

李浩,张琪. 动脉粥样硬化小鼠模型应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 787-794.

Li H, Zhang Q. Progress in the application of arteriosclerosis mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 787-794.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.011

动脉粥样硬化小鼠模型应用进展

李浩,张琪*

(陕西中医药大学基础医学院,陕西 咸阳 712000)

【摘要】 动脉粥样硬化(arteriosclerosis, AS)是常见的心脏病和中风等心脑血管疾病的病理基础,其诱因具有复杂、多样的特点。小鼠模型凭借成熟的基因改造优势,为研究 AS 发病机制和药物疗效验证等方面提供了重要依据。本文基于脂蛋白代谢及组织病理学变化情况,综述了传统转基因与新型小鼠模型的病理特点及其在药物开发中的临床前应用潜力和局限性,以便今后该疾病相关机制研究可以有针对性地选择模型。

【关键词】 动脉粥样硬化;小鼠模型;转基因;斑块

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0787-08

Progress in the application of arteriosclerosis mouse models

LI Hao, ZHANG Qi*

(Basic Medical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

Corresponding author: ZHANG Qi. E-mail: zhangqi@sntcm.edu.cn

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is the pathological basis of common cardiovascular diseases such as heart disease and stroke, and its causative factors are complex and diverse. With the advancement of mature genetic modifications, mouse models have provided an important basis to study the pathogenesis of AS and validating drug efficacy. In this article, we review the pathological characteristics of traditional transgenic and novel mouse models on the basis of lipoprotein metabolism and histopathological changes, as well as their potential and limitations for preclinical application in drug development, so that future studies on mechanisms related to this disease can be targeted to select models.

【Keywords】 atherosclerosis(AS); mouse model; transgenic; plaques

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

动脉粥样硬化(arteriosclerosis, AS)是一种以动脉血管壁脂质积累为特征的进行性、炎症性疾病,发病通常较为缓慢,常见于大、中型动脉^[1]。疾病发展中形成并积聚的动脉粥样硬化斑块,会增加动脉的厚度和硬度,抑制血液流动和氧气输送。人类 AS 斑块的形成通常发生在患病几年甚至几十年以上,易损斑块的突然破裂,是诱发心血管疾病临床表现的急性事件^[2-3]。

基于体型小、成本低以及更容易进行广泛基因操作等优点,自 20 世纪 60 年代以来,小鼠一直是建

立 AS 模型的流行选择。Vesselinovitch 等^[4]率先开发了小鼠 AS 模型,选用 C57BL/6J 小鼠,使用含 30%脂肪、5%胆固醇和 2%胆酸的饲料持续喂养 5 周得到了早期模型。尽管高脂高胆固醇(high-fat/high-cholesterol, HFHC)饮食所诱导的高水平、急性炎症变化不符合人类 AS 中观察到的慢性、低级别炎症,但是为小鼠模型的进一步发展开辟了先河。后续小鼠 AS 模型开发依托于基因工程的发展,对脂代谢中的两类主要效用基因进行敲除,包括载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 以及低密度脂蛋

【基金项目】 国家自然科学基金(82074380)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074380).

【作者简介】 李浩(1997—),男,硕士,研究方向:中医药防治心血管疾病机理研究。Email:221010011697@sntcm.edu.cn

【通信作者】 张琪,男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:心血管疾病机理研究。Email:zhangqi@sntcm.edu.cn

白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLr), 亦或采取手术干预致 AS 策略。由于 AS 病变往往呈递进发展态势且易并发其他血管疾病, 无论是临床治疗或者机制研究均面临诸多障碍。传统造模方式或单一模型病征存在较大局限性, 故本文对近年来

广泛使用的小鼠模型进行了利弊分析, 以期通过日益成熟的基因工程与手术方式等相结合, 探索更加具有针对性或复合病征的模型, 为 AS 的发病机制细化分析以及药物开发等方面研究提供可靠参考(见表 1)。

表 1 可用于 AS 研究的小鼠模型

Table 1 Mouse models that can be used in AS studies

小鼠模型 Mice models	造模方式 Moulding method	优点 Advantages	局限性 Limitations
早期模型 Early models	30%脂肪 + 5%胆固醇 + 2%胆酸 30% fat + 5% cholesterol + 2% bile acids	严重 AS 病变 Severe AS lesions	高死亡率 High mortality rate
经典 ApoE ^{-/-} 小鼠 Classical ApoE ^{-/-} mice	正常/高脂饮食 Normal/high fat diet	自发高脂血症和复杂 AS 病变 Spontaneous hyperlipidaemia and complex AS lesions	不符合人类脂质谱; 罕见斑块破裂; ApoE 多重功能干扰 Does not conform to human lipid profile; rare plaque rupture; ApoE multiple function disruption
ApoE*3-Leiden.CETP 转基因小鼠 ApoE*3-Leiden.CETP transgenic mice	高脂饮食 High fat diet	合成功能性 ApoE; 对炎症无影响; 类人脂质谱 Synthesis of functional ApoE; no effect on inflammation; human-like lipid profile	存在个体差异; 饮食依赖性; 无斑块破裂 The existence of individual differences; dietary dependence; no plaque rupture
ApoE ^{-/-} ; Namp1-Tg 小鼠 ApoE ^{-/-} ; Namp1-Tg mice	高脂饮食 High fat diet	加重 AS 炎症, 促进病变发展 Exacerbates AS inflammation and promotes lesion development	有待进一步开发 To be further developed
Cyp27a1/ApoE 双敲除小鼠 Cyp27a1/ApoE double knockout mice	0.1%胆酸/鹅去氧胆酸 + 西式饮食 0.1% Bile acid/ Chenodeoxycholic acid + Western diet	反映了胆固醇代谢差异性 Reflects differential cholesterol metabolism	基因剂量依赖性 Gene dose-dependent
ApoE/NOS3 双敲除小鼠 ApoE/NOS3 double knockout mice	10%和 20%高脂饮食 10% and 20% High fat diet	比 ApoE ^{-/-} 小鼠更高的 TC 和 LDL 水平; 呈现高血压病变; 严重斑块病变; 双基因敲除的纯合子后代 Higher TC and LDL levels than in ApoE ^{-/-} mice; presentation of hypertensive lesions; severe plaque lesions; pure progeny of double knockouts	有待进一步开发 To be further developed
载脂蛋白 E2 基因敲入小鼠 Apolipoprotein E2 knock-in mice	正常/高脂饮食 Normal/high fat diet	人 III 型高脂血症 Human type III hyperlipidaemia	无斑块破裂 No plaque rupture
经典 LDLr ^{-/-} 小鼠 Classical LDLr ^{-/-} mice	正常/高脂饮食 Normal/high fat diet	类人脂质谱; 对炎症无影响 Humanoid lipid profile; no effect on inflammation	饮食依赖性; 无斑块破裂 Dietary dependence; no plaque rupture
LDLr ^{-/-} ApoB ^{100/100} 小鼠 LDLr ^{-/-} ApoB ^{100/100} mice	正常 Normal	正常饮食即可诱发病变; 类人高胆固醇血症 The lesion can be induced by a normal diet; hypercholesterolemia in humans	无斑块破裂 No plaque rupture
Ldlr/ApoBec1 双敲除小鼠 Ldlr/ApoBec1 double knockout mice	低脂低胆固醇饮食 Low fat and low cholesterol diet	低脂饮食即可出现自发 AS 病变; 类似人 II a 型家族性高胆固醇血症 Spontaneous AS lesions can occur on a low-fat diet; Similar to human type II a familial hypercholesterolemia	病变过程较长 Longer course of lesions
ApoE ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/+} 和 LDLr ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/+} 小鼠 ApoE ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/+} and LDLr ^{-/-} Fbn1C1039G ^{+/+} mice	高脂饮食 High fat diet	自发斑块破裂 Spontaneous plaque rupture	后期死亡率较高 High mortality rate in later stages

续表 1

小鼠模型 Mice models	造模方式 Moulding method	优点 Advantages	局限性 Limitations
AAV8-Pcsk9-D377Y 注射小鼠 AAV8-Pcsk9-D377Y injected mice	AAV8-Pcsk9 注射 + 正常/高脂饮食 Injection of AAV8-Pcsk9 + normal/high fat diet	无需生殖系基因操作、简单便捷 No germline genetic manipulation required、 easy and convenient	PCSK9 与其他底物的非特异性结合 和裂解可能导致 ldlr 独立效应 Non-specific binding and cleavage of PCSK9 to other substrates may lead to ldlr-independent effects
颈动脉结扎小鼠 Carotid artery ligation in mice	手术 + 高脂饮食 Surgery + high fat diet	诱导 AS 速率较快;诱发定位 动脉 AS;形成斑块内新生血管 Faster rate of AS induction; induces localized arterial AS; forms intraplaque neovascularization	无斑块破裂 No plaque rupture
Ldlr-ASO 小鼠 Ldlr-ASO mice	注射 ASO + 高脂饮食 ASO injections + high fat diet	不改变脂代谢即发生可诱导和 可逆的动脉粥样硬化 Inducible and reversible atherosclerosis occurs without altering lipid metabolism	价格昂贵;无斑块破裂 Expensive; no plaque rupture

1 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠及其改良品系

1.1 经典 ApoE^{-/-}小鼠

ApoE 是一种糖蛋白,分子大小约为 34 kDa,作为低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 受体家族成员的配体,能够清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 残体^[5]。1992 年,通过同源重组在胚胎干细胞中操纵 ApoE 基因,在两个实验室同时成功培育出第一个 ApoE^{-/-}小鼠菌株^[6-7]。ApoE^{-/-}小鼠正常饮食即可达到较高血浆总胆固醇水平(400 ~ 600 mg/dL),为野生型小鼠的 4 ~ 5 倍^[8],避免了高毒性饮食的同时还会积累 VLDL 残余脂蛋白和乳糜微粒,并呈现人类Ⅲ型高脂血症状态^[9]。此外,Apoe^{-/-}小鼠基本涵盖了 AS 病变的整个过程,包括斑块形成等,而且在喂食高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 或西式饮食 (western diet, WD) 时能够更快地推进病变发展^[10]。ApoE^{-/-}小鼠的病变部位主要分布在主动脉根部、颈动脉和主动脉分支。

毋庸置疑,ApoE^{-/-}小鼠已经展现了转基因模型的优势一面,但依然存在局限性。首先在代谢水平的差异,人类体内的血浆胆固醇以 VLDL 为主而非 LDL,这就使动物实验所得数据无法完全类比到人身上^[11]。该小鼠模型的另一个局限性是,尽管 AS 发展较快,但病变很少破裂,因此不会导致血栓形成,而血管闭塞在人类中很常见^[12]。值得注意的是,ApoE 除介导脂蛋白清除外,还具有额外的 AS 保护作用^[5]。在 ApoE^{-/-}的小鼠中,肾上腺细胞中表达的低水平 ApoE 可以降低 AS 的严重程度,而不

影响血脂水平^[13]。因此,ApoE^{-/-}模型中的 AS 可能与血脂水平无关。

1.2 ApoE*3-Leiden.CETP 转基因小鼠

胆固醇酯转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 能够促进人体内胆固醇酯从抗 AS 的高密度脂蛋白 (high-density lipoproteins, HDLs) 到促 AS 的富含甘油三酯蛋白 (triglyceride-rich lipoproteins, TRLs) 的再分配,是胆固醇逆向运输的关键蛋白质,是血浆 HDL 水平的主要决定因素之一^[14]。在小鼠体内缺乏 CETP 且自身清除 TRLs 较快,ApoE*3-Leiden.CETP 小鼠由 ApoE*3-Leiden 小鼠与转基因人 CETP 小鼠杂交所得^[15]。相较于 ApoE^{-/-}小鼠而言,该模型优势在于自身能够合成 ApoE,避免了对 AS 病变中炎症发展的干预,更加有针对性地对血浆脂质水平调控。当饲喂 HFD 时,由于降低了 TRLs (即 VLDL 残体和乳糜微粒) 的清除,也显示出显著升高的总血浆胆固醇和甘油三酯水平,使得该模型具有更类似人类的脂蛋白谱^[10]。

相较于其他模型,ApoE*3-Leiden.CETP 小鼠对脂质修饰药物 (如他汀类药物、依折麦布和纤溶性药物等) 更敏感。经阿托伐他汀治疗的 CETP 小鼠表现出类人反应,减少 CETP 依赖的胆固醇从 HDL 转移到 VLDL,从而增加 HDL 胆固醇^[16],对于抗 AS 药物的临床前检验而言具有重要参考价值。

需要注意的是,该模型在喂食 HFD 饮食后发展代谢综合征,尽管缺乏遗传和环境变异,但个体间存在较大差异^[16]。另外昼夜节律的破坏对该模型 AS 发展和病变严重程度也很显著^[17],因此在实验过程中应注意外部环境因素造成的结果干扰。

1.3 其他 ApoE^{-/-}小鼠

1.3.1 ApoE^{-/-};Namp1-Tg 小鼠

该模型由烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyl transferase, Namp1) 转基因 (transgenic, Tg) 小鼠与 ApoE^{-/-} 杂交生成, 经 HFD 喂养 16 周后与 ApoE^{-/-} 相比, 表现出 AS 病变面积和厚度显著增加, 胶原蛋白含量降低, 凋亡细胞数量增加以及半胱天冬酶-3/8/9 (caspase-3/8/9) 的活性增强。此外, 巨噬细胞浸润、肿瘤坏死因子信号传导和趋化因子表达均在其主动脉的 AS 斑块中被激活^[18]。该模型证明 Namp1 转基因会加重 AS 炎症从而促进病变发展。

1.3.2 Cyp27a1/ApoE 双敲除小鼠

固醇 27-羟化酶 (CYP27A1) 是胆汁酸 (bile acids, BAs) 生物合成的关键酶, 也是胆固醇代谢的调节因子, 还是肝中 BAs 生物合成的限速酶^[19]。单纯用 WD 喂养时, 与 ApoE^{-/-} 小鼠对比发现双敲除小鼠的 AS 表型减弱或消失, 这是因为升高的 HDL-C 与低水平的血浆总胆固醇 (plasma total cholesterol, PTC) 以及 LDL-C 代偿性增加胆固醇分解代谢和排泄。BAs 通过肝和肠道中的法尼类 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 调节自身的合成和运输。在人体内, 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 是一种比胆酸 (CA) 更有效的 FXR 激动剂, 但在小鼠体内两者效用截然相反。分别用含 0.1% CA 或 CDCA 结合 WD 喂养小鼠 8 周, 前者表现出更为严重的 AS 病变^[20]。另有实验表明, CYP27A1 活性参与控制胆固醇稳态和 AS 的发展, 具有明显的基因剂量依赖性作用^[21]。该模型通过胆固醇代谢的差异性为 AS 保护提供了思路, 但实验结论主要依托于对 mRNA 水平的评估, 缺乏与生物学作用相关的转录后事件考虑。

1.3.3 ApoE/NOS3 双敲除小鼠

内皮一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3) 能够促进血管舒张并参与血管生成的调节。NOS3 表达异常导致 NO 产生不稳定, 血管内皮受损和功能障碍, 导致 AS 和高血压等疾病^[22]。ApoE^{-/-}/NOS3^{-/-} 小鼠模型由 ApoE^{-/-} 与 NOS3^{-/-} 交叉回交, 在 8 周前后分别喂食 10% 和 20% HFD 的方式建立。该模型表现出比 ApoE^{-/-} 小鼠更高的 PTC 和 LDL 水平, 并发生严重的肝细胞脂肪变性和肝细胞增大。此外还呈现出高血压肾病、高血压性视网膜病变的特征, 以及严重的斑块病变^[23]。

值得一提的是, 在正常饮食条件下交配的模式小鼠产生了更多的双基因敲除的纯合子后代, 相较于 HFD 条件提高了受孕成功率和产仔数, 极大减少了实验周期和成本。其虽然具备 AS 与高血压并发表型, 但由于临床上致病因素复杂多样, 所以可能无法完全类比到人类, 还需要进一步开发探索。

1.3.4 载脂蛋白 E2 基因敲入小鼠

该模型通过胚胎干细胞的靶向基因替换, 由人类 ApoE2 等位基因取代小鼠 ApoE 基因所得, ApoE2 基因敲入的小鼠具有人 III 型高脂血症的所有特征^[24]。与正常血脂小鼠相比, 这些小鼠的 PTC 和 TG 水平高出 2 ~ 3 倍。与 ApoE^{-/-} 类似, ApoE2.Ki 小鼠在清除循环 VLDL 方面存在缺陷, 即使在常规饮食中也会自发产生 AS 病变。喂食 HFD 后, 表现出更为强烈的病变特征。该模型可以用于研究 ApoE 家族蛋白的异构体特异性效应, 还用于 pemaifibrate 的临床前研究^[25], pemaifibrate 是一种有效和特异的过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR α) 的调节剂。PPAR α 是一种核受体, 能够调节脂质代谢、脂肪酸氧化和能量稳态的基因表达, 其信号异常可导致动脉粥样硬化的发生。

本文所述模型具有较为明确的指向性, 分别从炎症、胆固醇代谢、高血压并发症以及 ApoE 家族蛋白异构体, 多层面展开对 AS 的机制、干预研究和药物临床前检验。尽管存在各式局限性, 但对于 AS 小鼠模型的开发而言具有前瞻性与创新性。

2 LDLr 基因敲除 (LDLr^{-/-}) 小鼠及其改良品系

2.1 经典 LDLr^{-/-} 小鼠

LDLr 是一种膜受体, 其分子量为 160 kDa, 能够与富含胆固醇的 LDL 结合并促使其内吞, 从而对血浆中 LDL 的含量进行调控^[26], 还促进了含 APOB 和 APOE 的脂蛋白的细胞摄取。LDLr^{-/-} 小鼠是 1994 年由 Ishibashi 等^[27] 通过在胚胎干细胞中同源重组建立。与野生型小鼠相比, LDLr 小鼠在喂食正常饮食时血浆胆固醇水平约为 250 mg/dL, 仅表现出适度升高的血浆胆固醇水平, 没有或仅发生轻度 AS。对于脂蛋白颗粒, 中密度脂蛋白 (intermediate-density lipoprotein, IDL) 和 LDL 组分增加更高, 而 HDL 和甘油三酯不受影响^[28]。然而, 在喂食 HFD 时, 血浆胆固醇水平会上升到 1500 mg/dL 以上, 并

形成大部分泡沫状病变,但并未出现斑块破裂^[29]。

相较于 ApoE^{-/-}小鼠,LDLr^{-/-}小鼠模型优势在于:(1)血浆胆固醇主要由 LDL 携带更接近人类脂质谱;(2)LDLr 基因的敲除与 AS 病变中炎症发展并无关联,其斑块发展也是基于血浆脂质水平的改变,而非其他与 LDL 受体相关功能引起^[30];(3)LDLr^{-/-}小鼠模型病变特征与人类家族性高胆固醇血症所表现的症状相一致,包括主动脉瓣和主动脉根病变^[31]。然而,LDLr^{-/-}小鼠在正常饲料喂养时很少发生病变,需要高脂饲料喂养才能发生高胆固醇血症和 AS。需要注意的是,该模型因其本身缺乏 LDLr,故不适合评估潜在的 LDLr 上调药物。

2.2 LDLr^{-/-} ApoB^{100/100}小鼠

载脂蛋白 B(ApoB)基因编码该蛋白的两种不同的亚型,ApoB-100 和 ApoB-48。ApoB-100 在胆固醇在体内的移动中起着重要的作用,对 VLDL 在人肝中的组装至关重要。ApoB-48 是肠道乳糜微粒组装所必需的,往往在小鼠和大鼠中表达而非人类。该模型仅显著表达 ApoB-100,正常饮食饲喂 PTC 水平即可升至 300 mg/dL,脂蛋白主要以 IDL/LDL 组分的形式存在,更像人类的高胆固醇血症^[32]。其 AS 病变情形复杂、范围广泛,通常分布在主动脉内膜表面的腹段和末端 15% ~ 20% 范围^[33]。目前该模型在研究他汀类药物应对 AS 斑块炎症的抗炎效力方面取得显著成果^[34]。其与人类疾病相似的表现,同样具备药物检验和病理生理学意义。

2.3 Ldlr/Apobec1 双敲除小鼠

小鼠肝中存在一种 RNA 特异性胞苷脱氨酶(apobec-1),这种酶是一种二聚体的催化成分,能够将编码 ApoB-100 的 mRNA 改变为编码 ApoB-48 的 mRNA。可以在 VLDL 转化为 LDL 颗粒之前,将 ApoB-48 掺入 VLDL 以启动清道夫受体的快速清除^[35]。该模型在杂交育种之前,将与 C57BL/6J 小鼠进行至少 7 代的反向杂交,每一个基因型都是通过 PCR 分析基因组 DNA 筛选所得。该模型在低脂低胆固醇(low fat and low cholesterol, LFLC)饮食条件下也可以出现自发性 AS 病变,其脂质谱与患有 II a 型家族性高胆固醇血症易感人群非常相似。还包含与人类疾病的许多进展相似特征,从脂肪条纹开始,发展到明确的人类 IV 期 AS,再发展到薄帽纤维 AS^[36]。然而该模型病变发展过程较长,是一个复杂耗时的过程。

3 改良小鼠 AS 模型

3.1 ApoE^{-/-}Fbn1C1039G^{+/-}和 Ldlr^{-/-}Fbn1C1039G^{+/-}小鼠

原纤维蛋白(fibrillar protein 1, Fbn1)是微纤维的主要结构成分,为弹性蛋白沉积和交联提供支架。Fbn1 的突变会破坏弹性纤维的交联从而降低血管弹性,改变主动脉壁结构,最终导致斑块失稳破裂^[37]。两类模型为 Fbn1 基因中携带杂合突变(C1039^{+/-})的小鼠分别与 ApoE^{-/-}小鼠或 Ldlr^{-/-}小鼠杂交所得,在 HFD 饲喂 20 周或 35 周后两者显示出相似的血浆胆固醇水平。与以往模型不同的是,这类小鼠能表现出更多的斑块不稳定特性,尤其是在 ApoE^{-/-}Fbn1C1039G^{+/-}的升主动脉中观察到斑块破裂。此外还可出现冠状动脉病变和心肌梗死,适用于易感斑块破裂的病理机制及 AS 晚期病变研究。然而在 16 ~ 20 周,出现实验小鼠突然死亡的情况,到第 20 周死亡率高达 50%^[38]。斑块破裂是 AS 后期的主要致死因素之一,通过此模型进行药物临床前检验,结果更加符合人体生理学特性。

3.2 AAV8-Pcsk9-D377Y 注射小鼠

前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9 型(protein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)是一种丝氨酸蛋白酶,在肝中高表达,能够与 LDLR 结合并促进其在肝细胞溶酶体中的降解^[39]。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是一种被广泛用于基因治疗载体的小型无包膜病毒。将 AAV8-Pcsk9-D377Y 经尾静脉注射给正常 C57BL/6J 小鼠即可得到该模型。正常饮食饲喂,AAV8-Pcsk9-D377Y 注射小鼠的 TC 水平是野生型小鼠 2 倍。HFD 饲喂时,TC 水平更是高达 1165 mg/dL,是常规饮食饲喂条件下的 3 倍之多,其病变可以进展到纤维动脉粥样硬化阶段并出现高级发育斑块^[40]。该模型借助重组 AAV 载体造模的方式为科研人员探索新基因型提供了思路,例如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 25 (serine/threonine protein kinase 25, STK25)^[41]、B 类 1 型清道夫受体(scavenger receptor class B type 1, SR-B1)^[42]以及 NADPH 氧化酶组织者 1(NADPH oxidase organizer 1, NOXO1)等^[43],提高了对 AS 病变机制的研究广度和深度。

该系列模型优势在于,注射 AAV 病毒后的动物并未表现出病态或其他不良反应,并且肝和免疫系统皆正常发挥功能,未受干扰。然而单次注射引起

的病变发展较慢,周期较长且存在剂量依赖性,在某些基因型中还存在性别差异^[43]。与大多数模型相似,该模型依然缺乏自发的斑块破裂。另外,由于注射 aav8-*pcsk9*-d377y 的小鼠在诱导 AS 治疗的疗效方面存在个体间的差异^[44],因此需对 PCSK9 蛋白在死后肝中的表达和 LDLR 的降解进行验证。

3.3 颈动脉结扎 (partial carotid ligation PCL) 小鼠

以往的 AS 小鼠模型建模中心以脂代谢异常和炎症为主,然而血流动力学是 AS 病变中不可忽视的存在。AS 往往首先发生在以分支或弯曲动脉中的低振荡壁面剪切应力 (wall shear stress, WSS) 为特征的血流紊乱的特定区域^[45],如冠状动脉。相较于动脉直线部分的内皮细胞经历单向、长时间平均 WSS,曲部动脉内皮经历紊乱的血流刺激,更容易发生促 AS 生成反应,如细胞炎症、血栓形成和氧化应激等^[46-47]。Cheng 等^[48]的研究采用血管周围袖带对 ApoE^{-/-}小鼠的左颈动脉进行结扎以控制不同的血管剪切应力,并饲喂至少 8 周致 AS 饮食。结果显示在低剪切应力部位 AS 病变较大、脂质堆积较多,并显示出比振荡剪切应力病变更多的向外血管重塑。此外,该部位促炎性介质及基质金属蛋白酶活性的表达也更高,自发性和血管紧张素 II 诱导的斑块内出血也仅发生于此。然而该模型并未证明振荡剪切应力的作用。另有研究人员采用部分结扎左颈动脉方式^[49],诱导 AS 速率大大提升。在 1 周内损害了血管松弛反应,4 ~ 6 周便在内部弹性层附近发现了许多斑块内新生血管以及大量针状胆固醇裂缝。

通过该模型还可分离出内膜 RNA,能够进一步研究血管生物学和疾病的血流依赖性调节的分子机制,如新生血管形成和 AS。此外,体内模型还可用于测试针对内皮功能障碍和 AS 的各种治疗干预措施,从而大大缩短了研究时间。除治疗药物的临床前评估外,ApoE^{-/-}小鼠的 PCL 手术目前还被用于研究新型机械敏感转录因子如 Bach1 (BTB and CNC homology 1)^[44]以及转录因子缺氧诱导因子 1 α (transcription factor hypoxia-inducible factor1 α , HIF-1 α)^[50]的促 AS 作用。

PCL 手术与 ApoE^{-/-}或 Ldlr^{-/-}小鼠联合使用,既是阐明低流速诱导的内皮功能障碍的重要研究工具,也是评估具有调节脂质代谢和血流动力学作用的潜在抗动脉粥样硬化药物疗效的有效选择。

3.4 Ldlr-ASO 小鼠

反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 的使用是一种治疗相关的基因沉默手段。该模型建立于对正常血脂野生型 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 Ldlr ASOs,每周 1 次,持续 9 周并喂食高脂饲料,小鼠总胆固醇水平上升至 400 ~ 800 mg/dL,并观察到主动脉根部和头臂动脉出现明显斑块。本实验还同时使用正义寡核苷酸 (sense oligonucleotides, SOs) 恢复肝 Ldlr 的表达来逆转高胆固醇血症^[51]。该模型实现了一种在不影响脂蛋白代谢情况下,在小鼠中产生 AS 和消退。适用于评估 AS 斑块的修复。然而,未修饰的 ASOs 半衰期较短,需要多次注射 Ldlr-aso 才能有效抑制 Ldlr。在小鼠研究中,将 ASO 全身注射到小鼠体内是劳动密集型、昂贵的,并且会导致肝外组织靶基因的消耗。

4 结语

小鼠凭借繁殖速度快、易于基因操作以及成本低等优势被广泛应用于 AS 的病机研究当中。ApoE^{-/-}与 LDLr^{-/-}两种小鼠模型的出现,对于后续转基因模型的开发具有里程碑式意义。然而迄今为止,并没有一种小鼠模型能高保真地完全复刻人类病机和病变发展规律。一方面,AS 本身是一种多因素复合疾病,除高胆固醇血症外,还包括遗传、环境、疾病合并症 (如糖尿病和肥胖) 等,但小鼠模型的病变驱动往往以高胆固醇血症为主。另一方面,由于胆固醇代谢和脂质图谱差异,小鼠的主要循环脂蛋白以 HDL 为主而非 LDL。此外,小鼠模型 AS 斑块的解剖定位以主动脉、主动脉窦等为主,极少出现在人类易发的冠状动脉血管中。新型 PCL 模型,突出了血流动力学与动脉内皮功能障碍的关联,然而动脉结扎部位的曲度不同,产生的剪切应力和振荡应力不同,对于 AS 发展会产生很大区别,实验时应注意保持一致性。鉴于 AAV8-Pcsk9-D377Y 注射小鼠病变以及人类冠状动脉钙化均存在的两性差异,性激素对心血管的影响仍需注意,在实验设计时可予以考虑。

综上所述,目前的 AS 小鼠模型能够部分体现人类 AS 斑块特征,将来的研究中,造模条件改良、多模型联合使用以及设计多并发病共同表达模型对于解释人类 AS 的机制基础,检验各类药物临床前疗效具有重要意义。首先,可基于现代患病人群饮食共性开发新型饲喂条件。其次,突破传统基

因敲除方式而突出表达某种基因型,通过抑扬基因表达或许更容易发现基因型作用。此外,从模型提取内皮细胞进行离体研究可以为新基因的发现提供更多可能性。最后,基于人类复杂的 AS 病变特点,研究者有必要针对斑块侵蚀、钙化、斑块内出血以及血栓形成、破裂等特征研制模型,从多角度进一步了解动脉粥样硬化的分子基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis [J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1118–1120.
- [2] Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic plaque healing [J]. N Engl J Med, 2021, 384(3): 294.
- [3] Björkegren J, Lusis A. Atherosclerosis: recent developments [J]. Cell, 2022, 185: 1630–1645.
- [4] Vesselinovitch D, Wissler RW, Doull J. Experimental production of atherosclerosis in mice. 1. Effect of various synthetic diets and radiation on survival time, food consumption and body weight in mice [J]. J Atheroscler Res, 1968, 8(3): 483–495.
- [5] Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E and reverse cholesterol transport [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3479.
- [6] Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(10): 4471–4475.
- [7] Plump AS, Smith JD, 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.
- [8] 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.
- [9] Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, et al. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency [J]. Science, 1981, 214(4526): 1239–1241.
- [10] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 3–13.
- [11] 张森, 洪芬芳, 杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 122–127.
- [12] Zhang S, Hong FF, Yang SL. Hepatic lipid metabolism and atherosclerosis treatment [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 122–127.
- [12] Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research [J]. J Intern Med, 1997, 242(2): 99–109.
- [13] Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall [J]. J Lipid Res, 2009, 50: S156–S161.
- [14] 赵海苹, 张连峰. 动脉粥样硬化基因工程小鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 54–58.
- [15] Zhao HP, Zhang LF. Transgenic mouse models of atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(9): 54–58.
- [15] Jongejan YK, Eikenboom JCJ, Gijbels MJJ, et al. Atherothrombosis model by silencing of protein C in APOE*3-Leiden.CETP transgenic mice [J]. J Thromb Thrombolysis, 2021, 52(3): 715–719.
- [16] Paalvast Y, Zhou E, Rozendaal YJW, et al. A systems analysis of phenotype heterogeneity in APOE*3 Leiden. CETP mice induced by long-term high-fat high-cholesterol diet feeding [J]. Nutrients, 2022, 14(22): 4936.
- [17] Schilperoort M, van den Berg R, Bosmans LA, et al. Disruption of circadian rhythm by alternating light-dark cycles aggravates atherosclerosis development in APOE*3-Leiden. CETP mice [J]. J Pineal Res, 2020, 68(1): e12614.
- [18] Kong YY, Li GQ, Zhang WJ, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase aggravates inflammation and promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(9): 1184–1192.
- [19] Qi Y, Jiang C, Cheng J, et al. Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(1): 19–29.
- [20] Zurkinden L, Sviridov D, Vogt B, et al. Downregulation of *Cyp7a1* by cholic acid and chenodeoxycholic acid in *Cyp27a1/ApoE* double knockout mice: differential cardiovascular outcome [J]. Front Endocrinol, 2020, 11: 586980.
- [21] Zurkinden L, Solcà C, Vögeli IA, et al. Effect of *Cyp27A1* gene dosage on atherosclerosis development in ApoE-knockout mice [J]. FASEB J, 2014, 28(3): 1198–1209.
- [22] Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, et al. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension [J]. J Hypertens, 2009, 27(12): 2310–2320.
- [23] Liu K, Chen B, Zeng F, et al. ApoE/NOS₃ knockout mice as a novel cardiovascular disease model of hypertension and atherosclerosis [J]. Genes, 2022, 13(11): 1998.
- [24] Sullivan PM, Mezdoor H, Quarfordt SH, et al. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse *ApoE* with human *ApoE**2 [J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 130–135.
- [25] Hennuyer N, Duplan I, Paquet C, et al. The novel selective PPAR α modulator (SPPARM α) pemafibrate improves dyslipidemia, enhances reverse cholesterol transport and decreases inflammation and atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2016, 249: 200–208.
- [26] Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(7): 1254–1274.
- [27] Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice [J]. J Clin Invest, 1994, 93(5): 1885–1893.

- [28] Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 878–885.
- [29] Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2): 242–249.
- [30] Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(5): 1104–1115.
- [31] VanderLaan PA, Reardon CA, Thisted RA, et al. VLDL best predicts aortic root atherosclerosis in LDL receptor deficient mice [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(3): 376–385.
- [32] Véniant MM, Zlot CH, Walzem RL, et al. Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient “Apo-B48-only” and “Apo-B100-only” mice [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(8): 1559–1568.
- [33] Sanan DA, Newland DL, Tao R, et al. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet; no accentuation by apolipoprotein(a) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(8): 4544–4549.
- [34] Hellberg S, Sippola S, Liljenbäck H, et al. Effects of atorvastatin and diet interventions on atherosclerotic plaque inflammation and [^{18}F] FDG uptake in *Ldlr*^{-/-} *ApoB*^{100/100} mice [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 263: 369–376.
- [35] Blanc V, Park E, Schaefer S, et al. Genome-wide identification and functional analysis of Apobec-1-mediated C-to-U RNA editing in mouse small intestine and liver [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(6): R79.
- [36] Miyajima C, Iwaki T, Umemura K, et al. Characterization of atherosclerosis formation in a murine model of type II a human familial hypercholesterolemia [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1878964.
- [37] Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, et al. Impaired fibrillin-1 function promotes features of plaque instability in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2009, 120(24): 2478–87.
- [38] 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.
- [39] Akram ON, Bernier A, Petrides F, et al. Beyond LDL cholesterol, a new role for PCSK9 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1279–1281.
- [40] Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, et al. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 50–59.
- [41] Cansby E, Magnusson E, Nuñez-Durán E, et al. STK25 regulates cardiovascular disease progression in a mouse model of hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(8): 1723–1737.
- [42] Huang L, Chambless KL, Gao X, et al. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 565–569.
- [43] Buchmann GK, Schürmann C, Warwick T, et al. Deletion of No_x O₁ limits atherosclerosis development in female mice [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101713.
- [44] Jia M, Li Q, Guo J, et al. Deletion of BACH1 attenuates atherosclerosis by reducing endothelial inflammation [J]. *Circ Res*, 2022, 130(7): 1038–1055.
- [45] 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.
- [46] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction [J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(3): 519–560.
- [47] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, et al. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(25): 2379–2393.
- [48] Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress [J]. *Circulation*, 2006, 113(23): 2744–2753.
- [49] Nam D, Ni CW, Rezvan A, et al. Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(4): H1535–H1543.
- [50] Feng S, Bowden N, Fragiadaki M, et al. Mechanical activation of hypoxia-inducible factor 1 α drives endothelial dysfunction at atheroprone sites [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2087–2101.
- [51] Basu D, Hu Y, Huggins LA, et al. Novel reversible model of atherosclerosis and regression using oligonucleotide regulation of the LDL receptor [J]. *Circ Res*, 2018, 122(4): 560–567.

[收稿日期] 2023-02-20