

· 专家论坛 ·

微生物组与人体健康研究策略及方法

张晨虹, 杨 鑫

(上海交通大学生命科学技术学院微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

关键词: 微生物组; 人体健康; 策略

中图分类号: R372 文献标识码: A 文章编号: 1671-2870(2019)03-0250-08

DOI: 10.16150/j.1671-2870.2019.03.003

当今世界的绝大多数国家正面临着严重的慢性疾病爆发和流行, 其中与饮食习惯和生活方式相关的慢性疾病尤其严峻^[1]。在 2015 年之前, 我国政府在心脏病、卒中和糖尿病上的财政支出就高达 5 580 亿美元^[2]。流行病学数据表明, 实际上有 90% 以上的慢性疾病可以被预防^[3]。可见, 把工作重心从“治疗”转移到“预防”上, 是目前解决此类全球性公共医疗问题的可行方案。但现阶段关于评价疾病与否的临床指标, 无法全面反映人体健康和慢性病的发生和发展程度。

人体是一个极其复杂的生物系统, 细胞、组织与器官间相互整合和、协调, 才使得这个庞大的生物系统维持正常运转。而复杂的系统具有一个最重要的特征——“涌现特征”, 即整体功能大于局部功能之和^[4-5]。传统中医会运用涌现特征去评价人体的整体健康水平, 这类涌现特征指标必须可以反映全身系统性状态, 可通过分子水平检测, 取样手段也最好为非侵入性, 同时必须适于推广, 且检测的是动态的身体状态, 检测结果必须可定量、可重复。然而, 目前这种涌现特征指标相当难以寻找到。

近年来, 关于“人类——微生物代谢轴”对健康有重要影响已达成普遍共识。人类是一个行走的“生物反应器”, 人的肠道实质上也是一个大型的“发酵罐”, 人们的生活方式和饮食习惯都无可避免地维持和动态改变着肠道菌群的组成。没有任何一个人体细胞可以脱离被菌群代谢物影响。因此, 肠道菌群是可以反映人体系统状态涌现特征的指标, 是潜在的疾病诊治和健康测量的新窗口。本文将整理出寻找微生物组与疾病因果关系的策略, 介绍以肠道菌群为重要靶点的健康评估新方法。

分析微生物组与疾病因果关系的策略

一、相关策略

尽管肠道菌群研究已是热门领域, 但在该方向

仍存在很多问题, 其中一个关键问题是, “细菌的功能是菌株专一性的”这一概念长期被普遍忽略。在细菌的分类学中, 一个“种”内可以含有不同的菌株, 其基因组同源性最多可以相差 30%, 即属于同一个种的 2 个不同菌株之间的遗传差异, 甚至能超过人与小鼠之间的遗传差异, 后者间的遗传差异仅有 10%^[6]。同一种下多个菌株的基因组测序结果揭示了这一庞大的遗传多样性^[7-9]。因此, 在研究肠道菌群与疾病间的关系时, 一定要努力识别到菌株水平, 才有可能发现和鉴定出影响人体疾病发生、发展的关键功能细菌种群及其产物 (代谢物和抗原等), 并阐明这些细菌影响宿主健康的机制, 才能开发出以肠道菌群为靶点的疾病的诊断、预防和治疗的新技术、新方法。

上海交通大学赵立平教授^[10]在 *Nature Reviews Microbiology* 发表的文章, 提出了遵循“科赫法则”的逻辑框架、识别影响代谢性疾病的关键肠道功能细菌种群的研究策略: ①基于疾病临床队列或干预试验, 利用“全微生物组关联分析”, 寻找与疾病显著相关的关键肠道细菌种群; ②分离并鉴定出这些功能菌, 在无菌动物模型中复制疾病, 或在疾病动物模型中研究其拮抗代谢失调的能力; ③阐明从功能菌到疾病症状出现之间、或者代谢失调的拮抗菌到疾病症状改善之间的分子机制。

在菌株特异性原则的基础上, 首先要利用全微生物组关联研究寻找关键的功能菌群成员。与某个特定人体疾病有关系的肠道菌群成员或许有多种, 有的种类可能是促进疾病发生、发展的, 有的可能会延缓疾病的发生、发展。因此, 首先需要通过患者的菌群进行改变, 使临床症状得到改善, 然后通过宏基因组和代谢组多组学结合的方法进行“全微生物组关联分析”, 把与人体疾病发生、发展“正相关”或者“负相关”的细菌种类鉴定出来^[11]。全微生物组关联分析不仅能够应用于病例对照研究, 也能

用于时序性研究。由于肠道微生物组的结构可塑性,在时序性研究中通过更小的样本量即能够找到相关性。除此之外,需要对志愿者的粪便、血液和尿液等样品在干预措施开展全阶段进行连续采样。血液、尿液和粪便中含有可反映人体健康状况的重要的生物学信息,科学工作者可以按需选择靶向或非靶向代谢组学检测技术,分析血液、尿液和粪便中机体和肠道菌群的代谢产物的种类和浓度,继而与疾病病程、菌群结构等指标进行关联分析,找到潜在的可以影响疾病的菌株和关键代谢物。最后,需要通过培养组学分离技术分离并鉴定出这些功能菌,在无菌动物模型中复制疾病,或在疾病动物模型中研究其拮抗代谢失调的能力,阐明从功能菌到疾病症状出现之间、或者代谢失调的拮抗菌到疾病症状改善之间的分子机制。通过上述步骤,尝试回答与肠道菌群与疾病间关系研究的 3 个根本问题:“谁在那里?”“它们能做什么?”以及“它们怎么做?”。

二、依据策略取得的工作

1. 肠道菌群与肥胖:科学工作者利用上述策略作了许多重要的工作。例如,上海交通大学赵立平团队首次发现一株来自重度肥胖患者肠道的条件致病菌,在无菌小鼠体内引起了严重的肥胖和胰岛素抵抗,该过程遵循了科赫法则的逻辑架构,提示了内毒素产生菌的过度增长可能是肥胖和胰岛素抵抗发生的重要原因^[12]。研究人员在对一名重度肥胖患者进行膳食干预的过程中发现,膳食干预前,与肠杆菌属相关的细菌构成比约占该肥胖个体肠道菌群的 35%,但在该志愿者从其初始体重 174.8 kg 中减掉 51.4 kg 后,这些细菌几乎检测不到了。他们从该肥胖患者粪便中分离得到了一株阴沟肠杆菌 B29(以下简称 B29),并进行了后续的机制研究。与无菌小鼠能够抵抗高脂饮食引发的肥胖和胰岛素抵抗不同,只接种了 B29 一种菌的悉生小鼠在经过高脂饮食喂养后,与饲喂相同高脂饮食的普通小鼠出现了同样的肥胖和胰岛素抵抗症状;而只接种了 B29 一种菌的悉生小鼠在正常饮食喂养的条件下依然能够保持瘦的状态,这表明高脂饮食是 B29 诱发肥胖的辅因子。此外,血清脂多糖结合蛋白的检测表明,只接种了 B29 一种菌的肥胖悉生小鼠具有更高的抗原负载,且循环系统、肝脏和脂肪组织中的炎症都有所增强。作为对照,接种单一的双歧杆菌的悉生小鼠未在高脂饮食诱导下发生肥胖,与无菌小鼠的表现类似,这就表明 B29 所具备的诱发肥胖的能力具有特异性^[12]。

2015 年,Zhang 等^[13]对儿童遗传性肥胖和单纯性肥胖儿童进行了营养干预,并按照时间序列采集了其血液、尿液和粪便样本,然后对血液临床指标、尿液代谢组学数据和粪便的宏基因组学数据进行了关联融合分析。结果发现,肠道菌群失调在人类遗传因素造成的肥胖中也有重要贡献,证实了无论是遗传因素还是膳食导致的肥胖中,失调的肠道菌群具有普遍的病因学作用。这项研究中建立了基于优势菌高质量基因组草图拼装的宏基因组测序和分析平台,得到了 100 多株优势菌的高质量基因组草图,实现了肠道菌群的菌株水平的宏基因组变化与尿液代谢组变化的关联分析,发现了可能通过产生某种代谢物参与宿主代谢性疾病发生、发展的功能菌株。如找到了与尿液中三甲基胺氧化物浓度呈正相关且基因组同时也编码了把食物中的胆碱转化为三甲基胺的功能基因的菌株。由于已知三甲基胺氧化物可以促进冠状动脉粥样硬化,这些功能菌就成为参与推动疾病发展的候选“病菌”。这样的研究证明了,以多变量统计学整合分析宏基因组学、代谢组学数据来系统识别影响疾病的关键肠道功能细菌种群的研究策略在疾病临床研究中的可行性^[13]。

2. 肠道菌群与 2 型糖尿病:2018 年,赵立平团队^[14]利用此分析策略证实了高膳食纤维营养干预辅助阿卡波糖治疗,其可快速、有效改善 2 型糖尿病,同时通过分析肠道菌群变化,鉴定出一组与临床治疗效果显著相关的短链脂肪酸产生菌。通过专门设计的同等热量膳食进行随机分组的 2 型糖尿病临床干预研究,结合肠道微生物宏基因组测序,发现在接受高膳食纤维干预的 2 型糖尿病患者肠道中富集了一组特定的短链脂肪酸产生菌,而其他具有产生短链脂肪酸遗传潜力的细菌或没有发生变化,或显著下降。这组高膳食纤维富集的短链脂肪酸产生菌的丰度和多样性越高,通过增加胰高血糖素样肽 1 的分泌,从而使受试者糖化血红蛋白改善得也越好。富集这些特定的短链脂肪酸产生菌,能够减少那些产生如吲哚和硫化氢等损害代谢健康物质的细菌,这是由于当这些短链脂肪酸产生菌维持一定的种群水平时,其代谢物能够创造一个积极的肠道环境,如减低肠道 pH、增加丁酸盐水平及强化竞争性抑制,从而抑制病菌及有害菌生长,支持宿主的健康。移植了患者干预后肠道菌群的无菌小鼠,其血糖代谢显著优于移植干预前菌群的动物。不仅如此,这组被富集的短链脂肪酸产生菌的

增加先于患者糖化血红蛋白生理水平上的降低,这不仅意味着膳食改变的肠道菌群是宿主代谢健康改善的原因,且提供了一个以菌群为靶点来早期预测膳食干预效果的窗口期。以恢复这些短链脂肪酸产生菌为目标的营养干预,为2型糖尿病提供了新的基于生态学原理的防控方法^[14]。

肠道菌群分析技术

一、基因组学分析技术

1. 二代和三代测序技术及平台:在上述研究策略中,对微生物组结构、组成及功能分析是其核心。近十年内,基因测序技术不断革新、价格不断下降且通量不断增加,为微生物组与人体健康的研究提供的技术上的可能性。Illumina 测序平台是现在应用最广泛的二代测序平台之一。在该平台中,通过可逆的叠氮基团链终止反应,可将荧光信号转换为碱基序列。虽然 Illumina 测序平台的测序长度较短(如 X Ten 及 NovaSeq 6000 系统的最长测序读长都为 150 bp),但能够提供非常大的测序量(X Ten 平台每次测序能够产出 1.6~1.8 Tb 的测序量,而更新发布的 NovaSeq 6000 系统每次测序最多能够产出 6 Tb 的测序量)^[15]。

通过荧光标记识别碱基序列的单分子读取技术 Pacific Bioscience 和通过测定电流强度识别碱基序列的 Oxford Nanopore 技术是三代测序中的两大技术平台。Pacific Bioscience 应用单分子读取技术,将聚合酶固定在纳米孔的底部,当 DNA 模板经过纳米孔底部发生聚合反应时,已被不同荧光标记的核苷酸被添加到 DNA 链上,释放出不同的荧光,根据光的波长与峰值判断添加的碱基类型。Oxford Nanopore 平台利用孔形成蛋白固定在膜表面形成纳米孔,当碱基通过纳米孔时,跨孔电流强度会出现 4 种改变,分别对应不同的碱基,通过测量电流强度的改变来识别是哪一类碱基,从而达到 DNA 测序的目的。相比于二代测序,测序读长更长、测序时间更短、全程无 PCR 过程以及价格更便宜是三代测序的主要优点,但其缺点则在于测序错误率更高^[16],现阶段 Pacific Bioscience 平台平均每 8~12 个碱基就会有一个碱基被测错,错误率高达 10% 以上,但其随机分布的碱基错误率可以利用构建的“哑铃型文库”,通过多次往复测序被校正,这是一种用测序通量换取测序准确性的策略。

基于测序技术开展对肠道菌群研究的重要优

势是,无需将微生物进行培养,同时能够更为全面地提供样品中的物种组成等信息。相比于传统的微生物研究技术,测序技术更加省时、省力,也因为如此,研究者现在能够开展的实验规模之大是在 10 年前所无法想象的。基于测序技术优势,全球众多机构发起的专项研究产出了大量可供研究者自由获取的数据以及关于人体肠道菌群的研究成果^[17-20]。

2. 宏基因组学: Goodman 等^[21]在 1998 年首先提出了“宏基因组”一词。在 2005 年,Chen 等^[22]在前人工作的基础上,将宏基因组学定义为应用现代基因组学技术直接对自然环境中的微生物群落进行研究,而不需要对单个菌群成员进行分离和培养。首个应用宏基因组学开展的肠道菌群研究发表于 2006 年,Gill 等^[23]利用先构建克隆文库后测序的方式,对 2 名健康成人的粪便 DNA 进行测序,共得到约 7 千 8 百万条 DNA 序列,并发现人体肠道细菌富含多糖代谢、氨基酸代谢、甲烷合成及维生素合成等功能。同年,首个应用高通量测序技术开展的宏基因组学研究发表,在该研究中,Schuster 等^[24]利用焦磷酸测序技术对长毛象化石进行测序分析,得到的测序数据中包含了来自于多种物种的遗传信息。在利用测序技术对肠道菌群进行研究的方法中,宏基因组学是当下的应用热点,其研究对象是环境内所有微生物的所有遗传信息,能够同时得到菌群的组成和功能信息。因此,宏基因组学既克服了全基因组测序往往需要先将目标细菌进行分离培养的局限,也弥补了靶向基因(如 16S rRNA)测序分析中的信息不全的劣势。Garrido-Cardenas 等^[16]在对 Elsevier Scopus 数据的检索中发现,仅包含“人体”这一关键词的宏基因组学研究论文就已经从 2009 年的全年不到 200 篇,升至 2015 年的全年 700 余篇。近年来,诸如美国国立卫生研究院发起的 HMP(Human Microbiome Project)和由欧盟委员会资助的 MetaHIT 项目,充分地利用了测序技术的优势,产出了大量可供研究者自由获取的数据以及关于人体肠道菌群的研究成果。如 HMP 的研究结果预计涵盖了西方健康人微生物组 81%~99% 的属、菌群酶家族及菌群特征,为未来人体微生物组的流行病学、生态学以及转化应用提供了重要的参考信息^[18],MetaHIT 的一项重要研究成果则是对人体肠道细菌编码的基因数量进行不断地摸索和注释,基于来自三大洲共计 1 267 份的菌群样品,经过对数据的计算和分析,最终得到了一个含有 9 879 896 个肠道微生物基因的基因集合,该集合

已基本涵盖了大多数肠道菌群的所有基因,为探究肠道菌群在健康与疾病人群之间的差异提供了基础^[19]。在充分认识到微生物对于人体健康的重要性之后,科学家们提出了更宏伟的计划。在 2015 年,美国的一批菌群研究邻域前沿科学家们提出了开展“联合微生物组研究项目”的建议。该项目经由白宫科学与技术政策办公室、加利福尼亚 Oxnard 的 Kavli 基金会资助的一系列研讨后提出。紧随其后,来自德国 (Nicole Dubilier 教授)、美国 (Margaret McFall-Ngai 教授)、中国 (赵立平教授) 三国的科学家共同呼吁,在联合微生物组研究项目计划的基础上建立国际微生物组研究计划,希望得到全世界的资助机构和基金会的支持,保证不同国家、地域能够共享标准,实现已有微生物组研究计划的整合^[20]。

测序技术的不断进步,不仅让大规模研究项目的实现成为可能,同时因其多种形式的应用,也极大地丰富了研究内容的层次。宏基因组学平台可以提供肠道菌群结构的详细信息,但这些信息不能直接反映菌群的功能活性,宏转录组的发展弥补了单纯依赖基因组测序分析技术的不足,其以转录水平分析环境中具有功能活性的菌群结构,并可以根据其功能活性重新定义肠道菌群的结构组成^[25]。现如今,基于宏转录组学已开发出了许多相关的算法工具,科研工作者可以根据具体需求进行选择,这让基因组学分析平台能更好地服务于肠道菌群研究。

二、代谢组学检测分析技术

自 1999 年 Jeremy Nicholson 提出了代谢组学概念至今^[26-27],随着分析化学的发展,代谢组学技术也获得了蓬勃发展。对于人体来说,代谢的血液、尿液和粪便是最重要的可以反映机体状态的生物学信息,血液作为循环系统运载丰富的营养、细胞因子调控周身代谢平衡;尿液中含有种类繁多的小分子代谢物;粪便中含有大量的微生物及其代谢物。体内的任何功能紊乱都可能导致这些样品的分子组成发生变化^[26]。系统生物学可能有助于获取对于健康程度的评估和检测这些变化。科学工作者可以按需选择靶向或非靶向代谢组学检测技术,分析机体和肠道菌群的代谢产物,进而从整体评价人体的健康状况。

1. 分析平台及优势:核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR) 和 色 谱 - 质 谱 联 用 (chromatogram-mass spectrometer, LC/GC-MS) 是代谢组学研究领域的最主流分析平台。NMR 可以进行生物流质(包括血液、尿液和粪悬液等)的代谢组学分

析,是一种非侵入性的、成本低廉、高通量且可重现的分析手段,其可以提供代谢物的组成和分子结构的相关信息,这对于鉴定未知物质作为生物标志物必不可少。基于 NMR 分析的代谢组学分析已被广泛应用于毒理学、营养学和流行病学等研究领域^[28],其优势在于不通过标准曲线的真正定量,样品可保留,单次反应就能检测到所有带有结构信息的代谢物。LC-MS 联用技术则更适用于分析难挥发或热稳定性强的代谢物,同时 LC 还可以选择与飞行时间、四级杆-飞行时间、离子阱-飞行时间、静电轨道阱等高分辨质谱串联。因此,具备绝对定量和结构解析特点的 NMR 技术与具有灵活性和普适性的 LC-MS 技术的结合,成为当前代谢组学分析研究中最为常用的技术平台。此外,在代谢组学最前沿的技术——代谢流分析中,采用“核素示踪”实验来追踪标记的核素在代谢网络中的流向,通过分析代谢网络中核素标记的代谢物变化情况,准确地揭示代谢物的产生和流向,并清晰地解决关键代谢通路。

2. 实际应用:大量文献表明,肠道菌群代谢相关物质与人体的健康息息相关^[29-33]。然而,由于肠道菌群及其代谢产物以及宿主与肠道菌群共代谢物种类繁多、来源复杂、浓度极低且动态变化迅速,因此高覆盖准确定量检测这些代谢物面临极大的挑战。目前,发展复杂生物样本(如临床样本)的超灵敏高覆盖分析技术是国际代谢组学领域的重难点。目前,我国的超灵敏代谢组学检测技术处于国际领先水平,众多基础科学领域的学科骨干改良并创新了代谢物检测技术,不断提高检测灵敏度和检测覆盖率,在该领域取得了具有国际影响力的成绩^[34]。武汉大学的冯钰錡研究组将代谢物富集与质谱探针技术相结合,发展了超灵敏定量分析羧酸、硫醇等代谢物的检测分析方法,灵敏度达到了 10^{-14} 摩尔量级,并成功应用于模型鼠粪便的代谢物高覆盖分析检测。中科院武汉物理与数学研究所王玉兰研究组和复旦大学唐惠儒研究组发展了胆汁酸、磷脂、肠道菌群与宿主相互作用的代谢产物等多类代谢物的超灵敏定量检测方法,其灵敏度达到了 10^{-15} 摩尔量级,同时还建立了覆盖 20 多个重要代谢途径中的氨基酸代谢物的精密定量测量技术,灵敏度突破了 10^{-15} 摩尔量级,实现了超灵敏靶向代谢组学技术的关键突破,发展了组织细胞代谢组 HRMAS-NMR 原位定量方法和代谢流“核素示踪”技术,并清晰地研究了细胞糖酵解代谢途径^[35]。

肠道菌群产物 [如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)]、宿主与肠道菌群共代谢物(如马尿酸)以及二者相互作用产生的代谢物(如胆汁酸),与感染性肠炎、非酒精性脂肪性肝病等慢性炎症性肠、肝疾病的发生、发展密切相关^[36]。其中,SCFAs 主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸,大多是由食物中尚未被完全消化吸收的纤维素和碳水化合物在结肠腔内经肠道菌群发酵生成,是对宿主代谢健康具有关键作用的重要肠道细菌的代谢产物。这些重要细菌分别是来自厚壁菌门的 *Phascolarctobacterium*、*Roseburia*、*Blautia*、*Faecalibacterium*、*Clostridium*、*Subdoligranulum*、*Ruminococcus* 和 *Coprococcus* 属以及来自拟杆菌门的 *Bacteroides* 属。肠道中的 SCFAs 不仅可以为结肠黏膜供主要的能量物质来源,促进肠道细胞的分化和紧密连接蛋白的装配,上调肠道 L 细胞胰高血糖素原基因的表达,可提高具有肠屏障保护功能的胰高血糖素样肽 2 的分泌,保护肠屏障功能^[37],而且可以进入宿主体内直接起到抗炎的作用,从而降低宿主炎症水平,控制代谢综合征的发生、发展。SCFAs 可以通过与其受体 G 偶联蛋白 41、43 相结合,启动其对宿主的炎性反应的调节功能,具有明显的抗炎作用^[38]。研究表明,肠道菌群产生的 SCFAs 可以直接影响抗炎症的 Treg 细胞(抑制炎症)的发育和功能,在无菌小鼠结肠炎模型中,SCFAs 尤其是丙酸盐直接增加了 Treg 细胞的比例和绝对数量,从而增强了 Treg 细胞对炎症的抑制^[39]。Furusawa 等^[40]的研究则表明,梭状芽胞杆菌 Va 产生的丁酸盐,在体内和体外实验中都可以直接促进 Treg 细胞的分化,表明了肠道菌群代谢物 SCFAs 能够增强宿主的先天免疫和适应性免疫能力。

肠道菌群的代谢活动显著影响了宿主的代谢表型。基于复杂的代谢组学检测分析出的代谢谱可以“捕获”宿主和肠道菌群的共代谢活动,从而达到评价人类宿主的健康状况,这使代谢组学成为个性化营养管理的潜质手段^[41]。

三、培养组学分离技术

1. 培养组学:基因组学技术的发展及应用提高了人们对肠道菌群生态系统的认识,特别是宏基因组的出现揭示了肠道菌群的多样性,但肠道中大多数的细菌仍未能被培养^[42-43]。作为微生物学中培养技术的重要组成部分,培养组学的发展被应用于培养和鉴定定植于人体肠道中的未知微生物^[44]。培养

组学是通过多条件培养技术和细菌鉴定平台试图分离并培养环境中特定的目标菌株的技术。培养组学除了增加人们对细菌种类库的了解之外,还可以提供可用于离体实验的细菌菌株,并使用动物模型确认特定细菌种类在疾病发病机制中的作用。得益于多条件培养技术和快速鉴定细菌分类地位等技术手段的发展,目前通过培养组学已分离培养出数百种与人类相关的新的微生物,这为菌群和宿主关系提供了令人兴奋的新观点。

2. 分离菌株的方法:随着测序技术、细菌厌氧培养技术的发展,现今已建立起了基于分子生物学分析结果对菌群中特定细菌进行分离的“序列引导”分离方法,即首先通过 DNA 高通量测序技术对菌群结构进行分析,再根据分析结果选择性地分离感兴趣的菌株种类。在分离菌株过程中,首先将厌氧环境下稀释至恰当浓度的粪便样本(或是盲肠内容物样本等)涂布于合适的固体培养平板中,待出现明显菌落通过菌落 PCR 技术对克隆进行 16s rRNA 特定区域(V3 区、V4~V5 区或 V5~V8 区)进行 PCR-变性梯度凝胶电泳分析或 PCR-温度梯度凝胶电泳分析。选择序列匹配的克隆菌落纯化后扩大培养以进行后续的实验操作。上海交通大学赵立平团队利用此方法^[12],从肥胖患者粪便中分离出一株可以消除无菌小鼠高脂饮食肥胖抵抗的内毒素产生阴沟肠杆菌 B29。

对细菌的通用基因进行测序对细菌的分类鉴定至关重要,因此提出了 16s rRNA 基因扩增和测序作为通用菌种鉴定的方法。尽管这种基于 PCR 的分子鉴定技术具有巨大优势,但成本较高、耗时较长的劣势限制了其在高通量培养研究中的应用。自 1975 年研究者确定了革兰阴性菌特异性生物标志物以来,40 多年间科学家一直想使用算法将细菌蛋白质质谱与参考文库匹配,以达到能够准确鉴定细菌的目的^[45]。但现阶段较多的技术性难题一直限制了微生物鉴定质谱的发展及其在临床上的应用^[46]。2009 年,首次使用基质辅助激光解离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术在属水平鉴定细菌的分类地位^[47]。省时、低成本、技术门槛低等优势促进了 MALDI-TOF-MS 应用的普及^[48]。一项培养组学研究利用 212 种培养条件培养了超过 30 000 个菌落,随后通过 MALDI-TOF-MS 分析发现其包含了 341 种细菌,其中有 31 种新的细菌物种,且一半以上为首次从人体肠道中分离

获得^[49]。

菌株分离培养的一大难点在于,在选择合适的培养基和培养环境,在离体状态模拟出特定的宿主肠道菌群生境。2019 年,华大基因的肖亮团队选择 11 种不同的培养基用培养组学分离出>6 000 株人粪便细菌,得到 1 520 个高质量单菌基因组草图(338 个种),构成可培养基因组参考数据集。此研究使得细菌参考基因组数量大大增加,提高了宏基因组测序数据的可比对率^[50]。另外,基于宏基因组分析技术预测肠道菌群的功能,进而预测目标菌株在生长过程中必不可少的代谢物质,以此来调整培养基的配比,可以增加获得目标菌株的可能性^[51-52]。总体而言,宏基因组分析技术及其算法的快速发展促进了培养组学分离技术的快速发展;相反,越来越多的分离菌株的基因组序列提高了宏基因组测序数据的可比对率。

以肠道菌群为重要靶点的健康管理新方法

以微生物组与疾病因果关系的策略为指导,可以总结出一套行之有效的以肠道菌群为重要靶点的健康管理新方法。

一、应用于公共卫生管理

监测人体健康的系统生物学方法(如尿代谢物的代谢组学分析和肠道菌群的宏基因组测序分析)可以应用于与公共卫生等重要问题相关的大规模流行病学研究。粪便和尿液样本可以是针对一个个体随着时间推移的收集(纵向),也可以是从不同健康状态的众多人群中收集(横向)。通过比对健康与疾病状态下人们的尿液代谢组和粪便基因组,或是监测个体从健康到疾病状态下的尿液代谢组和粪便基因组的变化轨迹,就会发现与慢性疾病发生、发展有关的肠道菌群和宿主代谢型的图谱。如果它们是这些疾病的后果,那么这种模式也可以作为疾病诊断和防治的生物标志物。如果肠道菌群是疾病发生、发展的主要调控因素,那么则可以将其作为新的治疗手段的靶点。此外,还可以将一个人的健康状况的具体数据与总体数据库中的数据进行比较,如果这个人有任何的健康问题,那么比较结果可以提供关于症状异常的线索,这种方式可以适当地指导治疗。随着人们对人体系统认识的发展,肠道微生物组靶向分析可以应用于大规模流行病学研究,以发现“前疾病”状态的生物标志物。尿液和粪便是反映人体健康状况的 2 个窗口,对这些样本

中的代谢物、微生物代谢物和肠道菌群组成进行全面而精确的分析,可用于指示和检测整个人体在分子水平上的健康状况。通过多变量统计方法和模式识别对健康状况差异的大规模人群进行数据分析和建模,可以发现和确定与从健康到疾病发病过渡期相关的生物标志物,人们可以根据这些流行病学数据建立预防、预测和个性化的新兴诊治系统。

二、个体健康监测

监测人体健康的系统生物学方法也可用于营养研究,用以了解人类饮食中营养成分对人类这种超级生物体生理调节的影响。通过实时监测志愿者全身性的新陈代谢和肠道菌群结构的变化,科学地进行营养干预,并将代谢组分变化与微生物功能检测的宏基因组检测结果做关联分析,就可以确定人体肠道菌群在营养中的作用,也就是饮食如何影响肠道菌群的组成或功能,以及这些微生物如何进一步影响宿主的全身性的新陈代谢。

以系统生物学方法研究人体可以更好地理解传统中医的概念,因为二者强调的都是“整体性”的概念,而不是“极简性”的概念。中医根据患者的临床表现,如脉搏和舌头的颜色、纹路,将各种疾病和病症分为不同的综合征,这也是突出人整体功能性的理念。然而,脉搏和舌头的颜色、纹路等无法准确量化,因此难以用现代科学来解释中医药的原理。与此不同的是,系统生物学通过用代谢组学和宏基因组技术定量分析血液、尿液和粪便样本,像传统中医学类似的理念去研究人体或模式生物。因此,系统生物学将能够在分子水平上解释与中医理念类似的全身的代谢机制,从而可以将古老的中医与现代医学联系起来。

小 结

作为“超级生物体”的人体具有 2 个基因组,分别是继承自亲本的遗传性的基因组和出生后从环境中获取的菌群基因组^[27, 53]。疾病的发生受遗传因素和环境因素两方面的影响,现阶段环境因素主要已内化为伴随人体终生的菌群对疾病的影响。传统意义上检测健康的临床生理指标已不能满足当今健康管理的需求,需要以系统生物学的理论基础为指导,以基因组学、代谢组学和培养组学等多组学学科为武器,整合出一套行之有效的监控疾病的方法。但现如今“过热”的肠道菌群领域缺乏一套科学有效的规范化的分析肠道菌群和疾病因果关

系的策略。尽管如此,以肠道菌群为主要靶点的健康管理新方法必将因其绝对的优势在未来蓬勃发展,为健康中国、健康人类发挥无可取代的作用。

[参考文献]

- [1] Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation[J]. World Health Organ Tech Rep Ser,2000,894:i-xii,1-253.
- [2] Morabia A, Abel T. The WHO report "Preventing chronic diseases: a vital investment" and us[J]. Soz Praventivmed, 2006,51(2):74.
- [3] Willett WC. Overview and perspective in human nutrition [J]. Asia Pac J Clin Nutr,2008,17(Suppl 1):1-4.
- [4] Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup[J]. Curr Opin Microbiol,2004,7(3):296-307.
- [5] The Science of Synthesis: Exploring the Social Implications of General Systems Theory(Book)[M]. Choice: Current Reviews for Academic Libraries,2004,1114.
- [6] Wayne LG. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics[J]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A,1988, 268(4):433-434.
- [7] Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, et al. The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates[J]. J Bacteriol,2008,190(20):6881-6893.
- [8] Smokvina T, Wels M, Polka J, et al. Lactobacillus paracasei comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity[J]. PLoS One,2013, 8(7):e68731.
- [9] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature,2006,444(7122):1027-1031.
- [10] Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[M]. Nat Rev Microbiol,2013:639-647.
- [11] Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[J]. Nat Rev Microbiol,2013,11(9):639-647.
- [12] Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice[J]. ISME J,2013,7(4):880-884.
- [13] Zhang C, Yin A, Li H, et al. Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children[J]. EBioMedicine,2015,2(8): 968-984.
- [14] Zhao L, Zhang F, Ding X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. Science,2018,359(6380):1151-1156.
- [15] Merriman B, Ion Torrent R&D Team, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing[J]. Electrophoresis,2012,33(23):3397-3417.
- [16] Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. The metagenomics worldwide research[J]. Curr Genet,2017, 63(5):819-829.
- [17] Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project[J]. Nature, 2019,569(7758):641-648.
- [18] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature,2012,486(7402):207-214.
- [19] Li J, Jia H, Cai X, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome[J]. Nat Biotechnol,2014,32(8):834-841.
- [20] Dubilier N, McFall-Ngai M, Zhao L. Microbiology: Create a global microbiome effort[J]. Nature,2015,526(7575): 631-634.
- [21] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chem Biol, 1998,5(10):R245-R249.
- [22] Chen K, Pachter L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities[J]. PLoS Comput Biol,2005,1(2):106-112.
- [23] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science,2006,312 (5778):1355-1359.
- [24] Poinar HN, Schwarz C, Qi J, et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA [J]. Science,2006,311(5759):392-394.
- [25] Xiong X, Frank DN, Robertson CE, et al. Generation and analysis of a mouse intestinal metatranscriptome through Illumina based RNA-sequencing[J]. PLoS One,2012,7(4): e36009.
- [26] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica,1999,29(11):1181-1189.
- [27] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. Nat Rev Microbiol,2005,3(5):431-438.
- [28] Rezzi S, Ramadan Z, Fay LB, et al. Nutritional metabolomics: applications and perspectives[J]. J Proteome Res, 2007,6(2):513-525.
- [29] Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, et al. Assessment of

- analytical reproducibility of ^1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(7):2199-2208.
- [30] Holmes E, Loo RL, Stamler J, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure[J]. *Nature*, 2008, 453(7193):396-400.
- [31] Rezzi S, Ramadan Z, Martin FP, et al. Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(11):4469-4477.
- [32] Robosky LC, Wells DF, Egnash LA, et al. Communication regarding metabolomic identification of two distinct phenotypes in Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) rats[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(1):309.
- [33] Stella C, Beckwith-Hall B, Cloarec O, et al. Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(10):2780-2788.
- [34] Wan Q, Wang Y, Tang H. Quantitative ^{13}C Traces of Glucose Fate in Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(6):3293-3299.
- [35] Liu F, Zhang N, Li Z, et al. Chondroitin sulfate disaccharides modified the structure and function of the murine gut microbiome under healthy and stressed conditions[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):6783.
- [36] Rabot S, Membrez M, Bruneau A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism [J]. *FASEB J*, 2010, 24(12):4948-4959.
- [37] Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability[J]. *Gut*, 2009, 58(8):1091-1103.
- [38] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43[J]. *Nature*, 2009, 461(7268):1282-1286.
- [39] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis[J]. *Science*, 2013, 341(6145):569-573.
- [40] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. *Nature*, 2013, 504(7480):446-450.
- [41] Rezzi S, Ramadan Z, Martin FP, et al. Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(11):4469-4477.
- [42] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570):1127-1129.
- [43] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, et al. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8):2445-2450.
- [44] Lagier JC, Dubourg G, Million M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018:540-550.
- [45] Krasny L, Hynek R, Hochel I. Identification of bacteria using mass spectrometry techniques [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2013, 353:67-79.
- [46] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20(4):157-171.
- [47] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 49(4):543-551.
- [48] Seng P, Abat C, Rolain JM, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7):2182-2194.
- [49] Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(1):237-264.
- [50] Zou Y, Xue W, Luo G, et al. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(2):179-185.
- [51] van der Ark KCH, van Heck RGA, Martins Dos Santos VAP, et al. More than just a gut feeling: constraint-based genome-scale metabolic models for predicting functions of human intestinal microbes[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1):78.
- [52] Zarecki R, Oberhardt MA, Reshef L, et al. A novel nutritional predictor links microbial fastidiousness with lowered ubiquity, growth rate, and cooperativeness [J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(7):e1003726.
- [53] Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(5):723-735.

(收稿日期:2019-06-10)

(本文编辑:褚敬申)