

西方膳食对载脂蛋白 E 敲除小鼠的影响*

杨林^{1,2} 黎桂玲¹ 刘科¹ 代路路¹ 李金凤¹ 朱叶萌¹ 邝少松¹

(1.广东省医学实验动物中心,佛山 528248)(2.华南农业大学,广州 510642)

摘要:目的 研究西方膳食和标准饲料对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-})血液学及病理学的影响。方法 用西方膳食饲料和标准饲料对3月龄 ApoE^{-/-}小鼠进行喂养,并于喂养3个月、4个月和5个月时,采集小鼠外周血和主动脉弓。用全自动血液分析仪检测其血脂水平,并通过切片及染色,观察其动脉粥样硬化斑块的形成情况。**结果** 血脂方面,西方膳食及标准饲料喂养的小鼠血清中总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)比对照组 C57 小鼠明显升高,除了经4个月喂养的小鼠 HDL-C 外,其他各月龄血脂指标西方膳食喂养组都显著高于标准饲料组;在主动脉弓病理切片及染色方面,相同月龄下,西方膳食组小鼠主动脉斑块明显并且 AS 发病率明显升高。**结论** 西方膳食饲料及标准饲料均可诱导 ApoE^{-/-}小鼠表现 AS 病症,西方膳食饲料的诱导效果更明显。

关键词:动脉粥样硬化;ApoE^{-/-}小鼠;血脂

中图分类号: Q493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0063-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.015

动物体内的脂类物质代谢异常时,多余的脂类物质会沉积在血管壁上,并逐渐形成斑块,使血管内皮增厚、变硬,是引起动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的重要原因之一。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE)主要存在于乳糜微粒(chylomicron, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, LDL)等多种血浆脂蛋白中,可介导脂蛋白残粒的摄取,维持血浆胆固醇的平衡、促进泡沫细胞中胆固醇的外流以及具有抗氧化和消炎等作用,该基因缺陷将使体内脂代谢发生紊乱。ApoE 基因敲除的纯合小鼠(ApoE^{-/-})可正常存活和繁殖,当给予适当的高脂饮食时,可导致各种高脂蛋白血症^[1-3],并且其斑块分布与人类的动脉粥样硬化斑块的分布相似,在动脉粥样硬化的研究中发挥重要作用。本文使用西方膳食饲料和标准饲料两种不同脂肪和胆固醇含量的饲料喂养 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠,探究其血生化指标和动脉病理学的改变,为后续该模型小鼠的使用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取约3月龄的 SPF 级载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-})36只和 C57BL/6J 小鼠18只,其来源于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-002],动物饲养环境条件为20~26℃,相对湿度40%~70%。36只 ApoE^{-/-}小鼠分为6组,每组6只,分别为:喂养西方膳食(主要成分见表1)3个月(H6)、4个月(H7)和5个月(H8)组,和标准饲料(主要成分见表2)3个月(M6)、4个月(M7)和5个月(M8)组。西方膳食饲料含21%脂肪、0.25%胆固醇;标准饲料含10%脂肪。18只 C57BL/6J 小鼠即对照组小鼠(所喂饲料见表2),共分3组,每组6只,分别为:6月龄(WT6)、7月龄(WT7)和8月龄(WT8)组,饲养期间自由饮水。

收稿日期:2018-11-06

* 基金项目:广东省医学科研基金(C2018027)

作者简介:杨林(1985—),女,理学硕士,助理研究员,研究方向:基因工程动物及胚胎保种相关研究.E-mail: yanglin6060@sina.com.cn

通信作者:邝少松(1973—),女,农学博士,高级兽医师,研究方向:病理学、毒理学兽医学.E-mail: kuangss@126.com

表 1 西方膳食饲料主要组分及营养含量

Table 1 Main components and nutrient contents of Western diet

原料	%	营养素	质量比/%
基础饲料	81.85	蛋白	15
猪油	18	碳水化合物	47
胆固醇	0.15	脂肪	21

表 2 标准饲料及 C57 小鼠饲料主要组分及营养含量

Table 2 Main components and nutrient contents of standard diet and C57 mice diet

原料	标准饲料/%	C57 小鼠饲料/%	营养素	标准饲料质量比/%	C57 小鼠饲料质量比/%
玉米	31.5	26.5	蛋白	22	22
面粉	25	25	碳水化合物	52	48
豆粕	19	9	脂肪	6.5	10.5

1.2 主要试剂和仪器

试剂:溶血剂,DH-910,DH-680;清洗剂,DH-520,DH-620;稀释液,DH-640(东湖仪器试剂有限公司)

仪器:轮转切片机(德国 LEICA 公司 RM2135),生物组织全自动脱水机(湖北孝感医用仪器有限公司 TS-12C),生物组织包埋机及冷冻机(湖北孝感医用仪器有限公司 BM-VII),摊片烤片机(湖北孝感医用仪器有限公司 CS-VI),生物组织全自动染色机(湖北孝感医用仪器有限公司 RS-18),正置光显微镜(Olympus BX41),病理图像分析系统(Image-Pro Express 5.1.1.14),血液分析仪(NIHONKOH DEN)等。

1.3 血脂测定

9 组小鼠喂养到指定月龄后,称体质量并摘取眼球取血(不空腹),离心,分离血清,使用 NIHONKOH DEN 血液分析仪测定各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。

1.4 样本取材及制备

动物处死后,取主动脉根部,4%中性甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(4 μm)、烤片,常规 HE 染色,封片。在光学显微镜下观察主动脉弓有无动脉粥样硬化病变,并用 OLYMPUS BX41 显微镜拍照。

1.5 统计方法

使用 SPSS 21.0 统计软件处理,数值用平均值±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分

析(Oneway ANOV),两两比较用 Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 血脂水平的变化

与同月龄的对照组小鼠相比,高脂日粮喂养的 H 组与普通日粮喂养的 M 组的 APOE 基因敲除小鼠在 TC 和 LDL-C 两方面显著升高,并且 H 组显著高于 M 组小鼠。在 HDL-C 方面,H6 组与 M6 组小鼠显著高于 WT6 组小鼠,并且 H6 组小鼠也显著高于 M6 组小鼠;同样 H8 组与 M8 组小鼠在 HDL-C 方面也显著高于同 WT8 组小鼠,H8 组小鼠也显著高于 M8 组;在 7 月龄组,H7 与 M7 组小鼠显著高于 WT7 组小鼠,但是 H7 组与 M7 组小鼠相比并没有显著性差异。各组血浆 TG 没显著性差异,无统计学意义。

表 3 6 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 3 Comparison of lipid levels in sera among the 6 months old mice

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
H6	21.30±0.86 ^a	0.87±0.09	3.13±0.16 ^a	5.16±0.75 ^a
M6	15.60±2.01 ^b	0.92±0.25	2.34±0.33 ^b	2.50±0.72 ^b
WT6	2.88±0.85 ^c	0.98±0.29	2.19±0.95 ^c	0.16±0.06 ^c

注:不同字母代表具有统计学差异(P<0.05)

Note: Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

表 4 7 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 4 Comparison of lipid levels in sera among the 7 months old mice

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
H7	20.45±3.83 ^a	0.96±0.21	2.82±0.25 ^a	4.70±1.13 ^a
M7	15.30±1.61 ^b	1.53±0.34	2.62±0.50 ^a	2.30±0.31 ^b
WT7	1.61±0.25 ^c	0.83±0.15	0.96±0.23 ^c	0.30±0.25 ^c

注:不同字母代表具有统计学差异(P<0.05)

Note: Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

表 5 8 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 5 Comparison of lipid levels in sera among the 8 months old mice

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
H8	27.33±5.23 ^a	0.91±0.18	3.32±0.30 ^a	7.75±2.81 ^a
M8	16.00±1.19 ^b	0.95±0.26	2.25±0.27 ^b	2.67±0.51 ^b
WT8	3.13±0.25 ^c	0.83±0.13	1.82±0.22 ^c	0.40±0.07 ^c

注:不同字母代表具有统计学差异(P<0.05)

Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

2.2 ApoE^{-/-}小鼠主动脉弓 AS 病变的观察

在高倍镜下观察,WT6 组:6 只动物主动脉弓镜下均未见动脉粥样硬化(见图 1 A)。M6 组:4 只动

物(4/6)主动脉弓镜下见动脉粥样硬化,泡沫细胞聚集(见图 1B)。H6 组:5 只动物(5/6)主动脉弓镜下均见动脉粥样硬化(见图 1C)。

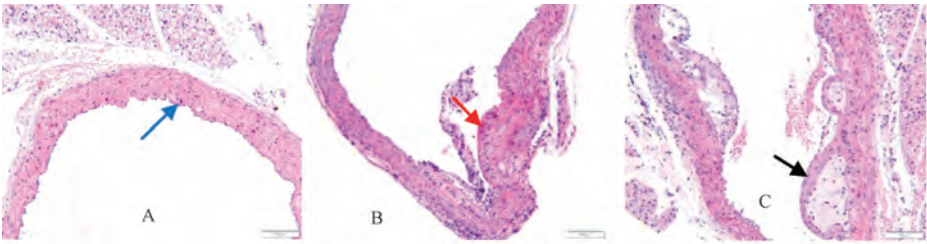


图 1 6 月龄小鼠的 HE 染色情况
注:A.WT6 组主动脉弓未见病变;B.M6 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H6 组大多数出现动脉粥样硬化

Fig.1 HE staining of 6 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT6 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M6 group; C. atherosclerosis occurred mostly in H6 group

WT7 组:1 只动物(1/6)可见动脉粥样硬化,内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶。其余动物主动脉弓未见明显异常(见图 2A)。M7 组:3 只动物(3/6)可见动脉粥样硬化,主要表现为血管内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶,其中 1 只动物(1/6)斑块局

部可见坏死钙化灶。其余动物主动脉弓未见明显异常(见图 2B)。H7 组:6 只动物(6/6)均可见动脉粥样硬化,主要表现为血管内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞,其中 5 只动物(5/6)斑块内可见胆固醇结晶(见图 2C)。

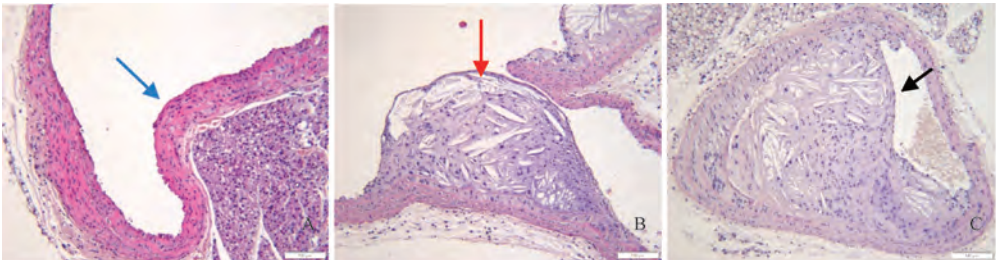


图 2 7 月龄小鼠的 HE 染色情况
注:A.WT7 组主动脉弓未见病变;B.M7 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H7 组全部出现动脉粥样硬化

Fig.2 HE staining of 7 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT7 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M7group; C. atherosclerosis occurred mostly in H7 group

WT8 组:所有动物均未见动脉粥样硬化(见图 3A);M8 组:4 只小鼠(4/6)主动脉弓镜下可见动脉

粥样硬化(见图 3B);H8 组:5 只小鼠(5/6)主动脉弓镜下可见动脉粥样硬化(见图 3C)。

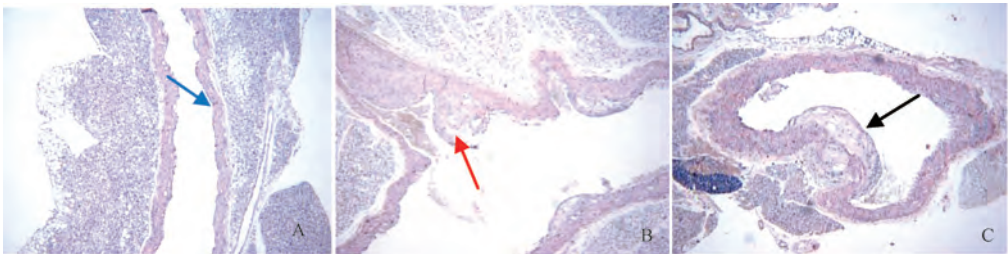


图 3 8 月龄小鼠的 HE 染色情况
注:A.WT8 组主动脉弓未见病变;B.M8 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H8 组大多数出现动脉粥样硬化

Fig.3 HE staining of 8 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT8 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M8group; C. atherosclerosis occurred mostly in H8 group

3 讨论

以往的 AS 动物模型多采用极高含量的胆固醇、脂肪的饲料长期饲养制作,但由于小鼠、大鼠等动物先天具有胆固醇抵抗的特性,在制作模型时,胆固醇负荷往往是正常膳食的数十倍的急性过程,因此与人类的病症情况相差甚远^[4-6]。ApoE 基因敲除小鼠是由美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗莱那大学病理遗传实验室于 1992 年应用胚胎干细胞基因敲除技术培育成功。有研究表明该小鼠用普通饲料喂养也可自发形成纤维斑块和复合斑块,高脂饲料喂养可以加速 AS,并且动脉粥样硬化斑块分布与人类的相似^[7]。田枫等^[8]研究发现普通饲养的 ApoE 敲除小鼠 12 个月时,其主要血管仍呈现明显的动脉粥样特征,表明 ApoE 敲除小鼠是动脉粥样硬化研究的可靠的动物模型。据报道 ApoE 敲除小鼠,15~20 周龄后逐渐出现纤维斑块,病变部位以主动脉根最为明显,其次为胸主动脉。

本研究中我们采用的是 21%脂肪、0.25%胆固醇的“西方膳食”饲料和标准饲料(中等脂肪含量)对 ApoE^{-/-}小鼠进行诱导,经过 3 个月、4 个月和 5 个月的诱导后发现,相同月龄下,在 TC 和 LDL-C 方面,西方膳食组和标准饲料组显著高于对照组(WT 组),同时西方膳食组也显著高于标准饲料组;在 HDL-C 方面,饲喂 3 个月与 5 个月表现出同样的结果。但是在饲喂 4 个月时,西方膳食组和标准饲料组都显著高于对照组(WT 组),两组无显著差异。在主动脉弓病理切片及染色方面,相同月龄下,西方膳食组主动脉斑块明显并且 AS 发病率明显升高。该小鼠可为 AS 的多方面研究提供有效的实验动物模型:药物筛选、分子干预等;以及 AS 病理学机制的相关研究等。

本研究用含有 21%脂肪和 0.25%胆固醇的西方膳食饲料(高脂饲料)和 10%脂肪的标准饲料饲养 ApoE^{-/-}小鼠,经 3 个月、4 个月及 5 个月的饮食

处理后,西方膳食饲料喂养的小鼠血浆总胆固醇、高密度脂蛋白指标(H6 和 H8)、低密度脂蛋白指标比标准饲料及对照组组(WT 组)明显升高,同时标准饲料组也明显高于对照组(WT 组);在主动脉弓病理切片及染色方面,西方膳食饲料组和标准饲料组都表现出血管内膜纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶的典型动脉粥样硬化病理特征。表明:西方膳食饲料及标准饲料均可诱导 ApoE^{-/-}小鼠表现 AS 病症,而且西方膳食饲料的诱导效果更明显。本研究观察动物经西方膳食饲料和标准饲料喂养后的血脂情况及 ApoE^{-/-}主动脉弓的病变特点,为该模型在心血管疾病等老年病学研究的广泛应用提供了基础资料。

参考文献

- [1] 欧海龙,张礼林,何晓兰,等. ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型的建立[J]. 生命科学研究, 2015, **19**(2): 141-144.
- [2] Plump A S, Smith J D, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells[J]. Cell, 1992, **71**(2): 343-353.
- [3] Nakashima Y, Plump A S, Raines E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1994, **14**(1): 133-140.
- [4] 程军,李金平,田卓,等. ApoE 基因敲除小鼠和 C57BL/CJ 小鼠血脂及主动脉组织病理学的对比观察[J]. 实验动物科学, 2008, **25**(2): 4-6.
- [5] Breslow J B. Mouse models of atherosclerosis[J]. Science, 1996, **272**(5262): 685-688.
- [6] 刘雪梅,吴符火. 几类高脂血症动物模型的比较[J]. 中西医结合学报, 2004, **2**(2): 132-134.
- [7] Nakashima Y, Plumb A S, Raines E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1994, **14**(1): 133-140.
- [8] 田枫,康爱君,张阔,等. 12 月龄 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠主要动脉病理学变化[J]. 实验动物科学, 2010, **27**(1): 10-12.

The Effect of Western Diet on the Apolipoprotein E Gene Knock out Mice

YANG Lin^{1,2}, LI Guiling¹, LIU Ke¹, DAI Lulu¹, LI Jinfeng¹, ZHU Yemeng¹, KUANG Shaosong¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

(2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Objective To study the effect of western diet and standard diet on the blood fat and aortic arch pathology of apolipoprotein E gene knock out mice. **Method** We feed 3 months old ApoE^{-/-} mice with western dietary or standard diet for 3 months, 4 months and 5 months, respectively, then collect peripheral blood and aortic arch. We use Automatic blood analyzer to detect lipid level in serum, and observe the formation of atherosclerotic plaque through sectioning and staining. **Result** On the blood lipids detection, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum of mice feeding western diet and standard diet were significantly higher than the control group. In addition to HDL-C mice 4 months feeding, the lipid index of western diet lipid groups are significantly higher than the standard diet group on the same age. On the stained sections, western diet aortic plaque and incidence of atherosclerosis are significantly increased. **Conclusion** Both Western dietary and standard diet can induce ApoE^{-/-} mice showed AS symptoms, the effect of western dietary is more obvious.

Key words: Atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice; blood lipid

(上接第 62 页)

Comparison of the Viscera Coefficient of CMU/1 and CMU/2 Inbred Strains of Gerbil

MA Lanzhi¹, LI Ying^{1,3}, SHANG Shichen¹, HUANG Bin¹,

SHANG Yupu¹, WANG Dongping¹, CHEN Zhenwen²

(1. Academy of Military Medicine Laboratory Animal Center of the Academy, Beijing 100071, China)

(2. Department of Laboratory Animal Science, Capital University Medical of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

(3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Objective To determine the body weight and main organ weight of inbred CMU/1 and CMU/2 inbred *Mongolian gerbils*, and to explore and establish the biological index system of main organs of *Mongolian gerbils*. It provides the necessary parameters for animal experiments. **Method** The body weight and organ weight of the 3~4 month-old gerbil in the inbred line were analyzed statistically. **Result** The difference between lung coefficient CMU/1 and CMU/2 inbred gerbils significantly, other no significant difference; Kendall coefficient (W) close to 1, the main organs of the overall development of better coordination; linear regression equation, the CMU/1 $P < 0.05$, CMU/2 in the liver, thymus, lung $P < 0.05$, two of the sample had a linear relationship between. The thymus of the liver, spleen, adrenal gland, ovary, pancreas and CMU/2 of CMU/1 was positively correlated with body weight. **Conclusion** There is significant difference in lung organ coefficient between CMU/1 and CMU/2 inbred strains of gerbil, and there is no obvious influence on the organ coefficient of the gerbil in the inbred line.

Key words: *Mongolian gerbil*; Inbred line; Organ coefficient