

本文引用: 王丽, 高金宁, 陈湘云, 等. STZ 诱导联合高脂喂养 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠糖尿病动脉粥样硬化模型的构建及评价[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(11): 985-993. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.11.009.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-11-0985-09

· 方法学研究 ·

## STZ 诱导联合高脂喂养 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠糖尿病动脉粥样硬化模型的构建及评价

王丽<sup>1</sup>, 高金宁<sup>2</sup>, 陈湘云<sup>1</sup>, 姜沛青<sup>1</sup>, 李梅<sup>1</sup>, 步芳芳<sup>1</sup>, 张梅<sup>3</sup>, 姚桂华<sup>1</sup>, 孙慧<sup>1</sup>

1. 山东大学齐鲁医院(青岛)心内科, 山东省青岛市 266053; 2. 青岛大学教务处, 山东省青岛市 266000;  
3. 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012

**[摘要]** [目的] 构建糖尿病动脉粥样硬化小鼠模型, 并研究该小鼠模型中糖尿病促动脉粥样硬化的病理特点。[方法] 8 周龄雄性 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠 50 只, 普脂饮食适应性喂养 2 周后改为高脂饮食, 并随机分为两组, 糖尿病动脉粥样硬化组采用小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射 5 天造模, 动脉粥样硬化组同时给予柠檬酸盐缓冲液注射。多次检测两组小鼠体重、血糖、血脂, 于 23 周龄糖耐量检测后安乐处死, 采用 HE 染色和油红 O 染色检测小鼠全长主动脉和主动脉根部动脉粥样硬化, 免疫组织化学染色检测斑块内 CD4、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、巨噬细胞含 EGF 样模块黏蛋白激素受体 1(EMR1)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、组织金属蛋白酶抑制物 1(TIMP-1), Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、CD4、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、NLRP3、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、I 型和 III 型胶原。[结果] 与动脉粥样硬化组相比, 糖尿病动脉粥样硬化组小鼠体重降低, 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)水平升高, 高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)水平降低, 糖耐量降低( $P < 0.05$ )。与动脉粥样硬化组相比, 糖尿病动脉粥样硬化组动脉粥样硬化斑块分布弥漫且面积增加, 其中脂质、T 细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、I 型和 III 型胶原含量增加( $P < 0.05$ ); 血管组织中 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MMP-2、NLRP3、ICAM-1、VCAM-1 蛋白含量增加, 而 TIMP-1 蛋白含量降低, MMP2/TIMP-1 比值升高( $P < 0.05$ )。[结论] 通过 STZ 诱导联合高脂饮食, 可将 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠成功构建糖尿病动脉粥样硬化模型, 并能体现糖尿病促动脉粥样硬化的斑块组成及炎症特点, 可作为一种相对理想的研究糖尿病大血管病变的病理模型。

**[关键词]** 链脲佐菌素; 高脂饮食; 糖尿病; 动脉粥样硬化; LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

### Construction and evaluation of diabetic atherosclerosis model in LDLR<sup>-/-</sup> mice induced by STZ and fed with high-fat diet

WANG Li<sup>1</sup>, GAO Jinning<sup>2</sup>, CHEN Xiangyun<sup>1</sup>, JIANG Peiqing<sup>1</sup>, LI Mei<sup>1</sup>, BU Fangfang<sup>1</sup>, ZHANG Mei<sup>3</sup>, YAO Guihua<sup>1</sup>, SUN Hui<sup>1</sup>

1. Department of Cardiology, Qilu Hospital (Qingdao), Shandong University, Qingdao, Shandong 266053, China; 2. Academic Affairs Office of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China; 3. Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To construct a diabetic atherosclerosis mouse model and study the pathological characteristics of diabetic atherosclerosis. **Methods** Fifty 8-week-old male LDLR<sup>-/-</sup> mice were fed with standard diet for 2 weeks and then changed to high-fat diet, they were randomly divided into two groups. The diabetic atherosclerosis group was given intraperitoneal injection of low dose streptozotocin (STZ) for 5 days continuously to establish the model, and the atherosclerosis group was given citrate buffer injection at the same time. The body mass, blood glucose and blood lipids of the mice in the two groups were detected for many times. At the age of 23 weeks, the mice were euthanized after glucose tolerance

[收稿日期] 2024-06-04

[修回日期] 2024-07-23

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81970282); 青岛市临床重点专科建设项目(QDZDZK-2022008)

[作者简介] 王丽, 硕士研究生, 医师, 主要从事高血压与心脏重构机制、动脉粥样硬化发生发展机制及防控研究, E-mail: wanglisdu@163.com。通信作者孙慧, 博士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化相关机制研究, E-mail: sunhuiql@163.com。

test. HE staining and oil red O staining were used to detect the gross and aortic root atherosclerosis, immunohistochemical staining was used to detect CD4,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (EMR1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), Western blot was used to detect  $\alpha$ -SMA, CD4, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), NLRP3, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and type I and III collagen.

**Results** Compared with the atherosclerosis group, the body mass decreased, the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) increased, and the levels of high density lipoprotein cholesterol (HDL) decreased ( $P < 0.05$ ) in the diabetic atherosclerosis group. Compared with the atherosclerosis group, the distribution of atherosclerotic plaques was diffuse and the area was increased in the diabetic atherosclerosis group, and the contents of lipids, T cells, macrophages, smooth muscle cells, type I and III collagen were increased ( $P < 0.05$ ); the protein levels of TNF- $\alpha$ , MCP-1, MMP-2, NLRP3, ICAM-1 and VCAM-1 in vascular tissues were increased, while the content of TIMP-1 were decreased and MMP2/TIMP-1 were increased ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** LDLR<sup>-/-</sup> mouse model of diabetic atherosclerosis can be successfully established by STZ induction combined with high-fat diet, which can reflect the plaque composition and inflammatory characteristics of diabetes promoting atherosclerosis. It can be used as a relatively ideal pathological model for the study of diabetic macroangiopathy.

[**KEY WORDS**] streptozotocin; high-fat diet; diabetes; atherosclerosis; LDLR<sup>-/-</sup> mice

随着人口老龄化、饮食高脂化以及遗传基因易感性等因素的影响,全球糖尿病患者以惊人速度增长。由于糖尿病起病隐匿,尤其是2型糖尿病早期症状不明显,大多数患者出现并发症才就诊。糖尿病是动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)的重要危险因素,ASCVD也成为糖尿病患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。为寻找更新、更有效的方法预防或延缓糖尿病并发症的发生发展,糖尿病诱发ASCVD的发病机制成为近几十年的研究热点,高血糖、胰岛素抵抗、炎症、氧化应激、内皮功能障碍等在其发病机制中扮演了重要的作用,并成为临床可干预的潜在治疗靶点<sup>[2]</sup>。但其中仍有诸多问题悬而未决,缺乏理想的动物模型便是首先需要解决的问题。目前在糖尿病动脉粥样硬化(diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis, DMAs)模型动物选择、糖尿病构建方法等方面存在诸多争议。由于啮齿类动物天然存在抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性,单纯的糖尿病小鼠模型难以出现显著的血管As改变。本课题组前期研究发现小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导普通饮食ApoE<sup>-/-</sup>小鼠可以作为DMAs模型<sup>[3]</sup>,但该模型饮食方式、血脂谱特点不能较好地模拟临床情况,不能全面地体现糖尿病大血管及微血管并发症。LDLR<sup>-/-</sup>小鼠也是常用的As小鼠模型,因其有类似人类的血脂谱、不干扰炎症反应等优势,越来越受到研究者的青睐。目前LDLR<sup>-/-</sup>小鼠作为DMAs模型的研究较少,且研究发现STZ诱导的LDLR<sup>-/-</sup>小鼠较单纯的LDLR<sup>-/-</sup>小鼠产生了显著的高血糖表现,却并未针对As程度及炎症、胶原等有

深入具体的研究<sup>[4]</sup>。LDLR<sup>-/-</sup>小鼠能否诱导构建糖尿病,并体现糖尿病促As改变仍需进一步验证。因此,本研究拟采用STZ诱导的LDLR<sup>-/-</sup>小鼠联合高脂饮食构建DMAs模型,并探寻该模型中糖尿病促As的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选用50只8周龄雄性LDLR<sup>-/-</sup>小鼠,购自北京大学医学部动物实验中心,行SPF级饲养管理,并采用PCR鉴定其基因型。饲养条件:恒温24℃,恒湿50%,保持光照12h、黑暗12h,自由饮水,定期更换垫料。先采用普脂饮食(含5%脂肪)喂养,第10周龄开始高脂饮食(含60%脂肪),23周龄给予安乐处死。

### 1.2 主要药品与试剂

STZ购自德国Boehringer公司;兔抗小鼠 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、兔抗小鼠CD4抗原、鼠抗小鼠基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)抗体、兔抗小鼠血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)抗体、兔抗小鼠/人NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)抗体、鼠抗小鼠/人细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)抗体、兔抗小鼠/人肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )抗体购自abcam公司;鼠抗小鼠组织金属蛋白酶抑制物1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)抗体、兔抗小鼠含EGF样

模块黏蛋白样激素受体 1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, EMR1) 抗体购自 ThermoFisher Scientific 公司; 兔抗小鼠单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic factor-1, MCP-1) 抗体购自 Elabscience 公司; I 型和 III 胶原购自 Affbiotech 公司; HRP 标记的二抗、DAB 试剂盒购自北京中杉有限公司; 明胶酶谱法电泳分析试剂盒购自 Genmed Scientifics INC USA。

### 1.3 DMAs 动物模型的建立

8 周龄 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠购入后给予普脂饮食适应性喂养 2 周, 后改为高脂饮食, 并随机均分为两组, 每组 25 只。DMAs 组小鼠连续 5 天每天腹腔注射 45 mg/(kg·d) STZ 溶液 (将 STZ 溶于柠檬酸盐缓冲液配成 1%、pH4.5 的溶液, 避光保存, 30 min 内使用), As 组小鼠同时腹腔注射柠檬酸盐缓冲液。随后 4 周, 每周取 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠尾静脉血测量血糖水平, 血糖持续高于 15 mmol/L 认为糖尿病造模成功<sup>[5]</sup>, 最终 DMAs 组 22 只小鼠造模成功, As 组 25 只小鼠全部存活。

### 1.4 血清学指标的检测

分别在第 11、12、15、17、19、23 周龄经小鼠尾静脉取血测量血糖。分别在第 11、23 周龄采用内眦静脉或心尖取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 使用全自动生化分析仪检测血清总胆固醇 (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 葡萄糖耐量试验

安乐处死前 3 天, 每组随机选取 5 只 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠进行葡萄糖耐量试验。空腹 6 h 后, 腹腔注射 20% 葡萄糖, 注射剂量为 2 g/kg, 分别在注射 0、10、30、60、90 和 120 min 后经尾静脉取血测量血糖, 计算注射不同时间点血糖与基础血糖差值, 基线差值为 0, 将后续差值绘制血糖变化曲线, 采用梯形规则线性方法计算曲线下面积。

### 1.6 实验动物标本取材及常规染色

0.5% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射安乐处死小鼠, 打开胸腔暴露心脏, 用含肝素 (7 kU/L) 的 PBS 缓冲液由小鼠心尖部进行压力灌注 2 min, 后以 4% 多聚甲醛压力灌注 5 min, 迅速剥离整个主动脉及心脏, 部分小鼠组织予 4% 多聚甲醛固定 6 h, 部分小鼠组织置于液氮中保存。沿左心耳将心脏分成两部分, 分别用石蜡或 OCT 包裹脱水的心底组

织, 连续石蜡或冰冻切片, 切至带瓣叶的主动脉血管时采集组织, 每隔 8 μm 连续切片, 直至主动脉瓣消失在左心室流出道。每张切片贴 2 个组织面, 分别行 HE 染色。HE 染色图片采用 IX81 倒置显微镜采集图像, 使用 Image-Pro Plus 6.0 形态学图像分析系统计算每组切片阳性染色面积均值。大体镜下分离全长主动脉, 去除周围组织及小血管分支后, 进一步行大体油红 O 染色, 采用相机拍照, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。其他组织于 -80 °C 冷冻, 用于分子生物学指标检测。

### 1.7 主动脉根部免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色检测主动脉根部 CD4、α-SMA、MMP-2、TIMP-1、MCP-1、NLRP-3、VCAM-1 的表达, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对这些指标的表达进行定量, 斑块内阳性染色面积与动脉斑块面积的比率表示其相对含量, 并计算斑块内 MMP-2 阳性面积与 TIMP-1 阳性面积比值。

### 1.8 Western blot 检测

使用含有磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液裂解组织, 以提取蛋白; 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 确保样品的质量和浓度; 制备分离胶和浓缩胶, 确保电泳的分离效果; 将样品与上样缓冲液混合后, 煮沸 5 min 变性处理, 以确保蛋白的充分变性; 将 100 μg 蛋白样品进行电泳, 并在 200 mA 恒流、4 °C 环境下进行湿转, 确保蛋白的转移效果; 将转移后的蛋白固定在 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭处理, 以减少非特异性结合; 加入一抗 (α-SMA、EMR1、CD4、I 型胶原、III 型胶原、TNF-α、ICAM-1、NLRP3), 于 4 °C 下孵育过夜, 以增强抗体的结合效果; 使用 TBST 洗膜, 去除未结合的抗体; 加入二抗, 并在室温下轻摇 50 min, 以确保二抗与一抗的有效结合; 最后使用 ECL 化学发光液显影, 观察并记录结果。使用 β-actin 或 GAPDH 作为内参, 以校正实验中的误差, 并获得准确可靠的实验结果。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对所有数据进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验、配对样本 *t* 检验和单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠体质量、血糖和血脂水平比较

DMAs 组和 As 组基线小鼠体质量、血糖、血脂水平均无统计学差异 (P > 0.05)。DMAs 组小鼠于

15 周龄后出现体质量下降,而 As 组小鼠体质量持续升高,两组小鼠在 17、19 和 23 周龄的体质量均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。DMAs 组小鼠血糖水平在注射 STZ 后即开始持续升高,第 11 周龄后血糖均  $> 15 \text{ mmol/L}$ ,认为糖尿病造模成功。As 组小鼠血糖均  $< 15 \text{ mmol/L}$ ,确定该组小鼠无糖尿病。第 23 周龄,DMAs 组 TG、TC、LDLC 均显著高于 As 组,HDLC 显著低于 As 组 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

### 2.2 两组小鼠糖耐量比较

注射葡萄糖溶液后,两组小鼠血糖水平都有上

升,As 组小鼠第 10 min 血糖开始下降,在 60 min 之内达到基础血糖值;而 DMAs 组小鼠血糖下降缓慢,第 30 min 开始下降,120 min 尚未回到基础血糖值。两者之间曲线下面积存在显著性差异,DMAs 组较 As 组增加 54.5% ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

### 2.3 主动脉斑块面积比较

大体油红 O 染色结果显示,DMAs 组主动脉全长的总斑块面积较 As 组增加 67.0% ( $P < 0.05$ );HE 染色结果显示,DMAs 组主动脉根部斑块面积较 As 组增加 59.5% ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

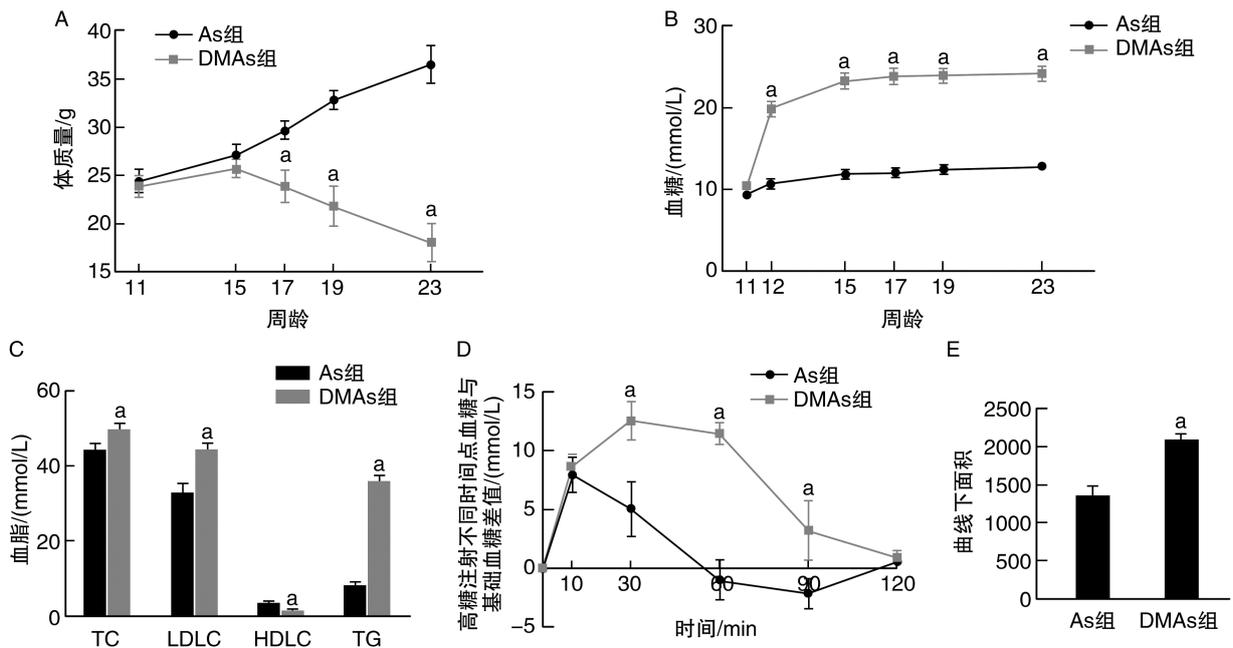


图 1. 小鼠体质量、血糖和血脂水平及糖耐量比较 ( $n = 5$ )

A 为体质量变化, B 为血糖水平变化, C 为第 23 周龄血脂水平, D 为第 23 周龄糖耐量曲线, E 为糖耐量曲线下面积。  
a 为  $P < 0.05$ , 与 As 组比较。

Figure 1. Comparison of body mass, blood glucose and lipid levels, and glucose tolerance in mice ( $n = 5$ )

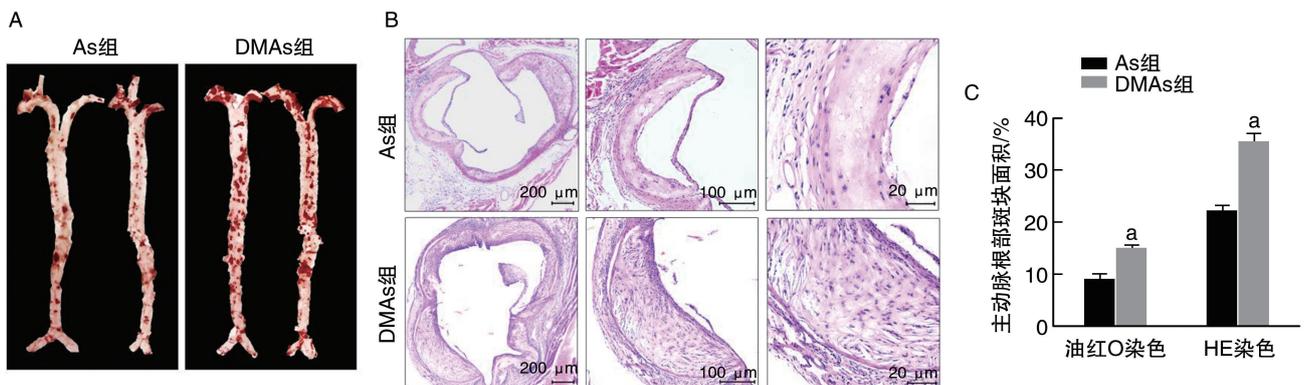


图 2. 小鼠动脉粥样硬化斑块病理染色 ( $n = 9$ )

A 为主动脉大体油红染色, B 为主动脉根部横截面 HE 染色, C 为主动脉根部斑块面积。a 为  $P < 0.05$ , 与 As 组比较。

Figure 2. Pathological staining of atherosclerotic plaques in mice ( $n = 9$ )

## 2.4 As 斑块组成比较

免疫组织化学染色结果显示,DMA<sub>s</sub>组  $\alpha$ -SMA 较 As 组增加 131.0% ( $P<0.05$ ),CD4 较 As 组增加

518.0% ( $P<0.05$ )。Western blot 检测结果显示,DMA<sub>s</sub>组  $\alpha$ -SMA、EMR1、CD4 的表达较 As 组显著增加,分别增加 152.6%、119.5%、69.6% ( $P<0.05$ ;图 3)。

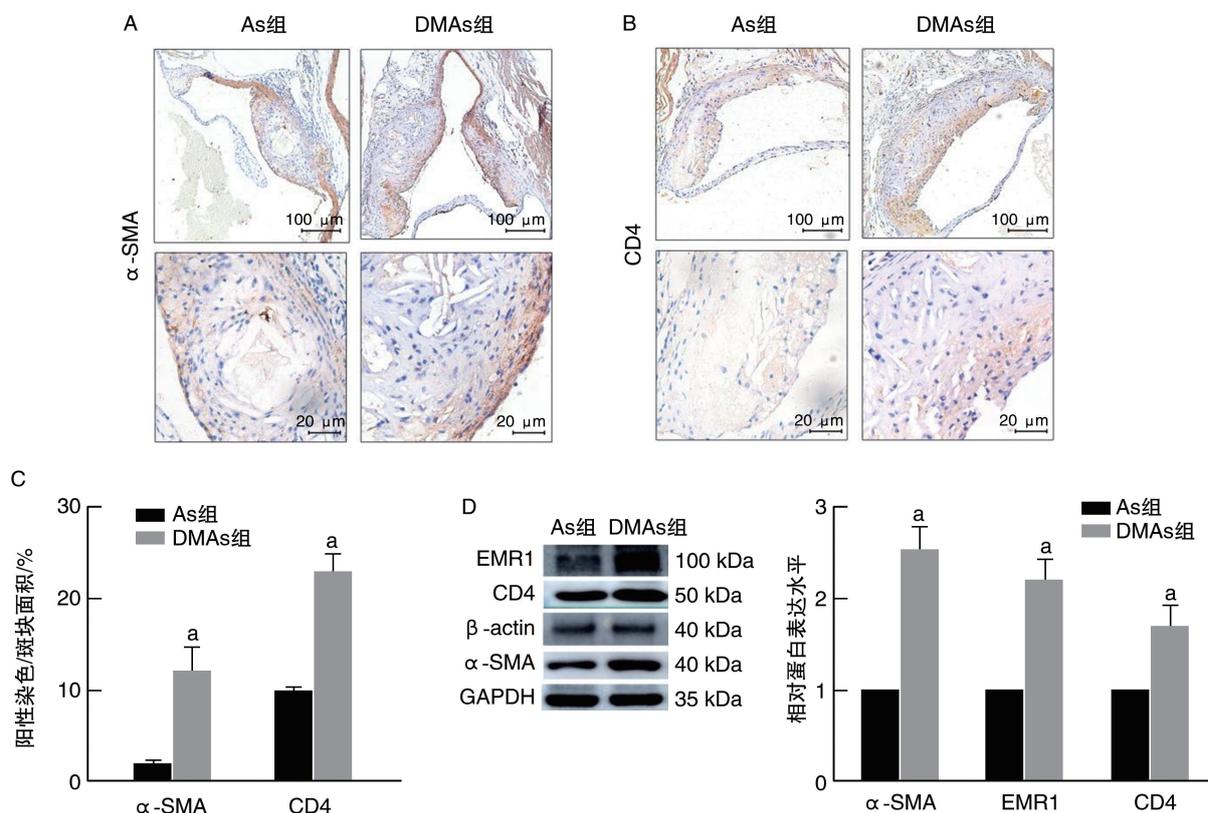


图 3. 动脉粥样硬化病变和斑块稳定性比较( $n=8$ )

A 为主动脉根部  $\alpha$ -SMA 免疫组织化学染色,B 为主动脉根部 T 细胞 CD4 免疫组织化学染色,C 为  $\alpha$ -SMA 和 CD4 的免疫组织化学染色定量分析,D 为 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、EMR1 和 CD4 的蛋白表达。a 为  $P<0.05$ ,与 As 组比较。

Figure 3. Comparison of atherosclerotic lesions and plaque stability ( $n=8$ )

## 2.5 炎症因子含量比较

免疫组织化学染色结果显示,DMA<sub>s</sub>组 MCP-1、NLRP3、VCAM-1 较 As 组显著增加,分别增加 101.8%、113.6%、428.0% ( $P<0.05$ );Western blot 检测结果显示,DMA<sub>s</sub>组 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、NLRP3 的表达较 As 组显著增加,分别增加 150.7%、106.2%、122.6% ( $P<0.05$ ;图 4)。

## 2.6 胶原代谢相关因子含量比较

免疫组织化学染色结果显示,DMA<sub>s</sub>组 MMP-2 较 As 组增加 253.4%,TIMP-1 较 As 组减少 82.7%,MMP-2/TIMP-1 比值较 As 组升高 2008.1% (均  $P<0.05$ ;图 5);Western blot 检测结果显示,DMA<sub>s</sub>组 I 型、III 型胶原含量较 As 组显著增加,分别增加为 22.0%、90.9% ( $P<0.05$ ;图 5)。

## 3 讨论

糖尿病大血管病变是糖尿病主要慢性并发症之一,一般发生在管腔直径  $>500 \mu\text{m}$  的大血管,以 As 病变为主,常常累及冠状动脉、脑血管及周围血管等,是糖尿病患者致死、致残的主要原因。2 型糖尿病是糖尿病的主要类型,其有两个重要特征:胰岛素抵抗引起的高血糖和高胰岛素血症。血脂代谢障碍是胰岛素抵抗的临床表现之一,主要特征为极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、TG 升高, HDLC 降低,出现小的、富含 TG 的 LDLC<sup>[6]</sup>。DMA<sub>s</sub> 发病机制复杂,参与的细胞、分子众多,且受各种危险因素交互影响,目前确切的致病机制仍未彻底阐明。因此,建立理想的 DMA<sub>s</sub> 动物模型对研究糖尿病大血管病变发病机制、降低糖尿病大血管并发症发病率具有深远的意义。

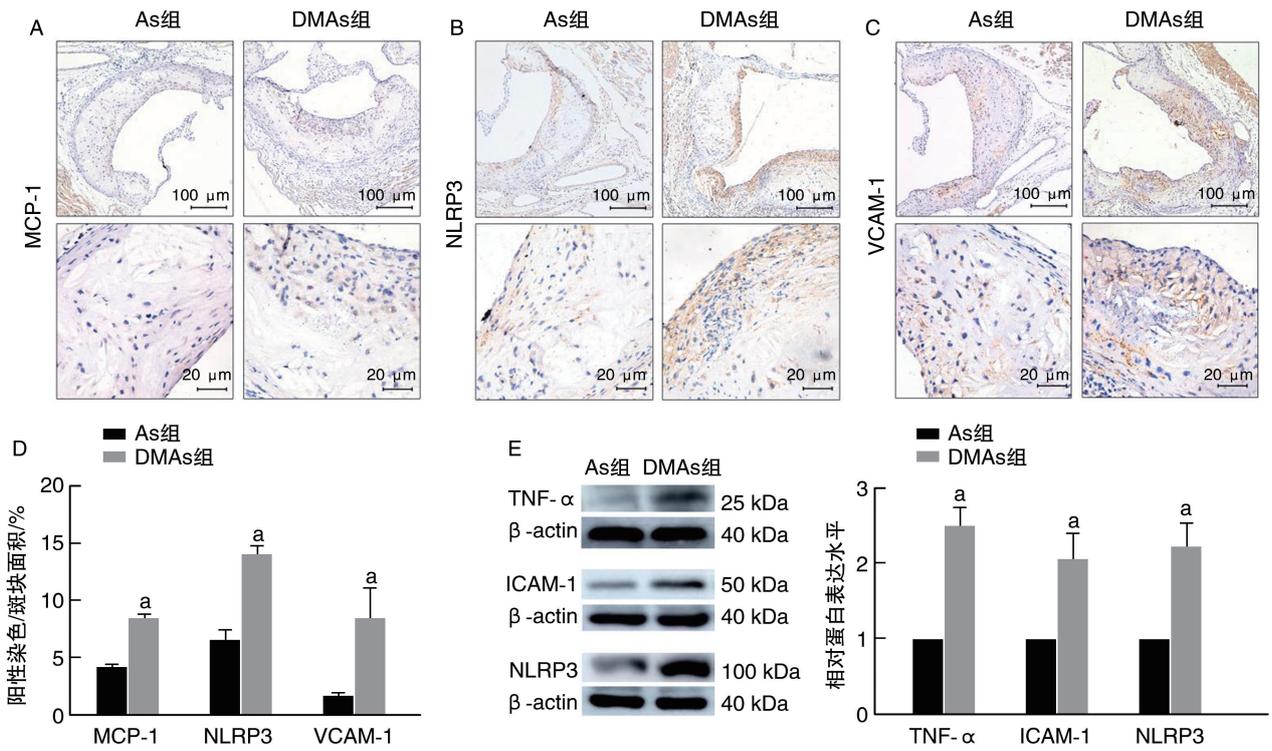


图 4. 炎症因子含量比较 (n=8)

A 为 MCP-1 免疫组织化学染色, B 为 NLRP3 免疫组织化学染色, C 为 VCAM-1 免疫组织化学染色, D 为 MCP-1、NLRP3、VCAM-1 免疫组织化学染色定量分析, E 为 Western blot 检测 TNF-α、ICAM-1 和 NLRP3 的蛋白表达。a 为 P<0.05, 与 As 组比较。

Figure 4. Comparison of inflammatory factor content (n=8)

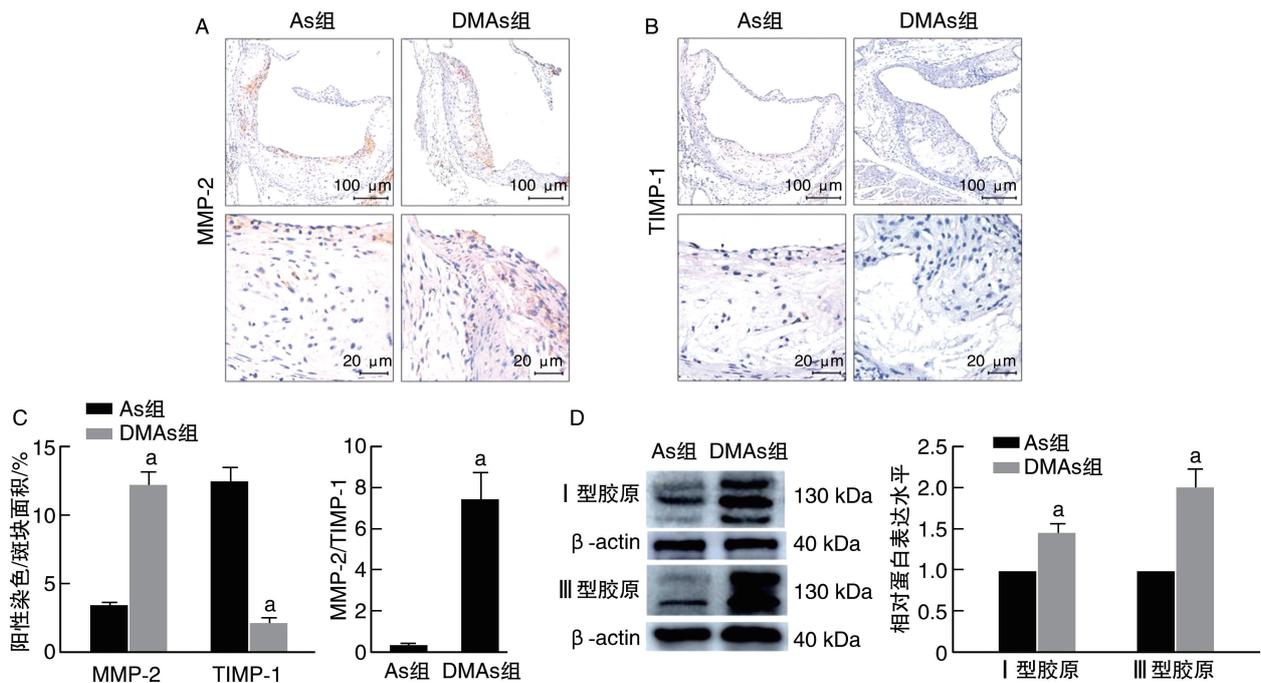


图 5. 胶原代谢相关因子含量比较 (n=6)

A 为 MMP-2 免疫组织化学染色, B 为 TIMP-1 免疫组织化学染色, C 为 MMP-2、TIMP-1 含量及其比值比较, D 为 Western blot 检测 I 型、III 型胶原表达。a 为 P<0.05, 与 As 组比较。

Figure 5. Comparison of collagen metabolism factor content (n=6)

糖尿病动物模型目前研究较为成熟,其中啮齿类动物模型文献描述较多。啮齿类动物糖尿病模型可大致分为 3 类:遗传自发性糖尿病模型、实验诱发性糖尿病模型和基因工程糖尿病动物模型<sup>[7]</sup>。遗传自发性糖尿病模型常用的 2 型糖尿病模型有 GK 大鼠、ob/ob 小鼠、db/db 小鼠;实验诱发性糖尿病模型有手术法、饮食法、化学法、饮食联合化学诱发法;基因工程糖尿病动物模型是指借助基因工程技术控制特殊相关基因表达,技术复杂,成本较高,实验应用较少。关于遗传自发性糖尿病模型和实验诱发性糖尿病模型,前者虽然血糖稳定,但是短期内血糖症状及血糖变化方面欠突出且费用较高,后者因需要化学药物,成功率低,死亡率高,但成本低廉、饲养简单。

STZ 是常用的糖尿病药物诱导剂,其亚硝基脲结构能够选择性地损伤胰岛  $\beta$  细胞。目前 STZ 注射剂量和方法存在分歧。通过调整 STZ 剂量、注射频次及方式,或联合不同饮食方式,可导致不同严重程度甚至不同类型的糖尿病。大剂量的 STZ 可造成胰岛  $\beta$  细胞完全坏死,丧失胰岛素分泌功能,成为典型的 1 型糖尿病模型。而多次小剂量的 STZ 可一定程度损伤胰岛  $\beta$  细胞功能,同时联合高热量高脂饮食可一定程度造成小鼠内环境胰岛素抵抗、胰岛素相对分泌不足,同时 STZ 多次小剂量注射可以降低小鼠模型的死亡率,成为研究者常用的 2 型糖尿病模型<sup>[8]</sup>。

啮齿类动物的天然抗 As 性使得糖尿病大鼠或小鼠很难自发形成显著的血管 As,为解决此问题,国内外普遍采用的方式有 3 种<sup>[9]</sup>:①基因杂交法,即糖尿病动物模型与 As 动物模型杂交,但操作复杂、成本较高、结果不确定等众多因素,较少应用;②在糖尿病动物模型的基础上构建 As,即给予糖尿病小鼠或大鼠高脂饮食喂养,但该方法成模周期长,动物间个体差异大,As 病变轻微,造模成功率不确切;③在 As 动物模型的基础上诱导糖尿病<sup>[10]</sup>,这种方法成模率相对较高,成本较低,目前使用最多。目前比较成熟的 As 动物模型是小鼠模型,其具有基因改造品系多、繁殖快、成本较低、易于饲养等优势<sup>[11]</sup>。而大鼠因基因改造困难、繁殖慢、饲养条件高等原因在 DMA 模型研究中使用相对较少。

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠是目前国内外常用的 As 模型<sup>[12]</sup>。本课题组前期对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠进行小剂量 STZ 诱导,使之出现高血糖状态,成功构建 DMA 模型<sup>[3]</sup>。然而,该模型也存在许多问题:首先,ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂谱异常主要表现为 TG、VLDL、HDL 升高,这与

人类 As 血脂谱并不完全一致<sup>[13]</sup>。其次,ApoE 是一种多功能蛋白,基础及临床研究均提示其可以独立于血脂水平对巨噬细胞胆固醇逆转运、氧化应激、炎症以及平滑肌增殖迁移产生额外影响<sup>[14]</sup>。由此看来,STZ 诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠并不完全具备理想的糖尿病动脉硬化动物模型的条件。研究 As 常用动物模型还有 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠<sup>[15]</sup>。与 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠相比,LDLR<sup>-/-</sup>小鼠模型具有一定的优势:首先,其血脂谱主要表现为 LDLC 升高,与人类类似。其次,在这个小鼠模型中,As 斑块的发展是基于血脂水平的升高,LDLR 的缺失对炎症没有影响。然而 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠也并非完美,其正常饮食难以造成自发性血脂显著升高,As 病变轻微、发展缓慢,因此常需高脂饮食加速 As 进展<sup>[16]</sup>。临床上高脂饮食也更能代表 2 型糖尿病患者的饮食特点。综上所述,高脂饮食联合小剂量的 STZ 诱导可能更符合 2 型糖尿病模型的特点。

本研究采用 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠进行小剂量 STZ 诱导联合高脂饮食喂养,作为优化的 DMA 模型,以研究糖尿病促 As 机制。研究结果发现,相比于 As 组,DMA 组小鼠可长期保持较高的血糖水平,糖耐量显著受损,血脂谱表现为 TC、LDLC、TG 显著升高,其中以 LDLC 升高为主,符合人类 As 血脂谱特点,提示糖尿病代谢异常模型造模成功。

在 As 斑块的发生发展过程中,炎症一直起着重要的作用<sup>[17]</sup>。而糖尿病同样也是一种慢性炎症性疾病,炎症有可能是二者之间互相交织的关键因素<sup>[18]</sup>。早期 As 的机制涉及内皮损伤、脂代谢异常和血流动力学损伤。当内皮细胞因各种原因受到损伤、活化后,大量炎症因子如 MCP-1、白细胞介素 8、ICAM-1、VCAM-1、TNF- $\alpha$  产生增加,趋化淋巴细胞和单核细胞,后者与内皮细胞结合后浸润动脉血管壁。高表达的 VCAM-1 和 ICAM-1 促进巨噬细胞增殖,导致大量的巨噬细胞在斑块中积累,从而增加斑块的不稳定性<sup>[19]</sup>。EMR1 是一种高度糖基化的 G 蛋白偶联受体,可作为小鼠巨噬细胞的标志。本研究发现,DMA 组小鼠 As 斑块分布弥漫且面积增加,其中脂质、T 细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞成分显著增多,TNF- $\alpha$ 、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 等炎症因子表达增加。提示 STZ 诱导联合高脂喂养下 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠大血管 As 进展加快,程度加重,模拟了高糖状态下促炎及促 As 过程。

固有免疫系统是大多数生物对感染或损伤作出反应的主要机制。宿主体内的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 可以识别由病原

体或受损细胞释放的分子,从而引起一系列炎症反应。NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)是目前已发现的四类固有免疫受体PRR家族成员之一,NLRP3与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck protein with a Caspase activation and recruitment domain, ASC)和Caspase-1共同构成一种细胞内多蛋白复合体,称为NLRP3炎症小体<sup>[20]</sup>。NLRP3炎症小体介导的炎症和焦亡在内皮功能障碍中起着关键作用<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,DMA组As斑块中NLRP3含量显著升高,表明其参与了DMA的发生发展,但其具体作用机制有待研究。本课题组拟在后续的研究中进行进一步探索。

胶原代谢异常在高糖所致的As斑块的进展中也起着关键作用<sup>[23]</sup>。在As晚期,大量的巨噬细胞伴随多种炎症因子浸润血管壁,并分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)。MMP可以降低斑块细胞外基质中的胶原纤维,导致斑块破裂、出血和血栓形成。临床研究表明,As易损斑块中MMP-9水平增高,且与As斑块易损性呈正相关<sup>[24]</sup>。MMP-2缺乏可减少ApoE<sup>-/-</sup>小鼠As斑块病变的形成。MMP活性可以被金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)所抑制。MMP与TIMP之间的平衡决定了蛋白水解的过程。研究表明,TIMP-1在纤维斑块中表达显著上调,而TIMP-1的表达缺失则加速了As斑块基质的降解<sup>[25]</sup>。本研究发现,DMA组小鼠血管组织中I型、III型胶原含量增加,主动脉根部斑块中MMP-2含量显著增多,TIMP-1含量显著减少,MMP-2/TIMP-1比值显著升高。MMP-2和TIMP-1参与了糖尿病小鼠的易损As斑块形成。本研究发现,STZ诱导联合高脂喂养下,斑块中MMP-2的表达增加,TIMP-1表达减少,从而改变斑块胶原代谢。该动物模型可反映出DMA疾病进展中胶原代谢的异常。

综上,通过STZ诱导联合高脂饮食,LDLR<sup>-/-</sup>小鼠成功出现血脂代谢异常、As斑块形成、高炎症水平状态、胶原代谢异常,构建了更能体现糖尿病促As的斑块组成及炎症特点的小鼠实验模型,可作为一种相对理想的研究糖尿病合并As的病理模型。

#### [参考文献]

[1] CRASTO W, PATEL V, DAVIES M J, et al. Prevention of microvascular complications of diabetes[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2021, 50(3): 431-455.  
[2] PANENI F, BECKMAN J A, CREAGER M A, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical con-

sequences, and medical therapy: part I[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(31): 2436-2443.  
[3] 孙慧, 赵磊, 甄茜, 等. STZ诱导糖尿病联合正常饮食促ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化的作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2014(10): 1-8, 28.  
SUN H, ZHAO L, ZHEN Q, et al. Pro-atherosclerotic effects of streptozotocin-induced diabetes combined with chow diet on ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2014(10): 1-8, 28.  
[4] GOLDBERG I J, ISAACS A, SEHAYEK E, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes in apolipoprotein A I deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2004, 172(1): 47-53.  
[5] SUN H, ZHANG X, ZHAO L, et al. Attenuation of atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using gene silencing of macrophage migration inhibitory factor[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(4): 836-849.  
[6] HENNING R J. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease[J]. *Future Cardiol*, 2018, 14(6): 491-509.  
[7] 崔森, 朱春江, 刘向荣. 糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2023, 27(2): 227-230.  
CUI M, ZHU C J, LIU X R. Research progress on the establishment of diabetic animal model [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2023, 27(2): 227-230.  
[8] REED M J, MESZAROS K, ENTE L J, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat[J]. *Metabolism*, 2000, 49(11): 1390-1394.  
[9] WU K K, HUAN Y. Diabetic atherosclerosis mouse models [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191(2): 241-249.  
[10] PARK L, RAMAN K G, LEE K J, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts[J]. *Nat Med*, 1998, 4(9): 1025-1031.  
[11] DAUGHERTY A, TALL A R, DAEMEN M J A P, et al. Recommendation on design, execution, and reporting of animal atherosclerosis studies: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): e131-e157.  
[12] PLUMP A S, SMITH J D, 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.  
[13] LEE Y T, LIN H Y, CHAN Y W, et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 12.  
[14] CIVEIRA-MARÍN M, CENARRO A, MARCO-BENEDÍ V, et al. APOE genotypes modulate inflammation independently of their effect on lipid metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12947.  
[15] ISHIBASHI S, BROWN M S, GOLDSTEIN J L, et al.

- Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery[J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(2): 883-893.
- [16] LICHTMAN A H, CLINTON S K, IYAMA K, et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(8): 1938-1944.
- [17] 支晨曦, 谢忠成, 李靛, 等. 中国动脉粥样硬化近三年基础研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(9): 744-752.
- ZHI C X, XIE Z C, LI L, et al. The progress of the national preclinical research of atherosclerosis in the recent three years [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(9): 744-752.
- [18] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835.
- [19] MANTOVANI A, GARLANDA C, LOCATI M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1419-1423.
- [20] 孟庆雯, 刘华江, 易泓汝, 等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用机制和靶向炎症治疗的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(1): 79-86.
- MENG Q W, LIU H J, YI H R, et al. Mechanisms of NLRP3 inflammasome in atherosclerosis and advances in targeted inflammatory therapy [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(1): 79-86.
- [21] POECK H, RULAND J. ITAM receptor signaling and the NLRP3 inflammasome in antifungal immunity[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(4): 496-501.
- [22] RHEINHEIMER J, DE SOUZA B M, CARDOSO N S, et al. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: a systematic review[J]. *Metabolism*, 2017, 74: 1-9.
- [23] DING S, ZHANG M, ZHAO Y, et al. The role of carotid plaque vulnerability and inflammation in the pathogenesis of acute ischemic stroke[J]. *Am J Med Sci*, 2008, 336(1): 27-31.
- [24] VICENTE A, BRAVO-GONZÁLEZ L A, NAVARRO J A, et al. Effects of diabetes on oxidative stress, periodontal ligament fiber orientation, and matrix metalloproteinase 8 and 9 expressions during orthodontic tooth movement[J]. *Clin Oral Investig*, 2021, 25(3): 1383-1394.
- [25] ORBE J, FERNANDEZ L, RODRÍGUEZ J A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 170(2): 269-276.
- (此文编辑 文玉珊)

~~~~~

(上接第 984 页)

- [18] ROMO E Z, ZIVKOVIC A M. Glycosylation of HDL-associated proteins and its implications in cardiovascular disease diagnosis, metabolism and function[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 928566.
- [19] GAO Y, WANG M, WANG R, et al. The predictive value of the hs-CRP/HDL-C ratio, an inflammation-lipid composite marker, for cardiovascular disease in middle-aged and elderly people: evidence from a large national cohort study[J]. *Lipids Health Dis*, 2024, 23(1): 66.
- [20] 生士凤, 陈静锋, 王佑翔, 等. 正常高值血压人群颈动脉斑块的相关因素[J]. *中华高血压杂志*, 2022, 30(10): 950-955.
- SHENG S F, CHEN J F, WANG Y X, et al. The contributing factors of carotid plaque in people with high-normal blood pressure [J]. *Chin J Hypertens*, 2022, 30(10): 950-955.
- [21] FERNANDES DAS NEVES M, BATUCA J R, DELGADO ALVES J. The role of high-density lipoprotein in the regulation of the immune response: implications for atherosclerosis and autoimmunity [J]. *Immunology*, 2021, 164(2): 231-241.
- [22] GROENEN A G, HALMOS B, TALL A R, et al. Cholesterol efflux pathways, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56(4): 426-439.
- [23] SONG Y, ZHAO Y, SHU Y, et al. Combination model of neutrophil to high-density lipoprotein ratio and system inflammation response index is more valuable for predicting peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients: a cross-sectional study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1100453.
- [24] LIBERALE L, MONTECUCCO F, TARDIF J C, et al. Inflamm-ageing: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease[J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(31): 2974-2982.
- [25] TOMIYAMA H, SHIINA K, MATSUMOTO-NAKANO C, et al. The contribution of inflammation to the development of hypertension mediated by increased arterial stiffness [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(7): e005729.
- (此文编辑 许雪梅)