

钙化性主动脉瓣疾病动物模型研究进展

李 宁 刘晓红 龚德军 徐志云

【摘要】 钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)曾被认为是一种退行性疾病,近年来发现 CAVD 是主动的病理进程,但具体发病机制尚未阐明。借助动物模型,能在体内复杂的生化环境中研究 CAVD 的发病机制及可能的治疗手段。选择动物模型多以建模所需时间为主要参考因素,此外还受物种差异、瓣膜组织结构、脂质代谢模式等影响。该文介绍常用的 CAVD 动物模型构建方法。

【关键词】 钙化性主动脉瓣疾病;动物模型;构建方法

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.004

钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)曾被认为是一种退行性疾病,但近年来研究发现其为主动脉瓣膜间质细胞(AVICs)调控的主动过程。CAVD 呈进行性发展,早期表现为主动脉瓣硬化,后逐渐发展为主动脉瓣狭窄。目前国内尚缺乏 CAVD 的流行病学调查资料,但 CAVD 是欧美发达国家人群第三大常见心血管疾病,美国 65 岁以上人群中主动脉瓣硬化患病率超过 25%^[1]。CAVD 具体发病机制尚未阐明,慢性炎症^[2]、细胞凋亡^[3]、异位钙化^[4]等都可能与 CAVD 进展有关。借助动物模型可在体内复杂的血流动力学及生化环境中观察 CAVD 的病理生理过程和药物干预效果,因此选择合适的动物模型至关重要。

1 动物模型的筛选标准

筛选 CAVD 模型需要考虑以下几个因素:建模所需时间、瓣膜组织结构、脂质代谢模式以及特定的实验检测指标,目前尚缺乏理想的 CAVD 动物模型。理想的 CAVD 动物模型应能模拟人 CAVD 的特点,即瓣膜组织形态、临床症状、影像学检查结果与人 CAVD 具有相似性。以往对于 CAVD 的病理学研究可以作为评估动物模型是否成功的标准,具体如下:存在由复杂炎症导致的瓣叶增厚,包括淋巴细胞浸润、巨噬细胞和内皮细胞活化及功能失调;脂质沉积,细胞外基质分泌增多;瓣膜中成骨相关蛋白骨钙蛋白(OCN)、骨桥蛋白(OPN)、碱性磷

酸酶(ALP)、Runt 相关转录因子 2(Runx2)等表达上调;瓣膜钙化结节形成。心脏彩超等影像学检查结果也应与人 CAVD 相似,包括跨主动脉瓣血流流速增加、跨主动脉瓣压差增大以及主动脉瓣瓣口面积减小等。

2 CAVD 动物模型的构建

构建动物模型所需时间是筛选动物模型最重要的因素。猪可以自发地形成主动脉瓣钙化,而家兔、小鼠则只有在特定的条件下才能形成。自发形成瓣膜钙化所需的时间较长,因此要将实验动物暴露在 CAVD 危险因素(雄性、高龄、高脂高胆固醇饮食、特定基因背景、钙磷代谢障碍等)中,诱发并加速瓣膜钙化的进程。基因干预、饮食干预、药物干预或三者的联合应用都能成功构建 CAVD 动物模型,常用的 CAVD 动物模型有以下几类。

2.1 小鼠

小鼠 CAVD 模型的应用最为广泛,优势在于实验成本低、管理方便、生命周期短且能构建基因突变体系。因小鼠对饮食干预介导 CAVD 较为耐受,故通常采用基因干预或基因与饮食联合干预的方法构建 CAVD 模型。

Galvin 等^[5]将小鼠的 Madh6 基因敲除 6 周后,由于其抑制转化生长因子- β 1(TGF- β 1)信号通路的 Smad6 基因,使其不能被编码,导致小鼠瓣膜增生和软骨化生。相似地,Luo 等^[6]研究发现,基质 γ -羧基谷氨酸蛋白敲除小鼠的血管平滑肌细胞可以自发形成钙化,通常在 2 个月之内因动脉钙化导致血管破裂而死亡。养育载脂蛋白 E(ApoE)敲除小鼠 30 个月,其主动脉瓣跨瓣压差增大,提示主动脉瓣

狭窄^[7]。有研究发现,养育 Klotho 基因敲除鼠 6~8 周之后,主动脉瓣中 Runx2 蛋白表达上调,有明显的钙化结节形成^[8]。

基因与饮食干预在构建 CAVD 动物模型过程中起协同作用。Aikawa 等^[9]喂养 ApoE 敲除小鼠高脂饮食(含 42%乳脂、0.2%总胆固醇)20 周后,在该动物模型主动脉瓣中检测到 OCN、OPN、ALP、Runx2 的表达,提示 CAVD 的早期改变。Weiss 等^[10]喂养低密度脂蛋白受体敲除小鼠 Ldlr^{-/-} 20 个月,发现小鼠左心室肥厚伴射血分数降低,同时合并中度高胆固醇血症及中度主动脉瓣钙化。与单纯高脂饮食相比,高脂高碳水化合物饮食可能更符合人类饮食习惯。用高脂高碳水化合物饮食(摄入的总能量 59%来自未添加胆固醇的脂肪)处理野生型和 Ldlr^{-/-} 小鼠,发现 Ldlr^{-/-} 小鼠主动脉瓣跨瓣流速增大,主动脉瓣瓣口面积缩小,伴瓣叶增厚以及钙沉积^[11]。

与正常人的三叶式主动脉瓣相比,先天性二叶式主动脉瓣畸形更容易形成主动脉瓣硬化和狭窄。Notch1 蛋白可以抑制骨形态发生蛋白-2(BMP-2)通路从而抑制瓣膜钙化。人 Notch1 基因突变可以导致先天性二叶式主动脉瓣畸形及 CAVD^[12]。用 0.2% 胆固醇喂养 Notch1 基因杂合子鼠(Notch1^{+/-})10 个月,其发生主动脉瓣钙化的概率是野生型小鼠的 5 倍^[13]。瓣膜内皮细胞(VECs)可以合成内皮型一氧化氮合酶(eNOS),但是在先天性二叶式主动脉瓣畸形的患者中,其表达减少。eNOS 基因敲除鼠较野生型小鼠更易形成二叶式主动脉瓣畸形^[14]。

还有学者利用组织损伤应答理论构建 CAVD 动物模型。Honda 等^[15]在超声心动图引导下,将弹簧导丝经小鼠右颈总动脉置入左心室损伤小鼠主动脉瓣,1 周后复查发现小鼠跨主动脉瓣血流流速增加;4 周后,小鼠主动脉瓣瓣叶显著增生,左室射血分数降低,瓣膜中成骨相关蛋白表达上调;12 周后,瓣膜组织茜素红染色显示瓣膜钙化。

在同等经费条件下,采用小鼠模型可以增大样本量,使统计数据更可靠。但小鼠模型也有一定的局限:(1)小鼠瓣膜解剖结构与人类瓣膜不同,其主动脉瓣并不是 3 层组织结构;(2)野生型小鼠不能自发出现主动脉瓣钙化,必须要在一定基因修饰甚至联合饮食等其他干预的条件下才能形成;(3)制备小鼠主动脉瓣钙化模型耗时较长;(4)小鼠主动脉

瓣瓣叶较小,一般只适用于组织学检测。

2.2 兔

兔 CAVD 模型的构建主要依靠饮食和药物干预介导,其优势在于:(1)兔的主动脉瓣是 3 层组织结构,与人主动脉瓣结构相似;(2)兔对饮食中的胆固醇和脂肪较为敏感,脂蛋白代谢也与人类相似;(3)兔体型中等,血容量大,取血方便;(4)兔对维生素 D₂ 敏感,可用药物进行干预,促进钙盐沉积。标准的兔模型是新西兰白兔,体质量 1.6~3 kg。常用的 4 种建模干预方案如下:(1)短期高胆固醇(2%);(2)中度胆固醇(0.5%~1%)加维生素 D₂; (3)长期低胆固醇(0.125%~0.25%);(4)单纯维生素 D₂。

据报道,经过 4 周高胆固醇(2%)饮食之后,兔主动脉瓣内皮下可见低密度脂蛋白堆积,瓣膜间质组织中可见胶原纤维增生^[16]。随着养育时间延长,12 周可以观察到 AVICs 凋亡数量增加,40 周可发生早期主动脉瓣狭窄,并且能在瓣膜中检测到 OPN 的表达^[17]。Drolet 等^[18-19]分别用胆固醇(0.5%)、维生素 D₂ (50 000 IU/d)以及两者联合饲养新西兰白兔 12 周,超声下发现单纯高胆固醇饮食组或者单纯维生素 D₂ 处理组瓣膜回声增强,提示主动脉瓣硬化,高胆固醇饮食与维生素 D₂ 两者合用组可见主动脉瓣瓣口面积明显减小,提示合并使用维生素 D₂ 可以显著促进钙沉积和主动脉瓣狭窄的进展。

应用低胆固醇饮食(0.12%~0.25%)构建 CAVD 兔模型所需的时间相对较长,喂养 5 个月时,瓣膜间质中可见胶原排列紊乱及脂质沉积,病变处可检测出 OPN 的表达。喂养 10~15 个月后,病变加重,直到 30 个月才能观察到显著的钙化^[20]。Ngo 等^[21]用维生素 D₂ (25 000 IU/2 d)喂养新西兰白兔 8 周,与正常组相比,维生素 D₂ 处理组钙沉积、跨主动脉瓣压差及流速显著增加,但单纯使用维生素 D₂ 并不能形成严重的主动脉瓣狭窄。维生素 D₂ 介导瓣膜钙化的机制尚未阐述清楚,可能与维生素 D 受体遗传多态性及氧化应激有关。此外,研究主动脉瓣狭窄的治疗效果时,也可以利用兔模型。Rajamannan 等^[22]发现,阿托伐他汀能调节高脂饮食兔模型的瓣膜细胞增殖以及骨化相关基因的表达。

2.3 猪

相对于鼠和兔模型,猪模型可能更适用于研究 CAVD,其优势在于:(1)猪的心脏解剖与人相似,主动脉瓣组织为 3 层结构;(2)无需特殊处理,随着饲养时间的延长,猪可自然形成血管和瓣膜病变;

(3)猪的血脂代谢与人类相似,特别是低密度脂蛋白代谢;(4)猪的基因组与人类相似,染色体结构和序列与人类同源。

Guerraty 等^[23]用高脂高胆固醇饮食(12%脂肪、1.5%胆固醇)饲养猪模型 6 个月,肉眼可见猪主动脉瓣局部增厚、不透明,组织学上可见瓣膜间质中脂质沉积及钙结节形成。Simmons 等^[24]发现,猪主动脉侧 VECs 中多种抑制瓣膜钙化的基因表达含量显著低于心室侧的 VECs。而人瓣膜组织病理结果显示钙盐多沉积于主动脉侧内皮下,提示 VECs 表型异质性与区域钙化易感性可能存在一定联系。此外,猪瓣膜可作为生物工程瓣膜材料来源,用于替换功能受损的人主动脉瓣,故研究猪主动脉瓣钙化的病理生理机制具有重要意义。

动物模型为研究 CAVD 的机制及干预提供了便利,弥补了细胞实验变量单一的不足。不同动物模型各有优缺点,可以根据研究目的选择合适的模型。

参 考 文 献

[1] Beckmann E, Grau JB, Sainger R, et al. Insights into the use of biomarkers in calcific aortic valve disease[J]. J Heart Valve Dis, 2010, 19(4):441-452.

[2] Lerman DA, Prasad S, Alotti N. Calcific aortic valve disease: molecular mechanisms and therapeutic approaches [J]. Eur Cardiol, 2015, 10(2):108-112.

[3] Galeone A, Brunetti G, Oranger A, et al. Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand [J]. Int J Cardiol, 2013, 169(4):296-304.

[4] 袁昭顺, 冯翔, 廖晓波. 主动脉瓣钙化性狭窄的异位钙化机制[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(2):69-71

[5] Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, et al. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system[J]. Nat Genet, 2000, 24(2):171-174.

[6] Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein [J]. Nature, 1997, 386(6620):78-81.

[7] 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.

[8] Cheek JD, Wirrig EE, Alfieri CM, et al. Differential activation of valvulogenic, chondrogenic, and osteogenic pathways in mouse models of myxomatous and calcific aortic valve disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(3):689-700.

[9] 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.

[10] Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, et al. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice [J]. Circulation,

2006, 114(19):2065-2069.

[11] 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.

[12] Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease[J]. Nature, 2005, 437(7056):270-274.

[13] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(6):828-834.

[14] Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, et al. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase[J]. Circulation, 2000, 101(20):2345-2348.

[15] 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.

[16] Nievelstein-Post P, Mottino G, Fogelman A, et al. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit[J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(7):1151-1161.

[17] Cimini M, Boughner DR, Ronald JA, et al. Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis; an immunohistochemical and histological study [J]. J Heart Valve Dis, 2005, 14(3):365-375.

[18] Drolet MC, Couet J, Arsenault M. Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits; role of cholesterol and calcium[J]. J Heart Valve Dis, 2008, 17(4):381-387.

[19] Drolet MC, Arsenault M, Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(7):1211-1217.

[20] Hamilton AM, Boughner DR, Drangova M, et al. Statin treatment of hypercholesterolemia-induced aortic valve sclerosis[J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20(2):84-92.

[21] Ngo DT, Stafford I, Kelly DJ, et al. Vitamin D (2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 590(1-3):290-296.

[22] 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.

[23] Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, et al. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway activation in swine aortic valve endothelium [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(2):225-231.

[24] Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, et al. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves[J]. Circ Res, 2005, 96(7):792-799.

(收稿:2014-10-14 修回:2014-10-22)

(本文编辑:丁媛媛)