

Exploration on the Relationship between Diarrhea and Intestinal Microecology in Infants and Young Children

Chuntao Sun¹ Xuejuan Wang¹ Youjing Sheng¹ Xia Yang¹ Bin Yue^{2*}

1. Department of Clinical Laboratory, Ningxia Women and Children's Hospital, Peking University First Hospital, Yinchuan, Ningxia, 750001, China

2. Suzhou Ganjiang Biotechnology Co., Ltd., Suzhou, Jiangsu, 215000, China

Abstract

Objective: To study the differences in the composition of intestinal microbiota between children with diarrhea and normal infants, and to explore the relationship between diarrhea and intestinal microbiota in infants. **Methods:** Fecal samples from 21 patients with diarrhea and 3 healthy infants were selected for 16S rRNA sequencing and microbiota abundance analysis. **Results:** Compared with the control group, there were great differences at the phylum level and genus level in the experimental group: at the phylum level, the proportion of Proteobacteria in exp1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 13, 16, 17 and 19 in the experimental group increased, and the proportion of Firmicutes decreased. At the genus level, the proportion of *Escherichia-Shigella* in exp1, 2, 3, 6 and 17 increased, while the proportion of *Enterococcus* decreased in the experimental group. The proportion of *Bacteroides* exp8, 11, 12, 13 and 14 increased significantly, while the proportion of *Enterococcus* decreased significantly. Exp5 and exp15 abundance declined, almost exclusively for *Enterococcus* spp. The abundance of exp4 decreased, almost for *F. Enterobacteriaceae* and *Clostridium Sensu Stricto 1*. **Conclusion:** There is a significant difference between the intestinal microbiota of infantile diarrhea and healthy infants, and it can be used for diagnosis and medication based on this characteristic in clinical practice.

Keywords

diarrhoea in infants and young children; intestinal microbiota; high-throughput sequencing

婴幼儿腹泻与肠道微生态的关系探究

孙春涛¹ 王雪娟¹ 盛优静¹ 杨霞¹ 岳斌^{2*}

1. 北京大学第一医院宁夏妇女儿童医院（宁夏回族自治区妇幼保健院）检验科，中国·宁夏 银川 750001

2. 苏州淦江生物技术有限公司，中国·江苏 苏州 215000

摘要

目的: 研究腹泻患儿与正常婴幼儿间肠道菌群构成的区别, 探究婴幼儿腹泻与肠道微生态的关系。**方法:** 选取21例腹泻患者和3例健康婴幼儿的粪便样本, 进行16S rRNA测序并进行菌群的丰度分析。**结果:** 实验组样本与对照组相比, 在门水平和属水平上均有较大差异: 门水平上, 实验组样本中exp1、2、3、4、6、9、11、13、16、17和19的变形菌门占比增高, 厚壁菌门占比降低; 属水平上, 实验组样本中exp1、2、3、6、17中大肠-志贺菌属占比增高, 肠球菌属占比降低; exp8、11、12、13、14拟杆菌属占比显著增高, 肠球菌属占比降低; exp5和exp15丰度下降, 几乎只有肠球菌属; exp4丰度下降, 几乎为肠杆菌科和*Clostridium_Sensu_Stricto_1*。**结论:** 婴幼儿腹泻患儿与健康婴幼儿的肠道菌群之间存在明显的差异, 临床上可依据此特点进行诊断及用药。

关键词

婴幼儿腹泻; 肠道微生态; 高通量测序

1 引言

婴幼儿腹泻是婴幼儿时期最为常见的疾病之一, 临床

特征为大便次数增多、排稀便、电解质紊乱等。本病发病率高, 多发于夏、秋季节, 病程较急, 病因多且病原复杂, 使得临床诊断具有一定的难度, 而患儿若得不到及时正确的治疗可发生严重的水电解质紊乱, 乃至危及生命^[1]。近年来医学界通过研究肠道微生态发现, 诸多疾病的发生发展都与肠道微生态平衡息息相关。肠道中数量巨大种类繁多的细菌组成了肠道微生态的主要成分, 有研究指出, 肠道菌群改变会导致婴幼儿腹泻。目前, 关于婴幼儿腹泻的研究主要运用细菌培养鉴定及细菌涂片等传统方法, 然后细菌培养困难及显微结构难以辨认都极大限制了研究的精确性, 因此本研究运

【课题项目】宁夏卫生健康委员会科研课题: 婴幼儿感染性腹泻肠道菌群谱随季节变化规律的临床研究(课题编号: 2022-NWKY-035)。

【作者简介】孙春涛(1974-), 女, 中国宁夏银川人, 本科, 副主任检验技师, 从事微生物学和免疫学检验研究。

【通讯作者】岳斌(1998-), 中国河南濮阳人, 硕士, 从事分子检测研究。

用 16S rRNA 对肠道菌群进行测序以探究婴幼儿腹泻对肠道菌群的影响。

2 临床资料

选取 2023 年 3 月至 2023 年 10 月到银川市妇幼保健院儿科就诊腹泻患儿 21 名，纳入标准：①伴有大便性状显著改变，如水样便、黏膜样便、脓血便等；②排便次数增加，每日 3 次以上或比平时增多一倍以上；③同时存在有恶心、呕吐、腹痛、腹胀、食欲不振等；④就诊前 1 个月内未服用过抗生素类药物。另外纳入 3 名儿童作为健康对照，标准为：①近一个月未有腹泻及其他相关疾病；②不存在恶心、呕吐、腹痛、腹胀、食欲不振等临床表现；③饮食正常。所有受试儿童其监护人均签署知情同意书。

3 方法

3.1 问卷调查

采用问卷调查的方式收集所有受试儿童的年龄、性别、主诉等信息。

3.2 样本收集、分组与储存

用无菌拭子采集所有受试儿童无尿液污染的粪便中段样本不少于 2g，采集样本时间不得超过 2h，之后置入冻存管内，并将实验组以 exp1~exp21 命名，对照组以 con1~con3 命名，保存于 -80℃。

3.3 DNA 提取、PCR 扩增以及测序

样本全程低温运输至安升达测序公司，进行样本核酸提取，使用 GENEWIZ 自主研发的引物体系对 V3~V4 区进行扩增，并在 Illumina MiSeq 高通量测序平台进行测序。

3.4 数据分析

首先对原始数据进行去接头和低质量过滤处理，然后去除嵌合体序列，得到有效序列后进行聚类分析，每一个聚类称为一个物种操作单元 (Operational Taxonomic Units, OTU)，对 OTU 的代表序列作分类学分析，得到各样本的物种分布信息。基于 OTU 分析结果，可以对各个样本进行多种 α 多样性指数分析，得到各样本物种丰富度和均匀度信息；基于分类学信息，可以在各个分类水平上进行群落结构。

3.5 统计分析

使用 Qiime 1.9.1 软件对肠道菌群的丰富度进行分析。

4 结果

4.1 一般结果

实验组患儿男性 11 名，女性 10 名。最小年龄为 20d，最大年龄为 11 岁。

4.2 腹泻患儿肠道菌群的变化

两组婴幼儿的肠道菌群种类在门水平上主要分为四种：厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门。其中对照组婴幼儿肠道菌群排名依次是：厚壁菌门>拟杆菌门>放线

菌门>变形菌门，相较而言，实验组婴幼儿肠道菌群中厚壁菌门占比大幅降低，变形菌门占比大幅升高。

两组婴幼儿的肠道菌群种类在属水平上主要分为三十种：Enterococcus (肠球菌属)、Escherichia-Shigella (大肠-志贺菌属)、Bifidobacterium (双歧杆菌属)、Bacteroides (拟杆菌属)、Veillonella (韦荣氏球菌属)、Prevotella (普雷沃氏菌属)、Streptococcus (链球菌属)、F_Enterobacteriaceae (肠杆菌科)、Clostridium_Sensu_Stricto_1 (梭菌属)、Faecalibacterium (栖粪杆菌属)、Klebsiella (克雷伯氏菌属)、Anaerostipes、Lactobacillus (乳杆菌属)、Hungatella、Ruminococcus_Torques_Group (扭链瘤胃球菌)、Blautia (经黏液真杆菌属)、F_Lachnospiraceae (毛螺菌属)、Erysipelatoclostridium (丹毒丝菌属)、Parabacteroides (副拟杆菌属)、Megasphaera (巨球型菌属)、Parasutterella (帕拉萨特氏菌属)、Subdoligranulum (罕见小球菌属)、Granulicatella (颗粒链菌属)、Ruminococcus_Gnavus_Group (活泼瘤胃球菌)、Rothia (罗斯氏菌属)、Clostridioides (梭菌属)、Actinomyces (放线菌属)、Pseudomonas (假单胞菌属)、Intestinibacter (肠杆菌属)和 Megamonas (巨单胞菌属)。其中对照组主要以肠球菌属、双歧杆菌属、链球菌属、韦荣氏球菌属为主，并以肠球菌属和双歧杆菌属为优势菌；实验组主要以大肠-志贺菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属、栖粪杆菌属为主，并以大肠-志贺菌属和双歧杆菌属为优势菌。对照组和实验组间菌群构成比差异较大(如图1所示)。

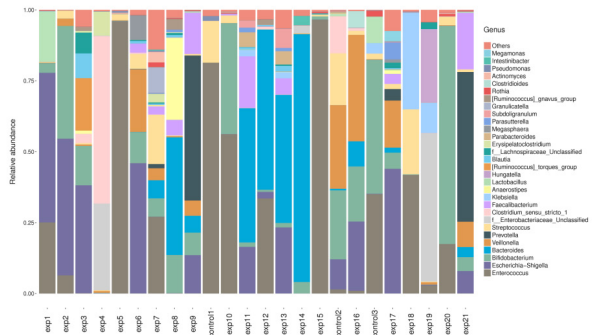


图 1 受试者肠道菌群结构相对丰度分布图

值得注意的是，图例为不同分类水平的物种分类名称(属水平)，Other 表示除相对丰度前 30 外的所有其他门水平分类的相对丰度和。

5 讨论

人体超过 90% 的细菌都位于消化道内。研究表明，健康成人肠道栖息着 1000 多种，约 10^{14} 个细菌，这些细菌编码的基因数量是人类基因组的 150 倍。肠道菌群数量庞大，结构复杂，和真菌、病毒等与宿主相互作用、相互影响，共同构成了一个庞大的肠道微生态系统。诸多研究证实，肠道

菌群具有重要生理功能,包括发挥生物拮抗、参与营养吸收及代谢、参与免疫系统成熟和调节免疫应答^[2]等,由此可见其在婴幼儿生长发育过程中至关重要,故肠道菌群又被称作人体的新“器官”。本研究通过16S rRNA高通量测序分析腹泻婴幼儿肠道菌群构成,与正常婴幼儿进行对比,以期探究腹泻与肠道微生态之间的联系。

健康婴幼儿肠道菌群在门水平上主要分为四类(占比由高到低):厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和变形菌门,且绝大部分婴幼儿肠道中99%的细菌都囊括在这四个门当中,并以厚壁菌门和拟杆菌门为主^[3]。在本研究中,腹泻婴幼儿与正常婴幼儿的肠道菌群结构存在着明显差异,主要体现在:

门水平上,实验组样本中exp1、2、3、4、6、9、11、13、16、17和exp19的变形菌门占比增高,厚壁菌门占比降低。其中变形菌门包括大肠-志贺菌属、沙门氏菌属、弯曲杆菌属等诸多临床症状为腹泻的属^[4],婴幼儿肠道菌群的这种改变也是发生腹泻的原因。

属水平上,实验组样本中exp1、2、3、6、17中大肠-志贺菌属占比增高,肠球菌属占比降低。大肠-志贺菌属包括众多致病菌,其通过破坏肠道黏膜,引起相应炎症,并释放内毒素、外毒素进入肠道血液中,进而引发婴幼儿腹泻;exp8、11、12、13、14中拟杆菌属占比显著增高,肠球菌属占比降低。鉴于研究表明婴幼儿肠道菌群的多样性、结构及组成一直处于动态变化,直至3岁左右时趋于稳定,类似成人肠道菌群^[1]。结合exp11、12、13、14受试者均≥3岁且肠道菌群组成结构更为相似这一特点,推测造成拟杆菌属显著增多而肠球菌属减少的原因可能是肠道菌群的演替的结果;exp5和exp15丰度下降,几乎只有肠球菌属。根据黄文献、Yassour M等人的研究结果,抗生素的使用不仅会显著减少新生儿肠道内双歧杆菌属的占比,长期使用还会导致婴幼儿肠道菌单一化,降低肠道微生态的稳定,从而引发疾病。因此推测exp5和exp15在入组前有长期抗生素服用史。肠球菌属等耐药菌过度生长;exp4丰度下降,几乎为肠杆菌科和Clostridium_Sensu_Stricto_1。exp4丰度下降的原因应与exp5和exp15一致,但由于抗生素种类等因素最终对肠道菌群造成的影响会有所不同,根据Gibson MK等人的报道,暴露于青霉素和氨苄西林等抗生素的新生

儿其肠道菌群中诸如肠杆菌科的致病菌相对占比会增加。

结合门水平和属水平的差异变化,得出以下结论:婴幼儿腹泻患儿存在肠道菌群失调—以大肠-志贺菌属为主的致病菌相对占比增高,种类增多,替代了双歧杆菌属、乳杆菌属等有益菌;同时其产生的有害物质严重破坏肠道微生态,造成恶性循环,最终导致了婴幼儿腹泻的发生。

另外,我们发现尽管同样来自对照组,不同个体之间肠道菌群构成亦有区别:con1中的肠球菌属占据了绝对优势,双歧杆菌属几乎消失;con2中出现了大量的韦荣氏球菌属和大肠志贺氏菌属,放线菌属含量相对较多,肠球菌属几乎消失;con3中肠球菌属和双歧杆菌属占据优势,乳杆菌属、经黏液真杆菌属含量相对较多。造成这种现象的原因在于婴幼儿肠道菌群的建立和演替极大程度上受到喂养方式、月龄^[13]和分娩方式的影响^[5]。如果有研究表明,双歧杆菌属是经母乳喂养的婴幼儿的肠道优势菌。本次研究受限于样本总量,未能针对以上因素设置多组别进行单一因素的深入研究,这也是本次研究的不足与局限性。

综上所述,本研究通过对腹泻患儿与健康儿童肠道菌群谱的对比,揭示了腹泻患儿与正常婴幼儿间肠道菌群的构成差异,为预防婴幼儿腹泻以及针对性治疗提供了较好的参考。

参考文献

- [1] 杨振兴,陈威.婴幼儿病毒性腹泻病原研究进展及其国内流行现状[J].应用预防医学,2022,28(5).
- [2] Kayama H, Okumura R, Takeda K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. Annu Rev Immunol,2020(38):23-48.
- [3] 谷和健康.肠道细菌四大“门派”——拟杆菌门,厚壁菌门,变形菌门,放线菌门[EB/OL].(2021-07-19)[2023-12-25]. <https://zhuanlan.zhihu.com/p/388218555>.
- [4] Rinninella E, Raou P, Cintoni M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and disease[J]. Microorganisms, 2019,7(1):7010014.
- [5] 杨莉,葛武鹏,梁秀珍,等.高通量测序技术研究不同喂养和分娩方式对不同月龄婴幼儿肠道菌群的影响[J].食品科学,2019,40(17):213-214.