

研究动向

动态监测婴儿肠道 16S rDNA 宏基因组 5 例报告

马丽亚¹ 张敏¹ 王辉林² 陈睿¹ 黄艳¹ 梁小琴¹ 卢光进¹

(深圳市宝安区妇幼保健院 1. 新生儿科; 2. 中心实验室, 广东 深圳 518133)

[摘要] **目的** 探讨婴儿肠道 16S rDNA 宏基因组的动态变化。**方法** 收集 5 例健康婴儿生后 3 d、1 个月、6 个月、1 岁时粪便样本共 17 份, 提取细菌总 DNA, 采用新一代高通量测序技术对 16S rDNA 的 V6 高变区测序并进行物种分类、丰度及多样性分析。**结果** 17 份样品共产生原始测序数据为 2 190.66 Mbp, Operational Taxonomic Units (OTU) 数量 36~308; 优势菌门包括变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门; 不同婴儿间肠道菌群分布有差异; 科水平 >1% 的物种生后 3 d 时 2~4 种, 1 个月、6 个月时增至最多 7 种, 1 岁时达 10 种; 4 个时间点的 npShannon 和 Simpson 指数均值分别为 1.117、1.460、2.088、2.50 和 0.443、0.408、0.229、0.143。**结论** 婴儿粪便中含丰富细菌基因组; 细菌物种丰度及分类存在个体差异; 细菌多样性随日龄而增加, 婴儿肠道菌群结构出生后逐渐趋向复杂和多样。[中国当代儿科杂志, 2014, 16(11): 1172-1176]

[关键词] 宏基因组; 测序; 肠道菌群; 婴儿

Dynamic changes of intestinal 16S rDNA metagenome in 5 infants

MA Li-Ya, ZHANG Min, WANG Hui-Lin, CHEN Rui, HUANG Yan, LIANG Xiao-Qin, LU Guang-Jin. Department of Neonatology, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China (Lu G-J, Email: lugj1111@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the dynamic changes of intestinal 16S rDNA metagenome in healthy infants. **Methods** Seventeen fecal samples were collected at ages of 3 days, 1 month, 6 months and 1 year in 5 infants. Total bacterial DNAs were extracted and submitted high throughput sequencing on the V6 viable region of 16S rDNA. Tags and Operational Taxonomic Units (OTU) were then obtained and analysis of taxonomy, abundance and alpha diversity were performed. **Results** In total 2 190.66 Mbp raw data in 17 samples were produced. The OTU numbers ranged from 36 to 308. The dominate phylum included Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes and Actinobacteria. The bacterial families >1% increased from only 2-4 per sample on day 3 to 7 at 1 or 6 months, 10 at 12 months. The average npShannon and Simpson index on day 3, at 1 month, 6 months and 1 year were 1.117, 1.460, 2.088, 2.50 and 0.443, 0.408, 0.229, 0.143 respectively. **Conclusions** Infants' intestines harbor abounding bacterial genomes. Distinct individual differences exist in infants in terms of intestinal bacterial abundance and composition. The abundance and diversity of gut bacteria increase over time. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(11): 1172-1176]

Key words: Metagenome; Sequencing; Intestinal microbiota; Infant

健康成人携带微生物所编码的基因多于人体自身基因组的 100 倍^[1-2], 被称为人类的“第二基因组”^[3], 这些微生物大部分寄居在肠道, 肠道菌群对于消化吸收营养物质、抑制病菌及调节免疫都发挥着重要作用^[4]。新生儿、婴儿期是肠道菌群定植、发育的重要阶段, 此期肠道菌群的失衡可

能会影响远期甚至成年后的健康^[1]。因而, 了解新生儿、婴儿期肠道菌群的发展模式及特点对研究相关疾病、改善人口质量有重要意义。

对肠道微生态的研究以往多采用培养或传统分子生物学(如 PCR、变性梯度凝胶电泳)方法, 但它们对于研究复杂的肠道菌群有明显的局限性,

[收稿日期] 2014-05-23; [接受日期] 2014-08-08

[基金项目] 深圳市科技计划项目(201102030)。

[作者简介] 马丽亚, 女, 硕士, 主任医师。

[通信作者] 卢光进, 男, 主任医师。

而宏基因组学研究则可以避免上述方法的缺陷^[5],近年已逐渐应用于婴儿肠道微生态研究^[2-3],但多集中于欧美发达国家,国内仅见零星报道^[6]。由于基因以及饮食等生活习惯的差异,不同地域人的肠道菌群构成有显著差异^[7-8],因此有必要研究我国婴儿肠道宏基因组特征。

婴儿肠道菌群的建立是一个连续、变化、受很多因素影响的过程,以往研究多局限于一个时间点,专注于某一种因素如喂养^[6]、生产方式^[9]、抗生素^[8]等的影响,缺乏连续性认识。本研究将采用以Illumia为测序平台的16S rDNA新一代高通量测序技术对5例健康婴儿1岁以内的粪便细菌基因组进行连续分析,探讨婴儿时期肠道宏基因组的动态变化,为以后大规模研究中国婴儿肠道菌群分布特征及婴儿肠道微生态相关疾病提供参照。

1 资料与方法

1.1 研究对象

征得我院伦理委员会批准及婴儿父母知情同意后,选择5例出生于深圳市宝安区妇幼保健院、胎龄37~40周的健康足月新生儿为研究对象,记录围产期信息及1岁以内喂养方式、疾病和用药信息(表1)。

1.2 粪便标本留取及细菌总DNA提取

生后3d、1个月、6个月和1岁时用无菌标本盒留取粪便样本共17份,其中1~3号婴儿样本收集至生后6个月各3份,4、5号婴儿收集至1岁各4份,提取细菌总DNA(QIAamp DNA Stool

Mini Kit,德国QIAGEN公司),保存于-70℃。冷藏条件下送至深圳华大基因科技服务有限公司进行测序及生物信息分析。

1.3 16S rDNA宏基因组测序

检测合格的粪便DNA样品用细菌通用引物进行16S rRNA基因V6区PCR扩增,引物序列为:967F(v6):CAACGCGAAGAACCTTACC,1046R(v6):CGACAGCCATGCANACCT;回收主要DNA片段,用T4 DNA Polymerase、Klenow DNA Polymerase和T4 PNK将打断形成的粘性末端修复成平末端,再通过3'端加碱基“A”,使得DNA片段能与3'端带有“T”碱基的特殊接头连接以构建文库;用合格的文库进行cluster制备;应用Hiseq 2000测序仪(Illumina公司,美国)对扩增的16S rDNA V6高变区序列进行测序,测序长度为64bp,测序类型:101PE测序;对原始的测序数据进行处理(去除接头污染、含N的碱基数和低复杂度reads),获取clean data。

1.4 物种分类与丰度分析

将clean data reads拼接成tags;利用Mothur(version 1.27.0)软件包对tags序列进行去冗余处理,从中挑选出unique tag序列;将unique tags进行物种注释并聚类成Operational Taxonomic Units(OTU),tags和OTU的数量初步说明了该样品是否具有丰富的物种;然后通过OTU注释(基于包含的tags的物种注释结果)完成物种组成和分类分析,可在界、门、纲、目、科、属、种水平,将每个注释上的物种或OTU在不同样品中的序列数进行整理。本研究中,每个样品均有80%以上

表1 婴儿围产因素及喂养方式等信息

婴儿编号	性别	胎龄(周)	出生体重(kg)	生产方式	母亲产后用药	3d时喂养	1月时喂养	6月时喂养	1岁时喂养	1岁内疾病
1	女	40	3.5	阴道分娩	无	母乳+奶粉	纯母乳	母乳+辅食	-	无
2	男	41	3.18	阴道分娩	头孢唑啉	母乳+奶粉	纯母乳	母乳+辅食	-	4月龄时曾解血丝便,口服阿莫西林
3	男	38 ⁺	3.55	剖宫产	头孢唑啉	母乳+奶粉	奶粉	奶粉+辅食	-	近8月龄时因喘息性肺炎住院1周
4	女	38	2.5	剖宫产	头孢唑啉	奶粉	母乳+奶粉	母乳+奶粉(主要)+辅食	奶粉+辅食	2月龄时感染性发热,CRP升高,服用阿莫西林;9月时解稀便服用妈咪爱3d
5	女	39	3.2	剖宫产	头孢唑啉	奶粉	母乳+奶粉	母乳+奶粉(主要)+辅食	奶粉+辅食	7月龄时发热后解稀便,曾服用妈咪爱和思密达

的 tags 在科水平上得到分类, 因此最佳的分类水平为科。

1.5 α 多样性分析

利用 Mothur 软件计算样品的 α 多样性值, 包括 chao1 值、ACE 值、Shannon、npShannon 以及 Simpson 指数, α 多样性是对单个样品中物种多样性的分析, 前面 4 个指标数值越大, 最后一个指标越小, 说明样品中的物种越丰富。

2 结果

2.1 样品测序数据

17 份粪便细菌总 DNA 样品共产生原始测序数据为 2 190.66 Mbp, 每一样品产生的 clean data 序列平均为 124 Mbp (116~131 Mbp), 每一样品信息的利用率都在 94% 以上。

2.2 物种分类和丰度分析

OTU 数量最少为 36, 最多达 308, 随年龄的增长而增加, 表明婴儿粪便样品中微生物丰度随时间而增加, 见表 2。

20 个菌门被检出细菌基因组, 但主要分布于 4 个菌门, 分别是变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria); 不同个体之间, 同一个体的不同时段, 其物种组成有差异, 除 1 号婴儿集中于拟杆菌门和变形菌门外, 其余婴儿样品均集中于变形菌门和厚壁菌门。

图 1 为各样品丰度 >1% 的菌群在为 Family (科) 水平 tags 的相对百分比。优势菌群包括: 变形菌门下的 *Enterobacteriaceae* (肠杆菌科)、*Vibrionaceae* (弧菌科); 厚壁菌门下的 *Lachnospiraceae* (毛螺旋菌科)、*Streptococcaceae* (链球菌科) 和 *Clostridiaceae* (梭菌科); 拟杆菌门下的 *Bacteroidaceae* (拟杆菌科); 放线菌门下的 *Bifidobacteriaceae* (双歧杆菌科)。

从图中可以看出: 虽然肠杆菌科出现于所有婴儿粪便, 甚至 2 号婴儿生后 1 个月时的粪便几乎达 90%, 但不同婴儿之间菌群组成有明显差异, 例如 1 号婴儿粪便中占主要比例的拟杆菌科在其他婴儿的粪便中几乎没有出现或比例很小; 出生

表 2 不同时间点 OTU 及 α 多样性指数 (均值)

时间	OTU	chao1	ACE	Shannon	npShannon	Simpson
3 d	77	195.526	334.342	1.113	1.117	0.443
1 个月	127	271.986	428.248	1.402	1.460	0.408
6 个月	130	249.435	409.865	2.082	2.088	0.229
1 岁	131	292.366	546.975	2.497	2.504	0.143

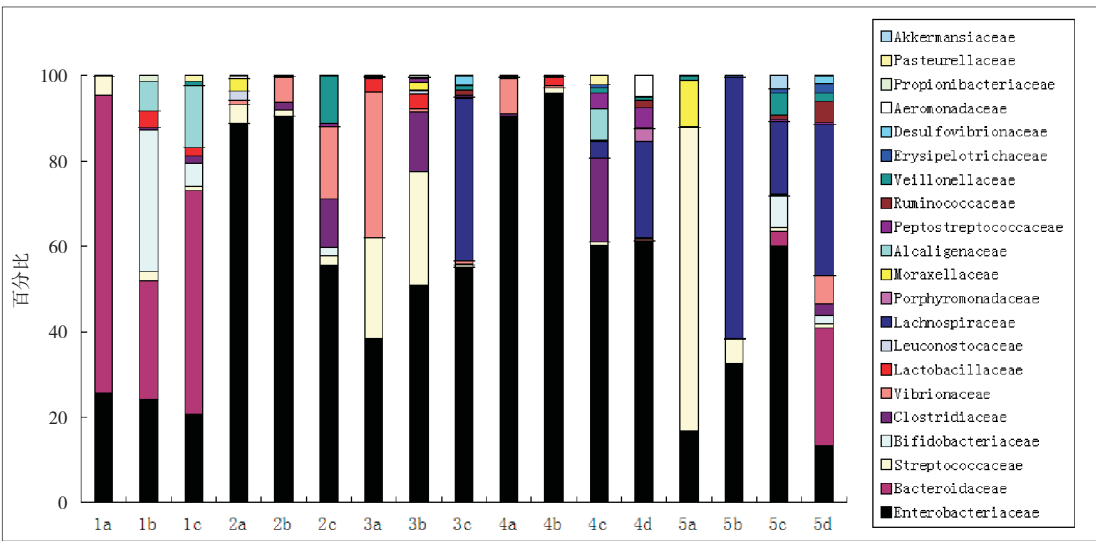


图 1 各样品 tags 中 >1% 的菌群在科水平的相对比例 横轴数字 1、2、3、4、5 为婴儿编号, a、b、c、d 分别代表 3d、1 个月、6 个月和 1 岁时间点。

3 d时,虽然菌群种类存在差异,但总的趋势是结构简单,主要由2~4种物种组成,随着日龄延长,物种组成逐渐丰富,菌群结构趋向复杂,生后1个月、6个月时样品中>1%物种最多7种,1岁时达10种之多;同一婴儿不同时间段的菌群构成虽随着日龄而复杂化,但种类相似,如1号婴儿粪便一直以拟杆菌科占优势,而2、3、4号婴儿粪便中则肠杆菌科一直占优势;值得一提的是,益生菌群双歧杆菌科在婴儿粪便中并不常见,仅纯母乳喂养的1号婴儿1月时比例较高(达33%),此后有所下降,所有婴儿生后3 d的粪便中几乎不含双歧杆菌科,虽然随着日龄和饮食结构复杂化而出现,但一直没有超过10%;而毛螺旋菌科则仅出现在奶粉或混合喂养的3例婴儿粪便中,母乳喂养的2例婴儿粪便中未超过1%。

2.3 多样性分析

从表2可以看出,各 α 多样性值中前4个值随着日龄而增加,而Simpson指数随之减少,说明粪便中菌群多样性随着日龄而增加,物种越来越丰富。

3 讨论

本研究对5例婴儿17份粪便样本进行了16S rDNA的V6高变区新一代高通量测序及分析,表明该技术能够全面分析婴儿肠道菌群的构成。以Illumina为测序平台的宏基因组测序技术以边合成边测序为原理,可以一次性对几十万至几百万条DNA分子进行序列测定,在研究人类肠道宏基因组方面发挥着重要作用^[2-3,6]。16S rRNA是细菌进化以及分类研究最常用的靶分子,其基因序列(即16S rDNA)的变化非常缓慢,可以用来标记生物进化距离和亲缘关系,由于肠道微生物中绝大部分为细菌,16S rDNA宏基因组测序技术能够满足肠道宏基因组的研究。研究表明,新生儿出生不久肠道中即包含了丰富的细菌基因组。

国外有关肠道宏基因组的研究表明,欧美健康成人及1~6岁健康儿童肠道菌门以厚壁菌门和拟杆菌门占优势^[11,10-11]。国内研究不多,东北农业大学Fan等^[6]采用与本研究相同的技术对生后1~6个月内24份北方婴儿粪便细菌DNA的测序表明,与欧美不同,所有样本均以厚壁菌门和变形菌门

为优势菌门;以肠杆菌科为优势菌科,但在母乳喂养婴儿粪便中的含量明显低于人工喂养及混合喂养婴儿。本研究中剖宫产出生、混合或人工喂养、母亲产后应用抗生素的3~5号婴儿1岁以内也以厚壁菌门和变形菌门为优势菌门,而阴道分娩、纯母乳喂养、母亲未使用抗生素的1号婴儿肠道则以拟杆菌门和变形菌门为优势菌门,且一直持续至生后6个月,双歧杆菌科比例也是最高的;同样为阴道分娩、纯母乳喂养的2号婴儿肠道菌群则与3~5号婴儿类似,且持续至生后6个月,可能与母亲产后使用抗生素或其他围产期因素有关。以上研究表明,婴儿肠道菌群的形成可能受分娩方式、喂养、母亲围产期因素、甚至地域环境等综合影响,中国婴儿甚至南北不同地域的婴儿可能有其独特的菌群模式,但这些结论还需要大样本、多地域人群的连续研究来证实。

Fan等^[6]的研究仅有一个时间点,而本研究表明,婴儿粪便中细菌的丰度及多样性随时间而增加,提示随着饮食结构的复杂以及活动范围的扩展,婴儿肠道菌群结构趋向复杂和多样。但值得注意的是,出生不久即定植的菌群,1岁以内可能会一直存在,不同个体之间的菌群组成虽有明显差异,而同一个体不同时间优势菌群构成相似,表现出独特的个体特征,说明生命早期的因素如生产方式、母亲用抗生素等可能会影响1岁以内甚至儿童、成人期的肠道菌群结构。

总之,本研究表明婴儿粪便中细菌物种丰度及分类存在个体差异;从出生到1岁,粪便中细菌丰度及多样性随时间而增加,表明肠道菌群结构趋向复杂和多样;在物种分类方面,不同个体之间的菌群组成有明显差异,而同一个体不同时间优势菌群构成相似,表现出独特的个体特征。本研究的不足之处是样本数少,难以代表所有婴儿肠道宏基因组特征,未来可行大样本、分组研究。

[参考文献]

- [1] Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, et al. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health[J]. Trends Microbiol, 2013, 21(4): 167-173.
- [2] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [3] Song S, Jarvie T, Hattori M. Our second genome-human

- metagenome: how next-generation sequencer changes our life through microbiology[J]. *Adv Microb Physiol*, 2013, 62: 119-144.
- [4] Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, et al. Gastrointestinal function development and microbiota[J]. *Ital J Pediatr*, 2013, 39: 15.
- [5] Berrington JE, Stewart CJ, Embleton ND, et al. Gut microbiota in preterm infants: assessment and relevance to health and disease[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2013, 98(4): F286-F290.
- [6] Fan W, Huo G, Li X, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(2): 133-143.
- [7] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-227.
- [8] Fallani M, Young D, Scott J, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010, 51(1): 77-84.
- [9] Biasucci G, Rubini M, Riboni S, et al. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut[J]. *Early Hum Dev*, 2010, 86(Suppl 1): 13-15.
- [10] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 174-180.
- [11] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33): 14691-14696.
- (本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

《实用专科护士丛书·儿科分册》出版

由中南大学湘雅医院和北京儿童医院主编的《实用专科护士丛书·儿科分册》已于 2014 年 5 月正式出版发行。该书是中华护理学会推荐专科护士培训用书之一, 供儿科在职护士、进修护士、护生使用, 并可作为培训儿科专科护士的主要参考书。全书共 19 章, 内容丰富, 涉及面广, 以临床护理为重点, 护理管理与教育为辅助, 护理科研融入临床护理中。每本定价 52 元, 欢迎订购。联系人: 邓芳明; 电话: 0731-84327402; Email: ddek@vip.163.com。