

本文引用: 宋博策, 谢蓓莉, 刘明旺, 等. 基于数据挖掘的动脉粥样硬化易损斑块动物模型分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11): 974-981. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.11.009.

· 方法学研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-11-0974-08

## 基于数据挖掘的动脉粥样硬化易损斑块动物模型分析

宋博策<sup>1</sup>, 谢蓓莉<sup>1</sup>, 刘明旺<sup>1</sup>, 别玉龙<sup>1</sup>, 李浩浩<sup>1,3</sup>, 闫宇新<sup>1,3</sup>, 张洋洋<sup>1</sup>, 赵福海<sup>1,2</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院心血管科, 北京市 100091; 2. 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京市 100091;  
3. 北京中医药大学临床医学院, 北京市 100029)

**[摘要]** **[目的]** 统计动脉粥样硬化易损斑块(VP)动物模型造模方法及应用情况。**[方法]** 检索2016年10月—2021年10月发表在中国知网、Pubmed、万方数据库关于VP动物造模的相关文献,对文献中的造模动物、造模方法、造模周期以及模型评价方法、相应检测指标等进行统计分析。**[结果]** 实验动物使用最多的,依次为6~12周载脂蛋白E基因缺陷小鼠,12~16周新西兰大白兔以及34周家族性高胆固醇血症猪。造模方法依次为高脂高胆固醇饮食诱导、动脉结扎,或结合主动脉内皮球囊拉伤、化学触发、免疫诱导等。造模周期为8周到1年不等,以12~18周的为最多。评价方法多为病理染色,并结合酶联免疫吸附法、Western blot、实时荧光定量PCR、流式细胞仪检测等手段;彩色多普勒超声、心脏灌注显影及体内活细胞示踪技术用于VP的活体探测。**[结论]** 高脂高胆固醇饮食饲养,或结合手术损伤建立VP模型具有很好的可重复性。若能研发高性价比的活体探测方法,将极大提高动脉粥样硬化疾病的研究效率。

**[关键词]** 数据挖掘; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 动物模型; 应用

**[中图分类号]** R363;R5

**[文献标识码]** A

## Analysis of animal model of atherosclerotic vulnerable plaque based on data mining

SONG Boce<sup>1</sup>, XIE Beili<sup>1</sup>, LIU Mingwang<sup>1</sup>, BIE Yulong<sup>1</sup>, LI Haohao<sup>1,3</sup>, YAN Yuxin<sup>1,3</sup>, ZHANG Yangfang<sup>1</sup>, ZHAO Fuhai<sup>1,2</sup>

(1. Department of Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;  
2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Beijing 100091, China; 3. Department of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the modeling methods and application of atherosclerotic vulnerable plaque (VP) animal model. **Methods** The related literature about VP animal modeling published in CNKI, Pubmed and Wanfang databases from October 2016 to October 2021 were retrieved. The modeling animals, modeling methods, modeling cycles, model evaluation methods and corresponding detection indexes in the literatures were statistically analyzed. **Results** The most commonly used experimental animals were mice with apolipoprotein E gene deficient at 6~12 weeks, New Zealand white rabbits at 12~16 weeks, and familial hypercholesterolemia pigs at 34 weeks. Modeling methods were followed by high-fat and high-cholesterol diet induction, arterial ligation, or combined with aortic endothelial balloon strain, chemical triggering, immune induction, etc. The modeling cycle ranged from 8 weeks to 1 year, with 12 to 18 weeks being the most. The evaluation methods were mostly pathological staining, combined with enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot, real-time fluorescence quantitative PCR, flow cytometry and other methods; color Doppler ultrasound, cardiac perfusion imaging and *in vivo* live cell tracking technology were used for VP live detection. **Conclusion** High-fat and high-cholesterol diet feeding, or combined with surgical injury to establish VP model has good reproducibility. If a cost-effective *in vivo* detection method can be developed, the research efficiency of atherosclerotic diseases will be greatly improved.

**[KEY WORDS]** data mining; atherosclerosis; vulnerable plaque; animal model; application

**[收稿日期]** 2021-10-20

**[修回日期]** 2021-12-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81973674);北京市自然科学基金面上项目(7202175);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(C1202100910)

**[作者简介]** 宋博策,博士研究生,研究方向为中西医结合防治冠心病,E-mail:1184580227@qq.com。通信作者赵福海,博士,主任医师,研究方向为中西医结合防治心血管疾病,E-mail:13911134962@163.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是最常见的动脉壁异常。易损斑块(vulnerable plaque, VP)又称不稳定斑块,VP 破裂继发血栓形成是心脑血管病患者发生急性事件的主要病理基础<sup>[1]</sup>,由 VP 破裂及局部血栓形成所诱发的急性冠状动脉综合征等疾病具有极高的致死率,是冠心病患者死亡的主要原因,因此斑块的稳定与否直接影响心血管疾病的疗效及预后<sup>[2]</sup>。建立合适的 VP 动物模型以供研究对心脑血管疾病的防治工作具有重要的指导意义,但目前尚无公认的复制 VP 的方法。本研究将近 5 年 VP 的动物造模及评价方法进行汇总和统计,以期对后续 VP 基础研究的动物模型应用提供参考和指导。

# 1 资料和方法

## 1.1 数据来源

检索数据库:中国知网、Pubmed、万方数据库。中文关键词或主题词:动脉粥样硬化不稳定斑块、动脉粥样硬化易损斑块、不稳定斑块、易损斑块、模型。英文关键词或主题词:atherosclerotic unstable plaque、atherosclerotic vulnerable plaque、unstable plaque、vulnerable plaque、model。检索时间:2016 年 10 月—2021 年 10 月。共检索到文献 1 535 篇。

## 1.2 纳入标准

选择 VP 动物模型的文献,排除临床试验、硕博学位论文、会议论文以及综述类文章,最终筛选出合适的文献 71 篇。

## 1.3 研究方法

详细阅读文献,将文献中涉及的实验动物种类、造模方法、造模周期、评价方法、检测指标等逐一输入 Excel 2016 建立数据库,对数据库进行统计分析并绘制相关表格进行展示。

# 2 结果

## 2.1 造模动物选择

对所有文献中造模动物种类、大小、体质量等相关信息统计发现,VP 常用实验动物依次为:6~12 周载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(apolipoprotein E gene knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>)占 52.11%,12~16 周新西兰大白兔占 21.13%,34 周家族性高胆固醇血症猪(小型猪)占 4.23%,其中以 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠和 16 周新西兰大白兔应用最多。其他基因工程小鼠占 14.10%,包括:低密度脂蛋白受体基因敲除小鼠(low density

lipoprotein receptor gene knockout mice, LDLR<sup>-/-</sup>)、纤维蛋白 1 基因 1039 位点突变-低密度脂蛋白受体基因敲除小鼠(mutation at 1039 locus of fibrin 1 gene-low density lipoprotein receptor gene knockout mice, Fbn1<sup>c1039g+/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E-细胞间黏附分子 1 双基因敲除小鼠(apolipoprotein E-intercellular adhesion molecule 1 double gene knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>/ICAM-1<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E-干扰素调节因子 5 双基因敲除小鼠(apolipoprotein E-interferon regulatory factor 5 double gene knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>/IRF5<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E-新西兰自身免疫 2 双基因缺陷小鼠(apolipoprotein E-New Zealand black autoimmunity 2 gene double knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>/Nba2<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E-结缔组织生长因子双基因敲除(apolipoprotein E-connective tissue growth factor double gene knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>/CTGF<sup>-/-</sup>)、低密度脂蛋白受体基因敲除-层黏连蛋白 A 609 位点突变小鼠(low density lipoprotein receptor gene knockout-609 locus of laminin A gene mutated mice, LDLR<sup>-/-</sup>/Lmna<sup>G609G/G609G</sup>)、微小 RNA-33a/b 基因敲除小鼠(miRNA-33a/b gene knockout mice, miR-33a/b<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E-微小 RNA-205ki 双基因敲除小鼠(apolipoprotein E-microRNA-205ki double gene knockout mice, ApoE<sup>-/-</sup>/miR-205ki<sup>-/-</sup>)、载脂蛋白 E 基因异形突变且清道夫受体 B 类 I 型基因敲除小鼠(hypomorphic mutant form of apolipoprotein E combination with a knockout in scavenger receptor class B type mice, HypoE/SRBI<sup>-/-</sup>)。造模动物体质量,小鼠一般选取 15~30 g,新西兰大白兔常选取 1 500~3 500 g。71 篇文献中雄性动物约占 91.54%。具体见表 1。

表 1. 动脉粥样硬化 VP 的动物模型  
Table 1. Animal model of atherosclerotic VP

| 造模动物                                              | 性别   | 占比/%  | 年龄/周  | 体质量/g       |
|---------------------------------------------------|------|-------|-------|-------------|
| ApoE <sup>-/-</sup> 小鼠                            | 雄性   | 52.11 | 6~12  | 15~30       |
|                                                   | 雌性   | 4.23  | >12   | —           |
|                                                   | 雌性   | 1.41  | —     | —           |
|                                                   | 雌雄均有 | 1.41  | —     | —           |
| 新西兰大白兔                                            | 雄性   | 21.13 | 12~16 | 1 500~3 500 |
| 小型猪                                               | 雄性阉割 | 4.23  | 34    | —           |
| Fbn1 <sup>c1039g+/-</sup> /LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠 | 雌性   | 1.41  | 8     | —           |
| ApoE <sup>-/-</sup> /ICAM-1 <sup>-/-</sup> 小鼠     | 雄性   | 1.41  | 9     | —           |
| ApoE <sup>-/-</sup> /IRF5 <sup>-/-</sup> 小鼠       | 雄性   | 1.41  | —     | —           |

续表

| 造模动物                                                | 性别   | 占比/% | 年龄/周   | 体质量/g       |
|-----------------------------------------------------|------|------|--------|-------------|
| ApoE <sup>-/-</sup> /Nba2 <sup>-/-</sup> 小鼠         | 雄性   | 1.41 | 11     | 24.1 ~ 25.2 |
| ApoE <sup>-/-</sup> /CTGF <sup>-/-</sup> 小鼠         | 雌性   | 1.41 | 8 ~ 10 | >18         |
| LDLR <sup>-/-</sup> /Lmna <sup>G609G/G609G</sup> 小鼠 | 雄性   | 1.41 | 8      | —           |
| LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠                              | 雄性   | 1.41 | 10     | —           |
| miR-33a/b <sup>-/-</sup> 小鼠                         | 未标注  | 1.41 | 6      | —           |
| ApoE <sup>-/-</sup> /miR-205ki <sup>-/-</sup> 小鼠    | 雄性   | 1.41 | 6      | —           |
| SD 大鼠                                               | 雄性   | 1.41 | —      | —           |
| HypoE/SRBI <sup>-/-</sup> 小鼠                        | 雌雄均有 | 1.41 | 18     | —           |

注:“—”表示数据未获得。

2.2 动脉粥样硬化 VP 造模方法汇总

所有文献中,标记 VP 造模方法的文献共有 65 篇,其中有 91.86% 的研究应用了高脂高胆固醇饮食 (high-fat and high-cholesterol diet, HFCD) 诱导法,或结合动脉结扎/动脉外置管法 (23.08%)、动脉内皮球囊拉伤 (18.46%)、化学触发 (10.77%)、免疫诱导 (1.54%) 等;使用单侧动脉结扎法占总研究的 6.15%。统计结果表明,各动物模型造模周期为 8 周到 1 年不等,以 12 ~ 18 周最多。对于特殊疾病引起的 As,可使用相应的转基因动物模型,如系统性红斑狼疮诱发的 VP 可选择 ApoE<sup>-/-</sup>/Nba2<sup>-/-</sup>小鼠,结缔组织疾病引起的 VP 可选择 ApoE<sup>-/-</sup>/CTGF<sup>-/-</sup>小鼠。具体见表 2。

表 2. 动脉粥样硬化 VP 造模方法汇总

Table 2. Summary of modeling methods for atherosclerotic VP

| 造模动物                   | 造模方法                          | 占比/%  | 具体操作                                                                                                 | 周期/周    | 造模特点                                               |
|------------------------|-------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|
| ApoE <sup>-/-</sup> 小鼠 | 单侧颈动脉和肾动脉结扎 <sup>[3]</sup>    | 6.15  | 部分结扎左侧颈总动脉和左侧肾动脉                                                                                     | 8       | 优点:肾动脉结扎可引发高血压,适用于高血压相关 As 研究;缺点:小鼠动脉较细难剥离,易造成小鼠死亡 |
|                        | 脂多糖诱导 <sup>[4]</sup>          | 1.54  | 正常饮食饲养至 45 周后,每日腹腔注射脂多糖 1.5 mg/kg,连续 5 天                                                             | 45      | 优点:符合高龄 As 的形成过程,结合脂多糖刺激,适合炎症损伤学说的研究;缺点:造模周期漫长     |
|                        | HFCD 饲养 <sup>[5]</sup>        | 35.38 | 5% ~ 40% 脂肪+0.15% ~ 4% 胆固醇,可添加糖类、蛋白质等;小鼠正常摄食                                                         | 8 ~ 40  | 优点:操作简单,符合生理状态下 As 的慢性发展;缺点:造模周期较长,结果受饲料配比影响       |
|                        | HFCD 饲养+动脉结扎 <sup>[6]</sup>   | 7.69  | HFCD 持续饲养,0 ~ 6 周后行颈动脉或肾动脉结扎术,继续饲养 0 ~ 8 周;饲料配比:20% ~ 21% 脂肪+1.25% 的胆固醇,15% 可可脂+0.25% 胆固醇            | 6 ~ 13  | 优点:HFCD 饲养,动脉结扎可缩短 VP 的形成时间;缺点:手术操作易造成小鼠死亡         |
|                        | HFCD 饲养+颈动脉外置管 <sup>[7]</sup> | 12.31 | HFCD 持续饲养,0 ~ 6 周后行颈动脉外置管术,术后继续饲养 7 ~ 12 周;饲料配比:15% 脂肪+1.25% 胆固醇,21% 脂肪(15% 可可油)+0.25% 胆固醇+19.5% 酪蛋白 | 9 ~ 14  | 优点:能够以确定的方式改变剪切应力;缺点:小鼠颈部解剖结构复杂,死亡率较高              |
| 小型猪                    | HFCD 饲养 <sup>[8]</sup>        | 3.08  | 10% 猪油+0.75% 胆固醇                                                                                     | 12      | 优点:斑块发生部位与人类相似;缺点:费用高,且猪可自发发生 As,对照组应选用符合要求的普通饲料   |
|                        | 人主动脉异体移植 <sup>[9]</sup>       | 1.54  | 人冠状动脉移植到活体猪心脏                                                                                        | —       |                                                    |
| 新西兰大白兔                 | HFCD 饲养+球囊拉伤 <sup>[10]</sup>  | 9.23  | HFCD 持续饲养,0 ~ 3 周后行主动脉内皮球囊拉伤术,术后继续饲养 8 ~ 14 周                                                        | 10 ~ 16 | 优点:基于损伤-反应学说、脂质浸润学说,VP 形成与现有理论相符;缺点:操作复杂,易造成动物死亡   |

续表

| 造模动物                                                 | 造模方法                                   | 占比/% | 具体操作                                                                                                                     | 周期/周  | 造模特点                                                                              |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|                                                      | HFCd 饲养+球囊拉伤+化学诱导 <sup>[11]</sup>      | 9.23 | 含 1~2% 胆固醇饲料持续饲养,0~2 周后行腹主动脉球囊拉伤术,术后继续饲养 7~12 周;动物处死前 48、24 h,在腹腔注射斑点蝮蛇毒 0.15 mg/kg,30 min 后静脉注射组胺 0.02 mg/kg,先后触发 VP 破裂 | 8~18  | 优点:蝮蛇毒能够激活凝血因子 V 和 X,促进血栓形成,同时促进血管收缩,造成斑块破裂;缺点:操作复杂,易造成动物死亡,且蛇毒不易获取               |
|                                                      | HFCd 饲养+低温损伤+化学诱导 <sup>[12]</sup>      | 1.54 | 通过液氮治疗仪将低温气体作用于左侧颈动脉内膜 5 s,反复 3 次;术后用含 1% 胆固醇饮食持续饲养 12 周;蛇毒触发 VP 破裂,方法同上                                                 | 12    | 液氮损伤对手术操作者有一定的危险性;其余同上一条                                                          |
|                                                      | HFCd 饲养+右侧股动脉内皮剥离并空气干燥 <sup>[13]</sup> | 1.54 | 含 0.25% 胆固醇饲料持续饲养,2~4 周后当血清胆固醇水平>2 g/L 时,剥离右侧股动脉空气干燥损伤内皮细胞,术后继续饲养 6 周                                                    | 8     | 优点:与“HFCd+球囊拉伤”相似;缺点:内皮干燥过程中,血管脆性加大,易造成动脉破裂                                       |
|                                                      | HFCd 饲养+颈动脉固定 <sup>[14]</sup>          | 1.54 | 将硅橡胶环置于左侧总颈动脉周围,用 2.0 丝线固定造成血管狭窄;术后予 5% 猪油+1% 胆固醇饲料饲养 8 周                                                                | 8     | 可用于血流动力学变化导致的 VP 研究                                                               |
| SD 大鼠                                                | HFCd 饲养+物理损伤+免疫诱导 <sup>[15]</sup>      | 1.54 | 持续 HFCd 饲养,2 周后一次性腹腔注射 700 kU/kg 维生素 D <sub>3</sub> ,暴露颈总动脉,液氮刺激 45 min,继续饲养 10 周;第 10 周起皮下注射牛血清白蛋白,同时腹腔注射卵清白蛋白          | 12    | 优点:利用液氮透壁全层冷冻损伤保证了管壁的完整性,术后持续免疫刺激加速斑块的进展;缺点:液氮刺激 45 min,长时间阻断血流易致动物死亡             |
| LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠                               | HFCd 饲养 <sup>[16]</sup>                | 1.54 | 21% 乳脂+17% 酪蛋白+0.21% 胆固醇                                                                                                 | 24    | 优点:LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠接受 HFCd 后,主动脉可出现明显的 As 病变;缺点:造模时间较长                      |
| ApoE <sup>-/-</sup> /IRF5 <sup>-/-</sup> 小鼠          | 石膏压迫颈动脉 <sup>[17]</sup>                | 1.54 | 正常饮食                                                                                                                     | 27    | 适用于髓系细胞对 VP 影响的研究                                                                 |
| ApoE <sup>-/-</sup> /Nba2 <sup>-/-</sup> 小鼠          | HFCd 饲养 <sup>[18]</sup>                | 1.54 | 20.1% 脂肪+1.25% 胆固醇                                                                                                       | 11    | ApoE <sup>-/-</sup> 小鼠与狼疮易感性小鼠杂交而来,适用于研究狼疮引起的动脉疾病                                 |
| ApoE <sup>-/-</sup> /CTGF <sup>-/-</sup> 小鼠          | HFCd 饲养+颈动脉套管 <sup>[19]</sup>          | 1.54 | 21% 脂肪+0.15% 胆固醇;HFCd 饲养 10 周,右侧颈总动脉滞留 0.3 mm 套管,继续 HFCd 喂养 2~4 周                                                        | 12~14 | 调控结缔组织生长因子,适用于结缔组织疾病的研究                                                           |
| LDLR <sup>-/-</sup> /Lm-na <sup>G609G/G609G</sup> 小鼠 | HFCd 饲养 <sup>[20]</sup>                | 1.54 | 10.7% 脂肪+0.75% 胆固醇                                                                                                       | 8     | LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠与早衰小鼠(Lm-na <sup>G609G/G609G</sup> )杂交而来,适用于早衰综合征相关 As 疾病研究 |

注:“—”表示数据未获得。

## 2.3 动脉粥样硬化 VP 的评价

VP 的评价,可以通过病理切片染色直接观察,包括苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、马松(Masson)染色、天狼猩红(picro sirius red, PSR)染色、免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色、免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色和油红 O 染色等。其中 HE 染色可观察到斑块纤维帽变薄以及坏死核心形成,少数典型切片可见斑块内出血

(41.68%); Masson 染色和 PSR 染色(29.16%)显示斑块的胶原纤维含量减少;IHC 染色和 IF 染色(45.84%)主要用于标记增多的炎症细胞及减少的平滑肌细胞,并检测新生血管形成相关指标。亦可以通过计算斑块易损指数评价 VP(29.16%)。彩色多普勒超声、心脏灌注显影及体内活细胞示踪技术可用于 VP 的活体探测。以上方法中病理染色应用最多,占 83.32%,而 VP 活体探测为 16.68%。

具体见表3。

表3. 动脉粥样硬化 VP 的评价方法

Table 3. Evaluation methods of atherosclerotic VP

| 评价方法                                                                                                                                                               | 占比/%  | 检测手段及指标                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 坏死核心区:每条动脉至少有3个30 μm 间隔的坏死核,含坏死碎片和胆固醇结晶的低细胞斑块空腔;急性斑块破裂:纤维帽可见缺损,斑块内出血 <sup>[21]</sup>                                                                               | 4.17  | HE 染色:坏死核心形成、纤维帽变薄以及斑块内出血;IF 染色:CD31 蛋白表达升高,提示新生血管形成                                     |
| 薄纤维帽厚度<3 层细胞;较大脂质核心>该部分斑块面积40%;斑块破裂:纤维帽破裂,或有斑块内出血 <sup>[22]</sup>                                                                                                  | 4.17  | HE 染色:纤维帽变薄及斑块内出血;油红 O 染色:大量脂质沉积;IHC 染色:炎症细胞浸润                                           |
| 坏死核心区定义为没有 HE 染色的区域,或显示斑块内大量新生血管形成或伴见出血 <sup>[23]</sup>                                                                                                            | 16.67 | HE 染色:斑块内坏死核心形成,或斑块内出血                                                                   |
| 易损指数=(巨噬细胞染色%+脂质染色%)/(平滑肌细胞染色%+胶原蛋白染色%) <sup>[24-25]</sup>                                                                                                         | 29.16 | 油红 O 染色:斑块内脂质沉积;PSR、Masson 染色:胶原纤维减少;IHC 染色:巨噬细胞标记蛋白升高,平滑肌细胞标记蛋白降低,或新生血管标记蛋白增多           |
| 超声检测内膜中膜厚度≥1.5 mm,表明 As 斑块形成;根据斑块大小、形状和回声分为硬斑块、平斑块、软斑块、溃疡斑块和混合斑块,将 VP 定义为软斑块、溃疡斑块和混合斑块                                                                             | 4.17  | 斑块严重程度:单侧颈动脉斑块<2.0 mm 为 I 级,单侧颈动脉斑块≥2.0 mm 为 II 级,双侧颈动脉斑块≥2.0 mm 为 III 级 <sup>[26]</sup> |
| 斑块破裂定义为纤维帽破裂,斑块内出血定义为斑块内血液产物的沉积 <sup>[6]</sup>                                                                                                                     | 4.17  | HE 染色:斑块破裂或斑块内出血                                                                         |
| 斑块内出血:纤维帽破损或新生血管破裂导致血液外溢;斑块破坏:纤维帽结构缺陷,使坏死核心暴露于血液中;As 血栓:斑块破裂,并伴有血小板和纤维蛋白富集的血栓 <sup>[27]</sup>                                                                      | 8.33  | HE 染色:纤维帽结构缺陷,以及斑块内出血或血栓形成                                                               |
| 虚拟血管内超声组织学(virtual histology intravascular ultrasound, VH-IVUS)分析,将坏死核心定义为缺乏胶原蛋白、含有坏死碎片和胆固醇结晶的低细胞斑块空腔 <sup>[10]</sup>                                              | 4.17  | VH-IVUS 观察下 VP 的纤维组织减少,纤维脂肪组织、坏死组织和钙化组织增多                                                |
| Cu-64 标记的双乙酰双 N <sup>4</sup> -甲基硫代氨基脲( <sup>64</sup> Cu-ATSM),靶向示踪斑块内堆积的炎症细胞 <sup>[28]</sup>                                                                       | 8.34  | 静脉注射 <sup>64</sup> Cu-ATSM 后行正电子发射计算机断层显像,实验证实其标记区域与 CD68 抗体荧光所在部位重合                     |
| 将五羟色胺酸(5-HT)和 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 与花青素 7-N-羟基琥珀酰亚胺酯结合成新型多模态成像剂 5-HT-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cy7 纳米颗粒(5HFeCNP),靶向示踪髓过氧化物酶,以预测 VP <sup>[29]</sup> | 4.17  | 心脏灌注显影或冠状动脉造影;5HFeCNP 标记后,对比度显著增强的斑块与病理学巨噬细胞浸润、新生血管形成和钙化灶高度吻合                            |
| 根据美国心脏协会的分类:无斑块、内膜增厚、内膜黄瘤、病理性内膜增厚和纤维帽状 As <sup>[8]</sup>                                                                                                           | 4.17  | 油红 O 染色:脂质沉积;IHC 染色:CD68 蛋白表达增多;弹性纤维染色:坏死核心为紫色                                           |
| 斑块内出现泡沫细胞,斑块内出血,新生血管形成,同时见管腔明显狭窄 <sup>[30]</sup>                                                                                                                   | 4.17  | HE 染色:斑块内呈气球样变,斑块内出血;IHC 染色:抗 CD31 抗体阳性                                                  |
| 周细胞不足可致血管破裂形成 VP,新生血管周细胞覆盖率(%)=周细胞/内皮细胞×100% <sup>[31]</sup>                                                                                                       | 4.17  | IHC 染色:CD31 抗体标记内皮细胞,神经元-神经胶质抗原 2 标记周细胞;周细胞覆盖率越低斑块易损性越高                                  |

## 2.4 其他检测指标

2.4.1 IHC 染色和 IF 染色 在 HFCD 饲养+颈外动脉外置管模型中,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)如 MMP-2、MMP-8、MMP-9 的含量明显升高<sup>[18,32]</sup>;在单侧颈动脉/肾动脉结扎模型中,单核细胞标记蛋白 CD68、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞

介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、CD11b、Mac-3、CD204、F4/80、趋化因子 2、髓过氧化物酶等炎症相关蛋白含量升高<sup>[22,24,33-35]</sup>;HFCD 饲养+球囊拉伤+化学诱导模型中,细胞黏附分子,包括细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1,

VCAM-1) 含量升高<sup>[11]</sup>, Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 如 TLR2、TLR4 亦有所增加<sup>[36]</sup>, 进而促进斑块中单核细胞浸润与胆固醇堆积; HFCD 饲养模型中, 帮助排除斑块中胆固醇的清道夫受体减少<sup>[37]</sup>, 同时凋亡相关蛋白如天冬氨酸蛋白水解酶升高<sup>[38]</sup>。

**2.4.2 Western blot 检测** 同 IHC 染色相似, Western blot 检测指标主要包括炎症因子如 CD68、MCP-1、细胞黏附分子 VCAM-1、ICAM-1 及 MMP-3、MMP-9 等<sup>[39]</sup>。

**2.4.3 酶联免疫吸附法检测** 在 HFCD 饲养+物理损伤+免疫诱导模型中, 过氧化物如活性氧、丙二醛含量升高, 抗氧化物如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽含量降低<sup>[15]</sup>, 加重了氧化应激反应, 促进斑块进展。各个模型检测中炎症相关指标, 如 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、CD86、巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$  均有所升高<sup>[6]</sup>, 同时血脂指标如甘油三酯、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 含量增加, 高密度脂蛋白减少, MMP-8、MMP-9 含量升高<sup>[40]</sup>。

**2.4.4 实时荧光定量 PCR** HFCD 饲养模型中, 与空白组比较, 模型组 Dll4、Notch1、Hey1 表达水平降低, 血管内皮生长因子表达升高, 表明外膜滋养血管的周细胞减少, 斑块稳定性下降<sup>[41]</sup>。

**2.4.5 其他检测** HFCD 饲养+颈动脉结扎模型中, 电镜观察到兔动脉内皮细胞受损、凋亡, 主要表现为高剪切应力部位 (动脉部分结扎、套管部位) 内皮细胞破损, 高剪切应力区凋亡的血管平滑肌细胞核固缩以及细胞质减少, 而固缩的染色质在核膜附近形成新月体是细胞凋亡早期的特征<sup>[13]</sup>。HFCD 饲养+颈动脉外置管模型中, 斑块部位普鲁士蓝染色呈阳性, 提示有斑块内出血<sup>[42]</sup>。HFCD 饲养+球囊拉伤模型中, 可观察到实验动物精神状态较差, 体质量增长显著, 目光呆滞<sup>[36]</sup>。另外应用先进仪器、方法, 如使用流式细胞仪检测血液中氧化型低密度脂蛋白含量<sup>[37]</sup>, 全自动生化分析仪检测 TC、LDL<sup>[24]</sup>, 活体荧光标记斑块内 MMP-2、MMP-9<sup>[43]</sup>, 为科学研究提供了更多选择。

### 3 讨论

急性心血管事件常由 VP 破裂形成血栓致使远端血流停止而引发, 是世界范围内导致死亡的主要原因之一<sup>[44]</sup>, 因此对于 VP 的研究越发重视。目前对于 As 斑块的形成机制尚未完全阐明, 现有假说主

要包括脂质浸润学说、血栓形成学说以及损伤-反应学说等<sup>[45-47]</sup>, VP 的形成表明斑块由稳态变为失稳态, 其发展过程十分复杂。

本文对近 5 年 VP 的动物造模及评价方法进行汇总和统计, 发现 VP 造模理念多以脂质浸润学说为基础, 常选用脂质敏感动物, 如 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠、新西兰大白兔、小型猪等, 予以 HFCD 饲养, 促进内皮下脂质沉积, 造模后可见斑块内坏死核心形成、纤维帽变薄。在此基础上, 或结合机械损伤、低温损伤, 破坏内皮细胞的连续性, 使血脂沉积、血小板黏附并释放多种生长因子, 激活内皮细胞和动脉中层的平滑肌细胞, 使之大量增殖, 加速斑块的进展, 此种模型病理学检测可观察到内膜明显增厚并形成隆起的斑块, 其内纤维含量明显减少, 纤维帽变薄且欠完整, 帽下可见大量浸润的巨噬细胞和泡沫细胞, 中膜平滑肌纤维排列明显紊乱; 或结合化学方法触发 VP, 进展中的斑块在成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等的作用下可生成较多新生血管, 这些微血管缺少足够的周细胞支撑, 脆性较大且易于破裂出血, 典型表现为镜下可见斑块纤维帽破裂、斑块内出血, 甚至有血栓形成; 或结合颈动脉结扎/动脉外置管, 改变管腔内局部血流动力学, 在持续高应力作用下, 斑块完整性被破坏, 造成纤维帽变薄、斑块破裂出血。此外, 脂多糖诱导可见斑块内大量炎症细胞聚集, 增加了斑块的不稳定性。

本研究中涉及多种 VP 评价方法, 以病理染色最为多见, 结合检测增加斑块破裂风险的相关蛋白, 如能够降解细胞基质的 MMP, 促进巨噬细胞内脂质蓄积的 TLR, 以及增加单核细胞与内皮结合的细胞黏附分子, 但以上方法需在动物取材后进行, 因此研究者常通过延长饲养时间以期增加模型成功率, 一定程度上增加了时间成本及经济成本。而同位素标记的 PET-CT 探针可以很好的改善这一难题, 如叶酸受体靶向的钆金纳米探针、<sup>18</sup>F 氟化钠 (<sup>18</sup>F-NaF) 和 <sup>18</sup>F-氟脱氧葡萄糖 (<sup>18</sup>F-FDG) 等<sup>[48]</sup>, 可用于 As 斑块的体内识别, 但因其成本较高, 应用并不广泛。

综上所述, VP 动物模型目前无标准构建方法, 而采用 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 HFCD 饲养法、ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 HFCD 饲养联合动脉结扎/动脉外置管法、新西兰大白兔 HFCD 饲养联合动脉内皮球囊拉伤法具有很好的可重复性, 造模周期一般为 12~18 周左右。鉴于 VP 造模周期较长, 活体探测费用高昂, 若能进一步优化造模方法, 缩短造模周期, 研发高性价比的活体探测方法, 将极大提高 As 疾病基础研究的效率。

## [参考文献]

- [1] CHOI S W, KIM H, KIM I C, et al. Implication of ultrasound contrast-enhancement of carotid plaques in prevalence of acute coronary syndrome and occurrence of cardiovascular outcomes[J]. *J Clin Ultrasound*, 2018, 46(7): 461-466.
- [2] PERROTTA P, EMINI V B, VAN DER V B, et al. Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 72-78.
- [3] SHEN L, SUN Z, CHU S, et al. Xuezhikang, an extract from red yeast rice, attenuates vulnerable plaque progression by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and inflammation[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188841.
- [4] MAWHIN M A, TILLY P, ZIRKA G, et al. Neutrophils recruited by leukotriene B<sub>4</sub> induce features of plaque destabilization during endotoxaemia[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(12): 1656-1666.
- [5] HOU Y, LIN X, LEI Z, et al. Sevoflurane prevents vulnerable plaque disruption in apolipoprotein E-knockout mice by increasing collagen deposition and inhibiting inflammation[J]. *Br J Anaesth*, 2020, 125(6): 1034-1044.
- [6] DING S, LIN N, SHENG X, et al. Melatonin stabilizes rupture-prone vulnerable plaques via regulating macrophage polarization in a nuclear circadian receptor ROR $\alpha$ -dependent manner[J]. *J Pineal Res*, 2019, 67(2): e12581.
- [7] DIEHL P, NIENABER F, ZALDIVIA M T K, et al. Lysophosphatidylcholine is a major component of platelet microvesicles promoting platelet activation and reporting atherosclerotic plaque instability[J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(8): 1295-1310.
- [8] HOOGENDOORN A, KOK A M, HARTMAN E M J, et al. Multi-directional wall shear stress promotes advanced coronary plaque development; comparing five shear stress metrics[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(6): 1136-1146.
- [9] HAJJARIAN Z, TOUSSAINT J D, GUERRERO J L, et al. *In vivo* mechanical characterization of coronary atherosclerotic plaques in living swine using intravascular laser speckle imaging[J]. *Biomed Opt Express*, 2021, 12(4): 2064-2078.
- [10] LIN Q F, LUO Y K, ZHAO Z W, et al. Atherosclerotic plaque identification by virtual histology intravascular ultrasound in a rabbit abdominal aorta model of vulnerable plaque[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2013, 238(11): 1223-1232.
- [11] CHEN L, LI X, LI C, et al. Chinese herbal cardiogenic pill stabilizes vulnerable plaques in rabbits by decreasing the expression of adhesion molecules[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(3): 215-222.
- [12] 李枚娟, 林杉懿, 王预立, 等. 应用液氮损伤建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型的研究[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(3): 343-345.  
LI M J, LIN S Y, WANG Y L, et al. Establishment of rabbit model of atherosclerosis vulnerable plaques by using liquid nitrogen injury[J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med*, 2020, 12(3): 343-345.
- [13] NIE X, LAFOREST R, ELVINGTON A, et al. PET/MRI of hypoxic atherosclerosis using <sup>64</sup>Cu-ATSM in a rabbit model[J]. *J Nucl Med*, 2016, 57(12): 2006-2011.
- [14] QIU J, LEI D, HU J, et al. Effect of intraplaque angiogenesis to atherosclerotic rupture-prone plaque induced by high shear stress in rabbit model[J]. *Regen Biomater*, 2017, 4(4): 215-222.
- [15] 魏刚, 高尚远, 张英, 等. 免疫刺激协同液氮冷冻损伤血管构建动脉粥样硬化易损斑块大鼠模型[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35): 5656-5661.  
WEI G, GAO S Y, ZHANG Y, et al. Immunostimulation combined with liquid nitrogen freezing to construct a rat model of atherosclerotic vulnerable plaque[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(35): 5656-5661.
- [16] WILCK N, FECHNER M, DAN C, et al. The effect of low-dose proteasome inhibition on pre-existing atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 781.
- [17] SENEVIRATNE A N, EDSFELDT A, COLE J E, et al. Interferon regulatory factor 5 controls necrotic core formation in atherosclerotic lesions by impairing efferocytosis[J]. *Circulation*, 2017, 136(12): 1140-1154.
- [18] SANTIAGO-RABER M L, MONTECUCCO F, VUILLEUMIER N, et al. Atherosclerotic plaque vulnerability is increased in mouse model of lupus[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18324.
- [19] 周心涛, 赵黎丙, 闵新文, 等. CTGF 缺失表达抑制动脉粥样硬化易损斑块的形成[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(9): 1872-1877.  
ZHOU X T, ZHAO L B, MIN X W, et al. Lack of CTGF expression inhibits atherosclerotic vulnerable plaque progression[J]. *J Clin Pathol Res*, 2019, 39(9): 1872-1877.
- [20] NEVADO R M, HAMCZYK M R, GONZALO P, et al. Premature vascular aging with features of plaque vulnerability in an atheroprone mouse model of hutchinson-gilford progeria syndrome with LDLR deficiency[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2252.
- [21] WANG X, FU Y, XIE Z, et al. Establishment of a novel mouse model for atherosclerotic vulnerable plaque[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 642751.
- [22] NIE P, YANG F, WAN F, et al. Analysis of microRNAs associated with carotid atherosclerotic plaque rupture with thrombosis[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 599350.
- [23] SHEN L, SUN Z, NIE P, et al. Sulindac-derived retinoid X receptor- $\alpha$  modulator attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(14): 2559-2572.
- [24] LI B, JIAO Y, FU C, et al. Contralateral artery enlargement predicts carotid plaque progression based on machine learning algorithm models in ApoE mice[J]. *Biomed Eng Online*, 2016, 15(Suppl 2): 146.
- [25] MAO Y, LIU X, SONG Y, et al. VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but not PDGF-BB/PDGF- $\beta$  play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201395.
- [26] TANG X. Analysis of interleukin-17 and interleukin-18 levels in animal models of atherosclerosis[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 517-522.
- [27] LIU X, MA J, MA L, et al. Overexpression of tissue factor induced atherothrombosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice via both en-

- hanced plaque thrombogenicity and plaque instability[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 127: 1-10.
- [28] NIE X, RANDOLPH G J, ELVINGTON A, et al. Imaging of hypoxia in mouse atherosclerotic plaques with  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM[J]. Nucl Med Biol, 2016, 43(9): 534-542.
- [29] TONG W, HUI H, SHANG W, et al. Highly sensitive magnetic particle imaging of vulnerable atherosclerotic plaque with active myeloperoxidase-targeted nanoparticles[J]. Theranostics, 2021, 11(2): 506-521.
- [30] SUN B, ZHAO H, LI X, et al. Angiotensin II-accelerated vulnerability of carotid plaque in a cholesterol-fed rabbit model-assessed with magnetic resonance imaging comparing to histopathology[J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(3): 495-503.
- [31] MAO Y, LIU X Q, SONG Y, et al. Fibroblast growth factor-2/platelet-derived growth factor enhances atherosclerotic plaque stability[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 1128-1140.
- [32] VENDROV A E, STEVENSON M D, ALAHARI S, et al. Attenuated superoxide dismutase 2 activity induces atherosclerotic plaque instability during aging in hyperlipidemic mice[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(11): e006775.
- [33] NISHINO T, HORIE T, BABA O, et al. SREBF1/microRNA-33b axis exhibits potent effect on unstable atherosclerotic plaque formation *in vivo*[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(10): 2460-2473.
- [34] WANG L, CHEN Q, KE D, et al. Ghrelin inhibits atherosclerotic plaque angiogenesis and promotes plaque stability in a rabbit atherosclerotic model[J]. Peptides, 2017, 90: 17-26.
- [35] YE M, ZHOU J, ZHONG Y, et al. SR-A-targeted phase-transition nanoparticles for the detection and treatment of atherosclerotic vulnerable plaques[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(10): 9702-9715.
- [36] 易丽贞, 杨俊, 谢涛, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化易损斑块兔腹主动脉 TLR2、TLR4、NF- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(3): 364-369.
- YI L Z, YANG J, XIE T, et al. Effects of herbal cake separated moxibustion on expression of abdominal aorta of TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B in rabbits with vulnerable atherosclerotic plaque[J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(3): 364-369.
- [37] WANG J, WU M, CHANG J, et al. Scavenger receptor-AI-targeted ultrasmall gold nanoclusters facilitate *in vivo* MR and *ex vivo* fluorescence dual-modality visualization of vulnerable atherosclerotic plaques[J]. Nanomedicine, 2019, 19: 81-94.
- [38] 林海丹, 陈铭泰, 庄震坤, 等. 温肾化痰方对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化易损斑块模型 Orai1、Caspase、Bax、Bcl-2 等基因及其相关蛋白表达的影响[J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(1): 8-12.
- LIN H D, CHEN M T, ZHUANG Z K, et al. Effect of Wenshen Huatan Decoction on the expression of Orai1, Caspase, Bax and Bcl-2 genes and related proteins in atherosclerotic plaque model of ApoE knockout mice[J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2019, 42(1): 8-12.
- [39] ZHAO D, TONG L, ZHANG L, et al. Tanshinone II A stabilizes vulnerable plaques by suppressing RAGE signaling and NF- $\kappa$ B activation in apolipoprotein-E-deficient mice[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 4983-4990.
- [40] GONG M, ZHUO X, MA A. STAT6 upregulation promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2017, 23: 240-249.
- [41] 漆仲文, 李萌, 朱科, 等. 四妙勇安汤促进滋养血管成熟化稳定动脉粥样硬化易损斑块机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 1998-2001.
- QI Z W, LI M, ZHU K, et al. Research on the effect of Simiao Yong'an Decoction on the maturation of vasa vasorum to stabilizing atherosclerotic vulnerable plaque[J]. CJTCMP, 2019, 34(5): 1998-2001.
- [42] CHAN J M S, MONACO C, WYLEZINSKA-ARRIDGE M, et al. Imaging vulnerable plaques by targeting inflammation in atherosclerosis using fluorescent-labeled dual-ligand microparticles of iron oxide and magnetic resonance imaging[J]. J Vasc Surg, 2018, 67(5): 1571-1583.
- [43] SEIFERT R, KUHLMANN M T, ELIGEHAUSEN S, et al. Molecular imaging of MMP activity discriminates unstable from stable plaque phenotypes in shear-stress induced murine atherosclerosis[J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0204305.
- [44] LIBBY P, RIDKER P M, HANSSON G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. Nature, 2011, 473(7347): 317-325.
- [45] SUN C, HE B, SUN M, et al. Yes-associated protein in atherosclerosis and related complications: a potential therapeutic target that requires further exploration[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 704208.
- [46] 陆闽侨, 李碧澄, 田野, 等. 血细胞对动脉粥样硬化出血斑块炎症环境及转归的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(9): 819-824.
- LU M Q, LI B C, TIAN Y, et al. Impact of blood cells on the inflammatory environment and outcome of atherosclerotic hemorrhagic plaques[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(9): 819-824.
- [47] 李兆钰, 马度芳, 王永成, 等. 免疫细胞亚群平衡在动脉粥样硬化中的机制与中医药调节作用的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(9): 737-741.
- LI Z Y, MA D F, WANG Y C, et al. Research progress on the mechanism of immune cell subsets balance in atherosclerosis and the regulatory role of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(9): 737-741.
- [48] ALIE N, ELDIB M, FAYAD Z A, et al. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease: PET/CT for the evaluation of atherosclerosis and inflammation[J]. Clin Med Insights Cardiol, 2015, 8(Suppl 3): 13-21.

(此文编辑 曾学清)