

• 论 著 •

miR-361-3p 对儿童肺炎炎性损伤的保护作用及机制研究

刘 莉¹, 张 军¹, 李晓波²

汉中市三二〇一医院:1. 检验科;2. 微免科, 陕西汉中 723000

摘 要:**目的** 探讨 miR-361-3p 在儿童肺炎炎性损伤中的保护作用及机制。**方法** 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 miR-361-3p 在肺炎患儿和健康儿童血清中的表达水平。采用脂多糖(LPS)刺激人胚肺成纤维细胞 WI-38 细胞,在体外建立 LPS 诱导的肺炎模型。在 WI-38 细胞体外肺炎模型中过表达或敲减 miR-361-3p,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 miR-361-3p 对促炎性因子水平的影响。在体外肺炎模型中共转染 miR-361-3p 和 MyD88,采用 qPCR 和 Western blot 检测 miR-361-3p 和 MyD88 的表达水平,ELISA 检测 MyD88 对促炎性因子水平的影响。**结果** 在肺炎患儿中,miR-361-3p 的相对表达水平(0.78 ± 0.33)显著低于健康儿童(1.53 ± 0.52),而在肺炎患儿中 MyD88 的相对表达水平(4.58 ± 0.82)显著高于健康儿童(1.96 ± 0.31),同时促炎性因子白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和 IL-1 β 水平的显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在体外肺炎模型中过表达 miR-361-3p 可以抑制促炎性因子的分泌,敲减 miR-361-3p 可促进促炎性因子的分泌。miR-361-3p 可通过结合 MyD88 的 3'端非翻译区(3'UTR)抑制 MyD88 的表达。在肺炎模型中过表达 MyD88 可以逆转 miR-361-3p 对炎性因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 分泌的促进作用。**结论** 在肺炎中,miR-361-3p 通过靶向调节 MyD88 的表达抑制促炎性因子的分泌,保护肺炎患者免受进一步的炎性损伤。

关键词: 儿童肺炎; miR-361-3p; MyD88; 促炎性因子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.020

中图法分类号: R446.9

文章编号: 1673-4130(2021)17-2135-06

文献标志码: A

Protective effect and mechanism of mir-361-3p on inflammatory injury in children with pneumonia

LIU Li¹, ZHANG Jun¹, LI Xiaobo²

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Microbiology and Immunization, Hanzhong 3201 hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China

Abstract:**Objective** To investigate the effect and mechanism of miR-361-3p on inflammatory injury of pneumonia in children. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR(qPCR) was used to detect the expression of miR-361-3p in serum of children with pneumonia and healthy children. Lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate WI-38 cells in vitro to establish a invitro pneumonia model. Overexpressed or knocked down miR-361-3p in the WI-38 cells, and the influence of miR-361-3p on the expression of pro-inflammatory factors was detected by ELISA. miR-361-3p and MyD88 were co-transfected into WI-38 cells, qPCR and Western blot were used to detect the expressions of miR-361-3p and MyD88, ELISA was used to measure the expression of pro-inflammatory factors. **Results** In children with pneumonia, relative expression level of miR-361-3p level(0.78 ± 0.33) was significantly lower than that of healthy children(1.53 ± 0.52), while in children with pneumonia, relative expression level of MyD88(4.58 ± 0.82) was significantly higher than that of healthy children (1.96 ± 0.31), accompanied by the significant increase of pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and IL-1 β , the difference were all statistically significant($P < 0.05$). Overexpression of miR-361-3p in pneumonia inhibited the secretion of pro-inflammatory cytokines, and decreased miR-361-3p expression promoted the secretion of pro-inflammatory cytokines. MiR-361-3p binding to the 3'UTR of MyD88 and inhibited the expression of MyD88. Overexpression of MyD88 in the pneumonia model could reverse the promotion effect of miR-361-3p on the secretion of inflammatory factors. **Conclusion** In pneumonia, miR-361-3p inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting MyD88, and protects patients with pneumonia from further

作者简介: 刘莉,女,主管技师,主要从事临床检验方面的研究。

本文引用格式: 刘莉,张军,李晓波. miR-361-3p 对儿童肺炎炎性损伤的保护作用及机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17): 2135-2140.

inflammatory damage.

Key words: children pneumonia; miR-361-3p; MyD88; pro-inflammatory factor

肺炎是一种常见的感染性疾病,在儿童中的发病率和病死率较高。2015 年,全世界大约有 70 万名 5 岁以下儿童死于肺炎^[1]。微小 RNA(miRNA)作为一种小型非编码 RNA,通过结合 3' 端非翻译区(3' UTR)调控其下游靶基因表达,参与细胞增殖、迁移、凋亡以及固有免疫、炎症和感染等过程^[2-3]。研究发现,大量 miRNA 在儿童肺炎的炎性损伤中发挥重要作用^[4-6]。肺部感染后,大量促炎性因子的产生可加重肺组织损伤^[7]。有研究表明,miR-361-3p 在克罗恩病中发挥重要作用^[8],但其在肺炎中的研究未见报道。本研究通过检测肺炎患儿血清中 miR-361-3p 表达,同时利用脂多糖(LPS)刺激人胚肺成纤维细胞 WI-38 构建肺炎损伤细胞模型,采用“敲减-回复”的研究策略探讨 miR-361-3p 对肺炎中促炎性细胞因子水平的影响,旨在为临床肺炎的治疗提供新的方向。

1 资料和方法

1.1 一般资料 将 20 例 3~5 岁的肺炎患儿(女性 10 例,男性 10 例)纳入研究,患儿均根据临床表现、呼吸道症状、细菌感染及胸部影像学检查确诊为肺炎,来自本院急诊科,在采血前未接受任何治疗。另外,选取同期在本院进行体检的性别、年龄匹配与纳入研究肺炎患儿相匹配的健康儿童作为对照。所有参与研究儿童的合法监护人均对本研究知情同意,并签署知情同意书;研究通过本院伦理委员会审查批准。

1.2 实验材料 人胚肺成纤维细胞 WI-38 购自中国典型培养物保藏中心(中国武汉);DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;LPS、MyD88 抗体和 GAPDH 抗体购自 Abcam 公司;逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR(qPCR)检测试剂盒购自 Bimake 公司;白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)-α 和 IL-1β 酶联

免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;Lipofectamine 3000 试剂购自 Invitrogen 公司;一抗稀释液、SDS 试剂盒、PBS 购自碧云天公司。miR-361-3p 模拟物、抑制物,pcDNA3.1-MyD88 质粒(oe-MyD88)及各自的阴性对照(NC)由上海 Gene Pharma 公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和转染 WI-38 细胞培养采用含 10%胎牛血清和 1%青霉素、链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养。采用转染 miR-361-3p 模拟物或抑制物提高或敲减 WI-38 细胞中 miR-361-3p 的表达,采用转染 oe-MyD88 在 WI-38 细胞中过表达 MyD88。具体方法如下:将对数期的 2×10⁵ 个 WI-38 细胞接种于 6 孔板内,24 h 后换新鲜培养基,将 50 nmol/L miR-361-3p 模拟物、100 nmol/L miR-361-3p 抑制物或 2~4 μg oe-MyD88 质粒加入 6 孔板内,同时加入 Lipofectamine 3000 试剂 4.5 μL,培养 48 h。细胞采用 5 μg/mL LPS 处理 72 h,构建体外肺炎细胞模型。miR-361-3p 模拟物序列为 5'-TTA TCA GAA TCT CCA GGG GTA C-3',miR-361-3p 抑制物序列为 5'-AAT GTC TTA GAG GAC CCC ATG-3'。

1.3.2 qPCR 检测 收集细胞,采用 Trizol 法提取总 mRNA,按 Bimake 逆转录试剂盒说明书进行操作,获取 cDNA。qPCR 反应体系的配制:SYBR Premix Ex Taq 5 μL,上、下游引物各 0.2 μL,cDNA 2 μL、ddH₂O 3.6 μL。反应条件:95 ℃ 20 s 预变性;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,共扩增 45 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
miR-361-3p	UCC CCC AGG UGU GAU UCU GAU UU	GCA AAT CAG AAT CAC ACC TG
MyD88	CTC CTC CAC ATC CTC CCT TC	GCT TGT GTC TCC AGT TGC C
U6	CT CGC TTC GGC AGC ACA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
GAPDH	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

1.3.3 ELISA 检测 采集肺炎组和对照组每位儿童的外周静脉血 2 mL,离心取血清作为检测标本;收集经 LPS 处理和未经 LPS 处理(作为对照)的 WI-38 细胞上清液作为检测标本。用相应的 ELISA 试剂盒检测标本中的 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平,均按试剂盒

操作说明进行操作,用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度,根据标准品得到线性校准曲线,进行均一化水平计算。

1.3.4 Western blot 检测 收集待测细胞,用 PBS 洗两遍,加细胞裂解液 80 μL 置冰上裂解 30 min,吸

取液体,离心收集蛋白,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测。取蛋白 30 μg 上样,进行 SDS-PAGE 电泳后转膜,用 5% 的脱脂牛奶 3 ℃ 封闭 1 h。MyD88 抗体作为一抗按 1 : 1 000 进行稀释,4 ℃ 孵育过夜。加 HRP 标记的二抗 37 ℃ 避光孵育 2 h,PBS-T 反复洗涤,加 ECL 试剂,采用化学发光仪检测目的蛋白。

1.3.5 荧光素酶报告基因试验 从美国国家生物信息中心(NCBI)数据库中下载人 MyD88-3'UTR 基因序列,采用 Primer5.0 软件进行引物设计。将含有 miR-361-3p 结合位点的 MyD88、3'UTR 野生型(WT)或突变型(MuT)片段插入 psiCHECK-2 载体中。取 2×10⁴ 个 WI-38 细胞接种于 24 孔板中,培养 24 h。转染前更换新鲜培养基,将脂质转染试剂 Lipofectamine 3000 与质粒及 miR-361-3p 模拟物溶液混合,共转染至 WI-38 细胞中。转染 24 h 后,用荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

1.4 统计学处理 实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Student's *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

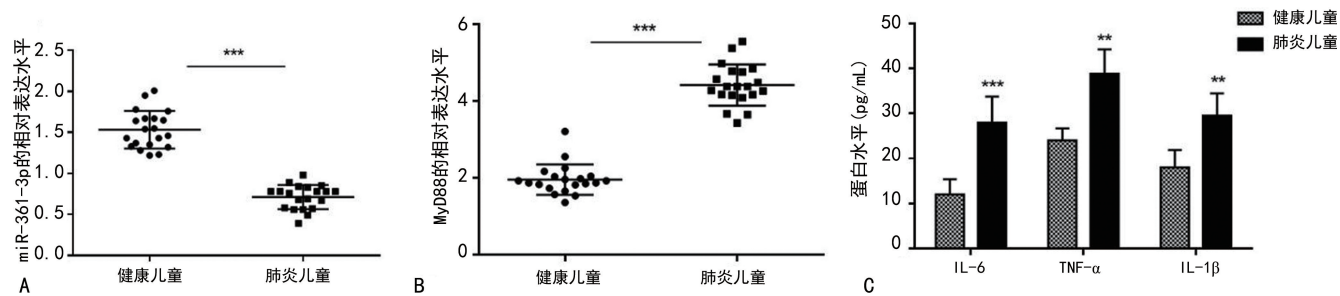
2.1 血清 miR-361-3p 和 MyD88 在肺炎患儿和健康儿童中的相对表达水平比较 与健康儿童比较,肺炎儿童血清 miR-361-3p 相对表达水平显著降低(*P* < 0.05),见图 1A;与健康儿童比较,肺炎儿童血清 MyD88 相对表达水平显著升高(*P* < 0.05),见图 1B;与健康儿童相比,肺炎儿童促炎性因子 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的水平均显著升高(*P* < 0.05),见图 1C。

2.2 miR-361-3p 减轻肺炎炎症性损伤的体外模型研究 建立了 LPS 诱导的体外肺炎模型。在 LPS 损伤的 WI-38 细胞中,miR-361-3p 表达水平比对照细胞显著降低(*P* < 0.05),见图 2A。随后,采用 miR-361-3p 模拟物和 miR-361-3p 抑制物转染 WI-38 细胞,用 LPS 处理后检测 miR-361-3p 的表达,结果显示 miR-361-

3p 模拟物能显著提高 miR-361-3p 表达,miR-361-3p 抑制物显著降低了 miR-361-3p 的表达(*P* < 0.05),见图 2B。ELISA 结果显示,miR-361-3p 模拟物降低了 LPS 损伤的 WI-38 细胞炎症因子 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的水平(*P* < 0.05),见图 2C~2E。miR-361-3p 抑制物提高了 LPS 损伤的 WI-38 细胞炎症因子 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的水平(*P* < 0.05)。

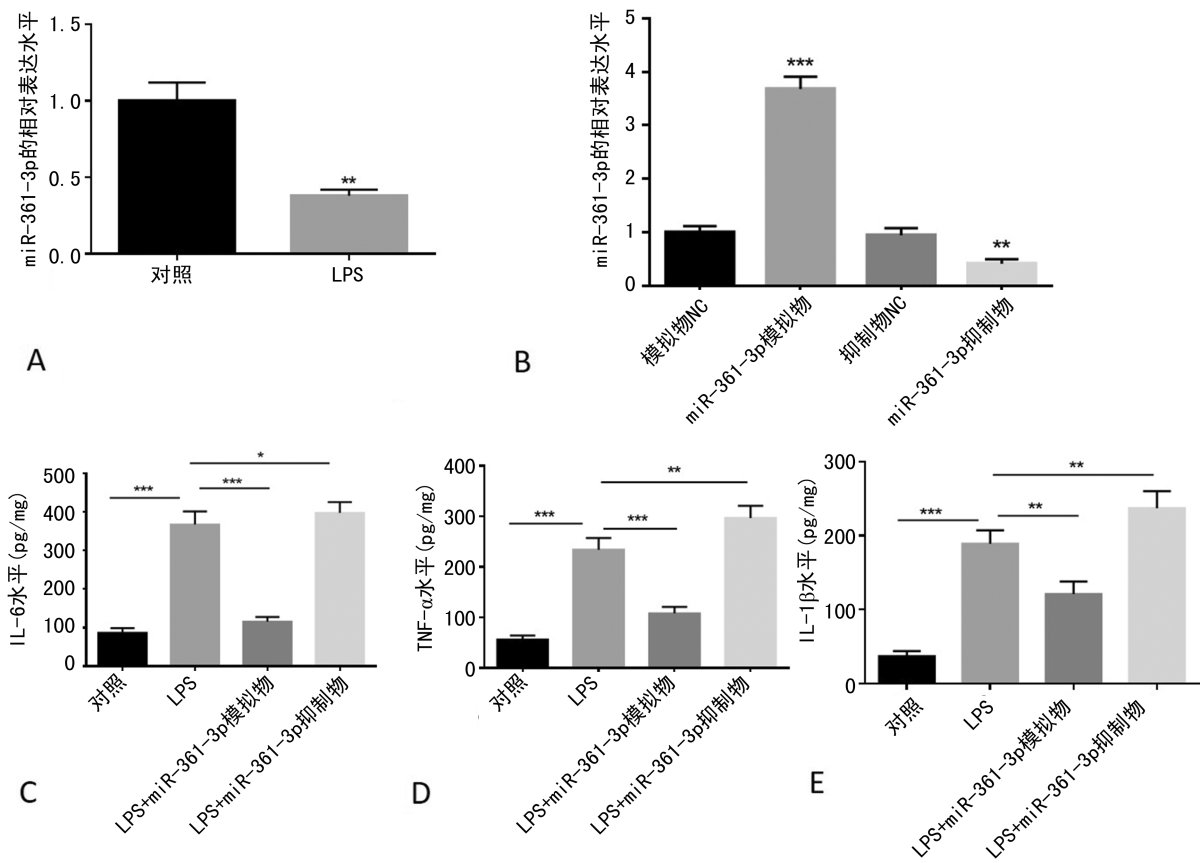
2.3 miR-361-3p 下调 MyD88 的表达 为了探究 miR-361-3p 调控儿童肺炎炎症性损伤的分子机制,本课题组采用 TargetScan Human 预测到 MyD88 为 miR-361-3p 的下游靶基因。MyD88 基因的 3'UTR 与 miR-361-3p 序列互补(图 3A)。采用荧光素酶报告基因实验进一步确认 MyD88 是否为 miR-361-3p 的直接靶基因。结果显示,在 psiCHECK-2-MyD88-野生型中,miR-361-3p 模拟物显著降低了荧光素酶的相对活性,而在 psiCHECK-2-MyD88-突变型无明显变化(图 3B),表明 MyD88 是 miR-361-3p 的直接靶基因。此外,本课题组检测了经 LPS 处理的 WI-38 细胞中 miR-361-3p 和 MyD88 表达的关系。qPCR 和 Western Blot 结果显示,miR-361-3p 上调抑制 MyD88 mRNA 和蛋白的表达(图 3C~3E)。

2.4 MyD88 在体外逆转 miR-361-3p 在肺炎炎症性损伤中的保护作用 为了研究 MyD88 在 miR-361-3p 调控的儿童肺炎炎症性损伤中的作用,本课题组检测了 MyD88 在经 LPS 处理的 WI-38 细胞中的表达,结果显示相较于未经处理的对照组细胞,LPS 损伤的 WI-38 细胞中 MyD88 表达水平更高(*P* < 0.05,图 4A)。在 WI-38 细胞中过表达 MyD88,MyD88 的表达水平明显增加(*P* < 0.05,图 4B)。在过表达 miR-361-3p 的 WI-38 细胞中增加 MyD88 的表达,促炎性因子表达明显升高(*P* < 0.05,图 4C~4E)。表明 MyD88 能在体外逆转 miR-361-3p 在肺炎炎症性损伤中的保护作用。



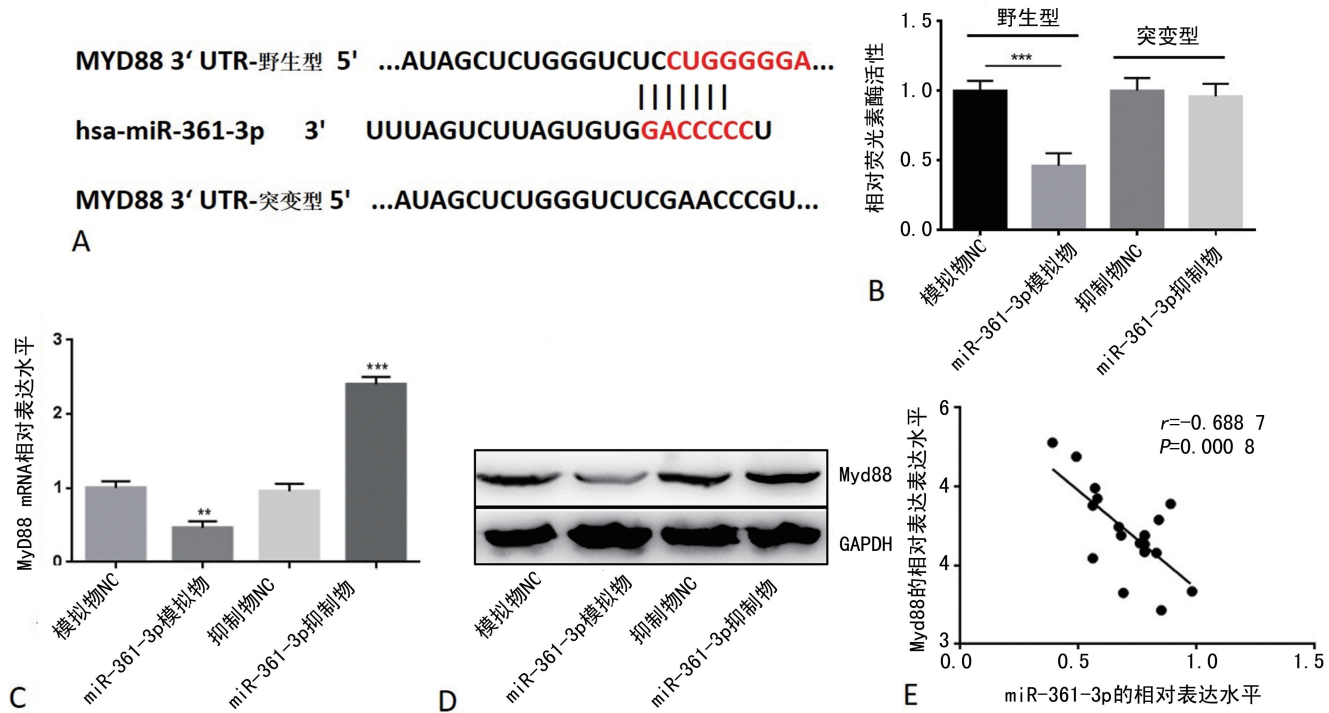
注:A为qPCR检测肺炎儿童和健康儿童血清miR-361-3p的相对表达水平;B为qPCR检测肺炎儿童和健康儿童血清MyD88的相对表达水平;C为ELISA检测肺炎儿童和健康儿童血清中IL-6、TNF-α和IL-1β的水平;与健康儿童比较,***P* < 0.01,****P* < 0.001。

图1 miR-361-3p和MyD88在健康儿童和肺炎儿童血清中的表达情况



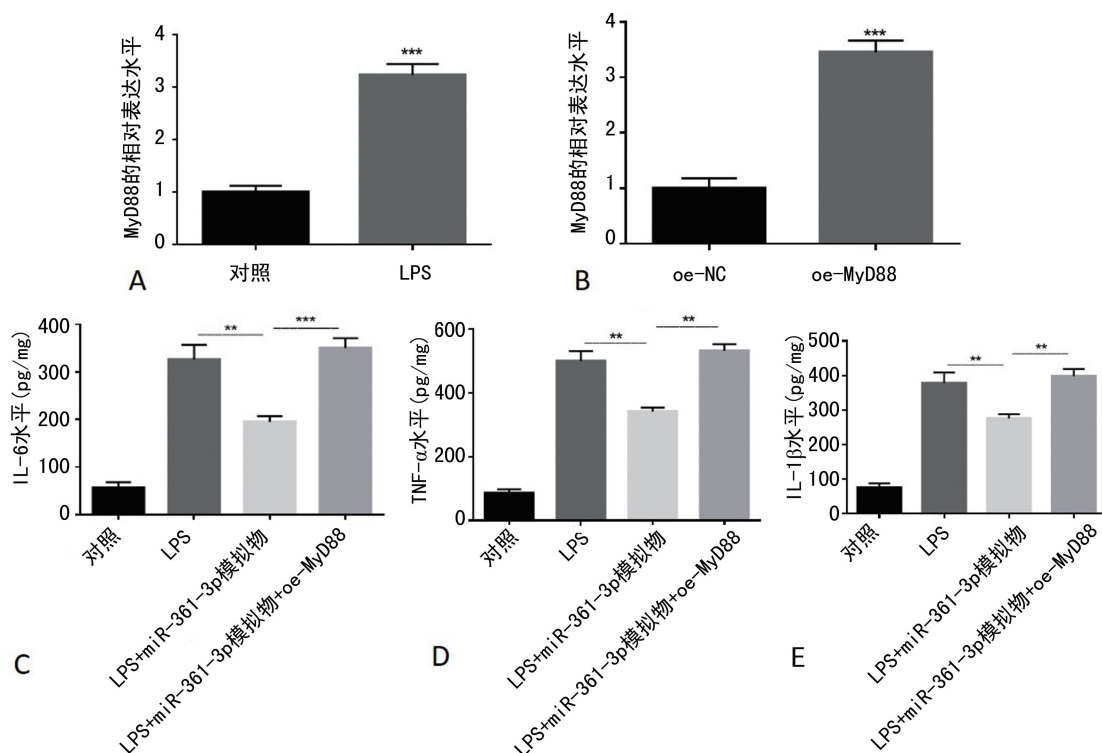
注:A表示LPS诱导的体外肺炎模型中miR-361-3p表达水平的变化;B表示转染miR-361-3p模拟物或抑制物对WI-38细胞miR-361-3p表达水平的影响;C~E分别表示转染miR-361-3p模拟物或抑制物对LPS诱导的体外肺炎模型细胞IL-6、TNF-α、IL-1β表达水平的影响;*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图2 miR-361-3p能在体外肺炎模型中减轻炎症损伤



注:A表示miR-361-3p与MyD88的预测结合位点;B表示psiCHECK-2载体处理后,转染野生型或突变型miR-361-3p模拟物WI-38细胞的相对荧光素酶活性检测;C、D分别表示转染miR-361-3p模拟物或抑制物对LPS诱导的体外肺炎模型细胞MyD88的mRNA和蛋白表达水平的影响;E为肺炎患儿血清中miR-361-3p与MyD88表达的相关性($n=20$);*表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$ 。

图3 miR-361-3p下调MyD88的表达



注:A表示LPS诱导的体外肺炎模型中MyD88相对表达水平的变化;B为WI-38细胞转染oe-MyD88后对MyD88相对表达水平的影响;C~E分别为miR-361-3p模拟物转染或联合oe-MyD88转染WI-38细胞对LPS诱导的体外肺炎模型中IL-6、TNF- α 和IL-1 β 表达水平的影响; *表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$ 。

图4 MyD88在体外逆转miR-361-3p对儿童肺炎的炎症损伤作用

3 讨论

肺炎是指由微生物及理化因素等造成的终末气道、肺泡及肺间质的炎症。最常见的为革兰阴性条件致病菌导致的肺炎^[9]。儿童肺炎的发病率较高,且可引起多种严重并发症,影响儿童的发育,甚至导致死亡^[10]。促炎性因子如IL-6、IL-1 β 和TNF- α 等的异常表达被认为是导致肺炎加重及发生并发症的主要因素,抑制促炎性因子的表达,可以减轻肺组织的损伤^[11]。

有研究发现,miRNA在肺炎中发挥重要作用,miR-141在LPS诱导的WI-38成纤维细胞的炎症损伤中发挥保护作用^[4]。此外,miR-1247通过靶向趋化因子CC配体抑制LPS诱导的A549细胞急性损伤^[12]。而miR-194和miR-20a对儿童肺炎炎症损伤有促进作用。有研究报道,miR-361-3p是一种肿瘤调节因子,同时与多种其他疾病如强直性关节炎和麻风有关^[8,13-15]。然而,miR-361-3p在肺部炎症中的表达情况尚不清楚,miR-361-3p在肺部炎症中的异常表达是否与炎症损伤相关尚鲜见报道。本研究发现肺炎儿童血清中miR-361-3p呈显著低表达,且miR-361-3p与促炎性因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 表达水平呈负相关。为了进一步探究miR-361-3p与肺炎的关系,本课题组采用LPS刺激WI-38细胞建立体外肺炎模型,结果显示,经LPS刺激后,WI-38细胞中miR-361-3p表达水平降低。而在WI-38细胞中过表达

miR-361-3p后,再采用LPS刺激,促炎性因子的表达水平明显下降,而降低miR-361-3p的表达,促炎性因子表达水平增加。这表明miR-361-3p在肺炎患儿中通过抑制促炎性因子的表达而发挥保护作用。

MyD88是Toll样受体(TLR)信号通路的关键连接分子,在疾病发生发展中发挥重要作用。MyD88被证实参与炎症肺损伤,包括肺炎。有学者发现MyD88促进了通气性肺损伤和炎症^[16]。同时,SONEGO等^[17]发现MyD88参与了铜绿假单胞菌诱导的肺部感染。本研究中,本课题组发现MyD88表达与miR-361-3p负相关,并参与了miR-361-3p介导的WI-38细胞炎症反应过程。此外,本课题组发现MyD88是miR-361-3p的直接靶点。在WI-38细胞中过表达MyD88可增加促炎性因子的表达。结果提示,miR-361-3p通过调控MyD88在WI-38细胞的炎症损伤中起保护作用。

综上所述,本研究发现增加miR-361-3p的表达在儿童肺炎的炎症损伤中具有保护作用。进一步探究miR-361-3p减轻LPS诱导的WI-38细胞炎症损伤的机制,可能为儿科肺炎的治疗提供新的治疗靶点。

参考文献

[1] GBD 2015 LRI Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2015 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17 (11): 1133-1161.
- [2] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-445.
 - [3] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
 - [4] QUAN B, ZHANG H, XUE R. MiR-141 alleviates LPS-induced inflammation injury in WI-38 fibroblasts by up-regulation of NOX2[J]. *Life Sci*, 2019, 216: 271-278.
 - [5] ZHANG L, DONG L, TANG Y, et al. MiR-146b protects against the inflammation injury in pediatric pneumonia through MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Infect Dis*, 2020, 52(1): 23-32.
 - [6] 彭官清, 乔凌, 余舒莹. miRNA-155 对重症肺炎大鼠肺组织的保护作用及机制[J]. *重庆医学*, 2019, 48(17): 2890-2894.
 - [7] DING C, VAN'T VEER C, ROELOFS J J T H, et al. Limited role of kininogen in the host response during Gram-negative pneumonia-derived sepsis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(3): 397-405.
 - [8] GUO Z, WU R, GONG J, et al. Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(1): 109-116.
 - [9] 蕊卿, 向晴可, 非肖, 等. 肺炎克雷伯菌黏附素 FimH 蛋白通过 TLR4/NF- κ B 途径诱导巨噬细胞分泌炎症因子[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(3): 208-212.
 - [10] LEYENAAR J, LAGU T, SHIEH M. Management and outcomes of pneumonia among children with complex chronic conditions[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(9): 907-911.
 - [11] 萍吴, 何文龙, 云付, 等. 秦皮甙对重症肺炎大鼠炎症因子表达及相关通路活化的影响[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(4): 292-298.
 - [12] GUO J, CHENG Y. MicroRNA-1247 inhibits lipopolysaccharides-induced acute pneumonia in A549 cells via targeting CC chemokine ligand 16[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(1): 60-68.
 - [13] FOGEL O, TINGGAARD AB, FAGNY M, et al. Deregulation of microRNA expression in monocytes and CD4⁺ T lymphocytes from patients with axial spondyloarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 51-56.
 - [14] SOARES C T, TROMBONE A P F, FACHIN L R V. Differential expression of microRNAs in leprosy skin lesions[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1035-1041.
 - [15] HUA B, LI Y, YANG X, et al. MicroRNA-361-3p promotes human breast cancer cell viability by inhibiting the E2F1/P73 signalling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109994.
 - [16] WANG X, LUO B, LU Y. The triggering receptor expressed by myeloid cells-1 activates TLR4-MyD88-NF kappa B-dependent signaling to aggravate ventilation-induced lung inflammation and injury in mice[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 374(1): 137-148.
 - [17] SONEGO F, CASTANHEIRA F V S, HORTA C V. The host control of a clinical isolate strain of *P. aeruginosa* infection is independent of Nod-1 but depends on MyD88[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(5): 435-443.

(收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-05-28)

(上接第 2134 页)

- [10] 邹善叶. 新生儿坏死性小肠结肠炎后继发过敏性疾病相关因素分析[D]. 重庆医科大学, 2019.
- [11] BEN X M. Nutritional management of newborn infants: practical guidelines[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(40): 6133-6139.
- [12] MEISTER A L, BURKHOLDER C R, DOHENY K K, et al. Ghrelin ameliorates the phenotype of newborn rats induced with mild necrotizing enterocolitis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(11): e13682.
- [13] MILLER S M, ZHOU A, WORHUNSKY D, et al. Term neonate with necrotizing enterocolitis and prothrombin mutation[J]. *J Clin Neonatol*, 2019, 8(3): 180-182.
- [14] MEISTER A L, DOHENY K K, TRAVAGLI R A. Necrotizing enterocolitis attenuates developmental heart rate variability increases in newborn rats[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(3): e13484.
- [15] ZHANG D, WEN J, ZHOU J, et al. Milk Fat Globule membrane ameliorates necrotizing enterocolitis in neonatal rats and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory response in IEC-6 enterocytes[J]. *JPN J Parenter Enteral Nutr*, 2019, 43(7): 863-873.
- [16] YU R, JIANG S, TAO Y, et al. Inhibition of HMGB1 improves necrotizing enterocolitis by inhibiting NLRP3 via TLR4 and NF- κ B signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13431-13438.
- [17] SILVER J, ZIEJEWSKI M. North American Brain Injury Society's 13th annual conference on brain injury[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2017, 32(6): 65-103.
- [18] PELL L G, LOUTET M G, ROTH D E, et al. Arguments against routine administration of probiotics for NEC prevention[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2019, 31(2): 195-201.
- [19] SANDRA Y M, GRAY K, ALBERT N L, et al. Clinical aspects and management of children in otorhinolaryngological consultation: case of university clinics of Lubumbashi (DR Congo) [J]. *Open Access Lib J*, 2019, 6(9): 1-11.

(收稿日期: 2020-12-20 修回日期: 2021-05-08)