

## 临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000373

## 先天性肛门直肠畸形患儿术后肠道菌群变化的前瞻性研究

安悦, 王佚, 李晓庆, 艾青, 余加林, 代英, 程茜

(重庆医科大学附属儿童医院; 儿童发育疾病研究教育部重点实验室、

儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

**【摘要】目的:**前瞻性研究先天性肛门直肠畸形(anorectal malformation, ARM)患儿术后肠道菌群变化的情况。**方法:**实时荧光定量 PCR 法检测分析 21 名先天性 ARM 组患儿 10 日龄(出院前 1 d)、1 月龄和 3 月龄~4 月龄时粪便中 3 种主要菌群数量,并与日龄匹配的 21 名对照组正常婴儿菌群数量进行比较。**结果:**(1)10 日龄,先天性 ARM 组双歧杆菌与大肠杆菌数量的比值(bifidobacteria/escherichia coli, B/E)<1,大肠杆菌数量较双歧杆菌高和乳酸杆菌高( $P=0.021$  和  $P=0.004$ ),且乳酸杆菌数量较对照组高( $P=0.001$ )。(2)1 月龄,先天性 ARM 组 B/E 较 10 日龄增高( $P=0.030$ ),B/E>1,双歧杆菌数量增高( $P=0.001$ ),高于自身大肠杆菌、乳酸杆菌数量和对照组双歧杆菌数量( $P=0.001$ ,  $P<0.001$  和  $P=0.004$ ),乳酸杆菌数量亦较对照组高( $P<0.001$ )。(3)3 月龄~4 月龄,先天性 ARM 组乳酸杆菌数量较 1 月龄时降低( $P=0.005$ ),与对照组无统计学差异( $P=0.571$ ),双歧杆菌数量较对照组高( $P=0.004$ )。(4)3 月龄~4 月龄,连续服用益生菌患儿肠道双歧杆菌数量显著高于对照组婴儿( $P=0.013$ ),未连续补充者肠道双歧杆菌数量和对照组婴儿相比无统计学差异( $P=0.032$ )。**结论:**(1)10 日龄,先天性 ARM 患儿以大肠杆菌数量占优势,乳酸杆菌数量亦高,较正常对照组婴儿肠道大肠杆菌和双歧杆菌数量均占优势的定植状况不同。(2)1 月龄和正常对照组婴儿一样,双歧杆菌成为患儿肠道优势菌,而乳酸杆菌数量仍居高。(3)3 月龄~4 月龄,患儿肠道乳酸杆菌数量下降至正常对照组水平,菌群状态接近正常婴儿。(4)患儿 1 月龄后连续补充益生菌制剂至 3 月龄~4 月龄能够使肠道保持高水平的双歧杆菌数量。

**【关键词】**先天性肛门直肠畸形; 大肠杆菌; 双歧杆菌; 乳酸杆菌**【中图分类号】**R726.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-08**作者介绍:**安悦, Email: docanyue@126.com,

研究方向: 肠道微生态学。

**通信作者:**程茜, Email: chqq5@126.com。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000373.html>

search Clinical Anaesthesiology, 2006, 20(1): 111-119.

[4] 谭玮, 罗爱林. Narcotrend 与 BIS 监测硬膜外阻滞期间右美托咪定镇静深度的比较[J]. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(2): 109-112.

[5] Ronald D. Miller. Miller's Anesthesia[M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009.

[6] 庄心良, 曾因明, 陈伯奎. 现代麻醉学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

[7] Frenneaux M, Williams L. Ventricular-arterial and ventricular-ventricular interaction and their relevance to diastolic filling[J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2007, 49(4): 252-262.

[8] Gyires K, Zadori ZS, Torok T, et al.  $\alpha(2)$ -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions[J]. Neurochem Int, 2009, 55(7): 447-453.

[9] Tobias JD. Dexmedetomidine: applications in pediatric critical care and pediatric anesthesiology[J]. Pediatr Crit Care Med, 2007, 8(2): 115-131.

[10] Ickeringill M, Shehabi Y, Adamson H, et al. Dexmedetomidine infusion without loading dose in surgical patients requiring mechanical venti-

lation: hemodynamic effects and efficacy[J]. Anaesth Intensive Care, 2004, 32(6): 741-745.

[11] Su F, Hammer GB. Dexmedetomidine: pediatric pharmacology, clinical uses and safety[J]. Expert Opin Drug Saf, 2011, 10(1): 55-66.

[12] 杨自娟, 张兴安. 右美托咪定的临床应用研究[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(2): 189-191.

[13] Massad IM, Mohsen WA, Basha AS, et al. A balanced anesthesia with dexmedetomidine decreases postoperative nausea and vomiting after laparoscopic surgery[J]. Saudi Med J, 2009, 30(12): 1537-1541.

[14] 吴涯雯, 黄鸿晖, 曾静贤, 等. 右美托咪啉用于妇科腹腔镜手术全麻后寒战的效果: 前瞻性、随机、单盲、临床对比研究[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(4): 611-614.

[15] 李尚福, 袁宝龙. 麻醉深度监测仪 Narcotrend 临床应用及研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2009, 30(6): 3262-3321.

[16] 赖仁纯, 王旭东, 黄婉. Narcotrend 在老年患者全麻清醒期意识恢复监测中的应用[J]. 广东医学, 2010, 31(9): 1100-1102.

(责任编辑: 唐宗顺)

## Changes of intestinal microflorae in infants with congenital anorectal malformation after the surgery: a prospective study

An Yue, Wang Yi, Li Xiaoqing, Ai Qing, Yu Jialin, Dai Ying, Cheng Qian

(Key Laboratory of Child Development and Disorders Founded by Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the changing trends of intestinal microflorae in the postoperative infants with congenital anorectal malformation (ARM). **Methods:** Real-time quantitative PCR was used to detect the numbers of three main intestinal microflorae in stools of 21 congenital ARM infants aged 10 d (the day before discharge), 1 month and 3–4 months. The number of microflorae was compared between 21 congenital ARM infants and 21 normal infants. **Results:** (1) In congenital ARM 10 d group, the number of *bifidobacteria* versus the number of *escherichia coli* (B/E) was  $<1$ ; the number of B/E was higher than that of *bifidobacteria* and *lactobacilli* in congenital ARM 10 d group ( $P=0.021$ ,  $P=0.004$ ); the number of *lactobacilli* was higher in congenital ARM 10 d group than in normal control group ( $P=0.001$ ). (2) B/E was increased in congenital ARM 1 month group ( $B/E>1$ ) than in congenital ARM 10 d group ( $P=0.030$ ). The number of *bifidobacteria* was increased significantly ( $P=0.001$ ), higher than that of B/E or *lactobacilli* in congenital ARM 1 month group ( $P=0.001$  and  $P<0.001$ ). The numbers of *bifidobacteria* and *lactobacilli* were higher in congenital ARM 1 month group than in normal control group ( $P=0.004$  and  $P<0.001$ ). (3) The number of *lactobacilli* was lower in congenital ARM 3–4 months group than in congenital ARM 1 month group ( $P=0.005$ ) and there was no difference in the number of *lactobacilli* congenital ARM 3–4 months group and normal control group ( $P=0.571$ ). The number of *bifidobacteria* was higher in congenital ARM 3–4 months group than in normal control group ( $P=0.004$ ). (4) The number of *bifidobacteria* was higher in infants taking probiotics continuously in congenital ARM–4 months group than in infants in normal control group ( $P=0.013$ ) whereas there was no significant difference in the number of *bifidobacteria* between infants taking probiotics discontinuously in congenital ARM 3–4 months group and infants in normal control group ( $P=0.032$ ). **Conclusion:** (1) B/E is the predominant bacteria and the number of *lactobacilli* is higher in the congenital ARM 10 d group. The structure of three main microflorae is different from that in normal control group. (2) *Bifidobacteria* becomes the predominant bacteria in congenital ARM 1 month group and normal control group and the number of *lactobacilli* is still high. (3) The number of *lactobacilli* is decreased in congenital ARM 3–4 months group. The structure of three main microflorae in congenital ARM 3–4 months group is similar to that in normal control group. (4) Taking probiotics continuously till 3–4 months' age can keep the high level of *bifidobacteria* in the intestine.

**[Key words]** congenital anorectal malformation; *escherichia coli*; *bifidobacteria*; *lactobacilli*

婴儿期是肠道菌群定植和达到微生态平衡的关键阶段, 婴儿肠道菌群多样性低, 微生态环境较脆弱, 定植过程易受多种因素影响。先天性肛门直肠畸形 (anorectal malformation, ARM) 是新生儿常见的消化道畸形, 及早进行手术解除肠道梗阻可以挽救患儿生命。但是, 生命早期的肠道手术及术后用药等是否会对肠道菌群定植造成影响鲜见报道。本研究选取先天性低位 ARM 术后的婴儿, 前瞻性观测其肠道内 3 种主要菌群的变化, 了解该人群肠道微生态建立情况及可能的影响因素。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

##### 1.1.1 先天性 ARM 组 所有病例来自重庆医科大学附属儿

童医院新生儿外科。纳入标准: 诊断为先天性低位 ARM, 足月儿, 生后 7 d 内行经会阴肛门成型术, 围术期均静脉注射头孢唑林 (50 mg/kg, bid); 排除标准: 早产儿, 低出生体重儿, 中、高位肛门闭锁行结肠造口术, 合并其它器官畸形, 21-三体综合征, 新生儿硬肿症, 败血症, 消化道穿孔, 巨结肠, 坏死性小肠结肠炎及其它急慢性疾病者。共 29 名患儿符合上述标准, 其中 21 名成功随访至 3~4 月龄的患儿作为先天性 ARM 组。

1.1.2 正常对照组 重庆市渝中区某社区进行新生儿访视的婴儿。纳入标准: 出生健康, 足月新生儿, 随访期间无消化系统疾病发生, 从未使用抗生素和益生菌制剂者。符合上述标准且成功随访至 3~4 月龄的婴儿共 32 名, 选取其中 21 名生产方式、喂养方式和 3 次收集样本日龄和先天性 ARM 组患儿匹配的婴儿作为正常对照组。

本研究为临床观察性研究, 已获得重庆医科大学伦理委员会批准。所有纳入研究的新生儿其监护人代表婴儿签署知

情同意书。

## 1.2 研究方法

1.2.1 标本收集 分 3 次分别收集 2 组的粪便标本,第 1 次:10 日龄(先天性 ARM 组出院前 1 d);第 2 次:1 月龄;第 3 次:3~4 月龄。样本收集时所有婴儿均未添加辅食。

1.2.2 细菌 DNA 提取 参照 Yuan 等<sup>[10]</sup>描述的方法,称取 100 mg 粪便经研磨、离心、抽提、沉淀、洗涤、溶解等步骤后将制备好的 DNA 溶液于-20 ℃冰箱保存。

1.2.3 构建标准曲线 利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,在各细菌属 16S rRNA 序列特异性区域设计上下游引物:大肠杆菌:上游 5'-CATGCCGCGTGTATGAAGAA,下游 5'-CGGGTAACGTCAATGAGCAAA-3';双歧杆菌:上游 5'-CGC-GTCCGGTGTGAAAG-3',下游 5'-CTTCCCGATATCTACACA-TTCCA-3';乳酸杆菌:5'-GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC-3',上游 5'-GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC-3'。取准确定量的细菌构建质粒(大肠杆菌、双歧杆菌分别由重庆医科大学微生物实验室和儿童医院临床检验中心提供,乳酸杆菌购于广州微生物菌种库)做 10 倍系列稀释后同时和样本进行如下反应,作为标准曲线。

1.2.4 Real-time PCR 20 μl PCR 扩增体系包括 DNA 模板 2 μl(稀释至 100 ng/μl),上下游引物各 2 μl(10 μmol/L),premix 10 μl,无菌水 4 μl。98 ℃变性 2 min 后,大肠杆菌反应条件:98 ℃ 2 s,56 ℃ 10 s;双歧杆菌反应条件:98 ℃ 2 s,57 ℃ 20 s,68 ℃ 10 s;乳酸杆菌反应条件:98 ℃ 2 s,61.5 ℃ 10 s;40 个循环;每个样品均同时做 3 个平行复孔。

## 1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,将细菌拷贝数结果经对数转换后,正态分布数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组间比较行  $t$  检验;非正态分布数据用中位数(最小值,最大值)[ $M(\min, \max)$ ]表示,2 组间相同菌群菌量资料行 Mann-Whitney U 检验,同组不同时间点菌群量资料行 Wilcoxon Signed Rank 检验,3 组间两两比较行 Bonferroni 检验;计数资料的比较行  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$  (Bonferroni 检验;调整检验水准  $\alpha'=0.017$ )。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

先天性 ARM 组患儿手术开始时间中位数为生后 1 d(0~7 d),围术期静脉注射头孢唑林的疗程中位数为 6.5 d(2~14 d),住院时间中位数为 8 d(6~16 d);21 名患儿术后第 7 天(出院后第 1 天)均按医嘱服用四联益生菌制剂,其中 13 名患儿至 3~4 月龄门诊随访结束均连续服用益生菌制剂,8 名患儿 1 月龄后未连续服用益生菌制剂,在 3~4 月龄随访时停用益生菌制剂 2 周到 2 月不等。所有患儿术后排便正常,无肛肠感染发生。先天性 ARM 组患儿和正常对照组婴儿在性别、生产方式、收集粪便样本期间的喂养方式构成比和胎龄、出生体质量、3 次收集样本日龄均无统计学差异(表 1)。

### 2.2 先天性 ARM 组和正常对照组菌群数量变化

2.2.1 先天性 ARM 组 (1)10 日龄:粪便样本中大肠杆菌数量较双歧杆菌高( $P=0.021$ ),较乳酸杆菌高( $P=0.004$ ),双歧杆菌与大肠杆菌数量的比值(*bifidobacteria/escherichia coli*, B/E)<1;(2)1 月龄:双歧杆菌数量较大肠杆菌高( $P=0.001$ ),大肠杆菌数量较乳酸杆菌高( $P<0.001$ )。较 10 日龄,双歧杆菌数量增高( $P=0.001$ ),B/E 增高( $P=0.030$ ),B/E>1;(3)3~4 月龄:双歧杆菌数量较大肠杆菌高( $P=0.001$ ),大肠杆菌数量较乳酸杆菌高( $P<0.001$ )。较 1 月龄,乳酸杆菌数量减少( $P=0.002$ )。

2.2.2 正常对照组 (1)10 日龄:大肠杆菌和双歧杆菌数量均较乳酸杆菌高( $P$  均<0.001),B/E<1;(2)1 月龄:大肠杆菌和双歧杆菌数量均较乳酸杆菌高( $P$  均<0.001),B/E>1。较 10 日龄,乳酸杆菌数量减少( $P=0.007$ );(3)3~4 月龄:双歧杆菌数量较大肠杆菌高( $P=0.043$ ),大肠杆菌数量较乳酸杆菌高( $P<0.001$ )。较 1 月龄,大肠杆菌数量增加( $P=0.023$ ),B/E>1。

2.2.3 先天性 ARM 组和正常对照组不同时间点菌群数量的差异 详见表 2。

### 2.3 3 组菌群数量比较

1 月龄后连续和未连续服用益生菌患儿与正常对照组肠道菌群数量变化的比较,详见表 3。

表 1 先天性 ARM 组和正常对照组婴儿资料统计

Tab.1 Characteristics of infants in congenital ARM group and normal group

| 指标                   | 先天性 ARM 组 ( $n=21$ )  | 正常对照组 ( $n=21$ )      | $\chi^2/(t, z)$ 值 | $P$ 值              |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 男/女 ( $n$ )          | 12/9                  | 14/7                  | 0.404             | 0.525 <sup>a</sup> |
| 顺产/剖宫产 ( $n$ )       | 5/16                  | 9/12                  | 1.714             | 0.190 <sup>a</sup> |
| 配方奶喂养/部分母乳喂养 ( $n$ ) | 5/16                  | 2/19                  | 0.686             | 0.408 <sup>b</sup> |
| 胎龄 (周)               | 39.29 ± 0.71          | 39.50 ± 1.24          | 0.330             | 0.503              |
| 平均出生体质量 (kg)         | 3.10 (2.70~4.40)      | 3.48 (2.60~4.20)      | -1.626            | 0.104              |
| 第 1 次收集样本日龄 (d)      | 9.00 (6.00~16.00)     | 10.00 (5.00~16.00)    | -0.228            | 0.819              |
| 第 2 次收集样本日龄 (d)      | 31.00 (30.00~37.00)   | 32.00 (30.00~37.00)   | -0.885            | 0.376              |
| 第 3 次收集样本日龄 (d)      | 110.00 (92.00~121.00) | 106.00 (92.00~120.00) | -0.517            | 0.605              |

注:a. Pearson Chi-square 的  $\chi^2$  检验;b. Continuity Correction 的  $\chi^2$  检验

表 2 先天性 ARM 组和正常对照组婴儿肠道菌群数量比较 ( log 拷贝数 /g 湿粪 )

Tab.2 Comparison of floras in congenital ARM group and normal group ( log N /g wet feces )

|        | 先天性 ARM 组 ( n=21 )   | 正常对照组 ( n=21 )       | Z 值    | P 值    |
|--------|----------------------|----------------------|--------|--------|
| 10日龄   |                      |                      |        |        |
| 大肠杆菌   | 10.85 ( 4.75~12.11 ) | 9.85 ( 4.87~11.34 )  | -1.648 | 0.099  |
| 双歧杆菌   | 8.02 ( 5.64~11.51 )  | 8.17 ( 5.51~11.36 )  | -0.516 | 0.606  |
| 乳酸杆菌   | 7.49 ( 4.80~11.04 )  | 5.14 ( 4.54~8.40 )   | -3.283 | 0.001  |
| B/E    | 0.91 ( 0.49~1.46 )   | 0.95 ( 0.56~2.08 )   | -0.818 | 0.414  |
| 1 月龄   |                      |                      |        |        |
| 大肠杆菌   | 10.16 ( 6.42~11.17 ) | 9.85 ( 4.50~10.66 )  | -1.924 | 0.054  |
| 双歧杆菌   | 11.05 ( 7.52~11.59 ) | 10.24 ( 5.78~11.59 ) | -2.855 | 0.004  |
| 乳酸杆菌   | 9.30 ( 4.33~10.22 )  | 4.60 ( 2.48~8.08 )   | -4.314 | <0.001 |
| B/E    | 1.08 ( 0.68~1.65 )   | 1.11 ( 0.73~1.88 )   | -0.189 | 0.850  |
| 3~4 月龄 |                      |                      |        |        |
| 大肠杆菌   | 10.22 ( 4.79~12.62 ) | 10.01 ( 5.76~11.53 ) | -0.591 | 0.554  |
| 双歧杆菌   | 11.18 ( 7.46~14.64 ) | 10.77 ( 5.90~11.37 ) | -2.855 | 0.004  |
| 乳酸杆菌   | 5.33 ( 2.92~8.75 )   | 4.97 ( 3.00~10.01 )  | -0.566 | 0.571  |
| B/E    | 1.14 ( 0.67~2.23 )   | 1.07 ( 0.55~1.76 )   | -1.371 | 0.170  |

表 3 先天性 ARM 组连续和未连续服用益生菌患儿与正常对照组婴儿肠道菌群数量比较 ( log 拷贝数 /g 湿粪 )

Tab.3 Comparison of floras among congenital ARM groups taking probiotics continuously and discontinuously and normal group ( log N /g wet feces )

|        | ①先天性 ARM 组连续<br>服用益生菌 ( n=13 ) | ②先天性 ARM 组未连<br>续服用益生菌 ( n=8 ) | ③正常对照组<br>( n=21 )   | $\chi^2$ 值 | P 值   | $P_2$<br>①与② | $P_2$<br>①与③ | $P_3$<br>②与③ |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| 1月龄    |                                |                                |                      |            |       |              |              |              |
| 大肠杆菌   | 10.05 ( 6.42~11.17 )           | 10.32 ( 9.61~10.99 )           | 9.85 ( 4.50~10.66 )  | 5.023      | 0.081 | 0.210        | 0.246        | 0.036        |
| 双歧杆菌   | 10.86 ( 9.10~11.59 )           | 11.09 ( 7.52~11.49 )           | 10.24 ( 5.78~11.59 ) | 8.651      | 0.013 | 0.336        | 0.022        | 0.016        |
| 乳酸杆菌   | 7.80 ( 4.33~10.08 )            | 9.83 ( 4.52~10.22 )            | 4.60 ( 2.48~8.08 )   | 20.180     | 0.000 | 0.045        | 0.000        | 0.000        |
| B/E    | 1.10 ( 0.82~1.65 )             | 1.08 ( 0.68~1.15 )             | 1.11 ( 0.73~1.88 )   | 0.553      | 0.758 | 0.547        | 0.834        | 0.518        |
| 3~4 月龄 |                                |                                |                      |            |       |              |              |              |
| 大肠杆菌   | 10.04 ( 8.45~12.62 )           | 10.29 ( 4.79~11.31 )           | 10.01 ( 5.76~11.53 ) | 0.459      | 0.795 | 0.750        | 0.727        | 0.549        |
| 双歧杆菌   | 11.13 ( 7.46~14.60 )           | 11.24 ( 7.63~11.67 )           | 10.77 ( 5.90~11.37 ) | 8.213      | 0.016 | 0.697        | 0.013        | 0.032        |
| 乳酸杆菌   | 5.28 ( 2.92~8.75 )             | 6.06 ( 4.36~7.80 )             | 4.97 ( 3.00~10.01 )  | 0.336      | 0.845 | 0.768        | 0.675        | 0.649        |
| B/E    | 1.14 ( 0.69~1.35 )             | 1.11 ( 0.67~2.23 )             | 1.07 ( 0.55~1.76 )   | 1.910      | 0.385 | 0.916        | 0.205        | 0.401        |

注:3 组之间两两比较采用 Bonferroni 法,以校正检验  $\alpha=0.017$  为水准

### 3 讨 论

人类肠道菌群主要分布在结直肠内,在各菌群之间和菌群与宿主肠道之间相互作用的发展过程中肠道微生态环境形成。各菌群保持平衡的状态下,共生菌对婴幼儿消化、代谢、营养、免疫调节方面均有重要帮助<sup>[2]</sup>。与此相反,当肠道菌群结构异常时,宿主发生肥胖,糖尿病等代谢系统性疾病及哮喘,炎症性肠病等免疫性疾病的风险也会增高<sup>[3-4]</sup>。尤其在生命早期阶段,肠道菌群的定植情况可影响后期肠道菌群的结构<sup>[5]</sup>,并可对远期疾病产生持续作用。现有研究已发现胎龄<sup>[6]</sup>、生产方式<sup>[7]</sup>、喂养<sup>[8]</sup>和

用药<sup>[9]</sup>等对早期肠道菌群定植均有影响。先天性低位 ARM 是肠道畸形的一种,早期需要手术及药物治疗,了解术后肠道菌群定植情况及其与正常婴儿的区别,不仅对临床治疗有一定帮助,也可以为将来了解菌群定植和结构变化对后续健康的影响提供依据。

3.1 先天性 ARM 患儿术后早期肠道菌群定植不同于正常婴儿

目前对肠道菌群定植状况的认识大多来源于对粪便中菌群结构的研究。B/E 与潜在致病菌肠杆菌、肠球菌的数值成负相关,是肠道微生物定植抗力的指标<sup>[10]</sup>,B/E 大于 1,被认为肠道定植抗力高,表示来自周围环境和宿主自身肠道的条件致病菌不能

定植肠道,反之,认为容易被条件致病菌定植。此次研究发现,先天性 ARM 组患儿 10 日龄,肠道 B/E 和正常对照组婴儿一样均小于 1,大肠杆菌为患儿肠道优势菌,肠道定植抗力低。由于患儿术前禁食和肠外营养造成短期肠道失用、手术实施、抗生素应用及肠道疾病本身等因素均可影响患儿肠道双歧杆菌的定植,对肠道内菌群达到动态平衡的进度可能产生一定阻碍。这在 Wang 和 Chen 的研究<sup>[11]</sup>中也得到证实,他们的研究表明,小肠闭锁患儿术后 2 周,肠道双歧杆菌的定植时间较正常婴儿明显延后,并且定植水平也相对下降。已有研究证明生后早期静脉使用抗生素可明显抑制双歧杆菌在婴儿肠道的定植<sup>[12]</sup>,本次纳入先天性 ARM 组的患儿在围术期均静脉注射头孢唑林预防肛肠感染,由于双歧杆菌对该抗生素较敏感<sup>[13]</sup>,可导致大肠杆菌等潜在致病菌受双歧杆菌的抑制作用减弱,同时大肠杆菌对该抗生素易发生耐药<sup>[14]</sup>,造成大肠杆菌繁殖数量超过双歧杆菌。住院期间配方奶喂养<sup>[15]</sup>可能也是原因之一,易使患儿肠道定植更多大肠杆菌,艰难梭菌,拟杆菌和乳酸杆菌的<sup>[16]</sup>。本研究中正常对照组婴儿和 Solis 等<sup>[17]</sup>观察 20 名纯母乳喂养的顺产足月儿生后第 10 天双歧杆菌成为肠道优势菌群的结果相差大,对照组婴儿 10 日龄时双歧杆菌仍然也不是肠道优势菌。究其原因,由于大部分婴儿生产方式为剖宫产,该影响因素可延迟或改变肠道菌群早期定植,使婴儿生后肠道内双歧杆菌定植时间较顺产婴儿晚,数量水平也较低,使得双歧杆菌成为优势菌的时间延后<sup>[18]</sup>。

国内外研究<sup>[19-20]</sup>证明乳酸杆菌能够保护细胞膜的完整性和活性,并可通过对肠道竞争性占位效应阻止致病性大肠杆菌对肠道细胞的黏附,减小对肠上皮细胞的损伤。患儿 10 日龄肠道乳酸杆菌数量较正常对照组高,并且术后未发生腹泻等,提示乳酸杆菌可能是术后肠道细胞炎症恢复的保护因素。但此时患儿并未补充额外益生菌制剂,该现象是否可由患儿生后延迟进食、术前禁食等导致肠黏膜绒毛破坏,缺乏乳糖酶不能充分水解乳糖,乳糖累积于肠道造成乳酸杆菌持续增殖的机制解释,还有待进一步研究证实。

### 3.2 先天性 ARM 患儿 1 月龄至 3~4 月龄菌群逐渐达到正常对照婴儿水平

先天性 ARM 患儿平均 1 月龄时和同龄正常对照组婴儿一样,肠道 B/E 增高,均大于 1,双歧杆菌成为肠道优势菌,且数量明显高于正常对照组。表

明患儿在 1 月龄时肠道微生物定植抗力较 10 日龄时明显增强,Dethlefsen 等<sup>[21]</sup>报道关于环丙沙星停用后 4 周肠道菌群基本恢复用药前结构,考虑可能因为围术期抗生素使用时间短,被抑制的正常菌群可继续增殖,并且术后早期益生菌干预可以增加双歧杆菌在肠道内的定植,可使肠道菌群快速调整为以双歧杆菌占优势的最佳菌群结构。患儿 1 月龄时肠道乳酸杆菌数量仍较高,分析此时肠道分解乳糖的功能仍未彻底恢复,肠道菌群仍与正常婴儿不同。期间患儿均未出现肠道感染情况,更进一步提示肠道高浓度的乳酸杆菌可能对肠道黏膜有一定保护作用。3~4 月龄时肠道双歧杆菌和大肠杆菌数量均维持 1 月龄时水平,B/E 未见明显变化。3~4 月龄乳酸杆菌数量较 1 月龄时降低,表明肠道黏膜细胞已修复完毕,菌群结构趋近正常,达到微生态平衡。

### 3.3 先天性 ARM 患儿 1 月龄后连续使用益生菌能够使肠道保持高水平的双歧杆菌数量

益生菌等微生态制剂现已广泛应用于临床,治疗婴幼儿感染性疾病、抗生素相关性腹泻及预防疾病等。研究报告显示,婴儿服用益生菌可改变肠道菌群的结构组成,减少致病菌的数量以及降低其分泌的毒素<sup>[22]</sup>,同时个别益生菌菌株可替换或阻止病原菌的肠道定植,当菌群发生紊乱(如使用抗生素后)可巩固其共生菌群稳定性,并且快速恢复菌群平衡状态<sup>[23]</sup>。Yutaka 等<sup>[24]</sup>发现,重度先天性畸形患儿术后早期服用含有双歧杆菌和乳酸杆菌的益生菌制剂,肠道短期内可调整为益生菌制剂中 2 种菌群占优势的结构,并最终形成正常菌群的定植结构。也有研究显示益生菌补充后对成人肠道菌群结构的影响较小,无法改变成人肠道已定植菌群的结构<sup>[25]</sup>。可见添加益生菌的时机对肠道菌群结构影响极为关键,婴儿时期肠道菌群定植结构未成熟,益生菌较容易定植并在肠道内大量增殖,而随着年龄的增长,由于肠道黏膜表面定植菌结构已基本形成,补充的益生菌更易成为过路菌,短暂停留肠道后便被排出<sup>[26]</sup>。目前关于患儿术后补充益生菌制剂的疗程尚无定论,临床医生通常根据经验或文献报道决定,家长也常常自行决定使用或停止时间。本次研究发现,连续补充益生菌的患儿 3~4 月龄肠道双歧杆菌水平显著高于正常对照婴儿,而未连续补充益生菌的患儿双歧杆菌水平和正常对照婴儿无显著差异。相关研究显示,益生菌在服用 1 周后开始在肠道定植,服用 20 d 后才能达到肠道最大定植数量,在停止服用益生菌制剂 3 周后定植肠道的益生菌可被

完全排除。可见益生菌在肠道的定植并非永久性,不同益生菌菌种菌株对肠道的黏附定植作用存在差异,造成其对肠道菌群结构的影响不同,对肠道菌群结构的调整改变需依赖持续不断的添加益生菌,以此维持益生菌的高水平状态而发挥其特殊的生理作用。

诚然,本次研究菌群种类有限,并且随访时间不长,益生菌在先天性低位 ARM 患儿术后使用疗程对肠道其他菌群定植的作用,连续补充益生菌对肠道菌群的长期影响等都需要进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Yuan J, Wei H, Zen B, et al. Impact of neonatal antibiotic treatment on the biodiversity of the murine intestinal *Lactobacillus* community[J]. *Curr Microbiol*, 2010, 60(1): 6–11.
- [2] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355–1359.
- [3] Reinhardt C, Reigstad CS, Bäckhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009, 48(3): 249–256.
- [4] Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2001, 107(1): 129–134.
- [5] Eggesbø M, Moen B, Peddada S, et al. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions[J]. *APMIS*, 2011, 119(1): 17–35.
- [6] Hallab JC, Leach ST, Zhang L, et al. Molecular characterization of bacterial colonization in the preterm and term infant's intestine[J]. *Indian J Pediatr*, 2013, 80(1): 1–5.
- [7] Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, et al. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999, 28(1): 19–25.
- [8] Rothe M, Blaut M. Evolution of the gut microbiota and the influence of diet[J]. *Benef Microbes*, 2013, 4(1): 31–37.
- [9] Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009, 56(1): 80–87.
- [10] 吴仲文, 李兰娟, 马伟杭, 等. 肠道微生物定植抗力的新指标—B/E 值[J]. *浙江预防医学*, 2000, 12(7): 4–6.
- [11] Wang R, Chen J. Early colonization of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in the postoperative neonates with congenital intestinal atresia[J]. *Saudi Med J*, 2011, 32(3): 265–270.
- [12] Hussey S, Wall R, Gruffman E, et al. Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates[J]. *Int J Microbiol*, 2011, pii: 130574.
- [13] C Moubareck I, F Gavini, L Vaugien, et al. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria[J]. *Antimicrob Chemother*, 2005, 55(1): 38–44.
- [14] Lee S, Lee T, Yang S, et al. The impact of intravenous cefazolin to the outcomes of cirrhotic patients with esophageal varices bleeding[J]. *O J Gas*, 2013, 3(3): 190–195.
- [15] Fallani M, Young D, Scott J, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010, 51(1): 77–84.
- [16] Solis G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, et al. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut[J]. *Anaerobe*, 2010, 16(3): 307–310.
- [17] Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy[J]. *Pediatrics*, 2006, 118(2): 511–521.
- [18] Chen J, Cai W, Feng Y. Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates[J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(5): 559–566.
- [19] 王 斌, 但国蓉, 袁 静, 等. 乳杆菌黏附抑制致病性大肠杆菌对肠上皮样细胞侵袭的初步研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(6): 550–552.
- [20] Roselli M, Finamore A, Britti MS, et al. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. *Br J Nutr*, 2006, 95(6): 1177–1184.
- [21] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(11): e280.
- [22] Marie-Jose Martel, velyne Rey, Jean-Luc Malo, et al. Determinants of the incidence of childhood asthma: a two-stage case-control study[J]. *Am J Epidemiol*, 2009, 169(2): 195–205.
- [23] Goksör E, Alm B, Pettersson R, et al. Early fish introduction and neonatal antibiotics affect the risk of asthma into school age[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013, 24(4): 339–344.
- [24] Yutaka Kanamori, Tadashi Iwanaka, Masahiko Sugiyama, et al. Early use of probiotics is important therapy in infants with severe congenital anomaly[J]. *Pediatrics*, 2010, 52(3): 362–367.
- [25] Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Campana-Martin L, et al. Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults; SETOPROB study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78111.
- [26] Goossens D, Jonkers D, Russel M, et al. The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 18(5): 495–505.

(责任编辑: 关蕴良)