

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.045

NAFLD 患者肠粘膜机械屏障损伤的研究*

叶艳伟 庄丽维[△] 韩继武 薄挽澜 王立国 李春苗

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是慢性肝损伤的主要病因之一。据估计,大约有 20%的成人有非酒精性脂肪性肝病,2%-3%发展成非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)。NASH 是 NAFLD 的渐进形式,并可能导致肝硬化和肝细胞癌。NAFLD 不仅增加了肝病患者死亡率,作为代谢综合征,还增加了肥胖、2 型糖尿病及高脂血症的发病率。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是细胞收缩的关键酶,可使肌球蛋白轻链磷酸化(MLC),促使肌动蛋白收缩,破坏细胞间的紧密连接蛋白,使细胞骨架收缩,进而使肠上皮通透性增加,肠粘膜机械屏障遭到破坏,致使 NAFLD 的病情进一步发展。MLCK 在 NAFLD 的发生及发展中起着重要作用。NAFLD 严重威胁人类健康,影响人们的生活质量及生存质量。为 NAFLD 患者寻找崭新的治疗方法是极其必要的。

关键词:非酒精性脂肪性肝病;肠粘膜机械屏障;肌球蛋白轻链激酶;紧密连接蛋白

中图分类号:R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)03-597-04

Study on Intestinal Mechanical Barrier Injury in Patients with NAFLD*

YE Yan-wei, ZHUANG Li-wei[△], HAN Ji-wu, BO Wan-lan, WANG Li-guo, LI Chun-miao

(The Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of major causes of chronic liver injury. It is estimated that about 20 percent of adults have nonalcoholic fatty liver disease, 2% -3% developed into nonalcoholic steatohepatitis (NASH). NASH is a progressive form of NAFLD, and may lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. NAFLD not only increased the mortality of liver disease, as the metabolic syndrome, also increased obesity, type 2 diabetes and hyperlipidemia incidence. Myosin light chain kinase (MLCK) is a key enzyme in cell contraction, and it can phosphorylate myosin light chain (MLC), promote actin to contract, disrupt the closely linked proteins, make the cell skeleton shrink, increase the permeability of the intestinal epithelium, destroy the intestinal mechanical barrier, and result in the further development of NAFLD. MLCK plays an important role in the occurrence and development of NAFLD. NAFLD seriously threatens the human health, and affects people's quality of life and survival quality. So it is extremely necessary to find a new therapy for the patients with NAFLD.

Key words: Nonalcoholic fatty liver disease; Intestinal mechanical barrier; Myosin light chain kinase; Closely linked proteins

Chinese Library Classification(CLC): R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)03-597-04

前言

NAFLD 是指排除由病毒性、酒精性及其他明确病因引起的慢性肝脏损伤性疾病。随着社会生活水平的变化,逐年增加的非酒精性脂肪性肝病日渐年轻化。NAFLD 已成为体检人群中,肝功能异常的主要原因。据测 NAFLD 在近十年里将成为肝脏移植的主要病因。随着病程进展,肝细胞变性、坏死、肝脏纤维化。NAFLD 可像慢性病毒性肝病及酒精性肝病一样进展至肝硬化甚至肝癌。我国是肝癌大国。深入探讨 NAFLD 的发生发展机制及相关疾病,对于延缓单纯性脂肪肝向肝硬化阶段发展和减少肝癌的发生具有非常重要的意义。为临床治疗非酒精性脂肪性肝病提供一种新的治疗方法。现就 NAFLD 患者肠粘膜机械屏障破坏的机制予以综述。

1 NAFLD 的概念及发病机制

NAFLD 的定义是:(一)有肝脏脂肪变性的证据;(二)不存在继发原因引起的肝脏脂肪堆积,如过量饮酒,使用损伤肝脏药物或遗传性疾病。NAFLD 可分为 NAFL 和 NASH。NAFL 被定义为脂肪肝存在无肝细胞损伤。NASH 为肝脏脂肪变性并伴有肝细胞损伤而无肝纤维化^[1]。NAFLD 早期病情稳定,尽早干预预后较好,NASH 是 NAFLD 从单纯性脂肪肝到脂肪性肝硬化的必经病理途径。是病情转变和防治的重点。及时治疗 NASH,可防止病情进一步进展至肝硬化甚至是肝癌。

对于 NAFLD 的发病机制,各学者的意见尚未同一,但仍以"二次打击"学说占主导地位。一次打击是以胰岛素抵抗为中心,使肝脏脂肪浸润。此时脂肪变的肝脏对外来的打击非常

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201139)

作者简介:叶艳伟(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:非酒精性脂肪性肝病, E-mail: 1072149787@qq.com

[△] 通讯作者:庄丽维, E-mail: zhuangliwei@126.com

(收稿日期:2016-12-30 接受日期:2017-01-24)

脆弱,第二次打击如炎症因子、氧化应激、内毒素、脂联素等使肝脏损伤易感性,进而导致炎症反应、肝细胞变性以及肝纤维化生成^[2]。近来也有学者提出“四次打击”学说,即在二次打击的基础上,机体对受损的肝细胞进行修复,肝脏发生纤维化(第三步),肝脏微循环障碍,肝细胞缺血、坏死,肝小叶改建成假小叶,最终导致肝硬化,即“四次打击”。但无论是二次打击学说还是四次打击学说,都认为胰岛素抵抗是 NAFLD 发生、发展的中心环节^[3]。但并不是所有的 NAFLD 都可发展为 NASH,这说明除了胰岛素抵抗还有其他因素可能参与该过程的进展。研究表明,在二次打击中,内毒素着实发挥了重要作用,肠道来源的内毒素即脂多糖(LPS)与受体结合,激活肝脏库鲁细胞释放多种炎症因子构成炎症介质网络,扩大 LPS 作用,从而促进 NAFLD 疾病的发生与发展。

2 NAFLD 与肠道

2.1 “肠-肝轴”学说

随着“肠-肝轴”学说被广泛的认可和接受,肠黏膜屏障功能在各种肝病的进展过程中的作用也深受人们的关注。在结构与功能,前肠是这两个器官的共同来源,肠淋巴细胞起源于发育中的肝脏;在解剖学上,二者通过共同的交通-门静脉,相互关联,肠道来源的血经门静脉回流入肝,而后又成为肝脏的主要血供,同时胆汁从肝脏排泄后又随肠-肝轴进入小肠,影响肠道。正常情况下,肠黏膜屏障是能够允许小量内毒素通过的,从而使肝脏内皮细胞处于活化状态。当肠黏膜屏障被破坏,细菌和内毒素将透过肠腔通过门静脉进入肝脏,使肝脏受累,内毒素激活肝脏后会分泌多种炎症因子,引发一系列炎症反应,诱导并加重肝损伤。而肝脏分泌的炎症因子大部分通过肠-肝循环进入肠道引起肠道损伤。二者相互影响,互相关联,形成恶性循环。

2.2 肠源性内毒素

各种脂肪细胞因子和促炎性因子(例如 TNF- α , IFN- γ)在 NAFLD 的发病机制中发挥着重要作用。刘慧研究证实 NAFLD 存在胰岛素抵抗,且血清内毒素及炎症因子均增加,二者参与了 NAFLD 的发生及发展^[4]。研究表明高脂饮食动物肝脏中 TNF- α 水平明显升高,且上述因子并不是肝脏自身所分泌,引起肝脏“二次打击”的炎症因子及内毒素很有可能来自肝外,首先我们想到的是与肝脏有着“交通”的肠道。当肠黏膜机械屏障受损这些炎症因子及内毒素经“交通”即门静脉系统进入肝脏引起肝脏损伤。近几年的研究证明了肠道来源的内毒素(即脂多糖 LPS)在 NAFLD 的病情变化中起了重要作用。给予 NAFLD 动物模型腹腔注射内毒素可以使肝脏中的 TNF- α 激活并表达,触发肝脏级联炎症反应^[5]。在 NAFLD 病情恶化过程中,从单纯性脂肪肝到早期肝纤维化的过程中,血浆内毒素水平的升高与肠黏膜通透性增加有关^[6]。大量的研究证明在各种肝脏疾病时,肠黏膜机械屏障被破坏,使肠源性内毒素进入肝脏,从而加重肝脏损伤^[7,9]。内毒素不仅对脏细胞有直接损伤作用,还可以激活肝脏库鲁细胞释放大量的炎症因子,引起级联放大反应,炎症因子又经过肝-肠循环进入肠腔,损伤肠道。因此探讨 NAFLD 患者肠黏膜屏障的变化机制为 NAFLD 患者提供新的治疗方法是有必要的。

2.3 NAFLD 患者肠黏膜机械屏障的变化

与肠黏膜通透性关系最大的是机械屏障。在机械屏障,两种紧密连接蛋白-occludin 和 ZO-1,在肠上皮细胞中发挥重要作用。当紧密连接遭到破坏时,细胞间隙增大,肠黏膜通透性增加,内毒素等有害物质经细胞间隙进入血液循环,触发各种炎症反应,甚至导致多器官功能衰竭。肠黏膜机械屏障损伤主要表现在肠黏膜通透性升高。在 NAFLD 的动物结果显示,肠黏膜的通透性在实验组较对照组明显增加,而且肠黏膜紧密连接蛋白的完整性也受到破坏^[10]。有试验检测到 NAFLD 大鼠门静脉血中内毒素水平升高,Occludin 在肠黏膜中表达下降,紧密连接在电子显微镜下排列紊乱,提示 NAFLD 肠黏膜屏障功能破坏,通透性增加^[11]。任卫英等成功模拟了动物实验,证明 NAFLD 时肠黏膜机械屏障被破坏,与肠道慢性炎症和紧密连接蛋白的表达异常有关,且紧密连接蛋白的表达减少与肝脏脂肪变性程度一致^[12]。Miele 等人的研究通过肝组织活检证实 35 名 NAFLD 患者体内肠黏膜机械屏障遭到破坏,通透性增高,紧密连接蛋白表达减少^[10]。人们还发现 NAFLD 患者小肠细菌过度生长且与肝脏脂肪变的程度有关,提示肠道菌群失调可能促进肠道内毒素的吸收,进一步可导致肝脏炎症和肝纤维化的发生^[13]。Gabele 等人发现,肠黏膜受损可促进肝纤维化及肝组织炎症^[14]。以上实验均证明肠黏膜屏障损伤参与了 NAFLD 的发病过程,因此注重肠黏膜屏障功能的早期维护可能有助于防治 NASH 甚至肝癌,应引起临床重视。

2.4 MLCK 在肠黏膜屏障中的变化

肠黏膜机械屏障功能的完善与否决定了内毒素是否能够通过门静脉进入肝脏,从而引起肝脏损伤。实验证明 TNF- α 、IFN- γ 等炎症因子能够损害肠黏膜屏障功能,其机制是激活 MLCK^[15]。MLCK 的作用是调控紧密连接蛋白的通透性。MLCK 是细胞收缩的关键酶,属于 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白酶,当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时, Ca^{2+} 迅速结合到 MLCK 的钙调蛋白端并使其激活,活化的 MLCK 能使肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化,磷酸化的 MLC 可激活肌球蛋白 ATP 酶,产生的能量使细胞骨架中的肌动蛋白与肌球蛋白相互滑动,对紧密连接和细胞表面产生张力,开放紧密连接,从而使肠上皮通透性增加^[16]。磷酸化的 MLC 被认为是肠上皮机械屏障破坏的分子基础。MLCK 在内皮细胞屏障功能障碍中发挥了重要作用^[17]。有文献报道在内毒素及炎症因子的作用下,肠上皮细胞紧密连接通过活化 MLCK,使肠上皮细胞间隙增大,肠黏膜通透性增加^[18]。在 MLCK 与肠黏膜屏障关系的研究中发现,炎症性肠病患者,肠黏膜上皮细胞 MLCK 表达和活性均增强^[19]。我国有研究充分证实了这一点^[20]。国外也有研究证实肠源性内毒素 LPS 可激活 MLCK 引起紧密连接发生变化,导致肠黏膜屏障功能障碍,肠上皮通透性增加^[21]。

3 ML-7 在肠道中的作用

研究发现 MLCK 能够使肠黏膜通透性增加,给予 MLCK 的阻滞剂 ML-7 能够改善肠黏膜通透性,减少内毒素的吸收^[22]。许建明的实验组证实:在溃疡性结肠炎患者,肠黏膜通透性与 MLCK 活性一致,并且给予 MLCK 抑制剂 ML-7 后患者肠黏膜通透性得到改善,进一步证实 MLCK 可能参与了肠黏膜机

械屏障损伤的发生机制^[23]。Wu 等人证明肠梗阻小鼠肠上皮通透性增加由 MLCK 引起,给予小鼠 ML-7 可改善由 MLC 磷酸化引起的肠上皮通透性。在内毒素血症等诱导腹泻的动物模型中,MLCK 的活化以及 MLC 的磷酸化水平与肠粘膜细胞间通透性相关;给予 MLCK 的抑制剂 ML-7 后可以有效改善内毒素血症引起的肠粘膜通透性,同时还可以使促炎因子,如 IFN- γ 、TNF- α 以及 IL-10 等细胞因子在肝脏中表达减少,可能会对肝脏起到保护作用^[24-27]。适当的抑制肠上皮细胞 MLCK 的活性,从而改善肠粘膜通透性,减少内毒素等炎性介质进入门脉系统,可能对预防 NAFLD 有重要意义。如果在非酒精性脂肪肝患者中给予 MLCK 的特异性抑制剂 ML-7,将有可能改善肠粘膜通透性,延缓甚至避免 NAFLD 的进一步发展。MLCK 在增加其他微血管通透性导致血管壁屏障功能障碍方面也有重大作用^[28]。有文献报道等给予兔子高脂饮食后诱导动脉粥样硬化(AS),使动脉壁渗透率增加,其机制与 MLCK 高表达使 MLC 发生磷酸化有关,细胞间隙增大,血管通透性增加,使炎性细胞,脂质成分容易沉积,而发生动脉粥样硬化,给予 MLCK 抑制剂 ML-7 可减弱动脉粥样硬化和渗透性^[29,30]。

4 小结与展望

以上实验数据均表明炎性因子可以诱导 MLCK 的表达,引起 MLC 磷酸化,进而开放紧密连接,使上皮细胞通透性增加,肠源性内毒素经门静脉入血引起肝脏损伤。MLCK 可以准确反映肠上皮屏障功能。

综上所述,MLCK 能够引起紧密连接发生变化,导致上皮细胞通透性增加,使内毒素穿过肠道经门静脉系统进入肝脏,引起肝脏损伤。肠源性内毒素血症的治疗现状,主要从改善肠道菌群减少内毒素的产生,然而,从根本上未解决问题。因此,研究肠粘膜屏障受损的机制,延缓 NAFL 向 NASH 发展,为 NAFLD 患者提供崭新的治疗方案是十分必要的。已有的研究多集中在动物实验,尚无法完全阐明 MLCK 在 NAFLD 患者肠道粘膜中的表达情况。因此还需要广大学者的进一步研究,探讨肠粘膜机械屏障损伤的机制必将成为今后研究慢性肝病领域的重点和热点。

参考文献(References)

- [1] Sanyal A J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association [J]. American Journal of Gastroenterology, 2012, 107(6): 2005-2023
- [2] Imajo K, Yoneda M, Ogawa Y, et al. Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis [J]. Seminars in Immunopathology, 2014, 36 (1): 115-132
- [3] 王素琴, 黄缘. 非酒精性脂肪肝病的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(23): 3410-3415
Wang Su-qin, Huang Yuan. Research progress of nonalcoholic fatty liver disease [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 22 (23): 3410-3415
- [4] 刘慧. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群变化与胰岛素抵抗及血清 LPS、TNF- α 、IL-6 的相关性研究[D]. 安徽医科大学, 2013
Liu Hui. Patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in the intestinal flora and serum LPS, TNF- α , IL-6 Correlation [D]. Anhui Medical University, 2013
- [5] Thomsen KL, Hebbard L, Glavind E. Non-alcoholic steatohepatitis weakens the acute phase response to endotoxin in rats [J]. Liver Int, 2014, 34(10): 1584-1592
- [6] Ritze Y, Böhle M, Haub S, et al. Role of serotonin in fatty acid-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. BMC Gastroenterology, 2013, 13(46): 8793-8798
- [7] Kudo H, Takahara T, Yata Y, et al. Lipopolysaccharide triggered TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model[J]. Journal of Hepatology, 2009, 51(1): 168-175
- [8] 林敏西. 肝病与肠源性内毒素血症防治 [J]. 中国感染控制杂志, 2003, 2(1): 74-77
Lin Min-xi. Endotoxemia in the liver and intestinal prevention [J] Chinese Journal of Infection Control, 2003, 2(1): 74-77
- [9] Chen P, Stärkel P, Turner J R, et al. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates TNFRI and mediates alcoholic liver disease in mice[J]. Hepatology, 2014: 883-894
- [10] Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1877-1887
- [11] 许腊梅, 孙丹莉, 张予蜀, 等. 紧密连接蛋白 Occludin 在非酒精性脂肪肝大鼠肠上皮细胞中的表达及其与 TNF- α 的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(10): 981-986
Xu La-mei, Sun Dan-li, Zhang Yu-shu, et al. Tight connection between expression and TNF- α protein in the intestinal epithelial cells Occludin nonalcoholic fatty liver in rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 18(10): 981-986
- [12] 任卫英, 沈继平, 潘刚, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠小肠黏膜上皮屏障及紧密连接蛋白表达的变化[J/CD]. 中华临床医师杂志, 2013, 13 (13): 219-234
Ren Wei-ying, Shen Ji-ping, Pan Gang, et al. Non-alcoholic fatty liver rat intestinal epithelial barrier and tight junction protein expression changes [J / CD]. Clinicalns, 2013, 13(13): 219-234
- [13] LK S, R H, R. K. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(9): 923-929
- [14] Gabele E. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH [J]. Journal of Hepatology, 2011, 55(6): 1391-1399
- [15] Zhang Y, Li J. Carbachol ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial tight junction damage by down-regulating NF- κ B and myosin light-chain kinase pathways[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2012, 428: 321-326
- [16] Cao M, Wang P, Sun C, et al. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Berberine via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Signaling Path way[J]. Plos One, 2013, 8(6): e61944
- [17] Rigor R R, Shen Q, Pivetti C D, et al. Myosin Light Chain Kinase Signaling in Endothelial Barrier Dysfunction [J]. Medicinal Research Reviews, 2013, 33(5): 911-933
- [18] Gilbert S, Zhang R, Denson L, et al. Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain ki-

- nase-mediated loss of barrier function and inflammation [J]. *Embo Molecular Medicine*, 2012, 4(2): 109-124
- [19] Kane A V. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease[J]. *Laboratory Investigation*, 2006, 86(2): 191-201
- [20] 刘晓昌, 梅俏, 黄健等. 溃疡性结肠炎患者小肠黏膜通透性改变及其机制研究[J]. *中华消化杂志*, 2013, 33(8): 559-561
Liu Xiao-chang, Mei Qiao, Huang Jian, et al. Ulcerative colitis intestinal mucosal permeability and its mechanism [J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2013, 33(8): 559-561
- [21] Su L, Nalle S C, Shen L, et al. TNFR2 Activates MLCK-Dependent Tight Junction Dysregulation to Cause Apoptosis-Mediated Barrier Loss and Experimental Colitis [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(2): 407-415
- [22] 黄健, 梅俏, 韩亮等. 环孢素 A 对 DSS 结肠炎小鼠肠黏膜通透性影响及其机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, (10): 1468-1471
Huang Jian, Mei Qiao, Han Liang, et al. The study of cyclosporine A DSS colitis mouse intestinal permeability and its mechanism [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, (10): 1468-1471
- [23] 刘晓昌. 溃疡性结肠炎肠黏膜通透性改变及其机制的临床和基础研究[D]. 安徽医科大学, 2012
Liu Xiao-chang. The study of cyclosporine A DSS colitis mouse intestinal permeability and its mechanism[D]. *Anhui Medical University*, 2012
- [24] Wu C C, Lu Y Z, Wu L L, et al. Role of myosin light chain kinase in intestinal epithelial barrier defects in a rat model of bowel obstruction [J]. *Bmc Gastroenterology*, 2010, 10(15): 39
- [25] Clayburgh D R, Barrett T A, Tang Y, et al. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(10): 2702-2715
- [26] Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, et al. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(3): 795-804
- [27] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, et al. Myosin Light Chain Kinase Is Involved in Lipopolysaccharide-Induced Disruption of Colonic Epithelial Barrier and Bacterial Translocation in Rats[J]. *American Journal of Pathology*, 2005, 167(4): 1071-1079
- [28] Shen Q, Rigor R R, Pivetti C D, et al. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function [J]. *Cardiovascular Research*, 2010, 87(2): 272-280
- [29] HQ Z, XB W, JX H, et al. Myosin light chain kinase inhibitor attenuates atherosclerosis and permeability via reduced endothelial tight junction in rabbits [J]. *International Journal of Cardiology*, 2013, 168(5): 5042-5043
- [30] Cheng X, Wan Y, Xu Y, et al. Melatonin alleviates myosin light chain kinase expression and activity via the mitogen activated protein kinase pathway during atherosclerosis in rabbits [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(1): 99-104

(上接第 587 页)

- [26] Wei X, Du Z, Zhao L, et al. IFATS series: the conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats[J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 478-488
- [27] David HN, Haelewyn B, Rouillon C, et al. Neuroprotective effects of xenon: a therapeutic window of opportunity in rats subjected to transient cerebral ischemia[J]. *FASEB J*, 2008, 22(4): 1275-1286
- [28] Xu Tao, Xu Neng-gui, Yang Zhong-hua, et al. Neuroprotective Effects of Electroacupuncture on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Newborn Rats Are Associated with Increased Expression of GDNF-RET and Protein Kinase B[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(6): 457-466
- [29] Yang C, Lin Y, Guo Q, et al. Chinese herbal medicine Xingnaojing injection for hypoxic ischemic encephalopathy in newborns: A systematic review and meta-analysis[J]. *Chin J Integr Med*, 2015
- [30] Mehwish A Mirza, Rodney Ritzel, Yan Xu, et al. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2015, 12: 32
- [31] Netto CA, Sanches E, Odorcyk FK, et al. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat [J]. *Neurosci Res*, 2017, 95(1-2): 409-421
- [32] Vera Joanna Burton, Gwendolyn Gerner, Elizabeth Cristofalo, et al. A pilot cohort study of cerebral autoregulation and 2-year neurodevelopmental outcomes in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy who received therapeutic hypothermia[J]. *BMC Neurology*, 2015, 15: 209