

文章编号:1000-5404(2014)20-2133-05

论著

肠道菌群多样性在喂养不耐受新生儿中的作用

唐小丽,余加林,艾青,卢虹旭,李阳,王政力,杨静丽,贺雨,潘云 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿中心,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)

[摘要] 目的 探讨肠道菌群多样性变化在喂养不耐受新生儿中的作用及其与疾病转归的关系。方法 采用16S rDNA PCR联合变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术,分别对12例喂养不耐受新生儿(喂养不耐受组)发生喂养不耐受24 h内(t_0)及喂养不耐受恢复后(t_1)的粪便标本进行菌群多样性分析,并通过T-A克隆测序,了解其细菌种类分布及常见优势菌。同期采集12例孕周、出生体质量、日龄匹配的喂养耐受新生儿(对照组)粪便标本进行对比分析。结果 经DGGE分析,喂养不耐受新生儿粪便标本的条带丰富度较对照组显著下降(9.00 ± 2.83 vs 12.76 ± 2.38 , $P < 0.05$),香农威纳指数较对照组显著下降(2.12 ± 0.36 vs 2.51 ± 0.19 , $P < 0.05$);喂养不耐受恢复后(t_1)粪便标本条带丰富度、香农威纳指数与对照组比较,差异无统计学意义(14.00 ± 1.91 vs 14.75 ± 1.76 , 2.61 ± 0.14 vs 2.66 ± 0.13 , $P > 0.05$);克隆测序发现,喂养不耐受组粪便标本中克雷伯菌属比例较对照组增加(53.40% vs 40.94% , $P < 0.05$)。结论 喂养不耐受新生儿肠道菌群多样性降低,随着病情的恢复,肠道菌群多样性恢复;新生儿发生喂养不耐受可能与其肠道菌群中克雷伯菌属比例增加有一定相关性。

[关键词] 新生儿;喂养不耐受;肠道菌群;生物多样性

[中图分类号] R378;R722.19;R725.74

[文献标志码] A

Intestinal microflora community diversity in newborns with feeding intolerance

Tang Xiaoli, Yu Jialin, Ai Qing, Lu Hongxu, Li Yang, Wang Zhengli, Yang Jingli, He Yu, Pan Yun (Department of Neonatology, Key Laboratory of Child Development and Disorder of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the alterations of intestinal microflora community diversity in newborns with feeding intolerance (FI) and the relationship with disease outcome. **Methods** Using 16s rDNA PCR-DGGE, we assessed 12 FI newborns' bacterial diversity in stool specimens within 24 h of the symptom onset (t_0) and after the recovery of FI (t_1). T-A cloning kit and sequencing were used to investigate the distribution of bacteria and common dominant bacteria in stool specimens. At the same time, we collected the stool specimens of 12 feeding tolerance newborns with the same gestational age, birth weight and day-old as control. **Results** In contrast to the control group, both the bands (S) of intestinal bacterial and the Shannon-wiener indexes (H) were relatively lower in the FI group at t_0 (9.00 ± 2.83 vs 12.76 ± 2.38 , 2.12 ± 0.36 vs 2.51 ± 0.19 , $P < 0.05$). However, there was no statistical significant difference in S and H between the FI group at t_1 and the control group (14.00 ± 1.91 vs 14.75 ± 1.76 , 2.61 ± 0.14 vs 2.66 ± 0.13 , $P > 0.05$). Compared with the control group, the results of molecular cloning and sequencing showed that the proportion of *Klebsiella* was significantly higher in the FI group (53.40% vs 40.94% , $P < 0.05$). **Conclusion** There is a decrease in intestinal microflora community diversity in newborns with FI, which is recovered with the rehabilitation of this disease. Higher proportion of *Klebsiella* in intestinal microflora might be correlated with the onset of FI in newborns.

[基金项目] “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAI04B05);国家自然科学基金(81070513,81370744);教育部高等学校博士点基金(20135503110009)

[通信作者] 余加林, E-mail: yujialin486@sohu.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1328.006.html>(2014-08-21)

[Key words] newborn; feeding intolerance; gut microbiota; biodiversity

Supported by the Subproject of National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period in China(2012BAI04B05), the National Natural Science Foundation of China (81070513, 81370744), and the Doctorial Program of Colleges and Universities of Ministry of Education (20135503110009). Corresponding author: Yu Jialin, E-mail:yujialin486@sohu.com

喂养不耐受(feeding intolerance, FI)是新生儿胃肠道功能紊乱所致的不耐受肠内营养的一组临床症候群,是一种常见的新生儿疾病。FI发病率高,足月儿为7.9%,体质量>2 500 g早产儿为25%,体质量2 001~2 500 g早产儿为50%,极低出生体重儿则可高达70%以上^[1-2]。FI可导致患儿不能达到最佳营养标准、增加住院时间^[3]。同时研究显示,FI与其他新生儿疾病有着紧密的关系,其可能继续发展成为新生儿坏死性小肠结肠炎(neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)危及生命^[4-5];同时报道提示FI可导致患儿心理发育落后^[3]。然而,FI的病因目前尚不清楚。国内外研究表明^[6-8],微生态制剂可以降低喂养不耐受的发生率,缩短达到全胃肠道营养的时间,提示肠道菌群对新生儿喂养不耐受的发生发展可能起着不容忽视的作用。因此,本研究旨在分析喂养不耐受新生儿肠道菌群的多样性及动态变化,探讨其在喂养不耐受中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有粪便标本采集于2012年5月至2013年5月重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心住院患儿。纳入标准:(1)符合喂养不耐受诊断标准:Moore和Wilson定义如下^[9]:①胃潴留即胃残余量(gastric residual volume, GRV)≥前次喂养量50%(每3小时);②频繁呕吐(呕吐≥3次/d)或者腹胀或者两者皆有;③打乱肠内营养计划包括减少、延迟或停止肠内营养,满足其中一项即可;(2)生后24 h内入住我院新生儿诊治中心;排除标准:(1)伴有先天性消化道畸形、遗传代谢疾病、NEC等疾病的病例;(2)在收集标本过程中的死亡病例及放弃治疗者;(3)大便常规有隐血、白细胞(+),满足以上一项即排除。满足以上标准,选取喂养不耐受新生儿12例为喂养不耐受组(FI组),分别采集其发生喂养不耐受24 h内(t₀)及喂养不耐受恢复(t₁)的粪便标本;同期采集12例喂养耐受新生儿(对照组)粪便标本为进行对比分析,其在抗生素的选择、基础疾病类型、胎龄及出生体质量、日龄、喂养方式、住院时间均与FI组匹配。12例喂养不耐受病例中,生后5、10、15 d内发病的分别有4例、6例、2例,临床资料详见表1。

1.2 实验方法

1.2.1 标本收集与保存 采集新鲜粪便,用高压灭菌离心管收集并分装,-20℃保存。

1.2.2 粪便细菌DNA提取 粪便细菌DNA提取步骤参照QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN,德国)说明书。

1.2.3 粪便细菌DNA PCR扩增 引物序列采用细菌16S rDNA V3 高变区^[11]:上游357f(含“GC”夹):CgCCCggggCgCg-CCCCgggCggggCgggggCAGgggCCTACgggAggCAGCAG;下游518r:ATTACCGcCgCTgCTgg(上海生工生物工程有限公司)。反应体系(50 μL):上下游引物各1 μL(10 μmol/L),DNA模板5 μL, Premix Taq(宝生物工程大连有限公司)25 μL,灭菌去离子水定容至50 μL。PCR反应条件^[11]:94℃、5 min;94℃、30 s,61℃-56℃,-0.5℃/循环、30 s,72℃、1 min,10个循环;94℃、30 s,56℃、30 s,72℃、1 min,25个循环;72℃延伸7 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物扩增效果^[12]。

1.2.4 粪便细菌DNA进行变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) PCR产物运用DCode™通用突变检测系统(Bio-Rad,美国)进行DGGE分析,聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%,变性梯度凝胶浓度梯度范围为35%~65%,电泳条件“60℃,85 V,16 h”,电泳结束后,SYBR Green I染色30 min,并对目的条带进行切割,回收细菌DNA。

1.2.5 DNA回收与纯化 以上一步细菌DNA液作为模板进行PCR,引物为16S rDNA V3区通用引物(不含“GC”夹)^[12],上游357f:CCTACgggAggCAGCAG;下游518r(同1.2.3)。反应体系(50 μL):上下游引物各1 μL(10 μmol/L),DNA模板10 μL, Premix Taq 25 μL,灭菌去离子水定容至50 μL;反应条件:94℃、5 min;94℃、30 s,60℃、30 s,72℃、30 s,共30个循环;72℃延伸5 min。将所得PCR产物纯化回收,步骤详见TaKaRa MiniBEST Agarose Gel Extraction kit ver 4.0试剂盒说明书(TAKARA,宝生物工程大连有限公司)。

1.2.6 T-A克隆及测序结果比对 将上一步所得的细菌DNA液进行T-A克隆,步骤详见PMD 18T Vector说明书(TaKaRa PMD,宝生物工程大连有限公司),挑取单菌落,送上海生工生物工程公司测序,测序结果在NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)中比对分析。

1.2.7 分析中运用的程序 运用Quantity One软件分析DGGE图谱,其检测到的条带数,代表菌群细菌DNA的丰富度(S);Bio-dap软件计算得出香农威纳指数(H),H反映细菌种类数目和种类中各个体分配的均匀性。

表1 喂养不耐受组与对照组临床资料比较

组别	n	性别(男/女)	胎龄($\bar{x} \pm s, d$)	出生体质量($\bar{x} \pm s, g$)	开奶时间(h)	喂养方式(母乳/人工)	生产方式(顺产/剖宫产)
FI组	12	9/3	250.42 ± 12.95	2 271.67 ± 520.26	2~72	1/11	8/4
对照组	12	8/4	246.42 ± 9.75	2 511.67 ± 585.77	2~38	1/11	6/6
统计值		$\chi^2=0.202$	$t=0.927$	$t=-0.972$	$Z=-0.691$	$\chi^2=0.000$	$\chi^2=0.686$
P值		0.65	0.36	0.35	0.49	1	0.41

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计数资料使用 χ^2 检验,计量资料使用配对 *t* 检验、秩和检验。

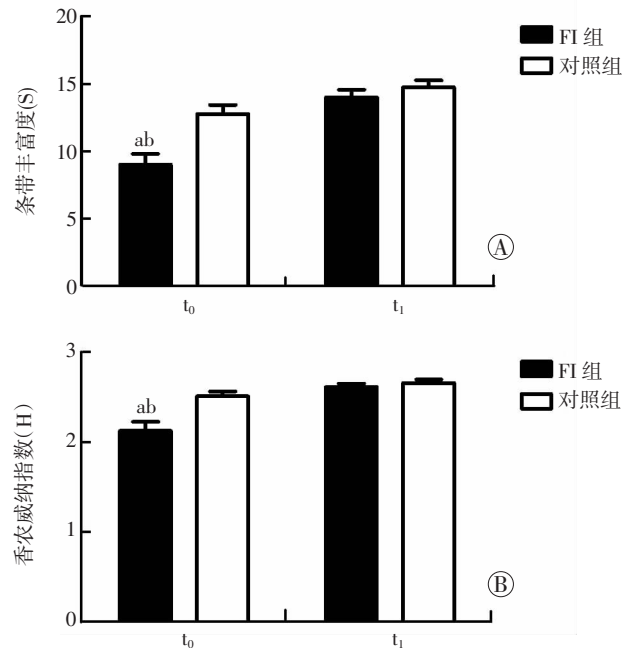
2 结果

2.1 粪便菌群多样性分析结果

喂养不耐受组 t_0 、 t_1 及对照组 t_0 、 t_1 共 48 份粪便标本,得到 16S rDNA PCR-DGGE 结果(图 1),通过 Quantity One 软件检测到 FI 组、对照组 t_0 的粪便标本条带丰富度(S)分别为 4~13 (9.00 ± 2.83)、10~17 (12.75 ± 2.38)(图 2A),差异具有统计学意义($P < 0.05$); t_1 时的粪便标本 S 为 11~17, S 分别为 (14.00 ± 1.91)、(14.75 ± 1.76),差异无统计学意义($P > 0.05$); t_0 时的粪便标本香农威纳指数(H)分别为 1.34~2.55 (2.12 ± 0.36)、2.29~2.82 (2.51 ± 0.19),差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2B); t_1 时粪便标本 H 分别为 2.38~2.82 (2.61 ± 0.14)、2.38~2.81 (2.66 ± 0.13),差异无统计学意义($P > 0.05$);随日龄增加(t_0 至 t_1)FI 组与对照组粪便标本 S、H 均呈增加趋势,FI 组 S、H 均有统计学差异($P < 0.05$),对照组 S、H 均无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 粪便菌群种属分布情况

对图 1 中标示的条带进行回收测序,测序结果详见表 2, 包含有传统培养法无法培养和可培养的 8 个菌属,其中克雷伯菌属、肠杆菌属、链球菌属、大肠杆菌属为构成比 $> 10\%$ 的优势菌(表 3),而克雷伯菌属占有绝对的优势,其在 FI 组、对照组 t_0 时粪便标本中所占比例分别为 53.40%、40.94%, t_1 时分别为 45.45%、40.11%;所有 4 组粪便标本菌群中各菌属构成比结果见图 3;与对照组相比较,FI 组 t_0 时粪便标本中克雷伯菌属比例明显增加,大肠杆菌属、链球菌属、肠杆菌属比例明显减少;本研究检测到厚壁菌门有乳酸杆菌属、链球菌属、肠球菌属 3 个菌属,在 FI 组、对照组 t_0 时粪便标本中厚壁菌门所占比例分别为 19.42%、21.48%, t_1 时分别为 23.17%、26.55%。



A: 条带丰富度(S)变化趋势;B: 香农威纳指数(H)变化趋势;
a: $P < 0.05$,与对照组 t_0 比较;b: $P < 0.05$,与 FI 组 t_1 比较

图 2 FI 组与对照组多样性指数变化趋势

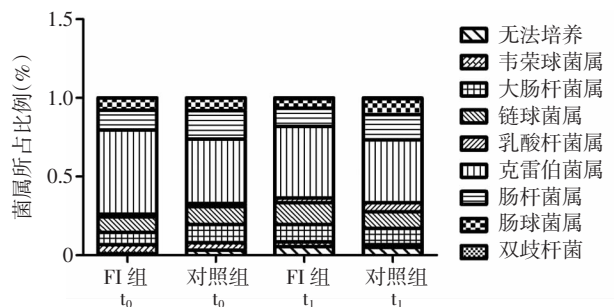
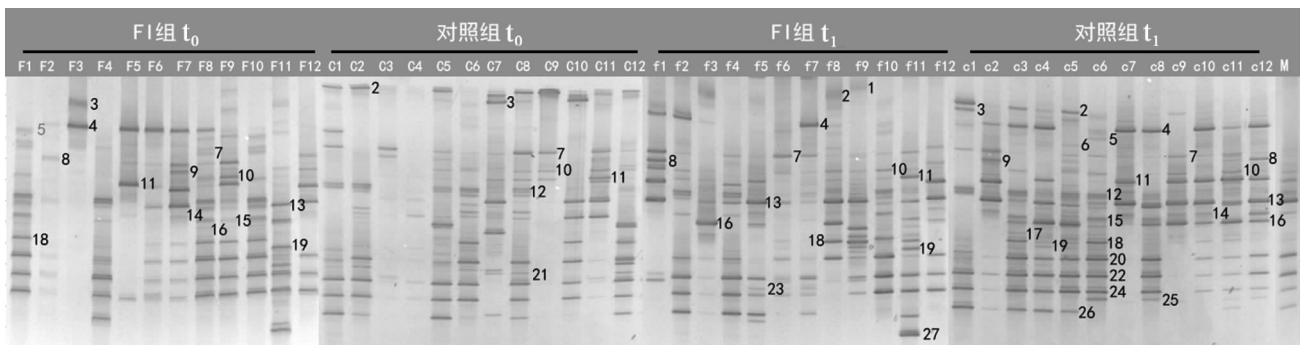


图 3 各组标本菌属构成比分布情况



F1~F12 为喂养不耐受组 12 例新生儿粪便标本 t_0 图谱;C1~C12 为对照组 12 例新生儿粪便标本 t_0 的图谱;f1~f12 为喂养不耐受组 12 例新生儿粪便标本 t_1 的图谱;c1~c12 为对照组 12 例新生儿粪便标本 t_1 的图谱;M: 标准;图片中标记数字对应条带测序结果详见表 2

图 1 16S rDNA PCR-DGGE 图谱

表2 DGGE 条带测序结果

条带编号	序列长度(bp)	细菌名称	序列号	相似度(%)	t ₀ (FI组/对照组)	t ₁ (FI组/对照组)
1	196	<i>Bifidobacterium breve</i> (短双歧杆菌)	KC160496.1	100	0/0	1/1
2	196	<i>Enterococcus faecium</i> (粪肠球菌)	KF732662.1	100	1/8	3/8
3	196	<i>Enterobacter hormaechei</i> (霍氏肠杆菌)	KF551982.1	100	3/8	4/9
4	197	<i>Enterococcus gallinarum</i> (鸪鸡肠球菌)	KF254553.1	100	7/4	7/10
5	196	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎克雷伯菌)	KF008552.1	100	4/0	3/2
6	196	<i>Lactobacillus helveticus</i> (瑞士乳杆菌)	AB889713.1	100	2/3	5/10
7	197	<i>Uncultured Streptococcus sp.</i> (无法培养的链球菌)	KC675685.1	100	4/9	12/10
8	197	<i>Uncultured bacterium</i> (无法培养的细菌)	JQ477950.1	100	1/3	2/3
9	196	<i>Enterobacter sp.</i> (肠杆菌)	KF447409.1	100	5/4	2/3
10	196	<i>Klebsiella sp.</i> (克雷伯菌)	KF447417.1	100	7/8	11/7
11	197	<i>Streptococcus sp.</i> (链球菌)	KC675685.1	100	6/8	11/9
12	196	<i>Klebsiella sp.</i> (克雷伯菌)	KF770752.1	100	5/9	10/11
13	195	<i>Escherichia sp.</i> (大肠埃希菌)	KF828880.1	100	7/8	11/11
14	196	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎克雷伯菌)	CP003999.1	100	2/4	9/6
15	197	<i>Veillonella sp.</i> (韦荣球菌)	JQ680196.1	100	6/7	5/3
16	196	<i>Enterobacter ludwigii</i> (路德维希肠杆菌)	KF254600.1	100	2/4	8/10
17	221	<i>Uncultured bacterium</i> (无法培养的细菌)	DQ633851.1	98	0/2	4/6
18	194	<i>Klebsiella sp.</i> (克雷伯菌)	JX520154.1	100	6/8	8/8
19	196	<i>Enterobacter cloacae</i> (阴沟肠杆菌)	CP006580.1	100	2/4	4/6
20	196	<i>Klebsiella sp.</i> (克雷伯菌)	JX520152.1	100	9/10	11/11
21	196	<i>Enterobacter hormaechei</i> (霍氏肠杆菌)	KF254597.1	100	1/7	1/0
22	196	<i>Klebsiella sp.</i> (克雷伯菌)	KF835726.1	100	10/11	12/10
23	176	<i>Uncultured bacterium</i> (无法培养的细菌)	DQ636229.1	100	0/0	3/0
24	196	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎克雷伯菌)	KF726078.1	100	11/11	10/10
25	196	<i>Klebsiella variicola</i> (变栖克雷伯氏菌)	KC853295.1	100	1/0	0/6
26	196	<i>Coliform bacterium</i> (大肠杆菌)	KF418620.1	100	1/9	7/7
27	196	<i>Uncultured Klebsiella sp.</i> (无法培养的克雷伯菌)	KF680978.1	100	1/0	1/0

表3 优势菌及无法培养的细菌构成比

细菌名称	t ₀				t ₁			
	FI组(%)	对照组(%)	χ ²	P	FI组(%)	对照组(%)	χ ²	P
克雷伯菌属	53.40	40.94	4.10	0.04	45.45	40.11	1.00	0.32
肠杆菌属	12.62	18.12	1.38	0.24	11.51	15.82	1.33	0.25
链球菌属	9.71	11.41	0.18	0.67	13.94	10.73	0.81	0.37
大肠杆菌属	7.77	11.41	0.90	0.34	10.91	10.17	0.05	0.82
无法培养的细菌	0.97	3.36	0.64	0.42	5.45	5.08	0.02	0.88

3 讨论

近年来,肠道菌群俨然已成为研究热点,其被认为是人类的“第二基因组”,有1 000~1 150个细菌种类^[13],结构复杂,影响因素多,尤其是新生儿时期,肠道菌群多样性处于一个动态变化的特殊时期,其定植和构成不仅受出生体质量、胎龄、生产方式、开奶时间、喂养方式等因素影响,还与生存环境、药物使用(常见包括抗生素)有关^[10, 14];若肠道菌群失衡,将可能导致疾病的发生,例如败血症、FI、NEC^[10, 15]。研究提示,预防使用微生态制剂可以降低喂养不耐受的发病率,缩短患儿住院时间^[6];使用微生态制剂治疗喂养不耐受,可缩短达到全胃肠喂养的时间,并可以降低NEC发生率^[7-8, 16],提示肠道菌群对新生儿喂养不耐受的发生发展和转归起着不容忽视的作用。然而,目前国内少见关于FI患儿肠道菌群多样性变化及其动态

变化过程的研究报道。本研究基于16S rDNA PCR-DGGE技术,通过PCR扩增肠道所有细菌16S rDNA片段,DGGE技术分离不同细菌的DNA序列,克隆测序确定细菌种类,克服了传统培养法对微生态认识不全面的不足^[17-18],研究FI新生儿肠道菌群多样性变化、细菌组成及动态变化。

DGGE结果显示,在FI组t₀时粪便标本的S、H较对照组t₀均显著降低,提示新生儿发生FI时,肠道菌群的多样性降低,肠道菌群失衡;FI组t₁时粪便标本条带丰富度、香农威纳指数较对照组t₁无差异,表示肠道菌群的多样性恢复;本研究还显示,随着日龄增长(t₀至t₁),FI组、对照组粪便标本多样性指数呈增长的趋势,包括美国国立卫生研究院(NIH)研究提示^[19],在生后3年内,肠道菌群多样性处于增加的状态,与本研究相符;并且结果显示,FI组多样性指数的涨幅更大,推测FI患儿肠道菌群有一个由发病时的失衡状态,至FI恢复后的平衡状态的过程。

测序结果显示,克雷伯菌属、肠杆菌属、大肠杆菌属、链球菌属为优势菌,其中肺炎克雷伯菌属占有绝对的优势,与Floch和Schwartz等研究^[20-21]结果吻合;比较各优势菌构成比的动态变化:与对照组相比,FI组t₀时粪便标本中克雷伯菌属所占比例明显增高,其他优势菌所占比例降低,随着FI恢复,所有优势菌比例

与对照组相当;同时对对照组 t_0 、 t_1 粪便标本中前述4种优势菌所占比例稳定,因此推测,克雷伯菌属增加,大肠杆菌属、肠杆菌属、链球菌属减少,可能是导致新生儿发生FI的危险因素。研究^[22-23]提示,在疾病状态时,肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)比值改变,因此F/B一定程度上可以反映肠道菌群的失衡,由于本实验未检测出拟杆菌门,仅厚壁菌门细菌所占比例,无法正确评估F/B;本研究中,随着日龄增加,厚壁菌门比例增加,可能与肠道细菌定植有关;常见的益生菌双歧杆菌、乳酸杆菌,由于在本实验中测出率不高,故无法比较;拟杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌检出率不高,可能与以下原因有关:一是由于剖宫产、早产、住院、患病、配方奶喂养等不利因素^[20],导致肠道菌群定植的延迟并影响肠道菌群组成;二是DGGE技术仅可以分辨出肠道菌群中数量大于1%的优势菌^[17],这三种细菌在实验个体中未达到这个数量级别。本研究结果中有相当比例无法培养的细菌,这在其他文献中也有报道,肠道中仍有高达25%的细菌,以目前的技术,尚未能被认识^[24]。

综上所述,新生儿肠道菌群多样性降低,克雷伯菌属比例增加,大肠杆菌属、肠杆菌属、链球菌属比例减少,与FI有着密切的联系。16S rDNA PCR-DGGE广泛用于菌群多样性研究,可对肠道菌群的变化进行定性及半定量研究;但是由于DGGE技术仅可以分辨出肠道菌群中数量大于1%的优势菌,不能对所有定植在肠道的细菌进行分离,且标本量较少,无法全面评估肠道定植菌、优势菌、致病菌之间的关系;后期可以在此实验基础上,结合q-PCR精确的监测菌种数量的差异,探讨细菌数量改变对疾病发生发展的可能作用。由于本研究中喂养不耐受患儿经过正规治疗后,症状体征消失,未进一步发展成为NEC,故FI与NEC肠道菌群的关系尚待研究。

参考文献:

[1] 陆彩霞, 韦露明, 刘义. 新生儿喂养不耐受的高危因素及对营养的影响[J]. 中国新生儿科杂志, 2006, 21(5): 293-294.
[2] 唐振, 周英, 李明霞. 早产儿喂养不耐受临床特征分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 627-630.
[3] 张志群, 朱建幸. 早产儿喂养不耐受治疗进展[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(6): 592-596.
[4] Ng E, Shah V S. Erythromycin for the prevention and treatment of feeding intolerance in preterm infants[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008(3): CD001815.
[5] Bertino E, Giuliani F, Prandi G, et al. Necrotizing enterocolitis: risk factor analysis and role of gastric residuals in very low birth weight infants[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009, 48(4): 437-442.
[6] Rojas M A, Lozano J M, Rojas M X, et al. Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants [J].

Pediatrics, 2012, 130(5): e1113-e1120.
[7] Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials[J]. Lancet, 2007, 369(9573): 1614-1620.
[8] Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, et al. The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns[J]. J Pediatr, 2008, 152(6): 801-806.
[9] Moore T A, Wilson M E. Feeding intolerance: a concept analysis[J]. Adv Neonatal Care, 2011, 11(3): 149-154.
[10] Ignacio L, AlFaleh K. Feeding intolerance in preterm infants fed with powdered or liquid formula: A randomized controlled, double-blind pilot study[J]. J Clin Neonatol, 2013, 2(1): 11-13.
[11] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(8): 4800-4806.
[12] 郑树芳, 徐艳珍, 艾青, 等. PCR-DGGE对新生儿坏死性小肠结肠炎肠道菌落结构及其动态性研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(29): 3026-3029.
[13] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
[14] 任亚方, 王琍琍. 新生儿肠道细菌定植研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37(1): 101-103.
[15] Fanaro S. Feeding intolerance in the preterm infant[J]. Early Hum Dev, 2013, 89(Suppl 2): S13-S20.
[16] Kliegman R M, Willoughby R E. Prevention of necrotizing enterocolitis with probiotics[J]. Pediatrics, 2005, 115(1): 171-172.
[17] 宋超, 余加林, 艾青, 等. 机械通气新生儿气管导管表面生物膜细菌多样性研究[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(8): 602-606.
[18] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728): 1635-1638.
[19] Yatsunenko T, Rey F E, Manary M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(7402): 222-227.
[20] Floch M H. Intestinal microecology in health and wellness[J]. J Clin Gastroenterol, 2011, 45(Suppl): S108-S110.
[21] Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants[J]. Pediatr Res, 2003, 54(3): 393-399.
[22] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031.
[23] Zhang H, DiBaise J K, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2365-2370.
[24] Collado M C, Cernada M, Bauerl C, et al. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages [J]. Gut Microbes, 2012, 3(4): 352-365.

(收稿:2014-03-31;修回:2014-06-09)

(编辑 黄超)