

外膜损伤致动脉粥样硬化动物模型的建立与评价

王爱迪¹, 仲爱芹¹, 张军平^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

[摘要] 对外膜损伤致动脉粥样硬化动物模型的建立与评价进行综述。总结近年来国内外对外膜损伤致动脉粥样硬化动物模型的研究, 在种属选择、模型制作中的进展情况, 并将各自模型的优缺点进行比较, 简述模型评价的依据。结果显示本模型的常用实验动物种属为大鼠、小鼠、兔和小型猪等, 模型制作方法可分为外膜剥离损伤、慢性炎症刺激和间接刺激。不同的模型动物种属和制作方法各有其特点, 应根据研究的侧重点不同而进行选择, 通过本文的介绍和总结, 能够对合理选择外膜损伤致动脉粥样硬化动物模型提供科学参考依据。

[关键词] 动脉粥样硬化; 外膜; 动物模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0239-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140239

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1144.008.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:44

Establishment and Evaluation of Adventitia Damage Induced Atherosclerosis Animal Models

WANG Ai-di¹, ZHONG Ai-qin¹, ZHANG Jun-ping^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China;
2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] To review the establishment and evaluation of adventitia damage induced atherosclerosis animal models. Summarized studies of the adventitia damage induced atherosclerosis animal models at home and abroad in recent years. Described the progress of animal species selecting and models establishment and compared the advantages and disadvantages of each model. The common species for this model are rats, mice, rabbits and small pig, etc. Model making method can be divided into adventitia stripping injury, chronic inflammatory stimulation and indirect stimulation. Different models of animal species and production methods have their characteristics, we should choose them according to study needs. Through the introduce in this article, we can provide scientific reference basis for choosing appropriate models of adventitia damage induced atherosclerosis animal models.

[Key words] atherosclerosis; adventitia; animal model

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 作为多种心脑血管疾病的基础病变, 其始动因素、病理过程、级联反应等一直都是研究的热点。以往研究多认为内膜是 AS 病变的主要病发场所, 然而随着研究深入, 越来越多的证据^[1]表明外膜功能对于 AS 的发生发展也起着重要影响。建立动物模型是进

行医学试验和假说的基础, 具有不可替代的重要意义, 笔者在此对外膜致 AS 的动物模型展开简要评述。

1 模型动物种属选择

AS 动物模型的实验对象选择一直是具有争议和讨论的话题, 研究者极力寻找与人类 AS 病变最为相似且易于复制动物模型, 故本文筛选了部分本模型常用且相对成熟的实验动物种属进行对比与评价。

1.1 大鼠模型 由于饲养方便、成本低廉, 且抵抗力强、死亡率低, 大鼠被广泛应用于动物实验中。随着免疫检测技术的发展, 实验大鼠因其丰富的抗体种类优势愈加明显, 较为常用的品系有: Wistar 大鼠和 SD 大鼠。但是由于大鼠先天胆囊缺失, 对脂质和胆固醇吸收不充分, 单纯的高脂饲料食饵法很难使大鼠形成 AS 病变^[2]。故根据 AS 发生的病程特

[收稿日期] 20130731(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173244)

[第一作者] 王爱迪, 硕士在读, 从事心血管疾病研究, E-mail: wangadtj@126.com

[通讯作者] * 张军平, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 从事心血管疾病的科研与临床工作, Tel: 022-27432016, E-mail: tjzhtcm@163.com

点人工培育的具有特定病理特性和疾病倾向的自然缺陷大鼠,近年来不断受到研究者的重视与青睐。如自发高血压症大鼠(spontaneous hypertensive rats, SHR):因其可出现自发性血压持续升高,且病态表现与人类原发性高血压极为相似,受到研究 AS 高血压风险因素相关研究领域的喜爱。动脉脂肪沉着易发症大鼠(arteriolipidosis-prone rats, ALR):该鼠属于 SHR 培育的亚型,在自发高血压同时伴有动脉脂肪沉积,经高脂饲料喂养可短时间内发生高脂血症,适合进行 AS 研究。正常血压性动脉粥样硬化症大鼠(normotensive atherogenic rats, NAR):系从 ALR 中反复杂交选择培养而成的正常血压性动脉硬化症大鼠,也被作为 AS 的研究对象^[3]。人工培育的自然缺陷动物虽然实验效果好,但由于成本偏高,很多品种在国内不易获得,故国内开展并不十分普遍。

1.2 小鼠模型 小鼠的基因图谱已全部获得,故利用转基因和基因敲除技术,能够使小鼠获得 AS 倾向。在基因层面上对小鼠进行干预,进而对一些特定的基因和蛋白表达进行研究,近年来得到心血管疾病研究领域的广泛应用。比较常用的转基因小鼠品种有:载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因缺陷小鼠、低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因缺陷小鼠、人载脂蛋白 B100 (apolipoprotein B100, ApoB100) 转基因小鼠等。此 3 种小鼠的 AS 病变出现早而广泛,整个动脉树均可发生病变,且与人类 AS 病理表现相似。故转基因小鼠很快成为目前 AS 研究中非常重要的动物模型。但就本模型来看,由于小鼠的体型过小,给造模手术带来较大难度,且转基因小鼠免疫力差、体质弱,手术存活率低,故并非本模型的最优选。

1.3 兔模型 兔是传统建立高脂血症和 AS 模型最常用的动物,常用实验品系有:日本大耳白兔和新西兰大白兔。兔作为 AS 模型动物的优势与其生理的脂蛋白构成和代谢特点是密不可分的:由于兔为食草动物,缺乏肝脂酶,肝脏 LDL 受体的表达弱,清除血脂能力差,而对外源性胆固醇的吸收率高,约为 75%~90%^[4]。所以,使用高脂饲料食饵法可在短时间内使家兔形成高胆固醇血症,诱发 AS 病变并产生 AS 斑块。且兔的脂类代谢特点与人类较为相似,如兔血浆中脂蛋白成分以 LDL 为主,其斑块构成成分与人类 AS 斑块的病理特点相符^[5];兔血浆中含有丰富的胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 其对血脂调节有重要影响^[6],这有利于进行调节血脂相关方面的研究。加之兔 AS 病变主要分布在主动脉弓、胸主动脉和腹主动脉等大动脉的分叉处^[7],取材方便。兔模型对 AS 易感,病理特点与人类相似等多种有利因素使之成为了理想动物实验模型对象。但是兔发生 AS 病变必需使血脂达到极高的水平,这与人的 AS 形成过程是不相符的,且单纯食饵法导致血脂过高可使家兔中毒,导致抵抗力减低,容易继发感染而死亡。故常在食饵法的基础上,加上局部损伤和免疫刺激的方法联合干预,通过复合损伤造模^[8]使 AS 形成过程与人类更为接近,更符合实验需求。

1.4 小型猪模型 猪与人类在生理、生化和解剖结构方面有诸多共性,其血浆脂蛋白的生化性质,LDL 及载脂蛋白结构等也与人类相似。由于这种相似性,小型猪高脂饲料喂养法复制 AS 的效果良好,而且其病变的分布部位和病理特征均与人相似。国际较为成熟的试验用小型猪品系有 Landrace, Yuctan, Hanfold, Nebraska, Yorkshire 等^[4],目前国内虽已开发了一些品种的小型猪,但均不甚成熟。且因其体积大,饲养场地受限,成本较高,故国内开展较少。

2 外膜损伤造模方法

为进一步研究外膜在 AS 过程中扮演的角色,研究者尝试通过不同方法建立外膜损伤诱发 AS 发生的动物模型,从血管壁完整性到局部炎症反应等不同角度来探讨外膜在 AS 病变过程中的作用。

2.1 外膜剥离损伤 用物理或化学的方法将外膜从血管壁上完全剥离,进而观察和研究血管外膜对于动脉粥样硬化形成的作用和机制。

2.1.1 外科手术锐性剥离法 Barker 等^[9]首先尝试建立外膜损伤致动脉粥样硬化的动物模型。选用新西兰大白兔进行高脂血症造模后进行手术,用手术刀将左侧颈动脉外膜和周围脂肪结缔组织刮净(约 3 cm)。术后 7 d 发现手术组的血管损伤部位内膜增厚,并在 14 d 达到高峰。后期随着时间推移,内膜的损伤逐渐消退,但在 42 d(实验结束)对比假手术组仍存在差异。该造模方法造成的外膜损伤彻底而明确,但是对手术技术要求高,需要显微外科设备,且手术过程容易对中膜和内膜造成牵拉扯等机械损伤,导致血管破裂出血或形成动脉瘤。故这种锐性剥离血管外膜的方法并没有得到广泛使用。

2.1.2 胰酶消化法联合机械剥离法 由于物理损伤外膜的方法对血管中膜和内膜影响较大,故国内一些学者采用酶消化和机械联合法剥离外膜,尝试在损伤外膜的同时尽量减少对中膜和内膜的刺激。选用雄性新西兰大白兔,将浸有 2 g·L⁻¹ 的 II 型胶原酶纱布包裹一侧颈总动脉,30 min 后终止消化,用眼科镊钝性剥离掉外膜白色疏松组织。在未结合高脂饲料喂养的情况下,仍可见到相应内膜出现增生性病变^[10]。结果证实:本法对外膜的损伤可以成功造成内膜增生性病变^[11]。胰酶消化法相对于锐性剥离的造模方法技术难度降低,而且对血管壁的损伤程度更易把控,对中膜和内膜的影响相对较小,受到相关领域研究者的欢迎^[12]。

2.1.3 剥离外膜联合药物凝胶包裹法 在外膜剥离后可加用一些药物对血管进行干预,以进一步研究药物和调节因子表达对于 AS 形成的作用。选用新西兰大白兔利用高质饮食和剥离外膜法联合造成 AS 病变,将 1 mL 1 μmol·L⁻¹ 的甲状旁腺激素相关蛋白 [PTHrP(1-34)] 凝胶固定于颈动脉周围,使 PTHrP(1-34) 可从凝胶中缓慢持续释放。术后 4 周即观察到损伤处颈动脉内膜增生明显,动脉管腔不规则;有散在脂质斑块突起,内含大量泡沫细胞;中膜平滑肌细胞排列紊乱,结缔组织增生明显;动脉 IMR 显著高于对照侧^[13]。去除外膜后使用药物或调节因子等对血管进行干预,通过凝胶

模拟药物在中膜缓慢释放,使之直接作用于血管中膜平滑肌细胞上,直接的干预平滑肌细胞,以研究药物或调节因子对平滑肌细胞增生迁移等影响。

血管外膜剥离法对外膜造成的损伤明确而彻底,实验研究证明:这种动物模型可形成典型的 AS 病变,适用于研究外膜在 AS 形成过程中的整体作用。但临床上 AS 形成是一个慢性的过程,将外膜完全剥离的急性损伤和人类 AS 形成的慢性过程不甚相符。由于外膜已经全部被剥离掉,对于外膜慢性损伤时发生的成纤维细胞增殖和迁移等病理变化观察效果欠佳。故另有研究者采取对外膜进行慢性刺激的方法进行研究。

2.2 慢性炎症刺激 慢性刺激法即对动脉外膜进行物理或化学的慢性刺激,也可同时在外膜局部加用药物进行干预,从而研究细胞分子或活性物质等对 AS 形成过程的影响。

2.2.1 硅胶环包裹法 选用 12 周龄的 Wistar 大鼠,手术暴露颈动脉(约 15~18 mm),用内径 1.5 mm,长 12 mm 的硅胶管包裹一侧颈动脉。术后至 3 d 即观察到损伤处血管管腔缩小,内皮增厚,血管外膜炎性细胞浸润。1 周时管腔明显缩小,内皮细胞变形并突向管腔,血管壁增厚,外膜大量炎性细胞浸润及滋养血管增生。2 周后,出现弥漫性内膜增生,中膜平滑肌及单核细胞浸润,而外膜炎症较 1 周时减轻^[14]。亦有研究者选用雄性新西兰大白兔(2.3~2.5 kg),手术暴露颈动脉后用生物硅胶环(长约 25 mm)包裹颈动脉,术后 6 h 即发现内膜下白细胞聚集和内皮细胞水肿^[15]。

本法主要利用物理刺激,造成血管外膜的无菌性炎症,使模型动物出现了具有 AS 早期特征的新生内膜病损。但需注意的是套管的内径应稍大于血管的外径,保证套管和血管外壁之间留有一定缝隙,以免血管壁受压变形使血液动力学发生改变。

2.2.2 特殊硅胶环包裹法 有研究者选择特殊造型的硅胶环,通过对血管外膜造成物理刺激和血管壁剪切应力改变联合干预,尝试更真实的模拟 AS 形成的体内环境。Antti Kivelä 等^[16]选用新西兰大白兔,在高血脂症模型的基础上,分别在左侧颈动脉和右侧股动脉上进行硅胶管包裹术。所选用的“颗粒硅胶管”内含有小颗粒凸起,可对血管壁造成不对称的压力刺激,使血管弯曲折叠,改变血流方向。结果显示:术后 8 周,超声检查和病理均显示损伤血管壁出现了典型的内膜和外膜增生,并可见到大量巨噬细胞浸润。本法利用 AS 的形成部位往往是血管分叉处,即血流剪切应力改变和形成湍流的部位,使用特殊造型的硅胶环,联合外膜损伤,这种内外膜复合损伤的方法能够更好的模拟真实的 AS 形成过程,但硅胶环制作难度大,成本较高。

2.2.3 硅胶管包裹联合药物刺激法 选用雄性新西兰大白兔,手术分离出长约 1.5 cm 的腹主动脉。硅胶管(直径:6~8 mm,长 1.5 cm)剖开,在其内侧黏附含有 5 mg·L⁻¹ 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)棉线。将硅胶管套在游离出来的腹主动脉壁上并进行固定,继以普通饲料喂养。结果发现,损伤段血管 1 周内即开始有内膜增生、炎性细胞浸润等

病理改变;第 2 周发现血管壁外膜、中膜和内膜均增厚,其中内外、膜较明显;4 周时血管呈阴性重构改变,以管腔狭窄和管壁增厚为主要特征。血管各层均有大量的炎性细胞浸润,但无明显粥样斑块^[17]。本实验将硅胶管包裹法和局部药物刺激相结合,构建了血管外膜炎性增生的动物模型。此种模型的出模时间短,4 周即可见到明显的病理变化,可用于研究在炎症状态下刺激因素对外膜的影响,但在给药剂量的质控方面需严格把控。

2.2.4 药棉浸润法 Hiroaki Shimokawa 等^[18],选用雄性 Yorkshire 猪(2~4 月,20~30 kg),手术分离冠状动脉,将浸有 IL- β 的纱条包裹于血管表面。术后 4 周,实验组与对照组相比,实验组的纱条包裹部位发生了明显的狭窄和内膜增生性病变,与对照组相比发生冠脉痉挛的机会更多。本法单纯使用药物干预血管外膜,研究其对动脉外膜和 AS 形成的影响。

2.3 间接刺激 研究者采用间接刺激法,如阻断外膜滋养血管,从而造成外膜缺血缺氧的病理状态进行研究。Barker S G 等^[19]选用雌性 Yucatan 小型猪(35.6~44.2 kg),游离出股动脉,对其外膜的血管滋养管进行结扎,3 周后结扎滋养管分布的血管内膜处出现了明显的增生性病变。因血管滋养管形态细小,手术难度大,故本法多用于大型动物模型中。

3 外膜损伤致 AS 模型评价

通过损伤外膜法建立 AS 模型后,对模型的评价就显得尤为重要。目前主要采用以下几个方面进行评价:①病理学观察:进行 HE 染色、苏丹 III 染色后,可通过图像采集系统对本标进行参数测量,如:血管内膜厚度(IT)、中膜厚度(MT)及内膜中膜厚度比(IT/MT);斑块部位外弹性膜面积(EEM-A);斑块部位内弹性膜面积(IEL-A)血管腔面积(LA);斑块部位血管腔内的面积;斑块面积(PA)等^[20]。②影像学检查:利用血管内超声技术(IVUSE)能够识别早期斑块,并预判纤维帽状态和斑块稳定程度^[21]。使用血流仪,将其探头黏附于待测血管表面,可以测量单位血流量^[13]。③生化指标检测:血清脂质测定如:总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)等,以及血浆同型半胱氨酸(HHey)均可作为模型成功的辅助指标^[20];而超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、斑块中核因子(NF- κ B)、金属蛋白酶-9(MMP-9)等则是与斑块稳定性相关的辅助指标。

4 讨论

对动脉粥样硬化的探索是不断深入的过程,从初期强调平滑肌层对血管舒缩作用的影响,到 20 世纪 80 年代逐渐认识到血管内膜对 AS 斑块形成和稳定的重要作用^[22],直至近年来对于血管外膜功能的热点研究,学术界达成了普遍共识:AS 病变形成并非是单纯的内膜损伤和增生性病变,而是整个血管壁各层之间相互影响作用的结果^[23]。内膜、中膜、外膜之间并非彼此孤立,而是具有动态网络联系的整体。研究发现,外膜的炎症损伤过程发生甚至要先于内膜损伤,其损伤的程度与内膜受损程度成正比,外膜功能失调可导致

AS 早期病变如内膜增生等^[24]。所以,外膜对于血管壁的作用不仅是单纯的物理支撑作用,其病生理对于血管壁功能的整体调节作用也是不可忽视的。

探索外膜损伤对 AS 形成的影响,对于研究 AS 的发生发展和病理机制有重要意义。但就外膜致 AS 动物模型来讲,仍存在问题:在对外膜的损伤过程中,如何做到尽量减小对于血管壁中膜和内膜的影响。使用物理或化学方法损伤外膜后,AS 形成的特点、斑块情况尚有待研究。外膜损伤与内皮损伤、脂质代谢紊乱和 AS 形成之间的关系,还需进一步阐明。根据实验需求,采用合理的动物模型将对进一步研究提供科学的实验依据和思路。

[参考文献]

[1] Elena Galkina, Klaus Ley. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(13):165.

[2] 杨威,关秀茹. 大鼠动脉粥样硬化模型的研究进展[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(4):391.

[3] 吕光耀,蔡叶峰,黄燕,等. 缺血性卒中二级预防研究中动物模型的选择应用与思考[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 23(2):177.

[4] 霍勇,陈明. 心血管病实验动物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011:372.

[5] 李琳,窦健霖,楚天舒,等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(20):3690.

[6] 高静,刘寅,王林. 胆固醇酯转运蛋白基因多态性与他汀类药物调脂疗效的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14(1):100.

[7] Zhang C, Zheng H, Yu Q, et al. A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits[J]. *Comp Pathol*, 2010, 142(2/3):122.

[8] 张军平,彭立,李良军,等. 实验性兔主动脉粥样硬化易损斑块模型的建立与评价[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(3):161.

[9] Barker S G E, Tilling L C, Miller G C, et al. The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a 'neoadventitia' [J]. *Atherosclerosis*, 1994, 105(2):131.

[10] 汤月霞,吴宗桂,刘永,等. 血管外膜剥离致内膜增生病变的动物模型[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(1):65.

[11] 王安才,李俊,曹衢,等. 血管紧张素(1-7)对颈动脉去外膜后内膜和中膜增生的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(9):741.

[12] 郭方圆. 丹莪片对兔颈动脉粥样硬化斑块的影响

[D]. 上海:第二军医大学, 2012.

[13] 姚睿荣,高琳,梁春,等. 甲状腺激素相关蛋白在兔颈动脉外膜损伤致动脉粥样硬化中的作用[J]. *上海医学*, 2009, 32(4):289.

[14] 谢莲娜,曾定尹,张海山,等. 硅胶管包裹大鼠颈动脉对血管收缩功能的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39(9):698.

[15] Donetti E, Baetta R, Comparato C, et al. Polymorphonuclear leukocyte-myocyte interaction: an early event in collar-induced rabbit carotid intimal thickening[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(2):197.

[16] Kivelä A, Hartikainen J, Ylä-Herttua S. Dotted collar placed around carotid artery induces asymmetric neointimal lesion formation in rabbits without intravascular manipulations [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2012, 17(12):91.

[17] 刘平. Gax 基因抑制血管外膜成纤维细胞增生的实验研究[D]. 济南:山东大学, 2006.

[18] Hiroaki Shimokawa, Akira Ito, Yoshihiro Fukumoto, et al. Chronic treatment with interleukin-1 β induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs *In Vivo*-the role of platelet-derived growth factor [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(3):769.

[19] Barker SG, Talbert A, Cottam S, et al. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(1):70.

[20] 张军平,许颖智,李良军,等. 实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(1):41.

[21] Zhang Peng-fei, Su Hai-jun, Zhang Yun, et al. Atherosclerotic plaque components characterization and macrophage infiltration identification by intravascular ultrasound elastography based on b-mode analysis: validation *in vivo* [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2011, 27(1):39.

[22] David D. Gutterman. Adventitia-dependent influences on vascular function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999, 277(9):H1265.

[23] Maiellaro K, Taylor W R. The role of the adventitia in vascular inflammation [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4):640.

[24] Kirsti A C, Michael J L, Amanda C D, et al. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2012, 110(6):889.

[责任编辑 邹晓翠]