

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.034

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.1334.008.html\(2020-11-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.1334.008.html(2020-11-26))

新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制的研究进展*

王 静¹综述,米弘琰^{2,3△}审校

(1. 大理大学,云南大理 671003;2. 云南省第一人民医院儿科,昆明 650032;

3. 昆明理工大学附属医学院,昆明 650032)

[摘要] 坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿期最常见的外科急危重症,发病特征主要为肠道上皮细胞死亡,大量炎症急性爆发。目前对 NEC 复杂的发病机制尚不完全清楚,缺乏有效的早期生物化学监测指标和治疗方法,使其发病率和死亡率在过去 30 年未得到改善。因此,阐明 NEC 的发病机制,并寻找合适的治疗靶点,十分关键。已有研究显示肠道细胞焦亡和中性粒细胞胞外陷阱作为细胞死亡的新方式,在炎症疾病中扮演重要角色,这为研究 NEC 的发病机制及靶向治疗提供了新的思路,现对此作一综述。

[关键词] 小肠结肠炎,坏死性;婴儿,新生;细胞焦亡;细胞诱捕网;综述

[中图法分类号] R722.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)04-0694-04

Advances in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis*

WANG Jing¹, MI Hongying^{2,3△}

(1. Dali University, Dali, Yunnan 671003, China; 2. Department of Pediatrics, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. School of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common surgical critical disease in neonatal period. The main characteristics of necrotizing enterocolitis are intestinal epithelial cell death and a large number of acute inflammation outbreaks. At present, the pathogenesis of NEC is not yet clear. There is no effective early biochemical monitoring index and treatment method. The incidence rate and mortality rate of the disease has not been improved in the past thirty years. Therefore, it is very important to elucidate the pathogenesis of NEC and find suitable therapeutic targets. As a new way of cell death, intestinal cell pyroptosis and neutrophil extracellular traps plays an important role in inflammatory diseases, which provides a new way to study the pathogenesis and targeted treatment of NEC. The related research is summarized as follows.

[Key words] enterocolitis, necrotizing; infant, newborn; pyroptosis; extracellular traps; review

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期最常见且病死率较高的外科急危重症,多发于早产儿,以呕吐、腹胀、血便为典型的临床表现。美国和加拿大的多中心新生儿网络数据库显示,出生体重 500~1 500 g 的早产儿中,NEC 的发生率为 7%,病死率为 20%~30%,近几年无明显改善^[1-3]。有研究揭示 NEC 的发生与新生儿肠道动力和肠道黏膜屏障不成熟、免疫系统的易感性、肠道微生物不成熟与失衡、喂养不当等有关^[4-8],目前国内外研究尚未能阐明 NEC 的发病机制。

1 既往研究

新生儿 NEC 是由多种因素导致的肠道炎症性疾

病,发病机制复杂,常常与脓毒血症、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、循环衰竭等全身炎症性疾病密切相关,其中早产和感染是其独立相关的危险因素,尤其由革兰阴性菌引起的脓毒症伴发 NEC 时,病情较危重,肠穿孔发生率及病死率较高^[9-11]。既往临床研究显示:NEC 小鼠回肠组织 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)4 及核因子- κ B(NF- κ B)表达升高,以及 TLR9 表达下降,提示 TLR4 介导的 NF- κ B 信号活化是导致 NEC 发病的重要机制之一^[12-13]。由肠细胞和巨噬细胞产生的炎性介质,尤其是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1、血

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(昆医联合专项)[2017FE468-166];+2019 名医专项(云卫人发[2019]35 号)。 作者简介:王静(1994-),在读硕士研究生,主要从事新生儿疾病研究。 △ 通信作者,E-mail:hongyingmi6100@sina.com。

小板活化因子和一氧化氮(NO)在 NEC 炎症反应中发挥重要的作用^[14]。已证实血小板活化因子能够诱导 TLR4 的表达和信号传导,并募集大量炎症细胞及补体参与肠黏膜上皮的炎症级联反应^[15]。

肠道炎症反应常引起肠道黏膜上皮弥漫性水肿、缺血、坏死、脱落等病理改变,严重者导致肠穿孔,引起急性腹膜炎、弥散性血管内凝血、脓毒症性休克、多器官功能障碍等并发症。临床上多以禁食、胃肠减压、营养支持、抗感染、维持水电解质及酸碱平衡、纠正凝血功能障碍等治疗为主^[16],对危重患儿采取外科手术治疗^[17-18],目前尚无特异性治疗方案。消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 的发现,无疑为探索新生儿 NEC 的发病机制及治疗方法提供了新的研究方向。

2 研究新进展

2.1 由 GSDMD 介导的细胞焦亡可能参与 NEC 的炎症机制

新生儿 NEC 是多种因素相互作用的结果,因其发病机制尚未完全清楚,目前临床上尚无突破性的有效治疗方案,导致其病死率较高、预后较差。随着 GSDMD 家族的发现及研究的深入,GSDMD 分子机制和在炎症中的作用逐渐被广泛认识。细胞焦亡是由 GSDMD 介导的一种特殊的程序性细胞死亡机制,无论在坏死机制上还是在细胞死亡形态上的分析,均与细胞凋亡和其他类型的细胞坏死不同。

近年来研究发现,GSDMD 作为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase)-1、caspase-4、caspase-5 及 caspase-11 的下游分子,被切割成有活性的 N-端结构域和无活性的 C-端结构域,有活性的 N-端结构与细胞膜上特定的磷脂分子如磷脂酰肌醇磷酸酯、磷脂酰丝氨酸和心磷脂等结合,介导非离子选择性孔道的形成,耗散细胞内外的离子渗透梯度^[19-22];而被磷酸化激活的混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)同时与质膜结合形成可渗透的离子通道,二者共同发挥成孔作用改变细胞内外渗透压的平衡^[23],导致细胞膨胀和崩解死亡,最后释放出 IL-1 β 等炎症介质发挥致炎作用^[24],同时将细胞内的微生物暴露出来,有利于机体对病原微生物的清除,在介导细胞裂解的过程中 MLKL 分子也发挥了重要作用。

在细胞焦亡的过程中,GSDMD 是如何精确调控细胞死亡、如何参与 NEC 的发病及探索 GSDMD 特异性抑制分子是未来研究的重点方向。CHEN 等^[23]研究发现,GSDMD-N 端存在 α -螺旋结构,而 MLKL 中的 N-末端也存在这种结构,这是 MLKL 齐聚和功能所必需的,因此,这种 α 结构可能是 GSDMD-N 端寡聚和细胞死亡所必需的,推测破坏这种结构就可能

会抑制细胞焦亡的发生。相关研究显示,caspase-1、IL-1 β 、IL-18、NLRP3 等与细胞焦亡相关的分子在肠上皮及小鼠 NEC 模型中显著高表达,从而提出细胞焦亡可能参与新生儿 NEC 的发病机制,且 GSDMD 基因有望成为治疗 NEC 的靶基因位点^[25]。

GSDMD 不仅是介导细胞焦亡的关键分子,还参与中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs) 的发生。最新研究发现,这两种细胞死亡方式均在 NEC 的肠黏膜上皮炎症反应中发挥不可或缺的作用。

2.2 NETs 在 NEC 发生、发展中的作用

NETs 是依赖于 GSDMD 形成的一种中性粒细胞死亡的特殊形式,它将细胞核 DNA 去致密化,随后排出染色质,染色质被细胞毒性颗粒蛋白包裹,如髓过氧化物酶(MPO)、弹性蛋白酶和其他蛋白酶等,这些被特殊修饰的染色质和其他蛋白质结构被称为 NETs,这个过程也被称作 NETosis^[26-27]。最新研究发现,GSDMD 在 NETs 的形成中发挥重要作用,在中性粒细胞中,GSDMD 被包括中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)在内的丝氨酸蛋白酶裂解,由被切割后的 GSDMD-N 端结构域的成孔作用导致细胞死亡^[28],在 NETosis 的过程中,GSDMD-N 端结构域在细胞膜上形成孔以允许 NETs 的释放^[29-30]。除此之外,NETosis 的发生与乙酸肉豆蔻酸佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA) 也密不可分^[31],PMA 通过 Nox 依赖途径诱导 NETosis 的发生,还能引起补体蛋白的最大释放。无论是这种中性粒细胞的特殊死亡,还是大量炎症物质及补体成分的释放,均可介导机体的炎症级联反应呈瀑布式的爆发。目前这种 NETs 的特殊死亡形式已经被证实参与了 NEC 的发病^[30],但其在 NEC 中具体的信号通路仍然不清楚,还有待进一步研究。

既往研究表明,中性粒细胞表面抗原 CD64 被证实对鉴别早发型和晚发型败血症及 NEC 具有良好的诊断价值^[32]。通过比较 CD64 和 C 反应蛋白的诊断价值,发现 CD64 在 LOS/NEC 中是一个比 C 反应蛋白好得多的早期预警生物标记物^[33-34]。总之,中性粒细胞 CD64 表达作为一种监测生物标记物,对识别极低出生体重儿 LOS/NEC 既灵敏(89%)又特异(98%)^[35]。只是 CD64 在 NEC 诊断过程中具体的参考值范围尚不清楚,其在 NEC 中的具体作用也未被完全详细阐明。由此推测,在 NEC 的发病过程中,可能存在早期预警的生物标记物。

2.3 GSDMD 介导细胞焦亡与 NETs 的发生的机制

作为同时介导细胞焦亡及 NETs 这两种程序性细胞死亡的关键分子,GSDMD 是如何介导细胞焦亡

与 NETs 的发生? 这两种机制是否只是在同一细胞死亡过程中的不同阶段,即细胞膜完整性被 GSDMD-N 端结构的成孔作用破坏导致细胞焦亡,在细胞膜被破坏后释放细胞内染色质及其他蛋白成分形成 NETs,二者共同发挥作用;还是 GSDMD 通过不同的受体与配体结合作用于不同的细胞,独立介导细胞焦亡和 NETs 的发生。有学者提出,在感染早期 NETs 的形成涉及中性粒细胞^[36],但中性粒细胞不发生溶解并保持多种任务能力,与上述设想有冲突,还有待于进一步深入研究。但针对 GSDMD 基因的特异性抑制因子阻止其表达可以阻断细胞焦亡和 NETs 的发展过程是毫无疑问的。新生儿 NEC 的发病多伴随着脓毒症,感染、细胞焦亡、NETs 等多种机制可能相互作用,形成恶性循环,而 GSDMD 是多种机制中的关键,阻断其基因表达有可能打破这种恶性循环,为治疗新生儿 NEC 提供新的理论依据。

3 展 望

由 GSDMD 介导的细胞焦亡和 NETs 在 NEC 发生、发展中的作用越来越受关注,近年来已有学者在研究能够阻断 GSDMD 基因表达的特异性抑制分子,并试图阐述其信号分子通路,揭示其在 NEC 中的具体参与机制,但目前还无实质性的突破。虽然在研究过程中也发现了有早期监测意义的生物化学指标,但还需临床上的进一步筛选。如能发现可以用来监测 NEC 的特异性生物化学指标,并且研究出 GSDMD 的有效特异性抑制分子,就可以做到早期诊断、早期治疗,从而提高 NEC 的临床治愈率并改善预后。

参考文献

- [1] LIM J C, GOLDEN J M, FORD H R. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatr Surg Int*, 2015, 31(6): 509-518.
- [2] JONES I H, HALL N J. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis: a systematic review[J]. *J Pediatr*, 2020, 220: 86-92.
- [3] FLAHOVE C, SCHLEGEL A, MEZOFF E A. Necrotizing enterocolitis: updates on morbidity and mortality outcomes[J]. *J Pediatr*, 2020, 220: 7-9.
- [4] KIM C S, CLAUD E C. Necrotizing enterocolitis pathophysiology: how microbiome data alter our understanding[J]. *Clini Perinatol*, 2019, 46(1): 29-38.
- [5] 许巍. 坏死性小肠结肠炎的早产儿存在肠道微生物菌群不平衡[J]. *国际儿科学杂志*, 2018, 45(1): 72.
- [6] 马源培, 马婧玥, 童笑梅. 肠道微生态与早产儿坏死性小肠结肠炎的研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(8): 680-685.
- [7] MEISTER A L, DOHENY K K, TRAVAGLI R A. Necrotizing enterocolitis: it's not all in the gut[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(2): 85-95.
- [8] NEU J. Necrotizing enterocolitis: the future [J]. *Neonatology*, 2020, 117(2): 240-244.
- [9] NOLAN L S, WYNN J L, GOOD M. Exploring clinically-relevant experimental models of neonatal shock and necrotizing enterocolitis[J]. *Shock*, 2020, 53(5): 596-604.
- [10] DUCI M, FASCETTI-LEON F, ERCULIANI M, et al. Neonatal independent predictors of severe NEC[J]. *Pediatr Surg Int*, 2018, 34(6): 663-669.
- [11] WANG K, TAO G, SYLVESTER K G. Recent advances in prevention and therapies for clinical or experimental necrotizing enterocolitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(11): 3078-3085.
- [12] 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.
- [13] WERTS A D, FULTON W B, LADD M R, et al. A novel role for necroptosis in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(3): 403-423.
- [14] BAZACLIU C, NEU J. Pathophysiology of necrotizing enterocolitis: an update[J]. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 15(2): 68-87.
- [15] MIHI B, GOOD M. Impact of Toll-like receptor 4 signaling in necrotizing enterocolitis[J]. *Clin Perinatol*, 2019, 46(1): 145-157.
- [16] WANG K, TAO G, SYLVESTER K G. Recent advances in prevention and therapies for clinical or experimental necrotizing enterocolitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(11): 3078-3085.
- [17] HONG C R, HAN S M, JAKSIC T. Surgical considerations for neonates with necrotizing enterocolitis[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2018, 23(6): 420-425.
- [18] FROST B L, MODI B P, JAKSIC T, et al. New medical and surgical insights into neonatal ne-

- crotizing enterocolitis: a review[J]. *JAMA Pediatr*, 2017, 171(1): 83-88.
- [19] YANG J, LIU Z, WANG C, et al. Mechanism of gasdermin D recognition by inflammatory caspases and their inhibition by a gasdermin D-derived peptide inhibitor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): 6792-6797.
- [20] 史客松, 马臣杰, 马玲玲, 等. Gasdermin 蛋白家族与细胞焦亡研究进展[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(2): 83-87.
- [21] ORNING P, LIEN E, FITZGERALD K A. Gasdermins and their role in immunity and inflammation[J]. *J Exp Med*, 2019, 216(11): 2453-2465.
- [22] 陶然, 李伟, 尚世强. Gasdermin 家族蛋白及其疾病相关性的研究进展[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39(10): 784-787.
- [23] CHEN X, HE W T, HU L, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis[J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007-1020.
- [24] EVAVOLD C L, RUAN J, TAN Y, et al. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages[J]. *Immunity*, 2018, 48(1): 35-44.
- [25] 胡刘宏, 余加林, 艾青, 等. 细胞焦亡在新生儿坏死性小肠结肠炎中的致病作用[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(14): 1440-1444.
- [26] SPEL L, MARTINON F. Gasdermin D opens the way for NETs[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(12): 690-692.
- [27] KUMAR S, GUPTA E, KAUSHIK S, et al. Neutrophil extracellular traps: formation and involvement in disease progression[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018, 17(3): 208-220.
- [28] KAMBARA H, LIU F, ZHANG X, et al. Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 2924-2936.
- [29] PANDEYA A, LI L, LI Z, et al. Gasdermin D (GSDMD) as a new target for the treatment of infection[J]. *Medchemcomm*, 2019, 10(5): 660-667.
- [30] MACQUEEN B C, CHRISTENSEN R D, YOST C C, et al. Elevated fecal calprotectin levels during necrotizing enterocolitis are associated with activated neutrophils extruding neutrophil extracellular traps[J]. *J Perinatol*, 2016, 36(10): 862-869.
- [31] ARMSTRONG C L, KLAES C K, VASHISH-TA A, et al. Filifactor alocis manipulates human neutrophils affecting their ability to release neutrophil extracellular traps induced by PMA[J]. *Innate Immun*, 2018, 24(4): 210-220.
- [32] SONG Y, CHEN Y, DONG X, et al. Diagnostic value of neutrophil CD64 combined with CRP for neonatal sepsis: a meta-analysis[J]. *Am J Emerg Med*, 2019, 37(8): 1571-1576.
- [33] MANGALAM A K, YADAV R. Utility of CD64 expression on neutrophils as a marker to differentiate infectious versus noninfectious disease flares in autoimmune disorders[J]. *Indian J Rheumatol*, 2019, 14(1): 9-11.
- [34] 何山, 李利, 米弘瑛, 等. CD₆₄ 指数联合中性粒细胞绝对值对极低出生体重儿脓毒血症及坏死性小肠结肠炎的诊断价值研究[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(12): 1442-1445.
- [35] LAM H S, CHEUNG H M, POON T C, et al. Neutrophil CD64 for daily surveillance of systemic infection and necrotizing enterocolitis in preterm infants[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1753-1760.
- [36] YIPP B G, PETRI B, SALINA D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo[J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1386-1393.