

ApoE 缺陷大鼠动脉粥样硬化模型的构建

徐敏^{1,2}, 韦舒杰², 张彦², 严鹏², 苏立男², 李莹², 马双陶², 李德², 杨永健^{1,2}

(1.西南医科大学,四川省泸州市 646000;2.成都军区总医院心内科,四川省成都市 610000)

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管紧张素Ⅱ; ApoE^{-/-}大鼠; 基因敲除; 高血脂; 内皮损伤

[摘要] 目的 构建大鼠的动脉粥样硬化模型。方法 将载脂蛋白 E(ApoE)缺陷(ApoE^{-/-})大鼠共 16 只,均分为两组作为实验组和对照组,均予高脂饲料喂养 12 周。实验组在前 4 周予 Alzet 渗透泵植入大鼠皮下,内部填充血管紧张素Ⅱ(AngⅡ),以 1 μg/(kg·min)的速率匀速释放。对照组仅予等量生理盐水处理。第 12 周麻醉后测体重、取血并处死,检测炎症因子及血脂,取心脏及主动脉组织,切片作 HE、油红 O、Masson 染色。结果 实验组大鼠出现动脉粥样硬化斑块,对照组无类似表现,两组之间在其他方面无统计学差异。结论 ApoE^{-/-}大鼠予高脂饮食饲养并予 AngⅡ刺激,可成功造成大鼠动脉粥样硬化模型。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The establishment of atherosclerosis model in apolipoprotein E-deficient rats

XU Min^{1,2}, WEI Shu-Jie², ZHANG Yan², YAN Peng², SU Li-Nan², LI Ying², MA Shuang-Tao², LI De², YANG Yong-Jian^{1,2}

(1. Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000; 2. Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; AngiotensinⅡ; ApoE^{-/-} rats; Knockout; High lipid; Endothelium injure

[ABSTRACT] **Aim** To establish a novel rat model of atherosclerosis. **Methods** 16 ApoE deficient rats (ApoE^{-/-} Rats) were divided into experimental group and control group on the average, and fed with high fat diet for 12 weeks. The experimental group received Alzet osmotic pump implanted subcutaneously in the first 4 weeks, filled with angiotensinⅡ(AngⅡ), at a rate of 1 μg/(kg·min) uniform release, while the control group was only treated with equivalent saline. At the end of the twelfth week, the experimental animals were tested for body weight and blood collected. The inflammatory factors (interleukin-1β(IL-1β), tumor necrosis factor alpha(TNF-α)) and blood lipids (total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high density lipoprotein cholesterol(HDLC), low density lipoprotein cholesterol(LDLC)) were detected. Sacrificed after anesthesia, the heart and aortic full length were harvested for HE, oil-red-O and Masson staining. **Results** The atherosclerotic plaque was found in the experimental group, while the control group had no similar performance. There was no statistical difference between the two groups in other aspects. **Conclusion** ApoE deficient rats could be induced atherosclerosis plaque successfully, when were treated with high fat diet and AngⅡ.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)疾病的动物实验研究始于上个世纪初, Ignatowski 等^[1]使用含胆固醇的高脂饲料喂养家兔并发现 As 斑块,首次成功建立了食饵性 As 动物模型,开创了 As 动物实验的先河。20 世纪 60 年代, Wissler 等研究者使用 C57BL/6J 小鼠喂养高脂、高胆固醇饲料后,在实验动物主动脉内膜发现少量脂纹,从而第一次建立了

小鼠的 As 模型。其后, Plump 等研究者于 1992 年又成功构建了 ApoE 缺陷(ApoE^{-/-})小鼠,为 As 的研究再提供了一种较好的动物模型。但长期以来一直没有成熟的大鼠 As 动物模型^[2-4]。大鼠因其生理指标及生活习性与人类更接近,更适合用于心血管研究,如自发性高血压大鼠已成为高血压研究的重要模型。我们在前期研究中,使用 SD 大鼠采用

[收稿日期] 2016-05-09

[修回日期] 2016-07-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470589)

[作者简介] 徐敏, 硕士, 主治医师, 研究方向为心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 286412861@qq.com。通讯作者杨永健, 博士后, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 yangyongjian38@yahoo.com。

转录激活子样效应因子核酸酶技术(transcription activator-like effectors nucleases,TALEN)构建了 ApoE^{-/-}大鼠模型^[5],采用 Sanger 法测序确定 ApoE 基因成功敲除,经高脂饮食喂养 3 个月后未见粥样斑块形成,推测其原因可能是大鼠内皮细胞对高脂饮食抵抗。本实验仍沿用 ApoE^{-/-}大鼠作为实验动物,采用血管紧张素 II(angiotensin II,Ang II)诱导血管内皮损伤和后续的血管壁慢性炎症,旨在构建大鼠 As 模型,为 As 的研究提供新的工具。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康且体重约 200 g 的雄性 ApoE^{-/-}大鼠 16 只系沿用本实验室前期方法^[5]构建。

1.2 动物分组与喂养

将实验大鼠均分为实验组和对照组,各组 8 只,均以高脂饲料喂养 12 周。饲料配方:2%胆固醇,10%猪油,0.5%胆酸钠,10%蛋黄粉,0.1%丙基硫氧嘧啶,5%白糖,72.4%基础饲料。

1.3 渗透泵皮下植入术

实验开始第 1 周,两组实验动物均予 4%水合氯醛,按每 100 g 体重 1 mL 的剂量腹腔麻醉,并予碘伏消毒,背部肩胛骨下 0.5 cm 处,横行剪开皮肤 1.5 cm,皮下植入 2004 型 Alzet 渗透泵 1 枚。该型渗透泵容量 200 μ L,可以 0.25 μ L/h 的速率稳定释放填充液体达 28 天。实验组渗透泵填充 Ang II 200 μ L(2.5 mg),对照组填充生理盐水 200 μ L。在渗透泵植入第 2 周初首次监测鼠尾动脉血压,以后分别于第 4 周、第 8 周及第 12 周末复查血压。

1.4 血液采集和检测

实验第 12 周末,各组动物禁食过夜,水合氯醛麻醉,用浸泡于 1000 kU/L 的肝素钠溶液中的医用玻璃毛细管,作双侧内眦静脉采血 3~5 mL,并予 3000 r/min 离心 15 min。按照操作手册,取适量血清使用 ELISA 试剂盒分别检测标本炎症因子白细胞介素 1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)及血脂总胆固醇(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)和空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)。

1.5 标本的制备和病理学观察

取直至髂总动脉分叉处,立即用 4%多聚甲醛

固定,作主动脉全段油红 O 染色,检查 As 斑块染色情况。取心脏作冰冻切片,层厚 5 μ m,分别作 HE、油红 O 及 Masson 染色,使用 Leica DM3000 正置光学显微镜系统拍照,作光镜下形态学检查。

1.6 统计学方法

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,利用 SPSS 17.0 统计软件作方差分析, $P<0.05$ 认为具有统计学差异, $P<0.01$ 为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 体重及生化指标

实验组大鼠收缩压(systolic blood pressure,SBP)为 142 \pm 5 mmHg,对照组大鼠收缩压为 110 \pm 3 mmHg,两组之间有统计学差异($P<0.05$)。而两组体重、空腹血糖、血清炎症因子及血脂指标,均未发现统计学差异($P>0.05$;表 1 和表 2)。

表 1. 两组大鼠体重比较($\bar{x}\pm s$,g)

Table 1. Comparison of body weight in rats of two groups($\bar{x}\pm s$,g)

时间	对照组(n=8)	实验组(n=8)
1 周	198.5 \pm 50.3	200.2 \pm 43.7
4 周	255.3 \pm 36.2	237.8 \pm 55.6
8 周	300.5 \pm 50.2	297.5 \pm 44.2
12 周	329.7 \pm 54.6	338.4 \pm 54.9

表 2. 两组大鼠生化指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2. Comparison of blood lipids, FBG and inflammatory parameters in rats of two groups($\bar{x}\pm s$)

生化指标	对照组(n=8)	实验组(n=8)
TG(mmol/L)	2.15 \pm 0.28	2.37 \pm 0.26
TC(mmol/L)	2.65 \pm 0.23	2.89 \pm 0.36
LDLC(mmol/L)	3.69 \pm 0.37	4.03 \pm 0.39
HDLC(mmol/L)	18.43 \pm 1.43	18.48 \pm 1.71
FBG(mmol/L)	8.5 \pm 1.7	7.4 \pm 1.5
IL-1 β (ng/L)	6.4 \pm 0.6	6.4 \pm 0.6
TNF- α (ng/L)	61.2 \pm 1.30	61.2 \pm 1.30

2.2 病理改变

实验组大鼠主动脉窦部可见少量动脉粥样斑块形成,经油红 O 染色,呈鲜艳的红色斑块(图 1)。这些 As 斑块,多形成于易出现湍流的部位,特别是主动脉壁与瓣膜交界处。斑块内有少量纤维组织,

可经 Masson 染色染为蓝色。斑块内可见细胞成分,在 HE 染色下易见,细胞形态不均一。相对而言,对照组大鼠未发现任何类似表现,提示对照组大鼠主

动脉窦部无 As 改变。

但主动脉大体油红 O 染色,实验组和对照组均未发现明显的 As 斑块(图 2)。

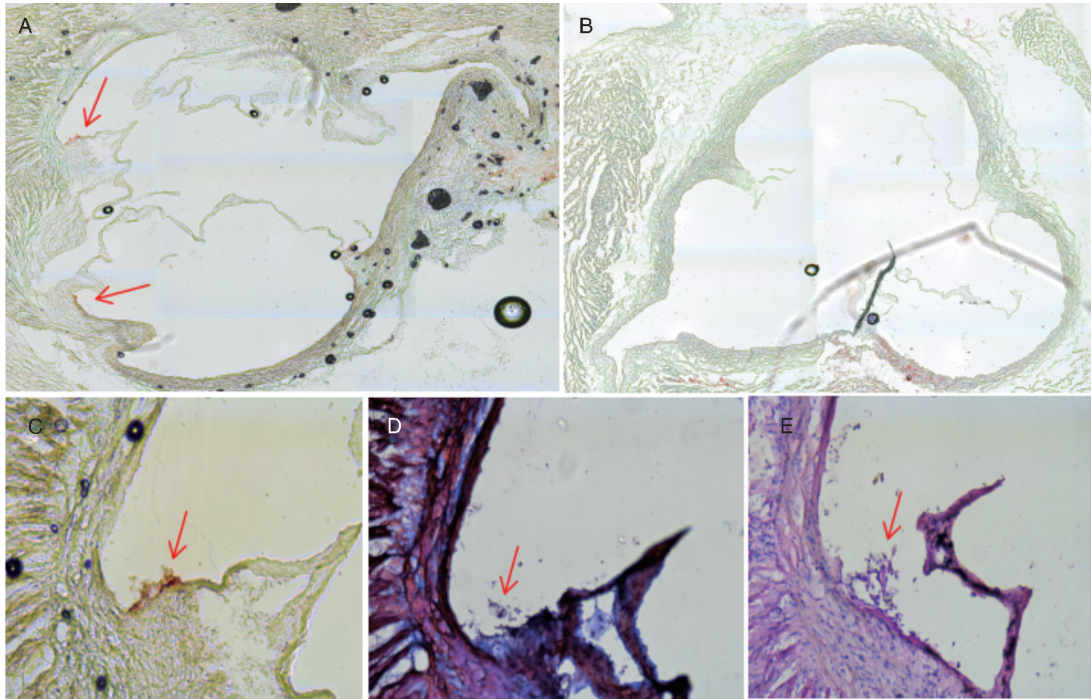


图 1. 大鼠主动脉窦部组织病理改变 A 为实验组油红 O 染色(40×),可见三个主动脉瓣,箭头所指处可见动脉粥样硬化斑块形成;B 为对照组油红 O 染色(40×),未见斑块。C、D、E 均为 A 图上方箭头所指病变处放大图示(200×),可见 As 斑块被油红 O 染为红色(C),被 Masson 染料染为蓝色(D),HE 染色可见其中细胞成分(E)。

Figure 1. Atherosclerosis plaques in aortic sinus of ApoE^{-/-} Rats



图 2. 大鼠主动脉大体油红 O 染色 A 为实验组, B 为对照组。

Figure 2. Enface oil red O staining of whole aortas of rats

3 讨论

动脉粥样硬化性心血管疾病(As cardio-vascular

disease, ASCVD) 已成为工业化国家的首位死因。这使得 As 疾病的研究,成了当今公共卫生的一个重要课题。在 As 的基础研究中,动物模型必不可少。其中, ApoE^{-/-}小鼠,是美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗莱那大学病理遗传实验室,应用胚胎干细胞基因敲除技术,于 1992 年成功培育出的新型 As 动物模型。该小鼠在饲喂含胆固醇的高脂饮食后,可出现显著的自发性 As 斑块,成了一种新型的、成熟的 As 疾病研究的实验动物模型。但以该小鼠构建 As 动物模型仍有诸多缺陷。其体型太小而不易进行血管腔内手术操作,难以出现易损斑块,As 斑块在主动脉树的分布以及斑块的组分与人的 As 斑块存在较大差异等问题^[6-7],限制了它的使用,这使得 ApoE^{-/-}小鼠不能完全满足 As 基础研究的需要。而大鼠体型较大,特别是颈总动脉等血管较粗,能满足血管腔内球囊损伤及血管支架植入等手术操作要求,这使得构建 As 大鼠模型的需求持续存在。

动物种属与其抗 As 的能力相关。研究证

实^[8],动物抗 As 能力呈以下趋势:大鼠>豚鼠>狗>兔>猪。鼠类缺乏胆固醇酯转运蛋白(CETP),因而其血脂主要成份为对血管具有保护作用的 HDL,而不易形成 As 病变,使得大鼠 As 模型难以建立。因此,改造大鼠脂质调控的相关基因表达,从而改变其脂代谢基础,将有利于大鼠 As 疾病模型的建立。

ApoE 是 1973 年 Shore 等^[9],在正常人的 VLDL 中首次发现的,其基因定位于第 19 对染色体长臂上,可翻译为 299 个氨基酸的成熟蛋白。目前认为 ApoE 具有抗 As 的作用^[10]。故而通过技术手段敲除 ApoE 基因可成功引起实验动物血脂升高^[11],使实验大鼠在高脂饮食的诱导之下出现显著的高脂血症^[5]。本研究基于以上观点,采用 TALEN 技术构建 ApoE^{-/-}大鼠。TALEN 技术是近几年的新型基因敲除方法,它采用 TALE 蛋白核酸结合域的特异性氨基酸序列,与其靶位点核酸序列之间存在对应关系,组装出能特异性结合任意 DNA 序列的模块化蛋白。其操作方便,理论上可以修饰任意内源性基因序列^[12-13]。

在 As 的形成过程中,脂代谢紊乱和内皮损伤是目前公认的主要始动因素^[14-16]。早在 1863 年,Virchow 即提出 As 的发生与血浆脂质水平升高相关。过多的血浆脂质可进入并沉积于动脉管壁(主要是胆固醇),同时伴随着巨噬细胞、淋巴细胞以及中膜的平滑肌细胞等的参与。炎症细胞通过吞噬作用清除脂质成分,同时逐渐泡沫化,形成泡沫细胞(包括巨噬细胞源性泡沫细胞和平滑肌细胞源性泡沫细胞),并由此形成脂质核心,引起动脉粥样斑块的形成。同时还可刺激动脉管壁的细胞外基质成分增生,引起动脉内膜增厚,血管硬化。其斑块内纤维帽的变薄,大的脂质核心以及炎细胞浸润增加等因素,均是促使斑块破裂并形成局部血栓的重要因素^[17]。血脂水平与 As 发病率呈正相关。所以通过升高血脂将有望成功造成 As 动物疾病模型。本实验使用 ApoE^{-/-}大鼠目的是为了通过脂质代谢紊乱增加脂质沉积,进而引起 As 发生。在既往国内外相关研究中,尚缺乏成熟的大鼠 As 模型。目前国内外学者多采用添加丙基硫氧嘧啶的高脂饲料造模,但未取得令人信服和满意的效果^[7]。该实验添加丙基硫氧嘧啶的目的是为确保和进一步升高血脂,在此基础上 As 斑块的出现,证明 As 的发生与丙基硫氧嘧啶本身无明显关联,而与脂代谢紊乱相关性大。

另外,内皮损伤在 As 动物模型的建立过程中同样起着十分重要的作用。机械、免疫等多种因素可以引起内皮损伤,并引起其功能的紊乱甚至剥落,

进而引起内膜的完整性与通透性障碍。在此基础上,血浆中的脂质成分将更容易在内膜损伤处得以富集,进而被单核巨噬细胞等炎症细胞吞噬并形成泡沫细胞,并使 As 斑块得以形成并进展^[18-19]。利用该机制造模较为成功的方式有,使用机械损伤^[20]、免疫损伤^[21-22]、VD3 注射^[23-24]、卡介苗注射^[25]等方式。但因损伤大,实验动物种属和遗传特性等方面问题,造模成功率较低,实验动物死亡率较高。

血管紧张素 II 在 As 发病机制中的作用早有研究^[26-27],其参与 As 发生发展的作用是值得肯定的。目前认为,Ang II 可通过诱导内皮细胞氧化应激反应^[28],降低内皮细胞的抗纤溶功能并使其纤溶/抗纤溶系统失衡^[29],以及激活内皮 NF- κ B 而促发内皮炎症反应等机制^[30],诱导 As 形成,故本实验采用 Ang II 协同诱导 As 斑块构建大鼠 As 模型的实验设计是可行的。

本建模方式可使既往难以形成 As 斑块的大鼠出现 As 表现,操作简单,实验大鼠均可出现不同程度 As 斑块表现,不会因为以上实验操作出现动物死亡。两组大鼠体重增加情况无统计学差别,提示 Ang II 对大鼠的生长发育无明显不良影响。As 的发生涉及到细胞炎症等因素的参与^[31]。但本实验中,在整体水平上,未发现实验组和对照组间有统计学差异。考虑在 As 发生及发展过程中,其炎症表现在整体水平上并不显著,仅仅在动脉管壁等局部可能有表现,若取主动脉组织作 q-PCR 检测其炎症因子表达则有望出现阳性结果。在本实验中出现的 As 斑块均较小,考虑其原因主要与建模周期短有关,如延长血管紧张素 II 的使用时间和高脂饲料喂养时间,则有望增加 As 斑块的大小,形成更有利于实验研究的 As 斑块。对于 ApoE^{-/-}小鼠而言,一般高脂饮食饲养 3 个月可出现显著的 As 斑块^[11]。对于大鼠而言,其本身具有抗 As 能力,且动物体型越大,As 模型建立起来需要的时间也会越长。如本实验建模时间延长到 4 至 6 个月,则 As 斑块有望更加明显。另外,在本研究中两组实验动物 HDLC 水平均远高于 TC 和 LDLC 水平,不排除其高水平的 HDLC 对该种实验动物抗 As 起了重要作用,这可能是大鼠 As 斑块难以形成的原因之一。

本实验结果表明:ApoE^{-/-}大鼠,在含胆固醇高脂饲料饲养以及 Ang II 的双重作用下,可出现典型的 As 斑块。与 ApoE^{-/-}小鼠相比,ApoE^{-/-}大鼠体积较大,满足血管腔内手术等操作的需要,与兔及猪等实验动物相比,其价格便宜,繁殖快速,取材方

便,可为国内外 As 的研究提供一个新型的动物模型以供参考。

[参考文献]

- [1] Ignatowski A. Über die Wirkung des tierischen Eiweißes auf die Aorta und die parenchymatösen Organe der Kaninchen[J]. Virchows Arch Path Anat, 1909, 198(2): 248-270.
- [2] Bragdon J H, Mickelsen O. Experimental atherosclerosis in the rat [J]. Am J Pathol, 1955, 31: 965-973.
- [3] Pang J, Xu Q, Xu X, et al. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitaminD3-induced atherosclerosis in the rat [J]. Peptides, 2010, 31: 630-638.
- [4] Ekuni D, Yoneda T, Endo Y, et al. Occlusal disharmony accelerates the initiation of atherosclerosis in apoE knockout rats [J]. Lipids Health Dis, 2014, 13: 144.
- [5] Wei S, Yang Y, Ma S, et al. Apolipoprotein E-deficient rats develop atherosclerotic plaques in partially ligated carotid arteries [J]. Atherosclerosis, 2015, 243(2): 589-592.
- [6] Getz G S, Reardon C A. Animal models of atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(5): 1 104-115.
- [7] Santos-Gallego C G, Badimon J J, Ibanez B. Experimental models of atherosclerosis [J]. Rev Esp Cardiol, 2013, 13: 9.
- [8] Groener JE, Bax W, Stuani C, et al. Difference in substrate specificity between human and mouse lysosomal acid lipase: low affinity for cholesteryl ester in mouse lysosomal acid lipase [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1487(2-3): 1 552-562.
- [9] Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins separation of species differing in protein components [J]. Biochemistry, 1973, 12(3): 502-507.
- [10] Stannard AK, Riddell DR, Sacre SM, et al. Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(49): 46 011-016.
- [11] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.
- [12] 应春妹, 陈艺升, 郑冰. TALENs 技术在基因功能研究中的应用[J]. 检验医学, 2014, 29(5): 464-463.
- [13] Sung Y H, Baek I J, Kim D H, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 23-24.
- [14] 杨永宗, 阮长耿, 唐朝枢, 等. 动脉粥样硬化性心血管病—基础与临床 2 版[M]. 北京: 科学出版社, 2009; 53-102.
- [15] Tomczyk M, Nowak W, Jazwa A. Endothelium in physiology and pathogenesis of diseases [J]. Postepy Biochem, 2013, 59(4): 357-364.
- [16] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al. Pravastatin has cholesterol lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 31(3): 684-691.
- [17] 王浩然, 于春江. 动脉粥样硬化发生机制及治疗药物的研究进展[J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(6): 828-833.
- [18] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [19] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32: 2 045-051.
- [20] Sheu JR, Wu CH, Chen YC, et al. Mechanisms in the inhibition of neointimal hyperplasia with triflavin in a rat model of balloon angioplasty [J]. J Lab Clin Med, 2001, 137(4): 270-278.
- [21] Castellanos E, Sueishi K, Tanaka K, et al. Ultrastructural studies of rat arteriosclerosis induced by stimulation of the immune system with ovalbumin [J]. Acta Pathol, 1991, 41: 113-121.
- [22] Blessing E, Lin TM, Campbell LA, et al. Chlamydia pneumoniae induces inflammatory changes in the heart and aorta of normocholesteremic C57BL /6J Mice [J]. Infect Immun, 2000, 684 765-768.
- [23] 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实验方法[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21(1): 50-52.
- [24] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(5): 465-469.
- [25] Dichtelmüller H, Rudnick D, Kloft M. Inactivation of lipid enveloped viruses by octanoic acid treatment of immunoglobulin solution [J]. Biologicals, 2002, 30(2): 135-142.
- [26] Miyazaki M, Takai S. Involvement of angiotensin II in development of atherosclerosis [J]. Nihon Rinsho, 2002, 60(10): 1 904-910.
- [27] 何继强, 王绿娅, 刘晓惠. 血管紧张素 II 与动脉粥样硬化形成的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 360-362.
- [28] Zalba G, San José G, Moreno MU, et al. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADP(H) oxidase [J]. Hypertension, 2001, 38: 1 395-399.
- [29] Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis [J]. J Clin Invest, 1995, 95(3): 995-1 001.
- [30] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez, et al. Role of renin-angiotensin system in vascular disease [J]. Hypertension, 2001, 38: 1 382-387.
- [31] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1 685-695.

(此文编辑 许雪梅)