

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003368

2型糖尿病雄性小鼠生殖细胞形态学改变及凋亡机制研究

李冲, 谢曦, 王雅茹, 刘瑜, 刘影, 牛文彦

(天津医科大学朱宪彝纪念医院检验科、天津市内分泌研究所、国家卫健委激素与发育重点实验室、天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134)

[摘要]目的:通过构建2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)雄性小鼠模型探究2型糖尿病对睾丸组织形态学、睾酮分泌、精子生成等方面的影响。方法:将24只8周龄C57BL/6J雄性小鼠随机分为2组:对照组10只和T2DM组14只。对照组小鼠基础饲料喂养,T2DM组给予高脂喂养。8周后对照组小鼠腹腔注射柠檬酸盐缓冲液,T2DM组小鼠腹腔注射60 mg/kg链脲佐菌素(streptozocin, STZ),持续5 d。饲养小鼠4周后断颈处死,分离出小鼠的血清、睾丸、附睾。通过精子计数、睾酮水平检测评估雄性小鼠生殖细胞生精功能;HE染色分析睾丸组织形态学变化;TUNEL染色检测睾丸生殖细胞的凋亡情况。ELISA检测雄性小鼠血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)水平;Western blot检测雄性小鼠睾丸组织中B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, BaX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)蛋白表达水平。结果:与对照组相比,T2DM组小鼠体质量(26.00 ± 2.85)g,精子数目(4.15 ± 1.01) $\times 10^6$ /L,睾酮水平(0.99 ± 0.41)ng/mL均降低($P=0.000, P=0.009, P=0.041$);TUNEL结果显示:T2DM组小鼠睾丸生精小管各级生精细胞都有不同程度的凋亡,凋亡细胞数量($21.60 \pm 5.11, P=0.033$)增加;ELISA结果显示:T2DM组小鼠血清氧化应激SOD(4.42 ± 0.47)pg/mL和HO-1(2968.00 ± 536.10)pg/mL表达水平增加($P=0.000, P=0.008$)。Western blot检测发现BaX(1.270 ± 0.059)、Caspase-3(1.94 ± 0.47)蛋白表达水平增加($P=0.008, P=0.041$),且BaX与Bcl-2比值增大。**结论:**2型糖尿病雄性小鼠血清睾酮含量显著降低,生精细胞凋亡增加,成熟精子数量减少,影响生殖能力。

[关键词]2型糖尿病; 睾酮; 生精功能**[中图分类号]**R587.2**[文献标志码]**A**[收稿日期]**2023-05-21

Influence of type 2 diabetes mellitus on the morphology and apoptosis of germ cells in male mice

Li Chong, Xie Xi, Wang Yaru, Liu Yu, Liu Ying, Niu Wenyan

(NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Institute of Endocrinology, Department of Clinical Laboratory, Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Medical University)

[Abstract]**Objective:** To investigate the influence of type 2 diabetes mellitus(T2DM) on testicular histomorphology, testosterone secretion, and spermatogenesis by establishing a male mouse model of T2DM. **Methods:** A total of 24 male C57BL/6J mice, aged 8 weeks, were randomly divided into control group with 10 mice and T2DM group with 14 mice. The mice in the control group were fed a basal diet, and those in the T2DM group were fed a high-fat diet. After 8 weeks, the mice in the control group were given intraperitoneal injection of citrate buffer, and those in the T2DM group were given intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin(STZ), for 5 consecutive days. The mice were sacrificed after 4 weeks of feeding, and the serum, testis, and epididymis of the male mice were isolated. Sperm count and testosterone level were measured to assess the spermatogenic function of germ cells in male mice; HE staining

作者介绍:李冲, Email: 15122121545@163.com,**研究方向:**主要从事糖尿病与雄性生殖相关研究。**通信作者:**牛文彦, Email: wyniu@139.com。**基金项目:**天津医科大学朱宪彝纪念医院科研基金资助项目(编号:**2019ZDKF16);天津市医学重点学科(专科)建设资助项目
(编号:TJYXZDXK-032A)。****优先出版:**<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231120.1643.008>**(2023-11-21)**

was used to observe the morphological changes of the testis; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of testicular germ cells. ELISA was used to measure the serum levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and heme oxygenase-1 (HO-1), and Western blot was used to measure the protein expression levels of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (BaX), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3) in testicular tissue of male mice. **Results:** Compared

with the control group, the T2DM group had significant reductions in body weight [(26.00 ± 2.85) g vs. (29.71 ± 4.28) g, $P=0.000$], sperm number [$(4.15 \pm 1.01) \times 10^6/\text{L}$ vs. $(5.56 \pm 0.70) \times 10^6/\text{L}$, $P=0.009$], and testosterone level [(0.99 ± 0.41) ng/mL vs. (19.85 ± 10.23) ng/mL, $P=0.041$]. TUNEL staining showed that the T2DM group had varying degrees of apoptosis in spermatogenic cells at all levels of testicular seminiferous tubules, with a significant increase in the number of apoptotic cells (21.60 ± 5.11 , $P=0.033$). ELISA showed that the T2DM group had significant increases in the expression levels of the serum oxidative stress markers SOD (4.42 ± 0.47) pg/mL and HO-1 (2968.00 ± 536.10) pg/mL ($P=0.000$ and 0.008). Western blot showed significant increases in the protein expression levels of BaX (1.270 ± 0.059) and caspase-3 (1.94 ± 0.47) ($P=0.008$ and 0.041) and BaX/Bcl-2 ratio. **Conclusion:** Male mice with T2DM have a significant reduction in serum testosterone level, a significant increase in the apoptosis of spermatogenic cells, and a significant reduction in the number of mature spermatogenic cells, which affect reproductive capacity.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; testosterone; spermatogenic function

随着生活环境改变、工作压力的增大,男性不育患者逐渐增多,男性不育现已成为生殖健康亟待解决的问题。先前研究表明:糖尿病可以直接或间接导致男性不育^[1],其中2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是导致男性不育的主要原因^[2]。T2DM男性患者与正常人相比,精子浓度、精子活力降低,形态正常的精子减少^[3-5]。T2DM雄性大鼠模型中,睾丸组织中一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性降低,内皮素(endothelin, ET)与降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、NO含量呈负相关^[6]。T2DM对男性生殖功能的影响多有报道,但其机制并未完全阐明。本文通过构建T2DM雄性小鼠模型来研究T2DM对雄性生殖功能的影响,并为T2DM对雄性生殖的作用机制提供一定基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(购自美国Sigma公司);睾酮检测试剂盒(购自华美生物工程公司);TUNEL细胞凋亡试剂盒(购自武汉赛维尔生物科技有限公司),PVDF膜(购自美国Millipore公司), β -actin中杉金桥(TA-09)、Caspase-3 proteintech(19677-1-AP)、BCL-2 Abcam(ab182858)、BaX CST(2772)等抗体购自易生源基因科技(天津)有限公司。BIO-RAD酶标仪(购自北京汇力宏业生物科技有限公司)、Champchemi 610 plus全自动化学/荧光/凝胶成像分析系统(购自北京赛智创业科技有限公司)、OLYMPUS BX53正置显微镜(购自日本Olympus Corporation公司)。

1.2 方法

1.2.1 T2DM 雄性小鼠模型制备

由天津医科大学内分泌研究所实验动物中心提供:8周龄C57BL/6J健康雄性小鼠24

只。将24只雄性小鼠随机分为两组:对照组10只;T2DM组14只。对照组给予基础饲料喂养,T2DM组小鼠给予60%高脂饲料饲养。饲养7周后,于实验前1d禁食,16h后对照组小鼠腹腔内注射0.1 mol/L($\text{pH}=4.5$)柠檬酸钠缓冲液,T2DM组小鼠腹腔内注射60 mg/kg链脲佐菌素(STZ)^[7-8],继续给予相应饲料饲养,实验持续重复5d。以空腹静脉血糖(fasting plasma glucose, FPG) ≥ 16.7 mmol/L为诊断糖尿病小鼠标准,T2DM组于第8周造模成功^[9],成功率93%(死亡1只)。继续饲养4周后于第21周断颈处死小鼠。分别取两组小鼠左侧睾丸于4%多聚甲醛动物组织固定液中,以备后期包埋,HE染色使用;小鼠眼球取血并立刻分离出血清,与睾丸、附睾等组织,尽快-80℃冰箱保存。

1.2.2 HE与TUNEL染色 HE染色:组织切片脱蜡、水化,苏木精染色5 min,去离子水漂洗;伊红染色2 min,去离子水漂洗,再次脱水,中性树胶封片。TUNEL染色:脱水组织切片脱蜡处理,将切片用蛋白酶K和3%过氧化氢处理,加入TUNEL反应液,37℃60 min。滴加链霉亲和素-辣根过氧化物酶标记的抗体,室温30 min,滴加新鲜配制的DAB溶液,苏木精复染,透明后中性树脂封片,显微镜下拍照。

1.2.3 小鼠体质量、附睾重量、精子计数和血清睾酮水平检测 取雄性小鼠左侧睾丸、附睾称重。剥离附睾尾,取1.5 mL EP管加入1 mL生理盐水制成精子悬液,37℃恒温箱平衡30 min,取20 μL滴入牛鲍计数板检测精子总数。

1.2.4 血清ELISA检测 从-80℃冰箱取出小鼠血清,冰盒上复溶后,ELISA法测定血清中睾酮、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)水平。并于酶标仪($n=450$ nm)检测。

1.2.5 睾丸组织蛋白检测 用BCA法进行蛋白定量,根据标准曲线计算出样品的浓度并计算上样量。配置分离胶和浓缩胶:将灌胶玻璃板洗净,晾干固定,配制10%分离胶4 mL,用去离子水覆盖胶面,室温放置约40 min;倒掉去离子水,用吸水纸吸掉残留的液体。加入4%浓缩胶液,室温放置约40 min将样品轻轻加至凝胶孔中,电泳仪恒压80 V

使样品通过浓缩胶与分离胶。蛋白 Marker 电泳到分离胶适当位置, 结束电泳。切胶获得目的胶, 由阴极侧开始, 按照海绵垫片→3 层滤纸→样品胶→PVDF 膜→三层滤纸→海绵垫片顺序放入含有转膜缓冲液的转移电泳槽中, 恒压 20 V, 30 min; 然后进行封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜, 最后曝光, 用 Image J 软件分析灰度值。

1.3 统计学方法

实验数据采用 Graph-Pad Prism5 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 2 组小鼠各项指标变化

与对照组相比, T2DM 组小鼠体质量明显减低($P=0.000$)。睾丸重量与对照组相比也明显减低($P=0.001$)。附睾尾精子计数结果显示: 与对照组相比, T2DM 组小鼠精子数目减少($P=0.009$)。睾酮主要由生精小管间质细胞产生, 参与精子生成过程^[10-11]。表 1 结果显示: 与对照组相比, T2DM 组小鼠血清中睾酮含量显著降低($P=0.041$)。

2.2 HE 检测结果

HE 结果显示: 对照组小鼠(图 1A)睾丸组织生精小管管壁完整、管腔规则、基膜完整而清晰。3~5 层生精细胞排列

整齐, 管腔中央能看到大量成熟游离精子。睾丸间质细胞成簇出现在曲细精管间三角形区域(蓝色箭头), 细胞多呈菱形或三角形, 体积大, 胞浆丰富, 胞核圆形或椭圆形, 染色质分布均匀。T2DM 组小鼠(图 1B)睾丸生精小管管壁相对变薄, 管腔相对宽大, 生精细胞脱落, 细胞层数减少, 细胞间排列疏松, 且形状多不规则。管腔中央成熟精子明显减少, 出现体积缩小、退化的生精细胞(红色箭头)。生精小管之间间隙增加, 有断裂区, 但间质细胞仍成簇出现, 细胞体积相对较小, 形状多不规则, 甚至出现无胞质的核细胞(黄色箭头)。

2.3 TUNEL 检测结果

TUNEL 检测结果显示: 与对照组小鼠睾丸中凋亡的生精细胞数量(15.73 ± 6.58)相比, T2DM 组小鼠睾丸中凋亡的生精细胞数量(21.60 ± 5.11 , $t=2.303$, $P=0.033$)明显增加(图 2C)。凋亡的细胞主要包括精原细胞、初级精母细胞等生精过程中前期细胞, 并且这些细胞多存在于生精小管的近基膜处(图 2A、B 红色箭头)。与对照组相比, T2DM 组睾丸组织间质细胞凋亡数量增加并不显著(图 2B 黄色箭头)。

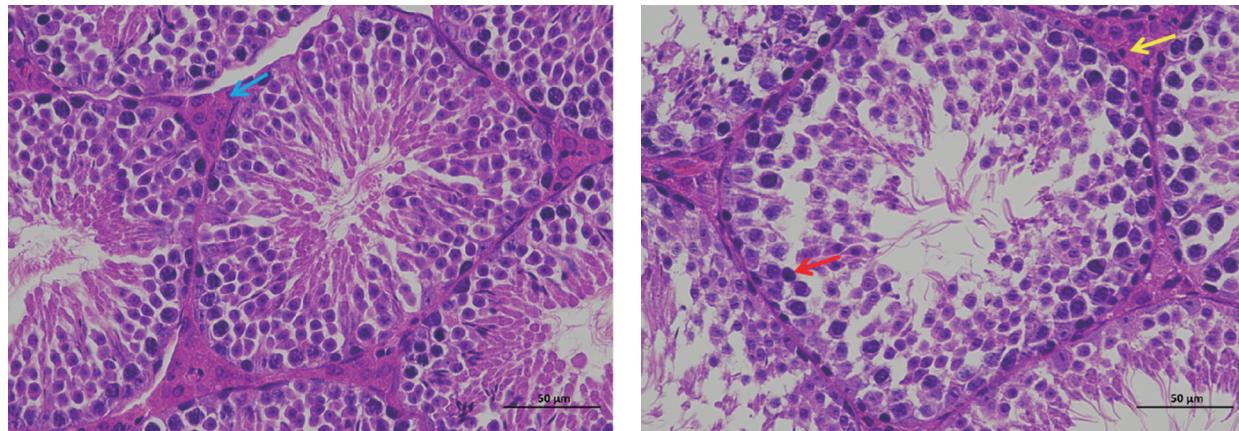
2.4 2 组小鼠血清 SOD、MDA、HO-1 水平

氧化应激被认为是 2 型糖尿病及其相关并发症的基本病理生理机制^[12]。为探究氧化应激在 2 型糖尿病中的作用机制, 本研究检测了 2 组小鼠血清中 SOD、MDA、HO-1 水平。结果显示: 与对照组小鼠血清中 SOD、HO-1 水平[(3.62 ± 0.11) pg/mL、(2194.00 ± 619.30) pg/mL]相比, T2DM 组小鼠

表 1 2 组小鼠各项指标变化($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)	睾丸重量(g)	精子数目($\times 10^6$ 个/L)	睾酮(ng/mL)
对照组($n=10$)	29.71 ± 4.28	0.1000 ± 0.0034	5.56 ± 0.70	19.85 ± 10.23
T2DM 组($n=13$)	26.00 ± 2.85^a	0.0800 ± 0.0021^a	4.15 ± 1.01^a	0.99 ± 0.41^b
<i>t</i> 值	4.732	4.000	3.027	2.231
<i>P</i> 值	0.000	0.001	0.009	0.041

注:^a与对照组比较, $P<0.01$; ^b与对照组比较, $P<0.05$



A. 对照组

B. T2DM 组

注: 蓝色箭头, 睾丸间质细胞区; 红色箭头: 体积缩小、退化的生精细胞; 黄色箭头: 无胞质的核细胞

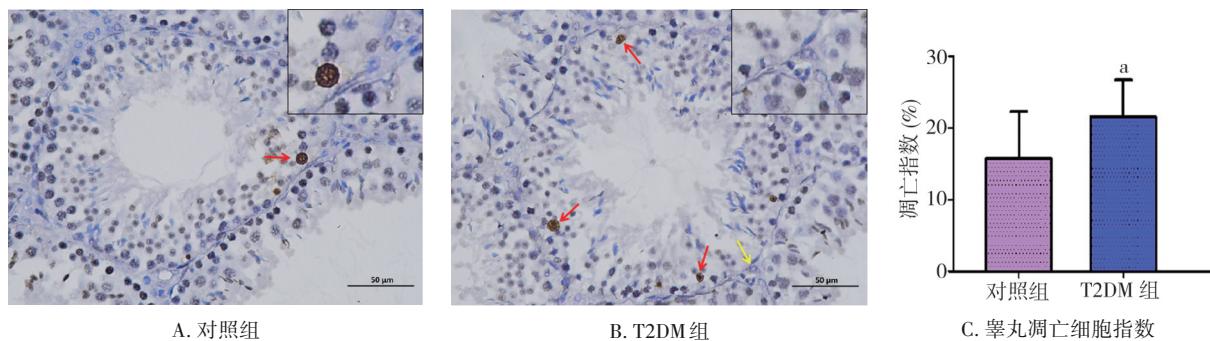
图 1 HE 染色检测 2 组小鼠睾丸组织形态学变化(400×)

血清中 SOD、HO-1 水平 [$(4.42 \pm 0.47) \text{ pg/mL}, t=5.157, P=0.000$ 、 $(2968.00 \pm 536.10) \text{ pg/mL}, t=2.991, P=0.008$] 显著升高(图 3A、C);与对照组小鼠血清中 MDA 水平 (288.20 ± 47.46) 相比, T2DM 组小鼠血清中 MDA 水平 (149.70 ± 43.95 , $t=2.144, P=0.045$) 降低(图 3B)。

2.5 睾丸组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, BaX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteinylaspartate specific proteinase-3, Caspase-3)蛋白表达水平

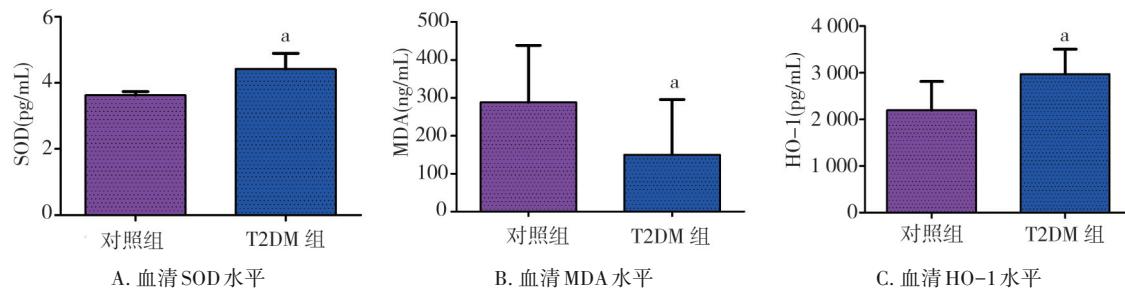
细胞凋亡是细胞在多基因作用下发生的自主性、程序性的死亡过程。Western blot 结果显示:与对照组小鼠睾丸组

织中 Bcl-2、BaX 蛋白表达水平 ($0.950 \pm 0.059, 0.91 \pm 0.18$) 相比, T2DM 组小鼠睾丸组织中 Bcl-2 蛋白表达水平 ($1.18 \pm 0.17, t=2.532, P=0.045$) 增加, BaX 蛋白表达水平 ($1.27 \pm 0.059, t=3.867, P=0.008$) 增加(图 4A、B),且 BaX 与 Bcl-2 比值增加(图 4C),表明睾丸组织生精细胞中凋亡增加;Caspase-3 是细胞凋亡最关键的效应蛋白酶,在细胞凋亡过程中起至关重要的作用。本实验发现:与对照组小鼠睾丸组织中 Caspase-3 蛋白表达水平 (1.27 ± 0.22) 相比, T2DM 组小鼠睾丸组织中 Caspase-3 蛋白表达水平 ($1.94 \pm 0.47, t=2.586, P=0.041$) 也增加(图 4A、B)。



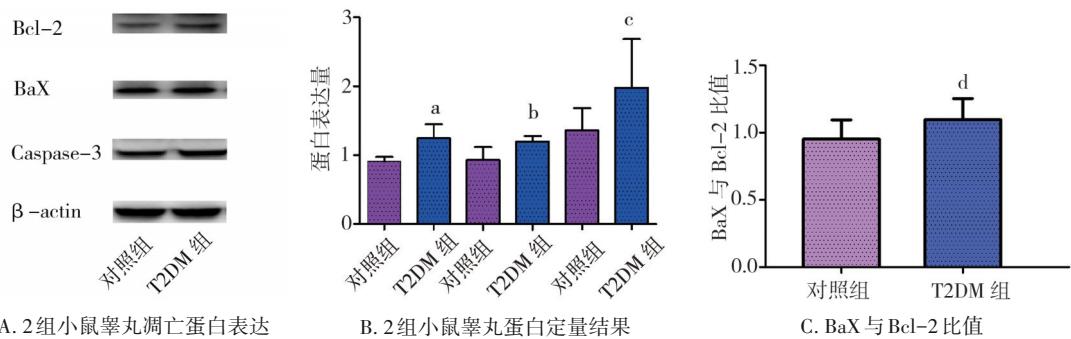
注:红色箭头,凋亡的生精细胞;黄色箭头,睾丸间质细胞区;凋亡细胞指数=凋亡细胞数/细胞总数;a:与对照组比较, $P<0.05$ (对照组 $n=10$;T2DM 组 $n=13$, $\bar{x} \pm s$)

图 2 TUNEL 检测 2 组小鼠睾丸组织细胞凋亡情况 (400×)



注:a,与对照组比较, $P<0.05$ (对照组 $n=10$;T2DM 组 $n=13$, $\bar{x} \pm s$)

图 3 ELISA 检测 2 组小鼠血清 SOD、MDA、HO-1 表达水平



注:a,与对照组 Bcl-2 蛋白表达水平比较, $P<0.05$;b:与对照组 BaX 蛋白表达水平比较, $P<0.05$;c:与对照组 Caspase-3 蛋白表达水平比较, $P<0.05$;d:与对照组 BaX 与 Bcl-2 比值比较, $P<0.05$ (对照组 $n=10$;T2DM 组 $n=13$, $\bar{x} \pm s$)

图 4 2 组小鼠睾丸组织凋亡相关蛋白的表达

3 讨 论

随着生活节奏不断加快,不育患者日益增多,男性不育已成为不孕不育的主要因素之一^[13]。先前研究表明:糖尿病影响雄性生殖功能,糖尿病患者存在生育能力减低等问题,但其机制尚未清楚^[14]。T2DM 患者占糖尿病患者总数 90% 以上,且发病率呈上升趋势^[15]。基于以上情况,研究 2 型糖尿病对雄性生殖功能的影响具有重要意义。

本研究构建了 T2DM 小鼠模型,且造模完成后随机血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$,成功率达 93%。研究发现:T2DM 雄性小鼠有明显的多食多饮体质量减轻的症状。另外,T2DM 雄性小鼠睾丸重量明显减少,精子计数显著减低。表明 T2DM 影响了雄性生殖功能。T2DM 常伴有胰岛素抵抗,胰岛素抵抗会影响下丘脑垂体性腺轴的分泌^[16]。而睾酮主要由睾丸间质细胞分泌,间质细胞中含有胰岛素受体,且受促性腺激素释放激素调控^[17]。因此,T2DM 对睾酮的分泌及调节具有重要影响。本研究通过检测血清睾酮含量发现:T2DM 组小鼠血清睾酮水平显著降低,进一步表明 T2DM 影响雄性生殖功能。睾酮是精子生成过程中最主要的调节激素,对维持生精具有重要作用。睾丸支持细胞影响睾丸发育及精子生成过程,过量的睾酮还可以作用于支持细胞,间接地参与精子成熟过程^[18]。本研究结果显示:T2DM 组雄性小鼠血清睾酮水平显著降低,附睾尾精子计数明显减少,说明睾酮影响精子生成过程;睾酮水平降低影响了睾丸支持细胞的功能,导致睾丸重量减轻。此外,睾丸中的睾酮水平比血清中高很多,睾丸发育不良进一步影响睾酮的生成水平,进而影响精子生成过程,使精子数量减少。HE 染色发现:睾丸组织中生精小管变化明显,管腔中成熟精子减少,与精子计数结果一致。进一步做 TUNEL 染色发现:凋亡的生精细胞主要集中在生精过程的初始阶段。实验中 T2DM 组雄性小鼠附睾质量和附睾组织 HE 染色差别不大,分析认为高血糖主要通过影响精子生成的初始阶段,而附睾主要在精子成熟的过程中发挥重要作用,高血糖对精子成熟过程影响不大。

高血糖与氧化应激密切相关,升高的葡萄糖会增加人内皮细胞中抗氧化酶的水平,导致细胞氧化

应激水平增加,最终导致胰岛素抵抗^[19]。细胞氧化还原状态的不平衡会增加自由基和过氧化物的水平,损害细胞的成分,如蛋白质和 DNA,并导致毒性作用。糖尿病患者体内活性氧增加和氧化应激反应影响精子生成过程,是引起男性不育的主要原因^[20]。糖尿病大鼠氧化应激增加可引起睾丸 DNA 损伤、精子细胞消耗和精子发生延迟,从而导致不孕^[21]。尽管诸多研究证明糖尿病影响雄性生殖功能,且与氧化应激密切相关,但其机制尚不明确。本研究通过检测 T2DM 小鼠血清中的 SOD、MDA、HO-1 3 个与抗氧化相关的关键酶发现:血清中的 SOD、HO-1 水平较对照组小鼠升高,但 MDA 水平较对照组雄性小鼠减少。说明 T2DM 小鼠体内发生了氧化应激。值得注意的是:SOD、MDA、HO-1 检测结果与先前研究结果并不一致,分析认为在糖尿病形成过程初期阶段,抗氧化防御系统始终处于动态平衡中,葡萄糖升高会增加人内皮细胞中抗氧化酶的水平,同时激活核因子 E2 相关因子 2 蛋白表达,进而刺激 HO-1 的表达,而减少氧自由基与脂质发生过氧化反应后的产物 MDA 的生成。

细胞凋亡是细胞在多基因作用下发生的自主性、程序性的死亡过程。T2DM 可通过 PI3K/AKT 通路的调控诱导睾丸微循环障碍,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达降低,细胞凋亡的增加,最终导致男性不育^[22]。BaX 为诱导细胞凋亡的发生基因,Bcl-2 为抑制细胞凋亡的发生基因,并且 Bcl-2 是 AKT 的底物之一。本文通过检测 BaX、Bcl-2 蛋白表达情况进一步探究 T2DM 引起雄性小鼠生殖细胞凋亡增加的机制。结果显示:T2DM 组雄性小鼠与对照组小鼠相比,睾丸组织中 BaX 与 Bcl-2 比值增加,表明睾丸组织生精细胞中细胞凋亡增加,与 TUNEL 结果中观察到生精细胞凋亡增加的结果一致。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteine-containing aspartate-specific protease, Caspase) 是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者,其中 Caspase-3 是 Caspase 级联“瀑布”下游中最关键的凋亡蛋白酶,在凋亡过程中起到决定性的调控作用。研究发现:T2DM 组雄性小鼠与对照组小鼠相比,睾丸组织中 Caspase-3 蛋白表达明显增加,更有力说明 T2DM 雄性小鼠睾丸中细胞凋亡增加。本研究通过以上结果认为:T2DM 雄性小鼠睾丸中细胞凋亡增多可能与 PI3K/AKT/Bcl-2/Caspase-3 信

号通路有关。

综上所述,本研究对T2DM与雄性生殖功能的关系进行了初步的探索,发现T2DM使雄性小鼠生殖细胞凋亡增多,其原因可能是氧化应激增加,凋亡相关蛋白表达增加,影响雄性生殖功能,并为下一步凋亡机制的研究提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Shi GJ, Li ZM, Zheng J, et al. Diabetes associated with male reproductive system damages: onset of presentation, pathophysiological mechanisms and drug intervention[J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 90:562–574.
- [2] Ferreira C, Sousa M, Rabaça A, et al. Impact of metformin on male reproduction[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(25):3621–3633.
- [3] 张军荣,徐惠明,唐 锋,等.2型糖尿病对患者精子DNA碎片率、AR和MMP的影响研究[J].浙江医学,2022,44(23):2556–2558.
Zhang JR, Xu HM, Tang F, et al. Sperm DNA fragment rate, AR rate and MMP in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Zhejiang Med J, 2022,44(23):2556–2558.
- [4] Singh AK, Tomarz S, Chaudhari AR, et al. Type 2 diabetes mellitus affects male fertility potential[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2014, 58(4):403–406.
- [5] 曹 雯,郑仁东,范尧夫,等.2型糖尿病男性患者睾酮水平与代谢指标相关性分析[J].四川大学学报(医学版),2018,49(2):235–238.
Cao W, Zheng RD, Fan YF, et al. Correlation between testosterone and metabolic index in male patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2018,49(2):235–238.
- [6] 孙淑红,戚双双,孙臣友.雄性T2DM模型大鼠血清、生殖器官中NO、NOS、ET与CGRP的变化[J].中国老年学杂志,2007,27(15):1468–1470.
Sun SH, Qi SS, Sun CY. Changes of NO, NOS, ET and CGRP in serum and reproductive organs of male T2DM model rats[J]. Chin J Gerontol, 2007,27(15):1468–1470.
- [7] 许芳芳,王 楠,李刚强,等.2型糖尿病小鼠模型的建立与评价[J].中国医学科学院学报,2017,39(3):324–329.
Xu FF, Wang N, Li GQ, et al. Establishment and assessment of mice models of type 2 diabetes mellitus[J]. Acta Acad Med Sin, 2017,39(3):324–329.
- [8] Sampannang A, Arun S, Burawat J, et al. Comparison of male reproductive parameters in mice with type 1 and type 2 diabetes[J]. Clin Exp Reprod Med, 2020,47(1):20–33.
- [9] 舒伟强,李春华,王惠秋,等.2型糖尿病并发肺结核患者血糖水平与CT特征的相关性分析[J].中国防痨杂志,2017,39(6):565–569.
Shu WQ, Li CH, Wang HQ, et al. The study on the relationship between blood glucose level's and chest CT features in diabetic patients complicated with pulmonary tuberculosis[J]. Chin J Antituberc, 2017, 39 (6) : 565–569.
- [10] Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation[J]. Biol Reprod, 2018,99(1):101–111.
- [11] Oduwole OO, Huhtaniemi IT, Misrahi M. The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (23) : 12735.
- [12] Dworzański J, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, et al. Glutathione peroxidase(GPx) and superoxide dismutase(SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus[J]. PLoS One, 2020,15(3):e0230374.
- [13] Concepción-Zavaleta M, Paz Ibarra JL, Ramos-Yataco A, et al. Assessment of hormonal status in male infertility. An update[J]. Diabetes Metab Syndr, 2022,16(3):102447.
- [14] Sandro LV, Rosita C, Enzo V, et al. Diabetes Mellitus and Sperm Parameters[J]. Journal of Andrology. 2012,33(2): 145–153.
- [15] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes[J]. Lancet, 2017,389(10085):2239–2251.
- [16] Oghbaei H, Fattah A, Hamidian G, et al. A closer look at the role of insulin for the regulation of male reproductive function[J]. Gen Comp Endocrinol, 2021, 300:113643.
- [17] 施长春,白文俊.睾丸生精功能障碍的促生精治疗[J].中国男科学杂志,2020,34(3):59–62.
Shi CC, Bai WJ. Spermatogenesis-promoting therapy for testicular spermatogenic dysfunction[J]. Chin J Androl, 2020,34(3):59–62.
- [18] Zaker H, Razi M, Mahmoudian A, et al. Boosting effect of testosterone on GDNF expression in Sertoli cell line (TM4); comparison between TM3 cells-produced and exogenous testosterone[J]. Gene, 2022, 812:146112.
- [19] Ceriello A, Dello Russo P, Amstad P, et al. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress[J]. Diabetes, 1996, 45 (4) : 471–477.
- [20] Barkabi-Zanjani S, Ghorbanzadeh V, Aslani M, et al. Diabetes mellitus and the impairment of male reproductive function: possible signaling pathways[J]. Diabetes Metab Syndr, 2020,14(5):1307–1314.
- [21] Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids[J]. Bioessays, 2004,26(5):533–542.
- [22] Long LL, Qiu H, Cai B, et al. Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2018,9(4):5321–5336.

(责任编辑:李青颖)