

• 论 著 •

NEC 患儿肠道菌群的优势菌属及益生菌制剂疗效分析

李琳琳, 张艳波, 张称心[△]

内蒙古医科大学附属医院儿内科, 内蒙古呼和浩特 010050

摘要:目的 探讨新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC) 患儿肠道菌群的优势菌属及益生菌制剂的疗效。**方法** 选取 2018 年 2 月至 2020 年 2 月于该院治疗的 30 例 NEC 患儿作为观察组,同时选取于该院体检的健康儿童 30 例作为对照组。比较观察组和对照组儿童肠道菌群的丰富度并分析两组儿童肠道菌群的优势菌属。采用随机数字表法,将观察组患儿分为 A 组及 B 组;A 组患儿采用酪酸梭菌二联活菌散剂联合奥曲肽治疗,B 组患儿仅采用奥曲肽治疗;两组患儿均治疗 1 周,比较两组患儿的治疗效果以及肠道菌群的差异。**结果** 观察组肠道菌群丰富度显著低于对照组($P<0.05$),两组儿童的肠道细菌优势菌属条带相似度接近 100%。观察组患儿双歧杆菌及大肠埃希菌呈下降趋势。经 1 周治疗,A 组治疗总有效率显著高于 B 组($P<0.05$);治疗后,A、B 两组患儿的粪便乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌菌落数均有所升高($P<0.05$),且 A 组患儿乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌菌落数明显高于 B 组。**结论** NEC 患儿肠道菌群中的双歧杆菌以及大肠埃希菌呈下降趋势,可通过采用益生菌制剂进行辅助治疗。

关键词:新生儿坏死性小肠结肠炎; 肠道菌群; 双歧杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.019

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)17-2132-04

文献标志码:A

Analysis on the dominant bacteria of intestinal flora for children with NEC and the efficacy of probiotics

LI Linlin, ZHANG Yanbo, ZHANG Chengxin[△]

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University,
Hohhot, Inner Mongolia 010050, China

Abstract: Objective To investigate the dominant bacteria of intestinal flora in children with neonatal necrotizing enterocolitis(NEC) and analyze the efficacy of probiotics. **Methods** A total of 30 NEC patients treated in the hospital from February 2018 to February 2020 were enrolled as the observation group, 30 healthy children who had undergone healthy examination were enrolled as control group. The abundance of the intestinal flora of children in the observation group and the control group was compared, and the dominant bacterial of the intestinal flora of the two groups were analyzed. The observation group were divided into group A and group B by using random number table. Group A were treated with clostridium butyricum combined with octreotide, group B patients were only treated with octreotide, and both groups were treated for 1 week. The treatment effect and the intestinal flora were compared between the two groups. **Results** The richness of intestinal flora in the observation group was significantly lower than that in the control group($P<0.05$). The similarity of the dominant intestinal bacterial bands between the two groups was close to 100%. Bifidobacterium and Escherichia coli in the observation group showed a downward trend. After 1 week of treatment, the total effective rate of treatment in group A was significantly higher than that in group B($P<0.05$); after treatment, the CFU numbers of Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus and Eubacteria in group A and B were increased ($P<0.05$), and the CFU numbers of Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus and Eubacterium in group A were significantly higher than those in group B($P<0.05$). **Conclusion** Bifidobacteria and Escherichia coli in the intestinal flora of children with NEC show a downward trend, and probiotics can be used for adjuvant treatment.

Key words: neonatal necrotizing enterocolitis; intestinal flora; Bifidobacterium

新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)是临床常见的 小儿获得性疾病之一,有研究报道显示,NEC 是由多

作者简介:李琳琳,女,副主任医师,主要从事儿童重症及消化系统的相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1135315688@qq.com。

本文引用格式:李琳琳,张艳波,张称心. NEC 患儿肠道菌群的优势菌属及益生菌制剂疗效分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17): 2132-2134.

种原因造成的肠道黏膜损伤性疾病,由于局部组织的缺血以及缺氧症状,最终导致患儿的小肠以及结肠发生弥漫性或局部坏死,严重影响患儿的生命安全^[1]。流行病学调查显示,NEC 主要好发于回肠远端以及结肠远端^[2]。目前对于 NEC 疾病的研究尚不明确,但是多数研究显示,肠道的细菌感染是造成患儿疾病进展的重要因素,相比健康儿童,患儿的肠道菌群存在显著的异常,但是在以往的研究中,对于人体正常的菌群培养难度较大,对于菌群多样性的研究存在局限性^[3]。随着分子生物学技术的不断进步,通过核酸检测手段对人体肠道菌群进行分析已经成了一种成熟的方法,这对于患儿的治疗有重要意义^[4]。本研究对 NEC 患儿肠道菌群的菌属分布情况及益生菌制剂的疗效进行了分析,旨在为临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 2 月至 2020 年 2 月于本院治疗的 30 例 NEC 患儿作为观察组,男 14 例、女 16 例,日龄(18.37±3.23)d;另外,选取同期于本院体检的健康儿童 30 例作为对照组,男 17 例、女 13 例,日龄(18.43±3.51)d。两组间性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。采用随机数字表法,将观察组患儿又分为 A 组和 B 组,各 15 例,两组患儿的一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患儿家属均签署知情同意书,本研究经本院伦理委员会审批通过。NEC 患儿纳入标准:(1)符合 Bell-NEC 临床诊断标准^[5];(2)患儿的胎龄均在 37 周以上;(3)入院前未使用肠道益生菌制剂;(4)入院前未在其他医院进行治疗。排除标准:(1)肠道畸形;(2)新生儿肺炎;(3)高胆红素血症;(4)肠道先天性疾病;(5)慢性腹泻。对照组纳入标准:(1)无肠道疾病;(2)胎龄均在 37 周以上。排除标准:(1)肠道出现异常情况者;(2)入院前使用肠道益生菌制剂。

1.2 方法

1.2.1 肠道菌群的 PCR 检测及分析 采集纳入儿童的新鲜粪便标本,随后称取 0.22 g 粪便提取 DNA,主要使用 QLAamp STOOL minikit 试剂盒进行,同时对儿童的 DNA 16S rDNA V3 高变区域进行 PCR 扩增,上游引物序列为 5'-CGCCCCGGGCGCGC-CCCCGGGCGCGGGCGCGCCACGCG-3',下游引物序列为 5'-ATTACGCGTGCGTAC-3'。PCR 扩增条件:94℃ 2 min;94℃ 扩增 30 s,60℃ 30 s,70℃ 30 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增完成后,及时对儿童的扩增样品进行变性梯度凝胶电泳分析,然后,采用 SYBR Green 进行染色,30 min 后,使用紫外透射仪器对儿童的凝胶色带进行观察,分析其优势条带^[6]。

1.2.2 治疗方案 A 组患儿采用酪酸梭菌二联活菌散剂(山东科兴生物制品有限公司)联合奥曲肽(浙江苏泊尔制药有限公司)治疗,B 组患儿仅采用奥曲肽治疗,两组患儿均治疗 1 周。对照组不采取任何治疗

措施。

1.2.3 粪便标本的培养 取患儿的新鲜粪便进行粪便培养,取上述标本 1 mL,溶于 99 mL 灭菌生理盐水中,充分振荡摇匀,使用接种环分别对两组患儿样本接种于 MRS 培养皿中^[8],35~37℃ 培养 72 h,通过菌落形态对肠道双歧杆菌、肠球菌、乳酸杆菌以及真杆菌的菌落数量进行统计。MRS 培养皿由江苏康典提供,操作严格按照说明书进行。

1.3 观察指标 (1)对观察组和对照组儿童的肠道菌群的丰富度进行比较。(2)对观察组和对照组儿童的肠道菌群优势菌属进行分析。(3)比较 A、B 两组患儿的治疗效果。治疗效果评价标准^[7]:患儿大便次数以及性状恢复正常,临床症状消失为显效;临床症状明显改善,大便次数和性状改善则为有效;大便性状、次数以及临床症状均未达到明显改善则为无效。总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数×100%。(4)比较 A、B 两组治疗前后的肠道菌群:分别对治疗前后的乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌的菌落数进行比较。

1.4 统计学处理 所有数据均使用统计软件 SPSS19.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组肠道菌群丰富度比较 观察组患儿的肠道菌群的丰富度(7.36±2.33)显著低于对照组(14.16±2.31),差异有统计学意义($t=11.352$, $P<0.001$)。

2.2 观察组和对照组肠道菌群优势菌属分析 观察组和对照组儿童肠道菌群优势菌属的条带相似度接近 100%,观察组双歧杆菌、大肠埃希菌呈下降趋势,见表 1。

表 1 观察组和对照组儿童肠道菌群优势菌属分析			
细菌菌属	菌属序列	条带相似度(%)	对照组/观察组条带数(n/n)
类杆菌	JQ680134.1	100	1/4
双歧杆菌	KC160496.1	100	11/3
肠球菌	KF745071.1	100	16/15
硬膜膜肠球菌	kf250872.1	100	13/2
乳杆菌	CQ996402.1	99	3/4
链球菌	KF561353.1	100	4/4
克雷伯菌	KF835726.1	100	15/7
大肠埃希菌	KF828880.1	99	14/9

2.3 A、B 两组患儿的治疗效果比较 经过 1 周治疗后,A 组患儿的治疗总有效率显著高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.4 A、B 两组患儿治疗前后肠道菌群的比较 治疗

前,两组患儿粪便中的乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌的菌落数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,两组患儿粪便中的乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌菌落数比治疗前均有所升高($P<0.05$),且 A 组患儿乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、真杆菌菌落数高于 B 组($P<0.05$)。见表 3。

表 2 两组患儿的治疗效果比较[n(%)]					
组别	n	显效	有效	无效	总有效率
A 组	15	7(46.67)	7(46.67)	1(6.67)	14(93.33)
B 组	15	2(13.33)	6(40.00)	7(46.7)	8(53.33)
χ^2					4.262
P					0.039

表 3 两组患儿治疗前后肠道菌群的比较($\bar{x}\pm s$,CFU)

组别	n	乳酸杆菌		双歧杆菌		肠球菌		真杆菌	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
B 组	15	8.69±0.34	8.80±0.27*	9.44±0.47	9.88±0.55*	7.80±0.89	8.22±0.47*	7.33±0.54	8.15±0.78*
A 组	15	8.58±0.53	9.32±0.54*	9.59±0.51	10.56±0.61*	7.88±0.78	8.88±0.66*	7.34±0.62	8.95±0.76*
t		0.677	3.336	0.838	3.207	0.262	3.155	0.047	2.845
P		0.504	0.003	0.409	0.003	0.795	0.004	0.963	0.008

注:与同组治疗前比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

肠道菌群平衡对于机体维持健康状态具有重要的意义^[9-11]。肠道菌群失调可能影响肠道细菌的正常生长及平衡,造成 NEC 的发生^[12]。有研究报道,肠道菌群不仅有利于营养物质的吸收,同时通过对脂肪的分解,有利于脂肪组织在机体各脏器的有效分布,对于调节肠道上皮细胞的屏障作用具有积极的意义^[13]。通过稳定的肠道菌群,加强肠道上皮细胞的屏障功能,建立先天性以及获得性免疫,对于机体维持正常的生理功能具有重要意义^[14-15]。由于受到检查条件的限制,自然环境中 99% 的微生物培养都较难适用于常规检测^[16]。通过对儿童标本进行传统微生物培养检测,仅能对儿童的肠道菌群中的个别菌属进行分析^[17],无法用于对儿童肠道菌群多样性的准确分析。随着分子生物学技术的不断发展,通过对肠道细菌核酸物质的分析,可以对肠道菌群进行完整分析,对了解疾病的发生机制具有重要意义。

本研究对健康儿童及 NEC 患儿的肠道菌群丰富度以及优势菌群进行了分析。观察组肠道菌群丰富度显著下降,而两组儿童肠道菌群的优势菌属的相似度接近 100%。NEC 患儿的肠道菌群中,双歧杆菌和大肠埃希菌均呈下降趋势。在疾病状态下,患儿的益生菌优势地位减弱^[18],这对于患儿的肠道上皮细胞损伤会有促进作用^[19]。

在对 NEC 患儿的治疗中,奥曲肽不仅可以降低患儿胃酸以及消化液的分泌量,同时还减少了胃肠道的蠕动,进一步缓解了患儿的临床症状。这些作用在短期内虽然可以使患儿的临床症状得到有效缓解,但患儿的局部病灶由于上皮细胞坏死造成的炎性反应仍有可能得不到有效控制,同时,患儿肠道菌群失衡,致病性微生物的分泌物还会不断刺激患儿的上皮细胞。通过对患儿采用益生菌制剂辅助治疗,可改善患儿肠道菌群丰富度,对于维持益生菌的优势地位具有

重要价值。本研究中,对患儿采用益生菌联合奥曲肽治疗,治疗后的患儿肠道菌群中益生菌的菌落数明显恢复,对于患儿康复具有积极作用。

综上所述,NEC 患儿肠道菌群表现为双歧杆菌及大肠埃希菌降低的趋势,通过采用益生菌制剂辅助治疗,酪酸梭菌二联活菌散剂联合奥曲肽治疗患儿的效果更好,建议临床推广应用。但本研究纳入的样本量较小,还需要进一步地扩大样本量进行研究。

参考文献

[1] 陈仁慧. 新生儿坏死性小肠结肠炎早期诊断生物标记物的研究进展[J]. 中国小儿急救医学, 2018, 25(4): 301-305.

[2] 唐书庆, 朱丽, 张蓉, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎 623 例临床特点分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(15): 1171-1175.

[3] 林宇, 吴晓娟, 黄文华, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎和先天性巨结肠肠穿孔的鉴别诊断和治疗[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(21): 1645-1648.

[4] 李朋, 盛庆丰, 余胜华, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎帕内特细胞的研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2019, 40(10): 905-910.

[5] 陈小慧, 余章斌, 李亚琴, 等. 美国极低出生体质量儿坏死性小肠结肠炎管理指南[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(14): 1134-1136.

[6] 刘仕琪, 赵静儒, 吕毅, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎治疗后直肠闭锁无缝线吻合一例[J]. 中华小儿外科杂志, 2019, 40(8): 752-754.

[7] 龙腾河, 崔惠勤, 董刚志. 新生儿坏死性小肠结肠炎的 DR 诊断[J]. 实用放射学杂志, 2019, 35(1): 97-99.

[8] 付春燕, 王政力, 肖洒, 等. 粪便自诱导分子-2 在新生儿坏死性小肠结肠炎临床病情监测中的价值[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(8): 570-574.

[9] 邹善叶, 李渠北. 新生儿坏死性小肠结肠炎后继发过敏性疾病相关因素分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 27(1): 87-90.

(下转第 2140 页)

- Study 2015 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17 (11): 1133-1161.
- [2] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-445.
 - [3] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
 - [4] QUAN B, ZHANG H, XUE R. MiR-141 alleviates LPS-induced inflammation injury in WI-38 fibroblasts by up-regulation of NOX2[J]. *Life Sci*, 2019, 216: 271-278.
 - [5] ZHANG L, DONG L, TANG Y, et al. MiR-146b protects against the inflammation injury in pediatric pneumonia through MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Infect Dis*, 2020, 52(1): 23-32.
 - [6] 彭官清, 乔凌, 余舒莹. miRNA-155 对重症肺炎大鼠肺组织的保护作用及机制[J]. *重庆医学*, 2019, 48(17): 2890-2894.
 - [7] DING C, VAN'T VEER C, ROELOFS J J T H, et al. Limited role of kininogen in the host response during Gram-negative pneumonia-derived sepsis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(3): 397-405.
 - [8] GUO Z, WU R, GONG J, et al. Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(1): 109-116.
 - [9] 蕊卿, 向晴可, 非肖, 等. 肺炎克雷伯菌黏附素 FimH 蛋白通过 TLR4/NF- κ B 途径诱导巨噬细胞分泌炎症因子[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(3): 208-212.
 - [10] LEYENAAR J, LAGU T, SHIEH M. Management and outcomes of pneumonia among children with complex chronic conditions[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(9): 907-911.
 - [11] 萍吴, 何文龙, 云付, 等. 秦皮甙对重症肺炎大鼠炎症因子表达及相关通路活化的影响[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(4): 292-298.
 - [12] GUO J, CHENG Y. MicroRNA-1247 inhibits lipopolysaccharides-induced acute pneumonia in A549 cells via targeting CC chemokine ligand 16[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(1): 60-68.
 - [13] FOGEL O, TINGGAARD AB, FAGNY M, et al. Deregulation of microRNA expression in monocytes and CD4⁺ T lymphocytes from patients with axial spondyloarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 51-56.
 - [14] SOARES C T, TROMBONE A P F, FACHIN L R V. Differential expression of microRNAs in leprosy skin lesions[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1035-1041.
 - [15] HUA B, LI Y, YANG X, et al. MicroRNA-361-3p promotes human breast cancer cell viability by inhibiting the E2F1/P73 signalling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109994.
 - [16] WANG X, LUO B, LU Y. The triggering receptor expressed by myeloid cells-1 activates TLR4-MyD88-NF kappa B-dependent signaling to aggravate ventilation-induced lung inflammation and injury in mice[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 374(1): 137-148.
 - [17] SONEGO F, CASTANHEIRA F V S, HORTA C V. The host control of a clinical isolate strain of *P. aeruginosa* infection is independent of Nod-1 but depends on MyD88[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(5): 435-443.
- (收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-05-28)
-
- (上接第 2134 页)
- [10] 邹善叶. 新生儿坏死性小肠结肠炎后继发过敏性疾病相关因素分析[D]. 重庆医科大学, 2019.
 - [11] BEN X M. Nutritional management of newborn infants: practical guidelines[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(40): 6133-6139.
 - [12] MEISTER A L, BURKHOLDER C R, DOHENY K K, et al. Ghrelin ameliorates the phenotype of newborn rats induced with mild necrotizing enterocolitis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(11): e13682.
 - [13] MILLER S M, ZHOU A, WORHUNSKY D, et al. Term neonate with necrotizing enterocolitis and prothrombin mutation[J]. *J Clin Neonatol*, 2019, 8(3): 180-182.
 - [14] MEISTER A L, DOHENY K K, TRAVAGLI R A. Necrotizing enterocolitis attenuates developmental heart rate variability increases in newborn rats[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(3): e13484.
 - [15] ZHANG D, WEN J, ZHOU J, et al. Milk Fat Globule membrane ameliorates necrotizing enterocolitis in neonatal rats and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory response in IEC-6 enterocytes[J]. *JPN J Parenter Enteral Nutr*, 2019, 43(7): 863-873.
 - [16] YU R, JIANG S, TAO Y, et al. Inhibition of HMGB1 improves necrotizing enterocolitis by inhibiting NLRP3 via TLR4 and NF- κ B signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13431-13438.
 - [17] SILVER J, ZIEJEWSKI M. North American Brain Injury Society's 13th annual conference on brain injury[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2017, 32(6): 65-103.
 - [18] PELL L G, LOUDET M G, ROTH D E, et al. Arguments against routine administration of probiotics for NEC prevention[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2019, 31(2): 195-201.
 - [19] SANDRA Y M, GRAY K, ALBERT N L, et al. Clinical aspects and management of children in otorhinolaryngological consultation: case of university clinics of Lubumbashi (DR Congo) [J]. *Open Access Lib J*, 2019, 6(9): 1-11.
- (收稿日期: 2020-12-20 修回日期: 2021-05-08)