

鹌鹑实验性动脉粥样硬化发生过程的动态观察

马杰 周群 杜佳林 张秀敏 郭力辉

(辽宁省中医研究院病理生理室, 沈阳 110031)

Continuous Studies of Experimental Atherogenesis Process in Quails

MA Jie, ZHOU Qu, DU Jia-Lin, ZHANG Xiu-Min, GUO Li-Hui

(Liaoning Academy of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110013, China)

ABSTRACT

In this studies, we used the plaque grades, the endangia thickness of aorta as Criteria to estimate the atherosclerotic lesion grade in Quails and to choose the best modeling time. At the same time, we have also studied the relationship of the atherosclerosis, cholesterol and the membrane fluidity of peripheral red blood cell. The results showed that the modeling time was the retarded the grade of atherosclerosis. It was ideal to model for 16 weeks. Plaques existed on the endangia of the aorta, and the endangia thickened under a microscope. The pathomorphologic changes were similar to that of human being. The membrane fluidity decreased. The animal's model may be useful in the research of atherosclerosis in human.

KEY WORDS Quail; Atherosclerosis; Membrane fluidity; Disease model

摘要 本实验以主动脉斑块分级、内膜厚度等指标, 评估鹌鹑喂饲胆固醇饲料形成动脉粥样硬化的程度, 选择最佳造模时间, 同时观察病变形成与血清胆固醇水平及红细胞膜流动性之间的关系。结果表明: 造模时间与动脉粥样硬化病变程度有明显相关性, 本组动物以16周造模较为理想, 主动脉有较明显的斑块, 镜下内膜明显增厚, 动脉病理形态学改变与人类近似红细胞膜流动性明显降低, 此模型用于人类动脉硬化症的

研究是可行的。

关键词 鹌鹑; 动脉粥样硬化; 疾病模型; 膜流动性

为了研究动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病原理, 往往需要建立一个成功的动物模型。本文目的在于了解鹌鹑造型后 As 病变的发展情况, 掌握何时用药观察 As 斑块变化的最佳时间, 为筛选及评价抗 As 药物提供可靠而省效的实验模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

市售雌性鹌鹑 40 只, 体重 119.0 ± 8.5 g, 由河北引进, 随机选取 10 只作为正常组外, 其余 30 只均为造型组, 正常组喂基础饲料(市售鸡饲料), 由沈阳嘉荣畜牧饲料有限公司提供, 造型组以 1% 胆固醇、1% 猪油、1% 豆油拌于饲料中喂饲, 连续观察 36 周, 其间在不同时期活杀。剩余一组动物在停喂胆固醇及油脂后, 以基础饲料续养 4~6 周, 观察斑块的变化。

1.2 鹌鹑血清胆固醇的测定

喂胆固醇饲料前及 6 周后, 由颈静脉抽血, 其中 5 只采血过少未列入, 故为 35 只。用酶法及 Autotech-128 全自动生化分析仪测定血清胆固醇含量。

1.3 鹌鹑外周血红细胞膜流动性的测定

喂胆固醇饲料 16 周后, 由颈静脉抽血, 在 6 周抽查时杀死 4 只, 3 只采血过少未列入, 故为 33 只。原理是用高灵敏度的膜脂区荧光探针 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH, 美国 Sigma 公司产品)嵌入完整红细胞膜双脂层, 通过日立 850-荧光分光光度计, 测定用 DPH 标记细胞膜的荧光偏振度(P), 按公式计算细胞膜脂区的平均微粘度($\bar{\eta}$), P 值大, 说明 DPH 分子活动性小, 脂双层的微粘度($\bar{\eta}$)大, 膜流动性越小, 反之亦然。具体步骤见参考文献[1]。

1.4 主动脉斑块的病理检查

造型组于喂胆固醇饲料 6 周、16 周、32 周、36 周时分别处死部分动物,并在造型 36 周后停喂胆固醇饲料 4 周、6 周时处死鹌鹑,分离左、右头臂动脉及主动脉至髂动脉分叉处,清除外膜附着组织,沿主动脉前壁中线纵行剖开,用 10% 甲醛溶液固定,以 Sudan N 染色,按下列主动脉斑块分级标准分级^[2]: 0 级(0 分)—内膜表面光滑,无奶油色变化,即无斑块; 0.5 级(0.5 分)—内膜有广泛的奶油色变化,但无凸出表面的斑块; 1 级(1 分)—有明显的奶油色凸起斑块,面积小于 3 mm²; 2 级(2 分)—斑块面积大于 3 mm²; 3 级(3 分)—有许多大小不等的斑块,有的融合成片,大斑块的面积超过 3 mm²; 4 级(4 分)—动脉内膜的表面几乎全为融合的斑块所覆盖。主动脉弓部取材,HE 染色,光镜下观察病理变化并用目镜测微尺测量内膜厚度。实验过程中死亡 6 只未列入,故为 34 只。

1.5 统计学处理

数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中体重随时间而增长,两组喂饲不同饲料动物的体重维持相近水平,无明显性差异($P > 0.05$, Table 1)。

Table 1. The change of Quails weight before and after the experiment(g, $\bar{x} \pm s$).

Groups	n	before	after
ordinary	10	118.8±5.9	134.3±15.5
modeling	30	119.0±9.2*	134.9±8.3*

*: $P > 0.05$ compared with ordinary group.

2.2 血清胆固醇含量的变化

喂胆固醇饲料前,两组动物血清胆固醇含量无明显性差异,而 6 周后,造型组鹌鹑血清胆固醇含量较正常组明显升高,二者有非常显著性差异($P < 0.001$, Table 2)。

2.3 鹌鹑外周血红细胞膜流动性

喂胆固醇饲料 16 周后,造型组红细胞膜微粘度较正常组升高,即红细胞膜流动性降低,二者有显著性差异($P < 0.05$, Table 3)。

Table 2. Content of cholesterol in Quails (mmol/L, $\bar{x} \pm s$).

Groups	n	before	after
ordinary	10	4.2±0.4	4.5±1.2
modeling	25	4.6±0.4	11.4±5.4*

*: $P < 0.001$, compared with ordinary group.

Table 3. The membrane fluidity of red blood cell in peripheral circulation ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	fluorescence polarization(FP)	microviscosity (η)
ordinary	9	0.21±0.05	1.64±0.26
modeling	24	0.25±0.02	2.40±0.08*

*: $P < 0.05$, compared with ordinary group.

2.4 主动脉形态学变化

2.4.1 主动脉粥样硬化病变程度 造型组实验共持续 42 周,主动脉斑块平均积分为 1.96±1.02,与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.001$);喂胆固醇饲料 6 周、16 周和 32~36 周,主动脉斑块平均积分与正常组比较均有显著性差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),主动脉内膜在 16 周、32~36 周时明显增厚,与正常组比较有显著性差异($P < 0.05$);停胆固醇饲料以基础饲料继续养喂 4~6 周时,主动脉斑块平均积分与正常组比较仍有非常显著性差异($P < 0.01$),内膜厚度及斑块积分与喂胆固醇饲料 32~36 周时比较,差异显著($P < 0.05$),说明停喂胆固醇饲料后 As 有可能自然恢复,同时结果显示造型时间与病变程度有一定相关性(Table 4)。

2.4.2 病理变化的光镜观察 造型 6 周时抽查,主动脉内膜仅有轻度改变,镜下见少数泡沫细胞分散存在(Figure 1)。16 周有较明显的斑块,镜下可见大量泡沫细胞,内膜明显增厚(Figure 2);32~36 周内膜明显增厚,纤维增生,有胆固醇结晶,细胞坏死较多,并有坏死区(Figure 3);停喂胆固醇饲料 4~6 周后,泡沫细胞减少,而裂隙空泡较多,但胆固醇结晶仍保留(Figure 4)。病理显示:停喂胆固醇饲料后 As 有自然恢复的趋势。

Table 4. Influeame of cholesterol on atherosclerosis in Quails($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	As grade							the endangia thick (μm)
		0	0.5	1	2	3	4	sum	
ordinary	9	2	5	2				0.50 ± 0.35	26.97 ± 10.28
modeling	25			11	6	6	6	$1.96\pm 1.02^*$	35.75 ± 14.96
for 5 weeks	4			3	1			1.25 ± 0.5^b	28.63 ± 13.32
for 16 weeks	7			3	2	2		1.86 ± 0.90^a	39.43 ± 9.99^a
for 32 to 35 weeks	7			1	1	3	2	2.86 ± 1.07^c	46.79 ± 18.84^a
non-cholesterol	7			4	2	1		$1.57\pm 0.79^{b\Delta}$	$25.11\pm 5.29^\Delta$

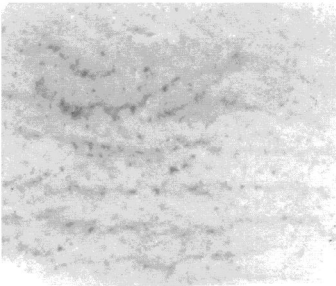


Figure 1. The animal's modeling time is 5 weeks. There are light changes and a few foam cells on endangia of the aorta through a microscope. (10×20).



Figure 3. After 32~36 weeks, fabric multiplied and cholesterolis crystallized. There are many cell necrosis and the area of necrosis. (10×20)

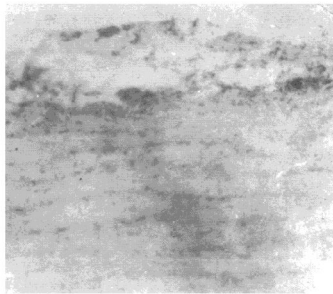


Figure 2. After 16 weeks, the endangia of the aorta got thick clearly and there are a lot of foam cells on it (10×20).

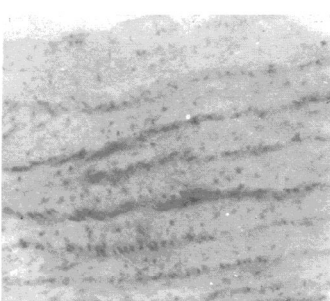


Figure 4. After 4~6 weeks, it didn't feed on cholesterolis, foam cells decreased and the space among cells increased. It shows that the cholesterol crystals still remains. (10×20)

3 讨论

细胞膜脂区微粘度是反映膜流动性的指标,膜微粘度越大,膜流动性越小,正常功能的细胞膜其膜脂质处于适当的流动状态。细胞膜流动性受体内许多因素的调节,血清中胆固醇含量升高,则红细胞膜上胆固醇增多,细胞膜流动性下降^[3]。本实验结果显示血清胆固醇高的鹌鹑,膜微粘度大,膜流动性比正常值低。流动性减低,不利于细胞代谢,易致细胞死亡,说明细胞膜的损伤对 As 可能起重要作用。

近年来研究表明血管壁内中膜增厚是 As 的早期指标^[4],而鹌鹑主动脉病变与人类早期脂肪斑相类似,主要病变在动脉分叉处严重,局限于内膜。本实验用 1%胆固醇及 2%油脂诱发鹌鹑发生 As 斑块。结果发现,As 斑块病理形态学变化的严重程度与造型时间密切相关,本组动物以 16 周造型较为理想,与正常组比较斑块已有凸起,内膜明显增厚,动脉病理形态学改变与人类近似,表现为平滑肌细胞数目减少,细胞核浓染、固缩,以此模型投药治疗,观察斑块内膜变化,评价抗 As 药物较为合理。又因其个体小,实验消耗的药品量较少,饲养、管理、采血和给药方便,故此模型可用于人类动脉硬化症的研究。

据文献[5]报道,当撤去致 As 的饲料后,发现在斑块缩小的同时,病灶内细胞数量和细胞内脂质含量减少。本实验停胆固醇饲料以基础饲料续养 4~6 周后,病变减轻,结果与文献[5]报道一致。

油脂与心血管疾病有关,文献报道以鹌鹑造 As,所用油脂高达 20%^[2,6]。本实验造型时间相对延长,说明与油脂低有关,提示我们在油脂的量上还要进一步探讨。

参考文献

- 1 陶鸿根,江世益,周逸平,等. 糖尿病病人红细胞膜脂区流动性的变化和胰岛素对其影响. 中华内分泌代谢杂志, 1986, 2(4): 239~241.
- 2 王巍,景厚德. 鹌鹑动脉粥样硬化模型的建立. 中华心血管杂志, 1984, 12(3): 222~224.
- 3 林克椿,聂松青. 细胞膜的流动性. 生理科学进展, 1985, 16(1): 83~89.
- 4 Bomithon-kopp C, Xaviver J, Anne T, et al. Early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged women a follow-up study. *Stroke*, 1993, 24: 1 837.
- 5 Weber G, Carlson LA. Regression of arterial lesions: Fact and problem. International Conference on atherosclerosis. Raven press, New York, 1978; 1~11.
- 6 萧锦腾,李树田,李新如,等. 猪油量与家兔动脉粥样硬化关系研究. 营养学报, 1991, 13(2): 114~118.

(1996-05-23 收到, 1996-12-01 修回)