

2 型糖尿病大鼠动脉粥样硬化模型不同制备方法探讨

徐 雷¹, 冯 波¹, 王 华¹, 王军臣², 符雪莲²

(同济大学附属东方医院 1. 内分泌科, 2. 病理科, 上海市 200120)

[关键词] 内科学; 大鼠; 动物模型; 糖尿病; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 比较和探索制备 2 型糖尿病动脉粥样硬化大鼠模型的不同方法。方法 健康雄性 Wistar 大鼠 5 只作为对照组, 雄性自发性糖尿病模型 GK 大鼠随机分为高甘油三酯组(12 周)、高胆固醇 12 周组和高胆固醇 24 周组, 每组 5 只。组织病理学观察各组动脉粥样硬化形成情况。结果 四组大鼠血管各层结构基本正常, 未见典型动脉粥样硬化病变。免疫组织化学染色显示, 四组主动脉壁均无巨噬细胞浸润, 中膜及内膜层平滑肌细胞排列规则。结论 对于 2 型糖尿病大鼠动脉粥样硬化模型的制备, 这三种方法在 Wistar 大鼠均不易复制成功。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Evaluation of the Methods for Establishing Type 2 Diabetic Atherosclerotic Rat Models

XU Lei¹, FENG Bo¹, WANG Hua¹, WANG Jun-Chen², and FU Xue-Lian²

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Pathology, the Affiliated Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China)

[KEY WORDS] Rat; Model; Diabetes; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Aim To compare and investigate the different methods for establishing type 2 diabetic atherosclerosis rat models. Methods 5 Wistar rats were chosen control group and 15 GK rats were randomly divided into three groups: hypertriglyceride diet (12 weeks) group, hypercholesterol diet with vitamin D (12 weeks) group and hypercholesterol diet with vitamin D (24 weeks) group. Histopathology was used to observe the atherosclerotic lesions. Results There were no obvious morphologic changes in these four groups by light microscope. The macrophage-related antigen expressions in the aorta were not observed in all the four groups. Absence in abnormal expression of SMC-related antigens was shown in all of them. Conclusion All of the three methods were not successful in establishing diabetic atherosclerotic rat models in Wistar rats.

至今糖尿病性血管病变的发病机制仍未完全阐明, 建立较理想的动物模型对深入研究糖尿病血管并发症有较为深远的意义。Goto Kakisaki (GK) 大鼠是一种自发性非肥胖 2 型糖尿病模型鼠, 与临床表型相近, 因此能较好地应用于研究 2 型糖尿病与血管病变的关系。2 型糖尿病并发动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 尚无理想的动物模型, 本实验在其他研究基础上, 尝试三种不同方法, 探讨这些方法制备 2 型糖尿病动脉粥样硬化大鼠模型的可靠性。

1 材料与方法

1.1 动物

选择 5 只体重为 236~244 g 的健康雄性 Wistar 大鼠(8 周龄)(清洁级, 由中国科学院上海实验动物

中心提供)作为对照组, 以高甘油三酯饲料(基础饲料 80%、猪油 10%、白砂糖 10%)喂养 12 周。选择 15 只体重为 220~240 g Goto-Kakisaki Wistar (GK) 大鼠(8 周龄)(清洁级, 由中国科学院上海实验动物中心提供), 随机分为 3 组, 每组 5 只: ①高甘油三酯组, 以高甘油三酯饲料(基础饲料 80%、猪油 10%、白砂糖 10%)喂养 12 周; ②高胆固醇 12 周组, 以高胆固醇饲料(普通饲料 78.5%、胆固醇 1%、胆酸盐 0.5%、猪油 20%)饲养 12 周, 从实验第 1 天起给予维生素 D3(钙尔奇 D, 惠氏一百官制药有限公司产品)灌胃, 按 60 万 u/kg 总剂量分 3 天操作; ③高胆固醇 24 周组, 高胆固醇饲料喂养 24 周, 余同高胆固醇 12 周组。高脂饮食配方由中国科学院动物所提供。动物饲养于上海交通大学医学院动物实验部的标准化饲养房, 相对湿度为 40%~70%, 室温保持在 18~22℃。

1.2 主动脉取样和 HE 染色

于实验 12 周和 24 周, 用戊巴比妥钠分别麻醉相应实验组大鼠, 剖开胸腹腔, 取主动脉弓下段 2~3 cm 主动脉置于 10% 中性福尔马林中固定, 常规梯

[收稿日期] 2008-01-08 [修回日期] 2008-09-05

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金(054087)

[作者简介] 徐雷, 硕士, 主要研究方向为糖尿病并发大血管病变的分子机制, E-mail 为 shielry-ok1@126.com。通讯作者冯波, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖尿病的临床研究, E-mail 为 fengbo@medmail.com.cn。王华, 硕士。

度酒精脱水,二甲苯透明后,浸蜡包埋,将以 2.5 μm 厚度切片,按照常规方法进行 HE 染色,光镜下观察动脉形态学变化。

1.3 免疫组织化学染色

采取 Envision 两步法^[1]应用小鼠单克隆 Mac 抗体(1:50, Antigenix)、小鼠单克隆平滑肌细胞 Actin 抗体(1:300, Neomarkers)和 RECA(1:50, Hbt)分别对动脉壁单核细胞、平滑肌细胞和内皮细胞进行免疫组织化学染色,以不加一抗的切片作为阴性对照。所有切片与一抗 4℃ 过夜孵育后,与抗小鼠 IgG(1:

300, Bethyl)室温下共同孵育 1 h,再与 DAB(由上海华美生物公司提供)共同孵育显色,苏木素复染。

2 结果

2.1 动脉壁组织形态学变化

光镜下各组大鼠主动脉管腔呈圆形,管壁层次尚清晰,内膜光滑,内皮细胞基本未见脱落,未见泡沫细胞,无内膜增厚,动脉壁结构各组之间无明显差异(图 1)。

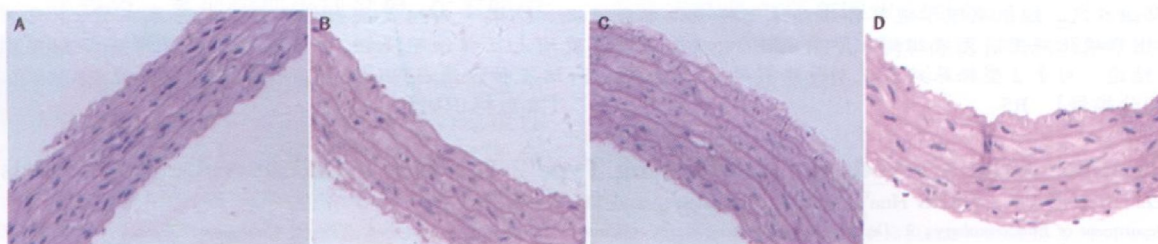


图 1. 各组大鼠主动脉 HE 染色($\times 40$) A 为对照组, B 为高甘油三酯组, C 为高胆固醇 12 周组, D 为高胆固醇 24 周组。

2.2 免疫组织化学染色结果

各组大鼠主动脉壁均未检测到 Mac 染色(图 2);平滑肌细胞 Actin 染色可见中膜及内膜层平滑肌

细胞排列规则,内膜平滑肌细胞未见增殖(图 3)。糖尿病大鼠各组 RECA 染色可见内皮细胞出现缺损,排列不连续,内膜下未见染色。

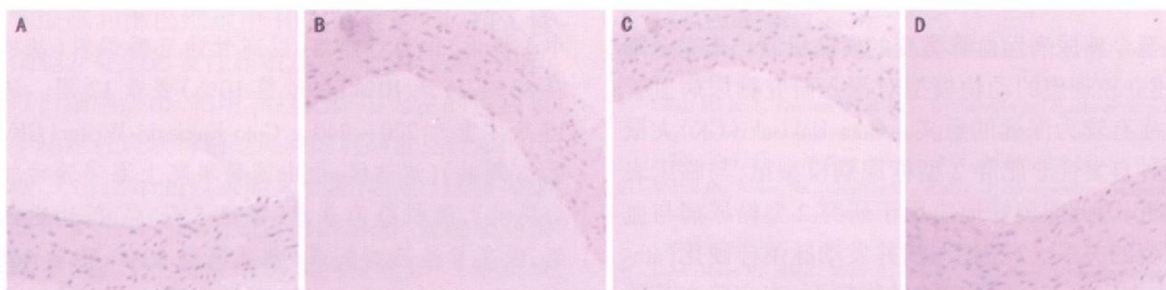


图 2. 各组大鼠主动脉 Mac 免疫染色($\times 40$) A 为对照组, B 为高甘油三酯组, C 为高胆固醇 12 周组, D 为高胆固醇 24 周组。

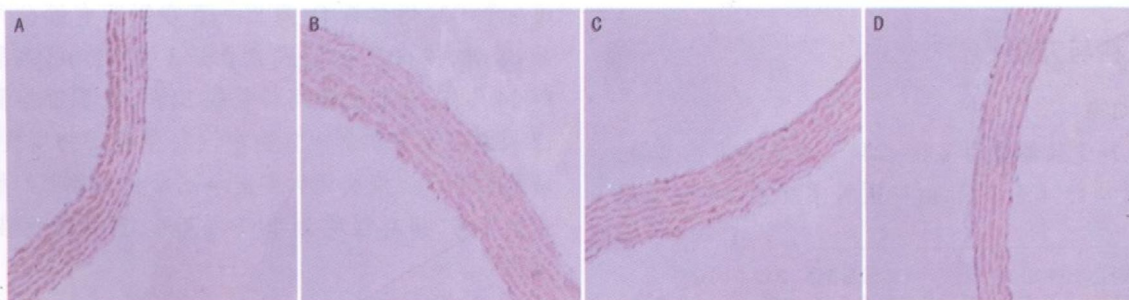


图 3. 各组大鼠平滑肌细胞 actin 免疫组织化学染色($\times 10$) A 为对照组, B 为高甘油三酯组, C 为高胆固醇 12 周组, D 为高胆固醇 24 周组。

3 讨论

糖尿病慢性并发症可累及全身各个重要器官,最严重而突出的问题是心血管病变,基本病理病变为动脉粥样硬化。选择合适的动物及成功建立 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化模型成了开展这方面研究的基础。目前可以用作模型的动物有:猪、猴、大白兔和大鼠等。虽然猴和猪的系统发育和饮食结构类似于人,能够产生明显的动脉粥样硬化,但这两种动物的购买和饲养成本较高,限制了其作为模型动物的大规模应用。家兔和大鼠是现在研究动脉粥样硬化最常用的模型动物。家兔是实验工作者建立动脉粥样硬化模型的首选,但家兔对链脲佐菌素损伤不敏感,这也是建立糖尿病模型不选择家兔的重要原因。GK 大鼠是一种自发性非肥胖 2 型糖尿病模型鼠,与临床表型相近,是较为理想的动物选择,但大鼠有天然抗动脉粥样硬化作用,从而利用大鼠制备动脉粥样硬化模型出现困难。

理论上在 GK 大鼠模型的基础上,通过给予高脂饮食,并且延长喂养时间可获得 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化的模型。但本实验采用高甘油三酯饮食喂养 12 周并未出现典型动脉粥样硬化病变,光镜下动脉壁层次结构尚清楚,与对照组无明显差别,免疫组织化学 Mac 染色呈阴性,表明无明显的单核巨噬细胞浸润。此外,对平滑肌细胞 Actin 和 RECA 的染色,未发现血管壁异常的标记着色,表明此时尚无平滑肌细胞的迁移、增殖和新生的血管形成。因此单纯加大甘油三酯成分,可能尚不足以促成动脉粥样硬化的形成,同时阴性结果也可能由于 12 周时间尚短所致。

曾有研究表明利用高胆固醇饮食,结合使用大剂量维生素 D3 建立钙超负荷型大鼠动脉粥样硬化模型,时间适中,9 周左右即可得到典型动脉粥样硬化病变^[2,3]。本实验在 GK 大鼠按照文献上方法进行复制和制备动脉粥样硬化模型,为提高成功率,将喂养时间分别延长为 12 周及 24 周。两组模型大鼠同样未见到典型动脉粥样硬化病变,其形态学改变及免疫组织化学染色结果与对照组亦无明显差别。究其原因,本研究采用的饮食配方、喂养方法以及用药剂量均与文献所述无明显差异,但本文使用的 GK 鼠是种 Wistar 大鼠,因此整个研究包括正常对照组均为 Wistar 大鼠,而不是文献中采用的 SD 大鼠^[2,3],不清楚大鼠品种不同是否为模型制备出现差异的原因之一,此需进一步对照观察。

本研究结果表明,GK 大鼠并不是最佳的复制 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化的模型动物,其制备时间长,仅依靠高脂饮食喂养以及造成动脉壁钙超负荷状态,或是延长喂养时间,都不易得到较高的成功率。故而寻找一种替代动物模型大鼠很有必要,如采用小剂量链脲佐菌素诱导载脂蛋白 E 基因敲除小鼠来制备 2 型糖尿病并发动脉粥样硬化模型的方法值得进一步关注。

[参考文献]

- [1] 马大烈,郑青渝,李今华,等. 微波 EnVision 免疫组织化学技术及其应用[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27 (2): 153-154.
 - [2] 沈丽,卢维晟,姚俊宇,等. 不同方法建立大鼠 AS 模型的比较[J]. 心脏杂志, 2005, 17 (1): 18-20.
 - [3] 温进坤,韩梅,杜玮南,等. 一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的方法[J]. 中国老年医学杂志, 2001, 21 (1): 50-52.
- (此文编辑 许雪梅)