



[专家简介] 陈华, 博士, 研究员。解放军总医院医学创新研究部某中心原主任。兼任国家实验动物专家委员会委员、中国实验动物学会常务理事、北京实验动物学会副理事长。《实验动物科学》杂志副主编。研究方向为小型猪医学研究模型的建立与应用。获国家科技攻关计划(十五)、国家科技支撑计划(2010)和国家自然科学基金(4项)资助, 发表论文 50 余篇, 曾获中国实验动物学会科技成果一等奖(2012)。

## 基于解放军总医院某中心的小型猪动脉粥样硬化模型研究进展

陈 华, 赵玉琼, 贾云晓, 刘 军, 郭 超  
解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853

**摘要:** 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是缺血性冠心病、脑卒中和外周大血管疾病的主要基础病变。小型猪血液循环系统与人类相似, 随着年龄增长可自发 AS, 是 AS 研究的良好模型。本文结合 AS 小型猪相关的最新研究, 简要论述了小型猪 AS 模型的建立过程、AS 的血管病理学研究、肠道菌群研究、炎症因子研究和代谢组学研究等领域的进展。

**关键词:** 小型猪; 动脉粥样硬化; 动物模型; 病理学; 血管疾病

**中图分类号:** R-332; R543.5; Q95-3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 2095-5227(2025)05-0425-04

**DOI:** 10.12435/j.issn.2095-5227.24062101

**引用本文:** 陈华, 赵玉琼, 贾云晓, 等. 基于解放军总医院某中心的小型猪动脉粥样硬化模型研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (5): 425-428.

### Research advances in establishment and application of minipig atherosclerosis model

CHEN Hua, ZHAO Yuqiong, JIA Yunxiao, LIU Jun, GUO Chao

Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: CHEN Hua. Email: chenhua301paper@163.com

**Abstract:** Atherosclerosis (AS) is the main underlying pathology of ischemic coronary heart disease, stroke and peripheral macrovascular disease. The circulation system of pigs is similar to that of human, and AS can occur spontaneously with age, making it a good model for human AS research. This article combines the latest research on AS minipigs, as well as the research overview in the fields of AS vascular pathology research, intestinal flora research, inflammatory factor research, and metabolomics research.

**Keywords:** minipig; atherosclerosis; animal model; pathology; vascular disease

**Cited as:** Chen H, Zhao YQ, Jia YX, et al. Research advances in establishment and application of minipig atherosclerosis model [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(5): 425-428.

心血管疾病是全球范围内的首要致死性疾病<sup>[1]</sup>。其中, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是缺血性冠心病、脑卒中和外周大血管疾病的基础病变, 是导致心血管疾病的主要原因。由于人类血管组织存在来源困难且实验手段有限等限制因素, 动物模型是 AS 发病机制研究和评价治疗措施的主要手段。小鼠、大鼠和家兔是 AS 研究最常用的模型动物, 由于猪和非人灵长类动物与人类生理高度相似, 已成为以上动物模型的重要补充<sup>[2-3]</sup>。

随着基因敲除小鼠模型(apoE<sup>-/-</sup>小鼠; LDLR<sup>-/-</sup>小鼠)的出现<sup>[2]</sup>, 小鼠模型已逐步成为 AS 研究的最常用模型。遗传修饰小鼠模型的应用为临床新药开发提供了方向, 基于此学者们进一步发现并阐释了 AS 发展过程中涉及的通路, 但将得到的研究成果应用到人类身上或作为临床前模型来证实新药的有效性却难以达到预期效果<sup>[4]</sup>。猪的血管生理结构和位置分布、血流动力学、血脂水平、对高胆固醇饮食的反应、AS 的好发部位和病变斑块的形态结构等方面都与人类十分相似<sup>[5-6]</sup>。猪脂蛋白代谢机制与人类相似, 可自发 AS, 在高脂高胆固醇饮食后可加速 AS 病变。常用的小型猪品系包括哥廷

收稿日期: 2024-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32370568)

通信作者: 陈华, 博士, 研究员。Email: chenhua301paper@163.com

根小型猪、尤卡坦小型猪、奥斯萨巴猪、汉福德小型猪、辛克莱小型猪及国内常用的如巴马小型猪、五指山小型猪、西藏小型猪、贵州小型猪等。在诱导方式上, Ignatowski 最早通过饲喂西方饮食(主要是肉、奶和蛋黄)在家兔的主动脉壁诱导出 AS 斑块病变<sup>[7]</sup>。既往有报道证实饲料中添加胆固醇是诱发动物 AS 的核心因素<sup>[8]</sup>。现高胆固醇饲料诱发动物 AS 成为动物实验研究的主要方法, 为加速 AS 的形成和(或)研究确定部位的病变, 血管内膜剥脱术+高胆固醇饲料喂养的方法也经常应用。研究报道采用的诱导饲料配方并不完全相同, 添加的胆固醇含量为 1.5%~6%, 但 AS 病变的发生过程、病变的分布和病变斑块的形态结构基本一致, 不同性别动物差异也不明显<sup>[9-11]</sup>。总之, 相对于小动物模型, 猪模型更适合用于 AS 的研究。

## 1 小型猪 AS 模型

早期研究发现, 猪群中存在自发性 AS, 研究人员对不同年龄段、不同饲养环境以及屠宰场的家猪进行了病理学分析和研究<sup>[12-13]</sup>。但由于应用高胆固醇高脂饲料诱发小型猪 AS 需要较长的时间, 且在相同的诱导条件下, 小型猪发生 AS 的概率也不尽相同, 所以 AS 的遗传易感性也成为重要的研究方向。Rapacz 等<sup>[14]</sup>报道了一种遗传性高胆固醇猪, 命名为遗传性低密度脂蛋白升高品系, 类似于人类的家族性高胆固醇血症。Rapacz 猪喂养普通饲料即可出现动脉粥样硬化病变, 2 岁出现斑块病变, 3 岁可发生广泛性的斑块病变。但 Rapacz 猪来源于农用家猪, 体形较大, 应用受限, 现正进行小型化培育。

随着基因编辑技术的快速发展, 近年来很多研究通过遗传修饰增加小型猪对 AS 的易感性<sup>[15]</sup>。国际上应用尤卡坦小型猪和奥斯萨巴猪为遗传背景的研究居多, 国内的研究报道主要应用巴马小型猪。如应用尤卡坦小型猪, 建立了肝特异性 D374Y 基因获得性突变小型猪, 从而获得了 PCSK9 蛋白突变; 应用重组腺病毒载体建立了 LDLR 基因敲除小型猪, 并选育出纯合突变的群体<sup>[16]</sup>; 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立了 apoE 基因敲除小型猪。我国学者应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 建立了 apoE 基因敲除巴马小型猪, 也建立了 apoE 和 LDLR 基因双敲除巴马小型猪<sup>[17]</sup>。这些基因编辑小型猪多数呈现明显的自发性高脂血症, AS 病变的形成也有所加速, 然而 AS 易感性

增加的程度却没有基因编辑小鼠那样显著。

## 2 基于小型猪模型的 AS 病理学研究

本课题组分别应用含 1.5% 胆固醇和 3.0% 胆固醇的高脂饲料诱导五指山小型猪 12 个月, 并分别在第 4、6、8、12 个月处死动物, 同时以含 2% 胆固醇的高脂饲料诱导巴马小型猪 9 个月, 均进行了病理学检查<sup>[11,18]</sup>。结果均表明, 小型猪饲喂高胆固醇高脂饲料后, 血清总胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白均显著升高, 三酰甘油和空腹血糖则在正常值范围内波动。高胆固醇高脂饲料喂养 4 个月, 胸主动脉可查见脂纹病变; 腹主动脉轻度、小范围斑块病变。第 6 个月, 胸主动脉仍为脂纹病变; 腹主动脉明显的斑块病变; 髂动脉和冠状动脉出现轻度的脂纹病变。第 8 个月, 动脉病变均有所加重。第 12 个月, 在腹主动脉、髂动脉和冠状动脉的斑块病变深处观察到脂质坏死核, 并有钙化、胆固醇析出现象, 胸主动脉仍然为脂纹病变<sup>[11]</sup>。虽然在应用五指山小型猪和巴马小型猪的实验中诱导饲料配方略有不同, 但实验结果表明五指山小型猪诱导 8 个月与巴马小型猪诱导 9 个月的动脉易感部位、病变类型和病变严重程度类似。这些结果与应用尤卡坦小型猪、约克夏猪等的研究结果也十分接近。

在人类婴儿时期的冠状动脉就可见 AS 早期病变, 但出现临床症状通常要在 50~60 年后, AS 病变的发生发展经历了长时间的进展过程<sup>[19]</sup>。小型猪高胆固醇高脂饲料诱发的 AS, 在 12 个月时间内, 病变严重的部位从脂纹病变发展到复杂斑块阶段, 其病理学特点与人类的 AS 病变存在一定的差异。值得注意的是, 相似之处在于血管易感部位(腹主动脉、髂动脉和冠状动脉)与人类一致; AS 病变的进展过程与人类相似, 同样经历初始病变、脂纹病变、中间病变和高等级病变<sup>[20-21]</sup>。突出的差别包括: 高胆固醇饮食诱导的小型猪 AS 斑块病变平滑肌增生比人类的自发病变更显著, 早期的纤维斑块主要由增生平滑肌细胞组成, 其他成分少; 小型猪病变斑块中 AS 晚期斑块特征性的“脂质坏死核”的形成起始于增生平滑肌细胞的坏死, 而人类 AS 病变中“脂质坏死核”的形成, 普遍接受的是 Stary 等<sup>[21]</sup>的观点, 即吞噬大量脂质的泡沫细胞死亡后, 其中的脂质释放出来, 逐渐形成小的细胞外脂质池, 这些小的脂质池逐步发展和融合形成“脂质坏死核”。

本课题组在应用五指山小型猪的研究中<sup>[11]</sup>,描述了腹主动脉、髂动脉、冠状动脉、颈总动脉和胸主动脉AS病变的病理学演进,并首次发现了血管内膜增生平滑肌细胞的来源。冠状动脉和髂动脉AS病变早期血管内膜增生平滑肌来自维持血管内弹力膜完整性的梭形细胞,而腹主动脉则来源于血管中膜平滑肌细胞的增生。

### 3 基于小型猪的AS与肠道菌群关系研究

人类肠道中寄居的大量细菌、真菌、病毒和古细菌等,统称为肠道菌群,共有500~1000种,数量达 $10^{13}$ ~ $10^{14}$ 个,这些菌群在维持机体健康方面起着重要作用。大量研究表明,肠道菌群免疫功能的紊乱和菌群组成的改变与动脉粥样硬化、肥胖、糖尿病、血脂异常等代谢性疾病密切相关<sup>[22]</sup>。肠道菌群紊乱是AS的高危因素,其对胆固醇和脂质代谢的影响直接作用于AS病变的进展,其代谢产物也可能对AS的进展产生多重影响<sup>[23]</sup>。

我们实验室对比了高胆固醇高脂饲料(AS组)与正常饲料对照(对照组)小型猪的肠道菌群变化,发现两组小型猪肠道中的优势菌门都是厚壁菌门和拟杆菌门,两者总占比分别为80.7%和91.4%,AS组和对照组小型猪的肠道菌群 $\alpha$ -多样性指数在两组间无显著差异,但 $\beta$ -多样性指数分析显示菌群组成明显不同,AS组的理研菌科和普雷沃菌科显著减少,拟杆菌科显著增多<sup>[24]</sup>。已知人类和小鼠的肠道菌群主要由厚壁菌门和拟杆菌门组成,两者占总群落的90%以上,其比例一般维持在一定范围内即为肠道稳态平衡,这有利于宿主健康<sup>[25]</sup>。Jie等<sup>[26]</sup>通过对218例动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ACVD)患者和187例健康对照者的肠道菌群进行了宏基因组测序,发现ACVD组与对照组在基因丰富度和 $\alpha$ -多样性上均无显著差异,但在菌群组成的聚类距离较远,表现为ACVD组的拟杆菌属和普雷沃菌属显著减少,链球菌属和埃希菌属显著增多。显然,普雷沃菌属在猪和人中的变化趋势是一致的。

### 4 小型猪AS与炎症因子研究

AS病变早期阶段循环中的单核细胞穿过血管内皮,进入内皮下层,吞噬滞留于内皮下层的氧化低密度脂蛋白等脂类,形成泡沫细胞。这种清除脂质的过程进一步释放炎症因子,吸引更多的循环单核细胞进入内皮下层。AS病变发展成斑块

病变的过程中,可查见T淋巴细胞等炎性细胞和多种炎症因子。因此,Ross<sup>[27]</sup>引入炎症疾病的概念并受到广泛认可。糖尿病(diabetes mellitus, DM)是AS的高危因素,且AS引发的冠心病是DM患者的主要死因,因此有学者提出DM促发AS的机制可能与炎症因子相关。

本实验室应用小型猪DM并发AS的模型探讨炎症因子的作用。对照组动物单纯饲喂高胆固醇高脂饲料9个月诱发AS病变,实验组同样以高胆固醇高脂饲料饲喂9个月,在第3个月时应用STZ诱发DM,从而探讨小型猪DM并发DM与单纯AS模型的炎症因子变化。第9个月,利用高通量猪细胞因子芯片检测50种炎症因子,发现DM+AS组与AS组比较,IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、MIG、MIP-1 $\beta$ 水平升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。Eotaxin-1水平降低。此后,又选择了16种炎症因子进行不同诱导时间点的动态监测,结果显示DM+AS组MCP-1水平呈逐渐上升趋势,Eotaxin-1水平呈逐渐下降趋势。IL-8、PECAM-1水平持续低于单纯AS对照组<sup>[28]</sup>。Yang等<sup>[29]</sup>以高脂饲料连续饲喂西藏小型猪12周,检测血清ox-LDL、CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、vWF和ET-1,结果这些指标均有不同程度的升高。Ludvigsen等<sup>[30]</sup>以高脂饲料饲喂哥廷根小型猪,发现ox-LDL和CRP在第43周显著升高,PAI-1变化不显著,与我们的实验结果一样,个体差异很大。由于血清中的炎症因子指标受多种因素的影响,而且检测结果在动物个体之间出现较大变异,这些结果与AS发生发展的关系还需要血管病变以及局部反应情况的进一步验证。

### 5 小型猪AS与代谢组学研究

代谢物揭示的是机体细胞内稳态的动态过程,代谢组学可全面表征氨基酸、脂类、有机酸等小分子代谢物的通量及其与生物表型之间关系,能够更直接、更准确地反映生物体的生理状态,为疾病的诊断、预后和发病机制研究提供了新的研究思路,现已广泛应用于人类AS的研究以及心血管疾病的风险评估和预测<sup>[31-32]</sup>。

本实验室通过超高效液相色谱-串联质谱方法动态监测了小型猪血清代谢组学变化,对AS易感动物和非易感动物进行对比分析,从而探究小型猪血清代谢组变化与AS发生发展的关系。结果表明,AS易感组和非易感组小型猪的代谢谱随着时

间的推进均发生变化,但两组之间的代谢物水平改变逐渐表现出差异,表明高胆固醇高脂饮食诱导小型猪AS发生发展过程中代谢组学的改变具有时间依赖性。通过对57种代谢物进行进一步分析发现,发生明显改变的代谢物中脂类和类脂分子数量最多,占主导地位。通过KEGG信号通路富集发现胆固醇代谢、初级胆汁酸生物合成、组氨酸代谢和牛磺酸、次牛磺酸代谢在高胆固醇高脂饮食诱导AS进展中受到了显著影响,其中胆固醇代谢和初级胆汁酸生物合成途径变化最为显著。通过对代谢组学的动态监测发现,脂类物质中的鹅脱氧甘胆酸盐、牛磺酸鹅去氧胆酸盐、牛磺胆酸盐和牛磺胆酸盐等代谢物在诱导4个月后,在易感组水平逐渐升高,提示这些代谢物可能是AS发生发展新的生物标志物<sup>[33]</sup>。

除了胆固醇代谢和初级胆汁酸生物合成通路,大量的啮齿类动物模型和人类队列研究显示,氨基酸代谢在AS进展中也发挥了作用,我们的结果显示组氨酸代谢和牛磺酸、次牛磺酸代谢(归属其他氨基酸代谢途径)均发生了改变。其中,4-咪唑乙酸和D-磷酸赤咪唑是组氨酸代谢的中间产物,1-甲基组胺在人体中参与许多酶促反应和组氨酸代谢,这3种代谢物在高胆固醇高脂饮食诱导3个月后,在易感组和非易感组之间逐渐表现出了差异,这种组氨酸代谢紊乱的发现值得关注。此外,牛磺酸和牛磺胆酸盐水平的上调与很多人类研究结果一致,也是值得关注的发现<sup>[33]</sup>。

综上所述,本文简要论述了小型猪AS模型的建立发展,及其在AS的血管病理学研究、肠道菌群研究、炎症因子研究和代谢组学研究等领域的概况。此外,基于在病理学研究 and 代谢组学研究中的新发现,我们将会在临床AS患者样本中进一步进行验证,这可能为更好地阐述AS发病机制及探索治疗靶点奠定重要基础。

**作者贡献** 陈华: 论文撰写; 赵玉琼: 审读和修订, 监督指导; 贾云晓、刘军、郭超: 审读和修订。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突。

#### 参考文献

- 1 WHO. Cause of death explorer-noncommunicable disease-cardiovascular diseases [Z]. 2020.
- 2 Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, et al. Animal

- models of atherosclerosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 816: 3-13.
- 3 Getz G, Reardon C. Animal models of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 1104-1115.
- 4 Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21 (5): 434-440.
- 5 Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, et al. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16 (8): 457-475.
- 6 陈华. 小型猪医学研究模型的建立与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- 7 Konstantinov IE, Jankovic GM, Alexander I, Ignatowski: a pioneer in the study of atherosclerosis [J]. *Tex Heart Inst J*, 2013, 40 (3): 246-249.
- 8 Cross TJ, Rashid MM, Berry PA, et al. The importance of steatosis in chronic hepatitis C infection and its management: a review [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40 (3): 237-247.
- 9 Reitman JS, Mahley RW, Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1982, 43 (1): 119-132.
- 10 Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, et al. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine [J]. *Diabetes*, 2001, 50 (7): 1654-1665.
- 11 Zhao YQ, Xiang L, Liu YQ, et al. Atherosclerosis induced by a high-cholesterol and high-fat diet in the inbred strain of the Wuzhishan miniature pig [J]. *Anim Biotechnol*, 2018, 29 (2): 110-118.
- 12 Ratcliffe HL, Luginbühl H, Pivnik L. Coronary, aortic and cerebral atherosclerosis in swine of 3 age-groups: implications [J]. *Bull World Health Organ*, 1970, 42 (2): 225-234.
- 13 Skold BH, Getty R, Ramsey FK. Spontaneous atherosclerosis in the arterial system of aging swine [J]. *Am J Vet Res*, 1966, 27 (116): 257-273.
- 14 Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, et al. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis [J]. *Science*, 1986, 234 (4783): 1573-1577.
- 15 Wang D, Xu X, Zhao M, et al. Accelerated miniature swine models of advanced atherosclerosis: a review based on morphology [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2020, 49: 107241.
- 16 张雪, 黄雷, 阮进学, 等. PCSK9基因D374Y突变体转基因猪的制备与分析 [J]. *中国农业科学*, 2017, 50 (19): 3808-3816.
- 17 Huang L, Hua ZD, Xiao HW, et al. CRISPR/Cas9-mediated ApoE<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (23): 37751-37760.
- 18 Zhao YQ, Niu MM, Jia YX, et al. Establishment of type 2 diabetes mellitus models using streptozotocin after 3 months high-fat diet in Bama minipigs [J]. *Anim Biotechnol*, 2023, 34 (7): 2295-2312.
- 19 Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults [J]. *Arteriosclerosis*, 1989, 9 (1 Suppl): I19-I32.
- 20 Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14 (5): 840-856.