

妊娠期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群的关联

张李一, 周钰涵, 张蕴晖

复旦大学公共卫生学院/公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032

摘要:

[背景] 已有动物实验表明细颗粒物(PM_{2.5})暴露会改变新生小鼠肠道菌群的构成, 但尚无报道妊娠期PM_{2.5}暴露对新生儿胎粪菌群影响的人群流行病学证据。

[目的] 探索妊娠期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群之间的关联, 并分析其可能涉及的功能通路。

[方法] 本研究基于上海亲子队列, 从中随机选取600名具有完整随访信息的孕妇, 通过卫星数据和监测站数据模拟妊娠期PM_{2.5}的个体暴露水平, 根据PM_{2.5}质量浓度(后称浓度)中位值将孕妇分为PM_{2.5}高暴露组和低暴露组。在胎儿娩出后留取胎粪, 通过Illumina Miseq测序平台进行16S rDNA测序并对测序成功的522个样本序列进行分析。使用多重线性回归, 构建PM_{2.5}单污染物模型以及联合其他空气污染物的双污染物模型评估PM_{2.5}对胎粪菌群α多样性(反映菌群组成, 评价指标: Chao1指数、observed species指数、Shannon指数和Simpson指数)的影响, 基于非加权UniFrac距离的主坐标分析和置换多元方差分析比较两组β多样性(反映菌群的相似程度), 使用线性判别分析效应大小(LefSe)分析两组间差异菌群, 并通过京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库(分为L1、L2和L3三个层次)预测涉及的功能通路。

[结果] 低暴露组PM_{2.5}浓度中位数(P₂₅~P₇₅)为38.3 μg·m⁻³(36.4~40.3 μg·m⁻³), 高暴露组浓度为45.4 μg·m⁻³(44.5~46.4 μg·m⁻³)。妊娠期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群α多样性具有负向关联。在单污染物模型中, PM_{2.5}浓度每升高1 μg·m⁻³, 胎粪菌群的Chao1指数、observed species指数、Shannon指数和Simpson指数分别降低5.28(95%CI: -7.73~-2.83)、4.00(95%CI: -5.75~-2.23)、3.06(95%CI: -4.66~-1.45)和4.54(95%CI: -6.65~-2.43)。两组间胎粪菌群β多样性也呈现显著差异(P=0.02)。变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门均为两组的优势菌。LefSe结果显示, 与低暴露组相比, PM_{2.5}高暴露组13个类群相对丰度升高, 而21个类群相对丰度降低。功能分析结果显示, 这些差异菌属功能涉及脂质代谢、能量代谢、氨基酸代谢、跨膜转运等。在KEGG L3水平上, PM_{2.5}高暴露组转运子、核糖体、ABC转运蛋白、糖酵解/糖异生、甘油酯代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢及D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢等通路上调; 而低暴露组分泌系统、细菌运动蛋白、双组分系统、能量代谢、脂多糖的生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、谷胱甘肽代谢、WNT信号通路和核黄素代谢等通路上调。

[结论] 孕期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群的多样性差异及菌群组成相关。妊娠期暴露于高浓度的PM_{2.5}与胎粪菌群的α多样性降低相关, 高、低暴露组间菌群的β多样性和优势菌群的组成亦呈现出差异。

关键词: 肠道菌群; 空气污染; 细颗粒物; 新生儿; 妊娠结局

Association between PM_{2.5} exposure during pregnancy and meconium microbiome of newborns ZHANG Liyi, ZHOU Yuhuan, ZHANG Yunhui (School of Public Health/Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Previous animal experiments have shown that fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure can change the composition of gut microbiota in newborn mice, but there is no epidemiological evidence on the effects of PM_{2.5} exposure during pregnancy on neonatal meconium microbiome.

[Objective] This study is designed to evaluate the association between PM_{2.5} exposure during pregnancy and neonatal meconium microbiome, and to explore the underlying functional

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21114

组稿专家

周志俊(复旦大学公共卫生学院), E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn
陶芳标(安徽医科大学), E-mail: fbtiao@ahmu.edu.cn

基金项目

国家自然科学基金项目(81872581)

作者简介

张李一(1996—), 男, 硕士生;
E-mail: 20211020042@fudan.edu.cn

通信作者

张蕴晖, E-mail: yhzhang@shmu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-03-23

录用日期 2021-07-27

文章编号 2095-9982(2021)09-0936-08

中图分类号 R122

文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21114

►引用

张李一, 周钰涵, 张蕴晖. 妊娠期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群的关联[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(9): 936-943.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21114

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Yunhui, E-mail: yhzhang@shmu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-03-23

Accepted 2021-07-27

Supplemental material

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21114

►To cite

ZHANG Liyi, ZHOU Yuhuan, ZHANG Yunhui. Association between PM_{2.5} exposure during pregnancy and meconium microbiome of newborns[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(9): 936-943.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21114

pathways involved.

[Methods] Based on Shanghai Maternal-Child Pairs Cohort, 600 pregnant women with complete follow-up data were randomly recruited. Maternal exposure levels of PM_{2.5} were estimated through gestational exposure prediction model combining satellite-driven ambient concentrations and monitoring station data. According to the median PM_{2.5} concentration, the pregnant women were divided into a PM_{2.5} high-exposure group and a low-exposure group. After delivery, newborns' meconium was collected and 16S rDNA gene sequencing was performed on the Illumina MiSeq sequencing platform. The sequences of 522 samples that were successfully sequenced were analyzed. Based on multiple linear regression, single pollutant models and two-pollutant models were used to evaluate the effect of PM_{2.5} on meconium microbiome alpha diversity (reflecting the composition of the flora, evaluation indicators: Chao1 index, observed species index, Shannon index, and Simpson index). Principal co-ordinates analysis and permutational multivariate analysis of variance, based on unweighted UniFrac distance, were used to compare beta diversity (reflecting the similarity of the flora). LDA Effect Size (LEfSe) was also used to analyze the different bacterial taxa between the two groups. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (divided into three levels: L1, L2, and L3) was used to predict the functional pathways involved.

[Results] The median (P_{25} - P_{75}) PM_{2.5} concentration in the low-exposure group was 38.3 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (36.4-40.3 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$), and the concentration in the high-exposure group was 45.4 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (44.5-46.4 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$). Gestational PM_{2.5} exposure was inversely associated with the alpha diversity of newborns' meconium microbiome. In the single pollutant model, every 1 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ increment in PM_{2.5} exposure was associated with 5.28 (95% CI: -7.73--2.83), 4.00 (95% CI: -5.75--2.23), 3.06 (95% CI: -4.66--1.45), and 4.54 (95% CI: -6.65--2.43) decrease in Chao1 index, observed species index, Shannon index, and Simpson index of meconium microbiome, respectively. Also, a significant difference in beta diversity between the two groups was observed ($P=0.02$). Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes were the dominant taxa in the meconium of the two groups. As shown in the LEfSe analysis, compared with the low-exposure group, the relative abundances of 13 bacterial taxa in the PM_{2.5} high-exposure group were increased, while the relative abundances of 21 taxa was decreased. The functional analysis results showed that these bacterial taxa were involved in glycolipid metabolism, energy metabolism, amino acid metabolism, transmembrane transport, etc. The results of KEGG enrichment analysis of the L3 group suggested that transporters, ribosome, ABC transporters, glycolysis/gluconeogenesis, glycerolipid metabolism, cysteine and methionine metabolism, pyruvate metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and *D*-glutamine and *D*-glutamate metabolism were up-regulated in the PM_{2.5} high-exposure group; while secretion system, bacterial motility proteins, two-component system, energy metabolism, lipopolysaccharide biosynthesis, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, glutathione metabolism, WNT signaling pathway, and riboflavin metabolism were up-regulated in the low-exposure group.

[Conclusion] Gestational PM_{2.5} exposure is associated with the diversity and composition of neonatal meconium microbiome. High PM_{2.5} exposure during pregnancy is associated with decreased alpha diversity of meconium microbiome. There is also significant differences in beta diversity and composition of the dominant microbiome between the high-exposure and the low-exposure groups..

Keywords: gut microbiota; air pollution; fine particulate matter; newborn; pregnancy outcome

肠道菌群是寄生于人体肠道内的所有微生物群落的总称,与人体健康状况密切相关。人体胃肠道含有约100万亿个微生物^[1],近1000种不同的细菌种类^[2]。Guzzardi等^[3]表明肠道微生物在胎儿宫内发育时期已开始定植。健康的肠道菌群有利于维持肠道的正常功能,如清除外源性毒素,代谢胆盐,生物合成维生素,提供能量,防止病原体过度生长等^[4]。而肠道菌群失调则会引发一系列的功能紊乱,进而影响机体的健康状态。肠道菌群失调已被认为是介导环境污染物引起疾病发展的重要因素^[5]。

多项流行病学研究与动物实验表明大气污染与多种不良健康结局密切相关,如呼吸系统疾病^[6-8]、心血管疾病^[9-10]、胃肠道疾病^[11]、代谢性疾病^[12-13]等。近年来有大量的研究发现PM_{2.5}可导致不良妊娠结局,如早产^[14-15]和低出生体重^[16]等。然而大气细颗粒物(fine particulate matter, PM_{2.5})导致不良妊娠结局的机制尚不明确,目前主要认为由氧化应激和炎症反应

等所介导^[17]。而有动物实验表明暴露于PM_{2.5}会引起小鼠肠道菌群的改变^[18],推测孕期PM_{2.5}暴露所致的不良妊娠结局可能与新生儿肠道菌群的改变有关。

本研究基于出生队列人群,通过对新生儿胎粪菌群进行16S rDNA测序,研究孕期暴露于PM_{2.5}对新生儿胎粪菌群多样性的影响,探索肠道菌群在介导生命早期PM_{2.5}暴露对儿童健康影响的潜在作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究基于上海亲子队列,该前瞻性出生队列主要探究妊娠期环境暴露、心理压力和生活方式对母婴健康的影响。从队列中随机选取600名2016年纳入队列的具有完整孕期随访信息且单胎妊娠的孕妇,并留取新生儿胎粪样本进行检测,选取测序成功的522例胎粪样本进行分析。本研究已通过复旦大学公共卫生学院医学研究伦理委员会审查批准(编号:IRB#2016-

04-0587-EX), 并获得每位研究对象的书面知情同意。

1.2 问卷调查

采用自填式调查问卷收集孕妇孕前身高、体重、分娩年龄、受教育水平、被动吸烟、孕期饮酒、孕期体力活动以及家庭年收入等信息, 通过医疗记录获取孕妇生育史、分娩孕周、分娩方式、分娩季节和新生儿性别等信息。孕妇分娩年龄为分娩日期与孕妇出生日期差值, 孕前体重指数 (body mass index, BMI) 由孕前体重 (kg) 除以身高² (m²) 计算得到。

1.3 孕期 PM_{2.5} 暴露数据

本研究使用了阚海东教授团队构建的 PM_{2.5} 精准暴露评价方法评估孕妇孕期 PM_{2.5} 暴露水平^[19]。通过从美国国家航空航天局 (National Aeronautics and Space Administration, NASA) 戈达德航天中心数据发布系统获取了上海市 2016 年多角度大气校正 (Multiangle Implementation of Atmospheric Correction, MAIAC) 的 1 km 气溶胶光学厚度 (aerosol optical depth, AOD)。随后利用随机森林算法及 MAIAC AOD 数据、气象参数、道路交通、土地利用数据和人口数据等, 整合包含和不包含 AOD 的随机森林模型, 构建了具有高精度 (1 km×1 km) 和 100% 时空覆盖率的 PM_{2.5} 暴露评价方法。最后将孕妇家庭住址进行地理编码, 根据孕妇末次月经日期和分娩日期, 计算出孕妇全孕期 PM_{2.5} 平均暴露质量浓度 (简称浓度), 按个体全孕期 PM_{2.5} 暴露浓度的中位数将研究人群分为高暴露组和低暴露组。

1.4 胎粪样本收集与菌群检测

由医院护理人员在胎儿娩出 24~48 h 内使用一次性无菌粪便收集器收集新生儿胎粪 (出生后的第一次粪便), 收集后立即置于 -80℃ 的冰箱中保存待测。首先提取胎粪样本中的 DNA, 对 16S V3-V4 区进行 PCR 扩增和定量, 回收目的条带并构建 16S V3-V4 区文库。其次使用 Illumina Miseq 测序平台进行高通量测序, 利用测序得到的读长 (reads) 进行聚类并按 97% 的相似水平划分为不同的分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs)。将 OTUs 的代表序列同已有微生物数据库进行比对、注释, 对注释后的 OTUs 进行初步生物信息学分析, 得到 α 多样性指数、 β 多样性指数和物种信息等。其中 α 多样性反映了样本个体内部微生物多样性, 包括丰富度和均匀性两个维度。本研究采用 Chao1 指数、observed species 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数对胎粪菌群 α 多样性进

行评价。Chao1 指数和 observed species 指数代表菌群的丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数代表菌群的多样性和均匀性。 β 多样性则代表了个体间微生物组成的相似程度。

1.5 统计学分析

使用 Qiime 1.9.1 和 R 3.6.1 进行统计分析, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。使用多重线性回归, 分别建立了 PM_{2.5} 单污染物模型和 PM_{2.5} 与 PM₁₀、O₃、SO₂、NO₂、CO 双污染物模型评估大气污染物对新生儿胎粪菌群 α 多样性的影响, 根据既往文献, 模型校正了孕妇年龄、孕前 BMI、受教育程度、新生儿性别、孕期被动吸烟、分娩方式、分娩季节、孕期体力活动和家庭年收入^[20-22]。高、低暴露组胎粪菌群 β 多样性比较采用非加权 UniFrac 距离进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) (对矩阵进行降维) 和置换多元方差分析 (比较两组间差异)。采用线性判别分析效应大小 (LDA Effect Size, LEfSe) 分析高、低暴露组新生儿胎粪菌群组成和组间差异物种, 根据 LDA 得分 >3 进行判断。

使用 PICRUSt 2 软件, 基于 16S rDNA 测序的基因数据和参照基因组数据库 (Greengenes 数据库) 预测功能基因, 将功能基因与京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库进行比对得到基因功能通路, KEGG 数据库中将生物代谢通路分为了三个层次, 分别为 L1、L2 和 L3 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>), 通过 STAMP 2.1.3 软件进行不同菌落的功能差异判断。

2 结果

2.1 PM_{2.5} 浓度和研究人群基本特征

根据 PM_{2.5} 的浓度中位数 (43.50 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) 将 600 名孕妇分为孕期 PM_{2.5} 高暴露组和孕期 PM_{2.5} 低暴露组, 排除了未成功测序的 78 例后, 得到胎粪菌群数据的人数为 522 人, 因而最终确定孕期 PM_{2.5} 低暴露组为 234 人, 高暴露组为 288 人。低暴露组 PM_{2.5} 浓度 M ($P_{25}\sim P_{75}$) 为 38.3 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (36.4~40.3 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$), 高暴露组浓度 M ($P_{25}\sim P_{75}$) 为 45.4 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (44.5~46.4 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$)。其余各污染物浓度详见表 1。

表 2 显示, 孕期 PM_{2.5} 低暴露组孕妇分娩年龄平均为 (28.3±4.4) 岁, 高暴露组为 (28.7±4.0) 岁。孕期 PM_{2.5} 高暴露组的受教育程度高于 PM_{2.5} 低暴露组 ($P<0.001$), 高暴露组中大专或大学及以上者占 43.4% (125/288), 低暴露组仅占 24.8% (58/234)。高暴露

组家庭年收入10万及以上人群占75.4% (217/288), 低暴露组仅56.8% (133/234); 而低暴露组孕妇孕期体力活动时间大于 $2\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 为14.1% (33/234), 多于高暴露组5.9% (17/288)。PM_{2.5}高暴露组和低暴露组孕妇的孕前BMI、生育史、孕周、分娩方式、分娩季节、孕期被动吸烟和孕期饮酒差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表1 研究人群大气污染物暴露情况 [$M(P_{25}\sim P_{75})$] ($n=522$)

Table 1 Air pollutant exposures of the study population

[$M(P_{25}\sim P_{75})$] ($n=522$)

污染物浓度 Pollutant concentration	PM _{2.5} 低暴露组 ($n=234$) PM _{2.5} low-exposure group ($n=234$)	PM _{2.5} 高暴露组 ($n=288$) PM _{2.5} high-exposure group ($n=288$)	P
PM _{2.5}	38.3 (36.4~40.3)	45.4 (44.5~46.4)	<0.001
PM ₁₀	42.7 (40.2~51.7)	54.0 (52.0~56.5)	<0.001
O ₃	105.0 (100.0~107.0)	96.9 (94.1~104.0)	<0.001
SO ₂	7.4 (6.7~9.9)	10.1 (9.8~10.8)	<0.001
NO ₂	31.6 (27.4~36.4)	37.2 (36.2~42.4)	<0.001
CO	0.7 (0.7~0.7)	0.8 (0.7~0.8)	<0.001

[注] PM_{2.5}、PM₁₀、O₃、SO₂、NO₂ 的浓度单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, CO 浓度单位为 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。

[Note] PM_{2.5}, PM₁₀, O₃, SO₂, and NO₂ concentration units are $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, CO concentration unit is $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$.

表2 研究人群基本特征 [n (构成比/%)] ($n=522$)

Table 2 Basic characteristics of the study population

[n (proportion/%)] ($n=522$)

基本特征 Basic characteristics	PM _{2.5} 低暴露组 ($n=234$) PM _{2.5} low-exposure group ($n=234$)	PM _{2.5} 高暴露组 ($n=288$) PM _{2.5} high-exposure group ($n=288$)	P
分娩年龄/岁* Maternal age at delivery/years*	28.3 (4.4)	28.7 (4.0)	0.239
新生儿性别 (Newborn's sex)			0.414
男 (Boy)	98 (41.9)	132 (45.8)	
女 (Girl)	136 (58.1)	156 (54.2)	
孕前 BMI/ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$) Prepregnancy BMI/ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)			0.661
低体重 (<18.5) Underweight (<18.5)	27 (11.5)	41 (14.2)	
正常体重 (18.5~<24.0) Normal (18.5~<24.0)	161 (68.8)	192 (66.7)	
超重或肥胖 (≥ 24.0) Overweight or obesity (≥ 24.0)	46 (19.7)	55 (19.1)	
生育史 (Parity)			0.450
初产 (Nulliparous)	114 (48.7)	151 (52.4)	
经产 (Multiparous)	120 (51.3)	137 (47.6)	
受教育程度 Maternal education level			<0.001
初中及以下 Junior high school and below	38 (16.2)	11 (3.8)	
高中或中专 (High school)	138 (59.0)	152 (52.8)	
大专或大学及以上 College or above	58 (24.8)	125 (43.4)	
孕周 (胎龄)/周* Gestational age/weeks*	39.0 (1.2)	39.1 (2.1)	0.478

续表2

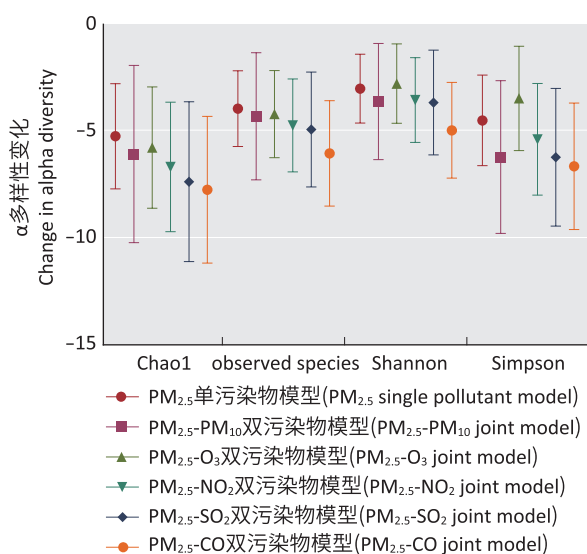
基本特征 Basic characteristics	PM _{2.5} 低暴露组 ($n=234$) PM _{2.5} low-exposure group ($n=234$)	PM _{2.5} 高暴露组 ($n=288$) PM _{2.5} high-exposure group ($n=288$)	P
分娩方式 (Delivery mode)			0.476
顺产 (Vaginal)	91 (38.9)	122 (42.4)	
剖宫产 (Cesarean)	143 (61.1)	166 (57.6)	
分娩季节 (Delivery season)			0.394
春季 (Spring)	152 (65.0)	169 (58.7)	
夏季 (Summer)	41 (17.5)	52 (18.1)	
秋季 (Autumn)	25 (10.7)	39 (13.5)	
冬季 (Winter)	16 (6.8)	28 (9.7)	
孕期被动吸烟 Passive smoking during pregnancy			0.546
否 (No)	195 (83.3)	233 (80.9)	
是 (Yes)	39 (16.7)	55 (19.1)	
孕期饮酒 Drinking during pregnancy			0.523
否 (No)	229 (97.9)	284 (98.6)	
是 (Yes)	5 (2.1)	4 (1.4)	
孕期体力活动时间/ ($\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$) Physical activity time during pregnancy/ ($\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$)			0.017
<0.5	115 (49.1)	141 (49.0)	
0.5~	54 (23.1)	74 (25.7)	
1~	32 (13.7)	56 (19.4)	
2~	24 (10.3)	13 (4.5)	
>4	9 (3.8)	4 (1.4)	
家庭年收入/元 Annual household income/yuan			<0.001
<100000	101 (43.2)	71 (24.6)	
100000~	121 (51.7)	190 (66.0)	
>300000	12 (5.1)	27 (9.4)	

[注] *: 数据为均数 (标准差)。

[Note] *: Data are presented as mean (SD).

2.2 孕期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群 α 多样性的关联

胎粪样本16S rDNA测序共获得19 144 233个序列, 185个OTUs。在校正了孕妇年龄、孕前BMI、受教育程度、新生儿性别、孕期被动吸烟、分娩方式、分娩季节、孕期体力活动时间和家庭年收入后的单污染物模型和双污染物模型中, 孕期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群 α 多样性变化均存在负向关联 (见图1), 在单污染物模型中, PM_{2.5}每升高 $1\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, Chao1指数、observed species指数、Shannon指数和Simpson指数分别降低5.28 (95%CI: -7.73~-2.83)、4.00 (95%CI: -5.75~-2.23)、3.06 (95%CI: -4.66~-1.45) 和4.54 (95%CI: -6.65~-2.43); 双污染物模型也呈现出相似的结果。



[注] 校正变量为孕妇年龄、孕前BMI、受教育程度、新生儿性别、孕期被动吸烟、分娩方式、分娩季节、孕期体力活动时间和家庭年收入。
[Note] Models are adjusted for maternal age, prepregnancy BMI, maternal education level, newborn's sex, passive smoking during pregnancy, delivery mode, delivery season, physical activity time during pregnancy, and annual household income.

图1 $PM_{2.5}$ 与新生儿胎粪菌群 α 多样性的关联

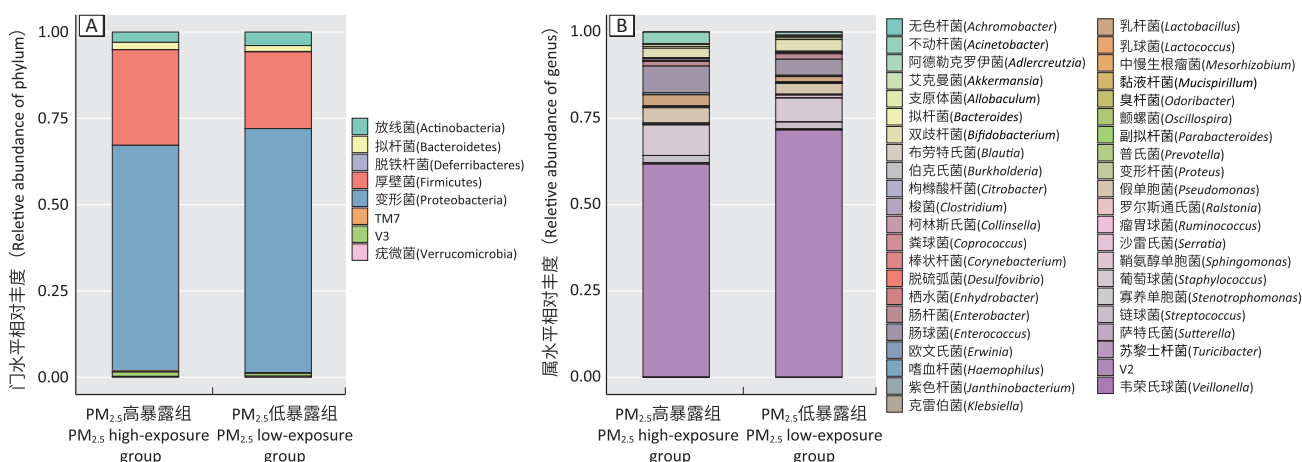
Figure 1 Association between $PM_{2.5}$ and alpha diversity of neonatal meconium microbiome

2.3 $PM_{2.5}$ 高、低暴露组间胎粪菌群 β 多样性的比较

基于非加权UniFrac距离的PCoA主坐标分析显示 $PM_{2.5}$ 高、低暴露组的 β 多样性差异有统计学意义($P=0.02$)，两坐标轴解释率分别为 $x_1=23.83\%$ ， $x_2=6.94\%$ 。见补充材料图S1。

2.4 孕期不同浓度 $PM_{2.5}$ 暴露组间新生儿胎粪菌群物种组成比较

图2展现了两组胎粪样本在门和属水平上的微生物分布。



[注] A：门水平菌群组成；B：属水平菌群组成。

[Note] A: Phylum-level composition; B: Genus-level composition.

图2 孕期 $PM_{2.5}$ 高暴露组和低暴露组胎粪菌群物种组成

Figure 2 Meconium microbiome composition in the gestational $PM_{2.5}$ high-exposure group and the low-exposure group

物分布。如图2A所示，在门水平上，孕期高、低 $PM_{2.5}$ 暴露组新生儿胎粪菌群的优势菌主要为变形菌、厚壁菌、放线菌和拟杆菌。在属水平上，两组优势菌基本一致，但假单胞菌、乳杆菌、肠球菌和无色杆菌构成上存在差异(见图2B)。

对胎粪菌群的相对丰度数据进行LEfSe分析，以确定高、低浓度 $PM_{2.5}$ 暴露组间的差异，结果见表3。本研究共发现34个微生物类群在 $PM_{2.5}$ 高、低暴露组新生儿胎粪菌群之间具有差异，高暴露组有13个特征类群，低暴露组有21个特征类群，但低暴露组中有1个未注释到的类群，高暴露组中有3个。在门水平上的差异类群有3个，包括厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门，其中厚壁菌门为高暴露组特征类群，变形菌门和拟杆菌门为低暴露组特征菌群；在纲及以下水平，高暴露组的特征菌群主要为葡萄球菌、假单胞菌、肠杆菌和肠球菌等；低暴露组的特征菌群主要是毛螺菌、瘤胃球菌、梭菌、芽孢杆菌、乳杆菌和拟杆菌等。不同暴露组间差异类群见补充材料图S2。

2.5 孕期不同浓度 $PM_{2.5}$ 暴露对新生儿胎粪菌群功能通路的影响

在KEGG L1水平上，两组间的差异通路包括代谢、遗传信息处理、细胞过程、环境信息处理、人类疾病和生物系统。在KEGG L3水平上，两组共有106条差异通路($P<0.05$)。其中 $PM_{2.5}$ 高暴露组中上调的通路主要有：转运子、核糖体、ABC转运蛋白糖酵解/糖异生、甘油酯代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢和D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢；低暴露组上调的通路主要有：分泌系统、细

表3 不同PM_{2.5}暴露组间的胎粪菌群差异类群Table 3 Different bacterial taxa of meconium microbiome in PM_{2.5} high-exposure group and low-exposure group

类别 Category	PM _{2.5} 低暴露组 PM _{2.5} low-exposure group	PM _{2.5} 高暴露组 PM _{2.5} high-exposure group
门 (Phylum)	拟杆菌 (Bacteroidetes)	厚壁菌 (Firmicutes)
	变形菌 (Proteobacteria)	
纲 (Class)	变形菌 (Gammaproteobacteria)	芽孢杆菌 (Bacilli)
	拟杆菌 (Bacteroidia)	
	梭菌 (Clostridia)	
	伯克氏菌 (Burkholderiales)	
目 (Order)	肠杆菌 (Enterobacteriales)	芽孢杆菌 (Bacillales)
	拟杆菌 (Bacteroidales)	
	梭菌 (Clostridiales)	
	伯克氏菌 (Burkholderiales)	
科 (Family)	肠杆菌 (Enterobacteriaceae)	肠球菌 (Enterococcaceae)
	乳杆菌 (Lactobacillaceae)	葡萄球菌 (Staphylococcaceae)
	拟杆菌 (Bacteroidaceae)	假单胞菌 (Pseudomonadaceae)
	毛螺旋菌 (Lachnospiraceae)	
	瘤胃球菌 (Ruminococcaceae)	
	芽孢杆菌 (Bacillaceae)	
属 (Genus)	乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i>)	葡萄球菌 (<i>Staphylococcus</i>)
	拟杆菌 (<i>Bacteroides</i>)	肠球菌 (<i>Enterococcus</i>)
		假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)
		肠杆菌 (<i>Enterobacter</i>)
		欧文氏菌 (<i>Erwinia</i>)
		沙雷氏菌 (<i>Serratia</i>)

菌运动蛋白、双组分系统、能量代谢、脂多糖的生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、谷胱甘肽代谢、WNT信号通路和核黄素代谢。孕期PM_{2.5}高暴露组和低暴露组新生儿胎粪菌群主要差异功能通路见补充材料图S3。

3 讨论

本研究通过使用高精度模型模拟了孕妇全孕期个体PM_{2.5}平均暴露浓度,将人群分为孕期PM_{2.5}低暴露组[38.3 (36.4~40.3) $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$]和高暴露组[45.4 (44.5~46.4) $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$]。孕期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群 α 多样性呈负相关。既往的研究表明,婴儿较高的 α 多样性代表机体的肠道菌群成熟度更高、更趋向成人化,而较低的 α 多样性往往与不良健康结局相关^[23]。并且本研究比较了孕期PM_{2.5}高暴露组和低暴露组的胎粪菌群的 β 多样性,发现两组 β 多样性也具有差异。同时发现孕期高、低浓度PM_{2.5}暴露组间的新生儿胎粪菌群共有34个差异类群。这可能与参与PM_{2.5}的病理生理通路有关,例如糖脂代谢、跨膜转运、信号转导等。本研究为孕期细颗粒物暴露对新生儿的健康影响提供了新的机制见解。

目前尚无孕期PM_{2.5}暴露对新生儿肠道菌群影响的流行病学资料,但有一项来自中国的动物实验探究了孕期PM_{2.5}暴露对子代肠道菌群的影响。Liu等^[24]以15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的PM_{2.5}悬液对孕鼠进行气管滴注,对照组给予空白悬液滴注,结果发现PM_{2.5}处理组的雄性子代血清甘油三酯水平高于对照组,两组雄性子鼠间肠道菌群 β 多样性具有显著差异。通过对两组肠道菌群的对比发现,产后3d处理组的雄性子鼠中毛螺菌和罗氏菌等富集,对照组中葡萄球菌、奈瑟氏菌和大肠志贺杆菌等富集,而本研究则发现毛螺旋菌是孕期低暴露组新生儿胎粪的特征菌群,葡萄球菌为高暴露组的特征菌群,因而需要后续的毒理学和流行病学研究予以论证。

有研究发现产前PM_{2.5}暴露对胎儿出生体重有一定影响^[25],猜测孕期PM_{2.5}暴露可能是通过影响了胎儿肠道菌群的构成引起新生儿的低出生体重。本研究发现,梭菌是低浓度PM_{2.5}暴露组新生儿胎粪菌群的特征类群,高暴露组梭菌数量较低暴露组降低。而梭菌是产丁酸的细菌,其数量的减少会导致丁酸水平的降低^[26]。丁酸是结肠细胞和黏膜免疫细胞必需的脂肪酸,丁酸的耗尽通常与屏障功能的降低和黏膜炎症的易感性增加有关^[27]。此外,颗粒物引起的微生物组成的改变会使肠道通透性增加,这与上皮细胞产生的活性氧自由基增加有关^[28]。Grevenonk等^[29]发现在生命早期暴露于颗粒物会增加母亲和胎儿的全身氧化应激水平。因此,孕期PM_{2.5}暴露可能是通过改变宫内胎儿的肠道微生物组成,影响其合成短链脂肪酸,使肠道通透性增高,进而激活了系统炎症和氧化应激通路,最终导致了新生儿出生体重降低。此外,短链脂肪酸对血脑屏障具有保护作用,有助于脑小胶质细胞形态的成熟和免疫功能的发挥^[30],孕期暴露于PM_{2.5}使得短链脂肪酸合成受到影响,这可能会进一步影响新生儿的神经发育。

本研究功能通路分析发现,高、低暴露组在糖脂代谢相关通路(如糖酵解/糖异生、乙醛酸和二羧酸代谢、甘油酯代谢和丙酮酸代谢等通路)具有差异,Wang等^[31]发现长期暴露于PM_{2.5}可引起肠道生态失调,并可能随后导致糖代谢异常的发展。本研究发现,毛螺旋菌和瘤胃球菌是PM_{2.5}低暴露组的特征菌群,有报道称梭状芽孢杆菌科、毛螺旋菌科和瘤胃球菌科的减少与胰岛素抵抗有关^[32]。肠道微生物区系中的脂多糖可通过激活Toll样受体4诱导慢性亚临床炎症

过程和肥胖,导致胰岛素抵抗^[33]。因而这可能是孕期PM_{2.5}暴露导致成年后糖尿病发病风险升高的原因之一。进一步分析结果也显示,PM_{2.5}高暴露组的D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢通路上调,谷氨酸已被证明对神经发育、突触可塑性、学习和记忆等生理过程是必不可少的。研究表明,PM_{2.5}通过谷氨酰胺酶介导谷氨酸生成,破坏血淋巴屏障内皮细胞之间的紧密连接,并诱导神经毒性^[34]。因而这些可能是孕期暴露于高浓度PM_{2.5}对儿童神经发育的影响的潜在生物学机制。

本研究基于前瞻性出生队列,获取孕妇全孕期PM_{2.5}暴露数据,采集胎粪进行新生儿肠道菌群检测,发现孕期暴露于不同浓度的细颗粒物导致的新生儿肠道差异菌群,结合功能通路分析结果,为生命早期肠道菌群定植的理论提供了人群证据的支持,并为探索孕期PM_{2.5}暴露致不良妊娠结局和新生儿发育不良的机制提供数据基础。但本研究仍存在一些不足。首先,尽管使用高精度模型模拟了孕妇孕期PM_{2.5}暴露,并且排除了孕期烹饪的影响,但仍缺乏个体监测数据,因而可能存在暴露错分,这可能会对结果产生影响。其次本研究仅校正了孕妇年龄、孕前BMI、受教育程度、新生儿性别、被动吸烟、分娩方式、分娩季节、孕期体力活动和家庭年收入,仍可能存在其他潜在的混杂因素,如孕期饮食等,因而结果可能存在偏倚。

综上所述,孕期PM_{2.5}暴露与新生儿胎粪菌群的多样性差异及菌群组成相关。相较于低暴露组,妊娠期暴露于高浓度的PM_{2.5}会降低胎粪菌群的 α 多样性,两组间菌群的 β 多样性和优势菌群的组成也呈现显著差异。

参考文献

- [1] FUJIMURA KE, SLUSHER NA, CABANA MD, et al. Role of the gut microbiota in defining human health [J]. *Expert Rev Anti-Infect Ther*, 2010, 8 (4) : 435-454.
- [2] PAREKH PJ, BALART LA, JOHNSON DA. The influence of the gut microbiome on obesity, metabolic syndrome and gastrointestinal disease [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2015, 6 (6) : e91.
- [3] GUZZARDI MA, ALI LA, D'AURIZIO R, et al. Fetal cardiac growth is associated with in utero gut colonization [J]. *Nutr, Metab Cardiovasc Dis*, 2019, 29 (2) : 170-176.
- [4] LYNCH SV, PEDERSEN O. The human intestinal microbiome in health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (24) : 2369-2379.
- [5] FENG P, YE Z, KAKADE A, et al. A review on gut remediation of selected environmental contaminants : possible roles of probiotics and gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2018, 11 (1) : 22.
- [6] HAMRA GB, GUHA N, COHEN A, et al. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer : a systematic review and meta-analysis [J]. *Environ Health Perspect*, 2014, 122 (9) : 906-911.
- [7] 曹丽敏,周芸,张庄,等. 环境空气颗粒物及其组分对呼吸系统健康的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50 (12) : 1114-1118.
CAO LM, ZHOU Y, ZHANG Z, et al. Impacts of airborne particulate matter and its components on respiratory system health [J]. *Chin J Prev Med*, 2016, 50 (12) : 1114-1118.
- [8] WANG G, ZHAO J, JIANG R, et al. Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM_{2.5}) exposures [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30 (3) : 343-356.
- [9] RAJAGOPALAN S, AL-KINDI SG, BROOK RD. Air pollution and cardiovascular disease : JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72 (17) : 2054-2070.
- [10] 袁凌珂,章明徐,朱娉,等. 不同浓度大气细颗粒污染物PM_{2.5}对心脏组织功能的影响 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32 (19) : 2942-2944.
YUAN LK, ZHANG MX, ZHU Y, et al. Effects of different concentrations of airborne fine particulate matter 2.5 on heart tissue function [J]. *J Mod Med Health*, 2016, 32 (19) : 2942-2944.
- [11] VIGNAL C, GUILLOTEAU E, GOWER-ROUSSEAU C, et al. Review article : epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 757 : 143718.
- [12] EZE IC, HEMKENS LG, BUCHER HC, et al. Association between ambient air pollution and diabetes mellitus in Europe and North America : systematic review and meta-analysis [J]. *Environ Health Perspect*, 2015, 123 (5) : 381-389.
- [13] SUN Q, YUE P, DEJULIIS JA, et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity [J]. *Circulation*, 2009, 119 (4) : 538-546.
- [14] LIANG Z, YANG Y, QIAN Z, et al. Ambient PM_{2.5} and birth outcomes : estimating the association and attributable risk

- using a birth cohort study in nine Chinese cities [J]. *Environ Int*, 2019, 126 : 329-335.
- [15] SHERIDAN P, ILANGO S, BRUCKNER T A, et al. Ambient fine particulate matter and preterm birth in California : identification of critical exposure windows [J]. *Am J Epidemiol*, 2019, 188 (9) : 1608-1615.
- [16] LI C, YANG M, ZHU Z, et al. Maternal exposure to air pollution and the risk of low birth weight : a meta-analysis of cohort studies [J]. *Environ Res*, 2020, 190 : 109970.
- [17] FENG S, GAO D, LIAO F, et al. The health effects of ambient PM_{2.5} and potential mechanisms [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, 128 : 67-74.
- [18] MUTLU EA, COMBA IY, CHO T, et al. Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome [J]. *Environ Pollut*, 2018, 240 : 817-830.
- [19] MENG X, LIU C, ZHANG L, et al. Estimating PM_{2.5} concentrations in Northeastern China with full spatiotemporal coverage, 2005—2016 [J]. *Remote Sens Environ*, 2021, 253 : 112203.
- [20] LAVIGNE É, BURNETT RT, STIEB DM, et al. Fine particulate air pollution and adverse birth outcomes : effect modification by regional nonvolatile oxidative potential [J]. *Environ Health Perspect*, 2018, 126 (7) : 077012.
- [21] GUO T, WANG Y, ZHANG H, et al. The association between ambient PM_{2.5} exposure and the risk of preterm birth in China : a retrospective cohort study [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 633 : 1453-1459.
- [22] SHI YC, GUO H, CHEN J, et al. Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) : 3255.
- [23] ABRAHAMSSON TR, JAKOBSSON HE, ANDERSSON AF, et al. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age [J]. *Clin Exp Allergy*, 2014, 44 (6) : 842-850.
- [24] LIU W, ZHOU Y, QIN Y, et al. Sex-specific effects of PM_{2.5} maternal exposure on offspring's serum lipoproteins and gut microbiota [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 739 : 139982.
- [25] LIU W, ZHOU Y, YONG L, et al. Effects of PM_{2.5} exposure during gestation on maternal gut microbiota and pregnancy outcomes [J]. *Chemosphere*, 2020, 247 : 125879.
- [26] HUR KY, LEE MS. Gut microbiota and metabolic disorders [J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39 (3) : 198-203.
- [27] NICHOLSON JK, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Science*, 2012, 336 (6086) : 1262-1267.
- [28] MUTLU EA, ENGEN PA, SOBERANES S, et al. Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8 (1) : 19.
- [29] GREVENDONK L, JANSSEN BG, VANPOUCKE C, et al. Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs [J]. *Environ Health*, 2016, 15 (1) : 10.
- [30] FUNG TC, OLSON CA, HSIAO EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20 (2) : 145-155.
- [31] WANG W, ZHOU J, CHEN M, et al. Exposure to concentrated ambient PM_{2.5} alters the composition of gut microbiota in a murine model [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2018, 15 (1) : 17.
- [32] ALLIN KH, TREMAROLI V, CAESAR R, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes [J]. *Diabetologia*, 2018, 61 (4) : 810-820.
- [33] SAAD MJ, SANTOS A, PRADA PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31 (4) : 283-293.
- [34] LIU F, HUANG Y, ZHANG F, et al. Macrophages treated with particulate matter PM_{2.5} induce selective neurotoxicity through glutaminase-mediated glutamate generation [J]. *J Neurochem*, 2015, 134 (2) : 315-326.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)