

## · 综 述 ·

## 易损斑块实验动物模型及评价

文 川<sup>1</sup> 徐 浩<sup>2</sup> 陈可冀<sup>2</sup> 黄启福<sup>1</sup>

**摘要** 针对易损斑块这一心血管病领域研究的热点,就近年来易损斑块的实验动物模型的文献进行简要概述。具体从易损斑块的概念、动物模型研究的意义、各模型易损斑块组织病理学特征,斑块易损性评价及国内的研究现状等方面做介绍。

**关键词** 动脉粥样硬化;易损斑块;斑块破裂;动物模型;不稳定斑块

**On Establishment and Assessment of Experimental Vulnerable Plaques Animal Models** WEN Chuan, XU Hao, CHEN Ke-ji, et al *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

**Abstract** Vulnerable plaques is the hot spot in the researching field of cardiovascular diseases. In this paper, literatures about establishment of experimental vulnerable plaques model animals published recent years were briefly reviewed and introduced concretely the conception, significance of researching, histopathologic characteristics of various types model, model assessment and current status of research.

**Key words** atherosclerosis; vulnerable plaques; plaques rupture; animal models; unstable plaques

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是以冠状动脉粥样硬化斑块破裂或糜烂,继发完全或不完全闭塞性血栓形成成为病理基础的一组临床综合征,包括不稳定心绞痛,非 Q 波性心肌梗死和 Q 波性心肌梗死等,严重威胁着人类健康。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块逐渐发展为易损斑块(vulnerable plaque),继而破裂导致血栓形成,是导致 ACS 发病的主要病理学基础。易损斑块的研究成为近年来心血管病领域研究的热点。本文就近年来易损斑块的实验动物模型研究进展作一简要概述。

#### 1 易损斑块的概念、意义、组织病理学特征

国内外文献上描述斑块的术语有多种:稳定性斑块、不稳定性斑块、易损斑块、活动性病变、非活动性病变等。1989 年 Muller<sup>[1]</sup>首次将引起多数急性心血管事件的具有破坏倾向的斑块称为“易损斑块”,其特点是脂质池大,纤维帽薄,斑块表面或内部有大量炎性细胞聚集。随着研究的不断深入,人们发现有些斑块虽然不具有上述特征但也能够引起急性冠脉事件。2003 年 Naghavi<sup>[2]</sup>等人,提出了以“易损斑块”来定义所有具有血栓倾向以及发展迅速、很可能成为“罪犯斑块”(culprit plaque)的动脉粥样硬化斑块。并按发展过程

将其分为 7 类:(1)大的脂质核心,纤维帽菲薄,且有巨噬细胞浸润;(2)斑块破裂伴不完全闭塞性血栓形成和早期机化;(3)斑块内的平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)丰富,含有大量蛋白多糖,使得斑块易遭侵蚀;(4)被侵蚀的斑块形成不完全闭塞性血栓;(5)斑块内出血;(6)钙化小结节向血管腔内突出;(7)慢性狭窄斑块,管腔呈偏心性,伴有严重钙化和陈旧血栓。斑块由稳定变为不稳定时,斑块内的 3 种成分发生改变:充满脂质的泡沫细胞死亡崩解,坏死脂质池变大;纤维帽中的 SMC 死亡使得纤维帽薄弱;内皮细胞功能异常、损伤,斑块出现溃疡,最终破裂,引发临床血栓栓塞事件<sup>[3]</sup>。

由于在人体上观察易损斑块的破裂非常困难,除了尸体解剖能够提供有限的回溯性资料,在活体上只能借助血管造影、血管内超声和快速体层 CT 等技术,加之斑块破裂的随意性很强,使得临床研究受到种种限制。因此寻找到一种理想的易损斑块动物模型,研究斑块由稳定状态发展至破裂、血栓形成过程,揭示易损斑块破裂的病理生理机制,对于急性冠状动脉综合征的预防和治疗,意义重大。

#### 2 斑块破裂的实验研究

斑块破裂是易损斑块发展的终极事件(endpoint),但是在动物模型中自发性的 AS 斑块出血、破裂相对较少发生。Prescott<sup>[4]</sup>等报道,患有遗传性高低密度脂蛋白(HDL)胆固醇血症的猪,2 年后可以形成典型的复杂斑块,3 年后冠状动脉 AS 斑块普遍发生血管新

作者单位:1. 北京中医药大学(北京 100029);2. 中国中医研究院西苑医院

通讯作者:文 川,北京中医药大学 93 号信箱(2002 级博士),Tel: 010-64286965, E-mail: linnwen@sina.com

生、自发性出血和斑块破裂。Rekhter<sup>[5]</sup>等人将经高脂/高胆固醇(cholesterol, CH)喂养的新西兰兔的胸主动脉用球囊牵拉,造成内膜损伤,并在该部位内置一球囊,1个月后斑块形成,将球囊充气,然后放气,引起斑块破裂,这种模型最大的特点是可以用于测定斑块的机械强度以评价斑块的易损性以及破裂后血栓形成的研究。Abela<sup>[6]</sup>等将经球囊拉伤的兔子喂养4~8个月,然后注射组胺升高血压,再注射 Russell viper venom(一种促凝血和内皮毒素样作用的物质),以触发斑块破裂和血栓形成。

小鼠的血浆胆固醇水平很低,而且绝大多数胆固醇在HDL颗粒中,在正常条件下很难形成动脉粥样硬化。但随着基因技术的兴起,各种基因敲除小鼠和转基因鼠作为研究动脉粥样硬化的新模型,近10年来受到广泛关注。

1992年美国两家实验室应用基因打靶技术将C57BL/6品系小鼠ApoE基因敲除,其血浆CH水平比正常小鼠高4~5倍,5~6周动脉内皮就有单核细胞黏附并向内皮下移行,10周脂质条纹形成,15周斑块内可见泡沫细胞和SMC细胞,20周由胶原和弹性纤维包绕的SMC细胞组成的纤维帽覆盖在坏死核心表面,形成成熟的斑块。随着年龄增长,出现钙化、增生的纤维帽。有些斑块破坏中膜细胞结构,形成动脉瘤,管腔狭窄甚至闭塞<sup>[7]</sup>。此后,转基因小鼠作为研究AS的动物模型,近年可见大量文献报道。Reddick<sup>[8]</sup>等人将ApoE缺陷小鼠动脉用镊子钳夹造成慢性斑块破裂后血小板血栓形成,同时也证明了损伤造成的血小板反应和SMC增生与ApoE基因缺失不相关。Calara<sup>[9]</sup>等人在老龄ApoE缺陷小鼠(9~20月龄)的冠脉粥样硬化斑块内观察到了出血,主动脉部位有斑块破裂和血栓形成。Johnson和Jackson<sup>[10]</sup>报道:11只ApoE缺陷小鼠喂养37~59周后,8只死亡,其中7只发生斑块破裂相关的管腔内血栓形成,6只在头臂干分叉至右颈总动脉和右锁骨下动脉部位有斑块破裂。Rosenfeld<sup>[11]</sup>等人在观察ApoE小鼠头臂干动脉时,发现30周龄到60周龄的小鼠都可以见到斑块内出血(30周,17%;36周,66%;42周,66%;48周,42%;54周,75%;60周,33%),但在形成的血栓附近很少有纤维素沉积和血小板聚集。小鼠的AS模型中也能出现自发性斑块破裂,形态学上表现为:纤维帽逐渐丧失,斑块内出血及纤维素沉积,崩解的纤维帽和血栓逐渐形成坏死核心。但在大多数情况下,不会引起血管的栓塞,也不会导致动物的死亡。这意味着虽然小鼠模型能够模拟斑块的破裂但却不能模拟与之相

关的死亡,可能与小鼠的解剖结构即种属特异性血液流变学特征有关<sup>[12]</sup>。但William<sup>[13]</sup>对98只ApoE缺陷小鼠(C57BL6/129SvJ杂交品系)饲以高脂/高CH饮食,约2/3死亡,剩余的1/3喂至60周,结果共有21只头臂干动脉处有急性破裂斑块,比较已破裂斑块和未破裂斑块发现,前者斑块大、脂质核心大、血管狭窄程度高而纤维帽薄。Bea等报道<sup>[14]</sup>3-羟基-3-甲基戊二酸辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaric acid coenzyme A)抑制剂辛伐他汀(Simvastatin)有稳定AS斑块的作用,且该作用与药物的降脂作用无关。该动物模型被用于研究药物抗AS和稳定斑块研究,相关文献报道近年不断出现,受到了广泛关注。

与ApoE缺陷小鼠相比低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体缺乏的小鼠病情相对较轻。在正常饲料喂养下,胆固醇为正常鼠的2倍,AS进展较慢,但在高脂、高CH饲料喂养下,CH水平和AS迅速发展。总体来说,ApoE缺陷小鼠和LDL受体缺陷小鼠的AS斑块相似,随着时间推移,由近心端的主动脉逐渐波及远端的主动脉,特别是在血流紊乱的部位<sup>[15]</sup>。此外,ApoE、清道夫受体B<sub>1</sub>(scavenger receptor B<sub>1</sub>, SR-B<sub>1</sub>)双缺陷的小鼠能形成更广泛的脂质和纤维粥样斑块,造成冠脉闭塞,动物在未成年就可发生心肌梗死、心功能不全而导致死亡<sup>[16]</sup>。

在生命医学的研究中,实验动物帮助人类了解正常的生理机能和病理状态下疾病的发生机制,还替代人类承受各种治疗的安全性评价和效果实验。但疾病模型的动物实验结论的正确性是相对的,其可靠程度取决于模型与人类疾病的相似或可比程度。例如,人类的血浆CH主要由LDL携带,ApoE缺陷小鼠主要由VLDL携带,故在AS发生机制上两者有很大不同<sup>[17]</sup>。Rosenfeld<sup>[11]</sup>等人将猝死患者的成熟斑块与42~60周龄的ApoE小鼠斑块比较发现两者有以下共同点:(1)血管腔径变小;(2)纤维帽变薄;(3)斑块内或表面形成钙化或血栓;(4)复合斑块;(5)纤维瘢痕形成。不同点:(1)小鼠斑块位于弹力层外;(2)中膜重塑和动脉瘤多见;(3)内膜剥脱后很难区别表面斑块糜烂和纤维帽破裂。最大的不同点在于:小鼠斑块或管腔内没有纤维素形成。有人认为可能纤维素产生了,但很快被纤溶作用降解了。

### 3 斑块易损性评价

在实验研究多以单一因素来诱导斑块破裂,如高脂饮食、机械压力等,而实际上斑块破裂是由复杂的因素共同作用的结果,两者之间存在一定偏差。在斑块破裂之前,可以通过对斑块的机械强度、血栓形成、炎

症和脂质 4 方面的检测,对斑块的易损性进行评价<sup>[18]</sup>。纤维帽厚度和脂质核心面积的比值(the cap/core rate),是公认的评价斑块易损程度的指标<sup>[19]</sup>。胶原成分维持纤维帽的完整性,抗机械应力,主要由 SMC 细胞合成分泌,由巨噬细胞(MP)分泌的金属基质蛋白酶(metal matrix proteins, MMPs)和组织蛋白酶降解。因此斑块胶原的含量,胶原降解相关酶的含量以及 SMC、SMC 凋亡的数量也可作为衡量斑块易损程度的指标<sup>[20]</sup>。SMC 是主要的细胞外基质分泌细胞,其迁移和增生有助于维持斑块的稳定性,而凋亡的意义则相反。所以 SMC 的数目和凋亡 SMC 的比例也能反映斑块易损性<sup>[21]</sup>。此外,Shiomi<sup>[22]</sup>等人将脂质成分(MP 和细胞外脂质)和纤维肌性成分(SMC 和胶原纤维)作为衡量斑块的“易损指数”。以上指标在实验研究中得到了广泛应用。

#### 4 国内研究现状

关于中药稳定易损斑块的研究尚未见系统报道。国内有学者采用 ApoE 基因缺陷小鼠观察中药抗 AS 作用,认为其机制可能涉及调脂、抗氧化和保护血管内皮的作用<sup>[23]</sup>,但对 AS 斑块稳定性影响没有进行研究。基于此,我们首次提出以活血中药干预动脉粥样硬化斑块稳定性的研究思路,采用 6~8 周龄的 ApoE 小鼠继喂高脂饲料所致 AS 模型进行观察,26 周后,模型组 ApoE 缺陷小鼠主动脉根部可以看到明显的动脉粥样斑块形成,泡沫细胞、脂质核心明显,纤维帽薄,局部可见巨噬细胞聚集,血管中膜结构严重破坏,脂质侵蚀,萎缩及钙化,显示出易损斑块的特征,活血中药具有不同程度干预易损斑块的作用<sup>[24]</sup>。

#### 5 展望

易损斑块动物模型还存在一些待解决的问题:(1)在有些动物模型中斑块内出血与血栓形成无关;(2)在现有的动物模型中破裂斑块与“罪犯斑块”之间并无必然联系;(3)易损斑块的外延在扩大,提出了“易损血流”、“易损患者”的概念,而动物模型仍以斑块为研究中心,而很少考虑血流-血管壁相互作用、血液凝聚、持续血管收缩及交感神经等因素的作用;(4)斑块表面糜烂是斑块易损的一大特征,但是其发生的机制人们所知甚少。

遗传操作技术的兴起,使得经遗传改良的小鼠成为研究 AS 十分有效、便利的动物模型。它还具备体形小、生命周期短、便于饲养和运输等优点<sup>[25]</sup>。如何利用遗传操作技术结合人类易损斑块的病理生理特征培育出更优良的易损斑块动物模型,大量有意的工作正在进行之中。

#### 参 考 文 献

- 1 Muller J, Toffer G, Stone P. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* 1989;79(4):733—743.
- 2 Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003; 108(14): 1664—1672.
- 3 Lindstedt KA, Leskinen MJ, Kovanen PT. Proteolysis of the pericellular matrix: A novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8):1350—1358.
- 4 Prescott MF, McBride CH, 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.
- 5 Rekhter MD, Shah N, Simari RD, et al. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res* 1998;83(7): 705—713.
- 6 Abela GS, Picon PD, Friedl SE, et al. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1995;91(3):776—784.
- 7 Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258(5081):468—471.
- 8 Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 1998;140(2):297—305.
- 9 Calara F, Silvestre M, Casanada F, et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol* 2001; 195(2): 257—263.
- 10 Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis* 2001; 154(2):399—406.
- 11 Rosenfeld ME, 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.
- 12 Bennett MR. Breaking the plaque: evidence for plaque rupture in animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(5):713—714.
- 13 Williams H, Johnson JL, Carson KG, 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.
- 14 Bea F, Blessing E, Bennet B, et al. Simvastatin promotes

- atherosclerotic plaque stability in apoE deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(11):1832—1837.
- 15 Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):2336—2345.
  - 16 Braun A, Trigatti BL, Post MJ, et al. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2002;90(3):270—276.
  - 17 Ohashi R, Mu H, Yao Q, et al. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14(5):187—190.
  - 18 Rekhter M. Vulnerable atherosclerotic plaque: emerging challenge for animal models. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17(6): 626—632.
  - 19 Loree HM, Tobias BJ, Gibson LJ, et al. Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14(2):230—234.
  - 20 Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94(6):2493—2503.
  - 21 Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999;41(2):361—368.
  - 22 Shiomi M, Ito T, Hirochi Y, et al. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. *Atherosclerosis* 2001;157(1):75—84.
  - 23 刘龙涛, 张文高, 郑广娟. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠在动脉粥样硬化研究中的应用. *山东生物医学工程* 2002;21(4):39—42.  
Liu LT, Zhang WG, Zheng GJ. Application of ApoE-gene knockout mice in research of atherosclerosis. *Shandong J Biomed Eng* 2002;21(4): 39—42.
  - 24 文川, 徐浩, 黄启福, 等. 活血中药对 ApoE 基因缺陷小鼠血脂及动脉粥样斑块炎症反应的影响. *中国中西医结合杂志* 2005;25(4):345—349.  
Wen C, Xu H, Huang QF, et al. Effects of drugs for promoting blood circulation on blood lipids and inflammatory reaction of atherosclerotic plaques in ApoE gene deficiency mice. *Chin J Integ Tradit West Med* 2005;25(4): 345—349.
  - 25 VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(1):12—22.

(收稿:2004-11-10 修回:2005-06-18)

## 《新中医》2006 年征订启事

《新中医》(月刊)是由国家中医药管理局主管、中华中医药学会与广州中医药大学共同主办的国家级中医药学术刊物,是被中华人民共和国新闻出版总署列入“中国期刊方阵——双效期刊”重点建设的刊物。继 2000 年《新中医》被确定为“中国中文核心期刊”后,2004 年《新中医》再次被确定为“中国中文核心期刊”。《新中医》是多个著名数据库的收录期刊及统计源期刊。

《新中医》一直坚持面向临床的方针,注重实践与实用,内容丰富,专栏众多,设有专家经验、名医名方、临床论著、中医急症、疑难杂症、中医外治、中西医结合、针灸推拿、验方介绍、古方新用、用药心得、医案精华、临证体会、文献综述、理论论坛、实验研究等专栏,信息量大,编排规范,可以最大限度地满足广大读者的需要,欢迎广大读者订阅。《新中医》每期 96 页,定价 7.8 元,全年 12 期,共 93.6 元。国内邮发代号:46—38,国外:M186。漏订者可直接向编辑部发行科订购,地址:广州市机场路 12 号大院 广州中医药大学内,邮政编码:510405,发行科电话:(020)36585482。

## 《北京中医》2006 年征订启事

《北京中医》是中医、中西医结合综合性学术期刊,月刊(2006 年 1 月起改为月刊)、大 16 开,为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国期刊全文数据库全文收录期刊,中国核心期刊(遴选)数据库全文收录期刊,中国自然科学核心期刊,北京市优秀科技期刊,由北京中医药学会、北京中西医结合学会主办。统一刊号 ISSN 1000-4599/CN 11-2258/R。本刊设有论著、京城名医、老中医经验、临床报道、中药方剂、针灸经络、学术探讨、文献综述、专题笔谈、京华中医医院、疑难病诊治、科研动态、短篇报道、成药研究等栏目。本刊附有英文目录,适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读,欢迎广大读者订阅,国内定价每册 6.50 元,全年 78.00 元。国内邮发代号:2-587,各地邮局订购。国外邮发代号:BM668,中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)订购。当地订阅不方便者,本编辑部代办邮购。编辑部地址:北京东单三条甲七号。邮政编码:100005,电话:(010) 65251589,传真:(010) 65251589,电子信箱:bjTcm@public3.bta.net.CN