

· 论著 ·

高胆红素血症足月儿的肠道菌群变化分析*

闫俊梅¹ 闫 静^{1,*} 刘松林¹ 索 峰² 缙灵山² 李倩倩¹ 袁振亚¹

1.徐州市妇幼保健院新生儿科 (江苏 徐州 221000)

2.徐州市妇幼保健院遗传医学中心 (江苏 徐州 221000)

【摘要】目的 探讨高胆红素血症与非高胆红素血症足月肠道菌群分布组成和变化。**方法** 取2022年1月至2023年1月于徐州市妇幼保健院出生的207例足月新生儿为研究对象, 其中107例非高胆红素血症健康足月新生儿作为对照组(Control组), 高胆红素血症组(Jaundice组)100例。分别取两组新生儿出生后第一次胎便样本, 随后采集高胆红素血症高峰期的粪便, 同时取相同日龄的对照组粪便样本, 对粪便样本进行16S rRNA基因测序。**结果** 对Control组和Jaundice组粪便中肠道菌群属水平进行比较, 发现两组间出生后第一次胎便中3种肠道菌群丰度具有统计学差异($P<0.05$), 其中Enterococcus的丰度高于Control组, Streptococcus及Lactobacillus丰度低于对照组。高胆红素血症高峰期两组间6种肠道菌群丰度差异具有统计学意义($P<0.05$), 与Control组进行比较, Jaundice组Klebsiella、Enterococcus、Lactobacillales丰度明显较高($P<0.05$), 而Bifidobacterium、Bacteroides、Escherichia-Shigella丰度明显偏低($P<0.05$)。另外, Jaundice组第一次胎便与高峰期粪便中肠道菌群的构成具有差异, 高胆红素血症高峰期粪便中Klebsiella丰度明显高于第一次胎便($P<0.05$), 而Enterococcus及Escherichia-Shigella丰度明显偏低($P<0.05$)。**结论** 高胆红素血症与健康足月新生儿出生后第一次胎便及高胆红素血症高峰期粪便中肠道菌群分布均存在明显差异, 且高胆红素血症患儿第一次胎便与高胆红素血症高峰期粪便中肠道菌群组成具有显著差异, 肠道菌群检测可能有助于高胆红素血症的风险预测及临床诊断。

【关键词】 高胆红素血症, 16S rRNA测序, 肠道菌群, 足月儿**【中图分类号】** R722**【文献标识码】** A**【基金项目】** 徐州市卫生健康委科技项目(XWKYHT20210543)**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2024.7.042

Analysis of Intestinal Flora Characteristics and Changes of Hyperbilirubinemic Full-term Neonates*

YAN Jun-mei¹, YAN Jing^{1,*}, LIU Song-lin¹, SUO Feng², GOU Ling-shan², LI Qian-qian¹, YUAN Zhen-ya¹.

1.Department of Neonate, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

2.Department of Medical Genetic, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Abstract: Objective To explore the differences and alterations in intestinal flora between full-term newborns of hyperbilirubinemia and non-hyperbilirubinemia. **Methods** A total of 207 cases of full-term newborns in Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital were recruited in this study. Among them, 107 healthy newborns were divided into Control group, and 100 hyperbilirubinemia newborns were divided into Jaundice group. Samples of first fetal stool after the birth were and during the peak period of jaundice for bacterial 16S rRNA sequencing. **Results** The compositions of intestinal flora between full-term newborns with hyperbilirubinemia and non-hyperbilirubinemia were compared, and found the significant differences of 3 intestinal floras in the first fetal stool between these two groups ($P<0.05$). The abundance of Enterococcus was higher than that of Control group, while the abundances of Streptococcus and Lactobacillus were significantly lower ($P<0.05$). During the peak period of jaundice, there were significant differences for the abundances of 6 bacteria between Control and Jaundice groups ($P<0.05$). The abundances of Klebsiella, Enterococcus, and Lactobacillales in Jaundice group were significantly higher than that of Control group, while Bifidobacterium, Bacteroides, Escherichia-Shigella abundances were significantly lower ($P<0.05$). For hyperbilirubinemia newborns, there were significant differences for the composition of intestinal flora between the first fetal stool after birth and the stool samples during the peak period of jaundice. The abundance of Klebsiella in stool samples during the peak period of jaundice was higher than that of the first fetal stool, while the abundances of Enterococcus and Escherichia-Shigella were significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion** There were significant differences for the composition of intestinal flora at birth and at the peak of hyperbilirubinemia between full-term newborns with hyperbilirubinemia and healthy neonates. Moreover, the compositions of intestinal flora at birth and at the peak of hyperbilirubinemia for hyperbilirubinemia neonates were different. Detection of of intestinal flora might benefit to the risk prediction and diagnosis of hyperbilirubinemia.

Keyword: Hyperbilirubinemia; 16S rRNA Sequencing; Intestinal Flora; Full-term Newborn

高胆红素血症是新生儿期最常见的临床问题, 约60%的足月儿在生后早期可出现皮肤黄染^[1]。黄疸大多数是生理性的, 然而少数重度患儿可出现核黄疸, 造成永久性的神经系统损害, 甚至死亡。肠道微生态被认为是一个代谢系统, 约存在15 000~36 000个菌种^[2], 近年国内外有关肠道菌群的研究大多是有关喂养不耐受、新生儿坏死性小肠结肠炎、分娩方式、喂养方式及抗生素使用等^[3-7], 而有关黄疸的研究较少。本中心前期研究亦发现高胆红素血症与非高胆红素血症早产儿肠道菌群的种类和丰度存在差异^[8], 然而高胆红素血症足月儿其出生后胎便中肠道菌群组成是否具有差异, 他们与高胆红素血症早产儿之间的肠道菌群是否有差异, 依然有待进一步研究。本文通过对高胆红素血症和非高

胆红素血症足月儿出生后第一次胎便及发病高峰期粪便进行16S rRNA基因测序, 探究高胆红素血症足月儿肠道菌群组成及出生后的变化, 为新生儿高胆红素血症的风险预测和诊断提供新思路 and 理论依据。

1 对象和方法

1.1 纳入、排除标准及分组标准 选取2022年1月至2023年1月在徐州市妇幼保健院足月新生儿为研究对象, 共包括107例足月健康新生儿及100例高胆红素血症足月儿。本研究在开展前已通过徐州市妇幼保健院临床研究伦理委员会审查批准, 批准号为[2019]伦理第(10)号。

【第一作者】 闫俊梅, 女, 副主任医师, 主要研究方向: 儿童营养与健康。E-mail: yanjunmei0101@163.com**【通讯作者】** 闫 静, 女, 副主任医师, 主要研究方向: 窒息与肠道菌群变化。E-mail: 59888272@qq.com

高胆红素血症的诊断参考2014年出版的新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识^[9]。高胆红素的诊断标准为：(1)出生后24小时内出现黄疸；(2)血清总胆红素已达到相应日龄及相应危险因素下的光疗干预标准，或超过小时胆红素风险曲线的第95百分位数；或胆红素每日上升85 μmol/L，或每小时>0.5 mg/dl；(3)黄疸退而复现。足月健康新生儿纳入对照组(Control组)，高胆红素血症足月儿纳入黄疸组(Jaundice组)。研究对象纳入标准为出生后因高胆红素血症在徐州市妇幼保健院新生儿科治疗的足月儿，以及同期出生的母婴同室健康足月新生儿。排除标准：日龄>7天且没有成功采集有效胎便样本；先天性消化道畸形；重度窒息；重症感染；坏死性小肠结肠炎；凝血功能异常导致消化道出血；需要外科治疗的消化道疾病；母亲产前有抗生素使用史。收集研究对象的胎龄、日龄、出生体重及总胆红素水平等临床信息。

1.2 样本采集与检测

1.2.1 样本采集 收集Jaundice组新生儿出生后第一次胎便及高胆红素血症高峰期的粪便，同时采集Control组新生儿出生后第一次胎便及与高胆红素血症高峰同时期的粪便样本。使用一次性无菌采样拭子挑取约1cm3新鲜粪便，以无菌密封管迅速封装，置于-80℃冰箱保存。

1.2.2 DNA提取、PCR扩增与高通量测序 使用E.Z.N.A.®StoolDNA Kit试剂盒提取样本细菌总DNA。使用ABIGeneAmp®9700PCR扩增仪、338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增引物对细菌16S rRNA基因的v3-v4区进行扩增。PCR扩增设置：(1)95℃预变性3min；(2)95℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸45s，循环27次；(3)72℃延伸10 min。使用2%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳检测，使用AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒回收纯化，通过QuantiFluor TM-ST实时PCR系统对产物定量，使用Illumina Miseq300 PE平台进行16S rRNA基因高通量测序。

1.3 生物信息学分析 对下机后的原始数据进行去噪与优化，将优化序列聚类成操作分类单位(OTU)，设置97%相似水平获得OTU代表序列，通过 Silva数据库比对获得OTU对应的物种分类信息。

1.4 统计学处理 计量资料中符合正态分布的以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组间差异采用t检验进行比较；使用R语言进行图形绘制。

2 结果

2.1 一般情况 Control组新生儿共107例，胎龄为38.1±0.6周，出生体重3065±703 g，高峰同时期总胆红素水平分别为167±39 μmol/L。Jaundice组新生儿100例，胎龄39.0±0.5周，出生体重3075±710 g，高峰期总胆红素水平307±101 μmol/L。两组间研究对象的胎龄、出生体重无显著差异(P>0.05)，Jaundice组的总胆红素水平显著高于Control组(P<0.001)(表1)。

2.2 两组间出生后第一次胎便肠道菌群分析 从属水平对两组间第一次胎便肠道菌群进行分析，结果显示，发现两组间出生后第一次胎便中3种肠道菌群丰度具有统计学差异(P<0.05)，其中Enterococcus的丰度显著高于Control组，Streptococcus及Lactobacillus丰度明显低于对照组(P<0.05)。见图1~图2。

2.3 两组间高胆红素血症高峰期粪便肠道菌群分析 结果显示，Jaundice组高胆红素血症高峰期有6种肠道菌群丰度与Control组同时期相比，差异具有统计学意义(P<0.05)。与Control组相比，Jaundice组Klebsiella、Enterococcus、unclassified_o_Lactobacillales丰度明显较高(P<0.05)，而Bifidobacterium、Bacteroides、Escherichia-Shigella丰度显著偏低(P<0.05)。结果见图1~图3。

2.4 Jaundice组新生儿出生后第一次胎便与高胆红素血症高峰期粪便中肠道菌群的比较分析 在Jaundice组患儿中，第一次胎便与高峰期粪便中肠道菌群的分布具有差异，高胆红素血症高峰期粪便中Klebsiella丰度明显高于第一次胎便(P<0.05)，而Enterococcus及Escherichia-Shigella丰度明显偏低(P<0.05)。见图1~图4。

表1 各组研究对象一般情况比较分析

	Control组(=107例)	Jaundice组(100例)	P值
胎龄(周)	38.1±0.6	39.0±0.5	0.450
出生体重(g)	3065±703	3075±710	0.226
高峰期总胆红素(μmol/L)	167±39	307±101	<0.001

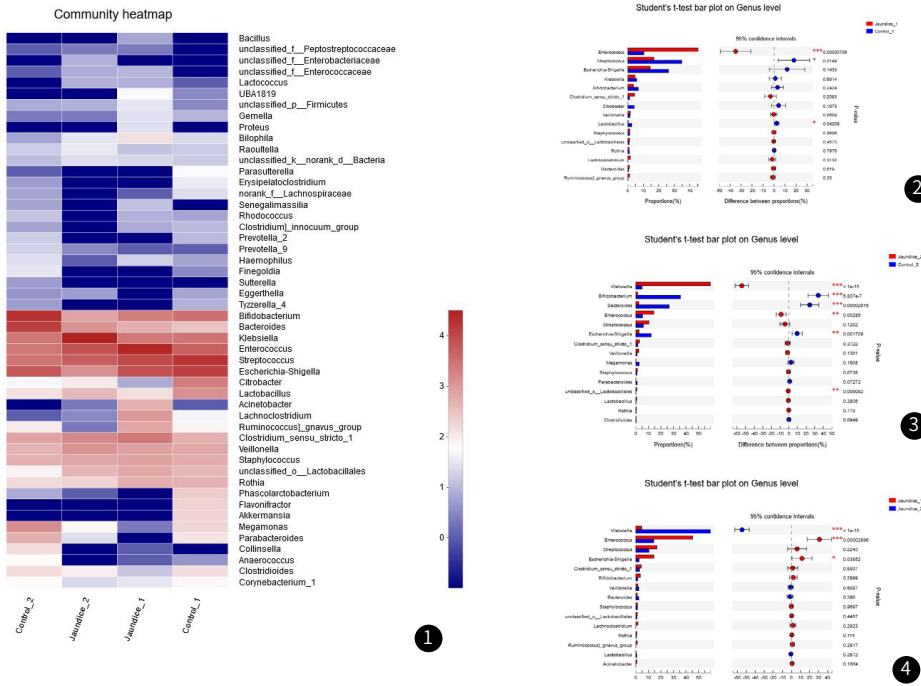


图1 16S rRNA的热图显示各组样品中的前50种肠道菌群的比较。图2 两组研究对象出生后第一次胎便肠道菌群属水平分布的比较分析。图3 两组研究对象高胆红素血症高峰期肠道菌群属水平分布的比较分析。图4 Jaundice组患儿出生后第一次胎便与高峰期粪便肠道菌群属水平分布的比较。

3 讨论

高胆红素血症是临床的常见疾病,约60%的足月儿在生后1周内可见不同程度的黄疸,胆红素持续升高,严重可致胆红素脑病,进而影响其听力和神经系统的正常发育^[10]。因此,高胆红素血症的诊疗受到愈来愈多的关注。肠道菌群数量庞大而复杂,被认为是人类的“第二基因组”,是人类疾病过程中潜在的生物标志物。目前国内外有关肠道菌群的研究绝大多数是关于营养相关性疾病如:糖尿病、喂养不耐受、坏死性小肠结肠炎患儿肠道菌群变化。或肠道菌群影响因素方面的研究如:分娩方式、喂养方式、抗生素等对肠道菌群的影响等^[3-7]。而有关黄疸的研究,大多数是有关益生菌治疗黄疸方面^[11-12],然而高胆红素血症患儿与健康新生儿出生后胎便中肠道菌群是否具有差异,以及胎便中肠道菌群检测是否有助于高胆红素血症的风险预测,依然尚未明确。本文对高胆红素血症患儿出生后第一次胎便中肠道菌群属水平进行分析,发现与健康新生儿相比肠道菌群构成具有差异。其中Enterococcus的丰度显著高于Control组,Streptococcus及Lactobacillus丰度明显低于对照组,这些结果提示在高胆红素血症发病前新生儿胎便中可能已出现肠道菌群构成得异常。值得注意的是,本文结果也发现Jaundice组患儿高胆红素血症高峰期肠道菌群中Enterococcus丰度亦高于健康新生儿,这与已有研究报道结果较为一致^[4],然而两组间Streptococcus及Lactobacillus丰度无显著差异。另外,本文还发现在高峰期Jaundice组患儿中,肠道菌群中Klebsiella和unclassified_o_Lactobacillales丰度高于对照组,而Bifidobacterium、Bacteroides、Escherichia-Shigella丰度低于对照组。另有研究报道,双歧杆菌数量减少与新生儿高胆红素血症发病风险增加有关^[13]。本文亦发现,非高胆红素血症婴儿的Bifidobacterium的相对丰度明显高于黄疸组。高胆红素血症足月儿与非高胆红素血症足月儿的肠道菌群之所以有差异,不仅因为肠道菌群在肠道生理功能调控、促进肠道蠕动及营养吸收、调节免疫反应中发挥作用,且在胆红素代谢和转化过程中发挥重要作用^[14]。另外,肠道菌群亦可通过影响肝功能和肝酶活性,调节胆红素的代谢和排泄^[15]。

本研究通过留取婴儿出生时首次胎便样本,并对其进行随访、监测其胆红素水平变化,当其发生高胆红素血症时,再次留取其大便样本。同一婴儿前后对比,可以纵向更直观的了解新生儿高胆红素血症发病过程中肠道菌群的变化规律。结果显示,在Jaundice组患儿中,第一次胎便与高峰期粪便中肠道菌群的分布具有差异,高峰期粪便中Klebsiella丰度明显高于第一次胎便,而Enterococcus及Escherichia-Shigella丰度明显偏低。这些研究结果提示,新生儿高胆红素血症发病时与出生后胎便中肠道菌群属水平构成具有差异,未来进一步研究新生儿高胆红素血症发病过程中肠道菌群的变化规律,有助于明确其在高胆红素血症发病中的作用及机制。值得注意的是,另有研究表明双歧杆菌活菌制剂有益于改善新生儿高胆红素血症临床症状,降低总胆红素水平^[16]。因在本中心治疗的患儿在治疗过程中均未使用益生菌制剂,故在服用了益生菌制剂后肠道菌群是否会出现变化,需进一步研究。

本研究小组前期通过探讨高胆红素血症早产儿与非高胆红素血症早产儿肠道菌群的差异,结果发现^[8]:在属水平上,两组对象肠道菌群均以Ralstonia、Rhodococcus、Enterococcus为主。对照组患儿肠道Lactobacillus的相对丰度显著高于黄疸组,黄疸组患儿肠道Ralstonia的相对丰度与总胆红素水平呈负相关。而本次通过高胆红素血症足月儿的研究发现:Jaundice组Klebsiella、

Enterococcus、unclassified_o_Lactobacillales丰度明显较高,而Bifidobacterium、Bacteroides、Escherichia-Shigella丰度显著偏低。可见同是高胆红素血症患儿,足月儿与早产儿之间的肠道菌群亦有明显差异。

综上所述,对于高胆红素血症足月儿,其在出生时,胎便中的肠道菌群构成与健康新生儿存在差异,这提示肠道菌群检测可能有助于新生儿高胆红素血症的风险预测。另外,在高胆红素血症高峰期,高胆红素血症足月儿与非高胆红素血症足月儿的肠道菌群的分布亦存在差异,且高胆红素血症高峰期粪便与新生儿出生后第一次胎便肠道菌群的构成亦不同,同是高胆红素血症患儿,足月儿与早产儿之间的肠道菌群亦有明显差异。这些结果有助于未来新生儿高胆红素血症的诊断和治疗方法研究。

参考文献

- [1]沈晓明,王卫平.儿科学(第7版)[M].北京:人民卫生出版社,2008:115.
- [2]Clemente JC,Ursell LK,Parfrey LW,et al.The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view[J].Cell,2012,148(6):1258-1270.
- [3]王萍,李强,何小群,等.肠道菌群失调对2型糖尿病患者生物钟信号通路的影响[J].罕少疾病杂志,2024,31(5):100-101.
- [4]李阳,余加林,艾青,等.足月儿坏死性小肠结肠炎肠道菌群多样性及其动态研究[J].中国循证儿科杂志,2014,9(2):117-121.
- [5]李菊芳,姜铁民,贾妮,等.分娩方式及婴儿性别对母乳喂养婴儿肠道菌群定植的影响[J].中国妇幼健康研究,2017年,28(9):1035-1040.
- [6]杨莉丽,王成文,邹傲.高通量测序分析肠易激综合征患者和健康人肠道菌群差异[J].罕少疾病杂志,2017,24(5):37-39.
- [7]陈静,方拴锋.喂养不耐受足月儿肠道菌群的研究[J].中国微生态杂志,2018,(2),398-401.
- [8]闫俊梅,袁振亚,李倩倩,等.早产儿高胆红素血症与肠道菌群的相关性[J].中国微生态学杂志,2021,33(10):1155-1161.
- [9].中华医学会儿科学分会新生儿学组,《中华儿科杂志》编辑委员会.新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识[J].中华儿科杂志,2014,52(10):745-748
- [10]Le Ray I,Wang C,Almqvist C,et al,Neonatal jaundice,attention deficit hyperactivity disorder and familial effects:A Swedish register study with sibling analysis[J].Acta Paediatr,2021,110(2):473-479.
- [11]V. Suganthi,A.Gokul Das[J].Journal of Clinical and Diagnostic Research,2016,Vol-10(11):SC12-SC15.
- [12]Armanian AM,Barakatin B,Hoseirizadesh M,et al.Prebiotics for the management of hyperbilirubinemia in preterm neonates[J].J Matern Fetal Neonatal Med,2016,29(18):3009-3013.
- [13]赵生莹,于锡洋,李艳,等.新生儿高胆红素血症与肠道菌群稳态及相关影响因素分析[J].国际医药卫生导报,2022,28(3):380-384.
- [14]Zubaida B,Cheema HA,Hashmi MA,et al.Spectrum of UGT1A1 variants in Pakistani children affected with inherited unconjugated hyperbilirubinemias[J].Clin Biochem,2019,69:30-35
- [15]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.
- [16]陈维静,常佩.双歧杆菌三联活菌散联合国歌蓝光照射治疗新生儿高胆红素血症的临床效果[J].临床医学研究与实践,2023,8(10):63-65.

(收稿日期:2024-03-25)

(校对编辑:孙晓晴)