

敌百虫联合高脂饲料喂养大鼠动脉粥样硬化模型的建立

赵绿英, 李金兰, 刘玉玲, 高治平, 黄红林

(南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探索建立类似人类长期接触低剂量、低毒性有机磷酸酯农药诱导动脉粥样硬化(As)大鼠模型的方法。 **方法** 健康SD大鼠,雌雄各半,随机分为普食喂养的对照组及敌百虫腹腔注射的高脂饲料喂养的模型组。 **结果** 第4、8周后模型组大鼠血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇LDLC及As指数(AI)均显著高于对照组($P < 0.05$);HDL/TC比值均显著低于对照组($P < 0.01$);主动脉弓及肝脏形态学观察发现,模型组出现明显的As病变。 **结论** 本实验初步建立了As大鼠模型,可作为研究人类长期接触低剂量、低毒性有机磷农药引起的大血管病变及其药物治疗的动物模型。

关键词: 动脉粥样硬化; 敌百虫; 模型; 大鼠

中图分类号:R541.4

文献标识码:A

Establishment of the Rat Models of Atherosclerosis Using Trichlorfon and High-fat Diet

ZHAO Lvyang, LI Jinlan, LIU Yuling, et al

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To establish an effective method of setting up an animal atherosclerosis model that simulates the human atherosclerosis disease after long-term exposure to low doses of low toxic organic phosphate pesticide. **Methods** Healthy Sprague Dawley rats, half male and half female, were divided randomly into two groups equally: normal dieted group, high-cholesterol dieted and injected intraperitoneally with a low-dose Trichlorfon(HCHL + Trichlorfon) group. TC, TG, HDL and LDL in serum were detected 0, 4 and 8 weeks from the start. Then the rats were killed separately and their arteries were isolated and fixed in 10% formalin for HE staining. Aortic histomorphology changes were observed by HE staining. **Results**

On the 4th, 8th-week after treatment, the levels of TC, HDL, LDL-C and the value of AI in HCHL + Trichlorfon group were significantly higher than those in normal diet group ($P < 0.05$), but the ratio of HDL and TC were significantly lower in groups with HCHL + Trichlorfon than those in groups with normal diet ($P < 0.05$). The damages of the aortas in normal diet group were less severe than that in model group. So the successful model was made. **Conclusion** An atherosclerosis model of rats can be successfully established with Trichlorfon plus high-cholesterol diet, this study provides the animal model for investigating human atherosclerosis disease after long-term exposure to low doses of low toxic organic phosphate pesticide.

Key words: atherosclerosis; trichlorfon; model; rat

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种心血管疾病的主要病理基础和共同病理过程,其主要危

险因素有高脂血症、高血压、糖尿病、吸烟、遗传因素、年龄、性别、肥胖、心理及环境因素等。其中,高脂血症是动脉粥样硬化最主要的危险因素。在环境因素中如长期接触有机磷酸酯类可导致体内对氧磷酶(paraoxonase, PON1)活性降低和以动脉粥样硬化为基础的心血管疾病的发生^[1-2]。

因此,环境残留的有机磷酸酯类杀虫剂可能是

收稿日期:2011-10-12

基金项目:湖南省高校创新平台开放基金资助(11K056)。

通讯作者:黄红林,联系电话:0734-8281049, E-mail: huanghonglinhui

@yahoo.com.cn.

动脉粥样硬化等心血管疾病潜在的致病因素。敌百虫是目前应用最广、接触人数最多的一种高效、低毒的有机磷类杀虫剂。本课题组已采用低毒性、低剂量(每天 18 mg/kg)有机磷农药敌百虫诱导主动脉内皮损伤,高脂饲料及敌百虫联合应用已成功建立家兔动脉粥样硬化模型^[3]。相比于家兔,大鼠对 As 有很强的抵抗力^[4],仅用高脂饲料喂养等方法不易使大鼠形成动脉粥样硬化^[5]。故本文拟用高脂饲料喂养加低剂量、低毒性敌百虫腹腔注射建立动脉粥样硬化大鼠模型,为动脉粥样硬化的发病机制及药物防治研究提供更多的动物疾病模型。

1 材料与方法

1.1 动物与饲料

清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,购自南华大学实验动物中心,2 月龄,体重 173 ± 9 g。大鼠用标准颗粒饲料由南华大学实验动物中心提供。高脂饲料由基础饲料加入 3% 胆固醇、0.2% 丙基硫氧嘧啶、0.5% 胆酸钠、5% 白糖以及 10% 猪油。胆固醇与胆酸钠购自 Sigma 公司。

1.2 试剂和仪器

丙硫氧嘧啶片,南通精华制药股份有限公司(090202)。90% 敌百虫原药,湖南沙隆达股份有限公司(20060707001)。1% 敌百虫溶液的配制^[6,7]:先配成 10% 的敌百虫母液,用新鲜且 pH ≤ 5.5 的双蒸水(高压灭菌冷却)溶解 90% 的敌百虫原粉,涡旋混匀,过滤除菌,4 ℃ 保存。1% 敌百虫应用液即取 10% 敌百虫母液 1 mL 用新鲜且 pH ≤ 5.5 双蒸水稀释 10 倍。TC、TG、HDLc 及 LDLc 诊断试剂盒,均为德国罗氏诊断有限公司生产。H7600 全自动生化分析仪,为德国罗氏公司生产,Nikon E200 光学显微镜,日本 Nikon 公司。

1.3 模型的制备

大鼠雌雄分笼喂养,均适应性喂养 7 天后称重,随机抽取 10 只作为普食对照组,以基础饲料喂养,其余为动脉粥样硬化模型组,喂以高脂饲料,并以每天 10 mg/kg 敌百虫腹腔注射,注射容量为每天 1 mL/kg,而对照组大鼠腹腔每天注射 1 mL/kg 新鲜且 pH ≤ 5.5 灭菌双蒸水,所有大鼠均自由进食、饮水 8 周。每 2 周为大鼠称 1 次体重,根据体重调整敌百虫给药剂量。

1.4 取材与指标检测

在实验给药前和给药后第 4、8 周分别用 4% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠断尾采血,室温静置 30 min 后,3 000 rpm 离心 30 min,收集血清,保存于 -70 ℃ 冰箱中,备样。用德国罗氏诊断有限公司试剂盒、全自动生化分析仪检测大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLc)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLc);AI 值由公式 $AI = (TC - HDLc) / HDLc$ 计算;另在第 8 周末采血时留 50 μL 全血加入以 0.1% 肝素钠抗凝的采血管中,采用羟脲酸铁比色法测定大鼠全血乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, AchE)活性^[8],第 8 周末所有大鼠摘取大鼠肝脏及主动脉弓,肉眼和苏木素—伊红(HE)染色后观察各组大鼠主动脉弓及肝脏病理形态学变化;同时摘取心脏分离其周围组织后称重,计算其脏器指数即心脏重量(HW)与第 8 周末体重(BW)比值。

1.5 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般状况

在实验前体重无明显差异,对照组的大鼠体重随饲养时间的延长而增加。模型组大鼠体重出现先增加后降低现象。实验过程中共有 1 只大鼠死亡,其中模型组死亡 1 只,对照组无死亡。剔除各组中体重、血脂异常者共 3 只,实际每组均取 6 只且雌雄各半进行统计分析。表 1 数据显示,与对照组比较,模型组心脏重量均有所降低($P < 0.01$),但两组大鼠心脏重量/体重比值无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 实验末期两组大鼠心脏重量/体重比值($n = 6$)
Table 1 The weight of heart/weight of rats at the experimental end($n = 6$)

组 别	体重(g)	心脏重量(g)	心脏重量/体重 (g/g, × 10 ⁻³)
对照组	259 ± 23	0.8477 ± 0.0844	3.31 ± 0.16
模型组	190 ± 15 ^a	0.6122 ± 0.0451 ^a	3.24 ± 0.19

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 全血 AchE 活性

实验第8周末检测大鼠全血 AchE 活性,模型组为 89.90 ± 9.04 ;而对照组为 95.44 ± 11.55 ,两组比较差异无显著性($P > 0.05$)。证明给SD大鼠腹腔每天注射10 mg/kg的敌百虫并不影响全血 AchE 活性,达到了实验预期的目的。

2.3 血脂含量

0周时,两组血清TC、TG、HDLc和LDLc含量均无显著差异($P > 0.05$),HDLc/TC比值与AI值

也无显著差异($P > 0.05$)。给药后第4周、8周末:模型组大鼠血清TC、LDLc、HDLc含量和AI值均较对照组明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而HDLc/TC值则明显降低($P < 0.001$)。两组大鼠血清TG含量无显著差异($P > 0.05$)。表2~4可见,模型组大鼠TC、HDLc、LDLc含量及AI比值与对照组比较有明显的增高($P < 0.05$),HDLc/TC比值有明显的降低($P < 0.01$),而TG虽有所增高,但无统计学差异($P > 0.05$)。

表2 两组大鼠血清TC、TG含量比较(n=6)

Table 2 Comparison of the levels of TC and TG in the two groups(n=6)

组别	TC (mmol/L)			TG (mmol/L)		
	0周	4周	8周	0周	4周	8周
对照组	1.44 ± 0.36	1.48 ± 0.13	1.40 ± 0.19	0.53 ± 0.20	0.57 ± 0.13	0.85 ± 0.20
模型组	1.40 ± 0.31	16.52 ± 3.13^b	12.27 ± 1.75^a	0.48 ± 0.13	0.72 ± 0.37	0.55 ± 0.19

与对照组比较,a: $P < 0.01$,b: $P < 0.001$

表3 两组大鼠血清HDLc、LDLc含量比较(n=6)

Table 3 Comparison of the levels of HDLc and LDLc in the two groups(n=6)

组别	HDLc (mmol/L)			LDLc (mmol/L)		
	0周	4周	8周	0周	4周	8周
对照组	0.98 ± 0.16	1.12 ± 0.08	1.06 ± 0.19	0.35 ± 0.26	0.27 ± 0.18	0.18 ± 0.08
模型组	1.01 ± 0.18	1.50 ± 0.20^c	2.15 ± 0.21^b	0.33 ± 0.19	14.87 ± 3.07^a	9.90 ± 1.95^a

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

表4 两组大鼠血清HDLc/TC比值与AI值比较(n=6)

Table 4 Comparison of the number of HDLc/TC and AI in the two groups(n=6)

组别	HDLc/TC			AI		
	0周	4周	8周	0周	4周	8周
对照组	0.72 ± 0.11	0.76 ± 0.09	0.76 ± 0.06	0.44 ± 0.26	0.33 ± 0.18	0.72 ± 0.11
模型组	0.73 ± 0.05	0.09 ± 0.02^b	0.18 ± 0.04^a	0.38 ± 0.11	10.11 ± 2.24^a	4.77 ± 1.16^a

与对照组比较,a: $P < 0.01$,b: $P < 0.001$

2.4 主动脉形态学观察

HE染色镜下显示图1A、B,对照组主动脉管壁各层结构清晰,内膜光滑完整,与中膜分界清晰,管壁厚薄相对均匀,无增生;内皮细胞结构完整光滑,未见脂质浸润;中膜层弹力纤维膜曲状平行排列,未见病理改变,外膜较薄,未见脂肪组织增多。而高脂加敌百虫模型组大鼠主动脉管壁各层结构欠清晰,内膜明显或局部增厚,不光滑,内皮细胞呈连续性或局部缺失,内皮下间隙增宽,可见排列紊乱迁移的平滑肌细胞增生,内有脂质沉积、大小不等、形态不规

则的泡沫细胞,靠近内膜的中膜平滑肌细胞明显增生、细胞排列紊乱、疏松,间隙增宽可见脂质沉积,并向内膜迁移;弹力纤维层结构不清晰,排列欠规则,局部有断裂现象,外膜有不同程度的脂质浸润。

2.5 肝脏形态学观察

HE染色光镜观察,与对照组比较,模型组可见肝细胞呈空泡状,大部分脂肪变性肝细胞的细胞膜消失,相互融合,有的核仁被融合的脂滴挤到一边或消失,胞质疏松状,肝索排列紊乱,有明显的炎症反应(图1C、D)。

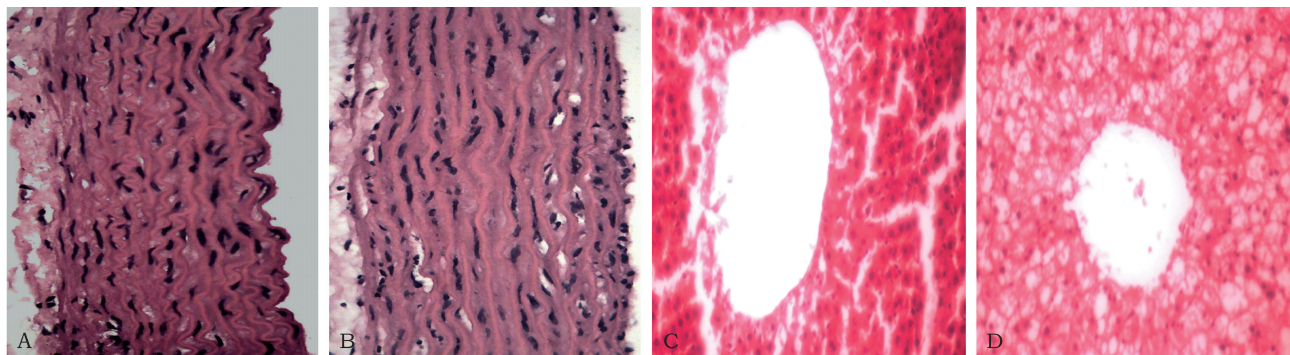


图1 主动脉弓及肝脏组织形态学变化(HE染色,40×10)。A:主动脉对照组,B:主动脉模型组,C:肝脏对照组,D:肝脏模型组

Fig.1 Pathologic picture of rat's aorta (A:control group,B:model group)and liver (C:control group,D:model group) under light microscope(HE staining,40×10)

3 讨 论

3.1 As 模型动物的选择

As 动物模型常选用:兔、大鼠、小香猪、鸡、鹌鹑和猴等,其中小香猪和猴的系统发育和饮食结构类似于人,其病变特点及分布等均近似于人,但它们购买费用及饲养成本比较昂贵,不适合模型动物的大规模使用;家兔和大鼠是目前研究 As 最常用的模型动物。与家兔相比,大鼠具有成本低廉、饲养方便、生存能力强、死亡率低、生理解剖与人类相似及运用于实验研究的大鼠商用抗体种类丰富等优点,Russell 等^[9]认为大鼠及小鼠等啮齿类小动物是研究心血管疾病最实用而有效的动物;吴端生等^[10]认为:由于大鼠血管和血管阻力对药物反应敏感,最适合心血管药理的研究。因此,本实验选择 SD 大鼠作为实验室研究 As 的动物模型。

用高胆固醇、高脂肪饲料长期喂养动物是目前复制 As 动物模型比较常用的方法。敌百虫是一种广泛使用的有机磷酸酯杀虫剂,其药理活性主要是通过乙酰胆碱酯酶介导,抑制胆碱酯酶活性。本课题组已采用低毒性、低剂量(每天 18 mg/kg)有机磷农药敌百虫诱导主动脉内皮损伤,高脂饲料及敌百虫联合应用已成功建立家兔 As 模型^[3]。由于大鼠无胆囊,单纯用含大量胆固醇的饲料不易使大鼠血清胆固醇增高,故不易形成 As 病变^[11];故本实验利用 SD 大鼠高脂饲料喂养同时予低剂量敌百虫腹腔注射(每天 10 mg/kg)诱导 As 病变,此方法在国内外尚未见文献报道。敌百虫可通过消耗机体 PON1 或通过改变 eNOS 表达致 NO 代谢紊乱,促进动脉粥样硬化的形成^[3,12]。此外,实验采用了腹腔注射的方法,给药均匀,吸收利用率高。

样硬化的形成^[3,12]。此外,实验采用了腹腔注射的方法,给药均匀,吸收利用率高。

3.2 实验结果与评价

本实验使用 10 mg/kg 给大鼠腹腔注射,结果显示,给予敌百虫组 AchE 与未给敌百虫之间差异无显著性($P > 0.05$);实验过程中敌百虫组大鼠表现出了胃肠道、骨骼肌本身具有的不良反应。因此,给 SD 大鼠腹腔每天注射 10 mg/kg 的敌百虫并不影响大鼠全血 AchE 活性,达到实验预期的目的。

第 4 周和第 8 周末结果发现:模型组大鼠血清 TC、LDLC、HDLc 含量和 AI 值均明显高于对照组($P < 0.05$),而 HDLC/TC 值则明显低于($P < 0.001$)对照组。

病理形态学检查发现 As 模型组大鼠均有不同程度的主动脉内皮细胞肿胀,局部脱落现象,内皮细胞损伤,脂质及炎性细胞浸润,泡沫细胞形成,平滑肌细胞增殖、排列紊乱、疏松,间隙增宽,并向内层迁移均符合 As 血管病理学变化特征。

谢作焯等^[15]在研究高脂血症影响 As 形成的有关因素时,发现实验组的大鼠和家兔均成功地复制出高脂血症,而在实验性大鼠组未见动脉粥样斑形成,在实验性家兔组仅 6 周时间 100% 动物的血管和心内血管形成了明显的动脉粥样斑。大鼠随着喂养高胆固醇时间的延长其血 HDLC 也随着增高(1.95 nmol/L 增高至 7.61 nmol/L),但是家兔血 HDLC 并不随血总胆固醇的升高而增加或增加不明显。

本实验结果显示,与对照组比较,高脂加敌百虫腹腔注射的模型组大鼠随着实验时间的延长其血清中 HDLC 也随着升高,0 周、4 周和 8 周末分别为 0.97 mmol/L、1.5 mmol/L 和 2.15 mmol/L,这可能

是 SD 大鼠难以形成典型的粥样斑块的最主要原因之一。

此外,与对照组比较,模型组 TG 水平升高不明显,文献[16-17]报道,不同饮食对 SD 大鼠血清的 TG 水平影响非常明显,并认为 SD 大鼠是研究血清 TG 最合适的动物模型。

综上所述,本实验初步建立了 SD 大鼠 As 模型,可作为研究人类长期接触低剂量、低毒性有机磷酸酯类农药引起的大血管病变及其药物治疗的动物模型。

参考文献:

- [1] Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine [J]. *Acta Biomed*, 2005, 76(Suppl2):50-57.
- [2] van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, et al. The story of PON1: how an organo-phosphate hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine [J]. *Neth J Med*, 2006, 64(2):34-38.
- [3] 李荣霏, 谢利, 郭鹏程, 等. 敌百虫对兔食饵性动脉硬化加速作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(8): 1422-1424.
- [4] Singh V, Tiwari RL, Dikshit M, et al. Models to study atherosclerosis: a mechanistic insight [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009, 7(1):75-109.
- [5] 赵娟, 任立群. 大鼠动脉粥样硬化模型的复制 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(23):4139-4141.
- [6] Ranaldi R, Gambuti G, Eichenlaub-Ritter U, et al. Trichlorfon effects on mouse oocytes following in vivo exposure [J]. *Mutat Res*, 2008, 651(1-2):125-130.
- [7] Hinz VC, Grewig S, Schmidt B H. Metrifonate and dichlorvos; effects of a single oral administration on cholinesterase activity in rat brain and blood [J]. *Neurochem Res*, 1996, 21:339-345.
- [8] WS/T 66-1996, 中华人民共和国卫生行业标准全血胆碱酯酶活性的分光光度测定方法羟胺三氯化铁法 [S].
- [9] Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease; tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2006, 15:318-330.
- [10] 吴端生, 张 建. 现代实验动物学技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. 50-51.
- [11] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化复制方法的比较 [J]. *中国动脉粥样硬化杂*, 2003, 11(5):465-468.
- [12] Dantoine T, Debord J, Merle L, et al. From organophosphate compound toxicity to atherosclerosis: role of paraoxonase 1 [J]. *Rev Med Interne*, 2003, 24(7):436-442.
- [13] Reiner E, Krauthacker B, Simeon V, et al. Mechanism of inhibition in vitro of mammalian acetylcholinesterase and cholinesterase in solutions of 0, 0-dimethyl-2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate (Trichlorphon) [J]. *Biochem Pharmacol*, 1975, 4:717-722.
- [14] Arao T, Fuke C, Takaesu H, et al. A case of fatal trichlorfon and methidathion poisoning [J]. *Legal Medicine*, 2002, 4(3):182-186.
- [15] 谢作煊, 李梅兰, 何文芳. 家兔和实验性动脉粥样硬化的比较研究 [J]. *解剖学研究*, 2000, 22(2):98-100.
- [16] Ching-Yi Lin, Cheng-Yu Tsai, Shyh-Hsiang Lin. Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(35):5549-5552.
- [17] Gao Y, Li K, Tang S, et al. Study on animal models for hyperlipidemia [J]. *Weisheng Yanjiu*, 2002, 31:97-99.