DOI:10.16016/j.1000-5404.202103125

坏死性小肠结肠炎对新生小鼠脑损伤及其程度的影响

王 雪,邹 谋,张绍卿,刘 兰,杜 敏,徐 颖 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院麻醉科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 探讨不同程度坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)对新生小鼠脑损伤的影响。**方法** 将60只5日龄C57BL/6小鼠随机分为对照组(CON组,$n=20$)和坏死性小肠结肠炎组(NEC组,$n=40$)。CON组与母鼠同笼,母乳喂养;NEC组饲养在保育箱,采用配方奶喂养+缺氧+口服脂多糖(LPS)诱导坏死性小肠结肠炎小鼠模型,建模4 d后处死所有小鼠。建模过程中记录小鼠每日体质量并观察一般情况;HE染色观察肠道组织的病理学改变。根据回盲部肠道损伤评分将NEC组分为轻度NEC组($n=12$)和重度NEC组($n=12$);Nissl染色观察相应脑组织的病理学变化,并将肠道损伤程度和神经细胞的数量做相关性分析。RT-qPCR检测脑组织中炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA的表达水平;酶联免疫吸附法(ELISA)检测脑组织炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α蛋白的表达水平;免疫荧光检测活化的小胶质细胞和星形胶质细胞的数量。**结果** 与CON组相比,NEC组小鼠活动度降低,体质量明显减轻(3.84 ± 1.25 *vs* 1.76 ± 0.26 g,$P<0.05$),肠道损伤严重,且在海马CA1区,轻、重度NEC组的神经细胞数量减少(125.83 ± 6.40 *vs* 103.83 ± 7.93、75.50 ± 8.87,$P<0.05$),重度NEC组较轻度NEC组减少更多($P<0.05$);相关性分析显示:神经细胞数量与肠道损伤的严重程度呈负相关($r=-0.943$,$P<0.001$)。与CON组相比,NEC组脑组织炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达水平均升高($P<0.05$),活化的小胶质细胞和星形胶质细胞也明显增多($P<0.05$),并且重度NEC组较轻度NEC组升高更明显($P<0.05$)。**结论** 坏死性小肠结肠炎可导致新生小鼠发生急性脑损伤,其损伤程度与肠道损伤的严重程度相关,可能与神经炎症的增加有关。

[关键词] 坏死性小肠结肠炎;早产儿;神经炎症;脑损伤
[中图法分类号] R-332; R725.746.2; R749.23 [文献标志码] A

Effects of necrotizing enterocolitis on brain injury and its severity in neonatal mice

WANG Xue, ZOU Mou, ZHANG Shaoqing, LIU Lan, DU Min, XU Ying Department of Anesthesiology, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of necrotizing enterocolitis (NEC) at different severities on brain injury in neonatal mice. **Methods** Sixty 5-day old C57BL/6 mice were randomly divided into control group (CON group, $n=20$) and NEC group ($n=40$). The CON group was breeding with female mice and breast-fed. The NEC group was fed in an incubator, and induced by formula gavage feeding+hypoxia +oral lipopolysaccharide (LPS) to establish the model of NEC. In 4 d after NEC modeling, all pups were sacrificed by cervical decapitation. Their body weight was measured and general conditions were observed. HE staining was used to observe the pathological changes of intestinal tissue. NEC group was divided into mild NEC subgroup and severe NEC subgroup according to the intestinal injury score of ileocecus. Nissl staining was employed to further observe the pathological changes of the corresponding brain tissue. The correlation

[基金项目] 重庆市技术创新与应用示范(社会民生类)一般项目(cstc2018jscx-msybX0104)
[通信作者] 徐 颖,E-mail:xuyingxy3066@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

between the severity of intestinal injury and the number of nerve cells was analyzed with Pearson analysis. The mRNA levels of the inflammatory factors interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in brain tissues were measured with quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the protein contents of IL-1β, IL-6 and TNF-α in brain tissues. Immunofluorescence assay was conducted to detect the number of activated microglia and astrocytes in the hippocampus. **Results** Compared with CON group, the NEC group had decreased activities and lower body weight (3.84±1.25 *vs* 1.76±0.26 g, $P<0.05$), and serious intestinal damage. The number of nerve cells in the hippocampus were significantly reduced in the NEC group than the CON group ($P<0.05$), so was in the severe NEC subgroup than that the mild NEC subgroup ($P<0.05$). Correlation analysis showed that the pathological changes of brain were negatively correlated with the severity of intestinal injury ($r=-0.943$, $P<0.001$). When compared with the CON group, the mRNA and protein levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in brain tissues were significantly elevated ($P<0.05$), and the numbers of activated microglia and astrocytes were also significantly increased in the NEC group ($P<0.05$), especially in the severe NEC subgroup ($P<0.05$). **Conclusion** NEC can lead to acute brain injury in neonatal mice, and the severity of damage is related to the severity of intestinal injury, which may be related to the increase of neuroinflammation.

[**Key words**] necrotizing enterocolitis; premature infants; neuroinflammation; brain injury

Supported by the General Project of Technology Innovation and Application Demonstration for Social Livelihood of Chongqing (cstc2018jscx-msybX0104).
Corresponding author: XU Ying, E-mail: xuyingxy3066@126.com

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)是早产儿常见的炎症性胃肠道疾病,特别是在极低体质量出生的早产儿中,其发病率达9%,病死率在30%~50%[1]。NEC主要以肠道的炎症为特征,并伴有不同程度的出血、坏死和穿孔,严重者需要手术治疗[2]。存活的NEC患儿常伴有多种短期和长期并发症,包括肠道衰竭、短肠综合征、神经发育障碍等[3]。NEC与神经认知障碍之间的关系已经得到了很多研究者的证实。一项回顾性的研究表明,约40%的NEC患儿存在不同类型的神经发育障碍(neurodevelopmental impairment, NDI),如:脑瘫、视觉、听力和认知障碍,比未合并其他疾病的早产儿更严重、持续时间更久[4]。与药物治疗的NEC患儿相比,接受手术治疗的严重NEC患儿在脑核磁共振成像(MRI)上表现出严重的脑损伤,且预后更差[5-6]。这似乎表明NEC对新生儿大脑的影响程度与肠道损伤的严重程度相关。

在NEC患儿中,细胞因子特别是IL-1β、IL-6和TNF-α在NEC的发病机制中具有重要作用,可导致机体产生过度的炎症反应,并且与肠道损伤的严重程度相关[7]。临床研究发现,这些细胞因子在具有认知障碍的NEC患儿中升高更明显[8]。NEC发生脑损伤和NDI的作用机制还未完全阐明,围产期的全身炎症已被证明与新生儿脑损伤有关。由于肠道和全身炎症是NEC的主要过程之一,我们推测神经炎症可能参与了NEC脑损伤的发病机制。为进一步证明NEC肠道损伤的程度与脑损伤相关性,本研究拟通过建立坏死性小肠结肠炎模型,观察不同程度NEC的脑组织损伤情况和神经炎症的水平,为尽早减轻NEC患儿病情和改善神经发育结果提供新的预防策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只新生5 d的C57BL/6小鼠购自重庆医科大学动物实验中心,雌雄不限,体质量2.0~3.0 g,饲养在重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心。本研究通过重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心伦理审查委员会批准(2020年2月)。

1.2 主要试剂

Similac奶粉购自美国Abbott Laboratories;倍乐酷狗代乳粉购自PetAg;脂多糖(L2880)购自美国Sigma;4%多聚甲醛、柠檬酸钠修复液(pH=6.0)和组织自发荧光淬灭剂购自北京赛维尔公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;反转录和实时荧光定量PCR试剂购自MCE公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;ELISA试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;Nissl染色液(焦油紫法)和驴血清购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗鼠Ibal抗体购自Abcam公司,兔抗鼠GFAP抗体购自CST公司,荧光二抗Alexa Fluor 555标记驴抗兔IgG和抗荧光淬灭封片剂均购自碧云天公司;DAPI染色液购自北京雷根生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与 NEC 模型建立 SPF 级新生 5 d 的 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为 CON 组(n=20)和 NEC 组(n=40),CON 组小鼠和母鼠同笼,母乳喂养,NEC 组小鼠饲养在保育箱(温度 36±1 ℃,湿度 45%~60%)。按照 CHEN 等[9]的方法建立 NEC 模型,灌胃喂养配方奶 30~50 μL/g,每日 5 次(8:00、12:00、16:00、20:00、23:00);在 5%氧气的缺氧箱中缺氧 10 min,每日 3 次(8:30、16:30、23:30);灌胃喂养脂多糖 LPS 5 mg/(kg·d),连续建模 4 d。

1.3.2 一般情况观察 观察新生小鼠的活动度、腹胀、腹泻等情况,并记录每日的体质量和死亡情况。

1.3.3 组织取材 最后一次喂养后 12 h,断头处死所有小鼠,获取胃端至直肠的整段肠组织,观察肠道组织的大体形态;取回肠、空肠和十二指肠的肠道组织固定于 4%多聚甲醛中;迅速剥离脑组织后将其一分为二,一半冻存于-80 ℃,另一半用 4%多聚甲醛固定。

1.3.4 肠道组织 HE 染色 CON 组和 NEC 组的肠道组织经过甲醛固定,脱水,石蜡包埋后切成 4 μm 厚度的薄片,在烤箱烘烤 2 h,二甲苯脱蜡后进行 HE 染色,中性树脂封片,在光学显微镜下观察肠组织病理形态学变化。根据 DRUCKER 等[10]的评分标准,采用双盲法评分,每个标本选取 3 个视野,取平均值作为每个标本的评分值,评分≥2 分认定为发生了 NEC。固有层和黏膜下层明显分离或(和)伴有局部绒毛脱落为轻度 NEC(n=12);绒毛全部脱落或坏死为重度 NEC(n=12)。

1.3.5 脑组织 Nissl 染色 取 CON 组、轻度 NEC 组和重度 NEC 组的脑组织,经固定、脱水和包埋后在冠状位切片,切片厚度为 4 μm,烤干后备用。经脱蜡至水后,取一部分脑片行 Nissl 染色,在 Cresyl violet Stain 中 56 ℃滴染 1 h,Nissl Differentiation 分化 1 min,梯度乙醇脱水后中性树脂封片。用光学显微镜观察海马的病理学变化。

1.3.6 荧光定量 PCR 检测脑组织炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 的表达水平 Trizol 法提取脑组织中的总 RNA,取 2 μg 总 RNA 按照反转录试剂说明书反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 IL-1β、IL-6 和 TNF-α,GAPDH 作为内参。反应条件设定为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 20 s 共 40 个循环。引物序列见表 1。

1.3.7 ELISA 检测脑组织炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白的表达水平 取冻存的脑组织,每 20 mg 组织加入 200 μL 含 1 mmol/L PMSF 的蛋白酶抑制剂,匀浆后离心(4 ℃,14 000 r/min)10 min,取上清液,根据 ELISA 试剂盒方法检测。

表 1 引物序列

基因	序列(5′→3′)	片段大小/bp
IL-1β	正义:CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG 反义:CTTCTTTGGGTATTGCTTGGGATC	175
IL-6	正义:CCAATTTCCAATGCTCTCCT 反义:ACCACAGTGAGGAATGTCCA	182
TNF-α	正义:TTCCGAATTCACTGGAGCCTCGAA 反义:TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA	144
GAPDH	正义:TGAAGCAGGCATCTGAGGG 反义: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG	102

1.3.8 免疫荧光检测活化的小胶质细胞和星形胶质细胞数量 脑组织的石蜡切片在二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,自来水冲洗 3 min;柠檬酸钠修复液(pH 值=6.0)修复 15 min,PBS 洗涤 3 次;组织自发荧光淬灭剂 A 室温孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次;驴血清 37 ℃封闭 30 min,一抗 4 ℃孵育过夜。次日 PBS 洗涤 3 次,荧光二抗室温孵育 2 h;PBS 洗涤 3 次,DAPI 染色 5 min,组织自发荧光淬灭剂 B 孵育 5 min,PBS 洗涤 3 次;抗荧光淬灭剂封片。在倒置荧光显微镜下采集数据图像,使用 Image-J 处理和分析图像。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Bonferroni 法进行组间两两比较,生存分析采用 Kaplan-Meier 检验,相关性分析采用 Pearson 检验,P<0.05 表示差异具有统计学意义。

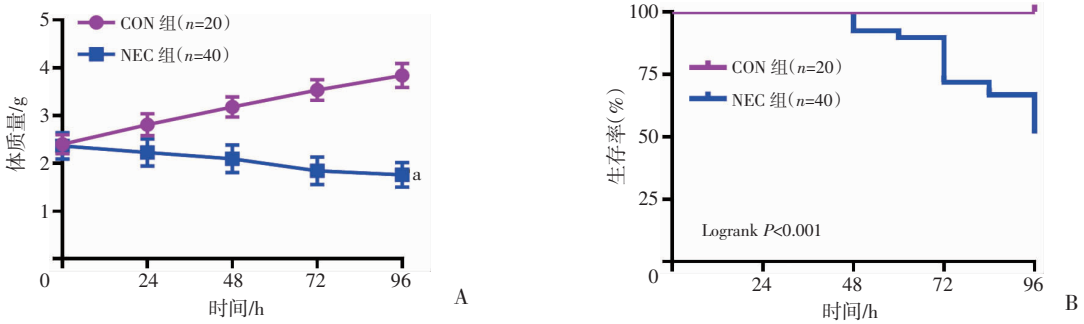
2 结果

2.1 NEC 小鼠的一般情况

CON 组小鼠活动度良好,无腹胀、腹泻;NEC 组小鼠活动度差,出现不同程度的腹胀、腹泻。CON 组小鼠体质量逐渐增加,NEC 组小鼠的体质量逐日递减,两组差异具有统计学意义(P<0.05,图 1A);CON 组小鼠无死亡,NEC 组小鼠死亡 16 只(40%),两组差异有统计学意义(P<0.001,图 1B)。

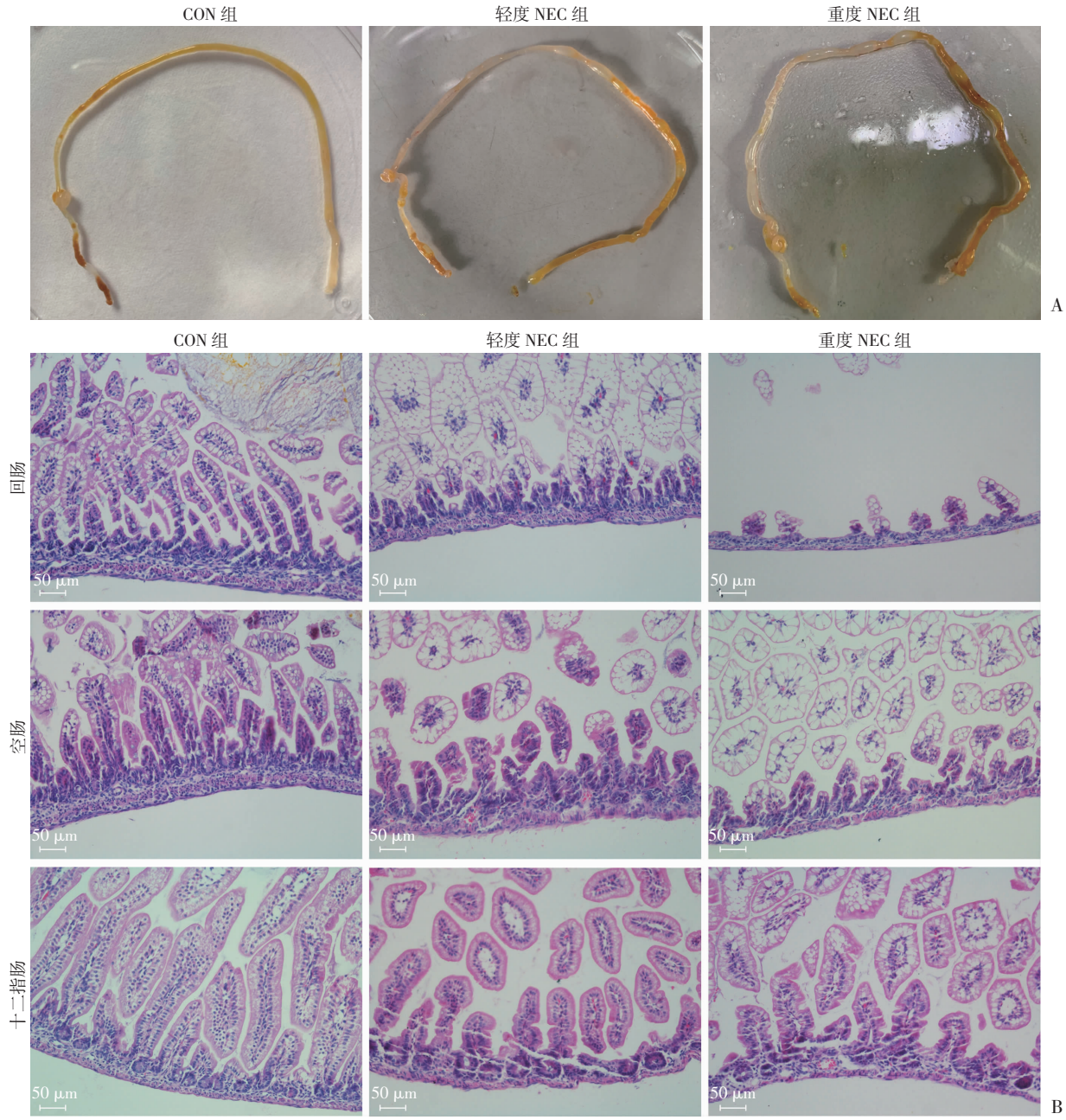
2.2 NEC 小鼠肠组织的大体形态和病理学改变

大体观察,CON 组小鼠肠组织呈淡黄色,弹性佳,无扩张、积气;轻度 NEC 小鼠肠组织大部分呈淡黄色,弹性稍差,部分肠管扩张,积气;重度 NEC 小鼠肠组织弹性差,肠管积气、扩张明显,部分呈串珠样改变,见图 2A。肠道 HE 染色显示,回盲部是肠道损伤最重的部位,空肠和十二指肠也存在不同程度的损伤。CON 组肠组织结构完整,肠上皮细胞结构连续,绒毛完整,固有层、黏膜下层和肌层无水肿或分离,无炎性细胞浸润。轻度 NEC 组小鼠肠组织结构紊乱,部分绒毛水肿或脱落,固有层和黏膜下层分离,并伴有黏膜下层和肌层水肿,少量炎性细胞浸润;重度 NEC 组小鼠肠组织结构消失,绒毛完全脱落,见图 2B。



A:体质量变化($\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 CON 组比较;B:生存率

图 1　NEC 小鼠的体质量变化和生存率



A:肠道组织的大体形态;B:HE 染色观察肠道组织的病理形态学改变

图 2　NEC 小鼠肠道组织的大体形态和病理形态学改变

2.3　NEC 小鼠脑组织海马区的神经细胞缺失

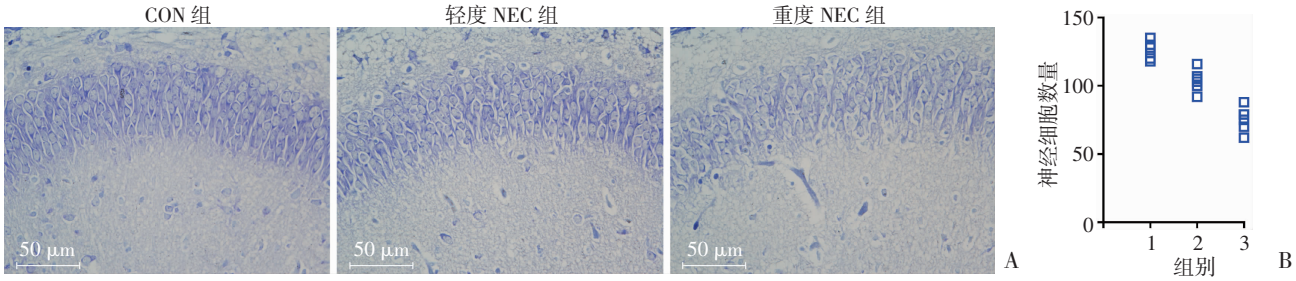
Nissl 染色显示,在海马 CA1 区,与 CON 组(125.83±6.40)相比,NEC 组 Nissl 体数量减少,颜色变浅(P<0.05);与轻度 NEC 组(103.83±7.93)相比,重度 NEC 组(75.50±8.87)Nissl 体数量减少更明显(P<0.05),见图 3;且相关性分析显示,肠道损伤越重,神经细胞缺失越多(r=−0.943,P<0.001)。

2.4　NEC 小鼠脑组织炎症因子的表达水平增加

RT-qPCR 和 ELISA 结果显示,与 CON 组相比,NEC 组小鼠脑组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 和蛋白水平均明显增加(P<0.05),且重度 NEC 组小鼠脑组织的炎症因子表达水平明显高于轻度 NEC 组(P<0.05,图 4、5)。

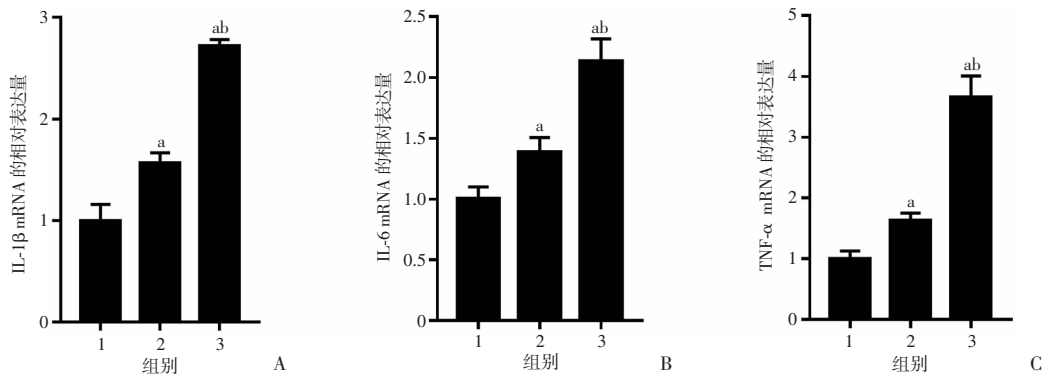
2.5　NEC 小鼠脑组织海马区活化的小胶质细胞和星形胶质细胞增加

免疫荧光结果显示,与 CON 组(1.73±0.16,8.85±3.14)相比,在海马中,轻度 NEC 组活化的小胶质细胞(7.96±1.35)和星形胶质细胞(25.49±1.22)增加(P<0.05),且重度 NEC 组(16.15±1.00,35.16±5.07)增加更明显(P<0.05,图 6、7)。



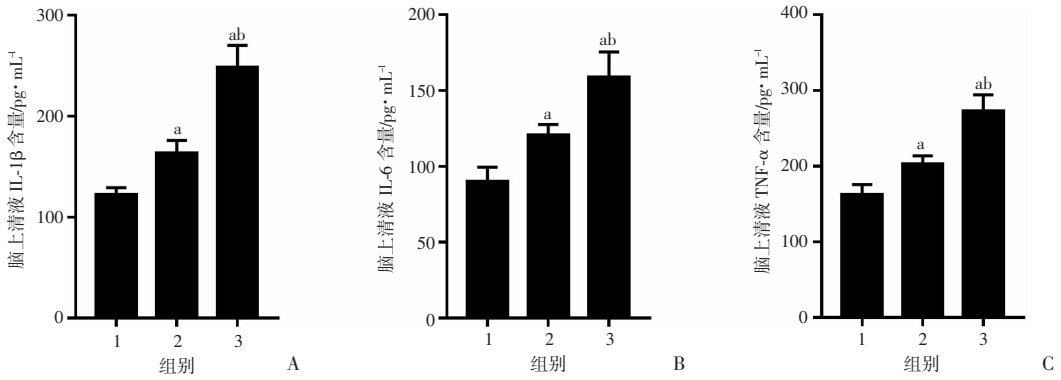
A:NEC 小鼠脑组织海马区 Nissl 染色观察结果;B:各组小鼠脑组织神经细胞数量分析(n=6)　1:CON 组;2:轻度 NEC 组;3:重度 NEC 组

图 3　NEC 小鼠脑组织海马区的神经细胞缺失及定量分析



1:CON 组;2:轻度 NEC 组;3:重度 NEC 组　a:P<0.05,与 CON 组比较;b:P<0.05,与轻度 NEC 组比较

图 4　RT-PCR 检测 NEC 小鼠脑组织炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 的表达(n=6,$\bar{x}\pm s$)



1:CON 组;2:轻度 NEC 组;3:重度 NEC 组　a:P<0.05,与 CON 组比较;b:P<0.05,与轻度 NEC 组比较

图 5　ELISA 检测 NEC 小鼠脑组织上清液中炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达(n=6,$\bar{x}\pm s$)

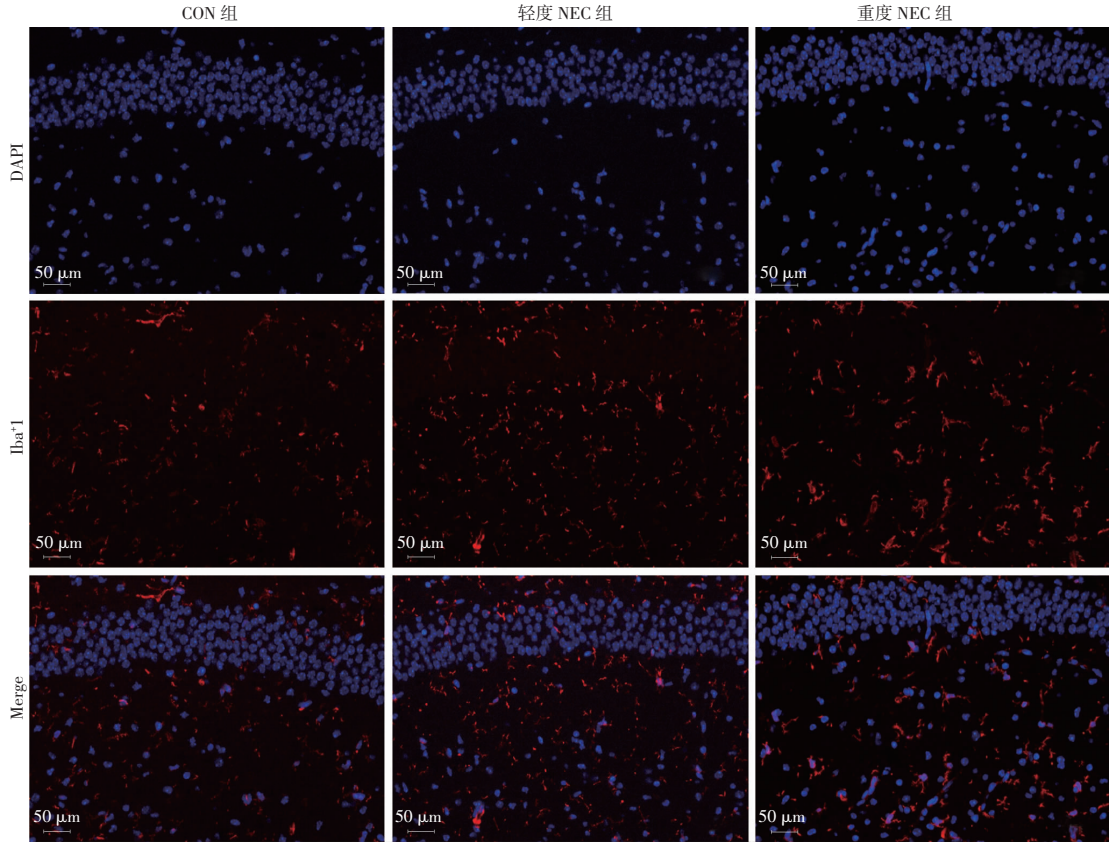


图 6　免疫荧光检测 NEC 小鼠海马区活化的小胶质细胞

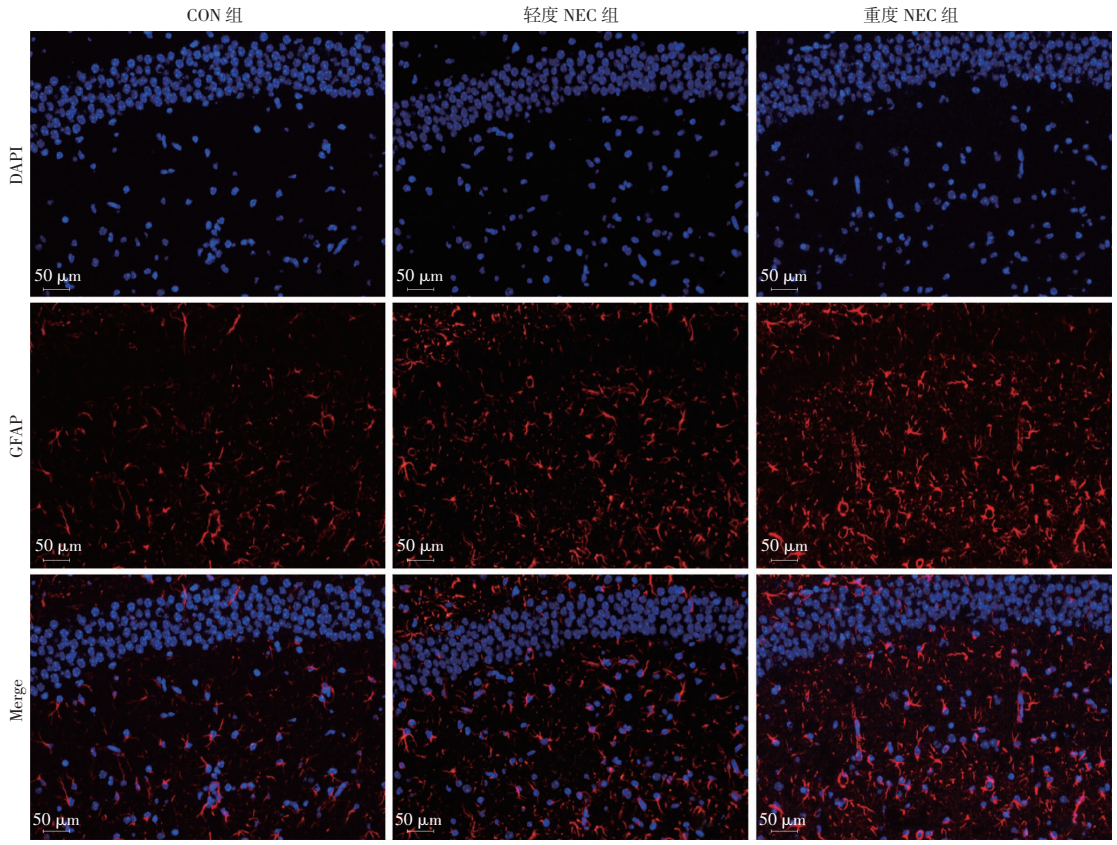


图 7　免疫荧光检测 NEC 小鼠海马区活化的星形胶质细胞

3 讨论

NEC 是新生儿期常见的严重胃肠道急症,常伴有肠道坏死和/或穿孔,可对神经系统的发育产生不良影响,且炎症在早产儿脑损伤的发生中具有重要。本研究应用 NEC 小鼠模型,研究不同肠道病变程度的 NEC,其对应的神经病理学变化及神经炎症水平,结果提示 NEC 小鼠发生了急性脑损伤,且肠道病变越严重,缺失的神经细胞越多,大脑中的炎症因子和活化的胶质细胞越多。

本研究成功建立了 NEC 小鼠模型,并且发现在相同的干预条件下,NEC 小鼠的肠道损伤程度不同,部分小鼠只出现了轻度的肠道损伤,而部分小鼠肠道损伤非常严重。肠道损伤后可破坏肠道屏障,导致大量的炎症介质释放和细菌入血,进而引起全身炎症反应[2]。NEC 好发于早产儿,此时大脑处于快速、动态发育的关键时期,包括神经发生、神经元迁移和突触形成,容易受到各种炎症介质、缺血缺氧和营养不良等因素的影响[11]。因此 NEC 可能影响早产儿大脑的发育。海马参与学习记忆的形成,是早产儿脑损伤的敏感区域[12]。本研究发现,NEC 小鼠海马区的神经细胞出现不同程度的缺失,这表明 NEC 可导致新生小鼠发生急性脑损伤。在早产仔猪的 NEC 模型中同样发现,海马区的神经细胞出现了损伤[13]。本研究进一步评估了肠道损伤程度和神经细胞数量之间的关系,结果发现,肠道损伤越重,缺失的神经细胞越多。这与临床上观察的结果相一致,与药物治疗的 NEC 患儿和非 NEC 患儿相比,接受手术治疗的严重 NEC 患儿脑损伤的程度更重[4]。这表明受损的肠道和大脑之间存在联系,肠-脑轴可能参与其中。肠道菌群失调激活的 Toll 样 4 受体(TLR4)是 NEC 肠道损伤的重要发病机制。TLR4 激活后可引起肠道的 $CD4^+$ T 淋巴细胞和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)释放,直接或间接作用于小胶质细胞引起脑损伤[14-15]。除此之外,失调的微生物还可通过引起和加剧全身炎症反应、增加血脑屏障通透性、产生各种神经递质以及影响迷走神经系统对大脑产生影响[16]。但是肠道菌群在 NEC 脑损伤中的具体作用机制还需进一步探索。

本研究结果显示:NEC 可导致脑组织中促炎细胞因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达以及小胶质细胞和星形胶质细胞的激活增加。这表明 NEC 脑组织发生了神经炎症。BIOUSS 等[17]的研究表明,与母乳喂养的小鼠相比,NEC 小鼠的全身炎症和神经炎症均增加。在 NEC 仔猪脑组织中,神经炎症和缺氧相关的差异表达基因上调,活化的小胶质细胞增多[18]。肠道受损后释放的大量细胞因子如 IL-1β、TNF-α 和 IL-6,可通过产生全身炎症、破坏血脑屏障进入大脑引起炎症反应[19]。许多研究已证实,NEC 小鼠不仅肠道屏障受损,血脑屏障和血脑脊液屏障也同样遭到破坏[13, 20]。细胞因子还可激活早产儿大脑中的星形胶质细胞和小胶质细胞,它们通过分泌细胞因子和趋化因子参与脑内的炎症反应。星形胶质细胞和小胶质细胞也表达细胞因子特异性受体,如 IL-1β、TNF-α 和干扰素-γ(IFN-γ)受体,并可被这些细胞因子激活,加剧脑内的炎症反应[21]。最新的研究表明,NEC 小鼠肠道的 $CD4^+$ T 淋巴细胞,可通过受损的肠道屏障和血脑屏障流向大脑,其释放的 IFN-γ 可激活小胶质细胞,从而引起认知功能障碍[15]。NEC 患儿的脑损伤在影像学上主要表现为脑白质的异常,以少突胶质细胞的减少和髓鞘缺失为特征。早产儿大脑中的少突胶质细胞处于高度分化的状态,对炎症、缺血缺氧和氧化应激等因素具有高度易损性。各种细胞因子和胶质细胞的激活均可影响少突胶质细胞的分化和成熟,导致髓鞘形成障碍。在 NEC 动物模型中证实了认知障碍的发生与小胶质细胞激活导致少突胶质细胞减少和髓鞘形成受损有关[14]。由此可知,小胶质细胞的激活是 NEC 脑损伤的中心靶点。

综上所述,本研究发现 NEC 引起的急性脑损伤与肠道损伤的严重程度相关,神经炎症反应在脑损伤中起重要作用,特别是小胶质细胞的激活。我们应尽早制定合理的护理和治疗方案,减轻 NEC 肠道损伤的程度,并同时考虑到对早产儿神经系统的影响,尽早采取脑保护策略,从而改善 NEC 患儿的神经发育结果。

参考文献:

[1] 中国医师协会新生儿科医师分会循证专业委员会. 新生儿坏死性小肠结肠炎临床诊治指南(2020)[J]. 中国当代儿科杂志,2021, 23(1): 1-11. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2011145.
Evidence-Based Medicine Group. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of neonatal necrotizing enterocolitis (2020)[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2021, 23(1): 1-11. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2011145.

[2] ZANI A, PIERRO A. Necrotizing enterocolitis: controversies and challenges[J]. F1000Res, 2015, 4: F1000FacultyRev-F1000Faculty1373. DOI: 10.12688/f1000research.6888.1.

[3] NIÑO D F, SODHI C P, HACKAM D J. Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(10): 590-

600. DOI:10.1038/nrgastro.2016.119.

[4] MATEI A, MONTALVA L, GOODBAUM A, *et al*. Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: systematic review and meta-analysis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2020, 105(4): 432-439. DOI: 10.1136/archdischild-2019-317830.

[5] HINTZ S R, KENDRICK D E, STOLL B J, *et al*. Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis[J]. Pediatrics, 2005, 115(3): 696-703. DOI:10.1542/peds.2004-0569.

[6] MERHAR S L, RAMOS Y, MEINZEN-DERR J, *et al*. Brain magnetic resonance imaging in infants with surgical necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation versus medical necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr, 2014, 164(2): 410-412.e1. DOI:10.1016/j.jpeds.2013.09.055.

[7] LODHA A, ASZTALOS E, MOORE A M. Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment[J]. Acta Paediatr, 2010, 99(3): 338-343. DOI:10.1111/j.1651-2227.2009.01600.x.

[8] ADAMS-CHAPMAN I. Necrotizing enterocolitis and neurodevelopmental outcome[J]. Clin Perinatol, 2018, 45(3): 453-466. DOI:10.1016/j.clp.2018.05.014.

[9] CHEN Y, KOIKE Y, MIYAKE H, *et al*. Formula feeding and systemic hypoxia synergistically induce intestinal hypoxia in experimental necrotizing enterocolitis[J]. Pediatr Surg Int, 2016, 32(12): 1115-1119. DOI: 10.1007/s00383-016-3997-8.

[10] DRUCKER N A, JENSEN A R, TE WINKEL J P, *et al*. Loss of endothelial nitric oxide synthase exacerbates intestinal and lung injury in experimental necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr Surg, 2018, 53(6): 1208-1214. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2018.02.087.

[11] HICKEY M, GEORGIEFF M, RAMEL S. Neurodevelopmental outcomes following necrotizing enterocolitis[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2018, 23(6): 426-432. DOI: 10.1016/j.siny.2018.08.005.

[12] EICHENBAUM H. Prefrontal-hippocampal interactions in episodic memory[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(9): 547-558. DOI:10.1038/nrn.2017.74.

[13] BRUNSE A, ABBASPOUR A, SANGILD P T. Brain barrier disruption and region-specific neuronal degeneration during necrotizing enterocolitis in preterm pigs[J]. Dev Neurosci, 2018, 40(3): 198-208. DOI:10.1159/000488979.

[14] NIÑO D F, ZHOU Q J, YAMAGUCHI Y, *et al*. Cognitive impairments induced by necrotizing enterocolitis can be prevented by inhibiting microglial activation in mouse brain[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(471): eaan0237. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan0237.

[15] ZHOU Q J, NIÑO D F, YAMAGUCHI Y, *et al*. Necrotizing enterocolitis induces T lymphocyte-mediated injury in the developing mammalian brain[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(575): eaay6621. DOI:10.1126/scitranslmed.aay6621.

[16] NIEMARKT H J, DE MEIJ T G, VAN GANZEWINKEL C J, *et al*. Necrotizing enterocolitis, gut microbiota, and brain development: role of the brain-gut axis[J]. Neonatology, 2019, 115(4): 423-431. DOI:10.1159/000497420.

[17] BIOUSS G, ANTOUNIANS L, LI B, *et al*. Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain[J]. J Neuroinflam, 2019, 16(1): 97. DOI:10.1186/s12974-019-1481-9.

[18] SUN J, PAN X Y, CHRISTIANSEN L I, *et al*. Necrotizing enterocolitis is associated with acute brain responses in preterm pigs[J]. J Neuroinflam, 2018, 15(1): 180. DOI: 10.1186/s12974-018-1201-x.

[19] DONG Y, SPEER C P. Late-onset neonatal sepsis: recent developments[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2015, 100(3): F257-F263. DOI: 10.1136/archdischild-2014-306213.

[20] TIAN F, LIU G R, LI N, *et al*. Insulin-like growth factor I reduces the occurrence of necrotizing enterocolitis by reducing inflammatory response and protecting intestinal mucosal barrier in neonatal rats model[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4711-4719.

[21] KABBA J A, XU Y, CHRISTIAN H, *et al*. Microglia: housekeeper of the central nervous system[J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(1): 53-71. DOI:10.1007/s10571-017-0504-2.

(收稿:2021-03-14;修回:2021-04-16)

(编辑 栾 嘉)