

新生鼠坏死性小肠结肠炎模型建立方法的改进及评价^{*}

席世兵 杨 敏 谢集建 景卫利 李兴朝 李 涛

(湖北省十堰市太和医院儿童医疗中心儿科2病区, 十堰 420000)

摘要:目的 通过改进和比较国内、外常用的坏死性小肠结肠炎(Necrotizing Enterocolitis, NEC)动物模型建立方法,明确简便有效的NEC建模方法。**方法** 采用出生2 h内新生SD大鼠,随机分为5组,对照组10只,实验组每组20只。A组与代母鼠同笼鼠乳喂养,且未行任何干预;B组人工喂养+缺氧冷刺激+(脂多糖)LPS灌胃(5 mg/kg 体重质量);C组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(10 mg/kg);D组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(2 mg/kg);E组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(5 mg/kg)。每日观察新生鼠的活动状况和体质量变化。实验结束后取小肠组织行苏木素-伊红染色、评价小肠病理损伤程度;检测小肠组织内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。**结果** 实验组新生鼠均出现不同程度的活动减少,腹胀腹泻,黑便,体质量减轻。病理评分显示实验组较对照组新生鼠病理损伤评分显著增高($P<0.05$)。LPS腹腔注射组(D、E)较经口给药组(B、C)NEC发病率更高($P<0.05$),但LPS大剂量(5 mg/kg)腹腔注射组较其他组,非NEC相关性致死率明显增高($P<0.05$)。**结论** 在人工喂养、缺氧冷刺激的基础上结合小剂量LPS(2 mg/kg)腹腔注射建立NEC的方法更具有可操作性、稳定性。

关键词:坏死性小肠结肠炎;模型建立;新生儿;大鼠;脂多糖

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0036-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.008

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

低体质量儿配方奶粉(特别能恩)由雀巢公司提供;脂肪乳注射液(C₁₄~C₂₄)由华瑞制药有限公司提供;汤臣倍健蛋白质粉购自朗臣健益公司;LPS(E.coli 055:B5)购自美国Sigma公司;喂养管由一次性使用静脉留置针(青岛,威高)改装;ZKY-4F智能控氧仪、XBS-01多功能小白鼠试验箱(杭州爱普仪器设备有限公司);保育箱由HW-1000超级恒温水浴箱改装(成都泰盟科技有限公司,成都);SM-3B手术显微镜(美国AmScope公司);尼康D5100照相机(日本,尼康)。

1.2 实验动物

SPF级出生2 h内未开奶新生SD大鼠90只,生产许可证:SYXK(E鄂)2011-0031,购自湖北医药学院动物中心。

1.3 方法与分组

1.3.1 分组:将体质量(5.6~8.5) g新生大鼠采用随机数字表法分组。分为5组,对照组10只,实验组每组20只。A组与代母鼠同笼鼠乳喂养,且未行任何干预;B组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(5 mg/kg);C组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(10 mg/kg);D组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(2 mg/kg);E组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(5 mg/kg)。

1.3.2 鼠乳代乳品的配置及人工喂养:B、C、D、E组新生大鼠出生后即置于自制的保育箱内(温度37℃;湿度45%~55%),采用代乳品人工喂养,代乳品参考Auestad^[1]研究报道配制,每100 mL代乳品添加早产儿奶粉1.6 g,加朗蛋白粉8.7 g,脂肪乳48 mL,总热量约581 kJ,最终成分及热量如表1所示。喂养方法参考文献^[2]并适当改进,采用1 mL注射器连接威高静脉留置针作为喂养管,沿新生大鼠一侧口角缓慢、轻柔插入约会厌水平(深度0.8~

收稿日期:2018-05-13

^{*} 基金项目:十堰市科学技术研究与开发项目计划(No.:16Y25)

作者简介:席世兵(1987—),男,博士,主治医师,研究方向:儿科心血管疾病及临床研究.E-mail:xishibing2009@163.com

通信作者:李 涛(1964—),男,博士,主任医师,研究方向:新生儿及儿科心血管疾病.E-mail:317371983@qq.com

1.0 cm),当新生鼠出现张口、吞咽动作时,缓慢注入代乳品每 4 h 给予代乳品约 0.1 mL/次,每 12 h 增加 0.05 mL,第 2 天增至 0.3 mL/次,72 h 后,停止缺氧冷刺激,继续喂养 12 h、取材。

表 1 鼠乳成分及代乳品成分

Table 1 Rat milk and simulated milk ingredients		
成分	鼠乳/L	代乳品/L
蛋白/g	73~77	75
脂肪/g	108~112	108
碳水化合物/g	23~27	26
能量/kJ	578~592	584

1.3.3 缺氧及冷刺激:实验组新生大鼠首次代乳品喂养后 1 h,预设 ZKY-4F 智能控氧仪氧浓度为 0%~0.5%,打开氮气罐阀门及流量表,控制氮气流量在 5 L/min 左右,待箱内氧浓度<0.5%,将新生大鼠置入缺氧箱内,缺氧 7 min,转置于 4℃冷藏室 7 min,D、E 组在冷刺激结束后分别接受 2 mg/kg、5 mg/kg LPS(LPS 均溶于 0.1 mL 生理盐水),注射结束后将所有新生鼠放回保育箱复温,上述操作每隔 12 h 一次,连续 3 d。

1.3.4 标本收集:正常对照组及实验处理组新生鼠在末次处理后 12 h 或自然死亡后,立即打开腹腔取近回盲部小肠 3 cm,近回盲 1 cm 置于 4%甲醛中固定,剩余 2 cm 肠管置液氮中储存备用做生化分析。

1.3.5 组织病理学检查:近回盲部小肠于 4%甲醛溶液中固定 24 h 以上,脱水、石蜡包埋,取冠状面、5 μm 切片,HE 染色后在光镜下观察各组织的形态学改变。参照文献^[3]的病理评分标准对回盲部进行肠组织损伤评分:0 分:肠黏膜绒毛完整,结构正常;1 分:绒毛轻度水肿,上皮脱落仅限于绒毛顶部;2 分:绒毛中部损伤坏死;3 分:绒毛缺失,隐窝仍可识别;4 分:黏膜上皮结构完全缺失,或透壁坏死。以取样品中观察到的最高分数确定为肠道的损伤程度,组织学评分≥2 分确认为 NEC。

1.3.6 炎症因子检测:根据试剂盒说明书操作方法,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组新生鼠小肠组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。

1.4 统计方法

用 SPSS 20.0 软件处理数据,计数资料采用单因素多组方差分析,多样本等级资料采用 kruskal-wallis 秩和检验结合 Nemenyi 法检验做两样本间分析,各组鼠存活情况采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及生长状况

A 组活动度良好,进食及排便皆正常,无腹胀及腹泻,体质量增加良好;B、C、D、E 组在缺氧过程中,均有呼吸困难,紫绀,抽搐及大小便失禁。B、C 组造模后新生鼠均出现活动减少,反应稍迟钝,体质量减轻、腹胀腹泻,排黄绿色黏液便甚至血便情况。其中,D 组大鼠注射 LPS 后约 60~120 min 出现抖动、精神萎靡,活动减少,6~12 h 后开始腹胀、腹泻,活动减少,体质量减轻。E 组在 LPS 注射后 30 min 左右出现烦躁、尖叫、黏膜苍白、晦暗,进而活动减少、萎靡,活动迟缓,4~6 h 出现腹胀、黄绿稀便或黑便,3 h 开始陆续出现实验鼠自然死亡。

2.2 生存状况及体质量变化情况

根据各组实验鼠存活情况,通过生存分析显示,实验组较对照组均存在差异($P<0.05$),B、C、D 组间生存差异均无统计学意义($P_{BC}=0.68$ 、 $P_{CD}=0.44$ 、 $P_{BD}=0.24$),但 D、E 组间生存差异有统计学意义($P=0.04$),大剂量 LPS(5 mg/kg)腹腔注射较小剂量 LPS(2 mg/kg)腹腔注射可显著增加实验鼠的死亡率($P<0.05$)。A 至 E 组 NEC 发病率分别为 0/10、25%(5/20)、35%(7/20)、75%(15/20)、80%(16/20),死亡率分别为:0/10、15%(3/20)、20%(4/20)、35%(7/20)、60%(12/20)。对死亡新生鼠解剖、取材、病理评分,若 NEC 病理评分≥2 分,认为是 NEC 相关性死亡,<2 分认为是其他非 NEC 相关性死亡,A、B 组均无非 NEC 相关性死亡;C、D、E 组分别有 1、2、5 只出现非 NEC 相关性死亡。除 A 组外,实验组新生鼠均有不同程度体质量减轻,除 B、C 组间体质量减轻无差异外,C、D、E 组间体质量减轻均有明显差异(见图 1)。

2.3 肠组织病理改变

显微镜下可见正常大鼠肠道空肠呈乳白色、回结肠为淡黄色,红润有光泽;肠管轻度扩张、充血;肠壁积气变薄,呈紫黑色,轻度腹水;肠管大量积气,发黑、坏死,穿孔、变脆、大量腹水(如图 2A~E);根据 HE 染色结果进行病理评分:图 2F 至 J 分别代表 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分。

2.4 病理评分结果

采用盲法由 3 名研究人员对 NEC 标本进行病理评分,评分不一致者,再由第 4 名研究人员介入讨

论确定病理评分。评分结果如图 1C,采用 Kruskal-Wallis H 检验提示 5 组间差别有统计学意义 ($P < 0.001$),进一步采用 Nenmenyi 法检验提示实验组间 NEC 病理评分均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 小肠组织内炎症因子变化

建模后测得各组实验鼠小肠组织中肿瘤坏死因

子- α 结果(如图 1.D),结果显示 LPS 经胃肠道给药组,不同剂量组间较对照组,TNF- α 水平差异性显著 ($P < 0.05$);经腹腔注射给药组,大剂量组较小剂量组小肠组织内 TNF- α 水平差异也较显著 ($P < 0.05$),提示高剂量组系统性炎症反应更重。

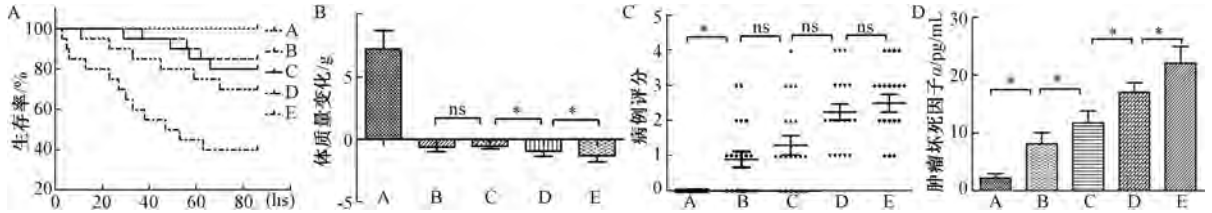


图 1 生存状况及体质量病例损伤程度及小肠组织内肿瘤坏死因子 α 浓度变化情况

注:A:实验鼠生存分析大剂量 LPS 腹腔注射组生存率显著降低 ($P < 0.05$);B: 实验前后新生鼠体质量变化,正常对照组体质量增加良好,但 NEC 模型组体质量显著降低 ($P < 0.05$);C:病理学评分及统计结果 实验组损伤程度较正常组显著增高,但 LPS 口服组间无显著差异,LPS 腹腔注射组间无显著差异 ($P \geq 0.05$);D:小肠组织中 TNF- α 浓度 实验组较对照组显著升高,LPS 经腹腔注射组较口服组小肠组织中 TNF- α 水平显著较高 ($P < 0.05$),且 TNF- α 升高水平与 LPS 剂量呈正相关。

Fig.1 The survival analysis (A), change of body weight (B), pathogenic score(C) TNF- α concentration in intestine(D)

Note:A:The survival rate of Group E (large-dose LPS intraperitoneal injection) is decreased significantly ($P < 0.05$),but difference between Group B, Group C and Group D were not significant (Fig1A);B:The change of body weight during study.The body weight obtain in Group A is normal, but the decrease of body weight in NEC model(Group B, C, D and E) was significant ($P < 0.05$); C:The pathological scores of intestinal injury is increased significant in experimental groups($P < 0.05$),but the differences between Group B and Group C, Group D and Group E are not significant;D:The TNF- α concentration in intestine between control and trail groups were significant ($P < 0.05$), LPS intraperitoneal injection higher than oral administration, the TNF- α concentration is positive corrective with the dose of LPS($P < 0.05$).

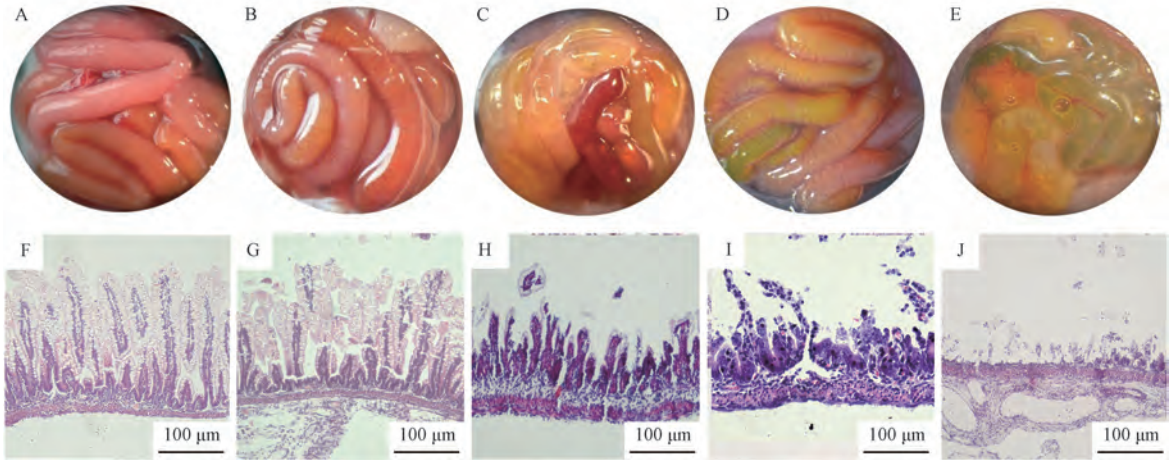


图 2 不同病理损伤程度的典型实体图及 HE 染色图 (HE 染色 $\times 200$)

注:A:0分,肠管呈粉红色、有光泽,瑞蠕动良;B:1分,轻度粘膜下肿胀和绒毛轻度受损;C:2分,肠管扩张,严重梗阻,肠壁积气;D:3分,肠管严重扩张,黑死;E:4分,严重坏死、肠穿孔、腹水;F:肠黏膜绒毛完整,结构正常;G:上皮脱落仅限于绒毛顶部;H:绒毛中部以上损伤坏死;I:绒毛缺失,隐窝仍可识别;J:黏膜上皮结构完全缺失,或透壁坏死

Fig.2 Typical characteristics of gross morphology and HE staining (0, 1, 2, 3, 4 points)

Note:A:NEC score 0, The normal intestinal tract was carnation and glossy, intestinal canal moved actively; B:1, Slightly congested disclosed; C:2, Sight dilatation, severe congested; D:3, Extensive dilatation, appeared black;E:4, Severe necrosis, extensive discoloration; F:NEC score 0, normal ileum; G:1, slight submucosal separation and villus tip injury; H:2, villas failed off; I:3, mucosa grew swelling and villus sever injury, severe separation of submucosa and/or lamina propria edema in submucosa; J:4,transmural necrosis

3 讨论

新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿期常见的致死性疾病。自1967年首次报道并被普遍认识以来,尽管围产医学取得了很大发展,早产儿成活率明显提高,但NEC的发病及预后仍无明显改善。目前,出生体质量在500~1 500 g之间的新生儿NEC的发病率高达7%,NEC相关死亡率达20%~30%,严重NEC需手术治疗的患儿死亡率更高^[4]。目前研究认为早产、不适当的胃肠喂养、缺氧缺血损伤及肠道菌群失调、移位导致肠道异常的免疫反应是NEC发病的关键环节^[5]。NEC的确切病因、病理机制仍不明确,亟需进一步研究。

动物模型在NEC病因及病理机制的研究中起着非常重要的作用,许多学者探索不同的NEC模型建立方法,但该模型建立方法至今仍不统一^[6]。人工喂养、缺氧、复氧、冷刺激、LPS等单一的建模方法稳定性、可重复性较差;而综合早产、人工喂养、缺氧冷刺激、LPS灌胃或腹腔注射的造模方法应用越来越普遍^[7]。但各研究报道在缺氧时间(3~10 min),4℃冷刺激时间(5~10 min)、LPS用法(经胃肠道、腹腔注射)用量(2~10 mg/kg)方面仍存在较大差异^[8-10]。故本实验参考目前普遍应用的建模方法,进一步改进、比较不同建模结果,以期优化建模条件。

新生大鼠是NEC模型最常用的实验动物,属“晚发育性动物”,1日龄新生鼠相当于22~24周早产儿、3日龄相当于28~32周早产儿发育水平^[11-12],故推测新生鼠可以模拟早产儿建立NEC模型,本实验鼠采用出生2 h内未开奶新生SD大鼠作为实验鼠。喂养方面,新生鼠,尤其是早产鼠,食管插管灌胃操作难度极大,食管穿孔、气胸、胃穿孔等并发症发生率高,预实验中发现,食管插管明显增加实验鼠的死亡率。故本实验在此基础上做适当调整,利用喂养管刺激新生鼠口咽部,引出新生鼠的吞咽反射,缓慢注入代乳品,可达到喂养目的,同时可减少新生鼠因喂养所致的非NEC相关性死亡,提示试验的稳定性。

最新研究认为TLR4作为LPS受体,可促进异常强烈的严重反应、诱导肠上皮细胞自噬、凋亡并抑

制其增殖、迁移继而抑制小肠损伤修复能力,在NEC的发病过程中发挥着关键性作用^[8, 10, 13],LPS在NEC模型建立中的应用得到认可并普遍应用。但其用法、用量并不统一,本实验比较人工喂养、缺氧冷刺激结合口服或腹腔注射两种常用不同剂量LPS的造模方法,经胃肠道组(B、C)之间在死亡率、NEC发病率、NEC评分方面,差异并无统计学意义。D、E组比较发现,LPS 5 mg/kg腹腔注射,新生鼠在3~6 h开始出现烦躁、尖叫,继而全身皮肤黏膜苍白、青紫等严重脓毒血症症状,且12 h内死亡率为3/20,解剖后病理证实NEC评分均小于2分,故认为非NEC相关性死亡;既往有研究也发现,注射LPS(5 mg/kg)可导致大鼠肝、肾、肺出现严重的出血坏死,导致实验鼠直接死亡^[14],本试验B、C、D组中新生鼠非NEC死亡分别为1、2、5只,虽无统计学差异($P_{DE}=0.2$),但不排除受样本量较小的影响;综合分析认为LPS高剂量腹腔注射,可能诱发全身性炎症反应综合征(SIRS)、肺出血、多器官功能衰竭(MODF),而NEC病变尚未充分显现,增加了非NEC致死率,导致NEC发生率及NEC病理评分呈“假性降低”,故D、E组间病理评分无差异,但死亡率($P=0.027$)、生存分析($P=0.04$)结果显示两组间差异有统计学意义,结果提示增加LPS腹腔注射剂量并不能提高NEC的发病率,而且由此诱发的并发症可能增加实验鼠的死亡率。

通过生存分析、NEC发生率、NEC相关性死亡率、NEC非相关性死亡率、NEC病理评分、小肠内炎症因子变化方面综合分析,认为新生鼠结合人工喂养、缺氧冷刺激、小剂量(2 mg/kg)LPS腹腔注射是建立NEC较为理想的方法。在NEC模型建立及试验结果分析过程中应该重点评价小肠病理性损伤程度,同时纳入实验鼠的生存情况综合性分析,尽可能防止假阴性或假阳性结果出现。

目前坏死性小肠结肠炎的病因及病理机制仍不完全,不明确,部分研究认为消化系统黏膜屏障损伤后继发性感染和脓毒血症是主要的病理过程^[15],但目前所有的动物模型建立方法主要通过系统性刺激而建立肠坏死病变,经消化道给予LPS的结果稳定性较差,成功率较低,随着对NEC病理生理机制研究的不断深入,改模型的建立方法应需要进一步改进和完善,以更好地模拟临床病例生理过程。

参 考 文 献

- [1] Auestad N, Korsak R A, Bergstrom J D, *et al.* Milk-substitutes comparable to rat's milk; their preparation, composition and impact on development and metabolism in the artificially reared rat [J]. *Br J Nutr*, 1989, **61** (3) : 495-518.
- [2] Ozdemir R, Yurttutan S, Sari F N, *et al.* All-trans-retinoic acid attenuates intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis [J]. *Neonatology*, 2013, **104** (1) : 22-27.
- [3] Afrazi A, Sodhi C P, Good M, *et al.* Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium [J]. *J Immunol*, 2012, **188** (9) : 4543-4557.
- [4] Neu J, Walker W A. Necrotizing enterocolitis [J]. *N Engl J Med*, 2011, **364** (3) : 255-264.
- [5] Afrazi A, Sodhi C P, Richardson W, *et al.* New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors and beyond [J]. *Pediatr Res*, 2011, **69** (3) : 183-188.
- [6] Sodhi C, Richardson W, Gribar S, *et al.* The development of animal models for the study of necrotizing enterocolitis [J]. *Dis Model Mech*, 2008, **1** (2-3) : 94-98.
- [7] Lu P, Sodhi C P, Jia H, *et al.* Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of necrotizing enterocolitis: pathophysiology, translational relevance, and challenges [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, **306** (11) : G917-928.
- [8] Neal M D, Sodhi C P, Dyer M, *et al.* A critical role for TLR4 induction of autophagy in the regulation of enterocyte migration and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis [J]. *J Immunol*, 2013, **190** (7) : 3541-3551.
- [9] Karatepe H O, Kilincaslan H, Berber M, *et al.* The effect of vascular endothelial growth factor overexpression in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Surg Int*, 2014, **30** (3) : 327-332.
- [10] Good M, Siggers R H, Sodhi C P, *et al.* Amniotic fluid inhibits Toll-like receptor 4 signaling in the fetal and neonatal intestinal epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109** (28) : 11330-11335.
- [11] Hagberg H, Bona E, Gilland E, *et al.* Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings [J]. *Acta Paediatr Suppl*, 1997, **422**:85-88.
- [12] Sangild P T. Gut responses to enteral nutrition in preterm infants and animals [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, **231** (11) : 1695-1711.
- [13] Sodhi C P, Shi X H, Richardson W M, *et al.* Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis [J]. *Gastroenterology*, 2010, **138** (1) : 185-196.
- [14] Zhou W, Zheng X H, Rong X, *et al.* Establishment and evaluation of three necrotizing enterocolitis models in premature rats [J]. *Mol Med Rep*, 2011, **4** (6) : 1333-1338.
- [15] Hackam D, Caplan M. Necrotizing enterocolitis: Pathophysiology from a historical context [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2018, **27** (1) : 11-18.

Improvement and Evaluation of Necrotizing Enterocolitis Models in Neonatal Rats

XI Shibing, YANG Min, XIE Jijian, JING Weili, LI Xinchao, LI Tao

(*Depth of pediatric, Shiyan Taihe Hospital, Hubei Medical University Affiliated Taihe Hospital, Shiyan 420000, China*)

Abstract: Objective The present study aimed to modify and evaluate necrotizing enterocolitis (NEC) models widely used in rats, and to determine the better method. **Method** Ninety rat pups were divided into five groups: Group A as control ($n = 10$). Group B to E ($n = 20$, respectively), rats were raised with simulated milk and subjected to hypoxia, cold stress, LPS with different ways and doses (Group B p.o. LPS 5 mg/kg; Group C p.o. LPS 10 mg/kg; Group D i.p. LPS 2.0 mg/kg; Group E i.p. LPS 5 mg/kg) per 12 hours for 72 hours. Followed by observing and recording body weight, survival time and sample collection, gross examination, HE staining, NEC injury scored, TNF- α levels in the intestine and kidneys were detected. **Result** We found that Group A rats were normal, but rats from groups B-E exhibited NEC clinical characteristics, but to varying degrees in different groups. The Group D (i.p. LPS 2.0 mg/kg) has comparatively lower mortality rate, no- NEC-associated death rate, higher morbidity rate and moderate TNF- α level in intestine and kidneys and NEC injury score when compared to other groups. **Conclusion** The modified method that through combination of formula feeding, hypoxia, cold stress, and low-dose LPS intraperitoneal injection is an optimal strategy of modeling rat pup NEC.

Key words: Necrotizing Enterocolitis; modeling; neonates; rat; Lipopolysaccharide