

基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展

胡 琴 综述, 张 运 审校

(教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 医学实验动物学; 动脉粥样硬化模型; 综述; 基因工程小鼠; 炎症

[摘要] 低密度脂蛋白受体和载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠模型的建立推动了动脉粥样硬化在体实验研究的进展。为寻找更符合人类动脉粥样硬化病变特点的动物模型, 许多学者对与炎症、高血压、蛋白酶、细胞外基质、糖代谢及免疫系统等相关的基因进行敲除或过度表达以改进动脉粥样硬化动物模型。本文就基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展做一综述。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是脂质和纤维成分在动脉内膜聚集的慢性病理过程, 研究 As 疾病的发生发展离不开 As 动物模型。1969 年 Thompson^[1]采用高脂饲料(含 50% 脂肪)喂养 C57BL/6J 小鼠 5 周, 最早建立了 As 小鼠模型, 但该模型死亡率很高。以后, Paigen 等^[2]对此进行改进(脂肪含量降至 15%, 饲养时间延长至 10 周), 该模型不仅具有明显的 As 病变特点, 且死亡率大大降低。但 As 病变仅限于主动脉根部。随着基因工程技术在 As 动物模型中的应用, 这种饮食诱导的模型已经不再使用。近年来, 饲养条件的改进、新基因信息和新生物手段的应用保证了 As 动物模型甚至小体积动物模型得以大规模使用。本文就基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的最新研究进展做一综述。

1 主要基因工程小鼠动脉粥样硬化模型

基因工程小鼠是采用基因工程技术将编码某一特定蛋白质的特殊等位基因缺失。最广泛采用的基因工程小鼠 As 模型是载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 和低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因缺陷小鼠。这两个基因在脂质代谢中起着非常重要的作用。载脂蛋白 E 是多种与脂蛋白摄入相关的 LDLR 基因家族的重要配体, 载脂蛋白 E 基因缺失导致酯化胆固醇颗粒的聚集。1992 年 Plump 等^[3]成功建立了载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 As 模型, 常规饲料饲养(含 4.5% 脂肪)即可出现严重的动脉粥样硬化病变, 这很快成为 As 研究领域的强有力工具。载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 As 病变处细胞类型如巨噬细胞、T 细胞和平滑肌细胞等与人类近似。与饮食诱导的动物模型不同, 载脂蛋白 E^{-/-}小鼠 As 病变遍布动脉树, 以主动脉根部最常见。予与人类相似的高脂饮食喂养载脂蛋白 E^{-/-}小鼠, 形成脂质条纹和纤维增生

病变的时间较常规饮食组更快。该模型的主要缺点是其脂蛋白谱与大多数人群不同。小鼠胆固醇主要存在于极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL), 而人类是 LDL。

研究发现一旦缺乏 LDLRs 或 LDLRs 发生变异, 人类出现进行性高胆固醇血症和心血管并发症。1993 年 Ishibashi 等^[4]采用基因工程技术从胚胎干细胞中建立起 LDLR^{-/-}小鼠。予含 10% 脂肪的饲料饲养该种动物模型后, 血 LDL 和 VLDL 增加, 血清胆固醇较正常升高 2 倍以上。虽然常规饮食饲养的 LDLR^{-/-}小鼠并无 As 生成, 但它有别于单纯饮食诱导的 C57BL/6J 小鼠模型, 前者 As 病变具有延展性。与载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠比较, LDLR 缺陷小鼠脂蛋白谱更近似于人类。随着载脂蛋白 E 和 LDLR 缺陷小鼠的出现, 寻找新的基因进行敲除或转染, 使其更接近于人类 As 特点的各种基因工程小鼠 As 模型已经着手研究, 但逆转人类 As 病变的研究仍是一个漫长过程。目前已经产生大量新型基因工程小鼠 As 模型, 下面详细阐述了其它基因工程小鼠 As 模型特点。

2 其它基因工程小鼠动脉粥样硬化模型

2.1 与炎症相关

动脉粥样硬化早期, 内皮损伤后, 巨噬细胞浸润血管壁。因此, 只有阻断巨噬细胞浸润才能进一步明确巨噬细胞的作用。由于巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)可影响单核及巨噬细胞发育, 将载脂蛋白 E^{-/-}小鼠与具有编码 MCSF 基因突变的 OP 小鼠进行杂交繁育, 结果杂交小鼠血液中的单核细胞及组织巨噬细胞均减少, 且 As 病变只有单纯载脂蛋白 E 缺陷小鼠的 1/7, 且不发展至纤维增生期, 说明巨噬细胞的“净”作用是促进 As 发展的^[5]。MCP-1 在巨噬细胞募集中的作用已经明确。MCP-1^{-/-}小鼠的 As 病变较轻; 而过度表达 MCP-1 基因的小鼠 As 病变加重^[6,7]。白三烯 B4(leukotriene B4, LTB4)是白细胞的重要趋化因子, 只有与白三烯 B4 受体(LTB4 receptor, BLTR)结合后才产生生物学效应。阻断 BLTR 能抑制单核细胞募集, 减缓载脂蛋白 E^{-/-}和 LDLR^{-/-}小鼠 As 病程^[8]。此外,

[收稿日期] 2005-10-24 [修回日期] 2006-07-06

[作者简介] 胡琴, 博士后, 副教授, 现在贵阳医学院附属医院心内科工作, 主要从事动脉粥样硬化基因治疗研究, 联系电话为 0531-82169258, E-mail 为 annettehu@163.com。通讯作者张运, 中国工程院院士, 从事动脉粥样硬化基础与临床研究。

IFN- γ 刺激促 As 因子如 ICAM-1 的生成,上调巨噬细胞脂蛋白清除受体的表达,削弱其抗 As 作用。已经发现载脂蛋白 E 和 IFN- γ 双基因敲除小鼠动脉壁脂质减少,这可能因为具有血管保护作用的磷脂/载脂蛋白 E 增加^[9]。尽管 IFN- γ 作用尚需进一步阐明,但促 As 作用是确定无疑的。TNF- α 减少脂蛋白脂酶的活性,影响脂质代谢,但缺乏 TNF- α 受体 p55 的 C57BL/6 小鼠动脉粥样硬化条纹病较野生型严重,表明 TNF- α 受体 p55 似乎有血管保护作用,这与 TNF- α 的促 As 作用相矛盾^[10]。

2.2 与蛋白酶和细胞外基质相关

易损斑块的血管平滑肌细胞和胶原明显减少,纤维帽易破裂,继而出现各种并发症。最近研究揭示 TGF- β 负显性突变小鼠血管炎症加重,平滑肌细胞和胶原成分减少,形成易损斑块表型。这表明抗炎因子 TGF- β 稳定 As 斑块,抑制 As 的发展^[11]。基质 GLA 蛋白缺乏(Mgp 基因敲除)小鼠动脉壁弹性组织和肌性组织自发钙化,多在 2 个月内死于动脉瘤破裂,但无斑块形成^[12]。纤溶酶原活化成纤溶酶后,参与细胞外基质的降解。载脂蛋白 E 和纤溶酶原双基因敲除小鼠 As 病变扩大,泡沫细胞浸润明显。而纤溶酶原活化抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) 是纤维蛋白/纤维蛋白溶解的另一通路,抑制纤溶酶原活化。感兴趣的是,无论 PAI-1 基因敲除或过度表达,均不影响 As 进程,这可能因为小鼠存在其它选择性抑制纤溶酶原活化的物质^[13]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP) 降解细胞外基质,平衡促蛋白分解和抗蛋白分解过程,在 As 过程中扮演重要角色。MMP-3 基因敲除小鼠的动脉病变进展,胶原大量聚集在斑块处,动脉瘤发生率很低^[14]。反之,采用基因转染技术过度表达 MMP-1 能促进新生内膜细胞外基质的降解,减轻 As 病变^[15]。

2.3 与免疫调控相关

动脉粥样硬化病变主要为巨噬细胞和 T 细胞浸润,说明免疫系统参与了 As 病变生成。以此为基础建立了与免疫调控有关的 As 小鼠模型。近年来 T 细胞在 As 生成中的作用已经基本明确。研究发现 T 细胞促进脂质条纹形成,CD4+ 和 CD8+ 细胞缺失的 C57BL/6 小鼠脂质条纹明显减少^[16]。免疫缺陷载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠获得有免疫活性小鼠的 CD4+ 细胞后,As 病变明显加重,表明 CD4+ 细胞促进病变进展^[17]。具有细胞毒性的 CD8+ 细胞诱导载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠血管平滑肌细胞凋亡,促进病变形成^[18]。与野生型小鼠比较,MHC-I 和 MHC-II 基因缺失小鼠病变更重。1997 年建立的重组酶激活基因 2 (recombinase activator gene 2, RAG-2) 缺失小鼠的 B 细胞和 T 细胞全部缺乏,与正常组比较,自身抗体和 T 细胞缺乏均不影响 As 病变^[19]。

2.4 与糖代谢相关

糖尿病是心血管疾病的危险因素,但其机制尚不清楚。以链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 诱导的自发糖尿病小鼠为模型明确了高糖对血管的损伤作用。高血糖副产物糖基化终末产物(advanced glycation end product, AGE) 与 AGE 受体(advanced glycation end product receptor, RAGE) 结合,诱导炎症

标志物产生,加重 As 病变。而予载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠注射 STZ 出现糖尿病后,每日注射 RAGE 可缓解 As 病变^[20]。这些结果证明 AGE 与糖尿病相关的 As 病变之间有着密切联系。但是,新近报道糖尿病是抗 As 的一个因素,予载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠注射硫葡萄糖金以破坏下丘脑饱中枢,诱导小鼠发生肥胖和糖尿病,与无糖尿病的载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠比较,As 发展缓慢^[21],这对糖尿病促 As 作用提出了质疑。因此进一步研究显得尤为重要。临床上 iv 型和 II 型糖尿病有着不同的病理生理特点和心血管并发症,目前确切机制尚不清楚。因此利用小鼠模型探讨 iv 型和 II 型糖尿病与 As 的关系尚有局限,这将是未来的研究领域。

2.5 与高血压相关

高血压也是 As 的一个病因。内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 调节血管舒缩。eNOS^{-/-} 小鼠出现高血压,与载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠交配后,子代同时存在高血压和 As。然而,有报道认为 eNOS 和 NO 产生超氧阴离子,氧化低密度脂蛋白,加速 As 病变进程^[22]。2002 年有学者报道了 eNOS^{-/-} 小鼠与载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠交配的子代较对照组载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠主动脉病理损害小,说明 eNOS 和 NO 与 As 的关系仍不明^[23]。近年发现血管紧张素 II 刺激血管平滑肌细胞增殖和巨噬细胞胆固醇聚集,加速 As 病变进程。与载脂蛋白 E^{-/-}/ACE^{+/+} 小鼠比较,载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠与 ACE^{-/-} 小鼠交配的子代 As 病变和氧化应激明显减少,表明 ACE 参与了 As 的形成^[24]。

2.6 其他

高同型半胱氨酸血症也是 As 的一个重要危险因素。合并高同型半胱氨酸血症的载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 As 病理损害面积扩大,血管炎症加重,出现多个并发症^[25]。维生素 C 可以在脯氨酸和赖氨酸两端加上氢氧根离子,有稳定胶原的作用。维生素 C 合成酶基因缺失的 Gulo^{-/-} 小鼠与载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠交配的子代病灶胶原成分明显减少^[26]。

3 结语

本文综述了采用基因工程技术建立的多种 As 小鼠模型特点。虽然载脂蛋白 E^{-/-} 和 LDLR^{-/-} 小鼠的应用在心血管疾病研究领域发挥了重大作用,但仍有一些问题悬而未决,如:TNF- α 和 eNOS 在 As 中确切作用报道的不一致性常常出现在基因敲除动物模型的研究中。因此削弱某一基因在靶器官的作用很重要。近年开展的 Cre-Lox 技术,选择性地去除靶基因在特定器官的表达,为阐明某一基因在血管系统的特定作用提供了方便^[27]。虽然基因敲除和转基因动物模型对心血管系统的研究大有裨益,但事实上,小啮齿类动物并不能精确反映人类心血管系统的某些生理功能^[28],寻找并建立更符合人类 As 病变特点的 As 动物模型仍有必要^[29]。因此,As 的研究任重而道远。

[参考文献]

- [1] Thompson JS. Atheromata in an inbred strain of mice[J]. *J Atheroscler Res*, 1969, **10**: 113-122
- [2] Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in suscep-

- bility to atherosclerosis among inbred strains of mice[J]. *Atherosclerosis*, 1985, **57**: 65-73
- [3] Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells[J]. *Cell*, 1992, **71**: 343-353
- [4] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery[J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 883-893
- [5] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 8 264-268
- [6] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1 518-525
- [7] Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 205-211
- [8] Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocyte foam cells in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 443-449
- [9] Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice[J]. *J Clin Invest*, 1997, **99**: 2 752-761
- [10] Feingold KR, Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia[J]. *Diabetes*, 1992, **41** (Suppl 2): 97-101
- [11] Mallat Z, Gojova A, Marchiol FC, Esposito B, Kamate C, Merval R, et al. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice[J]. *Circ Res*, 2001, **89**: 930-934
- [12] Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero CJ, Lover E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein[J]. *Nature*, 1997, **386**: 78-81
- [13] Sjöland H, Eitzman DT, Gordon D, Westrick R, Nabel EG, Ginsburg D. Atherosclerosis progression in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E deficient mice is independent of genetic alterations in plasminogen activator inhibitor 1[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 846-852
- [14] Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1 440-445
- [15] Lemaitre V, O'Byrne TK, Boreczuk AC, Boreczuk AC, Okada Y, Tall AR. ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis[J]. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1 227-234
- [16] Emeson EE, Shen ML, Bell CG, Qureshi A. Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice[J]. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 675-685
- [17] Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1 470-476
- [18] Ludwig B, Freigang S, Jaggi M, Kurrer MO, Pei YC, Vik L, et al. Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 12 752-757
- [19] Daugherty A, Pure E, Delfel-Butteiger D, Chen S, Leferovich J, Roselaar SE, et al. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice[J]. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 1 575-580
- [20] Vischer UM. Hyperglycemia and the pathogenesis of atherosclerosis: lessons from murine models[J]. *Eur J Endocrinol*, 1999, **140**: 1-3
- [21] Lyngdorf LG, Gregersen S, Daugherty A, Falk E. Paradoxical reduction of atherosclerosis in apoE-deficient mice with obesity related type 2 diabetes[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**: 854-862
- [22] O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease[J]. *Circ Res*, 2001, **88**: 12-21
- [23] Shi W, Wang X, Shih DM, Laubach M, Navab M, Lusis AJ. Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2002, **105**: 2 078-082
- [24] Hayek T, Pavlotzky E, Hamoud S, Coleman R, Keidar S, Aviram M, et al. Tissue angiotensin converting enzyme (ACE) deficiency leads to a reduction in oxidative stress and in atherosclerosis: studies in ACE-knockout mice type 2[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 2 090-096
- [25] Thambyrajah J, Townend JN. Homocysteine and atherothrombosis—mechanisms for injury[J]. *Eur Heart J*, 2000, **21**: 967-974
- [26] Nakata Y, Maeda N. Vulnerable atherosclerotic plaque morphology in apolipoprotein E-deficient mice unable to make ascorbic acid[J]. *Circulation*, 2002, **105**: 1 485-490
- [27] Bjarnegård M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, et al. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities[J]. *Development*, 2004, **131** (8): 1 847-857
- [28] Ohashi RJ, Mu Hong, Yao QZ, Chen CY. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, **14**: 187-190
- [29] 许金鹏, 王绿娅. 关于动脉粥样硬化斑块破裂的动物模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 440, 444, 448
- (此文编辑 朱雯霞)