

CpG ODN 对哮喘小鼠肺组织共刺激分子 B7 和 CD40 表达的影响

李如霞 罗 芳 李孟荣

摘 要 **目的** 观察 CpG ODN 对哮喘小鼠肺组织共刺激分子 B7 和 CD40 表达的影响,探讨其诱导免疫耐受的可能机制。**方法** 清洁级雄性 Balb/c 小鼠 48 只,随机分为对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、地塞米松(DXM)组(C 组)、CpG ODN 组(D 组),每组 12 只。用卵白蛋白(OVA)致敏和激发建立小鼠哮喘模型。观察肺组织病理变化,支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数及分类计数,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法及免疫组织化学法分别测定肺组织中 B7、CD40 mRNA 及蛋白表达。**结果** ①肺组织病理变化:B 组支气管、血管周围及间质和肺泡腔内有较多炎性细胞浸润,支气管上皮多处断裂,细小支气管内可见黏液栓和炎性渗出物,C 组、D 组与 B 组相比明显减轻;②BALF 中 D 组嗜酸性粒细胞平均计数为 $(2.76 \pm 0.25) \times 10^7/L$,C 组为 $(1.05 \pm 1.72) \times 10^7/L$,均低于 B 组的 $(12.09 \pm 2.62) \times 10^7/L$,差异有统计学意义($P < 0.01$),D 组与 C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);③RT-PCR、免疫组化结果:C、D 组显著低于 B 组($P < 0.05$),C 组与 D 组比较无统计学差异($P > 0.05$);④相关分析:肺组织共刺激分子 B7 和 CD40 表达呈正相关($P < 0.05$, $n = 40$)。**结论** CpG ODN 能降低共刺激分子 B7、CD40 在肺组织的表达,具有改善气道炎症和诱导免疫耐受的作用。

关键词 CpG ODN 哮喘 共刺激分子 免疫耐受 小鼠

Effects of CpG ODN on B7 and CD40 Costimulatory Molecule Expression in Asthma Model of Mice. Li Ruxia, Luo Fang, Li Mengrong.

Department of Pulmonary Medicine, Affiliated Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical College, Asthma and Allergy Immunotherapy Center, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the possible mechanisms induced by CpG ODN on the expression of costimulatory molecule B7, CD40 of lung tissue in acute asthma model of mice. **Methods** Forty-eight male Balb/c mice were randomly divided into the control group (group A), asthma model group (group B), dexamethasone control group (group C), CpG ODN treatment group (group D) with 12 in each. Group B were sensitized by OVA to establish the acute mice asthma model. Lung were fixed and sections were used for histopathological examination by optics microscope to observe condition of lung inflammation; Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected and the total cell numbers were counted. The expression of B7, CD40 in the lung were measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Immunohistochemistry. **Results** ①There were infiltration of inflammatory cells in bronchial contraction, narrow lumen and perivascular surrounding. Mucus secretion increased significantly, epithelium exfoliated, basement membrane was exposed, and bronchial secretions were storage, following the basement membrane and the smooth muscle were hypertrophy in Group B, whereas group D and group C showed significantly milder changes. ②In the BALF, the mean numbers of EOS were $(2.76 \pm 0.25) \times 10^7/L$ in group D and $(1.05 \pm 1.72) \times 10^7/L$ in group C, respectively, and were both significantly lower than group B, which was $(12.09 \pm 2.62) \times 10^7/L$ ($P < 0.01$). ③The expression of B7 and CD40 in group D and group C was significantly higher than group B ($P < 0.05$), and there was no difference between group C and group D ($P > 0.05$). ④The expression of B7 was positively correlated with CD40 ($P < 0.01$, $n = 40$). **Conclusion** CpG ODN lower costimulatory molecules B7, CD40 expression in the lung tissue and improve airway inflammation, induce immune tolerance.

Key words CpG ODN; Asthma; Costimulatory molecules; Immune tolerance; Mice

支气管哮喘是一种对过敏原免疫耐受缺陷的呼

吸道慢性疾病,其中共刺激信号通路是关键性的调节因素之一。最基本的共刺激信号是由抗原呈递细胞(APC)表达的 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)分子与 T 细胞上表达的相应受体提供协同刺激分子 CD28、CTLA-4/B7 及 CD40/CD40L 组成^[1]。因此研究共刺激分子在哮喘免疫耐受发生中的机制,对提高儿童

基金项目:温州市科技局对外科技合作交流项目(H200900021)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院、育英儿童医院呼吸科哮喘及变态反应免疫治疗中心(李如霞、李孟荣);宁波市妇女儿童医院(罗芳)

通讯作者:李孟荣,电子信箱:lmjohn@163.com

哮喘防治水平具有重要意义。目前研究发现,非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)是含有 CpG DNA 结构的人工合成的寡聚核苷酸,具有免疫刺激作用,能诱导 Th1 反应,抑制 Th2 反应,从而抑制嗜酸性粒细胞的活化、增生和聚集,抑制气道高反应性,从根本上改变哮喘的疾病过程^[2]。本实验通过 OVA 致敏和激发复制哮喘小鼠动物模型,在激发前给予 CpG ODN 干预,观察 B7、CD40 在哮喘小鼠肺组织中的变化,探讨 CpG ODN 对 B7、CD40 的调控作用,为哮喘的治疗提供新的策略。

材料与方法

1. 主要试剂: CpG ODN 1826 序列如下: 5' - TCCATGACGTTCTGACGTT - 3'、琼脂糖、溴化乙锭(EB),上海生工生物工程有限公司;卵清蛋白 OVA (Grade V)、地塞米松 DXM, Sigma(美国);Al(OH)₃ 自行配置,多聚甲醛,武汉博士德公司;兔抗小鼠 CD80 单克隆抗体, Epitomics(美国);兔抗小鼠 CD40 多克隆抗体, Santa Cruz(美国);SP 免疫组化试剂盒,上海晶美生物工程有限公司;DAB 显色剂,福州迈新生物技术有限公司;DEPC, GIBCO(美国);Trizol 抽提试剂, Invitrogen(美国);RT-PCR 试剂盒, Fermentas(美国)。

2. 实验动物分组: 4~6 周龄清洁级健康雄性 Balb/c 小鼠 48 只, 体重 18~22g, 购自中科院上海实验动物中心, 于温州医学院实验动物中心层流实验室饲养, 饲养温度 25℃, 相对湿度 70%, 昼夜照明 12h/12h。随机分为 4 组(每组 12 只): 对照组(A 组)、哮喘组(B 组)、地塞米松组(C 组)、CpG ODN 组(D 组)。

3. 哮喘模型建立: 哮喘模型制备参照文献[3]方法加以改进, B、C、D 组在第 1 天和第 14 天腹腔注射 0.1% OVA/Al(OH)₃ 混合凝胶 0.1ml 致敏(含 OVA 0.1mg 和 Al(OH)₃ 10mg), 各 1 次, 共 2 次。第 25 天开始使用空气压缩雾化器向置于密闭有机玻璃容器内的小鼠喷雾 1% OVA 液激发, 每天 1 次, 每次持续 30min, 连续激发 1 周。A 组致敏和激发均以生理盐水替代 OVA, C 组和 D 组在激发前 1 天和每次激发前 1h 分别腹腔注射 DXM 0.5 毫克/(公斤·只)和 CpG ODN 50 微克/只。

4. 标本收集及检测: 小鼠末次激发后 24h, 腹腔注射 25% 乌拉坦麻醉(5ml/kg), 行气管插管并固定。打开胸腔, 观察各小鼠肺组织大体改变, 然后行右肺支气管肺泡灌洗, 灌洗液行

白细胞总数及分类计数。灌洗完毕后, 左肺组织用 4% 多聚甲醛固定, 做石蜡切片, 苏木素-伊红(HE)染色光镜观察病理变化。其余肺组织分别包好后迅速丢入液氮速冻, 置于 -80℃ 冰箱保存备 RNA 抽提。

5. RT-PCR 法检测肺组织 CD80 mRNA、CD86 mRNA 和 CD40 mRNA 的表达: 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法抽提总 RNA, 进行反转录, 按下列条件进行 PCR 扩增: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 反应 35 个循环后再 72℃ 延伸 10min, PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 获得凝胶图像后, 用 Quantity One 软件测定产物光密度值, 用目的条带与内参照 GAPDH 扩增带的光密度值之比, 作为组织中目的基因 mRNA 表达水平的指标。引物序列分别为: CD80: 上游 5' - ATGCTCACGTGTCAGAGGA - 3', 下游 5' - GACGGTCTGTTTCAGCTAATG - 3'; CD86: 上游 5' - CAACTGGACTCTACGACTTC - 3', 下游 5' - TGCTTAGACGTGCAGGTCAA - 3'; CD40: 上游 5' - CTGCTGGTCATTCCTGTGCG - 3', 下游 5' - GGGCTCTGTCTTGGCTCAT - 3'; GAPDH: 上游 5' - GCACAGTCAAGGCCGAGAA - 3', 下游 5' - CCTCACCCATTGTGATGTAGTG - 3'。

6. 免疫组织化学法(SP): 肺组织 CD80 和 CD40 蛋白表达检测步骤按 SP 使用说明书进行, 一抗选用兔抗小鼠 CD80 单克隆抗体(稀释度 1:100)及兔抗小鼠 CD40 多克隆抗体(稀释度 1:150), DAB 显色, 苏木素轻度复染, 光镜观察。阳性结果呈棕黄色, 用 image-proplus 图像分析软件测定阳性区域的相对吸光度(mean optical density, MOD), 计算 10 个 MOD 值的平均值作为该片的 MOD 值, MOD 值越大, 蛋白含量越高。

7. 统计学方法: 全部数据经 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较方差齐者采用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett'T3 检验; 两变量相关分析采用 Pearson 直线相关分析法。P < 0.05 为差异有显著性。

结 果

1. 肺组织病理学改变: 光镜下, B 组可见支气管及血管周围有较多炎性细胞浸润, 支气管上皮多处断裂, 并有基膜轻度增厚、细支气管平滑肌轻度增生等表现, A 组无上述改变, C 组与 D 组病理改变较 B 组减轻, 但未完全消失(图 1)。

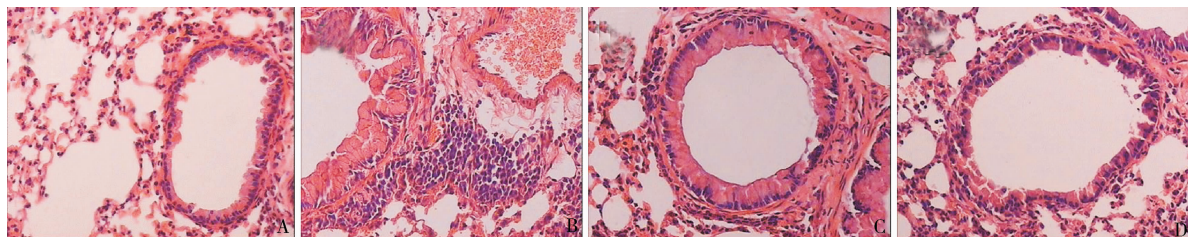


图 1 小鼠肺组织 HE 染色(×200)

A. 显示正常小鼠肺组织; B. 显示小鼠肺组织支气管周围有大量炎性细胞浸润;
C. 显示小鼠肺组织少量炎性细胞浸润; D. 显示小鼠肺组织少量炎性细胞浸润

2. BALF 中细胞总数和分类计数: B 组 BALF 中细胞总数、EOS 绝对值计数和 EOS 占细胞总数的百分比 (EOS%) 均显著高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组和 D 组上述指标均显著低于 B 组 ($P < 0.01$), 但仍显著高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组与 D 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数和分类计数 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数 ($\times 10^7/L$)	EOS 绝对数 ($\times 10^7/L$)	EOS 百分比 (%)
A 组	19.08 $\pm$ 5.34	0.14 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.18
B 组	68.88 $\pm$ 13.24	12.09 $\pm$ 2.62 *	9.10 $\pm$ 2.27 *
C 组	32.38 $\pm$ 8.01 * $\Delta\Delta$	1.05 $\pm$ 1.72 * $\Delta\Delta$	2.35 $\pm$ 0.98 * Δ
D 组	34.89 $\pm$ 9.62 $\Delta\Delta$	2.76 $\pm$ 0.25 * $\Delta\Delta$	3.17 $\pm$ 0.25 * $\Delta\Delta$

与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3. 各组小鼠肺组织 CD80、CD86、CD40 mRNA 的表达结果: B 组肺组织中共刺激分子 CD80、CD86、CD40 表达显著高于 A 组 (P 均 < 0.01), C、D 组与 A 组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), C 和 D 组显著低于 B 组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), C 组与 D 组比较无统计学差异 ($P > 0.05$, 表 2 和图 2)。

表 2 各组小鼠肺组织 CD80、CD86、CD40 mRNA 表达结果 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	CD80 mRNA	CD86 mRNA	CD40 mRNA
A 组	0.92 $\pm$ 0.20	0.83 $\pm$ 0.13	1.11 $\pm$ 0.27
B 组	1.30 $\pm$ 0.16 *	1.30 $\pm$ 0.37 *	1.85 $\pm$ 0.21 *
C 组	0.94 $\pm$ 0.15 Δ	0.70 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	1.29 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$
D 组	1.04 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	0.67 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	1.15 $\pm$ 0.25 $\Delta\Delta$

与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.05$

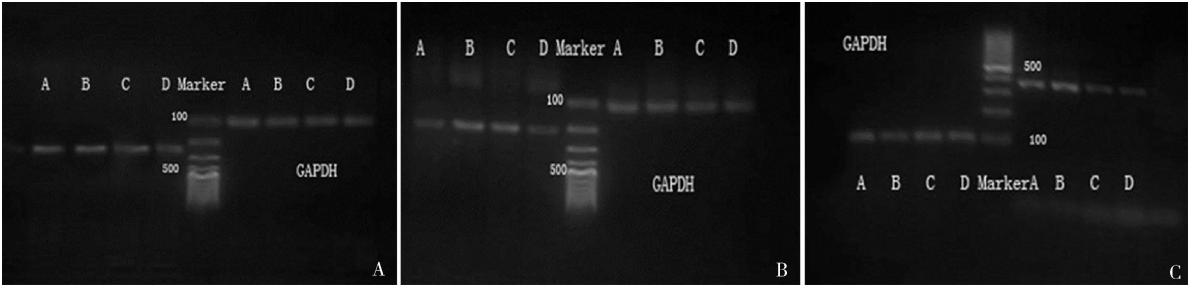


图 2 小鼠肺组织 RT-PCR 电泳结果

A ~ C 分别代表各组小鼠肺组织 CD80 mRNA、CD86 mRNA、CD40 mRNA 的表达结果

4. 各组小鼠肺组织中 CD80 和 CD40 蛋白免疫组化结果比较: 免疫组织化学显示 CD80 和 CD40 蛋白主要表达于支气管上皮细胞和支气管周围的炎性细胞, B 组支气管上皮细胞 CD80 和 CD40 蛋白的表达均显著高于 A 组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), C 组、D 组支气管上皮细胞 CD80 和 CD40 蛋白的表达均显著低于 B 组 (P 均 < 0.01), C 和 D 组与 A 组比较无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 3 和图 3)。

表 3 各组小鼠支气管上皮细胞免疫组化法检测 CD80 和 CD40 蛋白的表达 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	CD80	CD40
A 组	0.18 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.07
B 组	0.29 $\pm$ 0.04 **	0.22 $\pm$ 0.03 *
C 组	0.19 $\pm$ 0.02 Δ	0.15 $\pm$ 0.04 Δ
D 组	0.16 $\pm$ 0.02 Δ	0.15 $\pm$ 0.05 Δ

与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$

CD40 蛋白表达 (用平均吸光度 MOD 表示) 呈正相关 ($r = 0.33, P < 0.05, n = 40$)。肺组织共刺激分子 CD86 mRNA 和 CD40 mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.52, P < 0.01, n = 40$)。肺组织共刺激分子 CD80 mRNA 和 CD86 mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.49, P < 0.05, n = 40$)。

讨 论

“Th1/Th2 偏移”假说是哮喘发病的主要免疫学机制, 但近年的研究发现该学说不能完全解释哮喘的免疫学机制, 又提出“免疫耐受缺陷”假说。免疫治疗的策略之一就是 通过不同的信号通路降低胸腺外淋巴细胞活性而导致外周耐受, 免疫治疗可以诱导细胞在其激活过程中发生凋亡, 而这种凋亡过程与缺乏共刺激信号的辅助有关^[4]。因此阻断共刺激通路可能诱导机体产生免疫耐受。自 1995 年 Krieg 等^[5]首次提出 CpG ODN 的免疫调节作用以来, 国内外做了大量关于 CpG ODN 在哮喘免疫治疗中的作用的研究。已证实 CpG ODN 具有减轻哮喘模型气道黏膜充

5. 相关性分析: 肺组织共刺激分子 CD80 和

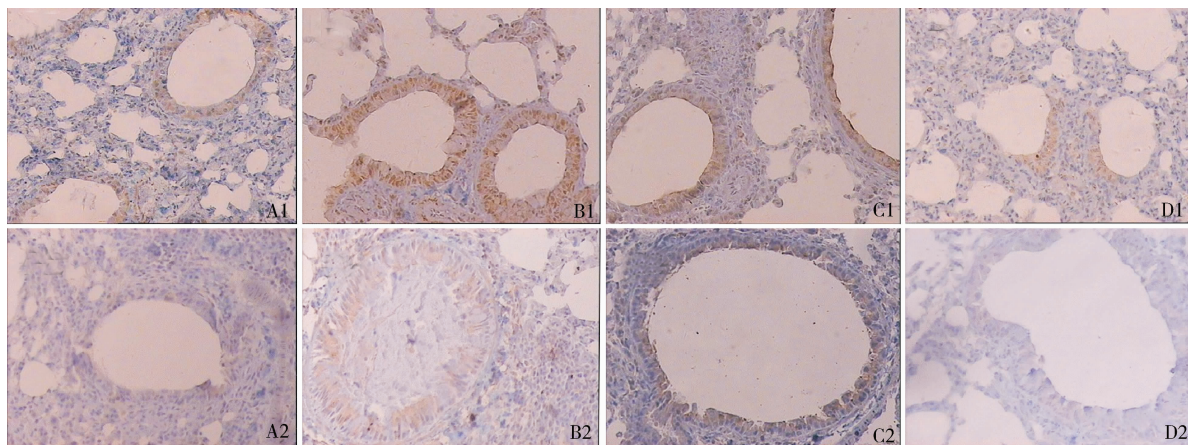


图3 小鼠肺组织免疫组织化学染色(×200)

A1、A2 为 A 组,分别显示小鼠支气管 CD80、CD40 正常表达,B1、B2 为 B 组,分别显示小鼠支气管 CD80、CD40 高表达,C1、C2 为 C 组,分别显示小鼠支气管 CD80、CD40 较低表达,D1、D2 为 D 组,分别显示小鼠支气管 CD80、CD40 较低表达

血水肿、黏膜增厚、支气管壁及血管周围炎性细胞浸润及诱导 Th2 向 Th1 转变的作用^[6,7]。Hessel 等^[8]发现 CpG ODN 通过减少气道 APC 细胞上的共刺激分子表达而降低气道炎症,这些研究均支持了本实验结果。

已知 T、B 淋巴细胞的有效活化需要两个信号的参与,即 AP-MHC 与 TCR-CD3 结合提供第一信号,以及共刺激分子介导的第二信号。因此 CD28、CTLA-4/B7 及 CD40/CD40L 介导的共刺激信号在参与 Th 亚群的极化以及疾病免疫病理的发生、发展、转归中起着十分重要的作用。B7 分子以单体形式表达于 APC 表面,包括 3 个成员 B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-3, B7-1 和 B7-2 是两个提供协同刺激信号的重要分子^[9]。CD40 分布广泛,主要表达在 B 细胞、单核细胞和树突状细胞表面,在 B 细胞活化、抗体产生和同型转换、记忆 B 细胞分化等方面发挥关键作用。表达于 T 细胞表面的 CD40L 通过 CD40 对 B 细胞介导的免疫反应发挥重要作用。CD40/CD40L 途径可能比 B7/CD28 途径更为重要,它的存在可以上调 B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) 在 APC 上的表达^[10]。若缺乏第二信号分子提供的协同刺激信号,T 细胞便不能活化,而处于无能状态,但是当其表达过度能引起异常的免疫反应^[11]。有研究发现,哮喘患者气道上皮细胞表达 CD40 和 CD40L 水平增高^[12]。

本研究显示哮喘组肺组织 B 细胞表面 CD80、CD86 及 CD40 表达均显著高于正常对照组,同时相关分析显示肺组织共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40

表达呈正相关,表明共刺激分子在哮喘发病中起到了重要作用。而 CpG ODN 的治疗干预可明显抑制哮喘小鼠肺组织中 B7 分子及 CD40 的过高表达,提示 CpG ODN 治疗哮喘可能通过改变调控共刺激分子 B7 及 CD40 而发挥作用,从而诱导免疫耐受。

总之,诱导外周抗原特异性免疫耐受的形成,是预防和治疗哮喘的一个新方向,哮喘是一种对过敏原免疫耐受缺陷的疾病,因此研究哮喘免疫耐受的发生机制,对于提高儿童哮喘防治水平具有重要意义。

参考文献

- 1 Radhakrishnan S, Cabrera R, Bruns KM, *et al.* Indirect recruitment of a CD40 signaling pathway in dendritic cells by B7-DC cross-linking antibody modulates T cell functions [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (4): e5373
- 2 Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (3): 256-262
- 3 崇蕾, 张维溪, 聂颖, 等. Notch2、Notch4 受体在哮喘小鼠肺中的表达及布地奈德、姜黄素对其影响 [J]. *医学研究杂志*, 2012, 42 (4): 73-75
- 4 Fujita H, Meyer N, Akdis M, *et al.* Mechanisms of immune tolerance to allergens. [J]. *Chemical Immunology and Allergy*, 2012, 96: 30-38
- 5 Krieg AM, Yi AK, Matson S, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 374 (6522): 546-549
- 6 Chen K, Xiang Y, Yao X, *et al.* The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (10): 1391-1398
- 7 Kulis M, Gorentla B, Burks AW, *et al.* Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice

- [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(5): 906-915
- 8 Hessel EM, Chu M, Lizcano JO, *et al.* Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction[J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1563-1573
- 9 Rau F C, Dieter J, Luo Z, *et al.* B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion[J]. J Immunol, 2009, 183(12): 7661-7671
- 10 Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, *et al.* CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease[J]. Biofactors, 2009, 35(6): 474-483
- 11 Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember[J]. Semin Immunol, 2009, 21(2): 69-77
- 12 Zietkowski Z, Skiepkowski R, Tomasiak MM, *et al.* Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction[J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2008, 18(4): 272-278 (收稿日期: 2013-05-27)
- (修回日期: 2013-06-28)

枯草杆菌肠球菌二联活菌多维颗粒在早产儿中的临床应用

甘景立 孙书丽 周建勋 梅国花 龚小伟

摘要 **目的** 观察枯草杆菌肠球菌二联活菌多维颗粒在早产儿中的辅助治疗作用。**方法** 将笔者医院新生儿科 2005 年 1 月~2012 年 12 月收治的符合条件的早产儿随机分成治疗组 286 例, 对照组 210 例, 对照组给予常规治疗; 治疗组在常规治疗基础上加用枯草杆菌肠球菌二联活菌多维颗粒口服, 0.5 克/次, 2 次/日, 对治疗效果进行统计学分析。**结果** 治疗组患儿体重增长更快, 第 14 天即与对照组比较差异有统计学意义 ($F=6.049, P<0.01$), 住院时间更短 ($F=7.851, P<0.01$), 黄疸消退更理想 ($F=10.019, P<0.01$), 达足量喂养时间更早 ($F=8.625, P<0.01$), 喂养不耐受的发生率更低 ($\chi^2=7.182, P<0.05$), 继发感染的发生率更低 ($\chi^2=4.213, P<0.05$), NEC 发生率更低 ($\chi^2=4.801, P<0.05$), 未发现益生菌相关败血症的发生。**结论** 枯草杆菌肠球菌二联活菌多维颗粒能改善早产儿的喂养及生长等一般情况、胆红素的代谢并减低感染相关性疾病的发病率, 对早产儿有辅助治疗作用。

关键词 早产儿 益生菌 临床观察

Efficacy of Combined Bacillus Sctibilis and Enterococcus Faecium Granules with Multivitamins, Live in the Clinical Application of Premature Infants. Gan Jingli, Sun Shuli, Zhou Jianxun, Mei Guohua, Gong Xiaowei. Department of Pediatrics, Quzhou Municipal Maternity and Child Hospital in Zhejiang Province, Zhejiang 324000, China

Abstract Objective To investigate the efficacy of combined bacillus sctibilis and enterococcus faecium granules with multivitamins, live in the clinical application of premature infants. **Methods** Totally 496 eligible premature infants from January 2005 to December 2012 were randomly divided into two groups, with 286 in the treatment group and 210 in the control group. Patients of both groups were subjected to routine treatments. Besides, patients of the treatment group were given combined bacillus sctibilis and enterococcus faecium granules with multivitamins, live oral, 0.5g, 2/day. **Results** There was obviously significant difference in weight growth ($F=6.049, P<0.01$), hospitalization time ($F=7.851, P<0.01$), jaundice subsidise ($F=10.019, P<0.01$), enough feeding time ($F=8.625, P<0.01$), incidence of feeding intolerance ($\chi^2=7.182, P<0.05$), incidence of secondary infection ($\chi^2=4.213, P<0.05$), and incidence of NEC ($\chi^2=4.801, P<0.05$). We did not find that probiotics related to the occurrence of sepsis. **Conclusion** Combined bacillus sctibilis and enterococcus faecium granules with multivitamins, live can improve the premature infant feeding and growth in general, bilirubin metabolism and reduce the incidence of infection-related disease, and have auxiliary therapeutic action for premature.

Key words Premature; Probiotics; Clinical observation

早产指妊娠满 28 周至不满 37 足周 (196~258 日) 间分娩者, 是围生医学的重要课题, 是造成新生

儿发病率及病死率升高的主要原因, 是目前围生儿发病和死亡的首要原因。本研究对 2005 年 1 月~2012 年 12 月笔者医院产科分娩及同期外院转入笔者医院儿科的符合条件的早产儿共 496 例临床资料进行了总结分析, 现报道如下。