

· 论著 ·

基于GDM产妇新生儿肠道菌群分布及其不良妊娠结局的研究

王凤莲*

天津医科大学第二医院 (天津 300000)

【摘要】目的 探究孕妇妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)产妇新生儿肠道菌群与不良妊娠结局关系。**方法** 基于产妇的健康情况将112例产妇的新生儿分为产妇妊娠期糖尿病的GDM组, 和产妇身体健康的健康组, 其中GDM组48例, 健康组64例。采集产妇新生儿24小时内的新鲜粪便样本, 采用Illumina 高通量测序技术对研究所收集的119例粪便样本进行检测, 在采用生物信息学操作使用Usearch 和 QIIME对新生儿的粪便样本分析, 观察分析两组新生儿出生后肠道菌群早期的分布特点、记录肠道菌群的相对丰度, 以及观察肠道菌群丰度变化。**结果** 根据产妇新生儿粪便样本分析, 与健康组相比, GDM组新生儿肠道菌群序列平均长度更长; GDM组的样本门级别上和属级别上丰度更高; GDM组的样本水平高丰度类群低, 约占有35%, 健康组的样本门级别上、科级别上和属级别上丰度更高, 健康组的样本水平高丰度类群高, 约占70%, Alpha多样性指数的比较经计算, 无统计学意义($P>0.05$)。**结论** GDM产妇新生儿肠道菌落处于一个失调状态。会显著降低肠道微生物的多样性, 对正常菌群的定植产生影响。

【关键词】 妊娠期糖尿病; 肠道菌群; 不良妊娠结局; 高通量测序

【中图分类号】 R714.14

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.11.031

Study on Intestinal Flora Distribution and Adverse Pregnancy Outcomes in Neonates Based on GDM

WANG Feng-lian*

The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China

Abstract: Objective To explore an association between intestinal microflora and adverse pregnancy outcome in pregnant women suffering from gestational diabetes mellitus (gestational diabetes mellitus, GDM). **Methods** According to the maternal condition, 112 newborns were divided into GDM group and healthy group, including GDM group ($n = 48$) and healthy group ($n = 64$). The fresh fecal samples of pregnant women and newborns were collected within 24 hours, and all fecal samples were detected by Illumina high-throughput sequencing technique. Usearch and QIIME were used to analyze the fecal samples of newborns in the bioinformatics operation. The distribution characteristics of intestinal microflora in the two groups were observed and analyzed, and the relative abundance and changes of intestinal microflora in the two groups were analyzed. **Results** According to the analysis of maternal and neonatal fecal samples, the average length of neonatal intestinal flora in GDM group was longer than that in healthy group; the abundance in GDM group was higher than that in healthy group; the high abundance group in GDM group was low, accounting for about 35%; the sample abundance in healthy group was higher than that in healthy group, accounting for about 70%. No significant difference in α diversity index between the two groups was observed. **Conclusion** The intestinal microflora of pregnant women and newborns with GDM is in a state of imbalance. It can significantly reduce the diversity of intestinal microorganisms and affect the colonization of normal flora. The intestinal microbial diversity of pregnant women and newborns with GDM is relatively low, and the intestinal microflora where bacteria are dominant, it may be related to the following situations, bad pregnancy.

Keywords: Intestinal Flora; Adverse Pregnancy Outcomes; High-throughput Sequencing; Gestational Diabetes Mellitus

GDM是指在怀孕期间出现的一种暂时性高血糖状态。已有研究的结果可以证明产妇在妊娠期间发生肠道菌群的改变是与GDM有关。研究显示, 通过动物实验, 可以观察到得出研究中被研究人员标记过的细菌在新生小体内发现, 并推测是由孕妇的肠道传递的, 因此, 新生儿的肠道菌群的构成可能会被产妇妊娠期糖尿病影响到。本研究采用Illumina 高通量测序技术对样本进行检测, 在采用生物信息学操作使用Usearch 和 QIIME对新生儿的粪便样本分析, 对两组24小时内的粪便样本均进行测序, 近年来, 更多的学者开始研究妊娠期糖尿病(GDM)与肠道菌群之间的关系。了解研究组(GDM组)新生儿出生后肠道菌群分布特点以及对照组(健康组)新生儿菌群相对丰度的差异是该研究领域的重要内容之一。肠道菌群是定植在人体肠道内的正常微生物, 这些微生物与人体代谢有密不可分的关系, 因此肠道菌群被认为是一种隐藏在人体的器官。因此研究GDM与肠道菌群的关系对于深入了解GDM的发病机制和预防治疗具有重要意义^[1-3]。且肠道菌群多样性的改变而引起的肠道菌群失调和糖尿病有密切联系^[4,5]。

本研究拟以肠道菌群为研究对象, 通过对其进行样本纯化, PCR扩增、样本定量、文库构建测序。后续生物信息学操作使用Usearch 和 QIIME5等完成, 统计和作图主要使用R、python和

java等来完成。研究结果显示, 仅有1%~10%的肠道细菌能够进行培养, 这提示我们, 仅仅只使用传统的培养方法是无法充分反映肠道菌群的多样性的, 为了解决这个问题, 研究人员使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)、实时荧光定量PCR等非培养技术对肠道菌群进行研究。这些技术可以检测出丰度较高或特定微生物的改变, 从而更全面地了解肠道菌群的结构和功能。最近的研究中, 高通量测序技术测序已经跃升成为研究环境微生物群组成和多样性的常用以及首选方法。运用此方法研究肠道菌群的改变对GDM发病是否起重要作用, 是否会出现不良妊娠结局。

1 资料与方法

1.1 研究设计 采用 Illumina 高通量测序技术对所有样本的肠道菌群物种丰度、多样性和构成的变化趋势进行分析, 探讨GDM产妇新生儿肠道菌群与不良妊娠结局试验结果。

1.2 纳入和排除标准 样本选取自2019年2月至2020年12月在本医院定期产检并分娩的产科、新生儿科的新生儿112例, 胎龄 ≤ 37 周或出生体重 ≤ 2500 g。排除标准: 住院天数 < 7 的患儿。合并患有严重先天性心脏病、严重消化道畸形, 唐氏综合征、遗传代谢病和重度窒息的早产儿。

【第一作者】 王凤莲, 女, 护师, 主要研究方向: 流产, 试管婴儿护理。E-mail: ese996728@21cn.com

【通讯作者】 王凤莲

1.3 GDM产妇新生儿肠道菌群失调和不良妊娠结局诊断依据

[5-6] GDM产妇新生儿肠道菌群失调定义：(1)妊娠期糖尿病产妇肠道的重要益生菌的数量出现下降，同时高糖状态改变了肠道的内环境。(2)肠道内PH值和厌氧环境的改变。在此基础上肠道菌群的变化会对GDM产妇妊娠结局产生一定的影响。

1.4 样本采集 本实验所用标本来源新生儿112例，其中GDM产妇新生儿粪便样本48例，健康产妇新生儿粪便64例，涉及的所有患者及其家属全部签署知情同意书。所用胶回收试剂盒购于ThermoFisher公司；文库的构建系统购于NEW ENGLAND BioLabs公司；测序试剂盒购于Illumina公司。实验中对64个健康组和48个GDM组的新生儿新鲜粪便样本进行初检，使用特制的DNA提取试剂盒进行基因组DNA抽提后，电泳检测DNA，然后再次进行样本收集。选择DNA序列的特定区域进行测序。Barcode是在测序过程中加入到引物中的一段序列，用于区分和识别不同的样品。特异引物是针对特定DNA序列设计的引物，通过聚合酶链式反应(PCR)对DNA样本的特定区域进行扩增，以增加其数量。为了增加实验的可靠性，对每个样本进行3次独立的PCR反应，并且在每个PCR反应达到预设的扩增周期时停止。在PCR结束后，同一样本的PCR产物收集并混合在一起，然后通过电泳进行检测，以确认目标DNA片段的扩增情况。回收PCR的产物时选择使用特制的试剂盒，回收目标的DNA片段前，使用TE缓冲液对DNA片段进行洗脱。根据电泳的初步检测结果，对PCR的回收产物进行定量分析(使用Qubit2.0进行)，根据每个样本的测序要求，将PCR回收产物按相应比例混合并且构建成适用于PE250测序的文库，进行测序以获取DNA序列数据。然后对数据进行分析：(1)对数据的序列拼接；(2)根据Barcode的结果，辨别划分样品。(3)去除结果中所包含的低质量序列。(4)去除数据中出现的嵌合体。(5)进行OTU聚类，标准：97%的相似性水平上。(6)从数据中挑选出OTU的代表性序列。(7)划分物种分类信息，具体方法：使用物种分类数据库进行；(8)将代表性序列进行对比并过滤，然后重建进化树。(9)选择不需要的OTU数据进行过滤，并对剩下的数据进行重抽样；(10)计算各个分类水平上的有关信息，统计并观察其它物种间的相关性等。

1.5 生物信息学分析 将测序得到的原始数据经过拼接、过滤后，使用生物信息学操作，如Usearch和QIIME5进行后续处理。在DNA纯化、聚类和差异物种分析的基础上，计算每个样本在97%相似水平上的(OTU)数量，用特定的分类单元分别代表特定的物种。根据样品测序产生的OTU的结果，对稀疏曲线进行绘制。并且计算单个样本的Alpha多样性(Shannon指数)，所得指数越大则说明该样本中的物种越丰富。统计样本的物种丰度(门和科两个分类)，并进行并行聚类分析。并对群落功能进行预测。

1.6 统计学分析 本研究所有数据均使用 SPSS 20.0 软件包处理。以n(%)表示计数资料，比较采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 生物信息分析显示：原始序列数据显示碱基读取错误率p越大，测序碱基质量值越大。测序质量越大(表1)。同时通过OTU聚类分析的样品，对测序深度多样性分析有一定影响。

2.2 群落组成分析显示 GDM组的样本中含有门类水平放线菌门(Actinobacteria)高，健康组的样本中几乎不含有放线菌门(Actinobacteria)；使用颜色深浅来表征丰度的高低，GDM组的样本群落组成分析平均丰度(1.0-5.0)，健康组的样本群落组成平均丰度(0.1-10)；GDM组的样本门级别上和属级别上丰度更高；GDM组的样本水平高丰度类群低，约占35%，健康组的样本目级别上、科级别上和属级别上丰度更高，健康组的样本水平高丰度类群高，约占70%。同时群落组成的分析可在任一分类水平(包括OTU)进行。对比发现不同物种，丰度波动不同颜色越深，丰度波动越大。同时变异系数越大，丰度波动越大。

2.3 物种丰度及多样性分析 通过计算研究样本的Alpha多样性指数，得出肠道中微生物群落的丰度均匀性、多样性等研究数据。研究分析对比2组样本中肠道菌群的多样性，可得出GDM组细菌生物群落的丰度及多样性要小于健康组。具体可以通过Rank-Abundance 曲线(图1)显示：物种的丰度越高，则曲线在横轴上的范围就越大；曲线平滑程度反映检测的物种的均度，曲线的变化越平缓，则物种分布越均匀。

各样本的OUT(运算分类)：GDM组新生儿出生后390，健康组新生儿出生后395；各样本的Shannon(香农维纳)指数：GDM组新生儿出生后3.2，健康组新生儿出生后3.5，均随日龄增加呈升高趋势。各样本Simpson(微生物多样性)指数：GDM组0.826534，健康组0.852960。如表2所示。

2.4 差异物种分析显示 为了弄清楚造成Beta多样性上的差别，所进行差异物种分析。为了展示具有更大的丰度波动的物种，使用变异系数(CV)来衡量物种丰度的变异程度，分为变异系数最大的10个属和最小的10个属。最大的10个属为：梭菌纲属、变形菌门属、巨单胞菌属、粪球菌属、氨基酸球菌属、嗜黏蛋白阿克曼菌、无芽胞厌氧菌属、小杆菌属、考拉杆菌属、普雷沃菌属。最小的10个属为：毛螺旋菌属、瘤胃球菌属、溶血性链球菌属、厚壁菌门属、普雷沃氏菌属、毛螺旋菌属、假单胞菌属、丁酸弧菌属、瘤胃菌属。结果见图2：可见在属的水平上选取总丰度大于0.1%的有。

表1 粪便样本测序序列总结

样品分组	双端测序数目	标记序列	过滤低质量序列	后续分析的Tags序列	标记序列与双端测序数目的比例	有效标记序列的平均长度	大于30的碱基所占比例(%)
健康组	26621	24959	24656	23902	89.80%	291.87	94.92
GDM组	29426	27726	27347	26386	89.81%	301	94.12

表2 Alpha多样性分析

分组	运算分类单位数量	香农维纳指数	微生物多样性指数
GDM组	390	3.2	0.826534
健康组	395	3.5	0.852960

3 讨论

高通量测序技术进行测序后可以得出深度极深的测序数据，这是它所具有的优势，与传统的培养方法以及以DNA为基础的分子生物学方法相比，高通量测序技术具有更高的敏感性和更全面的覆盖范围，高通量测序技术可以测出低丰度细菌甚至是未知细菌，提供更加全面和准确的信息。其中，Illumina高通量测序技术是目前研究中，用于肠道微生物研究中最前沿的监测技术

的其中之一。该技术能够通过对肠道微生物群进行深度测序，提供有关菌群结构、丰度、多样性和功能的信息。通过这种方法，研究人员可以更深入地了解肠道微生物群落的组成和变化，进而揭示肠道微生物与人体健康之间的关联。因此，高通量测序技术已成为肠道微生物研究的强大工具，为研究提供更好的工具，提供更加严谨的数据。

既往研究表明，人体肠道内有着特殊的微生物群落，它包括

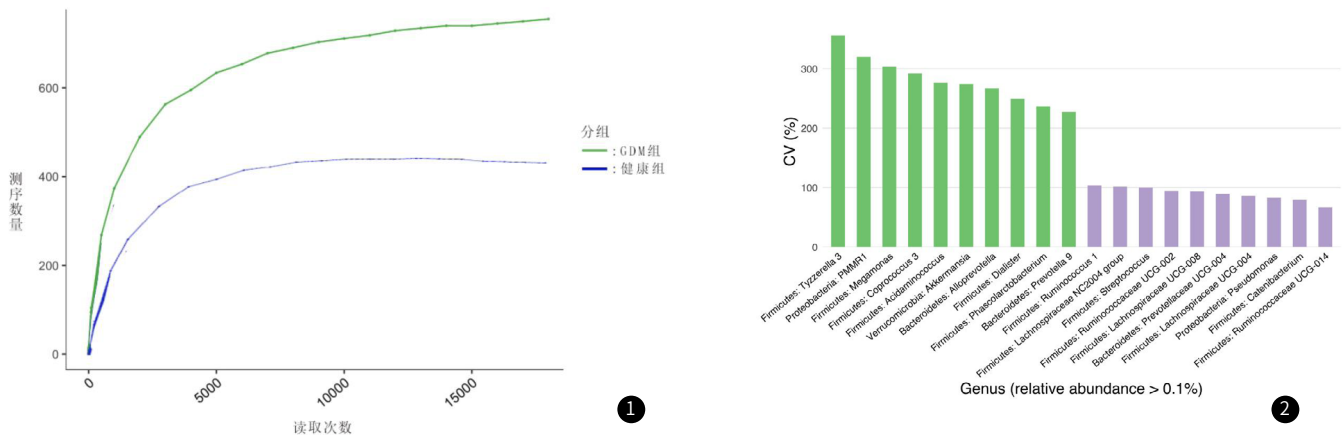


图1 Rank-Abundance 曲线。图2 异物种分析图。注：图中横坐标为变异系数，纵坐标为属，柱子越长，也就是越靠右代表变异系数越大。展示的是属水平上变异系数最大的10个属和最小的10个属，用不同的颜色来表示以方便区分。

各种常见或特殊的细菌病毒等微生物，这些微生物的总量已经超过1.5kg，这些微生物的基因组是100倍的人基因组。观察人体肠道内有益菌的种类的数量状态等，在一定程度上可以帮助我们观察机体的健康状态。并且研究认为，糖尿病与人体体内肠道菌群失调有一定关联。糖尿病患者通常会有严重的肠道菌群失调^[6-9]。本次研究显示：GDM产妇新生儿样本中肠道菌群数量、多样性以及分布状态较健康组呈现分散的趋势，通常表现为GDM产妇新生儿肠道内益生菌减少、致病菌增多等现象。

以前的文献报道显示^[10,11]，肠道菌群的多样性下降与代谢性疾病的发生有关，GDM就是一种代谢性疾病。GDM的发病机制复杂，产妇在妊娠期内的垂体泌乳素、孕酮等会发生改变，这些变化会导致周围的细胞组织减少对葡萄糖的利用，使血糖升高，进而发生妊娠期糖代谢异常。肠道菌群的协助下，人体才能完成对食物中的糖类的吸收和消化。因此，肠道菌群的情况也会对GDM产妇的胰岛素也会有间接的影响。此外，肠道菌群进入人体后，某些条件下，致病菌会携带产生的脂多糖进入血液，这种脂多糖会增加肠道的通透性，增加产妇血液中的毒性，继而会导致产妇机体内的炎症细胞因子含量增加，间接参与了炎症反应。这提示我们，肠道菌群会参与人体疾病的发生、进展^[12]。对于GDM产妇而言，肠道菌群可能通过影响胰岛素抵抗和炎症反应来影响妊娠期糖代谢的异常改变。因此，研究肠道菌群在GDM中的作用对于预防和治疗GDM具有重要意义^[3]。通过本次研究发现，GDM产妇新生儿肠道菌群在目级别上、科级别上和属级别上丰度呈现出不同情况。这可能与GDM产妇新生儿肠道微生态环境遭受破坏有关。GDM产妇新生儿肠道菌群多样性、丰度均要低于健康产妇新生儿。

深入探究其原因，推测GDM产妇肠道的酸碱度和所产生的厌氧菌的环境由于产妇代谢产物增加而得到了改善，一些厌氧菌的数量降低。肠道的寄生菌通过一系列过程，改善胃肠功能。当平衡被打破机体的炎症反应随之增加，糖代谢进一步加重，因此提示产妇在妊娠期，应该多补充益生菌，以此来减少肠道内的毒素，可改善胰岛素的抵抗^[13,14]。并且发现GDM产妇新生儿不良菌落高于健康产妇新生儿，有益菌落低于健康产妇新生儿，这表明GDM产妇新生儿的不良妊娠结局与肠道菌群有紧密相关性。说明含量越低的厌氧菌，会导致增加妊娠不良结局的可能性^[15]。这为临床GDM产妇及其新生儿的早期预防、治疗提供理论参考。

综上所述，产妇新生儿粪便中富集细菌，GDM不仅对产妇新生儿的健康产生影响，还会影响他们肠道内的菌群分布和相对丰度，导致肠道微生物多样性降低。GDM产妇新生儿的肠道菌群会

出现紊乱现象，这使得他们的肠道菌群定植和演变受到内部和外部因素的影响。这些变化显著降低了肠道菌群的多样性，影响了正常菌群的定植。为患有糖尿病家族史孕妇的早期筛查、干预提供支持，同时避免新生儿因其母在孕期因妊娠期糖尿病引起肠道菌落失调而导致不良妊娠结局的发生。

参考文献

- [1] 吴莎. 妊娠期糖尿病孕妇体重、肠道菌群的组成变化特点及对妊娠结局的影响[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 117-119.
- [2] 赵晓琴, 谷强, 赵静. 妊娠期糖尿病患者肠道双歧杆菌结构特征性分析[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(9): 65-66.
- [3] 王红日. 妊娠期糖尿病患者肠道菌群特征及对妊娠结局的影响[J]. 实用医技杂志, 2020, 27(10): 66-68.
- [4] 王海艳, 张中敏, 刘艳芳, 等. HbA1c水平对GDM孕妇临床结局和母婴肠道菌群的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(4): 585-589.
- [5] 张锋英, 邵秀兰, 吴春峰, 等. GDM患者肠道微生物分布特征及与妊娠结局关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2020, 28(11): 1793-1797.
- [6] 秦胜堂, 杨慧霞. 肠道菌群与妊娠期糖尿病相关性的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(7): 66-68.
- [7] 赵霞, 张国华, 高亚楠, 等. 孕期系统化管理对妊娠期糖尿病妊娠结局影响研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(6): 45-46.
- [8] 王宇卉, 李权伦, 殷卓, 等. 妊娠期糖尿病患者肠道菌群、细胞免疫功能及炎症因子变化[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(5): 56-57.
- [9] Lelmer J, van Zanden, Fleurisca J, et al. New diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus and their impact on the number of diagnoses and pregnancy outcomes[J]. 2018, 61(4): 13-14.
- [10] 王蕾蕾, 陶晔璇. 妊娠期糖尿病孕妇与健康孕妇的肠道菌群差异[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(11): 1300-1305.
- [11] Gao C, Sun X, Lu L, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. J Diabetes Investig, 2019, 10(1): 154-162.
- [12] Yamamoto JM, Kellett JE, Balsells M, et al. Gestational diabetes mellitus and diet: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials examining the impact of modified dietary interventions on maternal glucose control and neonatal birth weight[J]. Diabetes Care, 2018, 41(7): 1346-1361.
- [13] Ma QT, Li Y, Wang M, et al. Progress in metabolomics of type 2 diabetes mellitus[J]. Molecules, 2018, 23(7): E1834.
- [14] Wang Z, Zolnik CP, Qiu Y, et al. Comparison of fecal collection methods for microbiome and metabolomics studies[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 23(7): 301.
- [15] Cao Y, Yao G, Sheng Y, et al. Jin Qi Jiangtang tablet regulates gut microbiota and improve insulin sensitivity in type 2 diabetes mice[J]. J Diabetes Res, 2019, 35(6): 187-188.

(收稿日期: 2023-02-25)
(校对编辑: 孙晓晴)