

· 临床研究 ·

## 不同喂养方式对早期新生儿口咽微生物生态菌群的影响

王学娟<sup>1,2</sup>, 丁诗田<sup>3</sup>, 高胜男<sup>3</sup>, 迭馨娴<sup>3</sup>, 李冰洁<sup>1</sup>, 邵志英<sup>2</sup>, 朱敏蓉<sup>2</sup>, 游铭钰<sup>1</sup>, 张宇涵<sup>1</sup>, 陈筱青<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>上海市浦东新区妇幼保健院新生儿科, 上海 201206; <sup>3</sup>南京医科大学儿科学院, 江苏 南京 211166

**[摘要]** **目的:**初步探讨足月健康早期新生儿口咽生态中菌群分布的特点及不同喂养方式对早期新生儿口咽微生物生态菌群定植的影响。**方法:**选取2021年9月—2022年2月于上海市浦东新区妇幼保健院产科出生的20例足月健康新生儿为研究对象, 纯母乳喂养8例、混合喂养12例。采集新生儿出生当天及生后第5~7天的咽拭子样本, 利用Illumina Miseq™/Hiseq™平台对细菌16S rRNA的V3~V4可变区进行DNA测序, 对测序结果进行生物信息学分析。**结果:**①40个咽拭子样本中共发现门36个, 纲84个, 目144个, 科292个, 属736个。②足月健康新生儿从出生到生后5~7天, 新生儿口咽部菌群的相对丰富度及多样性逐渐降低, 个体间差异显著缩小; 纯母乳喂养的早期新生儿口咽菌群 $\alpha$ 多样性低于混合喂养新生儿。③在门水平上, 不同喂养组的主要门均为变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门, 4个优势菌门的相对丰度组间比较差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。与第1天相比, 第5~7天纯母乳喂养组中厚壁菌门( $P=0.008$ )、放线菌门( $P=0.844$ )、拟杆菌门( $P=0.250$ )的相对丰度上升, 变形菌门的相对丰度下降( $P=0.055$ ); 而混合喂养组中厚壁菌门( $P < 0.001$ )、放线菌门( $P=0.733$ )的相对丰度上升, 变形菌门( $P < 0.001$ )、拟杆菌门( $P=0.027$ )的相对丰度下降。④在属水平上, 出生当天以慢生根瘤菌属、葡萄球菌属、不动杆菌属、伯克氏菌属、链球菌属为主要属, 随着出生时间的推移, 生后5~7天链球菌属、葡萄球菌属、拟杆菌属、罗氏菌属、双歧杆菌属上升为主要属; 不同喂养组均以链球菌属和葡萄球菌属为优势属, 纯母乳喂养组中拟杆菌属、罗氏菌属、双歧杆菌属等厌氧菌的丰度高于混合喂养组。**结论:**新生儿生后早期口咽微生物生态菌群的多样性逐渐降低, 稳定性逐渐增加; 且不同喂养方式对早期新生儿口咽部菌群定植与分布存在一定的影响, 纯母乳喂养有助于新生儿口咽部厌氧菌的早期定植。

**[关键词]** 口咽; 微生物生态菌群; 16S rRNA; 新生儿; 母乳喂养**[中图分类号]** R722.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)10-1432-08**doi:** 10.7655/NYDXBNS20221013

## Effects of different feeding methods on oropharyngeal microbiota in early-life of newborns

WANG Xuejuan<sup>1,2</sup>, DING Shitian<sup>3</sup>, GAO Shengnan<sup>3</sup>, DIE Xinxian<sup>3</sup>, LI Bingjie<sup>1</sup>, SHAO Zhiying<sup>2</sup>, ZHU Minrong<sup>2</sup>, YOU Mingyu<sup>1</sup>, ZHANG Yuhan<sup>1</sup>, CHEN Xiaqing<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Pediatric, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Neonatal Department, Shanghai Pudong New Area Health Care Hospital for Woman and Children, Shanghai 201206; <sup>3</sup>School of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the distribution characteristics of oropharyngeal microbiota and the effects of different feeding methods on oropharyngeal microbiota colonization of healthy full term newborns in early-life. **Methods:** A total of 20 healthy term infants delivered between September 2021 and February 2022 at Shanghai Pudong New Area Health Care Hospital for Women and Children were recruited. According to feeding methods, infants were respectively divided into two groups, which were exclusively breastfeeding ( $n=8$ ) and mixed-feeding ( $n=12$ ). Oropharyngeal swab samples of all subjects were collected on the first day and day 5-7 after birth. The V3~V4 region of 16S rRNA gene was sequenced on Illumina Miseq™/Hiseq™ platform, and the results were analyzed by bioinformatics. **Results:** ①36 phylum, 84 class, 144 order, 292 family and 736 genus were identified in the 40 oropharyngeal swab samples. ②From day 1 to day 5~7 after birth, the relative abundance and diversity of oropharyngeal microbiota decreased gradually, and the differences between individuals decreased significantly. The  $\alpha$  diversity of oropharyngeal microbiota in the exclusive breastfeeding group was lower than that in the mixed-feeding group. ③At the phylum level, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* were the main phyla in different feeding groups. However, there was no significant difference in the four dominant phyla between two groups ( $P > 0.05$ ). Compared with day 1, the relative abundance of *Firmicutes* ( $P=0.008$ ), *Actinobacteria* ( $P=0.844$ )

and *Bacteroidetes* ( $P=0.250$ ) increased, but *Proteobacteria* decreased ( $P=0.055$ ) on day 5~7 in the exclusive breastfeeding group; while *Firmicutes* ( $P < 0.001$ ) and *Actinobacteria* ( $P=0.733$ ) increased, but *Proteobacteria* ( $P<0.001$ ) and *Bacteroidetes* ( $P=0.027$ ) decreased in the mixed-feeding group. ④ At the genus level, *Bradyrhizobium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* and *Streptococcus* were the main genera on day 1, while with the passage of birth time, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Rothia* and *Bifidobacterium* became the main genera at day 5~7. *Streptococcus* and *Staphylococcus* were the dominant genera in different feeding groups, and the abundance of *Bacteroides*, *Rothia*, *Bifidobacterium* and other anaerobes in exclusive breastfeeding group was higher than that in mixed-feeding group. **Conclusion:** The diversity of oropharyngeal microbiota decrease gradually and the stability increased gradually in the early life of newborns. Different feeding methods have certain effects on the colonization and distribution of oropharyngeal microbiota in early life. Exclusive breastfeeding is helpful for the early colonization of anaerobes in the oropharynx of newborns.

[Key words] oropharynx; microbiota; 16S rRNA; newborn; breastfeeding

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(10): 1432-1439]

微生物定植于人体口腔、皮肤、胃肠道及呼吸道等不同部位<sup>[1]</sup>,通过促进黏膜结构和功能的分化,刺激先天和获得性免疫系统的发育,并提供对病原体入侵的“定植抵抗”,为机体提供多种重要的功能<sup>[2-3]</sup>。目前的报道主要集中在肠道微生态,而对于呼吸道微生态的研究相对较少,尤其是在免疫程序开始启动的生命早期。口咽经常暴露在来自上呼吸道和下呼吸道的微生物中,这些微生物可能代表与呼吸道疾病相关的微生物<sup>[4-5]</sup>。因此,对新生儿口咽微生态的研究一定程度上可以预测新生儿呼吸道微生态的分布特征。另外,新生儿早期免疫程序的启动在很大程度上受到早期食物成分的影响,因此喂养方式可以对新生儿呼吸道微生态的形成产生重要影响。本研究采用16S rRNA基因测序技术分析足月健康新生儿早期口咽微生物群的分布特征,并探讨不同喂养方式对新生儿早期口咽微生物群定植的影响。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

研究对象为2021年9月—2022年2月在上海市浦东新区妇幼保健院出生的足月健康新生儿。纳入标准:①胎龄 $\geq 37$ 周,顺产娩出;②单胎;③母亲无吸烟、酗酒等不良嗜好;④母亲孕期无患病史及非法药物使用史;⑤母亲无产前发热、胎膜早破、羊水污染及抗生素应用史;⑥母亲在分娩前1个月以内和/或新生儿在研究期间未曾服用益生菌制剂。排除标准:①新生儿出生时有窒息、颅内出血、感染等病史;②新生儿存在先天畸形或遗传代谢性疾病;③研究过程中出现新生儿高胆红素血症等其他需要治疗的疾病;④重要临床资料数据不全;⑤家长

中途退出,或者拒绝进行合作。根据纳入和排除标准,本研究最终共纳入20例新生儿。本研究通过上海市浦东新区妇幼保健院伦理委员会批准(伦理批号:20210615B),患儿家长均知情并签署知情同意书。纳入纯母乳喂养8例(exclusively breastfeeding, B)、混合喂养12例(mixed-feeding, M)。采集新生儿出生当天纯母乳喂养、混合喂养的咽拭子样本标记为B1、M1,生后第5~7天纯母乳喂养、混合喂养标记的咽拭子样本为B2、M2。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样本采集

由经过培训的专人负责于新生儿生后4~6 h内及第5~7天晨起洗澡时采集咽拭子样本,采样前30 min不进食,用无菌采样拭子擦拭新生儿咽后壁后放入无菌冻存管,避免触及唇、舌、牙龈等部位。样本采集后编号即放入 $-40$  °C冰箱,1周内用干冰运送至生工生物工程(上海)股份有限公司实验室,放入 $-80$  °C冰箱保存待检测。

#### 1.2.2 DNA提取和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增

采用E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit提取试剂盒(厂商OMEGA,货号M5635-02)提取咽拭子样本中微生物的总DNA,具体步骤按说明书操作。利用Qubit3.0 DNA检测试剂盒对基因组DNA精确定量,以确定PCR反应需加入的DNA量。PCR所用的引物融合了Illumina测序平台的V3~V4区段(341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, 805R: GACTACHVGGG-TATCTAATCC)。初次PCR扩增体系采用30  $\mu$ L: 2 $\times$ Hieff® Robust PCR Master Mix 15  $\mu$ L,引物各1  $\mu$ L, PCR产物10~20 ng,灭菌双蒸水9~12  $\mu$ L,反应条件:94 °C,预变性3 min;然后94 °C 30 s, 45 °C 20 s,

65 ℃ 30 s, 5个循环;再94 ℃ 20 s, 55 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 20个循环;最后72 ℃ 充分延伸5 min, 10 ℃ 保温。初次PCR结束后进行第二轮扩增,引入Illumina桥式PCR兼容引物,扩增体系采用30 μL: 2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL, 引物各1 μL, PCR产物10~20 ng, 灭菌双蒸水9~12 μL, 反应条件: 95 ℃ 预变性3 min; 然后94 ℃ 20 s, 55 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s, 5个循环;再72 ℃ 充分延伸5 min, 10 ℃ 保温。所得PCR产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测质量。

### 1.2.3 文库构建及上机测序

使用Yeasen公司的Hieff NGS™ DNA Selection Beads 文库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库使用Qubit3.0荧光定量仪进行文库浓度测定, 合格后使用Illumina Miseq™/Hiseq™平台进行测序。

### 1.2.4 生物信息学分析

测序所得的原始序列经过优化处理和质控过滤后, 获得优化序列。利用Usearch软件将优化序列基于97%相似性进行聚类为操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU), 得到OTU代表序列后进行比对生成OTU表格。利用RDP classifier与RDP数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/misc/resources.jsp>)比对, 对物种进行注释, 从而获得每个OTU对应的物种分类信息。基于样品测序产生的OTU结果, 利用mothur做rarefaction分析; 利用R软件绘制稀释曲线; 利用mothur计算单个样本的Alpha多样性(OTU数目、Chao1指数、Shannon指数)。在门和属两个分类水平上统计样本的物种丰度, 并行聚类分析。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件进行数据处理。采用mothur软件计算生物多样性指数, 并利用R 3.6.0软件制作Chao1指数和Shannon指数的差异检验箱线图以及PcoA主坐标分析图。采用STAMP 2.1.3软件对不同喂养组间的差异类群进行分析。对于符合正态分布的连续型变量, 采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行描述, 对于不符合正态分布的连续型变量, 采用中位数(四分位数)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]进行描述; 对于分类变量, 采用频数和百分数进行描述。对于满足参数检验的连续型变量, 采用两独立样本 $t$ 检验进行组间比较或采用配对 $t$ 检验进行组内前后比较; 对于不满足参数检验的连续型变量, 采用Wilcoxon秩和检验进行组间比较; 对于数目方差不等的两组间比较采用Welch's- $t$ 检验; 对于分类资料采用 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法检验。所有统计推断均采用双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

20例新生儿(均为阴道顺产娩出; 8例母乳喂养, 12例混合喂养)中, 性别( $P=1.000$ )、胎龄( $P=0.607$ )、出生体重( $P=0.281$ )、母孕期增重( $P=0.114$ )及孕母年龄( $P=0.625$ )均没有显著差异(表1)。新生儿生后1 min、5 min和10 min的Apgar评分均为10分, 参与本研究的母亲和新生儿在样本采集前或采集时均未接受任何抗生素治疗及益生菌暴露。母孕期均无妊娠期高血压疾病、糖尿病、感染等并发症。

表1 两组新生儿临床基本情况的比较

Table 1 Comparison of clinical basic characteristics between two groups of newborns

组别	性别(女/男, $n/n$ )	胎龄(d, $\bar{x} \pm s$ )	母孕期增重(kg, $\bar{x} \pm s$ )	孕母年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )
纯母乳喂养组( $n=8$ )	2/6	276.63 ± 8.09	13.00 ± 3.74	29.38 ± 4.24
混合喂养组( $n=12$ )	2/10	278.25 ± 3.62	15.83 ± 3.74	30.00 ± 4.94
$P$ 值	1.000*	0.607	0.114	0.625

\*Fisher确切概率法。

### 2.2 高通量测序情况

所有样本均含有可检测到的细菌16S DNA, 40例样本经测序共获得原始序列2 758 724条, 经过滤处理后, 最终用于后续分析的有效序列为1 847 830条, 平均碱基长度(422.415±5.609)bp。序列深度足以获得所有样本的高度序列覆盖(平均值为0.998; 中位数为0.999; 范围为0.988~0.999)。在OTU水平上, 总共检测到36个门, 84个纲, 144个

目, 292个科, 736个属。

### 2.3 细菌丰富度和多样性的特异性指数分类

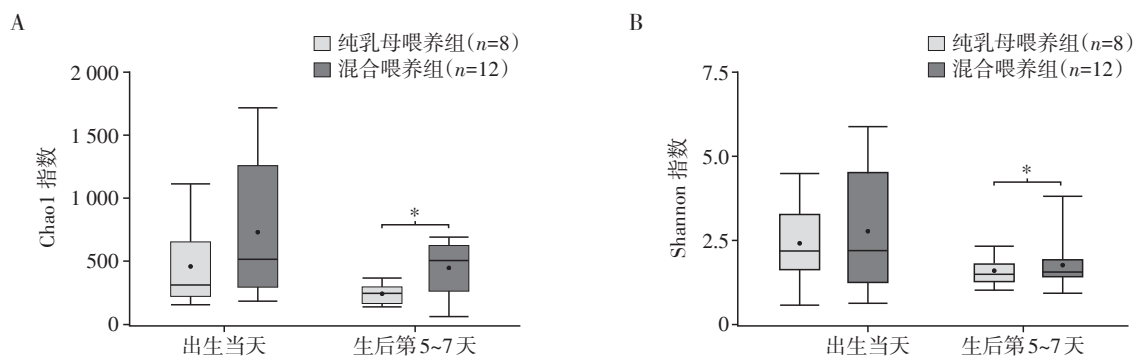
#### 2.3.1 样本类型的丰富度和多样性( $\alpha$ 多样性)

用Chao1指数计算每个样品的丰富度, 用Shannon指数评价多样性, 同时考虑相对丰富度和均匀度。图1显示了统计学分析指数估计口咽群落的物种丰富度和多样性。由图可见, 不同时点混合喂养组的丰富度和均匀度均高于纯乳母喂养



组。出生当天,纯母乳喂养组与混合喂养组的 Chao1 和 Shannon 指数差异无统计学意义( $P=0.203$ ,  $P=0.847$ ),随着出生时间的推移,多样性指数呈下降趋势,生物多样性逐渐趋于稳定;生后第 5~7 天,

纯母乳喂养组与混合喂养组的 Shannon 指数无显著差异( $P=0.729$ ),而混合喂养组的 Chao1 指数显著高于纯母乳喂养组,差异有统计学意义( $P=0.049$ )。



A: Chao1 指数; B: Shannon 指数。Wilcoxon 秩和检验,两组比较,  $P < 0.05$ 。

图1 各组样本微生物群的 $\alpha$ 多样性

Figure 1 Microbial  $\alpha$  diversity of oropharynx microbiotas in each group

### 2.3.2 样本间群落组成的变异性( $\beta$ 多样性)

为了比较不同喂养方式下口咽部整体微生物群的组成,基于 OTU 水平上 Weighted Unifrac 距离进行了主坐标分析(PcoA)。由图 2 可见,生后不同时间点的样本之间明显分离,但同一时间点的组间差异并不显著;出生当天样本间微生物群组成差异明显,随着出生时间的推移,样本间菌群组成差异逐渐减小。ANOSIM 分析也证实了不同时间点组间微生物群组成差异有统计学意义( $P=0.001$ ),但相同时间点的不同喂养组之间微生物群组成均无显著差异( $P=0.847$ ,  $P=0.600$ )。

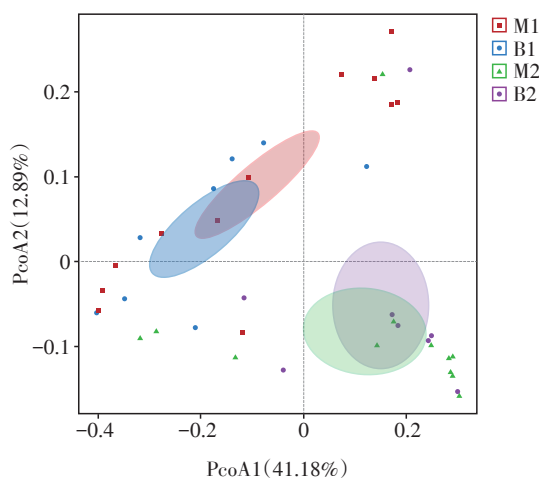


图2 基于 OTU 水平上 Weighted Unifrac 距离的 PcoA 图  
Figure 2 Principal coordinates analysis (PcoA) plots (Weighted Unifrac distances) on OTU level between different samples

### 2.4 不同喂养方式新生儿口咽菌群的构成比较

#### 2.4.1 基线水平新生儿口咽菌群的构成特征

分析出生当天口咽部主要优势菌群的组成,发现尽管优势菌群在不同喂养组之间的分布有所不同,但差异均无统计学意义(表 2)。

#### 2.4.2 门水平下菌群构成特点及动态变化

在 2 个时间点的咽拭子样本中,均以变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门为优势菌;出生当天变形菌门为最优菌门,厚壁菌门次之,拟杆菌门及放线菌门丰度相对较低。随着出生时间的推移,在生后第 5~7 天厚壁菌门的丰度明显上升并成为最优菌门( $P < 0.01$ ),变形菌门则明显下降( $P=0.055$ ,  $P < 0.001$ ),拟杆菌门在纯母乳喂养组中呈上升趋势( $P=0.250$ ),但在混合喂养组则呈下降趋势( $P=0.027$ ),放线菌门均呈上升趋势( $P=0.844$ ,  $P=0.733$ ),但差异无统计学意义。纯母乳喂养组中变形菌门( $P=0.735$ )、放线菌门( $P=0.571$ )及拟杆菌门( $P=0.735$ )均高于混合喂养组,而厚壁菌门则略低于混合喂养组( $P=0.624$ ),但组间差异无统计学意义(图 3A)。

#### 2.4.3 属水平下菌群构成特点及动态变化

出生当天咽拭子样本中以慢生根瘤菌属、葡萄球菌属、不动杆菌属、伯克氏菌属、链球菌属等需氧菌或兼性厌氧菌丰度相对较高,随着出生时间的推移,生后第 5~7 天链球菌属和葡萄球菌属成为绝对优势属,而拟杆菌属、罗氏菌属、孛生球菌属、双歧杆菌属及副拟杆菌属等厌氧菌或兼性

表2 基线水平新生儿口咽优势菌门/属的平均丰度比较

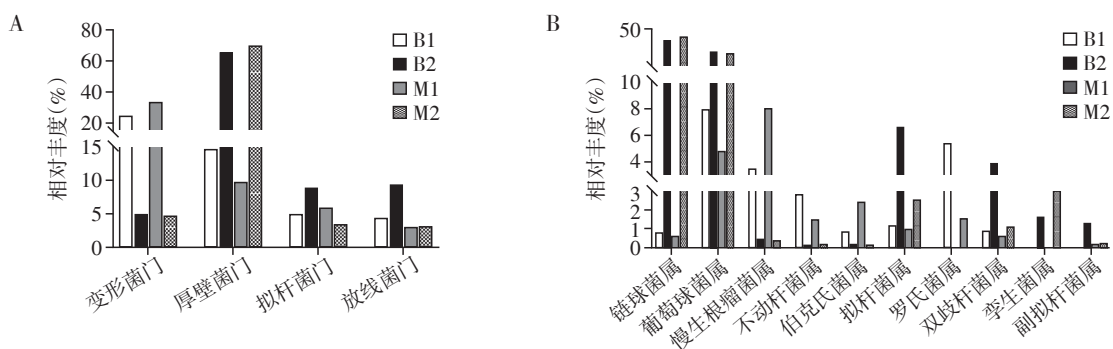
Table 2 Comparison of average abundance of dominant oropharynx microbiotas at phylum/genus level in neonates at baseline

微生物类群	纯母乳喂养组(B1, n=8)	混合喂养组(M1, n=12)	P值	q值*
门				
变形菌门	24.268	33.105	0.427	0.740
厚壁菌门	14.610	9.704	0.238	0.640
拟杆菌门	4.883	5.787	0.910	0.951
放线菌门	4.402	2.993	0.238	0.640
属				
链球菌属	0.830	0.586	0.427	0.792
葡萄球菌属	9.074	5.592	0.384	0.792
慢生根瘤菌属	4.957	6.796	0.734	0.922
不动杆菌属	3.516	1.109	0.678	0.922
伯克氏菌属	1.097	2.101	1.000	1.000
拟杆菌属	1.526	1.784	0.208	0.792
罗氏菌属	0.004	0.038	0.408	0.792
双歧杆菌属	0.839	0.539	0.135	0.792
孪生菌属	0.002	0.029	0.433	0.792
副拟杆菌属	0.012	0.260	1.000	1.000

\*: Wilcoxon 秩和检验, P值: 两组样本丰度的秩和是否有显著差异的概率值; q值: 矫正后的P值, 即将检验得到的P值采用FDR做多重检验校正得到q值。

厌氧菌丰度较前明显上升。进一步对生后第5~7天咽拭子样本中常见菌属进行定量, 结果显示, 罗氏菌属在纯母乳喂养组中的含量显著高于混合喂养组 (4.33% vs. 1.58%,  $P=0.016$ ), 拟杆菌属

(7.35% vs. 2.83%,  $P=0.792$ )、双歧杆菌属 (4.78% vs. 1.19%,  $P=0.735$ )、副拟杆菌属 (1.41% vs. 0.24%,  $P=0.967$ ) 含量亦高于混合喂养组, 但差异并不显著 (图3B)。



A: 门水平, 主要优势菌门; B: 属水平, 相对丰度百分比前10位的菌属。

图3 各组样本在门/属水平的菌群相对丰度柱状图

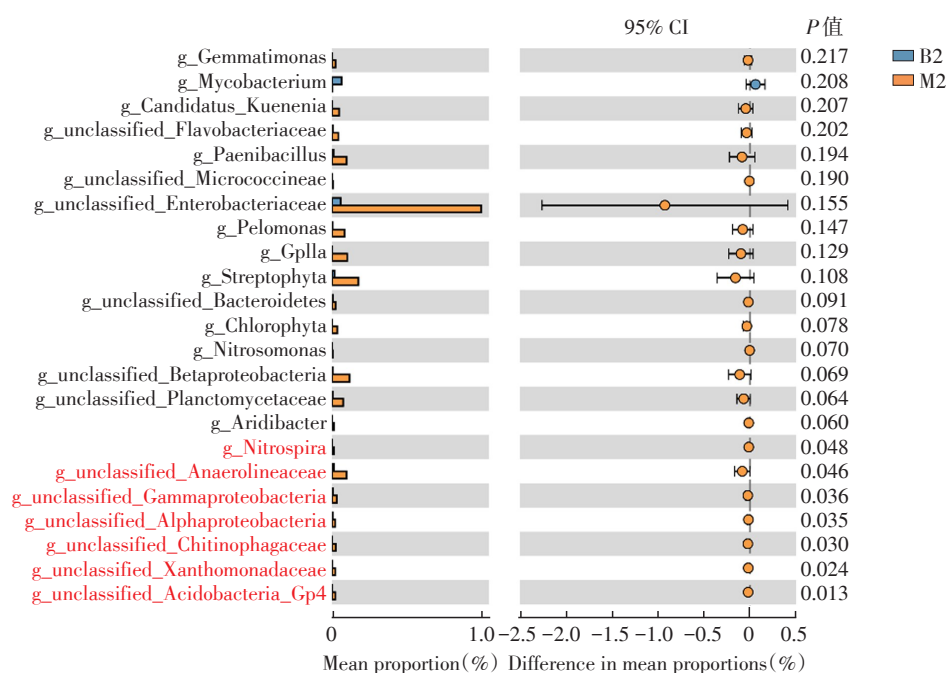
Figure 3 Histogram of relative abundance of each group at phylum/genus level

### 2.5 不同喂养组间的差异类群分析

使用STAMP 2.1.3软件包进行统计分析, 采用Welch's-t检验比较组间菌群丰度的变化。由图4可见, 不同喂养组间的差异菌属均为丰度很低的罕见菌, 而纯母乳喂养与混合喂养对新生儿早期口咽部优势菌属的影响并不显著。

### 3 讨论

呼吸道作为人体重要的组成部分, 其特定部位的微生物定植对于婴儿呼吸道免疫功能的发育起着非常重要的作用。而围生期可能是呼吸道免疫介导效应形成的重要时期, 有研究显示, 新生儿呼



左边所示为不同菌群分类在两组样本中的丰度比例,中间所示为95%置信区间内菌群分类丰度的差异比例,最右边为P值, $P < 0.05$ 表示差异显著,红色标识。

图4 群落差异结构图(属水平,平均丰度 > 0.1%)

Figure 4 Community structure differences (genus level, average abundance > 0.1%)

吸道的定植菌在出生第1周即发生了改变,大多数新生儿在出生1周内会建立一个优势菌群<sup>[6]</sup>。

本研究显示,不同时间点纯母乳喂养组新生儿的口咽菌群丰度和多样性均低于混合喂养组,且随着出生时间的推移呈下降趋势;混合喂养组的菌群丰度显著高于纯母乳喂养组( $P=0.008$ ),但两组间生物多样性差异并不显著( $P=0.435$ ); $\beta$ 多样性分析显示,不同观察组的样本间能够大致分离开,但组内样本间个体差异较大;不同时点之间口咽微生物群的 $\beta$ 多样性明显分离,但同一时点的组间差异并不显著;另出生当天样本间微生物群组成差异明显,随着出生时间的推移,样本间菌群组成差异逐渐减小。分析原因可能与宿主的固有遗传变异以及出生当天样本采集时环境微生物群的定植还没有完成有关<sup>[2]</sup>。

微生物主要通过呼吸进入肺部,而咽部作为进入人体的切入点,代表了呼吸道的一个中间位置,能够证实沿着呼吸道微生物生态的相对变化<sup>[7]</sup>。目前对新生儿咽部微生物生态的研究主要集中在鼻咽部,但有研究显示,与之相比,口咽部更能代表下呼吸道的微生物群<sup>[8]</sup>。本研究发现,早期新生儿咽部的细菌门以厚壁菌门、变形菌门、放线菌门及拟杆菌门为主,与Powell等<sup>[9]</sup>的研究基本一致;纯母乳喂养和混

合喂养的早期新生儿口咽部最丰富的细菌门均是厚壁菌门,在纯母乳喂养的新生儿中,放线菌门是第二个最常见的门,而变形菌门则是混合喂养新生儿口咽部的第二常见门,这些发现与之前对婴儿肠道微生物群的研究一致<sup>[10]</sup>。属水平上,新生儿咽部最初定植的细菌主要为慢生根瘤菌、葡萄球菌、不动杆菌、伯克氏菌等需氧或兼性厌氧菌,随着时间的推移,生后第5~7天的咽拭子样本中需氧或兼性厌氧菌的相对丰度降低,而拟杆菌、双歧杆菌等厌氧菌开始增殖,逐渐成为主要菌群,可注释的物种亦减少,这与肠道菌群的研究结果一致<sup>[11]</sup>。2个不同时间点的优势菌比较发现,部分咽部最初优势菌仍能在生后第5~7天的样本中保持优势地位,如葡萄球菌。可见,虽然新生儿出生后口咽菌群发生了很大的变化,菌群构成不同,但仍有共有优势菌。

初乳富含细胞因子、抗菌肽、无机盐、抗体、激素和生物活性因子,具有较强的免疫调节活性。初乳中还含有大量的微生物,包括葡萄球菌属、链球菌属和拟杆菌属<sup>[12]</sup>。获得性母源微生物群对子代免疫系统的发育具有重要作用<sup>[13]</sup>。微生物在哺乳期间从母亲的皮肤转移,但一些研究也支持“肠-乳途径假说”,即来自母亲肠道的细菌通过母亲的树突状细胞和巨噬细胞到达乳腺。人乳中的母乳低聚糖可



以调节免疫细胞反应或表现出抗炎特性<sup>[14]</sup>。此外,研究发现,母乳-唾液可以通过调节婴儿早期口腔微生物群的相互作用促进先天免疫<sup>[15-16]</sup>,因此作为早期新生儿(7 d以内)唯一食物来源的初乳,对新生儿的初始发育至关重要<sup>[17]</sup>。但部分母亲由于早期乳汁分泌不足、剖宫产等因素的影响,新生儿出生早期往往需要添加配方奶喂养,这可能在一定程度上影响新生儿早期呼吸道菌群的定植,从而影响免疫功能的建立。本研究发现,阴道分娩的新生儿,生后第5~7天,不同喂养组的优势菌构成相似,主要为链球菌属和葡萄球菌属,但纯母乳喂养组的罗氏菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属、副拟杆菌属等厌氧菌的含量均高于混合喂养组,这与 Maleki 等<sup>[18]</sup>研究基本一致。拟杆菌属与双歧杆菌属产生的短链脂肪酸可通过血液循环进入肺组织从而影响呼吸功能<sup>[14]</sup>。进一步对不同喂养组样本中 9 个母乳常见菌属(葡萄球菌属、链球菌属、沙雷菌属、假单胞菌属、棒状杆菌属、罗氏菌属、丙酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌属和慢生根瘤菌属)进行定量<sup>[19]</sup>,结果显示葡萄球菌属、罗氏菌属、慢生根瘤菌属在纯母乳喂养组中的含量高于混合喂养组,而假单胞菌属、链球菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属和鞘氨醇单胞菌属的含量则低于混合喂养组,但差异并不显著。今后需要进一步的研究来探讨母乳喂养对新生儿咽部菌群的影响。

早期口咽微生态菌群的建立为以后呼吸道的健康奠定了基础,微生态菌群的失调会导致炎症反应和免疫紊乱的增加。有研究发现呼吸道微生态菌群在新生儿中的定植与上呼吸道感染<sup>[20-21]</sup>及儿童后期反复喘息或哮喘的风险增加有关<sup>[21-22]</sup>。共生菌作为抵御病原体获取、过度生长和入侵的第一线防御,可能影响对感染的易感性。对此,我们重点分析了咽部的两个优势群:需氧优势菌——链球菌和厌氧优势菌——拟杆菌。链球菌作为口咽的常见共生菌,是纯母乳喂养和混合喂养新生儿早期最常见的口咽细菌属(37.08%、41.26%),其生后丰度明显增加,是婴儿口咽中确定的主要属,这与其他研究结果一致,即婴儿的口咽部含有大量的链球菌,且其丰富度随时间的推移而增加<sup>[23]</sup>。链球菌可以产过氧化氢抑制病原微生物的生长,包括医院内的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和铜绿假单胞菌,因此它被认为是一种潜在益生菌<sup>[24-25]</sup>。研究结果显示,随着时间的推移,口咽微生物群发生了变化,但喂养方式对口咽部链球菌丰度的影响无显著

差异,这也说明了链球菌在口咽部的重要性。拟杆菌是口咽部的另一种共生菌,在纯母乳喂养组中的丰度高于混合喂养组,可能是早期定植动态的关键决定因素,其定植失败或延迟与T细胞分化有关,可能会影响生命早期免疫系统的建立和成熟<sup>[26-27]</sup>。目前已有临床试验探索了上呼吸道共生菌的益生菌潜力<sup>[28-29]</sup>。共生菌在免疫成熟、增强黏膜屏障功能、抵抗病原体定植等方面发挥着重要作用。鉴于定植微生物的重要功能,在生命早期建立宿主和微生物群之间的共生关系可能对老年期的健康状态至关重要<sup>[30]</sup>。

本研究尚存在一些局限与不足,主要是纳入研究的样本量较小,为了保留数据的真实性,我们没有对离群值进行剔除;另由于考虑到人体标本采集的伦理问题及受试者家属的依从性,我们没有采集下呼吸道样本进行比较跟踪,因此,我们的发现只是口咽菌群特点的初步探索,将来需要增加样本量来进一步研究。受住院时间的限制,为了尽量减少混杂因素的影响,我们未进行出生 1 周后的样本采集,但是既往研究已证实新生儿呼吸道菌群在出生 1 周内即发生了改变<sup>[7]</sup>。

综上所述,本研究揭示了新生儿早期口咽菌群的定植和演替动态。喂养方式影响初生婴儿口咽部的微生物群,母乳喂养有利于口咽共生菌早期的定植。本研究最大限度地减少了其他因素对口咽细菌群落的影响,为今后进一步的研究提供了初步的数据。

#### [参考文献]

- [1] 孙 僮,富建华. 呼吸道微生态与新生儿疾病关系的研究进展[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(9): 688-692
- [2] BACH L L, RAM A, IJAZ U Z, et al. A longitudinal study of the human oropharynx microbiota over time reveals a common core and significant variations with self-reported disease[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 573969
- [3] YI H, YONG D, LEE K, et al. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 583
- [4] CHIU C Y, CHAN Y L, TSAI Y S, et al. Airway microbial diversity is inversely associated with mite-sensitized rhinitis and asthma in early childhood [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1820
- [5] OKEREKE I, MILLER A, HAMILTON C, et al. Microbiota of the oropharynx and endoscope compared to the esophagus[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10201
- [6] MOURANI P M, HARRIS J K, SONTAG M K, et al. Mo-

- lecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25959
- [7] IBIRONKE O, MCGUINNESS L R, LU S E, et al. Species-level evaluation of the human respiratory microbiome [J]. *Gigascience*, 2020, 9(4): giaa038
- [8] WYPYCH T P, WICKRAMASINGHE L C, MARSLAND B J. The influence of the microbiome on respiratory health [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(10): 1279-1290
- [9] POWELL E A, FONTANELLA S, BOAKES E, et al. Temporal association of the development of oropharyngeal microbiota with early life wheeze in a population-based birth cohort [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46: 486-498
- [10] TURRONI F, MILANI C, DURANTI S, et al. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being [J]. *Ital J Pediatr*, 2020, 46(1): 16
- [11] 丁溢芳,肖玲莉,郭佳林,等.新生儿出生后三天内肠道微生态中菌群分布[J]. *中华围产医学杂志*, 2017, 20(7): 507-514
- [12] TOSCANO M, DE GRANDI R, PERONI D G, et al. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 205
- [13] 徐影,刁飞扬.母体微生物群对妊娠并发症及子代发育的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(7): 1030-1035
- [14] CASTANYS-MUÑOZ E, MARTIN M J, VAZQUEZ E. Building a beneficial microbiome from birth [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(2): 323-330
- [15] AL-SHEHRI S S, KNOX C L, LILEY H G, et al. Breast-milk-saliva interactions boost innate immunity by regulating the oral microbiome in early infancy [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0135047
- [16] AL-SHEHRI S S, SWEENEY E L, COWLEY D M, et al. Deep sequencing of the 16S ribosomal RNA of the neonatal oral microbiome: a comparison of breast-fed and formula-fed infants [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38309
- [17] TOSCANO M, DE GRANDI R, PERONI D G, et al. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 205
- [18] MALEKI A, ZAMIRNASTA M, TAHERIKALANI M, et al. The characterization of bacterial communities of oropharynx microbiota in healthy children by combining culture techniques and sequencing of the 16S rRNA gene [J]. *Microb Pathog*, 2020, 143: 104115
- [19] 彭文静,曹云.母乳微生态及其研究进展[J]. *中华围产医学杂志*, 2018, 21(7): 483-486
- [20] BOSCH A A T M, DE STEENHUIJSEN PITERS W A A, VAN HOUTEN M A, et al. Maturation of the infant respiratory microbiota, environmental drivers, and health consequences. A prospective cohort study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(12): 1582-1590
- [21] TA L D H, YAP G C, TAY C J X, et al. Establishment of the nasal microbiota in the first 18 months of life: correlation with early-onset rhinitis and wheezing [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(1): 86-95
- [22] DEPNER M, EGE M J, COX M J, et al. Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(3): 826-834
- [23] WANG H, DAI W, FENG X, et al. Microbiota composition in upper respiratory tracts of healthy children in Shenzhen, China, differed with respiratory sites and ages [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6515670
- [24] MAMMEN M J, SCANNAPIECO F A, SETHI S. Oral-lung microbiome interactions in lung diseases [J]. *Periodontol 2000*, 2020, 83(1): 234-241
- [25] QI C, ZHOU J B, TU H Y, et al. Lactation-dependent vertical transmission of natural probiotics from the mother to the infant gut through breast milk [J]. *Food Funct*, 2022, 13(1): 304-315
- [26] BRUMBAUGH D E, ARRUDA J, ROBBINS K, et al. Mode of delivery determines neonatal pharyngeal bacterial composition and early intestinal colonization [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016, 63(3): 320-328
- [27] 刘誉,秦胜堂,马京梅,等.不同分娩方式和喂养方式下婴儿肠道菌群的分布特征[J]. *中华围产医学杂志*, 2018, 21(7): 465-471
- [28] LA MANTIA I, VARRICCHIO A, CIPRANDI G. Bacteriotherapy with *Streptococcus salivarius* 24SMB and *Streptococcus oralis* 89a nasal spray for preventing recurrent acute otitis media in children: a real-life clinical experience [J]. *Int J Gen Med*, 2017, 10: 171-175
- [29] MARCHISIO P, SANTAGATI M, SCILLATO M, et al. *Streptococcus salivarius* 24SMB administered by nasal spray for the prevention of acute otitis media in otitis-prone children [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(12): 2377-2383
- [30] BIESBROEK G, TSIVTSIVADZE E, SANDERS E A, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(11): 1283-1292

[收稿日期] 2022-04-02  
(责任编辑:蒋莉)