

# 中国母乳中低聚糖组分及含量变化 ——以中国广东江门地区为例

魏远安, 郑惠玲\*, 吴少辉, 吴嘉仪, 霍金洪

(量子高科(中国)生物股份有限公司技术中心, 广东 江门 529081)

**摘要:** 密集收取22位中国母亲共163个母乳样品, 采用高效阴离子色谱法监测在不同泌乳期中22种母乳低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs)的组成和含量变化。结果表明, 15种中性低聚糖含量在泌乳初期(初乳)达到最高值后逐渐减少(成熟乳), 但是3-岩藻糖乳糖的含量在整个取样阶段均在持续增加。6种酸性低聚糖在泌乳初期稳定但后期随时间延长逐渐减少, 其中唾液酸化-乳糖-N-四糖a只在部分样本中检出。基于Lewis血型类型, 可将母亲分为分泌型组和非分泌型组。分泌型母亲的母乳中富含 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖(如2'-岩藻糖乳糖、乳糖-N-岩藻五糖 I、二岩藻糖基乳糖、乳糖-N-二岩藻六糖 I)。在分泌型与非分泌型母乳中,  $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖的质量浓度范围分别为1 211~7 272 mg/L和100~920 mg/L; 然而 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖(如乳糖-N-二岩藻六糖 II、乳糖-N-二岩藻糖基-八糖、3-岩藻糖乳糖、乳糖-N-岩藻五糖 II)的质量浓度范围则分别为181~2 722 mg/L和476~4 931 mg/L。总体表明, 分泌型和非分泌型母亲在泌乳期内的HMOs的组成和含量均在不断变化且差异明显。

**关键词:** 高效阴离子色谱; 母乳低聚糖; 分泌型母乳; 非分泌型母乳

## Change in Composition and Content of Oligosaccharides in Human Milk from Chinese Lactating Mothers

WEI Yuan'an, ZHENG Huiling\*, WU Shaohui, WU Jiayi, HUO Jinhong

(Technical Center, Quantum Hi-Tech (China) Biological Co. Ltd., Jiangmen 529081, China)

**Abstract:** Twenty two human milk oligosaccharides (HMOs) in 163 milk samples collected from 22 Chinese mothers during different stages of lactation were measured by high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC). Levels of 15 neutral HMOs were highest at the early stages of lactation (in colostrum) and decreased later (in mature milk), but 3-fucosyllactose level continuously increased throughout the sampling period. Levels of six sialylated HMOs decreased during the course of lactation, and LSTa was detected only in some samples. Based on the Lewis blood types, the volunteers were divided into secretor mother group and non-secretor mother group. Milk samples from secretor mothers were rich in  $\alpha$ -1-2-linked fucosylated oligosaccharides (such as 2'-FL, LNFP I, LDFT, and LNDFH I). Specifically, the concentrations of the  $\alpha$ -1-2-linked fucosylated oligosaccharides ranged from 1 211 to 7 272 mg/L in milk from secretor mothers and from 100 to 920 mg/L in milk from non-secretor mothers. In contrast, the contents of  $\alpha$ -1-3/4-linked fucosylated oligosaccharides (such as LNDFH II, DFLNH, 3-FL, and LNFP II) was 476~4 931 mg/L in milk from non-secretor mothers, compared to 181~2 722 mg/L for milk from secretor mothers. Generally, this study showed that the composition and contents of HMOs in milk from secretor and non-secretor mothers varied continuously and were different significantly during the lactation period.

**Key words:** high-performance anion exchange chromatography (HPAEC); human milk oligosaccharides; secretor type milk; non-secretor type milk

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718029

中图分类号: Q501

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)18-0180-07

引文格式:

魏远安, 郑惠玲, 吴少辉, 等. 中国母乳中低聚糖组分及含量变化: 以中国广东江门地区为例[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 180-186. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718029. <http://www.spkx.net.cn>

WEI Yuan'an, ZHENG Huiling, WU Shaohui, et al. Change in composition and content of oligosaccharides in human milk from Chinese lactating mothers[J]. Food Science, 2017, 38(18): 180-186. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718029. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-01-17

作者简介: 魏远安(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为碳水化合物化学、糖酶生物化学及其应用。E-mail: yawei@qht.cc

\*通信作者: 郑惠玲(1986—), 女, 助理工程师, 本科, 研究方向为低聚糖分析及生产技术。E-mail: zhenghl@qht.cc

母乳低聚糖 (human milk oligosaccharides, HMOs) 是人类母乳中的第3大固体成分, 仅次于乳糖和脂肪, 具有重要的生物学功能, 不仅对肠道病原微生物起到抗感染的作用, 还能维持肠道微生态的平衡, 调节免疫反应, 有助于促进婴儿大脑发育<sup>[1-8]</sup>。母乳低聚糖包含中性低聚糖和酸性低聚糖, 中性低聚糖又可分为无岩藻糖基及含岩藻糖基的低聚糖, 占母乳低聚糖质量分数约70%, 酸性低聚糖是包含唾液酸及硫酸盐结构的低聚糖, 占母乳低聚糖质量分数约30%<sup>[9-12]</sup>。

研究发现, HMOs的组成与含量具有个体差异, 而且受泌乳期、血型 (Lewis血型)、地域等因素影响<sup>[1,13-14]</sup>。在Lewis血型系统中的Le<sup>a</sup>抗原是由Lewis (Le或FUT3) 基因控制, 而Le<sup>b</sup>抗原是由Lewis (Le或FUT3) 基因和分泌基因 (Se或FUT2) 共同控制, 根据个体红细胞Le<sup>a</sup>抗原和Le<sup>b</sup>抗原的检测结果, 可分为4种抗原表型: Le (a<sup>+</sup>b<sup>-</sup>)、Le (a<sup>-</sup>b<sup>+</sup>)、Le (a<sup>-</sup>b<sup>-</sup>) 和Le (a<sup>+</sup>b<sup>+</sup>)。这4种表型受Le<sup>a</sup>和Le<sup>b</sup>抗原分泌状态的影响。FUT3基因表达产物为 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基转移酶, 该酶控制产生 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化的低聚糖; FUT2基因表达产物为 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶, 该酶控制产生 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化的低聚糖, 根据FUT2是否正常表达分泌 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶可以将母乳分为分泌型和非分泌型。分泌型母乳中含有丰富的 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖, 而非分泌型母乳中缺乏或只存在很少 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖。所以, 通过Lewis血型鉴定和母乳中低聚糖组成分析可研究比对两者的调控关系<sup>[1,14-15]</sup>。从文献调研和对中国母乳的实测研究发现, 过往对母乳研究得到的一些结果多基于欧美母亲母乳, 而中国母亲HMOs组分的分析和研究很少。同时也发现中外母亲母乳中特定组分的低聚糖含量存在较大差异。

过往对HMOs的研究分析主要采用高效液相色谱法<sup>[16-19]</sup>或高效液相色谱-质谱串联法<sup>[20-22]</sup>, 样品需除去蛋白、脂肪及部分乳糖, 再经衍生化后测定, 方法复杂且部分糖类易因衍生化的效率和产生异构体等而影响低聚糖的测定。近年来高效阴离子交换色谱-脉冲电化学检测法<sup>[23-26]</sup>迅速发展起来, 采用高效阴离子交换色谱柱分离糖类, 利用不同低聚糖之间碱性条件下羟基解离度的细微差异进行精确分离和检测分析, 具有高效、灵敏、准确、线性范围宽、针对性强、无需衍生化处理、操作方便等优点, 避免了糖类因初分、衍生化而产生的误差, 非常适用于复杂低聚糖混合物的定性和定量分析。本研究对中国母亲母乳进行密集取样, 利用高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培 (high-performance anion exchange chromatography-integrated pulsed amperometric detection, HPAEC-IPAD) 法检测HMOs, 并结合母亲Lewis血型鉴定, 分析总结中国母亲HMOs的特点, 同时为进一步构建中国HMOs大数据库提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 母乳及血液样本

选择广东江门地区常住、健康、营养良好、可信赖的、足月生产、自愿捐献的25~39岁母亲, 同时签署知情同意书。取母乳时间为产后泌乳开始的3、7、14、28 d, 28 d后每月收集1次。收集单侧全部乳汁并混匀后取其中5 mL至冻存管, 于-20℃冰箱冻存。本研究共收集22位母亲, 3~343 d, 163个母乳样品。血液样为母亲产后6周取手指末梢血液。

#### 1.1.2 标准品

标准品信息如表1所示。

表1 23种HMOs标准信息  
Table 1 Information about 23 HMOs standards

中文名称	英文名称	缩写	中文名称	英文名称	缩写
乳糖-N-三糖	lacto-N-triose	LNT2	乳糖-N-岩藻五糖 V	lacto-N-fucopentaose V	LNFP V
乳糖-N-四糖	lacto-N-tetraose	LNT	乳糖-N-二岩藻新六糖	lacto-N-neodifucohexaose	LNDFH
乳糖-N-新四糖	lacto-N-neotetraose	LNnT	乳糖-N-二岩藻六糖 I	lacto-N-difucohexaose I	LNDFH I
乳糖-N-新六糖	lacto-N-neohexaose	LNnH	乳糖-N-二岩藻六糖 II	lacto-N-difucohexaose II	LNDFH II
对-乳糖-N-新六糖	para-lacto-N-neohexaose	Para-LNnH	乳糖-N-二岩藻糖基-八糖	difucosyllacto-N-hexaose	DFLNH
乳糖-N-新八糖	lacto-N-neooctaose	LNnO	3'-唾液酸化乳糖	3'-sialyllactose	3'-SL
2'-岩藻糖乳糖	2'-fucosyllactose	2'-FL	6'-唾液酸化乳糖	6'-sialyllactose	6'-SL
3-岩藻糖乳糖	3-fucosyllactose	3-FL	唾液酸化-乳糖-N-四糖 a	LS-tetrasaccharide a	LSTa
二岩藻糖基乳糖	lactodifucotetraose	LDFT	唾液酸化-乳糖-N-四糖 b	LS-tetrasaccharide b	LSTb
血型A抗原类型 II 四糖	blood group tetrasaccharide	A-Tetra	唾液酸化-乳糖-N-四糖 c	LS-tetrasaccharide c	LSTc
乳糖-N-岩藻五糖 I	lacto-N-fucopentaose I	LNFP I	二唾液酸-乳糖-N-四糖	disialyllacto-N-tetraose	DSLNT
乳糖-N-岩藻五糖 II	lacto-N-fucopentaose II	LNFP II			

注: 均购自英国Carbosynth公司。

#### 1.1.3 试剂

无水乙醇 天津永大化学试剂公司; 抗-Le<sup>a</sup>试剂血清、抗-Le<sup>b</sup>试剂血清 德国CE-Immundiagnostika公司; 岩藻糖 (fucose, Fuc)、半乳糖 (galactose, Gal)、葡萄糖 (glucose, Glc)、乳糖 (lactose, Lac)、醋酸钠 美国Sigma公司; 50%氢氧化钠 美国赛默飞公司; 乙醇 美国天地公司; 99.9%氮气 金珠江气体有限公司。所用试剂均为色谱纯。

### 1.2 仪器与设备

ICS-5000离子色谱仪 (配有四元梯度泵、脉冲安培检测器、脱气装置、GM-3淋洗液混合器、柱温箱、AS-AP自动进样器、chromeleon 7.2色谱工作站)、阴离子交换色谱柱PA1 (4 mm×250 mm) 美国Thermo Fisher公司; XSE205型电子分析天平 美国Mettler Toledo公司; Casada BIO超纯水机 美国Pall公司; KQ-100DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 HMOs检测方法

##### 1.3.1.1 样品前处理

母乳样品解冻, 取1 mL乳汁与1 mL无水乙醇混合均

匀并密封于4℃冰箱放置60 min, 取出于4℃冷冻离心机10 000 r/min离心20 min。提取所有上清液后氮吹除去乙醇, 再用50 mL容量瓶定容, 样液经0.22 μm膜过滤后进样离子色谱仪进行HMOs组分检测, 并以HMOs标准品作对照外标定量分析样品中22种HMOs组分含量。

### 1.3.1.2 色谱条件

色谱柱: CarboPac PA1保护柱(4 mm×50 mm), CarboPac PA1分离柱(4 mm×250 mm, 6.5 μm); 流速0.7 mL/min; 柱温30℃; 进样量25 μL; 检测方式: Au电极, AgCl参比模式, 脉冲安培检测, 糖标准四电位波形; 淋洗液洗脱梯度程序如表2所示。

表2 洗脱梯度程序  
Table 2 Eluent gradient program

时间/min	洗脱液体积分数/%		
	250 mmol/L NaOH溶液	100 mmol/L NaOH + 1 000 mmol/L 醋酸钠溶液	水
0.00	44.0	0.0	56.0
10.00	44.0	0.0	56.0
18.00	39.0	5.0	56.0
30.00	37.0	10.0	53.0
37.00	37.0	10.0	53.0
47.00	20.0	50.0	30.0
52.00	20.0	50.0	30.0
52.10	44.0	0.0	56.0
65.00	44.0	0.0	56.0

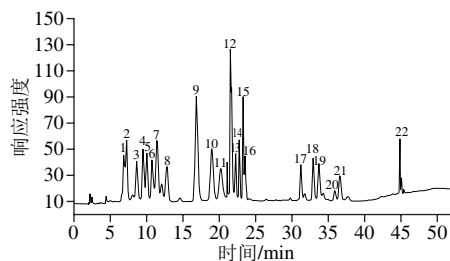
注: 时间为0.0 min时开始进样和数据采集; 时间为52.10 min时停止数据采集。

### 1.3.2 Lewis血型鉴定

血液样本取样后24 h内完成检测: 参照ABO血型检测方法, 利用抗-Le<sup>a</sup>试剂血清和抗-Le<sup>b</sup>试剂血清检测血液红细胞中的抗原。与抗-Le<sup>a</sup>试剂血清发生凝集, 则受检标本含有-Le<sup>a</sup>抗原, 反之为无-Le<sup>a</sup>抗原; 与抗-Le<sup>b</sup>试剂血清发生凝集, 则受检标本含有-Le<sup>b</sup>抗原, 反之为无-Le<sup>b</sup>抗原, 从而得出Lewis血型类型<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 HPAEC-IPAD方法分离HMOs



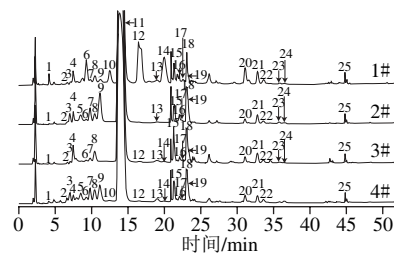
1. LNFDFH; 2. LNFDFH II; 3. DFLNH; 4. LNFDFH I; 5. 3-FL; 6. A-Tetra; 7. LNFP II; 8. LDFT; 9. 2'-FL; 10. LNT2; 11. LNFP I; 12. LNnT; 13. LNFP V; 14. LNnH; 15. LNT; 16. LNnO; 17. LSTc; 18. 6'-SL; 19. 3'-SL; 20. LSTa; 21. LSTb; 22. DSLNT。

图1 22种HMOs混标的离子色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixture of 22 HMOs standards

通过梯度方法研究及优化得到PA1柱分离HMOs较好的色谱条件, HMOs的分离情况见图1。0~28 min之间绝大部分为中性低聚糖(无岩藻糖基化低聚糖及岩藻糖基化低聚糖), 28~50 min之间绝大部分为酸性低聚糖。结合标准品可测定母乳中6种无岩藻糖基化低聚糖, 分别为LNT2、LNT、LNnT、LNnH、Para-LNnH和LNnO, 其中LNnH和Para-LNnH未分离开, 定量以LNnH计; 11种岩藻糖基化低聚糖, 分别是3-FL、2'-FL、LDFT、A-Tetra、LNFP I、LNFP II、LNFP V、LNnDFH、LNFDFH I、LNFDFH II和DFLNH; 6种酸性低聚糖, 分别为LSTc、6'-SL、3'-SL、LSTa、LSTb和DSLNT。该方法样品处理简单、不需去除乳糖、不进行衍生化即可对至少22种HMOs进行快速、全面、定量的分析。

### 2.2 分泌型和非分泌型母亲初乳中HMOs的组成



1. Fuc; 2. LNnDFH; 3. LNFDFH II; 4. Gal+Glc; 5. DFLNH; 6. LNFDFH I; 7. 3-FL; 8. A-Tetra; 9. LNFP II; 10. LDFT; 11. Lac; 12. 2'-FL; 13. LNT2; 14. LNFP I; 15. LNnT; 16. LNFP V; 17. LNnH; 18. LNT; 19. LNnO (与18未完全分离); 20. LSTc; 21. 6'-SL; 22. 3'-SL; 23. LSTa; 24. LSTb; 25. DSLNT。  
1#. 分泌型母乳样品; 2#~4#. 非分泌型母乳样品。

图2 4个代表性母乳离子色谱对比图

Fig. 2 Chromatograms of 4 representative human milk samples

通过检测已分析母乳的中国母亲血液样本, 确定其Lewis血型, 将中国泌乳母亲分为分泌型组和非分泌型组, 以分析对应的HMOs组成和含量差异。在测定的样本中, 中国母亲Lewis血型均为Le(a<sup>-</sup>b<sup>+</sup>)和Le(a<sup>+</sup>b<sup>-</sup>)。其中Le(a<sup>-</sup>b<sup>+</sup>)血型母亲为分泌型, Le(a<sup>+</sup>b<sup>-</sup>)血型母亲为非分泌型。由于初乳中HMOs的含量较高, 所以对两者的初乳进行比较, 发现两者母乳中酸性HMOs的组成相同且含量接近, 而中性HMOs的组成和含量存在一定差异, 特别是岩藻糖基化低聚糖存在较大差异。分泌型母乳中含有较丰富的α-1-2-L-岩藻糖基化低聚糖, 标志性组分为2'-FL、LNFP I、LDFT、LNFDFH I; 非分泌型母乳中以LNT、LNnT和α-1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖为主, 没有或很少2'-FL、LNFP I、LDFT、LNFDFH I。如图2所示, 分泌型和非分泌型母乳中HMOs的组成差异。分泌型母乳中HMOs成分较非分泌型丰富, 所检测的个体成分组成差异较小(以1#样品为例)。非分泌型母亲的初乳中低聚糖组成个体差异比



较大。图2中2#~4#为非分泌型母乳样, 2#母乳中缺少LDFT、2'-FL、LNFP I, 而LNDFH I很少; 3#母乳中缺少LNFP II、LDFT, 而2'-FL、LNFP I很少; 4#母乳中未缺少监测分析的组分, 但LNDFH I、LDFT、2'-FL及LNFP I很少。

### 2.3 分泌型和非分泌型母亲泌乳期内HMOs组分含量变化

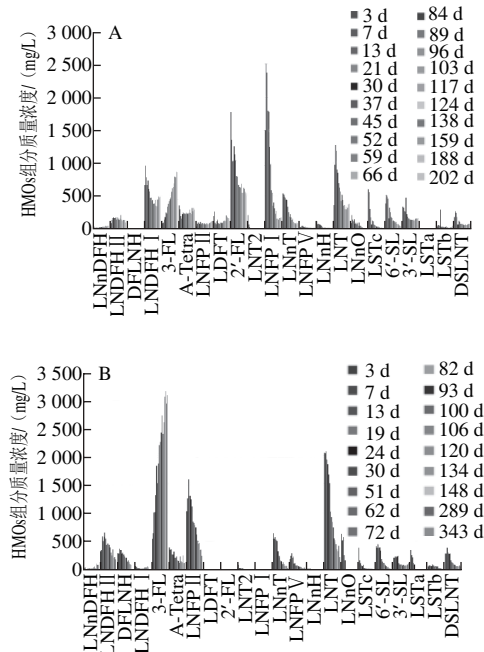


图3 分泌型(A)和非分泌型(B)母亲母乳中不同泌乳期HMOs组分含量变化图

Fig. 3 Changes in contents of 22 HMOs in secretor breast milk (A) and non-secretor breast milk (B) in different stages of lactation

对典型的分泌型和非分泌型母乳母亲, 在哺乳期前6个月进行密集采集母乳, 监测母乳中HMOs成分发现, HMOs在不同泌乳期内组成及含量差异明显。3-FL的含量在整个取样阶段均在持续增加, 而其他15种中性低聚糖的含量在泌乳初期(3~14 d)达到最高值后逐渐减少(成熟乳); 6种酸性低聚糖在泌乳初期后随时间延长逐渐减少, 其中LSTa只在部分样本中检出。图3给出了2个代表性样本, 很好地反映出分泌型和非分泌型母亲中HMOs各组分含量差异及变化趋势。图3A中分泌型母亲母乳的中性低聚糖最高质量浓度在500 mg/L以上的有LNFP I、2'-FL、LNT、LNDFH I、3-FL, 其中LNFP I质量浓度最高达2 500 mg/L, 缺少DFLNH、LSTa组分, LNT2在成熟乳中消失。图3B中非分泌型母乳的中性低聚糖最高质量浓度在500 mg/L以上的为3-FL、LNT、LNFP II、LNDFH II、LNaT、LNaO, 其中3-FL质量浓度最高达3 100 mg/L, 缺少LDFT、2'-FL、LNFP I组分, LNT2、LNaH、LSTa在成熟乳中消失。

表3 分泌型和非分泌型母亲母乳中22种HMOs组分含量比较

Table 3 Contents of 22 HMOs of milk from secretor and non-secretor mothers

样本类别	组分	mg/L					
		14个分泌型			8个非分泌型		
		平均 最小值	平均 最大值	质量浓度 范围	平均 最小值	平均 最大值	质量浓度 范围
无岩藻糖 基化低聚糖	LNT2	26	79	4~202	39	123	0~219
	LNaT	231	487	58~753	377	815	28~1 095
	LNT	468	960	271~1 578	733	1 653	225~2 105
	LNaH	26	77	0~177	5	18	3~26
	LNaO	79	186	9~335	183	476	21~681
$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖 基化低聚糖	2'-FL	858	1 306	220~2 270	11	19	0~22
	A-Tetra	219	353	120~564	258	504	100~675
	LDFT	122	306	37~741	3	42	0~42
	LNFP I	581	1 543	27~2 840	28	75	0~100
	LNDFH I	616	1 059	34~1 790	34	88	9~139
$\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖 基化低聚糖	3-FL	319	754	78~1 935	548	2 049	220~4 080
	LNFP II	121	198	0~544	372	1 058	0~1 611
	LNFP V	11	46	0~196	56	180	17~296
	LNaDFH	26	53	10~125	31	112	2~153
	LNDFH II	78	168	19~363	151	430	33~880
酸性低聚糖	DFLNH	53	91	0~209	189	413	0~486
	6'-SL	171	454	28~963	91	466	3~500
	3'-SL	150	294	41~706	127	290	52~342
	LSTa	53	264	0~1 370	60	386	0~889
	LSTb	30	86	10~286	24	80	7~123
$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基HMOs含量	LSTc	139	478	8~1 185	27	352	5~441
	DSLNT	100	207	35~357	71	302	54~385
	22种HMOs含量	5 249	8 034	2 631~12 465	4 374	7 552	3 004~9 090
	$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基HMOs含量	2 582	4 785	1 211~7 272	313	640	100~920
	$\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基HMOs含量	522	1 111	181~2 722	1 712	3 000	476~4 931
	岩藻糖基HMOs含量	3 519	5 125	2 002~7 837	2 115	3 498	1 005~5 061
	无岩藻糖基HMOs含量	834	1 637	350~2 346	1 306	2 991	259~3 445
	酸性HMOs含量	731	1 469	232~2 870	448	1 623	171~1 857

注: 分泌型14人, 其中平均最大、最小值统计10人, 含量范围统计14人; 非分泌型8人, 其中平均最小、最大值统计4人, 含量范围统计8人。

如表3所示, 分泌型母亲的母乳中可定量检出15~16种中性HMOs和5~6种酸性HMOs, 主要组分为无岩藻糖基化低聚糖LNT、LNaT,  $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖2'-FL、LNFP I、LNDFH I, 酸性低聚糖6'-SL、3'-SL、LSTc、DSLNT。平均最高含量在500~1 600 mg/L的组分有LNT、2'-FL、LNFP I、LNDFH I、3-FL, 其中2'-FL和LNFP I的最高质量浓度达2 270 mg/L和2 840 mg/L。在0~6个月内组分平均质量浓度都在100 mg/L以下或缺少或随泌乳期延长而消失的组分有LNT2、LNaH、LNFP V、LNaDFH、DFLNH、LSTb。0~6月哺乳期母乳中5种 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖、6种 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖、5种无岩藻糖基化低聚糖、6种酸性低聚糖、总低聚糖的平均值范围分别为2 582~4 785、522~1 111、834~1 637、731~1 469、5 249~8 034 mg/L, 这4类HMOs分别占22种总HMOs比例为50%~60%、10%~15%、15%~20%、14%~20%。

非分泌型母亲的母乳中可定量检出11~16种中性HMOs和6种酸性HMOs, 主要组分为无岩藻糖基化低聚糖LNT、LNnT,  $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖3-FL、LNDF II、LNDFH II, 酸性低聚糖6'-SL、3'-SL、LSTc、DSLNT。平均最高质量浓度在500~2 100 mg/L的组分有LNT、LNnT、A-Tetra、3-FL、LNDF II, 其中LNT和3-FL的最高质量浓度达2 105 mg/L和4 080 mg/L。在0~6月内组分平均质量浓度都在100 mg/L以下或缺少或随泌乳期延长而消失的组分有LNnH、2'-FL、LDFT、LNFP I、LNDFH I、LSTb。0~6月哺乳期母乳中5种 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖、6种 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖、5种无岩藻糖基化低聚糖、6种酸性低聚糖、总HMOs的平均值范围分别为313~640、1 712~3 000、1 306~2 991、448~1 623、4 374~7 552 mg/L, 这4类HMOs分别占总HMOs比例为7%~9%、40%、30%~40%、10%~22%。

总体上看, 分泌型母亲母乳HMOs平均质量浓度比非分泌型的要高500~1 000 mg/L且成分组成更丰富, 其中 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖总量比非分泌型的高约7倍, 而非分泌型的 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖和无岩藻糖基化低聚糖则比分泌型的高约1~2倍。分泌型母乳中的 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖比 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖的高约4倍, 而非分泌型母乳中的正好相反( $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖比 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖的高约4倍)。

### 3 讨论

#### 3.1 不同泌乳期中国母乳HMOs成分的变化

本研究采用HPAEC-IPAD法同时分析母乳中的中性和酸性低聚糖, 对每一位母亲, 至少取样10次以保证能更好地监测22种低聚糖在产后0~6个月的含量变化。过去的相关研究多集中于欧美地区母亲母乳中10多种HMOs组分的变化, 几乎没有对同一位母亲从开始泌乳持续监测至半年以上且同时分析HMOs种类达到22种的研究数据。

关于中国母乳HMOs的研究较少。姚文等<sup>[27]</sup>用高效液相色谱衍生化法检测了上海51位母亲9种低聚糖的变化趋势, 认为2'-FL和3-FL随泌乳期呈上升趋势, LNFP I的含量则持续下降。而Austin等<sup>[22]</sup>用高效液相色谱法检测了北京、广州、苏州450位母亲10种低聚糖的变化趋势, 却认为包括2'-FL在内的9种低聚糖的含量在初乳或过渡乳时达到最高后保持一定时间后逐渐减少。本研究结果与Austin等<sup>[22]</sup>研究的HMOs变化趋势基本一致, 但具体含量有较大差异(以初乳为例, 由于初乳中HMOs含量一般是最高的), 其中2'-FL的质量浓度范围为

0~2 270 mg/L比Austin等<sup>[22]</sup>的26~4 900 mg/L变动范围要小。这有可能是检测方法或人群的差异导致, 需要更大样本量的统计分析确定。3-FL是所有HMOs成分中唯一随泌乳时间延长而保持含量增加的成分, 在测定的中国母乳中, 其最低点平均值在分泌型中为319 mg/L; 最高点平均值在非分泌型中为2 049 mg/L。另外, 3-FL与2'-FL在母乳中的含量视乎有一定的互补性, 2'-FL含量高的母乳样本, 3-FL的起始含量较低, 随着2'-FL的逐步走低, 3-FL逐步增加。而没有或很少2'-FL的母乳样本中, 3-FL的含量普遍较高。

#### 3.2 岩藻糖基化HMOs的人群差异

据Glycom A-S公司2014年申报的FDA GRASS文件GRN000546中的附件A (APPENDIX A) 中总结的多项研究数据, 认为2'-FL在母乳中的平均质量浓度为2 000~4 000 mg/L, 但是这一结论主要是根据欧美地区母亲母乳的分析结果得出, 然而本研究的结果却表明2'-FL在中国母亲母乳中的变动范围要低得多, 其最低点平均值在非分泌型母亲母乳中为11 mg/L, 最高点平均值在分泌型母亲母乳中为1 306 mg/L, 另外, 2'-FL的浓度在泌乳初期达到最高值, 然后随着泌乳时间的延长而逐渐减少。

在过去的报道中, 也有2'-FL含量较低的情况出现, 其中有研究表明检测成熟乳的2'-FL含量分别为220 mg/L<sup>[17]</sup>和1 480 mg/L<sup>[28]</sup>, 另外一篇论文分析了南太平洋萨摩亚群岛母亲的初乳, 其2'-FL的含量为330 mg/L<sup>[19]</sup>。Erney等<sup>[29]</sup>对10个国家母亲的母乳进行研究, 发现78%的中国母亲乳汁中分泌2'-FL, 而菲律宾仅有46%的母亲乳汁中含有2'-FL, 可见2'-FL的分泌与地域也存在一定关系, 所以是否中国或亚洲地区和欧美地区母乳中2'-FL存在较大差别, 甚至其他岩藻糖基化HMOs的含量变化也存在人群差异, 值得进一步进行大样本量的比对分析和研究。

#### 3.3 HMOs与Lewis血型关系

本研究通过对HMOs的分析检测和对母亲的Lewis血型进行鉴定, 发现母亲产后0~6个月母乳中低聚糖的组成及含量与其Lewis血型有密不可分的关系, 不同的Lewis血型会影响母乳的中性低聚糖(包括无岩藻糖基化低聚糖、 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖和 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖)的组成及含量, 对酸性低聚糖的组成未有明显差异, 但在含量变化上会有一定差异。

根据其岩藻糖基连接位置的不同, 可将岩藻糖基化的HMOs分为 $\alpha$ -1-2、 $\alpha$ -1-3、 $\alpha$ -1-4连接。岩藻糖基化的HMOs由 $\alpha$ -1-2和 $\alpha$ -1-3、 $\alpha$ -1-4岩藻糖转移酶控制产生, 而 $\alpha$ -1-2、 $\alpha$ -1-3、 $\alpha$ -1-4岩藻糖基转移酶的表达与FUT2 (Se基因) 和FUT3 (Lewis基因) 有关, 所以, 这2个基因的不同表达会影响Lewis血型。根据文献[13-14], 总结出三者之间的关系, 如表4所示。

表4 岩藻糖基转移酶、Lewis血型与相关基因的关系

Table 4 Relationship among fucosyltransferase, Lewis blood types and related genes

基因型		基因产物	Lewis血型
Lewis (FUT3)	Se (FUT2)		
LelLe或Lelle	Se/Se或Selse	$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶	Le (a <sup>-</sup> b <sup>+</sup> )
LelLe或Lelle	selse	$\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基转移酶	Le (a <sup>+</sup> b <sup>-</sup> )
lelle	Se/Se或Selse	$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶	Le (a <sup>-</sup> b <sup>-</sup> )
lelle	selse	$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶	Le (a <sup>-</sup> b <sup>-</sup> )
LelLe或Lelle	Sew (弱)	$\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基转移酶 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基转移酶	Le (a <sup>+</sup> b <sup>+</sup> )

本研究中Le (a<sup>-</sup>b<sup>+</sup>) 表型的母亲母乳富含2'-FL、LNFP I、LDFT、LNDFH I等 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖, 为分泌型母亲母乳; 而Le (a<sup>+</sup>b<sup>-</sup>) 表型的母亲母乳以 $\alpha$ -1-3/4-L-岩藻糖基化低聚糖和无岩藻糖基化低聚糖为主, 缺少或含有很低浓度的 $\alpha$ -1-2-L-岩藻糖基化低聚糖, 此类为非分泌型母亲母乳。分泌型与非分泌型母亲母乳的HMOs组成与含量均有较大的差异。

### 3.4 中国母亲HMOs数据库的构建

有研究<sup>[30]</sup>表明, 分泌型和非分泌型母亲母乳影响婴儿肠道菌群的定植时间和菌群构成。分泌型母乳哺乳的婴儿双歧杆菌的定植要比非分泌型的要早, 且双歧杆菌数量更多, 表明婴儿肠道中双歧杆菌的优先定植与HMOs成分和含量相关。未来开展HMOs分析研究, 同时跟踪监测婴儿粪便中HMOs和菌群的变化, 对进一步确定分泌型和非分泌型母亲母乳中HMOs组成对婴儿健康和成长的影响是很有价值的研究。

目前针对中国母乳HMOs的研究还处于起步阶段, 为此, 及早规划、建立中国母亲HMOs大数据库很有必要。其目标是希望通过大样本的收集中国母亲和婴儿健康背景资料、测定相应母乳中HMOs组分及含量、鉴定母亲的Lewis血型、同时跟踪监测婴儿发育过程中肠道菌群的变化等多层次、多方面研究相结合, 积累数据逐步建立代表性区域乃至全国范围的大样本量的HMOs变化及其对应的婴儿发育健康关联数据库。由于母乳是人体发育生长最初和最脆弱阶段母亲对婴儿的直接生命呵护纽带和营养来源, 而母乳HMOs又是这个纽带中许多生物遗传、免疫调控信息的分子载体, 所以建立大数据库并对其中的各种关联影响加以研究、总结, 必将揭示出更多关于HMOs中所携带的母体对幼体保护和营养的生物密码和调控信息, 这些信息对分子层面更深刻地认识中国母乳的特点及其对婴幼儿健康、发育成长的影响至关重要, 这些科学数据和信息也将能进一步指导我国母乳代用品企业合理开发产品、合理添加低聚糖配料, 促进母乳代用品质量的提高, 为保证婴幼儿的营养和健康发育成长打下坚实的科学基础。

### 参考文献:

- [1] 魏远安, 张丽君, 郑慧玲, 等. 中国母乳低聚糖的研究进展和现状[J]. 食品工业科技, 2016, 39(3): 33-38. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2016.03.008.
- [2] DONOVAN S M, COMSTOCK S S. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2016, 69(Suppl 2): 42-51. DOI:10.1159/000452818.
- [3] URASHIMA T, ASAKUMA S, LEO F, et al. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(3): 473-482. DOI:10.3945/an.111.001412.
- [4] KUNZ C. Historical aspects of human milk oligosaccharides[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(3): 430-439. DOI:10.3945/an.111.001776.
- [5] BLANK D, GEBHARDT S, MAASS K, et al. High-throughput mass finger printing and Lewis blood group assignment of human milk oligosaccharides[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(8): 2495-2510. DOI:10.1007/s00216-011-5349-9.
- [6] NEWBURG D S. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans[J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(Suppl 13): 26-34. DOI:10.2527/jas.2008-1347.
- [7] DE LEOZ M L, WU Shuai, STRUM J S, et al. A quantitative and comprehensive method to analyze human milk oligosaccharide structures in the urine and feces of infants[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(12): 4089-4105. DOI:10.1007/s00216-013-6817-1.
- [8] HESTER S N, CHEN Xin, LI Min, et al. Human milk oligosaccharides inhibit rotavirus infectivity *in vitro* and in acutely infected piglets[J]. British Journal of Nutrition, 2013, 110(7): 1233-1242. DOI:10.1017/S0007114513000391.
- [9] LOCASCIO R G, NINONUEVO M R, KRONEWITTER S R. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 2(3): 333-342. DOI:10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x.
- [10] KUNTZ S, KUNZ C, RUDLOFF S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells[J]. British Journal of Nutrition, 2009, 101(9): 1306-1315. DOI:10.1017/S0007114508079622.
- [11] ZIVKOVIC A M, GERMAN J B, LEBRILLA C B. Human milk glycometabolism and its impact on the infant gastrointestinal microbiota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(11): 4653-4658. DOI:10.1073/pnas.1000083107.
- [12] 孙建华, 谢恩萍. 母乳喂养与新生儿免疫[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(3): 204-207. DOI:10.3969/j.issn.1000-3606.2012.03.002.
- [13] KOBATA A. Structures and application of oligosaccharides in human milk[J]. Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences, 2010, 86(7): 731-747. DOI:10.2183/pjab.86.731.
- [14] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 156-164.
- [15] 安万新, 于卫建. 输血技术学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2010: 56-61.
- [16] URASHIMA T, ASAKUMA S, LEO F, et al. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(3): 473-482. DOI:10.3945/an.111.001412.

- [17] SUMIYOSHI W, URASHIMA T, NAKAMURA T, et al. Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation[J]. *British Journal of Nutrition*, 2003, 89(1): 61-69. DOI:10.1079/BJN2002746.
- [18] NIÑONUEVO M R, PERKINS P D, FRANCIS J, et al. Daily variations in oligosaccharides of human milk determined by microfluidic chips and mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 56(2): 618-626. DOI:10.1021/jf071972u.
- [19] LEO F, ASAKUMA S, FUKUDA K. Determination of sialyl and neutral oligosaccharide levels in transition and mature milks of Samoan women, using anthranilic derivatization followed by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74(2): 298-303. DOI:10.1271/bbb.90614.
- [20] NIÑONUEVO M, AN H, YIN Hongfeng, et al. Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(19): 3641-3649. DOI:10.1002/elps.200500246.
- [21] 魏京华, 陈历俊, 赵军英, 等. 液相色谱-质谱法快速检测4种乳源低聚糖[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 86-91. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614015.
- [22] AUSTIN S, DE CASTRO C A, BÉNET T, et al. Temporal change of the content of 10 oligosaccharides in the milk of Chinese urban mothers[J]. *Nutrients*, 2016, 8(6): 346-368. DOI:10.3390/nu8060346.
- [23] KUNZ C, RUDLOFF S, SCHAD W, et al. Lactose-derived oligosaccharides in the milk elephants: comparison with human milk[J]. *British Journal of Nutrition*, 1999, 82(5): 391-399. DOI:10.1017/S0007114599001798.
- [24] COPPA G V, PIERANI P, ZAMPINI L, et al. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation[J]. *Acta Paediatrica*, 1999, 430: 89-94. DOI:10.1111/j.1651-2227.1999.tb01307.x.
- [25] THURL S, MUNZERT M, HENKER J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactation periods[J]. *British Journal of Nutrition*, 2010, 104(9): 1261-1271. DOI:10.1017/S0007114510002072.
- [26] GABRIELLI O, ZAMPINI L, GALEAZZI T, et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation[J]. *Pediatrics*, 2011, 128(6): 1520-1531. DOI:10.1542/peds.2011-1206d.
- [27] 姚文, 张卓君, 周婷婷, 等. 中国母亲母乳中中性寡糖的浓度变化[J]. *中国儿童保健杂志*, 2009, 17(3): 251-253.
- [28] ASAKUMA S, HATAKEYAMA E, URASHIMA T, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(40): 34583-34592. DOI:10.1074/jbc.M111.248138.
- [29] ERNEY R M, MALONE W T, SKELDING M B, et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2000, 30(2): 181-192. DOI:10.1097/00005176-200002000-00016.
- [30] LEWIS Z T, TOTTEN S M, SMILOWITZ J T, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants[J]. *Microbiome*, 2015, 3(1): 3-13. DOI:10.1186/s40168-015-0071-z.