

极低/超低出生体重儿出生后28天内肠道菌群与临床指标的关联性分析

刘玲¹, 李烨珊¹, 陈柔熠¹, 敖当¹, 林少珠¹, 杨玉萍^{2*} (1. 广东医科大学附属第一医院儿科, 广东湛江 524000; 2. 广东医科大学附属第一医院超声医学科, 广东湛江 524000)

摘要: **目的** 了解出生后28 d内极低/超低出生体重儿肠道菌群与临床指标之间相关性。**方法** 选取出生胎龄<32周且出生身体质量<1.5 kg早产儿, 收集其胎粪(D1)、出生后14 d(D14)和28 d(D28)时粪便样本, 进行16S rRNA基因测序及液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析。采用Spearman分析肠道菌群及代谢物与临床指标相关性。**结果** 达到全肠道喂养时间对肠道菌群结构影响最大($r^2=0.105$, $P=0.001$); 达到全肠道喂养时间与葡萄球菌属、杜氏牙形石属、乳酸菌属、粪杆菌属、约氏不动杆菌、嗜齿粪杆菌呈正相关, 而与副腐化梭状芽胞杆菌、丁酸梭菌呈负相关($P<0.05$)。胎龄、剖宫产与D1肠道菌群呈正相关, 正压通气时间、抗生素使用时间以及达到全肠道喂养时间与D14及D28肠道菌群呈正相关($P<0.01$)。12-羟基十八烷酸、琥珀酸、5-氨基戊酸、十二烷基苯磺酸与达到全肠道喂养时间呈负相关($P<0.05$)。**结论** 肠道菌群及代谢物与临床指标之间存在明显关联, 达到全肠道喂养时间对极低/超低出生体重儿早期肠道菌群的影响最大。

关键词: 肠道菌群; 极低/超低出生体重儿; 16S rRNA; 全肠道喂养; LC-MS/MS

中图分类号: R 722.6 文献标志码: A 文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0406-07

An association between gut microbiota and clinical parameters in very/extremely low birth weight infants during the first 28 days of life

LIU Ling¹, LI Ye-shan¹, CHEN Rou-yi¹, AO Dang¹, LIN Shao-zhu¹, YANG Yu-ping^{2*} (1. Department of Pediatrics; 2. Department of Ultrasound Medicine; Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association between gut microbiota and clinical indicators in very/extremely low birth weight (V/ELBW) infants within the first 28 days of life. **Methods** Preterm infants with <32 weeks' gestational age and <1.5 kg birth weight were recruited. Their stool samples were collected on days 1, 14 and 28, and then subjected to 16S rRNA sequencing and LC-MS/MS analysis. The relationship between gut microbiota and metabolites and clinical factors was investigated by Spearman correlation analysis. **Results** The time to full enteral feeding had the greatest influence on the gut microbiota ($r^2=0.105$, $P=0.001$). The time to full enteral feeding was positively correlated with *Staphylococcus*, *Dubosiella*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Acinetobacter johnsonii*, *Faecalibaculum rodentium*, and negatively with *Clostridium paraputrificum* and *Clostridium butyricum* ($P<0.05$). Gut microbiota was positively associated with gestational age and cesarean section on D1, and negatively with positive pressure ventilation time, antibiotic course, and time to full enteral feeding on D14 and D28 ($P<0.01$). 12-hydroxyoctadecanoic acid, succinic acid, 5-aminopentanoic acid and dodecylbenzene sulfonic acid were negatively correlated with the time to full enteral feeding ($P<0.05$). **Conclusion** There is a significant correlation between gut microbiota and metabolites, and clinical indicators. The time to full enteral feeding has the greatest impact on early-stage gut microbiota of V/ELBW infants.

Key words: gut microbiota; very/extremely low birth weight infants; 16S rRNA sequencing; full enteral feeding; LC-MS/MS

随着新生儿救治水平的逐步提高, 早产儿的存活率显著增加。然而, 早产仍占围产期死亡率的三分之一^[1]。在早产儿中, 肠道菌群失调是非常普遍的现象。

早产儿肠道中潜在致病菌定植增加, 菌群多样性减少, 严格厌氧菌水平降低而变形菌门相对丰富^[2]。研究发现, 极低/超低出生体重儿的胎粪中存在大量需氧或

收稿日期: 2024-06-07

基金项目: 广东省医学科研基金(A2022441), 广东医科大学附属第一医院临床研究项目(LCYJ2020DL01, LCYJ2019B009)

作者简介: 刘玲, 女, 博士, 主治医师, E-mail: liul37@163.com

通信作者: 杨玉萍, 女, 博士, 主治医师, E-mail: 286270774@qq.com

兼性厌氧菌(如变形菌门),并且在出生后约两周开始向专性厌氧菌(如厚壁菌门)进行初步演替过程^[3]。早产儿肠道菌群中存在较高含量的肠杆菌科、肠球菌和条件致病菌^[4]。与足月儿相比,早产儿表现出双歧杆菌定植延迟。这种异常细菌定植可能是由于多种原因引起的,如肠道炎症或抗生素治疗^[5]、剖宫产率增加以及全肠外营养等^[6]。目前尚未明确极低/超低出生体重儿肠道菌群成分及代谢物相关的临床指标,也没有报道主要影响这些婴儿肠道菌群组成和代谢物的临床指标。本研究采用Spearman相关性分析探究临床指标与肠道菌群组成和代谢物之间的关联,筛选出对肠道菌群结构影响较为显著的临床指标,以期预防极低/超低出生体重儿相关并发症提供科学依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2022年4月至2023年12月广东医科大学附属第一医院收治且符合纳入条件的研究对象173例,死亡或家属放弃治疗16例,最后纳入157例。纳入标准:(1)出生时胎龄小于32周;(2)出生身体质量低于1.5 kg;(3)入院日龄不超过24 h;(4)家属签署知情同意书。排除标准:(1)死亡;(2)曾使用微生态制剂。入院时胎龄为(30.40±0.18)周,出生身体质量为(1.27±0.01) kg。本研究经广东医科大学附属第一医院机构审查委员会(PJ2021-097)批准,所有参与者的监护人均知情同意。

1.2 粪便收集与保存

取样时使用无菌棉签,分别采集新生儿出生后的胎粪(出生后24 h内)以及出生后14、28 d的粪便标本。从粪便的3个不同位置进行采样,每个样本约0.2 g(大小如黄豆),将其保存在-80 °C冰箱中直到送检。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取、PCR扩增及Illumina Miseq测序

根据E.Z.N.A.® soil DNA kit(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行微生物群落总基因组DNA抽提,使用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA质量,使用NanoDrop2000(美国Thermo Scientific公司)测定DNA浓度和纯度。以上述提取的DNA为模板,使用携带Barcode序列的上游引物338F(5'-ACTCC TACGGGAGGCAGCAG-3')和下游引物806R(5'-GG ACTACHVG GGTWTCTAAT-3')^[7]对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增。利用Illumina公司的Miseq PE300/NovaSeq PE250平台进行测序(上海美

吉生物医药科技有限公司)。

1.3.2 液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析

仪器平台为赛默飞公司生产的UHPLC-Q Exactive HF-X系统。经过预处理后,将数据上传至美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)进行数据分析。同时将LC-MS/MS质谱信息与代谢公共数据库HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>)数据库进行匹配,得到代谢物信息。

1.4 统计学处理

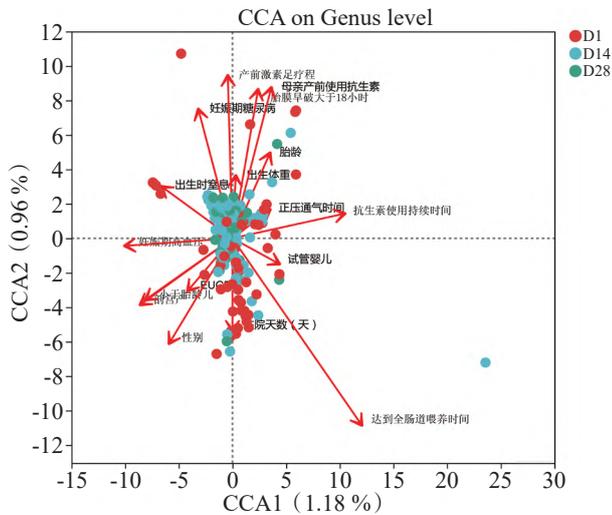
本研究的统计分析使用R语言(version 3.3.1)。典范对应分析(CCA)是基于对应分析发展而来的一种排序方法,将对应分析与多元回归分析相结合,每一步计算均与临床指标进行回归,评估达到全肠道喂养时间、剖宫产、产前激素足疗程、母亲产前使用抗生素、妊娠期高血压、妊娠期糖尿病及胎膜早破大于18 h等临床指标对肠道菌群结构的影响。通过Spearman相关性分析,计算菌群丰度前30的优势微生物(属与种水平)及粪便代谢物与临床指标之间的相关性系数。利用相关性heatmap图展示菌群分类、粪便代谢物与临床指标之间的关联程度。采用mothur软件(<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>)计算alpha多样性(单样本的多样性)Ace、Chao、Shannon和Simpson指数等。其中Chao和Ace为反映菌群丰富度的指数,Ace和Chao指数越大表明群落的丰富度越高;Shannon和Simpson为反映菌群多样性的指数,Shannon指数值越高表明群落的多样性越高,Simpson指数值越大说明群落多样性越低。运用临床指标排序回归分析评估主要临床指标对菌群alpha多样性指数的影响。利用多变量相关线性模型(Multivariate Analysis by Linear Models, MaAslin)挖掘临床指标与菌群相对丰度之间的关联性。使用Mantel-test检验极低/超低出生体重儿不同阶段肠道菌群与临床指标之间的相关性。所有统计检验均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床指标与肠道菌群的关系

基于单峰模型的CCA方法可以反映菌群与临床指标之间的关系。达到全肠道喂养时间、剖宫产、产前激素足疗程、母亲产前使用抗生素、妊娠期高血压、妊娠期糖尿病及胎膜早破大于18 h与肠道菌群明显相关($P<0.05$),见图1。其中,达到全肠道喂养时间对肠道菌群结构影响最大($r^2=0.105$, $P=0.001$),见表1,达到全肠道喂养时间与群落和物种分布呈负相关

($P<0.05$),见图1。



红色箭头表示数量型临床指标,箭头的长短代表临床指标对于肠道菌群影响程度的大小;临床指标箭头间的夹角代表正、负相关性(锐角:正相关;钝角:负相关;直角:无相关性)

图1 临床指标与肠道菌群的CCA分析

表1 临床指标与肠道菌群的CCA分析

	CCA1	CCA2	r^2	P
胎龄	0.604	0.796	0.016	0.078
出生身体质量	0.172	0.985	0.005	0.446
性别	-0.702	-0.711	0.033	0.003
产前激素足疗程	0.042	0.999	0.038	0.001
母亲产前使用抗生素	0.441	0.897	0.041	0.001
妊娠期糖尿病	-0.335	0.942	0.026	0.016
妊娠期高血压	-0.991	-0.129	0.043	0.003
试管婴儿	0.968	-0.247	0.008	0.320
胎膜早破大于18h	0.340	0.940	0.036	0.008
剖宫产	-0.891	-0.454	0.040	0.001
出生时窒息	-0.936	0.350	0.020	0.050
小于胎龄儿	-0.893	-0.448	0.035	0.006
正压通气时间	0.882	0.470	0.006	0.378
抗生素使用持续时间	0.976	0.214	0.049	0.002
达到全肠道喂养时间	0.755	-0.654	0.105	0.001
EUGR	-0.796	-0.604	0.012	0.181
住院时间/d	-0.088	-0.996	0.012	0.164

EUGR: 宫外发育迟缓; r^2 : 临床指标对肠道菌群影响程度的大小, 越大代表临床指标对于肠道菌群影响程度越大; CCA1 和 CCA2 代表两个主成分, 其值表示对应的主成分解释度

2.2 临床指标与肠道菌群之间的关联性分析

通过相关性 heatmap 图分析不同的临床指标对菌群组成(属)的影响,发现达到全肠道喂养时间与葡萄球菌属(*g_Staphylococcus*)、杜氏牙形石属(*g_Dubosiella*)、乳酸菌属(*g_Lactobacillus*)、粪杆菌属(*g_Faecalibacterium*)呈正相关(r 分别为 0.151、0.209、0.190、0.196, $P<0.01$),与双歧杆菌属(*g_Bifidobacterium*)、狭义梭菌

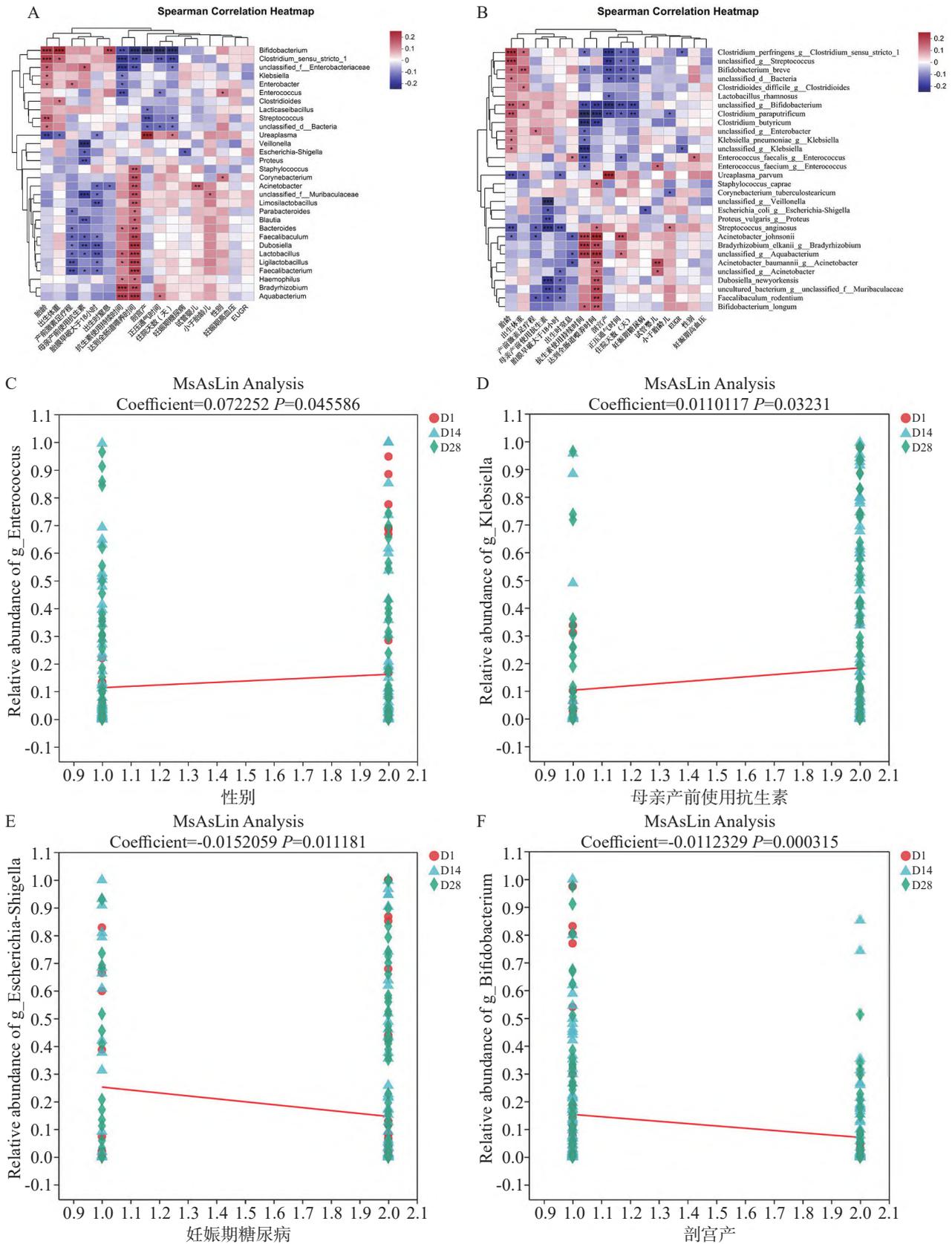
1 属(*g_Clostridium_sensu_stricto_1*)呈负相关(r 分别为 -0.229、-0.174, $P<0.01$)。抗生素使用持续时间、达到全肠道喂养时间、剖宫产、正压通气时间及住院时间均与双歧杆菌属呈负相关(r 分别为 -0.169、-0.229、-0.246、-0.237、-0.228, $P<0.01$),但胎龄、出生身体质量与双歧杆菌属呈正相关(r 分别为 0.211、0.232, $P<0.001$)。热图也显示多个属类与母亲产前使用抗生素及产前激素足疗程呈负相关($P<0.01$),见图 2A。

通过相关性 heatmap 图分析不同的临床指标对菌群组成(种)的影响,发现达到全肠道喂养时间与约氏不动杆菌(*s_Acinetobacter_johnsonii*)、啮齿粪杆菌(*s_Faecalibaculum_rodentium*)呈正相关(r 分别为 0.237、0.184, $P<0.01$),而与副腐化梭状芽胞杆菌(*s_Clostridium_paraputrificum*)、丁酸梭菌(*s_Clostridium_butyricum*)呈负相关(r 分别为 -0.208、-0.180, $P<0.001$)。抗生素使用持续时间、剖宫产、正压通气时间及住院时间均与副腐化梭状芽胞杆菌呈弱负相关(r 分别为 -0.227、-0.160、-0.131、-0.154, $P<0.05$),但胎龄与副腐化梭状芽胞杆菌呈弱正相关($r=0.164$, $P<0.01$)。热图也显示多个种类与产前抗生素使用呈负相关($P<0.01$),见图 2B。

通过 MaAsLin 分析发现性别与肠球菌属(*g_Enterococcus*)的相对丰度呈弱正相关(coefficient=0.072, $P<0.05$),见图 2C;母亲产前使用抗生素与克雷伯菌属(*g_Klebsiella*)的相对丰度呈弱正相关(coefficient=0.110, $P<0.05$),见图 2D;妊娠期糖尿病与大肠杆菌志贺菌属(*g_Escherichia-Shigella*)的相对丰度呈弱负相关(coefficient=-0.152, $P<0.05$),见图 2E;剖宫产与双歧杆菌属的相对丰度呈弱负相关(coefficient=-0.112, $P<0.001$),见图 2F。

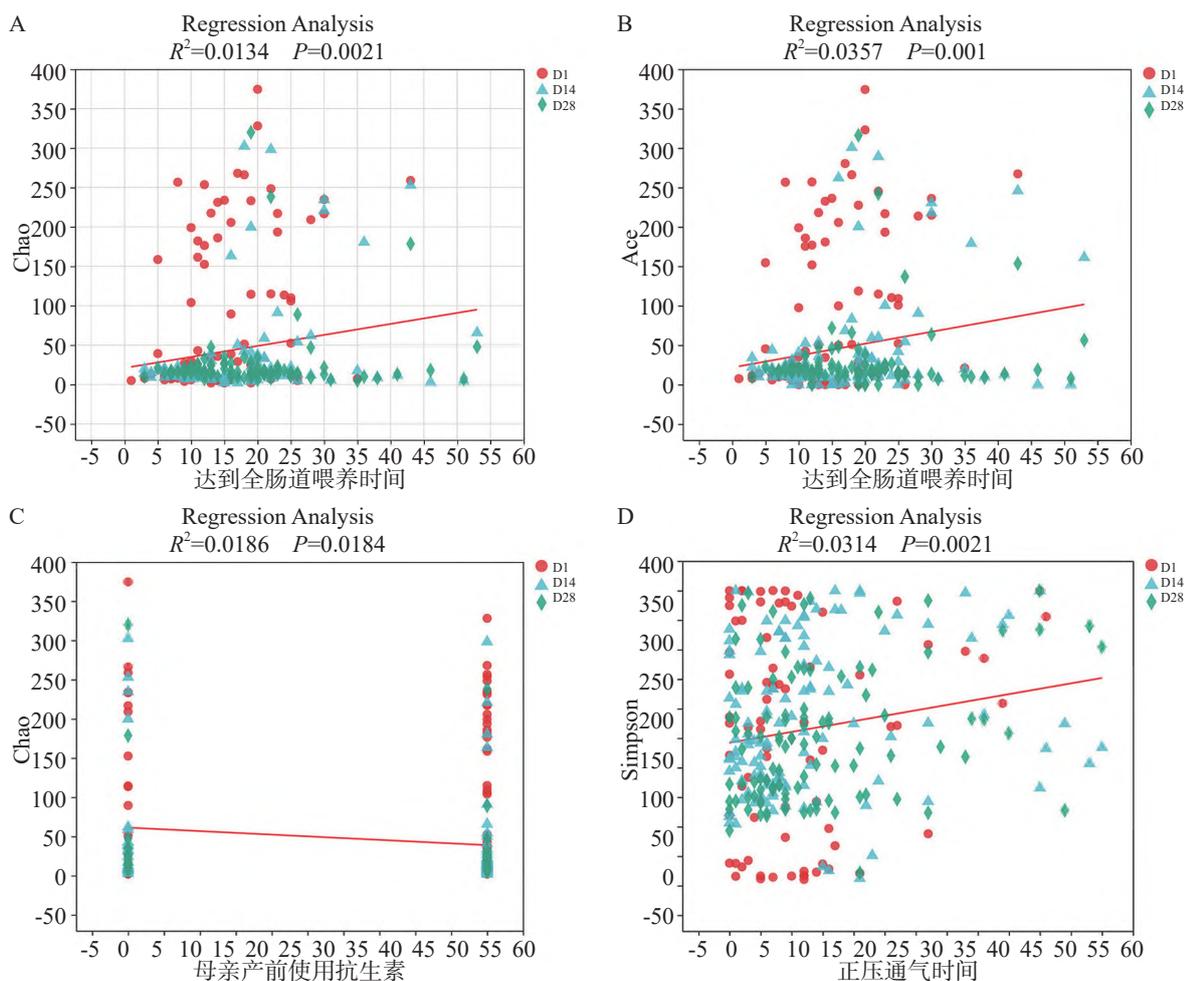
2.3 临床指标对菌群 alpha 多样性的影响

临床指标对菌群 alpha 多样性影响较大。图 3 显示极低/超低出生体重儿 28 d 内属水平的微生物群落多样性与临床指标之间的关系。根据临床指标排序回归分析,达到全肠道喂养时间与 alpha 多样性指数明显相关($P<0.05$),见图 3A、B。达到全肠道喂养时间与 Chao 指数($R^2=0.031$, $P=0.002$)及 Ace 指数($R^2=0.035$, $P=0.001$)均呈正相关,见图 3A 和 B。而母亲产前使用抗生素与 Chao 指数呈负相关($R^2=0.018$, $P=0.018$),见图 3C。图 3D 也显示正压通气时间与 Simpson 指数呈正相关($R^2=0.031$, $P=0.002$)。其他临床指标与 alpha 多样性指数(Ace、Shannon、Chao、Simpson)之间无显著相关性($P>0.05$)。



A. 临床指标与肠道菌群(属水平)之间的相关性(heatmap图); B. 临床指标与肠道菌群(种水平)之间的相关性(heatmap图); 红色表示正相关, 蓝色表示负相关, X轴和Y轴分别为临床指标和物种, 颜色越深代表相关系数越大; C. MaAsLin分析 *g_Enterococcus* 与性别关系; D. MaAsLin分析 *g_Klebsiella* 与母亲产前使用抗生素关系; E. MaAsLin分析 *g_Escherichia-Shigella* 与妊娠期糖尿病关系; F. MaAsLin分析 *g_Bifidobacterium* 与剖宫产关系; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 临床指标与肠道菌群组成之间的关联性分析



A. 达到全肠道喂养时间与 Chao 指数之间的关系; B. 达到全肠道喂养时间与 Ace 指数之间的关系; C. 母亲产前使用抗生素与 Chao 指数之间的关系; D. 正压通气时间与 Simpson 指数之间的关系; 临床指标排序回归分析, 根据 alpha 多样性分析结果, 以各样本对应的 alpha 多样性指数为 y 轴, 以该样品对应的临床指标为 x 轴做散点图, 并进行线性回归, 标注 R^2 , 可用于评价二者间的关系, 其中 R^2 为决定系数, 代表变异被回归直线解释的比例

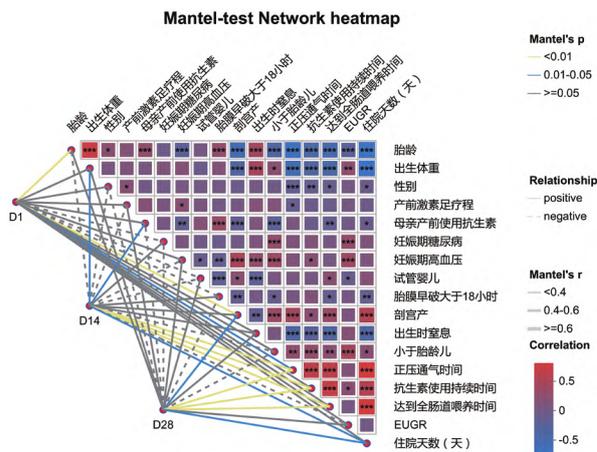
图 3 alpha 多样性与临床指标之间的关系

2.4 临床指标与肠道菌群的相关性分析

胎龄、剖宫产与 D1 肠道菌群呈正相关 (Mantel's r 分别为 0.124、0.128, $P < 0.01$), 正压通气时间、抗生素使用持续时间及达到全肠道喂养时间与 D14 (Mantel's r 分别为 0.140、0.115、0.183, $P < 0.01$)、D28 (Mantel's r 分别为 0.123、0.135、0.120, $P < 0.01$) 肠道菌群呈正相关。达到全肠道喂养时间与胎龄、出生身体质量、母亲产前使用抗生素、胎膜早破大于 18 h 时、剖宫产、出生时窒息、小于胎龄儿、正压通气时间及抗生素使用持续时间均呈负相关 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 临床指标与代谢物的相关性

代谢物的改变与极低/超低出生体重儿临床指标之间存在一些关联 (图 5)。十二烷基苯磺酸 (Dodecylbenzenesulfonic Acid) 与胎龄呈正相关 ($r = 0.416$, $P = 0.007$), 与抗生素使用持续时间 ($r = -0.354$, $P = 0.024$)、住院时间 ($r = -0.340$, $P = 0.031$)、正压通气时间 ($r =$



图中线条代表群落和临床指标相关性, heatmap 图代表临床指标之间相关性; 线条粗细表示群落与临床指标之间相关性大小, 取 Mantel's r (r 的绝对值) 绘制; Positive 和 Negative 群落与临床指标的正负相关性; heatmap 图中不同颜色代表正负相关性, 颜色深浅代表正负相关性的大小; 色块中星号代表显著性: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 4 临床指标与肠道菌群的相关性分析

-0.583, $P<0.001$) 和达到全肠道喂养时间($r=-0.370$, $P=0.018$) 均呈负相关。12-羟基十八烷酸(12-Hydroxyoctadecanoic acid)与正压通气时间呈负相关关系($r=-0.370$, $P=0.026$)。12-羟基十八烷酸($r=-0.320$, $P=0.044$)、琥珀酸(succinic acid, $r=-0.411$, $P=0.008$)、5-氨基戊酸(5-Aminopentanoic acid, $r=-0.335$, $P=0.034$)与达到全肠道喂养时间呈负相关。见图5。

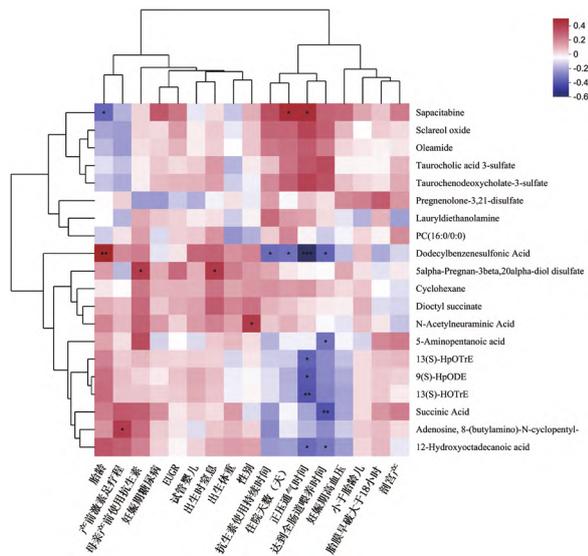


图5 肠道代谢物与临床指标的相关性

3 讨论

目前尚不清楚对极低/超低出生体重儿早期肠道菌群影响较大的临床指标。本研究采用前瞻性队列设计,探讨了不同时间点上极低/超低出生体重儿肠道菌群与临床指标之间的相关性,结果发现肠道菌群及代谢物与临床指标之间存在明显关联,正压通气时间、抗生素使用持续时间以及达到全肠道喂养时间对不同时期极低/超低出生体重儿肠道菌群影响较大。本研究为预防极低/超低出生体重儿相关并发症提供科学依据。

本研究基于单峰模型的CCA发现达到全肠道喂养时间对肠道菌群结构产生了显著的影响。在新生儿重症监护病房,早产儿达到全肠道喂养是一个挑战,延迟全肠道喂养与早产儿短期和长期预后不良相关^[8]。具体而言,达到全肠道喂养时间与葡萄球菌属、杜氏牙形石属、乳酸菌属、粪杆菌属、约氏不动杆菌、啮齿粪杆菌呈正相关。葡萄球菌属是极低出生体重儿出生后不久胃肠道内常见的微生物,随着时间推移逐渐被其他兼性和专性厌氧菌所取代^[9]。Romano-Keeler等^[10]发现,与接受肠道手术而无新生儿坏死性小肠结肠炎

(NEC)的婴儿相比,需要外科手术NEC患儿其肠道菌群多样性降低,葡萄球菌属丰度增加。与阴道产相比,存在于皮肤表面的葡萄球菌属在剖宫产新生儿肠道菌群内丰度更高^[11],但在我们目前研究中并未发现葡萄球菌属丰度与剖宫产的关联。杜氏牙形石属与肥胖的发展有直接关系^[12]。Cheng等^[13]研究发现,在属水平上,与对照组相比,阿尔兹海默症小鼠的肠道菌群乳酸菌属和杜氏牙形石属的丰度增加。Wang等^[14]研究发现肠道菌群粪杆菌属与智力障碍和注意缺陷多动障碍呈负相关。在食物过敏组患者肠道菌群粪杆菌属的丰度比健康对照组更高^[15]。在移植后30天,急性移植植物抗宿主病(aGvHD)患者约氏不动杆菌丰度较无aGvHD患者高,约氏不动杆菌与aGvHD相关^[16]。我们的前期研究发现早产儿脑组显著富集约氏不动杆菌,其可能与额叶白质脑损伤有关^[17]。葡萄球菌属、杜氏牙形石属、乳酸菌属、粪杆菌属、约氏不动杆菌、啮齿粪杆菌丰度的增加可能延长全肠道喂养时间。

本研究还发现达到全肠道喂养时间与双歧杆菌属、狭义梭菌1属、副腐化梭状芽胞杆菌、丁酸梭菌呈负相关。Doumatey等^[18]发现,与对照组相比,II型糖尿病患者肠道菌群副腐化梭状芽胞杆菌丰度明显降低。副腐化梭状芽胞杆菌也与散发的人类感染有关。丁酸梭菌是一种益生菌,可产生短链脂肪酸(SCFAs),如丁酸、醋酸和丙酸,可以预防感染。有研究发现,母乳喂养的母鼠服用丁酸梭菌能够调节其子代的肠道菌群平衡,丁酸梭菌可能是一种改善子代肠道菌群平衡的安全方法^[19]。狭义梭菌1属与多种炎症基因相关,被认为是一种与肠道炎症相关的条件致病菌^[20]。但Hong等^[21]在关于肠道菌群与喂养不耐受的关系的研究中发现,早产儿喂养不耐受组在出生后3~4周时,狭义梭菌1属的相对丰度显著低于对照组。狭义梭菌1属可能影响早产儿肠内喂养。

本研究发现抗生素使用持续时间、达到全肠道喂养时间、剖宫产、正压通气时间及住院时间均与双歧杆菌属呈负相关。在早产儿中,双歧杆菌属的相对丰度降低,而潜在的条件致病菌则明显增加。此外,早产儿的菌群多样性低于健康的足月新生儿,双歧杆菌属等有益菌株的定植相对延迟。有研究表明,早产儿补充益生菌(包括双歧杆菌)有可能预防早产儿严重并发症^[22]。本研究也发现达到全肠道喂养时间与双歧杆菌属呈负相关。达到全肠道喂养时间、正压通气时间及住院时间越长可能延迟早产儿肠道双歧杆菌属的定植。

极低/超低出生体重儿的临床指标与肠道菌群和代谢物之间存在明显关联,不同时间点的肠道菌群影响也有所不同。正压通气时间、抗生素使用持续时间以及达到全肠道喂养时间对出生后 14、28 d 肠道菌群结构的影响最为显著,而胎龄和剖宫产则对出生时肠道菌群产生较大影响。此外,根据 Spearman 相关性分析结果显示,达到全肠道喂养时间、正压通气时间和抗生素使用持续时间与多种代谢物之间存在相关性。

在临床实践中,努力减少正压通气时间、抗生素使用持续时间以及达到全肠道喂养时间对于纠正早产儿早期肠道菌群失调,降低早产儿并发症具有重要意义。

参考文献:

- [1] LEE J Y, SONG H, DASH O, et al. Administration of melatonin for prevention of preterm birth and fetal brain injury associated with premature birth in a mouse model[J]. *AM J Reprod Immunol*, 2019, 82(3): e13151.
- [2] TIRONE C, PEZZA L, PALADINI A, et al. Gut and lung microbiota in preterm infants: Immunological modulation and implication in neonatal outcomes[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2910.
- [3] CONG X, HENDERSON W A, GRAF J, et al. McGrath, early life experience and gut microbiome: The brain-gut-microbiota signaling system[J]. *Adv Neonatal Care*, 2015, 15(5): 314-323.
- [4] LIU L, AO D, CAI X, et al. Early gut microbiota in very low and extremely low birth weight preterm infants with feeding intolerance: A prospective case-control study[J]. *J Microbiol*, 2022, 60(10): 1021-1031.
- [5] LITVAK Y, BYNDLOSS M X, TSOLIS R M, et al. Dysbiotic Proteobacteria expansion: A microbial signature of epithelial dysfunction[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 39: 1-6.
- [6] NAVARRO-TAPIA E, SEBASTIANI G, SAILER S, et al. Probiotic supplementation during the perinatal and infant period: Effects on gut dysbiosis and disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2243.
- [7] LIU C, ZHAO D, MA W, et al. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(3): 1421-1426.
- [8] ZHENG L, GAI L, WU Y, et al. Breast milk enema and meconium evacuation among preterm infants: A randomized clinical trial[J]. *JAMA Netw Open*, 2024, 7(4): e247145.
- [9] ASBURY M R, SHAMA S, SA J Y, et al. Human milk nutrient fortifiers alter the developing gastrointestinal microbiota of very-low-birth-weight infants[J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(9): 1328-1339.e5.
- [10] ROMANO-KEELER J, SHILTS M H, TOVCHIGRECHKO A, et al. Distinct mucosal microbial communities in infants with surgical necrotizing enterocolitis correlate with age and antibiotic exposure[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206366.
- [11] LEO S, CETINER O F, PITTET L F, et al. Metagenomics analysis of the neonatal intestinal resistome[J]. *Front Pediatr*, 2023, 11:1169651.
- [12] BAI Y F, WANG S W, WANG X X, et al. The flavonoid-rich Quzhou Fructus Aurantii extract modulates gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed mice[J]. *Nutr Diabetes*, 2019, 9(1): 30.
- [13] CHENG X, TAN Y, LI H, et al. Fecal 16S rRNA sequencing and multi-compartment metabolomics revealed gut microbiota and metabolites interactions in APP/PS1 mice[J]. *Comput Biol Med*, 2022, 151: 106312.
- [14] WANG Y, CHENG T, CUI Y, et al. Associations between gut microbiota and adverse neurodevelopmental outcomes in preterm infants: A two-sample Mendelian randomization study[J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1344125.
- [15] WANG S, ZHANG R, LI X, et al. Relationship between maternal-infant gut microbiota and infant food allergy[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 933152.
- [16] QI L, PENG J, HUANG X, et al. Longitudinal dynamics of gut microbiota in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(24): 21567-21578.
- [17] LIU L, XIANG M, CAI X, et al. Multi-omics analyses of gut microbiota via 16S rRNA gene sequencing, LC-MS/MS and diffusion tensor imaging reveal aberrant microbiota-gut-brain axis in very low or extremely low birth weight infants with white matter injury[J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 387.
- [18] DOUMATEY A P, ADEYEMO A, ZHOU J, et al. Gut microbiome profiles are associated with type 2 diabetes in Urban Africans[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 63.
- [19] MIAO R X, ZHU X X, WAN C M, et al. Effect of *Clostridium butyricum* supplementation on the development of intestinal flora and the immune system of neonatal mice[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1):1081-1086.
- [20] CHEN X, YAN Z, LIU L, et al. Characteristics of gut microbiota of term small gestational age infants within 1 week and their relationship with neurodevelopment at 6 months[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 912968.
- [21] HONG L Y, HUANG Y H, HAN J Y, et al. Dynamics and crosstalk between gut microbiota, metabolome, and fecal calprotectin in very preterm infants: Insights into feeding intolerance[J]. *Nutrients*, 2023, 15(22): 4849.
- [22] PLUMMER E L, DANIELEWSKI J A, GARLAND S M, et al. The effect of probiotic supplementation on the gut microbiota of preterm infants[J]. *J Med Microbiol*, 2021, 70(8): 001403.

(责任编辑:李 晓)