



研究报告

孕晚期肠道菌群与孕妇血糖血脂的临床相关性

叶樱琳 蒋荣珍* 郭晓蒙 张烨 徐钦洋 李明 滕银成 陶敏芳

上海交通大学附属第六人民医院 上海 200233

摘要:【背景】孕期体重增长不当与孕妇血糖血脂水平紊乱密切相关,而血糖血脂水平与母胎代谢性疾病的发生密切相关。肠道菌群协调肠道细胞吸收营养物质,可能与母婴糖脂代谢疾病的发生具有密切关系。【目的】观察孕期增重不同的孕妇肠道菌群生物多样性、丰富度与功能间差异,探讨孕晚期肠道菌群与孕妇血糖血脂的相关性。【方法】收集 34 例孕晚期孕妇粪便样本,利用 MiSeq 高通量测序技术对样本中 16S rRNA 基因的 V3–V4 区序列进行测序,分析孕期增重对孕妇肠道菌群多样性与丰度差异的影响,利用京都基因及基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析研究不同孕期增重水平肠道菌群代谢通路变化,通过相关分析预测对孕期增重、孕妇孕晚期体质指数(Body Mass Index, BMI)、血糖血脂有影响的肠道微生物。【结果】孕妇肠道菌群多样性和群落结构变化不大,但差异菌属丰度占比有变化;相关分析发现 *Ruminococcaceae*_UCG-014 sp. 与孕晚期 BMI 和孕期增重呈负相关, *Lachnospira* spp. 与孕晚期血糖呈负相关, *Alistipes* spp. 和 *Ruminococcus*_torques_group spp. 与孕晚期甘油三酯呈负相关, *Parabacteroides* spp. 与孕晚期 HDL 和新生儿体重呈正相关,而 *Mucispirillum* spp. 与 HDL 呈负相关;KEGG 分析显示,孕期增重正常孕妇肠道菌群在碳水化合物、脂质和氨基酸代谢等 31 条代谢通路上较孕期增重不足和增重过度明显升高。【结论】肠道微生物可能通过调节营养物质代谢和吸收影响血糖血脂水平,进而影响孕期增重。

关键词: 肠道菌群, 孕期增重, 血糖血脂, 16S rRNA 基因测序

Correlations analysis of gut microbiota with blood glucose and lipids in the third trimester pregnancy

YE Yinglin JIANG Rongzhen* GUO Xiaomeng ZHANG Ye XU Qinyang LI Ming
TENG Yincheng TAO Minfang

Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract: [Background] Inappropriate gestational weight gain is associated with disorder of pregnant women's blood glucose and lipids which are closely related to maternal-fetal metabolic diseases. Gut microbiota coordinates the absorption of nutrients by intestinal cells, which may affect maternal-fetal glucose and lipids level. [Objective] To observe the constitution and diversity of gut microbiota from pregnant women with different gestational weight gain, and explore microbiota which may be related to blood glucose and lipids in the third trimester pregnancy. [Methods] A total of 34 excrement samples were

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81570444)

*Corresponding author: Tel: 86-21-64369181; E-mail: jianrzh@163.com

Received: 17-11-2020; Accepted: 23-12-2020; Published online: 11-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81570444)

*通信作者: Tel: 021-64369181; E-mail: jianrzh@163.com

收稿日期: 2020-11-17; 接受日期: 2020-12-23; 网络首发日期: 2021-03-11

selected from pregnant women with different gestational weight gain. 16S rRNA gene sequencing in the V3–V4 region of gut microbiota was acted by high throughput MiSeq method to analysis the constitution and diversity of gut microbiota. KEGG analysis was used to study the metabolic pathway change of different gestational weight gain. By correlations analysis, we can predict gut microbiota associated with gestational weight gain, maternal body mass index and blood glucose and lipids in the third trimester pregnancy. **[Results]** There was no significant difference in the diversity and constitution of gut microbiota, but the percentage of differential gut microbiota has changed. Correlation analysis found that *Ruminococcaceae*_UCG-014 sp. was negatively correlated with maternal body mass index (BMI) in the third trimester and gestational weight gain, *Lachnospira* spp. negatively correlated with blood glucose in the third trimester, *Alitipes* spp. and *Ruminococcus*_torques_group spp. were negatively correlated with maternal triglycerides in the third trimester, *Parabacteroides* spp. positively correlated with high density lipoprotein in the third trimester while negatively correlated with birthweight. Besides, *Mucispirillum* spp. was negatively correlated with high density lipoprotein in the third trimester. KEGG analysis found that gut microbiota with average gestational weight gain was significantly higher in 31 metabolic pathways including carbohydrate, lipid and amino acid metabolism than lower and higher gestational weight gain. **[Conclusion]** Gut microbiota may affect blood glucose and lipids level by affecting the metabolism and transport of nutrients, thereby affecting weight gain during pregnancy.

Keywords: gut microbiota, gestational weight gain, blood glucose and lipids, 16S rRNA gene sequencing

肠道菌群与宿主互相依存、互利共生, 在肠道壁细胞的能量代谢与营养吸收、机体免疫调节和体内健康平衡维持等生理过程中起重要作用^[1]。机体内外环境发生变化均可引起肠道菌群失调; 增加肠道通透性, 导致脂多糖和乳糜微粒吸收增多; 引起人体消化与吸收、免疫等系统疾病^[2-3]。研究发现肠道菌群变化与非孕期体重过度增加导致的肥胖密切相关, 而孕期体重增长异常与母胎代谢性疾病的发生密切相关^[4], 但是国内关于孕期肠道菌群变化是否参与孕期母胎增重与血糖血脂调控的研究较少。因此, 本研究通过高通量测序技术检测不同孕期增重水平的孕妇肠道菌群多样性、群落结构和丰度差异, 分析可能影响孕期增重、血糖血脂的肠道菌群, 通过 KEGG 富集分析增重不同孕妇肠道菌群代谢通路的差异, 以期调控孕期增重与预防高脂高糖血症提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

经由上海交通大学附属第六人民医院伦理委员会审核通过和受试对象知情同意后, 收集 2019 年

1–12 月计划于上海交通大学附属第六人民医院生产的孕妇孕晚期(36–40 周)粪便 34 例, 收集其一般临床资料、孕晚期血糖血脂数据。根据美国医学研究所(Institute of Medicine, IOM)标准^[5], 按照孕期增重(Gestational Weight Gain, GWG)将孕妇分为增重不足(LGWG 组, $N=7$)、增重正常(AGWG 组, $N=12$)和增重过度组(HGWG 组, $N=15$)。纳入标准: (1) 20–40 岁足月单胎孕妇; (2) 取样前 3 个月内没有使用过抗生素; (3) 无妊娠前已存在的血液病、内分泌疾病、慢性肾病、肝功能不全、慢性高血压疾病等; (4) 无妊娠期高血压疾病、妊娠期糖尿病、妊娠剧吐等可能影响食欲的疾病。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒, Qiagen 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒, TaKaRa 公司; 核酸纯化试剂盒, Beckman Coulter 公司; 所有引物由上海欧易生物医学科技有限公司合成。PCR 仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 微量分光光度计, Thermofisher 公司; MiSeq 测序仪器, Illumina 公司。

1.3 样品收集、DNA 提取和测序

经孕妇同意后用无菌采样管收集孕妇粪便,

样品置于 -80°C 冻存备用。用DNA抽提试剂盒对样本DNA进行提取,用微量分光光度计检测DNA浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。根据文献[6]选择引物,使用带Barcode的特异引物343F (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3')和798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3'),以样品菌群总DNA为模板,对细菌16S rRNA基因的V3-V4可变区进行PCR扩增。PCR反应体系(30 μL): 2 \times Gflex PCR缓冲液 15 μL , 引物343F和798R (5 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , Tks Gflex聚合酶(1.25 U/ μL) 0.6 μL , DNA模板 50 ng, 超纯水补足 30 μL 。PCR反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 20 s, 27个循环; 72°C 5 min。用2%琼脂糖凝胶电泳检测是否有条带及条带是否单一,用核酸纯化试剂盒和PCR产物回收试剂盒纯化并回收PCR产物。纯化定量后进行MiSeq文库构建和测序。

1.4 菌群多样性、群落结构和丰度分析

对相似度大于97%的序列划分为一个操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU),采用RDP Classifier算法对OTU代表序列进行分类学物种分析。分析丰度占比超过0.01%的不同组之间肠道菌群结构和丰富度差异,利用Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数代表 α 多样性,利用基于Weighted UniFrac距离的主坐标分析(Principal Co-Ordinates Analysis, PCoA)和非度量多维尺度分析(Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS)对 β 多样性进行分析。

1.5 孕期不同增重组肠道菌群基因功能预测分析

将各组粪便样本中经测序得到的OTU标准化,与京都基因及基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行对比,得到孕期不同增重组的肠道菌群功能丰度谱,然后进行差异分析得到有统计学意义的功能通路。

1.6 统计学方法

采用SPSS 23.0对数据进行统计分析,符合正

态性分布的计量资料以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,非正态性分布的计量资料和计数资料以中位数(M)、四分位数间距(P25-P75)表示。计量资料的正态性检验使用夏皮洛-威尔克检验(Shapiro-Wilk Test, S-W Test),符合正态分布的2组计量资料之间比较采用独立样本 t 检验,3组及以上计量资料的比较采用单因素方差分析。不符合正态分布的计量资料或计数资料2组之间的比较采用曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U Test),3组及以上的比较采用克鲁斯凯-沃里斯H检验(Kruskal-Wallis H Test)。将差异菌群与孕妇孕期增重、孕晚期体质指数(Body Mass Index, BMI)、孕妇血糖与血脂进行斯皮尔曼(Spearman)相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 资料参数正态性检验

通过对计量资料进行正态检验,符合正态分布的参数有孕期增重、新生儿体重、胎盘重量、孕晚期母血指标(血糖、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白),采用统计值 F 和 P 值显示统计分析结果;不符合正态分布的有孕妇年龄、初诊孕周、分娩孕周、孕前体重、孕前BMI、孕晚期体重、孕晚期BMI、孕晚期母血甘油三酯,采用统计值 H 和 P 值显示统计分析结果。孕次、产次、 α 多样性指数、 β 多样性指数、菌群丰度指数、KEGG丰度参数属于计数资料,使用统计值 H 和 P 值显示统计分析结果。正态检验结果见表1。

2.2 孕妇一般情况

孕妇平均年龄为33岁,孕2次,产1次,新生儿平均体重为 3462.21 ± 392.6 g,孕妇一般资料、孕晚期血糖血脂水平无显著统计学差异($P > 0.05$),增重过度组孕期增重、孕晚期体重较增重正常组和增重不足组明显增加,增重不足组较增重正常组孕期增重明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表 1 各统计学资料的正态性检验结果

Table 1 Results of normality test of various statistical data

Items	统计值 Statistics value	P 值 P value
年龄 Maternal age	0.923	0.036
初诊孕周 First visiting pregnant weeks	0.846	0.001
分娩孕周 Gestational age	0.880	0.003
孕前体重 Pre-pregnant weight	0.721	<0.001
孕前 BMI Pre-pregnant BMI	0.696	<0.001
孕晚期体重 Perinatal weight	0.684	<0.001
孕晚期 BMI Perinatal BMI	0.618	<0.001
孕期增重 GWG	0.989	0.985
新生儿体重 Birthweight	0.931	0.059
胎盘重量 Placental weight	0.940	0.100
孕晚期母血血糖 Maternal glucose	0.962	0.358
孕晚期母血总胆固醇 Maternal total cholesterol	0.986	0.954
孕晚期甘油三酯 Maternal triglycerides	0.865	0.002
孕晚期高密度脂蛋白 Maternal high density lipoprotein	0.956	0.257
孕晚期低密度脂蛋白 Maternal low density lipoprotein	0.964	0.419

注: S-W test: 夏皮洛-威尔克检验(Shapiro-Wilk test), 简称 SW 检验, 适用于小样本($N<50$)正态性检验; P value >0.05 , 代表资料满足正态分布, P value <0.05 , 资料不满足正态分布

Note: S-W test: Shapiro-Wilk test, applied to the normality test of small samples ($N<50$); If $P>0.05$, representative data meet normal distribution, $P<0.05$, data do not meet normal distribution

表 2 孕期增重不同组孕妇的一般资料与血糖血脂比较

Table 2 Characteristics of general and blood glucose and lipids comparison by gestational weight gain

参数 Items	增重不足组 LGWG ($N=7$)	增重正常组 AGWG ($N=12$)	增重过度组 HGWG ($N=15$)	统计值 F or H value	P 值 P value
年龄(岁) Age (years)	35.0 (30.0–36.0)	30.0 (27.5–34.0)	33.0 (28.0–36.0)	2.254	0.324
孕次 Parity	2 (1–4)	2 (1–3)	2 (1–3)	3.259	0.353
产次 Gestation	1 (0–1)	0.5 (0–1)	1 (0–1)	5.567	0.135
初诊孕周 First visiting pregnant weeks	12.3 (10.9–15.6)	11.6 (10.3–13.5)	12.7 (11.0–13.4)	1.096	0.578
分娩孕周 Gestational weeks (week)	39.1 (38.9–39.4)	39.7 (39.2–40.1)	39.7 (39.3–41.1)	4.230	0.121
孕前体重 Pre-pregnant weight (kg)	54.0 (49.6–67.0)	51.5 (45.5–59.9)	55.0 (51.0–70.0)	2.235	0.327
孕前 BMI Pre-pregnant BMI (kg/m^2)	21.2 (20.9–28.6)	19.4 (18.4–22.6)	22.0 (19.7–26.7)	4.122	0.127
孕晚期体重 Perinatal weight (kg)	63.0 (59.6–72.0)	65.0 (60.5–72.0)	77.0 (69.5–83.0)*#	10.456	0.005
孕晚期 BMI Perinatal BMI (kg/m^2)	25.5 (24.3–30.8)	24.9 (23.5–27.6)	30.1 (26.5–32.4)*#	8.832	0.012
孕期增重 GWG (kg)	8.1 \pm 1.9*#	13.6 \pm 2.1	18.5 \pm 3.5*#	34.523	<0.001
新生儿体重 Birthweight (g)	3 241.4 \pm 343.8	3 483.3 \pm 330.1	3 548.3 \pm 440.9	1.533	0.232
胎盘重量 Placental weight (g)	613.6 \pm 113.6	578.4 \pm 54.5	608.1 \pm 108.6	0.408	0.669
孕晚期母血指标 Maternal serum measures in third trimester					
血糖 Glucose (mmol/L)	4.38 \pm 0.42	4.46 \pm 0.36	4.46 \pm 0.30	0.128	0.881
甘油三酯 Triglycerides (mmol/L)	3.05 (2.70–3.48)	3.34 (2.89–4.60)	3.49 (3.12–4.17)	2.697	0.260
总胆固醇 Total cholesterol (mmol/L)	6.68 \pm 1.32	7.01 \pm 1.21	6.51 \pm 1.56	0.413	0.666
高密度脂蛋白 High density lipoprotein (mmol/L)	1.80 \pm 0.52	1.85 \pm 0.59	1.81 \pm 0.56	0.022	0.978
低密度脂蛋白 Low density lipoprotein (mmol/L)	3.95 \pm 1.04	3.94 \pm 1.15	3.53 \pm 1.44	0.406	0.670

注: *: 与 AGWG 相比有统计学差异; #: 与 LGWG 相比有统计学差异

Note: *: Statistical difference compared with AGWG; #: Statistical difference compared with AGWG

2.3 肠道菌群多样性分析

2.3.1 测序结果

通过对 34 例粪便样品测序后共得到 1 162 675 条原始序列，经质控处理后每个粪便样品的有效序列在 10 254–37 026 之间，每条序列的平均长度为 419 bp。通过 OTU 的聚类 and 物种注释，增重不足组、增重正常组和增重过度组分别得到 983、1 299 和 1 278 个 OTU。

2.3.2 多样性分析

增重不足组、增重正常组和增重过度组组间肠道菌群的 α 多样性与 β 多样性无明显统计学差异 ($P>0.05$)，在图 1 主坐标分析(PCoA)中，各圆点之

间没有明显区分开，提示不同组肠道菌群相对稳定，非度量多维尺度分析(NMDS)可得到相似结果(图 1)。增重正常组 Observed_Apecies 和 Chao1 指数均高于其余 2 组，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 3。

2.4 孕妇肠道优势菌群结构和丰度分析

门水平上，粪便样本优势肠道菌群以厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)为主，组间未见显著统计学差异($P>0.05$)；与增重正常组相比，增重不足组硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)和芽单

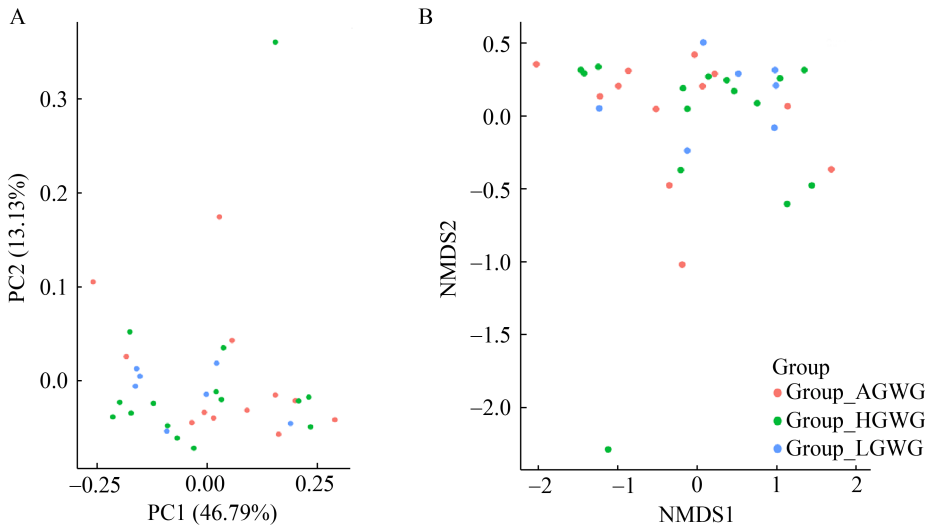


图 1 基于 Weighted UniFrac 距离算法的 PCoA 和 NMDS 分析
Figure 1 PCoA and NMDS analysis based on weighted UniFrac distance algorithm
注：A：主坐标分析(PCoA)；B：非度量多维尺度分析(NMDS)
Note: A: Principal co-ordinates analysis, PCoA; B: Nonmetric multidimensional scaling (NMDS)

表 3 孕期增重不同组粪便样本的 α 多样性指数比较

指数	增重不足组	增重正常组	增重过度组	统计值	P 值
Indexes	LGWG (N=7)	AGWG (N=12)	HGWG (N=15)	H value	P value
Goods coverage	0.99±0.01	0.98±0.01	0.99±0.01	2.711	0.258
Observed_species	279.57±130.87	348.38±121.32	287.80±126.61	1.794	0.408
Chao1 index	405.27±209.21	553.69±202.65	454.30±221.74	2.062	0.357
Shannon index	5.41±0.85	5.28±0.92	4.84±1.07	1.784	0.410
Simpson index	0.94±0.03	0.93±0.06	0.88±0.10	4.227	0.121

胞杆菌门(*Gemmatimonadetes*)占比明显降低, 增重过度组酸杆菌门(*Acidobacteria*)占比降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。属水平上, 在菌群占比 $>0.01\%$ 的微生物中共发现 14 种差异菌群; 与增重正常组相比, 增重过度组降低的菌群有扭链胃球菌属(*Ruminococcus_torques_group* spp.)、厌氧菌属(*Anaerostipes* spp.)、伊格尔兹氏菌属(*Eggerthella* spp.); 增重不足组升高的菌群有瘤胃球菌属 UCG-014 (*Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.)、丁酸单胞菌属(*Butyricimonas* spp.), 降低的菌群有克雷伯氏菌属(*Klebsiella* spp.)、粘液杆菌属(*Mucispirillum* spp.)、螺杆菌属(*Helicobacter* spp.)、假单胞菌属

(*Pseudomonas* spp.); 与增重不足组相比, 增重过度组毛螺菌属(*Lachnospira* spp.)、瘤胃球菌属 2 (*Ruminococcus_2* sp.)、*Klebsiella* spp.水平升高, 另支菌属(*Alistipes* spp.)、副拟杆菌属(*Parabacteroides* spp.)、*Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.、罕见小球菌属(*Subdoligranulum* spp.)水平降低(表 4)。

2.5 肠道菌群与血糖血脂的关系

将筛选出来的属差异水平微生物与孕期增重、孕晚期 BMI、孕妇血糖血脂进行相关性分析。发现 *Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.与孕晚期 BMI 呈负相关, $r=-0.360$, $P=0.037$; 同时与孕期增重呈负相关, $r=-0.423$, $P=0.013$ 。*Lachnospira*

表 4 不同孕期增重水平组间肠道菌群结构差异分析

Table 4 Analysis of the constitution of gut microbiota between groups from different gestational weight gain

菌群名称 Flora name	增重不足组 LGWG (%)	增重正常组 AGWG (%)	增重过度组 HGWG (%)	统计值 H value	P 值 P value
门分类水平 Phylum level					
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	42.50±15.69	51.63±21.02	46.21±20.00	1.626	0.444
拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	49.67±16.88	36.35±19.79	42.92±22.83	2.157	0.340
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	5.16±3.43	7.15±7.71	8.40±17.86	0.907	0.635
放线菌门 <i>Actinobacteria</i>	2.08±3.12	4.58±4.50	2.33±2.42*	2.315	0.314
硝化螺旋菌门 <i>Nitrospirae</i>	0.01±0.02*	0.07±0.05	0.04±0.04	6.128	0.047
脱铁杆菌门 <i>Deferribacteres</i>	0.00±0.00*	0.04±0.04	0.02±0.02	7.333	0.026
芽单胞杆菌门 <i>Gemmatimonadetes</i>	0.00±0.00*	0.03±0.03	0.02±0.02#	8.901	0.012
酸杆菌门 <i>Acidobacteria</i>	0.01±0.01	0.01±0.01	0.00±0.01*	7.234	0.027
属分类水平 Genus level					
毛螺菌属 <i>Lachnospira</i> spp.	0.38±0.62	2.87±4.91	3.56±6.16#	4.363	0.113
另支菌属 <i>Alistipes</i> spp.	4.07±2.51	2.07±2.81	1.94±2.31#	5.160	0.076
副拟杆菌属 <i>Parabacteroides</i> spp.	4.38±5.43	0.88±0.8	2.01±3.45#	4.723	0.094
瘤胃球菌属 UCG-014 <i>Ruminococcaceae</i> _UCG-014 sp.	3.91±5.10*	0.84±2.05#	0.84±1.59#	6.059	0.048
罕见小球菌属 <i>Subdoligranulum</i> spp.	1.17±0.60	1.30±0.98	0.74±0.83#	4.727	0.094
扭链胃球菌属 <i>Ruminococcus_torques_group</i> spp.	0.48±0.54	1.51±1.51	0.65±0.99*	5.322	0.070
厌氧菌属 <i>Anaerostipes</i> spp.	0.50±0.55	0.99±1.55	0.32±0.44*	4.352	0.113
瘤胃球菌属 2 <i>Ruminococcus_2</i> sp.	0.25±0.29	0.50±0.62	0.62±0.56#	4.087	0.130
克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i> spp.	0.01±0.02*	1.20±3.87#	0.13±0.20#	8.505	0.014
丁酸单胞菌属 <i>Butyricimonas</i> spp.	0.59±0.32*	0.36±0.76#	0.36±0.47	5.757	0.056
伊格尔兹氏菌属 <i>Eggerthella</i> spp.	0.07±0.12	0.09±0.14	0.01±0.03*	7.739	0.021
粘液杆菌属 <i>Mucispirillum</i> spp.	0.00±0.00*	0.04±0.04#	0.02±0.02	7.333	0.026
螺杆菌属 <i>Helicobacter</i> spp.	0.01±0.01*	0.04±0.05#	0.01±0.02	5.438	0.066
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> spp.	0.01±0.01*	0.02±0.02#	0.02±0.02	4.241	0.120

注: *: 与 AGWG 相比有统计学差异; #: 与 LGWG 相比有统计学差异

Note: *: Statistical difference compared with AGWG; #: Statistical difference compared with AGWG

spp. 与孕晚期血糖呈负相关, $r=-0.376$, $P=0.037$ 。*Alistipes* spp.与甘油三酯呈负相关, $r=-0.420$, $P=0.017$ 。*Ruminococcus_torques_group* spp.与甘油三酯呈负相关, $r=-0.482$, $P=0.005$ 。*Parabacteroides* spp.与孕晚期 HDL 成正相关, $r=0.374$, $P=0.035$; 同时与新生儿体重呈负相关, $r=-0.397$, $P=0.020$ 。然而 *Mucispirillum* spp.与 HDL 呈负相关, $r=-0.401$, $P=0.023$, 见图 2。

2.6 KEGG 功能富集分析

通过将增重不足、增重正常和增重过度组的 OTU 数量标准化并与 KEGG 数据库进行比对, 获得每个组的代谢通路功能丰度谱。在 Level 3 水平共富集到 293 条代谢通路, 各组粪便样本共有的前 50 个代谢相关差异信号通路见图 3, 统计分析结果见表 5。通过图 3 可以发现, 肠道微生物主要参与: (1) 多种物质的代谢途径, 包括维生素、辅助因子、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、蛋

氨酸、D-谷氨酰胺、D-谷氨酸、叶酸、烟酰胺、烟酸酯、硫胺素、碳水化合物、果糖、甘露糖、丙酮酸、戊糖、葡萄糖醛酸酯、半乳糖、淀粉、蔗糖、生物素、磷酸酯、次磷酸酯、丙酸酯、甘油磷脂、丁酸酯、甘油酯、脂质、泛酸、CoA、硫、氮、氨基苯甲酸酯、甲烷、肽聚糖、萜类骨架、维生素 B6、谷胱甘肽、无机离子、托烷、嘧啶、吡啶生物碱、硒、卟啉、叶绿素、玉米素、异喹啉生物碱、牛磺酸、次牛磺酸和苯甲酸酯; (2) 能量与信号通路代谢, 包括柠檬酸循环、糖酵解、糖异生、能量代谢、过氧化物体、蛋白酶体、磷脂酰肌醇信号系统、PPAR 信号通路和 NOD 样受体信号通路; (3) 蛋白质输出和细菌分泌系统。表明肠道微生物的主要功能是参与物质代谢与能量转移。此外, 通过表 5 组间比较发现, 增重异常, 包括增重不足和增重过度, 肠道微生物的代谢功能主要与营养物质代谢如氨基酸、碳水化合物和脂质等功能降低有关, 其次, 细菌分泌及输出能量物质的能力也有所下降。

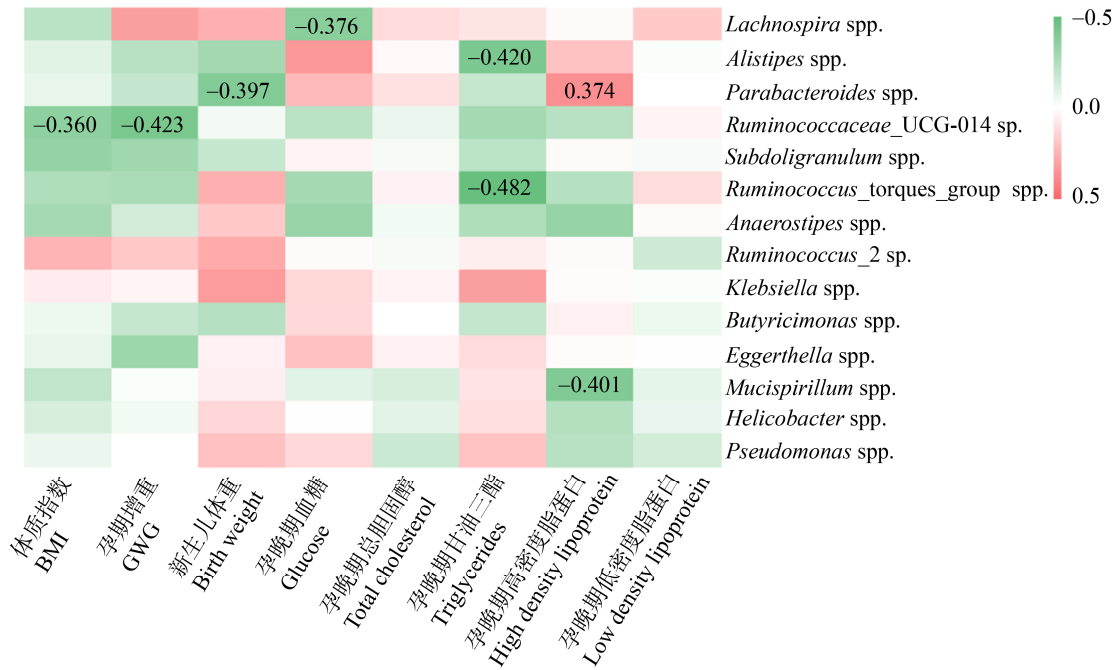


图 2 孕期增重、新生儿体重、孕晚期 BMI 和血糖血脂水平与差异肠道菌群的相关性分析
Figure 2 Correlation analysis of GWG, birth weight, maternal BMI, blood glucose and lipids level in late pregnancy with differential gut microbiota

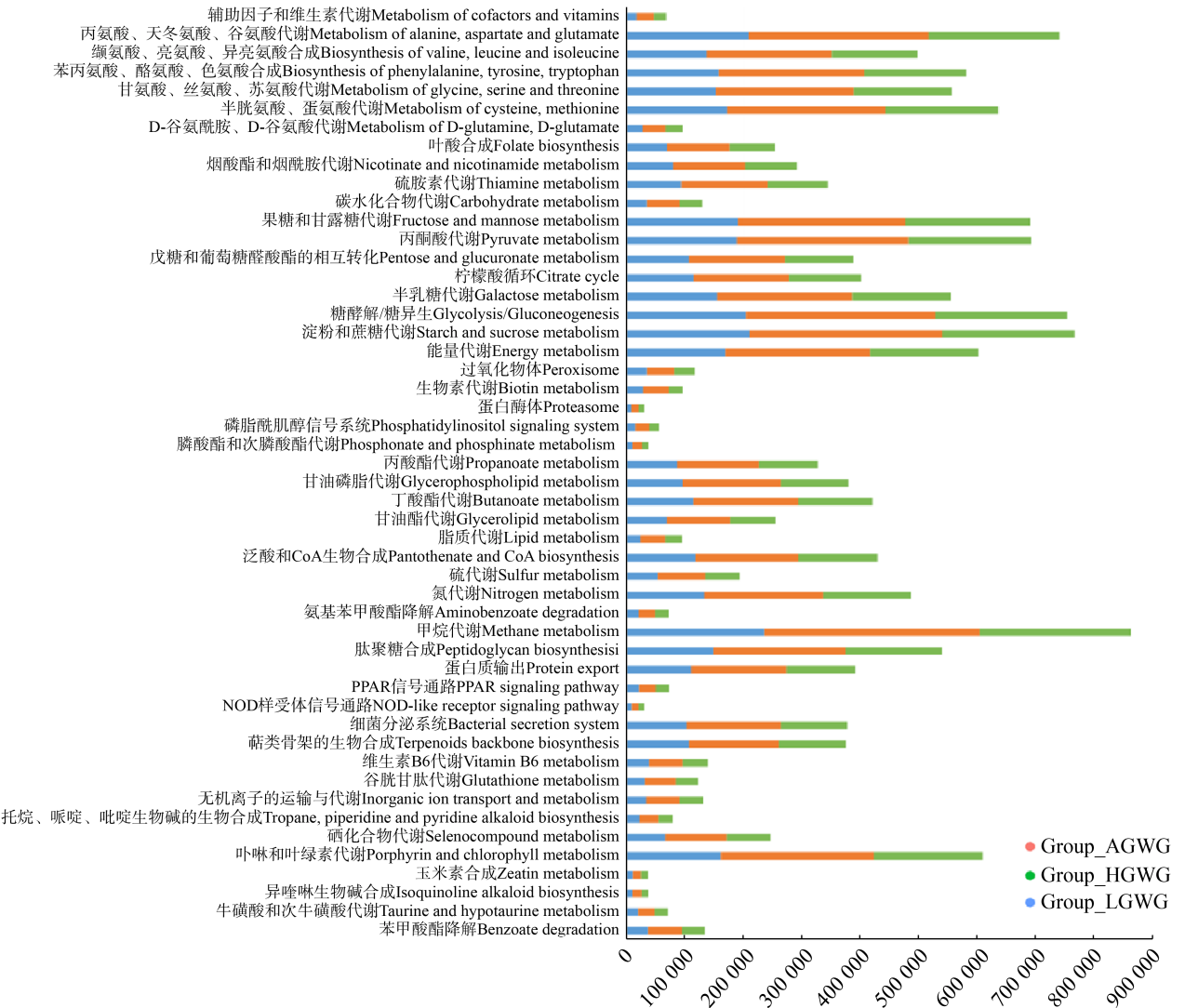


图 3 不同孕期增重组粪便样本前 50 差异代谢信号通路
Figure 3 Top 50 differential matabolic signal pathways of fecal samples from different gestational weight gain

表 5 不同孕期增重组组间差异信号通路比较分析
Table 5 Comparative analysis of differential metabolic pathways between groups in different gestational weight gain

代谢通路名称	相对丰度			统计值	P 值
Metabolic pathway items	The relative abundance of co-pathways			H value	P value
	LGWG	AGWG	HGWG		
辅助因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	17 117	29 946	20 991	6.788	0.033
丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢 Metabolism of alanine, aspartate and glutamate	209 018	308 405	224 227	8.485	0.014
缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸合成 Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine	137 640	214 638	147 821	8.485	0.014
苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸合成 Biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan	158 056	249 454	174 403	8.142	0.017
甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢 Metabolism of glycine, serine and threonine	153 258	235 780	168 453	7.351	0.025
(待续)					

(待续)

(续表 5)

半胱氨酸、蛋氨酸代谢 Metabolism of cysteine, methionine	172 489	271 257	193 953	7.293	0.026
D-谷氨酰胺、D-谷氨酸代谢 Metabolism of D-glutamine, D-glutamate	27 288	39 603	29 854	7.293	0.026
叶酸合成 Folate biosynthesis	69 472	107 499	77 692	7.789	0.020
烟酸酯、烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	79 934	123 838	88 870	7.523	0.023
硫胺素代谢 Thiamine metabolism	93 731	147 736	103 658	8.378	0.015
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	34 739	56 728	37 939	6.798	0.033
果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	190 528	287 290	213 994	6.846	0.033
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	189 521	293 851	210 167	8.489	0.014
戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化 Pentose and glucuronate metabolism	107 396	164 562	116 763	8.417	0.015
柠檬酸循环 Citrate cycle	114 907	163 497	124 287	8.175	0.017
半乳糖代谢 Galactose metabolism	155 412	231 758	168 750	8.142	0.017
糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	205 103	324 097	225 877	7.643	0.022
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	210 642	331 416	225 581	7.586	0.023
能量代谢 Energy metabolism	170 087	247 076	185 466	6.472	0.039
过氧化物体 Peroxisome	34 857	47 409	35 160	10.760	0.005
生物素代谢 Biotin metabolism	28 510	44 268	30 634	10.027	0.007
蛋白酶体 Proteasome	8 499	12 820	9 515	7.523	0.023
磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	15 666	23 906	16 388	13.275	0.001
磷酸酯和次磷酸酯代谢 Phosphonate and phosphinate metabolism	10 123	16 246	11 022	11.769	0.003
丙酸酯代谢 Propanoate metabolism	86 280	140 437	101 136	7.953	0.019
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	101 411	163 743	114 669	7.591	0.022
丁酸酯代谢 Butanoate metabolism	114 575	179 383	127 729	6.956	0.031
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	68 668	109 421	77 860	6.380	0.041
脂质代谢 Lipid metabolism	23 969	42 847	27 791	6.317	0.042
泛酸和 CoA 生物合成 Pantothenate and CoA biosynthesis	118 439	181 366	130 334	7.239	0.027
硫代谢 Sulfur metabolism	53 387	82 129	58 558	8.241	0.016
氮代谢 Nitrogen metabolism	133 575	203 384	150 669	7.969	0.019
氨基苯甲酸酯降解 Aminobenzoate degradation	21 214	28 385	22 741	8.142	0.017
甲烷代谢 Methane metabolism	236 107	369 147	258 789	8.057	0.018
肽聚糖合成 Peptidoglycan biosynthesis	148 838	226 733	165 558	7.867	0.019
蛋白质输出 Protein export	111 169	163 030	117 730	7.835	0.020
PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	21 820	28 783	22 313	7.398	0.025
NOD 样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	8 702	12 319	9 566	6.008	0.049
细菌分泌系统 Bacterial secretion system	102 738	162 449	113 471	7.351	0.025
萜类骨架的生物合成 Terpenoids backbone biosynthesis	107 165	153 877	115 213	7.321	0.026
维生素 B6 代谢 Vitamin B6 metabolism	38 856	56 722	43 361	7.164	0.028
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	31 401	53 116	37 841	7.015	0.030
无机离子的运输与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	33 179	57 847	40 353	6.991	0.030
托烷、哌啶、吡啶生物碱的生物合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	22 396	32 624	23 936	6.956	0.031
硒化合物代谢 Selenocompound metabolism	66 725	104 961	75 206	6.679	0.035
卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	162 288	261 070	187 544	6.537	0.038
玉米素合成 Zeatin metabolism	10 708	14 445	11 294	6.337	0.042
异喹啉生物碱合成 Isoquinoline alkaloid biosynthesis	10 258	15 311	11 454	6.197	0.045
牛磺酸和次牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	19 973	28 693	21 857	6.165	0.046
苯甲酸酯降解 Benzoate degradation	36 794	57 364	40 336	6.094	0.048

3 讨论与结论

随着生活方式的改变, 全球营养过剩和肥胖已成为威胁人类健康的重要问题, 孕妇肥胖及孕期增重对妊娠相关并发症具有重要影响, 超重和肥胖孕妇妊娠代谢性并发症、心血管并发症、巨大儿与新生儿窒息等风险增加^[7-8]。孕期营养摄入与母婴增重关系密切, 而肠道菌群是影响肠道营养摄入的关键因素。有研究表明肠道菌群改变可能与肥胖的发生发展有关^[9]。本研究结果中孕妇肠道优势菌群 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 占比大于 99%, 这与以往研究^[10]一致。然而 α 多样性和 β 多样性组间未见明显区别, DiGulio 等^[11-12]对孕妇肠道菌群的分析发现妊娠期 β 多样性没有显著变化, α 多样性仅有轻微的边缘性变化, 这可能与采样频率方法、测序区域和研究对象有关。研究表明厚壁菌门/拟杆菌门的比值与 BMI 密切相关, 高脂饮食人群中厚壁菌门/拟杆菌门比值显著增加^[13]。然而本研究中增重正常组该比例最高, 这可能与产检过程中孕期增重过度孕妇的饮食干预(如嘱孕妇少食多餐、多食纤维素含量多的食物、降低饮食进补的观念、养成健康的饮食习惯意识)有关, 而忽略了对孕期增重不足和增重正常孕妇的饮食教育。因此, 孕期饮食控制适用于所有孕期增重不同孕妇, 控制饮食能在一定程度上缓解孕期增重对肠道菌群结构的影响。

在菌群门分类水平, 与正常增重孕妇相比, 孕期增重不足孕妇肠道中 *Nitrospirae*、*Deferribacteres* 和 *Gemmatimonadetes* 的丰富度降低, 增重过度孕妇肠道中 *Acidobacteria* 丰富度降低。有研究表明过度暴露于 $PM_{2.5}$ 可引起 *Acidobacteria*、*Deferribacteres* 和 *Gemmatimonadetes* 降低^[14]。本研究中增重不足或增重过度也会导致这 3 种细菌降低, 提示这几种细菌可能对外环境变化如饮食、体重和空气等较为敏感, 可作为肠道健康状况的指示菌群。*Nitrospirae* 是自然环境

中的一种具有净化作用的菌群, 能将亚硝酸盐氧化成硝酸盐, 降低亚硝酸盐含量^[15]。*Deferribacteres* 是一种严格的嗜热厌氧菌, 在系统发育上与 *Nitrospirae* 非常接近, 这是因为 *Deferribacteres* 和 *Nitrospirae* 的同源祖先中基因转移非常普遍^[16]。*Deferribacteres* 能利用 Fe^{3+} 、 Mn^{4+} 、硫、硝酸盐等作为电子受体进行能量代谢^[17]。此外, 其还可调节 $CD103^{+}$ 树突状细胞, 增强调节性 T 细胞活性, 抑制食物过敏引起的免疫反应^[18]。有研究发现小鼠饮食中添加蓝莓多酚提取物能增加 *Deferribacteres* 和 *Proteobacteria* 水平, 降低 *Actinobacteria* 水平, 从而调控脂代谢紊乱, 减轻肥胖^[19]。也有研究发现高脂饮食引起的肥胖小鼠粪便中, *Deferribacteres* 和 *Mucispirillum* spp. 丰度增加^[20]。*Gemmatimonadetes* 和 *Acidobacteria* 是近年来发现的一类光源性细菌。*Gemmatimonadetes* 广泛存在于自然界, 能水解纤维素和半纤维素^[21]。然而 *Gemmatimonadetes* 和 *Nitrospirae* 与人体体重的关系未见报道。*Acidobacteria* 能利用不同碳源和氮源物质等作为能量来源, 对环境中酸碱度 pH 值变化敏感, 当 pH 低于 5.5 时活性降低; 正常人群肠道 pH 偏中性, 大量摄入肉类物质后 pH 升高^[22]。有研究发现在高脂饮食所致肥胖小鼠肠道菌群中 *Acidobacteria* 占比下降^[23]。本文中增重过度孕妇肠道中 *Acidobacteria* 占比也有所下降。这可能是增重过度孕妇肠道 pH 和饮食改变影响了 *Acidobacteria* 活性^[22]。

本研究在属水平上发现 14 种差异菌属, 包括 *Lachnospira* spp.、*Alistipes* spp.、*Parabacteroides* spp.、*Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.、*Subdoligranulum* spp.、*Ruminococcus*_torques_group spp.、*Anaerostipes* spp.、*Ruminococcus*_2 sp.、*Klebsiella* spp.、*Butyricimonas* spp.、*Eggerthella* spp.、*Mucispirillum* spp.、*Helicobacter* spp. 和 *Pseudomonas* spp.。其中, *Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.、*Lachnospira* spp.、*Ruminococcus*_

torques_group spp.、*Anaerostipes* spp.、*Ruminococcus_2* sp.和*Subdoligranulum* spp.属于厚壁菌门，*Alistipes* spp.、*Parabacteroides* spp.和*Butyricimonas* spp.属于拟杆菌门，*Mucispirillum* spp.属于脱铁杆菌门，*Eggerthella* spp.属于放线菌门，*Klebsiella* spp.和*Pseudomonas* spp.属于变形菌门，*Helicobacter* spp.属于大肠杆菌门，差异菌属主要集中在厚壁菌门和拟杆菌门。

本研究通过对差异菌属与孕妇血糖血脂作相关性分析，发现孕妇 BMI 和孕期增重与 *Ruminococcaceae_UCG-014* sp. 呈负相关。*Ruminococcaceae_UCG-014* sp.在消瘦人群中占比升高，这与以往研究^[24]一致。*Ruminococcaceae_UCG-014* sp.是一种可以降解纤维素产生丁酸盐的益生菌，丁酸盐作为短链脂肪酸的一种，是结肠细胞的重要能量来源；短链脂肪酸可通过不同的机制影响能量吸收，例如通过促进肽 YY 分泌，抑制下丘脑弓状核中的神经肽 Y 和激活前阿黑皮素原(POMC)神经元来影响食欲和饱腹感，延迟胃排空，增加肌肉对能量的消耗等控制体重增长^[25]。本研究发现孕晚期血糖与 *Lachnospira* spp.呈负相关，*Lachnospira* spp.在增重过度组中丰度最高，这与以往研究^[10]一致。*Lachnospira* spp.能产生短链脂肪酸和抗炎物质，刺激肠道吸收能量物质，调控血糖水平，缓解代谢性疾病的发展^[26]，其可能作为一种益生菌在调节糖脂紊乱、抵抗肥胖中具有重要作用。

本研究中甘油三酯与 *Ruminococcus_torques_group* spp. 和 *Alistipes* spp. 呈负相关。*Ruminococcus_torques_group* spp.和 *Alistipes* spp.可通过发酵产生短链脂肪酸，短链脂肪酸通过 FFAR2 受体信号转导抑制胰岛素刺激引起的脂质积累，调节血脂水平^[27]。另外本研究中发现高密度脂蛋白与 *Parabacteroides* spp.呈正相关，与 *Mucispirillum* spp.呈负相关，同时 *Parabacteroides* spp.与新生儿体重呈负相关。有研究发现 *Eggerthella* spp.和 *Parabacteroides* spp.与新生儿头

围和体重呈负相关^[28]。本研究中 *Parabacteroides* spp.与母血孕晚期高密度脂蛋白呈正相关。高密度脂蛋白的代谢过程可以看作是胆固醇的逆向转运，高密度脂蛋白可将血液中的胆固醇转运至肝脏，通过转化为胆汁酸排出，与心血管疾病呈负相关，有抗炎调节胆固醇的作用。胆固醇通过胎盘转运，是新生儿宫内正常发育的重要能量物质之一。*Parabacteroides* spp.可通过调节高密度脂蛋白的浓度进而影响新生儿发育。*Mucispirillum* spp.与血清瘦素、体重增加及脂质储备呈正相关^[28]。摄入肉类食物可显著增加 *Mucispirillum* spp.和 *Oscillibacter* 的丰富度与脂肪合成；在肥胖人群中 *Mucispirillum* spp.占比升高，在增重不足组中占比下降^[29]。这与本研究一致。*Subdoligranulum* spp.和 *Anaerostipes* spp.同属厚壁菌门，它们可帮助宿主降解碳水化合物，从而产生短链脂肪酸，而短链脂肪酸通常被认为对维持人类健康具有重要作用，例如作为肠上皮的特殊营养和能量成分，保护肠粘膜屏障，减少炎症和增强胃肠蠕动。本研究中 *Subdoligranulum* spp.和 *Anaerostipes* spp.丰度在增重正常组中最高，在增重不足和增重过度组中均有所下降。Kim 等^[30]发现 *Subdoligranulum* spp.与腰围、体重、BMI 成正相关。然而在 Jia 等^[31]的研究中，*Subdoligranulum* spp.与 BMI 有负相关趋势，而且长期的地中海饮食能提高肠道中 *Subdoligranulum* spp.的水平。Vazquez-Moreno 等^[32]研究发现 *Anaerostipes* spp.的相对丰度与 2 型糖尿病的风险适度降低有关。Rodriguez 等^[33]发现 BMI 降低增加了阿克曼氏菌(*Akkermansia*)和丁酸球菌(*Butyricicoccus*)的含量，降低了 *Anaerostipes* spp.的水平。*Ruminococcus_2* sp.属于厚壁菌门瘤胃球菌科，本研究中增重过度组含量最高，然而其生物学特性可能与该科其他物种不同，饮食中添加抗性淀粉并不能增加 *Ruminococcus_2* sp.含量^[34]，其具体机制及与人体 BMI 的关系有待进一步研究。*Butyricimonas* spp.属于拟杆菌门，在本研究中其与甘油三酯具有负相关

调控作用, 这与以往研究^[35]一致。*Butyricimonas* spp. 可将碳水化合物转化为丁酸和异丁酸, 从而对调控血脂控制体重具有积极作用^[35]。*Helicobacter* spp. 属于大肠杆菌门, 本研究中 *Helicobacter* spp. 与孕妇 BMI 和孕期增重具有负相关趋势。以往研究发现 *Helicobacter* spp. 对孕期增重和新生儿出生体重具有负面影响, 这可能与 CagA 阳性菌株引起的胃部炎症有关, 从而引起妊娠恶心和怀孕初期呕吐^[36]。*Klebsiella* spp. 和 *Pseudomonas* spp. 同属变形菌门中的致病菌, 它们均与甘油三酯成正相关趋势, 在孕妇粪便中检出可能与医源性感染有关。

关于增重不同孕妇肠道菌群的富集分析鲜有报道, 我们通过 KEGG 富集分析发现, 孕期增重不足或过度的孕妇肠道菌群在营养物质如碳水化合物、氨基酸、核酸、脂质代谢, 以及细胞信号转导、能量生产、基因复制与修复和细胞壁/膜/包膜生物发生等代谢通路中显著降低。说明孕期增重过度或不足可能会影响肠道微生物稳态, 某些肠道菌群丰度减少降低了利用碳源、氮源等不同来源有机质的能力, 能量转换和交换的能力下降, 影响营养物质的代谢与吸收, 进而调控血糖血脂水平^[10,28]。一项与孕妇 BMI 有关的代谢通路研究发现, 肥胖孕妇次生代谢物的生物合成通路富集增多, 但此通路内的次级通路和孕妇 BMI 却没有任何显著的统计学关联^[37]。然而孕期增重相关的代谢通路改变有待进一步分析。

综上, 本研究发现差异菌群与孕期增重、孕妇 BMI 和血糖血脂水平存在一定的相关性, 后续有待进一步通过体外菌群移植实验验证差异菌群对血糖血脂的作用, 为孕期补充有益菌调节孕期增重和血糖血脂水平、改善孕妇不良妊娠提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Lappan R, Classon C, Kumar S, Singh OP, De Almeida RV, Chakravarty J, Kumari P, Kansal S, Sundar S, Blackwell JM. Meta-taxonomic analysis of prokaryotic and eukaryotic gut flora in stool samples from visceral leishmaniasis cases and endemic controls in Bihar State India[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2019, 13(9): e0007444
- [2] Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. BMJ, 2018, 361: k2179
- [3] Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system[J]. Nature Reviews Immunology, 2017, 17(4): 219-232
- [4] Gérard P. Gut microbiota and obesity[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(1): 147-162
- [5] Rasmussen KM, Yaktine AL. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines[M]. Washington DC: The National Academies Press, 2009: 160
- [6] Nossa CW, Oberdorf WE, Yang LY, Aas JA, Paster BJ, DeSantis TZ, Brodie EL, Malamud D, Poles MA, Pei ZH. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome[J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16(33): 4135-4144
- [7] Goldstein RF, Abell SK, Ranasinha S, Misso M, Boyle JA, Black MH, Li N, Hu G, Corrado F, Rode L, et al. Association of gestational weight gain with maternal and infant outcomes: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA, 2017, 317(21): 2207-2225
- [8] Jiang X, Bian Z, Yuan L, Wang WL, Ying H. Influence of preconception over-weight and obesity on gestational weight gain and pregnancy related prognosis[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2019, 46(3): 301-304 (in Chinese)
蒋湘, 卞政, 袁玲, 王伟琳, 应豪. 孕前超重及肥胖对孕期体质量控制及妊娠结局的影响[J]. 国际妇产科学杂志, 2019, 46(3): 301-304
- [9] Gohir W, Ratcliffe EM, Sloboda DM. Of the bugs that shape us: maternal obesity, the gut microbiome, and long-term disease risk[J]. Pediatric Research, 2015, 77(1/2): 196-204
- [10] Stanislawski MA, Dabelea D, Wagner BD, Sontag MK, Lozupone CA, Eggesbø M. Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 113
- [11] DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, Sun CL, Goltsman DSA, Wong RJ, Shaw G, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(35): 11060-11065
- [12] Bisanz JE, Enos MK, PrayGod G, Seney S, Macklaim JM, Chilton S, Willner D, Knight R, Fusch C, Fusch G, et al. Microbiota at multiple body sites during pregnancy in a rural Tanzanian population and effects of *Moringa*-supplemented probiotic yogurt[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 4965-4975
- [13] Liu YY, Li T, Alim A, Ren DY, Zhao Y, Yang XB. Regulatory effects of stachyose on colonic and hepatic inflammation, gut microbiota dysbiosis, and peripheral CD4⁺ T cell distribution abnormality in high-fat diet-fed mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019,

- 67(42): 11665-11674
- [14] Liu W, Zhou YL, Yong L, Qin Y, Yu LL, Li RJ, Chen YH, Xu YJ. Effects of PM_{2.5} exposure during gestation on maternal gut microbiota and pregnancy outcomes[J]. *Chemosphere*, 2020, 247: 125879
 - [15] Crowe W, Elliott CT, Green BD. A review of the *in vivo* evidence investigating the role of nitrite exposure from processed meat consumption in the development of colorectal cancer[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2673
 - [16] Kunisawa T. Inference of the phylogenetic position of the phylum *Deferribacteres* from gene order comparison[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 99(2): 417-422
 - [17] Gittel A, Kofoed MVW, Sørensen KB, Ingvorsen K, Schramm A. Succession of *Deferribacteres* and *Epsilonproteobacteria* through a nitrate-treated high-temperature oil production facility[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(3): 165-174
 - [18] Ma JY, Zhang J, Li QH, Shi ZL, Wu HJ, Zhang HQ, Tang LP, Yi R, Su H, Sun X. Oral administration of a mixture of probiotics protects against food allergy via induction of CD103⁺ dendritic cells and modulates the intestinal microbiota[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 55: 65-75
 - [19] Jiao XY, Wang YH, Lin Y, Lang YX, Li EH, Zhang XY, Zhang Q, Feng Y, Meng XJ, Li B. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2019, 64: 88-100
 - [20] Walker A, Pfitzner B, Neschen S, Kahle M, Harir M, Lucio M, Moritz F, Tziotis D, Witting M, Rothballer M, et al. Distinct signatures of host-microbial meta-metabolome and gut microbiome in two C57BL/6 strains under high-fat diet[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2380-2396
 - [21] Halkjaer SI, Nilas L, Carlsen EM, Cortes D, Halldórsson TI, Olsen SF, Pedersen AE, Krogfelt KA, Petersen AM. Effects of probiotics (Vivomixx®) in obese pregnant women and their newborn: study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2016, 17(1): 491
 - [22] Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, Van Veen JA, Kuramae EE. The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 744
 - [23] Si YC, Miao WN, He JY, Chen L, Wang YL, Ding WJ. Regulating gut flora dysbiosis in obese mice by electroacupuncture[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2018, 46(7): 1481-1497
 - [24] Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Cocconi D, Van Sinderen D, Ventura M. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(12): fix153
 - [25] Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11(10): 577-591
 - [26] Gutiérrez-Repiso C, Hernández-García C, García-Almeida JM, Bellido D, Martín-Núñez GM, Sánchez-Alcoholado L, Alcaide-Torres J, Sajoux I, Tinahones FJ, Moreno-Indias I. Effect of synbiotic supplementation in a very-low-calorie ketogenic diet on weight loss achievement and gut microbiota: a randomized controlled pilot study[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(19): 1900167
 - [27] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, 7(3): 189-200
 - [28] Lee J, Jang JY, Kwon MS, Lim SK, Kim N, Lee J, Park HK, Yun MS, Shin MY, Jo HE, et al. Mixture of two *Lactobacillus plantarum* strains modulates the gut microbiota structure and regulatory T cell response in diet-induced obese mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(24): 1800329
 - [29] Ahmad MI, Ijaz MU, Haq IU, Li CB. The role of meat protein in generation of oxidative stress and pathophysiology of metabolic syndromes[J]. *Food Science of Animal Resources*, 2020, 40(1): 1-10
 - [30] Kim BS, Song MY, Kim H. The anti-obesity effect of *Ephedra sinica* through modulation of gut microbiota in obese Korean women[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 152(3): 532-539
 - [31] Jia WR, Zhen JH, Liu AJ, Yuan JY, Wu XL, Zhao PF, Zhao L, Li XL, Liu QG, Huang GR, et al. Long-term vegan meditation improved human gut microbiota[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 9517897
 - [32] Vazquez-Moreno M, Perez-Herrera A, Locia-Morales D, Dizzel S, Meyre D, Stearns JC, Cruz M. Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children[J]. *Pediatric Obesity*, 2020: e12748
 - [33] Rodriguez J, Hiel S, Neyrinck AM, Le Roy T, Pötgens SA, Leyrolle Q, Pachikian BD, Gianfrancesco MA, Cani PD, Paquot N, et al. Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients[J]. *Gut Microbiota*, 2020, 69(11): 1975-1987
 - [34] Vital M, Howe A, Bergeron N, Krauss RM, Jansson JK, Tiedje JM. Metagenomic insights into the degradation of resistant starch by human gut microbiota[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01562-18
 - [35] Pan YY, Zeng F, Guo WL, Li TT, Jia RB, Huang ZR, Lv XC, Zhang JC, Liu B. Effect of *Grifola frondosa* 95% ethanol extract on lipid metabolism and gut microbiota composition in high-fat diet-fed rats[J]. *Food & Function*, 2018, 9(12): 6268-6278
 - [36] Grooten IJ, Den Hollander WJ, Roseboom TJ, Kuipers EJ, Jaddoe VW, Gaillard R, Painter RC. *Helicobacter pylori* infection: a predictor of vomiting severity in pregnancy and adverse birth outcome[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2017, 216(5): 512.e1-512.e9
 - [37] LeMay-Nedjelski L, Butcher J, Ley SH, Asbury MR, Hanley AJ, Kiss A, Unger S, Copeland JK, Wang PW, Zinman B, et al. Examining the relationship between maternal body size, gestational glucose tolerance status, mode of delivery and ethnicity on human milk microbiota at three months post-partum[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 219