

# 坏死性小肠结肠炎体内外模型的研究进展



全文二维码

高润楠 朱海涛 沈淳

复旦大学附属儿科医院新生儿外科,上海 200000

通信作者:沈淳,Email:chunshen@fudan.edu.cn

**【摘要】** 坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是早产儿胃肠外科最常见急症之一。在过去50年里,为了研究该病的病理生理学特点以及明确新治疗策略的有效性,多种多样的实验模型应运而生。目前对于NEC的病因研究主要采用肠上皮细胞和NEC动物模型,然而细胞模型无法还原患儿肠组织体内生物学特性,动物模型无法反映人体疾病的相关特性。近年来肠道干细胞标记物Lgr5+的发现,使新型肠道体外模型——肠道类器官模型得以逐渐兴起。本文将就上述NEC体内外实验模型的研究进展进行综述,分析每种模型的特点与优劣势,进而帮助研究人员理解和选择与研究目的相关的NEC实验模型。

**【关键词】** 小肠结肠炎, 坏死性; NEC模型; 类器官; 上皮细胞; 模型, 动物; 肠

**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81873849);上海市自然科学基金面上项目(22ZR1408600);国家儿童医学中心青年临床科学家项目(EK112520180306)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202009024-007

## Research advances in models of necrotizing enterocolitis *in vivo* and *in vitro*

Gao Runnan, Zhu Haitao, Shen Chun

Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200000, China

Corresponding author: Shen Chun, Email: chunshen@fudan.edu.cn

**【Abstract】** Necrotizing enterocolitis (NEC) has been a leading cause of gastrointestinal emergencies in premature infants. Over the last 50 years, a large variety of experimental models have been developed for examining the pathophysiology of NEC and testing the effectiveness of new therapeutic strategies. Current etiological studies of NEC have employed intestinal epithelial cells and animal models. However, cell models cannot mimic the biological characteristics of intestinal tissues in children while animal models reflect human diseases and other related characteristics. With the latest discovery of intestinal stem cell marker Lgr5+, a novel *in vitro* intestinal model is gradually emerging. This review focused upon the relevant experimental models and discussed the main advantages and disadvantages of each model so as to help researchers better select proper NEC experimental models.

**【Key words】** Enterocolitis, Necrotizing; Models of Necrotizing Enterocolitis; Organoids; Epithelial Cells; Models, Animal; Intestines

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81873849); Shanghai Municipal Natural Science Foundation (22ZR1408600); Youth Clinical Scientist Project of National Children's Medical Center (EK112520180306)

DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202009024-007

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿胃肠外科常见急症之一<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着新生儿重症监护技术的发展,大量早产儿得以存活,NEC的发病率不断上升<sup>[3-5]</sup>。为了降低NEC的发病率和提高NEC患儿存活率,在过去50年里,许多研究人员进行了大量NEC相关基础和临

床研究。

目前NEC的发病机制仍不十分清楚,较为统一的观念认为,NEC是一种多因素共同作用所致的疾病,其中最被公认的NEC诱发因素是早产,早产儿肠道蠕动和消化功能、肠道血液循环调节、肠道屏障功能及免疫防御机制尚不成熟。另一个被公认

的诱发因素是配方奶喂养,配方奶喂养诱发的肠道损伤机制可能是液体自绒毛血管转移至肠腔,导致肠黏膜缺血损伤。因此,对于新生儿(尤其是早产儿),任何高渗性液体的摄入都可能损伤肠黏膜。此外,低氧也可导致坏死性小肠结肠炎。而细菌感染是否在坏死性小肠结肠炎的发病中起主要作用,抑或患儿最初的肠黏膜损伤是否会进一步导致继发性细菌入侵,目前尚不清楚<sup>[1]</sup>。

基于对 NEC 发病机制的认知,有研究人员利用导致人类疾病的致病因素,建立各种实验模型,模拟实验性 NEC 样损伤,如新型肠道体外模型——肠道类器官模型,进一步拓宽了 NEC 研究模型的平台<sup>[6]</sup>。本文将重点介绍目前应用最为广泛的 NEC 实验模型[肠上皮细胞模型(intestinal epithelia cells, IEC)、肠道类器官模型和动物 NEC 实验模型]。

### 一、肠上皮细胞模型与 NEC

IEC 是长期以来研究 NEC 相关机制的细胞水平的模型。IEC6 和 IEC18 作为 NEC 细胞水平研究中最常用的两种贴壁细胞,其来源容易,生长速度快,易于培养,体外因素简单,便于研究控制,可以评估单一的 NEC 相关应激因子或不同 NEC 相关应激因子的组合,进而更好地了解这些应激因子上皮损伤和炎症严重程度的影响,有助于 NEC 发病机制的研究。氧化应激一直被认为与 NEC 发生密切相关, Li 等<sup>[6]</sup>采用 IEC18 细胞,研究 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激对肠上皮的影响,成功地在体外模拟肠上皮损伤,并进一步验证 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激是参与 NEC 发生的主要机制之一。而 Lee 等<sup>[7]</sup>通过比较单一因素脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或低浓度牛血清(2%)与多因素 LPS、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 2% 牛血清刺激下的 IEC18 炎症水平 IL-6 以及肠干细胞标志物 *Lgr5* 基因表达情况,发现当单一因素诱导 IEC18 轻度损伤,会促进 *Lgr5* 的表达升高。在多个因素同时刺激下,IEC18 重度损伤,*Lgr5* 表达降低。一方面,体外细胞系利用单个刺激因素或不同组合刺激因素,能更加直观研究这些刺激因素下肠上皮损伤和炎症的严重程度;另一方面,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 类似, LPS 或低血清诱导的细胞损伤,有助于我们理解细菌感染致 NEC 发生发展的机制。因此,对于 NEC 细胞水平的研究,推荐采用多种刺激共同诱导,能够更好模拟 NEC 在人体的发病情况,从而进一步探索 NEC 的发生机制。而对于已知可能导致 NEC 发生机制的研究,肠上皮细胞系能够较为方便进行外源基因表达的调控,从而在体外细胞模型中更有利

于 NEC 机制的探究。

Caco-2 细胞作为一种人克隆结肠腺癌细胞,它具有与小肠上皮细胞相似的形态学、相同的细胞极性与紧密连接。有研究人员将其作为 NEC 肠道屏障功能的细胞模型,结果显示,紧密连接蛋白 ZO-1(zonula occludens-1)对经过 LPS 和双歧杆菌双重诱导损伤的肠道屏障具有保护作用;而这与在 NEC 患儿和动物模型中发现的现象相符<sup>[9-10]</sup>。

总的来说,肠道细胞模型来源简单,价格低廉,单纯的体外因素更有利于直接观察细胞增殖、凋亡和基因表达等。然而,细胞模型无法还原患儿肠组织的体内生物学特性,这也成为细胞模型在 NEC 研究中的局限之一。

### 二、肠道类器官与 NEC

随着近年来肠道干细胞标记物 *Lgr5* + 的发现,新型肠道体外模型 - 肠道类器官(intestinal organoid)模型逐渐兴起<sup>[11]</sup>。肠道类器官是由组织多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)或成年干细胞(adult stem cells, ASCs)衍生而来的三维体外培养结构,它具有与原组织相似的结构与功能特性<sup>[12]</sup>。肠道类器官既具有易于培养、连续培养时稳定不易癌变、可以冷冻、便于长期保存等体外研究优势;又可以获得在体内模型中表现的多种病理生理特征,是两方面优势的完美结合。因此,大量研究人员开始利用动物和人来源肠道类器官,作为理想的研究肠道上皮干细胞生物学和肠道结构与功能机制等相关肠道疾病的体外研究模型<sup>[13-14]</sup>。

#### (一) 鼠源肠道类器官

有研究人员使用成年小鼠肠道组织来源的肠道类器官来研究肠道损伤<sup>[15]</sup>。McElroy 等<sup>[15]</sup>利用 *ErbB4*<sup>-/-</sup> 小鼠的肠道组织培养类器官,该种类器官潘氏细胞低表达,对炎症因子呈高敏状态,以此来模拟 NEC 样损伤。他们的研究证实,*ErbB4* 配体 - 神经调节蛋白 4(neuregulin-4, NRG4)可以在损伤中发挥保护性作用。Sodhi 等<sup>[16]</sup>利用 *TLR4* 基因敲除小鼠来源的肠道类器官探讨 TLR4 对杯状细胞的影响及其在 NEC 发病中的作用。

然而,有研究表明,新生儿肠道上皮与成年肠道上皮并不完全相同<sup>[16]</sup>。因此,为了更好还原 NEC 在新生儿的发病环境,研究人员尝试利用来源于新生小鼠的回肠组织的肠道类器官<sup>[17]</sup>。Li 等<sup>[17]</sup>采用日龄为 P9(postnatal 9 days)天的 C57BL/6 系新生小鼠肠道组织进行肠道类器官培养,模拟新生儿肠道环境,结果证实 NEC 样损伤新生儿肠道类器官可以

通过缺氧和 LPS 共同诱导而成。我们课题组比较了不同时期母乳来源外泌体对肠道类器官的作用,采用相同来源的新生小鼠肠道类器官并给予 LPS 单一刺激,发现肠道类器官炎症水平升高,而肠道干细胞的活力不仅不降,反而升高<sup>[18]</sup>。这一现象可能与 Lee 等在体外细胞系中的发现相同,当单一刺激因子导致轻度损伤时,可促进 Lgr5 的表达升高。而在多重因子同时刺激下导致重度损伤时,Lgr5 的表达降低<sup>[7]</sup>。因此,与肠上皮细胞模型相似,在肠道类器官模型中,可以通过对单个刺激因素或多个刺激因素的控制,模拟所需要的 NEC 样损伤程度。

## (二) 人源肠道类器官

Wu 等<sup>[19]</sup>收集了 NEC 早产儿手术中回肠组织,并进行肠道类器官培养。由于肠道类器官具有与来源组织相似的结构与功能特性,故该肠道类器官具有为 NEC 损伤的肠道。他们发现使用人母乳多聚寡糖(human milk oligosaccharides, HMO)处理,可以促使肠道类器官出芽增加,Muc2 蛋白的表达升高,从而改善肠道内环境的平衡状态。而 Ares 等<sup>[20]</sup>取肠切除患儿的正常肠道组织,对肠干细胞进行分离后培养类器官。当 LPS 加入培养基与肠道类器官共培养时,其组织学、基因水平、蛋白表达和炎症反应均与人体 NEC 病理生理条件相似。然而,正常肠道组织的获取常涉及伦理问题。近年来,有研究显示,来源于人诱导多能干细胞的肠道类器官是研究 NEC 的另一个可靠模型,因其被证实具有与新生儿肠道组织相似的基因表达<sup>[21]</sup>。同时,研究发现将人诱导多能干细胞来源肠道类器官移植入 NEC 小鼠中,可以有效增加肠道干细胞标志物人类嗅素蛋白(olfactomedin 4, Olfm4)的表达<sup>[21]</sup>。

除直接来源于肠道组织之外,也有研究发现可以使用已有肠上皮细胞株进行肠道类器官诱导培养<sup>[22]</sup>。研究人员通过比较 IEC6、CT26. WT 和 Caco-2 三种肠上皮细胞株进行类器官诱导培养,最终发现只有结肠癌上皮细胞株 Caco-2 能形成肠道类器官样结构<sup>[22]</sup>。这为肠道类器官的培养提供了一个新的来源。

综上所述,新生儿肠道类器官为 NEC 研究提供了一个平台,使我们能够在不受复杂神经体液和其他器官系统干扰的情况下,研究肠道损伤的直接影响及影响因素。然而,当前研究中所使用的肠道类器官仍是孤立的培养体系,尚未将免疫系统、神经网络、血管与体液等肠道生理微环境进行整合。因此,目前肠道类器官模型仍然无法完全还原肠道所

处微环境,故创造更贴近人类体内肠道微环境的培养体系将是肠道类器官研究的发展方向<sup>[23]</sup>。

## 三、动物模型与 NEC

多年来,人们对 NEC 的各种实验动物模型进行了研究,主要通过给予各种刺激因素,模拟人类 NEC 发生发展的可能致病因素。人类 NEC 的精确模型尚未被描述。目前,大多数研究人员会根据研究的方向和目的来选择模型,大鼠和小鼠仍是 NEC 研究的主要动物模型。NEC 动物模型增进了我们对于 NEC 这种高致死率疾病的了解,特别是在致病因素、预防和治疗选择方面。

### (一) 大鼠动物模型

NEC 动物模型最早由 Barlow 等<sup>[24]</sup>于 1974 年提出,至今仍被广泛应用于 NEC 的研究。NEC 大鼠模型基于 NEC 的发病因素而产生,包括未成熟肠道、高渗奶喂养、低氧刺激和细菌过多生长<sup>[24]</sup>。考虑到早产和低出生体重是 NEC 新生儿的主要危险因素,Barlow 等<sup>[24]</sup>提出使用新生儿大鼠来模拟 NEC 患儿的未成熟肠道。此外,由于 NEC 主要发生于配方奶喂养的新生儿,Barlow 等<sup>[24]</sup>采用高渗配方奶喂养大鼠。他们将人和狗配方奶进行混合,并计算出每 100 mL 奶可提供热能 681.7 焦耳(1 卡路里 = 4.182 焦耳),这与大鼠母乳提供的热量相近。高渗配方奶通过滴管进行喂养,每日 4 次,每日提供总热量约 1254.6 焦耳/kg(1 卡路里 = 4.182 焦耳)<sup>[25]</sup>。在这种喂养条件下,与母乳喂养的老鼠生长速率相比,高渗配方奶喂养的小鼠总体呈现出 1 天的生长滞后。为了重现 NEC 新生儿肠缺血的变化,研究人员给予大鼠缺氧应激,将大鼠头部周围密封在塑料袋 3 ~ 5 min,直至观察到发绀为止<sup>[24]</sup>。

有研究人员通过在大鼠分娩 24 h 前口服或经阴道插入导尿管给予克雷伯氏菌,来模拟肠道细菌过度生长;他们认为,在大鼠 NEC 模型条件中,缺氧和配方奶粉喂养最为关键<sup>[24]</sup>。在此基础上,其他研究团队对大鼠 NEC 模型条件进行了不同的改进,最终由 Nadler 等<sup>[25]</sup>提出标准化的缺氧刺激,即将新生大鼠置于缺氧箱(4% O<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>) 10 min,每日 3 次。为了保证成模率,一些研究团队引入另一个刺激因子-LPS<sup>[26-27]</sup>。LPS 是革兰氏阴性菌的一种内毒素,是细菌外膜的主要成分,研究显示 LPS 参与了人 NEC 的发病。因此,他们在造模第 1 天和第 2 天将 LPS 与高渗配方奶混合经口喂给大鼠,以达到更严重的肠道损伤<sup>[26]</sup>。

另外,一些研究发现,单个刺激因素即可导致

新生大鼠产生严重肠道损伤。Nadler 等<sup>[25]</sup>发现高渗配方奶可以导致严重的肠道损伤。也有研究人员报道,低氧(氧浓度 0%, 2 min 或氧浓度 5%~10%, 30 min)可以引起重度肠道损伤<sup>[28]</sup>。

总之,NEC 大鼠模型因其成本低、易于饲养而被广泛应用。新生大鼠出生后不久便进行人工喂养,各实验室 NEC 诱导选用的大鼠年龄较为统一,大鼠模型变异率较低。然而,大多数大鼠在经历 NEC 诱导后最终都会死亡。此外,大鼠遗传背景尚不清楚,这使得 NEC 大鼠模型中许多转基因模型不能使用,这在很大程度上限制了 NEC 发病机制的研究。

## (二)小鼠动物模型

由于小鼠成本低,容易繁殖,最重要是转基因小鼠的可用性,因此小鼠作为 NEC 动物模型的研究愈发普遍。小鼠的这些特点为更好研究 NEC 发病的分子机制或新药的疗效提供了较好的模型。但由于小鼠体型较小以及转基因小鼠的低存活率,使得 NEC 小鼠模型的建立具有一定的挑战性。

与大鼠 NEC 诱导相比,不同研究中小鼠 NEC 诱导起始新生小鼠的年龄差异较大。Jilling 等<sup>[29]</sup>采用出生后即刻幼鼠进行 NEC 诱导,通过经口喂养高渗配方奶、缺氧和冷刺激( $N_2$ :100%, 1 min; 4°C, 10 min)完成。其他研究团队使用相似的 NEC 诱导方法,只是选择不同日龄的新生小鼠开始造模,主要选用日龄为 P3 或 P5 的新生小鼠<sup>[30]</sup>。值得一提的是,Hackam 团队比较了诱导 NEC 从 P7~P21 的转基因小鼠模型,他们认为选用 NEC 诱导的小鼠年龄不宜超过 P14~21<sup>[16,31-32]</sup>。Tian 等<sup>[33]</sup>比较了 NEC 新生小鼠在不同年龄段的发病率,认为母乳喂养不影响生后初期的小鼠 NEC 发病率。这项研究为许多实验室在新生儿小鼠生后何时开始 NEC 诱导提供了依据。

除了上述标准的 NEC 诱导方案外,研究人员还利用其他应激因素诱导 NEC。Ginzel 等<sup>[34]</sup>研究证实,将广泛用于炎症性肠病和结肠炎的葡聚糖硫酸钠(DSS)与配方奶同时喂养时,可以诱导新生小鼠发生 NEC。也有研究通过清除肠道潘氏细胞来诱导 NEC 的发生。Zhang 等<sup>[35]</sup>发现在对 P14~P16 小鼠腹腔注射双硫唑酮清除 Paneth 细胞和克雷伯氏菌以诱导炎症反应 10 h 后,小鼠出现 NEC 发展现象。然而,很难在新生小鼠身上复制上述模型,因为与人类新生儿相同,新生小鼠在出生时也缺乏潘氏细胞。

近年来,NEC 小鼠模型在基础研究中逐渐流行

起来,其主要优点是饲养成本低,容易繁殖,且小鼠模型更适合基因操作,从而建立精确的分子途径参与 NEC 的发病,这有助于确定 NEC 发病机制中涉及各种信号分子和分子通路的作用。然而,新生小鼠由于体型原因,在进行人工喂养时仍为 NEC 诱导操作带来了一定的挑战。

总之,目前用于 NEC 病理生理机制研究的体内外模型平台各具特点。这些模型包括体外肠上皮细胞模型、肠道类器官模型和动物模型。这些实验模型的应用将加深我们对 NEC 的了解。随着对 NEC 发病机制研究的不断深入,诱导 NEC 所涉及的刺激因子也在不断完善,但目前仍然没有完美再现人体 NEC 的模型。因此,研究人员需要根据研究目的选择合适的模型。而重现人类早产儿的胃肠道环境,可能是此类模型今后所面临的挑战和努力的方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 文献检索为高润楠,论文调查设计为高润楠、朱海涛、沈淳,论文分析为高润楠,论文撰写为高润楠,论文讨论分析为高润楠、朱海涛、沈淳

## 参 考 文 献

- [1] Zani A, Piero A. Necrotizing enterocolitis: controversies and challenges[J]. F1000 Res, 2015, 4 pii: F1000FacultyRev-1373. DOI: 10.12688/f1000research.6888.1.
- [2] Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993–2012 [J]. J Am Med Assoc, 2015, 314: 1039–1051. DOI: 10.1001/jama.2015.10244.
- [3] Niño DF, Sodhi CP, Hackam DJ. Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13: 590–600. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.119.
- [4] 吕志宝, 盛庆丰. 新生儿坏死性小肠结肠炎的病因与诊治研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18(5): 352–355. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.05.003.  
Lü ZB, Sheng QF. Advances in the etiology, diagnosis and treatment of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. Clinical Pediatric Surgery, 2019, 18(5): 352–355. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.05.003.
- [5] Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories [J]. J Pediatr Surg, 2009, 44: 1072–1075. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.02.013.
- [6] Li B, Lee C, Martin Z, et al. Intestinal epithelial injury induced by maternal separation is protected by hydrogen sulfide. J Pediatr Surg, Jan 2017; 52(1): 40–44. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2016.10.013
- [7] Lee C, Minich A, Li B, et al. Influence of stress factors on intestinal epithelial injury and regeneration [J]. Pediatr Surg Int, 2018, 34(2): 155–160. DOI: 10.1007/s00383-017-4183-3.
- [8] Ling X, Linglong P, Weixia D, et al. Protective effects of bifido-

- bacterium on intestinal barrier function in LPS-induced enterocyte barrier injury of Caco-2 monolayers and in a rat NEC model [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (8) : e0161635. DOI: 10.1371/journal.pone.0161635.
- [9] Bergmann KR, Liu SX, Tian R, et al. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182 (5) :1595–1606. DOI:10.1016/j.ajpath.2013.01.013.
- [10] Lin HC, Hsu CH, Chen HL, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial [J]. *Pediatrics*, 2008, 122 (4) :693–700. DOI:10.1542/peds.2007–3007.
- [11] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459 (7244) : 262–265. DOI: 10.1038/nature07935.
- [12] Dedhia PH, Bertaux-Skeirik N, Zavros Y, et al. Organoid models of human gastrointestinal development and disease [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150 (5) : 1098–1112. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.12.042.
- [13] Schweiger PJ, Jensen KB. Modeling human disease using organotypic cultures [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 43 : 22–29. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.07.003.
- [14] Kretschmar K, Clevers H. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish [J]. *Dev Cell*, 2016, 38 (6) : 590–600. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.08.014.
- [15] McElroy SJ, Castle SL, Bernard JK, et al. The ErbB4 ligand neuregulin-4 protects against experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184 (10) :2768–2778. DOI:10.1016/j.ajpath.2014.06.015.
- [16] Sodhi CP, Neal MD, Siggers R, et al. Intestinal epithelial toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143 (3) :708.e5–718.e5. DOI:10.1053/j.gastro.2012.05.053.
- [17] Li B, Lee C, Cadete M, et al. Neonatal intestinal organoids as an ex vivo approach to study early intestinal epithelial disorders [J]. *Pediatr Surg Int*, 2019, 35 (1) :3–7. DOI:10.1007/s00383-018-4369-3.
- [18] Gao R, Zhang R, Qian T, et al. A comparison of exosomes derived from different periods breast milk on protecting against intestinal organoid injury [J]. *Pediatric Surgery International*, 2019, 35 (12) :1363–1368. DOI:10.1007/s00383-019-04562-6.
- [19] Wu RY, Li B, Koike Y, et al. Human milk oligosaccharides increase mucin expression in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63 (3) : e1800658. DOI: 10.1002/mnfr.201800658.
- [20] Ares GJ, Buonpane C, Yuan C, et al. A novel human epithelial enteroid model of necrotizing enterocolitis [J]. *J Vis Exp*, 2019, 10 (146) :91–94. DOI:10.3791/59194.
- [21] Finkbeiner SR, Hill DR, Althaim CH, et al. Transcriptome-wide analysis reveals hallmarks of human intestine development and maturation in vitro and in vivo [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4 (6) :1140–1155. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.04.010.
- [22] 欧静, 徐珍妮, 刘登群, 等. 3D 培养体系中不同肠上皮细胞株形成肠类器官潜能的比较及应用 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42 (1) :31–38. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907198. Ou J, Xu ZN, Liu DQ, et al. Potential capacities of different intestinal epithelial cell lines for forming enteroids in 3D culture system: comparisons and applications [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2020, 42 (1) :31–38. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907198.
- [23] Almeqdadi M, Mana MD, Roper J, et al. Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317 (3) : C405–C419. DOI: 10.1152/ajpcell.00300.2017.
- [24] Barlow B, Santulli TV, Heird WC, et al. An experimental study of acute neonatal enterocolitis—the importance of breast milk [J]. *J Pediatr Surg*, 1974, 9 (5) :587–595. DOI: 10.1016/0022-3468(74)90093-1.
- [25] Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *J Surg Res*, 2000, 92 :71–77. DOI:10.1006/jsre.2000.5877.
- [26] Zani A, Eaton S, Leon FF, et al. Captopril reduces the severity of bowel damage in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr Surg*, 2008, 43 (2) :308–314. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2007.10.022.
- [27] Ford HR, Avanoğlu A, Boechat PR, et al. The microenvironment influences the pattern of bacterial translocation in formula-fed neonates [J]. *J Pediatr Surg*, 1996, 31 (4) :486–489. DOI: 10.1016/s0022-3468(96)90480-7.
- [28] Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, et al. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat [J]. *Regul Pept*, 2003, 116 (1–3) : 53–60. DOI:10.1016/s0167-0115(03)00177-0.
- [29] Jilling T, Simon D, Lu J, et al. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis [J]. *J Immunol*, 2006, 177 (5) :3273–3282. DOI:10.4049/jimmunol.177.5.3273.
- [30] Zani A, Zani-Ruttenstock E, Peyvandi F, et al. A spectrum of intestinal injury models in neonatal mice [J]. *Pediatr Surg Int*, 2016, 32 (1) :65–70. DOI:10.1007/s00383-015-3813-x.
- [31] Qureshi FG, Leaphart C, Cetin S, et al. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128 (4) : 1012–1022. DOI:10.1053/j.gastro.2005.01.052.
- [32] Mollen KP, Gribar SC, Anand RJ, et al. Increased expression and internalization of the endotoxin coreceptor CD14 in enterocytes occur as an early event in the development of experimental necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr Surg*, 2008, 43 (6) :1175–1181. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2008.02.050.
- [33] Tian R, Liu SX, Williams C, et al. Characterization of a necrotizing enterocolitis model in newborn mice [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2010, 3 (4) :293–302.
- [34] Ginzel M, Feng X, Kuebler JF, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (8) : e0182732. DOI: 10.1371/journal.pone.0182732.
- [35] Zhang C, Sherman MP, Prince LS, et al. Paneth cell ablation in the presence of *Klebsiella pneumoniae* induces necrotizing enterocolitis (NEC)-like injury in the small intestine of immature mice [J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5 (4) :522–532. DOI: 10.1242/dmm.009001.

(收稿日期:2020-09-14)

本文引用格式:高润楠,朱海涛,沈淳.坏死性小肠结肠炎体内外模型的研究进展[J].临床小儿外科杂志,2022,21(4):331–335. DOI:10.3760/cma.j.cn101785-202009024-007.

Citing this article as: Gao RN, Zhu HT, Shen C. Research advances in models of necrotizing enterocolitis in vivo and in vitro [J]. *J Clin Pediatr Surg*, 2022, 21 (4) : 331–335. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202009024-007.