

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠不同周龄动脉粥样硬化的病理变化

刘剑刚¹, 董国菊¹, 史大卓¹, 王永炎²

(1. 中国中医研究院西苑医院心血管实验室, 北京市 100091; 2. 中国中医研究院, 北京市 100700)

[关键词] 病理学与病理生理学; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的病理进程; 病理形态观察; 动脉粥样硬化; 脂质代谢; 斑块面积; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 研究载脂蛋白 E 基因敲除小鼠不同时间段的动脉粥样硬化的病理进展, 探讨不同饮食对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化进展的影响。方法 采用 6 周龄 40 只载脂蛋白 E 基因敲除小鼠, 20 只给予高脂膳食饲料, 20 只给予普通饮食, 分别于 15 周龄、19 周龄、24 周龄、28 周龄、36 周龄 5 个时间段各取 4 只麻醉处死做病理检测。结果 随着时间进展, 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化程度逐渐加重, 经历了从脂质条纹到粥样斑块形成典型的动脉粥样硬化病理过程; 高脂饮食组比普通饮食组的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化病理改变严重。结论 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠是研究动脉粥样硬化的可靠模型, 高脂饮食可以加速载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的病理进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Pathological Progress of Apolipoprotein E-Knockout Mice and the Influence of Different Diets on Atherosclerosis Progress

LIU Jiann Gang¹, DONG Guo Ju¹, SHI Da Zhuo¹, and WANG Yong Yan²

(1. Laboratory of Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100091; 2. China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Pathology; Apolipoprotein E-Knockout; Atherosclerosis; Fatty Substance Metabolism; Plaque Area; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To acquaint with atherosclerosis (As) progress of apolipoprotein E⁻ knockout (ApoE⁻) mouse in different periods and explore the influence of different diets on As progress of ApoE⁻ mice. **Methods** 40 ApoE⁻ mice with 6 week age, 20 mice among them were given west food diet and 20 mice were given common diet, 4 mice were randomly chosen in each group at the period of 15, 19, 24, 28 and 36 weeks and sacrificed for pathological determination. **Results** As of ApoE⁻ mouse gradually aggravated with time passing, undergone a typical pathological course from fatty streak to atheromatous plaque; As of ApoE⁻ mice with high fat diet were more severe than As of ApoE⁻ mouse with common diet. **Conclusions** ApoE⁻ mouse was a reliable model for As research; west food diet could accelerate As pathological progress of ApoE⁻ mouse.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 基因敲除小鼠 (载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠) 可在正常饲料喂养下产生严重的高胆固醇血症, 并自发形成动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块, 其斑块分布及病理特征与人类 As 斑块极为相似, 是研究 As 病程及干预效果的较好的动物模型^[1]。本实验动态观察了不同饮食对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 As 进展的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠, 6 周龄, 雌雄各半, 由北京大学医学部实验动物科学部提供。胆固醇 (total cholesterol, TC), 批号: 010116; 甘油三酯 (triglyceride, TG), 批号: 010126; 由北京中生生物工程高技术公司生产; 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein, HDLC), 批号: 010212; 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein, LDLC), 批号: 010215; 由北京利德曼生物化学技术有限公司生产。

1.2 动物模型制备与分组

20 只载脂蛋白 E 基因敲除小鼠给予高脂膳食结构的饲料饮食 (脂肪 21%、胆固醇 0.15%); 20 只载脂蛋白 E 基因敲除小鼠给予普通饲料饮食, 饮水不限。分别在饲养 15 周龄、19 周龄、24 周龄、28 周龄、36 周龄时随机各取 5 只处死, 处死前一天晚上

[收稿日期] 2004-12-21 [修回日期] 2005-10-10

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目课题 (No. G1999054405) 资助

[作者简介] 刘剑刚, 副研究员, 从事心血管中药药理、生物流变学的临床研究和基础研究工作, 联系电话为 010-62875599-6407, E-mail 为 liujiangang2002@sina.com。董国菊, 博士, 主治医师, 从事中西医结合心血管临床与基础研究, 联系电话为 010-62875599-6332。史大卓, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 从事中西医结合心血管临床与基础研究, 联系电话为 010-62875599-6407, E-mail 为 heartmail@263.net。

禁食不禁水。

1.3 血脂的测定

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠麻醉后,经眼眶采血,分离血清,测定血脂。TC 采用 CHOD-PAP 方法测定;TG 采用 GPO-PAP 方法测定;HDL 和 LDL 采用直接测定法;以上血脂测定用全自动生物化学仪,仪器型号:RX-2000,美国 TECHNICON 公司生产。

1.4 主动脉病理标本制备

动物采血后,麻醉处死小鼠,取出心脏及主动脉,用生理盐水冲洗干净,从主动脉根部开始取材,剪下 1~1.5 cm 的血管放入 10% 甲醛中固定。常规石蜡包埋,从主动脉根部 0.2 cm 起间断均匀切片,切片厚度为 5 μ m,每个血管取 5 张切片进行苏木素—伊红染色 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色,普通光镜观察形态学改变,显微镜—微机彩色图像处理系统测量相关病理指标。

1.5 病理观察方法

每间隔 5 张切片取 1 张进行 HE 染色,普通光镜观察血管及斑块的形态结构,进行病理形态学描述;每个标本共取 3 张切片用 Image Pro Plus 4.5 显微镜—微机彩色图像处理软件测量,测量指标包括:

血管管腔面积 (LA, 指血管内膜所包围的血管管腔面积)、斑块面积 (PA, 每张切片所有斑块面积之和) 和斑块面积与管腔面积之比 (PA/LA)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件 (12.0 版) 进行统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料前后对比采用配对 t 检验,组间对比采用单因素方差分析,计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 作为显著界限。

2 结果

2.1 不同周龄和不同饮食对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂的影响

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂水平自发升高,与时间密切相关,但与时间并不绝对成正比;高脂膳食会加速高脂血症的形成。普通饮食组小鼠 TC 水平从 15 周龄时 6.20 ± 0.63 mmol/L 上升到 36 周龄时 16.06 ± 0.56 mmol/L,且均较同时期高脂膳食饮食小鼠的 TC 水平低;高脂膳食组小鼠 TC 水平从 15 周龄时 11.58 ± 1.16 mmol/L 增至 36 周龄时 24.01 ± 1.58 mmol/L ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (表 1, Table 1)。

表 1. 不同周龄和不同饮食载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Changes of lipids metabolism in the different diets and time of ApoE^{-/-} mice

分 组		<i>n</i>	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLc (mmol/L)	VLDL (mmol/L)	TC/HDL
普通饮食组	15 周	5	6.20±0.63	1.00±0.41	1.48±0.27	1.31±0.41	3.41±0.05	4.19±2.33
	19 周	5	12.08±1.28	1.13±0.26	2.48±0.41	2.75±0.47	6.85±0.40	4.87±3.12
	24 周	5	12.74±1.52	1.05±0.44	2.25±0.46	2.24±0.78	8.25±0.28	5.66±3.30
	28 周	5	13.78±1.58	1.08±0.21	2.16±0.14	2.97±0.38	8.65±1.06	6.37±3.85
	36 周	5	16.06±0.56	1.75±0.25	2.38±0.48	3.79±1.02	9.89±0.94	6.74±1.16
高脂膳食组	18 周	5	11.58±1.16 ^b	1.03±0.42	2.28±0.83	3.89±0.84 ^b	5.41±0.51 ^a	5.08±1.40
	19 周	5	14.56±1.11	2.00±0.29	3.59±0.28	4.53±1.14 ^a	6.44±0.25	4.05±3.96
	24 周	5	18.10±1.11 ^b	2.28±0.50 ^a	3.62±0.11	4.34±0.83 ^a	10.14±0.17 ^a	5.00±1.09
	28 周	5	19.89±1.06 ^a	2.15±0.35 ^a	3.26±0.16	5.37±0.58 ^a	11.26±0.32 ^b	6.10±3.36
	36 周	5	23.08±1.58 ^b	2.53±0.17 ^a	3.78±0.26	5.94±0.94 ^a	13.36±0.38 ^b	6.10±2.07

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与同周龄普通饮食组比较。

2.2 不同周龄和不同饮食对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠病理形态学的影响

光学显微镜下,15 周龄普通饮食组小鼠内膜有钝角,缺乏连续性,主要病理改变为内膜增厚、脂质沉积,管腔内径未见异常。15 周龄高脂饮食组小鼠 3 只有纤维斑块形成,2 只有脂质条纹形成,纤维斑块有比较完整的纤维帽,内含小的脂质中心和少量泡沫细胞,纤维帽主要由平滑肌细胞、弹力纤维和胶

原组织组成。

19 周龄普通饮食组小鼠均有明显的脂质条纹块形成,其中泡沫细胞聚集,有少量纤维成分交联其中,其病理改变并非真正意义上的纤维斑块,或者可以称作纤维斑块形成的过度前期;而高脂饮食组小鼠均有斑块形成,斑块大小、面积与 15 周龄高脂饮食组相比有不同程度的进展,并均以胶原含量较多的纤维斑块为主。

24 周龄普通饮食和高脂饮食组小鼠全部有斑块形成, 普通饮食组的纤维斑块大小、程度类同于 15 周龄高脂饮食组的纤维斑块; 24 周龄高脂饮食组比 19 周龄高脂饮食组的斑块在面积、泡沫细胞堆积、胶原及弹力纤维沉积等方面程度重。

28 周龄两种饮食组小鼠全部有斑块形成, 普通饮食组的斑块 1 只有粥样斑块形成, 其余 4 只的斑块在大小、程度上介于 19 周龄和 24 周龄高脂饮食

组的斑块之间; 高脂饮食组斑块与 24 周龄高脂饮食组相比, 纤维帽变薄、泡沫细胞堆积、部分破裂。

36 周龄普通饮食组全部形成粥样斑块, 程度类似于 28 周龄高脂饮食组; 36 周龄高脂饮食组粥样斑块进展明显, 大量泡沫细胞崩解, 深部为大量无定形坏死物质, 斑块破裂、管腔狭窄明显, 严重者达 70% ~ 90% (图 1 和 2, Figure 1 和 2)。

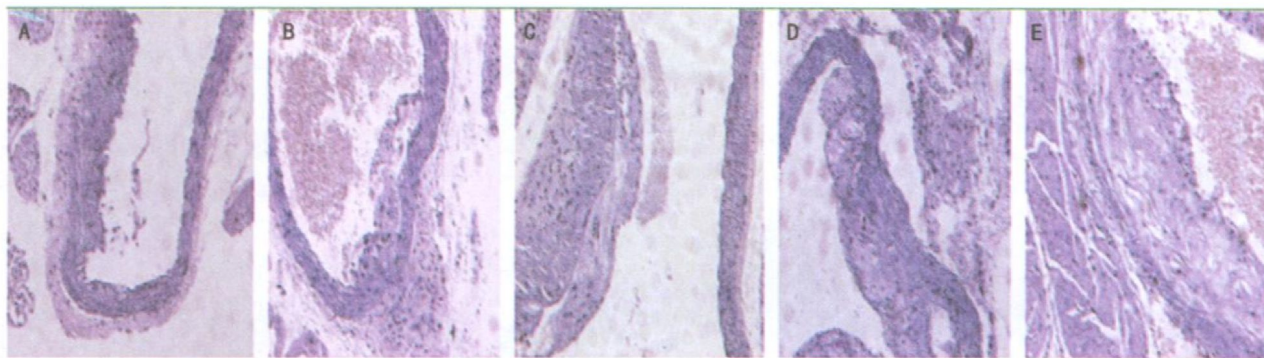


图 1. 普通饮食组载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化病理变化(HE 染色, $\times 200$) A 为 15 周, 血管内膜增厚; B 为 19 周, 泡沫细胞聚集, 细胞外基质沉积; C 为 24 周, 胶原沉积, 覆盖泡沫细胞, 纤维斑块形成; D 为 28 周, 斑块进展, 胶原成分减少, 有坏死中心形成; E 为 36 周, 斑块深部有柳叶状的胆固醇结晶堆积, 纤维成分减少, 粥样斑块形成。

Figure 1. Full diet apolipoprotein E⁻ mouse As patho advancement (HE $\times 200$)

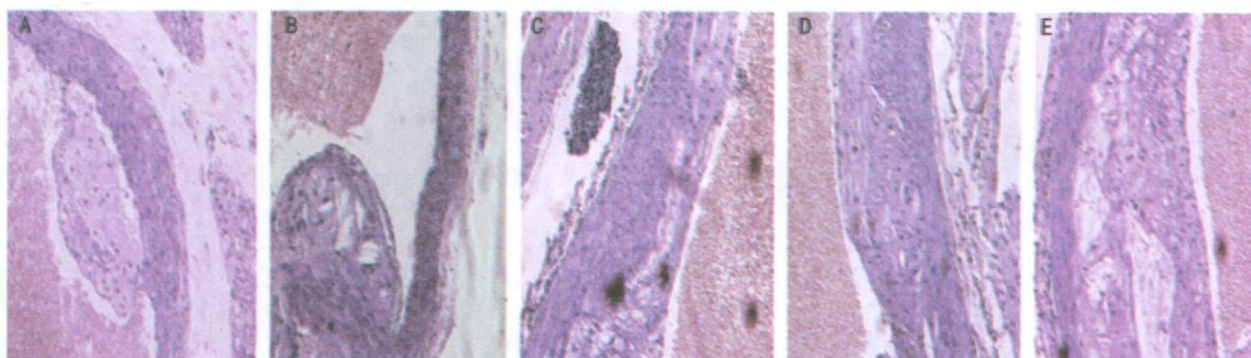


图 2. 高脂饮食组载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化病理变化(HE 染色, $\times 200$) A 为 15 周, 内膜增厚, 脂质沉积; B 为 19 周, 胶原沉积, 覆盖脂质成分形成纤维帽; C 为 24 周, 大量泡沫细胞沉积, 胶原纤维成分减少; D 为 28 周, 斑块深部有大量无定形物质及坏死中心形成; E 为 36 周, 斑块深部有大块坏死中心, 纤维肌性成分很少。

Figure 2. High fat diet apolipoprotein E⁻ mouse As patho advancement (HE $\times 200$)

2.3 不同周龄和不同饮食的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管管腔面积和斑块面积的变化

从 15 周龄至 36 周龄动态连续观测结果看, 两种饮食不同时间段的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管管腔面积没有明显差异, 与时间和饮食无明确关系。随时间延长, 两组的斑块面积大小和斑块面积百分比(PA/LA) 呈增长趋势, 且高脂膳食组明显高于同时期的普通饮食组, 说明斑块增长不仅与时间呈正比, 与饮食亦密切相关(表 2, Table 2)。

3 讨论

载脂蛋白 E 是组成脂蛋白的重要成份, 载脂蛋白 E 作为一种清除配体, 参与受体介导的载脂蛋白清除过程, 在脂质残粒的代谢中起重要作用^[2]。因此, 载脂蛋白 E 基因敲除势必导致肝脏对 VLDL、乳糜微粒的摄取和清除障碍, 造成脂质代谢紊乱, 从而使含胆固醇的残粒在血浆中堆积引起高脂血症, 当

表 2. 不同周龄和不同饮食载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管腔面积和斑块面积的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Changes of lumens areas and plaque areas in the different diets and time of ApoE⁻ mice

分 组		<i>n</i>	血管管腔面积 (mm ²)	斑块面积 (mm ²)	血管面积/ 斑块面积
普通饮食组	15 周	5	12.17 ±1.00	0.48 ±0.03	0.03 ±0.01
	19 周	5	15.12 ±0.60	1.25 ±0.12	0.08 ±0.01
	24 周	5	14.37 ±0.88	2.19 ±0.61	0.15 ±0.04
	28 周	5	14.71 ±1.40	3.14 ±0.21	0.21 ±0.02
	36 周	5	15.25 ±1.06	4.22 ±0.94	0.28 ±0.07
高脂膳食组	15 周	5	13.67 ±0.67	1.25 ±0.14 ^a	0.09 ±0.01
	19 周	5	14.92 ±1.17	2.45 ±0.11 ^a	0.16 ±0.01 ^b
	24 周	5	15.18 ±0.72	3.33 ±0.41 ^a	0.22 ±0.02 ^b
	28 周	5	14.65 ±0.99	4.14 ±0.43 ^a	0.29 ±0.05 ^a
	36 周	5	14.83 ±1.51	7.46 ±0.46 ^b	0.51 ±0.07 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与同周龄普通饮食组比较。

大量胆固醇类在血管壁沉积时,则引起 As。研究结果发现,与其它猪、兔子、大鼠和鸽子等大多数 As 模型一样,载脂蛋白 E 基因敲除小鼠形成 As 斑块是一个慢性的进程:首先是脂质沉积、单核细胞迁移并分化为巨噬细胞、T 淋巴细胞浸润、大量巨噬细胞源性和肌源性泡沫细胞聚集,逐渐形成脂质条纹,血管内皮隆起或变形^[3];As 逐步进展,在心脏心肌底部连续切片病理观察发现,胶原纤维不断增加并发生玻璃样变,脂质被埋于深层,形成表面为纤维帽,内含脂质、巨噬细胞、平滑肌细胞和泡沫细胞纤维斑块;比较脆弱的泡沫细胞坏死并释放胞浆内的脂质,形成富含胆固醇酯的脂质池,同时在氧自由基及泡沫细胞释放的溶酶体作用下,内皮细胞及其它细胞坏死崩解,随着这些病理过程的发展,纤维斑块逐渐演变为粥样斑块^[4]。与其它模型不同的是,载脂蛋白 E 基因敲除小鼠形成 As 呈自发性,无需运用高脂饮食或机械外力培育模型,节约了劳力和时间。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠属小型动物,并且可以从基因水平上大量复制,增加了需要大样本动物研究的可行性和可操作性。

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的病变在 5~6 周龄时主要是单核细胞粘附于损伤的内皮细胞处,8~10 周龄起脂质条纹逐渐形成,18~20 周龄起富含泡沫细胞的纤维斑块逐渐形成,病变部位主要在主动脉根部,胸主动脉次之。粥样斑块大约在 28~30 周龄左右逐渐形成,40 周龄以后,粥样斑块有出血、斑块破溃、血栓形成等各种并发症,甚至有的小鼠因急性

心脑血管事件自发死亡。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠形成 As 斑块不仅局限于主动脉根部,在冠状动脉、主动脉弓及其分叉处、颈总动脉及其分叉处、胸主动脉、腹主动脉、双肾动脉分叉处均可形成斑块,与人类全身 As 好发处相近^[5,6]。与鹌鹑、兔子等易受饮食诱导形成 As 的动物不同,小鼠在高脂饮食诱导下不容易形成 As。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠则不同,即可以在普通饮食的条件下自发形成 As,又与人类相似,高脂饮食会加速载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 As 形成的进程。本病理观察验证了载脂蛋白 E 基因敲除小鼠晚期形成的斑块属于典型的不稳定斑块。高脂膳食的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠比同期普通饮食小鼠 As 形成的面积大、程度重;换言之,形成相同程度的 As 斑块,高脂膳食组所需时间平均比普通饮食组节约 3~6 周左右。高脂饮食组载脂蛋白 E 基因敲除小鼠大约 15 周龄即开始形成纤维斑块,并且复合病变如出血、血栓形成亦更容易在高脂饮食组小鼠中出现。因此,在动物膳食中采用高脂饮食,会加速模型的形成,不仅节省时间,而且对于不稳定斑块的研究可提供更可靠、模拟性更强的模型。

实验研究表明,载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的 As 形成呈慢性、自发性、进展性、连续性、广泛性,在很大程度上与人类 As 形成相似,具有代表性,是探讨 As 发生发展的可靠模型。此外,载脂蛋白 E 基因敲除小鼠为基因联合敲除形成多因素相互作用的复合模型提供了良好的前景,比如糖尿病、高血压等多种 As 危险因素的交叉,使探讨 As 的形成与多因素的关系变为可能。

[参考文献]

- [1] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992, **258**: 468-471
- [2] 张春妮,汪俊军,庄一义,刘小传,强宏娟,陈大宁,等. 脂蛋白对巨噬细胞的作用研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 225-227
- [3] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 249-250
- [4] 胡维成,李莉,陈融, Patti Polinsky, Stephen MS. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠心肌微动脉内“微病灶”与外膜炎. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (11): 1146-1147
- [5] Yutaka N, Andrew SP, Elaine WR. ApoE-Deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis Thrombosis*, 1994, **14** (1): 133-140
- [6] Chen J, Tung CH, Umar M, Vasilis N, Robert G, Mark C, et al. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **11** (6): 2766-2771

(此文编辑 朱霞霞)