

早产小鼠经灌肠粪菌移植后肠道菌群定植与粘膜屏障功能的相关性分析

金华翠 何月贤^(通讯作者) 刘荣姣 陈志勇 侯欢 宋文秀 朱丽君

遵义医科大学第五附属(珠海)医院, 广东珠海, 519100;

摘要: 目的: 探讨经灌肠粪菌移植对早产小鼠肠道菌群定植及粘膜屏障功能的影响。方法: 建立剖宫产早产小鼠模型, 随机分为粪菌移植组、口服益生菌组和足月对照组。动态监测并比较各组肠道菌群组成、肠道组织病理、紧密连接蛋白表达及免疫指标。结果: 与口服益生菌组相比, 经灌肠 FMT 能更有效地促进早产小鼠肠道菌群多样性的恢复 ($P<0.05$), 显著增加有益菌(如乳杆菌属、双歧杆菌属)的相对丰度, 并降低潜在致病菌(如肠杆菌科)的比例 ($P<0.05$)。在肠道屏障功能方面, FMT 组小鼠肠道绒毛结构更完整, 炎症浸润更轻; 紧密连接结构清晰完整; Claudin-1 与 Mucin-2 蛋白表达水平在干预中后期(第 14、21、28 天)显著上调 ($P<0.01$); 粪便 SIgA 水平亦随时间显著升高 ($P<0.05$)。相关性分析显示, 肠道菌群多样性指数与 Claudin-1 蛋白表达、SIgA 水平呈显著正相关 ($r=0.742, 0.698, P<0.01$), 而与肠道组织炎症评分呈负相关 ($r=-0.715, P<0.01$)。结论: 经灌肠途径实施的粪菌移植能有效重建早产小鼠紊乱的肠道菌群, 促进有益菌定植, 并通过调节紧密连接蛋白表达及局部免疫反应, 显著增强肠道粘膜屏障功能。本研究为 FMT 作为一种潜在的、针对喂养不耐受早产儿的肠道微生态干预策略提供了重要的临床前实验依据。

关键词: 粪菌移植; 早产小鼠; 肠道菌群; 粘膜屏障; 紧密连接蛋白; 分泌型免疫球蛋白 A

DOI: 10.64216/3104-9656.25.03.001

引言

在全球范围内, 早产(胎龄 <37 周)是新生儿死亡和远期发育障碍的主要原因之一^[1]。早产儿因各器官系统, 尤其是消化系统发育不成熟, 常并发喂养不耐受及坏死性小肠结肠炎(NEC), 严重威胁生命^[2]。肠道菌群在生命早期迅速定植, 对免疫成熟和屏障功能建立至关重要^[3]。然而, 早产儿因剖宫产、延迟喂养、抗生素暴露等因素, 普遍存在肠道菌群失调——表现为多样性降低、有益菌定植不足及潜在致病菌过度增殖, 显著增加 NEC 等疾病风险^[4]。

肠道粘膜屏障由机械、化学、免疫及生物屏障共同构成。其中, 紧密连接蛋白(如 Claudin-1)构成的机械屏障及分泌型免疫球蛋白 A (SIgA) 介导的免疫屏障尤为重要^[5]。肠道菌群通过其代谢产物(如短链脂肪酸)参与调节这些屏障组分的表达与功能^[6]。目前, 口服益生菌是常用干预手段, 但对存在喂养不耐受的早产儿适用性受限^[7]。

粪菌移植(FMT)通过整体移植健康菌群, 在成人肠道疾病治疗中效果显著^[8]。灌肠途径可绕过上消化道, 直达结肠, 理论上适用于无法经口喂养的早产儿, 但其在早产群体中的安全性与有效性尚缺乏系统研究^[9]。为

此, 本研究建立早产小鼠模型, 对比灌肠 FMT 与口服益生菌对肠道菌群定植及粘膜屏障功能的影响, 以期临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与模型

选用清洁级 C57BL/6 小鼠(雌 120 只, 雄 30 只), 购自珠海市金海浩生物科技有限公司(许可证号: SCXK(粤)2020-00051), 雌雄 4: 1 合笼, 检见阴栓计为妊娠第 0 天。孕鼠单笼饲养于标准环境。本研究经本单位伦理委员会快速审查通过(审查结论: 符合伦理要求, 同意开展), 遵循 3R 原则。

1.2 分组与干预

孕 18 天起腹腔注射米非司酮 (0.15mg/kg) 连续 2 天诱导早产, 孕 19-20 天剖宫产取仔设为早产模型; 另设足月顺产仔鼠为对照。将 80 只早产仔鼠随机分为粪菌移植组(FMT 组)和口服益生菌组(Probiotics 组), 各 40 只; 设足月仔鼠 40 只为对照组(Control 组)。所有仔鼠由代乳母鼠哺乳。

1.3 菌液制备与给药

采集健康成年小鼠粪便，按 1: 5 (W/V) 加 PBS 匀浆过滤，离心后重悬于 10% 甘油 PBS，-80℃ 保存。FMT 组于剖宫产术中经肛门灌入菌液 120 μL，术后每日灌肠 1 次连续 7 天；Probiotics 组每日灌胃益生菌混悬液（含 1×10⁷ CFU）连续 7 天；对照组不予干预。

1.4 样本采集

分别于干预后第 1、7、14、21、28 天每组取 8 只仔鼠，采集肛拭子、粪便及肠道组织（空肠、回肠、结肠），分装用于后续检测。

1.5 检测方法

HE 染色观察肠道病理并进行损伤评分；透射电镜观察紧密连接超微结构；Western Blot 检测 Claudin-1 和 Mucin-2 蛋白表达；ELISA 检测粪便 SIgA 水平；选择性培养和 16S rDNA 测序分析肠道菌群。

1.6 统计学分析

所有实验数据均以均数±标准差 (x±s) 表示。采

表 1 各组小鼠体重变化 (g, x±s)

组别	存活率 (%)	D1 体重(g)	D7 体重(g)	D14 体重(g)	D21 体重(g)
Control 组	95.00%	1.52±0.11	5.32±0.28	8.15±0.34	12.23±0.41
Probiotics 组	92.50%	1.48±0.13	4.97±0.31	7.41±0.38*	10.89±0.45*
FMT 组	95.00%	1.50±0.12	5.08±0.29	7.94±0.35#	11.87±0.42#

与 Control 组比较，*P<0.05；与 Probiotics 组比较，#P<0.05

2.2 肠道菌群组成变化

2.2.1 菌群 α 多样性

在 D1 时，三组菌群多样性均较低。随着时间推移，Control 组多样性迅速增加并保持稳定。FMT 组从 D7

表 2 各组小鼠肠道菌群 α 多样性指数 (Shannon 指数)

组别	D1	D7	D14	D21	D28
Control 组	1.85±0.21	3.52±0.24	4.12±0.26	4.28±0.27	4.35±0.28
Probiotics 组	1.82±0.22	2.68±0.25*	3.01±0.29*	3.42±0.31*	3.78±0.33*
FMT 组	1.83±0.20	3.21±0.23#	3.89±0.25#	4.05±0.26#	4.20±0.27#

与 Control 组比较，*P<0.05；与 Probiotics 组比较，#P<0.05

2.2.2 菌群 β 多样性

PCoA 分析显示，D1 时三组样本点混杂。D7 时，FMT 组样本点开始向 Control 组区域靠拢，而 Probiotics 组仍停留在远离区域。至 D28，FMT 组与 Control 组样本点聚集区域高度重叠，表明二者菌群结构相似度极高，而 Probiotics 组则形成独立的聚集区。

2.2.3 菌群组成分析

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，组间两两比较采用 LSD-t 检验。肠道菌群参数与屏障功能指标间的相关性采用 Pearson 相关分析。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及肠道大体形态

各组仔鼠存活率无显著差异 (P>0.05)。FMT 组和 Probiotics 组早产仔鼠在出生后第一周体重增长略缓于 Control 组，但从第二周开始，FMT 组体重追赶趋势明显优于 Probiotics 组，至第 28 天时，FMT 组体重与 Control 组无统计学差异 (P>0.05)，而 Probiotics 组仍显著低于 Control 组 (P<0.05)。解剖观察发现，Probiotics 组部分小鼠肠道可见轻度胀气，肠壁颜色略暗；FMT 组肠道形态更接近于 Control 组，肠管充盈度、色泽良好。

起，Shannon 指数和 Chao1 指数均显著高于同时时间点的 Probiotics 组 (P<0.05)，并在 D14 后逐渐接近 Control 组水平。Probiotics 组多样性恢复缓慢，至 D28 仍显著低于 Control 组 (P<0.05)。

在门水平上，FMT 组和 Control 组均以厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 为绝对优势菌门，二者比例相对稳定。Probiotics 组则表现出厚壁菌门比例异常升高，拟杆菌门比例过低的失衡状态。在属水平上，FMT 组从 D14 起，乳杆菌属 (Lactobacillus) 和另枝菌属 (Alistipes, 拟杆菌门下有益菌) 的相对丰度显著高于 Probiotics 组 (P<0.01)，且与 Control 组无差异。而 Probiotics 组中，肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)

未分类属的相对丰度在 D7 和 D14 时显著高于其他两组 (P < 0.05)。选择性培养计数结果与之吻合: FMT 组粪便中乳酸菌和双歧杆菌的活菌数在干预后期 (D14,

D21, D28) 显著高于 Probiotics 组 (P < 0.01), 而大肠杆菌计数则显著低于 Probiotics 组 (P < 0.05)。

表 3 D28 时各组小鼠肠道主要菌属相对丰度 (%)

菌属	Control 组	Probiotics 组	FMT 组
乳杆菌属	35.2±3.1	22.4±2.8*	33.8±3.0#
另枝菌属	18.5±2.3	10.1±1.9*	17.6±2.2#
肠杆菌科未分类属	5.2±1.1	15.8±2.4*	6.5±1.3#
双歧杆菌属	12.4±1.8	8.3±1.5*	11.9±1.7#

与 Control 组比较, *P < 0.05; 与 Probiotics 组比较, #P < 0.05

2.3 肠道粘膜屏障功能评估

2.3.1 组织病理学改变

HE 染色显示, Control 组绒毛排列整齐, 隐窝结构清晰。Probiotics 组在 D7 和 D14 可见绒毛轻度萎缩、断

裂, 固有层有较多炎症细胞浸润。FMT 组肠道结构损伤明显较轻, 绒毛高度和完整性保持较好, 炎症浸润轻微。组织损伤评分显示, FMT 组在 D7、D14、D21 的评分均显著低于同期 Probiotics 组 (P < 0.01)。

表 4 各组小鼠肠道组织损伤评分 (Chiu 评分)

组别	D1	D7	D14	D21	D28
Control 组	0.5±0.1	0.6±0.2	0.7±0.2	0.8±0.2	0.8±0.2
Probiotics 组	0.6±0.2	2.8±0.5*	3.5±0.6*	2.2±0.4*	1.5±0.3*
FMT 组	0.5±0.1	1.2±0.3#	1.5±0.3#	1.1±0.3#	0.9±0.2#

与 Control 组比较, *P < 0.05; 与 Probiotics 组比较, #P < 0.05

2.3.2 紧密连接超微结构

透射电镜下, Control 组肠上皮细胞间的紧密连接结构清晰, 呈典型的“吻状”连接, 间隙紧密。Probiotics 组可见紧密连接结构模糊、局部增宽甚至断裂。FMT 组的紧密连接结构较 Probiotics 组明显改善, 接近正常形态, 连接处电子密度高, 间隙均匀。

表 5 D28 时各组小鼠肠道屏障相关蛋白相对表达水平 (与 GAPDH 比值)

组别	Claudin-1	Mucin-2
Control 组	1.00±0.12	1.00±0.10
Probiotics 组	0.58±0.09*	0.62±0.08*
FMT 组	0.95±0.11#	0.97±0.09#

与 Control 组比较, *P < 0.05; 与 Probiotics 组比较, #P < 0.05

2.3.3 紧密连接蛋白及黏蛋白表达

Western Blot 结果显示, Claudin-1 和 Mucin-2 蛋白在 Control 组表达稳定。Probiotics 组表达量在整个观察期内均处于较低水平。FMT 组在 D7 时表达量开始上升, 至 D14、D21、D28 时, 其 Claudin-1 和 Mucin-2 的表达水平均显著高于 Probiotics 组 (P < 0.01), 并与 Control 组无统计学差异。

2.3.4 肠道局部免疫水平

ELISA 检测显示, Control 组粪便 SIgA 水平随日龄增长而升高。Probiotics 组 SIgA 水平增长缓慢。FMT 组从 D14 起, SIgA 水平即显著高于 Probiotics 组 (P < 0.05), 并在 D21 和 D28 时达到甚至略高于 Control 组的水平。

表 6 各组小鼠粪便 SIgA 水平 (μg/g)

组别	D1	D7	D14	D21	D28
Control 组	12.5±2.1	45.3±4.2	78.6±6.5	102.4±8.3	125.8±9.7
Probiotics 组	11.8±2.0	32.1±3.8*	51.2±5.1*	68.9±6.2*	89.5±7.8*
FMT 组	12.1±2.1	40.5±4.0#	72.8±6.0#	98.7±7.9#	122.4±9.5#

与 Control 组比较, *P < 0.05; 与 Probiotics 组比较, #P < 0.05

2.4 肠道菌群参数与屏障功能指标的相关性分析

将 D14 和 D28 两个关键时间点的数据进行合并分析。Pearson 相关分析表明：

表 7 肠道菌群参数与屏障功能指标的相关性分析 (Pearson r)

相关性指标	Shannon 指数	乳杆菌属丰度	肠杆菌科丰度
Claudin-1 表达水平	0.742**	0.654**	-0.667**
Mucin-2 表达水平	0.681**	0.589*	-0.602**
粪便 SIgA 水平	0.698**	0.612**	-0.588*
肠道组织炎症评分	-0.715**	-0.593*	0.725**

*P < 0.05; ** P < 0.01

3 讨论

本研究通过构建剖宫产早产小鼠模型，成功模拟了临床早产儿因分娩方式、延迟喂养等因素导致的初期肠道菌群“空白”或“失调”状态^[11]。研究发现，即便在代乳母乳喂养的背景下，早产模型鼠（Probiotics 组）的肠道菌群多样性恢复依然缓慢，且菌群结构失衡，有益菌定植不足而条件致病菌占优，这与临床观察到的早产儿肠道菌群特征高度一致^[12]。口服益生菌干预虽有一定改善作用，但效果有限且缓慢，提示在严重紊乱的微生物生态环境中，外源性单一或少数几种菌株可能面临定植抗力，难以有效重塑整体生态^[13]。

本研究的核心发现是，经灌肠途径实施的 FMT 展现出显著优于传统口服益生菌的干预效果。FMT 组小鼠的肠道菌群多样性在短期内（D7）即得到显著提升，并迅速建立起以厚壁菌门、拟杆菌门为主，乳杆菌属等有益菌为优势的、更接近健康足月儿的菌群结构。这充分体现了 FMT 作为“整体移植”疗法的优势：它并非引入几种孤立的细菌，而是移植了一个包含数百种细菌、古菌、病毒及代谢产物的、具备自我调控功能的完整微生物生态系统^[14]。这个完整的生态系统能够更有效地在受体肠道内“安家落户”，通过种间竞争、合作等生态学机制，排挤潜在致病菌，快速恢复微生态平衡。

更重要的是，本研究首次在早产动物模型中系统阐明了 FMT 改善肠道菌群与增强粘膜屏障功能之间的紧密联系及相关性。首先，在机械屏障层面，FMT 组小鼠肠上皮紧密连接的超微结构更为完整，关键紧密连接蛋白 Claudin-1 的表达显著上调。Claudin-1 是构成紧密连接链、调控细胞旁通透性的关键蛋白，其表达下降是肠道屏障泄漏的重要标志^[15]。我们的相关性分析显示，菌群多样性与 Claudin-1 表达呈强正相关，提示健康、多样的菌群可能通过其代谢产物（如丁酸盐）激活宿主细胞内相关信号通路（如 AMPK、HIF-1 α ），从而促

进紧密连接蛋白的合成与正确组装^[16]。其次，在化学/免疫屏障层面，FMT 显著提高了黏蛋白 Mucin-2 的表达和 SIgA 的分泌。Mucin-2 是肠粘液层的主要成分，为上皮细胞提供物理保护和菌群定植位点^[17]。SIgA 则是粘膜适应性免疫的核心效应分子，能中和病原体，并调节菌群组成。菌群，尤其是某些特定共生菌，是诱导肠道 SIgA 产生的主要刺激物。本研究中 FMT 组 SIgA 水平的快速升高，很可能得益于移植菌群中包含了能有效刺激派尔集合淋巴结产生 IgA 的特定细菌种类。

综上所述，经灌肠 FMT 将健康、完整的供体微生物群落移植到早产小鼠结肠。这些微生物迅速定植并增殖，重建多样、平衡的肠道微生态。恢复健康的菌群通过两方面的作用增强屏障功能：（1）直接生态效应：有益菌通过竞争营养和空间，抑制潜在致病菌过度生长；（2）间接宿主调节：菌群代谢产物（如 SCFAs）和细胞组分（如 LPS、肽聚糖）作为信号分子，激活肠上皮细胞和免疫细胞内的特定通路，上调 Claudin-1、Mucin-2 等屏障相关分子的表达，并促进 SIgA 的分泌，从而全面加固肠道粘膜屏障。这个“菌群-屏障”正向循环的建立，可能是 FMT 能够有效预防 NEC 等肠道损伤性疾病的核心机制。

当然，本研究尚存在局限性。我们使用的是近交系小鼠，其菌群与人类存在差异。未来研究需考虑使用无菌小鼠移植人源菌群或采用更大型的早产动物模型（如早产仔猪）以增加转化医学价值。此外，FMT 的长期安全性、最佳移植时机、菌液制备标准等仍需深入探索。

综上所述，本研究证实，在早产小鼠模型中，经灌肠途径的粪菌移植是一种高效、可行的肠道微生态重建策略。它不仅能快速、有效地纠正早产相关的肠道菌群失调，促进有益菌定植，更能通过多靶点、多机制显著增强肠道粘膜的机械、化学及免疫屏障功能。菌群结构的改善与屏障功能的增强之间存在显著的正相关性。这

些发现为将 FMT 作为一种新型的、针对喂养不耐受等高危早产儿的预防性或治疗性干预手段, 提供了坚实的临床前实验证据和深入的理论机制见解, 具有重要的潜在临床转化价值。

参考文献

- [1] Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, et al. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;52:3-12.
- [2] 张沂, 朱燕洁, 陈超. 早产儿发生率及变化趋势[J]. *中华新生儿科杂志*, 2021, 36(4):74-77.
- [3] Patel RM, Denning PW. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2015;78(3):232-238.
- [4] Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):690-703.
- [5] Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* 2016;352(6285):539-544.
- [6] Mai V, Torrazza RM, Ukhanova M, et al. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PLoS One.* 2013;8(1):e52876.
- [7] 贾琼, 童笑梅. 早产儿菌群特征及与疾病关系的研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(11):103-107.
- [8] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-9.
- [9] Peng L, Li ZR, Green RS, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 2009;139(9):1619-1625.
- [10] 钟敏, 崔伯塔, 张发明. 结肠植管途径粪菌移植治

疗克罗恩病合并肠内瘘感染[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2019, 36(2):5-6.

- [11] Arboleya S, Sánchez B, Milani C, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015;166(3):538-544.
- [12] Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat Med.* 2019;25(5):716-729.
- [13] de Groot PF, Frissen MN, de Clercq NC, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes.* 2017;8(3):253-267.
- [14] Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(4):631-659.
- [15] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):662-671.
- [16] Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15064-15069.
- [17] Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. *Immunity.* 2018;49(2):211-224.

作者简介: 金华翠, 女, 汉族, 在读研究生, 贵州兴义, 遵义医科大学第五附属(珠海)医院, 科室: 儿科, 专业: 儿内科学, 研究方向: 儿童急危重症基础与临床研究。

通讯作者: 何月贤, 女, 汉族, 博士, 广东珠海, 遵义医科大学第五附属(珠海)医院, 科室: 儿科, 专业: 儿内科学, 研究方向: 儿童呼吸与急危重症。

基金项目: 2022 年贵州省卫生健康委科学技术基金项目, 项目编号: gzwkj2022-398, 项目名称: 粪菌移植建立早产小鼠肠道菌群和对肠道粘膜功能的影响。