

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.24.016

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1444.046.html\(2021-10-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1444.046.html(2021-10-25))

# 基于 16S rRNA 基因测序分析不同喂养方式对食物过敏婴幼儿肠道微生态的影响\*

王晶, 黄丽英, 陆俊佳, 余夏<sup>△</sup>

(广西医科大学第三附属医院/南宁市第二人民医院, 南宁 530031)

**[摘要]** **目的** 通过 16S rRNA 测序, 分析不同喂养方式对食物过敏婴幼儿肠道微生态的影响。**方法** 应用 Illumina 高通量测序技术检测食物过敏婴幼儿( $n=44$ )及健康婴幼儿( $n=12$ )的粪便中微生物 16S rRNA-V3 区, 分析不同喂养方式的食物过敏婴幼儿肠道菌群的差异。**结果** (1)人工喂养和混合喂养的食物过敏婴幼儿粪便中平均临时操作单元(OTU)数量, 较母乳喂养的食物过敏婴幼儿和健康婴幼儿明显升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); (2)4 组婴幼儿间拟杆菌门、梭杆菌门和放线菌门的相对丰度差异有统计学意义( $P<0.05$ ); (3)物种注释显示所有样本最佳的分类水平为科, 4 组间差异贡献最大的类群为瘤胃菌科、双歧杆菌科和拟杆菌科。所有样本进行聚类分析发现, 母乳喂养组与对照组、人工喂养组与混合喂养组的相似性较高。**结论** 食物过敏可能与喂养方式所致的肠道微生态的改变有关。

**[关键词]** 16S rRNA; 喂养方式; 食物过敏; 肠道微生态**[中图法分类号]** R725.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)24-4218-05

## Effects of different feeding practices on the intestinal microecology of infants with food allergies based on 16S rRNA gene sequencing analysis\*

WANG Jing, HUANG Liying, LU Junjia, YU Xia<sup>△</sup>

(The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University/the Second Nanning People's Hospital, Nanning, Guangxi 530031, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the effects of different feeding practices on the intestinal microecology of infants with food allergy by 16S rRNA sequencing. **Methods** The illumina high-throughput sequencing technology was applied to detect the microbial 16S rRNA-V3 region in the faeces of food-allergic infants (44 cases) and healthy infants (12 cases), and to analyse the differences in the intestinal flora of food-allergic infants with different feeding practices. **Results** (1) The mean number of OTUs in the faeces of hand-fed and mixed-fed food-allergic infants was significantly higher than that of breast-fed food-allergic infants and healthy infants, with statistically significant differences ( $P<0.05$ ). (2) The relative abundance of the phylum mycobacterium, clostridium and actinomycetes showed significant differences between the four groups ( $P<0.05$ ). (3) Species annotation showed that the best taxonomic level for all samples was family, and the groups contributing the most to the difference between the four groups were ruminobacteriaceae, bifidobacteriaceae and bacteroidaceae. Cluster analysis of all samples showed that the breastfeeding group and control group, and the artificial feeding group and mixed feeding group had high similarity. **Conclusion** Food allergy may be associated with alterations in the intestinal microecology due to feeding patterns.

**[Key words]** 16S rRNA; feeding method; food allergy; intestinal microecology

食物过敏(food allergy, FA)的发生率目前逐年 上升, 有资料显示 8% 的儿童、近 5% 的成年人存在

\* 基金项目:广西壮族自治区卫生计生委自筹经费科研课题(Z20180587)。 作者简介:王晶(1987—), 主治医师, 硕士, 主要从事临床检验

工作。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:13481143325@163.com。

FA<sup>[1]</sup>。虽然部分婴幼儿的 FA 可随年龄增长而自愈,但 MIYAJI 等<sup>[2]</sup>认为婴幼儿期 FA 可能会成为严重过敏性疾病的重要诱因或加重因素。同时婴幼儿因 FA 所致的优质蛋白、微量元素等物质摄入不足继发的健康问题也时有报道<sup>[3]</sup>。有学者发现肠道菌群结构、机体肠道黏膜免疫功能和过敏反应密切相关,认为肠道微生态是引起 FA 的主要原因<sup>[4]</sup>。本研究应用 Illumina 第 2 代高通量测序技术研究不同喂养方式的 FA 婴幼儿肠道菌群的差异,分析不同喂养方式对婴幼儿肠道微生态的影响,以期对婴幼儿 FA 的预防及治疗提供新的思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

2019 年 3—10 月于南宁市第二人民医院初诊为 FA 的婴幼儿 ( $n = 44$ ), 根据喂养方式的不同分为 3 组, 纯母乳喂养组: 出生 6 个月内除母乳外, 不给予配方奶或其他食物(糖水、维生素和钙除外); 人工喂养组: 出生后完全配方奶喂养; 混合喂养组: 出生 6 个月内除母乳外, 给予配方奶补充喂养。选取同期进行健康体检的健康婴幼儿 12 名作为对照组, 4 组研究对象性别、年龄、胎龄、出生体重、生产方式等差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

FA 婴幼儿纳入标准: (1) 临床诊断为 FA; (2) 年龄 0~24 个月; (3) 无糖尿病、肥胖及其他代谢疾病; (4) 无感染性疾病; (5) 征得患儿监护人同意, 并签署知情同意书。

所有研究对象均通过问诊获得胎次、产次、胎龄、家族性过敏史、遗传性疾病史等基本信息, 且在粪便采集前 1 个月未使用抗生素、益生菌、益生元等。本研究经本院医学伦理委员会批准通过。

表 1 研究对象基本情况

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (月)	平均年龄 (月)	胎龄 (周)	出生体重 (kg)	生产方式 (顺产/剖宫产)
纯母乳喂养组	15	8/7	7~22	14.7	39.3	2.8	11/4
人工喂养组	14	7/7	5~24	13.3	39.7	2.9	10/4
混合喂养组	15	8/7	6~24	13.7	39.6	2.9	12/3
对照组	12	7/5	5~23	14.3	39.4	3.0	9/3

## 1.2 方法

### 1.2.1 标本采集

采集研究对象新鲜成形大便的中段大便 10 g, 放入无菌采集盒后, 1 h 内置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 用于后期肠道微生物总 DNA 提取。

### 1.2.2 微生物总 DNA 的提取和检测

采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取研究对象粪便中微生物总 DNA, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的纯度和完整性, 并对 DNA 进行定量。

### 1.2.3 微生物 DNA 文库的构建

经过检测的 DNA 被超声波破碎仪随机打断成长度约为 350 bp 的片段, 用 T4 DNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶和 T4 PNK 将打断形成的黏性末端修复成平末端, 并在 3' 端加碱基“A”, 使 DNA 片段能与 3' 端带有“T”碱基的特殊接头连接后, 以目的 DNA 为模板, 在含有测序接头的融合引物引导下, 进行融合引物聚合酶链反应后, 磁珠筛选纯化目的扩增片段。最后, 用合格的文库进行集群制备和测序。

### 1.2.4 测序

应用 Illumina 平台(Miseq)进行测序。

## 1.3 数据分析

样本经过测序可得到大量序列, 应用 mothur 软件进一步处理, 将相似度大于或等于 97% 的序列聚类形成 1 个临时操作单元(operational taxonomic unit, OTU), 得到多个 OTU。OTU 一方面可用于计算样本的 Alpha 多样性(chao1 值、ACE 值、Shannon 指数等), 并判断样本物种的多样性。另一方面 OTU 注释可明确样本的物种组成和分类分项, 在最佳分类水平上分析各研究对象物种组成的相似性。同时对样本做主成分分析(PCA), 找出对造成样本间差异贡献较大的物种。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象肠道微生态样本物种丰度及 Alpha 多样性的比较

4 组研究对象粪便中的物种丰度(OTU 数量)和多样性指数均以母乳喂养组最低, 其次是对照组, 最高的是人工喂养组。4 组间 OTU 数量存在明显差异 ( $P < 0.05$ )。组间进一步比较, 母乳喂养组和对照组的平均 OTU 数量明显少于混合喂养组和人工喂养组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但母乳喂养组较对照组、混合喂养组较人工喂养组的平均 OTU 数量虽略有差异, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。4 组间 Alpha 多样性指数略有差异, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 研究对象样本的物种丰度及 Alpha 多样性

组别	n	OTU			Alpha 多样性		
		最大值	最小值	平均值	chao1 值	ACE 值	Shannon 指数
母乳喂养组	15	326	126	216±45	465±92	768±122	1.83±0.29
人工喂养组	14	423	188	257±42*#	538±101	835±135	2.07±0.34
混合喂养组	15	411	164	249±36*#	523±105	813±119	2.04±0.33
对照组	12	341	133	222±31	478±83	787±142	1.89±0.31
F			13.453		5.756	3.527	8.127
P			0.026		0.086	0.163	0.054

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与母乳喂养组比较。

## 2.2 4 组研究对象的肠道菌群结构

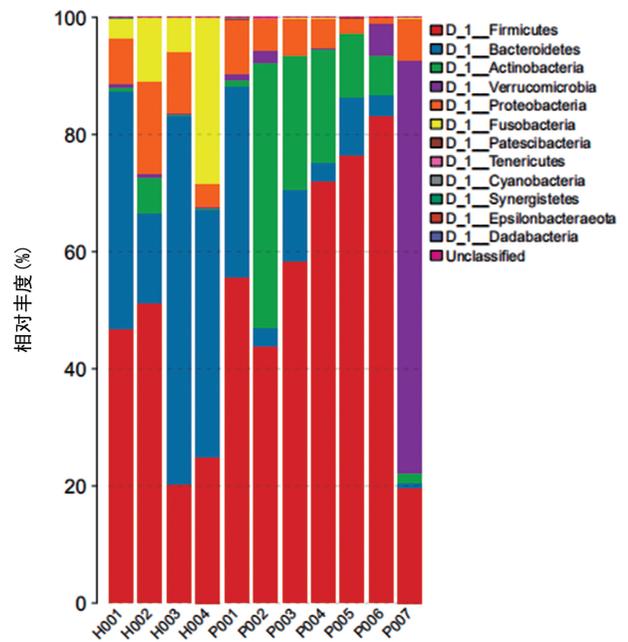
### 2.2.1 FA 婴幼儿和健康婴幼儿在肠道菌群分级门 (Phylum) 水平的分布比较

对研究对象的粪便进行微生物 16S rRNA 基因 V3 区测序, 共检测到 12 个菌门, 相对丰度较高者为厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和梭杆菌门 (Fusobacteria) 等 5 个菌门。进一步物种差异分析, 厚壁菌门在研究对象中均有较高的相对丰度, 但与对照组比较, FA 婴幼儿的厚壁菌门相对丰度更高。拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门在 4 组间呈现明显差异, 拟杆菌门、梭杆菌门在母乳喂养组 (28.5% 和 7.9%) 和对照组 (44.7% 和 13.7%) 的相对丰度较人工喂养组 (7.5% 和 0.6%) 和混合喂养组 (14.1% 和 0.5%) 显著增加。而放线菌门在人工喂养组和混合喂养组 (19.2% 和 23.4%) 的相对丰度较母乳喂养组 (3.1%) 和对照组明显增加 (1.0%)。从门分类水平物种注释图中可看出样本之间也有明显的个体差异, 拟杆菌门在混合喂养组中的丰度可从 3.2% 上升到 38.6%; 而放线菌门在混合喂养组各样本中的比例也是从 1.2% 上升到 42.8%, 见图 1。

### 2.2.2 FA 婴幼儿和健康婴幼儿在肠道菌群分级科 (Family) 水平的分布比较

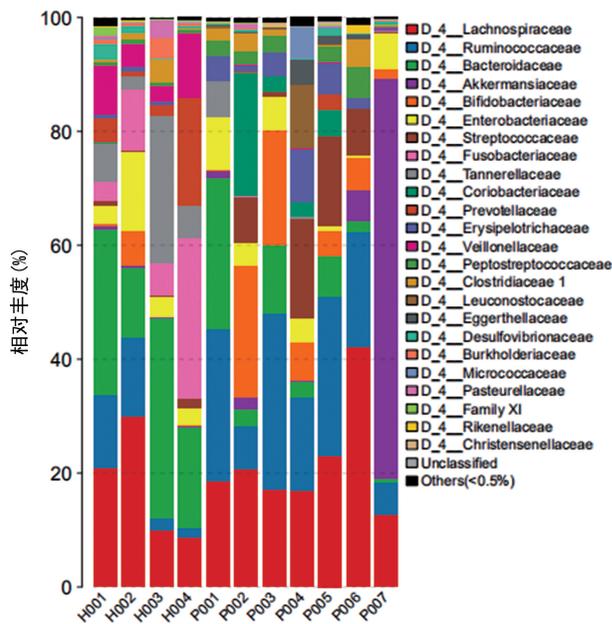
物种注释显示最佳的分类水平为科, 每个样本均有 98% 以上的序列在该水平上得到分类。在科水平上, 笔者对各样本中丰度  $\geq 0.5\%$  的科进行了统计。研究对象粪便样本中相对丰度较高的科共检测到 24 个 (图 2)。母乳喂养组和对照组以螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae) 为优势菌, 而人工喂养组和混合喂养组主要以螺旋菌科、瘤胃菌科 (Rumionococcaceae) 为优势菌。4 组物种构成呈现多样化, 但 4 组间物种多样性并未显著差异。对所有样本进行聚类分析发现, 人工喂养组、混合喂养组和母

乳喂养组、对照组的相似性很低, 表明 4 组样本菌群差异较大。进一步两两分析显示, 母乳喂养组、对照组的相似性较高, 而人工喂养组和混合喂养组的相似性亦较高。PCA 分析发现造成 4 组之间差异贡献最大的类群为瘤胃菌科、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae) 和拟杆菌科。瘤胃菌科在对照组 (3.4%) 中相对丰度明显低于母乳喂养组 (13.3%)、混合组喂养组 (23.6%) 和人工喂养组 (28.8%)。而拟杆菌科在对照组中 (31.1%) 的相对丰度却明显高于母乳喂养组 (23.16%)、混合喂养组 (8.16%) 和人工喂养组 (4.48%)。另外 PCA 分析还发现与母乳喂养组相似性较高的混合喂养组样本中拟杆菌科相对丰度较高, 而与人工喂养组相似的样本中瘤胃菌科含量较高, 见图 2。



H001、H002: 母乳喂养组; H003、H004: 对照组; P001、P002、P003: 混合喂养组; P004、P005、P006、P007: 人工喂养组。

图 1 4 组研究对象肠道微生物菌群门水平的组成



H001、H002: 母乳喂养组; H003、H004: 对照组; P001、P002、P003: 混合喂养组; P004、P005、P006、P007: 人工喂养组。

图 2 4 组研究对象肠道微生物菌群科水平的组成

### 3 讨 论

肠道微生态是指寄生于肠道的微生物与宿主之间相互作用、相互影响的共生关系系统一体。有学者认为肠道定植的大量微生物是人类基因组信息的重要补充,与人体健康密切相关<sup>[5]</sup>。国内外研究亦表明肠道微生物群落的紊乱,将影响机体的免疫、代谢、神经、内分泌等系统,是诱发自身免疫性疾病、糖尿病、自闭症、抑郁症和癌症等多种疾病的重要因素之一<sup>[6-7]</sup>。婴幼儿时期是宿主肠道菌群建立的关键时期,而喂养方式是影响婴幼儿肠道微生态的重要因素,它通过影响婴儿肠道菌群的定植,进而影响肠道微生态的稳定性<sup>[8]</sup>。国内研究亦表明喂养方式与婴儿腹泻、过敏性疾病等有关系<sup>[9]</sup>。因此研究不同喂养方式所引起食物过敏的作用机制具有非常重要的临床意义。早期对肠道微生态的研究主要采用传统培养技术,但该方法具有局限性,只能检测培养型的微生物,而培养型的细菌在肠道菌群中仅为 1%~10%,与机体相互作用的非培养型菌群严重漏检<sup>[10]</sup>。随着核酸测序技术的发展和测序成本的降低,通量高、测序快、准确度高的高通量测序技术被广泛应用在微生物的研究中,肠道微生态的研究亦逐渐使用该技术<sup>[11]</sup>,它几乎可以检测出粪便中所有菌群,对肠道微生物的构成有更全面、更深入的认识,对肠道病理学的研究具有巨大的促进作用。

本研究的结果显示所有粪便样本 OTU 数量最多可达到 423,最少为 126。OTU 的数量代表样本物种的丰度,表明研究对象粪便样本中的微生物丰度很高,但样本之间微生物丰度差异较大,母乳喂养组的

平均 OTU 数量最少,其次为对照组,人工组最高。母乳喂养组和对照组的平均 OTU 明显低于人工喂养组和混合喂养组,这与李在玲等<sup>[12]</sup>的研究结论一致,而母乳喂养的 FA 婴幼儿的肠道细菌丰度较对照组无明显差异,这提示健康婴幼儿和母乳喂养的 FA 婴幼儿维持肠道正常功能、代谢及抵御病原菌方面的肠道细菌丰度要低于人工喂养和混合喂养的 FA 婴幼儿,进一步说明 FA 的发生、发展不仅可能与肠道定植的细菌丰度有关,还与遗传因素有关。有学者认为微生物的构成多样性,对宿主的表型有着重要的影响<sup>[13]</sup>。但本研究中 4 组间肠道菌群的 Alpha 多样性指数差异无统计学意义,说明菌群的相对丰度在宿主的表型中起到更加重要的作用。

本研究发现厚壁菌门是所有研究对象粪便样本中的优势菌,与 FU 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,厚壁菌门在宿主肠道上皮细胞供能和发育起到重要作用,当厚壁菌门的丰度减少,将引起机体糖类代谢异常。4 组间肠道菌群结构差异主要在于拟杆菌门、梭杆菌门和放线菌门。拟杆菌门和梭杆菌门在母乳喂养组和健康婴幼儿中的相对丰度较人工喂养组和混合喂养组高。拟杆菌门主要定植在肠黏膜表面,能抵御肠侵入性病原菌的黏附,为有益菌群。而梭杆菌门的梭杆菌已被证实可以抑制调节 T 细胞的增生,从而抑制组织的炎症反应<sup>[14]</sup>。而人工喂养组和混合喂养组的放线菌门较母乳喂养组和对照组明显增加。有学者发现放线菌门通过微生物的磷酸转移酶系统能影响机体糖、脂、蛋白质代谢相关<sup>[15]</sup>。这可能是 FA 婴幼儿容易营养不良的主要原因。

进一步分析肠道菌群结构,发现螺旋菌科是研究对象中的优势菌,但健康婴幼儿的相对丰度明显低于 FA 婴幼儿,这可能是婴幼儿发生 FA 的原因之一。对所有样本进行聚类分析显示人工喂养组、混合喂养组、母乳喂养组、对照组的相似性很低。进一步两两分析发现母乳喂养组与对照组、人工喂养组与混合喂养组的相似性较高,提示人工喂养和混合喂养的婴幼儿发生 FA 的原因可能与肠道菌群结构有关,而母亲喂养的婴幼儿发生 FA 的原因更倾向于遗传因素。PCA 分析发现导致 4 组之间差异贡献最大的菌群为瘤胃菌科、双歧杆菌科和拟杆菌科。瘤胃菌科在对照组中相对丰度明显低于 FA 婴幼儿,而拟杆菌科在健康婴幼儿中的相对丰度却明显高于 FA 婴幼儿。而研究已发现拟杆菌主要定植在肠黏膜表面,拮抗侵入性病原菌的黏附肠上皮细胞,是有益菌群<sup>[15]</sup>。同时 PCA 分析发现混合喂养婴幼儿间的菌群结构差异与喂养情况有关,与母乳喂养较高的混合喂养组样本中拟杆菌科相对丰度较高,而配方奶喂养较高的样本中瘤胃菌科含量较高。

综上所述,母乳喂养的 FA 婴幼儿与健康婴幼儿肠道微生态相似,而人工喂养和混合喂养的 FA 婴幼儿肠道菌群结构和丰度与健康婴幼儿存在差异,提示 FA 的发生、发展可能跟喂养方式不同所致的肠道微生态的改变有关。

## 参考文献

- [1] HICKE-ROBERTS A, WENNERGREN G, HESSELMAR B. Late introduction of solids into infants' diets may increase the risk of food allergy development [J]. *BMC Pediatrics*, 2020, 20 (1): 1814-1822.
- [2] MIYAJI Y, YANG L, YAMAMOTO-HANADA K, et al. Earlier aggressive treatment to shorten the duration of eczema in infants resulted in fewer food allergies at 2 years of age [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8(5): 397-405.
- [3] 余晓丹. 婴幼儿食物过敏的营养问题 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019(21): 1614-1617.
- [4] GERNEZ Y, NOWAK-WEGRZYN A. Oral immunotherapy for food allergy (OIT) effectively desensitizes most infants and young children [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145 (2): 2143-2149.
- [5] LING Z X, LIU X, CHENG YI, et al. Gut microbiota and aging [J]. *Critic Rev Food Sci Nutr*, 2020, 21(3): 129-137.
- [6] BUI P T H, EWA W, JOHAN D. Analysis of the developing gut microbiota in young dairy calves-impact of colostrum microbiota and gut disturbances [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2020, 53(1): 2147-2158.
- [7] DENG Y, TANG D, HOU P, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with esophageal cancer [J]. *Microb Pathog*, 2020, 25 (6): 674-685.
- [8] 王新梅, 邢静, 乔慕华. 不同喂养方式对婴幼儿肠道菌群多样性影响的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9314-9319.
- [9] 孙彩粉. 不同喂养方式对婴幼儿腹泻的影响 [J]. *中国肛肠病杂志*, 2018, 38(5): 44-45.
- [10] 叶毅, 陈杨畅, 兰巧丽, 等. 宏基因组序粪菌移植对非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群影响 [J]. *中国药物与临床*, 2019, 19(22): 3892-3894.
- [11] 于君, 杨佳. 肠道微生态与结直肠癌: 基础和临床转化研究进展 [J]. *中华消化杂志*, 2020, 40 (12): 793-796.
- [12] 李在玲, 张婷, 陈同辛, 等. 肠道微生态与婴幼儿免疫 [J]. *临床儿科杂志*, 2020, 38(11): 801-809, 816.
- [13] TOCHITANI S. Vertical transmission of gut microbiota: points of action of environmental factors influencing brain development [J]. *Neurosci Res*, 2020, 28(12): 653-661.
- [14] FU H B, ZHANG L Z, FAN C, et al. Environment and host species identity shape gut microbiota diversity in sympatric herbivorous mammals [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 24(12): 1180-1189.
- [15] SUSAN E, WOLFGANG M, FIONA C, et al. Plasma metabolomic profiles associated with infant food allergy with further consideration of other early life factors [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid*, 2020, 159: 754-762.

(收稿日期: 2021-04-04 修回日期: 2021-09-15)

(上接第 4217 页)

- [13] DIMOPOULOS J C, LANG S, KIRISITS C, et al. Dose-volume histogram parameters and local tumor control in magnetic resonance image-guided cervical cancer brachytherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(1): 56-63.
- [14] 李龙婕, 邓晓琴. 宫颈癌近距离放射治疗进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2019, 41(3): 193-198.
- [15] BYUN D J, GOROVETS D J, JACOBS L M, et al. Strict bladder filling and rectal emptying during prostate SBRT: does it make a dosimetric or clinical difference? [J]. *Radiat Oncol*, 2020, 15(1): 239.
- [16] 龚文, 晏军, 刘军, 等. 宫颈癌术后阴道三维腔内近距离放射治疗两种施源器剂量学研究 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2020, 33(1): 51-55.

(收稿日期: 2021-05-05 修回日期: 2021-10-09)