摘 要

背景与目的：

子痫前期（PE）是妊娠特有的高血压疾病，同时是伴多脏器受损的妊娠严重并发症。PE 的发病率高，常导致严重的妊娠结局，目前采取措施为适时终止妊娠及降压治疗，但并未有明确筛查及有效处理措施。研究认为 PE 发生原因与母胎界面的氧化应激，母体循环中的炎症刺激相关。随着对胎盘微生物的深入研究，学者们发现其中存在独特的微生物群。菌群的紊乱可促使内皮细胞损伤，并通过自身或代谢产物引起胎盘局部炎症和全身炎性反应，促使孕妇发生高血压。因此，本研究从胎盘菌群出发，通过 16S r RNA 高通量测序技术，研究健康(NP)孕妇和子痫前期(PE)孕妇的胎盘菌群情况并以非特异性炎性指标：NLR（中性粒细胞与淋巴细胞的计数比值）作为 PE 预测因子，力求对 PE 的筛查，治疗以及预后提供新方向。

研究内容与方法：

1.标本收集：选择 2021 年 10 月至 2022 年 10 月在南昌大学第一附属医院入院就诊中招募符合条件的妊娠妇女，记录患者年龄、孕周、孕产次、血压、体重指数及 24 小时尿蛋白等信息，收集患者外周血，剖宫产胎盘标本，尿液标本。

2.标本处理：在无菌条件下采集两组孕妇剖宫产胎盘样本，提取细菌 DNA，并以合格的基因组 DNA 样本为模版，对 16S rDNA V3−V4 可变区进行扩增及 Illumina-Miseq 高通量测序，将测序数据处理及 ASV 注释分析。

3.数据分析：最后得到的数据进行 Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析以及 LEfSe 分析。对 PE 组和 NP 组的研究对象的外周血的血常规指标检测，采用 ROC 曲线及二元 Logistic 回归分析计算血常规里中性粒细胞/淋巴细胞（NLR）与子痫前期相关性。

研究结果：

1. α-生物多样性分析表明： PE 组胎盘菌群多样性的 ACE 指数和 Shannon 指数均显著低于 NP 组 ($P < 0.05$)。β-多样性分析表明两组胎盘菌群具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.门水平：PE 组与 NP 组胎盘菌群中相对丰度较高的有拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门、柔壁菌门。属水平：两组相对丰度较高的有 Muribaculaceae、

毛螺菌属、葡萄球菌、梭菌属、拟杆菌属、假单胞菌属、另枝菌属、葡萄球菌属、梭杆菌属、大肠杆菌志贺菌属、瘤胃球菌属、克雷伯菌属。

3. LEfSe 分析表明：在 PE 组中变形菌门、变形菌纲、鞘脂单胞菌目、鞘氨醇单胞菌属、 假单胞菌目、假单胞菌科、假单胞菌属、克雷伯氏菌属、以及大肠杆菌志贺菌属菌群丰度较高。在 NP 组中的拟杆菌目、Muribaculaceae、毛螺菌科、梭状芽孢杆菌、黄杆菌属、颤螺菌属、葡萄球菌、瘤胃球菌属菌群相对丰度较高。

4. ROC 曲线及二元 Logistic 回归分析表明：PE 组的 NLR 明显高于 NP 组（$P<0.05$）。当 NLR 选取 4.254 时，灵敏度为 88.0%，特异度为 74.3%。

研究结论：

本研究发现 PE 患者与 NP 组妇女的胎盘菌群是有显著性差异，PE 患者胎盘菌群的丰富性和多样性降低。属水平，PE 组优势菌属主要集中在变形菌门，NP 组优势菌属主要集中在厚壁菌门。PE 患者胎盘中某些丰度较高的潜在致病菌 Fusobacterium、Escherichia-Shigella、Klebsiella 等和 Alistipes、Muribaculaceae、Lachnospiraceae、Ruminococcus 等有益菌的减少可能是 PE 患者发病的关键因素，这些菌群的结构异常可能会导致全身炎症反应的发生。PE 组孕妇 NLR 显著高于 NP 组，NLR 诊断子痫前期优质界点为 4.254。可为 PE 病因预防以及治疗提供方向。

关键词：子痫前期；胎盘微生物；NLR；高通量测序

ABSTRACT

Background and Purpose:

Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific hypertensive disease and a serious complication of pregnancy with multiple organ damage. PE has a high incidence and often leads to serious pregnancy outcomes. The current measures are timely termination of pregnancy and antihypertensive treatment, but there are no clear screening and effective treatment measures. It is believed that the cause of PE is related to oxidative stress at the maternal fetal interface and inflammatory stimulation in maternal circulation. As researchers studied the placenta's microbes, they discovered a unique microbiome. The disturbance of bacterial flora can promote endothelial cell damage, and through its own or metabolites cause placental local inflammation and systemic inflammatory response, promote the occurrence of hypertension in pregnant women. Therefore, this study started from the placental microflora and used 16S r RNA high-throughput sequencing technology to study the placental microflora of healthy (NP) pregnant women and preeclampsia (PE) pregnant women with non-specific inflammatory indicators: As a predictor of PE, NLR (neutrophil to lymphocyte count ratio) aims to provide new directions for the screening, treatment, and prognosis of PE.

Research contents and methods:

1. Specimen collection: A total of 60 eligible pregnant women were recruited from the First Affiliated Hospital of Nanchang University from October 2021 to October 2022. Patient information was recorded and peripheral blood, placenta and urine samples were collected.

2. Sample processing: The placenta samples from two groups of pregnant women during cesarean section were collected under aseptic conditions, and bacterial DNA was extracted. The qualified genomic DNA samples were used as templates to amplify the V3−V4 variable region of 16S rDNA and perform Illumina-Miseq high-throughput sequencing. The sequencing data were processed and ASV commentary analyzed.

3. Data analysis: Alpha diversity analysis, Beta diversity analysis and LEfSe analysis were conducted on the data obtained at last. The peripheral blood routine indexes of PE group and NP group were detected. ROC curve and binary Logistic regression analysis were used to calculate the correlation between neutrophils/ lymphocytes (NLR) and preeclampsia in blood routine.

Research results:

1. The ACE index and Shannon index of placental flora diversity in PE group were significantly lower than those in NP group ($P < 0.05$). β-diversity analysis showed that the placental flora of the two groups was significantly different ($P < 0.05$).

2. Phylum level: The relatively high abundance of placental flora in PE group and NP group included Bacteroidetes, Firmicutes, actinobacteria, Proteobacteria and flexicutes. Genus level: Muribaculaceae, Spirillum, Staphylococcus, Clostridium, Bacteroides, Pseudomonas, Mycobacterium, Staphylococcus, Clostridium, Escheric -hia coli Shigella, Rumen coccus, Klebsiella were relatively abundant in the two groups.

3. LEfSe analysis showed that the flora abundance of Proteobacteria, Proteobacteria, Sphingomonas, Sphingosinomonas, Pseudomonas, Pseudomonas, Pseudomonas, Klebsiella, and Escherichia coli in PE group was higher. The relative abundance of Bacteroidetes, Muribaculaceae, Spirillaceae, Clostridium, Flavobacter -ium, Spirillum, Staphylococcus and Rumen cocci in NP group was higher.

4. ROC curve and binary Logistic regression analysis showed that the NLR of PE group was significantly higher than that of NP group ($P<0.05$). When the NLR was 4.254, the sensitivity was 88.0% and the specificity was 74.3%.

Research conclusion:

This study found that there was a significant difference in placental flora between PE patients and NP women, and the richness and diversity of placental flora in PE patients decreased. At the genus level, the dominant bacteria of PE group were mainly concentrated in Proteobacteria, and the dominant bacteria of NP group were mainly concentrated in Firmicutes. Some potential pathogenic bacteria Fusobacterium, Escherichia-Shigella, Klebsiella and Alistipes, Muribaculaceae, Lachnospiraceae,

Ruminococcus and others with high abundance in the placenta of PE patients The decrease of beneficial bacteria may be the key factor in the pathogenesis of PE patients, and the abnormal structure of these bacteria flora may lead to the occurrence of systemic inflammatory response. The NLR of PE group was significantly higher than that of NP group, and the good boundary point of NLR for the diagnosis of preeclampsia was 4.254. It can provide direction for prevention and treatment of PE etiology.

Key words: Preeclampsia; Placental microorganisms; NLR; high throughput sequencing

目 录

第 1 章 前言.....1
第 2 章 材料与方法.....3
2.1 研究对象的选择及标本采集.....3
2.1.1 研究对象.....3
2.1.2 观察指标及标本采集.....3
2.2 实验试剂及仪器.....4
2.2.1 实验试剂.....4
2.2.2 实验仪器耗材.....4
2.3 实验步骤.....4
2.3.1 胎盘基因组 DNA 的提取.....4
2.3.2 胎盘菌群 16S rRNA 基因扩增.....5
2.3.3 数据统计分析.....6
第 3 章 结果.....9
3.1 临床基本数据分析.....9
3.2 样本序列结果分析.....9
3.3 observed-species 指数稀释曲线分析.....9
3.4 胎盘菌群分布分析.....10
3.5 α-多样性分析.....11
3.6 β-多样性分析.....12
3.7 微生物差异性分析.....13
3.8 诊断价值及二元 Logistic 回归分析.....14
第 4 章 讨论.....16
第 5 章 结论.....20
致 谢.....21
参考文献.....22
综 述.....26

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PE	Preeclampsia	子痫前期
NP	Normotensive pregnant women	非子痫前期孕妇
16S rRNA	16S ribosomal RNA	16S 核糖体 RNA
SBP	Systolic blood pressure	收缩压
DBP	Diastolic blood pressure	舒张压
ASV	amplicon sequence variant	扩增子变异序列
PCoA	Principal corrdinate analysis	主成分分析
LEfSe	Linear discriminant analysis effect size	线性判别分析
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
NLR	neutrophils to lymphocytes ratio	中性粒细胞与淋巴细胞比值
ROC	Receiver operator characteristic curve	受试者工作特征曲线
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖

第 1 章 前言

子痫前期（PE）是发生在 20 周后伴随多脏器严重受损的妊娠期疾病[1]。在全球发病率约为 3-5%，PE 的发展迅速，血压可急剧升高。有着围产期孕妇及胎儿死亡的严重不良妊娠结局，可引起子痫、胎盘早剥、多器官功能衰竭、早产、新生儿死亡等严重并发症[2, 3]。PE 主要有子痫前期病史、孕前糖尿病、肥胖、高龄、多胎妊娠、不良孕产史等高危因素[4]。其确切病因及发病机制至今不明确，有相关说法认为胎盘螺旋小动脉的异常重塑，母胎界面的氧化应激和母体循环中的炎症刺激是原因之一。研究发现 PE 的胎盘病理中螺旋动脉硬化与动脉粥样硬化有着相似发病机制。在动脉粥样硬化斑块中检测到口腔病原体，这种病原体会通过氧自由基导致自身繁殖的脂质过氧化物形成，进而损伤内皮细胞[5]。PE 胎盘中病原体和口腔病原体有着极高相似度[6]，由此猜测胎盘内存在类似的病原体微生物，通过自身及代谢产物诱导 PE 发病。因此，进一步了解 PE 胎盘微生物的组成及失调菌群，对 PE 的发病率和改善妊娠结局有重要意义。

微生物在调节代谢、免疫耐受、糖尿病和心血管相关疾病起重要作用[7]。随着高通量测序等微生物技术的发展，人们开始肯定微生物在胎盘中存在[8]，并且发现在早产、妊娠期糖尿病等不同妊娠结局的胎盘微生物菌群是有显著差异[9, 10]。胎盘微生物所致的慢性感染可能是诱导母体循环炎症反应的关键因素。虽然胎盘微生物影响妊娠结局逐渐被认可，但具体机制并未完全阐明，因此找出失调的菌落及致病菌并通过靶向调节菌群改善妊娠结局更为重要。有研究在 PE 患者的胎盘中检测到核梭杆菌，这种菌群可以让粘附素（FadA）结合胎盘内皮细胞上的粘附蛋白（Cadherin），从而侵袭内皮细胞、改变血管通透性，导致局部炎症反应的发生，并使得更多的菌群（如大肠埃希菌）能够更轻易的穿透血管内皮屏障[11]。口腔、肠道、羊水、呼吸道内均检测到与胎盘相关的菌群，并且其中部分菌群存在致病性[12]。由此可见，如果我们从胎盘菌群作为切入点，更好的了解 PE 胎盘菌群相关结构，采取措施从源头调节胎盘组织微环境，从而减少 PE 发病。

相关研究表明不同于 NP 胎盘，PE 胎盘组织能够释放促炎因子、趋化因子等并以某种形式进入母体外周血中，从而诱发母体内中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞释放。不断积累的炎细胞长期浸润在部分组织和血管中，影响胎盘血

管的形成和全身细小动脉的损伤，进一步增加 PE 的炎症状态及临床症状[13, 14]。作为人体内重要防线中性粒细胞和淋巴细胞，可通过释放炎性因子和自身抗体等共同参与炎症反应[15]，这和部分学者研究子痫前期母体内炎症免疫反应的过度激活相符[16]。血常规中 NLR（中性粒细胞和淋巴细胞比值）作为低价、简单可获取的炎症性标志物之一，已作为评估肿瘤，心脏病等相关疾病的全身炎症指标[17, 18]。PE 作为一种炎症状态的疾病，也可将 NLR 作为预测 PE 的重要指标。因此，本研究通过 16S rRNA 基因测序技术，分析 PE 组和 NP 组的胎盘菌群组成，以图寻找 PE 胎盘中特异性差异菌。并且联合外周血中 NLR 评估预测子痫前期炎症状态，通过靶向调节改善菌群失衡状态及炎症的发生，期望为后续预防和治疗子痫前期提供思路。

第 2 章 材料与方法

2.1 研究对象的选择及标本采集

2.1.1 研究对象

本研究对象为 2021 年 10 月至 2022 年 10 月在南昌大学第一附属医院入院就诊孕妇中筛选出符合条件的 34 名 PE 组和 26 名 NP 组孕妇。

纳入标准： PE 组纳入标准为孕 20 周后首次检查血压（BP）升高、并且 BP≥140/ 90mmHg 或 24h 尿蛋白≥0.3g。NP 组纳入标准为同期平均年龄及孕周匹配的产前检查正常因头盆不称选择剖宫产的患者。两组均为单胎剖宫产分娩孕妇。

排除标准：两组均排除胎膜早破、术前宫口未开、产前使用过抗生素、多胎妊娠、感染、肿瘤、糖尿病、免疫系统疾病和各基础脏器疾病。

本研究涉及伦理及操作步骤通过病人及家属知晓并签署同意书，通过南昌大学第一附属医院伦理。

2.1.2 观察指标及标本采集

观察指标：所有入组患者在入院后记录，治疗前年龄、孕周、孕产次、血压、血常规、体重指数及 24 小时尿蛋白。

胎盘标本：采样为所有孕妇在手术室进行剖宫产，为防止污染由专业操作人员在手术室中严格使用无菌操作进行，婴儿分娩后，胎盘被运输至无菌托盘上，使用无菌剪从靠近脐带插入点和胎盘边缘的四个象限各采集深约 1cm 和硬币大小胎盘组织，放入无菌试管中，并立即保存到- 80℃冰箱，记录样本采集时间和编号。

尿液标本：患者用力排空一次膀胱后开始计时 24 小时尿液，并置于干净的桶内，送至南昌大学第一附属医院检验科测定 24 小时尿蛋白含量。

血液标本：在入院后，分娩前首次抽血检测，使用抗凝管抽取清晨空腹肘静脉外周血 5ml，立即送入南昌大学第一附属医院检验科检测，所有使用试剂及操作严格按照国家标准执行。记录两组中性粒细胞值（N）及淋巴细胞值（L），并统计出中性粒细胞/淋巴细胞计数值（NLR）。

2.2 实验试剂及仪器

2.2.1 实验试剂

表 1.1 实验试剂

试剂名称	试剂来源	Cat. No.
MagPure Soil DNA LQ Kit	Magen（广州）	D6356-02
Qubit dsDNA Assay Kit	Life Technologie（美国）	Q32854
Tks Gflex DNA Polymerase	Takara（日本）	R060B
Agencourt AMPure XP 磁珠	Beckman Coulter (美国)	-

2.2.2 实验仪器耗材

表 1.2 实验仪器

仪器名称	仪器来源	型号
台式常温高速离心机	Eppendorf （德国）	Centrifuge 5418
PCR 仪	Bio-rad（美国）	580BR10905
QIAxtractor	QIAGEN（德国）	SN 002358
电泳仪	Tanon（中国）	HE-120
凝胶成像仪	Tanon（中国）	2500
移液器	Eppendorf（德国）	-
Bioanalyzer	Aglient （美国）	2100
NanoDrop	Thermo Fisher（美国）	2000
tip，离心管	Axygen（美国）	-
-80℃超低温冰箱	Takara（日本）	SANYO MDF-382

2.3 实验步骤

2.3.1 胎盘基因组 DNA 的提取

根据 MagPure Soil DNA LQ Kit 试剂盒说明书步骤对胎盘标本进行 DNA 提

取。

（1）将解冻的胎盘样本称量约 0.2g 放于 2ml 离心管中，加 800μLsolution TBL1 置入样品中，加入研磨珠使用最大速度搅拌 3min 使其彻底碾碎。

（2）60-70℃水浴 30-60 分钟，过程中轻微震荡离心管，加入 10μL 核糖核酸酶（Rnase）室温下静置 5 分钟，10000rpm 室温离心 3 分钟，移液枪提取上层清亮液体至另 2ml 离心管中。

（3）离心管内加入 20μLProteinase 和 300μL solution TBL2，涡旋彻底混匀，65℃孵育 10 分钟，使 DNA 充分溶解。

（4）继续加入 300μL 无水乙醇，倒置于离心管，经过 20-30 次彻底混匀。

（5）在收集管中安装 DNA 离心柱，离心柱中放入量约 700μL 混合液，10000xg 全速离心，并将滤液全部丢弃。

（6）在离心柱内继续添加 DNA Wash Buffer500μL,在室温下，以 12000rpm 转速离心 1 分钟，并将滤液全部丢弃。

（7）在离心柱内继续注入 700μL DNA Wash Buffer, 12000rpm 离心 1 分钟，将滤液丢弃，置入吸附柱，在室温下以 12000rpm 转速离心 1 分钟使离心柱干燥。

（8）新的 1.5ml 离心管中置入离心柱，将 100μL DNA Elution Buffer 以 70℃预热，加入空离心管中，在室温下静置 2 分钟，4℃下继续全速离心 2 分钟，丢弃离心柱，留取离心管内的胎盘样本 DNA。

（9）使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计测量 DNA 浓度，Qubit dsDNA Assay Kit 试剂盒对细菌 DNA 进行定量分析。

（10）将提取的胎盘 DNA 转移至新的 1.5 ml 离心管中放于-80℃冰箱用于高通量测序。

2.3.2 胎盘菌群 16S rRNA 基因扩增

选取符合要求的 DNA 样本为模版，选择带 barcode 的 16S rRNA 引物：(343FTACGGRAGGCAGCAG 为前端引物和 798RAGGGTATCTAATCCT 为后端引物)，将此 V3-V4 区域进行首次聚合酶链反应（PCR）扩增，在 PCR 管中加入以下材料：

表 2.1 实验材料

名称	体积
2×Gflex PCR Buffer	15 μl
5 pmol/μl primer F	1μl

名称	体积
5 pmol/μl primer R	1μl
Template DNA	≥ 1 μl (50 ng)
Tks GflexDNAPolymerase(1.25U/μl)	0.6 μl
H_2O	补足至 30 μl
总计	30 μl

混匀后按以下程序设置 PCR 仪：

表 2.2 实验过程

过程	温度	时间	循环数
预变性	94℃	5min	1
变性	94℃	30S	-
退火	56℃	30S	30
延伸	72℃	20S	-
终延伸	72℃	5min	1

第一轮 PCR 产物使用 2%琼脂凝胶电泳检测，将合格产物使用磁珠纯化，纯化后重复以上操作，第二轮 PCR 扩增是以第一轮纯化后产物作为模版进行。继续使用磁珠纯化, Qubit 浓度检测最后得到的 PCR 产物, 检测合格的文库稀释后, 根据相应的比例混合后统一使用 Illumina-Miseq 测序。

2.3.3 数据统计分析

2.3.3.1 测序数据处理及 ASVs 注释分析

将 Illumina-Miseq 高通量测序后得到的数据通过碱基识别（BaseCalling），最后生成原始双端序列(raw data)。储存文件格式为 FASTQ，里面包括测序序列的全部序列信息和质量信息。将上一步所得 raw data 进行处理：使用 cutadapt 软件, 剪切掉引物序列 (切除引物设置的最大碱基差异率为 15%), 使用 DADA2, 将以上所得的合格双端 raw data 以 Qiime2 默认参数操作，依次进行指控分析：先质量过滤（filter），然后降噪(denoise)、衔接(merge)以及最后去除嵌合体等，去重后特征序列即为扩增子序列变体（ASV，Amplicon Sequence Variant），获得代表序列及 ASV 丰度表格。本研究采用 ASVs 进行物种注释的 16SrDNA 高通量测序技术，是基于 100%相似度进行注释的单元，其物种注释和多样性分析的准确性均高于 OTU。使用 QIIME 软件，从界、门、纲、目、科、属、种等不同层次，对 PE 组和 NP 组的菌落数量进行统计分析，以揭示其中的特定菌群。使用

R 语言工具绘制不同水平下菌群结构图, 本研究主要在门及属水平展开对胎盘菌群的分析。

2.3.3.2 多样性分析

2.3.3.2.1 α-多样性分析（Alpha diversity）：

α-多样性分析可反映一定环境下单个样本菌群丰度及菌落分布均匀度。为了减少两样本之间的差异，我们在分析前将抽样深度统一。本研究结合 Wilcoxon 秩和检验, 以统一深度来计算 PE 组和 NP 组样本多样性指数。并使用 boxplot 分析，绘制 PE 组和 NP 组的多样性指数 boxplot 图。通过此图能够简单地找出各组内样本分散程度和两组间指数值大小。选用 ACE 指数和 Shannon 指数来衡量胎盘菌群丰度，这两者指数值越大，表明该胎盘菌群的丰富度越高，数量越大。

2.3.3.2.2 β-多样性分析：

β-多样性反映一定环境下生物的多样性程度。可比较不同分组样本菌群的结构差异。一般以主坐标分析（PCA，PCoA, NMDS ）等来观察各样本之间的差异。本研究使用 PCoA 方法（排序向量和特征值，选取最高几位特征值，记录距离矩阵中最主要坐标值）观察收集的胎盘菌群之间的结构差异性，PCoA 分析：是提供基于各类距离矩阵结果而言，使用 PCoA 能够观察每个样本或两组胎盘总体的差异，同一组的样本距离越近，说明样本之间差异性越小。并结合根据 Adonis 差异 p 值结合 PCoA 结果分析从而判断这种差异是否显著。

2.3.3.3 胎盘菌群组间差异显著分析

微生物多元变量统计分析，可以检验各组间显著性差异及优势物种的分布，本研究分组数较小，因此选用 LEfSe 分析，即 LDA Effect Size 分析。本文主要是通过非参数因子 Kruskal-Wallis 和 Wilcoxon 秩和检验来检测胎盘菌群各水平间的物种丰度差异，将得到的差异性物种结合线性判别分析（LDA），用数据分析找到界门纲目科属种分类下较为显著的差异物种，从而得到我们所需要的胎盘的优势菌群分布情况。选用 LDA 柱状分布图，LDA 绝对值越大，横坐标显示的图越长，表明改菌群对两组间比较产生较大的影响，有着明显差异性。

2.3.3.4 统计学分析

将实验数据使用 SPSS 26.0 软件分析。非参数秩和检验用于分析不符合正态分布的资料。均数±标准差用来分析符合正态分布的计量资料，独立样本 t 检验用来比较 NP 组和 PE 组两组间关系。两组样本使用 Wilcoxon 检验对α多样性指数进行统计分析。将两组间的菌群丰度差异结果使用 Kruskal-Wallis 秩和检验分

析，$P < 0.05$ 表示差异显著并有统计学意义，$P > 0.05$ 表示无统计学差异。ROC 曲线（Receiver operator characteristic curve 受试者工作特征曲线）用于评估 NLR 对子痫前期患者的诊断价值，$P<0.05$ 时差异有统计学意义。采用二元 Logistic 回归分析 NLR 对子痫前期患者的预测价值。

第 3 章 结果

3.1 临床基本数据分析

本研究共选取 60 例入组标本，其中 PE 组 34 例，NP 组 26 例。结果表明：PE 组与 NP 组相比，年龄，产次的 P 值均大于 0. 05，差异无统计学意义，但 PE 组孕周明显低于 NP 组（$P < 0.05$），而在体重指数、收缩压、舒张压、NLR 和 24 小时尿蛋白来看 PE 组明显高于 NP 组（$P < 0.05$）。

表 3.1 临床基本数据分析

组别	子痫组	正常组	*P*
年龄（岁）	31.57±6.67	31.00±4.57	0.15
产次（次）	0.54±0.78	0.56±0.76	0.91
孕周（周）	35.30±4.16	38.59±1.19	< 0.001
体重指数（kg/㎡）	28.35±3.88	26.26±2.77	0.025
收缩压（mmHg）	162.83±13.81	115.96±9.24	< 0.001
舒张压（mmHg）	102.06±11.38	72.60±7.63	< 0.001
24h 尿蛋白（g/24h）	3.1±3.17	0.02±0.039	< 0.001
NLR	5.19±1.44	3.08±1.09	< 0. 001

3.2 样本序列结果分析

本研究分析两组共 60 个胎盘样本，测序下机 raw reads 数据量 NP 组与 PE 组平均值分别为 79932 和 79768, 去除嵌合体两组得到的最终分析数据(valid tags)数据量平均值分别为 43728 和 53204, 在 100%相似性水平下对有效序列进行 ASV 聚类，两组共有 ASV 数目 8640 个，得到 NP 组样本 ASV 总数为 8078 个，PE 组为 12569 个。

3.3 observed-species 指数稀释曲线分析

根据图 2.1 可以看到随着抽取序列数的增加（即抽样深度），曲线由陡峭逐渐变为平缓，当数据量增大到一定程度时曲线不再变化，只产生少量新 ASV,说明本研究样本的测序覆盖的深度及测序的数据量足够合理，可行下一步分析。

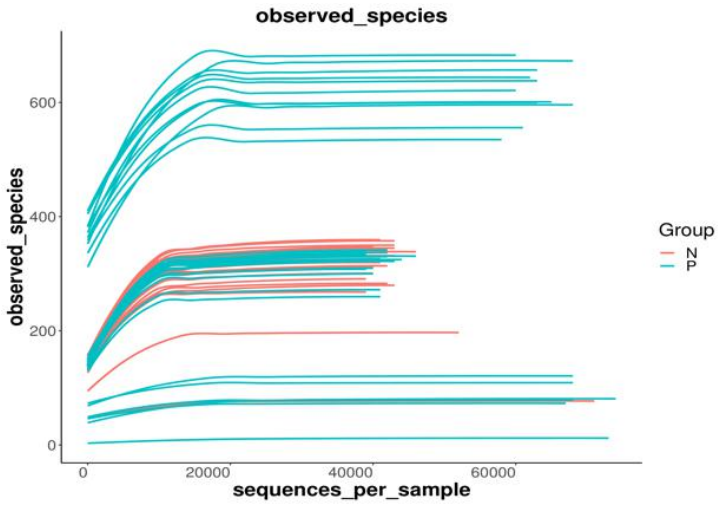
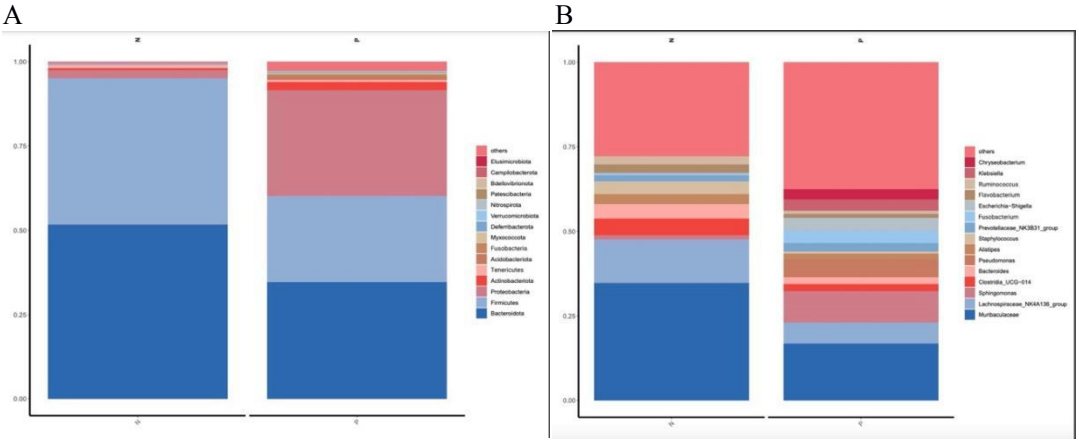


图 2.1 observed-species 指数稀释曲线。每一条曲线代表一个样本，红线表示 NP 组样本，绿线表示 PE 组样本。横轴表示抽样的序列数，纵轴表示指数值。

3.4 胎盘菌群分布分析

A. 图 3-1A 可知在门水平观察，两组胎盘优势菌群有：Firmicutes（厚壁菌门）、Bacteroidota（拟杆菌门）、Proteobacteria（变形菌门） 、Actinobacteriota（放线菌门）、Tenericutes（柔壁菌门）。以上菌群正常组占比为 98.27%，子痫组占比为 94.12%，NP 组结构较为简单。柱状图可以看出 PE 组 Bacteroidota、Firmicutes、Actinobacteriota、Tenericutes 相对丰度小于 NP 组，而 Proteobacteria 相对丰度高于 NP 组。

B. 图 3-1B 观察出在属水平，检测菌群主要为变形菌门和厚壁菌门的菌属。两组胎盘菌群中可测到 Muribaculaceae、毛螺菌属（Lachnospiraceae）、葡萄球菌（Sphingomonas）、梭菌属（Clostridia）、拟杆菌属（Bacteroides）、假单胞菌属（Pseudomonas）、另枝菌属（Alistipes）、葡萄球菌属（Staphylococcus）、梭杆菌属（Fusobacterium）、大肠杆菌志贺菌属（Escherichia-Shigella）、瘤胃球菌属（Ruminococcus）、克雷伯菌属（Klebsiella）等属种。



A：门水平　　B：属水平

图 3.1 PE 组和 NP 组胎盘菌群柱状图。不同水平的微生物物种及丰度各不相同，为了更清晰的表现胎盘样本微生物的结构情况，本研究仅显示门及属水平 TOP15 的菌落分布情况，进行绘制柱状图，横坐标为子痫组（P）和正常组（N）名称，纵坐标表示不同层次下序列数占总注释数的百分比，所占比例越大表明该菌群丰度越高。

3.5 α-多样性分析

本研究基于 ASV 聚类结果，使用 ACE 指数来评估群落中所含的物种数反应群落的多样性，指数约大提示菌群物种数目越大。图 4.1A 中可看出两组存在显著差异性，PE 组 ACE 指数低于 NP 组，表明 PE 组物种数目低于 NP 组（$P < 0.05$）。使用 Shannon 指数反映物种丰富度和分布的均匀度，图 4.1B 可看出 PE 组 Shannon 指数低于 NP 组，表明 PE 组胎盘菌落丰富度较 NP 组低，差异有统计学意义($P < 0.01$)。

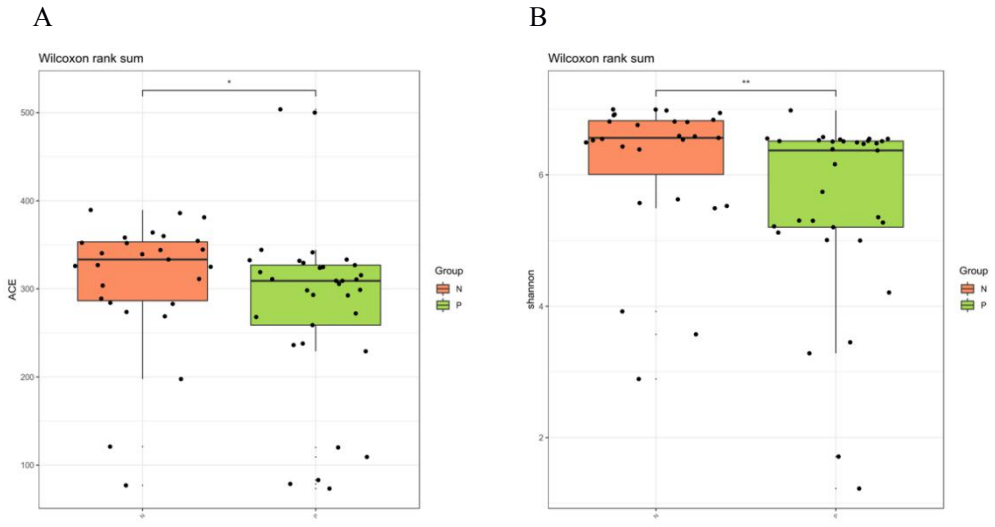


图 4.1 PE 组和 NP 组胎盘菌群α多样性相关 boxplot 分析

A：ACE 指数图　　B：Shannon 指数

图 4.1 展示在子痫组（*P*）与健康组(E)的分布情况，横坐标为分组，纵坐标为指数值。ns：差异无统计学意义；*：*P*< 0.05；**：*P*< 0.01；***：*P*< 0.001；****P< 0.0001。）

3.6 β-多样性分析

本研究使用主坐标 PCoA 分析，对胎盘菌群内的特征值和向量进行排序来观察两组样本的多样性。并基于不加权的（Unweighted）Unifrac 距离算法来评估 PE 组和 NP 组两组样本 beta 多样性。图 5.1 可以看出正常组较为集中，组内距离接近，而 PE 组较为分散，两组样本点并未完全分开，存在部分重合点，说明两组样本有一定的相似性。基于不加权的 (Unweighted) Unifrac 距离 PCoA 分析，总体而言 PE 组和 NP 组胎盘菌群结构明显不同，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。结合以上算法使用 R 语言结合 Adonis 检验（非参数多因素方差分析 nonparametric MANOVA），此检验是对样本间总体方差进行分解，从而评估胎盘样本分组是否合理，差异是否显著，结果表明出 PE 组与 NP 组胎盘菌群有相对显著差异（R^2=0.079，　P=0.001）。

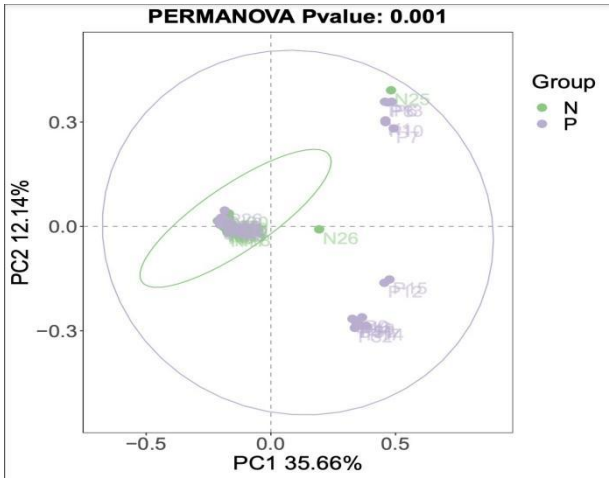


图 5.1 NP 组与 PE 组胎盘菌群β-多样性分析。样本间最大的差异解释度用图中横坐标（PC1）和纵坐标（PC2）两主要坐标表示，每一个点代表一个样本，相同颜色为同一组，以 0.95 置信度椭圆绘图。

3.7 微生物差异性分析

图 6.1 表明： PE 组中变形菌门（Proteobacteria）、变形菌纲（Alphaproteob-acteria）、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、鞘氨醇单胞菌属（ Sphingomonas）、假单胞菌目（Pseudomonadales）、 假单胞菌科（Pseudomonadaceae）、假单胞菌属（Pseudomonas）、大肠杆菌志贺菌属（Escherichia-Shigella）、克雷伯氏菌属（Klebsiell）菌群相对富集。NP 组的拟杆菌目（Bacteroidales）、Muribaculaceae、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、梭状芽孢杆菌（Clostridia）、黄杆菌属 Flavobacterium）、颤螺菌属（Oscillospirales）、葡萄球菌（Staphylococcus）、瘤胃球菌属（Ruminococcus）菌群相对富集。

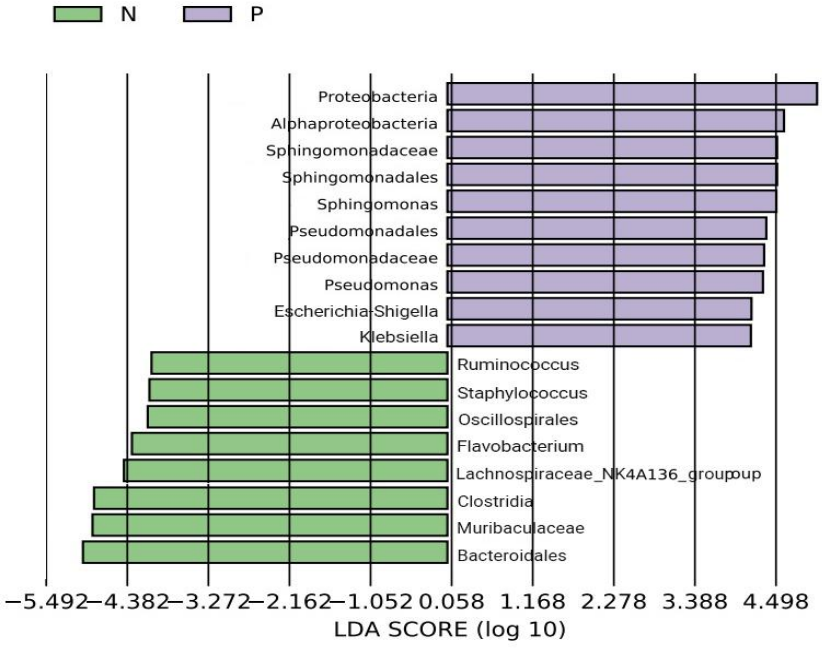


图 6.1 LEfSe 分析两组胎盘菌群差异分布。图中结果显示 PE 组和 NP 组在各分级水平下的组间差异性，N 表示 NP 组 P 表示 PE 组。

3.8 诊断价值及二元 Logistic 回归分析

图 8.1 分析可知，本实验曲线下面积较大，说明 NLR 对子痫前期患者的预测准确率较高。NLR 对子痫前期进行预测，当 NLR 选取 4.254 时，灵敏度为 88.0%，特意度为 74.3%，曲线下面积为 0.89。根据二元 Logistic 回归分析得出，当以子痫前期为因变量，NLR≥4.254 为自变量时，分析发现 NLR≥4.254 时，可以称为子痫前期的危险因素。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/757004141011006033