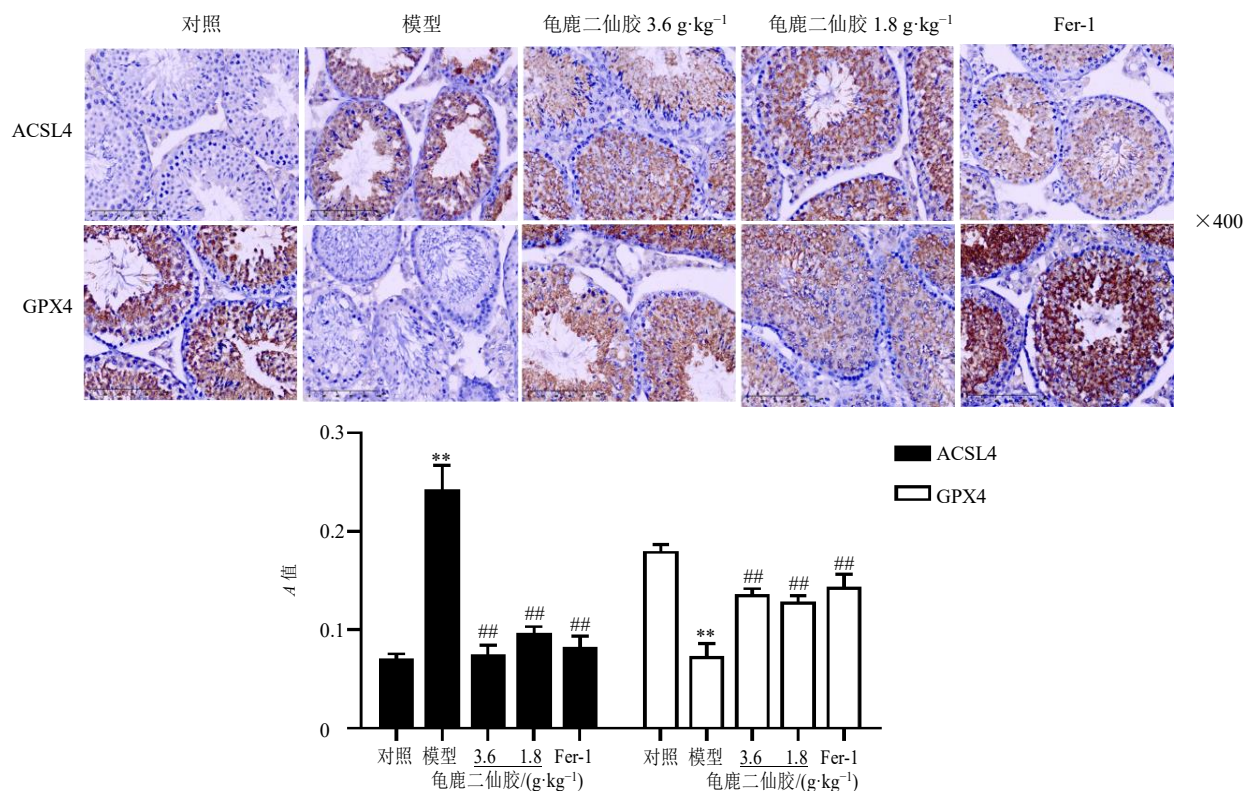


图 13 龟鹿二仙胶对少弱精子症小鼠睾丸组织 ACSL4 和 GPX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of Guilu Erxian Gel on ACSL4 and GPX4 protein expressions in testicular tissue of mice with oligospermia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

二胶皆血肉之品合用补肝肾、益精血之功更甚，共为君药；枸杞子滋补肝肾，益精明目；人参补气益脾肺，同为臣药，4药合用，阴阳气血并补，先后天同补，效专力宏，共奏补髓填精之功。

本研究通过网络药理学得到龟鹿二仙胶 81 个活性成分和 190 个作用靶点，并得到了 686 个铁死亡相关基因和 4777 个少弱精子症的差异基因，三者取交集后得到 11 个龟鹿二仙胶治疗少弱精子症的铁死亡相关靶点，对其进行 PPI 网络的构建和相关性分析，发现 11 个靶点之间具有较强的相互作用和相关性，随后对其进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，在满足 $P < 0.05$ 且 $q < 0.2$ 条件下，GO 富集分析共检测到 869 个条目，其中 BP 有 804 条，CC 有 33 条，MF 有 32 条，KEGG 共有 35 条。体外实验结果发现， H_2O_2 诱导的 TM4 细胞出现了线粒体收缩、线粒体嵴减少或消失等典型的铁死亡特征，同时还能促进细胞 ROS、LDH、总铁离子和亚铁离子的含量，并还能促进铁死亡阳性基因 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达，抑制铁死亡阴性基因 GPX4 的 mRNA 和蛋白表达；龟鹿二仙胶含药血清能有效地缓解细胞的线粒体损伤以及 ROS、LDH、总铁离

子和亚铁离子的含量，同时也能逆转 H_2O_2 诱导的铁死亡相关基因 mRNA 和蛋白表达，并能有效改善细胞形态，表明龟鹿二仙胶可能是通过抑制细胞铁死亡的发生来缓解 H_2O_2 诱导的细胞损伤。此外，本研究还通过环磷酸腺苷诱导了小鼠少弱精子症模型，结果显示龟鹿二仙胶能有效调节模型小鼠的性激素水平，显著促进 T 和 E_2 的分泌，抑制 LH 和 FSH 水平，还能有效改善模型小鼠睾丸组织的病理损伤，逆转模型小鼠睾丸组织铁死亡标志蛋白的表达，提示龟鹿二仙胶可能是通过抑制铁死亡的发生，进而调节性激素水平来治疗少弱精子症。

综上，本研究结合网络药理学技术，并通过体内外实验验证，预测并分析验证了龟鹿二仙胶治疗少弱精子症模型铁死亡发生的药效机制和作用机制，初步揭示了龟鹿二仙胶抗铁死亡的药效机制，以为中医药治疗少弱精子症提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sharma A, Minhas S, Dhillon W S, *et al.* Male infertility due to testicular disorders [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(2): e442-e459.

- [2] Sheweita S A, Alian D M E, Haroun M, *et al.* Chitosan nanoparticles alleviated the adverse effects of sildenafil on the oxidative stress markers and antioxidant enzyme activities in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 9944985.
- [3] 邓省, 李海松, 王彬, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨菟丝子-枸杞子对少弱精子症大鼠增殖凋亡相关蛋白的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 795-799.
- [4] 梁景辉, 朱闽, 买鹏宇, 等. 基于 CiteSpace 对中医药防治男性少弱精子症的可视化分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(6): 1915-1923.
- [5] Choy J T, Amory J K. Nonsurgical management of oligozoospermia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(12): e4194-e4207.
- [6] 宫艺, 李建, 吴效科. 经皮穴位电刺激治疗特发性少弱精子症的 Meta 分析 [J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(10): 917-926.
- [7] Chehab M, Madala A, Trussell J C. On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): 595-604.
- [8] 郭汉林, 李晓阳, 高旋慰. 龟鹿二仙胶治疗男性精液异常 60 例 [J]. 陕西中医, 2005, 26(3): 213-214.
- [9] Park E, Chung S W. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 822.
- [10] 李永顺, 谢嘉嘉, 李航, 等. 基于生物信息学及铁死亡分析特发性肺纤维化的差异基因及潜在的治疗中药预测 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 501-509.
- [11] Yang W, Wang Y, Zhang C, *et al.* Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865689.
- [12] Yang X, Liu P L, Zhang X L, *et al.* T-2 toxin causes dysfunction of sertoli cells by inducing oxidative stress [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 225: 112702.
- [13] He S, Wang T Q, Shi C W, *et al.* Network pharmacology-based approach to understand the effect and mechanism of Danshen against anemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114615.
- [14] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [15] Ding J, Lu B W, Liu L M, *et al.* Guilu-Erxian-Gluo alleviates *Tripterygium wilfordii* polyglycoside-induced oligoasthenospermia in rats by resisting ferroptosis via the Keap1/Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 213-227.
- [16] Zheng Q, Li P F, Zhou X, *et al.* Deficiency of the X-inactivation escaping gene KDM5C in clear cell renal cell carcinoma promotes tumorigenicity by reprogramming glycogen metabolism and inhibiting ferroptosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8674-8691.
- [17] Cao Y C, Wang X S, Li S Q, *et al.* The effects of l-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 120(2): 152-158.
- [18] 李波, 王广建, 陈广辉, 等. 百合育子方治疗特发性少精子症随机对照研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(11): 1318-1322.
- [19] Zhao X, Liu Z H, Gao J, *et al.* Inhibition of ferroptosis attenuates busulfan-induced oligospermia in mice [J]. *Toxicology*, 2020, 440: 152489.
- [20] 丁劲, 何清湖, 周兴, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨龟鹿二仙胶治疗少、弱精子症作用机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(12): 4490-4504.

[责任编辑 李亚楠]