

## 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型

张磊<sup>1</sup>, 陈国荣<sup>2</sup>, 郑荣远<sup>1</sup>, 王群姬<sup>2</sup>, 谢淑萍<sup>3</sup>, 王拥军<sup>3</sup>

(温州医学院附属第一医院 1. 神经内科, 2. 病理科; 浙江省温州市 325000。

3. 首都医科大学附属宣武医院神经内科, 北京 100053)

[关键词] 动脉粥样硬化; 颈动脉; 疾病模型, 动物; 空气干燥/方法

[摘要] 为建立一种新的比较适合于研究颈动脉粥样硬化的动物模型, 将 54 只日本大耳白兔分为 3 组, 分别给予高脂饲料喂养加空气干燥术( $n=24$ )、单纯高脂饲料喂养( $n=24$ )和正常饲料喂养( $n=6$ )。在实施空气干燥术后的第 3 天、第 1 周、第 2 周和第 4 周时分别处死动物, 观察颈动脉病变的形态特征, 计量其内膜增厚程度。结果发现, 在高脂饲料加空气干燥术组出现较典型的动脉粥样硬化病变, 包括内皮细胞再生、内膜增厚、平滑肌细胞移行增殖、脂质沉积、弹力纤维和胶原基质的生成等。第 2 周和第 4 周时内膜增生明显, 内膜与中膜面积比值分别达到  $0.47 \pm 0.07$  和  $0.94 \pm 0.07$ , 而在单纯高脂饲料组的颈动脉和高脂饲料加空气干燥术组的对侧颈动脉未发现明显的动脉粥样硬化病变。以上结果提示, 高脂饲料加空气干燥术可以使家兔形成典型的颈动脉粥样硬化病变, 其病理改变较适合于研究颈动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### A Novel Experimental Carotid Atherosclerotic Rabbit Model Induced by High-Cholesterol Diet Plus Air-Drying

ZHANG Lei, CHEN Guo-Rong, ZHENG Rong-Yuan, WANG Qun-Ji, XIE Shu-Ping, and WANG Yong-Jun.

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**MeSH** Atherosclerosis; Carotid Arteries; Disease Model, Animal; Air-Drying/methods

**ABSTRACT** **Aim** To establish a new animal model which is more suitable for the study on carotid atherosclerosis and to investigate its mechanisms. **Methods** 54 male Japanese White rabbits were randomly divided into 3 groups. The first group was fed by normal diet as blank control ( $n=6$ ), the second group was fed by high-cholesterol diet as cholesterol-fed control groups ( $n=24$ ), the third group was fed by high-cholesterol diet and treated by air-drying as experimental groups ( $n=24$ ). Animals were sacrificed at various times (from 3 days to 4 weeks) after surgery in the experimental groups and at the corresponding times in the control groups. The carotid arteries were prepared for examination by light microscopy and by transmission electron microscopy. The intimal thickening were evaluated by intimal area/medial area ratio (I/M ratio). **Results** The typical carotid atherosclerosis was observed in the experimental groups. The changes included endothelial regeneration, the proliferation of smooth muscle cells and monocytes, significant intimal thickening and secondary vascularization in intimal, the formation of connective tissue matrix comprising elastic and collagen, the accumulation of lipid and cholesterol in the associated cells and in the surrounding matrix. The neointimal thickening was significant at 2 week and 4 week in the experimental groups and the I/M ratio reached  $0.47 \pm 0.07$  and  $0.94 \pm 0.07$ . **Conclusions** The typical carotid atherosclerosis lesion can induced by cholesterol diet plus air-drying in rabbit. The pathological changes and its mechanisms were more suitable for the advanced research in experimental carotid atherosclerosis.

[作者简介] 张磊, 男, 1972 年出生, 浙江省奉化市人。1994 年毕业于温州医学院医学系, 1999 年获首都医科大学硕士学位, 现为神经内科主治医师, 研究方向为神经内科和脑血管疾病。陈国荣, 男, 1962 年出生, 浙江省诸暨市人, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事病理学和免疫病理学研究。郑荣远, 男, 1949 年出生, 浙江省温州市人。神经内科教授, 主任医师, 硕士研究生导师。

颈动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是造成脑血管疾病的主要原因。随着对颈 As 的发病机制及预防、治疗方面研究的不断深入, 迫切需要建立一种简便易行、重复性好、有较典型的 As 病理改变, 易于评价, 适于干预治疗的动物模型。然而, 单纯长期高脂饲料不易在颈动脉部位形成 As 病变。Fishman

等<sup>[1]</sup>利用气流通过血管内腔造成内膜上皮干燥、剥脱。在干燥处理 12 h 后全部内皮剥脱。受此启发,我们设想用高脂饲料加空气干燥术建立颈 As 模型。经尝试取得成功,现予报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性日本大耳白兔 54 只,体重 2.0~2.5 kg,4 个月龄,由温州医学院实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 胆固醇(化学纯)购自上海化学试剂公司,批号为 980908;弹力纤维染色试剂盒购自福建三强生物化学试剂公司。

### 1.2 实验动物分组

将动物按抽签法随机分为 3 组,分别为正常饲料组( $n=6$ ),喂普通颗粒兔饲料;高脂饲料加空气干燥术组( $n=24$ ),喂含 1.5% 胆固醇的颗粒饲料,1 周后实施颈动脉内膜空气干燥术,术后继续高脂饲料喂养,分别于术后第 3 天、第 1 周、第 2 周和第 4 周各处死 6 只;单纯高脂饲料组( $n=24$ ),除不实施内膜干燥术外,处理均同高脂饲料加空气干燥术组,于相对应的时间点各处死 6 只。所有动物均单笼喂饲,饮水不限,自由摄食,每日每只进食 150 g 饲料。

### 1.3 内膜空气干燥术的实施

动物术前 12 h 禁食,不禁水。在严格无菌条件下,动物经 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,颈部脱毛清洁消毒后,作颈正中切口,于甲状软骨上方水平分离右侧颈总动脉,长约 2.5 cm,两端以动脉夹阻

断血流。4.5 号头皮针尽可能平行于血管纵轴方向穿刺阻断血管的两端,生理盐水冲洗置换出管腔内的血液后,接上已调节好流量为 250 mL/min 的气流,历时 5 min 造成内皮干燥,然后管腔内重新充满生理盐水,放开临时动脉夹恢复血流。湿润棉片轻轻压迫穿刺点 3~5 min 止血。缝合皮肤创口并包扎。术前术后均无需使用抗生素。

### 1.4 病理标本的留取

所有喂饲高脂饲料动物经放血处死,留取右侧颈动脉 1.0 cm 与 0.2 cm,生理盐水轻轻冲洗后分别以 10% 甲醛和 2.5% 戊二醛固定,用作光镜及透射电镜观察。高脂饲料加空气干燥术组动物同时留取对侧颈动脉,10% 甲醛固定,行光镜观察、弹力纤维染色及内膜/中膜面积比值分析。

### 1.5 血脂测定

血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)的测定在日立 7170A 全自动生物化学分析仪上进行,应用 Friedwald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇(LDLC),公式为  $LDLC = TC - HDLC - TG/2.2$ 。

### 1.6 统计学处理

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间平均数比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

所有实验动物无中途死亡或患病。高脂饲料加空气干燥组动物未发现局部感染,创口愈合良好。

表 1. 各组动物血脂测定值(mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Serum lipids in rabbits in three groups

Groups	TC	HDLC	LDLC	TG
Normal control	1.58 ± 0.18	0.58 ± 0.15	0.62 ± 0.34	0.81 ± 0.10
Cholesterol-fed (CF)				
CF for 10 days	29.15 ± 3.48 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.47	24.27 ± 3.45 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.31 <sup>a</sup>
CF for 2 weeks	28.59 ± 3.60 <sup>a</sup>	5.05 ± 0.53	22.70 ± 3.67 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.64 <sup>a</sup>
CF for 3 weeks	27.73 ± 4.03 <sup>a</sup>	3.01 ± 1.72	23.49 ± 4.12 <sup>a</sup>	2.45 ± 1.76 <sup>a</sup>
CF for 5 weeks	37.57 ± 6.80 <sup>a</sup>	3.36 ± 1.54	33.01 ± 5.77 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.18 <sup>a</sup>
Cholesterol-fed plus Air-drying (CA)				
CA for 3 days	29.29 ± 3.62 <sup>a</sup>	6.43 ± 0.77	21.94 ± 3.20 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.42 <sup>a</sup>
CA for 1 week	30.50 ± 8.55 <sup>a</sup>	4.92 ± 1.08	24.61 ± 8.34 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.51 <sup>a</sup>
CA for 2 weeks	27.80 ± 9.96 <sup>a</sup>	5.45 ± 1.56	21.25 ± 11.26 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.60 <sup>a</sup>
CA for 4 weeks	37.72 ± 11.36 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.53	33.13 ± 10.78 <sup>a</sup>	3.05 ± 2.21 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with normal control group.

2.2 血脂变化情况

各组动物血脂变化见表 1 (Table 1)。可见高脂喂饲 10 天至 5 周后,TC 升高至 27.7~ 37.7 mmol/L, LDLC 升高至 21.2~ 33.1 mmol/L。与正常饲料组相比,高脂饲料加空气干燥术组和单纯高脂饲料组的 TC 与 LDLC 均明显升高,统计学上差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。而后两组对应时间点的血脂指标比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

2.3 病理形态学观察

2.3.1 肉眼大体观察 正常饲料组和单纯高脂饲料组的兔颈动脉柔软有弹性,管腔内膜光滑。高脂饲料加空气干燥组经空气干燥术的颈动脉(右侧)1 周后出现明显的管壁僵硬、增厚,2 周及 4 周组上述改变加重并在内膜可见白色条纹状隆起。

2.3.2 光镜下 HE 染色观察 正常饲料组、单纯高脂饲料组和高脂饲料加空气干燥术组对侧(左侧)颈动脉内皮细胞完整,单层紧贴内弹力板。中层平滑肌细胞排列整齐,呈长型或椭圆型,胞浆呈嗜酸性红染,无明显脂质沉积。

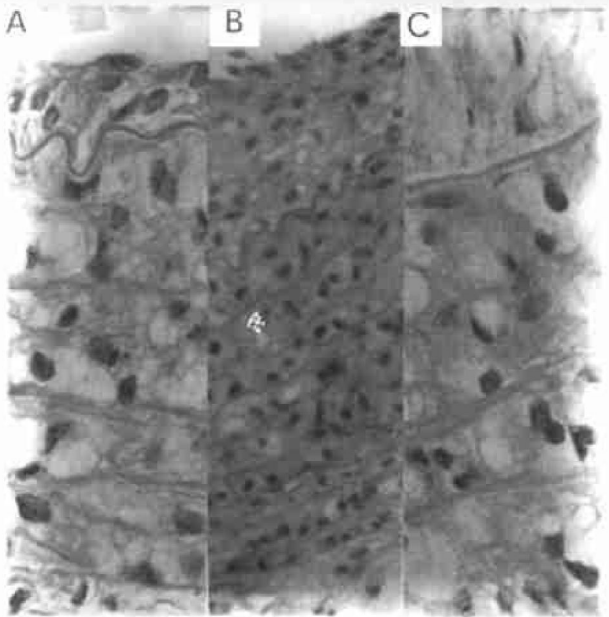


图 1. 空气干燥术后颈动脉内膜组织病理改变  
说明见正文。A: HE × 400; B: HE × 100; C: HE × 400

空气干燥术后 3 天组见内皮细胞完全脱落,内弹力板层暴露于血管内腔。空气干燥术后 1 周组可见管腔内皮开始再生,多为一层内皮细胞(图 1. A, Figure 1. A)。空气干燥术后 2 周组内膜下层可见大量梭形增生的平滑肌细胞,中膜肌层内胞浆嗜酸性的平滑肌细胞减少,代之以大量的胞浆淡染和充满脂质空泡的泡沫细胞(图 1. B, Figure 1. B)。空气干燥术后 4 周组内膜继续明显增厚,细胞胞浆

嗜酸性更不明显,代之以更典型的泡沫细胞。内膜中细胞间基质增多,泡沫细胞比例也较 2 周时增多(图 1. C, Figure 1. C)。在内膜增生的部分细胞团中还可可见新生滋养血管的形成。这些新生血管呈不规则的扁平腔隙,腔隙表面由一层内皮细胞覆盖。

2.3.3 透射电镜观察 正常饲料组和单纯高脂饲料组的颈动脉透射电镜下 Replace and press any key to reboot 数来源于平滑肌细胞,粗面内质网、核糖体等细胞器丰富。吞噬了较多脂滴的平滑肌细胞内的脂质融合成长形、针形或不规则的结晶。

表 2. 各组内膜/中膜面积比值(I/M 比值)( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 The ratio of intimal area/medial area in three groups

Groups	n	I/M ratio
Normal control	6	0.03 ± 0.009
Cholesterol- fed (CF)		
CF for 10 days	6	0.02 ± 0.007
CF for 2 week	6	0.03 ± 0.005
CF for 3 weeks	6	0.02 ± 0.006
CF for 5 weeks	6	0.04 ± 0.007
Cholesterol- fed plus Air- drying (CA)		
CA for 3 days	6	0
CA for 1 week	6	0.14 ± 0.04
CA for 2 weeks	6	0.47 ± 0.07
CA for 4 weeks	6	0.94 ± 0.07

The neointimal thickening was significant at 2 week and 4 week in the experimental groups compared with the empty control group, AVOMA,  $F = 325.68$ ,  $P < 0.001$ 。

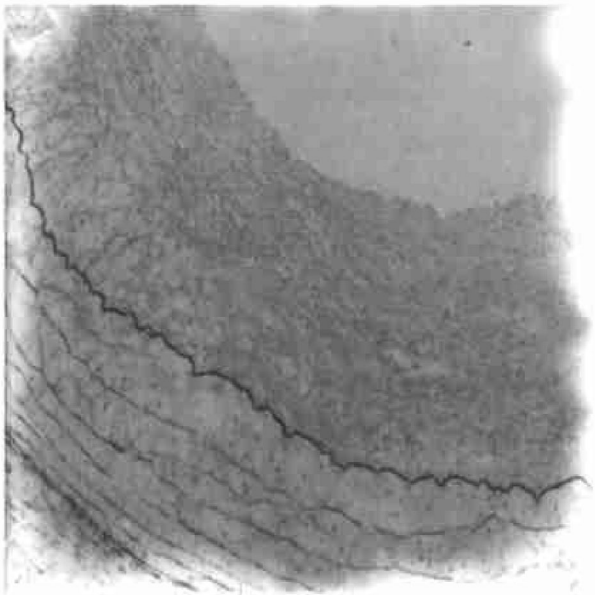


图 2. 空气干燥术后 4 周颈动脉壁弹力纤维染色  
说明见正文。

## 2.4 弹力纤维染色及内膜/中膜面积比值

弹力纤维染色可以清晰地区分内膜与中膜的界限。各组内弹力板均完整,无断裂征象。I/M 比值见表 2 (Table 2) 所示,高脂饲料加空气干燥术组 2 周和 4 周时内膜有明显增厚(图 2, Figure 2)。正常饲料组和高脂饲料加空气干燥术组各时间点 I/M 比值经行单因素方差分析,差异有非常显著性意义( $F = 325.68, P < 0.001$ )。

## 3 讨论

既往动物实验证明,虽然高脂饲料在 3~5 个月内可诱发冠状 As,也能诱发脑基底 As,但不能形成颈 As<sup>[2,3]</sup>。其原因至今尚未明了,可能与局部的动脉管腔结构、血流动力学特点以及内皮细胞功能等因素有关。球囊导管扩张法造成的血管损伤广泛应用于冠心病,尤其是经皮腔内冠状动脉成形术后再次狭窄的研究。但它的缺点,如内膜剥脱不完整,中层延展性损伤的存在和程度的不同以及一定的血栓形成率等<sup>[4,5]</sup>,不适于颈 As 病变的研究。我们利用高脂饲料加空气干燥术能在较短的时间内诱发家兔颈 As,经应用于实验研究,获得满意的结果<sup>[6]</sup>。

Ross 等<sup>[7]</sup>和 Schwartz 等<sup>[8]</sup>总结了人们熟知的 As 病变的三个特点:①有增殖的平滑肌细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等;②平滑肌细胞形成的结缔组织基质,包括弹力纤维蛋白、胶原和糖蛋白;③积蓄的脂质,主要是游离或酯化的胆固醇。本文在形成的颈 As 病变中,这些典型的病理改变都可以看到。而且在第 4 周时病灶内发现了新生滋养血管样管道形成,这意味着 As 病变的进一步发展。

球囊导管损伤法造成内皮细胞即刻的剥脱并且造成较严重的弹力板及中膜损伤,而空气干燥术操作当时并不立即造成内皮剥脱,亦不造成内弹力板和中膜的破坏,而是通过造成内皮细胞功能障碍和变性,然后在 24~48 h 内脱落<sup>[1]</sup>。之后的 1 周至 2 周内皮开始从两端修复再生。本文中观察到类似的这种内皮变化与再生过程可在一定程度上模拟内皮细胞受损与 As 形成过程的关系。高脂饲料加空气干燥术组 2 周、4 周时内膜增生明显,内膜与中膜面

积比值(I/M 比值)分别达到  $0.47 \pm 0.07$  和  $0.94 \pm 0.07$ 。随时间变化内膜增厚的程度易于量化,可重复性好,有利于进一步进行干预实验的研究。我们还观察了内膜和中膜细胞 PCNA 阳性率与病理形态学中细胞增殖情况的关系以及凝血系统和溶系统活性的变化,为今后的深入研究打下了基础。

利用高脂饲料加空气干燥术建立的颈 As 动物模型具有如下优点:损伤相对轻柔,只损伤内皮细胞而不造成内弹力板和中膜的破坏;无需结扎颈外动脉从而不影响血流动力学变化;无血栓形成,不影响结果的观察;其内皮细胞的修复与内膜的增殖过程更接近于颈动脉疾病的生理过程;内膜增殖程度和内膜、中膜中细胞的增殖程度易于量化,可重复性好;操作简便,无需球囊导管等特殊器械;易于确定损伤病变部位,方便取材。该模型上述优点使其更接近于模拟颈 As 病变的发生发展过程,比较适合于颈 As 病变的进一步研究<sup>[6]</sup>。

## 参考文献

- [1] Fishman JA, Graeme BR, Morris JK, et al. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening [J]. *Lab Invest*, 1975, **32**: 339–351
- [2] Wilson RB. Atherosclerosis in the rabbit fed a low cholesterol diet for five years [J]. *Arteriosclerosis*, 1982, **2**: 228–229
- [3] 赵水平,王钟林,陆宗良主编. 临床血脂学 [M]. 长沙:湖南科技出版社,1997; 226–227
- [4] Gordon AA, Ferns AL, Stewart L, et al. Arterial response to mechanical injury: balloon catheter deendothelialization [J]. *Atherosclerosis*, 1992, **3**: 89–104
- [5] Manderson JA, Mosse PRL, Safstrom JA, et al. Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. iv. Changes in smooth muscle phenotype [J]. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**: 289–298
- [6] 王明山,张磊,郑荣远,等. 实验性颈动脉粥样硬化模型中血栓素 B2 和 6-酮-前列腺素 F1 $\alpha$  与抗凝血酶 ③ 和纤溶酶原活性的改变 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (2):
- [7] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362**: 801–809
- [8] Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis [J]. *Am J Card*, 1993, **71**: B9–B14

(此文 2000–10–30 收到, 2001–03–27 修回)

(此文编辑 胡必利)