

高脂环境下雄激素缺乏对小型猪内脏脂肪蓄积和炎症基因表达的影响

蔡兆伟, 凌云, 蔡月琴, 朱科燕, 陈诚

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨高脂环境下雄激素缺乏对小型猪内脏脂肪沉积、血清激素以及炎症相关基因表达的影响。**方法** 将性成熟的雄性五指山小型猪随机分成三组, 即不去势组 (SHAM), 去势组 (CAS) 和去势加睾酮组 (CAS + T), 每组 6 只, 所有动物均饲喂高脂饲料。12 周实验结束时, 采血检测血清激素水平变化, 分离内脏脂肪并进行称重, 采用荧光定量 PCR 技术检测脂肪合成与脂肪分解基因以及炎症相关基因的表达。**结果** (1) 去势显著减少高脂饮食小型猪血清睾酮含量但增加其血清瘦素含量, 给予外源性睾酮处理能够恢复去势小型猪血清睾酮和瘦素水平; (2) 去势导致高脂饮食小型猪内脏脂肪大量沉积, 给予睾酮处理后, 去势小型猪内脏脂肪含量显著降低; (3) 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪内脏脂肪组织 FAS、ACC、HSL 和 ATGL 等脂肪代谢基因的表达没有显著影响; (4) 去势显著上调高脂饮食小型猪内脏脂肪组织 Leptin、CD68、CCL16、CCL23 和 SAA 等炎症基因的表达, 采用外源性睾酮处理去势小型猪则能降低上述基因的表达。**结论** 去势诱导的雄激素缺乏促进高脂饮食小型猪内脏脂肪沉积, 并上调其内脏脂肪组织中炎症基因的表达, 采用睾酮处理则能够改善去势小型猪内脏脂肪蓄积和炎症反应。

【关键词】 雄激素; 小型猪; 肥胖; 脂肪沉积; 炎症基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 01-0074-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.01.014

Effects of androgen deficiency on visceral fat accumulation and inflammatory gene expression in miniature pigs fed a high-fat diet

CAI Zhao-wei*, LING Yun, CAI Yue-qin, ZHU Ke-yan, CHEN Cheng

(Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Center,
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to explore the effect of androgen deficiency on serum hormone levels, visceral fat accumulation and inflammatory gene expression in miniature pigs fed a high-fat diet (HFD). **Methods** Sexually mature male Chinese Wuzhishan miniature pigs were divided into three groups (animals/group) as follows: intact male pigs (SHAM), castrated male pigs (CAS) and castrated male pigs plus testosterone treatment (CAS + T). The pigs were fed a HFD diet for 12 weeks. Serum levels of testosterone and leptin were measured and visceral fat were dissected and weighted. qRT-PCR was performed to determine the mRNA expression levels of lipogenic, lipolysis and inflammation related genes. **Results** (1) Serum testosterone levels were significantly decreased but serum leptin levels were significantly increased in the castrated pigs. These effects were recovered after testosterone treatment. (2) Visceral fat percentage was significantly increased in the castrated pigs, and testosterone treatment reduced the increased visceral fat in the castrated

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究(实验动物)计划项目(编号:2014C37010); 国家自然科学基金项目(编号:31200921)。

[通讯作者] 蔡兆伟(1983-), 男, 副研究员, 研究方向为动物分子遗传。E-mail: czw1234@163.com

pigs. (3) Castration and testosterone treatment had no significant effects on the expression levels of lipogenic genes (FAS and ACC) and lipolysis genes (HSL and ATGL) in pigs fed a HFD. (5) Castration significantly induced the expressions of inflammatory genes including Leptin, CD68, CCL16, CCL23 and SAA, and testosterone treatment recovered the expressions of the above genes in the castrated pigs. **Conclusions** Castration-induced testosterone deficiency promotes visceral fat accumulation and upregulates the expression levels of inflammatory genes in miniature pigs fed a HFD. Moreover, testosterone treatment ameliorates castration-induced visceral fat accumulation and inflammatory response in HFD-fed pigs.

[Key words] Testosterone; Miniature pigs; Obesity; Fat accumulation; Inflammatory gene

Corresponding author: CAI Zhao-wei, E-mail: czw1234@163.com

近年来,随着人口老龄化和生活方式的转变,肥胖等慢性代谢性疾病的发病率急剧攀升,已成为严重威胁人类健康的社会问题。流行病学资料显示,中老年男性体内的雄激素水平随增龄而逐渐降低,体内的脂肪含量则显著增加^[1]。动物实验表明,睾酮剥夺能够增加小鼠体内脂肪堆积,引起肥胖^[2]。我们前期试验也发现,去势能够促进饲喂普通饲料的猪脂肪沉积和肥胖发生^[3]。这些结论提示,肥胖与雄激素水平下降之间存在着密切的关系。最近研究发现,高脂饮食(尤其是日粮胆固醇摄入增加)也是引发肥胖的重要风险因素,如高胆固醇饮食诱导猴和小鼠内脏脂肪组织炎症反应和脂肪细胞肥大并导致肥胖^[4,5]。尽管雄激素缺乏和高脂饮食均是够诱导脂肪沉积和肥胖的独立危险因素,但雄激素缺乏对高脂环境下内脏脂肪沉积和肥胖的影响目前却仍不清楚。

本研究通过建立雄激素缺乏调控高脂饮食小型猪肥胖的动物模型,观察高脂诱导环境下去势和睾酮处理对小型猪内脏脂肪沉积的影响,并进一步探讨脂肪合成、脂肪分解以及炎症相关基因在雄激素缺乏调控内脏脂肪沉积中的作用,旨在为老年性雄激素缺乏引起的肥胖提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

普通级雄性五指山小型猪 18 只,体重(11.72 ± 0.38)kg,6~7 月龄,购自广东大华农动物保健品股份有限公司[SCXK(粤)2013-0022],饲养在浙江中医药大学动物实验研究中心[SYXK(浙)2013-0183],并按实验动物 3R 原则给予人道的关怀。小型猪按体重随机分成 3 组:不去势组(SHAM)、去势组(CAS)和去势+睾酮组(CAS+T),每组 6 只。手

术去势在无菌和麻醉环境下进行,将小型猪阴囊处切口后将睾丸去除,不去势组小型猪在阴囊处进行切口但不去除睾丸(伪手术组),去势+睾酮组小型猪是小型猪去势后随后注射丙酸睾酮注射液(10 mg/kg 体重)。三组动物均饲喂高脂高胆固醇饲料(高脂饲料配方:1.5% 胆固醇、10% 蛋黄粉、0.5% 食盐、15% 起酥油、73% 基础饲料),自由饮水,实验周期为 12 周。实验动物及分组见我们前期发表文献^[6]。

1.2 脂肪样本采集和称重

所有实验动物在 12 周时处死,处死前进行空腹称重。迅速采集内脏脂肪组织样本,置入液氮中速冻,随后保存在 -80°C 备用。分离小型猪内脏脂肪并称重,计算内脏脂肪率:内脏脂肪重(kg)/体重(kg) $\times 100\%$ 。

1.3 血清激素检测

12 周实验结束后,禁食 12 h,取血并分离血清,采用 ELISA 试剂盒检测血清中睾酮(T)和瘦素(leptin)含量,实验严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 RNA 提取及荧光定量 PCR 检测

采用 RNeasy Mini Kit(Qiagen 公司)提取脂肪组织总 RNA,具体操作步骤参照说明书进行。提取 RNA 的浓度和纯度用 Nano 2000 微量核酸测定仪检测,合格后备用。每个样品取 1 μg 总 RNA,采用 TaKaRa 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。根据 NCBI 数据库中对应的 mRNA 序列,采用 Oligo 6 软件设计引物,引物由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成(表 1)。所有荧光定量 PCR 反应在美国伯乐 IQ-5 荧光定量 PCR 仪上进行,每个样品的 PCR 反应重复 3 次,并根据溶解曲线判断产物特异性。目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers used for real-time RT-PCR

基因名称 Gene names	序列号 Accession number	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
脂肪酸合成酶(FAS)	EF589048.1	GGTGTGAGCAGTTCTGATG	GAAGTCAAAGAAGAAGGAGAC
乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)	EF618729	ATGTTTCGGCAGTCCCTGAT	TGTGGACCAGCTGACCTTGA
激素敏感酯酶(HSL)	NM_214315.1	GCTCCCATCGTCAAGAATC	TAAAGCGAATGCGGTCC
脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)	EF583921	AGTTACAGCCTGCGCAACCTC	AGGGCACCATCATGGCTG
瘦素(Leptin)	NM_213840	GTGACATTTACACATGCAGTC	AGACTGGTGAGGATCTGTTGGT
肿瘤坏死因子 α(TNF-α)	JF831365.1	CTCTTCTGCCCTACTGCACTTCG	GATGATCTGAGTCCCTTGGGC
CD68 分子(CD68)	NM_001291776.1	GGGTGCGGTTGTCTCAGTTA	GGTTCGTGTCCCTACCAGC
CC 类趋化因子配体 16(CCL16)	XM_003131714.4	CACCTGCTGCCTGACGTAT	TGGTGATGAAGATGATTGCTG
CC 类趋化因子配体 23(CCL23)	XM_013989952.1	CTGTCTCATGGAGGCTTTCAC	GGAGCACTCACTGGTCGTTAG
重组人血清淀粉样蛋白 A(SAA)	DQ367410	CTATGATGCTGCCCAAAGG	CACGAGGTCTGAAGTGGTTG
β-肌动蛋白(β-actin)	XM_003357928.2	TCTGGCATCACACTTCTACA	GAGTCATCTTCTCACGGTTGG

1.5 数据统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据均以平均数 ± 标准误表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较用 Tukey 方法进行处理,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

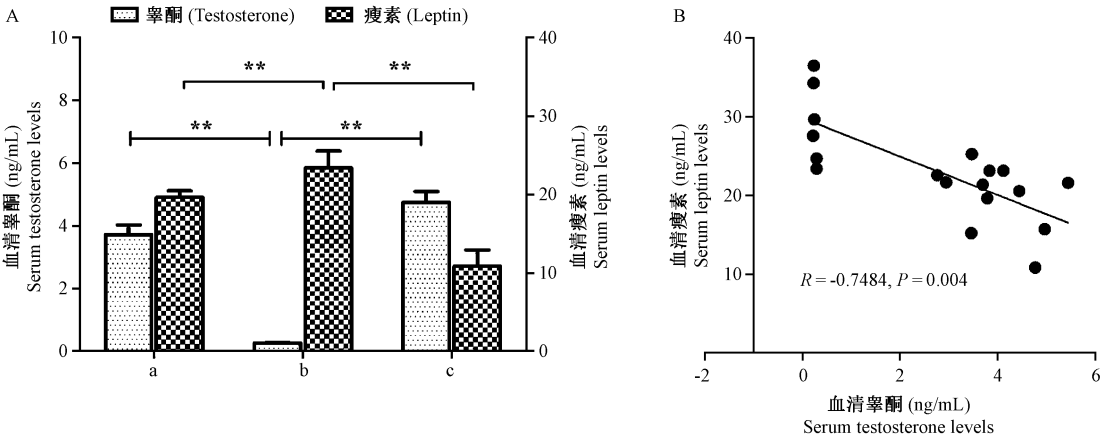
2.1 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪血清激素水平的影响

去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪血清 T 和 leptin 水平的影响见图 1。由图可见,小型猪去势后,血清 T 水平显著降低,而血清 leptin 水平显著升高($P < 0.01$),并且采用外源性 T 处理能够恢复去

势小型猪血清 T 和 leptin 水平。另外,相关性分析结果显示,小型猪血清 T 水平和血清 leptin 水平呈显著负相关($P < 0.01$) (图 1B)。

2.2 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪内脏脂肪沉积的影响

去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪内脏脂肪沉积的影响见图 2。高脂饮食环境下去势和睾酮处理对小型猪体重没有显著影响(图 2A),但显著影响小型猪内脏脂肪含量。如图 2 所示,去势小型猪内脏脂肪率极显著高于不去势小型猪($P < 0.01$),并且睾酮处理后能减少去势小型猪增加的内脏脂肪含量($P < 0.01$) (图 2B)。



注:A:血清睾酮和瘦素水平。a: 不去势;b: 去势;c: 去势 + 睾酮。B:血清睾酮和血清瘦素相关性。** $P < 0.01$ 。

图 1 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪血清睾酮和瘦素水平的影响

Note. A: Serum testosterone and leptin levels. a: Sham-operated(SHAM) group; b: Castration(CAS) group;

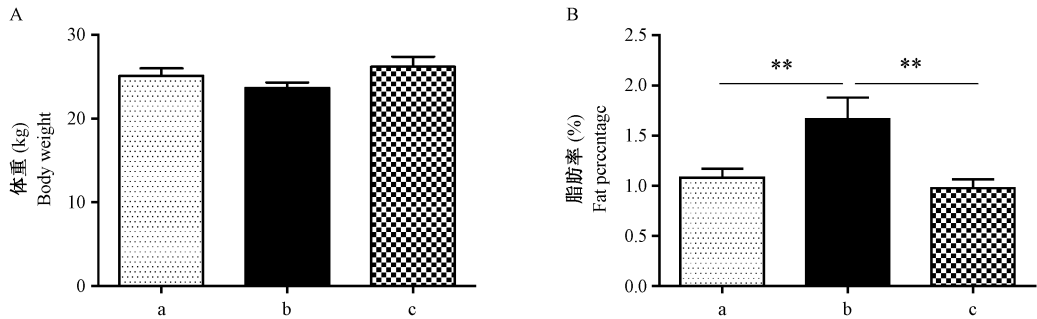
c: Castration plus testosterone treatment(CAS + T). B: Correlation between serum testosterone and leptin levels. ** $P < 0.01$.

Fig.1 Effects of castration and testosterone replacement on serum testosterone and leptin levels in the miniature pigs fed a high-fat diet

2.3 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪内脏脂肪组织基因表达的影响

去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪内脏脂肪组织基因表达的影响见图 3。由图可见,去势和睾酮处理对高脂诱导的小型猪内脏脂肪组织脂肪酸合成

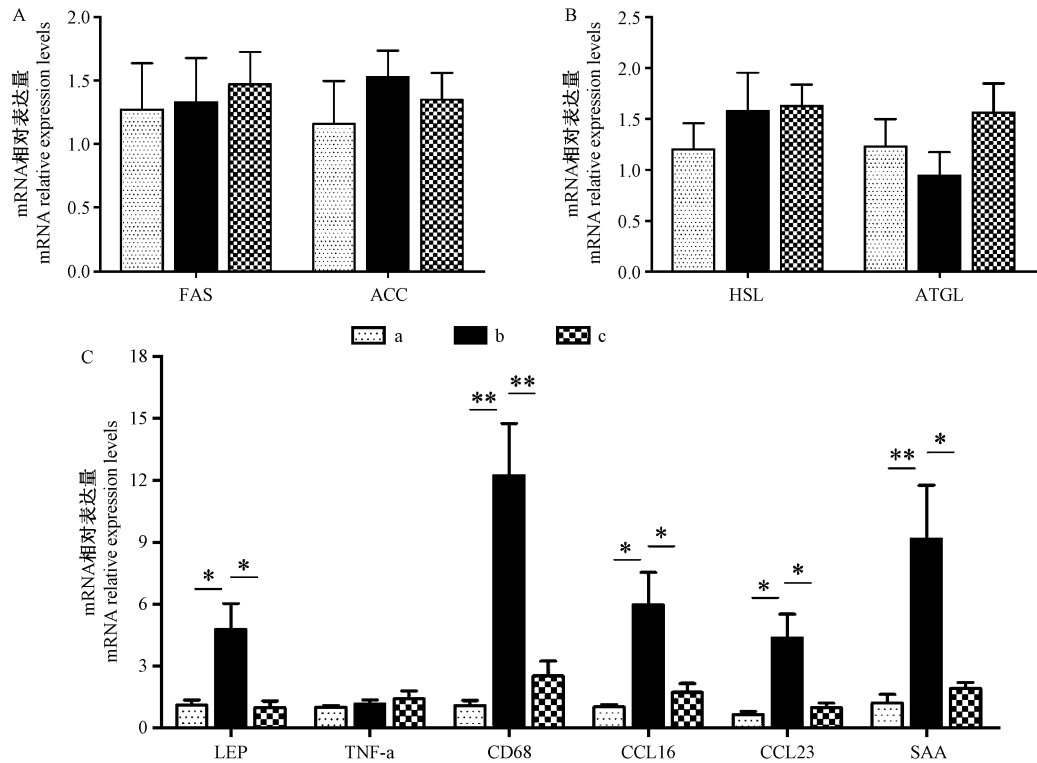
酶(FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、激素敏感酯酶(HSL)和脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)等脂肪代谢基因的表达没有明显影响($P > 0.05$) (图 3A 和 3B)。雄激素缺乏显著影响高脂诱导小型猪内脏脂肪组织炎症相关基因的表达。与不去势小型猪相



注:A;体重。a: 不去势; b: 去势; c: 去势 + 睾酮; B;脂肪率。** $P < 0.01$ 。
图 2 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪内脏脂肪沉积的影响

Note. A: Body weight; a: Sham-operated(SHAM) group; b: Castration(CAS) group; c: Castration Plus testosterone treatment(CAS + T) group.
B: Visceral fat percentage. ** $P < 0.01$.

Fig.2 Effects of castration and testosterone treatment on serum lipid levels in the miniature pigs fed a high-fat diet



注:A;脂肪合成基因。a: 不去势;b: 去势;c: 去势 + 睾酮;B;脂肪分解基因;C;炎症基因。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 高脂状态下去势和睾酮处理对小型猪内脏脂肪组织基因表达的影响

Note. A: Lipogenic genes; a: Sham-operated(SHAM) group; b: Castration(CAS) group; c: Castration plus testosterone treatment(CAS + T) group. B: Lipolysis genes; C: Inflammatory genes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig.3 Effects of castration and testosterone treatment on gene expression in visceral adipose tissue in the miniature pigs fed a high-fat diet

比,去势小型猪脂肪组织中 leptin、CD68 分子(CD68)、CC 类趋化因子配体 16(CCL16)、CC 类趋化因子配体 23(CCL23)和重组人血清淀粉样蛋白 A(SAA)基因的表达均显著升高,采用睾酮处理则下调去势小型猪内脏脂肪组织上述基因的表达($P < 0.05$)。另外,去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪内脏脂肪组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因的表达没有显著影响($P > 0.05$)(图 3C)。

3 讨论

大量研究表明,老年男性随着年龄增长,体内的雄激素水平不断降低,易患肥胖等代谢紊乱疾病的风险^[1]。目前认为,高脂饮食尤其是胆固醇摄入增加也是诱导脂肪沉积并引发肥胖的重要风险因素^[4-5]。但迄今为止,雄激素缺乏对高脂饮食环境下肥胖的影响却并不清楚。本研究以小型猪为动物模型,分析了高脂状态下去势和补充睾酮对内脏脂肪沉积的影响。结果发现,去势诱导的雄激素缺乏促进高脂饮食小型猪内脏脂肪大量沉积,给予外源性睾酮处理则减少去势小型猪增加的内脏脂肪含量。这和最近发表的一项小鼠上的研究相似,Dubois 等^[7]研究发现,性腺去除结合高脂饮食能够加速小鼠腹部脂肪沉积和胰岛素抵抗。

研究已证实,脂肪组织(尤其是内脏脂肪组织)作为一种重要的内分泌器官,能够分泌多种脂肪因子和炎症因子^[8]。Leptin 是最早发现的由白色脂肪组织合成和分泌的一种脂肪因子,我们发现去势不仅增加高脂饮食小型猪血清 leptin 含量,还上调其内脏脂肪组织 leptin 基因的表达,并且补充睾酮能降低去势小型猪血清 leptin 水平和脂肪组织 leptin 表达。研究表明,血清 leptin 含量与体内脂肪含量成正比;当脂肪含量增加时,脂肪组织 leptin 分泌会增多^[8]。所以,去势小型猪内脏脂肪组织 leptin 表达升高可能和其具有较高的内脏脂肪含量有关。SAA 是一种新的促炎脂肪因子,它可以诱导趋化多种免疫细胞产生促炎性因子,在肥胖和胰岛素抵抗的形成中起着重要作用^[9]。我们发现,去势小型猪内脏脂肪组织 SAA 表达显著高于不去势和去势加睾酮处理组小型猪。de Oliveira 等^[10]研究表明,高脂诱导的肥胖小鼠内脏脂肪组织 SAA 表达升高,而 SAA 敲除能够抵抗高脂诱导的小鼠肥胖并减少其脂肪组织巨噬细胞浸润,这和本文中去势小型猪内脏脂肪 SAA 表达升高的结果相似。我们还发现,去

势上调高脂饮食小型猪内脏脂肪组织中趋化因子 CCL16 和 CCL23 基因的表达。Starr 等^[11]研究表明,肥胖状态下,脂肪细胞分泌的趋化因子活化和吸引各种炎性细胞进入脂肪组织,造成脂肪组织的慢性低度炎症,这和本文的研究结果相一致。近年来发现,肥胖个体的脂肪组织巨噬细胞的浸润显著增加,并有研究表明脂肪组织的炎性反应因子许多是由浸润的巨噬细胞分泌^[12]。本实验发现,去势能够增加高脂饮食小型猪内脏脂肪组织巨噬细胞特异性的标志物 CD68 的表达,提示雄激素缺乏诱导的内脏脂肪组织慢性低度炎症可能与脂肪组织中过多的巨噬细胞浸润有关。上述研究结果表明,雄激素缺乏能够诱导高脂饮食小型猪内脏脂肪组织促炎因子的表达升高,导致慢性炎症的发生。

脂肪组织沉积是脂肪合成代谢和分解代谢的一种平衡状态,当合成代谢增强或分解代谢减弱时会导致脂肪沉积增加^[3]。我们分析了去势和补充睾酮对高脂饮食小型猪内脏脂肪组织脂肪合成(FAS 和 ACC)和分解(HSL 和 ATGL)代谢相关基因表达的变化,结果发现,去势和睾酮处理对内脏脂肪组织脂肪合成与代谢的基因表达均没有显著影响,表明高脂饮食状态下雄激素缺乏诱导的内脏脂肪堆积可能不是由脂肪代谢基因改变引起的。

综上所述,雄激素缺乏能够加速高脂饮食诱导的小型猪内脏脂肪蓄积和肥胖。虽然雄激素缺乏不影响高脂饮食小型猪内脏脂肪组织脂肪合成与分解代谢基因的表达,但显著增加其炎症基因表达。另外,补充外源性睾酮能够降低高脂饮食小型猪内脏脂肪组织炎症基因的表达,改善雄激素缺乏诱导的内脏脂肪蓄积和肥胖。

参 考 文 献

- [1] Tsai EC, Boyko EJ, Leonetti DL, et al. Low serum testosterone level as a predictor of increased visceral fat in Japanese-American men [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, 24(4): 485 - 491.
- [2] Movérare-Skrtic S, Venken K, Andersson N, et al. Dihydrotestosterone treatment results in obesity and altered lipid metabolism in orchidectomized mice [J]. *Obesity*, 2006, 14(4): 662 - 672.
- [3] Cai Z, Zhang L, Chen M, et al. Castration-induced changes in microRNA expression profiles in subcutaneous adipose tissue of male pigs [J]. *J Appl Genet*, 2014, 55(2): 259 - 266.
- [4] Subramanian S, Han C Y, Chiba T, et al. Dietary cholesterol

- gramms [J]. *Nature*, 2007, 446(7138): 882–887.
- [4] Zhang R, Xue GZ, Wang SD, et al. Novel object recognition as a facile behavior test for evaluating drug effects in a PP/PS1 Alzheimer's disease mouse model [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2012, 31(4): 801–812.
- [5] Sun GQ, Alzayady K, Stewart R, et al. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(8): 1997–2005.
- [6] 薛涛, 邬丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3): 321–326.
- [7] 丁艳平, 邵宝平, 董辉, 等. 胎次、性别对成年小鼠海马区齿状回神经发生及学习记忆的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(3): 7–11.
- [8] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941–953.
- [9] 张武文, 李逸平. 组蛋白甲基化修饰酶与早期胚胎发育 [J]. *生命科学*, 2012, 24(7): 653–659.
- [10] Sakane N, Kwon HS, Pagans S, et al. Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1) [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8): e1002184.
- [11] 张洁. LSD1 对斑马鱼发育的影响及其机制的初步研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [12] Jarome TJ, Lubin FD. Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior [J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(4): 375–387.

[收稿日期] 2016–05–18

(上接第 78 页)

- worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(4): 685–691.
- [5] Chung S, Cuffe H, Marshall SM, et al. Dietary cholesterol promotes adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation in visceral, but not subcutaneous fat in monkeys [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9): 1880–1887.
- [6] 蔡兆伟, 潘永明, 陈亮, 等. 睾酮缺乏对高脂饮食小型猪血脂和肝内脂质沉积的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(1): 40–44.
- [7] Dubois V, Laurent MR, Jardi F, et al. Androgen deficiency exacerbates high-fat diet-induced metabolic alterations in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 157(2): 648–665.
- [8] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2548–2556.
- [9] 朱大龙, 童国玉. 血清淀粉样蛋白 A-联系肥胖及其代谢合并症的促炎性脂肪细胞因子 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2006, 26(3): 205–206.
- [10] de Oliveira EM, Ascar TP, Silva J C, et al. Serum amyloid A links endotoxaemia to weight gain and insulin resistance in mice [J]. *Diabetologia*, 2016; 59(8): 1–9.
- [11] Starr AE, Dufour A, Maier J, et al. Biochemical analysis of matrix metalloproteinase activation of chemokines CCL15 and CCL23 and increased glycosaminoglycan binding of CCL16 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5848–5860.
- [12] Kang YE, Kim JM, Joung KH, et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154003.

[收稿日期] 2016–06–23