

王玺,刘浩,沈鑫宇,等. 肠纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 666–675.

WANG X, LIU H, SHEN X Y, et al. Advances in animal models of intestinal fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5): 666–675.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.014

肠纤维化动物模型研究进展

王玺¹, 刘浩², 沈鑫宇², 孙心³, 邹得方⁴, 顾任钧^{5,6*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023; 2. 东部战区总医院门诊部, 南京 210002;

3. 江苏省中医院消化科, 南京 210004; 4. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;

5. 南京中医药大学中医学院, 南京 210023; 6. 东部战区总医院消化科, 南京 210002)

【摘要】 肠纤维化(intestinal fibrosis, IF)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的并发症之一, 其难愈性和复发性给患者带来了严重的负担。目前该发病机制尚不明确, 且尚无有效治疗方法, 故造模研究备受关注, 但现缺乏公认的动物模型。本文就国内外肠纤维化动物模型的建立方法、适用范围、关键特征和优缺点, 从造模周期和造模方式两个维度做一综述。

【关键词】 肠纤维化; 动物模型; 模型特点

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2024) 05-0666-10

Advances in animal models of intestinal fibrosis

WANG Xi¹, LIU Hao², SHEN Xinyu², SUN Xin³, ZOU Defang⁴, GU Renjun^{5,6*}

(1. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Outpatient Department, Eastern Theater General Hospital, Nanjing 210002, China; 3. Digestive Department,

Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210004, China; 4. College of Pharmacy, Nanjing

University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 5. College of Chinese Medicine, Nanjing

University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 6. Digestive Department, Eastern Theater

General Hospital, Nanjing 210002, China)

Corresponding author: GU Renjun. E-mail: renjunga@hotmail.com

【Abstract】 Intestinal fibrosis is a complication of inflammatory bowel disease, and its refractory and recurrent nature impose a serious disease burden on patients. The disease's pathogenesis is not clear, and there is no effective treatment. Moreover, there is still a lack of recognized intestinal fibrosis models. In this paper, we review the method used to establish animal models of intestinal fibrosis both at home and abroad, and consider the clinical relevance, key characteristics, and advantages and disadvantages of the procedures. Intestinal fibrosis models were summarized according to the modeling period and method.

【Keywords】 intestinal fibrosis; animal model; model characteristic

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)以炎症为特征, 分为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)^[1], 具有慢性发作、迁延难愈的特点, 其常见并发症是肠纤维化(intestinal fibrosis, IF)。此症是由于直肠到

结肠近端段粘膜层细胞对 IBD 诱发的肠道炎症进行修复, 导致大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉淀, 使全肠壁组织尤以黏膜下层及肌层出现明显增厚^[2-3], 致肠腔狭窄^[4]。出现 IF 后患者出现恶心呕吐、餐后腹痛、腹胀等症状, 进一步发

【基金项目】江苏省中医药科技发展计划青年人才项目(QN202206), 南京中医药大学罗林秀教师发展基金项目(LLX202310)。

Funded by Young Talents Project of Jiangsu Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Program (QN202206), Luo Linxiu Teacher Development Fund of Nanjing University of Chinese Medicine (LLX202310).

【作者简介】王玺, 女, 在读本科生, 研究方向: 消化系统疾病研究。Email: wangxiwj@163.com

【通信作者】顾任钧, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 消化系统疾病研究。Email: renjunga@hotmail.com

展可致肠痿,使患者生活质量急剧下降^[5]。目前,IBD 的常规治疗药物如氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂等^[6]难以逆转 IF。IF 主流治疗手段如外科手术或内镜治疗的临床疗效并不乐观,术后 10 年复发率高达 55%^[7]。IF 诊断指标尚未定型,RIEDER 等^[8]组建专家小组将 IF 诊断标准确定为:出现管腔狭窄(与邻近健康肠道相比 > 50%)、肠壁厚度(与邻近健康肠道相比壁厚增加 25%)和狭窄前扩张(相较邻近健康肠道,狭窄前扩张直径至少 ≥ 3 cm)。但临床面临的困境是出现该病理表现时,纤维化已完全建立,导致 IF 早中晚期细化研究受阻,且难以预测 IF 的发生。

因 IF 治疗效果不佳且复发率高,故其病因病机研究备受重视。构建动物模型是研究 IF 的主要手段之一。IBD 动物模型主要关注炎症、宿主免疫反应以及肠道微生物的变化,IF 作为模型中不稳定出现的现象,仅为模型中附带的一个评价指标^[9]。而 IF 造模方法通过不同手段诱导 IF 现象,便于研究 IF 生理病理学特征。如今,针对 IF 动物模型研究较少,每种造模方法在症状严重程度、适用范围及临床相关性方面均有局限性。本文检索国内外相关 IF 造模文献,概述了目前可用的 IF 动物模型,整理了每种模型的适用范围、关键特征和模型的优缺点。从造模周期和造模方式两个角度将其大致分为两类模型:(1)短期型,包括化学诱导模型、细菌诱导模型、基因工程诱导模型和手术诱导模型;(2)长期型,包括自发模型、术后复发模型和辐射诱导模型。以期帮助临床前研究选取合适的造模方法,协助肠道纤维化机制研究和药物研发。

1 短期型肠纤维化模型

短期型造模时间一般控制在 15 周以内,方法主要集中在化学诱导、细菌诱导、基因工程诱导和手术诱导 4 种手段。前 3 种手段通过不同因素破坏肠粘膜模拟 IBD 炎症,诱发肠上皮细胞对其进行过度修复出现 IF。手术诱导手段较特殊,通过异位移植使肠表面成纤维细胞数量增加,致 ECM 过度沉积出现 IF。手术诱导虽能模拟 IF,但无法模拟 IF 的发展过程。

1.1 化学诱导模型

化学诱导作为常用模型之一,通过化学物质损伤肠上皮致炎症再逐渐发展为 IF。该类造模方法操作相对简单,便于研究炎症发展至 IF 这一过程。

1.1.1 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS)诱导的纤维化模型

TNBS 是一种接触致敏剂,可作为半抗原,即通过与蛋白质的不可逆共价结合,诱发免疫反应^[10]。给药 TNBS 可激活 Th1 辅助细胞介导的急性炎症反应^[11],引起与人类 IBD 中的 CD 病理生理学特征高度相似的肠壁全层炎症^[12]。降低 TNBS 剂量或多周重复给药会增大诱发 IF 的可能性^[13]。故通过反复给予少量 TNBS 可诱导 IF。该模型适用于研究 IF 的早中晚各期,也可用于 IF 药物疗效的研究^[14]。

实验前可预敏化降低小鼠死亡率^[15],促使小鼠发展为慢性炎症出现 IF。在预敏化当天配制预敏化液(以 4:1 的体积比混合丙酮和橄榄油,再以 4:1 混合丙酮橄榄油混合液与 5% TNBS 溶液,得到 1% TNBS 的预敏化溶液),剃除小鼠背部肩膀之间 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 区域的毛发,轻度麻醉小鼠,之后将 150 μ L 预敏化溶液滴加到剃光的背部皮肤上^[16]。预敏化后禁食、不禁水 12 或 24 h,麻醉小鼠,从肛门插入导管至 4 ~ 5 cm 的肠道,灌注 TNBS 乙醇溶液,之后将小鼠倒置 60 s,持续多周,诱导形成 IF 模型。其造模常见方法见表 1。

控制合适的 TNBS 浓度,可降低死亡率并确保发病率。此外,小鼠遗传背景对浓度有一定影响,相较于 C57BL/6 小鼠, BALB/c 小鼠更易被 TNBS 诱导^[22]。乙醇浓度方面,SCHEIFFELE 等^[23]建议 40% ~ 50% 为最佳浓度,因为此浓度乙醇在不干扰实验结果的前提下,诱发的肠道炎症情况更显著,便于后续 IF 的发生。在灌肠液总体积方面,大部分研究控制总灌肠液体积在 50 ~ 150 μ L^[22]。以上所有数据仅供参考,在实际实验时还需考虑动物体重、性别、年龄等一系列变量,细化造模方法。

该模型优点是所用动物和试剂价格较低,模型维持时间长,易于掌握和复现,模型包括了炎症从急性向慢性转化的过程;缺点是动物死亡率较高,且人类 IBD 的发病机制与 TNBS 的相关性尚未证实。因此,该模型与临床的关联度存疑。

1.1.2 硫酸葡聚糖钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导肠纤维化模型

DSS 对肠上皮有毒性作用,能损害上皮细胞并产生免疫反应,使肠壁糜烂、破坏肠粘膜屏障功能^[24],引起肠道慢性炎症和纤维组织增生,最终发展为 IF^[25]。该模型为临床常用模型之一,主要用于验证药物疗效,口服 DSS 持续 5 d 造模,可研究由炎

表 1 TNBS 造模方法汇总表

Table 1 Summary of TNBS molding methods

TNBS 剂量/mg TNBS dose/mg	动物 Animals	造模方法 Molding methods	临床表现 Clinical manifestation	应用 Application
0.75、1、1.5、2、2、2.5 mg, 溶于 45% 乙醇, 总体积为 100 μL 0.75, 1, 1.5, 2, 2, 2.5 mg, dissolved in 45% ethanol in totally 100 μL	8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 8 weeks old male C57BL/6 mice	灌肠前禁食 12 h, 灌肠 6 周 6 次(每周 1 次) ^[17] Fasting for 12 h before enema, enema 6 weeks 6 times (once a week) ^[17]	观察到胶原 I 和胶原 III 等纤维化指标增加, 检测到肠壁增厚 Increases in fibrosis indicators such as collagen I and collagen III were observed, intestinal wall thickening was detected	
首次剂量为 1 mg 逐周递增 0.5 mg, 溶于 45% 乙醇, 总体积为 100 μL First dose of 1 mg in weekly increments of 0.5 mg, dissolved in 45% ethanol in totally 100 μL	6 ~ 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 6 ~ 8 weeks old female C57BL/6 mice	预敏化 1 周后第 1 次灌肠, 之后 3 周 3 次(每周 1 次) ^[18] After presensitization 1 week, first enema was given and then 3 weeks 3 times (once a week) ^[18]	存活率 60%, 小鼠结肠出现增厚 Survival rate was 60%, intestinal fibrosis occurred	
2 mg, 溶于 50% 乙醇, 总体积为 100 μL 2 mg, dissolved in 50% ethanol in totally 100 μL	6 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 6 ~ 8 weeks old female BALB/c mice	灌肠 6 周 6 次(每周 1 次) ^[19] Enema 6 weeks 6 times (once a week) ^[19]	存活率 66.67%, 1 周后处死观察到结肠僵硬, 部分狭窄 Survival rate was 66.67%, one week later, colonic stiffness, partial stenosis were observed	适用 CD 诱发 IF 的发生发展及药物治疗研究 Suit for study of IF's occurrence, development and the drug efficacy induced by CD
首次剂量为 1.5 mg 逐 2 周递增 0.5 mg, 溶于 45% 乙醇, 总体积为 150 μL First dose of 1.5 mg in 2 weeks increments of 0.5 mg, dissolved in 45% ethanol in totally 150 μL	6 ~ 7 周龄雄性 BALB/c 小鼠 6 ~ 7 weeks old male BALB/c mice	灌肠 6 周 6 次(每周 1 次) ^[20] Enema 6 weeks 6 times (once a week) ^[20]	灌肠 3 周后观察结肠切片, 显微镜下出现 IF After 3 weeks of enema, colon sections were observed and IF appeared under the microscope	
首次剂量为 1 mg 逐周递增 0.5 mg, 溶于 50% 乙醇, 总体积为 80 μL First dose of 1 mg in weekly increments of 0.5 mg, dissolved in 50% ethanol in totally 80 μL	180 ~ 230 g 雄性 SD 大鼠 180 ~ 230 g male SD rat	灌肠 5 周 5 次(每周 1 次) ^[21] Enema 5 weeks 5 times (once a week) ^[21]	存活率 62.5%, Masson 染色显示组织胶原浸润程度深 Survival rate was 62.5%, Masson staining showed that tissue collagen infiltration was serious	

症快速发展的 IF。建议实验前 1 周对小鼠每天 DSS 溶液消耗量进行滴定,并以 DSS 给药 5 ~ 8 d 后体重减轻 15% ~ 20%为最佳 DSS 浓度^[16]。其造模常见方法见表 2。

DSS 剂量过高可致小鼠产生高死亡率。大部分 DSS 造模选择通过多个周期口服 DSS 诱导 IF,但研究发现小鼠口服 DSS 持续 5 d,可诱发急性炎症并逐渐发展为慢性炎症出现 IF,且此种方式受到遗传背景的影响。MELGAR 等^[31]分别使 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠口服 DSS 持续 5 d, BALB/c 小鼠在口服 DSS 结束后急性炎症症状消退,而 C57BL/6 小鼠则在急性炎症之后逐渐发展为慢性炎症出现 IF。

该模型优点是相较于 TNBS 造模方法,饮用水中给药易控制剂量,且症状明显;缺点是 DSS 引起的化学性上皮损伤尚未被证实与人类 IBD 的发病机制有关。因此,模型与临床的相关性值得商榷。

1.1.3 过氧亚硝酸盐诱发的肠纤维化模型

该模型几乎未在临床研究中应用。一氧化氮

和过氧亚硝酸盐可加剧 IBD 的胃肠道炎症反应^[32],故 RACHMILEWITZ 等^[33]在 0.4 mL 的 0.15 mol/L 氯化钠溶液中溶解 0.165、0.437、1.65、3.3 mmol/L 过氧亚硝酸盐,通过直径 0.3 mm 导管注射至 200 ~ 250 g 雄性大鼠肛门 5 cm 处,注入 0.25 mL 空气确保注射器中液体排尽。造模后 1、3、21 d 分批处死大鼠,检查结肠。仅在 3.3 mmol/L 组,第 21 天发现粘膜肌层、固有肌层增厚和肠狭窄,出现 IF。该模型适用于深入探讨一氧化氮和过氧亚硝酸盐在 IF 发病机制中的潜在作用,开发针对一氧化氮和超氧化物反应生成过氧亚硝酸盐加重 IF 的药物。

该模型优点是操作简便;缺点是仅在 1 份报告中描述过,无法证明其能作为一类动物模型稳定诱导 IF 的发生。

1.2 细菌诱导模型

有研究认为肠道菌群的存在是慢性炎症和 IF 发展的先决条件^[34]。肠道菌群作为 IF 发展中不容忽视的因素之一,细菌诱导模型可为研究肠道菌群

表 2 DSS 造模方法汇总表

Table 2 Summary table of DSS molding methods

DSS 浓度/% DSS concentration/%	动物 Animals	造模方法 Molding methods	临床表现 Clinical manifestation	应用 Application
1.5	6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 6 weeks old male C57BL/6 mice	口服 DSS 持续 1 周, 饮用无菌水 2 周为 1 个周期, 进行 3 个周期 ^[26] Oral DSS lasted for 1 week, drinking sterile water for 2 weeks was a cycle, 3 cycles were performed ^[26]	ECM 沉积增多, 结肠组织胶原蛋白含量显著增加, 出现 IF ECM deposition increased, collagen content in colon tissue increased significantly, appeared IF	适用 UC 诱发诱导 IF 的发生发展及药物疗效研究 Suit for study of IF's occurrence, development and the drug efficacyinduced by UC
	8 ~ 12 周龄 C57BL/6 小鼠 8 ~ 12 weeks old C57BL/6 mice	口服 DSS 持续 5 d, 饮用无菌水 2 d 为 1 个周期, 进行 4 周期 ^[27] Oral DSS lasted for 5 days, drinking sterile water for 2 d was a cycle, 4 cycles were performed ^[27]	结肠出现充血红肿, 长度缩短, 出现 IF Colon presented hyperemic and red, shortened in length, appeared IF	
1.5	11 ~ 12 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 11 ~ 12 weeks old female C57BL/6 mice	口服 DSS 持续 5 d ^[28] Oral DSS lasted for 5 d ^[28]	大肠中的胶原蛋白沉积增加, 出现 IF Collagen deposition in the large intestine increases, appeared IF	
2.5	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	口服 DSS 持续 5 d, 饮用无菌水 1 周为 1 个周期, 进行 3 周期 ^[29] Oral DSS lasted for 5 d, drinking sterile water for 1 week was a cycle, 3 cycles were performed ^[29]	13% 死亡率, 结肠重量/长度比增加, 出现弥漫性炎症和 IF 13% mortality, increased in colon weight/length ratio, appeared diffuse inflammation and IF	
3	野生型小鼠 Wild type mice	口服 DSS 持续 5 d, 饮用无菌水 25 d ^[30] Oral DSS lasted for 5 d, drinking sterile water for 25 d ^[30]	观察到粘膜下层结肠粗大增厚, 纤维化程度增加 Submucosal colon was thickened, the degree of fibrosis increased	

在 IF 中的作用机制提供依据。

1.2.1 注射细菌聚合物肽聚糖-多糖 (peptidoglycan-polysaccharide, PG-PS) 诱导的纤维化模型

PG-PS 是一种在细菌中由糖和氨基酸组成的聚合物。将 PG-PS 注射到大鼠的盲肠或小肠壁内, 可观察到肠壁全层炎症, 伴有明显 IF。因 PG-PS 中普遍存在胞壁酰二肽 (muramyl dipeptide, MDP), IF 倾向于发生在携带 NOD2 基因多态性的 CD 患者中, 而该基因影响 MDP 的细胞内模式识别受体的表达^[35]。故该模型适用于研究 IF 与遗传的关联性。

ADLER 等^[36]选取成年 Lewis 大鼠远端回肠和盲肠的 6 个部位 (盲肠尖端、肠系膜、盲肠壁肠系膜、远端回肠肠系膜及 2 个远端回肠派耶氏淋巴集结处斑), 在肠壁内注射 PG-PS (12.5 μg/g, 鼠李糖乳杆菌的肽聚糖, 每个注射部位 0.05 mL)。24 h 后, 大鼠发作急性炎症。手术后约 14 d, 大鼠肠部呈炎症晚期状态, 出现肠壁增厚和腹腔内粘连, IF 程度严重。

该模型优点是展现了肠部炎症的全部过程, 并且在 2 周就可出现显著的 IF; 缺点是技术难度较大。

1.2.2 鼠伤寒沙门氏菌感染诱导的肠纤维化模型

鼠伤寒沙门菌可通过直接侵袭小肠上皮、破坏肠上皮细胞和定植于肠道, 诱导炎症^[37]进而诱发 IF。该模型适用于发掘肠道菌群紊乱对 IF 的影响和早期干预炎症对 IF 影响。

LO 等^[38]在感染前 1 d, 在 2.5 mL 水中溶解 0.5 g 链霉素制备抗生素, 使 8 ~ 10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠口服, 每只小鼠 100 μL 抗生素, 降低肠道微生物对肠粘膜的保护作用, 提高鼠伤寒沙门菌的肠道定植率。连续 2 次以 1:10 稀释鼠伤寒沙门菌培养物, 保证每 100 μL 灌胃剂中约含 3 × 10⁶ CFU 鼠伤寒沙门菌, 灌胃每只小鼠。灌胃后第 7 天出现显著 IF, 对天狼星红染色的盲肠切片进行纤维化评估, 发现 IF 程度在第 3 周达到顶峰。不同菌株会影响 IF 程度, JOHNSON 等^[39]通过对比实验发现在 ΔaroA 菌株和野生型 SL1344 感染 C57BL/6J、129X1/SvJ、129S1/SvImJ、DBA/1J 和 CBA/J 小鼠中, 野生型 SL1344 菌株感染 CBA/J 品系小鼠诱导 IF 模型, 效果更好且 IF 进展类似于人类, IF 外显率高且症状持续时间长。JOHNSON 等^[40]在感染沙门菌小鼠第 2、4、8 天后分别口服左氧氟沙星, 发现药物去除炎症刺激后, 可抑制促纤维化基因转化因子-

β (transforming growth factor- β , TGF- β)的诱导(第3天用左氧氟沙星治疗可抑制 TGF- β 达到与未感染组无法区分的水平),改善 α -平滑肌肌动蛋白表达量(第21天,药物干预组蛋白表达较无药物感染组降低2.6倍)和降低纤维化组织评分(药物干预组 *vs* 无药物感染组 *vs* 未感染组,1.8 *vs* 2.8 *vs* 0),但无法完全阻止 IF 发展,提示在某种程度上 IF 发展可独立于炎症。该模型拓宽了对 IF 发展的认知和 IF 治疗的角度。

该模型优点是诱导的炎症可通过药物消除;缺点是相较于其他模型,IF 持续时间短暂,在 C57BL/6 小鼠中,纤维化通常只持续3周,且鼠伤寒沙门菌并不是临床 IBD 的病因,提示模型中的 IF 过程与临床患者的 IF 过程可能在病理生理学上有所差异。

1.2.3 粘附侵袭性大肠杆菌(adherent invasive *Escherichia Coli*, AIEC)诱导肠纤维化模型

IBD 与肠道微生物菌群组成的改变有关^[41],在 IBD 临床患者体内发现 AIEC 菌株的富集^[42],其通过粘附在肠上皮细胞,定植于肠粘膜。AIEC 具有一定毒性,能促进炎症性损伤^[43-44]诱发 IF。构建方法为:小鼠在感染人类 AIEC 分离株 NRG857c 前24 h,用20 mg 链霉素或3.5 mg 万古霉素溶解于200 μ L 无菌水中进行灌胃,以便于菌株在肠道定植。随后,用200 μ L 含 2×10^9 CFU AIEC 分离株对小鼠灌胃^[16],一般7周内成模。该模型适用于研究肠道菌群对 IF 发生发展的影响和通过重调肠道菌群稳态治疗 IF 的研究。

SMALL 等^[45]在8~10周龄雌性 CD-1、DBA/2、C3HeN、129e、C57BL/6 这5种小鼠身上进行实验,造模后第7天,小鼠肠道就出现 ECM 过度沉积,随后7周内所有小鼠品系均在盲肠出现全肠壁 IF。除 DBA/2 小鼠在结肠粘膜下层和肌肉粘膜中表现出广泛的 ECM 过度沉积,其余小鼠 IF 局限在盲肠,结肠部分不太明显。

该模型优点是可揭示肠道菌群与 IF 间的关系,且适用于多品类小鼠,IF 特征与人 IF 表现相关性高;缺点是 IF 病变在大多数小鼠中局限于盲肠。

1.3 基因工程诱导模型

该类模型通过腺病毒转染技术使相关基因过度表达,致炎症相关因子上调,可单独研究相关因子免疫失调诱导 IF 的发生机制。

1.3.1 TGF- β 1 过度表达的纤维化模型

现有研究表明,TGF- β 1 是人体多个器官和组织

纤维化的关键驱动因子^[46]。相较于正常人,IBD 患者肠粘膜中的 TGF- β 1 表达增强^[47]。模型通过灌肠递送表达小鼠 TGF- β 1 的重组腺病毒,诱导小鼠结肠上皮 TGF- β 1 表达活跃从而诱发 IF。因 TGF- β 1 在免疫细胞中高表达^[48],故该模型适用于研究免疫调节与 IF 之间关联性。

VALLANCE 等^[49]麻醉 NIH 瑞士小鼠,100 μ L 50%乙醇直肠内灌注。灌注后将小鼠保持垂直位置30 s,确保灌肠剂分布于整个结肠。3 h 后,再次麻醉小鼠,100 μ L 磷酸盐缓冲盐水灌肠(pH = 7.4,含 1×10^9 PFU 表达小鼠 TGF- β 1 的重组腺病毒)。感染后第14~28天,超过50%的小鼠因 IF 致结肠梗阻和肠壁增厚,Masson 染色显示结肠组织存在显著 IF。此外,小鼠的遗传背景不同可能影响 IF 模型进展。实验中使用 BALB/c、C57BL/6 和 NIH Swiss 小鼠3种品系造模,虽然都出现 IF,但前两者 IF 程度不如 NIH Swiss 小鼠明显,一定程度上提示 NIH Swiss 小鼠更易被腺病毒载体转染诱发纤维化,其次,因肠上皮更新快速,腺病毒的转基因表达时间受限,会一定程度上影响造模情况。研究结果反映活性 TGF- β 1 水平在第2天达到峰值之后迅速下降,提示需使用高剂量的腺病毒以保证持续高水平的 TGF- β 1 表达^[49]。

该模型优点是造模死亡率 < 10%,TGF- β 1 引起的纤维化机制基本明确^[50];缺点是给药途径对 IF 有一定趋向,转基因蛋白的过度表达集中于胃肠道下半段。

1.3.2 单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)过度表达的肠纤维化模型

MCP-1 作为趋化因子之一,在炎症过程中起着至关重要的作用^[51]。已有研究证明 MCP-1 是诱发肾^[52]、肝^[53]、皮肤^[54]等器官纤维化的一个重要因素。数据表明,与健康人相比,IBD 患者血清中 MCP-1 水平显著升高^[55]。该模型通过注射表达小鼠 MCP-1 的重组腺病毒,致小鼠肠道 MCP-1 表达活跃,诱导 IF 发生,适用于以下调 MCP-1 为机制的 IF 特异性治疗研究。

MOTOMURA 等^[56]构建表达 MCP-1 的重组腺病毒,并使用编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒和空病毒作为对照组,麻醉8~10周龄的小鼠,分别在30 μ L 生理盐水中稀释 2.5×10^9 PFU 的3种病毒,注射至不同组小鼠的直肠壁内,注射后3、7、14、21、28、35和42 d 处死小鼠。相较于注射空病毒治疗组,灌肠

表达小鼠 MCP-1 的重组腺病毒组从第 3 ~ 21 天结肠黏膜下层及固有肌层中胶原沉积持续增加,且小鼠直肠壁相对增厚变硬。

该模型优点是选择壁内注射病毒载体方式,使腺病毒表达持续维持高水平,从而模拟 IBD 患者中 MCP-1 水平升高;缺点是使用腺病毒载体转染基因,表达时间较短,且可引起机体的免疫反应,有一定操作难度,诱导的 IF 具局灶性。

1.4 手术诱导模型

手术诱导模型分为短期诱导模型和长期诱导模型。短期诱导模型作为一种较新颖诱导方法,虽然与人类 IF 形成方式不同,但便于在细胞分子水平观察 IF 组织。类比大鼠气管异位移植的模型,该模型通过切除肠道后异位移植,导致肠道上皮细胞消失,成纤维细胞增殖,致肠腔纤维性闭塞^[57]。此模型主要适用于肠纤维化病理分子水平研究。

HAUSMANN 等^[58]切除供体(Brown Norway 或 Lewis 大鼠盲肠近端 3 cm 小肠),用生理盐水冲洗后,麻醉受体 Lewis 大鼠,在其颈部两侧平行于体轴切 2 个小切口,制备 2 个皮下储袋。植入供体小肠于每个皮下口袋。皮下注射单剂量丁丙诺啡(0.01 ~ 0.05 mg/kg,溶于 0.9% NaCl)作为术后镇痛,腹腔注射单剂量头孢唑啉(1 g 稀释为 2.5 mL,每只动物 0.15 mL)预防感染,并确保移植时间在 15 min 之内。移植后 2、7、14 和 21 d 处死大鼠,取出移植物,发现在第 21 天 I 型胶原蛋白 mRNA 增加,出现淋巴细胞浸润和肠腔纤维性闭塞的 IF 现象。此法也适用于小鼠,WEDER 等^[59]以 10 ~ 16 周龄,体重 19 ~ 23 g 雌性小鼠作为供体和受体,成功诱导了 IF。

该模型优点是可通过检测 ECM 的过度沉积和肠成纤维细胞活化以反映 IF 的发生发展;缺点是与人类 IF 产生机制不符,因异位移位导致肠组织处于不同生物环境,提示这可能会对 IF 表现有影响,并且微生物菌株在基因组上的差异会影响免疫应答,干扰肠道纤维化的发展。

2 长期型肠纤维化模型

长期型造模一般持续 15 周以上,分为自发发展模型、术后复发模型和辐射诱导模型 3 种。因其较长造模时间目前临床应用率并不高。但长期型 IF 模型可以更全面地模拟 IF 患者症状。此外,模拟术后复发的模型立足点新颖,在研究 IF 术后管理方面,展现了巨大潜力。

2.1 自发模型

该类模型可以成功模拟出患者发展为 IF 这一自发慢性的过程,与人类 IF 关联度高。共同缺点是造模较困难、耗时长、商业化程度低。

2.1.1 SAMP1/YitFc 小鼠自发肠纤维化模型

PIZARRO 等^[60]发现 SAMP1/YitFc 小鼠在选择性育种下,会在 10 ~ 20 周龄自发肠道炎症,进一步表现出炎症晚期并发症,30 周后 IF 外显率为 100%。SAMP1/YitFc 小鼠因粘膜间充质细胞损伤致上皮形态和功能改变、上皮屏障功能失调,诱发肠道炎症发展为 IF^[61]。

此模型的优点在于自发发生,无需其他操作,可排除操作不同带来的结果差异。此外,SAMP1/YitFc 小鼠在疾病部位、发展过程,组织学特征、肠外表现以及治疗反应方面与人类 IF 具有高相似性,还出现肛周瘘管现象^[60-62];缺点是 SAMP1/YitFc 小鼠繁殖率低、培育耗时长,且只有选定的实验室才能获得,使 SAMP1/YitFc 小鼠无法商业化,限制了研究人员对该模型的使用。

2.1.2 白介素-10(interleukin 10, IL-10) 缺失小鼠自发肠纤维化模型

IL-10 作为一种重要的抗炎因子,是肠道重要的免疫调节剂,已被证明与 IBD 发病有关^[63],通过抑制促炎因子的释放、减少细胞凋亡和促进组织再生,减轻粘膜炎症程度,促进肠道重回稳态^[64]。研究发现 IL-10 受体的突变与 IBD 发病有高关联度^[65]。NIETO-VELOZA 等^[66]在常规条件下饲养 IL-10 缺陷小鼠,出现类似人类 IBD 的疾病情况,出现 IF 致结肠缩短。该模型适用于研究基因缺陷与 IF 发病的关联性。

IL-10 缺陷小鼠的发病率低且发病时间长,仅不足 5% 的小鼠在 2 ~ 8 个月内患上 IBD^[67]。有研究发现 IL-10 缺陷小鼠在无病原体时,对慢性炎症的发展具有抵抗力^[68]。HOLGERSEN 等^[69]为加速模型的构建,采用在食物中加入吡罗昔康的方法(临床患者用药剂量折算成小鼠用药量,每只 0.6 μg)。使用 9 ~ 12 周龄与 C57BL/6J 背景回交的 IL-10 缺陷雌性小鼠,连续用药 9 d,于实验的第 4、9、14 天处死小鼠,发现小鼠肠壁出现增厚、结肠长度缩短,并且吡罗昔康停药后症状持续约 13 d。此外,LUND 等^[25]发现炎症主要发生在 IL-10 缺陷小鼠的粘膜中,提示该模型可以帮助确定粘膜间充质细胞在 IF 中的作用。

该模型优点是能够展现炎症早期发展至晚期并进一步出现 IF 在免疫层面的差异^[70];缺点是需基因修饰,操作难度较大,模型构建耗时耗力。

2.2 术后复发模型

IF 术后的高复发率是临床面临的一大难题,此模型模拟术后复发的 IF,为术后管理提供基础。

临床 80% 的 CD 患者需要接受手术治疗,回盲肠交界处切除再吻合手术是干预 IF 主要手段之一^[71],但术后伴有在手术吻合处纤维化的高复发情况^[72]。此模型通过对小鼠进行回盲肠交界处切除再吻合手术观察小鼠术后纤维化情况,适用于术后纤维化机制和术后纤维化预防药物的研究。

RIGBY 等^[73]将 8 周龄野生型和 IL-10 缺失小鼠随机分为假手术组、回肠盲肠交界处切除组或不手术组,在实验开始前 2 d 和实验后 7 d 均给予小鼠流质饮食,在无菌条件下,假手术组横切并重新吻合距回盲部近端约 12 cm 的肠组织。回肠盲肠交界处切除组,在距回盲部交界处近端 12 cm 处和距盲肠远端 2 ~ 3 cm 处的近端结肠处划分小肠,结扎肠系膜并移除其中的小肠、盲肠和近端结肠,采用端对端单层吻合技术恢复肠道连续性。实验中,持续用 1 ~ 2 mL 温热的生理盐水给小鼠腹腔补水,用连续缝合法封闭腹部。术后观察天狼星红染色肠组织切片发现 IF 具遗传易感性,易发于 IL-10 缺失小鼠中,并出现无炎性 IF,提示 IBD 术后复发 IF 机制可能异于初次 IF 发展机制。BOROWIEC 等^[74]用此方法造模后,分别于 6 周和 15 周处死小鼠。第 6 周时,吻合处无明显炎症,但胶原蛋白沉积增加。其中最明显的 IF 出现在 15 周后回肠盲肠交界处切除组的 IL-10 缺失小鼠中。

该模型优点是可研究应对术后复发的策略;缺点是要进行手术、操作难度大,并且模型成功率不高,并不是所有小鼠都能出现术后复发 IF。

2.3 辐射诱导模型

因具结肠直肠病史患者在辐射下易发生 IF,此模型可在一定程度上研究 IBD 患者因化疗辐射下诱发 IF。

临床观察到进行癌症放疗时,肠道暴露于辐射下常致 IF^[75],提示辐射可直接损伤粘膜下层和固有肌层内的间充质细胞,聚集中性粒细胞和巨噬细胞以消除受损细胞、引起成纤维细胞对粘膜过度修复并促进结缔组织中肥大细胞分泌促纤维化因子如 TGF- β 1 等,诱发 IF^[76]。研究表明有结肠或直肠病

史的患者,患辐射诱发的 IF 概率上升^[77],且 IF 中胶原蛋白沉积是一般患者的 3 倍多^[78]。该模型适用于 IBD 患者因辐射致 IF 的治疗研究。

具体辐射诱导造模主要有 2 种手段:HAYDONT 等^[79]麻醉 300 g 雄性 Wistar 大鼠,取出一段 6 cm 回肠用 X 射线机进行照射(X 射线机在 225 kV 和 17 mA 下运行,添加 0.5 mm 铜过滤,剂量率为 0.98 Gy/min)。局部给予 19 Gy 的单剂量,其余部分使用 5 mm 厚的铅屏覆盖屏蔽辐射。照射后,将暴露辐射下肠节段放回腹腔。LANGBERG 等^[80]将雄性 SD 大鼠切除睾丸打开腹股沟环,迁移功能完整的 4 cm 小肠段入左侧阴囊,产生“阴囊疝”。手术 3 周后,对大鼠的“阴囊疝”部位进行每 24 h 2.8 Gy 的照射持续 18 d。2 种造模方式均在 26 周后出现肠道 ECM 过度沉积,发展为明显的 IF。

该模型优点是易于从外部进入待照射的肠段;缺点是需要外科手术、操作复杂,且无法模拟 IBD 患者在接受放疗前已存在肠道炎症这一状态。

3 总结与展望

据统计超过 40% 的 IBD 患者会患有 IF^[81],虽然有研究提出 IF 可以逆转^[81],但临床尚无成熟治疗手段来逆转此症状^[82],这让 IF 成为 IBD 并发症中棘手的难题。IF 造模目前成果丰富、手段多样,可成功模拟 IF 的典型病理特征,如肠壁增厚、肠腔狭窄、肠长度缩短等。现多种造模方法已用于 IF 机制研究、治疗和药物开发,推进了人类对 IF 的深入了解。但 IF 造模还存在以下问题:(1)临床抗炎疗法不能显著降低 IF 的发生率,提示还存在除炎症诱发外其他机制导致 IF^[83]。大部分 IF 动物模型通过破坏肠粘膜诱发炎症诱导 IF,这阻碍了非炎症机制研究;(2)IF 长期型模型虽与人类 IF 病理表现关联度相对高,但因造模周期较长,大规模研究难以开展;(3)UC 和 CD 的 IF 发生位置不同^[84],但目前多数模型尚未深入区分 UC 和 CD。

故未来在开发非炎症机制诱导 IF 动物模型、缩短长期型模型造模时长和细化完善 UC 和 CD 的 IF 造模等方面值得深入研究。迄今为止,尚无模型可以完全模仿 IF 的全部症状,因此在特异性抗纤维化疗法方面,研究进展缓慢。临床迫切需要此类研究来扩大 IF 患者的治疗选择。本文从造模周期和造模方式 2 个维度综述 IF 动物模型,以期能够在动物模型选择方面,为科研工作者们提供帮助。

参 考 文 献(References)

[1] SEYEDIAN S S, NOKHOSTIN F, MALAMIR M D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease [J]. J Med Life, 2019, 12(2): 113–122.

[2] WANG J, LIN S, BROWN J M, et al. Novel mechanisms and clinical trial endpoints in intestinal fibrosis [J]. Immunol Rev, 2021, 302(1): 211–227.

[3] WU X, LIN X, TAN J, et al. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis [J]. Gut Liver, 2023, 17(3): 360–374.

[4] YU M, ZHU W, WANG J, et al. Caveolin-1 alleviates Crohn’s disease-induced intestinal fibrosis by inhibiting fibroblasts autophagy through modulating sequestosome 1 [J]. Inflamm Bowel Dis, 2022, 28(6): 923–935.

[5] SLEIMAN J, OUALI S E, QAZI T, et al. Prevention and treatment of stricturing Crohn’s disease-perspectives and challenges [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(4): 401–411.

[6] PITHADIA A B, JAIN S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) [J]. Pharmacol Rep, 2011, 63(3): 629–642.

[7] MAK J W Y, NG S C. Epidemiology of fibrostenosing inflammatory bowel disease [J]. J Dig Dis, 2020, 21(6): 332–335.

[8] RIEDER F, BETTENWORTH D, MA C, et al. An expert consensus to standardise definitions, diagnosis and treatment targets for anti-fibrotic stricture therapies in Crohn’s disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2018, 48(3): 347–357.

[9] KATSANDEGWAZA B, HORSNELL W, SMITH K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9344.

[10] ADAIR K, MENG X, NAISBITT D J. Drug hapten-specific T-cell activation: Current status and unanswered questions [J]. Proteomics, 2021, 21(17/18): e2000267.

[11] ANTONIOU E, MARGONIS G A, ANGELOU A, et al. The TNBS-induced colitis animal model: an overview [J]. Ann Med Surg, 2016, 11: 9–15.

[12] MATHUR R, ALAM M M, ZHAO X F, et al. Mechanistic insight into the development of TNBS-mediated intestinal fibrosis and evaluating the inhibitory effects of rapamycin [J]. J Vis Exp, 2019, 151: e60067.

[13] LEE C H, KOH S J, RADI Z A, et al. Animal models of inflammatory bowel disease: novel experiments for revealing pathogenesis of colitis, fibrosis, and colitis-associated colon cancer [J]. Intest Res, 2023, 21(3): 295–305.

[14] FICHTNER-FEIGL S, FUSS I J, YOUNG C A, et al. Induction of IL-13 triggers TGF-β-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis [J]. J Immunol, 2007, 178(9): 5859–5870.

[15] MAJEWSKA-SZCZEPANIK M, GÓRALSKA M, MARCIŃSKA K, et al. Epicutaneous immunization with protein antigen TNP-Ig alleviates TNBS-induced colitis in mice [J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(6): 1497–1504.

[16] LI J, DEJANOVIC D, ZANGARA M T, et al. Mouse models of intestinal fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2299: 385–403.

[17] WU J, TIAN Z, ZHUANG X, et al. Dynamic alterations in metabolomics and transcriptomics associated with intestinal fibrosis in a 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine model [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 554.

[18] 叶晨. VEGF-C 刺激的脂肪间充质干细胞通过调节炎症反应与淋巴管引流减轻 TNBS 介导的慢性实验性结肠炎 [D]. 苏州: 苏州大学; 2020.

[19] YE C. Adipose mesenchymal stem cells stimulated by VEGF-C alleviate TNBS-mediated chronic experimental colitis by regulating inflammatory response and lymphatic drainage [D]. Suzhou: Soochow University; 2020.

[19] 张善金. NF-κBp65 反义寡核苷酸对 TNBS 诱导 BALB/C 小鼠慢性结肠炎肠道纤维化的影响 [D]. 南昌: 南昌大学; 2011.

[19] ZHANG S J. Effect of NF-κBp65 antisense oligonucleotide on TNBS-induced intestinal fibrosis in BALB/C mice with chronic colitis [D]. Nanchang: Nanchang University; 2011.

[20] BUTERA A, QUARANTA M T, CRIPPA L, et al. CD147 targeting by AC-73 induces autophagy and reduces intestinal fibrosis associated with TNBS chronic colitis [J]. J Crohns Colitis, 2022, 16(11): 1751–1761.

[21] 徐速. 三棱丸方对克罗恩病肠纤维化的影响及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2017.

[21] XU S. Effect of Sanleng pills on intestinal fibrosis in Crohn’s disease and its mechanism [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2017.

[22] SILVA I, PINTO R, MATEUS V. Preclinical study *in vivo* for new pharmacological approaches in inflammatory bowel disease: a systematic review of chronic model of TNBS-induced colitis [J]. J Clin Med, 2019, 8(10): 1574.

[23] SCHEIFFELE F, FUSS I J. Induction of TNBS colitis in mice [J]. Curr Protoc Immunol, 2002, 15: 19.

[24] BAYDI Z, LIMAMI Y, KHALKI L, et al. An update of research animal models of inflammatory bowel disease [J]. Sci World J, 2021, 2021: 7479540.

[25] LUND P K, ZUNIGA C C. Intestinal fibrosis in human and experimental inflammatory bowel disease [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2001, 17(4): 318–323.

[26] 王瑛. 二甲双胍缓解慢性结肠炎相关肠纤维化的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2023.

[26] WANG Y. Study on the effect and mechanism of metformin on chronic colitis-related intestinal fibrosis [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2023.

[27] 战蓉蓉. 淋系细胞高表达 TL1A 对 DSS 诱导的慢性实验性结肠炎相关肠纤维化的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学; 2017.

[27] ZHAN R R. Effect of TL1A overexpression in lymphoid cells on DSS-induced intestinal fibrosis associated with chronic experimental colitis [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical

- University; 2017.
- [28] AGISTA A Z, RUSBANA T B, ISLAM J, et al. Fermented rice bran supplementation prevents the development of intestinal fibrosis due to DSS-induced inflammation in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1869.
 - [29] GREGORIO J D, SFERRA R, SPECA S, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 β and PPAR- γ on epithelial-to-mesenchymal transition in DSS-induced colorectal fibrosis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171093.
 - [30] FLANNIGAN K L, NIEVES K M, SZCZEPANSKI H E, et al. The pregnane X receptor and indole-3-propionic acid shape the intestinal mesenchyme to restrain inflammation and fibrosis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(3): 765–795.
 - [31] MELGAR S, KARLSSON A, MICHAËLSSON E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice; correlation between symptoms and inflammation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(6): G1328-G1338.
 - [32] KAMALIAN A, SOHRABI ASL M, DOLATSHAHI M, et al. Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(24): 3365–3400.
 - [33] RACHMILEWITZ D, STAMLER J S, KARMEI F, et al. Peroxynitrite-induced rat colitis-a new model of colonic inflammation [J]. *Gastroenterology*, 1993, 105(6): 1681–1688.
 - [34] BAMIAS G, PIZARRO T T, COMINELLI F. Immunological regulation of intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2022, 28(3): 337–349.
 - [35] GAO J, ZHAO X, HU S, et al. Gut microbial DL-endopeptidase alleviates Crohn's disease via the NOD2 pathway [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(10): 1435–1449.
 - [36] ADLER J, SWANSON S D, SCHMIEDLIN-REN P, et al. Magnetization transfer helps detect intestinal fibrosis in an animal model of Crohn disease [J]. *Radiology*, 2011, 259(1): 127–135.
 - [37] GEISER P, DI MARTINO M L, SAMPERIO VENTAYOL P, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits cycling through epithelial cells to colonize human and murine enteroids [J]. *mBio*, 2021, 12(1): e02684-e02620.
 - [38] LO B C, SHIN S B, MESSING M, et al. Chronic *Salmonella* infection induced intestinal fibrosis [J]. *J Vis Exp*, 2019, (151): e60068.
 - [39] JOHNSON L A, RODANSKY E S, MOONS D S, et al. Optimisation of intestinal fibrosis and survival in the mouse S. typhimurium model for anti-fibrotic drug discovery and preclinical applications [J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(6): 724–736.
 - [40] JOHNSON L A, LUKE A, SAUDER K, et al. Intestinal fibrosis is reduced by early elimination of inflammation in a mouse model of IBD: impact of a “Top-Down” approach to intestinal fibrosis in mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(3): 460–471.
 - [41] FU Q, SONG T, MA X, et al. Research progress on the relationship between intestinal microecology and intestinal bowel disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(4): 297–310.
 - [42] KITTANA H, GOMES-NETO J C, HECK K, et al. Evidence for a causal role for *Escherichia coli* strains identified as adherent-invasive (AIEC) in intestinal inflammation [J]. *mSphere*, 2023, 8(2): e0047822.
 - [43] BARNICH N, DARFEUILLE-MICHAUD A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(1): 16–20.
 - [44] MIRSEPAZI-LAURIDSEN H C, VALLANCE B A, KROGFELT K A, et al. *Escherichia coli* pathobionts associated with inflammatory bowel disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00060-e00018.
 - [45] SMALL C L, REID-YU S A, MCPHEE J B, et al. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1957.
 - [46] LICHTMAN M K, OTERO-VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2): 215–222.
 - [47] BABYATSKY M W, ROSSITER G, PODOLSKY D K. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(4): 975–984.
 - [48] STREEL G D, LUCAS S. Targeting immunosuppression by TGF- β 1 for cancer immunotherapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 192: 114697.
 - [49] VALLANCE B A, GUNAWAN M I, HEWLETT B, et al. TGF- β 1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289(1): G116-G128.
 - [50] KIM K K, SHEPPARD D, CHAPMAN HA. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4): a022293.
 - [51] SINGH S, ANSHITA D, RAVICHANDIRAN V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101: 107598.
 - [52] HE S, YAO L, LI J. Role of MCP-1/CCR2 axis in renal fibrosis: Mechanisms and therapeutic targeting [J]. *Medicine*, 2023, 102(42): e35613.
 - [53] KANG J, POSTIGO-FERNANDEZ J, KIM K, et al. Notch-mediated hepatocyte MCP-1 secretion causes liver fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(3): e165369.
 - [54] FERREIRA A M, TAKAGAWA S, FRESCO R, et al. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(8): 1900–1908.
 - [55] SINGH U P, SINGH N P, MURPHY E A, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 44–49.
 - [56] MOTOMURA Y, KHAN W I, EL-SHARKAWY R T, et al. Induction of a fibrogenic response in mouse colon by overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 [J]. *Gut*, 2006, 55(5): 662–670.

- [57] ROGLER G, HAUSMANN M. Factors promoting development of fibrosis in Crohn's disease [J]. *Front Med*, 2017, 4: 96.
- [58] HAUSMANN M, RECHSTEINER T, CAJ M, et al. A new heterotopic transplant animal model of intestinal fibrosis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(11): 2302–2314.
- [59] WEDER B, SCHEFER F, VAN HAAFTEN W T, et al. New therapeutic approach for intestinal fibrosis through inhibition of pH-sensing receptor GPR4 [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2022, 28(1): 109–125.
- [60] PIZARRO T T, PASTORELLI L, BAMIAS G, et al. SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(12): 2566–2584.
- [61] VIDRICH A, BUZAN J M, BARNES S, et al. Altered epithelial cell lineage allocation and global expansion of the crypt epithelial stem cell population are associated with ileitis in SAMP1/YitFc mice [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(4): 1055–1067.
- [62] RIVERA-NIEVES J, BAMIAS G, VIDRICH A, et al. Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(4): 972–982.
- [63] WANG D, JIN H, SHENG J, et al. A high salt diet protects interleukin 10-deficient mice against chronic colitis by improving the mucosal barrier function [J]. *Mol Immunol*, 2022, 150: 39–46.
- [64] SUN X, HUANG Y, ZHANG Y L, et al. Research advances of vasoactive intestinal peptide in the pathogenesis of ulcerative colitis by regulating interleukin-10 expression in regulatory B cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(48): 7593–7602.
- [65] GLOCKER E O, KOTLARZ D, BOZTUG K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21): 2033–2045.
- [66] NIETO-VELOZA A, HONG S, REEDER M, et al. Lunasin reduces the susceptibility of IL-10 deficient mice to inflammatory bowel disease and modulates the activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 119: 109383.
- [67] WANG H, VILCHES-MOURE J G, CHERKAOUI S, et al. Chronic model of inflammatory bowel disease in IL-10^{-/-} transgenic mice: evaluation with ultrasound molecular imaging [J]. *Theranostics*, 2019, 9(21): 6031–6046.
- [68] CHICHLOWSKI M, SHARP J M, VANDERFORD D A, et al. *Helicobacter typhlonius* and *Helicobacter rodentium* differentially affect the severity of colon inflammation and inflammation-associated neoplasia in IL10-deficient mice [J]. *Comp Med*, 2008, 58(6): 534–541.
- [69] HOLGERSEN K, KVIST P H, MARKHOLST H, et al. Characterisation of enterocolitis in the piroxicam-accelerated interleukin-10 knock out mouse-a model mimicking inflammatory bowel disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2014, 8(2): 147–160.
- [70] SPENCER D M, VELDMAN G M, BANERJEE S, et al. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(1): 94–105.
- [71] REYNOLDS I S, DOOGAN K L, RYAN É J, et al. Surgical strategies to reduce postoperative recurrence of Crohn's disease after ileocolic resection [J]. *Front Surg*, 2021, 8: 804137.
- [72] SOLITANO V, DAL BUONO A, GABBIADINI R, et al. Fibrostenosing Crohn's disease: what is new and what is next? [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(9): 3052.
- [73] RIGBY R J, HUNT M R, SCULL B P, et al. A new animal model of postsurgical bowel inflammation and fibrosis: the effect of commensal microflora [J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1104–1112.
- [74] BOROWIEC A M, SYDORA B C, DOYLE J, et al. Small bowel fibrosis and systemic inflammatory response after ileocolonic anastomosis in IL-10 null mice [J]. *J Surg Res*, 2012, 178(1): 147–154.
- [75] ZHAO X, JI K, ZHANG M, et al. NMN alleviates radiation-induced intestinal fibrosis by modulating gut microbiota [J]. *Int J Radiat Biol*, 2023, 99(5): 823–834.
- [76] MOHAMED H A, SAID R S. Coenzyme Q10 attenuates inflammation and fibrosis implicated in radiation enteropathy through suppression of NF-κB/TGF-β/MMP-9 pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107347.
- [77] USUNIER B, BROSSARD C, L' HOMME B, et al. HGF and TSG-6 released by mesenchymal stem cells attenuate colon radiation-induced fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1790.
- [78] FOLLOWILL D S, TRAVIS E L. Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon [J]. *Radiat Res*, 1995, 144(3): 318–328.
- [79] HAYDONT V, GILLIOT O, RIVERA S, et al. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 68(5): 1471–1482.
- [80] LANGBERG C W, HAUER-JENSEN M. Influence of fraction size on the development of late radiation enteropathy. An experimental study in the rat [J]. *Acta Oncol*, 1996, 35(1): 89–94.
- [81] BETTENWORTH D, RIEDER F. Reversibility of stricturing Crohn's disease-fact or fiction? [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(1): 241–247.
- [82] SANTACROCE G, LENTI M V, SABATINO A D. Therapeutic targeting of intestinal fibrosis in Crohn's disease [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 429.
- [83] BOS S, LAUKENS D. Metabolic modulation during intestinal fibrosis [J]. *J Dig Dis*, 2020, 21(6): 319–325.
- [84] MACIAS-CEJA D C, MENDOZA-BALLESTEROS M T, ORTEGA-ALBIACH M, et al. Role of the epithelial barrier in intestinal fibrosis associated with inflammatory bowel disease: relevance of the epithelial-to mesenchymal transition [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1258843.