

益生菌对 NICU 早产儿的肠道菌群代谢功能及临床疾病的影响

宫晨, 杨琍琦, 程雁

摘要 目的 探讨益生菌对新生儿重症监护病房(NICU)早产儿肠道菌群的功能代谢及临床疾病的影响 方法 选取NICU早产儿40例,随机分为益生菌组和对照组。收集两组早产儿出生第10天时的粪便标本,通过16S rRNA高通量测序对肠道菌群进行检测和分析,并比较两组早产儿发生相关临床疾病的差异。结果 与对照组比较,益生菌组早产儿第10天时肠道菌群中的双歧杆菌属与乳酸杆菌属丰度更高($P < 0.05$),而梭菌属、葡萄球菌属和亲铜菌属更低($P < 0.05$)。功能分析中益生菌组的磷酸戊糖途径及烟酸和烟酰胺代谢功能高于对照组($P < 0.05$),而坏死性凋亡功能更低($P < 0.05$)。且人类病原体败血症($P < 0.01$)、肺炎、肠胃炎和腹泻($P < 0.05$)的基因功能表达也更低。此外,益生菌组早产儿第10天时的胆红素、血红蛋白水平($P < 0.01$)和腹泻、喂养不耐受的发生率($P < 0.05$)均低于对照组。益生菌组败血症和坏死性小肠结肠炎(NEC)发生率也较低,但差异无统计学意义。结论 研究表明益生菌可能对NICU早产儿的肠道菌群代谢功能和临床疾病均产生有利影响,并从功能上解释了益生菌降低临床疾病风险的机制。

关键词 早产儿; 益生菌; 肠道菌群; 代谢功能; 临床疾病; 高通量测序

中图分类号 R 722.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1132-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.024

人类肠道微生物群是目前存在的微生物群落中最复杂和最多样的,对健康起着重要作用。NICU病房中的早产儿常处于临床和生理上的限制中,包括各种留置管的使用、抗生素暴露以及延迟的肠内喂养等。这些因素导致了早产儿肠道菌群定植延迟和紊乱^[1]。而肠道菌群的失衡被认为与早产儿的许多疾病密切相关^[2-4]。因此,尽早干预肠道菌群非常必要。益生菌是目前最常见的干预措施,有助于早产儿尽早建立一个稳定的肠道菌群,并且可以降低早产儿发生相关疾病的风险^[5]。

虽然已有研究^[6]表明益生菌对早产儿肠道菌群的作用,但却缺乏功能和机制方面的分析。该研究旨在探讨益生菌对NICU早产儿肠道菌群代谢组学的影响,从代谢组数据中识别功能代谢变化,并同时临床疾病的差异进行分析,以确定肠道菌群紊乱的NICU早产儿的临床特征。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取出生后立即入住该院NICU的胎龄28~37周早产儿40例。排除标准:喂养困难,先天性胃肠畸形,严重呼吸暂停等。该研究经安医大二附院伦理委员会批准(批准号: PJ 2016-05-01),所有入选早产儿均经家长知情同意。

1.2 方法

1.2.1 分组 所有入选早产儿随机分为益生菌组和对照组,每组20例。两组均予以原发病治疗及配方奶合理喂养,益生菌组早产儿开奶后加用双歧杆菌三联活菌散剂口服(上海上药信谊药厂有限公司;国药准字S10970104;每包含量2g,含活菌数分别不低于 2.0×10^7 CFU),0.5包/次,每天2次。

1.2.2 样本收集 在出生后第10d时收集两组早产儿的粪便样本。并立即存放至已消毒的冷冻试管中,置于液氮中转送-80℃冰箱中保存。

1.2.3 临床指标收集 ① 两组早产儿在出生后第0天和10天进行血常规及血生化检测,并记录血红蛋白、血小板、总胆红素、直接胆红素等。② 记录两组早产儿恢复出生体质量的时间,发生腹泻、败血症(根据血培养结果确诊)、NEC(根据临床表现及影像学确诊)及喂养不耐受(胃潴留 $\geq$ 前次喂养量的50%,每3h进食1次;频繁呕吐 >3 次/d,或者腹胀;打乱肠内营养计划,包括减少、延迟或停止肠内营养)的例数。

1.2.4 肠道菌群检测 将采取十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)的方法提取的样本基因组DNA作为模版,针对细菌16S rRNA的V4区选择相应的引物,进行PCR扩增。然后使用ThermoFisher的IonS5TMXL平台进行高通量测序。测序的原始结果进行处理后得出有效数据,然后通过Uparse软件

2021-03-12 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目(编号: 1604a0802080)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230601

作者简介: 宫晨,男,硕士研究生;

程雁,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: chengyan@ahmu.edu.cn

(Uparse v7.0.1001) 进行序列分析,筛选每个 OTU 的代表性序列后,使用基于 Mothur 算法的席尔瓦数据库进行物种注释。

1.2.5 数据分析 LEfSe(线性鉴别分析效应大小)软件用于比较组间差异有统计学意义的 Biomarker(生物标记物)。Tax4Fun 和 PICRUSt 软件通过将提取和注释的 KEGG 数据库原核生物全基因组功能信息对应到 SILVA 数据库中实现功能注释,并对肠道细菌的基因功能进行预测。使用 Wilcoxon test 对两组早产儿肠道菌群组间差异进行显著性分析,并用 R 软件进行绘图显示。

1.3 统计学处理 两组早产儿的基本信息及临床指标的显著性水平采用 SPSS 19.0 软件计算,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,非正态分布的计量资料表示为 $M(Q_{25}, Q_{75})$,组间比较采用 Mann-Whitney 检验;计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本信息比较 两组早产儿在出生体质量、胎龄、性别及出生方式上的差异无统计学意义,具有可

比性(表 1)。

2.2 两组临床资料比较 两组早产儿临床指标结果显示,在出生第 10 天时,益生菌组的总胆红素、直接胆红素和血红蛋白水平低于对照组($P < 0.01$)。且益生菌组的早产儿恢复出生体质量时间更短($P < 0.05$),罹患喂养不耐受和腹泻更少($P < 0.05$)。此外,益生菌组发生败血症及 NEC 的早产儿也较少,但差异无统计学意义(表 2)。

2.3 肠道菌群丰度的差异 在出生第 10 天时,益生菌组早产儿肠道菌群中的乳酸杆菌属(lactobacillus)和双歧杆菌属(bifidobacterium)丰度更高($P < 0.05$),而对照组的早产儿肠道菌群中梭菌属(clostridioides)、葡萄球菌属(staphylococcus)和亲铜菌属(cupriavidus)丰度更高($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 肠道菌群群落结构差异分析 使用 LEfSe 软件对群落结构中有统计学差异的物种进行分析,结果显示,益生菌组的群落结构生物标记物主要是双歧杆菌科(bifidobacteriaceae)和乳酸杆菌科(lactobacillaceae),而对照组主要是毛螺旋菌科(lachnospiraceae)、瘤胃球菌科(luminococcaceae)、消化链球菌科(leptostreptococcaceae)和未分类的梭菌科(unidentified-Clostridiales)。见图 2。

表 1 益生菌组与对照组早产儿基本信息比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

项目	益生菌组($n=20$)	对照组($n=20$)	$t/\chi^2/Z$ 值	P 值
出生体质量(kg)	2.14 ± 0.37	2.09 ± 0.32	0.424	0.674
胎龄(周)	33.85 ± 1.55	34.04 ± 1.38	-0.398	0.693
性别(男性)	13 (65)	11 (55)	0.417	0.519
出生方式(顺产)	10 (50)	8 (40)	0.404	0.525

表 2 益生菌组与对照组临床资料比较 [$\bar{x} \pm s, M(Q_{25}, Q_{75}), n(\%)$]

项目	益生菌组($n=20$)	对照组($n=20$)	$t/\chi^2/Z$ 值	P 值
血红蛋白(g/L)				
0 d	166.9 ± 14.5	170.6 ± 11.8	-0.896	0.376
10 d	126.4 ± 15.0	144.6 ± 13.0	-4.102	<0.001
血小板($\times 10^9/L$)				
0 d	298.5 (242.0, 312.5)	285.0 (219.0, 316.8)	-0.758	0.449
10 d	331.0 (239.0, 400.0)	311.0 (194.7, 346.2)	-1.732	0.083
总胆红素($\mu\text{mol/L}$)				
0 d	35.1 (27.4, 43.8)	35.6 (33.1, 40.8)	-0.636	0.525
10 d	145.3 ± 21.8	181.5 ± 14.6	-6.163	<0.001
直接胆红素($\mu\text{mol/L}$)				
0 d	5.3 ± 1.2	5.6 ± 1.5	-0.810	0.423
10 d	5.4 ± 0.7	6.9 ± 1.4	-4.119	<0.001
恢复出生体质量时间(d)	7.0 ± 1.3	8.5 ± 1.3	-3.807	<0.001
NEC	0 (0)	3 (15)	3.243	0.072
败血症	0 (0)	2 (10)	2.105	0.147
腹泻	5 (25)	12 (60)	5.013	0.025
喂养不耐受	6 (30)	13 (65)	4.912	0.027

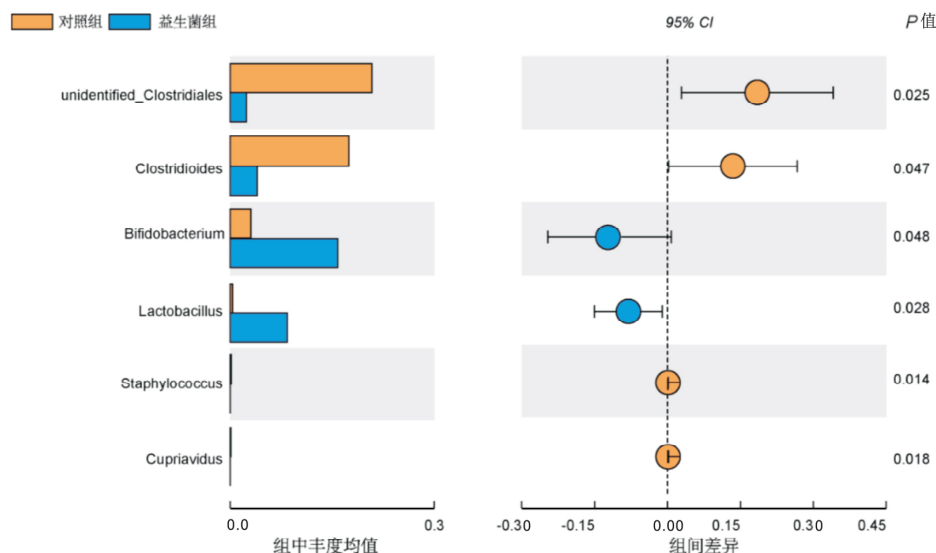


图1 第10天时两组早产儿肠道菌群属水平的丰度差异
与对照组比较: $P < 0.05$

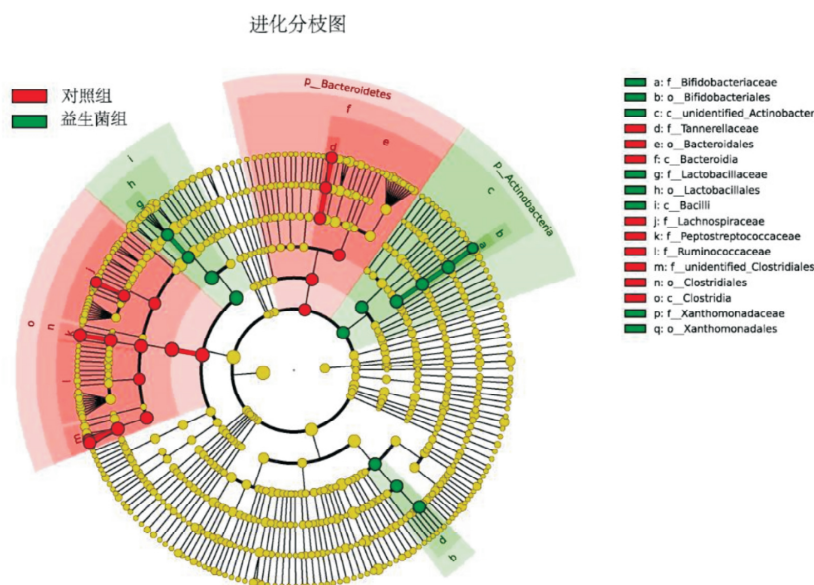


图2 第10天时两组早产儿肠道菌群群落结构的差异
图中所示为两组早产儿肠道菌群群落结构中差异有统计学意义的物种

2.5 肠道菌群功能分析 Tax4Fun 结果显示益生菌组的磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway)、烟酸和烟酰胺代谢 (nicotinate and nicotinamide metabolism)、磷酸肌醇代谢 (inositol phosphate metabolism) 等功能高于对照组 ($P < 0.05$), 而坏死性凋亡 (necroptosis) 功能更低 ($P < 0.05$)。见图3。

PICRUSt 分析结果提示益生菌组的人类病原体败血症的基因功能表达低于对照组 ($P < 0.01$)。且人类病原体肺炎、人类病原体肠胃炎和人类病原体腹泻等功能表达也低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图4。

3 讨论

益生菌组早产儿中发生腹泻及喂养不耐受的风险更低, 恢复出生体质量时间更短, 这是因为益生菌组中乳酸杆菌和双歧杆菌含量更高, 抑制了致病菌的生长, 减少了腹泻和喂养不耐受的发生, 也因此促进了生理体质量的尽早恢复^[4]。且双歧杆菌可以参与胆红素代谢, 有助于降低早产儿的胆红素水平^[5]。有研究^[7]表明, 使用益生菌的婴儿在6个月时的血红蛋白更低, 而粪便中钙卫蛋白更高。更高的钙卫蛋白可能反映了肠道的中性粒细胞增加, 从

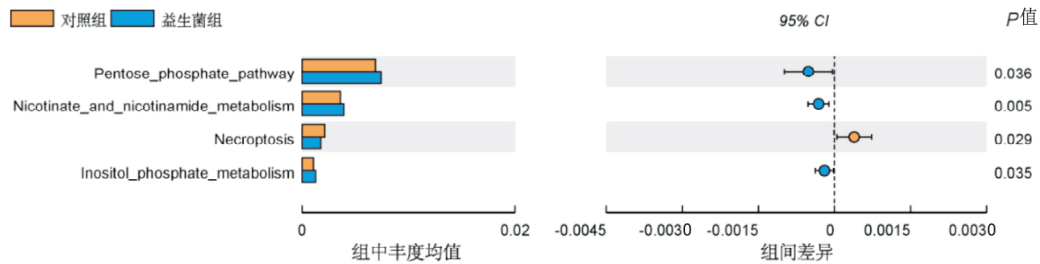


图3 Tax4Fun 肠道菌群功能预测
与对照组比较: $P < 0.05$

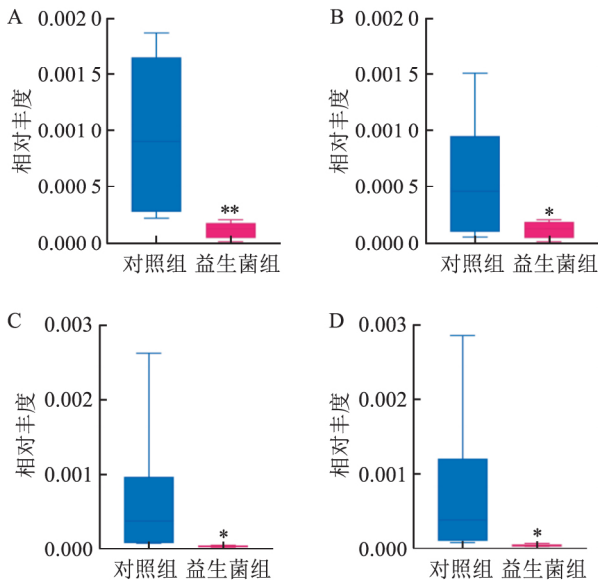


图4 PICRUSt 肠道菌群功能预测

A: 人类病原体败血症; B: 人类病原体肺炎; C: 人类病原体肠炎; D: 人类病原体腹泻; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

而参与肠道免疫系统的发育和正常菌群的形成。但粪便钙卫蛋白也被认为与肠道通透性相关。因此,推测益生菌维持肠道菌群平衡的同时,可能引起肠道通透性的轻度增高,从而导致失血、缺铁以及较低的血红蛋白水平。该实验中益生菌组早产儿在出生第10天时血红蛋白更低,可能与这一机制有关,但也不能排除孕母因素的影响,因此,需要更深入的研究。此外,益生菌组早产儿的 NEC 和败血症的发生率低于对照组,但差异无统计学意义,这可能是对比的标本量过少的原因。

益生菌组的双歧杆菌属和乳酸杆菌属的丰度更高。这与之前的研究^[8]结果一致。且益生菌组的梭菌属、葡萄球菌属和亲铜菌属的丰度更低。亲铜菌属是人类的机会致病菌,虽然感染人类的频率较小,但是感染后易引起败血症、脑膜炎等严重感染性疾病^[9]。有研究^[2]表明发生败血症的早产儿肠道菌群中葡萄球菌增多,且双歧杆菌减少,该研究中益

生菌组的双歧杆菌属丰度增多,而葡萄球菌属减少,表明益生菌可能有利于减少早产儿败血症的发生。

之前对成人肠道菌群群落结构的研究^[10]表明,使用益生菌后的菌落结构中瘤胃球菌科、消化链球菌科和梭菌科均减少。该实验中,使用益生菌的早产儿肠道菌群群落结构也发生了同样的变化。此外,益生菌组中的毛螺旋菌科也更少,毛螺旋菌科的肠道定植被认为有助于肥胖小鼠糖尿病的发展^[11],因此,使用益生菌是否有利于避免早产儿后期成长过程中糖尿病的发生值得进一步研究。

叶酸是由6-羟甲基-7,8-二氢蝶呤焦磷酸盐提供的蝶呤部分和对氨基苯甲酸结合形成。而双歧杆菌通过磷酸戊糖途径制造对氨基苯甲酸^[12]。因此,该实验益生菌组的磷酸戊糖途径更高,可能与双歧杆菌属含量更高相关,并且可能有利于叶酸的合成。烟酸和烟酰胺有助于降低血胆固醇和三酰甘油。在肥胖人群中,人体肠道靶向缓释烟酸改善了系统胰岛素敏感性和代谢炎症的生物标记物^[13]。有研究^[14]表明,高脂饮食喂养导致肥胖小鼠肠道烟酸和烟酰胺代谢途径显著降低。而在该实验中,益生菌的使用则增加了早产儿肠道菌群的烟酸和烟酰胺代谢途径。此外,坏死性凋亡是一种不同于凋亡和坏死的新细胞死亡途径,在诱导肠道时,会引起机体强烈的炎症反应^[15]。因此,益生菌的使用可能有利于减轻早产儿肠道的炎症反应。

PICRUSt 分析的结果显示,益生菌组早产儿肠道菌群的人类肠胃炎、腹泻、败血症和肺炎等病原体的基因功能表达均更低,这从肠道菌群功能的方面解释了为什么益生菌减少了早产儿罹患腹泻、败血症及 NEC 等疾病的概率。此外,研究表明益生菌的使用可能有利于降低早产儿发生肺炎的风险。

参考文献

- [1] Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods [J].

- Anaerobe, 2010,16(4):362–70.
- [2] Stewart C J, Embleton N D, Marrs E C, et al. Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls [J]. *Microbiome*, 2017,5(1):75.
 - [3] Pammi M, Cope J, Tarr P I, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Microbiome*, 2017,5(1):31.
 - [4] Zhang A M, Sun Z Q, Zhang L M. Mosapride combined with probiotics on gastrointestinal function and growth in premature infants [J]. *Exp Ther Med*, 2017,13(6):2675–80.
 - [5] Li Y F, Zhu C R, Gong X L, et al. Beneficial effects of probiotic treatment on gut microbiota in very low birth weight infants [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019,2019:3682836.
 - [6] Zhou S, Wang Z, He F, et al. Association of serum bilirubin in newborns affected by jaundice with gut microbiota dysbiosis [J]. *J Nutr Biochem*, 2019,63:54–61.
 - [7] Kuitunen M, Kukkonen K, Savilahti E. Pro-and prebiotic supplementation induces a transient reduction in hemoglobin concentration in infants [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2009,49(5):626–30.
 - [8] 黎红平,马丽亚,肖斌,等. 益生菌对极低出生体重早产儿生后第14天肠道菌群的影响 [J]. *中华新生儿科杂志(中英文)*, 2017,32(4):264–8.
 - [9] 李金钟,李中华,刘利平. 罗尔斯顿菌属和亲铜菌属的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2008,29(5):437–9.
 - [10] Liu S, Liu H, Chen L, et al. Effect of probiotics on the intestinal microbiota of hemodialysis patients: a randomized trial [J]. *Eur J Nutr*, 2020,59(8):3755–66.
 - [11] Kameyama K, Itoh K. Intestinal colonization by a lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice [J]. *Microbes Environ*, 2014,29(4):427–30.
 - [12] Gu Q, Li P. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria [M]. *Prob Preb Nutr Heal*, 2016:135–44.
 - [13] Fangmann D, Theismann E M, Türk K, et al. Targeted microbiome intervention by microencapsulated delayed-release niacin beneficially affects insulin sensitivity in humans [J]. *Diabetes Care*, 2018,41(3):398–405.
 - [14] Hong Y, Li B, Zheng N, et al. Integrated metagenomic and metabolomic analyses of the effect of astragalus polysaccharides on alleviating high-fat diet-induced metabolic disorders [J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:833.
 - [15] Dhuriya Y K, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death [J]. *J Neuroinflamm*, 2018,15(1):199.

Effects of probiotics on metabolic function in the intestinal flora and clinical disease in the premature infants of NICU

Gong Chen, Yang Liqi, Cheng Yan

(*Dept of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*)

Abstract Objective To investigate the effects of probiotics on the functional metabolism of intestinal flora and clinical diseases in the neonatal intensive care unit (NICU) premature infants. **Methods** A total of 40 premature infants from the NICU were randomly divided into the probiotics group and the control group. Feces samples of two groups were collected on the 10th day, and intestinal flora was detected and analyzed by 16S rRNA high-throughput sequencing. And the differences in the incidence of clinical diseases were also compared between the two groups.

Results Compared with the control group, the abundance of bifidobacterium and lactobacillus in intestinal flora of the probiotics group on the 10th day was higher ($P < 0.05$), while clostridioides, staphylococcus and cupriavidus bacteria were lower ($P < 0.05$). In terms of functional analysis, the functions of the pentose phosphate pathway and nicotinate and nicotinamide metabolism in the probiotics group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while the necroptosis was lower ($P < 0.05$). In addition, the function gene expression levels of human pathogen sepsis ($P < 0.01$), pneumonia, gastroenteritis and diarrhea ($P < 0.05$) were also lower in the probiotics group. Moreover, the bilirubin and hemoglobin on the 10th day ($P < 0.01$) and the incidence of diarrhea and feeding intolerance ($P < 0.05$) in the probiotics group were lower than those in the control group. And the incidence of sepsis and necrotizing enterocolitis (NEC) was also lower, but the difference was not significant. **Conclusion** This study shows that probiotics may have a significant effect on the metabolic function of intestinal flora and clinical disease in NICU premature infants, and explain the mechanism of probiotics to reduce the risk of clinical disease from the perspective of function.

Key words premature infants; probiotics; intestinal flora; metabolic function; clinical diseases; high-throughput sequencing