



高脂血症食蟹猴模型的建立及分析

杨永立 李 锋 汪云龙 刘发琴 周国春 高仕平 徐子辰 徐永德

(昆明科灵生物科技有限公司, 昆明 650550)

摘要:目的 建立高脂血症食蟹猴模型。方法 采用高脂膳食饲料诱导食蟹猴,分别在4、8、12、18个月检测血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、甘油三酯(TG)指标,对其血脂指标的变化趋势进行分析。结果 模型组在饲喂高脂膳食饲料4个月后,TC、HDL、LDL与实验前相比差异极显著($P<0.01$);TG在饲喂高脂膳食饲料8个月后明显升高,与实验前相比差异极显著($P<0.01$);造模后,高脂饲料组与正常对照组比较,TC、HDL、LDL、TG均高于对照组,差异极显著($P<0.01$)。结论 在本实验中,模型组TC、HDL、LDL、TG均呈现递增趋势,尤其是TC、LDL明显高于食蟹猴正常参考值水平,说明模型组食蟹猴具有高胆固醇和高、低密度脂蛋白血症的特征,初步建立了食蟹猴高脂血症动物模型。

关键词:高脂血症;动物模型;食蟹猴

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0031-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.008

随着人们生活水平的提高,高脂血症(Hyperlipidaemia)和脂肪肝(fatty liver)的发病率在逐年增加。高脂血症,又称脂代谢紊乱,即血清总胆固醇(Total Cholesterol, TC),甘油三酯(Triglyceride, TG),低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)的增高以及高密度脂蛋白(high-density lipoprotein HDL)的降低,这不仅是脂代谢紊乱的标志,也是动脉粥样硬化、冠心病、脑卒中、高血压、心脏病、中风和脂肪肝等疾病的主要危险因素^[1-4]。高脂血症已成为医药界研究的热点,理想的高脂血症动物模型不仅是研究人类高脂血症发病机理的有效工具,也是开展脂代谢异常及动脉粥样硬化研究的重要手段。

建立高脂血症模型的动物,要考虑造模动物对膳食脂质调节和代谢、生理功能反应以及高脂血症的各种症状等要与人类尽可能相似。非人灵长类动物因在遗传、生理以及生物学特性方面与人类十分相似,高脂血症动物所表现的病理特征和血脂变化规律与人类高脂血症患者的临床特征也十分相似^[5],故选用食蟹猴作为实验动物,用高脂膳食饲料诱导方法,初步建立高脂血症食蟹猴动物模型,本研究通过检测TC、HDL、LDL、TG的水平来衡量血脂变化情

况,同时对其血脂指标变化趋势进行分析,为筛选理想的高脂血症模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:正常饲养的健康成年雄性食蟹猴804只,由昆明亚灵生物科技有限公司提供,许可证号为SCXK(滇)K2015-0003;实验过程在生物医学动物模型国家地方联合工程研究中心昆明科灵生物科技有限公司动物实验设施中进行,实验动物使用许可证号为SYXK(滇)K2012-0002。

1.1.2 实验饲料:正常饲料由昆明亚灵生物科技有限公司提供,生产许可证号为SCXK(滇)K2018-0004。高脂饲料由广州市国龙科技有限公司提供,(加工配方:15%猪油、30%糖、0.5%胆固醇、5%无营养物质、49.5%基础饲料),生产许可证号为SCXK(粤)2014-0026。

1.1.3 主要试剂及仪器设备:胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯检测试剂盒由罗氏诊断产品(上海)有限公司提供。使用罗氏全自动生化分析仪(c501)检测血清样品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及高脂血症动物模型的制备:随机挑选 435 只食蟹猴为模型组,饲喂高脂膳食饲料;369 只为对照组,饲喂正常饲料。模型组和对照组动物每天每只饲喂 200 g 饲料,分别在上午 08:00 和下午 16:00 各给予 100 g。每日中午 13:30 饲喂 150 g 水果,自由饮水。饲养环境温度 18~26 ℃,相对湿度 40%~70%,本试验分别在第 4 个月、第 8 个月、第 12 个月、第 18 个月采血进行血脂检测。

1.2.2 血液样品采集及血脂检测:动物空腹 12~14 h,前肢静脉采血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后收集血清。马上使用罗氏全自动生化分析仪(c501)检测 TC,HDL,LDL 和 TG。

1.3 统计方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,差异性分析采用方差分析,数值以($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 高脂膳食诱导组造模前、后血脂指标检测结果比较

高脂膳食诱导组血脂指标与造模前自身对照,TC、HDL、LDL 在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后明显

升高,在 4~12 个月均维持在较高水平,18 个月略下降,但与实验前相比均极显著上升($P<0.01$);TG 在饲喂高脂膳食饲料 8 个月后明显升高,并维持在较高水平,与实验前相比差异极显著($P<0.01$)。

2.2 高脂膳食诱导组与正常饲料对照组血脂指标检测结果比较

造模后,高脂膳食诱导组与正常饲料对照组比较,TC、HDL、LDL、TG 均高于对照组,差异极显著($P<0.01$)。

2.3 对照组、模型组实验前后血脂指标检测结果比较

血脂各项指标的分析结果表明,在实验过程中,对照组血清 TC、HDL、LDL、TG 均无明显的变化。模型组 TC 水平有递增趋势,在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后,与实验前相比呈现极显著性差异($P<0.01$),并且 TC 明显高于食蟹猴血脂的正常参考水平,具备了高胆固醇血症特征;HDL 先增加后降低,但与实验前相比均极显著上升($P<0.01$);LDL 在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后水平快速递增,虽然后期有下降,但都维持在较高水平,并且与实验前相比极显著上升($P<0.01$),且明显高于食蟹猴血脂的正常参考水平,提示脂代谢紊乱导致了高脂血症;TG 水平呈现递增趋势,在 8 个月时极显著升高($P<0.01$),见表 1。

表 1 食蟹猴高脂血症模型组与对照组血脂指标监测结果($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Indexes about lipids of the model group and the control group($\bar{x}\pm s$)

分组(Group)		检测指标(Index)	TC	HDL	LDL	TG
模型组 model group (n=435)	实验前	Pre	2.60±2.13 ^a	1.48±0.48 ^a	1.17±0.90 ^a	0.58±0.39 ^a
	4 个月	4 months	14.48±7.75 ^b	2.17±0.47 ^b	13.55±8.12 ^b	0.69±0.59 ^a
	8 个月	8 months	12.51±6.20 ^b	1.96±0.76 ^b	11.63±6.82 ^b	0.96±0.99 ^b
	12 个月	12 months	13.35±7.32 ^b	1.86±0.69 ^b	11.90±7.56 ^b	1.25±1.40 ^b
	18 个月	18 months	10.71±5.74 ^b	1.77±0.68 ^b	9.78±5.96 ^b	1.22±1.72 ^b
对照组 control group (n=369)	实验前	Pre	/	/	/	/
	4 个月	4 months	/	/	/	/
	8 个月	8 months	2.25±0.53 ^a	1.31±0.46 ^a	0.95±0.34 ^a	0.92±0.45 ^a
	12 个月	12 months	/	/	/	/
	18 个月	18 months	2.42±0.54 ^a	1.34±0.42 ^a	1.17±0.38 ^a	0.88±0.58 ^a

注:TC, HDL, LDL, TG 单位均为 mmol/L。同列字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异极显著($P<0.01$)
Note:The units of TC, HDL, LDL and TG are all mmol/L, The same letter in the same trade means no significant difference($P>0.05$), while different letter means significant difference or extremely significant($P<0.05, P<0.01$)

2.4 高脂膳食诱导组血脂检测指标 TG 水平

饲喂高脂膳食饲料动物的 TG 水平,个体间存在较大差异。TG 代谢极端异常的动物 TG 水

平可突然升高至 57.6 mmol/L,而饲喂相同时间高脂膳食饲料的动物 TG 水平最低的为 0.1 mmol/L。

3 讨论

非人灵长类动物是现代医学研究领域重要的实验动物,在遗传学、解剖学和生理学上都与人类高度相似。食蟹猴体型小,性情温顺,便于实验操作,且繁殖周期短,在医学研究中应用广泛,常应用于药理学、毒理学、药物安全性评价等方面的实验研究^[6]。

本试验选择生长和代谢都较为稳定的成年食蟹猴作为实验猴^[7],通过饲喂高脂膳食饲料形成高脂血症动物模型,该模型形成时间相对较长,与人类长期高脂膳食导致的高脂血症相似。脂代谢紊乱是诱发高脂血症的关键原因,血清中 TC、HDL、LDL、TG 的含量可在一定程度反映机体脂肪代谢状况,是监测血脂变化的重要指标^[8]。TC 体内含量过量时会导致高胆固醇血症,对机体产生不利的影响;HDL 主要功能是将肝外组织中过多的胆固醇运输到肝脏代谢,HDL 具有防止动脉粥样硬化、降低冠心病病死率作用;LDL 是所有血浆脂蛋白中首要的致动脉粥样硬化性脂蛋白,如果血液中 LDL 含量过高,就易沉积于动脉血管壁,会形成粥样斑块,导致血管狭窄或破裂可直接导致急性心梗、中风甚至猝死。本实验通过检测 TC、HDL、LDL、TG 的水平来衡量血脂变化情况。

本实验结果显示,在饲喂高脂膳食饲料 4 个月时,试验组 TC 和 LDL 水平极显著升高($P<0.01$),在后期有所下降,但都稳定维持在一个较高的水平,且 TC 和 LDL 的水平明显高于食蟹猴血脂的正常水平^[9-11];HDL 和 TG 水平先增加后降低,虽然与实验前相比有极显著的上升($P<0.01$),但均维持在食蟹猴血脂的正常水平;在实验 8 个月、18 个月时模型组 TC、HDL、LDL、TG 均明显高于对照组($P<0.01$)尤其是 TC 和 LDL 的水平,这一结果与杨凤梅等的实验结果一致^[11]。造成这些结果的可能机制是因为高脂膳食饲料中含 15% 的猪油、30% 的糖和 0.5% 胆固醇,高脂肪、高糖和高 TC 的摄入使造模动物体内血液的 TC 含量急剧增加,出现 TC 代谢障碍从而导致机体内的血脂代谢紊乱,使 LDL 的代谢也出现障碍并在体内蓄积,从而使造模动物出现高 TC 和高 LDL 血症。通过分析 TG 的结果可知,饲喂高脂膳食饲料动物的 TG 水平,个体间存在较大差异,造成这一结果的原因可能是动物个体间基因存在差异,有些动物的基因在特定的身体条件和环境因素作用下会发生突变。有全基因组研究发现,TG 代谢

极端异常的 HTG 患者,脂蛋白(lipoprotein lipase, LPL)基因,载脂蛋白 C2 基因有突变聚集倾向^[12]。脂蛋白脂肪酶的主要生理功能是水解血液中富含甘油三酯脂蛋白中的三脂酰甘油,生成的甘油和脂肪酸可供组织氧化分解并提供能量^[13]。有些 LPL 自身变异并结合遗传因素或者环境因素时会产生严重的临床症状,比如妊娠后,LPL 基因发生突变,TG 由 3.4 mmol/L 升高至 22.5 mmol/L^[14]。

本实验结果说明,采用高脂膳食饲料建立的食蟹猴高脂血症动物模型前期表现为 TC 和 LDL 迅速升高,后期虽有下降,但都维持在较高的异常水平,这一结果表明食蟹猴在造模过程中可能存在一个机体内适应的过程,通过体内代谢调节血脂水平,维持在一个稳定的水平;HDL 和 TG 水平先增加后降低,但都在正常范围内波动。通过各项指标分析,用高脂饲料建立的食蟹猴高脂动物模型符合高脂血症临床分类中的高胆固醇血症和高 LDL 血症的特征,并且在 18 个月的试验监测中,TC 和 LDL 都维持在较高水平,说明本试验已经初步建立了稳定的食蟹猴高脂血症动物模型。

参考文献

- [1] Szapary P O, Rader D J. The triglyceride-high-density lipoprotein axis: an important target of therapy[J]. American Heart Journal, 2004, **148**(2): 211-221.
- [2] 吴隰宏,方显明. 家兔实验性高脂血症模型的研究[J]. 广西中医药大学学报, 2004, **7**(2): 1-2.
- [3] Cannon C P. Mixed Dyslipidemia, Metabolic Syndrome, Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease: Clinical Implications[J]. The American Journal of Cardiology, 2008, **102**(12): 5L-9L.
- [4] Wang S H, Sun Z L, Ruan X Z, et al. Dyslipidaemia among diabetic patients with ischemic stroke in a Chinese hospital [J]. 中华医学杂志(英文版), 2009, **122**(21): 2567-2572.
- [5] Carlsson H E, Schapiro S J, Farah I, et al. Use of primates in research: a global overview. [J]. American Journal of Primatology, 2004, **63**(4): 225-237.
- [6] 石巧娟,李巍,萨晓婴. 食蟹猴在医学研究中的应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2012, **32**(4): 358-365.
- [7] 李冰. 食蟹猴生长曲线[J]. 实验动物科学, 2006, **23**(3): 61-62.
- [8] Rodoman G V, Shalaeva T I, Dobretsov G E. Blood fatty acid transporters in acute pancreatitis[J]. Vopr Med Khim, 2001, **47**(47): 633-641.
- [9] 李岩,何君,孙井江,等. 实验用食蟹猴生物学指标的研究[J]. 现代预防医学, 2010, (13): 2503-2505.
- [10] 王冬平,隋丽华,洪宝庆,等. 食蟹猴与猕猴血液生理和生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2007(7): 400-402.
- [11] 杨凤梅,李艳艳,鲁帅尧,等. 实验性高脂血症恒河猴模型的

- 初步建立及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, (9): 31-35.
- [12] Johansen C T, Wang J, Lanktree M B, *et al.* Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia [J]. *Nature Genetics*, 2010, **42** (8): 684-687.
- [13] 穆云翔. 脂蛋白脂肪酶基因突变研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, (4): 358-362.
- [14] Ma Y, Liu M S, Ginzinger D, *et al.* Gene-environment interaction in the conversion of a mild-to-severe phenotype in a patient homozygous for a Ser172→Cys mutation in the lipoprotein lipase gene [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, **91**(5): 1953-1958.

Establishment and Analysis of Hyperlipidemia Model in Cynomolgus Monkey

YANG Yongli, LI Feng, WANG Yunlong, LIU Faqin, ZHOU Guochun,

GAO Shiping, XU Zichen, XU Yongde

(*Kunming Biomed International, Kunming 650550, China*)

Abstract: Objective To establish Cynomolgus monkey model of hyperlipidemia. **Method** Cynomolgus were feed by high fat diet, the levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG) of the Cynomolgus monkey were determined at 4, 8, 12, 18 months for analyzing the trend of each paramaters above. **Result** When it was 4 months, the level of TC, HDL, LDL were higher significantly than that before feeding the high fat diet ($P < 0.01$). When it was 8 months, the level of TG was higher signifcantly than that before feeding the high diet ($P < 0.01$). And the levels of TC, HDL, LDL and TG of model group were significantly different from that of the control group ($P < 0.01$) at 8 months, 18 months. At this experiment, TC, HDL, LDL, TG all showed a increase trend, expecially the levels of TC and LDL much higher than the normal levels of Cynomolgus monkey. **Conclusion** Cynomolgus monkey of the model group has the feature of high total cholesterol and high low-density lipoprotein cholesterol, the method to establish Cynomolgus monkey model of experimental hyperlipidemia was feasible.

Key words: Hyperlipidemia; animal model; Cynomolgus monkey

(上接第 30 页)

Establishment of Hepatic Fibrosis Model Induced by CCl₄ in Inbred C57BL/6 Mice

LIU Susu, HUO Guitao, WANG Chenfei, FAN Changfa

(*1. Institute for Laboratory Animal Resources National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China*)

(*2 National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China*)

Abstract: Objective Compared the effects of different doses of carbon tetrachloride induced liver fibrosis in inbred C57BL/6 mice, in order to established a stable liver fibrosis model for the study of liver diseases and related drug mechanisms. **Method** The 5-week-old C57BL/6 mice were subjected to high, medium and low dose by CCl₄, after the experiment collected blood and liver tissue to detect the levels of plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver pathology. **Result** After the induction of inbred C57BL/6 mouse drug, the medium and low dose group could survive for 8 weeks, the increase of serum transaminase content and the pathological changes of liver tissues had a dose-time effect, and the mice with severe pathological changes had a large area of liver tissue necrosis and were wrapped by fibrous tissue. **Conclusion** Eight weeks after administration of 10% carbon tetrachloride, inbred C57BL/6 mice were induced to form a stable mouse model of liver fiber.

Key words: Inbred C57BL/6 mice; carbon tetrachloride; Liver fibrosis