

高脂饲喂结合颈总动脉球囊损伤制作 胰岛素抵抗兔动脉粥样硬化模型

许振坤, 任丽玮, 原 涛

(河北省邯郸市第一医院心内二科, 邯郸 056002)

[摘要] 目的 探索制作快速、稳定可靠的兔动脉粥样硬化(AS)模型的方法。方法 采用高脂饲料喂养结合动脉内膜球囊损伤的方法建立兔AS模型。选择健康雄性新西兰白兔20只, 体重2.0~2.5 kg, 实施颈总动脉内膜球囊损伤术后予以高脂饲料喂养, 于饲喂前和饲喂12周后, 取耳缘静脉血测定总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBG)及空腹胰岛素(FSI), 计算胰岛素敏感指数(ISI)和稳态模型-胰岛素抵抗(HOMA-IR); 在肉眼及光学显微镜下观察颈总动脉内膜形态特征。结果 高脂饲喂12周后, 可见体质量、TC、TG和LDL-C较饲喂前均显著升高($P<0.01$); FBG无明显变化($P=0.550$), FSI及HOMA-IR较饲喂前显著升高, HDL-C、ISI较饲喂前显著降低($P<0.01$); 颈总动脉内壁肉眼可见典型动脉粥样斑块, 光学显微镜下见内膜明显增厚, 形成明显的粥样斑块及纤维帽结构。结论 高脂饲喂可导致兔胰岛素抵抗, 联合动脉内球囊损伤法可以短期内成功制作兔AS模型。

[关键词] 兔; 动脉粥样硬化(AS); 胰岛素抵抗(IR); 球囊损伤; 动物模型制作

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0028-05

随着人们生活水平的提高和高脂肪饮食习惯的形成, 越来越多的冠心病患者合并有糖尿病和/或高脂血症, 而这些疾病有一个“共同土壤”——胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。IR是指由于各种影响胰岛素的原因, 使得机体摄取和利用葡萄糖的效率降低, 为了维持血糖的稳定, 机体代偿性分泌过多胰岛素, 从而形成高胰岛素血症^[1]。代表性症状为血脂紊乱、肥胖、动脉粥样硬化(AS)等。其中AS主要表现为动脉粥样斑块, 不稳定粥样斑块极易破裂, 诱发急性血

栓, 导致急性动脉综合征, 甚至危及生命, 所以AS给人类生命健康造成了严重的威胁。评估斑块的结构和组成, 密切关注其动态, 对防止其破裂和选择合适的治疗时机和方案具有重要的临床价值^[2,3]。

目前常见的AS动物模型包括: 载脂蛋白E基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)^[4]和高脂饮食兔等模型的建立。前者由于实验过程复杂, 成本较高, 故不易推广; 后者其脂代谢虽与人类有相似之处, 但由于造模时间过长, 且高脂饮食改变兔的饮食结构, 容易使其发生胆固醇贮积症继发感染而死亡。本实验试图通过高脂饮食联合球囊剥脱法建立AS兔模型, 加之饲喂方便、易获得且成本低, 故可行性较高; 同时对高脂饮食后兔的血糖和胰岛素指数进行分析, 验证高脂饮食可诱发IR, 进一步探讨IR可能对AS发生、发展有一定促进作用。

[收稿日期] 2019-05-13

[基金项目] 邯郸市科学技术研究与发展计划项目
(1723208066-10)

[作者简介] 许振坤(1984-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病介入治疗研究。

E-mail: xjandy1201@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

20只普通级雄性新西兰白兔,体质量2.0~2.5 kg,购自天津医科大学实验动物科学部[SCXK(津)2018-8-001]。将兔单笼喂养普通饲料1周,温度22~26℃,相对湿度50%~60%,12 h昼夜循环,自由摄食及饮水,随后进行实验。

1.2 主要实验试剂和仪器设备

罗氏全自动生化分析仪7200购自德国罗氏诊断公司,低速台式离心机DT5-6购自北京时代北利公司,LEICADM LB2型双目显微镜购自德国Leica公司,普通球囊(2.0~2.5) mm×20 mm、0.014"×185 cm ATW PTCA引导钢丝和球囊扩张压力泵均购自美国Cordis公司。胰岛素放免测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司),血糖仪及试纸(Medisafe,上海泰尔茂医疗产品有限公司),胆固醇(天津市瑞科生物技术有限公司),蛋黄粉和猪油(天津安赛商贸有限公司)。

1.3 干预措施

所有兔连续饲喂高脂饲料(普通颗粒饲料+4%胆固醇+10%猪油+10%蛋黄粉)12周,允许兔自由饮水。

在高脂饲喂1周后,实施颈总动脉内膜损伤术:(1)动物术前12 h禁食,不禁水,称重、麻醉(肌肉注射1 mg/kg速眠新,吉林省华牧动物保健品有限公司,批号00115821),固定于手术台上;(2)剪去颈部体毛,剃毛直径7 cm,常规消毒铺巾;(3)沿颈部正中切开皮肤5.0 cm左右,分离皮下组织及肌肉,暴露并游离左侧颈总动脉3.0~4.0 cm;(4)于甲状软骨上方水平分离左侧颈内、外动脉,分别用动脉夹临时夹闭颈总动脉近心端及颈内动脉;(5)颈外动脉远心端结扎,近心端用线提起,距颈内、外动脉分叉点0.5 cm约45°角“v”形剪开颈外动脉;(6)插入引导钢丝,在钢丝引导下逆行插入球囊约10.0 cm;(7)连接球囊扩张压力泵,注入肝素生理盐水,膨至303.975~405.300 kPa,自近心端缓慢回拉,回拉有阻力时表明球囊直径与血管吻合,反复3次后撤出球囊导管、导丝;(8)结扎左颈外动脉近心端,使左颈总、颈内动脉恢复血流,缝合皮肤;(9)从耳缘静脉给予肝素200 U/kg,伤口处洒入

4万U庆大霉素(华北制药集团有限公司,批号:070501)预防感染,术后连续3 d每日肌肉注射40万U青霉素。术后于普通饲料饲喂3 d后改为高脂饲料饲喂,每只每日80 g,持续至12周。

1.4 血液指标检测

分别于高脂饲喂前及饲喂12周后空腹取兔耳缘静脉血测定总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBG)及空腹胰岛素(FSI),计算胰岛素敏感指数(ISI)和稳态模型-胰岛素抵抗(HOMA-IR)水平,血脂、血糖、胰岛素水平差异大者不用作实验。20只兔均行颈总动脉内膜球囊损伤后予高脂饲料喂养。ISI的计算方法:ISI=1/(FSI, mIU/L)×(FBG, mmol/L),HOMA-IR的计算方法:HOMA-IR=(FSI, mIU/L)×(FBG, mmol/L)/22.5。分析HOMA-IR与血脂的相关性。

1.5 组织病理学观察

处死兔后,根据球囊损伤术中球囊导管进入的深度及损伤长度,截取损伤段颈总动脉1.5~2.0 cm,生理盐水冲洗后以体积分数10%甲醛溶液固定及石蜡包埋,苏木素伊红(HE)染色,直视下观察粥样斑块形态,病理切片厚度为5 μm,光学显微镜观察。

1.6 统计学处理

应用SPSS17.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布的计量资料比较采用t检验,不符合正态分布的计量资料采用对数转换。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

2只兔死于颈总动脉球囊损伤术后感染,2只兔于饲喂高脂饲料3周后出现腹泻,及时调整进食结构后好转,腹泻消失,继续用于实验。

2.2 高脂饲喂前后兔体质量及血脂变化

高脂饲喂12周后,可见体质量、TC、TG、LDL-C显著升高,HDL-C显著降低($P < 0.01$)(表1)。

2.3 高脂饲喂前后兔血糖及胰岛素变化

高脂饲喂12周后,可见FBG无明显变化($P = 0.550$)。FSI及HOMA-IR显著升高,ISI显著降低($P < 0.01$)(表2)。

2.4 HOMA-IR与血脂的相关分析

经Pearson直线相关分析,结果显示:HOMA-IR

表 1 高脂饲喂前后兔的体质量及血脂情况

时 期	<i>n</i>	体质量/kg	TC/mmol · L ⁻¹	TG/mmol · L ⁻¹	HDL-C/mmol · L ⁻¹	LDL-C/mmol · L ⁻¹
高脂饲喂前	18	2.27 ± 0.15	1.49 ± 0.62	1.00 ± 0.46	0.98 ± 0.29	0.38 ± 0.39
高脂饲喂后	18	2.51 ± 0.25*	30.35 ± 1.05*	5.72 ± 3.87*	0.68 ± 0.24*	26.7 ± 1.80*
<i>t</i>	—	3.46	-94.93	-4.85	-3.17	-57.03
<i>P</i>	—	0.002	0.000	0.000	0.003	0.000

注: 与高脂饲喂前比较, **P*<0.01表 2 高脂饲喂前后血糖及胰岛素情况($\bar{x} \pm s$)

时 期	<i>n</i>	FBG/mmol · L ⁻¹	FSI/mIU · L ⁻¹	ISI (10 ⁻³)	HOMA-IR
高脂饲喂前	18	5.26 ± 0.72	23.98 ± 11.70	9.85 ± 3.99	5.22 ± 2.32
高脂饲喂后	18	5.37 ± 0.61*	207.92 ± 103.52**	0.71 ± 0.30**	70.33 ± 2.18**
<i>t</i>	—	-0.61	3.89	-5.66	6.59
<i>P</i>	—	0.550	0.001	0.000	0.000

注: 与高脂饲喂前比较, **P*>0.05, ***P*<0.01

与TG存在正相关($r=0.52$, $P=0.039$), 回归方程为 $\hat{Y}=2.416+0.065X$, 与TC、LDL、HDL无相关性($P>0.05$).

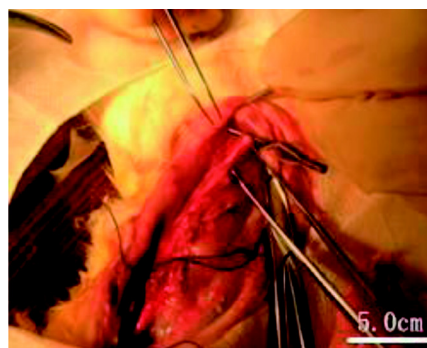
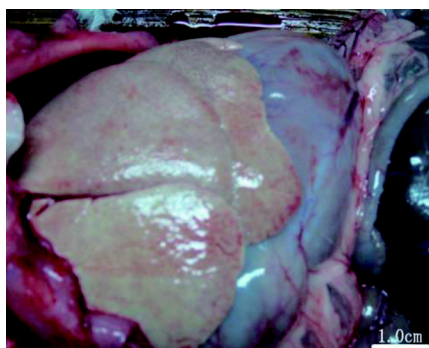
2.5 病理形态学结果

(1)肉眼观察: 解剖见高脂饲喂12周后, 肝脏体积增大, 表面光滑, 边缘钝, 色发白, 质软, 比重轻, 肝脏明显脂肪肝改变(图1A)。高脂饲喂后兔颈总动脉管腔壁增厚, 可见突起于内膜表面的散在的、大小不等的黄白色脂质条纹及隆起的脂质斑块形成(图1B)。(2)光学显微镜观察: 高脂饲喂前, 可见兔颈动脉内膜光滑, 未见脂纹或脂斑, 上皮细胞完整, 中膜无增生(图2A); 经高脂饲喂12周后, 兔颈动脉未行球囊损伤侧颈动脉内膜绝大部分光滑, 仅局部见稍微隆起于腔内的脂斑, 其内可见少量泡沫细胞(图2B); 颈动脉球囊损伤联合高脂饲喂12周后可见颈总动脉内皮细胞脱落, 多数血管可见粥样斑块或纤维板

块, 内膜下可见大量炎性细胞(泡沫细胞和淋巴细胞)浸润, 斑块中可见新生血管; 中层平滑细胞排列紊乱, 胞质嗜酸性平滑肌细胞减少, 代之以大量胞质淡染和充满脂质空泡的泡沫细胞, 弹力纤维断裂、溶解, 斑块向管腔凸出, 胶原增生(图2C和图2D)。

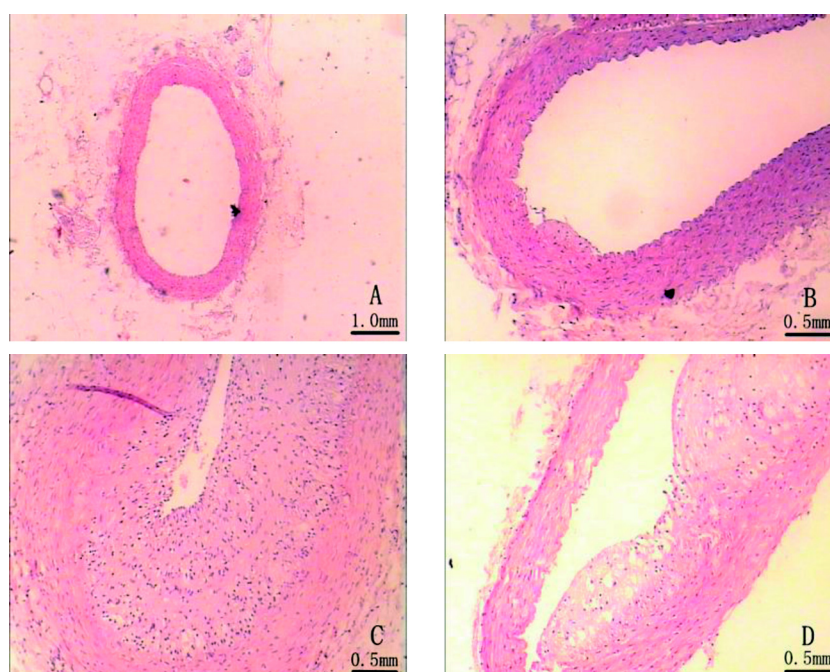
3 讨论

AS是一种慢性炎症反应性疾病, 常累及大、中动脉。相关研究^[5,6]提示, 高脂血症能够激活体内炎症免疫反应, 致使血管内皮细胞损伤, 功能紊乱, 是AS的始动因素。我们通常所提的IR是指当单位胰岛素生物学功能下降时, 外周组织利用葡萄糖发生障碍, 导致血糖水平显著上升, 评估IR程度的定量指标主要是HOMA-IR, HOMA-IR越高, 说明IR越严重^[7]。代谢性疾病



A: 肝脏特征性表现; B: 手术侧颈动脉特征性表现

图1 高脂喂养12周后兔肝脏及颈动脉肉眼观察



A: 高脂喂养前兔颈动脉; B: 高脂喂养 12 周后未手术侧兔颈动脉; C、D: 高脂喂养 12 周后手术侧兔颈动脉

图 2 兔颈动脉病理学观察

发病的主要关键环节是 IR, 并且 IR 与某些心脏病(如冠状动脉粥样型)的发病因素有关, 其中 AS 最初的明显变化就是动脉血管内皮发生异常, 血管壁受伤可导致脂质聚集, 并导致血管内膜纤维化和增生, 血管壁变厚, 而管腔狭窄和血脂代谢异常可导致血液黏稠度增加, 而流动性减小, 脂质聚集于损伤的血管内壁并逐渐形成斑块, 尤其是易损斑块, 在受到刺激后斑块破裂, 血栓沉渣可堵塞血管腔, 诱发急性缺血性疾病。而 IR 与内皮功能紊乱和炎症因子又有着密切的关联^[8], 同时还可诱发高血糖状态, 从而诱导载脂蛋白 C3(APOC3)基因的转录及表达, 进而引起富含甘油三酯的脂蛋白(triglyceride-rich lipoproteins, TRLs)代谢紊乱^[9], 导致血脂异常, 激活体内炎症因子, 从而进入恶性循环。因此, 建立合适的 IR 的 AS 动物模型有助于更好地了解 AS 斑块形成的确切机制。

本实验建立了 18 只兔的颈总动脉粥样硬化斑块模型, 高脂饲养 12 周后均出现高 TG 和高 TC 血症, 体质量均明显增加, 通过 HOMA-IR 计算提示亦同样出现 IR, 经 Pearson 直线相关分析发现 HOMA-IR 与 TG 存在正相关, 提示高 TG 血症、肥胖、IR 三者之间确实存在一定相关性, 前期研究^[10,11]也发现, 肥胖人群中存在糖脂代谢异常、体脂水平增高及 IR。而对于 IR 动物模型的

制作, 兔形成的粥样斑块与人类相似性较高, 是 AS 的易感动物, 因此常选兔制作 AS 模型^[12]。本实验通过病理观察表明, 高脂饲喂 12 周后, 未损伤侧兔颈总动脉仅局部见稍微隆起于腔内的脂斑, 少量泡沫细胞; 而球囊损伤侧兔颈总动脉斑块较大, 内含有纤维组织, 泡沫细胞和淋巴细胞, 明显隆起突入管腔, 弹力纤维断裂、溶解, 符合不稳定性 AS 斑块的特征。球囊损伤可使得兔颈总动脉受到创伤性刺激, 血管内皮损伤, 激活氧化应激和炎症反应, 不断加重血管内壁细胞和组织损伤, 为颈总动脉粥样硬化病变和斑块性质创造了条件; 高脂饮食不仅可导致血脂代谢异常, 还可影响基质金属蛋白酶的降解, 也是推动病变进程的重要条件。

目前对于饲喂高脂饲料建立动物模型的研究仅仅局限于对 AS 的研究或者 IR 的研究, 很少有研究将两者结合起来。本实验成功建立了颈总动脉粥样硬化合并 IR 的动物模型, 符合 AS 合并 IR 的形成机制, 模拟了人类代谢综合征的形成过程, 在生理、病理及药理学效应方面为冠心病的研究提供了可靠的实验平台。

参考文献:

- [1] 汪晓红, 李莉. 维生素 D 对老年 2 型糖尿病患者胰岛素

- 抵抗影响的研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(9):1195-1197.
- [2] 许秋莲, 杨阳, 田野. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1):97-100.
- [3] 杨霞峰, 王风云, 李延辉, 等. 低频超声治疗对动脉粥样硬化性大脑中动脉狭窄急性脑梗死患者的临床疗效观察[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(1):15-19.
- [4] Wang C, Chen H, Zhu W, et al. Nicotine accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by activating $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on mast cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(1):53-65.
- [5] Zhao X, Zhang HW, Xu RX, et al. Oxidized-LDL is a useful marker for predicting the very early coronary artery disease and cardiovascular outcomes[J]. *Per Med*, 2018, 15(6):521-529.
- [6] Liang C, Wang QS, Yang X, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates epithelial sodium channels in endothelial cells of mouse thoracic aorta[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8):1318-1328.
- [7] 吴贻竟, 刘礼梅. 胰岛素抵抗与颈动脉硬化相关性分析[J]. 医药前沿, 2016, 6(23):89.
- [8] 孙钧, 郑继伟, 贾凡, 等. 2型糖尿病患者血清IL-10 α 2[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5):548-554.
- [9] Aroner SA, Furtado JD, Sacks FM, et al. Apolipoprotein C-III and its defined lipoprotein subspecies in relation to incident diabetes: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(6):981-992.
- [10] 陈志刚, 何桦, 罗宏斌. 肥胖2型糖尿病患者体脂参数与胰岛素抵抗的相关性分析[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(1):30-32.
- [11] Malik SUF, Mahmud Z, Alam J, et al. Relationship among obesity, blood lipids and insulin resistance in Bangladeshi adults[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1):444-449.
- [12] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146(2):104-119.

Establishment of Atherosclerosis Model Induced by Feeding High-fat Diet Plus Carotid Artery Balloon Injury in Rabbits with Insulin Resistance

XU Zhenkun, REN Liwei, YUAN Tao

(Second Department of Cardiology, First Hospital of Handan City, Handan 056002, China)

[Abstract] Objectives To identify a quick, stable and reliable method for establishing atherosclerosis (AS) model in rabbit. **Methods** The atherosclerosis rabbit models were established by feeding high-fat diet plus carotid artery balloon injury. twenty healthy New Zealand white male rabbits weighting 2.0-2.5 kg were injured by carotid artery balloon and fed with high fat diet. Before and after 12 weeks feeding, blood from jugular vein were collected to detect total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), fasting blood glucose (FBG), fasting serum insulin (FSI), insulin sensitivity index (ISI) and homeostasis model assessment insulin resistance (HOMA-IR). Total carotid artery endometrium morphology was observed with naked eye and microscope. **Results** After feeding high fat diet for 12 weeks, the body weight, TC, TG, LDL-C of the rabbits were significantly higher than pre-treatment ($P < 0.01$). The difference of FBG was not statistically significant compared with pre-treatment ($P = 0.550$). FSI and HOMA-IR were significantly higher than pre-treatment ($P < 0.01$). HDL-C and ISI were significantly lower than pre-treatment ($P < 0.01$). The typical atherosclerosis mottling in common carotid artery lumen under macrography was visible and intima thickness increased significantly. Plaque and structure of fibrous cap had formed. **Conclusions** The typical carotid atherosclerosis lesion can be successfully induced by high fat diet combining with balloon injury in carotid artery. On the other hand, high fat diet can induce insulin resistance model.

[Key words] Rabbit; Atherosclerosis (AS); Insulin resistance (IR); Balloon injury; Animal model establishment