

蔡宏文,陈晨,李家英,等. 心肌缺血和动脉粥样硬化斑块血管新生双靶点小鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 32-36.

Cai HW, Chen C, Li JY, et al. Establishment of a dual-target mouse model of angiogenesis in myocardial ischemia and atherosclerotic plaque [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 32-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.006

心肌缺血和动脉粥样硬化斑块血管新生双靶点小鼠模型的建立

蔡宏文¹, 陈晨¹, 李家英¹, 李心遥¹, 陈民利², 毛威¹

(1. 浙江中医药大学附属第一医院心内科, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨建立心肌缺血和动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块内血管新生双靶点小鼠模型的有效方法。**方法** C57BL/6 J小鼠10只作为对照组, ApoE^{-/-}小鼠10只作为模型组。对照组喂普通饲料, 模型组喂高脂饲料。模型组高脂饲料喂养8周后, 皮下注射异丙肾上腺素100 mg/kg, 连续2 d, 对照组皮下注射等量生理盐水。4周后, 检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平; HE染色观察主动脉和心肌不同区域的病理形态学变化; CD31免疫组化染色检测主动脉和心肌组织不同部位的新生血管密度。**结果** 模型组血TC、LDL-C水平显著高于对照组($P<0.05$), 而HDL-C显著低于对照组($P<0.05$); HE染色显示模型组主动脉形成了典型的AS病理学改变; 皮下注射异丙肾上腺素4周后, 模型组心肌组织HE染色可见典型的心肌梗死病理改变; CD31免疫组化染色结果显示, 模型组主动脉新生血管密度显著高于对照组($P<0.05$), 模型组心肌缺血区的新生血管表达最丰富, 显著高于心肌梗死区和正常心肌组织区($P<0.05$)。**结论** ApoE^{-/-}小鼠在高脂饮食下, 通过皮下注射异丙肾上腺素造成心肌梗死, 能够成功建立心肌缺血和AS斑块血管新生的双靶点小鼠模型。

【关键词】 心肌缺血; 动脉粥样硬化; 血管新生; 异丙肾上腺素; 小鼠模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0032-05

Establishment of a dual-target mouse model of angiogenesis in myocardial ischemia and atherosclerotic plaque

CAI Hongwen¹, CHEN Chen¹, LI Jiaying¹, LI Xinyao¹, CHEN Minli², MAO Wei¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China.
2. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Objective To explore an effective method for establishing a dual-target mouse model of angiogenesis in myocardial ischemic and atherosclerotic plaque. **Methods** Ten C57BL/6 J mice were fed basic forage as a control group, while ten ApoE^{-/-} mice were fed high-fat forage as a model group. After 8 weeks, the model group was subcutaneously injected with isoproterenol at 100 mg/kg once a day for 2 days, while the control group was subcutaneously injected with the same amount of physiological saline. Another 4 weeks later, the serum levels of TC, TG, LDL-C, and

[基金项目] 浙江省公益技术应用研究(实验动物)项目(2017C37182); 浙江省中医药科研基金项目(2016ZA073, 2019ZB037)。

[作者简介] 蔡宏文(1978—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 冠心病基础与临床, E-mail: chwzju2002@163.com

HDL-C were measured. HE staining was used to estimate the pathomorphological changes in aortic tissues and different regions of myocardium. Immunohistochemical staining was used to measure the density of new vessels in aortic plaques and different regions of the myocardium that were marked by CD31. **Results** The levels of serum TC and LDL-C in the model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), while HDL-C was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). HE staining revealed pathological changes typical of AS in the aorta of the model group. After 4 weeks of the subcutaneous injection of isoproterenol, pathological changes typical of myocardial infarction were observed in HE staining of myocardial tissue in the model group. CD31 immunohistochemical staining showed that the density of new vessels in aorta of the model group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of neovascularization in the myocardial ischemia zone was the highest in the model group, which was significantly higher than that in the myocardial infarction zone and normal myocardium zone ($P < 0.05$). **Conclusions** ApoE^{-/-} mice with myocardial infarction induced by subcutaneous injection of isoproterenol under a diet of high-fat forage can be successfully used to establish a dual-target mouse model of angiogenesis in myocardial ischemia and atherosclerotic plaque.

【Keywords】 Myocardial ischemia; Atherosclerosis; Angiogenesis; Isoproterenol; Mouse model

冠心病是一种严重的心血管系统疾病,是当前引起死亡的主要病因之一。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的病理基础,AS 斑块破裂引起冠脉内急性血栓形成是导致冠心病死亡的主要原因,而斑块内血管新生是 AS 不稳定斑块形成的关键,抑制斑块内血管新生已成为增强斑块稳定性,进而防治冠心病的一个新靶点^[1-2]。然而,血管新生对于缺血心肌又是有效的代偿机制,心肌缺血区的新生血管可建立有效的侧枝循环,提高心肌耐受缺氧的能力,促进心肌缺血区血管新生是改善冠心病心肌缺血的一项重要手段^[3-4]。血管新生一方面是 AS 斑块破裂的关键,另一方面它又是改善心肌缺血的有效治疗途径,如何在同一个体中兼顾两者的统一,建立理想的心肌缺血和 AS 斑块血管新生的双靶点动物模型是展开上述研究的关键。迄今为止,尚未见有关心肌缺血区和斑块内血管新生的双靶点动物模型的研究报道。因此,本实验以载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠作为实验对象,在高脂饮食下,通过皮下注射异丙肾上腺素造成心肌梗死,成功建立了心肌缺血和 AS 斑块内新生血管的双靶点小鼠模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠和 C57BL/6 J 小鼠各 10 只,体重 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号[SCXK(沪)2017-0005]。动物饲养及无菌手术均在浙江中医药大学动物实验中心屏障系统小鼠饲养室进行[SYXK(浙)2018-0012]。动物实验福利伦理审查号[ZSLL-2017-107],按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸异丙肾上腺素纯品购自美国 Sigma 公司(CAS 号:51-30-9)。CD31 Rabbit mAb 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和模型建立

C57BL/6 J 小鼠作为对照组,模型组为 ApoE^{-/-}小鼠,每组 10 只。对照组全程饲喂普通饲料,模型组给予高脂饲料(高脂饲料配方:普通小鼠基础饲料+1.25%胆固醇+15%猪油)。模型组小鼠在高脂饲料喂养 8 周后,给予异丙肾上腺素 100 mg/kg 皮下注射,连续 2 d。对照组皮下注射等量生理盐水。两组继续各自饮食喂养 4 周。

1.3.2 标本取材

第 12 周末,小鼠腹腔注射麻醉后,眼眶静脉丛取血。常规消毒,暴露胸腹腔,剪取心脏,将心脏沿短轴面横切留取心肌组织标本,其中模型组按正常心肌组织区、心肌梗死边缘区(心肌缺血区)和心肌梗死区分别留取标本。同时小心取出主动脉,按横截面分段留存。各组标本置入甲醛保存固定,脱水浸蜡包埋,切片备用。

1.3.3 观察指标

(一)血脂测定

采用全自动生化分析仪检测以下血脂项目:血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)。

(二)HE 染色

观察主动脉横切面,观察主动脉血管壁、内膜

的病理结构、斑块形态等。观察心肌组织不同区域的组织形态学变化。

(三)CD31 免疫组化染色检测心肌组织和主动脉斑块内新生血管密度

选用内皮细胞特异性标记物 CD31 行免疫组化染色,CD31 标记的新生血管内皮细胞阳性染色呈棕黄色,采用 Carl Zeiss Imaging Systems 测量的阳性细胞的平均光密度值(mean optical density, MOD)来反映新生血管的密度。

1.4 统计学方法

表 1 两组血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$, mmol/L)
Table 1 The levels of serum TC, TG, LDL-C, and HDL-C in the two groups

组别 Groups	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	低密度脂蛋白 LDL-C	高密度脂蛋白 HDL-C
对照组 Control group	2.57±0.49	2.38±0.54	1.28±0.28	1.80±0.54
模型组 Model group	8.32±1.15*	2.46±0.33	5.35±0.97*	1.34±0.20*

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

2.2 两组主动脉 HE 染色

对照组主动脉 HE 染色见管壁内膜平整、未向管腔突出、无明显增厚,中膜平滑肌排列整齐,未见脂肪细胞沉积,无斑块形成。模型组主动脉 HE 染色见血管腔内粥样斑块形成,内皮细胞排列不完整,内膜增厚、断裂、不平整,内皮下见大量泡沫细胞,平滑肌细胞增生明显、排列紊乱,见纤维帽形成。见图 1。

2.3 心肌组织 HE 染色

对照组心肌组织 HE 染色显示心肌细胞排列整齐,形态基本一致,细胞浆中横纹较清晰,细胞核多呈椭圆形。模型组 HE 染色见心肌组织结构紊乱,室壁变薄,心肌细胞横纹消失、部分破裂变性、细胞核模糊,细胞间可见纤维组织和炎症细胞。见图 2。

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。所有数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血脂检测结果比较

与对照组比较,模型组小鼠的血清 TC、LDL-C 水平显著升高,而 HDL-C 水平显著下降($P<0.05$)。见表 1。

2.4 免疫组化染色检测两组主动脉新生血管

采用 CD31 标记的新生血管内皮细胞阳性染色呈棕黄色或棕褐色。结果显示:与对照组比较,模型组的 CD31 表达明显增多($P<0.05$)。见表 2、图 3。

2.5 免疫组化染色检测不同部位心肌组织新生血管

将模型组心肌组织分为 3 组:正常心肌组织区、心肌梗死区和心肌缺血区,分别行 CD31 染色。结果显示:缺血区的新生血管表达最丰富;与正常心肌组织区相比,缺血区和梗死区的 CD31 表达均明显增加($P<0.05$);与梗死区相比,缺血区的 CD31 表达也显著增加($P<0.05$)。见表 3、图 4。

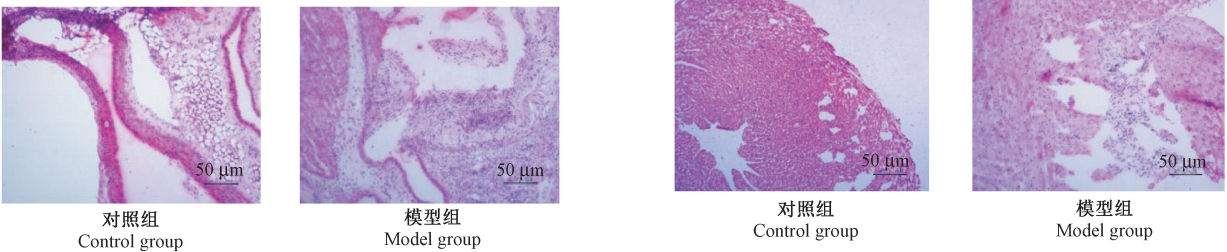


图 1 两组主动脉比较(HE 染色,×100)
Figure 1 Comparison of aortic tissue in the two groups (HE staining)

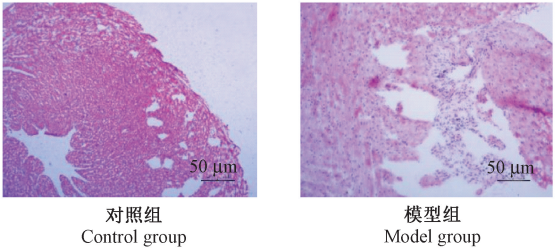


图 2 两组心肌组织比较(HE 染色,×100)
Figure 2 Comparison of pathological changes in the myocardial tissue in the two groups (HE staining)

表 2 两组主动脉新生血管密度比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 The density of neovascularization in aorta in the two groups	
组别 Groups	CD31 MOD
对照组 Control group	0.09±0.03
模型组 Model group	0.25±0.02 *

注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

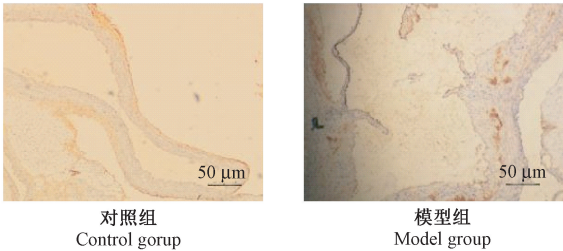


图 3 两组主动脉 CD31(免疫组化染色,×400)
Figure 3 Histology of the control and model mouse aortas (immunohistochemical staining)

表 3 不同心肌组织新生血管密度比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of the neovascular density in different myocardial tissue zones	
不同心肌组织区 Different myocardial tissue zone	CD31 MOD
正常心肌区 Normal zone	0.19±0.03
心肌梗死区 Infarction zone	0.27±0.05 *
心肌缺血区 Ischemic zone	0.37±0.06 * [△]

注:与正常心肌区相比, * $P<0.05$;与心肌梗死区相比, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal zone, * $P<0.05$; Compared with the infarction zone, [△] $P<0.05$.

3 讨论

血管新生既是 AS 不稳定斑块形成的关键,又是改善心肌缺血有效的代偿途径^[5]。于是问题就在于,抑制斑块内血管新生的药物或者因子,有无

可能同时抑制缺血心肌区的血管新生,从而加重心肌缺血?反之,具有促进缺血心肌区血管新生作用的药物,是否会加重斑块内血管新生而诱发斑块破裂?无论是抗血管生成的药物还是促血管生成因子,尤其是临床上广泛应用的一些抗心肌缺血中药,都面临安全性问题^[6]。因此,在抑制 AS 斑块内新生血管和促进心肌缺血区侧枝形成的治疗策略中,存在着固有的相互制约,必须综合考虑并兼顾这对矛盾的平衡和统一^[7]。因此,很有必要在同一生物体内建立心肌缺血区和 AS 斑块内新生血管的双靶点模型,为进一步研究血管新生在心肌缺血区和 AS 斑块内两种不同病理环境下的发生机制提供平台,也为有关药物干预的疗效和安全性评价提供平台。目前在进行心血管疾病研究,大多是独立的急性心肌梗死模型或 AS 模型,迄今为止,尚未见有关心肌缺血区和 AS 斑块内新生血管双靶点动物模型的研究报道。正是由于缺乏可供研究的动物模型,目前国内外学者多将 AS 斑块或缺血心肌内的血管新生孤立开来作为独立的研究对象进行研究,因而无法得到全面准确的研究结果。因此,建立理想的心肌缺血区和 AS 斑块内血管新生的双靶点动物模型是探讨血管新生发生机制和评价安全有效干预手段的基础。

基于以上研究目的,本项目选用 ApoE^{-/-}小鼠作为实验对象构建血管新生双靶点动物模型。不同于大鼠、家兔等动物,高脂饲喂的 ApoE^{-/-}小鼠是目前成熟的 AS 动物模型选择,其形成的主动脉 AS 斑块病变较恒定,接近人体病理形态^[8]。构建心肌梗死的动物模型,目前多采用传统的开胸结扎法阻断冠状动脉血流来完成^[9]。但是小鼠体型小,采用冠状动脉结扎法制造心梗模型十分困难,该方法对术者的要求非常高,需要长切口开胸,出血多、创伤大,动物死亡率极高,实验成功率很低^[10]。异丙肾上腺素具有强烈的收缩冠状动脉的作用,同时能增强心肌收缩力和加快心率增加心肌耗氧,能够诱发

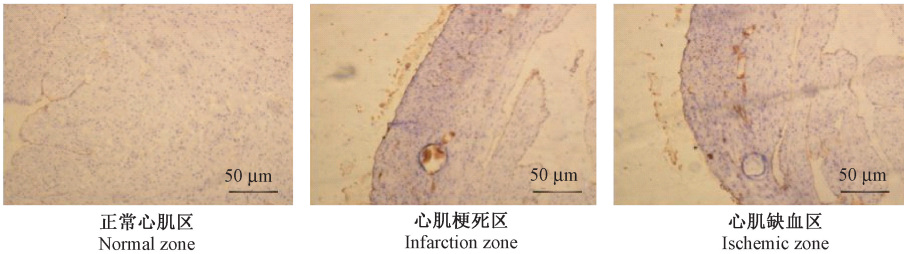


图 4 不同部位心肌组织 CD31(免疫组化染色,×400)
Figure 4 Histological images of different myocardial tissue zones (immunohistochemical staining)

心肌梗死^[11]。皮下注射异丙肾上腺素操作简便,对动物损伤小,死亡率低,心肌梗死效果稳定可靠。但合适的皮下注射剂量和用药时间是造模成功与否的关键。给药剂量过大容易导致小鼠死亡,剂量过低则不容易引起心肌梗死。实验发现,选择异丙肾上腺素 100 mg/kg 连续 2 d 皮下注射是小鼠不致死又能造成心肌梗死模型的理想给药方式。本研究发现,在高脂喂养 12 周后,模型组血清 TC、LDL-C 水平显著高于对照组,而 HDL-C 显著低于对照组;HE 染色发现模型组主动脉形成了典型的 AS 病理学改变;在异丙肾上腺素皮下注射 4 周后,模型组心肌组织 HE 染色可见典型的心肌梗死镜下改变。CD31 免疫组化染色结果显示,模型组主动脉新生血管密度显著高于对照组;而且模型组心肌缺血区的新生血管表达最丰富,显著高于心肌梗死区和正常心肌组织区。

本研究通过皮下注射异丙肾上腺素干预 ApoE^{-/-}小鼠的实验方法,在国内外首次成功建立了心肌缺血和 AS 斑块内新生血管的双靶点小鼠模型。该方法不需要开胸,损伤小、死亡率低、易于操作,为血管新生在不同微环境下的发生机制和药物干预的疗效及安全性研究提供了一种简便经济又稳定可靠的动物模型制作方法。

参考文献:

[1] Van der Veken B, De Meyer GR, Martinet W. Intraplaque neovascularization as a novel therapeutic target in advanced atherosclerosis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(10): 1247-1257.

[2] Perrotta P, Emini Veseli B, Van der Veken B, et al.

Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis[J]. Vascul Pharmacol, 2018, pii: S1537-1891(18)30113-30117.

[3] 刘灿, 海宝, 张稳, 等. 骨内单次注射小剂量辛伐他汀对大鼠心梗后血管新生的影响[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 506-512.

[4] Guo D, Murdoch CE, Liu T, et al. Therapeutic angiogenesis of chinese herbal medicines in ischemic heart disease: A Review[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 428.

[5] Wu W, Li X, Zuo G, et al. The role of angiogenesis in coronary artery disease: a double-edged sword; intraplaque angiogenesis in physiopathology and therapeutic angiogenesis for Treatment[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(4): 451-464.

[6] Yuan R, Shi WL, Xin QQ, et al. Holistic regulation of angiogenesis with Chinese herbal medicines as a new option for coronary artery disease[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 3725962.

[7] Zukowska Z. Atherosclerosis and angiogenesis: what do nerves have to do with it? [J] Pharmacol Rep, 2005, 57 Suppl: 229-234.

[8] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, et al. Animal models of atherosclerosis[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 3-13.

[9] 兰琴, 王竹林, 曹浩, 等. 改良左旋支结扎法微创小型猪急性心肌梗死模型建立与评估[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 414-419.

[10] 曹珏, 李贻奎, 陈孟倩, 等. 大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 96-100.

[11] Lobo Filho HG, Ferreira NL, Sousa RB, et al. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2011, 26(3):469-476.

[收稿日期] 2018-09-28