

## 早/中孕期孕妇肠道菌群差异及其与妊娠期糖尿病的关系： 前瞻性队列研究

王佩，马良坤，刘俊涛

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院妇产科，北京 100730

通信作者：刘俊涛 电话：010-69156230, E-mail: liujt@pumch.cn

**【摘要】目的** 探讨早/中孕期妇女的肠道菌群物种及功能特点，并分析其与妊娠期糖尿病（gestational diabetes mellitus, GDM）的关系。**方法** 前瞻性收集并分析2017年5月至12月北京协和医院产科招募的早孕期孕妇的临床资料。依据孕24~28周75g口服葡萄糖耐量试验（oral glucose tolerance test, OGTT）结果分为GDM组（研究组）和非GDM组（对照组）。分别于早孕期和中孕期收集两组孕妇粪便标本，对肠道菌群的16S rRNA V4可变区进行DNA测序及生物信息学分析。采用多因素Logistic回归分析探讨肠道菌群Alpha多样性及菌群相对丰度与GDM的关系。**结果** 共145例符合纳入和排除标准的孕妇入选本研究。其中研究组34例、对照组111例。Alpha多样性分析显示，研究组早孕期Shannon指数和Simpson指数低于对照组（ $P$ 均<0.05）。LEfSe分析显示，早孕期和中孕期，多个物种的相对丰度在两组间差异具有统计学意义（ $P$ 均<0.05）。多因素Logistic回归分析显示，早孕期Shannon指数≤6.51（ $OR=3.15$ , 95% CI: 1.32~7.52）、Simpson指数≤0.96（ $OR=2.54$ , 95% CI: 1.09~5.89）、拟普雷沃菌属（*Alloprevotella*）相对丰度≤0.004（ $OR=2.65$ , 95% CI: 1.09~6.44）、毛螺菌属（*Lachnospira*）相对丰度≤0.0107（ $OR=3.17$ , 95% CI: 1.33~7.55）是发生GDM的危险因素。肠道菌群功能预测比较显示，早孕期时两组差异较少；中孕期时与能量代谢、糖代谢、氨基酸代谢和脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）合成相关的通路在研究组显著富集。**结论** 与健康孕妇相比，中孕期GDM患者肠道菌群的功能特点为LPS合成、能量代谢、糖代谢和氨基酸代谢相关通路显著富集；早孕期肠道菌群物种多样性降低及某些菌属的丰度降低是发生GDM的危险因素。

**【关键词】**妊娠期糖尿病；肠道菌群；丰度；多样性

**【中图分类号】**R714.256   **【文献标志码】**A   **【文章编号】**1674-9081(2021)05-0721-08

**DOI:** 10.12290/xhyxzz.20200122

## Difference in Gut Microbiota between the First and the Second Trimester of Pregnancy and the Association of Gut Microbiota with Gestational Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study

WANG Pei, MA Liangkun, LIU Juntao

Department of Obstetrics and Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: LIU Juntao Tel: 86-10-69156230, E-mail: liujt@pumch.cn

**【Abstract】Objective** To characterize the characteristics of gut microbiota and its function in the first (T1) to second trimester (T2) of pregnancy and to evaluate its association with gestational mellitus diabetes

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程（2016J2M-1-008）

引用本文：王佩，马良坤，刘俊涛. 早/中孕期孕妇肠道菌群差异及其与妊娠期糖尿病的关系：前瞻性队列研究 [J]. 协和医学杂志, 2021, 12 (5): 721-728. doi: 10.12290/xhyxzz.20200122.

(GDM). **Methods** A prospective cohort study was conducted in Peking Union Medical College Hospital from May to December 2017. The pregnancies were divided into GDM group and non-GDM group (control group) according to the results of 75 g oral glucose tolerance test at 24 to 48 weeks of gestation. Stool samples of all participants were collected in the first and the second trimester. The V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced and analyzed. Multivariate Logistic regression analysis was used to investigate the relationship between Alpha diversity, relative abundance of intestinal flora and GDM. **Results** A total of 145 pregnancies, of whom 34 diagnosed with GDM (GDM group) and 111 healthy (control group) were analyzed. The Alpha diversity of the GDM group (Shannon index and Simpson index) was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). LEfSe analysis revealed that the relative abundance of several genera was different between the 2 groups in T1 or T2. Multivariate Logistic analysis showed that Shannon index  $\leq 6.51$  ( $OR = 3.15$ , 95% CI: 1.32–7.52), Simpson index  $\leq 0.96$  ( $OR = 2.54$ , 95% CI: 1.09–5.89), the lower relative abundance of *Alloprevotella* ( $OR = 2.65$ , 95% CI: 1.09–6.44) and *Lachnospira* ( $OR = 3.17$ , 95% CI: 1.33–7.55) in the first trimester were risk factors for GDM. The pathways of LPS biosynthesis, energy metabolism, glucose metabolism and amino acid metabolism of gut microbiome revealed through the Tax4Fun analysis were significantly enriched in the GDM group in T2. **Conclusions** Compared with healthy controls, the functional characteristics of intestinal microflora in GDM patients during the second trimester were significantly enriched in functional pathways related to LPS synthesis, energy metabolism, glucose metabolism and amino acid metabolism. The decreases of the diversity as well as the relative abundance of some genus in the early pregnancy are the risk factors for GDM.

**【Key words】** gestational diabetes mellitus; gut microbiota; abundance; diversity

**Funding:** CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-008)

Med J PUMCH, 2021, 12(5):721–728

全球妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 发病率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>，我国 GDM 发病率高达 14.8%<sup>[2]</sup>。GDM 可影响母婴结局<sup>[1,3]</sup>，显著增加母婴远期患代谢性疾病的风险<sup>[4-5]</sup>。GDM 的发病与妊娠期胰岛素抵抗加重及胰岛  $\beta$  细胞功能障碍相关，但具体分子机制尚不明确<sup>[6]</sup>。近期研究发现，肠道菌群失调在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)<sup>[7]</sup>、肥胖<sup>[8]</sup>以及免疫性疾病<sup>[9]</sup>的发生发展中起重要作用，且可能参与 GDM 发病。目前关于孕妇肠道菌群和 GDM 相关性的报道较少，且研究对象多处于中/晚孕期<sup>[10-13]</sup>，缺乏早孕期研究证据。本研究探讨早/中孕期女性肠道菌群物种及功能特点，并分析其与 GDM 的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象及分组

#### 1.1.1 研究对象

本研究为前瞻性队列研究。研究对象为 2017 年 5 月至 12 月北京协和医院产科招募的妊娠期女性。

纳入标准：(1) 孕 13<sup>+6</sup>周前建档产检；(2) 单胎妊娠；(3) 年龄 20~45 岁；(4) 规律产检并可按

要求进行随访。

排除标准：(1) 孕前或早孕期明确诊断患有任何类型的糖尿病，包括 1 型糖尿病、T2DM 和其他特殊类型糖尿病；(2) 患有胃肠道疾病、高血压、自身免疫性疾病等；(3) 孕前接受大型胃肠道手术者；(4) 近 3 个月内服用抗生素者。

#### 1.1.2 分组

根据《妊娠合并糖尿病诊治指南（2014）》<sup>[14]</sup>，将妊娠 24~28 周经 75 g 口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 确诊为 GDM 的孕妇纳入研究组，无 GDM 的孕妇设为对照组。

本研究已在 clinicaltrials.gov 注册（注册号：NCT04420507），并通过北京协和医院伦理审查委员会审批（审批号：JS-1535）。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 一般临床资料收集

在研究对象入组时进行问卷调查，内容包括：年龄、孕前体质质量指数 (body mass index, BMI)、本次妊娠情况 (孕/产次、预产期、辅助生殖方式)、既往病史等。

#### 1.2.2 粪便样本采集

分别于早孕期 (9~13<sup>+6</sup>周) (T<sub>1</sub>) 和中孕期 (24~

27<sup>±6</sup>周) (T<sub>2</sub>) 使用可常温保存的粪便采样标本管 (PSP® Spin Stool DNA Kit, 德国 Stratec 公司) 留取粪便标本 (嘱孕妇使用适配的无菌采样器取新鲜粪便约 1 g 浸泡于标本管内保存液中), 避光室温保存并于产检随访时上交, 所有标本于留取 1 周内进行粪便 DNA 提取<sup>[15]</sup>。

### 1.2.3 样本 DNA 提取、扩增、纯化和测序

采用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法对样本的基因组 DNA 进行提取, 并将提取的 DNA 用无菌水稀释至 1 mg/L。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用带 Barcode 的特异引物 515F-806R 对 16S rDNA 的 V4 测序区域进行特异性扩增。PCR 体系: Phusion Master Mix (2 ×) 15 μL, Primer (2 μmol/L) 3 μL, gDNA (1 mg/L) 10 μL, 无菌双蒸水补齐至 30 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。根据 PCR 产物浓度与载样缓冲液进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测。使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (美国 Illumina 公司) 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经 Qubit 定量和文库检测, 合格后使用 HiSeq 2500 平台 (美国 Illumina 公司) 上机进行高通量测序。

### 1.2.4 生物信息学分析

默认以 97% 的一致性将序列聚类为操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)。根据 OTUs 聚类结果进行物种注释并统计基于丰度的物种分布情况, 然后对各样品的数据进行均一化处理并分析, 包括: (1) Alpha 多样性: 采用 Qiime 1.9.1 软件进行分析, 以 Chao1 指数评估菌群丰度, Shannon 指数和 Simpson 指数反映菌群多样性; (2) Beta 多样性: 采用 R 2.15.3 软件的 Adonis 进行分析, 以反映组间群落结构的相似性; (3) 差异物种鉴别: 采用线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 1.40.0 软件寻找组间相对丰度有统计学差异的物种 (设置 LDA score 的筛选值为 3); (4) Tax4Fun 功能预测<sup>[16]</sup>与差异比较: 提取京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库原核生物全基因组 16S rRNA 基因序列并利用 BLASTN 算法将其比对至 SILVA SSU Ref NR 数据库建立相关矩阵, 将通过 UProC (ultra-fast protein domain classification) 注释的 KEGG 数据库原核生物全基因组功能信息对应至

SILVA 数据库中, 实现 SILVA 数据库功能注释。所有标本的测序数据以 SILVA 数据库序列为参考序列聚类出 OTUs, 进而获取基因功能注释信息, 采用 reporter score 的差异富集法分析各组包含的 KEGG 通路的丰度差异, 其绝对值大于 1.6 (相当于正态分布 90% CI), 说明差异显著。

### 1.3 样本量估算

根据研究目的, 选择孕期女性粪便中的 OTUs 为计算样本量的指标。据文献报道<sup>[17]</sup>, 孕期 OTUs 平均值为 160±5.7, 依据专家建议, 以均数改变 25% 为假设检验可检验的最小差异, 根据公式

$$\tilde{N} = 2 \sigma^2 \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta/2})^2}{\delta^2} \quad (\text{注: } \sigma \text{ 为总体标准差估}$$

计值, δ 为期望的效应差值, 检验水准 α=0.05, 把握度 1-β=0.8, Z 为给定累积概率下标准正态分布的界值) 计算出研究组最小样本量为 30 例。假设失访率 5%, 根据既往统计 GDM 患病率为 25%, 计算所需入组研究对象共为 127 例。

### 1.4 质量控制

本研究由经标准化培训的 3 名研究员进行研究对象的招募入组、标本收集指导和随访工作, 并留存研究完整记录。采用常温粪便采样标本管留取标本以避免标本提取前变质失效, 由研究员把控取样流程, 严格遵循采样和检验的时效性要求。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用独立样本 t 检验; 非正态分布计量资料以中位数 (四分位数) 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以频数 (百分数) 表示, 组间比较采用 χ<sup>2</sup> 检验。采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析菌群各指标的最佳临界值。采用多因素 Logistic 回归分析肠道菌群 Alpha 多样性及菌群相对丰度与 GDM 的关系。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般临床资料

共 145 例符合纳入和排除标准的孕妇入选本研究。其中研究组 34 例、对照组 111 例。研究组孕妇年龄及 75 g OGTT 0 h、1 h、2 h 血糖值均明显高于对照组 (P 均<0.05), 孕前 BMI、GDM 诊断孕周以及经产妇比率等与对照组差异无统计学意义 (P 均>0.05) (表 1)。

## 2.2 肠道菌群物种差异及与妊娠期糖尿病的关系

### 2.2.1 两组早/中孕期肠道菌群 Alpha 多样性和 Beta 多样性比较

Alpha 多样性分析显示, 研究组早孕期肠道菌群的 Shannon 指数和 Simpson 指数低于对照组 ( $P$  均 $<0.05$ ), Chao1 指数无显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 2), 中孕期时各指数与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 两组患者早孕期与中孕期组内比较, 各指数差异亦无统计学意义 ( $P>0.05$ )。采用 ROC 曲线分析确定早孕期 Alpha 多样性各指数的最佳临界值 (Chao1 指数为 1544.13、Shannon 指数为 6.51、Simpson 指数为 0.96)。多因素 Logistic 回归分析在调整年龄、孕前 BMI 后显示, 早孕期 Shannon 指数 $\leq 6.51$ 、Simpson 指数 $\leq 0.96$  是中孕期发生 GDM 的危险因素 (表 2)。

Beta 多样性分析结果显示, 研究组早孕期和中孕期肠道菌群组成结构与对照组比较均无明显差异 ( $P_{T1}=0.148$ ,  $P_{T2}=0.498$ ); 组内早/中孕期的比较中, 对照组显示出明显差异 ( $P=0.01$ ), 而研究组无显著差异 ( $P=0.608$ )。

### 2.2.2 两组早/中孕期肠道菌群物种差异分析

早孕期时, 研究组有 15 个类群的相对丰度明显低

于对照组, 在属水平上拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*) 和毛菌属 (*Leptotrichia*) 的相对丰度明显低于对照组 ( $P<0.05$ )。中孕期时, 研究组有 13 个类群的相对丰度与对照组存在显著差异 ( $P<0.05$ )。研究组拟杆菌目 (*Bacteroidales*) 及其亲本分类群拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和拟杆菌纲 (*Bacteroidia*), 以及巨单胞菌属 (*Megamonas*) 及其亲本分类群 *c\_- Negativicutes* 和 *o\_- Selenomonadales* 相对丰度均高于对照组 ( $P$  均 $<0.05$ ), 梭菌目 (*Clostridiales*) 及其亲本分类群厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和梭菌纲 (*Clostridia*) 的相对丰度均低于对照组 ( $P$  均 $<0.05$ ) (图 1)。

### 2.2.3 早孕期肠道菌群主要物种相对丰度与 GDM 的关系

由于 LEFSe 分析显示, 研究组在早孕期肠道菌群多个类群的相对丰度明显低于对照组, 为探索与中孕期发生 GDM 相关的早孕期肠道菌群特征菌属, 采用 ROC 曲线下面积法计算早孕期肠道菌群主要物种 (在属水平上相对丰度排名前 35 的物种) 相对丰度的最优临界值。以中孕期是否合并 GDM 为因变量, 早孕期肠道菌群主要物种为自变量进行 Logistic 回归分析, 校正年龄、孕前 BMI 后, 早孕期拟普雷沃菌属相对丰度 $\leq 0.004$ 、毛螺菌属相对

表 1 两组孕妇的临床特征比较

指标	研究组 (n=34)	对照组 (n=111)	P 值
年龄 ( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	35.5±4.3	32.3±3.9	<0.001
经产妇 [n (%) ]	13 (38.2)	24 (21.6)	0.052
孕前 BMI ( $\bar{x}\pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	22.8±3.8	21.9±2.6	0.187
75 g OGTT ( $\bar{x}\pm s$ , mmol/L)			
0 h 血糖	4.9±0.4	4.5±0.2	<0.001
1 h 血糖	9.2±1.6	7.3±1.3	<0.001
2 h 血糖	8.3±1.3	6.4±0.9	<0.001
GDM 诊断孕周 [ $M (P_{25}, P_{75})$ , 周]	24.9 (24.3, 25.6)	24.7 (24.1, 25.4)	0.153
早孕期留取标本孕周 [ $M (P_{25}, P_{75})$ , 周]	12.6 (12.0, 13.6)	12.7 (12.1, 13.4)	0.632
中孕期留取标本孕周 [ $M (P_{25}, P_{75})$ , 周]	25.5 (24.6, 26.4)	25.5 (24.4, 26.7)	0.647

BMI: 体质量指数; OGTT: 口服葡萄糖耐量试验; GDM: 妊娠期糖尿病

表 2 两组早孕期肠道菌群 Alpha 多样性比较及多因素 Logistic 回归分析

Alpha 多样性指数	研究组 (n=34)	对照组 (n=111)	P 值	多因素 Logistic 回归分析 *		
				取值范围	OR (95% CI)	P 值
Chao1 指数 [ $M (P_{25}, P_{75})$ ]	918.9 (749.4, 1450.7)	1082.3 (857.1, 2037.1)	0.119	$\leq 1544.1$	1	
				$> 1544.1$	0.49 (0.19~1.27)	0.144
Shannon 指数 ( $\bar{x}\pm s$ )	6.19±0.93	6.60±0.84	0.019	$\leq 6.51$	3.15 (1.32~7.52)	0.009
				$> 6.51$	1	
Simpson 指数 [ $M (P_{25}, P_{75})$ ]	0.96 (0.94, 0.97)	0.97 (0.95, 0.98)	0.004	$\leq 0.96$	2.54 (1.09~5.89)	0.030
				$> 0.96$	1	

\* 多因素 Logistic 回归分析调整因素包括年龄和孕前体质量指数

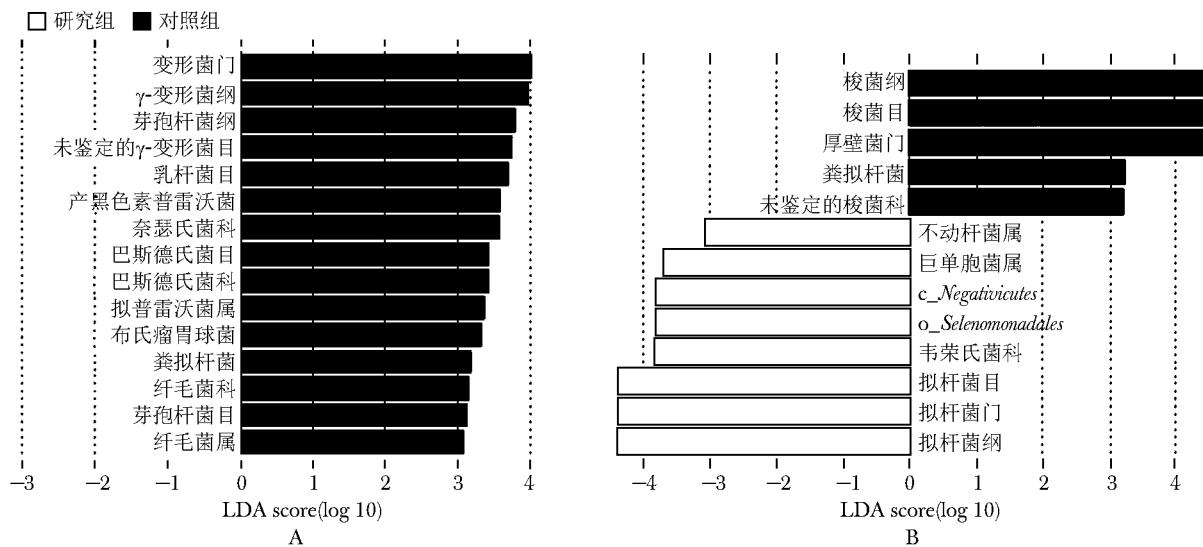


图 1 两组肠道菌群物种差异的 LEfSe 分析

A. 早孕期; B. 中孕期

丰度 (*Lachnospira*)  $\leq 0.0107$  是中孕期发生 GDM 的危险因素 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 早孕期肠道菌群主要物种与 GDM 关系的多因素

Logistic 回归分析结果

菌属	取值范围	多因素 Logistic 回归分析 *		
		OR (95% CI)	P 值	R <sup>2</sup>
拟普雷沃菌属	$\leq 0.004$	2.65 (1.09~6.44)	0.032	0.144
	$> 0.004$	1		
毛螺菌属	$\leq 0.0107$	3.17 (1.33~7.55)	0.009	0.153
	$> 0.0107$	1		
罗氏菌属	$\leq 0.0148$	1		
	$> 0.0148$	2.06 (0.83~5.13)	0.121	0.106
巨单胞菌属	$\leq 0.00133$	1		
	$> 0.00133$	2.75 (0.94~8.04)	0.064	0.089

GDM: 同表 1; \* 同表 2

## 2.2.4 两组早/中期肠道菌群功能差异分析

两组早孕期肠道菌群功能通路相对丰度较少存在差异，仅脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 合成和磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 等通路在 GDM 组富集，而鞭毛装配和细菌趋化性通路在对照组富集。中孕期时，与能量代谢 (氧化磷酸化)、糖代谢 (三羧酸循环、PTS、半乳糖代谢、戊糖-葡萄糖醛酸转换)、细菌生物膜合成 (LPS 合成、甘油磷脂代谢)、氨基酸代谢和维生素及辅因子代谢 (叶酸合成、烟酸及烟碱代谢、核黄素代谢、抗坏血酸代谢) 相关的通路在研究组显著富集 (图 2)。

## 3 讨论

本研究对早/中期妇女的肠道微生物群落组成和功能进行分析，发现 GDM 患者孕早期时的肠道菌群物种多样性 Shannon 指数和 Simpson 指数明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )，且早孕期 Shannon 指数  $\leq 6.51$  ( $OR = 3.15$ , 95% CI: 1.32~7.52)、Simpson 指数  $\leq 0.96$  ( $OR = 2.54$ , 95% CI: 1.09~5.89)、拟普雷沃菌属相对丰度  $\leq 0.004$  ( $OR = 2.65$ , 95% CI: 1.09~6.44)、毛螺菌属相对丰度  $\leq 0.0107$  ( $OR = 3.17$ , 95% CI: 1.33~7.55) 是中孕期发生 GDM 的危险因素。菌群功能预测及比较分析发现，GDM 患者在中孕期时与糖代谢、能量代谢等相关的通路呈富集状态。

肠道丰富的菌群及其结构多样性有助于宿主维持物质和能量代谢等功能的稳定及有效抵御致病性微生物的入侵<sup>[18]</sup>，肠道微生物多样性降低与肥胖、胰岛素抵抗和血脂异常相关<sup>[19]</sup>。Alpha 多样性反映样本内群落的丰富度和多样性，其中 Shannon 指数和 Simpson 指数反映群落的物种多样性，Chao1 指数反映群落的丰富度。本研究中 GDM 组早孕期肠道菌群的 Shannon 指数和 Simpson 指数均显著低于对照组，且多因素 Logistic 分析显示早孕期 Shannon 指数与 Simpson 指数降低是 GDM 发生的危险因素，提示早孕期肠道菌群物种多样性的降低可能与中孕期发生 GDM 存在一定关系，与 Ma 等<sup>[20]</sup>针对早孕期肠道菌群特征与 GDM 关系的前瞻性研究结果一致。本研究中两组

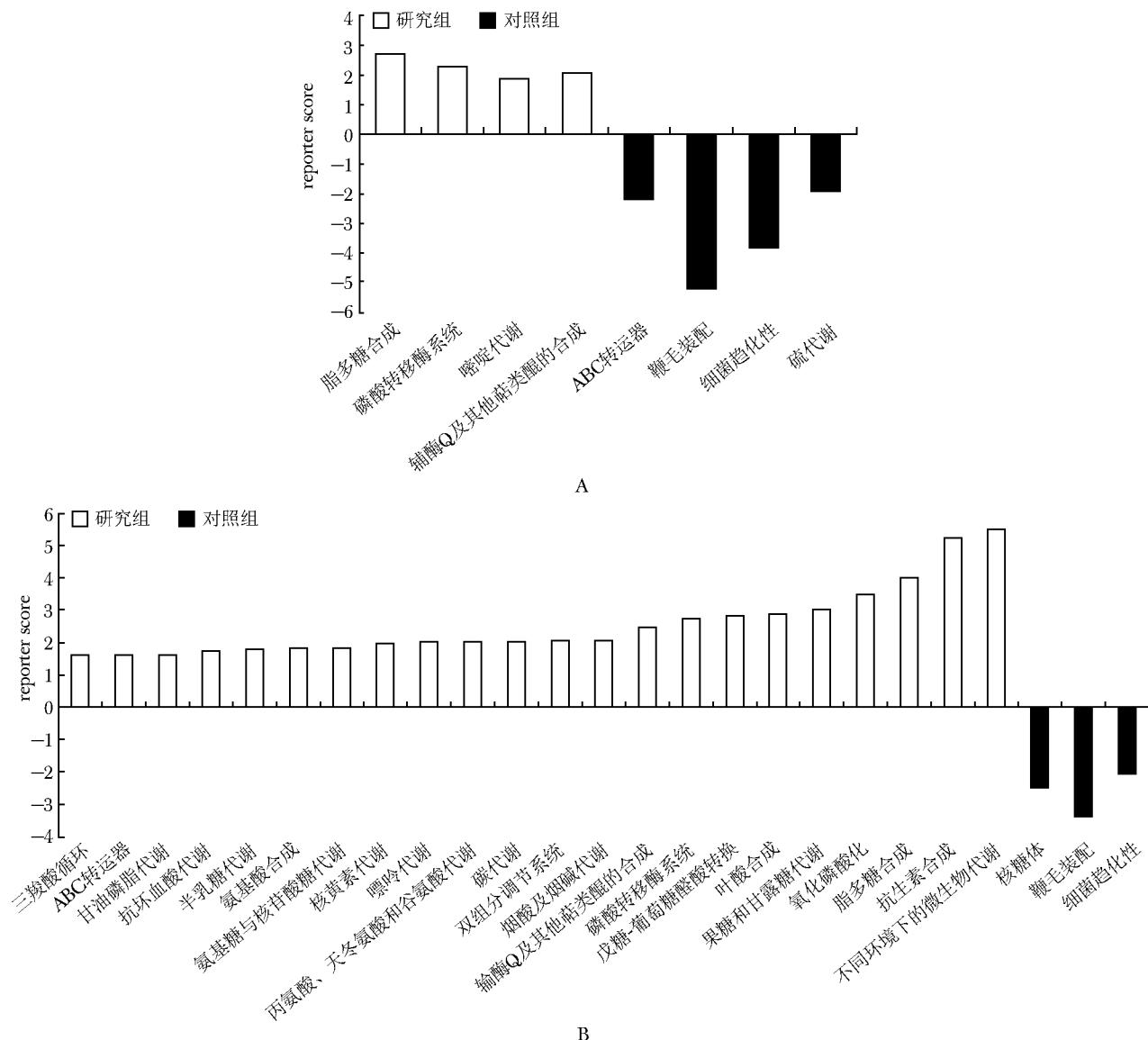


图 2 两组肠道菌群功能通路相对丰度富集分析

A. 早孕期；B. 中孕期

组内和组间的比较中, Chao1 指数均未显示出差异, 提示孕妇肠道菌群的群落丰度可能较为稳定。

Beta 多样性反映组间群落组成结构的差异。本研究仅在对照组的早/中孕期比较中 Beta 多样性存在显著差异, 提示随着孕期改变, 健康孕妇的肠道菌群群落结构会发生变化。Koren 等<sup>[17]</sup>比较了 91 名孕妇早孕期和晚孕期的肠道菌群变化, 发现其 Beta 多样性存在显著差异, 且与是否患 GDM 无关。肠道菌群 Beta 多样性是否随孕期进展或 GDM 疾病状态变化而发生改变目前尚不明确, 可能与肠道菌群易受饮食结构、人种、地域影响有关<sup>[21]</sup>。

孕期肠道微生物的群落组成保持相对稳定状态,

均以拟杆菌门和厚壁菌门为主, 辅以放线菌门和变形菌门<sup>[13,17]</sup>。本研究 LEfSe 分析显示, 中孕期时 GDM 组拟杆菌门相对丰度高于健康孕妇, 而厚壁菌门相对丰度低于健康孕妇, 此种拟杆菌占比增高而梭菌占比减少的分布特点与 T2DM 患者肠道菌群的分布相似<sup>[19]</sup>。多项研究报道拟杆菌门/厚壁菌门的比值与血糖、胰岛素抵抗<sup>[22]</sup>呈正相关。GDM 孕妇即使在分娩后, 其肠道菌群的厚壁菌门相对丰度仍低于健康对照孕妇, 这可能是 GDM 孕妇患 T2DM 风险增加的原因之一<sup>[23]</sup>。GDM 组中孕期时巨单胞菌属及其亲本分类群的相对丰度明显高于对照组, 与 Kuang 等<sup>[13]</sup>针对中孕期 GDM 患者肠道菌群进行的宏基因组分析结果

一致。针对冠心病患者的研究发现，巨单胞菌属相对丰度与胆固醇水平呈正相关<sup>[24]</sup>，提示巨单胞菌属可能与宿主的糖脂代谢异常存在一定相关性。

本研究多因素 Logistic 回归分析提示，早孕期拟普雷沃菌属和毛螺菌属的相对丰度降低可能是中孕期发生 GDM 的危险因素。既往有动物实验发现，高糖或高脂饮食均可使小鼠肠道中的拟普雷沃菌属丰度降低，而给予益生菌干预后其丰度可回升<sup>[25]</sup>。拟普雷沃菌属在心血管疾病高风险的人群肠道中相对丰度明显降低，表明拟普雷沃菌属丰度降低可能与糖脂代谢紊乱有关，进而引起 GDM<sup>[26]</sup>。毛螺菌属能分泌短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs)<sup>[27]</sup>，在糖尿病动物实验中被发现毛螺菌属的相对丰度与血糖呈负相关<sup>[28]</sup>。食物中不能被直接消化的碳水化合物在肠道会经特殊菌群发酵，生成包括乙酸、丙酸、丁酸在内的多种 SCFAs，SCFAs 减少可能与胰岛素抵抗加重有关<sup>[29]</sup>。此外，SCFAs 参与维持肠道黏膜屏障的完整性，其分泌减少会增加肠壁渗透性，减弱肠黏膜屏障功能，使肠道内的条件致病菌、LPS 等渗透进入血液循环，引发全身慢性炎症反应，加重胰岛素抵抗<sup>[30-31]</sup>。本研究对肠道菌群功能的分析亦发现，与对照组相比，GDM 患者早孕期时 LPS 合成相关通路明显富集。分泌 SCFAs 菌的减少以及 LPS 的增加可能共同加剧了孕妇糖代谢的异常。孕中期时 GDM 已经发生，表现为与能量、糖和氨基酸代谢等相关的多种菌群功能的富集，可能是在高糖环境下，肠道菌群作出的代偿性反应，即为适应宿主的高糖代谢状态，肠道菌群适应性地加强了自身对糖和能量代谢等的处理能力，此种菌群功能的特征性改变可作为 GDM 的干预靶点。

目前研究认为，肠道菌群紊乱导致的产丁酸菌的减少、LPS 增多，是发生胰岛素抵抗和代谢综合征的原因之一<sup>[7,32]</sup>。因此，进行菌群干预可能对 GDM 的早期预防有一定效果。利用益生菌、益生元对 GDM 进行干预的临床研究已有报道。Callaway 等<sup>[33]</sup>应用益生菌来对超重/肥胖女性进行干预，结果并未发现早孕期补充益生菌能够预防 GDM 的发生。一项纳入 11 项临床研究的 Meta 分析显示，补充益生菌似乎能改善 GDM 孕妇的血糖、血脂、炎症及氧化应激状态<sup>[34]</sup>。但目前通过肠道菌群干预来预防/缓解 GDM 的研究较少，尚无确切结论。

本研究尚有不足之处：(1) 由于缺乏孕妇孕期饮食结构和能量摄入的相关数据，饮食结构的个体化差异可能影响 GDM 的发生。(2) 本研究样本量较

小，而肠道菌群的个体差异较大，结果可能存在偏倚。后续的研究可借助多种组学方法优化研究设计，根据饮食结构等影响因素作分层分析，在本研究的基础上进一步明确肠道菌群与 GDM 间的因果关系，强调肠道菌群的物种及其功能在 GDM 发展中的意义，以期发现可应用于临床的 GDM 预防与治疗靶点。

综上，与健康孕妇相比，中孕期 GDM 患者肠道菌群的功能特点为 LPS 合成、能量代谢、糖代谢和氨基酸代谢相关通路显著富集。早孕期肠道菌群物种多样性降低及某些菌属的丰度降低是发生 GDM 的危险因素。

**作者贡献：**王佩负责研究设计、实施、数据采集、统计分析、撰写论文；马良坤指导研究设计；刘俊涛参与研究设计和实施、论文修改、经费支持。

**利益冲突：**无

## 参 考 文 献

- [1] Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational Diabetes Mellitus [J]. Obstet Gynecol, 2018, 131: e49-e64.
- [2] Gao C, Sun X, Lu L, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. J Diabetes Investig, 2019, 10: 154-162.
- [3] Johns EC, Denison FC, Norman JE, et al. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29: 743-754.
- [4] Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review [J]. Diabetes Care, 2002, 25: 1862-1868.
- [5] Boney CM, Verma A, Tucker R, et al. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus [J]. Pediatrics, 2005, 115: e290-e296.
- [6] Plows JF, Stanley JL, Baker PN, et al. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 3342.
- [7] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490: 55-60.
- [8] Cani PD, Osto M, Geurts L, et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity [J]. Gut Microbes, 2012, 3: 279-288.
- [9] 焦禹豪, 张奉春. 肠道菌群与人体免疫系统相关性研究方兴未艾 [J]. 协和医学杂志, 2019, 10: 193-196.

- Jiao YH, Zhang FC. New Insights into Research on the Role of Gut Microbiota in Human Immune System [J]. *Xiehe Yixue Zazhi*, 2019, 10: 193-196.
- [10] Crusell MKW, Hansen TH, Nielsen T, et al. Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum [J]. *Microbiome*, 2018, 6: 89.
- [11] Ferrocino I, Ponzo V, Gambino R, et al. Changes in the gut microbiota composition during pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (GDM) [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 12216.
- [12] 刘誉, 马京梅, 秦胜堂, 等. 妊娠期糖尿病患者治疗前后肠道菌群变化及其与血糖的相关性 [J]. 中华围产医学杂志, 2020, 23: 98-104.
- Liu Y, Ma JM, Qin ST, et al. Different characteristics of gut microbiota before and after management of women with gestational diabetes mellitus and the association with blood glucose level [J]. *Zhonghua Weichan Yixue Zazhi*, 2020, 23: 98-104.
- [13] Kuang YS, Lu JH, Li SH, et al. Connections between the human gut microbiome and gestational diabetes mellitus [J]. *GigaScience*, 2017, 6: 1-12.
- [14] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014) [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49: 561-569. Obstetrics group of Obstetrics and Gynecology branch of Chinese Medical Association, Chinese Medical Association perinatal medicine branch, gestational diabetes cooperation group. Guidelines for the diagnosis and treatment of gestational diabetes mellitus (2014) [J]. *Zhonghua Fuchan Zazhi*, 2014, 49: 56-569.
- [15] Chen CC, Wu WK, Chang CM, et al. Comparison of DNA stabilizers and storage conditions on preserving fecal microbiota profiles [J]. *J Formos Med Assoc*, 2020, 119: 1791-1798.
- [16] Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, et al. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31: 2882-2884.
- [17] Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy [J]. *Cell*, 2012, 150: 470-480.
- [18] Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome [J]. *Genome Med*, 2016, 8: 51.
- [19] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. *Nature*, 2013, 500: 541-546.
- [20] Ma S, You Y, Huang L, et al. Alterations in Gut Microbiota of Gestational Diabetes Patients During the First Trimester of Pregnancy [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 58.
- [21] DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 11060-11065.
- [22] Taddei CR, Cortez RV, Mattar R, et al. Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80: e12993.
- [23] Fugmann M, Breier M, Rottenkolber M, et al. The stool microbiota of insulin resistant women with recent gestational diabetes, a high risk group for type 2 diabetes [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13212.
- [24] Liu Z, Li J, Liu H, et al. The intestinal microbiota associated with cardiac valve calcification differs from that of coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 121-128.
- [25] Kong C, Gao R, Yan X, et al. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet [J]. *Nutrition*, 2019, 60: 175-184.
- [26] Kelly TN, Bazzano LA, Ajami NJ, et al. Gut Microbiome Associates With Lifetime Cardiovascular Disease Risk Profile Among Bogalusa Heart Study Participants [J]. *Circ Res*, 2016, 119: 956-964.
- [27] Bryant MP, Small N. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle [J]. *J Bacteriol*, 1956, 72: 22-26.
- [28] Zhang Q, Xiao X, Li M, et al. Vildagliptin increases butyrate-producing bacteria in the gut of diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0184735.
- [29] Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. Butyrate: implications for intestinal function [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15: 474-479.
- [30] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56: 1761-1772.
- [31] Ploeger S, Stumpff F, Penner GB, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1258: 52-59.
- [32] Zheng W, Xu Q, Huang W, et al. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated with Reduced Dynamics of Gut Microbiota during the First Half of Pregnancy [J]. *mSystems*, 2020, 5: e00109-e00120.
- [33] Callaway LK, McIntyre HD, Barrett HL, et al. Probiotics for the Prevention of Gestational Diabetes Mellitus in Overweight and Obese Women: Findings From the SPRING Double-Blind Randomized Controlled Trial [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42: 364-371.
- [34] Zhang J, Ma S, Wu S, et al. Effects of Probiotic Supplement in Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 5364730.

(收稿: 2020-05-06 录用: 2020-06-11 在线: 2021-06-08)

(本文编辑: 董 哲)