

三种剂量维生素 D₃ 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较

周红¹, 吴晓燕¹, 袁艺标¹, 戚晓红²

(南京医科大学 1. 基础医学实验教学中心; 2. 病理生理学系, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 动脉粥样硬化; 动物模型; 维生素 D₃

[摘要] **目的** 探讨维生素 D₃ 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的方法。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只随机平均分为四组: 对照组、模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组。对照组喂常规饲料, 模型组喂高脂饲料。模型 1 组在造模前腹腔注射维生素 D₃ 70 万 IU/kg, 分 4 次每隔两天注射; 模型 2 组在造模前注射 60 万 IU/kg, 造模后第 3、6、9 周分别注射 10 万 IU/kg; 模型 3 组在造模前和造模后第 3、6、9 周分别注射 60 万 IU/kg; 喂养 12 周后比较各组动物体重、血脂和主动脉病理变化。**结果** 12 周后, 模型组各组体重较对照组明显下降 ($P < 0.01$), 其中模型 3 组体重下降最显著且死亡率最高; 模型组各组的血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇与对照组比较均明显升高 ($P < 0.01$); 模型 1、2、3 组造模成功只数分别为 3 只、8 只和 5 只。**结论** 高脂饲料结合造模前腹腔注射维生素 D₃ 60 万 IU/kg, 造模后第 3、6、9 周各补充 10 万 IU/kg 是比较有效的制备动脉粥样硬化大鼠模型方法。

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

Comparison of Methods for Establishing A Rat Model of Atherosclerosis Using Three-doses of Vitamin D₃ and Atherogenic Diet

ZHOU Hong¹, WU Xiao-Yan¹, YUAN Yi-Biao¹, and QI Xiao-Hong²

(1. Laboratory Center for Basic Medical Sciences; 2. Department of Pathophysiology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Animal Model; Vitamin D₃

[ABSTRACT] **Aim** To explore an efficient method to establish a rat model of atherosclerosis using vitamin D₃ (VitD₃) and atherogenic diet. **Methods** Forty healthy Wistar rats were randomly divided into 4 groups, ie, a control group receiving standard diet, three model groups receiving atherogenic diet for 12 weeks. At the same time, model group 1 were injected VitD₃ 7.0×10^5 IU/kg every two days before feeding for four times; model group 2 were injected VitD₃ 6.0×10^5 IU/kg before feeding and 1.0×10^5 IU/kg in the third, sixth and ninth week respectively after feeding; model group 3 were injected VitD₃ 6.0×10^5 IU/kg before feeding and in the third, sixth and ninth week respectively after feeding. The body weights of all rats were recorded between 12 weeks. After 12 weeks, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), and triacylglycerol (TG) were measured. HE staining was used to verify the atherosclerotic lesion in aorta. **Results** Compared with the control group, the body weights of model groups were seriously decreased ($P < 0.01$), especially model group 3 and its high death rate. The serum levels of TC and LDL in model groups were obviously increased than the control group. The numbers in three model groups producing typical atherosclerotic lesion in aorta were 3, 8 and 5 respectively. **Conclusions** It was an effective method for establishing a rat model of atherosclerosis by feeding atherogenic diet and injecting VitD₃, and the suitable dose of VitD₃ was 6×10^5 IU/kg before feeding and 1.0×10^5 IU/kg in the third, sixth and ninth week respectively after feeding.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害 人类健康的常见病、多发病, 因此建立合适的 As 动

[收稿日期] 2011-12-21

[基金项目] 南京医科大学基础医学院优势学科科研创新配套经费 (JX10131801095)

[作者简介] 周红, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管及神经生理, E-mail 为 zhouhong2002@hotmail.com。通讯作者戚晓红, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 qxh@njmu.edu.cn。吴晓燕, 硕士, 实验师, 研究方向为心血管疾病的分子机制。

物模型对该病的研究具有重要意义。目前,研究者比较认同的建模方法是以大鼠为制备对象,喂以高脂饲料结合注射维生素 D₃ (VitD₃),此法操作简单,周期短^[1]。但我们查阅文献后发现,有关 VitD₃ 的给药剂量和给药时间各研究者不尽相同,缺乏统一认识。因此我们归纳了有关文献^[2-8],设计了三种 VitD₃ 的给药剂量和时间,探讨如何建立比较理想的 As 模型。

1 材料和方法

1.1 动物

健康雄性 Wistar 大鼠,40 只,体重 250 ± 15 g,购于江苏省实验动物中心。清洁级实验室饲养,12 h 明暗交替,每天上午 8:00 至 8:30 喂食,动物自由获食和饮水。

1.2 仪器、药品和试剂

Leica 石蜡切片机,日立 7600-020 全自动生化分析仪,Nikon 光学显微镜。VitD₃ 注射液(规格:1 mL: 7.5 mg,上海通用药业股份有限公司,批号:090903);胆固醇为分析纯,胆酸钠(国药集团化学试剂有限公司,生物级,批号:WSER20081014);丙基硫氧嘧啶(原料药,南通精华制药股份有限公司,批号:PTU9-091001)。

1.3 As 大鼠模型制备

将大鼠随机分为 4 组:对照组、模型 1 组、模型 2 组和模型 3 组,各 10 只。对照组喂以常规饲料,模型组各组均喂高脂饲料(配方^[9]:标准饲料中加入 3% 胆固醇、0.5% 胆酸、5% 猪油、5% 白糖、0.2% 丙基硫氧嘧啶),喂养 12 周。同时,模型组分别腹腔注射不同剂量的 VitD₃,具体为:模型 1 组在造模前注射 70 万 IU/kg(分 4 次,隔 2 天注射一次);模

型 2 组在造模前注射 60 万 IU/kg,造模后第 3、6、9 周分别注射 10 万 IU/kg;模型 3 组在造模前和造模后第 3、6、9 周分别注射 60 万 IU/kg。每天记录动物进食量及体重变化。

1.4 血脂检测

各组分别于实验开始时及 12 周末眼眶静脉采血,静置 4 h 后离心,3 000 r/min × 10 min,取上清。检测血总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDLC)。

1.5 组织学染色

动物取血后,自主动脉根部起切下 1 cm 长的血管,10% 中性甲醛固定,用作石蜡切片。石蜡切片 4 μm,脱蜡至水,常规 HE 染色,光学显微镜观察,评估主动脉病变情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、非配对 *t* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 一般状况

实验过程中共有 5 只大鼠死亡,其中模型 3 组 4 只,因腹泻、厌食、体重下降死亡;模型 2 组 1 只,因腹腔出血死亡。对照组大鼠的进食量较稳定,体重一直呈增长趋势。模型组各组造模前体重与对照组差异无显著性,但自第 3 周开始进食量有不同程度的下降,体重增长趋势缓慢,与对照组比较差异有显著性($P < 0.01$)。第 9 ~ 12 周,模型组各组体重均有下降,其中模型 3 组下降最明显,与其他组比较差异有显著性($P < 0.01$;表 1)。

表 1. 各组动物只数和体重

Table 1. The number and body weight of each group($\bar{x} \pm s$)

分 组	0 周		3 周		6 周		9 周		12 周	
	<i>n</i>	体重(g)	<i>n</i>	体重(g)	<i>n</i>	体重(g)	<i>n</i>	体重(g)	<i>n</i>	体重(kg)
对照组	10	224.00 ± 8.72	10	322.67 ± 11.67	10	421.67 ± 22.85	10	470.60 ± 26.84	10	517.67 ± 16.65
模型 1 组	10	230.83 ± 18.52	10	269.33 ± 24.16 ^a	10	300.75 ± 28.82 ^a	10	291.25 ± 27.72 ^{ab}	10	276.75 ± 27.72 ^a
模型 2 组	10	225.50 ± 8.41	10	272.83 ± 15.22 ^a	10	309.20 ± 22.57 ^a	9	288.00 ± 10.91 ^{ab}	9	252.60 ± 8.71 ^a
模型 3 组	10	236.00 ± 5.29	10	261.67 ± 9.29 ^a	9	280.00 ± 12.50 ^a	7	236.33 ± 9.29 ^a	6	191.33 ± 6.35 ^a

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型 3 组比较。

2.2 血脂检测

实验开始时,大鼠血清 TC、TG、HDLC 和 LDLC

水平各组之间差异无显著性($P > 0.05$)。喂养 12 周后,模型组各组的血清 TC 和 LDLC 与对照组比较

明显升高 ($P<0.01$);模型 2 组、3 组血清 TG 较对照组明显降低($P<0.01$),模型 1 组 TG 无变化;模型 1 组、2 组血清 HDLC 较对照组明显增高 ($P<0.01$),而模型 3 组无变化(表 2)。

表 2. 血清血脂变化 ($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

Table 2. The change of lipids in serum

血 脂	对照组		模型 1 组		模型 2 组		模型 3 组	
	0 周	12 周	0 周	12 周	0 周	12 周	0 周	12 周
TC	2.04 ± 0.06	2.14 ± 0.19	2.14 ± 0.14	10.40 ± 5.34 ^a	1.91 ± 0.1	8.23 ± 5.48 ^a	2.29 ± 0.28	6.07 ± 2.35 ^a
TG	0.95 ± 0.09	0.86 ± 0.17	0.68 ± 0.25	0.88 ± 0.36	0.84 ± 0.24	0.28 ± 0.15 ^a	0.77 ± 0.19	0.08 ± 0.04 ^a
HDLC	1.22 ± 0.03	1.29 ± 0.28	1.35 ± 0.05	2.62 ± 0.55 ^a	1.11 ± 0.17	2.04 ± 0.32 ^a	1.47 ± 0.16	1.58 ± 0.61
LDLC	0.53 ± 0.15	0.49 ± 0.12	0.71 ± 0.17	9.47 ± 3.35 ^a	0.51 ± 0.1	5.58 ± 4.12 ^a	0.68 ± 0.07	3.64 ± 1.74 ^a

a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

2.3 主动脉 HE 染色

光镜下观察主动脉,以产生 As 斑块作为造模成功标准,模型 1 组、2 组、3 组中造模成功的分别有 3 只、8 只和 5 只。HE 染色发现,对照组大鼠主动脉壁各层结构正常,内膜光滑,中膜弹力纤维正常。模型 1 组有 7 只出现内膜损伤,中膜平滑肌纤维排

列紊乱,略有增生,未见 As 斑块。模型 2 组多数动脉可见向腔内凸起的斑块,内膜增厚,内膜下平滑肌细胞增生,斑块内发生变性坏死,并有泡沫细胞积聚。模型 3 组超过半数动脉产生了 As 斑块,内膜断裂损伤,内膜下可见坏死及钙化、炎性细胞浸润,中膜内层出现断裂(图 1)。

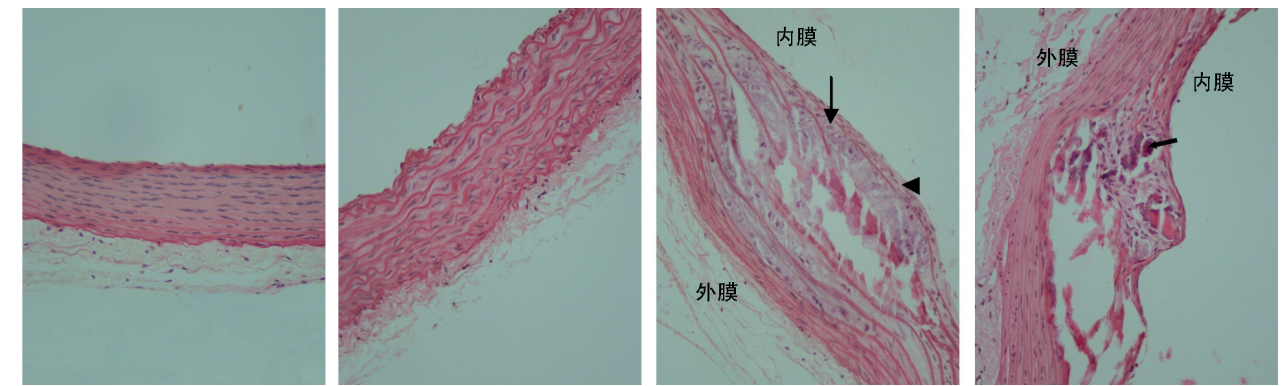


图 1. 各组主动脉病理改变 (HE × 200) 从左到右依次为对照组、模型 1 组、模型 2 组和模型 3 组。→:泡沫细胞;▲:平滑肌细胞;➡:钙化。

Figure 1. Pathological changes in aorta of each group(HE × 200)

3 讨论

制备 As 模型常用的实验动物为兔和大鼠。兔是草食动物,不易自发性产生 As,但对高脂饲料比较敏感。此外,兔与人类的胆固醇代谢不完全一致,病变部位与人类也不相同,主要区别为:①兔病变部位主要在胸主动脉弓部和心肌内冠状动脉,而人的病变部位主要在腹主动脉和心肌外冠状动脉;②兔不产生人体的并发症,形成的损伤不像人的 As。大鼠可通过减少肝脏合成胆固醇,增加胆汁酸生成而使血浆脂蛋白浓度保持相对稳定,因此大鼠具有抗 As 特性,但是用大鼠 As 模型比用高脂饲料诱发的家兔 As 模型更接近人类,且具有耗时短,简

便易行等优点,所以目前仍是研究 As 常用的动物。研究表明,人类动脉硬化的血管壁中含有大量的钙,其含量与冠心病的病变程度呈正相关^[10]。Fleckerrstein 等^[11]发现健康冠状动脉壁的钙含量处于较低的水平,脂质条纹钙含量增加 13 倍,纤维斑块钙含量上升至 24 倍,而到晚期的复合斑块钙含量可达到健康冠状动脉的 80 倍。提示血管的钙化参与 As 的产生和发展过程,故可通过钙超负荷的方法建立 As 模型。实验证明,VitD₃ 有利于损伤血管内皮细胞,促进血浆脂质及钙对血管壁的侵入和沉积,从而加速 As 形成^[12]。本实验遵循该致病机制的思路,选择大鼠为实验对象,喂以高脂饲料并设计了不同剂量 VitD₃ 作为诱导剂对大鼠进行诱导。

本实验发现,不同剂量的 VitD₃ 结合高脂饲料都能使动物血脂水平增高,但诱导产生的血管病变不尽相同。模型1 组给予 VitD₃ 70 万 IU/kg,模型复制成功率低,大部分动物的血管仅见内膜损伤和肌纤维紊乱,并没有产生 As 斑块;模型2 组先给予 VitD₃ 60 万 IU/kg,第3、6、9 周各补充 10 万 IU/kg,结果产生了典型 As 斑块,造模成功只数最多;模型3 组分4 次各给 60 万 IU/kg,也成功诱导出了 As 病变,且其钙化程度较模型2 组严重。这些结果提示,大剂量的 VitD₃ 更易诱导出 As 病变,例如模型2 组和模型3 组。

但同时值得引起注意的是,模型3 组较其他模型组具有更明显的体重下降和高达 40% 的死亡率。死亡中的大部分动物是由于厌食、体重下降而死亡。我们的实验结果显示,模型组各组动物喂以高脂饲料3 周后,进食量逐渐下降,体重增长速度减慢,到第9 周时体重开始下降,而模型3 组体重下降更严重。当动物体重下降明显时,我们适当予以补充糖盐水、鸡蛋、瓜子等以增强动物抵抗力,但模型3 组的动物还是发生了较高的死亡率,估计与模型3 组摄入过多的钙有关。实验记录显示,每次注射 VitD₃ 后动物的进食量就有所下降,体重也继而下降。我们推测,给动物注射大剂量 VitD₃ 后导致高钙血症,引起消化系统功能障碍,如食欲减退等,继而因体质下降死亡。另外我们在取样时也发现模型3 组动物的颈动脉及腹主动脉呈竹节样改变、肝和肾体积增大,且布满白色钙化点,这些都是由于摄入过多钙,在体内异位沉着导致的。这些现象显示,大剂量 VitD₃ 有助于形成 As 斑块,产生典型 As 血管病理改变,但是过多的 VitD₃ 会导致动物其他器官病变和多系统功能异常,死亡率增高,加大了 As 模型制备的难度。

综上,本实验结果提示,用高脂饲料结合 VitD₃ 建立 As 大鼠模型时,VitD₃ 剂量过小,不易形成典型 As 血管病变;而 VitD₃ 剂量过大,则会造成过高的死亡率。我们认为在造模前腹腔注射 60 万 IU/kg,造模后第3、6、9 周各补充 10 万 IU/kg 的 VitD₃ 是比较有效的制备 As 大鼠模型的方法,具有成功率高、死亡率低等优点。

[参考文献]

[1] 赵娟. 大鼠动脉粥样硬化模型的复制[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(23): 4 139-141.

[2] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 802-804.

[3] 章义利, 周秀云, 应斌宇, 等. 大鼠动脉粥样硬化模型的建立方法[J]. 温州医学院学报, 2007, 37(4): 331-333.

[4] 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.

[5] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化复制方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(5): 465-469.

[6] 陈世健, 严晓红, 祝晓莹, 等. 硫化氢抗动脉粥样硬化作用研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(1): 1-7.

[7] Fleckenstein-Grun G, Frey M, Luley C, et al. Differentiation calcium and cholesterol-dominated types of atherosclerosis lesion: antiarteriosclerotic aspects of calcium antagonist[J]. Cardiovas Pharmacol, 1991, 18(suppl 16): s1-s9.

[8] van Ditzhuijzen NS, van den Heuvel M, Sorop O, et al. Invasive coronary imaging in animal models of atherosclerosis[J]. Neth Heart, 2011, 19: 442-446.

[9] 周永刚, 蓝晓红, 李 祥, 等. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立与评价[J]. 解放军药学报, 2011, 27(5): 399-403.

[10] Lee WC, Chao WT, Yang VC. Effects of high-cholesterol diet on the interendothelial clefts and the associated junctional complexes in rat aorta[J]. Atherosclerosis, 2001, 155(2): 307-312.

[11] Fleckenstein KN, Kehel L, Bouayadi EF, et al. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D2 vitamin[J]. Atherosclerosis, 2000, 150: 55-61.

[12] 孙安阳, 俞 彰, 钟慈声, 等. 大鼠动脉钙超负荷模型的建立及确证[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(10): 769-772.

(此文编辑 许雪梅)