

脐血有机磷阻燃剂暴露与新生儿胎粪菌群的 关联研究

刘洋¹,张李一¹,马文娟²,张蕴晖¹

1.复旦大学公共卫生学院,上海 200032 2.复旦大学附属儿科医院,上海 201102

摘要:

[背景] 动物实验研究显示,有机磷阻燃剂(OPEs) 暴露与小鼠、斑马鱼的肠道菌群系统紊乱相关,人群证据较少。鉴于肠道菌群对新生儿发育的重要作用,探讨 OPEs 暴露对新生儿发育早期菌群的潜在影响显得尤为重要。

[目的] 探索脐血 OPEs 暴露对新生儿胎粪菌群多样性及组成的影响。

[方法] 本研究依托上海亲子队列, 纳入 391 名具备完整随访信息和生物样本的孕妇及其子 代。使用超高效液相色谱-串联质谱法检测新生儿脐带血中 OPEs 质量浓度(后称浓度)。在新 生儿分娩后收集胎粪, 使用 Illumina Miseq 测序平台进行 16S rRNA 测序分析。应用多重线性 回归模型评估 OPEs 暴露对新生儿肠道菌群 α 多样性的影响。通过非加权 UniFrac 距离的主 坐标分析和置换多元方差分析比较不同类型 OPEs 高、低暴露组间菌群 β 多样性的差异。采 用线性判别分析效应大小(LEfSe)分析不同 OPEs 高、低暴露组间差异肠道菌群类群。基于京 都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库预测胎粪菌群功能通路,并使用多变量线性回归模 型(MaAsLin2)探索 OPEs 暴露对肠道菌群通路的影响。

[结果] 新生儿脐血样本中共检出 7 种 OPEs 暴露,其中磷酸三丁酯(TBP)、磷酸三(2-丁氧基 乙基)酯(TBEP)、磷酸二苯异辛酯(EHDPP)和磷酸三(2-氯-1-(氯甲基)乙基)酯(TDCPP)检出 率大于 50%,其浓度中位数分别为 0.52、2.41、0.13 和 2.23 μg·L⁻¹。脐血 TBEP 和 TDCPP 暴露 水平与新生儿胎粪菌群 α 指数相关,同时 OPEs 高、低暴露分组的 β 多样性差异有统计学意 义。LEfSe 结果表明,脐血 OPEs 暴露与链球菌、棒状杆菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属和副拟杆菌 属等 27 个菌属存在关联。MaAsLin2 分析发现,OPEs 暴露和亚油酸代谢、类固醇合成、Toll 和 Imd 信号通路、视黄醛代谢、NOD 样受体信号通路和脂肪酸合成等通路上调存在 关联。

[结论] 脐血 OPEs 暴露与新生儿胎粪菌群的 α 多样性指数增加以及奈瑟菌属、链球菌属、副 拟杆菌属和棒状杆菌属等菌属相对丰度增加存在关联,并且与亚油酸代谢和脂肪酸合成等 预测的代谢通路改变存在关联,表明脐血 OPEs 暴露可影响胎粪菌群稳态。

关键词:肠道菌群;新生儿;有机磷阻燃剂;脐血;多样性

Association between umbilical blood organophosphate esters exposure and meconium microbiome of newborns LIU Yang¹, ZHANG Liyi¹, MA Wenjuan², ZHANG Yunhui¹ (1. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China)

Abstract:

[Background] Animal studies have shown that exposure to organophosphate esters (OPEs) disturbs the composition of gut microbiome in rodents and zebrafish. However, current associated evidence in humans is limited. Considering the importance of gut microbiome in neonatal development, we need to investigate the impact of OPEs exposure on the early development stage of neonatal microbiome.

[Objective] To investigate the associations between umbilical OPEs exposure and the diversity and composition of gut microbiome in newborns.

[Methods] Based on the Shanghai Maternal-Child Pairs Cohort (MCPC), 391 mother-infant pairs with comprehensive follow-up information and bio-samples were enrolled in this study.



基金项目

上海市加强公共卫生体系建设三年行动计 划重点学科建设项目(GWVI-11.1-39);复旦-闵行康联体项目(2022FM11)

作者简介 刘洋(2000—),男,硕士生; E-mail: 21211020041@m.fudan.edu.cn

通信作者 张蕴晖, E-mail: yhzhang@shmu.edu.cn

作者中包含编委会成员 有 伦理审批 已获取 利益冲突 无申报 收稿日期 2024-04-18 录用日期 2024-06-25

文章编号 2095-9982(2024)09-1004-08 中图分类号 R12 文献标志码 A

▶引用

刘洋,张李一,马文娟,等.脐血有机磷阻燃 剂暴露与新生儿胎粪菌群的关联研究[J].环 境与职业医学,2024,41(9):1004-1011.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24163

Funding This study was funded.

Correspondence to

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

Editorial Board Members' authorship Yes Ethics approval Obtained Competing interests None declared Received 2024-04-18 Accepted 2024-06-25

To cite

LIU Yang, ZHANG Liyi, MA Wenjuan, et al. Association between umbilical blood organophosphate esters exposure and meconium microbiome of newborns[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(9): 1004-1011.

► Link to this article www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24163 Concentrations of OPEs in neonatal cord blood were quantified using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Meconium samples were collected after delivery and measured through 16S rRNA sequencing on the Illumina Miseq platform. Multiple linear regression models were used to assess the effects of OPEs exposure on the alpha diversity of meconium microbiome. Principal coordinate analysis and permutational multivariate analysis of variance based on unweighted UniFrac distance were used to compare the beta diversity differences between high and low exposure groups of OPEs. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was utilized to analyze the differential gut microbiome taxa between high and low OPEs exposure groups. The functional pathways involved in the meconium microbiome were predicted based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, and multivariate analysis

[Results] Seven OPEs were detectable in the neonatal cord blood samples, of which four were detected higher than 50% including tributyl phosphate (TBP), tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBEP), 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP), and tris (2-chloro-1 (chloromethyl) ethyl) phosphate (TDCPP), and the median concentrations of these four congeners were as follows: $0.52 \ \mu g \cdot L^{-1}$ for TBP, 2.41 $\mu g \cdot L^{-1}$ for TBEP, 0.13 $\mu g \cdot L^{-1}$ for EHDPP, and 2.23 $\mu g \cdot L^{-1}$ for TDCPP. A significant association was observed between umbilical TBEP and TDCPP exposure and alpha diversity indices in neonatal meconium microbiome. Beta diversity significantly differed across varied high and low OPEs exposure groups. The results of LEfSe analysis indicated a significant correlation between umbilical OPEs exposure and 27 genera, including *Streptococcus, Corynebacterium, Neisseria, Haemophilus,* and *Parabacteroides.* The MaAsLin2 analysis identified associations between OPEs exposure and upregulation of pathways related to linoleic acid metabolism, steroid biosynthesis, Toll and Imd signaling pathway, retinol metabolism, NOD like receptor signaling pathway, and fatty acid biosynthesis.

by linear models (MaAsLin2) were conducted to explore the effects of OPEs exposure on gut microbiome pathways.

[Conclusion] Umbilical OPEs exposure is associated increased alpha diversity indices, increased relative abundances of *Neisseria*, *Strepto-coccus*, *Parabacteroides*, and *Corynebacterium* in the gut microbiome, as well as predicted metabolic pathway alterations in linoleic acid metabolism, fatty acid biosynthesis, etc. These findings indicate that umbilical OPEs exposure may disrupt meconium microbiome equilibrium.

Keywords: gut microbiome; newborn; organophosphate ester; cord blood; diversity

肠道菌群的稳态与人体健康密切相关^[1]。研究表 明,胎儿在子宫内即开始肠道菌群的早期定植,新生 儿的肠道菌群在出生后迅速定植,并在生命早期发育 至稳态^[2]。新生儿肠道菌群的定植与发育过程,经历从 低多样性逐渐发育成为成熟的菌群生态系统的转变, 对机体的代谢及免疫的发育成熟产生显著影响^[3]。肠 道菌群最主要的功能之一是通过细菌发酵向人体提 供乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA),为结肠细胞提供营养,同时代谢胆汁酸, 合成维生素,并具有抗炎和抗氧化作用,对宿主的能 量代谢和免疫系统调节起着重要作用^[4]。然而,肠道菌 群的稳态失衡可能导致功能紊乱,进而损害机体的健 康。已有研究表明,肠道菌群紊乱可能在环境污染物 引起疾病发生的过程中发挥重要作用^[5]。

有机磷阻燃剂(organophosphate esters, OPEs)因 其优良的阻燃和增塑性能,被作为多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDE)的替代品,广泛在 电子产品、个人护理用品、润滑油、家具建材和泡沫 塑料等领域被大量应用^[6]。已有研究通过检测室内灰 尘、腕带、血液和尿液样本来评估人体 OPEs 暴露情况, 发现其暴露与多种健康结局存在显著关联,包括生殖 和妊娠结局、甲状腺疾病、新生儿神经发育、哮喘呼 吸系统疾病、免疫毒性和皮肤湿疹等^[7–10]。研究显示 肠道菌群及其构成的肠-脑轴、肠-肺轴和肠-皮轴等调 节系统对人体神经发育、呼吸系统和皮肤免疫系统发育和功能有着重要影响^[11-12]。然而,关于 OPEs 暴露对 肠道菌群影响的研究尚不充分,目前有少量动物实验 和流行病学研究发现 OPEs 暴露与小鼠、斑马鱼和成 人的肠道菌群系统紊乱相关^[13-14],仍缺乏生命早期 OPEs 暴露对新生儿菌群定植的影响的人群研究证据。

本研究依托前瞻性出生队列人群,通过检测脐血 血清评估生命早期 OPEs 暴露水平,并使用 16S rRNA 方法对新生儿胎粪样本进行测序,探究脐血 OPEs 暴 露对新生儿肠道菌群定植的影响,以期为探索 OPEs 暴露对儿童体格生长、呼吸系统和神经发育等不良健 康影响的作用机制提供数据支持。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究依托上海亲子队列,纳入于 2016 年 4 月--2017 年 4 月期间在上海市浦东医院及松江市妇保院 招募的健康孕妇 760 人,该前瞻性队列主要是探究妊 娠期乃至生命早期不同类型环境暴露、生活方式和心 理压力与妊娠妇女及其子代健康之间的关联^[15]。纳入 排除标准包括:1)孕妇的分娩时间为 2016 年 4 月至 2017 年 4 月间,具备完整的基本人口学信息;2)单胎 妊娠;3)孕妇年龄大于 18 周岁;4)孕妇无传染病或严 重慢性疾病史;5)新生儿无重大遗传性疾病。在排除 孕期饮酒、主动吸烟、失访以及出生后脱落的新生儿 后,并同时收集到脐血和胎粪的婴幼儿,最终共有 391 对母婴纳入本研究。本研究已获得复旦大学公共 卫生学院医学研究伦理委员会的审批(编号: IRB# 2016-4-0587-EX),同时也获取了所有参与者的书面知 情同意。

1.2 基本信息收集

纳入队列的妊娠孕妇需填写本研究设计的标准 调查问卷,以获取其及配偶的孕前体重、年龄、受教育 程度、身高、家庭年收入、饮酒习惯及主动吸烟与被 动吸烟等信息,并计算了妊娠妇女孕前体重指数 (body mass index, BMI)。此外,从医院数据库中收集 妊娠妇女分娩前体重,以计算孕期增重、妊娠期并发 症、胎次、分娩方式、分娩孕周、胎儿出生体长、出生 体重和性别等信息。

1.3 脐血样本 OPEs 浓度检测

标准品磷酸三丙酯(tripropyl phosphate, TPrP)和 三甲苯磷酸酯(tris-m-cresylphosphate, TMCP)(LGC Standards Ltd,英国);磷酸三丁酯(tributyl phosphate, TBP)(江苏坛墨质检科技股份有限公司,中国);磷酸 二苯异辛酯(2-ethylhexyl diphenyl phosphate, EHDPP)、 磷酸三苯基酯(triphenyl phosphate, TPhP)、磷酸三(2-氯-1-(氯甲基)乙基)酯 [tris (2-chloro-1 (chloromethyl) ethyl) phosphate, TDCPP] 和磷酸三(2-丁氧基乙基)酯 [tris (2-butoxyethyl) phosphate, TBEP](北京曼哈格生物 科技有限公司,中国);同位素内标 100 µg·mL⁻¹ d₁₅-磷 酸三苯基酯正己烷溶液(Cambridge Isotope Laboratories,美国)。

本研究采用液-液萃取法制备脐血血清样品,并使 用超高效液相色谱串联质谱法检测脐血中 OPEs 的质 量浓度(后称浓度),详细的操作和质控过程见已发表 的文献^[16-17]。该方法 OPEs 的回收率为 69.0%~118.9%。 OPEs 的检出限如下: TBP为 0.020 μ g·L⁻¹, TBEP为 0.210 μ g·L⁻¹,EHDPP为0.030 μ g·L⁻¹,TDCPP为0.070 μ g·L⁻¹, TMCP为 0.010 μ g·L⁻¹, TPhP为 0.650 μ g·L⁻¹, TPrP为 0.570 μ g·L⁻¹。

采用氧化酶法测定总胆固醇和甘油三酯水平,而 总脂质含量的计算则参考 Phillips 等^[18]的方法。OPEs 的浓度以脂质校正值(ng·g⁻¹)和测量浓度(μg·L⁻¹)表示。 **1.4 胎粪样本 165 rRNA 测序**

从胎粪样本中提取 DNA,并对 16S V3~V4 区进行 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增和 定量,回收目的条带和构建终文库。采用 Illumina Mis-

eq 测序平台进行高通量测序,根据测序结果的读长 (reads)进行聚类,按照 97%的相似度划分为不同的分 类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)。将 OTUs 的代表序列与微生物数据库进行比对和注释,进 行初步的生物信息学分析,得到 β 多样性指数、 α 多 样性指数和物种信息等,详细的操作和质控过程见既 往文献^[19]。其中β多样性指数表征样本间微生物组成 的相似度; α 多样性指数表征样本内部的微生物多样 性,包括均匀度和丰富度两个方面。本研究使用 ACE 指数、Chao1 指数、系统发育多样性指数(phylogenetic diversity, PD)、Shannon 指数和 Simpson 指数表征胎 粪菌群的 α 多样性。Shannon 指数反映了群落的物种 丰富度和均匀度,该指数的值越高,表明群落的多样 性水平越高。Simpson 指数则评估群落物种分布的均 匀性,其值越高表明群落均匀度越高。PD 指数反映了 群落的发育多样性和均匀度,其数值越高则群落的多 样性水平越高。Chao1 和 ACE 指数主要评估群落的物 种丰富度,表征物种数量; Chao1 指数值越高,反映物 种总数越多; ACE 指数值越大, 表明群落的物种丰富 度越高。

1.5 统计学分析

本研究采用 Qiime 1.9.1 与 R 4.2.0 软件进行统计 分析,设定检验水准为 α =0.05。通过多重线性回归模 型,评估脐血 OPEs 暴露对新生儿胎粪菌群 α 多样性 的影响,模型中校正了孕妇受教育程度、孕前 BMI、年 龄、孕期增重、孕期被动吸烟、孕期并发症、分娩方式、 新生儿性别、分娩季节、孕期体力活动和家庭年收入 等混杂因素。将新生儿按照脐血 OPEs 浓度中位数分 为高、低暴露组,使用非加权 UniFrac 距离计算样本间 的相似度,进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)降维,再应用置换多元方差分析来检验 两组胎粪菌群的 β 多样性差异。使用线性判别分析效 应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)来 分析 OPEs 高、低暴露组的胎粪菌群组成和差异物种, 设定线性判别分析得分阈值为 3。

应用 PICRUSt 2 软件,依据 16S rRNA 测序数据与 参考基因组数据库(Greengenes 数据库)来预测胎粪 菌群的功能基因,再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)数据库比对,得到基因功能通路。使用多变量线 性回归模型(multivariate analysis by linear models, MaAsLin2)评估脐血 OPEs 暴露对肠道菌群功能通路 的影响^[20]。

1007

2 结果

2.1 研究人群基本特征和脐血 OPEs 暴露水平

表1呈现了纳入研究对象的基本人口学信息。结果显示,纳入孕妇人群的分娩年龄为(29.32±4.28)岁, 孕前 BMI为(21.49±2.96)kg·m⁻²,孕期增重(13.73± 5.56)kg;受教育水平在高中及以上占比超过92.83%; 家庭年均收入超过10万元的占比超过70%;有25.32% 研究对象有被动吸烟情况;孕期体力活动为中等水平 以上占比58.05%;顺产分娩的孕妇占43.99%;未出现 妊娠期并发症的孕妇占61.89%;初产妇占研究人群 的56.78%。新生儿中女婴占比为44.25%,早产占比为 3.84%,且52.69%出生在暖季。

表1 研究对象基本人口学信息 [均数±标准差或 n(%)]

Table 1 Basic sociodemographic characteristics of subjects $[\bar{x} \pm s \text{ or } n(\%)]$

基本特征 (Basic characteristic)	纳入人群(<i>n</i> =391) (Included population)	总人群(<i>n</i> =760) (Total population)	Р
孕妇年龄/岁 (Maternal age at delivery/years)	29.32±4.28	29.00±4.34	0.174
孕前BMI(Pre-pregnancy BM)/(kg·m ⁻²)	21.49±2.96	21.50±2.94	0.937
孕期增重(Gestational weight gain)/kg	13.73±5.56	13.80±5.31	0.885
受教育程度			
(Maternal education level)			0.561
初中及以下 (Junior high school and below)	28(7.16)	65(8.55)	
高中至大专 (High school or college)	204(52.17)	406(53.42)	
大学及以上 (University or above)	159(40.66)	289(38.03)	
家庭收入水平/万元 (Annual family income/ten thousand yuan)			0.630
<10	102(26.09)	216(28.42)	
10~20	250(66.24)	402(64.97)	
>20	20(7.67)	493(04.87)	
孕期被动吸烟(Passive smoking during pregnancy) ¹	50(7.07)	51(0.71)	0.963
有(Yes)	99(25.32)	190(25.00)	
无(No)	292(74.68)	570(75.00)	
孕期体力活动水平 (Physical activity level during pregnancy)			0.483
低(Low)	164(41.94)	293(38.55)	
中(Median)	209(53.45)	425(55.92)	
高(High)	18(4.60)	42(5.53)	
分娩模式 (Delivery mode)			0.491
顺产(Vaginal)	172(43.99)	352(46.32)	
剖宫产(Cesarean)	219(56.01)	408(53.68)	

基本特征 (Basic characteristic)	纳入人群(n=391) (Included population)	总人群(<i>n</i> =760) (Total population)	Ρ
妊娠期并发症(Pregnancy complications) ²			0.439
有(Yes)	149(38.11)	309(40.66)	
无(No)	242(61.89)	451(59.34)	
生育史(Parity)			0.864
初产(Nulliparous)	222(56.78)	437(57.50)	
经产(Multiparous)	169(43.22)	323(42.50)	
胎儿性别(Newborn's sex)			0.890
男(Boy)	218(55.75)	419(55.13)	
女(Girl)	173(44.25)	341(44.87)	
早产 (Premature delivery)			0.999
否(No)	376(96.16)	731(96.18)	
是(Yes)	15(3.84)	29(3.82)	
出生季节(Delivery season)			0.644
冷季(Cold season)	185(47.31)	372(48.95)	
暖季(Warm season)	206(52.69)	388(51.05)	-

续表1

[注]1:孕期被动吸烟指平均每周>1次,每次>15 min;2:妊娠并发症 包括妊娠期高血压、妊娠期贫血、妊娠期糖尿病和先兆子痫。

[Note] 1: Passive smoking during pregnancy means average >1 session per week with at least 15 min per session; 2: Pregnancy complications include hypertension, anemia, diabetes, and preeclampsia disease.

研究人群脐血样本中 OPEs 暴露特征如表 2 所示。 本研究共检测 7 种 OPEs,其中 TPrP、TPhP 和 TMCP 的 检出率低于 50%,未纳入后续分析。脐血中 TDCPP 的 检出率最高,为 87.72%; TBP 和 TBEP 检出率分别为 80.05%和 74.42%; EHDPP 检出率为 62.66%。脐血血清 中 TBEP 浓度最高,浓度中位数为 2.41 µg·L⁻¹。

表 2 新生儿脐血 OPEs 暴露情况 [*M*(*P*₂₅, *P*₇₅)]

Table 2 Prenatal OPEs exposure of newborns [M (P_{25} , P_{75})] 单位(Unit): μ g·L⁻¹

OPEs	纳入人群 (Included participants) (<i>n</i> =391)	低暴露组 (Low exposure group) (<i>n</i> =195)	高暴露组 (High exposure group) (<i>n</i> =196)
ТВР	0.52 (0.08, 0.92)	0.08 (LOD, 0.34)	0.92 (0.74, 1.26)*
TPhP	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""></lod<></td></lod<>	<lod< td=""></lod<>
ТВЕР	2.41 (LOD, 5.58)	LOD(LOD, 1.12)	5.58 (3.84, 8.46)*
TPrP	<lod< td=""><td><lod< td=""><td><lod< td=""></lod<></td></lod<></td></lod<>	<lod< td=""><td><lod< td=""></lod<></td></lod<>	<lod< td=""></lod<>
EHDPP	0.13 (LOD, 0.31)	LOD(LOD, 0.03)	0.31 (0.22, 0.49)*
TDCPP	2.23 (0.88, 4.11)	0.88 (0.12, 1.45)	4.08 (3.17, 5.47)*
тмср	LOD (LOD, 0.01)	<lod< td=""><td>0.01(<lod, 0.92)<="" td=""></lod,></td></lod<>	0.01(<lod, 0.92)<="" td=""></lod,>

[注(Note)]*: P<0.001。

2.2 脐血 OPEs 暴露和新生儿胎粪菌群 α 多样性关联 通过对胎粪样本进行 16S rRNA 测序,获得 19144 233

个序列,按标准分为 185 个 OTUs。多重线性回归模型 结果显示, 脐血中经脂质校正后的 OPEs 暴露与新生 儿胎粪菌群 α 多样性呈正向关联(图 1A)。校正混杂 因素后, TBEP 暴露每增加一个对数单位($ng \cdot g^{-1}$), Simpson、Shannon、ACE 和 PD 指数分别提高 0.017(95%CI: 0.001~0.033), 0.079(95%CI: 0.001~0.157), 2.402 (95%CI: 0.262~4.543)和 6.822(95%CI: 0.016~13.629); TDCPP 暴露每增加一个对数单位(ng·g⁻¹), Shannon、 ACE、Chao1 和 PD 指数分别提高 0.084(95%CI: 0.000~ 0.166) 2.924(95%CI: 0.632~5.215) 3.306(95%CI: 0.962~5.649)和 10.215(95%CI: 2.950~17.479)。采用 基于分位数的 g-算法评估不同类型脐血 OPEs 复合暴 露对新生儿肠道菌群 α 多样性的影响。OPEs 复合暴 露与新生儿肠道菌群 α 多样性 5 个指数均存在关联 (P_{Shannon}=0.011, P_{Simpson}=0.035, P_{Chao1}=0.017, P_{PD}=0.016, $P_{ACE}=0.010$),结果如图 1B 所示。多重线性回归模型对 性别分层分析结果显示, 脐血 TBEP 和 TDCPP 暴露与

女婴人群中胎粪菌群 α 多样性呈正向关联,与总人群 关联结果相近;而在男婴中未发现暴露与胎粪菌群 α 多样性存在关联(图 1C)。

2.3 OPEs 高、低暴露组间胎粪菌群 β 多样性比较

采用非加权 UniFrac 距离进行 PCoA 主坐标分析, 比较了 OPEs 高、低暴露组新生儿胎粪菌群的 β 多样 性差异,分析发现高、低暴露分组之间的 β 多样性存 在差异(*P*=0.018),第一主坐标轴和第二主坐标轴的方 差贡献率分别为 25.90%和 8.93%。

2.4 OPEs 暴露与新生儿胎粪菌群物种相对丰度的 关联

采用 LEfSe 分析模型对胎粪菌群的相对丰度数据 进行分析,以识别脐血不同类型 OPEs 高、低暴露组间 的差异菌属,结果如图 2 所示。27 个差异菌属在 OPEs 高、低暴露组存在差异,其中高暴露组有 1 个特 征菌属,低暴露组有 26 个,包括链球菌、棒状杆菌、奈 瑟菌属和副拟杆菌属等。







[Note] A: Association of cord blood OPEs exposure with neonatal meconium microbiome alpha diversity; B: Quartile-based g-computation to assess the association of different types of cord blood OPEs composite exposures with neonatal gut microbiome alpha diversity; C: Sex-stratified association of cord blood OPEs exposure with neonatal meconium microbiome alpha diversity; confounders including maternal education, pre-pregnancy BMI, maternal age, gestational weight gain, passive smoking during pregnancy, complications during pregnancy, delivery mode, infant sex, season of delivery, physical activity during pregnancy, and annual household income.

图 1 OPEs 暴露与新生儿胎粪菌群 α 多样性关联

Figure 1 Associations between OPEs exposure and alpha diversity of meconium microbiome





Figure 2 Differential microbiome taxa of meconium microbiome in prenatal OPEs high-exposure group and low-exposure group

2.5 脐血 OPEs 暴露与新生儿胎粪菌群功能通路的 关联

MaAsLin2 模型分析发现, 脐血 OPEs 暴露与新生 儿胎粪菌群功能通路存在显著关联, 结果如图 3 所示。 TBEP 暴露和新生儿肠道菌群功能通路上调相关, 主要 包括类固醇合成、糖胺聚糖降解、亚油酸代谢、类固 醇降解、糖苷合成、视黄醛代谢、NOD 样受体信号通 路和脂肪酸合成; TDCPP 暴露与类固醇降解、类固醇 合成、亚油酸代谢、类固醇激素合成、糖苷合成、Toll 和 Imd 信号通路、聚酮糖单元生物合成、视黄醛代谢 和硒化合物代谢等功能通路上调相关。



图 3 脐血 TBEP (A) 和 TDCPP (B) 暴露与新生儿胎粪菌群 KEGG 通路关联

Figure 3 Associations between prenatal TBEP (A) and TDCPP (B) exposure and KEGG functional pathways of neonatal meconium microbiome

3 讨论

本研究检测收集脐带血中 OPEs 浓度,评估新生 儿经脐血的暴露水平,分析结果显示,脐血 TEBP 和 TDCPP 暴露与新生儿胎粪菌群 α 多样性指标呈正向 关联,OPEs 复合暴露也与 α 多样性指标呈相关;分层 分析发现女婴人群中的关联,提示女婴可能是 OPEs 暴露影响的敏感人群; OPEs 暴露关联的差异菌群包 括链球菌、棒状杆菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属和副拟 杆菌属等,影响的功能通路包括亚油酸代谢、类固醇 合成、Toll 和 Imd 信号通路、视黄醛代谢、脂肪酸合成 和类固醇降解等。

通常认为,较高的肠道菌群 α 多样性是群落成熟 度的指标,而较低的 α 多样性常与不良的健康结果相 关^[21]。但近期研究发现,患有重性抑郁症和精神分裂 症的成年人的肠道菌群 α 多样性较高^[22],以及新生儿 粪便中的 α 多样性与儿童的亲社会行为呈负相关^[19], 并发现1岁时的肠道菌群α多样性与杏仁核、右侧前 岛叶和前扣带回之间的连接性呈现负向关联,表明较 高的 α 多样性可能与情绪处理机制的低效有关^[23]。在 探究 OPEs 暴露对肠道菌群影响的动物实验中, TD-CIPP 暴露处理后的小鼠肠道菌群多样性增加,菌群组 成出现紊乱,具体表现为拟杆菌门(如拟杆菌属)相对 减少,而厚壁菌门(如梭状芽孢杆菌属)数量增多[24]; 而孕期 EHDPHP 暴露可诱导哺乳动物及其幼崽的肠道 生态失调^[25];还有研究发现 TPhP 暴露对小鼠肠道梭 状芽孢杆菌及杆菌的丰度存在影响^[26]。人群研究方面, 一项小样本研究报告了 TDCPP 暴露对肠道菌群的稳 态产生负面影响,与变形菌等有害菌的相对丰度增加 存在关联^[13],这些研究证据均支持了本研究 OPEs 暴 露和新生儿胎粪菌群 α 多样性指标呈正向关联的 结论。

本研究筛选出与 OPEs 暴露相关的胎粪菌群包括 链球菌、棒状杆菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属和副拟杆 菌属等。已有研究表明,副拟杆菌与心血管疾病的严 重程度和结局存在关联,除部分菌种为有益菌外,副 拟杆菌常视为机会致病菌,也发现其与脂肪酸代谢有 关,这与本研究预测到的信号通路保持一致^[27-28]。奈 瑟菌属是一种革兰氏阴性需氧球菌,被视为潜在致病 菌,可代谢多种糖类产生酸,研究报告了其与甲状腺 疾病密切相关^[29],还发现与甲状旁腺激素生成通路的 改变存在关联,提示潜在的作用途径;有研究发现心 血管病人样本中嗜血杆菌的富集,其丰度水平与异戊 酸和异丁酸等脂肪酸水平呈负相关,进一步支持了心 血管系统可能是 OPEs 潜在的毒作用靶器官^[30],有待 进一步的探索。

此外,研究报告苏黎世杆菌属是潜在的有害菌, 在结肠炎患者中富集,并可能与视黄醇和氨基酸代谢 改变存在关联,视黄醇作为微生物代谢产物在维持肠 道免疫稳态中发挥重要作用^[31]。链球菌属被认为是机 会致病菌,可产生外毒素、荚膜多糖和透明质酸酶等 致病物质,通过 NOD 信号通路产生促炎作用,与新生 儿败血症、肺炎等疾病的发生相关^[32–33]。而棒状杆菌 属可参与具有抗炎作用的糖胺聚糖的生产与代谢,这 些差异菌群的发现均提示 OPEs 暴露对人群健康的潜 在影响^[34–36]。

在本研究预测到的信号通路中,亚油酸已被证实 可在 THP-1 细胞中诱导超氧化物和其他活性氧化物的 生成,也可被酶氧化成参与细胞信号传导的多种衍生 物,因而亚油酸代谢通路可能是影响炎症等疾病发生 的潜在通路^[37-38]。此外,类固醇的水平对于维持睾酮 水平和雌激素周期等两性生殖功能有重要作用,而 OPEs 暴露影响类固醇的降解和合成,可能对人体生殖 健康造成影响^[39]。并且,肠道菌群可在肠上皮细胞中 诱导视黄醇结合蛋白,将视黄醇输送到髓样细胞,促 进肠道免疫的发展^[40]。

综上所述,本研究观察到脐血 OPEs 暴露与新生 儿胎粪菌群 α 多样性和类群存在关联,并结合 KEGG 功能通路分析,为 OPEs 暴露的健康影响提供了新的 人群研究证据。然而,本研究仅从观察性的角度发现 了 OPEs 暴露对新生儿胎粪菌群的影响,缺乏实验验 证;分析中尽管已校正多种混杂因素,但仍需考虑孕 期膳食等其他潜在混杂的影响;另外,其他环境污染 物,包括超细颗粒物、全氟化合物和多环芳烃等,可能 与新生儿期肠道菌群定植存在关联,真实场景中的污 染物共暴露会低估本研究发现的菌群干扰作用,需要 进一步的系统研究。

参考文献

- [1] FUJIMURA K E, SLUSHER N A, CABANA M D, et al. Role of the gut microbiota in defining human health [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(4): 435-454.
- [2] CHARBONNEAU M R, BLANTON LV, DIGIULIO D B, et al. A microbial perspective of human developmental biology[J]. Nature, 2016, 535(7610): 48-55.
- [3] DONALD K, FINLAY B B. Early-life interactions between the microbiota and immune system: impact on immune system development and atopic disease [J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(11): 735-748.
- $\left[\ 4 \ \right]$ VAN DER HEE B, WELLS J.M. Microbial regulation of host physiology by

1011

short-chain fatty acids [J]. Trends Microbiol, 2021, 29(8): 700-712.

- [5] GAN H, ZHANG Y, WANG YF, et al. Relationships of prenatal organophosphate ester exposure with pregnancy and birth outcomes: a systematic scoping review of epidemiological studies[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 252: 114642.
- [6] WANG X, ZHU Q, YAN X, et al. A review of organophosphate flame retardants and plasticizers in the environment: analysis, occurrence and risk assessment [J]. Sci Total Environ, 2020, 731: 139071.
- [7] SOUBRY A, HOYO C, BUTT C M, et al. Human exposure to flame-retardants is associated with aberrant DNA methylation at imprinted genes in sperm [J]. Environ Epigenet, 2017, 3(1): dvx003.
- [8] HOFFMAN K, STAPLETON H M, LORENZO A, et al. Prenatal exposure to organophosphates and associations with birthweight and gestational length [J]. Environ Int, 2018, 116: 248-254.
- [9] ARAKI A, BASTIAENSEN M, BAMAI YA, et al. Associations between allergic symptoms and phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children [J]. Environ Int, 2018, 119: 438-446.
- [10] BI C, MAESTRE J P, LI H, et al. Phthalates and organophosphates in settled dust and HVAC filter dust of U. S. low-income homes: association with season, building characteristics, and childhood asthma[J]. Environ Int, 2018, 121(Pt 1): 916-930.
- [11] GUO H H, HAN YX, RONG XJ, et al. Alleviation of allergic asthma by rosmarinic acid via gut-lung axis[J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155470.
- [12] MAHMUD M R, AKTER S, TAMANNA S K, et al. Impact of gut microbiome on skin health: gut-skin axis observed through the lenses of therapeutics and skin diseases [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2096995.
- [13] HUANG W, JIN L, YIN H, et al. Assessments of the effects of tris(1, 3dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) on human intestinal health from the aspects of intestinal flora changes and cytotoxicity to human cells[J]. Sci Total Environ, 2023, 894: 164823.
- [14] SUN W, DANG Y, DAI L, et al. Tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate causes female-biased growth inhibition in zebrafish: linked with gut microbiota dysbiosis[J]. Aquat Toxicol, 2023, 260: 106585.
- [15] GUI Y, ZHAO Y, TAO X G, et al. Cohort profile: the Shanghai maternal-child pairs cohort (MCPC)[J]. Int J Epidemiol, 2024, 53(1): dyad185.
- [16] HU L, TAO Y, LUO D, et al. Simultaneous biomonitoring of 15 organophosphate flame retardants metabolites in urine samples by solvent induced phase transition extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chemosphere, 2019, 233: 724-32.
- [17] LI J, LI Q, LI J, et al. Simultaneous determination of poly- and perfluoroalkyl substances and organophosphorus flame retardants in serum by ultraperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2022, 36(14): e9312.
- [18] PHILLIPS D L, PIRKLE J L, BURSE V W, et al. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1989, 18(4): 495-500.
- [19] WEI Q, JIANG Z, SHI H, et al. Associations of maternal prenatal emotional symptoms with neurodevelopment of children and the neonatal meconium microbiota: a prospective cohort study[J]. Psychoneuroendocrinology, 2022, 142: 105787.
- [20] MALLICK H, RAHNAVARD A, MCIVER LJ, et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies[J]. PLoS Comput Biol, 2021, 17(11): e1009442.
- [21] SHADE A. Diversity is the question, not the answer[J]. ISME J, 2017, 11(1): 1-6.
- [22] LAI W T, ZHAO J, XU SX, et al. Shotgun metagenomics reveals both taxonomic and tryptophan pathway differences of gut microbiota in bipolar disorder with current major depressive episode patients[J]. J Affect Disord, 2021, 278: 311-319.

- [23] GAO W, SALZWEDEL AP, CARLSON AL, et al. Gut microbiome and brain functional connectivity in infants-a preliminary study focusing on the amygdala[J]. Psychopharmacology (Berl), 2019, 236(5): 1641-1651.
- [24] YAN X, HE M, ZHENG J, et al. Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate exposure disrupts the gut microbiome and its associated metabolites in mice[J]. Environ Int, 2021, 146: 106256.
- [25] LI X W, QIU F, LIU Y, et al. Inulin alleviates perinatal 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPHP) exposure-induced intestinal toxicity by reshaping the gut microbiota and suppressing the enteric-origin LPS/TLR4/NF-κb pathway in dams and pups [J]. Environ Pollut, 2024, 346: 123659.
- [26] WANG D, YAN S, YAN J, et al. Effects of triphenyl phosphate exposure during fetal development on obesity and metabolic dysfunctions in adult mice: impaired lipid metabolism and intestinal dysbiosis[J]. Environ Pollut, 2019, 246: 630-638.
- [27] HU X, LI H, ZHAO X, et al. Multi-omics study reveals that statin therapy is associated with restoration of gut microbiota homeostasis and improvement in outcomes in patients with acute coronary syndrome[J]. Theranostics, 2021, 11(12): 5778-5793.
- [28] MEDAWAR E, HAANGE S B, ROLLE-KAMPCZYK U, et al. Gut microbiota link dietary fiber intake and short-chain fatty acid metabolism with eating behavior [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 500.
- [29] SU X, ZHAO Y, LI Y, et al. Gut dysbiosis is associated with primary hypothyroidism with interaction on gut-thyroid axis[J]. Clin Sci (Lond), 2020, 134(12): 1521-1535.
- [30] CHEN L, CHEN J, HUANG Y, et al. Changes of the gut microbiota composition and short chain fatty acid in patients with atrial fibrillation [J]. PeerJ, 2023, 11: e16228.
- [31] CHENG H, ZHANG D, WU J, et al. Atractylodes macrocephala Koidz. volatile oil relieves acute ulcerative colitis via regulating gut microbiota and gut microbiota metabolism [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1127785.
- [32] XIE S, ZHANG Y, XU L, et al. Acacetin attenuates *Streptococcus suis* virulence by simultaneously targeting suilysin and inflammation [J]. Microb Pathog, 2022, 162: 105354.
- [33] WIESE KM, COATES BM, RIDGE KM. The role of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in pulmonary infection[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 57(2): 151-161.
- [34] YEO L F, LEE S C, PALANISAMY U D, et al. The oral, gut microbiota and cardiometabolic health of indigenous orang asli communities[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 812345.
- [35] SHIKINA E V, KOVALEVSKY R A, SHIRKOVSKAYA A I, et al. Prospective bacterial and fungal sources of hyaluronic acid: a review [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2022, 20: 6214-6236.
- [36] CHENG F, YU H, STEPHANOPOULOS G. Engineering Corynebacterium glutamicum for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid[J]. Metab Eng, 2019, 55: 276-289.
- [37] YAN B, FUNG K, YE S, et al. Linoleic acid metabolism activation in macrophages promotes the clearing of intracellular *Staphylococcus aureus* [J]. Chem Sci, 2022, 13(42): 12445-12460.
- [38] RYBICKA M, STACHOWSKA E, GUTOWSKA I, et al. Comparative effects of conjugated linoleic acid (CLA) and linoleic acid (LA) on the oxidoreduction status in THP-1 macrophages[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 4095-4103.
- [39] MAYNERIS-PERXACHS J, ARNORIAGA-RODRÍGUEZ M, LUQUE-CÓRDOBA D, et al. Gut microbiota steroid sexual dimorphism and its impact on gonadal steroids: influences of obesity and menopausal status[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 136.
- [40] BANG Y J, HU Z, LI Y, et al. Serum amyloid A delivers retinol to intestinal myeloid cells to promote adaptive immunity [J]. Science, 2021, 373(6561): eabf9232.