

配方奶添加半乳糖-低聚糖对婴儿肠道微生物生态调节作用的研究

蔡俊伟¹, 陆亚东², 贲晓明²

(1. 中山市陈星海医院儿科, 广东 中山 528415; 2. 南京医科大学附属南京儿童医院新生儿医学中心, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的 观察婴儿配方奶(Frisolac Advanced)添加半乳糖-低聚糖,对婴儿肠道微生物生态和肠道内发酵的影响,并与母乳和原有配方奶(Frisolac H)比较其功能特点。**方法** 选取华东、华南地区2个城市的4家医院,选择足月健康新生儿,随机分配进入已添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L的配方喂养组(Frisolac Advanced)/未添加低聚糖的配方喂养组(Frisolac H),并选择纯母乳喂养为参考对照。共371个健康足月儿参与此项目。我们邀请所有参与的婴儿在满3个月时入院,采样检测大便中肠道微生物生态(双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌)和短链脂肪酸(乙酸),测定大便pH值,并记录婴儿体格生长、大便性状与机体抵抗力。**结果** 在婴儿满3个月时,Frisolac Advanced配方喂养组和纯母乳喂养组肠道益生菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)数量均显著高于Frisolac H配方喂养组,Frisolac Advanced配方喂养组和纯母乳喂养组之间差异无显著性;各组间肠道大肠杆菌数量差异无显著性。与原有配方(Frisolac H)比较,配方添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L可显著提高大便短链脂肪酸(乙酸)含量,降低大便pH值,改善大便性状,提高大便次数,增加大便体积。配方添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L喂养婴儿,未见明显肠道不良反应(哭闹、溢奶、呕吐)。**结论** 婴儿配方奶添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L,可部分模拟母乳功能,调整肠道微生物生态,提高肠道益生菌数量,促进肠道内营养物质酵解产生短链脂肪酸,并改善大便性状。

[中国当代儿科杂志,2008,10(5):629-632]

[关键词] 半乳糖-低聚糖;肠道微生物;发酵;婴儿

[中图分类号] R723 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)05-0629-04

Effects of infant formula containing galacto-oligosaccharides on the intestinal microflora in infants

CAI Jun-Wei, LU Ya-Dong, BEN Xiao-Ming. Department of Pediatrics, Chen Xing-Hai Hospital of Guangdong, Zhongshan, Guangdong 528415, China (Ben X-M, Email:benxm@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of a low level of galacto-oligosaccharides (GOS) on intestinal bifidobacteria and lactobacilli, and fermentation characteristics in term infants by comparing with human milk and a standard infant formula without GOS. **Methods** A total of 371 term infants from four hospitals of China were enrolled. The infants started with breast-feeding. After 1-2 weeks, some of the infants were changed to feeding with formula milk and then were randomly assigned to two formula-feeding groups: with or without GOS supplementation (2.4 g/L). Growth, stool characteristics, and side effects were recorded in a 3-month-follow-up. Faecal samples were collected for analysis of intestinal bacteria (culture technique), acetic acid (gas chromatography) and pH (indicator strip) at postnatal 3 months. **Results** Compared with the formula-feeding group without GOS, the contents of bifidobacteria, lactobacilli and acetic acid and stool frequency increased, and faecal pH decreased significantly in the GOS-formula-feeding and the human milk group. There were no significant differences between the GOS-formula-feeding and the human milk groups. Supplementation with GOS did not lead to an increase in the incidence of crying, regurgitation and vomiting. **Conclusions** A supplementation of low levels of GOS in infant formula seemed to improve stool frequency, decrease faecal pH, and stimulate intestinal bifidobacteria and lactobacilli up to levels as found in breast-fed infants.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (5):629-632]

Key words: Galacto-oligosaccharides; Intestinal microflora; Fermentation; Infant

碳水化合物中低聚糖是机体消化系统中重要的营养与免疫调节物质^[1]。母乳中已分离出100多种低聚糖^[2,3],在母初乳中占10~20 g/L,成熟乳中占

5~10 g/L。母乳低聚糖是肠道内双歧杆菌的“生长因子”,是母乳中的益生菌(prebiotics)^[5]。低聚糖在小肠不能被消化,在结肠菌群的作用下生成短链

[收稿日期]2008-04-07;[修回日期]2008-05-17

[作者简介]蔡俊伟,男,大学,副主任医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者]贲晓明,博士,教授,主任医师。南京医科大学附属南京儿童医院,邮编:210008。

脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA),保持肠道内低pH值,利于双歧杆菌和乳酸杆菌的生长,抑制肠道致病菌的过度繁殖,维持肠道的正常微生态,从而保护婴儿免受肠道致病菌的侵袭。

双歧杆菌是婴儿肠道微生态中最重要的益生菌(probiotics)^[5],是婴儿生长发育中重要的营养与免疫调节物质:双歧杆菌能分泌的各种消化酶,将不溶性的蛋白质、脂肪和碳水化合物变为可溶性,使其易被宿主吸收;双歧杆菌能合成多种维生素;双歧杆菌及其裂解产物均能激活淋巴细胞,增加抗体产生,增强免疫系统识别和抗感染能力。

由于双歧杆菌多功能的营养与免疫调节作用,许多婴儿配方奶中都添加双歧杆菌^[6]。然而,双歧杆菌是专性厌氧菌,在体外空气中常温下难以保存。因此,本研究中使用的婴儿配方,试图通过添加低聚糖来促进婴儿体内的内源性双歧杆菌生长,并模拟母乳中低聚糖的数量与结构,试图获得母乳样功能效应。

1 对象与方法

1.1 研究对象

我们在华东、华南地区2个城市的4家三级医院,2002年1月起至2004年12月止,共登记注册371名健康足月儿自愿参与此项目。371例足月婴儿均健康分娩,单胎,胎龄37~42周,无影响发育的先天性异常。所有进入该项目的医院均与婴儿家长签署知情同意书。

1.2 对象分组

全部婴儿开始均采用母乳喂养1~2周,不能/不愿/不足母乳喂养者,可申请给予配方乳喂养,纳入对象按参与时间顺序被随机编号,按单数与双数被分别地给予美素A配方(Frisolac Advanced)或美素H配方(Frisolac H)配方。Frisolac Advanced婴儿配方添加半乳糖低聚糖(galacto-oligosaccharides, GOS) 2.4 g/L。Frisolac H婴儿配方未添加半乳糖低聚糖,其他成分同Frisolac Advanced婴儿配方。两种配方中碳水化合物(carbohydrate)总量相同,均为74 g/L。家长和研究人员未被告知两种配方的差异。同时本研究选择纯母乳喂养者为对照组,要求纯母乳喂养3个月。

1.3 检测指标和随访

对所有参与的婴儿在满3个月时入院采样检测大便中肠道微生态和短链脂肪酸,测定粪便pH值。记录评价婴儿体格生长,回顾性记录粪便性状、次数,喂养相关不良反应(哭闹、溢奶和呕吐情况),并

记录出生以来呼吸道感染与消化道感染的发生率,以上回顾性资料以母亲记录为基准。以及到医院看病的次数与抗生素使用的疗程。所有纳入研究的婴儿均给予3个月的配方奶粉或纯母乳,中途退出者不再追踪随访。

1.4 肠道微生态分析

双歧杆菌和乳酸杆菌培养^[7,8]:取新鲜的婴儿粪便1 g,立即投置预先还原处理的脑心浸注液10 mL,在厌氧手套箱匀浆稀释,取10 μ L接种在Rogosa SL (Difco)培养基,37 $^{\circ}$ C厌氧培养,2 d菌落计数乳酸杆菌,4 d菌落计数双歧杆菌。大肠杆菌培养:取新鲜的婴儿粪便1 g,立即投置预先还原处理的脑心浸注液10 mL,在操净台匀浆稀释,取10 μ L接种在MacConkey (Difco)培养基,37 $^{\circ}$ C培养,1 d菌落计数大肠杆菌。有效菌落直径至少1 mm,根据有效菌落数量计算每克大便细菌数量(clone form unit, CFU)。

1.5 粪便SCFA检测^[9]

取新鲜的婴儿粪便1 g,用0.1 mmol/L磷酸钠缓冲液(pH 6.5)10 mL匀浆,离心分离,取悬浮液,气体色谱分析检测大便短链脂肪酸。气体色谱仪采用Hewlett-Packard 5890A Series II gas chromatograph (Agilent, Wilmington, DE),色谱柱采用180 cm \times 4 mm玻璃柱,填充10% SP-1200,1% H₃PO₄ (Supelco, Bellefonte, PA),氮气为驱动载体,流速每分钟75 mL,柱温、探测室和进样室温度分别是125、175和180 $^{\circ}$ C,标准乙酸(Sigma)定标。

1.6 粪便pH检测

取新鲜的婴儿粪便1 g,双蒸水dd H₂O匀浆,离心分离,取悬浮液,采用多色指示纸(准确度: \pm 0.2, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany),检测新鲜粪便样品的pH值。

1.7 变量及赋值方法

大便性状(水状=1,稀糊状=2,软成形状=3,硬成形状=4);大便次数(<1次/d=1,1~2次/d=2,3~4次/d=3,>4次/d=4)。哭闹(无哭闹=1,喂奶时哭闹=2,反复哭闹-与喂奶无关=3);溢奶(无溢奶=1,溢奶1~2次/d=2,溢奶>2次/d=3);呕吐(无呕吐=1,呕吐1次/d=2,呕吐>1次/d=3)。呼吸道感染标准:(发热+咳嗽+流涕) \times 1~3 d;消化道感染标准为:发热+纳差+腹泻 \times 1~3 d。消化道感染和呼吸道感染的变量赋值,为两分类变量(有=1,无=0)。

1.8 统计分析

全部数据以均值和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组计量资料间差异采用方差分析(ANOVA);计数资料

间差异采用卡方分析(χ^2);多因素变量间关系采用 logistic 回归。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据分析采用 Statistic View 5.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 纳入研究对象的一般情况

共纳入 371 名新生儿参与本研究项目,164 名(44.2%,164/371)婴儿按研究计划喂养满 3 个月,并参与满 3 个月的随访评价与采样检测。按研究计划喂养并参与随访评价的 164 名婴儿中,37 例(22.5%,37/164)仅喂 Frisolac Advanced 配方,45 例(27.4%,45/164)仅喂 Frisolac H 配方,24 例

(14.6%,24/164)为纯母乳喂养,58 例(35.3%,58/164)为母乳与 Frisolac Advanced 配方混合喂养。不同喂养组间新生儿性别、胎龄、出生体重和 3 个月内体重增长速度(g/kg/day)均无显著差别。

2.2 肠道微生态变化

在婴儿满 3 个月时,参与随访评价的 164 名婴儿中,共有 82 名成功采样并检测到肠道内菌群(双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌)。配方添加半乳糖-低聚糖 2.4 g/L 喂养组和纯母乳喂养组肠道益生菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)数量均显著高于 Frisolac H 配方喂养组;Frisolac Advanced 配方喂养组和纯母乳喂养组之间肠道益生菌数量差异无统计学意义。各组间肠道大肠杆菌数量差异无统计学意义(表 1)。

表 1 不同喂养组随访时肠道微生态状况

	对照组	GOS 配方	GOS 配方 + 母乳	母乳	F/P 值
双歧杆菌(n=82)	8.16 ± 0.99 (n=18)	9.01 ± 1.18 (n=20)	8.97 ± 0.85 (n=29)	9.25 ± 0.93 (n=15)	4.08/ <0.01
乳酸杆菌(n=82)	4.27 ± 2.02 (n=18)	5.91 ± 1.61 (n=20)	5.99 ± 2.12 (n=29)	5.45 ± 2.16 (n=15)	3.17/ <0.05
大肠杆菌(n=82)	5.68 ± 2.11 (n=18)	6.35 ± 1.59 (n=20)	5.90 ± 1.84 (n=29)	5.74 ± 1.68 (n=15)	0.52/ >0.05

每克湿大便细菌含量 Lg 值($\bar{x} \pm SD$, log 10 cfu/g)

2.3 肠道短链脂肪酸水平

与原有配方(Frisolac H)比较,配方添加半乳糖-低聚糖 2.4 g/L (Frisolac Advanced)可显著

提高粪便短链脂肪酸(乙酸)含量,降低大便 pH 值(表 2)。

表 2 不同喂养组肠道短链脂肪酸(乙酸)水平与 pH 值

	对照组	GOS 配方	GOS 配方 + 母乳	母乳	F/P 值
乙酸(n=96)	19.42 ± 5.35 (n=24)	25.93 ± 6.84 (n=21)	25.09 ± 5.49 (n=34)	23.76 ± 5.65 (n=17)	6.03/ <0.01
pH 值(n=112)	5.56 ± 0.51 (n=27)	5.22 ± 0.25 (n=25)	5.27 ± 0.25 (n=41)	5.32 ± 0.24 (n=19)	5.57/ <0.01

每克湿大便乙酸含量 mol 值($\bar{x} \pm SD$, mol/g)

2.4 纳入研究对象的喂养耐受性、感染频率、粪便性状

与原有配方(Frisolac H)比较,配方添加半乳糖-低聚糖 2.4 g/L 可改善粪便性状,提高大便次数和体积。配方添加半乳糖-低聚糖 2.4 g/L 喂养婴儿,未见明显肠道不良反应(哭闹,溢奶,呕吐)。各组小儿呼吸道感染和消化道感染发生率无显著差异。

受体 analogue),封闭肠道内致病菌,减少其结合并定殖(clonization)肠道黏膜。母乳中已分离出 100 多种低聚糖^[2,3]。Coppa 等^[4]对足月儿母乳中低聚糖的含量动态观察发现:母乳中低聚糖含量在出生后初乳中最高,产后第 5 天则开始出现下降趋势,3 个月时相当于初乳中低聚糖含量的 30% ~ 40%。母乳低聚糖是肠道内双歧杆菌的“生长因子”,是母乳中的益生菌(prebiotics)^[5]。

3 讨论

糖包括单糖、双糖、低聚糖(oligosaccharides,链长 3 ~ 11 个单位)和多糖(polysaccharides,链长 ≥ 12 个单位)。低聚糖是机体消化系统中重要的营养与免疫调节物质^[1]:一方面低聚糖可通过肠道细菌发酵分解成短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA),短链脂肪酸是大肠主要的能量源泉;另一方面肠道内低聚糖可作为肠道致病菌的可溶性受体(re-

ceptor analogue),参与机体营养与免疫调节的益生菌^[5]。双歧杆菌和乳酸杆菌通过发酵未在小肠消化吸收的低聚糖、多糖和食物纤维产生短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acid, SCFA),降低肠道中的 pH,抑制大肠杆菌生长,促进双歧杆菌生长,促进宿主肠道菌群的平衡。

母乳喂养的婴儿粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌占优势;人工喂养的婴儿粪便中则以大肠杆菌,肠球菌为优势,双歧杆菌建立相对延迟。为模拟母乳的功

能效应,部分配方乳添加双歧杆菌活菌制剂^[6]。然而,口服双歧杆菌活菌制剂受到胃酸和胆汁的作用而难以存活,即使到达肠道后,由于益生菌生长较慢,亦难以在菌种生存竞争中处于有利地位^[6]。

母乳低聚糖是肠道内双歧杆菌的“生长因子”,是母乳喂养婴儿肠道双歧杆菌、乳酸杆菌占优势的主要原因^[1-3]。母乳中低聚糖是母乳中含量仅次于乳糖和脂肪的固体成分,在母初乳中占10~20 g/L,成熟乳中占5~10 g/L,以半乳糖残基连接构成低聚糖的核心结构。本研究使用的Frisolac Advanced婴儿配方,试图通过添加半乳糖低聚糖来促进婴儿体内的内源性双歧杆菌生长,获得母乳样功能效应。

本研究结果显示:配方添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L喂养婴儿,可获得与母乳喂养婴儿类似的肠道微生态,双歧杆菌、乳酸杆菌为肠道的优势菌群。未添加低聚糖的标准婴儿配方喂养婴儿,肠道双歧杆菌、乳酸杆菌数量显著低于母乳喂养婴儿和Frisolac Advanced喂养婴儿,肠道大肠杆菌为优势菌群。本研究提示配方乳添加半乳糖-低聚糖,可模拟母乳的功能效应,促进婴儿体内的内源性双歧杆菌和乳酸杆菌生长。由于双歧杆菌和乳酸杆菌能分泌的多种消化酶,将肠道未消化的蛋白质进一步降解,理论上可减少婴儿蛋白质过敏的发生^[10, 11]。

本研究结果显示:配方添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L可显著提高大便短链脂肪酸(乙酸)含量,降低大便pH值,提示配方乳添加半乳糖-低聚糖,可在肠道酵解,产生短链脂肪酸。肠道短链脂肪酸不仅是结肠营养的重要来源,更重要的是短链脂肪酸提供了肠道的酸性环境,有利于肠道益生菌的生长,并促进微量元素和矿物质的吸收。因此,婴儿配方乳添加半乳糖-低聚糖,可通过肠道酵解产生短链脂肪酸,提高婴儿营养与免疫功能^[12, 13]。

由于低聚糖在肠道酵解,产生短链脂肪酸,可提高肠道内渗透压,一方面肠道内容物吸取肠道内水分,使肠道内容物体积增大,结构松软;另一方面肠道内渗透压的增加与肠道内容物体积的增大刺激肠蠕动。因此,婴儿配方乳添加低聚糖,理论上可增加大便次数,改变大便性状,防止便秘^[14];同时,由于肠蠕动和排空的加快,胆红素的肠肝循环减少,婴儿配方乳添加低聚糖理论上有利于新生儿黄疸的消退^[14];但是,低聚糖添加不当亦可导致腹泻^[14]。本研究中使用配方Frisolac Advanced,添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L,婴儿大便以稀糊状为主要特征,与母乳喂养婴儿相似;而使用配方Frisolac H,未添加低聚糖,婴儿大便以软成形状为主要特征。本研究结

果表明:婴儿配方乳添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L,可改变婴儿大便性状。

对成年人的研究显示,添加低聚糖的保健食品可引起肠胃胀气^[14]。本研究中婴儿配方奶添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L,可显著调整肠道内菌群,提高肠道内酵解,改善大便性状,未见明显肠道不良反应(哭闹,溢奶,呕吐),提示:标准婴儿配方添加半乳糖-低聚糖2.4 g/L是有效和安全的。

[参 考 文 献]

- [1] Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk[J]. *Acta Paediatr*, 1993, 82(5): 903-912.
- [2] Newburg DS. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonisation[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30(1): S8-17.
- [3] Picciano MF. Nutrient composition of human milk[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2001, 48(1): 53-67.
- [4] Coppa GC, Pierani P, Zampini L, Knol J, Kok FJ, Pinkas JW, et al. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation[J]. *Acta Paediatrica*, 1999, 430(1): 89-94.
- [5] Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology[J]. *Intern Dairy J*, 1999, 9(1): 53-61.
- [6] Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium* on the intestinal microflora during the first 4 months of life[J]. *Br J Nutr*, 2005, 94(5): 783-790.
- [7] Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2578-2588.
- [8] Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula fed infants by molecular identification methods[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30(1): 61-67.
- [9] Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon[J]. *J Appl Bacteriol*, 1992, 72(1): 57-64.
- [10] Rigo J, Pielman C, Studzinski F, Garssen J, Knol J. Clinical evaluation in term infants of a new formula based on prebiotics and hydrolysed proteins[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2001, 32(3): 402-407.
- [11] Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2000, 83(3): F186-192.
- [12] Fanaro S, Boehm G, Garssen J, Knol J, Mosca F, Stahl B, et al. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review[J]. *Acta Paediatr Suppl*, 2005, 94(449): 22-26.
- [13] Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkens J, Gro S, Helm K, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005, 40(1): 36-42.
- [14] Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics[J]. *J Nutr Biochem*, 1998, 9(7): 668-675.

(本文编辑:吉耕中)