

宗永辉,刘新灿. 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 133-139,145.
Zong YH, Liu XC. Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 133-139,145.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 11. 022

钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展

宗永辉¹, 刘新灿^{2*}

(1.河南中医药大学,郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 钙化性主动脉瓣膜病是一种以炎症、纤维化和钙化为特征的主动进展性疾病,但具体发病机制尚未明确。现阶段对其机制的研究主要来自动物模型的应用,能够模拟疾病进程的动物模型将有助于我们对疾病发生发展机制的明确和寻找有效的临床治疗途径。本文就钙化性主动脉瓣狭窄的小鼠造模方法进行综述,并对其模型做出评价,为钙化性瓣膜病相关研究时模型选择提供参考。

【关键词】 钙化性主动脉瓣膜病;主动脉瓣狭窄;动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0133-07

Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease

ZONG Yonghui¹, LIU Xincan^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 45000, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 45000)

【Abstract】 Calcific aortic valve disease is an active progressive disease characterized by inflammation, fibrosis and calcification, but the exact pathologic mechanism is unclear. At present, research is mainly conducted in animal models. Those animal models that best simulate the disease process help to clarify the mechanisms of the occurrence and development of the disease, and may lead to the identification of effective clinical treatments. In this paper, we reviewed and evaluated the mouse model of calcific aortic stenosis to provide a reference for the selection of other animal models of calcified valvular disease

【Keywords】 calcific valve disease, CAVD; aortic valve stenosis; animal

钙化性主动脉瓣膜病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是指由早期未发生血液动力学影响的瓣膜硬化逐渐发展到需要瓣膜置换术的严重钙化性主动脉瓣狭窄 (aortic valve stenosis, AS) 的进展性疾病^[1], 其主要特征为炎症、纤维化和钙化^[2]。在发达国家, 钙化主动脉瓣疾病是成年人主动脉瓣狭窄最常见的病因, 并且患病率随着年龄的增加呈

非线性增长^[3]。我国一项针对老年瓣膜性心脏病住院患者诊疗状况的研究结果显示, 钙化性主动脉瓣狭窄患者占比 18.99%^[4]。随着医疗卫生条件的提升以及人口老龄化的显著, 钙化性主动脉瓣膜病的发病率将逐年上升。目前对钙化性主动脉瓣狭窄的药物疗法未显示出可减轻进行性瓣膜钙化或改善生存率, 症状严重者主要通过外科手术和内科介

【基金项目】 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研重点专项(2018JDZX008)。

【作者简介】 宗永辉(1992—), 男, 硕士, 主要从事心血管疾病预防及介入医学研究。E-mail: zongyonghui101@163.com

【通信作者】 刘新灿(1965—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事心血管疾病预防及介入医学研究。

E-mail: liuxincan103@163.com

入干预^[5]。所以明确钙化性瓣膜病的发病机制,进行早期干预,延缓发病进程,是现在社会面临的重大课题。

对瓣膜病的发病机制的认识从以往的随着年龄增长的被动性退化现象转变为主动性的类似“动脉粥样硬化”病变^[2],这一里程碑式的研究重新引起了对钙化性瓣膜病研究的热潮。根据临床上对疾病发病机制的认识,再转移到动物实验给与验证,是我们研究钙化性瓣膜病的主要方法。在实验研究中,虽然体外实验可以观察到对细胞因子的影响,但无法发现观察到病理生理学的代偿反应;并且瓣膜所处解剖位置和环境特殊性和复杂性,因此整体动物实验更能合适对瓣膜病机制的研究^[6]。目前动物造模方法较多^[7-8],使用的动物也不相同,如小鼠、兔、猪等。其中最常用的是小鼠模型,首先是它们的体型小,便于饲养和管理,并且具有经济成本低等优势;其次是较短的繁殖周期、遗传操作的简便性以及基因图谱的全面性使得对 CAVD 的关键分子介体的具体研究成为可能。本文主要针对钙化性主动脉瓣狭窄的模型优缺点及进展进行综述,总结见表 1。

1 饮食诱导模型

1.1 高胆固醇饮食法

临床证据表明,冠状动脉粥样硬化和主动脉瓣狭窄具有相似的流行病学危险因素,例如年龄,性别,高胆固醇血症和高血压^[9-11]。对人类狭窄主动脉瓣的临床病理研究发现,病变与包含炎性细胞和钙化沉积物的动脉粥样硬化斑块相似^[12-13]。临床前研究进一步证实了在兔和小鼠动脉粥样硬化模型中主动脉瓣小叶中的动脉粥样硬化样病变^[14-15]。因此,动脉粥样硬化模型常被借鉴到主动脉瓣狭窄的实验研究。

标准饮食条件下野生型小鼠(WT)不会自发主动脉瓣钙化,因此需要高脂饮食或者基因敲除等方式干预。低密度脂蛋白受体(LDLR)是肝细胞膜上一种镶嵌式蛋白,能介导 LDL 和 VLDL 的胞吞作用,低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})小鼠可引起内源性胆固醇升高常被应用于钙化性瓣膜病模型的建立。C57BL/6J 背景的低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})雄性小鼠常规饮食 17~22 个月时,会自发出现轻度高胆固醇血症、瓣口直径急剧缩小、跨瓣膜收缩压梯度升高以及左心室肥厚等早期瓣膜

硬化表现^[16]。Towler 等^[17]应用特制饮食中脂肪含量为总热量的 42%并含有 0.15%胆固醇和 0.5%的胆酸盐的饲料喂食 17 周后,出现严重的胆固醇血症(1040±37),高血糖和瓣膜矿物质沉积以及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达。

载脂蛋白 E(ApoE)是 VLDL 受体的配体,也是肝细胞 CM 残粒受体的配体,载脂蛋白 E 缺陷(apoE^{-/-})同样引起内源性胆固醇升高。在没有饮食干预条件下,半数以上的 apoE^{-/-}小鼠在超过 43 周龄时主动脉流速快于 150 cm/s,最高可达 427 cm/s,其中伴有少数主动脉反流,并且与性别无相关性;Von Kossa 染色在 97 周龄主动脉瓣中显示出异位钙化^[15],这与人主动脉瓣狭窄病程相似。在 apoE^{-/-}小鼠 10 周龄时给予脂肪含量为总热量的 42%并含有 0.2%胆固醇的饮食,30 周龄时血清胆固醇明显增加至 588 mg/dL,小叶增厚,内皮细胞活化,以及富含巨噬细胞的内皮下病变;在病变区域能够检测到组织蛋白酶 B, α 平滑肌肌动蛋白(α SMA),碱性磷酸酶, Runx2 和 OPN mRNA 表达^[18],虽然没有 von Kossa 染色的证据表明有钙盐沉积,但通过双磷酸盐结合的成像颗粒显示出早期微钙化的迹象,表明该饮食模式可导致加速早期疾病形成。

模型评价:该模型优点是操作简单,明显的缺陷是在单纯饮食干预下造模周期较长,模型成功率低;联合基因敲除虽然能够明显缩短主动脉狭窄模型的建立时间,但不可避免的出现严重的高胆固醇血症,导致小鼠过早死亡,并且这与人瓣膜病发病时轻度高胆固醇血症不符。以往临床研究表明他汀类药物对主动脉瓣狭窄没有明显的疗效^[19-22],动物实验研究表明在早期进行他汀药物的干预可延缓疾病的进展^[14,23]。因此,该模型可适用于明确高胆固醇血症在主动脉瓣膜狭窄进展中的作用以及他汀类药物对瓣膜病的影响研究。

1.2 高脂饮食法

许多研究表明以胰岛素抵抗/2 型糖尿病(T2D)为特征的代谢异常状态在 CAVD 的发生和进展中起重要作用^[24-25]。Towler 等^[17]在一项关于糖尿病对血管钙化的研究中,低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})小鼠给予总热量的 58%来自脂肪而没有添加胆固醇的食物,喂食 2 周后胆固醇出现明显变化,17 周后血清胆固醇水平较正常饮食组升高 62%,并出现高血糖,高胰岛素血症和肥胖症, von

Kossa 染色发现主动脉瓣小叶上矿物质沉积。Drolet 等^[26]采用同样的喂养模式喂食 C57BL/6J 背景的雄性小鼠,4 个月后发现轻度高胆固醇血症,肥胖和高血糖症;超声心动图检测主动脉瓣面积(aortic valve area,AVA)减小,跨瓣速度增加,瓣膜小叶增厚;免疫组化检测证实巨噬细胞(CD68 阳性细胞),泡沫细胞等炎性细胞以及骨桥蛋白的合成;组织染色发现瓣膜小叶区域有结节性钙沉积,再次证实了 CAVD 的病因是多因素的。

模型评价:高脂饮食模型明显的优点是避免了高胆固醇饮食引起的高胆固醇毒症,同时引起的体重增加和血糖的升高近似模拟了人类真实生活环境中,这与钙化性瓣膜病流行病学危险因素^[27]相一致。Le 等^[28]利用合并血脂异常和 2 型糖尿病的 LDLr^{-/-}/ApoB^{100/100}/IGF-II 小鼠模型,观察到高胆固醇血症和高血糖症对 CAVD 早期病变的累积效应,证实了 T2D 是 CAVD 发生发展的独立危险因素,可能成为未来潜在的治疗靶点。因此,该模型可应用于研究血糖对瓣膜病钙化形成的影响以及降糖药物延缓病情进展的效果观察。

1.3 其他饮食诱导模型

Huk 等^[29]给野生型 C57BL/6J 小鼠喂食含有 200 IU/g 视黄醇棕榈酸酯过量维生素 A 的食物(Harlan,TD.110146)持续 12 个月,检测到主动脉瓣的峰值压力梯度和速度显著增加,小叶明显钙化结节。该模型主要通过视黄酸(retinoic acid,RA)介导的钙化信号导致转录因子 Sox9 抑制及其靶基因失调,成骨基因 Runx2 和骨钙蛋白(bone Gla protein,BGLAP)表达增强,这与先前研究结果一致^[30-31],提示过量膳食维生素 A 是 CAVD 发病的危险因素。

模型评价:该模型的优点与其他饮食诱导模型一样,操作简便。但缺点也比较明显,由于造模周期较长,对后续开展相关研究不利,并且对研究人员精力和经济上都是一项挑战。利用此模型可以研究成人过量膳食维生素 A 对促进 CAVD 进展的影响,给予 CAVD 患者在膳食习惯上的指导。

2 基因修饰模型

2.1 基因敲除模型

弹性纤维作为主动脉瓣细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的重要组成部分,在结构和功能上具有重要作用^[32]。弹性纤维由弹性蛋白

(核心蛋白)和微纤维(原纤维蛋白及相关蛋白),以及各种糖蛋白,如 emilins 和 fibulins 组成^[33]。Fibulin4^{-/-}小鼠可导致 TGF- β 信号通路激活,引起主动脉瓣成纤维细胞激活,小叶增厚,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)激活和营养不良性钙化^[34]。同样 Emilin1^{-/-}小鼠也能导致瓣膜组织内 TGF- β 因子失调,引起经典通路 Smad2/3 和非经典途径细胞外信号调节激酶 1 和 2(Erk1/2)激活,17 月龄时主动脉瓣增厚,峰值速度和相应的压力梯度显著增加,组织内血管生成,巨噬细胞浸润, α SMA 表达以及纤维化^[35];值得注意的是此模型未检测出钙盐沉积的迹象,但它提供了 ECM 病理结构的变化,与人瓣膜病的早期病理改变是一致的。Angel 等^[36]利用此模型证实了主动脉瓣膜病发病前后蛋白组变化与生物力学存在明显的相关性,ECM 中蛋白质的变化早于血流动力学的变化。

以往研究证实炎症与钙化性主动脉瓣膜病存在联系,并且白介素(IL)-1 β 参与了 CAVD 的发病机制^[37-38]。Isoda 等^[39]发现 BALB/c 背景的白介素-1 受体拮抗剂缺陷(IL-1Ra^{-/-})雄性小鼠在标准饮食条件下,16 周龄时出现主动脉瓣叶增厚,巨噬细胞浸润并含有分化的肌成纤维细胞,43 周龄时检测到钙化病变。

模型评价:基因敲除小鼠模型在众多疾病发病机制研究中常用的方法,其优点是小鼠往往是近交品系,同源性好,便于基因编辑操作,能够明确某种特定因素缺失对疾病造成的影响。缺点是基因敲除仅对单一位点实施干预,会影响与钙化性主动脉瓣膜病其他危险因素的相互促进作用,有时还会造成动物模型典型表现(钙化)欠缺。

2.2 基因过表达模型

Cadherin-11(Cad-11)是一种细胞间粘附蛋白,可介导细胞迁移并促进间充质细胞分化为骨和软骨^[40]。先前研究表明,在人和动物的钙化性主动脉瓣 VIC 中发现 Cad-11 表达明显增加^[41-42];Cad-11 缺乏可导致 GTP-RhoA 和 Sox9 失活,影响胚胎瓣膜的形成和重塑,进而阻止了成年小鼠的钙化^[43]。Sung 等^[44]运用转基因技术创建了 Nfatc1^{Cre};R26-Cad11^{Tg/Tg}小鼠模型,小鼠在一个月时主动脉瓣厚度或横截面积没有显著差异和其他身体缺陷,10 个月时出现主动脉钙化和狭窄伴反流,瓣膜明显增厚(>70%),横截面积增加(>46%),射血速度增快,存在成骨细胞标志物肌纤维母细胞(α SMA)和成骨细胞

(Runx2, 骨钙素) 以及阳性的 Von Kossa 和茜素红染色。该模型小鼠病理学及生物分子学与人钙化性主动脉瓣膜病表现出一致性, 作为一种新的模型证

实了 Cadherin-11 过表达通过体内 GTP-RhoA 介导的成骨和营养不良性钙化以及 Sox9 介导的细胞外基质重塑诱导主动脉狭窄。

表 1 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型

Table 1 Mouse models of calcified aortic valve disease

模型 Model	动物 Animals	造模方法 Model method	特点 Characteristics
饮食诱导模型 Diet induction model	高胆固醇饮食法 High cholesterol diet	C57BL/6J、 Ldlr ^{-/-} 、 Apoe ^{-/-} 喂食脂肪含量为总热量的 42% 并含有 0.2% 胆固醇的饮食持续 20 周 A diet with 42% fat and 0.2% cholesterol was fed for 20 weeks	操作简单, 模型成功率低, 易引起高胆固醇血症 The operation is simple, the success rate of the model is low, and it is easy to cause hypercholesterolemia
	高脂饮食法 High fat diet	C57BL/6J、Ldlr ^{-/-} 喂食脂肪含量为总热量的 58% 并且不添加胆固醇的食物持续 4 个月 The diet containing 58% fat and no cholesterol was fed for 4 months	避免了高胆固醇饮食引起的高胆固醇血症, 但模型成功率低 High cholesterol toxicity caused by high cholesterol diet was avoided, but the success rate of the model was low
	其他饮食诱导模型 Other dietary induction models	C57BL/6J 喂食含有 200 IU/g 视黄醇棕榈酸酯维生素 A 持续 12 个月 The diet contained 200 IU/g retinol palmitate vitamin A for 12 months	操作简单, 但造模周期较长, 模型成功率低 The model is simple and easy to operate, but the modeling period is long and the success rate of the model is low
基因修饰模型 Gene modification model	基因敲除模型 Gene knockout model	Fibulin4 ^{-/-} 、 Emilin1 ^{-/-} 、 IL-1Ra ^{-/-} 利用基因敲除技术针对主动脉瓣膜病危险因素靶点进行干预 Gene knockout technique was used to intervene the target of risk factors of aortic valvular disease	能够明确研究靶点在疾病发生中的作用 It can clearly study the role of target in the occurrence of disease
	基因过表达模型 Gene overexpression model	Nfatc1 ^{Cre} 、 R26- Cad11 ^{Tg/Tg} 、 REN ⁺ AGT ⁺ 利用转基因技术对疾病发生相关危险因素进行过表达 Overexpression of risk factors related to disease occurrence by transgenic technology	操作复杂, 模型成功率低, 实验成本高 The operation is complex, the success rate of model is low and the cost of experiment is high
先天发育异常模型 Congenital dysplasia model	Notch1 ^{+/-} 、 Postn ^{-/-} 、 Egfr ^{Vel/+}	干预瓣膜发育成熟关键位点造成瓣膜缺陷 Valve defects caused by intervention at key sites of valvular development and maturation	提供先天型瓣膜病模型, 但模型成功率低, 耗时长, 并且在复制模型时操作复杂 The model of congenital valvular disease is provided, but the success rate of the model is low, it takes a long time, and the operation is complicated when copying the model
手术诱导模型 Surgical induction model	C57BL/6J	利用导丝损伤瓣膜 Use the guide wire to damage the valve surface	操作简单, 造模周期短, 模型成功率高 The operation is simple, the modeling period is short, and the success rate of the model is high

注: C57BL/6J: 野生型小鼠亚种; Ldlr: 低密度脂蛋白受体; Apoe: 载脂蛋白 E; Fibulin/Emilin: 糖蛋白; IL-1Ra: 白介素-1 受体拮抗剂; Nfatc1: 活化 T 细胞的核因子 1; Cre: 重组酶; R26: Rosa26, 启动子 26; Cad-11: 细胞间粘附蛋白; REN: 肾素; AGT: 血管紧张素; Notch1: 转录调节因子; Postn: 骨膜素; Egfr: 上皮生长因子受体。

Note. C57BL/6J, Wild type mouse subspecies. Ldlr, Low density lipoprotein receptor. Apoe, Apolipoprotein E. Fibulin/Emilin, glycoprotein. IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist. Nfatc1, Nuclear factor of activated T cell1. Cre, Recombinase. Cad-11, Cadherin-11, Intercellular adhesion protein. REN, renin. AGT, Angiotensin. Notch1, transcriptional regulatory factor. Postn, Periostin. Egfr, Epithelial growth factor receptor.

Chu 等^[45]综合考虑高胆固醇血症和高血压与主动脉瓣膜病的相关性,首次在 APOE^{-/-}小鼠基础上利用转基因技术建立了肾素(REN⁺)、血管紧张素(AGT⁺)为一体的纤维化性主动脉瓣狭窄(fibrotic aortic valve stenosis, FAVS)模型。标准饮食 12 个月后表现出严重的主动脉瓣狭窄,相邻瓣膜吻合线明显增长,瓣膜基底部胶原蛋白网状化,伴有轻度钙化。虽然瓣膜钙化不明显,但类似于儿童和一些成年人的主动脉瓣狭窄^[46-47]。

模型评价:该模型优点是可以针对特定的主动脉狭窄发病危险因素利用转基因技术检测该基因过表达对机体的影响。缺点是实验成本较高。虽然转基因技术比较成熟,但操作复杂,实验者需要到专业机构购买特定小鼠,并且价格昂贵。

3 先天发育异常模型

流行病学显示先天异常主动脉瓣患者主动脉瓣狭窄的发病率明显高于三尖瓣,并且发病时间会提前 10-20 年^[48-50]。此外钙化性主动脉瓣狭窄的地理分布是异质的,并且显示出聚类效应,表明遗传因素与瓣膜病之间的相关性^[51]。

Garg 等^[52]在同一个家族的五代人的先天性心脏病研究中,首次发现了转录调节因子 NOTCH1 突变是主动脉瓣钙化的遗传基础,并且通过突变基因的转基因小鼠中证实能够引起心脏瓣膜缺陷。Notch1 杂合子(Notch1^{+/-})雄性小鼠喂食含 0.2%胆固醇的高胆固醇饮食 10 个月后,与 WT 对照组相比主动脉瓣钙化程度增加 5 倍,小叶中 Bmp2 表达增加了 3 倍以上,虽然小鼠均为没有表现出二尖瓣,但是在三尖瓣中存在钙化,证明 Notch1 在发育过程中和在抑制出生后的钙化中具有独立的功能^[53]。

骨膜素(periostrin, POSTN)基因编码的蛋白骨膜素在胚胎发育的心脏流出道(OFT)心内膜垫中高度表达,诱导心脏形成主动脉瓣等多种结构^[54]。POSTN 基因缺失(postn^{-/-})小鼠通过诱导 Notch1 负调控因子 δ 样同系物(DLK1)的过度表达,主动脉瓣严重变形,并呈双尖瓣样形态,标准饮食 6 月龄时,von Kossa 染色主动脉瓣小叶上有大量钙沉积物,并伴有转录因子 Runx2、OPN 和骨钙素的表达^[55]。

上皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)信号传导通路在调节小鼠主动脉瓣的胚胎发育过程中起关键性作用,其主要功能受体缺陷可导致主动脉瓣异常和功能障碍^[56]。Weiss

等^[57]研究表明上皮生长因子受体突变(Egfr^{Vel/+})小鼠瓣膜发育异常发生率约 75%,形态类似于人的单尖瓣主动脉瓣;8 个月时主要表现为狭窄伴或不伴关闭不全,并且瓣膜功能障碍随年龄增长更加明显;虽然该模型小鼠未表现明显的出间质细胞分化以及钙化迹象,但这与儿童和年轻成人的先天型单尖瓣主动脉瓣临床表现相似^[58],因此可以作为一种先天型单尖瓣瓣膜病动物模型。

模型评价:先天发育异常诱导模型的建立为 CAVD 遗传因素的研究提供了新的途径,通过对先天发育异常小鼠的观察进一步认识调控瓣膜胚胎发育的信号通路在 CAVD 发生发展的作用,也可以研究先天型瓣膜病(单尖瓣、二尖瓣)在生物力学方面的作用。缺点是模型成功率低,耗时长,并且在复制模型时操作复杂。

4 手术诱导模型

由于血液动力应力引起的机械损伤被认为是 AS 的重要危险因素^[59],一种导丝损伤瓣膜的 AS 模型被建立。Honda 等^[60]最早通过将超声导丝在超声心动图引导下通过右颈总动脉插入并移动到雄性 C57/BL6 小鼠的左心室中,导丝的尖端位于瓣膜的左心室侧前后移动 20 次并旋转 50 次,从而造成主动脉瓣损伤。大部分小鼠损伤 1 周后主动脉速度持续性增加,损伤后 4 周,瓣膜小叶明显增生,射血分数降低,增生瓣膜显示出活性氧的产生增加以及炎性细胞因子和骨软骨形成因子的表达,12 周后表现出明显主动脉瓣狭窄,茜素红染色显示瓣膜钙化。但是该方法在操作过程中无法控制对瓣膜造成的损伤程度,导致瓣膜狭窄伴反流的混合型瓣膜病模型和死亡率增加。后来,Niepmann 等^[61]在此基础上改用多种类型的导丝进行分级损伤瓣膜,对于轻度和中度损伤,使用尖端缩短并焊接的直导丝(雅培 HI-TORQUE 0.014''),前后移动 20 次后再分别以 2 次/秒的速度旋转 50 次和 100 次;对于严重损伤,使用尖端附带 15°角度的传统导丝(Asahi INTECC MIRACLEbros6),旋转 200 次,以此控制瓣膜的轻、中、重损伤程度。该方法能明显控制不同程度狭窄中主动脉反流的发生率,并且术后 24 h 死亡率从 20%降到 4.4%。

模型评价:该模型优点是操作简单,造模周期短,模型成功率较其他模型高,其缺陷是造成瓣膜的急性损伤,病理周期短,与人主动脉瓣狭窄漫长

的病程不一致。但在病理组织学是相似的,能够形成主动脉狭窄以及钙化,并且具有易操作性,可以作为一种新兴动物实验模型。模型可应用于炎症机制的研究和抑制炎症反应对 CAVD 进程的影响。

5 展望

动物模型是研究 CAVD 的病理生物学机制和潜在的治疗干预的重要工具。目前大多数 CAVD 小鼠模型的建立集中在炎症机制和加快疾病进程的合并症,如高胆固醇血症、糖尿病、高血压等,但仍存在不足之处,未来理想模型应该能够精确测量主动脉瓣所处的高度动态的生物力学效应。由于主动脉瓣独特的解剖位置,使其暴露于血流诱导的剪应力、压力负荷、弯曲变形和 ECM 的机械阻力下,这些机械刺激中的每一个都调节瓣膜细胞的生物学,因此可能对体内平衡和疾病都有贡献。小鼠模型由于受物种的限制,首先在组织结构上缺乏与人主动脉瓣的三层结构,其次是体型小不利于力学方面的精确测量。我们应该看到在其他动物模型的优势,如猪在组织结构和形态大小与人瓣膜是相似的,可能成为研究生物力学的绝佳模型。然而小鼠模型在基因修饰上的便利性,为生物力学相关信号通路研究提供了可行性。不同物种的 CAVD 模型都有其局限性和优势,我们利用其优势上的互补,帮助我们对疾病机制更深入的认识。

参考文献:

- [1] Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis — from patients at risk to severe valve obstruction [J]. 371(8): 744–756.
- [2] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. Circulation, 1994, 90(2): 844–853.
- [3] Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, et al. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø study [J]. Heart, 2013, 99(6): 396–400.
- [4] 齐喜玲, 许海燕, 刘庆荣, 等. 中国老年退行性心脏瓣膜病住院患者诊疗现状分析 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(8): 771–776.
- [5] Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 63(22): e57–e185.
- [6] Weiss RM, Miller JD, Heistad DD. Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models [J]. Circ Res, 2013, 113(2): 209–222.
- [7] Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease [J]. Int J Inflam, 2011, 2011: 364310.
- [8] Guerraty M, Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification [J]. J Investig Med, 2007, 55(6): 278–283.
- [9] Mohler ER 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification [J]. Am J Cardiol, 2004, 94(11): 1396–1402, A6.
- [10] Allison MA, Cheung P, Criqui MH, et al. Mitral and aortic annular calcification are highly associated with systemic calcified atherosclerosis [J]. Circulation, 2006, 113(6): 861–866.
- [11] Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study [J]. J Am Coll Cardiol, 1997, 29(3): 630–634.
- [12] Otto CM, Kuusisto JK, Reichenbach DD. Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. Circulation, 1994, 90(2): 844–853.
- [13] Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(5): 1218–1222.
- [14] Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve [J]. Circulation, 2002, 105(22): 2660–2665.
- [15] Tanaka K, Sata M, Fukuda D, et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(1): 134–141.
- [16] Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, et al. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice [J]. Circulation, 2006, 114(19): 2065–2069.
- [17] Towler DA, Bidder M, Latifi T, et al. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. J Biol Chem, 1998, 273(46): 30427–30434.
- [18] Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease [J]. Circulation, 2007, 115(3): 377–386.
- [19] Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial [J]. Circulation, 2010, 121(2): 306–314.
- [20] Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis [J]. N Engl J Med, 2005, 14(9): 33–34.
- [21] Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(5): 554–561.
- [22] Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis [J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1343–1356.
- [23] Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, et al. Atorvastatin

- inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve [J]. *Heart*, 2005, 91(6): 806-810.
- [24] Katz R, Wong ND, Kronmal R, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2113-2119.
- [25] Capoulade R, Clavel MA, Dumesnil JG, et al. Insulin resistance and LVH progression in patients with calcific aortic stenosis: a substudy of the ASTRONOMER trial [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(2): 165-174.
- [26] Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, et al. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(4): 850-855.
- [27] Yan AT, Koh M, Chan KK, et al. Association between cardiovascular risk factors and aortic stenosis: the canheart aortic stenosis study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(12): 1523-1532.
- [28] Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, et al. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10): 2283-2291.
- [29] Huk DJ, Hammond HL, Kegechika H, et al. Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification *in vivo* [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 285-293.
- [30] Wirrig EE, Hinton RB, Yutzey KE. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 561-569.
- [31] Yang X, Meng X, Su X, et al. Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(4): 1008-1015.
- [32] Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination [J]. *J Heart Valve Dis*, 1997, 6(1): 1-6.
- [33] Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(14): 2817-2828.
- [34] Hanada K, Vermeij M, Garinis GA, et al. Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice [J]. *Circ Res*, 2007, 100(5): 738-746.
- [35] Munjal C, Opoka AM, Osinska H, et al. TGF- β mediates early angiogenesis and latent fibrosis in an Emilin1-deficient mouse model of aortic valve disease [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(8): 987-996.
- [36] Angel PM, Narmoneva DA, Sewell-Loftin MK, et al. Proteomic alterations associated with biomechanical dysfunction are early processes in the emilin1 deficient mouse model of aortic valve disease [J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(11): 2548-2562.
- [37] Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(5): 483-491.
- [38] Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Interleukin-1 β promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 170(2): 205-211.
- [39] Isoda K, Matsuki T, Kondo H, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 708-715.
- [40] Kii I, Amizuka N, Shimomura J, et al. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(11): 1840-1849.
- [41] Zhou J, Bowen C, Lu G, et al. Cadherin-11 expression patterns in heart valves associate with key functions during embryonic cushion formation, valve maturation and calcification [J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 198(4): 300-310.
- [42] Hutcheson JD, Chen J, Sewell-Loftin MK, et al. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(1): 114-120.
- [43] Bowen CJ, Zhou J, Sung DC, et al. Cadherin-11 coordinates cellular migration and extracellular matrix remodeling during aortic valve maturation [J]. *Dev Biol*, 2015, 407(1): 145-157.
- [44] Sung DC, Bowen CJ, Vaidya KA, et al. Cadherin-11 overexpression induces extracellular matrix remodeling and calcification in mature aortic valves [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(8): 1627-1637.
- [45] Chu Y, Lund DD, Doshi H, et al. Fibrotic aortic valve stenosis in hypercholesterolemic/hypertensive mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(3): 466-474.
- [46] Mohler ER 3rd, Medenilla E, Wang H, et al. Aortic valve calcium content does not predict aortic valve area [J]. *J Heart Valve Dis*, 2006, 15(3): 322-328.
- [47] Hinton RB Jr, Lincoln J, Deutsch GH, et al. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves [J]. *Circ Res*, 2006, 98(11): 1431-1438.
- [48] Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, et al. Calcific aortic stenosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16006.
- [49] Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation [J]. *Circulation*, 2005, 111(7): 920-925.
- [50] Michelena HI, Prakash SK, Della Corte A, et al. Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon) [J]. *Circulation*, 2014, 129(25): 2691-2704.

- cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient: Case report [J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21(4): 618–622.
- [35] Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient [J]. *PLoS Med*, 2009, 6(2): e1000029.
- [36] Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1): 1–15.
- [37] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2019, 53(1): e12712.
- [38] Xian B, Huang B. The immune response of stem cells in subretinal transplantation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 161.
- [39] Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens [J]. *Stem cells*, 2008, 26(5): 1275–1287.
- [40] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells; immunogenicity, tolerance, and suppression [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 12(1): 47–57.
- [41] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(5): 655–667.
- [42] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells; immune evasive, not immune privileged [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 252–260.
- [43] Schu S, Nosov M, O'Flynn L, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 2094–2103.
- [44] Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair [J]. *Circulation*, 2010, 122(23): 2419–2429.
- [45] Liu H, Kemeny DM, Heng BC, et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2864–2871.

[收稿日期]2020-03-15

(上接第 139 页)

- [51] Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, et al. Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 856–860.
- [52] Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease [J]. *Nature*, 2005, 437(7056): 270–274.
- [53] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(6): 828–834.
- [54] Kruzynska-Freitag A, Machnicki M, Rogers R, et al. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation [J]. *Mech Dev*, 2001, 103(1–2): 183–188.
- [55] Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, et al. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease [J]. *Physiol Genomics*, 2009, 39(3): 160–168.
- [56] Chen B, Bronson RT, Klamann LD, et al. Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 296–299.
- [57] Weiss RM, Chu Y, Brooks RM, et al. Discovery of an experimental model of unicuspid aortic valve [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(13): e006908.
- [58] Fealey ME, Edwards WD, Miller DV, et al. Unicommissural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978–2008) [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(4): 324–333.
- [59] Li C, Xu S, Gotlieb AI. The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(3): 183–190.
- [60] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(2): 270–278.
- [61] Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847–856.

[收稿日期]2020-03-30