DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20220108

肠道微生物代谢物功能筛选平台

李准多，孙辉*

（兰州大学第二医院，甘肃 兰州 730030）

【摘要】人类肠道微生物代谢物（Gut Microbial Metabolites，GMM）与人体的生理功能有着密切的联系，对这些小分子功能的探究是研究人员不断进行的课题。随着宏基因组学、代谢组学的发展，体内、体外以及离体模型的不断建立和改进，小分子功能筛选的平台也越来越多。本文主要介绍了一些常用的GMM功能筛选平台，并展望了在不久的将来可能在该领域运用的新技术。

【关键词】人类肠道微生物代谢物；筛选；模型；类器官

中图分类号：R-3，R333.3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2022）01-0058-04

Gut microbial metabolite functional screening platform

Li Zhunduo，Sun Hui*

（Second Hospital of Lanzhou University，Lanzhou 730030，Gansu，China）

【**Abstract**】Human gut microbial metabolites are closely related to the physiological functions of the human body, and the exploration of the functions of these small molecules is an ongoing topic for researchers. With the development of metagenomics and metabolomics, and the continuous establishment and improvement of in vivo, *in vitro* and *ex vivo* models, there are more and more platforms for small molecule functional screening. This paper mainly introduces some commonly used GMM functional screening platforms, and looks forward to new technologies that may be applied in this field in the near future.

【**Keywords**】GMM; Screen; Model; Organoids

在人类的身体中存在着包括细菌、真菌、病毒、古生菌和原生动物在内的多种微生物，它们的种类高达数千种，数量则以万亿计。研究表明，人类与细菌的细胞比约为1∶1~1∶1.3[1]，而肠道微生物基因组则比人类基因组高出数百倍[2]。因此可以这样说，人类肠道是一个巨大的、多样化的和动态的微生物群落的居住地。肠道微生物菌群这种丰富的生态系统可以发挥大量的生理功能，包括合成维生素、发酵食物、抵抗病原体、促进宿主免疫系统完善和维持肠道屏障功能等[3]。因此，肠道微生物在维持宿主生理和动态平衡方面发挥着重要作用。

在肠道微生物行使相关功能时，人类肠道微生物代谢物（Gut Microbial Metabolites，GMM）是宿主—微生物区系相互作用的关键因素。所以，GMM对宿主的健康和相关疾病的发生发展十分重要。在肠道中的微生物群能够产生各种各样的小分子代谢物，这些代谢物有的来自于外来的食物成分，有的来自于人体自身合成的化合物。人体肠道微生物群可以识别食物分子，将其转化为可在广泛的人体组织中检测到的代谢物，包括血液、尿液、粪便、肝脏和脑脊液等[4]。由于不同地域及种族的不同饮食和人群个体间差异性，微生物的代谢物也

收稿日期：2022-01-30；**修回日期**：2022-03-08

基金项目：国家自然科学基金（32070138；82060105）

通讯作者：孙　辉（1986-），男，山东潍坊人，博士生导师，主要从事免疫与微生物方面的研究。E-mail: sunhui@lzu.edu.cn

不尽相同[5]。值得注意的是，GMM和宿主之间的相互作用是复杂的，即使是同一种GMM，由于相关组织的代谢状态、饮食环境和代谢物的循环水平等因素的差异，对人体产生的效果也大不相同[6]。

在过去的十年中，二代测序的发展提高了我们对肠道微生物菌落的分辨能力。而代谢组学方法，比如常用的技术：核磁共振光谱、气相色谱-质谱（GC-MS）和液相色谱-质谱（LC-MS）的发展使得我们可以对样本中的各种小分子，包括碳水化合物、脂质、氨基酸、生物胺和许多其它有机酸进行广泛的鉴定[7]。为了研究GMM在人体生理学和病理学中的作用，已经有多种实验模型来概括GMM和人体之间的相互作用。本综述主要介绍目前常用的一些肠道微生物代谢物功能的筛选平台，并且将讨论已建立的体内和体外实验模型的优缺点以及相关应用。最后，我们讨论了最近发展的器官芯片（Organ-On-A-Chip，OOAC）。值得提出的是，随着生物技术的不断进步以及研究要求的不断提高，单独使用一个筛选平台的方式已不常见，大多数研究都采取了多平台相互验证的方式联合使用，以达到更好的效果。

1 二维细胞筛选平台

自20世纪初以来，二维（2D）细胞培养模式便在研究中发挥了重要作用[8]。传统的2D细胞培养通常附着在玻璃或聚苯乙烯的培养皿平面上，为细胞提供机械支撑。细胞在培养皿中获得培养基中的营养物质和生长因子，从而进行生长和增殖。2D组织培养系统的主要优点包括它的简单性和重复性，并能生成具有紧密连接屏障的完整单层上皮[9]。这一特点使得2D细胞培养模式深受研究人员的喜爱。这些体外模型可以在分子水平上对细胞机制进行简单和可重复性的研究，而这些研究在体内可能很难重复进行。比如在一项研究中，研究人员使用Caco-2和T84细胞来筛选改变上皮紧密连接和局部粘附形态的肠道微生物代谢物小分子，初步得到了一种肠道微生物代谢物——腐胺，它可以破坏结肠上皮组织的紧密连接[10]。

虽然2D细胞培养已被证明对基于细胞的研究是一种有价值的方法，但在研究过程中，研究人员也逐渐发现了它的不足之处：由于2D细胞培养没有充分考虑细胞的自然生长环境，在2D培养中生长的细胞通常比在活体中看起来更扁平。而2D培养中的异常细胞形态会影响许多细胞过程，包括细胞的增殖、分化、凋亡以及基因和蛋白质的表达[11]。同时，由于这个模型不能充分模拟活体微环境[12]，2D培养细胞和活体内的细胞有很大差异。因此，在2D细胞层面的筛选往往作为初步筛选，之后还需要到更加高级的平台，比如动物模型和类器官模型中进行验证[10]。

2 动物模型

从公元6世纪开始至今，动物模型在医学研究中已经持续应用了一千多年。动物模型在我们追求医学知识和减轻人类痛苦方面提供了宝贵的信息[13]。动物实验也对疫苗和抗生素的开发起到了不可替代的作用[14]。总的来讲，实验动物为现代医学的发展和进步做出了重大贡献。现如今，在GMM功能研究中常常使用到的主要是小鼠，比如在一项自闭症谱系障碍(Autism Spectrum Disorder，ASD)的研究中，使用小鼠模型验证了人类肠道微生物会诱导标志性的ASD行为[15]；在小鼠模型中进行了肠道微生物代谢产物三甲胺氮氧化物（Trimethylamine N-Oxide，TMAO）增强血小板高反应性和血栓风险的实验[16]；在微生物区系衍生的代谢物促进肠道中组蛋白脱乙酰化酶3（Histone Deacetylase3，HDAC3）活性的研究中发现，与无菌小鼠相比，微生物区系丰富的小鼠肠上皮细胞中的组蛋白脱乙酰化酶3活性显著增加[17]等。

当然，动物模型也有它的不足之处，因为动物模型属于完整的个体模型，但种属差异所带来的是细胞、遗传、免疫水平以及药代动力学等方面的巨大差异，很难从这些动物模型中来推断人体对药物的真实反应[18]。目前只有6%的动物试验能真正预测人体反应。药物失败的原因大部分是缺乏疗效，但也有部分是药物或其代谢物的毒副作用。就好比目前已经开发出100多种对抗类艾滋病毒的疫苗，这些疫苗在动物模型中已经证明有效，但是迄今为止，没有一种疫苗能在人体上得到应用。而在癌症研究中，将动物研究成功转化为人体临床试验的平均成功率约为8%[19]。其次，随着动物保护力度的加强，一些国家已经开始实行禁止利用动物进行实验。再者，动物模型比较昂贵，若要进行大量筛选，它的成本太高[20]。

3 离体模型

3.1 类器官（Organoids）模型

1975年，James Rheinwald和Howard Green开创了类器官领域的先河[21]，再到Clevers实验室2009年报告了在细胞外基质替代物中种植单个肠道干细胞，干细胞增殖形成复杂的三维组织结构，包含干细胞和各种分化的细胞类型[22]，最终开创了类器官领域。现在，越来越多的类器官模型得以构建，比如胃、肾、肝脏、胰腺、乳腺、和大脑等[23]。类器官细胞主要来源于两条途径，一是成体干细胞（Adult Stem Cells，ASCs），二是多能干细胞（Pluripotent Stem Cells，PSCs），而PSCs则包括了胚胎干细胞（Embryonic Stem Cells，ESCs）和对分化的细胞类型进行重新编程获得诱导的多能干细胞（induced Pluripotent Stem Cells，iPSCs）[24]。

与传统的2D单细胞培养模式相比，3D培养的类器官在基因和蛋白质表达、代谢功能和微观尺度组织结构等方面更接近人体器官。虽然动物模型最接近活体人类生理学，但它们受到多种变量的影响、可用性有限以及动物和人类生物学之间的差异等因素的限制[25]。而其他3D培养系统通常缺乏维持3D培养所需的相关干细胞或祖细胞群体，所以缺乏自我更新和分化的细胞。因此，类器官在药物筛选以及限制动物实验的需要中起到了很大的作用。而对于微生物代谢物筛选来讲，类器官也成为了越来越常见的筛选平台：比如通过建立小鼠小肠组织类器官模型，探讨铁沉积在小鼠小肠组织器官损伤中的作用，得出了小鼠小肠肠道微生物代谢产物通过激活瞬时受体电位香草酸亚型1（Transient Receptor Potential Vanilloid 1，TRPV1）抑制肠缺血再灌注诱导的铁下垂促进Gpx4的表达组织器官的铁沉积情况[26]。

当然，类器官也有他本身的不足之处。尽管现有的类器官模型已经能在一定程度上表达出人体器官的某一些功能，但由于类器官中缺乏关键的特化细胞、部分间充质以及血管化和微生物组，因此无法体现体内器官的复杂性，所以至今仍然没有一个类器官可以完全复刻某一器官的全部功能[27]。并且，由于类器官系统在培养中可以保持的时间有限，通常无法将ASCs分化为体内预期的全套分化细胞类型。而且随着类器官尺寸的增大，养分的供应和废物清除效率也会降低[28]。

3.2 器官芯片

器官芯片是一种通过微芯片制造方法制造的微流体细胞培养设备。该设备包含连续灌注腔室，具有多细胞层结构、组织界面、物理化学微环境以及人体血管循环，是可模拟和重构人体器官生理功能的细胞培养微工程设备[29]。器官芯片是多研究领域融合的结果，一套完整的器官芯片体系，涉及微流控、组织工程、微电子、干细胞、检测技术等多项技术。该技术具有极大潜力，可促进组织发育学、器官生理学和疾病病因学的研究。器官芯片对于研究分子作用机理、药物候选者的优先次序、毒性测试和生物标志物鉴定特别有价值[30]。

器官芯片系统在人体生理研究方面比动物或体外细胞培养更加接近人体。它可以模拟器官之间的化学信号和代谢物交换，从而发现药物潜在治疗效果与副反应。虽然现在在GMM中运用的很少，但是器官芯片已经应用在了诸多领域，比如药物开发[31]、癌症和免疫器官建模[32]、女性生殖系统研究[33]、血管生物学研究[34]等，相信在不久的将来，器官芯片在GMM领域的应用也会很广泛。

4 总结与展望

在目前的肠道微生物代谢物功能探索的研究中，无论是经典的2D细胞培养平台，还是动物模型或者离体组织培养模型，都有着各自的优势与局限。比如2D细胞模型易于重复与构建但与人体真实环境差异很大，动物模型与人体相对接近但涉及成本及伦理问题，离体模型虽然在一定程度上可以代替动物模型但相关技术还需发展。因此研究人员在使用上述这些平台的时候往往都是联合使用，利用它们的优势，弥补它们的劣势。

目前看来，类器官与器官芯片技术的结合，即类器官芯片是筛选平台未来的发展大趋势。通过使用诱导的iPSCs，可在芯片上建立各种各样的类器官病理模型，并在体外模拟和重现。类器官芯片可以实现对药物药效和毒性进行更有效、更真实的检测，也可用于个体化治疗。由于类器官可以由人类iPSCs直接培养生成，相比于动物模型，会在很大程度上避免因动物和人类细胞间的差异而导致的检测结果不一致性，相信类器官芯片技术日后将会在我们的研究中发挥巨大的作用。

综上所述，目前的研究模型越来越多，我们应该选取适合自己研究的平台进行研究。同时应该不

断完善现有的生物学技术，发展新的实验技术，构建更加满足研究需求的筛选平台，使筛选平台做到更精确、更精准、更简便。

参 考 文 献

[1] SENDER R, FUCHS S, MILO R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans[J]. Cell, 2016, 164(3): 337-340.

[2] TIERNEY B T, YANG Z, LUBER J M, et al. The landscape of genetic content in the gut and oral human microbiome [J]. Cell Host Microbe, 2019, 26(2): 283-295.e8.

[3] ALAM A, NEISH A. Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function[J]. Tissue Barriers, 2018, 6(3): 1539595.

[4] KRISHNAN S, DING Y F, SAEDI N. et al. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages [J]. Cell Rep, 2018, 23(4): 1099-1111 .

[5] JHA A R, DAVENPORT E R, GAUTAM Y, et al. Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya[J]. PLoS Biol, 2018, 16(11): e2005396.

[6] DEVLIN A S, MARCOBAL A, DODD D, et al. Modulation of a circulating uremic solute via rational genetic manipulation of the gut microbiota[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(6): 709-715.

[7] ZHANG A H, SUN H, WANG P, et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis[J]. Analyst, 2012, 137(2): 293-300.

[8] FERREIRA L P, GASPAR V M, MANO J F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-advances and prospects[J]. Acta Biomater, 2018, (75): 11-34.

[9] EDMONDSON R, BROGLIE J J, ADCOCK A F, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors [J]. Assay Drug Dev Technol, 2014, 12(4): 207-218.

[10] GROSHEVA I, ZHENG D P, LEVY M, et al. High-throughput screen identifies host and microbiota regulators of intestinal barrier function[J]. Gastroenterology, 2020, 159(5): 1807-1823.

[11] TIBBITT M W, ANSETH K S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 103(4): 655-663.

[12] HUH D, HAMILTON G A, INGBER D E. From 3D cell culture to organs-on-chips[J]. Trends Cell Biol, 2011, 21 (12): 745-754.

[13] ROBINSON N B, KRIEGER K, KHAN F M, et al. The current state of animal models in research: a review[J]. Int J Surg, 2019, 72: 9-13.

[14] LOEB J M, HENDEE W R , SMITH S J, et al. Human vs animal rights. In defense of animal research[J]. JAMA, 1989, 262(19): 2716-2720.

[15] SHARON G, CRUZ N J, KANG D W, et al. Human gut microbiota from Autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice[J]. Cell, 2019, 177(6): 1600-1618.e17.

[16] ZHU W F, GREGORY J C, ORG E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. Cell, 2016, 165(1): 111-124.

[17] WU S E, HASHIMOTO-HILL S, WOO V, et al. Microbiota-derived metabolite promotes HDAC3 activity in the gut[J]. Nature, 2020, 586(7827): 108-112.

[18] HALL E D, YONKERS P A, MCCALL J M, et al. Effects of the 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice[J]. J Neurosurg, 1988, 68(3): 456-461.

[19] MAK I W, EVANIEW N, GHERT M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment[J]. Am J Trans Res, 2014, 6(2): 114-118.

[20] FERDOWSIAN H R, GLUCK J P. The ethical challenges of animal research[J]. Camb Q Healthc Ethics, 2015, 24 (4): 391-406.

[21] RHEINWALD J, GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes in defined clonal and serum-free culture[J]. J Invest Dermatol, 1975, 6: 331-344.

[22] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids[J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-1597.

[23] MCCAULEY H A, WELLS J M. Pluripotent stem cellderived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish[J]. Development, 2017, 144(6): 958-962.

[24] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids[J]. Nat Rev Mater, 2021, 6(5): 402-420.

[25] SHANKS N, GREEK R, GREEK J. Are animal models predictive for humans? [J]. Philos Ethics Humanit Med, 2009, 4: 2.

[26] DENG F, ZHAO B C, YANG X, et al. The gut microbiota metabolite capsiate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-21.

[27] YIN X L, MEAD B E, SAFAEE H, et al. Engineering stem cell organoids[J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(1): 25-38.

[28] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as

（下转第74页）