

近交系 NJS 小鼠动脉粥样硬化发病情况的观察

孙敬方

田小芸

(解放军南京军区南京总医院, 南京 210002)

Observation on Atherosclerosis of Inbred NJS Mouse Strain

SUN Jing-Fang and TIAN Xiao-Yun

(Medical Animal Experimental Center, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT

Aim This study is to observe on incidence and pathological changes of atherosclerosis for inbred NJS mouse strain in spontaneous hypercholesterolemia, and to investigate the biological property of the strain.

Methods The aorta lesions was observed by using original staining and tissue flat staining.

Results The incidence of atherosclerosis of the strain was 100% in some liable positions such as aortic sac and ascending aorta at 8~10 months. Most of the lesions were in fatty streaks. It appeared stripy or flaky obviously on some red coloring positions by original staining. There were some foam cell in aortic wall by tissue flat staining. No pathological changes were seen at 2~3 months of age.

Conclusion Inbred NJS mouse strain can develop lesions of atherosclerosis. The strain can be used as a model of atherosclerosis.

KEY WORDS Inbred strain; Mouse; Atherosclerosis

摘要 为了观察自发性高胆固醇血症近交系 NJS 小鼠动脉粥样硬化发病情况,了解该品系的生物学特性,采用原位固定染色与组织切片染色来观察其动脉粥样硬化病变情况。结果发现该品系 8~10 月龄小鼠动脉粥样硬化好发部位(如主动脉窦和升主动脉)的阳性检出率为 100%,主要是脂斑和脂纹期的病变。原位固定染色呈红染明显的条索状脂斑和片状脂斑,组织切片染色可见升主动脉内膜中有泡沫细胞,2~3 月龄小鼠中均未见明显病变。提示,近交系 NJS 小鼠可发

生动脉粥样硬化,该动物可作为动脉粥样硬化症研究的模型动物。

关键词 近交系; 小鼠; 动脉粥样硬化

人类动脉粥样硬化研究以往主要以兔、鸽、猪和非人灵长类等作模型动物,一般用极度高脂食料饲喂动物诱发而成,试验成本相当高。此外,这些模型还存在的共同缺点是不易获得大量的动物,难以开展遗传分析。近年来,小鼠作为模型动物却越来越受到重视^[1]。小鼠体型小,来源广,繁殖力强,遗传背景清楚,脂质代谢与病理改变和人类近似。小鼠不同品系间对动脉粥样硬化的易感性和抵抗性存在差异,便于作系间基因分析。近交系 C₅₇BL/6 小鼠就是常被使用的一种易感性品系。最近几年间,基因 Knockout 技术和转基因技术的应用,产生了一些突变系小鼠,如载脂蛋白 E 缺乏症小鼠、低密度脂蛋白受体缺乏症小鼠、载脂蛋白 E Leiden 小鼠、载脂蛋白 E R142C 小鼠、HuBTg 小鼠等,为动脉粥样硬化的研究提供了更为广泛的模型材料。但这些小鼠一般也都是在极高胆固醇、胆酸的食料饲喂后可形成极高胆固醇血症,并诱发出动脉粥样硬化病变^[2]。

由于动脉粥样硬化症的发病是极为复杂的过程,可能是遗传因素与环境因素共同作用的结果。探讨复制模型的有效途径和寻找理想的模型材料,一直是实验研究者的努力方向之一。作者自 1990 年始即采用数量遗传学原理开展自发性高胆固醇血症和动脉粥样硬化近交系小鼠的培育工作^[3]。育种方法是:在固定的低胆固醇、低脂肪的普通食料下,以血清胆固醇含量为选育指标,将高度近交与定向选育相结合,通过后裔鉴定,逐代反复留种与淘汰,以不断增加群体的育种值。目前,已完成连续全同胞近交 20

代以上,并达到了预定的育种目标(血清胆固醇水平提高1倍以上,呈高胆固醇血症状态),该品系已被命名为“近交系NJS小鼠”^[4,6]。为观察该品系小鼠动脉粥样硬化发病情况,进一步了解其生物学特性,作者采用原位固定染色和组织切片染色两种方法来检测其动脉粥样硬化病变。

1 材料与方法

1.1 动物

近交系NJS小鼠,作者培育,随机取自F₂₂代群,2~3月龄,12只,雌雄各半;8~10月龄,12只,雌雄各半。

1.2 饲料

整个育种过程中,始终以固定的普通配方饲养。饲料配方:玉米24.5%、麸皮24.5%、大麦21%、豆饼12%、鱼粉6.0%和其他12%。该配方由作者设计,系鼠用普通饲料配方,未添加胆固醇或动物油等高脂性成分。饲料主要营养指标:粗蛋白18.57%±0.08%,粗脂肪5.31%±0.26%。

1.3 材料

眼科剪、镊、输液瓶(250 ml)、输液器、塑料细管(自制,前端拉成直径0.2~0.5 mm)、载玻片、培养皿、搪瓷盘、显微外科手术剪、镊、体视解剖镜(2×10倍)、各级酒精、二甲苯、苏木精染色液、伊红酒精染色液。

1.4 病变检测方法

1.4.1 原位固定染色 采用王南等^[6]介绍的方法加以改进。具体操作有10个步骤。①将10%甲醛、70%酒精、生理盐水和苏丹Ⅳ染色液分装入各输液瓶,安装好输液器,输液器针头与塑料细管连接,输液瓶距实验台高度1 m左右。②脱颈椎处死小鼠放入搪瓷盘中,剖开腹腔,剪断腹主动脉,注意切勿弄破横膈。再迅速剖开胸腔露出心脏,将塑料细管前端轻轻由心尖部插入左心室,并用夹子固定于心脏。③以10%甲醛固定液输液,每分钟5~7滴,持续滴注30 min,固定液经左心室、主动脉、胸主动脉至腹主动脉流出。④改用生理盐水滴注,洗去固定液,再用70%酒精滴注,持续5 s。⑤以苏丹Ⅳ染色液滴注,持续5 min。⑥再改用70%酒精滴注5~10 s,然后用生理盐水滴注冲洗。⑦分离心脏及胸主动脉,剪去所有分支,浸于生理盐水中,洗涤数次。⑧在20倍体视解剖镜下,用显微外科手术剪沿主动脉小弯处剖开。上至左心室半月瓣,下至胸主动脉终

端,仔细将剖开的主动脉段平铺在载玻片上。⑨在普通显微镜下检查是否有红染部位。⑩对红染部位作显微摄影。

1.4.2 组织切片染色 脱颈椎处死动物后,作心脏及主动脉石蜡包埋,制作普通切片。由半月瓣附着处开始,切片厚5 μm。每隔100 μm左右取一片,按顺序排列于载玻片上。作HE染色,镜检。对可能病变作显微摄影。

2 结果

2.1 原位固定染色检测

被检的6只8~10月龄NJS小鼠均可见不同程度的嗜苏丹Ⅳ的红染部位。在主动脉根部与心脏交界处,特别是半月瓣边缘可见有较深的红染。在主动脉窦内可见红染的密集细点形成索状或片状,病理诊断为处于脂斑和脂纹期的脂斑和脂纹(Figure 1)。在升主动脉前端亦可见红染的密集点形成明显的条索状并连成片,比主动脉窦内的条索更为宽和长,其走行方向与动脉纵轴相平行,系脂斑和脂纹期较为典型的脂纹(Figure 2)。在主动脉弓处有三个分支动脉(无名动脉、左颈总动脉和左锁骨下动脉),其开口处周围明显红染,尤其第三分支(左锁骨下动脉)更为明显(Figure 3),可见开口处周围不平整、有隆起灶。在肋间动脉开口部位,亦可见红染明显加深(Figure 4)。在1例雌性小鼠肺动脉干处还可见突出于内膜表面十分明显的斑块,病理诊断为处于纤维斑块期和粥样斑块期的粥样斑块(Figure 5)。这些部位与动脉粥样硬化好发部位是一致的。

被检的6只2~3月龄NJS小鼠,均未见明显的红染部位,主动脉窦及主动脉各段管壁清晰,4×40倍镜下平滑肌纤维正常、规则,半月瓣边缘红染极淡,分支动脉开口处也正常。

2.2 组织切片染色检测

HE染色显示:8~10月龄小鼠的主动脉系列切片中均可找到发生于升主动脉部位的内膜下有大量脂肪空泡,病理诊断是处于脂斑和脂纹期的泡沫细胞(Figure 6)。可能是内膜中的

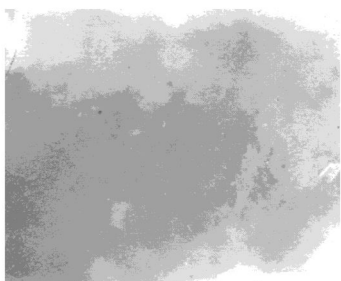


Figure 1. Fatty streaks in aortic sac (4×10).

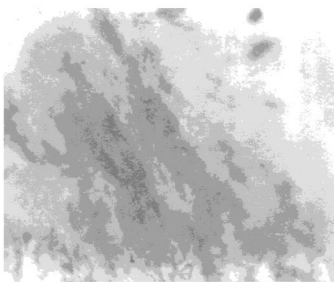


Figure 2. Fatty streaks on ascending aorta (4×10).



Figure 3. Red coloring at the base of left subclavian aorta (4×4).



Figure 4. Red coloring obviously at the base of intercostal aorta (4×10).

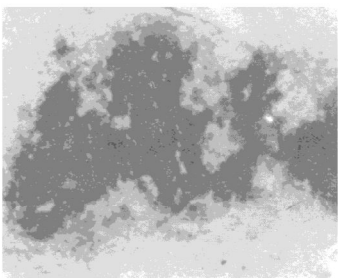


Figure 5. Atheromatous plaques on arteria pulmonalis (4×4).

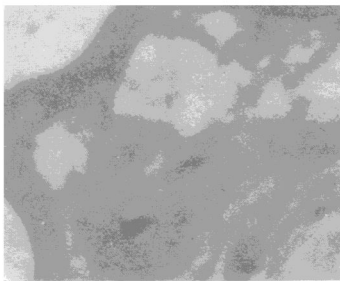


Figure 6. Foamy cells in fatty streaks (6.3×100).

平滑肌细胞活跃增殖以及中膜内的平滑肌细胞进入内膜并失去分化,吞噬脂质后形成。在2~3月龄小鼠的切片中所见到的组织结构均正常,未见明显病变。

3 讨论

王南等^[6]曾将原位固定染色法与普通切片染色法作比较后认为,原位固定染色方法的可靠性及灵敏度高,其优点是不会因切片时随机取材而使一些小病变漏掉,而且可直接检查小鼠主动脉中粥样硬化病变程度,简便快速。作者通过本试验也认为,原位固定染色方法是一种比较理想的小鼠动脉粥样硬化病变检测方法,能够更为全面地反映动脉粥样硬化病变情况,所获得的结果明确。

作者在本试验中观察了近交系NJS小鼠主动脉前端(心脏至胸主动脉)以及肺动脉干处动脉粥样硬化发病情况。其他部位,如冠状动脉、腹主动脉、脑动脉、肾动脉等动脉粥样硬化发病情况在进一步研究之中。从主动脉前段发病情况看,该品系小鼠主要好发于半月瓣边缘、主动脉窦、升动脉前端,以及分支动脉开口部位,这些部位与报道的小鼠动脉粥样硬化的好发部位是一致的。与人类情况相比较,就主动脉粥样硬化斑块分布状态而言,人类可能更为广泛。但就组织结构病理改变情况而言,二者是一致的。可能都是由于动脉内膜中细胞内外的脂质沉积,平滑肌细胞增殖,形成泡沫细胞,进而泡沫细胞发生变性、坏死、崩解以及释放脂质等。

通过对原位固定染色和组织切片染色镜下观察到的结果进行分析,可综合认为:近交系NJS小鼠8~10月龄发生于好发部位的动脉粥样硬化是处于脂斑和脂纹期的病变^[7]。这种病变比食源性诱发的动脉粥样硬化发生偏迟(一般对2~3月龄以高脂食料食源性诱发3~5月

后可出现),这可能除动脉粥样化本身是一种病程发展缓慢的疾病外,还可能与食源性诱发是使动物处于极度高胆固醇血症(胆固醇水平增加10~20倍)状态有关。不过,食源性诱发与人类正常饮食情况是不一致的,而普通食料饲喂下自然形成的可能更具有相似性。

NJS小鼠是作者经多年定向选育而成的一株自发性高胆固醇血症近交系小鼠,能在普通饲养下自然形成,属内源性的。这种性状的出现可能是由于群体中携带的能引起血清胆固醇代谢障碍的突变型隐性基因在高度近交下纯合暴露,同时在定向选育引导下被留种、固定的结果。也可能是在育种过程中发生基因突变,通过近交与定向选育而保留下来^[8]。因而该性状也具有稳定的遗传性。可能是持续性的高胆固醇血症状态,导致该小鼠动脉粥样硬化病变的发生。

参考文献

- 1 徐兆光,刘瑞三,陈筱侠. 比较医学进展. 北京:北京科技出版社,1988,113~123.
 - 2 Jan L Breslow. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 1996, 272: 685~688.
 - 3 孙敬方,潘震寰. 高胆固醇血症近交系小鼠选育研究的阶段性总结(一). *实验动物与动物实验*, 1994, 6(4): 40~48.
 - 4 孙敬方,潘震寰,田小芸. 高胆固醇血症近交系小鼠选育研究的阶段性总结(二). *南京师大学报(自然科学版)*, 1996, 19(增刊): 5~8.
 - 5 孙敬方. NJS小鼠的选育研究 I. 培育历史与建系方法. *上海实验动物科学*, 1996, 16(3,4): 131~133.
 - 6 王南,蔡海江,史泓浏. 一种小鼠动脉粥样硬化模型病变检测方法. *实验动物与动物实验*, 1994, 6(4): 75.
 - 7 文仲. *病理解剖学图谱*. 太原:山西科学教育出版社, 1987, 27~28.
 - 8 孙敬方,朱德生,郝光荣,等. *实验动物学技术*. 北京:科学技术文献出版社,1993,33~52.
- (1996-06-27收到,1996-09-16修回)