

动脉粥样硬化易损斑块动物模型的建立

李碧澄, 田芳, 田野

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 易损斑块; 斑块破裂; 动脉粥样硬化; 动物模型

[摘要] 动脉粥样硬化进展、易损斑块破裂导致主要不良心血管事件发生。易损斑块形成机制和干预措施的研究一直备受瞩目。建立与人体斑块相似的进展性斑块是对易损斑块进行研究的基础及热点。目前,研究者已在多种动物体内建立了多种易损斑块模型。本文对目前建立的易损斑块动物模型进行综述与评价,为完善易损斑块模型的建立提供新思路。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Establishment of Animal Model of Atherosclerotic Vulnerable Plaque

LI Bi-Cheng, TIAN Fang, and TIAN Ye

(Cardiovascular Institute, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Vulnerable Plaque; Plaque Rupture; Atherosclerosis; Animal Model

[ABSTRACT] The occurrence of major adverse cardiovascular events is the result of advanced atherosclerosis and plaque rupture. The research on the formation mechanism and treatment of vulnerable plaque has been on focus. The basic research and even the hot spot of studying vulnerable plaque is how to produce a progressive plaque like human beings'. At present, many different vulnerable plaque models have been produced in a variety of animals. In this review, the animal models of vulnerable plaque will be summarized and discussed. And this review may provide new ideas for the production of the vulnerable plaque model.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作为困扰人类千年的疾病^[1],目前随着人们生活水平的提高,发病率逐年增加,As 斑块一旦发生破裂,引起局部血栓形成,阻塞血管管腔,导致相应器官组织缺血表现及相关疾病的发生,如心肌梗死、脑梗死、下肢动脉闭塞症等,严重威胁着人类健康及生命。As 斑块破裂则通常被认为是具有破损及导致血栓形成倾向的“罪犯斑块”所致,这种斑块也被称为易损斑块(vulnerable plaque, VP)^[2]。人类易损斑块以具有薄纤维帽、斑块内炎症反应活跃及蛋白水解酶增加为特征^[3]。近些年,研究者们进行了多种易损斑块动物模型的探究。理想的易损斑块模型应当是构建与人体斑块相似的进展性斑块,并且可以最终在一定的时间内诱导斑块破裂及血栓形成。本文将对目前建立的易损斑块动物模型进行综述。

1 代谢异常作为易损斑块形成基础

在人类 As 的研究中,人们很早就意识到了高血脂、高血糖、高血压等所造成的代谢紊乱,是导致 As 发生的危险因素,而 As 是易损斑块形成的基础。所以,在建立易损斑块模型时,代谢异常因素也常常被考虑应用进来。首先是高脂血症,特别是高胆固醇血症,作为 As 的独立危险因素,对于 As 斑块会产生促成作用^[4]。所以,众多研究者也把给予动物高胆固醇及高脂肪饲料饲养作为建立易损斑块模型的基础。在 As 模型研究之初,人们就尝试给予动物含有高脂的饲料进行喂养,虽然成功建立了 As 模型,但同时也发现了一些问题,如 As 成模比率不高,脂肪更容易在肝脏内堆积,不确定性的胆结石形成

[收稿日期] 2015-10-12

[修回日期] 2015-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81371709)

[作者简介] 李碧澄,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化斑块易损性,E-mail 为 platy8917@126.com。田芳,博士研究生,研究方向为动脉粥样硬化斑块易损性,E-mail 为 maomi8092@163.com。通讯作者田野,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床,E-mail 为 yetian@ems.hrbmu.edu.cn。

等,这些都限制了 As 模型的建立,更限制了进一步建立易损斑块模型。为了避免这些情况,人们对高脂饲料进行改进,如广泛应用的 Paigen 饮食^[5-6]可明显增加 As 成模比率,而在高脂饮食中加入氧化甾醇^[7]可加速易损斑块的形成。此外,糖尿病对于动脉的影响已被证明^[8],高血糖水平可以促进 As 的发生。研究者通过给予实验动物高糖饮食或者应用胰岛 β 细胞毒性制剂(如链脲霉素等)造成胰岛 β 细胞破坏,增加血糖水平,加快 As 进展,并以此作为易损斑块建模的基础^[9]。另外,高血压亦可以促进 As 模型建立,早在 2004 年 Mazzolai 等^[10]证实,高血压可以促进载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-})鼠 As 模型建立,且血清血管紧张素 II 浓度高者的斑块易损性较低者增加,这种现象的产生可能与促炎的 Th1 细胞活化相关。

值得注意的是,临床上因易损斑块而导致血管事件的患者,其发生 As 的危险因素往往不是独立存在,所以在未来对于易损斑块模型的研究中,对于高血脂、高血糖或高血压的相互作用研究及利用还值得进一步探讨。

2 药物应用促进易损斑块形成及破裂

早在 1961 年,Constantinides 等^[11]通过给予新西兰大白兔注射组胺及蝥蛇毒的方式成功诱导兔动脉内发生易损斑块破裂。主要机制是组胺具有缩血管的作用,可以在升高血压的同时增加斑块所受压力,而蝥蛇毒作为一种促凝剂,其可以活化凝血因子 V 和 X,并可直接损伤内皮,导致血栓事件的发生^[12]。随后,研究者们在此基础上进行改良,除应用蝥蛇毒外,联合应用球囊拉伤、硅胶管套扎等方法,建立了更为稳定、斑块破裂率更高的易损斑块模型^[13-14]。亦有研究者应用异种蛋白诱导斑块炎症反应及氧化应激反应^[15]或应用维生素 K 拮抗剂促进动脉中层钙化等方式促进易损斑块形成^[16]。

但是这些通过外源性给药的方式所诱导的易损斑块形成及破裂并不是正常的病理生理过程,与人类血管内的自发性易损斑块破裂存在差距。

3 物理方式建立易损斑块模型

利用物理方式建立易损斑块模型主要是通过影响血管内皮结构或功能达到的,主要有两种:直

接损伤血管内皮和改变血管壁所受血流剪切力。损伤血管内皮可以通过多种方式完成,如应用单极微型电凝器^[17]、寒冷刺激^[18]、放射性元素辐射^[19]、球囊拉伤^[14]等方式。这些方式通过破坏斑块表面内皮的连续性,导致斑块表面裂隙或斑块溃疡,使斑块内组织因子等促血栓形成因子释放,进一步激活血小板及凝血因子,启动凝血级联反应,导致局部血栓形成^[20]。而改变血流对血管壁所产生的剪切力会导致血管内皮功能障碍从而促进 As 进展,大量研究证实 As 斑块更容易发生在动脉弯曲处及分叉处^[21]。且已有研究显示在血流对血管壁产生低剪切力及局部血流发生震荡时,局部管壁均可发生 As,而剪切力较大时反而阻止了血管 As 的发生,且受到低剪切力影响的血管管壁斑块易损性增加^[12]。目前主要是通过缩窄血管达到改变血流剪切力的目的,其干预方式主要有两种:一种是结扎血管,如结扎迷你猪的颈动脉可以建立易损斑块模型,通过 MRI 检测其具备人易损斑块的多数特征^[22]。而联合结扎 ApoE^{-/-}鼠的颈动脉和肾动脉可以造成颈动脉易损斑块形成,并产生自发性斑块破裂^[23]。而第二种方式,则是在血管外套扎硅胶管等辅助装置来造成不完全闭塞的管腔狭窄^[24],亦可形成具有破裂倾向的易损斑块。

4 基因技术促进易损斑块发生

由于遗传基因的不同,小鼠、兔等动物很难自发性形成 As,更加不易产生易损斑块,而基因敲除技术的出现为研究者提供了新的手段。其中,较经典的是 ApoE^{-/-}鼠,这种鼠极易形成与人类相似的 As^[25],并易产生易损斑块,尤其是在头臂干血管内^[26],而给予高脂饮食喂养,可以加速易损斑块病变的发生。ApoE^{-/-}鼠发生 As 的机制,被认为是由于 ApoE^{-/-}鼠体内缺乏载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE),导致低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)代谢障碍,使血浆胆固醇浓度明显增加至 400 mg/dL,高于非基因敲除鼠 8 倍(非基因敲除鼠血浆胆固醇一般小于 80 mg/dL)^[25]。同时,另一种基因敲除鼠——LDL 受体基因敲除(LDL receptor gene knockout, LDLR^{-/-})鼠也由于存在 LDL 代谢障碍,在高脂饮食喂养下,同样可以产生具有典型特征的易损斑块病变而被广泛应用^[27]。由于上述基因敲除鼠具备易发 As 的特点,所以常常被选择用于建立易损斑块模型。

除应用基因敲除技术外,局部基因转染技术也

被应用于易损斑块建立的研究中,如给予动物转染基质金属蛋白酶 9^[28]和系统转染白细胞介素 18^[29]、P53 基因^[30]及 Fas ligand 基因^[31]等,并使目的基因过表达,均可增加斑块易损性。亦有研究者通过对小鼠进行骨髓移植的方式使其体内尿激酶纤溶酶原激活物过表达,进一步促进斑块不稳定及发生破裂^[32]。同时,2015 年 Ozawa 等^[33]成功应用体细胞核移植技术制备转基因迷你猪,并使其体内高表达载脂蛋白(a)而易产生进展性 As 斑块病变。

5 不同种类动物建立易损斑块模型的利弊及选择

在易损斑块动物模型的选择上,研究者们有多种尝试,如猪、狗、兔、鼠类、猴等,其中最广泛被研究和应用的是兔、小鼠及猪的模型。

在兔种属中,新西兰大白兔被最多应用于医学相关实验的动物模型建立中。与人类相似的是在兔的体内,载脂蛋白 A II 的表达量较少,且其肝脂肪酶活性相对较低,而载脂蛋白 B 及胆固醇脂转移蛋白的水平与人类相近^[34]。所以,在正常饮食下兔很少发生自发性 As 病变,必须辅助以高脂肪高胆固醇饮食,才可诱导 As 病变的发生。同时值得注意的是,由单基因隐性突变而来的遗传性高血脂家兔,由于其存在自发性高胆固醇血症的特点^[35],亦可被应用于易损斑块模型的建立。而兔本身身体积较小,易于喂养,以及其血液及组织样本的获得相对容易,都使其成为模型动物的不错选择。

小鼠一直被人们广泛应用于对疾病的发生发展及治疗的研究中。由于小鼠很难自发性形成 As,一度被认为不适合应用于易损斑块模型的建立。直到 ApoE^{-/-}鼠的出现,才彻底改变了人们的一贯认识。小鼠也具备体积小,易于喂养的优势,且对于干预性药物试验来讲,其药品需要量小,节约药品成本。但小鼠由于身体积较小,手术操作、血液及组织标本的取得相对难度较大。

猪的基因序列和染色体构成与人有高度的同源性,其生理学特征、器官组织发育及疾病的发生发展也都与人类相似,且猪的脂蛋白代谢与人类相近^[34],可以自发产生 As,故猪也被认为是建立易损斑块模型的理想选择。但值得注意的是应用猪做为动物模型,由于其体型较大,喂养时间长,干预过程操作难度大,花费高及相关干预药品消耗大也是需要面对的问题。

6 现有易损斑块动物模型的限制及展望

医学研究中建立动物模型的目的是为了进一步了解人类疾病发生发展过程、研究治疗疾病的药物及方法。所以,对于易损斑块动物模型的评价要着眼于其是否能够模仿人易损斑块的特征。而目前的易损斑块动物模型往往是使动物体内短时间达到一个内分泌及代谢紊乱的状态,并常常造成血管内皮人为损伤,这与人体内漫长的 As 过程不符,且与人体内自发性斑块破裂的病理生理过程存在差异。本质上动物基因与人类存在的差异,也局限着动物模型研究的进展。所以,在未来对于动物易损斑块模型的研究中,应用基因技术使动物体内致 As 相关基因的表达与人类相近,并联合应用多种外源性干预方式使其模仿人体内易损斑块进展的复杂过程,或许将成为完善易损斑块模型建立的新手段。

【参考文献】

- [1] Thompson RC, Allam AH, Lombardi GP, et al. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations[J]. *Lancet*, 2013, 381 (9873): 1 211-222.
- [2] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I[J]. *Circulation*, 2003, 108 (14): 1 664-672.
- [3] Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability[J]. *J Intern Med*, 2015, 278 (5): 483-493.
- [4] Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (21): 2 004-013.
- [5] Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse[J]. *J Lipid Res*, 1990, 31 (5): 859-869.
- [6] Su H, Gorodny N, Gomez LF, et al. Atherosclerotic plaque uptake of a novel integrin tracer ¹⁸F-Flotegatide in a mouse model of atherosclerosis[J]. *J Nucl Cardiol*, 2014, 21 (3): 553-562.
- [7] Sato K, Nakano K, Katsuki S, et al. Dietary cholesterol oxidation products accelerate plaque destabilization and rupture associated with monocyte infiltration/activation via the MCP-1-CCR2 pathway in mouse brachiocephalic arteries: therapeutic effects of ezetimibe[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19 (11): 986-998.
- [8] Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (9): 883-884.
- [9] Jiang L, Tu Y, Kimura RH, et al. ⁶⁴Cu-labeled divalent cystine knot peptide for imaging carotid atherosclerotic plaques[J]. *J Nucl Med*, 2015, 56 (6): 939-944.
- [10] Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, et al. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice [J]. *Hypertension*, 2004, 44 (3): 277-282.
- [11] Constantinides P, Charkracarti RN. Rabbit arterial thrombosis pro-

- duction by systemic procedures [J]. Arch Pathol, 1961, 72: 197-208.
- [12] Olivon VC, Fraga-Silva RA, Segers D, et al. Arginase inhibition prevents the low shear stress-induced development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice [J]. Atherosclerosis, 2013, 227 (2): 236-243.
- [13] Phinikaridou A, Andia ME, Indermuehle A, et al. Vascular remodeling and plaque vulnerability in a rabbit model of atherosclerosis: comparison of delayed-enhancement MR imaging with an elastin-specific contrast agent and unenhanced black-blood MR imaging [J]. Radiology, 2014, 271 (2): 390-399.
- [14] Sun X, Cao W, Cui JJ, et al. An animal model of atherosclerotic plaque disruption and thrombosis in rabbit using pharmacological triggering to plaques induced by perivascular collar placement[J]. Cardiovasc Pathol, 2013, 22 (4): 264-269.
- [15] Zhang G, Li M, Li L, et al. The immunologic injury composite with balloon injury leads to dyslipidemia: A robust rabbit model of human atherosclerosis and vulnerable plaque[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 249129.
- [16] Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, et al. Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype[J]. PLoS One, 2012, 7 (8): e43229.
- [17] Chiesa G, Di Mario C, Colombo N, et al. Development of a lipid-rich, soft plaque in rabbits, monitored by histology and intravascular ultrasound [J]. Atherosclerosis, 2001, 156 (2): 277-287.
- [18] 路怀志, 杜大勇, 柳杨, 等. 温控气体损伤建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (2): 132-136.
- [19] Pakala R, Leborgne L, Cheneau E, et al. Radiation-induced atherosclerotic plaque progression in a hypercholesterolemic rabbit: a prospective vulnerable plaque model[J]. Cardiovasc Radiat Med, 2003, 4 (3): 146-151.
- [20] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011, 473 (7347): 317-325.
- [21] Winkel LC, Hoogendoorn A, Xing R, et al. Animal models of surgically manipulated flow velocities to study shear stress-induced atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2015, 241 (1): 100-110.
- [22] Jiang XB, Yuan WS, Wang JS, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in carotid atherosclerotic plaque and contrast-enhanced MRI in a swine model[J]. J Neurointerv Surg, 2014, 6 (1): 24-28.
- [23] Jin SX, Shen LH, Nie P, et al. Endogenous renovascular hypertension combined with low shear stress induces plaque rupture in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32 (10): 2372-379.
- [24] Fraga-Silva RA, Montecucco F, Costa-Fraga FP, et al. Diminazene enhances stability of atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice [J]. Vascul Pharmacol, 2015, 74: 103-113.
- [25] Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, et al. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond[J]. J Lipid Res, 2009, 50: 178-182.
- [26] Matoba T, Sato K, Egashira K. Mouse models of plaque rupture [J]. Curr Opin Lipidol, 2013, 24 (5): 419-425.
- [27] 张臣, 张兆琪. 动脉粥样硬化斑块的磁共振成像进展 (一)——动物模型建立[J]. 心肺血管病杂志, 2011, 30 (5): 436-438.
- [28] de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thülen JH, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 (2): 340-346.
- [29] de Nooijer R, von der Thülen JH, Verkleij CJ, et al. Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (12): 2313-319.
- [30] Chen WQ, Zhang L, Liu YF, et al. Prediction of atherosclerotic plaque ruptures with high-frequency ultrasound imaging and serum inflammatory markers[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293 (5): H2836-844.
- [31] Zadelaar AS, von der Thülen JH, Boesten LS, et al. Increased vulnerability of pre-existing atherosclerosis in ApoE-deficient mice following adenovirus-mediated Fas ligand gene transfer[J]. Atherosclerosis, 2005, 183 (2): 244-250.
- [32] Hu JH, Du L, Chu T, et al. Overexpression of urokinase by plaque macrophages causes histological features of plaque rupture and increases vascular matrix metalloproteinase activity in aged Apolipoprotein E-null mice [J]. Circulation, 2010, 121 (14): 1637-644.
- [33] Ozawa M, Himaki T, Ookutsu S, et al. Production of cloned miniature pigs expressing high levels of human apolipoprotein (a) in plasma[J]. PLoS One, 2015, 10 (7): e0132155.
- [34] Millon A, Canet-Soulas E, Boussel L, et al. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression[J]. Vascular, 2014, 22 (3): 221-237.
- [35] 何津春, 刘维娟, 刘宇琴, 等. WHHL 家兔在心血管疾病研究的应用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35: 4063-065.

(此文编辑 文玉珊)