

转基因兔在动脉粥样硬化研究中的应用及其进展

刘恩岐¹, 范江霖¹

(西安交通大学医学院实验动物中心, 西安 710061; 1. 筑波大学基础医学系, 日本)

[关键词] 病理学与病理生理学; 转基因家兔; 动脉粥样硬化; 动物模型

[摘要] 家兔脂蛋白组成和脂代谢特点适合研究人的动脉粥样硬化疾病, 携带与动脉粥样硬化相关人基因的转基因兔又成为研究人脂蛋白代谢和动脉粥样硬化一个独特工具。到目前为止, 携带人载脂蛋白(a)、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 B、载脂蛋白 E2、载脂蛋白、肝脂酶、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶、脂蛋白脂酶、15-脂质氧化酶、基质金属蛋白酶 12, 以及家兔的载脂蛋白 B mRNA 编码蛋白催化多肽 1 基因等已经在家兔身上表达。另外, 人的载脂蛋白(a)、载脂蛋白 A IV、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶和脂蛋白脂酶基因也已经被导入到低密度脂蛋白受体缺陷的 WHHL 家兔体内。本文对利用转基因兔在研究脂代谢和动脉粥样硬化方面取得的进展进行了回顾总结。

[中图分类号] Q-3, R363

[文献标识码] A

1 引言

1.1 家兔的一般特性

家兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 属于兔形目 (Lagomorphs) 动物, 和啮齿类实验动物 (如小鼠和大鼠) 相比, 在系统发育上更接近人。家兔的妊娠周期短、性成熟早, 体形较大, 容易操作, 也不存在严重的可以传染给人的疾病。更重要的是, 家兔脂蛋白的特征与人相似, 在脂蛋白代谢方面更适合于人动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的研究, 是目前研究人 As 应用最广泛的动物模型之一^[1]。

表 1. 人、家兔和小鼠脂蛋白代谢特征的比较

代谢特征	小鼠	家兔	人
脂蛋白概貌	HDL 含量高	LDL 含量高	LDL 含量高
是否含有 CEPT	否	是	是
肝载脂蛋白 B 编辑功能	有	无	无
载脂蛋白 B48	乳糜微粒, VLDL	乳糜微粒	乳糜微粒
肝脂酶活性	高, 70% 在血液中	低, 主要局限于肝脏	高, 主要局限于肝脏
肝 LDL 受体	通常较多	低	低
载脂蛋白 A _{II}	有	无	有
饮食中的胆固醇	多数品系抵制	敏感	-
动脉粥样硬化	抵制	敏感	-

家兔体内低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 含量高, 与人相似, 而啮齿类实验动物体内高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 占优势^[2]; 家兔的肝脏不能编码载脂蛋白 B48 mRNA, 象人的肝脏一样只能合成载脂蛋白 B100, 而小鼠肝脏既能产生载脂蛋白 B100, 又可以合成载脂蛋白 B48, 因此, 小鼠的载脂蛋白 B48 既存在于肝源性 VLDL 中, 也

存在于肠源性乳糜微粒之中, 这一点与人不同, 人的载脂蛋白 B48 只存在于乳糜微粒之中^[3]; 和人一样, 家兔血浆中富含胆固醇酯转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP), CETP 在 As 发生和发展中起重要作用^[4]; 高胆固醇饲料容易诱发家兔 As, 对于大多数小鼠品系则不能, 因为小鼠缺乏 CETP^[5]。家兔的这些特性使之成为独特的模型用于研究血浆脂蛋白的代谢以及与 As 的关系 (表 1)。

1.2 高脂饲料诱发性高胆固醇血症模型

上个世纪初人们就开始使用家兔来研究人的 As^[1]。近几十年的研究证明, 高脂饲料中胆固醇含量达 0.2% ~ 2.0%, 就可使家兔血浆中胆固醇浓度迅速升高。高胆固醇血症后果是 As 的形成和发展。研究发现, 饲喂胆固醇饲料 2 周后, 家兔血管内皮下细胞外脂质开始沉积, 单核细胞和巨噬细胞浸润并出现脂滴。1 个月后, 主动脉出现脂肪条纹, 内含由巨噬细胞转化的泡沫细胞。3~6 个月时, 脂肪条纹变成由细胞内外脂质沉积而成的复杂的纤维斑块 (fibrous plaques), 这些斑块发展成为严重的 As 病变。平滑肌细胞也变成泡沫细胞, 胶原纤维 (collagen fibers) 合成增加, 出现坏死灶 (necrotic core), 胆固醇结晶 (cholesterol crystals) 析出^[6]。家兔血管病变主要分布在主动脉弓和胸主动脉, 而腹主动脉的病变更轻微一些。这些主动脉病变部位的特征是, 血管壁内含有大量 LDL 渗入并与胶原和粘多糖黏附、结合。内膜下细胞外滞留的脂蛋白容易发生氧化, 引起局部细胞反应, 释放各种细胞因子, 聚集淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞, 表达细胞黏附分子, 平滑肌细胞成为合成型并增殖, 这些变化是动脉血管壁局部病变的主要反应^[7]。

1.3 自发性高胆固醇血症模型

渡边兔 (Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL) 和圣·托马斯兔 (St. Thomas' s hospital strain, SHHS) 是自发的内源性高胆固醇血症家兔品系。是研究高胆固醇血症和 As 常用的两个自发性动物模型^[1]。WHHL 兔是日本神户大学的渡边雄 (Yoshio Watanabe) 博士 1980 年从日本大耳白兔 (Japanese white) 中选拔出来的第一个自发的内源性高脂血症 (hyperlipi-

[收稿日期] 2003-05-12 [修回日期] 2003-07-09

[作者简介] 刘恩岐, 男, 1965 年出生, 陕西岐山人, 副教授。毕业于中国农业大学, 主修动物遗传和兽医专业, 现从事医学实验动物学及人动脉硬化疾病动物模型的研究。

demia) 动物模型^[8]。WHHL 兔是单基因隐性突变造成 LDL 受体缺陷, 饲喂普通饲料就可以形成高胆固醇血症和 As, 纯合子 WHHL 兔血清胆固醇的浓度是正常日本大耳白兔的 8~14 倍。WHHL 兔的临床特征和病理变化与家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 非常相似^[9]。使用 WHHL 兔既可以在 LDL 受体缺陷的情况下研究脂蛋白功能, 又不需要饲喂高胆固醇饲料就可以直接研究高胆固醇血症和 As 的关系。

英国伦敦圣·托马斯医院的 La Ville 等在新西兰白兔 (New Zealand white, NZW) 中发现脂代谢紊乱的家兔, 培育成功圣·托马斯兔^[10]。该品系家兔肝脏合成极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 功能亢进, 饲喂正常饲料就可造成血中 LDL、中间密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) 和 VLDL 浓度升高。圣·托马斯兔 LDL 受体功能正常, 遗传特征还没有确定, 可能是一个主要基因突变引起的。该品系兔脂质代谢的特性和病理变化与高胆固醇饲料诱发的高胆固醇血症不同, 具有人复合性高胆固醇血症的特征。

1.4 转基因兔模型

制作转基因兔的方法, 主要采用的是, 将构建好的外源基因直接注射到受精卵的雄原核中, 与采用此法制转基因小鼠的过程相似(这里不再赘述)。

Hammer 等^[11] 1985 年最早用连接小鼠金属硫蛋白基因 (metallothionein) 启动子的人生长素基因制作成功转基因兔, 在家兔的血清中检测到了人生长素。1993 年, Hoeg 等^[12] 和 Perevozchikov 等^[13] 同时将人载脂蛋白 AI 基因导入到家兔的基因组中, 培育成功携带人载脂蛋白 A iv 的转基因兔。1994 年, 范江霖等^[14] 培育成功表达人的肝脂酶转基因兔, 开始了使用转基因兔研究脂质、脂蛋白的代谢。

转基因兔的培育成功, 为研究与 As 和高脂血症有关的一些蛋白质提供了新的途径, 为人 As 研究开辟了新天地。

到目前为止, 人的载脂蛋白 (a)、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 B、载脂蛋白 E2、载脂蛋白 E3、肝脂酶、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 (lecithin: cholesterol acyltransferase, LCAT)、脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL)、15-脂氧化酶 (15-lipoxygenase, 15-LO)、基质金属蛋白酶 12 (matrix metalloproteinase 12, MMP-12) 基因以及家兔的载脂蛋白 B mRNA 编码蛋白催化多肽 1 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1, APOBEC-1) 基因等已经在家兔身上表达。此外, 人的载脂蛋白 (a)、载脂蛋白 A iv、LCAT 和 LPL 基因已经被导入到 LDL 受体缺陷的 WHHL 兔体内。这些基因在家兔体内的表达及对脂蛋白代谢和 As 的影响总结如表 2 所示。

转基因家兔是研究血浆中脂蛋白代谢和 As 的重要模型, 为研究人 As 的发生、发展提供了新的、独特的方法。下面主要讨论一下转基因兔作为人疾病模型来研究 As 取得的一些进展。

2 研究进展

2.1 载脂蛋白 A iv 转基因兔

1993 年, Perevozchikov 等^[13] 培育成功带有人载脂蛋白 AI

表 2. 转基因兔子携带的外源基因在动脉粥样硬化中的作用

表达的基因	表达部位	对脂蛋白的影响	对 As 的影响
人肝脂酶	肝脏	VLDL ↓, IDL ↓, HDL ↓	抗 As 形成
人 LPL	多组织表达	VLDL ↓, IDL ↓, LDL ↑, HDL ↓	根据胆固醇的水平, 抗或导致 As 的形成
人 LCAT	肝脏	HDL ↑, LDL ↓	抗 As 的形成
家兔 APOBEC	肝脏	LDL ↓	不清楚
人载脂蛋白 (a)	肝脏	载脂蛋白 (a) 形成	导致 As 形成
人载脂蛋白 A iv	肝脏	HDL ↑	抗 As 形成
人载脂蛋白 B100	肝脏	HDL ↓, IDL ↑	不清楚
人载脂蛋白 E2	肝脏	VLDL ↑, IDL ↑, HDL ↑ (♀)	导致 As 形成
人载脂蛋白 E3	肝脏	VLDL ↓, IDL ↑, HDL ↑	高表达时, 导致 As 形成
15-脂氧化酶	巨噬细胞	不清楚	导致 As 形成

cDNA 的转基因兔。3 年后, Duverger 等^[15] 将包含人载脂蛋白 A iv 基因 11 kb DNA (带有在肝脏特异表达的启动子) 导入到 NZW 兔基因组内, 在肝脏中表达了人的载脂蛋白 AI, 转基因兔血浆中人载脂蛋白 A iv 浓度为 80~1 000 mg/L。饲喂含 0.4% 胆固醇的饲料 14 周后, 载脂蛋白 A iv 转基因兔血浆中 HDL 胆固醇含量为对照组的 2 倍 (680 ± 110 比 370 ± 30 mg/L, $P < 0.001$)。实验后期, 转基因兔主动脉表面脂质聚集比对照组明显减小 (15% ± 12% 比 30% ± 18%, $P < 0.01$), 总胆固醇为对照组的 46% (116 ± 31 比 247 ± 39 μmol/g, $P < 0.01$)。研究显示, 过度 (overexpression) 表达人的载脂蛋白 A iv 似乎有抑制 As 发展趋势^[16]。但是, Mackness 等^[17] 的研究却不支持 Duverger 的结论, 他们给载脂蛋白 AI 转基因兔饲喂高胆固醇饲料 14 周后, 转基因兔胸主动脉表面的病变和对照组相比, 并无显著差异 (26% ± 15% 比 29% ± 16%, $P > 0.05$)。

2.2 载脂蛋白 B 转基因兔

范江霖等^[18] 将人全长 80 kb 的载脂蛋白 B 基因组 DNA 注射到 NZW 兔受精卵的雄原核中, 培育出携带人载脂蛋白 B100 基因的转基因兔。转基因兔血浆中只表达人载脂蛋白 B100, 不表达载脂蛋白 B48, 因为家兔的肝脏中缺乏编辑相应的载脂蛋白 B mRNA 的功能^[3]。转基因兔血浆中人载脂蛋白 B100 的含量为 120~940 mg/L。与相同性别、相同年龄、相同条件饲养的非转基因兔相比, 转基因兔血浆中胆固醇和甘油三酯的含量是对照组的 2~3 倍, HDL 胆固醇则显著降低。转基因兔血浆中几乎所有的胆固醇和人的载脂蛋白 B100 以 LDL 颗粒 (fraction) 形式存在, LDL 颗粒富含甘油三酯。通过梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 转基因兔 LDL 颗粒直径和对照相比, 显著减小 (24 nm 比 27.5 nm)。在这项研究中, 携带人载脂蛋白 B100 基因的转基因兔是否易感 As 没有确定^[18]。

2.3 载脂蛋白 (a) 转基因兔

自然界只在人、猴子和刺猬体内发现了载脂蛋白 (a), 作为脂蛋白 (a) 主要成分的载脂蛋白 (a) 与人的冠心病、中风和冠状动脉扩张术后再狭窄有密切关系, 但一直缺乏合适的动

物模型研究人的载脂蛋白(a)。转基因小鼠表达的人载脂蛋白(a)不能和啮齿类的载脂蛋白B结合成脂蛋白(a)颗粒(particles),小鼠不是理想的动物模型。范江霖等^[19]和Rouy等^[20]分别建立了表达人载脂蛋白(a)的转基因兔模型。人载脂蛋白(a)在以YAC为载体的转基因兔中表达量为25 mg/L, cDNA转基因兔的表达量为18~45 mg/L。研究显示,这些表达人载脂蛋白(a)的转基因兔能够形成类似人的脂蛋白(a)样颗粒,提示这样的转基因兔是研究脂蛋白(a)有用的模型^[19]。为了确定载脂蛋白(a)与As的关系,范江霖等^[21]给转基因兔饲喂正常和高胆固醇饲料,发现饲喂正常饲料的转基因兔没有发生As病变,显示了低水平载脂蛋白(a)不能导致As的形成。用含有0.3%胆固醇的饲料饲喂家兔16周后,转基因兔和非转基因兔血浆胆固醇含量相似,但转基因兔动脉粥样病变却严重的多,转基因兔在主动脉、髂动脉和颈动脉粥样病变区域扩大。最新的研究表明,在转基因兔表达的脂蛋白(a)使纤维蛋白溶解的活性推迟,使血浆中血纤维蛋白酶原催化剂抑制子1的含量增加,脂蛋白(a)还促使平滑肌细胞在As病变部位增殖^[22]。

2.4 载脂蛋白E2转基因兔

高浓度表达人载脂蛋白E2(Cys112...Cys158)的转基因兔由Huang等^[23]培育成功。人遗传性 β 型高脂蛋白血症(type β hyperlipoproteinemia)就是载脂蛋白E2基因纯合的表现,这类病人未成年前容易患As。Huang的研究发现,过度表达人载脂蛋白E2的转基因兔血浆中载脂蛋白E2的浓度为300~700 mg/L,非转基因的对照组家兔只有40 mg/L,而且转基因兔总胆固醇和HDL胆固醇浓度也比对照高,转基因兔总胆固醇和HDL胆固醇浓度雌雄差异较大。分析转基因兔的血浆脂蛋白,发现与 β 型高脂蛋白血症的特征相符, β -VLDL聚集,VLDL和IDL浓度显著增加,表现出性别差异等。用正常饲料饲喂这些家兔11个月,在主动脉弓和腹主动脉自发形成动脉粥样病变,显示了转基因兔过度表达人载脂蛋白E2有促进自发形成As作用。研究还发现雄兔比雌兔病变部位更广一些,提示性激素在 β 型高脂蛋白血症中起重要作用。

2.5 载脂蛋白E3转基因兔

范江霖等^[24]将人载脂蛋白E3基因组DNA连接肝脏调控区域导入到家兔基因组内,转基因兔表达了人载脂蛋白E3(Cys112...Arg158)。在建立的3个转基因兔品系中,人载脂蛋白E3表达水平分别为60、110和130 mg/L。与非转基因兔相比,转基因兔VLDL降低,LDL升高。转基因兔血浆中几乎没有大的VLDL颗粒(>36 nm),而非转基因兔大约有20%这种颗粒,差别极显著,可能是载脂蛋白E增加了受体介导的对VLDL的清除功能。Huang等^[25]人研究表明,转基因兔过度表达载脂蛋白E3刺激肝脏产生VLDL,增强VLDL清除,抑制VLDL的脂解,引起高脂血症。在较窄范围内表达人载脂蛋白E不同水平的差异,对调整血浆胆固醇和甘油三酯浓度起着重要的临界作用,对高脂蛋白血症的类型可能起决定作用。

2.6 载脂蛋白B mRNA 编码蛋白催化多肽1转基因兔

山中等^[26]同时培育了携带家兔APOBEC-1基因的转基因兔和转基因小鼠,以确定动物肝脏表达APOBEC-1后是否降低血浆LDL。研究发现,与对照相比,转基因兔和小鼠肝脏产生的大多数载脂蛋白B mRNA被APOBEC-1剪辑、修饰,载脂蛋白B100和LDL浓度降低。转基因兔VLDL、IDL和LDL含量减少,HDL胆固醇含量增加。但是,几乎所有转基因兔和小鼠肝脏发育异常,很多小鼠发展为肝细胞癌^[26]。通过进一步研究,他们发现,如果转基因小鼠肝脏长时间低水平表达足够清除LDL的APOBEC-1,小鼠肝脏没有明显的病变,也不会引发肝肿瘤^[27]。

2.7 肝脂酶转基因兔

范江霖等^[14]将人载脂蛋白E/CI在肝脏表达的调控区域和肝脂酶cDNA导入到家兔基因组中,6只家兔在肝脏中表达了人的肝脂酶。肝脂酶在脂蛋白代谢过程中起举足轻重的作用,家兔本身内源性肝脂酶活性很低,表达人肝脂酶的转基因兔对血液中脂质和脂蛋白代谢有重要影响。范江霖等^[28]从10种组织中提取总RNA,发现人肝脂酶基因只在家兔肝脏中表达。肝脂酶肝脂酶过度表达导致HDL、VLDL和IDL显著下降,转基因兔中总胆固醇和甘油三酯下降了42%和58%。给肝脂酶转基因兔饲喂含0.3%的胆固醇和3%的豆油饲料5周后,转基因兔血液中胆固醇的含量只有对照组的1/3,转基因兔高胆固醇血症趋势减弱。初步研究显示,降低肝脂酶转基因兔的血液中胆固醇浓度与主动脉粥样硬化区域的缩小有关。

2.8 脂蛋白脂酶转基因兔

为了研究LPL在脂代谢中的作用以及与As的关系,Araki等^[29]将带有鸡 β -肌动蛋白(β -actin)启动子的人LPL cDNA注射到家兔受精卵中,获得了表达人LPL的转基因兔。Northern杂交显示人LPL在心脏、肾脏、肾上腺和肠组织中表达。转基因兔人LPL的活性是对照组的4倍,在肝磷脂浆中(post heparin plasma) LPL浓度高达650 μ g/L。转基因兔中血浆甘油三酯下降80%,HDL下降59%。分析脂蛋白密度颗粒显示,增加转基因兔LPL表达量可以显著降低VLDL和IDL的水平,LDL胆固醇水平明显增加。当给转基因兔饲喂胆固醇饲料时,转基因兔明显抑制高胆固醇血症和主动脉粥样硬化病变的形成和发展。提示过度表达的LPL对饲料诱导的高胆固醇血症和As有抑制作用^[30]。

2.9 卵磷脂-胆固醇酰基转移酶转基因兔

人卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(LCAT)是胆固醇代谢的一个关键酶。1996年,Hoeg等^[31]报道了将覆盖人LCAT基因的基因组DNA导入到NZW兔体内,培育成功携带人LCAT的转基因兔,用于研究家兔过度表达LCAT对血浆脂质和脂蛋白代谢的影响。Northern杂交发现,LCAT主要在肝脏中表达,脑、心脏和肌肉中也有表达。转基因兔血浆脂质和脂蛋白含量发生显著变化,总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯浓度显著提高。总胆固醇的增加主要是由于HDL胆固醇的浓度明显增加。用含0.3%的胆固醇饲料饲喂家兔17周后,与对照组相比,转基因兔HDL胆固醇含量增加了20%。转基因兔动脉表面病变只有5%,对照组家兔为35%。提示

LCAT 对饲料诱导的 As 有抑制作用^[31]。而 Mehlum 等^[32]研究却发现,携带人 LCAT 的纯合转基因小鼠的 LCAT 活性比对照组高 14~27 倍, HDL 胆固醇浓度高 2 倍,但对饲料诱导的 As 并没有明显的抑制作用。

2.10 15-脂氧化酶转基因兔

15-脂氧化酶(15-LO)在 As 病变部位的泡沫样巨噬细胞内表达,可能与 As 发生过程中 LDL 的氧化有关。Shen 等^[33]用溶菌酶巨噬细胞特异启动子连接人 15-LO 基因,培育成功表达人 15-LO 基因的转基因兔,在单核细胞起源的巨噬细胞内大量表达。用含有 10% 玉米油和 0.25% 胆固醇的饲料饲喂 13.5 周,转基因兔血液中甘油三酯、VLDL 和 HDL 的浓度与非转基因兔相同,但主动脉粥样硬化病变形态分析则显示,转基因兔与同窝非转基因兔相比病变区域明显缩小($9.8\% \pm 6.6\%$ 比 $17.8\% \pm 15.0\%$, $P < 0.05$)。将 15-LO 转基因兔与 WHHL 家兔杂交,发现携带 15-LO 的 WHHL 家兔 As 病变的面积只有对照组的 26% ($7.7\% \pm 5.7\%$ 比 $20.7\% \pm 19.4\%$, $P < 0.05$),证实 As 早期发生过程中,在单核细胞或巨噬细胞中过度表达 15-LO 有抑制脂质在血管壁沉积的作用^[34]。Cyrus 等^[35]研究转基因小鼠却得出完全相反的结论,发现 15-LO 的功能与 As 的发生、发展密切相关,15-LO 参与脂质过氧化反应和 As 的形成。

2.11 基质金属蛋白酶 12 转基因兔

基质金属蛋白酶 12(MMP-12)参与 As 的形成和发展。巨噬细胞和泡沫细胞产生的 MMP-12 可能影响 As 斑块的稳定性,使 As 病变部位破裂。Wang 等^[36]利用人清道夫受体启动子连接人 MMP-12 结构基因培育成功转基因兔。在转基因兔腹膜的巨噬细胞、肺泡巨噬细胞以及含有大量巨噬细胞的组织(如脾脏、肺和骨髓)中检测到 MMP-12 mRNA 的表达。培养转基因兔的腹膜和肺泡巨噬细胞,检测到人 MMP-12 基因大量表达的 MMP-12。该项研究正在进行之中。

2.12 转多基因 WHHL 兔

1993 年, Hoeg 等^[12]将人载脂蛋白 AI 基因导入到 WHHL 家兔的基因组中,与非转基因兔相比,转基因兔 HDL 胆固醇浓度显著提高(240 ± 20 mg/L 比 60 ± 10 mg/L),显示出人载脂蛋白 AI 基因在 WHHL 家兔体内的表达有抑制 As 的作用^[37]。Brousseau 等^[38]研究 LCAT 转基因 WHHL 兔发现,LCAT 经由 LDL 的受体通道调节 LDL 的代谢,影响 As 的形成。为了确认在高胆固醇血症基础上再增加血液中脂蛋白(a)的含量是否加重 As 的发展,范江霖等^[39]将人载脂蛋白(a)基因导入到 WHHL 家兔的基因组中,与对照组相比,载脂蛋白(a)转基因兔 As 病变更广泛。研究还发现,在转基因兔中严重的 As 病变往往伴有组织的钙化(calcification),这在非转基因兔身上很罕见,第一次证实脂蛋白(a)不但加速 As 的发展,而且还可能在动脉血管的钙化上起重要作用^[40]。

2.13 双基因转基因兔

Barbagallo 等^[41]将载脂蛋白 E 和肝脂酶转基因兔杂交,获得携带人载脂蛋白 E 和肝脂酶基因的双基因转基因兔。用高脂、胆固醇饲料饲喂 10 周后,与对照组相比,过度表达人载脂蛋白 E 和肝脂酶转基因兔的总胆固醇降低 85%、

VLDL+IDL+LDL 降低 87%,差异极显著。单纯肝脂酶转基因兔 VLDL 和 LDL 降低, VLDL 不降低^[14,28];单纯载脂蛋白 E 转基因兔 VLDL 降低, LDL 升高^[24]。双转基因兔研究显示了人载脂蛋白 E 和肝脂酶相互共同作用,调节血浆胆固醇和脂蛋白代谢。Rouy 等^[42]也培育了表达人载脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 的双转基因兔,发现人载脂蛋白(a)通过共价键与家兔内源性载脂蛋白 B 结合的效率比与人载脂蛋白 B 结合的效率低,为研究载脂蛋白(a)的功能及脂蛋白(a)在 As 和术后狭窄中的功能提供了一个有益的模型。

3 结语

从上文讨论可以发现,家兔和小鼠在脂蛋白的代谢方面有不同的特点,当相同的人基因导入到它们的基因组之后,在家兔和小鼠身上的表现出差异(表 3)。如人的 LCAT 在家兔身上对饲料诱导的 As 有抑制作用^[31],但是在小鼠身上却没有反映出来^[32]。人同一基因在不同种动物反映出表型的差异,可能会影响人们对实验结果的解释。

表 3. 导入的同一种基因在小鼠和家兔中的不同表现

导入的基因	小鼠	家兔	资料来源
LCAT	导致 As 形成	抗 As 形成	Mehlum 1997, Hoeg 1996
HL	抗 As 形成	导致 As 形成	Amar 2000, Taylor 1997
载脂蛋白(a)	不与载脂蛋白 B 结合	与载脂蛋白 B 结合	Chiesa 1992, Fan 1999
载脂蛋白 E3	抗 As 形成	导致 As 形成(高表达)	Shimano 1992, Fan 1998
15-LO	导致 As 形成	抗 As 形成	Cycus 1999, Shen 1996
LPL	引起肌病	肌肉正常	Levak-Frank 1995, Koike 2002

通过对来源不同种类动物模型的比较分析,将会不断提高人们对 As 的认识水平。家兔在研究 As 上的独特优势,使得转基因兔成为研究人脂蛋白代谢和 As 相互关系理想的动物模型,为人研究 As 提供了一个新的工具。在不久的将来,我们相信制作转基因兔的技术将更加丰富、效率更高。随着家兔 ES 细胞系的建立,培育成功基因敲除(knock out)家兔将成为可能。核移植技术也将广泛应用于转基因兔的培育。新的转基因兔模型不断的培育成功,人们对 As 的预防、发生、发展认识将有一个大的飞跃。

[参考文献]

- [1] Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. The biology of the laboratory rabbits. Academic Press Inc, San Diego, USA, 1994; 294-230
- [2] Fan J, Challah M, Watanabe T. Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives. *Pathol Int*, 1999, **49**: 583-594
- [3] Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, et al. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apo B-containing lipoproteins. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 1 367-383
- [4] Nagashima M, McLean JW, Lawn RL. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 643-649
- [5] Fan J, Watanabe T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2000, **7**: 26-32
- [6] Daley SJ, Herderick EE, Cornhill JF, et al. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 95-104

- [7] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [8] Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*, 1980, **36**: 261-268
- [9] Kita T, Brown MS, Watanabe Y, et al. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 2 268-272
- [10] La Ville A, Turner PR, Pittilo RM, et al. Hereditary hyperlipidemia in the rabbit due to overproduction of lipoproteins. *Arteriosclerosis*, 1987, **7**: 105-124
- [11] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, **315**: 680-683
- [12] Hoeg JM, Vaisman BL, Demosky SJ, et al. Development of transgenic Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits expressing human apolipoprotein A-I. *Circulation*, 1993, **88**: 1-2
- [13] Perevozchikov AP, Vaisman BL, Sorokin AV, et al. Study of the effect of the cDNA for the human A-I gene in transgenic rabbits: modeling the neurological syndrome of human Tangier disease. *Molekuliarnaia Biologi*, 1993, **27**: 24-37
- [14] Fan J, Wang J, Bensadoun A, et al. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8 724-728
- [15] Duverger N, Viglietta C, Berthou L, et al. Transgenic Rabbits Expressing Human Apolipoprotein A-I in the Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 1 424-429
- [16] Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, et al. Inhibition of Atherosclerosis Development in Cholesterol-Fed Human Apolipoprotein A-I Transgenic Rabbits. *Circulation*, 1996, **94**: 713-717
- [17] Mackness M, Boullier A, Hennuyer N, et al. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **269**: 232-236
- [18] Fan J, McCormick SPA, Krauss RM, et al. Overexpression of human apolipoprotein B100 in transgenic rabbits results in increased levels of LDL and decreased levels of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 889-899
- [19] Fan J, Araki M, Wu L, et al. Assembly of lipoprotein (a) in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a). *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **255**: 639-644
- [20] Rouy D, Duverger N, Lin SD, et al. Apolipoprotein (a) yeast artificial chromosome transgenic rabbits. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 1 247-251
- [21] Fan J, Shimoyamada H, Sun H, et al. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 88-94
- [22] Ichikawa T, Unoki H, Sun H, et al. Lipoprotein (a) promotes smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation in atherosclerotic lesions of human apo (a) transgenic rabbits. *Am J Pathol*, 2002, **160**: 227-236
- [23] Huang Y, Schwendner SW, Rall SC, et al. Apolipoprotein E2 transgenic rabbits: modulation of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen and occurrence of spontaneous atherosclerosis. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 22 685-694
- [24] Fan J, Zhong-Sheng J, Huang Y, et al. Increased expression of apolipoprotein E in transgenic rabbits results in reduced levels of very low density lipoproteins and an accumulation of low density lipoproteins in plasma. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 2 151-164
- [25] Huang Y, Ji ZS, Brecht WJ, et al. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 2 952-959
- [26] Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 8 483-487
- [27] Qian X, Balestra ME, Yamanaka S, et al. Low expression of the apolipoprotein B mRNA-editing transgene in mice reduces LDL levels but does not cause liver dysplasia or tumors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1 013-020
- [28] Fan J, Wang J, Ji ZS, et al. Transgenic rabbits overexpression human hepatic lipase have reduced level of high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins and diminished response to dietary cholesterol. *Circulation*, 1994, **90** (Suppl I): 298
- [29] Araki M, Fan J, Challah M, et al. Transgenic rabbits expressing human lipoprotein lipase. *Cytotechnology*, 2000, **33**: 93-99
- [30] Fan J, Unoki H, Kojima N, et al. Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 40 071-079
- [31] Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Bernard AM, et al. Overexpression of lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 11 448-453
- [32] Mehlum A, Gjernes E, Solberg LA, et al. Overexpression of human lecithin: cholesterol acyltransferase in mice offers no protection against diet-induced atherosclerosis. *APMIS*, 2000, **108**: 336-342
- [33] Shen J, Kuhn H, Pethö-Schramm A, et al. Transgenic rabbits with the integrated human 15-lipoxygenase gene driven by a lysozyme promoter: macrophage-specific expression and variable positional specificity of the transgenic enzyme. *FASEB J*, 1995, **9**: 1 623-631
- [34] Shen J, Herderick E, Cornhill JF, et al. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest*, 1996, **98**: 2 201-208
- [35] Cyrus T, Pratico D, Zhao L, et al. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2001, **103**: 2 277-282
- [36] Wang X, Unoki H, Liang J, et al. Transgenic rabbits with specific expression of human matrix metalloproteinase-12 in macrophage. *Lab Invest*, 2003 (in press)
- [37] Emmanuel F, Caillaud JM, Hennuyer N, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I inhibits atherosclerosis development in Watanabe rabbits. *Circulation*, 1996, **94**: F-632
- [38] Brousseau ME, Kauffman RD, Herderick EE, et al. LCAT modulates atherogenic plasma lipoproteins and the extent of atherosclerosis only in the presence of normal LDL receptors in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 450-458
- [39] Fan J, Sun H, Unoki H, et al. Enhanced atherosclerosis in Lp(a) WHHL transgenic rabbits. *Ann NY Acad Sci*, 2001, **947**: 362-365
- [40] Sun H, Unoki H, Wang X, et al. Lipoprotein (a) enhances advanced atherosclerosis and vascular calcification in WHHL transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a). *J Biol Chem*, 2002, **277**: 47 486-492
- [41] Barbaggio CM, Fan J, Blanche PJ, et al. Overexpression of human hepatic lipase and Apo E in transgenic rabbits attenuates response to dietary cholesterol and alters lipoprotein subclass distributions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 625-632
- [42] Rouy D, Duverger N, Lin SD, et al. Apolipoprotein (a) yeast artificial chromosome transgenic rabbits. *Lipoprotein (a) assembly with human and rabbit apolipoprotein B*. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 1 247-251

(此文编辑 胡必利)