

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003878

丁酸对小鼠坏死性小肠结肠炎中髓源性抑制细胞的作用

彭映秋,王青,贺雨,艾青,史源

(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/
儿童感染与免疫罕见病重庆市重点实验室,重庆 400014)

【摘要】目的:探究丁酸干预对新生小鼠坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)中髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的影响。**方法:**7日龄C57BL/6小鼠随机分成对照组(CON组)、NEC+PBS建模组(NP组)、NEC+丁酸钠灌胃组(NB组),CON组由母乳喂养,NP与NB组采用人工喂养与缺氧冷刺激联合的方式建立新生鼠NEC模型,NB组在此基础上灌胃丁酸钠,连续4d。建模完成后分析各组小鼠存活率、体质量变化曲线、肠组织病理损伤情况、ELISA检测肠组织炎症因子、流式细胞术以CD11b/Ly6C/Ly6G为标志物分析MDSCs分群与比例、Western blot检测S100A9蛋白水平。使用MDSCs清除抗体与大鼠同型对照抗体后采用NEC+丁酸的方式建模,即NEC+Butyrate+anti-DR5组(NBA组)与NEC+Butyrate+Isotype组(NBI组),进行流式细胞术检测MDSCs变化情况、ELISA检测肠组织炎症因子、16s rRNA测序对各组菌群进行分析。**结果:**与CON组相比,丁酸减轻NEC小鼠肠道炎症,降低NEC小鼠PMN-MDSC比例($P=0.001$),降低NEC小鼠中S100A9的表达,NBA组处理后NEC小鼠肠道病理损伤评分降低($P=0.006$),NBA组肠组织肿瘤坏死因子表达降低($P=0.002$),白细胞介素-10表达升高($P<0.001$),并且可以改善肠道菌群的组成以及基于ASV水平的 α -多样性情况。**结论:**丁酸能够降低NEC小鼠中PMN-MDSC的比例,但在NEC中发挥作用不依赖于MDSCs。

【关键词】坏死性小肠结肠炎;丁酸钠;髓源性抑制细胞;肠道菌群**【中图分类号】**R72**【文献标志码】**A

Effect of butyrate on myeloid-derived suppressor cells in mice with necrotizing enterocolitis

Peng Yingqiu, Wang Qing, He Yu, Ai Qing, Shi Yuan

(Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Rare Diseases in Infection and Immunity)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of butyrate intervention on myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in neonatal mice with necrotizing enterocolitis (NEC). **Methods:** C57BL/6 mice, aged 7 days, were randomly divided into control group (CON group), NEC+PBS model group (NP group), and NEC+sodium butyrate group (NB group). The mice in the CON group were fed by female mice, and those in the NP and NB groups were given formula feeding combined with hypoxia and cold stimulation to establish a neonatal mouse model of NEC; in addition, the mice in the NB group were given sodium butyrate by gavage. After modeling, the above groups were analyzed in terms of survival rate, body weight change curve, and intestinal tissue injury; ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors in intestinal tissue; flow cytometry was used to analyze the grouping and proportion of MDSCs with CD11b/Ly6C/Ly6G as markers; Western blot was used to measure the protein level of S100A9. After the application of an antibody for clearing MDSCs and rat isotype control antibody, the method of NEC+sodium butyrate was used for modeling, i.e., NEC+sodium butyrate+anti-DR5 group (NBA group) and NEC+sodium butyrate+isotype group (NBI group); flow cytometry was used to measure the changes in MDSCs, ELISA was used to measure inflammatory factors in intestinal tissue, and 16s rRNA sequencing was used to analyze the microbiota of each group. **Results:** Compared with the CON group, sodium butyrate alleviated intestinal inflammation and reduced the proportion of PMN-MDSC in NEC mice ($P=0.001$) and the expression of S100A9, and after treatment, the NBA group had significant reductions in intestinal pathological injury score ($P=0.006$) and the expression of tumor necrosis factor in intestinal tissue ($P=0.002$) and a significant increase in the expression of interleukin-10 ($P<0.001$), with improvements in the composition of intestinal microbiota and the α -diversity profile based on ASV levels. **Conclusion:** Sodium butyrate can reduce the proportion of PMN-MDSC in NEC mice, and its role in NEC does not depend on MDSCs.

作者介绍:彭映秋,Email:3010349265@qq.com,

研究方向:新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制的研究。

通信作者:史源,Email:petshi530@163.com。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250606.0827.002

(2025-06-06)

【Key words】 necrotizing enterocolitis; sodium butyrate; myeloid-derived suppressor cell; intestinal microbiota

新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis of newborn, NEC)是新生儿时期尤其是早产儿时期最严重的胃肠道疾病之一^[1-3]。随着医疗技术的发展,全球早产儿存活率升高,在2010年至2020年间已占新生儿出生率的10%左右,在中国,根据Chen C等^[4]的统计结果,2015年至2016年间早产儿的发生率在6.7%~7.3%。与此一致,NEC的发病率也逐渐升高^[5-6],在体质量<1 500 g的极低出生体质量儿中发病率可达7%^[7]。在高发病率的情况下,NEC的预后不容乐观,短肠综合征、生长迟缓、神经发育障碍等^[5,6,8-10]都是NEC严重的并发症,部分患儿也可能因此而死亡^[9,11],这些不良预后结果引起了研究人员对NEC的高度重视。对于NEC的研究离不开病因的探寻,然而,现在关于NEC的关键发病机制尚不十分清楚,目前认为引起NEC的因素多样,肠道微生物定植失调是十分重要的一项因素^[7,12-14],菌群失调可破坏稳态下的微生物信号传导,引发一系列相关炎症反应及上皮屏障损伤反应。

丁酸(Butyrate)作为一种短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA),是肠道微生物参与食物分解所产生的代谢物,具有促进肠道蠕动、维持肠道上皮细胞间紧密连接的完整性等作用^[15-17],可以通过直接或间接调节肠道巨噬细胞的功能^[18]、影响中性粒细胞的趋化募集^[19]以及T细胞的分化^[20-22]来影响肠道的免疫功能,因此在维持肠道稳态中具有重要的生物学作用。李秋平^[23]已经证实丁酸对NEC具有抗炎、促肠道稳态恢复的作用,但关于丁酸干预对NEC中髓源性抑制细胞的影响尚未见报道。

肠道微环境的稳态与肠道免疫细胞息息相关,NEC的发生发展伴随着免疫细胞的失衡,其中髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的参与是非常重要的一环^[24]。MDSCs是来源于骨髓的一群免疫抑制细胞,具有强大的免疫抑制活性,与许多病理状态的调节相关。MDSCs主要分为类粒细胞或多形核细胞(PMN-MDSC)和单核细胞(M-MDSC),顾名思义,PMN-MDSC在表型和形态学上与中性粒细胞相似,而M-MDSC更类似于单核细胞^[25]。两者在免疫机制上是相似的,但是有部分细微的差别:精氨酸酶-1和前列腺素E2优先由PMN-MDSC产生,而一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)由M-MDSC产生^[26]。He YM等^[27]的研究表明了MDSCs在新生儿时期具有重要的免疫学功能以及MDSCs可抑制新生小鼠NEC的发生,揭示了MDSC在NEC临床免疫治疗中的潜在的重要应用价值。

基于丁酸与MDSCs在肠道稳态中均发挥重要的作用,本研究通过建立NEC模型来观察丁酸干预对NEC中MDSCs的影响以及两者的协同作用对于NEC炎症的影响,从而为丁酸调节NEC炎症的作用机制提供更深刻的理解。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用7日龄C57BL/6新生小鼠均购于重庆医科大学动物实验中心。本研究已得到本中心伦理审查委员会的批准(批准号:CHCMU-IACUC20220629012)。

1.2 主要试剂

Similac配方奶(Abbott Laboratories公司,美国);Esbilac Puppy Milk Replacer Powder(Pet-Ag公司,美国);丁酸钠(上海生物工程股份有限公司,中国);抗DR5抗体(Bioxcell公司,美国);APC-Cy7™7 Rat Anti-Mouse CD45(BD Biosciences, 美国);BV421 Rat Anti-CD11b(BD Biosciences, 美国);PE-Cy7 Rat Anti-Mouse Ly-6C(BD Biosciences, 美国);FITC Rat anti-Mouse Ly-6G(BD Biosciences, 美国);Live/dead(BD Biosciences, 美国);Mouse IL-6 ELISA试剂盒(中国四正柏);Mouse IL-10 ELISA试剂盒(中国四正柏);Mouse TNF- α ELISA试剂盒(中国四正柏);4%多聚甲醛(武汉赛维尔生物技术有限公司,中国);BCA蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天);RIPA裂解液(中国碧云天);S100a9 Rabbit pAb(武汉爱博泰克,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与NEC模型建立 7日龄C57BL/6小鼠随机分成3组:CONTROL组(CON组,与母鼠共同饲养)、NEC+PBS灌胃组(NP组)、NEC+丁酸钠灌胃组(NB组)。丁酸钠配置成150 mmol/L, pH 7.62^[23]。C57BL/6小鼠饲养于自制保育箱内,NP组喂食配方奶(2 g Esbilac与3.33g Similac奶粉加入10 mL温水中搅拌均匀),NB组喂食配方奶+丁酸钠,每日喂食5次,间隔4 h 1次。NP组和NB组的小鼠每日进行2次缺氧(99.99%氮气,90 s)和冷刺激(4 °C, 10 min),持续4 d。对照组小鼠由正常母鼠喂奶且不进行缺氧冷刺激。在第4天造模结束后间隔12 h后断头处死小鼠,留取肠道组织标本。

1.3.2 肠道组织病理取材与切片染色 建模结束后的小鼠进行断头处理,暴露腹腔,轻柔钝性分离肠管,肉眼观察肠管内有无充气、坏死、出血等情况。取小鼠回盲部1~2 cm肠组织,用4%多聚甲醛固定,脱水后石蜡包埋,进行厚度为4 μ m的切片,烘干后二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,苏木精-伊红染色后中性树脂封片。按照Yu XY等^[28]的评分标准,采用双盲法进行评分,分数 ≥ 2 分即认定为NEC。

1.3.3 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 冻存的肠组织按重量加入适量组织裂解液(20 mg肠组织加入150~250 μ L组织裂解液)后进行研磨匀

浆,静置 20~30 min 后离心取上清(4 °C, 12 000 r/min),上清液用 BCA 试剂盒测量后调整蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作后用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度后绘制标准曲线并计算公式,按照公式计算炎症因子水平。

1.3.4 流式细胞术 肠组织冰 PBS 清洗,放入含有 L-DTT(1 mmol/L)、L-EDTA(1 mmol/L)与 FBS 的 D-Hanks 液,150 r/min,30 min 冰上孵育去除上皮细胞,清洗后剪成 1 cm² 大小碎片放入含有胶原酶(1 mg/mL)、DNase I (5 U/mL)与 FBS(10%)消化液中 37 °C,100 r/min,30 min 消化,过细胞筛后细胞悬液 1 000 g,10 min 离心去上清,清洗 2 次后重悬细胞。细胞悬液用 CD45、CD11b、Ly6C、Ly6G 和 Live/dead 进行染色后上机检测。

1.3.5 MDSCs 清除 根据 He YM 等^[27]的方案在 NEC 建模初始前 1 h 与开始后 36 h 分别按照 40 μg/g 腹腔注射抗 DR5 抗体,大鼠 IgG 同种型作为对照,其余同 NB 组建模方式进行灌胃缺氧及冷刺激。

1.3.6 粪便收集与菌群测定 断头处死小鼠暴露腹腔,取完整肠组织,以 1 mL 无菌注射器吸取 1 mL 灭菌 ddH₂O 反复冲洗肠腔 5~8 次,冲洗液收集至 1.5 mL 无菌离心管,以液氮速冻后送上海美吉生物公司进行肠道菌群测定。

1.4 统计学方法

使用 FlowJo 进行流式细胞术分析,使用 GraphPad Prism 8.0.2 分析所有数据并进行差异性分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析或双因素方差分析确定显著性。非正态分布计量资料采用中位数(四分位间距)[$M_d(P_{25}, P_{75})$]来描述,并通过 Kruskal-Wallis 检验来确定差异。计数资料采用构成比或者率表示,采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

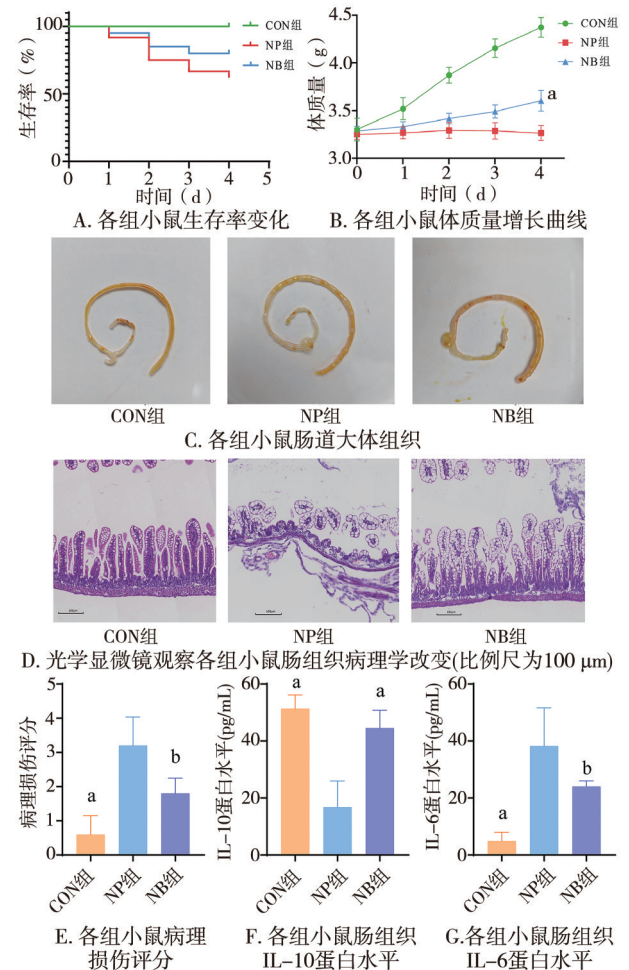
2 结果

2.1 丁酸干预可以改善 NEC 小鼠的生存状况与肠道组织病理损伤

经过 4 d NEC 建模,NP 组小鼠的生存率(62.5%)明显低于 CON 组小鼠(100%),NB 组生存率(83.3%)处于两者之间,较 NP 组的生存率差异有统计学意义($P=0.030 2, n=24$,图 1A)。NEC 是新生儿时期疾病,体质量增长是新生儿的关注指标,NB 组较 NP 组体质量增长改善,差异有统计学意义($P<0.0001, n=7$,图 1B)。观察肠道组织大体样本 CON 组肠段规整,未见明显肠胀气,NP 组肠腔胀气明显,NB 组肠腔胀气较 NP 组好转,但未达到 CON 组水平(图 1C)。与大体样本观察结果一致,肠道组织 HE 染色后可见 CON 组肠腔肠绒毛生长良好整齐,上皮细胞连续完整,肠壁肌层厚而连续,NP 组肠腔绒毛紊乱断裂,上皮细胞完整性连续性破坏,细胞脱落丢失,肠壁肌层明显变薄,NB 组肠腔情况好转,较 CON 组仍有肌层变薄,绒毛充气的现象(图 1D)。对肠组织进行病理学评分,可见 NP 组显著高于 CON 组,NB 组评分有所降低,但仍高于 CON 组(图 1E),此 3 组病理学评分差异具有统计学意义。

对 CON 组、NP 组、NB 组肠组织进行 ELISA 检测炎症因子水平,可见 NP 组白细胞介素-6(interleukin6, IL-6)水平较 CON 组明显升高,白细胞介素-10(interleukin10, IL-10)水平较 CON 组降低,NB 组较 NP 组 IL-6 水平下降,IL-10 水平升高,但仍未达 CON 组水平(图 1F、G),提示丁酸对 NEC 炎症的改善作用。

丁酸对肠道的稳态维持十分重要,在肠道发挥着抗炎作用。综上,丁酸在 NEC 中能够明显提升 NEC 小鼠的生存状况,减轻 NEC 小鼠的肠道损伤,降低 NEC 小鼠的肠道炎症水平。



注:a,与 NP 组相比较, $P<0.01, n=4-7$;b,与 NP 组相比较, $P<0.05, n=5$

图 1 丁酸减轻 NEC 肠损伤

2.2 丁酸对 NEC 小鼠中 MDSCs 的影响

除了炎症因子的分泌外,炎症反应还必然伴随着各种免疫细胞的代偿性调节,其中包括髓源性抑制细胞 MDSCs。因此,本课题组以 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} 标记 PMN-MDSC, CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} 标记 M-MDSC,以这两种标记策略对 NEC 小鼠肠组织 MDSCs 进行了流式细胞术分析。流式细胞术分析显示,PMN-MDSC 与 M-MDSC 分群较为明显,NP 组小鼠肠组织中 MDSCs 的比例较 CON 组明显升高,而 NB 组小鼠的百分比降低,降低主要见于 PMN-MDSC 分群(图 2A)。流式细胞术进行分群比例统计,NB 组 PMN-MDSC 占总细胞数目的比例明显降低,M-MDSC 无明显改变(图 2B)。研究

显示 PMN-MDSCs 受 S100A9 的调控^[27], Western blot 检测 3 组的 S100A9 比例, 结果显示相较于 NP 组, 丁酸干预后小鼠肠组织中 S100A9 的水平显著降低 (图 2C)。以上结果说明 NEC 小鼠中免疫细胞 MDSCs 在炎症情况下会增加, 丁酸干预后则出现减少, 并且主要体现在 PMN-MDSC 的减少上, 这一趋势与 S100A9 的变化一致。

2.3 MDSCs 清除后丁酸对 NEC 的作用

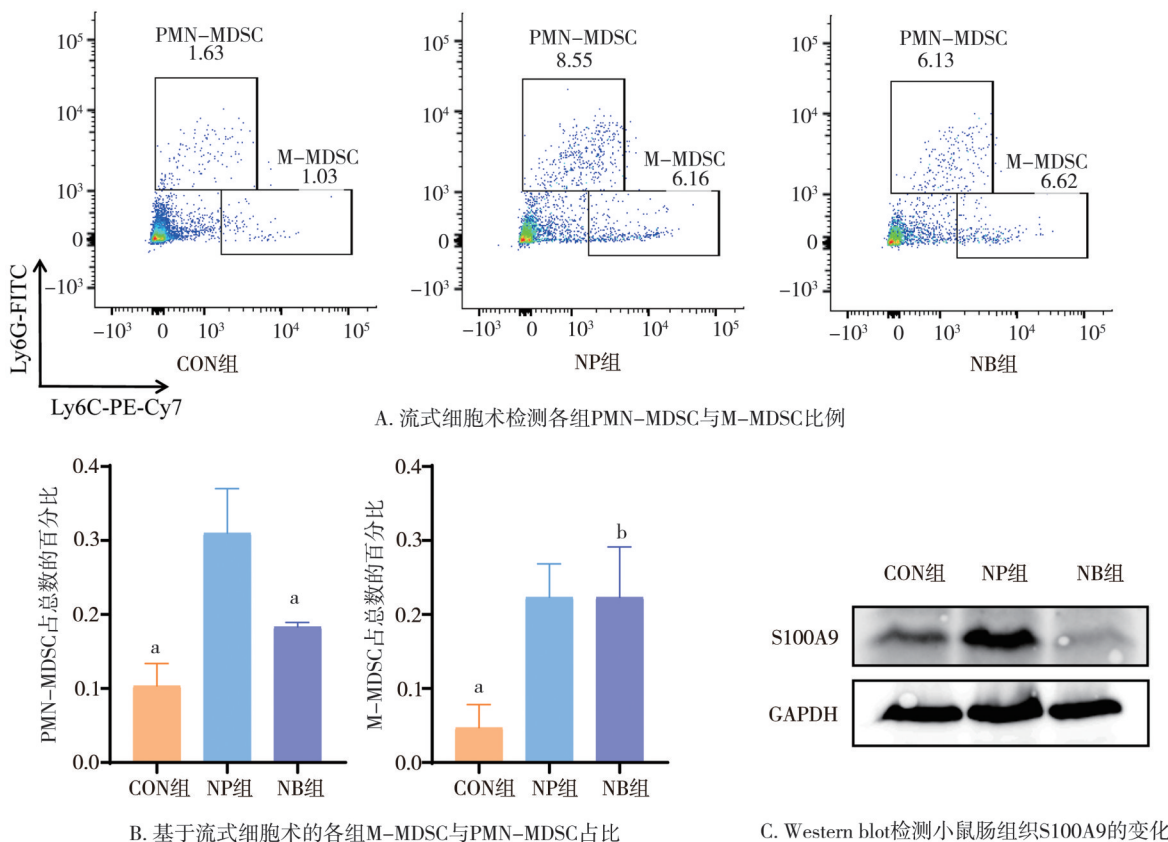
内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER 应激) 的激活是小鼠和人类 MDSCs 的共同特征, ER 应激通路的激活诱导 MDSC 上 DR5 (一种 TRAIL 受体) 的上调, 靶向该分子迅速诱导 MDSC 细胞凋亡^[29]。为了进一步确定丁酸在 NEC 中影响 MDSCs 的作用, 本研究使用 MDSCs 清除抗体 Anti-DR5 与同型对照抗体 Rat IgG Isotype 对 NEC 建模小鼠进行干预, 同时 2 组均使用丁酸灌胃, 即 NBA 组与 NBI 组, 建模模式图见图 3A。建模结束后取小鼠肠组织进行流式细胞术检测 MDSCs 改变, 可见 NBI 组 PMN-MDSC 比例下降, 流式细胞术改变趋势与 2.2 中的结果一致 (图 3B-D), 而 NBA 组 PMN-MDSC 与 M-MDSC 比例均降低, 这表明丁酸对 NEC 的保护作用可能不依赖于 MDSCs。小鼠肠道组织 HE 切片显示相比 NP 组, NBI 组与 NBA 组肠绒毛完整, 上皮细胞脱落明显减少, 肠壁肌层增厚连续性增强, 肠组织损伤减轻 (图 3E), 病理学评分 NBI 与 NBA 组较 NP 组降低, 但 NBI 与 NBA 组间无区别 (图 3F)。ELISA 检测肠组织炎症因子水平, 相较 NP

组, NBI 与 NBA 组 IL-10 水平升高, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平降低, 2 组间水平无差异, 提示 NBA 与 NBI 在减轻肠道炎症的作用无明显差别 (图 3G, H)。

结合图 2、3, 丁酸可以降低 NEC 中 MDSCs 的比例, 且主要降低 PMN-MDSC 比例, MDSCs 清除后丁酸对 NEC 小鼠肠道损伤的抑制作用未见明显减弱, 提示丁酸对 NEC 的保护作用不依赖于 MDSCs。

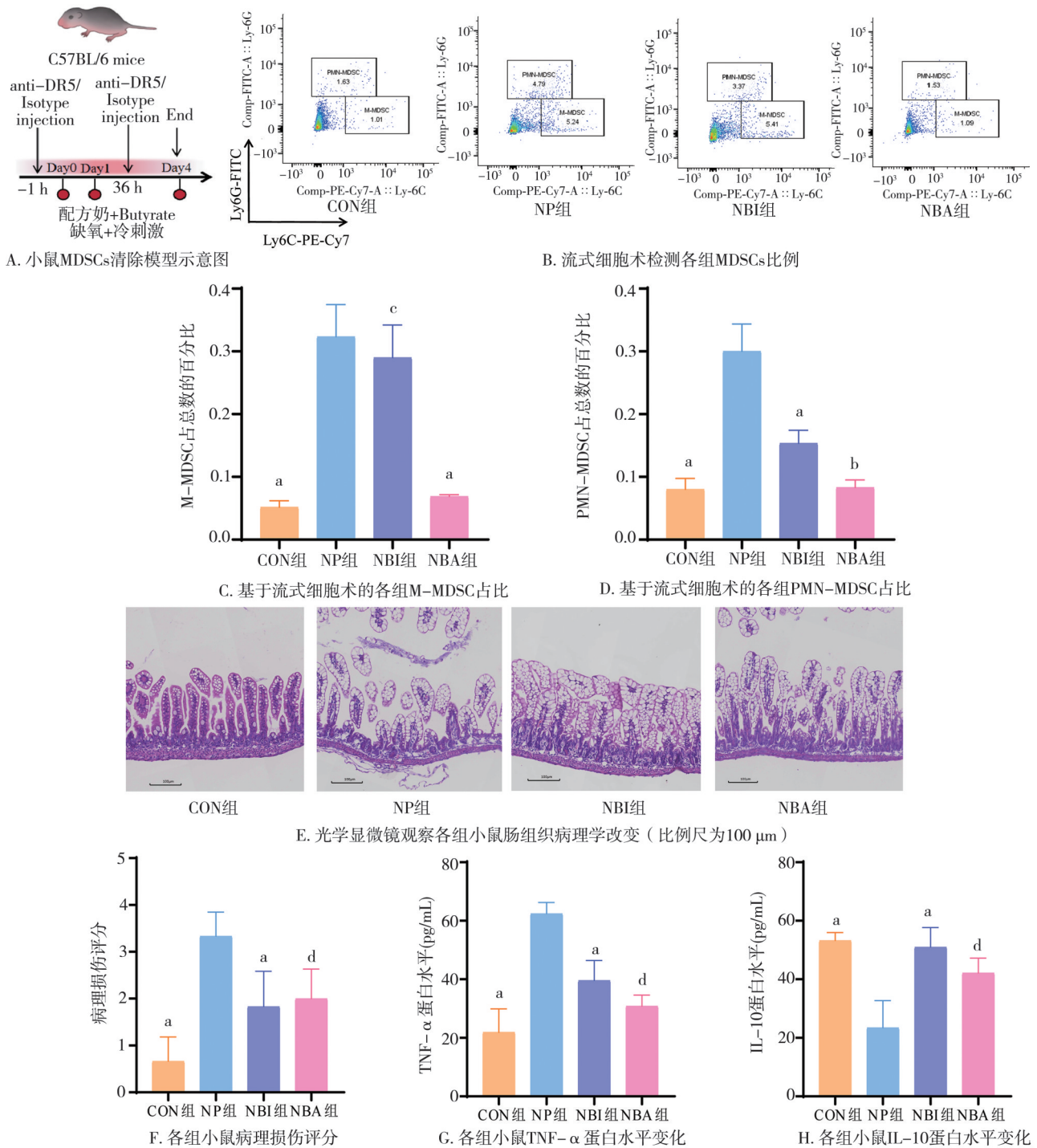
2.4 丁酸联合 MDSCs 对 NEC 菌群的影响

丁酸是肠道菌群分解食物的代谢产物, 又可以影响肠道菌群情况, MDSCs 在炎症中可被激活增殖后发挥抗炎作用, 两者对于肠道微生物群的影响亦是 NEC 发生发展中重要的一环。本课题组对 CON 组、NP 组、NBI 与 NBA 组进行肠道菌群 16sRNA 测序。测序结果显示, 基于小鼠肠道中细菌群落扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASV) 水平的稀释曲线随着采样的读数数量的增加逐渐达到饱和平台期, 表明测序深度足以代表大多数微生物物种 (图 4A)。图 4C-F 显示肠道菌群的 α -多样性, 结果显示包括 Chao、Ace、Shannon 和 Simpson 指数在 NBI 与 NBA 组间无明显差异, 但两组与 NP 组之间有明显差异, 表明在 NEC 中无论是否去除 MDSCs, 丁酸干预后都能明显影响 NEC 小鼠的整体细菌丰富度和群落多样性。未加权的基于 UniFrac 的主坐标分析 (PCoA) 的结果表明, NP 组、NBI 组、NBA 组在 ASV 水平上与对照组分离, 但 NBI 组与 NBA 组有较多重叠 (图 4G)。Venn



注: a, 与 NP 组相比较, $P < 0.05$, $n = 3$; b, 与 NP 组相比, $P > 0.05$, $n = 3$

图 2 流式细胞术检测各组小鼠 MDSCs 变化



注:a,与NP组相比, $P<0.05$, $n=3-6$;b,与NBI组相比, $P<0.05$, $n=3$;c,与NP组相比, $P>0.05$, $n=3$;d,与NBI组相比, $P>0.05$, $n=4-6$

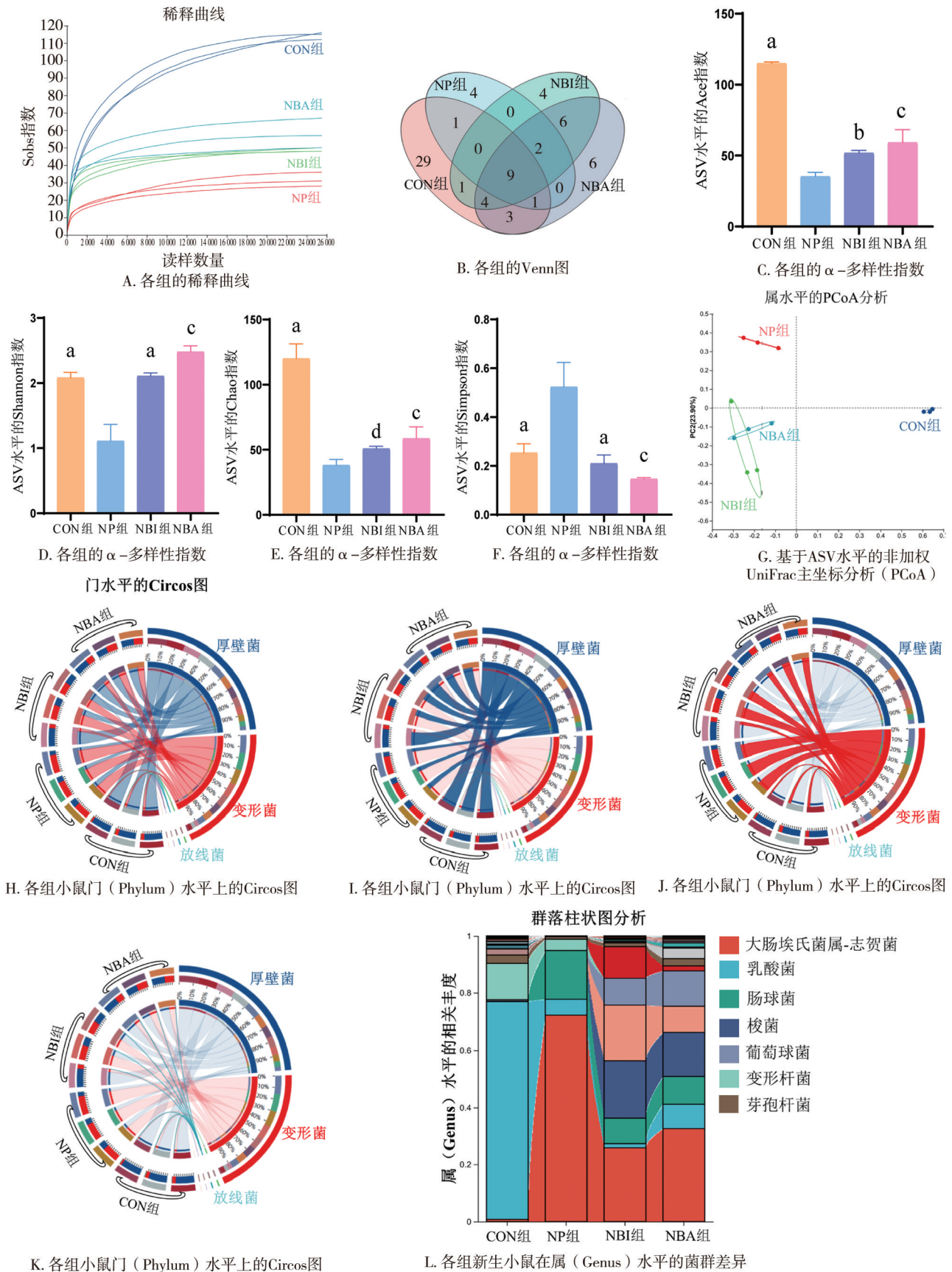
图3 MDSCs去除后NEC小鼠肠组织损伤变化

图显示了重叠和共享的ASV数据,显示4组间有9个ASV重合,NBI,NBA组较NP组与CON组重合度更高,NBI与NBA之间有较高重合度(图4B)。

在菌种的细分上面,根据门水平上的Circos图(图4H-K)显示,NP组在厚壁菌(*Firmicutes*)比例明显低于CON、NBI、NBA组,在变形菌(*Proteobacteria*)比例明显高于其他3组(4I);CON组、NBI组、NBA组在放线菌门(*Actinobacteria*)

水平均高于NP组(图4K);在属(*Genus*)水平对各组进行比较,可见NP组大肠埃氏菌属-志贺菌(*Escherichia-Shigella*)与肠球菌(*Enterococcus*)比例较CON组大幅度增高,NBI与NBA组则降低了这2种菌的比例。

总的来说,NBI组与NBA组相较于NP组在肠道菌群的构成上有益菌如厚壁菌门的比例更高,MDSCs清除未能明显改变丁酸改善NEC菌群组成的现象。



注: a, 与 NP 组相比, $P < 0.01$, $n = 3$; b, 与 NP 组相比, $P < 0.05$, $n = 3$; c, 与 NBI 组相比, $P > 0.05$, $n = 3$; d, 与 NP 组相比较, $P > 0.05$, $n = 3$

图 4 丁糖与 MDSC 改变对小鼠菌群的影响

3 讨论

3.1 丁酸干预减轻 NEC 小鼠肠道炎症

NEC 是一种威胁新生儿尤其是早产儿的急性消化道疾病,具有发病率高、死亡率高、发病机制复杂以及严重后遗症等特点^[1,2,8-10],这引起本研究的高度重视。从 1828 年^[14]首次被发现的一百多年来,各国研究人员与临床工作者对于 NEC 的探索从未止步,但直至距今的 30 年左右,对于 NEC 发病机制的研究才取得了比较大的发展。NEC 的发病机制十分复杂,呈现出多因素的特点,包括遗传易感性、早产、配方奶喂养和微生物群失调等^[7,12,30]。研究表明微生物群失调与 NEC 的进展存在联系^[12,24,31-32],因此对于 NEC 中微生物群的作用探索引起了广泛关注。以丁酸为代表的短链脂肪酸(SCFAs)是由肠道细菌经过食物发酵代谢产生的。作为一种重要的能量来源,其可为肠道细胞提供能量,确保上皮屏障的完整性,因此,肠道微生物群失调将不可避免地改变短链脂肪酸的组成和浓度^[33]。既往研究已证明,丁酸干预可以改善 NEC 小鼠的肠道炎症与急性损伤程度^[23]。本研究采用人工喂养与缺氧冷刺激的方式建立 NEC 模型,并在此基础上使用丁酸进行干预,结果表明丁酸可以直接改善 NEC 小鼠的生存情况、肠道损伤情况以及肠道炎症。

3.2 丁酸干预可以减少 NEC 小鼠肠组织中的 MDSCs 比例

既往研究表明肠道微生物群改变可以影响肠道黏膜中包括 T、B 淋巴细胞的适应性免疫,也可以影响包括 ILC3s 在内的固有免疫^[34-35],对于肠道的免疫功能的调节十分重要。MDSCs 是一类免疫抑制细胞,在对抗肠道炎症中发挥了重要作用,He YM 等^[27]验证了 MDSCs 对于 NEC 小鼠肠道炎症的改善作用。本研究将微生物群相关代谢物丁酸与 MDSCs 联系起来,旨在探索丁酸是否能够调节 MDSCs 从而影响 NEC 小鼠的炎症程度。根据流式细胞术结果显示,丁酸干预后 NEC 小鼠肠道 PMN-MDSC 比例降低。钙结合蛋白 S100A9 对于 PMN-MDSC 的调节十分重要^[27],Western Blot 结果显示丁酸干预后 NEC 小鼠肠道 S100A9 水平下降,与 PMN-MDSC 的改变一致。参照 He YM 等^[27]方案将 MDSCs 进行清

除后进行丁酸钠灌胃,观察清除 MDSCs 后 NEC 小鼠在丁酸干预下的肠道情况,结果表明 MDSCs 清除后小鼠肠组织炎症未见明显改变。本研究结果表明丁酸可能通过对 S100A9 的调节影响 PMN-MDSC 的招募,但其对 NEC 的保护作用并不依赖于 MDSCs 的改变。

研究表明 S100A9 的上调与 PMN-MDSC 的免疫抑制作用息息相关^[27],这是一种钙结合蛋白,主要限制性地表达于单核/巨噬细胞系、中性粒细胞等,与许多炎症中的免疫息息相关。S100A9 在肠道黏膜损伤的早期即可被分泌到肠腔中,可以作为 NEC 的一种早期损伤识别标志物^[36]。Pergialiotis V 等^[37]对多个数据库中的数据进行综合分析也证实 S100A9 在 NEC 患儿的粪便中显著升高。Cao T 等^[38]的实验显示丁酸在神经退行性病变模型小鼠中可以明显降低 S100A9 的水平。因此本课题组推测在 NEC 小鼠中可能由于 S100A9 水平上升,引起 PMN-MDSC 的肠道聚集,使用丁酸干预后小鼠肠道 S100A9 水平下降,因而引起 PMN-MDSC 比例的明显下降。这与本研究中的结果一致。除了调节 MDSCs 的扩增与迁移之外,S100A9 对于 PMN-MDSC 的免疫抑制功能也至关重要。低水平的 S100A9 大大减少 MDSCs 的活化,免疫调节能力显著降低。除此之外,研究表明使用丁酸干预 IBD 后观察 MDSCs 在肠道变化的结果显示在结肠炎的情况下,趋化因子受体 CCR9 上调,与趋化因子配体 CCL25 的结合增加,促进 MDSCs 的招募,但丁酸的使用可以明显减少这一趋势,两者均能改善 IBD 小鼠结肠炎,呈现功能互补的状态^[39]。在 NEC 中,CCR9/CCL25 受到 TLR4 调节而显著上调^[40]。本课题组前期研究表明丁酸干预 NEC 可以通过抑制 TLR4 通路减轻 NEC 炎症^[41]。基于此,推测在 NEC 中丁酸干预可能通过抑制 TLR4 的表达下调 CCR9/CCL25 的水平,对 MDSCs 的水平与功能产生抑制作用。另外,既往的研究表明丁酸与 MDSCs 均能明显促进肠道调节性 T 细胞(Regulatory cells, Tregs)的分化,增强肠道抗炎作用^[33,42-43]。综上所述,本课题组推测丁酸在 NEC 小鼠中通过下调 S100A9 的水平与抑制 TLR4 通路等方式下调 MDSCs 尤其是 PMN-MDSC 的比例与活化程度,二者在免疫细胞的调节和减轻肠道炎症的功能上有互补的趋势,因此在清除 MDSCs 后丁酸对 NEC 的保护作用未

见明显减弱。这需要后续进一步的研究加以证明。

3.3 MDSCs 清除后丁酸干预部分改变 NEC 小鼠肠道菌群

临床研究显示与足月婴儿相比,早产儿的肠道微生物群幼稚且多样性较低^[44]。对早产儿粪便微生物群的分析研究发现^[44-45],在 NEC 发生之前已有肠道菌群的改变,变形菌门的丰度增加,厚壁菌门和拟杆菌门的丰度降低。由此可见肠道微生物的改变是 NEC 发生发展的一大高危因素,本研究对各组小鼠进行肠道菌群 16sRNA 测序,结果显示相对对照组,NEC 小鼠的菌群多样性降低,MDSCs 清除组与同型对照组在接受丁酸干预后菌群多样性升高,且两者无明显差异。进一步对菌群种类进行分析,NEC 小鼠较对照组变形菌增多,厚壁菌减少,符合临床 NEC 早产儿粪便菌群改变。NEC 小鼠的大肠埃希菌属-志贺菌属以及肠球菌增加,均是已知的肠道致病菌或者机会致病菌,MDSCs 清除组与同型对照组在接受丁酸干预后菌群改变相似,肠道致病菌比例减少。放线菌是肠道微生物群的四大门之一,在维持肠道稳态方面十分重要^[46]。根据门水平的 Circos 显示,MDSCs 清除组与同型对照组在接受丁酸干预后可以明显提高小鼠的放线菌比例,帮助恢复肠道稳态。由此可见,丁酸作用于 NEC 小鼠时 MDSCs 是否清除对于其改善 NEC 小鼠菌群的现象无明显差异,表明丁酸促进 NEC 小鼠的肠道菌群恢复并不依赖于 MDSCs 的参与。

综上所述,丁酸可能通过下调 S100A9 与抑制 TLR4 通路降低 NEC 小鼠中的 MDSCs 尤其是 PMN-MDSCs 的比例。在进一步探究丁酸是否依赖 MDSCs 发挥作用时发现 MDSCs 是否清除对丁酸减轻 NEC 小鼠的肠道炎症与改善菌群分布的作用无明显影响,即丁酸改善 NEC 小鼠炎症与肠道菌群构成并不依赖 MDSCs 的参与。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 彭映秋:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;王青:研究方案设计、实施研究;贺雨:实验技术指导;艾青:实验技术指导;史源:研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

[1] Lawn JE, Ohuma EO, Bradley E, et al. Small babies, big risks: global estimates of prevalence and mortality for vulnerable newborns to accelerate change and improve counting[J]. *Lancet*, 2023, 401 (10389):

1707-1719.

[2] Cao G, Liu J, Liu M. Global, regional, and national incidence and mortality of neonatal preterm birth, 1990-2019[J]. *JAMA Pediatr*, 2022, 176(8):787-796.

[3] Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications[J]. *Lancet*, 2012, 379(9832):2162-2172.

[4] Chen C, Zhang JW, Xia HW, et al. Preterm birth in China between 2015 and 2016[J]. *Am J Public Health*, 2019, 109(11):1597-1604.

[5] Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, et al. The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States[J]. *Am J Public Health*, 1997, 87(12):2026-2031.

[6] Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012[J]. *JAMA*, 2015, 314(10):1039-1051.

[7] Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(3):255-264.

[8] Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, et al. Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatrics*, 2005, 115(3):696-703.

[9] Stey A, Barnert ES, Tseng CH, et al. Outcomes and costs of surgical treatments of necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatrics*, 2015, 135(5):e1190-e1197.

[10] Amin SC, Pappas C, Iyengar H, et al. Short bowel syndrome in the NICU[J]. *Clin Perinatol*, 2013, 40(1):53-68.

[11] Thyoka M, de Coppi P, Eaton S, et al. Advanced necrotizing enterocolitis part 1:mortality[J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2012, 22(1):8-12.

[12] Duess JW, Sampah ME, Lopez CM, et al. Necrotizing enterocolitis, gut microbes, and sepsis[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1):2221470.

[13] Collado MC, Cernada M, Neu J, et al. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants[J]. *Pediatr Res*, 2015, 77(6):726-731.

[14] Obladen M. Necrotizing enterocolitis: 150 years of fruitless search for the cause[J]. *Neonatology*, 2009, 96(4):203-210.

[15] Peng LY, Li ZR, Green RS, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly *via* activation of AMP-activated protein kinase in caco-2 cell monolayers 1 2[J]. *J Nutr*, 2009, 139(9):1619-1625.

[16] Donohoe DR, Holley D, Collins LB, et al. A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(12):1387-1397.

[17] Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:185.

[18] ChangPV, HaoL, OffermannsS, et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase

- inhibition[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(6):2247–2252.
- [19] Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils[J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(9):849–855.
- [20] Nastasi C, Fredholm S, Willerslev-Olsen A, et al. Butyrate and propionate inhibit antigen-specific CD8⁺ T cell activation by suppressing IL-12 production by antigen-presenting cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):14516.
- [21] Postler TS, Ghosh S. Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system[J]. Cell Metab, 2017, 26(1):110–130.
- [22] 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.
- [23] 李秋平. 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[D]. 重庆:重庆医科大学, 2018.
- Li QP. Protective effect of butyric acid on neonatal mouse model of neonatal necrotizing enterocolitis[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018.
- [24] Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, et al. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Shock, 2007, 27(2):124–133.
- [25] Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age[J]. Nat Immunol, 2018, 19(2):108–119.
- [26] Karin N. The development and homing of myeloid-derived suppressor cells: from a two-stage model to a multistep narrative[J]. Front Immunol, 2020, 11:557586.
- [27] He YM, Li X, Perego M, et al. Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation[J]. Nat Med, 2018, 24(2):224–231.
- [28] Yu XY, 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.
- [29] Condamine T, Kumar V, Ramachandran IR, et al. ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6):2626–2639.
- [30] Niño DF, Sodhi CP, Hackam DJ. Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(10):590–600.
- [31] Carlisle EM, Morowitz MJ. The intestinal microbiome and necrotizing enterocolitis[J]. Curr Opin Pediatr, 2013, 25(3):382–387.
- [32] Vongbhavit K, Underwood MA. Prevention of necrotizing enterocolitis through manipulation of the intestinal microbiota of the premature infant[J]. Clin Ther, 2016, 38(4):716–732.
- [33] Liu J, Zhu HT, Li B, et al. Beneficial effects of butyrate in intestinal injury[J]. J Pediatr Surg, 2020, 55(6):1088–1093.
- [34] Hu C, Xu B, Wang X, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids regulate group 3 innate lymphoid cells in HCC[J]. Hepatology, 2023, 77(1):48–64.
- [35] Jiao Y, Wu L, Huntington ND, et al. Crosstalk between gut microbiota and innate immunity and its implication in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11:282.
- [36] Thuijls G, Derikx JP, van Wijck K, et al. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis[J]. Ann Surg, 2010, 251(6):1174–1180.
- [37] Pergialiotis V, Konstantopoulos P, Karampetsou N, et al. Calprotectin levels in necrotizing enterocolitis: a systematic review of the literature[J]. Inflamm Res, 2016, 65(11):847–852.
- [38] Cao T, Zhou X, Zheng X, et al. Histone deacetylase inhibitor alleviates the neurodegenerative phenotypes and histone dysregulation in presenilins-deficient mice[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10:137.
- [39] 孙丹, 吕国忠, 曹玲, 等. 成年严重烧伤患者发生肠内营养不耐受风险预测模型的构建及验证[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(12):1173–1182.
- Sun D, Lyu GZ, Cao L, et al. Establishment and validation of a risk prediction model for the occurrence of enteral nutrition intolerance in adult patients with severe burns[J]. Chin J Burns Wounds, 2025, 41(12):1173–1182.
- [40] Egan CE, Sodhi CP, Good M, et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis[J]. J Clin Invest, 2016, 126(2):495–508.
- [41] Sun Q, Ji YC, Wang ZL, et al. Sodium butyrate alleviates intestinal inflammation in mice with necrotizing enterocolitis[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021:6259381.
- [42] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(3):162–174.
- [43] Bline KE, Wilt AL, Alexander RN, et al. Myeloid-derived suppressor cells and T cell populations in children with Multisystem Inflammatory Syndrome[J]. Pediatr Res, 2024, 95(5):1288–1294.
- [44] Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e90784.
- [45] Pammi M, Cope J, Tarr PI, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Microbiome, 2017, 5(1):31.
- [46] Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, et al. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis[J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(5):421–428.

(收稿:2024-12-21;修回:2025-04-07;录用:2025-04-11)

(责任编辑:李青颖)

本文引用格式:

彭映秋, 王青, 贺雨, 等. 丁酸对小鼠坏死性小肠结肠炎中髓源性抑制细胞的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(2):232–240.