

## · 实验研究 ·

## 坏死性小肠结肠炎动物模型建立方法的改进与评价



全文二维码

徐铃琪<sup>1</sup> 马淑蓉<sup>1</sup> 陈璐璐<sup>2</sup> 周慧婷<sup>1</sup> 汪健<sup>2</sup><sup>1</sup> 苏州大学附属儿童医院儿科临床研究所, 苏州 215025; <sup>2</sup> 苏州大学附属儿童医院普外科, 苏州 215025

通信作者: 汪健, Email: wj196312@vip.163.com

**【摘要】 目的** 目前新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)动物模型的构建方式仍不统一,本研究旨在明确更贴切临床 NEC 患儿实际情况的动物建模方式。 **方法** 随机将 54 只 C57BL/6 新生小鼠分为五组,依次为:对照组(Ctrl 组,10 只)、缺氧+人工喂养组(HF 组,10 只)、缺氧+人工喂养+冷刺激组(Cold 组,12 只)、缺氧+人工喂养+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组(LPS 组,11 只)、缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌组(Bac 组,11 只);分别建立 NEC 动物模型后,评估肠道组织病理、NEC 相关肠上皮屏障蛋白( $\beta$ -catenin、Occludin)和肠上皮细胞死亡标记性分子(CC3、RIPK1、PARP1)以及促炎细胞因子(IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP1)的表达变化。 **结果** 按照肠道组织学 Nadler 评分 $\geq 2$ 分视为 NEC 样肠道损伤。本研究除 Ctrl 组和 HF 组外,其余三组 NEC 造模的肠道组织病理均满足 NEC 样肠道损伤标准。与 HF 组(30%)、Cold 组(83.3%)和 LPS 组(81.8%)相比,Bac 组的建模成功率最高(100%),且造模期间 Bac 组小鼠的精神状况、腹胀腹泻、活动度等与 NEC 临床情况更为贴切,同时 Bac 组小鼠的肠道屏障蛋白  $\beta$ -catenin 和 Occludin 表达下降,与 Ctrl 组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组和 Bac 组肠上皮细胞死亡标记性分子 RIPK1 和 PARP1 表达上调,炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 MCP1 表达水平增加,与 Ctrl 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。 **结论** 本研究成功比较了 4 种 NEC 动物模型的建立方法,明确了一种更贴近临床 NEC 患儿实际情况的动物建模方法,即“缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌”。该造模方法成功率高,肠道组织病理损伤、肠道屏障蛋白表达和全身炎症反应与临床上 NEC 患儿特征相似度更高。

**【关键词】** 小肠结肠炎, 坏死性; 模型, 动物; 可行性研究**基金项目:**江苏省卫生健康委医学科研项目(H2019002)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202202036-014

## Improvements and evaluations of animal models of neonatal necrotizing enterocolitis

Xu Lingqi<sup>1</sup>, Ma Shurong<sup>1</sup>, Chen Lulu<sup>2</sup>, Zhou Huiting<sup>1</sup>, Wang Jian<sup>2</sup><sup>1</sup> Institute of Pediatric Research, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025, China; <sup>2</sup> Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215025, China

Corresponding author: Wang Jian, Email: wj196312@vip.163.com

**【Abstract】 Objective** The construction of animal models of neonatal necrotizing enterocolitis (NEC) is still not uniform, and animal modeling approaches that are more relevant to the actual clinical situation of NEC children should be clarified. **Methods** Fifty-four newborn mice were randomized into five groups of control (Ctrl), hypoxia plus artificial feeding (HF), hypoxia plus artificial feeding plus cold stimulation (Cold), hypoxia plus artificial feeding plus lipopolysaccharide (LPS) and hypoxia plus artificial feeding plus intestinal bacteria in NEC (Bac). After successful modeling, intestinal pathology, NEC-related intestinal epithelial barrier proteins ( $\beta$ -catenin & Occludin), intestinal epithelial cell death (CC3, RIPK1 & PARP1) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  & MCP1) were evaluated. **Results** Nadler score  $\geq 2$  according to intestinal histology was considered as NEC-like intestinal injury. In this study, the intestinal histopathology of the three NEC-modeled groups met the criteria for NEC-like intestinal injury, except for the Ctrl and HF groups. Compared with the NEC modeling groups HF (30%), Cold (83.3%) and LPS (81.8%), the Bac group had the high-

est modeling success rate (100%), and the mental status, bloating and diarrhea, and mobility of the mice in the Bac group during the modeling period were more consistent with clinical NEC. Meanwhile, the expression of intestinal barrier proteins  $\beta$ -catenin and Occludin was decreased in the Bac group mice, and the difference was statistically significant compared with the Ctrl group ( $P < 0.05$ ). the expression of intestinal epithelial cell death marker molecules RIPK1 and PARP1 was upregulated in the LPS and Bac groups, and the expression levels of inflammatory factors IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP1 were increased compared with the Ctrl group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study has successfully established four NEC animal models and verified a more appropriate animal modeling method of clinical NEC, namely "hypoxia plus artificial feeding plus NEC intestinal bacteria". Such a modeling method has a high success rate. And intestinal histopathological injury, intestinal barrier protein expression and systemic inflammatory response mimic closely the clinical characteristics of NEC.

**【Key words】** Enterocolitis, Necrotizing; Models, Animal; Feasibility Studies

**Fund program:** Medical Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (H2019002)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202202036-014

新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿时期特有的累及肠道组织的炎症坏死性疾病,多见于早产儿和低出生体重儿<sup>[1]</sup>。近年来新生儿疾病的诊疗水平不断提高,但相较于其他新生儿疾病,NEC的病死率仍然较高,因此进一步探究 NEC 的病理生理过程尤为重要<sup>[2-3]</sup>。NEC 是一种多因素疾病,其危险因素包括早产、非母乳喂养和微生物定植,但具体发病机制尚未完全明确<sup>[4]</sup>。优良的动物模型有利于研究者针对疾病的病因、病理生理、诊治和预防进行深入研究。但目前 NEC 动物模型的建立方法仍存在较大争议。本研究通过比较 4 种 NEC 动物模型的建立方法,旨在明确一种相对简便且与 NEC 患儿临床特征相似度更高的方法,以帮助研究人员更好地探索 NEC 的发病机制,改善 NEC 患儿的预后。

## 资料与方法

### 一、实验材料

#### (一)实验动物与模型建立

从昭衍(苏州)新药研究中心有限公司[生产许可证号:SCXK(苏)2018-0006]购买 5 日龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6 新生小鼠,在苏州大学附属儿童医院儿科临床研究所的动物实验中心适应性喂养 2 d(即小鼠达 7 日龄)后开始造模。分组方案如下:将 54 只 7 日龄新生小鼠随机分为对照组(Ctrl 组,10 只)、缺氧+人工喂养组(HF 组,10 只)、缺氧+人工喂养+冷刺激组(Cold 组,12 只)、缺氧+人工喂养+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组(LPS 组,11 只)和缺氧+人工

喂养+NEC 患儿肠内细菌组(Bac 组,11 只)。

造模条件:①缺氧:每日早晚固定时间将小鼠置于缺氧环境(95% N<sub>2</sub> + 5% O<sub>2</sub>),每日 2 次,每次 10 min;②人工喂养:将配制好的高渗配方奶(3 g 牛奶粉和 2 g 羊奶粉溶于 10 mL 纯水)经口置入胃管,以管饲高渗配方奶的方式进行人工喂养,每次剂量为 40  $\mu$ L/g 小鼠体重,每日 3 次;③冷刺激:每日早晚固定时间对小鼠进行低温刺激(4℃),每日 2 次,每次 10 min;④LPS:在造模第 2、3 天的第 2 次人工喂养配方奶中加入 LPS(4  $\mu$ g/g);⑤NEC 患儿肠内细菌:在喂养的配方奶中加入 3 例严重 NEC 患儿的粪便原浆(1 mL 配方奶中加入 12.5  $\mu$ L 粪便原浆)。Ctrl 组不予干预,继续由母乳喂养。整个造模周期为 96 h。

#### (二)主要试剂与仪器

牛奶粉(美国雅培公司),羊奶粉(美国倍酷公司),LPS(美国 Sigma 公司),TUNEL 和 cleaved-caspase3(CC3)(武汉赛维尔生物科技有限公司),RIPK1 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),PARP1、 $\beta$ -catenin 和  $\beta$ -actin 抗体(美国 CST 公司),Occludin 抗体(英国 Abcam 公司),RIPA 裂解液(碧云天生物科技公司),All-In-One 5X RT MasterMix(加拿大 ABM 公司),24GY 型静脉留置针(美国 BD 公司),希玛 AR8100 氧浓度测试仪,实验动物缺氧仓。

### 二、实验方法

#### (一)观察小鼠一般情况

将小鼠分组编号并称重,之后于每日实验开始前称重。造模期间仔细观察 5 组小鼠的状态,包括活动性、皮肤颜色、反应能力、腹部膨隆、腹泻、大便性状、呕吐等;记录小鼠在造模期间的具体

死亡时间与数量。

## (二) 肠道大体与病理学检测

96 h 造模结束后, 麻醉小鼠, 沿腹中线纵向切开小鼠腹部, 分离盲肠及回肠, 观察各组小鼠的肠管外形、颜色以及肠壁是否有串珠样积气、坏死等。用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate balanced solution, PBS) 冲洗肠道后剪取约 1 cm 回肠末端标本, 用 4% 多聚甲醛固定。固定后的组织放入脱水盒中依次用 99%、85%、75% 浓度酒精进行组织脱水, 然后加入液体石蜡制作蜡块, 于包埋机内将浸好蜡的组织包埋, 石蜡切片机切片, 厚度约 4  $\mu\text{m}$ 。最后行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin stain, HE) 常规染色, 于显微镜下观察并进行肠道病理损伤评分。评分参考 Nadler 评分系统, 组织学评分  $\geq 2$  分判定为 NEC 样肠道损伤<sup>[5]</sup>。

(三) 肠道多核苷酸链断裂 (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 检测

石蜡切片脱蜡后按照赛维尔公司提供的 tunel 试剂盒操作步骤进行染色, 封片后在荧光显微镜下观察 tunel 染色结果。

## (四) 蛋白印迹法检测

取新鲜回肠末端标本加入适量含磷酸酶和蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液 (Radio-Immunoprecipitation Assay, RIPA) 充分低温研磨, 冰上静置裂解 30 min, 离心, 留上清液, 加入相应量的蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$  金属浴 10 min 使蛋白充分变性。根据蛋白含量进行上样、电泳、转膜、封闭、一抗二抗孵育, 最后浸泡于显色液显影, 并用 Image J 软件分析蛋白表达量。

## (五) 免疫荧光检测

回肠末端标本石蜡切片脱蜡后进行抗原修复, 在组织周围画圈防止抗体丢失, 用血清封闭 30 min 后加入一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育过夜, PBS 清洗后加入二抗, 避光孵育 45 min, PBS 清洗后用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 避光染核 5 min。加入荧光淬灭剂后立即封片, 使用荧光显微镜观察染色结果。

## (六) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 Trizol 法提取回肠末端标本总 RNA, 根据 All-In-One 5X RT MasterMix 操作说明书步骤合成 cDNA, PCR 反应采用三步法扩增, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  分析各基因的 mRNA 水平。各引物序列如下: IL-6: (F) 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3', (R) 5'-AGTGG-

TATAGACAGGTCTGTTGG-3'; TNF- $\alpha$ : (F) 5'-CAG-GCGGTGCCTATGTCTC-3', (R) 5'-CGATCACCCG-AAGTTCAGTAG-3'; MCP1: (F) 5'-TTAAAAACCTG-GATCGGAACCAA-3', (R) 5'-GCATTAGCTTCAGATT-TACGGGT-3';  $\beta$ -actin: (F) 5'-AGAGGGAAATCGTG-CGTGAC-3', (R) 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。

## 三、统计学处理

应用 Graphpad Prism 8 进行统计学分析。服从正态分布和方差齐性的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 整体差异有统计学意义的基础上两两组间比较采用 LSD-t 检验; 非正态分布的计量资料以  $M(Q_1, Q_3)$  表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验, 整体差异有统计学意义的基础上两两组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验。存活率采用 Log-Rank 检验, 生存曲线采用 Kaplan-Meier 分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 结 果

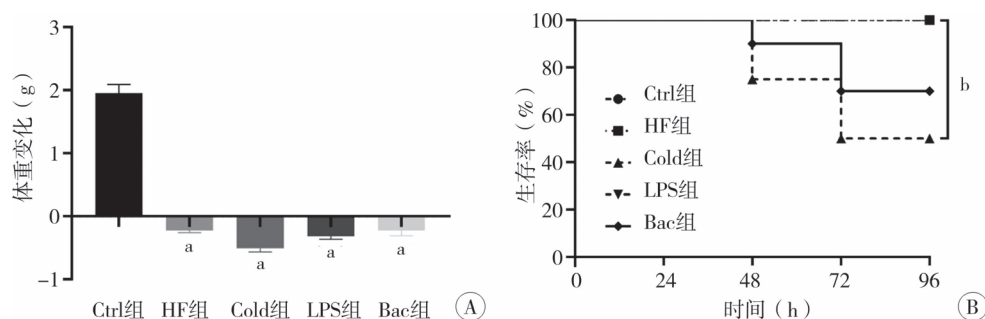
## 一、一般情况与生长状况

造模期间, 与 Ctrl 组相比, HF 组、Cold 组、LPS 组和 Bac 组小鼠造模期间均有不同程度精神萎靡, 活动量减少, 蜷缩抽搐, 腹胀腹泻, 偶有血便, 腹部皮肤略苍白, 皮下脂肪减少; HF 组症状相对较轻, Cold 组、LPS 组和 Bac 组症状相对较重。造模结束后各造模组小鼠体重均明显减轻 [HF 组为  $(-0.224 \pm 0.113)\text{g}$ ; Cold 组为  $(-0.508 \pm 0.142)\text{g}$ ; LPS 组为  $(-0.317 \pm 0.14)\text{g}$ ; Bac 组为  $(-0.230 \pm 0.224)\text{g}$ ], 与 Ctrl 组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 但各造模组之间体重改变差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1A)。造模期间, Ctrl 组、HF 组和 LPS 组均无小鼠死亡, 存活率均为 100%; 而 Cold 组死亡 6 只, 存活率为 50% (6/12), 与 Ctrl 组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Bac 组死亡 3 只, 存活率为 72.7% (8/11), 与 Ctrl 组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1B)。

## 二、小肠组织宏观和微观病理改变

肉眼观察肠道外观, Ctrl 组肠管呈淡黄色, 弹性好; HF 组、Cold 组和 LPS 组肠管颜色略淡, 肠壁韧性差, 易破损, 有不同程度的肠壁积气, 以 Cold 组和 Bac 组串珠样积气最为明显。此外, Bac 组肠管颜色较红, 弹性差, 有积气和血性渗出物 (图 2A)。病理结果显示, Ctrl 组绒毛结构完整无断裂, 排列整齐, 病理损伤平均分为 0.2 分; HF 组绒毛水肿轻, 排





注 A:各 NEC 造模组小鼠与 Ctrl 组小鼠体重比较(a 表示  $P < 0.001$ );B:NEC 造模组小鼠与 Ctrl 组小鼠存活率比较(b 表示  $P < 0.05$ );NEC:新生儿坏死性小肠结肠炎;Ctrl:对照组;HF 组:缺氧+人工喂养组;Cold 组:缺氧+人工喂养+冷刺激组;LPS 组:缺氧+人工喂养+脂多糖;Bac 组:缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌组

图 1 各 NEC 造模组小鼠的一般情况

Fig.1 General conditions of mice in each NEC group

列较整齐,黏膜及黏膜上皮层轻度水肿,病理损伤平均分为 1.2 分,未达到 Nadler 的 NEC 评分标准;Cold 组、LPS 组、Bac 组均有不同程度的绒毛断裂、脱落和消失,排列紊乱,有中度或重度黏膜下和(或)固有层分离,病理损伤平均分别为 2.5、2.3、3 分,与 Ctrl 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2B、图 2C)。按照 Nadler 双盲法将病理评分  $\geq 2$  分判定为 NEC 样肠道损伤,Cold 组、LPS 组和 Bac 组的 NEC 动物模型成功率分别为 83.3%、81.8% 和 100%。

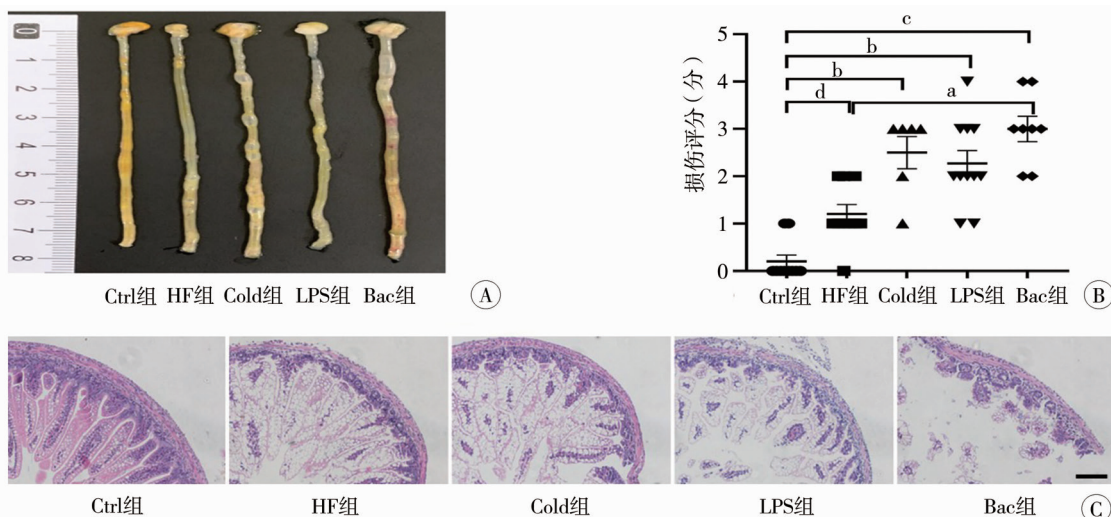
### 三、肠道屏障功能障碍

TUNEL 法检测各组肠道细胞死亡结果显示,绒毛尖端 TUNEL 阳性细胞数最多,表明肠上皮尖端损伤最严重(图 3A)。与 Ctrl 组相比,肠道上皮屏障的黏附连接蛋白  $\beta$ -catenin 在各 NEC 造模组的表达均下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其中 Bac 组  $\beta$ -

catenin 蛋白表达下降最明显,与 HF 组、Cold 组和 LPS 组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3B)。与 Ctrl 组相比,Cold 组、LPS 组和 Bac 组肠道上皮屏障的紧密连接蛋白 Occludin 表达下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Bac 组的 Occludin 蛋白表达下降最显著,与 HF 组和 Cold 组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3C)。4 种造模方式中,Bac 组肠道屏障损伤最严重。

### 四、肠上皮细胞死亡增加

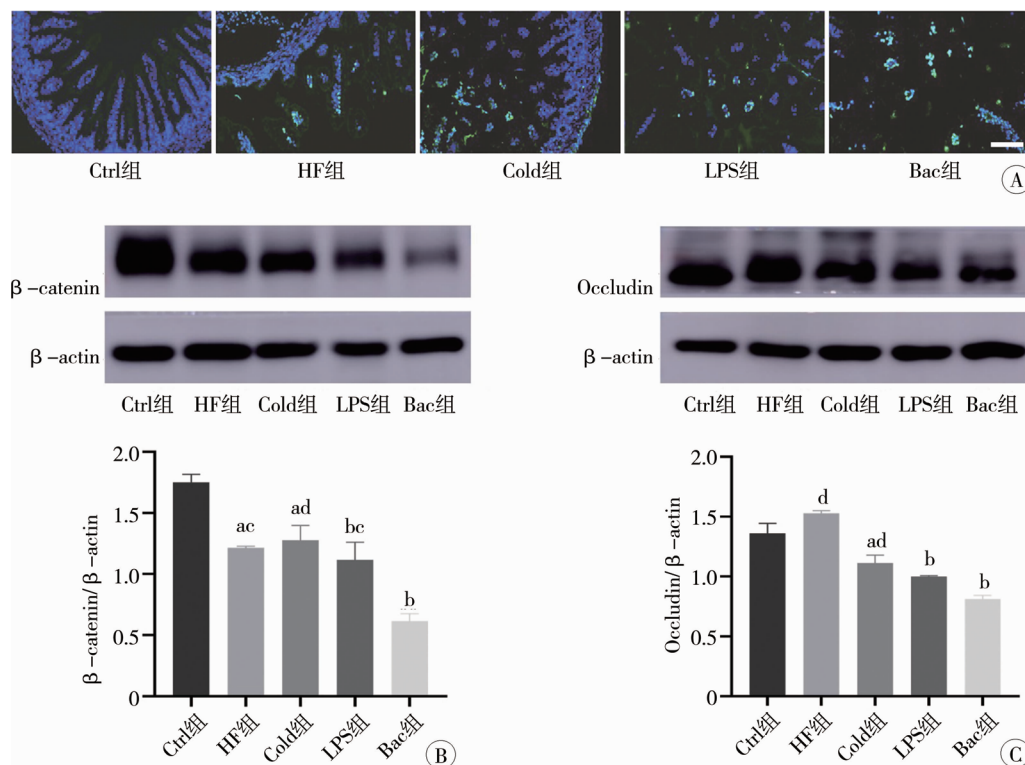
CC3、RIPK1 和 PARP1 分别是细胞凋亡、坏死性凋亡和 parthanatos 细胞死亡途径的标记性分子。用免疫荧光技术检测细胞死亡途径的标记性分子表达显示,CC3 在 Ctrl 组不表达,在各 NEC 造模组均表达;RIPK1 和 PARP1 在 LPS 组与 Bac 组表达明显(图 4),Bac 组和 LPS 组肠道坏死最严重。



注 A:各组小鼠肠道的形态对比;B、C:各组肠道组织损伤评分及病理结果(HE 染色  $\times 200$ ,标尺为  $100 \mu\text{m}$ ),a 表示  $P < 0.05$ ;b 表示  $P < 0.01$ ;c 表示  $P < 0.001$ ;d 表示  $P > 0.05$ ;Ctrl:对照组;HF 组:缺氧+人工喂养组;Cold 组:缺氧+人工喂养+冷刺激组;LPS 组:缺氧+人工喂养+脂多糖;Bac 组:缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌组

图 2 各组小鼠肠道的宏观大体标本和病理切片对比

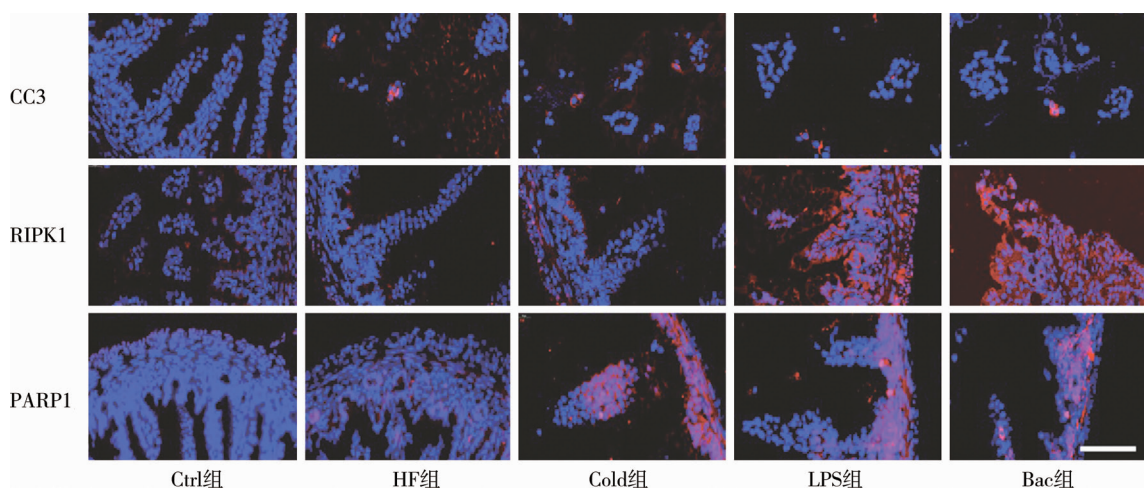
Fig.2 Comparison of macroscopic specimens and pathological sections of murine intestine in each group



注 A:各组小鼠肠道的 TUNEL 染色(绿色,标尺为 100 μm); B:蛋白质印迹法检测肠道屏障蛋白 β-连环蛋白和内参 β-肌动蛋白的蛋白条带及蛋白表达量; C:蛋白质印迹法检测肠道屏障蛋白咬合蛋白和内参 β-肌动蛋白的蛋白条带及蛋白表达量(a 表示与 Ctrl 组比较  $P < 0.05$ ; b 表示与 Ctrl 组比较  $P < 0.01$ ; c 表示与 Bac 组比较  $P < 0.05$ ; d 表示与 Bac 组比较  $P < 0.01$ ); Ctrl:对照组; HF 组:缺氧+人工喂养组; Cold 组:缺氧+人工喂养+冷刺激组; LPS 组:缺氧+人工喂养+脂多糖; Bac 组:缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌组

图 3 各组小鼠肠道屏障功能障碍情况对比

Fig. 3 Comparison of intestinal barrier dysfunction of mice of in each group



注 小鼠肠道组织 CC3(细胞凋亡)、RIPK1(坏死性凋亡)和 PARP1(parthanatos)免疫荧光染色(红色,×600,标尺为 100 μm); Ctrl:对照组; HF 组:缺氧+人工喂养组; Cold 组:缺氧+人工喂养+冷刺激组; LPS 组:缺氧+人工喂养+脂多糖; Bac 组:缺氧+人工喂养+NEC 肠内细菌组

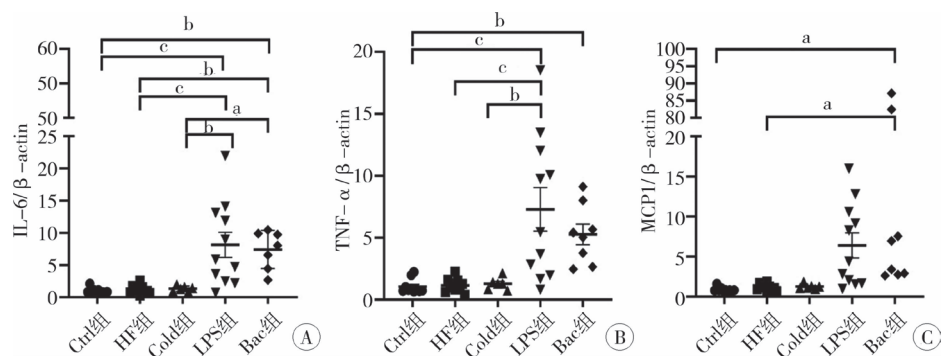
图 4 各组小鼠肠上皮细胞死亡数量对比

Fig. 4 Increased number of intestinal epithelial cell death of mice in each group

## 五、肠道组织过度炎症

检测各组肠道组织的细胞因子和趋化因子发现,与 Ctrl 组相比,IL-6(图 5A)和 TNF-α(图 5B)以及趋化因子 MCP1(图 5C)在 LPS 组和 Bac 组的表

达显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 HF 组和 Cold 组上述细胞因子的表达变化与 Ctrl 组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



注 A: qRT-PCR 检测炎症因子 IL-6 的表达量; B: qRT-PCR 检测炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达量; C: qRT-PCR 检测趋化因子 MCP1 的表达量(a 表示  $P < 0.05$ ; b 表示  $P < 0.01$ ; c 表示  $P < 0.001$ ); Ctrl: 对照组; HF 组: 缺氧 + 人工喂养组; Cold 组: 缺氧 + 人工喂养 + 冷刺激组; LPS 组: 缺氧 + 人工喂养 + 脂多糖; Bac 组: 缺氧 + 人工喂养 + NEC 肠内细菌组

图 5 各组小鼠肠道组织过度炎症反应的对比

Fig. 5 Comparison of excessive inflammatory response in intestinal tissue of mice in each group

## 讨论

目前国际上尚无统一的 NEC 动物模型建立方法。本研究比较了国内外相对常见的 4 种 NEC 造模方法。实验结果显示,与其他 3 种造模方式相比, Bac 组肠道组织学和肠道上皮屏障蛋白损伤最严重,肠上皮细胞死亡和炎症反应明显。因此与其他造模方式相比,采用含严重 NEC 患儿肠内细菌的高渗配方奶,辅以间断性缺氧来诱导新生小鼠发生 NEC 样肠道损伤是最贴近 NEC 患儿临床特征的一种造模方法。

造模期间,4 个 NEC 造模组的小鼠均出现了 NEC 的临床特征性表现,如体重下降、吐奶、腹部膨隆、腹泻或便血、尿潴留。其中, Cold 组小鼠精神萎靡,活动状态最差,体重减轻最明显,存活率最低(仅 50%),这与已有的研究结果一致<sup>[6-7]</sup>。给予实验动物冷刺激能够降低肠系膜血流量,造成选择性循环缺血,最终引起 NEC 样肠道坏死。但并非所有暴露于缺氧或冷刺激下的早产儿都会患 NEC,这可能与缺氧或冷刺激刺激的次数及频率相关<sup>[8]</sup>。

本研究中 Cold 组小鼠一般情况较差,但肠道组织损伤没有 LPS 组与 Bac 组小鼠严重。LPS 是绝大多数革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,通过激活 TLR4 可以引起肠道组织屏障修复功能受损,肠腔内细菌移位导致血管收缩,最终造成肠道缺血坏死<sup>[9]</sup>。然而, LPS 并非 NEC 独有,它还可以诱导全身性炎症疾病(如脓毒症),且 LPS 并不能代表与 NEC 相关的所有细菌成分。以往研究发现在 NEC 发生之前就存在肠道菌群改变,且梭状芽胞杆菌、阪崎肠杆菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌均与 NEC 的发生有关。但由于这些微生物也常见于非

NEC 患者,所以它们不符合微生物与疾病发病机制之间的因果关系,即科赫法则<sup>[10-11]</sup>。这样看来, NEC 属于没有统一微生物定植的疾病,单个致病病原体不会诱导 NEC 的发生,这与 NEC 是一种多因素疾病的观点不谋而合。16S rRNA 基因测序结果显示,与曾经因复杂 NEC 行肠道吻合术的婴儿相比, NEC 患儿肠内细菌中专性厌氧菌(梭菌和拟杆菌)数目增加,菌群多样性下降,所以采用严重 NEC 患儿的肠内细菌进行 NEC 动物造模更加符合 NEC 的病理生理过程<sup>[12]</sup>。本研究发现 Bac 组小鼠肠道组织韧性差,串珠状积气与坏死明显,故肠道组织损伤最为严重。

肠道组织的损伤由肠上皮细胞死亡引起。近年来,随着对细胞死亡途径分子机制的深入研究,细胞死亡方式的分类与命名被不断更新。研究表明,细胞凋亡、细胞焦亡、坏死性凋亡均参与 NEC 肠上皮细胞死亡<sup>[13-15]</sup>。Parthanatos 是一种由 PARP1 介导的新型程序性细胞死亡方式<sup>[16]</sup>。本研究中,细胞凋亡、坏死性凋亡和 parthanatos 的标记性分子 CC3、RIPK1 和 PARP1 以及 TUNEL 染色在 LPS 组和 Bac 组中均明显上调,说明这两种造模方式的小鼠肠道上皮细胞死亡数目多,三种死亡方式均参与肠道组织的损伤。因此在 NEC 发展进程中,肠上皮细胞可能存在多种死亡途径,各途径之间可能具有协同效应,最终导致 NEC 肠道坏死。理想的动物模型不仅要求操作简单、结果稳定性强、成功率高,更需要与人类疾病的发病机制、病理生理及临床表现相似。本研究中 Bac 组的造模方法(即间断性缺氧加含有严重 NEC 患儿肠内细菌的配方奶喂养)可引起大部分新生小鼠出现 NEC 样肠道损伤,因此是较为理想的 NEC 动物模型建立方法。



**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 徐铃琪、马淑蓉、陈璐璐、周慧婷负责研究的设计、实施和起草文章、数据收集及分析；汪健负责研究设计、文章审核校对

## 参 考 文 献

- [1] 周思海,顾茜,刘晓莉,等. 新生儿坏死性小肠结肠炎全麻手术后苏醒延迟的相关因素分析[J]. 临床小儿外科杂志, 2021, 20(10): 968-973. DOI: 10. 12260/lxewkzz. 2021. 10. 014.  
Zhou SH, Gu Q, Liu XL, et al. Risk factors of delayed recovery after general anesthesia in infants with neonatal necrotizing enterocolitis[J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20(10): 968-973. DOI: 10. 12260/lxewkzz. 2021. 10. 014.
- [2] Talavera MM, Bixler G, Cozzi C, et al. Quality improvement initiative to reduce the necrotizing enterocolitis rate in premature infants[J]. Pediatrics, 2016, 137(5): e20151119. DOI: 10. 1542/peds. 2015-1119.
- [3] Liang SX, Lai PJ, Li XB, et al. Ulinastatin reduces the severity of intestinal damage in the neonatal rat model of necrotizing enterocolitis[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 9123-9130. DOI: 10. 12659/MSM. 919413.
- [4] 邓姗姗,朱海涛,陈宇,等. C57BL/6 新生小鼠坏死性小肠结肠炎模型改建与评估[J]. 中华小儿外科杂志, 2018, 39(5): 376-382. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2018. 05. 012.  
Deng SS, Zhu HT, Chen Y, et al. Improvements and assessments of a neonatal murine model of necrotizing enterocolitis in C57BL/6 mice[J]. Chin J Pediatr Surg, 2018, 39(5): 376-382. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2018. 05. 012.
- [5] Zani A, Cordischi L, Cananzi M, et al. Assessment of a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis[J]. Eur J Pediatr Surg, 2008, 18(6): 423-426. DOI: 10. 1055/s-2008-1038951.
- [6] Guven A, Gundogdu G, Vurucu S, et al. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(9): 1730-1735. DOI: 10. 1016/j. jpedsurg. 2009. 01. 007.
- [7] Bell RL, Withers GS, Kuypers FA, et al. Stress and corticotropin releasing factor (CRF) promote necrotizing enterocolitis in a formula-fed neonatal rat model[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0246412. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0246412.
- [8] Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model[J]. Surgery, 1975, 77(5): 687-690.
- [9] Yazji I, Sodhi CP, Lee EK, et al. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(23): 9451-9456. DOI: 10. 1073/pnas. 1219997110.
- [10] 安宗剑,孙勇. 新生儿肠道菌群与坏死性小肠结肠炎发病关系的研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18(5): 356-360. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2019. 05. 004.  
An ZJ, Sun Y. Research advances of neonatal intestinal microbiome and necrotizing enterocolitis[J]. J Clin Ped Sur, 2019, 18(5): 356-360. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2019. 05. 004.
- [11] Morowitz MJ, Poroyko V, Caplan M, et al. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Pediatrics, 2010, 125(4): 777-785. DOI: 10. 1542/peds. 2009-3149.
- [12] Brower-Sinning R, Zhong D, Good M, et al. Mucosa-associated bacterial diversity in necrotizing enterocolitis[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105046. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0105046.
- [13] Yang YJ, Zhang T, Zhou GY, et al. Prevention of necrotizing enterocolitis through milk polar lipids reducing intestinal epithelial apoptosis[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(26): 7014-7023. DOI: 10. 1021/acs. jafc. 0c02629.
- [14] 胡丹慧,刘海英. 细胞焦亡(pyroptosis)参与大鼠坏死性小肠结肠炎的致病作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(12): 1070-1074. DOI: 10. 13423/j. cnki. cjmi. 008718.  
Hu DH, Liu HY. Role of pyroptosis in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2018, 34(12): 1070-1074. DOI: 10. 13423/j. cnki. cjmi. 008718.
- [15] Werts AD, Fulton WB, Ladd MR, et al. A novel role for necroptosis in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 9(3): 403-423. DOI: 10. 1016/j. jcmgh. 2019. 11. 002.
- [16] Li DF, Kou YY, Gao Y, et al. Oxaliplatin induces the PARP1-mediated parthanatos in oral squamous cell carcinoma by increasing production of ROS[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(3): 4242-4257. DOI: 10. 18632/aging. 202386.

(收稿日期:2022-02-07)

**本文引用格式:** 徐铃琪, 马淑蓉, 陈璐璐, 等. 坏死性小肠结肠炎动物模型建立方法的改进与评价[J]. 临床小儿外科杂志, 2023, 22(6): 569-575. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101785-202202036-014.

**Citing this article as:** Xu LQ, Ma SR, Chen LL, et al. Improvements and evaluations of animal models of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. J Clin Ped Sur, 2023, 22(6): 569-575. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101785-202202036-014.