

• 方法与技术 •

脂肪乳灌胃建立家兔高脂血症模型方法的探讨

马建林 毛焕元^① 周本财^① 郭和平^① 劳英坚^②

(海南省人民医院心内科, 海口 570311)

摘要 采用自制脂肪乳剂给家兔连续灌胃2周, 观察家兔血清总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白B、血浆血栓素B₂和6-酮-前列腺素F_{1α}水平的变化以及主动脉壁动脉粥样硬化斑块形成的情况。结果发现, 灌胃后动物体内总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白B和血栓素B₂水平明显升高, 而6-酮-前列腺素F_{1α}水平明显降低($P < 0.01$), 其中总胆固醇含量较灌胃前增加14.8倍, 甘油三酯较灌胃前增加3.9倍, 形态学检查也发现主动脉壁中少许脂肪颗粒沉积, 其结果符合实验用动物高脂血症模型的特点, 提示采用脂肪乳剂灌胃建立家兔高脂血症模型的方法是可行的。

关键词 脂肪乳剂; 高脂血症; 动物模型

本文根据以往的实践经验, 采用自配脂肪乳剂给予家兔连续灌胃2周, 以期制造出高脂血症动物模型, 并观察该方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择普通大耳白兔20只, 体重2.38~2.96 kg, 雌雄不拘, 由同济医科大学心血管病研究所喂养, 同济医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 胆固醇由上海市食品公司提供; 胆酸钠为美国Serua产品; 丙基硫氧嘧啶由德国Handberg公司提供; 1,2-丙二醇及吐温-80由北京医药采购站提供; 猪油自制。

1.2 方法

1.2.1 脂肪乳配制 根据刘明等^[1]方法略加修改, 配制脂肪乳剂。将80 g固态猪油置于500 mL烧杯中, 逐渐加热使之完全融化, 取40 g胆固醇粉剂溶于猪油中, 然后取8 g胆酸钠和4 g丙基硫氧嘧啶片制成的粉剂加入猪油中并充分搅匀, 放入适量的蒸馏水、80 mL

吐温-80和80 mL 1,2-丙二醇, 不断搅匀, 最后加入双蒸水至400 mL, 充分混匀后即配制成含10%胆固醇、20%猪油、2%胆酸钠和1%丙基硫氧嘧啶的脂肪乳剂, 置于冰箱保存待用。

1.2.2 实验步骤 将20只家兔单笼喂养, 每日给予100 g普通饲料, 饮水不限, 观察2周无异常发现后, 禁饮食12 h, 清晨从剑突下穿刺心脏抽取血液6 mL, 将其中3 mL加入含0.33 mL 2% EDTA Na₂的试管中, 以2 500 r/min的速度离心5 min, 取其血浆。采用苏州医学院血栓室提供的放射免疫药盒测定血栓素B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)及6-酮-前列腺素F_{1α} (6-keto-prostaglandin F_{1α}, 6-keto-PGF_{1α})水平。其余3 mL血样直接离心取血清, 采用温州东欧生物试剂厂提供的药盒酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)水平, 采用湖北医科大学生化教研室提供的羊抗兔载脂蛋白B(apolipoprotein B)测试药盒Laurell电泳法^[2]测定血清载脂蛋白B水平。

采血后于每日上午10时给予脂肪乳灌胃。将家兔上下牙齿用特殊装置张开固定, 经咽部插入胃管约15~20 cm, 将胃管的另一端浸入水中观察几分钟无气泡冒出, 说明已进入胃中, 即将上述脂肪乳剂按每天2 mL/kg的剂量灌入胃中, 每日重复一次共持续2周, 2周后再按上述方法心脏采血, 复测血浆和血清生化指标。

1.2.3 组织学处理 实验结束时处死动物, 取主动脉作苏丹Ⅳ大体染色, 石蜡包埋切片HE染色。

2 结果

2.1 血生物化学测定结果比较

灌胃前后测定的家兔血清总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白B、血浆TXB₂和6-Keto-PGF_{1α}水平的比较结果见附表。由附表可以看出, 灌胃后家兔血清总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白B及血浆TXB₂水平明显升高, 与灌胃前相比差异显著($P < 0.01$), 而6-keto-PGF_{1α}水平与灌胃前

①同济医科大学心血管病研究所, 武汉 430022

②红惠医药发展公司, 北京 100028

相比明显降低($P<0.01$),其中总胆固醇升高14.8倍,TG升高3.9倍。

附表. 灌胃前后家兔血脂的变化($\bar{x}\pm s$, $n=20$).

生化指标	灌胃前	灌胃后
总胆固醇(g/L)	6.87±1.39	10.17±18.67 ^a
甘油三酯(g/L)	9.64±2.37	37.60±8.96 ^a
载脂蛋白B(g/L)	1.86±0.34	3.94±0.73 ^a
血栓素B ₂ (ng/L)	168.7±78.4	486.7±139.2 ^a
6-酮-前列腺素F _{1α} (ng/L)	57.8±22.3	32.4±13.8 ^a

a : $P<0.01$, 与灌胃前相比.

2.2 组织学检查结果

主动脉大体苏丹Ⅳ染色发现有少许颗粒状脂肪在内膜沉积,HE染色切片光镜下观察发现内皮细胞轻度受损,内膜下少许泡沫细胞沉积,中膜平滑肌细胞轻度增殖。

3 讨论

高血脂目前仍被公认为是致动脉粥样硬化的危险因子^[3],但其具体的致病机理在某些方面尚不十分清楚^[4],因此高血脂症动物模型的建立对于其致病机理的探讨十分重要。目前实验中常采用高脂饲料喂养大、小鼠及家兔来建立动脉粥样硬化或高血脂症动物模型,前者所制作的模型其结果较为恒定,但采血量较少^[1],不能同时检测数个相关指标,后者受动物食欲的影响较大,投喂高脂饲料的剂量不易掌握,故制作的模型其结果不太恒定。

为了避免上述缺陷,本文采用自制脂肪乳剂灌胃,所需的剂量准确可靠,可以在2周内迅速建立高血脂症动物模型。实验结果发现,连续脂肪乳剂灌胃2周后家兔血总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白B和TXB₂水平明显升高,而6-keto-PGF_{1α}水平明显降低,符合实验所需高脂

血症动物模型的特点,其血脂升高的部分原因可能与肝脏载脂蛋白B受体合成被抑制有关^[5]。高脂食物进入体内,造成了胆固醇在肝细胞中堆积,后者反馈性地抑制载脂蛋白B受体合成,而载脂蛋白B受体是清除血浆中低密度脂蛋白的主要途径,其合成受抑制,必然造成低密度脂蛋白清除障碍,使TC和载脂蛋白B水平升高^[6]。

组织学观察发现,采用脂肪乳剂灌胃2周,可以制造出早期动脉粥样硬化的病理改变模型,表现为脂肪颗粒在主动脉内膜沉积,内皮轻度受损,内膜下少许泡沫细胞沉积等,从而提示该方法也可以制造动脉粥样硬化动物模型,但其制造明显粥样斑块所需的时间尚待进一步证实。

参考文献

1 刘明,董超仁,苏静怡. 一种简便实用的大鼠高脂血症模型. 中国药理学通报,1989, 5(2): 119.

2 周新,张华征,殷以礼,等. 抗人载脂蛋白血清的制备及其临床应用. 中华心血管病杂志,1986, 14(3): 135.

3 Campos H, Roederer GO, Lussier CS, et al. Predominance of large LDL and reduced HDL₂-cholesterol in normal lipidemic men with coronary artery disease. Arterioscler Vasc Biol, 1995, 15(8): 1 043.

4 Gimbrone MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. Am J Cardiol, 1995, 75: 67B.

5 Goldstein H. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. J Lipid Res, 1984, 25: 1 450.

6 Campos H, Dreon DM, Krauss M, et al. Association of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. J Lipid Res, 1995, 36(3): 462.

(1998-01-17 收到, 1998-05-12 修回)