

从“病-证-方-药”关联视角探讨负载槲皮素的外泌体改善 Leydig细胞睾酮合成机制

王梅静¹, 兰秀成¹, 王方月¹, 张静益¹, 李广森¹,
常德贵¹, 俞旭君^{2*}, 阳方^{2*}

(1. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 成都 610072;
2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 基于“疾病-证候-方剂-药物”多维关联分析框架, 系统阐释强精片有效成分在氧化应激状态下对睾丸Leydig细胞睾酮合成通路的调控作用, 为男性不育的中医药治疗及复方现代化研究提供理论依据。方法: 通过人类基因数据库(GeneCards, score \geq 20)、比较毒理基因组学数据库(CTD, score \geq 150)、DrugBank(score \geq 0.2)和DisGeNET(score \geq 0.2)获取男性不育疾病靶点; 从中医药证候关联数据库(SymMap)获取肾虚血瘀证相关靶点。基于中医药百科全书数据库(ETCM)和中医药整合药理学研究平台(TCMIP)获取强精片成分, 按定量评估药物相似性(QED) \geq 0.49和靶点置信指数 $>$ 0.8筛选。取交集靶标, 利用蛋白互作网络分析数据库(String)构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, Cytoscape软件可视化, 并进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。通过ADMETlab 2.0平台, 依据Lipinski规则、Pfizer规则、GSK规则和Golden Triangle规则预测质量标志物(Q-marker)。实验验证部分, 采用大鼠睾丸Leydig细胞, 提取外泌体(Exo)并通过超声法负载有效成分。使用蛋白定量法(BCA)蛋白定量试剂盒测定Exo浓度, 透射电镜观察形态, 粒径分析仪分析粒径大小, 蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定表面标志蛋白[分化簇(CD)9、CD63、CD81], 高效液相色谱法(HPLC)测定载药量。通过偶氮二异丁脒盐酸盐(AAPH)诱导氧化应激模型, 将Leydig细胞分为正常组、AAPH组、槲皮素(Que)组、Exo组、负载Que的Exo(Que-Exo)组; 采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力; 流式细胞术检测活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和睾酮的水平; Western blot和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测类固醇生成酶[细胞色素P450家族11亚家族A成员1(CYP11A1)、皮质类固醇3 β 脱氢同工酶1(HSD3B1)、HSD17B3]及调控因子[类固醇生成因子-1(SF-1)、类固醇生成急性调节蛋白(StAR)]的表达, 并检测miR-145-5p含量。结果: 网络药理学分析显示, 强精片干预男性不育肾虚血瘀证的主要活性成分为Que、6-羟基木犀草素等, 核心机制涉及类固醇激素合成等通路。实验结果表明, 与正常组比较, AAPH组细胞活力显著降低($P<$ 0.01), 线粒体膜电位显著下降($P<$ 0.01), ROS、MDA及miR-145-5p水平显著升高($P<$ 0.01), SOD、GSH-Px、CAT活性及睾酮含量显著降低($P<$ 0.01), 类固醇生成酶及SF-1、StAR蛋白与mRNA表达均显著下调($P<$ 0.01)。Que组与Que-Exo组上述指标有所逆转($P<$ 0.05)。与Que组比较, Que-Exo组在提升细胞活力、线粒体膜电位、睾酮水平、抗氧化酶活性及类固醇生成通路关键分子表达方面效果更明显($P<$ 0.05)。结论: 该研究表明, 强精片活性成分Que通过抑制氧化应激反应, 改善Leydig细胞线粒体功能, 上调类固醇生成酶的表达, 恢复睾酮的产生。Exo作为Que的载体, 提高了其稳定性和递送效率, 增强了生物学效应。此外, miR-145-5p可能与睾酮合成密切相关, 但其精确的分子机制仍需深入探索。该研究将传统中药复方与现代科学技术相结合, 拓展了中医药现代化研究的路径, 同时为男性不育症的临床干预开辟了具有转化潜力的治疗新方向。

[关键词] 强精片; 槲皮素; 外泌体; 睾酮; 氧化应激

[中图分类号] R339.2; R285.5; R289

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-9903(2026)14-0360-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251118

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250919.1510.003>

[网络出版日期] 2025-09-19 17:14:52

[增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



[收稿日期] 2025-07-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274534); 成都中医药大学附属医院专项(WXLH202403084); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(MPRC2023057)

[第一作者] 王梅静, 在读博士, 医师, 从事中医药防治泌尿及生殖系统疾病的研究, E-mail: 1114076028@qq.com

[通信作者] * 俞旭君, 博士, 教授, 从事中医药防治泌尿及生殖系统疾病的研究, E-mail: 20639179@qq.com;

* 阳方, 博士, 主治医师, 从事中医药防治泌尿及生殖系统疾病的研究, E-mail: 252142600@qq.com

Mechanism of Quercetin-loaded Exosomes in Improving Testosterone Synthesis in Leydig Cells from Correlation Perspective of "Disease, Syndrome, Formula, and Medicine"

WANG Meijing¹, LAN Xiucheng¹, WANG Fangyue¹, ZHANG Jingyi¹,
LI Guangsen¹, CHANG Degui¹, YU Xujun^{2*}, YANG Fang^{2*}

(1. *Traditional Chinese Medicine (TCM) Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China;*
2. *Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China*)

[Abstract] Objective: Based on the multidimensional correlation analysis framework of "disease, syndrome, formula, and medicine", this study aims to systematically elucidate the regulatory effects of effective components in Qiangjing tablet on testosterone synthesis pathways in testicular Leydig cells under oxidative stress, providing a theoretical basis for the treatment of male infertility with traditional Chinese medicine and modern research on compounds. **Methods:** Disease targets for male infertility were obtained from The Human Gene Database (GeneCards, score ≥ 20), the Comparative Toxicogenomics Database (CTD, score ≥ 150), DrugBank (score ≥ 0.2), and DisGeNET (score ≥ 0.2). Targets related to the syndrome of kidney deficiency and blood stasis were acquired from the traditional Chinese medicine syndrome association database SymMap. Components of Qiangjing tablet were retrieved based on The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM) database and the Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine (TCMIP), and they were screened according to a quantitative estimate of drug-likeness (QED ≥ 0.49) and a target confidence index > 0.8 . Intersecting targets were taken to construct a protein-protein interaction (PPI) network using the STRING database. The network was visualized with Cytoscape software and subjected to the functional annotation of gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Quality markers (Q-markers) were predicted via the ADMETlab 2.0 platform based on Lipinski's rule, Pfizer's rule, GSK's rule, and the Golden Triangle. For experimental validation, rats' testicular Leydig cells were used. Exosomes were extracted and loaded with active components via the ultrasonic method. Exosome concentration was determined using a BCA protein quantification kit. Morphology was observed using a transmission electron microscope. The particle size was analyzed with a particle size analyzer. The surface marker proteins such as cluster of differentiation 9 (CD9), cluster of differentiation 63 (CD63), and cluster of differentiation 81 (CD81) were identified by Western blot, and drug loading capacity was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). An oxidative stress model was induced by alpha, alpha'-azodiisobutyramidine dihydrochloride (AAPH), and Leydig cells were divided into the following groups: A control group, an AAPH group, a quercetin group (Que group), an exosome group (Exo group), and a QUE-loaded Exo group (Que-Exo group). The cell viability was detected using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) thiazolyl blue assay. The reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial membrane potential were measured by flow cytometry. The levels of oxidative indicators, including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), and testosterone (T), were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of steroidogenic enzymes such as cytochrome p450 family 11 subfamily a member 1 (CYP11A1), hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1), and hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3 (HSD17B3), regulatory factors such as steroidogenic factor 1 (SF-1) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and miR-145-5p content, were detected by Western blot and real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Results:** Network pharmacology analysis reveals that the main active components of Qiangjing tablet for intervening in male infertility with kidney deficiency and blood stasis syndrome were Que, luteolin, etc., with the core mechanism involving pathways such as steroid hormone biosynthesis. Experimental results show that compared with the control group, the AAPH group exhibits significantly reduced cell viability ($P < 0.01$), decreased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), significantly elevated levels of ROS, MDA, and miR-145-5p ($P < 0.01$), significantly reduced activities of SOD, GSH-Px, and CAT, as well as reduced testosterone content ($P < 0.01$), and significantly downregulated protein and mRNA expressions of steroidogenic enzymes, SF-1, and StAR ($P < 0.01$). The above indicators were reversed in the Que and Que-Exo groups ($P < 0.05$). Compared with the Que group, the Que-Exo group showed more significant effects in enhancing cell viability, mitochondrial membrane potential, testosterone level, antioxidant enzyme activities, and expressions of key molecules in the steroidogenic pathway ($P < 0.05$). **Conclusion:** This study demonstrates that Que, an active component of Qiangjing tablet, inhibits oxidative stress reaction, improves mitochondrial function in Leydig cells, upregulates steroidogenic enzyme expression, and restores testosterone production. As a carrier for Que, Exo enhance its stability, delivery efficiency, and biological effect. Additionally, miR-145-5p may be closely associated with testosterone synthesis, though its precise molecular mechanism requires

further exploration. By integrating traditional Chinese medicine compounds with modern scientific technology, this research expands the paths for the modernized research of traditional Chinese medicine and opens a novel therapeutic direction with translational potential for clinical intervention of male infertility.

[Keywords] Qiangjing tablet; quercetin; exosome; testosterone; oxidative stress

近年来,我国人口生育率持续下降,男性不育问题日益凸显^[1-2]。睾丸损伤和生精功能障碍是男性不育的重要原因^[3]。在生殖医学领域,中医药凭借其独特的理论体系和显著的临床效果,在治疗不育症方面展现出明显优势。川渝地区男性不育的病因病机具有鲜明的地域特色。《黄帝内经》曰:“西方者……其病生于内,其治宜毒药”,川渝地处西南,气候潮湿多雨,湿邪易袭,加之饮食偏嗜辛辣,湿热交蒸。《临证指南医案》谓:“湿热无形,入肺乘脾,布散三焦”,湿热上犯则伤肺,中侵则伤脾,下注则伤肾,进而耗气伤阴。《临证指南医案》曰:“久病血瘀”“久则血伤入络”,男性不育症多发病隐匿,多数患者确诊时病程已迁延日久,因此川渝地区男性不育患者常有“肾虚为本、瘀血为标”的复合病机^[4]。

基于“肾主生殖”理论,结合“久病入络”的病机特点,四川省中医院男科团队创新性地提出“补肾活血通络”治疗大法,并据此研制出特色制剂强精片,其临床疗效已获多项研究证实^[5-7]。然而,进一步阐明其科学内涵、推动其高质量发展面临挑战:作为典型的中药复方,存在活性成分溶解性差、生物利用度低、靶向性不足,以及药效物质基础与作用机制不明晰等问题,制约了其药效机制的精准解析与临床应用^[8-9]。因此,现代中药研究正沿两个方向协同推进:一是系统解析复方的药效物质基础及作用机制,二是发展新型药物递送系统以提高其生物利用度和靶向性。

在补肾活血类中药中,黄酮类化合物[如槲皮素(Que)^[10]、山柰酚^[11]、金丝桃苷^[12]等]因其广泛的药理活性而备受关注,但其口服稳定性差、生物利用度低等问题亟待解决^[13]。外泌体(Exo)作为天然纳米载体,凭借其良好的生物相容性、低免疫原性和靶向递送能力,为中药复方活性成分的传递提供了解决方案^[14]。鉴于此,本研究立足于“病-证-方-药”多维研究框架,以男性不育肾虚血瘀证为研究对象,以强精片及其活性成分为核心,首先采用网络药理学方法筛选其潜在活性成分及关键靶点,并利用Exo载药技术,以氧化应激诱导的Leydig细胞睾酮合成功能障碍为模型,重点探讨强精片主要活性成分的调控作用与机制。研究旨在明确强精片的药效物质基础,揭示其作用原理,并为发展中药

精准治疗策略与转化应用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞 大鼠睾丸Leydig细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号CP-R206),传代次数不超过3代。

1.2 试剂 Que、偶氮二异丁脒盐酸盐(AAPH)(德国Sigma-Aldrich公司,批号分别为Q4951、440914-25G);培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号CM-R206);胎牛血清(上海道鹏生物科技有限公司,批号C04001-500);青霉素-链霉素溶液(双抗)(上海源培生物科技股份有限公司,批号S110JV);噻唑蓝(MTT)检测试剂盒(德国BioFroxx公司,批号1334GR001);活性氧(ROS)检测试剂盒、细胞线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒、蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为S0033S、C2006、P0011);总蛋白(TP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A045-2-1、A001-3-1、A003-1-1、A005-1-1、A007-1-1);PKH67Exo荧光标记(上海宇玫博生物科技有限公司,批号UR52303);Molpure[®] Cell/Tissue Total RNA Kit、Bis-Tris 10%高分辨率预制胶、变性蛋白预制胶缓冲液(Tris-Mops)(上海翊圣生物科技有限公司,批号分别为19221ES50、36266ES10、36271ES05);Bulge-Loop[™] miRNA实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Starter Kit(广州市锐博生物科技有限公司,批号R10211-1);蛋白免疫印迹法(Western blot)及IP细胞裂解液、蛋白酶抑制剂通用型100×、磷酸酶抑制剂100×、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)、预染蛋白Marker、聚山梨醇酯-20(兰杰柯科技有限公司,批号分别为BL509A、BL612A、BL615A、BL502A、BL712A、BS100);‘Torchlight’ Hypersensitive 增强化学发光法(ECL) Western blot辣根过氧化物酶(HRP) Substrate(成都正能生物技术有限责任公司,批号17046);FITC标记anti-rat分化簇(CD)9抗体(美国Biolegend公司,批号206505);FITC标记CD81 Monoclonal抗体(Eat2)(美国Invitrogen公司,批号MA5-17939);HRP标记山羊抗兔二抗(江苏亲

科生物研究中心有限公司,批号 S0001); β -肌动蛋白(β -actin)、CD9、CD63、CD81、CYP11A1、HSD3B1、HSD17B3、SF-1、StAR(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为 AC026、A1703、A22343、A5270、A16363、A19266、A7687、A24536、A22166)。

1.3 仪器 DMI1 型倒置生物显微镜(德国 Leica 公司);IX73 型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);311 型二氧化碳培养箱、905 型超低温冰箱、Varioskan LUX 型多功能酶标仪、QuantStudio™ 3 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo Fisher 公司);OptiClean 1300 型超净工作台、Neofuge1600R 型冷冻离心机(力康精密科技有限公司);DSX-280B 型压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);Cytotflex 型流式分析仪(美国 Beckman 公司);CP100MX 型超速离心机、HT-7700 型透射电镜(日本 Hitachi 公司);N30E 型粒径分析仪(厦门福流生物科技有限公司);UV752N 型分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);PMX120 型纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司);JY-SCZ4+型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);S1010E 型掌上离心机(美国 Scilogex 公司);JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);H2050R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);5200 Multi 型荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 男性不育肾虚血瘀证“疾病-证候”相关基因的收集和整理 在整合人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>, score \geq 20)、比较毒理基因组学数据库(CTD, <https://ctdbase.org/>, score \geq 150)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>, score \geq 0.2)、DisGeNET(<https://disgenet.com/>, score \geq 0.2)数据库,以“Male infertility”为关键词,以获取与男性不育疾病相关的靶点。从中医药证候关联数据库(SymMap, <http://www.symmap.org/>)中获取肾虚血瘀证型相关靶点。

2.2 强精片化学成分及靶标的收集和整理 从中医药百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/>)、中药整合药理学计算平台(TCMIP, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/>)中获取强精片中8味中药人参、菟丝子、枸杞子、淫羊藿、当归、益母草、仙茅和车前子的成分及靶标。根据定量评估药物相似性(QED) \geq 0.49 筛选成分,以靶点置信

指数 $>$ 0.8 筛选靶标。

2.3 强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的“疾病-证候-方剂-药素”网络调控机制分析 取男性不育、肾虚血瘀证、强精片交集基因作为核心网络靶标。运用蛋白互作网络分析数据库(String, <https://string-db.org/>)构建蛋白质相互作用网络,随后借助 Cytoscape 软件可视化核心靶标网络。为进一步阐明其生物学功能,采用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行了基因本体论(GO)功能注释和 KEGG 通路富集分析。根据核心靶点反推核心药素,并通过 ADMETlab 2.0 平台(<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index>),以化合物是否满足 Lipinski 规则、Pfizer 规则、GSK 规则和 Golden Triangle 预测强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的质量标志物(Q-marker),后续实验以筛选的 Q-marker 进行验证。

2.4 Exo 制备、鉴定、载药与稳定性检测 Leydig 细胞培养液经梯度离心(4 °C, 2 000 \times g, 40 min; 4 °C, 10 000 \times g, 45 min)去除碎片及大囊泡后,经 0.45 μ m 滤膜过滤,最终通过超速离心(4 °C, 100 000 \times g, 70 min)获得 Exo。参考文献[15],采用超声处理法制备负载药物的 Exo。Exo 的鉴定包括,透射电子显微镜观察形态;粒径分析仪测定 Exo 粒径分布及浓度;Western blot 检测 Exo 特定标志物 CD9、CD63 和 CD81 的表达;纳米流式细胞术结合 CD9、CD81 荧光标记的抗体评估 Exo 的蛋白指标。溶解药物,以磷酸盐缓冲液(PBS)为空白对照,使用分光光度计在 272 nm 处测定吸光度 A,代入标准曲线测定含量。由于纳米材料通常具有团聚现象,为了探究 Exo 的储存条件对载药 Exo 的影响,将同一批次的载药 Exo 分别置于-80、4 °C 和常温条件下保存 0 d 和 7 d,随后用透射电子显微镜和粒径分析仪分别检测载药 Exo 样本的形态和粒径分布。

2.5 Exo 细胞摄取实验 使用绿色 PKH67 荧光标记 Exo、红色 PKH26 荧光标记负载 Que 的 Exo(Que-Exo)。将荧光标记的各组 Exo 分别与 Leydig 细胞培养 6、12、24 h 后,在荧光显微镜下观察 Leydig 细胞对 Exo 及 Que-Exo 摄取情况。

2.6 分组、造模与给药 大鼠睾丸 Leydig 细胞分为正常组、AAPH 组(30 mmol \cdot L⁻¹ AAPH)、Que 组(30 mmol \cdot L⁻¹ AAPH+50 μ mol \cdot L⁻¹ Que)、Exo-Que 组[30 mmol \cdot L⁻¹ AAPH+ 负载 Que 的外泌体(1 000 颗粒/细胞)、Exo 组(30 mmol \cdot L⁻¹ AAPH+ 与 Exo-Que 组等量的对照外泌体)。每组 6 次重复,根

据实验方案加入相应浓度 AAPH/外泌体后,于 37 °C、5% CO₂条件下恒温培养 24 h。

2.7 MTT 法检测细胞活力 细胞给药作用 24 h 后,吸弃上清,每孔加入终质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 200 μL;并轻轻晃动培养板数次,37 °C、5% CO₂ 恒温继续培养 4 h。吸弃上清液,每孔加 DMSO 150 μL,摇床低速,避光振荡 10 min 使结晶物充分溶解。使用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光度 A。

2.8 流式细胞术检测 ROS 及线粒体膜电位 细胞给药作用 24 h 后,收集细胞沉淀,每组加入 10 μmol·L⁻¹ 的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 1 mL,37 °C 孵育 20 min;350×g 离心 5 min,去除未进入细胞的探针;正常组加入等量 Rosup 阳性诱导剂,37 °C 孵育 30 min 后上机分析 ROS 水平。细胞给药作用 24 h 后,收集细胞沉淀,加入 JC-1 染色工作液 1 mL 重悬细胞,随后用流式细胞仪分析线粒体膜电位。

2.9 酶联免疫吸附测定法检测氧化应激指标及睾酮浓度 每组加入 RIPA 裂解液冰裂解 30 min 后取上清,根据试剂盒说明书进行操作,随后在酶标仪 450 nm 波长下检测 A,随后代入标准曲线,计算丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和睾酮浓度。

2.10 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达 先后用无水乙醇、裂解液和漂洗液充分裂解细胞,将裂解产物转移至吸附柱进行 RNA 结合,最后用 RNase-free H₂O 洗脱获得总 RNA。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后,随后进行 PCR 扩增。反应程序为 95 °C、30 s 预变性,95 °C、5 s 变性,55 °C、30 s 退火,72 °C、30 s 延伸,共 45 循环。以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算细胞色素 P450 家族 11 亚家族 A 成员 1 (CYP11A1)、3β-羟基类固醇脱氢酶 1(HSD3B1)、17β-羟基类固醇脱氢酶 3(HSD17B3)、类固醇生成因子 1(SF-1)、类固醇生成急性调节蛋白(StAR) mRNA 的相对表达。另取上述总 RNA,随后采用 Bulge-Loop™ 茎环法进行 miRNA 逆转录,反应条件为 42 °C 60 min,70 °C 10 min。扩增反应程序为 95 °C 10 min 预变性;45 个循环(95 °C 2 s,60 °C 20 s,70 °C 10 s)。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 miR-145-5p 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成,引物序列见表 1。

2.11 Western blot 检测相关蛋白表达 取细胞样本,RIPA 裂解 10 min 后测蛋白浓度。将蛋白质样品

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	233
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
CYP11A1	上游 CACTCCTCAAAGCCAGCATCAAG	95
	下游 ATTACGAAGCACCAGGTCATTAC	
HSD3B1	上游 CCGCTGCTGTCATTGATGTCTC	114
	下游 AGGCTGGCACACTGGCTTC	
HSD17B3	上游 TGACCAAGACCGCCGATGAG	137
	下游 GCTGCTGTAGAAGATTCTGGAAGG	
SF-1	上游 TGTCTGTCTCAAGTTCCTCATCCTC	84
	下游 TTCTCTGGGCGTCTTTACC	
StAR	上游 GGCATACTCAACAACCAGGAAGG	80
	下游 GGCACCACCTTACTTAGCACTC	

通过 SDS-PAGE 凝胶转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。5% 脱脂奶粉稀释 TBST Buffer 封闭 2 h,使用一抗 CD9(1:5 000)、CD63(1:1 000)、StAR(1:5 000)、CYP11A1(1:1 000)、HSD3B1(1:1 000)、HSD17B3(1:2 000)、β-actin(1:50 000)4 °C 孵育过夜;二抗(1:5 000)室温孵育 2 h 后加显影液,使用 Tanon 荧光图像分析系统软件 V2.0 对条带进行曝光。采用 Image J 分析 Western blot 条带灰度值。

2.12 统计学分析与绘图 采用 SPSS 20.0 与 GraphPad Prism 8.0 双平台协同分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布且方差齐,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的核心成分与靶标 从数据库共获取“男性不育”疾病靶点 711 个,肾虚血瘀证相关证候(精冷、下元虚衰、肾阳不足、肾阳虚衰、瘀血肿痛、瘀血、瘀血阻络、瘀滞、瘀阻)共 2 349 个靶点。从 ETCM、TCMIP 中获取强精片中药物靶点 356 个,最终获得“疾病-证候-药物”的 7 个交集靶点,包括 HSD3B1、过氧化物酶体增殖物激活受体 α(PPARA)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)、乙酰辅酶 A 羧化酶 α(ACACA)、CCAAT 增强子结合蛋白 β(CEBPB)、视黄醇 X 受体 α(RXRA)、类固醇 5α-还原酶 2 型(SRD5A2)。交集基因对应 12 个成分,根据 ADMET 预测出 5 个核心成分,分别是 Que、6-羟基木犀草素、生物素、山柰酚、癸二酸。

3.2 强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的“疾病-证候-方剂-靶点-成分-通路”网络调控机制分析 构建强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的“疾病-证候-方剂-靶点-成分-通路”网络图(见增强出版附加材料)。结果表明,强精片治疗男性不育肾虚血瘀证主要通过调节内分泌相关通路,如类固醇激素合成、卵巢类固醇生成、胆汁分泌、脂肪酸代谢等。同时,强精片还显著参与了炎症与免疫相关通路,如白细胞介素(IL)-17通路、辅助性T细胞17(Th17)细胞分化、前列腺癌、甲状腺癌等。此外,还涉及细胞通信通路,如细胞分化、胞吞作用等。在强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的核心通路富集分析结果中,类固醇激素合成通路的显著性最高(见增强出版附加材料),而核心成分Que的作用靶点涉及类固醇激素合成通路,因此选择Que作为切入点,采用Exo载药技术,重点探究其对睾丸Leydig细胞睾酮合成机制的影响。

3.3 Exo和Que-Exo的提取与鉴定 在透射电子显微镜下观察到Exo和Que-Exo为球形囊泡样结构。粒径分析显示Exo平均粒径大小分布在147.3 nm左右,Que-Exo粒径大小增加,分布在150.8 nm,符合Exo的定义。Western blot和纳米流式细胞术确认了Exo特异性蛋白CD9、CD63和CD81的表达,结果表明成功制备得到Exo及Que-Exo。具体数据见增强出版附加材料。

根据载药量计算公式得出Exo负载Que的质量浓度为 $3\ 687.53\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,载药率为2.21%。不同储存条件下Que-Exo的稳定性测试结果显示,其在初始阶段(Day 0)各温度组粒径无明显差异,但储存7 d后,-80℃组保持稳定,而4℃和室温下组则出现粒径增大,提示Exo可能发生团聚或融合。这种粒径变化可能影响细胞通过胞吞作用对Exo的摄取效率,因此采用-80℃储存以维持其稳定性。具体数据见增强出版附加材料。

3.4 Leydig细胞对Exo和Que-Exo摄取情况 结果显示,绿色PKH67标记的Exo和红色PKH26标记的Que-Exo位于大鼠睾丸Leydig细胞的胞浆内,并随着观察时间的延长,大鼠睾丸Leydig细胞摄取的Exo数量增多。见图1、图2。

3.5 对Leydig细胞活力和线粒体的影响 光学显微镜观察显示,与正常组比较,AAPH组大鼠Leydig细胞数量减少,形态皱缩,间隙增大。与AAPH组比较,Que组和+Que-Exo组细胞数量增加,形态改善,间隙缩小。MTT法检测显示,与正常组比较,

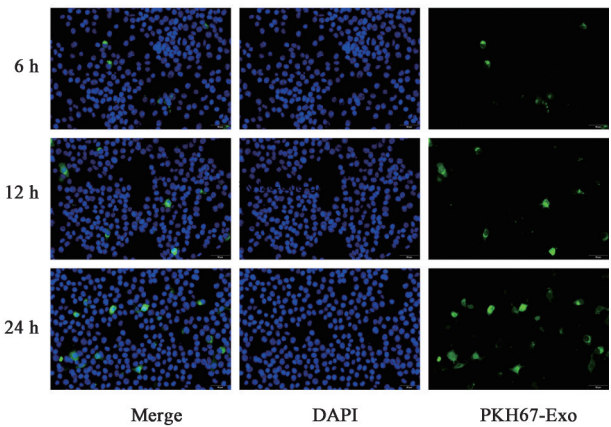


图1 Leydig细胞对Exo摄取情况(免疫荧光,×20)

Fig. 1 Uptake of exosomes by Leydig cells (IF, ×20)

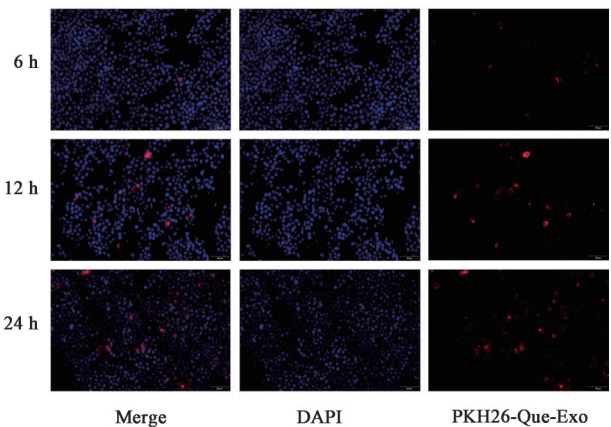
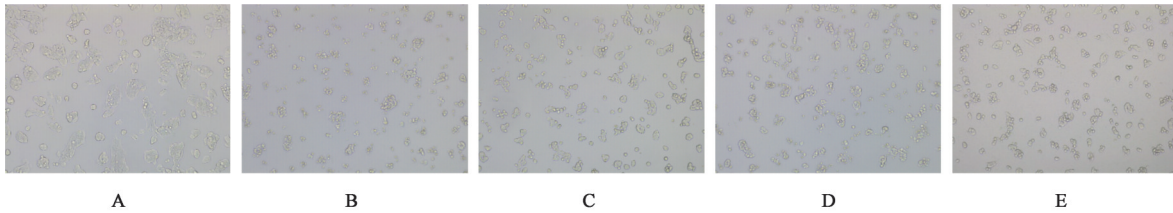


图2 Leydig细胞对Que-Exo摄取情况(免疫荧光,×20)

Fig. 2 Uptake of quercetin-loaded exosomes by Leydig cells (IF, ×20)

AAPH组细胞活力显著下降($P<0.01$);与AAPH组比较,Que组和Que-Exo组Leydig细胞存活率显著升高($P<0.01$);与Que-Exo组比较,Que组和Exo组改善作用较弱($P<0.05$)。流式JC-1分析显示,与正常组比较,AAPH组细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)显著下降($P<0.01$);与AAPH组比较,Que组和Que-Exo组 $\Delta\Psi_m$ 显著上升($P<0.01$);与Que-Exo组比较,Que组和Exo组 $\Delta\Psi_m$ 显著降低($P<0.01$)。见图3、表2。

3.6 对Leydig细胞氧化应激损伤的影响 结果显示,与正常组比较,AAPH组Leydig细胞内ROS、MDA含量显著升高,SOD、GSH-Px和CAT活性显著降低($P<0.01$)。与AAPH组比较,Que组和Que-Exo组ROS、MDA明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD、GSH-Px和CAT活性明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与Que-Exo组比较,Exo组ROS、MDA水平显著升高,SOD、GSH-Px及CAT活性显著降低($P<0.01$);Que组ROS含量显著升高($P<0.01$),SOD活



注:A.正常组;B.AAPH组;C.Que组;D.Exo组;E.Que-Exo组(图4同)

图3 Que-Exo对Leydig细胞形态的影响(倒置显微镜,×10)

Fig. 3 Effect of Que-Exo on morphology of leydig cells (inverted microscope, ×10)

表2 Que-Exo对Leydig细胞活力和 $\Delta\Psi_m$ 的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Que-Exo on Leydig cell viability and $\Delta\Psi_m$ ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量	抑制率/%	$\Delta\Psi_m$
正常组	-	-	62.54±2.05
AAPH组		51.55±2.77	3.54±0.08 ²⁾
Que组	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	37.72±2.28	8.13±0.29 ^{4,6)}
Exo组	1 000 颗粒/细胞	52.06±4.56	3.51±0.02 ⁶⁾
Que-Exo组	1 000 颗粒/细胞	32.63±3.69	13.88±0.23 ⁴⁾

注:Que-Exo组中Que剂量与Que组一致;与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与AAPH组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与Que-Exo组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3-表5同)

表3 Que-Exo对Leydig细胞氧化应激的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Que-Exo on oxidative stress ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	ROS荧光强度	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	GSH-Px/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	CAT/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
正常组		184 922.7±2 866.1	0.66±0.09	13.24±1.11	97.90±5.45	15.01±1.77
AAPH组		293 360.5±3 411.6 ²⁾	1.71±0.09 ²⁾	7.18±0.78 ²⁾	56.84±6.59 ²⁾	7.81±1.06 ²⁾
Que组	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	252 658.4±10 043.2 ^{4,6)}	1.28±0.31 ³⁾	9.11±0.74 ^{3,5)}	76.96±5.05 ⁴⁾	12.12±0.95 ⁴⁾
Exo组	1 000 颗粒/细胞	273 946.1±11 023.9 ^{3,6)}	1.77±0.31 ^{4,6)}	7.04±0.77 ⁶⁾	59.22±7.60 ⁶⁾	7.90±0.57 ⁶⁾
Que-Exo组	1 000 颗粒/细胞	226 431.2±8 544.4 ⁴⁾	1.00±0.21 ⁴⁾	11.30±1.29 ⁴⁾	87.58±10.15 ⁴⁾	13.37±1.11 ⁴⁾

表4 Que-Exo对睾酮及类固醇生成酶mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Que-Exo on testosterone and steroidogenic enzyme mRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	睾酮/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	CYP11A1	HSD3B1	HSD17B3	SF-1	StAR
正常组		28.60±2.78	1.00±0.09	1.00±0.03	1.00±0.06	1.01±0.15	1.00±0.08
AAPH组		13.93±4.21 ²⁾	0.32±0.02 ²⁾	0.32±0.04 ²⁾	0.27±0.06 ²⁾	0.26±0.06 ²⁾	0.32±0.09 ²⁾
Que组	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	21.03±1.96 ^{3,5)}	0.46±0.08 ^{3,6)}	0.45±0.07 ^{3,6)}	0.49±0.10 ³⁾	0.46±0.03 ³⁾	0.49±0.09 ³⁾
Exo组	1 000 颗粒/细胞	13.38±4.34 ⁶⁾	0.32±0.04 ⁶⁾	0.32±0.05 ⁶⁾	0.30±0.08 ⁶⁾	0.26±0.06 ⁶⁾	0.32±0.02 ⁶⁾
Que-Exo组	1 000 颗粒/细胞	24.34±3.41 ⁴⁾	0.65±0.05 ⁴⁾	0.66±0.08 ⁴⁾	0.63±0.12 ⁴⁾	0.58±0.03 ⁴⁾	0.61±0.15 ⁴⁾

3.8 对miR-145-5p水平的影响 在哺乳动物睾丸发育的生理过程中,Sertoil细胞对Leydig细胞的发育和功能维持具有关键调控作用。研究表明,miR-145-5p在未成熟Sertoil细胞中呈现高表达状态,并通过Exo介导的细胞间通讯途径转运至Leydig细胞。miR-145-5p通过特异性结合Sf-1基因3'非翻译区(3'-UTR),抑制SF-1表达,调节睾酮合成酶的

活性,睾酮生成减少^[16]。为了进一步研究Que和Que-Exo对睾酮合成的影响,使用AAPH处理大鼠睾丸Leydig细胞,结果显示,与正常组比较,AAPH组miR-145-5p含量增加($P<0.01$)。与AAPH组比较,Que组和Que-Exo组miR-145-5p表达水平明显降低($P<0.05$);与Que-Exo组比较,Exo组miR-145-5p表达明显升高($P<0.05$),而Que组miR-145-5p表

性明显降低($P<0.05$),而MDA、GSH-Px和CAT水平差异无统计学意义。见表3及增强出版附加材料。
3.7 对睾酮及类固醇生成酶的影响 结果显示,与正常组比较,AAPH组睾酮及类固醇生成酶CYP11A1、HSD3B1、HSD17B3、StAR和SF-1水平显著降低($P<0.01$);与AAPH组比较,Que组和Que-Exo组睾酮及类固醇生成酶水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。上述结果提示Que和Que-Exo可以通过上调类固醇生成酶的表达来促进睾酮的产生。见表4和图4。

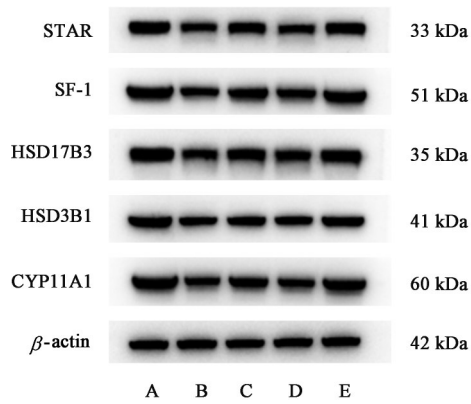


图4 各组类固醇生成酶蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of steroidogenic enzyme proteins

达差异无统计学意义。上述结果提示 Que 可能通过影响 miR-145-5p 的表达,改善氧化应激导致的睾酮合成障碍,但具体作用和方式未来需要进一步进行探究。见表5。

表5 Que-Exo对 miR-145-5p 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Que-Exo on miR-145a-5p expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	miR-145-5p
正常组		1.010±0.167
AAPH组		3.330±0.774 ²⁾
Que组	50 μmol·L ⁻¹	1.710±0.386 ³⁾
Exo组	1 000 颗粒/细胞	3.283±1.730 ³⁾
Que-Exo组	1 000 颗粒/细胞	1.060±0.157 ³⁾

4 讨论

“肾藏精,主生殖”理论系统阐释了男性生殖生理功能,涵盖生精、化精、藏精及泄精等完整生理过程,其中睾丸生精功能是该理论体系的核心环节。川蜀地域气候温暖潮湿,常年雨雾交织,易致外湿困表;加之居民嗜食辛香厚味,常引动内湿化热,终致湿热蕴结之证。湿热下注,影响肾精的生成和输布。如《黄帝内经》云:“湿邪伤人,常在下部。”男性不育症患者往往病程迁延,根据“久病入络”理论,长期病理状态下多伴血瘀证候;瘀血内停可导致精室脉络瘀阻,既影响睾丸生精功能,又妨碍精液正常输泄,最终导致“湿热-肾虚-血瘀”的病理转变,因此四川省中医院男科团队研究制备了以补肾活血为主,兼具清热利湿之强精片。本团队既往研究表明,强精片通过多靶点协同作用发挥疗效,然而中药复方作用机制的解析仍存在难点:一方面,中药复方成分复杂,单味药材活性成分的药效学基础研究尚不完善;另一方面,复方中各组分间的协同/拮

抗效应网络仍需系统阐释^[17]。基于此,通过构建“疾病-证候-方药”网络图,对强精片治疗男性不育症肾虚血瘀证的靶点、机制进行了分析,结果共筛选出包括 Que 等多个药物活性成分,作用于类固醇激素合成等通路。因此,本研究以强精片关键成分 Que 为切入点,采用 Exo 载药技术,重点探究其对睾丸 Leydig 细胞睾酮合成机制的影响,旨在为复方药理研究提供单体层面的科学依据,为中药新药的开发与转化提供思路与方法。

通过构建“疾病-证候-方剂-药素”网络图,结果显示强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的核心通路分析中,类固醇激素合成通路的显著性最高。睾酮是睾丸内关键的类固醇激素,其对精子发生至关重要,不仅促进圆形精子细胞从Ⅶ期向Ⅷ期转化^[18],还调控 DNA 修复、减数分裂及代谢相关蛋白表达^[19];同时通过维持血睾屏障、调节支持细胞-精子细胞连接及精子释放来保障生精过程^[20]。Leydig 细胞是睾丸合成类固醇激素的关键细胞,经下丘脑-垂体-性腺轴调控,以胆固醇为前体经多步酶促反应生成睾酮,维持男性生殖功能。类固醇合成转运蛋白 StAR 促进胆固醇转运至线粒体,最终转化为睾酮, SF-1 可激活 StAR 表达^[21-22]。氧化应激会导致睾酮分泌减少,类固醇生成过程中, ROS 主要产生于线粒体电子传递链、细胞色素 P450 酶反应等途径^[23-24], MDA 水平可反映 ROS 过量产生和氧化损伤程度^[25]。抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 可抑制 ROS 形成,减少脂质过氧化及对脂质、蛋白质和 DNA 的损害^[26]。因此,本研究通过体外构建氧化应激损伤的 Leydig 细胞模型来模拟睾酮生成功能障碍,结果显示 AAPH 升高 ROS、MDA 水平,降低 SOD、GSH-Px 和 CAT 水平,改变线粒体膜通透性,使 Leydig 细胞凋亡或坏死。因此,提供抗氧化剂可防止 Leydig 细胞氧化应激,对改善类固醇生成障碍有潜力。

强精片治疗男性不育肾虚血瘀证的核心活性成分主要包括 Que、6-羟基木犀草素、生物素、山柰酚和癸二酸。其中, Que 作为膳食中最丰富的类黄酮化合物,占总黄酮的 60%~75%,具有显著的抗氧化活性^[27]。在雄性生殖系统中能有效清除活性氧,促进精子生成^[10,28]。6-羟基木犀草素是木犀草素羟基化的衍生物,虽然木犀草素已被证实具有抗氧化应激^[29]、调节类固醇激素^[30]的作用,但 6-羟基木犀草素的生物活性作用仍需进一步验证。生物素是水溶性维生素,参与脂肪酸合成、氨基酸代谢和糖

异生等关键代谢过程^[31]。研究表明,精子培养基中添加生物素不仅可提升精子活力^[32],还能增强精子的受精能力,改善植入前胚胎发育^[33];生物素还能促进小鼠睾丸癌肿瘤细胞系 I-10 细胞、Leydig 细胞肿瘤细胞系 MA-10 细胞睾酮合成^[34],但过量生物素也可能抑制精子发生^[35]。山柰酚是一种天然类黄酮,具备抗氧化和抗炎特性^[11],对睾丸生精功能损伤和睾酮生成损伤具备一定的修复作用^[36-37]。癸二酸是一种天然存在的饱和脂肪族二元酸,具有抗炎^[38]、改善糖代谢的潜力^[39],由于其生物降解性和生物活性,常作为药物载体被广泛应用,但其在男性生殖系统中的作用机制仍有待深入研究。在强精片中,这些成分可能通过协同作用改善男性生殖功能。基于现有研究基础和实际条件限制,本研究首先选取研究最为充分的 Que 作为切入点,重点考察其对类固醇激素合成的调控作用,后续将逐步开展对其他成分及其协同作用机制的系统性研究,以全面阐明强精片改善男性生殖功能的作用机制,为中医药的转化应用提供新思路、新方法。

Que 是一种在多种天然植物中广泛分布的黄酮类化合物,临床上可用于神经保护、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等,但是由于其溶解性差和不稳定性,Que 的临床应用受到限制^[40]。近年来,Que 的修饰和药物递送以保留和提高其功能活力受到广泛关注。由于囊泡样结构特征,Exo 常被作为药物载体,如同充质干细胞衍生的负载维生素 A 和 Que 的 Exo 在治疗急性肝损伤方面表现出良好的靶向性和治疗效果^[41]。本研究构建了 Que-Exo 递药系统,研究结果提示,Que 可通过抑制氧化应激,改善线粒体功能,上调类固醇合成酶来恢复睾酮的产生。与 Que 比较,负载 Que 的 Exo 在改善 Leydig 细胞氧化应激和恢复睾酮方面更为显著,表现出良好的治疗效果。Exo 用于负载 Que 时,或许可以提供以下几个方面的改善效果^[42]:①保护作用,Exo 的膜结构可以保护 Que 免受外界环境的破坏,例如避免被体内的酶快速降解,从而提高其稳定性和生物利用度;②靶向递送:Exo 具有特定的表面标志物,通过配体-受体特异性结合机制,显著提升 Que 在靶细胞内的富集效率;③增强吸收:Exo 可以促进 Que 在细胞膜上的融合和吸收,提高其进入细胞内部的效率。因此,Exo 作为 Que 的载体,不仅提高了 Que 的稳定性和递送效率,还可能增强其生物学效应,使得改善细胞氧化应激的效果更为显著。负载 Que 的外泌体改善 Leydig 细胞睾酮合成机制见增强出版附加材料。

尽管 Que 能改善 Leydig 细胞氧化应激,但其调控睾酮生成的机制仍需深入探索。研究发现,氧化应激可特异性调控 miRNA 表达谱,如 H₂O₂ 刺激可诱导神经元中 miR-146a、miR-21 和 miR-150 表达的上调^[43];反过来,miRNA 能调节 ROS/RNS 生成酶如还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶、一氧化氮合酶,影响氧化还原稳态和 ROS 的产生^[44]。因此,抗氧化剂有可能通过调控 miRNA 表达减轻细胞的氧化应激反应。作为天然抗氧化剂,黄酮类化合物的生物活性涉及 miRNA 的参与^[45-47]。Que 可能通过影响特定 miRNA,如 miR-485-5p^[48]、miR-34a^[49]、miR-155^[50]、miRNA-101^[51]、miR-122R^[52]等的表达来调节氧化应激反应。miR-145-5p 是一种特定的微小 RNA,靶向作用于 SF-1 的 3'-UTR,进而抑制 SF-1 和睾酮合成相关酶的表达^[53]。本研究表明氧化应激引起了 miR-145-5p 表达的上调,给予 Que 和负载 Que 的 Exo 干预后其表达水平显著降低,miR-145-5p 在睾酮合成过程中的具体作用,未来需要进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 叶欣. 中国人口负增长的现状、挑战及对策研究[J]. 扬州大学学报:人文社会科学版,2023,27(5):76-92.
YE X. Negative population growth in China: Current situation, challenges and countermeasures[J]. J Yangzhou Univ: Humanit Soc Sci, 2023, 27(5): 76-92.
- [2] MINHAS S, BOERI L, CAPOGROSSO P, et al. European Association of Urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2025 update on male infertility[J]. Eur Urol, 2025, 87(5): 601-616.
- [3] ROWAIEE R, ALMIDANI O, RAHEEM O A. Recent advances in the management of male infertility[J]. Asian J Androl, 2025, 27(6): 669-672.
- [4] 常德贵. 男性不育症病证结合诊治策略与研究实践[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(11): 1291-1292.
CHANG D G. Diagnosis and treatment strategy and research practice of combination of disease and syndrome in male infertility[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(11): 1291-1292.
- [5] 董良. 强精片对肾虚血瘀型弱畸精子症患者精子 DNA 完整性及 ICSI 妊娠结局的临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
DONG L. Clinical study on the effects of Qiangjing tablets on sperm DNA integrity and ICSI pregnancy outcomes in patients with asthenoteratozoospermia of kidney deficiency and blood stasis type[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [6] 张培海, 陈帝昂, 董良, 等. 强精片对不育模型 SD 大鼠细胞凋

- 亡通路Fas/FasL的影响[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22: 246-251.
- ZHANG P H, CHEN D A, DONG L, et al. Inhibitory effect of Qiangjing tablets on the Fas/FasL pathway of cell apoptosis in male SD rats with infertility[J]. Natl J Androl, 2016, 22(3): 246-251.
- [7] 尤耀东, 张玲, 朱坤, 等. 强精片对睾丸支持细胞Toll样受体信号通路的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(11): 1363-1368.
- YOU Y D, ZHANG L, ZHU K, et al. Effects of Qiangjing tablets for Toll-like receptor signaling pathway in testicular support cells[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(11): 1363-1368.
- [8] WEI D, YANG H, ZHANG Y, et al. Nano-traditional Chinese medicine: A promising strategy and its recent advances[J]. J Mater Chem B, 2022, 10(16): 2973-2994.
- [9] LI M, WANG Y, CHEN Y, et al. A comprehensive review on pharmacokinetic mechanism of herb-herb/drug interactions in Chinese herbal formula[J]. Pharmacol Ther, 2024, 264: 108728.
- [10] BEHAIRY A, HASHEM M M, ABO-EL-SOUD K, et al. Quercetin abates aluminum trioxide nanoparticles and lead acetate induced altered sperm quality, testicular oxidative damage, and sexual hormones disruption in male rats[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(11): 2133.
- [11] KHAFAJI S S. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-reprotoxic effects of kaempferol and vitamin E on lead acetate-induced testicular toxicity in male rats[J]. Open Vet J, 2023, 13(12): 1683-1695.
- [12] MOREIRA M V, PEREIRA S C, GUERRA-CARVALHO B, et al. Hyperoside supplementation in preservation media surpasses vitamin C protection against oxidative stress-induced damages in human spermatozoa[J]. Cell Physiol Biochem, 2022, 56(S1): 1-23.
- [13] 朱梦婷, 孟胜喜. 纳米载体负载中药单体治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2025, 35(5): 387-391.
- ZHU M T, MENG S X. Research progress on nano-carrier loaded traditional Chinese medicine monomers for Alzheimer's disease treatment[J]. J Jiangsu Univ: Med Ed, 2025, 35(5): 387-391.
- [14] FERREIRA D, MOREIRA J N, RODRIGUES L R. New advances in exosome-based targeted drug delivery systems[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2022, 172: 103628.
- [15] HANEY M J, KLYACHKO N L, ZHAO Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. J Control Release, 2015, 207: 18-30.
- [16] 李汉豪. 睾丸支持细胞来源的外泌体 miR-145a-5p 调控睾丸间质细胞睾酮合成的作用及机制研究[D]. 广州: 暨南大学, 2021.
- LI H H. Study on the effect and mechanism of exosomal miR-145a-5p derived from Sertoli cells in regulating testosterone synthesis in Leydig cells[D]. Guangzhou: Jinan University, 2021.
- [17] 杜一峰, 刘元禄, 郑浩, 等. 右归丸组方单体对骨关节炎影响机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(2): 212-221.
- DU Y F, LIU Y L, ZHENG H, et al. Research progress on the mechanism of Yougui pill's active monomers in osteoarthritis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(2): 212-221.
- [18] O'DONNELL L, MCLACHLAN R I, WREFORD N G, et al. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle[J]. Endocrinology, 1994, 135(6): 2608-2614.
- [19] SMITH L B, WALKER W H. The regulation of spermatogenesis by androgens[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 30: 2-13.
- [20] SHIHAN M, BULLDAN A, SCHEINER-BOBIS G. Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with G α 11[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(6): 1172-1181.
- [21] BATH R, NICOLLE C, CUCIUREAN I S, et al. Biosynthesis and industrial production of androsteroids[J]. Plants (Basel), 2020, 9(9): 1144.
- [22] HATANO M, MIGITA T, OHISHI T, et al. SF-1 deficiency causes lipid accumulation in Leydig cells via suppression of STAR and CYP11A1[J]. Endocrine, 2016, 54(2): 484-496.
- [23] HANUKOGLU I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells[J]. Drug Metab Rev, 2006, 38(1/2): 171-196.
- [24] BEATTIE M C, CHEN H, FAN J, et al. Aging and luteinizing hormone effects on reactive oxygen species production and DNA damage in rat Leydig cells[J]. Biol Reprod, 2013, 88(4): 100.
- [25] PEI J, GUO S, ZHANG C, et al. Effects of tea polyphenols on the activity of GSH-Px and NOS, and the content of MDA and NO in rats fed with high methionine diet[J]. J Hyg Res, 2011, 40(6): 750-752.
- [26] ROTIMI D E, OLAOLU T D, ADEYEMI O S. Pharmacological action of quercetin against testicular dysfunction: A mini review[J]. J Integr Med, 2022, 20(5): 396-401.
- [27] ULUSOY H G, SANLIER N. A minireview of quercetin: From its metabolism to possible mechanisms of its biological activities[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60(19): 3290-3303.
- [28] DE O S A, QUADRELI D H, FERNANDES G, et al. Quercetin supplementation reduces oxidative stress in the testes of Wistar rats fed a high-fat diet[J]. Am J Reprod Immunol, 2025, 93(1): e70048.
- [29] HUANG Y, ZHANG X. Luteolin alleviates polycystic ovary syndrome in rats by resolving insulin resistance and oxidative stress[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 320(6): E1085-E1092.
- [30] COUTURE R, MORA N, AL BITTAR S, et al. Luteolin modulates gene expression related to steroidogenesis, apoptosis, and stress response in rat LC540 tumor Leydig cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2020, 36(1): 31-49.
- [31] TARDY A L, POUTEAU E, MARQUEZ D, et al. Vitamins and minerals for energy, fatigue and cognition: A narrative review of the biochemical and clinical evidence[J]. Nutrients, 2020, 12(1): 228.
- [32] KALTHUR G, SALIAN S R, KEYVANIFARD F, et al. Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases

- the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(7): 631-635.
- [33] SALIAN S R, NAYAK G, KUMARI S, et al. Supplementation of biotin to sperm preparation medium enhances fertilizing ability of spermatozoa and improves preimplantation embryo development[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(2): 255-266.
- [34] SHIOZAWA K, MAEDA M, HO H J, et al. Biotin enhances testosterone production in mice and their testis-derived cells[J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4761.
- [35] PASTÉN-HIDALGO K, RIVERÓN-NEGRETE L, SICILIA-ARGUMEDO G, et al. Dietary biotin supplementation impairs testis morphology and sperm quality[J]. *J Med Food*, 2020, 23(5): 535-544.
- [36] AJISEBIOLA B S, TOROMADE A A, OLADELE J O, et al. *Echis ocellatus* venom-induced sperm functional deficits, proapoptotic and inflammatory activities in male reproductive organs in rats: Antagonistic role of kaempferol[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2024, 25(1): 46.
- [37] ADEYI A O, AJISEBIOLA B S, SANNA A A, et al. Kaempferol mitigates reproductive dysfunctions induced by *Naja nigricollis* venom through antioxidant system and anti-inflammatory response in male rats[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 3933.
- [38] OGAWA E, SUZUKI N, KAMIYA T, et al. Sebacic acid, a royal jelly-containing fatty acid, decreases LPS-induced IL-6 mRNA expression in differentiated human THP-1 macrophage-like cells [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2024, 74(3): 192-198.
- [39] IACONELLI A, GASTALDELLI A, CHIELLINI C, et al. Effect of oral sebacic acid on postprandial glycemia, insulinemia, and glucose rate of appearance in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(11): 2327-2332.
- [40] MAGAR R T, SOHNG J K. A review on structure, modifications and structure-activity relation of quercetin and its derivatives[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(1): 11-20.
- [41] FANG J, LIANG W. ASCs-derived exosomes loaded with vitamin A and quercetin inhibit rapid senescence-like response after acute liver injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 572: 125-130.
- [42] LIANG Y, DUAN L, LU J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195.
- [43] JIANG Y, ZHAO S, DING Y, et al. MicroRNA-21 promotes neurite outgrowth by regulating PDCD4 in a rat model of spinal cord injury[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2522-2528.
- [44] CIESIELSKA S, SLEZAK-PROCHAZKA I, BIL P, et al. Micro RNAs in regulation of cellular redox homeostasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6022.
- [45] OHNO M, SHIBATA C, KISHIKAWA T, et al. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice[J]. *Sci Rep*, 2013, 3(1): 2553.
- [46] WANG L, WANG X, KONG L, et al. Activation of PGC-1 α via isoliquiritigenin-induced downregulation of miR-138-5p alleviates nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Phyther Res*, 2022, 36(2): 899-913.
- [47] ZHANG Z, XU P, YU H, et al. Luteolin protects PC-12 cells from H₂O₂-induced injury by up-regulation of microRNA-21 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108698.
- [48] WAN H, WANG Y, PAN Q, et al. Quercetin attenuates the proliferation, inflammation, and oxidative stress of high glucose-induced human mesangial cells by regulating the miR-485-5p/YAP1 pathway[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2022, 36: 20587384211066440.
- [49] KIM M, JEE S C, SHIN M K, et al. Quercetin and isorhamnetin reduce benzo [a] pyrene-induced genotoxicity by inducing RAD51 expression through downregulation of miR-34a[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13125.
- [50] BOESCH-SAADATMANDI C, LOBODA A, WAGNER A E, et al. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: Role of miR-155[J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(3): 293-299.
- [51] AMANZADEH J E, ESMAEILI A, RAHGOZAR S, et al. Quercetin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles protect AlCl₃-induced neurotoxicity in a rat model of Alzheimer's disease via antioxidant genes, APP gene, and miRNA-101[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 598617.
- [52] BOESCH-SAADATMANDI C, WAGNER A E, WOLFFRAM S, et al. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver *in vivo*-role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 65(5): 523-530.
- [53] LIANG J, LI H, MEI J, et al. Sertoli cell-derived exosome-mediated transfer of miR-145-5p inhibits Leydig cell steroidogenesis by targeting steroidogenic factor 1[J]. *FASEB J*, 2021, 35(6): e21660.

[责任编辑 顾雪竹]