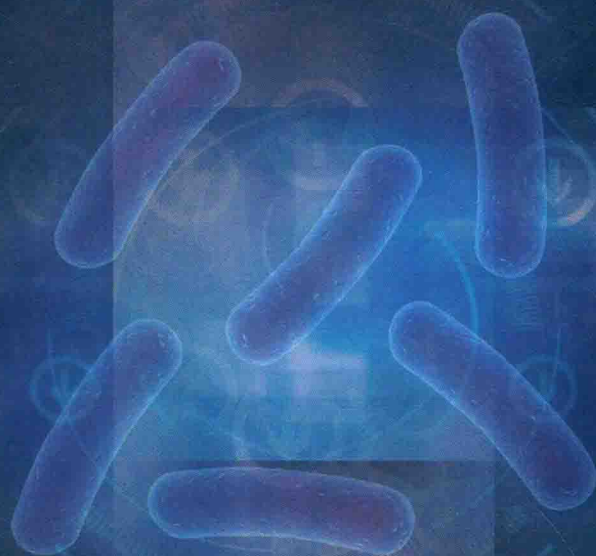


婴幼儿肠道菌群和 益生菌新进展

Research Progress of
Intestinal Flora and Probiotics
in Infants & Young Children

主编 郑跃杰



婴幼儿肠道菌群和 益生菌新进展

Research Progress of Intestinal Flora and
Probiotics in Infants & Young Children

主 编 郑跃杰

副主编 陈 卫 武庆斌 任发政

编 者 (以姓氏笔画为序)

王文建 深圳市儿童医院

毛丙永 江南大学

任发政 中国农业大学

宋晓翔 苏州市儿童医院

杨 波 江南大学

陆文伟 江南大学

陈 卫 江南大学

武庆斌 苏州市儿童医院

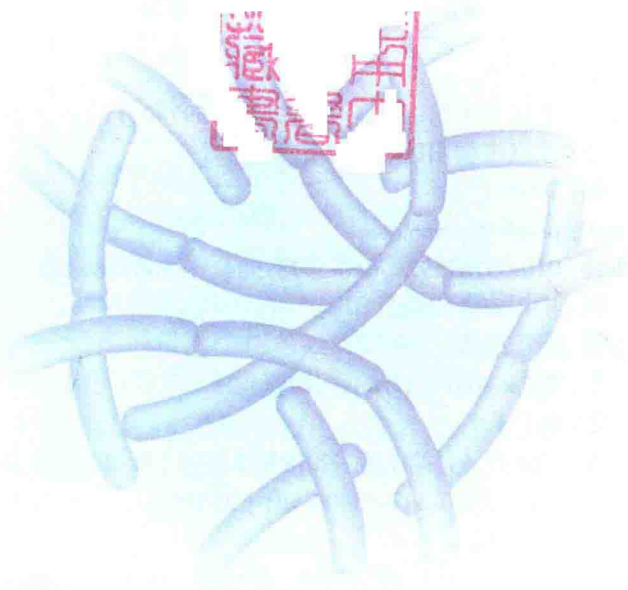
郑跃杰 深圳市儿童医院

赵 亮 中国农业大学

葛 兰 深圳市儿童医院

翟齐啸 江南大学

戴文魁 深圳市儿童医院



人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

婴幼儿肠道菌群和益生菌新进展 / 郑跃杰主编. —北京: 人民卫生出版社, 2017

ISBN 978-7-117-25404-5

I. ①婴… II. ①郑… III. ①乳酸细菌-应用-婴幼儿-卫生保健-研究 IV. ①R174 ②Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 286708 号

人卫智网 www.ipmph.com 医学教育、学术、考试、健康,
购书智慧智能综合服务平台
人卫官网 www.pmph.com 人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

婴幼儿肠道菌群和益生菌新进展

主 编: 郑跃杰

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 21

字 数: 511 千字

版 次: 2018 年 4 月第 1 版 2018 年 7 月第 1 版第 2 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-25404-5/R·25405

定 价: 99.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)



前言

菌群 (microbiota) 和微生物组 (microbiome) 是当前医学领域最为重要的热点之一。肠道是人体菌群定居的最主要和最重要的部位,肠道中数量巨大、复杂的菌群,在协助人体对抗感染、驱动免疫系统成熟和维持免疫反应的稳定性、参与人体生物转化和补充能量及营养物质方面发挥着不可缺少的生理功能,这些功能相互影响,互相促进。近年来,研究者还发现肠道菌群在调节婴儿生长发育、神经内分泌及行为方面也有重要的作用。10年前就有学者提出肠道菌群是一个被忽略或遗忘的“器官”(a forgotten organ)。

肠道菌群对人体的作用在婴幼儿期尤其突出。一方面是由于婴幼儿期是人一生中肠道菌群建立和发展的最为重要的时期,这个时期菌群处于不断的演化过程中,稳定性差,受影响因素多,如分娩方式、饮食结构、环境因素、应用药物特别是抗菌药物、甚至母亲怀孕期情况等。另一方面是这个时期肠道菌群的作用具有“年龄窗口期”,即肠道菌群的作用与婴幼儿一些生理功能的发育成熟是同步进行的。如果婴幼儿期肠道菌群形成过程出现延迟或紊乱,就会影响到以后许多疾病的发生发展,如过敏性疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病和肠道慢性炎症性疾病等。

益生菌 (probiotics) 是目前补充、调整肠道菌群最主要的手段,无论作为药物还是保健食品的添加剂,均受到广泛的关注。本书在前2章介绍肠道菌群概况及婴幼儿肠道菌群研究进展的基础上,第3章至第7章重点介绍益生菌在儿童保健预防和各种疾病防治方面的应用,第8章收录了国内外益生菌在儿童临床应用的指南或共识,第9章则介绍了当前菌群研究最重要的方法——高通量测序技术。期望通过阅读,使读者能够了解肠道菌群和益生菌应用的最新研究进展,更加合理地选择和使用益生菌,造福于儿童。

本书出版之际,恳切希望广大读者在阅读过程中不吝赐教,欢迎发送邮件至邮箱 renweifuer@pmph.com,或扫描封底二维码,关注“人卫儿科”,对我们的工作予以批评指正,以期再版修订时进一步完善,更好地为大家服务。

郑跃杰

2017年10月



目 录

| | |
|--------------------------------|----|
| 第一章 肠道微生态概述..... | 1 |
| 第一节 微生态学发展历程与研究进展 | 2 |
| 一、微生态学发展历程 | 2 |
| 二、微生态学研究进展 | 5 |
| 第二节 肠道菌群的生理功能 | 9 |
| 一、生物拮抗及防御感染作用 | 9 |
| 二、驱动免疫成熟和维持免疫稳态 | 10 |
| 三、代谢与营养作用 | 15 |
| 第三节 正常微生物群的平衡和失衡 | 25 |
| 一、微生态平衡 | 26 |
| 二、微生态失衡 | 28 |
| 三、常见的微生态失衡 | 32 |
| 第二章 婴幼儿肠道菌群研究进展..... | 36 |
| 第一节 婴幼儿肠道菌群的建立和演替 | 36 |
| 一、婴幼儿肠道菌群的建立和发展 | 37 |
| 二、肠道正常菌群的来源 | 38 |
| 三、婴幼儿肠道菌群的演替 | 39 |
| 第二节 影响婴幼儿肠道菌群建立的因素 | 41 |
| 一、分娩方式对肠道菌群定植的影响 | 41 |
| 二、胎龄对肠道菌群结构的影响 | 42 |
| 三、喂养方式对肠道菌群定植的影响 | 42 |
| 四、应用抗生素对肠道菌群定植的影响 | 43 |
| 五、环境因素对肠道菌群定植的影响 | 43 |
| 第三节 母乳中的有益菌及母乳对肠道菌群建立的影响 | 44 |
| 一、母乳微生物菌群的独特性 | 44 |
| 二、母乳中细菌的传递 | 45 |
| 三、母乳修饰新生儿肠道微生态体系 | 45 |
| 四、母乳喂养在婴儿胃肠道菌群形成所起作用的研究 | 45 |



| | |
|----------------------------------------|-----------|
| 第四节 母乳低聚糖及其对肠道菌群的影响 | 46 |
| 一、母乳低聚糖的存在与结构 | 46 |
| 二、母乳低聚糖的代谢与功能 | 47 |
| 三、母乳低聚糖与肠道菌群 | 49 |
| 第五节 肠道菌群演替与婴幼儿健康 | 49 |
| 一、肠道菌群对机体健康的促进作用 | 50 |
| 二、肠道菌群的演替与疾病 | 51 |
| 第六节 妊娠期间微生物菌群的变化特征 | 56 |
| 一、妊娠期肠道微生态菌群的变化 | 56 |
| 二、胎盘微生态菌群 | 57 |
| 第三章 益生菌与相关微生态制剂研究进展 | 60 |
| 第一节 益生菌概述 | 60 |
| 一、益生菌定义的演变 | 60 |
| 二、常见益生菌的种类 | 61 |
| 三、益生菌的益生机制 | 62 |
| 第二节 益生菌的鉴别与筛选 | 64 |
| 一、益生菌筛选的体外模型 | 64 |
| 二、益生菌筛选的体内模型 | 66 |
| 三、益生菌筛选的人体试验 | 67 |
| 四、益生菌的菌株特异性 | 69 |
| 第三节 现代工艺对益生菌的活性保持 | 71 |
| 一、益生菌高密度发酵 | 71 |
| 二、益生菌菌粉的制备 | 72 |
| 三、益生菌的微胶囊包埋 | 73 |
| 第四节 益生菌对肠道微生态的作用 | 73 |
| 一、益生菌与肠道菌群 | 73 |
| 二、动物实验 | 74 |
| 三、人体实验 | 74 |
| 第五节 益生元与合生元的概述与研究进展 | 75 |
| 一、益生元的定义 | 75 |
| 二、益生元的种类 | 76 |
| 三、益生元的作用 | 76 |
| 四、合生元 | 78 |
| 第四章 益生菌对婴幼儿胃肠道疾病防治作用的研究进展 | 87 |
| 第一节 婴幼儿胃肠道健康 | 87 |
| 第二节 全球与中国婴幼儿胃肠道疾病的现状和发展趋势 | 90 |
| 一、腹泻病 | 90 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 二、炎症性肠病 | 93 |
| 三、胃肠道功能性疾病 | 94 |
| 第三节 益生菌对婴幼儿腹泻的作用 | 95 |
| 一、婴幼儿腹泻与肠道菌群失调 | 95 |
| 二、益生菌防治腹泻的作用机制 | 96 |
| 三、益生菌在儿童腹泻病的临床应用 | 97 |
| 第四节 益生菌对婴幼儿炎症性肠病的作用 | 100 |
| 一、肠道菌群在炎症性肠病发病中的作用 | 100 |
| 二、益生菌对炎症性肠病的治疗作用 | 102 |
| 三、粪菌移植在炎症性肠病治疗中的应用 | 105 |
| 第五节 益生菌对功能性胃肠病的作用 | 106 |
| 一、功能性胃肠病的发病机制进展 | 106 |
| 二、儿童功能性胃肠病的特点 | 108 |
| 三、肠道菌群与肠易激综合征 | 109 |
| 四、肠道菌群与儿童功能性便秘 | 112 |
| 五、肠道菌群与儿童功能性腹痛 | 113 |
| 第五章 益生菌对婴幼儿过敏疾病防治的研究进展 | 116 |
| 第一节 过敏性疾病概述 | 116 |
| 一、过敏的定义 | 116 |
| 二、过敏原及其分类 | 118 |
| 三、儿童常见过敏性疾病患病率 | 119 |
| 四、病史及表现 | 119 |
| 五、实验室检查 | 120 |
| 六、治疗 | 122 |
| 第二节 食物过敏 | 125 |
| 一、病因和发病机制 | 126 |
| 二、临床表现 | 128 |
| 三、诊断和鉴别诊断 | 130 |
| 四、治疗 | 132 |
| 五、预防 | 134 |
| 第三节 湿疹 | 136 |
| 一、病因和发病机制 | 136 |
| 二、临床表现 | 137 |
| 三、实验室检查 | 138 |
| 四、诊断和鉴别诊断 | 138 |
| 五、治疗 | 139 |
| 六、复诊和随访 | 141 |
| 第四节 过敏性疾病与肠道菌群变化 | 141 |



| | |
|-------------------------------------|-----|
| 一、过敏性疾病增加的卫生学说到菌群学说解读 | 141 |
| 二、肠道菌群紊乱可能是过敏性疾病增加的因素之一 | 143 |
| 第五节 肠道菌群调控儿童免疫成熟和过敏疾病的发生 | 144 |
| 第六节 益生菌对过敏性疾病动物模型的干预研究 | 146 |
| 第七节 益生菌应用于过敏性疾病的临床研究 | 147 |
| 一、辅助治疗 | 147 |
| 二、预防 | 148 |
| 第六章 益生菌对婴幼儿其他健康作用的研究进展 | 151 |
| 第一节 益生菌对早产儿健康的作用 | 151 |
| 一、早产儿的肠道菌群特点 | 151 |
| 二、益生菌与新生儿坏死性小肠炎 | 152 |
| 三、益生菌与新生儿黄疸 | 154 |
| 四、益生菌与早产儿喂养不耐受 | 155 |
| 第二节 孕期及生命早期使用益生菌对远期健康作用 | 156 |
| 第三节 益生菌对婴幼儿呼吸系统疾病防治作用的研究进展 | 161 |
| 一、呼吸道微生态特点 | 161 |
| 二、肠道菌群与呼吸道免疫 | 163 |
| 三、益生菌对呼吸系统的免疫调节机制及其应用 | 165 |
| 第四节 益生菌对营养不良及儿童肥胖的作用 | 166 |
| 第五节 益生菌与脑 - 肠轴 | 171 |
| 一、脑 - 肠轴的概念 | 172 |
| 二、大脑对肠道菌群的影响 | 172 |
| 三、肠道菌群对大脑的影响 | 173 |
| 四、肠道菌群对大脑的调节机制 | 174 |
| 五、益生菌调节脑 - 肠轴的应用 | 175 |
| 第七章 婴幼儿健康领域常见菌株的研究进展 | 181 |
| 第一节 乳双歧杆菌 BB12 | 182 |
| 一、菌株简介 | 182 |
| 二、主要生理功能 | 183 |
| 第二节 鼠李糖乳杆菌 LGG | 188 |
| 一、菌株简介 | 188 |
| 二、主要生理功能 | 189 |
| 第三节 罗伊氏乳杆菌 DSM17938 | 199 |
| 一、菌株简介 | 199 |
| 二、主要生理功能 | 200 |
| 第四节 其他可用于婴幼儿食品的菌株 | 207 |
| 一、嗜酸乳杆菌 NCFM | 207 |

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 二、鼠李糖乳杆菌 HN001 | 208 |
| 三、乳双歧杆菌 HN019 | 210 |
| 四、发酵乳杆菌 CECT5716 | 211 |
| 五、乳双歧杆菌 Bi-07 | 212 |
| 六、短双歧杆菌 M-16V | 213 |
| 第五节 其他婴幼儿健康领域常见菌株 | 216 |
| 第八章 国内外益生菌应用指南编译 | 221 |
| 第一节 2014 年欧洲立场文件:益生菌在急性胃肠炎的应用 | 221 |
| 一、摘要 | 221 |
| 二、总结 | 222 |
| 第二节 2015 年世界过敏组织指南:益生菌对过敏性疾病的预防 | 222 |
| 一、摘要 | 222 |
| 二、问题 | 223 |
| 三、推荐 | 223 |
| 四、将来优先的研究 | 224 |
| 第三节 2015 年耶鲁 / 哈佛工作组共识:益生菌应用推荐 | 224 |
| 一、摘要 | 224 |
| 二、推荐建议 | 225 |
| 第四节 2017 年世界胃肠病学组织指南:益生菌和益生元 | 226 |
| 一、益生菌和益生元的概念 | 226 |
| 二、产品、健康声明和商业贸易 | 227 |
| 三、临床应用及证据汇总 | 227 |
| 第五节 2017 年中国指南:益生菌儿科临床应用循证指南 | 228 |
| 一、前言 | 228 |
| 二、国内使用的益生菌 | 228 |
| 三、益生菌儿科应用推荐 | 230 |
| 四、益生菌使用和评价中应注意的问题 | 232 |
| 五、益生菌药物的安全性 | 233 |
| 六、今后研究建议 | 233 |
| 第九章 微生物高通量测序和分析 | 235 |
| 第一节 样本采集和 DNA 提取 | 236 |
| 一、样本采集和保存 | 236 |
| 二、DNA 提取和保存 | 237 |
| 第二节 微生物研究测序技术 | 237 |
| 第三节 16S rDNA 扩增子分析 | 241 |
| 一、从测序数据到可操作分类单元 | 241 |
| 二、基于可操作分类单元分析样本的细菌种类 | 242 |



| | |
|-------------------------------|-----|
| 三、基于可操作分类单元分析样本的细菌种类多样性 | 243 |
| 四、样本间的差异分析 | 246 |
| 五、细菌之间的关联网络分析 | 248 |
| 六、细菌组成和临床指标的相关分析 | 249 |
| 第四节 宏基因组分析 | 250 |
| 一、数据评估和处理 | 250 |
| 二、每个样本的物种、基因和功能组成 | 251 |
| 三、样本间差异分析 | 255 |
| 四、不同样本富集的基因关联网络分析 | 256 |
| 附录 1 古生菌域检索表 | 258 |
| 附录 2 细菌域检索表 | 263 |



第一章 肠道微生物生态概述

医学微生物生态学(medical microecology)是一门新兴的交叉学科,是研究人体内共生微生物群与其宿主相互关系的生命科学,目前主要集中在共生细菌群方面。在人的体表和与外界相通的腔道中寄居着大约100万亿、1000余种细菌,其数量是人体细胞的10倍,一般情况下,这些细菌与人体处于共生状态,我们称为共生性细菌(commensal bacteria)、正常菌群(normal microflora)、共生菌群(commensal microbiota)或菌群(microbiota)。菌群与宿主的共生关系是细菌与人类经过亿万年互为环境,同步进化的结果:一方面,宿主为正常菌群的繁殖提供了场所和营养,并且不对它们引起强烈的免疫反应(免疫耐受);另一方面,菌群则对宿主发挥着必要的生理功能。实际上菌群已经成为人体的一个不可分割的组成部分,甚至有人把菌群作为人体的一个器官。与传统的医学微生物学(medical microbiology)不同,医学微生物学研究的对象是与人类疾病有关的病原微生物。随着非依赖培养的高通量测序技术和生物信息分析技术的飞速发展和应用,发现人体中大多数的微生物是无法依靠现有的培养技术所呈现,并且人体中微生物所编码的基因数量是人体自身基因的100倍以上,这些存在于人体中所有微生物的基因总和,称为人体的微生物组(microbiome),也有人认为微生物组应是人体微生物群及其基因的总和。

根据人体中菌群的分布,可将人体微生态系统分为口腔、胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道和皮肤五个系统,其中胃肠道菌群占人体总微生物量的78%,是人体最主要和最复杂的微生态系统,并且与其他部位的微生态系统存在着密切的联系。

第一节 微生物学发展历程与研究进展

一、微生物学发展历程

(一) 对正常菌群认识的转变

人们对正常菌群重要性的认识可以追溯到 19 世纪。路易·巴斯德(Louis Pasteur, 1822—1895 年)是法国微生物学家、化学家,他首先研究了微生物的类型、习性、营养、繁殖和作用等,奠定了工业微生物学和医学微生物学的基础,并开创了微生物生理学,被称为微生物学之父。他证实发酵作用都是由于微生物引起的,发现了乳酸杆菌,最早证实细菌的致病理论,创立了巴斯德消毒法,发明了狂犬病疫苗,首先提出了预防接种。1885 年他 63 岁时,在巴黎的《科学院报告》中指出:“毫不隐瞒地说如果我还有时间的话,我将从事这样的实验,我想在无菌条件下生命将是不可能的”。他认为微生物与动物之间存在长期的依存关系,人或动物必须有正常菌群。进入 20 世纪初期,霍乱、鼠疫、天花、流感、伤寒等传染病的大流行,夺取了亿万人的生命,迫使人们集中研究病原菌,并且发现了愈来愈多的病原体,逐渐形成了一种认识:微生物主要是有害的。这种片面的认识及当时科学技术条件的限制,严重妨碍了人们对正常微生物菌群的进一步认识。

1929 年,英国细菌学家亚历山大弗来明发现了青霉素,1945 年开创了抗生素工业。作为对付细菌的武器,抗生素在医药史上有着无与伦比的作用。但是随着抗生素的普遍使用和抗生素的不断开发,对抗生素耐药菌株增多了,而且抗生素在抑杀病原菌的同时,也能抑杀正常菌群,破坏正常的微生态平衡,引起菌群失调或二重感染。耐药菌株和二重感染的出现引起了人们的反思,唤醒了人们对正常菌群研究的兴趣,成为微生物学发展的一个主要动力。另外,应用抗肿瘤药物、免疫抑制剂及肾上腺皮质激素以及应激、放射治疗等人为地抑制了机体的免疫系统,使体内原来不致病的正常细菌中的一部分表现出致病性,引起所谓的内源性感染,也促使人们需要对正常菌群进行研究。

1977 年,德国的 Volker Rusk 博士首先提出微生物生态学(microecology),他把微生物生态学定义为研究正常微生物群的结构、功能以及与其宿主相互关系的生命科学分支,是微观层次的生态学,即细胞或分子水平的生态学。近 30 年来,随着微生物生态学的迅速发展,人们对菌群的认识已经发生了天翻地覆的变化,正如我国微生物生态学奠基人、微生物学家康白教授在 2013 年第四届世界人体微生态大会上所说的:当值人类对微生物的认识态度由第一次世界大战的“恐菌时代”、第二次世界大战的“抗菌时代”,到如今保护有益菌、抑制有害菌的“保菌时代”的到来,让我们迎接这个伟大的新时代,为人类的健康和长寿作出贡献。

(二) 对正常菌群研究技术的发展

常规研究微生物特别是细菌的技术,如显微镜、染色、分离培养和各种分子生物学技术同样应用于正常微生物群的研究。无菌动物与悉生动物技术、厌氧培养技术和分子生物学

特别是宏基因组学技术在微生态学的发展中尤其重要。

无菌动物,是指在无菌环境下,用无菌饲料、无菌水通过无菌操作而培养出来的动物。这一技术 1945 年首先在美国获得成功,为研究微生物群与宿主的关系提供了实验模型,并由此而形成了一个全新的学科,即悉生动物学。悉生动物学是一门方法科学,利用这一技术,人们可以进一步对正常菌群的生理及病理作用进行深入系统的研究,为微生态学的发展提供了主要的手段。例如,通过这一技术现已认识到了消化道微生物菌群的很多作用。微生物菌群能通过分泌多种酶类分解内源性分泌物和许多难被宿主吸收的营养物而改变消化道内容物,参与食物的消化和吸收;微生物菌群能通过作用于消化道壁的结构、消化道中物质的输送、黏膜层细胞的更新速度和营养物的吸收等来修饰消化道的解剖学和消化生理学;微生物菌群作为抗原,能促进机体免疫系统的成熟;微生物菌群形成生物屏障,能对抗日常摄入的外源细菌的入侵。事实上,只有利用悉生动物这一模型,才有可能将宿主和其微生物菌群分离开进行研究,因此没有悉生动物技术,就不可能有今天的微生态学。

20 世纪 70 年代厌氧培养技术的发展,使厌氧性细菌的检出率大大提高,促成了厌氧细菌学的崛起,这一技术也极大地推动了微生态学的发展。厌氧培养技术的应用给人们揭示出了一个前所未知或知之不多的微生物世界。例如,以往认为大便中的主要细菌为大肠埃希菌及肠球菌,而且大部分为死菌,只有少数能培养出来。现在利用厌氧培养技术已经探明,大便细菌中 95% 以上为厌氧菌,70% 以上的细菌都能培养成功。现已证明,在人、畜的体表或体内寄生着几百种数以亿万计的细菌,它们绝大多数为厌氧菌,对宿主非但无害,而且有益;不仅有益,而且是必需的。它们与宿主和平共处互相影响,参与了宿主的生长发育、新陈代谢、营养吸收、致病免疫等一系列活动。

分子生物学技术,特别是宏基因组学技术把微生态学带入黄金时代。1953 年,英国物理学家克里克和美国生化学家沃森合作提出了脱氧核糖核酸(DNA)双螺旋分子结构,标志着分子生物学及分子遗传学的诞生,同时也为不能培养的细菌(uncultured microorganism)研究打开了大门。1998 年 Handelsman 提出了宏基因组(metagenome)概念。宏基因组又称微生物环境基因组、微生物组,其定义为环境中全部微小生物遗传物质的总和,目前主要指环境样品中的细菌和真菌的基因组总和。微生物组学技术是一种不依赖于传统的细菌培养与鉴定,直接从样品中提取基因组 DNA 后进行测序,生物信息分析,获得活性物质和功能基因的新技术。微生物组检测的微生物既包括了可培养的,又包括了目前条件下无法培养的微生物遗传信息。目前认为人体中约 40%~80% 的细菌是不能通过传统纯培养技术培养出来的。微生物组技术绕过了菌种纯培养的缺陷,极大地扩大了我们认识微生物的视野,这是人类继发明显微镜以来研究微生物方法的最重要进展,是对微生物世界认识的革命性突破。

微生物组研究的核心方法是高通量测序和生物信息分析。高通量测序技术(high-throughput sequencing)又称下一代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS),一次能对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,又被称为深度测序(deep sequencing)。高通量测序技术应用于微生态研究包括 16S rDNA 测序和宏基因组测序,其中前者针对细菌核糖体的 16S 亚基,主要用于标本中细菌群的组成分析,后者能检测出标本中所有微生物基因序列(包括细菌、真菌以及病毒等),不仅能够分析微生物组的组成,还可以分析基因的功能



等。生物信息分析中所呈现的结果和统计的方式与传统的微生物检测和研究不同,主要有操作分类单位(operational taxonomic units, OTU)、微生物多样性分析(Shannon-Wiener 指数)、物种组成与丰度分析、进化关系分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)、聚类及相关性分析和基因功能注释分析等(详见第九章微生态高通量测序和分析)。

(三) 对益生菌的认识及演变

人类对益生菌的认识已有 100 年的历史,1907 年诺贝尔奖获得者,俄国微生物学家 Eli Metchnikoff 首先从保加利亚酸奶中分离出保加利亚乳杆菌,并观察到这些细菌对人体发挥积极的作用,提出了通过食物补充有益菌可能改变肠道菌群和取代体内有害微生物,而起到促进健康作用的观点。1906 年法国儿科医生 Henry Tisser 首先观察到腹泻儿童大便中一种古怪的 Y 形细菌(以后由他命名为双歧杆菌)比正常儿童减少,提出给病人补充这些细菌可以恢复正常肠道菌群。但直到 1965 年, Lilliey 和 Stillwell 才首次提出益生菌的概念,其英文 probiotics 一词来源于希腊文,意思是“为了生命(for life)”,其反义词为抗生素(antibiotics),益生菌最初的含义为能刺激一种微生物生长的另一种微生物物质。1989 年 Roy Fuller 把益生菌定义为“能够通过促进肠道菌群平衡,对宿主发挥有益作用的口服的活的微生物”,此定义首次指出益生菌应该为活的微生物,去除了包括抗生素和此后称为益生原(元)(prebiotics)的物质。1996 年 Arameo 等对益生菌做出进一步定义,益生菌是含生理性活菌或死菌(包括其组分和代谢产物),经口服或经由其他途径投入,旨在改善黏膜表面的微生物或酶的平衡,或刺激机体特异性或非特异性免疫机制,提高机体定植抗力或免疫力的微生物制剂。这一定义当时被多数国内外学者所接受,但显然该定义包含的范围过于广泛,不够确切。为此 2002 年,联合国粮农组织和世界卫生组织(FAO/WHO)召集专家,制定了《食物中益生菌健康及营养评价指南》,该指南对益生菌重新定义为给予一定数量的、能够对宿主健康产生有益作用的活的微生物,目前这一概念已经被全世界广泛使用。不是所有的经食物摄入的活的微生物均为益生菌,益生菌应具有以下特征:①为活的微生物;②经过培养、生产和贮藏,在使用之前仍然保持存活和稳定;③能够耐受胃液、胆汁和胰酶的消化,维持活性;④进入机体肠道以后,能够引起宿主反应;⑤在功能或临床上,对宿主产生有益作用。

与益生菌相关的另外 2 个概念是益生原(元)(prebiotics)和合生元(synbiotics)。益生元是 1995 年提出的,是指能够选择性地刺激一种或几种肠道内有益菌的活性或生长繁殖,起到增进宿主健康作用的,不被宿主消化的食物成分。益生原应具备以下 4 个条件:①在胃肠道的上部既不能水解,也不能被宿主吸收;②只能选择性对肠道内有益菌(如双歧杆菌和乳杆菌等)有刺激生长繁殖或激活代谢功能的作用;③能够提高肠内有益于健康的优势菌群的构成和数量;④能起到增强宿主机体健康的作用。目前最符合益生原标准的是非消化性低聚糖(NDO),NDO 也称功能性低聚糖或寡糖。常用的 NDO 有菊粉(菊糖)、低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)和乳果糖等。益生原(元)的作用主要是通过促进肠道有益菌发挥的,也可以通过被有益菌的代谢,产生短链脂肪酸等产物发挥作用,目前主要用于食品添加和保健,作为药物使用的主要为乳果糖。合生元是指益生菌与益生原制成的复合制剂。国内把益生菌、益生元和合生元统称为微生态制剂。

二、微生物学研究进展

(一) 正常微生物群是人体一个新的生理系统

微生物学的兴起和蓬勃发展引起了人们对生命及疾病本质认识的一场革命。人类或动物刚出生时是无菌的,但出生后立即与周围环境中的微生物接触,通过演替过程,在体内和体表形成一个正常的微生物菌群,这一菌群终生存在,直至宿主死亡。据统计,一个成年人大约有 10^{13} 细胞,而其体表与体内携带的正常微生物竟然有 10^{14} 之多,即机体所携带的微生物细胞的数量是其自身细胞数量的 10 倍,这样庞大的正常微生物菌群以一定的种类和比例存在于机体的特定部位,参与机体的生命活动,与宿主细胞进行着物质、能量和基因的交流,在宿主的生长发育、消化吸收、生物拮抗及免疫等方面发挥着不可替代的生理功能,共同维持着生命过程。因此,正常微生物菌群是机体生命活动不可分割的一部分。生命现象在本质上是生物体与内外环境的平衡和稳定。2003 年我国微生物生态学奠基人康白教授基于以下基本论点:①正常微生物群是生物体整体一个不可分割的组成部分;②从生态学出发,人和动物、植物、微生物所有生物体构成一个统一的生物区系 (biota);③互为环境,同步进化,微生物生态系统应为“在一定的时间和空间内相互作用的有机物和无机物的总和”;④“微生态三角”在宿主遗传性控制下,正常微生物群、免疫与营养构成的“微生态三角”的相互依赖、相互制约的关系;系统地提出了正常微生物群是一个新的人体生理学系统。这一新理论得到了国外学者的支持与呼应,2006 年国外学者也提出了肠道共生菌群是“一个被忽略或遗忘的器官” (a forgotten organ)。2013 年有学者提出了肠道菌群是宿主发育和生理的“主人” (masters)。

(二) 微生物组研究已经成为生命科学研究最重要的热点之一

2004 年,美国国立卫生研究院 (NIH) 专门设立了“利用宏基因组学研究口腔微生物”的研究项目。为了全面分析人体微生物群系,揭示微生物与人体健康和疾病状态之间的联系,NIH 于 2007 年 12 月 19 日正式启动了一项新的基因工程——人体微生物组计划 (Human Microbiome Project, HMP)。HMP 计划是人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 的延伸,又称“人类第二基因组计划”。将来,HMP 与 HGP 相互结合,将为了解“遗传与环境”相互作用提供前所未有的机遇,揭示人类健康与疾病更多的秘密。科学家认为,HMP 计划将对阐明人类许多疾病的发生机制、研究新药物、控制药物毒性等产生巨大作用。人类基因组和人类宏基因组这两本“天书”绘制完成后,将有助于更好地破解人类疾病。HMP 的目标:①利用新的高通量技术的优点,更为全面的对至少 250 名健康志愿者的多个部位进行人体微生物组研究;②通过对一些不同的医学状况进行研究,明确人体微生物组变化与健康/疾病的相关性;③为 HMP 的广泛研究和推广,提供标准化的数据库和新的技术,同时系统地研究 HMP 涉及的伦理、法律和社会问题。HMP 的最终目的是通过监测和调节人体微生物组,实现增进人类健康的目标。因为肠道菌群在人类健康方面起着重大的作用,欧盟第七框架协议在 2008 年 1 月资助了“人类肠道宏基因组计划” [European Commission Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) Project]。MetaHIT 项目的合作伙伴包括了来自中国、



美国、丹麦、法国、日本、西班牙、英国、芬兰 8 个国家学术界和工业界的 13 个成员。MetaHIT 项目的目的是研究人类肠道中的所有微生物群落,进而了解人肠道中细菌的物种分布,最终为后续研究肠道微生物与人的肥胖、肠炎、糖尿病等疾病的关系提供非常重要的理论依据,达到预防和监控的目的。MetaHIT 项目相当于对人类肠道中的细菌进行了一次全面的“基因普查”。目前 HMP 和 MetaHIT 的第 1 期计划均已经完成,继续进入第 2 期研究。2016 年 5 月 13 日美国白宫科学和技术政策办公室 (OSTP) 与联邦机构、私营基金管理机构一同宣布启动“国家微生物组计划”(National Microbiome Initiative, NMI)。加拿大、日本、韩国等也正在实施类似的研究项目。微生物组研究已经成为国际生命科学研究最重要的热点之一,如 2010 年世界权威杂志《自然》把人类微生物组学预测为未来十年科学的走向之一,2013 年,微生物组学与疾病再次被《自然》列入“新年新科学”。

人体微生物组构成了人类的第二套基因组,初步研究表明,人体微生物编码的基因是人体自身基因数目的 100 余倍,它们与人类自身的基因组一起,共同作用于人体的免疫、营养和代谢过程,影响着人体的健康和疾病,这一结果对认识人类健康与疾病、疾病的临床诊断、治疗和预防将产生深远的影响。微生物组与人类疾病的研究进入了黄金时代,主要的表现是肠道共生菌群与肥胖、糖尿病、冠心病、炎症性肠病等已经取得了突破性进展,呼吸道和肺的微生物组与呼吸系统急性感染及慢性疾病的关系,口腔、鼻腔、皮肤、泌尿生殖道等部位的菌群及微生物组研究也引起了全世界的关注,并且取得了重要的进展。

(三) 菌群、微生物组可能为环境与人体疾病关系的桥梁

当前,人类自身正面临着内、外两大环境的挑战。外环境属于宏观生态学的研究领域,随着人类文明的发展,人们越来越重视宏观生态对人类生存的影响,保护生态就是保卫地球即保护人类自身的发展和文明,宏观生态破坏造成的严重不良后果使人类越来越重视宏观生态平衡的作用。内环境属于微生态研究领域,随着新技术新方法的应用,人类对微生态学的认识也越来越深入,与宿主正常生理关系密切的微生态学规律被逐渐挖掘出来,这在一定程度上有助于人类对于疾病的认识和革新。越来越多的研究提示,人类生存和生活的外环境既影响着人体自身,又影响着人体所携带的菌群,并且环境中的许多因素可能是通过影响菌群而进一步对人体发挥作用的,无论是健康状态还是疾病,菌群更有可能是外环境与人体之间的一个桥梁。典型的例子就是膳食构成对人体的影响,西方发达国家高脂肪、高蛋白、高热量和低纤维饮食模式已经被认为与肥胖、心血管病、糖尿病、大肠肿瘤的发病密切相关,这些国家和地区的过敏性疾病包括哮喘也远高于发展中国家。既往我们只考虑到食物成分对人体的影响,现在已经明确,不同的膳食构成,会显著改变肠道菌群的结构,肠道菌群及其代谢产物通过对人体的免疫、代谢等作用,进一步影响着人类的健康和疾病。

工业化、城市化是人类文明和进步的标志,但是由此带来的外环境变化、生活方式的改变、饮食改变、微生物暴露的变化、广泛使用抗菌药物等,均与目前的一些慢性疾病如过敏性疾病、自身免疫疾病、代谢疾病和肿瘤的增加有关,菌群可能是这些环境因素与人体疾病的非常重要的关联者。我国目前正处于工业化和城市化的进程中,并且速度很快,伴随的以上疾病也逐年增加。运用微生态学理论、技术和知识,指导人群实行合理的现代生活方式和饮食或实施有效的菌群干预策略,避免重复发达国家一些疾病的增加,将是我们面临的挑战和机遇。

(四) 菌群及微生物组与各种疾病的关联性研究

微生物学的出现引起了医学观念上的重大转变,随着微生物学基础研究的不断深入,其理论和知识对人体健康和疾病的认识、对一些疾病发病机制的探索、以及对相关疾病的临床防治,不断进行更新,已经引起了全世界的高度关注。无论从传统的细菌培养技术及无菌动物和悉生动物技术、聚合酶链式反应技术(PCR)、指纹图谱技术、16SrRNA 靶探针技术,到最近的宏基因组技术,越来越多的研究显示,正常菌群在人体防御感染、调节免疫、调节代谢、参与营养物质消化和吸收、延缓衰老等方面发挥着不可替代的重要作用,菌群及微生物组的变化与许多疾病存在着关联性,这些疾病既涉及感染性疾病,又涉及非感染性疾病;既包括肠道疾病,又包括肠道外疾病。

肠道是人体菌群最主要和重要的定植场所,体内约 80%~90% 的菌群存在于肠道,目前的研究已经发现肠道菌群和微生物组的变化与肠道慢性炎症性疾病、结肠癌、过敏性疾病、自身免疫性关节炎和肥胖、糖尿病、高血脂等代谢性疾病的发生和发展密切相关。最近的研究还提示抑郁症和自闭症等神经系统患者也存在肠道微生物组的异常。

呼吸道菌群及微生物组的研究也取得了颠覆式的结果。既往认为声门以下的气管、支气管树(下气道)及肺是没有细菌定植的。随着支气管镜检查获取下呼吸道标本如支气管肺泡灌洗液(BALF)技术的普及和不依赖细菌培养的 16SrRNA 细菌基因测序技术的应用,越来越多的研究证实了在正常健康人的下呼吸道和肺部也有细菌定植,并且下呼吸道和肺的微生物组变化可能与哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化(CF)、肺炎、迁延性细菌性支气管炎、支气管扩张和肺结核等呼吸疾病有关联。

通过开展菌群及微生物组与各种疾病的关联性研究,将更深入地探讨疾病的发病机制、寻找疾病相关或特异性的标志物、寻找干预的新靶点,进一步提高临床诊断、治疗和预防水平。

(五) 益生菌的临床应用日益规范

随着菌群及微生物组与人类健康及疾病的关系日益受到重视,益生菌越来越得到了广大医生的认可与使用,其效果也越来越得到肯定,可以说益生菌的研制和应用是微生物学理论在临床实践中的最直接体现,一方面提高了一些疾病的防治水平,另一方面又极大地推动了微生物学的发展。益生菌作为一类新型药物,已经用于腹泻病、炎症性肠病、慢性肠炎、肝胆疾病、过敏性疾病等的防治,取得了确切的效果。由此而出现的微生物制药业蒸蒸日上,新的益生菌药物仍然在不断地涌现。与此同时,益生菌的临床应用日益规范,目前全世界已经制定了许多益生菌临床应用指南或共识,如世界胃肠组织(WGO)全球性指南《益生菌与益生元》(2011年)、Yale/Harvard 工作组《对益生菌的推荐共识》(2015年)、欧洲儿科胃肠肝与营养学委员会(ESPGHAN)《急性胃肠炎中益生菌应用立场性文件》(2014年)、世界过敏组织(WAO)McMaster 大学指南《过敏性疾病预防:益生菌》(2015年)等。我国自 2010 年起在第 9 版国家药典中,首次增加了“微生物活菌制品总论”一章,纳入了国内批准上市的 20 余种益生菌药物。中华预防医学会微生物学会儿科学组 2010 年制定的《微生物制剂儿科应用专家共识(2010 年 10 月)》是国内首个益生菌临床应用的共识,2016 年对该共识进行了更新,制定了《益生菌儿科临床应用循证指南》。中华预防医学会微生物学会也在 2016 年