

不同时期家兔动脉粥样硬化模型的比较

裴天仙^{1,2}, 王晶晶^{1,2}, 郭景玥^{1,2}, 高广深^{1,2}, 杨东^{1,2}, 张宗鹏^{1,2}, 郭传敏^{1,2*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

摘要: **目的** 从动脉粥样硬化(AS)发生进展的不同时期, 对家兔模型进行比较和研究。**方法** 新西兰白兔 30 只, 随机分为 5 组, 包括对照组和模型组, 模型组又分为 AS 4 周组、AS 8 周组、AS 12 周组和 AS 16 周组, 每组 6 只。对照组给予普通饲料喂养, 模型组给予高脂饲料喂养。分别于实验 0、4、8、12、16 周给各组动物称质量, 耳缘静脉取血, 测定血清胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)含量; 通过石蜡切片 HE 染色及冰冻切片油红 O 染色对胸主动脉进行病理形态学观察。**结果** 实验 4 周时, 模型组家兔体质量增加值明显高于对照组, 而在实验 8、12、16 周时, 二者比较没有明显差异。血脂测定显示, 模型组 TC 和 LDL 水平增加幅度较大, TG 和 HDL 水平增加幅度较小, 但是与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05, 0.01$)。组织病理学检查结果显示, 实验 4 周时, 模型组家兔在主动脉内皮下可见少量脂质沉积, 油红 O 染色呈红色; 实验 8 周和 12 周时, 处于动脉粥样硬化脂纹期的不同阶段, 病灶处内皮下可见大量的泡沫细胞聚集; 实验 16 周时, 处于动脉粥样硬化纤维斑块期, 病灶表层可见覆盖以纤维帽, 纤维帽下有数量不等的泡沫细胞, 平滑肌细胞、炎细胞等。**结论** 家兔单纯给予高脂饲料喂饲 4~16 周, 可造成不同病理分期的动脉粥样硬化模型。

关键词: 家兔; 动脉粥样硬化; 血脂; 主动脉

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)04-0305-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.004

Comparison on rabbit atherosclerosis models in different periods

PEI Tian-xian^{1,2}, WANG Jing-jing^{1,2}, GUO Jing-yue^{1,2}, GAO Guang-shen^{1,2}, YANG Dong^{1,2}, ZHANG Zong-peng^{1,2}, GUO Chuan-min^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Center for Drug Evaluation and Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To compare and research on rabbit models from the atherosclerosis occurred at different times. **Methods** New Zealand white rabbits (30), randomly divided into five groups, including control group and model group, model group is divided into AS4, AS8, AS12, and AS16 weeks group (six in each group). The rabbits in the control group were given ordinary feed, the rabbits in the model group were given a high-fat feed. To weight and extract the ear marginal vein blood in 0, 4, 8, 12, and 16 weeks of the experiment in each group; To determinate the cholesterol (CHO), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) in serum. To observe the pathological morphological changes of thoracic aortic through the paraffin section of HE staining and frozen section oil red O staining. **Results** At week 4, the added value of rabbit weight in the model group was obviously higher than that in the control group, and in weeks 8, 12, and 16 of the experiment, the difference is not obvious. Blood lipid measurement showed that CHO and LDL levels increased amplitude of the model group was bigger, TG and HDL levels increased amplitude was smaller; But compared with the control group, the difference is obvious ($P < 0.05, 0.01$). Histopathological examination results showed that we can find a small amount of lipid deposition from subcutaneous tissue of the rabbit aorta in the model group at the week 4, oil red O staining is mei red; At weeks 8 and 12, the pathological change is at different stages of atherosclerosis fatty streaks period, and we could find a large number of foam cells in the lesions. The experiments at week 16, the pathological change was in the fiber patch phase of atherosclerosis, the surface of lesions was covered with fibrous cap, under the fibrous cap we could find foam cells, smooth muscle cells, inflammatory cells, etc. **Conclusion** Rabbit alone is given high fat feed for 4 to 16 weeks, we can copy the atherosclerosis models in different pathological stages.

Key words: rabbit; atherosclerosis; blood lipid; aorta

收稿日期: 2014-03-26

基金项目: 国家科技重大专项 (2013ZX09302301)

作者简介: 裴天仙, 助理研究员, 硕士, 研究方向为毒性病理和药理。Tel: (022)84845246 E-mail: peitx@tjpr.com

*通信作者 郭传敏, 研究员, 研究方向为毒性病理和毒理。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是危害人类健康的一类疾病, 是导致人类死亡的头号杀手。因此, 国内外医学界对动脉粥样硬化关注程度也日益增长^[1]。动脉粥样硬化是一种多因素疾病, 涉及多个组织器官和系统, 其发生发展过程复杂, 有多种学说从不同角度阐明其发病机制, 包括脂源性学说、炎症学说、内皮细胞损伤学说等。研究表明, 血浆胆固醇水平的升高与动脉粥样硬化的形成呈正相关, 而与之相关的肥胖症也是动脉粥样硬化形成的危险因素之一^[2]。本实验以家兔作为实验动物, 从病理学角度来探讨和研究家兔高脂喂饲不同时期体质量、血脂及主动脉的病理变化, 为动脉粥样硬化相关药物的研究和开发提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

健康纯种新西兰雄性大白兔 30 只, 体质量 2.0~2.5 kg, 月龄 3~4 个月, 购自天津市华荣实验动物科技有限公司; 血脂四项[胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL)]试剂盒, 购自中生北控生物股份有限公司; 日立全自动生化分析仪; Olympus BX53 普通光学显微镜及 Olympus DP71 显微摄影系统; 樱花 IVS-410 型推拉式切片机; 樱花 Cryo3 型冷冻切片机; Beckman 低温离心机。

1.2 动物模型制备及处理

健康家兔, 雌雄各半, 分笼饲养, 饲养温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 每天每只 150 g 定量喂食, 自由饮水。适应性喂养 3 d 后, 采用随机数字表法分为 5 组 (每组 6 只): 对照组, 喂饲基础饲料; 模型组: AS 4 周组、AS 8 周组、AS 12 周组和 AS 16 周组, 喂饲高脂饲料 (高脂饲料: 1%胆固醇+4%猪油+95%基础饲料)。AS 4 周组、AS 8 周组、AS 12 周组和 AS 16 周组分别于高脂喂饲 4、8、12 和 16 周时剖杀, 对照组于基础饲料喂饲 16 周时剖杀。各组动物在实验 0、4、8、12、16 周时称质量, 耳缘静脉取血, 制备血清用于测定生化指标, 取胸主动脉, 用于组织病理学观察 (采用 HE 和油红 O 两种染色方法)。

1.3 观察指标

1.3.1 症状、体征及体质量 观察家兔一般精神状况、饮食、皮毛、肥胖程度等, 计算出各组各只动物体质量增加值。

1.3.2 TC、TG、LDL 和 HDL 的测定 家兔用兔盒

固定, 耳缘静脉取血 2 mL, 置于生化采血管内, 充分混匀, 全自动生化分析仪测定血清 TC、TG、LDL 和 HDL。

1.3.3 胸主动脉病理形态学观察 一部分胸主动脉福尔马林固定 24~48 h, 常规脱水、浸蜡、包埋、切片、HE 染色、透明和封片, 于光学显微镜下观察组织病理学变化。另一部分胸主动脉冰冻切片机切片, 温度 -20 °C~-30 °C, 切片厚度 4~6 μm, 用干净清洁的硅化载玻片粘取冷冻切片, 切片干燥后入 60%异丙醇浸洗 10 min, 油红 O 工作液染色 10 min, 60%异丙醇分化 3~10 s 至间质清晰, 水洗, Mayer 苏木精复染 1 min, 自来水返蓝, 甘油明胶封片。染色结果中性脂肪呈红色, 核呈蓝色。于光学显微镜下观察组织病理学变化。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS11.5 统计分析系统, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般状况变化

对照组家兔摄食、活动、粪便等一般状况良好, 且皮毛光滑; AS4 周组、AS8 周组、AS12 周组和 AS16 周组出现厌食、烦躁、活动迟缓等症状。

2.2 体质量变化

在整个实验过程中, 各组动物的体质量逐渐增加。实验 4 周时, 模型组家兔体质量增加值明显比对照组高 ($P < 0.01$); 在实验 8、12 和 16 周时, 模型组家兔体质量增加值与对照组比较则没有显著差异, 结果见表 1。

表 1 各组家兔体质量增长值的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Changes of body weight growth of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 体质量增加值 | | | |
|-----|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 第 4 周 | 第 8 周 | 第 12 周 | 第 16 周 |
| 对照组 | 0.15 ± 0.10 | 0.70 ± 0.28 | 0.94 ± 0.29 | 1.15 ± 0.23 |
| 模型组 | 0.50 ± 0.18 ^{△△} | 0.74 ± 0.25 | 0.94 ± 0.24 | 1.18 ± 0.32 |

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group

2.3 生化测定结果

在整个实验过程中, 模型组 TC 和 LDL 水平增加幅度较大, 模型各组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), 在高脂喂养 0~8 周时迅速增加, 在 8~16 周时增加趋缓; TG 含量增加幅度较小, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$ 、0.01, AS4 组除外),

在高脂喂养 0~12 周时迅速增加,在 12~16 周时增加趋缓; HDL 含量增加幅度较小,与对照组比较差

异有显著性 ($P<0.01$), 在高脂喂养 0~4 周时迅速增加, 在 4~16 周时却缓慢减少 (表 2)。

表 2 各组家兔血脂的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Changes of blood lipid of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | TC/(mg·dL ⁻¹) | TG/(mg·dL ⁻¹) | LDL/(mg·dL ⁻¹) | HDL/(mg·dL ⁻¹) |
|------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照 | 1.10±0.42 | 0.59±0.14 | 1.07±0.93 | 1.14±0.16 |
| AS4 | 23.27±5.76 ^{△△} | 0.89±0.80 | 50.11±12.55 ^{△△} | 3.68±0.59 ^{△△} |
| AS8 | 33.75±2.26 ^{△△} | 1.95±1.45 [△] | 105.90±26.77 ^{△△} | 3.10±0.56 ^{△△} |
| AS12 | 34.34±0.42 ^{△△} | 3.00±0.97 ^{△△} | 117.11±14.20 ^{△△} | 3.22±0.64 ^{△△} |
| AS16 | 35.23±4.51 ^{△△} | 3.03±0.90 ^{△△} | 116.02±16.34 ^{△△} | 3.31±0.73 ^{△△} |

与对照组比较: [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

[△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs control group

2.4 组织病理形态学观察结果

病理形态学检查结果 (图 1、2) 显示, 对照组家兔主动脉内膜、中膜和外膜结构完整, 内皮光滑连续, 内皮下未见异物沉积; AS4 组家兔在主动脉内皮下就可发现有少量脂质沉积, 油红 O 染色呈红色; AS8 和 AS12 组家兔在主动脉处于动脉粥样硬化脂纹期的不同阶段, 病灶处内皮下可见大量的泡

沫细胞聚集, 另可见较多的基质, 数量不等的合成型平滑肌细胞, 少量的淋巴细胞和粒细胞; AS16 组家兔在主动脉处于动脉粥样硬化纤维斑块期, 病灶表层可见覆盖以纤维帽, 其中胶原纤维可发生玻璃样变性, 纤维帽下可见不等的泡沫细胞、平滑肌细胞、炎细胞等, 另见泡沫细胞坏死、崩解, 出现脂质池和分解的脂质产物, 对中膜有压迫。

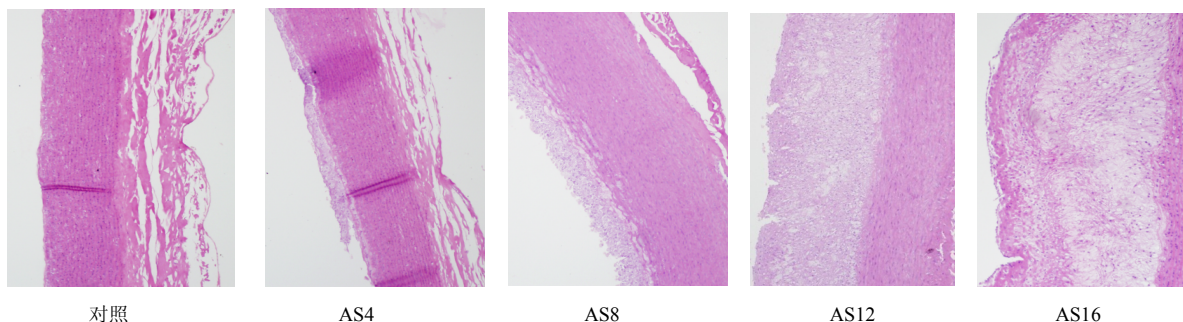


图 1 各组家兔主动脉 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining of rabbit aorta in each group

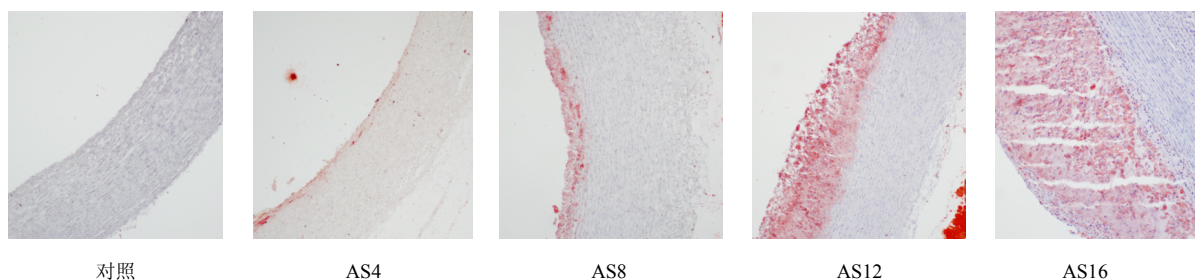


图 2 各组家兔主动脉油红 O 染色结果比较

Fig. 2 Oil red O staining of rabbit aorta in each group

3 讨论

建立一个良好的动脉粥样硬化动物模型是人们进一步认识和防治动脉硬化的研究手段, 当前应用较多的是单纯饲喂高脂饲料、正常或高脂血症动物

动脉内膜损伤术致动脉粥样硬化狭窄模型。众所周知, 兔是较易建立动脉粥样硬化的动物之一, 模型复制比较简单, 重复性好, 易于评判, 适用于预防治疗等研究制作动物模型, 也为研究疾病发生、发

展、治疗提供一个平台。动物模型在病理学和生物化学方面应与人类相似,才具有参考价值。Forster等^[3]及 Haunstetter 等^[4]分别在基础病理学与病理生理学方面就兔与人类动脉粥样硬化斑块做了比较研究,发现兔的斑块与人的斑块具有一定的相似性,故本实验以家兔作为模型动物。

研究结果显示,实验4周时,模型组家兔体质量增加明显;在实验8、12、16周时,家兔体质量增加值与对照组比较没有明显差异,这可能是由于实验8周以后,模型组家兔厌食症状更加明显。实验血脂测定表明,模型组TC和LDL水平增加幅度较大,实验8周前增加迅速,8周后增加趋缓;TG水平增加幅度较小,实验12周前增加迅速,12周后增加趋缓;HDL水平增加幅度较小,4周时迅速增加,达到峰值,4~16周时却缓慢减少。组织病理学检查可见,实验4周时,在主动脉内皮下发现有少量脂质沉积;实验8~12周,主动脉内膜逐渐增厚,内皮下可见大量的泡沫细胞聚集,处于动脉粥样硬化脂纹期;16周时,内膜继续增厚,病灶内部可见脂质池和分解的脂质产物,表层覆盖以纤维帽,处于动脉粥样硬化纤维斑块期。

动脉粥样硬化的发病过程十分复杂,一般认为是多种遗传因素和环境因素互相作用所致^[5],高胆固醇血症、高三酰甘油血症是最早被公认的重要危险因素^[6]。而本实验模型组的TC和LDL含量均明显升高,尤其是TC进入动脉壁,并在局部沉积聚集,引起局部巨噬细胞和平滑肌细胞集结,这些细胞吞噬脂质后形成泡沫细胞。本实验模型组中TG和LDL水平升高,可透过内皮层,沉积于内皮下层,从而导致血管平滑肌细胞增殖,促进动脉粥样硬化的形成;TG通过产生氧自由基,加速LDL氧化损伤内皮细胞,促单核细胞黏附分子表达而黏附于血管内皮,还促进泡沫细胞形成^[7]而促进动脉粥样硬化的形成;HDL可抑制LDL的细胞毒作用,减轻内皮的损伤。在实验4~16周期间,TG和LDL的

量一直在升高,而HDL则在实验4周后就开始缓慢减少,实验组血脂代谢的紊乱促进并加重了动脉粥样硬化的发展。LDL的细胞毒作用可使泡沫细胞坏死、崩解,致使局部出现脂质池和分解的脂质产物,在病变的表面则形成纤维帽,进入纤维斑块期。当纤维斑块中脂质沉积过多以后,斑块的中央基部常常会因为营养不良而发生变性、坏死而崩解,这些崩解物与脂质混合在一起,看起来就如同黄色米粥样,这就形成了粥样斑块。本实验复制了不同时期的动脉粥样硬化模型,在高脂喂饲4周时,仅出现了少量脂质在主动脉内皮下的沉积;8~12周期间,脂纹形成并进一步发展加重;16周时则进入了纤维斑块的病变期。这为进一步探明动脉粥样硬化的病因、发病机制、病理变化、早期诊断及防治药物的研究与开发均具有重要的意义。

参考文献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(29): 801-809.
- [2] 陈瑶, 李晓梦. 烟酸对幼年肥胖大鼠血脂及血管内皮黏附功能的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 25(8): 978-981.
- [3] Forster B A, Weinberg P D. Changes with age in the influence of endogenous nitric oxide on transport properties of the rabbit aortic wall near branches [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 1361-1368.
- [4] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1998, 82(21): 1111-1129.
- [5] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 曲红, 王德山. 枸杞多糖的药理及临床研究概况 [J]. *山东医药工业*, 2002, 21(4): 36.
- [7] Mulhaupt H A, Gavlits M E, Kafiko K, et al. Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall: analysis of human tissues by *in situ* hybridization and immunohistochemistry [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(6): 1985-1997.