

# 易损斑块动物模型的研究进展

胡 琴, 张 运

(教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 医学实验动物学; 易损斑块动物模型; 综述; 高胆固醇血症; 基因敲除

[摘要] 对易损斑块形成和破裂机制的探讨是目前研究热点。临床及斑块治疗研究迫切需要建立一个理想的易损斑块和破裂动物模型。基因敲除技术和先进的影像学技术为大体积动脉粥样硬化动物模型的应用提供了保证, 但这些模型的临床和科研应用价值尚存争议。本文就易损斑块动物模型的研究现状做一简要综述。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及其并发症的心血管病, 尤其急性冠状动脉综合征(不稳定型心绞痛、心肌梗死和猝死)是发达国家的主要死因。其主要病理基础是易损斑块(vulnerable plaque, VP)纤维帽破裂或断裂致冠状动脉血栓形成。现有模型虽模拟了血管再狭窄、As演变、心肌缺血等病理特点, 但尚无VP或斑块破裂的理想动物模型。临床及斑块治疗研究迫切需要建立一个理想的VP和斑块破裂动物模型。目前基因敲除技术和先进的影像学技术为大体积As动物模型的应用提供了保证, 但这些模型的临床和科研应用价值尚存争议。本文就易损斑块动物模型的研究现状做一简要综述。

## 1 易损斑块和斑块破裂概念和病理组织学特点

### 1.1 概念

早在1992年Muller等<sup>[1]</sup>首先提出了VP的概念。2002年Vimani等<sup>[2]</sup>将易形成血栓的As斑块病变定义为VP。最常见的VP分类有两种, 分别是薄帽纤维斑块和由脂质核心、薄纤维帽( $< 65 \mu\text{m}$ )、大量巨噬细胞(显微镜下 $> 25$ 个/ $0.3 \text{ mm}$ 直径)浸润组成的偏心性病变。斑块破裂是指纤维帽断裂、血液成分侵入病变, 血栓形成。VP按病理学特点分为腐蚀斑块和钙化结节, 前者有内皮缺失, 但无斑块破裂证据。钙化结节在纤维病灶表面, 可能是血栓形成部位。统计学证实: 70%~80%急性心肌梗死患者冠状动脉栓塞由斑块破裂所致, 而20%~30%与斑块腐蚀和钙化结节有关。虽然尚无统一命名, 但目前文献仍将“VP”同义于“薄帽的纤维斑块”。

### 1.2 组织病理学特点

与常见斑块相比较, VP具有以下组织学特点: VP体积大、血管正性重塑。④脂质池体积 $> 60\%$ , 脂质核心大小与斑块不稳定性成正比。④斑块肩部是承受环周力的主要部位, 大部分斑块破裂发生于此处。这为斑块检测奠定了基础。游离胆固醇、胆固醇酯、胆固醇晶体组成脂质核心。

其中氧化型脂蛋白和来源于巨噬细胞的组织因子促血栓形成。大量单核/巨噬细胞以及少量T细胞和肥大细胞浸润。炎症调控子如氧化脂蛋白、细胞因子和血管紧张素II促进炎症细胞聚积。③VP纤维帽含胶原、弹性蛋白、蛋白多糖及少量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC), 但ECM和SMC含量远低于稳定斑块。⑤常伴有滋养血管形成, 诱导炎症细胞浸润。

## 2 易损斑块的影像学检测

目前影像学技术已渗入As动物模型的研究。IVUS能清晰地分辨人类完整或破裂的纤维帽及脂质核心, 该技术如能检测斑块的膨胀性, 其应用前景会更好。不稳定性斑块在炎症因子作用下温度较正常血管高 $0.6 \sim 1.5^\circ\text{C}$ , 采用温度图能探测 $0.05^\circ\text{C}$ 温差<sup>[2]</sup>。而且近红外线光谱仪能探及斑块内的炎症细胞。此外, 光学相干X射线断层摄影(Optical coherence tomography, OCT)最小分辨率达 $10 \mu\text{m}$ , 判断纤维帽厚度,  $< 65 \mu\text{m}$ 者为VP<sup>[3]</sup>。直径 $20 \sim 50 \mu\text{m}$ 巨噬细胞浸润也能被OCT检测到, 这是VP的另一特征。除了细胞基础上的观测, 分子水平也能进行。因此, 先进的影像技术为评价As斑块的易损性提供了可靠工具。

## 3 传统As动物模型斑块的“易损性”

传统As动物模型存在固有的缺点和局限。如: 大白兔不能自发形成As斑块, 与人类As病变相差甚远, 但因其对高脂饮食的敏感性而被广泛采用。大鼠和犬类极少形成As斑块。相反, 猪和猴子As模型与人类相似, 但受费用、数量及伦理问题的限制。目前As动物模型斑块易损性的检测指标多在细胞水平, 易于被人们所接受的斑块易损性是VP的病因。如: 帽厚度的测量、帽与脂质核心的比值。“易损指

[收稿日期] 2005-10-09

[修回日期] 2006-08-31

[作者简介] 胡琴, 博士后, 副教授, 主要从事心肌能量代谢和动脉粥样硬化基因治疗研究, 以第一作者发表论著20余篇; 现在贵阳医学院附属医院心内科工作, 通讯地址为贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院心内科, 邮政编码550001, 联系电话0851-6855119-3022(0), 0851-6757616(H), 13885053096, E-mail为annettehu@163.com。通讯作者张运, 教授, 博士研究生导师, 中国工程院院士, 山东大学副校长, 山东大学医学院院长, 教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室主任, 齐鲁医院心内科主任。近年主要从事动脉粥样硬化性疾病基础和临床研究, 承担多项国家自然科学基金课题; 联系电话0531-82159356, E-mail为yur.zhang@163.com。

数”是指斑块内含巨噬细胞和 ECM 与 SMC 和胶原二者的比值。其中巨噬细胞数量在 VP 占重要地位,但其活性受组织因子影响。SMC 数量增多有稳定斑块作用,一旦发生凋亡,斑块易损性增加。基质金属蛋白酶(MMPs)是易损性增加的标志。但斑块易损性的描述很困难,且与斑块破裂无必然联系。因此,其应用也受到限制。

## 4 易损斑块大动物模型

### 4.1 诱发型易损斑块模型

Constantinides 等<sup>[4]</sup>早在 40 年前就建立了诱发兔 VP 动物模型。该模型是高脂饮食喂养新西兰大白兔 As 模型,经腹腔注射内皮毒素、促凝的蝾螈毒和组织胺以促进斑块破裂。以后 Abela 等<sup>[5]</sup>进行改良,采用球囊拉伤加速动脉硬化进程。予蝾螈毒、5 羟色胺或 Ang Ⅱ干预遗传性高脂血症 Watanabe 大白兔,可诱导 AMI,但无斑块破裂证据。物理刺激可诱发斑块破裂,如放置充气气囊在大白兔主动脉斑块处可建立斑块破裂和血栓形成动物模型。超过斑块伸展力的球囊压力通过增大斑块裂隙以诱发斑块破裂。该模型适合药物运送到病变靶点,作为检测稳定斑块策略的有效手段,但仅限于斑块力学特点的探索,对于斑块破裂的机制和大小的研究尚有局限性<sup>[6]</sup>。此外,直接注射某种物质至猪血管中膜,形成以脂质为主的病变,且病灶部位和大小能任意控制,可模拟出易损斑块成分<sup>[7-9]</sup>。2001 年,Keelan 等<sup>[10]</sup>采用带针头注射器球囊证实了该技术的可行性,但球囊充气诱发内膜形成限制了该模型使用。因此如应用不带球囊的针头注射器可避免上述缺点。最近有学者用球囊拉伤高脂饲养的新西兰大白兔髂动脉,并用放射性元素锶(15 拉德)照射髂动脉,4 周后斑块面积明显增大,巨噬细胞数目增加,SMC 减少,斑块易损性增加<sup>[11]</sup>,可作为探讨斑块易损性机制及稳定斑块治疗研究的动物模型。此外,陈文强等<sup>[12]</sup>应用外源性人野生型 p53 基因转染动脉硬化兔导致斑块不稳定,药物(中国斑点蝾螈毒、组胺)触发后出现斑块破裂及血栓形成,这为研究不稳定斑块建立了可靠的模型。新近研究发现转染 Fas 基因或过度表达 IL-18 可增加载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠斑块的易损性<sup>[13,14]</sup>。

### 4.2 自发型易损斑块模型

39~45 周龄的遗传性高胆固醇血症 Rapacz 猪冠状动脉斑块自发破裂、血栓形成。这是比较理想的自发型 VP 动物模型,但价格因素限制了其大规模使用<sup>[15]</sup>。总之,大动物 As 模型应用是有潜力的,但尚无一特定模型被广为接受。

## 5 易损斑块小动物模型

### 5.1 诱发型易损斑块模型

予含 21% 脂肪和 0.15% 胆固醇的西方饮食喂养载脂蛋白 E-低密度脂蛋白受体双基因敲除小鼠形成 As 模型,缺氧刺激诱发急性心肌梗死(AMI)。内皮素 A 拮抗剂抑制上述作用,但无急性斑块破裂或血栓形成的报道<sup>[16]</sup>。机械刺激如光化学反应能诱导血栓形成。有学者在载脂蛋白 E 基因

敲除小鼠颈动脉放置硅胶鞘并转染 P53 基因,结果发现纤维帽变薄,苯肾上腺素诱发后 40% 斑块破裂<sup>[17]</sup>。Shimshi 等<sup>[18]</sup>用二磷酸盐—阿仑膦酸钠和利塞膦酸钠予 16 周龄的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠灌胃 16 周,诱导出斑块破裂。目前为止,这是第一个研究 As 斑块破裂机制的动物模型。与大动物诱发型 VP 类似,小鼠模型未被广泛采纳,可能因为诱发因素与自身病理生理过程存在差距,更重要的是自发型 VP 小动物模型的问世。

### 5.2 自发型易损斑块模型

Dahl 盐敏感高血压大鼠转染人胆固醇酯转移蛋白后,除具有高血压大鼠的特点外,还出现增龄性高甘油三酯和高胆固醇血症,高密度脂蛋白下降,主动脉和冠状动脉可见 As 病灶,发生心肌梗死和猝死。这与人类近似,有大量的脂质沉积和纤维帽。虽然目前无斑块破裂证据,但解剖学上的相似性及心肌梗死的高发生率奠定了重要基础<sup>[19]</sup>。1994 年发现载脂蛋白 E 基因敲除小鼠胸主动脉能自发形成 As 病变,但病灶以黄色瘤为主,有大量坏死的脂肪成份,这在人类罕见<sup>[20]</sup>,与临床相关性较差。随着对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠研究的深入,近年来报道 24~60 周龄的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠头臂干动脉处(长约 150  $\mu\text{m}$ ,起源于主动脉,分成右颈总动脉和右锁骨下动脉)As 病变近似于人类:血管中膜萎缩、外膜炎<sup>[21]</sup>。成熟的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(42~54 周龄,C57BL/6 背景)饲以常规饮食,部分补充雌激素,结果发现:超过 75% 动物无名动脉斑块内出血,纤维成份变成坏死带,纤维帽丧失,而且这些病灶内皮剥蚀或缺失,有巨噬细胞浸润。虽然纤维帽变薄,但未发现斑块破裂和血栓形成的证据。该模型具有坏死区无细胞、血管腔内腐蚀病灶以及斑块内出血三大特点,与斑块腐蚀血栓形成高度一致<sup>[22]</sup>。在此基础上,最近将各含 50% C57BL/6 和 129SvJ 基因背景的小鼠载脂蛋白 E 基因敲除,6~8 周开始予高脂饮食(含 21% 脂肪和 0.15% 胆固醇)饲养,干预 4 周头臂干动脉即可出现明显粥样病灶,具有与人类 As 近似的 VP 特点,有丰富的脂质成份、相对变薄的纤维帽。与既往研究不同的是,98 只动物中 51 只发生急性斑块破裂,纤维帽变薄、断裂,血液成份进入病灶;可见纤维帽埋入病灶里,揭示静止斑块破裂反复发生。而急性斑块破裂引发管腔栓塞。该模型显示了 VP 的诸多特点,更重要的是证实了急性斑块破裂,这是 VP 动物模型研究领域的重大进展<sup>[23]</sup>。该模型为探讨急性斑块破裂的细胞和分子机制以及稳定斑块治疗提供了工具。其中,纤维帽埋入病灶,与静止斑块反复破裂相吻合。在人类也发现静止斑块反复破裂的现象<sup>[24]</sup>,证明了该种 VP 动物模型的可靠性。

## 6 结语

对易损斑块形成和破裂机制的探讨是目前研究热点,而采用合理的动物模型非常关键,传统的 As 动物模型应用存在局限。近年 VP 动物模型的研究,尤其载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的应用成为 As 领域研究的重大突破<sup>[25-27]</sup>。我们深信建立更符合人类 VP 病变特点的动物模型为时不远。

## [参考文献]

- [1] Muller JE, Tofler G. Triggering and hourly variation of onset of arterial thrombosis [J]. *Ann Epidemiol*, 1992, **2** (4): 393-405
- [2] Moreno PR, Lodder RA, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor WN, Muller JE. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy [J]. *Circulation*, 2002, **105** (8): 923-927
- [3] Tearney GJ, Yabushita H, Houers SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, et al. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography [J]. *Circulation*, 2002, **107** (1): 113-119
- [4] Constantinides P, Chakravarti RH. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures [J]. *Arch Pathol*, 1961, **72**: 197-208
- [5] Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Federman M. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model [J]. *Circulation*, 1995, **91** (3): 776-784
- [6] Nakamura M, Abe S, Kinukawa N. Aortic medial necrosis with or without thrombosis in rabbits treated with Russell's viper venom and angiotensin II [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **128** (2): 149-156
- [7] Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture [J]. *Circ Res*, 1998, **83** (7): 705-713
- [8] Granada JF, Moreno PR, Burke AP, Schulz DG, Raizner AE, Kaluza GL. Endovascular needle injection of cholesteryl linoleate into the arterial wall produces complex vascular lesions identifiable by intravascular ultrasound: early development in a porcine model of vulnerable plaque [J]. *Coron Artery Dis*, 2005, **16** (4): 217-224
- [9] 杨永宗. 中国动脉粥样硬化病理生理学研究近况[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 481-489
- [10] Keelan PC, Bayes-Genis A, Kantor B. A novel porcine model for in vivo detection of vulnerable plaque: deposition and localization of lipid-rich lesions in the coronary artery wall [J]. *Circulation*, 2001, **98**: 11-67
- [11] Pakala R, Leborgne L, Cheneau E, Chan RC, Yazadi H, Fournadjev J, et al. Radiation-induced atherosclerotic plaque progression in a hypercholesterolemic rabbit: a prospective vulnerable plaque model [J]? *Cardiovasc Radiat Med*, 2003, **4** (3): 146-151
- [12] 陈文强, 张运, 张梅, 季晓平, 林晨, 朱永峰, 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**: 43-47
- [13] Zadelaar As, von der Thusen JH, Boesten LS, Hoeven RC, Kockx MM, Verneel MA, et al. Increased vulnerability of pre-existing atherosclerosis in ApoE-deficient mice following adenovirus-mediated Fas ligand gene transfer [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **183** (2): 244-250
- [14] de Nooijer R, von der Thusen TH, Verkleij CJ, Kuipei J, Jukena JW, Van Derwall EF, et al. Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (12): 2313-319
- [15] Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Thoren P, Hansson GK. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B [J]. *Am J Pathol*, 1991, **139** (1): 139-147
- [16] Caligiuri G, Levy B, Pernow J, Thoren P, Hansson GK. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (12): 6920-924
- [17] Von der Thusen JH, van Vlijmen BJ, Hoeven RC, Kockx MM, Havekes LM van. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice after adenovirus-mediated transfer of p53 [J]. *Circulation*, 2002, **105** (17): 2064-070
- [18] Shimshi M, Abe E, Fisher EA, Zaidi M, Fallon JT. Bisphosphonates induce inflammation and rupture of atherosclerotic plaques in apolipoprotein E null mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328** (3): 790-793
- [19] Herrera VL, Makrides SL, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US, et al. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein [J]. *Nat Med*, 1999, **5** (12): 1383-389
- [20] Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesion development and progression [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (1): 141-147
- [21] Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, et al. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (12): 3593-601
- [22] Rosenfeld ME, Polinsky P, Vimani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM, et al. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (12): 2587-592
- [23] Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson KL. Characteristic of intact and ruptured atherosclerotic plaque in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 788-792
- [24] Newby AC, Libby P, van der Wal AC. Plaque instability-the real challenge for atherosclerosis research in the next decade [J]? *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 321-322
- [25] Lowe HC, Jang IK, Khachigian LM. Animal models of vulnerable plaque. Clinical context and current status [J]. *Thromb Haemost*, 2003, **90** (5): 774-780
- [26] 许金鹏, 王绿娅. 关于动脉粥样硬化斑块破裂的动物模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 440-444
- [27] Bengel FM. Atherosclerosis imaging on the molecular level [J]. *J Nucl Cardiol*, 2006, **13** (1): 111-118

(此文编辑 胡必利)