覆盆子原花青素对雄性糖尿病桑蚕生殖损伤的修复作用

曾小艳[1,2,3]，童丽[1,2*]

（1. 青海大学，青海 西宁 810099；2. 青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室，青海 西宁 810099；3. 恩施土家族苗族自治州中心医院，湖北 恩施 445000）

摘要　目的：探讨覆盆子原花青素对雄性糖尿病桑蚕生殖损伤的修复作用。方法：实验组桑蚕喂食含10%葡萄糖的高糖饲料18 h，建立2型糖尿病模型；糖尿病桑蚕随机分为模型组、覆盆子原花青素高剂量组（50 μL）、覆盆子原花青素中剂量组（25 μL）、覆盆子原花青素低剂量组（12.5 μL）。检测血淋巴中的睾酮（T）、促黄体生成素（LH）和卵泡刺激素（FSH）水平；检测脂肪体中的甘油三酯（TG）水平；检测睾丸组织中的超氧化物歧化酶（SOD），丙二醛（MDA）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH－Px）水平；HE染色观察睾丸组织的病理损伤；RT－PCR检测piRNA信号通路中siwi1和siwi2基因表达水平。结果：与模型组比较，覆盆子原花青素各剂量组的血糖下降（$P<0.05$），LH水平升高（$P<0.05$），覆盆子原花青素高、中剂量组T水平升高（$P<0.05$）；覆盆子原花青素各剂量组的GSH－Px和SOD水平升高（$P<0.05$），MDA水平下降（$P<0.05$）；覆盆子原花青素各剂量组的睾丸病理损伤减轻；siwi1、siwi2 mRNA水平升高（$P<0.05$）。结论：覆盆子原花青素可以通过降低血糖、血脂，增加LH和T水平，减轻睾丸氧化应激损伤，减轻睾丸病理损伤，改善piRNA信号通路中相关基因的表达进而改善糖尿病导致的雄性生殖损伤。

关键词　覆盆子原花青素；糖尿病桑蚕；生殖损伤；修复作用

中图分类号：R285.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392（2025）06－0026－06

DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250113

2型糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性代谢紊乱性疾病，在全球范围内正在迅速增加[1]。到2045年，糖尿病患者的人数预计将上升到6.29亿人[2]。糖尿病可增加睾丸内生精细胞的凋亡，影响精子的正常产生，从而导致男性生育能力的下降[3]。糖尿病还会导致血清中激素水平紊乱，从而导致精子发生减少。目前，糖尿病的治疗包括胰岛素注射和口服降糖药物。虽然这些治疗方法可以控制血糖水平，从而部分改善性功能，但效果还远远不够。在一项调查中，大约1/3的糖尿病患者倾向于使用替代药物控制血糖水平[4]。覆盆子为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子（*Rubuschingii* Hu）的干燥成熟果实，广泛种植于亚洲、欧洲和北美[5]。覆盆子果实富含超氧化物、多糖、黄酮类化合物、花青素等。据报道，覆盆子有较好的降低血脂和血糖作用[6]。从覆盆子中提取的原花青素已广泛用于糖尿病的治疗。研究显示原花青素具有降血脂、降血糖、抗氧化、抗炎等特性[7-9]。虽然现代医学在控制血糖水平方面已经作出了很大的努力，但糖尿病并发症仍持续导致死亡和器官功能障碍。将哺乳动物和啮齿动物作为疾病研究的动物模型，存在成本高、实验时间长、某些生物危害等问题[10]。2002年，国际无脊椎动物协会正式将家蚕鉴定为鳞翅目模式昆虫。蚕自然变异多，生命周期短，个体大小适中，雌雄易分，易繁殖，容易提取器官和组织作为体外培养的实验材料。随着蚕基因组测序的完成，蚕生物信息资源和分析平台以及功能基因鉴定和分析平台变得越来越完善。桑蚕有望逐渐作为研究人员的模型动物，以研究人类疾病的发病机制和开发新药。本研究旨在评价覆盆子原花青素对雄性糖尿病桑蚕模型生殖功能的改善作用。

收稿日期：2024－06－04　　**修回日期**：2024－11－03

基金项目：“昆仑英才·高端创新创业人才”领军人才项目（青人才字〔2021〕9号）

作者简介：曾小艳（1992－），女，博士研究生，研究方向：中医药防治生殖内分泌疾病。

*　**通信作者**：童丽（1972－），女，博士，教授，博士研究生导师，研究方向：中医药防治生殖内分泌疾病。

1 材料和方法

1.1 动物

150 只 5 龄蚕,蚕种选用广西的两广 2 号。由中国青海大学蚕资源库提供。在青海大学实验动物中心提供的 SPF 级动物实验室饲养,饲养环境温度 25 ℃,相对湿度为 75% ~85%,12 h 明暗交替照明。

1.2 药物

覆盆子购自青海省中医院,经青海民族大学热增才旦教授鉴定为真品。将覆盆子粉碎后用丙酮水浸泡,反复提取 3 次,过滤,合并滤液,旋转蒸发干燥,用 D101 大孔树脂柱纯化,得到原花青素(含量 >95%),4 ℃保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

睾酮(T)、促黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;甘油三酯(TG)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RNA Trizol 试剂由合肥博生物技术有限公司提供。

血糖仪及试纸(上海强生医疗器械有限公司,Touch one);T - 6500 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);荧光化学发光成像系统(上海勤翔仪器,ChemiQ4600)。

1.4 糖尿病桑蚕模型的建立

本研究随机选取 150 只 5 龄雄性桑蚕。随机选取 10 只蚕作为正常组,其余 140 只蚕作为实验组。实验组的蚕喂食含有 10% 葡萄糖的高糖饲料 18 h[11]。通过切断蚕的第一条前腿获得血淋巴,用血糖仪测定血糖水平。血糖 >11.1 mmol/L 为糖尿病桑蚕模型造模成功。

1.5 给药方法

将成功建模的桑蚕随机分为模型组、覆盆子原花青素高剂量组、覆盆子原花青素中剂量组、覆盆子原花青素低剂量组,每组 10 只,每个实验组继续喂食高糖饮食,而正常组继续喂食正常饮食。覆盆子原花青素高剂量组、覆盆子原花青素中剂量组、覆盆子原花青素低剂量组分别以 50 μL、25 μL、12.5 μL 通过蚕背部注入蚕血淋巴中,给药 24 h 后检测相关指标。

1.6 蚕血淋巴样品的制备

切开蚕的第一腹足,收集血淋巴。在离心管中加入少量苯硫脲,以防止血淋巴变黑。离心,上清保存在 -80 ℃冰箱中。

1.7 蚕脂肪体样品的制备

将蚕幼虫的脂肪体组织匀浆,60 ℃孵育 15 min,离心,得到脂肪体裂解液。

1.8 血淋巴中 T、LH、FSH 和 TG 测定

采用 ELISA 试剂盒检测血淋巴中 T、LH、FSH 的水平。取 2.5 μL 脂质体组织裂解液,加入 200 μL 甘油三酯检测试剂。波长为 510 nm,用酶标记仪测定每个孔的吸光度。

1.9 睾丸中 SOD、MDA 和 GSH - Px 测定

采集蚕的睾丸组织样本并进行匀浆。匀浆后离心提取上清液。用 ELISA 检测试剂盒测定 SOD、MDA 和 GSH - Px 含量。

1.10 睾丸的组织学观察

取每只蚕一个睾丸,立即用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,显微镜下进行组织学观察。

1.11 siwi1、siwi2 基因表达水平的测定

引物均由上海生功生物工程服务有限公司设计和合成,见表 1。用 Trizol 法提取家蚕睾丸中的 RNA,测定 RNA 浓度及纯度(OD_{260}/OD_{280} = 1.91)。根据说明书进行逆转录。将 cDNA 扩增(条件:37 ℃,15 min,85 ℃,5 s,4 ℃,60 min),加入 ddH_2O 稀释。配制 PCR 反应混合液。设定 PCR 程序,上机扩增检测。采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算 mRNA 表达水平。

表 1 PCR 引物信息

引物	Forward Primer(5′ - 3′)	Reverse Primer(5′ - 3′)	产物长度/bp
GAPDH	GCCGTGGTGCTCAACAAAACATC	ATGCCATTCCAGTCAGCTTGCC	102
siwi1	ACTCCCCTGGATCTGCTTGCC	TCCTCCGAGTGTTTTGCTGTGAAC	150
siwi2	GCACACGTCGTTTGAGCGAAAG	ATGTTGGCGTCCGAAGCGAATC	95

1.12 统计分析

数据均采用 SPSS23.0 进行统计分析。治疗前后血糖的比较采用配对样本 t 检验,组间比较采用单因素 ANOVA 检验,结果用($\bar{x} \pm s$)表示,$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血糖比较

治疗后覆盆子原花青素各剂量组血糖显著低于治疗前($P < 0.05$,$P < 0.01$)。模型组血糖较正常组显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗后覆盆子原花青素各剂量组血糖明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2　各组桑蚕血糖比较($\bar{x} \pm s$, mmol · L^{-1}, $n = 10$)

组别	治疗前	治疗后
正常组	4.53 ± 0.60	4.50 ± 1.00
模型组	14.99 ± 2.14	15.30 ± 1.83 *
覆盆子原花青素高剂量组	15.07 ± 3.55	10.62 ± 1.04 *#
覆盆子原花青素中剂量组	16.23 ± 2.68	11.79 ± 1.46 *#
覆盆子原花青素低剂量组	15.46 ± 2.18	12.56 ± 1.51 *#

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，# $P < 0.05$。

2.2　各组血脂指标比较

模型组桑蚕的 TG 水平较正常组家蚕明显升高($P < 0.05$)。治疗后，与模型组比较，覆盆子原花青素中、高剂量组 TG 明显下降($P < 0.05$)。见表 3。

表 3　覆盆子原花青素对各组桑蚕血脂的影响($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n = 10$)

组别	TG
正常组	0.61 ± 0.09
模型组	3.32 ± 0.68 *
覆盆子原花青素高剂量组	1.23 ± 0.71#
覆盆子原花青素中剂量组	1.82 ± 0.18 *#
覆盆子原花青素低剂量组	2.82 ± 0.31 *

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，# $P < 0.05$。

2.3　各组 T、LH、FSH 水平的变化

模型组桑蚕的 LH 和 T 水平较正常组显著下降($P < 0.05$)。覆盆子原花青素各剂量组的 LH 水平较模型组升高($P < 0.05$)，覆盆子原花青素高、中剂量组 T 水平较模型组升高($P < 0.05$)。各组桑蚕的 FSH 无显著性差异($P > 0.05$)。见表 4。

2.4　各组桑蚕睾丸的氧化应激指标的变化

模型组桑蚕的 GSH - Px 和 SOD 水平较正常组显著下降($P < 0.05$)，MDA 水平较正常组升高($P < 0.05$)。覆盆子原花青素各剂量组的 GSH - Px 和 SOD 水平较模型组升高($P < 0.05$)，MDA 水平较模型组下降($P < 0.05$)。见表 5。

表 4　覆盆子原花青素对各组桑蚕 T、LH、FSH 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	FSH/(IU/L)	LH/(mIU/L)	T/(pg/mL)
正常组	2.42 ± 0.29	4.13 ± 0.31	6.91 ± 2.98
模型组	2.82 ± 0.31	0.21 ± 0.10 *	0.28 ± 0.11 *
覆盆子原花青素高剂量组	2.79 ± 0.43	0.91 ± 0.09 *#	2.89 ± 0.83 *#
覆盆子原花青素中剂量组	2.73 ± 0.55	0.64 ± 0.11 *#	0.90 ± 0.46 *#
覆盆子原花青素低剂量组	2.61 ± 0.32	0.38 ± 0.08 *#	0.59 ± 0.29 *

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，# $P < 0.05$。

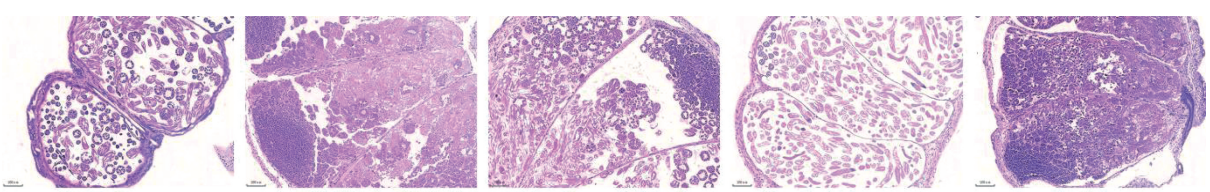
表 5　覆盆子原花青素对各组桑蚕 SOD、GSH - PX、MDA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	SOD/(U/mg)	GSH - Px/(U/mg)	MDA/(mmol/mg)
正常组	66.85 ± 7.93	42.93 ± 4.79	3.25 ± 0.42
模型组	39.27 ± 4.23 *	27.20 ± 4.51 *	5.11 ± 0.65 *
覆盆子原花青素高剂量组	60.58 ± 3.82 *#	39.56 ± 1.72 *#	3.85 ± 0.43 *#
覆盆子原花青素中剂量组	57.32 ± 4.07 *#	35.99 ± 4.55 *#	4.14 ± 0.29 *#
覆盆子原花青素低剂量组	48.95 ± 5.74 *#	31.69 ± 3.25 *#	4.56 ± 0.39 *#

注：与正常组比较，* $P < 0.05$；与模型组比较，# $P < 0.05$。

2.5　各组桑蚕睾丸组织病理学结果

正常组睾丸外膜细胞结构完整，睾丸内可见大量精原细胞，精囊完整，出现精子束。模型组的睾丸发育明显滞后，大量精原细胞坏死、精囊坏死、浆液性纤维样渗出。覆盆子原花青素高剂量组和中剂量组的睾丸病理变化明显小于模型组，而低剂量组的睾丸病理变化略有减轻，见图 1。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 覆盆子原花青素高剂量组；D. 覆盆子原花青素中剂量组；E. 覆盆子原花青素低剂量组。

图 1　各组桑蚕睾丸组织病理变化(HE 染色，×100)

2.6　各组桑蚕 siwi1、siwi2 mRNA 的影响

与正常组相比，模型组 siwi1 和 siwi2 mRNA 水平明显下降($P < 0.05$)。经治疗后，覆盆子原花青素各剂量组 siwi1 和 siwi2 mRNA 水平较模型组明显升高($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 覆盆子原花青素对各组桑蚕 siwi1、siwi2 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	siwi1	siwi2
正常组	1.08 ± 0.31	0.97 ± 0.09
模型组	0.40 ± 0.11 *	0.45 ± 0.09 *
覆盆子原花青素高剂量组	0.86 ± 0.12 *#	0.86 ± 0.05 *#
覆盆子原花青素中剂量组	0.77 ± 0.04 *#	0.78 ± 0.05 *#
覆盆子原花青素低剂量组	0.68 ± 0.08 *#	0.68 ± 0.05 *#

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$。

3 讨论

动物模型在人类疾病研究中发挥着至关重要的作用,研究人员可利用动物模型观察病理生理变化并阐明疾病过程,并用于筛选潜在的药物[12]。由于伦理和监管问题,以及动物实验所需的高成本和专业设施,人们建议用不同的无脊椎动物模型来替代哺乳动物[13-14]。由于蚕的遗传特征和基因组大小,蚕被认为是生命科学中一种有价值的模式生物。蚕有 28 对染色体和大约 4.5 亿个碱基对,其基因组非常庞大,在遗传复杂性方面可与人类相媲美[15]。这表明利用家蚕进行研究和实验进而了解各种生物过程的潜力巨大。此外,蚕的糖代谢功能与哺乳动物的糖代谢功能相似,突出了它们在研究代谢途径和疾病方面的相关性[16]。因此,家蚕被认为是研究糖尿病的潜在模型[11]。MATSUMOTO 等[11]利用蚕成功开发了 2 型糖尿病模型,并利用该模型评估了吡格列酮和二甲双胍的降糖效果。同样,在西班牙进行的一项研究[17]表明,给蚕喂食葡萄糖和饲料的组合会导致血淋巴葡萄糖浓度升高,抑制生长,并成功复制 2 型糖尿病的症状。这些研究说明了将蚕作为 2 型糖尿病模型并研究治疗方案的潜力。然而,目前还缺乏有关糖尿病对雄蚕生殖系统影响的研究。

因此,本研究以高糖饲料喂食桑蚕成功建立了 2 型糖尿病模型,并观察了 2 型糖尿病对雄蚕生殖系统的损害。结果显示,2 型糖尿病桑蚕的血糖、血脂显著升高,LH、T 水平降低,GSH - Px、SOD 水平下降,MDA 水平升高,睾丸组织严重受损,piRNA 信号通路中相关因子的表达水平降低,这些症状与人类 2 型糖尿病生殖损伤相似。实验结果表明,家蚕可能是研究糖尿病生殖损伤的一种有价值的动物模型。

同时,本研究观察了覆盆子原花青素对糖尿病所致生殖系统损伤的修复作用。结果显示,覆盆子原花青素可以降低血糖和血脂,增加 LH 和 T 水平,减轻睾丸氧化应激损伤,减少睾丸的病理损伤,增加 siwi1 和 siwi2 的基因表达水平,从而改善的生殖系统损伤。结果表明,桑蚕糖尿病生殖损伤模型可用于药物的筛选,覆盆子原花青素可能是治疗糖尿病生殖损伤的潜在药物。

糖尿病有多种并发症,可导致对许多系统的损害。男性生殖系统功能障碍是其并发症之一[18]。糖尿病可导致男性内分泌水平(T、FSH 和 LH)的变化。长期高血糖状态,LH 的产生会被抑制,T 的基础分泌也会减少[19]。睾丸 T 水平降低与男性生育率低密切相关[20-24]。T 和 LH 水平的降低会导致精子发育成熟的下降,精子输出能力的下降[25]。本研究发现,模型组的 T 和 LH 水平显著下降,但经覆盆子原花青素处理的桑蚕 T 和 LH 水平得到了恢复。

一些学者认为,高血糖可以通过增加睾丸中的氧化应激水平影响男性的生育能力,SOD 和 GSH - Px 是清除活性氧的重要酶[26]。GSH - Px 有助于减少脂质过氧化,而 SOD 则是清除氧自由基的重要抗氧化酶。在高血糖的情况下,睾丸组织中的活性氧水平升高会导致 SOD 和 GSH - Px 活性降低,同时脂质过氧化反应加剧[26]。抗氧化酶活性的降低会减低抗氧化能力,并使睾丸组织中的 MDA 含量升高,最终导致睾丸损伤[26]。本研究结果显示,模型组桑蚕睾丸中的GSH - Px 和 SOD 水平下降,MDA 水平升高。覆盆子原花青素治疗后,桑蚕睾丸中的 GSH - Px 和 SOD 水平较模型组升高,MDA 水平下降,提示覆盆子原花青素可减轻睾丸的氧化应激损伤。

长期的高血糖还会导致睾丸组织病理损伤[27]。研究发现,高脂血症可导致男性精子细胞计数减少、精子活力下降、精子畸形率增加和生育功能下降[28]。血脂升高是 2 型糖尿病的常见并发症之一[29]。本实验发现,模型组桑蚕的睾丸发育明显滞后,有大量精原细胞坏死、精囊坏死、浆液性纤维样渗出,而覆盆子原花青素高剂量组和中剂量组的睾丸病理变化明显优于模型组;模型组桑蚕的 TG 水平明显高于正常组,经覆盆子原花青素治疗后 TG 水平明显下降。因此,覆盆子原花青素可以通过降低 TG 水平、修复睾丸组织病理损伤来修复糖尿病桑蚕的生殖功能。

在精子发生过程中,非小编码 RNA(sncRNAs)调节生殖细胞中几乎所有的基因表达水平[30]。在生殖细胞中,piRNA 在细胞特异性(主要在生殖细胞中表达)和数量方面都优于其他 sncRNA。piRNA 是一种非编码的小 RNA,专门与 Argonaute 蛋白家族的 PIWI 蛋白结合。与 PIWI 蛋白结合后,形成一个 piRNA 沉默复合物[31-34]。piRNA 通路的异常可导致精子发生障碍,并可能最终导致男性不育。piRNA 通路通过不

同的机制参与精子发生,包括抑制转座子、翻译调控、维持种系干细胞、RNA 降解、基因防御、假基因的产生等。pi - RNA 的发现为生物基因组提供了重要的保护和防御。piRNA 将转座子与特定的蛋白质结合,piRNA 识别转座子,并切割 PIWI 蛋白上的转座子,产生新的反义 piRNA。这些 piRNA 簇包含部分或完整的转座子序列。当转座子跳入 piRNA 簇时,它们启动相应的 piRNA 防御,并根据自己的序列与目标转座子配对以降解它们,进而降低生物体基因组中转座子的跳跃概率。在桑蚕中,piRNA 主要分布在转座子中,可能通过调节转座子的功能在家蚕生殖细胞的发育中发挥作用[35]。基于桑蚕基因组数据库和已知的 PIWI 蛋白亚家族基因,通过同源性搜索检测到两个 PIWI 蛋白基因 siwi1 和 siwi2。siwi1 和 siwi2 在桑蚕睾丸和卵巢中高表达[36]。因此,piRNA 的研究对生殖细胞、生殖功能和基因遗传的研究具有重要意义。本研究发现,模型组桑蚕睾丸中 siwi1 和 siwi2 mRNA 水平显著下降,覆盆子原花青素可以提高桑蚕 siwi1 和 siwi2 mRNA 表达水平。

本研究成功探索了糖尿病桑蚕模型的建立,并观察了糖尿病对雄性生殖系统的损伤以及覆盆子原花青素对糖尿病所致生殖损伤的修复作用。本研究发现覆盆子原花青素在治疗糖尿病致所致生殖损伤中具有很好的潜力,其机制可能与覆盆子原花青素可以降低血糖、降低血脂、增加性激素水平、减轻睾丸氧化应激损伤、减轻睾丸病理损伤、提高 piRNA 信号通路中相关基因的表达相关。

参考文献:

[1] GIRIBABU N, KUMAR K E, REKHA S S, et al. Chlorophytum borivilianum root extract maintains near normal blood glucose, insulin and lipid profile levels and prevents oxidative stress in the pancreas of streptozotocin - induced adult male diabetic rats[J]. Int J Med Sci, 2014, 11(11): 1172 - 1184.

[2] CHEN Y P, JIAO N, JIANG M, et al. Loganin alleviates testicular damage and germ cell apoptosis induced by AGEs upon diabetes mellitus by suppressing the RAGE/p38MAPK/NF - κB pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6083 - 6095.

[3] KOH P O. Streptozotocin - induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes[J]. J Vet Med Sci, 2007, 69(9): 969 - 971.

[4] SOLIMAN G A, SAEEDAN A S, ABDEL - RAHMAN R F, et al. Olive leaves extract attenuates type II diabetes mellitus - induced testicular damage in rats: molecular and biochemical study[J]. Saudi Pharm J, 2019, 27(3): 326 - 340.

[5] ZAFRILLA P, FERRERES F, TOMáS - BARBERáN F A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (Rubus idaeus) Jams[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(8): 3651 - 3655.

[6] 谢欣梅,庞晓斌. 覆盆子提取物对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响及对肝脏保护作用的研究[J]. 中成药, 2013, 35(3): 460 - 465.

[7] COLEMAN S L, SHAW O M. Progress in the understanding of the pathology of allergic asthma and the potential of fruit proanthocyanidins as modulators of airway inflammation[J]. Food Funct, 2017, 8(12): 4315 - 4324.

[8] NIE Y, STüRZENBAUM S R. Proanthocyanidins of natural origin: molecular mechanisms and implications for lipid disorder and aging - associated diseases[J]. Adv Nutr, 2019, 10(3): 464 - 478.

[9] ZHOU Q, HAN X, LI R B, et al. Anti - atherosclerosis of oligomeric proanthocyanidins from Rhodiola rosea on rat model via hypolipemic, antioxidant, anti - inflammatory activities together with regulation of endothelial function[J]. Phytomedicine, 2018, 51: 171 - 180.

[10] KING A J F. The use of animal models in diabetes research[J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(3): 877 - 894.

[11] MATSUMOTO Y, ISHII M, HAYASHI Y, et al. Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10722.

[12] BRITO - CASILLAS Y, MELIÁN C, WÄGNER A M. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models[J]. Endocrinol Nutr, 2016, 63(7): 345 - 353.

[13] DOKE S K, DHAWALE S C. Alternatives to animal testing: a review[J]. Saudi Pharm J, 2015, 23(3): 223 - 229.

[14] KAITO C, MURAKAMI K, IMAI L, et al. Animal infection models using non - mammals[J]. Microbiol Immunol, 2020, 64(9): 585 - 592.

[15] HOU J M, TAN C, CHEN N, et al. Establishment of diabetes mellitus model using Bombyx mori silkworms in a low - temperature environment[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2024, 115(1): e22083.

[16] MATSUMOTO Y, SEKIMIZU K. Evaluation of anti - diabetic drugs by using silkworm, Bombyx mori[J]. Drug Discov Ther, 2016, 10(1): 19 - 23.

[17] AZNAR - CERVANTES S D, MONTEAGUDO SANTESTEBAN B, CENIS JL. Products of sericulture and their hypoglycemic action evaluated by using the silkworm, Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae), as a model[J]. Insects, 2021, 12(12): 1059.

[18] CHEN Y, ZHANG Y, JI H F, et al. Involvement of hypoxia - inducible factor - 1α in the oxidative stress induced by advanced glycation end products in murine Leydig cells[J]. Toxicol In Vitro, 2016, 32: 146 - 153.

[19] IRANMANESH A, LAWSON D, VELDHUIS J D. Glucose ingestion acutely lowers pulsatile LH and basal testosterone secretion in men[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(6): E724 - E730.

[20] FUI M N T, DUPUIS P, GROSSMANN M. Lowered testosterone in male obesity: mechanisms, morbidity and management[J]. Asian J Androl, 2014, 16(2): 223 - 231.

[21] KEBER R, ROZMAN D, HORVAT S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation[J]. J Lipid Res, 2013, 54(1): 20 - 33.

[22] FAROOQ R, LUTFULLAH S, AHMED M. Serum leptin levels in obese infertile men and women[J]. Pak J Pharm Sci, 2014, 27(1): 67 - 71.

[23] CUNNINGHAM M J, CLIFTON D K, STEINER R A. Leptin's actions

on the reproductive axis: perspectives and mechanisms[J]. Biol Reprod, 1999, 60(2): 216 – 222.
[24] KIM C Y, KIM K H. Curcumin prevents leptin – induced tight junction dysfunction in intestinal Caco – 2 BBe cells[J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(1): 26 – 35.
[25] SCHOELLER E L, SCHON S, MOLEY K H. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(3): 839 – 847.
[26] EL – MISSIRY M A. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats[J]. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1999, 124(3): 233 – 237.
[27] TANGVARASITTICHAI S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus[J]. World J Diabetes, 2015, 6(3): 456 – 480.
[28] SHALABY M A, EL – ZORBA H Y, KAMEL G M. Effect of alpha – tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats[J]. Pharmacol Res, 2004, 50(2): 137 – 142.
[29] LIU J L, TIAN S Q, XIN C, et al. The identification of anthocyanins from Padus racemosa and its protective effects on H2O2 – induced INS – 1 cells damage and STZ – induced diabetes mice[J]. Chem Biodivers, 2020, 17(11): e2000382.
[30] LUO L F, HOU C C, YANG W X. Small non – coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis[J]. Gene, 2016, 578(2): 141 – 157.
[31] GIRARD A, SACHIDANANDAM R, HANNON G J, et al. A germline – specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins[J]. Nature, 2006, 442(7099): 199 – 202.
[32] WATANABE T, TAKEDA A, TSUKIYAMA T, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon – derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes[J]. Genes Dev, 2006, 20(13): 1732 – 1743.
[33] GRIVNA S T, BEYRET E, WANG Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells[J]. Genes Dev, 2006, 20(13): 1709 – 1714.
[34] ARAVIN A, GAIDATZIS D, PFEFFER S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes[J]. Nature, 2006, 442(7099): 203 – 207.
[35] 蔡亦梅. 利用 SOLiD 测序技术鉴定和分析家蚕的非编码小 RNA[D]. 北京: 中国科学院北京基因组研究所, 2011.
[36] SUN M, ZHU T T, TONG J Z, et al. Screening active components from Rubus amabilis for pancreatic β – cells protection[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 674 – 685.

Reparative Effect of Raspberry Proanthocyanidins on Reproductive Damage in Male Diabetic Silkworms

ZENG Xiaoyan[1,2,3], TONG Li[1,2]

(1. *Qinghai University*, *Xining* 810099, *China*; 2. *Qinghai Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research for Glucolipid Metabolic Diseases*, *Xining* 810099, *China*; 3. *Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital*, *Enshi* 445000, *China*)

Abstract Objective: To investigate the reparative effect of raspberry proanthocyanidins on reproductive damage in male diabetic silkworms. Methods: Silkworms in the experimental group were fed a high – glucose diet containing 10% glucose for 18 hours to establish a type 2 diabetes model. The diabetic silkworms were randomly divided into a model group, and high – dose (50 μL), medium – dose (25 μL), and low – dose raspberry proanthocyanidins (12.5 μL) groups. The levels of testosterone (T), luteinizing hormone (LH), and follicle – stimulating hormone (FSH) in the hemolymph were measured; triglyceride (TG) levels in the fat body were determined; superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH – Px) levels in the testicular tissue were measured; pathological damage to testicular tissue was observed via HE staining; and the expression levels of siwi1 and siwi2 genes in the PiRNA signaling pathway were analyzed using RT – PCR. Results: Compared to the model group, all raspberry proanthocyanidin doses led to a reduction in blood glucose levels ($P < 0.05$) and an increase in LH levels ($P < 0.05$), with high – and medium – dose groups also showing increased T levels ($P < 0.05$). The levels of GSH – Px and SOD were elevated ($P < 0.05$), while MDA levels were decreased ($P < 0.05$) in all raspberry proanthocyanidin groups. Testicular pathological damage was alleviated, and mRNA levels of siwi1 and siwi2 were increased ($P < 0.05$) in all raspberry proanthocyanidin groups. Conclusion: Raspberry proanthocyanidins can improve male reproductive damage caused by diabetes by lowering blood glucose and lipid levels, increasing LH and T levels, reducing oxidative stress in the testes, alleviating testicular pathological damage, and enhancing the expression of related genes in the PiRNA signaling pathway.

Key words Raspberry proanthocyanidins; Diabetic silkworms; Reproductive damage; Repair action