

生命奥秘

LifeOmics

2013年 9月刊 总第58期



肠道菌群

——一个被遗忘的“功能器官”

基因组工程学里的三大利器——ZFN、TALEN和CRISPR/Cas

动物能够预见未来？

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

专题

肠道菌群

——一个被遗忘的“功能器官”

前言	01
一、人类微生物组计划	02
1. 各国已经完成或正在进行的有关人类微生物组的项目	02
2. 人体肠道微生物定殖	03
3. 正常人体的肠道微生物组成	04
4. 研究肠道微生物组的主要方法	07
二、肠道菌群的功能	08
1. 肠道菌群与物质代谢	09
2. 肠道菌群在免疫调控和宿主防御中的作用	13
3. 肠道菌群对大脑发育及人类行为的影响	19
三、与肠道菌群相关的疾病	22
1. 肠道菌群与肥胖和2型糖尿病	24
2. 肠道菌群与炎性肠病（IBD）	26
3. 肠道菌群与易激综合征（IBS）	27
4. 肠道菌群与结肠癌	28
5. 肠道菌群与感染类疾病	30
6. 肠道菌群与肝脏疾病	31
7. 肠道菌群与乳糜泻	32
8. 肠道菌群与肠道外自身免疫病	33
9. 肠道菌群与神经行为类疾病	33
四、以肠道菌群为靶标的防治策略	35
1. 肠道菌群的可塑性	35
2. 合理饮食调控肠道菌群相关疾病	36
3. 合理使用抗菌素	37
4. 新型益生菌的研发与应用	40
5. 粪便移植	41
6. 肠道菌群与定点给药	43
7. 肠道微生物组中新功能基因的挖掘	44
8. 肠道微生物组与个性化医药	44
五、展望	46

下一期（2013年10月刊）预告：肿瘤靶向治疗药物研究进展

近年来，肿瘤靶向药物治疗的研究日益增多，越来越多的药物公司将新药开发集中在靶向药物上。2012年美国FDA总共批准了34种新药，其中11种是抗肿瘤药物，而大部分是靶向治疗药物。美国临床肿瘤学会（ASCO）年初发布的ASCO2012年度十七大重要进展中，有多项是关于肿瘤靶向药物治疗的。因此靶向治疗目前已经成为肿瘤治疗领域最热门的研究，为肿瘤患者提供了新的治疗选择。

热点

基因组工程学里的三大利器——ZFN、TALEN和CRISPR/Cas	49
------------------------------------	----

百态

动物能够预见未来？	64
-----------	----

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

Worthy Issues

肠道菌群——一个被遗忘的“功能器官”

特约编辑：尹业师，男，博士，研究方向：肠道微生态与微生物资源开发利用

<<<< 前 言 >>>>



成人胃肠道粘膜表面积达到300 m²，是与外界环境发生相互作用的最大区域。在成人胃肠道中定殖着约10¹⁴个微生物，其数量是人体体细胞总数的10倍。正常情况下，成人肠道菌群重量超过1 kg，编码约330万个特异基因，是人类基因组编码基因数的150多倍。尽管人类不同个体间基因组的差异只有0.1%左右，但不同个体间肠道微生物组的差异可以达到80–90%。定殖在宿主肠道中的菌群，在发挥宿主生理功能上起着非常重要的作用，包括从食物中摄取能量、产生重要的代谢产物、促进免疫系统的发育与成熟、保护宿主免受病原的感染等。

肠道菌群反过来也会受到宿主遗传因子、饮食习惯和环境因素等的影响，使得肠道菌群具有多样性和宿主特异性。随着DNA测序技术和生物信息学技术突飞猛进的发展，更好地研究和了解肠道菌群在各种疾病，如肥胖、糖尿病、IBS、IBD、结肠癌和代谢综合症等疾病中的重要作用，将为我们采取更为有效的防治措施提供指导。

一、人类微生物组计划

1. 各国已经完成或正在进行的有关人类微生物组的项目

2005年10月，一个国际会议召集了一批专家讨论人类宏基因组分析的可行性和面临的挑战。会议结果是启动了一个国际性的人类微生物组计划，该计划的目标是在共同的原则和政策下研究和理解人类微生物组在宿主健康与疾病中的重要作用，并通过对这些知识的理解来预防和治疗疾病（表1）。到目前为止，很多国家已经相继启动了人类微生物组计划。

表 1 各国微生物组计划相关项目一览表^[1]

项目名称	持续时间	资助组织 / 国家	研究目标
<i>NIH Jumpstart Program</i>	2007-2008	NIH/ 美国	对 200 种细菌进行全基因组测序并研究人体不同部位的微生物组成。
<i>NIH Human Microbiome Project</i>	2007	NIH Roadmap Program/ 美国	研究人体微生物组成并了解菌群变化与人类健康间的关系。
<i>DACC-Data Analysis and Coordination Center</i>	2008-2013	NIH Human Microbiome Project (HMP)/ 美国	数据处理的标准化与公布（包括储 存、分析及展示）。
<i>MetaHIT, Metagenomics of the Human Intestinal Tract</i>	2008-2011	European Commission (FP7)/7 国集团	研究微生物菌群在 IBD 肠炎和肥胖中的作用；制定肠道菌群的参考目录。
<i>Canadian Human Microbiome Initiative</i>	2009	Canadian Institutes of Health Research(CIHR) / 加拿大	肠道微生物间的相互作用及其与人类健康间的关系

（接下表）

(续上表)

<i>The Australian Jumpstart Human Microbiome Project</i>	2009	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation(CSIRO) / 澳大利亚	对一些特异的细菌菌株进行测试, 并应用宏基因组学方法研究肠道菌群与宿主间的相互作用。
<i>MicroObes, Human Intestinal Microbiome in Obesity and Nutritional Transition</i>	2008-2010	French National Agency for Research(ANR)/ 法国	研究肠道菌群与营养及宿主代谢状况间的关系
<i>Korean Microbiome Diversity Using Korean Twin Cohort Project</i>	2010-2015	National Research Foundation of Korea/ 朝鲜	研究朝鲜双胞胎不同部位上皮的微生物组成、研究人体微生物组与疾病间的关系, 并建立朝鲜微生物组分析与信息中心。
<i>ELDERMET Project</i>	2007-2013	National Development Food Research Health Initiative and Science Foundation Ireland / 爱尔兰	了解粪便菌群随年龄的变化情况; 研究粪便菌群多样性与健康、饮食和生活习惯间的关系。

2. 人体肠道微生物定殖

在子宫中, 胎儿的发育被认为是完全无菌的; 出生后, 肠道细菌开始定殖, 直到建立一个富有多样性的微环境。实际上, 婴儿肠道菌群的获得与分娩方式有很大的关系。在出生后20分钟, 自然分娩的婴儿, 来源于母亲产道的菌群开始在婴儿中定殖, 但剖腹产婴儿的肠道菌群却主要来源于人的皮肤, 包括护士和医护人员的皮肤。在儿童早期, 肠道菌群组成随年龄和饮食的改变而改变。在婴儿出生后的前几年, 其肠道菌群还处于一个定殖和变化时期, 到一岁时基本上具有了与成人相似的肠道菌群。尽管这样, 肠道菌群在人的一生中并不是稳定不变的。有一项研究对婴儿从出生到2.5岁的肠道菌群进行了跟踪研究, 结果发现

肠道菌群的多样性随着年龄的增大而直线上升。而且不同年龄段其肠道中的优势菌也不同(图1)。尽管成年后, 不同个体间肠道菌群存在着差异, 但对同一个体来说, 在相当长的一段时间内是比较稳定的。但是到了老年后, 由于味觉和嗅觉功能消失、牙齿脱落及咀嚼困难等, 老人的饮食更偏向于高糖高脂肪食物, 从而减少植物类食物的摄入, 以致引起菌群结构出现较大的改变。当然老年人肠道菌群的改变也有一些与饮食无关, 而与其生理和免疫因素相关, 如免疫系统功能减退。这表现在与年轻对照相比, 老年人瘤胃球菌和*Blautia spp.*减少, 而大肠杆菌增多。

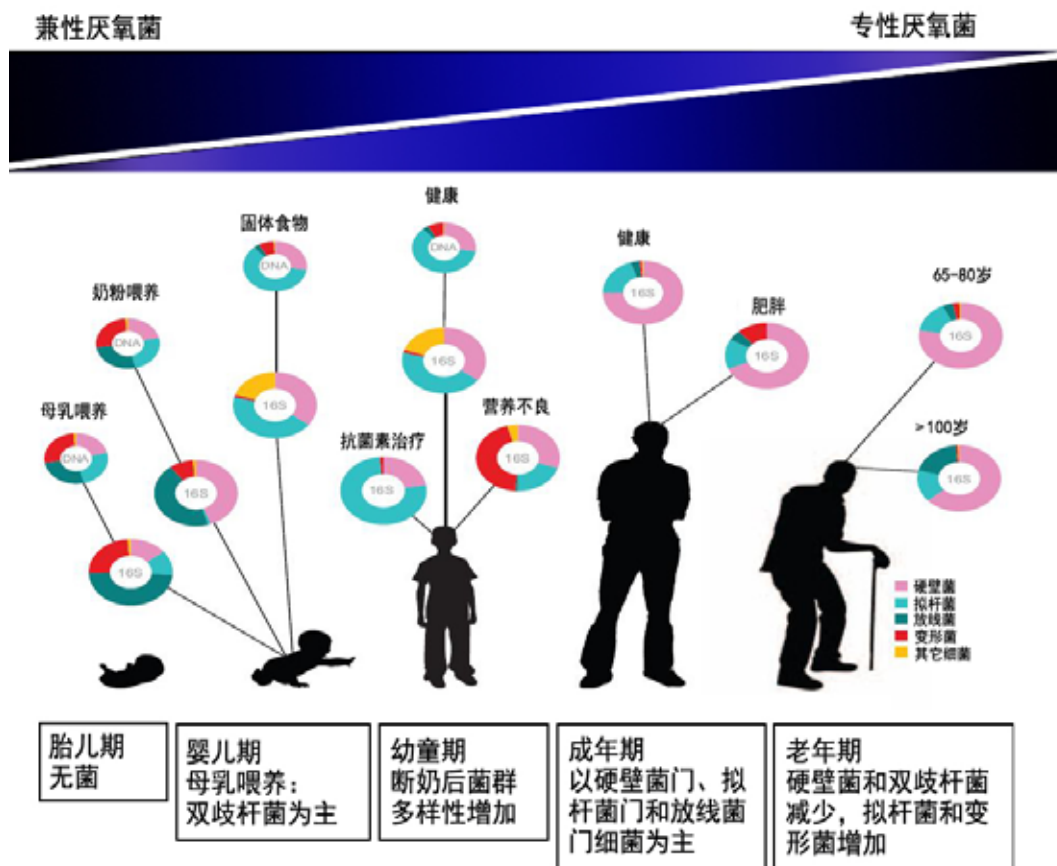


图1 年龄对肠道菌群的影响。图片整合自Duncan和Flint^[2]及Ottman等^[3]的文章。

3. 正常人体的肠道微生物组成

在各国人类微生物基因组计划的大力推动下，人们开始对定殖在我们肠道中并不起眼的微生物有了全新的认识。研究表明平均每个人肠道中定殖的细菌总数估计约有1000种，而对整个人群来讲，可以达到10,000到40,000种。人体肠道菌群是一个复杂的生态系统，包括细菌、古菌、酵母和纤维状真菌。古菌和真菌各自只代表单独的一个门，而人胃肠道中的细菌却非常富有多多样性。人们已经在

人胃肠中检测到了9个细菌门，其中硬壁菌门（*Firmicutes*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）和放线菌门（*Actinobacteria*）占优势。变形菌门（*Proteobacteria*）的细菌也很常见，但含量相对较低。表2列出了人胃肠道中常见的优势菌群。而且肠道细菌的数量和组成与不同的解剖部位也有关（图2），在人体肠道的不同部位其微生态环境和所定殖细菌的数量与组成也存在着明显的差异。

表 2 人体胃肠道中的优势菌群^[4]

细菌门	细菌纲	细菌科	细菌属	Gram
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i> *	+
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	+
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i> *	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas</i> *	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	-
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	(-)
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialiser</i>	(-)
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>unclassified lostridiales</i>	<i>Mogibacterium</i> *	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i> *	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coproccoccus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Dorea</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>	(-)
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	(-)
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Anaerotruncus</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Subdoligranulum</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Blautia</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>unclassified</i>	<i>Collinsella</i>	+
<i>Firmicutes</i>	<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Holdemania</i>	+
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Sutterella</i>	-

(接下表)

(续上表)

细菌门	细菌纲	细菌科	细菌属	Gram
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Bilophila</i>	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus</i> *	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i> *	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i> *	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> *	—
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Cardiobacteriaceae</i>	<i>Cardiobacterium</i>	—
<i>Spirochaetae</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Brachyspiraceae</i>	<i>Brachyspira</i>	—
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>	—

*表示这些细菌主要分布在从口腔到十二指肠这些部位，而在回肠到直肠这些部位含量很低，Gram列中+表示革兰氏染色阳性，—表示革兰氏染色阴性，（—）表示革兰氏染色阴性或不稳定。此表主要根据细菌16S基因测序整理而得。

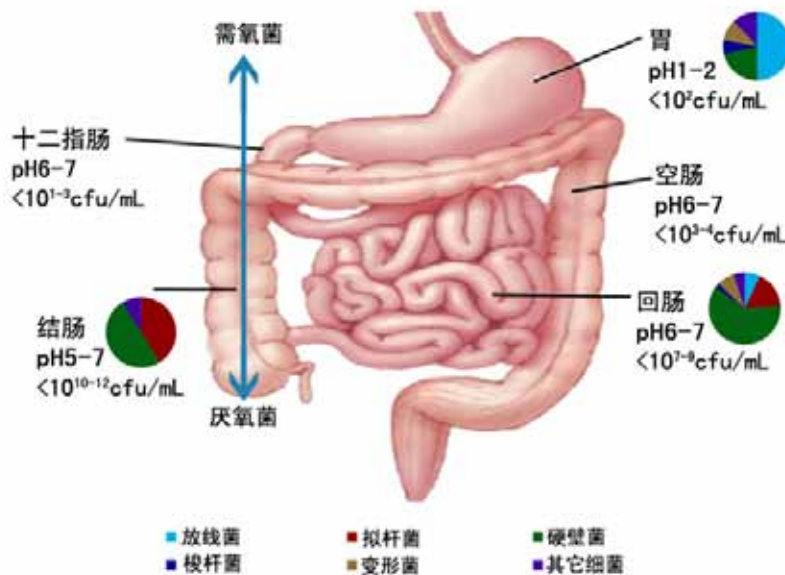


图2 胃肠道不同部位菌群分布情况。图片整合自DiBaise等^[5]和Dave等^[6]的文章。

4. 研究肠道微生物组的主要方法

随着科学技术的发展，用于研究复杂微生物群体的方法也越来越多（图3），我们通常会采用各种方法对其菌群结构、功能蛋白组成、代谢活性及代谢路径等进行系统的研究。早期用于研究肠道微生物组的方法主要是细菌分离培养和基于16S基因的PCR-DGGE、

RFLP、16S芯片及16S克隆文库测序等。但随着高通量测序技术的迅猛发展，这些方法渐渐地被16S高通量测序和宏基因测序所取代。用于研究蛋白质学和代谢组学的新技术和新方法也渐渐开始在肠道微生物组中大展拳脚。

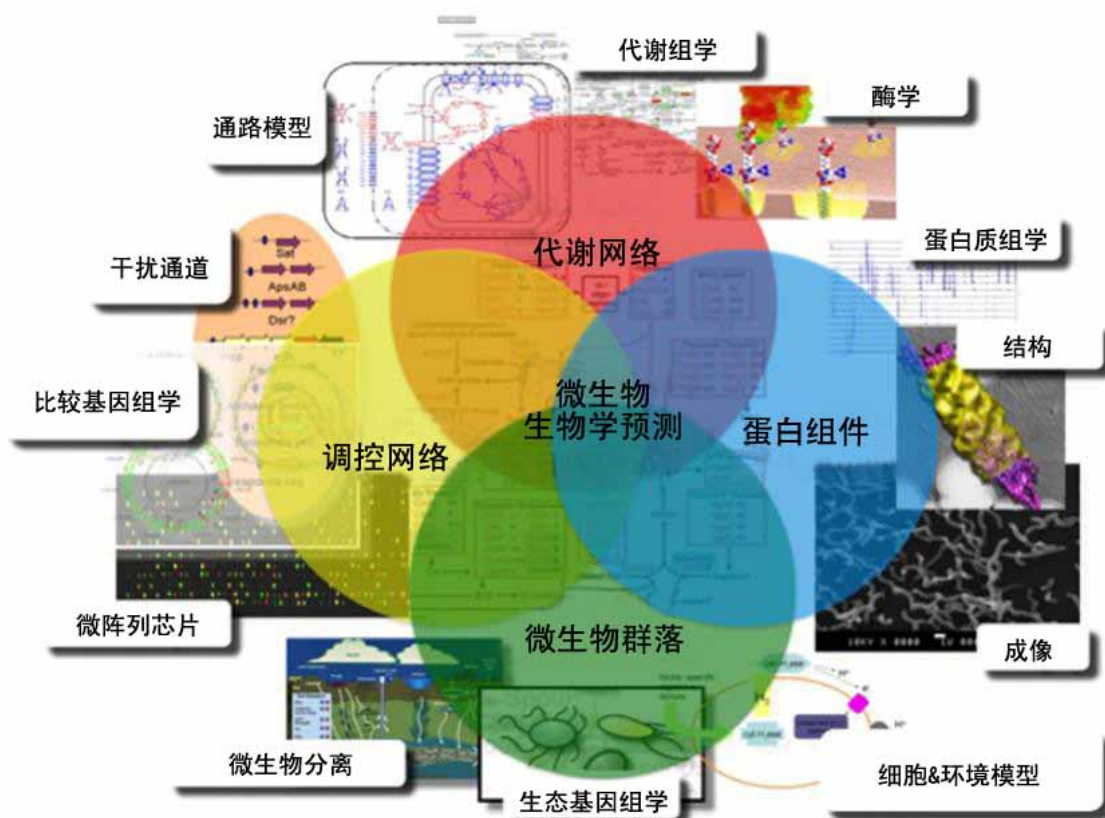


图3 研究复杂环境微生物组的主要方法。原图来自Lepage等的文章^[7]。

尽管如此，到目前为止这些研究方法还不能完全满足研究肠道微生物组成与功能的需要，如图4所示，现有的高通量测序方法还只能检测到肠道样品中丰度大于 10^6 以上的菌，

而肠道样品中65%的菌的丰度小于 10^6 ，并且其中大部分都是未可培养菌，所以开发新的研究方法仍然非常必要而且迫在眉睫。

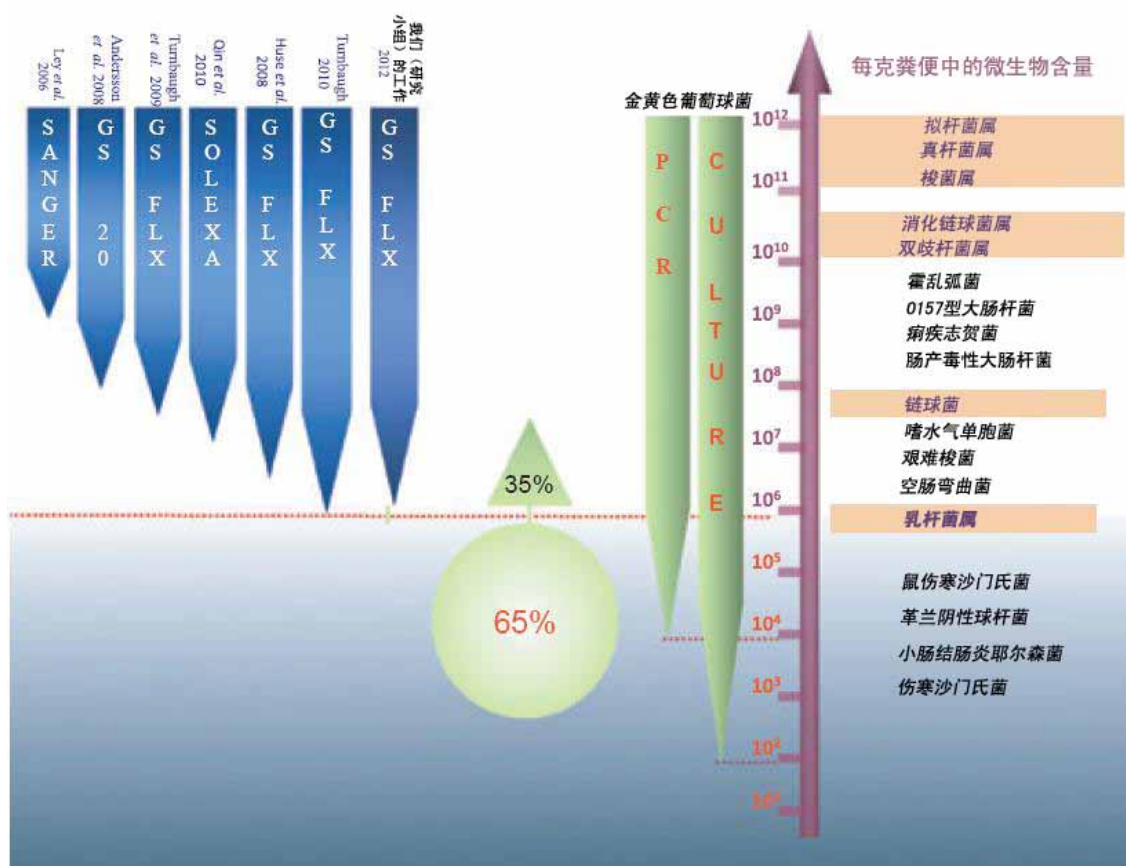


图4 各种肠道菌群检测方法的检测阈值。原图来自Lagier等的文章^[8]。

二、肠道菌群的功能

人体胃肠道中定居着100万亿的细菌和古菌，与宿主存在着共生关系，共同维护着宿主的生理平衡。宿主为细菌的生长提供营养环境，细菌为宿主提供一些宿主自身不能完成的生理功能，如产生一些维生素、消化复杂的碳水化合物和调控免疫环境等。同时肠道菌群也

可以调控宿主基因的表达，这些基因参与各种各样的宿主功能，包括物质的代谢、免疫系统的发育与成熟及组织器官的发育等。尽管不同个体间其微生物菌群组成存在很大的差异，但其功能基因却相对稳定（图5）。

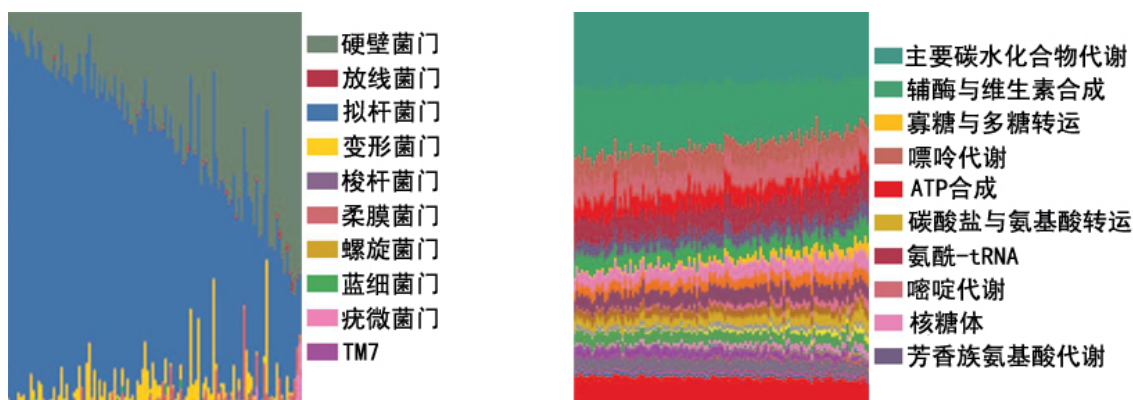


图5 人体肠道微生物的菌群多样性和功能分类。原图来自人类微生物组计划^[9]。

1. 肠道菌群与物质代谢

人类基因组中缺少大部分糖元发酵成短链脂肪酸的酶，而远端的肠道微生物具有这些功能。微生物基因组中含有很多与淀粉、蔗糖、葡萄糖、半乳糖、果糖和阿拉伯糖代谢相

关的基因。由此可以看到人类是一个超级生物体，包含着人体基因和微生物基因联合参与的代谢（图6）。

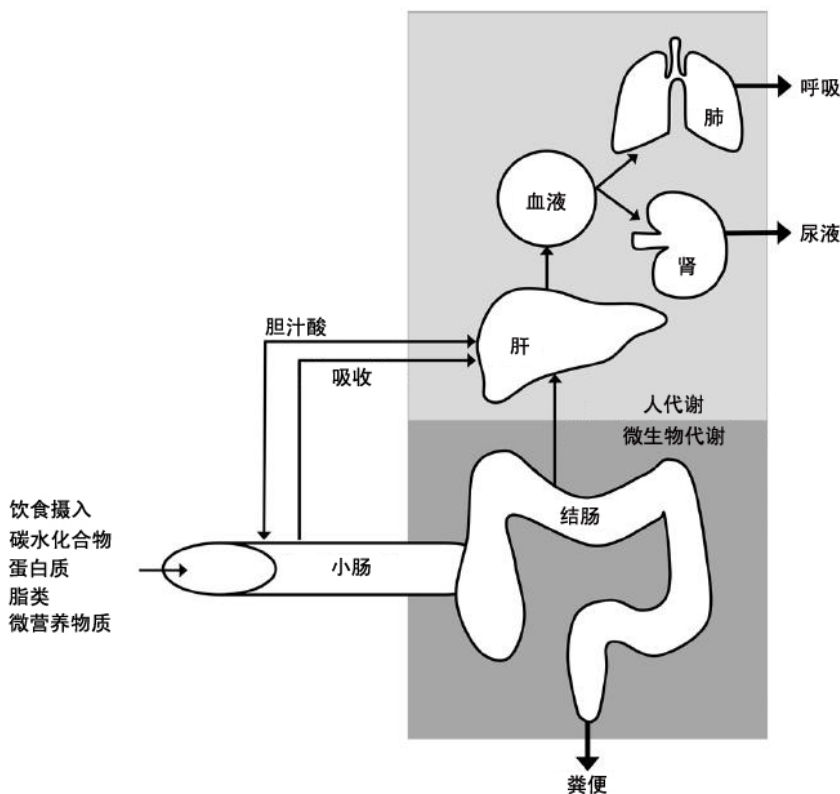


图6 肠道菌群与宿主共代谢。原图来自Hamer等的文章^[10]。

1.1 肠道菌群对碳水化合物的代谢

人大肠中的碳源主要来源于碳水化合物，如淀粉和寡糖。由于人类基因组并没有编码足够的碳水化合物代谢酶，肠道菌群在代谢饮食中的碳水化合物，尤其是多糖中发挥着重要的作用。人类肠道微生物组和宏基因组学研究已经发现了很多碳水化合物代谢酶，如Turnbaugh等人报道2.62%的人类微生物组序列编码碳水化合物代谢相关的酶，在单独一个人

的肠道微生物组中就发现了156种碳水化合物代谢酶。这表明数目庞大、多样性丰富的肠道微生物可以利用很多种不同的多糖。图7展示了肠道细菌在多糖代谢中的作用。多糖被肠道菌群降解后的产物主要为短链脂肪酸（如醋酸、丙酸和丁酸）和一些气体，而短链脂肪酸在维护上皮屏障功能、调控上皮增生、调控免疫反应和阻止结肠癌方面发挥着重要的作用。

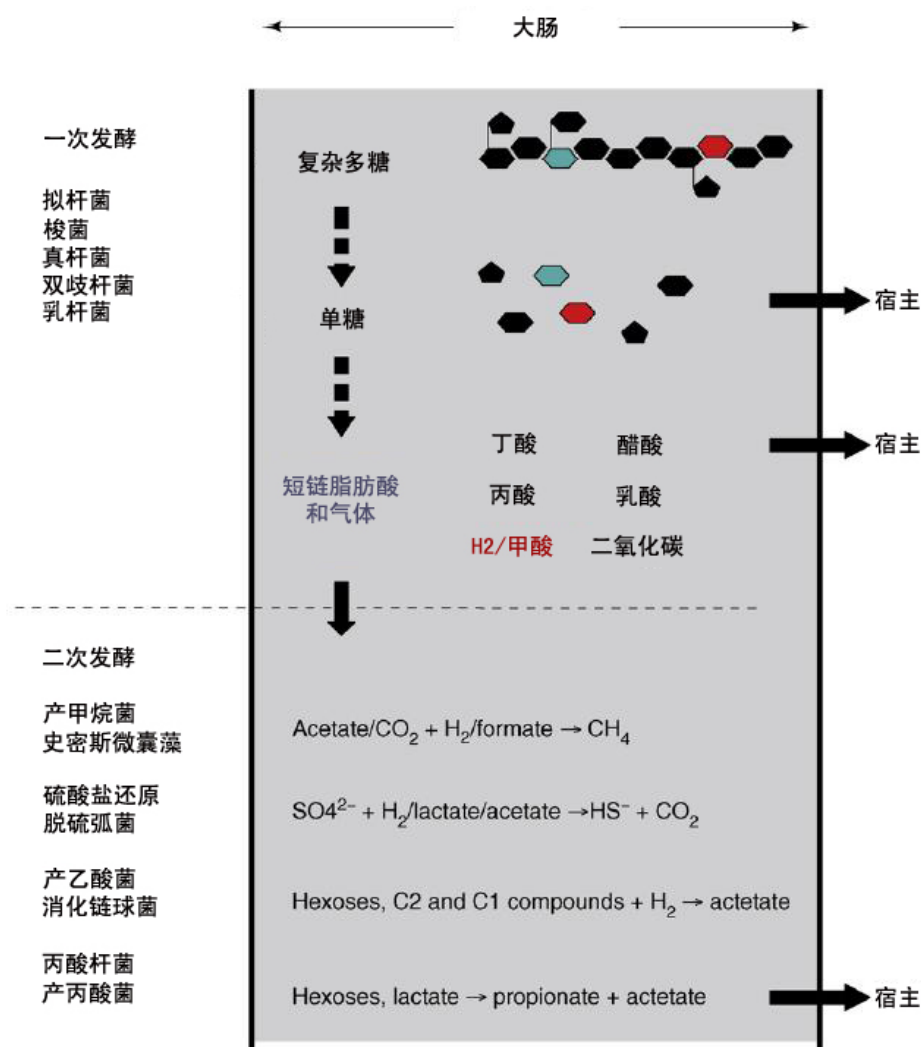


图7 肠道菌群对饮食多糖的降解与利用。肠道菌群在大肠中形成一张复杂的食物网。在上消化道（小肠）不能被消化的营养物质，如复杂多糖被转运到大肠。大肠中含有大量的微生物，其密度最高，拟杆菌属的细菌含量非常高，可以合成酶来降解饮食中没有被消化的成分，其降解产物主要是单糖。单糖进一步被肠道细菌发酵为短链脂肪酸（如醋酸、丁酸、甲酸）和一些气体（二氧化碳和氢气）。短链脂肪酸是宿主能量的主要来源，占摄入饮食热量的10%。大量氢气聚集可以抑制初级发酵，尽管这样，在肠道中大部分氢气在二级发酵中通过细菌间的转氢作用而被移除。通常这些二级代谢以一级代谢的产物，如短链脂肪酸做为发酵底物。参与二级代谢的细菌主要有硫还原菌、同型产乙酸菌群、产甲烷菌和丙酸杆菌。二级代谢产物有短链脂肪酸（醋酸和丙酸）和气体（甲烷和硫化氢）。原图来自Stecher和Hardt的文章^[1]。

1.2 肠道菌群对含氮化合物的代谢

饮食和内源性含氮化合物，如蛋白质，除了一小部分在小肠被蛋白水解为氨基酸和多肽从而被小肠上皮吸收外，大部分都会被转运到大肠，被肠道菌群发酵后再被宿主利用。尽管食物中的蛋白被消化成氨基酸和多肽，从而被小肠上皮吸收被认为是一种有效的蛋白利用过程，但大部分饮食或内源性的含氮化合物可以通过回盲口进入大肠。实际上，即使是一些很容易被消化的蛋白，其大部分也能躲过小肠消化而进入大肠。这些含氮化合物主要是蛋白质和多肽，进入大肠后被肠道菌群和残胰蛋白酶降解成肽和氨基酸，然后用于各种细菌代谢产物的合成，其中有些是中间代谢产物，有些

是终产物。

尽管有实验表明肠道菌群能吸收和降解某些氨基酸，同时肠道菌群也能合成氨基酸。实际上，人类肠道远端微生物组含有与必需氨基酸合成相关的基因簇。虽然这些氨基酸不能很好地被结肠上皮吸收，但可以做为肠道菌群合成其它代谢终产物的前体物质。在这些物质中，如短链脂肪酸和有机酸可以做为结肠粘膜的能量底物，而其它一些物质如硫化物和氨可以影响结肠上皮细胞的能量代谢。这说明宿主与肠道菌群间氨基酸的交换是双向的。但奇怪的是，很少有人对结肠菌群如何降解蛋白和多肽进行研究。

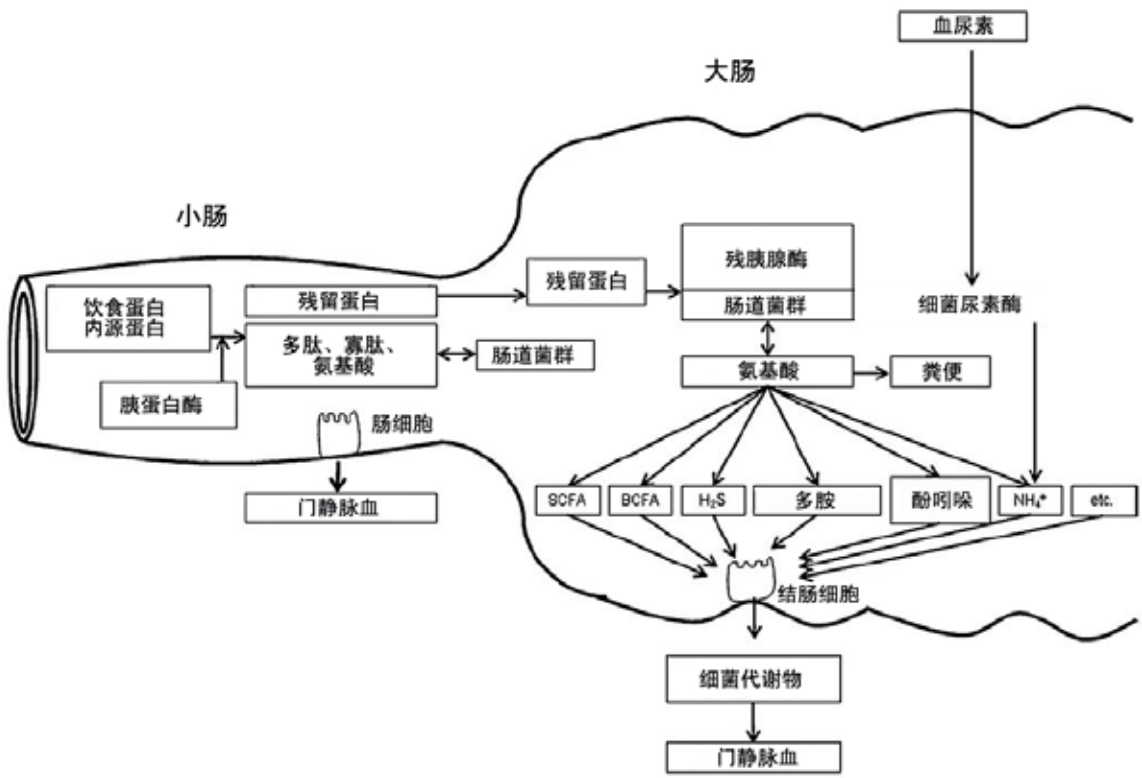


图8 肠腔蛋白在小肠和大肠中的代谢示意图。饮食和内源性蛋白在经过胰腺外分泌蛋白酶降解后释放出多肽、寡肽和氨基酸。最终消化发生在肠道上皮，主要是通过活化肽酶来实现。小肠上皮细胞可以转运氨基酸和寡肽，在转运过程中可以将部分代谢产物从肠腔转运至外周血管。已有数据表明，小肠菌群可以利用氨基酸，但同时也可以合成一些氨基酸。宿主和肠道菌群对氨基酸代谢的净效益还有待进一步研究。肠腔中残留的未消化蛋白从小肠转运到大肠，被肠道菌群和残胰蛋白酶降解。氨基酸可以被肠道菌群进一步代谢为代谢终产物，如短链脂肪酸、支链脂肪酸、硫化氢、多胺、酚、吲哚、氨和很多其它还未被鉴定的代谢物。原图来自Davila等的文章^[12]。

1.3 肠道菌群对药物或药物前体的代谢

肠道菌群代谢能力的差异使人们对肠道菌群影响药物代谢的研究更加富有激情。人们已经开发出了好几种研究策略，包括比较普通小鼠和无菌小鼠间的代谢图谱、利用生物化学实验研究细菌培养物中微生物代谢产物的活性和诱变研究等。当然也发展了一些基于群体的研究方法，如比较不同个体在摄入同一种药物，如地高辛后的药物反应差异与菌群变化。

到目前为止已有很多报道表明，肠道微生物通过各种作用方式，如还原反应、水解作用、功能基团移除、水解和裂解等参与药物的代谢（表3）。药物或药物前体在经过微生物代谢后，其药效和毒性也随之发生改变（表4），有些药物在经过肠道微生物代谢后活性增强，而有些药物却在经过菌群代谢后药效降低或毒性增强。

表 3 肠道菌群药代反应类型^[13]

反应类型	药品名称
还原反应 (Reduction)	地高辛 (Digoxin)、氯硝西泮 (Clonazepam)、舒林酸 (Sulindac)、柳氮磺胺吡啶 (Sulfasalazine)、百浪多息 (Prontosil)、偶氮磺酰胺 (Neoprontosil)、巴沙拉嗪 (Balsalazine)、偶氮水杨酸 (Olsalazine)、硝基安定 (Nitrazepam)、磺吡酮 (Sulfinpyrazone)、奥美拉唑 (Omeprazole)、甲硝唑 (Metronidazole)、米索硝唑 (Misonidazole)、唑尼沙胺 (Zonisamide)
水解反应 (Hydrolysis)	耐绞宁 (Nitroglycerin)、吡苯氧磺钠 (Sodium picosulphate)、生胃酮 (Carbenoxolone)、氨甲噻唑啉 (Methotrexate)、吗啡葡萄糖醛酸 (Morphine glucuronide)、番泻苷 (Sennosides)、索利夫定 (Sorivudine)、半乳糖果糖苷 (Lactulose)
功能基团移除 (Functional group removal)	氟胞嘧啶 (Flucytosine)、甲基苯丙胺 (Methamphetamine)、爱儿多巴 (Levodopa)、非那西汀 (Phenacetin)、琥珀酰磺胺噻唑 (Succinylsulfathiazole)
氧化裂解 (N-oxide cleavage)	甲硝咪胍 (Ranitidine)、尼扎替丁 (Nizatidine)
蛋白水解 (Proteolysis)	胰岛素 (Insulin)、密钙息 (Calcitonin)
去硝化 (Denitration)	硝酸异山梨醇 (Isosorbide dinitrate)、三硝酸甘油 (Glyceryl trinitrate)
去共轭 (Deconjugation)	吲哚新 (Indomethacin)、伊立替康 (Irinotecan)
胺形成与胺水解 (Amine formation/amide hydrolysis)	氯霉素 (Chloramphenicol)
打开噻唑环 (Thiazole ring-opening)	左旋噻米唑 (Levamisole)

(接下表)

(续上表)

乙酰化作用 (Acetylation)	5-氨基水杨酸 (5-Aminosalicylic acid)
异恶唑断裂 (Isoxazole scission)	利哌利酮 (Risperidone)
其它	氮 替 瑞 林 (Azetirelin)、氧 嗪 酸 钾 (Potassium oxonate)、橙皮甙 (Hesperidin)

表 4 肠道菌群对一些非处方药药效的影响^[14]

药品名称	药理作用	肠道对临床药效的影响
对乙酰氨基酚 (Acetaminophen)	止痛与退烧药	增加临床效果与毒性
氯霉素 (Chloramphenicol)	抗菌药	增加毒性
地高辛 (Digoxin)	强心药	增强活性与毒性
氟胞嘧啶 (Flucytosine)	抗真菌药	增效作用
甲硝唑 (Metronidazole)	抗真菌和抗厌氧细菌	降低抗菌效果
甲硝唑 (Metronidazole)	抗真菌和抗厌氧细菌	降低药效
柳氮磺胺吡啶 (Sulfasalazine)	抗菌药	增强活性
磺吡酮 (Sulfinpyrazone)	抗菌药	增强活性
舒林酸 (Sulindac)	非类固醇类抗炎药	增强活性
索利夫定 (Sorivudine)	抗病毒	增加毒性
唑尼沙胺 (Zonisamide)	抗惊厥剂	降低药效

除了对药物或药物前体的直接代谢作用以外, 肠道菌群也可以通过宿主-微生物相互作用间接影响药物或药物前体的代谢。比如, 肠道微生物可以改变宿主与药物代谢相关基因的表达。有课题组曾采用生物芯片的方法比较了无菌小鼠和普通小鼠间肝脏中与药物代谢相关基因的表达差异, 结果表明在无菌小鼠中一些重要的与药物代谢相关的基因表达上调, 包括雄甾烷受体, 该受体是肝脏药物代谢的一个

重要调控因子。而且他们也发现这种基因表达的差异与生理功能相关, 因为无菌小鼠对麻醉药戊巴比妥的代谢比普通对照小鼠要快。肠道菌群影响宿主对药物代谢的另一个间接方式是肠道微生物的代谢产物影响宿主对药物的加工能力。**Clayton**等人采用不同的方法监控了不同个体在接受退热净治疗前后代谢谱的变化, 他们发现微生物能通过中和磺基转移酶活性而降低宿主对退热净的代谢能力。

2. 肠道菌群在免疫调控和宿主防御中的作用

通过对普通饲养小鼠和无菌小鼠免疫特性的比较发现, 无菌小鼠在表型上存在着很多免疫缺陷 (表5), 而且在接种正常菌群后, 小

肠粘膜会分泌大量免疫细胞、肠绒毛结构出现明显改变。这说明正常肠道菌群在宿主免疫成熟与调控中发挥着重要的作用。

表 5 无菌小鼠肠道免疫缺陷^[15]

免疫缺陷	解剖部位	无菌小鼠的免疫表型（与普通笼养小鼠比）
小肠发育	派尔集合淋巴结	细胞数量少而且小
	固有层	细胞数量少而且固有层薄
	生发中心	血浆细胞少
	孤立淋巴滤泡	细胞数量少而且小
肠系膜淋巴结发育	生发中心	细胞数量少而且小，血浆细胞少
CD8 ⁺ T 细胞	肠上皮淋巴细胞	细胞数量减少，细胞毒性降低
CD4 ⁺ T 细胞	固有层	细胞数量减少，Th17 细胞数量在小肠减少，但在结肠增多
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	肠系膜淋巴结	FoxP3 表达降低，抑制能力降低
血管生长素 4 表达	潘纳斯细胞	降低
再生胰岛衍生蛋白 3 γ 表达	潘纳斯细胞	降低
降低	B 细胞	降低
ATP 水平	肠道	降低
MHC II 分子的表达	肠上皮细胞	降低
TLR9 表达	肠上皮细胞	降低
白细胞介素 25 水平	肠上皮细胞	降低

2.1 肠道菌群的屏障功能

肠道菌群的一个重要功能是保护宿主免受肠道病原的攻击。这种高密度的复杂菌群行使一种所谓的定殖抗性功能，从而阻止病原菌的繁殖与生长。无菌小鼠或只拥有低复杂性肠道菌群的小鼠，对肠道病原的易感性更高。类似的情况，抗菌素处理能显著改变菌群密度与组成，从而有利于机会病原菌的定殖。尽管如此，重建正常肠道菌群可以通过抑制病原菌生长或促进肠道免疫反应消除已经感染的病原菌来进行。天然免疫反应受体，如Toll样受体或NOD（nucleotide oligomerization domain）

样受体在介导抗肠道感染的免疫保护反应过程中发挥着重要的作用。如肠道菌群DNA刺激TLR9产生抗寄生虫感染的免疫保护反应。相似的是，细胞内NOD1能识别和感应革兰氏阴性菌的肽聚糖，从而促进嗜中性粒细胞对肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌产生免疫清除反应。适应免疫系统对宿主防御病原菌在粘膜表面的感染也起着非常重要的作用。B淋巴细胞在微生物定殖过程中对细胞信号做出反应，向肠腔中分泌IgA抗体，从而限制病原的入侵。实际上，IgA产生浆细胞在肠道体液免疫系统中起决定性作用，会导致粘膜表面大量IgA的分

泌。所以并不奇怪，IgA缺陷小鼠中分节丝状菌（SFB）和其它梭菌的含量较高。

正常肠道菌群在阻止病原菌的定殖方面发挥着重要的功能，但必须避免正常菌群与免疫系统之间的一些不必要的免疫反应。宿主可以使用多种策略来避免免疫系统与正常肠道之间发生的相互作用。肠道上皮细胞通过物理性隔离肠道正常菌群与免疫系统来提供第一道防线。这道屏障通过产生粘液、抗微生物产物、防御素和分泌型IgA（sIgA）而得到进一步加强。大肠中的粘液在组织结构上可以分为两层，结肠内层的粘液更粘稠从而可以将正常菌

群限制在粘液外层。尽管有些小肠上皮只有一层粘液层，但其粘液中分泌型IgA、抗菌肽，如RegIII c的含量较高，从而阻止了细菌与肠道上皮细胞间的紧密接触。

2.2 肠道菌群的免疫调控功能

现在我们已经知道，肠道菌群对促进宿主免疫系统的发育并维护宿主免疫系统的功能是不可缺少的。而且正常的肠道菌群在维持免疫系统的动态平衡中发挥着重要的作用（图10）。

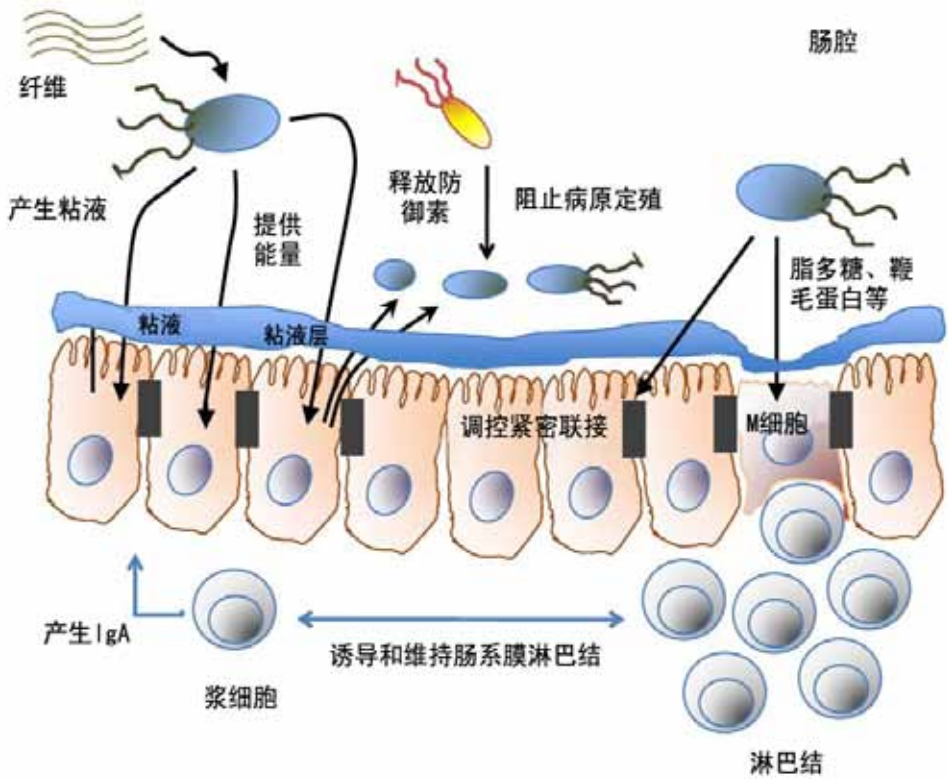


图9 肠道菌群与肠道屏障。原图来自Bischoff的文章^[16]。

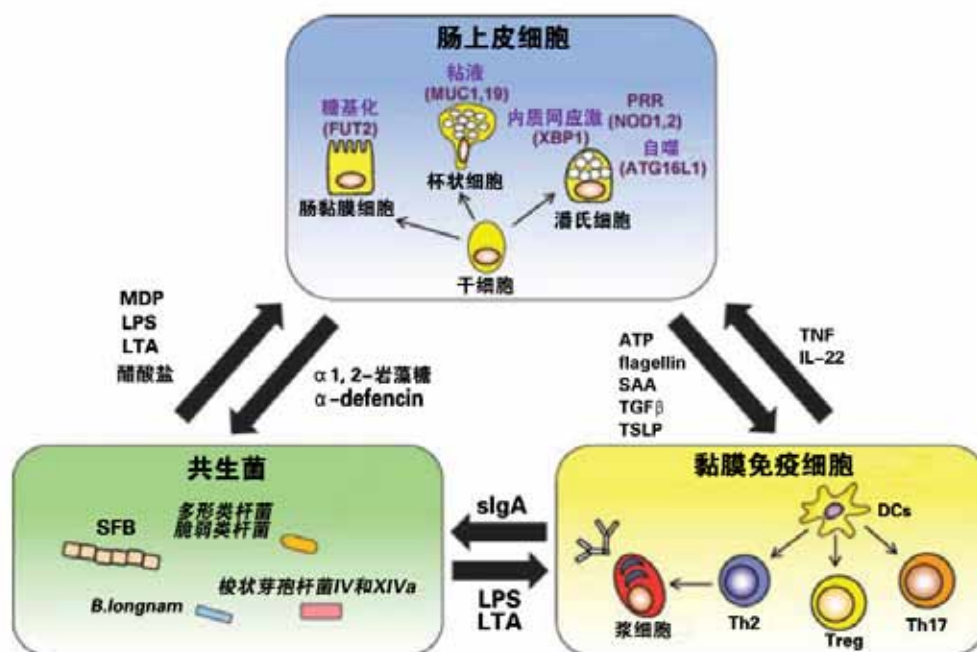


图10 肠道菌群与三维平衡。原图来自Goto和Kiyono的文章^[17]。

2.3 肠道菌群的免疫调控机制

2.3.1 调控T细胞分化

肠道细菌在调控肠道 $CD4^+$ T细胞反应中起着非常重要的作用。尽管 $CD4^+$ T细胞通过识别抗原递呈细胞，如树突状细胞、巨噬细胞和B细胞表面的MHC II分子而活化，但是特异的微生物刺激可以诱导特异的分化程序。如细胞内病原驱动T细胞分化为TH1细胞，从而分泌大量干扰素；而细胞外寄生虫刺激T细胞分化为能产生白细胞介素4的TH2细胞。最近第三种T细胞亚群TH17被认为与控制细胞外病原有关。除了这些效应T细胞亚群外，活化的 $CD4^+$ T细胞也可以分化为调控T细胞（Treg），它可以表达FoxP3转录因子（forkhead box P3）。在稳定状态下，粘膜表面IL-17产生T细胞的量比较高，有趣的是，无菌小鼠肠道中IL-17分泌型T细胞的数量非常少，这表明肠道细菌对TH17细胞的分化非常重要。但天然免疫受体信号对固有层TH17细胞的分化好像并不是必需的，因为Myd88或TRIF的缺失对TH17细胞的分化表型并没有影响。肠道细菌可以产生ATP是无菌小鼠中缺少

TH17的原因。来源于正常菌群的细胞外ATP可以诱导固有层 $CD11c^+$ 抗原递呈细胞，促进IL-6和IL-23的产生，这两种细胞因子对产生和维持TH17非常重要。在普通饲养小鼠的肠道内容物中，ATP的含量较高，而在无菌动物中其浓度显著降低。使用ATP类似物对无菌小鼠进行处理后其肠道中的TH17细胞数量显著增多。这进一步验证了肠道正常菌群产生的细胞外ATP是一种TH17细胞诱导因子。

另外，TH17和Treg细胞都可以通过芳香烃受体（aryl-hydrocarbon receptor, AhR）激活。很多AhR的配体都是由肠道细菌通过代谢色氨酸产生的。AhR的表达影响了TH17细胞与AhR的结合，从而影响了TH17细胞相关细胞因子IL-22的产生。最近的研究很清楚地表明并不是所有的肠道细菌对刺激T细胞反应具有相同的能力。例如，单独的分节丝状菌（SFB）就可以替代肠道菌群而促进肠道TH17细胞反应。SFB是一种能形成孢子的革兰氏阳性厌氧菌。最近三个不同的研究组分别对其基因组进行了测序。SFB基因组中编码一些典型厌氧生活相关的基因，但是缺少很多与

生物合成酶相关的基因，很大程度上其生存依赖于宿主。用SFB接种无菌小鼠后，可以恢复小肠固有层TH17细胞反应。尽管这样，SFB如何诱导TH17细胞反应至今还不清楚。SFB诱导的TH17细胞反应可能与血清淀粉样蛋白A（Serum amyloid A）有关，因为在SFB定殖无菌小鼠后其表达量升高，而且血清淀粉样蛋白A在体外能促进TH17的分化。

有趣的是，初步研究表明SFB可以通过活化B细胞而刺激体液免疫，如诱导IgA分泌和募集上皮内淋巴细胞。也有研究报道肠道细菌与一些Treg细胞亚型的分化相关。脆弱拟杆菌是一种革兰氏阴性厌氧菌，它定殖在两个不同的肠炎模型中均能阻止肠道病理现象的发

生。脆弱拟杆菌的保护作用归功于其所产生的多糖A（polysaccharide A, PSA）。多糖A通过增加IL-10产生CD4⁺ T细胞的数量来抑制肠道炎症的发生。当用多糖A处理小鼠后，肠系膜淋巴结中IL-10产生CD4⁺ T细胞的出现频率增加，而且多糖A的这种保护作用在IL-10缺陷小鼠中消失。另外Atarashi等人表明，一些梭菌在结肠中可以诱导IL-10产生Treg细胞从而阻止肠炎的发生。这些结果表明特定的微生物可能已经在肠道中进化出了不同的调控路径来促进效应T细胞和Treg细胞的分化，从而影响粘膜稳定平衡。尽管这样，微生物调控宿主免疫反应的精确细菌成分和机制到目前还不清楚。

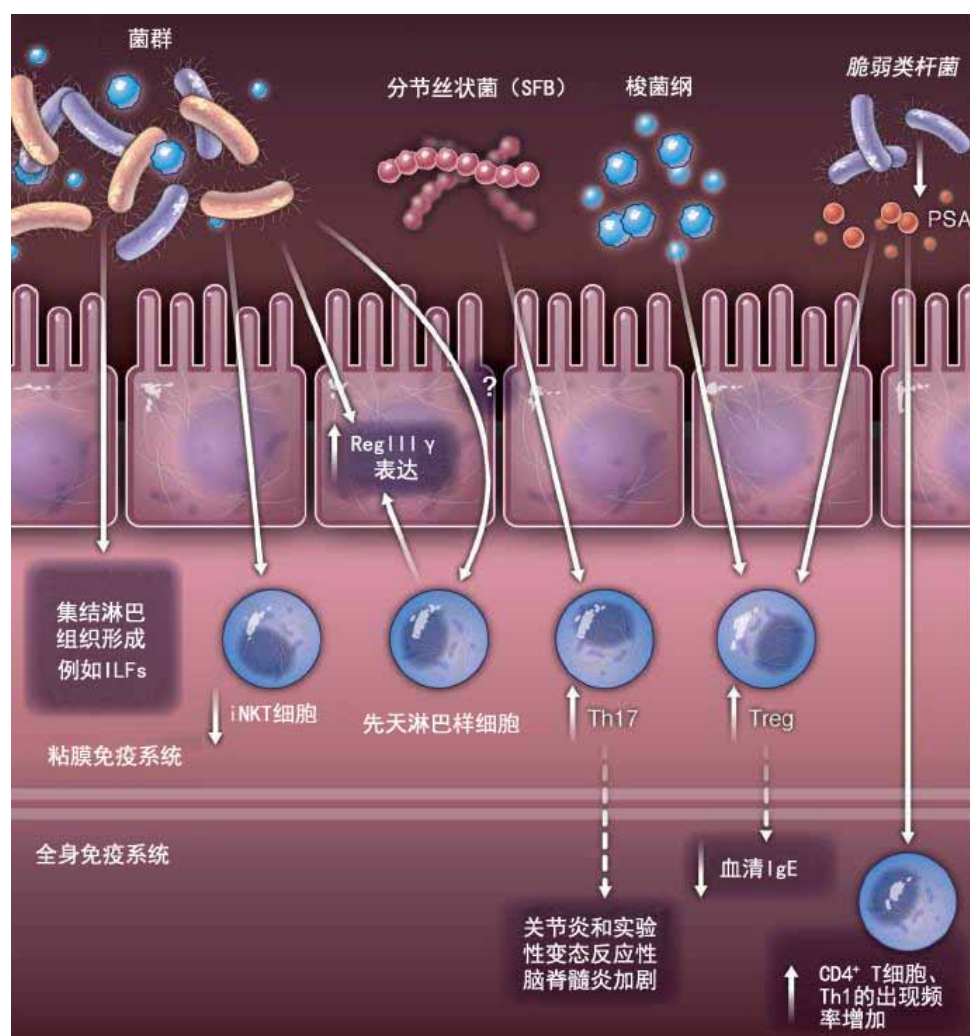


图11 肠道菌群调控免疫细胞分化。原图来自Hooper等的文章^[18]。

2.3.2 刺激抗原递呈细胞

肠道抗原递呈细胞，特别是各种各样的树突状细胞和巨噬细胞出现在肠道相关淋巴组织中，通过维持免疫和耐受的平衡来保持肠道免疫系统的稳定。模式识别受体可以激活树突状细胞的决定簇，从而决定产生哪种类型的细胞因子。然后，这些细胞因子调控自然T细胞分化成不同的促炎性或调控细胞系。有些肠道细菌可以直接作用于树突状细胞，如脆性拟杆菌产生的多糖A可以刺激树突状细胞从而有助于T细胞分化为TH1细胞、IL-10产生T细胞或

FoxP3⁺ Treg细胞。

2.3.3 细菌代谢产物的免疫调控作用

除了以上提到的一些调控因素外，肠道正常细菌的产物或代谢物可能从肠腔转位到粘膜循环系统中，从而影响与免疫调控或自身免疫相关基因的表达。尽管其作用机制还不是很清楚，但最近有研究表明革兰氏阴性菌的肽聚糖可以通过肠道粘膜提高嗜中性粒细胞介导的免疫反应。肠道细菌也可以产生其它一些重要的免疫调控因子，如短链脂肪酸。表6列出了常见的肠道菌群代谢产物及其潜在的生理功能。

表 6 肠道菌的代谢产物及其可能的生理功能^[19]

代谢产物	相关的细菌	可能的生理功能
短链脂肪酸：醋酸、丙酸、丁酸、异丁酸、2-甲基-丙酸甲酯、戊酸、异戊酸、己酸	梭菌 IV 簇和 XIVa 簇，包括真细菌、罗氏菌、普拉梭菌和粪球菌	降低结肠 pH，抑制病原菌生长；促进水和钠离子吸收；参与胆固醇合成；为结肠上皮细胞提供能量，与人类肥胖、胰岛素抗性和 2 型糖尿病及结肠癌等相关
胆汁酸（Bile acids）与胆酸盐（cholate）	乳酸菌、双杆菌、肠细菌、拟杆菌和梭菌	吸收饮食中的脂肪和脂溶性维生素，促进脂类吸收，维持肠道屏障功能；接受系统激素信号；调控甘油三酯、胆固醇、葡萄糖和能量平衡
胆碱代谢物：甲胺、二甲胺、三甲胺、三甲胺-N-氧化物、二甲基甘氨酸、甜菜碱	普拉梭菌、双歧杆菌	调控脂质代谢和糖平衡；与非酒精性脂肪肝、饮食诱导的肥胖、糖尿病和心血管疾病相关
苯酚（Phenolic）、苯甲酰（benzoyl）和苯基衍生物（phenyl derivatives）	艰难梭菌、普拉梭菌、双歧杆、 <i>Subdoligranulum</i> 、乳酸菌	药物脱毒；肠道微生物组成与活性的指示剂；多酚类的使用
吲哚衍生物（Indole derivatives）	生孢梭菌、大肠杆菌	保护应激引起的胃肠道损伤；调控促炎症因子的表达，促进抗炎基因的表达，加强上皮屏障特性。与胃肠病理、肠脑轴及一些条件性神经病有关。
维生素：维生素 K、维生素 B ₁₂ 、生物素、叶酸、维生素 B ₁ 、核黄素、吡哆醇	双歧杆菌	提供内源性维生素，加强免疫功能，调控细胞增生。

（接下表）

(续上表)

多胺 (Polyamines): 腐胺、尸胺、亚精胺、精胺	空肠弯曲杆菌、化糖梭状芽胞杆菌	影响宿主基因毒性、抗炎症与抗肿瘤作用; 可能的肿瘤标记物。
脂质 (Lipids): 共轭脂肪酸、脂多糖 (LPS)、甘油酯、鞘磷脂、胆固醇、卵磷脂、磷酸乙醇胺甘油三酯等	双歧杆菌、罗氏菌、乳酸菌、克雷伯氏菌、肠细菌、柠檬酸细菌、梭菌	影响肠道渗透性, 活化肠-脑-肝神经轴调控糖平衡; LPS 慢性系统炎症; 共轭脂肪酸改善血胰岛素增多、改善免疫系统、改变脂蛋白图谱。另外胆固醇是固醇和胆汁酸产生的基础。
其它: D-乳酸、甲酸、甲醇、乙醇、琥珀酸、赖氨酸、葡萄糖、尿素、肌氨酸、肌氨酸酐、大麻素类物质等	拟杆菌、假丁酸弧菌、瘤胃球菌、普拉梭菌、双歧杆菌、 <i>Subdoligranulum</i> 、奇异菌、壁厚菌、乳酸菌	直接或间接合成或使用这些成分, 或调控相关的代谢通路, 包括内源性大麻素系统。

3. 肠道菌群对大脑发育及人类行为的影响

胃肠道和中枢神经间存在着双向功能交流, 这其中一个重要的组成部分是胃肠道免疫系统与下丘脑-垂体-肾上腺轴之间的交流 (图 12)。脑-肠相互作用在调控肠道功能和影响宿主健康状况方面发挥着非常重要的作用。肠道菌群在相互作用中所扮演的角色也是最近这几年才开始受到关注。大脑通过改变胃肠道移动性、分泌物和肠道渗透性从而间接影响正常菌群, 或通过固有层细胞 (肠嗜铬细胞、神经元和免疫细胞) 释放信号分子直接影响肠道菌群。相反, 肠道菌群通过上皮细胞受体介导的信号直接刺激固有层的宿主细胞。肠道菌群主要通过释放细菌底物、发酵产物和肠道内分泌因子, 及其与免疫系统间的相互作用来维持大脑系统的神经传感和动力功能。另外, 改变肠道菌群也可以改变动物的行为。例如, 接种病原菌空肠弯曲杆菌或鼠类柠檬酸杆菌可以在健康小鼠中诱导焦虑样行为。这种行为的改变在细菌接种后数小时就可以出现, 表明调控肠道

菌群很快就可以改变中枢神经系统中生物化学物质的产量。同时, 肠道菌群的消失能影响下丘脑-垂体-肾上腺轴的发育。与普通饲养小鼠相比, 无菌小鼠在受到应激时产生了更高水平的促肾上腺皮质激素和皮质脂酮。另外无菌小鼠的N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位NR-1和NR-2a在皮质和海马中的表达水平较低。这种现象与大脑同一区域脑源性神经营养因子水平下降同时存在。接种正常小鼠的粪便可以阻止无菌小鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的改变。这些数据表明, 早期肠道菌群的定殖对大脑的充分发育起着重要的作用。对肠道菌群的改变可能会引起与沮丧和焦虑相关行为特征的改变。广谱非吸收性抗菌素已经用于评价其对微生物-肠-轴的影响。口服硫酸新霉素、细菌素和匹马菌素引起的肠道紊乱, 增加了小鼠大脑边缘区探究行为和脑源性神经营养因子, 而当使用腹腔注射时却并不会出现这种影响。

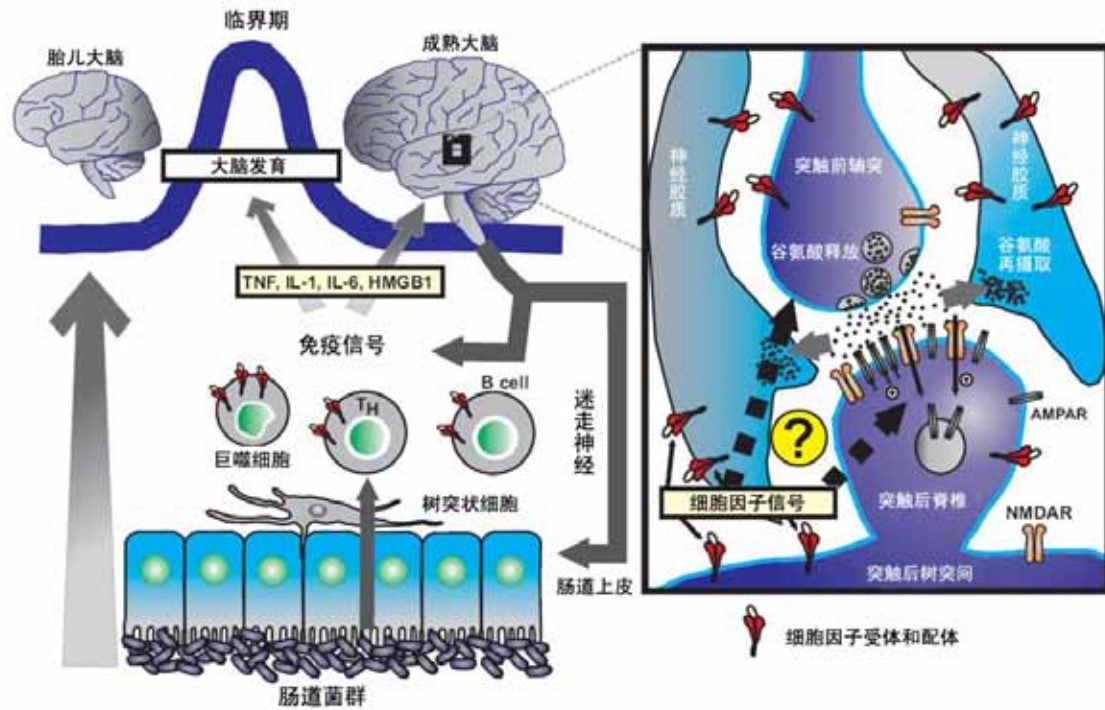


图12 肠道菌群促进大脑发育。原图来自Diamond等的文章^[20]。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：蔡小姐

三、与肠道菌群相关的疾病

如上所述，正常的肠道菌群对宿主很多重要生理功能的维护和发挥起着非常重要的作用，但当这种自然稳定状态遭到破坏后也可以引起很多疾病，如肥胖、糖尿病、代谢综合症、IBD、IBS、自身免疫病和乳糜泻等的发生（图13）。

虽然已有很多研究指出，在疾病发生的同时也伴随着菌群结构的变化（表7），但谁因谁果还有待进一步研究。大部分学者认为菌群结构的改变可能是因，而疾病的发生是果，尤其是在对肠道菌群的代谢产物进行了更深入的研究后，很多学者认为微生物代谢物可能在疾病发生过程中起着非常重要的作用（表8）。

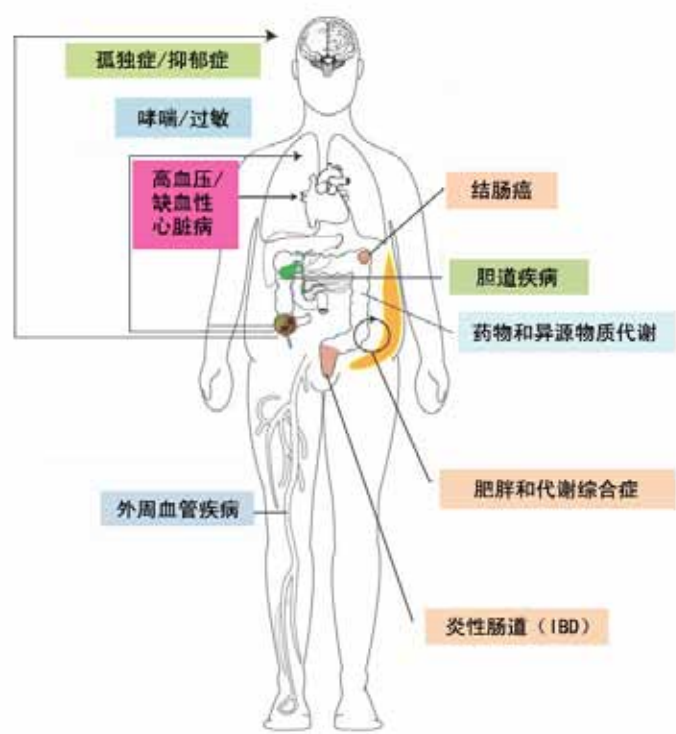


图13 与肠道菌群相关的疾病。原图来自Kinross等的文章^[21]。

表 7 各种疾病状态下的菌群变化^[22,23,24]

疾病名称	变化菌群
肥胖（Obesity）	<i>Coriobacteriaceae</i> 、乳酸杆菌属（ <i>Lactobacillus</i> ）、肠球菌（ <i>Enterococcus</i> ）、普拉梭菌（ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ）、普雷沃菌属（ <i>Prevotella</i> ）、梭状芽胞杆菌（ <i>Clostridium</i> ）、真细菌（ <i>Eubacterium</i> ）、罗氏菌属（ <i>Roseburia</i> ）、葡萄球菌属（ <i>Staphylococcus</i> ）、大肠杆菌（ <i>Escherichia coli</i> ）增多，拟杆菌和史氏甲烷短杆菌减少

（接下表）

(续上表)

2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes)	拟杆菌 - 普雷沃菌和 B- 变形菌增多, 硬壁菌、梭菌、球形梭菌 - 直肠真细菌减少, 硬壁菌与拟杆菌比率降低
克罗恩病 (Crohn's Disease)	卵形拟杆菌和普通拟杆菌增多, 单形拟杆菌减少
炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)	放线菌和变形菌增多, 拟杆菌、毛螺菌、柔嫩梭菌群、球形梭菌、普拉梭菌和双歧杆菌减少, 硬壁菌与拟杆菌比率下降
肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS)	韦永氏球菌、Dorea、瘤胃球菌、梭状芽胞杆菌数量增多, 拟杆菌、双歧杆菌、柔嫩梭菌、产甲烷菌及乳酸杆菌减少
乳糜泻 (Celiac Disease, CD)	普通拟杆菌增多、大肠杆菌和球样芽胞杆菌减少
胃癌 (Gastric Cancer)	幽门螺杆菌增多
厌食症 (Anorexia)	史氏甲烷短杆菌增多
过敏 (Allergies)	乳酸杆菌、青春双歧杆菌、幽门螺杆菌和艰难梭菌减少
孤独症 (Austim)	拟杆菌和变形菌增多, 放线菌和硬壁菌减少

表 8 细菌代谢产物和细菌成分在疾病发生过程中的作用 ^[25]

发酵产物种类		主要产生细菌	对宿主可能的影响
肠道菌群对饮食成分的转化产物	短链脂肪酸 (由碳水化合物, 如植物细胞壁多糖、抗性淀粉、多糖和寡糖转化而来)	醋酸: 肠道很多细菌都具有产生醋酸的能力	胆固醇合成的主要底物
		丙酸: 主要由拟杆菌、梭菌 IX, 和丙酸杆菌属细菌产生	肝脏糖异生底物, 能抑制胆固醇合成
		丁酸: 主要由梭菌 XIVa 和 IV (如普拉梭菌, 直肠真杆菌, <i>R. bromii</i> , 罗氏菌属, <i>Anaerostipes</i>) 产生	结肠细胞的主要能量源, 维护肠道粘膜的完整性, 降低结肠癌发病风险, 抗炎作用
	甲烷	产甲烷菌 (<i>Methanovibrebacter smithii</i>)	减缓小肠转运
	蛋白异化代谢产物 (如氨、胺、酚类、硫醇类、吲哚类、N-亚硝基化合物、支链脂肪酸)	肠道多种细菌	细胞毒性和基因毒性, 与小孩孤独症和结肠癌有关
	氢化硫	硫还原菌脱硫弧菌和牛磺酸降解菌嗜胆菌	基因毒性, 腐蚀肠道粘膜
	次级胆酸 (石胆酸、脱氧胆酸)	真细菌属、梭菌	增加胆固醇结石, 诱变性、致癌性
	雌马酚	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> 、梭菌及埃格特菌	抗氧化、抗炎症、减少骨损失, 雌激素

(接下表)

(续上表)

肠道菌群的合成产物	未知的发酵产物	普拉梭菌	通过阻断 NF-KB 的活化而达到抗炎症的作用
	未知的发酵产物	嗜酸乳杆菌 NCFM	调节肠道内脏痛，诱导类鸦片活性肽和大麻素受体
	维生素 K₂ (甲基萘醌类)	脆性拟杆菌、大肠杆菌、丙酸杆菌、真细菌、极小韦永氏球菌、乳酸乳球菌及乳明串珠菌	调节骨盐沉积和血液凝固
	维生素 B₉ (叶酸)	双歧杆菌	调控细胞循环和细胞增生
	维生素 B₁₂ (钴维生素)	罗伊乳杆菌	刺激神经系统发育
	共轭亚油酸	短双歧杆菌、长双歧杆菌	调控免疫系统、降低代谢类疾病的患病风险
	γ -氨基丁酸	短乳杆菌，副干酪乳杆菌	抑制中枢神经系统，缓解血压过低和多尿
肠道细菌的细胞成分	多糖 A	脆性拟杆菌	降低促炎性分子，如 TNF-α 、 IL-1β 和 IL-17 水平，提高抗炎性因子 IL-10 水平，减少中性粒细胞浸润和上皮细胞增生
	脂多糖	革兰氏阴性细菌	通过活化 NF-κB 而具有促炎性作用，促进树突状细胞的成熟
	磷壁(酸)质	革兰氏阳性细菌	调节促炎性或抗炎性免疫反应

1. 肠道菌群与肥胖和2型糖尿病

2004年，美国华盛顿大学Gordon实验室在美国科学院院刊(*PNAS*)上首次报道了肠道菌群与肥胖相关，研究结果表明肠道菌群可以调节实验小鼠的脂肪存储。2006年，Gordon等人再次在《自然》杂志(*Nature*)上发表肠道菌群与肥胖相关的论文。他们分别在小鼠和人体的肠道菌群中发现了与肥胖相关

的菌群特征，即肥胖的人或者小鼠肠道菌群中，厚壁菌门相对拟杆菌门的比例(F/P)更高。他们发现，无论高脂饲料诱导的肥胖小鼠，还是瘦素基因缺失的遗传性肥胖小鼠，其肠道菌群中的F/P比值都比健康的、瘦的小鼠高。在肥胖者和瘦人之间也存在着这种比例差异。自此，肠道菌群与肥胖间的相互关系成

为新的研究热点，很多实验室都对肥胖者和瘦人间的F/P的比值进行了研究。但大量研究并不能验证这一点，甚至有些研究发现F/P比例与肥胖根本就不存在关联。这在一定程度上引起了人们对肠道菌群与肥胖间存在相互关系的怀疑，并开始思考谁因谁果，到底是菌群结构变化引起肥胖，还是由于肥胖导致菌群结构的变化。直到Patrice D. Cani等人在《糖尿病》杂志（*Diabetes*）上发表论文称肠道细菌产生的内毒素可以引起肥胖，才使人们依然坚信肠道菌群可能是引起肥胖的诱因。他们发现用高脂饲料饲喂正常有菌群的小鼠8周以后，小鼠出现肥胖和胰岛素抗性。他们在这种肥胖小鼠的血液中发现一种由肠道细菌产生的内毒素的浓度比健康对照高2-3倍。因此，他们推测来自肠道菌群的内毒素可能是引起肥胖小鼠全身性低度炎症和肥胖的重要因素。为了证实这个假说，他们从希格玛化学公司购买了一种标准的内毒素（一种从大肠杆菌的细胞壁提纯出来的脂多糖成份）。他们用一种注射泵，给吃普通饲料本来不会胖的小鼠持续皮下注射这种内毒素，剂量与肥胖小鼠血液里的内毒素浓度相当，在注射内毒素后这些小鼠开始出现低度炎症，最后变成肥胖小鼠，而且也有了胰岛素抵抗。这进一步验证了肠道细菌产生的内毒素是引起动物肥胖的一个关键致病因子。最近上

海交通大学赵立平实验室的研究结果进一步证明了肠道细菌能引发肥胖的结论。他们在肥胖志愿者中发现了一种被命名为*Enterobacter cloacae*B29的细菌含量非常高，而且用这种菌接种无菌小鼠后，使用高脂饲料饲喂数周后出现了肥胖和胰岛素抗性，但无菌小鼠却没有出现类似的症状。尽管如此，但是由于引起肥胖和胰岛素抗性的原因很复杂，而且与很多遗传和环境因子均有关，所以肠道菌群诱发肥胖的作用机制还有待进一步研究。从已有研究结果来看，肠道菌群可能通过多个途径影响宿主肥胖的发生（图14）。

肥胖动物，除了能高效地合成和积累脂肪以外，还表现出一系列的代谢受损的症状，其中最重要的是胰岛素抵抗。我们知道，胰岛素抵抗是因为炎症因子破坏了胰岛素受体造成的。肥胖小鼠与肥胖者一样，身体里有一种低度的、全身性的慢性炎症。正是这种慢性炎症不仅破坏胰岛素受体，造成胰岛素抵抗，而且还破坏血管，造成大小血管病变。虽然已有很多研究表明肠道菌群与代谢紊乱和糖尿病有关，但肠道菌群与2型糖尿病间的关系还有待进一步研究。如Qin等人报道在糖尿病个体中，丁酸产生菌数量减少，机会病原菌增多。但也有报道称2型糖尿病与肠道菌群无关。

2. 肠道菌群与炎性肠病（IBD）

炎性肠病是一种与遗传、环境、免疫相关的肠道疾病，包括克罗恩病和溃疡性结肠炎。其病原是多方面的，通常在遗传性敏感个体中其肠道粘膜完整性受到损害，使得微生物抗原更容易穿过上皮屏障，进而活化免疫细胞，从而引起不恰当的或潜在的慢性炎症。菌群通过活化天然TLR受体对维持肠道平衡起着重要作

用，也在IBD病人肠道粘膜完整性损坏和修复过程中扮演着重要角色。菌群紊乱可以引起小鼠肠炎，也会使得IBD患者中微生物多样性减少，肠细菌科的含量升高，拟杆菌门和硬壁菌门的一些细菌减少。菌群紊乱如何导致IBD还不清楚，但可能与一些病原菌的入侵，以及

疫细胞活化、破坏Th1和Th17介导的免疫反应、增加粘膜渗透性和失去免疫耐受功能等有关。肠道菌群被认为是引起IBD的一个重要因子，所以很多学者对研究哪些菌群可以保护肠道非常感兴趣。也有研究表明饮食中脂质的摄入也是引起IBD的一个重要病原。有一项研究指出，在丹麦人群中，吃omega-6多不饱和脂肪酸的人群患溃疡性结肠炎的风险增加了30%；而以二十二碳六烯酸（一种omega-3

多不饱和脂肪酸）为饮食的患者发病率下降了77%。过多地摄入omega-6多不饱和脂肪酸增加IBD患病风险被认为是饮食脂肪酸直接改变宿主肠道免疫反应所致，但这种改变至少在一部分上与肠道菌群的改变有关。有研究表明，肠道菌群中拟杆菌含量升高促进宿主肠道免疫和氧化还原反应，从而保护宿主免受致死性肠炎感染。这表明肠道菌群影响宿主反应和疾病易感性。

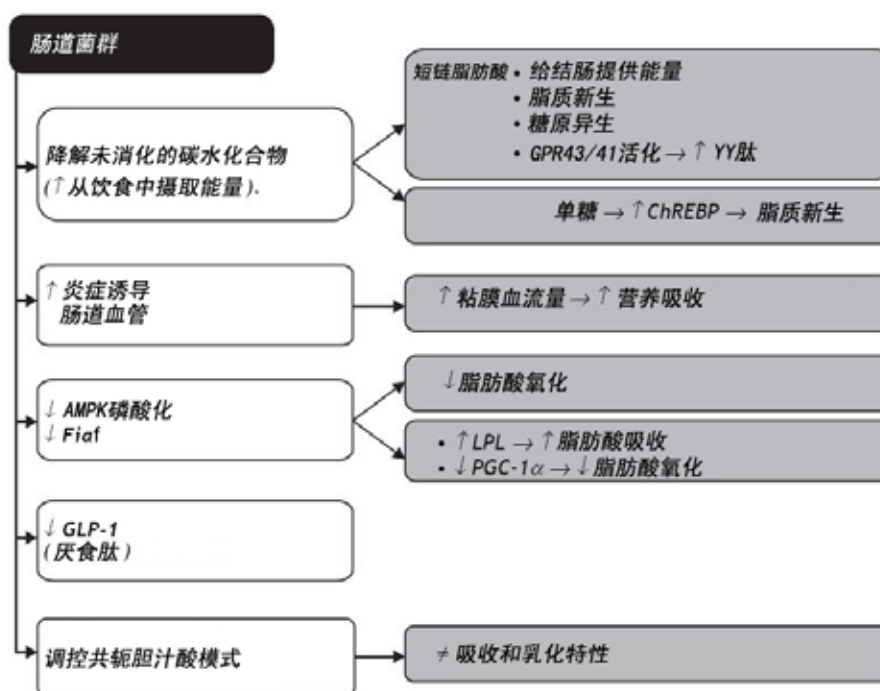


图14 肠道菌群引发肥胖的可能机制。肠道菌群可以降解未消化的碳水化合物，将其转化为短链脂肪酸和单糖。短链脂肪酸不仅是结肠细胞的底物，也是脂质新生和糖原异生的前体，另外也可与特异的受体GPR43/41结合致使蛋白肽YY增加。这种YY肽可以减缓肠道转运时间从而促进营养吸收。单糖可以激活一种叫碳水化合物反应元件结合蛋白的转录因子（ChREBP），促进脂质新生。由于粘膜血流加快，营养的吸收也更有效，同时加速炎症诱导的血管形成。肠道菌群也可以降低AMP活化蛋白激酶（AMPK）的磷酸化和减少饥饿诱导脂肪因子（*fiaf*）的产生，导致脂肪组织、肝脂肪酸氧化的减少和脂肪酸摄入的增多。肠道菌群降低胰高血糖素样多肽-1（GLP-1），一种已知的使食欲减退的多肽的分泌。最后，肠道菌群可以通过调控共轭胆汁酸模式来调控其吸收和乳化作用。PGC-1 α ：过氧化物酶体增殖物激活受体辅激活因子1 α ；LPL：低密度脂蛋白脂肪酶。原图来自Machado和Cortez-Pinto的文章^[26]。

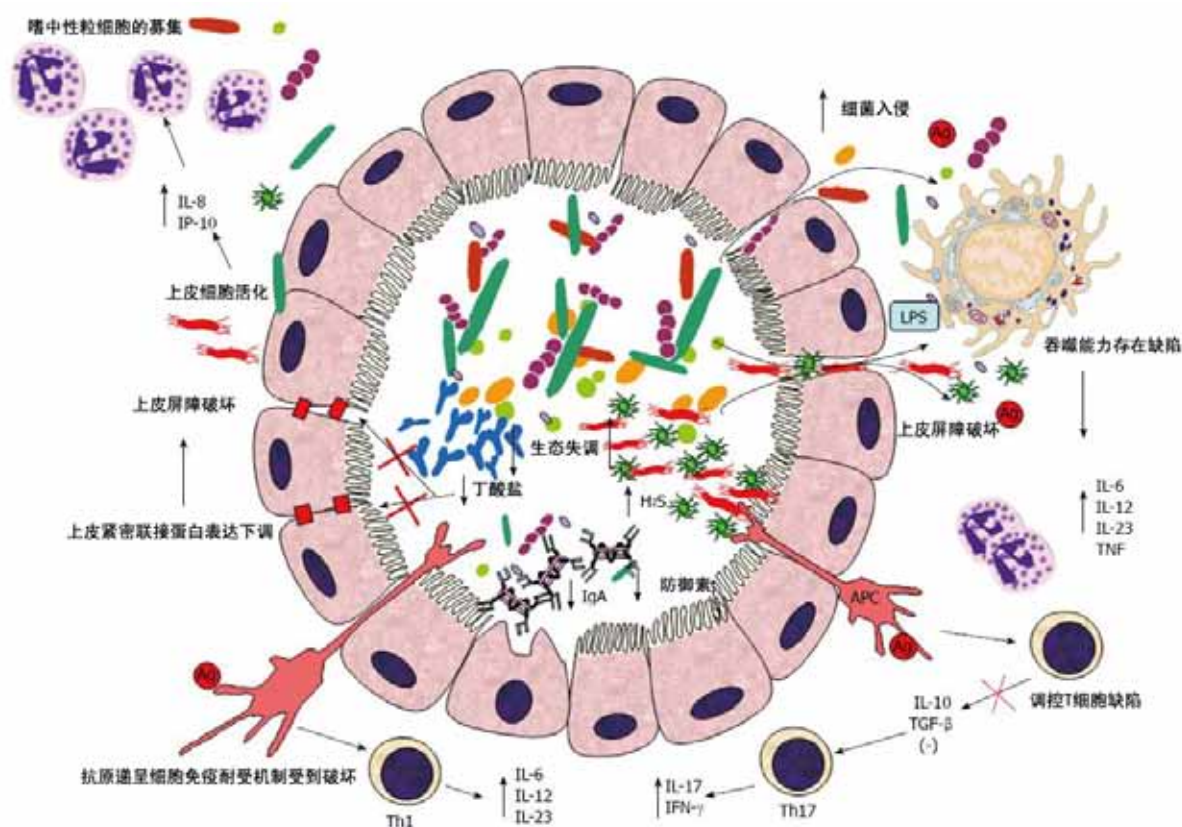


图15 IBD的可能致病机制。IBD肠道紊乱包括益生菌（如双歧杆菌）数量减少，伴随着有害细菌（如硫还原菌）增多。这种微生态失衡导致管腔内丁酸水平降低，因此下调了上皮紧密连接蛋白的表达，从而增加上皮渗透性。上皮屏障破坏后导致细菌转位增多，伴随着肠腔IgA和防御素浓度的降低，情况更加恶化。遗传上倾向于有缺陷的巨噬细胞其吞噬能力存在缺陷，所以对穿过固有层而发生转位的细菌的杀伤力也较低。对感染细菌的清除导致TLR的过度刺激，从而分泌促炎细胞因子和活化天然免疫和T细胞介导的免疫反应。这种上皮细胞和抗原递呈细胞免疫耐受机制的破坏加剧了天然免疫细胞与嗜中性粒细胞的募集。另外，调控T细胞缺陷和抗原递呈细胞引起的过度T细胞反应（Th1和Th17），相应地强化了炎症反应和肉芽肿反应。IL：白细胞介素；IFN- γ ： γ -干扰素；TNF：肿瘤坏死因子；TGF- β ：转化生长因子- β ；LPS：脂多糖。原图来自Fava和Danese的文章^[27]。

3. 肠道菌群与肠易激综合征（Irritable Bowel Syndrome, IBS）

肠易激综合征也就是肠子容易激动、容易受刺激，从而出现痉挛而引起腹痛。IBS患者占了胃肠科门诊病人的40%。尽管其致病机理还不清楚，但有研究表明可能与肠道菌群有关。IBS患者的粪便菌群与健康个体间差异显著。健康者菌群多样性比IBS患者更丰富。在

有些IBS病例中也可以看到小肠细菌的过度生长。与对照相比，IBS患者的硬壁菌/拟杆菌比例提高两倍以上，而梭菌的水平升高，双歧杆菌的水平降低。有一项研究也发现IBS患者的粪便样品中拟杆菌和乳酸菌的多样性更丰富。IBS通常分为两类，一类以腹泻为主，另一类

以便秘为主。腹泻为主的IBS肠道中一些有害细菌，如变形菌的数量明显增多，而一些有益菌，如乳酸菌、放线菌和拟杆菌的数量以及整个菌群的多样性减少。便秘为主的IBS患者肠道中硬壁菌的数量增加，乳酸产生菌的数量减少，乳酸产生和利用菌，如霍氏真杆

菌和*Anaerostipes caccae*降低。这些菌群怎样影响IBS还并不清楚，但其中一个影响因素可能是轻度炎症。IBS患者在菌群变化后引起TLR4和5的表达量上调，从而启动天然免疫反应的情况充分说明了这一点。图16推测了肠道菌群引起IBS疾病的可能机制。

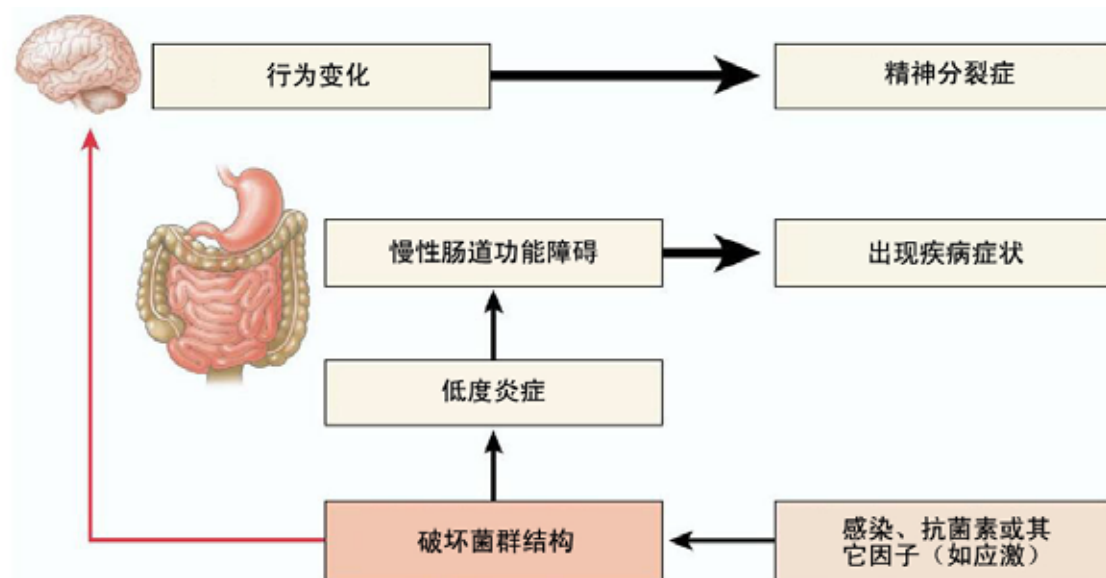


图16 肠道菌群在IBS发病过程中的作用。在这个模型中，一些已知的IBS风险因子包括胃肠炎、抗菌素的使用和应激会引起肠道菌群改变并加剧生理性炎症。同时还会导致肠道功能发生改变而引起腹部出现症状。在这种情况下，肠道菌群的改变对人的行为也有所影响。原图来自Collins和Bercik的文章^[28]。

4. 肠道菌群与结肠癌

大量实验室和临床证据表明肠道慢性炎症增加了致癌性转化风险，所以有研究指出“病原菌”引起的慢性炎症与结肠癌相关也就并不奇怪了。已有研究报道各种不同的细菌能引起与炎症相关的结肠癌的发生（表9）。尽管这样，微生物成员是如何成为病原菌，从而引起慢性炎症并导致癌症的发生还不是很清楚，有推测表明，这可能是由肠道菌群结构的改变会影响免疫功能和炎症反应所致。如促炎性细胞

因子通过调节细胞因子、化学因子、粘附分子和血管生成等可以促进肿瘤的发生。最近也有研究表明感染产肠毒素型脆性拟杆菌可以引起炎症性腹泻，最终导致肠炎和结肠癌。临床结果也说明慢性炎症在癌症发生中起着非常重要的作用。慢性溃疡性结肠炎患者发展成结肠癌的风险比普通人高5倍，且抗炎药可以抑制患结肠癌的风险。

表 9 由各种细菌引起的炎症相关癌变^[29]

细菌名称	癌症种类
芽孢杆菌 (<i>Bacillus spp.</i>)	膀胱癌
拟杆菌 (<i>Bacteroides spp.</i>)	结肠直肠癌
肠杆菌属 (<i>Enterobacter spp.</i>)	实体和血液肿瘤
肠球菌 (<i>Enterococcus spp.</i>)	实体肿瘤
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、肾细胞癌和急性髓细胞样白血病
螺杆菌 (<i>Helicobacter spp.</i>)	胃癌、肝癌、子宫癌、食道癌、结肠癌和淋巴瘤
肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella spp.</i>)	实体肿瘤
假单胞菌属 (<i>Pseudomonas spp.</i>)	实体和血液肿瘤

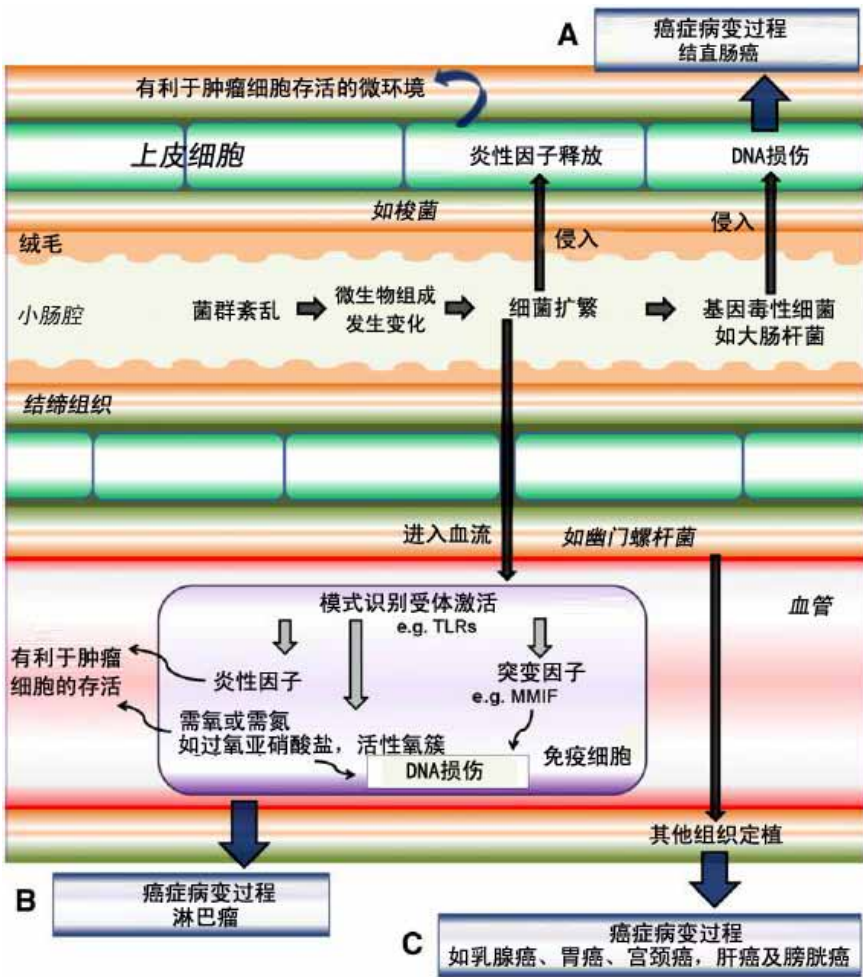


图17 肠道菌群与癌变。肠道菌群，一群永久定居在胃肠道中的微生物，在消化、免疫和防癌方面起着重要的作用。在肠道微环境发生改变的情况下，肠道菌群可以促进各种细胞的恶性转化。在大肠癌的发生过程中(A)，能损伤DNA的细菌侵入上皮细胞，在DNA损伤后开始转化和促进炎症因子的产生，从而有利于肿瘤细胞的生存。在淋巴瘤的生成过程中(B)，能损伤DNA的细菌在损伤DNA后开始转位到淋巴细胞，从而进入血流。感染了免疫细胞产生大量促炎因子，从而有利于肿瘤细胞的生存。相似的是，能损伤DNA的细菌可以感染其它多种类型的细胞，并通过血流进行转位，从而引起乳腺癌、胃癌、子宫癌、肝癌和膀胱癌等(C)。MMIF：巨噬细胞游走抑制因子；ROS：活性氧簇；TLRs：Toll样受体。原图来自Kipanyula等的文章^[29]。

5. 肠道菌群与感染类疾病

最近小鼠模型研究结果表明宿主的菌群组成可以影响肠道病原的易感性，而且一些特定的菌群可以影响入侵病原的定殖和有益微生物的定殖。如宿主中大肠杆菌密度高者对肠炎沙门氏菌的易感性也比较高，而乳酸菌数量高的宿主更有利于益生菌乳酸菌的定殖。尽管肠道上皮、天然和适应免疫系统、肠道粘膜均参与宿主对感染性疾病的防御，但肠道细菌也为宿主抵御入侵性病原的感染起着非常重要的作用。当菌群紊乱时，一些条件性致病菌，如沙门氏菌和艰难梭菌会出现过度繁殖而引发疾病，但正常肠道菌群对很多病原菌的感染也具有

有很好的防御作用。目前研究得比较多的就是肠道菌群对艰难梭菌感染的抑制作用，图18描述了其简单的作用机制。正常菌群主要通过定殖抗性来防御病原菌的感染，所谓定殖抗性即内源肠道菌群保护宿主免受感染性微生物入侵的过程。目前研究表明定殖抗性可能存在以下几种作用机制，其中最重要的可能是通过肠腔粘膜正常菌群与病原菌竞争生存空间和营养。另外，正常菌群产生的一些代谢产物，如短链脂肪酸、活性氧和细菌素等对肠道病原也有抑制或杀灭作用。

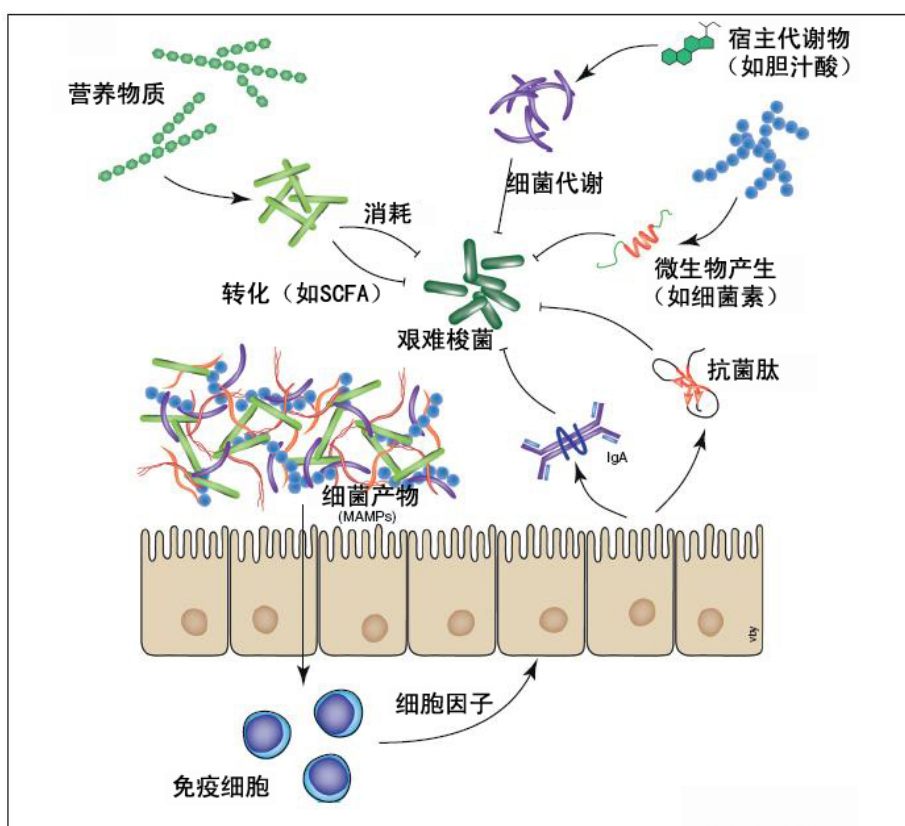


图18 正常菌群介导艰难梭菌定殖抗性的可能机制。在肠道中一些特异的细菌可以直接或间接地干扰艰难梭菌的繁殖。直接抑制包括通过营养竞争、将营养物质或宿主代谢产物转化为艰难梭菌抑制物，或土著细菌产生具有抑制作用的代谢产物。间接抑制包括菌群与宿主间的相互作用，影响宿主基因的表达从而抑制艰难梭菌的定殖和繁殖。识别微生物分子相关的模式（MAMP）可以启动宿主免疫信号介导的级联反应，从而产生天然和适应免疫效应分子。原图来自Britton和Young的文章^[30]。

肠道菌群除了对一些病原细菌的易感性有影响外，也有研究报道肠道菌群可以影响宿主对病毒的易感性。第一，无菌小鼠对A型流感病毒、Coxsackie病毒BT、弗里德（氏）病毒的易感性更高。第二，登革热病毒是一种血源性疾病，但它却通过肠道途径起始其在蚊子中的感染。更有趣的是，登革热病毒在抗菌素处理蚊子的中肠内复制得更快，这表明昆虫肠道菌群限制了病毒的复制。第三，防御素可以抑制腺病毒的复制，而防御素是肠道菌群刺激宿

主后所产生的一种抗菌肽。在体外实验中，防御素可以直接结合到病毒粒子上而抑制病毒复制。相反，也有研究表明，一些菌群可以间接加速病毒的复制和疾病的发生。第一，一种革兰氏阴性菌的组成成分脂多糖可以促进小鼠乳腺癌病毒的持续感染；第二，脂多糖处理促进了泰勒脑脊髓炎病毒在中枢神经系统中的复制和疾病的发生；第三，脂多糖介导的慢性炎症反应有利于人免疫缺陷病毒感染者的免疫缺陷症状的出现。

6. 肠道菌群与肝脏疾病

非酒精性脂肪肝（NAFLD）是最常见的一种慢性肝脏疾病。NAFLD的发病机制还不清楚，但大部分人认为，除了遗传因素外，摄入高脂肪和高果糖的饮食可以影响NAFLD的发生。最近有研究表明肠-肝轴可能在这个复杂调控网络中起着重要的作用。已经有研究表明，肠道菌群可能通过几种不同的方式影响NAFLD。首先，肠道菌群可以直接影响宿主从肠道内容物中摄入热量的多少，从而影响增重和肥胖的发生；其次，肠道菌群和相应的内毒素可能与NAFLD的胰岛素抗性有关；再次，肠道紧密连接改变后可以影响肠道完

整性，从而增加肠道渗透性，导致细菌转位和细菌产物进入循环系统，最后达到肝脏而影响NAFLD的发生。肠-肝轴是细菌和其可能对肝脏有毒性的产物（脂多糖、DNA和RNA等）进入肝脏的便利通道。这些微生物成分通常被定义为病原相关的分子模式（PAMP），而内源性的产物被定义为损伤相关分子模式（DAMP）。当然，除了非脂肪肝外，也有文献报道肠道菌群与原发硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化及乙肝病毒引起的肝硬化等有关。

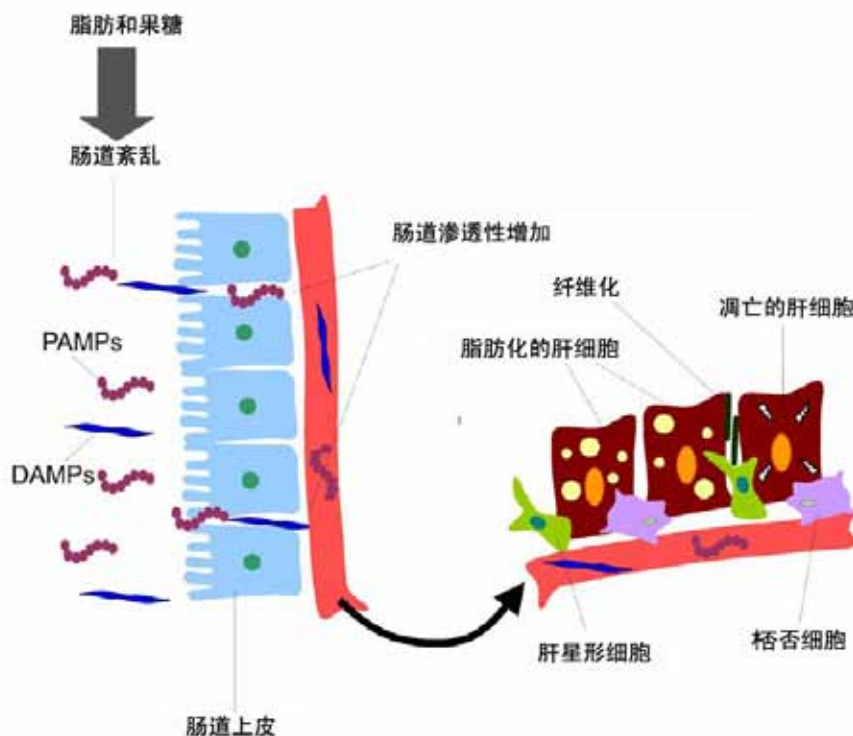


图19 肠源物质在非酒精性脂肪肝发展过程中对肝细胞的影响。脂肪和果糖含量较高的饮食可能会破坏肠道屏障，增加肠道渗透性，使肠源物质更容易通过肠道屏障，从而将PAMP（病原相关分子模式）和DAMP（损伤相关分子模式）释放到循环系统中。这样PAMP和DAMP就有可能到达肝脏细胞，从而促进脂肪在肝细胞中储存和纤维化，并造成肝细胞损伤。原图来自Alisi等的文章^[31]。

7. 肠道菌群与乳糜泻

乳糜泻是一种慢性炎性肠病，是由于小麦、大麦和黑麦的麸质肽被巨噬细胞摄入和递呈给CD4⁺ T细胞后引起自身免疫反应而导致。这个过程加速促炎性细胞因子的释放从而损伤小肠粘膜。尽管乳糜泻的发病机制已经非常清楚，但最近有研究表明，肠道菌群在病理生理过程中也起着重要的作用。顺产和母乳喂养的小孩可能由于定植了健康的菌群而保护其不出现这种疾病。很多研究组发现，与健康成人相比，乳糜泻患者的粪便中双歧杆菌、乳酸菌、拟杆菌、葡萄球菌和大肠杆菌的数量增多。但也有些研究发现乳糜泻患者的双歧杆菌数量比正常对照低；在患乳糜泻疾病的儿童中双歧杆菌的多样性降低；长双歧杆菌可以减轻由麸质引起的肠病。总之，在患乳糜泻疾病

的儿童中，革兰氏阴性菌和潜在的能促进促炎因子释放的菌数量增加，这与病理性紊乱和疾病症状的出现有关。改变TLR2和9的表达，以及抑制小肠中与Toll相互作用的接头蛋白可以缓解症状，这表明菌群相关的因子在疾病发生过程中也起着重要作用。目前，无麸质肽的饮食是治疗乳糜泻疾病的唯一方法，而且发现在治疗与不治疗者间其菌群结构存在差异。无麸质肽的饮食降低了硬壁菌门的量，增加了变形菌的量。尽管这样，无麸质肽的饮食无法让乳糜泻患者完全恢复正常菌群。在麸质肽诱导的小鼠疾病模型中，干酪乳杆菌可以有效地恢复粘膜结构和肠道相关淋巴组织的平衡。这表明，特异的微生物可能参与促进某些免疫反应，可能是潜在的治疗靶标。

8. 肠道菌群与肠道外自身免疫病

由于肠道菌群在免疫系统中发挥着重要的作用，所以肠道菌群与很多肠道疾病，如IBD和肠炎相关也并不奇怪。尽管这样，越来越多的证据表明，肠道菌群与肠道外的免疫疾病也有关系，如1型糖尿病、多发性硬化、风湿性关节炎和红斑狼疮等。尽管肠道菌群与这些疾病间的关系还处于研究的初步阶段，菌群改变对疾病的影响有多大也还不是很清楚，但有实验表明这种菌群变化可以通过改变免疫耐受与炎症反应间的平衡来影响自身免疫病的发生。

与2型糖尿病相比，1型糖尿病起病比较急剧，多发生在儿童和青少年，体内胰岛素绝对不足，而且容易发生酮症酸中毒。小鼠和大鼠1型糖尿病模型均表明1型糖尿病个体其菌群结构的多样性降低、乳酸菌含量减少及硬壁菌/拟杆菌比例降低。尽管菌群结构如何特异性改变从而引发1型糖尿病并不清楚，但可能存在以下几种机制：(1)一些微生物抗原能促进T细胞相关 β 细胞的损坏，这个过程在肠道屏障破坏的情况下更加严重，而且在临床和实验性1型糖尿病中均表现出肠道屏障破坏；(2)改变天然免疫信号传导可能在这个过程中起着重要的作用，因为缺少天然适配体蛋白MyD88的无菌NOD小鼠出现了明显的糖尿病症状，但无特定病原小鼠或用无特定病原菌群定殖的无菌小鼠不出现症状或症状较轻。这表明微生物抗原通过天然免疫系统参与1型糖尿病的发病过程；(3)尽管没有证据表明肠道菌群能控制症状明显的糖尿病，但是肠道菌群好

像对维持肠道组织、肠系膜和胰腺淋巴结中的Th17/Treg的平衡及胰岛炎的发生非常重要，从而影响1型糖尿病的发生。另外，也有研究指出，通过对肠道菌群的调控可以影响1型糖尿病的发生。如乳酸菌johnsonii N6.2通过调控肠道屏障功能和炎症反应保护BB大鼠不出现1型糖尿病；一种可以促进Th17细胞分化的特定细菌SFB可以保护NOD小鼠不出现1型糖尿病症状；复合益生菌VSL#3可以减轻NOD小鼠的胰岛素抗性和糖尿病的病症；母乳中由于含有很多复合多糖可能会促进益生菌的生长，所以母乳喂养可以保护婴儿抵抗1型糖尿病。

多发性硬化是一种中枢神经系统的脱髓鞘紊乱。这种疾病通常受到环境和遗传双因子的影响。遗传因子中，尽管全基因组相关分析表明一些非MHC位点的突变与多发性硬化的易感性相关，但MHC仍然是主要的影响因子。单卵孪生群体的发病率大约在30%左右，这说明环境因子在疾病发生过程中也起着非常重要的作用。在过去，微生物感染被认为是引起这种疾病的原因，但到目前为止还不知道与哪种特异的病原相关。

另外，最近有研究表明肠道细菌可能在自发性关节炎模型中具有促关节炎作用。这主要是因为HLA-B27转基因大鼠中经常出现严重的关节炎症状，而在无菌小鼠中却不发病。

9. 肠道菌群与神经行为类疾病

尽管肠道菌群与神经行为类疾病的研究还刚刚起步，但已有研究表明肠道菌群与孤闭症、应激、焦虑等神经行为类疾病相关。其作

用机制可能与肠道菌群通过神经或体液途径影响肠道神经系统和中枢神经系统有关。

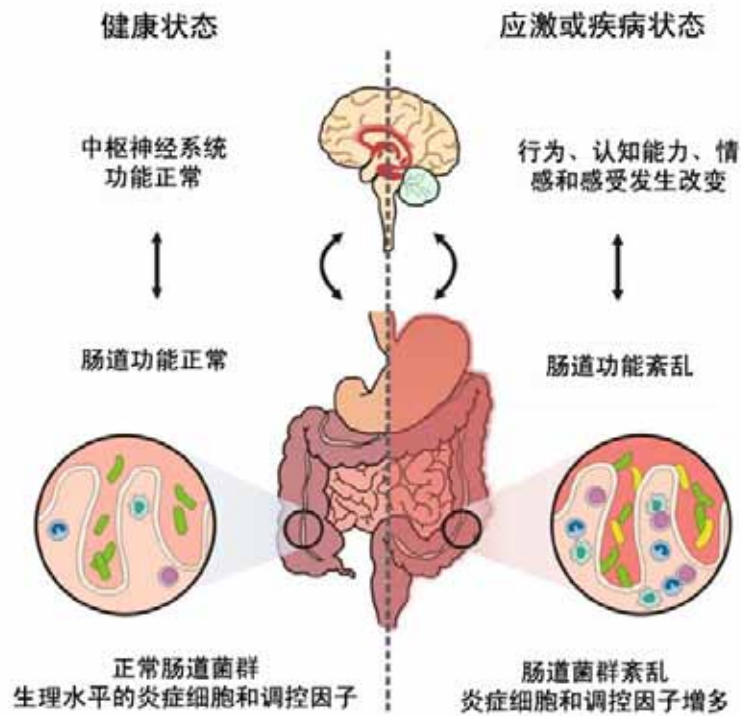


图20 脑-肠-微生物在健康和疾病状态下的交流。原图来自Grenham等的文章^[24]。

百态 · 频道

www.LifeOmics.com

四、以肠道菌群为靶标的防治策略

自从发现幽门螺杆菌能引起胃溃疡以来，人们开始意识到肠道菌群可能与其它胃肠道慢性疾病也有关。这也表明，如果对某些疾病的治疗只是集中在宿主病理和生理方面，而不去注意宿主与菌群间的相互作用，将很难达到预期的治疗效果。科学家和商人们也开始对以肠道菌群做为药物治疗靶标的防治策略非常感兴趣。

1. 肠道菌群的可塑性

以肠道菌群为靶标进行疾病防治的一个主要问题是人类肠道菌群是否具有可塑性，是否可以通过干预的方法改变肠道菌群从而达到防治疾病的目的。肠道菌群一旦建立以后，就会相当稳定。尽管这样，大量研究还是表明，外

部因子可以改变胃肠道中的菌群结构。除了出生地和年龄差异与肠道菌群结构差异相关外，很多后天性的因素，如饮食习惯、饮食组成、益生菌和抗菌素治疗等均能影响宿主肠道菌群的结构与组成（图21）。

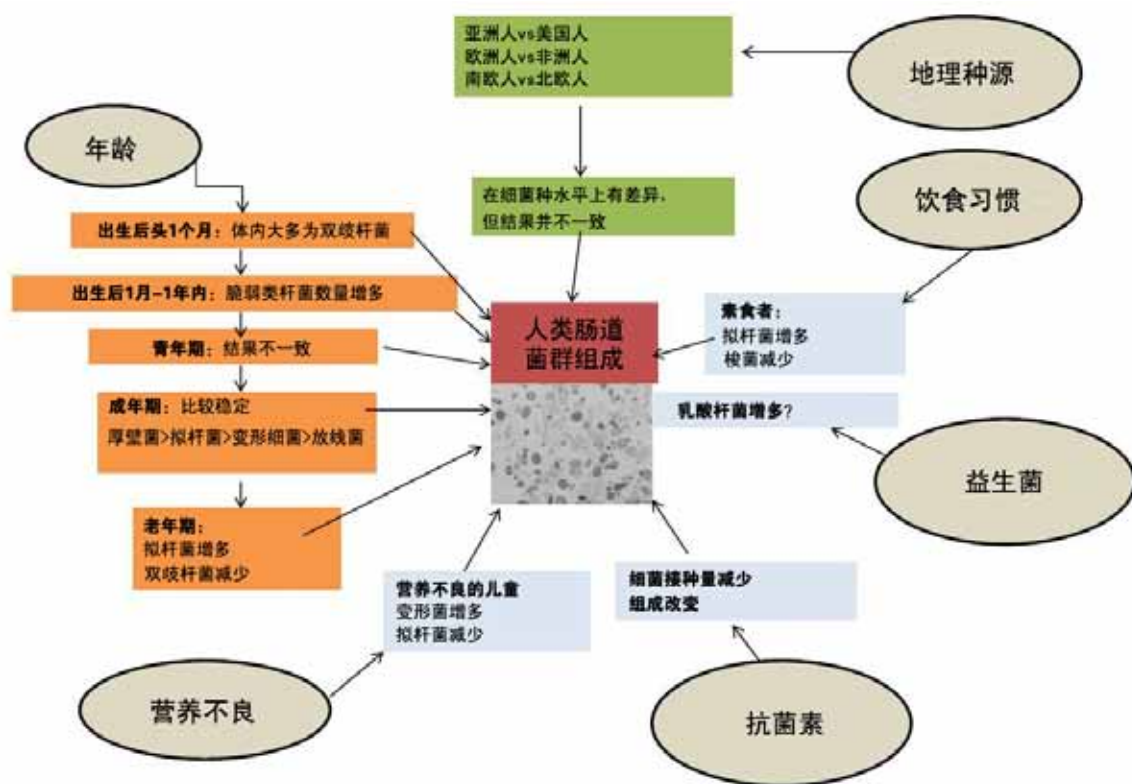


图21 影响肠道菌群结构与组成的因素。原图来自Lagier等的文章^[32]。

2. 合理饮食调控肠道菌群相关的疾病

饮食对肠道菌群的影响从起始定殖时就开始了：母乳哺乳婴儿双歧杆菌的含量较高，但奶粉喂养婴儿拟杆菌的含量较高，同时球形梭菌和乳酸菌的含量也会升高。尽管在断奶后，肠道菌群被认为维持一个比较稳定的状态，但不同的饮食成分仍具有改变已经稳定菌群结构的能力。有研究表明肠道菌群组成与饮食间有很强关系，总体来说，饮食改变可以解释肠道总体菌群结构变化的57%，而遗传因子所占比例小于12%。这表明饮食是改变肠道菌群的主要因素，一些重要菌群的改变可

能使健康菌群变成疾病相关菌群。如西方饮食是一种高糖高脂肪饮食，可以引起宿主胃肠道代谢和免疫紊乱。这项研究在人源化的小鼠模型中进行了研究，将成人粪便菌群接种到无菌小鼠，然后将小鼠的低脂肪高植物多糖饮食换成西方饮食后，硬壁菌门的细菌含量增高，包括无害梭菌、*Eubacterium dolichum*、*Catenibacterium mitsuokai*和肠球菌，而一些拟杆菌种的含量明显降低。表10列出了不同饮食成分对肠道菌群结构的调控情况。

表 10 不同饮食对肠道菌群的影响^[33]

饮食类型	菌群的变化
高脂肪	双歧杆菌减少或消失
高脂肪和高糖	无害芽胞梭菌、 <i>Catenibacterium mitsuokai</i> 、肠球菌增多，拟杆菌减少
低碳水化合物	拟杆菌增多
能量限制	球形梭菌、乳酸杆菌和双歧杆菌减少或抑制生长
复杂碳水化合物	长双歧杆菌、短双歧杆菌和多形拟杆菌增多，鸟分枝杆菌亚种副结核分枝杆菌和肠杆菌减少
精制糖	艰难梭菌和产气荚膜梭菌增多
素食	大肠杆菌减少
来源于红花油的高 <i>n-6</i> 系列多不饱和脂肪酸	硬壁菌、放线菌和变形菌增多，拟杆菌减少
动物脂肪	δ -变形菌增多

大家已经意识到有些食物能引起某些疾病的发生，而另一些食物却具有防病的作用，所以在我们思考饮食因素的同时，也有必要思考与我们一起消化食物的肠道菌群。肠道菌群可能在饮食相关的疾病中发挥着重要的作用，有些饮食，如牛奶、果汁、鸡蛋和软饮料可以促进1型糖尿病患者的 β 细胞损坏；而

很多其它饮食，如低蛋白、高脂肪和omega-6:omega-3比例低的多不饱和脂肪酸在啮齿目动物模型中能阻遏1型糖尿病的发生。而且有报道表明IBS症状的出现有52%的可能与饮食成分有关，碳水化合物丰富的食物、咖啡、酒及辛辣调料都有可能是诱发IBS症状的病原。最近，大家对通过饮食调控来进行疾病防治非

常感兴趣，表11列出了一些可能具有防癌作用的饮食成分，其防癌机制主要是通过肠道菌群将这些饮食成分代谢成具有生物学活性的物质。另外通过改变饮食也可以调控肠道菌群从而影响人的认知能力。如将50%的瘦牛肉加入小鼠的正常饲料中，其粪便菌群出现了明显

的改变。而且这种伴随着饮食改变而出现肠道菌群的变化也改善了其认知参数，焦虑样行为也减轻。因此改变它们之间的相互交流不仅可以影响胃肠道功能，也可以影响精神状况，如情绪紊乱。所以根据自身需要合理饮食对防治疾病非常重要。

表 11 具有防癌特性的饮食成分^[34]

饮食成分	食品来源	细菌代谢产物
纤维物质	谷物类	丁酸盐
亚油酸	植物油	共轭亚油酸
黄豆苷元	大豆	雌马酚
开环异落叶松脂素	亚麻子、芝麻	肠内酯、肠二醇
异黄酮醇	啤酒花和其衍生物，如啤酒	8- 异戊二烯基三羟黄烷酮
鞣花酸	草莓、树莓、核桃和石榴	尿石酸 A 和 B

3. 合理使用抗菌素

上个世纪我们发现了抗菌素可以用来防治感染性疾病，但对滥用抗生素的危害却一直认识不够，除了引起细菌耐药性外，直到最近我们才慢慢开始意识到抗菌素对定殖在我们胃肠道内的共生微生物也有杀伤作用。广谱抗菌素的反复使用可以严重影响人肠道菌群的结构与组成（表12），而且这种影响可能会持续很长时间。不同个体对抗菌素的反应不一样，有的在使用抗菌素治疗一周后，肠道菌群开始恢复治疗前的结构，但有些菌群已经无法再恢复定殖。实际上有些个体在接受抗菌素治疗后，抗菌素对肠道菌群的影响一直持续到治疗后4年。也有报道表明抗菌素的使用与肠道代谢图谱的改变有关。尽管这种改变所导致的后果并不总是很明显，但很清楚，抗菌素治疗可以让

宿主对感染更敏感。正常菌群受到破坏后，其它有害菌就会在此繁殖，从而形成"二次感染"，这往往会导致抗生素无效和死亡率升高。艰难梭菌就是一个很好的例子，它就是在抗菌素治疗后由于肠道菌群多样性降低而引起的一种严重腹泻性疾病，严重时可危及生命。

当然我们也可以选择性地使用抗菌素来防治与肠道菌群相关的疾病，如有报道表明使用抗菌素可以改变肠道菌群，从而阻遏饮食诱导的肥胖和降低遗传性肥胖小鼠的增重。另外，抗菌素治疗可以改善葡萄糖耐受。但这方面的尝试还处于初级阶段，开发出能特异抑制某些与疾病相关细菌或菌群的窄谱抗菌素还有待进一步研究。

表 12 抗菌素对肠道菌群的调控^[32]

抗菌素名称	受影响菌群	检测方法
青霉素类 (PENICILLINS)		
氨苄青霉素钠 (Ampicillin)	减少肠球菌 (<i>Enterococci</i>)、链球菌 (<i>Streptococci</i>) 和大肠杆菌 (<i>E.coli</i>)；轻度减少厌氧革兰氏阳性菌	细菌培养
阿莫西林 (Amoxicillin)	增加需氧革兰氏杆菌，如肠细菌；增加厌氧革兰氏阳性杆菌；增加拟杆菌；增加链球菌 (<i>Streptococci</i>) 和葡萄球菌 (<i>Staphylococci</i>)；减少革兰氏球菌，如真菌菌	细菌培养
阿莫西林 - 克拉维酸 (Amoxicillin/clavulanic acid)	增加肠球菌和大肠杆菌；减少乳酸菌 (<i>Lactobacilli</i>)、梭菌 (<i>Clostridia</i>) 和双歧杆菌 (<i>Bifidobacteria</i>)	细菌培养
	使梭菌 14a 簇 (<i>Clostridium</i> cluster XIVa) 消失；减少 <i>Faecalibacterium</i> spp.	克隆测序
氧哌嗪青霉素 - 他唑巴坦 (Piperacillin/tazobactam)	减少肠细菌 (<i>Enterobacteria</i>)、双歧杆菌、真菌菌、乳酸菌和厌氧革兰氏球菌，如梭菌	细菌培养
头孢菌素类 (CEPHALOSPORINS)		
头孢吡肟 (Cefepime)	减少大肠杆菌和双歧杆菌；增加梭菌和拟杆菌	细菌培养
头孢曲松 (Ceftriaxone)	减少厌氧菌总量；急剧减少梭菌、乳酸菌和双歧杆菌；急剧减少革兰氏阴性杆菌，如肠细菌；增加肠球菌	细菌培养
碳青霉烯类 (Carbapenems)		
美罗培南 (Meropenem)	减少肠细菌和链球菌；增加肠球菌；减少梭菌、革兰氏阴性球菌和拟杆菌	细菌培养
氟喹诺酮类 (FLUOROQUINOLONES)		
环丙沙星 (Ciprofloxacin)	急剧减少肠细菌；减少需氧革兰氏阳性球菌、链球菌和肠球菌；减少厌氧细菌；	细菌培养
	抑制腐败拟杆菌 (<i>Bacteroides putredinis</i>) 和扭链瘤胃球菌 (<i>Ruminococcus torques</i>)	DGGE
诺氟沙星 (Norfloxacin)	急剧减少肠细菌；减少需氧革兰氏阳性球菌、链球菌和肠球菌	细菌培养
氧氟沙星 (Ofloxacin)	急剧减少肠细菌；减少需氧革兰氏阳性球菌、链球菌、乳酸菌、双歧杆菌、真菌菌；减少厌氧细菌；减少韦荣氏球菌属 (<i>Veillonella</i>) 和拟杆菌属细菌	细菌培养
左氧氟沙星 (Levofloxacin)，加替沙星 (Gatifloxacin)，曲氟沙星 (Trovafoxacin)，莫西沙星 (Moxifloxacin)	急剧减少肠细菌；急剧减少需氧革兰氏阳性球菌；减少梭菌和梭杆菌属细菌	细菌培养

(接下表)

(续上表)

甘油多肽 (GLYCOPEPTIDS)		
口服万古霉素 (Oral vancomycin)	减少肠球菌、葡萄球菌；增加乳酸菌；强烈抑制或消除拟杆菌；减少梭菌和双歧杆菌	细菌培养
口服替考拉宁 (Oral teicoplanin)	增加革兰氏阴性需要杆菌和需氧菌总量；增加乳酸菌和兼性厌氧菌种 (Pediococci)	细菌培养
利奈唑胺 (LINEZOLID)	减少肠球菌、双歧杆菌、乳酸菌、梭菌和拟杆菌；增加克雷伯氏杆菌 (<i>Klebsiella</i>)	细菌培养
四环素类 (TETRACYCLINES)		
多西环素 (Doxycycline)	减少双歧杆菌	细菌培养
替加环素 (Tigecycline)	减少肠球菌、大肠杆菌；明显减少乳酸菌和双歧杆菌；增加其它肠细菌，如克雷伯氏杆菌和肠杆菌；增加酵母菌	细菌培养
大环内酯类 (MACROLIDES)、林可霉素类 (LINCOSAMIDES) 和链阳霉素类 (SYNERGISTINS)		
红霉素 (Erythromycin)	急剧减少链球菌和肠细菌；减少梭菌、乳酸菌、双歧杆菌和拟杆菌	细菌培养
克拉霉素 (Clarithromycin)	减少肠细菌、大肠杆菌和链球菌；急剧减少梭菌和拟杆菌；减少乳酸菌和双歧杆菌	细菌培养
泰利霉素 (Telithromycin)	减少大肠杆菌，但增加其它肠细菌；减少乳酸菌和双歧杆菌	细菌培养
克林霉素 (Clindamycin)	增加肠细菌	T-RFLPT-RFLP
	减少厌氧菌总量、减少乳酸菌、拟杆菌、梭菌；消除双歧杆菌	细菌培养
	急剧减少双歧杆菌属、梭菌属和拟杆菌属细菌	T-RFLP
	抑制普通类杆菌 (<i>B. vulgatus</i>)、 <i>B. acidofasciens</i> 、普拉氏梭杆菌 (<i>F. prausnitzii</i>)、吡啶梭菌 (<i>C. indolis</i>) 和柔嫩梭菌 (<i>C. leptum</i>)	DGGE
链阳菌素 (Streptogramins)：奎奴普汀-达福普汀 (Quinupristin/dalfopristin)	减少厌氧革兰氏阴性菌；增加肠球菌和肠细菌	细菌培养
其他		
复方新诺明 (Cotrimoxazole)	抑制肠杆菌科细菌 (<i>Enterobacteriaceae</i>)	细菌培养
呋喃妥因 (Nitrofurantoin)	对肠道菌群无影响	细菌培养

4. 新型益生菌的研发与应用

益生菌已为大家所熟知，也因为具有各种可能的保健功能（图22）而在临床中被广泛应用。益生菌在很多临床疾病的防治中也起着一定的作用，但大部分已有的益生菌也都会受到各种质疑，如益生菌能否在指定的肠道部位定殖，益生菌的效果是否具有可重复性和广泛应用性，益生菌是否对已经发生疾病的患者具有治疗作用等。由于大部分益生菌最终需要经过肠道来发挥其益生作用，难免与复杂的肠道菌群存在着千丝万缕的联系。由于过去对肠道菌群的多样性及功能了解不够，所以大部分益生菌都是一种通用的具有益生作用的细菌，而现在随着科学技术的发展，科学家对肠道菌群与疾病间的关系已经了解得越来越多，所以开发出具有针对性的能纠正这种菌群紊乱，从而恢复宿主健康的新型益生菌将更具吸引力，可能效果也会更加明显。如华大基因的王俊实

实验室采用宏基因组关联分析（Metagenome-Wide Association Study, MGWAS）方法对345个中国人的肠道微生物进行了两个阶段的宏基因组关联分析，找出了中国人群中的糖尿病患者与非糖尿病患者在肠道微生物组成上差异。他们发现在2型糖尿病患者肠道中丢失了一些有益菌，如丁酸产生菌，而一些有害菌却有所增多。所以他们尝试使用这种在糖尿病患者中缺少的菌做为益生菌来进行糖尿病的防治，据说能起到较好的防治效果，但还有待进一步证实。另外，肠道菌群与肥胖间的研究已经取得了较大的进展，很多实验室也都在有针对性地采用阻断肠道菌群引起肥胖相关的信号通路来防治肥胖。如表13所示，在动物实验中已经发现有些益生菌可能对防治肥胖有一定的效果，但离真正的临床应用可能还很长的一段路要走。

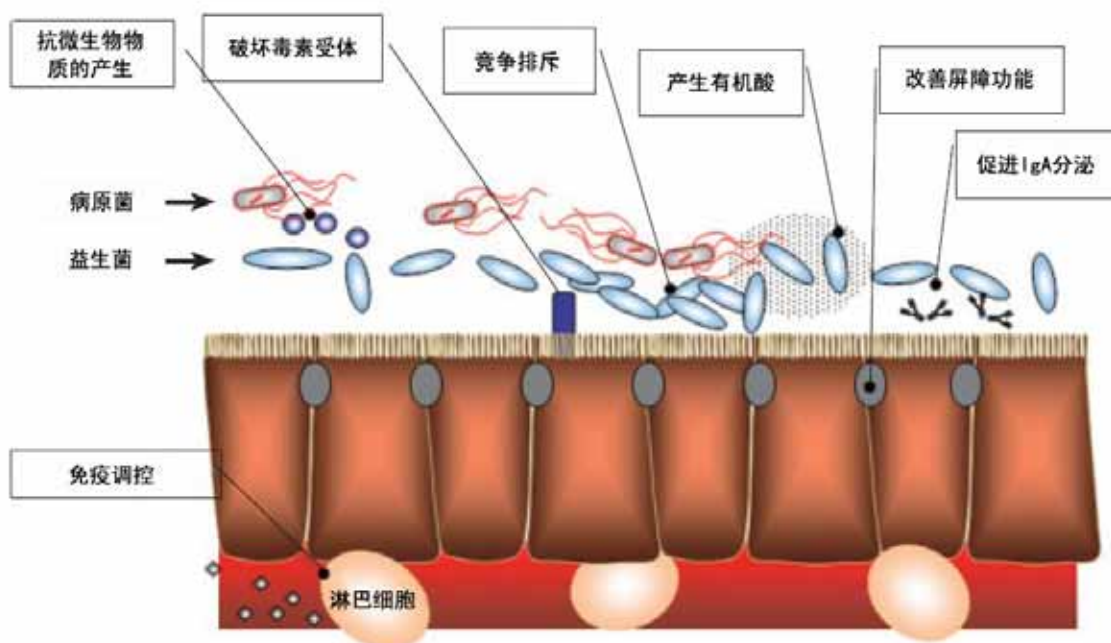


图22 益生菌的可能作用机制。原图来自Ewaschuk和Dieleman的文章^[35]。

表 13 益生菌抗肥胖动物实验结果^[36]

动物品种	益生菌	给药模式	效果
C57/BL6J 小鼠	鼠李糖乳杆菌 PL60	PBS	增重降低，脂肪量降低，饮食摄入量无影响
C57/BL6J 小鼠	植物乳杆菌 PL62	PBS	增重降低，脂肪量降低，饮食摄入量无影响
SD 大鼠	加氏乳杆菌 SBT2055	发酵的奶粉（饮食的 20%）	脂肪细胞变小，增重和脂肪量无变化
Zucker 大鼠	加氏乳杆菌 SBT2055	发酵的奶粉（饮食的 20%）	脂肪量和脂肪细胞在消瘦小鼠变少，增重和饮食摄入无变化
C57/BL6J 小鼠	植物乳杆菌 14	PBS	脂肪量降低，脂肪细胞变小，增重无变化
SD 大鼠	加氏乳杆菌 BNR 17	PBS	增重降低，脂肪量降低，饮食摄入量无影响
db/db 小鼠	加氏乳杆菌 BNR 17	PBS	增生降低，饮食摄入减少
SD 大鼠	乳杆菌	发酵的小麦和大麦粉（饮食的 20%）	增重降低，脂肪量减少，饮食摄入减少
SD 大鼠	VSL#3（乳酸菌、双歧杆菌和嗜热唾液链球菌）	水	脂肪量减少，增重和饮食无变化
Wistar 大鼠	副干酪乳杆菌 ST11（NCC2461）	水	增重降低，脂肪量减少，饮食摄入减少
SD 大鼠	假链状双歧杆菌 SPM 1204、长双歧杆菌 SPM 1205 和长双歧杆菌 SPM 1207	PBS	增重降低，脂肪量减少，饮食摄入减少
Wistar 大鼠	长双歧杆菌 88	生理盐水	增重降低，脂肪量减少，葡萄糖水平降低，肠道 <i>RegI</i> 降低
C57/BL6J 小鼠	干酪乳杆菌 Shirota	0.05%（W/W）与饮食混合	葡萄糖水平降低，脂肪量无变化
SD 大鼠	植物乳杆菌 DSM 15313	水	增重降低，脂肪量减少，瘦素水平降低

5. 粪便移植

由于益生菌的效果不是很稳定，而且单一益生菌的效果不如复合益生菌，一种选择性的

替代方法——粪便移植慢慢开始被人们重视。虽然粪便移植听起来让人觉得不舒服，但目前

患者对这种治疗方法的接受程度正在逐步提高。其实早在1958年，Eiseman等人就开始使用粪便移植方法来治疗暴发性假膜小肠结肠炎。最近几十年，粪便移植已经开始应用于艰难梭菌、肠道炎性疾病（IBD）、肠道应激综合症（IBS）和慢性便秘等的防治。加拿大、美国、澳大利亚和北欧等国家的科研医务人员对粪便移植的研究开展得比较多，到目前为止已有数百名艰难梭菌患者接受了粪便移植的治疗。Gough等人对2011年前的27篇相关报道中的317名患者在接受粪便移植治疗后的效果进行了分析，结果表明，其平均治愈率高达92%，而且没有发现死亡或明显的副作用（表14）。尽管粪便移植具有较好的临床

效果，有些学者也提出了粪便移植防治艰难梭菌的标准操作流程，但也还有一些问题有待解决。如供体的选择，选择的供者是亲戚好还是生活在一起的人好，或者收集其自身在进行抗菌素治疗前的菌群？同一个供体的菌群是不是对每个受体都有较好的防治效果？如何进行粪便移植才能让患者接受？由于粪便菌群是一个复杂的群体，而且很多是未培养菌，这种组成不明的产品能不能通过药监局的审批？可喜的消息是，最近加拿大开发出了一种粪便菌群产品RePOOPulate，这可能更容易被患者接受，而且美国食品药品监督管理局（FDA）也正在采取措施推动这类产品的审批与应用。

表 14 粪便移植对艰难梭菌防治效果总结^[37]

不同处理方法		研究次数	治愈率(%) (预后数 / 总人数)	复发率(%) (预后数 / 总人数)	死亡率(%) (粪便移植导致)	死亡率(%) (其它原因导致)
合计		28	89.0 (284/317)	3.9(11/284)	1.3(4/317)	4.1(13/317)
处理人数	1 人	12	87.5 (147/168)	4.8(7/147)	1.8(3/168)	4.8(8/168)
	≤ 3 人	5	95.7 (67/70)	4.5(3/67)	0.0(0/70)	0.0(0/70)
	> 3 人	5	90.0 (36/40)	2.8(1/36)	2.5(1/40)	12.5(5/40)
	未报道	6	87.2 (34/39)	0.0(0/34)	0.0(0/39)	0.0(0/39)
灌入方法	结肠镜	9	88.7 (55/62)	5.4(3/55)	0.0(0/62)	0.0(0/62)
	灌肠剂	11	95.4 (105/110)	4.8(5/105)	0.9(1/110)	4.5(5/110)
	胃镜管	4	76.4 (55/72)	3.6(2/55)	4.2(3/72)	9.7(7/72)
	直肠导管	2	95.6 (44/46)	0.0(0/44)	0.0(0/46)	2.2(1/46)
	> 1 种方法	2	90.5 (19/21)	5.3(1/19)	0.0(0/21)	0.0(0/21)
	未报道	1	100.0 (6/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)	0.0(0/6)
捐助者与患者的关系	有亲属关系	19	93.3 (195/209)	3.6(7/195)	0.0(0/209)	1.4(3/209)
	无亲属关系	4	84.0 (21/25)	0.0(0/21)	0.0(0/25)	4.0(1/25)
	混合	3	79.2 (57/72)	7.0(4/57)	5.6(4/72)	12.5(9/72)
	未报道	3	100.0 (11/11)	0.0(0/11)	0.0(0/11)	0.0(0/11)

(接下表)

(续上表)

粪样稀释	生理盐水	20	86.2 (169/196)	3.0(5/169)	2.0(4/196)	5.6(11/196)
	水	1	98.5 (64/65)	7.8(5/64)	0.0(0/65)	1.5(1/65)
	其他	3	88.6 (31/35)	3.2(1/31)	0.0(0/35)	2.9(1/35)
	未报道	4	95.2 (20/21)	0.0(0/20)	0.0(0/21)	0.0(0/21)
预处理	万古霉素或甲硝唑	6	91.5 (150/164)	3.3(5/150)	1.8(3/164)	3.7(6/164)
	抗菌素与洗肠	2	94.3(33/35)	12.1(4/33)	0.0(0/35)	0.0(0/35)
	其他	8	86.0(43/50)	4.6(2/43)	0.0(0/50)	6.0(3/50)
	未报道	12	85.3(58/68)	0.0(0/58)	1.5(1/68)	5.9%(4/68)
灌入体积 (mL)	< 200	5	80.0(32/40)	6.2(2/32)	0.0(0/40)	7.5(3/40)
	200-500	13	86.0(98/114)	4.1(4/98)	2.6(3/114)	4.4(5/114)
	> 500	2	97.3(107/110)	4.7(5/107)	0.0(0/110)	0.9(1/110)
	未报道	8	88.7(47/53)	0.0(0/47)	1.9(1/53)	7.5(4/53)
粪样重量 (g)	< 50	9	82.8(53/64)	3.8%(2/53)	0.0(0/64)	3.1(2/64)
	≥ 50	7	86.2(100/116)	1.0(1/100)	2.6(3/116)	5.2(6/116)
	未报道	12	95.6(131/137)	6.1(8/131)	0.7(1/137)	3.6(5/137)

6. 肠道菌群与定点给药

肠道菌群的这种强大的代谢潜能也可以用于特异性的局部给药。整个胃肠道细菌无处不在,但不同解剖部位细菌的组成和数量存在差异。胃和小肠前部菌群密度较低,而结肠中细菌密度最高,且可以影响肠道环境和药物剂型行为。这种消化道上段和下段间细菌浓度的差异可以用来开发在结肠中特异性起始释放的药物。菌群诱导的药物靶向输送可以通过以下两个途径完成:(1)特异的微生物酶可以将药物成分中没有活性的衍生前体转化为有活性的分子,从而使具有生物活性的药物成分的浓度很快在结肠中升高。如药物前体水杨酸偶氮磺胺吡啶,依赖于结肠细菌将一种没有药物活性的前体降解后再释放出药物活性元件。(2)用

可生物降解的多聚物对药物外壳进行包裹。在这种情况下,多聚物对上消化道的消化具有抗性。在结肠中,微生物将多聚物降解,药物快速释放,然后被结肠上皮吸收。开发出高度药物特异性和更通用与实用的系统还是有必要的,多糖被认为是一种理想的材料。一种选择性多糖可以避免在小肠中被降解,但可以被结肠细菌作为底物。利用多糖进行结肠药物配送的多糖包括胶质、瓜胶、几丁聚糖和直链淀粉。直链淀粉与乙基纤维素混合喷洒在药丸或药片外壳上后,体外和体内实验均表明具有高度结肠环境释放特异性。如用这种系统包裹的氢化泼尼松琥珀酸钠已处于局部治疗溃疡性结肠炎临床实验的后期阶段。利用微生物的这些

特性进行结肠特异性给药已经在局部和系统药物治疗中取了较好的成果。也有研究表明，这

种以细菌为靶标的结肠给药方法比以PH反应为靶标的给药方法更好。

7. 肠道微生物组中新功能基因的挖掘

人体肠道菌群可能编码了300多万个基因，这是人类基因组编码基因数的150多倍。目前，从肠道菌群中挖掘新的活性物质，包括新药、功能食品成分和期望的代谢功能基因已经成为药物生物学关注的一个兴趣点。能挖掘到新的抗菌物质的理论依据是肠道不同部位其细菌种类和数量存在差异，而这种差异不仅受到宿主方面的影响，而且也受到细菌间相互竞争的影响，它们通过释放抗菌肽，如细菌素和防御素而抑制或杀灭竞争菌。细菌素是由核糖体合成的抗微生物肽，通常其抗菌谱比较窄，而且产生菌自身具有抗这种肽的抗性。细菌素已经在发酵食品的生产和食品保存方面有成功的应用。另外，一种细菌素产生菌——唾液链球菌已经用来防治口臭。一种由乳酸乳球菌

DPC3147产生的广谱细菌素在体外有抗艰难梭菌的活性，而且效果与目前商用的抗菌素效果相当。开发这种对艰难梭菌相对特异的窄谱细菌素对防治新出现的高毒力艰难梭菌非常有吸引力，因为这些艰难梭菌菌株对已有抗菌素的抗性越来越强。

另外，已经有很多科学家对肠道菌群相关疾病致病机制进行了研究，如已有研究报道瘦素、Gpr41和饥饿诱导脂肪因子(*fiaf*)等与肠道菌群诱导的肥胖相关。我们也可以以这些基因为靶标，从正常菌群中寻找能阻断这些致病信号通路的竞争物。尽管到目前为止，以瘦素为靶标开发出来的药物均效果不佳，但Samuel等人报道Gpr41可能是一种非常具有吸引力的抗肥胖药物靶标。

8. 肠道微生物组与个性化医药

研究这些复杂的相互作用的最终目的是设计出个性化的治疗方案，使药效达到最高，而毒副作用降到最低。以下是可能的开发肠道药物微生物组和转化成个性化医药的四个步骤。第一步是挖掘现有的药物与微生物组相互作用的信息，建立一些类似于用于药物遗传学、药物基因组学和药物间相互作用的数据库。在建立数据库的同时开发一些用来发现和挖掘这些数据库的工具和资源，并且使这些数据库能与微生物基因组数据库间数据共享。第二步是发展和执行新药-微生物组相互作用的高通量筛选。在挖掘已有知识的同时，也还有必要继续研究药物-微生物组相互作用的未知空间。可以高通量筛选药物对不同个体肠道微生物组的菌群影响情况，同时也可以反过来高通量研究

定植在不同个体中单一微生物对不同药物或化学物质的反应情况。第三步是开发出模拟药物反应的软件和模型。已有数据表明，定植在宿主中的微生物菌群和病毒可以影响宿主的药物反应，所以需要构建一个考虑了所有这些参数的软件来提供合理的假设和准确的研究结果预测。开发这样一个软件和模型需要将所有文献中与病毒组、微生物组和共代谢相关的数据整合进来，然后利用这些整合的数据进行结果预测。例如，Hlavaty等人使用相似的方法构建了一个英夫利昔单抗治疗克罗恩氏病的凋亡药物遗传学预测模型。在进行数据挖掘后，他们使用软件SASW预测所有遗传变异与英夫利昔单抗引起的凋亡间的相关性。第四步是数据整合与临床转化。已有的网络资源、产生的大量

数据和构建的各种药物-微生物组相互作用模型将为转化为临床诊断和测试提供机遇。在将来进行临床实践时都应该把微生物组数据考虑在内，并且利用这些数据来产生一个良好的治疗效果，同时在这些数据基础上确定给病人的药物类型、剂量及保养方法。鉴于此，每个病

例都应该有个性化的治疗方案。例如，如果病人肠道菌群能产生降解药物相关的酶就应该给予更高的剂量，而如果病人对对乙氨基酚毒性很易感，就应该给予低剂量或非类固醇类药物。

目前可用于开发肠道药物微生物组的网络资源^[14]

人类病毒组资源：

HVP (Human Variome Project): <http://www.humanvariomeproject.org>

HapMap: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

人类微生物组资源：

MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract): <http://www.metahit.eu>

HM P: <http://hmpdacc.org>

浏览人类微生物组的工具和数据库

IMG/HMP: http://www.hmpdacc-resources.org/cgi-bin/imgm_hmp/main.cgi

myMGDB: <http://edwards.sdsu.edu/cgi-bin/mymgdb/show.cgi>

MG-R AST: <http://metagenomics.anl.gov>

The SEED Servers: <http://www.theseed.org/servers>

药物基因组学/药物微生物组学数据库：

PharmGKB (Pharmacogenomics Knowledge Base): <http://www.pharmgkb.org>

PacDB (Pharmacogenetics and Cell Database): <http://www.pacdb.org>

CTDB (Comparative Toxigenomics Database): <http://ctdbase.org>

The PharmacoMicrobiomics Portal: <http://www.pharmacomicrobiomics.org>

酶/代谢通路数据库：

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): <http://www.genome.jp/kegg/>

Model SEED: <http://seed-viewer.theseed.org/seedviewer.cgi?page=ModelView>

BRENDA (BRaunschweig ENzyme Database): <http://www.brenda-enzymes.org>

五、展望

随着人类微生物组研究的重点从了解肠道菌群结构向研究肠道菌群功能的转变，人类-微生物及微生物-微生物间相互作用的分子机制开始慢慢取得进展。科学家们正在研究如何利用遗传学方法对人肠道微生物菌群进行改造，从而使其中的一些细菌能获得期望的功能而达到防治疾病和改善健康的目的。例如，想象一下每天摄入的益生菌片中含有4种细菌：第一种细菌能合成各种维生素和分泌一种能降低胆固醇的药物；第二种细菌能中和致癌自由基与消耗饮食中的胆固醇和脂肪；第三种细菌能调控免疫系统抵御感染和防止自身免疫病的发生；第四种细菌能产生一些抑制食欲、抗抑郁和使人聪明的代谢物。目前参与微生物组研究的主要是一些微生物学家和免疫学家。随着

合成生物学和系统生物学方法在这个领域的应用，微生物组遗传学工程改造将渐渐创造一个新的平台，从而可以使用微生物细胞来调控人体生物学。另外，除了直接作用于宿主的微生物组遗传学工程改造外，通过优化微生物组的功能从而间接影响宿主也是可能的。在肠道中分解胆固醇、在皮肤表面产生能吸收紫外光的分子、在泌尿生殖道或呼吸道产生抗菌物质貌似都是可行的。但还有两个关键问题有待解决：第一，要有办法让一种新的细菌能在已经稳定的菌群中定殖或以一种适应性很好的细菌为模板来进行遗传改造。毫无疑问，合成生态学将会在近年成为研究的热点。第二，如何和何时才能让这些监管机构与公众接受使用这种改造过的微生物来进行疾病防治。



参考文献

1. Jeffery IB, O'Toole PW. (2013) Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients*, 5 (1):234-52.
2. Duncan SH, Flint HJ. (2013) Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 75 (1):44-50.
3. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. (2012) The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*, 2:104.
4. Hakansson A, Molin G. (2011) Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*, 3(6):637-82.
5. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD et al. (2008) Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*, 83(4):460-9.
6. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. (2012) The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res*, 160(4):246-57.
7. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M et al. (2013) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*, 62(1):146-58.
8. Lagier JC, Armougom F, Million M et al. (2012) Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*, 18(12):1185-93.
9. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402):207-14.
10. Hamer HM, De Preter V, Windey K, Verbeke K. (2012) Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302(1):G1-9.
11. Stecher B, Hardt WD. (2008) The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*, 16(3):107-14.
12. Davila AM, Blachier F, Gotteland M et al. (2013) Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res*, 68(1):95-107.

13. Haider HJ, Turnbaugh PJ. (2013) Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacol Res*, 69(1):21-31.
14. Saad R, Rizkallah MR, Aziz RK. (2012) Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathog*, 4(1):16.
15. Round JL, Mazmanian SK. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(5):313-23.
16. Bischoff SC. (2011) 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC Med*, 9:24.
17. Goto Y, Kiyono H. (2012) Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev*, 245(1):147-63.
18. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086):1268-73.
19. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J et al. (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086):1262-7.
20. Diamond B, Huerta PT, Tracey K, Volpe BT. (2011) It takes guts to grow a brain: Increasing evidence of the important role of the intestinal microflora in neuro- and immune-modulatory functions during development and adulthood. *Bioessays*, 33(8):588-91.
21. Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. (2011) Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med*, 3(3):14.
22. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6):1258-70.
23. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. (2012) The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*, 7(1):91-109.
24. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. (2011) Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol*, 2:94.
25. van Hylckama Vlieg JE, Veiga P, Zhang C et al. (2011) Impact of microbial transformation of food on health - from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Curr Opin Biotechnol*, 22(2):211-9.
26. Machado MV, Cortez-Pinto H. (2012) Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 11(4):440-9.
27. Fava F, Danese S. (2011) Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol*, 17(5):557-66.
28. Collins SM, Bercik P. (2009) The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 136(6):2003-14.
29. Kipanyula MJ, Seke Etet PF, Vecchio L et al. (2013) Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. *Cell Signal*, 25(2):403-16.
30. Britton RA, Young VB. (2012) Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends Microbiol*, 20(7):313-9.
31. Alisi A, Ceccarelli S, Panera N, Nobili V. (2012) Causative role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:132.
32. Lagier JC, Million M, Hugon P et al. (2012) Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:136.
33. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. (2012) Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, 4(8):1095-119.
34. Davis CD, Milner JA. (2009) Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem*, 20(10):743-52.
35. Ewaschuk JB, Dieleman LA. (2006) Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 12(37):5941-50.
36. Arora T, Singh S, Sharma RK. (2013) Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*, 29(4):591-6.
37. Gough E, Shaikh H, Manges AR. (2011) Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 53(10):994-1002.

致谢:

由于篇幅有限, 还有很多参考文献并没有一一列出, 在此一并表示感谢。同时感谢国家自然科学基金(NO. 31100097)和“十二五”农村领域国家科技计划(NO. 2013BAD10B02-03)对本人从事肠道微生物相关研究的资助。

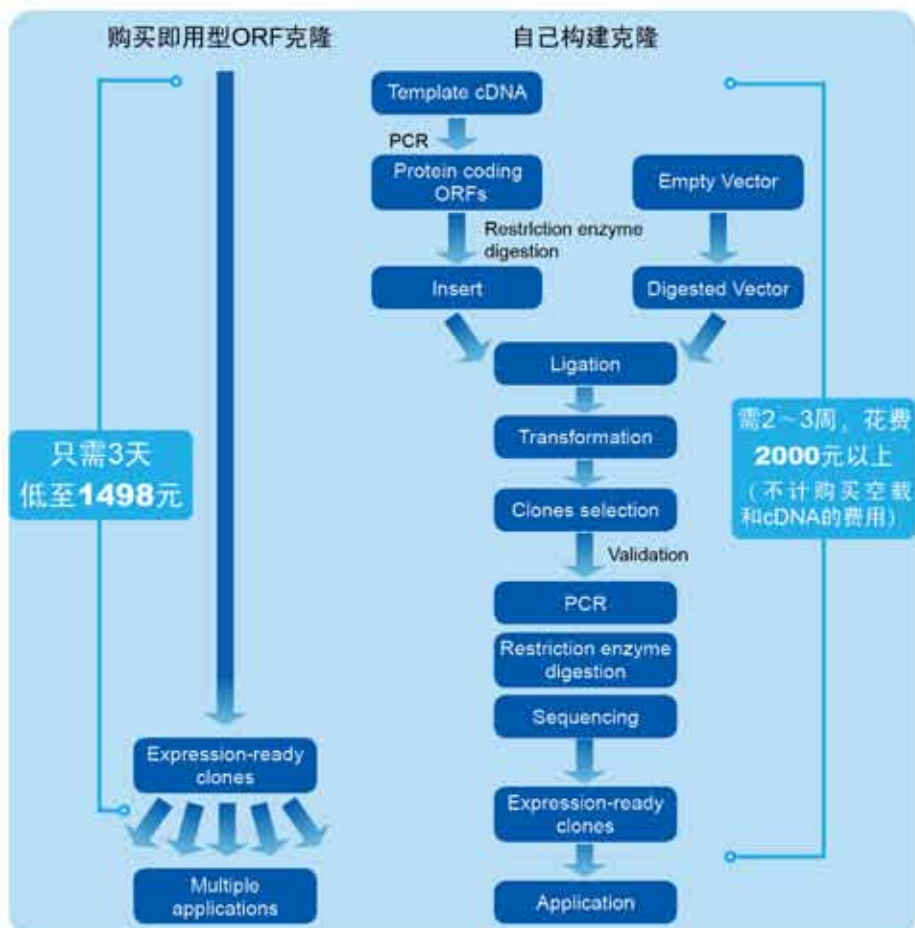
克隆青春

致我们终将发表的论文

美国GeneCopoeia（广州复能基因）是NCBI推荐的克隆供应商。公司致力于为客户提供高性价比的克隆产品与服务。

即用型ORF克隆 20,000个人类基因可选 保证序列无误，3个工作日内送货

将目的基因的ORF（开放阅读框）装载在带有不同蛋白标签或无标签的表达载体中，可直接用于不同宿主或表达系统的蛋白质表达和功能研究。我们也提供ORFEXPRESS™
*Gateway® PLUS穿梭克隆，该克隆与Invitrogen公司的 Gateway®克隆技术的兼容。

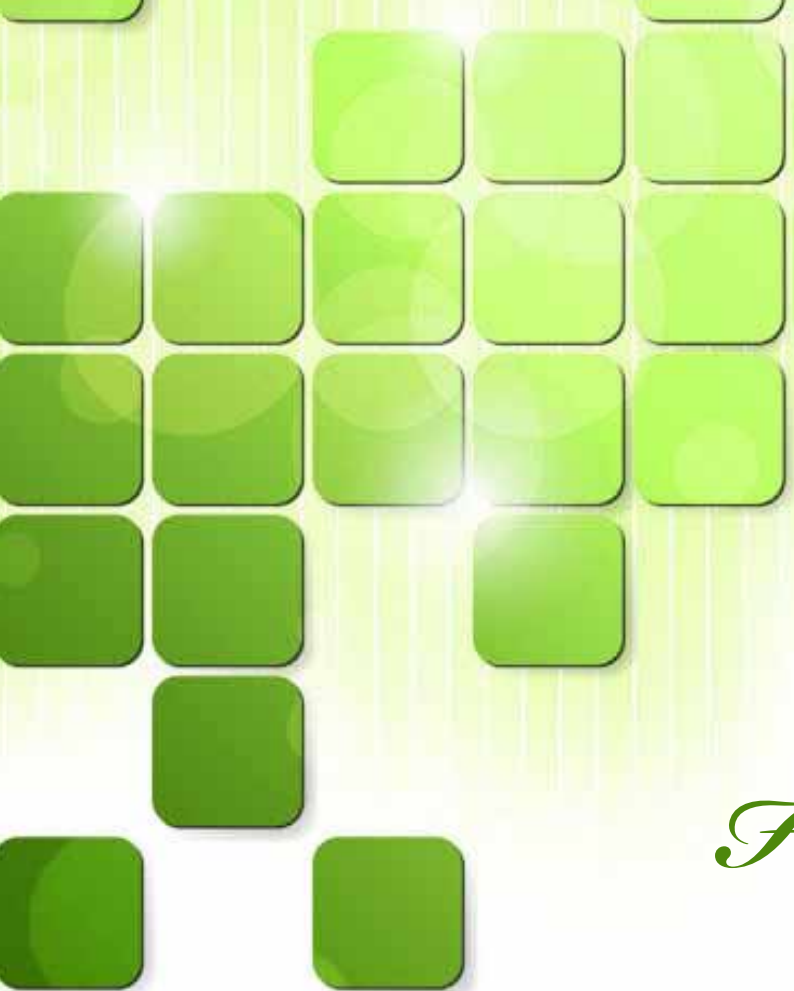


克隆类型	标签	筛选标记	人源基因(条)	价格(RMB)	应用
哺乳动物载体表达克隆	Native	Neomycin	20,000	≥1498元	✓ 基因过表达 ✓ shRNA和miRNA抑制基因的功能拯救试验等
	C-Flag	Neomycin			
	C-eGFP (monomeric)	Neomycin			
慢病毒载体表达克隆	Native	Puromycin	20,000	≥1598元	✓ 其他
	C-V5	Puromycin			
穿梭载体克隆	和Gateway® (Invitrogen Inc.) 克隆技术的兼容		20,000	≥1498元	通过基因重组原理将目的基因整合到表达载体上

*商标Gateway®由Invitrogen公司所拥有。已有大量论文发表，查看请登录官网。

GeneCopoeia
(复能基因)

Tel: 400-6020-200 020-32068595
Email: sales@fulengen.com
Web: www.genecopoeia.com.cn



热点

Hot Topics

基因组工程学里的三大利器 ——ZFN、TALEN和CRISPR/Cas

锌指核酸酶（Zinc-finger nucleases, ZFN）和转录激活因子样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nucleases, TALEN）这两种新型的核酸酶重新定义了传统生物学的界限和范畴。这两种核酸酶都是嵌合体，都是由经过设计的、序列特异性的DNA结合元件（programmable, sequence-specific DNA-binding modules）和非特异性的DNA切割结构域结合而成的。ZFN和TALEN都可以对DNA进行各种遗传修饰，这两种核酸酶的作用机制都是先对DNA双链分子进行切割，形成DNA双链断裂切口（DNA double-strand break），然后激活细胞内的非同源末端连接修复机制（nonhomologous end joining，这是一种非保真的、容易出现遗传突变的修复机制），或者同源重组修复机制（homology-directed repair，这是一种高保真的修复机制，不容易出现突变），利用细胞自身的修复机制对DNA进行遗传学修饰。接下来，我们就将为读者介绍这种新型的、序列特异性的核酸酶，看看它们在遗传分析和遗传改造工作中都能发挥哪些功用。此外，我们还会重点介绍ZFN和TALEN在临床治疗方面的潜力，以及这些核酸酶，与包括最新出现的RNA介导的、基于成簇的规律间隔的短回文重复序列和Cas蛋白的DNA核酸内切酶（clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas-based RNA-guided DNA endonucleases）在内的其它核酸酶在未来的发展潜力。

了解基因功能的传统方法和现代方法

随着全基因组测序技术（whole-genome sequencing）的不断发展和完善，以及大型基因组注释项目（genome annotation projects）的实施，科研人员们已经开始跃跃欲试，想要将基因组研究的成果尽早地运用到基础科学研究的各个领域，以及个性化医疗（personalized medicine）工作当中。不过海量的基因组信息也给科研人员们出了一个不小的难题，那就是该如何将这些枯燥的数据转换成有意义的基因组功能，或者与临床相关的信息呢？解决这个问题的核心就在于尽快开发出一种高效率的、可靠的方法，来帮助科研人员研究基因型（genotype）对表型（phenotype）的影响作用。利用同源重组机制（homologous recombination）对基因进行定向失活（Targeted gene inactivation）就是这样一种好方法，可以帮助科研人员明确基因的功能。不过在实际工作中使用这种方法也会受到好几个因素，比如存在效率太低、费时费力、而且有可能导致突变等的限制。而RNAi（详见名词解释）等基因靶向敲除技术则为科学家们提供了一种快捷、廉价而且可以开展高通量研究的新方法。不过RNAi这种基因敲除技术的敲除效果还不够彻底，每次试验以及每个实验室的试验结果都会有差异，另外还存在不可预知的脱靶情况（off-target effect），所以只能用于需要暂时抑制基因功能的试验当中。这些研究手段的种种不足都严重限制了科学家们在探索基因型和表型关系的科研道路上前进的步伐，也妨碍了RNAi技术的实际应用。

近十年来出现了一种新的研究手段，可以帮助科研人员对各种细胞和各种生物体内的几乎任意基因进行人工操作。这种新技术就是我们常说的“基因组编辑技术（genome editing）”，而前面介绍过的由序列特异性的DNA结合结构域与非特异性的DNA切割结构域组合而成的人工核酸酶就是这种基因组编辑技术的重要组成部分。这些嵌合式的核酸酶能够以极高的效率、极高的精确度对基因组进行人工修饰，其机制就是我们前面介绍过的切割DNA产生DSB，然后利用NHEJ或HDR等DSB修复机制完成我们所需要的各种人工修饰。由于科研人员们对锌指蛋白和TALE蛋白等蛋白的DNA结合结构域的设计能力越来越强，所以这种基因组编辑技术的应用范围也一再地被拓展。这些既简单又灵活的核酸酶在遗传工程学领域里发挥了极大的作用，其重要性也在与日俱增，已经站到了遗传工程工作的最前线。下面我们将介绍几个最近在位点特异性核酸酶技术（site-specific nuclease technologies）领域取得的最新研究成果，我们也将就这项新技术在基因组靶向工程学（targeted genome engineering）领域的应用，以及在对真核细胞和模式生物的分析工作中的应用价值展开探讨。我们还将介绍这种位点特异性核酸酶技术在临床治疗方面的应用潜力，以及未来的发展趋势，比如RNA介导的、基于成簇的规律间隔的短回文重复序列和Cas蛋白的DNA核酸内切酶未来的发展和应用前景等。

名词解释:

CRISPR/Cas (CRISPR associated) systems:

CRISPR/Cas 系统 (CRISPR 相关系统), CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) 即成簇的、规律间隔的短回文重复序列, 是基因组中一个含有多个短重复序列的位点, 这种位点在细菌和古细菌 (archaea) 胞内起到了一种获得性免疫 (acquired immunity) 的作用。CRISPR 系统主要依赖 crRNA 和 tracrRNA 来对外源 DNA 进行序列特异性降解。目前已经发现了 3 种 CRISPR/Cas 系统, 其中在 2 型系统 (type II systems) 中依赖的是 Cas9 蛋白。在 RNA 的介导下, Cas9 蛋白能够对 crRNA-tracrRNA 识别的靶序列进行切割。

crRNA: CRISPR RNA 能够与 tracrRNA 配对, 形成双链 RNA 结构, 这种双链 RNA 分子能够介导 Cas9 核酸内切酶对与双链 RNA 分子互补结合的 DNA 序列进行切割。

DSB: ZFN、TALEN 以及 CRISPR/Cas9 系统对 DNA 双链进行切割之后就会形成 DNA 双链断裂缺口 (double-strand breaks), 即 DSB。

HDR: 同源重组修复, DSB 出现之后, 细胞会启动这种修复机制, 以同源链为模板, 对 DSB 进行修复。由于这种修复作用是以同源链为模板, 而且还有位点特异性的核酸酶 (site-specific nuclease) 参与, 所以其保真度非常高。利用 HDR 可以插入一个或者多个基因, 也可以进行单碱基替换。

NHEJ: 非同源末端连接修复机制是另外一种 DSB 修复机制, 通过这种修复可以将断裂的 DSB 末端直接连接起来。由于在这种修复过程中不会用到同源模板链, 所以在断裂处容易出现小的插入或者缺失突变,

常常会导致移码突变, 使基因的功能遭到破坏。

PAM: 前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif), 这是一种见于 crRNA 分子的短核苷酸基序, 可以被 Cas9 蛋白特异性识别并切割。

RNAi: RNA 干扰技术, 是一种利用 RNA 分子抑制或者敲除基因表达的技术。从更广义的角度来说, RNA 干扰技术是细胞对外源 RNA 分子的天然抑制机制, 是细胞的一种自我保护行为。

TALEN: 转录激活因子样效应因子核酸酶主要由 FokI 内切酶结构域和 TALE 蛋白的 DNA 结合结构域组合而成。TALE 蛋白含有多个 33-35 个氨基酸组成的重复肽段, 而每一个肽段都能够识别一个碱基。与 ZFN 一样, TALEN 也能使 DNA 靶序列断裂, 形成 DSB, 进而激活 DNA 损伤修复机制, 对基因组进行定点改造。

tracrRNA: 反式激活嵌合 RNA (trans-activating chimeric RNA), 这是一种非编码 RNA, 能够促进 crRNA 的形成, 也是 Cas9 蛋白发挥 RNA 介导的 DNA 切割作用必不可少的辅助因子。

ZFN: 锌指核酸酶是由 FokI 限制性核酸内切酶当中的非特异性的 DNA 切割结构域和锌指蛋白 (zinc-finger protein) 组合而成的。ZFN 二聚体 (dimers) 能够促使 DNA 断裂形成 DSB, 进而诱发 DSB 修复机制。锌指结构域的靶向功能使 ZFN 能够对基因组中的特定位点进行定向改造。

ZFNickases: 锌指切口酶 (zinc-finger nickases) 也是 ZFN, 不过是在其中两个 FokI 限制性核酸内切酶结构域其中的一个结构域发生了失活突变的 ZFN。锌指切口酶只能够形成 DNA 单链断裂 (single-strand DNA break), 所以只能激活同源重组修复机制, 不能激活 NHEJ 修复机制。

定制 DNA 结合结构域

ZFN 和 TALEN 极强的“适应性”源自我们可以对这些核酸酶里的 DNA 结合结构域进行个性化的定制, 使其能够特异性地识别各种 DNA 序列。这些 DNA 结合结构域能够与背

景知识框 1 里介绍过的各种效应元件 (effector domain), 比如转录活化因子、转录抑制因子、重组酶 (recombinase)、转座酶 (transposases)、DNA 和组蛋白甲基转移

酶（methyltransferases）以及组蛋白乙酰基转移酶（acetyltransferases）等搭配，来对基因组进行各种改造，比如对基因组的结构或者基因组的功能进行改造等。由此可以看出，其

中最关键的因素就是各种核酸酶对DNA结合的特异性和亲和力。下面，我们将重点介绍几个比较成功的，组装这些DNA结合结构域的方法和技术。

Cys₂ - His₂ 锌指蛋白

Cys₂-His₂ 锌指结构域是在真核生物中最常见的一种DNA结合基序，在人类基因组中也是编码频次排名第2的蛋白结构域。一个锌指大约由30个氨基酸组成，形成了一种保守的ββ α 结构（图1A）。在锌指 α 螺旋结构表面的那几个氨基酸能够与DNA大沟上的3个碱基结合，不过这种结合的选择性会有所差异。由于锌指蛋白具有这种分子结构，所以非常适于打造个性化的DNA结合蛋白。在锌指蛋白特异性识别DNA序列的应用当中，最关键的工作就是设计出人造的、非天然的组合，比如含有3种以上的锌指蛋白DNA识别结构域的蛋白。高度保守的链接序列（linker sequence）的出现使这种设计成为了可能，因为有了这种链接序列，我们就可以设计出能够识别9~18个碱基长度的DNA序列。在一段680亿个碱基组成的DNA序列里，18个碱基组成的序列就足以成为一段特异性的序列，所以如果能够设计出含有3种以上的锌指蛋白DNA识别结构域的蛋白，那么就意味着科学家们能够利用锌指蛋白识别出人类基因组里的任意一段DNA序列。虽然这种理论在最开始还存在一定的争议，但是后来发现，如果要识别复杂基因组中某一段特定序列的DNA片段，这种设计策略的确是最佳的方案。

基于前期开展的论证研究（proof-of-principle）成果，科研人员们又开发出了好几种新的构建锌指蛋白的策略和方法，这些锌指蛋白在DNA结合的特异性方面都有其独到之处。模块化组装（modular assembly）

策略就是其中的一种，这种策略就是以预先选择好的锌指蛋白模块文库（这种预选的文库是通过对多个大型文库进行筛选，或者人工设计出来的）为基础，从中挑选出合适的模块组装出所需要的锌指蛋白。由于目前开发的锌指结构域几乎已经可以识别所有64种三联核苷酸组合（密码子），所以我们可以完全可以将这些锌指模块串联起来，识别特定的DNA序列。另外，也可以使用基于选择的策略（selection-based approach），比如寡聚体化序列设计策略（oligomerized pool engineering, OPEN）就可以从任意的文库（这些文库会考虑相邻锌指之间与序列有关的相互作用）中选择出新的锌指结构域。还有人将前面介绍的这些方法结合起来开发出了新的策略，比如先预先选择出与序列有关的（context-dependency）锌指模块，然后将这些模块组合在一起形成更长的锌指组合。多年以来，锌指蛋白技术一直都是打造位点特异性的DNA结合蛋白或酶的唯一方法。目前已经有商业化的人工锌指可供选择，比如美国的Sangamo Biosciences（Richmond, CA, USA）公司就已经和美国Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）公司合作，开发出了一套名为CompoZr的锌指蛋白构建系统，免去了科研人员自己构建锌指蛋白以及后续的验证工作。目前已经有数千个锌指蛋白可供我们选择。可以毫不夸张地说，锌指蛋白技术可以以任意序列为靶标。



核酸酶之外的其它工具酶： 重组酶、转座酶及转录因子

位点特异性的核酸酶（Site-specific nucleases）是目前被研究得最透彻，也是应用范围最广的一种遗传修饰工具酶，主要应用于细胞和模式生物的遗传改造工作。不过这种酶也有其局限性。比如，位点特异性的核酸酶的脱靶效应（off-target effect）就会对细胞产生毒性，更麻烦的是我们很难预测是否会出现脱靶效应，也几乎无法系统地监测细胞内出现的脱靶效应，所以科学家们也陆续开发出了其它几种新型的基因组改造工具。此外，由于这些核酸酶还需要依赖细胞自身的NHEJ及同源重组修复机制来完成遗传改造工作，所以这种技术也只能应用于某几种具备这些修复机制的细胞。为了解决上述问题，科学家们决定另辟蹊径，将锌指蛋白和TALE蛋白与核酸酶之外的其它几种酶结合，开发出了新的遗传改造工具，比如位点特异性的重组酶、转座酶等。这些酶可以使细胞基因组DNA发生整合、切除或者倒位等改变。因为这些酶能够自动完成对DNA的切割和连接操作，因此核酸酶脱靶导致的“毒性”DSB不太可能在细胞内累积，也就不会对细胞造成太大的伤害。另外，重组酶和转座酶更利于在基因组内的特定位点插入新的基因，所以能够更有目的地监测是否出现了脱靶效应。而且重组和转座机制是不依赖于细胞自身的DSB修复机制的。所以这些工具酶几乎可以应用于任何细胞，也可以在任何细胞周期内使用。我们还可以通过定向进化（directed evolution）的方式来提高这些工具酶的催化效率。不过要使这些重组酶和转座酶的可用性达到核酸酶的水平，还需要对它们进行更进一步的改进和优化，进一步提高酶的活性和在使用方面的灵活性。尤其是在所结合的重组酶的催化活性结构域中还保留有部分的序列特异性，所以还需要对它们进行更进一步的改造，使其能够特异性地与我们所瞄准的靶标序列结合。虽然转座酶与锌指等序列特异性结合蛋白融合之后表现出了极高的特异性，但还是会表现出比较明显的脱靶现象，所以也需要对这类蛋白进行更进一步的优化。最后再来介绍一下人工合成的锌指转录因子和TALE转录因子，这类蛋白能够特异性地影响基因的表达，这也起到了一种基因组定向修饰的作用。综上所述，位点特异性的重组酶、转座酶及转录因子是除了位点特异性的核酸酶之外的一大类灵活、好用的基因组修饰工具，是对位点特异性的核酸酶的良好补充。

TALE核酸酶

最近又发现了另外一种简单的DNA识别模块，那就是TALE核酸酶中的DNA识别模块，这无疑又给科学家们提供了另外一个平台，方便他们设计出更多的DNA结合蛋白。TALE蛋白是一种源自植物致病菌——黄单胞杆菌（*Xanthomonas*）的天然蛋白，其中也含有DNA结合结构域（图1B）。TALE蛋白中的DNA结合结构域是由一连串33~35个氨基酸组成的重复结构域组成的，其中每一个结构域都能够识别一对碱基。TALE核酸酶的DNA结合特异性主要由两个高度可变的氨基酸决定，科学家们将这两个关键的氨基酸称作重复可变双氨基酸残基位点（repeat-variable di-residues, RVD）。与锌指结构域一样，这种TALE重复模块也能够串联起来，识别一长串的DNA序列。不过与锌指蛋白不同的是，针对基因组中的某个位点，在连接TALE蛋白的DNA识别模块时，接头没有太多的改造空间。经过前人对锌指蛋白开展的近20年的科研工作，科学家们已经发现了大量的效应因子结构域（effector domain），比如核酸酶（nuclease）结构域、转录激活因子（transcriptional activator）结构域、位点特异性的重组酶（site-specific recombinase）结构域等，这些效应因子结构域都可以与TALE蛋白DNA序列识别结构域搭配，对基因组中的目标位点进行各种遗传修饰。虽然TALE蛋白DNA序列识别结构域能够识别单个碱基对的特性要比锌指蛋白的3碱基识别更

富灵活性，在设计的时候可变性更强，但是克隆这么一大段TALE蛋白DNA序列识别结构域的重复编码序列也是一个不小的挑战。为了解决这个问题，科学家们也想出了不少的办法，现在就已经有好几种方案能够让科研人员快速地组装出任意搭配的TALE蛋白DNA序列识别结构域。金门分子克隆技术（‘Golden Gate’ molecular cloning）就是其中的一种解决方案，这是一种高通量的固态组装技术（solid-phase assembly），而且是一种不需要进行连接的克隆技术（ligation-independent cloning techniques）。有多个使用了各种组装策略的大规模的、系统性研究项目表明，TALE重复识别模块可以组装在一起，识别任何DNA序列。根据文献的报道，TALE蛋白在识别DNA序列方面存在的唯一限制就是它所识别的位点必须以T开始。最近有项研究指出，已经有人构建了一个TALEN文库，能够靶向结合18740个人类编码基因，这说明构建TALEN蛋白并不是那么困难。这项“浩大的”工程不仅能够促进科研人员利用核酸酶开展更多的研究，同时也有利于鼓励大家开展类似的、更大规模的工作。目前也出现了商业化的人工TALE文库，比如法国巴黎的Cellestis Bioresearch公司、美国的Transposagen Biopharmaceuticals公司（Lexington, KY, USA）和生命科技公司（Life Technologies, Grand Island, NY, USA）都提供这类服务。



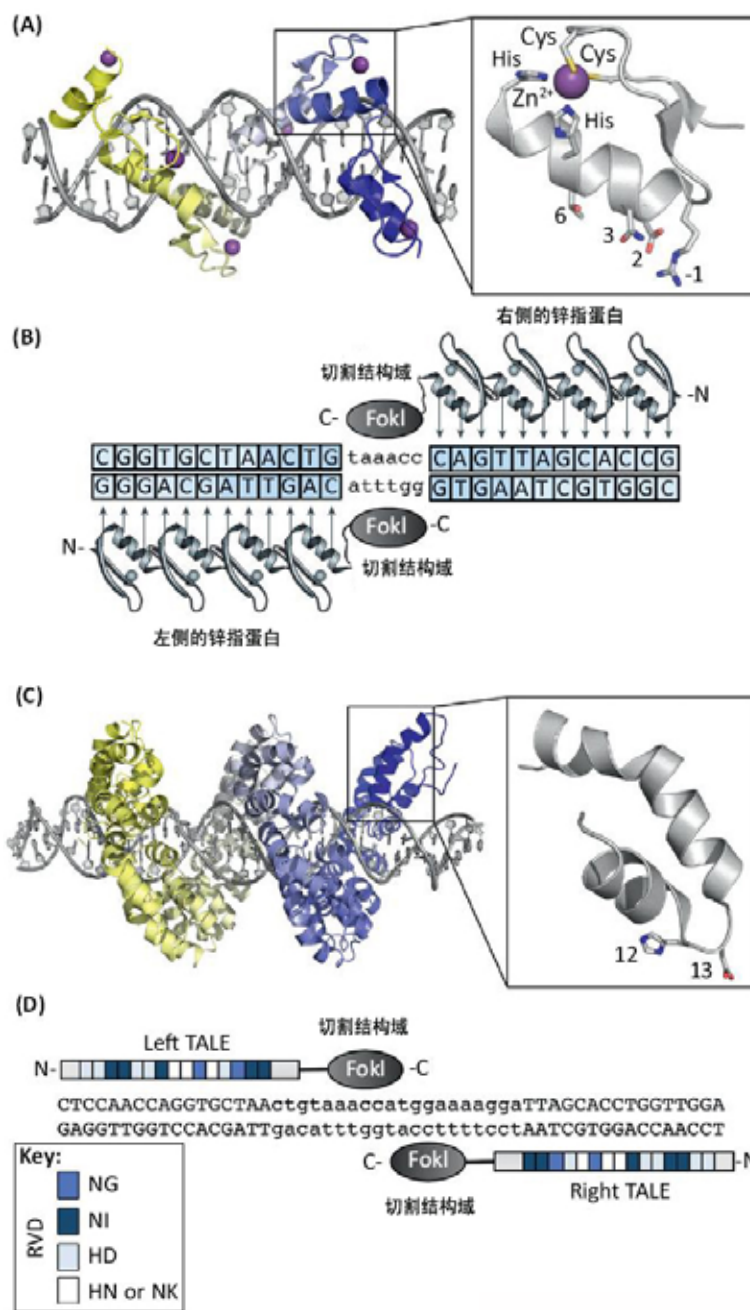


图1 锌指蛋白 (zinc-finger) 和转录活化因子样效应蛋白 (transcription activator-like effector, TALE) 的结构。(A) 人工设计的锌指蛋白与靶标DNA分子 (图中灰色所示) 形成的复合结构(PDB ID: 2I13)。每一个锌指结构都由大约30个氨基酸组成, 形成了一个 $\beta\beta\alpha$ 样结构, 如放大图所示。位于锌指结构域表面的氨基酸残基 (即1、2、3、6号氨基酸) 能够与DNA接触, 如图中的棒状结构所示。因此, 每一个锌指结构域都能够与DNA大沟侧的3至4个碱基接触。保守的半胱氨酸残基侧链和组氨酸残基侧链能够与紫色的锌离子结合。(B) 锌指核酸酶二聚体与DNA结合示意图。锌指核酸酶的靶序列含有两个锌指蛋白结合位点, 不过这两个位点之间还有一段5~7bp的间隔序列, 锌指核酸酶里的FokI酶切结构域就能够切割这段间隔序列。当然, 我们也可以设计出只能够识别左侧或者右侧结合位点的锌指蛋白。(C) TALE蛋白与DNA分子结合形成的复合体(PDB ID: 3UGM)。每一个TALE结构域都是由33~35个碱基组成的序列反复重复形成的, 每一个33~35个碱基组成的序列都能够依靠序列里两个高度可变的氨基酸残基 (即重复可变双残基RVD, 放大图中的棒状结构所示) 识别1个碱基对。(D) TALE核酸酶二聚体与DNA形成的复合物的结构示意图。TALEN的靶序列也含有两个TALE结合位点, 其中也有一段12~20bp长的间隔序列, 而且也能够设计出只能与其中一个结合位点结合的TALE。图中列举了4种RVD组合。

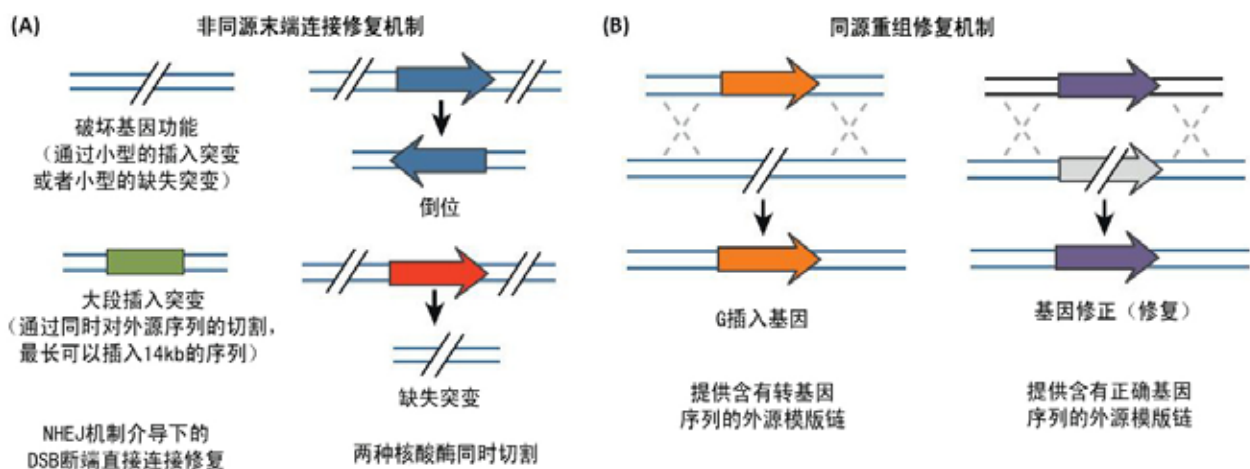
利用位点特异性的核酸酶进行基因组编辑 (Genome editing) 操作

一直以来, 科研人员在进行基因定向抑制、替代或者额外插入等遗传学操作时主

要依靠的都是同源重组技术 (homologous recombination), 不过这种方法对哺乳动

物细胞和模式生物进行遗传改造时的效率非常低，这就极大地限制了这类遗传操作的开展。后来科学家们发现，当细胞内出现DSB之后，同源重组的效率会上调好几个数量级，再加上后来发现的定向核酸酶，就极大地提高了利用同源重组技术进行遗传改造操作的工作效率。科学家们同时在细胞内转入位点特异性的核酸酶和携带有位点特异性同源序列（locus-specific homology arm）的外源质粒，这样就能够以极高的效率在细胞基因组特定的位点转入一个或者多个转基因序列（图2A）。我们也可以通过这种方法，转入一段不超过50bp的线性外源同源序列或者单链的DNA寡核苷酸链，在细胞基因组内的特定位点引入替换突变、缺失突变或者插入突变。这项技术具有非常重要的意义，因为位置的效应（positional effect）在这里已经不再那么重要了（可是在以前，位置效应会让很多遗传学分析变得非常复杂），可以对天然的、复杂染色体环境下的基因组结构与其功能之间的关系进行研究。位点特异性的核酸酶除了能够提高同源重组的效率之外，还能够以很快的速度构

建null表型（null phenotype）的细胞系和模式生物。这些核酸酶产生DSB之后如果启动了NHEJ修复机制，那么就会在DSB位点处引入小段的缺失突变或者是插入突变，使基因发生移码，从而起到敲除基因功能的作用（图2B）。这些位点特异性的核酸酶还能够引入大段的染色体缺失突变，使染色体发生大段的倒位（inversion）和转位（translocation）。总而言之，借助细胞的NHEJ修复机制，通过这些核酸酶对外源DNA片段和内源染色体位点的定向切割，我们可以实现大片段（最大可以达到14kb）转基因操作。这些方法能够帮助科研人员更好地研究基因的功能，还可以通过改变基因来模拟已知的或者是尚未确定的基因型，构建病理模型等。这类技术当中已经有很多被应用到了胚胎干细胞、iPS细胞等祖细胞（progenitor cell type）的研究工作中（表1），这样就可以开发出更多遗传背景下的细胞、乃至组织等模型。我们还可以用这类技术对非编码DNA（比如调控序列）的作用进行研究，有助于发现与目的基因有关的未知调控序列。



TRENDS in Biotechnology

图2 使用位点特异性核酸酶进行基因组编辑操作时可能出现的几种情况。核酸酶切割DNA形成DSB之后细胞可能会借助同源重组修复途径，或者是NHEJ修复途径对DSB进行修复。（A）在缺乏外源质粒DNA模版的情况下，细胞会通过NHEJ机制进行修复，在基因组中形成小型的插入或者缺失突变。在存在双链寡聚核苷酸分子，或者在细胞内存在线性的质粒片段时，可以通过NHEJ机制在基因组中插入大段的DNA序列，最长可以插入14kb的序列。同时形成两种DSB之后会形成缺失、倒位或者倒位的序列转位等突变。（B）在存在同源序列的外源模版的情况下，细胞会通过同源重组修复机制修复DSB，在基因组内插入1个或者多个转基因，或者对基因组中的错误基因进行修复。

表1 使用ZFN、TALEN和CRISPR/Cas对人及模式生物进行基因组修饰的案例

遗传修饰类型	修饰物种	修饰基因	使用的核酸酶
破坏基因功能	人	<i>CCR5</i>	ZFN
			TALEN
			CRISPR/Cas
	人	TCR（T细胞受体编码基因）	ZFN
	斑马鱼	<i>gol</i> (Golden)、 <i>ntl</i> (No tail)、 <i>kra</i>	ZFN
	猪	α 1, 3-半乳糖转移酶编码基因 <i>GGTA1</i> (α 1, 3-galactosyltransferase)	ZFN
		低密度脂蛋白受体编码基因 <i>LDLR</i> (LDL receptor)	TALEN
	牛	<i>ACAN12</i> 、 <i>p65</i>	TALEN
	人	<i>EMX1</i> 、 <i>PVALB</i>	CRISPR/Cas
	大鼠	<i>IgM</i> 、 <i>Rab38</i>	ZFN
	拟南芥 (<i>Arabidopsis</i>)	<i>ADH1</i> 、 <i>TT4</i>	ZFN
	秀丽隐杆线虫	<i>ben-1</i> 、 <i>rex-1</i> 、 <i>sdc-2</i>	ZFN/TALEN
	仓鼠 (Hamster)	<i>DHFR</i>	ZFN
	果蝇	<i>Yellow</i>	ZFN
	水稻	<i>OsSWEET14</i>	TALEN
插入基因	人	<i>OCT4</i> 、 <i>PITX3</i>	ZFN/TALEN
	人	<i>CCR5</i>	ZFN
	人	凝血因子9编码基因 <i>F9</i> (Coagulation Factor IX)	ZFN
	小鼠	<i>Rosa26</i>	ZFN
	人	<i>AAVS1</i>	ZFN
			TALEN
			CRISPR/Cas
	人	<i>VEGF-A</i>	ZFN
	斑马鱼	酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase) 编码基因 <i>th</i> 、 <i>fam46c</i> 、 <i>smad5</i>	TALEN
	玉米	<i>IPK1</i>	ZFN

(接下表)

(续上表)

基因修正	人	<i>IL2RG</i>	ZFN
		α 1抗胰蛋白酶 (α 1-antitrypsin) 编码基因 <i>A1AT</i>	ZFN
		β 球蛋白 (β - globin) 编码基因 <i>HBB</i>	ZFN
		α 突触核蛋白 (α - synuclein) 编码基因 <i>SNCA</i>	ZFN
	烟草	乙酰乳酸合酶 (acetolactate synthase) 编码基因 <i>SuRA</i> 、 <i>SurRB</i>	ZFN
	果蝇	<i>yellow</i>	ZFN

位点特异性核酸酶的优化问题

位点特异性核酸酶应用（遗传分析、临床应用等）的一大特点就是要保证极高的位点特异性。不过在复杂的基因组里，同一段序列往往会含有多个拷贝，这些序列都和我们的目标序列一模一样（或者高度同源），这就会给核酸酶技术带来脱靶的问题，而且很有可能会给细胞带来毒性和伤害。为了解决这个问题，科学家们提出了以结构和选择为基础的方案，开发出了ZFN和TALEN的异源二聚体蛋白，这种新型的核酸酶蛋白的切割特异性更高，而且对细胞的毒性也更低。Thomas Gaj等人的实验室就运用定向进化技术（directed evolution）开发出了具有超强活性的FokI蛋白酶切结构域，他们将之称作Sharkey。这种蛋白的酶切活性要比传统的ZFN至少提高了15倍，而且可以和任意的ZFN蛋白搭配。另外，有大量的证据表明，每一个ZFN中如果携带4至6个锌指结构域，就能够获得最大的特异性和酶切活性。除此之外，科研人员还开发出了其它几种改进核酸酶的方法，比如暂时使用低温培养条件来提高核酸酶的表达量；在使用核酸酶的同时使用DNA末端处置酶（DNA

end-processing enzyme）；使用荧光报告载体筛选、富集ZFN和TALEN作用过的细胞等。随着锌指切口酶（zinc-finger nickases，该酶可以切割DNA双链，也可以切割DNA单链）的出现，ZFN介导的基因组修饰技术的特异性得到了进一步增强，有研究发现，使用这种酶切割DNA之后只会激活同源重组修复机制，不会激活比较容易出错的NHEJ修复机制。这样一来就会减少脱靶（突变）效应出现的机率，不过在使用这种锌指切口酶时，同源重组的效率也会比使用锌指核酸酶时低一些。如果使用传统的DNA和mRNA转染的方式在细胞内表达锌指核酸酶，那只能对特定的几种细胞进行操作，而且还会发生很多副作用（背景知识框2），比如会出现插入突变、细胞毒性及转染效率低下等。为了解决这些问题，他们最近又新开发了一种更加简便的措施，直接将已经纯化的锌指核酸酶转入目标细胞里，这样就不会出现插入突变，而且脱靶效应出现的机率也更低。这种新方法对于那些需要从事高精度的基因组遗传改造工作的科研人员非常有帮助。



将位点特异性的核酸酶 输送到细胞内的几种方法

虽然位点特异性的核酸酶是一种非常好的基因组改造工具，但是如何将这些酶转移到目标细胞内，这还是一个比较棘手的问题，也直接影响了位点特异性的核酸酶的应用。通常使用的几种方法包括直接将携带编码位点特异性的核酸酶基因片段的质粒、病毒载体或者直接用体外转录的mRNA转入细胞当中。科学家们可以根据应用的需要，或者所针对的细胞类型对这些转染方法进行适当的改进，但是现有的病毒或非病毒转运系统还是大大地限制了位点特异性的核酸酶的应用。尤其是在转染质粒DNA或者是体外转录mRNA时，如果采用电转（electroporation）或者是阳离子脂质转染试剂（cationic lipid-based reagents）等方式，会给细胞带来比较大的毒性，所以这种方法只能应用于少数几种细胞，这更是限制了位点特异性的核酸酶的应用。采用病毒载体也有缺陷，比如病毒非常复杂，很难制备，而且还存在潜在的免疫原性，同时还牵涉到很多监管方面的问题等等。不过虽然存在上述种种困难，以腺病毒为载体的ZFN临床试验也已经开展起来了，目前开展的这些试验主要都是以T淋巴细胞为靶标，将来如果出现了更好的转运技术，则会给位点特异性的核酸酶带来更广阔的应用前景。

整合酶缺陷的慢病毒载体（Integrase-deficient lentiviral vector, IDLV）是一种比较诱人的ZFN转运工具，尤其适用于用常规方法难以转染的细胞。不过这种载体似乎不太适于装载高度重复的TALEN编码序列。虽然设计TALEN明显要容易一些，但是TALEN要比ZFN更难被转运进入细胞内。AAV载体也是一个比较有前景的ZFN转运载体，能够提高ZFN介导的同源重组修复的效率，也能够提高细胞内ZFN引起的基因修复工作的效率。不过AAV只适合装载不超过4.2kb的DNA序列。虽然这个装载容量对于ZFN单体和外源模板序列来说已经足够了，但是对于TALEN而言却不太够，只能装下一个TALEN单体外加一段最简单的启动子序列。

Thomas Gaj等人的课题组最近发现可以让纯化的ZFN蛋白直接透过细胞膜进入细胞内，使细胞内的基因被破坏，这也可以作为一种ZFN转运的替代技术。与传统的基因转运方式相比，他们这种方法具有以下几个优势。首先，可以减少脱靶效应发生的几率，因为它减少了细胞内ZFN酶活性持续的时间，所以最大限度地降低了核酸酶的“脱靶活性”。其次，这种方法对目标细胞没有太大的偏好性，也不存在病毒或者非病毒基因转运系统对细胞带来的毒性伤害。第三，这种方法不存在安全性等监管方面的障碍，所以更适合用来开发ZFN治疗技术。不过他们现在还不确定是不是也能将纯化的TALEN蛋白直接转入细胞内。

位点特异性的核酸酶在模式生物中的应用

位点特异性的核酸酶也能够多种在生物研究工作中经常会用到的模式生物里进行位点特异性的遗传修饰，其中就包括斑马鱼、大鼠、小鼠、果蝇、秀丽隐杆线虫、黑脉金斑蝶（monarch butterfly）、蛙和家畜（livestock）等。ZFN和TALEN都能应用于这些模式生物的研究工作当中，比如就可以用ZFN和TALEN对秀丽隐杆线虫和与其关系相近的广杆属线虫（*Caenorhabditis briggsae*）的基因功能进行比较研究，来发现这些彼此亲缘关系相近物种间的相似之处和差异，这让正向同源基因（orthologous gene）之间的比对分析工作成为了可能。实验证明，用显微注射的方法在单个的斑马鱼胚胎内注入TALEN的

mRNA和单链的DNA寡核苷酸片段，或者是携带有超过800bp同源臂（homology arm）的质粒等外源序列，就可以实现定点整合（targeted integration）的遗传编辑操作，得到loxP人工染色体。用这种方法也可以对模式生物进行有条件的人工基因活化操作。ZFN和TALEN除了在上述这些动物模式生物上具有应用价值之外，也可以应用于拟南芥、水稻、玉米等多种植物模式生物，进行遗传改造，打造出携带多种有益性状的“人造”植物，比如让植物携带抗病基因或者抗除草剂基因等。我们相信，将来这些位点特异性核酸酶一定可以应用于更多的模式生物，为基础研究和基因组生物学研究提供更多、更好的研究平台。

位点特异性的核酸酶在临床治疗方面的应用价值

在临床治疗工作中使用位点特异性的核酸酶是基因治疗领域的一大进展和趋势。与目的在于暂时缓解症状，或者是随意地在基因组中掺入几个治疗因子（therapeutic factors）的传统基因治疗方式所不同的是，ZFN和TALEN都能够纠正错误的致病基因，所以能够一劳永逸地解决问题。到目前为止，ZFN搭配同源重组修复的基因组编辑技术已经被用于多种疾病的临床治疗工作中了，其中就包括X染色体连锁的严重复合免疫缺陷病（X-linked severe combined immune deficiency, SCID）、乙型血友病（hemophilia B）、镰刀状细胞贫血（sickle-cell disease）和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏综合症（ $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency）等疾病。此外，ZFN也被用于修复帕金森氏病患者自身来源的iPS细胞里与帕金森氏病相关的SNCA基因突变。用ZFN及NHEJ机制实施的基因靶向敲除操作在治疗艾滋病方面也表现出了非常大

的应用潜力。有人利用ZFN技术对初始T细胞（primary T cell）进行了遗传改造，使T细胞上的HIV共受体——C-C细胞因子受体5（C-C chemokine receptor type 5）编码基因CCR5丧失了正常的功能，这样一来HIV就不能感染这些T细胞了。现在这项技术已经进入了临床试验阶段，NCT01252641、NCT00842634和NCT01044654这3个临床实验项目都在进行相关的试验研究。最近，还有科研人员利用ZFN相关技术在CCR5基因所在的基因座内敲入了抗HIV的限制性因子（anti-HIV restriction factor），得到了对R5和X4 HIV毒株（R5- and X4-tropic strains of HIV）近乎完全抵抗的T细胞。此外，ZFN也被用来改进T细胞免疫疗法的治疗效果，主要就是通过ZFN技术使T细胞受体编码基因失活，提高肿瘤特异性的T细胞的获得效率。位点特异性的核酸酶能够以非常安全的方式在人类基因组特定的位点（所谓的安全插入位点）里插入治疗性的转基

因序列。虽然目前这种技术主要还只能应用于体细胞改造，但是随着干细胞研究的不断深入，随着iPS技术的不断发展，相信位点特异

性的核酸酶一定能够在基因治疗方面取得更大的成果，比如应用于自体干细胞移植等领域。

使用RNA介导的DNA内切酶进行基因组编辑操作

与前面介绍的位点特异性的核酸酶不同，CRISPR/Cas系统是最近才发现的一个新型的基因组定向编辑技术，而且完全有能力与ZFN和TALEN技术“分庭抗礼”。CRISPR系统能够为细菌提供一种获得性免疫保护机制，通过这套RNA介导的DNA切割机制使细菌免受外源DNA的侵扰。在2型CRISPR/Cas系统里，短片段的外源DNA分子（也可以称之为间隔分子）被整合到CRISPR基因组位点内，进行转录，进而被处理成短CRISPR RNA，即所谓的crRNA分子。这些crRNA分子与反式激活的crRNA，即tracrRNA结合，介导了序列特异性的切割作用，最后在Cas蛋白的作用下使外源的“致病”DNA分子沉默。最近的研究表明，Cas9蛋白的靶向识别作用需要依靠crRNA里的一段“种子序列”，以及crRNA结合区域上游的保守的含有双核苷酸（dinucleotide-containing）的间隔前临近基序序列（protospacer adjacent motif sequence, PAM）的帮助。所以从理论上来

说，这套CRISPR/Cas系统几乎可以在crRNA的介导下对任意的DNA序列进行切割，关键在于设计出合适的crRNA序列。更加重要的是，这套CRISPR/Cas系统已经被证实能够在人体细胞内发挥作用，只需要在人体细胞内转入能够表达Cas9核酸内切酶的质粒和相应的crRNA分子就够了。已经有人使用这套RNA介导的DNA切割机制成功地对iPS细胞进行了试验，证明这套技术对这种细胞具有基因破坏作用和定向整合等多种基因组编辑修饰作用。Cas9蛋白也可以被替换成切口酶，进而启动另外一种DNA修复操控机制。除了能够应用于人体细胞之外，这套CRISPR/Cas基因组编辑技术也可以应用于斑马鱼和细菌等其它物种的细胞，不过还需要开展更进一步的研究来充分认识这套系统的真正应用价值，比如是否存在脱靶效应等。另外，我们也不清楚这套系统是否就是唯一的单位点特异性的基因组识别系统。

结论及未来的发展方向

ZFN、TALEN和CRISPR/Cas系统都是非常有力的转化工具，对生物学研究和个性化医疗（personalized medicine）都能够起到革命性的影响和促进作用。实际上，这些新兴的技术极大地拓展了我们对模式生物的处置和研究能力，也为治疗遗传性疾病，纠正遗传错误提供了一种平台。不过要充分发挥这类技术的潜力，还有很多问题和困难需要解决和克服（背景知识框3）。其中最主要的问题就是每

一种技术平台的特异性问题。在不久的将来，能够全面识别脱靶位点的高通量筛查技术可以帮助我们更清楚地认识每一种技术平台的特异性问题。其它问题还包括用哪种方法往细胞或者生物体内输送核酸酶更合适等。尤其值得注意的是，虽然腺病毒载体能够装载并转运全长的TALEN编码基因到人类细胞当中，但是用于转运TALEN的慢病毒载体（lentiviral plasmid vectors）比较容易导致基因组重排

(rearrangement)。另外，TALEN编码序列这种比较庞大的基因片段也影响了重组腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体的转运能力，研究表明，这种载体更适于转运ZFN基因。上述研究发现都表明，开发新的TALEN转运系统迫在眉睫，是未来一个重要的研究方向。虽然CRISPR/Cas系统在遗传改造方面表现出了极大的潜力，同时也展现出了极强的灵活性，但是这套系统对PAM序列的独特需求也在一定程度上限制了它的应用。对Cas9蛋白的定向进化工作可能能够帮

助CRISPR/Cas系统最终“抛弃”PAM序列，同时也可以得到酶切效率更高的Cas9蛋白。当然，还需要开展其它体内和体外研究，来评价CRISPR/Cas系统的特异性和毒性。最后，对重组酶、转录因子等能够影响基因组结构和功能的蛋白的继续开发工作也不能中断，因为它们都能对核酸酶系统起到非常重要的补充作用。综上所述，这些技术能够极大地提高我们研究基因组、改造基因组的能力，为我们认识并最终攻克疾病提供一个更新、更好及更有力的技术平台。



尚存的几点问题

- 如果用作治疗用途，ZFN和TALEN的疗效会如何？
- 什么方法是转运位点特异性的核酸酶的最佳方法？如果使用慢病毒载体该如何转运TALEN蛋白？
- Cas9蛋白能够被当作DNA结合结构域与其它酶蛋白的活性结构域融合，形成新的工具酶蛋白吗？
- CRISPR/Cas9系统的特异性和安全性如何？与ZFN和TALEN技术相比，CRISPR/Cas9系统的基因组编辑效率如何？
- 在哺乳动物细胞内使用CRISPR/Cas9系统时使用哪一种RNA骨架结构效果最好？

原文检索：

Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas III. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 1073, 1-9.



YORK/编译

TALEN, TALE-TF 靶向基因修饰技术服务

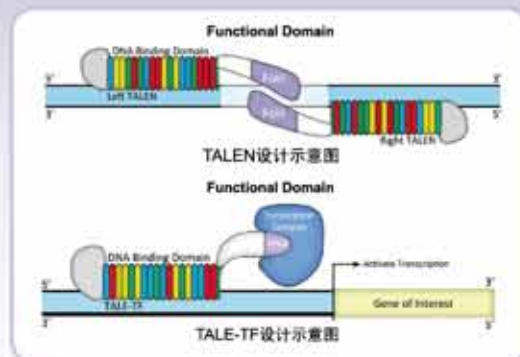
低至3000元!

定制服务及其应用

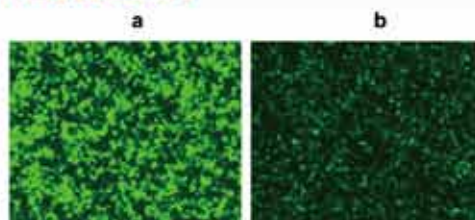
- **TALEN** (Transcription activator-like effector nuclease): 通过融合表达核酸内切酶靶向切割实现定点基因敲除、基因敲入等。
- **TALE-TF** (TALE-transcription factors): 精确激活细胞内靶基因。
- **TALE其他定制服务**: 根据顾客需求实现基因组修饰、基因转录抑制等目的。

技术优势

- ✓ 10年克隆构建经验
- ✓ 提供细胞筛选服务
- ✓ 提供细胞外或者细胞内的功能验证服务
- ✓ 毒性低, 脱靶概率小



应用实例



a. EX-eGFP-Lv105 (200 ng) + Control Plasmid (800 ng)
b. EX-eGFP-Lv105 (200 ng) + eGFP TALENs (800 ng)

eGFP TALENs 下调靶基因eGFP的表达: 共转染eGFP TALENs质粒和EX-eGFP-Lv105 (eGFP表达克隆)到6孔板中的HEK293T 细胞中。48小时后在显微镜下观察eGFP的表达水平。(Nikon Eclipse Ti, 曝光时间: 600ms)

活动时间: 6月13日-12月31日



百态

Amazing Lives

动物能够预见未来？

想象一下，你是一位将要执掌某项一流实验的研究者，你调动了自己所有的科学经验，使得实验进展得相当漂亮。数年之后，你接到来自学院的祝贺电话，他们告诉你刚刚荣获了诺贝尔奖。于是，你飞往斯德哥尔摩，登上讲坛，此时瑞典国王正静候着你的到来……

哇！有没有意识到，刚才你的心理其实已经超越了自己的现实！当然咯，不必大惊小怪，我们人类常常在做这种事。只是，我们在运用自己过往的记忆来构造可能永远不会成真的未来幻影，你可以说这是白日梦，但学者们却称之为心理时间旅行（**mental time travel**, **MTT**）。20世纪90年代，这个词由分别来自澳大利亚圣卢西亚的昆士兰大学（**University of Queensland**）和新西兰奥克兰大学

（**Auckland Univeristy**）的心理学家**Thomas Suddendorf**及**Michael Corballis**创造。这两位学者主张，**MTT**通常含有意识认知，是人类独有的。不仅如此，他们还对证明动物也能做到这件事制定了严格的标准。显然，那时他们肯定地认为，哪怕是最聪明的非人类物种，也永远不可能经历这种事情。

不过，科学喜欢把真相隐藏在迷雾之中。自两位科学家提出心理时间旅行这一概念以

来，其他研究者开展了数百项实验，用以测试动物是否能进行MTT，此行为是它们能够提前计划行动的关键所在。而今，Corballis受到一项有关大鼠大脑的新研究的启发，改变了自己的想法，这件事受到了认知专家们的关注。上个月，两位曾经是同一阵营的科学家虽然依然彼此友好，却已经产生分歧，并在《认知科学

进展》（*Trends in Cognitive Sciences*）杂志上相互辩论起来。Corballis提出，多项研究表明，大鼠不仅仅是单纯地重复曾经走过的迷宫小径，而且还在心理层面上探索实际上从未涉足的路径——这就是MTT的一种表现形式。而Suddendorf则坚决为他俩原先的立场辩护。



那些与似乎能够提前计划的动物打交道的研究者们辩驳说，即使目前没有方法可以证明某些非人类物种存在意识，但它们一定能够完成MTT行为。他们引证说，比如鸟类懂得储存食物以备食用，而某只名叫Santino的暴躁气黑猩猩似乎懂得提前藏好石头，以备攻击来动物园参观的游人。

而Suddendorf坚称，这些现象都不是MTT的证据。他的原话是，“动物享有某些”MTT的组成部分，包括具备在脑中反映外部物理空间和储存周遭世界相关知识的能力。“但是，心理时间旅行的内涵要更为丰富，它能促使我们灵活地想象任何情节，描绘出我们

的未来，以及为可能发生的偶然事件做好准备。”

看来，双方对动物具有MTT行为有着不同程度的认可，只是Suddendorf认为还不足以达到MTT。当然，Corballis也并非断言动物具有类似于人类的想象力。但是，他也表示，他和Suddendorf曾经共同策划的关于MTT的行为测试——包括启用新颖的问题和单独实验，这样动物就无法通过学习来获得成功——可能过于严格。他说，一项新的有关大鼠的研究针对动物或许具备什么能力“提供了更深入的信息”。

在最近的研究中，人们还记录了大鼠在

闯迷宫时，来自其海马部分的神经冲动。海马是人类和动物记忆储存的关键，“也是人类心理时间旅行的关键。”Corballis如是说。这项突破性的研究由明尼苏达大学（University of Minnesota）双子城分校的神经科学家A. David Redish牵头，并于2007年发表于《科学》杂志（*Science*, 9 November 2007, p. 900）。Redish发现，海马中所谓的位置细胞（place cell）是一种神经元，其作用相当于迷宫的心理地图，能模拟迷宫的地形路径顺次激活。这种激活发生在大鼠实际定位之前，甚至沿袭的路径可能只是大鼠考虑到的，而非它真正走过的。

为了支持这一发现，研究者们于去年在《科学》（*Science*, 15 June 2012, p. 1454）上证明，大鼠在学习走迷宫时，其海马神经元重复了之前的以及可能要走的路径，这种行为甚至在它们呆在迷宫之外休息的时候也有发生。而上个月发表于《科学》的一篇论文（*Science*, 19 April, p. 367）表明，蝙蝠能使用位置细胞来描绘出它们飞行的3D空间图。

可见，越来越多的研究工作显示，心理时间旅行具有古老的起源。这也是Corballis所提出的辩论点，尽管他也承认这种行为在人类身上要复杂得多。而Redish表示，尽管大鼠和人类之间有着“明显的差异”，但他本人“完全相信动物能够进行心理时间旅行。”

Suddendorf则回击说，大鼠在整个MTT组件中只占据相当少的一部分。比如说，它们缺乏主观意识以及所谓的递推思想（recursive

thought），即把图像和经验组合起来以构造无数未来场景（就像赢得诺贝尔奖或者到久远的星球旅行一样神奇的场景）的能力。

也有别的声音。一些动物行为学专家表示，非人类物种的MTT是真实存在的，但理由却与Corballis所解读的不同。来自隆德大学（Lund University）的灵长类动物学家Mathias Osvath认为，曾发表于《科学》杂志，阐述有关猩猩和储存食物以备食用的鸟类的行为学研究（*Science*, 23 February 2007, p. 1074）比关于大鼠的发现“要令人瞩目得多”。这位专家一直在研究那只名叫Santino，并在瑞典耶夫勒富鲁维克动物园（Furuvik Zoo）向游人投掷石头的愤青黑猩猩，似乎也有一定的发言权。总之，这类研究描述了动物的计划性，因此他认为MTT存在于非人类物种之中。他还坚称，没有必要通过意识或者想象性认知来证明动物参与了MTT行为。

目前，关于这个问题的主流争论对进一步阐明非人类的MTT有着不同的见解。Corballis推崇大鼠的海马作用这一类的神经生理学研究，而Suddendorf则认为如果动物确实参与了MTT行为，那么就应该有能够对此进行检测得“更加周全的”行为测试。不过，他和Corballis都同意一个核心的观点：只有语言的进化才能使动物具备彼此间分享其心理时间旅行内容的能力，如果能达到这一点，那么想象中的场景才可能真正成为现实。

原文检索：

MICHAEL BALTER. (2013) Can Animals Envision the Future? Scientists Spar Over New Data. *Science*, 340, 909.



文佳/编译

A group of people are building a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid is composed of several layers of people standing on each other's shoulders. The people at the base are looking up at the pyramid. The sky is filled with soft, white clouds. The overall tone of the image is motivational and collaborative.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255

www.LifeOmics.com
WWW.LIFEOMICS.COM