

脂肪乳剂灌胃加氮气损伤建立兔颈动脉粥样硬化动物模型

王茁伉¹, 彭成^{1*}, 王忠², 苟显娜¹

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 610075; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探索一种快速建立颈动脉粥样硬化动物模型的有效方法。**方法:**将30只雄性日本大耳白兔随机分为3组,分别给予正常饲料喂养、单纯脂肪乳剂ig和脂肪乳剂ig加氮气损伤(脂肪乳剂按胆固醇:猪油:蛋黄粉1:5:4配制;同时历时5 min, 150 mL·min⁻¹氮气流损伤血管内皮)。于实验第4周和第8周,检测动物血脂含量并观察颈动脉病理变化特征。**结果:**脂肪乳剂手术组大耳白兔4周时已经形成高脂血症,血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量分别达(17.55 ± 5.36), (13.68 ± 2.67) mmol·L⁻¹较空白组显著升高(P < 0.01),内膜轻度增厚呈现动脉粥样硬化早期改变;8周时TC、LDL-C含量进一步升高分别达(21.13 ± 3.59), (15.18 ± 3.29) mmol·L⁻¹,内膜明显增厚可见大量泡沫细胞及脂质沉积。而上述病理改变未见于空白组、脂肪乳剂组和脂肪乳剂手术组对侧的颈动脉。**结论:**脂肪乳剂加氮气损伤能有效的建立兔颈动脉粥样硬化模型。

[关键词] 颈动脉粥样硬化; 高脂血症; 脂肪乳剂; 模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0176-04

[doi] 10.11653/syfy2013110176

Establishment of Carotid Atherosclerotic Model Induced by Fat Emulsion and Nitrogen Gas Injury in Rabbit

WANG Zhuo-kang¹, PENG Cheng^{1*}, WANG Zhong², GOU Xian-na¹

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an experimental animal model of carotid atherosclerotic in rabbit. **Method:** Thirty male Japanese White rabbits were randomly divided into three groups. The control group fed with normal diet, the fat-emulsion group gavage with high cholesterol fat emulsion, the experimental group gavage with high cholesterol fat emulsion and operated by nitrogen-drying (fat emulsion formulation: cholesterol: pork fat: custard powder 1:5:4; nitrogen-drying operation: lasted 5 min and 150 mL·min⁻¹ airflow rate). Blood lipids and pathological change examination of carotid artery were done at the 4 and 8th week after surgery. **Result:** At 4th week later, the content of total cholesterol (TC) and low density lipoprotein (LDL-C) were (17.55 ± 5.36), (13.68 ± 2.67) mmol·L⁻¹, which significant higher than blank-control group (P < 0.01), and the pathological studies suggested that early atheromatosis appeared, such as intimal thickening lightly. At 8th week later, the content of TC and LDL-C were (21.13 ± 3.59), (15.18 ± 3.29) mmol·L⁻¹, and the typical carotid atherosclerosis was observed which include significant intimal thickening and secondary vascularization in intimal, the accumulation of lipid and cholesterol in the associated cells in the high cholesterol fat emulsion and operated by nitrogen-drying group. No artherosclerosis were seen in the control group, fat-emulsion group and self-control group. **Conclusion:** The animal model of carotid atherosclerotic in rabbit can be effectively established by fat emulsion

[收稿日期] 20121219(002)

[基金项目] 综合性中药新药研究开发技术大平台(2009ZX09301-005)

[第一作者] 王茁伉, 博士研究生, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, E-mail: 349787665@qq.com

[通讯作者] * 彭成, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, E-mail: pengchengchengdu@126.com

plus nitrogen gas injury.

[**Key words**] carotid artery atherosclerosis; hyperlipidemia; fat-emulsion; model

颈动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一个复杂的病理生理过程,与卒中有着密切的关系,是短暂性脑缺血发作、脑梗死的主要原因之一。随着对颈AS的发病机制及药物干预作用的研究,需要建立一种简便易行、重复性好、易于评价、有较典型的AS病理改变、适于干预治疗的动物模型。以往动物实验证明,单纯长期高脂饲料可以诱发冠状动脉AS,但不易在颈动脉部位形成AS病变,原因可能与局部血管构造及血流动力学有关^[1-2]。有文献报道,采用高脂饲料喂养加空气干燥内膜损伤法可以制成兔颈动脉粥样硬化模型^[3],本实验结合前期研究对这一模型制作方法进行部分改进,现报告如下。

1 材料

1.1 动物 健康雄性日本大耳白兔30只,体重2.0~2.5 kg,月龄4~6个月,由四川省实验动物专委会养殖场提供,SCXK(川)2010-14,检疫后备用。

1.2 药品和试剂 胆固醇(成都蓉海生物制品有限公司提供,日本进口,国内分装),蛋黄粉(成都艾美艾食品有限公司,批号20100509),猪油自制。实验前将猪油融化后溶入胆固醇和蛋黄粉按胆固醇:猪油:蛋黄粉1:5:4配制成脂肪乳剂备用^[4-5]。总胆固醇(TC)检测试剂盒(批号20090206),甘油三酯(TG)检测试剂盒(批号20090205,温州东欧津玛生物科技有限责任公司);高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒(批号20090112);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测试剂盒(批号20090218,浙江伊利康生物技术有限公司)。

1.3 仪器 7170全自动生化分析仪(日本,日立株式会社);TSJ-1A型自动组织脱水机(天津天利航空机电有限公司);BH-2型显微镜(Olympus);组织细胞分析诊断系统(Zoneking softronics Co. Ltd.);LZB-3精密玻璃转子流量计(江苏江阴市科达仪表厂)。

2 方法

2.1 动物分组 将30只日本大耳白兔随机分为3组,分别为正常饲料组($n=6$),饲喂普通颗粒饲料;脂肪乳剂加氮气损伤组($n=12$),ig给予脂肪乳 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,1次/d,1周后实施颈动脉内膜氮气干燥术,术后饲喂含胆固醇1.5%高脂饲料1周,待伤口恢复后继续ig脂肪乳剂,分别于术后第3周,第7周各处死6只;单纯脂肪乳剂组($n=12$)除不实施内膜氮气干燥术外,处理均同脂肪乳剂加氮气

损伤组,于相同的时间点处死。所有动物均单笼喂饲,饮水不限,自由摄食。

2.2 内膜空气干燥术 3%戊巴比妥钠 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 耳缘静脉麻醉,无菌条件下,兔颈正中纵切约3~4 cm,于甲状软骨上方水平分离右侧颈总动脉,长约3 cm,两端以动脉夹阻断血流。10 mL注射器内装生理盐水,接4.5号头皮针尽可能平行于血管纵轴方向穿刺阻断血管的两端,生理盐水冲洗置换出管腔内的血液。接上已调节好流量 $150\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的医用氮气流,历时5 min造成内皮干燥。然后管腔内重新充满生理盐水,放开动脉夹恢复血流,湿润棉片轻轻压迫穿刺点3~5 min止血。缝合皮肤创口并包扎。术后每日im青霉素20万U/只,连续3 d。

2.3 血脂测定 分别于实验第4,8周经兔耳缘静脉空腹取血,测定血清中TC, TG, LDL-C, HDL-C的含量。

2.4 病理标本的留取 3组动物均留取右侧颈动脉2.0 cm,脂肪乳剂ig加氮气损伤术组同时留取相同长度对侧颈动脉,生理盐水轻轻冲洗后在背侧面纵行切开,直接以肉眼观察颈动脉粥样硬化病变情况,然后以10%福尔马林溶液固定送病理检查。光镜下观察主动脉内壁有无泡沫细胞形成以及粥样斑块的形成情况,评定病变的程度。颈动脉AS性病变更程度的评价方法如下^[5]:无异常改变(-)记0分,少量泡沫细胞(+)记1分,大量泡沫细胞聚集(++)记2分,纤维斑块(+++)记3分。

2.5 统计方法 以上测定的数据均采用SPSS 13.0统计软件建立实验结果数据库并进行统计学分析,计量资料组间比较采用方差分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示各计量指标的平均值和离散程度;计数等级资料组间比较采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计意义。

3 结果

3.1 一般情况 单纯脂肪乳剂组有1只大耳白兔因灌胃失误死亡及时补充,其余实验动物均无中途死亡与患病,手术组动物创口愈合良好,未发现局部感染。

3.2 血脂测定 在实验的第4周和第8周,脂肪乳剂组和脂肪乳剂手术组兔血清中TC, LDL-C, HDL-C含量升高,与正常组比较有显著差异($P<0.01$);而HDL-C/LDL-C值降低,与正常组比较有显著差异($P<0.01$)。见表1。

表 1 各组家兔血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mmol · L⁻¹

组别	时间/周	TC	TG	HDL-C	LDL-C	HDL-C/LDL-C
空白	8	1.57 ± 0.59	0.88 ± 0.72	0.56 ± 0.18	0.72 ± 0.49	0.78 ± 0.38
脂肪乳剂	4	18.31 ± 2.76 ²⁾	1.28 ± 0.64	1.53 ± 0.14 ²⁾	14.36 ± 3.45 ²⁾	0.12 ± 0.04 ²⁾
	8	20.43 ± 4.61 ²⁾	1.30 ± 0.36	1.62 ± 0.51 ²⁾	15.18 ± 3.29 ²⁾	0.11 ± 0.02 ²⁾
脂肪乳手术	4	17.55 ± 5.36 ²⁾	1.22 ± 0.93	1.43 ± 0.31 ²⁾	13.68 ± 2.67 ²⁾	0.10 ± 0.03 ²⁾
	8	21.13 ± 3.59 ²⁾	1.39 ± 1.25	1.72 ± 0.57 ²⁾	15.78 ± 3.50 ²⁾	0.11 ± 0.05 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 病理形态学观察

3.3.1 肉眼观察 空白组、脂肪乳剂组和脂肪乳剂加手术组左侧颈动脉血管颜色红润,柔软有弹性,剖检可见内膜光滑,无奶油色变化;脂肪乳剂加手术组右侧颈动脉血管颜色发白,粗细不匀,弹性略差有僵硬感,剖检可见内膜粗糙不平,有点片状、条纹状脂纹或大小不等黄白色斑块隆起。

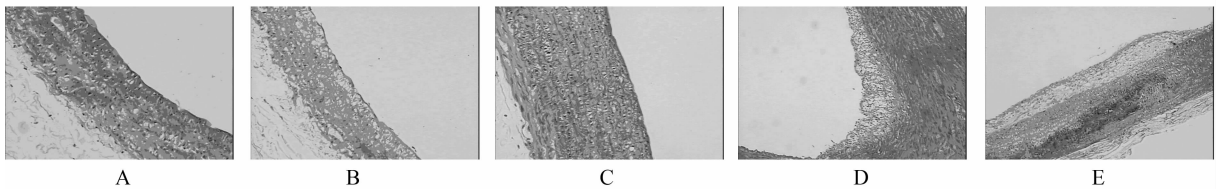
3.3.2 光镜下 HE 染色观察 空白组、脂肪乳剂组和脂肪乳剂加手术组左侧颈动脉均可见正常动脉管壁,内膜,中膜,外膜清晰,各层结构正常,内膜无明显脂质沉积,弹力纤维分布均匀,部分脂肪乳剂组和

脂肪乳剂加手术组左侧颈动脉内皮下有少量泡沫细胞。脂肪乳剂加手术组 4 周后部分动脉管壁轻度增厚,内膜下可见泡沫细胞、平滑肌细胞增生,部分区域伴有纤维组织增生,呈现动脉粥样硬化早期病变特点;8 周后动脉管壁较 4 周显著增厚,内膜下可见泡沫细胞、平滑肌细胞明显增生,中层平滑肌细胞排列紊乱出现大量胞浆淡染和充满脂质空泡的泡沫细胞,并经内弹力膜向斑块部位游走,管腔面可见粥样斑块或纤维斑块,部分斑块内可见坏死钙化区域。见表 2,图 1。

表 2 造模 8 周时各组动物颈动脉粥样硬化病变情况

组别	n	动物数/只				病变程度/分
		阴性(-)	少量泡沫细胞(+)	大量泡沫细胞(++)	纤维斑块(+++)	
空白	6	6	0	0	0	0
脂肪乳剂	6	5	1	0	0	0.17 ± 0.21 ¹⁾
脂肪乳剂手术	6	0	0	2	4	2.67 ± 0.52 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与脂肪乳剂组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组 8 周; B. 脂肪乳剂组 8 周; C. 脂肪乳剂手术组左侧 8 周; D. 脂肪乳剂手术组右侧 4 周; E. 脂肪乳剂手术组右侧 8 周

图 1 不同造模方法对颈动脉粥样硬化病变的影响 (HE, ×100)

4 讨论

颈动脉粥样硬化是一个复杂的病理生理过程,与卒中有着密切的关系,是短暂性脑缺血发作、脑梗死的主要原因之一。建立适合的颈动脉粥样硬化动物模型对研究颈动脉粥样硬化疾病有重要的意义。目前,制作模型常用的动物有大鼠、兔、猪等。猪是人类动脉粥样硬化理想的动物模型,其血脂蛋白及病变与人类相似,但资费昂贵,较难满足实验需求;

大鼠具有抗自发性及实验性动脉粥样硬化特性,复制模型的条件要求严格,且病变不稳定,动脉血管较小;家兔在脂蛋白代谢方面与人有一些相似之处,通过高胆固醇喂养极易产生富含脂质的动脉粥样硬化,是一种易感动物,但既往实验证明,虽然高脂饲料在 3~5 个月内可诱发冠状 AS,也能诱发脑基底 AS,但不能形成颈 AS^[6-7]。

目前多采用球囊导管扩张加高胆固醇饲料喂养

制作颈动脉粥样硬化模型。但球囊导管扩张法,存在内膜剥脱不完整,中层延展性损伤及一定的血栓形成率等缺点^[8-9],不适于颈 AS 病变的研究;同时由于动物食性原因及高脂饲料容易变质等因素,使造模药物剂量不易准确投喂,需较长饲喂周期才能形成高脂血症,给实验带来一定的不便。实验中笔者采用氮气流损伤血管内膜结合脂肪乳剂 ig 造成高脂血症双重因素来建立模型。脂肪乳剂 ig 4 周后,单纯脂肪乳剂组和脂肪乳剂手术组兔血清 TC、LDL-C 含量明显升高,而 HDL-C/LDL-C 明显降低,说明高脂血症动物模型已成功建立,同时罹患动脉粥样硬化的风险增大;病理检查发现手术组右侧颈动脉部分区域内膜轻度增厚,伴有少量泡沫细胞沉积,出现早期动脉粥样硬化病理改变,而自身对照左侧颈动脉及脂肪乳剂组兔颈动脉未见改变,说明血管内皮损伤在动脉粥样硬化形成过程中起主要作用,高脂血症作为另一危险因素起促进作用^[10]。随着时间延长,脂肪乳剂 ig 8 周后,兔血清 TC, LDL-C 含量进一步增加,氮气流损伤颈动脉病理改变也更加明显,可见内膜明显增厚,伴大量平滑肌细胞、巨噬细胞和淋巴细胞增殖,有游离或酯化胆固醇积蓄,表明造模是成功的。

该方法建立的颈动脉粥样硬化模型具有以下优点:①脂肪乳剂 ig 能克服动物食性因素的影响,加速动物高脂血症的形成,增加模型的稳定性;②气流对血管内壁的损伤相对轻柔,其内皮细胞的修复与内膜的增殖过程更接近于颈动脉疾病的生理过程;③气流速度及损伤血管长度相对可控,使损伤程度可保持相对恒定,便于后期病理指标的评价;④动脉血管损伤小无需结扎,不影响血液循环;⑤操作相对

简单、动物死亡率低、模型成功率高、可重复性好。

[参考文献]

- [1] 赵水平,王钟林,陆宗良. 临床血脂学[M]. 长沙:湖南科技出版社,1997:226.
- [2] Juzwiak S, Wojcicki J, Mokrzycki K, et al. Effect of quercetin on experiment of hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits[J]. Pharmacol Rep, 2005, 57(5):604.
- [3] 张磊,陈国荣,郑荣远,等. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001,9(2):155.
- [4] 王茁伉,彭成,张美玲,等. 脑络舒宁胶囊降血脂及抗动脉粥样硬化作用的实验研究[J]. 中药与临床, 2010,1(1):34.
- [5] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2003:56.
- [6] 王建辉,李磊,柳芳,等. 大鼠颈总动脉粥样硬化易损斑块模型建立与评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(17):158.
- [7] 张美玲,王茁伉,彭成. 动脉粥样硬化动物模型研究进展[J]. 四川动物,2009,28(5):794.
- [8] Gordon A A, Ferns G L, Stewart L, et al. Arterial response to mechanical injure: balloon catheter deendothelialization[J]. Atherosclerosis, 1992, 3: 89.
- [9] McMahon A C, Kritharides L, Lowe H C. Animal models of atherosclerosis progression: current concepts [J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005, 5(6):433.
- [10] 郭伟魁,张海燕,宋伟,等. 中药对内皮祖细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):282.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,350 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。