DOI:10.16016/j.2097-0927.202211032

丁酸钠对坏死性小肠结肠炎小鼠脑损伤的保护作用

张玉妮,张兴道,贺 雨,艾 青,史 源 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,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,儿童感染免疫重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 探究丁酸钠对坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)小鼠脑损伤的影响。**方法** 137 只 3 d 龄 C57BL/6 新生鼠分为:对照组(CON 组,$n=40$,不与母鼠分离)、NEC+PBS 灌胃组(NP 组,$n=57$)和 NEC+丁酸钠灌胃组(NB 组,$n=40$),NP 组和 NB 组分别从 3 d 龄开始予 PBS 或丁酸钠灌胃,干预 7 d 后与母鼠分离,采用人工喂养联合缺氧冷刺激的方法连续 3 d 刺激建立 NEC 模型。分析各组小鼠存活率,肠组织病理损伤情况,脑组织 TNF-α、IL-6 mRNA 水平以及活化的小胶质细胞和星形胶质细胞的表达情况。采用水迷宫实验和透射电镜检测各组成年小鼠学习记忆能力和髓鞘微结构改变。Western blot 检测肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平。**结果** 与 CON 组相比,NP 组小鼠大脑中 TNF-α、IL-6 mRNA 表达显著上调(1.51±0.20 *vs* 0.67±0.14,$P<0.05$;2.03±0.39 *vs* 1.01±0.17,$P<0.05$),活化的小胶质细胞增加(751.00±82.35 *vs* 284.70±52.01,$P<0.05$),星形胶质细胞数量增加($P<0.05$),肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平显著升高(1.76±0.19 *vs* 0.73±0.06,$P<0.05$;1.14±0.16 *vs* 0.81±0.01,$P<0.05$;1.21±0.19 *vs* 0.60±0.15,$P<0.05$);NP 组成年小鼠水迷宫逃避潜伏期延长($P<0.05$),平台穿越次数减少($P<0.05$),G-ratio 显著升高($P<0.05$)。而与 NP 组相比,NB 组小鼠大脑中 TNF-α、IL-6 mRNA 表达水平降低(0.81±0.12 *vs* 1.51±0.20,$P<0.05$;0.93±0.38 *vs* 2.03±0.39,$P<0.05$),小胶质细胞活化减少(468.00±99.59 *vs* 751.00±82.35,$P<0.05$),星形胶质细胞减少($P<0.05$),肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 蛋白表达降低(1.22±0.11 *vs* 1.76±0.19,$P<0.05$;0.88±0.06 *vs* 1.14±0.16,$P<0.05$;0.70±0.19 *vs* 1.21±0.19,$P<0.05$);成年小鼠水迷宫逃避潜伏期缩短($P<0.05$),平台穿越次数增加($P<0.05$),髓鞘厚度增加($P<0.05$)。**结论** 丁酸钠可通过抑制大脑中的 TLR4-NF-κB 通路减轻神经炎症反应,从而发挥对 NEC 远期相关脑损伤的保护作用。

[**关键词**] 坏死性小肠结肠炎;脑损伤;丁酸钠;神经炎症;小胶质细胞活化

[**中图法分类号**] R725.7;R322.81;R914.4 [**文献标志码**] A

Protective effect of sodium butyrate on brain injury in mice with necrotizing enterocolitis

ZHANG Yuni, ZHANG Xingdao, HE Yu, AI Qing, SHI Yuan Department of Neonatology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of sodium butyrate on brain injury in mice with necrotizing enterocolitis (NEC). **Methods** A total of 137 3-day-old C57BL/6 mice were randomly divided into Control group (CON group, $n=40$, without maternal separation), NEC+PBS group (NP group, $n=57$) and NEC+butyrate group (NB group, $n=40$). The mice from the NP and NB groups were separated maternally and given either PBS or sodium butyrate by gavage from postnatal day 3 for 7 consecutive days,

[**基金项目**] 国家重点研发计划项目(2022YFC2704802)

[**通信作者**] 史 源,E-mail:shiyuan@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

then a NEC model was established by formula feeding combined with hypoxia and hypothermia for 3 consecutive days. Survival rate, histopathological injury of the intestine, mRNA expression of TNF-α and IL-6 in the brain, and number of activated microglia and astrocytes were observed and detected. Morris water maze and transmission electron microscopy were employed to observe the long-term cognitive impairment and microstructure of myelin, respectively, for the adult mice (4 weeks old). Western blotting was used to measure the protein level of HMGB1 in the intestine and TLR4 as well as NF-κB in the brain. **Results** Compared with the CON group, the mice of the NP group showed increased mRNA expression of TNF-α (1.51±0.20 *vs* 0.67±0.14) and IL-6 (2.03±0.39 *vs* 1.01±0.17) in the brain (both $P<0.05$), raised number of activated microglia (751.00±82.35 *vs* 284.70±52.01, $P<0.05$) and astrocytes ($P<0.05$) in the hippocampus, and elevated protein levels of HMGB1 (1.76±0.19 *vs* 0.73±0.06) in the intestine as well as TLR4 (1.14±0.16 *vs* 0.81±0.01) and NF-κB (1.21±0.19 *vs* 0.60±0.15) in the brain (all $P<0.05$). In addition, the adult mice in the NP group demonstrated the prolonged escape latency and decreased crossing-platform times, and increased G-ratio (all $P<0.05$). After the administration of sodium butyrate, the mRNA expression levels of TNF-α (0.81±0.12 *vs* 1.51±0.20) and IL-6 (0.93±0.38 *vs* 2.03±0.39) in the brain were decreased, the activation of microglia was inhibited (468.00±99.59 *vs* 751.00±82.35), and the number of astrocytes was reduced (all $P<0.05$). The decreased expression levels of HMGB1 (1.22±0.11 *vs* 1.76±0.19) in the intestine and TLR4 (0.88±0.06 *vs* 1.14±0.16) and NF-κB (0.70±0.19 *vs* 1.21±0.19) in the brain were also marked in the NB group (all $P<0.05$). The adult mice of the NB group showed shortened escape latency, and increased crossing-platform times and myelin thickness (all $P<0.05$). **Conclusion** Sodium butyrate alleviates the neuroinflammation by inhibiting the activation of TLR4-NF-κB signal pathway in the NEC brain, and thus exerts protective effect against NEC-associated brain injury.

[**Key words**] necrotizing enterocolitis; brain injury; sodium butyrate; neuroinflammation; microglial activation

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2704802). Corresponding author: SHI Yuan, E-mail: shiyuan@hospital.cqmu.edu.cn

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)是新生儿期最严重的胃肠道急症,主要见于极低和超低出生体质量儿[1]。NEC 在出生体质量<1 500 g 的极低出生体质量儿中的发生率约为 7%,病死率高达 30%[2],而随着早产儿数量的增加,NEC 患儿数量也在缓慢上升[3-4]。在存活的患儿中,约 45% 会出现神经发育不良,在 18~24 个月时出现认知、精神运动、视觉或听觉障碍[5]。与单纯的早产儿相比,合并 NEC 的早产儿,其神经发育结果明显更差[6]。目前认为导致 NEC 脑组织病理改变的机制较为复杂,主要为小胶质细胞活化、少突胶质细胞分化成熟障碍等[7-8]。

小胶质细胞作为中枢神经系统中的巨噬细胞,在不受外界炎症、感染等损伤的情况下处于静息状态,当受到上述损伤后,可发生表型转换,由静息向活化状态转变,其中活化状态表现为胞体增大,呈阿米巴样形态,并释放出大量炎性因子如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)和其他神经毒素等参与神经炎症,损伤其他神经元,从而导致脑内正常神经结构和功能发生病理改变[9]。星形胶质细胞数量的增加,这一过程被称为反应性星形细胞增多,可由炎症晚期活化的小胶质细胞诱导。激活的星形胶质细胞可释放出毒性因子,进一步促进了神经炎症的发展[10]。总之,活化的小胶质细胞和星形胶质细胞都参与了神经炎症的病理损伤过程。炎症性疾病发生时,血脑屏障通透性增加,外周炎症因子更易进入脑内进一步活化小胶质细胞和星形胶质细胞,加重神经炎症反应造成脑白质损伤[8],从而影响神经发育尤其是认知功能受损。一项最新的研究结果表明,NEC 小鼠肠道释放的高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein 1,HMGB1)可激活脑内 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)从而导致小胶质细胞的活化,最终引起 NEC 相关脑损伤的发生[7]。目前,与肠道损伤的广泛研究相比,关于 NEC 相关脑损伤的研究仍比较少,其导致脑损伤的具体机制仍不清楚,且尚缺乏针对 NEC 脑损伤的防治措施。

丁酸是肠道菌群分解寡糖的产物。丁酸钠是内源性丁酸的钠盐,具有促进髓鞘再生、免疫调节、抗炎等多种重要的生物学作用[11-13],其在 NEC 中的抗炎保护作用已被证实[14-15],但在 NEC 相关脑损伤中的保护作用尚未见报道。本实验采用人工喂养联合缺氧冷

刺激的方法建立 NEC 小鼠模型并预先给予丁酸钠灌胃处理,观察丁酸钠对 NEC 相关脑损伤的影响,并探究其可能的潜在机制,从而为丁酸钠防治 NEC 相关脑损伤提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

137 只清洁级新生 3 d 龄的 C57BL/6 新生鼠,不限雌雄,体质量 1.5~4.0 g(购自重庆医科大学动物中心),饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心。本研究已得到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的批准(CHCMU-IACUC20220629012)。

1.2 主要试剂

Similac 配方奶(Abbott Laboratories 公司,美国);犬代乳奶粉(Pet-Ag 公司,美国);丁酸钠(上海生物工程公司股份有限公司,中国);反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);抗 Iba-1 抗体,抗 GFAP 抗体,4%多聚甲醛,柠檬酸盐缓冲液,电镜固定液(武汉赛维尔生物技术有限公司,中国);2%多聚甲醛-2.5%戊二醛电镜固定液(北京雷根,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与 NEC 模型建立 3 日龄 C57BL/6 小鼠分为 3 组:对照组(CON 组,$n=40$,不与母鼠分笼,母乳喂养),NEC+PBS 灌胃组(NP 组,$n=57$)和 NEC+丁酸钠灌胃组(NB 组,$n=40$)。分别从 3 日龄开始予 PBS 或丁酸钠灌胃,连续干预 7 d 后与母鼠分离,采用人工喂养联合缺氧冷刺激的方法连续 3 d 刺激建立 NEC 模型。丁酸钠配置成 150 mmol/L 的溶液,pH=7.62[15]。根据文献[14]建立 NEC 模型:C57BL/6 新生小鼠饲养在自制保育箱内,配方奶经口灌胃喂养(0.03~0.05 mL/g),每 4 小时喂养 1 次。将新生鼠放入自制的缺氧箱内,向箱内充入纯氮(100% N_2),控制 N_2 流量为 9~12 L/min,当测氧仪测得箱内 O_2 浓度降为 0 时开始计时,90 s 后关闭阀门并将新生鼠取出,立即将其置于 4 ℃冰箱中刺激 10 min。缺氧、冷刺激每天 3 次。

1.3.2 组织取材和切片制备 NEC 建模结束间隔 12 h 后,断头处死部分小鼠,分离十二指肠下端至回盲部肠管,肉眼观察有无肠腔积气、出血、坏死等 NEC 样病变。获取小鼠近回盲部 1~2 cm 肠组织,用 4%多聚甲醛固定;同时在冰上迅速剥离出脑组织,用 4%的多聚甲醛固定。肠和脑组织经脱水和石蜡包埋后,进行切片,切片厚度为 4 μm,烘干后备用。

1.3.3 肠道组织 HE 染色 取肠道组织石蜡切片于二甲苯中脱蜡,HE 染色后中性树脂封片,在光学显微镜下观察肠道组织病理形态学变化。采用双盲法进行肠组织病理损伤评分,根据 YU 等[16]的评分标准,评分≥2 分认定为 NEC。

1.3.4 免疫组化染色 取脑组织石蜡切片于二甲苯中脱蜡,梯度浓度的乙醇溶液中脱水。柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)覆盖组织切片,修复抗原,微波炉加热 25 min,阻断内源性过氧化物酶,3% 牛血清白蛋白阻断非特异性结合 30 min 后用抗 Iba-1 和抗 GFAP 一抗 4 ℃孵育过夜,PBS 冲洗,二抗在室温孵育 1 h。DAB 染色后苏木精复染,切片脱水,封片,全玻片扫描仪扫描后使用 Image J 软件进行分析,筛选出活化状态的小胶质细胞并计算其数量[8]。

1.3.5 荧光定量 PCR 取冻存的脑组织,TRIzol 法提取 Total RNA,将 Total RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 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。引物序列如下:IL-6 正义链 5′-CTTCTTGGGACTGATGCTGGT-3′,反义链 5′-GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC-3′;TNF-α 正义链 5′-CCAAAGGGATGAGAAGTTCC-3′,反义链 5′-CTCCACTTGGTGGTTTGCTA-3′;GAPDH 正义链 5′-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3′,反义链 5′-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3′。

1.3.6 透射电镜 存活至 4 周龄的小鼠用生理盐水约 10 mL 快速灌流,待肝脏变白且右心耳流出液体澄清后,使用 2%多聚甲醛-2.5%戊二醛电镜固定液约 10 mL 继续灌注后断头取脑。冠状位将脑组织切成 1 mm 厚的脑片,小心修出包含胼胝体的 1 mm×1 mm×1 mm 组织块,放入电镜固定液中固定,PBS 室温洗涤 3 次,四氧化锇固定后,用丙酮脱水并包埋在环氧树脂中,然后将标本切成 70 nm 的超薄切片,再用电镜观察髓鞘的超微结构,镜下依次放大 3 000 和 8 000 倍。用 Image-J 软件中的 Gratio 插件计算出 G-ratio 值。G-ratio 定义为:有髓神经纤维轴突直径/有髓神经纤维髓鞘外直径,能反映不同直径的神经纤维髓鞘厚度,G-ratio 值越大,髓鞘厚度越小。

1.3.7 Morris 水迷宫实验 按照 ZHU 等[17]的方法进行 Morris 水迷宫实验,包括 5 d 的定位航行实验和 1 d 的空间探索实验。第 1~5 天,平台在水面下 1~2 cm,连续 5 d 将小鼠依次放入 4 个象限内,记录小鼠在 60 s 内定位目标平台所用的总时间(潜伏逃避期)。在测试的第 6 天撤走平台,记录 60 s 内的小鼠在目标平台区的穿越次数、目标象限穿越次数和目标象限停留时间,评估小鼠的远期学习记忆能力。实验采用 ANYmaze 视频跟踪软件自动记录。

1.3.8 Western blot 取冻存的肠组织和脑组织,加入

组织裂解混合液,匀浆,静置 20 min 后,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量。取上清液加入 5×蛋白上样缓冲液 100 ℃煮 10 min,冻存备用。取 50 μg 总蛋白样品进行凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,封闭 15 min,孵育一抗(HMGB1 抗体稀释浓度为 1∶5 000,TLR4 抗体稀释浓度为 1∶500,NF-κB 抗体稀释浓度为 1∶500,β-actin 抗体稀释浓度为 1∶10 000),4 ℃孵育过夜 14~16 h,孵育二抗(稀释浓度为 1∶20 000),显影。分析软件采用 Image J,目的蛋白相对表达量以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值比值表示。

1.4　统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.3.0 分析所有数据并检验是否为正态分布。正态分布数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用单因素方差分析或双因素方差分析确定显著性。采用 $M(P_{25}, P_{75})$来描述非正态分布数据,并通过 Kruskal-Wallis 检验来确定差异。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

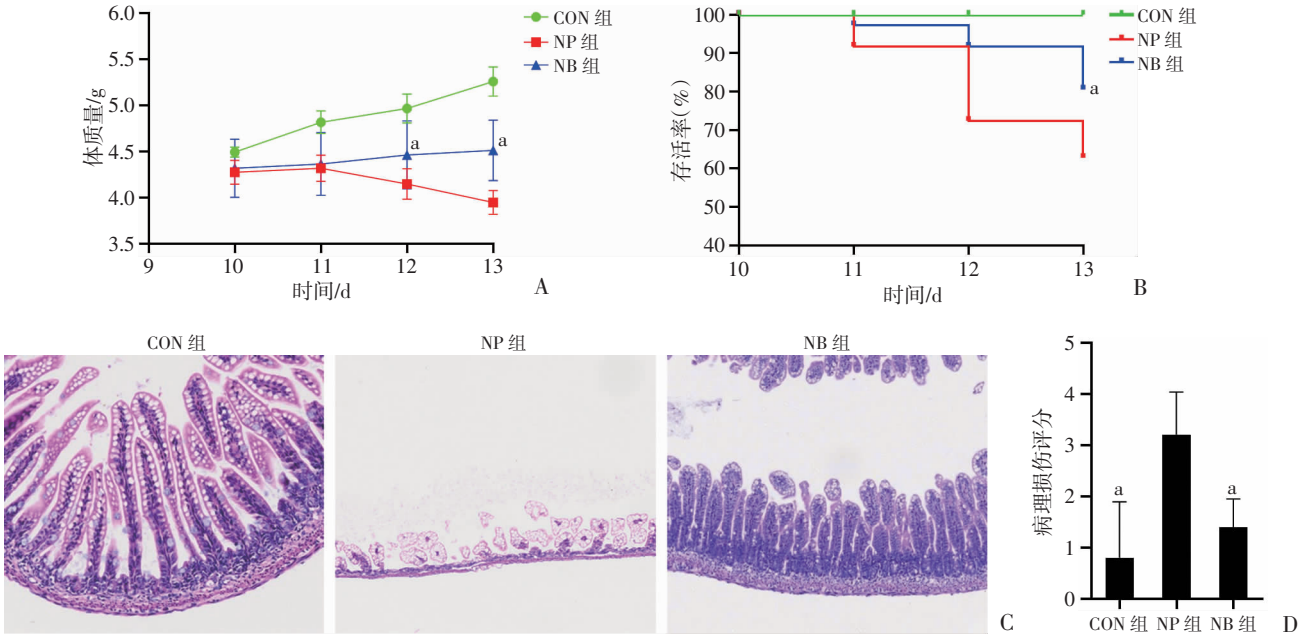
2　结果

2.1　NEC 小鼠模型的建立以及丁酸钠对 NEC 小鼠肠道损伤的影响

建模前 2 d(即生后第 10、11 天),NB 组与 NP 组小鼠体质量无统计学差异(图 1A),建模第 3 天和取材时(即生后第 12、13 天),NB 组体质量高于 NP 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。最终生存率 NP 组为 62.8%,NB 组为 80.6%,差异有统计学意义($P<0.05$,图 1B)。光学显微镜下观察,CON 组小鼠肠道组织绒毛结构清晰完整,上皮细胞排列整齐,肌层厚而连续;NP 组部分绒毛坏死、脱落,肌层变薄;NB 组绒毛结构相对完整,肌层较 NP 组增厚,见图 1C。病理损伤评分结果显示,与 CON 组比较,NP 组小鼠肠组织病理损伤评分显著升高($P<0.05$),丁酸钠干预后,NB 组病理损伤评分显著降低($P<0.05$),见图 1D。以上结果表明 NEC 模型建立成功,丁酸钠的干预可减轻 NEC 的肠道损伤。

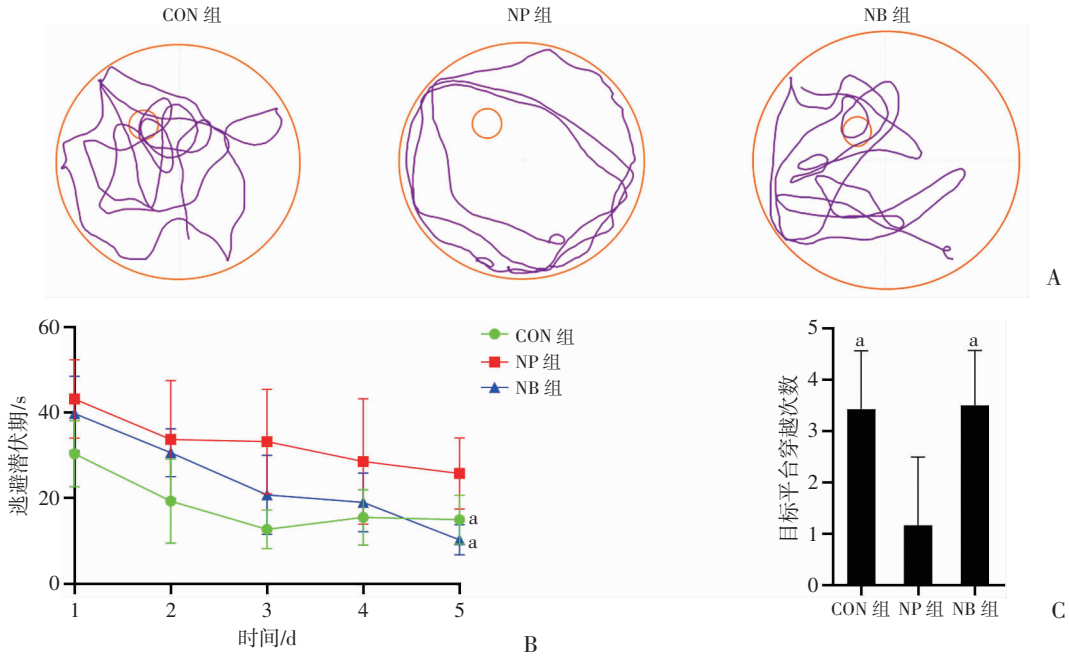
2.2　丁酸钠对 NEC 小鼠远期认知功能的影响

水迷宫实验结果显示,在定位航行实验的第 5 天,与 CON 组比较,NP 组逃避潜伏期延长($P<0.05$),丁酸钠干预后,NB 组逃避潜伏期缩短($P<0.05$);空间探索实验结果显示,与 CON 组比较,NP 组穿越目标平台次数减少($P<0.05$),丁酸钠干预后,NB 组穿越目标平台次数增加($P<0.05$),见图 2。表明 NEC 小鼠存在远期认知障碍,而丁酸钠的干预可改善这一现象。



A:各组小鼠建模期间体质量变化情况;B:各组小鼠生存率分析;C:光学显微镜观察各组小鼠肠组织病理改变(×100);D:各组小鼠病理损伤评分;a:$P<0.05$,与 NP 组比较

图 1　NEC 小鼠模型的建立与鉴定($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

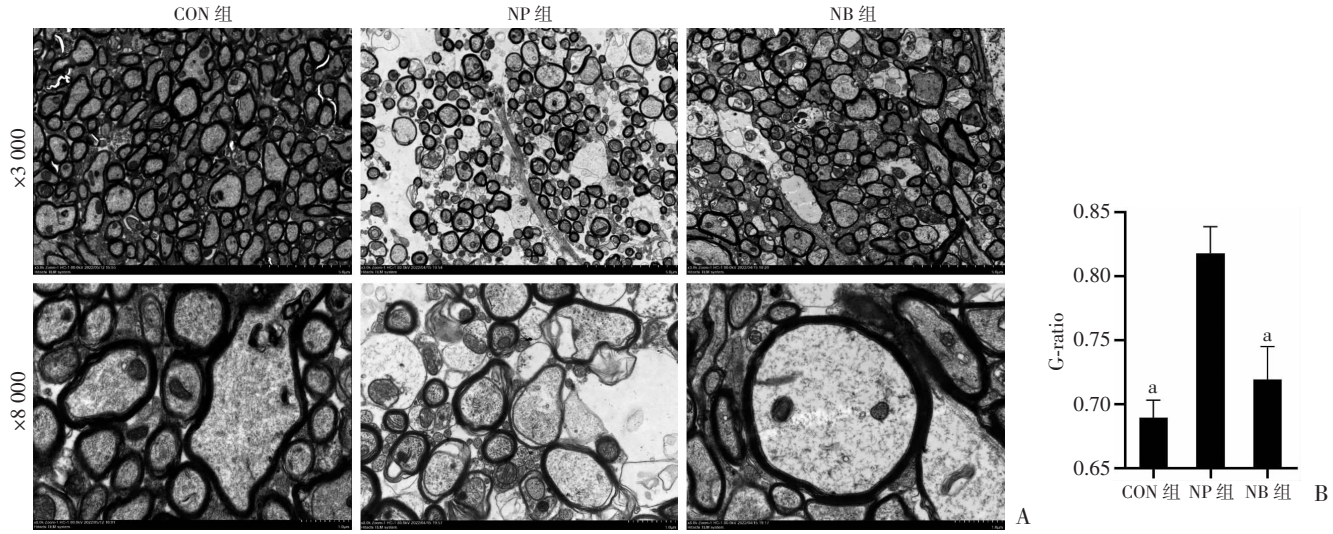


A:各组小鼠 Mirrors 水迷宫平台探索期轨迹图;B:各组小鼠训练期内逃避潜伏期比较;C:各组小鼠平台探索期内平台穿越次数比较;a:$P<0.05$,与 NP 组比较

图 2 水迷宫实验检测各组小鼠远期认知功能($\bar{x}\pm s$,$n=6\sim8$)

2.3 丁酸钠对 NEC 小鼠远期髓鞘发育的影响

为了评估丁酸钠对 NEC 小鼠远期髓鞘发育的影响,使用透射电镜观察 4 周龄时小鼠髓鞘的超微结构。CON 组髓鞘完好,均匀,边界清晰;NP 组髓鞘呈松散、分离和崩解的形态,有髓轴突数量减少;NB 组部分髓鞘局部分离,结构大致完整,有髓轴突数量较 NP 组有所增加,见图 3A。比较各组 G-ratio 比值,NP 组 G-ratio 升高($P<0.01$),说明髓鞘厚度降低,表明 NEC 小鼠远期存在髓鞘的发育障碍。丁酸钠干预后,NB 组的 G-ratio 降低($P<0.05$,图 3B)。说明髓鞘厚度增加,提示丁酸钠改善了 NEC 小鼠远期的髓鞘化障碍。

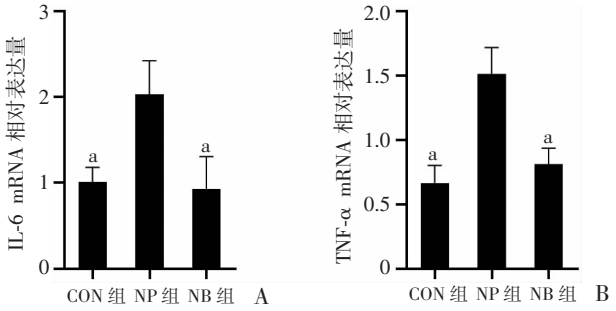


A:透射电镜检测各组小鼠髓鞘发育情况;B:各组小鼠 G-ratio 分析;a:$P<0.05$,与 NP 组比较

图 3 透射电镜检测各组小鼠远期髓鞘发育情况($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

2.4　丁酸钠对 NEC 小鼠脑组织中炎症因子表达的影响

RT-qPCR 检测结果显示:NP 组炎症因子 IL-6、TNF-α 较 CON 组表达升高(P <0.01);与 NP 组相比,NB 组 IL-6 和 TNF-α mRNA 表达水平明显降低(P<0.01,图 4),提示丁酸钠减轻了 NEC 脑组织中的神经炎症反应。



A:各组小鼠 IL-6 表达水平;B:各组小鼠 TNF-α 表达水平;a:P<0.05,与 NP 组比较

图 4　RT-qPCR 检测 13 d 龄各组小鼠脑组织炎症因子 IL-6、TNF-α 表达水平($\bar{x}\pm s$,n=6)

2.5　丁酸钠对 NEC 小鼠海马星形胶质细胞的影响

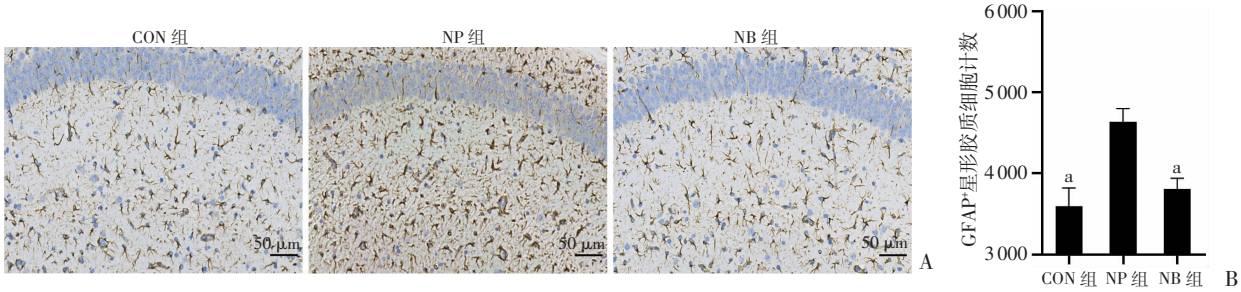
免疫组化检测各组 13 d 龄小鼠海马区星形胶质细胞的数量,结果显示:与 CON 组比较,NP 组小鼠海马区星形胶质细胞数量增多(P<0.05,图 5A)。丁酸钠干预后,抑制了海马区反应性星形胶质细胞增多,NB 组星形胶质细胞较 NP 组减少(P<0.05,图 5B)。

2.6　丁酸钠对 NEC 小鼠海马小胶质细胞的影响

免疫组化检测各组 13 日龄小鼠海马区处于活化状态的小胶质细胞的数量。如图 6A 所见,静息状态的小胶质细胞包含许多分支,几乎没有细胞质,而活化状态的小胶质细胞呈棒状,几乎没有分支。与 CON 组比较,NP 组小鼠海马区活化的小胶质细胞增多(P<0.05);丁酸钠干预后,抑制了小胶质细胞的活化,NB 组活化的小胶质细胞减少(P<0.05),见图 6B。

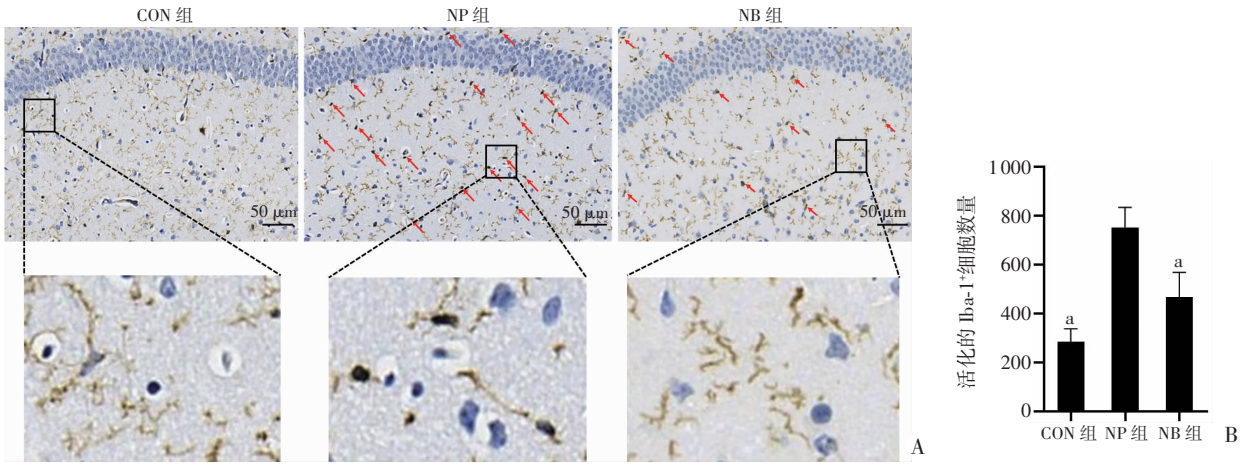
2.7　丁酸钠对 NEC 小鼠肠组织中 HMGB1 和脑组织中 TLR4、NF-κB 表达的影响

Western blot 结果显示,与 CON 组比较,NP 组肠组织中 HMGB1 和脑组织中 TLR4、NF-κB 蛋白表达均明显升高(P<0.05),与 NP 组比较,NB 组肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 的蛋白表达均明显降低(P<0.05),见图 7。说明丁酸钠抑制了肠道 HMGB1 的表达以及大脑中 TLR4、NF-κB 的表达。



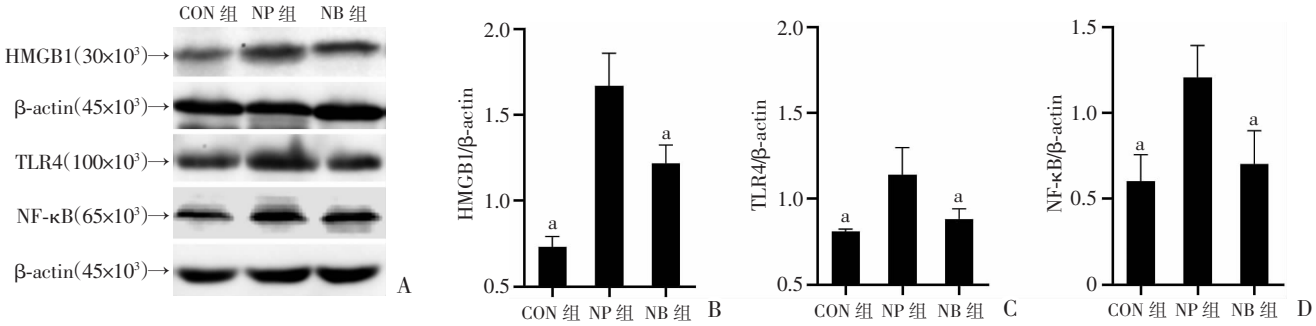
A:免疫组化检测各组小鼠海马区 GFAP 表达情况;B:各组小鼠星形胶质细胞计数　a:P<0.05,与 NP 组比较

图 5　免疫组化检测各组小鼠海马区的星形胶质细胞($\bar{x}\pm s$,n=3)



A:免疫组化检测各组小鼠海马区 Iba-1 表达情况　红色↑:活化的小胶质细胞;B:各组小鼠活化的小胶质细胞计数;a:P<0.05,与 NP 组比较

图 6　免疫组化检测各组小鼠海马区小胶质细胞活化情况($\bar{x}\pm s$,n=3)



A:各组小鼠肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 表达;B:肠组织 HMGB1 定量分析;C:脑组织 TLR4 定量分析;D:脑组织 NF-κB 定量分析;a:$P<0.05$,与 NP 组比较

图 7 Western blot 检测各组小鼠肠组织 HMGB1 和脑组织 TLR4、NF-κB 蛋白表达量($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

3 讨论

3.1 NEC 脑损伤模型的成功建立

神经认知障碍是 NEC 患儿常见的远期并发症,相比于未发生 NEC 的早产儿,患有 NEC 的早产儿远期发生神经认知损伤的风险更高,且程度可能与肠道损伤的严重程度有关[18-19],表明肠道损伤和 NEC 脑损伤之间存在联系。本研究采用人工喂养联合缺氧冷刺激建立 NEC 小鼠模型,结果显示 NP 组小鼠生存率降低,病理学观察结果示其绒毛结构破坏、坏死、脱落或消失,肌层变薄甚至断裂,表明成功建立了 NEC 小鼠模型。于 4 周龄时行水迷宫实验和透射电镜观察髓鞘结构,结果显示 NP 组小鼠逃避潜伏期延长,穿越目标平台次数减少;透射电镜观察到 NP 组髓鞘呈松散、分离和崩解的形态,髓鞘厚度降低,有髓轴突数量减少;表明本研究中的 NEC 脑损伤小鼠模型与临床上 NEC 相关的脑损伤具有相似性,包括髓鞘化障碍以及远期认知障碍[7]。

3.2 丁酸钠对 NEC 小鼠神经炎症反应的影响

研究表明,NEC 脑损伤与神经炎症的发生有关,NEC 小鼠脑内促炎细胞因子表达水平、活化的小胶质细胞和星形胶质细胞数量增多,且趋势与 NEC 肠道损伤的严重程度呈正相关[8]。在 NEC 新生猪的脑组织中,与神经炎症和缺氧相关的差异表达基因明显上调,活化的小胶质细胞增多[20]。炎症性疾病中,小胶质细胞和星形胶质细胞对进入脑内的外周炎症因子进一步反应并释放大量的氧自由基、炎症因子、谷氨酸等物质聚集在脑白质区域,造成髓鞘化障碍等脑白质的损伤,从而影响神经发育特别是远期认知功能[8,21]。这提示参与神经炎症的小胶质细胞和星形胶质细胞,是 NEC 相关脑损伤发生的重要环节。在 NEC 导致的远期认知损伤中,小胶质细胞活化也被认为是参与其中的重要环节[7]。丁酸钠是短链脂肪酸丁酸的钠盐形式,可在肠道内形成,已在不同的神经疾病模型中被证实具有抑制炎症的作用[22-23]。研究发现通过早期的丁酸钠干预,NEC 小鼠脑内星形胶质细胞和活化的小胶质细胞数量减少,脑组织炎症因子 IL-6、TNF-α 表达水平降低;丁酸钠还改善了 NEC 小鼠远期的髓鞘化障碍和认知功能损伤。在其他疾病模型的研究中,丁酸钠可改善缺血再灌注脑损伤以及阿尔茨海默病导致的认知功能障碍[24-25];在脱髓鞘疾病的动物模型中,丁酸钠还具有促进髓鞘再生的作用[13]。这与本研究的结果一致,支持了丁酸钠的神经功能保护作用,且其机制可能与减轻神经炎症有关。

3.3 丁酸钠保护 NEC 脑损伤的机制探讨

HMGB1 是一种重要的炎症递质和促炎细胞因子[26],在 NEC 的发病机制中,HMGB1 的表达增加可促进肠道炎症的发展[27]。此外,不仅仅局限于肠道,研究显示,HMGB1 作为 TLR4 的激动剂可促进大脑中小胶质细胞的活化,从而导致活性氧等有害介质的释放增多,引起了少突胶质细胞前体细胞减少和髓鞘丢失,最终导致了 NEC 相关的脑损伤[7],是引起 NEC 相关脑损伤的重要介质。丁酸钠已被证实在多种炎性疾病如急性肺损伤、急性胰腺炎和急性肝损伤中可通过减少 HMGB1 的释放来发挥抗炎活性[28-31]。先前的研究也表明,丁酸钠的干预可能通过抑制 TLR4-NF-κB 通路减少肠道 HMGB1 的分泌从而减轻 NEC 的肠道炎症[14]。NF-κB 是 TLR4 下游一种重要的核转录因子,能控制 DNA 转录和细胞因子合成,广泛存在于神经元及胶质细胞中,在炎症反应中起关键作用[32-33]。为了进一步明确丁酸钠减轻 NEC 小鼠神经炎症的作用机制,本研究检测了肠组织中 HMGB1 和脑组织中 TLR4、NF-κB 的蛋白表达水平,结果显示,丁酸钠干预后肠道释放的 HNGB1 和脑组织表达的 TLR4 和 NF-κB 蛋白

水平均明显降低。由此可见,丁酸钠可减少 NEC 肠道分泌 HMGB1,抑制大脑中 TLR4-NF-κB 通路的激活,从而抑制脑内小胶质细胞的活化和炎症因子的表达,减轻神经炎症,最终改善 NEC 远期髓鞘化障碍和认知功能损伤。

综上所述,本研究结果初步推断丁酸钠可能通过减少肠道分泌 HMGB1,抑制脑内 TLR4-NF-κB 通路减轻 NEC 小鼠神经炎症反应,从而发挥对 NEC 远期相关脑损伤的保护作用,但其更深入的保护机制还需进一步探索。

参考文献:

[1] NEU J, PAMMI M. Necrotizing enterocolitis: the intestinal microbiome, metabolome and inflammatory mediators[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2018, 23(6): 400-405. DOI: 10.1016/j.siny.2018.08.001.

[2] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3): 255-264. DOI: 10.1056/NEJMra1005408.

[3] STOLL B J, HANSEN N I, BELL E F, *et al*. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012[J]. JAMA, 2015, 314(10): 1039-1051. DOI: 10.1001/jama.2015.10244.

[4] REES C M, EATON S, PIERRO A. National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units[J]. J Pediatr Surg, 2010, 45(7): 1391-1397. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.12.002.

[5] ROBINSON J R, KENNEDY C, VAN ARENDONK K J, *et al*. Neurodevelopmental considerations in surgical necrotizing enterocolitis[J]. Semin Pediatr Surg, 2018, 27(1): 52-56. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2017.11.010.

[6] REES C M, PIERRO A, EATON S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007, 92(3): F193-F198. DOI: 10.1136/adc.2006.099929.

[7] 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.

[8] 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.

[9] QIN C, ZHOU L Q, MA X T, *et al*. Dual functions of microglia in ischemic stroke[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(5): 921-933. DOI: 10.1007/s12264-019-00388-3.

[10] DENG Y Y, XIE D, FANG M, *et al*. Astrocyte-derived proinflammatory cytokines induce hypomyelination in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87420. DOI: 10.1371/journal.pone.0087420.

[11] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, *et al*. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. Nature, 2013, 504(7480): 446-450. DOI: 10.1038/nature12721.

[12] PATNALA R, ARUMUGAM T V, GUPTA N, *et al*. HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 6391-6411. DOI: 10.1007/s12035-016-0149-z.

[13] CHEN T, NOTO D, HOSHINO Y, *et al*. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 165. DOI: 10.1186/s12974-019-1552-y.

[14] SUN Q, JI Y C, WANG Z L, *et al*. Sodium butyrate alleviates intestinal inflammation in mice with necrotizing enterocolitis[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 6259381. DOI: 10.1155/2021/6259381.

[15] 李秋平, 余加林, 胡坤, 等. 丁酸对新生儿坏死性小肠结肠炎新生小鼠模型的保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(3): 201-205. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.03.04.
LI Q P, YU J L, HU K, *et al*. Protective effect of sodium butyrate on the neonatal mouse model of necrotizing enterocolitis[J]. Med J Chin PLA, 2018, 43(3): 201-205. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.03.04.

[16] YU X Y, RADULESCU A, ZORKO N, *et al*. Heparin-binding EGF-like growth factor increases intestinal microvascular blood flow in necrotizing enterocolitis[J]. Gastroenterology, 2009, 137(1): 221-230. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.03.060.

[17] ZHU F, WANG L Y, GONG Z Z, *et al*. Blockage of NLRP3 inflammasome activation ameliorates acute inflammatory injury and long-term cognitive impairment induced by necrotizing enterocolitis in mice[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 66. DOI: 10.1186/s12974-021-02111-4.

[18] WADHAWAN R, OH W, HINTZ S R, *et al*. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants with spontaneous intestinal perforation or surgical necrotizing enterocolitis[J]. J Perinatol, 2014, 34(1):64-70. DOI: 10.1038/jp.2013.128.

[19] 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.

[20] 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.

[21] BACK S A. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms[J]. Acta Neuropathol, 2017, 134(3):331-349. DOI: 10.1007/s00401-017-1718-6.

[22] YAMAWAKI Y, YOSHIOKA N, NOZAKI K, *et al*. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice [J]. Brain Res, 2018, 1680: 13-38. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.12.004.

[23] HUUSKONEN J, SUURONEN T, NUUTINEN T, *et al*. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids[J]. Br J Pharmacol, 2004, 141(5): 874-880. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705682.

[24] LIU H, ZHANG J J, LI X, *et al*. Post-occlusion administration of sodium butyrate attenuates cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2015, 135: 53-59. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.05.012.

[25] SUN J, WANG F Y, LI H X, *et al*. Neuroprotective effect of sodium butyrate against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 395895. DOI: 10.1155/2015/395895.

[26] ANDERSSON U, YANG H, HARRIS H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(3): 263-277. DOI: 10.1080/14728222.2018.1439924.

[27] ZAMORA R, GRISHIN A, WONG C, *et al*. High-mobility group box 1 protein is an inflammatory mediator in necrotizing enterocolitis: protective effect of the macrophage deactivator semapimod[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(4): G643-G652. DOI: 10.1152/ajpgi.00067.2005.

[28] LIANG X, WANG R S, WANG F, *et al*. Sodium butyrate protects against severe burn-induced remote acute lung injury in rats[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68786. DOI: 10.1371/journal.pone.0068786.

[29] YANG F, WANG L K, LI X, *et al*. Sodium butyrate protects against toxin-induced acute liver failure in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(3): 309-315. DOI: 10.1016/s1499-3872(14)60044-8.

[30] ZHANG T, XIA M, ZHAN Q, *et al*. Sodium butyrate reduces organ injuries in mice with severe acute pancreatitis through inhibiting HMGB1 expression[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(7): 1991-1999. DOI: 10.1007/s10620-015-3586-z.

[31] LI N, LIU X X, HONG M, *et al*. Sodium butyrate alleviates LPS-induced acute lung injury in mice *via* inhibiting HMGB1 release[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 56: 242-248. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.01.017.

[32] SHI L M, LIN Q L, YANG T, *et al*. Oral administration of *Lentinus edodes* β-glucans ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice *via* MAPK-Elk-1 and MAPK-PPARγ pathways[J]. Food Funct, 2016, 7(11): 4614-4627. DOI: 10.1039/C6FO01043A. [LinkOut]

[33] LI C L, AI G X, WANG Y F, *et al*. Oxyberberine, a novel gut microbiota-mediated metabolite of berberine, possesses superior anti-colitis effect: impact on intestinal epithelial barrier, gut microbiota profile and TLR4-MyD88-NF-κB pathway[J]. Pharmacol Res, 2020, 152: 104603. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104603.

(收稿:2022-11-06;修回:2023-02-25)

(编辑 栾 嘉)