

遗传性混合型高脂血症小鼠的自发性动脉粥样硬化

王亚楠, 洗勋德, 张晓红, 刘国庆

(北京大学医学部心血管研究所, 分子心血管学教育部重点实验室, 北京市 100083)

[关键词] 病理学与病理生理学; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠; 甘油三酯; 动脉粥样硬化; 脂蛋白脂肪酶

[摘要] 目的 为探讨高甘油三酯血症对动脉粥样硬化的影响, 建立了脂蛋白脂肪酶和载脂蛋白 E 双基因缺陷的混合型高甘油三酯和高胆固醇血症动物模型。方法 比较了双基因以及载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠的血浆甘油三酯, 总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的水平, 并对整条主动脉和主动脉流出道进行了动脉粥样硬化病变定量检测。结果 发现双基因缺陷小鼠血浆甘油三酯是载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠的 3.8 倍 (5.904 ± 0.505 比 1.536 ± 0.860 g/L), 血浆总胆固醇也略有增加, 但高密度脂蛋白胆固醇则无明显差异。两种小鼠的主动脉全长及流出道均有明显的粥样硬化, 斑块面积占全部动脉的 $37.2\% \pm 10.7\%$ 比 $44.6\% \pm 18.1\%$, 但之间无显著差异。结论 载脂蛋白 E 基因缺陷合并脂蛋白脂肪酶缺陷虽然可以出现血浆甘油三酯增高, 但动脉粥样硬化病变并没有加重。这可能与血管壁局部脂蛋白脂肪酶的活性相应降低而对动脉粥样硬化抑制作用有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Development of Spontaneous Atherosclerosis in Inherited Combined Hyperlipidemic Mice

WANG Yan-Nan, XIAN Xun-De, ZHANG Xiao-Hong, and LIU Guo-Qing

(1. Institute of Cardiovascular Science, Key Laboratory of Molecular Cardiology, Ministry of Education, Peking University, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] ApoE-deficient Mice; Triglyceride; Atherosclerosis; Lipoprotein Lipase

[ABSTRACT] **Aim** To study the development of spontaneous atherosclerosis in combined hyperlipidemic mice. **Methods** Comparison of apolipoprotein (Apo) E/lipoprotein lipase (LPL)-double deficient mice with ApoE-deficient mice on the plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL) as well as the atherosclerotic lesion area of the aortic root and the whole aorta. **Results** ApoE/LPL-double deficient mice had an approximately 60% and 380% increase in total cholesterol (7.237 ± 0.448 and 4.435 ± 1.892 g/L) and triglyceride (5.904 ± 0.505 and 1.536 ± 0.860 g/L) respectively, but high density lipoprotein was not significantly different from ApoE deficient mice. The atherosclerotic lesion area of the aortic root and the whole aorta were also not significantly different between the 2 groups of mice. **Conclusion** ApoE/LPL-double deficient mice display significantly higher plasma TG and Ch levels than ApoE deficient mice but the spontaneous atherosclerotic lesions are not different.

目前高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG) 动物模型大多是通过喂饲高脂饲料复制^[1], 由于种属差异, 由此建立的小鼠高脂血症模型血浆 TG 仅增高一倍左右, 作为人类高 TG 血症的模型有较大局限性。脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是清除 TG 的限速酶, LPL 缺陷则造成乳糜微粒 (chylomicron, CM) 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 大量聚集, 形成 I 型高脂血症。我们新近将载脂蛋白 E 与 LPL 基因缺陷小鼠杂交, 得到了高胆固醇与高 TG 血症的双基因缺陷小鼠模型^[2]。通过与载脂蛋白 E 单基因缺陷小鼠比较, 将能够比较

准确地了解 HTG 对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生和发展的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠由北京大学医学部实验动物中心提供, C57/BL6 背景的 LPL 基因缺陷小鼠自加拿大引进。TaqDNA 聚合酶及 dNTP 购自上海生工公司, 血浆 TG 和 TC 测定试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.2 动物模型的建立

载脂蛋白 E/LPL 双基因缺陷小鼠模型是通过将载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠与 LPL 基因缺陷小鼠杂交后获得^[2]。所有小鼠实验前均在无菌过滤鼠笼内, 并且可自由进食及饮水。小鼠喂饲正常饲料 (不含额外的胆固醇和 TG)。

[收稿日期] 2006-04-30 [修回日期] 2006-09-10

[作者简介] 王亚楠, 基础医学专业本科生。洗勋德, 博士研究生。张晓红, 博士研究生, 研究方向为脂蛋白代谢与动脉粥样硬化。通讯作者刘国庆, 长江学者特聘教授, 博士研究生导师, 研究方向为高脂蛋白血症与动脉粥样硬化。联系电话 010-82802769, E-mail 为 georgeliu@bjmu.edu.cn

新生小鼠4周龄离乳后,从鼠尾中提取DNA作PCR鉴定基因型。剪取约2 mm鼠尾,放入5%蛋白酶K中55℃消化过夜,然后置于95℃水浴中15 min将蛋白酶K灭活,10 kr/min离心10 min,取上清做基因型鉴定。

1.3 血浆总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇的检测

分别收集9个月龄的正常、载脂蛋白E基因缺陷和双基因缺陷小鼠眶静脉血($n=20$)。分离血浆后,按照试剂盒说明书测定血浆TC及TG浓度。血浆HDLc采用聚乙二醇(PEG)沉淀法测定,即取等体积10%PEG溶液和血浆充分混匀后,8 kr/min离心10 min,取上清后按照测量血浆TC的方法测HDLc。

1.4 组织学观察及主动脉流出道粥样硬化斑块面积的测量

9月龄小鼠10只,1%戊巴比妥钠麻醉,打开胸腔,暴露心脏,剪开右心房,经左心室先灌注生理盐水-磷酸缓冲液后20 mL,再灌注含4%多聚甲醛的同样缓冲液20 mL,灌注固定后,取全长主动脉后在解剖显微镜下仔细剥离外膜组织,4%多聚甲醛固定。心脏OCT包埋后做主动脉流出道的冰冻切片。油红O染色:用双蒸馏水洗三次后,60%异丙醇浸泡5 min,0.05%油红O-异丙醇浸染30 min,再以60%异丙醇洗去背景红色,然后以ImageJ 1.29软件对斑块面积进行测定。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。所有数据处理应用SPSS统计处理软件进行分析。

2 结果

2.1 双基因缺陷小鼠模型基因型鉴定结果

聚合酶链反应结果发现,双基因缺陷小鼠同时具有200 bp和600 bp两条条带,而载脂蛋白E基因缺陷小鼠只有200 bp条带(图1)。

2.2 双基因缺陷小鼠血浆脂质水平

成年双基因缺陷小鼠血浆TG水平比正常小鼠增高6.5倍,是载脂蛋白E基因缺陷小鼠的3.8倍,具有明显的统计学差异($P < 0.001$)。同时双基因缺陷小鼠血浆TC水平比正常小鼠增高9倍($P < 0.001$),比载脂蛋白E基因缺陷小鼠的血浆TC水平也略有增加(增加了0.63倍)。另一方面,双基因缺陷

小鼠血浆HDLc水平与载脂蛋白E基因缺陷小鼠血浆的HDLc水平没有明显的差异(表1)。

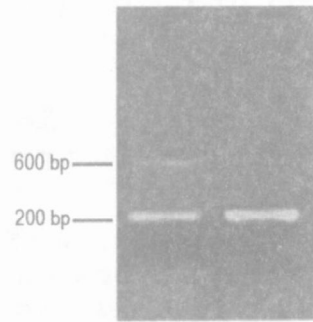


图1. 小鼠模型基因型鉴定 1为双基因缺陷小鼠,2为载脂蛋白E基因缺陷小鼠

表1. 三种小鼠血浆脂质的比较 ($n=20$, g/L)

分组	TC	TG	HDLc
正常基因小鼠	0.724 ± 0.192	0.784 ± 0.379	0.602 ± 0.073
单基因缺陷小鼠	4.435 ± 1.892 ^a	1.536 ± 0.860 ^a	0.191 ± 0.102 ^a
双基因缺陷小鼠	7.237 ± 0.448 ^{ab}	5.904 ± 0.505 ^{ab}	0.158 ± 0.104 ^a

单基因缺陷小鼠是指载脂蛋白E基因缺陷小鼠; a为 $P < 0.01$,与正常小鼠比较; b为 $P < 0.01$,与载脂蛋白E基因缺陷小鼠比较。

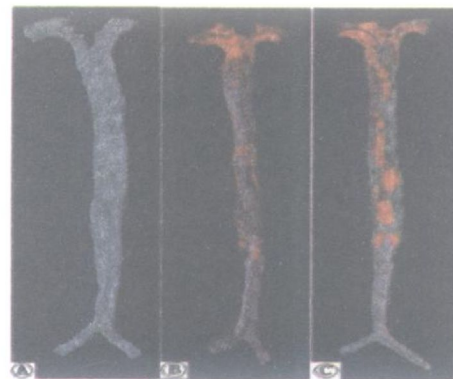


图2. 小鼠全主动脉油红O染色 A为正常小鼠, B为载脂蛋白E基因缺陷小鼠, C为双基因缺陷小鼠。

2.3 双基因缺陷小鼠与载脂蛋白E基因缺陷小鼠全主动脉粥样硬化斑块面积的比较

油红O染色发现(图2),双基因缺陷和载脂蛋白E基因缺陷小鼠主动脉脂质沉积显著增加,全部样本($n=10$)均出现了严重的As斑块,而正常小鼠无一个标本出现病变。定量扫描病变面积显示,双基因缺陷小鼠全主动脉斑块面积占全部面积的37.2% ± 10.7%;载脂蛋白E基因缺陷小鼠As斑块面积占全部面积的44.6% ± 18.1%,两者之间没有明显的统计学差异。

2.4 双基因缺陷与载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉流出道病变面积的比较

三种不同基因型小鼠主动脉流出道部位油红 O 染色后显示, WT 小鼠无脂质沉积, 而双基因缺陷和载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠在瓣膜部位以及血管壁



图 3. 小鼠主动脉流出道油红 O 染色 A 为 WT 小鼠, B 为载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠, C 为双基因缺陷小鼠。

表 2. 三种小鼠主动脉流出道斑块面积比较

分 组	n	病变面积(μm^2)
正常基因小鼠	10	0.00 ± 0.00
单基因缺陷小鼠	10	48.50 ± 15.12
双基因缺陷小鼠	10	38.09 ± 8.63

3 讨论

通过将载脂蛋白 E 和 LPL 基因缺陷小鼠的杂交, 得到了具有稳定遗传性的混合型高胆固醇/高 TG 血症小鼠模型。这种小鼠比正常小鼠的血浆 TG 增加了 6.5 倍, 血浆 TC 增加了 9 倍, 同时出现了与载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠相似的严重自发性动脉粥样硬化。

虽然有流行病学资料显示高 TG 血症是冠心病的危险因素之一^[3], 但是也有研究表明, 血浆 TG 水平与动脉粥样硬化的发生无明显的相关性^[4]。我们通过混合型高脂血症与单纯高胆固醇血症两种动物模型的比较研究, 发现尽管前者的血浆 TG 水平是后者的 3.8 倍, 但是两者间自发性动脉粥样硬化的程度却没有显著的差别。其原因可能与双基因缺陷小鼠动脉壁 LPL 的缺乏有关。已知脂肪和肌肉等外周组织与动脉壁的 LPL 对于动脉粥样硬化的发生具有不同的作用^[5]: 外周组织 LPL 活性增高既可以降低 TG 水平, 又可以升高 HDL 水平^[6], 表明 LPL 可以抑制动脉粥样硬化的发生。然而在血管壁, 主要来自巨噬细胞的 LPL 可介导脂蛋白滞留和修饰, 促进巨噬细胞吞噬后形成泡沫细胞, 增加动脉粥样硬化的易感性^[7]。此外有研究证明, 血管壁的 LPL 可

上有明显的动脉粥样硬化病变(图 3)。斑块面积定量分析表明, 高胆固醇血症的载脂蛋白 E 基因缺陷和混合型高脂血症的双基因缺陷小鼠之间没有明显的统计学差异(表 2)。

作为一种单核细胞粘附蛋白, 介导单核细胞向血管壁的聚集^[8]。以上证据均说明增加局部血管壁的 LPL 可以促进动脉粥样硬化。因此, 当血管壁 LPL 与其它组织的 LPL 都降低时, 可能高甘油三酯 TG 血症就不表现为独立的危险因素。

综上所述, 我们培育的载脂蛋白 E/LPL 双基因缺陷小鼠模型不需喂饲高脂饲料就产生稳定的高胆固醇/TG 血症和显著的自发性动脉粥样硬化。该小鼠将可用于 TG 代谢和动脉粥样硬化关系的深入研究, 并是降脂和抗动脉粥样硬化药物筛选以及疗效评定的良好动物模型。

[参考文献]

- [1] 沈涛, 白怀, 刘秉文, 张祖辉. 实验性高甘油三酯血症大鼠凝血和纤溶的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 199-204
- [2] 周淑佩, 张晓红, 刘国庆, 田枫. 混合型高甘油三酯/高胆固醇血症小鼠模型的培育[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(6): 368-371
- [3] Masaki N, Tatami R, Kunamoto T, Izawa A, Shimada Y, Takamatsu T, et al. Ten-year follow-up of familial hypercholesterolemia patients after intensive cholesterol-lowering therapy [J]. *Int Heart J*, 2005, 46(5): 833-843
- [4] Rapp RJ. Hypertriglyceridemia: a review beyond low-density lipoprotein [J]. *Cardiol Rev*, 2002, 10(3): 163-172
- [5] Clee SM, Nagat Bissada, Fudan Miao, Li miao, David AM, John JP, et al. Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41: 521-531
- [6] Alaupovic P, Mack WJ, Knight-Gibson C, Hodis HV. The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesion as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinic trial [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 715-722
- [7] Renier G, Skamene E, DeSanctis JB, Radzioch D. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1993, 13: 190-196
- [8] Mamputu J, Desfaits C, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38: 1722-729

(此文编辑 胡必利)