

儿童孤独症谱系障碍患者的母亲肠道菌群组成特征及其对疾病预测价值的研究

徐玉兵¹, 刘兴晖², 张蜀豫³, 肖玲¹, 程雅婷⁴, 孟晓伟¹, 陈禹¹

(1. 上海金城医学检验所有限公司, 上海 201301; 2. 上海市浦东新区公利医院, 上海 200135; 3. 海军军医大学附属东方肝胆外科医院, 上海 200438; 4. 广州金城医学检验中心有限公司, 广州 510330)

摘要: 目的 研究孤独症谱系障碍 (Autism spectrum disorder, ASD) 儿童的母亲肠道菌群组成的特点, 基于微生物生态学方法发现具有早期 ASD 临床辅助诊断意义的生物标志物。方法 回顾性分析了 76 例 ASD 儿童的母亲和 47 例正常发育 (Typical development, TD) 儿童的母亲粪便中肠道菌群高通量测序数据。对数据进行质控、剪切、拼接和降噪, 得到扩增序列变异 (amplicon sequence variants, ASVs), 基于 ASVs 相对丰度的相关性建立具有生态学意义的 17 个丰度共变化群 (co-abundance groups, CAGs), 比较 ASD 儿童母亲和 TD 儿童母亲 CAGs 的差异, 判别两组人群的生物标志物。结果 基于 ASVs 相对丰度的相关性建立的 17 个 CAGs, 其中, CAG8 主要由属于 Bacteroides 的肠道细菌组成, CAG10 主要由属于 Collinsella 的肠道细菌组成, 而 CAG16 主要由属于 Erysipelotrichaceae 和 Lachnospiraceae 的肠道细菌组成。比较这些 CAGs 相对丰度的结果显示, ASD 儿童的母亲 CAG10 的相对丰度 (3.37 ± 0.76) 较 TD 儿童的母亲 (0.95 ± 0.25) 显著升高, 差异具有统计学意义 ($U=1\ 393$, $P=0.038$); 与 TD 儿童的母亲相比, ASD 儿童的母亲 CAG8 (7.27 ± 1.11 vs 12.98 ± 2.14) 和 CAG16 (0.7 ± 0.06 vs 1.37 ± 0.33) 显著降低, 差异具有统计学意义 ($U=1\ 252$ 和 $1\ 387$, $P=0.005$, 0.038)。基于这些变化的肠道细菌建立的肠道紊乱指数 (gut dysbiosis index, GDI) 具有区别 ASD 儿童的母亲和 TD 儿童的母亲的潜力, 当 GDI 以 -1.073 为阈值时, 其敏感度和特异度分别为 93.4% 和 80.9%。结论 ASD 儿童的母亲肠道细菌组成失调, 基于母亲的肠道菌群计算的生物标志物可用于 ASD 儿童的早期诊断。

关键词: 孤独症谱系障碍; 母源肠道菌群; 肠道紊乱指数; 丰度共变化组

中图分类号: R749.94; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 05-065-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.014

Characteristics of Maternal Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder and Its Predictive Value for This Disease

XU Yu-bing¹, LIU Xing-hui², ZHANG Shu-yu³, XIAO Ling¹, CHENG Ya-ting⁴, MENG Xiao-wei¹, CHEN Yu¹

(1. Shanghai Kingmed Diagnostics Co. LTD, Shanghai 201301, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Pudong Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 3. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 4. Guangzhou Kingmed Diagnostics Co. LTD, Guangzhou 510330, China)

Abstract: Objective To explore the gut microbial composition in mothers of children with autism spectrum disorder (ASD) based on biomarkers which had the significance of clinical auxiliary diagnosis of early ASD discovered by the microbial ecology method. **Methods** This study analyzed gut microbial composition in 76 mothers of children with ASD and 47 mothers of children with typical development (TD). The data of gut microbiota was calculated as amplicon sequence variants (ASVs) which were then clustered into 17 co-abundance groups (CAGs) with ecological significance based on the correlation of relative abundances of ASVs. Compared the differences of CAGs between ASD children's mothers and TD children's mothers, and identified the biomarkers of the two groups. **Results** 17 CAGs were established based on the correlation of the relative abundance of ASVs. Among them, CAG8 was mainly composed of intestinal bacteria belonging to Bacteroides, CAG10 was mainly composed of intestinal bacteria belonging to Collinsella, and CAG16 was mainly composed of intestinal bacteria belonging to Erysipelotrichaceae and lachno spiraceae. The relative abundance of CAG10 in mothers of children with ASD (3.37 ± 0.76) increased compared with mothers of children with TD (0.95 ± 0.25), and the difference was statistically significant ($U=1\ 393$, $P=0.038$). Compared with mothers of children with TD, CAG8 (7.27 ± 1.11 vs 12.98 ± 2.14) and CAG16

基金项目: 广州市科技计划项目 (201802010054), 上海市浦东新区卫生系统领先人才培养计划 (PWRI2018-05)。

作者简介: 徐玉兵 (1984-), 男, 本科, 中级检验师, 研究方向: 微生物相关临床检验技术, E-mail: sh-xuyubing@kingmed.com.cn。

通讯作者: 陈禹 (1988-), 男, 博士, 研究方向: 微生物相关临床检验技术, E-mail: sh-chenyu@kingmed.com.cn。

(0.7 ± 0.06 vs 1.37 ± 0.33) decreased in mothers of children with ASD, the differences were statistically significant respectively ($U=1\ 252, 1\ 387, P=0.005, 0.038$). Based on these changes, gut dysbiosis index (GDI) established by intestinal bacteria had the potential to distinguish the mothers of ASD children and TD children. When GDI takes -1.073 as the threshold, its sensitivity and specificity were 93.4% and 80.9% respectively. **Conclusion** The gut microbiota was altered in mothers of children with ASD. The biomarkers calculated by the alterations of maternal gut microbiota based on maternal gut microbiota based on microbiota may contribute to diagnose ASD children in early stage.

Keywords: autism spectrum disorder; maternal gut microbiota; gut dysbiosis index; co-abundance group

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一组精神发育障碍的统称,其核心临床表现为社交损伤、行为方式刻板 and 兴趣狭窄^[1]。来自世界各地的流行病学调查研究显示 ASD 发病率在 3 ~ 17 岁儿童中逐年升高^[2]。目前还不明确 ASD 的确切病因,肠道菌群作为环境因素之一可能与 ASD 的发生发展有关^[3-4]。母亲以多种方式将肠道菌群传递给子代,称为母源肠道菌群的垂直传递,这对子代菌群的建立非常关键。明确母源肠道菌群对子代的影响可能对 ASD 的早期诊断和早期干预具有重要意义。有研究显示,垂直传递不仅与传递方式有关,也与母亲自身的肠道菌群组成有关^[5]。

传统的研究肠道细菌的方法基于分类学地位,然而肠道细菌的功能具有菌株特异度^[6-7],这种研究方法可能将功能不同的细菌归为一类。实际上,人体的肠道微生物形成一个独特的生态环境,其中功能相似的细菌形成独特的功能团影响人体的健康。相对于传统的基于分类学地位的分析方法,基于微生物生态学的研究方法可能更准确地揭示肠道菌群与人类疾病的关系^[8]。

然而,目前利用生态学方法揭示 ASD 儿童母亲肠道菌群组成特征并且基于此特征发掘对 ASD 诊断具有临床意义的生物标志物的研究还非常缺乏。因此,本研究对已经公开的 ASD 儿童母亲(mothers of children with ASD, MA)和正常发育儿童母亲(mothers of children with typical development, MT)的肠道菌群数据,基于生态学的概念进行全新的分析,以期探究 ASD 儿童母亲的肠道菌群特征并且发现具有诊断意义的生物标志物。

1 材料和方法

1.1 研究对象 本研究回顾性分析了先前发表的研究中的 MA 和 MT 的肠道菌群(16S rRNA 基因 V3-V4 区)测序数据,其中 MA 组为 76 例,MT 组为 47 例^[9]。人群基础信息和分组信息见于已经发表的研究,此研究在中国临床试验注册中心注册,注册号为 ChiCTR- RPC-16008139。

1.2 方法

1.2.1 生成扩增序列变异: 人群肠道菌群测序数据下载于 NCBI 的 SRA (short read archive) 数据库,项目号为 PRJNA644763。利用 2022.02 版 QIIME2

(quantitative insights into microbial ecology) 软件进行生物信息处理,具体包括:①在 QIIME2 中导入 fastq.gz 文件;②依据文献中的描述切除 PCR 引物的序列信息;③质控序列信息;④利用 QIIME2 中的 DADA2 指令降噪;⑤基于重叠的长度不小于 20 的原则拼接序列,获得各个样本的扩增序列变异(amplicon sequence variants, ASVs) 丰度文件和代表序列文件;⑥将所有的样本的序列数均一化到 10 000,获得各个样本细菌的相对丰度;⑦在 SILVA 参考数据库(136 版)中注释 ASVs 的分类地位(80% 相似度)。

1.2.2 肠道细菌丰度共变化组的建立: 在软件 R (3.5.1 版)中,将 10% 以上 MA 和 MT 共有的 160 个 ASVs 划分为丰度共变化组(co-abundance groups, CAGs),包括如下步骤:①计算各个 ASVs 相对丰度的相关性(Spearman's 相关系数),得到 R 值矩阵;②利用软件 R (3.5.1 版)中的基因相关网络分析(weighted gene correlation network analysis, WGCNA)数据包,将 R 值矩阵作为 WGCNA 中的 TOM (topological overlap matrix),从而得到 dissTOM 矩阵;③基于 dissTOM 矩阵,利用 Ward.D2 算法建立聚类树,此树上 ASVs 距离越小表示其相对丰度变化越相似,基于此原理,计算 ASVs 之间的相似度值(β),当 β 值 ≥ 1 时,ASVs 被划分为同一个 CAG。单个 CAG 中不少于 5 个 ASVs (minClusterSize = 5)。除此之外,CAGs 中各个 ASVs 的相对丰度之和为此 CAG 的相对丰度。

1.2.3 肠道紊乱指数(Gut dysbiosis index, GDI)的计算: 基于先前的研究计算 GDI;

$$GDI = \frac{\sum CAGa}{A} - \frac{\sum CAGt}{T}$$

其中 $\sum CAGa$ 代表在 MA 中升高并且有统计学意义的 CAGs 相对丰度之和, $\sum CAGt$ 代表在 MA 中降低并且有统计学意义的 CAGs 相对丰度之和,A 代表在 MA 中升高并且有统计学意义的 CAGs 的数目,T 代表在 MA 中降低并且有统计学意义的 CAGs 的数目^[10]。

1.3 统计学分析 本研究所有的统计学分析均使用 SPSS 软件(IBM, version 26.0)完成。利用 Mann-Whitney U 检验分析 MA 和 MT 之间 CAGs 相对丰

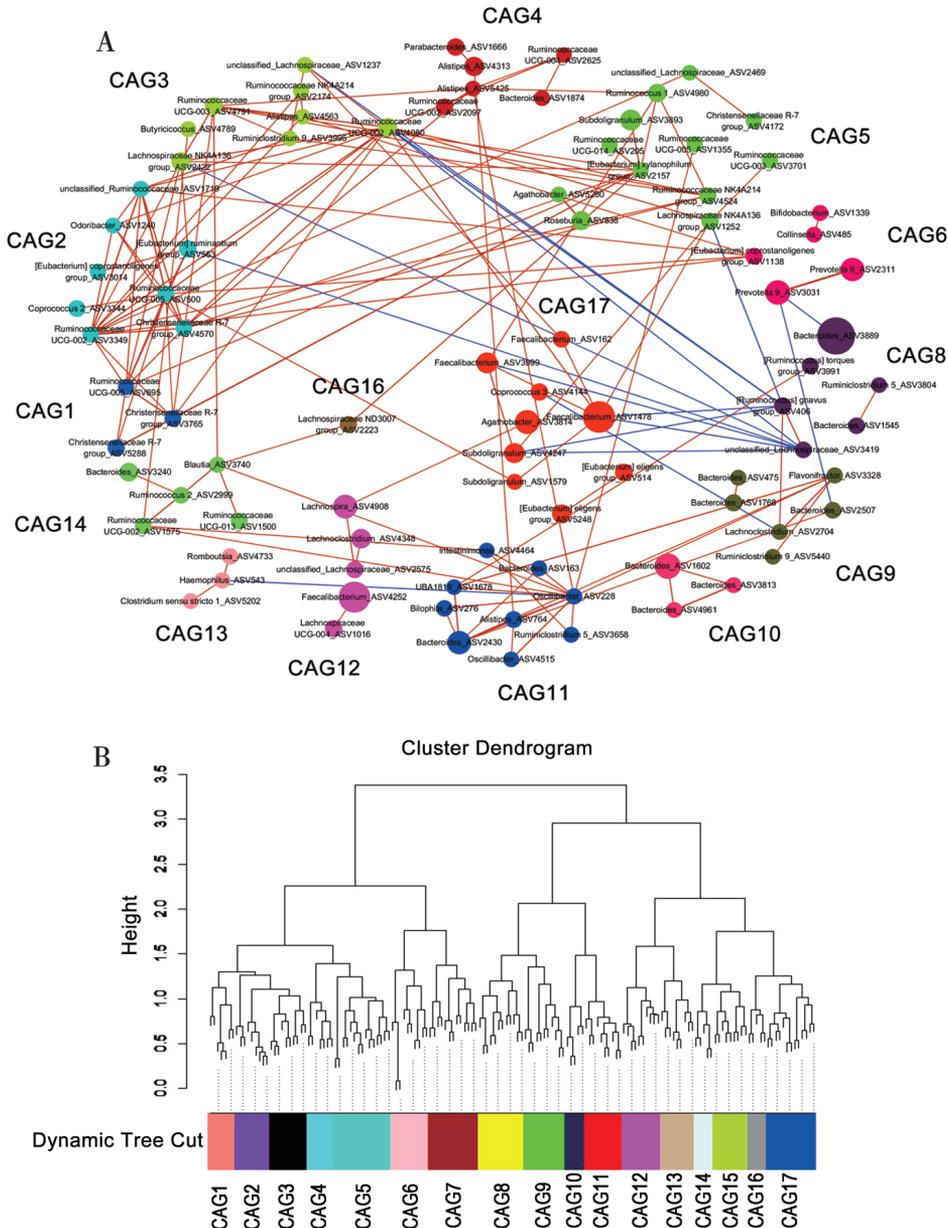
度的差异是否具有统计学意义。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用“leave-one-out”交叉验证检验 GDI 的受试者操作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 并且利用尤登系数计算模型阈值, 以及对应的敏感度和特异度。

2 结果

2.1 ASD 儿童母亲和 TD 儿童母亲肠道菌群组成比较 利用 QIIME2 对先前研究^[9]的 ASD 儿童母

亲 (76 例) 和 TD 儿童母亲 (47 例) 的粪便样本中菌群测序数据进行质控、拼接和降噪, 最后获得 2 725 224 高质量序列, 平均测序量为 221 563, 方差值为 40 636, 合计 3 620 个 ASVs。

为了基于微生物生态学的角度探究 ASD 儿童母亲相对于 TD 儿童母亲肠道菌群组成的特征性变化。利用 10% 以上 MA 和 MT 体内可以检测到的 160 个 ASVs 建立了丰度共变化网络, 基于此网络将这些 ASVs 划分为 17 个 CAGs, 见图 1A 和 1B。



A. 由 160 个 ASVs 构建的丰度共变化网络。节点的面积代表 ASVs 的平均丰度, 连接节点的线的宽度代表相关系数的绝对值, 红色的线代表它连接的 2 个节点正相关, 蓝色的线代表它连接的 2 个节点负相关。B. 基于 ASVs 之间的相对丰度相关系数, 160 个 ASVs 划分为 17 个肠道细菌 CAGs。MA: 76 例; MT: 47 例。

图 1 利用 10% 以上 MA 和 MT 共有的 160 个 ASVs 建立丰度共变化网络的 CAGs

利用曼 - 惠特尼 U 检验比较 MA 和 MT 的 CAGs 相对丰度, 发现 CAG8, CAG10 和 CAG16 在这二组间的差异具有统计学意义, 见表 1。

并且 CAG8 和 CAG16 的相对丰度在 MA 中降低, 而 CAG10 在 MA 中升高。CAG8 主要由属于 *Bacteroides* 的 ASVs 组成。CAG10 主要由属

于 *Collinsella* 的 ASVs 组成。CAG16 主要由属于 *Erysipelotrichaceae* 和 *Lachnospiraceae* 的 ASVs 组成, 见表 2。

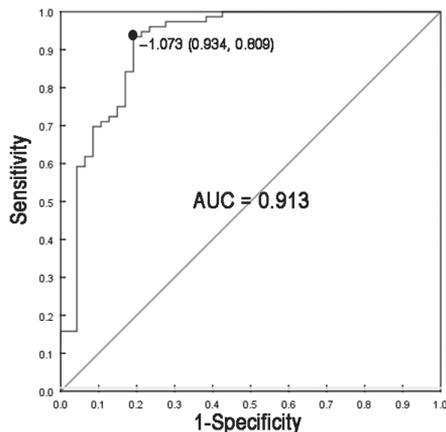
表 1 MA 和 MT 之间 CAGs 相对丰度的差异 ($\bar{x} \pm s$)

项目	MT (n=47)	MA (n=76)	U	P
CAG8	12.98 ± 2.14	7.27 ± 1.11	1 252	0.005
CAG10	0.95 ± 0.25	3.37 ± 0.76	1 393	0.038
CAG16	1.37 ± 0.33	0.7 ± 0.06	1 387	0.038

表 2 肠道细菌 CAG8, CAG10 和 CAG16 的组成

	Gut bacteria	Number of ASVs (n)	Relative abundance ($\bar{x} \pm s$) %
CAG8	<i>Bacteroides</i>	4	1.922 ± 0.357
	<i>Escherichia-Shigella</i>	1	0.69 ± 0.287
	<i>Lachnospiraceae</i>	4	0.213 ± 0.049
	<i>Ruminococcaceae</i>	2	0.022 ± 0.003
	<i>Parabacteroides</i>	1	0.18 ± 0.03
CAG10	<i>Collinsella</i>	3	0.73 ± 0.175
	<i>Lachnospiraceae</i>	2	0.13 ± 0.021
CAG16	<i>Erysipelotrichaceae</i>	1	0.258 ± 0.028
	<i>Lachnospiraceae</i>	3	0.218 ± 0.056
	<i>Alistipes</i>	1	0.048 ± 0.011

2.2 基于肠道菌群特征性变化计算的 GDI 具有区分 MA 和 MT 能力 见图 2。基于 CAG8, CAG10 和 CAG16 的相对丰度, 依据先前研究中 GDI 的计算方法^[10] 分别计算 MA 和 MT 的 GDI (2.66 ± 0.76 vs -6.22 ± 1.16)。以 GDI 和分组信息建立 ROC 模型, 经过“leave-one-out”交叉验证, 发现 ROC 模型的曲线下面积为 0.913 (95% 置信区间为: 0.864 ~ 0.971), 并且 $P < 0.01$, 表明模型具有区分 MA 和 MT 的潜能。基于尤登指数, 计算最佳阈值, 发现 GDI 为 -1.073 时, GDI 的敏感度为 0.934, 特异度为 0.809。



注: 利用“leave-one-out”交叉验证检验 GDI 的 ROC, 图中的点表示基于尤登检验得到的 GDI 的阈值, 以及对应的敏感度和特异度。AUC 表示 ROC 的曲线下面积。

图 2 基于 GDI 判别 MA 和 MT

3 讨论

人类不仅有“血脉”, 还有“菌脉”, 或者称之为母源肠道菌群垂直传递, 其途径包括胎盘途径、产道途径、母乳途径、皮肤接触等^[11]。母源肠道菌群垂直传递对子代肠道菌群的早期建立至关重要, 并且持续影响着子代肠道菌群的功能。母源肠道菌群垂直传递通过影响子代的肠道菌群组成间接调控子代能量代谢、神经系统发育等在内的多项生理过程。母源肠道菌群与包括精神发育障碍在内的多种疾病有关。CHEN 等^[9] 发现 ASD 儿童母亲肠道菌群整体结构、多样性和丰富度相比于 TD 儿童母亲无显著差异, 而儿童和母亲共有特定的肠道细菌与 ASD 的临床症状有关, 提示 ASD 儿童母源肠道菌群垂直传递可能发生了改变。

KIMURA 等^[12] 研究发现母亲肠道菌群的垂直传递的改变可能与子代罹患 ASD 有关, 而影响肠道菌群垂直传递的因素一方面包括传递途径, 比如生产方式、喂养方式等; 另一方面也包括母亲自身的菌群组成。本研究结合微生物生态学的研究方法发现相对于 TD 儿童母亲, 属于 *Collinsella* 的肠道细菌相对丰度升高、而属于 *Bacteroides*, *Erysipelotrichaceae* 的 *Lachnospiraceae* 的肠道细菌降低。而母体中 *Collinsella* 的升高或者 *Bacteroides* 和 *Lachnospiraceae* 的降低可能与子代罹患 ASD 的风险有关。*Collinsella* 中的成员可以使集体长期处于低水平的炎症反应中^[13], 而母孕期间的急性或者慢性炎症是子代罹患 ASD 的高风险因素之一。HSIAO 等^[14] 研究发现免疫激活母鼠 (immune activated mothers, MIA) 的子代相比于野生型小鼠子代表现出诸如社交损伤、刻板等 ASD 样行为症状和肠道慢性炎症, 将 *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 灌胃于 MIA 子代, 发现此菌株有效缓解了 MIA 子代 ASD 样行为症状, 显著降低了慢性炎症水平。属于 *Lachnospiraceae* 的很多肠道细菌成员可以产生短链脂肪酸, 如丁酸。一项研究发现, 丁酸可减轻小鼠胚胎、成纤维细胞和人胚肾 293 细胞中赖氨酸 23 中组蛋白 H3 的酰化缺陷。而这种缺陷是发育迟缓儿童的重要特征之一。因此, 丁酸可能缓解儿童的发育迟缓^[15]。这些研究表明本研究发现的特征性变化的母源肠道细菌可能在 ASD 的发展中扮演着角色。

在探究疾病与肠道微生物的关系时, 发现与特定的疾病症状具有相关关系甚至因果关系的特定成员至关重要。然而因为肠道细菌的复杂性和多样性, 肠道微生物组数据集具有高维度、稀疏的特点。此特征导致很难发现与特定临床症状密切相关的肠道细菌。因此一些分析方法用以降低微生物组数据集

的维度和稀疏性,如 Taxon-based 方法。虽然这些分析方法有效降低了数据集的维度和稀疏性,但是他们往往依赖于先前的经验,把具有不同功能的肠道细菌视为一类,从而导致研究结果不一致。然而,在人体肠道这个生态系统中,细菌之间很可能形成功能上互相联系的群体(Giuld),从而以相互关联的方式影响人类的生命活动。同一个 Giuld 中的成员表现出丰度共变化的特点,可以基于这种特点将肠道菌群进行降维和聚类,比如构建 CAGs^[8]。ZHAO 等^[16-17]的研究表明, Giuld-based 分析可能是更具有生态学意义的降低微生物组数据集维度的方法,基于此方法有可能找到在人类疾病中扮演着关键角色的肠道细菌。本研究不仅通过 Giuld-based 的分析方法发现了 ASD 儿童母亲肠道菌群的特征性变化,而且基于这些变化得到了判别 ASD 儿童母亲和 TD 儿童母亲的生物标志物。

本研究检测人群的粪便样本,样本便于保存和运输,并且为非侵入性检测项目,无安全隐患。但本研究也存在一定的不足,首先非多中心研究,生活习惯、饮食习惯等环境因素可能系统性干扰研究结果;其次样本量较小;再次本研究为回顾性研究。所以,未来可以开展多中心、更大人群的前瞻性研究,检验此指数预测子代罹患 ASD 风险的能力,为 ASD 的早期诊断提供临床指导。

综上所述,本研究明确了 ASD 儿童母亲肠道菌群特征,发掘了具有早期诊断 ASD 潜能的指标,这为未来肠道菌群运用于 ASD 临床诊疗提供了新的方向。

参考文献:

- [1] LORD C, BRUGHA T S, CHARMAN T, et al. Autism spectrum disorder[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1):5.
- [2] GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J].Lancet Psychiatry, 2022 ,9(2):137-150.
- [3] BUNDGAARD-NIELSEN C, KNUDSEN J, LEUTSCHER P, et al. Gut microbiota profiles of autism spectrum disorder and attention deficit/hyperactivity disorder: A systematic literature review.[J]. Gut Microbes,2020 ,11(5):1172-1187.
- [4] KUSHAK R I, SENGUPTA A, WINTER H S. Interactions between the intestinal microbiota and epigenome in individuals with autism spectrum disorder[J]. Developmental Medicine and Child Neurology, 2022, 64(3): 296-304.
- [5] MOELLER A H, SUZUKI T A, PHIFER-RIXEY M, et al. Transmission modes of the mammalian gut microbiota[J]. Science (New York, N.Y.), 2018, 362(6413): 453-457.
- [6] PAN Fengwei, ZHANG Liying, LI Min, et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 54.
- [7] JIANG Tianyi, WU Huan, YANG Xin, et al. *Lactobacillus mucosae* strain promoted by a High-Fiber Diet in genetic obese child alleviates lipid metabolism and modifies gut microbiota in ApoE(-/-) mice on a western Diet[J]. Microorganisms, 2020, 8(8): 1225.
- [8] WU Guojun, ZHAO Naisi, ZHANG Chenhong, et al. Guild-based analysis for understanding gut microbiome in human health and diseases[J]. Genome Medicine, 2021, 13(1): 22.
- [9] CHEN Yu, FANG Hui, LI Chunyan, et al. Gut bacteria shared by children and their mothers associate with developmental level and social deficits in autism spectrum disorder[J]. mSphere, 2020, 5(6): e01044-20.
- [10] WANG Jing, WANG Yang, ZHANG Xu, et al. Microbial dysbiosis is associated with altered hepatic functions and serum metabolites in chronic hepatitis B patients [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2222.
- [11] KORPELA K, DE VOS W M. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere [J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 44: 70-78.
- [12] KIMURA I, MIYAMOTO J, OHUE-KITANO R, et al. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice[J]. Science (New York, N.Y.), 2020, 367(6481): eaaw8429.
- [13] JAAGURA M, VIIARD E, KARU-LAVITS K, et al. Low-carbohydrate high-fat weight reduction diet induces changes in human gut microbiota[J]. MicrobiologyOpen, 2021, 10(3): e1194.
- [14] HSIAO E Y, MCBRIDE S W, HSIEN S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders[J]. Cell, 2013, 155(7): 1451-1463.
- [15] YAN Kezhi, ROUSSEAU J, MACHOL K, et al. Deficient histone H3 propionylation by BRPF1-KAT6 complexes in neurodevelopmental disorders and cancer[J]. Science Advances, 2020, 6(4): eaax0021.
- [16] ZHAO Liping, ZHANG Feng, DING Xiaoying, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes[J]. Science (New York, N.Y.), 2018, 359(6380): 1151-1156.
- [17] ZHANG Chenhong, YIN Aihua, LI Hongde, 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.

收稿日期: 2022-03-09

修回日期: 2022-05-06