

五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪对外源性脂肪的敏感性观察

陈亮, 潘永明, 朱科燕, 徐孝平, 徐剑钦, 陈民利

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪对外源性脂肪的敏感性。方法 取雄性五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪各5只,分别采用静脉注射脂肪乳和饲喂高脂饲料,分别检测静脉注射脂肪乳后0.5、1、1.5、2、2.5、3 h和饲喂高脂饲料后12、24、36、48、60、72、84、120 h的血清胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)和甘油三酯(TG)水平,并计算曲线下面积变化 Δ AUC值。结果 注射脂肪乳后3种小型猪甘油三酯(TG)均明显升高($P < 0.01$),在注射后0.5 h达到峰值,其升高程度和 Δ AUC值高低依次为西藏小型猪 > 五指山小型猪 > 巴马小型猪,而TC、LDL-C和HDL-C则无明显变化($P > 0.05$);高脂饲料饲喂饮食诱导后3种小型猪TC、LDL-C、HDL-C和TG均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),其中,五指山小型猪TC、LDL-C在饲喂后36 h、HDL-C在饲喂后48 h、TG在饲喂后24 h达到峰值,巴马小型猪和西藏小型猪TC、LDL-C、HDL-C在饲喂后48-60 h、TG在饲喂后36 h达到峰值,TC、LDL-C、HDL-C的 Δ AUC值高低依次为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪。结论 静脉注射脂肪乳3种小型猪对TG敏感,脂耐量值高低依次为西藏小型猪 > 五指山小型猪 > 巴马小型猪;高脂饲料饲喂对3种小型猪TC、LDL-C、HDL-C敏感,脂耐量值高低依次为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪。

【关键词】 小型猪;血脂代谢;脂耐量;敏感性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0012-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.003

Observation on the sensitivity of Wuzhishan, Tibetan and Bama minipigs to exogenous fats

CHEN Liang, PAN Yong-ming, ZHU Ke-yan, XU Xiao-ping, XU Jian-qin, CHEN Min-li
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the sensitivity of Wuzhishan, Tibetan and Bama minipigs to exogenous fats. **Methods** A total of 15 male minipigs including 5 WZS minipigs, 5 Tibetan minipigs and 5 Bama minipigs, were used in this study. The minipigs were intravenously injected with fat emulsion and fed with high-fat diet, and the changes of serum total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL-C), high density lipoprotein (HDL-C) and triglyceride (TG) levels were detected at 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h and 3 h after intravenous injection of fat emulsion and at 3 h and 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h and 84 h after fed with high-fat diet, respectively, and calculated the changes of area under the curve (Δ AUC) values. **Results** The triglyceride (TG) in the three kinds minipigs were significantly increased ($P <$

[基金项目] 浙江省科技厅实验动物科技计划项目(2012C37078), 浙江中医药大学比较医学创新团队(XTD201301)。

[作者简介] 陈亮(1982-), 男, 助理研究员, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: chl810@foxmail.com。

[通讯作者] 陈民利(1963-), 女, 教授, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: cml1991@aliyun.com。

0.01), and reached a peak at 0.5 h after injection. The degree of elevation of Δ AUC values were different showing on increasing order: Tibetan minipig > Wuzhishan minipig > Bama minipig, while TC, LDL-C and HDL-C showed no significant changes ($P > 0.05$). Moreover, TC, LDL-C, HDL-C and TG were significantly increased in the three stocks of minipigs induced by feeding with high-fat diet ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Among them, the TC and LDL-C of Wuzhishan minipigs peaked at 36 h, HDL-C peaked at 48 h and TG peaked at 24 h after feeding, respectively. TC, LDL-C and HDL-C in the Bama minipigs and Tibetan minipigs peaked at 48–60 h and TG peaked at 36 h after feeding, and the Δ AUC values of TC, LDL-C and HDL-C were in an increasing order of Wuzhishan minipigs > Bama minipigs > Tibetan minipigs. **Conclusions** The three stocks of minipigs are sensitive to TG after intravenous injection of fat emulsion, and the lipid tolerance values are in an order of Tibetan minipig > Wuzhishan minipigs > Bama minipigs. Meanwhile, the three stocks of minipigs are also sensitive to TC, LDL-C and HDL-C after feeding with high-fat diet, and the lipid tolerance values are in an increasing order of Wuzhishan minipig > Bama minipigs > Tibetan minipigs.

【Key words】 Minipig; Blood lipid metabolism; Lipid tolerance; Sensitivity

血脂异常是引起动脉粥样硬化、心脑血管疾病和高血压的重要危险因素。随着人类物质生活水平和生活方式的改变,血脂异常的患病率呈逐渐上升趋势,已成为 21 世纪人类健康普遍关注的问题^[1]。血脂代谢异常主要包括胆固醇和甘油三酯水平的异常改变,其敏感性可能与遗传因素有关。

小型猪是研究心脑血管疾病的一个重要模型,其循环系统和代谢系统与人类极为相似^[2]。在脂质成分的比例与人类十分接近,如小型猪血脂中 LDL-C 成分比例占主导,而兔和大小鼠 LDL-C 成分所占比例极少,与人类差异较大^[3]。我国有丰富的小型猪种质资源,如五指山小型猪、广西巴马小型猪、西藏小型猪、版纳小型猪、贵州香猪等,但在许多生理及其应用特点尚未清楚,在人类疾病动物模型复制和评价中具有较好的应用价值。当前除采用糖耐量和胰岛素耐量筛选评价糖代谢和胰岛素代谢的敏感性外,未见小型猪血脂耐量的相关研究方法。选择和筛选对某些指标易感性强的实验动物,关系到疾病动物模型是否成功的关键因素之一。我们在前期研究中发现同样的高脂环境下,巴马小型猪、西藏小型猪、五指山小型猪的血脂水平和动脉粥样硬化斑块的形成进度存在差异,推测可能与血脂的敏感性和耐量有关。目前有采用糖耐量和胰岛素耐量筛选评价糖代谢和胰岛素代谢的敏感性。为此,本实验采用注射脂肪乳和饲喂高脂饲料,观察巴马小型猪、西藏小型猪、五指山小型猪在血脂代谢敏感性,为这 3 种小型猪在心脑血管疾病模型中的应用和动物选择提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级五指山小型猪 (WZS) 和西藏小型猪

(Tibetan) 各 5 只,雄性,体重为 (14~18) kg,分别购于广东大华动物保健品股份有限公司提供【SCXK(粤)2008-0022】和南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】;普通级巴马小型猪 5 只,雄性,体重为 14~18 kg,购于上海市南汇区老港镇华新特种养殖场提供【SCXK(沪)2012-0013】。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通级实验室【SYXK(浙)2008-0116】,环境温度为 (22±1)℃,相对湿度为 45%~65%。饲喂全价营养饲料和自由饮水,12 h/12 h 明暗交替,所有小型猪在实验过程中按实验动物使用的“3R”原则给予人道的关怀,并在适应性恢复 8 周后开始正式试验。

1.2 主要仪器及试剂

7020 全自动生化分析仪,日本日立公司;甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)均由上海申能德赛诊断技术有限公司提供。30% 脂肪乳注射液(英脱利匹特),华瑞制药有限公司生产,批号:80EA153。高脂饲料:15% 油脂、10% 蛋黄粉、1.5% 胆固醇、73.5% 基础饲料。

1.3 方法

1.3.1 静脉注射脂肪乳对小型猪血脂代谢的影响:实验前将五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪禁食 12 h 后,称重并行颈静脉穿刺取血 1 mL,而后耳缘静脉注射 1 mL/kg 的脂肪乳,分别在静脉注射前、注射后 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 时取血,分离血清,测定血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 的变化,并计算各指标的变化幅度(Δ)及曲线下面积 AUC(脂耐量值)。

1.3.2 高脂饮食对小型猪血脂代谢的影响:实验前将五指山小型猪、西藏小型猪和巴马小型猪禁食 12 h,称重并行颈静脉穿刺取血 1 mL,然后按 3% 体重

给予高脂饲料,分别在高脂饮食前、给予后 12、24、36、48、60、72、84、120 h 时取血,测定血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 指标的变化,并计算各指标的变化幅度及曲线下面积 AUC (脂耐量值)。其中在高脂饮食 24 h 后开始饲喂基础饲料 300 g/d,分成上午 9:00 和下午 15:00 两次饲喂。

1.4 统计学方法

数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 19.0 软件统计,进行单因素 ANOVA 方差分析,组间比较采用 L-S-D 法;以 $P < 0.05$ 为显著差异。

2 实验结果

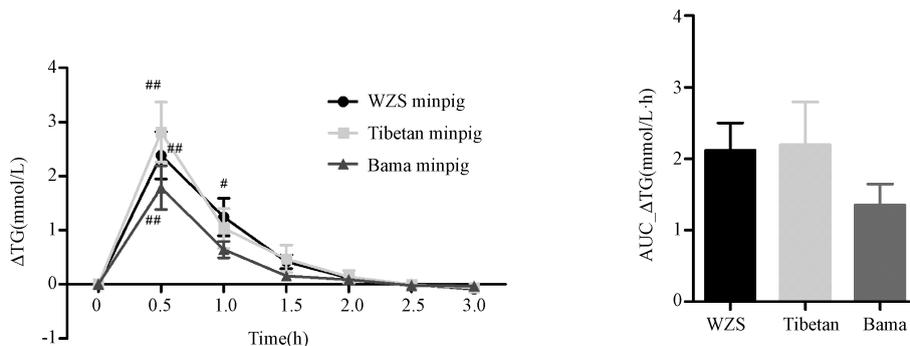
2.1 静脉注射脂肪乳对 3 种品系小型猪血脂代谢的影响

注射脂肪乳后,3 种小型猪的血清 TC、LDL-C 和 HDL-C 水平给药前后均无明显变化 ($P > 0.05$),仅见血清 TG 水平出现显著性升高 ($P < 0.01$),并在注射 0.5 h 后达到峰值,随后开始逐渐降低,且在注射后 (2.5 ~ 3)h 时间点恢复到基础水平;另外,3 种小型猪的 AUC_{ΔTG} 的曲线面积从高低依次为西藏小型猪 > 五指山小型猪 > 巴马小型猪,但各品种间无明显差异 ($P > 0.05$),见图 1。

2.2 高脂饮食对 3 种品系小型猪血脂代谢的影响

饲喂高脂饲料后,五指山小型猪 TC 水平明显升高,其中在 (24 ~ 72)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 36 h 时达到峰值,此后开始降低,直至 120 h 仍高于基础水平;而西藏小型猪和巴马小型猪 TC 水平亦升高显著,分别在 (24 ~ 72)h 和 (24 ~ 84)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 48 h 时

达到峰值,随后开始降低并直至 120 h 时仍高于基础水平;从 AUC_{ΔTC} 来看,其高低依次分别为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪,其中西藏小型猪 AUC_{ΔTC} 明显低于五指山小型猪 ($P < 0.05$),见图 2A。另外,五指山小型猪和西藏小型猪的 HDL-C 水平亦明显升高,其中 (24 ~ 120)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 (48 ~ 60)h 时达到峰值,此后降低并直至 120 h;巴马小型猪 HDL-C 水平亦有升高,其中 (24 ~ 84)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 48 ~ 60 h 左右达到峰值,此后下降直至 120 h,从 AUC_{ΔHDL-C} 来看,其高低依次分别为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪,但品种间差异不显著 ($P > 0.05$),见图 2B。此外,五指山小型猪 LDL-C 水平明显升高,其中在 (24 ~ 72)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 36h 时达到峰值,此后逐渐降低并至 120 h;而西藏小型猪和巴马小型猪 LDL-C 水平亦升高显著,分别在 (24 ~ 72)h 和 (24 ~ 60)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),且分别在 60 h 和 48 h 时达到峰值,随后开始降低并直至 120 h;从 AUC_{ΔLDL-C} 来看,其高低依次分别为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪,其中西藏小型猪 AUC_{ΔLDL-C} 明显低于五指山小型猪 ($P < 0.05$),见图 2C。同样,五指山小型猪的 TG 出现升高,并在饲喂后 (84 ~ 120)h 时升高显著 ($P < 0.05, P < 0.01$),并在 120 h 时达到峰值;而西藏小型猪和巴马小型猪的 TG 亦有上升,并在饲喂后 (24 ~ 36)h 时升高显著,且分别在 36 h 和 24 h 时达到峰值,此后有所下降,并在 48 ~ 120 h 间维持一定的水平,从 AUC_{ΔTG} 来看,其高低依次为西



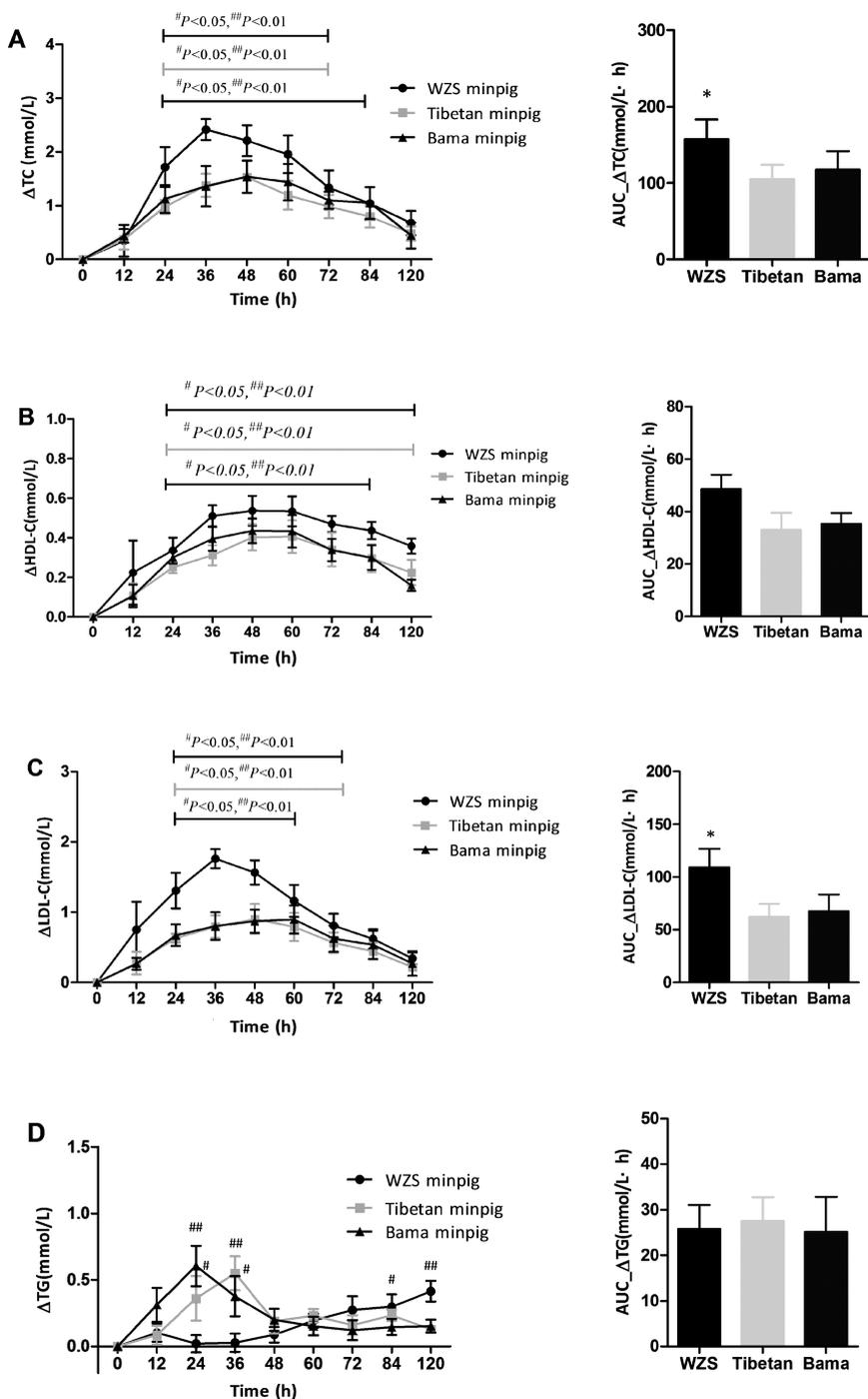
注:与西藏小型猪比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与巴马小型猪比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与注射前(0h)比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。

图 1 静脉注射脂肪乳对 3 种品系小型猪血脂代谢的影响

Note. Compared with the Tibetan minipigs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the Bama minipigs, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with that before injection (0 h), # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

Fig. 1 Effect of intravenous injection of fat emulsion on lipid metabolism in the three stocks of minipigs

藏小型猪 > 五指山小型猪 > 巴马小型猪, 但品种间 无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 2D。



注: 与西藏小型猪比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与巴马小型猪比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与高脂饲喂前(0 h)比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 单次饲喂高脂饲料三种品系小型猪血脂代谢的影响

Note. compared with the Tibetan minipigs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the Bama minipigs, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; compared with that before fed with high fat diet (0 h), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of high-fat-diet feeding on lipid metabolism in the three stocks of minipigs

3 讨论

疾病动物模型的建立和评价是研究和探讨人类疾病病理机制和药物干预的有效手段。近来,以高脂血症为主的血脂代谢紊乱和脂质过氧化是动脉粥样硬化形成和发展的重要因素,其中血脂代谢紊乱主要表现为 TC、LDL-C、TG 水平升高或 HDL-C 水平降低^[4]。最近 Ridker P M^[5] 提出,餐后甘油三酯浓度的可变性,正是反映了个体代谢水平的相关信息,更能反映心血管疾病的风险,未来在冠心病患者中有必要进行脂耐量试验,评价其血脂的耐受情况。但目前对于脂耐量试验的相关研究甚少,包括动物实验^[6]。因此,开展脂耐量试验相关方法学的研究,有助于筛选和评价机体对脂质代谢的耐受情况,对于疾病的预防具有重要的参考价值。

脂肪乳为复制大小鼠、兔等高脂血症模型的诱导剂^[7]。本研究在静脉注射脂肪乳后,小型猪 TG 水平出现明显的升高,而其它指标则未见明显的改变。这与脂肪乳中主要含有甘油三酯、磷脂成分有关^[8]。同时,注射脂肪乳后可见小型猪机体 TG 水平迅速在 30 min 内升高到峰值,在 2.5 h 后恢复到基础水平。可见,脂肪乳对小型猪体内 TG 代谢反应敏感,有助于评估机体对甘油三酯水平的吸收利用情况,且其反应迅速、恢复时间快、是筛选 TG 水平敏感性较好的研究方法。同时,本研究也发现,注射脂肪乳后 Δ TG 曲线面积结果表明,相比巴马小型猪,西藏小型猪和五指山小型猪对脂肪乳的耐受能力较差,其中西藏小型猪对甘油三酯的排泄能力最差,注射脂肪乳半小时后血清 TG 水平上升最高,且下降也较为缓慢。

高脂饮食在形成高脂血症、动脉粥样硬化、脂肪肝以及相关疾病并发症等动物模型中是最常见和重要的诱导剂。本研究结果表明,单次饲喂高脂饲料后小型猪体内血脂代谢水平均出现明显的升高,其中胆固醇指标在诱导 12 h 后即可升高,(24 h ~ 72) h 时出现显著性变化,72 h 后逐渐下降,并至 120 h 后恢复到基础水平,而 HDL-C 成分的升高可能与 TC 整体水平的升高有关。同时,发现五指山小型猪的循环中胆固醇代谢指标曲线下面积最高,西藏小型猪则最低,同样本结果也发现,高脂饮食

后 3 种小型猪机体 TG 水平的升高,其中巴马小型猪和西藏小型猪升高相对迅速,五指山升高相对缓慢,但 Δ TG 曲线下面积也证实西藏小型猪最高,巴马小型猪较低,这与本试验注射脂肪乳的反应结果较为一致。

综合上述结果,注射脂肪乳和饲喂高脂饲料均可观察到小型猪脂质耐受性的变化,其中脂肪乳侧重于反映 TG 水平的变化,高脂饮食则可同时反映 TG 和 TC 的变化,两种方式均可用于评估小型猪脂质代谢反应的敏感性。但是,不同品系的小型猪对脂质敏感性存在明显的差异,其中,静脉注射脂肪乳 3 种小型猪对 TG 敏感,TG 脂耐量值高低依次为西藏小型猪 > 五指山小型猪 > 巴马小型猪;高脂饲料饲喂对 3 种小型猪 TC、LDL-C、HDL-C 敏感,脂耐量值高低依次为五指山小型猪 > 巴马小型猪 > 西藏小型猪。因此,在选择小型猪时,可根据实验要求和目的进行选择。

参考文献:

- [1] 张庆国. 血脂异常的药物治疗进展 [J]. 临床进展, 2011, 23 (5): 5-6.
- [2] Svendsen O. The minipig in toxicology [J]. Exp Toxicol Pathol, 2006, 57: 335-339.
- [3] Kawaguchi H, Miyoshi N, Miura N, et al. Microminipig, a non-rodent experiment animal optimized for life science research: novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet [J]. J Pharmacol Sci, 2011, 115(2): 115-121.
- [4] 王特, 刘运海. Ox-LDL 与动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(29): 230-231.
- [5] Ridker PM. Fasting versus nonfasting triglycerides and the prediction of cardiovascular risk: do we need to revisit the oral triglyceride tolerance test? [J]. Clin Chem, 2008, 54(1): 11-13.
- [6] 王宇辉, 刘国庆. 胆固醇和甘油三酯代谢紊乱与代谢性心血管病的研究进展 [J]. 中国医学前沿杂志, 2012, 4(8): 19-22.
- [7] 韩荣, 王茜, 张海英, 等. 阿魏胶囊对高脂血症大鼠及家兔的预防作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(3): 174-177.
- [8] 陈洁. 脂肪乳的特点及临床应用 [J]. 中国医学创新, 2012, 9(4): 158-161.

[修回日期] 2016-12-27