◆网络药理学◆

基于网络药理学及分子对接技术探讨熟地黄-当归药对对男性不育症作用的机制

叶有骏[1]，崔云[2]，徐新宇[1]，应志康[1]，管鹏飞[1]，闫译[1]，刘磊[1]，钱文君[1]

1. 浙江中医药大学第三临床医学院，浙江 杭州 310053
2. 浙江中医药大学附属宁波中医院，浙江 宁波 315010

［摘要］**目的：**运用网络药理学和分子对接技术探讨熟地黄-当归药对治疗男性不育症的作用机制。**方法：**通过检索中药系统药理数据库与分析平台（TCMSP）数据库及查阅文献筛选出熟地黄-当归药对的活性成分和对应靶点，借助GeneCards、人类孟德尔遗传数据库（OMIM）和DisGeNET数据库收集男性不育症作用靶点并通过Venny 2.1.0获得药物-疾病共同作用靶点，再利用Cytoscape 3.9.0软件构建“药对-活性成分-作用靶点”调控网络并进行拓扑分析。然后用STRING数据库作蛋白互作（PPI）分析筛选核心靶点。再用DAVID数据库对共同作用靶点进行基因本体（GO）富集分析与京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路分析并构建“成分-靶点-关键通路”网络图。最后用AutoDock软件通过分子对接验证活性成分与核心靶点的结合能力。**结果：**熟地黄-当归药对存在6个活性成分及57个相关作用靶点，与男性不育症的1 361个靶点有19个交集靶点。这些靶点涉及蛋白结合、蛋白二聚体活动、酶结合、细胞老化与凋亡过程等生物学过程，干预癌症通路、Apoptosis通路、Hepatitis B通路、TNF信号通路等发挥治疗作用。分子对接验证了各活性成分与其对应的作用靶点具有良好的对接活性。**结论：**熟地黄-当归药对可能从蛋白多糖信号通路调控、抑制炎症、神经调节、抑制细胞老化与凋亡等方面对男性不育症起到治疗作用。

［关键词］男性不育症；熟地黄；当归；药对；网络药理学；分子对接；作用机制
［中图分类号］R285 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）05-0028-08
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.05.006

Study on the Mechanism of Rehmanniae Radix Praeparata-Angelicae Sinensis Radix on Male Infertility Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

YE Youjun, CUI Yun, XU Xinyu, YING Zhikang, GUAN Pengfei, YAN Yi, LIU Lei, QIAN Wenjun

Abstract：Objective：To explore the mechanism of Rehmanniae Radix Praeparata-Angelicae Sinensis Radix in the treatment of male infertility by using network pharmacology and molecular docking technology. **Methods：**The active components and corresponding targets of Rehmanniae Radix Praeparata-Angelicae Sinensis Radix were screened by searching the TCMSP database and literature, and the male infertility target was collected by using GeneCards, the human Mendelian genetic database (OMIM) and the

［收稿日期］2022-09-13
［修回日期］2022-12-26
［基金项目］崔云全国名老中医药专家传承工作室建设项目（国中医药人教函〔2022〕75号）；浙江省中医药科学研究基金项目（2022ZB337，2022ZB311）；浙江省中医药科技计划项目（2023ZF161，2023ZF042）；宁波市中医医学重点学科建设计划（2022-Z04）
［作者简介］叶有骏（1999-），男，在读硕士研究生，E-mail：1060524417@qq.com。
［通信作者］崔云（1961-），男，博士生导师，E-mail：nbszyy@sina.com。

DisGeNET database, and the drug-disease target was obtained by Venny 2.1.0. Then, the regulatory network of "drug pairs-active component targets" was constructed by using Cytoscape 3.9.0 software and topology analysis was carried out. Then STRING database was used for protein-protein interaction (PPI) analysis to screen core targets. Then the DAVID database is used to enrich and analyze the gene ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of the co-acting targets, and a "component-targets-key pathways" network diagram is constructed. Finally, AutoDock software was used to verify the binding ability of active components to core targets through molecular docking. **Results:** There were 6 active components and 57 related targets in the drug pair of Rehmanniae Radix Praeparata-Angelicae Sinensis Radix, and 19 cross targets with 1 361 targets of male infertility. These targets involve biological processes such as protein binding, protein dimer activity, enzyme binding, cell aging and apoptosis, and play a therapeutic role in cancer pathway, Apoptosis pathway, Hepatitis B pathway, TNF signal pathway, etc. Molecular docking verified that each active component and its corresponding target have good docking activity. **Conclusion:** The drug pair of Rehmanniae Radix Praeparata-Angelicae Sinensis Radix may play a therapeutic role in male infertility from the aspects of regulation of proteoglycan signal pathway, inhibition of inflammation, neuroregulation, inhibition of cell aging and apoptosis.

Keywords: Male infertility; Rehmanniae Radix Praeparata; Angelicae Sinensis Radix; Drug pair; Network pharmacology; Molecular docking; Action mechanism

男性不育症由多种因素共同造成，包括性交和(或)射精功能障碍、免疫学病因、精索静脉曲张、男性附属性腺感染等16个方面，现有的治疗往往通过雌激素受体调节剂、精子营养剂、抗生素等对症处理[1]，以经验性治疗为主，而缺乏特异性治疗手段，所以疗效往往差强人意，且不良反应复杂众多，更加重了患者的焦虑心理，导致恶性循环。另一方面，国家近年来实施“鼓励二胎，开放三胎”政策，男性不育症的治疗更是面临着巨大的挑战。近年来中医药在整体观念、辨证论治理论基础上对男性不育的治疗起着举足轻重的作用，已成为一种安全有效的治疗手段。因此，从中医药中探寻男性不育症的作用机制、推广中医药文化具有美好的发展前景。

男性不育，在中医中亦称男子绝子、无子、无嗣等，中医认为男性不育主要责之于肾，《素问·上古天真论》记载：“丈夫八岁，肾气实，发长齿更；二八，肾气盛，天癸至，精气溢泻，阴阳和，故能有子。”认为男性是否有子与“肾-天癸”为核心的生殖轴相关。巢元方在《诸病源候论》提出无子是因虚劳精少所致。故临床上常用填精补肾、补益精血的方法。

熟地黄甘而微温，味厚气薄，功能补血滋阴疗虚损，益精填髓养肝肾；当归辛甘性温，补虚而养血，为血中气药，功能补血活血。“熟地黄-当归”药对源于《仙授理伤续断秘方》,《太平惠民和剂局方》最早记载，认为二者相须配伍为用，肝肾同源，精血双补，一走一守，为补血活血、调理冲任必用之品。张景岳认为熟地黄、当归实乃“精血形质中第一品纯厚之药”。

网络药理学是近年来新兴学科，它是基于数据库检索和数据分析手段构建“药物-靶点-基因-疾病”互作网络，揭示中药对疾病的作用机制。本研究基于网络药理学联合分子对接技术，挖掘“熟地黄-当归”药对对男性不育症可能起治疗作用的活性成分、作用靶点和信号通路，探索该药对对男性不育症的作用机制。

1 材料与方法

1.1 熟地黄-当归药对活性成分及相关作用靶点的收集筛选 本研究从中药系统药理数据库与分析平台(TCMSP)中检索“熟地黄”“当归”的所有化学成分，并以口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥

0.18作为条件筛选出两药的活性成分。此外，查阅其他相关文献收集不在筛选范围内但已有明确记载的活性成分。以这些活性成分的MOL ID号在TCMSP平台收集对应靶点。并用UniProt数据库将所有对应蛋白靶点转换为基因名。

1.2 男性不育症靶点的收集筛选 以“Male Infertility”为关键词，在GeneCards数据库、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和DisGeNET数据库中检索并筛选相关疾病靶点，其中GeneCards数据库选择条件为相关度≥5，取交集并去重后，即为“男性不育症”的相关靶点。

1.3 药对-活性成分-作用靶点网络构建 用Venny 2.1.0构建中药-疾病靶标的Venn图，得到“熟地黄-当归”药对和“男性不育症”疾病的交集基因，整合药物-活性成分-交集基因的映射关系，再利用Cytoscape 3.9.0软件构建“药对-活性成分-作用靶点”调控网络并进行拓扑分析，以度值(Degree)衡量并以文字大小体现，筛选前3位核心化学成分。

1.4 蛋白互作(PPI)网络构建及核心靶点的筛选 将交集基因导入STRING数据库，选择“Multiple Proteins”模式，种属设为“Home Sapiens”，设置最小互作需求得分为0.400，构建PPI网络模型。将tsv格式文件导入Cytoscape 3.9.0软件进行可视化处理，根据软件中Cytohubba插件MCC算法分析出核心程度最高的8位蛋白并以颜色深浅体现，即为该药对作用于男性不育症的可能核心靶点。

1.5 基因本体(GO)富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 应用DAVID数据库对交集基因进行GO和KEGG富集分析，分析均以$P<0.05$表示具有统计学意义，其中GO包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)3部分，各选取分析结果前10位和KEGG富集分析结果前10位导入RStudio可视化，运用R语言绘制气泡图。

1.6 成分-靶点-关键通路网络构建 为呈现药物影响靶点的作用机理，以Count值排序得到前10条信号通路作为关键通路，与“熟地黄-当归”药对活性成分及核心靶点相映射，并用Cytoscape 3.9.0软件绘制“成分-靶点-关键通路”网络，对该交互网络的节点进行拓扑分析，直观反映核心成分、核心靶点、关键通路之间的联系。

1.7 分子对接 为验证核心成分与核心靶点的可信度，利用分子对接模拟软件AutoDock对核心成分与核心靶点进行受体-配体对接模拟计算。从PubChem数据库中下载核心成分3D结构，PDB数据库中下载核心靶点的3D结构并使用Pymol去水去配体处理，再将处理后的受体导入AutoDock中加氢、加Gasteiger电荷处理，然后进行模拟分子对接并分析找到最佳配对位点，记录结合能。最后使用Pymol软件对对接结果可视化。

2 结果

2.1 熟地黄-当归药对活性成分及相关靶点 见表1。从TCMSP数据库中检索并筛选得到熟地黄活性成分2个，对应相关靶点34个；当归活性成分5个，对应相关靶点69个；其中熟地黄-当归共有成分1个，所对应相关靶点31个。查阅相关文献后纳入当归活性成分3个，分别为阿魏酸、咖啡酸和藁本内酯，根据MOL ID检索得到相关靶点28个。去重后最终获得熟地黄-当归药对活性成分6个，相关作用靶点57个。

表1 熟地黄-当归药对活性成分

中药	活性成分	MOL ID	中文名
熟地黄、当归	Stigmasterol	MOL000449	豆甾醇
熟地黄	sitosterol	MOL000359	谷甾醇
当归	beta-sitosterol	MOL000358	β-谷甾醇
当归	Ferulic Acid	MOL002665	阿魏酸
当归	Caffeate	MOL000414	咖啡酸
当归	Ligustilide	MOL011782	藁本内酯

2.2 男性不育症相关靶点 以“Male Infertility”为关键词，从GeneCards数据库中获得4 268个相关基因，筛选“relevance score”值>5的基因，余下1 083个潜在靶点。结合OMIM获得的38个潜在靶点、DisGeNET数据库获得的515个潜在靶点，删除重复值后最终获得与男性不育症相关的靶点1 361个。将所收集的药对相关靶点与筛选后的男性不育症相关靶点导入Venny2.1.0中构建Venn图，得到共有基因19个，见图1。

2.3 药物-活性成分-作用靶点网络图构建 见图2。通过Network Analyzer功能对网络进行拓扑分析，计算图中每个节点的连接度(Degree)。Degree值越高，表示该成分或靶点在此网络中扮演的重要性就越大。在本网络中，Degree值前3位的化学成分为核

心化学成分，分别是豆甾醇(Stigmasterol)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、阿魏酸(Ferulic Acid)。

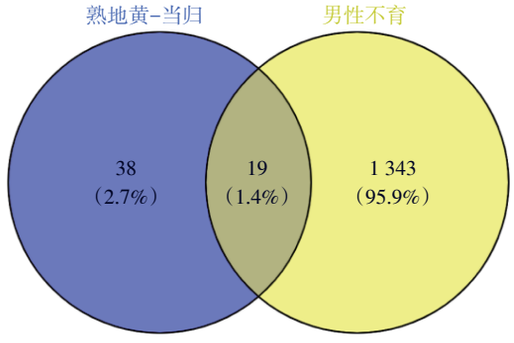


图 1　熟地黄-当归药对靶点与男性不育症疾病靶点的 Venn 图

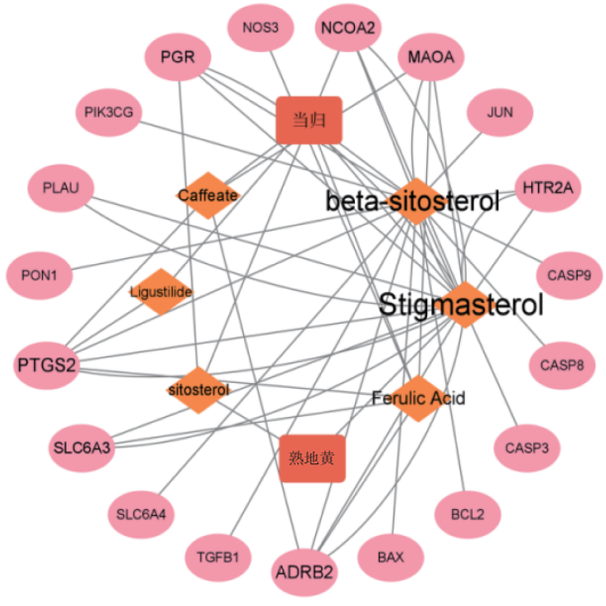


图 2　药物-活性成分-作用靶点调控网络

2.4　PPI 网络构建及核心靶点筛选　将 19 个交集基因导入 STRING 数据库中，默认置信度为 0.400，隐藏孤立基因，得到 PPI 网络图，见图 3，图中包含 18 个节点，44 条边，节点表示单个蛋白质编码基因位点产生的所有蛋白质，边表示蛋白质之间的相互关系。将图以 tsv 格式导入 Cytoscape 软件中实现可视化，利用 Cytoscape 中的 cytoHubba 插件进行 MCC 算法分析，依据 Degree 挖掘关键基因，筛选度值最大的前 8 位基因，分别为 CASP3、JUN、PTGS2、CASP9、BAX、CASP8、NOS3、THFB1，这些基因通过蛋白质-蛋白质交互关联发挥重要作用，认为此 8 个基因为熟地黄-当归药对治疗男性不育症的核心靶点。分离出核心靶点组成核心网络图，Degree 值大小以颜色深浅表示，见图 4。

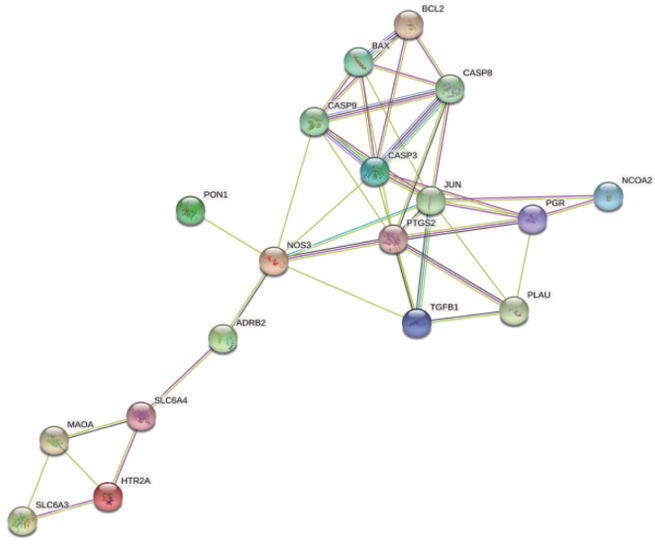


图 3　熟地黄-当归药对治疗男性不育症的 PPI 网络

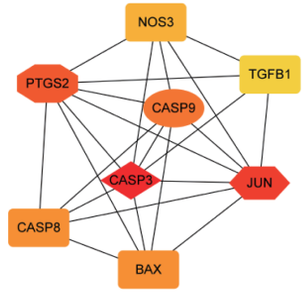


图 4　熟地黄-当归药对治疗男性不育症 TOP8 核心靶点互作图

2.5　靶点的 GO 及 KEGG 通路富集分析　为更好地探索熟地黄-当归药对对男性不育症作用靶点的药理功能，从生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)3 个模块对基因功能进行分析，并富集信号通路以反映药物靶点产生作用的过程。将 19 个交集基因导入 DAVID 数据库中，选取 $P<0.05$ 有统计学意义的数据，共涉及生物过程 87 个，细胞组分 13 个，分子功能 17 个，KEGG 信号通路 39 个。根据 Count 排序后分别选取前 10 位导入 RStudio，运用 R 语言作出气泡图 5。如图所示，在生物过程方面，主要涉及对药物的反应(response to drug)、对雌二醇的反应(response to estradiol)、对脂多糖的反应(response to lipopolysaccharide)、老化(aging)、凋亡过程(apoptotic process)等；在细胞组分方面，主要涉及细胞核(nucleus)、细胞液(cytosol)、细胞质(cytoplasm)、等离子体膜(plasma membrane)等；在分子功能方面，主要涉及蛋白结合(protein binding)、

蛋白质同源二聚化活动(protein homodimerization activity)、酶结合(enzyme binding)、蛋白质异源二聚体活动等。KEGG信号通路富集分析示熟地黄-当归药对作用靶点对男性不育症治疗主要通过癌症通路(Pathways in cancer)、乙肝病毒通路(Hepatitis B)、结肠直肠癌通路(Colorectal cancer)、细胞凋亡通路(Apoptosis)、非酒精性脂肪性肝病通路(Non-alcoholic fatty liver disease)、肺结核通路(Tuberculosis)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、弓形体病通路(Toxoplasmosis)等过程实现。结果表明熟地黄-当归药对可能通过癌症中的蛋白多糖信号通路调控、抗细胞凋亡、抗病毒、抑制炎性反应、神经调节、免疫活性调节等方面发挥治疗作用。

2.6　成分-靶点-关键通路网络构建　见图6。根据KEGG富集结果，将通路中富集的蛋白与熟地黄-当归药对的活性成分、共同靶点相映射，用Cytoscape软件可视化展现，得到成分-靶点-关键通路网络图，更清晰地展示药对活性成分对应相关靶点对男性不育症作用的通路过程。

2.7　成分-核心靶点分子对接验证　见图7、表2。将CASP3、JUN、PTGS2、CASP9、BAX、CASP8、NOS3、THFB1 8个核心靶点与豆甾醇、谷甾醇、β-谷甾醇、阿魏酸、咖啡酸、藁本内酯6个活性成分根据成分-靶点对应关系进行12次分子对接。根据文献[2]报道，结合能＜0说明受体配体可自发结合并释放能量，化合物和靶标之间结合自由能≤-1.2 kcal/mol(即-5.0 kJ/mol，1 kcal=4.18 kJ)被认为具有较好作用。根据分子对接结果显示，所有对应

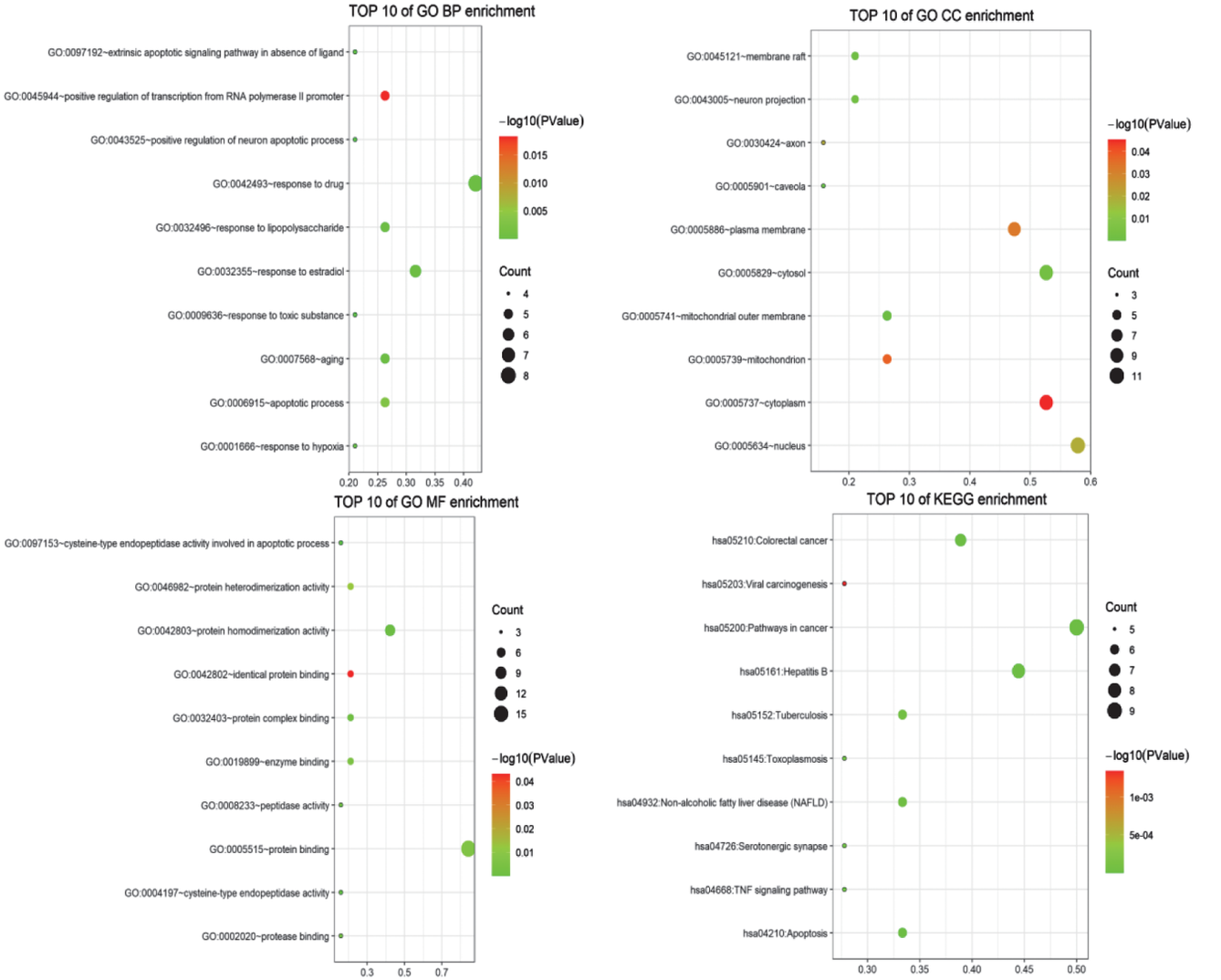


图5　GO分析和KEGG分析

关系分子对接结合能均＜-1.2 kcal/mol，表示均可自发结合并具有较好结合可能，其中 CASP9 与 β-谷甾醇(beta-sitosterol)结合性最强，对接活性最好。选取 CASP9 与 β-谷甾醇(beta-sitosterol)、JUN 与 β-谷甾醇(beta-sitosterol)、BAX 与 β-谷甾醇(beta-sitosterol)导入 Pymol 可视化。

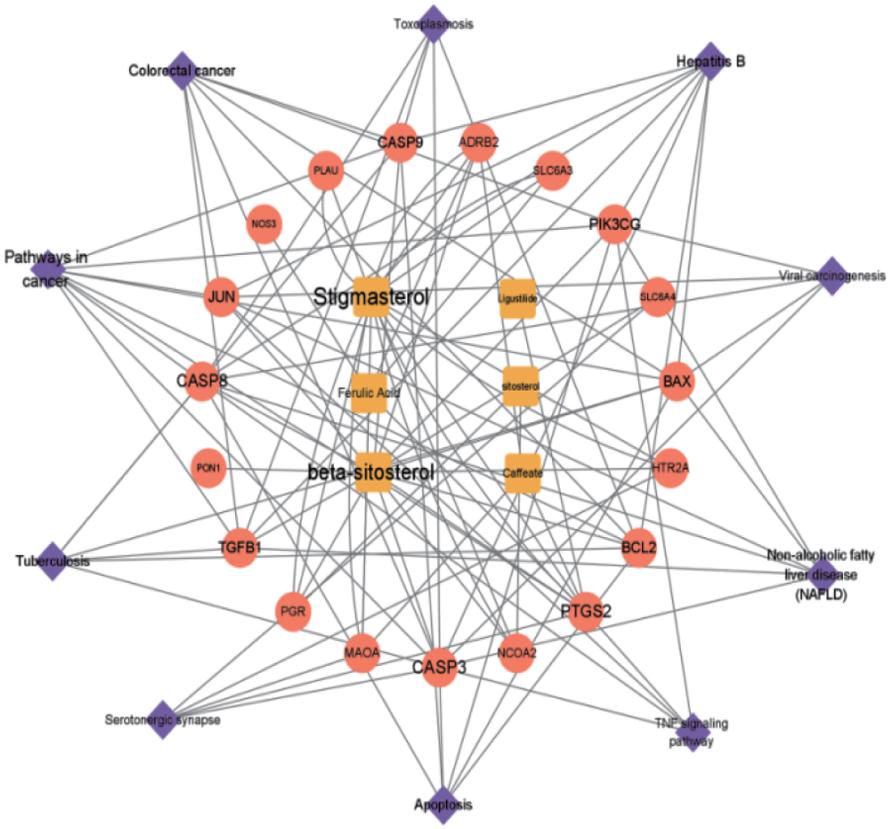


图 6　成分-靶点-关键通路网络图

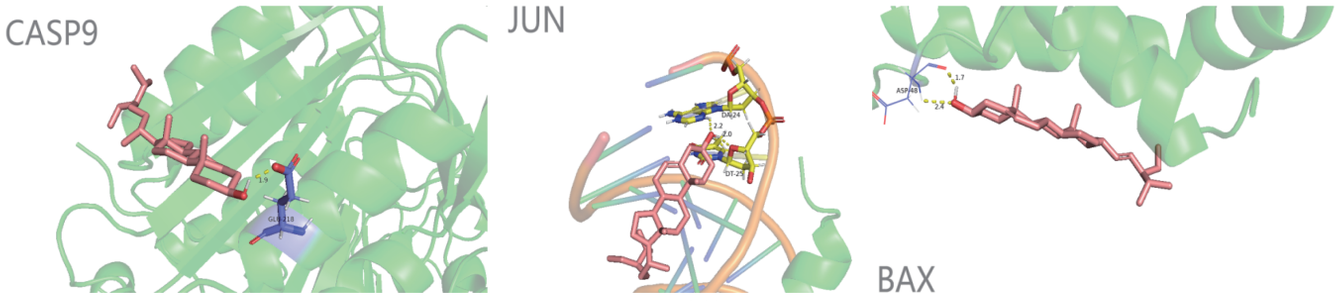


图 7　分子对接结果展示

表 2　分子对接结果

编号	PDB ID	靶点	化合物	结合能（kcal/mol）	是否＜-1.2 kcal/mol	编号	PDB ID	靶点	化合物	结合能（kcal/mol）	是否＜-1.2 kcal/mol
1	1NME	CASP3	beta-sitosterol	-5.30	是	7	5F19	PTGS2	Ligustilide	-4.12	是
2	5T01	JUN	beta-sitosterol	-6.23	是	8	2AR9	CASP9	beta-sitosterol	-6.33	是
3	5F19	PTGS2	beta-sitosterol	-5.48	是	9	4S0O	BAX	beta-sitosterol	-6.18	是
4	5F19	PTGS2	FerulicAcid	-2.62	是	10	3KJN	CASP8	beta-sitosterol	-5.84	是
5	5F19	PTGS2	Caffeate	-1.65	是	11	1M9M	NOS3	FerulicAcid	-2.32	是
6	5F19	PTGS2	Stigmasterol	-4.54	是	12	5VQP	TGFB1	beta-sitosterol	-5.37	是

3 讨论

熟地黄，《本草纲目》中言：“填骨髓，长肌肉，生精血，补五脏、内伤不足，通血脉，利耳目，黑须发，男子五劳七伤，女子伤中胞漏，经候不调，胎产百病。”《本草从新》：“一切肝肾阴亏，虚损百病，为壮水之主药。”中医认为熟地黄功效主要体现在益真阴、归真气、降火升等方面。

当归，《景岳全书·本草正》云：“当归……大约佐之以补则补，故能养营养血，补气生精，安五脏，强形体，益神志，凡有形虚损之病，无所不宜。”中医认为当归其要在动、滑两字，具有“可升可降，阴中有阳，补中有动，行中有补”的特性。

熟地黄-当归药对在古籍中便多有出现，《景岳全书·新方八阵》中熟地黄与当归同用的频率高达17.96%[3]。熟地黄填精滋补肾阴，当归补血调理冲任，两药相须为用，精血同源互生，肾-天癸-冲任轴同调。然熟地黄-当归药对治疗男性不育症的潜在机制尚不明确，笔者希望基于网络药理学技术进一步探索该药对的作用机制。

通过药理活性筛选，得到6个活性成分，其中豆甾醇为两药共有活性成分，与男性不育症相关度较高的是β-谷甾醇、豆甾醇和阿魏酸。相关研究发现，活性氧会导致细胞膜多不饱和脂肪酸的损失和精子中脂质过氧化物的增加，诱导自由基介导的分子分解，最终导致细胞死亡，过量的活性氧产生会导致精子异常从而导致不育[4]。熟地黄作用于人体可增强血清谷胱甘肽过氧化物酶的活性及抑制过氧化脂的形成来达到抗氧化效果[5]，其活性成分β-谷甾醇和豆甾醇作为天然高效的抗氧化剂，可显著增加精子数量和精子活力，减弱氧化应激所诱导的睾丸毒性损伤[6]。当归作用于人体可通过减轻过氧化氢引起的细胞氧化反应损伤来提高细胞活力、减弱细胞凋亡和活性氧的产生[7]，阿魏酸是当归非常重要的活性成分，属于苯丙酸类化合物，其可抑制脂质过氧化和增强抗氧化防御系统，并使精原细胞、精母细胞及精子细胞数量正常化，间质细胞和支持细胞数量增加[8]。

根据PPI蛋白互作结果显示，与男性不育症相关靶点包括CASP3、JUN、PTGS2、CASP9、CASP8、BAX等。CASP家族，即半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶，主要在人类生精上皮细胞凋亡调节中起核心作用，CASP3更是被称为“刽子手蛋白酶”，它们参与响应促凋亡信号而触发的级联反应，与多种男科疾病相关，如精子发生受损、精子活力降低、精子DNA碎片化水平升高、精索静脉曲张、睾丸扭转和免疫性不育[9]。还有研究表明，miRNA在精子发生的调节中具有重要作用，阻塞性无精子症和非阻塞型无精子症患者miRNA均显著增加，而包括CASP9在内的靶基因的表达水平根据miRNA的表达水平发生了显著变化[10]。CASP8与精子凋亡也有较大的关联度，这也导致了精子活力差和精子浓度下降。JUN靶点所对应的转录因子AP-1涉及广泛的生物反应，研究表明AP-1在睾丸中具有多种功能，表现出年龄特异性缺损，精子头部和鞭毛结构异常，不仅如此，AP-1在生殖细胞的凋亡中扮演着非常重要的角色。PTGS2，即COX-2，是将多不饱和脂肪酸和花生四烯酸转换为前列腺素的关键酶，可能被认为是诊断男性不育症的额外分子标志物[11]。研究认为，PTGS2可能对顶体反应有重大影响，PTGS上调会使进行性前列腺素失衡，进而可能导致氧化应激增加，从而使线粒体和核DNA受损[12]。BAX基因属于BLC-2基因家族，促进细胞凋亡，当细胞暴露于凋亡诱导因子时，BAX蛋白会从细胞质转移到线粒体膜并改变外膜通透性最终导致DNA碎片化[13]。

根据KEGG富集分析结果显示，熟地黄-当归药对治疗男性不育症靶点通路主要集中在癌症通路、乙肝病毒通路、结肠直肠癌通路、细胞凋亡通路、非酒精性脂肪性肝病通路、TNF信号通路等。相关研究表示，患有乙肝的男性不育症患者的精细胞核异常率、核碎解率、其他核异常率明显高于不患乙肝的男性不育症患者，而其他精液指标未见明显差异，由此可以推测乙肝病毒提高精细胞核碎解率及鼓槌率来影响男性生殖细胞，导致男性不育症的发生[14]。细胞凋亡是正常生理过程，但过度的细胞凋亡阻碍了精子发生的正常过程，从而导致精子浓度和活力的下降，本研究发现熟地黄-当归药对作用靶点高度富集在细胞凋亡通路，如核心靶点CASP3、CASP9、CASP8、BAX等。另外，细胞凋亡还涉及p53和NF-κB通路，研究发现这些信号通路的失活可以减轻DNA损伤和恢复睾丸功能[15]。非酒精性脂肪性肝病，是与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的获得性代谢应激性肝损伤，多发生于肥胖患者。

而肥胖是导致男性不育症的一大要素。肥胖导致性器官发育迟缓，改变睾丸基因 mRNA 的表达，使血睾屏障破坏；肥胖还可能通过使下丘脑-垂体-性腺轴功能失调、胰岛素抵抗、间质细胞功能受损以及阴囊皮肤温度升高等影响精液质量[16]。TNF 信号通路是炎症反应的核心，会引起炎症和内皮功能障碍，环境因素如应激状态、辐射等均能导致 TNF 信号通路的激活，诱导睾丸内膜的损伤和精子细胞数目的减少[17]。由上述可知，熟地黄-当归药对从抗细胞凋亡、抑制炎症反应、调节内分泌、抗病毒等方面发挥治疗作用。

分子对接技术，广泛用于药物研究的酶-肽作用等宏观方面，微观方面又可以分析结构以验证生物利用度等信息，本研究中分子键均具有良好的对接活性，表示熟地黄-当归药对在对男性不育症的治疗中具有分子层面的可信度。

综上，本研究基于网络药理学和分子对接技术，多层次、多角度阐述了熟地黄-当归药对对男性不育症的作用机制，为后续相关实验验证及临床运用提供了理论支持。

[参考文献]

[1] CANNARELLA R, CONDORELLI R A, MONGIOI L M, et al. Effects of the selective estrogen receptor modulators for the treatment of male infertility: a systematic review and meta-analysis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(12): 1517-1525.

[2] 李然，郭颖. 基于网络药理学及分子对接探讨二至天癸方治疗女性不孕症的作用机制[J]. 中国药理学通报，2022，38(1)：126-133.

[3] 朱化珍，陈德兴. 张景岳《新方八阵》配伍规律研究[J]. 中华中医药杂志，2012，27(4)：1034-1037.

[4] AITKEN R J, DE IULIIS G N. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation[J]. Soc Reprod Fertil Suppl, 2007, 65: 81-92.

[5] 李鹏飞，苗明三. 熟地黄的现代研究及应用现状分析[J]. 中医学报，2014，29(2)：252-254.

[6] ZHANG Y, SONG M, RUI X, et al. Supplemental dietary phytosterin protects against 4-nitrophenol-induced oxidative stress and apoptosis in rat testes[J]. Toxicol Rep, 2015, 2: 664-676.

[7] 吕成龙，李会会，史永洁，等. 中药当归现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2022，47(19)：5140-5157.

[8] HASANEIN P, FAZELI F, PARVIZ M, et al. Ferulic acid prevents lead-induced testicular oxidative stress and suppressed spermatogenesis in rats[J]. Andrologia, 2018, 50(1): 12798.

[9] SAID T M, PAASCH U, GLANDER H J, et al. Role of caspases in male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1): 39-51.

[10] RAHBAR S, PASHAIASL M, EZZATI M, et al. MicroRNA-based regulatory circuit involved in sperm infertility[J]. Andrologia, 2020, 52(1): e13453.

[11] SUOMALAINEN L, DUNKEL L, KETOLA I, et al. Activator protein-1 in human male germ cell apoptosis[J]. Molecular Human Reproduction, 2004, 10(10): 743-753.

[12] PERROTTA I, SANTORO M, GUIDO C, et al. Expression of cyclooxygenase-1(COX-1) and COX-2 in human male gametes from normal patients, and those with varicocele and diabetes: a potential molecular marker for diagnosing male infertility disorders[J]. J Anat, 2012, 221(3): 209-220.

[13] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax[J]. Clin Exp Reprod Med, 2020, 47(3): 155-160.

[14] 王安莲，王炳青，王秋萍. 乙肝病毒诱发男性不育症患者精液精细胞核异常分析[J]. 安徽预防医学杂志，2005，11(6)：336-337.

[15] ZHAO H, LIU J, SONG L, et al. Oleanolic acid rejuvenates testicular function through attenuating germ cell DNA damage and apoptosis via deactivation of NF-κB, p53 and p38 signalling pathways[J]. J Pharm Pharmacol, 2017, 69(3): 295-304.

[16] 焦薇薇，鲁嗣，邱文然，等. 肥胖对男性生殖功能影响的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志，2021，16(3)：585-588.

[17] LEE J, Ha S J, PARK J, et al. Arctium lappa root extract containing L-arginine prevents TNF-α-induced early atherosclerosis in vitro and in vivo[J]. Nutr Res, 2020, 77: 85-96.

（责任编辑：吴凌，李海霞）