

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.20.004

脂多糖给药途径和剂量优化在新生儿坏死性小肠结肠炎大鼠模型建立中的应用*

程海燕,张成欢,沈蕾蕾,尹显源,陶 敏,徐鹤丹,陈 盛[△]
陆军军医大学第一附属医院儿科,重庆 400038

摘 要:目的 比较不同脂多糖(LPS)给药途径与剂量对新生大鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)模型的影响,建立兼具病理典型性与适当存活率的优化模型。方法 将 2~3 d 龄 SD 大鼠 150 只随机分为 6 组:对照组(腹腔注射无菌生理盐水)、腹腔注射 LPS 低剂量组(1 mg/kg)、腹腔注射 LPS 高剂量组(2 mg/kg)、口服 LPS 低剂量组(4 mg/kg)、口服 LPS 中剂量组(8 mg/kg)、口服 LPS 高剂量组(12 mg/kg),每组 25 只。对照组大鼠每日 1 次腹腔注射无菌生理盐水,持续 3 d,进行母乳喂养;其余 5 组每日接受 LPS 给药(通过腹腔注射或经口灌胃的方式给予相应剂量的 LPS,每日 1 次)、人工喂养及冷刺激与缺氧复合应激,持续 3 d。评估 6 组大鼠存活率、一般状况(包括精神状态、活动度、腹胀程度、腹泻评分及总评分)、体重变化、肠道病理改变情况、肠组织炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)]水平及肠道紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin 蛋白)表达水平和肠道通透性(血清 FITC-dextran 水平)。绘制 K-M 生存曲线进行生存分析。结果 建模 72 h,对照组存活 25 例,腹腔注射 LPS 低剂量组存活 14 例,腹腔注射 LPS 高剂量组存活 11 例,口服 LPS 低剂量组存活 23 例,口服 LPS 中剂量组存活 20 例,口服 LPS 高剂量组存活 7 例。K-M 生存曲线结果显示,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组生存曲线明显低于对照组(log-rank $\chi^2=14.58, 21.88, 5.56, 34.72$, 均 $P<0.05$)。与对照组相比,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组 72 h 生存率明显降低($P<0.05$)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分、总评分、肠组织病理评分及肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 和血清 FITC-dextran 水平均明显升高,第 4 天体重、体重变化率及肠组织 IL-10、Occludin 蛋白、ZO-1 蛋白水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,口服 LPS 低剂量组和口服 LPS 中剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显降低,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组和口服 LPS 高剂量组第 4 天体重及体重变化率均明显升高,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织病理评分明显降低,口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组新生大鼠肠组织病理评分明显升高,口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 降低,口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组肠组织 IL-10 水平升高,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平升高,口服 LPS 高剂量组肠组织 Occludin 蛋白水平降低,口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组血清 FITC-dextran 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与口服 LPS 中剂量组比较,口服 LPS 高剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显升高,口服 LPS 低剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显降低,腹腔注射 LPS 低剂量组和口服 LPS 高剂量组第 4 天体重及体重变化率均明显降低,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织病理评分均明显降低,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 高剂量组肠组织 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 升高,口服 LPS 低剂量组肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平升高,腹腔注射 LPS 低剂量组肠组织 Occludin 蛋白水平及口服 LPS 高剂量组血清 FITC-dextran 水平升高,口服 LPS 低剂量组血清 FITC-dextran 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。口服 LPS 中剂量组表现为典型的 NEC 大体改变,肠道节段性充血、水肿明显,散在坏死灶,肠壁增厚,部分肠段呈暗红色。结论 口服 LPS 8 mg/(kg·d)联合复合应激可成功诱导新生大鼠 NEC 模型,该模型兼

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82170565);重庆市自然科学基金重点项目(2024NSCQ-KJFZZDX0018);陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2019XQY09)。

作者简介:程海燕,女,主治医师,主要从事新生儿消化系统疾病方面的临床研究。 [△] 通信作者,E-mail:chensh129@tmmu.edu.cn。
引用格式:程海燕,张成欢,沈蕾蕾,等.脂多糖给药途径和剂量优化在新生儿坏死性小肠结肠炎大鼠模型建立中的应用[J].检验医学与临床,2025,22(20):2756-2766.

具典型病理特征、适度炎症反应和较高存活率,为 NEC 研究提供了优化的实验模型。

关键词:坏死性小肠结肠炎; 脂多糖; 动物模型; 新生大鼠; 给药途径; 给药剂量

中图法分类号:R722.1;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)20-2756-12

Application of lipopolysaccharide administration route and dose optimization for establishing a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis*

CHENG Haiyan, ZHANG Chenghuan, SHEN Leilei, YIN Xianyuan, TAO Min,

XU Hedan, CHEN Sheng[△]

Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Army Military Medical

University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To compare the effects of different lipopolysaccharide (LPS) administration routes and doses on neonatal rat models of necrotizing enterocolitis (NEC), and to establish an optimized model balancing pathological typicality and survival rate. **Methods** One hundred fifty Sprague-Dawley pups (2—3 days old) were randomized into six groups: control (intraperitoneal sterile saline), intraperitoneal injection (IP) low-dose LPS group (1 mg/kg), IP high-dose LPS group (2 mg/kg), oral administration (PO) low-dose LPS group (4 mg/kg), PO medium-dose LPS group (8 mg/kg) and PO high-dose LPS group (12 mg/kg), 25 cases in each group. The control group received daily intraperitoneal injections of sterile saline for 3 consecutive days and were breastfed, while the other five groups received daily LPS administration (via intraperitoneal injection or oral gavage at corresponding doses) artificial feeding, and a combined stressor of cold exposure and hypoxia for 3 consecutive days. Survival rate, general condition (including mental state, activity level, abdominal distension degree, diarrhea scores and total score), body weight changes, intestinal pathological changes, levels of intestinal inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10)], expression levels of intestinal tight junction proteins (ZO-1 and Occludin proteins) and intestinal permeability (serum FITC-dextran level) in the 6 groups were evaluated. Kaplan-Meier (K-M) curves were plotted for survival analysis. **Results** At 72 hours after model establishment, 25 cases survived in the control group, 14 cases in the IP low-dose LPS group, 11 cases in the IP high-dose LPS group, 23 cases in the PO low-dose LPS group, 20 cases in the PO medium-dose LPS group, and 7 cases in the PO high-dose LPS group. K-M survival curve analysis results showed that the survival curves of the IP low-dose LPS group, IP high-dose LPS group, PO medium-dose LPS group and PO high-dose LPS group were significantly lower than that of the control group ($\log\text{-rank } \chi^2 = 14.58, 21.88, 5.56, 34.72$, all $P < 0.05$). Compared with the control group, the 72-hour survival rate was significantly decreased in the IP low-dose LPS group, IP high-dose LPS group, PO medium-dose LPS group and PO high-dose LPS group ($P < 0.05$). Compared with the control group, mental state score, activity score, abdominal distension score, diarrhea score, total score, intestinal histopathological score, as well as the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and the ratios of TNF- α /IL-10 and IL-1 β /IL-10 in intestinal tissue and FITC-dextran in serum were significantly increased in the IP low-dose LPS group, IP high-dose LPS group, PO low-dose LPS group, PO medium-dose LPS group and PO high-dose LPS group, while the 4-day body weight, body weight change rate and the levels of IL-10, Occludin and ZO-1 in intestinal tissue were significantly decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the IP high-dose LPS group, the mental state score, activity score, abdominal distension score, diarrhea score and total score in the PO low-dose LPS group and the PO medium-dose LPS group were significantly decreased, the 4-day body weight and body weight change rate in the IP low-dose LPS group, PO low-dose LPS group, PO medium-dose LPS group and PO high-dose LPS group were significantly increased, the intestinal histopathological scores of neonatal rats in the IP low-dose LPS group and PO low-dose LPS group were significantly decreased, the intestinal histopathological scores of neonatal rats in the PO medium-dose LPS group and PO high-dose LPS group were significantly increased, the intestinal levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and the ratios of TNF- α /IL-10, IL-1 β /IL-10 in the PO low-dose group, PO medium-dose group and PO high-dose LPS group were significantly decreased, the IL-10 levels in intestinal tissue in the PO low-dose group and PO medium-dose LPS group were significantly increased, levels of Occludin and ZO-1 proteins in the intestinal tissue of neonatal rats in the IP low-dose LPS group and PO low-dose LPS group were significantly increased,

level of Occludin protein in intestinal tissue in the PO high-dose LPS group was obviously decreased, serum FITC-dextran level in the PO low-dose group, PO medium-dose group and PO high-dose LPS groups were significantly decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the PO medium-dose LPS group, the mental state score, activity score, abdominal distension score, diarrhea score and total score in the PO high-dose LPS group were significantly increased, the mental state score, activity score, abdominal distension score, diarrhea score, total score, as well as the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α /IL-10, IL-1 β /IL-10 in intestinal tissue in the PO low-dose LPS group were significantly decreased, the 4-day body weight and body weight change rate in the IP low-dose LPS group and PO high-dose LPS group were significantly decreased, the intestinal histopathological score of neonatal rats in the IP low-dose LPS group and PO low-dose LPS group was significantly decreased, the ratios of TNF- α /IL-10 and IL-1 β /IL-10 in intestinal tissue in the IP low-dose LPS group and PO high-dose LPS group were significantly increased, the levels of Occludin protein and ZO-1 protein in intestinal tissue in the PO low-dose LPS group were significantly increased, Occludin protein level in intestinal tissue in the IP low-dose LPS group and serum FITC-dextran level in the PO high-dose LPS group were significantly increased, serum FITC-dextran level in the PO low-dose LPS group was significantly decreased, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The PO medium-dose LPS group showed typical gross pathological changes of NEC, with obvious segmental hyperemia and edema of the intestine, scattered necrotic foci, thickened intestinal wall and dark red color in some intestinal segments. **Conclusion** PO of 8 mg/(kg · day) LPS combined with compound stress can successfully induce a neonatal rat NEC model, and this model possesses typical pathological features, moderate inflammatory response and high survival rate, providing an optimized experimental model for NEC research.

Key words: necrotizing enterocolitis; lipopolysaccharide; animal model; neonatal rats; administration route; administration dose

新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)为新生儿重症监护室(NICU)常见的一种消化道急症,主要发生在极低出生体重儿(VLBW),其发病率为 10% ~ 12%^[1]。NEC 是以肠道炎症损伤、坏死和肠穿孔为主要表现的一类疾病,并常伴全身严重感染,病程发展快,预后差,病死率达 20% ~ 30%,成为造成早产儿死亡的原因之一;幸存者中易出现多种严重的远期并发症如短肠综合征、生长落后和神经系统发育异常等^[2]。目前对 NEC 的确切病因尚未完全阐明,故在一定程度上制约了 NEC 临床防治策略的发展^[3]。因此,建立稳定、可靠的动物模型对于深入探讨 NEC 发病机制及评估潜在干预措施具有重要意义。

脂多糖(LPS)是存在于革兰阴性菌胞壁里的大分子化合物,它能激活肠道上皮细胞 Toll 样受体 4 (TLR4)信号通路,引发炎症连锁反应,参与到 NEC 的发生及发展进程当中,所以被视作 NEC 发病的关键环节之一^[4-6]。于是,LPS 结合人工喂养、冷刺激及缺氧就被广泛运用于 NEC 动物模型的构建之中。不过现有研究在 LPS 给药方案存在较大差异,如剂量范围为 0.5 ~ 10 mg/kg,给药途径包括腹腔注射和口服,给药频率也存在差异^[7]。这种方法学的不一致性会影响模型的有效性和可靠性,进而对研究结果的可重复性、机制研究的准确性和干预效果的可靠性都会产生一定的影响。给药途径的选择或许会对模型的病理特点及动物存活率产生重要影响^[8]。腹腔注射 LPS 建立动物模型虽然在操作上简便,但易在短时间

内诱发急性内毒素血症,严重时甚至会导致动物休克或死亡,这和临床 NEC 早期是以肠道局部病变为主导、随后发展成为全身炎症反应的病程特点存在一定的差异^[9]。口服给药能够在一定程度上模拟肠道菌群失调及内毒素吸收的过程,在理论上更加契合 NEC 的病理生理过程。然而新生大鼠的胃肠道发育并不成熟,可能致使 LPS 在吸收、耐受等方面出现个体差异,剂量控制不当甚至会影响模型的典型性或者导致动物死亡^[10]。因此,如何找到更合适的给药途径和剂量,在保证模型病理特征足够典型(能真实反映 NEC 的关键变化)的同时,又能维持一个合理的动物存活率,就成了当前优化 NEC 模型研究的核心挑战。

基于上述考虑,本研究通过综合评估动物存活率、临床症状、肠道病理改变、炎症反应水平以及肠道屏障功能等指标,系统比较了不同 LPS 给药途径和剂量对 NEC 模型构建效果的影响,旨在探讨更为优化的 NEC 模型构建方案,为后续 NEC 机制研究和干预策略评估提供可靠的实验平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(2 ~ 3 d, 体重 7 ~ 9 g, 雌雄不限)150 只,购自陆军军医大学实验动物中心[实验动物生产许可证号为 SCXK(渝)2022-0011, 使用许可证号为 SYXK(渝)2022-0018]。SD 大鼠饲养温度为 22 ~ 24 ℃, 相对湿度为 55% ~ 65%, 光照周期为 12 h/12 h 昼夜节律。新生 SD 大鼠与母鼠同笼饲养至实验干预前。本研究

涉及动物实验的操作均经陆军军医大学动物伦理委员会审核通过(审批号:AMUWEC20237081)。

1.2 仪器与试剂 电子天平(德国赛多利斯集团,型号:SQP 10mg);恒温培养箱(美国 Thermo Scientific 公司,型号:FOS-2430V);酶标仪(瑞士 TECAN 集团公司,型号:Infinite M200 Pro);离心机(德国西格玛离心机有限公司,型号:3K15);Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:165-8001);Trans-Blot Turbo 半干转印系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:165-8001);多功能光密度成像系统(法国 Vilber Lourmat 公司,型号:SOLO. 6S. EDGE V0. 70);脱水机(意大利迪佩斯,型号:Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);组织摊片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P);冰箱(青岛海尔股份有限公司,型号:BCD-192TGN);-80℃冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司,型号:MDF-8020S)。LPS(大肠埃希菌 E. coli O55:B5, MedChemExpress 公司);PetAg Esbilac® 幼犬代乳粉(美国 PetAg 公司);Similac 早产儿婴儿配方奶(美国雅培公司);4%多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA 裂解液(强效型,含 1%蛋白酶抑制剂混合物;上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)和白细胞介素-10 (IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳市博研生物技术有限公司);兔抗大鼠闭锁小带蛋白-1(ZO-1)抗体(稀释比 1:800,武汉爱博泰克生物科技有限公司);兔抗大鼠闭合蛋白(Occludin)抗体(稀释比 1:800,武汉爱博泰克生物科技有限公司);兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(稀释比 1:10 000,武汉爱博泰克生物科技有限公司);HRP 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(稀释比 1:10 000,武汉爱博泰克生物科技有限公司);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(武汉爱博泰克生物科技有限公司);封闭用脱脂奶粉(武汉爱博泰克生物科技有限公司);超敏化学发光(ECL)底物(武汉爱博泰克生物科技有限公司);FuturePAGE™ 蛋白预制胶(4%~20%梯度胶,常州伯仪生物科技有限公司);1×Western 快速转膜液(粉末, Biosharp 公司);TBS 缓冲液(即用型干粉, Biosharp 公司);Tween®-20(国药集团化学试剂有限公司);异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-dextran, 相对分子质量为 4 000, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及 NEC 模型构建 采用随机数字表法将 150 只新生 SD 大鼠分为 6 组:对照组、腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS

低剂量组、口服 LPS 中剂量组和口服 LPS 高剂量组,每组 25 只。在为期 3 d 的实验周期内,对照组大鼠腹腔注射 0.1 mL 无菌生理盐水,每天 1 次,并与母鼠同笼进行母乳喂养。其余 5 组大鼠均与母鼠分离并置于温度为 32℃ 的恒温培养箱内,参考文献[11]中的方法建立模型,接受每天 1 次的 LPS 给药、人工喂养以及冷刺激与缺氧复合应激,具体干预措施包括:(1) LPS 给药。每天通过腹腔注射(腹腔注射 LPS 低剂量组为 1 mg/kg,腹腔注射 LPS 高剂量组为 2 mg/kg)或经口灌胃(口服 LPS 低剂量组为 4 mg/kg,口服 LPS 中剂量组为 8 mg/kg,口服 LPS 高剂量组为 12 mg/kg)的方式给予相应剂量的 LPS,持续 3 d。(2) 人工喂养。每天定时对新生 SD 大鼠进行人工哺乳喂养。配方奶由 PetAg Esbilac® 幼犬代乳粉和 Similac 早产儿婴儿配方奶以 1:1 比例混合,配制成总固形物浓度为 33.3% 的混合乳液。每 4 小时饲喂 0.2 mL/10 g。(3) 冷刺激与缺氧。每天进行 3 次冷刺激(4℃冷暴露 10 min)和缺氧处理(密闭氮气舱中维持 90 s,氧浓度<0.5%),每次干预间隔 4 h。

1.3.2 6 组新生大鼠建模 72 h 生存情况 每天定时记录各组新生大鼠的存活数量,自实验开始当天记为第 1 天,在各组模型建立 72 h(即第 4 天)计算分析各组总体生存情况。

1.3.3 6 组存活新生 SD 大鼠一般状况观察 实验期间,每天观察并记录各组存活新生大鼠的一般状况,包括精神状态、活动度、腹胀程度、腹泻评分及总评分。(1)精神状态:参照文献[7]描述的方法通过观察头部姿势和对外界刺激的反应进行评分,0 分为正常(警觉,反应迅速),1 分为轻度嗜睡(反应稍慢),2 分为中度嗜睡(反应明显减弱),3 分为重度嗜睡(几乎无反应)。(2)活动度:参照文献[7]描述的方法通过观察大鼠在笼内自发运动频率进行评分,0 分为正常(运动频繁),1 分为轻度减少,2 分为中度减少,3 分为重度减少(几乎无运动)。(3)腹胀程度:通过视觉观察和触诊评估,0 分为无腹胀,1 分为轻度(腹部略膨胀),2 分为中度(明显膨胀),3 分为重度(严重膨胀,可能伴疼痛)。评分根据实验观察制订。(4)腹泻评分:参考文献[12]描述的方法使用纸巾法辅助观察,观察粪便一致性和形状,采用 3 级系统,1 分为正常(成形,无水渍),2 分为湿粪便(成形但有水渍),3 分为水样粪便(无成形,伴水渍)。总评分为精神状态、活动度、腹胀程度、腹泻评分之和,总分 0~12 分,分值越高表示状态越差。

1.3.4 6 组新生大鼠第 1 天及第 4 天体重测量 因 NEC 模型组大鼠死亡率较高,为保障统计所需有效样本量,采用有放回随机抽样法:每天上午 9:00 从各组存活大鼠中随机选 6 只,同日不重复抽同一只,次日可重复;使用精度 10 mg 电子天平,测量前校准调零,轻柔抓取大鼠平稳称量,每只测 3 次取平均值。重点

分析实验第 1 天(干预前基线)与第 4 天(干预后)各组体重,通过比较其变化来评估不同 LPS 给药方案对大鼠生长的影响。

1.3.5 6 组新生大鼠肠道组织收集及肠道原位宏观观察 模型建立 72 h 后(即第 4 天),对 6 组存活新生大鼠采用颈椎脱臼法处死,打开腹腔后,进行肠道原位宏观观察,并使用华为 Mate 40 Pro 后置主摄镜头(等效焦距 27 mm)在解剖台冷光源下拍摄,拍摄距离固定为 15 cm。随后迅速分离回盲瓣上下 2 cm 的肠组织。为确保后续分析的独立性,将此段肠组织分为 2 部分进行处理:取回肠末端 1 cm 长度的肠段,立即置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于后续的组织病理学检查;将剩余肠组织立即投入液氮速冻,之后转移至 -80 ℃ 冰箱保存,用于后续的生化检测。

1.3.6 6 组新生大鼠肠道组织病理学检查 将置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h(4 ℃)的肠组织取出后,每组抽取 8 份标本,用自动脱水机脱水,石蜡包埋后制备 4 μ m 连续切片。HE 染色后的切片由 2 名经验丰富的病理医师在双盲条件下进行 NEC 病理评分^[13]:0 分,正常肠黏膜;1 分,上皮细胞分离或黏膜下层轻度水肿;2 分,中度分离,黏膜下层及固有肌层分离;3 分,重度分离,绒毛脱落,黏膜下层出血;4 分,肠壁坏死。评分 ≥ 2 分定义为 NEC。

1.3.7 6 组新生大鼠肠组织炎症因子检测 将保存在 -80 ℃ 冰箱的肠组织取出后,从每组中随机称取 6 份标本(每份 100 mg,均来自单独的新生鼠),加入预冷的 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂),匀浆后在 4 ℃ 条件下以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度,根据结果用 ELISA 试剂盒提供的标本稀释液稀释标本,以确保后续实验每个 ELISA 孔中加入的总蛋白量相同。使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 水平,操作步骤严格按照说明书进行,每个标本设 3 个复孔,取平均值。

1.3.8 6 组新生大鼠肠组织 Western blotting(WB)检测 将保存在 -80 ℃ 冰箱的肠组织取出后,从每组中随机称取 4 份样本(每份 100 mg,均来自单独的新生鼠),加入预冷的 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上匀浆,在 4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度后,取上样量 30 μ g/泳道,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳系统分离,转膜至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 缓冲液洗涤后,分别加入兔抗大鼠 ZO-1 抗体(1 : 800)、Occludin 抗体(1 : 800)或 β -actin 抗体(1 : 10 000),4 ℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗涤后,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1 : 10 000),室温孵育 1 h。TBST 洗涤后,ECL 化学发光底物(超敏型)显影,ImageJ 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参 β -actin 比值表示 ZO-1 蛋白与 Occludin 蛋白的水平。

1.3.9 6 组新生大鼠肠道通透性检测 采用 FITC-dextran 法,造模 72 h 后每组随机选取 6 只存活新生大鼠经口给予 FITC-dextran(4×10^3 , 44.4 mg/kg),2 h 后采集血清,用酶标仪(激发波长 485 nm,发射波长 528 nm)检测血清 FITC-dextran 水平,评估肠道通透性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 与 R4.4.1 进行数据处理与分析。计量资料先行 Shapiro-Wilk 正态性与 Levene 方差齐性检验,符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布且方差不齐的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示;2 组比较中,正态分布且方差齐性计量资料采用独立样本 t 检验、方差不齐采用 Welch t 检验,非正态分布计量资料采用 Mann-Whitney U 检验;多组间比较中,正态分布且方差齐性计量资料先采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 检验,方差不齐计量资料先采用 Welch 方差分析,进一步两两比较采用 Games-Howell 检验,非正态分布计量资料先采用 Kruskal-Wallis H 检验,进一步两两比较采用 Dunn 检验(Bonferroni 校正)。绘制 K-M 生存曲线进行生存分析,若曲线交叉,整体比较以 MaxCombo(Fleming-Harrington 组合权重)为主,同时报告 log-rank χ^2 值。按 $t = 72$ h 计算限制平均生存时间(RMST),报告相对于对照组的 Δ RMST(实验组 - 对照组)。所有检验均为双侧, $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 6 组新生大鼠生存结果比较 建模 72 h,对照组存活 25 例,腹腔注射 LPS 低剂量组存活 14 例,腹腔注射 LPS 高剂量组存活 11 例,口服 LPS 低剂量组存活 23 例,口服 LPS 中剂量组存活 20 例,口服 LPS 高剂量组存活 7 例。K-M 生存曲线结果显示,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组生存曲线明显低于对照组(log-rank $\chi^2 = 14.58, 21.88, 5.56, 34.72$, 均 $P < 0.05$)。见图 1。与对照组相比,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组 72 h 生存率明显降低($P < 0.05$),但口服 LPS 低剂量组与对照组 72 h 生存率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组 Δ RMST 显著缩短($P < 0.05$),但口服 LPS 低剂量组与对照组比较,差异无统计学意义($P = 0.24$)。见表 1。

2.2 6 组存活新生大鼠一般状况比较 6 组存活新生大鼠精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组精神状态评分、活动度评

分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分均明显升高($P<0.05$);与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,口服 LPS 低剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显降低,口服 LPS 中剂量组精神状态评分、腹胀程度评分及总评分明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与口服 LPS 中剂量组比较,口服 LPS 高剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显升高,口服 LPS 低剂量组精神状态评分、活动度评分、腹胀程度评分、腹泻评分及总评分明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

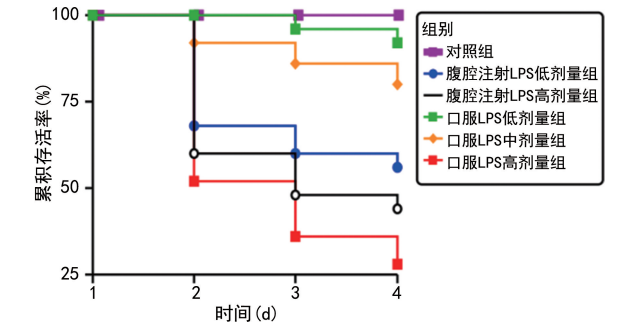


图 1 6 组新生 SD 大鼠 K-M 生存曲线

2.3 6 组新生大鼠第 1 天与第 4 天体重比较 6 组新生大鼠组内第 1 天与第 4 天体重比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);6 组新生大鼠第 1 天体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$);6 组新生大鼠第 4 天体重及体重变化率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组第 4 天体重及体重变化率均明显降低($P<0.05$);与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组和口服 LPS 高剂量组第 4 天体重及体重变化率均明显升高($P<0.05$);与口服 LPS 中剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组和口服 LPS 高剂量组第 4 天体重及体重变化率均明显降低($P<0.05$)。见表 3。

2.4 6 组新生大鼠肠道原位宏观状态 肠道原位宏观观察结果显示,对照组肠道呈淡粉色,肠壁光滑,肠

管充盈良好,肠腔内容物正常,无充血、水肿或坏死征象;腹腔注射 LPS 低剂量组肠道轻度充血水肿,部分肠段呈暗红色,肠壁略增厚;腹腔注射 LPS 高剂量组充血水肿更为严重,肠道呈暗红色至紫黑色,肠腔扩张,内有气体和血性液体积聚;口服 LPS 低剂量组病理改变最轻,仅表现为肠道轻度充血,部分肠段呈淡黄色,肠壁结构相对完整;口服 LPS 中剂量组表现为典型的 NEC 大体改变,肠道节段性充血、水肿明显,散在坏死灶,肠壁增厚,部分肠段呈暗红色;口服 LPS 高剂量组损伤最为严重,肠道广泛充血坏死,呈暗红色至紫黑色,肠壁明显增厚,肠腔内可见大量气体和血性内容物。见图 2。

2.5 6 组新生大鼠肠道组织病理学情况 HE 染色显示,对照组肠道组织结构完整,绒毛排列整齐,上皮细胞连续性良好,黏膜下层及肌层结构清晰;腹腔注射 LPS 低剂量组和高剂量组均呈中至重度病理改变,绒毛部分脱落、上皮细胞分离、黏膜下层水肿并伴炎症细胞浸润,部分区域可见黏膜下层与肌层分离;口服 LPS 低剂量组病理损伤较轻,主要表现为上皮细胞轻度分离和黏膜下层轻度水肿;口服 LPS 中剂量组出现典型 NEC 病理特征:绒毛顶端广泛坏死脱落,大量炎症细胞浸润,黏膜下层严重水肿伴出血,肌层分离明显;口服 LPS 高剂量组损伤最为严重,绒毛大面积坏死脱落,肠黏膜结构完全破坏,弥漫性出血,部分区域可见肠壁全层坏死。见图 3。6 组新生大鼠肠组织病理评分比较,差异有统计学意义($P<0.001$)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组新生大鼠肠组织病理评分均明显升高($P<0.05$);与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织病理评分明显降低,口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组新生大鼠肠组织病理评分明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与口服 LPS 中剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织病理评分均明显降低($P<0.05$)。见表 4。

表 1 6 组新生大鼠 72 h 生存结果比较($n=25$)

组别	72 h 生存率(95%CI, %)	Δ RMST 率(95%CI, h)	中位生存时间(h)
对照组	100.0(86.3~100.0)	—	>72 h
腹腔注射 LPS 低剂量组	56.0(34.9~75.6) [#]	-22.2(-33.1~-12.6) [#]	>72 h
腹腔注射 LPS 高剂量组	44.0(24.4~65.1) [#]	-29.6(-40.8~-19.0) [#]	64 h
口服 LPS 低剂量组	92.0(74.0~99.0)	-1.7(-4.6~0.0)	>72 h
口服 LPS 中剂量组	80.0(59.3~93.2) [#]	-8.3(-15.8~-2.2) [#]	>72 h
口服 LPS 高剂量组	28.0(12.1~49.4) [#]	-36.1(-46.2~-25.3) [#]	50 h

注:—表示无数据;与对照组比较, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.001$ 。

表 2 6 组存活新生大鼠一般状况比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	<i>n</i>	精神状态	活动度	腹胀程度	腹泻评分	总评分
对照组	25	0.16±0.37	0.28±0.46	0.08±0.28	0.12±0.33	0.64±0.76
腹腔注射 LPS 低剂量组	14	2.29±0.47 [*]	2.43±0.51 [*]	2.14±0.36 [*]	2.57±0.51 [*]	9.43±1.09 [*]
腹腔注射 LPS 高剂量组	11	2.82±0.40 [*]	2.82±0.40 [*]	2.64±0.50 [*]	2.91±0.30 [*]	11.18±0.87 [*]
口服 LPS 低剂量组	23	1.65±0.49 ^{*#△△}	1.78±0.42 ^{*#△△}	1.48±0.51 ^{*##△△}	1.78±0.67 ^{*#△△}	6.70±1.33 ^{*##△△}
口服 LPS 中剂量组	20	2.15±0.37 ^{*#}	2.30±0.47 ^{*##}	1.95±0.60 ^{*#}	2.45±0.51 ^{*#}	8.85±1.18 ^{*##}
口服 LPS 高剂量组	7	2.43±0.53 ^{*△}	2.57±0.53 ^{*△}	2.29±0.49 ^{*△}	2.71±0.49 ^{*△}	10.00±1.00 ^{*△}
<i>F</i>		86.21	70.60	68.39	82.49	208.17
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*}*P*<0.01;与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01,^{###}*P*<0.001;与口服 LPS 中剂量组比较,[△]*P*<0.05,^{△△}*P*<0.001。

表 3 6 组新生大鼠第 1 天与第 4 天体重比较($\bar{x}\pm s$,g)

组别	<i>n</i>	第 1 天	第 4 天	体重变化率(%)	<i>t</i>	<i>P'</i>
对照组	6	7.30±0.11	10.41±0.23	42.5±0.7	42.36	<0.001
腹腔注射 LPS 低剂量组	6	7.27±0.12	7.03±0.18 ^{*#△}	-3.3±0.5 ^{*#△△}	2.89	0.032
腹腔注射 LPS 高剂量组	6	7.34±0.12	5.93±0.23 [*]	-19.2±1.0 [*]	15.62	<0.001
口服 LPS 低剂量组	6	7.30±0.12	8.05±0.18 ^{*#}	10.3±0.4 ^{*#}	8.75	<0.001
口服 LPS 中剂量组	6	7.32±0.12	7.68±0.17 ^{*#}	4.8±1.2 ^{*#}	3.51	0.015
口服 LPS 高剂量组	6	7.31±0.12	6.51±0.21 ^{*#△△}	-11.0±0.6 ^{*#△△}	9.23	<0.001
<i>F</i>		0.27	366.13	289.57		
<i>P</i>		>0.05	<0.001	<0.001		

注:体重变化率=(第 4 天体重-第 1 天体重)/第 1 天体重×100%;与对照组比较,^{*}*P*<0.001;与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,[#]*P*<0.001;与口服 LPS 中剂量组比较,[△]*P*<0.01,^{△△}*P*<0.001;*t*、*P'*表示组内第 1 天与第 4 天体重比较的统计学结果。

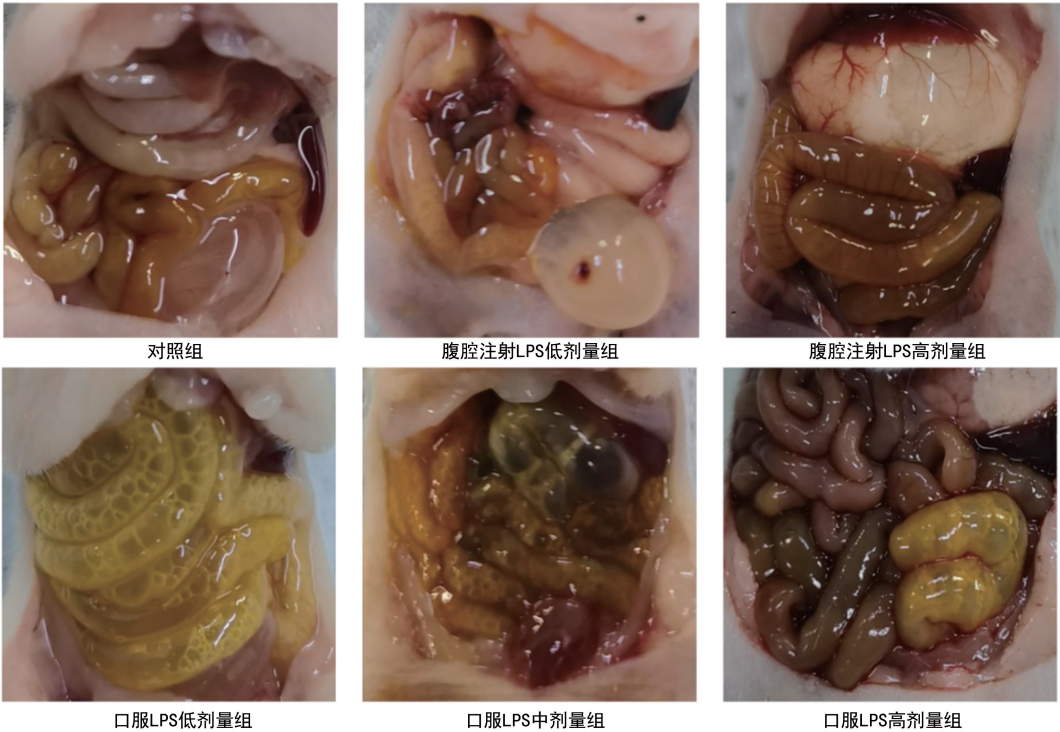
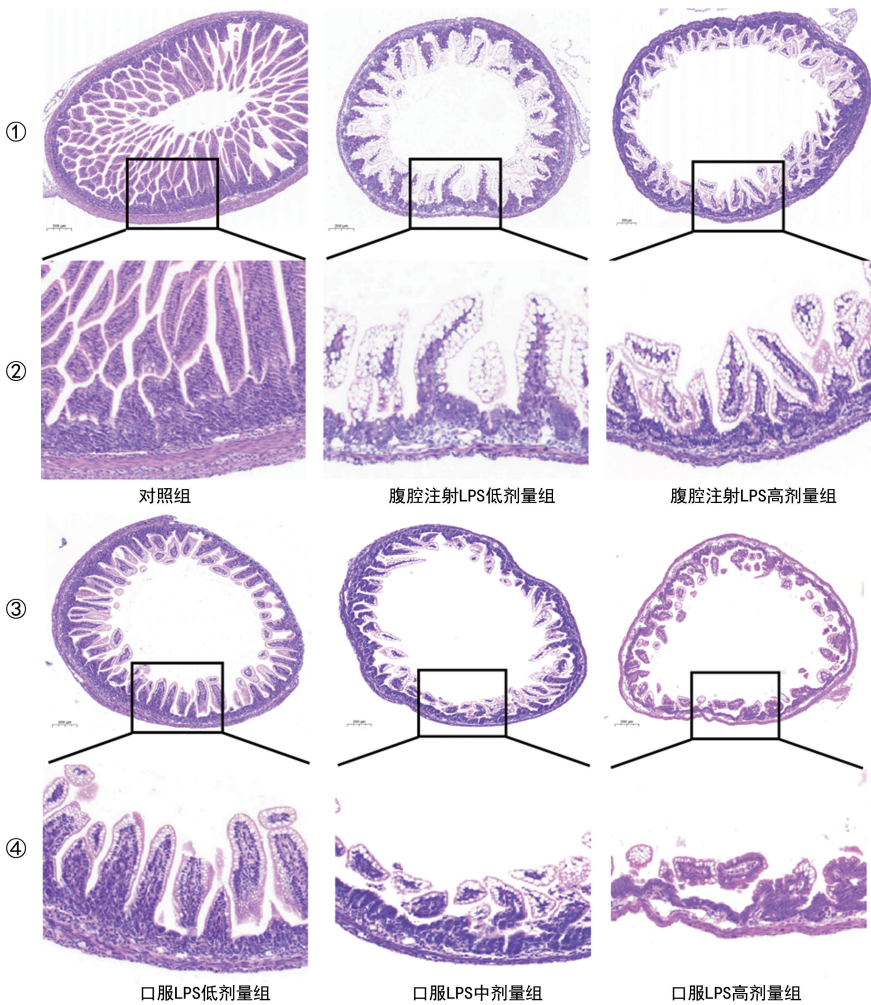


图 2 6 组新生大鼠肠道原位宏观状态

2.6 6 组新生大鼠肠组织炎症因子水平比较 6 组新生大鼠肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平及 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量

组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 升高,肠组织 IL-10 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及 TNF- α /IL-10、IL-1 β /

IL-10 降低,口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组肠组织 IL-10 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与口服 LPS 中剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 高剂量组肠组织 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 升高,口服 LPS 低剂量组肠组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及 TNF- α /IL-10、IL-1 β /IL-10 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。



注:①③放大倍数为 50;②④放大倍数为 200。

图 3 6 组新生大鼠肠道组织病理学情况(HE 染色)

表 4 6 组新生大鼠肠组织病理评分比较[M(P ₂₅ , P ₇₅)]		
组别	n	病理评分(分)
对照组	8	0.0(0.0,0.0)
腹腔注射 LPS 低剂量组	8	2.5(2.0,3.0) *## Δ
腹腔注射 LPS 高剂量组	8	3.0(3.0,3.0) *
口服 LPS 低剂量组	8	2.0(1.0,2.0) *## Δ
口服 LPS 中剂量组	8	4.0(3.0,4.0) *#
口服 LPS 高剂量组	8	4.0(4.0,4.0) *#
H		35.18
P		<0.001

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与腹腔注射 LPS 高剂量组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与口服 LPS 中剂量组比较, Δ $P < 0.001$ 。

2.7 6 组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平及血清 FITC-dextran 水平比较 6 组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平及血清 FITC-dextran 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、腹腔注射 LPS 高剂量组、口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平降低,血清 FITC-dextran 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与腹腔注射 LPS 高剂量组比较,腹腔注射 LPS 低剂量组、口服 LPS 低剂量组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平升高,口服 LPS 高剂量组肠组织 Occludin 蛋白水平和口服 LPS 低剂量组、口服 LPS 中剂量组、口服 LPS 高剂量组血清

FITC-dextran 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与口服 LPS 中剂量组比较, 腹腔注射 LPS 低剂量组肠组织 Occludin 蛋白水平升高, 口服 LPS 高剂量组血清 FITC-dextran 水平和口服 LPS 低剂量组

肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平升高, 口服 LPS 低剂量组血清 FITC-dextran 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4、表 6。

表 5 6 组新生大鼠肠组织炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
对照组	6	35.8 $\pm$ 3.7	28.5 $\pm$ 3.8	48.3 $\pm$ 5.5
腹腔注射 LPS 低剂量组	6	185.3 $\pm$ 17.0**	152.7 $\pm$ 16.1**	286.6 $\pm$ 28.7**
腹腔注射 LPS 高剂量组	6	256.8 $\pm$ 28.0**	208.8 $\pm$ 24.2**	392.4 $\pm$ 41.1**
口服 LPS 低剂量组	6	126.8 $\pm$ 12.2*** $\Delta\Delta$	103.8 $\pm$ 11.0*** $\Delta\Delta\Delta$	192.3 $\pm$ 22.3*** $\Delta\Delta\Delta$
口服 LPS 中剂量组	6	172.6 $\pm$ 16.2*** $\#$	145.3 $\pm$ 13.8*** $\#$	268.5 $\pm$ 27.1*** $\#$
口服 LPS 高剂量组	6	195.7 $\pm$ 19.1*** $\#\Delta$	168.4 $\pm$ 14.6*** $\#\Delta$	312.8 $\pm$ 35.0*** $\#\Delta\Delta$
<i>F</i>		119.37	98.47	96.75
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

组别	<i>n</i>	IL-10(pg/mL)	TNF- α /IL-10	IL-1 β /IL-10
对照组	6	72.5 $\pm$ 6.8	0.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
腹腔注射 LPS 低剂量组	6	45.4 $\pm$ 4.8**	4.1 $\pm$ 0.2** $\Delta\Delta\Delta$	3.4 $\pm$ 0.1** Δ
腹腔注射 LPS 高剂量组	6	35.6 $\pm$ 5.5**	7.3 $\pm$ 0.6**	5.9 $\pm$ 0.4**
口服 LPS 低剂量组	6	56.3 $\pm$ 7.6*** $\#$	2.3 $\pm$ 0.1*** $\#\Delta\Delta\Delta$	1.9 $\pm$ 0.0*** $\#\Delta\Delta\Delta$
口服 LPS 中剂量组	6	48.7 $\pm$ 5.6*** $\#$	3.6 $\pm$ 0.2*** $\#$	3.0 $\pm$ 0.1*** $\#$
口服 LPS 高剂量组	6	42.3 $\pm$ 5.5**	4.6 $\pm$ 0.2*** $\#\Delta\Delta\Delta$	4.0 $\pm$ 0.2*** $\#\Delta\Delta\Delta$
<i>F</i>		31.63	443.61	545.44
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$;与腹腔注射 LPS 高剂量组比较, $\#P < 0.01$, $\#\#P < 0.001$;与口服 LPS 中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

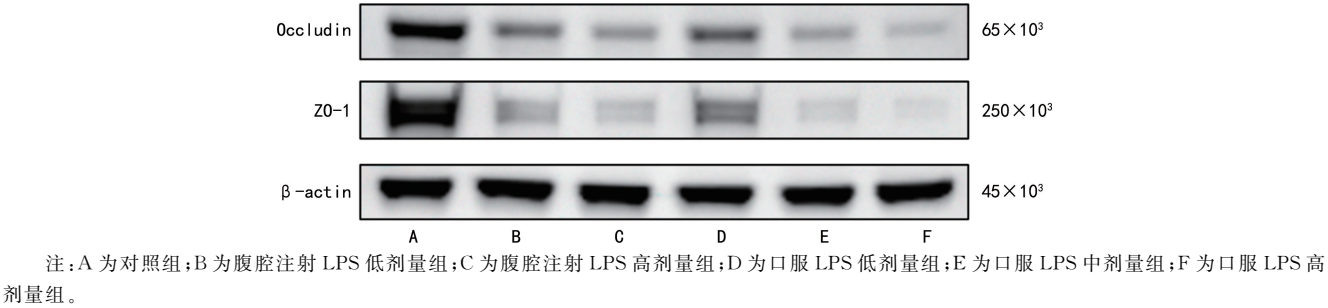


图 4 6 组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白表达 WB 图

表 6 6 组新生大鼠肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白水平及血清 FITC-dextran 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Occludin 蛋白	ZO-1 蛋白	FITC-dextran(μ g/mL)
对照组	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06	13.5 $\pm$ 3.7
腹腔注射 LPS 低剂量组	0.42 $\pm$ 0.05*** $\Delta\Delta$	0.20 $\pm$ 0.04** $\#$	68.9 $\pm$ 7.5*
腹腔注射 LPS 高剂量组	0.23 $\pm$ 0.04*	0.14 $\pm$ 0.03*	89.5 $\pm$ 11.6*
口服 LPS 低剂量组	0.69 $\pm$ 0.06*** $\Delta\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.05*** $\Delta\Delta\Delta$	45.7 $\pm$ 4.9*** $\Delta\Delta\Delta$
口服 LPS 中剂量组	0.27 $\pm$ 0.04*	0.18 $\pm$ 0.04*	65.8 $\pm$ 8.9*** $\#$
口服 LPS 高剂量组	0.16 $\pm$ 0.03*** $\#\Delta\Delta$	0.10 $\pm$ 0.03** Δ	78.4 $\pm$ 10.3** $\#\Delta$
<i>F</i>	192.15	264.87	64.10
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:Occludin、ZO-1 蛋白检测每组有 4 个标本,FITC-dextran 检测每组 $n = 6$;与对照组比较,* $P < 0.001$;与腹腔注射 LPS 高剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$;与口服 LPS 中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

3 讨 论

NEC 是威胁新生儿,尤其是早产儿的严重疾病。因其病理机制的复杂性,开发能够准确反映人类疾病特征动物模型,已成为解析发病机制和验证治疗手段的关键环节。本研究系统比较了 LPS 腹腔注射与口服 2 种给药方式在不同剂量下对新生大鼠 NEC 建模的影响。本研究结果表明,口服 8 mg/kg LPS 联合人工喂养、冷应激及低氧干预,可实现 NEC 表型的有效诱导,动物存活率约达 80%。该模型呈现明确的肠屏障损伤证据:肠组织紧密连接核心蛋白 Occludin 和 ZO-1 表达量减少 70%~90%,且明显低于对照组($P<0.001$);通过 FITC-dextran 法检测肠道通透性结果显示,血清 FITC-dextran 水平较对照组显著增加($P<0.001$)。通过采用 RMST 分析和 MaxCombo 检验更准确地评估不同给药方案对动物生存期的影响,为模型优化提供了更为可靠的统计学依据。口服 LPS 中剂量组的肠组织 TNF- α /IL-10 和 IL-1 β /IL-10 均显著低于腹腔注射 LPS 高剂量组,说明该模型可在诱导适度炎症反应的同时避免过度的全身炎症反应。这和 BEIN 等^[13]的临床观察高度契合,使该模型模拟临床情况的可信度得到明显提升。

研究者在构建 NEC 动物模型时会面临“如何在保证动物存活率的前提下,尽可能复现疾病的典型病理特征”这一挑战^[14]。尽管 LPS 在触发肠道炎症级联反应中占据主导地位,但单独使用 LPS 并不能成功诱导典型的 NEC 病变。本研究采用人工喂养、冷刺激、缺氧联合 LPS 给药复合应激策略,真实模拟了临床 NEC 的多因素致病过程。在这种“多重打击”模式中,各因素通过不同机制协同作用:人工喂养剥夺了母乳中的保护性因子,其高渗透性也可直接损伤未成熟的肠道黏膜;冷刺激激活交感神经系统使肠道血管收缩;缺氧则诱发缺血再灌注损伤并产生大量活性氧自由基。正是在这些多因素损伤的基础上,LPS 通过与肠上皮细胞表面的 TLR4 受体结合,激活下游 NF- κ B 信号通路,使 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎性细胞因子大量释放,最终导致肠道炎症失控和组织坏死。本研究中口服 LPS 中剂量组成功构建出较为理想的 NEC 模型,可能是因为在这种复合应激条件下达成了最佳的致病阈值——充分激活炎症反应的同时不引起过度的全身炎症反应。这一发现意味着 LPS 的致病作用可能有明显的“环境依赖性”,其效果强度由肠道基础状态及同期存在的其他损伤因素决定^[15]。而腹腔注射 LPS 虽操作简便,但绕开了肠道的自然屏障,导致肠道局部的病理变化被系统性炎症所掩盖,使 NEC 特征性的肠道损伤表现不够典型或与其他病理改变混杂^[16]。腹腔注射 LPS 的局限性在本研究中得到验证:腹腔注射 LPS 高剂量组仅 44% 的存活率,反映了其对动物生存的严重影响。RMST 分析进一步显示,腹腔注射组的平均生存时间损失相对更为显

著,这为定量评估不同给药方案的安全性提供了客观指标。针对此,口服给药路径提供了一种替代策略,它通过模拟肠道感染的自然进程,可更准确地复现 NEC 的局部病理特征。不过,口服给药的核心在于剂量优化。GUVEN 等^[11]运用口服 LPS 2~5 mg/kg 的剂量范围能成功建立大鼠 NEC 模型,ZANI 等^[17]使用口服 LPS 4 mg/kg 联合缺氧和高渗配方奶成功诱导了 NEC。参照以上研究,笔者起初尝试了 4 mg/kg 剂量的口服 LPS,尽管这个剂量保证了超过 90% 的高存活率,可是它所诱导出的肠道病理变化比较轻微,肠组织病理评分虽说达到了 NEC 诊断的标准,但是相对而言偏低,没办法充分模拟 NEC 的典型病理特点。这一发现呈现出了口服 LPS 建模时的剂量困境:过低的 LPS 剂量很难诱导出典型的肠道损伤,而过高的剂量则容易致使动物死亡率升高,但与文献所报道的大鼠 NEC 模型存活率存在着极大的差别。CAPLAN 等^[18]报道采用缺氧、配方奶和细菌联合处置的大鼠,在 96 h 内的存活率仅仅只有 14%,而在其他研究中,大鼠模型的死亡率为 30%~70%^[19]。本研究经过系统的剂量优化,最终确定的 8 mg/kg 剂量口服 LPS 达成了 80% 的存活率,获取到了相对理想的肠组织病理评分以及临床症状总评分。通过 MaxCombo 检验证实各组间总体生存差异比较,差异有统计学意义($P<0.001$),为不同给药方案的生存获益比较提供了统计学支持。这一结果不但验证了口服给药路径的可行性,而且更为关键的是确立了 8 mg/kg 作为大鼠 NEC 模型的优化剂量,实现了动物存活和病理特征典型性之间的平衡。从临床表型的角度来讲,口服 LPS 中剂量组由于其临床症状总评分处于轻度损伤的口服 LPS 低剂量组和重度损伤的腹腔注射 LPS 高剂量组之间,呈现出相对理想的疾病严重程度,这既满足了模型的表型要求,又保证了后期有足够数量的实验动物用于后续的研究。

不同给药途径凭借其独特的药代动力学过程影响模型的最终表型。腹腔注射 LPS 直接进入体循环,肝脏 Kupffer 细胞会快速清除,大部分 LPS 在到达肠道前就已被中和^[20-21]。而口服 LPS 先和肠道上皮直接接触,通过 TLR4 受体激活局部炎症反应,随后才部分进入体循环。这种“由内而外”的致病模式更契合临床 NEC 从肠道局部损伤发展成全身炎症的病理过程。2 种给药途径走不同的免疫应答模式。腹腔注射主要激活全身单核细胞系统,产生急性“炎症风暴”;口服给药则优先激活肠道固有层的免疫细胞,诱导更缓和但持续的炎症过程^[22-23]。本研究结果显示,腹腔注射 LPS 高剂量组虽血清炎症因子水平更高,但肠道病理评分较低,提示全身炎症与肠道损伤之间存在一定的解离现象。口服 LPS 的剂量—效应关系映衬肠道对内毒素的处理能力。低剂量时(4 mg/kg),肠道的防御机制(肠碱性磷酸酶、分泌型 IgA 等)足以

应对 LPS 挑战;高剂量(12 mg/kg)则完全压倒了防御能力,引起严重损伤。8 mg/kg 剂量或正处于“临界窗口”,既能突破基础防御激活炎症反应,但又不至于造成严重的不可逆损伤,这可能与肠道上皮细胞的适应性反应和组织修复机制的平衡有关。

本研究也还存在一些局限。新生 SD 大鼠虽能在一定程度上模拟早产儿 NEC,但人类 NEC 多见于 VLBW,其发病本身跟早产、喂养方式等诸多复杂因素有关^[24],因此该模型的临床转化价值仍需审慎评估;本研究观察周期较短,仅评估了造模后 72 h 内的相关指标变化,对肠道功能的远期并发症及长期影响尚不清楚,需待后续实验进一步探讨;尽管采用了 RMST 分析等生存分析方法,但仍需要更长期的随访观察来评估不同给药方案对动物长期生存和功能结局的影响;冷刺激与缺氧虽是构建 NEC 模型的常用手段,但对复合应激协同作用的机制还有待深入认识;肠道微生态在 NEC 发生、发展中扮演着核心角色^[25],本研究未能涉及相关检测,这对全面理解疾病的病理生理过程有所限制;相对较小的样本量对统计分析的效力和结论的普适性有一定影响;本研究虽有助于减少实验结果的内部变异性,但要实现跨实验室的数据标准化比较,仍需在动物品系选择、饲养条件控制及评价指标设计等方面建立更系统且统一的标准体系。

尽管存在上述不足,本模型依然有一定的应用价值。高达 80% 的存活率便于研究者进行超过 1 周的动态观察,这对研究 NEC 晚期病理机制及评价干预措施的长期效果极为有利;RMST 分析显示口服 LPS 中剂量组具有相对较好的生存获益,这为后续的干预性研究提供了合适的实验基础;模型所呈现的中等程度的炎症反应,为深入探讨炎症调控机制提供了稳定的实验基础;从转化医学的视角看,该模型可作为一个有效用于筛选潜在治疗药物的平台,例如靶向 TLR4-MD-2 信号通路的小分子抑制剂 C34,或是旨在促进肠道屏障修复的各类生长因子^[26]。

本研究通过对 LPS 给药方式和剂量参数的系统性优化,成功构建了一个由口服给予 LPS 8 mg/(kg·d)并结合多因素应激诱导的 NEC 大鼠模型。该模型能较稳定地模拟 NEC 患儿的典型病理特征与炎症反应,同时保持较高的动物存活率。这为 NEC 的基础研究提供了一个有效的技术平台,也为未来深入探索其发病机制和开发新的临床干预策略奠定了坚实的基础。

参考文献

[1] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3): 255-264.
[2] FLAHIVE C, SCHLEGEL A, MEZOFF E A. Necrotizing enterocolitis: updates on morbidity and mortality out-

comes[J]. J Pediatr, 2020, 220: 7-9.
[3] GANJI N, LI B, LEE C, et al. Necrotizing enterocolitis: recent advances in treatment with translational potential[J]. Pediatr Surg Int, 2023, 39(1): 205.
[4] SCHEESE D, LU P, MOORE H, et al. Cytomegalovirus worsens necrotizing enterocolitis severity in mice via increased toll-like receptor 4 signaling[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2025, 19(6): 101473.
[5] HACKAM D J, SODHI C P. Bench to bedside-new insights into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(7): 468-479.
[6] BLUM L, VINCENT D, BOETTCHER M, et al. Immunological aspects of necrotizing enterocolitis models: a review[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1434281.
[7] BAUTISTA G M, CERA A J, CHAABAN H, et al. State-of-the-art review and update of in vivo models of necrotizing enterocolitis[J]. Front Pediatr, 2023, 11: 1161342.
[8] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 280-304.
[9] HU X, LIANG H, LI F, et al. Necrotizing enterocolitis: current understanding of the prevention and management[J]. Pediatr Surg Int, 2024, 40(1): 32.
[10] SINGHI S C, KUMAR S. Probiotics in critically ill children[J]. F1000Res, 2016, 5: F1000 Faculty Rev-407.
[11] 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.
[12] YIM S K, KIM S W, LEE S T. Efficient stool collection methods for evaluating the diarrhea score in mouse diarrhea models[J]. In Vivo, 2021, 35(4): 2115-2125.
[13] BEIN A, EVENTOV-FRIEDMAN S, ARBELL D, et al. Intestinal tight junctions are severely altered in NEC pre-term neonates[J]. Pediatr Neonatol, 2018, 59(5): 464-473.
[14] 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.
[15] BUONPANE C, ARES G, YUAN C, et al. Experimental modeling of necrotizing enterocolitis in human infant intestinal enteroids[J]. J Invest Surg, 2020, 33(10): 989-996.
[16] GINZEL M, FENG X, KUEBLER J F, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces necrotizing enterocolitis-like lesions in neonatal mice[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182732.
[17] ZANI A, CANANZI M, LAURITI G, et al. Amniotic fluid stem cells prevent development of ascites in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis[J]. Eur J Pediatr Surg, 2014, 24(1): 57-60.

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.20.005

单细胞 RNA 测序揭示角膜内皮急性损伤修复双轴协同调控机制^{*}

晏志翔,李沂键,吴龙旺,邓负笈,杨于力[△]
陆军军医大学第一附属医院眼科,重庆 400038

摘要:**目的** 利用单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)技术分析大鼠角膜内皮机械损伤后修复过程中的细胞异质性、功能转化与分化轨迹,以阐明角膜内皮细胞(CECs)在有限增殖下的体内修复机制。**方法** 选取 30 只健康雄性 SD 大鼠作为实验对象,将其随机分为对照组(未接受手术大鼠)、D5 组(手术损伤后 5 d 大鼠,代表炎症反应高峰期)和 D10 组(手术损伤后 10 d 大鼠,代表修复与重塑的后期阶段),每组 10 只。收集 3 组 CECs 进行 scRNA-seq。通过聚类分析、差异表达、功能富集和拟时序分析,分析 CECs 亚群动态演变。**结果** 3 组 CECs 共鉴定出 7 个功能上截然不同的亚群,命名为 CECs_1~CECs_7,且这 7 个亚群的占比情况在 CECs 损伤修复的不同阶段表现出剧烈的动态变化。对照组中表达增殖相关基因的 CECs_5 亚群仅占 3.67%,D5 组中 CECs_5 的占比上升至 13.40%。拟时序分化轨迹结果显示,在对照组,细胞的分化轨迹起始于稳态的 CECs_1;D5 组以 CECs_2、CECs_4 主导的“免疫防御轴”激活;D10 组以 CECs_3、CECs_6 主导的“ECM 重塑轴”。**结论** CECs 损伤修复中存在“免疫防御-ECM 重塑”双轴协同修复及具增殖潜能的 CECs。

关键词:角膜内皮; 角膜内皮功能障碍; 单细胞 RNA 测序; 损伤修复; 细胞异质性; 功能转化; 分化轨迹

中图法分类号:R772.2;R446.8

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)20-2767-07

Single-cell RNA sequencing reveals the bi-axis synergistic regulation mechanism of acute corneal endothelial injury repair^{*}

YAN Zhixiang, LI Yijian, WU Longwang, DENG Fuji¹, YANG Yuli[△]

Department of Eye, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To analyze the cellular heterogeneity, functional transformation and differentiation trajectories during the repair process of rat corneal endothelium cells (CECs) after mechanical injury based on single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), and to clarify the in vivo repair mechanism under its limited proliferation. **Methods** Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were selected as experimental subjects and randomly divided into three groups: the control group (rats without surgical injury), the D5 group (rats 5 days after surgical injury, representing the peak inflammatory response), and the D10 group (rats 10 days after surgical injury, representing the late stage of repair and remodeling), with 10 rats in each group. The CECs of the 3 groups was selected by scRNA-seq. The dynamic evolution of CECs subsets was analyzed by clustering analysis, differential expression, functional enrichment and pseudotime analysis. **Results** Seven CECs subsets with distinct functions were identified from 3 groups, named CECs_1—CECs_7, and the proportion of these seven CECs subsets showed intense dynamic changes at different stages of injury repair. The CECs_5 subset expressing proliferation-related genes in the control group accounted for only 3.67%, while the proportion of CECs_5 in the D5 group increased to 13.40%. Pseudotime analysis results showed that cellular trajectory in the control group originated from the homeostatic CECs_1, the "immune defense axis" dominated by CECs_2 and CECs_4 was activated in the D5 group, the D10 group was characterized by an "ECM reshaping axis" led by CECs_3 and CECs_6. **Conclusion** The repair of corneal endothelial injury involves a dual-axis synergistic repair mechanism of "immune defense-ECM remodeling" and CECs with proliferative potential.

Key words: corneal endothelial; corneal endothelial dysfunction; single-cell sequencing; damage repair; cellular heterogeneity; functional transformation; differentiation trajectories

角膜内皮是位于角膜最内侧的单层、不可再生的六边形细胞,其核心生理功能是通过泵-障功能维持角

^{*} 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82271055);重庆市科卫联合医学科研项目面上项目(2022MSXM051)。

作者简介:晏志翔,女,在读硕士研究生,主要从事屈光及眼表疾病的研究。 [△] 通信作者, E-mail: yangyuli1023@tmmu.edu.cn。

引用格式:晏志翔,李沂键,吴龙旺,等.单细胞 RNA 测序揭示角膜内皮急性损伤修复双轴协同调控机制[J].检验医学与临床,2025,22(20):2767-2773.