

王达洋,王显. 小型猪动脉粥样硬化模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 410-415.

Wang DY, Wang X. Miniature swine models of atherosclerotic disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 410-415.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.018

小型猪动脉粥样硬化模型研究进展

王达洋¹, 王显^{1,2*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学心血管病研究所, 北京 100700)

【摘要】 小型猪因在动脉解剖、生理等方面与人类十分相似,是目前研究动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)相关疾病最理想的模型。至今已有多种可以模拟小型猪 AS 模型的方法公布,除传统的高脂饲料+球囊拉伤外,还包括新方法如基因编辑诱导自发性高脂血症、冠脉壁局部注射脂质或炎症因子等。但目前尚无成熟、公认的小型猪冠状动脉粥样硬化模型。造模周期长、成功率低、花费高等是制约小型猪动物模型研究的瓶颈所在。现就适合造模的小型猪的品种、造模方法进行综述。

【关键词】 小型猪;动脉粥样硬化;模型;基因编辑;动脉壁内注射

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 03-0410-06

Miniature swine models of atherosclerotic disease

WANG Dayang¹, WANG Xian^{1,2*}

(1. Department of Cardiovascular Disease, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China.

2. Institute of Cardiovascular Diseases, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

Corresponding author: WANG Xian. E-mail: wx650515@hotmail.com

【Abstract】 Miniature swine provide valuable research models for cardiovascular disease because their anatomical structure and physiological features are similar to those of human. Several studies have been published in which the miniature swine models of atherosclerosis have been established successfully. These models included general method of a high-fat diet plus balloon injury, as well as new method, such as gene editing-induced familial hypercholesterolemia, and local intravascular delivery of lipid and inflammation factors. However, few of these models have been widely used. Long time consumption, high cost and huge heterogeneity among studies are problems that restrict application of these AS models. This article summarizes the breeds of miniature swine, the method used to establish atherosclerosis models, and the advantages and disadvantages of current models.

【Keywords】 miniature swine; atherosclerosis; models; gene editing; intramural delivery

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前,心脑血管疾病仍是威胁人类健康的头号杀手,而动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是引起急性心肌梗死、卒中等重大疾病的首要病因^[1]。以小型猪为代表的大动物模型因在动脉解剖、生理等方面与人类更为相似,因此在心血管相关研究及转

化医学领域有着无可比拟的优势。在小型猪 AS 模型的构建中,国内外学者已进行了大量的探索^[2],但目前尚无成熟、公认的小型猪 AS 模型。模型的成功构建与小型猪的品系、适宜的造模方法均密切相关,且需要使用合理的方法对模型进行评价。现

【基金项目】 国家自然科学基金(81774058)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81774058).

【作者简介】 王达洋(1991—),男,博士,主要从事中西医结合防治冠心病及支架术后狭窄研究。Email: wdy337@163.com

【通信作者】 王显,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事介入心脏病学与中医药相关研究。Email: wx0515@hotmail.com

就小型猪 AS 模型的相关问题综述如下。

1 用于构建 AS 模型的小型猪品系

目前用于构建小型猪 AS 模型的国内品系有中国实验用小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪、贵州小型猪等;国外品系包括尤卡坦小型猪、Obbassaw 小型猪及 Rapacz 猪等。

1.1 国内品系

1.1.1 中国实验用小型猪

中国实验用小型猪 (Chinese Experimental Minipigs, CEMP) 也被称为农大小型猪。该品种是由广西、贵州引进的香猪繁育而来,分为三大品系^[3],其中农大 II 系在心血管器械领域有较多的应用,其对应激的耐受程度较好,手术死亡率低,这些优势使得其在心脏介入领域具有较好的应用前景。但近年来鲜有基于该品系的研究结果发表,提示近年来该品系可能较难获得。

1.1.2 巴马小型猪

巴马小型猪是目前用于心血管研究最常用的小型猪动物模型,目前国内关于小型猪 AS 模型的构建大多是基于该品系^[4-5]。虽然与农大 II 系相比,该品系体型略大,抗应激能力略弱,但目前是可获取的最佳品种。

1.1.3 五指山小型猪

五指山小型猪是国内另一种较常用的实验动物模型,具有体型小^[6],对高脂饲喂敏感^[7]的优势。但五指山小型猪的缺点对于侵入性操作的耐受性较低,手术过程中容易发生室颤而死亡^[8]。

1.1.4 其他

目前国内使用的小型猪还包括贵州小型猪、西藏小型猪和版纳小型猪,目前在报导的文献中较少使用。

1.2 国外品系

1.2.1 尤卡坦小型猪

尤卡坦小型猪原产于墨西哥尤卡坦半岛,经过封闭培育使得品种体型减小。目前该品系是北美应用最广泛的品系。除采用传统的造模方法外,还可通过基因编辑方法诱导家族性高脂血症小型猪。该品系具有体型小,遗传稳定的优势^[9]。

1.2.2 Ossabbaw 猪

Ossabbaw 猪是由原欧洲品系的猪经过长期的地理隔离,进化出适应当地环境的特性,具备强大的脂肪储备能力。较其他品系 Ossabbaw 猪容易通

过高脂高糖饲喂诱导代谢综合征^[10],是目前研究代谢综合征合并 AS 的重要品系。

1.2.3 Rapacz 猪

Rapacz 猪最早由 Rapacz 报道,由此得名。该品系天然具有家族性高脂血症,可自发性出现 AS,因此在 AS 的研究中应用十分广泛。该品系载脂蛋白 B 基因及 LDLR 基因突变^[11-12]是其家族性高脂血症的原因。但该品系体型较大,不利于操作,和中国梅山猪杂交后得到体型较小的品种,即 FBM 猪^[13],更具备可操作性。

2 构建小型猪 AS 模型的方法

目前用于构建小型猪 AS 模型的思路大致可分为两类,一类是通过诱导小型猪高胆固醇血症,促进 AS 斑块形成;另一类为使用手术法,通过对动脉壁的定向损伤或促进炎症反应,加速 AS 斑块的形成。

2.1 高脂血症诱导 AS 的形成

2.1.1 小型猪的高脂饮食

高胆固醇血症是 AS 形成最重要的环节,因此目前小型猪 AS 模型多以高脂饲料的喂养作为模型构建的基础方法。尽管高脂饲喂法早在 20 世纪 70 年代已被采用^[14],但至今仍是模拟 AS 模型最重要的方法。单纯高脂饲喂法十分简便,而且模拟了人类 AS 的形成过程,但其缺点是:成模率低,AS 形成的位置、大小、程度均不可控;成本高,长期高脂饲喂造成时间成本与价格成本高昂^[7]。这些因素是制约目前小型猪 AS 模型发展的瓶颈。

此外,在各项研究中,高脂饲料的配方不尽相同。小型猪高脂饮食的基本组成成分为:基础饲料(约 80%),胆固醇(0.5% ~ 6%),饱和脂肪酸(约 15%),胆盐(0.5% ~ 2%),微量元素预混料及调味剂等^[15]。不同研究中所采用不同高脂饲料的主要区别在于胆固醇的含量:低剂量($\leq 1\%$)胆固醇的高脂饲料多用于兔模型的研究而较少用于小型猪的造模^[16-17];中剂量(1.5% ~ 5%)及高剂量($\geq 5\%$)胆固醇高脂饲料在小型猪模型中均有应用,但由于高胆固醇含量的增高并未显著增加 AS 的形成速度及程度^[15],结合成本,目前研究多采用胆固醇含量为 1.5% ~ 3%的饲料进行小型猪的造模。

2.1.2 基因编辑构建自发性高脂血症

基因编辑技术为小型猪 AS 模型构建的加速创造了有利的条件。通过基因改造,使得小型猪携带

家族性高脂血症基因,大幅提升基础血浆胆固醇水平,从而加速 AS 的形成。目前试验成功的基因编辑方法包括低密度脂蛋白受体敲除 (Low Density Lipoprotein Receptor-Knock off, LDLR-KO)、ApoE-KO 以及 D374Y-PCSK9 功能获取 (Gain of Function, GOF) 三类。

(1) LDLR-KO

LDLR 表达于肝细胞表面,可与血液中的 LDL-C 特异性结合,通过胞吞作用,将 LDL-C 吞入细胞内并在酸性条件下相互分离,LDL-C 被溶酶体降解,LDLR 返回细胞表面继续发挥作用^[18]。通过敲除 LDLR 基因,可使血液中 LDL-C 升高,从而诱发 AS。上文所述的 Rapacz 猪即是因 LDLR 受体天然变异引起家族性高脂血症及自发性 AS,虽然该品系过大的体型和个体间的差异^[19]限制了其广泛的应用,但为 LDLR-KO 小型猪模型的构建提供了思路。

基于该方案, Bryan 等^[20]通过体细胞和移植技术构建了 LDLR-KO 尤卡坦小型猪,联合高脂饲喂制作 AS 模型。经过 6 个月高脂饲喂,在动物的腹主动脉可观察到 $(56.6 \pm 26.7)\%$ 的直径狭窄,并在冠状动脉中观察到 $(18.1 \pm 4.6)\%$ 的面积狭窄。在另一项研究中, Li 等^[21]使用 Landrace 与白猪的杂交品系成功制作了 LDLR-KO 小型猪,合并 4 个月的高脂饲喂后,尽管在冠状动脉中未表现出严重的狭窄,但其斑块的特征与人类晚期 AS 斑块相符。此外, Ogita 等^[22]基于 LDLR-KO 敲除的小型猪联合高脂饲料+球囊拉伤法模拟 AS 模型,该模型高脂饲喂的时间为 12 个月,病理结果显示其斑块特征与晚期 AS 相符,即纤维成分外层包裹的脂质核心,但该研究并未报道其造成冠状动脉狭窄的具体程度。

LDLR 敲除是采用基因编辑制作小型猪自发性高脂血症研究时间最常、最成熟的方法。其最大的优势在于可以成功构建与人 AS 类似的病变,且更高的血脂水平使得其较单纯高脂饲喂法已显著降低成模时间,但均一性差是目前 LDLR-KO 小型猪模型所共有的问题。

(2) ApoE 敲除

ApoE 是载脂蛋白中的一类,在调节血脂方面, ApoE 是 VLDL 的组成成分,介导了 VLDL 与 LDLR 的结合,促进血液 VLDL 的清除。如 ApoE 变异或表达量降低,将导致 VLDL 清除减缓,血液 VLDL 及 LDL 水平升高而诱发 AS^[23]。基于该思路,已构建了多种自发性 AS 的动物模型。

Shim 等^[23]使用尤卡坦小型猪构建了 ApoE-KO 模型。在血脂方面,与野生型相比, ApoE-KO 动物的总胆固醇显著升高,升高的主要成分为 IDL 和 VLDL,这与 ApoE 的生理作用相吻合。在诱导的斑块方面, ApoE-KO 动物的斑块覆盖面积较野生型显著增加,显示了 AS 形成的加速。此后,为构建适合国内使用的自发性高脂血症动物模型,方斌等^[4]通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建 ApoE 敲除的巴马小型猪,经高脂饲料 6 个月,在主动脉内观察到 AS 面积约为 $(46.13 \pm 6.13)\%$,具有良好的均一性。除此以外,有两项研究^[5, 24]报告了基于 ApoE 及 LDLR 双基因敲除的巴马小型猪,可显著增高 LDL-C、TC、ApoB 的水平,但未报告所产生的 AS 的程度。

ApoE 敲除小型猪的研究目前均未报道诱导 AS 引起最大管腔狭窄程度以及 AS 斑块的病理特征,即与人类晚期 AS 斑块的相似程度,是目前相关研究所共有的局限。

(3) D374Y-PCSK9 GOF

PCSK9 是一种肝源性蛋白,具有多种生物学功能。在血脂调节方面, PCSK9 可与 LDLR 结合提高 LDLR 与 LDL 的亲和力,导致 LDLR 与 LDL-C 紧密连接而无法在细胞内分离,最终 LDLR、LDL-C 和 PCSK9 一同被降解,细胞表面的 LDLR 数量减少,导致循环中的 LDL-C 水平升高^[25]。PCSK9 的突变体 D374Y-PCSK9 致 LDLR 降解的作用远超过野生型^[26], D374Y-PCSK9 GOF 小型猪的构建即是基于该思路。

Al-Mashhadi 等^[27]使用 D374Y-PCSK9 GOF 克隆尤卡坦小型猪联合高脂饲喂,与单纯高脂饲喂组相比,将动脉粥样硬化面积提高了 2.1 倍,狭窄程度增加 1.8 倍,且形成的 AS 斑块与人类的较相似。但该研究并未设定时间梯度,高脂饲喂的时间长达 46 周,并未验证该模型对 AS 形成的加速作用。Fang 等^[28]使用 D374Y-PCSK9 GOF 克隆 Ossabaw 小型猪,联合高脂饲喂 6 个月后,可观察到 LAD、RCA 中均出现直径狭窄 $18\% \sim 37\%$,病变长度 $9.9 \sim 38.3 \text{ mm}$ 的斑块,采用组织病理学评价,这些斑块中 80% 以上均符合晚期斑块的特征。

LDLR、ApoE、PCSK9 是近年来发现的高胆固醇血症的三大主效基因^[29],对这三种基因进行编辑均大幅提升了小型猪血浆胆固醇浓度及 AS 形成的速度。在不同品系中,同样的基因编辑策略所产生的血脂升高幅度及 AS 形成速度有差异,这与不同品

系对高胆固醇血症的易感性密切相关。

2.2 手术法诱导 AS 形成

对于小型猪 AS 模型而言,即便自发性高脂血症动物可在短时间内自发形成 AS 斑块,但这些斑块的产生的部位、程度是随机的。由于 AS 在动脉内产生的位置无法预测,由此构建的动物模型无法用于评价特定血管(如冠状动脉)的植入器械。为解决这一问题,已有研究探索使用手术法定点构建 AS 斑块,包括球囊拉伤法和血管壁内注射法。

2.2.1 球囊拉伤法

球囊拉伤法是最早用于小型猪 AS 造模的辅助方法。该方法是通过介入手术,将大于血管直径 10% ~ 30% 的球囊于目标血管位置进行扩张,以损伤动脉内膜^[22]。联合高脂饲喂,这一方法模拟了人 AS 形成的内皮损伤-脂质沉积的过程。球囊拉伤法在一定程度上加重了 AS 的程度,加快其形成的速度,且使得病变产生的位置可以预测^[13],因此是目前较广泛使用的方法。

尽管使用高脂饲料+球囊拉伤法模拟小型动物如兔类等的 AS 模型已十分成熟^[30-31],但基于小型猪的研究,这一方法仍然存在争议。高脂饲料联合球囊拉伤诱发的病变与人类 AS 病变的结构存在差异,球囊损伤后所产生的血管反应以内膜增生为主,在病理学上,内膜增生以增殖的血管平滑肌细胞和细胞外基质为主,大多不伴有坏死核心,与典型的晚期动脉粥样硬化斑块截然不同^[32]。除此以外,还有研究表明,在球囊损伤后血管内植入支架与在正常血管植入支架所引起的支架内再狭窄的程度及病理类型无明显差异^[33],因而造模的意义有待商榷;上述争议使得这一方法一直未获得公认。

2.2.2 动脉壁局部注射法

由于 ox-LDL 是 AS 发病的使动病因,通过血管壁内注射的方法提高局部 LDL 浓度,理论上可加速 AS 的形成,且较构建高脂血症而言成本可显著降低。基于该思路 Granada 等^[34]进行了首次探索。使用注射导管将胆固醇亚油酸注射于普通家猪的冠状动脉及髂动脉壁中,后经过 4 周的高脂饲喂,成功在 75% 的注射节段制造了 $(36 \pm 8)\%$ 的狭窄,且上述狭窄均具有脂质核心。后续该团队采用人 ox-LDL 进行注射,并联合球囊拉伤,经过平均 8.2 周的高脂饲喂,模拟出 $(58.9 \pm 14.0)\%$ 的 AS 病变^[34],具有较好的均一性。但后续研究逐渐暴露了该方法的问题。Tellez 等^[35]的结果显示尽管脂质组

MCP-1 与新生血管密度高于生理盐水组,但狭窄程度与面积两组间并无差异。Buszman 等^[36]未采用高脂饲喂,仅在球囊拉伤后局部注射 LDL,观察周期为 28 d,但结果仅 OCT 评价 LDL 组狭窄面积及程度显著高于对照组,且构成狭窄的物质主要为平滑肌细胞及细胞外基质。

除注射 LDL 外,还可通过该方法局部注射炎症因子,增加动脉血管壁局部炎症反应程度进而加速 AS 的形成。这一思路在兔模型中已诱导了晚期的 AS 斑块的形成^[37],但在基于其他动物的模型报道较少。Lee 等^[38]探索使用该方法构建小型猪 AS 模型,使用注射导管将 HMGB1 及 TNF- α 分别注射入小型猪冠脉及髂动脉内,联合 8 周高脂饲喂及球囊拉伤,构建了程度中等且均一性好的斑块模型。但这一方法仍然具有无法模拟人类晚期 AS 斑块的特征。

因此,即便局部注射法较构建高脂血症效率更高,花费更低,且具有良好的均一性,但其模拟的动脉狭窄的结构与人类 AS 斑块存在一定的差异,即具有丰富的平滑肌细胞和细胞外基质,但没有脂质核心、钙化等,是该方法的缺陷所在。

2.3 其他

除上述方法外,通过诱导糖尿病来加速 AS 斑块的形成的方案也已有多项研究发表^[39-40]。在这些研究中建立了 DM/HC 小型猪模型,即通过链脲佐菌素杀伤胰岛 β 细胞诱导猪血糖升高,再联合高脂饲喂诱导高脂血症,明显加快了 AS 的生成速度。但临床合并 AS 的糖尿病患者多为 II 型糖尿病,同时合并代谢综合征,而 DM/HC 猪是 I 型糖尿病模型,显然无法与临床实际结合。相比之下, Ossabaw 猪因易通过饮食诱导高脂血症及代谢综合征^[10],而在 AS 的相关研究中广泛使用。但通过诱导糖尿病加速 AS 形成的方法依然存在均一性较差的问题,目前仍难以解决。

3 小型猪 AS 模型构建的问题

尽管构建小型猪 AS 模型的研究已有数十年,但面临的主要问题仍未有实质性的突破。这些问题包括:难以在短期内构建与人类类似的晚期 AS 斑块;AS 狭窄程度、范围及位置具有较高的异质性;高脂饲喂诱导时间长,费用高昂。目前尚无方法能较好的解决上述所有的问题。

除此以外,在模型的评价方法上同样存在问

题。多数文献仅报道血脂、动脉粥样硬化指数 (atherosclerosis index, AI) 等指标, 这些指标固然重要, 但更重要的是对 AS 的范围、程度、结构、分期进行多维度的评价。评价方法中, 组织病理学应是所有评价方法中最必要的手段; 而在动物取材之前, 进行适宜的影像学检查, 包括超声、造影、OCT、IVUS 等, 也是模型评价的重要工具。笔者认为研究中应报告除组织病理学外至少一项影像学指标, 以对 AS 模型进行规范的评价。目前国内较多研究尚未采用合理的方法对模型进行评价, 或未在文献中进行报告, 是需要解决的重要问题之一。

4 总结

小型猪模型对于 AS 的研究具有非凡的意义, 经过数十年的研究, 已有多项行之有效模型构建方法相继发表, 尽管目前各类模型均存在不足, 但已为未来的研究提供了丰富的经验。本文将这些研究综述如上, 以启发同行, 为助力 AS 相关研究提供思路。

参 考 文 献 (References)

- [1] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
Hu S, Gao R, Liu L, et al. Summary Of China Cardiovascular Disease Report 2018 [J]. Chin Circul J, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] Emami Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816 (2017): 3-13.
- [3] 王超凡, 杨关林. 小型猪动脉粥样硬化模型研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(5): 69-71.
Wang C, Yang G. Research progress of atherosclerosis model in miniature pig [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2014, 16(5): 69-71.
- [4] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs[J]. Dis Models Mech, 2018, 11(10): dmm036632.
- [5] 阮苗苗. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 LDLR/ApoE 双基因缺陷猪模型以及二十二碳六烯酸对神经胶质瘤转录组影响研究, 2018.
Ruan M. Construction of LDLR/ApoE double gene deficient pig model by CRISPR/Cas9 technology and the effect of docosahexaenoic acid on the transcriptome of glioma [D]. Nanjing University of Medicine, 2018.
- [6] 田玉龙, 钟红珊. 五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25(4): 363-366.
Tian Y, Zhong H. Application of Wuzhishan miniature pig in cardiovascular system disease modeling [J]. J Interv Radiol, 2016, 25(4): 363-366.
- [7] Zhao Y, Xiang L, Liu Y, 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.
- [8] 谢忠忱, 黄广勇, 尹明, 等. 五指山小型猪冠状动脉球囊损伤术[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(6): 9-12.
Xie Z, Huang G, Yin M, et al. Balloon injury of coronary artery in Wuzhishan miniature pig [J]. Chin J Comparative Med, 2008, (6): 9-12.
- [9] Panepinto LM, Phillips RW. The Yucatan miniature pig: characterization and utilization in biomedical research [J]. Lab Anim Sci, 1986, 36(4): 344-347.
- [10] Matthan NR, Solano-Aguilar G, Meng H, et al. The ossabaw pig is a suitable translational model to evaluate dietary patterns and coronary artery disease risk [J]. J Nutr, 2018, 148(4): 542-551.
- [11] Hasler-Rapacz J, Ellegren H, Fridolfsson AK, et al. Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine [J]. Am J Med Genet, 1998, 76(5): 379-386.
- [12] Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, et al. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterol bearing mutant alleles for apolipoprotein B [J]. Am J Pathol, 1991, 139(1): 139-147.
- [13] Thim T, Hagensen MK, Drouet L, et al. Familial hypercholesterolaemic downsized pig with human-like coronary atherosclerosis: a model for preclinical studies [J]. EuroIntervention, 2010, 6(2): 261-268.
- [14] Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity T, et al. Swine lipoproteins and atherosclerosis. Changes in the plasma lipoproteins and apoproteins induced by cholesterol feeding [J]. Biochemistry, 1975, 14(13): 2817-2823.
- [15] 冯元洁, 尹妮, 高玉竹, 等. 小型猪动脉粥样硬化模型中饲料配方的探讨[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 2052-2055.
Feng Y, Yin N, Gao Y, et al. Study on feed formula of atherosclerosis model in miniature pig [J]. Chin Arch Tradit Med, 2017, 35(8): 2052-2055.
- [16] Koza Y, Aydin MD, Bayram E, et al. Role of cardiac ganglia in the prevention of coronary atherosclerosis: An analytical examination of cholesterol-fed rabbits [J]. Balkan Med J, 2019.
- [17] Li J, Wang W, Han L, et al. Human apolipoprotein A-I exerts a prophylactic effect on high-fat diet-induced atherosclerosis via inflammation inhibition in a rabbit model [J]. Acta Biochim Biophys Sini, 2017, 49(2): 149-158.
- [18] Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor [J]. Ann Rev Biochem, 2005, 74: 535-562.
- [19] Hoogendoorn A, den Hoedt S, Hartman EMJ, et al. Variation in coronary atherosclerosis severity related to a distinct LDL (low-density lipoprotein) profile: findings from a familial hypercholesterolemia pig model [J]. Arterioscler Thromb Vasc

- Biol, 2019, 39(11): 2338–2352.
- [20] Davis BT, Wang XJ, Rohret JA, et al. Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs[J]. PLoS one, 2014, 9(4): e93457.
- [21] Li Y, Fuchimoto D, Sudo M, et al. Development of human-like advanced coronary plaques in low-density lipoprotein receptor knockout pigs and justification for statin treatment before formation of atherosclerotic plaques[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(4): e002779.
- [22] Ogita M, Miyauchi K, Onishi A, et al. Development of Accelerated coronary atherosclerosis model using low density lipoprotein receptor knock-out swine with balloon injury [J]. PLoS one, 2016, 11(9): e0163055.
- [23] Shim J, Poulsen CB, Hagensen MK, et al. Apolipoprotein E deficiency increases remnant lipoproteins and accelerates progressive atherosclerosis, but not xanthoma formation, in gene-modified minipigs[J]. JACC Basic Transl Sci, 2017, 2(5): 591–600.
- [24] Huang L, Hua Z, Xiao H, et al. CRISPR/Cas9-mediated ApoE $-/-$ and LDLR $-/-$ double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels[J]. Oncotarget, 2017, 8(23): 37751–37760.
- [25] Durairaj A, Sabates A, Nieves J, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and its inhibitors: a review of physiology, biology, and clinical data[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2017, 19(8): 58.
- [26] Nguyen MA, Kosenko T, Lagace TA. Internalized PCSK9 dissociates from recycling LDL receptors in PCSK9-resistant SV-589 fibroblasts[J]. J Lipid Res, 2014, 55(2): 266–275.
- [27] Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(166): 166ra161.
- [28] Yuan F, Guo L, Park KH, et al. Ossabaw pigs with a PCSK9 gain-of-function mutation develop accelerated coronary atherosclerotic lesions: A novel model for preclinical studies[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(6): e006207.
- [29] 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.
- Zhang X, Huang L, Ruan J, et al. Preparation and analysis of PCSK9 D374Y mutant transgenic pig [J]. Sci Agric Sin, 2017, 50(19): 3808–3816.
- [30] Jain M, Frobert A, Valentin J, et al. The rabbit model of accelerated atherosclerosis: a methodological perspective of the iliac artery balloon injury[J]. J Vis Exp, 2017(128).
- [31] Liu J, Peng Y, Lai J, et al. Fluid upstream shear stress of rabbit aortic stenosis inhibits neointimal hyperplasia by promoting endothelialization after balloon injury[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2017, 17(1): 273.
- [32] Busnelli M, Froio A, Bacci ML, et al. Pathogenetic role of hypercholesterolemia in a novel preclinical model of vascular injury in pigs[J]. Atherosclerosis, 2009, 207(2): 384–390.
- [33] Iqbal J, Chamberlain J, Francis SE, et al. Role of animal models in coronary stenting[J]. Ann Biomed Eng, 2016, 44(2): 453–465.
- [34] Granada JF, Wallace-Bradley D, Win HK, et al. In vivo plaque characterization using intravascular ultrasound-virtual histology in a porcine model of complex coronary lesions [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(2): 387–393.
- [35] Tellez A, Schuster DS, Alviar C, et al. Intramural coronary lipid injection induces atheromatous lesions expressing proinflammatory chemokines: implications for the development of a porcine model of atherosclerosis[J]. Cardiovasc Resusc Med, 2011, 12(5): 304–311.
- [36] Buszman PP, Orlik B, Milewski KP, et al. Local intravascular delivery of low-density-lipoprotein cholesterol corresponds with increased intimal thickening in a healthy porcine coronary model. A prelude to development of a model of atherosclerosis [J]. Postępy Kardiologii Interwencyjnej, 2019, 15(1): 81–90.
- [37] Kim JS, Lee SG, Oh J, et al. Development of advanced atherosclerotic plaque by injection of inflammatory proteins in a rabbit iliac artery model[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(5): 1095–1105.
- [38] Lee SG, Oh J, Bong SK, et al. Macrophage polarization and acceleration of atherosclerotic plaques in a swine model[J]. PLoS one, 2018, 13(3): e0193005.
- [39] Xia J, Qu Y, Yin C, et al. Optical coherence tomography assessment of glucose fluctuation impact on the neointimal proliferation after stent implantation in a diabetic/hypercholesterolemic swine model [J]. Int Heart J, 2017, 58(4): 608–614.
- [40] Hamamdžić D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia[J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 761415.

[收稿日期] 2019-12-21