

· 中国国家出生队列 ·

中国国家出生队列母婴肠道微生物亚队列研究

林苑^{1,2} 陆群¹ 蒋杨倩³ 孟庆霞⁴ 王晓艳⁵ 刘聪³ 何元林³ 韩秀梅³ 周昆³
杜江波³ 马红霞^{2,3} 靳光付^{2,3} 李红⁴ 凌秀凤⁶ 沈洪兵^{2,3} 胡志斌^{2,3}

¹南京医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系 211166; ²南京医科大学生殖医学国家重点实验室全球健康研究中心 211166; ³南京医科大学公共卫生学院流行病学系 211166; ⁴南京医科大学附属苏州医院生殖与遗传中心, 苏州 215002; ⁵南京医科大学附属苏州医院妇产科, 苏州 215002; ⁶南京医科大学附属妇产医院生殖医学中心 210011
通信作者: 胡志斌, Email: zhibin_hu@njmu.edu.cn

【摘要】 肠道微生物对人类健康的重要性逐渐被人们关注。动物模型揭示了孕期母体微生物通过对子代微生物、代谢和免疫发育的作用影响了子代健康结局。然而, 人体生理机制更为复杂, 并受到多种暴露因素的交互影响, 在动物模型中得到的研究结果往往与人群研究不一致。目前, 孕期母体肠道微生物对子代微生物定植和健康的影响尚不明确。在大型前瞻性出生队列的基础上建设微生物亚队列, 检测母亲孕期和子代发育多时点微生物组状态, 并进一步与人群环境、行为暴露等宏观信息结合, 能更好地为人体健康和疾病的机制研究提供可靠支撑。本研究从研究目标、内容、进展及优势与潜在问题等方面对该亚队列研究进行简要介绍, 着重呈现本研究的总体设计和进展情况。

【关键词】 母婴; 肠道微生物; 出生队列

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1004200, 2016YFC1000200)

A sub-cohort study design of the maternal and infant microbes in China National Birth Cohort

Lin Yuan^{1,2}, Lu Qun¹, Jiang Yangqian³, Meng Qingxia⁴, Wang Xiaoyan⁵, Liu Cong³, He Yuanlin³, Han Xiumei³, Zhou Kun³, Du Jiangbo³, Ma Hongxia^{2,3}, Jin Guangfu^{2,3}, Li Hong⁴, Ling Xiufeng⁶, Shen Hongbing^{2,3}, Hu Zhibin^{2,3}

¹Department of Maternal, Child and Adolescent Health, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; ²State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Center for Global Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; ³Department of Epidemiology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; ⁴Reproductive and Genetic Center, Nanjing Medical University Affiliated Suzhou Hospital, Suzhou 215002, China; ⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Nanjing Medical University Affiliated Suzhou Hospital, Suzhou 215002, China; ⁶Reproductive Medical Center, Nanjing Medical University Affiliated Maternity and Child Health Hospital, Nanjing 210011, China

Corresponding author: Hu Zhibin, Email: zhibin_hu@njmu.edu.cn

【Abstract】 The importance of gut microbes to human health has gradually attracted attention. With the use of animal models, it has been revealed that maternal microbes during pregnancy could influence their children's health outcomes through shaping their microbial composition and regulating the development of their metabolic and immune system. However, the physiological mechanism of the human body is more complex and is affected by the interaction of multiple factors. The research results obtained from animal models are often inconsistent with

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201211-01406

收稿日期 2020-12-11 本文编辑 李银鸽

引用本文: 林苑, 陆群, 蒋杨倩, 等. 中国国家出生队列母婴肠道微生物亚队列研究[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(4): 597-601. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201211-01406.



human studies. At present, the influence of maternal intestinal microbes during pregnancy on the microbial colonization in their offspring and on a series of children's health outcomes is still unclear. Establishing a sub-cohort to detect the microbiome of the women across pregnancy and of their offspring, and further to integrate with variety of environmental and behavioral exposures can better provide reliable support for the research on the mechanism of children's health and diseases. This paper briefly introduces the research objectives, content, progress, strength and limitations of the sub-cohort study.

【Key words】 Mother and child; Gut microbiome; Birth cohort

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1004200, 2016YFC1000200)

近年来,随着高通量测序技术的发展,肠道微生物对人类健康的重要性逐渐被揭示^[1]。微生物的定植是建立健康的宿主-微生物共生关系的关键,可以影响个体代谢、免疫系统发育及健康状况^[2]。肠道微生物如双歧杆菌,能参与维生素 B₁₂ 等多种维生素的合成,此外还能发酵未消化的碳水化合物,参与肝脏能量代谢、糖代谢等过程^[3]。肠道微生物还可以作为一种重要的抗原,刺激肠道黏膜相关淋巴组织的发育成熟,增强机体免疫功能^[2]。研究表明,肥胖、糖尿病、哮喘等代谢、免疫系统疾病与肠道微生物失衡密切相关^[4]。

新生儿肠道微生物呈现快速变化的特征,生命早期阶段的微生物容易受到母亲孕期因素、分娩方式、出生后药物使用和喂养等因素的影响^[2]。同时,流行病学研究表明新生儿肠道微生物在儿童健康和发育中起到重要作用^[5]。例如子代 3~6 月龄时肠道中柠檬杆菌、乳球菌等丰富度降低会增加 3 岁时食物过敏的风险^[6]。儿童肠道中萨特菌属、普氏菌属和拟杆菌属丰富度的降低以及相关代谢活动的失调可能与自闭症的发病有关^[4]。基于小鼠模型的研究提示,孕鼠肠道微生物变化能够对子代鼠先天免疫发育产生影响^[7-8]。例如, Gomez 等^[7]的研究发现,给孕鼠移植大肠埃希菌导致子代鼠出生后 14 d 肠上皮固有免疫细胞数量显著增加。基于动物模型开展的研究一定程度上揭示了母体孕期微生物影响子代健康结局的机制。然而,动物模型中大剂量直接干预与人的实际暴露情况存在巨大差异,动物模型也无法模拟人在面对复杂暴露时的生理机制。因此,基于动物模型的研究成果有时难以外推到人群。

人的生活环境和遗传背景复杂多样,孕期母亲膳食、抗生素使用、分娩方式以及子代喂养等因素均可影响子代肠道微生物^[9],目前利用前瞻性队列探讨子代菌群构成影响因素的研究尚缺乏。本课题

组依托中国国家出生队列(China National Birth Cohort, CNBC)前期开展了子代肠道微生物研究的预实验。结果发现,辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)可能影响子代肠道微生物构成。与自然妊娠出生的新生儿相比,ART 新生儿胎便中拟杆菌门相对丰富度显著减少,并且拟杆菌门相对丰富度与婴幼儿早期体重增速呈显著负相关关系,由此提示 ART 可能通过作用于新生儿肠道菌群构成对儿童生长发育产生影响^[10]。但是,该研究仅分析了子代出生时单个时点的微生物样本,没有对孕期母亲和子代生长发育过程中的微生物进行系统性分析,无法对潜在机制进行探讨。

因此,本课题组依托 CNBC 建设了母婴微生物亚队列。该亚队列采用精细化设计,除常规收集整个孕期的环境、行为暴露等宏观信息外,还采集孕期多时点、子代分娩时以及儿童生长发育早期粪便样本,计划对母亲孕期和儿童发育多时点进行微生物组学检测,并与人群环境暴露、行为等宏观信息结合,开展进一步研究。该亚队列的总体研究目标是系统比较 ART 孕妇及子代和自然妊娠孕妇及子代的肠道微生物构成,探讨 ART 人群经历的特殊暴露是否对母婴肠道微生物产生影响;基于 CNBC 系统采集的孕前期、孕期、分娩期以及子代的人群信息、环境暴露、行为习惯和临床信息,综合评价微生物在母婴间的传递和相关的上游影响因素,及其对子代体格和神经发育的影响,为机制研究提供可靠支撑。该队列研究于 2018 年 11 月启动,计划纳入并随访 500 个 ART 家庭和 500 个自然妊娠家庭及其子代。

一、肠道微生物亚队列的研究内容

1. 研究对象纳入:以南京市妇幼保健院和苏州市立医院为现场,计划纳入 500 个 ART 家庭和 500 个自然妊娠家庭。自然妊娠家庭纳入条件:① CNBC 从产科门诊招募的怀孕早期(妊娠 8~14 周)

家庭;②没有 ART 治疗史。ART 家庭纳入条件:①CNBC 从生殖中心纳入,并在该中心进行 ART 治疗;②ART 治疗后成功妊娠,并处在孕早期阶段(妊娠 8~14 周)。另外,所有家庭应满足:①同意参加亚队列研究并计划在南京市妇幼保健院或苏州市立医院分娩;②南京市户籍(或在南京市居住超过 1 年)或苏州市户籍(或在苏州市居住超过 1 年);③既往无糖尿病、高血压病史。本项目通过南京医科大学伦理委员会审批,研究对象均已签署知情同意书。

2. 暴露:亚队列研究的主要暴露为受孕方式(ART 与自然妊娠)。此外,孕前及孕期的多种环境暴露、行为习惯和疾病健康状态也将作为暴露因素进行综合研究。项目使用无纸化电子问卷,以面访或电话随访的方式对研究对象进行调查。调查问卷分为纳入期基线问卷(男、女方)以及孕期随访问卷(女方孕早、中、晚期)。女性基线信息主要包括一般人口学特征、社会经济水平信息、月经、生育史及生育相关疾病史等。孕期环境和行为暴露信息主要包括孕妇吸烟、饮酒、运动、睡眠、膳食、心理和疾病情况等。除问卷调查采集的信息外,我们还从医院系统获取了孕期各阶段临床信息,包括疾病诊断治疗信息及临床检查和实验室检测数据。对于辅助生殖人群,还从医院系统中获取移植前后的用药情况、移植情况等临床数据。

3. 结局:亚队列研究的主要结局为母婴肠道微生物的构成。此外,儿童早期的体格发育和神经发育状态也将作为亚队列研究的次要结局,并评价母婴肠道微生物是否介导了上游暴露因素对子代生长发育的影响。婴幼儿 42 d 和 6 月龄随访采用电话随访的方式,获取其在当地社区医院进行的相关体格检测数据。婴幼儿 1 岁时则邀约回医院儿保科进行面访并由临床医生进行全面体格和神经发育检查。子代体格发育测量主要包括身高、体重、

头围和胸围。婴幼儿 1 岁智力评估采用《贝利婴幼儿发展量表第三版》。亚队列设计流程见图 1。

4. 生物标本的采集与处理:肠道微生物样本的采集覆盖孕早、孕晚期,以及子代分娩时和生长发育早期。孕妇在其孕早期和孕晚期产检当日,在队列专职人员指导下,排便于无菌托盘内,同时避免尿液污染,随后用带粪勺的灭菌采粪管,挖取采集粪便样本,于-80℃冰箱冻存;子代胎便样本在分娩后 24 h 内采集,由产科护士从尿不湿上刮取胎便样本至无菌粪管,置于-80℃冻存;子代 1 岁时的粪便样本于邀约回访当日采集,采集方法与孕期粪便采集方法类似,样本采集后于-80℃冻存。粪便微生物 DNA 提取采用 QIAamp 快速粪便 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司,德国)(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, Germany)。粪便样本全部收集完毕后,将通过 16S rRNA 测序分析检测粪便中微生物构成。此外,队列在孕早、孕中和孕晚期常规采集孕妇外周血样本,在子代分娩时采集脐带血样本,1 岁时采集指尖血样本。标本的采集流程见图 1。

二、亚队列现阶段进展

截至 2021 年 1 月底,微生物亚队列已完成 500 对 ART 家庭和自然妊娠家庭的纳入。整个亚队列项目预计将于 2022 年 8 月完成所有子代随访及样本采集。

对已收集的基线资料进行分析显示,本研究孕妇平均年龄为 30.8 岁,ART 组孕妇孕前年龄高于自然妊娠组(ART 组 31.7 岁,自然妊娠组 29.8 岁);孕前 BMI 两组差异无统计学意义;ART 组孕妇初次妊娠率高于自然妊娠组;两组孕妇孕前吸烟及饮酒情况差异无统计学意义。见表 1。

截至 2021 年 1 月底,孕早期、孕晚期、分娩阶段和 12 月龄分别采集了 500、343、307 和 61 例 ART 家庭粪便标本和 500、327、281 和 56 例自然妊娠家庭

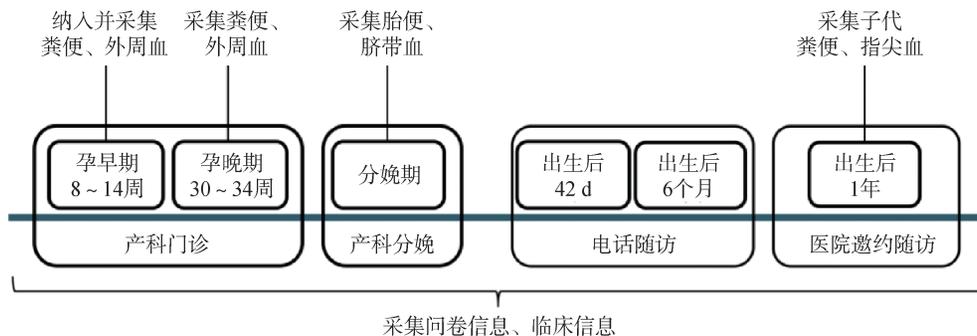


图 1 亚队列设计及生物标本的采集

表 1 已纳入家庭基线信息

变 量	辅助生殖家庭(n=500)	自然妊娠家庭(n=500)	P 值
孕前女方年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	31.7±3.4	29.8±3.7	<0.001
孕前女方 BMI(kg/m ² , %)			0.044
<18.5	38(7.6)	55(11.0)	
18.5~	270(54.0)	351(70.2)	
24.0~	86(17.2)	69(13.8)	
≥28.0	22(4.4)	25(5.0)	
文化程度(大专及以上, %)	383(76.6)	441(88.2)	<0.001
既往有妊娠经历(%)	209(41.6)	258(51.6)	0.002
孕前吸烟(%)	7(1.4)	3(0.6)	0.340
孕前饮酒(%)	11(2.2)	5(1.0)	0.208

粪便标本。标本采集情况见图 2。

三、微生物亚队列的优势与潜在问题

既往研究认为,通过 ART 受孕的子代代谢及心血管系统疾病、认知发育障碍和自闭症等疾病的发生风险较自然妊娠子代更高。然而,既往人群研究多为横断面关联研究,一方面无法区分因果关系,另一方面无法进行更深入的机制探讨。母婴微生物亚队列具有前瞻性队列研究在因果推断上的优势,并且采用多时点随访和长时间随访的设计,除常规问卷调查外,还能够获取医院系统的临床检验和诊断信息,收集信息丰富准确。队列对 ART 和自然妊娠人群采用平行设计和标准化随访流程,确保两组人群的可比性。此外,亚队列采用精细化设计,在多个关键时间窗口采集生物样本,计划开展多时间点微生物组学研究,并且能够与收集的环境和遗传因素进行交互分析。目前,国内外著名的

出生队列,如丹麦国家出生队列、挪威母亲和儿童队列、中国的上海优生儿童队列和安徽出生队列等^[11-14],尚未报道对研究对象的微生物样本进行系统性采集和相关研究。针对母婴微生物的小型人群队列研究已有报道^[15-16],但大多受到样本量限制,或未采集多时点母婴粪便样本,无法从肠道微生物角度深入探讨母婴健康疾病发生的潜在机制。本亚队列的建设和应用将有助于阐明微生物的母婴传递和其生命早期的动态变化,揭示子代健康及疾病发生的部分潜在机制。

然而,微生物亚队列在队列建设过程中,受限於实际情况,仍然存在一些潜在问题。例如子代出生后,外环境暴露对子代早期肠道微生物影响较大,而亚队列在子代 42 d、6 月龄随访采用电话随访的方式,不进行生物样本采集。但队列子代随访采集的信息完整全面,在后续分析时可充分考虑,控



图 2 亚队列生物标本采集情况

制外环境暴露因素的影响。在微生物亚队列建设过程中,由于主队列计划外生物样本的采集,需要耗费额外的人力、物力和财力。且由于粪便样本对采样时间和样本存储的要求较为严苛,需要目标家庭和医院产科病房高度配合,使得亚队列规模会受到一定限制。但该亚队列采用精细化研究设计,多时间窗口采集个体信息、临床信息和生物标本,并最大程度确保数据的完整性和准确性,获得的海量动态宏观和微观信息能够满足研究的需要。

微生物亚队列研究旨在全面比较 ART 母婴和自然妊娠母婴的肠道微生物构成,并系统研究母婴间微生物传递和相关的上游影响因素,及其对子代体格和神经发育的影响,为子代健康和疾病的机制研究提供线索。为了确保亚队列项目的顺利进行,需要进一步加强项目现场、调查对象和医院工作人员之间的配合,充分利用项目优势开展研究,并共同克服和解决可能存在的问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Stiemsma L, Reynolds L, Turvey S, et al. The hygiene hypothesis: Current perspectives and future therapies[J]. *Immuno Targets and Therapy*, 2015, 4 (1):143-157. DOI: 10.2147/ITT.S61528.
- [2] Tamburini S, Shen N, Wu HC, et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes [J]. *Nat Med*, 2016, 22(7):713-722. DOI:10.1038/nm.4142.
- [3] Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants [J]. *Microbiome*, 2015, 3: 13. DOI:10.1186/s40168-015-0071-z.
- [4] Zhou D, Mao XH, Liu QS, et al. Altered gut microbial profile is associated with abnormal metabolism activity of Autism Spectrum Disorder [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1246-1267. DOI:10.1080/19490976.2020.1747329.
- [5] Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, et al. The infant microbiome development: mom matters [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(2):109-117. DOI:10.1016/j.molmed.2014.12.002.
- [6] Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood[J]. *Allergy*, 2018, 73(1):145-152. DOI:10.1111/all.13232.
- [7] Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development[J]. *Science*, 2016, 351(6279):1296-1302. DOI:10.1126/science.aad2571.
- [8] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1451-1463. DOI:10.1016/j.cell.2013.11.024.
- [9] Stiemsma LT, Michels KB. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease[J]. *Pediatrics*, 2018, 141(4):e20172437. DOI:10.1542/peds.2017-2437.
- [10] Lu Q, Lin Y, Chen T, et al. Alternations of gut microbiota composition in neonates conceived by assisted reproductive technology and its relation to infant growth [J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1794466. DOI: 10.1080/19490976.2020.1794466.
- [11] Olsen J, Melbye M, Olsen SF, et al. The Danish National Birth Cohort—its background, structure and aim[J] *Scand J Public Health*, 2001, 29(4): 300-307. DOI: 10.1177/14034948010290040201.
- [12] Magnus P, Birke C, Vejrup K, et al. Cohort Profile Update: The Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)[J]. *Int J Epidemiol*, 2016, 45(2): 382-388. DOI: 10.1093/ije/dyw029.
- [13] Zhang J, Tian Y, Wang W, et al. Cohort profile:the Shanghai Birth Cohort[J]. *Int J Epidemiol*, 2019, 48(1): 21-21. DOI: 10.1093/ije/dyy277.
- [14] Tao FB, Hao JH, Huang K, et al. Cohort Profile: the China-Anhui Birth Cohort Study[J]. *Int J Epidemiol*, 2013, 42(3):709-721. DOI:10.1093/ije/dys085.
- [15] Schei K, Avershina E, Øien T, et al. Early gut mycobiota and mother-offspring transfer[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 107. DOI:10.1186/s40168-017-0319-x.
- [16] Azad MB, Konya T, Persaud RR, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study[J]. *BJOG*, 2016, 123(6): 983-993. DOI:10.1111/1471-0528.13601.