

- pionic acid - induced cell death in embryonic dopaminergic neurons [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(4): 535 - 544
- 14 Nutt JG. Levodopa - induced dyskinesia: review, observations, and speculations [J]. *Neurology*, 1990, 40: 340 - 345
- 15 肖勤, 翁多芳. 左旋多巴对帕金森病大鼠血清兴奋性氨基酸及抗氧化指标的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2003, 16(2): 69 - 71
- 16 Basma AN, Morris EJ, Nicklas WJ, *et al.* L - DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation [J]. *Neurochem*, 1995, 64(2): 825
- 17 Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L - DOPA up - regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress [J].

- Neurochem*, 1996, 66: 501 - 510
- 18 Maeda T, Cheng N, Kume T. *et al.* L - dopamine neurotoxicity is mediated by glutamate release in cultured rat striatal neurons [J]. *Brain Res*, 1997, 77: 159 - 162
- 19 Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, 164: 719 - 721
- 20 杨彦玲. 谷氨酸转运体与神经退行性疾病 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(2): 227 - 230
- 21 程肖蕊, 周文霞. 囊泡谷氨酸转运体与神经系统疾病 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(3): 290 - 294

(收稿: 2010 - 05 - 27)

动脉粥样硬化动物模型研究进展

赵 欣 赵全明

心脑血管疾病是人类健康的“头号杀手”, 是世界范围的主要死亡原因。而冠心病、缺血性脑卒中和外周血管病的主要病因是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)。由于伦理学的原因, 无法直接在人体进行动脉粥样硬化的发生机制、药物疗效和检测方法的系统研究。因此, 动脉粥样硬化动物模型就成为了进行这一领域研究的主要工具。本文将系统复习各种动物 AS 模型的特点和建立方法, 为科研人员进行 AS 相关研究提供参考。

一、鼠模型

大白鼠具有饲养方便、抵抗力强、食性与人相近的优点。利用大白鼠建立 AS 模型主要采用的方法包括: 脂质浸润法、内膜损伤法和免疫刺激法^[1~3]。利用小白鼠制造实验模型取血不便、难做动态观察, 所以较少采用。虽然鼠类被认为对动脉粥样硬化具有抗性, 然而随着转基因技术和基因敲除技术的出现, 目前已成功培育出脂蛋白代谢基因缺陷鼠, 使得鼠模型在动脉粥样硬化模型的研究中重新受到重视^[4]。

在转基因方法上, 1993 年出现的转载脂蛋白 E 3 Leiden 基因小鼠常规饲料喂养即可出现高胆固醇血症和高三酰甘油血症, 但无 AS 病灶^[5]; 若同时喂以高脂饲料, 可引发整个主动脉出现从脂质条纹到纤维

斑块、钙化灶等 AS 病灶。在基因敲除技术方面, 利用胚胎干细胞和同源重组的方法建立的载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除小鼠模型同样提供了新的动脉粥样硬化鼠模型^[6]。ApoE 基因敲除小鼠产生的 AS 病变广泛, 全身大中动脉如主动脉根部、胸主动脉、颈动脉、肾动脉、冠状动脉和股动脉等均可发生。若进食高脂饲料, AS 病变的形成更快更严重。随着基因敲除和转导技术的出现, 后来产生了目前应用最为广泛的两种鼠模型: ApoE 缺陷株 (ApoE^{-/-}) 和 LDL 受体缺陷株 (LDL - R^{-/-}) 小鼠。这类小鼠可以自发形成动脉粥样病变, 如同时配合高脂饮食, 能够产生易损斑块或形成血栓。近年来这两种模型的研究主要集中在利用遗传或药物调控加速病变的发生。其中比较高效的途径包括: 快速升高血浆脂质水平和诱导产生与人类血脂代谢障碍相似的脂蛋白表现。

鼠 AS 模型的病变具有两大优势: 首先, 病变的形态与人类产生的十分相似。其次, 斑块的破裂位置也与人类相似, 同样是发生在斑块的肩部。然而, 鼠模型的斑块破裂主要由周围黄瘤内密集的泡沫巨噬细胞凋亡所引起的, 且斑块破裂处缺乏纤维蛋白和血栓形成, 这与人类的情况有所不同^[7]。由此可见此类模型需要进一步地改进, 以更符合人类病变的特征。

二、兔模型

兔是最早被用于制作动脉粥样硬化模型的动物, 至今仍然被广泛应用。兔对外源性胆固醇的吸收率高 (75% ~ 95%)、清除能力低, 饲喂高脂饮食后可形

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972810)

作者单位: 100029 首都医科大学附属北京安贞医院心内科

通讯作者: 赵全明, 电子信箱: zhaoqm123@sohu.com

成明显的动脉粥样硬化症,而且与人体发生的病变相似,取血检查也较方便。此外,兔的体型大小非常适合制作动物模型,饲养方便,费用也能够承受,常通过饲喂高脂饮食,或球囊拉伤腹主动脉配合高脂饲料喂养的方法来制造动脉粥样硬化模型;在此基础上进行药物激发斑块破裂,可以产生类似人类动脉粥样硬化的易损斑块。这类模型可用于评价动脉粥样硬化的检测方法和治疗效果。

1. 单纯高脂饲料喂养兔模型:高脂饲料喂养是建立动脉粥样硬化兔模型的基本方法。早在 1926 年, Sarah Clarkson 及 L. H. Newburgh 就开始利用兔模型研究不同水平的胆固醇摄入与动脉粥样硬化形成的关系。在此之后,许多人尝试用饲喂或静脉注射胆固醇的方法诱导动脉内膜粥样斑块。方法是常用高脂饲料一般由蛋黄、猪油、胆固醇和基础饲料 4 种成分组成。典型的配比为:蛋黄 3% ~ 10%,猪油 4% ~ 10%,胆固醇 1%,基础饲料 85%。连续饲养 12 周,可以观察到比较明显的病变。尽管简便易行,但是高脂饲料喂养法建立模型时动物血清胆固醇很高,容易发生胆固醇贮积症,常导致家兔继发感染而死亡。此外,单纯高脂喂养的家兔病变分布与人类存在差异;上述短期喂饲高脂饲料诱发的病变主要是脂质条纹,只有在延续或间断喂饲高脂饲料 1 年以上才可能复制出与人类相似的 AS 病变,包括粥样斑块及复合病变。所以短期喂饲高脂饲料诱发的病变并不能反映有实际临床意义的进展性 AS 斑块,一般需要辅以其他技术进行改进。

2. 球囊损伤合并高脂饲料喂养兔模型:球囊损伤合并高脂饲料喂养兔模型即在高脂饲料喂养兔的基础上,运用球囊的膨胀和拖拉造成动脉损伤,形成斑块^[8]。该方法目前在腹主动脉和颈动脉粥样硬化模型的建立中获得了广泛的应用。(1)方法:术前两周开始饲喂高脂饲料;术中使用 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉(1ml/kg)动物,在腹股沟区触摸股动脉搏动,纵向切开皮肤,分离皮下组织,钝性分离动静脉及股神经。取 4F Forgaty 球囊插入股动脉,上行插入约 30cm 后,向球囊内注入生理盐水 0.2ml(球囊膨胀直径约 0.5cm),向下拖拉球囊至髂总动脉分叉处,反复 3 次。撤出球囊导管,结扎股动脉,依次缝合组织及皮肤创口。术后给予青霉素 80 万单位腹腔注射 3 天(预防感染)。给予动物含 2% 胆固醇的高脂饲料饲喂 12 ~ 18 周。(2)球囊损伤合并高脂饲料喂养兔模型的优点在于:建立模型时间比较短,动脉粥样硬化

的部位比较明确。其斑块病变基本符合人类动脉粥样硬化的 3 个特征。该模型产生的病变有如下特点:降主动脉斑块病变呈连续性分布,膈水平以下腹主动脉明显变细,肉眼可见动脉壁增厚,并有明显的斑块分布。多数病变表现为 AHA 分类的 IV 型或 V 型病变。病变动脉管腔明显变细,具有明显炎症细胞浸润。但很少发生斑块破裂、出血、血管闭塞等人类典型易损 - 破裂斑块样改变。

3. 药物激发产生斑块破裂和动脉血栓的兔模型:药物激发方法产生较早,该方法一般通过高脂饲料喂养和药物注射来诱发斑块^[9]。该方法主要优势在于可以通过注射对斑块的形成进行一定的控制。方法:①1% 的胆固醇饮食 2 周;②腹主动脉内膜球囊拉伤;③间断高脂饲喂:1% 的胆固醇饮食 6 周 + 普通饲料喂养 4 周;④通过腹腔注射蛇毒(Russell's viper venom, RVV, 一种内皮毒素和促凝物质)和静脉内注射组胺(histamine, 一种血管加压素)来激发斑块破裂和血栓形成。具体如下:间隔 24h RVV 腹腔注射两次(0.15mg/kg),并于每次 RVV 注射后 30min 经耳缘静脉注射组胺(0.02mg/kg)。该模型中的易损斑块定义为^[7]:药物激发试验后有血小板和富含纤维蛋白的血栓附着的斑块。这些破裂斑块与人类斑块具有以下相似性:①有明显的中膜和外膜变化,包括新生血管和炎症;②在内膜和纤维帽有胆固醇结晶和液晶状胆固醇酯;③炎症的薄纤维帽。增加的胆固醇结晶面积、内弹力层面积、正性重构、纤维帽炎症、外膜破裂及炎症是斑块破裂的独立危险因素。

4. 易心肌梗死兔模型:典型的易心肌梗死兔模型包括 Watanabe 可遗传的高脂血症(watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL)心肌梗死(myocardial infarction, MI)兔(WHHLMI)和 STH 兔(The St. Thomas Hospital Rabbit)。WHHLMI 兔是在 Watanabe 可遗传的高脂血症兔的基础上发展起来的一种动物模型。它会自发突发心脏事件而不用任何人工手段^[10]。在达 35 个月龄时,致命的突发心脏事件的累积发生率为 97%。在这些兔子的心脏内,可见典型的心肌梗死表现。WHHLMI 兔子会发生(如 Naghavi 等所定义的)致命性的 MI 和易损斑块。通过检查猝死的 WHHLMI 兔子,发现有缺血性心肌损害、被粥样硬化斑块完全堵塞的冠状动脉,以及心肌梗死形成时在心电图上的典型改变。

然而,有关 WHHLMI 兔子冠脉斑块和心肌病变中的发现表明,其缺血损害的机制与人类冠状动脉内

形成闭塞性血栓导致的急性冠脉综合征的机制有所不同。此外,在此模型中斑块破裂或者闭塞性血栓形成的最后决定性触发因素仍未知,未来希望在 WHHLM I 兔子中能够明确这些触发因素,并通过给 WHHLM I 兔子使用各种药物来阐明它们怎样使冠脉易损斑块破裂或诱发血栓形成的。相信 WHHLM I 兔子将在开发更加有效的药物来抑制易损斑块的形成和突发心脏事件的发生中发挥有意义的作用。STH 兔是一种遗传性新陈代谢紊乱的新西兰白兔,它的显著特点是血胆固醇含量过高。与正常兔相比,STH 兔的低密度 (low density lipoprotein, LDL)、中低密度 (intermediate low density lipoprotein, ILDL) 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 水平明显偏高,造成自由胆固醇和酯化胆固醇含量升高。这使得 STH 兔具有自发性高胆固醇血症和高三酰甘油血症,其表现类似于人的高三酰甘油血症和复合型高脂血症,出现的 As 病变也与人非常相似。虽然 WHHL 兔和 STH 兔都可以形成 As 的晚期病变,但人工培育的自然缺陷动物模型基因缺陷单一,品种较少,应用范围相对较窄。

5. 四氧嘧啶诱导糖尿病兔模型: King 等人在研究中发现: 糖尿病患者的冠心病发病率要高于非糖尿病患者,病情也更加严重^[11]。而斑块的研究也表明: 患糖尿病的动脉粥样硬化患者的斑块内炎症活动更活跃,斑块稳定性下降^[12]。因此利用糖尿病作为诱导,有可能达到增加动脉粥样硬化模型成功率的目的。(1) 方法: 新西兰大白兔耳缘静脉推注无菌生理盐水配制的 5% 四氧嘧啶 100mg/kg, 72h 后测空腹血糖,以空腹血糖 (FBG) $\geq 16\text{mmol/L}$ 者为模型成功,不达标者 1 周后追加四氧嘧啶 120mg/kg, 追加后 72h FBG 仍不达标者 1 周后再追加,直至 FBG 达标。由于四氧嘧啶引起大量胰腺 β 细胞坏死,短期内释放出大量胰岛素可至严重低血糖使兔死亡,故用药后 24h 予 5% 葡萄糖水自由饮用,对血糖 30mmol/L 以上者每日两次皮下注射 0.5U/kg 左右短效猪胰岛素 1 周,以助其渡过最初的严重代谢失衡阶段,减少高血糖所致死亡。确定糖尿病后即开始喂含 2% 胆固醇、15% 胆酸和 5% 猪油的高脂饲料 30g/(kg·d)。1 周后进行内膜球囊损伤术,术后继续以上述饲料喂养 10 周。(2) 特点: 糖尿病动脉粥样硬化兔的血糖、血总胆固醇、三酰甘油和低密度脂蛋白胆固醇较高脂饲料喂养动脉粥样硬化模型有明显的升高。糖尿病动脉粥样硬化兔的主动脉内膜增厚要轻于高脂喂养动

脉粥样硬化兔;但糖尿病动脉粥样硬化兔病变内巨噬细胞浸润明显重于高脂喂养动脉粥样硬化兔。但两者病变内巨噬细胞和平滑肌细胞数量尚无明显差别。

6. 其他方法: 以上介绍了几种常用的建立兔粥样硬化模型的方法。此外,还有空气干燥法、电刺激法、免疫法、转基因法等。由于这些方法大多还处于研究阶段,因此,在本文中不一一进行详细介绍。

三、猪模型

猪可能是动脉粥样硬化研究较为理想的动物模型,其优点包括: ①在解剖学上猪的心脏与人类相似: 冠脉系统在形态和功能上与人类有 90% 的相似性,猪的大动脉亦具有与人类相似的组织解剖结构; ②猪的血液学和血液生化指标与人类接近,血流动力学方面,猪已被证实在心脏功能上与人类相似; ③猪可自发动脉粥样硬化,也可由导致动脉粥样硬化的饮食实验性诱发; ④猪的脂蛋白代谢机制与人类相似,如果让猪随着年龄的增长自然地形成动脉粥样硬化病变,则动脉粥样硬化斑块的分布与人类相似,斑块的组织结构和发病机制也类似于人类的情况。但猪模型存在体型大、形成病变周期长、费用较高的缺点。以下将以小型猪为主介绍 4 种主要的模型建立方法。

1. 单纯高脂饲料喂养猪模型: (1) 方法: 3~4 个月龄小型猪,雌雄不限。具体饲料配方为: 胆固醇 1.5%~3%, 牛油 10.0%, 花生油 6.0%, 胆盐 0.5%, 基础料 82.0%。小型猪每日饲料量为体重的 3%, 分两次饲喂。为避免动物突然喂饲高脂饮食出现应激反应,采取高脂饲料与基础料的比例逐步增加的方法,10 天后达到目标用量,作为高脂饮食正式开始时间。一共饲喂 12 个月。(2) 特点: 动脉病变分布与血管的大小、位置及血流剪切应力相关,其中粥样硬化斑块隆起明显且易于发生部位为腹主动脉、髂动脉、脐动脉和冠状动脉,病变较轻且不易发生的部位为颈总动脉、肠系膜动脉和肾动脉,此外,粥样硬化斑块在动脉分叉部位多发,而且病变隆起明显,通常是血管的一侧比较严重。总体而言,单纯高脂饲料喂养建立动脉粥样硬化模型方法简单,易于操作,但产生的病变相对较轻,很少产生晚期动脉粥样斑块,且动物饲喂时间长,花费高,对研究易损斑块作用有限。

2. 动脉内膜球囊损伤合并高脂饲料喂养猪模型: 此种方法为目前建立猪动脉粥样硬化模型的常用方法,球囊拉伤的部位可以选择髂动脉、颈动脉或冠状动脉等,方法基本相似,这里主要介绍髂动脉球囊损伤法建立粥样硬化模型^[10]。(1) 方法: 3~4 个月龄

小型猪,雌雄不限。高脂饲料喂养 1 个月,术前禁食、水,麻醉后行气管插管,动物取仰卧位,在 X 线机透视引导下将造影导管送入左右髂总动脉分叉处上方 1~1.5cm,快速推入泛影葡胺造影,将球囊导管沿导丝进入一侧髂总动脉至髂外动脉中段,给球囊充气至 6~8 大气压,持续 30s、间隔 60s,然后保留球囊内压力 1~3 大气压来回拖拉球囊 5 次。再用同样方法损伤另一侧。退出导管,结扎动脉,缝合伤口。术后继续高脂饮食 12 周。(2)特点:球囊损伤的方法是广泛被应用来模拟动脉粥样硬化样病变的实验技术,此技术显示在任何动物种的血管内的任何部位都可以通过机械性对内-中膜损伤发生反应来诱发内膜的增厚。但是在这一模型中有几个局限性存在:病变通常没有晚期“复杂的粥样斑块”的组织学特点,如钙化、斑块内出血、坏死核心,这和临床上所见到的完全不同。尽管应用更深更广泛的损伤联合高胆固醇饮食能够产生在内膜增厚基础上更加晚期的病变特征,但是考虑应用大型的实验动物的费用昂贵,此种机械性损伤所致的急性/亚急性闭塞性血栓的高发生率(20%~50%)仍是其主要的不足。

3. 链脲霉素诱导糖尿病合并高脂饲料喂养猪模型:与糖尿病诱发动脉粥样硬化的兔模型类似,Gerriety 等也尝试利用猪进行了糖尿病诱发动脉粥样硬化的模型制作,并且获得了可重复的结果^[13]。(1)方法:2~3 个月龄雄性 Yorkshire 小型猪,体重 15~20kg。麻醉后从耳缘静脉注入细胞毒性药物链脲霉素(streptozotocin, STZ),50mg/kg 溶于浓度为 0.1mol/L 的柠檬酸钠溶液中,连续 3 天,此后两天给予葡萄糖 25g 饲喂,每日两次以抵消 β 细胞释放的胰岛素。血糖达到诊断糖尿病的水平后并维持这样的水平,而不给予外源性的胰岛素长达 48 周,其间合并 1.5% 胆固醇饲料喂养。(2)特点:用此种方法诱导产生动脉病变的概率是单纯高脂饲料喂养法的两倍,并且早在 12 周病变已经明显。冠状动脉的主要病变出现在血管起始段的 2~3cm 处,表现出类似于人动脉粥样硬化的形态学特征,且无论在冠状动脉还是腹主动脉,斑块有相对的无细胞坏死核心,覆盖有纤维帽,病变常侵入到血管中膜,斑块内出血、钙化常见,亦可见到冠脉分支的闭塞,偶见主动脉瘤或夹层发生。有人类特征的糖尿病模型,包括高三酰甘油血症、严重的、加速进展的动脉粥样硬化在猪身上能够被重复复制和维持。这一模型将会在阐明人类糖尿病患者中见到的进展性动脉粥样硬化病变的产生机

制有重要的价值。

4. 颈动脉部分结扎合并高脂饲料喂养猪模型:高脂饲料喂养和外部实验结合的方法在动脉粥样硬化模型的制作中获得了广泛的应用。然而,这两种方法却难以帮助形成颈动脉的斑块。为此,Ishili 等采用提出了颈动脉部分结扎的方法来解决这一问题^[14]。(1)方法:选用 Yuctan 雄性小型猪,体重 20~30kg,术前高脂饲料喂养 2 周,手术当日禁食水,麻醉后纵向切开皮肤,分离皮下组织,钝性分离动静脉及神经,不完全结扎颈动脉,造成血管狭窄约 80%。术后每日给予阿司匹林 81mg,时间 1 个月,以减少术后风险,并继续饲喂高脂饲料 3 个月。高脂饲料配方:4% 胆固醇、20% 饱和脂肪、并追加 1.5% 胆碱。(2)特点:这一模型产生的颈动脉病变包含了若干易损动脉粥样硬化病变的形态学特征,诸如细胞坏死核心、薄纤维帽、斑块内出血。而这些特征在有症状的颈动脉粥样硬化的病变中经常见到。此外,这一模型首次展现了动脉远端栓塞,由于并非急性冠脉综合的主要发生机制,这一现象从未在其他模型中报道过。与球囊损伤动脉内膜的方法相比,该模型能够很好地生成晚期动脉粥样硬化斑块,斑块特征与人类颈动脉粥样斑块十分相似,且这种方法成功率高,而较少出现相关的并发症。因此,日后有可能成为研究动脉粥样硬化的发病机制、评价斑块对降脂、抗炎治疗的疗效、探索易损斑块的无创性检测方法等较为理想的动物模型。

四、结 论

动物模型对研究动脉粥样硬化和易损斑块的发生机制和病理生理,检测相关诊断方法的有效性和实用性,评价抗动脉粥样硬化和防治冠心病药物的疗效是一种不可缺少的研究工具。制作和选择合适的动物模型对保证结果的准确性、有效性十分重要。高胆固醇饲料喂养法是大部分模型制作方法的基础,在此基础上,还出现了其他如免疫学方法、注射儿茶酚胺类药物法、注射表面活化剂法、胆固醇-脂肪乳剂静脉注射法等。由于各种方法所建立的模型均有其各自的优势和缺点,所以目前动脉粥样硬化模型的建立尚缺乏金标准。

造成这一现象的原因在于 AS 的发病机制十分复杂,至今尚未有全面的解释。同时,各种动物与人类的生理差别进一步增加了复制人类 AS 的困难。因此,加强对 AS 发病机制的研究,明晰发病过程,是推动 AS 动物模型发展根本力量。同时,通过采用基

(转至第 2 页)