维普资讯 http://www.cqvip.com

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0153-05

·文献综述·

血管钙化动物模型的研究进展

段晓辉[1]，齐永芬[1,2]综 述， 唐朝枢[1,2]审 校

(1.北京大学第一医院心血管病研究所，北京市 100034；2.北京大学医学部生理学与病理生理学系，北京市 100083)

[关键词] 医学实验动物学； 血管钙化； 动物模型； 药物诱导； 慢性肾功能衰竭； 基因敲除； 高脂饮食

[摘 要] 血管钙化是临床上多种疾病共有的病理表现，为阐明其发病因素和发病机制，有赖于可靠、稳定的动物模型。常见的制备动物血管钙化模型的方法有药物诱导、慢性肾功能衰竭、基因敲除和高脂饮食近交培育四种，各有其适用范围和局限性。本文对近年来血管钙化动物模型制备的研究进展作简要综述。

[中图分类号] R332 [文献标识码] A

血管钙化是动脉粥样硬化(atherosclerosis，As)、高血压、糖尿病血管病变、血管损伤、慢性肾病和衰老等普遍存在的病理表现，主要表现为血管壁僵硬性增加，顺应性降低，易导致心肌缺血、左心室肥大和心力衰竭，引发血栓形成、斑块破裂，是心脑血管疾病高发病率和高死亡率的重要因素之一。血管影像学和细胞生物学的发展证实血管钙化是一个与骨发育类似的主动的、可预防和可逆转的高度可调控的生物学过程。血管钙化主要表现为钙磷产物在动脉壁的细胞间和细胞内的聚集。细胞外的钙磷升高不仅使钙磷乘积(Ca×P)增加，而且可使血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells，VSMC)膜上钠磷共转运体开放，增加细胞内的磷水平，诱发凋亡，产生凋亡小体和基质囊泡，使 VSMC 向成骨细胞样表型转化。目前认为许多因素都参与了血管钙化的发病过程，提出了骨形成蛋白调节学说、细胞控制学说、凋亡体基质囊泡学说和氧化应激学说等多种假说，但这些学说均不能完全说明血管细胞向骨细胞表型转化的机制，难以解释临床常见血管钙化与骨质疏松并存的现象。目前常用来诱导在体血管钙化的实验动物有小鼠、大鼠、兔和微型猪等，最常用的鼠血管钙化模型的方法主要有药物诱导、慢性肾功能衰竭、基因敲除和高脂饮食近交培育等 4 种。现将近年来血管钙化模型制作的研究进展简述如下。

1 药物诱导

维生素 D3、华法令、尼古丁、氯化钙单独或联合应用均可诱导大鼠和小鼠的动脉钙化。其操作相对比较简便，诱导时间较快，成活率高，成本较低，作为常用的血管钙化动物模型的制备方法广泛地用于基础研究。

[收稿日期] 2007-09-26 [修回日期] 2007-11-29
[基金项目] 国家自然科学基金(30470693)；教育部新世纪优秀人才基金(NCET-05-0016)；科技部“973”重大血管性疾病发病机制和防治的基础研究(2006CB503807)

[作者简介] 段晓辉，硕士研究生，主要从事血管损伤性疾病发病机制研究，联系电话为 010-82802851，E-mail 为 duanxiaohui19820@163.com。齐永芬，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事心血管疾病发病与防治，联系电话为 010-82802851。通讯作者唐朝枢，硕士，教授，博士研究生导师，研究方向为心血管疾病基础与临床研究，联系电话为 010-82805222，E-mail 为 tangchaoshu@263.net.cn。

1.1 维生素 D3 诱导

生理状况下，体内的维生素 D3 主要来源于阳光中紫外线 B 段光谱照射后皮肤的合成以及食物摄取，维生素 D3 在体内经肝和肾的羟基化反应，生成有活性的 1,25-二羟维生素 D3，维生素 D3 与其结合蛋白结合发挥生物学效应。除骨组织外，体内几乎所有的组织均有维生素 D3 的受体，包括 VSMC、心肌细胞和血管内皮细胞[1]。血浆高甲状旁腺激素(parathyroid hormone，PTH)和低磷水平能使肠道钙摄入增加，进而增加血钙促进活性维生素 D3 的合成。在人体，用中毒剂量的维生素 D3 可诱导出现高钙血症、高钙尿、食欲不振、恶心、昏迷、异位软组织的钙化、肾钙质沉着及肾功能衰竭。中毒剂量的维生素 D3 诱导动脉弹力层钙化已有 70 余年的历史。维生素 D3 能够有效促进骨的重吸收，使血清钙水平升高 30%以上。Price 等[2]报道给 7 周龄雄性 SD 大鼠皮下注射维生素 D3 50 万单位/(kg·d)，持续 3 d 能使大鼠出现广泛的主动脉、股动脉、肠系膜动脉、肝动脉、肾动脉和颈动脉的钙化，血清钙水平上升 30%以上。但这种血管钙化大鼠同时并发肺、气管、肾、胃、小肠等脏器广泛钙化。但这种钙化模型难以模拟临床血管钙化的病因，因为机体存在对维生素 D3 摄取和代谢的稳态调节，除医源性外，自然病程很难使体内维生素 D3 的蓄积量达到这种诱导剂量[3]。

1.2 华法令诱导

华法令是维生素 K 的抑制剂，在临床上作为抗凝剂广泛用于治疗血栓性疾病。依赖维生素 K1 的基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein，MGP)γ 羧化后产生的羧化基质 Gla 蛋白是血管钙化的抑制因子，华法令通过拮抗维生素 K1 而抑制羧化基质 Gla 蛋白的生物合成发挥其致动脉钙化的作用。Price 等给 6 周龄雄性 SD 大鼠每 12 h 背部皮下注射华法令 150 mg/kg，同时为有效防止华法令引起的出血，每天再给予维生素 K1 15 mg/kg 连续 3 周即可诱导动脉中膜弹力层钙化[4]。这种模型显著增加了钙化血管的 MGP mRNA 和蛋白质的水平但下调血清 MGP 水平，但不影响骨的生长和重吸收、体重的增加以及血清钙磷含量，且这种大鼠不出现骨量减少以及由此而产生的病理性骨折[4]。Price 等[5]给 20 d 龄的雄性 SD 大鼠华法令 2 周，主动脉中膜出现大量的局灶性

维普资讯 http://www.cqvip.com

钙化,但对6周龄的大鼠动脉钙化的诱导作用不明显;给予10月龄的大鼠华法令4周,检测不到动脉钙化。有趣的是给20 d龄雄性SD大鼠限量饮食(<6 g/d)下给予华法令也不能产生动脉钙化。这些结果表明华法令能否诱导产生血管钙化与大鼠的年龄和生长状况有关。

1.3 华法令和维生素D3的联用

华法令和维生素D3的联用能明显增加动脉中膜弹力层钙化的范围。Price等[5]给24周龄雄性SD大鼠皮下注射维生素D3 30万单位/(kg·d)连续3 d,同时每12 h皮下注射华法令150 mg/kg,且在注射维生素D3前的48 h即开始辅之维生素K1 15 mg/(kg·d)皮下注射,4 d后出现明显的动脉中膜弹力层钙化。维生素D3诱导血管钙化的作用与其升高血钙有关,其血管钙化效应与血清钙水平呈正相关。而华法令则是通过抑制MGP的活性诱导血管钙化。华法令和维生素D3的联用能促进骨的重吸收,从而更快、更广泛地诱导血管钙化的发生。但华法令能增加维生素D3诱导血管钙化鼠死亡率,研究表明单独用维生素D3诱导血管钙化的大鼠全部存活,但两者联用者3 d存活率100%,4 d存活率为75%,6 d存活率为40%,在9 d时所有动物全部死亡。

1.4 维生素D3和尼古丁联用

Niederhoffer等[6]联用维生素D3和尼古丁制备出模拟衰老、终末期肾病和糖尿病血管病变的大鼠血管钙化模型。大剂量维生素D3可造成动脉组织钙含量增加,尼古丁可增强维生素D3的作用。上午9时给予两月龄的雄性Wistar大鼠肌肉注射维生素D3 30万单位/kg和灌胃25 mg/kg尼古丁,当日下午6时再重复给尼古丁一次,两个月后发生了广泛的血管中膜钙化,伴有血管弹力蛋白降解,弹力纤维网的破坏,动脉壁的僵硬性增加,脉压升高和左心室肥大。大鼠收缩期血压显著升高伴左心室的肥大,可视为是收缩期高血压模型。实验室对8周龄雄性Wistar大鼠肌肉注射维生素D3 30万单位/kg,同时用尼古丁25 mg/kg灌胃,9 h后再重复给予尼古丁1次。4周后大鼠出现广泛的血管钙化。钙化大鼠血浆钙含量、心率、平均动脉压无明显影响,可以作为一种稳定性高、重复性好的血管钙化的诱导方法[7]。但是VDN除诱导心血管组织钙化外,还伴有肾、肺、肠等多器官组织的钙超载。

1.5 氯化钙诱导

Basalyga等[8]暴露成年SD大鼠的腹主动脉后,其外膜用浸有0.15 mol/L氯化钙溶液的无菌纱布湿敷15 min,7 d后能明显诱导相应区域血管的钙化。钙化区域有弹性纤维降解、细胞外基质的结构破坏以及血管细胞中等程度的凋亡,但不会出现由更高浓度氯化钙诱导血管钙化时所伴有的动脉瘤和炎症反应的发生。Longo等[9]发现在此过程中基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2)和MMP-9降解弹力蛋白,易产生腹主动脉瘤。而MMP-2基因敲除(MMP-2$^{-/-}$)和MMP-9基因敲除(MMP-9$^{-/-}$)的小鼠能对抗氯化钙所诱导血管损伤,不产生弹性蛋白的降解和血管钙化,所以氯化钙诱导血管钙化的机制与钙在弹力纤维上的沉积和MMP介导的弹性蛋白的降解有关。与此机制相似,Bailey等[9]在3~5周龄SD大鼠背部前后皮下植入两个10~15 mg纯化的弹力蛋白移植物,3周后取出发现移植物发生了钙沉积。

2 慢性肾病大鼠血管钙化

血管钙化是慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)的并发症之一,CKD大鼠的主动脉中膜钙化,这与CKD产生的继发性的甲状旁腺功能亢进和骨代谢紊乱有关。

2.1 维生素D3联合肾次全切除术

Tamura等[10]对9周龄Wistar大鼠行左肾切除术1周后再切除右肾的2/3,其生存率可达95%,在高钙(4%)高磷(1.8%)饮食喂养下,给予1,25-二羟维生素D3[1 μg/(kg·d)]溶解在芝麻油中灌胃3周,可以出现动脉中膜的血管钙化。慢性肾病时易并发高磷血症,导致血管钙化的发生。Jono等体外培养人VSMC发现磷以剂量依赖的方式增加VSMC的钙化,同时增加钙化区钠—磷共转运体(Pit-1)的表达。磷亦能促进核心结合因子α-1的活性以及其下游的成骨细胞分化标志物骨钙素的表达。在软骨细胞中钙化的VSMCs所释放的高磷负荷的基质囊泡亦发现有钠—磷共转运体的存在,推测磷通过Pit-1转运至VSMC内诱导VSMC转化为成骨样细胞而导致血管钙化的发生。

2.2 腺嘌呤喂养产生高甲状旁腺激素血症血管钙化

Tamagaki等[11]给予8周龄雄性SD大鼠含0.75%的腺嘌呤饮食持续4周后即可产生慢性肾功能衰竭,表现为继发性甲状旁腺功能亢进症,甲状旁腺增生,血中甲状旁腺激素急剧升高。钙磷代谢严重紊乱,骨的再吸收作用增强,主动脉、冠状动脉以及其他软组织的钙化形成。主动脉钙化主要出现在中膜,与临床上典型的慢性透析病人动脉钙化极为相似,另外,在其胃粘膜固有层和肌层可以检出转移性钙化病灶。其可能原因是高浓度腺嘌呤严重损害了肾脏的正常生理功能,甲状旁腺激素升高,血肌酐和无机磷酸盐增加,血清钙的水平下降,但钙磷乘积升高,最终肾功能衰竭,钙盐在血管等软组织沉积所致。

3 基因敲除

基因敲除小鼠血管钙化模型是利用转基因技术,把对血管钙化有抑制作用的基因缺失或替换以制备血管钙化的小鼠模型。这种方法排除了饮食和药物诱导血管钙化时所伴随的副作用和复合因素,但是其制备过程复杂,需时长,成本较高。

3.1 基质Gla蛋白缺陷小鼠

基质Gla蛋白(MGP)是一种由84个氨基酸残基组成的分子量为14 kDa的细胞外基质蛋白,主要在肾脏、心脏、软骨、VSMC、内皮细胞和巨噬细胞等部位表达。在辅助因子维生素K1的存在下,γ-谷氨酸羧化酶可将无活性的谷氨酸残基羧化为有活性的Gla残基,具有5个Gla残基的MGP与羟基磷灰石具有高度亲和力,可抑制钙沉积及羟基磷灰石晶体增长从而抑制血管钙化。Robicsek等[12]发现MGP$^{-/-}$小鼠可产生广泛的动脉弹力层钙化,包括主动脉及其大的分支、所

维普资讯 http://www.cqvip.com

有弹性动脉和肌肉动脉，同时冠状动脉内弹力层和气管、小支气管软骨钙化，伴随主动脉的软骨性化生，表现为软骨性基质Ⅱ型胶原蛋白聚糖的出现。动脉的管壁僵硬，脆性增大，易于破裂。该模型小鼠出生后 1 周出现动脉中膜钙化，两周时变化明显，3 周时中膜全部钙化，两个月时常因主动脉破裂死亡。其机制可能是 MGP 与骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic proteins 2，BMP-2)相结合阻断了 BMP-2 的作用，而 $MGP^{-/-}$ 小鼠不能抑制 BMP-2 的成骨活性而导致血管钙化的发生。近来研究还证实，脉管系统中 MGP 组织特异性敲除的小鼠如果再恢复表达 MGP 则可阻止血管钙化的发生[13]。

3.2 骨保护素缺陷小鼠

骨保护素(osteoprotegerin，OPG)是肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor，TNF)受体基因超家族的成员，在软骨组织及动脉中均有表达，是一种能在体内外抑制破骨细胞发育的分泌性蛋白。生理状态下产生的 OPG 还能维持内皮细胞的生存，降低血管对骨质的重吸收。Bucay 等[14]制备的 $OPG^{-/-}$ 小鼠出现总的骨密度的下降和骨折发生率的升高，同时产生动脉内膜和中膜的钙化，在两周时出现，两个月时最为明显，但没有 $MGP^{-/-}$ 小鼠动脉钙化范围广泛，钙化主要发生在主动脉和肾动脉，在小动脉中不明显，伴有严重的骨质疏松，其病变还可以在内源性 OPG 产生的部位出现[14]。由于 OPG 能通过核因子 κB 信号途径竞争性抑制骨保护素配体，OPG 的缺失使其抑制骨保护素配体的作用消失而产生血管钙化。Orita 等[15]最新发现，6～10 周龄的雄性 $OPG^{-/-}$ 小鼠连续 3 d 注射维生素 D3 后可见主动脉中膜 VSMC 胞浆和细胞外基质中严重的钙沉积，碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)的活性与主动脉钙化面积呈正相关，但无 VSMC 凋亡和巨噬细胞浸润。

3.3 载脂蛋白 E 缺陷小鼠

载脂蛋白 E(apolipoprotein E，ApoE)分布于乳糜微粒(carrier protein，CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein，VLDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein，HDL)中，能识别低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor，LDLR)，结合和转运脂质、稳定脂蛋白结构而参与脂蛋白代谢。载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠在上世纪 90 年代初期即广泛用于研究高胆固醇血症和 As 的斑块进展。Qiao 等[16]研究发现载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠在 As 纤维帽形成后即可产生血管钙化，2/3 的载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠在正常饮食下同时发生主动脉和冠状动脉的钙化。在高脂饮食下载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠可出现更为广泛的 As 和血管钙化。该模型广泛用于研究动脉粥样硬化和血管钙化的发病和治疗。Massy 等[17]发现载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠在慢性肾功能衰竭后期出现的尿毒症症状能加速载脂蛋白内膜以及无动脉粥样硬化的血管中膜的钙化形成。

3.4 低密度脂蛋白受体缺陷小鼠

低密度脂蛋白受体广泛分布于肝脏和动脉壁细胞的细胞膜表面，能特异性识别并结合 LDL，其主要作用是转运肝脏合成的内源性胆固醇，LDLR 缺陷是引起家族性高胆固醇血症的重要原因。Towler 等[18]用普通饮食喂养 $LDLR^{-/-}$ 小鼠并不能诱导产生肥胖、糖尿病、As 和血管钙化，而给予 8～10 周龄 $LDLR^{-/-}$ 小鼠喂养导致糖尿病的高脂饮食(含 1.25%的胆固醇和 0.5%的胆盐)，则能产生明显的主动脉钙化，表现为促进矿化和成骨分化的同源结构域转录因子 Msx2、Msx1 以及成骨细胞的基质蛋白—骨桥蛋白(osteopontin，OPN)的表达上调，von Kossa 染色证明主动脉和动脉外组织中广泛钙沉积，表明导致糖尿病的饮食诱导 $LDLR^{-/-}$ 小鼠血管钙化是通过启动成骨细胞转录调节过程来实现的。

3.5 骨桥蛋白缺陷小鼠

骨桥蛋白(OPN)是一种分泌型糖基化磷酸蛋白，在骨、软骨、肾、蜕膜和胎盘等组织中广泛表达，OPN 能与存在于破骨细胞表面的整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体结合，酸化局部的微环境，使矿物质溶解，抑制羟基磷灰石结晶的生长，并分泌蛋白酶和水解酶，降解胶原和其它的骨基质蛋白，刺激破骨细胞的骨重吸收活性。OPN 抑制血管钙化的作用可能是通过其转录后磷酸化修饰来实现的，未磷酸化的 OPN 则无此作用。Speer MY 等[19]研究发现 $OPN^{-/-}$ 小鼠破骨细胞功能异常，导致骨质的丢失，但是血管钙化的发生不明显。然而 MGP 和 OPN 基因双敲除($MGP^{-/-}/OPN^{-/-}$)的小鼠在 4 月龄时动脉钙化的程度比单纯 $MGP^{-/-}$ 小鼠更为严重，组织学检查发现动脉弹力层断裂、血管破裂并形成动脉瘤，同时发现这种双敲小鼠的 VSMCs 的标志物 β-actin 丧失，致使 VSMC 的可塑性下降并转化为成骨样细胞最终导致血管钙化的发生。从主动脉的 von-Kossa 切片染色和钙化区域的定量分析表明，60 周龄 $OPN^{-/-}$/载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠比 60 周龄载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠具有更广泛的钙化面积[20]。

3.6 胎球蛋白 A 缺陷小鼠

胎球蛋白 A(Fetuin-A)又称 α2- Heremans-Schmid 糖蛋白，是一种与矿物质具有高度亲和力的血清蛋白，是羟基磷灰石前体沉积的抑制因子，它可作为调理素促进细胞对细胞外不溶性钙的内吞作用。用电子显微镜和动态光散射实验观察发现，Fetuin-A 能够与钙和磷形成直径为 30～150 nm 的胶质状可溶性复合物从而抑制羟基磷灰石结晶的起始和初期合成，但是对已经形成的结晶体无作用。Schäfer C 等[21]用含维生素 D3 的高钙高磷饮食喂养 $Fetuin\text{-}A^{-/-}$ 小鼠可自发性地产生严重的小血管、肾小管和肺泡的异位钙化，而有钙化倾向的 DBA/2 小鼠的 Fetuin-A 缺失则出现严重的肾、心、肺、皮肤广泛的矿物质的沉积，伴有动脉血压的增高、肾功能衰竭、严重的蛋白尿、继发性甲状旁腺功能亢进症和骨质的减少，但未见大动脉的钙化。这可能与 $Fetuin\text{-}A^{-/-}$ DBA/2 小鼠动脉壁中抑制血管钙化的因子 MGP、OPN 的 mRNA 和蛋白水平的上升有关。

3.7 Klotho 基因缺陷(Klotho$^{-/-}$)小鼠

Klotho 基因是 Kuro-o M 等[22]于 1997 年发现的能够抑制衰老的新基因，编码与 β-葡萄糖苷酶序列相似的一种膜蛋白，大部分在肾脏和脑组织表达。Kuro-o 等通过插入突变培育成 $Klotho^{-/-}$ 小鼠，出现与人类相似的以寿命缩短为特征的衰老过程，包括动脉硬化、不孕、皮肤萎缩、骨质疏松和肺气肿，$Klotho^{-/-}$ 小鼠于出生后 4 周就能产生进行性的动脉粥

维普资讯 http://www.cqvip.com

样硬化过程,随后出现中等大小的肌性动脉的中膜钙化及其内膜增厚,肾脏的小动脉也出现广泛的钙化。Koh N 等的研究发现,Klotho 基因的缺失与慢性肾功能衰竭病人所出现的高磷血症和肾病性骨营养不良有关。尿毒症期的病人出现衰老、动脉硬化的加速和异位钙化等症状,与 Klotho 蛋白产生减少而失去其保护作用有关。

3.8 Smad6 基因缺陷(Smad6$^{-/-}$)小鼠

Smad 是转化生长因子 β(transforming growth factor, TGF-β)/骨形态发生蛋白(Bone morphogenic protein, BMP)家族信号蛋白,包括 8 个成员,分别称为 Smad 1 ~ 8。分为三类:Smad1、2、3、5 和 8 称为受体调节 Smad,介导 TGF-β 超家族的信号;Smad6 和 7 称为抑制性 Smad,抑制 TGF-β 超家族信号的传导;Smad4 为协同 Smad,是受体调节 Smad 的协助信号蛋白。Hruska KA 等研究表明 BMP2/4 能通过激活其下游的 Smad1/5 调控成骨细胞的分化和促进成骨的作用,而 Smad6 则通过抑制 Smad1/5 的活性而抑制所有 BMP 诱导血管钙化的信号传导通路;此外 Smad6 还能通过与 BMP Ⅰ型受体的相互作用拮抗 BMP 诱导的成骨作用[23]。Smad6$^{-/-}$ 小鼠心瓣膜形成障碍,6 周时心脏附近的主动脉和肺动脉出现钙化,而且在主动脉的中膜发现软骨的化生和骨小梁结构的形成,可伴有骨髓的成分,与 BMP-2 介导的软骨内成骨过程相似,但是有 Smad6 表达的 VSMC 处的骨形成受到抑制。同时内皮依赖的血管舒张功能下降,股动脉的平均动脉压升高[24]。

3.9 碳酸苷酶同功酶Ⅱ(carbonic anhydrase Ⅱ, CAⅡ)缺陷(CAⅡ$^{-/-}$)小鼠

碳酸苷酶(carbonic anhydrase, CA)能把二氧化碳(CO_2)和水转化成碳酸氢根(HCO_3^-)和氢离子($CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$),通过细胞膜上的钠氢交换($Na^+$-$H^+$)使 H^+ 分泌到细胞外,从而调节 CO_2 转运、pH 稳态、骨的重吸收和尿素的生成等。Whyte 等[25]发现 CAII 是碳酸苷酶家系的催化活性最强的同功酶,广泛分布于哺乳动物的骨、肾、脑等各组织细胞及红细胞胞浆内,尤以破骨细胞中含量最丰富。遗传学研究表明,CAII 缺陷是一种常染色体隐性遗传病,临床表现为骨硬化症、肾小管性酸中毒以及大脑的钙化。由于骨的重吸收需要酸性的微环境,而破骨细胞中碳酸苷酶同功酶Ⅱ缺陷后,丧失形成氢离子的能力,失去了骨重吸收所需的酸性微环境,因此 CAII$^{-/-}$ 小鼠出现骨硬化症和血管钙化。Spicer 等[26]观察到 CAII$^{-/-}$ 小鼠大部分器官的小动脉及其分支的中膜均发生钙化,这种血管钙化与年龄的增长呈正相关,雄性比雌性严重,生殖道动脉壁有广泛的钙盐沉积。

3.10 原纤维蛋白 1 缺陷小鼠

原纤维蛋白 1 是弹性蛋白相关的细胞外微纤维的主要结构成分,参与弹性蛋白在血管血流动力学稳态的维持,其同源染色体等位基因的突变会破坏局部组织的稳态,诱导显性遗传病 Marfan's 综合征的产生,出现主动脉根部的扩张和夹层动脉瘤的破裂。Pereira 等[27]发现 6 周龄原纤维蛋白缺陷鼠可见血管中膜弹力层的钙化,在弹力层断裂处最为明显,伴有炎性的纤维增生反应和炎症介导的弹性组织溶解。9 周时 VSMC 侵入内膜层并大量增生,弹力层变薄以至破坏消失,胶原、蛋白聚糖和弹力蛋白紊乱。内弹力层的断裂主要是由于内皮细胞的变性和中膜炎症细胞的浸润,外弹力层的破坏则是因炎症细胞和成纤维细胞在邻近外膜的聚集所致,这可能与局灶性的 MMP-9 过表达降解了弹性蛋白有关。

3.11 核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1 缺陷小鼠

核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1(ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase Ⅰ, NPP1)能够水解 ATP 产生焦磷酸,从而抑制羟磷灰石结晶的形成。NPP1 表达缺失,焦磷酸的产生受到抑制,则不能抑制基质囊泡中羟基磷灰石结晶的形成,而且丧失其原本具有的局限基质囊泡和拮抗钙化的功能。先天性 NPP1 缺失会导致原发性婴儿动脉中层钙化征。Johnson 等[28]发现 C57BL/6 背景的 NPP1$^{-/-}$ 小鼠有软骨特异性基因的表达,上调碱性磷酸酶活性,下调生理性钙化抑制剂骨桥蛋白的表达;在主动脉组织内可见到软骨特异性胶原基因的表达,使血管等软组织发生广泛的钙化。

3.12 锚蛋白缺陷小鼠

锚蛋白基因最先由 Ho AM 等在 2000 年发现,定位于 5 号染色体短臂上,是脊椎动物中普遍存在的一段高度保守的基因序列,编码由 492 个氨基酸残基组成的多次跨膜蛋白,分子量为 54.3 kDa,可调节细胞内外焦磷酸盐的水平。焦磷酸盐及其衍生物是软组织钙化的重要抑制因子,锚蛋白能够把细胞内的焦磷酸盐转运到细胞外,通过抑制矿物质的沉积而抑制钙化的发生。Johnson 等[28]报道小鼠 Ank 基因敲除后产生了广泛的异位钙化,包括心、血管、脑、肝、脾、肺、骨骼肌,同时伴有骨关节炎的发生、骨赘的形成和关节的破坏。但是与 NPP-1$^{-/-}$ 小鼠相比,锚蛋白缺陷小鼠的钙化程度要低一些,而锚蛋白和 NPP-1 双敲除(锚蛋白缺陷 NPP-1$^{-/-}$)小鼠则出现更广泛的钙化[29]。

4 高脂、高胆固醇饮食喂养的近交系小鼠

动脉粥样硬化常伴有血管钙化的发生,血管钙化增加动脉粥样硬化斑块的不稳定性和导致心血管事件的发生。Qiao JH 等[16]实验证实高脂、高胆固醇饮食(含有 15%脂肪、1.25%胆固醇和 0.5%胆酸)不仅加剧动脉粥样硬化病变的进程,亦能诱导血管钙化的发生。近交系是指经连续 20 代以上的全同胞兄妹交配或亲子交配,近交系数大于 99%,品系内所有个体都可追溯到前 20 或以上代数的一对共同祖先。一些近交系小鼠在普通饮食喂养条件下并不出现血管钙化,而在高脂、高胆固醇饮食的喂养时容易自发产生血管钙化[16]。常见的有 C57BL/6J、C3H/HeJ、C57BL/6J 和 C3H/HeJ 重组近交系(B×H RI)和 DBA/2J 四种近交系小鼠。

高脂、高胆固醇饮食喂养 15 周,C57BL/6J 和 C3H/HeJ 小鼠出现主动脉钙化率分别为 24%和 17%,冠状动脉钙化率为 2%和 26%。B×H RI 小鼠在第 11 代(B×H RI-11)100%出现升主动脉和主动脉弓的中膜钙化,而只有约 25%的冠状动脉出现钙化(其他代数的钙化率更低)。DBA/2J 小鼠在普通饮食喂养 15 周,50%即能发生冠状动脉钙化,高脂、高胆固醇饮食可使其 100%主动脉钙化,但不能产生冠状动脉钙化[16]。另外,Doehring 等[30]用冷冻复融方法损伤 C3H/HeJ

维普资讯 http://www.cqvip.com

小鼠肾内大动脉的方法诱导产生该部位血管的钙化,最早出现在损伤后的 24 h 内,7 d 可达高峰。不同品系的小鼠表现出的主动脉钙化和冠状动脉钙化的程度不同的机制可能是由不同遗传因子的差别所致。

5 结语

临床血管钙化是多因素的复杂病理过程,受到先天的遗传因素和后天的内外环境因素综合影响,为多种因子高度调控,如年龄、吸烟、高血压、糖尿病、脂质代谢异常、肥胖、运动量不足,尿毒症相关的因素包括内分泌(甲状旁腺激素,甲状旁腺素相关肽,维生素 D 等)和钙磷代谢紊乱、慢性炎症以及其它因素 (如使用磷结合剂,肝素,华法令)等都是发生血管钙化和导致心血管事件的危险因素。临床上 80% 的血管损伤和 90% 的冠脉疾病中均存在血管钙化,血管钙化是心血管事件和脑卒中的预警指标。但血管钙化的发病机制目前尚未完全阐明,因此根据病原学、发病学和治疗学研究的不同需要选择和改良不同模型对于阐明血管钙化的发病机制及临床防治血管钙化及新药的开发具有重要的意义。

[参考文献]

[1] Towler DA, Clemens TL. Vitamin D and cardiovascular medicine [P]. In: FeldmanD, Pike JW, Glorieux FH. Vitamin D [M]. 2nd edition, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005: 899-910.

[2] Price PA, June HH, Buckley JR, et al. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (10):1 610-616.

[3] Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective [J]. *Br J Nutr*, 2005, **94** (4): 483-492.

[4] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (9): 1 400-407.

[5] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-Induced Artery Calcification Is Accelerated by Growth and Vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (2): 317-327.

[6] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, et al. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine [J]. *J Vasc Res*, 1997, **34** (5): 386-398.

[7] Wu SY, Zhang BH, Pan CS, et al. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Peptides*, 2003, **24** (8): 1 149-156.

[8] Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong WF, et al. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases [J]. *Circulation*, 2004, **110** (22): 3 480-487.

[9] Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, et al. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves [J]. *J Biomed Mater Res*, 2003, **66** (1): 93-102.

[10] Tamura K, Suzuki Y, Hashiba H, et al. Effect of etidronate on aortic calcification and bone metabolism in calcitoriol-treated rats with subtotal nephrectomy [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, **99** (1): 89-94.

[11] Tamagaki K, Yuan QS, Ohkawa H, et al. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, **21** (3): 651-659.

[12] Robicsek F, Rubenstein RB. Calcification and thickening of the aortic wall complicating aortocoronary grafting: A technical modification [J]. *Ann Thorac Surg*, 1980, **29** (1): 84-85.

[13] Murshed M, Schinke T, McKee MD, et al. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins [J]. *J Cell Biol*, 2004, **165** (5): 625-630.

[14] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification [J]. *Genes Dev*, 1998, **12** (9):1 260-268.

[15] Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, et al. Role of osteoprotegerin in arterial calcification. Development of new animal model [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (9): 2 058-064.

[16] Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, et al. Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994, **14** (9): 1 480-497.

[17] Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-KT, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout Mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, **16** (1): 109-116.

[18] 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): 30 427-434.

[19] Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla proteindeficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo [J]. *J Exp Med*, 2002, **196** (8): 1 047-055.

[20] Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, et al. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient Mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (6): 1 029-034.

[21] Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification [J]. *J Clin Invest*, 2003, **112** (3): 357-366.

[22] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. *Nature*, 1997, **390** (6 655): 45-51.

[23] Goto K, Kamiya Y, Imamura T, et al. Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282** (28): 20 603-611.

[24] 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.

[25] Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, et al. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification [J]. *FAsEB J*, 2002, **16** (6): 577-582.

[26] Spicer SS, Lewis SE, Tashian RE, et al. Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification [J]. *Am J Pathol*, 1989, **134** (4): 947-954.

[27] Pereira L, Lee SY, Gayraud B, et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 3 819-823.

[28] Johnson K, Polewski M, van Etten D, et al. Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1$^{-/-}$ mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (4): 686-691.

[29] Harmey D, Hessle L, Narisawa S, et al. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders [J]. *Am J Pathol*, 2004, **164** (4): 1 199-209.

[30] Doehring LC, Kaczmarkek PM, Ehlers E, et al. Arterial calcification in mice after freeze-thaw injury [J]. *Ann Anat*, 2006, **188** (3): 235-242.

(此文编辑 陈临溪)