

小型猪动脉粥样硬化斑块稳定性模型研究*

刘录山 杨永宗** 冯大明 孙文清 唐朝克 唐雅玲
易光辉 王 佐 任 重 王贵学*** 杨保堂 万载阳

(南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001)

摘要 目前已有的动物模型在研究动脉粥样硬化斑块破裂、破裂的可控性及量化研究方面均不能满足研究的需要. 为了建立类似于人类动脉粥样硬化病变的斑块模型, 体外研究斑块稳定性, 应用传统的高脂高胆固醇膳食诱导建立了小型猪动脉粥样硬化模型, 并从血脂水平和斑块病理形态学特征方面加以证实. 该模型中斑块与人类成熟斑块的高度相似性使其成为研究斑块稳定性和斑块破裂的较好模型. 从量化比较这一出发点着手, 建立了一个体外可控可量化诱导斑块破裂模型, 方法简单易行, 是一个较好的量化研究斑块破裂和破裂相关因素间关系的实验模型.

关键词 动脉粥样硬化, 斑块破裂, 猪, 动物模型

学科分类号 R363

一系列动脉粥样硬化动物模型的建立是动脉粥样硬化 (AS) 研究在基础医学与临床方面都取得了许多重要进展的主要原因. 这些模型在血脂水平、病变形态、药物反应等方面都与人类动脉粥样硬化发生、发展过程及病变形态存在着差别, 选择和建立新的动脉粥样硬化病变模型依然十分必要^[1]. 近来研究表明, 导致心脑血管疾病的主要原因是动脉粥样硬化斑块破裂导致血管腔内血栓形成而非传统的斑块堵塞. 这对传统的动脉粥样硬化动物模型提出了挑战, 使得建立新的尽可能类似于人类病变的动物模型的紧迫性更为突出. Stary 和 Virmani 等^[2,3]给出的斑块破裂概念为: 斑块纤维帽破裂, 导致形成与脂质核心直接相延续的血管腔内血栓, 其要点在于, 是纤维帽发生了破裂, 导致腔内血栓形成, 而不是斑块内发生出血事件. 研究斑块破裂机制有助于临床上防止斑块破裂的发生, 在人类直接研究斑块破裂显然是不可行的, 目前建立了很多研究斑块破裂的自发性或诱导破裂的动物模型, 但这些模型都难以模拟人类斑块破裂及导致的终点事件^[4]. 由于缺乏一个好的研究斑块破裂的动物模型, 因此研究进展有限. 本实验拟通过建立动脉粥样硬化动物模型, 尔后通过体外直接可控破裂斑块的方法, 为探讨斑块稳定性提供一个简单易行的动物模型.

1 方 法

1.1 猪动脉粥样硬化模型的建立

3~4 月龄雄性贵州小型香猪 10 只 (购自第三军医大学动物部), 平均体重 (6±2) kg/ 只, 动物随机分为基础饲料组 (control diet, CD, $n=5$), 和高脂高胆固醇饲料组 (high fatty high cholesterol, HFHC, 基础饲料+2%胆固醇和 10%猪油, $n=5$). 分栏喂养, 日投食两次, 日粮为体重的 2%, 自由饮水, 喂养 12 个月.

1.2 血脂的测定

每 2 个月末称体重并从禁食过夜的小香猪眶静脉窦采集血样, 检测血脂浓度. 血浆总胆固醇 (TC)、血浆甘油三脂 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的浓度均用氧化酶法测定.

1.3 动脉病变大体形态分析

第 12 个月末, 用适量盐酸氯氨酮麻醉动物,

*国际科技合作重点项目 (2004DFA06400) 和湖南省科技厅重点资助项目 (01SSY1003).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0734-8281288, E-mail: yzyanghy@163.com

*** 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

收稿日期: 2005-06-24, 接受日期: 2005-09-07

股动脉插管放血,处死动物. 取出整条主动脉(从主动脉弓至髂动脉分枝下 1 cm)、颈总动脉和冠脉, 清除其外部的脂肪和结缔组织, 生理盐水冲洗干净, 10%福尔马林液固定, 沿动脉纵向剪开, 37℃ 浸泡在由 5 g/L 苏丹Ⅳ与 70%异丙醇配制的混合液中 15 min, 然后用 70%异丙醇冲洗 3 次. 把动脉平铺于玻璃盘上并照相, 动脉脂纹通过数码成像系统 (GT-800, Seiko Epson 公司) 记录, 脂纹与动脉总面积用图像分析软件 (HPIAS-1000) 进行计算.

1.4 动脉病变病理形态学分析

PBS 清洗各组动物动脉, 把实验病变区和对照组相应区域用 10%福尔马林液固定后, 常规石蜡包埋, 作 HE 染色, 观察动脉粥样硬化斑块的形成以及血管壁的变化.

1.5 动脉粥样硬化斑块体外稳定性分析装置

装置主要由一个压力泵(爱尔兰 Merit 医疗公司), 一个压力记录装置 (BL-420 生物信号记录系统, 成都泰盟科技有限公司)和一个压力传输通道(末端带有 7 号针头) 组成. 通过一个三通管, 将加压装置和压力记录装置及压力传输通道连接起来. 通过加压装置逐步加压, 将压力通过压力传输通道末端的针头传递到斑块内, 压力大小通过压力记录装置记录 (图 1).

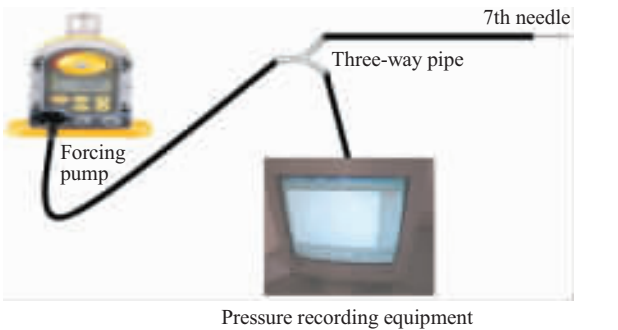


Fig. 1 The design of pressure making atherosclerotic plaque rupture

1.6 动脉粥样硬化斑块体外稳定性分析

取肉眼观察向血管腔内突起明显的新鲜斑块, 由血管外膜与管壁成大约 30°方向进针, 根据进针时的阻力变化和肉眼观察, 判定针尖是否进入斑块部位内膜下. 在确定针尖进入斑块内膜下后, 用球囊充气加压, 同时开始记录压力. 肉眼观察发现斑块破裂和压力曲线突然下降作为斑块破裂的判定指标.

2 结 果

2.1 实验动物体重、血脂水平变化结果及动脉病变大体和病理形态学描述

实验期间 HFHC 组和 CD 组动物的体重及其增加值差异无显著性 ($P>0.05$)^[9]. 与 CD 组比较, HFHC 组血浆总胆固醇(TC)、血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 含量从第 3 个月起持续增高 ($P<0.05$), 血浆甘油三酯(TG) 水平从第 5 个月起持续增高 ($P<0.05$)^[9]. 在 HFHC 组动物的主动脉、颈总动脉、髂动脉和冠状动脉可见 As 斑块和 / 或脂质条纹, 病变以腹主动脉和髂总动脉最为明显. CD 组的主动脉、颈总动脉、髂动脉和冠状动脉均没有发现 As 斑块和 / 或脂质条纹病变^[9](图 2). 高脂高胆固醇组腹主动脉

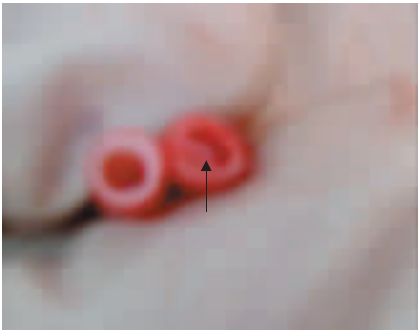


Fig. 2 Atherosclerotic plaque in minipig carotid
Left is control group, and right is the experimental group (the arrow show the plaque).

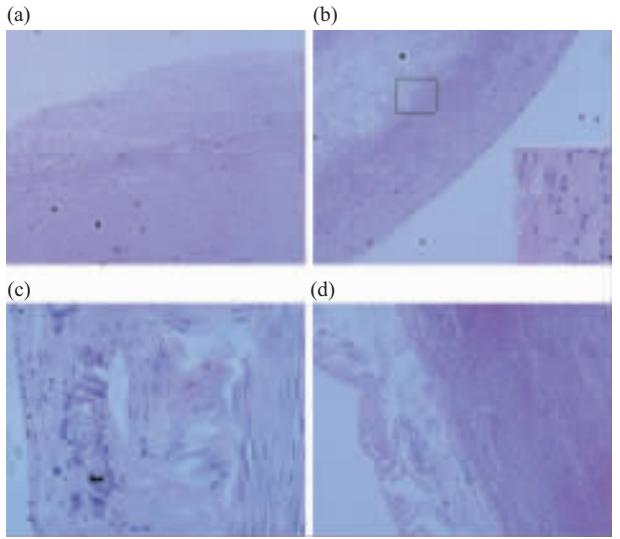


Fig. 3 The pathological character of the advanced atherosclerotic plaque

(a) shows the plaque protrude from vascular well and obstruct the vascular duct. (b) shows inflammatory cells infiltrating into intraplaque. (c) shows calcific lesion in plaque. (d) shows the multiple lesions in plaque (40×).

AS斑块部位石蜡切片, HE 染色后, 光镜下可见 AS 斑块部位, 内膜明显增厚向管腔内突起, 表面纤维组织增生, 纤维帽深部开始玻变, 斑块内可见到较大的脂质粥样坏死核和胆固醇结晶, 可见较多的泡沫细胞和大量炎症细胞浸润, 斑块基底钙化, 斑块内有出血, 斑块肩部较薄, 斑块与中膜融合, 内弹力膜断裂消失, 平滑肌细胞排列紊乱, 稀少, 血管外膜胶原及毛细血管增生 (图 3). 而对照组未见 AS 斑块和脂质条纹 (图 4).

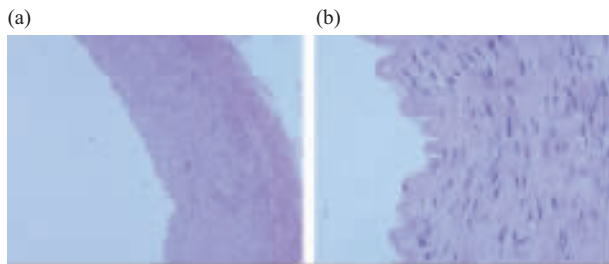


Fig. 4 No atherosclerotic lesions are discovered in control diet group
(a) 10 $\times$. (b) 40 $\times$.

2.2 斑块稳定性检测结果

压力作用下斑块发生破裂, 肉眼可见斑块部位发生凸起, 在破裂的瞬间又消失, 同时可见压力记

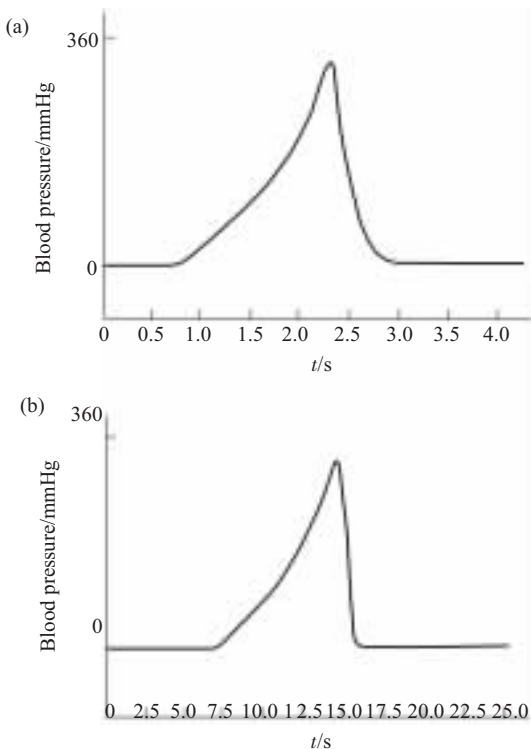


Fig. 5 Pressure change curve of atherosclerotic plaque rupture

(a) and (b) show two different atherosclerotic plaque.

录装置上压力曲线突然下降, 这表明斑块发生破裂. 破裂斑块 HE 染色发现, 斑块的内膜与中膜分离, 表明针尖确实插在内膜下且斑块发生了破裂, 同时可见到斑块破裂常发生在斑块的边缘 (图 5, 图 6).

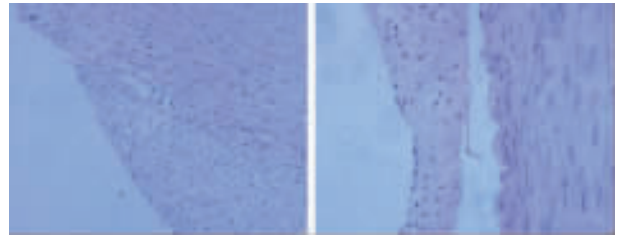


Fig. 6 The atherosclerotic plaque dissociated from the vascular wall media after rupture (40 $\times$)

3 讨 论

早在 1908 年, Ignatowski 等认识到高胆固醇饮食与实验性动脉粥样硬化形成可能有关, 1913 年, Anichkov 和 Chalatov 用高胆固醇饮食建立起了第一个动脉粥样硬化家兔模型^[67]. 自此以后, 建立起了包括高脂高胆固醇膳食诱发的、天然突变和人工突变的各种动脉粥样硬化动物模型. 这些模型或是从调脂的角度, 或是从斑块 / 脂纹消退的角度来进行建模, 而从整体上看都有一定的局限性. 最近认为不稳定斑块破裂导致的急性冠脉综合征和外周血管堵塞是临床上心血管事件的主要原因, 因而建立有斑块破裂倾向的动物模型又成为研究的热点.

本实验结果显示, 以高脂高胆固醇饲料喂饲的贵州小香猪, 血浆总胆固醇、甘油三酯及高密度脂蛋白胆固醇含量明显增高, 但升高幅度与人类高脂血症血脂水平相接近. 油红 O 及肉眼观察, 主动脉、髂动脉、颈总动脉及冠状动脉都可见到红染脂质条纹和向管腔内突起的斑块, 其中以冠脉和腹主动脉病变最为明显, 这与人类动脉粥样硬化病变的分布特点也相一致. 病理形态学结果表明, 这些斑块具有人类成熟斑块的特点: 具有脂质坏死核心, 有大量泡沫细胞存在, 炎性细胞浸润, 可见钙化, 出血等等^[8]. 这些结果说明复制 AS 模型无论在血脂水平, 还是在动脉粥样硬化病变特点及病理形态学分析都与人类动脉粥样硬化病变特点相一致, 因此该动物模型可以作为一个很好的研究动脉粥样硬化的工具.

大量临床资料的观察总结出了一些有破裂倾向斑块的病理形态学特征^[9], 但是具体的破裂机制仍不清楚. 以往建立了数个斑块破裂的在体动物模型, 主要包括自发性斑块破裂和诱导破裂两类. 其中 apoE^{-/-} 小鼠被看成是研究斑块破裂最成功的自发性斑块破裂模型, 但是事实上在 apoE^{-/-} 小鼠中观察到的被认为是自发性斑块破裂仅仅是一种斑块内出血^[9,10]. 此种斑块破裂现象也见于其他一些用来研究斑块破裂的动物模型, 如 P53 诱导斑块内平滑肌细胞凋亡加肾上腺素诱导破裂模型, TGF- β 抑制模型以及遗传性高 LDL-C 血症猪模型等^[11~14], 也都大部分是斑块内出血, 而非纤维帽破裂导致脂核直接与血液接触而形成与脂核相衔接的血管腔内血栓形成. 研究斑块破裂首先要求所选择的动物模型在斑块的病理形态学上与人类斑块类似. 成熟的人动脉粥样硬化斑块由一个大的脂质核心和纤维帽, 以及浸润的炎性细胞组成. 本实验的贵州小型香猪模型中, 斑块在大血管中的分布部位以及在病理形态上非常接近人类的斑块, 而有别于家兔等实验动物仅有脂质的沉积, 因此是一个很好的研究动脉粥样硬化斑块破裂的动物模型.

以往研究动脉粥样硬化斑块破裂都是在体进行, 斑块破裂除与斑块本身病理形态学特征有关外, 还与全身性因素有关, 如血液流变学改变、血液凝固性的改变、全身性炎症状态以及反复感染等等^[4]. 这些因素对斑块破裂的作用具有不可控性, 加上在体观察斑块破裂状况比较困难, 因而建立直接的压力诱导斑块破裂模型就很有必要. 以往建立的诱导斑块破裂模型主要是应用一些强缩血管药物如肾上腺素、组胺、血管紧张素 II 和 5-羟色胺等^[11,15,16], 主要目的是改变斑块局部血管壁的力学环境, 从而诱导斑块的破裂. 很显然此种方法具有给药剂量的不可控性和结果的不可预期性, 这样就导致了对于斑块破裂研究的量化比较不能进行. Rekhter 等^[17]将高胆固醇血症家兔胸主动脉内皮细胞去除后, 将一个特制的球囊埋入管壁, 在一个月以后即可在球囊部位形成类似于人动脉粥样硬化斑块的病变, 再通过与外界连通的导管即可控诱导斑块破裂. 该模型可以将与斑块破裂相关的因素如斑块内平滑肌细胞数目、胶原含量等与斑块破裂压进行量化比较, 从而直接说明这些因素与斑块破裂的量化关系. 该模型的最大问题在于制作过程复杂, 代价很高, 因此在本实验中我们尝试建立一个直接体外可控破裂斑块模型. 我们通过压力传输通道将

压力泵加压传递到斑块内, 再通过与之相连接的压力记录装置记录斑块破裂的压力情况, 实验结果表明, 这种方法行之有效. 熟练操作下, 针尖可以直接进入斑块内, 而不像文献^[17]会直接影响到斑块的形成, 从而可能会影响斑块生物学性质. 而且斑块破裂的方式接近于临床及病检发现的人类斑块破裂常发生在斑块的肩部.

总之, 此种方法的优点在于方法简单, 易于实施, 在斑块破裂后, 可以用其进行进一步的细胞和分子生物学研究, 通过量化比较破裂压大小和相应的斑块内的病理形态结构, 以明确与斑块破裂相关的细胞和分子生物学机制. 此种模型也可用于药物干预后斑块稳定性研究. 需要指出的是, 斑块破裂后血栓形成是斑块破裂导致严重临床事件的主要原因, 该体外模型显然不能用于此方面的研究.

参 考 文 献

- 1 杨永宗, 阮长耿, 唐朝枢, 等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床. 北京: 科学出版社, 2004. 139~166
Yang Y Z, Ruan C G, Tang C S, et al. The Basic and Clinical of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. Beijing: Science Press, 2004. 139~166
- 2 Stary H C. Natural and historical classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (5): 1177~1178
- 3 Virmani R, Kolodgie F D, Burke A P, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (5): 1262~1275
- 4 Lutgens E, Suylen R J A, Faber B C, et al. Atherosclerotic plaque rupture: Local or systemic process?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (12): 2123~2130
- 5 唐朝枢, 冯大明, 孙文清, 等. 动脉粥样硬化小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的变化. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (3): 221~227
Tang C K, Feng D M, Sun W Q, et al. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (3): 221~227
- 6 Shirley S. Optimal diets to prevent heart disease. *The Journal of the American Medical Association*, 2003, **289** (12): 1510
- 7 Anichkov N, Chalator S. Ueber experimentelle cholesterinsteatose: Ihre bedeutung fur die entstehung einer pathologischer processen. *Centrbl Allg Pathol Pathol Anat*, 1913, **24**: 1~9
- 8 Stary H C, Chandler A B, Dinsmore R E, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15** (9): 1512~1531
- 9 Williams H, Johnson J L, Carson K G, et al. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 788~792

- 10 Rosenfeld M E, Polinsky P, Virmani R, *et al.* Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (12): 2587~2592
- 11 von der Thusen J H, van Vlijmen B J, Hoebe R C, *et al.* Induce of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E-/-mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation*, 2002, **105** (17): 2064~2070
- 12 陈文强, 张 运, 张 梅, 等. 外源性人野生型 p53 基因转染导致兔动脉硬化斑块的不稳定性. *中华医学杂志*, 2004, **84** (1): 43~47
Chen W Q, Zhang Y, Zhang M, *et al.* *Chin Med J*, 2004, **84** (1): 43~47
- 13 Lutgens E, Gijbels M, Smook M, *et al.* Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (6): 975~982
- 14 Prescott M F, McBride C H, Hasler-Rapacz J, *et al.* Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol*, 1991, **139** (1): 139~147
- 15 Abela G S, Picon P D, Friedl S E, *et al.* Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation*, 1995, **91** (3): 776~784
- 16 Nakamura M, Abe S, Kinukawa N. Aortic medial necrosis with or without thrombosis in rabbits treated with Russell's viper venom and angiotensin II. *Atherosclerosis*, 1997, **128** (2): 149~156
- 17 Rekhter M D, Hicks G W, Brammer D W, *et al.* Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res*, 1998, **83** (7): 705~713

Study of The Stability of Atherosclerotic Plaque in Minipigs*

LIU Lu-Shan, YANG Yong-Zong**, FENG Da-Ming, SUN Wen-Qing,
TANG Chao-Ke, TANG Ya-Ling, YI Guang-Hui, WANG Zuo,
REN Zhong, WANG Gui-Xue***, YANG Bao-Tang, WAN Zai-Yang
(Institute of Cardiovascular Diseases, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract The atherosclerotic animal model was established, whose pathological changes and the plasma lipid level are as same as the atherosclerotic injury in human, and then the stability of atherosclerotic plaque was studied. The miniswine resemble human in the physiology, biochemistry and anatomy. So it is a very appropriate candidate animal for atherosclerosis study. The miniswine atherosclerotic model by high lipid and high cholesterol diet was successfully established, whose plaque included a necrotic lipid core, a thin fibrin cap, a lot of foam cells and inflammatory cells. Calcify and intraplaque hemorrhage might be found in plaque. Based on the pathological character, the model might be as an appropriate tool for the study of plaque rupture and stability. Atherosclerotic plaque rupture was the major cause of the clinic cardiovascular diseases. To study the mechanics of plaque rupture had important significance. The establishment of the appropriate animal model of plaque rupture was the premiss to study the mechanism of plaque rupture. The established animal model existed deficiency on many aspects, such as uncontrolling and quantifying the pressure which led to plaque rupture, and whether the rupture was really existed. A swine model of plaque rupture was established in the experiment, which had much excellences, such as the pressure which led to plaque rupture could be controlled and qualified *in vitro*, and the way was very simple. So it provided a very good animal model for studying plaque rupture and the relation of rupture and related factors with rupture.

Key words atherosclerosis, plaque rupture, minipig, animal model

*This work was supported by grants from Key Project of International Scientific and Technological Cooperation (2004DFA06400) and Special Funds for Department of Science and Technology of Hunan Province (01SSY1003).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-734-8281288, E-mail: yzyanghy@163.com

***College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China.

Received: June 24, 2005 Accepted: September 7, 2005