

动脉粥样硬化实验研究模型百年回溯

杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[作者简介] 杨永宗, 南华大学病理生理学教授, 博士研究生导师。中国病理生理学会理事, 中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会主任委员, 国际动脉粥样硬化学会中国分会主席, 《中国动脉硬化杂志》主编。长期从事动脉粥样硬化病因发病学和动脉粥样硬化防治的实验研究。

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 实验研究模型; 泡沫细胞; 自然缺陷动物; 基因工程动物; 易损斑块模型

[摘要] 自从 1908 年俄国病理学家 Ignatowski 用蛋和奶喂饲家兔引发动脉粥样硬化病变至今整整一百年。经过一个世纪的变迁, 动脉粥样硬化实验模型的研究有了巨大发展, 不仅品种增多, 而且在机制研究方面有根本性突破。然而, 这与临床医学相关领域的突飞猛进发展的需要仍不相适应。值此百年之际, 特撰此文, 对动脉粥样硬化实验模型的研究现状和方向作一简述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A



1 引言

1908 年俄国病理学家 Ignatowski 用蛋和奶喂饲家兔引发动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 病变, 开启了 As 实验研究新时代, 为 As 研究创立了重大里程碑。自 1908 年至今的一百年间 As 实验研究为阐明 As 的病因和发病机制, 促进心脑血管疾病的防治做出了巨大贡献。进入 20 世纪 80 年代之后, 一方面 As 实验研究遭遇循证医学的挑战, 另一方面由于血管内成像等临床诊疗技术的革命性进步导致对 As 实验研究依赖性降低, 而 As 实验研究方法的进步相对滞后, 不能提供相应临床事件的研究模型, 以致 As 实验研究的先导作用逐渐削弱。究其原因, 与 As 实验研究模型落后和选用不当密切相关。

2 常用动脉粥样硬化动物模型

常用的研究模型大致包括细胞模型、食饵性动物模型、人工培育自然缺陷动物模型和基因工程动物模型四大类。

2.1 细胞模型

通过体外孵育使单核巨噬细胞转化为具有 As 病变象征性的泡沫细胞用于 As 实验研究的细胞模型。细胞模型因复制迅速而简单, 数十小时即可成功, 故应用广泛。泡沫细胞虽是 As 病变的特征性细胞, 但不能代表 As 的基本病变——粥样斑块, 更不能反映人体 As 病变的实际状态。泡沫细胞比较适合用于细胞脂质代谢方面的实验研究。

2.2 食饵性动物模型

1913 年 Nikolai 创立的经典实验模型, 是目前最常用的

实验动物模型, 尤其是家兔高脂血症诱发 As 病变发生快而且范围广, 最为常用。家兔与人类血浆都具有胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 活性; 脂蛋白成分都以低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 为主, 而肝脏 LDL 受体的表达较弱, 对血脂的清除能力低; 对外源性胆固醇的吸收率很高, 可达 75% ~ 90%, 所以家兔对高脂饲料非常敏感。一般高脂饲料喂养一个月可造成动脉内皮损伤, 2~3 个月可出现 As 病变。应当特别注意的是, 首先, 家兔为草食动物, 没有肝脂酶, 也没有人类的载脂蛋白 A-Ⅰ类类似物。其次, 复制模型时动物血清胆固醇很高, 容易发生胆固醇贮积症, 常导致家兔继发感染而死亡。第三, 家兔的病变常分布在主动脉弓和胸主动脉, 而人类多在腹主动脉, 家兔冠状动脉病变多出现在小动脉, 冠状动脉大分支不出现病灶, 而人类主要发生在冠状动脉的大分支。更应强调的是, 上述短期喂饲高脂饲料诱发的病变主要是脂质条纹, 只有在延续或间断喂饲高脂饲料一年以上才可能复制出与人类相似的 As 病变, 包括粥样瘤及复合病变。所以短期喂饲高脂饲料诱发的病变并不能反映有实际临床意义的进展性 As 斑块。

猪与人类在生理、生物化学和解剖学方面有许多共同之处, 血浆脂蛋白的生物化学性质、LDL 结构以及载脂蛋白等也与人类相似。小型猪 As 病变分布和病理形态近似于人, 冠状动脉 As 病变重于主动脉病变, 而且左冠状动脉比右冠状动脉更为易发。用含 1% ~ 2% 高胆固醇饲料饲养 6 个月即可形成 As 病灶。更长时间可诱发进展型 As 病变, 冠状动脉和主动脉出现严重的粥样瘤。但猪模型的缺点是体型大, 形成病变周期长, 耗费较高。

食饵性动物模型应用最为广泛, 但存在问题也最普遍:

一是喂养时间太短,多数病变为脂质条纹,若用于研究临床事件则意义有限;二是饲料中胆固醇含量太高,血液胆固醇超过 800 mg/dL,不仅死亡率很高,也不切合临床实际。

2.3 人工培育的自然缺陷动物模型

渡边兔 (watanabe heritable hyperlipidemic rabbit WHHL) 是 1974 年渡边发现的自发性高脂血症的日本白兔,经过 5 年的筛选传代于 1979 年培育成功。WHHL 兔的 LDL 受体先天性缺陷,幼龄时即可发生 As 心肌梗死和黄色瘤等,与人类家族性高胆固醇血症患者极为相似。但其繁殖能力较低、身体抵抗力较差、对球虫病易感性高、不易饲养。

STH 兔为 1987 年伦敦圣托马斯医院 Ville 发现一种遗传性脂代谢紊乱的新西兰白兔。STH 兔肝脏合成极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 功能亢进,饲喂正常饲料就可造成血中 LDL、IDL 和 VLDL 浓度升高,具有自发性高胆固醇血症和高甘油三酯血症,其表现类似于人的高甘油三酯血症和复合型高脂血症,出现的 As 病变也与人非常相似。虽然 WHHL 兔和 STH 兔都可以形成 As 的晚期病变,但人工培育的自然缺陷动物模型基因缺陷单一,品种较少,应用范围相对较窄。

2.4 基因工程动物模型

自 1992 年洛克非勒大学 Breslow 以及北卡大学 Maeda 两个研究组同时在《Cell》和《Science》上发表了关于载脂蛋白 E 基因敲除小鼠以后,相继出现了 LDL 受体基因敲除鼠、肝脂酶基因敲除鼠、人载脂蛋白 B100 转基因鼠和人 CETP 转基因鼠等,并出现不少基因工程兔的 As 模型。基因工程动物模型包括转基因动物、基因敲除动物和基因替换动物。

2.4.1 转基因动物模型 1993 年报道转载脂蛋白 E 3-Leiden 基因小鼠常规饲料喂养即可出现高胆固醇和高甘油三酯血症,但无 As 病灶;若喂以高胆固醇和高脂饲料,血液胆固醇可高达 40~60 mmol/L,引发整个主动脉树出现从泡沫细胞组成的脂肪条纹到纤维斑块、钙化病灶等 As 病灶。此外还有转人载脂蛋白 B 基因小鼠、转人脂蛋白 (a) 基因小鼠、转人载脂蛋白 E 基因小鼠和转人载脂蛋白 AI 基因小鼠等。由于小鼠体小,病变样本采集困难,近年有研究者应用转基因兔研究 As 病变和脂代谢。已报道有载脂蛋白 AI 转基因兔、载脂蛋白 E2 转基因兔、基质金属蛋白酶 12 转基因兔和 LCAT 转基因兔等。值得注意的是由于兔与小鼠脂蛋白代谢方面显著差别,相同的人类基因导入可出现不同病理学效应 (表 1),对单一实验结果的解释应很谨慎。

表 1 转入同种人类基因的转基因兔和转基因小鼠在表型上的差异性

转入的基因	兔	小鼠
LCAT	抗 As	致 As
肝脂酶	致 As	抗 As
载脂蛋白 A	与载脂蛋白 B 结合	不与载脂蛋白 B 结合
载脂蛋白 E3	致 As	抗 As
15 脂加氧酶	抗 As	致 As

2.4.2 基因敲除动物模型 1992 年 Jane 等在胚胎肝细胞中通过同源重组的方法创建了载脂蛋白 E 基因敲除小鼠模型。这是第一个具有与人类相似的 As 病变的小鼠模型。载脂蛋白 E 是血液中最主要的载脂蛋白,是 LDL、VLDL、乳糜微粒和乳糜微粒残基受体的配基,与很多脂蛋白代谢密切相关。载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠因载脂蛋白 E 失效使得 LDL、VLDL/IDL 等不能与相关受体识别结合,以致这些脂蛋白清除延缓而出现高脂血症,胆固醇和甘油三酯水平都升高。喂饲普通饲料小鼠血浆胆固醇水平即可高达 400~600 mg/dL,5~6 周龄单核细胞在血管内皮上粘附,10 周龄后可见脂质条纹,20 周龄后即可出现纤维斑块,若时间较长还可见到成熟薄纤维帽、大坏死脂核的斑块,甚至出现钙化斑块。载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠的 As 病变广泛,全身大中动脉如主动脉根部、胸主动脉、颈动脉、肾动脉、冠状动脉和股动脉等均可发生。若进食高脂高胆固醇饲料,血浆胆固醇水平可高达 800~1000 mg/dL,As 病变形成更快更严重。LDL 受体基因敲除小鼠高脂喂养时血液胆固醇可达 1.5 g/dL,形成脂质条纹病灶,较晚期病灶可出现脂质核,也可诱发纤维斑块。应该注意的是小鼠在脂代谢方面与人类有较大差别,小鼠缺乏 CETP 活性,因此血浆脂蛋白主要是 HDL。小鼠的肝脏和小肠一样表达高活性的载脂蛋白 B 编辑酶,体内的载脂蛋白 B 主要为载脂蛋白 B48。而人类只有小肠表达载脂蛋白 B 编辑酶,血浆中以载脂蛋白 B100 为主。含有载脂蛋白 B48 的脂蛋白可被肝脏迅速清除,以致小鼠血脂水平较人类低。

3 动脉粥样硬化易损斑块模型

尽管上述 As 实验研究模型可提供多种相关实验选用,但基本上都还不能满足临床病理学的需求,更不能反映 As 引发临床事件的病理学基础。

大量临床证据表明,肇事斑块中因为严重狭窄而引发心肌梗死的只是很少一部分,大部分的心肌梗死发生在管腔狭窄并不严重的斑块破裂的血管,即心肌梗死发生并不与冠状动脉狭窄程度成正比。重要的是斑块稳定性的强弱,不稳定的易损斑块才是可能造成临床危害的关键病变。As 实验研究急迫需要的是能提供阐述如何测定斑块的稳定性,引发易损斑块破裂机制及因素是什么,如何预判易损斑块破裂等重大临床意义的实验研究模型,可现在实验研究模型基本上还停留在以病变面积大小、病变厚薄和病变发生快慢描述 As 病变特点和衡量病变严重程度的阶段,还有相当一部分研究以泡沫细胞代替粥样斑块,以脂质条纹代替易损斑块,其实实验结果很难得出有说服力的实验结论。

此外,现用的 As 实验动物模型离不开高脂饲料和胆固醇,事实上引发人体 As 病变危险因素多达数百种,高脂血症只是最常见最重要的一种,40% 冠心病病例找不到高脂血症的证据。所以现用的 As 实验动物模型,也带来了病因学研究的片面性。

近年已有很多研究着手复制 As 易损斑块的模型,应用最多的动物是载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠。据报载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠喂饲高胆固醇饲料 8 周即可在靠近主动脉弓的头臂干动脉

上,出现类似人类易损斑块的病变,这些斑块可以发生纤维帽撕裂,弹性蛋白丧失,附壁血栓形成和斑块内出血等斑块破裂现象,甚至导致小鼠猝死。但该模型斑块破裂的发生率不一,并且小鼠斑块的破裂与As末期的病理过程无关,大部分不会出现人类As病变末期的病理过程,如心肌梗死、心功能不全和猝死。人类易损斑块的特征如血管新生、斑块内出血和血栓形成比例少,血栓栓塞在小鼠模型上也不常见。Johnson等用含21%猪油和0.15%胆固醇食物喂养载脂蛋白E^{-/-}鼠长达37~59周,自然死亡后尸检发现头臂干动脉中存在与斑块破裂有关的血栓形成。显然,载脂蛋白E^{-/-}小鼠动物模型用于阐明As的病理学进程有重大意义,但用于研究易损斑块与As末期的病理关系作用却比较局限。

由于模型复制时间过长,而且斑块破裂很不规律,2002年Jan等改良模型复制方法,小鼠颈动脉壁出现粥样硬化斑块后再将以腺病毒为载体的人p53基因导入小鼠的总颈动脉,使平滑肌细胞和胶原含量减少,纤维帽显著变薄。之后静脉注射加压剂复合苯肾上腺素可使斑块破裂的发生率显著增加,表现为斑块的纤维帽破、核心内容物挤出、破裂斑块内出血、颈动脉内血栓形成以及病变内巨噬细胞吞噬红细胞等。但该方法操作复杂,很难大规模广泛使用。

另有研究者选用新西兰白兔制备As易损斑块的兔模型。早在40多年前,Constantinides等首次报道,新西兰白兔周期性的喂养胆固醇诱发As斑块,之后静脉注射血管加压药组胺,再腹腔注射Russell蝥蛇蛇毒(为一种前凝血素和内皮毒素)以触发血栓形成。随后Abela等重复并改良了上述方法,通过球囊损伤主动脉以加速粥样斑块的发生,并可产生急性主动脉血栓,但是引发这些血栓形成的原因主要是内皮受损而不是真正的斑块破裂。现在一般采用球囊损伤新西兰白兔股动脉和主动脉,高胆固醇饲料喂养8个月以建立As模型,再用Russell蝥蛇蛇毒腹腔注射,30min后静脉注射加压药组胺,触发兔As斑块破裂和血栓形成。Nakamura等还用Russell蝥蛇蛇毒结合5羟色胺或血管紧张素②以激发WHHL兔,也可诱发斑块破裂和血栓形成。

国内张运院士实验室在As易损斑块兔模型方面做了很多工作并获得一些创造性的重要成果。他们用野生型p53基因抑制血管平滑肌细胞增殖、促进其凋亡使斑块纤维帽变薄,再用蝥蛇蛇毒和组胺触发斑块破裂。他们还用斑块内注射洗涤红细胞建立易损斑块的兔模型。该模型的特点是红细胞注射的斑块内含有大量的泡沫细胞、胆固醇结晶和脂质积聚,可见明显的斑块内出血。

尽管在易损斑块动物模型构建方面取得了些进展,但这些动物模型有多大程度上反映人类As易损斑块病理学和体内斑块破裂实际过程的真实性,还有待更多的研究支持。回溯一百年,As实验研究模型工作有很大发展,方法有改进,品种已增多,但仍然不能满足临床医学研究的迫切需求。创建适合临床医学实际的As实验研究模型是一项费时费事费神费财的基础工作,现今的实际状况与期待的目标还有相当距离。我们As领域研究者应当义不容辞地负起重担,更加关注更加重视这项最基本的工作。

[参考文献]

- [1] Aliev G, Bumstock G, Watanabe rabbits with heritable hyperlipidemia: a model of atherosclerosis [J]. *Histol Histopathol* 1998; **13** (3): 797-817.
- [2] Bennett MR. Breaking the plaque: evidence for plaque rupture in animal models of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22** (5): 713-714.
- [3] Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis [J]. *Science* 1996; **272** (5262): 685-688.
- [4] Bumett MS, Gaydos CA, Madico GE, et al. Atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice infected with multiple pathogens [J]. *J Infect Dis* 2001; **183** (2): 226-231.
- [5] Calara F, Silvestre M, Casanada F, et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice [J]. *J Pathol* 2001; **195** (2): 257-263.
- [6] Campbell LA, Blessing E, Rosenfeld M, et al. Mouse models of C. pneumoniae infection and atherosclerosis [J]. *J Infect Dis* 2000; **181** (Suppl 3): S508-513.
- [7] Fan J, McCormick SPA, Krauss RM, et al. Overexpression of human apolipoprotein B-100 in transgenic rabbits results in increased levels of LDL and decreased levels of HDL [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15** (11): 1889-899.
- [8] Fan J, Shinoyama H, Sun H, et al. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21** (1): 88-94.
- [9] Fernandez MI, Vitek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation [J]. *Nutr Metab (Lond)* 2006; **3**: 17.
- [10] Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model [J]. *J Clin Invest* 2001; **107** (6): 675-683.
- [11] Jan H, der Thissen van Vlijen BJ, Hoeber RC, et al. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E^{-/-} mice after adenovirus-mediated transfer of p53 [J]. *Circulation* 2002; **105**: 2064-070.
- [12] McMahon AC, Kriharides L, Lowe HC, et al. Animal models of atherosclerosis: progression, current concepts [J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; **5** (6): 433-440.
- [13] Mezour H, Jones R, Dengremon C, et al. Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Biol Chem* 1997; **272** (21): 13570-575.
- [14] Mitchell C, Mignon A, Guidotti JE, et al. Therapeutic liver repopulation in a mouse model of hypercholesterolemia [J]. *Hum Mol Genet* 2000; **9** (11): 1597-602.
- [15] Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview [J]. *Life Sci* 2002; **70** (8): 855-865.
- [16] Pratic D, Tangirala RK, Herke S, et al. Circulating autoantibodies to oxidized cardiolipin correlate with isoprostane F(2 alpha)-V1 levels and the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice: modulation by vitamin E [J]. *Blood* 2001; **97** (2): 459-464.
- [17] Reikter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis [J]? *Cardiovasc Res* 2002; **54** (1): 36-41.
- [18] Rothstein NM, Quinn TC, Madico G, et al. Effects of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by chlamydia pneumoniae [J]. *J Infect Dis* 2001; **183** (2): 232-238.
- [19] Tsimikas S, Palinski W, Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21** (1): 95-100.
- [20] Williams H, Johnson JL, Carson KG, et al. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22** (5): 788-792.

(此文编辑 李小玲, 胡必利)