技术方法 文章编号:0253-3626(2009)01-0313-05

# 新生儿坏死性小肠结肠炎动物模型建立方法改进与比较

李金纯,韦 红,贾盛华,魏小娣
(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

【摘 要】目的:在国内外坏死性小肠结肠炎(Necrotizing enterocolitis,NEC)动物模型建立现状基础上提出缺氧复氧冷刺激 +LPS 灌胃 + 人工喂养三因素联合造模的新方法(B 组),并与国内外常见的四种方法进行比较。方法:采用出生当日 SD 新生大鼠为研究对象,按不同造模方式随机分为 6 组,每组 8 只。A 组大鼠采取人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激,B 组大鼠为人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激 +LPS 灌胃,C 组大鼠仅接受缺氧复氧冷刺激,D 组大鼠仅接受 LPS 灌胃,E 组为人工喂养组,F 为正常对照组。每日定时称量体重,实验结束取肠组织 HE 染色后观察肠道组织病理损伤情况,采用 Nandle 评分法对病变程度进行评价。结果:实验过程中,各模型组新生鼠相继出现活动减少,倦怠,进而可见腹胀及大便颜色性状发生改变。实验结束 A、B、E 组体重下降,C、D、F 组体重上升,各组与 F 组比较有统计差异($P<0.05$)。Kruskal-wallis 检验发现:体重改变 F 组 >D 组 >C 组 >E 组 >A 组 >B 组。各组病理评分分别为 A:3.0 ± 0.53、B:3.63 ± 0.52、C:1.75 ± 0.71、D:1.75 ± 0.46、E:2.38 ± 0.52、F:0.5 ± 0.53,各组与 B 组比较均有统计差异($P<0.05$)。缺氧复氧冷刺激、LPS 灌胃、人工喂养均为 NEC 发病危险因素,三项联合法造模所致肠道病理损伤明显重于其他方法。结论:新生大鼠在缺氧复氧冷刺激 +LPS 灌胃 + 人工喂养三因素联合干预下可诱导严重肠道损伤,接近人类新生儿坏死性小肠结肠炎病理改变,可广泛应用于建立新生儿坏死性小肠结肠炎模型。

【关键词】新生儿坏死性小肠结肠炎;肠道损伤;动物模型;新方法;比较
【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-01

# Improvement and comparison of animal models of neonatal necrotizing enterocolitis

*LI Jin-chun, et al*
(*Department of Neonataology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Absreact】*Objective*: To establish a new animal model of neonatal necrotizing enterocolitis (NEC) by cold exposure after hypoxic-reoxygenation treatment, formula feeding and (Lipopolysaccharid, LPS) intragastric administration on the base of the modeling status, and to compare the differences between them. *Methods*: According to different modeling methods, 0-day-postnatal S-D rats were divided into 6 groups randomly, each group including 8 rats. Group A was given cold exposure shortly after hypoxic-reoxygen treatment and received formula feeding. Group B was in the same condition expect extra LPS intragastric administration. Group C was given cold exposure after simple hypoxic-reoxygenation treatment. Group D received LPS intragastric administration. Group E was given formula feeding alone. Group F was set up as control group. All rats were weighed every day and sacrificed on the 4th day. Proximal intestines of ileocecal junction were harvested and were evaluated by HE staining for pathological scoring. *Results*: All the neonatal rats in model groups had physical inactivity, abdominal distention and a change in stool. On day 3, neonatal rats in group A, B, and E had weight loss, while group C, D, and F had weight gain. The terminal weight and weight change of every model group were different from that of Group F ($P<0.05$). By Kruskal-wallis analysis, weight changes of each group were: Group F>Group D>Group C>Group E> Group A>Group B. The pathological scores ($\bar{x} \pm s$) for each gourp were group A: 3.0 ± 0.53, group B: 3.63 ± 0.52, group C: 1.75 ± 0.71, group D: 1.75 ± 0.46, group E: 2.38 ± 0.52 and group F 0.5 ± 0.53 respectively. The score of group B had significant differences from those of other 5 groups ($P<0.05$). Cold exposure after hypoxic-reoxygenation, formula feeding and LPS intragastric administration were all risk factors for NEC. Our new method with combination of all these factors could produce the most serious intestine injury. *Conclusions*: By cold exposure after hypoxic-reoxygenation, formula feeding and LPS intragastric administration, we could produced animal models which had intestine injury similar to neonatal necrotizing enterocolitis. This new method could be used for the establishment of NEC animal modle extensively.

【Key words】Neonatal necrotizing enterocolitis; Intestine injury; Animal modle; New method; Comparison

作者介绍:李金纯(1985- ),女,硕士,研究方向:新生儿疾病。
通讯作者:韦 红,女,副教授,E-mail:waehong@yahoo.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200300)。

坏死性小肠结肠炎(Necrotizing enterocolitis,NEC)是新生儿最常见的胃肠道急症,也是肠穿孔和全身炎症反应综合征的主要原因之一[1]。目前认为 NEC 是一种多因素导致的临床疾病,由于其尚无有效预防治疗措施,死亡率高,严重影响新生儿存活率而受到广泛重视。因此,建立新生儿 NEC 动物模型,以探求该疾病发病机制与有效的预防治疗成为 NEC 研究的重要环节之一,具有重要的实验价值和临床意义。鉴于目前国内外模型建立方法繁多杂乱,无统一标准,本研究在相关研究现状基础上,经过合理改进,建立理想、方便易行的新生儿 NEC 动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

清洁级 SD 新生鼠 48 只,购于重庆医科大学实验动物中心,雌雄不限,体重范围为 4~7 g,出生当日称重后按研究计划随机分为 6 组,每组 8 只。A 组大鼠采取人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激,B 组大鼠为人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激 +LPS 灌胃,C 组大鼠仅接受缺氧复氧冷刺激,D 组大鼠仅接受 LPS 灌胃,E 组为人工喂养组,F 为正常对照组。其中 C、D 组处理完毕后放回鼠笼,鼠乳喂养。本研究所有实验均在普通级动物饲养间级相应实验室完成。

### 1.2 主要试剂及仪器

Ecoli O55:B5 脂多糖(lipopolysaccharide,LPS;Sigma Chemical CO.,St Louis,Mo),1.9F 硅胶管(B-D Inc,Sandy,UT,USA),雅培 - 加营素蛋白粉由美国雅培公司惠赠,英脱利匹特脂肪乳注射液(C14-24)购自华瑞制药有限公司,惠氏 S-26 金装爱儿乐低出生体重儿配方奶购自惠氏公司。CY-100 型便携式数字测氧仪购自浙江省建德市利达仪器厂,37℃恒温水浴箱(上海医疗器械厂),4℃冰箱(德国西门子),根据实验需要自制密闭缺氧箱及新生鼠保育箱。

### 1.3 处理方法

1.3.1 人工喂养 新生 SD 大鼠于出生当日与母鼠分离,置于新生鼠保育箱内进行人工喂养,代乳品参考 Auestand 等[2]报道配制(表 1),用清洁无菌 1.9 F 硅胶管每 4 h 经口插管喂养一次,喂养前分别用生理盐水及 75%医用酒精清洁新生鼠口腔周围皮肤,喂养完毕硅胶管立即清洗消毒后浸泡于盛放 75%医用酒精之密闭容器中备用,并于下次使用前取出用灭菌生理盐水彻底清洗。实验过程中每只硅胶管消毒后仅应用于 1 只新生鼠。首次喂养量为 0.1 ml,以后每 24 h 增加 0.1 ml 至 0.3 ml。

1.3.2 缺氧复氧冷刺激 测氧仪调零后将探头连接于密闭缺氧箱顶端缺口处,胶布封闭,入气孔中充入纯氮,控制氮气流量为 15 L/min,箱内氧气浓度降至零后迅速将新生鼠置入,持续通入氮气,维持 100% $N_2$ 10 min 后打开箱盖取出新生鼠,随即将其置于 100%氧气环境之氧仓中,保持 10 min 后立即将其置于 4℃冰箱中刺激 10 min。每日 3 次,处理后送回保育箱或母鼠笼中喂养,连续 3 d。

**表 1 人工喂养代乳品配方及与鼠乳主要成分的比较**

| 成分 | 代乳品(L) | 鼠乳(L) |
|---|---|---|
| 糖(g) | 28.04 | 26 |
| 蛋白质(g) | 100 | 69~118 |
| 脂肪(g) | 105.7 | 93~175 |
| 热量(kJ) | 5 817.23 | 5 200~9 300 |

1.3.3 LPS 灌胃 LPS 以 10 mg/kg 稀释于 0.1 ml 灭菌水中,每日 1 次灌胃,连续 3 d。

各组大鼠每日定时称量体重,于第 4 d 开始空腹 24 h 后断头处死,自腹正中线打开腹腔,仔细分离肠系膜及血管后取出十二指肠下端至回盲部肠管待检。

### 1.4 肠组织病理学检查与评分

取回盲部近端肠管 1~2 cm 立即固定于 4%多聚甲醛中,石蜡包埋,作 4~5 μm 连续切片,常规HE 染色,肠道组织病理评分参考 Nadler 标准[3]进行双盲法评分:0 分:肠道绒毛及上皮完整,组织结构正常;1 分:轻微黏膜下或固有层肿胀分离;2 分:中度黏膜下和 / 或固有层分离,黏膜下和 / 或肌层水肿;3 分:重度黏膜下和 / 或固有层分离,黏膜下和 / 或肌层水肿,局部绒毛脱落;4 分:肠绒毛消失伴肠坏死。病理评分大于或等于 2 分者视为 NEC 发病。

### 1.5 统计学分析

SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析,$P<0.05$ 判定为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 肠道组织大体改变

A~E 组肠道组织较之正常组均有改变,其中 A、B、E 组病变严重,回盲部以上近端肠管呈黑红色。C、D 组回盲部近端肠管呈黄红色改变。所有实验组大鼠肠腔均可见到不同程度积气,严重者呈串珠样。正常对照组肠管色泽粉嫩,呈黄色,弹性佳,无积气出现。

### 2.2 肠道组织病理学改变

各组新生鼠回盲部病理切片 HE 染色显示。

2.2.1 实验组 A、B 组 肠道组织坏死严重,肠壁绒毛参差不齐,变性水肿,部分绒毛坏死,脱落消失,腺体排列紊乱消失,肌层变薄甚至断裂,固有层与粘膜下层重度水肿,可见炎性细胞浸润,双盲法病理学评分均为 3~4 分。C 组与 D 组回肠末端肠黏膜

及黏膜下层可见轻中度水肿充血，绒毛水肿，腺体结构紊乱，部分肠管病变不十分明显。E 组出现严重黏膜下层及固有层水肿，部分血管扩张充血，绒毛变性明显，排列紊乱（图 A~E）。

2.2.2 正常对照组 肠道结构完好，组织结构清晰正常。上皮完整连续，腺体排列规则，绒毛高耸整齐，黏膜层、黏膜下层、固有层无充血水肿甚至断裂分离（图 F）。

2.3 各种危险因素对 NEC 模型病变程度的影响

将 C、D、E 三组病理评分进行比较：E 组肠道损伤最重，与 C、D 组差异均有统计意义。C 组与 D 组差异无统计学意义（表 2）。

2.4 NEC 发病率及不同组别病理评分比较

各组 NEC 发病率分别为 A 组：100%（8/8）、B 组：100%（8/8）、C 组：62.5%（5/8）、D 组：75%（6/8）、E 组：100%（8/8）、F 组：0%。A~F 组 6 组大鼠双盲法病理评分及组间比较。结果显示所有实验组与正常对照组肠道损伤病理评分均有显著差异。实验组间比较，除 C 组与 D 组外，各组间比较差异均有统计学意义。其中，B 组经人工喂养+缺氧冷刺激+LPS 灌胃三项联合处理，其肠道损伤病理学评分显著增加（表 3）。

2.5 生长情况与一般情况

2.5.1 生长情况 造模开始后，各模型组大鼠均在不同程度出现生长发育迟缓，较正常对照组明显滞后，体重增长缓慢，皮下脂肪减少，皮肤松弛。各组新生鼠身长体重测量结果见下表（表 4）。各组实验前体重没有差异性（$P$=0.984）；实验后各组间体重、体重增减差值与正常对照组比较均有差异性（$P$=0.000 1）。根据 Kruskal-wallis 检验进一步推断，实验前后体重增长差值比较：正常对照组组>LPS 灌胃组>缺氧复氧冷刺激组 >人工喂养组 >人工喂养+缺氧复氧冷刺激组>人工喂养+缺氧复氧冷刺激+LPS 灌胃组。

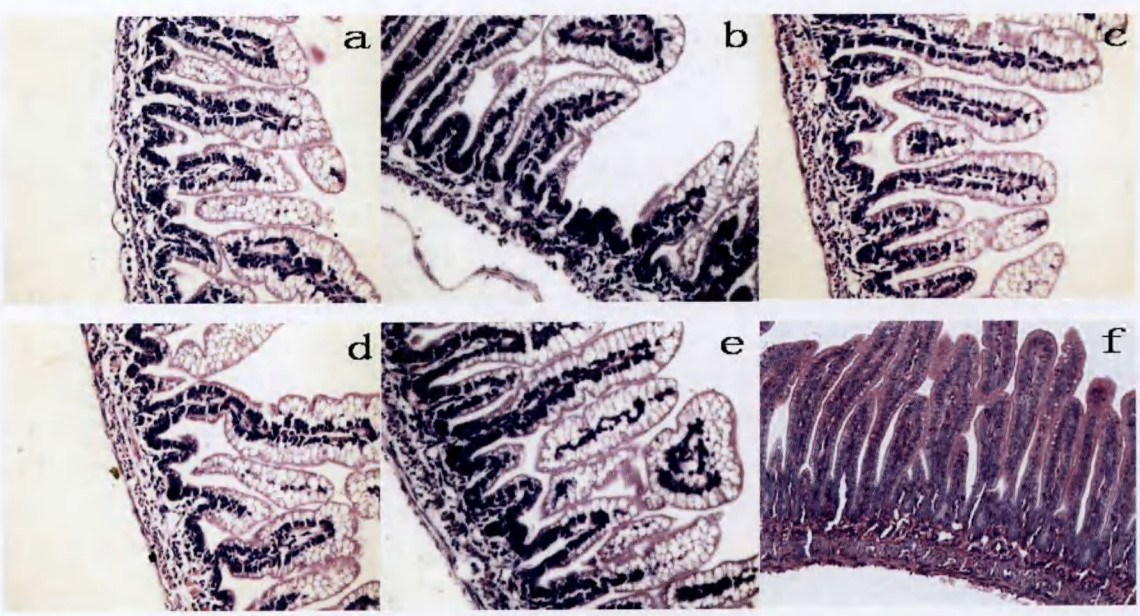



图 a. A 组（缺氧复氧冷刺激 + 人工喂养）；图 b. B 组（缺氧复氧冷刺激 + 人工喂养 +LPS 灌胃）；图 c. C 组（缺氧复氧冷刺激）；图 d. D 组（LPS 灌胃）；图 e. E 组（人工喂养）；图 f. F 组（正常对照）

**图 1 各组新生大鼠回盲部肠段病理切片（HE 染色×400）**

**表 2 不同危险因素对 NEC 动物模型病理评分的比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 鼠数（$n$） | 评分 | $P$ 值 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 与缺氧复氧冷刺激比较 | 与 LPS 灌胃比较 | 与人工喂养比较 | 与正常对照比较 |
| 缺氧复氧冷刺激 | 8 | 1.75 ± 0.707 1 | — | 1.000 0 | 0.028 0 | 0.000 1 |
| LPS 灌胃 | 8 | 1.75 ± 0.462 91 | 1.000 0 | — | 0.028 0 | 0.000 1 |
| 人工喂养 | 8 | 2.38 ± 0.517 6 | 0.028 0 | 0.028 0 | — | 0.000 1 |
| 正常对照 | 8 | 0.5 ± 0.534 51 | 0.000 1 | 0.000 1 | 0.000 1 | — |

2.5.2 一般情况 实验过程中,各模型组新生鼠相继出现活动减少,倦怠,进而可见大便颜色性状发生改变,均不同程度排黄绿色或黑色稀便,B 组大鼠部分出现肉眼可见黑红色血便。开始建模后第 2 d 开始,A、B、E 组新生鼠出现喂养困难,吐奶,进奶量下降等胃潴留症状。至建模后第 3 d,所有模型组新生鼠均有不同程度嗜睡,对刺激反应迟钝,活动缓慢,蜷曲而卧等一般情况不佳情况。正常对照组生长发育良好,皮下脂肪丰满,体重稳定增长,活动度及对刺激反应好,进食及排便正常,大便为金黄色颗粒状,无腹胀及胃潴留发生。

表 3 不同干预方式对 NEC 动物模型病理评分的比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | A 组 | B 组 | C 组 | D 组 | E 组 | F 组 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 鼠数($n$) | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 评分 | 3.0 ± 0.53▲★ | 3.63 ± 0.52▲ | 1.75 ± 0.71▲★ | 1.75 ± 0.46▲★ | 2.38 ± 0.52▲★ | 0.5 ± 0.53★ |

▲:与 F 组(正常对照组)比较,$P<0.05$;★:与 B 组比较,$P<0.05$

表 4 实验前后 NEC 动物体重及其差值的比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | A 组 | B 组 | C 组 | D 组 | E 组 | F 组 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 处理前 | 6.220 ± 0.432 | 6.051 ± 0.747 | 6.257 ± 0.608 | 6.203 ± 0.719 | 6.170 ± 0.664 | 6.199 ± 0.590 |
| 处理后 | 5.843 ± 0.410★ | 5.471 ± 0.768★ | 7.292 ± 0.463★ | 7.486 ± 0.557★ | 5.792 ± 0.657★ | 10.409 ± 0.411 |
| 增长 | −0.377 ± 0.227★ | −0.580 ± 0.171★ | 1.036 ± 0.206★ | 1.283 ± 0.307★ | −0.378 ± 0.216★ | 4.116 ± 0.545 |

★:与 F 组比较,$P<0.05$

## 3 讨 论

NEC 是新生儿尤其是早产儿最常见的胃肠道急症,发生率及病死率高,治疗较为困难,已经引起新生儿学家的广泛关注。然而其发病机制尚不明确,目前认为:早产、缺氧窒息、感染等是 NEC 发病的高危因素。有学者[4]提出,超过 20%的 NEC 患儿中,早产为其单一致病因素。较大多数研究所采用新生 1 日龄或 2 日龄,体重范围 5~10 g 者,本研究选用 SD 大鼠均为当日出生,体重更低,更符合低出生体重早产儿的范畴。可很好接近于新生儿坏死性小肠结肠炎的发病人群特征。

目前大部分实验研究是根据某项独立危险因素建立动物模型。例如通过使动物窒息缺氧,或 LPS 灌胃,肠系膜缺血再灌注,及胃造口术人工喂养,腹腔注射 PAF 等方式诱发 NEC[5-7]。本研究比较了三种危险因素(C 组:缺氧复氧冷刺激,D 组:LPS 灌胃及 E 组:人工喂养)在 NEC 发病机制中的作用,对以上因素造模后动物肠道组织进行病理评分并与正常对照组进行比较,结果显示:缺氧复氧冷刺激,LPS 灌胃,人工喂养均为 NEC 发病的危险因素,均可以引起肠黏膜及黏膜下层不同程度的水肿充血,绒毛水肿或者变性坏死等 NEC 的改变。根据 Nadler 病理评分标准,对各组间损伤进行评分后比较,结果显示:E 组即人工喂养处理组病变最严重,出现严重黏膜下层及固有层水肿,部分血管扩张充血,绒毛变性明显,排列紊乱;而鼠乳喂养处理 C 组与 D 组损伤相对较轻,提示母乳喂养在减轻缺氧复氧冷刺激或 LPS 灌胃损伤中可能起到重要作用,一方面可能由于母乳中诸多有益成分对胃肠道的保护作用;此外,母乳喂养避免了人工超量超速喂养时对肠道的容量压力性损伤。

然而在临床工作中,NEC 的发病常常不是单一因素,而是早产后窒息缺氧、感染及喂养不当的共同作用的结果,因此多因素联合造模更接近 NEC 发病的临床特征,更为科学合理。美国一个著名 NEC 研究小组在近年研究中也提出[8],采用鼠配方乳人工喂养结合缺氧冷刺激所制造的动物模型(A 组),能更真实反映人类 NEC 的发病过程。我们的前期工作表明 LPS(致病菌)为 NEC 的独立危险因素,而良好设计的流行病学研究和严格感染控制后 NEC 发病率的下降均可证明致病菌感染在 NEC 发病机制中不可或缺的作用。因此,我们根据 NEC 发病特点,结合国内实验条件,在 A 组方法的基础上添加 LPS 灌胃处理,提出新的三因素联合干预的造模方法(B 组),并将其与其他各组进行比较。结果显示,A 组动物肠道损伤程度及体重变化较各单因素组均有统计差异,但经添加 LPS 灌胃处理的 B 组,病理评分最为严重,且与 A 组比较病理评分有统计差异,

表明人工喂养+LPS 灌胃+缺氧复氧冷刺激这种多因素综合干预其肠道损伤程度最重。此外，由于实验动物本身对监测条件的限制，体重是反映新生动物身体状况的良好指标。本研究实验结束时，体重增长：正常对照组组>LPS 灌胃组>缺氧复氧冷刺激组>人工喂养组>人工喂养+缺氧复氧冷刺激组>人工喂养+缺氧复氧冷刺激+LPS 灌胃组，其中凡人工喂养处理者均出现负增长，而人工喂养+缺氧复氧冷刺激+LPS 灌胃组体重负增长最为严重，进一步说明在三种因素联合干预下，动物健康状态受到严重打击。该方法中全部实验动物均发生严重 NEC，成功率及重复性较好。因此，本研究建立的新的动物模型综合了早产、低出生体重、窒息缺氧、缺血再灌注损伤、快速超量人工喂养、肠道致病菌感染等多种致病危险因素，在病因学上更符合 NEC 的病理生理机制；采用 NEC 模型的经典方法 Nadler 病理评分标准进行评分，分级明确清晰，结果客观可靠；且模型制作简单易行，对设备器材要求不高，是研究新生儿坏死性小肠结肠炎较为理想的一种动物模型，明显优于国内外其他方法。

此外，本研究中在对所有实验组肠道病理切片观察后发现，尽管坏死等改变显著，但各组均无明显炎症反应发生，其原因可能包括新生动物免疫应答不成熟及中性粒细胞等急性炎性细胞在 NEC 发病中被大量募集至腹膜[9]，国内外报道甚少，具体原因有待进一步研究。

## 参 考 文 献


[1] 何乃殷. 新生儿坏死性小肠结肠炎[J]. 实用儿科临床杂志，Shiyong Erke Linchuang Zazhi，2002，17(1)：10-13.

[2] 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.

[3] Nadler E P，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(1)：71-77.

[4] Elizadeth H，Rosenberg A A，William W，et al. Necrotizing enterocolitis in current pediatrics[J]. Edlbth MccGraw Hill Companies，2002，36-37.

[5] 阴怀清，石 岩，王阿琚，等. 降钙素基因相关肽在新生儿坏死性小肠结肠炎发病机理中作用的实验研究[J]. 中华围产医学杂志，2003，6(3)：168-171.

[6] Caplan M S，Jilling T. Neonatal necrotizing enterocolitis：possible role of probiotic supplementation[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr，2000，30(52)：18-22.

[7] Ewer A K，Al-Salti W，Conev A M，et al. The role of platelet activating factor in a neonatal piglet model of necrotising enterocolitis[J]. Gut，2004，53(2)：207-213.

[8] Caplan M S，Jilling T. New concepts in necrotizing enterocolitis[J]. Curr Opin Pediatr，2001，13(2)：111-115.

[9] Balcom R J，Clark D A，Rokahr J，et al. Peritoneal neutrophilic cell response in necrotizing enterocolitis[J]. Am J Dis Child，1985，139(7)：701-704.


（责任编辑：冉明会）

读者·作者·编者

# 关于论文写作中的作者致谢

我国著作权法公布以来，已得到社会各界的广泛重视，作为医学科技期刊必须不折不扣的执行著作权法。为此将本刊对作者致谢的有关要求重申如下。在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢，但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向：(1)对确实给予了帮助的单位和个人，甚至用了他人的方法、思路、资料，为了抢先发表，而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑，将应被致谢人放在作者的位置上，混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3)以知名人士、知名专家包装自己的论文，抬高论文的身份，将未曾参与工作的，也未阅读过该论文的知名专家写在被致谢者中。被致谢者包括：(1)对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)做出贡献又不能成为作者的人，如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人，在致谢中应阐明其支援的性质。(6)其他需致谢者。

本刊编辑部