

早产儿早期肠道菌群在早发型败血症中的意义探究

马小赛¹, 孙学梅^{2*}

¹青岛大学第十一临床学院, 山东 青岛

²临沂市人民医院儿科, 山东 临沂

收稿日期: 2023年6月25日; 录用日期: 2023年7月19日; 发布日期: 2023年7月26日

摘要

目的: 应用高通量测序(16S rRNA)方法检测发生早发型败血症的中晚期早产儿早期肠道菌群分布情况, 评估中晚期早产儿早期肠道菌群种类、数量及分布特点在早发型败血症诊断中的意义, 为早期识别高危婴儿, 减少非必要抗生素应用, 预测EOS发生以及进一步发展提供临床依据。方法: 随机选取2021年9月1日至2021年12月31日出生的早产儿, 收集早产儿出生后1 h内的第一次胎便, 通过高通量测序(16S rRNA)分析技术分析胎便中肠道菌群组成。结果: 肠道菌群特点: EOS组和非EOS组群落间OTU的种类和数量存在差异, 非EOS组群落间OTU的种类和数量明显优于EOS组。结论: 中晚期早产儿标本EOS组和标本非EOS组肠道菌群存在一定差异, 标本EOS组样本物种丰富度、群落多样性均低于标本非EOS组。通过肠道菌群的分析, 对中晚期早产儿EOS的发生有提示意义, 早期肠道菌群有可能作为中晚期早产儿早发型败血症的筛选方法。

关键词

早发型败血症, 早产儿, 高通量测序(16S rRNA), 肠道菌群

The Significance of Early Gut Microbiota in Premature Infants with Early-Onset Sepsis

Xiaosai Ma¹, Xuemei Sun^{2*}

¹The 11th Clinical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Pediatrics, Linyi People's Hospital, Linyi Shandong

Received: Jun. 25th, 2023; accepted: Jul. 19th, 2023; published: Jul. 26th, 2023

*通讯作者。

Abstract

Objective: High-throughput sequencing (16S rRNA) was used to detect the early intestinal flora distribution of premature infants with early sepsis. The significance of evaluating the types, quantities, and distribution characteristics of early gut microbiota in mid to late stage premature infants in the diagnosis of early-onset sepsis, to provide clinical evidence for early identification of high-risk infants, reduction of unnecessary antibiotic use, prediction of EOS occurrence, and further development. **Methods:** Randomly select premature infants born from September 1, 2021 to December 31, 2021, collect the first feces of premature infants within 1 hour after birth. The composition of intestinal flora in fetal stool was analyzed by high-throughput sequencing (16S rRNA) analysis technology. **Results:** Characteristics of gut microbiota: There are differences in the types and quantities of OTUs between the EOS group and non EOS group communities. The types and quantities of OTUs in non EOS groups were significantly better than those in EOS groups. **Conclusion:** There are certain differences in the intestinal flora between the EOS group and the non EOS group of mid and late preterm infants. The species richness and community diversity of the EOS group were lower than those of the non EOS group. The analysis of intestinal microflora may have implications for the occurrence of EOS in mid to late preterm infants. Early intestinal flora may be used as a screening method for early onset sepsis in mid to late preterm infants.

Keywords

Early-Onset Sepsis, Premature, High-Throughput Sequencing (16S rRNA), Intestinal Flora

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

据估计, 全球 1.35 亿新生儿中有 11% 在妊娠 37 周之前出生, 早产一直在稳步增加, 特别是在发达国家[1] [2]。新生儿败血症 95% 的病例发生在早产儿。新生儿败血症是新生儿死亡的最常见原因之一。近年来, 肠道菌群的研究成为热点, 肠道菌群被称为人类“隐形的器官”。迄今为止, 通过各种平台, 高通量测序(16S rRNA)技术提供了令人印象深刻的应用范围, 其飞速发展和进步, 极大地提高了我们确定和诊断人类疾病根本原因的能力。本研究将通过高通量测序(16S rRNA)技术对早产儿早期肠道菌群进行研究, 分析早期肠道菌群在 EOS 中的意义。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

随机选取 2021 年 9 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日出生, 生后立即入住 NICU 的早产儿。纳入标准: 1) 胎龄 32~37 周, 体重不限, 性别不限。2) 剖宫产出生。3) 入院时间 < 1 小时, 且未开奶, 未使用抗生素。4) 留取生后 1 h 内的第一次胎便。5) 临床资料完整。排除标准: 1) 母亲有免疫性疾病、使用免疫抑制剂或者抗生素者; 2) 患儿有严重的先天畸形如先天性心脏病, 脑发育不良, 先天性十二指肠闭锁等需行外科手术者; 3) 患儿染色体异常或遗传代谢病者; 4) 数据收集部分指标缺失, 住院资料不完整。

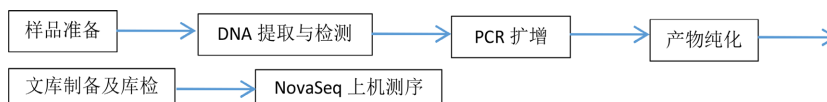
共收集标本 55 例, 其中男性 25 例(45.45%), 女性 30 例(54.55%), 标本 EOS 患儿共有 16 例(29.09%), 标本非 EOS 患儿共有 39 例(70.91%)。所有患儿的性别、胎龄、出生体重等指标没有差异, 两组间均衡可比。

2.2. 方法

入选早产儿生后 1 小时内, 以翻盖无菌 EP 管收集胎便, 低温液氮保存。标本统一用干冰快速运送至实验室, 进行高通量测序(16S rRNA)分析。

2.3. 实验室上机流程

从 DNA 样本到最终数据获得的过程中, 样本检测、PCR、纯化、建库、测序每一个环节都会对数据质量和数量产生影响, 而数据质量又会直接影响后续信息分析的结果。为了从源头上保证测序数据的准确性、可靠性, 实验室对样本检测、建库、测序每一个实验步骤都严格把控, 从根本上确保了高质量数据的产出, 流程图如下:



2.4. 统计学处理

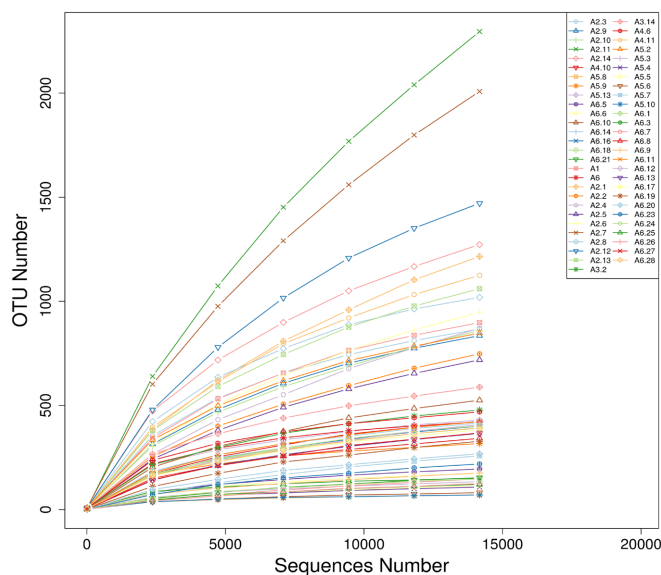
对所获得数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析, 正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料用率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验。Logistic 回归分析发生 EOS 的早产儿早期肠道菌群的组成和分布特点, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 测序数据结果

本实验所有纳入标本, 共注释出 OTU 数目为 14,158 个。

Alpha 多样性指数稀释曲线平缓, 表明此次测序量合理。见图 1。



说明: 稀释曲线中, 横坐标为从某个样本中随机抽取的测序条数, 纵坐标为基于该测序条数能构建的 OTU 数量, 用来反映测序深度情况, 不同的样本使用不同颜色的曲线表示。

Figure 1. Alpha diversity index dilution curve

图 1. Alpha 多样性指数稀释曲线

3.2. Alpha 多样性分析(Diversity)

3.2.1. Alpha 多样性指数

比较两组 Alpha 多样性指数发现, 标本 EOS 组与标本非 EOS 组相比, 标本 EOS 组的 ACE 指数、Shannon 指数、Chao1 指数均降低, 而 Simpson 指数升高, 表明标本 EOS 组群落丰富度及多样性降低。Coverage 指数表明本次结果可反应样本中微生物的真实情况。

经差异性分析可知, 标本 EOS 组和标本非 EOS 组研究对象两组间 Observed species ($Z = -0.630$, $P = 0.529$)、shannon ($t = -0.766$, $P = 0.447$)、simpson ($Z = -0.834$, $P = 0.404$)、chao1 ($Z = -0.259$, $P = 0.795$)、ACE ($Z = -0.148$, $P = 0.882$)、Goods coverage ($Z = -0.084$, $P = 0.933$)和 PD whole tree ($Z = -0.296$, $P = 0.767$) 指标差异没有统计学意义。具体见表 1。

Table 1. Analysis of differences in Alpha indicators between two groups of study subjects

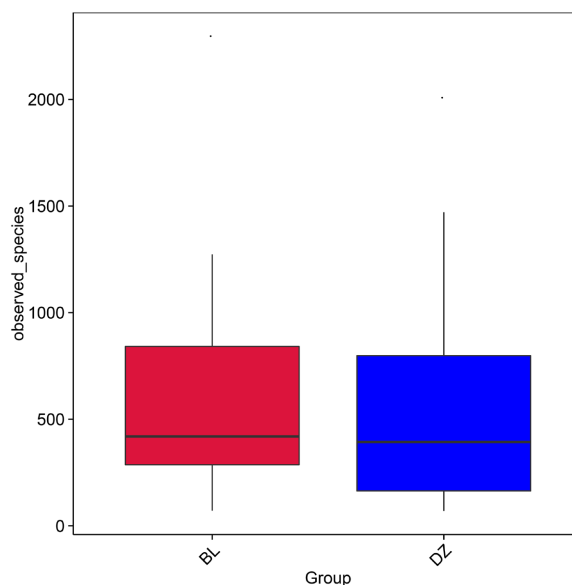
表 1. 两组研究对象 Alpha 各指标差异性分析

| 变量 | 标本非 EOS 组(n = 39) | 标本 EOS 组(n = 16) | 检验量 | P |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------|-------|
| Observed species, M (Q ₁ , Q ₃) | 393.00 (151.00, 848.00) | 419.00 (256.00, 847.50) | $Z = -0.630$ | 0.529 |
| shannon, $\bar{x} \pm s$ | 3.02 ± 1.83 | 3.43 ± 1.69 | $t = -0.766$ | 0.447 |
| simpson, M (Q ₁ , Q ₃) | 0.64 (0.31, 0.81) | 0.68 (0.43, 0.85) | $Z = -0.834$ | 0.404 |
| chao1, M (Q ₁ , Q ₃) | 551.96 (288.78, 1200.58) | 564.94 (338.79, 1093.56) | $Z = -0.259$ | 0.795 |
| ACE, M (Q ₁ , Q ₃) | 599.33 (316.22, 1286.43) | 587.06 (351.51, 1159.19) | $Z = -0.148$ | 0.882 |
| Goods coverage, M (Q ₁ , Q ₃) | 0.99 (0.98, 0.99) | 0.99 (0.98, 0.99) | $Z = -0.084$ | 0.933 |
| PD whole tree, M (Q ₁ , Q ₃) | 71.43 (58.79, 217.62) | 83.12 (54.74, 281.94) | $Z = -0.296$ | 0.767 |

结果: 指标差异没有明显统计学意义, 考虑与我们的样本量有限, 有一定相关性。

3.2.2. Alpha 多样性指数组间差异分析

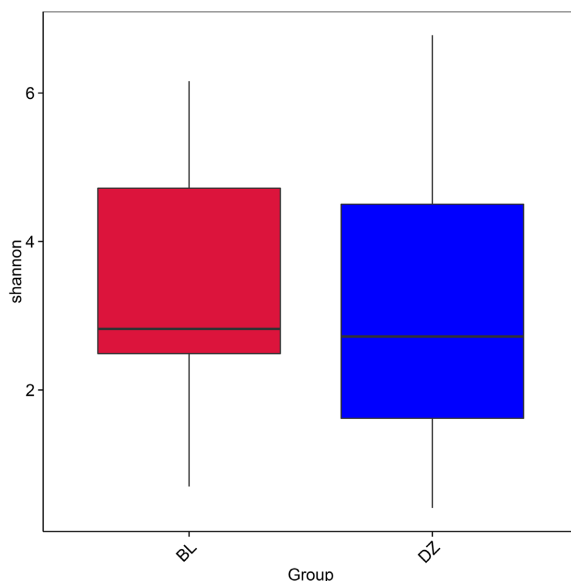
observed_species 和 shannon 指数, 其组间差异分析的箱形图, 见图 2 和图 3:



结论: EOS 组样本物种丰富度低于非 EOS 组, EOS 组样本群落多样性低于非 EOS 组。

Figure 2. Box plot of the differences between groups of the specifications index of Observed_species

图 2. Observed_species 指数组间差异箱形图



结论: EOS 组样本物种丰富度低于非 EOS 组, EOS 组样本群落多样性低于非 EOS 组。

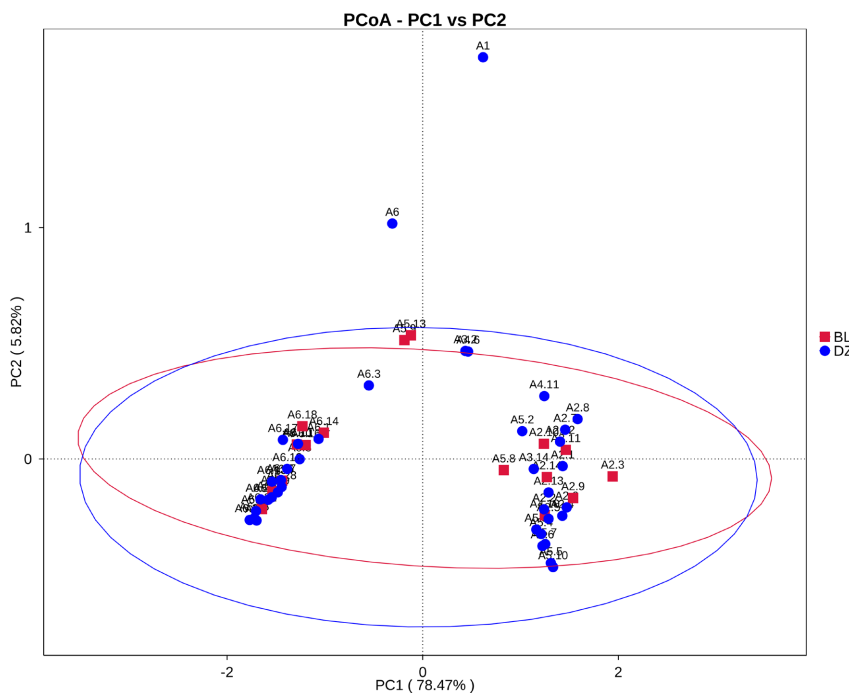
Figure 3. Box plot of shannon index difference between groups

图 3. shannon 指数组间差异箱形图

3.3. Beta 多样性分析(Diversity)

主坐标分析(PCoA, Principal Co-ordinates Analysis), 见图 4。

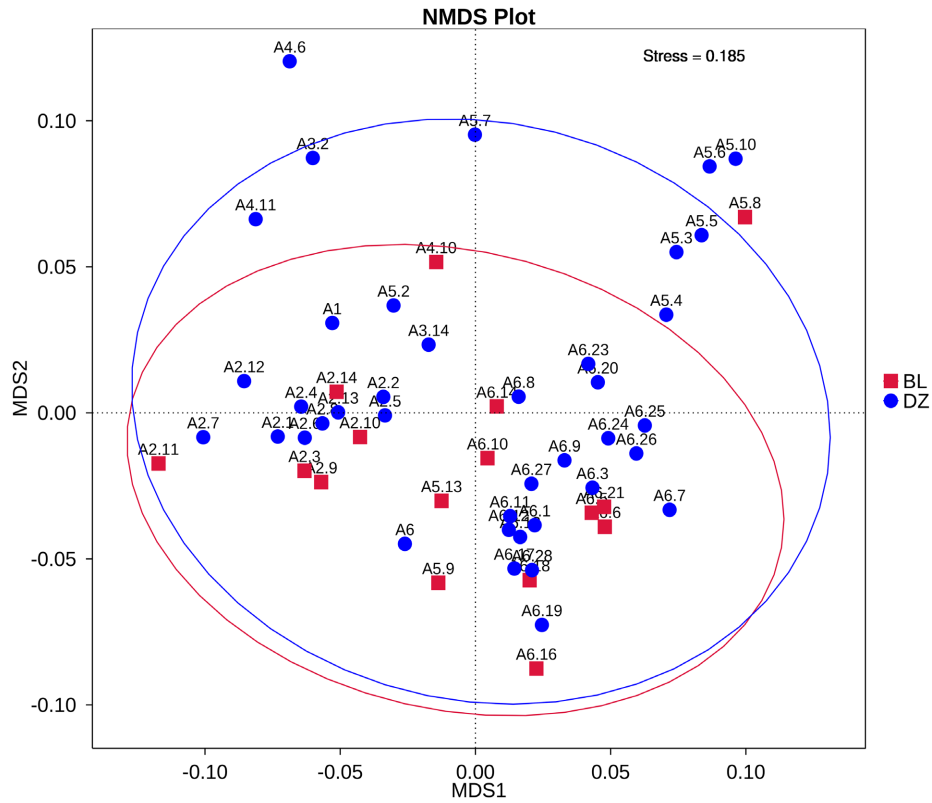
无度量多维标定法(NMDS, Non-Metric Multi-Dimensional Scaling), 见图 5。



说明: 图中的每个点表示一个样本, 同一个组的样本使用同一种颜色表示。BL: 标本 EOS 组。DZ: 标本非 EOS 组。

Figure 4. Based on Weighted Unifrac distance PCoA analysis

图 4. 基于 Weighted Unifrac 距离 PCoA 分析

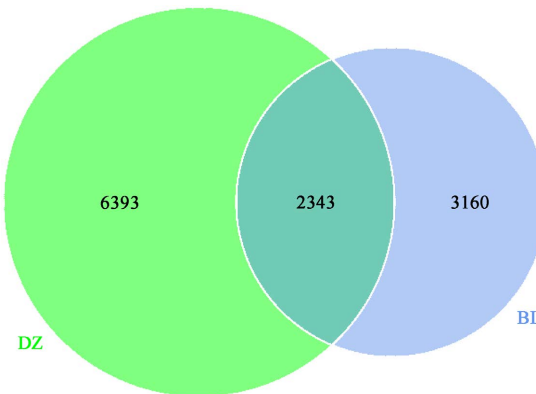


结果显示：标本 EOS 组和非 EOS 组之间菌群差异性较大。

Figure 5. NMDS analysis using non metric multidimensional calibration method
图 5. 无度量多维标定法 NMDS 分析

3.4. 基于 OTU 的 Venn 图和花瓣图，见图 6

根据聚类得到 OTUs 结果和研究需求，分析不同样本之间共有、特有的 OTUs，当样本数小于 5 时，绘制成韦恩图(Venn Graph)，当样本数大于 5 时，会展示花瓣图。韦恩图和花瓣图的绘制是对所有样本进行均一化处理之后进行的。不同样本的 OTU 有交集，也分别有其特有部分。



说明：图中每个圈代表一个样本，圈和圈重叠部分的数字代表样本之间共有的 OTUs 个数，没有重叠部分的数字代表样本的特有 OTUs 个数。BL：标本 EOS 组。DZ：标本非 EOS 组。

Figure 6. Venn graph and petal graph based on OUT
图 6. 基于 OTU 的 Venn 图和花瓣图

3.5. 物种相对丰度展示

根据物种注释结果, 选取每个样本在分类水平(Phylum, Genus)上最大丰度排名前 10 的物种, 生成物种相对丰度柱形累加图, 以便直观查看各样本在不同分类水平上, 相对丰度较高的物种及其比例。门水平上的物种相对丰度柱形图见图 7, 属水平上的物种相对丰度柱形图见图 8:

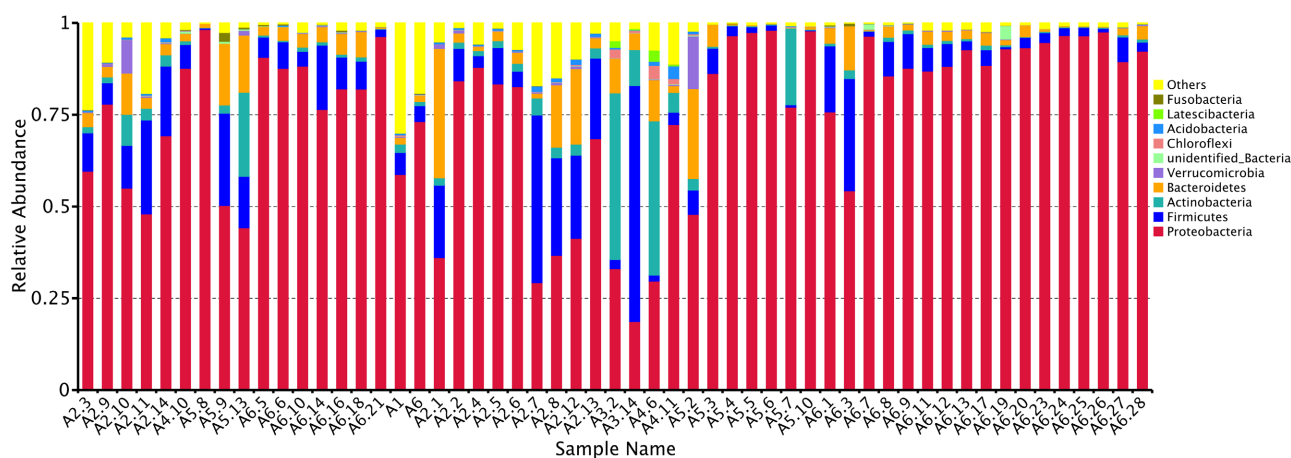
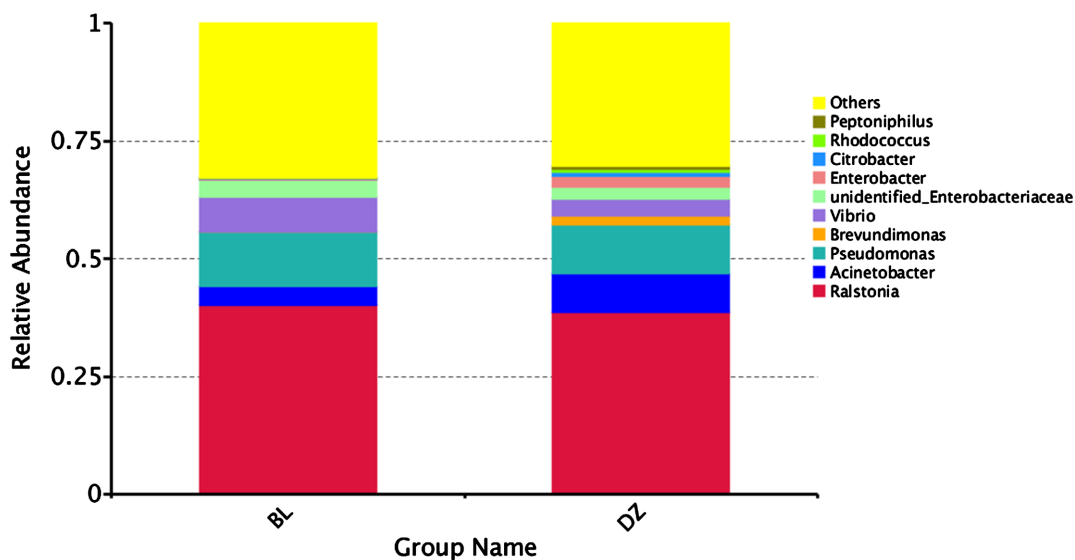


Figure 7. Bar chart of relative abundance of species at the phylum level

图 7. 门水平上的物种相对丰度柱形图



说明: 横坐标(Sample Name)是样本名; 纵坐标(Relative Abundance)表示相对丰度; Others 表示图中这 10 个门之外的其他所有门的相对丰度之和。结果: 在门水平上, 标本 EOS 组、标本非 EOS 组均主要由 4 个菌门组成, 分别为变形菌门 Proteobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes, 标本 EOS 组的厚壁菌门的相对丰度高于标本非 EOS 组, 放线菌门相对丰度低于标本非 EOS 组。

Figure 8. Bar chart of relative abundance of species at the genus level

图 8. 属水平上的物种相对丰度柱形图

在属水平上, 标本 EOS 组、标本非 EOS 组均主要由 4 个菌属组成, 分别为罗尔斯通菌属 *Ralstonia*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、弧菌属 *Vibrio*, 标本 EOS 组的罗尔斯通菌属、假单胞菌属、弧菌属的相对丰度高于标本非 EOS 组, 不动杆菌属相对丰度低于标本非 EOS 组。

3.6. 组间差异分析

组间群落结构差异显著性检验 MRPP

MRPP 分析[3], 是基于 Bray-Curtis 距离的参数检验, 用于分析组间微生物群落结构的差异是否显著, MRPP 分析使用 R vegan 包 mrpp 函数。分析结果见表 2:

Table 2. Analysis of differences between MRPP groups

表 2. MRPP 组间差异分析

| MRPP 组间差异分析 | | | | |
|-------------|-----------|----------------|----------------|--------------|
| Group | A | Observed-delta | Expected-delta | Significance |
| BL-DZ | -0.002359 | 0.7664 | 0.7646 | 0.467 |

说明: Observe Delta 值越小说明组内差异小, Expect delta 值越大说明组间差异大。A 值大于 0 说明组间差异大于组内差异, A 值小于 0 说明组内差异大于组间差异。Significance 值小于 0.05 说明差异显著。结论: 标本 EOS 组和标本非 EOS 组的肠道菌群分布, 组内差异大于组间差异。

4. 讨论

“医学之父”希波克拉底曾说: “一切疾病都始于肠道”(Liu *et al.* 2020)。肠道菌群的紊乱, 与多种疾病都有着千丝万缕的联系。早产儿对定植模式特别敏感, 因为固有的肠道防御机制不成熟, 而不成熟的肠道上皮细胞对共生菌和致病菌[4]有夸大的炎症反应。由于核心微生物群的形成依赖于暴露于首次定植于胃肠道的微生物, 因此在出生后的头几天建立“健康”的微生物群可能对正常发育至关重要。

新生儿早期和生命早期肠道生态系统的正常建立和维持的重要性的新信息正在出现。这种生态系统的紊乱, 尤其是在婴儿早期, 可能会产生远远超出新生儿期的后果, 并在以后的生活中表现为疾病。EOS 是早产儿的致命疾病。然而, 经过多年的研究, 医学界既无法发现确切的致病因素, 也无法预防这些疾病。随着技术的进步, 以及我们继续挽救小胎龄婴儿的生命, 我们有必要尽可能多地了解肠道菌群及其在 EOS 中的作用。

有报道, 人类肠道中的大多数微生物组被限制在 4 个优势门: 厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门。这 4 个菌门虽然通常被认为是与疾病有关的病原体, 但大多数肠道微生物是共生体和共生体, 在营养、免疫系统发育和出生后肠道成熟方面提供有益的效果。它们执行人类宿主本身无法执行的功能。一般来说, 早产儿的胎粪以厚壁菌门和变形菌门为主, 物种多样性较足月婴儿低[5]。在门水平上, 厚壁菌门在第 1 周占优势, 变形菌门在第 1 个月占优势。与本研究结果一致。肠道菌群的失调会使肠道不能耐受发生了变化了的菌群, 防御功能下降, 导致感染。

人体正常肠道菌群构成了肠粘膜的生物屏障, 能够阻止致病菌在肠上皮细胞黏附和定植, 有助于预防肠道感染、调节免疫反应、维持人体健康。EOS 组样品物种丰富度和群落多样性均低于非 EOS 组, 这种肠道菌群多样性降低的特点, 可能使早产儿更容易发生新生儿感染。

细菌提供了对健康肠道功能至关重要的代谢物。例如, 厚壁菌门提供的代谢物可抑制病原体的生长并降低结肠 pH 值, 肠杆菌提供的代谢物可促进和调节脂质吸收、肠道屏障功能和脂溶性维生素。这种共生关系需要肠道内的内稳态。然而, 由于肠道的不成熟、灌注和氧合的波动以及微生物多样性的缺乏, 潜在的致病菌有很大的风险过度生长, 引起粘膜损伤部位的炎症, 和/或通过受损的肠道泄漏到血液。本研究中 Beta 多样性指数组间差异分析得出结论: EOS 组和非 EOS 组群落间 OTU 的种类和数量存在差异, 非 EOS 组群落间 OTU 的种类和数量明显优于 EOS 组。Dornelles 等[6]也发现 EOS 新生儿首次胎粪中变形菌门更为丰富, 与本研究结果一致。变形菌门多数为革兰阴性条件致病菌, 其表达毒力因子脂多糖(LPS),

由此激活 Toll 样受体 4 (TLR4)信号通路, 导致促炎细胞因子的释放增加、肠细胞凋亡增加和黏膜愈合受损[7]。

早产儿肠道发育不成熟, 菌群定植阻力较低, 有利于需要细菌及兼性厌氧菌的过度生长及外袭菌的侵入, 因此感染发生率高, 死亡率高。目前的研究证实, 新生儿肠道菌群的定植与建立是一个复杂的、连续演变的动态过程。生命早期肠道菌群的结构和相对丰度, 影响日后患病的概率。早产儿肠道中各种微生物群相互影响, 菌群更替, 最终达到动态平衡。早产儿肠道微生态环境不稳定, 肠道菌群定植延迟, 菌群种类多样性不足, 这种失衡导致疾病的发生。

中晚期早产儿早发型败血症的发生受多种因素影响, 肠道菌群的研究越来越受到重视。本研究表明, 标本 EOS 组和非 EOS 组中晚期早产儿的早期肠道菌群存在明显差异, 并有一定规律性。通过这些差异及规律性, 可以对中晚期早产儿早发型败血症的发生起到一定的预测意义。高通量测序(16S rRNA)技术的发展推动肠道菌群的研究不断深入, 通过早产儿肠道菌群的研究, 为了能早期识别早发型败血症的早产儿, 并进行相应的临床干预和早期肠道微生态的调节。在未来的研究中, 需要更多样本的收集, 更深入的研究, 从而得到肠道菌群的个体差异, 获得更明确的答案。

总之, 早产儿早期肠道菌群分布特点及差异, 与早发型败血症的发生可能有一定相关性。对可能发生 EOS 的高危早产儿进行规范化管理, 实现早期诊断积极干预, 对改善 EOS 预后有着重要意义。

参考文献

- [1] Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., *et al.* (2012) Global, Regional, and National Causes of Child Mortality: An Updated Systematic Analysis for 2010 with Time Trends Since 2000. *Lancet*, **379**, 2151-2161. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60560-1)
- [2] Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., *et al.* (2012) National, Regional, and Worldwide Estimates of Preterm Birth Rates in the Year 2010 with Time Trends Since 1990 for Selected Countries: A Systematic Analysis and Implications. *Lancet*, **379**, 2162-2172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60820-4)
- [3] O Reilly, F.J. and Mielkejr, P.W. (1980) Asymptotic Normality of MRPP Statistics from Invariance Principles of u-Statistics. *Communications in Statistics*, **9**, 629-637. <https://doi.org/10.1080/03610928008827907>
- [4] Nanthakumar, N.N., Fusunyan, R.D., Sanderson, I. and Walker, W.A. (2000) Inflammation in the Developing Human Intestine: A Possible Pathophysiologic Contribution to Necrotizing Enterocolitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 6043-6048. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6043>
- [5] Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., Fernandez, L., Rodriguez, J.M. and Jimenez, E. (2013) Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLOS ONE*, **8**, e66986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066986>
- [6] Dornelles, L.V., Procianoy, R.S., Roesch, L.F.W., *et al.* (2020) Meconium Microbiota Predicts Clinical Early-Onset Neonatal Sepsis in Preterm Neonates. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, **35**, 1935-1943. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1774870>
- [7] Denning, N.L. and Prince, J.M. (2018) Neonatal Intestinal Dysbiosis in Necrotizing Enterocolitis. *Molecular Medicine*, **24**, Article No. 4. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0002-0>