慢性心理应激 apoE$^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化模型的建立与评价

顾洪丰[1,2],唐雅玲[1],杨永宗[1]
(1. 南华大学 心血管病研究所,湖南省动脉粥样硬化重点实验室;
2. 南华大学 生理学教研室,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 目的 探索建立慢性心理应激动脉粥样硬化动物模型。 **方法** 4 周龄 80 只 apoE$^{-/-}$ 小鼠随机均分为对照组与应激组,实验动物都以高脂、高胆固醇饲料(5% 猪油,1% 的胆固醇)喂养。应激组小鼠按顺序接受昼夜颠倒 7 或 17 h(每周 2 次)、鼠笼倾斜成 45 度角 7 或 17 h(每周 2 次)、噪声刺激 9 或 15 h(每周 2 次,70 dB)与恐惧刺激 1 h(放入大鼠刚住过鼠笼、每周 2 次)应激原的刺激;对照组的小鼠关在单独的实验动物房,除了不给予应激刺激外,其它的实验条件与应激组相同。分别在 0、4、8 与 12 周后 4 个时间点处死动物,检测血浆中总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白与低密度脂蛋白水平;采用放射免疫测定方法测定血浆中皮质酮激素水平;油红 O 染色法观察主动脉窦动脉粥样硬化病变。 **结果** 应激组的总胆固醇、三酰甘油与低密度脂蛋白明显高于对照组(均 $P<0.05$);与相应对照组相比较,应激组小鼠血浆中的皮质酮激素的水平显著升高($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$);主动脉窦动脉粥样硬化病变显著加重(均 $P<0.01$)。 **结论** 成功建立慢性心理应激动脉粥样硬化动物模型。

关键词: 慢性心理应激; 动脉粥样硬化; 模型
中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**2095 - 1116(2011)01 - 0002 - 05

Establishment and Evaluation of an Animal Model for Atherosclerosis in aopE$^{-/-}$ Mice Induced by Chronic Psychological Stress

GU Hong-feng, TANG Ya-ling, YANG Yong-zong
(*Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Artherosclerology of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: Objective To establish an ideal animal model for atherosclerosis in aopE$^{-/-}$ mice induced by chronic psychological stress. **Methods** Eighty male apoE$^{-/-}$ mice were divided into groups of control and chronic psychological stress. The stress scheme was slightly modified and consisted of the following: two periods of continuous overnight illumination; two periods (7 and 17 h) of 45 degrees cage tile, two periods (9 and 15 h) of intermittent sound (a tone of 70 dB) and two periods of exposure to rat odour. The stressed mice received this stress protocol for 0, 4, 8 and 12 weeks (n = 10 each group). The control mice were housed under identical conditions in a separate room, and had no contact with the stressed animals. All mice were fed a high-fat, high-cholesterol (atherogenic) diet containing 5% (wt/wt) fat and 1.0% cholesterol. The plasma level of TC, TG, HDL and LDL were measured by ELISA using commercially available kits, the splasma corticosterone concentration was determined by solid-phase ^{125}I radioimmunoassay using a commercially available reagent kit, and the lesion areas in aortic sinus were stained with Oil red O and were quantified with IMAGEPRO PLUS. **Results** (1) Compared with the control group, the level of TC、TG and LDLC in hyperlipidemia group were higher (all $P<0.05$); (2) After 4, 8 and 12 weeks of sress, the corticosterone concentration was significantly higher in the chronic psychological stress group than that in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, respectively); (3) The athero-

收稿日期:2011 - 01 - 13
基金项目:国家自然科学基金(30470720)资助项目.
通讯作者:杨永宗,硕士,教授,博士生导师,E-mail:yzyanghy@163.com.

sclerosis lesions in aortic sinuses of the stressed group mice were significantly increased linearly in response to duration of chronic psychological stress exposure (all $P<0.01$). **Conclusion** We constructed an ideal chronic psychological stress atherosclerosis apoE$^{-/-}$ mice model successfully.

Key words: chronic psychological stress; atheroaclerosis; model

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是动脉管壁发生的一种慢性炎症性疾病,是多数心血管病、脑血管病和肾脏、肢体等外周动脉疾病的共同病因和病理基础。高血脂、高血压、肥胖等传统心血管疾病危险因素只能解释约40% ~50% AS患者患病的病理生理学机制,大约40%没有传统危险因素的AS患者则与慢性心理应激有关[1]。随着社会竞争的日益激烈、生态环境的不断恶化,心理社会应激负荷日趋加重,大量流行病学调查资料和实验室研究结果表明,心理应激负荷已经成为现代人类AS等多种重大致死性疾病的重要因素[2~4]。虽然有越来越多的临床流行病学研究资料表明慢性心理应激在AS病变中有着重要作用,由于缺乏理想可靠的慢性心理应激动脉粥样硬化动物模型[5],对慢性心理应激在AS发生与发展中的作用机制至今尚未阐明。鉴于通过人体研究资料来阐释慢性心理应激在AS性疾病发生与发展中的作用及其机制存在诸多的限制因素,因此,建立适当的慢性心理应激动脉粥样硬化动物模型来探讨其在AS中的作用机制显得尤为重要。由于apoE$^{-/-}$小鼠对慢性心理应激敏感性好;能自发性地发生AS病变,且其好发AS病变的部位与性质与人类极其相似,因此本文采用apoE$^{-/-}$小鼠来构建慢性心理应激加速AS病变模型,为探讨慢性心理应激在AS发生、发展中的作用及其机制研究提供稳定、可靠的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 *实验动物* 载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E knockout,apoE$^{-/-}$)小鼠120只,雄性、4周龄、体重17 ~18 g,购自北京大学实验动物部(引自American Jackson Laboratory)。

1.1.2 *主要试剂* 油红O(oil red O,Sigma公司)。

1.1.3 *主要实验仪器* 倒置光学显微镜(日本Olympus公司),Leiea CM1900冰冻切片机(德国Leiea公司);图像分析系统(武汉华海公司,HIPAS-1000型)。

1.2 实验方法

1.2.1 *实验动物分组* 80只apoE$^{-/-}$小鼠置于清洁、无病原体的动物实验室,温度为(23 ±1)℃,相对湿度为55% ~60%;每笼5只(聚碳酸脂鼠笼的容积大小为:8 cm×13.5 cm×8.1 cm),垫料为消毒、干燥后的木屑,每5天换一次垫料,饮用水为消毒的蒸馏水。所有小鼠在相同的环境下平衡一周后开始实验。随机将80只apoE$^{-/-}$小鼠分成两组:对照组与应激组。每组apoE$^{-/-}$小鼠40只,实验动物都以高脂、高胆固醇饲料(5%猪油,1%的胆固醇)喂养;分别在试验开始后的第0、4、8、12周4个时间点处死动物。

1.2.2 *慢性温和应激动物模型的建立* 本实验所采用的应激方案在Ipek Yalcin等[6]建立的慢性应激模型基础上进行了改进,具体应激方案如下:昼夜颠倒7或17 h(每周2次);鼠笼倾斜成45度角7或17 h(每周2次);噪声刺激9或15 h(每周2次,70 dB);恐惧刺激1 h(放入大鼠刚住过鼠笼、每周2次)。应激组小鼠按顺序接受每个应激原的刺激。对照组的小鼠关在单独的实验动物房,除了不给予应激刺激外,其它的实验条件与应激组相同。

1.2.3 *血浆皮质酮激素浓度测定* apoE$^{-/-}$小鼠,于每周周一的上午9:00 ~10:00空腹从眼眶静脉窦采血0.1 mL,0.5% EDTA-Na_2抗凝,冰浴冷却,1 100 g、4℃离心10 min,采用^{125}I-皮质酮放射性免疫检测试剂盒测定血浆皮质酮的含量,此过程贯穿于整个实验。apoE$^{-/-}$小鼠采血后,立刻经腹腔注射0.5 mL的无菌生理盐水。^{125}I-皮质酮放射性免疫检测试剂盒的检测灵敏度为16 ng/mL,批内与批间分析变异系数分别为12.2%和14.9%。

1.2.4 *血浆脂质含量的测定* apoE$^{-/-}$小鼠经眼眶采血后,常温下3 000 r/min离心5 min,小心吸取上层血浆,然后按照相应的检测试剂盒说明书检测血浆胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)浓度。

1.2.5 *apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦AS病变面积测定* 以3%的戊巴比妥钠溶液麻醉apoE$^{-/-}$小鼠后,摘除眼球取血,随后以4%的中性多聚甲醛自左心室灌流1 h,然后自腹主动脉分叉连同心脏一并剪下,自主动脉根部将心脏与主动脉分离。随即将心脏置于4%的多聚甲醛溶液中、常温下固定3 h;然后将心脏放入30%的明胶—蔗糖PBS溶液(1%阿拉伯胶,30%蔗糖)中,4℃,24 h。冰冻切片时,将心脏自心

尖剪去约1/3(沿与心脏纵轴垂直方向),以O.C.T compound包埋剂包埋。心尖朝下、将心脏垂直固定与冰冻切片机,自主动脉根部(或心底)向心尖方向进行低温冰冻连续10 μm切片。主动脉窦始于瓣膜将主动脉腔分为三个独立的部区域的部分,在这个区域,主动脉壁不规则、且向外膨出。当主动脉壁变圆,且只有一个腔出现时,这时开始进入非主动脉窦部分的标志;整个主动脉窦的厚度约为200 μm。每组随机取5个标本,每一个心脏标本,将连续12张10 μm冰冻切片进行油红O染色,以IMAGEPRO PLUS软件计算AS病变面积。apoE$^{-/-}$小鼠心脏AS病变的面积大小通常分为两部分来进行定量分析:主动脉窦AS部分和瓣膜部分。

1.2.6 统计学分析 数据用均数±标准差表示,两组均数间差异性检验采用小样本t检验;多组之间比较采用One-Way ANOVA方差分析,由SPSS12.0统计软件完成。统计结果以$P<0.05$为差异有显著性。

2 结 果

2.1 慢性心理应激对apoE$^{-/-}$小鼠血浆皮质酮激素水平的影响

对照组小鼠血浆中皮质酮的浓度小于100 ng/mL,慢性心理应激组apoE$^{-/-}$小鼠应激4、8周后,应激组小鼠血浆中的皮质酮激素的水平均显著高于对照组;而应激12周后,应激组小鼠血浆皮质酮激素浓度大约是对照组的10倍,与相应对照组相比,其血浆皮质酮激素浓度差异有非常显著性(表1)。

表1 慢性心理应激对apoE$^{-/-}$小鼠血浆皮质酮水平的影响(ng/mL)

组别	0周	4周	8周	12周
对照组	37.17±6.06	37.92±7.44	40.27±6.68	39.41±8.32
应激组	35.82±5.16	173.63±17.02[a]	281.75±28.51[b]	396.47±31.82[c]

与对照组比较,a:$P<0.05$;b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

2.2 慢性心理应激对apoE$^{-/-}$小鼠血脂水平的影响

由表2可见,应激组apoE$^{-/-}$小鼠应激之前(0周)的血液中TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇与HDLC的含量与对照组相比较,两组之间差异无显著性;而apoE$^{-/-}$小鼠接受慢性心理应激4周后,血浆中的TC、TG与LDLC的水平显著高于相应对照组,但其血浆中的HDLC的水平却显著低于相应对照组,HDLC/LDLC的比值显著降低($P<0.05$)。

表2 慢性心理应激对apoE$^{-/-}$小鼠血脂水平的影响(mg/dL)

血脂	组别	0周	4周	8周	12周
TC	对照组	416.37±40.12	851.74±69.36	1098.64±95.27	1477.42±161.53
	应激组	425.82±38.71	1 286.92±112.32[a]	1622.51±173.18[a]	1940.66 ±211.76[a]
TG	对照组	69.38±6.07	97.43±11.16	142.77±25.81	202.41±23.57
	应激组	70.61±5.74	186.06±26.61[a]	274.18±30.33[a]	361.27±47.72[a]
HDLC	对照组	63.14±4.58	149.51±18.36	144.38±17.63	271.28±26.53
	应激组	64.82±6.24	205.49±21.18[a]	175.82±23.82[a]	168.22±14.46[a]
LDLC	对照组	285.61±29.31	605.28±74.11	801.94±78.07	1003.53±116.42
	应激组	289.74±32.63	896.37±91.26[a]	1173.25±132.37[a]	1412.28±157.91[a]

与对照组相应指标比较,a:$P<0.05$

2.3 慢性心理应激对apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦动脉粥样硬化病变的影响

在实验刚开始时,应激组与对照组apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦都未发生AS病变;而分别经过4、8与12周的高脂、高胆固醇的饮食喂养后,对照组与应激组apoE$^{-/-}$小鼠的主动脉窦都出现AS病变,随着时间的增加,主动脉窦AS病变显著加重。apoE$^{-/-}$小鼠接受4、8和12周慢性心理应激刺激后,其主动脉窦AS病变与相应对照组相比较,应激组的AS病变显著加重。应激12周apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦的AS病变的面积占主动脉窦面积的26.07%±3.85%,而相应对照组apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦的病

变面积百分比仅为6.35% ±1.52%。两者 AS 病变面积百分比相比较,差异有显著显著性($P<0.01$)。与相应对照组相比,随着应激时间的增加,apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦 AS 增加更为显著(表3,图1)。

表3 慢性心理应激对 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦动脉粥样硬化病变的影响(%)

组别	0周	4周	8周	12周
对照组	0	1.47 ±0.41	3.88 ±0.63	6.35 ±1.52
应激组	0	10.36 ±2.27[a]	16.76 ±2.65[a]	26.07 ±3.85[a]

与对照组比较,a:$P<0.01$

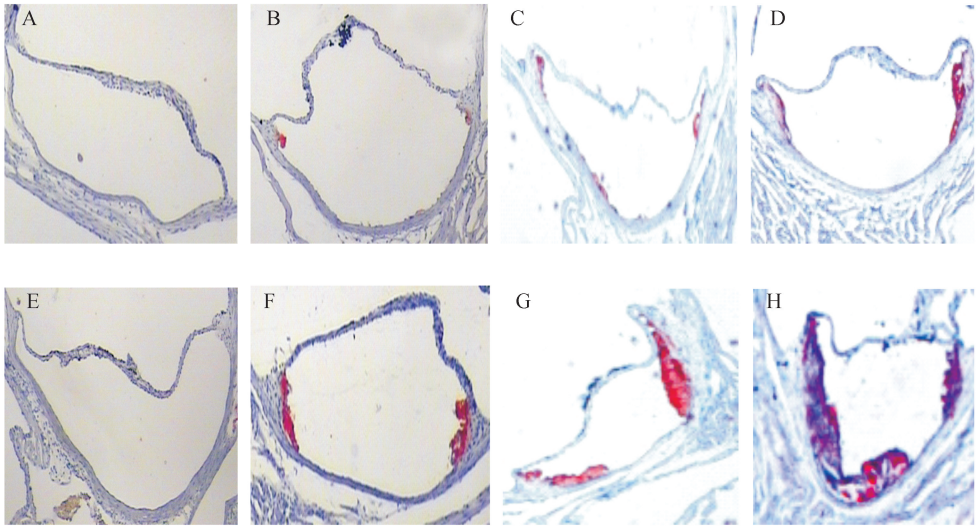

图1 油红O染色观察慢性心理应激对 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦动脉粥样硬化病变的影响(放大倍数×4)

A~D 分别表示0、4、8、12周对照组 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦 AS 病变;

E~H 分别表示0、4、8、12周应激组 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦 AS 病变

3 讨 论

短尾猴是研究慢性温和应激和动脉粥样硬化性心血管疾病的重要实验动物[7],可用短尾猴复制动脉粥样硬化模型以研究心理应激反应对动脉粥样硬化性心血管疾病的影响。但因短尾猴数量有限、费用高昂,加上野生动物保护法的限制,很难用于进行大样本的研究,使得其模型推广受到限制。因此,探索建立一种理想、可靠的心理应激动脉粥样硬化模型就显得意义重大。apoE$^{-/-}$小鼠不仅可自发动脉粥样硬化病变[8],而且对不可预知性的慢性应激原刺激非常敏感,特别是应激过程中应激激素、心血管反应和 AS 病变等特征与人类相似,是当前研究应激反应和动脉粥样硬化的理想动物。

本实验采用慢性心理应激原制备 apoE$^{-/-}$小鼠慢性应激模型,实验结果证实该模型建立的方法简便可行,可以模拟人类日常生活慢性应激状态。实验过程中应激组小鼠血浆皮质酮激素的水平显著升高,高达对照组的10倍,反映小鼠下丘脑—腺垂体—肾上腺轴高度兴奋[9]。应激组小鼠蔗糖偏嗜度明显下降,反映对奖赏的反应性下降[10],快乐体验能力缺乏(anhedonia),食欲减退,以致体重相对显著低于对照组。这些功能变化说明小鼠处于应激状态。更为重要的是肾上腺、淋巴腺、脾、肝等器官的病理形态学改变证实慢性心理应激原制备的 apoE$^{-/-}$小鼠成功出现全身应激反应。此模型的特点是所用的应激原与日常生活中人类所遭受的相似,避免使用对机体造成生理性创伤的刺激,如电击,悬尾,灼烫等。

本研究实验结果得出,慢性心理应激刺激4周后 apoE$^{-/-}$小鼠血浆 TC、TG 与 LDLC 的水平显著高于相应对照组,血浆 HDLC 水平显著低于相应对照组,说明这些应激原引发的全身应激反应促进血液脂质成分发生显著变化,出现致动脉粥样硬化血脂谱。主动脉窦部位油红O染色结果显示应激组 apoE$^{-/-}$小鼠 AS 病变较对照组小鼠显著加重,慢性心理应激第12周 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉窦的 AS 病变面积百分比为26.07 ±3.85,接近对照组小鼠病变面积百分比6.35 ±1.52的4倍($P<0.01$)。病理形态学变化结果可以明确得出慢性心理应激反应加速 apoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化病变发生进程的

结论。

本研究实验结果与 Kumari 等[8]在 8 周龄 apoE$^{-/-}$小鼠主动脉树上的观察结果相一致,为便利于观测慢性心理应激对 apoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化病变发生发展的全过程,本实验采用更年轻的 4 周龄 apoE$^{-/-}$小鼠。一般认为主动脉窦是检测小鼠动脉粥样硬化病变是最佳部位,所以本实验重点观测主动脉窦部位病变程度的变化。近期 Evelina Bernberg 等[11]报告慢性应激反应对 apoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化病变没有显著的影响。比较分析各自实验条件,不一致的实验结果可能与下述差别有关:(1)本实验用的是雄性 apoE$^{-/-}$小鼠,而 Evelina Bernberg 用的是雌性小鼠;(2)采用的应激原种类不相同,且应激强度不同,我们采用的是不可预知的温和应激;(3)本实验采用高脂、高胆固醇饲料,而 Evelina Bernberg 采用的 8% 食盐的高盐饲料;(4)本文动物样本数为每组 40 只,而该作者每组的样本数只有 12 只。

综上所述,本实验所采用的慢性心理应激原显著促进 apoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化病变进程,可以作为慢性心理应激反应与动脉粥样硬化相关性研究的理想动物模型。

参考文献:

[1] Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease[J]. Journal of Psychosomatic Research, 2002,52(1):1-23.

[2] Shively CA, Musselman DL, Willard SL. Stress, depression, and coronary artery disease: Modeling comorbidity in female primates [J]. Neuroscience and Biobeha-vioral Reviews, 2009,33(2):133-144.

[3] Ljudmila Stojanovich. Stress and autoimmunity[J]. Autoimmunity Reviews, 2010,9(5):A271-A276.

[4] Dimsdale JE. Psychological Stress and Cardiovascular Disease[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2008,51(13):1237-1246.

[5] 曹碧茵,施建蓉,童瑶,等. 心理应激动物模型的研制及其应用[J]. 中国行为医学科学,2005,14(2):95-96.

[6] Yalcin I, Aksu F, Belzung C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress mode in mice are altered by yohimbine but not by pindolol[J]. Euro-pean Journal of Pharmacology, 2005,14(2-3):165-174.

[7] Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy[J]. Circulation, 1999, 99(16):2192-2217.

[8] Kumari M, Grahame-Clarke C, Shank N, et al. Chronic stress accelerates athero-sclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse[J]. Stress, 2003,6(4):297-299.

[9] Ziemssen T, Kern S. Psychoneuroimmunology-Cross-talk between the immune and nervous systems[J]. J Neurol, 2007,254(2):8-11.

[10] Grippo AJ, Beltz TG, Weiss RM, et al. The Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Chronic Mild Stress-Induced Cardiovascular Changes and Anhedonia[J]. Biol Psychiatry, 2006,59(4):309-316.

[11] Bernberg E, Andersson IJ, Tidsrand S, et al. Repeated exposure to stressors do not accelerate atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice [J]. Atherosclerosis, 2009, 204 (1): 90-95.

(此文编辑　蒋湘莲)