

使用实时荧光定量 PCR 解析婴儿肠道 双歧杆菌构建规律*

何苗¹, 李鸣¹, 王舒悦¹, 张玲琳², 苗俊杰², 石磊¹,
余倩², 姚建蓉³, 黄承钰¹, 何方^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养与食品卫生及毒理学系(成都 610041);

2. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041); 3. 四川大学华西第二医院 产科(成都 610041)

【摘要】 目的 通过非培养的分子生物学方法检测婴儿早期肠道双歧杆菌的菌种组成及其数量变化,解析婴儿肠道双歧杆菌种群构建及菌种组成变化的规律及其可能的影响因素。**方法** 收集 2013 年 3~4 月 16 例正常足月新生儿第 1 次,第 2、4、7、10、14、28 天,3 个月,6 个月,1 岁共 10 次粪便,使用实时荧光定量 PCR 和双歧杆菌属及种特异性引物对收集的粪便中的双歧杆菌属及人体肠道特有的 8 个双歧杆菌菌种进行定性及定量分析。**结果** 共收集婴儿粪便样品 136 份,双歧杆菌检出率为 93.4%(127/136),湿便中菌数为 $10^5 \sim 10^{11}$ CFU/g;第 1 次胎便双歧杆菌检出率为 83.3%(湿便中菌数约为 10^5 CFU/g);出生后 14 d 内双歧杆菌检出率及菌量在相对低的水平,被检出的双歧杆菌为 1 种或 2 种;出生 28 d 及以后双歧杆菌检出率增至 100%,湿便中菌量增至 10^8 CFU/g 以上;出生后 28 d 至 6 月龄多数婴儿、1 岁时全部婴儿粪便中被检出双歧杆菌增至 3 种;双歧杆菌各菌种的检出率为 *B. breve* (92.1%)、*B. infantis* (66.1%)、*B. catenulatum* (59.8%)、*B. bifidum* (25.2%)、*B. longum* (24.4%)、*B. dentium* (13.4%)、*B. angulatum* (5.5%)、*B. adolescentis* (1.6%)。**结论** 受试婴儿出生后到 1 岁其肠道双歧杆菌数量、菌种组成及其菌种多样性均随时间出现显著的变化,是受试婴儿肠道双歧杆菌种群构建的重要时期;同时发现受试婴儿双歧杆菌的菌种群构建整体上延迟、菌种组成上出现异常,推测是和受试婴儿的生产方式、喂养情况及其他各种环境因素密切相关。

【关键词】 婴儿 肠道 双歧杆菌 实时荧光定量 PCR

Analyzing Colonization of *Bifidobacteria* in Infants with Real-time Fluorescent Quantitative PCR HE Miao¹, LI Ming¹, WANG Shu-yue¹, ZHANG Ling-lin², MIAO Jun-jie², SHI Lei¹, YU Qian², YAO Jian-rong³, HUANG Cheng-yu¹, HE Fang^{1△}. 1. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: nrb47389@nifty.com

【Abstract】 Objective In order to know how intestinal *Bifidobacteria* community could be built in the infants and whether the environmental factors could affect them, the present study was conducted to characterize the species composition and trace the quantitative changes of intestinal *Bifidobacteria* of the infants in their early stages with non-culture dependent molecular method. The possible association of *Bifidobacteria* community of the infants with their health was also discussed. **Methods** Total 16 of full-term newborn infants born between March and April 2013 were recruited for the present study. Fecal samples were collected from them at 1 day, 2 days, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days, 28 days, 3 months, 6 months and 1 year after birth. Real-time fluorescent quantitative PCR with genus and species specific primers was used to detect *Bifidobacteria* and 8 predominate species in human intestine qualitatively and quantitatively present in these collected fecal samples. **Results** Total 136 fecal sample were collected and *Bifidobacteria* were detected from 93.4% (127/136) of them with the concentration of 1.0×10^5 to 1.0×10^{11} CFU/g. *Bifidobacteria* were found in 83.3% of the fecal samples collected from the first day after birth with more than about 10^5 CFU/g. However, *Bifidobacteria* were detected relative low until 14 days and were taxonomically belonged only to one or two species. *Bifidobacteria* were found in almost 100% of the fecal samples

* 国家自然科学基金(No. 81372982)资助

△ 通信作者, E-mail: nrb47389@nifty.com

collected after birth 28 days with more than 10^8 CFU/g, and the detected species of *Bifidobacteria* was increased to 3 species after 28 days to 6 months. All of the fecal samples collected from one year had more than 3 species of *Bifidobacteria* with high cell counts. Among the detected *Bifidobacteria* were *B. breve* 92.1%, *B. infantis* 66.1%, *B. catenulatum* 59.8%, *B. bifidum* 25.2%, *B. longum* 24.4%, *B. dentium* 13.4%, *B. angulatum* 5.5% and *B. adolescentis* 1.6%, respectively. **Conclusion** The detected *Bifidobacteria* greatly varied qualitatively and quantitatively after birth to one year which could be considered as the important and sensitive period for *Bifidobacteria* to colonize and built its community in the infants. Different from previous studies, the colonization of *Bifidobacteria* in the tested infants was found delayed and the composition and diversity of *Bifidobacteria* species was different from other studies. These might result from different delivery way, feeding pattern and other environmental factors related to the tested infants.

【Key words】 Infant Intestine *Bifidobacteria* Real-time fluorescent quantitative PCR

双歧杆菌(*Bifidobacteria*)是最早出现的婴儿肠道菌群的主要构成菌、优势菌群之一,也是人体肠道内最主要的有益菌之一,对维持人体健康有着极其重要的作用^[1]。对双歧杆菌构建规律、特别是其菌种组成变化规律的研究有着重要的意义。HE等^[2]发现双歧杆菌自身生理代谢及对宿主健康的影响均有着显著的菌种特异性,其菌种构成及菌种的多样性对于预防过敏性疾病、腹泻、喂养不耐受等均受到广泛的关注^[3-5]。但目前国内对双歧杆菌在婴儿期构建规律的研究很少。

目前为止,婴儿肠道双歧杆菌构建规律、特别是其菌种组成变化的知识多数是建立在使用传统的培养分离方法结果的基础上。传统的培养分离方法因受其使用的培养基的选择性及厌氧培养技术的影响,能检出双歧杆菌的菌种多数是易于培养的优势菌种,难以正确地检测出和反映其它难培养且少量存在的婴儿肠道双歧杆菌的变化。近年,分子生物技术的快速发展为肠道菌群研究提供了全新的方法和思维,这类实验方法可检出双歧杆菌活菌和死菌的总和,具有快速、准确、检出限低等优点。有国内学者采用实时荧光定量 PCR 的方法对婴儿双歧杆菌进行检测,但检测时间较短,且只涉及到双歧杆菌属或者长、短双歧杆菌两种,均不能较为系统地了解婴儿肠道双歧杆菌的定植时间及数量、种类的动态变化情况^[6-8]。

本研究基于张玲琳等^[9]采用传统培养方法探索婴儿肠道双歧杆菌的构建规律的研究,通过实时荧光定量 PCR 对婴儿肠道内双歧杆菌属及人体肠道特有的 8 种双歧杆菌进行定性及定量检测,全面系统地观察婴儿期双歧杆菌的定植动态变化和定植特点,为人们进一步了解婴儿肠道双歧杆菌的构建规律提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象及样本采集

本研究选取 2013 年 3~4 月出生于四川大学华西第二医院产科的新生儿作为研究对象。纳入标准:居住于成都五城区;足月正常体质量新生儿,无先天疾病或缺陷。排除标准:母亲产前 1 月或新生儿因各种原因服用抗生素或微生物制剂者;父亲或母亲有乙肝、艾滋病等传染性疾病。遵循 Helsinki 原则纳入 16 例新生儿作为研究对象,其中男 7 例,女 9 例;剖宫产 13 例,顺产 3 例;母乳喂养 7 例,混合喂养 9 例。通过问卷调查收集婴儿性别、生产方式、喂养方式等信息,同时收集新生儿第 1 次,第 2、4、7、10、14、28 天,3 个月,6 个月,1 岁共 10 次粪便,采集粪便后立即暂存于 4℃,后及时低温保存于一 80℃超低温冰箱待测,共收集粪便样品 136 份。

1.2 材料和试剂

MRS 培养基为北京陆桥公司产品;粪便细菌总 DNA 提取试剂盒(TIANamp stool DNA Kit)为天根生化科技(北京)有限公司产品;引物合成、SYBR premix Ex Taq™ II 为宝生物工程(大连)有限公司产品;八联管为生工生物工程上海(股份)有限公司产品;双歧杆菌标准菌株由日本理化学研究所微生物保存施設(Japan Collection of Microorganism, JCM)提供。

1.3 粪便总 DNA 提取

称取 0.200 g 粪便,按照 TIANamp stool DNA Kit 试剂盒实验步骤提取,最终稀释 2 倍,获得 50 μ L DNA 液,一 80℃保存备用。根据提取过程得到浓度换算公式: $C_{\text{粪便}} = 2 \times C$, $\lg C_{\text{粪便}} = \lg C + \lg 2$,式中 $C_{\text{粪便}}$ 为每克粪便中细菌浓度(CFU/g), C 为标准曲线中细菌浓度(CFU/mL),此处按照水的密度进行换算即 1 g=1 mL。

1.4 引物选择及反应条件

针对双歧杆菌菌种的特定基因,采用实时荧光定量 PCR 进行检测,双歧杆菌属及人体肠道特有的 8 种不同的双歧杆菌种引物见表 1。采用 25 μ L 体系进行实时荧光定量 PCR 反应,包括 SYBR premix Ex

Taq™ II 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L,模板 DNA 2.0 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共 40 个循环。每次实验均设立阴性对照,同时做溶解曲线,检查有无非特异性扩增。

表 1 双歧杆菌属/种 PCR 特异性引物
Table 1 Specific primers of *Bifidobacteria/Bifidobacteria* species

<i>Bifidobacteria/Bifidobacteria</i> species	Primer	Gene sequence (5'-3')	Amplified fragment length/bp
<i>Bifidobacteria</i>	<i>g-Bifid-F</i>	CTCCTGGAACGCGTGG	549-563
	<i>g-Bifid-R</i>	GGTGTCTTCCCGATATCTACA	
<i>B. adolescentis</i> group	<i>BiADog-1a</i>	CTCCAGTTGGATGCATGTC	279
	<i>BiADog-1b</i>	TCCAGTTGACCGCATGGT	
	<i>BiADog-2</i>	CGAAGGCTTGCTCCAGT	
<i>B. longum</i>	<i>BiLON-1</i>	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	831
	<i>BiLON-2</i>	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	
<i>B. breve</i>	<i>BiBRE-1</i>	CCGGATGCTCCATCACAC	288
	<i>BiBRE-2</i>	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	
<i>B. infantis</i>	<i>BiINF-1</i>	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	828
	<i>BiINF-2</i>	GGAAACCCATCTCTGGGAT	
<i>B. bifidum</i>	<i>BiBIF-1</i>	CCACATGATCGCATGTGATTG	278
	<i>BiBIF-2</i>	CCGAAGGCTTGCTCCCAA	
<i>B. catenulatum</i> group	<i>BiCATg-1</i>	CGGATGCTCCGACTCCT	285
	<i>BiCATg-2</i>	CGAAGGCTTGCTCCCGAT	
<i>B. angulatum</i>	<i>BiANG-1</i>	CAGTCCATCGCATGGTGGT	275
	<i>BiANG-2</i>	GAAGGCTTGCTCCCAAC	
<i>B. dentium</i>	<i>BiDEN-1</i>	ATCCCGGGGTTTCGCCT	387
	<i>BiDEN-2</i>	GAAGGGCTTGCTCCCGA	

1.5 绘制标准曲线及计算粪便双歧杆菌浓度

将标准菌株接种到 MRS 培养基,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h,收集细菌制备菌悬液;将菌悬液 10 倍系列稀释,取 5 个适宜浓度梯度的菌悬液接种到适宜培养基上,进行活菌计数;用 TIANamp stool DNA Kit 试剂盒提取菌悬液中细菌 DNA,取准确定量(3.5×10^{10} CFU/mL)的细菌 DNA 进行 10 倍系列稀释,进行实时荧光定量 PCR,以细菌 DNA 浓度对数为横坐标,Ct 值为纵坐标,制作标准曲线。根据标准曲线及浓度换算公式计算粪便中双歧杆菌浓度。

1.6 统计学方法

采用独立样本 *t* 检验进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 婴儿双歧杆菌属水平检测结果

使用双歧杆菌属引物的测定中,双歧杆菌检出率为 93.4%(127/136),湿便中菌数为 $10^5\sim10^{11}$ CFU/g,平均为 8.4×10^8 CFU/g,未检测出双歧杆菌属的样本均为第 1 次至第 14 天样本。第 1 次胎便双歧杆菌检出率为 83.3%(10/12),第 2、7、14 天检出率分别为 92.3%(12/13)、91.7%(11/12)、

78.6%(11/14),第 28 天及以后检出率达 100%,并维持至 1 岁。第 1 次胎便双歧杆菌数平均检出量为 2.7×10^5 CFU/g,在第 14 天及以前数量在(1.2×10^5)~(1.1×10^6) CFU/g 水平内波动;第 28 天时数量明显增加,与第 14 天相比差异有统计学意义($t=-3.086,P<0.05$),数量可达 1.3×10^8 CFU/g,后增加缓慢,3 个月、6 个月、1 岁时双歧杆菌数量分别为: 7.6×10^8 CFU/g、 4.0×10^9 CFU/g、 3.5×10^9 CFU/g。见图 1。

2.2 婴儿双歧杆菌菌种检测结果

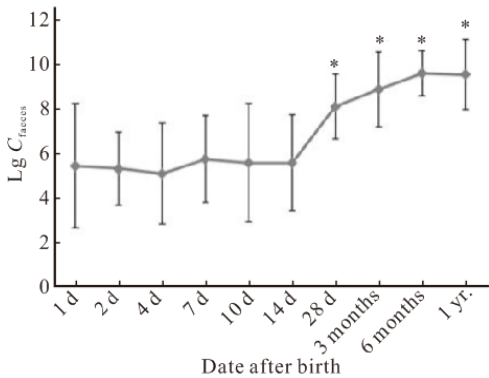


图 1 婴儿粪便中双歧杆菌数量随时间的变化情况

Fig 1 Changes of *Bifidobacteria* quantities by time

* $P<0.05$, vs. 14 d after birth

2.2.1 双歧杆菌检出菌种数量变化情况 使用双歧杆菌种特异性引物的测定中,婴儿第 1 次胎便即可检出多种双歧杆菌,平均检出菌种数为 1.92 种,最高为 5 种,菌种数多为 1 种或 2 种,其中 *B. breve* 检出率为 75%(9/12),其次为 *B. infantis*(50%,6/12)。出生后至第 14 天,婴儿粪便中双歧杆菌检出种数多为 1 种或 2 种,检出 3 种及以上菌种的情况较少,菌种数平均为 1.50~2.25 种。出生 28 d 后,检出菌种数显著增加,第 14 天和第 28 天检出菌种数差异有统计学意义($t = -2.421, P < 0.05$)。第

28 天、3 个月、6 个月及 1 岁检出 3 种及以上双歧杆菌菌种的婴儿占多数,分别占 78.6%(11/14)、80.0%(12/15)、100.0%(15/15)、78.6%(11/14),菌种数平均为 3.50~4.40 种。至 1 岁时,多数婴儿肠道中双歧杆菌检出率的菌种数为 3 种及以上,5 种检出者最多,平均为 3.86 种,*B. breve*、*B. infantis*、*B. catenulatum* 检出率最高,分别为 92.9%(13/14)、85.7%(12/14)、71.4%(10/14)。见图 2、图 3。

2.2.2 不同双歧杆菌菌种检出情况 结果见图 4、

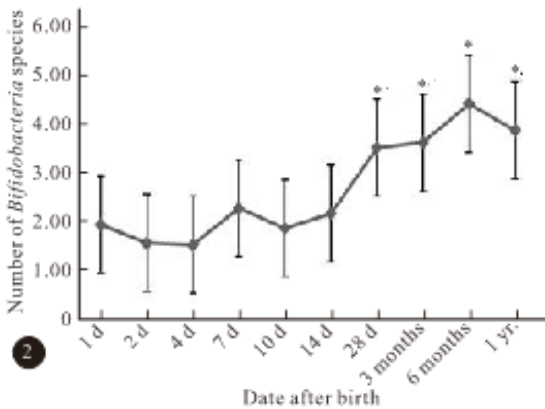


图 2 婴儿粪便中双歧杆菌菌种数随时间变化情况

Fig 2 Changes of detected *Bifidobacteria* species quantities over time
* $P < 0.05$, vs. 14 d after birth

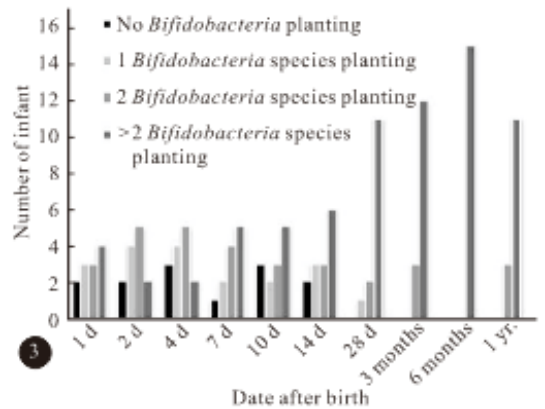


图 3 婴儿粪便中双歧杆菌菌种数定植状况

Fig 3 The distribution of planting *Bifidobacteria* species numbers

图 5。婴儿 1 岁前不同双歧杆菌菌种检出率由高到低分别为 *B. breve*(92.1%, 117/127)、*B. infantis*(66.1%, 84/127)、*B. catenulatum*(59.8%, 76/127)、*B. bifidum*(25.2%, 32/127)、*B. longum*(24.4%, 31/127)、*B. dentium*(13.4%, 17/127)、*B. angulatum*(5.5%, 7/127)、*B. adolescentis*(1.6%, 2/127),而其中 *B. breve*、*B. infantis*、*B.*

catenulatum 为婴儿双歧杆菌优势菌种,平均数量分别为 1.1×10^6 CFU/g、 2.3×10^4 CFU/g、 7.0×10^3 CFU/g,14 d 以前,其数量波动较大,14 d 后呈逐渐上升的趋势,6 个月达高峰,菌种数量为 $(1.1 \times 10^7) \sim (2.6 \times 10^7)$ CFU/g,前两者数量维持至 1 岁,但 *B. catenulatum* 1 岁时降至 6.3×10^5 CFU/g。*B. bifidum*、*B. longum* 在 14 d 以前数量低且

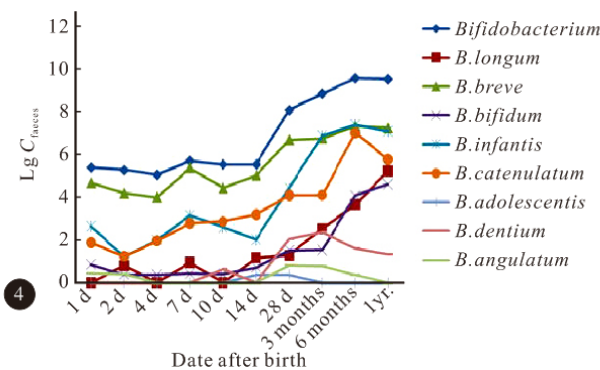


图 4 婴儿粪便中 8 种双歧杆菌数量随时间的变化状况

Fig 4 Changes of quantities of 8 *Bifidobacteria* species by time

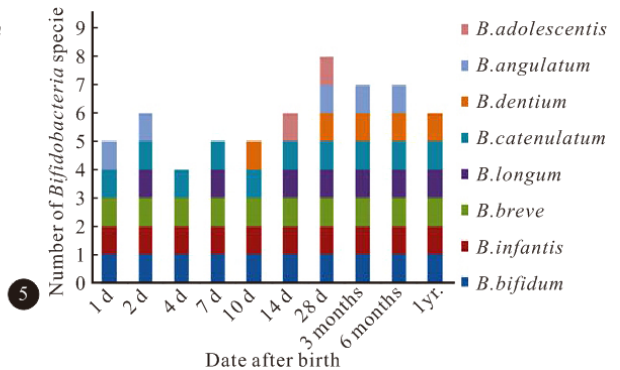


图 5 婴儿粪便中双歧杆菌种类随时间的变化情况

Fig 5 Changes of colonization 8 *Bifidobacteria* species by time

波动小, 14 d 后持续增加, 1 岁时其数量分别为 4.3×10^4 CFU/g、 1.7×10^5 CFU/g。 *B. angulatum* 第 1 次、第 2 天粪便中检出后消失, 第 28 天至 6 个月重新出现, 1 岁时消失; *B. adolescentis* 仅在第 14 天、第 28 天检出; *B. dentium* 在 28 d 前偶有检出, 28 d 后持续存在, 3 个月后有下降趋势。

3 讨论

3.1 婴儿肠内双歧杆菌定植情况及数量变化

使用传统培养方法的研究指出胎儿肠道在母亲体内处于无菌状态, 出生后的胎便为无菌, 但是出生后数小时内便开始有微生物定植^[10], 定植顺序依次为: 厌氧菌、革兰阳性菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和双歧杆菌^[11]。本研究结果显示多数婴儿第 1 次胎便即出生后数小时内便开始有双歧杆菌定植, 1 月龄双歧杆菌定植率为 100%, 与 GRZE ŚKOWIAK 等^[12] 研究结果一致, 与张玲琳等^[9] 前期研究结果相比较, 本研究结果显示双歧杆菌定植时间早、检出率高。张玲琳等^[9] 采用传统培养方法、黄永坤等^[7] 采用实时荧光定量 PCR 检测婴儿肠道双歧杆菌数均与本研究检测结果有差异。分析其原因, 一方面本研究采用实时荧光定量 PCR 分子学方法, 较传统培养方法具有更高的精确性、灵敏性, 较张玲琳的研究更真实的反映出婴儿早期肠道双歧杆菌的数量变化; 另一方面, GUEIMONDE 等^[13] 和茹彩旺等^[14] 发现母乳喂养对双歧杆菌的定植具有非常重要的意义, 母乳中双歧杆菌的含量可能会影响肠道双歧杆菌的含量。婴儿出生后 1 d 或 2 d, 在母乳喂养的婴儿粪便内便开始出现双歧杆菌, 菌量约 10^5 CFU/g, 出生后 5~6 d 双歧杆菌数显著增加, 1 月时双歧杆菌数增加至 10^{11} CFU/g, 成为肠内优势菌群^[15], 与本研究结果有所差别, 考虑到本研究对象均为母乳喂养或混合喂养, 推测喂养方式是影响婴儿肠道内双歧杆菌菌群构建的重要因子之一。

3.2 婴儿肠内双歧杆菌菌种构成及菌种多样性

双歧杆菌菌种的变化与过敏、代谢疾病及肥胖等炎症性疾病有密切的关系, 不同的双歧杆菌的免疫调节特性不同, 如成人型双歧杆菌 *B. adolescentis* 可能放大炎症反应, 而婴儿型双歧杆菌 *B. breve* 和 *B. bifidum* 则具有调节免疫平衡、抗炎症作用^[2]。GRZE ŚKOWIAK 等^[12] 发现 1 月龄婴儿肠内 *B. longum*、*B. bifidum*、*B. breve* 定植率分别为 100%、80%、56%, *B. longum*、*B. bifidum* 明显高

于本研究结果 21.4% (3/14)、28.6% (4/14)。TURRONI 等^[16] 对 11 对 1.5~5 月龄婴儿及其母亲肠道菌群检测结果显示, 婴儿肠道内双歧杆菌为优势菌群, 其中 *B. longum*、*B. bifidum* 为优势菌种, 定植率分别为 56.2%、10.7%。MARTÍN 等^[17] 也发现婴儿半岁前双歧杆菌优势菌种为 *B. longum*、*B. breve*、*B. bifidum*, 结果与张玲琳等^[9] 前期研究结果相似。本研究中双歧杆菌菌种检出率由高到低分别为 *B. breve*、*B. infantis*、*B. catenulatum*, 因 *B. catenulatum* 是代表性成人型双歧杆菌, 结果提示本研究受试婴儿肠内双歧杆菌种群中有过早出现成人型双歧杆菌的异常现象。

已有研究证明母乳喂养有助于新生儿的肠道菌群、特别是肠道双歧杆菌的定植^[17]。最新的研究更深入地解析了母乳和婴幼儿肠道内双歧杆菌之间存在密切的共生关系, 指出母乳里含有的多种人体独有的低聚糖及抗菌性物质, 人体肠道内双歧杆菌不同的菌种能菌种特异性地利用低聚糖和表现出对抗菌性物质的特异性的耐性, 由于 *B. breve*、*B. bifidum*、*B. longum* 等婴儿型双歧杆菌可分解代谢母乳中低聚糖和具有对母乳由来抗菌物质的特异性耐性, 其可在母乳喂养婴儿肠道内成为优势菌种^[18], 同样, BARRETT 等^[19] 认为在生命早期接触低聚半乳糖或果糖, 有利于婴儿 *B. longum* 定植和肠道菌群多样性形成。人工喂养婴儿肠道内成人型双歧杆菌 *B. adolescentis* 占主导地位^[20]。受试婴儿肠内双歧杆菌种群过早出现成人型双歧杆菌的异常现象推测可能与其混合喂养有密切的关系, 今后还将继续对婴儿喂养方式对肠道菌群菌种构成的影响进行更深入地研究。

基于现有的研究报告, 同时考虑本研究多为剖宫产婴儿, 受试婴儿胎便开始出现成人型双歧杆菌的原因, 推测为由于剖宫产等的原因造成母乳延迟, 引起婴儿型双歧杆菌 *B. infantis*、*B. bifidum* 生长繁殖减慢, 相反, 环境中存在的成人型双歧杆菌 *B. catenulatum* 得到生长繁殖的机会, 可早期定植在受试婴儿粪便里。但是由于婴儿肠内厌氧度不足等原因, *B. catenulatum* 等不能正常生长繁殖、活菌数低, 使得传统培养方法不能检出。之后随着辅食添加及喂养方式的改变, *B. longum* 等菌种快速繁殖生长, 成人型 *B. catenulatum* 生长受到抑制, 所以 1 岁时 *B. catenulatum* 数量有所下降。近年已有研究指出阴道分娩婴儿肠道菌群组成与剖宫产婴儿肠道菌群结构显著不同, 其中大肠杆菌、拟杆菌属和长

双歧杆菌是阴道分娩婴儿肠道的优势菌群,而葡萄球菌、肠杆菌等菌群在剖宫产婴儿肠道内占主导地位^[21]。由此推测生产方式除造成婴儿肠内双歧杆菌菌群构建延迟以外,还能影响双歧杆菌菌种组成,在今后应进行更深入的研究。

本研究采用实时荧光定量 PCR 方法,相对于传统培养方法,排除培养基、培养条件、实验条件等外在因素对婴儿肠道菌群构建规律的探索的限制,更全面、准确地阐述婴儿肠道双歧杆菌构建情况及菌种组成变化情况,并通过对检测结果的全面探讨,推测其构建的影响因素。本研究检测结果更精确地显示出双歧杆菌及其不同菌种数量、定植率,检出范围更广,为 $10^5 \sim 10^{11}$ CFU/g;双歧杆菌定植早但菌量较少,菌种组成具有明显的多样性但结构异常,主要是成人型双歧杆菌出现过早,而婴儿型双歧杆菌定植时间晚、检出率低,推测婴儿生产方式及喂养方式是影响双歧杆菌构建及菌种组成的重要影响因子。

基于本研究结果,为进一步更全面地探讨婴儿肠道菌群的构建规律,应扩大研究样本量,同时结合每个婴儿除生产方式、喂养方式之外的其他情况如出生周龄、健康状况、抗生素/益生菌等食用情况进行更全面、系统的分析。

参 考 文 献

- [1] RAUTAVA S, LUOTO R, SALMINEN S, *et al.* Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(10): 565-576.
- [2] HE F, OUWEHAND AC, ISOLAURI E, *et al.* Comparison of mucosal adhesion and species identification of *bifidobacteria* isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, 30(1): 43-47.
- [3] BISGAARD H, LI N, BONNELYKKE K, *et al.* Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128(3): 646-652.
- [4] RINGEL-KULKA T, CHENG J, RINGEL Y, *et al.* Intestinal microbiota in healthy US young children and adults—a high throughput microarray analysis. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64315 [2013-05-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064315>.
- [5] NYLUND L, SATOKARI R, NIKKILÄ J, *et al.* Microarray analysis reveals marked intestinal microbiota aberrancy in infants having eczema compared to healthy children in at-risk for atopic disease. *BMC microbiology*, 2013, 13(1): 1 [2013-01-23]. <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-12>. doi: 10.1186/1471-2180-13-12.
- [6] 张红波, 陆薇, 黄娟, 等. 不同分娩方式对母乳喂养婴儿肠道菌群的影响. *临床儿科杂志*, 2010, 28(3): 251-254.

- [7] 黄永坤, 曹志琅, 杨武, 等. 出生早期新生儿肠道双歧杆菌动态检测. *临床儿科杂志*, 2010, 28(10): 938-941.
- [8] 张海波, 余加林, 艾青, 等. 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. *重庆医学*, 2012, 41(21): 2157-2159.
- [9] 张玲琳, 苗俊杰, 李鸣, 等. 婴儿早期肠道双歧杆菌构建规律的初探. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(3): 207-212.
- [10] HARMSEN HJ, WILDEBOER-VELOO AC, RAANGS GC, *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 30(1): 61-67.
- [11] LEE EK, AHN YT, HUH CS, *et al.* The early intestinal microbiota of healthy Korean newborns. *Iran J Pediatr*, 2015, 25(5): e2079 [2015-10-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4610329/>. doi: 10.5812/ijp.2079.
- [12] GRZEŠKOWIAK Ł, TEIXEIRA TFS, BIGONHA SM, *et al.* Gut *Bifidobacterium* microbiota in one-month-old Brazilian newborns. *Anaerobe*, 2015, 35 (Pt B): 54-58 [2015-07-20]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415300408>. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.07.004.
- [13] GUEIMONDE M, LAITINEN K, SALMINEN S, *et al.* Breast milk: a source of *bifidobacteria* for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 2007, 92(1): 64-66.
- [14] 茹彩旺, 秦涛, 王玲, 等. 母乳和新生儿粪便细菌与母乳性黄疸的相关性分析. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(3): 325-327.
- [15] 光岡知足. 腸内菌の世界. 東京: 叢文社, 1980: 105-112.
- [16] TURRONI F, PEANO C, PASS DA, *et al.* Diversity of *bifidobacteria* within the infant gut microbiota. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36957 [2012-05-11]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036957>.
- [17] MARTÍN V, MALDONADO-BARRAGÁN A, MOLES L, *et al.* Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact*, 2012, 28(1): 36-44.
- [18] FRANCESCA B, MARCO V, DOUWE VAN S, *et al.* Diversity, ecology and intestinal function of *bifidobacteria*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13 Suppl 1: S4 [2014-08-29]. <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-S1-S4>. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S4.
- [19] BARRETT E, DESHPANDEY AK, RYAN CA, *et al.* The neonatal gut harbours distinct *bifidobacterial* strains. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2015, 100(5): F405-F410 [2015-04-20]. <http://fn.bmj.com/content/100/5/F405.long>. doi: 10.1136/archdischild-2014-306110.
- [20] GARRIDO D, BARILE D, MILLS DA. A molecular basis for *bifidobacterial* enrichment in the infant gastrointestinal tract. *Adv Nutr*, 2012, 3(3): 415S-421S.
- [21] LIU D, YU J, LI L, *et al.* Bacterial community structure associated with elective cesarean section versus vaginal delivery in Chinese newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, 60(2): 240-246.

(2016-02-03 收稿, 2016-05-18 修回)

编辑 余琳