

杨燕,陈正涛,肖华胜,等. 糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1194-1205.

Yang Y, Chen ZT, Xiao HS, et al. Research progress on mouse models of diabetes macroangiopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1194-1205.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.09.011

糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展

杨燕¹,陈正涛¹,肖华胜³,高泓^{1,2*},谢春光^{1,2*}

(1. 成都中医药大学附属医院,成都 610075;2. 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室,成都 610075;3. 上海伯豪生物技术有限公司,上海 201203)

【摘要】 动物模型广泛应用于研究疾病的发病机制及药物干预的安全性、疗效、作用机制等研究。选择和制备符合疾病发病规律的动物模型是开展实验研究的基础和前提。糖尿病大血管病变的特征为广泛且进展迅速的血管壁动脉粥样硬化,小鼠是动脉粥样硬化实验研究中运用最广泛的动物。本文基于最新研究结果根据1型和2型糖尿病的特征、糖尿病动脉粥样硬化斑块发展规律以及相关评估技术对糖尿病动脉粥样硬化小鼠模型进行系统性综述。

【关键词】 糖尿病大血管病变;动脉粥样硬化;小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 09-1194-12

Research progress on mouse models of diabetes macroangiopathy

YANG Yan¹, CHEN Zhengtao¹, XIAO Huasheng³, GAO Hong^{1,2*}, XIE Chunguang^{1,2*}

(1. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China. 2. Traditional Chinese Medicine Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610075.

3. Shanghai Biotechnology Corporation, Shanghai 201203)

Corresponding author: GAO Hong. E-mail: cdgh76@163.com; XIE Chunguang. E-mail: xiecg@cdutcm.edu.cn

【Abstract】 Animal models are widely used to study the pathogenesis of diseases and the safety, efficacy, and mechanisms of drug treatments. The selection and preparation of animal models that conform to the law of disease incidence are the basis and premise of experimental research. Diabetes macroangiopathy is characterized by extensive and rapidly progressing atherosclerosis of vascular walls. Mice are the most widely used experimental animals in atherosclerosis research. On the basis of the current research information and in accordance with the characteristics of type 1 and 2 diabetes, the development of diabetic atherosclerotic plaques, and the current monitoring technologies, this article systematically reviews diabetic atherosclerosis mouse models.

【Keywords】 diabetes macroangiopathy; atherosclerosis; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81973585),四川省中医药管理局重大疾病中医药、中西医结合临床循证评价研究项目(2020ZD001),国家中医药传承创新团队项目(ZYYCXTD-C-202209)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81973585), Research Program on Clinical Evidence-based Evaluation of Traditional Chinese Medicine and Integrated Chinese and Western Medicine for Major Diseases of the Administration of Traditional Chinese Medicine of Sichuan Province(2020ZD001), National Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Team Project (ZYYCXTD-C-202209).

【作者简介】 杨燕(1996—),女,在读博士研究生,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病的临床和实验研究。

Email: 2223089054@qq.com

【通信作者】 高泓,女,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病的临床和实验研究。

Email: cdgh76@163.com;

谢春光,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治内分泌代谢性疾病的临床和实验研究。

Email: xiecg@cdutcm.edu.cn。

* 共同通信作者

1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是一种以胰岛素分泌绝对缺乏为主要表现的慢性自身免疫性疾病^[1], 具有显著的遗传倾向^[2]。胰岛 β 细胞进行性破坏是 T1DM 胰岛素分泌绝对缺乏和血糖升高的关键。2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的核心发病机制为多因素诱导的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛素分泌障碍^[3-4]。我国 T2DM 患病人数已达 1.144 亿^[5], 其中约 50% 患者合并大血管病变^[6]。在糖尿病患者中, 因大血管病变造成的死亡率约为 65% ~ 75%^[7]。糖尿病大血管病变的特征性病理表现为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS), 糖尿病加速动脉粥样硬化及斑块不稳定性^[8]。高血糖、血糖波动、血脂异常、炎症等是糖尿病动脉粥样硬化的危险因素, 但其对糖尿病动脉粥样硬化的单独贡献程度尚不明确。

研究糖尿病动脉粥样硬化的动物模型包括猴、兔、狗、猪、斑马鱼、小鼠、大鼠等。猴和猪虽然可以产生自发性动脉粥样硬化是较理想的血管病变实验动物, 但由于购买困难、饲养成本高, 难以推广^[9-10]。小鼠与人类基因组相似, 共同拥有 95% 的蛋白质编码基因^[11], 能模拟人类重要的病理生理特征及类似地疾病特征。随着基因工程技术的发展, 啮齿类动物是糖尿病血管疾病研究中最可复制、最有效和最优选的动物模型^[9]。在动脉粥样硬化的研究中, 小鼠是使用数量最多、最广泛的动物^[12]。因此本文就糖尿病动脉粥样硬化小鼠模型分类、构建、各自特点及相关实验技术进行详细论述。

1 人类糖尿病动脉粥样硬化特征

遗传、不良饮食习惯、超重、肥胖、久坐的生活方式、缺乏体育锻炼等因素均为人类糖尿病的发病诱因。高血糖是 T1DM 和 T2DM 的重要特征, 高血糖通过修饰蛋白质等大分子物质形成晚期糖化终产物 (advanced glycation end-products, AGEs), AGEs 与其受体 (receptor for AGE, RAGE) 的相互作用驱动炎症/氧化应激途径, 从而引发分子、细胞和血管损伤^[13]。高血糖还通过影响一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase enzyme3, NOS3) 解耦联导致氧化应激, 降低一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生物利用度, 损害血管内皮功能诱导血管壁动脉粥样硬化^[14]。在连续性血糖监测研究中发现, 即使血糖控制良好的

糖尿病患者仍然有 50% 的时间处于高血糖状态, 特别是餐后高血糖, 这与斑块易损性增加相关^[15]。研究发现, 短暂的间歇性高血糖 (transient intermittent hyperglycemia, TIH) 通过促进骨髓生成引起单核细胞增多从而加速动脉粥样硬化^[16]。

糖尿病大多伴随着以甘油三酯 (triglyceride, TG) 升高、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 降低和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 结构改变为特征的血脂异常, 导致更严重的动脉粥样硬化病变^[17]。特别是餐后血脂清除率下降和小密度低密度脂蛋白颗粒 (small dense LDL, sdLDL) 与动脉粥样硬化更加密切。在活性氧的作用下, LDL 被氧化为氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)。oxLDL 通过巨噬细胞清道夫受体, 沉积于巨噬细胞内部, 形成动脉粥样硬化特异性泡沫细胞^[18]。血管内膜下泡沫细胞形成被认为是血管动脉粥样硬化早期标志。人类糖尿病动脉粥样硬化病理进展呈现出一定的规律性: 早期内膜下泡沫细胞沉积, 表现为血管壁脂肪条纹形成; 随后, 血管内皮细胞和平滑肌细胞向成纤维细胞等间质细胞转分化; 成纤维细胞等间质细胞构成纤维斑块, 覆盖脂质条纹并进一步形成粥样斑块。随着病情进展, 斑块内部存在出血、坏死、钙化等复合病变, 炎症浸润、血管微环境变化、纤维帽变薄加剧动脉粥样硬化斑块不稳定性, 使斑块破裂、血栓栓塞从而发生急性心、脑血管事件。

2 小鼠与人类糖尿病动脉粥样硬化的差异

小鼠由于缺乏胆固醇酯转移蛋白, 会导致具有动脉粥样硬化保护作用的高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平升高, 使其不容易发生动脉粥样硬化病变^[19]。目前, 通常使用敲除载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 或低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 基因以弥补小鼠异于人类的血脂代谢特征, 从而建立小鼠动脉粥样硬化模型。ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠表现出明显的高脂血症, 与野生型小鼠相比, 其血浆胆固醇脂升高约 5 倍^[20], 动脉粥样硬化进展也更迅速, 联合高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 喂养 10 ~ 14 周时主动脉窦即出现复杂的纤维斑块^[21]。与 ApoE^{-/-} 小鼠模型相比, LDLR 敲除 (LDLR^{-/-}) 小鼠模型更能反应人类家族性高胆固醇血症特征, 且更

容易表现出肥胖和胰岛素抵抗^[21]。

尽管小鼠的使用非常广泛、相关研究报道丰富,但仍然与人类动脉粥样硬化存在差异。目前尚无能够完全再现人类动脉粥样硬化特性的完美动物模型^[22]。人类与小鼠在影响动脉粥样硬化部位的心血管解剖和血流动力学方面存在差异。人类动脉粥样硬化主要发生在冠状动脉、颈动脉和外周血管。而小鼠动脉粥样硬化损伤则通常发生于主动脉窦和主动脉弓,冠状动脉中很少形成动脉粥样硬化斑块^[23]。与人类相比,动脉粥样硬化小鼠血管内炎症更高,靶向炎症治疗途径有更明显的抗小鼠动脉粥样硬化作用。最重要的是,小鼠通常不会出现自发性斑块破裂、出血及心梗、中风等急性血管事件。

3 糖尿病动脉粥样硬化早期小鼠模型

3.1 T1DM 动脉粥样硬化小鼠模型

ApoE^{-/-}小鼠联合使用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导 T1DM 动脉粥样硬化。STZ 是一种胰岛细胞毒素,通过葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter 2, GLUT-2) 进入并破坏胰岛 β 细胞,从而导致高血糖^[24]。在 ApoE^{-/-}小鼠中采用多次低剂量 STZ 注射(40 mg/(kg·d), 每天 1 次,连续 5 d)诱导慢性胰岛炎和胰岛素缺乏,这种方式比单次大剂量 STZ 诱导的高血糖模型更接近人类胰岛素缺乏和 T1DM^[25]。这是因为 GLUT-2 也在肾小管上皮细胞和肝细胞中表达,大剂量 STZ 注射可能会导致肝、肾副作用^[26]。

STZ 诱导的糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠模型是研究 T1DM 动脉粥样硬化的首选模型^[27]。与非糖尿病小鼠相比,STZ 诱导的糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠胆固醇增加 2 倍,10 ~ 20 周时斑块形成增加 3 ~ 6 倍,并在主动脉窦和主动脉弓内观察到早期离散病变;随后,胸主动脉和腹主动脉区域也可观察到病变。然而,STZ 诱导的糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠对罗格列酮、共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)等抗动脉粥样硬化治疗不敏感^[28]。

糖尿病动脉粥样硬化的另一个特征是高血糖。小鼠的遗传特征决定其组织中醛糖还原酶(aldehyde reductase, AR)表达水平较低,对高血糖的危害有抵抗力,从而不容易出现糖尿病动脉粥样硬化^[29]。为了突出高血糖对动脉粥样硬化的贡献程度,在 STZ 诱导糖尿病的 ApoE^{-/-}小鼠中过表达人醛糖还原酶

(human aldose reductase, hAR),通过引起内皮细胞功能障碍加速动脉粥样硬化的发生^[30]。在 STZ 诱导糖尿病的 LDLR^{-/-}小鼠中过表达 hAR,与 STZ 诱导糖尿病的 LDLR^{-/-}小鼠相比,LDLR^{-/-}(hAR)小鼠动脉粥样硬化病变大小增加 2 倍^[31]。因此该模型适用于观察高糖及控糖在糖尿病动脉粥样硬化中的作用及机制。

携带胰岛素 2 基因常染色体显性遗传突变的自发性 T1DM 秋田小鼠与 ApoE^{-/-}或 LDLR^{-/-}小鼠杂交产生的 Akita ApoE^{-/-}或 Akita LDLR^{-/-}小鼠是研究 T1DM 动脉粥样硬化的另一个理想模型。在 Akita ApoE^{-/-}或 Akita LDLR^{-/-}小鼠中,4 ~ 5 周出现 T1DM,胆固醇和总甘油三酯显著升高,25 周时动脉粥样硬化病变增加约 3 倍^[32-33],且雄性小鼠比雌性小鼠血管损伤更显著^[32]。这与雄性小鼠动脉粥样硬化增加与病变部位炎症细胞的增加有关^[33]。因此,这是研究性别差异与动脉粥样硬化关系的良好动物模型。

使用 C57BL/6J 背景上的 LDLR^{-/-}小鼠与携带 Ins2 基因(Cys96Tyr)中显性突变的秋田小鼠(Ins2^{Akita})杂交产生 Ins2^{Akita}LDLR^{-/-}小鼠,该小鼠参与脂质稳态和炎症的多个基因表达异常,出现严重高血糖、葡萄糖耐受受损和高血脂。动脉粥样硬化加速发展,20 周龄时雄性小鼠主动脉动脉粥样硬化面积增加 224%,雌性小鼠增加 30%,是研究 T1DM 动脉粥样硬化的十分有前途的动物模型^[34]。

非肥胖糖尿病(non obese diabetic, NOD)小鼠能识别人类 T1DM 发病中关键的遗传和环境因素,在 T1DM 研究中有十分重要的意义^[35]。为了研究自身免疫背景在动脉粥样硬化中的作用,在 NOD 小鼠中敲除 ApoE 或 LDLR 基因,从而制备出 NOD ApoE^{-/-}和 NOD LDLR^{-/-}小鼠。NOD ApoE^{-/-}或 NOD LDLR^{-/-}小鼠表现出高脂血症、促炎性单核细胞集聚但并不足以出现动脉粥样硬化^[36]。与单独的 ApoE^{-/-}或 LDLR^{-/-}基因敲除相比,在 HFD 喂养的 NOD 小鼠中双重敲除 ApoE^{-/-}和 LDLR^{-/-}基因小鼠表现出更严重的动脉粥样硬化病变^[36]。在这种模型中小鼠主动脉因斑块而缩小了 60%以上,出现阻塞性冠状动脉粥样硬化和心肌梗死,同时伴有胰岛破坏和高脂血症。更适于研究自身免疫背景下的严重糖尿病动脉粥样硬化病变。

STZ 是糖尿病的重要诱导剂,同样广泛用于糖

尿病血管病变动物模型诱导。在使用 STZ 诱导 T2DM 时通常加用烟酰胺或尼古丁胺以保护胰岛 β 细胞过度损害,从而制备胰岛素缺乏的 T2DM 模型。其特点为稳定、中度的高血糖, β 细胞功能损失约 60%^[37]。在 HFD 喂养的小鼠中使用适量 STZ 能诱导 IR 的 T2DM 模型,这是用于研究人类糖尿病并发症的适宜模型。需注意,STZ 是不稳定

的不溶物质,在使用时应先将 STZ 与柠檬酸缓冲液溶解 15 ~ 20 min,并在 5 min 内完成注射^[25]。其次,STZ 具有致癌性,在使用时实验人员应注意防护。最后,雌性动物对 STZ 不敏感,在使用 STZ 制备糖尿病模型时应选用更敏感的雄性动物,而不是盲目地增加 STZ 的剂量,因为这会造成肝肾副作用,见表 1。

表 1 T1DM 动脉粥样硬化早期小鼠模型特征
Table 1 Characteristics of the T1DM mouse model of early atherosclerosis

模型类别 Model type	方法 Methods	饮食 Diet	特点 Characteristic	优势 Advantages	不足 Disadvantages
ApoE ^{-/-} 小鼠 ^[24-28] ApoE ^{-/-} mice ^[24-28]	ApoE ^{-/-} 小鼠 + STZ (40 mg/kg) 1 d 一次,连续注射 5 d ApoE ^{-/-} mice were injected with STZ (40 mg/kg) once a day for 5 d	正常饮食 Normal diet	符合 T1DM 病特征;血脂升高 2 倍;10 ~ 20 周时斑块形成增加 3 ~ 6 倍 Accord with that characteristics of T1DM; Blood lipid increased by 2 times; Plaque shape at 10 ~ 20 weeks Increase by 3 ~ 6 times	模拟 T1DM 早期动脉粥样硬化 Simulate early atherosclerosis of T1DM	对药物干预不敏感 Insensitive to drug intervention
ApoE ^{-/-} (hAR) 小鼠 ^[30] ApoE ^{-/-} (hAR) mice ^[30]	在 ApoE 敲除 (ApoE ^{-/-}) 背景下表达 hAR; + STZ (50 mg/kg) 1 d 一次,连续注射 5 d Expressing hAR in the context of ApoE knockout + STZ (50 mg/kg) was injected once a day for 5 d	-	符合 T1DM 特征;伴高脂血症;动脉粥样硬化加速 Meet the characteristics of T1DM; With hyperlipidemia; Acceleration of atherosclerosis	模拟高血糖引起的 T1DM 早期动脉粥样硬化; Early atherosclerosis of T1DM induced by hyperglycemia	醛糖还原酶的分布与人类存在差异 Distribution of aldose reductase is different from human
LDLR ^{-/-} (hAR) 小鼠 ^[31] LDLR ^{-/-} (hAR) mice ^[31]	C57BL/6 背景下的 (hAR) 转基因小鼠与 LDLR ^{-/-} 小鼠杂交; STZ (50 mg/kg) 1 d 一次,连续 5 d (hAR) transgenic mice hybridized with LDLR ^{-/-} mice under C57BL/6 background STZ (50 mg/kg) once a day for 5 d	高胆固醇 (含 0.15% 胆固醇) 饮食 High cholesterol diet (containing 0.15% cholesterol)	符合 T1DM 特征点;伴高脂血症、炎症;早期加速动脉粥样硬化 Accord with characteristic of T1DM; With hyperlipidemia and inflammation; Early acceleration of atherosclerosis	模拟高血糖引起的 T1DM 早期动脉粥样硬化 Early atherosclerosis of T1DM induced by simulated hyperglycemia	醛糖还原酶的分布与人类存在差异 Distribution of aldose reductase is different from human
Akita ApoE ^{-/-} 或 Akita LDLR ^{-/-} 小鼠 ^[32-33] Akita ApoE ^{-/-} or Akita LDLR ^{-/-} mice ^[32-33]	T1DM Akita (秋田) 小鼠与 ApoE ^{-/-} 或 LDLR ^{-/-} 小鼠杂交 T1DM Akita mice hybridize with ApoE ^{-/-} or LDLR ^{-/-} mice	西方饮食 (0.15% 胆固醇 + 20% 无水牛奶) Western diet (0.15% cholesterol + 20% anhydrous milk)	4 ~ 5 周自发 T1DM; 5 周动脉粥样硬化病变增加约 3 倍; 雄性突出 Spontaneous T1DM in 4 ~ 5 weeks; Atherosclerosis increased about 3 times in 5 weeks; Male prominence	性别差异与动脉粥样硬化相关性的良好动物模型 A good animal model of gender difference and atherosclerosis	雌性小鼠动脉粥样硬化病变不突出 Atherosclerosis in female mice is not obvious
Ins2AkitaLDLR ^{-/-} 小鼠 ^[34] Ins2AkitaLDLR ^{-/-} mice ^[34]	LDLR ^{-/-} 小鼠与携带 Ins2 基因 (Cys96Tyr) 中显性突变的秋田小鼠 (Ins2Akita) 杂交 LDLR ^{-/-} mice were crossed with Akita (Ins2 Akita) carrying dominant mutation in Ins2 gene (Cys96Tyr)	高脂饮食 High-fat diet	严重高血糖、血脂升高; 动脉粥样硬化进展异常迅速 Severe hyperglycemia and elevated blood lipids; Rapidly progresses of atherosclerosis	高糖和高脂加速动脉粥样硬化良好模型 A good model of atherosclerosis accelerated by high glucose and high fat	雌性小鼠动脉粥样硬化病变不突出 Atherosclerosis in female mice is not obvious
NOD ApoE ^{-/-} LDLR ^{-/-} 小鼠 ^[36] NOD ApoE ^{-/-} LDLR ^{-/-} mice ^[36]	NOD 小鼠中双重敲除 ApoE 和 LDLR 基因 Double knockout of ApoE and LDLR genes in NOD mice	高脂饮食 High-fat diet	胰岛破坏、高脂血症; 严重动脉粥样硬化; 主动脉狭窄, 甚至心肌梗死 Islet destruction Severe hyperlipidemia; Severe atherosclerosis aortic; Stenosis and myocardial infarction	自身免疫背景下表现出严重动脉粥样硬化病变 Severe atherosclerosis in autoimmune background	操作复杂; 成本高 Complex operation; high cost

3.2 T2DM 动脉粥样硬化小鼠模型

T2DM 的特征是胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血糖和血脂紊乱。环境和遗传共同诱导 2 型糖尿病的发生,因此遗传和饮食诱导是制备 T2DM 动脉粥样硬化模型的重要方法。T2DM 动脉粥样硬化研究中最常见的动物模型是瘦素 (ob/ob) 和瘦素受体 (db/db) 纯合子基因突变小鼠与 ApoE^{-/-}或 LDLR^{-/-}小鼠杂交产生的 ob/ob ApoE^{-/-}小鼠、ob/ob LDLR^{-/-}小鼠以及 db/db ApoE^{-/-}小鼠、db/db LDLR^{-/-}小鼠。研究发现,db/db ApoE^{-/-}小鼠在 20 周后出现体重增加、高血糖、高胰岛素血症、高血脂等 T2DM 典型特征,且动脉粥样硬化斑块增加 3 ~ 4 倍^[38]。与之相反,ob/ob ApoE^{-/-}小鼠仅表现为早期脂肪条纹形成阶段,斑块形成不典型^[39]。上述模型可能由于高脂血症过于突出而掩盖高血糖对动脉粥样硬化的影响。为了使其更符合人类 T2DM 脂代谢特征,研究人员将 ob/ob ApoE^{-/-}小鼠、ob/ob LDLR^{-/-}小鼠与 ApoB^{100/100}小鼠 (不表达负责小鼠胆固醇吸收的 ApoB-48 基因) 杂交,制备 Ob/Ob ApoE^{-/-} ApoB^{100/100}小鼠和 ob/ob LDLR^{-/-} ApoB^{100/100}小鼠,以上两种小鼠表现出肥胖、胰岛素抵抗、动脉粥样硬化和高血压^[40],非常适合用于 T2DM、代谢综合征及动脉粥样硬化影响的研究。也有研究直接使用 db/db 小鼠研究 2 型糖尿病动脉粥样硬化。7 周龄 db/db 小鼠高脂饮食干预 8 周后出现血管内膜损伤、中膜增厚等早期动脉粥样硬化病变^[41]。8 周龄 db/db 小鼠在高脂饲料喂养 16 周后,80% 的 db/db 小鼠出现血管损伤,动脉粥样硬化斑块平均面积可达 $26\,098 \pm 7486\ \mu\text{m}^2$ ^[42]。与上述基因突变小鼠相比,db/db 小鼠更容易获得,并且价格也更优惠,除了用于研究糖尿病大血管病变外,还在糖尿病肾病、视网膜病变等糖尿病微血管病变研究领域广泛使用。

另一种表现为 T2DM 和代谢综合征相关的动脉粥样硬化模型是 ApoE^{-/-}小鼠与胰岛素受体底物 (IRS) 基因缺失小鼠杂交产生的 ApoE^{-/-} IRS1^{+/-}小鼠、ApoE^{-/-} IRS2^{+/-}小鼠和 ApoE^{-/-} IRS2^{-/-}小鼠。这些小鼠在血脂轻度异常的基础上表现出胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血糖、糖耐量受损和动脉粥样硬化加速进展^[43]。这是研究胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血糖对动脉粥样硬化影响及相关药物作用的适宜模型。

葡萄糖激酶基因敲除 (GK^{+/-}) 小鼠是研究

T2DM 血糖控制的优良动物模型,在 T2DM 中用于研究高血糖、糖耐量受损引起的动脉粥样硬化加速进展。将 ApoE^{-/-}小鼠与 GK^{+/-}小鼠杂交产生的 ApoE^{-/-} GK^{+/-}小鼠,在给予高脂饮食 (HFD) 喂养的条件下 ApoE^{-/-} GK^{+/-}小鼠的脂质水平与 ApoE^{-/-}小鼠相同,但其动脉粥样硬化进展更快且更严重^[44]。这是用于研究 T2DM 中高血糖对动脉粥样硬化影响及药物干预作用机制的理想模型。

APOE * 3-Leiden (E3L) 小鼠也是研究饮食诱导的高脂血症和动脉粥样硬化的良好动物模型。为了探讨高糖和高脂同时对动脉粥样硬化的影响,研究者将 E3L 小鼠与 GK^{+/-}小鼠杂交产生 E3L/GK^{+/-}小鼠。在上述研究中,E3L/GK^{+/-}小鼠胆固醇、甘油三酯和空腹葡萄糖显著升高,动脉粥样硬化病变增加了 2.2 倍^[45],E3L/GK^{+/-}小鼠是研究代谢综合征和糖尿病动脉粥样硬化的新型动物模型。此外,还可以通过添加 HFD 饮食,诱导胰岛素抵抗来研究 T2DM 动脉粥样硬化。ApoE^{-/-}或 LDLR^{-/-}小鼠联合 HFD 喂养,表现出高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症并增加整个主动脉损伤^[46]。另外,在高脂饮食中添加 0.15% 胆固醇及果糖也能加速动脉粥样硬化进展^[47-48]。

另一种操作简便且成本更低的模型是直接 db/db 小鼠中注射 AAV8-PCSK9-D377Y (一种能够促进 LDLR 降解的 PCSK9 功能增益突变体) 这种方法可以诱导严重的肝脂肪变性、高胆固醇血症和动脉粥样硬化,是一种新的研究糖尿病动脉粥样硬化合并脂肪肝的小鼠模型^[49]。糖尿病 KK 小鼠以及直接将黄色肥胖基因 (Ay) 转移到 KK 小鼠中产生的 KK-Ay 小鼠表现出高血糖、胰岛素抵抗、纤维蛋白原升高、纤维酶原激活物抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 升高,在 4 月龄时表现出主动脉粥样硬化病变,可作为糖尿病动脉粥样硬化早期模型^[50]。另一项研究中 7 周龄雌性 KK-Ay 小鼠在 HFD 饲料喂养 8 周后,发现血清单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和血管细胞粘附分子 1 (vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1) 水平增高,动脉粥样硬化范围扩大^[51],这是研究胰岛素抵抗致动脉粥样硬化的理想模型。

上述 T1DM 和 T2DM 动脉粥样硬化小鼠模型既可观察到内皮功能障碍、氧化应激、炎症、内膜增厚等斑块形成早期病变,也可观察到平滑肌细胞迁

移、纤维帽形成等斑块进展期病变。因此,是研究糖尿病动脉粥样硬化前期的适宜动物模型,可用于糖尿病动脉粥样硬化前期病理特征、发病机制和药物干预有效性和安全性研究,见表 2。

表 2 T2DM 早期动脉粥样硬化小鼠模型特征

Table 2 Characteristics of the T2DM mouse model of early atherosclerosis					
模型类别 Model type	方法 Methods	饮食 Diet	特点 Characteristic	优势 Advantages	不足 Disadvantages
db/db ApoE ^{-/-} 小鼠 ^[38] db/db ApoE ^{-/-} mice ^[38]	瘦素受体 (db/db) 缺陷小鼠与 ApoE ^{-/-} 小鼠杂交 Leptin receptor (db/db) deficient mice hybridized with ApoE ^{-/-} mice	常规饮食或西方饮食 Normal diet or western diet	在常规饮食中 20 周表现出 T2DM 典型特征;动脉粥样硬化加速;在西方饮食中,动脉粥样硬化进一步加速 In the noemal diet for 20 weeks, it showed typical characteristics of T2DM; accelerated atherosclerosis; In western diet, atherosclerosis is further accelerated	典型 T2DM 动脉粥样硬化小鼠模型 Typical T2DM atherosclerosis mouse model	血脂过高;成本较高 Hyperlipidemia; High cost
ob/ob ApoE ^{-/-} 小鼠 ^[39] ob/ob ApoE ^{-/-} mice ^[39]	ob/ob 小鼠与 ApoE ^{-/-} 小鼠杂交 ob/ob mice hybridize with ApoE ^{-/-} mice	含有 1.25% 胆固醇、12.5% 脂肪和 0.5% 胆酸钠的致动脉粥样硬化饮食 An atherosclerotic diet containing 1.25% cholesterol, 12.5% fat and 0.5% sodium cholate	ob/ob ApoE ^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化为脂质条纹; ApoE ^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化为纤维斑块;与 ApoE ^{-/-} 小鼠相比, ob/ob ApoE ^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化进展减缓 Atherosclerosis in ob/ob ApoE ^{-/-} mice showed lipid stripes; Atherosclerosis in ApoE ^{-/-} mice showed fibrous plaque; Compared with ApoE ^{-/-} mice, the progression of atherosclerosis in ob/ob ApoE ^{-/-} mice slowed down	动脉粥样硬化早期脂肪条纹研究模型;瘦素加速动脉粥样硬化良好模型 Study model of fat stripe in early atherosclerosis; A good model of leptin accelerating atherosclerosis	病变局限于早期脂肪条纹阶段 Lesions were limited to the early stage of fat stripe
ob/ob ApoE ^{-/-} ApoB ^{100/100} 小鼠 ^[40] ob/ob ApoE ^{-/-} ApoB ^{100/100} mice ^[40]	ob/ob ApoE ^{-/-} 小鼠与 ApoB ^{100/100} 小鼠杂交 ob/ob ApoE ^{-/-} mice crossed with ApoB ^{100/100} mice	含 22.0% 粗蛋白、5% 粗脂肪和 4.5% 粗纤维的饲料 Feed with 22.0% crude protein, 5% crude fat and 4.5% crude fiber.	肥胖、高胰岛素血症;高血压、动脉粥样硬化;与 ob/ob LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100} 小鼠相比,糖尿病更严重 Obesity, hyperinsulinemia; hypertension and atherosclerosis; Compared with ob/ob LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100} mice, diabetes is more serious	代谢综合征合并糖尿病动脉粥样硬化模型 Metabolic syndrome complicated with diabetic atherosclerosis model	操作困难;血脂过高 Complicated operation; High blood lipid
ob/ob LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100} 小鼠 ^[40] ob/ob LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100} mice	ob/ob LDLR ^{-/-} 小鼠与 ApoB ^{100/100} 小鼠杂交 ob/ob LDLR ^{-/-} mice hybridized with ApoB ^{100/100} mice	含 22.0% 粗蛋白、5% 粗脂肪和 4.5% 粗纤维的饲料 Feed with 22.0% crude protein, 5% crude fat and 4.5% crude fiber	肥胖、高胰岛素血症;高血压、动脉粥样硬化;与 ob/ob ApoE ^{-/-} ApoB ^{100/100} 小鼠相比,动脉粥样硬化进展更快 Obesity, hyperinsulinemia; hypertension, atherosclerosis; compared with ob/ob ApoE ^{-/-} ApoB ^{100/100} mice, atherosclerosis progresses faster	代谢综合征合并糖尿病动脉粥样硬化模型 Metabolic syndrome complicated with diabetic atherosclerosis model	操作困难;成本较高 Complicated operation; High cost
db/db 小鼠 ^[41-42] db/db mice ^[41-42]	瘦素受体纯合子基因突变 Homozygous gene mutation of leptin receptor	高脂饮食 High-fat diet	8 周出现内膜损伤、中膜增厚;16 周 80% 小鼠动脉粥样硬化斑块突出 Intima injury and media thickening occurred in 8 weeks; At 16 weeks, 80% of the mice had prominent atherosclerotic plaques	易于获得的肥胖 2 型糖尿病动脉粥样硬化研究模型 An Easy-to-obtain atherosclerosis model for obese type 2 diabetes mellitus	动脉粥样硬化进展稍慢;干预时间稍长 Atherosclerosis progresses slowly; the intervention time is longer
ApoE ^{-/-} IRS1 ^{+/-} 小鼠 ^[43] ApoE ^{-/-} IRS1 ^{+/-} mice ^[43]	ApoE ^{-/-} 小鼠与胰岛素受体底物 (IRS) 基因缺失小鼠杂交 ApoE ^{-/-} mice hybridized with mice with insulin receptor substrate (IRS) gene deletion	西方饮食 Western diet	在血脂轻度异常的基础上表现出胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血糖和糖耐量受损,动脉粥样硬化加速 Insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperglycemia and impaired glucose tolerance on the basis of mild dyslipidemia. Acceleration of atherosclerosis	研究 IR、高胰岛素血症、高血糖对动脉粥样硬化影响及相关药物作用的适宜模型 To study the effects of insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperglycemia on atherosclerosis and drug intervention	成本高;操作困难;不易获得 High cost; Operation difficulty; and not easy to obtain

续表 2

模型类别 Model type	方法 Methods	饮食 Diet	特点 Characteristic	优势 Advantages	不足 Disadvantages
GK ^{+/-} ApoE ^{-/-} 小鼠 ^[44] GK ^{+/-} ApoE ^{-/-} mice ^[44]	杂合子葡萄糖激酶敲除 (GK ^{+/-}) 小鼠与 ApoE ^{-/-} 小鼠杂交 Heterozygous glucokinase knockout (GK ^{+/-}) mice hybridize with ApoE ^{-/-} mice	西方饮食 Western diet	稳定的高血糖; 胰岛素分泌受损; 与 ApoE ^{-/-} 小鼠相比, GK ^{+/-} ApoE ^{-/-} 小鼠的胆固醇和 TG 水平略低, 动脉粥样硬化加速进展 Stable hyperglycemia; Impaired insulin secretion; compared with ApoE ^{-/-} mice, the levels of cholesterol and TG in GK ^{+/-} ApoE ^{-/-} mice were slightly lower, and accelerated atherosclerosis	稳定的糖脂水平; 可同时评估糖尿病和心血管疾病终点 Stable glucose and lipid levels; simultaneously evaluate the endpoint of diabetes and cardiovascular disease	操作复杂; 成本较高 Difficulty operation; High cost
E3L/GK ^{+/-} 小鼠 ^[45] E3L/GK ^{+/-} mice ^[45]	E3L 小鼠与 GK ^{+/-} 小鼠杂交 E3L mice hybridized with GK ^{+/-} mice	高脂饮食 High-fat diet	高血脂、高血糖、炎症、纤维化; 动脉粥样硬化病变增加了 2.2 倍 Hyperlipidemia, hyperglycemia, inflammation and fibrosis; atherosclerosis increased by 2.2 times	评估高血糖和高血脂和降脂药对动脉粥样硬化的影响 To evaluate the effects of hyperglycemia and hyperlipidemia and lipid-modulating drugs on atherosclerosis in arteries	操作复杂; 价格昂贵; 不易获得 Complicated operation; expensive; not easy to obtain
db/db (PCSK9) 小鼠 ^[49] db/db (PCSK9) mice ^[49]	在 db/db 小鼠中注射 AAV8-PCSK9 AAV8-PCSK9 was injected into db/db mice	高胆固醇饮食 High cholesterol diet	严重的肝脂肪变性; 高胆固醇血症和动脉粥样硬化 Severe hepatic steatosis; hypercholesterolemia and atherosclerosis	研究糖尿病动脉粥样硬化合并脂肪肝的适宜模型 The mouse model of diabetic atherosclerosis complicated with fatty liver	新颖; 文献报道相对较少 Novel; few literature reports
KK 小鼠 ^[50] KK mice ^[50]	KK 小鼠 KK mic	育种饮食 Breeding diet	高血糖、IR、高血脂、血清纤维蛋白原升高、PAI 升高; 4 月龄出现主动脉脂质沉积 Hyperglycemia, insulin resistance, hyperlipidemia, elevated serum fibrinogen and PAI; lipid deposition in aorta at the age of 4 months	早期糖尿病动脉粥样硬化小鼠模型 Mouse model of early diabetic atherosclerosis	劣于 KK-Ay 小鼠 Worse than KK-Ay mice
KK-Ay 小鼠 ^[50-51] KK-Ay mice ^[50-51]	将黄色肥胖基因 (Ay) 转移到 KK 小鼠中 Transfer yellow obesity gene (Ay) into KK mice	育种饮食 Breeding diet	高血糖、高血脂; 更严重的胰岛素抵抗; 血清纤维蛋白原升高、PAI 升高; 与 KK 小鼠相比早期动脉粥样硬化病变出现更早 Hyperglycemia, hyperlipidemia; more severe insulin resistance; elevated serum fibrinogen and PAI; the early atherosclerotic lesions appeared earlier than KK mice	胰岛素抵抗致动脉粥样硬化最佳模型; 早期糖尿病动脉粥样硬化小鼠模型 Best model of atherosclerosis caused by insulin resistance; Mouse model of early diabetic atherosclerosis	日本多用; 文献报道不多 Mostly reported in Japan; not many literature reports

4 糖尿病动脉粥样硬化晚期小鼠模型

随着疾病进展, 斑块破裂引起管腔血栓形成, 导致急性心、脑血管事件, 这是糖尿病患者死亡的重要原因。然而由于种族差异, 很难在小鼠中直接观察到斑块破裂及出血。因此, 需要采取额外的手段在小鼠中诱导并重现人类动脉粥样硬化中斑块不稳定特征。在 HFD 喂养的 6 ~ 8 周龄 ApoE^{-/-} 或 LDLR^{-/-} 小鼠进行右侧颈总动脉双重结扎, 以备串联狭窄 (tandem stenosis, TS) 模型。在 TS 4 周后出现以较大坏死核心、免疫细胞浸润和局灶性薄纤维覆盖斑块为特征的复杂动脉粥样硬化病变; 7 周后,

50% 的动物出现不稳定斑块破裂^[52]。在 STZ 诱导糖尿病的 ApoE^{-/-} 小鼠中制备 TS, 高脂饮食喂养 7 周可造成动脉粥样硬化斑块的大小、斑块不稳定性标记物及坏死核心面积增加, 而钠葡萄糖共转运蛋白 2 (sodium glucose co-transporter 2, SGLT2) 抑制剂的使用则有助于稳定斑块^[53]。此外, 在 ApoE^{-/-} 小鼠串联狭窄模型中敲除髓过氧化物酶基因 (myeloperoxidase, MPO^{-/-}), 诱导 MPO^{-/-} ApoE^{-/-} 小鼠。发现 MPO 基因缺失显著增加了纤维帽厚度, 并增加了斑块的稳定性^[54]。因此推测 MPO 可能是反应斑块不稳定性的潜在预测因子。TS 模型复制了人类不稳定斑块的关键特征, 是研究人类动脉粥样

硬化斑块破裂生物学机制、新诊断技术及稳斑药物的重要模型^[55]。

在高脂饮食喂养的 20 周龄雌性 ApoE^{-/-}小鼠中放置颈动脉袖带,通过改变血管血流动力学也可复制动脉粥样硬化晚期血管栓塞模型,单核细胞原位治疗有助于减少斑块内细胞凋亡并促进干细胞修复^[56]。在高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠中通过手术夹闭一侧肾血管或者连续泵入血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 以提高 Ang III 水平。在 16 ~ 18 周龄即出现易损斑块,表现为较大的脂质坏死核、巨噬细胞浸润、炎症,造成斑块纤维帽变薄以及斑块不稳定^[57]。还有研究在 STZ 诱导 T1DM 的 ApoE^{-/-}小鼠颈动脉周围放置颈圈诱导斑块不稳定,二甲双胍抑制 AMPK α /AP-2 α /miRNA-124/P4H α 1 轴可逆转上述进程^[58]。在 ApoE^{-/-}小鼠中添加原纤维蛋白-1 基因 (fibrillin-1 gene, FBN1) C1039^{+/-}杂合突变,形成 ApoE^{-/-} Fbn1^{C1039G + / -}小鼠,这种小鼠表现为血管壁弹性纤维断裂,动脉壁硬度增加及斑块破裂^[59]。当 ApoE^{-/-} Fbn1^{C1039G + / -}小鼠给予高脂喂养 35 周后,斑块坏死核心增加了 3 倍,并且在超过 50% 的小鼠中观察到升主动脉和头臂动脉自发性斑块破裂^[59],见表 3。

5 糖尿病动脉粥样硬化新评估技术

动脉粥样硬化的诊断依赖于影像学检查,颈动脉内膜-中膜厚度 (intima-media thickness, IMT) 是临床常用的糖尿病大血管病变动脉粥样硬化评估指标。大量新型技术的涌现,能够对糖尿病动脉粥样硬化实现直观地可视化观察。显微计算机断层扫描 (micro CT) 技术对所取组织进行扫描并构建二维、三维模拟图,从而实现对动脉粥样硬化斑块的可视化观察^[60]。使用 X 射线微计算机断层扫描技术 (X-ray micro-computed tomography, X-ray micro-CT) 可以实现糖尿病动脉粥样硬化中血管钙化的实时可视化观测^[61],这有利于评估斑块等稳定性。超声、高分辨率磁共振成像 (high-resolution magnetic resonance imaging, HRMRI) 技术均能无创地对动脉粥样硬化进行评估。HRMRI 技术更能清晰直观地判断血管狭窄及动脉粥样硬化斑块的严重程度^[62]。血管肌电图也可用于观察糖尿病动脉粥样硬化早期内皮细胞活力及损伤情况^[63]。还有学者根据红外自体荧光与动脉粥样斑块内出血和血红素降解产物胆红素相关的发现,通过荧光发射计算机断层

扫描检测近红外自体荧光 (near-infrared autofluorescence, NIRAF), 从而监测斑块内出血情况^[64],这有利于早期检测高危动斑块并指导患者风险评估与分层。在微观上,激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 技术可获取特定区域细胞基因表达谱系,从而成功获得血管内皮细胞特异性基因表达^[65]。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 可对斑块部位单细胞种群进行快速分类、鉴定和量化,用于研究某类细胞在动脉粥样硬化中的作用^[66]。单细胞 RNA 测序技术 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 能揭示动脉粥样硬化起始、进展、回归和斑块破裂过程中细胞类型之间的复杂相互作用,成功发现人和小鼠动脉粥样硬化区域免疫细胞群体的广泛多样性^[67]。在单细胞测序基础上采用细胞通信分析方法有望构建糖尿病动脉粥样硬化斑块细胞之间信号传导通路系统并筛选出关键信号。scRNA-seq、细胞索引 (cellular indexing, CITE-seq) 及染色质测序 (chromatin sequencing, ATAC-seq) 技术可整合细胞蛋白质、基因表达、转录组数据,实现动脉粥样硬化病变区域细胞异质性评估,但该技术的局限在于敏感性有限^[68]。此外,针对单细胞测序技术所得数据的遗传信息可能会出现混杂的情况,现在越来越多的科学家把目光聚焦到细胞谱系示踪技术中,该技术在动脉粥样硬化斑块组成分析中有望获得更准确的细胞谱系信息。

6 总结

糖尿病动脉粥样硬化严重威胁人类健康和预后。由于种属的不同,很难制造一种与人类发病规律完全一致的动物模型。详细区分 T1DM 和 T2DM 动脉粥样硬化的不同特征,选择能模拟糖尿病动脉粥样硬化前期、后期斑块特征表现的动物模型是研究的前提和保障。小鼠是使用最广泛的、能反应糖尿病动脉粥样硬化全程特点的动物模型。选择合适的小鼠模型需要考虑研究目的,动物的性别、饮食、年龄、昼夜节律、干预时间等因素。目前直接的糖尿病动脉粥样硬化晚期斑块不稳定模型信息较少,这影响糖尿病动脉粥样硬化晚期斑块不稳定性机制和药物稳斑疗效及安全性、作用机制的研究。适当延长实验周期或采用颈动脉串联狭窄、颈动脉缝线、放置颈动脉袖带或结扎一侧颈总动脉等方法可能对斑块不稳定性模型制备具有一定的参考意义。

表 3 糖尿病动脉粥样硬化晚期斑块不稳定小鼠模型特征

Table 3 Characteristics of advanced diabetic atherosclerosis mouse mode

模型类别 Model type	方法 Methods	饮食 Diet	特点 Characteristic	优势 Advantages	不足 Disadvantages
串联狭窄 (TS) 模型 ^[52-54] Tandem stenosis (TS) model ^[52-54]	6 ~ 8 周龄 ApoE ^{-/-} 或 LDLR ^{-/-} 小鼠进行右侧颈总动脉双重结扎	高脂饮食 High-fat diet	4 周后出现以较大坏死核心、免疫细胞浸润和局灶性薄纤维覆盖斑块为特征的复杂动脉粥样硬化病变;7 周后,50%的动物斑块破裂	研究较多的动脉粥样硬化晚期斑块破裂小鼠模型 Mouse model of plaque rupture in the late stage of atherosclerosis has been studied.	复杂、操作难度较大 Complex and difficult to operate
	ApoE ^{-/-} or LDLR ^{-/-} mice aged 6 ~ 8 weeks were subjected to double ligation of the right common carotid artery		After 4 weeks, complex atherosclerotic lesions characterized by large necrotic core, immune cell infiltration and local thin fiber covered plaques appeared. After 7 weeks, 50% of the animal plaques ruptured.		
颈动脉袖带置放模型 ^[56] Carotid cuff placement model ^[56]	雌性 ApoE ^{-/-} 小鼠左颈总动脉周围放置一个非收缩性硅弹性项圈,持续 10 d A non-contractile silicone elastic collar was placed around the left common carotid artery of female ApoE ^{-/-} mice for 10 d.	高脂饮食 High-fat diet	大量脂质沉积;颈动脉血管栓塞、狭窄 Massive lipid deposition, carotid artery embolism, stenosis	动脉粥样硬化晚期血管栓塞小鼠模型 Mouse model of vascular embolism in late stage of atherosclerosis	实验难度较大 Difficult to master
肾血管性高血压模型 ^[57] Renal vascular hypertension model ^[57]	ApoE ^{-/-} 小鼠中通过手术夹闭一侧肾血管或者连续泵入 Ang II ApoE ^{-/-} mice, one renal vessel was clamped by surgery or Ang II was pumped continuously	高脂饮食 High-fat diet	动脉粥样硬化加速进展;16 ~ 18 周龄出现易损斑块;斑块纤维帽变薄、较大的脂质坏死核、巨噬细胞浸润、炎症;Atherosclerosis accelerated, and vulnerable plaques appeared from 16 ~ 18 weeks old. Fibrous cap of plaque becomes thinner, and there are larger lipid necrosis nuclei, macrophage infiltration and inflammation.	高血压、高血脂作用下动脉粥样硬化晚期斑块纤维帽破裂小鼠模型 Mouse model of fibrous cap rupture in late atherosclerotic plaque under the action of hypertension and hyperlipidemia.	未明确血糖情况、实验时间较长 Blood sugar situation is not clear, and long duration
STZ 诱导的糖尿病 ApoE ^{-/-} 小鼠颈动脉周围放置项圈模型 ^[58] STZ-induced diabetic ApoE ^{-/-} mouse model of placing collar around carotid artery ^[58]	STZ 诱导糖尿病的 ApoE ^{-/-} 小鼠中颈动脉周围放置项圈 Collars were placed around the carotid artery in ApoE ^{-/-} mice with diabetes induced by STZ	高脂饮食 (0.25% 胆固醇和 15% 可可脂) High-fat diet (0.25% cholesterol and 15% cocoa butter)	胶原合成障碍的动脉粥样硬化晚期易损、斑块脆弱模型 A model of vulnerability and plaque vulnerability in late atherosclerosis with collagen synthesis disorder	良好的 T1DM 动脉粥样硬化斑块易损小鼠模型 Mouse model of vulnerable atherosclerotic plaque in T1DM.	未在 T2DM 模型中验证 Not validated in T2DM model
ApoE ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/-} 小鼠模型 ^[59] ApoE ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/-} mouse model ^[59]	在 ApoE ^{-/-} 小鼠中添加原纤维蛋白-1 基因 (C1039 ^{+/-}) 杂合突变 Addition of heterozygous mutation of fibrinogen-1 gene (C1039 ^{+/-}) in ApoE ^{-/-} mice	高脂饮食喂养 35 周 High-fat diet for 35 weeks	血管壁弹性纤维断裂;动脉壁硬度增加及斑块破裂;斑块坏死核心增加 3 倍,超过 50%的小鼠中升主动脉和头臂动脉自发性斑块破裂 Elastic fiber of that blood vessel wall are broken. Hardness of that arterial wall increase. The necrotic core of plaque increased by 3 times. Spontaneous plaque rupture of ascending aorta and brachiocephalic artery in more than 50% mice	典型的自发性斑块破裂小鼠模型 Typical mouse model of spontaneous plaque rupture	实验周期长、成本高、不易获得 Long period, high cost and difficult to obtain.

参 考 文 献(References)

- [1] DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes [J]. *Lancet*, 2018, 391(10138): 2449–2462.
- [2] Regnell SE, Lernmark Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(8): 1370–1381.
- [3] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2017, 389(10085): 2239–2251.
- [4] Weir GC, Gaglia J, Bonner-Weir S. Inadequate β -cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(3): 249–256.
- [5] Hu C, Jia W. Diabetes in China: epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication [J]. *Diabetes*, 2018, 67(1): 3–11.
- [6] 张明琛, 张宏武, 茅山峰, 等. 早发 2 型糖尿病患者的血糖控制现况以及大血管并发症危险因素分析 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(11): 808–812.
Zhang MC, Zhang HW, Mao JF, et al. Glucose control and risk factors of macrovascular complications in early onset type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Diabetes Mellit*, 2014, 6(11): 808–812.
- [7] Kunz J. Aktuelles zur diabetischen makroangiopathie [J]. *Pathologe*, 2012, 33(3): 192–204.
- [8] Gargiulo S, Gramanzini M, Mancini M. Molecular imaging of vulnerable atherosclerotic plaques in animal models [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1511.
- [9] 田光晶, 马丛丛, 许继取. 动脉粥样硬化动物模型筛选 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29(1): 26–31.
Tian GJ, Ma CC, Xu JQ. Screening of animal models of atherosclerosis [J]. *Chin J Food Hygien*, 2017, 29(1): 26–31.
- [10] 龚博君, 李自成. 主动脉中膜钙化型动脉粥样硬化模型的建立 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20): 5687–5689.
Gong BJ, Li ZC. Establishment of atherosclerosis model with calcified aortic media [J]. *Chin J Gerontol*, 2015, 35(20): 5687–5689.
- [11] von Scheidt M, Zhao Y, Kurt Z, et al. Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2): 248–261.
- [12] Ilyas I, Little PJ, Liu Z, et al. Mouse models of atherosclerosis in translational research [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(11): 920–939.
- [13] Sourris KC, Harcourt BE, Forbes JM. A new perspective on therapeutic inhibition of advanced glycation in diabetic microvascular complications: common downstream endpoints achieved through disparate therapeutic approaches? [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 30(4): 323–335.
- [14] Faria AM, Papadimitriou A, Silva KC, et al. Uncoupling endothelial nitric oxide synthase is ameliorated by green tea in experimental diabetes by re-establishing tetrahydrobiopterin levels [J]. *Diabetes*, 2012, 61(7): 1838–1847.
- [15] Hall H, Perelman D, Breschi A, et al. Glucotypes reveal new patterns of glucose dysregulation [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(7): e2005143.
- [16] Flynn MC, Kraakman MJ, Tikellis C, et al. Transient intermittent hyperglycemia accelerates atherosclerosis by promoting myelopoiesis [J]. *Circ Res*, 2020, 127(7): 877–892.
- [17] Goldberg IJ. Clinical review 124: diabetic dyslipidemia: causes and consequences [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(3): 965–971.
- [18] Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, et al. Clinical update: cardiovascular disease in diabetes mellitus: atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus-mechanisms, management, and clinical considerations [J]. *Circulation*, 2016, 133(24): 2459–2502.
- [19] Oppi S, Lüscher TF, Stein S. Mouse models for atherosclerosis research-which is my line? [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6: 46.
- [20] Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse [J]. *Annu Rev Nutr*, 1995, 15: 495–518.
- [21] 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*, 1994, 14(1): 133–140.
- [22] Kamato D, Ilyas I, Xu S, et al. Non-mouse models of atherosclerosis: approaches to exploring the translational potential of new therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12964.
- [23] VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1): 12–22.
- [24] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas [J]. *Physiol Res*, 2001, 50(6): 537–546.
- [25] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015, 70: 1–20.
- [26] Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA, et al. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models [J]. *Acta Naturae*, 2018, 10(1): 24–33.
- [27] Choi JSY, de Haan JB, Sharma A. Animal models of diabetes-

- associated vascular diseases: an update on available models and experimental analysis [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(5): 748–769.
- [28] Wu KK, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191(2): 241–249.
- [29] Goldberg IJ. Why does diabetes increase atherosclerosis? I don't know! [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(5): 613–615.
- [30] Vedantham S, Noh H, Ananthakrishnan R, et al. Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic Apo E^{-/-} mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(8): 1805–1813.
- [31] Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh HL, et al. Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2434–2443.
- [32] Jun JY, Ma Z, Segar L. Spontaneously diabetic Ins2^{+/Akita}: apoE-deficient mice exhibit exaggerated hypercholesterolemia and atherosclerosis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(1): E145–E154.
- [33] Engelbertsen D, To F, Dunér P, et al. Increased inflammation in atherosclerotic lesions of diabetic Akita-LDLr^{-/-} mice compared to nondiabetic LDLr^{-/-} mice [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 176162.
- [34] Zhou C, Pridgen B, King N, et al. Hyperglycemic Ins2AkitaLdlr^{-/-} mice show severely elevated lipid levels and increased atherosclerosis: a model of type 1 diabetic macrovascular disease [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(8): 1483–1493.
- [35] Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes [J]. *J Autoimmun*, 2016, 66: 76–88.
- [36] Wang X, Huang R, Zhang L, et al. A severe atherosclerosis mouse model on the resistant NOD background [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(10): dmm033852.
- [37] Gvazava IG, Karimova MV, Vasiliev AV, et al. Type 2 diabetes mellitus: pathogenic features and experimental models in rodents [J]. *Acta Naturae*, 2022, 14(3): 57–68.
- [38] Wu KK, Wu TJ, Chin J, et al. Increased hypercholesterolemia and atherosclerosis in mice lacking both ApoE and leptin receptor [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 181(2): 251–259.
- [39] Chiba T, Shinozaki S, Nakazawa T, et al. Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1): 68–75.
- [40] Lloyd DJ, McCormick J, Helmering J, et al. Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48^{-/-} Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(3): E496–E505.
- [41] Hwang SM, Kim JS, Lee YJ, et al. Anti-diabetic atherosclerosis effect of *Prunella vulgaris* in db/db mice with type 2 diabetes [J]. *Am J Chin Med*, 2012, 40(5): 937–951.
- [42] MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, et al. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(8): 1412–1415.
- [43] Galkina EV, Butcher M, Keller SR, et al. Accelerated atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice heterozygous for the insulin receptor and the insulin receptor substrate-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(2): 247–256.
- [44] Adingupu DD, Heinonen SE, Andréasson AC, et al. Hyperglycemia induced by glucokinase deficiency accelerates atherosclerosis development and impairs lesion regression in combined heterozygous glucokinase and the apolipoprotein E-knockout mice [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 8630961.
- [45] Pouwer MG, Heinonen SE, Behrendt M, et al. The APOE 3-leiden heterozygous glucokinase knockout mouse as novel translational disease model for type 2 diabetes, dyslipidemia, and diabetic atherosclerosis [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 9727952.
- [46] Schreyer SA, Lystig TC, Vick CM, et al. Mice deficient in apolipoprotein E but not LDL receptors are resistant to accelerated atherosclerosis associated with obesity [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 171(1): 49–55.
- [47] Neuhofer A, Wernly B, Leitner L, et al. An accelerated mouse model for atherosclerosis and adipose tissue inflammation [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 23.
- [48] Sangüesa G, Baena M, Hutter N, et al. The addition of liquid fructose to a Western-type diet in LDL-r^{-/-} mice induces liver inflammation and fibrogenesis markers without disrupting insulin receptor signalling after an insulin challenge [J]. *Nutrients*, 2017, 9(3): 278.
- [49] Xu M, Wu X, Liu Z, et al. A novel mouse model of diabetes, atherosclerosis and fatty liver disease using an AAV8-PCSK9-D377Y injection and dietary manipulation in db/db mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 622: 163–169.
- [50] Okazaki M, Udaka Y, Saito Y, et al. Increase in plasma fibrinogen and plasminogen activator inhibitor level in diabetic KK and KK-Ay mice [J]. *In Vivo*, 2003, 17(1): 5–11.
- [51] Mita T, Goto H, Azuma K, et al. Impact of insulin resistance on enhanced monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerogenesis independent of LDL cholesterol level [J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2010, 395(4): 477–483.
- [52] 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 microRNA expression profiling [J]. Circ Res, 2013, 113(3): 252–265.
- [53] Chen YC, Jandeleit-Dahm K, Peter K. Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor dapagliflozin stabilizes diabetes-induced atherosclerotic plaque instability [J]. J Am Heart Assoc, 2022, 11(1): e022761.
- [54] Rashid I, Maghazal GJ, Chen YC, et al. Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque [J]. Eur Heart J, 2018, 39(35): 3301–3310.
- [55] Noonan J, Bobik A, Peter K. The tandem stenosis mouse model: towards understanding, imaging, and preventing atherosclerotic plaque instability and rupture [J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(5): 979–997.
- [56] Lima LC, Porto ML, Campagnaro BP, et al. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Lipids Health Dis, 2012, 11: 96.
- [57] Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, et al. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice [J]. Hypertension, 2004, 44(3): 277–282.
- [58] Liang WJ, Zhou SN, Shan MR, et al. AMPK α inactivation destabilizes atherosclerotic plaque in streptozotocin-induced diabetic mice through AP-2 α /miRNA-124 axis [J]. J Mol Med, 2018, 96(5): 403–412.
- [59] van der Donckt C, van Herck JL, Schrijvers DM, et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death [J]. Eur Heart J, 2015, 36(17): 1049–1058.
- [60] Martinez HG, Prajapati SI, Estrada CA, et al. Images in cardiovascular medicine: microscopic computed tomography-based virtual histology for visualization and morphometry of atherosclerosis in diabetic apolipoprotein e mutant mice [J]. Circulation, 2009, 120(9): 821–822.
- [61] Borland SJ, Behnsen J, Ashton N, et al. X-ray micro-computed tomography: an emerging technology to analyze vascular calcification in animal models [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4538.
- [62] 徐松涛, 李嘉颖, 沈利叶, 等. 超声、高分辨率磁共振成像技术在诊断评估兔颈动脉粥样硬化中的应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 9–16.
- Xu ST, Li JY, Shen LY, et al. Application of ultrasound and high-resolution magnetic resonance imaging in the diagnosis and evaluation of carotid atherosclerosis in rabbits [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 9–16.
- [63] Sharma A, Sellers S, Stefanovic N, et al. Direct endothelial nitric oxide synthase activation provides atheroprotection in diabetes-accelerated atherosclerosis [J]. Diabetes, 2015, 64(11): 3937–3950.
- [64] Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 75.
- [65] Zhou T, Wang J. Laser capture microdissection of vascular endothelial cells from frozen heart tissues [M]. New York: Springer US; 2021.
- [66] Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances [J]. Bioanalysis, 2021, 13(3): 181–198.
- [67] Zernecke A, Winkels H, Cochain C, et al. Meta-analysis of leukocyte diversity in atherosclerotic mouse aortas [J]. Circ Res, 2020, 127(3): 402–426.
- [68] Williams JW, Winkels H, Durant CP, et al. Single cell RNA sequencing in atherosclerosis research [J]. Circ Res, 2020, 126(9): 1112–1126.

[收稿日期] 2022-12-13