

申请上海交通大学硕士学位论文

儿科肠道炎症性疾病与肠道菌群相关性研究

论文作者：_____

学 号：_____

导 师：_____

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

SHANGHAI CHILDREN'S MEDICAL CENTER
SCHOOL OF MEDICINE, SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY
SHANGHAI, P.R.CHINA

May, 2019

儿科肠道炎症性疾病与肠道菌群相关性研究

摘 要

肠道菌群纵向模式与早产儿坏死性小肠结肠炎研究

目的 探究早产儿坏死性小肠结肠炎 (NEC) 和迟发型败血症 (LOS) 与出生后肠道菌群定植模式的相关性。

方法 入组 24 名早产新生儿, 其中 4 名在住院后发展为 NEC, 3 名为 LOS, 其余 17 名为对照组。从出生后的第一天开始收集粪便标本, 纵向收集直至患儿出院, 共收集 192 个粪便样本。扩增每个粪便样品的 16s rRNA 基因的细菌 V3 V4 区域并测序; 后续分析包括: OTU 聚类, 各分类水平注释, 多样性分析和多级物种判别分析。

结果 从出生后第 14 天开始, 肠道微生物群定植模式开始在 NEC, LOS 及其匹配的对照组之间出现差异。迟发性脓毒症婴儿的肠道微生物群最少 (Shannon 指数 = 1.66), 对照组保持最多样化 (Shannon 指数 = 0.88, $p = 0.01$)。潜在致病菌属肠球菌 (20.86%) 和葡萄球菌 (8.67%) 在 NEC 患者中显着, 而在 LOS 组中克雷伯氏菌 (42.15%)。NEC 和对照组均较 LOS 组 (3.66%) 含有更多的乳球菌 (分别为 7.98% 和 13.76%)。

结论 肠道菌群定植失调与早产儿 NEC 和 LOS 发生和发展相关, 尤其是潜在致病菌属, 包括链球菌、葡萄球菌和克雷伯菌的相对丰度增加与上述疾病发展相关。

肠道菌群研究中粪便样品取样与保存方法

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)

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,

迟发性败血症，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

Patterened Intestinal Microbiota in Necrotizing Enterocolitis

AIM To profile postpartum pattern progression of intestinal microbiome in these two diseases, with the aim of understanding their etiologic microbiota profiles from a dynamic perspective.

METHODS 24 preterm newborns were enrolled, among whom four subsequently developed NEC, three LOS, and the remaining 17 were healthy controls. Starting from the first stool after birth and continuing till discharge, 192 longitudinal fecal samples were prospectively collected from all patients. Bacterial V3 V4 region of 16s rDNA from each stool sample were amplified and sequenced.

RESULTS The postpartum gut microbiota colonization started to diverge among NEC, LOS and their matched control groups, from the second week after birth. Late-onset sepsis infants held the least diversified gut microbiota (Shannon index=1.66), with the control group held the most diversified one (Shannon index=0.88, $p=0.01$). Potentially pathogenic genus *Enterococcus* (20.86%) and *Staphylococcus* (8.67%) were prominent in NEC patients and *Klebsiella* (42.15%) in LOS group. Both NEC and control groups addressed higher proportion of *Lactococcus* (7.98% and 13.76%, respectively) than the control group (3.66%).

CONCLUSIONS After-birth colonization pattern of gut microbiome might predispose preterm newborns to necrotizing enterocolitis or late-onset sepsis, in which reduced diversity of the whole microbiota community and potentially pathogenic genus could have played an essential role in disease progression. Still, more studies are needed to identify etiological strains, underlying mechanisms and correspondent microbial patterns.

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

Abstract With the rapid development of high-throughput sequencing (NGS) tech-

nique, 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)

KEY WORDS: Intestinal Microbiota, High-throughput Sequencing, Necrotizing Enterocolitis, Hirschsprung's Disease, Late-Onset Sepsis, Hirschsprung-Associated Enterocolitis, Inflammatory Bowel Disease

目 录

插图索引	VII
表格索引	IX
公式索引	XI
缩略语中英文对照表	XIII
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 肠道菌群纵向模式与早产儿坏死性小肠结肠炎研究	7
2.1 引言	7
2.2 材料与方法	7
2.2.1 伦理	7
2.2.2 研究对象	7
2.2.3 诊断标准	8
2.2.4 主要实验室试剂及仪器	8
2.2.5 粪便标本采集方法	9
2.2.6 标本总 DNA 提取	9
2.2.7 总 DNA 16s rDNA V3-V4 可变区片段的扩增	12
2.2.8 荧光定量	12
2.2.9 Illumina Miseq 下一代高通量测序	13
2.2.10 原始数据处理	13
2.2.11 统计学方法	17
2.3 结果	18

2.3.1	患者基本情况	18
2.3.2	样本及测序信息	20
2.3.3	分类学分析	20
2.3.4	多样性分析和纵向分析	24
2.3.5	基于 β 多样性分析纵向菌群定植模式	25
2.4	讨论	27
2.5	结论	32
全文总结		35
附录 A 综述 肠道菌群研究中粪便样品取样与保存方法		37
附录 B 原始数据与源代码存档		43
附录 C 辅助材料：表格		45
附录 D 辅助材料：图片		47
参考文献		49
攻读学位期间发表的学术论文		61
攻读学位期间参与的项目		63

插图索引

2-1	门水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度	21
2-2	纲水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度	22
2-3	目水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度	23
2-4	科水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度	24
2-5	属水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度	25
2-6	LEfSe 分析 NEC, LOS 和对照组患儿菌群	26
2-7	NEC, LOS 和对照组患儿间肠道菌群 α 多样性比较	27
2-8	NEC, LOS 和对照组组内患儿出生后肠道菌群定植模式变化	28
2-9	按照日龄对 NEC, LOS 和对照组患儿间肠道菌群模式分析	29
2-10	NEC 和对照组患儿肠道菌群模式比较	30
2-11	三名 NEC 患儿出生后菌群定植模式	31
D-1	NEC, LOS 和对照组患儿诊断、治愈时年龄和住院时长对比	47

表格索引

2-1 NEC, LOS 和对照组早产儿一般情况	19
C-1 NEC, LOS 和对照组每名患儿基本情况	46

公式索引

缩略语中英文对照表

缩略语	英文全称	中文全称
ANOSIM	Analasis of Similarity	相似性分析
ANOVA	Analysis of Variance	方差分析
bp	base pair	碱基
CD	Crohn's Disease	克罗恩病
CDI	Clostridia difficile Infection	艰难梭菌感染
FMT	Fecal Microbial Transplantation	粪便微生物群移植
FOBT	Fecal Occult Blood Test	粪便隐血实验
GF	Germ Free	无菌
HAEC	Hirschsprung's Disease Associated Enterocolitis	先天性巨结肠相关性小肠结肠炎
HD	Hirschsprung's Disease	先天性巨结肠
IBD	Inflammatory Bowel Disease	炎症性肠病
IRT	Inhibitor Removal Technology	阻断物移除技术
LDA	Linear Discriminant Analysis	线性判别分析
LEfSe	Linear Discriminant Analysis of Effect Size	多级物种判别分析
LOS	Late-Onset Sepsis	迟发型败血症
MAMP	Microbial Associated Molecular Patterns	微生物相关分子模式
NEC	Necrotizing Enterocolitis	坏死性小肠结肠炎
NGS	Next Generation Sequencing	下一代测序
OTU	Operational Taxanomic Unit	操纵分类单元
PAF	Platelet Activating Factor	血小板活化因子
PCA	Primary Component Analysis	主成分分析
PCO	Primary Coordinary Analysis	主坐标分析
PRR	Patterned Recognizing Receptor	模式识别受体

TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
UC	Ulcerative Colitis	溃疡性结肠炎

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）^[1] 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）^[2, 3]，II 型糖尿病^[4]，自闭症^[5, 6] 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^[7]，保护其免受外界伤害^[8]，维护和支持消化功能^[9]，调节肠道免疫功能^[10, 11] 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^[12]，以及早产儿气道内的不动杆菌属（*Acinetobacter*）^[13]，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^[14] 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（*Enterobacteriaceae*），肠球菌（*Enterococci*）和葡萄球菌（*Staphylococci*）^[15]。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^[16]。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 γ -变形菌门（*Gammaproteobacteria*）和梭菌门（*Clostridia*），接着其余菌群的连续定植^[17]。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^[18]。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^[19]。

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^[20]。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^[21]。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^[22, 23]。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^[24]，严重者可致死。

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^[25]。在不同地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^[26]；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^[27]。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^[28]。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^[15, 29, 30]。

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^[31, 32]。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^[33-35]。

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^[36], 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^[37]。

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^[38]。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 γ -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^[17]。

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^[39]。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%^[40]。

目前 HAEC 的具体发病机制仍然未明^[41]。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^[40]。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^[42], 大肠杆菌^[43],

轮状病毒^[44]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^[45]。

目前国内外应用宏基因组学测序和分析技术研究肠道菌群在 HAEC 中的作用的研究较少,检索得相关发表文章共 4 篇,其中 2 篇是本课题组的临床前期研究^[46, 47]。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^[47]。

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^[48]。

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^[49];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^[50];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- α 分泌,与克罗恩病患者回肠黏膜病变相关^[51]。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^[52]。

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^[53]。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^[54]。

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 肠道菌群纵向模式与早产儿坏死性小肠结肠炎研究

2.1 引言

肠道菌群紊乱常常见于多种早产并发症,包括坏死性小肠结肠炎(Necrotizing Enterocolitis, NEC)和迟发性败血症(Late-Onset Sepsis, LOS)。前者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^[20],在早产儿发病率为4~7%^[55];起病快,进展凶险,严重者可致死。近年来有研究发现肠道菌群紊乱存在于 NEC 发病期间。后者是一种在出生后 72 小时后发生的败血症,其是早产儿和极低出生体重的死亡主要原因之一^[56]。近期,有报道 LOS 患儿肠道内菌群多样性下降^[57],致病菌包括肠球菌(*Enterococcus*)丰度增加^[58],提示肠道菌群紊乱与 LOS 发病相关。本研究拟前瞻性观察早产儿出生后总想肠道菌群变化规律,以探究肠道菌群不同变化轨迹与 NEC 和 LOS 发生发展的相关规律,为明确其发病机制并早期预防、诊断和治疗提供依据。

2.2 材料与方法

2.2.1 伦理

该研究经上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心伦理委员会批准(SCMCIRB-K2013022)。在入组前,取得其监护人理解、同意并于知情同意书上签字。

2.2.2 研究对象

于 2013 年 7 月至 2014 年 12 月间,上海儿童医学中心新生儿重症监护病房(NICU)患儿,

2.2.2.1 入选及排除标准

2.2.2.1.1 入组标准 胎龄小于 34 周,出生体重不低于 950g 的早产儿。

2.2.2.1.2 排除标准 1) 新生儿早发型败血症, 2) 肝脏疾病, 3) 肾功能损害($\text{Cr} > 88\text{M}$), 4) 存在先天肠道发育异常, 5) 需要进行大型胸部或腹部手术(男性包皮环切术或动脉导管结扎除外), 6) 预计使用肠外营养(Parental Nutrition,

PN) 支持供应超过 50% 的每日热卡摄入量, 且时间超过 4 天, 7) 静脉注射抗生素 (除常规使用头孢噻肟、哌拉西他唑和甲硝唑), 8) 有口服抗生素史, 9) 有血便史, 10) 日龄大于五天者。

2.2.3 诊断标准

评估并记录入组患儿一般情况, 临床症状体征、实验室检查及影像学检查等, 观察其是否发生 NEC (II 期和 III 期) 或 LOS。

坏死性小肠结肠炎 NEC 诊断和分级根据“改良 Bell 分级标准”^[59]: II 期, 伴有放射性肠扩张, 肠梗阻, 肠道积气和/或腹部压痛, 和/或轻度代谢性酸中毒, 肠鸣音减弱, 血小板减少症。

迟发型败血症 LOS 确诊标准: 如果患儿在出生后 72 小时后, 由至少两位新生儿科医生独立检查确认脓毒症体征/症状, 血培养或其他体液培养阳性或可疑阳性, 并接受过高级别抗生素治疗 (例: 美罗培南等), 则诊断为 LOS。

住院期间无感染性并发症或败血症、无 NEC 的患儿纳入对照组。

2.2.4 主要实验室试剂及仪器

2.2.4.1 试剂与材料

1. PowerSoil[®] DNA Isolation Kit: 美国 MoBio 公司
2. AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒: Axygen 爱思进生物技术 (杭州) 公司
3. TruSeq[™] DNA Sample Prep Kit: Illumina 中国
4. 纸质冻存管盒: 江苏省中瑞实验器材经营部
5. 冻存管 (规格 1.8ml): 江苏省中瑞实验器材经营部
6. 无菌塑料铲子: 江苏省中瑞实验器材经营部
7. 干冰: 上海京日实业有限公司

2.2.4.2 仪器

1. -80实验室冰箱 (超低温冰箱): ThermoFisher 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司
2. 电子天平 (型号 XSE104): 梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司
3. 恒温金属浴 (型号 TU-100C): 上海一恒科学仪器有限公司
4. 小珠研磨器 MiniBeatbeater (型号-16): 美国 BioSpec 实验仪器设备公司。
5. 台式高速冷冻离心机 (型号 5427R): Eppendorf 艾本德 (上海) 国际贸易有限公司

6. 移液器（型号：Eppendorf Reference[®] 2；规格：20 l, 100 l, 200 l, 1000 l）：Eppendorf 艾本德（上海）国际贸易有限公司
7. 移液器支架系统（The Eppendorf Pipette Holder System）：Eppendorf 艾本德（上海）国际贸易有限公司
8. 自封式双层超滤芯吸头（型号 Dualfilter T.I.P.S.[®] SealMax；规格：20 l, 100 l, 200 l, 1000 l）：Eppendorf 艾本德（上海）国际贸易有限公司
9. 漩涡混合器（型号：VORTEX-5；江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司
10. 2-8医用冷藏箱（型号：HYC-940（F））：中国海尔集团
11. 超微量紫外线分光光度计（型号 NanoDrop 2000C）：ThermoFisher 赛默飞世尔科技（中国）有限公司
12. PowerPac 通用电泳仪电源
13. 水平小型电泳槽（型号：Sub-Cell[®] 96）：BIO-RAD 伯乐生命医学产品（上海）有限公司
14. ABI GeneAmp[®] PCR 仪（型号：9700）：ThermoFisher 赛默飞世尔科技（中国）有限公司美国应用生物系统中国公司
15. Tanon 4100 全自动数码凝胶图像分析系统：上海天能科技有限公司
16. QUANTIFLUOR 荧光计仪（型号 QUANTIFLUORST/P）：Promega - 普洛麦格（北京）生物技术有限公司，上海盛兆生物科技有限公司。
17. 16sRNA 第二代高通量平台（Illumina Miseq）：Illumina 中国

2.2.5 粪便标本采集方法

1. 取得患儿监护人理解、同意并于知情同意书上签字。
2. 准备无菌手套、干冰（置于密封盒中）、无菌塑料铲子、冻存管。
3. 患儿排便 30 分钟内，带手套，使用塑料铲，于尿布附近刮取粪便样本，置于冻存管内，约 1g。
4. 根据入组患儿编号和采集时间，对样本进行编号后立刻放入干冰盒中，30 分钟内储存于-80冰箱中备用。

2.2.6 标本总 DNA 提取

本课题使用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 试剂盒（Catalog No. 12888-100）提取粪便标本总 DNA；流程如下所述：操作全程都需带手套。

1. 向所提供的 PowerBead 管中加入不少于 0.25 克粪便标本（均质化和裂解程

- 序,管内的缓冲剂将(a)帮助分散土壤颗粒,(b)开始溶解腐殖酸(c)保护核酸免于降解)
2. 使用漩涡混合器,轻轻涡旋混合(开始将样品分散在 PowerBead 溶液中)。
 3. 检查溶液 C1,如果观察到 C1 沉淀,将溶液置于恒温金属浴 60℃ 直至沉淀物在使用前溶解。溶液 C1 可以在加热后直接使用。(溶液 C1 包含 SDS 和其他裂解细胞所需的阻断成分;SDS 作为一种阴离子洗涤剂,也可帮助分解与细菌细胞膜相关的脂肪酸和脂质有关的脂肪酸。金属浴 60℃ 将溶解 SDS,但不会损害 SDS 或其他阻断成分。)
 4. 在 PowerBead 管中加入 60l 溶液 C1 并手动翻转数次,或也可以短暂涡旋混合。
 5. 使用小珠研磨器 MiniBeatbeater垂直固定 PowerBead 管,以最大速度涡旋 15 分钟。(注意:1)标准时间为 10 分钟,但本课题使用 24 孔 Beatbeater,故涡旋时间增加至 15 分钟;2)涡旋步骤对于完全均质化和细胞裂解是至关重要的。通过来自步骤 1-4 的化学试剂和在该步骤引入的机械振荡的组合裂解细胞。通过在破坏剂存在下随机摇动珠子,珠子与微生物细胞的机械震荡、碰撞将是微生物细胞完全破裂。)
 6. 确保 PowerBead 管在离心机中无摩擦、可自由旋转。在室温下以 10,000xg 离心 1 分钟。(注意:1)转速不应超过 10,000 x g,因为管子可能会破裂。2)标准流程离心时间为 30 秒,由于本课题所收取的样品量有时较多,经尝试,离心时间 1 分钟的离心效果较好。)
 7. 将第(6)步中收取的上清液转移至干净的 2 ml 收集管(试剂盒提供)中,该步骤上清液约 500l。
 8. 将 250l 溶液 C2 加入步骤(7)中的收集管中,然后涡旋 5 秒;在 4℃ 环境中孵育 5 分钟。(溶液 C2 为 Inhibitor Removal Technology® (IRT),含有一种沉淀非 DNA 有机和无机物质的试剂,包括腐殖质,细胞碎片和蛋白质,同时可去除可能降低 DNA 纯度并抑制下游 DNA 应用的污染性有机和无机物质。)
 9. 在室温下,离心步骤(8)中的收集管,转速 10,000 x g,离心时间 1 分钟。
 10. 将步骤(9)中收取的上清液(体积不多于 600l 的)转移至新的干净的 2 ml 收集管(试剂盒提供)中,注意吸头避免碰触沉淀。(此时的沉淀含有非 DNA 有机和无机物质,包括腐殖酸,细胞碎片和蛋白质。为了获得最佳的 DNA 产量和质量,请避免转移任何沉淀。)
 11. 将 200l 溶液 C3 加入步骤(10)中的上清液中,并短暂涡旋。在 4℃ 孵育 5

分钟。(溶液 C3 为 Inhibitor Removal Technology[®], IRT), 是另一种沉淀其他非 DNA 有机和无机物质的试剂, 包括腐殖酸, 细胞碎片和蛋白质, 也可去除可能降低 DNA 纯度并抑制下游 DNA 应用的污染性有机和无机物质。

12. 在室温下, 离心步骤 (11) 中的收集管, 转速 10, 000 x g, 离心时间 1 分钟。
13. 将步骤 (12) 中收取的上清液 (体积不多于 750l 的) 转移至新的干净的 2 ml 收集管 (试剂盒提供) 中, 注意吸头避免碰触沉淀。(此时的沉淀含有非 DNA 有机和无机物质, 包括腐殖酸, 细胞碎片和蛋白质。为了获得最佳的 DNA 产量和质量, 请避免转移任何沉淀。)
14. 使用溶液 C4 前, 将其轻轻摇匀。将 1.2ml 溶液 C4 加入步骤 (13) 中的收集管中 (此步骤小心缓慢, 避免溶液溢出收集管边缘), 然后涡旋 5 秒。(溶液 C4 是高浓度盐溶液。由于 DNA 在高盐浓度下与二氧化硅紧密结合, 因此 C4 可以调节 DNA 溶液盐浓度, 以使 DNA (但可能仍然有低水平的非 DNA 有机和无机物质) 与离心过滤管 Spin Filter 的滤膜结合。)
15. 转移 675l 步骤 (14) 中获取的混合液, 于离心过滤管 Spin Filter 中, 然后于室温下离心 Spin Filter, 转速 10, 000 x g, 离心时间 1 分钟, 弃去下层离心液。重复上述步骤, 直至步骤 (14) 中的混合液完全耗尽, 共 3 次。(此时, 高浓度盐溶液中结合 DNA, 且被选择性结合至 Spin Filter 二氧化硅过滤膜上。)
16. 将 500l 溶液 C5 加入 Spin Filter 中, 然后将其于室温下离心, 转速 10, 000 x g, 离心时间 1 分钟。(溶液 C5 是乙醇基的洗涤溶液, 用于进一步清洁与 Spin Filter 的二氧化硅滤膜结合的 DNA。该洗涤溶液除去残留的盐, 腐殖酸和其他污染物, 同时使 DNA 保持与二氧化硅膜结合。)
17. 弃去步骤 (16) 中的下层离心液 (含有非 DNA 的无机和有机物质)。
18. 于室温下, 再次将 Spin Filter 离心, 转速 10, 000 x g, 离心时间 1 分钟。尽可能完全除去残留的溶液 C5 (乙醇基洗涤溶液), 因为乙醇会干扰许多下游 DNA 步骤, 如 PCR, 限制性消化和凝胶电泳。
19. 小心将 Spin Filter 置于新的干净的 2ml 收集管 (试剂盒已提供) 中, 避免将任何溶液 C5 带入新收集管。
20. 将 100l 溶液 C6 小心加入 Spin Filter 的白色滤膜上, 保证整个滤膜充分浸润超市, 然后静置等待 12 分钟。(溶液 C6 可与滤膜中的高浓度盐溶液结合, 促使 DNA 与盐溶液解离并洗脱。因此, 本课题在此处选择将其滤膜于室温下静置等待 12 分钟, 以确保 DNA 更大程度的解离, 后续浓度更高

而适合建库测序。)

21. 在室温下, 将步骤 (20) 中的 Spin Filter 和收集管离心, 转速 10, 000 x g, 离心时间 1 分钟。
22. 弃去 Spin Filter, 得到粪便样本总 DNA。
23. DNA 提取质控: 利用超微量紫外线分光光度计 (型号 NanoDrop 2000C) 检测 DNA, 目标浓度约 50ng/ml。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。
24. 将通过质控的 DNA 样本置于 -80℃ 冰箱中上海美吉生物医药科技有限公司进行后续扩增。

2.2.7 总 DNA 16s rDNA V3-V4 可变区片段的扩增

扩增区域为 16 s rDNA V3-V4 可变区, 合成带有 Illumina 官方接头序列 barcode 的特异引物。扩增模版为上述提取的粪便样品总 DNA。用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 95 预变性 3min, 27 个循环 (95 变性 30s, 55 退火 30s, 72 延伸 30s), 最后 72 延伸 10min (PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型)。扩增体系为 20ul, 4ul 5*FastPfu 缓冲液, 2ul 2.5mM dNTPs, 0.8ul 引物 (5uM), 0.4ul FastPfu 聚合酶; 10ng DNA 模板。PCR 采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase; PCR 仪为 ABI GeneAmp® 9700 型。扩增质控: 为保证后续数据分析的准确性及可靠性, 全部样品均按照正式实验条件进行, 尽可能使用低循环数扩增, 每例样本重复扩增 3 次, 使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。为保证后续数据分析的准确性及可靠性, 需满足两个条件, 1) 尽可能使用低循环数扩增; 2) 保证每个样本扩增的循环数一致。随机选取具有代表性的样本进行预实验, 确保在最低循环数中使绝大多数样本能够扩增出浓度合适的产物。

2.2.8 荧光定量

利用 QuantiFluor-ST (Promega, USA) 进行检测定量。然后根据每例 DNA 样本的目标测序量, 进行相应比例的混合。

2.2.9 Illumina MiSeq 下一代高通量测序

2.2.9.1 文库构建

根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2*300 的文库, 构建步骤如下:

1. 连接“Y”字形接头;
2. 使用磁珠筛选去除接头自连片段;
3. 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;
4. 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段, 使用试剂 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit。

2.2.9.2 高通量测序

使用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)

1. DNA 片段的一端与引物碱基互补, 固定在芯片上;
2. 以 DNA 片段为模板, 芯片上固定的碱基序列为引物进行 PCR 合成, 在芯片上合成目标待测 DNA 片段;
3. 变性、退火后, 芯片上 DNA 片段的另一端随机与附近的另外一个引物互补, 也被固定住, 形成“桥 (bridge)”;
4. PCR 扩增, 产生 DNA 簇;
5. DNA 扩增子线性化成为单链。
6. 加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP, 每次循环只合成一个碱基;
7. 用激光扫描反应板表面, 读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类;
8. 将“荧光基团”和“终止基团”化学切割, 恢复 3' 端粘性, 继续聚合第二个核苷酸;
9. 统计每轮收集到的荧光信号结果, 获知模板 DNA 片段的序列。

2.2.10 原始数据处理

将测序所得的原始数据进行质控、过滤和优化后, 进行 OTU 聚类 and 分类学水平注释。后续, 本课题则基于 OTU 进行多种多样性指数分析, 以及对测序深度的检测; 基于分类学信息, 在各个分类水平上, 分析了样本所在的生物环境进行群落的组成、结构、相对丰度等特征。在上述分析的基础上, 可以对多样本的群落

组成和系统发育信息进行多元分析和差异显著性检验等一系列深入的统计学和可视化分析。

2.2.10.1 原始数据保存

为方便保存和共享各实验室产生的高通量测序数据, NCBI 数据心建立了大容量的数据库 SRA (Sequence Read Archive, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra>) 来存放共享的原始测序数据。本实验的测序数据上传至 NCBI 数据库中 (BioProject 序列号: PRJNA470548)。

2.2.10.2 原始数据管理

根据序列索引中的 barcode 区分各个样本的数据, 提取所需的数据后以 fastq 格式保存, PE 数据每个样本有 fq1 和 fq2 两个文件, 里面为测序两端的 reads, 且按顺序一一对应。

Fastq (fq) 是第二代测序技术中一种展示测序序列碱基质量的文件格式。每条序列 read 包含 4 行信息, 其中: 第一行为文件识别标志, 第一行以“@”开头; 第二行为具体的碱基序列; 第三行为读段名 (ID) (第三行中 ID 可以省略, 但“+”不能省略), 也可以含有文件识别标志; 第四行是第二行中的序列内容每个碱基所对应的测序质量值, 必须包含与序列中的字母相同数量的符号。

如下所示:

```
@HWI-ST531R:144:D11RDACXX:4:1101:1212:1946 1:N:0:ATTCCT
```

(第一行)

```
ATNATGACTCAAGCGCTTCCTCAGTTTAATGAAGCTAACTTCAATGCTGA  
GATCGTTGACGACATCGAATGGG
```

(第二行)

```
+ HWI-ST531R:144:D11RDACXX:4:1101:1212:1946 1:N:0:ATTCCT
```

(第三行)

```
?A#AFFDFFHGFHJJGIIJJIIIIIIJJGGHIIJJIIIIHGI@FEHIIJBFFHGGJIIH  
HHDFFFFDCCCCEDDCDDCDEACC
```

(第四行)

2.2.10.3 接质控与优化数据

Illumina Miseq 二代测序所得到原始数据 PE reads 序列为双端序列数据, 根据序列件的重叠关系, 将成对的 reads 拼接 (merge) 成一条序列, 同时对 reads 的质

量和 merge 的效果进行质控过滤，根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列，并校正序列方向，即为优化数据。使用软件：Trimmomatic 软件质控，使用 FLASH 软件进行拼接。具体方法及相关参数：

1. 设置 50bp 的过滤窗口，如果窗口内的平均质量值低于 20，从窗口前端位置截去该碱基后端所有序列，之后再去除质控后长度低于 50bp 的序列；
2. 根据双段序列数据的正向和反向两条序列重叠关系（overlap）进行拼接（merge），拼接时 overlap 之间的最大错配率为 0.2，长度需大于 10bp。去除无法拼接的序列。
3. 根据序列首尾两端的 barcode 和引物将序列拆分至每个样本，barcode 需精确匹配，引物允许 2 个碱基的错配，去除存在模糊碱基的序列。
4. 根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品，并调整序列方向，barcode 允许的错配数为 0，最大引物错配数为 2；

2.2.10.4 OTU 聚类

在系统发生学或群体遗传学的研究中，为了便于进行分析，将某一个分类单元（例：品系，门，纲，目，属，种、分组等）人为地设置成同一标志，称为操作分类单元（Operational Unit Taxonomy, OTU）。当在科学研究中分析每个样本测序结果中的各水平分类单元的数目信息前，就需要对序列进行归类操作（cluster）；通过这种归类操作，按照彼此的相似性将序列分归为许多小组，此时一个小组就是一个 OTU。通常情况下，在 97% 的相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析。

基于 OTU 可以进行多种多样性指数分析，基于 OTU 聚类分析结果，可以对样品生物群落进行多样性分析，并检测测序深度；基于分类学信息，则可以在各个分类水平上，对样本所在的生物环境进行群落的组成、结构、相对丰度等分析。在上述分析的基础上，可以对多样本的群落组成和系统发育信息进行多元分析和差异显著性检验等一系列深入的统计学和可视化分析。

使用的 UPARSE 软件（version 7.1），根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类，并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。

2.2.10.5 分类学分析

为了得到每个 OUT 所对应的物种分类学信息，采用<http://rdp.cme.msu.edu/>贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析，并分别在各个分类学水平：

domain（域），kingdom（界），phylum（门），class（纲），order（目），family

(科), genus (属) 比对<http://www.arb-silva.de>, 统计各样本的群落组成, 默认置信度阈值为 70%。

多级物种判别分析 (LEfSe 分析, Linear discriminant analysis Effect Size) 是一种用于发掘高维度生物标示和揭示基因组特征的软件。包括基因、代谢和分类, 用于区别两个或以上生物条件 (或是生物类群)。该分析软件先采用 non-parametric factorial Kruskal-Wallis sum-rank test 检测具有显著丰度差异特征, 并找到与丰度有显著性差异的类群。最后, 采用线性判别分析 (LDA, Linear Discriminant Analysis) 来估算每个物种丰度对于差异效果影响的大小。在 Cladogram 中, 不同颜色的节点表示在对应组别中显著富集, 且对组间差异存在显著影响的微生物分类群; 浅黄色节点表示在不同分组中均无显著差异, 或对组间差异无显著影响的微生物类群。

2.2.10.6 多样性分析

多样性指数用来表述一个群落的多样性的统计量, 在生物学中可以被用来描述某中环境下的生物多样性。多样性指数常备用来估算任何一个群落, 每个成员都属于一个独特的群体或者物种。往往, 多样指数的估计量存在一定的偏差, 因此相似的值之间往往不能直接比较: 本课题主要选择两个空间尺度来比较各分组间和样本间的微生物多样性—— α 多样性和 β 多样性。

α 多样性指数该指数主要关注局部均匀微生物群落的环境中的物种数目, 在本课题中, 该微生物群落基于特定分组或特定样本。它反映了群落内物种间通过竞争资源或者利用同一种群落环境而产生的共存结果, 它可分为物种丰富度指数、物种均匀度指数和物种多样性指数。

丰富度指数刻画了微生物群落中所含物种的多少, 反映了一定空间范围内生物的丰富程度; 其常常受制于群落总体包含的微生物数量, 忽略了富集种和稀疏种对于群落多样性的贡献, 因而常常将丰富度指数和均匀度指数结合使用。物种多样性指数则结合了物种多样性和多度性, 本课题使用 Shannon-Wiener 指数 (Shannon-wiener index) 和 Simpson 多样性指数 (Simpson's diversity index)。其中, 前者受物种丰富度和均匀度影响, 该指数越大, 则反映群落多样性越高, 均匀度越低; 后者反映了优势种在群落中的地位和作用, 也成为生态优势度, 与其他多样性指数呈负相关。多样性指数越高, 生态优势度越小, 均匀度指数越高:

1. Shannon-wiener index

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i^1 \quad (2-1)$$

2. Simpson's diversity index

$$D = \sum_{i=1}^R p_i^2 \quad (2-2)$$

β 多样性指数该指数用来表示生物种类对于群落异质性的反映：不仅描述群落内不生物种类的数量，也考虑它们的相似性及其彼此之间的位置。通常 β 多样性表示为群落相似性指数或是同一分组内不同样本中生物物种的周转率。不同分组间生物种类的相似性越差， β 生物多样性越高。

本课题计算 unweighed UniFrac distance, weighed UniFrac distance 和 Bray-Curtis dissimilarity 来进行 β 多样性分析，其中 weighed UniFrac distance 将各物种丰度纳入考虑，而 unweighed 未对物种丰都进行加权处理。基于 β 多样性进行 PCoA 作图使用上述距离文件进行 PCoA 和 PCA 作图，每个代表一个样品菌群整体（即群落），而点与点之间的距离代表两个菌群整体（群落）间的序列相似度。

PCA (Principal Components Analysis) 即主成分分析，也称主分量分析或主成分回归分析法，首先利用线性变换，将数据变换到一个新的坐标系统中；然后再利用降维的思想，使任何数据投影的最大方差在第一个坐标（称为第一主成分）上，第二大方差在第二个坐标（第二主成分）上。这种降维的思想首先减少数据集的维数，同时还保持数据集的对方差贡献最大的特征，最终使数据直观呈现在二维坐标系。

PCoA (Principal Co-ordinates Analysis) 分析即主坐标分析，可呈现研究数据相似性或差异性的可视化坐标，是一种非约束性的数据降维分析方法，可用来研究样本群落组成的相似性或相异性。它与 PCA 类似，通过一系列的特征值和特征向量进行排序后，选择主要排在前几位的特征值，找到距离矩阵中最主要的坐标，产出结果是旋转后的数据矩阵，改变了坐标系统，并未改变样本点之间的相互位置关系。两者的区别为 PCA 是基于样本的相似系数矩阵来寻找主成分，而 PCoA 是基于距离矩阵（欧式距离以外的其他距离）来寻找主坐标。

2.2.11 统计学方法

1. 使用 Kruskal-Wallis H test 检验各分类水平下各物种在各组间的分布（相对丰度）是否存在显著性差异；使用 Benjaminia and Hochberg 法对 p 值进行

¹ p_i 属于第 i 种物种的个体数占群落中总个体数的比例。下同。

多重检验校正。使用 Student's *t* 检验检验各分类水平下各物种在两个组之间的分布（相对丰度）是否存在显著性差异；使用 Benjaminia and Hochberg 法对 *p* 值进行多重检验校正。

2. 使用 Student's *t* 检验评估两组间多样性指数的差异。若 $p < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。过 α 多样性分析可以得到群落（分组或者单个样本）中物种的丰度、覆盖度和多样性等信息。
3. 利用 Wilcoxon 秩和检验，对每一组中的亚组进行两两检验，在具有显著差异物种类中的所有亚种比较是否都趋同于同一分类级别。

2.3 结果

2.3.1 患者基本情况

2013 年 7 月至 2014 年 12 月，共有 1148 名早产儿入院，其中 5 名在此期间诊断为坏死性小肠结肠炎 (NEC)；发病率 4.4%，与总体发病率一致 rees2010national。在所有早产儿中，有 130 名符合我们的研究标准，并向其收集了 1698 份粪便标本。

本研究最终选择 24 个充分采样的早产儿，包括 4 名坏死性小肠结肠炎 (NEC) 患儿（2 个 IIA 期和 2 个 IIB 期），3 个迟发型败血症 LOS 和 17 个匹配对照（表 S1）；共收集 192 个样本，其中 NEC 标本 47 个，LOS 标本 44 个，对照组标本 101 个，并进行 16s rRNA 基因测序。

本研究中，所有早产儿的平均胎龄为 30.5 周（28 至 33 周），平均出生体重为 1440 克（945 克至 1950 克）。NEC 组有 3 名女婴和 1 名男婴，LOS 组有 2 名女婴和 1 名男婴，对照组有 9 名女婴和 8 名男婴。所有患儿均通过剖宫产分娩，并以早产儿配方奶喂养。NEC 的平均发病时间为出生后 16 天（范围：11 至 19 天），确诊为 LOS 的平均生命日为 12 天（图 D-1）。三组的人口统计学比较（表 2-1）显示，在胎龄，出生体重和性别百分比方面未见显著差异。

一旦怀疑发生 NEC，患儿会立即得到支持性护理和抗生素治疗——支持性护理包括停止肠内喂养、肠道休息，开始全肠外营养（TPN），补液，纠正代谢性酸中毒，肠道休息。在上海儿童医学中心新生儿重症监护病房，用于预防早产儿出生后败血症的抗生素组合为哌拉西林 - 他唑巴坦，头孢噻肟和甲硝唑。分别在治疗 28 天和 15 天后，两名 NEC 患儿情况好转并重新开始肠内喂养。一名患儿在家人同意终止治疗并拒绝手术干预后死亡（表 C-1）。

根据细菌血培养的阳性结果，来自 LOS 组的一名患儿被诊断出患有肺炎克雷伯菌血症，并且给予美罗培南 21 天；第二名患儿被诊断患有肺炎克雷伯氏菌和

铜绿假单胞菌血症并给予美罗培南 38 天。第三名患儿被诊断为肺炎克雷伯菌血症、重症肺炎且对头孢噻肟耐药，因此给予美罗培南 13 天。

住院前和住院期间所有患者均未接受益生菌处方。

表 2-1 早产儿患者一般情况¹

Table 2-1 Demographic characteristics of Preterm NEC, LOS and control groups.

	NEC (N=3)	LOS (N=4)	Control (N=17)	Statistical Test	<i>p value</i>
胎龄 (周)	29(29-30)	30(29-31)	31(28-33)	Kruskal- Wallis test	0.074
出生体重 (克)	1416.3 (773.4- 2149.1)	1141.7 (633.4- 1649.9)	1527.4 (1391.6- 1663.1)	Kruskal- Wallis test	0.111
性别				Fisher's ex- act test	0.82
	女 3(75%)	2(67%)	9(53%)		
	男 1(25%)	1(33%)	8(47%)		
诊断时年龄 (天)	16(11-19)	16(10-22)	—	Wilcoxon rank-sum test	0.629
住院时长 (天)	54.3 (13.5- 95.0)	60.0 (24.8- 95.2)	32.9 (26.3- 39.5)	Kruskal- Wallis test	0.046
标本总数	46	42	103	—	—

¹NEC、LOS 和对照组在入院时，胎龄、出生体重、年龄和性别无统计学差异。三组住院时常具有显著性差异 ($p = 0.046$)，这符合我们的预期，因为 NEC 和 LOS 患儿往往需要更长时间恢复，因此住院时间相对更长；比较 NEC 和 LOS 组住院时长未见明显统计学差异。胎龄 = 平均值 (下限-下限)，出生体重 = 平均值 (95% 置信区间)，诊断时年龄 = 平均值 (下限-下限)，性别 = 人数 (占本组的百分比)，住院时长 = 平均值 (95% 置信区间)

2.3.2 样本及测序信息

入选 NEC 患儿 4 例, LOS 患儿 3 例, 对照组患儿 17 例。采集其纵向粪便标本, 共 192 个, 其中 NEC 标本 47 个, LOS 标本 44 个, 对照组标本 101 个。其他临床资料见表 2-1。

使用 Illumina MiSeq 高通量测序、优化后, 得到 7,472,400 条 16s rRNA 基因序列, 碱基数目共 3348030799; 优化碱基数目为 3348,030,799, 优化平均序列长度为 448bp。

2.3.3 分类学分析

对于测序数据进行 OTU 聚类, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并分别在各个分类水平 (从域 (domain) 到属 (genus)) 统计各样本的群落组成, 比对 silva 数据库得出各群落数量。

2.3.3.1 门 (phylum) 水平

在门水平, 三组患儿肠道内以变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、和放线菌门 (*Actinobacteria*) 为主导。变形菌门的丰度在 LOS 组最高 (59.67%), 对照组次之 (59.67%), NEC 组最低 (38.53%), 三组丰度显著不同 ($p = 0.017$); 厚壁菌门 (*Bacilli*) 丰度在 NEC 组最高 (59.59%), 对照组次之 (44.88%), LOS 组最低 (39.54%), 且三组间丰度呈显著性差异 ($p = 0.017$); 放线菌门 (*Actinobacteria*) 的丰度对照组最高 (3.40%), NEC 组次之 (1.10%), LOS 组最低 (0.06%), 三组丰度组间差异显著 ($p = 0.001$) (图 2-1)。

2.3.3.2 纲 (class) 水平

在纲水平, 三组患儿肠道内以 γ -变形菌纲 (γ -*Proteobacteria*)、杆菌纲 (*Bacilli*)、梭菌纲 (*Clostridia*) 和放线菌纲 (*Actinobacteria*) 为主导。 γ -变形菌纲的丰度在 LOS 组最高 (59.57%), 对照组次之 (50.51%), NEC 组最低 (38.06%), 三组丰度显著不同 ($p = 0.013$); 厚壁菌门 (*Bacilli*) 丰度在组最高 NEC (53.56%), 对照组次之 (39.19%), LOS 组最低 (32.17%), 且三组间丰度呈显著性差异 ($p = 0.015$); 梭菌纲 (*Clostridia*) 丰度在 LOS 组最高 (6.54%), NEC 组次之 (5.36%), 对照组最低 (4.86%), 三组丰度差异在统计学上不显著 ($p = 0.236$); 放线菌纲 (*Clostridia*) 的丰度在对照组最高 (3.40%), 在 LOS 和 NEC 丰度相似 (前者 0.63%, 后者 1.01%, 组间差异不显著 ($p = 0.76$)), 三组间丰度差异显著 ($p = 0.001$) (图 2-2) (图 2-2)。

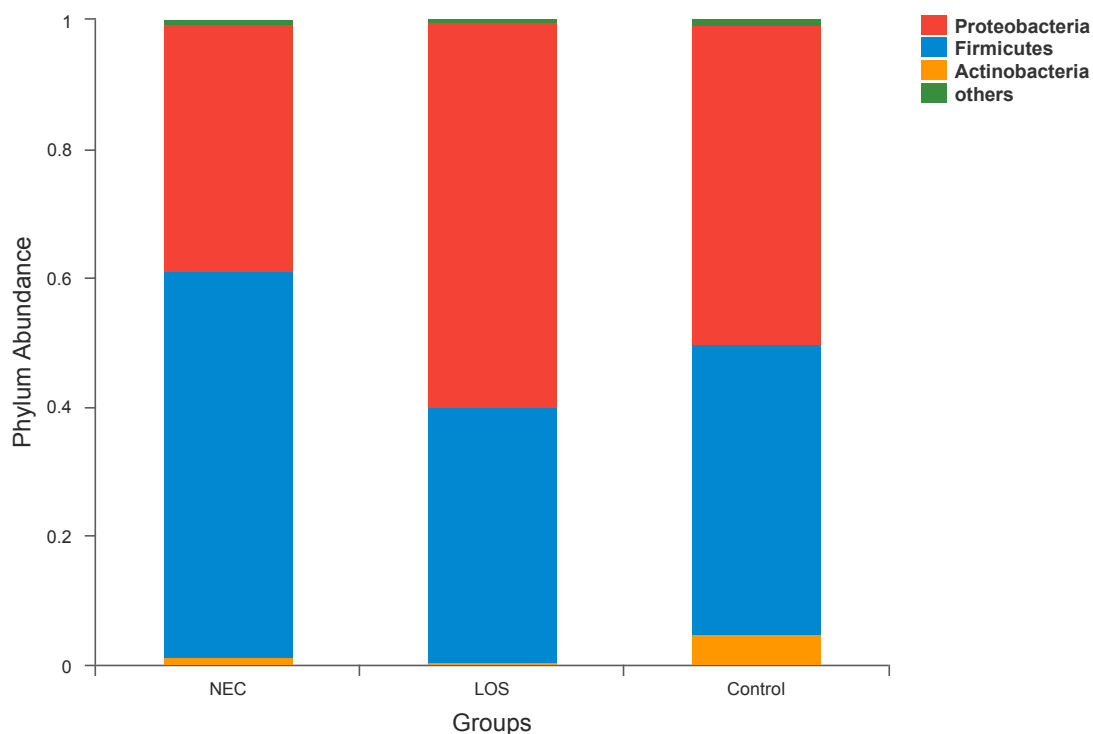


图 2-1 门水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度。

Figure 2-1 Relative Abundance of Phylum in Intestinal Microbiota.

2.3.3.3 目 (order) 水平

在目水平, 三组患儿肠道内以肠杆菌目 (*Enterobacteriales*)、乳杆菌目 (*Lactobacillales*)、芽孢杆菌目 (*Bacillales*)、梭菌目 (*Clostridiales*)、假单胞菌目 (*Pseudomonadales*)、微球菌目 *Micrococcales* 为主。肠杆菌目在 LOS 组最高 (57.05%), 对照组次之 (40.89%), NEC 组最低 (34.87%), 三组丰度差异在统计学上显著 ($p = 0.011$); 乳杆菌目在 NEC 组丰度最高, 为 37.94%, 在 LOS 和对照组丰度分别为 (27.1%) 和 (28.28%), 且三组间乳杆菌丰度差异不显著 ($p = 0.176$); 芽孢杆菌目在 LOS 组丰度 (5.08%) 显著低于 NEC 组 (15.62%, 两组比较 $p = 0.05$), 对照组丰度为 10.91%; 梭菌目分别在三组的丰度类似: NEC 组为 5.36%, LOS 组为 6.54%, 对照组为 4.86%; 假单胞菌目在对照组的丰度 (8.62%) 显著高于 NEC 组 (3.15%, $p = 0.015$) 和 LOS 组 (2.39%, $p = 0.015$)。另外, 棒状杆菌目 (*corynebacteriales*) 和黄色单胞菌目 (*Xanthomonadales*) 为对照组所独有 (丰度分别为 1.62% 和 0.88%) 的菌目 (图2-3)。

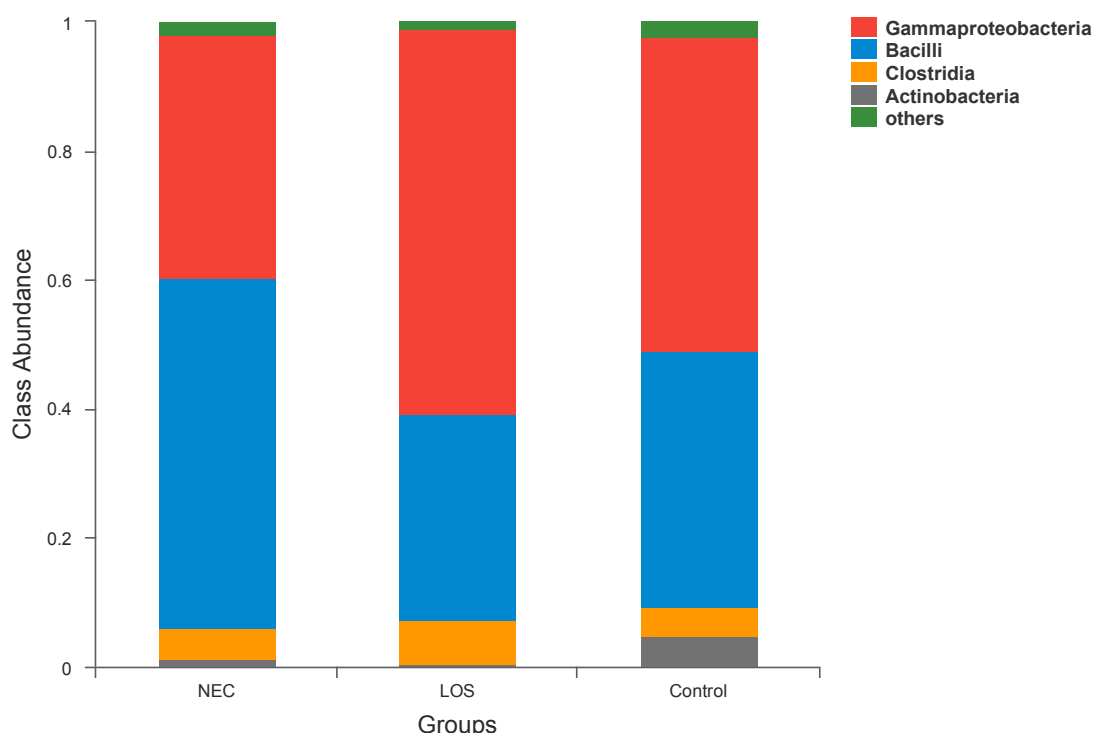


图 2-2 纲水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度。

Figure 2-2 Relative Abundance of Class in Intestinal Microbiota.

2.3.3.4 科 (family) 水平

在科水平，三组患儿肠道内以肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、肠球菌科 (*Enterococcaceae*)、乳杆菌目 (*Lactobacillales*)、链球菌科 (*Streptococcaceae*)、葡萄球菌科 (*Staphylococcaceae*)、假单胞菌科 *Pseudomonadaceae* 占主导。肠杆菌科丰度在 LOS 组最高，为 57.05%，NEC 组和对照组丰度分别为 34.87% 和 40.89%，三组间丰度差异显著 ($p = 0.011$)；肠球菌科在三组的丰度分别为 NEC 组 20.86%，LOS 组 18.15%，对照组 8.46%，三组间差异不显著 ($p = 0.109$)；LOS 组链球菌科百分比 (8.70%) 显著低于 NEC 组 (16.67%， $p = 0.$) 和对照组 (19.07%， $p = 0.023$)，NEC 组为 16.67%，且三组比较差异不显著 ($p = 0.438$)；假单胞菌在三组的丰度分别为 NEC 组 2.41%，LOS 组 2.05%，对照组 5.40%，三组间差异显著 ($p = 0.039$) (图2-4)。

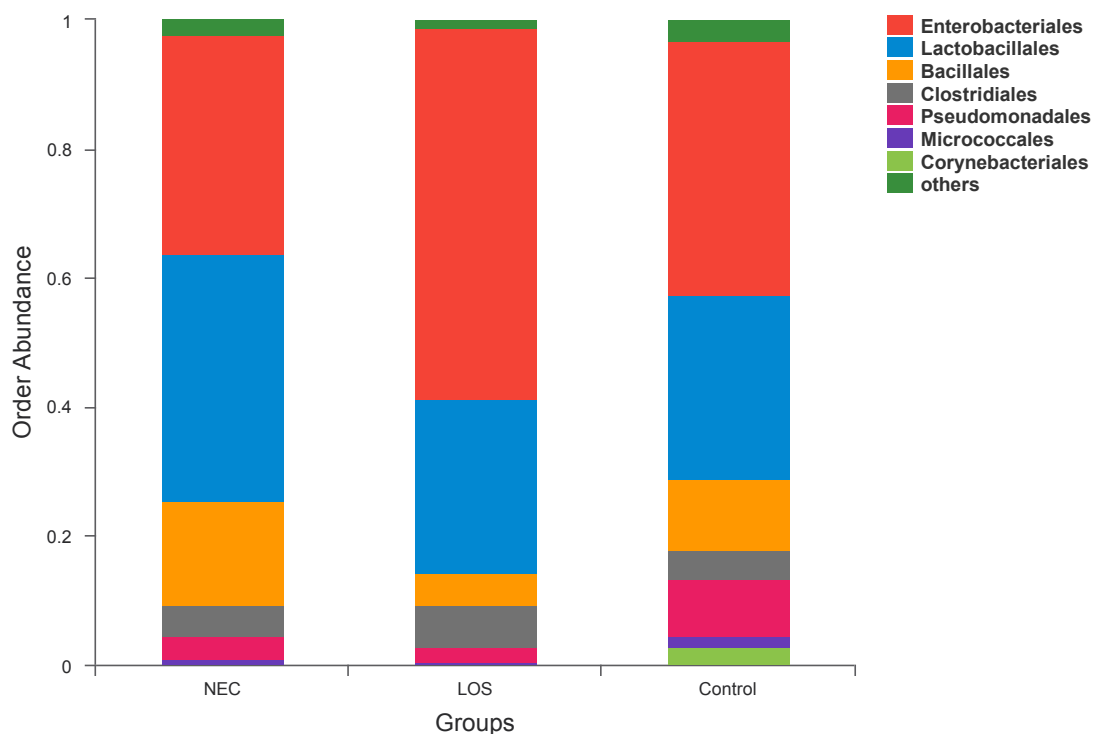


图 2-3 目水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度。

Figure 2-3 Relative Abundance of Order in Intestinal Microbiota.

2.3.3.5 属 (genus) 水平

属水平上, 肠道菌群以克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、埃希菌-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占主导。克雷伯菌在 LOS 组丰度最高 (%42.15), 且三组丰度差异不显著 ($p = 0.025$); 肠球菌属在三组的丰度分别为 NEC 组 20.86%, LOS 组 18.14%, 对照组 8.45%, 三组间差异不显著 ($p = 0.105$); 埃希菌-志贺菌属在三组的丰度分别为 NEC 组 4.83%, LOS 组 12.99%, 对照组 10.14%, 三组丰度差异不显著 ($p = 0.291$); LOS 组乳球菌属丰度 3.65%, 显著低于对照组 (3.65%, $p = 0.006$); 链球菌属在三组的丰度分别为 NEC 组 8.67%, LOS 组 5.04%, 对照组 5.28%, 三组间差异显著 ($p = 0.0022$); LOS 葡萄球菌属丰度 0.15%, 对照组丰度为 5.79%, 三组间差异在统计学上非显著 ($p = 0.526$); 假单胞菌属在三组的丰度分别为 NEC 组 2.41%, LOS 组 2.05%, 对照组 5.40%, 且三组间丰度存在显著性差异 ($p = 0.0039$) (图2-5)。

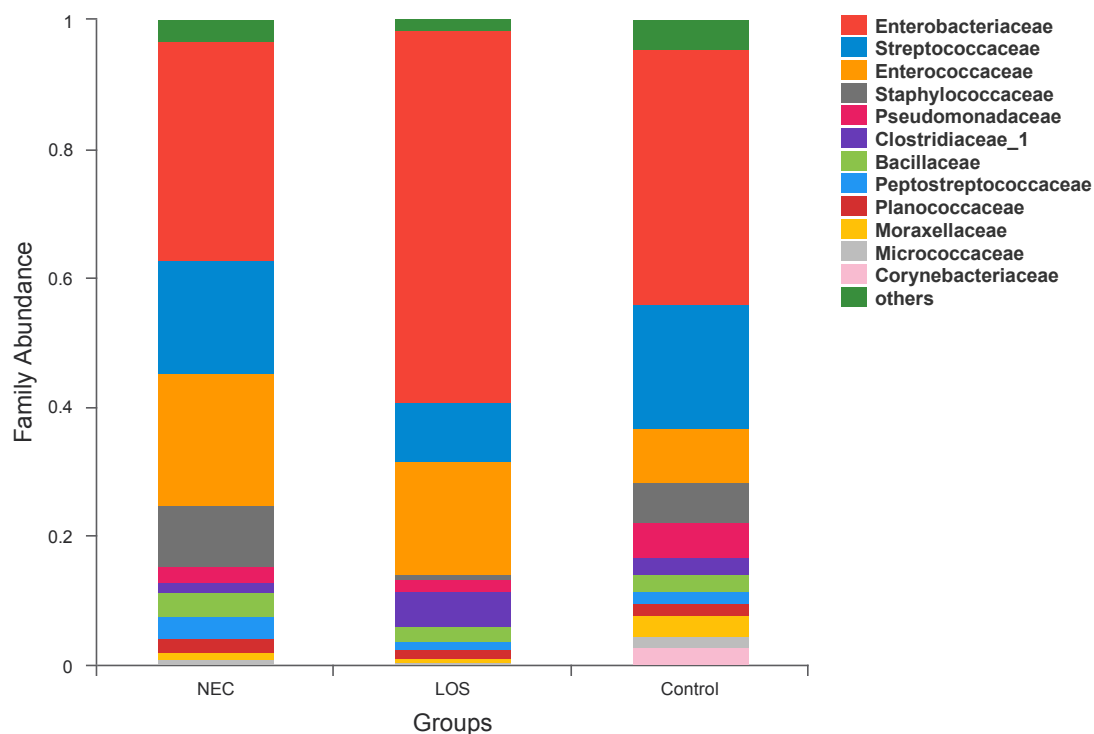


图 2-4 纲水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度。

Figure 2-4 Relative Abundance of Family in Intestinal Microbiota.

2.3.3.6 多级物种差异判别分析 (LEfSe 分析)

通过 LEfSe 分析可发现, 在 NEC 组厚壁菌门 (*Firmicutes*)、芽孢杆菌纲 (*Bacillus*)、芽孢杆菌 XII 菌科 (*XII_o_Bacillales*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 的丰度显著增加, 同时柔壁菌门 (*Tenericutes*)、柔壁菌纲 (*Mollicutes*)、支原体目 (*Mycoplasmatales*)、支原体科 (*Mycoplasmataceae*)、尿素原体属 (*Ureaplasma*) 为其独有; 而在 LOS 组, 其主导作用的物种为变形菌门 (*Proteobacteria*)、 γ -变形菌纲 (γ -*Proteobacteria*)、肠杆菌目 (*Enterobacteriales*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella*) 为主 (图2-6)。

2.3.4 多样性分析和纵向分析

2.3.4.1 NEC, LOS 和对照组患儿间肠道菌群 α 多样性分析

基于 OTU 进行计算, NEC、LOS 和对照组 Shannon-Wiener 指数分别为: 1.32, 1.16 和 1.66; 三组两两比较, 可知 LOS 组和 NEC 组、NEC 组和对照组 shannon

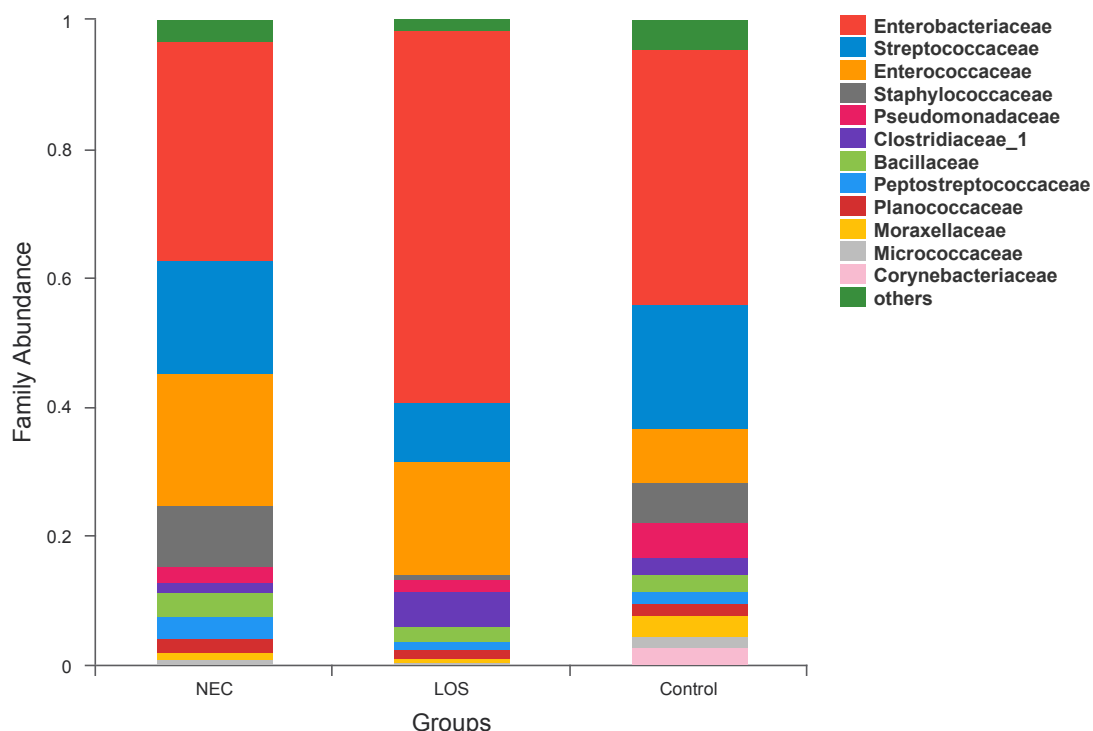


图 2-5 属水平上 NEC, LOS 和对照组患儿菌群相对丰度。

Figure 2-5 Relative Abundance of Genus in Intestinal Microbiota.

指数无统计学差异（分别 $p = 0.47$, $p = 0.06$ ），LOS 组和对照组之间存在统计学差异（图2-7a, $p = 0.01$ ）。NEC, LOS 和对照组 Simpson 指数分别为：0.51, 0.53 和 0.41；三组两两比较，可知 LOS 组和 NEC 组 Simpson 指数无统计学差异（ $p = 0.77$ ）、NEC 组和对照组存在统计学差异（ $p = 0.03$ ），LOS 组和对照组之间存在统计学差异（图2-7b, $p = 0.02$ ）。

2.3.5 基于 β 多样性分析纵向菌群定植模式

使用基于 weighed unifracc 距离的主坐标 (PCoA) 进行分析发现，NEC、LOS 和对照组出生后肠道菌群定植以周为单位进行变化（图2-8，(A)PC1 = 69.92%, PC2 = 15.43%, ANOSIM $r = 0.40$, $p = 0.001$, (B)PC1 = 78.07%, PC2 = 8.06%, ANOSIM $r = 0.36$, $p = 0.001$, (C)PC1 = 66.59%, PC2 = 13.18%, ANOSIM $r = 0.40$, $p = 0.001$ ），这与以往研究的结果一致^[60]。

三组组间比较以及任意两组比较结果表明，在出生后 14 天内和 21 天后，其微生物群定植无明显差异（图2-9(A, B, D, E), ANOSIM (A) $r = 0.02$, $p = 0.797$, (B) r

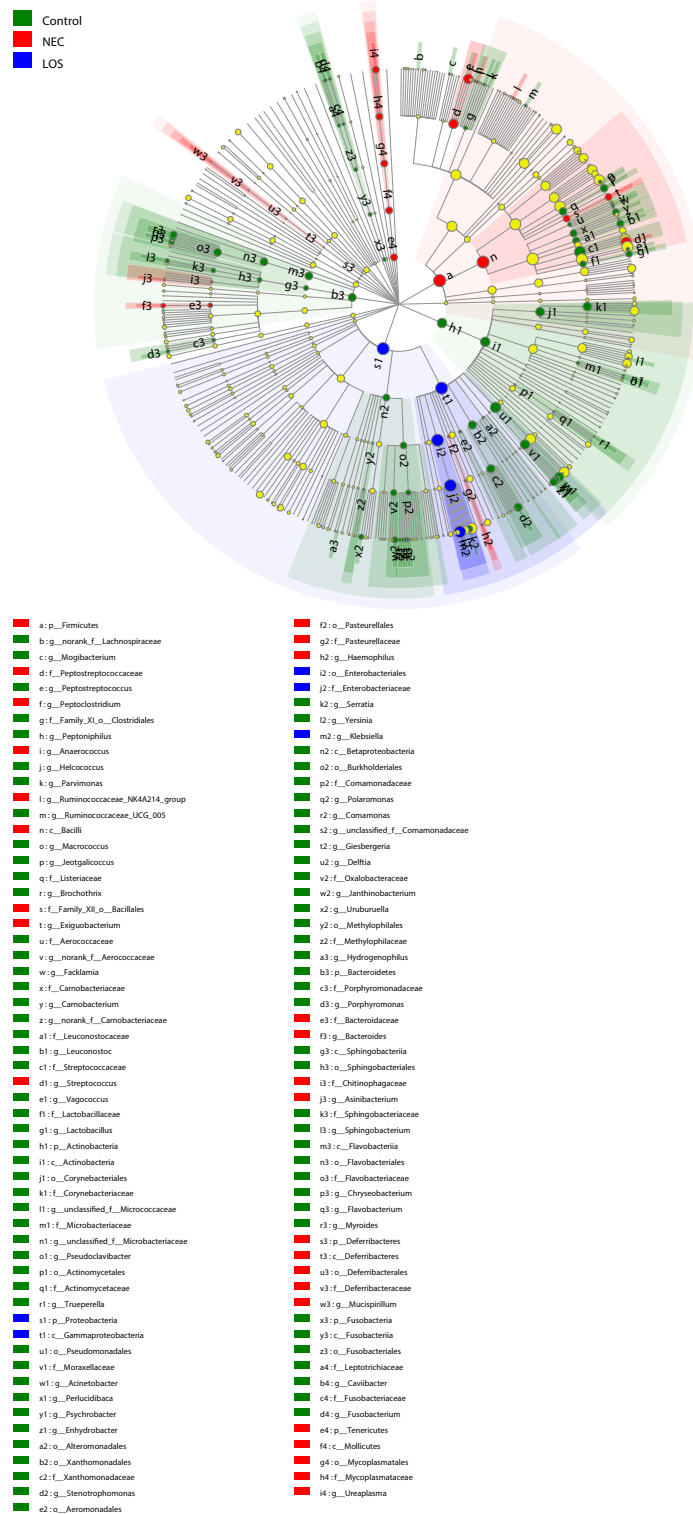


图 2-6 NEC, LOS 和对照组患儿菌群 LefSe 进化分支图。绿色代表对照组，红色代表 NEC 组，蓝色代表 LOS 组。

Figure 2-6 Cladogram generated by software LefSe. Green color represents the control group, red represents the NEC group, and blue represents the LOS group.

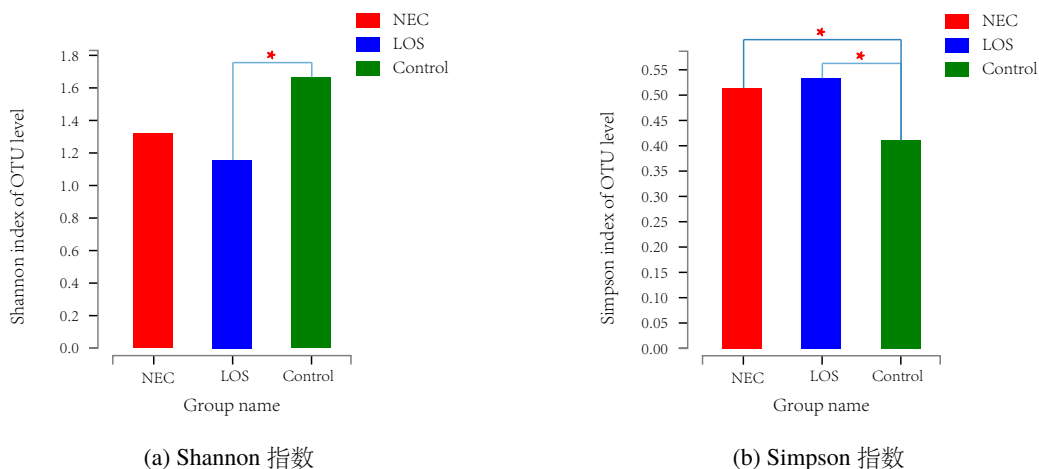


图 2-7 通过计算 Shannon 指数 (a) 和 Simpson(b) 指数对 NEC, LOS 和对照组患儿间肠道菌群 α 多样性分析

Figure 2-7 Exploring α diversity by calculation Shannon diversity index(a) and Simpson diversity index(b) among preterm infants with NEC, LOS and Control groups.

= 0.12, $p = 0.079$, (D) $r = 0.21$, $p = 0.087$, (E) $r = 0.11$, $p = 0.183$); 出生后 14 到 21 天即出生后第三周, PC1 和 PC2 分别占组间差异的 78.18% 和 9.29% (图2-9(C), ANOSIM $r = 0.32$, $p = 0.001$), 提示菌群模式与 NEC 发病的可能关联。此外, NEC 和对照组的对比显示出生后 21 到 28 天即出生后第四周的显著差异 (图2-10, ANOSIM $r = 0.27$, $p = 0.030$); 这表明在 NEC 病程中存在这菌群的持续失调, 尽管在出生后 28 天后, 两组间的差异不显著 (ANOSIM $r = 0.27$, $p = 0.052$)。

另外, 为排除组内个体间差异对于分析结果的潜在影响, 本研究对于每个 NEC 患儿进行单病例的微生物组成 PCoA 分析, 并发现其各自肠道微生物定植随着出生后时间推移的显著模式 (图2-11, ANOSIM (A) $r = 0.26$, $p = 0.01$, (B) $r = 1.00$, $p = 0.035$, (C) $r = 0.610$, $p = 0.014$, (D) $r = 0.09$, $p = 0.008$)。

2.4 讨论

在人类肠道黏膜中定植了超过 10 万亿个微生物^[61], 并在方方面面影响人类的健康^[62]。肠道微环境紊乱可能扰乱人体稳态并导致各种疾病, 包括肥胖^[63], IBD^[61], 心血管疾病^[64], 以及精神障碍^[65]等。虽然早期细菌定植对人类健康的长期影响仍然缺乏证据, 但它仍然是新生儿出生后健康或某些疾病易感性的重要因素。到目前为止, 少有研究关注 NEC 菌群的纵向发展, 另外, 对于新生儿晚期败血症 (Late-Onset Sepsis, LOS) 的菌群研究也十分有限。近期有研究发现 NEC 的致病菌与梭菌 (*Clostridium*) 增殖相关^[66]。然而, 特定病原体尚未确定; 2013 年的

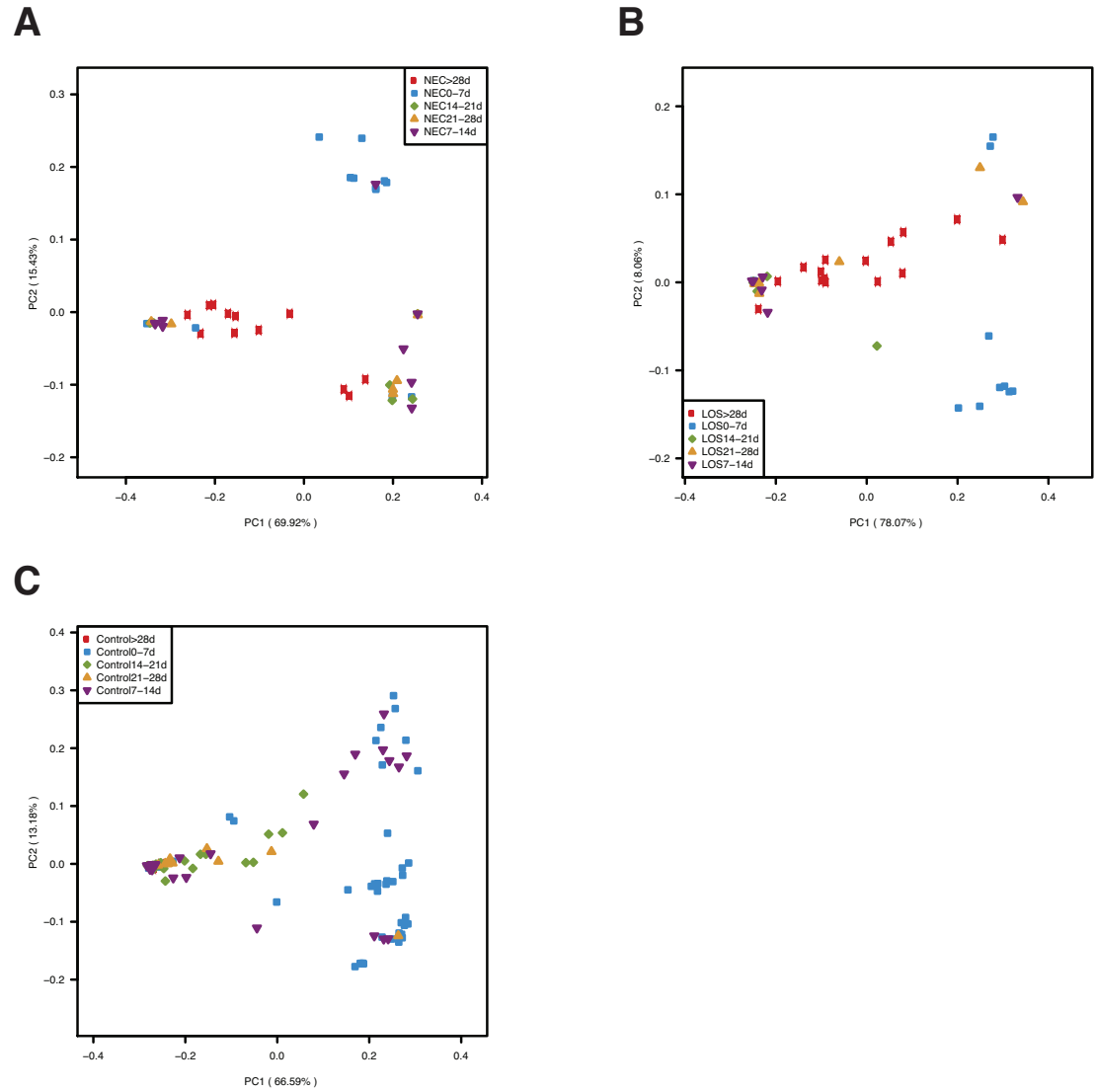


图 2-8 使用 weighed unifrac 距离对出生后肠道菌群定植进行 PCoA 分析

Figure 2-8 Post-partum Colonization Pattern by PCoA of Weighed Unifrac Distances

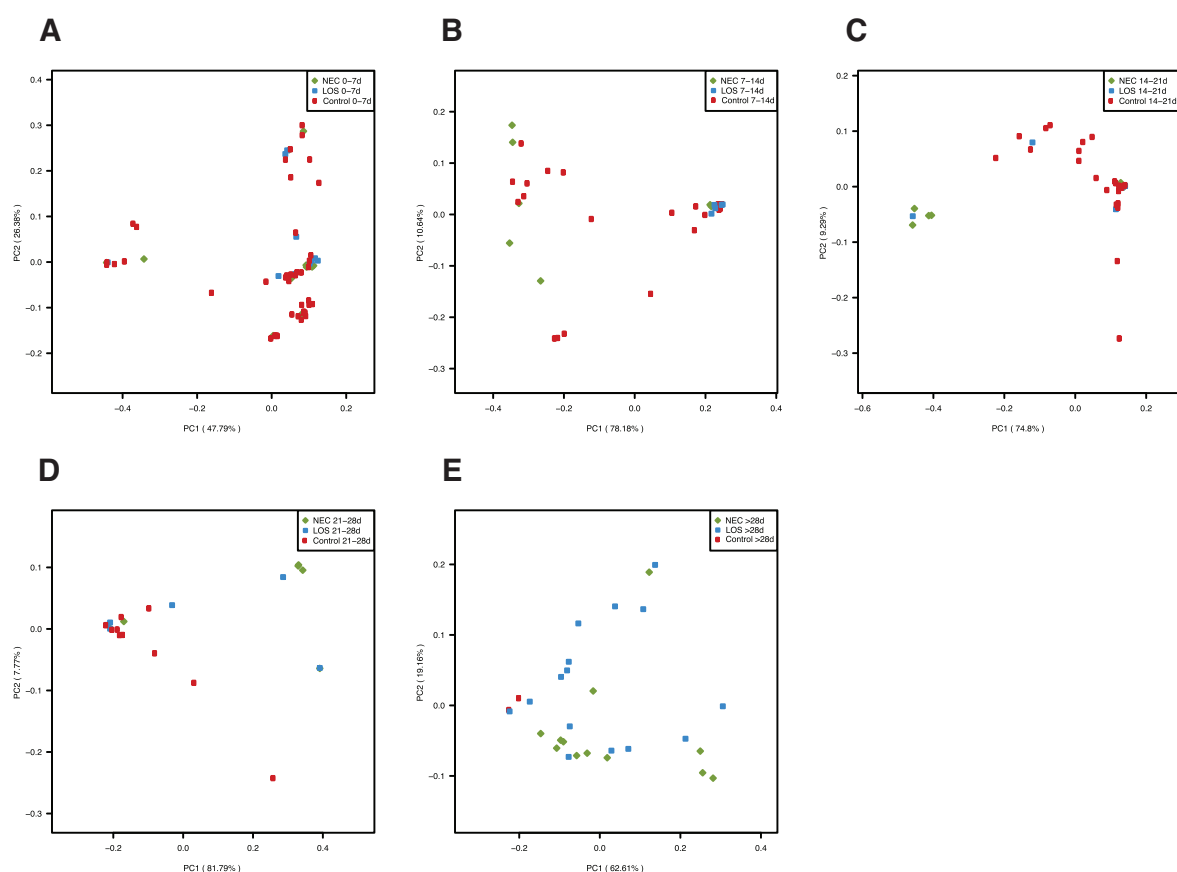


图 2-9 使用 weighed unifrac 距离对三组患儿间肠道菌群模式进行 PCoA 分析。三组患儿在出生后 0 到 7 天菌群分布相似。但在出生后 14 天开始，菌群模式出现显著差异，而此时也是 NEC 常见的发病时间。

Figure 2-9 The PCoA of Microbiota Colonization Analysis on a Weekly Basis after Birth. The colonization patterns within 14 days after birth were similar among NEC, LOS and Control groups. However, after the 14th day after birth, the diversity differed among three groups, which was the time when most NEC occurs.

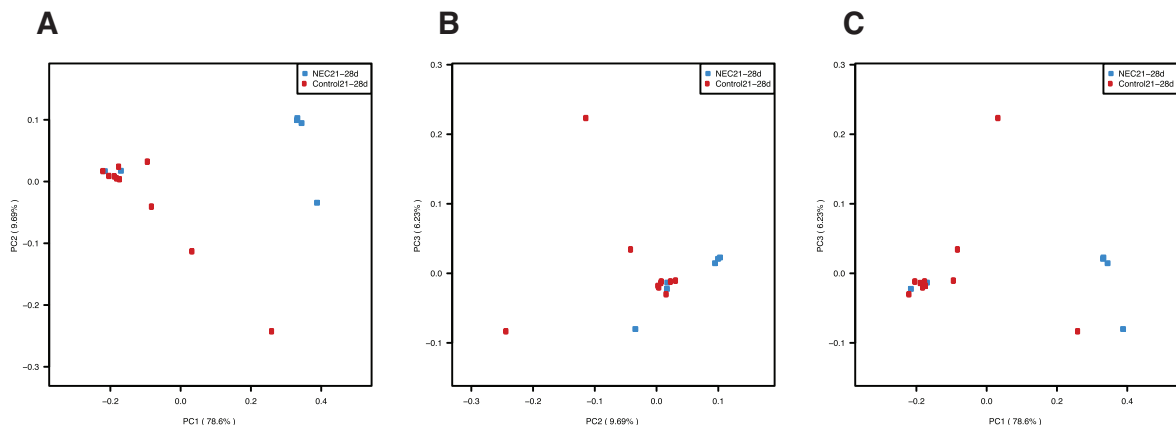


图 2-10 使用 weighed unifrac 距离对 NEC 和对照组患儿肠道菌群模式进行 PCoA 分析。

Figure 2-10 The PCoA of Microbiota Colonization Analysis between NEC and Control groups.

一项研究表明,在生命的 4-9 天内早期的生态失调可能与 NEC 病理生理学密切相关^[67]。因此,为在菌群层面提供对其病因学的新见解,本研究致力于探究肠道菌群定植的发展模式,而非寻找单一病原体。

本研究描述并比较了 NEC 和 LOS 早产儿及其匹配对照组出生后肠道菌群的定植模式的发展。我们对 192 个肠道标本中的 16S rRNA 基因进行了测序:包括 NEC 早产儿的 46 个标本,LOS 早产儿的 42 个标本,以及对照组的 103 个标本。使用 Illumina-MiSeq 平台为所有样品生成了总共 7,472,400 个序列,并检测出一些在自然环境下较为稀有的 OTU。

本研究显示早产儿在 NEC 发病期间存在丰富的变形菌;另外,数据显示,NEC 患者中的厚壁菌门丰富 (59.79%),而对照组和 LOS 组则为变形菌。此外,NEC 患者在发病前分别在 1-3 天和 3-7 天内肠球菌和葡萄球菌的平均丰度最高,相比对照组相比增加了克雷伯氏菌和葡萄球菌的丰度也更高。这些发现表明潜在的致病性葡萄球菌属在 NEC 的发病机理中可能的作用以及常规致病物种如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)。革兰氏阴性克雷伯氏菌丰度增加的趋势表明 LPS 的作用,作为 TLR-4 的配体其能促进体外 Caco-2 胞吞转运作用^[68],并增加细菌易位^[69]。

此外,LOS 组中显著的肠球菌表明高级别抗生素治疗会对菌群平衡产生较大影响。尽管脓毒症中确切的微生物群组成仍有待通过动物研究来阐明^[62, 70],脓毒症,免疫反应和微生物群破坏的机制及其后果可能有助于对败血症进展的理解,并有助于疾病的预防。在一项关于成人的临床研究中,系统性炎症反应综合征对患者肠道厌氧菌减少和肠道致病菌增加与更高的败血症并发症和更高对死亡率相

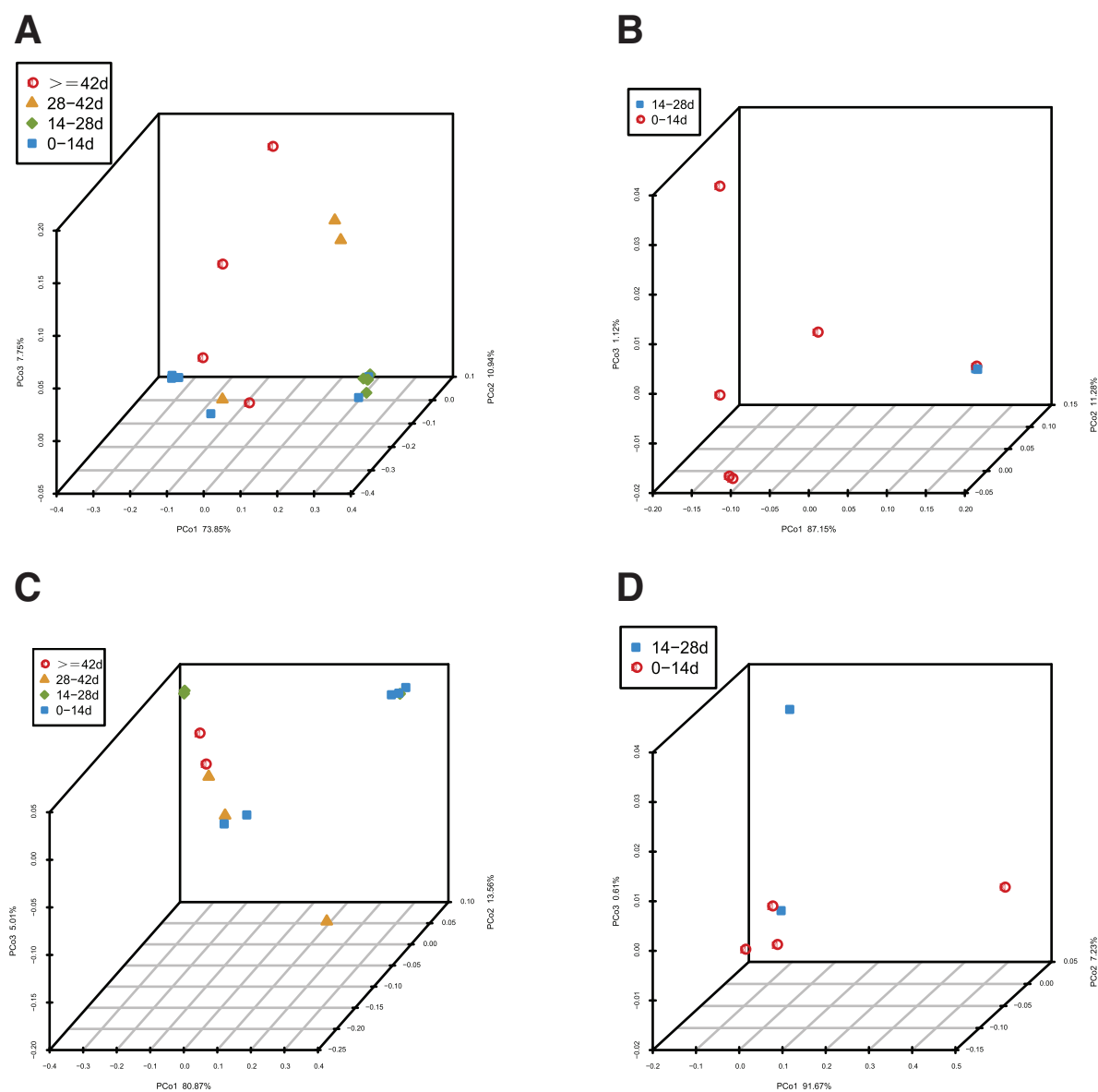


图 2-11 使用 weighed unifrac 三名 NEC 患儿出生后菌群定植模式进行 PCoA 分析。(A)NEC patient No.1, (B)NEC patient No.1, (C)NEC patient No.1, (D)NEC patient No.1

Figure 2-11 The PCoA OF post-partum colonization of each NEC patient. (A)NEC patient No.1, (B)NEC patient No.1, (C)NEC patient No.1, (D)NEC patient No.1

关^[71]；菌群的早期异常定植也与医院相关事件相关^[72]，包括机械通气和抗生素治疗^[73]。虽然我们相对较小的样本量仅显示特定菌属与败血症发病相关的证据有限，但脓毒症患儿的宿主 - 微生物群 - 病原体相互作用值得进一步研究。

另一项研究发现，早产儿肠道微生物群的定植和突然变化可能是分娩方式，喂养类型和孕龄的结果^[72]。以往研究在早产儿中观察到从芽孢杆菌， γ 芽孢杆菌到梭菌的一系列细菌^[74]）的先后主导作用在本研究内在包括 LOS 患者在内的大多数研究受试者中也观察到。本研究证实了出生后以周为时间单位的细菌定植模式，并发现每组肠道微生物群在不同组患儿间存在的显著差异。此外，本研究数据显示，在出生后第 14 天，NEC 和对照组之间的肠道微生物群显著不同，尽管在出生后的前 14 天内具有相似的定植模式（图2-8），Anosim $r = 0.32$ $p = 0.001$ ），表明肠道微生态失调与 NEC 发病之间的强相关性。最后，肠道微生物群在出生后第 21 天至第 28 天的差异（图2-8，ANOSIM $r = 0.27$ ， $p = 0.030$ ）表明在 NEC 进展期间持续的生态失调，这与之前的横断面研究一致^[75]。

2.5 结论

多年来，临床医生和科研工作者在不断努力探究 NEC 和 LOS 与肠道菌群的相关性。虽然尚未阐明特定的病原体或微生物模式，但现有的研究结果有助于改善临床策略，并最大限度地减少早产儿的并发症。

本研究使用高通量测序描述、比较和分析早产儿出生后肠道微生物群的动态模式在 NEC 和 LOS 早产儿中的作用的研究。我们的研究结果支持了“肠道生态失调假说”，即肠道微生物群的“异常动态定制模式”是早产儿 NEC 和 LOS 发生进展的重要因素。

肠道菌群失调和潜在致病菌的过度增殖与 NEC 和 LOS 进展至关重要，抗生素（特别是氨基糖苷类抗生素），可以减少早产儿肠道微生物群落的丰度和多样性。

本研究发现早产儿出生后以周为时间单位的肠道菌群变化模式。早产儿出生后第 2 周起，肠道菌群定植模式出现紊乱并逐渐发展为早产特定感染，NEC 和 LOS 分别呈现不同的纵向变化规律，包括不同致病菌属的丰度增加及菌群多样性不同程度的降低，并且与临床变化相关。

本研究以及其他类似相关研究在肠道菌群动态变化和构成方面提供了早产儿 NEC 和 LOS 发生和发展的证据，从而帮助其早期预防、诊断和治疗，以降低其发病率和严重程度。

当然，本研究有其局限性。首先，本研究中的所有婴儿均采用配方奶进行喂

养，因此无法评估人类母乳的保护作用。由于所有患儿入院时均的经验性抗生素方案，因此经验型抗生素对肠道微生物群的影响无法完全避免。但是，三组横向及纵向比较研究方法可以最大程度找到差异影响因素。此外，NEC 和 LOS 组样本量比较小。本研究结果仍需要在更大样本量的验证。

全文总结

本研究利用 Illumina Miseq 高通量测序平台对坏死性小肠结肠炎和迟发性败血症早产儿出生后肠道菌群进行测序，深入探究其菌群定植的多样性与丰度变化。

通过描述和比较菌群定植模式，我们发现早产儿出生后肠道菌群定植模式的改变使其易感于坏死性小肠结肠炎和迟发性败血症；肠道菌群模式改变具体表现为菌群多样性降低和潜在性致病菌属相对丰度增加。

肠道菌群菌群多样性降低表现为疾病组（NEC 和 LOS 组）的粪便样本菌群的丰富度和均匀度均显著低于同时期内的对照组指数；另外，三组组间的菌群构成的相似度随日龄增加而递减。多样性降低的特征在疾病后期及治愈后仍然持续存在。

包括葡萄球菌、链球菌和克雷博菌在内的潜在致病菌属丰度从 NEC 和 LOS 发病前开始增加，并持续增加直到治愈后，这种持续存在的肠道模式可能是此二种疾病病程长、预后差的重要机制。

附录 A 综述 肠道菌群研究中粪便样品取样与保存方法

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

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^[76]。肠道与人体内其他部位相比, 细菌数量最多、物种丰度最高^[77]。

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^[78, 79]。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^[76, 80, 81]。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^[82, 83]。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^[84]。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^[47, 85-87]。

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

A.1.1.1 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^[88]。

A.1.1.2 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[®] (Ambion, Inc., AM7020) 稳定液，转移至冻存管内，于-80条件下冻存^[88]。

A.1.2 IHMS 标准操作规程 (IHMS Sample Collection and Handling SOPs)

A.1.2.1 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^[89]。

A.1.2.2 样品保存条件

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。

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^[89]。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^[90]，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^[91]。

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 α 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^[92]。

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^[93]。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^[94] 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 RNAlater (Ambion, Austin, TX) 稳定剂(每 0.2 g 粪便样品使用 1mL RNAlater 试剂),再进行样品运输,其测序分析结果 α 多样性、 β 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^[95] 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^[96]。

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^[94, 96]。Wu 等^[97] 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 PSP[®] (Invitek GmbH, Germany) 缓冲液并置于室温下 48h,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^[98]。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^[95]。若取样后的低温放置条件尚难达到,可以使用 RNAlater[™] (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 α 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 RNAlater 稳定剂等样品，其内部 α 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^[99]。另外，此研究与另一研究均提示，使用粪便隐血试卡 FOBT Hemocult Sensa[®]（Beckman Coulter Brea, CA）取样并在常温下放置于 Ep 管内超过 3 天的样品相比立即于 -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^[99, 100]。

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^[90] 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 α 多样性和总 OTU 计数略减少，但无统计学意义。另外，Choo 等^[101] 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 α 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^[102]。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^[91, 103, 104]。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 RNAlater[™]（Ambion, Austin, TX）以及硫氰酸胍溶液^[103] 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

B.1.1 坏死性小肠结肠炎 (NEC) 肠道菌群 MiSeq 测序原始数据

为每个样本生成单独的 FASTQ 文件,存档至 BioProject 登记号为PRJNA470548的 NCBI 序列读取归档中。

B.1.2 儿科肠道炎症性疾病肠道菌群 MiSeq 测序原始数据

为每个样本生成单独的 FASTQ 文件,存档至 BioProject 登记号为PRJNA518158的 NCBI 序列读取归档中。

B.2 论文源代码和原始图片

B.2.0.1 源代码¹

github.com/jiayiliujiayi/masterthesis/tex

B.2.1 原始图片

github.com/jiayiliujiayi/masterthesis/figure

¹本论文使用 L^AT_EX 编译生成

附录 C 辅助材料：表格

表 C-1 NEC, LOS 和对照组每名患儿一般情况

Table C-1 Demographic characteristics of every preterm patient from NEC, LOS and control groups.

Group	PatientID	Gender	Gestational Age(weeks)	Birth weight(g)	NEC Stage	Septic Pathogen	Diagnose Age(d)	ATB duration (d)	Length of Stay(d)
NEC	NEC1	Male	29	1690	IIB	—	11	—	63
NEC	NEC2	Female	29	1025	IIB	—	19	—	221
NEC	NEC3	Female	30	1950	IIA	—	16	—	49
NEC	NEC4	Female	29	1180	IIA	—	18	—	83
LOS	LOS1	Male	29	1080	—	Klebsiella Pneumo- niae	22	21	65
LOS	LOS2	Female	30	975	—	Acinetobacter bau- manni & Klebsiella Pneumoniae & Pseu- domonas aeruginosa	10	37	71
LOS	LOS3	Female	31	1370	—	N—A	17	13	44
Control	Control1	Male	28	1090	—	—	—	—	58
Control	Control2	Female	28	1350	—	—	—	—	56
Control	Control3	Male	29	1230	—	—	—	—	23
Control	Control4	Female	30	1445	—	—	—	—	46
Control	Control5	Female	30	1090	—	—	—	—	22
Control	Control6	Female	31	1550	—	—	—	—	36
Control	Control7	Female	31	1560	—	—	—	—	30
Control	Control8	Female	31	1350	—	—	—	—	53
Control	Control9	Male	31	1700	—	—	—	—	37
Control	Control10	Male	31	1520	—	—	—	—	29
Control	Control11	Male	31	1480	—	—	—	—	29
Control	Control12	Female	32	1860	—	—	—	—	23
Control	Control13	Male	32	1940	—	—	—	—	23
Control	Control14	Female	32	1990	—	—	—	—	19
Control	Control15	Female	33	1610	—	—	—	—	26
Control	Control16	Male	33	1480	—	—	—	—	27
Control	Control17	Male	33	1720	—	—	—	—	22

附录 D 辅助材料：图片

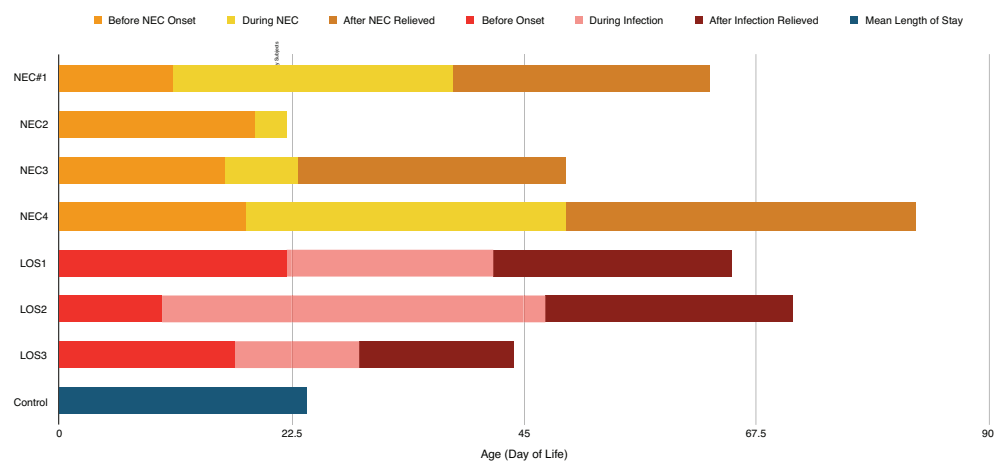


图 D-1 NEC, LOS 和对照组患儿诊断时年龄和住院时长对比。

Figure D-1 Onset and relieving age in NEC and LOS groups, in comparison with a mean length of stay of control group.

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] YOO B B, MAZMANIAN S K. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut[J]. *Immunity*, 2017, 46(6): 910–926.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] HOOPER L V, GORDON J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. *Science*, 2001, 292(5519): 1115–1118.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] PENNISI E. Our egalitarian eden. 2014.
- [15] BÄCKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915–1920.
- [16] AAGAARD K, MA J, ANTONY K, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6: 237ra65. 2014.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 364(3): 255–264.
- [21] 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.
- [22] WALSH M, KLIEGMAN R, FANAROFF A. Necrotizing enterocolitis: a practitioner’s perspective.[J]. *Pediatrics in Review*, 1988, 9(7): 219–226.

- [23] 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.
- [24] KLIEGMAN R, FANAROFF A. Necrotizing enterocolitis[J]. New England Journal of Medicine, 1984, 310(17): 1093–1103.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] KAWASE Y, ISHII T, ARAI H, et al. Gastrointestinal perforation in very low-birthweight infants[J]. Pediatrics International, 2006, 48(6): 599–603.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.

- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.

- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] SOKOL H, LEDUCQ V, ASCHARD H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD[J]. Gut, 2017, 66(6): 1039–1048.
- [53] 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.

- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] STOLL B J, HANSEN N, FANAROFF A A, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network[J]. *Pediatrics*, 2002, 110(2): 285–291.
- [57] MAI V, TORRAZZA R M, UKHANOVA M, et al. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants[J]. *PloS one*, 2013, 8(1): e52876.
- [58] STEWART C J, EMBLETON N D, MARRS E C, et al. Longitudinal development of the gut microbiome and metabolome in preterm neonates with late onset sepsis and healthy controls[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 75.
- [59] BELL M J, TERNBERG J L, FEIGIN R D, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging.[J]. *Annals of surgery*, 1978, 187(1): 1.
- [60] MOLES L, GOMEZ M, HEILIG H, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life[J]. *PloS one*, 2013, 8(6): e66986.
- [61] LEY R E, PETERSON D A, GORDON J I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine[J/OL]. *Cell*, 2006, 124(4): 837–848. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406001929?via%7B%5C%7D3Dihub>. DOI: 10.1016/J.CELL.2006.02.017. ISSN: 0092-8674.
- [62] SEKIROV I, FINLAY B B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection[J]. *The Journal of Physiology*, 2009, 17: 4159–4167. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.172742.

- [63] LIU R, HONG J, XU X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention[J/OL]. *Nature Medicine*, 2017, 23(7):859–868. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.4358>. DOI: 10.1038/nm.4358. ISSN: 1078-8956.
- [64] WANG Z, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease.[J/OL]. *Nature*, 2011, 472(7341):57–63.<http://www.nature.com/articles/nature09922>%20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475195>%20<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3086762>. DOI: 10.1038/nature09922. ISSN: 1476-4687.
- [65] ROGERS G B, KEATING D J, YOUNG R L, et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways[J/OL]. *Molecular Psychiatry*, 2016, 21(6):738–748. <http://www.nature.com/articles/mp201650>. DOI: 10.1038/mp.2016.50. ISSN: 1359-4184.
- [66] HOSNY M, CASSIR N, LA SCOLA B. Updating on gut microbiota and its relationship with the occurrence of necrotizing enterocolitis[J]. *Human Microbiome Journal*, 2017, 4: 14–19.
- [67] MORROW A L, LAGOMARCINO A J, SCHIBLER K R, et al. Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants[J]. *Microbiome*, 2013, 1(1): 13.
- [68] PANIGRAHI P, BAMFORD P, HORVATH K, et al. Escherichia coli Transcytosis in a Caco-2 Cell Model: Implications in Neonatal Necrotizing Enterocolitis1[J]. *Pediatric research*, 1996, 40(3): 415.
- [69] DEITCH E A, BERG R, SPECIAN R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut.[J/OL]. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 1987, 122(2): 185–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3545142>. ISSN: 0004-0010.
- [70] HAND T W, SANTOS L M D, BOULADOUX N, et al. Acute Gastrointestinal Infection Induces Long-Lived Microbiota-Specific T Cell Responses[J/OL]. *Science (New York, N.Y.)*, 2012, 337(September):1553–1557. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1220961>%20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923434>%20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923434>

- //www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3784339. DOI: 10.1126/science.1220961. ISSN: 1095-9203.
- [71] SHIMIZU K, OGURA H, HAMASAKI T, et al. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2011, 56(4): 1171–1177. DOI: 10.1007/s10620-010-1418-8. ISSN: 01632116.
- [72] DUTTA S, GANESH M, RAY P, et al. Intestinal colonization among very low birth weight infants in first week of life.[J/OL]. Indian pediatrics, 2014, 51(10): 807–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25362012>. ISSN: 0974-7559.
- [73] MOLES L, GÓMEZ M, HEILIG H, et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e66986. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066986>. DOI: 10.1371/journal.pone.0066986. ISSN: 1932-6203.
- [74] LA ROSA P S, WARNER B B, ZHOU Y, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut.[J/OL]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(34): 12522–7. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409497111>%20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114261>%20<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4151715>. DOI: 10.1073/pnas.1409497111. ISSN: 1091-6490.
- [75] WANG Y, HOENIG J D, MALIN K J, et al. No Title[J/OL]. 2009, 3(8). <http://www.nature.com/articles/ismej200937>%20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369970>%20<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2713796>. DOI: 10.1038/ismej.2009.37.
- [76] SAXENA R, SHARMA V K. Metagenomic Insight into Human Microbiome : Its Implications in Health and Disease A Metagenomic Insight Into the Human Microbiome : Its Implications in Health and Disease[M/OL]. June. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016: 107–119. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12->

- 420196-5.00009-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-420196-5.00009-5. ISBN: 9780124201965.
- [77] Willey, Sherwood, Woolverton. Prescott's Microbiology[M]. Vol. 53. 9. [S.l.]: [s.n.], 2013: 1689-1699arXiv: arXiv : 1011 . 1669v3. DOI: 10 . 1017 / CB09781107415324.004. ISBN: 9788578110796.
- [78] LI D, WANG P, WANG P, et al. The gut microbiota: A treasure for human health[J]. Biotechnology Advances, 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.003. ISSN: 07349750.
- [79] LOZUPONE C A, STOMBAUGH J I, GORDON J I, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota[J]. Nature, 2012, 489(7415): 220.
- [80] RAOULT D, HENRISSAT B. Are stool samples suitable for studying the link between gut microbiota and obesity?[J]. European Journal of Epidemiology, 2014, 29(5): 307-309. DOI: 10.1007/s10654-014-9905-4. ISSN: 15737284.
- [81] GILL S, POP M, DEBOY R, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science (New York, N.Y.), 2006, 312(June): 1355-1359. DOI: 10.1126/science.1124234.
- [82] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J/OL]. Nat Rev Genet, 2016, 17(6): 333-351arXiv: arXiv:1011.1669v3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184599>. DOI: 10.1038/nrg.2016.49. ISSN: 1471-0056.
- [83] FRAHER M H, O'TOOLE P W, QUIGLEY E M M. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician[J/OL]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2012, 9(6): 312-322. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.44. ISSN: 1759-5045.
- [84] FRASER L, STRZEZEK J, KORDAN W. Effect of freezing on sperm nuclear DNA[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2011, 46(SUPPL. 2): 14-17. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01815.x. ISSN: 09366768.
- [85] MAI V, YOUNG C M, UKHANOVA M, et al. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis[J]. PLoS ONE, 2011, 6(6): 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0020647. ISSN: 19326203.

- [86] CHU D M, MA J, PRINCE A L, et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery[J/OL]. *Nature Medicine*, 2017, 23(3):314–326 13. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4272>. DOI: 10.1038/nm.4272. ISSN: 1078-8956.
- [87] SCHMIDT N W, THURNHEER T, ZHANG S, et al. Sampling Strategies for Three-Dimensional Spatial Community Structures in IBD Microbiota Research[J]. *Cell. Infect. Microbiol*, 2017, 7(7). DOI: 10.3389/fcimb.2017.00051. ISSN: 2235-2988.
- [88] WU W, CHEN C, PANYOD S, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study-The journey from bathroom to bench.[J]. *Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi*, 2018.
- [89] SANTIAGO A, PANDA S, MENGELS G, et al. Processing faecal samples: a step forward for standards in microbial community analysis[J]. *BMC microbiology*, 2014, 14(1): 112.
- [90] SHAW A G, SIM K, POWELL E, et al. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room?[J]. *Microbiome*, 2016, 4(1): 40.
- [91] GUO Y, LI S.-H, KUANG Y.-S, et al. Effect of short-term room temperature storage on the microbial community in infant fecal samples[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 26648.
- [92] WATT E, GEMMELL M R, BERRY S, et al. Extending colonic mucosal microbiome analysis—assessment of colonic lavage as a proxy for endoscopic colonic biopsies[J/OL]. *Microbiome*, 2016, 4(1):61. <http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-016-0207-9>. DOI: 10.1186/s40168-016-0207-9. ISSN: 2049-2618.
- [93] KUMAR R, EIPERS P, LITTLE R B, et al. Getting started with microbiome analysis: sample acquisition to bioinformatics[J]. *Current protocols in human genetics*, 2014, 82(1): 18–8.

- [94] NECHVATAL J M, RAM J L, BASSON M D, et al. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces[J]. *Journal of microbiological methods*, 2008, 72(2): 124–132.
- [95] GORZELAK M A, GILL S K, TASNIM N, et al. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool[J]. *PloS one*, 2015, 10(8): e0134802.
- [96] IANCU C V, WRIGHT E R, HEYMANN J B, et al. A comparison of liquid nitrogen and liquid helium as cryogenics for electron cryotomography[J]. *Journal of structural biology*, 2006, 153(3): 231–240.
- [97] WU G D, LEWIS J D, HOFFMANN C, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags[J]. *BMC microbiology*, 2010, 10(1): 1.
- [98] TEDJO D I, JONKERS D M, SVELKOU P H, et al. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects[J]. *PloS one*, 2015, 10(5): e0126685.
- [99] VOGTMANN E, CHEN J, AMIR A, et al. Comparison of collection methods for fecal samples in microbiome studies[J]. *American journal of epidemiology*, 2017, 185(2): 115–123.
- [100] DOMINIANNI C, WU J, HAYES R B, et al. Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection[J]. *BMC microbiology*, 2014, 14(1): 103.
- [101] CHOO J M, LEONG L E, ROGERS G B. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles[J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 16350.
- [102] BAHL M I, BERGSTRÖM A, LICHT T R. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis[J]. *FEMS microbiology letters*, 2012, 329(2): 193–197.
- [103] NISHIMOTO Y, MIZUTANI S, NAKAJIMA T, et al. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy[J]. *Gut*, 2016: gutjnl–2016.

- [104] CARROLL I M, RINGEL-KULKA T, SIDDLE J P, et al. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage[J]. PloS one, 2012, 7(10): e46953.

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 第一作者. 中文核心期刊论文, 2018.
- [2] 第一作者. SCI 论文, 2019.(修回中)

攻读学位期间参与的项目

- [1] 参与国家自然科学基金项目 (2018 年 6 月-2019 年 3 月)