

· 临床研究 ·

剖宫产对新生儿出生后 3 d 内肠道双歧杆菌和乳酸杆菌定植的影响

张海波, 余加林[△], 艾青, 徐艳珍

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心/儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/儿科学重庆市重点实验室/重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地 400014)

摘要:目的 探讨剖宫产对新生儿出生后 3 d 内肠道细菌定植的影响。方法 以 83 例足月新生儿为研究对象, 均为配方奶喂养, 分为剖宫产组($n=44$), 自然分娩组($n=39$)。采集生出后 3 d 内每天的粪便标本, 通过 real-time PCR 技术对新生儿粪便中的双歧杆菌属, 乳酸杆菌属进行定量检测。结果 日龄 1、2、3 d 剖宫产组粪便标本中双歧杆菌数量的对数值(\lg copies/g) 分别为 5.65 ± 0.64 、 6.36 ± 1.00 、 6.69 ± 1.06 , 自然分娩组分别为 5.69 ± 0.75 、 7.19 ± 1.15 、 7.49 ± 1.29 ; 日龄 1、2、3 d 剖宫产组粪便标本中乳酸杆菌数量的对数值分别为 4.66 ± 0.73 、 4.71 ± 0.84 、 5.16 ± 0.55 , 自然分娩儿分别为 5.88 ± 0.41 、 6.30 ± 0.99 、 5.79 ± 0.33 , 两种细菌的对数值在相同日龄行组间独立样本的 t 检验, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 剖宫产改变了新生儿早期肠道菌群的正常定植, 因此自然分娩是最佳的分娩方式。

关键词:新生儿; 剖宫产; 肠道; 双歧杆菌; 乳酸杆菌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)21-2157-03

Impact of cesarean section delivery on intestinal bifidobacteria and lactobacillus in newborn babies in the first three days after delivery

Zhang Haibo, Yu Jialin[△], Ai Qing, Xu Yanzhen

(Neonatal Diagnosis and Treatment Centre, Children's Hospital of Chongqing Medical University/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of cesarean section delivery on the development of gut microflora in neonates in the first 3 days of life. **Methods** Eighty three cases of healthy formula-fed term infants were enrolled in the study and divided into two groups: vaginal delivery group ($n=39$) and cesarean section delivery group ($n=44$). The faecal bifidobacteria and lactobacillus of neonates were consecutively quantified by real-time polymerase chain assays during the first 3 days after birth. **Results** Bifidobacteria logarithmic absolute value (\lg copies/g) of the first three days after birth were 5.65 ± 0.64 , 6.36 ± 1.00 , 6.69 ± 1.06 in cesarean section group respectively and 5.69 ± 0.75 , 7.19 ± 1.15 , 7.49 ± 1.29 in vaginal delivery group. Lactobacillus logarithmic absolute value (\lg copies/g) of the first three days after birth were 4.66 ± 0.73 , 4.71 ± 0.84 , 5.16 ± 0.55 in cesarean section group respectively and 5.88 ± 0.41 , 6.30 ± 0.99 , 5.79 ± 0.33 in vaginal delivery group. The above value had statistical difference between group to group in different time ($P < 0.05$). **Conclusion** Cesarean section decrease significantly the count of primary intestinal bifidobacteria and lactobacillus in formula-fed term infants.

Key words: neonate; cesarean section; gut; bifidobacteria; lactobacillus

中国是剖宫产率最高的国家, 据世界卫生组织最新的调查显示中国的剖宫产率达 46%, 远高于 15% 的世界平均水平^[1-2]。剖宫产不仅带来了高昂医疗费用, 而且对新生儿未来的健康带来很大的影响^[3]。大量研究表明, 新生儿胃肠道最初定植的细菌在机体免疫系统的发育中发挥了关键作用。肠道最初定植菌的刺激作用促进了新生儿免疫器官的发育成熟, 并产生了多种保护性抗体^[4-5]。研究发现许多过敏性疾病与肠道微生物最初建立时的失调有关^[6]。本研究应用 16SrRNA/DNA 结合 real-time PCR 技术对配方奶喂养的新生儿生后前 3 d 内的肠道双歧杆菌和乳酸杆菌进行了定量分析, 以探讨剖宫产对新生儿肠道菌群定植的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 12 月 1 日至 2011 年 1 月 15 日在重庆市妇幼保健医院出生的 83 例健康足月新生儿为研究对

象(均为配方奶喂养)。其中, 剖宫产组($n=40$), 自然分娩组($n=39$)。纳入标准: 健康足月新生儿, 胎龄 37~<42 周, 体质量 2 500~4 000 g, 出生后没有使用任何抗生素和微生态制剂, 没有腹泻等感染性疾病。其母在分娩前 2 周内没有使用抗生素, 没有患肠道、生殖道等感染性疾病。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有纳入标准的新生儿均收集其出生后 3 d 内的粪便样本。具体操作: 用收集管的小匙刮取尿不湿上的新鲜粪便, 放入收集管, 然后放在装有冰块的保温壶中, 6~12 h 后分装于无菌的 1.5 mL EP 管中, 放置在 -70 °C 的冰箱中保存以备用。

1.2.2 粪便样本细菌 DNA 的提取 使用 QIAamp DNA mini kits (Qiagen, Hilden) 提取粪便样本内的细菌基因组 DNA, 具体操作按照说明书进行。提取的细菌基因组 DNA 放入

[△] 通讯作者, E-mail: yujialin486@sohu.com.

-20 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 引物设计及合成 从 GenBank 中分别获取双歧杆菌和乳酸杆菌各菌种的序列,根据细菌的 16srRNA/DNA 特异性基因序列,设计双歧杆菌属和乳酸杆菌属特异性引物,并在 BLAST 基因库(www. ncbi. nlm. gov/BLAST)中进行比对,验证其特异性^[7]。所有引物均由上海生工公司合成。见表 1。

表 1 PCR 特异性引物

| 细菌 | 引物序列(5'-3') | 扩增长 (bp) |
|------|--|-------------|
| 双歧杆菌 | 上游序列 CGC GTC YGG TGT GAA AG | 244 |
| | 下游序列 CCC CAC ATC CAG CAT CCA | |
| 乳酸杆菌 | 上游序列 GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT C | 126 |
| | 下游序列 GGC CAG TTA CTA CCT CTA TCC TTC TTC | |

1.2.4 质粒标准品的制备

1.2.4.1 标准菌株的培养和细菌 DNA 的提取 双歧杆菌标准菌株(两歧双歧杆菌 6174)由重庆医科大学微生物实验室惠赠,乳酸杆菌标准菌株(嗜酸乳杆菌 6005)购于广微菌库。双歧杆菌和乳酸杆菌用 MRS 培养基在装有混合气体(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)的厌氧罐中 37 °C 培养 48 h 后提取细菌 DNA。细菌 DNA 的提取采用天根公司的“细菌基因组 DNA 提取试剂盒”,操作按照说明书。

1.2.4.2 16SrDNA PCR 扩增及其反应条件 以两种细菌的基因组 DNA 为模板,应用上述相应的引物进行 50 μL 体系的 PCR 反应。所用试剂盒为:PCR Premix Taq(D334A, TaKaRa),反应条件:94 °C 5 min,35 个循环(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s),72 °C 5 min。PCR 产物均进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4.3 PCR 产物纯化及 TA 克隆 两种细菌的 16SrDNA-PCR 产物经切胶回收纯化后,产物用 PMD18-T Vector(TaKaRa)试剂盒进行克隆。克隆产物均匀涂在 X-Gal-IPTG-Amp-LB 琼脂平板上,37 °C 培养 18 h。

1.2.5 质粒的培养和鉴定 挑取培养皿上的白色单菌落放入 10 mL 含有 10 μL Amp 的 LB 培养基中,在 37 °C,200 转/分,的摇床上振荡培养 18 h。取 2 mL 菌液用 MiniBEST Plasmid Purification Kit (TaKaRa)提取质粒 DNA,进行 PCR 反应,产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定连接情况。如果有目的条带,则取 500 μL 菌液加入等量 30% 的甘油,送上海生工公司测序以进一步鉴定。测序结果在 BLAST 基因库(www. ncbi. nlm. gov/BLAST)中进行比对,验证其特异性。

1.2.6 标准曲线的建立及定量分析

1.2.6.1 标准质粒拷贝数换算 据公式:拷贝数=质量数(g)×6.02×10²³/660×(2 692+碱基对数),计算出每微升的质粒标准品的拷贝数。然后,进行 10 倍体积梯度稀释。具体方法:取 2 μL 标准质粒加入到 198 mL ddH₂O 中充分混匀,形成 10⁻² 浓度梯度,取 100 μL 该浓度梯度液加入到 900 μL ddH₂O 中形成 10⁻³ 浓度梯度,以此类推直到形成 10⁻⁷ 浓度梯度。

1.2.6.2 荧光定量 PCR 反应条件(所用试剂盒为 SsoFastTM EvaGreen Supermix) 反应体系为 10 μL SYBR Green 反应体系,包括:Supermix 5 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 2 μL。经优化后的扩增条件为:双歧杆

菌质粒:98 °C 2 min,40 个循环包括(98 °C 2 s,57 °C 20 s,68 °C 10s),读板。乳酸杆菌质粒:98 °C 2 min,40 个循环包括(98 °C 2 s,61 °C 10 s),读板。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,各菌群所测结果经对数转换后进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间差异比较采用独立样本的 *t* 检验,两组内相同菌种不同日龄之间两两比较用单因素的方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

自然分娩组的新生儿在生后第 1 天肠道双歧杆菌的数量与剖宫产组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05);但出生后第 2 天、第 3 天则明显高于同日龄的剖宫产组(*P* < 0.05)。在乳酸杆菌的检测中,自然分娩组的新生儿肠道细菌的量均明显高于剖宫产组的婴儿(*P* < 0.05)。

表 2 两组新生儿不同日龄的粪便标本中双歧杆菌和乳酸杆菌细菌数量的对数值($\bar{x} \pm s$,lg copies/g)

| 菌种 | 日龄 | 自然分娩组 (n=39) | 剖宫产组 (n=44) | <i>t</i> | <i>P</i> |
|------|-------|-----------------|----------------|----------|----------|
| 双歧杆菌 | 第 1 天 | 5.69±0.75 | 5.65±0.64 | 0.191 | 0.849 |
| | 第 2 天 | 7.19±1.15 | 6.36±1.00 | 2.584 | 0.013 |
| | 第 3 天 | 7.49±1.29 | 6.69±1.06 | 2.066 | 0.046 |
| 乳酸杆菌 | 第 1 天 | 5.88±0.41 | 4.66±0.73 | 6.556 | 0.000 |
| | 第 2 天 | 6.30±0.99 | 4.71±0.84 | 5.798 | 0.000 |
| | 第 3 天 | 6.79±0.33 | 5.16±0.55 | 4.258 | 0.000 |

3 讨 论

从出生开始,产生儿道经历了从无菌状态到大量细菌定植的变化。但这一阶段肠道菌群很不稳定,易受到外界各种因素的影响而发生菌群失调。影响新生儿早期肠道菌群建立的因素主要有:分娩方式、喂养方式、胎龄、抗生素使用、环境卫生和地域分布等^[8]。母乳可以促进婴儿肠道中双歧杆菌和乳酸杆菌的生长^[9],也有研究者认为剖宫产儿的产妇由于术中和术后大多使用抗生素,因此乳汁中含有的少量抗生素可能会进入婴儿肠道,干扰婴儿肠道双歧杆菌的早期定植^[10-11]。本研究中所选的研究对象为出生后 3 d 的足月产新生儿,且均为配方奶喂养,以排除喂养方式带来的影响。与长期喂养相比,出生后 3 d 内新生儿受喂养的影响相对较小,似乎更能反映出剖宫产可能带来的影响。

在新生儿肠道中,最先定植的细菌通常是肠杆菌、肠球菌和葡萄球菌这样的需氧菌和兼性厌氧菌。随着这些细菌的生长消耗了肠道中的氧气,降低了肠道中的氧化还原电位,为严格厌氧菌的定植创造了适合生存的环境。首次定植的严格厌氧菌包括双歧杆菌、梭状芽孢杆菌和脆弱杆菌。这类厌氧菌在生长过程中通过竞争底物和肠黏膜上的粘附位点,产生抑制需氧菌生长的代谢产物,降低肠道的 pH 值等使厌氧菌和需氧菌的比例逐渐增高,从而更加接近成人的肠道微生态特点^[12]。

本研究结果表明,剖宫产对新生儿早期肠道微生态的定植产生了明显的影响。相同时间内,剖宫产分娩的新生儿肠道双歧杆菌和乳酸杆菌明显低于自然分娩的新生儿。这种差异可解释为:自然分娩的新生儿分娩过程中容易接触到母亲产道,肛周及会阴部皮肤的细菌,并通过口腔吸入和肛门移入,定植

在自身肠道中,这些细菌大部分是需氧菌,能很快消耗掉肠道中的氧气和降低氧化还原电位,创造有利于厌氧菌生长的环境;而剖宫产的新生儿由于不经过母亲产道,并且手术过程中都经过了严格消毒,减少了接触母体细菌的机会,因此肠道最初定植的细菌可能多是来自于医院环境的细菌,且定植延迟,因此不能很快消耗掉肠道中的氧气,因此使双歧杆菌和乳酸杆菌生长受到抑制。

值得注意的是许多研究报道,通过培养的方法对早期新生儿粪便中的菌群进行研究,发现出生后前 2 d,至少在出生后第 1 天内新生儿肠道中均没有发现有双歧杆菌和乳酸杆菌的生长^[13-14]。但是,本研究结果却表明新生儿在出生后 4 h 肠道中就能检测出双歧杆菌和乳酸杆菌。在第 1 天时,自然分娩的新生儿肠道双歧杆菌的量略高于剖宫产的新生儿但差异无统计学意义($P>0.05$),而且两组中,双歧杆菌和乳酸杆菌的绝对数量均较低。可能的原因:(1)研究使用的方法不同。传统的细菌定性和定量方法多采用培养和计数的方法,对于双歧杆菌和乳酸杆菌这样的厌氧菌培养相对困难,在早期即使有很少量的细菌生长也可能检测不出来;本研究应用分子生物学 16SrRNA/DNA 结合 real-time PCR 技术对婴儿肠道细菌进行绝对定量,全程操作均在相对封闭的 PCR 管中进行,受人为干扰的因素较小,并且检测精度比培养方法明显要高。(2)检测到的可能是来自母体产道中的双歧杆菌和乳酸杆菌的 DNA 产物,而不是活菌内的 DNA。Satokari 等^[14]对新生儿胎盘上的双歧杆菌和乳酸杆菌及其产物进行了研究,发现对胎盘组织进行选择培养没有发现细菌生长,但是用细菌特异性引物对胎盘中的细菌 DNA 进行 PCR 扩增,发现绝大部分胎盘组织中都扩增出了双歧杆菌和乳酸杆菌的 DNA 产物。

总之,本研究结果表明剖宫产改变了新生儿早期肠道菌群的正常定植,自然分娩的新生儿肠道早期定植的双歧杆菌和乳酸杆菌明显比剖宫产儿高,因此自然分娩是最佳的分娩方式。

参考文献:

- [1] Muula AS. Ethical and practical consideration of women choosing cesarean section deliveries without "medical indication" in developing countries[J]. Croat Med J, 2007, 48(1):94-102.
- [2] 张杏敏,郑月红. 剖宫产率升高的因素分析与干预措施[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(29):4488-4489.
- [3] Vassallo MF, Walker WA. Neonatal microbial flora and

disease outcome[J]. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2008, 61:211-224.

- [4] Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, et al. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period[J]. Early Hum Dev, 2005, 81(4):387-392.
- [5] Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut[J]. Gut, 2005, 54(3):317-320.
- [6] Salam MT, Margolis HG, McConnell R, et al. Mode of delivery is associated with asthma and allergy occurrences in children[J]. Ann Epidemiol, 2006, 16(5):341-346.
- [7] Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, et al. Quantification of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. in rat fecal samples by real-time PCR[J]. Microbiol Res, 2008, 163(6):663-670.
- [8] Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy [J]. Pediatrics, 2006, 118(2):511-21.
- [9] 张会丰,李根山,田秀巧,等. 初乳对早期新生儿肠道菌群的作用[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(8):735.
- [10] Jauregui F, Carton M, Panel P, et al. Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11):5184-5188.
- [11] 孙敬,陈会,邓林强,等. 母乳中抗生素对新生儿肠道正常菌群建立的影响[J]. 江西医学检验, 2007, 25(2):116-118.
- [12] Adlerberth I. Factors influencing the establishment of the intestinal microbiota in infancy[J]. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2008, 62:13-29.
- [13] Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns[J]. Eur J Pediatr, 1985, 144(2):186-90.
- [14] Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, et al. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta[J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 48(1):8-12.

(收稿日期:2012-03-20 修回日期:2012-04-11)

(上接第 2156 页)

卷[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:2023.

- [6] 邱丽芹,谭威. 化脓性脊柱炎的 MRI 表现分析(附 22 例报告) [J]. 辽宁医学院学报, 2007, 6(7):61-62.
- [7] 王鹏,万春虎,张永刚,等. 鉴别结核性脊柱炎和化脓性脊柱炎[J]. 军医进修学院学报, 2005, 6(8):454-455.
- [8] 于静红,陶美丽,尤壮志. 化脓性脊柱炎的影像学诊断[J]. 中国医师进修杂志, 2008, 31(10):45-47.

- [9] Tali ET. Spinal infections[J]. Eur J Radiol, 2004, 50(2):120-133.

- [10] 王雪飏,郭建. MRI STIR 技术在诊断脊柱转移瘤中的应用价值[J]. 中国医学影像杂志, 2005, 13(4):279-282.
- [11] 陈瑶,丁永生,袁军. MRI 在脊柱转移瘤中的诊断价值[J]. 实用放射学杂志, 2008, 24(2):225-227.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-03-06)