

申请上海交通大学硕士学位论文

儿科炎症性肠病与肠道菌群相关性研究

论文作者:	刘 嘉 奕
学 号:	116731910672
导 师:	洪莉教授
专 业:	儿科学
答辩日期:	2019 年 5 月



Submitted in total fulfillment of the requirements for the degree of Master  
in Paediatrics

# Pediatric Enterocolitis and Intestinal Microbiota

JIAYI LIU

Advisor

Prof. LI HONG

SHANGHAI CHILDREN'S MEDICAL CENTER

SCHOOL OF MEDICINE, SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

SHANGHAI, P.R.CHINA

May, 2019



# 上海交通大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：\_\_\_\_\_

日 期：\_\_\_\_\_年 \_\_\_\_月 \_\_\_\_日



## 上海交通大学 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权上海交通大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

保 密 ☐，在 \_\_\_\_\_ 年解密后适用本授权书。

不保密 ☐。

(请在以上方框内打√)

学位论文作者签名： \_\_\_\_\_

指导教师签名： \_\_\_\_\_

日 期： \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_月 \_\_\_\_日

日 期： \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_月 \_\_\_\_日





## 儿科炎症性肠病与肠道菌群相关性研究

### 摘 要

#### 第一部分 肠道菌群纵向定植模式与早产儿坏死性小肠结肠炎相关性研究

目的 详细内容

方法 详细内容

结果 详细内容

结论 详细内容...

#### 第二部分 儿科炎症性肠病与肠道菌群相关性研究

目的 详细内容

方法 详细内容

结果 详细内容

结论 详细内容...

**关键词：**肠道菌群，高通量测序, 坏死性小肠结肠炎，先天性巨结肠相关性小肠结肠炎，炎症性肠病



# **PEDIATRIC ENTEROCOLITIS AND INTESTINAL MICROBIOTA**

## **ABSTRACT**

**KEY WORDS:** Intestinal Microbiota, High-throughput Sequencing, Necrotizing Enterocolitis, Hirshsprung-Associated Enterocolitis, Inflammatory Bowel Disease



## 目 录

插图索引	VII
表格索引	VIII
算法索引	IX
缩略语中英文对照表	XI
第一章 绪论	1
1.1 人体肠道菌群及其早期定植特点	1
1.2 儿科肠道炎症性疾病与肠道菌群	2
1.2.1 坏死性小肠结肠炎与肠道菌群紊乱	2
1.2.2 先天性巨结肠，先天性巨结肠肠炎与肠道菌群紊乱	3
1.2.3 炎症性肠病与肠道菌群紊乱	4
1.3 肠道菌群研究与宏基因组学技术	5
第二章 肠道菌群纵向定植模式与早产儿坏死性小肠结肠炎相关性研究	6
2.1 测试	6
第三章 常见问题	7
全文总结	9
附录 A 综述 人体肠道菌群研究粪便样品取样与保存方法	10
附录 B 原始数据与源代码存档	16
附录 C 从 CJK- $\LaTeX$ 转向 $X_{\text{g}}\LaTeX$	17
附录 D 模板更新记录	18
参考文献	20
致 谢	26

---

攻读学位期间发表的学术论文	27
攻读学位期间参与的项目	28
简 历	29

## 插图索引

## 表格索引



## 算法索引



## 缩略语中英文对照表

缩略语	英文全称	中文全称
NEC	Necrotizing Enterocolitis	坏死性小肠结肠炎
HAEC	Hirschsprung-Associated Enterocolitis	先天性巨结肠相关性小肠结肠炎
。。	。。	。。



## 第一章 绪论

### 1.1 人体肠道菌群及其早期定植特点

肠道菌群是指定植于人或其他动物消化道内的微生物群落，人体肠道也是体内最大的免疫器官。作为人体本身和外部环境的主要界面，肠道必须保护其免收有害抗原（如毒素和病原体）的侵害，同时容纳和耐受对自身健康有益的共生细菌——这是一项艰巨的任务，因为细菌病原体和共生菌之间平衡的改变将肠道从健康的肠内稳态（intestinal homeostasis）<sup>[1]</sup> 转变为不受控制的炎症状态，这可能导致肠道本身的损伤，也可能干扰其他系统的正常生理功能，从而与多种疾病的发生发展息息相关，包括炎症性肠病（Inflammatory Bowel Disease, IBD）<sup>[2]</sup>，II 型糖尿病<sup>[3]</sup>，自闭症<sup>[4, 5]</sup> 等疾病。共生细菌为人类宿主的健康提供诸多保障，包括维持肠内稳态<sup>[6]</sup>，保护其免受外界伤害<sup>[7]</sup>，维护和支持消化功能<sup>[8]</sup>，调节肠道免疫功能<sup>[9, 10]</sup> 等。

长久以来，新生儿肠道被认为是一种无菌环境，但近年的研究证实了胎粪中的微生物群和羊水水中的潜在微生物群的相关性<sup>[11]</sup>，以及早产儿气道内的不动杆菌属（*Acinetobacter*）<sup>[12]</sup>，这表明肠道微生物的获取可能从胎儿在非无菌宫内条件下就开始了。然而，在重复这些研究结果之前，考虑到非基于培养的测序方法<sup>[13]</sup> 中细菌污染的影响以及取样时羊膜可能不完整，其结果应被谨慎考虑。

在生理条件下的胎儿肠道在出生后迅速开始获得共生微生物群；并且如前所述，该过程甚至可开始于子宫内。微生物群的初始组成来源于胎儿母亲的结肠和阴道菌群，阴道分娩的婴儿可以通过产道获得。这些微生物群包括肠杆菌（*Enterobacteriae*），肠球菌（*Enterococci*）和葡萄球菌（*Staphylococci*）<sup>[14]</sup>。更多研究表明，菌群通过胎盘转移也可能影响肠道微生物组的发育<sup>[15]</sup>。肠道微生物群的获得大致上是一个有顺序的过程，从杆菌门（*Bacilli*），再到  $\gamma$ -变形菌门（*Gammaproteobacteria*）和梭菌门（*Clostridia*），接着其余菌群的连续定植<sup>[16]</sup>。通过母乳喂养，更多益生元及其他免疫因子被引入肠道，能够后续促进肠道共生菌的生长，进一步发展和改变肠道微生物群，从而有益于婴儿<sup>[17]</sup>。与剖宫产和/或配方奶喂养的婴儿相比，纯母乳喂养和通过阴道分娩出生的足月婴儿表现出良好的肠道微生物群组成，双歧杆菌（*Bifidobacteria*）数量较多，艰难梭菌（*Clostridium difficile*）和大肠杆菌（*Escherichia coli*）数量较少<sup>[18]</sup>。

## 1.2 儿科肠道炎症性疾病与肠道菌群

在临床实践中,常见的儿科肠道炎症性疾病包括但不限于坏死性小肠结肠炎(Necrotizing Enterocolitis, NEC)、先天性巨结肠相关性小肠结肠炎(Hirschsprung-Associated Enterocolitis)和炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD);炎症性肠病又包括克罗恩病(Crohn's Disease, CD)和溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)。这些疾病严重影响患儿肠道功能,进而严重影响患儿后续生活质量,甚者可危及生命。目前,NEC、HAEC、IBD的发病机制均未明确;既往研究表明,肠道菌群紊乱与上述疾病的发病关系密切。

### 1.2.1 坏死性小肠结肠炎与肠道菌群紊乱

坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿最常见的胃肠道急症之一。它是一种以小肠黏膜缺血性坏死为特征的疾病,与重度炎症、肠道产气菌侵袭、产气侵入肠道壁和门静脉系统相关<sup>[19]</sup>。大多数坏死性小肠结肠炎患儿在发病前健康状况、生长情况和喂养情况均良好<sup>[20]</sup>。早期最常见症状表现为喂养耐受性突然变化。腹部体征包括腹胀、腹部压痛、喂养残留、呕吐(通常为胆汁)、腹泻、血便、肠内喂养管可见胆汁<sup>[21, 22]</sup>。其他非特异体征包括腹壁红斑、痉挛和硬结。非特异性系统性发现包括呼吸暂停、呼吸衰竭,嗜睡,体温不稳定。更严重者可发生由感染性休克引起的低血压,20%的NEC患儿被诊断有并发的菌血症<sup>[23]</sup>。

因已发表研究的诊断和数据收集不一致,故其发病率尚未明确<sup>[24]</sup>。在不同区间的发病率无明显差异:美国一项研究统计表明:在过去25年内NEC的发病率稳定在0.3-2.4例/1000新生儿,且常见于胎龄最小的早产儿中<sup>[25]</sup>;来自其他国家(包括加拿大、日本等)的统计研究也得出了类似的发病率结论<sup>[26]</sup>。然而,新生儿胎龄对NEC发病的影响较大——NEC在早产儿中发病率更高,且与出生体重和孕龄呈负相关:出生体重低于1000g的新生儿发病率最高(尽管不同研究显示发病率在4%-50%或更高);出生体重介于1501-2000g的新生儿,其NEC发病率急剧下降到3.8个/1000活产新生儿<sup>[27]</sup>。同样对于胎龄为35-36周的新生儿,其发病率也骤减。尽管总体上存在差异,但来自世界各地的研究数据始终表明,随着胎龄和孕周的降低,NEC发病率增加<sup>[14, 28, 29]</sup>。

近年来,尽管NEC的早期识别和积极护理治疗已显著改善其临床结果,但其发病率仍然未降低,特别在早产极低出生体重的婴儿中,其发病率依然居高不下。因而,寻找其病因并相应地采取预防措施显得尤为重要。

坏死性小肠结肠炎发病机制尚未明确,但研究表明它是多因素决定的:促炎细胞极联反映加剧的缺血和/或再灌注损伤可能起了重要作用。动物模型中的大量

实验研究结果表明, 肠道缺血, 免疫功能不成熟和免疫功能障碍的相互作用使得肠道菌群易位穿过肠黏膜屏障, 导致炎症介质, 包括白三烯, 肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF), 血小板活化因子 (Platelet Activating Factor, PAF) 扩散与腔内胆汁酸释放, 引发不同程度的肠道损伤, 并损伤引发全身受累<sup>[30, 31]</sup>。流行病学调查表明了感染作为因素之一, 包括格兰阴性菌、真菌和病毒<sup>[32-34]</sup>。

既往许多动物实验发现, 无菌 (Germ Free, GF) 小鼠模型在出生后不并发 NEC<sup>[35]</sup>, 引入正常小鼠肠道菌群后, 肠道内潘氏细胞 (Paneth cells) 受损伤, 肠道上皮细胞 (Intestinal Epithelial Cell) 的 TLR4 信号介导增强<sup>[36]</sup>。

近年来临床研究也致力于发现 NEC 的特定致病菌。有研究表明, 与对照组相比, 早发型 NEC 的患儿在发病早期, 肠道内厌氧芽孢杆菌丰度增加; 而晚发型 NEC 患儿在发病前 6 天大肠志贺杆菌 (*Escherichia shigella*) 比例增加, 发病前 3 天, 阪崎肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 显著升高<sup>[37]</sup>。美国一项大型前瞻性病例对照研究发现, 在混合模型中, NEC 的发病与肠道内革兰氏阴性厌氧杆菌  $\gamma$ -变形菌 (*Gamma-Proteobacteria*) 的丰度呈正相关, 与专性厌氧菌, 尤其是厚壁 *Negativicutes* 和梭状芽孢杆菌 (*Clostridia*) 丰度呈负相关<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 先天性巨结肠, 先天性巨结肠肠炎与肠道菌群紊乱

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HD) 是病变肠段粘膜下和肌间神经丛副交感神经节细胞缺失, 导致病变结肠持续痉挛收缩, 近端肠管扩张, 肠内容物排出受阻为特征的一种先天性肠道动力障碍性疾病。该病是小儿外科常见疾病, 占消化道畸形的第二位<sup>[38]</sup>。HD 可以经外科手术切除无神经节细胞的肠管而治愈。然而, 有高达 40% 的 HD 患儿在巨结肠根治术后仍可能罹患巨结肠小肠结肠炎 (Hirschsprung's disease associated enterocolitis, HAEC), 说明缺乏神经节细胞并非 HAEC 唯一的病因。HAEC 是 HD 最常见和最严重的并发症, 文献报道其发病率为 20%-58%, 复发率达 50%, 病死率为 1%-10%<sup>[39]</sup>。

目前 HAEC 的具体发病机制仍然未明<sup>[40]</sup>。近年来, 有研究显示, 由于先天性巨结肠肠道神经系统的紊乱可能增加肠道对特定病原菌感染和定植的敏感性, 肠道微生态失衡可能可能是 HAEC 的主要发病机制<sup>[39]</sup>。巨结肠根治术后发作的 HAEC 的治疗 (去除机械性梗阻病因后) 包括肠道休息、肠道灌洗、全身抗生素应用等, 表明肠道菌群紊乱可能是 HAEC 起病和复发的启动因素。如何在源头上明确 HAEC 致病菌, 并阻断肠道微生态失衡的恶性循环, 可能是防治 HAEC 的解决之道。

近 30 年来许多临床和动物研究致力于发现 HAEC 特定的致病菌, 尽管有一些致病菌被认为可能与 HAEC 发病有关, 如艰难梭状芽孢杆菌<sup>[41]</sup>, 大肠杆菌<sup>[42]</sup>,

轮状病毒<sup>[43]</sup>等,但迄今为止,尚无明确结论,主要原因是受限于依赖细胞培养的技术,以及肠道菌群的复杂性。由于肠道菌群数量庞大,种类繁多,有 85% 的肠道细菌无法由培养得到。有学者利用扩增 rDNA 限制性片段分析技术对一例反复发作 HAEC 的 3 岁患儿进行了纵向系列粪便(共 15 次)检测,发现 HAEC 发作与特定肠道菌群分布模式有关,并受到应用抗生素的影响<sup>[44]</sup>。

目前国际上应用宏基因组学技术研究 HAEC 肠道菌群的工作才刚刚起步。经文献检索,相关发表文章共 4 篇,其中 2 篇是本课题组的临床前期研究<sup>[45, 46]</sup>。我们在手术中提取 HAEC 和 HD 患儿不同肠道部位的粪便标本,比较其肠道菌群特点。研究中最大的发现是,HAEC 和 HD 患儿肠道菌群种类存在明显差异,而远端无神经节细胞肠道和近端有神经节细胞肠道内样本的肠道菌群种类并无明显差别。这表明,有无神经节细胞并不是影响肠道菌群组成的主要决定因素;而有无特定肠道菌群的定植可能是影响 HAEC 产生和发展的重要原因。同时,我们也发现,肠道菌群分布也跟患儿的年龄是有一定关系的,不同年龄阶段的患儿肠道微生物菌群差异明显。说明肠道菌群随着患儿年龄的改变有所不同,这也符合从新生儿出生时消化道的无菌状态到 2 岁时接近成人的总体变化规律。我们进一步研究发现,曾经罹患 HAEC 患儿在症状缓解期肠道菌群构成依然与发病时的 HAEC 患儿相似,提示导致 HAEC 发病的特定肠道菌群分布模式可能持续存在,这也可能是 HAEC 复发率高达 50% 的原因<sup>[46]</sup>。

### 1.2.3 炎症性肠病与肠道菌群紊乱

尽管儿科 IBD 的发病机制和诊断程序与成人 IBD 相似,但是前者的疾病程度较严重,病情进展较快,易发生并发症,易存在生长迟缓,营养不良等。其病因及发病机制尚不完全明确,目前认为遗传易感性、肠道菌群紊乱以及免疫应答异常对于 IBD 发病起到贡献作用<sup>[47]</sup>。

近期,越来越多的研究支持肠道菌群紊乱在 IBD 发病中的作用。厚壁菌门(*Firmitutes*),尤其是 *Firmitutes prausnitzii* 在克罗恩病患者的粪便中丰度减少<sup>[48]</sup>;另外黏附侵袭性大肠杆菌(adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC)和副结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*) 在 IBD 发病中作用也相对显著。在 2012 年, AIEC 的 EC15 和 EC10 菌株被首次发现于 IBD 患儿肠道炎症组织中<sup>[49]</sup>;在体外试验中, AIEC 在肠道上皮细胞中的复制增值能力很强,可以诱导肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  分泌,与克罗恩病患者回肠黏膜病变相关<sup>[50]</sup>。与健康人相比,克罗恩病患儿肠道内真菌紊乱较为明显,表现为担子菌门(*Basidiomycota*):子囊菌门(*Ascomycota*)比例降低,以及白色念珠菌(*Candida albicans*)丰度增



高<sup>[51]</sup>。

### 1.3 肠道菌群研究与宏基因组学技术

宏基因组学技术是指通过直接从样品中提取全部微生物的 DNA，构建文库并筛选，利用基因组学的研究策略来研究样品中所包含的全部遗传组成和功能。由于菌群中的大部分微生物尚且被认为“无法培养”，并且传统上认为通过纯培养的方式难以进行微生物进行研究，因此宏基因组方法的出现使研究人员能够通过 DNA 测序和异源宿主中宏基因组 DNA 的功能表达，以与培养无关的方式获取和研究这些微生物。宏基因组学揭示了非凡的多样性和新颖性，不仅在微生物群落本身，而且在这些微生物的基因组中。宏基因组分析可涉及基于序列或功能的方法（或两者的组合）。DNA 测序技术的不断改进以及成本的大幅降低使得宏基因组学领域的发展迅速。

宏基因组学方法实现了大量关于人体内微生物群在人类健康和疾病中的研究。例如：利用红基因组测序技术，Belizario 等开辟了基于微生物组治疗方法的新领域，包括噬菌体疗法和 CRISPR 技术的使用，粪菌移植技术（Fecal Microbial Transplantation, FMT）治疗艰难梭菌感染（Clostridia difficile Infection, CDI）等<sup>[52]</sup>。通过宏基因组测序分析川崎病（Kawasaki Disease, KD）患者的肠道菌群信息，并揭示了链球菌属丰度增加在其发病急性期所发挥的作用<sup>[53]</sup>。

基于序列的宏基因组学研究向我们提供了越来越多关于微生物群落组成，结构和功能能力的新认识和新见解。宏基因组学已经成功地用于鉴定许多新的基因，蛋白质和次级代谢物，例如具有工业，生物技术，药物和医学相关性的抗生素。测序技术，表达载体，替代宿主系统和新型筛选试验的未来改进和发展将有助于通过揭示新的分类学和遗传多样性进一步推动该领域。通过研究曾经无法深入探索的和未发现的微生物基因组学、生理学、进化生态学，无疑证明了宏基因组学方法的实用性和可靠性，也说明其将来将揭示从基因到物种的更多的创新和多样发现。

综上，本研究使用 Illumina Miseq 深度测序平台对 NEC、HD 和 HAEC 及 IBD 患儿的肠道菌群进行测序比对研究，藉以全面深度探索 NEC 患儿肠道菌群纵向分布特点，并比较 NEC，HD，HAEC 以及 IBD 患儿肠道菌群定制模式的差异和相似性，揭示特定菌群定植模式或者致病菌在其四种儿科炎症性疾病发病中以及 NEC 和 HAEC 所扮演的角色。另外，本研究对人体肠道菌群研究中取样和保存方法对于研究结果的影响及重要性进行综述。

## 第二章 肠道菌群纵向定植模式与早产儿坏死性小肠结肠炎相关性研究

### 2.1 测试

### 第三章 常见问题

**Q: 我是否能够自由使用这份模板?**

A: 这份模板以 Apache License 2.0 开源许可证发布, 请遵循许可证规范。

**Q: 我的论文是 Word 排版的, 学校图书馆是不是只收 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 排版的论文?**

A: 当然不是, Word 版论文肯定收。

**Q: 我的论文是 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 排版的, 学校图书馆是不是只收 Word 排版的论文?**

A: 当然不是, PDF 版的电子论文是可以上交的。是否要交 Word 版就看你导师的喜好了。

**Q: 为什么屏幕上显示的左右页边距不一样?**

A: 模板默认是双面打印, 迎面页和背面页的页边距是要交换的, 多出来的那一部分是留作装订的。

**Q: 为什么在参考文献中会有 “//” 符号?**

A: 那就是国标 GB/T 7714 参考文献风格规定的。但可以使用 `gbpunctin=false` 选项将其还原成 `in:`, 进一步可以在导言区加入 `\DefineBibliographyStrings{english}{in=}` 将其去掉。

**Q: 为什么参考文献中会有 [s.n.], [S.I], [EB/OL] 等符号?**

A: 那也是国标 GB/T 7714 参考文献风格定义的。[s.n.] 表示出版者不详, [S.I] 表示出版地不详, [EB/OL] 表示引用的参考文献类型为在线电子文档。但可以使用 `gbpub=false` 选项将其缺省补充的出版项 [s.n.] 等去掉。也可以使用选项 `gb-type=false` 将参考文献类型标识去掉。

**Q: 如何获得帮助和反馈意见?**

A: 你可以通过在 github 上开 issue、在水源 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 版发帖反映你使用过程中遇到的问题。

**Q: 使用文本编辑器查看 tex 文件时遇到乱码?**

A: 请确保你的文本编辑器使用 UTF-8 编码打开了 tex 源文件。

**Q: 在 C<sub>T</sub>E<sub>X</sub> 编译模板遇到 “rsfs10.tfm already exists” 的错误提示?**

A: 请删除 `X:\CTEX\UserData\fonts\tfm\public\rsfs` 下的文件再重新编译。问题讨论见水源 2023 号帖。

**Q: 升级了 TeX Live 2012, 编译后的文档出现 “minus” 等字样?**

A: 这是 `xltextra` 和 `fontspec` 宏包导致的问题。学位论文模板从 0.5 起使用 `metatlog` 宏包代替 `xltextra` 生成 X<sub>Y</sub>L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 标志, 解决了这个问题。

**Q: 为什么在 bib 中加入的参考文献，没有在参考文献列表中出现？**

A: bib 中的参考文献条目，常通过\cite 或\parencite 或\supercite 或\textcite 等命令在正文中引用进而加入到参考文献列表中。当需要将参考文献条目加入到文献表中但又不引用可以使用\nocite 命令，当 nocite 参数为 \* 时则引入 bib 中的所有文献。

**Q: 我可以使用 Sublime Text 编写学位论文吗？**

A: 可以。首先下载并安装 Sublime Text，然后安装 Package Control，之后按ctrl+shift+p 或者cmd+shift+p 调出命令窗口，输入install，选择 *Package Control: Install Package*，按回车，稍等片刻，等待索引载入后会弹出选项框，输入LaTeXTools 并回车，即可成功安装插件。之后只需要打开.tex 文件，按ctrl+b 或者cmd+b 即可编译，如有错误，双击错误信息可以跳转到出错的行。

**Q: 在 macTex 中，为什么 pdf 图片无法插入？**

A: 如果报错是“pdf: image inclusion failed for “./figure/chap2/sjtulogo.pdf”.”，则采取以下步骤

代码 3-1 编译模板

```
brew install xpdf
wget http://mirrors.ctan.org/support/epstopdf.zip
unzip epstopdf.zip
cp epstopdf/epstopdf.pl /usr/local/bin/
cd figure/chap2
pdftops sjtulogo.pdf
epstopdf sjtulogo.ps
pdfcrop sjtulogo.pdf
mv sjtulogo.pdf backup.pdf
mv sjtulogo-crop.pdf sjtulogo.pdf
```

**Q: 为什么维普等查重系统无法识别此模板生成的 pdf 内所有的中文？**

A: 中文无法识别的情况多半是由于使用了 ShareLaTeX 的原因，请尝试使用 TexStudio 等软件在本地进行编译。如果使用 TeXstudio 请在 Preferences-Build 中将 Default Compiler 和 Default Bibliography Tool 分别改为 XeLaTeX 和 Biber。

**Q: 如何向你致谢？**

A: 烦请在模板的github 主页点击“Star”，我想粗略统计一下使用学位论文模板的人数，谢谢大家。非常欢迎大家向项目贡献代码。

## 全文总结

这里是全文总结内容。

2015 年 2 月 28 日，中央在北京召开全国精神文明建设工作表彰暨学雷锋志愿服务大会，公布全国文明城市（区）、文明村镇、文明单位名单。上海交通大学荣获全国文明单位称号。

全国文明单位这一荣誉是对交大人始终高度重视文明文化工作的肯定，是对交大长期以来文明创建工作成绩的褒奖。在学校党委、文明委的领导下，交大坚持将文明创建工作纳入学校建设世界一流大学的工作中，全体师生医护员工群策群力、积极开拓，落实国家和上海市有关文明创建的各项要求，以改革创新、科学发展为主线，以质量提升为目标，聚焦文明创建工作出现的重点和难点，优化文明创建工作机制，传播学校良好形象，提升社会美誉度，显著增强学校软实力。2007 至 2012 年间，上海交大连续三届荣获“上海市文明单位”称号，成为创建全国文明单位的新起点。

上海交大自启动争创全国文明单位工作以来，凝魂聚气、改革创新，积极培育和践行社会主义核心价值观。坚持统筹兼顾、多措并举，将争创全国文明单位与学校各项中心工作紧密结合，着力构建学校文明创建新格局，不断提升师生医护员工文明素养，以“冲击世界一流大学汇聚强大精神动力”为指导思想，以“聚焦改革、多元推进、以评促建、丰富内涵、彰显特色”为工作原则，并由全体校领导群策领衔“党的建设深化、思想教育深入、办学成绩显著、大学文化丰富、校园环境优化、社会责任担当”六大板块共 28 项重点突破工作，全面展现近年来交大文明创建工作的全貌和成就。

进入新阶段，学校将继续开拓文明创建工作新格局，不断深化工作理念和工作实践，创新工作载体、丰富活动内涵、凸显创建成效，积极服务于学校各项中心工作和改革发展的大局面，在上级党委、文明委的关心下，在学校党委的直接领导下，与时俱进、开拓创新，为深化内涵建设、加快建成世界一流大学、推动国家进步和社会发展而努力奋斗！

上海交通大学医学院附属仁济医院也获得全国文明单位称号。

## 附录 A 综述 人体肠道菌群研究粪便样品取样与保存方法

### Sampling and Storage Methods of Fecal samples in human intestinal microbiome study

刘嘉奕（综述） 洪莉（审校）

**摘要** 随着高通量测序技术（next generation sequencing, NGS）的飞速发展，肠道菌群得以被更深入的研究。肠道内容物和粪便样品有着取样便捷、代表性强等特点，因此常被作为肠道菌群研究中的主要研究对象；而样品的收集和保存方法很大程度上影响其内部菌群结构和多样性，从而决定了后续测序分析的准确性。该文将就现今常用的肠道菌群研究中粪便样品的取样和保存方法进行综述。

**关键词** 肠道菌群；高通量测序；肠道内容物；粪便；取样

**基金项目** 国家自然科学基金（项目编号 81771630）

**Abstract** With the rapid development of high-throughput sequencing (NGS) technique, intestinal microbiome could be studied more deeply. Intestinal contents and fecal samples have the characteristics of convenient sampling and strong representation, so they are often used as the main research objects in the study of intestinal microbiota. The method of collecting and storage of samples are very important to affect the internal flora structure and diversity, which determines the accuracy of subsequent sequencing analysis. This review summarizes the sampling and storage methods of fecal samples in the study of intestinal microbiome.

**Key Words** Intestinal Microbiome; High Throughput DNA Sequencing; Intestinal Contents; Feces; Specimen Collection

**Fundings** National Natural Science Foundation of China (Project No. 81771630)

肠道菌群是广泛存在于人类和其他动物（包括昆虫）的肠道中的微生物所组成的复杂群落；在正常人体肠道中，存在至少 1000 种菌种。肠道菌群宏基因组是肠道菌群的所有基因组的总和，它包含了超过三百万个基因 [1]。肠道与人体内其他部位相比，细菌数量最多、物种丰度最高 [2]

越来越多的研究表明，人体肠道菌群的早期定植、构成、转换模式、代谢特点和免疫应答模式与肥胖、糖尿病、炎症性肠病、自闭症等多种疾病的发生与发展相关 [3-4]。因此，肠道菌群研究对于疾病发病机制及临床防治的重要性不言而喻。

粪便和肠内容物有采样便捷、样品易获取和代表性强等优势，因此常被选择作为肠道菌群取样的来源 [1,5-6]。随着高通量测序技术（Next Generation Sequencing, NGS）的推广和普及，相比以往基于细菌培养的分析手段，肠道菌群的组成得以更准确、更全面、更高效地分析 [7-8]。然而，测序方法有着一定的敏感性，而不适当的样品采集或储存易导致实验结果的偏差，因此分析结果的准确性很大程度上取决于样品在 DNA 提取之前的完整性和稳定性。例如，反复冻融过程中形成的冰晶体会促使细胞破裂，导致 DNA 损伤和细胞凋亡，影响后续测序分析结果 [9]。为保护粪便样品 DNA 和 RNA 所采取的防护措施，应以维持细胞膜稳定、保持基因活性和微生物多样性稳定为前提。近年来，一些研究比较了测序前的样品收集和制备方法对于测序和分析结果的影响。本文就现今常用的肠道菌群研究中粪便样品的取样和保存方法进行综述，以期能为肠道菌群研究提供方法学参考。

## A.1 粪便样品取样与保存常用方法

目前，粪便样品的统一取样与保存方法“标准操作规则”尚未统一；人类微生物组计划（Human Microbiome Project, HMP）提供的标准流程和国际人类微生物组标准（International Human Microbiome Standards, IHMS）项目提供的取样标准操作规程被作为现今肠道菌群研究的常用方法 [10-13]。

### A.1.1 HMP 标准流程（HMP Core Microbiome Sampling, Protocol A）

#### A.1.2 样品采集方法

获得患者（或监护人）的理解与许可并签署知情同意书。准备干冰盒、无菌手套、无菌塑料铲、无菌采样管。带无菌手套，使用无菌塑料勺，收集粪便或肠内容物样品（约 1g）于无菌采样管内，样本进行编号后立刻放入干冰盒中 [14]。

#### A.1.3 样品保存条件

反复冻融后冰晶会微生物细胞破裂、DNA 裂解，故应尽量立即提取样品 DNA。若无立即提取 DNA 的条件，则应在样品置于干冰盒后 30 min 内，将其转移至冻存管内，并于-80条件下冻存。若样品后续需提取 RNA，则应在每 500l 样品中加入 1ml RNeasy lysis buffer<sup>®</sup> (Qiagen, Inc., RNeasy lysis buffer) 稳定液，转移至冻存管内，于-80条件下冻存 [14]。

#### A.1.4 IHMS 标准操作规程 (IHMS Sample Collection and Handling SOPs)

#### A.1.5 样品采集方法

同 B.0.1.1.1[15]。

#### A.1.6 样品保存条件

样品需在采集后 7 天内送至实验室或冻存 [15]。

1. 若样品能够在采集后 4 小时内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则可将其室温储存并立即运输。若样品能够在采集后 4~24 小时内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则需在室温条件下使用 Anaerocult® 厌氧培养袋储存样品并尽快送至实验室。
2. 若样品能够在采集后 1~7 天内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则需将其置于干冰盒内, 或加入相应稳定液, 并使用 Anaerocult® (Merck Millopore, Germany) 厌氧培养袋储存, 7 天内转移至-80条件下冻存。

(1) 若样品能够在采集后 4 小时内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则可将其室温储存并立即运输。若样品能够在采集后 4~24 小时内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则需在室温条件下使用 Anaerocult® 厌氧培养袋储存样品并尽快送至实验室。(2) 若样品能够在采集后 1~7 天内送至实验室进行 DNA 或 RNA 提取, 则需将其置于干冰盒内, 或加入相应稳定液, 并使用 Anaerocult® (Merck Millopore, Germany) 厌氧培养袋储存, 7 天内转移至-80条件下冻存。[SM6] [LJ7]

### A.2 粪便样品取样方法对实验结果的影响

由于环境和(或)实验条件的限制, 肠道菌群研究中的取样方法可能并非完全遵守上述取样标准; 收集替代样品、取样温度的差异和使用试剂的不同等多种因素均可能对研究结果产生影响。以下总结不同粪便取样方法对于后续测序分析结果的影响。

#### A.2.1 取样时间

应在粪便排出后 2 h 内尽快取样, 防止需氧菌和兼性厌氧菌过度生长, 导致菌群丰度产生偏移 [15]。对于使用尿布的小儿患者, 应每隔 0.5~1 h 检测是否排便以便尽快取样 [16], 防止因局部温度过高导致的菌群生长抑制或过度生长导致后续分析结果偏倚 [17]。



### A.2.2 选择替代样品

当粪便或肠内容物样品难以获得时,可以选择收集结肠灌洗液作为替代样品。一项纳入了 23 例成年人粪便标本的研究显示,结肠灌洗液菌群的多样性(包括 OTU 多样性和均匀性)和菌门相对丰度均与肠道黏膜样品菌群类似 [18]。

### A.2.3 取样人员

当研究需纳入多地区、大样本或按时间顺序纵向进行取样时,因人力有限,有时要求研究对象代替研究人员自行取样,即研究对象自行在病房或家中收集粪便样品,再将其送至或邮寄至研究机构 [19]。研究对象自行取样时,往往缺乏存放样品所使用的干冰盒等条件;Nechvatal 等 [20] 研究显示,自行取样和邮寄时温度等因素会影响样品后续的分析结果。为避免分析结果偏移,应尽量选择使用方法简便的试剂盒进行取样,该研究推荐自行取样后立即置入 RNeasy (Qiagen, Austin, TX) 稳定剂(每 0.2 g 粪便样品使用 1mL RNeasy 试剂),再进行样品运输,其测序分析结果多样性、多样性和 OTU 数目等未产生较大偏移,变异性较小。因此,这种方法较适用于基于大样本量的肠道菌群流行病学研究。

### A.2.4 取样次数

通过多次取样,可以降低由方法学带来的相对误差。Gorzelak 等 [21] 研究表明,对于同一研究对象的同一样品在相同取样条件下进行多次取样,再将各样品通过液氮冷冻形成细微粉末进行均质化后,测序分析得到的细菌类群丰度在各样品间的差异显著降低。部分原因是由于液氮速冻能够直接形成玻璃态,避免冰晶形成对微生物细胞内 DNA 造成的机械性损伤 [22]。

### A.2.5 采样后、保存前所使用的试剂

由于取样条件的限制,样品取得后可能无法立即置于干冰盒内,或在干冰盒内放置时间超过 30 min,而样品所处的温度条件、氧气含量和稳定剂的使用皆可能对研究结果产生不同的影响 [19,21]。Wu 等 [23] 研究表明,若取样后不加入稳定剂,放置于-4℃环境中 48 h,后置于-80℃条件下冻存,其菌群结构和多样性的变异与取样后立即于-80℃条件下冻存样品无显著差异;若取样后加入 PSP6 (Invitex GmbH, Germany) 缓冲液并置于室温下 48 h,再冻存于-80℃条件下,则厚壁菌门的少部分菌属丰度有所增加。同样,若样品在-80℃条件下冻存前,于室温下放置 24 h 或更短时间,其后续测序结果相比取样后立即于-80℃冻存的样品仍未产生较大变异 [24]。然而,也有研究显示,取样后置于室温下 15~30 min 后,样品内厚壁菌门丰

度增加、拟杆菌门丰度降低；而取样后若样品置于家用无霜冰箱（温度范围-20~-2）超过 3 d，其拟杆菌门丰度开始显著降低，双歧杆菌属、乳杆菌属和肠杆菌属丰度均显著降低 [21]。若取样后的低温放置条件尚难达到，可以使用 RNeasy (Ambion, Austin, TX) 等稳定剂于室温下保存。关于各种稳定剂对于菌群样品的维持作用，一项纳入了 52 例成年人的研究报道，使用 95% 酒精作为稳定剂的样品，其多样性与立即冻存样品相比稍有降低，而使用粪便免疫化学试剂管收取或加入 RNeasy 稳定剂等样品，其内部多样性值和各菌群丰度（变形菌门和拟杆菌门为主）并未发现显著改变 [25]。另外，此研究与另一研究均提示，使用粪便隐血试卡 FOBT Hemoccult Sensa (Beckman Coulter Brea, CA) 取样并在常温下放置于 Ep 管内超过 3 d 的样品相比立即于-80冻存的样品，其菌群多样性及各菌门的丰度均无明显差异，因此 FOBT 收集样品适合用于需要进行远距离邮寄的样品研究 [25-26]。

### A.3 粪便样品不同保存方法对研究结果的影响

以往多数研究表明，储存粪便样品的条件只会轻度影响其微生物群落的结构。Shaw 等 [16] 研究表明，若样品收集后存放于-80条件保存长达 2 年，其菌群分布只产生了微小变化——乳杆菌和芽孢杆菌丰度略有降低，而多样性和总 OTU 计数略减少，但无统计学意义。另外，Choo 等 [27] 比较了分别于室温、4条件和-80条件保存的样品，以-80条件为标准，后两者样品多样性值和各菌群丰度等分析未产生显著性差异，而室温下保存的样品的放线菌门双歧杆菌属的丰度显著降低。于-20条件下冻存样品相比取样后立即提取 DNA 并扩增的样品，其厚壁菌门：拟杆菌门比值升高 [28]。样品在室温环境下保存时间的长短对于样品微生物组成以及菌群多样性仍然存在争议 [17,29-30]。此外，现有的一些菌群样品保存的试剂具有较好的技术可重复性，也能够较好的在室温条件下维持菌群稳定性，其中包括 OMNIgeneGUT (DNA Genotek, Inc. Ottawa, CAN)，和上文提到的 RNeasy (Ambion, Austin, TX) 以及硫氰酸胍溶液 [29] 等。

### A.4 总结

肠道菌群的研究很大程度上依赖粪便和肠内容物样品的采集。随着对肠道菌群研究的发展，亟须能够直接比较不同数据集之间结果的标准操作流程。然而，目前对于人体肠道菌群研究中的粪便样品的采集与保存方法尚未有统一的“金标准”。因此，亟须优化并标准化收集程序和储存条件，从而减缓样品中的 DNA 降解、减少微生物分析中的变异，便于比较不同研究结果。在未来的研究中还应纳入更多

实验样品，将人口学特征和疾病状态纳入实验设计，确定最优化的操作规则，为后续的测序及分析研究提供便利。

## 附录 B 原始数据与源代码存档

### B.1 原始测序数据存档

坏死性小肠结肠炎 (NEC) 肠道菌群 MiSeq 测序原始数据 儿科炎症性肠病肠道菌群 MiSeq 测序原始数据

### B.2 论文相关源代码和原始图标存档

源代码<sup>1</sup> 尝试引用<sup>[1]</sup>

原始图片和表格

---

<sup>1</sup>本论文使用 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 编译生成

## 附录 C 从 CJK- $\LaTeX$ 转向 $X_{\LaTeX}$

我习惯把 v0.2a 使用 `dvipdfmx` 编译的硕士学位论文模板称为“CJK- $\LaTeX$  模板”，而这个使用  $X_{\LaTeX}$  引擎 (`xelatex` 程序) 处理的模板则被称为“ $X_{\LaTeX}/\LaTeX$  模板”。从 CJK- $\LaTeX$  模板迁移到  $X_{\LaTeX}/\LaTeX$  模板的好处有下：

- ☺ 搭建  $X_{\LaTeX}$  环境比搭建 CJK- $\LaTeX$  环境更容易；
- ☺ 更简单的字体控制；
- ☺ 完美支持 PDF/EPS/PNG/JPG 图片，不需要“`bound box(.bb)`”文件；
- ☺ 支持 OpenType 字体的复杂字型变化功能；

当然，这也是有代价的。由于  $X_{\LaTeX}$  比较新，在我看来，使用  $X_{\LaTeX}$  模板所必须付出的代价是：

- ☺ 必须把你“古老的” $\TeX$  系统更新为较新的版本。TeXLive 2012 和 CTeX 2.9.2 能够编译这份模板，而更早的版本则无能为力。
- ☺ 需要花一些时间把你在老模板上的工作迁移到新模板上。

第一条就看你如何取舍了，新系统通常意味着更好的兼容性，值得升级。而转换模板也不是什么特别困难的事情，可以这样完成：

1. 备份你要转换的源文件，以防你的工作成果丢失；
2. 将你原来的 `tex` 以及 `bib` 文件另存为 UTF-8 编码的文件。`iconv`、`vim`、`emacs`、`UEdit` 等等工具都可以完成。`WinEdt` 对文件编码识别功能很差 (到了 v6.0 还是如此)，不推荐作为字符编码转换工具；
3. 将 `diss.tex` 导言区中的内容替换为  $X_{\LaTeX}$  模板 `diss.tex` 导言区的内容；
4. 将你对原先导言区的修改，小心翼翼地合并到新的导言区中；
5. 使用  $X_{\LaTeX}$  模板中的 `GBT7714-2005NLang.bst` 替换原有的 `bst` 文件，新的 `bst` 文件只是将字符编码转换为 UTF-8；
6. 删除 `bouding box` 文件；
7. 使用本文??介绍的方法，重新编译文档；

## 附录 D 模板更新记录

**2018 年 1 月 v0.10** 发布, 项目转移至 SJTUG 名下, 并增加了英文模版, 修改了默认字体设置。

**2016 年 12 月 v0.9.5** 发布, 改用 GB7714-2015 参考文献风格。

**2016 年 11 月 v0.9.4** 发布, 增加算法和流程图。

**2015 年 6 月 19 日 v0.9** 发布, 适配 ctex 2.x 宏包, 需要使用 TeXLive 2015 编译。

**2015 年 3 月 15 日 v0.8** 发布, 使用 biber/biblatex 组合替代 BibTeX, 带来更强大稳定的参考文献处理能力; 添加 enumitem 宏包增强列表环境控制能力; 完善宏包文字描述。

**2015 年 2 月 15 日 v0.7** 发布, 增加盲审选项, 调用外部工具插入扫描件。

**2015 年 2 月 14 日 v0.6.5** 发布, 修正一些小问题, 缩减 git 仓库体积, 仓库由 sjtu-thesis-template-latex 更名为 SJTUThesis。

**2014 年 12 月 17 日 v0.6** 发布, 学士、硕士、博士学位论文模板合并在了一起。

**2013 年 5 月 26 日 v0.5.3** 发布, 更正 subsection 格式错误, 这个错误导致如"1.1 小结" 这样的标题没有被正确加粗。

**2012 年 12 月 27 日 v0.5.2** 发布, 更正拼写错误。在 diss.tex 加入 ack.tex。

**2012 年 12 月 21 日 v0.5.1** 发布, 在 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 命令和中文字符之间留了空格, 在 Makefile 中增加 release 功能。

**2012 年 12 月 5 日 v0.5** 发布, 修改说明文件的措辞, 更正 Makefile 文件, 使用 metalog 宏包替换 xltextra 宏包, 使用 mathtools 宏包替换 amsmath 宏包, 移除了所有 CJKtilde(~) 符号。

**2012 年 5 月 30 日 v0.4** 发布, 包含交大学士、硕士、博士学位论文模板。模板在github上管理和更新。

**2010 年 12 月 5 日 v0.3a** 发布, 移植到 X<sub>Y</sub>L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X/L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 上。

**2009 年 12 月 25 日 v0.2a** 发布, 模板由 CASthesis 改名为 sjtumaster。在 diss.tex 中可以方便地改变正文字号、切换但双面打印。增加了不编号的一章“全文总结”。添加了可伸缩符号(等号、箭头)的例子, 增加了长标题换行的例子。

**2009 年 11 月 20 日 v0.1c** 发布, 增加了 Linux 下使用 ctex 宏包的注意事项、.bib 条目的规范要求, 修正了 ctexbook 与 listings 共同使用时的断页错误。

**2009 年 11 月 13 日 v0.1b** 发布，完善了模板使用说明，增加了定理环境、并列子图、三线表格的例子。

**2009 年 11 月 12 日**上海交通大学硕士学位论文 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 模板发布，版本 0.1a。

## 参考文献

- [1] COLLIER-HYAMS L, NEISH A. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(12): 1339–48.
- [2] NI J, WU G D, ALBENBERG L, et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation?[J]. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2017, 14(10): 573.
- [3] HARSCH I, KONTUREK P. The role of gut microbiota in obesity and Type 2 and Type 1 diabetes mellitus: new insights into “old” diseases[J]. *Medical Sciences*, 2018, 6(2): 32.
- [4] De THEIJE C G, WOPEREIS H, RAMADAN M, et al. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders[J]. *Brain, behavior, and immunity*, 2014, 37: 197–206.
- [5] DE ANGELIS M, PICCOLO M, VANNINI L, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified[J]. *PloS one*, 2013, 8(10): e76993.
- [6] HOOPER L V, GORDON J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. *Science*, 2001, 292(5519): 1115–1118.
- [7] RAKOFF-NAHOUM S, PAGLINO J, ESLAMI-VARZANEH F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis[J]. *Cell*, 2004, 118(2): 229–241.
- [8] GUARNER F, BOURDET-SICARD R, BRANDTZAEG P, et al. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited[J]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2006, 3(5): 275.
- [9] ROUND J L, MAZMANIAN S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature reviews immunology*, 2009, 9(5): 313.



- [10] ABREU M T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(2): 131.
- [11] ARDISSONE A N, DIOMEL M, DAVIS-RICHARDSON A G, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth[J]. *PloS one*, 2014, 9(3): e90784.
- [12] LOHMANN P, LUNA R A, HOLLISTER E B, et al. The airway microbiome of intubated premature infants: characteristics and changes that predict the development of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatric research*, 2014, 76(3): 294.
- [13] PENNISI E. Our egalitarian eden. 2014.
- [14] BÄCKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915–1920.
- [15] AAGAARD K, MA J, ANTONY K, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6: 237ra65. 2014.
- [16] LA ROSA P S, WARNER B B, ZHOU Y, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(34): 12522–12527.
- [17] OUWEHAND A C, DERRIEN M, de VOS W, et al. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2005, 16(2): 212–217.
- [18] DEMEHRI F R, HALAWEISH I F, CORAN A G, et al. Hirschsprung-associated enterocolitis: pathogenesis, treatment and prevention[J]. *Pediatric surgery international*, 2013, 29(9): 873–881.
- [19] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 364(3): 255–264.
- [20] HÄLLSTRÖM M, KOIVISTO A.-M, JANAS M, et al. Laboratory parameters predictive of developing necrotizing enterocolitis in infants born before 33 weeks of gestation[J]. *Journal of pediatric surgery*, 2006, 41(4): 792–798.
- [21] WALSH M, KLIEGMAN R, FANAROFF A. Necrotizing enterocolitis: a practitioner's perspective.[J]. *Pediatrics in Review*, 1988, 9(7): 219–226.

- [22] YU V, HOLLINGSWORTH E. Improving prognosis for infants weighing 1000 g or less at birth.[J]. Archives of disease in childhood, 1980, 55(6): 422–426.
- [23] KLIEGMAN R, FANAROFF A. Necrotizing enterocolitis[J]. New England Journal of Medicine, 1984, 310(17): 1093–1103.
- [24] ZANI I A, STEPHEN S L, MUGHAL N A, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease[J]. Cells, 2015, 4(2): 178–201.
- [25] PICKARD S S, FEINSTEIN J A, POPAT R A, et al. Short-and long-term outcomes of necrotizing enterocolitis in infants with congenital heart disease[J]. Pediatrics, 2009, 123(5): e901–e906.
- [26] KAWASE Y, ISHII T, ARAI H, et al. Gastrointestinal perforation in very low-birthweight infants[J]. Pediatrics International, 2006, 48(6): 599–603.
- [27] STOLL B J, HANSEN N I, BELL E F, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012[J]. Jama, 2015, 314(10): 1039–1051.
- [28] REES C M, EATON S, PIERRO A. National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units[J]. Journal of pediatric surgery, 2010, 45(7): 1391–1397.
- [29] YEE W H, SORAISHAM A S, SHAH V S, et al. Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants[J]. Pediatrics, 2012: peds–2011.
- [30] GOOD M, SODHI C P, EGAN C E, et al. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor[J]. Mucosal immunology, 2015, 8(5): 1166.
- [31] MILLER M J, WITHERLY S A, CLARK D A. Casein: a milk protein with diverse biologic consequences[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1990, 195(2): 143–159.
- [32] De la COCHETIÈRE M.-F, PILOQUET H, des ROBERT C, et al. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium[J]. Pediatric research, 2004, 56(3): 366.

- [33] HODZIC Z, BOLOCK A M, GOOD M. The role of mucosal immunity in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. *Frontiers in pediatrics*, 2017, 5: 40.
- [34] DENNING T L, BHATIA A M, KANE A F, et al. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response[C] // *Seminars in perinatology*. Vol. 41. 1. Elsevier. [S.l.]: [s.n.], 2017: 15–28.
- [35] ROZENFELD R A, LIU X, DEPLAEN I, et al. Role of gut flora on intestinal group II phospholipase A2 activity and intestinal injury in shock[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001, 281(4): G957–G963.
- [36] WHITE J R, GONG H, POPE B, et al. Paneth cell disruption-induced necrotizing enterocolitis requires live bacteria and occurs independent of TLR4 signaling[J]. *Disease models & mechanisms*, 2017: dmm–028589.
- [37] ZHOU Y, SHAN G, SODERGREN E, et al. Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: a case-control study[J]. *PloS one*, 2015, 10(3): e0118632.
- [38] LANGER J C, MINKES R K, MAZZIOTTI M V, et al. Transanal one-stage Soave procedure for infants with Hirschsprung’s disease[J]. *Journal of pediatric surgery*, 1999, 34(1): 148–152.
- [39] FRYKMAN P K, SHORT S S. Hirschsprung-associated enterocolitis: prevention and therapy[C] // *Seminars in pediatric surgery*. Vol. 21. 4. Elsevier. [S.l.]: [s.n.], 2012: 328–335.
- [40] AUSTIN K M. The pathogenesis of Hirschsprung’s disease-associated enterocolitis[C] // *Seminars in pediatric surgery*. Vol. 21. 4. Elsevier. [S.l.]: [s.n.], 2012: 319–327.
- [41] THOMAS D, MALONE M, FERNIE D, et al. Association between *Clostridium difficile* and enterocolitis in Hirschsprung’s disease[J]. *The Lancet*, 1982, 319(8263): 78–79.
- [42] THOMAS D, FERNIE D, BAYSTON R, et al. Enterocolitis in Hirschsprung’s disease: a controlled study of the etiologic role of *Clostridium difficile*[J]. *Journal of pediatric surgery*, 1986, 21(1): 22–25.

- [43] WILSON-STOREY D, SCOBIE W, MCGENITY K. Microbiological studies of the enterocolitis of Hirschsprung's disease.[J]. Archives of disease in childhood, 1990, 65(12): 1338–1339.
- [44] DE FILIPPO C, PINI-PRATO A, MATTIOLI G, et al. Genomics approach to the analysis of bacterial communities dynamics in Hirschsprung's disease-associated enterocolitis: a pilot study[J]. Pediatric surgery international, 2010, 26(5): 465–471.
- [45] YAN Z, POROYKO V, GU S, et al. Characterization of the intestinal microbiome of Hirschsprung's disease with and without enterocolitis[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 445(2): 269–274.
- [46] LI Y, POROYKO V, YAN Z, et al. Characterization of Intestinal microbiomes of Hirschsprung's disease patients with or without enterocolitis using Illumina-MiSeq high-throughput sequencing[J]. PloS one, 2016, 11(9): e0162079.
- [47] LIANG J, SHA S M, WU K C. Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases[J]. Journal of digestive diseases, 2014, 15(12): 641–646.
- [48] MOSCA A, LECLERC M, HUGOT J P. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem?[J]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 455.
- [49] NEGRONI A, COSTANZO M, VITALI R, et al. Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease[J]. Inflammatory bowel diseases, 2011, 18(5): 913–924.
- [50] O'BRIEN C L, BRINGER M.-A, HOLT K E, et al. Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli[J]. Gut, 2017, 66(8): 1382–1389.
- [51] SOKOL H, LEDUCQ V, ASCHARD H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD[J]. Gut, 2017, 66(6): 1039–1048.
- [52] BELIZÁRIO J E, NAPOLITANO M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches[J]. Frontiers in microbiology, 2015, 6: 1050.

- [53] KINUMAKI A, SEKIZUKA T, HAMADA H, et al. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis[J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 824.

## 致 谢

昔人有云：人生天地间，如白驹过隙，忽然而已。吾深以为然：求学儿医，倏然已三载；个中滋味，耐人咀嚼；值此论文成文之际，感慨万千；三年期间，收获颇丰，且遇贵人无数，实属幸事！

一谢父母，父兮生我，母兮鞠我；拊我蓄我，长我育我，顾我复我，出入腹我；春晖寸草，左提右挈，于生活嘘寒问暖、关怀备至，于学业慷慨解囊、鼎力相助；欲报之德，昊天罔极。

再谢师长，百世之师，诲尔谆谆；高山仰止，景行行止。蒙恩师洪莉不弃，传道授业解惑，春风化雨，润物无声；蒙儿童医学中心潘莉雅、顾莹芬老师厚爱，博我以文，约我以礼，不厌其烦，循循善诱；承蒙外导 Valeriy Poroyko 博士关照，治学严谨，求真务实，造诣精深，为人和蔼，德为人表。怀瑾握瑜，不胜枚举，深感无以为报，唯有心中谨记，日后悬梁刺股，负薪挂角，披荆斩棘，唯愿不负师恩。

三谢友人，山河不足重，重在遇知己。遥谢挚友程瑶，高山流水，幸得此知音，虽行路艰难，歧路常遇，有朝一日必云帆直挂，乘风破浪，横渡沧海。感谢挚友张菁、周琳，相知无远近，万里尚为邻，喜怒哀乐，与汝共享，风风雨雨，与尔共历，千言万语，只求君好。感恩师姐杜丽娟、李玉青、谢丽清、室友李亚璇、吴蕊池、马希瑞，师妹张卉、朱媛、韩茜，何缘幸相识，承君呵护重。

四谢同仁，响必应之与同声，道固从之与同类。感恩 City of Hope National Medical Center 各位无私帮助：Dr. Ravi Salgia, Dr. Edward Wenge Wang, Prakash Kulkarni, Chong Kai Wang, Bolot Mambetsariev, Tamara Mirzapozazova, Ekaterina Semenyuk, Atish Mohanty, Arjun Kalvala, Arin Nam, Anusha Nathan, 梁睿，齐秀英，郑桐森，王广雨，张元新，赵玲，孙婷……与尔共事，神怪气愉。

**And special gratitude to Ka Ming Pang –you taught me all the precious things.**

五谢光阴，逝者如斯，不舍昼夜，冲淡一切欢愉与苦难，带来所有宽慰与光明。

往者不可谏，来者犹可追，只愿不忘初心——路漫漫其修远兮，吾将上下而求索！

基金资助：本课题承蒙国家自然科学基金（No.81771630）资助，特致谢意！

技术支持：感谢所有开发、移植、维护和测试上海交通大学 L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 毕业论文模板的同学们！

## 攻读学位期间发表的学术论文

- [1] CHEN H, CHAN C T. Acoustic cloaking in three dimensions using acoustic metamaterials[J]. Applied Physics Letters, 2007, 91:183518.
- [2] CHEN H, WU B I, ZHANG B, et al. Electromagnetic Wave Interactions with a Metamaterial Cloak[J]. Physical Review Letters, 2007, 99(6):63903.

## 攻读学位期间参与的项目

- [1] 973 项目“XXX”
- [2] 自然科学基金项目“XXX”
- [3] 国防项目“XXX”



## 简 历

### 基本情况

某某, yyyy 年 mm 月生于 xxxx。

### 教育背景

yyyy 年 mm 月至今, 上海交通大学, 博士研究生, xx 专业

yyyy 年 mm 月至 yyyy 年 mm 月, 上海交通大学, 硕士研究生, xx 专业

yyyy 年 mm 月至 yyyy 年 mm 月, 上海交通大学, 本科, xx 专业

### 研究兴趣

L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 排版

### 联系方式

地址: 上海市闵行区东川路 800 号, 200240

E-mail: xxx@sjtu.edu.cn