

家兔颈总动脉粥样硬化模型的建立

王 荣

齐鲁医药学院 山东 淄博 255300

DOI:

研究背景

心血管疾病是人类常见,也是能影响生命的一种比较严重的疾病,其中因为动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)造成的心血管病是不可避免的,多见于老年人。有相关研究人员预计,未来几年由动脉粥样硬化导致的心血管疾病将成为地球大部分种族引起致残乃至死亡重要的因素,同时随着经济发展,人民的生活水平得以提高,人口老龄化及城镇居民的增多,中国患有心血管危险因素的患者持续上升,已接近发达国家的水平。如今,心血管疾病成为了重大公共卫生问题,心血管疾病居各类疾病之首。因此,继续进行探究动脉粥样硬化的病因、病理和机制对心血管疾病的控制尤为重要。

尽管研究心血管疾病方面的科研工作人员非常多,但到目前为止,对于 AS 的发病机理尚不明确。目前,对于内皮的损伤—炎症反应这一学说,是人们普遍比较认可。动物和人体在生物学、解剖学和病理生理学有相似性,可以利用实验动物复制动脉粥样硬化的动物模型是为研究相关的发病机制和表现体征,为疾病的研究提供了有力的科学依据。同时提高了 AS 相关疾病的临床治疗的可靠性。

研究目的

近年来利用实验动物复制多种心血管疾病的病理模型证据可靠^[1-3],大量研究资料显示,利用高脂饲料单纯喂养或高脂血症动物动脉内膜损伤致 AS 模型,或者在此研究方法的基础上,机械地诱发斑块破裂,再做出 AS 斑块破裂的动物实验模型^[4],以及 von der Thuson 等^[5]采取特异部位缩减 AS 进程的

方法转染 P53,诱发的斑块破裂模型。目前,采用家兔建立的 AS 模型比较广泛。Forster 等^[6]及 Haunstetter 等^[7]对兔和人的 AS 斑块进行了比较,证实了家兔的 AS 斑块与人的 AS 斑块有相似性。该课题组亦利用外源性 P53 基因转染,建立了易损斑块的模型^[8]。由于实验方法繁琐,工序复杂,周期长,加上动物本身的不可控性,研究结果差异颇大,若想明确模型的效果有待验证。目前我们仍需要建立更为简单可靠的动物模型。故本实验拟采用喂养高脂饲料与动脉内膜球囊损伤相结合的方法建立腹主动脉粥样硬化的模型。

材料和方法

1 实验动物和材料

宁夏医科大学内购健康家兔 20 只,雄性,0.5—1.0 千克,根据课题要求,随机分组:对照组(n=5),高脂饲养组(n=5),高脂饲养+假手术组(n=5),球囊损伤+高脂饲养组(n=5),均按照实验方案饲养 8 周。对照组使用普通饲料饲养,其他三组使用高脂饲料(基础饲料+4%胆固醇+4%猪油)饲养。

2 检测仪器和检测方法

2.1 激光多普勒血流检测仪。8 周后,所有实验组动物在取材前,用激光多普勒血流检测仪进行血流检测,观察右侧颈总动脉单位面积内血流量及血流速度。将家兔用乙醚吸入性麻醉后仰卧于兔台上,头偏向左侧,充分暴露颈部颈总动脉,进行观察。

2.2 动物模型的建立 颈总动脉球囊损伤术:高脂饲养+假手术组和球囊损伤+高脂饲养组家兔术

前禁食禁水 6 小时,耳缘静脉注射乌拉坦(5ml/kg),将家兔固定在兔台上,酒精消毒后,静脉注射肝素钠 100 U/kg 用于抗凝处理,剪开颈部皮肤 3—5 厘米,钝性分离右侧颈总动脉至颈内颈外分叉处。4 号手术线结扎颈外动脉,颈总动脉近心端和颈内动脉用动脉夹夹住,球囊损伤+高脂喂养组临近左颈总动脉分叉处剪开一 V 形切口,逆行插入直径 2.5 mm × 10 mm 球囊,长度 2cm,与压力泵连接,增压至 2 个大气压,从近心端开始,缓慢转动球囊并回拉,重复 3 次后取出球囊,将颈外动脉起始部进行结扎,恢复血流后,进行手术缝合。

2.3 术后处理 将手术后家兔在麻醉状态下静脉注射青霉素 5 万 U 以防止术后感染,并继续使用术前喂养方案进行喂养。与其他两组一起放回动物房饲养。饲养 8 周后检测血流、取材。

2.4 血脂分析 通过日本希森美康 XS-500i 全自动血脂分析仪对各组家兔进行 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的含量进行检测。

2.5 病理学分析 常规消毒后,家兔耳缘静脉取血,进行麻醉处理,切开颈部皮肤及皮下组织,重复暴露右侧颈总动脉,并快速取出,用生理盐水进行冲洗,血管周围液体用滤纸吸干后,小心去掉血管周围残余组织。放入 4% 的多聚甲醛溶液(磷酸盐缓冲液配制)中固定,过夜后,利用酒精进行梯度脱水,包埋,切片,厚度 4 μ m,进行 HE 染色,使用中性树脂进行封片,然后在光学显微镜下观察。

1.3 采用 SPSS 23.0 进行统计学数据处理,并对实验数据予以对比分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

实验结果

1 4 组颈总动脉血流情况的比较

激光多谱勒血流成像图,与对照组相比较,高脂饲养组,高脂饲养+假手术组,球囊损伤+高脂饲养组血流水平有显著差异($P < 0.05$),其中球囊损伤+高脂饲养组的血流量水平明显高于高脂饲养组和高脂饲养+假手术组。见图 1

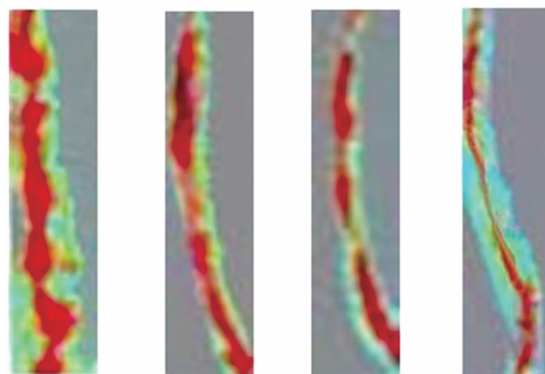


图 1

注:从左向右依次为对照组,高脂饲养组,高脂饲养+假手术组,球囊损伤+高脂饲养组。

统计结果分析,球囊损伤可加速动脉粥样硬化斑块形成($* P < 0.05$),而经高脂饲养组,高脂饲养+假手术组处理的较之球囊损伤组的效果显著下降($* P < 0.05$)。如图 2

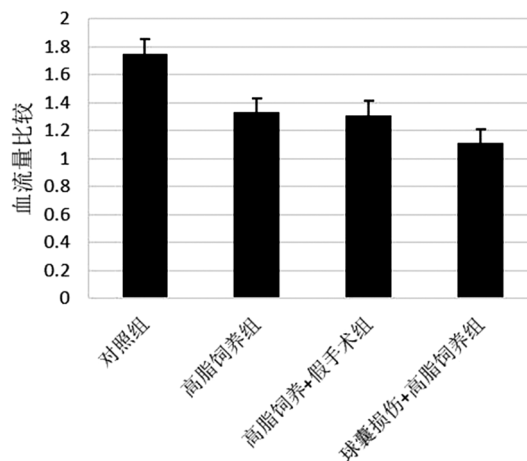


图 2

2 4 组家兔血脂水平的变化

与对照组相比较,高脂饲养组,高脂饲养+假手术组,球囊损伤+高脂饲养组血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平有显著差异($P < 0.05$),其中球囊损伤+高脂饲养组的血清中 TC、TG、LDL-C 水平明显高于高脂饲养组和高脂饲养+假手术组,HDL-C 水平明显低于高脂饲养组和高脂饲养+假手术组;高脂饲养组和高脂饲养+假手术组相比无显著性差异。如表 1

表 1 各组家兔血清 TC、TG、HDL 及 LDL 水平比较 (x±s, mmol/L)

组别	只数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	5	1.06±0.33	0.66±0.21	6.53±0.57	2.77±1.11
高脂饲养组	5	26.53±3.07#	2.31±0.66#	4.32±0.21#	20.37±1.19#
高脂饲养+假手术组	5	25.78±2.83#	2.38±0.39#	4.41±0.54#	19.86±6.16#
球囊损伤+高脂饲养组	5	35.83±4.16*	4.51±0.27*	0.99±0.38*	27.61±1.47*

注: # 与对照组比较, $P < 0.05$; * 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 4 组颈总动脉斑块情况的与对照组比较

HE 染色镜下观察正常对照组, 内膜光滑而完整, 高脂饲养组和高脂饲养+假手术组和球囊损伤+高脂饲养组部分内膜变厚, 斑块向管腔凸起, 并有大量脂质和泡沫细胞沉积和聚集在内膜下, 部分中层弹力纤维断裂、排列紊乱, 并伴有炎症细胞浸润, 但球囊损伤+高脂饲养组的更为严重和典型, 同时结合表 1 中各组家兔的血脂水平均明高于其它组(表 1), 因此可以推断由球囊损伤构建的颈总动脉粥样硬化模型是可行的。

结论与展望

采用球囊损伤术和高脂饮食建立动脉粥样硬化狭窄的动物模型, 结果显示, 球囊损伤术可以加速动脉粥样硬化斑块的形成。此建模方案耗时短、效果好、可重复, 比较适合用于 AS 相关实验的研究。但是, 由于动物和人的机体差异, 病程发展的过程也存在不同, 要使病理的模型更契合与人类, 以及斑块形成过程中, 动脉内径狭窄程度的控制还有待于进一步的研究发现。

[1] LIAO X, SLUIMER J C, WANG Y, et al. Macro-phage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 15: 545-553.

[2] CONSTANTINIDES P, CHAKRAVARTI RN. Rabbit arterial thrombosis Production by systemic Procedures. Arch Pathol. 1961; 72: 197-208.

[3] Johnstone MT, Botnar RM, Perez AS, et al. In vivo magnetic resonance imaging of experimental thrombosis in a rabbit model. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(9): 1556-1560.

[4] Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. Cir Res. 1998; 83(7): 705-713.

[5] von der Thusen JH, van Mijmen BJ, Hooft RC, et al. Induction of atherosclerotic Plaque rupture in a P53-deficient mice after adenovirus-mediated transfer of P53. Circulation. 2002; 105(17): 2064-2070.

[6] Chen WQ, Zhang Y, Zhang M, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2004; 84(1): 43-47. 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[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(1): 43-47.