

· 论 著 ·

布拉氏酵母菌通过抑制 TLR-4/NF- κ B 炎症信号通路 预防新生鼠坏死性小肠结肠炎

王阳¹, 李艳丽¹, 洪倩¹, 王实¹, 王军²

1. 徐州医科大学附属淮海医院儿科, 江苏 徐州 221004;

2. 徐州医科大学附属医院儿科, 江苏 徐州 221006

摘要: **目的** 探讨布拉氏酵母菌预防新生鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的保护机制。**方法** 64 只新生小鼠随机分为 4 组, 每组 16 只, 正常对照组给予母乳喂养, 人工喂养组仅给予代乳品人工喂养, NEC 模型组通过人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激 + 脂多糖方法制备 NEC 模型, 布拉氏酵母菌干预组在 NEC 模型基础上加布拉氏酵母菌, $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每日灌胃 1 次, 连用 3 d。HE 染色、病理评分检测肠组织损伤程度; 气相色谱法检测结肠粪便中短链脂肪酸(SCFAs)含量; pH 计检测结肠粪便中 pH 值; 实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)法检测肠组织中 Toll 样受体 4(TLR-4)、核因子(NF)- κ B mRNA 表达水平; 蛋白质印迹法(Western blot)检测肠组织 TLR-4、NF- κ B 蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较, 人工喂养组体重稍下降, 病理评分略升高, 差异无统计学意义($P > 0.05$); NEC 模型组体重下降明显, 病理评分升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 布拉氏酵母菌干预组体重较 NEC 组上升, 病理评分降低($P < 0.05$), 各种指标接近于或稍好于人工喂养组。与正常对照组比较, NEC 模型组结肠粪便中乙酸、丁酸含量降低, pH 值增高($P < 0.05$); 与 NEC 模型组相比, 布拉氏酵母菌干预组结肠粪便中乙酸、丁酸含量增加($P < 0.05$), pH 值降低($P < 0.05$)。与正常对照组比较, NEC 模型组中 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 NEC 模型组相比, 布拉氏酵母菌干预组 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达水平均下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 布拉氏酵母菌可以保护新生鼠 NEC, 其作用可能与提高肠道中 SCFAs 的含量、降低肠道 pH 值, 最终抑制 TLR-4/NF- κ B 炎症有关。

关键词: 布拉氏酵母菌; 坏死性小肠结肠炎; 新生鼠; 短链脂肪酸; Toll 样受体 4; 核因子- κ B

中图分类号: R-33 R 722.19 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)08-1009-06

Prevention of *Saccharomyces boulardii* on neonatal mice with necrotizing enterocolitis by inhibiting TLR-4/NF- κ B inflammation signaling pathways

WANG Yang*, LI Yan-li, HONG Qian, WANG Shi, WANG Jun

* Department of Pediatrics, The Huaihai Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China

Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjunxuzhou@163.com

Abstract: Objective To investigate the protective mechanism of *Saccharomyces boulardii* in preventing necrotizing enterocolitis (NEC) in neonatal mice. **Methods** Sixty-four neonatal mice were randomly divided into 4 groups, 16 in each group. Breast feeding was given in normal control group. The artificial feeding of dairy substitute was performed in NEC model group. The artificial feeding + hypoxia-reoxygenation cold stimulation + lipopolysaccharide were used to prepare NEC model. On the basis of NEC model group, *Saccharomyces boulardii* ($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was fed once a day for 3 days in *Saccharomyces boulardii* intervention group. HE staining and pathological score were used to detect the degree of intestinal tissue damage; gas chromatography was used to detect the content of short-chain fatty acids (SCFAs) in colonic feces; pH meter was used to detect the pH value in colonic feces; real-time PCR was used to detect the expression of Toll-like receptor 4 (TLR-4) and nuclear factor(NF)- κ B mRNA in intestinal tissues; Western blot was used to detect the levels of TLR-4 and NF- κ B protein in intestinal tissues. **Results** Compared with the normal control group, the body weight decreased slightly, and the pathological score increased slightly in the artificial feeding group ($P > 0.05$), but the body weight decreased significantly, and the pathological score increased significantly in the NEC model group ($P < 0.05$). Compared

with the NEC model group, the body weight increased significantly, and the pathological score decreased significantly in the *Saccharomyces boulardii* intervention group ($P < 0.05$). The various indicators in the *Saccharomyces boulardii* intervention group were close to or slightly better than the artificial feeding group. Compared with the normal control group, the content of acetic acid and butyric acid in feces decreased significantly, and the pH value of feces increased significantly in the NEC model group ($P < 0.05$). Compared with the NEC model group, the content of acetic acid and butyric acid in feces increased significantly and the pH value of feces decreased significantly in the *Saccharomyces boulardii* intervention group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the expression levels of TLR-4 and NF- κ B mRNA and protein increased significantly in the NEC model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the NEC model group, the expression levels of TLR-4 and NF- κ B mRNA and protein decreased significantly in the *Saccharomyces boulardii* intervention group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** *Saccharomyces boulardii* can prevent necrotizing enteritis in neonatal mice, which may be related to increasing the content of SCFAs and decreasing pH in the intestine, and ultimately inhibiting TLR-4/NF- κ B inflammation.

Key words: *Saccharomyces boulardii*; Necrotizing enterocolitis; Neonatal mice; Short-chain fatty acids; Toll-like receptor 4; Nuclear factor- κ B

Fund program: Innovation Program of Nanjing Military Region (15MS042)

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是一种由多种因素导致的严重威胁患儿生命的新生儿阶段消化道疾病,严重影响新生儿存活率^[1]。由于导致发病的因素众多,临床上对 NEC 缺乏有效的诊治和预防手段,因此 NEC 的病死率很高^[2]。目前,国内外多采用口服益生菌制剂防治 NEC,主要是双歧杆菌与乳酸杆菌两种^[3]。

布拉氏酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*) 是目前唯一上市的真菌类微生态制剂。研究表明,布拉氏酵母菌在旅行者腹泻、抗生素引起的肠内失调等方面具有很好的疗效^[4-5]。早在 2003 年就已经有研究证实布拉氏酵母菌能改善幼鼠因缺血/缺氧所导致的肠坏死,但作用机制仍不明确^[6]。因此,布拉氏酵母菌对于肠道系统疾病的治疗有研究价值。短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 是肠道菌群的重要代谢产物,主要位于肠道菌群发酵结肠中,主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸等,多是由未被宿主消化吸收的碳水化合物和蛋白质而产生,其中乙酸、丙酸、丁酸所占比例高达 85%^[7]。有研究指出,SCFAs 不仅能调节肠道内环境的 pH 值,还具有调节炎症反应^[8]、抗肿瘤和调控基因表达等作用^[9]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR-4) 是一类模式识别受体,主要通过识别多种损伤相关分子并造成下游凋亡基因表达的改变,进而造成细胞恶变^[10]。TLR-4/核因子 (NF)- κ B 信号通路是重要的炎性通路之一,在许多疾病的发生过程中发挥重要作用。但是布拉氏酵母菌是否可以通过 SCFAs 抑制新生鼠肠内 TLR-4/NF- κ B 的炎症反应,减轻肠道组织损伤,最终降低 NEC 的发病率尚未明了。

因此,本研究利用新生小鼠建立 NEC 模型,并使

用布拉氏酵母菌进行干预治疗。通过检测其对小鼠结肠内 SCFAs 和 pH 值以及 TLR-4/NF- κ B 的相关表达,探讨布拉氏酵母菌可能发挥的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 新生当日龄小鼠,体重 1.4 ~ 1.6 g,雌雄不限。采用随机数字表法将小鼠分为 4 组:正常对照组 (给予母鼠喂养),人工喂养组 (代乳品人工喂养),NEC 模型组 (人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激 + 脂多糖方法制备 NEC 模型),布拉氏酵母菌干预组 (NEC 成模后给予布拉氏酵母菌干预),每组 16 只。所有实验动物均由徐州医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要仪器和试剂 1.9F 硅胶管 (B-D Inc, Sandy, U T, USA), 配方奶粉 (惠氏 S-26 金装爱儿乐低出生体重儿专用奶粉,惠氏公司), 布拉氏酵母菌 (亿活,法国百科达制药厂), 37 °C 恒温水浴箱 (上海医疗器械厂), 4 °C 冰箱 (德国西门子), 根据实验需要自制密闭缺氧箱及新生鼠保育箱。安捷伦 6890N 气相色谱仪 (美国安捷伦公司), Delta 320 型 pH 计 (瑞士 Mettler Toledo 公司), 脂多糖 (E. coli 055: B5, 美国 Sigma-Aldrich 公司), TLR-4 抗体 (sc-30002, Santa Cruz 公司), NF- κ B 抗体 (sc-109, Santa Cruz 公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (sc-25778, Santa Cruz 公司)。

1.3 处理方法

1.3.1 人工喂养^[11] 新生小鼠出生当日即单独置于新生鼠保育箱,使用代乳品进行喂养,代乳品参考 Auestand 等^[12] 报道配制 (表 1)。代乳品用无菌的 1.9F 硅胶管进行插管喂养,新生鼠每 4 h 喂 1 次。每

次进行喂养前,用生理盐水及 75% 医用酒精清洁新生鼠口腔及周围皮肤,喂养完毕后,新生鼠放回保育箱,同时硅胶管应立即清洗消毒并浸泡于 75% 医用酒精中消毒,以备下次使用。实验过程中每只硅胶管应专鼠专用,如出现操作失误导致硅胶管污染应及时更换硅胶管。首次喂养量为 0.1 ml,以后每 24 h 增加 0.1 ~ 0.3 ml。

表 1 人工喂养代乳品配方及与鼠乳主要成分的比较

成分	1L 代乳品	1L 鼠乳
糖(g)	28	26
蛋白质(g)	100	69 ~ 118
脂肪(g)	106	93 ~ 175
热量(kJ)	5817	5200 ~ 9300

1.3.2 缺氧复氧冷刺激 将测氧仪归零,测氧仪探头连接于密闭缺氧箱顶端缺口处,胶布封闭防止因外部气体进入导致实验出现偏差。密闭缺氧箱使用纯氮气,氮气流量为 15 L/min。密闭缺氧箱准备完成后,将 NEC 模型组和布拉氏酵母菌干预组新生鼠放入缺氧箱内,维持窒息时间为 90 s,随即将两组新生鼠置于 100% 氧气环境之氧仓中,保持 10 min,10 min 后立即置于 4 °C 冰箱中刺激 10 min。经过缺氧 + 复氧 + 冷刺激后新生鼠被送回保育箱中喂养,每日 3 次,连续 3 d。

1.3.3 脂多糖灌胃 脂多糖 10 mg/kg 稀释于 0.1 ml 灭菌水中,通过口腔插管对 NEC 模型组和布拉氏酵母菌干预组新生鼠进行灌胃,每日 1 次,连续 3 d。口腔插管针头为去芯留置针头。

1.3.4 布拉氏酵母菌干预 NEC 模型建立成功后布拉氏酵母菌干预组每天经口灌胃 1 次,布拉氏酵母菌含量为 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[13],灌胃结束后,新生鼠送回保育箱中喂养,连续 3 d。

1.4 标本采集 各组小鼠定时称量体重并记录。造模开始 72 h 后停止喂饲,颈椎脱臼法处死各组小鼠。切开腹腔,取各组回盲部及其远、近端肠管(共 5 cm)置入包埋盒进行石蜡包埋,用于病理学检查。取远端肠道 0.5 cm 置于中性甲醛固定液中固定。取回结肠内粪便,于滤纸上轻轻吸干表面液体,吸干后的粪便置于冻存管中,放入 -80 °C 冰箱,直至实验开始。所有标本采集均在冰上完成。

1.5 病理学检查与评分 取回盲部肠组织 1 ~ 2 cm,用 4% 的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,以 4 ~ 6 μm 厚进行组织切片,用苏木素-伊红(HE)染色后肠道组织病理评分参考 Nadler 标准^[14]进行双盲法评分,0 分:肠道绒毛及上皮完整,组织结构正常;1 分:轻微黏膜下或固有层肿胀分离;2 分:中度黏膜下和/

或固有层分离,黏膜下和/或肌层水肿;3 分:重度黏膜下和/或固有层分离,黏膜下和/或肌层水肿,局部绒毛脱落;4 分:肠绒毛消失伴肠坏死。病理评分 ≥ 2 分者视为 NEC 发病。

1.6 SCFAs 的测定 各组取 6 只实验鼠粪便,分别准确称取 0.1 g 粪便溶于 2 ml 纯净水。漩涡混匀后的液体采用 1 500 r/min 离心 5 min。然后将各组上清液转移于另一离心管中,实验过程中小心进行,避免将下部沉淀物带入。将上清液中加入 25% 的偏磷酸溶液,上清液与偏磷酸溶液体积比为 4:1,充分混匀,混匀后离心取上清液备用。取上述处理过的样品 5 μl 进行 SCFAs 含量测定。使用载气为氦气,流速为 1.19 ml/min,升温程序:起始温度 80 °C,持续 1 min,以 20 °C/min 升温至 190 °C,再以 40 °C/min 升温至 250 °C,保持 5 min,进样口温度 240 °C,柱温为 250 °C,运行时间 13 min。

1.7 pH 值的测定 前期粪便上清液的准备过程与测定 SCFAs 时一致。上清液 pH 值使用 Delta 320 型 pH 计测定。

1.8 Western blot 检测蛋白表达 将各组所提取组织置于冰上,加入 4 °C 预冷的细胞蛋白裂解液进行裂解。裂解完成后进行蛋白定量,蛋白定量采用 BCA 法(二喹啉甲酸法)。将已经配平的蛋白按照相同的蛋白含量加入到十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶中进行电泳,电泳完成后采用 NC 膜用恒流湿法进行转膜。将转膜成功的 NC 膜在 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭液中,37 °C 恒温摇床封闭 1 h。再将 NC 膜分别加入稀释的 TLR-4、NF- κ B 和 GADPH 一抗,4 °C 轻摇过夜;第二日,去除一抗后,Washing buffer 清洗 NC 膜 3 遍,每遍 5 min。加入相应的二抗(1:100 稀释),37 °C 恒温摇床孵育 1 h。Washing buffer 清洗 NC 膜 3 遍,每遍 5 min。将 NC 膜置于 NBT/BCIP 显色液中(现用现配),待蛋白条带达到要求后,倒掉显色液,加入 ddH₂O 终止显色,取出条带。蛋白的相对表达量用待测蛋白与 GADPH 的灰度值比值计算。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 表达 取 1 ~ 2 cm 结肠组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,后进行 RT-PCR 操作,各步操作严格按照说明书。引物设计:从网址 www.ncbi.nlm.nih.gov 的 GENBANK 中检索出小鼠基因 TLR-4 和 NF- κ B 基因 cDNA 序列,Primer 软件设计引物(表 2)。1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,Image J 凝胶摄像分析系统分析(以 β -actin 扩增片段为密度标准品对实验各组进行光密度扫描分析)。见表 2。

表 2 TLR-4、NF- κ B 及 β -actin 引物序列及相关参数

基因	序列	长度(bp)
TLR-4	5'-AGAATGAGGACTGGGTGA-3'	243
	5'-AGCGGCTACTCAGAAACT-3'	
NF- κ B	5'-GCAAACCTGGGAATACTTCATGTGACTAAG-3'	123
	5'-ATAGGCAAGGTCAGAAATGCACCAGAAGTCC-3'	
β -actin	5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'	190
	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及两两比较的 SNK- q 检验;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生鼠基本情况 正常对照组生长发育无异常,体重增长稳定。人工喂养组小鼠体重稍有下降,主动活动减少,对外界刺激反应稍减缓,粪便稍稀疏,出现轻度腹胀和胃存留。NEC 模型组体重下降明显,与正常对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),主动活动显著减少,对外界刺激反应减缓或者消失,同时伴有排黄绿色甚至黑色稀便等粪便性状发生改变,出现重度的腹胀和胃存留。布拉氏酵母菌干预后,实验鼠体重有所回升,但低于正常对照组,接近于人工喂养组。其他主观症状均有明显改观,各种指标接近于或稍好于人工喂养组实验鼠。见表 3。

2.2 肠道组织病理学改变 各组新生鼠回盲部病理切片见图 1。正常对照组肠道结构完好,组织结构清晰,上皮完整连续,腺体排列规则,绒毛高耸整齐,黏膜层、黏膜下层、固有层无充血水肿甚至断裂分离(图 1a);人工喂养组中回肠末端肠黏膜及黏膜下层可见轻度水肿充血,绒毛水肿,腺体结构紊乱,双盲法

病理学评分为 0~2 分(图 1b);NEC 模型组中肠道组织坏死严重,绒毛变性明显,变性水肿,部分绒毛坏死,脱落消失,腺体排列紊乱消失,肌层变薄甚至断裂,固有层与黏膜下层重度水肿,双盲法病理学评分为 2~3 分(图 1c);布拉氏酵母菌干预组中出现黏膜下层及固有层轻度水肿,部分血管扩张充血,肠壁绒毛参差不齐,部分肠管病变不十分明显(图 1d)。

2.3 布拉氏酵母菌对结肠粪便内 SCFAs 含量的影响 与正常对照组相比,NEC 模型组中乙酸、丁酸的含量下降($P < 0.05$);布拉氏酵母菌干预后乙酸、丁酸的含量增加($P < 0.05$),与人工喂养组相比无统计学差异($P > 0.05$)。见表 4。

2.4 布拉氏酵母菌对结肠粪便内 pH 值的影响 与正常对照组相比,人工喂养组、NEC 模型组中结肠粪便内 pH 值升高($P < 0.05$),经布拉氏酵母菌干预后,结肠粪便的 pH 值降低($P < 0.05$),接近于人工喂养组,但是数值比人工喂养组低。见表 5。

2.5 各组肠组织中 TLR-4 和 NF- κ B mRNA 表达 与正常对照组相比,人工喂养组 TLR-4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达水平上升,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常对照组相比,NEC 模型组中的 TLR-4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达水平上升($P < 0.01$)。经过布拉氏酵母菌干预后,布拉氏酵母菌干预组比 NEC 组的 TLR-4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。见图 2。

2.6 各组肠组织中 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达 与正常对照组相比,人工喂养组、NEC 组 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);布拉氏酵母菌干预组 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达水平较 NEC 模型组下降($P < 0.05$)。见表 6、图 3。

表 3 布拉氏酵母菌对新生小鼠体重变化的影响 ($n = 16, g, \bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
正常对照组	1.52 \pm 0.11	1.65 \pm 0.14	1.73 \pm 0.07	1.98 \pm 0.09
人工喂养组	1.50 \pm 0.13	1.58 \pm 0.08	1.63 \pm 0.12	1.71 \pm 0.13
NEC 模型组	1.51 \pm 0.18	1.48 \pm 0.07 ^a	1.31 \pm 0.06 ^a	1.22 \pm 0.15 ^a
布拉氏酵母菌干预组	1.52 \pm 0.16	1.56 \pm 0.12 ^b	1.62 \pm 0.09 ^b	1.81 \pm 0.12 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 NEC 模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 布拉氏酵母菌对结肠粪便 SCFAs 含量的影响

($n = 16, \text{mmol/g}, \bar{x} \pm s$)

组别	乙酸含量	丙酸含量	丁酸含量
正常对照组	1.16 \pm 0.15	0.25 \pm 0.07	0.72 \pm 0.11
人工喂养组	1.03 \pm 0.23	0.23 \pm 0.06	0.44 \pm 0.13
NEC 模型组	0.62 \pm 0.21 ^a	0.20 \pm 0.04	0.32 \pm 0.15 ^a
布拉氏酵母菌干预组	1.09 \pm 0.16 ^b	0.24 \pm 0.02	0.58 \pm 0.17 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 NEC 模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 5 布拉氏酵母菌对结肠粪便内 pH 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

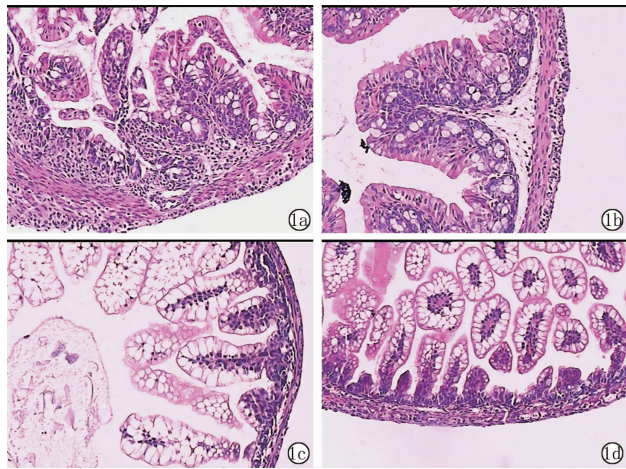
组别	鼠数(只)	pH 值
正常对照组	16	5.30 \pm 0.26
人工喂养组	16	5.57 \pm 0.38 ^a
NEC 模型组	15	5.87 \pm 0.31 ^a
布拉氏酵母菌干预组	16	5.47 \pm 0.15 ^b

注:NEC 模型组有 1 只小鼠因未取得足够样本,未测得数据;与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 NEC 模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 6 布拉氏酵母菌对肠组织中 TLR-4 和 NF-κB 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

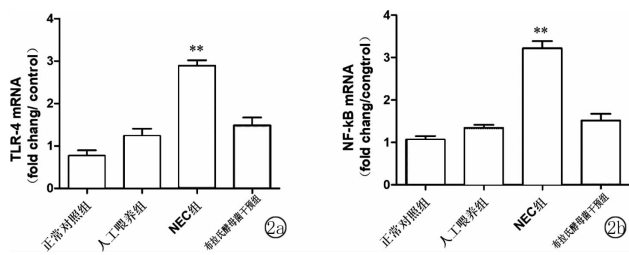
组别	只数	TLR-4/GAPDH	NF-κB/GAPDH
正常对照组	16	1.55 ± 0.25	0.83 ± 0.11
人工喂养组	16	1.78 ± 0.39 ^a	1.23 ± 0.27 ^a
NEC 模型组	14	2.99 ± 0.47 ^a	3.15 ± 0.38 ^a
布拉氏酵母菌干预组	15	2.01 ± 0.40 ^b	1.34 ± 0.27 ^b

注: NEC 模型组有 2 只小鼠因未取得足够样本, 未测得数据; 布拉氏酵母菌干预组有 1 只小鼠因未取得足够样本, 未测得数据。与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NEC 模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。



注: 1a: 正常对照组; 1b: 人工喂养组; 1c: NEC 模型组; 1d: 布拉氏酵母菌干预组。

图 1 各组新生鼠回盲部肠段病理切片 (HE 染色, ×400)



注: 2a: TLR-4 mRNA 相对表达量; 2b: NF-κB mRNA 相对表达量; 与其他三组比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 TLR-4 和 NF-κB RT-PCR 结果图

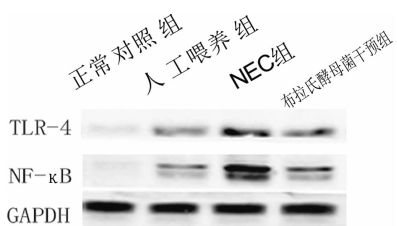


图 3 TLR-4 和 NF-κB 蛋白结果图

3 讨论

SCFAs 主要是由人体结肠中厌氧菌发酵未消化性碳水化合物的重要产物组成, 通过降低肠道内 pH 值提高肠道酸性环境而减少有害菌的生长, 维持水电解质平衡, 对肠道上皮细胞起到营养作用^[15]。有研究报道指出 SCFAs 能减少白介素 (IL)-6 蛋白释放。

SCFAs 种类繁多, 效能上同样存在差异, 其中丙酸和丁酸具有等效抗炎作用, 而乙酸作用较前两种小^[16]。早在 1994 年, Treem 等^[17] 研究发现人类炎症性肠病与肠道 SCFAs 产生减少密切相关。Kawamura 等^[18] 认为, SCFAs 在抑制结肠炎过程中发挥重要的作用。因此, 新生儿肠腔中不足量的 SCFAs 导致肠腔内 pH 值升高, 有害菌大量生成, 促进炎症因子的释放, 加重肠损害, 极大可能是 NEC 发病的机制。

TLR-4/NF-κB 炎症信号通路是目前研究炎症反应的热点。此通路包括 TLR、NF-κB 等多个环节, 从而诱发机体的一系列变异炎症反应。有文献指出在脂多糖诱导外周血单个核细胞中, SCFAs 中的丁酸和丙酸可能是通过抑制 TLR-4 及其下游信号髓分化因子 (MyD) 88 和 NF-κB 活性, 发挥抗炎作用^[19]。在本研究中, 与正常对照组作比较, NEC 组中的 TLR-4 和 NF-κB 的蛋白和 mRNA 水平均升高, 表明 TLR-4 及 NF-κB 参与了本病的发病机制。布拉氏酵母菌是迄今为止所发现的唯一一株具有生态调节作用的生理性真菌, 以其常温保存不受影响和其天然的抗生素耐药性的特点而被认为是治疗肠道系统疾病的优质选择^[20]。经布拉氏酵母菌预防治疗后的组别中, SCFAs 表达量上升, pH 值下降, TLR-4 及 NF-κB 的蛋白和 mRNA 水平均有所下降, 说明布拉氏酵母菌可通过提高肠道中 SCFAs 的含量, 抑制相关炎症反应保护新生鼠肠道系统。

目前报道的 NEC 动物模型较多, 但多是以人工喂养 + 缺氧复氧冷刺激 + 脂多糖来建立模型, 该模型成功率和重复性高, 简单易行。其临床症状, 结肠肉眼病变组织病理学改变均与人类新生儿 NEC 相似。本实验结果分析发现, 布拉氏酵母菌虽然能够有效预防治疗 NEC, 但是疗效并不能接近于正常对照组。分析其原因, 可能是由于人工喂养方式对肠道菌群的建立有一定的阻碍, 无法完全恢复到正常水平, 因此人工喂养仍然无法完全代替母乳喂养。

由此可推测, 布拉氏酵母菌对于治疗新生鼠 NEC 效果显著, 其机制可能与提高肠道中 SCFAs 的含量, 抑制炎症反应有关, 可为布拉氏酵母菌作为新生儿 NEC 治疗微生态制剂提供理论依据。

参考文献

- [1] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 477 - 483.
- [2] Aceti A, Gori D, Barone G, et al. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review and meta-analysis [J]. Ital J Pediatr, 2015, 41 (1) : 89.
- [3] AlFaleh K, Anabrees J, Bassler D. Probiotics reduce the risk of ne-

- crotizing enterocolitis in preterm infants: a meta-analysis[J]. *Neonatology*, 2010, 97(2): 93–99.
- [4] Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45 Suppl: S149–S153.
- [5] Can M, Besirbellioglu BA, Avci IY, et al. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic associated diarrhea: a prospective study[J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12(4): 119–122.
- [6] Akisu M, Baka M, Yalaz M, et al. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates Hypoxia/Reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2003, 13(5): 319–323.
- [7] McOrist AL, Abell GC, Cooke C, et al. Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans[J]. *Br J Nutr*, 2008, 100(1): 138–146.
- [8] 刘小华, 李舒梅, 熊跃玲. 短链脂肪酸对肠道功效及其机制的研究进展[J]. *肠外与肠内营养*, 2012, 19(1): 56–58.
- [9] Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils[J]. *J Nutr Biochemistry*, 2011, 22(9): 849–855.
- [10] Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(6): 571–578.
- [11] 李金纯, 韦红, 贾盛华, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎动物模型建立方法改进与比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(3): 313–317.
- [12] Auestand N, Korsak RA, Bergstrom JD, et al. Milk-substitutes comparable to rat's milk; their preparation, composition and impact on development and metabolism in the artificially reared rat [J]. *Br J Nutr*, 1989, 61(3): 495–518.
- [13] Aldemir M, K okoglu  F, Geyik MF, et al. Effects of octreotide acetate and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in an experimental intestinal loop obstruction model of rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2002, 198(1): 1–9.
- [14] Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis[J]. *J Surg Res*, 2000, 92(1): 71–77.
- [15] 刘松珍, 张雁, 张名位, 等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(11): 99–103.
- [16] Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease [J]. *WJG*, 2007, 13(20): 2826.
- [17] Treem WR, Ahsan N, Shoup M, et al. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994, 18(2): 159–164.
- [18] Kawamura T, Andoh A, Nishida A, et al. Inhibitory effects of short-chain fatty acids on matrix metalloproteinase secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(2): 238–245.
- [19] Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR41/GPR43 pathways [J]. *Nutrition*, 2010, 26(6): 653–661.
- [20] Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, et al. Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii* [J]. *Early Hum Dev*, 2003, 74(2): 89–96.

收稿日期: 2019-03-15 修回日期: 2019-04-02 编辑: 王国品