

研究报告

基于宏基因组技术分析产褥期新生儿肠道菌群变化的研究

韩小飞^{1,2}, 周俊栏¹, 赵岩¹, 卢静¹, 吕明生¹, 王淑军¹

(1. 江苏海洋大学海洋生物资源与环境重点实验室/海洋生物技术重点实验室, 江苏海洋大学, 江苏连云港 225005; 2. 南京医科大学康达学院, 江苏连云港 222000)

摘要:目的 研究影响产褥期新生儿肠道微生物群的建立过程中的因素。方法 采用宏基因组技术, 对不同喂养方式、出生方式和性别的4名在月子会所中产褥期新生儿肠道微生物生态系统形成的过程进行研究。结果 新生儿肠道菌群多样性均明显增加, 满月时新生儿肠道菌群中存在显著差异的纲为拟杆菌和放线菌($P < 0.05$)。母乳与婴儿配方奶粉间隔喂养的混合喂养的新生儿肠道中乳酸杆菌比例显著低于母乳喂养方式的新生儿。母乳喂养的新生儿肠道菌群多样性较低, 而混合喂养的新生儿菌群结构则多样性高, 拟杆菌、肠杆菌、梭菌的丰度高于母乳喂养的新生儿。在纲水平上, 母乳喂养与混合喂养组肠道菌群中存在显著差异的菌为杆菌。满月时女婴肠道菌群物种组成与男婴相比更丰富、分布均匀度更高。结论 喂养方式、分娩方式、性别均在不同程度上影响产褥期新生儿肠道微生物的构成。

关键词:宏基因组技术; 肠道菌群; 新生儿; 母乳喂养; 混合喂养

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)05-0664-10

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.05.005

Analysis of changes in the intestinal flora of neonates during puerperium based on metagenomic technology

HAN Xiaofei^{1,2}, ZHOU Junlan¹, ZHAO Yan¹, LU Jing¹, LYU Mingsheng¹, WANG Shujun¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment/Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Jiangsu Lianyungang 225005, China;

2. Kangda College, University of Nanjing Medical, Jiangsu Lianyungang 222000, China)

Abstract: Objective The factors affecting the establishment of the neonatal gut microbiota during puerperium were studied. **Methods** Metagenomic technology was used to study the formation of the gut microbial ecosystem of four neonates in confinement during the puerperium, using different feeding methods, birth methods and genders. **Results** The diversity of neonatal gut microbiota increased significantly from birth to 30 d, and the classes with significant differences in neonatal gut microbiota in the first month were Bacteroides and Actinomyces. The proportion of lactobacilli in the gut of mixed-fed neonates, who were fed breastmilk and infant formula at intervals, was significantly lower than that of neonates who were breastfed. Breastfed neonates had lower gut flora diversity compared to mixed-fed neonates. Mixed-fed neonates had higher gut flora diversity compared to breastfed neonates, the abundance of Bacteroides, Enterobacter and Clostridium was higher than that of breastfed newborns. The order of bacteria with significant differences in the intestinal flora of the breastfeeding and mixed-feeding groups was Bacillus. Additionally, the intestinal flora composition of female infants in the first month was more abundant and evenly distributed than that of male infants. **Conclusion** Feeding mode, delivery mode, and gender can affect the composition of intestinal microorganisms in newborns during puerperium in varying degrees.

Key words: Metagenomic technology; intestinal flora; newborn; breast-feeding; mixed feeding

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 江苏省研究生创新项目(SJGX20-1325); 南京医科大学康达学院科研发展基金课题(KD2020KYJJZD004); 南京医科大学科技发展基金(NMUB20210366)

作者简介: 韩小飞 女 硕士研究生 研究方向为微生物学 E-mail: hanxiaofei@njmu.edu.cn

通信作者: 吕明生 男 教授 研究方向为食品生物技术 E-mail: mslyu@jou.edu.cn

肠道中含有高度复杂的微生态系统,肠道中的微生物菌群处于动态变化中,而肠道菌群稳态对维护人类的健康具有至关重要的作用^[1-2]。肠道微生态系统与人类免疫和疾病密切相关,肠道菌群紊乱可导致一系列疾病^[2]。肠道微生物群及其代谢产物参与宿主的各种活动,甚至影响人类的大脑和行为^[3]。肠道菌群的调控已逐渐成为预防和治疗一些疾病的新方法^[1-3]。

乳酸菌是肠道微生物群的重要组成部分,参与改善体内平衡,主要分布在球菌属(乳球菌属、吸球菌属、链球菌属、明串珠菌属和片球菌属)和杆状菌属(胡萝卜杆菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属和孢子乳杆菌属)^[4-5]。

新生儿肠道微生物的转变经历了从无到有、从简单到复杂、从不稳定到稳定的过程^[6]。由于肠道富含氧气,最先定植在新生儿肠道内的微生物种类为需氧型和兼性厌氧型,随着新生儿的成长,肠道里的微生物逐渐转变为厌氧型。新生儿肠道微生物定植发育期间,微生物群更替频繁,受许多因素的影响^[7]。新生儿肠道菌群的变化与定植对健康至关重要。新生儿肠道微生物菌群在满月前的变化规律研究可为保障婴儿的健康提供依据。建立健康的微生物群对于免疫规划、疾病预防和健康成长具有重要意义^[8]。然而,目前针对产褥期新生儿体内微生物菌群变化的相关研究非常少^[9]。在探索肠

道微生物群变化的研究中,宏基因组技术可以更深入地挖掘菌群的多样性,监测菌群的动态变化。

本研究通过宏基因组技术检测了新生儿肠道微生物的变化,拟为新生儿肠道微生物的调控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

连云港妇幼保健院月子会所住所 4 名新生儿的粪便,其中包括 2 名女婴,均为剖宫产;2 名男婴,顺产与剖宫产各 1 名。在入所和出所时各采 1 次粪便,时间间隔为 28 d。

1.1.2 混合喂养添加的奶粉营养成分

混合喂养新生儿:母乳与婴儿配方奶粉间隔喂养,比例约为 1:1。配方奶粉分别为启赋一段(1F1)和飞鹤一段(1F2)。

1.1.3 产妇食谱

产妇入所期间,饮食均由医院月子会所营养科提供,周食谱见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

护士经培训后,用无菌采样勺采集新生儿自然排出的粪便,置于含冰袋的冷藏保温箱,用于宏基因组测序分析样本情况见表 2。

表 1 产妇的周食谱

Table 1 Dietary structure of each week

| 餐次 | 菜品 | 周一 | 周二 | 周三 | 周四 | 周五 | 周六 | 周日 |
|--------------|----|--------------|--------------|---------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| 午餐 2荤2素1汤 | 荤菜 | 水产:鱼 禽肉:鸡 | 水产:虾 禽肉:鸭 | 水产:鲍鱼 禽肉:鸡 | 水产:鲈鱼 猪蹄 | 水产:虾 禽肉:鸡 | 水产:黄鱼 猪肝 | 水产:鲜贝 禽肉:鸡 |
| | 素菜 | 叶菜 豆制品 | 叶菜 根茎类 | 根茎类 豆制品 | 豆制品 菌菇类 | 根茎类 瓜果类 | 叶菜 瓜果类 | 叶菜 豆制品 |
| | 汤品 | 猪骨汤 水产汤 | 猪蹄汤 乳鸽汤 | 乌鸡汤 乌鸡汤 | 猪腰汤 牡蛎汤 | 鲫鱼汤 排骨汤 | 牛肉汤 牛肉汤 | 黑鱼汤 猪肚汤 |
| 晚餐 1荤1素 | 荤菜 | 牛肉 猪肝 | 禽肉:鸡 禽肉:鸡 | 水产:黄鳝 猪肉 | 水产:海参 猪肉 | 水产:墨鱼 蛋类 | 水产:虾 水产:虾 | 牛肉 牛肉 |
| | 素菜 | 根茎类 | 根茎类 | 瓜果类 | 瓜果类 | 根茎类 | 菌菇类 | 叶菜 |

表 2 宏基因组测序部分取样新生儿基本信息

Table 2 Information of sampled newborns for metagenomic sequencing

| 性别 | 入所取样编号 | 出所取样编号 | 喂养方式 | 出生胎龄 | 出生体质量/kg | 生产方式 | 出生日期 |
|----|--------|--------|------|--------------------|----------|------|-------------|
| 男 | MB-1 | MB-2 | 母乳喂养 | 37 ⁺⁶ 周 | 3.67 | 剖宫产 | 2021年11月11日 |
| 男 | MM-1 | MM-2 | 混合喂养 | 39 ⁺² 周 | 2.93 | 顺产 | 2021年12月20日 |
| 女 | FB-1 | FB-2 | 母乳喂养 | 39 ⁺¹ 周 | 2.50 | 剖宫产 | 2021年11月23日 |
| 女 | FM-1 | FM-2 | 混合喂养 | 40 ⁺⁶ 周 | 3.95 | 剖宫产 | 2021年11月23日 |

1.2.2 宏基因组测序

采集 4 名新生儿的粪便样品,在入所和出所时各采一次。样本寄生工生物工程(上海)股份有限公司宏基因组测序。使用 E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒提取样本 DNA,通过 2% 琼脂糖凝

胶电泳检测文库,Qubit3.0 荧光定量仪检测文库浓度。使用 Illumina Hiseq™ 测序平台得到原始测序序列,得到有效序列后,使用 Usearch^[10]对所有序列进行 OTU 聚类分析,RDP classifier^[11]、SINTAX^[12]、Blast^[13]对 OTU 物种注释及统计,得到各样本分类

水平信息进行多样性分析,并在此基础上进行群落结构的统计分析。

1.2.3 宏基因组信息分析

1.2.3.1 样本有效序列数据统计

8份新生儿粪便样品测序得到的序列,使用 cutadapt^[14]去除测序引物接头序列,成对 reads 通过 PEAR^[15]拼接(merge)成一条序列,从拼接后数据中区分各样本数据,并校正方向,reads 尾部低于质量值 20 的碱基使用 PRINSEQ^[16]切除,通过设置 10 bp 的窗口过滤掉低复杂度的序列,最终获得 8 个样本的有效数据。

1.2.3.2 稀释曲线分析

以超 1 指数(Chao)为纵轴,以随机抽取的序列数据量为横轴绘制曲线,样本曲线能否到达平缓,可判断测序数据量是否达到要求。

1.2.3.3 Rank-abundance 曲线分析

用于物种的分析多样性,横轴为 OTU 等级,纵轴为每个 OTU 中所含的序列数。横轴上的长度表示物种的丰富程度;曲线的形状反映样品中物种的均匀程度。

1.2.3.4 Alpha 多样性指数分析

超 1 指数、香农指数、辛普森指数、香农维纳指数等反映样品中微生物数量丰度,数值与样品中微生物丰度的相关。

1.2.3.5 样本层级聚类分析

使用 R 的 hclust 函数构建聚类树,并利用 ape package 绘制树状图。样本的相似性与距离相关。

1.2.3.6 OTU 物种分布韦恩图

韦恩图中重叠部分、未重叠部分表示样本中共有的和独有的 OTU 的数目。数字代表物种数,不同颜色代表不同组。

1.2.3.7 主成分分析

数据简化分析的技术,反映样本间的差别与距离,用横轴和纵轴表示母乳喂养与混合喂养的主成分轴,两种颜色代表喂养方式不同的两组样品,样本物种组成相似则样本点近。

1.2.3.8 两组样本 Welch'S *t*-test 分析

样本间的肠道菌群物种丰度用 STAMP 差异分析,判断组间是否存在显著性物种差异。样本分析采用威尔奇的 *t* 检验,实验中将检验得到的 *P* 值采用 FDR 做多重测试校正得到 *q* 值。

1.3 统计学分析

使用 cutadapt、PEAR、PRINSEQ、phyloseq、mothur、STAMP 进行数据处理及分析,利用 R 制作曲线图。

2 结果

2.1 检测序列

2.1.1 样本有效序列

表 3 为 8 个样本的有效数据统计,序列数量满足统计分析的要求。

表 3 样本有效序列数据统计

| 分组信息 | 样品名 | 区分样本使用的 barcode 信息 | 有效序列条数 | 碱基数 | 平均长度/bp |
|------|------|--------------------|--------|------------|---------|
| BF | MB-1 | TATGCA | 66 799 | 28 067 979 | 420.19 |
| BF | FB-1 | ATCGCA | 78 747 | 33 753 115 | 428.63 |
| BF | MB-2 | ATCACG | 58 058 | 24 492 278 | 421.86 |
| BF | FB-2 | AAGGTA | 49 291 | 20 283 593 | 411.51 |
| MF | MM-1 | TCGCAA | 67 475 | 28 226 762 | 418.33 |
| MF | FM-1 | TTACGA | 70 059 | 30 014 658 | 428.42 |
| MF | MM-2 | CGGACC | 40 180 | 16 479 294 | 410.14 |
| MF | FM-2 | ACATAG | 64 517 | 26 508 127 | 410.87 |

2.1.2 稀释曲线分析

本样品的 Chao 稀释曲线图(图 1)所示,样品曲线随着序列数据量的增加而最终趋于平缓,说明测序数据量足够,满足测序深度要求。

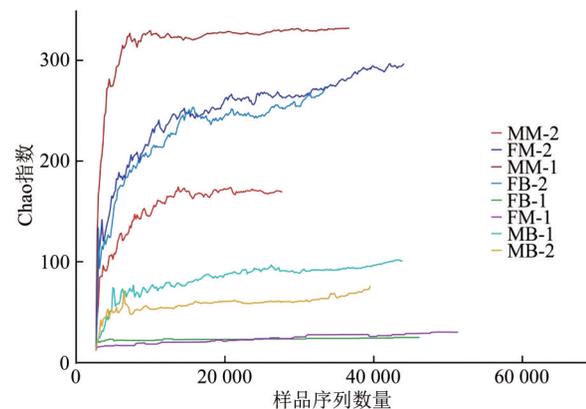


图 1 Chao 稀释曲线图

Figure 1 Chao dilution curve

2.1.3 Rank-abundance 曲线分析

由图 2 可以看出,混合喂养的新生儿粪便样本 MM-1、MM-2、FM-2 较母乳喂养的新生儿粪便样本 MB-1、MB-2、FB-1 的 Rank-abundance 曲线更宽且更平坦,表示混合喂养的新生儿肠道微生物较母乳喂养的新生儿的组成更丰富,均匀程度更高。

女婴出所的样品 FB-2、FM-2 与入所的样品 FB-1、FM-1 相比,Rank-abundance 曲线更宽且更平坦,表示女婴肠道微生物的物种组成更丰富,均匀程度更高。与此相反,男婴反而是入所时物种的组成更丰富,均匀程度更高。此外,女婴肠道物种组成丰富度和均匀度好于男婴。

2.1.4 Alpha 多样性指数分析

如表 4 所示,出所时,男婴肠道 OTUs 数量呈现

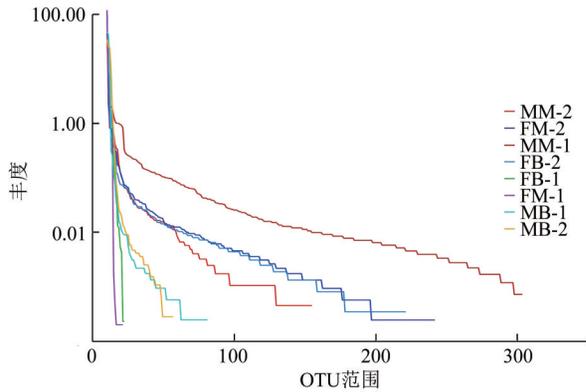


图2 新生儿粪便样本 Rank-abundance 曲线图

Figure 2 Neonatal stool sample Rank-abundance curve

表4 Alpha多样性指数统计表

Table 4 Alpha diversity index

| 编号 | 序列数 | OTU数 | 香农指数 | 超1指数 | 发现物种数 | 辛普森指数 | 香农维纳指数 |
|------|--------|------|------|--------|--------|-------|--------|
| FB-1 | 53 466 | 14 | 1.21 | 15.00 | 0.00 | 0.34 | 0.46 |
| FB-2 | 38 236 | 227 | 1.36 | 276.14 | 263.35 | 0.55 | 0.25 |
| FM-1 | 59 843 | 13 | 0.45 | 20.50 | 62.68 | 0.81 | 0.18 |
| FM-2 | 50 941 | 249 | 1.18 | 300.13 | 288.70 | 0.66 | 0.21 |
| MB-1 | 50 683 | 77 | 1.19 | 94.50 | 94.22 | 0.36 | 0.28 |
| MB-2 | 45 316 | 51 | 1.59 | 69.00 | 56.43 | 0.24 | 0.40 |
| MM-1 | 41 888 | 334 | 3.26 | 337.44 | 337.37 | 0.18 | 0.56 |
| MM-2 | 30 773 | 156 | 1.19 | 166.50 | 178.27 | 0.60 | 0.24 |

出减少的趋势,而女婴则明显上升。除混合喂养的男婴外,出所新生儿肠道菌群的多样性明显高于入所新生儿,表现为香农指数分别由入所时的 1.19、1.21 和 0.45 增加到 1.59、1.36 和 1.18。辛普森指数结果表明,新生儿 MM-1 和 FM-2 的肠道菌群多样性增加的同时,肠道群落的均匀度在下降,婴儿 FB-2 的肠道菌群多样性以及群落均匀度均有不同程度的增加。

2.1.5 样本层级聚类分析

图3以 Phylum 水平上 Bray 距离所做的样本层级聚类树,由图3可以看出样本间距离最近的是 MB-1 与 MB-2、FB-2 与 FM-2。

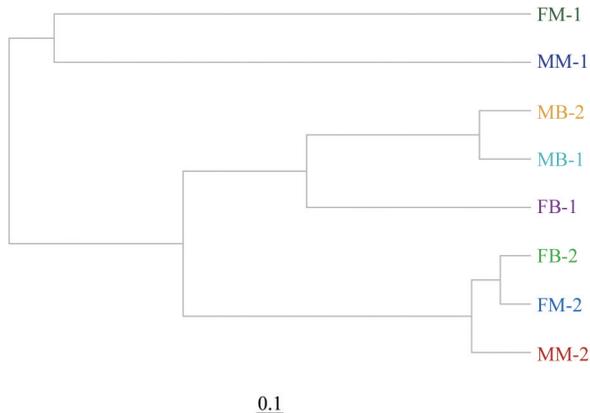


图3 样本层级聚类树

Figure 3 Sample hierarchical clustering tree

2.2 新生儿肠道菌群的演变

2.2.1 新生儿肠道菌群结构组成

样品中包含的主要菌群门类为放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 结果见图4。其中母乳喂养的新生儿在入所前后的主要门类为放线菌门、厚壁菌门, 而混合喂养的新生儿入所时的主要门类为变形菌门、拟杆菌门, 出所时与母乳喂养的新生儿主要门类一致。

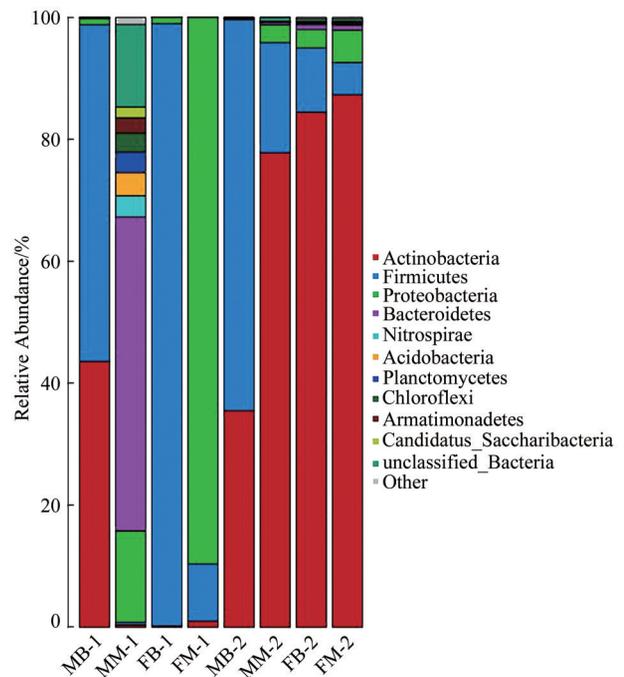


图4 新生儿肠道菌群门水平物种分布

Figure 4 Species distribution at the phylum level of the neonatal gut flora

由图5可以看出放线菌门由入所时的 11.20%, 增至出所时的 70.71%, 而厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门出所时均呈现下降趋势。

新生儿肠道菌群主要体现在双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、韦荣球菌属 (*Veillonella*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、肠球菌 (*Enterococcus*)。双歧杆菌属入所时为 10.59%, 出所时增至 65.81% (图6)。

2.2.2 新生儿肠道菌群 OTUs

如图7所示,入所与出所的新生儿共有的 OTUs 数目为 210 个,入所独有的 OTU 数目为 165 个,出所独有的 OTU 数目为 129 个,出所比入所 OTU 数目减少了 36 个。

2.2.3 新生儿肠道菌群热图

出所时,新生儿肠道菌群的门类数量组成明显

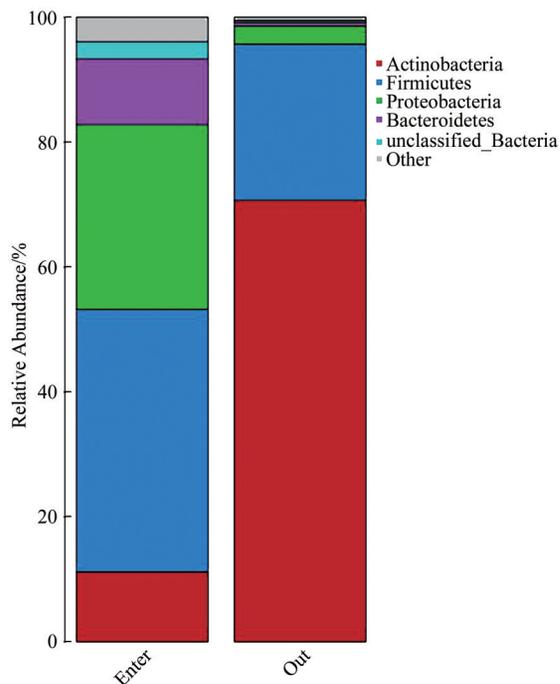


图5 入所初和出所时肠道菌群门水平物种分布
Figure 5 The species distribution at the phylum level of the gut microbiota at the time of entry and exit

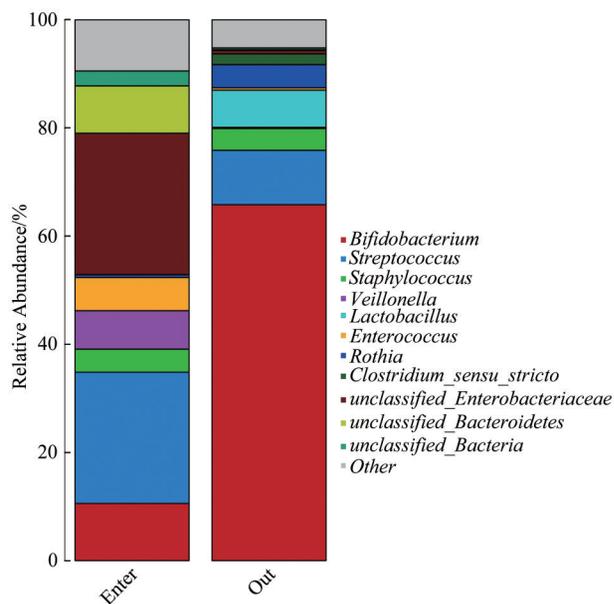


图6 新生儿肠道菌群属水平物种分布
Figure 6 Genus-level distribution of neonatal gut microbiota
增加(图8)。顺产新生儿在入所时肠道物种较其他样品均丰富,拟杆菌门含量为51.44%,变形菌门含量为15.01%,顺产新生儿获得类似于母体阴道和肠道微生物群,主要有变形菌门、拟杆菌门、硝化螺菌、酸杆菌。图9表明新生儿在产褥期内,肠道菌群的功能呈现上升趋势,新陈代谢的酶大幅增加。
2.2.4 两组样本 Welch's *t*-test 分析
图10所示,在纲的水平上,入所与出所新生儿肠道菌群中存在显著差异的纲为拟杆菌

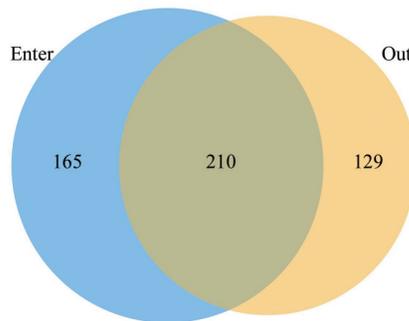


图7 入所与出所组 OTU 组间物种分布韦恩图
Figure 7 Venn diagram of species distribution among OTU groups of entry and exit groups

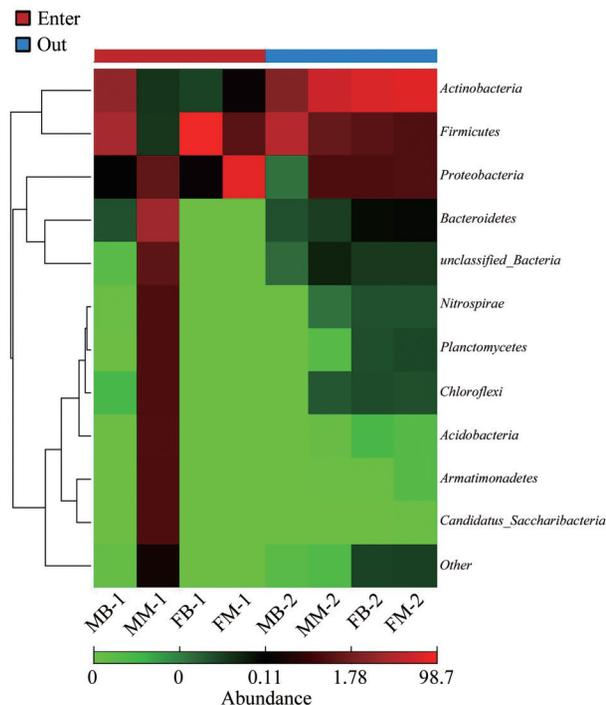


图8 新生儿入所初和出所时肠道菌群门水平热图
Figure 8 Heat map of gut microbiota phylum levels at the beginning and at the time of discharge of neonates

(Bacteroidia)和放线菌(Actinobacteria)(相对丰度>0.01%, $P<0.05$)。

2.3 喂养方法对肠道菌群的影响

2.3.1 新生儿肠道菌群结构组成

如图11所示,在目水平上,母乳喂养的两个新生儿入所时乳酸杆菌目的占比分别为70.70%和39.33%,混合喂养的新生儿则明显减少,仅分别为8.44%和0.12%。混合喂养的新生儿肠道中的拟杆菌、肠杆菌和梭菌的丰度高于母乳喂养的新生儿。

从图12可以看出母乳喂养的新生儿肠道菌群主要为放线菌门、变形菌门、厚壁菌门,多样性较低,而混合喂养的新生儿菌群结构则显示出多样性高的特点。

上述结果表明,母乳喂养的新生儿和混合喂养

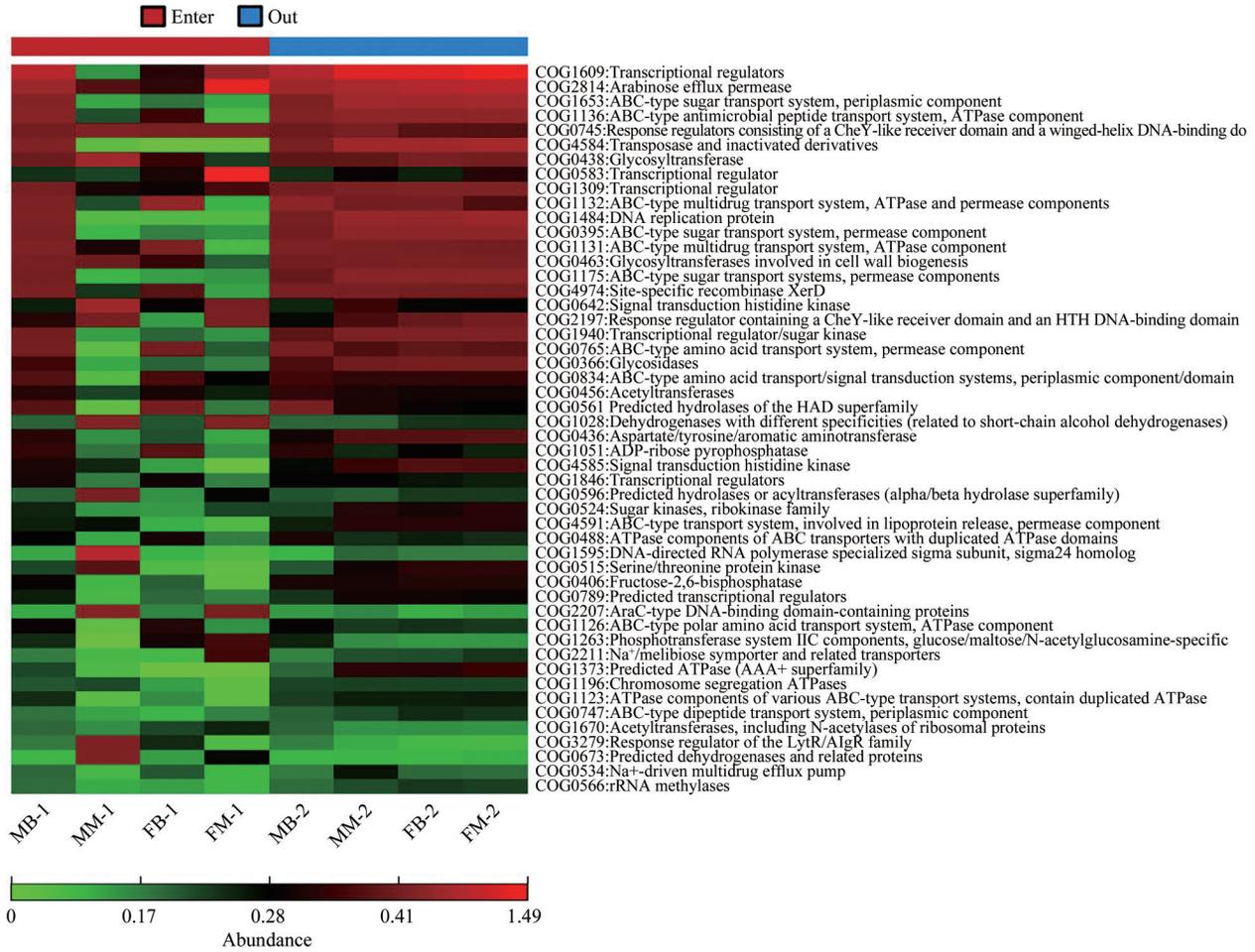


图9 入所与出所功能预测热图

Figure 9 Heatmap of feature and function prediction at entry and exit

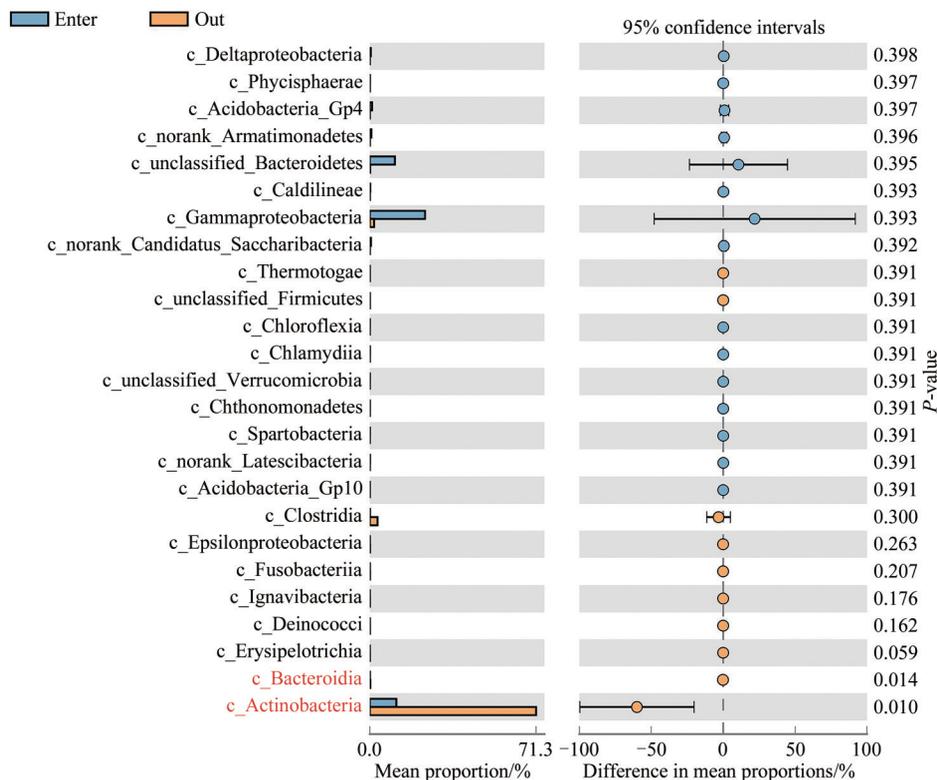


图10 新生儿入所与出所组微生物群落纲水平物种差异

Figure 10 Species differences at the class level of the microbial community between the neonatal entry and exit groups

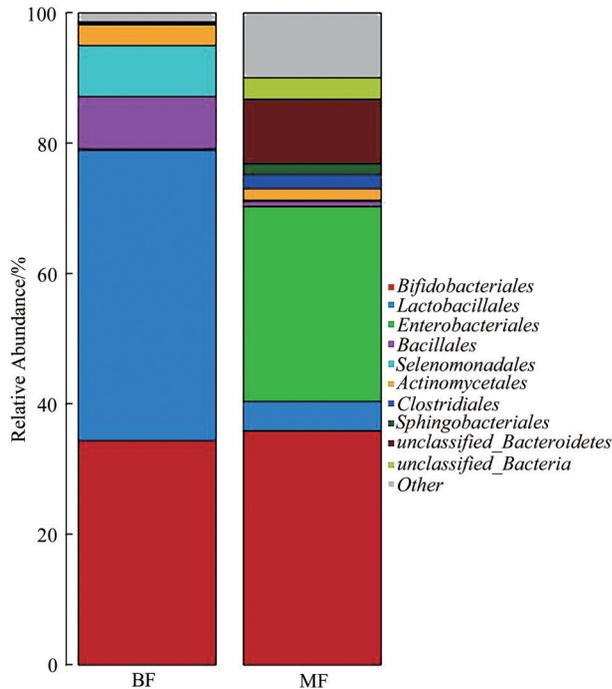
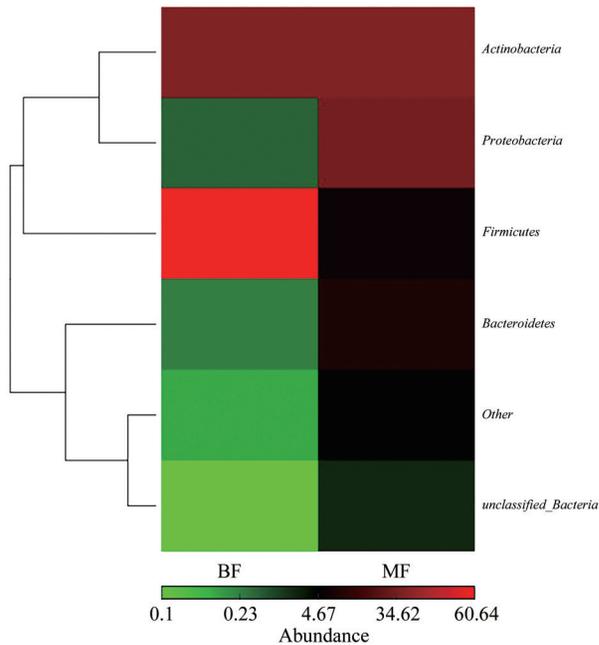


图 11 母乳喂养(BF)与混合喂养(MF)肠道菌群目水平物种分布

Figure 11 Species distribution at the order level of gut microbiota of breastfeeding and mixed feeding groups



注:BF表示母乳喂养, MF表示混合喂养

图 12 喂养方式对新生儿肠道菌群门水平丰度热图
Figure 12 Heatmap of feeding patterns on phyla level abundance of gut microbiota in neonates

新生儿肠道菌种在目水平和门水平均有显著改变, 喂养方式对乳酸杆菌目的丰度影响显著。

2.3.2 主成分分析

由图 13 可知, 出所时, 不同喂养方式的新生儿 (MM-2、FM-2、FB-2) 3 个点相近, 表明 3 个样本的物种组成较相似。

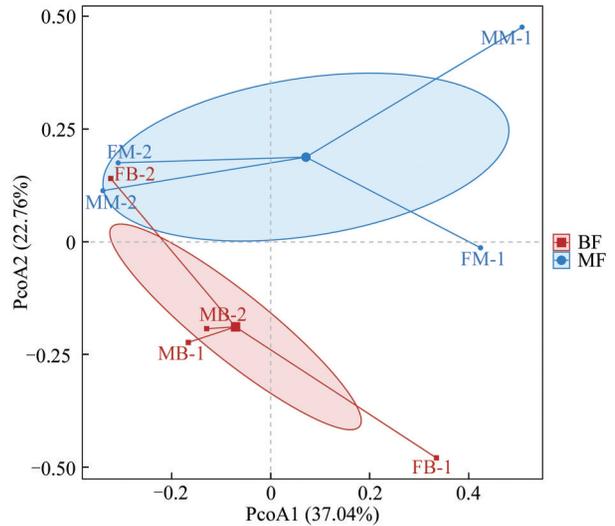


图 13 母乳喂养与混合喂养新生儿肠道菌群 PCA 图

Figure 13 PCA map of the gut microbiota of breast-fed and mixed-fed neonates

2.3.3 新生儿肠道菌群 OTUs

母乳喂养与混合喂养共有的 OTUs 数目为 247 个, 母乳喂养独有的 OTUs 数目为 22 个, 混合喂养独有的 OTUs 数目为 235 个, 混合喂养比母乳喂养的 OTUs 数目多 213 个(图 14)。

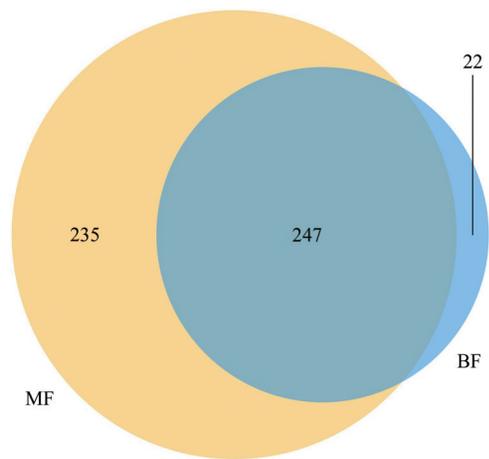


图 14 母乳喂养与混合喂养组 OTU 组间物种分布韦恩图

Figure 14 Venn diagram of species distribution between OTU groups in breastfeeding and mixed feeding groups

2.3.4 两组样本 Welch'S t-test 分析

母乳喂养与混合喂养组微生物群落纲水平物种差异如图 15 所示, 母乳喂养与混合喂养组肠道菌群中存在显著差异的纲为杆菌 (Bacilli) (相对丰度 >0.01%, P<0.05)。

2.4 性别与肠道菌群的关系

在图 16 中, 男性与女性新生儿共有的 OTU 数目为 230 个, 男婴独有的 OTU 数目为 229 个, 女婴独有的 OTU 数目为 45 个, 男婴比女婴的 OTU 数目多 184 个。

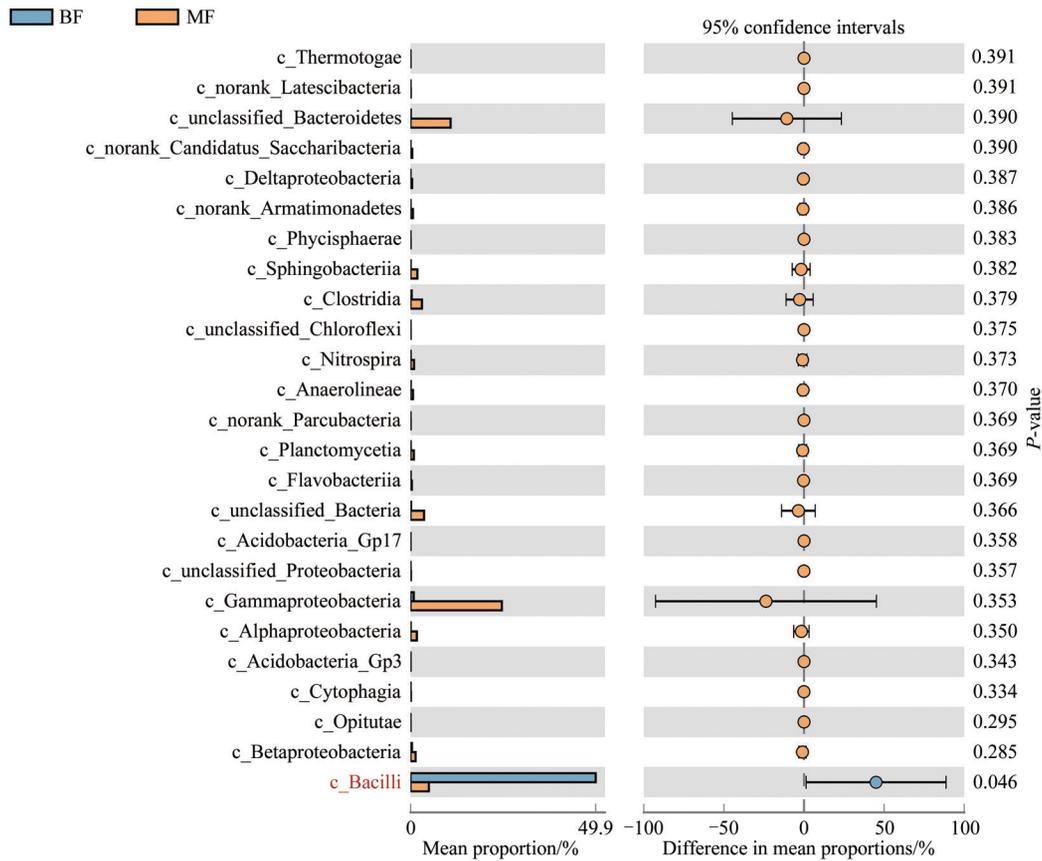


图 15 母乳喂养与混合喂养组微生物群落纲水平物种差异

Figure 15 Species differences at the class level of microbial communities

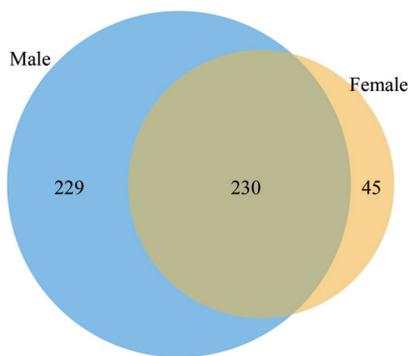


图 16 男性与女性新生儿组 OTU 组间物种分布韦恩图

Figure 16 Venn diagram of species distribution between OTU groups in male and female neonatal groups

3 讨论

本文采用宏基因组技术分析产褥期新生儿肠道菌群变化。新生儿肠道菌群的多样性从出生到满月均明显增加,入所与出所新生儿肠道菌群中存在显著差异的纲为拟杆菌、放线菌。混合喂养的新生儿肠道中乳酸杆菌比例显著少于母乳喂养方式的新生儿。在纲水平上,母乳喂养的新生儿肠道菌群多样性较低,而混合喂养的新生儿菌群结构则多样性高,拟杆菌、肠杆菌、梭菌的丰度要高于母乳喂养的新生儿,母乳喂养与混合喂养组肠道菌群中存在显著差异的纲为杆菌;出所时,女婴肠道菌群物

种组成与男婴相比更丰富、分布均匀度更高。男婴比女婴的肠道菌群 OTUs 数目多 184 个。喂养方式、分娩方式、性别均在不同程度上影响产褥期新生儿肠道微生物的构成。为今后深入探究新生儿肠道菌群的多样性,监测菌群的动态变化奠定了研究基础。

新生儿肠道微生物不仅影响健康和疾病的抵抗,还影响着新生儿的免疫系统发育、宿主代谢和对肠道病原体的定植抗性方面的重要功能^[17]。新生儿肠道的微生物群是与环境微生物菌群,尤其是母亲的菌群共生的^[18]。肠道微生物群在新生儿阶段经历动态发展,通过微生物群的组成改变,影响健康^[19]。健康肠道菌群的移植可用于胃肠道疾病的临床治疗,如复发性艰难梭菌相关性腹泻^[20]。本研究选了 4 名新生儿,其中两男两女、两名母乳及两名混合喂养。样本量虽少,但初步研究的结果已呈现出一定的规律性,为进一步研究奠定了基础。

从入所到出所,新生儿肠道最初定植了兼性厌氧菌,有利于严格厌氧菌的增殖,如梭菌属、拟杆菌属和双歧杆菌属^[21]。肠道微生物从出生开始,就处于动态变化中,新生儿刚出生,肠道 α 多样性降低,到 1 周大时,肠道微生物菌群已经与 1 个月大的婴儿

非常相似^[22]。STOKHOLM 等^[23]研究也表明,在产褥期新生儿肠道菌群中,微生物生态系统出现结构差别较大的时间是不同生产方式生产后的 7 d。本研究中,入所与出所新生儿肠道菌群中存在显著差异的纲为拟杆菌、放线菌;双歧杆菌属在出所时显著增加,新生儿在产褥期内,物种丰度越来越高。顺产新生儿肠道微生物群落更接近阴道微生物的菌属,如拟杆菌属和乳酸杆菌属^[24],而通过剖宫产出生的新生儿更接近环境微生物,如葡萄球菌、棒状杆菌和丙酸杆菌属^[25]。SELMA-ROYO 等^[26]研究表明,出生方式和出生地显著影响新生儿肠道微生物群,相对于其他出生方式,经阴道分娩的新生儿肠道中的拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度较高,包括拟杆菌属和大肠杆菌或志贺氏菌属。与本研究中顺产新生儿粪便检测结果一致,其入所时拟杆菌占比比较大。

饮食显著影响新生儿的肠道菌群。母乳喂养的新生儿乳酸杆菌目明显高于混合喂养的婴儿,肠道中的双歧杆菌占有明显优势,肠道菌群主要为放线菌门、变形菌门、厚壁菌门,多样性较低,而混合喂养的新生儿菌群结构则显示出多样化,多样性高,拟杆菌门、肠杆菌门、梭菌门的丰度要高于母乳喂养的新生儿,与报道的一致。母乳喂养与混合喂养组肠道菌群中存在显著差异的纲为杆菌。母乳喂养婴儿的肠道微生物丰度,尤其是双歧杆菌,与母乳低聚糖和其相关的分解代谢活动相关^[27-29]。研究发现,母乳喂养可确保新生儿的生理免疫力^[30],混合喂养婴幼儿粪便中拟杆菌、肠杆菌、梭菌、肠球菌、链球菌等的丰度要高于母乳喂养婴幼儿^[31-32]。在配方奶喂养的婴儿的菌群结构则显示出多样化,纯母乳喂养婴儿的 α 多样性较低^[24,33]。新生儿肠道与母乳中的益生菌组成存在着相似之处,能够更好地增进肠道活性^[34-35]。母乳喂养中的优势菌是双歧杆菌和乳酸杆菌,而混合喂养的肠道菌群为双歧杆菌、拟杆菌、梭菌、肠球菌和葡萄球菌^[36-38]。

早期喂养暴露对肠道内微生态的形成起关键作用。混合喂养方式中配方奶粉的添加可能是多样性增加的原因。安涛等^[39]研究表明,同是剖宫产条件下,母乳喂养的新生儿要比配方奶粉喂养的新生儿肠道菌群丰度低;而同是顺产条件下,母乳喂养的新生儿却要比配方奶粉喂养的新生儿肠道微生物种类多。李菊芳等^[40]在对婴儿肠道菌群的多样性及丰度研究过程中发现,在科水平上,性别与肠道菌群存在差异,女婴相对丰度高的科是毛螺菌科,而男婴是丹毒丝菌科。本研究样本层次聚类树中,样本距离最近的两个男性新生儿 MB-1、MB-2,

以及两个女性新生儿 FB-2、FM-2;出所时,女婴较男婴肠道物种组成更丰富且分布均匀度更高;男婴比女婴的肠道菌群 OTU 数目多 184 个。研究表明,性别不是肠道菌群定植的关键因素,但在生长发育过程中会对肠道菌群构成产生一定的影响。

参考文献

- [1] ALTAMIRANO Á, SAA P A, GARRIDO D. Inferring composition and function of the human gut microbiome in time and space: A review of genome-scale metabolic modelling tools[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 3897-3904.
- [2] SAA P, URRUTIA A, SILVA-ANDRADE C, et al. Modeling approaches for probing cross-feeding interactions in the human gut microbiome[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021, 20: 79-89.
- [3] CODAGNONE M G, SPICHAK S, O' MAHONY S M, et al. Programming bugs: Microbiota and the developmental origins of brain health and disease[J]. Biological Psychiatry, 2019, 85(2): 150-163.
- [4] DENG Z X, HOU K W, ZHAO J C, et al. The probiotic properties of lactic acid bacteria and their applications in animal husbandry[J]. Current Microbiology, 2021, 79(1): 22.
- [5] LIU Z J, XU C, TIAN R, et al. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2021, 22(7): 533-547.
- [6] 唐炜, 卢红艳, 孙勤, 等. 高胆红素血症新生儿肠道菌群特点及与 β -葡萄糖醛酸苷酶活性的相关性[J]. 中国当代儿科杂志, 2021, 23(7): 677-683.
TANG W, LU H Y, SUN Q, et al. Characteristics of gut microbiota and its association with the activity of β -glucuronidase in neonates with hyperbilirubinemia[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2021, 23(7): 677-683.
- [7] BELLER L, DEBOUTTE W, FALONY G, et al. Successional stages in infant gut microbiota maturation[J]. mBio, 2021, 12(6): e0185721.
- [8] DONOVAN S M. Evolution of the gut microbiome in infancy within an ecological context[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2020, 23(3): 223-227.
- [9] KU H J, KIM Y T, LEE J H. Microbiome study of initial gut microbiota from newborn infants to children reveals that diet determines its compositional development[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(7): 1067-1071.
- [10] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [11] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [12] GDANETZ K, BENUCCI G M N, VANDE POL N, et al. CONSTAX: A tool for improved taxonomic resolution of environmental fungal ITS sequences[J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1): 538.
- [13] SAMAL K C, SAHOO J P, BEHERA L, et al. Understanding

- the BLAST (basic local alignment search tool) program and a step-by-step guide for its use in life science research [J]. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 2021(0f): 55-61.
- [14] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. *EMBnet Journal*, 2011, 17(1): 10.
- [15] ZHANG J J, KOBERT K, FLOURI T, et al. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR [J]. *Bioinformatics*, 2013, 30(5): 614-620.
- [16] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets [J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2011, 27(6): 863-864.
- [17] SANIDAD K Z, ZENG M Y. Neonatal gut microbiome and immunity [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2020, 56: 30-37.
- [18] UBEROS J. Perinatal microbiota: review of its importance in newborn health [J]. *Archivos Argentinos De Pediatría*, 2020, 118(3): e265-e270.
- [19] TAMBURINI S, SHEN N, WU H C, et al. The microbiome in early life: Implications for health outcomes [J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(7): 713-722.
- [20] KINROSS J M, DARZI A W, NICHOLSON J K. Gut microbiome-host interactions in health and disease [J]. *Genome Medicine*, 2011, 3(3): 14.
- [21] NEU J. Developmental aspects of maternal-fetal, and infant gut microbiota and implications for long-term health [J]. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology*, 2015, 1: 6.
- [22] DOMINGUEZ-BELLO M G, GODOY-VITORINO F, KNIGHT R, et al. Role of the microbiome in human development [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1108-1114.
- [23] STOKHOLM J, THORSEN J, CHAWES B L, et al. Cesarean section changes neonatal gut colonization [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 138(3): 881-889.e2.
- [24] ITANI T, AYOUB MOUBARECK C, MELKI I, et al. Establishment and development of the intestinal microbiota of preterm infants in a Lebanese tertiary hospital [J]. *Anaerobe*, 2017, 43: 4-14.
- [25] DOMINGUEZ-BELLO M G, COSTELLO E K, CONTRERAS M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11971-11975.
- [26] SELMA-ROYO M, CALATAYUD ARROYO M, GARCÍA-MANTRANA I, et al. Perinatal environment shapes microbiota colonization and infant growth: impact on host response and intestinal function [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 167.
- [27] BENDER J M, LI F, MARTELLY S, et al. Maternal HIV infection influences the microbiome of HIV-uninfected infants [J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(349): 349ra100.
- [28] DAVIS J C C, TOTTEEN S M, HUANG J O, et al. Identification of oligosaccharides in feces of breast-fed infants and their correlation with the gut microbial community [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(9): 2987-3002.
- [29] MILANI C, DURANTI S, BOTTACINI F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2017, 81(4): e00036-e00017.
- [30] CAMACHO-MORALES A, CABA M, GARCÍA-JUÁREZ M, et al. Breastfeeding contributes to physiological immune programming in the newborn [J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2021, 9: 744104.
- [31] 杨莉, 葛武鹏, 梁秀珍, 等. 高通量测序技术研究不同喂养和分娩方式对不同月龄婴幼儿肠道菌群的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(17): 208-215.
- YANG L, GE W P, LIANG X Z, et al. Effects of feeding and delivery modes on intestinal flora of infants of different ages investigated by high-throughput sequencing [J]. *Food Science*, 2019, 40(17): 208-215.
- [32] HO N T, LI F, LEE-SARWAR K A, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4169.
- [33] RASPINI B, VACCA M, PORRI D, et al. Early life microbiota colonization at six months of age: A transitional time point [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 590202.
- [34] KHALKHALI S, MOJGANI N. *In vitro* and *in vivo* safety analysis of *Enterococcus faecium* 2C isolated from human breast milk [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 73-77.
- [35] DAMACENO Q S, SOUZA J P, NICOLI J R, et al. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 371-379.
- [36] BEZIRTZOGLU E, TSIOTSIAS A, WELLING G W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [J]. *Anaerobe*, 2011, 17(6): 478-482.
- [37] TANNOCK G W, LAWLEY B, MUNRO K, et al. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(9): 3040-3048.
- [38] YOSHIOKA H, ISEKI K, FUJITA K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants [J]. *Pediatrics*, 1983, 72(3): 317-321.
- [39] 安涛, 安云鹤, 刘悦, 等. 北京地区不同喂养方式婴幼儿肠道菌群多样性分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(18): 6694-6701.
- AN T, AN Y H, LIU Y, et al. Diversity of intestinal microflora in infants with different feeding methods in Beijing [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(18): 6694-6701.
- [40] 李菊芳, 姜铁民, 贾妮, 等. 分娩方式及性别对母乳喂养婴儿肠道菌群的影响 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28(9): 1035-1040.
- LI J F, JIANG T M, JIA N, et al. Effect of delivery mode and infant gender on intestinal microflora in breast feeding infants [J]. *Chinese Journal of Woman and Child Health Research*, 2017, 28(9): 1035-1040.