

睾酮缺乏对高脂饮食小型猪血脂和肝内脂质沉积的影响

蔡兆伟, 潘永明, 陈亮, 朱科燕, 陈方明, 蔡月琴, 徐孝平, 陈民利

(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** 探讨睾酮缺乏对高脂饮食小型猪血脂水平和肝脏脂质沉积的影响。**方法** 取6~7月龄性成熟后的雄性五指山小型猪18只按体重随机分成三组,即不去势组,去势组和去势加睾酮处理组,每组6只。三组动物均采用高脂饲料饲喂12周,每周测定动物体重。采血检测血清睾酮、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平变化。12周后动物处死,采集肝组织,检测肝脏TG和TC含量。肝组织标本石蜡包埋切片后进行苏木素-伊红染色,观察肝脏病理变化。**结果** (1)高脂饮食诱导后,三组小型猪体重均呈线性增长趋势,不去势和去势加睾酮处理组小型猪的体重略高于去势组小型猪,但三者差异不显著;(2)去势小型猪血清睾酮含量显著减少,但给予外源性睾酮后,睾酮水平恢复;(3)去势显著增加高脂饮食小型猪血清TC,LDL-C和TG水平,但对血清HDL-C水平没有显著影响。睾酮处理后,血清TG,TC和LDL-C水平均显著降低;(4)去势组小型猪肝脏TG和TC含量均显著高于不去势组小型猪,睾酮处理后TG和TC含量显著减少;(5)与不去势组小型猪相比,去势组小型猪肝细胞脂肪变性程度增加,睾酮处理后,去势小型猪肝脂肪变性程度明显减轻。**结论** 睾酮缺乏加剧高脂饮食诱导小型猪的血脂代谢紊乱,增加肝脏脂质沉积。

【关键词】 睾酮;小型猪;动脉粥样硬化;高胆固醇血症

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0040-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.007

Effects of testosterone deficiency on serum lipid levels and hepatic lipid accumulation in miniature pigs fed a high-fat diet

CAI Zhao-wei, PAN Yong-ming, CHEN Liang, ZHU Ke-yan, CHEN Fang-ming, CAI Yue-qin, XU Xiao-ping, CHEN Min-li
(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 testosterone deficiency on serum lipid levels and hepatic lipid accumulation in miniature pigs fed a high-fat diet (HFD). **Methods** Eighteen sexually mature male Chinese Wuzhishan miniature pigs (6~7 months old) were used in this study. The pigs were divided in three groups (n = 6 animals/group) as follows: intact male pigs, castrated male pigs and castrated male pigs with testosterone replacement. They were fed a HFD diet for 12 weeks and body weights were recorded weekly. Serum levels of testosterone, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG) were measured. Hepatic TG and TC levels were also determined, and liver tissues were embedded in

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31200921);浙江省自然科学基金项目(LQ12C04003);浙江省公益性技术应用研究(实验动物)计划项目(2014C37010)。

【作者简介】 蔡兆伟(1983-),男,助理研究员,研究方向为动物分子遗传。E-mail: czw1234@163.com。

【通讯作者】 陈民利(1963-),女,教授,研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: cml991@126.com。

paraffin and stained with hematoxylin and eosin (H&E). **Results** (1) The body weights of pigs in each group were found to be linearly elevated over time. Though castrated pigs gained less weight than did pigs in the other groups, no significant differences were found between them. (2) Castration caused a significant decrease in serum testosterone levels in pigs. This effect was recovered by testosterone treatment. (3) Serum levels of TC, LDL-C and TG were significantly increased in castrated pigs. However, castration had no significant effect on serum HDL-C levels. Testosterone treatment reduced the increased serum lipids in castrated pigs. (4) Hepatic TG and TC contents in castrated pigs were also significantly higher than those in other groups of pigs. Testosterone treatment reduced the increased hepatic lipids in castrated pigs. (5) Compared with other groups of pigs, castrated pigs showed increased steatosis. However, testosterone treatment attenuated hepatic steatosis in castrated pigs. **Conclusion** Testosterone deficiency caused severe dyslipidemia, and increased hepatic lipid accumulation in miniature pigs fed a high-fat diet.

【Key words】 Testosterone; Miniature pigs; Atherosclerosis; Hypercholesterolemia

近年来研究表明,雄激素(主要是睾酮)缺乏加速男性动脉粥样硬化形成^[1-4],但具体影响机制尚不完全清楚。血脂异常,尤其是血胆固醇水平升高是动脉粥样硬化的主要发病因素^[3]。流行病学研究显示,男性随着年龄的增加,体内睾酮水平逐渐降低,而血浆 TC、LDL-C 和 TG 水平显著升高^[2,4],提示内源性睾酮缺乏会引起血脂代谢紊乱,可能影响动脉粥样硬化的形成。猪的心血管系统在解剖结构、生理功能方面与人类极为相似,尤其是脂蛋白结构与组成、脂质代谢机制与人类最为接近,是研究脂代谢和动脉粥样硬化的理想模式动物^[5]。尽管目前睾酮影响血脂代谢的研究较多,但以猪为模型的有关睾酮调节高脂饮食诱导的血脂代谢紊乱的研究还未见报道。

本研究通过建立睾酮调控高脂饮食小型猪血脂代谢的动物模型,分析去势和睾酮处理对高脂饮食诱导的小型猪血脂水平以及肝脏脂质沉积的影响,旨在为今后防治雄激素缺乏引起的男性动脉粥样硬化等心血管疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~7 月龄性成熟后的雄性五指山小型猪 18 只,体重为 10~12 kg,来源于广东大华动物保健品股份有限公司提供【SCXK(粤)2008-0022】,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通级小型猪实验室【SYXK(浙)2013-0183】,环境温度:22±1℃,相对湿度:40%~65%,自由饮水,12h/12h 明暗交替。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 仪器与试剂

日立 7020 型全自动生化仪(日本日立公司); Nikon eclipse 80i 倒置显微镜(日本 Nikon 公司); 自动染色机(德国 Leica 公司);丙酸睾酮注射液(50

mg/mL)购自上海通用药业股份有限公司;总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)试剂盒购自上海申能德赛诊断技术有限公司;蛋白定量检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;猪睾酮 ELISA 试剂盒购自上海拜沃生物科技有限公司。

1.3 动物分组及高脂饮食诱导

小型猪适应性恢复 4 周后,按体重随机分成三组,即非去势组,去势组,去势加睾酮处理组,每组 6 只。小型猪去势之前,颈静脉采血检测性激素和血脂代谢情况是否正常。去势手术在无菌环境下进行,肌肉注射镇静剂(氯胺酮:2.5 mg/kg)以后,在麻醉(异氟烷:1.5%~2.0%)状态下,将小型猪阴囊处切口后将睾丸去除;非去势组小型猪进行伪去势处理,即将阴囊处进行切口,但不去除睾丸^[6]。为了避免雄激素影响的中断,去势睾酮处理组小型猪将小型猪去势以后,随后注射丙酸睾酮注射液(上海通用药业股份有限公司,10 mg/kg 体重),具体方法参照文献^[7]。手术一周后,三组动物均采用高脂饲料饲喂 12 周,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。高脂饲料中主要营养成分百分比:蛋白质 15.86%,碳水化合物 40.82%,脂肪 25.12%;每克饲料含热量 4.45 kcal。

1.4 血清睾酮和血脂指标检测

分别在实验前 0 周和实验后 4、8、12 周时,禁食 12 h 后,取颈静脉血 5 mL,3000 r/min 离心 15 min,分离血清。采用 ELISA 试剂盒检测 12 周小型猪血清中睾酮含量;采用全自动生化分析仪酶联免疫法检测血清中血脂指标包括总胆固醇(TC)、低高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平变化,具体方法按照试剂盒的操作说明使用(上海申能德赛诊断技术有限公司)。

1.5 肝脏组织甘油三酯和胆固醇含量测定

称取 500 mg 左右肝脏组织,加入 9 倍体积的预冷生理盐水,置于玻璃匀浆管中充分研磨制成匀浆液,匀浆后在 4℃ 条件下 3000 r/min 离心 10 min,取上清液测定肝脏中 TG 和 TC 含量,具体方法按照试剂盒检测说明书使用(上海申能德赛诊断技术有限公司)。肝脏蛋白含量采用 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定,具体步骤参照说明书进行(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.6 肝脏组织病理学观察

取小型猪肝脏组织置于 10% 中性甲醛溶液固定后,常规脱水石蜡包埋后,切片进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色和中性树胶封固,光学显微镜下观察组织病理学改变。

1.7 数据统计分析

所有数据均用平均数 ± 标准误表示,并采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析(One way-ANOVA)分析,组间多重比较采用 Tukey 方法进行分析,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪体重和血清睾酮含量的影响

去势和睾酮处理对高脂饮食诱导的小型猪体重和血清睾酮水平的影响见图 1。三组小型猪饲喂高脂饲料后,体重均呈线性增长趋势。去势组小型猪体重增长速度慢于不去势和去势加睾酮处理组小型猪,但三组小型猪体重之间差异不显著($P > 0.05$)(图 1A)。由图可见,小型猪去势后,血清睾酮水平显著降低($P < 0.01$),采用外源性睾酮处理

后,血清睾酮水平则显著升高($P < 0.01$)(图 1B)。

2.2 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪血脂水平的影响

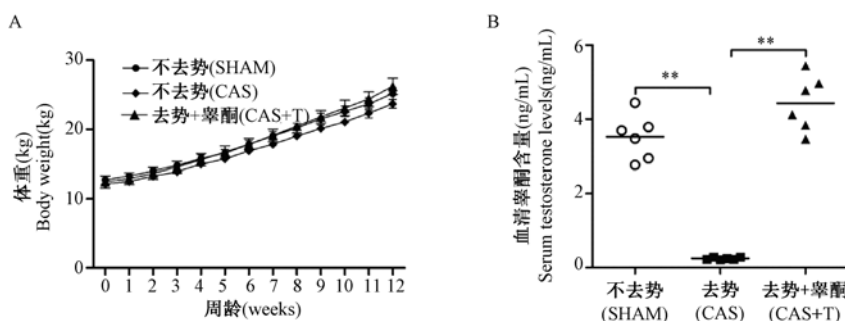
为研究去势和睾酮处理对高脂诱导小型猪血脂代谢的影响,我们检测了三组小型猪 0、4、8 和 12 周时血脂代谢指标的变化(图 2)。由图可见,饲喂高脂饲料后,三组小型猪血清 TC, HDL-C, LDL-C 以及 TG 水平均显著升高。高脂诱导 4、8 和 12 周时,去势组小型猪血清 TC 水平均显著高于不去势组小型猪($P < 0.01$);采用睾酮处理后,去势加睾酮处理组小型猪 TC 水平显著降低($P < 0.01$)(图 2A)。去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪 HDL-C 水平没有显著影响($P > 0.05$)(图 2B)。小型猪血清 LDL-C 水平变化趋势与 TC 相似,去势小型猪血清 LDL-C 水平均显著高于其他两组小型猪($P < 0.01$)(图 2C)。12 周时,去势组小型猪血清 TG 水平显著高于不去势组($P < 0.01$)和去势加睾酮处理组($P < 0.05$)小型猪(图 2D)。

2.3 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪肝脏组织病理变化的影响

高脂饮食诱导 12 周后,三组小型猪肝组织均发生不同程度的脂肪变性(彩插 5 图 3)。由图可见,相比不去势组小型猪,去势组小型猪肝脏脂肪变性程度显著增加,并且发生大量的大泡性和小泡性脂肪变性,而不去势组小型猪则只有少量小泡性脂肪变性。采用睾酮处理后,小型猪肝脏脂肪变性程度则明显有所改善(彩插 5 图 3)。

2.4 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪肝脏脂质沉积的影响

去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪肝脏 TG 和



注:A:体重;B:血清睾酮。 ** $P < 0.01$ 。 不去势(假手术):SHAM;去势:CAS;去势+睾酮:CAS+T。

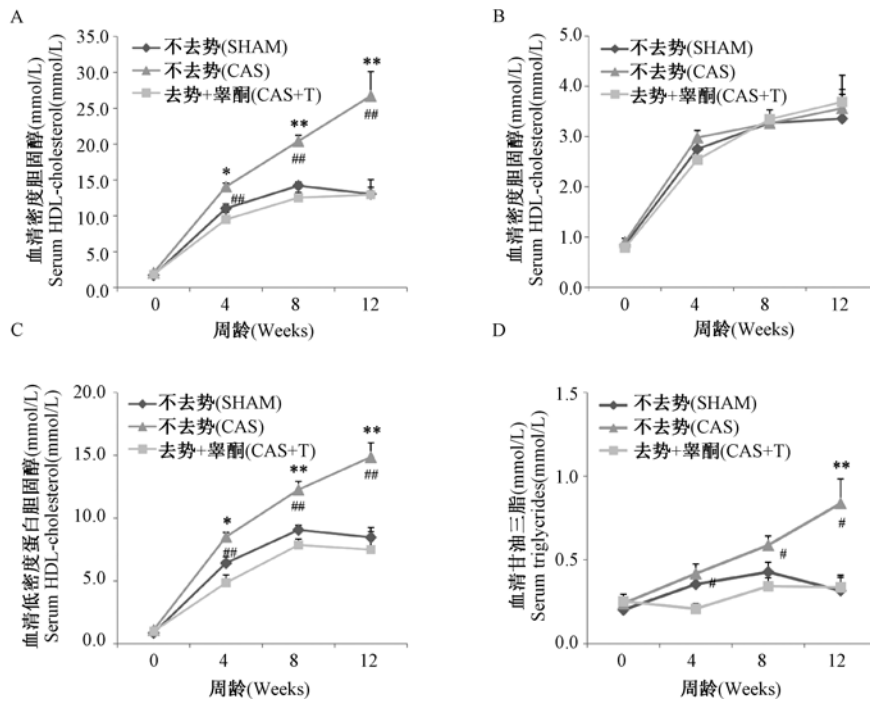
图 1 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪体重和血清睾酮水平的影响

Note: A: Body weight; B: Serum testosterone levels. ** $P < 0.01$. Sham-operated: SHAM; Castration: CAS; Castration with testosterone supplementation: CAS + T.

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

TC 含量的影响见图 4。去势组小型猪肝脏 TG 含量显著高于不去势组小型猪 ($P < 0.05$), 采用睾酮处理后, 去势小型猪肝脏 TG 含量则显著减少 ($P <$

0.01)(图 4)。与 TG 相似, 去势组小型猪肝脏 TC 含量显著高于不去势小型猪和去势加睾酮处理组小型猪 ($P < 0.05$)(图 4)。

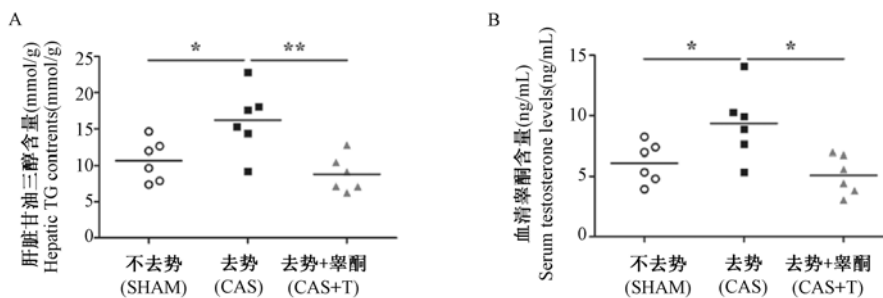


注:A:总胆固醇;B:高密度脂蛋白胆固醇。C:低密度脂蛋白胆固醇;D:甘油三酯。不去势(假手术);SHAM;去势;CAS;去势+睾酮;CAS+T。不去势组与去势组相比,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。去势+睾酮组与去势组相比,# $P < 0.05$;## $P < 0.01$ 。

图 2 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪血脂水平的影响

Note:A; TC; B; HDL-C; C; LDL-C; D; TG. Sham-operated; SHAM; Castration; CAS; Castration with testosterone supplementation; CAS+T. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, SHAM vs. CAS; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, CAS+T vs. CAS.

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



注:A:肝脏甘油三酯含量;B:肝脏胆固醇含量。不去势(假手术);SHAM;去势;CAS;去势+睾酮;CAS+T。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 去势和睾酮处理对高脂饮食小型猪肝脏甘油三酯和胆固醇含量的影响

Note:A; Hepatic TG contents; B; Hepatic TC contents. Sham-operated; SHAM; Castration; CAS; Castration with testosterone supplementation; CAS+T. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 4 Effects of castration and testosterone treatment on hepatic TG and TC contents in miniature pigs fed a high-fat diet

3 讨论

大量研究表明,低雄激素(主要是睾酮)水平增加男性患动脉粥样硬化疾病的风险^[1-4]。目前研究

认为,睾酮缺乏引起血脂代谢紊乱,最终会导致氧化应激、内皮功能紊乱和促炎性细胞因子增加,从而加速动脉粥样硬化形成^[3],其机制包括受体依赖性和非依赖性(芳香化)介导的途径^[8]。但雄激素

水平变化与血脂代谢之间的关系,不同的研究得出的结果也不尽相同。有研究表明,大鼠去势后,血浆 TC 水平显著增加,但 TG 水平没有明显变化^[9]。相比不去势雄鼠和雌鼠,去势雄鼠血清 TC 和 TG 水平都显著增高^[10]。还有研究发现,去势对高脂饮食诱导的小鼠血清 TC 水平没有影响,却减少血清 TG 水平^[11]。另外,去势可显著增加高脂饮食诱导的雄兔血清 TC、LDL-C 和 TG 水平^[12]。目前睾酮影响血脂水平的研究采用的动物多为大鼠、小鼠和兔等,但它们的血脂代谢与人类存在较大差异,并且动脉粥样硬化病变部位与人也不相同^[13],因此,许多在鼠和兔上的实验结果很难直接应用于人体进行进一步的研究。猪的胆固醇代谢与人类极为相似,是高脂饲料引发的高胆固醇血症和动脉粥样硬化的理想动物模型^[5]。因此,本研究以五指山小型猪为动物模型,分析了去势和睾酮处理对高脂饮食诱导的血脂代谢紊乱的影响。实验结果表明,睾酮缺乏显著增加高脂饮食诱导的小型猪血清胆固醇(TC 和 LDL-C)和甘油三酯水平,而给予外源性睾酮处理后,去势小型猪血清胆固醇和甘油三酯水平则显著降低。我们前期研究已证实,睾酮缺乏可显著增加饲喂普通饲料猪的血清胆固醇和甘油三酯水平^[14],说明睾酮缺乏对饲喂正常和高脂饲料猪的血脂代谢均有显著影响。实验还发现,睾酮缺乏不仅影响高脂饮食小型猪血脂水平,还能促进脂质在小型猪肝脏内沉积。Volzke 等^[15]研究表明,雄激素水平低下增加男性患非酒精性脂肪肝风险,这和我们发现的睾酮缺乏增加小型猪肝脏脂质沉积的研究结果相一致。最新研究发现,高脂饮食诱导的高胆固醇血症亦是引发非酒精性脂肪肝的重要风险因素^[16]。我们前面已证实,睾酮缺乏能增加高脂饮食小型猪血清 TC 和 LDL-C 水平,促进高胆固醇血症形成。所以,睾酮缺乏本身或睾酮缺乏引起的高胆固醇血症均可能促进小型猪肝脏脂质沉积。

综上所述,去势能够减少高脂饮食诱导的小型猪血清睾酮水平,增加血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯水平。给予外源性睾酮处理后,则能够改善高脂饮食诱导的血脂代谢紊乱,减少肝脏脂质沉积。

参考文献:

- [1] Traish AM, Kypreos KE. Testosterone and cardiovascular disease: an old idea with modern clinical implications [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214:244 - 248.
- [2] Makinen JI, Perheentupa A, Irjala K, *et al.* Endogenous testosterone and serum lipids in middle-aged men [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197(2):688 - 693.
- [3] Traish AM, Abdou R, Kypreos KE. Androgen deficiency and atherosclerosis: The lipid link [J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 51:303 - 313.
- [4] Jones TH, Arver S, Behre HM, *et al.* Testosterone replacement in hypogonadal men with type 2 diabetes and/or metabolic syndrome (the TIMES2 study) [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34:828 - 837.
- [5] 谢忠忱,黄广勇,陈华,等. 五指山小型猪高脂血症模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(9):537 - 540.
- [6] van Eerdenburg FJ, Lugard-Kok CM, Dieleman SJ, *et al.* Influence of gonadectomy and testosterone supplementation on the postnatal development of the casopressin and oxytocin-containing nucleus of the pig hypothalamus [J]. *Neuroendocrinology*, 1991, 54(6):580 - 586.
- [7] Kojima M, Sekimoto M, Degawa M. Androgen-mediated down-regulation of CYP1A subfamily genes in the pig liver [J]. *J Endocrinol*, 2010, 207(2):203 - 211.
- [8] Bourghardt J, Wilhelmson AS, Alexanderson C, *et al.* Androgen receptor-dependent and independent atheroprotection by testosterone in male mice [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(11):5428 - 5437.
- [9] Lee CE, Kang JS, Kim KI. Effects of gender, gonadectomy and sex hormones on growth and plasma cholesterol level in rats [J]. *Ann Nutr Metab*, 2008, 53:1 - 5.
- [10] Hatch NW, Srodulski SJ, Chan HW, *et al.* Endogenous androgen deficiency enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Genet Med*, 2012, 9(5):319 - 328.
- [11] Senmaru T, Fukur M, Okada H, *et al.* Testosterone deficiency induces markedly decreased serum triglycerides, increased small dense LDL, and hepatic steatosis mediated by dysregulation of lipid assembly and secretion in mice fed a high-fat diet [J]. *Metabolism*, 2013, 62(6):851 - 860.
- [12] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, *et al.* Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits [J]. *Circ Res*, 1999, 84:813 - 819.
- [13] 刘月环,毛栋森,吴旧生,等. 高脂血症长爪沙鼠模型的转录组检测和代谢性炎症通路的初步研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4):51 - 56.
- [14] Yao YC, Cai ZW, Zhao CJ, *et al.* Influence of castration-induced sex hormone deficiency on serum lipid levels and the genes expression in male pigs [J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(10):674 - 680.
- [15] Volzke H, Aumann N, Krebs A, *et al.* Hepatic steatosis is associated with low serum testosterone and high serum DHEAS levels in men [J]. *Int J Androl*, 2010, 33(1):45 - 53.
- [16] Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, *et al.* Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(9):1626 - 1635.

[修回日期] 2014-11-21