

· 研究报告 ·

尹业师 博士，湖南科技学院教授/研究员，湖南科技学院化学与生物工程学院副院长，湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室主任。主持国家自然科学基金、国家 863 计划子课题和湖南省自然科学基金杰出青年基金等科研项目；以主要作者身份在 *ISME J*、*Appl Environ Microbiol*、*Mol Microbiol*、*Front Microbiol*、*FEMS Microbiol Ecol* 等期刊发表论文 100 余篇；以第一发明人获得中国发明专利授权 6 项。兼任湖南省微生物学会常务理事、湖南省生物化学与分子生物学学会理事、中华医学会消化病学分会微生态组委员。



人体肠道 4 644 株代表菌次级代谢产物生物合成基因簇挖掘与耐药及毒力基因分析

尹业师¹，陈浒¹，张美红²，曹林艳¹，陈华海¹

- 1 湖南科技学院 化学与生物工程学院 湖南南岭地区植物资源研究开发湖南省工程研究中心 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室，湖南 永州 425199
- 2 中国农业大学 动物科学技术学院 动物营养学国家重点实验室，北京 100193

尹业师，陈浒，张美红，曹林艳，陈华海. 人体肠道 4 644 株代表菌次级代谢产物生物合成基因簇挖掘与耐药及毒力基因分析. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3682-3694.

YIN YS, CHEN H, ZHANG MH, CAO LY, CHEN HH. Mining of gene clusters for biosynthesis of secondary metabolites and analysis of genes encoding antibiotic resistance and virulence in 4 644 representative human gut strains. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3682-3694.

摘要：为了更好地从肠道微生物组中挖掘新的次级代谢产物、了解肠道微生物组编码的抗生素耐药基因和毒力因子情况，本研究基于 4 644 株人体肠道微生物代表菌的基因组序列，对其编码的次级代谢产物基因簇、抗生素耐药基因和毒力因子进行了预测分析。经 antiSMASH 预测分析发现，超过 60% 的代表菌编码至少 1 个次级代谢产物基因簇，并从 8 个未可培养菌中发现了 8 个潜在的新颖次级代谢产物基因簇。人体肠道中的次级代谢产物主要由梭菌纲 (Clostridia)、芽孢杆菌纲

Received: March 21, 2022; **Accepted:** June 22, 2022; **Published online:** June 27, 2022

Supported by: Distinguished Young Scholars of Hunan Natural Science Foundation (2020JJ2016); NSFC—Regional Innovation and Development Joint Fund (U21A20411)

Corresponding authors: YIN Yesi. Tel/Fax: +86-746-6381164; E-mail: yinyeshi@huse.edu.cn

CHEN Huahai. Tel/Fax: +86-746-6381164; E-mail: chenhuahai@huse.edu.cn

基金项目：湖南省自然科学基金杰出青年基金 (2020JJ2016)；国家自然科学基金区域创新发展联合基金 (U21A20411)

(Bacilli)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、放线菌纲 (Actinobacteria) 和厚壁菌纲 (Negativicutes) 6 类细菌编码的非核糖体多肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS)、细菌素、芳基多烯类化合物、萜烯、 β -丙内酯、NRPS-样蛋白组成。经 PathoFact 预测分析发现, 抗生素耐药基因和毒力因子在代表性菌株中分布广泛, 但潜在病原菌编码频率更高。潜在病原菌中编码外膜蛋白、PapC N-端结构域、PapC C-端结构域、肽酶 M16 失活结构域等分泌型毒素和硝基还原酶家族、AcrB/AcrD/AcrF 家族、PLD-样结构域、Cupin 结构域、假定溶血素、S24-样肽酶、磷酸转移酶家族、内切核酸酶/外切核酸酶/磷酸酶家族、乙二醛酶/博莱霉素抗性等非分泌型毒素的频率较高。该研究将为进一步从肠道微生物组中挖掘新的微生物天然产物、了解肠道微生物的定殖与感染机制, 为肠道微生物相关疾病提供靶向防治策略等奠定基础。

关键词: 肠道菌群; 代表性菌株; 次级代谢产物; 抗生素耐药基因; 毒力因子

Mining of gene clusters for biosynthesis of secondary metabolites and analysis of genes encoding antibiotic resistance and virulence in 4 644 representative human gut strains

YIN Yesi¹, CHEN Hu¹, ZHANG Meihong², CAO Linyan¹, CHEN Huahai¹

¹ Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Hunan Nanling Plant Resources Research and Development Hunan Engineering Research Center, College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China

² State Key Laboratory of Animal Nutrition, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Genome sequences of 4 644 representative strains from human gut microbiota were analyzed to mine gene clusters for biosynthesis of novel secondary metabolites, as well as genes encoding antibiotic resistance and virulence factors. AntiSMASH analysis showed that more than 60% of the representative strains encoded at least one secondary metabolite gene cluster, and 8 potential novel secondary metabolite gene clusters were identified from 8 unculturable bacteria. The secondary metabolite gene clusters in human intestine are mainly composed of nonribosomal peptide synthetase (NRPS), bacteriocin, arylpolyene, terpene, betalactone and NRPS like gene clusters distributed in Clostridia, Bacilli, Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria and Negativicutes. PathoFact analysis showed that genes encoding antibiotic resistance and virulence factors are widely distributed in representative strains, but the frequency encoded by potential pathogens is significantly higher than that of non-potential pathogens. The frequency of genes encoding secretory toxins such as outer membrane protein, PapC N-terminal domain, PapC C-terminal domain, peptidase M16 inactive domain, and non-secretory toxins such as nitroreductase family, AcrB/AcrD/AcrF family, PLD-like domain, Cupin domain, putative hemolysin, S24-like peptidase, phosphotransferase enzyme family, endonuclease/exonuclease/ phosphatase family, glyoxalase/ bleomycin resistance was high in potential pathogens.

This study may facilitate mining new microbial natural products from the intestinal microbiome, understanding the colonization and infection mechanism of intestinal microorganisms, and providing targeted prevention and treatment of intestinal microbial related diseases.

Keywords: gut microbiota; representative strains; secondary metabolites; antibiotic resistance gene; virulence factors

天然产物,尤其是微生物次级代谢产物一直是药物先导化合物的重要来源。在过去几十年,超过一半的新型小分子药物来源于微生物天然产物。微生物天然产物具有巨大的结构和化学多样性及各种各样的生物特性。然而,值得注意的是无法培养菌株和沉默基因簇等所带来的限制越来越大,传统自上而下的筛选方法发现新的微生物天然产物变得越来越困难。采用先进的分析方法并以生物信息学分析为指导的自下而上的靶向筛选方法为前所未有的规模化解锁微生物代谢组提供了一种有希望的替代方法^[1]。哺乳动物肠道中居住着大量微生物,人体肠道微生物组编码的基因数量是人类基因组所编码基因数量的 400 多倍^[2],这将是一个挖掘候选新药的重要资源宝库^[3]。

人体肠道菌群大多数为共生微生物。它们有助于人体宿主的基本功能和生理发育。相反,少部分病原微生物可以通过表达毒力因子,微调宿主反应,从而有效感染宿主并导致疾病。毒力因子是在细胞水平上帮助细菌定殖宿主的分子,包括分泌性的、膜相关的和细胞质性的。分泌因子是细菌武器库的重要组成部分,帮助细菌逃脱宿主体内的先天性和适应性免疫反应。膜相关毒力因子有助于细菌粘附和逃避宿主排斥。胞质因子促进细菌快速适应代谢、生理和形态变化^[4]。因此,对毒力因子的研究不仅可以更好地了解病原微生物的感染和致病机制,也可以作为疾病防治的重要靶标。但到目前为止,除了对大肠杆菌^[5]和结核分枝杆菌^[4]

等常见病原菌的毒力因子有较系统的研究外,肠道中丰富多样的微生物所编码毒力因子的种类和功能还有待进一步研究。

随着抗生素的过度使用和滥用,全球抗生素耐药性日趋严重,许多致病菌对主要类别的抗生素均产生了耐药,导致无法治疗的感染急剧增加,从而出现了所谓的“超级细菌”。因此,抗生素耐药对公共卫生构成了紧迫且日益严重的威胁。多重耐药细菌的出现和传播严重威胁着人类健康。估计到 2050 年,每年由抗生素耐药引起的死亡人数将超过 1 000 万^[6]。人体肠道微生物是一个抗生素耐药基因混合池,分析和研究肠道微生物组编码的耐药基因情况,将为更好认识耐药基因的流行情况及指导抗生素有效使用提供参考。

随着测序技术的不断发展和生物信息学分析方法的不断更新,科学家们可以不受微生物体外培养的限制,更好地认识和分析肠道菌群组成。为了建立一个统一的人类肠道微生物基因组非冗余数据集,Almeida 等收集了大量从人类胃肠道分离获得的细菌基因组序列和人体肠道微生物宏基因组数据,通过拼接和筛选获得了 286 997 个肠道微生物参考基因组^[7]。为了进一步确定肠道微生物参考基因组数据库中包含多少物种,Almeida 等使用基于距离的多步法对所有基因组进行了聚类,在至少 30%的对齐分数,平均核苷酸同一性 (average nucleotide identity, ANI) 大于 95%的分析标准下,共鉴定到 4 644 个原核物种 (4 616 种细菌和 28 种古

菌)^[7]。人体肠道微生物代表性菌株的获得将更好地认识肠道菌群及简化生物信息学分析奠定基础。本研究将基于这 4 644 个代表性菌株的基因组信息对其编码次级代谢产物情况、编码抗生素耐药基因情况和编码毒力因子情况进行预测分析。

1 材料与方法

1.1 材料

从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 下载人体肠道微生物 4 644 株代表性菌株^[7]的基因组序列。

1.2 基因组注释

在标准模式下使用快速原核基因组注释工具 (Prokka v1.14.6) 对基因组序列进行注释^[8]。

1.3 次级代谢产物生物合成基因簇预测

结合基因组注释文件,使用基因组次级代谢产物分析工具 antiSMASH v6.0.0 (其数据库已更新到最新版 antiSMASH database v3) 进行基因簇编码基因预测^[9]。经 antiSMASH 分析,从注释结果中提取次级代谢产物合成基因簇核心基因蛋白质序列,用于后续序列相似性比对分析。使用比对搜索工具 BLASTP 将基因簇中的核心基因蛋白质序列与 NCBI 中的非冗余蛋白序列数据库 (non-redundant) 进行序列比对,以一致性 30%为阈值对对比结果进行筛选和分类。

1.4 潜在新次级代谢产物生物合成基因簇鉴定

在核心基因相似性分析基础上,对核心基因蛋白质序列相似性低于 30%的基因簇,使用在线版 antiSMASH (V6.0.0) 对其整个生物合成基因簇与 antiSMASH 数据库 (v3) 和 MIBiG 标准数据库进行基因簇相似性比对,进一步筛

选相似性均少于 30%的基因簇被认定为潜在的新生物合成基因簇。

1.5 毒力因子预测

使用最新发布的 PathoFact (v1.0) 对抗生素耐药基因、毒素和毒力因子进行预测分析^[10]。

1.6 Circos 图绘制

使用 R 软件 circlize 安装包对代表性菌株与耐药基因型之间的数量关系进行 Circos 图绘制。

2 结果与分析

2.1 4 644 株代表菌的分类与组成分析

4 644 株代表菌有 20 株属于尚未被分类的新细菌门,其他 4 624 株分布在 15 个已知的细菌门和 1 个古菌门,其中 54%的代表菌株分布在厚壁菌门 (Firmicutes),其他菌株分布较多的细菌门分别为放线菌门 (Actinobacteria) (18%)、拟杆菌门 (Bacteroidia) (13%) 和变形菌门 (Proteobacteria) (10%)。在细菌属的水平,3 033 株代表菌被注释到 319 个细菌属,其他 1 611 个代表菌株未能在细菌属水平进行分类。含量较高的 10 个细菌属分别为柯林斯氏菌属 (*Collinsella*, 580 株代表菌)、梭菌属 (*Clostridium*, 273 株代表菌)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*, 126 株代表菌)、拟杆菌属 (*Bacteroides*, 107 株代表菌)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*, 67 株代表菌)、另枝杆菌属 (*Alistipes*, 66 株代表菌)、优杆菌属 (*Eubacterium*, 65 株代表菌)、链球菌属 (*Streptococcus*, 55 株代表菌)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 54 株代表菌) 和萨特氏菌属 (*Sutterella*, 43 株代表菌)。在细菌种的水平,只有约 20%的代表菌株 (933 株) 被注释到 734 个细菌种,其中分布到产气柯林斯菌 (*Collinsella aerofaciens*)、简明弯曲菌 (*Campylobacter concisus*) 和普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 的菌株数较多,分别为 61 株、12 株

和 10 株。根据 Almeida 等的分析发现, 894 株代表菌的基因组序列与人肠道来源的可培养菌具有大于 95% 的同源性, 3 312 株仍属于尚未可培养细菌^[7]。

为进一步鉴定 4 644 代表菌株中哪些可能是具有传染性的病原微生物, 参照中华人民共和国国家卫生健康委员会官网发布的“人间传染的病原微生物目录 (征求意见稿)” (<http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s3590/202112/94fcc4480ea2403e9c51c641645d6c20.shtml>), 从被注释到的 734 种细菌中检测到 50 种 80 个代表菌株为潜在的病原微生物。包括鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、短螺旋体属 (*Brachyspira*)、大肠弯曲菌 (*Campylobacter coli*)、胎儿弯曲菌 (*Campylobacter fetus*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、艰难梭菌 (*Clostridioides difficile*)、肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、纹带棒杆菌 (*Corynebacterium striatum*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、侵蚀艾肯菌 (*Eikenella corrodens*)、产气肠杆菌/阴沟肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes/Enterobacter cloacae*)、肠杆菌 (*Enterobacter spp.*)、坏死梭杆菌 (*Fusobacterium necrophorum*)、阴道嗜血杆菌 (*Gardnerella vaginalis*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、其他分枝杆菌 (other *Mycobacterium species*)、索氏梭菌

(*Paeniclostridium sordellii*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、厌氧消化链球菌 (*Peptostreptococcus anaerobius*)、类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)、普雷沃氏菌 (*Prevotella spp.*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、彭氏变形菌 (*Proteus penneri*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、产碱普罗威登斯菌 (*Providencia alcalifaciens*)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、链球菌 (*Streptococcus spp.*)、非霍乱弧菌 (non-cholerae *Vibrio spp.*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、分枝结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*)。“人间传染的病原微生物目录”将病原微生物按危害程度由高到低分为第四类、第三类、第二类、第一类, 除 *Mycobacterium tuberculosis*、*Vibrio cholerae*、*Yersinia pestis* 属于第三类外, 其他肠道代表菌中潜在的传染性病原微生物均属于第二类。

2.2 4 644 株代表菌编码的次级代谢产物分析

使用 antiSMASH 预测分析发现, 4 644 株代表菌中有 2 800 株含有至少 1 个编码次级代谢产物的基因簇, 共预测到 5 766 个基因簇。其中 24 株代表菌的基因组中预测发现含有 10 个及以上编码次级代谢产物的基因簇 (表 1)。在细菌门的水平, 厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门

(Verrucomicrobia) 编码较多次级代谢产物基因簇, 分别预测到 3 793、1 109、363、308 和 139 条编码次级代谢产物的基因簇。在细菌纲的水平, 梭菌纲 (Clostridia)、芽孢杆菌纲 (Bacilli)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、放线菌纲 (Actinobacteria)、厚壁菌纲 (Negativicutes)、 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 分别编码 2 559、818、744、350、255、170、157、111 条基因簇。从代谢产物类型来看, 分别有 1 210、898、587、481、390、337、291、257、224、206 条基因簇编码塞克肽类、非核糖体多肽合酶、细菌素、芳基多烯类化合物、萜烯、 β -丙内酯、NRPS-like、内酯类自诱导剂、羊毛硫肽

化合物、III型聚酮合酶等次级代谢产物。具体肠道菌群在纲水平与微生物编码的次级代谢产物类型之间的对应关系如图 1 所示。肠道古菌编码的次级代谢产物生物合成基因簇数量较少。肠道细菌编码的次级代谢产物生物合成基因簇主要由梭菌纲 (Clostridia)、芽孢杆菌纲 (Bacilli)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、放线菌纲 (Actinobacteria) 和厚壁菌纲 (Negativicutes) 6 类细菌编码的非核糖体多肽合酶、细菌素、芳基多烯类化合物、萜烯、 β -丙内酯、NRPS-样酶组成。

对预测发现的基因簇进一步进行核心基因的 BLASTp 同源性比对分析发现, 有 9 条基因簇的核心基因其同源性与数据库中已有基因的

表 1 含有 10 个以上基因簇的代表菌株名称和可培养情况

Table 1 Name and culturability of representative strains containing more than 10 gene clusters

Species representative	Taxonomy	Status	Cluster No.
GUT_GENOME239690	s_ <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Cultured (human gut)	24
GUT_GENOME140361	s_ <i>Mycobacterium avium</i>	Cultured (human gut)	23
GUT_GENOME001364	s_ <i>Bacillus sonorensis</i>	Cultured (human gut)	20
GUT_GENOME096381	g_ <i>Streptomyces</i>	Cultured (human gut)	20
GUT_GENOME143709	s_ <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	Cultured (human gut)	20
GUT_GENOME143383	s_ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultured (human gut)	17
GUT_GENOME141727	s_ <i>Bacillus wiedmannii</i>	Cultured (human gut)	16
GUT_GENOME000711	s_ <i>Bacillus paralicheniformis</i>	Cultured (human gut)	15
GUT_GENOME207869	g_ <i>Bradyrhizobium</i>	Cultured (unknown)	15
GUT_GENOME000031	s_ <i>Bacillus subtilis</i>	Cultured (human gut)	14
GUT_GENOME000295	s_ <i>Roseburia intestinalis</i>	Cultured (human gut)	14
GUT_GENOME095592	g_ <i>Pseudomonas</i>	Cultured (unknown)	14
GUT_GENOME096372	g_ <i>Paenibacillus</i>	Cultured (human gut)	14
GUT_GENOME141763	s_ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cultured (human gut)	14
GUT_GENOME171359	g_ <i>Paenibacillus</i>	Uncultured	14
GUT_GENOME200288	s_ <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Cultured (unknown)	14
GUT_GENOME001578	g_ <i>Clostridium</i>	Cultured (human gut)	12
GUT_GENOME243082	g_ <i>Bradyrhizobium</i>	Cultured (unknown)	12
GUT_GENOME001770	s_ <i>Roseburia inulinivorans</i>	Cultured (human gut)	11
GUT_GENOME096513	s_ <i>Paenibacillus ihumii</i>	Cultured (human gut)	11
GUT_GENOME141425	s_ <i>Serratia marcescens</i>	Cultured (human gut)	11
GUT_GENOME213384	s_ <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	Cultured (unknown)	11
GUT_GENOME096393	s_ <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	Cultured (human gut)	10
GUT_GENOME232192	g_ <i>Serratia</i>	Cultured (human)	10

氨基酸序列同源性低于 30%，推测可能编码新颖次级代谢产物。在整个基因簇的水平再次进行同源性分析发现，除代表菌株 GUT_GENOME157951 编码的羊毛硫肽化合物基因簇与优杆菌 (*Eubacteriaceae bacterium*) NZ_CABIWW01000011 具有

大于 30%的同源性外，其他 8 条基因簇均与已知基因簇的同源性低于 30%。从表 2 可以看出，这 9 条基因簇除了 GUT_GENOME187394 曾从未知环境中分离获得过培养菌外，其他 8 株菌仍属于未被分离培养的微生物。

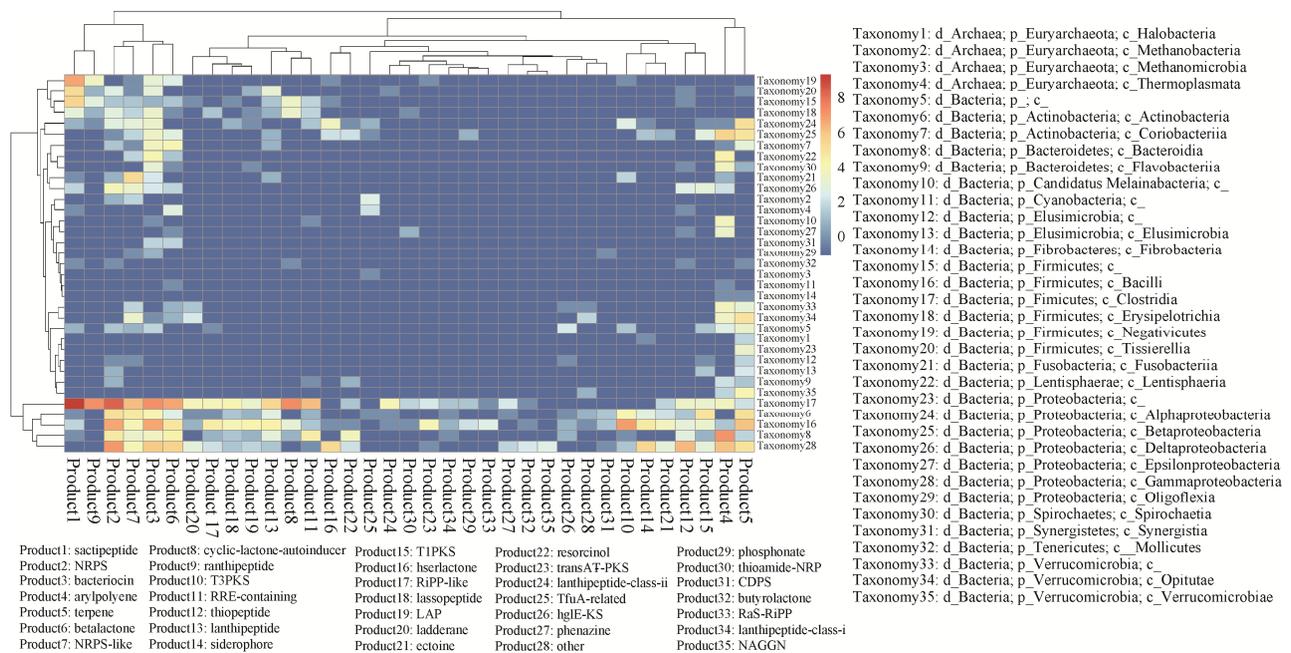


图 1 4 644 株代表菌可能产生的次级代谢产物预测与分析

Figure 1 Prediction and analysis of secondary metabolites that might be produced by 4 644 representative strains.

表 2 潜在的可能产生新颖次级代谢产物的代表性菌株信息

Table 2 Information of representative strains that might produce potential new secondary metabolites

No.	Cluster length (bp)	Code genes	Product	Species representative	Taxonomy	Status
Cluster 1	9 873	6	NRPS	GUT_GENOME064659	f_Lachnospiraceae	Uncultured
Cluster 2	57 398	38	NRPS/T1PKS /NRPS-like	GUT_GENOME104570	f_Ruminococcaceae	Uncultured
Cluster 3	24 204	35	NRPS	GUT_GENOME112856	g_Prevotella	Uncultured
Cluster 4	19 673	10	NRPS/NRPS-like	GUT_GENOME121457	g_Eubacterium	Uncultured
Cluster 5	22 228	25	Ranthipeptide	GUT_GENOME157951	o_Clostridiales	Uncultured
Cluster 6	22 908	23	Lanthipeptide	GUT_GENOME187394	s_Peptoniphilus lacydonensis	Cultured (unknown)
Cluster 7	26 044	20	NRPS	GUT_GENOME233270	f_Lachnospiraceae	Uncultured
Cluster 8	2 071	2	NRPS	GUT_GENOME233276	f_Porphyrimonadaceae	Uncultured
Cluster 9	5 584	8	Other: LmbU	GUT_GENOME234141	f_Akkermansiaceae	Uncultured

2.3 4 644 株代表菌编码的抗生素耐药基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 分布情况

使用 PathoFact 整合的抗生素耐药基因预测功能对 4 644 株代表性菌株编码的抗生素耐药基因进行分析。结果发现所有 4 644 株肠道代表菌共编码 30 675 个 ARGs, 平均每个代表菌株编码 6–7 个 ARGs, 被分类到 31 个抗生素耐药基因型。图 2 展示了各代表菌株所编码的抗生素耐药基因型与细菌分类之间的对应关系。28 个代表性古菌共编码 16 个 ARGs, 平均每个菌编码 ARGs 的概率较低; 81 个潜在的传染性病原微生物共编码 4 213 个 ARGs, 平均每个细菌编码 50–51 个 ARGs, 编码 ARGs 的概率较高; 其他 4 535 个代表菌

株共编码 26 446 个 ARGs, 平均每个细菌编码 5–6 个 ARGs, 编码 ARG 的概率较潜在的传染性病原微生物低 10 倍。如表 3 所示, 每个潜在病原菌编码的多重耐药、多肽、 β -内酰胺、氨基糖苷类 ARGs 数量较多, 潜在病原菌中每个细菌平均编码四烯霉素、氨基香豆素、氨基糖苷 (氨基香豆素)、艾法霉素、磺胺、抗菌游离脂肪酸的 ARGs 数量比非病原菌高 20 倍以上。

2.4 4 644 株代表菌编码的毒力因子和毒素分布情况

使用 PathoFact 对 4 644 株代表性细菌编码的毒力因子和毒素进行分析。如图 3 所示, 所有 4 644 个菌株编码的参考基因数量差异较大, 最少的只编码 425 个参考基因, 最多的编码

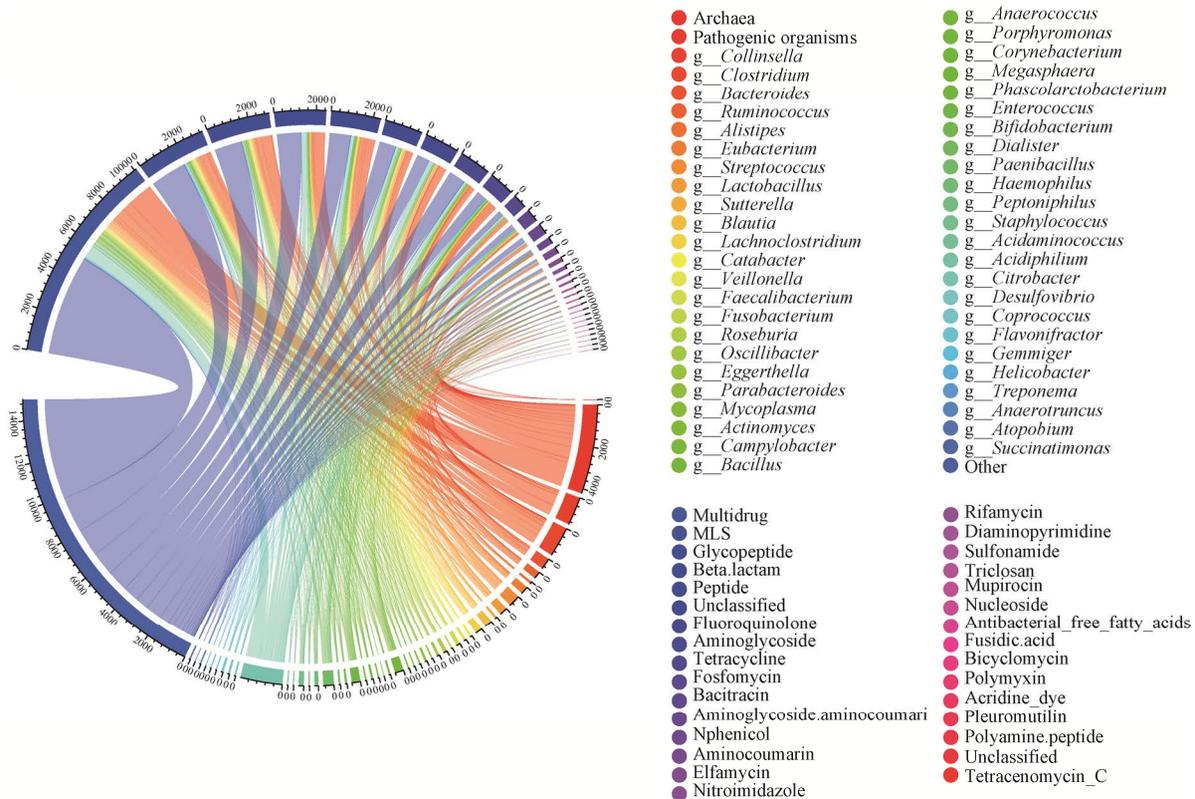


图 2 代表菌株编码的抗生素耐药基因分布情况

Figure 2 The prevalence of different resistance gene categories within the representative species.

表3 平均每个细菌基因组编码的抗生素耐药基因统计表

Table 3 Statistics of antibiotic resistance genes encoded by each bacterial genome on average

Type of antibiotic resistant genes	Non-pathogen	Pathogen	Pathogen/non-pathogen
Multidrug	1.95	15.60	8.01
Peptide	0.43	7.06	16.42
β -lactam	0.42	4.96	11.95
Aminoglycoside	0.28	4.91	17.52
Unclassified	0.34	3.06	8.95
Fuoroquinolone	0.27	2.80	10.24
MLS	0.70	2.20	3.16
Aminoglycoside: aminocoumarin	0.08	2.10	27.83
Bacitracin	0.12	1.90	15.82
Tetracycline	0.23	1.88	8.04
Aminocoumarin	0.04	1.47	35.25
Elfamycin	0.03	0.78	26.13
Fosfomycin	0.12	0.78	6.63
Phenicol	0.06	0.67	11.58
Glycopeptide	0.65	0.58	0.89
Nitroimidazole	0.03	0.46	16.84
Sulfonamide	0.01	0.26	22.61
Triclosan	0.01	0.12	13.02
Diaminopyrimidine	0.02	0.12	6.51
Rifamycin	0.02	0.11	5.48
Antibacterial free fatty acids	0.00	0.06	21.53
Nucleoside	0.01	0.05	5.21
Mupirocin	0.01	0.02	2.80
Tetracenomycin_C	0	0.01	55.99
Bicyclomycin	0	0.01	8.00
Polymyxin	0	0.01	8.00
Fusidic-acid	0	0.01	7.00
Acridine_dye	0	0	0
Pleuromutilin	0	0	0
Polyamine: peptide	0	0	0

9 054 个参考基因, 平均每个菌株编码 2 154 个基因。其中平均 5.26%、12.24%和 49.34%的基因分别编码分泌型毒力因子、非分泌型毒力因子和潜在毒力因子。

所有 4 644 个肠道代表菌株共编码 56 096 个分泌型毒素 (211 个毒素类型) 和 156 446 个非分泌型毒素 (302 个毒素类型), 平均每个代表菌株编码 12 个分泌型毒素和 34 个非分

泌型毒素。81 个潜在传染性病原微生物共编码 8 359 个分泌型毒素 (平均每个细菌编码 103 个) 和 10 899 非分泌型毒素 (平均每个细菌编码 135 个)。4 535 个非病原菌共编码 47 674 个分泌型毒素 (平均每个细菌编码 11 个) 和 144 914 非分泌型毒素 (平均每个细菌编码 32 个), 编码分泌型毒素和非分泌型毒素的概率均明显低于潜在传染性病原微生物。如表 4 所

示, 平均每个潜在传染性病原微生物中编码 5 个以上外膜蛋白、PapC N 端结构域、PapC C 端结构域、肽酶 M16 非活性结构域等分泌型毒素。尽管潜在传染性病原微生物编码的非分泌型毒素的数量平均只是非病原菌的 4 倍左右, 但如表 5 所示, 平均每个潜在传染性病原微生物编码 5 个以上硝基还原酶家族、AcrB/AcrD/AcrF 家族、PLD 样结构域、Cupin 结构域、假定溶血素、肽酶 S24 样蛋白、磷酸转移酶家族、核酸内切酶/核酸外切酶/磷酸酶家族、乙二醛酶/博莱霉素抗性等非分泌型毒素。值得注意的是, 在分泌型毒素中, 尽管每个非病原菌编码的外膜蛋白基因簇数量明显比潜在病原菌低, 但每个

非病原菌可以编码约 2 个外膜蛋白基因簇。在非分泌型毒素中, 虽然非病原菌与潜在病原菌之间的差异比分泌型毒素小, 但每个非病原菌基因组序列中预测到可以编码约 2 个肽酶 S24 样蛋白和 3 个硝基还原酶家族基因。

3 讨论

虽然已有多个研究团队对人体肠道微生物进行了培养组学研究^[11-14], 但基因组同源性分析表明, 从人体肠道中拼接获得的 4 644 株代表菌仍有 71% 属于未可培养菌^[7]。尽管高通量测序和大数据生物信息学分析为我们认识肠道菌群的功能及其与疾病的相关性创造了条件。

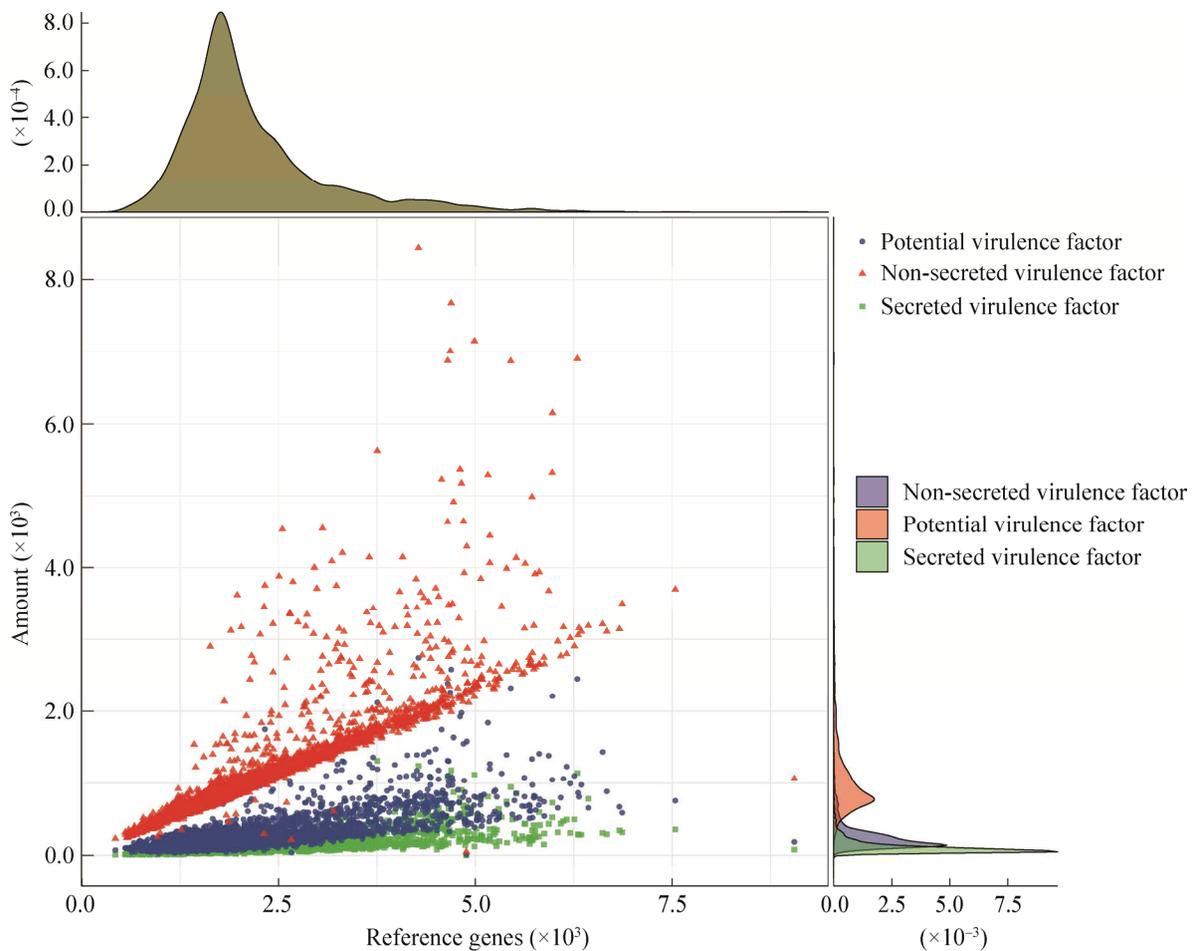


图 3 代表菌株参考基因数目和编码毒力因子数量

Figure 3 Number of reference genes and virulence factors encoded in the representative strains.

表 4 平均每个细菌基因组中编码 2 个以上分泌型毒素的统计表

Table 4 Statistics of secretory toxins (more than 2 encoded in each bacterial genome on average)

Secretory toxins	Non-pathogen	Pathogen	Pathogen / non-pathogen
AcrB/AcrD/AcrF family	0.45	3.25	7.14
Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase family	0.43	3.05	7.07
Gram-negative porin	0.21	3.31	15.50
Hyaluronoglucosaminidase	0.31	3.07	9.83
Insulinase	0.30	4.90	16.07
Outer membrane protein	1.77	14.91	8.44
PapC C-terminal domain	0.15	6.20	41.27
PapC N-terminal domain	0.17	7.20	41.63
Peptidase C10 family	0.16	3.51	22.24
Peptidase M16 inactive domain	0.35	5.25	15.01
Presequence protease	0.30	4.35	14.56
Sialidase-1	0.21	2.07	9.90
Streptopain	0.26	6.65	26.04

表 5 平均每个细菌基因组中编码 2 个以上非分泌型毒素的统计表

Table 5 Statistics of non-secretory toxins (more than 2 encoded in each bacterial genome on average)

Non-secretory toxins	Non-pathogen	Pathogen	Pathogen/non-pathogen
Nitroreductase family	2.85	9.95	3.50
AcrB/AcrD/AcrF family	1.35	9.62	7.15
PLD-like domain	1.54	7.99	5.17
Cupin domain	1.67	7.70	4.62
putative hemolysin	1.25	6.56	5.25
Peptidase S24-like	2.31	6.52	2.82
Phosphotransferase enzyme family	1.53	6.43	4.20
Endonuclease/exonuclease/phosphatase family	1.28	6.28	4.92
Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase superfamily	1.02	5.73	5.63
Peptidase M16 inactive domain	1.43	3.22	2.26
UDP-glucose 4-epimerase C-term subunit	0.92	2.80	3.04
Presequence protease	1.01	2.77	2.74
Insulinase (peptidase family M16)	0.75	2.68	3.55
Insecticidal toxin complex protein TccC	0.17	2.57	14.74
Hemolysin III	0.63	2.07	3.31

但最近 Tierney 等使用数百万种不同的关联建模策略,评估了肠道菌群-疾病关联的一致性,涉及 6 种疾病、15 个队列和 2 343 名个体^[15]。很多情况下,对于同一个分类群-疾病的配对,不同的建模产生了相互矛盾的关联结果。大量潜在的混杂因素(如测序深度、血糖水平、胆固醇、身体质量指数等)和 DNA 提取方法、生

物信息学分析流程等均可能影响菌群关联研究的结果^[15]。通过与“人间传染的病原微生物目录”比对,在 4 644 株代表菌中找到 81 株是潜在传染性微生物,但也很难排除其他条件致病菌和非传染性病原微生物。因此,分离培养与疾病相关菌株,并遵从“科赫法则”,对其在疾病发生发展中的作用进行验证十分必要。目前已

经基本公认, 人体肠道菌群分为拟杆菌肠型、普雷沃氏菌肠型和瘤胃球菌肠型, 拟杆菌和普雷沃氏菌是人体肠道中的优势菌群^[16-17]。但分析发现, 柯林斯氏菌 (*Collinsella*) 和梭菌 (*Clostridium*) 的菌株多样性高于拟杆菌和普雷沃氏菌, 其生物学意义尚有待进一步研究。

肠道菌群是一个有待挖掘的资源宝库, 其编码的蛋白质、酶、多肽和合成的次级代谢产物等具有非常重要的生理功能^[18-20]。最近, 中国科学院微生物研究所王军团队与陈义华团队合作, 使用人工智能方法从人体肠道微生物组数据中挖掘出了 181 个新型抗菌肽, 其中 10 多种新型抗菌肽在体内外对多重耐药菌表现出较好的抑制作用^[21]。本研究从未培养菌中预测到了 8 个与次级代谢产物基因簇同源性低于 30% 的基因簇, 主要编码 NRPS。通过细菌分离和合成生物学异源表达等进一步对这些次级代谢产物进行分离和鉴定, 将为发现新型 NRPS 提供指导。另外, 肠道菌群也参与饮食代谢, 其转化代谢的产物对维持宿主健康具有非常重要的作用。越来越多的证据表明, 肠道微生物衍生代谢产物氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO) 在许多疾病的发病机制中起着至关重要的作用, 可以作为多种心血管疾病的预后生物标志物^[22]。由于肠道环境中代谢网络的复杂性, 肠道微生物自身分泌的次级代谢产物及参与代谢产生的代谢产物还有待进一步研究。

抗生素耐药已经成为全球关注的公共卫生问题, 肠道中由于微生物数量多, 接触抗生素的频率较高, 已被认为是抗生素耐药基因产生和传播的重要混合池^[23-25]。而且抗生素耐药基因不仅会影响细菌的耐药性, 也可能与疾病的发生发展相关。最近研究报道, 肠道抗生素抗性组的结构在健康人、糖尿病前期和 2 型糖尿病患者中存在显著差异, 抗生素抗性组的多样

性与 2 型糖尿病的发生发展呈正相关^[26]。通过对人体肠道 4 644 株代表菌株的耐药基因进行预测发现, 古菌编码的耐药基因较少, 潜在传染性病原微生物编码的耐药基因明显高于非传染性病原微生物, 这也是导致目前临床上需要开发新型抗生素来对抗耐药病原菌的重要原因之一。同时, 这些数据也暗示我们, 通过监测抗生素耐药基因的丰度也可能在一定程度上反映病原微生物的数量。

毒力因子顾名思义与致病性有较大关联, 它有助于致病微生物能够在宿主生态位定居, 最终导致组织损伤以及局部和全身炎症。这些因素对病原体建立感染很重要, 从而直接或间接地影响疾病进程^[27]。尽管科学家们对病原微生物的毒力因子已关注较多, 但对非病原微生物及人体肠道菌群毒力因子的认识和研究还有待进一步加强。本研究对人体肠道 4 644 株代表菌株编码的毒力因子和毒素进行了较全面的分析和统计, 结果发现平均每个代表菌株编码 12 个分泌型毒素和 34 个非分泌型毒素。虽然对分泌型毒素研究相对较多, 在致病过程中可能发挥更直接的作用, 但对非分泌型毒素的功能研究还有待进一步加强。尽管在潜在传染性病原微生物基因组中能预测到更多的编码毒素的基因, 但有些非传染性病原微生物中也能预测到较多的毒素编码基因。这些非病原微生物编码的毒素基因是否与正常肠道菌群促进免疫系统发育成熟和调控免疫平衡等有关仍有待进一步研究。

总之, 通过对人体肠道中 4 644 株代表菌进行分析发现, 人体肠道中 70% 以上的菌株仍属于未可培养菌, 尽管拟杆菌属和普雷沃氏菌属细菌在人体肠道中含量较高, 但柯林斯氏菌 (*Collinsella*) 和梭菌 (*Clostridium*) 可能具有更丰富的多样性。超过 60% 的代表菌株编码至少 1 个次级代谢产物基因簇, 并从 8 个未可培养菌

中鉴定到了 8 个与已有基因簇同源性低于 30% 的潜在新颖次级代谢产物基因簇。抗生素耐药基因和毒力因子在代表性菌株中分布广泛, 但潜在在传染性病原微生物编码的抗生素耐药基因和毒力因子频率显著高于非传染性病原微生物。

REFERENCES

- [1] Sukmarini L. Recent advances in discovery of lead structures from microbial natural products: genomics- and metabolomics-guided acceleration. *Molecules*, 2021, 26(9): 2542.
- [2] Li JH, Jia HJ, Cai XH, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(8): 834-841.
- [3] Kalkreuter E, Pan GH, Cepeda AJ, et al. Targeting bacterial genomes for natural product discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(1): 13-26.
- [4] Sharma AK, Dhasmana N, Dubey N, et al. Bacterial virulence factors: secreted for survival. *Indian J Microbiol*, 2017, 57(1): 1-10.
- [5] Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: a review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9922.
- [6] 尹业师, 陈华海, 曹林艳, 等. 细菌耐药性应对策略研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1346-1360.
Yin YS, Chen HH, Cao LY, et al. Progress in strategies to combat antimicrobial resistance. *Chin J Biotech*, 2018, 34(8): 1346-1360 (in Chinese).
- [7] Almeida A, Nayfach S, Boland M, et al. A unified catalog of 204, 938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 105-114.
- [8] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [9] Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, et al. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [10] De Nies L, Lopes S, Busi SB, et al. PathoFact: a pipeline for the prediction of virulence factors and antimicrobial resistance genes in metagenomic data. *Microbiome*, 2021, 9(1): 49.
- [11] Traoré SI, Bilen M, Cadoret F, et al. Study of human gastrointestinal microbiota by culturomics in Africa. *Med Sante Trop*, 2019, 29(4): 366-370.
- [12] Forster SC, Kumar N, Anonye BO, et al. A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(2): 186-192.
- [13] Zou YQ, Xue WB, Luo GW, et al. 1 520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(2): 179-185.
- [14] Raymond F, Boissinot M, Ouameur AA, et al. Culture-enriched human gut microbiomes reveal core and accessory resistance genes. *Microbiome*, 2019, 7(1): 56.
- [15] Tierney BT, Tan YX, Yang Z, et al. Systematically assessing microbiome-disease associations identifies drivers of inconsistency in metagenomic research. *PLoS Biol*, 2022, 20(3): e3001556.
- [16] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS*, 2010, 107(33): 14691-14696.
- [17] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473(7346): 174-180.
- [18] Jia BL, Han X, Kim KH, et al. Discovery and mining of enzymes from the human gut microbiome. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(2): 240-254.
- [19] Wang LL, Ravichandran V, Yin YL, et al. Natural products from mammalian gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(5): 492-504.
- [20] Bhattarai K, Bhattarai K, Baral B. Next-generation microbial drugs developed from microbiome's natural products. *Adv Genet*, 2021, 108: 341-382.
- [21] Ma Y, Guo ZY, Xia BB, et al. Identification of antimicrobial peptides from the human gut microbiome using deep learning. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(6): 921-931.
- [22] Huang R, Yan L, Lei YH. The gut microbial-derived metabolite trimethylamine N-oxide and atrial fibrillation: relationships, mechanisms, and therapeutic strategies. *Clin Interv Aging*, 2021, 16: 1975-1986.
- [23] Hu YF, Yang X, Qin JJ, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun*, 2013, 4: 2151.
- [24] Hu YF, Yang X, Li J, et al. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(22): 6672-6681.
- [25] Hu YF, Gao GF, Zhu BL. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Front Med*, 2017, 11(2): 161-168.
- [26] Shuai ML, Zhang GQ, Zeng FF, et al. Human gut antibiotic resistome and progression of diabetes. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(11): e2104965.
- [27] Wu HJ, Wang AHJ, Jennings MP. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(1): 93-101.

(本文责编 郝丽芳)