

乳双歧杆菌联合乳果糖对功能性便秘儿童的疗效及其对肠道菌群的影响分析

张爱华 代金明 顾秀明 严华杰 曾春云 董蔚

【摘要】目的 分析乳双歧杆菌联合乳果糖对功能性便秘儿童的疗效及其对肠道菌群的影响。**方法** 选取2019年10月至2022年1月就诊于上海市嘉定区南翔医院儿科门诊的61例功能性便秘(FC)患儿为研究对象,采用随机数字表法分为干预组(31例)和对照组(30例)。干预组给予乳双歧杆菌B6-12联合乳果糖治疗,对照组仅给予乳果糖治疗。对比分析治疗前后患者的便秘症状是否改善,同时通过16SrRNA测序结果分析两组治疗前后肠道菌群的变化。**结果** 两组患儿治疗前资料差异均无统计学意义($P>0.05$),但治疗后干预组的治疗有效率大于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);干预组治疗前后的菌群多样性的差异有统计学意义($P<0.05$);干预组和对照组治疗前后的菌群相对丰度的差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 乳双歧杆菌联合乳果糖治疗儿童FC的临床疗效优于常规单一乳果糖治疗,同时使用乳双歧杆菌联合乳果糖有利于儿童FC菌群多样性和相对丰度的恢复。

【关键词】 16SrRNA测序;儿童功能性便秘;乳双歧杆菌;乳果糖

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.03.011

功能性便秘(functional constipation, FC)的发生与肠道微生态失衡密切相关。研究^[1]发现,和健康儿童相比,FC患儿的肠道菌群多样性下降,菌群组成发生明显改变。正常肠道菌群通过代谢食物、产生气体、降低肠道pH值、调节肠道渗透压等方式影响肠道微生态,可促进肠道蠕动、影响肠道平滑肌收缩和增加肠内容物,从而降低FC的发生^[2]。国内外多项临床研究^[3-8]发现,益生菌可明显改善儿童FC的临床症状,比如双歧杆菌、罗伊氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌等。以往研究较多采用几种益生菌混合使用的方法,通过直接补充肠道有益菌,以达到恢复肠道微生态平衡,修复肠道菌膜屏障,提高肠道定植抗力,抑制条件致病菌的过度生长^[9]。

目前,研究微生物群落结构常用16SrRNA测序方法(16SrRNA位于原核细胞核糖体小亚基上,长度约为1540bp),通过比对细菌16SrRNA序列实现对细菌的物种鉴定^[10]。同时通过分析测序数据获得样品中的各菌群的相对丰度,进行分类、菌群差异等分析^[11]。本研究采用单一补充乳双歧杆菌的方法,探索其对FC患儿的干预效果;同时使用16SrRNA测序方法研究治疗前后的肠道菌群变化,旨在为临床治疗方案的改善提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究共纳入61例FC患儿,均在2019年10月至2022年1月就诊于上海市嘉定区南翔医院儿科门诊。研究采用随机数字表法将研究对象分为干预组(31例)和对照组(30例)。干预组中患儿年龄为6.5个月~6岁,平均 (2.82 ± 1.65) 岁,其中男性14例,女性17例,病程为2~30个月,平均 (10.58 ± 13.34) 月;对照组中患儿年龄6.5个月~5岁11个月,平均 (2.89 ± 1.62) 岁,其中男性13例,女性17例,病程2~31个月,平均 (11.13 ± 11.38) 月。两组患儿年龄、性别和病程差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经上海市嘉定区南翔医院医学伦理委员会批准(No.2019-12)。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:①符合罗马IV诊断标准^[12]的年龄0.5~6岁的FC患儿;②无已知慢性病和其他消化道疾病;③患儿家长同意,并签署知情同意书,并能配合完成治疗与记录。排除标准:①患儿近2周内或试验进行期间使用了抗生素;②患儿近2周内服用过微生态制剂;③胃肠道器质性疾病;④未遵守协议或其他原因退出。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法 干预组给予乳双歧杆菌B6-12

(科汉森公司,商品编号:100015917266,规格:每6滴含菌量10亿CFU)和乳果糖口服溶液(雅培公司,批准文号:H20171057,规格:667 mg/mL)联合治疗;对照组则给予乳果糖口服溶液治疗,两组患儿治疗时间均为4周。治疗方案如下,对照组:口服乳果糖口服溶液,用量及用法为,<1岁,每次5 mL;1~3岁,每次7.5 mL;3~6岁,每次10 mL,每日1次,加入20 mL温开水稀释,早餐前半小时空腹口服。干预组:在乳果糖口服溶液治疗同时口服乳双歧杆菌Bb-12,用量及用法为,<1岁每次6滴,≥1岁每次12滴,每日1次,早餐前口服(能配合的患儿,直接滴入口中喂服,不能配合的患儿,采用滴入小匙辅助喂服)。

1.3.2 随访指标 采用随访表记录治疗期间服药情况、排便频率、大便性状、排便困难、排便伴有腹痛(患儿是否出现哭闹抗拒呼痛等症状)和大小便失禁等情况。采用视觉模拟评分法评估患儿排便恐惧度及家长治疗满意度^[13]。

1.4 观察指标及疗效标准 采用自拟儿童便秘症状自评量表评价两组患儿治疗前、治疗4周后的临床症状,量化评分包括排便频率、大便性状、排便困难情况、排便腹痛(家长反馈排便过程中是否存在呼痛及异常哭闹情况)和大小便失禁5个条目,分数越低表示症状改善效果越显著。疗效评估标准,①有效:治疗后每周排便次数≥3次,大便性状改变达到Bristol大便分类法^[14]中粪便类型中第3~5型标准;②无效:经治疗后临床症状无明显改善,仍符合罗马IV诊断标准。

1.5 16SrRNA 分析菌群种类及结构

1.5.1 粪便采集 两组患儿治疗前及治疗4周后来院进行粪便采集,各取约2 g的粪便标本置于无菌冻存管中,暂存于4℃冰箱中,待当日所有样本取样完成后转移至-80℃冰箱保存。

1.5.2 样品DNA抽提 使用OMEGA Soil DNA Kit(M5635-02)分别提取两组患儿治疗前后的16SrRNA的基因片段,同时使用超微量分光光度计对DNA进行定量检测。

1.5.3 16S rRNA 扩增子测序 使用TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit对样本16SrRNA V3-V4区进行文库构建(引物338F:5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCA-3',806R:5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')。在Illumina NovaSeq机器上使用NovaSeq 6000 SP Reagent Kit进行2×250 bp的双端测序。

1.5.4 数据处理和分析 通过基因测序技术获取16SrRNA序列信息,再进行生物信息学分析,鉴定出样

本中肠道菌群的种类,进而分析患儿治疗前后肠道菌群的种类变化。基于DADA2^[15]的16S扩增子分析流程对测序数据进行处理。经过拼接和去冗余得到100%一致性的分类操作单元(operational taxonomic units,OTU)。将实验所得数据与Silva数据库(v138,https://www.arbsilva.de/)进行比对获得菌群分类信息。根据OTU聚类结果,得到序列的菌群信息和菌群的丰度分布;同时可进行Alpha多样性、Beta多样性和菌群分布等分析,而后根据两组菌群信息进行主坐标分析(PCoA分析)。PCoA分析方法可用来研究样本群落组成的相似性或相异性,使得数据投影的第一大方差在第一坐标,同时第二大方差在第二坐标上;一个坐标点代表一个菌群的相对丰度,曲线连接的两个点分别代表同一样本治疗前和后,曲线越长则说明差异越大^[16-17]。香依指数(Shannon)是基于样品的所有OUT丰度和均匀度以及其物种的注释信息计算的,是度量物种Alpha多样性的指标之一,Shannon指数越大说明样品中的菌群种类越丰富,多样性水平越高。

1.6 统计学方法 使用SPSS 22.0进行统计分析,正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本t检验或配对t检验;计数资料以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;组间样本菌群分布差异用PERMANOVA分析;相对丰度比较应用Wilcoxon符号秩和检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿治疗前后临床症状量化评分比较 两组患儿治疗前临床症状量化评分差异无统计学意义(P>0.05);治疗4周后临床症状量化评分变化幅度,干预组大于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表1。

表1 两组患儿治疗前后临床症状量化评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	例数	治疗前	治疗后	差值
干预组	31	22.39±4.11	7.03±7.04 ^①	15.35±7.36
对照组	30	22.40±3.76	16.47±7.21 ^①	5.93±5.67
t值		-0.013	-5.167	-5.586
P值		0.990	<0.001	<0.001

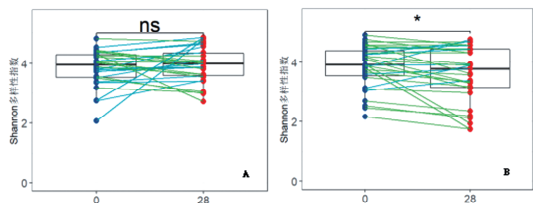
注:与治疗前比较,①P<0.05。

2.2 两组患儿治疗有效率比较 干预组有效率为83.9%(26/31),对照组为60.0%(18/30),差异有统计学意义($\chi^2=4.322,P=0.036$)。

2.3 16SrRNA 测序结果

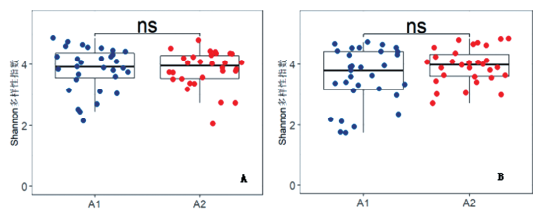
2.3.1 治疗前后Alpha多样性比较 干预组治疗前后的香依指数分别为(3.847±0.719)、(3.582±

0.934), 对照组分别为 (3.828 ± 0.599) 、 (3.948 ± 0.582) 。应用配对 t 检验对干预组的 31 个样本治疗前后的 Shannon 指数进行检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.339$, $P = 0.026$), 其中 23 组在乳双歧杆菌与乳果糖联用治疗后的菌群多样性均有降低; 同样对照组的 30 个便秘患者治疗前后样本分析, 差异均无统计学意义 ($t = -0.774$, $P = 0.445$)。见图 1。应用独立样本的 t 检验分别对干预组和对照组治疗前后的 Shannon 指数进行检验, 两组检验结果显示均无统计学意义 ($t_{\text{治疗前}} = 0.054$, $P_{\text{治疗前}} = 0.957$; $t_{\text{治疗后}} = -1.842$, $P_{\text{治疗后}} = 0.071$)。见图 2。



注: A 为对照组, B 为干预组; 横坐标中“0”和“28”分别代表第 0 天与第 28 天; ns 表示差异无统计学意义。

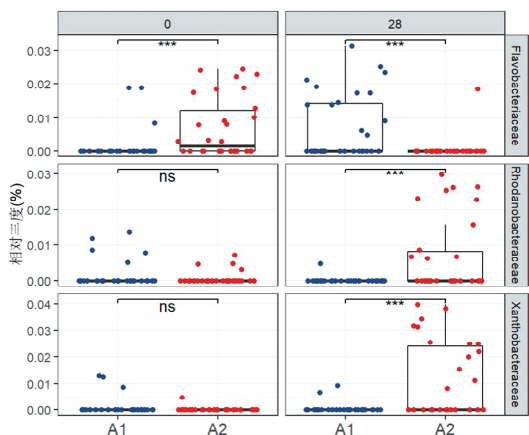
图 1 干预组与对照组患儿治疗前后 Shannon 指数比较



注: A 为治疗前, B 为治疗后; A1 为干预组, A2 为对照组; ns 表示差异无统计学意义。

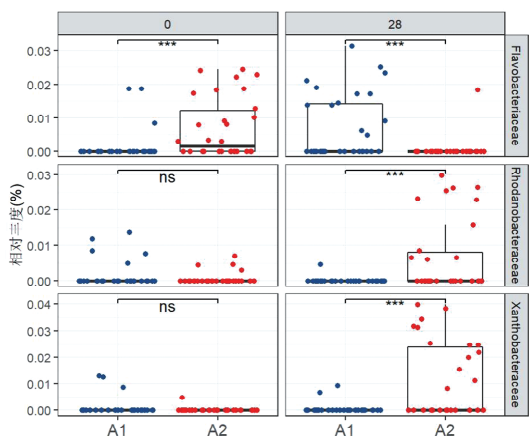
图 2 两组患儿治疗前后 Shannon 指数比较

不同菌种相对丰度方面, 应用 Wilcoxon 符号秩和检验分别对干预组和对照组治疗前后的黄杆菌科 (flavobacteriaceae)、纱丽杆菌科 (xanthobacteraceae) 和罗丹诺杆菌科 (rhodanobacteraceae) 的相对丰度进行检验, 结果显示对照组中 3 个菌种存在差异有统计学意义 ($V_F = 125$, $P_F = 0.003$; $V_R = 9$, $P_R = 0.007$; $V_X = 1$, $P_X = 0.001$), 干预组中黄杆菌科 (flavobacteriaceae) 治疗前后差异有统计学意义 ($V = 20$, $P = 0.024$), 见图 3。同时, 应用 Wilcoxon 符号秩和检验分别对治疗前后的干预组和对照组中 3 种菌群的相对丰度进行检验, 结果显示, 治疗前的黄杆菌科 (flavobacteriaceae) 在干预组和对照组间差异有统计学意义 ($W = 280$, $P < 0.001$), 治疗后 3 种菌群在干预组和对照组间差异有统计学意义 ($W_F = 644.5$, $P_F < 0.001$; $W_R = 304$, $P_R < 0.001$; $W_X = 1$, $P_X < 0.001$)。见图 4。



注: A1 为干预组, A2 为对照组; 横坐标中“0”和“28”分别代表第 0 天与第 28 天; ns 表示差异无统计学意义。

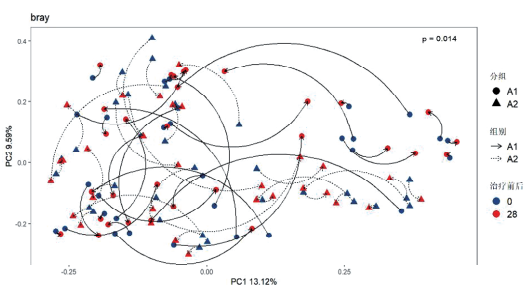
图 3 干预组与对照组患儿治疗前后菌群丰度比较



注: A1 为干预组, A2 为对照组; “0”和“28”分别代表第 0 天与第 28 天; ns 表示差异无统计学意义。

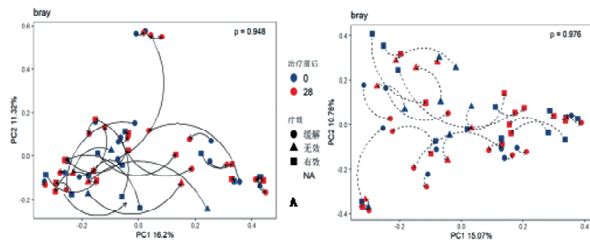
图 4 干预组与对照组患儿治疗前后菌群丰度比较

2.3.2 治疗前后 Beta 多样性比较 PCoA 分析方法中曲线的长短和聚集程度显示部分人群肠道菌群稳定性较高, 一部分人群在治疗前后差异很小, 而另一部分人群则在治疗前后发生菌群结果的重大变化; 应用 PERMANOVA^[16] 对干预组和对照组治疗前后的菌群相对丰度差异进行分析, 发现差异有统计学意义 ($F = 1.874$, $P = 0.014$), 且干预组 (A1) 在 PC1 轴上曲线变化幅度较大, 见图 5。应用 PERMANOVA 检验方法对干预组治疗前后的菌群相对丰度差异进行分析, 显示差异无统计学意义 ($F = 0.569$, $P = 0.948$), 见图 6A。运用同样方法对对照组在治疗前后的菌群相对丰度进行分析, 同样差异无统计学意义 ($F = 0.531$, $P = 0.976$)。见图 6B。



注:A1 为干预组,A2 为对照组。

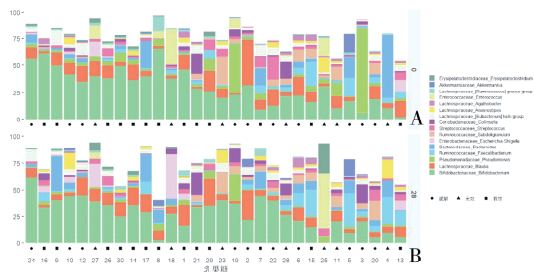
图5 干预组与对照组患儿治疗前后 Beta 多样性比较



注:A 为干预组,B 为对照组。

图6 干预组与对照组患儿治疗前后 Beta 多样性比较

2.3.3 菌群结构组成分析 为分析各样本的菌群组成,选取平均相对丰度大于1%的菌属作为代表菌属,分别构建每个患儿治疗前后的菌群结构,不同颜色代表不同菌属,面积大小代表在该样本中该菌属所占比例。由治疗前后的菌群结构分布可知,多数患者的菌群结构存在较大的改变。见图7。



注:A 为干预组,B 为对照组。

图7 干预组与对照组患儿治疗前后菌群结构比较

3 讨论

儿童 FC 的发生、发展与肠道菌群失调密切相关。乳双歧杆菌能够有效调节人体肠道菌群平衡,酸化肠道,提高肠道渗透性和刺激肠道蠕动^[19]。本研究使用乳双歧杆菌联合乳果糖口服溶液的治疗方案可同时发挥益生菌和益生元的双重作用,既发挥了益生菌的生理活性,又可以选择性地刺激肠道内有益菌生长,改善 FC 患儿肠道菌群结构,从而使便秘症状得以改善。通过对比乳双歧杆菌 B6-12 联合乳果糖口服溶液和乳果糖口服溶液两组治疗后的临床疗效,结果显示乳双歧杆菌联合乳果糖口服溶液干预组患儿的临床症状的

改善程度优于对照组,临床总有效率显著提高(83.9%比60%)。

本研究通过将统计学数据与高通量实验数据联合分析的方式,对两组患儿治疗前后肠道菌群的多样性变化和肠道菌群结构进行分析。儿童 FC 可能会造成肠道菌群失调^[20],Alpha 多样性分析的结果显示,治疗前两组的菌群多样性没有差异,说明两组的可比性较好,组间的平衡性较好;治疗前后干预组的菌群多样性有所下降,差异具有统计学意义,说明在缓解症状的同时能改善肠道菌群结构,干预组多样性的降低可能是由于肠道菌群处于动态恢复期。通过分析各菌种的相对丰度发现:治疗后,两组的菌种相对丰度存在显著性差异。干预组治疗前后的黄杆菌科丰度有差异,对照组治疗前后的黄杆菌科、纱丽杆菌科以及罗丹诺杆菌的丰度均有显著性差异,其中黄杆菌科与纱丽杆菌科为条件致病菌,关于罗丹诺杆菌科的研究不多,说明通过乳双歧杆菌补充有益菌后,条件致病菌的生长受到抑制,肠道菌群的恢复更加有利^[21]。Beta 多样性分析的结果显示,干预组和对照组治疗前后的菌群结构的差异具有统计学意义。菌群结构分析结果显示,多数样本在治疗前后菌群的变化很大,与 Beta 多样性分析的结果一致。乳双歧杆菌与乳果糖联用有利于促进肠道菌群恢复,进而可以改善患儿便秘情况。

16SrRNA 常用于微生物检测和分类鉴定,同时具有保守性和变异性,仅存在于细菌染色体基因组中,不存在于病毒、真菌等非原核细胞生物体中;16SrRNA 基因序列分析技术具有高灵敏度和特异性的特点^[22]。本研究应用 16SrRNA 基因序列分析技术对肠道菌群进行聚类分析,将临床疗效与基因数据分析结果联合分析,进一步了解肠道菌群对疾病发生发展的影响。

综合已有研究结果和本研究数据表明乳双歧杆菌和乳果糖口服溶液联用有望为儿童 FC 的治疗提供更多选择。由于本次研究样本量偏小,治疗观察周期仅 4 周,未能对该方案长期使用效果进行评估。长期治疗效果及其肠道菌群的改变有待于进一步探索。

参考文献

- [1] DE MEIJ T G, DE GROOT E F, ECK A, et al. Characterization of microbiota in children with chronic functional constipation[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164731.
- [2] TIAN Y, ZUO L, GUO Q, et al. Potential role of fecal microbiota in patients with constipation[J]. JOL. Therap Adv Gastroenterol(2020 - 10 - 31) [2022 - 05 - 14]. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756284820968423>.

- [3] BANASZKIEWICZ A, SZAJEWSKA H. Ineffectiveness of *Lactobacillus* GG as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial[J]. *J Pediatr*, 2005, 146(3): 364-369.
- [4] BU L N, CHANG M H, NI Y H, et al. *Lactobacillus casei* rhamnosus Lcr35 in children with chronic constipation[J]. *Pediatr Int*, 2007, 49(4): 485-490.
- [5] KHODADAD A, SABBAGHIAN M. Role of synbiotics in the treatment of childhood constipation: a double-blind randomized placebo controlled trial[J]. *Iran J Pediatr*, 2010, 20(4): 387-392.
- [6] TABBERS M M, CHMIELEWSKA A, ROSEBOOM M G, et al. Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173010 in childhood constipation: a randomized, double-blind, controlled trial[J]. *Pediatrics*, 2011, 127(6): e1392-1399.
- [7] SANEIAN H, TAVAKKOL K, ADHAMIAN P, et al. Comparison of *Lactobacillus Sporogenes* plus mineral oil and mineral oil alone in the treatment of childhood functional constipation[J]. *Res Med Sci*, 2013, 18(2): 85-88.
- [8] SADEGHZADEH M, RABIEEFAR A, KHOSHNEVISASL P, et al. The effect of probiotics on childhood constipation: a randomized controlled double blind clinical trial[J/OL]. *Int J Pediatr* (2014-04-09) [2022-05-16]. <https://www.hindawi.com/journals/ijpedi/2014/937212/>. DOI: 10.1155/2014/937212.
- [9] SANCHEZ B, DELGADO S, BLANCO-MIGUEZ A, et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease[J/OL]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1): 1600240. (2016-10-10) [2022-05-17]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201600240>.
- [10] 马超, 贺毅, 孙作厘, 等. 基于 16SrRNA 技术分析石珍安神汤对脱髓鞘小鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(1): 64-70.
- [11] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [12] MARC A B, SAMUEL N, CHRISTOPHE F, et al. 儿童功能性胃肠病罗马IV标准[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(1): 4-14.
- [13] WEGH CARRIE A M, HERMES GERBEN D A, SCHOTERMAN MARGRIET H C, et al. The Modified Bristol Stool Form Scale: a reliable and valid tool to score stool consistency in dutch (non) toilet-trained toddlers[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2021, 73(2): 210-216.
- [14] LANE M M, CZYZEWSKI D I, CHUMPITAZI B P, et al. Reliability and validity of a modified bristol stool form scale for children[J]. *J Pediatr*, 2011, 159(3): 437-441.
- [15] CALLAHAN B J, MC MURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(7): 581-583.
- [16] YANG Z, GUO R, XU X, et al. Enhanced methane production via repeated batch bioaugmentation pattern of enriched microbial consortia[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 216: 471-477.
- [17] CHECINSKA A, PROBST A J, VAISHAMPAYAN P, et al. Microbiomes of the dust particles collected from the international space station and spacecraft assembly facilities[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 50.
- [18] KELLY B J, GROSS R, BITTINGER K, et al. Power and sample-size estimation for microbiome studies using pairwise distances and PERMANOVA[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(15): 2461-2468.
- [19] BA Z Y, LEE Y J, MENG H C, et al. Effects on the delivery efficacy of *bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on fecal microbiota, gut transit time, and short-chain fatty acids in healthy young adults[J]. *mSphere*, 2021, 6(4): e0008421.
- [20] 王放, 薛今俊. 儿童功能性便秘不同严重程度肠道菌群特点及胃肠激素水平变化[J]. *中国现代医生*, 2022, 60(11): 73-75, 94.
- [21] 郭增, 刘春强, 黄业保, 等. 功能性便秘与肠道菌群的关系及相关治疗的研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2021, 37(10): 210-212.
- [22] 徐爱蕾, 黄毅, 王为. 16SrRNA 基因序列分析技术在肠道菌群检测中的应用进展[J]. *临床消化病杂志*, 2015, 27(3): 186-189.

(2022-09-01 收稿)

(本文编校: 张迪, 崔月婷)