

一种纯系小鼠动脉粥样硬化病理模型的建立

杨小毅 杨永宗 谭健苗 袁中华 万载阳

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

The Establishment of an Atherosclerotic Murine Model and Pathological Observation of Plaques by Laser Scanning Confocal Microscopy

YANG Xiao-Yi, YANG Yong-Zong, TAN Jian-Miao, YUAN Zhong-Hua and WAN Zai-Yang

(Institute of Cardiovascular Diseases, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT The C57BL/6J mice were assigned at random to two groups; the experimental group was fed cholesterol-rich diets; the control group received normal mouse chow. Mice receiving normal diets were completely free of atherosclerotic lesions. In mice fed cholesterol-rich diets for 16 weeks, the lesions of the aorta and coronary arteries were observed by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The typical atherosclerotic plaques, which consisted of amounts of foam cells, were formed near the aortic valves. Roberts & Theompson remarks were 8.0 ± 1.2 . The atherosclerotic lesions were very similar pathologically to those in the human. The plasma total and free cholesterol levels increased progressively. The obtained results suggested that an atherosclerotic murine model be successfully established. It may provide an available experimental model for further investigation into the molecular mechanism of atherosclerosis and screening of antiatherosclerotic drugs.

KEY WORDS Mouse; *in vivo*; Animal model; Atherosclerosis; Laser scanning confocal microscopy

摘要 实验选用 C57BL/6J 纯系小鼠, 饲喂含 2% 胆固醇饮食 16 周后, 血清脂质 (包括总胆固醇、游离胆固醇和甘油三酯) 水平升高, 血清总胆固醇为 3.69 ± 0.78

g/L, 与人类高脂血症接近; 油红 O 方法染色后在光镜、激光扫描共聚焦显微镜下观察, 形态学结果显示实验组小鼠在主动脉瓣膜、冠状动脉等部位均形成典型的含有大量泡沫细胞的动脉粥样硬化斑块, Roberts & Thompson 评分达到 8.0 ± 1.2 。这表明成功地建立了一种实验性动脉粥样硬化纯系小鼠整体动物模型。

关键词 小鼠; 动脉粥样硬化; 在体; 模型

动脉粥样硬化是影响人类健康最严重、最常见的心血管疾病之一, 在我国成年人中其发病率可高达 4%~10%, 在欧美国家发病率更高, 是人类当前死亡的一个主要病因, 因此对其病因、发病机理和防治的研究是一个相当活跃的领域^[1,2]。而整体动物模型的建立又是所有这些工作的基础。国内外许多实验室依据不同实验目的, 曾报道应用家兔、鼠、狗、小型猪、非人灵长类和鸟类等动物来复制人类动脉粥样硬化病理模型^[3~5]。就抗动脉粥样硬化药物筛选模型而言, 目前国内主要推荐采用家兔和鹌鹑两种动物, 尽管二者脂代谢紊乱较明显, 但前者系草食动物, 后者又是非哺乳动物, 并且所形成的病变与人类动脉硬化斑块相差甚远^[3]。因此, 建立一种具有遗传背景清楚、繁殖力强、脂质代谢和斑块与人类相似等特征, 并且适合于筛选抗动脉粥样硬化药物的实验性动脉粥样硬化整体动物模型具有重要的意义。

本文采用 C57BL/6J 小鼠, 饲喂含 2% 胆固醇饮食 16 周, 经血清脂质分析, 光镜和激光扫描共聚焦显微镜等形态学观察, 结果显示其血脂水平与人类接近, 主动脉、冠状动脉均有明显斑块形成。这表明在国内首次成功地建立了实验性动脉粥样硬化纯系小鼠整体动物模型。

1 材料与方法

1.1 试剂

血清总胆固醇、甘油三酯酶法测定试剂盒系北京化工厂产品,戊二醛为 Sigma 产品,胆固醇、胆酸钠等试剂均为国产分析纯。

1.2 小鼠高脂饲料的配制

在小鼠普通饲料的配方中添加胆固醇、胆酸钠、棕榈油和牛奶粉等成分,制成颗粒饲料,暴晒干燥,高温高压灭菌处理。饲料的原料组成见表 1。

表 1. 小鼠高脂饲料配方

玉米	33.5%	鱼粉	5.0%	棕榈油	10.0%
黄豆	16.7%	食盐	0.8%	牛奶粉	4.0%
小麦	8.4%	多维素	0.8%	胆固醇	2.0%
大米	8.4%	生长素	0.8%	胆酸钠	0.4%
麦麸	8.4%	土霉素	0.8%		

1.3 小鼠的饲养

取 C57BL/6J 品系小鼠 24 只(雌雄各半,9 周龄,21.7±2.9 g,中国医学科学院实验动物中心提供),随机分为两组即普通饲料对照组和高脂饲料实验组。两组间体重及血脂水平差异无显著性。各组小鼠雌雄分笼按清洁级饲养,饮用冷开水。对照组饲喂普通饲料,每天 4.0 克/鼠,实验组在第 1 周饲喂过渡期饲料,含普通和高脂饲料每天各 2.0 克/鼠,此后给予全高脂饲料,每天 4.0 克/鼠,直至小鼠 26 周龄。整个实验周期为 16 周。

1.4 血清脂质水平测定

分别于实验前、后在尾静脉或眼球采血,分离血清,用酶法测定总胆固醇和甘油三酯。

1.5 标本的处理与光镜观察

取上述 26 周龄小鼠,眼球放血致死,解剖小鼠,连同心脏取出主动脉,剥离血管外附着组织后,置于含 2.0%戊二醛的固定液中,20℃固定 1 周。从心脏上部截取主动脉,在 Diaphot 300 型冷冻切片机上冷冻切片。在显微镜下观察切片,所需切片从主动脉窦瓣膜起始部位开始,以 20 μm 厚度连续切取 50 片。切片用油红 O 方法染色,水洗 5 min→60%异丙醇浸泡 5 min→新过滤的油红 O 染液染色 10 min(储备液含 0.5%油红 O,98%异丙醇;用前以 40%水稀释,24 h 后过滤)→60%异丙醇 5 min→水洗 5 min→Mayer 氏苏木精明矾染液染色 5 min(染液含 0.1%苏木精,0.02%碘化钠,5%钾矾,5%水合氯乙醛,0.1%枸橼酸)→水洗 30 min

→干燥封片。在 Nikon Microphot-FXA 型倒置显微镜下观察,选择主动脉窦瓣膜起始部位的切片,以 10×40 倍作彩色照相。

1.6 Roberts & Thompson 评分

选择第 5、10、15、20...50 等共 10 块切片,在 Nikon Microphot-FXA 型倒置显微镜下观察,参考 Roberts & Thompson 方法^[6,7]根据斑块数及面积大小、斑块中泡沫细胞的数目、内膜损伤和中膜累及等参数对小鼠的动脉粥样硬化斑块特征进行评分(表 2)。

表 2. 动脉粥样硬化的定量评价指标.

评价参数	定量标准	评分
斑块数	0~1	0
	2~4	1
	5~	2
斑块平均大小与瓣膜之比	~1/8	1
	1/8~1/4	2
	1/4~	3
斑块中泡沫细胞最多数目	1~5	1
	6~15	2
	16~	3
中膜损伤	无	0
	有	1
内皮突起	无	0
	有	1

1.7 病变区域的激光扫描共聚焦显微镜观察

激光扫描共聚焦显微镜系统(laser scanning confocal microscopy, LSCM;德国 Zeis 公司)由高分辨共聚焦显微镜主体、激光扫描器(Argon 激光和 He-Ne 激光)和计算机构成。激光束的扫描与控制以及图象数据的采集和加工均由计算机完成。将切片置于激光共聚焦扫描显微镜载物台上,激发波长 633 nm,在监视器上显示所要观察的位置。激光束扫描光切按每片厚度为 10 μm 进行,图象通过影像记录器输出。

2 结果

2.1 血清脂质水平分析

从 Table 3 可见,实验前各组小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量相近,饲喂高脂饲料 16 周后,与对照组相比,血清脂质水平(包括血清总胆固醇、游离胆固醇和甘油三酯)明显升高,

血清总胆固醇为 3.69 ± 0.78 g/L, 与人类高脂血症接近。

Table 3. The changes of blood lipid in C57BL/6J mice fed with control diet or cholesterol-rich diet for 16 weeks ($\bar{x} \pm s$, g/L).

Group	TC	FC	TG
A	1.68 ± 0.32	0.18 ± 0.17	1.25 ± 0.30
B	$3.69 \pm 0.78^{**}$	$1.73 \pm 0.46^{**}$	$3.07 \pm 0.62^{**}$

A, control diet group; B, cholesterol-rich diet group. TC, total cholesterol; FC, free cholesterol; TG, triglyceride. * $P < 0.05$ vs control

2.2 主动脉形态的光镜观察与 Roberts and Thompson 评分

C57BL/6J 小鼠经高脂饲料饲喂 16 周后, 用光镜观察主动脉瓣膜部位的形态, 可见血管内膜下有多处斑块, 大小不等, 斑块中可见数目不等的泡沫细胞, 数目最多者可达 20 以上, 泡沫细胞被油红 O 染成红色。有的部位还可见到斑块近向或远离管腔发展, 使内皮突起或中膜损伤。而普通饲料对照组小鼠则无明显的动脉粥样硬化损伤表现。Figure 1 为光镜下观察到的主动脉瓣膜起始部位的病变 (10×40 倍)。

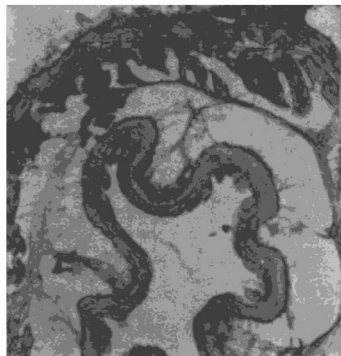


Figure 1. Light micrograph of aortic wall from the valve cusps near the aorta sinus in the 26-week-old C57BL/6J mice fed with cholesterol-rich diets. (10×40)

选择主动脉瓣膜起始部位的切片作连续冰冻切片, 每片间隔 $20 \mu\text{m}$, 选择一块切片 (共计 10 片), 根据斑块数目、平均斑块大小、斑块中最多泡沫细胞数、中膜损伤和内皮突起等参数进行 Roberts & Thompson 评分, 经统计处理, 实验组小鼠的 Roberts & Thompson 评分达到 8.0 ± 1.2 。

2.3 主动脉和冠状动脉病变的激光扫描共聚焦显微镜观察

通过左、右眼立体图视的编码手段用立体眼镜观察主动脉病变时就可呈现出不同深度的病变区细胞及其邻近区域的三维空间分布变化, 结果可见明显的主动脉管腔狭窄, 内膜下间隙增大, 冠状动脉管壁明显增厚, 管腔狭窄。

3 讨论

复制人类动脉粥样硬化病理模型时选用的实验动物主要从动物品系、饲养的难易程度、繁殖能力、抗传染病能力、对动脉粥样硬化的易感性、动物心血管解剖及生理功能与人类的相似性等方面来考虑。吴淑敏和孙仁俊曾较系统地评述了国内外动脉粥样硬化造型的现状, 指出国内尽管这方面进展较快, 但尚存在动物种类太少、品种不纯和饲养质量较差等问题^[2]。并且作为抗动脉粥样硬化药物筛选的动物模型, 还应具备动物个体较小、用药量少、易于饲养和操作等条件, 因此选择更为理想的动物建立一种较之现有模型更适合于药物筛选的动物模型是极为重要的。以往文献上曾认为大、小鼠因主动脉过于细小难以形成动脉粥样硬化斑块, 但近年来研究表明主动脉的大小并不是鼠类能否形成斑块的决定因素, Paigen 报道 C57BL/6J 小鼠受 *Ath-1*^[4]、*Ath-2*^[9]、*Ath-3*^[10] 等基因的调控, 是一种对动脉粥样硬化易感的小鼠品系^[11-13]。加之小鼠本身个体及血容量体积较小、繁殖力强、饲养方便、操作简单, 因此选择 C57BL/6J 小鼠造型是比较理想的。

动脉粥样硬化病理模型可分为急性和慢性两种, 本实验室杨永宗等^[14]在 1982 年即用一

次性高脂血清注射复制出急性高脂血症家兔模型。而动脉粥样硬化慢性模型的复制主要采用高胆固醇—高脂肪膳食饲养或在此基础上再施以动脉内膜损伤等方法,造型效果和周期差别较大。但目前国内在用高胆固醇—高脂肪膳食复制模型时在饲料中添加的胆固醇量一般偏高,血总胆固醇水平高达 7~10 g/L,这样高的血脂与人类的高脂血症相距甚远,所形成的斑块在分布和形态特征上也与人类不同。在本实验中,我们对 10 周龄 C57BL/6J 小鼠持续饲喂高胆固醇饮食 16 周后,血总胆固醇水平控制在 3~5 g/L 左右与人类较为接近,在主动脉窦瓣膜起始部位可以观察到多个大小不等的动脉粥样硬化斑块,这说明用 C57BL/6J 小鼠建立的动脉粥样硬化模型是一种可靠的在体动物模型。

病理形态学观察与评价是衡量动脉粥样硬化病变程度的主要指标。对于血管较细小的小鼠动脉标本,肉眼和普通光镜观察病变比较困难,特别是连续机械切片可能造成显微结构的机械损伤。激光扫描共聚焦显微系统是一种分辨率介于光镜与电镜之间的新型显微镜,由于 LSCM 系利用激光束扫描进行光学切片,所以深度分辨率高,切片的方向既可以平行又可垂直于样品的表面,同时聚焦的平面及景深都可任意调节,这样就避免了切片时对样品显微结构的机械损伤,使切片的结构信息得到完整保留。而且在三维重建时,通过精确地共聚焦使切片之间能准确定位,避免连续机械切片造成的人为误差,使三维图象更真实、精确。本实验应用 LSCM 观察小鼠主动脉和冠状动脉粥样硬化病变均取得满意的效果,首次得到了清晰的动脉粥样硬化病变区域共聚焦立体影像。

综上所述,本文采用含 2%胆固醇饮食饲喂 C57BL/6J 小鼠,成功地建立了一种实验性动脉粥样硬化纯系小鼠整体动物模型。它不仅具有遗传背景清楚、繁殖力强、饲养方便、操作简单和模型稳定等优点;而且血脂水平与人类接近,主动脉和冠状动脉均有明显斑块形成。这为进一步探讨动脉粥样硬化的发生和发展机

制,筛选抗动脉粥样硬化药物提供了良好的整体动物模型。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801.
- 2 杨小毅,杨永宗. 动脉粥样硬化时平滑肌细胞增殖及表型转变的若干分子机制. 衡阳医学院学报, 1991, **19** (3): 45.
- 3 吴淑敏,孙仁俊. 实验性动脉粥样硬化病理模型的复制. 见:梅美珍,徐也鲁,杨永宗(主编). 动脉粥样硬化实验技术. 中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会, 1989, 1~10.
- 4 杨永宗,冯大明,金海燕. 利血平抑制动脉粥样硬化的实验研究. 中华心血管病杂志, 1983, **11**, 298.
- 5 邓仲端,徐增绶,李丽珠,等. 家兔实验性冠状动脉粥样硬化的超微结构观察. 中国循环杂志, 1989, **4** (4): 361.
- 6 Paigen B, Morrow A, Holmes PA, et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987, **68**: 231~240.
- 7 Genevieve R, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid prevent the development of atherosclerotic lesions in mice modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13** (10): 1.
- 8 Paigen B, et al. *Ath-1*, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 3 763.
- 9 Paigen B, Nesbitt MN, Mitchell D, et al. *Ath-2*, a second gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Genetics*, 1989, **122**: 163.
- 10 Stewart-Philips JL, et al. *Ath-3*, a new gene for susceptibility to atherosclerosis in mice. *Clin Invest Med*, 1989, **12**: 121.
- 11 Stewart PJJ, et al. Genetically determined susceptibility and resistance to diet-induced atherosclerosis in inbred strains of mice. *J Lab Clin Med*, 1988, **112**: 36.
- 12 Paigen B, Morrow A, Brandon C. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 1985, **57**: 65.
- 13 Eugene E, et al. Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57BL/6J mice treated with cyclosporin A. *Am J Pathol*, 1993, **142**(6): 1 906.
- 14 杨永宗,王瑞瑜. 一次静脉注射高脂血清对家兔主动脉内膜通透性影响. 中华心血管病杂志, 1982, **10**: 216.

(1996-02-23 收到)