

三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较

郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 黄高忠

(第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003)

[关键词] 病理学与病理生理学; 大鼠动脉粥样硬化模型的复制; 高脂+维生素D+内皮损伤; 动脉粥样硬化, 大鼠模型; 高脂; 维生素D; 内皮损伤

[摘要] 为研究动脉粥样硬化的发病机制, 比较了三种大鼠动脉粥样硬化斑块模型建立的方法。分别予单纯高脂、高脂+维生素D、高脂+维生素D+内皮损伤三种不同方法处理大鼠, 90天后比较血脂、血钙、胸主动脉的形态学改变、巨噬细胞和 α -平滑肌肌动蛋白含量。结果发现, 三组实验组与正常对照组相比, 总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇均明显升高($P < 0.01$); 高脂+维生素D组、高脂+维生素D+内皮损伤组与正常对照组和高脂组相比, 血钙均明显升高($P < 0.01$); 高脂+维生素D组、高脂+维生素D+内皮损伤与正常对照组相比, 内膜增厚、中膜萎缩($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 单纯高脂组、高脂+维生素D组CD68为弱阳性, 高脂+维生素D+内皮损伤组为强阳性; 高脂+维生素D组内膜有较厚的 α -平滑肌肌动蛋白阳性, 高脂+维生素D+内皮损伤组斑块表面只有很薄的 α -平滑肌肌动蛋白阳性; 单纯高脂组只可形成高脂血症, 无法形成动脉粥样硬化病变; 高脂+维生素D组可形成纤维斑块; 高脂+维生素D+内皮损伤组可形成较成熟的动脉粥样硬化斑块。证明了大鼠可作为研究动脉粥样硬化的良好动物模型, 高脂+维生素D+内皮损伤组可形成较成熟的动脉粥样硬化斑块。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Comparison on the Three Duplication Methods of Atherosclerosis Model in Rats

GUO Yair-Song, WU Zong-Gui, YANG Jun-Ke, and HUANG Gao-Zhong

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Rat; Model; High lipid; Vitamin D; Endothelium Injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate pathogenesis of atherosclerosis, three methods for establishment of rat animal model were compared. **Methods** Three different methods, including high lipid only, high lipid+ Vitamin D overload, and high lipid+ Vitamin D overload+ endothelium injury, were used for inducing atherosclerosis in rats. After 90 days, serum lipid, serum calcium, morphology change of thoracic aorta were determined, and immunohistochemical assay of macrophage and α -smooth muscle actin were performed. **Results** The levels of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), LDLC in three groups (hyperlipidemia group, hyperlipidemia + vitamin D3 group, and hyperlipidemia + vitamin D3 + endothelium denudate group) were obviously higher than those in control group ($P < 0.01$). The levels of serum calcium in two groups (hyperlipidemia + vitamin D3 group and hyperlipidemia + vitamin D3 + endothelium denudate group) were also obviously higher than those in control group and hyperlipidemia group ($P < 0.01$). Compared with control group, there were thicker intima, thinner media in hyperlipidemia + vitamin D3 group and hyperlipidemia + vitamin D3 + endothelium denudate group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). By immunohistochemistry, the CD68 positive level were low in hyperlipidemia group and hyperlipidemia + vitamin D3 group, and high in hyperlipidemia + vitamin D3 + endothelium denudate group. The α -actin positive level in intima is thick in hyperlipidemia + vitamin D3 group, thin in hyperlipidemia + vitamin D3 + endothelium denudate group. The rats treated with high lipid only showed hyperlipidemia without As lesion; the rats treated with high lipid+ Vitamin D overload showed fibrous plaque; the typical mature atheromatous plaques were presented in the rats treated with high lipid+ Vitamin D overload+ endothelium injury creates mature atheromatous plaque. **Conclusions** Rat can be used as a ideal model for research atherosclerosis. The mature atheromatous plaque may created by high lipid + Vitamin D overload and endothelium injury.

建立合适的动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)动物模型是研究其发病机制及探讨治疗措施的重要前提条件。As是多因素引起的慢性炎症性反应,涉及

脂质浸润、钙超载、内皮损伤等致病因素,为此,本文设计了三种大鼠动脉粥样硬化模型建立的方法并进行了比较,为研究As的病因、发病机制和防治措施提供合适的动物模型。

[收稿日期] 2003-01-21 [修回日期] 2003-06-30

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(G2000056900)资助

[作者简介] 郭延松,男,1971年出生,汉族,福建省福清市人,医学博士,主要从事冠心病研究,E-mail为ysguo1234@sina.com。吴宗贵,男,1952年出生,汉族,安徽省枞阳县人,教授,博士研究生导师,为本文通信作者,联系电话:021-63610109-73201。杨军柯,男,1970年出生,汉族,河南省洛阳市人,博士,主要从事冠心病研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康纯种Wistar雄性大白鼠,体重200g(3~4

月龄),由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组与喂养

40只大鼠随机分为4组,每组10只:正常对照组喂基础饲料。单纯高脂组以高脂饲料(2%胆固醇、0.5%胆酸钠、3%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶和94.3%的基础饲料)喂养。高脂维生素组在喂高脂饲料的基础上加维生素D3粉剂(1.25×10^6 u/kg饲料)喂养,实验开始时于右下肢肌肉注射维生素D3针剂(3×10^5 u/kg体重),每隔30天重复一次。内皮损伤组在给予高脂维生素组相同处理的基础上,于第7天行大鼠主动脉内膜球囊损伤术^[1]。动物饲养在带不锈钢盖底的塑料笼内,每笼2只,自由饮水,室温19~23℃,自然采光。

1.3 大鼠主动脉内膜球囊损伤术

动物用戊巴比妥钠(30 mg/kg体重)腹腔麻醉,背位固定,无菌条件下作颈正中切口,分离左颈总动脉,结扎远心端,向心脏方向插入1.5F球囊,进入8 cm后,注入0.2 mL生理盐水充盈球囊,手感到一定阻力向回拉约4~5 cm,放水后再进入8 cm,注水充盈、回拉、放水,反复3次,拔出球囊,结扎近心端。

1.4 血液和动脉标本的采集

实验第90天,各组动物禁食过夜,在戊巴比妥钠腹腔麻醉下,分离腹主动脉,在肾动脉分叉处下方,剪开腹主动脉,插入穿刺针,以注射器采集动脉血,用3 000 r/min立即离心15 min,分离血浆,取1 mL用检测血脂和血钙;剪下主动脉,取胸主动脉下段约1 cm立即用10%甲醛固定,用于常规形态学和免疫组织化学检查。

1.5 血脂和血钙的检测

用Abbott Aeroset TM生物化学分析仪(美国亚培公司)检测血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、LDLC和 Ca^{2+} 。

1.6 病理学观察

1.6.1 形态学研究 将用10%甲醛固定的胸主动脉石蜡包埋,连续切片,切片固定于载玻片上,HE染色,光镜观察,利用HPLAS-1000型图象分析系统检测内膜、中层厚度。

1.6.2 巨噬细胞和 α 平滑肌肌动蛋白免疫组织化学检测 采用微波EnVision法^[2],应用小鼠抗大鼠CD68单克隆抗体和 α 平滑肌肌动蛋白单克隆抗体为一抗鉴定巨噬细胞和平滑肌细胞,EnVision复合物为二抗,常规DAB-H2O2显色,苏木素复染。

1.7 统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS10.0统计软件行方差分析,各组间两两比较用SNK法。

2 结果

2.1 一般状况

实验过程中共有4只大鼠死亡,其中单纯高脂组死亡1只,高脂维生素组死亡2只,内皮损伤组死亡1只,对照组无死亡。实际用于结果分析的共36只。实验发现,正常对照组大鼠的体重随饲养的时间延长而逐渐增加,但单纯高脂组、高脂维生素组和内皮损伤组大鼠的体重在最初一个月增长,到第二个月基本不变,在第三个月略有减少,但组间差异无统计学意义(表1, Table 1)。

表1. 各组实验大鼠体重变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The changes of weight in experimental rats.

分 组	n	0 天	第 30 天	第 60 天	第 90 天
正常对照组	10	206 ± 16	231 ± 10	258 ± 13	288 ± 11
单纯高脂组	9	211 ± 12	238 ± 10	241 ± 11	226 ± 16
高脂维生素组	8	199 ± 12	229 ± 12	231 ± 21	223 ± 18
内皮损伤组	9	207 ± 14	235 ± 17	234 ± 18	221 ± 12

2.2 血脂和血钙浓度的变化

血脂和血钙变化见表2 (Table 2)。经方差分析,与正常对照组相比,其它三组动物血清TC、TG和LDLC均明显升高($P < 0.01$),HDLC各组间差异无统计学意义。与正常对照组和高脂组相比,高脂维生素组和内皮损伤组动物血清 Ca^{2+} 均明显升高($P < 0.01$)。

2.3 胸主动脉形态学变化

各组动物胸主动脉经HE染色在显微镜观察发现,正常对照组管腔圆形,内膜、中膜和外膜分界清楚,管腔面由单层内皮细胞覆盖,细胞完整,中膜主要见梭形平滑肌细胞;外膜较薄,为疏松结缔组织。高脂组管壁层次尚清晰,内膜内皮细胞完整,中膜无明显萎缩、增厚,外膜为疏松结缔组织。高脂维生素组管壁明显增厚,平滑肌增生明显,细胞排列紊乱,纤维组织增生伴片状或点状钙化,弹性纤维层结构不清,形成纤维增生性动脉粥样硬化斑块。内皮损伤组管壁内皮细胞脱落,内膜增厚,斑块表面纤维帽薄,突出的斑块内含有坏死物质,平滑肌细胞减少,纤维组织增生伴片状或点状钙化,中膜明显萎缩,呈较典型的成熟动脉粥样硬化斑块(图1, Figure 1)。

表 2. 各组大鼠血清脂质和血钙水平 (mmol/L, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2. The changes of serum lipids in experimental rats.

分 组	TC	TG	HDLc	LDLc	Ca ²⁺
正常对照组	2.49 ± 0.20	0.84 ± 0.38	0.98 ± 0.22	1.13 ± 0.48	2.45 ± 0.51
单纯高脂组	14.64 ± 4.48 ^b	2.28 ± 0.48 ^b	1.05 ± 0.38	11.32 ± 3.54 ^b	2.44 ± 0.57
高脂维生素组	15.87 ± 4.18 ^b	2.79 ± 0.50 ^b	1.05 ± 0.53	11.72 ± 3.14 ^b	4.02 ± 0.83 ^{bd}
内皮损伤组	16.34 ± 4.39 ^b	2.93 ± 0.45 ^b	1.14 ± 0.35	13.46 ± 3.55 ^b	3.97 ± 0.91 ^{bd}

b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; d: $P < 0.01$, 与高脂组比较

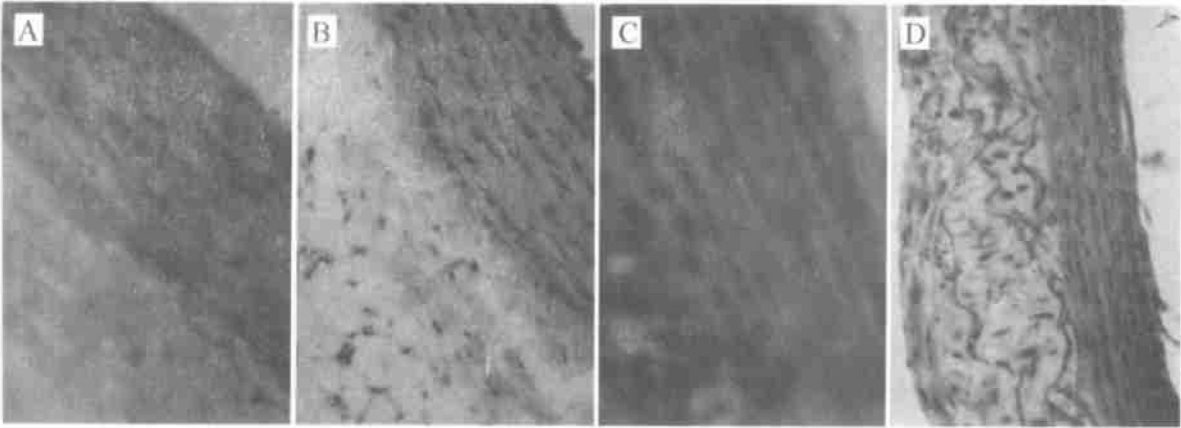


图 1. 大鼠胸主动脉壁显微镜图像(HE 染色, $\times 100$) A 为正常对照组, B 为高脂组, C 为高脂维生素组, D 为内皮损伤组。

Figure 1. Photomicrograph of thoracic aorta in rats (HE staining, $\times 100$)

2.4 胸主动脉内膜和中膜厚度

用图像分析仪检测的胸主动脉壁内膜和中膜的厚度见表 3(Table 3)。与正常对照组相比, 高脂组动物内膜和中膜厚度均无差别; 高脂维生素组内膜增厚 ($P < 0.01$), 中膜萎缩 ($P < 0.05$); 内皮损伤组内膜明显增厚 ($P < 0.001$), 中膜明显变薄 ($P < 0.01$)。

2.5 胸主动脉巨噬细胞免疫组织化学检测

用特异性巨噬细胞抗体 CD68 抗体为一抗, 阳性为椭圆形黄染。可见正常对照组阴性、高脂组和高脂维生素组为弱阳性, 内皮损伤组为强阳性(图

2, Figure 2)。

表 3. 胸主动脉内膜和中膜厚度(μm , $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3. Thickness of intima and media in thoracic aorta

分 组	内膜厚度	中膜厚度
正常对照组	8.3 ± 1.4	100.7 ± 9.7
单纯高脂组	8.6 ± 1.3	102.7 ± 10.1
高脂维生素组	37.8 ± 8.9 ^b	80.7 ± 9.1 ^a
内皮损伤组	105.7 ± 24.6 ^c	42.6 ± 6.1 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 与正常对照组比较。

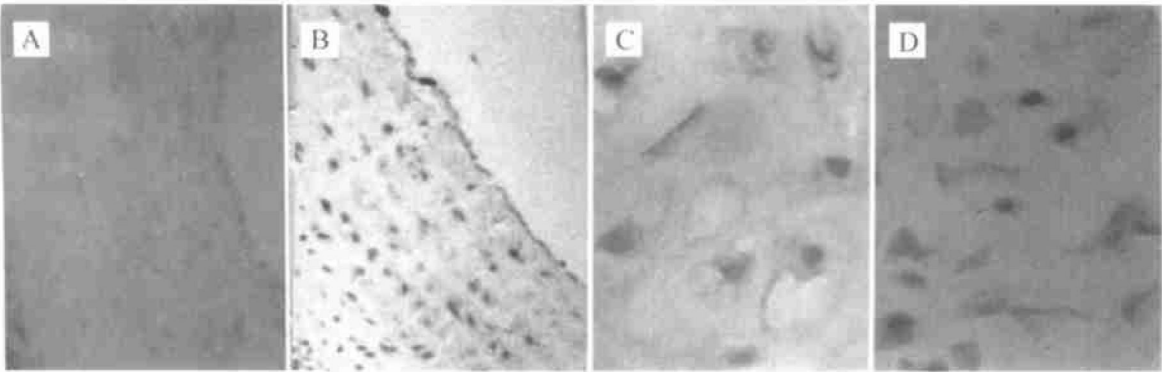


图 2. 大鼠胸主动脉的巨噬细胞免疫组织化学染色 A 为正常对照组($\times 100$), B 为高脂组($\times 100$), C 为高脂维生素组($\times 200$), D 为内皮损伤组($\times 200$)。

Figure 2. Macrophage immunohistochemical staining of thoracic aorta in rats

2.6 胸主动脉 α 肌动蛋白免疫组织化学检测

用特异性平滑肌抗体 α 平滑肌肌动蛋白抗体为一抗, 阳性为梭形黄染。可见正常对照组、高脂组基

本正常, 高脂维生素组内膜有较厚的 α actin 阳性, 内皮损伤组斑块表面只有很薄的 α actin 阳性(图 3, Figure 3)。

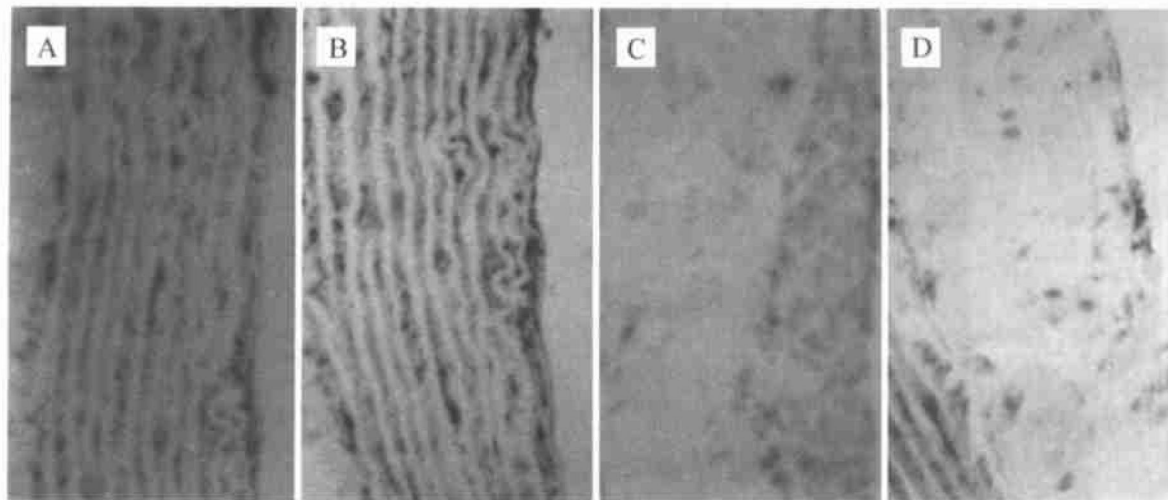


图 3. 大鼠胸主动脉的 α 平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色($\times 100$)

A 为正常对照组, B 为高脂组, C 为高脂维生素组, D 为内皮损伤组。

Figure 3. α actin immunohistochemical staining of thoracic aorta in rats

3 讨论

建立合适的动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)动物模型是研究其发病机制及探讨治疗措施的重要条件。在常用的实验动物中, 草食性动物家兔不易自发性产生 As, 但它对高脂饮食特别敏感, 故有人将它作为 As 模型^[3], 但它产生的损害更类似黄瘤病, 而不象人的 As。谷食性动物鸡可产生自发性 As, 但主要形成脂质条纹, 且它的局部解剖学与人不同, 也限制了它的应用; 猴和猪的系统发育和饮食结构类似于人, 可产生自发性 As, 是研究 As 的理想实验动物, 但由于购买和维持费用的昂贵, 难以作为模型使用; 鼠类虽具有抗 As 特性, 但由于应用的广泛性、易获得、易饲养; 属杂食类动物, 生理解剖与人类相似; 重要的是可用于实验研究的商用抗体种类丰富; 所以人们还是不断摸索建立鼠类 As 模型^[4]。

由于大鼠无胆囊, 单纯用含胆固醇的饲料不易使大鼠血清胆固醇增高, 故不易形成 As 病变。因此本实验的高脂饲料配方中, 增加了胆酸钠和丙基硫氧嘧啶, 前者能显著增加胆固醇吸收量, 后者使甲状腺功能低下, 最终使 TC 和 LDLC 增高, HDLC 降低。单纯高脂饲料组只发现可形成高脂血症, 却并没有形成 As 病变, 可能与大鼠本身内在的抗 As 因素有关。据报道不同种的动物主动脉胆固醇酯酶活性不同, 大鼠 > 豚鼠 > 狗 > 兔 > 猪, 这个顺序显然与抗

As 的种属特异性颇为一致^[5]。

维生素 D 诱发动脉壁的损伤和粥样硬化形成已有报道, 高脂+ 钙超载组在胸主动脉形成了具有平滑肌细胞增殖以及泡沫细胞形成的增生性纤维斑块, 但还不是成熟的动脉粥样硬化斑块, 这也限制了该模型的广泛应用。维生素 D 诱发 As 的机理目前仍存有争论, 有作者认为, 维生素 D 诱发动脉粥样硬化是由于它能使血浆胆固醇升高之故; 也有作者认为, 与维生素 D 导致的血钙升高有关。在本实验中, 单纯高脂组、高脂维生素组和内皮损伤组, 血脂水平无差别, 似乎说明维生素 D 诱发动脉粥样硬化与血浆胆固醇升高无关; 我们认为可能的机理是: 维生素 D 导致血钙升高, 破坏动脉管壁内皮的完整性, 有利于血浆脂质对管壁侵入和损伤, 从而形成动脉粥样硬化^[6]; ④维生素 D 导致血钙升高, 可促使钙盐在主动脉中膜沉积, 使平滑肌细胞变性或钙化^[7]。Kramsch 等^[8]发现在 As 形成过程中, 平滑肌细胞的迁移和增殖, 以及分泌细胞外基质都需要钙离子作为第二信使, Weinstein 等^[9]发现在 As 动物模型中, 钙离子拮抗剂可抑制 As 病变的进展, 也都从侧面说明了钙离子在 As 形成过程中的重要性。内皮损伤组胸主动脉 HE 染色见典型的且较成熟的动脉粥样硬化斑块: 病变处内皮细胞脱落, 内膜明显增厚、纤维化, 血管壁向管腔内突出, 斑块内含有大量

的泡沫细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞, 纤维组织增生伴片状钙化, 中层平滑肌细胞明显萎缩; 巨噬细胞免疫组织化学、 α 平滑肌肌动蛋白免疫组织化学结果也说明了该模型的成功。该模型的成功建立说明了在较短时间内建立较成熟的动脉粥样硬化斑块模型, 内膜的机械损伤十分必要, 因为它直接造成内膜的损伤、剥脱, 内弹力板的断裂, 极大地加速了脂质及钙盐的沉积、血流中炎症细胞的侵入; 而单纯高脂或/和钙超载只能通过较长时间的应用, 使机体内环境的发生改变, 进而造成易损血管的生理生物化学变化, 使脂质及钙盐的沉积、炎症细胞的浸润成为可能。

本实验结果表明: 大鼠可作为研究 As 的良好动物模型。(1) 单纯给予大鼠高脂饲料不易形成 As 病变; (2) 给予大鼠高脂饲料加维生素 D 负荷仅仅导致纤维和平滑肌增生样的动脉粥样硬化, 并没有成熟的动脉粥样硬化斑块形成; (3) 给予大鼠高脂饲料及维生素 D 负荷的同时, 予球囊损伤动脉可形成与人类 As 相似的较成熟的动脉粥样硬化斑块模型。

[参考文献]

- [1] Fonseca FA, Paiva TB, Silva EG, Ihara SS, Kasinski N, Martinez TL, et al. Dietary manesium improves endothelial dependent relaxation of balloon injured arteries in rats. *Atherosclerosis*, 1998, **139**: 237-242
 - [2] 马大烈, 郑青渝, 李今华, 李金华, 黄玲, 魏建丽. 微波 EnVision 免疫组织化学技术及其应用. *中华病理学杂志*, 1998, **27** (2): 153-154
 - [3] 张磊, 陈国荣, 郑荣远, 王群姬, 谢淑萍, 王拥军. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 155-158
 - [4] 杨小毅, 万载阳, 谭健苗, 袁中华, 杨永宗. 一种纯系小鼠动脉粥样硬化模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (2): 182
 - [5] Groener JE, Bax W, Stuan C, Pagani F. Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1487** (2-3): 155-162
 - [6] 吴开云, 高振渊, 袁融, 庄文华. 维生素 D 诱发大鼠动脉粥样硬化的实验研究. *解剖学报*, 1996, **27**: 133-135
 - [7] Bennani KN, Kehel L, Bouayadi EF, Fdhil H, Amarti A, Saidi A, et al. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D2 vitamin. *Atherosclerosis*, 2000, **150**: 55-61
 - [8] Krams DM. Atherosclerosis progression/regression: lipoprotein and vessel wall. *Atherosclerosis*, 1995, **118**: s29-36
 - [9] Weinstein DB, Heider JG. Antiatherogenic Properties of Calcium Antagonists determinants. *Am J Cardiol*, 1987, **59**: 163B-172B
- (此文编辑 胡必利)

• 征订 •

《实用全科医学》杂志 2004 年征稿征订启事

《实用全科医学》杂志是经中华人民共和国科学技术部批准, 国家新闻出版总署注册备案, 全国公开出版发行的医学科技类学术性双月刊, 国际标准刊号 ISSN 1672-1764, 国内统一刊号 CN 34-1261/R。主要栏目: 专家论坛、全科基础研究、全科临床研究、全科医学探讨、医学教育、医疗卫生管理、预防与保健、全科临床实践、临床护理、中医中药、医学检验、短篇报道、社区卫生与康复、健康教育、医疗与法律、心理卫生、药物与临床、综述、专题讲座、国外医学进展、卫生信息、急诊急救、临床病例分析、医学影像、简讯、争鸣园地等栏目。欢迎临床医务人员、社区医务人员、医疗卫生管理人员及教学人员、科研人员踊跃投稿, 对于基金资助项目、科研课题等高质量研究性论文优先刊用。

《实用全科医学》杂志 2004 年为双月刊, 每单月 10 日出刊。国际标准版本, 大 16 开, 80 页, 每期定价 6 元, 全年 36 元。本刊立足全科、服务全国、面向临床、面向基层、注重实用、适宜各级医疗机构、科研单位、大专院校及各类卫生人员阅读。本刊被《中国核心期刊(遴选)数据库》收录, 现已加入“万方数据—数字化期刊群”和《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊全文数据库》收录期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊。读者可上网查询浏览本刊内容并征订本刊。

订购全国各地邮政局(所), 邮发代号 26-200。也可直接汇款至《实用全科医学》杂志编辑部订阅, 免收邮寄费, 欢迎投稿(请寄打印稿与软盘)。

地址: 安徽省蚌埠市长淮路 41 号, 《实用全科医学杂志》社编辑部; 邮编: 233004; 电话/传真: (0552) 3066635; 电子信箱: Zhouhp@ah163.com Syqkyx@periodicals.net.cn Syqy@chinajournal.net.cn