

黄芩苷对坏死性小肠结肠炎新生大鼠肠损伤及 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的作用研究*

刘小利¹,何心如²,黄彦鹏¹

1 广州中医药大学第一附属医院/广东省中医临床研究院,广东 广州 510405;

2 上海中医药大学,上海 201203

[摘要] 目的:研究黄芩苷对坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)新生大鼠模型肠损伤及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1,Caspase-1)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)和 IL-18的影响。方法:30只3日龄SD新生大鼠,随机分为对照组、模型组及黄芩苷组,每组10只。对照组不予任何处理,模型组及黄芩苷组新生大鼠均采用鼠奶联合配方奶粉人工喂养方式、缺氧以及冷刺激方法建立 NEC 模型。苏木精-伊红染色法观察肠组织病理学改变情况;蛋白免疫印迹法检测肠组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平;酶联免疫吸附法检测肠组织 IL-1 β 、IL-18 表达水平。结果:与对照组比较,模型组大鼠肠组织损伤严重,病理损伤评分显著增加($P < 0.05$);NLRP3、Caspase-1 蛋白及 IL-1 β 和 IL-18 表达水平增加($P < 0.05$)。与模型组比较,黄芩苷组肠组织损伤评分降低,NLRP3、Caspase-1 蛋白及 IL-1 β 和 IL-18 表达水平降低($P < 0.05$)。结论:黄芩苷可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路,降低新生大鼠 NEC 发生率,而细胞焦亡可能参与新生大鼠 NEC 的发病过程。

[关键词] 坏死性小肠结肠炎;黄芩苷;NOD样受体家族3;半胱氨酸天冬氨酸酶-1;白细胞介素1 β ;
白细胞介素18

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2026)05-0001-06

Effects of Baicalin on Intestinal Injury and the NLRP3/Caspase-1/IL-1 β Signaling Pathway in Neonatal Rats with Necrotizing Enterocolitis

LIU Xiaoli¹, HE Xinru², HUANG Yanpeng¹

1 The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine/Guangdong Provincial Clinical Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract Objective: To investigate the effects of baicalin on intestinal injury and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-18 in neonatal rat models of necrotizing enterocolitis (NEC). Methods: Thirty 3-day-old neonatal SD rats were randomly divided into a control group, a model group, and a baicalin group, with 10 rats in each group. The control group received no intervention. The neonatal rats in the model group and the baicalin group were subjected to artificial feeding with a combination of rat milk and formula milk, along with hypoxia and cold stimulation, to establish the NEC model. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe histopathological changes in intestinal tissues; Western blot was employed to detect the protein expression levels of NLRP3 and Caspase-1 in intestinal tissues; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the expression levels of IL-1 β and IL-18 in intestinal tissues. Results: Compared with the control group, the model group showed severe intestinal tissue injury, with a significantly increased pathological injury score ($P < 0.05$), and elevated expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the baicalin group exhibited a decreased intestinal injury score and reduced expression levels of NLRP3, Caspase-1 protein, IL-1 β , and IL-18 ($P < 0.05$). Conclusion: Baicalin may reduce the incidence of NEC in neonatal rats by inhibiting the NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway, and pyroptosis may be involved in the pathogenesis of NEC in neonatal rats.

Keywords necrotizing enterocolitis; baicalin; NOD-like receptor family protein 3; Caspase-1; IL-1 β ; IL-18

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)主要发生于早产儿及低出生体重儿,随着早产儿存活率的提升,NEC已成为新生儿重症监护室中最严重的疾病之一。除极高的发病率、死亡率及高昂的治疗成本外,其长期并发症还包括肠道狭窄与粘连、胆汁淤积、短肠综合征、神经运动功能发育不良等^[1-2]。

研究发现,NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 细胞焦亡通路的异常与多种炎症性疾病密切相关^[3-4]。炎症小体核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)被激活后,通过斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)募集半胱天冬氨酸酶-1前体(pro-cysteine-requiring aspartate-specific protease-1, pro-Caspase-1),形成活化的Caspase-1;活化的Caspase-1切割pro-白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),并通过切割焦亡相关蛋白(gasdermin D, GSDMD)产生其N端产物(GSDMD-NT),在细胞膜上形成孔洞,促使IL-1 β 、IL-18等炎症因子分泌至细胞外,从而触发细胞焦亡。可见,NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路对炎症反应的启动与发展至关重要^[5-8],且可能与新生大鼠NEC发病相关。

黄芩苷具有抗炎等作用,能够下调感染性早产孕鼠体内NLRP3、pro-IL-1 β 及pro-Caspase-1表达水平^[9]。然而,关于黄芩苷在NEC动物模型中的作用研究报道较少。本研究通过观察黄芩苷对新生大鼠NEC模型病理形态及NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18表达的影响,探讨黄芩苷防治NEC肠损伤的作用,为NEC的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD新生大鼠30只,SPF级,3日龄,体质量(9 \pm 1)g,雌雄不限,购自广州中医药大学动物中心[合格证号:SCXK(粤)218-0034]。本研究已通过广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审批(TCMF1-2021010)。

1.2 实验药品与试剂 黄芩苷(宝鸡市金台区盛世科技仪经营部,批号:HA5329S1,纯度>98%);MinuteTM总蛋白提取试剂盒(美国Invent,批号:SD001);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0012);2 \times 双色Loading Buffer(杭州弗德生物科技有限公司,批号:FD003);Western/IP细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013);SDS-PAGE电泳液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0014B);

ECL发光液(美国Millipore,批号:WBKLS0500);NLRP3抗体(英国Abcam,批号:ab214185);Caspase-1抗体(英国Abcam,批号:ab179515); β -actin抗体(美国Cell Signaling Technology,批号:4970s);IL-1 β 抗体(武汉爱博泰克生物有限公司,批号:RM 17733);IL-18抗体(博士德生物技术公司,批号:A00101-1)。

1.3 主要仪器 高速冷冻离心机(丹麦Gebe-speed公司,型号1730R);垂直板电泳槽(美国Bio-Rad公司,型号165-8001);全能型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号ChemiDoc MP)。

1.4 分组及构建NEC动物模型 按随机数字表法随机分为对照组、模型组、黄芩苷组,每组10只。模型组及药物干预组采用缺氧联合冷刺激法复制NEC动物模型:每天给予间断缺氧处理(100%氮气,每次90 s,每天2次,连续3天),缺氧后立即置于4 $^{\circ}$ C环境中进行冷刺激(每次10 min,2次/d,连续3天)复制NEC动物模型^[10]。

1.5 给药方法 药物干预组(黄芩苷组)于造模后第2天予黄芩苷灌胃(每次12.5 mg/kg),每天2次,连续灌胃1周。模型组予相同剂量生理盐水灌胃,灌胃时间、频次同黄芩苷组。对照组不予处理。

1.6 观察指标

1.6.1 一般情况 每天观察并记录新生大鼠精神状态、生命体征、反应灵敏度、肤色、爪色、饮食、体型、体质量、大小便等情况。

1.6.2 肠组织形态学变化 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)检测回肠末端肠组织形态学变化情况,干预结束后24 h处死乳鼠,取回肠末端肠组织,依次进行固定、脱水、透明、包埋及切片处理。切片经苏木素染色8 min后,用1%盐酸酒精分化,再以0.6%氨水返蓝;随后进行伊红染色1 min,经脱水、透明处理后,用中性树脂胶封片。最后通过显微镜镜检并采集图像进行分析。

1.6.3 肠道病理损伤评分 HE染色完成后,采用双盲法对肠组织损伤程度进行评分。评分标准参照文献^[11]:1) 0分:肠壁组织结构正常,肠绒毛及上皮完整;2) 1分:轻度黏膜下层和(或)固有层分离;3) 2分:中度黏膜下层和(或)固有层中度分离和(或)黏膜下层和(或)肌肉层水肿;4) 3分:重度黏膜下层和(或)固有层重度分离和(或)黏膜下层和(或)肌肉层水肿,局部绒毛脱落;5) 4分:肠绒毛消失伴肠坏死。

1.6.4 相关蛋白表达检测 药物干预结束后24 h

处死乳鼠,取回肠末端肠组织,用电子天平称取30 mg待测组织,使用invent试剂盒提取总蛋白加入研磨管中,用研磨棒充分研磨后加入200 μ L蛋白裂解液,再次研磨样本并混匀,冰上静置2 min,随后以离心半径8.4 mm,13500 r/min离心3 min,收集上清液即为蛋白溶液。采用BCA法测定各样本蛋白浓度后,加入等体积2 \times loading buffer,95 $^{\circ}$ C金属浴变性10 min,收集样本置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中待测。SDS-PAGE电泳及转膜、封闭及孵抗体:转膜结束后进行封闭,使用5%脱脂奶粉封闭1 h。封闭结束后孵育一抗,4 $^{\circ}$ C过夜。抗体浓度:Caspase-1(1:1000)、GSDMD(1:1000)、NLRP3(1:1000)、 β -actin(1:1000)。孵育过夜,回收一抗,TBST洗膜,每次10 min,洗涤3次。1:5000比例稀释二抗并孵育,室温孵育1 h,弃二抗。TBST洗膜,每次10 min,洗涤3次。显影成像,拍照保存。

1.6.5 IL-1 β 及IL-18水平检测 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出回盲部肠组织100 mg,研碎后加入缓冲裂解液,4 $^{\circ}$ C裂解1 h,加入PMSF并制成组织匀浆;随后以离心半径8.4 mm,5000 r/min离心10 min,取上清液。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定肠组织IL-1 β 、IL-18水平。

1.7 统计学方法 应用SPSS 26.0软件分析数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经正态及方差齐性检验后,两组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 对照组大鼠精神状态良好,反应灵敏,肤色、爪淡红,食量及大小便正常,体质量平稳增加;模型组大鼠精神萎靡不振,反应迟钝,倦卧不动,腹胀、血便,食量减少,体质量增长较少,部分体质量甚至下降,肤色欠红润,爪色淡;黄芩苷组大鼠精神状态欠佳,灵敏度较差,爪色略暗,腹胀、血便情况改善,食量尚可,体质量略有增加。

2.2 肠管形态 对照组大鼠回肠末端呈白色或淡黄色,无肠壁水肿及积气;模型组大鼠结肠肠管扩张明显,肠壁积气明显,肠壁变薄,肠管僵直,有串珠改变。黄芩苷组大鼠结肠肠管扩张不明显,肠壁积气不明显。见图1。

2.3 肠组织形态学变化情况 对照组大鼠肠管无明显病理学改变,绒毛完整,黏膜层、黏膜下层及固有层肠组织结构完整,未见明显水肿或断裂分离;模型组大鼠局部或片状绒毛坏死脱落,黏膜层、黏膜下层及固有层水肿分离,甚至见充血、积气改变,肌层变薄甚至断裂;黄芩苷组大鼠肠组织结构、绒毛相对完整。见图2。

2.4 肠组织病理评分 与对照组比较,模型组肠组织病理评分升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷组肠组织病理评分降低($P<0.05$)。见表1。

2.5 NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平 与对照组比较,模型组NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷组NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图3。



图1 各组大鼠肠管形态

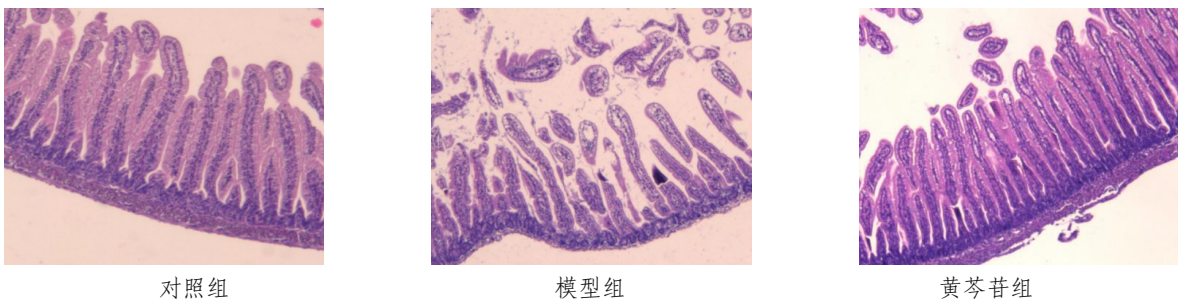
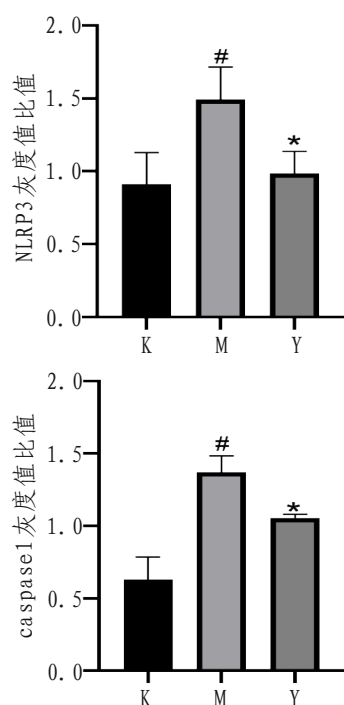


图2 各组大鼠肠组织形态学变化情况(HE, $\times 50$)

表1 各组大鼠肠组织病理评分比较($\bar{x} \pm s$) 分

组别	鼠数	肠组织病理评分
对照组	10	0.34 ± 0.11
模型组	10	3.32 ± 0.32 [#]
黄芩苷组	10	1.56 ± 0.16 [*]

注:#表示与对照组比较, $P < 0.05$; *表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。



注:K为对照组;M为模型组;Y为黄芩苷组;#表示与对照组比较, $P < 0.05$; *表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠肠组织NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平

2.6 IL-1 β 及IL-18水平 与对照组比较,模型组IL-1 β 、IL-18水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,黄芩苷组IL-1 β 、IL-18水平降低($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠肠组织IL-1 β 及IL-18水平比较($\bar{x} \pm s$) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	鼠数	IL-1 β	IL-18
对照组	10	0.43 ± 0.16	0.48 ± 0.05
模型组	10	0.85 ± 0.09 [#]	1.65 ± 0.13 [#]
黄芩苷组	10	0.58 ± 0.08 [*]	0.96 ± 0.12 [*]

注:#表示与对照组比较, $P < 0.05$; *表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

新生儿NEC在新生儿重症监护病房收治的婴儿中约占5%,在胎龄22周至29周出生的早产儿中发生率为9%,部分北美国家医院的发病率甚至高达20%。早产是新生儿坏死性小肠结肠炎的主

要危险因素,占NEC病例的70%至90%^[2,12]。早产儿易发生NEC,与其宿主防御功能不成熟有关,包括肠道蠕动及消化功能不成熟、肠道屏障功能不成熟、肠道免疫调节功能不成熟^[13]。部分足月儿若因产前、围产期、产后的各种有害因素导致肠道血流灌注异常,如母亲用药、出生窒息或结构性先天性心脏病相关损害,均存在NEC的发病风险。

NEC严重影响新生儿健康,若不及时治疗,常引发全身性脓毒症、多器官功能衰竭等^[14-15]。NEC的临床表现主要为喂养不耐受、休克、腹胀、肠道出血等,其病因和发病机制目前被认为是多因素综合作用的结果,包括早产、感染、喂养不当、缺血、缺氧、损伤、微生物生态失调(肠道菌群异常)等。这些因素会影响肠黏膜血液供应,引发局部黏膜缺血,导致肠蠕动功能下降、食物在肠道积聚,加速细菌繁殖,进而引发肠壁缺血缺氧、炎症损伤,最终导致肠黏膜出血、坏死^[16-18]。

目前新生儿NEC的研究多聚焦于肠道上皮细胞的病理死亡过程,已知死亡模式主要包括细胞凋亡、坏死、焦亡、铁死亡和自噬等^[19]。焦亡是近年来研究较多的一种程序性细胞死亡的炎症模式^[20]。细胞焦亡与凋亡存在一定相似性,例如均涉及DNA损伤,但二者的形态学特征存在明显差异。细胞凋亡是一种相对安全的死亡形式,而焦亡可引发炎症反应,其激活源于细胞外或细胞内的刺激,如细菌、病毒、毒素等。活化的半胱天冬氨酸酶通过切割焦亡相关蛋白GSDMD,在细胞膜上形成直径1-2 μm 的孔洞,使直径4.5 nm的成熟IL-1 β /IL-18和直径7.5 nm的Caspase-1分别通过。与焦亡细胞不同,凋亡细胞的细胞膜完整性得以保留。在新生儿NEC动物模型中,肠上皮细胞可能发生焦亡,但具体的焦亡通路作用机制仍需进一步研究。炎症小体NLRP3在活化状态下可诱导多种炎症因子产生,推动炎症反应的发生与发展,是炎症性疾病等多种疾病治疗的重要靶点。MiR-223-3p可通过靶向作用于NLRP3,减轻NEC新生大鼠肠组织炎症反应与细胞损伤。NLRP3在NEC中发挥重要作用,通过靶向调节NLRP3炎症小体研究相关疾病已成为当前研究热点^[21]。NEC模型小鼠回盲部肠道组织中,IL-1 β 、IL-18和NLRP3的mRNA表达显著增加,Caspase-1激活态P10/P20的蛋白表达也显著升高^[22]。临床研究显示,新生儿NEC患儿外周血中IL-1 β 水平及肠上皮细胞中IL-1 β 和Caspase-1表达均增高^[23]。本研究通过构建NEC新生大鼠模型,比较对照组与模型组NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平,发现模型组中

两者蛋白表达明显升高,与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。同时,模型组肠组织匀浆中IL-1 β 、IL-18表达升高,与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

黄芩苷是从黄芩根茎中分离提取的黄酮类化合物,为中药黄芩的核心活性成分,具有多种药理效应,如抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒及安胎等^[24]。黄芩苷通过下调环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)表达,抑制NF- κ B/AKT信号通路的激活,降低炎症因子水平,从而控制并减轻肠上皮细胞受损程度;同时,它还能抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、降低肿瘤细胞侵袭迁移率,进而控制病情、减轻溃疡性结肠癌的恶化程度。NF- κ B、COX-2蛋白表达与黄芩苷浓度呈量效关系,浓度越高,抑制效果越明显,表明黄芩苷对结肠癌的发生与发展具有一定控制作用^[25]。黄芩苷能增加骨肉瘤细胞内自噬小体数量,通过抑制AKT1蛋白磷酸化及p-AKT/AKT表达水平,诱导骨肉瘤细胞内LC3-II、p62以及p-JNK/JNK表达,从而抑制HOS和143B骨肉瘤细胞增殖、迁移与凋亡,提示黄芩苷可能通过多靶点与多通路的相互作用发挥抗骨肉瘤效应^[26]。黄芩苷能减轻带状疱疹后遗神经痛大鼠神经炎症,其作用机制可能是通过抑制TLR2/MyD88/NF- κ B信号通路,降低炎症因子PGE2、IL-18、COX-2水平,抑制炎症细胞浸润及神经炎症,减少脊髓神经细胞凋亡,缓解PHN大鼠机械性痛阈降低、热痛阈升高的症状,减轻大鼠长时间自发疼痛,具有显著镇痛作用^[27]。黄芩苷能抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中p-PI3K、p-Akt、NF- κ B p65、NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达,减少炎症因子IL-1、IL-18分泌。黄芩苷通过调控PI3K/Akt/NF- κ B信号转导,减轻NLRP3炎症小体活化^[28]。

在抗炎方面,黄芩苷通过调节TLR4/NF- κ B和JAK/STAT信号通路,诱导细胞凋亡,抑制TNF- α 、IL-6、ICAM-1及MCP-1等炎症因子释放,从而发挥抗炎作用^[29]。黄芩苷可抑制LPS激活的巨噬细胞中NLRP3炎症小体活化与细胞焦亡,其作用可能与调控蛋白激酶A信号通路有关^[30]。本研究结果表明,黄芩苷组肠组织匀浆中IL-1 β 、IL-18表达减少,与模型组比较差异明显($P<0.05$)。

肠道上皮细胞作为肠道的第一道防线,具有消化、吸收、分泌、免疫调节及抗感染等多种功能。肠道上皮细胞的病理性死亡机制可诱导肠道通透性增加,进而导致肠屏障功能障碍,因此研究细胞死亡机制有望成为新生儿坏死性小肠结肠炎的新治疗策略。寻找能有效保护肠道上皮屏障的药

物,或抑制肠道上皮细胞程序性死亡与炎症反应,可能是新生儿坏死性小肠结肠炎的治疗方向。本研究对模型组与对照组大鼠肠组织形态进行观察比较,结果显示模型组回盲部肠管出现扩张、肠壁积气、肠壁变薄、肠管僵直及串珠样改变;HE染色后,模型组可见绒毛坏死脱落,肌层变薄甚至断裂,对照组肠组织结构完整,黄芩苷组肠组织结构相对完整;模型组肠组织病理评分显著升高,与对照组及黄芩苷组比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

本研究结果表明,在NEC新生大鼠模型中,肠道损伤明显,NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18表达水平升高;经黄芩苷干预后,模型大鼠肠道损伤减轻,上述指标表达水平降低。黄芩苷可减少新生大鼠NEC肠道损伤的发生,其作用机制可能与抑制NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的异常表达有关,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] BAZACLIU C, NEU J. Necrotizing enterocolitis: long term complications[J]. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 15(2): 115-124.
- [2] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(3): 255-264.
- [3] LAMKANFI M, DIXIT V M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [4] WEGIEL B, LARSEN R, GALLO D, et al. Macrophages sense and kill bacteria through carbon monoxide-dependent inflammasome activation[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11): 4926-4940.
- [5] DUBOIS H, SORGELOOS F, SARVESTANI S T, et al. NLRP3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): 1007709.
- [6] GONG T, YANG Y, JIN T, et al. Orchestration of NLRP3 inflammasome activation by ion fluxes[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(5): 393-406.
- [7] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018, 115(26): 6792-6797.
- [8] 李捷, 郑雅峰, 徐赛, 等. TXNIP/NLRP3/GSDMD信号轴介导的细胞焦亡与糖耐量减低胰岛 β 细胞的关系及中医药防治研究进展[J]. *西部中医药*, 2025, 38(10): 104-108.
- [9] 刘洋, 于洋, 周南, 等. 黄芩苷抑制NLRP3炎症小体与TLR4/NF- κ B信号通路缓解感染性早产大鼠子宫平滑肌收缩[J]. *解剖科学进展*, 2021, 27(1): 22-25.
- [10] DVORAK B, HALPERN M D, HOLUBEC H, et al. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(1): 156-164.