

·颈动脉狭窄·

一种改良的小鼠颈动脉不稳定粥样硬化斑块模型构建方法

刘炎东¹ 杨復唐¹ 邹思力¹ 严国锋² 卢今² 曲乐丰¹¹海军军医大学附属长征医院血管外科, 上海 200003; ²上海交通大学医学院动科部, 上海 200003

通信作者: 曲乐丰, Email: qulefeng@smmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨一种改良后的小鼠颈动脉不稳定粥样硬化斑块模型构建方法, 为模拟人的颈动脉不稳定斑块形成提供动物模型。**方法** 选择低密度脂蛋白受体敲除(LDLr^{-/-})的C57BL/6雄性小鼠24只, 随机数字表法分为颈动脉串联结扎+高胆固醇饮食组(造模组, $n=12$)和假手术+高胆固醇饮食组(假手术组, $n=12$)。两组均连续进行12周喂养, 而后对小鼠颈动脉进行取材, 利用小动物颈动脉超声、病理形态观察等方法判断颈动脉斑块形成及稳定性情况。**结果** 两组小鼠体质量、血脂差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。造模组小鼠术后颈动脉有明显狭窄形成, 并在两端狭窄处之间的血管探测到有斑块形成。通过病理形态学观察, 假手术组颈动脉未见斑块形成, 假手术组头臂干动脉稳定斑块及造模组颈动脉斑块中脂质沉积面积分别为 $(4.8\pm0.6)\times10^4$ 、 $(10.2\pm1.1)\times10^4 \mu\text{m}^2$, 差异有统计学意义($t=12.023$, $P<0.001$)。另外两组斑块纤维帽厚度分别为 (122.4 ± 17.8) 、 $(41.3\pm20.2)\mu\text{m}$, 差异有统计学意义($t=9.224$, $P<0.001$); 两组坏死核心面积分别为 $(3.3\pm0.4)\times10^4$ 、 $(8.1\pm0.9)\times10^4 \mu\text{m}^2$, 差异有统计学意义($t=13.456$, $P<0.001$)。假手术组头臂干动脉稳定斑块及造模组颈动脉斑块中巨噬细胞占斑块中总细胞的比例分别为 $(20.8\pm5.2)\%$ 、 $(38.6\pm6.4)\%$, 平滑肌细胞比例分别为 $(32.5\pm7.3)\%$ 、 $(21.2\pm5.1)\%$, 差异均有统计学意义($t=6.114$ 、 3.585 , 均 $P<0.05$), 提示造模组斑块炎症反应更强烈。**结论** 将LDLr^{-/-}小鼠进行颈动脉串联结扎手术用于不稳定颈动脉斑块构建具有周期短、模拟效果确切、可重复性强等优点。

【关键词】 动脉粥样硬化; 卒中; 模型, 动物; 小鼠**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(81570440); 国家自然科学基金资助项目(81700408); 上海市卫计委科研项目(20164Y0096); 上海市科学技术委员会科研计划项目(16411966500)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.04.007

A modified mouse model of instable carotid atherosclerotic plaqueLiu Yandong¹, Yang Futang¹, Zou Sili¹, Yan Guofeng², Lu Jin², Qu Lefeng¹¹Department of Vascular and Endovascular Surgery, Changzheng Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200003, China; ²Department of Animal Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200003, China

Corresponding author: Qu Lefeng, Email: qulefeng@smmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore a modified method for constructing a mouse model of instable carotid plaque and provide the mouse model for simulating the development of human instable carotid plaque. **Methods** Twenty-four low density lipoprotein receptor deficiency (LDLr^{-/-}), C57BL/6, male mice were randomized into two groups according to computer-generated table, tandem constriction of carotid artery + high cholesterol diet (tandem surgery group, $n=12$); sham surgery + high cholesterol diet (sham surgery group, $n=12$). After 12 weeks of consecutive feeding, murine carotid artery were collected and analyzed by carotid ultrasound, pathological examination to assess the formation and stability of atherosclerotic plaque. **Results** No statistical difference in body weight and blood lipid level between the two groups was observed (all $P>0.05$). After surgery, through ultrasound biomicroscopy, obvious stenosis at the two sites of tandem constriction and atherosclerotic plaque between the two sites were observed in tandem surgery group. By pathological examination, no plaque was formed in carotid artery in sham surgery

group. The lipid area in the stable plaque of innominate artery in sham surgery group and the plaque of carotid artery in tandem surgery group were $(4.8 \pm 0.6) \times 10^4$, $(10.2 \pm 1.1) \times 10^4 \mu\text{m}^2$, respectively. The difference was statistically significant between the two groups ($t=12.023$, $P<0.001$). In addition, the thickness of fibrous cap in the above groups were (122.4 ± 17.8) , $(41.3 \pm 20.2) \mu\text{m}$, respectively. The difference was statistically significant either ($t=9.224$, $P<0.001$); The region of necrotic core were $(3.3 \pm 0.4) \times 10^4$, $(8.1 \pm 0.9) \times 10^4 \mu\text{m}^2$. The difference was statistically significant as well ($t=13.456$, $P<0.001$). The percentage of macrophages in innominate artery of sham surgery group and in carotid artery of tandem surgery group were $(20.8 \pm 5.2) \%$, $(38.6 \pm 6.4) \%$, respectively; The percentage of vascular smooth muscle cells were $(32.5 \pm 7.3) \%$, $(21.2 \pm 5.1) \%$, respectively ($t=6.114$, 3.585 , all $P<0.05$). The results indicated that the plaque in tandem surgery group had severer inflammatory response. **Conclusion** Through tandem constriction surgery upon carotid artery in LDL^{-/-} mouse, instable carotid atherosclerotic plaque can be induced, which is less time-consuming, replicable and effective.

【Key words】 Atherosclerosis; Stroke; Models, animal; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570440); National Natural Science Foundation of China (81700408); Shanghai Municipal Commission of Health Research project (20164Y0096); the Guiding Project of Western medicine from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (16411966500)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.04.007

动脉粥样硬化是一种进展性、慢性炎症反应性疾病,能引起全身大中动脉管壁粥样硬化斑块形成,成为全世界范围内发病率、死亡率最高的疾病^[1]。而以脑卒中为代表的心血管疾病,已经成为我国国民死亡的首要原因^[2],是动脉粥样硬化最为严重的并发症,多数患者由于颈动脉不稳定斑块发生脱落或形成血栓引起。对于不稳定斑块,其特征为薄的或者破裂的纤维帽,脂质池存在活动性炎症,容易增加斑块内出血、斑块内新生血管形成等^[3]。因此,对不稳定斑块形成机制的研究对临床治疗具有重要的意义。但是,目前对于不稳定斑块机制的研究更多局限于临床标本的分析,由于收集到的临床标本往往处于终末期病变,难以具体研究其形成过程,因此相关动物模型的建立十分必要。小鼠模型具有可重复性高、个体差异小、繁殖速度快、增殖数量多等特点,动脉粥样硬化模型构建相对容易。但是不论是载脂蛋白 E 基因敲除 (apoE^{-/-}) 还是低密度脂蛋白受体敲除 (LDLR^{-/-}) 小鼠,在喂养高脂或高胆固醇以后,在正常构建动脉粥样硬化周期内均不能自发形成颈动脉粥样硬化斑块^[4],需要人为在小鼠颈动脉进行干预。目前,颈动脉不稳定斑块模型构建方法相对较多,包括:长期单纯高脂喂养^[5]、高蛋氨酸饮食诱导^[6]、颈动脉球囊损伤^[7]、颈动脉完全结扎^[8]等,但是前两种构建方法喂养耗时长,得到的不稳定斑块未与稳定斑块进行对比,模型构建不确切;后两者构建过程中死亡率较高,难度大。本研究所建立的方法在喂养小鼠高胆固醇饮食 6 周后进行颈动脉串联结扎,手

术时间短,死亡率低,随后继续喂养 6 周后发现小鼠颈动脉斑块出现与人类不稳定斑块类似的表现。通过该模型,一方面可以直接检测药物对逆转斑块不稳定性的效果,为药物研发提供动物模型;另一方面,可以对不同阶段的小鼠颈动脉斑块及不稳定斑块进行分子水平研究,为寻找不稳定斑块形成相关药物靶点提供基础。

材料与方法

一、材料

选择健康 LDLR^{-/-} 的 C57BL/6 雄性小鼠 24 只,6 周龄,无特定病原体 (SPF) 级,平均体质量 $(20.0 \pm 0.7) \text{g}$ 。试验中所有小鼠均由上海交通大学医学院生物化学与分子生物学系提供,饲养于上海交通大学动物科学部 (自由进水,根据实验计划进食,明暗 12 h 交替,室温 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,符合美国国立研究所实验动物使用及护理指南规定)。实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0050。6-0 Polyester 丝线,直径为 $150 \mu\text{m}$ 的钛丝;高胆固醇饲料 (0.4% 脂肪 + 1.1% 胆固醇 + 18.8% 酪蛋白等,美国 Research Diets 公司 D12104C); Mac-3 (BD Science 550292)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA, Abcam ab5694)、苏木精、伊红、masson 染料购自 Sigma Aldrich 公司。防淬灭封片剂购自碧云天公司;动物超声机 (Vevo 770; VisualSonics),超声探头型号为 MS400,频率 30 MHz;解剖显微镜 (Nikon; MSZ1500)

二、方法

1. 颈动脉不稳定斑块模型构建:选择 LDLr^{-/-}的 C57BL/6 雄性小鼠 24 只,随机数字表法分为颈动脉串联结扎+高胆固醇饮食组(造模组, $n=12$)和假手术+高胆固醇饮食组(假手术组, $n=12$)。小鼠 6 周开始喂养高胆固醇饮食,6 周后行颈动脉串联结扎术,方法如下:术前对小鼠进行常规称重,采用戊巴比妥钠(60 mg/Kg)进行腹腔注射麻醉,在解剖显微镜下于小鼠颈部右侧前缘作长为 1 cm 纵向切口,钝性分离软组织,打开颈动脉鞘。将气管轻轻推向另一侧暴露右侧颈总动脉,向上分离至颈动脉分叉处,然后将钛丝平行放置于颈总动脉一侧并在距离颈总动脉分叉处 1、4 mm 处准备结扎钛丝及颈总动脉(图 1)。完全结扎后轻轻抽出钛丝。逐层缝合小鼠颈部组织,消毒,置于 30 °C 恒温毯上直至其恢复活动。假手术组暴露颈总动脉后进行逐层缝合。造模组中 1 只在术中发生死亡,建模成功率 92.9%。

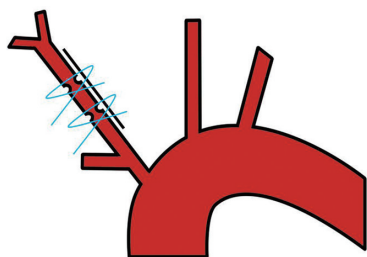


图1 小鼠右侧颈总动脉串联结扎模型示意图

2. 颈动脉超声检查:术后 3 周通过动物超声检查小鼠颈动脉结扎情况,观察小鼠双侧颈动脉狭窄情况。利用 3% 异氟烷完成气体诱导麻醉,术中给予 2% 异氟烷进行维持麻醉,氧气流量 2 L/min。待小鼠麻醉成功后,固定小鼠,并完成心电图监护,使用脱毛膏脱去小鼠颈部皮肤,在颈部皮肤处涂耦合剂后,用超声探头前外侧长轴探测双侧颈动脉,操作时维持小鼠心率 300~600 次/min。结扎处颈动脉狭窄程度测量方法为:1-狭窄处动脉直径/非狭窄处动脉直径。

3. 血脂指标检测:连续喂养 12 周后,将小鼠饥饿过夜,麻醉后经眼球摘除取血,血液样本室温放置 30 min 后,2 700×g 离心 20 min,提取上层血清,将其储存于 -80 °C 冰箱中,备用。检测时取血清 20 μ l,各利用 5 μ l 采用全自动生化分析仪检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)、高密度脂蛋白(HDL)及低密度脂蛋白(LDL)水平,有关操作严格

遵循仪器操作说明书完成。

4. 颈动脉取材及病理形态观察:连续喂养高胆固醇饮食 12 周后,麻醉后行眼球取血,待刺激小鼠足底无反应后,取出小鼠心脏,通过心室灌流磷酸盐缓冲液(PBS, 15 ml/只),排除血栓,而后灌流 4% 多聚甲醛(PFA)(5 ml/只)完成内固定,迅速剪开小鼠颈部皮肤,解剖显微镜下暴露右侧颈总动脉。取下整段颈总动脉,在两个狭窄处中间离断颈总动脉,两段均置入 4% PFA 进行固定,至少 24 h。将远心端颈总动脉进行蔗糖梯度脱水,进行最佳切割温度复合物(OCT)包埋,行冰冻切片制作。将近心端颈总动脉进行石蜡包埋,切片,完成苏木精-伊红(HE)、Masson 胶原纤维染色,观察斑块形态,并通过定量斑块纤维帽厚度(纤维帽定义为斑块管腔侧非坏死核心区域,每个标本随机选取三处进行测量,取平均值),判断斑块稳定性。

5. 油红 O 染色:称取 0.5 g 油红干粉溶于 100 ml 异丙醇中配置油红储存液,取出 -80 °C 冰箱中的 OCT 块,制备 6 μ m 切片,放入 55 °C 烘箱中 1 h。按照油红储存液:双蒸馏水为 3:2 的比例配置油红工作液,滤纸过滤 3 遍后静置 10 min 进行染色。而后将切片放入 PBS 缓冲液中洗去 OCT,将切片放入 60% 异丙醇 10 min,而后将切片置入油红工作液避光,37 °C 染色 30 min;放入 60% 异丙醇中直至间质清晰;放入苏木精染液染核 10 s,使用水连续清洗,直至洗去多余染液。

6. 巨噬细胞及平滑肌细胞免疫荧光染色:将制作好的切片放入 55 °C 烘箱中 30 min, PBS 缓冲液冲洗,去除 OCT。沿组织周围用阻水笔画好阻水圈,0.1% triton 溶液破膜 10 min;而后使用 PBS 缓冲溶液 5 min 洗 3 次,使用 2.5% 的马血清(vector R.T.U)滴加于圈内,室温孵育 30 min,弃除。在组织上滴加簇分化抗原-107b(CD-107b)(1:100)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)(1:100)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(1:1 000)一抗,4 °C 孵育过夜。而后使用 PBS 缓冲溶液 5 min 洗 3 次。在组织上滴加适量的荧光二抗(1:1 000),红色荧光代表巨噬细胞,绿色荧光代表平滑肌细胞。37 °C 孵育 1 h。最后滴加适量抗淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下,对动脉管腔内斑块上呈现红色与绿色荧光的细胞数量观察计数,统计斑块内巨噬细胞及平滑肌细胞的数量。

7. 统计学分析:采用 SPSS19.0 进行分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组计量资料的比较采用 t 检验,多组计量资料的比较采用方差分析。通

过 Graphpad Prism 软件进行作图。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠体质量及血脂变化:造模组、假手术组小鼠初始体质量分别为 (19.9 ± 0.7) 、 (20.2 ± 0.8) g,差异无统计学意义($t=0.085$, $P>0.05$)。随着周龄增长,小鼠体质量逐渐增加,每周动态监测体质量,发现两组小鼠体质量差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。喂养 12 周以后造模组及假手术组小鼠平均体质量分别为 (26.5 ± 0.6) 、 (26.4 ± 0.9) g,差异无统计学意义($t=0.616$, $P>0.05$)。假手术组及造模组小鼠 HDL、LDL、T-CHO、TG 差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 2 组小鼠血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	HDL	LDL	T-CHO	TG
造模组	12	3.3 \pm 0.9	21.4 \pm 2.1	40.7 \pm 4.2	3.5 \pm 0.5
假手术组	12	2.8 \pm 1.0	21.4 \pm 2.4	37.9 \pm 6.6	3.3 \pm 0.8
t 值		1.103	0.074	1.165	0.778
P 值		0.284	0.942	0.258	0.446

注: HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白; T-CHO: 总胆固醇; TG: 甘油三酯

2. 小鼠颈动脉结扎模型超声探测:通过微型小鼠超声检测两组小鼠手术侧颈动脉狭窄及斑块形成情况。于术后 3 周进行探测,发现造模组小鼠颈动脉有两段狭窄(图 2A, B),狭窄程度平均为 $(62.1\pm 10.1)\%$,在长轴水平上探测到两端狭窄之间血管壁上有明显斑块形成,进一步使用短轴探测颈动脉横截面,发现管壁上有明显斑块形成(图 2C)。超声探测的结果证实颈动脉斑块模型构建成功。

3. 小鼠颈动脉病理染色:首先通过油红染色检测粥样硬化斑块形成。通过颈动脉斑块横截面切片,发现假手术组小鼠颈动脉无斑块形成;假手术组小鼠头臂干动脉有脂质沉积;造模组斑块较大,脂质含量丰富,其中后两组斑块面积较大,差异具

有统计学意义(表 2)。进一步通过 HE、Masson 染色检测造模组及假手术组小鼠斑块的纤维帽、坏死核心面积以及胶原纤维的含量,发现假手术组颈动脉无斑块形成,并且与假手术组头臂干动脉稳定斑块相比,造模组斑块坏死核心面积明显增加($t=13.456$, $P<0.001$),纤维帽厚度明显降低($t=9.224$, $P<0.001$)。另外斑块内胶原纤维含量造模组相对于稳定斑块明显下降($t=4.282$, $P<0.001$)。另外稳定斑块组胶原纤维排列整齐,而造模组斑块排列紊乱。在造模组发现局部内皮细胞脱落,血管内皮破裂,提示斑块不稳定(图 3)。

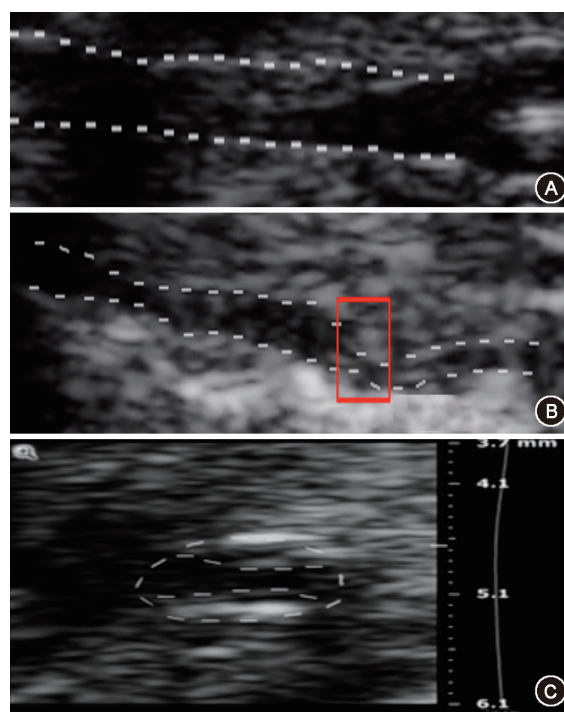


图 2 颈动脉超声评估小鼠建模 A 图:假手术组小鼠右侧颈动脉(纵轴);B 图:造模组小鼠右侧颈动脉(纵轴),可见颈动脉有两处狭窄;C 图:造模组小鼠右侧颈动脉狭窄处局部放大(横轴),可见管腔内有斑块形成

4. 小鼠颈动脉切片免疫荧光染色:红色荧光代表巨噬细胞,绿色荧光代表平滑肌细胞。假手术组小鼠头臂干动脉斑块中有巨噬细胞浸润,平滑肌细胞排列整齐。假手术组小鼠头臂干动脉及造模组

表 2 2 组小鼠动脉斑块参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	斑块面积 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	坏死核心面积 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	胶原纤维面积 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	纤维帽厚度 (μm)
造模组	12	10.2 \pm 1.1	8.1 \pm 0.9	2.2 \pm 0.5	41.3 \pm 20.2
假手术组 12	12	4.8 \pm 0.6	3.3 \pm 0.4	3.3 \pm 0.5	122.4 \pm 17.8
t 值		12.023	13.456	4.282	9.224
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

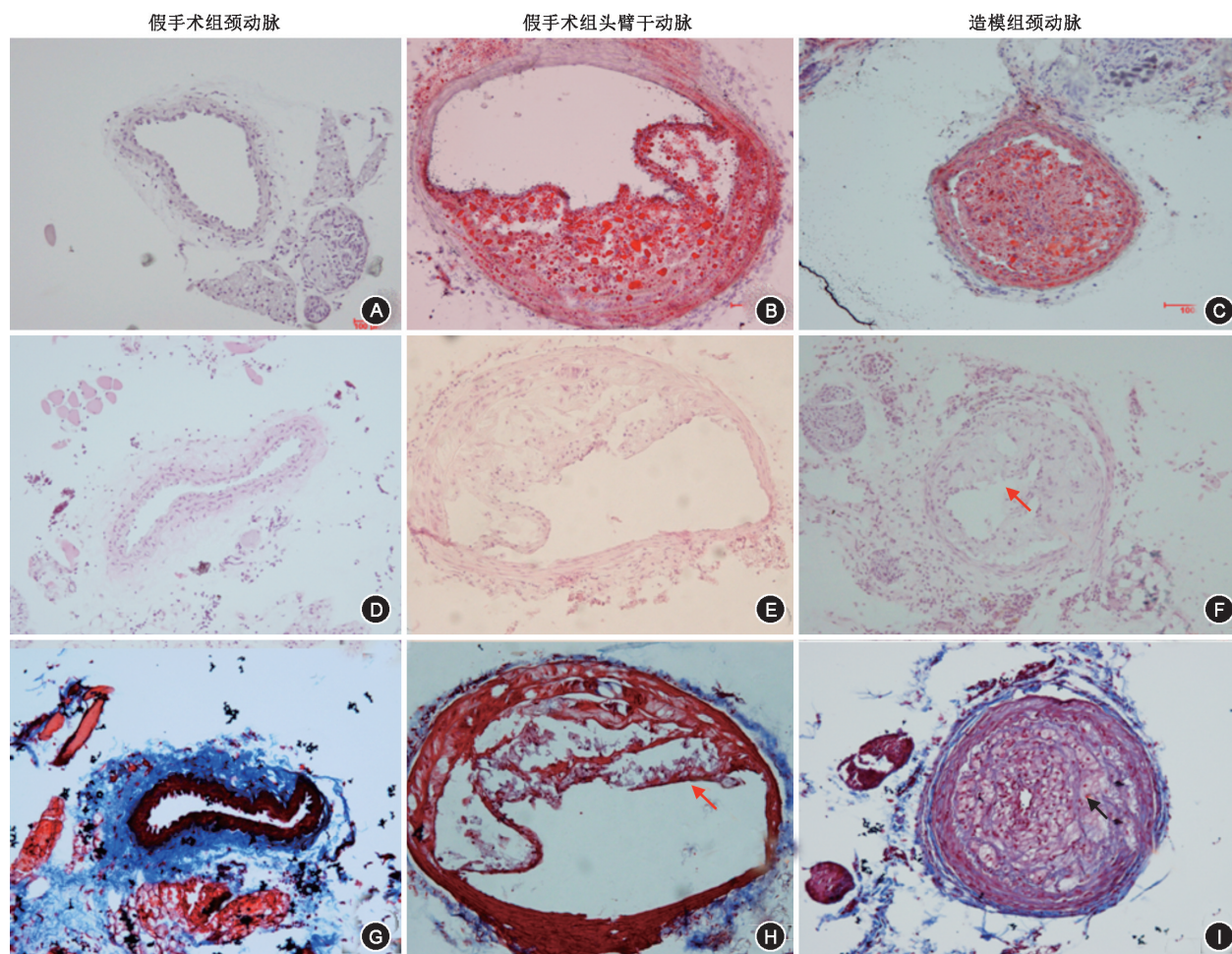


图3 假手术组及造模组小鼠动脉病理图 A~C 图(油红 O 染色 $\times 200$):假手术组小鼠颈动脉无斑块形成(A 图);相比于假手术组头臂干动脉斑块(B 图),造模组颈动脉中斑块面积更大(C 图);D~F 图(苏木精-伊红染色 $\times 200$):假手术组小鼠颈动脉无斑块形成(D 图);相比于假手术组头臂干动脉斑块(E 图),造模组颈动脉斑块中坏死核心比例更大,纤维帽厚度更小,可见局部斑块破裂(F 图箭头所示);G~I 图(masson 染色 $\times 200$):假手术组小鼠颈动脉无斑块形成(G 图);相比于假手术组头臂干动脉斑块(H 图),造模组颈动脉斑块中胶原纤维比例更低,箭头所示为典型胶原纤维(I 图)

小鼠颈动脉斑块中巨噬细胞占管腔内所有细胞比例分别为 $(20.8 \pm 5.2)\%$ 、 $(38.6 \pm 6.4)\%$,平滑肌细胞比例分别为 $(32.5 \pm 7.3)\%$ 、 $(21.2 \pm 5.1)\%$ 。相对于假手术组稳定斑块,造模组颈动脉斑块巨噬细胞数量明显增多,平滑肌细胞数量减少,差异均有统计学意义($t=6.114, 3.585$, 均 $P < 0.05$);并且排列不整齐,表现出与人类不稳定粥样硬化斑块类似的特征(图4)。

讨 论

颈动脉粥样硬化是目前导致人类缺血性脑卒中的主要原因,据统计 30%~50% 的缺血性脑卒中是由颈动脉粥样硬化斑块引起^[9]。一方面颈动脉引起血管狭窄导致血供不足,可能引起脑血流灌注

不足,但是由于对侧血管代偿,脑血管事件发生较缓;另一方面,斑块逐渐增大,可能形成不稳定斑块,内容物发生脱落栓塞远端血管造成急性脑卒中,发病凶险,危害极大。因此研究不稳定颈动脉斑块形成机制具有重要的临床意义。目前,临床上对于不稳定颈动脉斑块机制研究相对较少,原因主要为:(1)动脉粥样硬化形成是一个慢性过程,虽然目前手术治疗技术及影像学检查水平的进步,临床上发现并处理颈动脉不稳定斑块的能力得到一定提升,但是由于粥样硬化早期临床表现不明显,不稳定斑块的生成及后期形成过程仍然无法精确捕捉,使得通过手术治疗来预防颈动脉不稳定斑块引发的脑血管事件往往为时已晚。(2)人动脉粥样硬化斑块只能通过活检或者手术时获得,因此获取的标本仅能反应不稳定斑块终末时期的状态,无

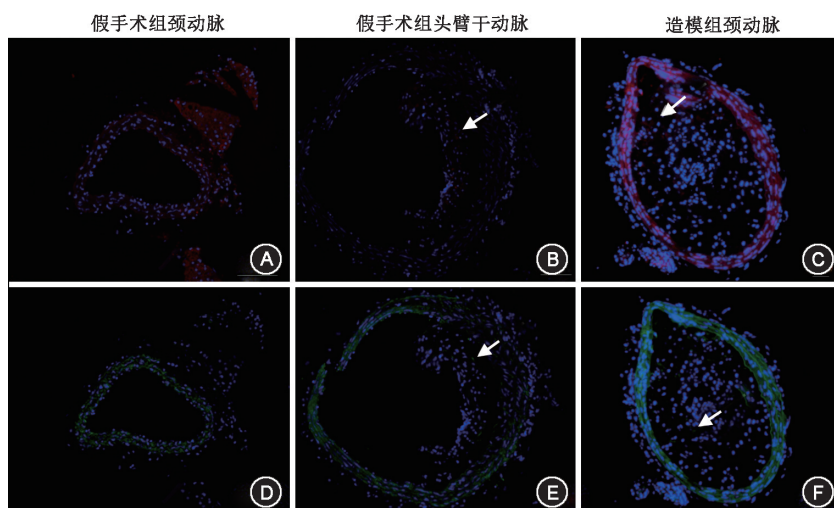


图4 颈动脉管腔内巨噬细胞及平滑肌细胞免疫荧光检测图($\times 200$) A~C图:巨噬细胞荧光与DAPI共定位,相比于头臂干动脉斑块,造模组斑块中巨噬细胞数量更多;箭头所示为典型巨噬细胞荧光;D~F图:平滑肌细胞荧光与DAPI共定位,相比于头臂干动脉斑块,造模组斑块中平滑肌细胞数量更少;箭头所示为典型平滑肌细胞荧光

法获取不稳定斑块形成动态过程中的资料,因此无法研究其各个阶段的机制。(3)由于人群中个体差异性较大,影响因素较多,无法确切定位到影响不稳定斑块形成的重要因子^[10]。目前有很多动物模型运用于动脉粥样硬化的研究中,其中多数为小鼠模型。在人类全基因组研究中,与疾病相关的因子在小鼠疾病模型中同样存在,这为我们利用基于小鼠模型得出的研究结果阐释人类疾病的发病机制提供了理论基础。在动脉粥样硬化疾病中,建立小鼠粥样硬化模型使我们能够在不稳定斑块形成初期、后期发展的动态过程中研究其发病机制,另外可以克服动脉粥样硬化在人群中的异质性,为临床治疗提供重要的靶点。

目前,小鼠动脉粥样硬化模型的构建方法相对较多,而喂养apoE-/-或者LDLr-/-小鼠高脂或者高胆固醇饮食较为常用^[11]。本研究采用LDLr-/-小鼠喂养高胆固醇饮食为基础动物模型,这种小鼠模拟了人类高胆固醇血症的表现,可较好地拟合人类动脉粥样硬化的病理状态。但是上述几种小鼠的颈动脉即使在高脂刺激下,在动脉粥样硬化造模周期内亦不能自发形成粥样硬化斑块。近年来研究表明,通过改变局部血流动力学,改变局部血流剪切力,损伤血管内皮可促使小鼠颈动脉粥样斑块形成,并且斑块表现为不稳定。Chen等^[12]研究发现在对apoE-/-小鼠颈动脉构建串联狭窄模型时,通过计算机流体力学技术检测到两端狭窄段之间的血流剪切力明显下降,另外这种串联结扎模型建立可

增加局部的血管牵张压力,表现在近心端狭窄近侧血压最高,两端狭窄之间血压次之,远心端狭窄以远血压最低。通过动脉取材形态学检测发现在近侧狭窄近心端以及两段狭窄之间的血管均有明显斑块形成且斑块脂质含量丰富,炎症反应明显,表现为不稳定斑块的特征。另外Ding等^[13]通过在apoE-/-小鼠颈总动脉上进行套圈构建动脉缩窄模型,喂养高脂饮食以后,动脉取材检测发现套圈近侧动脉处有明显斑块形成,而且斑块巨噬细胞浸润增多,平滑肌细胞数量减少,表现为不稳定斑块的特征。这说明血流剪切力改变与不稳定斑块的形成具有密切的关系。

本研究利用改变局部血流动力学的原理,在LDLr-/-小鼠模型上进行节段性缩窄操作构建颈动脉不稳定斑块模型。在不影响血脂、摄食量、体质量的情况下,通过动脉组织切片及大体形态的观察统计发现,假手术组的小鼠颈动脉未见斑块形成,假手术组小鼠的头臂干动脉斑块脂质含量少,巨噬细胞浸润较少,平滑肌细胞较多且排列整齐,与之前文献报道的小鼠稳定斑块特征一致^[12]。而造模组小鼠颈动脉斑块表现为脂质池丰富,巨噬细胞浸润多,平滑肌细胞稀疏等与人类不稳定粥样斑块类似的表现。

近年来,高分辨率超声活体成像(ultrasound biomicroscopy, UBM)逐渐用于动物实验中,其优势是可以进行活体成像,从而检测不同时期小鼠动脉粥样硬化斑块形成情况,避免只能通过病理取材检测斑块形成情况而造成的模型动物浪费。Gan等^[14]研究表明,通过超声检测小鼠升主动脉,主动脉弓处斑块形成,可以很清晰地显示出斑块,并可检测出血管中内膜厚度以及最大斑块厚度。超声检测结果与最终动脉标本的病理形态分析结果高度吻合。另有研究者通过UBM探测经过颈动脉套圈手术的apoE-/-小鼠的颈动脉斑块形成情况,发现通过超声检测的颈动脉斑块面积、中内膜厚度与组织活检结果具有高度相关性,并且发现了可能预测不稳定斑块形成的超声指标^[15-16]。

本模型构建的关键技术为颈动脉串联套扎。本模型构建成功率为92.9%,其中造模小鼠死亡

1 只, 术中出现左侧肢体偏瘫而后四肢抽搐, 原因可能为颈动脉短时间内缩窄程度过大, 使小鼠发生急性脑卒中事件。因此在进行手术时, 在缩紧结扎线时应匀速缓慢进行, 避免套扎过紧过快的情况, 使小鼠能够耐受逐渐缺血的过程, 避免小鼠发生急性脑缺血甚至导致死亡。手术过程中的关键步骤还包括: (1) 在术中打开颈动脉鞘以后, 需小心将气管推向对侧; (2) 把颈动脉向远端分离至分叉处时, 需避免触碰周围神经组织; (3) 结扎好以后需进行颈动脉鞘、皮下各层组织、皮肤逐层缝合, 注意结扎出血点。另外在超声探测颈动脉斑块时, 需要事先进行颈部脱毛, 探头不可挤压过深, 避免动脉斑块受压脱落。同时在超声探测时需观测小鼠心率, 使其维持在正常范围内。

本研究改良的小鼠颈动脉不稳定斑块模型相比以往模型具有一定优势。串联缩窄模型构建所需时间短, 手术后 6 周即可出现成熟的不稳定斑块; 另外所需器材简易, 饲料容易获得, 形成斑块范围广, 可为取材、进行多项检测提供方便。但本研究也存在以下不足: 首先未进一步行超声相关指标分析, 来寻找斑块稳定性的预测指标; 另外尚未对造模组进行斑块内出血、钙化等检测, 为模型的模拟效果提供进一步的证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics-2017 update: A report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135: e146-e603. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000485.
- [2] 中华人民共和国卫生部. [M/OL]. 中国卫生统计年鉴. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2010.
- [3] Niccoli G, Liuzzo G, Montone RA, et al. Advances in mechanisms, imaging and management of the unstable plaque [J]. *Atherosclerosis*, 2014; 233 : 467-477. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.036.
- [4] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. Apoe-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994, 14 : 133-140.
- [5] 魏伟超, 宫丽鸿, 安毅. 中药复方对 apoe 基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块的影响及机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10 : 632-635.
- [6] 徐志红, 陆国平, 席锐等. 蛋氨酸诱导 apoe 基因敲除小鼠主动脉不稳定斑块形成模型的研究[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30 : 1115-1120.
- [7] 于熙滢, 曹海利, 于波. 家兔颈总动脉不稳定斑块模型的建立[J]. *心脏杂志*, 2009, 354-357.
- [8] Sasaki T, Kuzuya M, Nakamura K, et al. A simple method of plaque rupture induction in apolipoprotein e-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 : 1304-1309. DOI: 10.1161/01.ATV.0000219687.71607.f7.
- [9] Mendis S. Stroke disability and rehabilitation of stroke: World Health Organization perspective[J]. *Int J Stroke*, 2013, 8(1): 3-4. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00969.x.
- [10] Daugherty A, Tall AR, Daemen M, et al. American Heart Association Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Basic Cardiovascular S. Recommendation on design, execution, and reporting of animal atherosclerosis studies: A scientific statement from the american heart association[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, Sep; 37(9): e131-e157. DOI: 10.1161/ATV.000000000000062.
- [11] Powell-Braxton L, Veniant M, Latvala RD, et al. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: Markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 934-938.
- [12] Chen YC, Bui AV, Diesch J, et al. A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/therapeutic discoveries using gene and microma expression profiling[J]. *Circ Res*, 2013, 113 : 252-265. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301562.
- [13] Shi Fang Ding, Mei Ni, Xiao Ling Liu, et al. A causal relationship between shear stress and atherosclerotic lesions in apolipoprotein e knockout mice assessed by ultrasound biomicroscopy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, Jun; 298(6): H2121-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00308.2009.
- [14] Gan LM, Gronroos J, Hagg U, et al. Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190 : 313-320. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.03.035.
- [15] Harmon EY, Fronhofer V, Keller RS, et al. Ultrasound biomicroscopy for longitudinal studies of carotid plaque development in mice: Validation with histological endpoints [J]. *PLoS one*, 2012, 7: e29944. DOI: 10.1371/journal.pone.0029944.
- [16] Ni M, Zhang M, Ding SF, et al. Micro-ultrasound imaging assessment of carotid plaque characteristics in apolipoprotein-e knockout mice[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197: 64-71. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.039.

(收稿日期: 2018-05-14)

(本文编辑: 张媛)