



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114949001 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 30

(21) 申请号 202210623110.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013.08.28

A61K 35/74 (2015.01)

(30) 优先权数据

A61K 35/741 (2015.01)

61/694,679 2012.08.29 US

A23L 33/135 (2016.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 1/10 (2006.01)

201380056909.2 2013.08.28

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(71) 申请人 加州理工学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伊莲·萧

萨尔基斯·K·马兹曼尼恩

保罗·H·帕特森

萨拉·麦克布莱德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

权利要求书2页 说明书38页

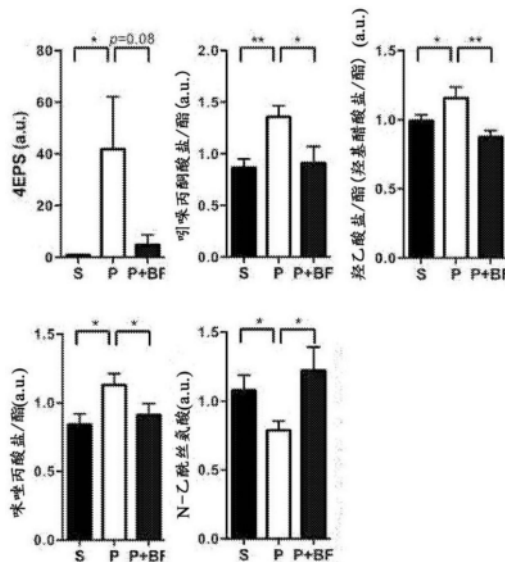
序列表2页 附图38页

(54) 发明名称

孤独症谱系障碍的诊断和治疗

(57) 摘要

本申请涉及孤独症谱系障碍的诊断和治疗。本文公开了用于诊断和治疗罹患焦虑、孤独症谱系障碍(ASD)、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况的受试者的组合物、系统、和方法。



1. 一种包含拟杆菌属 (*Bacteroides*) 细菌的组合物, 用于在改善受试者的行为表现的治疗中使用, 其中所述拟杆菌属细菌为脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*)、多形拟杆菌 (*B. thetaiotaomicron*)、普通拟杆菌 (*B. vulgatus*)、或其混合物,

其中所述受试者罹患孤独症谱系障碍 (ASD), 并且

其中需要治疗的所述受试者中4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯 (4EPS) 的血液水平相对于未罹患ASD的受试者的血液中观察到的4EPS的血液水平增加,

所述使用包括通过施用所述组合物减少需要治疗的所述受试者中4EPS的血液水平, 直到观察到所述受试者中ASD的至少一种或更多种症状上的缺陷的修正。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述拟杆菌属细菌为多形拟杆菌。

3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述拟杆菌属细菌为脆弱拟杆菌。

4. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述拟杆菌属细菌为普通拟杆菌。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物, 其中所述组合物为益生菌组合物、营养制品、药物组合物、或其混合物。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的组合物, 其中减少4EPS的血液水平改善需要治疗的所述受试者的胃肠 (GI) 不适, 或降低需要治疗的所述受试者的肠通透性。

7. 根据权利要求6所述的组合物, 其中所述GI不适包括腹部绞痛、慢性腹泻、便秘、肠通透性、或其组合。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物, 还包括在体外确定非ASD受试者中4EPS的参考水平、在减少需要治疗的所述受试者中4EPS的血液水平之前和之后确定需要治疗的所述受试者的行为表现, 或二者。

9. 根据权利要求8所述的组合物, 其中确定需要治疗的所述受试者的行为表现包括使用孤独症行为量表 (ABC)、孤独症诊断访谈量表-修订版 (ADI-R)、儿童孤独症评定量表 (CARS)、和/或语言前期孤独症诊断观察方案 (PL-ADOS)。

10. 一种包含拟杆菌属细菌的组合物, 用于在改善受试者的行为表现的治疗中使用, 其中所述拟杆菌属细菌为脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、普通拟杆菌、或其混合物,

其中所述受试者罹患ASD, 并且

其中需要治疗的所述受试者中4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯 (4EPS) 的尿液水平相对于未罹患ASD的受试者中观察到的所述4EPS的尿液水平增加,

所述使用包括通过施用所述组合物减少所述受试者中4EPS的尿液水平, 直到观察到所述受试者中ASD的至少一种或更多种症状上的缺陷的修正。

11. 一种包含拟杆菌属细菌的益生菌组合物, 用于在调节罹患孤独症谱系障碍 (ASD) 并对益生菌治疗敏感的受试者的肠道微生物群中使用, 其中所述拟杆菌属细菌选自脆弱拟杆菌、多形拟杆菌和普通拟杆菌、或其混合物组成的组, 所述使用包括:

确定所述受试者中4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯的血液水平;

将所述受试者中4EPS的血液水平与罹患ASD和一种或更多种胃肠紊乱的受试者中4EPS的参考水平比较, 其中所述受试者中4EPS的血液水平与所述参考水平之间的基本一致指示所述受试者对所述益生菌治疗敏感; 以及

施用所述益生菌组合物以调节所述受试者的肠道微生物群的组成。

12. 根据权利要求11所述的益生菌组合物, 其中所述拟杆菌属细菌为多形拟杆菌。

13. 根据权利要求11所述的益生菌组合物,其中所述拟杆菌属细菌为脆弱拟杆菌。
14. 根据权利要求11所述的益生菌组合物,其中所述拟杆菌属细菌为普通拟杆菌。

孤独症谱系障碍的诊断和治疗

[0001] 本申请是申请日为2013年08月28日,申请号为201380056909.2,发明名称为“孤独症谱系障碍的诊断和治疗”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2012年8月29日提交的美国临时申请号61/694,679的优先权,本文明确地通过引用将其全文并入。

[0004] 对序列列表的参考

[0005] 本发明连同电子格式的序列列表一起提交。序列列表作为于2013年8月28日生成的标题为SEQLISTING.TXT的文件提供,其大小为4Kb。通过引用以序列列表的电子格式的信息将其全部并入本文。

发明领域

[0006] 本申请大体上涉及孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD) 的诊断和治疗的领域。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 孤独症谱系障碍 (ASD) 是严重的神经发育障碍,以刻板行为和语言及社交方面的缺失为特征。到2008年为止报道的在美国的孤独症的发生率已快速增长到88个新生儿中就有1个 (CDC, 2012), 代表着在未来数十年中不可忽视的医疗和社会负担。用于ASD的可复制的分子诊断还未被开发并且用于治疗ASD的核心症状的疗法是有限的, 并且可复制的分子诊断还未被开发。对于孤独症谱系障碍 (ASD) 的很多研究集中在疾病的遗传、行为和神经学方面, 但是最近在ASD的发病机理中环境风险因素 (Hallmayer等人, 2011)、免疫失调和另外的外周破坏的主要作用已得到重点关注。在有相同的诊断的个体间的显著异质性与对于ASD有多种病因的普遍概念相符。此外, ASD症状的谱系和在区别具体原因、治疗和分子生物标志物上的挑战强调了对更好的限定ASD的临床亚型以及对ASD个体的亚类提供量身定做的治疗的需求。

[0009] 概述

[0010] 本文公开的一些实施方案涉及用于改善受试者的行为表现的方法, 其中该方法包括: 确定需要治疗的受试者中的孤独症谱系障碍 (ASD) 相关代谢物的血液水平; 以及调节所述受试者中的所述ASD相关代谢物的血液水平直到观察到所述受试者的行为表现方面的改善。

[0011] 在一些实施方案中, 受试者罹患焦虑、孤独症谱系障碍 (ASD)、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况。在一些实施方案中, 受试者罹患ASD。

[0012] 在一些实施方案中, 调节ASD相关代谢物的血液水平包括调节受试者的肠道微生物群的组成。在一些实施方案中, 调节受试者的肠道微生物群的组成包括粪移植。在一些实施方案中, 调节受试者的肠道微生物群的组成包括对受试者施用包含拟杆菌属 (Bacteroides) 细菌的组合物。在一些实施方案中, 拟杆菌属 (Bacteroides) 细菌为脆弱拟杆菌 (B. fragilis)、多形拟杆菌 (B. thetaiotaomicron)、普通拟杆菌 (B. vulgatus)、或其混

合物。

[0013] 在一些实施方案中,组合物为益生菌组合物、营养制品(neutraceutical)、药物组合物、或其混合物。

[0014] 在一些实施方案中,调节受试者的肠道微生物群的组成包括降低受试者中的梭菌纲(Clostridia)细菌的水平。在一些实施方案中,所述梭菌纲(Clostridia)细菌为毛螺菌科(Lachnospiraceae)。在一些实施方案中,调节受试者的肠道微生物群的组成包括增加受试者中的瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、丹毒丝菌科(Erysipelotrichaceae)、和/或产碱杆菌科(Alcaligenaceae)细菌的水平。

[0015] 在一些实施方案中,ASD相关代谢物为在表1中列出的代谢物中的一种。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为参与色氨酸代谢的代谢物、参与脂肪酸代谢的代谢物、参与嘌呤代谢的代谢物、羟乙酸盐或羟乙酸酯、咪唑丙酸盐或咪唑丙酸酯、或N-乙酰丝氨酸。在一些实施方案中,参与色氨酸代谢的代谢物为4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯、吲哚丙酮酸盐或吲哚丙酮酸酯、吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸、或血清素。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯、吲哚丙酮酸盐或吲哚丙酮酸酯、羟乙酸盐或羟乙酸酯、或咪唑丙酸盐或咪唑丙酸酯。

[0016] 在一些实施方案中,调节受试者中ASD相关代谢物的血液水平包括对受试者施用抗ASD相关代谢物抗体、抗ASD相关代谢物的体内合成的中间体的抗体、或抗ASD相关代谢物的体内合成的底物的抗体。

[0017] 在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯、或吲哚丙酮酸盐或吲哚丙酮酸酯。

[0018] 在一些实施方案中,调节受试者中ASD相关代谢物的血液水平包括抑制参与ASD相关代谢物的体内合成的酶。

[0019] 在一些实施方案中,调节ASD相关代谢物的血液水平减轻受试者的胃肠(GI)不适。在一些实施方案中,GI不适包括腹部绞痛、慢性腹泻、便秘、肠通透性、或其组合。在一些实施方案中,调节ASD相关代谢物的血液水平降低受试者的肠通透性。

[0020] 在一些实施方案中,该方法包括确定非孤独症受试者中代谢物的参考水平。在一些实施方案中,该方法包括在调节受试者中ASD相关代谢物的血液水平之前和之后,确定受试者的行为表现。

[0021] 在一些实施方案中,确定受试者的行为表现包括使用孤独症行为量表(Autism Behavior Checklist,ABC)、孤独症诊断访谈量表-修订版(Autism diagnostic Interview-Revised,ADI-R)、儿童孤独症评定量表(childhood autism Rating Scale,CARS)、和/或语言前期孤独症诊断观察方案(Pre-Linguistic Autism Diagnostic Observation Schedule,PL-ADOS)。

[0022] 在一些实施方案中本文还公开了用于改善受试者中的行为表现的方法,其中该方法包括:确定需要治疗的受试者中的孤独症谱系障碍(ASD)相关代谢物的尿液水平;以及调节受试者中的ASD相关代谢物的尿液水平直到观察到受试者中在行为表现方面的改善。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-甲基苯基、4-甲基苯硫酸盐或4-甲基苯硫酸酯、或吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸。

[0023] 在一些实施方案中,调节ASD相关代谢物的尿液水平包括调节受试者中的肠道微

生物群的组成。在一些实施方案中,调节受试者的肠道微生物群的组成包括对受试者施用包含拟杆菌属(Bacteroides)细菌的组合物。

[0024] 本文提供的一些实施方案涉及用于评价罹患孤独症谱系障碍(ASD)的受试者对益生菌治疗的敏感性的方法,其中该方法包括:确定受试者中脆弱拟杆菌响应性代谢物的血液水平;以及将受试者中的脆弱拟杆菌响应性代谢物的血液水平与在罹患ASD和一种或更多种胃肠紊乱的受试者中的代谢物的参考水平相比,其中在受试者中的代谢物的血液水平和参考水平之间的基本一致表明受试者对益生菌治疗敏感。

[0025] 在一些实施方案中,该方法包括调节受试者的肠道微生物群的组成。

[0026] 在一些实施方案中,调节受试者的肠道微生物群的组成包括对受试者施用包含拟杆菌属细菌的组合物。在一些实施方案中,拟杆菌属细菌为脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、普通拟杆菌、或其混合物。

[0027] 在一些实施方案中,调节受试者的肠道微生物群的组成包括粪移植。

[0028] 在一些实施方案中,脆弱拟杆菌响应性代谢物为在表2中列出的代谢物中的一种。

[0029] 本文公开的一些实施方案涉及用于减轻罹患孤独症谱系障碍(ASD)的受试者的胃肠(GI)不适的方法,所述方法包括降低受试者中的肠通透性。在一些实施方案中,GI不适包括腹部绞痛、慢性腹泻、便秘、肠通透性、或其组合。在一些实施方案中,降低肠通透性包括调节受试者中的肠道微生物群的组成。

[0030] 在一些实施方案中本文还公开了用于诊断受试者中的孤独症谱系障碍(ASD)的方法,其中该方法包括:确定在受试者肠道中的细胞因子的水平以及所述受试者中的一种或更多种ASD相关代谢物的血液水平;以及检测在受试者中肠道中的细胞因子水平和受试者中ASD相关代谢物的至少一种或更多种的血液水平与非孤独症受试者中的细胞因子和代谢物的参考水平相比是否有改变,凭借在肠道中的细胞因子的量以及一种或更多种代谢物中的至少一种的血液水平的改变来表明受试者罹患ASD。

[0031] 在一些实施方案中本文还公开了用于诊断受试者中的孤独症谱系障碍(ASD)的方法,其中该方法包括:确定受试者中的两种或更多种ASD相关代谢物的血液水平;以及检测在受试者中的两种或更多种ASD相关代谢物的血液水平与非孤独症受试者中的代谢物的参考水平相比是否有改变,凭借在两种或更多种ASD相关代谢物中的至少两种的血液水平的改变指示受试者罹患ASD。

[0032] 在一些实施方案中,ASD相关代谢物的一种或更多种选自在表1中列出的代谢物。在一些实施方案中,一种或更多种ASD相关代谢物包括参与色氨酸代谢的代谢物、参与脂肪酸代谢的代谢物、参与嘌呤代谢的代谢物、羟乙酸盐或羟乙酸酯、咪唑丙酸盐或咪唑丙酸酯、N-乙酰丝氨酸、或其任何组合。在一些实施方案中,参与色氨酸代谢的代谢物为4-乙基苯硫酸盐或4-乙基苯硫酸酯、吲哚丙酮酸盐或吲哚丙酮酸酯、吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸、或血清素。在一些实施方案中,细胞因子为白细胞介素-6(IL-6)。在一些实施方案中,该方法包括如果表明受试者罹患ASD,则改变受试者中的一种或更多种ASD相关代谢物的水平以改善受试者的行为表现。

[0033] 附图简述

[0034] 图1A-图1D.MIA后代表现出缺乏的GI屏障完整性以及紧密连接成分和细胞因子的异常表达。图1A.肠渗透性测定,测量在口腔强饲FITC-葡聚糖之后在血清中检测到的异硫

氰酸荧光素 (FITC) 的荧光强度。DSS: n=6; S: 成年 n=16, 未成熟的 n=4; P: 成年 n=17, 未成熟的 n=4。数据对在成年盐水后代中观察到的荧光强度标准化。图1B. 成年盐水和聚 (I:C) 后代的结肠中的紧密连接成分相对于 β -肌动蛋白的表达。每一个基因的数据对盐水后代中的表达水平标准化。n=8。图1C. 成年盐水和聚 (I:C) 后代的结肠中的细胞因子和炎症标志物相对于 β -肌动蛋白的表达。每一个基因的数据对盐水后代中的表达水平标准化。n=6-21。图1D. 在成年盐水和聚 (I:C) 后代的结肠中的细胞因子和趋化因子相对于总蛋白含量的蛋白水平。n=10。数据展示为平均值 \pm SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。DSS=葡聚糖硫酸钠, S=盐水+媒介物, P=聚 (I:C)+媒介物。对于每个实验, 在三周龄时用媒介物处理成年盐水和聚 (I:C) 后代, 并且对聚 (I:C)+脆弱拟杆菌处理组同时地收集数据。

[0035] 图2A-图2C. 脆弱拟杆菌处理对小肠中的紧密连接表达和细胞因子谱具有很小的影响。图2A. 在成年盐水和聚 (I:C) 后代的小肠中紧密连接成分相对于 β -肌动蛋白的表达。每个基因的数据对盐水后代中的表达水平标准化。n=8。图2B. 在MIA后代的小肠中脆弱拟杆菌处理对值得注意的紧密连接成分的表达的影响相对于 β -肌动蛋白的定量。盐水和聚 (I:C) 的数据如在图2A中。n=8。图2C. 在成年盐水、聚 (I:C) 和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌后代的小肠中, 细胞因子和趋化因子相对于总蛋白含量的蛋白水平。数据对盐水后代中的表达水平标准化。柱正上方的星号指示与盐水对照 (标准化至1, 如由黑线所表示的) 相比显著, 而在图上部的星号指示在聚 (I:C) 组和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌组之间统计上显著。n=8-10。数据展示为平均值 \pm SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, S=盐水+媒介物, P=聚 (I:C)+媒介物, P+BF=聚 (I:C)+脆弱拟杆菌。

[0036] 图3A-图3F. 脆弱拟杆菌处理对MIA后代中的系统性免疫功能失调无影响。图3A. 通过来自成年盐水、聚 (I:C) 和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌后代的脾细胞的流式细胞术来测量的, 来自CD4+TCRb+细胞的母本群体的Foxp3+CD25+调节性T细胞的百分比频率。n=5。图3B. 通过来自成年盐水、聚 (I:C) 和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌后代的脾细胞的流式细胞术来测量的, 来自TER119-细胞的母本群体的CD4+T辅助细胞以及CD11b+且Gr-1+的中性粒细胞和单核细胞的百分比频率。n=5。图3C. 在用PMA/离子霉素体外刺激之后, 由从成年盐水和聚 (I:C) 后代分离的脾CD4+T细胞生成IL-17和IL-6。通过重复测量两因素ANOVA和邦弗朗尼事后检验来评价处理效果。n=5。图3D. 在用PMA/离子霉素体外刺激之后, 由从成年盐水和聚 (I:C) 后代的肠系膜淋巴结分离的CD4+T细胞生成IL-17和IL-6。通过重复测量两因素ANOVA和邦弗朗尼事后检验来评价处理效果。n=5。图3E. 在开场探究测定中用缺乏多聚糖A (PSA) 生成的突变脆弱拟杆菌处理的成年MIA后代的焦虑样和运动行为。数据表明了10分钟的试验内在50 \times 50cm的开场中的总活动里程 (右)、在17 \times 17cm的中央场地停留的时间 (中间) 以及进入中央场地的次数 (左)。盐水组、聚 (I:C) 组和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌组的数据如在图10A-图10F中的。聚 (I:C)+有PSA缺失的脆弱拟杆菌: n=17。图3F. 在10分钟的试验中在6 \times 8阵列中的珠的重复掩埋。盐水组、聚 (I:C) 组和聚 (I:C)+脆弱拟杆菌组的数据如在图10A-图10F中的。聚 (I:C)+有PSA缺失的脆弱拟杆菌: n=17。数据展示为平均值 \pm SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。S=盐水+媒介物, P=聚 (I:C)+媒介物, P+BF=聚 (I:C)+脆弱拟杆菌, P+BF Δ PSA=聚 (I:C)+有PSA缺失的脆弱拟杆菌。

[0037] 图4A-图4D. MIA引起肠微生物群的组成上的改变。图4A. 肠微生物群的丰富度, 如由绘制每个处理组的Faith's系统发育多样性 (PD) 与序列的数目的稀疏曲线所例证的。图

4B. 肠微生物群的均匀度, 如由Gini系数所表明的。图4C. 在用媒介物或脆弱拟杆菌处理成年后代之后1、2、和3周时收集的粪便样品中的脆弱拟杆菌16S序列(上部)和细菌16S序列(底部)的水平。用脆弱拟杆菌定殖的无菌小鼠被用作阳性对照。数据展示为定量RT-PCR循环阈值 $[C(t)]$, 其中 $C(t) > 34$ (剖面线)被认为可以忽略, 并且对于 $C(t) < 34$, 越小的 $C(t)$ 相当于越强的丰度。 $n=1$, 其中每一个代表来自3-5个独立的笼的混合样品。图4D. 在用媒介物或脆弱拟杆菌处理成年后代后1、2、和3周时收集的盲肠样品中的脆弱拟杆菌16S序列(上部)和细菌16S序列(底部)的水平。用脆弱拟杆菌定殖的无菌小鼠被用作阳性对照。数据展示为定量RT-PCR循环阈值 $[C(t)]$, 其中 $C(t) > 34$ (剖面线)被认为可以忽略, 以及对于 $C(t) < 34$, 越小的 $C(t)$ 相当于越强的丰度。 $n=1$, 其中每一个代表来自3-5个独立的笼的混合样品。数据展示为平均值 \pm SEM。S=盐水+媒介物, P=聚(I:C)+媒介物, P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌, GF+BF=无菌+脆弱拟杆菌。

[0038] 图5A-图5E. MIA后代表现出肠微生物群的生态失调。图5A是基于所有OTU的不加权的基于UniFrac的3D PCoA图, 例证了在成年MIA和对照后代之间在肠微生物群上的总体差异。在轴线上标明了由每个主坐标(PC)所说明的百分比变化。图5B是基于梭菌纲和拟杆菌纲OTU的子取样(每个样品2003个读数)的不加权的基于UniFrac的3D PCoA图。图5C是在减去梭菌纲和拟杆菌纲OTU之后基于剩余OTU的子取样(每个样品47个读数)的不加权的基于UniFrac的3D PCoA图。图5D是显示针对来自成年盐水和聚(I:C)后代的个体生物重复(右, y轴)的肠微生物群的独特的OTU(底部, x轴)的相对丰度的热图, 其中强度增加的红色指示特定样品的独特的OTU的增加的相对丰度。绘制了在处理组之间显著区别的所有OTU。对每个OTU表明了如由Ribosomal Database Project指定的科水平的分类学指定。图5E显示了最丰富类群(左)和最不丰富类群(右)的由分类学指定来分类的OTU在纲水平上的平均相对丰度。 $n=10$ 。对聚(I:C)+脆弱拟杆菌处理组同时地收集数据并分析。

[0039] 图6A-图6F. 脆弱拟杆菌处理修正MIA后代中的在GI屏障完整性上的缺陷和结肠紧密连接成分和细胞因子的表达。图6A. 肠通透性测定, 测量了口腔强饲FITC-葡聚糖后在血清中检测到的异硫氰酸荧光素(FITC)的荧光强度。数据对成年盐水后代中观察到的荧光强度标准化。DSS、盐水和聚(I:C)的数据如在图1A-图1D中的。聚(I:C)+脆弱拟杆菌: $n=9$ 。图6B. 在成年盐水、聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌后代的结肠中紧密连接成分相对于 β -肌动蛋白的表达。每个基因的数据对盐水后代中的表达水平标准化。盐水和聚(I:C)的数据如在图1A-图1D中的。柱正上方的星号指示与盐水对照(标准化至1, 如由黑线所表示的)相比显著, 而在图上部的星号表示在聚(I:C)组和聚(I:C)+脆弱拟杆菌组之间统计上显著。 $n=8$ 。图6C. 对claudin 8的免疫荧光染色。对 $n=5$ 的代表性图片。图6D. 在来自盐水、聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌后代的结肠中claudin 8(左)和claudin 15(右)的蛋白水平, 如由蛋白印迹所测量的。来自同一张图的代表信号在以下描述。数据对在盐水后代中检测到的信号强度标准化。 $n=3$ 。图6E. 在成年盐水、聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌后代的结肠中IL-6相对于 β -肌动蛋白的表达。数据对在盐水后代中的表达水平标准化。盐水和聚(I:C)的数据如在图1A-图1D中的。聚(I:C)+脆弱拟杆菌: $n=3$ 。图6F. 在成年盐水、聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌后代的结肠中细胞因子和趋化因子相对于总蛋白含量的蛋白水平。数据对在盐水后代中的表达水平标准化。盐水和聚(I:C)的数据如在图1A-图1D中的。柱正上方的星号指示与盐水对照(标准化至1, 如由黑线所表示的)相比显著, 而在图上部的星号表示在聚(I:C)组

和聚(I:C)+脆弱拟杆菌组之间统计上显著。 $n=10$ 。数据展示为平均值 \pm SEM。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$,n.s.=不显著。DSS=葡聚糖硫酸钠,S=盐水+媒介物,P=聚(I:C)+媒介物,P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌。

[0040] 图7A-图7C.IL-6调整结肠claudin 8和15的表达。图7A.在用递增浓度的重组小鼠IL-6离体培养4小时的成年野生型小鼠的结肠中claudin8(左)和claudin 15(右)相对于 β -肌动蛋白的剂量依赖性表达。数据对在0ng/ml IL-6对照中检测到的表达水平标准化。 $n=3$ 。图7B.在用80ng/ml重组小鼠IL-6培养的成年野生型小鼠的结肠中claudin 8(左)和claudin15(右)相对于 β -肌动蛋白的时间依赖性表达。 $n=3$ 。图7C.在用重组小鼠IL-6处理后12小时时在成年野生型小鼠的结肠中claudin 8(上部)和claudin15(底部)相对于 β -肌动蛋白的表达。 $n=3$ 。数据展示为平均值 \pm SEM。

[0041] 图8A-图8C.脆弱拟杆菌处理改变MIA后代中肠微生物群的组成并修正物种水平上的异常。图8A是基于所有OTU的不加权的基于UniFrac的3D PCoA图。在轴上标明了由每个主坐标(PC)说明的百分比变化。盐水和聚(I:C)的数据如在图2A-图2C中的。图8B.被MIA显著地改变并被脆弱拟杆菌处理完全地恢复的毛螺菌科(上部)和拟杆菌目(Bacteroidales)(下部)的关键OTU的相对丰度。数据展示为平均值 \pm SEM。图8C是基于在图8B中展示的关键OTU的16S rRNA基因序列的最近邻分析法的系统进化树。以实线显示的进化枝指示毛螺菌科的OTU并且以虚线显示的进化枝指示拟杆菌目的OTU。用数字标示的6个分类群指示在聚(I:C)后代中被显著地提高并被脆弱拟杆菌处理修正的OTU。 $n=10$ 。

[0042] 图9A-图9B.不存在处理MIA后代之后脆弱拟杆菌的持续定殖的证据。图9A.在用媒介物或脆弱拟杆菌处理成年后代后1、2和3周时收集的粪便样品中脆弱拟杆菌16S序列(上部)和细菌16S序列(底部)的水平。用脆弱拟杆菌定殖的无菌小鼠被用作阳性对照。数据展示为定量RT-PCR循环阈值[C(t)],其中C(t) >34 (剖面线)被认为是可忽略的,并且对于C(t) <34 ,越小的C(t)相当于越强的丰度。 $n=1$,其中每个代表来自3-5个独立的笼的混合样品。图9B.在于用媒介物或脆弱拟杆菌处理成年后代后1、2、和3周时收集的盲肠样品中脆弱拟杆菌16S序列(上部)和细菌16S序列(底部)的水平。用脆弱拟杆菌定殖的无菌小鼠被用作阳性对照。数据展示为定量RT-PCR循环阈值[C(t)],其中C(t) >34 (剖面线)被认为是可忽略的,并且对于C(t) <34 ,越小的C(t)相当于越强的丰度。 $n=1$,其中每一个代表来自3-5个独立的笼的混合样品。数据展示为平均值 \pm SEM。S=盐水+媒介物,P=聚(I:C)+媒介物,P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌,GF+BF=无菌+脆弱拟杆菌。

[0043] 图10A-图10F.脆弱拟杆菌处理改善MIA后代中的孤独症相关行为异常。图10A.在开场探究测定中的焦虑样和运动行为,如由在10分钟试验内在50 \times 50cm开场中活动的总里程(右)、在17 \times 17cm中央场地中停留的时间(中)和进入场地的中央的次数(左)所测量的。 $n=35-75$ 。图10B.在前脉冲抑制测定中的感觉运动门控,如通过对仅脉冲的惊恐反应和在5db或15db前脉冲之后的脉冲的惊恐反应之间的百分比差异所测量的。通过重复测量两因素ANOVA和邦弗朗尼事后检验来评价处理效果。 $n=35-75$ 。图10C.在10分钟的试验期间在3 \times 6阵列中的珠的重复掩埋。 $n=16-45$ 。图10D.通讯行为,如通过在20分钟的社会性遭遇期间由成年雄性小鼠发出的超声发声的总次数(左)、平均持续时间(中)和总持续时间(右)来测量的。 $n=10$ 。图10E显示了在脆弱拟杆菌处理的MIA后代中在社交能力上的缺陷。图10F显示了在脆弱拟杆菌处理的MIA后代中在社会偏好上的缺陷。图展示了对于3-6只独立的小鼠

群所获得的累加结果。数据展示为平均值±SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。S=盐水+媒介物, P=聚(I:C)+媒介物, P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌。对聚(I:C)+脆弱拟杆菌 Δ PSA处理组和聚(I:C)+多形拟杆菌处理组同时地收集数据。

[0044] 图11A-图11D. 在MIA后代中孤独症相关行为的改善并不是对脆弱拟杆菌处理特异的。图11A. 在开场探究测定中的焦虑样和运动行为, 如通过在10分钟试验内在 50×50 cm开场中的总活动里程(右)、在 17×17 cm中央场地中停留的时间(中), 以及进入场地的中央的次数(左)所测量的。聚(I:C)+多形拟杆菌: $n=32$ 。图11B. 在10分钟试验期间在 3×6 阵列中的珠的重复掩埋。聚(I:C)+多形拟杆菌: $n=32$ 。图11C. 通讯行为, 如通过在10分钟社会性遭遇期间由成年雄性小鼠发出的超声发声的总次数(左)、平均持续时间(中间)和总持续时间(右)所测量的。聚(I:C)+多形拟杆菌: $n=10$ 。图11D. 在前脉冲抑制测定中的感觉运动门控, 如通过对仅脉冲的惊恐反应和对5db或15db前脉冲之后的脉冲的惊恐反应之间的百分比差异所测量的。通过重复测量两因素ANOVA和邦弗朗尼事后检验来评价处理效果。聚(I:C)+多形拟杆菌: $n=32$ 。对于所有的图, 盐水、聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌的数据如在图10A-图10F中的。图展示了对于3-6个独立的小鼠群获得的累加结果。数据展示为平均值±SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。S=盐水+媒介物, P=聚(I:C)+媒介物, P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌, P+BT=聚(I:C)+多形拟杆菌。

[0045] 图12A-图12B. 脆弱拟杆菌处理引起血清代谢物统计上显著的改变, 和在与脂肪酸代谢和嘌呤补救途径有关的生物物质上的广泛变化。脆弱拟杆菌处理的MIA后代的血清中与盐水对照相比103种代谢物的水平被显著地改变, 如由GC/LC-MS所测量的。颜色指示相对于在盐水后代中所检测到的代谢物浓度的变化倍数, 其中红色调表示与对照相比增加的水平并且绿色调表示与对照相比减少的水平(参见在上左部的图例)。所有显示的变化为通过带比较的两因素ANOVA $p < 0.05$ 。P=聚(I:C), P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌。 $n=8$ 。

[0046] 图13A-图13D. 脆弱拟杆菌处理修正MIA引起的足够引起焦虑样行为的微生物依赖的代谢物4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)的改变。图13A显示了由GC/LC-MS检测到的被MIA显著地改变并被脆弱拟杆菌处理恢复的代谢物的相对定量。 $n=8$ 。图13B显示了通过LC-MS检测的成年无菌的(GF)和常规地定殖的(无特定病原体, SPF)小鼠的血清中的4EPS的浓度。U.D.=无法检测。 $n=1$, 其中每一个代表来自3-5只小鼠的混合血清。图13C. 在对于用4EPS或盐水媒介物处理的常规野生型小鼠的开场探究测定中的焦虑样和运动行为。数据表明了了在10分钟试验内在 50×50 cm开场中的总活动里程(右)和在 17×17 cm中央场地中停留的时间(左)。在4EPS和媒介物处理的小鼠之间在进入场地中央的次数上没有差异(数据未显示)。 $n=10$ 。图13D. 在4EPS处理的小鼠中与对照相比在前脉冲抑制测定中被增强的惊恐反射。数据显示对120db脉冲反应(左)的惊恐的平均强度以及当5db或15db前脉冲之后进行脉冲(右)的百分比抑制。 $n=10$ 。数据展示为平均值±SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, S=盐水+媒介物, P=聚(I:C)+媒介物, P+BF=聚(I:C)+脆弱拟杆菌, SPF=无特定病原体(常规地定殖的), GF=无菌, Veh.=媒介物(盐水), 4EPS=4-乙基苯硫酸盐/酯。

[0047] 图14A-图14B. 孤独症相关代谢物通过宿主-微生物相互作用的合成。图14A. 图解例证了通过微生物酪氨酸代谢和宿主硫酸化作用合成4EPS(被发现在MIA血清中被提高并被脆弱杆菌处理恢复)和对甲酚(被报道在患有ASD的个体的尿液中被提高)。图14B. 图解例证了从微生物色氨酸代谢和宿主甘氨酸缀合合成吲哚丙酮酸盐/酯(被发现在MIA血清中被

提高并被脆弱杆菌处理恢复)和吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸(被报道在患有ASD的个体的尿液中被提高)。实线箭头代表已知的生物转换。虚线箭头代表预测的生物转换。

[0048] 图15A-图15E. 4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)合成、检测和体内实验。图15A. 通过用在回流的苯中的三氧化硫-吡啶处理4-乙基苯酚以生成吡啶盐,随后在K⁺树脂上离子交换以生成钾盐来合成4EPS的图解。图15B. 对于由LC/MS分析的4EPS钾盐的已知浓度的剂量响应曲线以及线性回归分析。图15C. 在将30mg/kg 4EPS钾盐单次腹腔注射至成年野生型小鼠后在血清4EPS上的时间依赖性增加。图15D. 通讯行为,如通过在10分钟的社会性遭遇期间由成年雄性小鼠发出的超声发声的总次数(左)、平均持续时间(中间)和总持续时间(右)来测量的。 $n=5$ 。图15E. 在10分钟的试验期间在 3×6 阵列中的珠的重复掩埋。 $n=10$ 。数据展示为平均值 \pm SEM。Veh. = 媒介物(盐水),4EPS = 4-乙基苯硫酸盐/酯。

[0049] 详细描述

[0050] 在以下的详细描述中,对附图进行参考,所述附图形成本文的一部分。在附图中,相似的代号典型地标识相似的组成部分,除非上下文另有规定。在详细描述、图、和权利要求书中描述的例证性实施方案并非意图限制。可使用其它的实施方案,并且可进行其它改变,而不脱离本文提出的主题的精神或范围。将很容易地理解,如在本文中一般性的描述、以及在图中阐述的,本公开内容的多个方面能以很多种不同的构形排列、替代、组合、分割、和设计,其全部在本文中明确地预期到。

[0051] 孤独症谱系障碍(ASD)是严重的神经发育障碍,以刻板行为以及在语言和社交方面的缺失为特征。如本文描述的,多种代谢物与ASD有关。受试者中这些代谢物的水平可被确定并用于诊断ASD,或被调节用于诸如通过改善受试者的行为表现来治疗ASD。另外,如本文描述的,多种代谢物响应于脆弱拟杆菌治疗,并且这些代谢物可被用来评价罹患ASD的受试者对益生菌治疗的敏感性。

[0052] 在一些实施方案中,在需要治疗的受试者的循环中的代谢物的水平被确定并被调节以改善受试者的行为表现。需要治疗的受试者可以是罹患焦虑、ASD、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况的受试者。在受试者的循环中的代谢物的水平可以是代谢物的血液水平,例如血清水平或血浆水平。在一些实施方案中,受试者中的代谢物的尿液或粪便水平被确定并被调节以改善受试者的行为表现。

[0053] 在一些实施方案中,检测在受试者的循环中的代谢物的水平并与非孤独症群体中的代谢物的参考水平相比,以诊断受试者是否罹患ASD。在受试者的循环中的代谢物的水平可以是代谢物的血液水平,例如血清水平或血浆水平。

[0054] 定义

[0055] 除非另有限定,否则本文使用的技术和科学术语具有与由本公开内容所属的技术领域中的普通技术人员通常理解的意思相同的意思。参见,例如Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第二版,J.Wiley&Sons(New York, NY 1994); Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。为了本公开内容的目的,以下限定下面的术语。

[0056] 如本文使用的,术语“受试者”为诸如哺乳动物的脊椎动物。术语“哺乳动物”被限定为隶属于哺乳纲(Mammalia)的个体并且包括但不限于人类、家畜和农畜、以及动物园

动物、运动动物、或宠物动物,诸如羊 (sheep)、狗、马、猫或牛。在一些实施方案中,受试者为人类。

[0057] 如本文使用的,术语“状况/障碍/症状”或“行为异常”指由受试者表现的包括但不限于以下的症状:焦虑、脆性X染色体、Rett综合征、结节性硬化、强迫症、注意力缺陷障碍、精神分裂症、孤独性障碍(典型孤独症(classic autism))、阿斯伯格症(阿斯伯格综合征)、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)、童年瓦解性精神障碍(CDD)、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况。

[0058] 如本文使用的,术语“需要治疗的受试者”指表现或罹患以上提到的行为障碍/症状中一种或更多种的受试者。适当的合格人员能够利用标准行为测试方案/指南辨别此类需要治疗的个体。相同的行为测试方案/指南也能被用来确定个体的障碍和/或症状是否有改善。

[0059] 如本文使用的,术语“在行为表现上的改善”指在由罹患焦虑、ASD、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况的个体表现的行为障碍、症状和/或异常中的一种或更多种的严重程度或频率上至任何程度的预防或减少。行为症状的非限制性实例包括重复性行为、减少的前脉冲抑制(PPI)、和增加的焦虑。由接受治疗的个体自身或由另一个人(医生或其他)来观察改善。

[0060] 如本文使用的,术语“治疗”指针对由患者、特别是罹患ASD的患者表现出的疾病、障碍或病理状态进行的临床干预。治疗的目的可包括但不限于以下中的一种或更多种:症状的减轻或预防;疾病、障碍、或状况的进展或恶化的减缓或中止;以及疾病、障碍或状况的缓解。在一些实施方案中,“治疗”不仅指治疗性治疗还指预防性(prophylactic)或预防性(preventative)措施。需要治疗的那些包括已经受疾病或障碍或不期望的病理状况影响的那些以及在其中要预防疾病或障碍或不期望的病理状况的那些。例如,在一些实施方案中治疗可改善受试者的包括ASD相关行为的行为表现。如本文使用的,术语“预防”指减轻个体后来表现那些行为症状的负担的任何活动。这在初级、二级和三级预防水平上发生,其中:a) 初级预防避免症状/障碍/状况的发展;b) 二级预防活动的目的在于状况/障碍/症状治疗的早期阶段,从而增加干预的机会以防止状况/障碍/症状的进展和症状的出现;以及c) 三级预防通过例如恢复功能和/或减少任何状况/障碍/症状或相关并发症来降低已证实的状况/障碍/症状的负面影响。

[0061] “药学上可接受的”载体为对暴露至使用的剂量和浓度的所述载体的细胞或哺乳动物无毒的那些。“药学上可接受的”载体可以是但不局限于有机的或无机的、固体的或液体的赋形剂,所述赋形剂适合于选择的诸如口服应用或注射的应用方式,以及以常规的药物制剂的形式施用,所述常规的药物制剂的形式诸如固体,诸如片剂、颗粒剂、粉剂、胶囊剂;和液体诸如溶液、乳剂、混悬剂等。往往生理上可接受的载体为诸如磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液的水性pH缓冲溶液。生理上可接受的载体也可包括以下中的一种或更多种:包括抗坏血酸的抗氧化剂;低分子量(少于约10个残基)多肽;诸如血清白蛋白、明胶、免疫球蛋白类的蛋白;诸如聚乙烯吡咯烷酮的亲水性聚合物;氨基酸;包括葡萄糖、甘露糖、或糊精的碳水化合物;诸如EDTA的螯合剂;诸如甘露醇或山梨醇的糖醇类;诸如钠的成盐抗衡离子;以及诸如TweenTM、聚乙二醇(PEG)、和PluronicTM的非离子型表面活性剂。也可将辅剂、稳定剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂、pH调节剂控制剂(pH adjustor controller)、等渗剂和其

它的常规添加剂添加至载体。

[0062] 药学上可接受的或适当的载体可包括已知对GI道的受损情况有益的其它化合物, (例如诸如维生素C、维生素E、硒或锌的抗氧化剂);或食品组合物。食品组合物可以是但不局限于牛奶、酸奶、凝乳、奶酪、发酵乳、基于牛奶的发酵制品、冰激凌、基于发酵谷物的制品、基于牛奶的粉末、婴儿配方食品、片剂、液体细菌混悬剂、干的口服补充剂、或湿的口服补充剂。

[0063] 如本文使用的,术语“营养制品”指提供健康益处的食物(作为强化食品或膳食补充剂)。营养制品并不受与药物制品相同的测试和规定的管制。

[0064] 如本文使用的,术语“益生菌”指活的微生物,当以足够的量施用,所述活的微生物给予宿主健康益处。益生菌剂可以是在食品和膳食补充剂(例如,但不局限于胶囊剂、片剂、和粉剂)中可得的。包含益生菌的食品的非限制性实例包括诸如酸奶、发酵牛奶和非发酵牛奶的乳制品、冰沙(smoothies)、黄油、奶油、鹰嘴豆泥(hummus)、红茶菌(kombucha)、沙拉酱、味噌(miso)、丹贝(tempeh)、营养棒、和一些果汁和豆类饮料。

[0065] 如本文使用的,术语“代谢物”指参与代谢的任何分子。代谢物可以是在代谢过程中的产物、底物、或中间体。例如,代谢物可以是初级代谢物、次级代谢物、有机代谢物、或无机代谢物。代谢物包括但不局限于氨基酸、肽、酰基肉碱、单糖类、脂类和磷脂类、前列腺素类、羟基花生四烯酸类、羟基十八碳二烯酸类、类固醇、胆酸类、以及糖脂类和磷脂类。

[0066] 如本文使用的,术语“细胞因子”指调节免疫系统的细胞的活性的分泌蛋白或其活性片段或突变体。细胞因子的实例包括但不局限于白细胞介素、干扰素、趋化因子、肿瘤坏死因子、免疫细胞前体的集落刺激因子等。

[0067] 如本文使用的,术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如双特异性抗体、双体、和单链分子)、以及抗体片段(例如,Fab或F(ab')₂、和Fv)。对于不同类别的抗体的结构和特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Sties,Abba I.Terr和Tristram G.Parsolw(编),Appleton&Lange,Norwalk,Conn.,1994,第71页和第6章。

[0068] 孤独症谱系障碍(ASD)

[0069] 孤独症谱系障碍(ASD)是复杂的神经发育残疾,以刻板行为以及在交流和社交方面的缺失为特征。术语“谱系”指患有ASD的患者会具有的广泛范围的症状、技能、和损伤或残疾的水平。ASD通常根据在Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,第四版-文本修订(DSM-IV-TR)中列出的指南来诊断。手册目前限定了有时被称为广泛性发育障碍(PDD)的五种障碍作为ASD,所述五种障碍包括孤独性障碍(典型孤独症)、阿斯伯格障碍(阿斯伯格综合征)、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)、Rett's障碍(Rett综合征)、和童年瓦解性精神障碍(CDD)。一些患者轻微地受其症状损害,但是其他人则严重残疾。ASD包括具有较差确定的病因,并且无针对性的治疗的一组复杂的障碍。

[0070] 目前的研究着重消除在孤独症个体中的神经及外周免疫失调。在ASD中的若干共存病中,考虑到胃肠(GI)不适的普遍性以及核心孤独症行为的严重度的关联(Adams等人,2011;Buie等人,2010;Coury等人,2012;Gorrindo等人,2013;Ibrahim等人,2009;Wang等人,2011),对其特别的感兴趣。ASD儿童的值得注意的子集表现出包括增加的肠通透性(或“肠漏”)和改变的肠道微生物群的组成(Buie等人,2010;Coury等人,2012;D' Eufemia等

人,1996;de Magistris等人,2010;de Magistris等人,2013;Ibrahim等人,2009)的胃肠(GI)并发症。而且,最近超过14,000名ASD个体的多中心研究报道在ASD患者中与对照相比更高的炎症性肠病(IBD)和其它GI紊乱的患病率(Kohane等人,2012)。改变的营养素摄取、食物过敏和代谢崩溃也与ASD有关,并且报道了抗生素治疗以及限制膳食对一些孤独症儿童提供行为改善(Buie等人,2010)。

[0071] 母体免疫激活(MIA)是ASD的重要环境风险因素。几项大型流行病学研究已经将母体病毒和细菌感染与后代中增加的孤独症风险联系起来(Atladdottir等人,2010;Gorrindo等人,2012)。通过用病毒模拟聚(I:C)注射妊娠雌鼠将这种风险因素在小鼠中建模已显示产生表现孤独症包括重复/强迫行为的标志症状的核心行为症状,以及常见的孤独症神经病理(浦肯野细胞的空间限制性缺乏)的后代(Boksa,2010;Malkova等人,2012;Schwartz等人,2013;Shi等人,2009)。目前,也已发现MIA后代表现出在免疫系统和胃肠道中的异常。

[0072] 人类被很丰富且多样的微生物寄生,所述微生物在调节健康和疾病中发挥至关重要的作用。共生微生物群的生态失调被牵涉在包括IBD、肥胖和心血管疾病的若干人类疾病的病理中(Blumberg和Powrie,2012;Clemente等人,2012)。在小鼠(Al-Asmakh等人,2012;Collins等人,2012;Cryan和Dinan,2012)和人类(Tillisch等人,2013)中共生细菌还影响包括社交、情绪、伤害感受和焦躁类行为的多种复杂行为(Amaral等人,2008;Bravo等人,2011;Desbonnet等人,2013;Heijtz等人,2011),并且有助于脑的发育和功能。在肠道微生物群和脑之间的长程相互作用是基于微生物的疗法治疗小鼠中的多发性硬化和抑郁的症状的能力(Bravo等人,2011;Hooper等人,2012;Ochoa-Reparaz等人,2010)以及报道的益生菌在治疗人类中的慢性疲劳综合征和心理不适的情绪症状方面的疗效(Messaoudi等人,2011;Rao等人,2009)的基础。

[0073] 在孤独症个体中,包括混乱的群落组成(Adams等人,2011;Finegold,2011;Finegold等人,2010;Finegold等人,2012;Gondalia等人,2012;Parracho等人,2005b;Williams等人,2011;Williams等人,2012)和改变的微生物衍生代谢物的外周水平(Altieri等人,2011;Frye等人,2013;MacFabe,2012;Ming等人,2012b;Yap等人,2010a)的很多涉及微生物群的异常已被鉴定出。

[0074] 用于改善行为表现的方法

[0075] 本文提供了用于改善需要治疗的受试者的行为表现的方法。需要治疗的受试者可以是罹患焦虑、ASD、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况的受试者。

[0076] 在一些实施方案中,所述方法包括:确定需要治疗的受试者中的ASD相关代谢物的血液水平;以及调节受试者中的ASD相关代谢物的血液水平直到观察到受试者在行为表现方面的改善。

[0077] 在一些实施方案中,该方法包括:确定需要治疗的受试者中的孤独症谱系障碍(ASD)相关代谢物的水平;以及调节受试者中的ASD相关代谢物的水平以使得受试者中的代谢物的水平与非孤独症受试者中的代谢物的参考水平基本上相同,从而改善受试者中的行为表现。在一些实施方案中,该方法还可包括确定在非孤独症受试者的群体中的ASD相关代谢物的参考水平。

[0078] 在一些实施方案中,该方法包括:确定在需要治疗的受试者中的孤独症谱系障碍(ASD)相关代谢物的水平;以及调节受试者中的ASD相关代谢物的水平以使得受试者中的代

谢物的水平与在未罹患ASD、焦虑或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者的群体中的代谢物的参考水平基本上相同,从而改善受试者中的行为表现。在一些实施方案中,该方法还可包括确定在未罹患ASD、焦虑或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者中的ASD相关代谢物的参考水平。

[0079] 在一些实施方案中,本文公开的方法还可包括在调节需要治疗的受试者中的ASD相关代谢物的水平之前测量行为表现的基线和/或在调节需要治疗的受试者中的ASD相关代谢物的水平之后测量行为表现。在一些实施方案中,所述方法可包括比较在调节需要治疗的受试者中的ASD相关代谢物的水平之前和之后的行为表现,并且该比较可被用来确定在受试者中的行为表现是否改善以及到了什么程度。

[0080] 在本文公开的方法中,可利用多种参数和方法来测量和评价行为表现。例如,可进行行为测试以确定局限性重复行为的存在和/或程度和/或受试的受试者的刻板行为模式。在一些实施方案中,孤独症行为量表(ABC)、孤独症诊断访谈量表-修订版(ADI-R)、儿童孤独症评定量表(CARS)、和/或语言前期孤独症诊断观察方案(PL-ADOS)被用于行为测试。行为测试可包括但不局限于检测以下的存在和/或程度:a)以一种或更多种刻板 and 局限的模式全神贯注于兴趣,其在强度或焦点上是异常的;b)不可改变地固执于特定的、没有意义的常规或仪式;c)刻板且重复的运动的作态行为(诸如手扑动、手指扑动等);和/或d)持续的全神贯注于物体的局部。可包含于行为测试中并且暗示需要改善受试的受试者中的行为表现的行为的非限制性实例包括:a)感官行为,所述感官行为包括在学习时视觉辨别使用不佳,似乎听不到因而怀疑听力缺失,有时候显示对大声的噪音没有“吃惊反应”,有时候诸如擦伤、割伤、和注射的疼痛刺激不唤起反应,在强光照向眼睛时经常会不眨眼,在很多声音下捂住耳朵,当自然光存在时斜眼、皱眉、或捂住眼睛,经常地对“生”人没有视觉反应,长时间瞪着眼发呆;b)相关行为:经常地不注意社会/环境刺激,没有社会性微笑,当有人向其伸手时不会也伸出手,对其他人的面部表情/情感没有回应,积极地回避眼神接触,拒绝被抚摸或拥抱,当被抱在怀里时身体软绵,被抱起时身体僵硬,不模仿其他孩子玩耍,无法建立任何友谊,经常惊恐或很焦虑,“看穿”人;c)躯体和物品使用习惯:长时间旋转自身,无法适当地使用玩具,坚持让某些物品伴随他/她,长时间拍打自身,重复戳和投掷,扑动手掌,用脚尖走路,通过撞头、咬手等……伤害自己,重复转动、旋转、及摔扔物品,会触摸、闻、和/或尝环境中的物品,陷入难以理解的“仪式”诸如把东西排成直线等……,很有破坏性;以及d)语言行为:无法听从曾经给过的简单指令,代词反用,说话语调异常,当自己的名字在其它两个中叫出时对其无反应,很少说“是”或“我”,无法听从含有介词的简单指令,通过打手势得到想要的物品,一遍又一遍的重复短句,不能指出五种以上被叫出的物品,每天使用0-5个自发的词来传达需求和需要,一遍又一遍的重复声音或词语,重复由别人提出的问题或所说的话,每天使用至少15但少于30个自发的短语来交流,习得简单的任务但很快地“忘记”,对常规/环境的变化强烈反应,在发育的一个方面具有“特殊能力”,其似乎排除智力障碍,严重的坏脾气和/或经常的小脾气,通过咬、打、踢等……伤害别人,不等待需求被满足,梳洗困难,没有频繁的帮助就无法自己穿衣,经常对环境无察觉,并且可能对危险的情况无意识,喜欢摆弄并专注于无生命的东西,并且在30个月或之前的年龄鉴定出发育延迟。本领域普通技术人员应领会,主治医生会知道如何鉴别需要本文公开的治疗的受试者。

[0081] 调节后,受试者中的ASD相关代谢物的水平可为非孤独症受试者中的代谢物的参

考水平的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%、约99%、约100%、约101%、约102%、约105%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、或在这些值中的任何两个之间的范围。在一些实施方案中,受试者中的ASD相关代谢物的水平为非孤独症受试者中的代谢物的参考水平的约80%、约90%、约95%、约98%、约99%、约100%、约101%、约102%、约105%、约110%、约120%、或在这些值中的任何两个之间的范围。在一些实施方案中,受试者中的ASD相关代谢物的水平为非孤独症受试者中的代谢物的参考水平的约95%、约98%、约99%、约100%、约101%、约102%、约105%、或在这些值中的任何两个之间的范围。代谢物的水平可以是在受试者的循环中的代谢物的水平。例如,代谢物的水平可以是在受试者的血液或其它体液(例如,脑脊液、胸膜液、羊水、精液、或唾液)中的代谢物的水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为受试者中的代谢物的血液水平。代谢物的血液水平可以是例如代谢物的血清水平或血浆水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为受试者中的代谢物的尿液水平。

[0082] 在一些实施方案中,受试者罹患焦虑、ASD、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况。ASD的非限制性实例包括孤独性障碍(典型孤独症)、阿斯伯格症(阿斯伯格综合征)、待分类的广泛性发育障碍(PDD-NOS)、Rett's障碍(Rett综合征)、及童年瓦解性精神障碍(CDD)。在一些实施方案中,受试者罹患ASD。在一些实施方案中,受试者罹患孤独症。

[0083] 可利用多种方法来调节受试者中的ASD相关代谢物的水平,例如血液水平。在一些实施方案中,通过调节受试者中的肠道微生物群的组成来调节代谢物的水平,例如血液水平。调节受试者中的肠道微生物群的组成可通过例如粪便移植(也被称作粪便微生物群移植(FMT)、粪便细菌疗法或粪便移植(stool transplant))来实现。粪便移植可包括将粪便细菌从例如非孤独症受试者的健康供体移植到受体(例如罹患孤独症的受试者)的过程。粪便移植的程序可包括将细菌粪便菌丛从供体单次或多次灌输(例如通过灌肠)到受体。

[0084] 在一些实施方案中,调节受试者中的肠道微生物群的组成包括对受试者施用包含细菌的组合物,例如包含拟杆菌属细菌的组合物。可用在本文公开的方法中的拟杆菌属细菌并不被特别地限制。在一些实施方案中,拟杆菌属细菌包括脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、普通拟杆菌、或其混合物。在一些实施方案中,拟杆菌属细菌可以是脆弱拟杆菌。可通过多种路径对受试者施用例如包含拟杆菌属细菌的组合物包含细菌的组合物。例如,可通过口服施用、直肠施用、透皮施用、鼻内施用或吸入对受试者施用该组合物。在一些实施方案中,口服地对受试者施用组合物。包含诸如拟杆菌属细菌的细菌的组合物也可以为多种形式。例如,组合物可以是益生菌组合物、营养制品、药物组合物、或其混合物。在一些实施方案中,组合物为益生菌组合物。用于人类和动物受试者的每个剂量优选地包含预确定数量的细菌,所述预确定数量的细菌为经计算足够产生期望效果的量。实际剂型将取决于使用的具体细菌以及要达到的效果。包含细菌的组合物,例如包含拟杆菌属细菌的组合物可单独施用或与一种或更多种另外的益生菌、营养制品、或治疗剂联合施用。与一种或更多种进一步的另外的益生菌、营养制品、或治疗剂“联合”施用包括同时的(在同一时候)和以任何顺序连续的施用两者。施用可以是长期的或间歇的,如由指导医师认为适当的,特别是考虑到在疾病状态上的任何变化或任何不期望的副作用。“长期”施用指以连续的方式施用组合物,而“间歇”施用指伴随中断进行治疗。

[0085] 在一些实施方案中,调节受试者中的肠道微生物群的组成包括降低受试者中的一

种或更多种细菌物种的水平。例如,可降低受试者中的梭菌纲(Clostridia)细菌(诸如毛螺菌科(Lachnospiraceae))的水平以调节受试者中的肠道微生物群的组成。在一些实施方案中,毛螺菌科为罗斯氏菌属(Roseburia)。也可降低拟杆菌目细菌(诸如拟杆菌目S24-7)的水平以调节受试者中的肠道微生物群的组成。在一些实施方案中,梭菌纲细菌为毛螺菌科。可使用多种方法来降低受试者中的一种或更多种细菌物种的水平。例如,可对受试者提供减少的碳水化合物膳食以减少一种或更多种肠道细菌物种。并不束缚于任何具体的理论,相信减少的碳水化合物膳食能限制细菌发酵必需的可行的材料以减少肠道细菌物种。

[0086] 在一些实施方案中,调节受试者中的肠道微生物群的组成包括增加受试者中的一种或更多种细菌物种的水平。例如,可增加受试者中的瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)、丹毒丝菌科(Erysipelotrichaceae)、和/或产碱杆菌科(Alcaligenaceae)细菌的水平以调节受试者中的肠道微生物群的组成。

[0087] ASD相关代谢物

[0088] 如本文使用的,术语“孤独症谱系障碍(ASD)相关代谢物”指其在罹患ASD、焦虑、和/或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者中的水平与非孤独症受试者和/或未罹患ASD、焦虑、和/或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者相比被改变了的代谢物。例如,罹患ASD的受试者与非孤独症受试者相比循环中的代谢物的水平可被改变。在一些实施方案中,罹患ASD的受试者与非孤独症受试者相比血液、血清、血浆、体液(例如,脑脊液、胸膜液、羊水、精液、或唾液)、尿液、和/或粪便中的代谢物的水平被改变。在一些实例中,在罹患ASD的受试者中,ASD相关代谢物在ASD相关行为的发展中发挥着成因的作用。在一些实例中,在ASD相关代谢物的水平上的改变由ASD引起。在罹患ASD的受试者中与非孤独症患者或未罹患ASD、焦虑或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者相比ASD相关代谢物可具有升高或降低的水平。

[0089] 本领域普通技术人员将领会,个体之间可存在代谢物的水平上的变化性,并且可建立参考水平作为代表非孤独症群体或未罹患ASD、焦虑或具有ASD的一种或更多种症状的任何病理状况的受试者的群体中的代谢物的水平的值用于比较。可使用包括受试者的年龄(例如参考受试者可与需要治疗的受试者在相同的年龄组内)和受试者的性别(例如参考受试者可与需要治疗的受试者是相同的性别)的多种标准来确定在参考群体中特定受试者的包括和/或排除。在一些实施方案中,罹患ASD的受试者中的ASD相关代谢物与参考水平相比具有升高的水平。在一些实施方案中,罹患ASD的受试者中的ASD相关代谢物与参考水平相比具有降低的水平。在一些实施方案中,在ASD相关代谢物水平上的改变可通过调节罹患ASD的受试者中的肠道微生物群的组成来部分地或全部地恢复。

[0090] 在表1中提供了ASD相关代谢物的非限制性实例。

[0091] 表1. 示例性ASD相关代谢物

[0092]	N-乙酰丝氨酸	β -丙氨酸	4-甲基-2-氧代戊酸盐/酯
	咪唑丙酸盐/酯	苯酚硫酸盐/酯	5-甲基硫代腺苷
	血清素	3-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	二十二碳五烯酸盐/酯(n3 DPA; 22:5n3)
	精氨酸	鸟氨酸	二十二碳五烯酸盐/酯(n6 DPA; 22:5n6)
	甘氨酸缬氨酸	二十碳烯酸盐/酯	二高-亚油酸盐/酯(20:2n6)
	木糖	十八烷二酸盐/酯	二十二碳六烯酸盐/(DHA; 22:6n3)
	硬脂酸盐/酯	泛酸盐/酯	1-十五酰基甘油磷脂酰胆碱
[0093]	13-HODE+9-HODE	麦角硫因	1-油酰基甘油磷脂酰乙醇胺
	胆红素(E,E)	羟乙酸盐/酯(羟基乙酸盐/酯)	4-乙基苯硫酸盐/酯
	硫酸雌马酚	反式尿苷酸盐/酯	1-棕榈酰甘油磷脂酰乙醇胺
	谷氨酰胺	吲哚丙酮酸盐/酯	1-硬脂酰甘油磷脂酰肌醇
	肾上腺素盐/酯	3-磷酸甘油酸盐/酯	1-棕榈油酰甘油磷脂酰胆碱
	肌醇	苯乙酰甘氨酸	1-棕榈酰缩醛磷脂酰乙醇胺
	半胱氨酸	磷酸烯醇丙酮酸盐/酯	肽 TDTEKGEFLSEGGVVR
	核糖	12-HETE	4-甲基苯硫酸盐/酯
	4-甲基苯基	吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸	4-乙苯基

[0094] ASD相关代谢物参与多种代谢途径。ASD相关代谢物可参与的代谢途径的实例包括但不局限于氨基酸代谢、蛋白质代谢、碳水化合物代谢、脂质代谢、以及辅因子和维生素的代谢。例如,ASD相关代谢物可以是参与以下代谢的代谢物:甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;丙氨酸和天冬氨酸代谢;谷氨酸代谢;组氨酸代谢;苯丙氨酸和酪氨酸代谢;色氨酸代谢;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢;半胱氨酸、甲硫氨酸、SAM、和牛磺酸代谢;鸟氨酸循环;精氨酸-、脯氨酸-代谢;和/或聚胺代谢。ASD相关代谢物也可以是二肽或纤维蛋白原裂解肽。另外,ASD相关代谢物可以是参与以下代谢的代谢物:糖酵解、糖异生、丙酮酸盐/酯代谢;和/或核苷酸糖、戊糖代谢。ASD相关代谢物也可以是参与必需脂肪酸、长链脂肪酸、单羟基和/或二羧酸脂肪酸、类二十烷酸/盐/酯、肌醇、和/或溶血脂质(lysolipid)代谢的代谢物。ASD相关代谢物可以是参与血红蛋白和卟啉代谢、泛酸盐/酯和CoA代谢、和/或苯甲酸盐/酯代谢的代谢物。

[0095] 一些实施方案中,ASD相关代谢物为参与色氨酸代谢的代谢物、参与脂肪酸代谢的代谢物、或参与嘌呤代谢的代谢物。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为羟乙酸盐/酯、咪唑丙酸盐/酯、或N-乙酰丝氨酸。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)、4-乙苯基、吲哚丙酮酸盐/酯、吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸、或血清素。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-甲基苯硫酸盐/酯或4-甲基苯基。

[0096] 在一些实施方案中,一种ASD相关代谢物的水平被调节以改善受试者中的行为表现。例如,可调节受试者中的4EPS或吲哚丙酮酸盐/酯的水平用于改善受试者的行为表现,所述4EPS或吲哚丙酮酸盐/酯的水平例如4EPS或吲哚丙酮酸盐/酯的血液水平(例如,血清

水平)。在一些实施方案中,调节两种或更多种ASD相关代谢物的水平用于改善受试者中的行为表现。例如,可调节受试者中的4EPS和吲哚丙酮酸盐/酯的水平用于改善受试者的行为表现,所述4EPS和吲哚丙酮酸盐/酯的水平例如4EPS和吲哚丙酮酸盐/酯的血液水平(例如,血清水平)。

[0097] 多种方法可被用来调节受试者中的ASD相关代谢物的水平用于改善受试者的行为表现,所述水平例如血液水平(例如,血清水平)或尿液水平。例如,可对受试者施用特异性结合ASD相关代谢物、用于ASD相关代谢物的体内合成的中间体、或用于ASD相关代谢物的体内合成的底物的抗体,以调节受试者中的ASD相关代谢物的水平。例如,可使用特异性结合4EPS和/或4EPS体内合成中的底物和中间体的一种或更多种的抗体,以降低受试者中的4EPS的水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合酪氨酸、羟苯丙酮酸盐/酯、对香豆酸、对乙烯基苯酚、羟苯丙酸盐/酯、和/或4-乙基苯酚的抗体,以降低受试者中的4EPS的水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合4EPS的抗体,以降低受试者中的4EPS的水平。另一个实例,可使用特异性结合4-甲基苯硫酸盐/酯和/或4-甲基苯硫酸盐/酯体内合成中的底物和中间体的一种或更多种的抗体,以降低受试者中的4-甲基苯硫酸盐/酯的水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合酪氨酸、羟苯丙酮酸盐/酯、羟苯丙酸盐/酯、羟苯乙酸盐/酯、和/或对甲酚的抗体,以降低受试者中的4-甲基苯硫酸盐/酯的水平,所述4-甲基苯硫酸盐/酯的水平例如4-甲基苯硫酸盐/酯的尿液水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合4-甲基苯硫酸盐/酯的抗体,以降低受试者中的4-甲基苯硫酸盐/酯的水平。仍然另一个实例,可使用特异性结合吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸和/或吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸体内合成中的底物和中间体的一种或更多种的抗体,以降低受试者中的吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸的水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合色氨酸、吲哚丙酮酸盐/酯、和/或吲哚丙酮酸的抗体,以降低受试者中的吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸的水平。在一些实施方案中,对受试者施用特异性结合吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸的抗体,以降低受试者中的吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸的水平。依旧仍然另一个实例,可使用特异性结合色氨酸和吲哚丙酮酸盐/酯的抗体以降低受试者中的吲哚丙酮酸盐/酯的水平。

[0098] 在本领域中用于生成特异性结合小分子的抗体的方法已被开发。例如在Rufo等人, *J. Ag. Food Chem.* 52:182-187 (2004) 中已描述了抗小分子的单克隆抗体的生成,通过引用将其特此并入。例如,可用与半抗原(例如KLH)缀合的小分子免疫诸如豚鼠或大鼠、优选小鼠的动物,可收集抗体生成细胞、优选地脾脏淋巴细胞并且与稳定、永生化细胞系、优选地骨髓瘤细胞系融合,以生成杂交瘤细胞,然后将所述杂交瘤细胞分离并克隆。参见例如美国专利号6,156,882,通过引用将其特此并入。另外,编码小分子特异抗体的重链和轻链的基因可从细胞克隆,例如,编码单克隆抗体的基因可从杂交瘤克隆并用于制备重组单克隆抗体。

[0099] 也可通过抑制参与ASD相关代谢物的体内合成的酶来调节受试者中的ASD相关代谢物的水平,用于改善受试者的行为表现,所述水平例如血液水平(例如,血清水平)或尿液水平。

[0100] 如本文描述的,调节受试者中的ASD相关代谢物的水平可减轻罹患ASD的受试者的胃肠(GI)不适,所述水平例如血液水平(例如,血清水平)。GI不适可以是腹部绞痛、慢性腹泻、便秘、肠通透性、或其组合。如本文公开的,减轻被广义上用来指至少在与被治疗的病理

状况有关的例如症状的参数的量级上的降低。在一些实施方案中,该方法可完全地抑制例如阻止发生或停止例如终止病理状况或表征病理状况的症状的至少一种或更多种,以使得受试者不再受其苦。在一些实施方案中,该方法可以能察觉或无法察觉地延迟或减缓疾病进展、减轻或缓和疾病状态、以及免除(部分的或完全的)。

[0101] 如以上讨论的,考虑到胃肠(GI)不适的普遍性以及与其核心孤独症行为的严重度的关联,其是ASD中的重要共病。在本文也公开了用于减轻罹患ASD的受试者的胃肠(GI)不适的方法。该方法可包括降低受试者中的肠通透性。在一些实施方案中,GI不适包括腹部绞痛、慢性腹泻、便秘、肠通透性、或其组合。降低肠通透性可通过改变受试者中的肠道微生物群的组成来实现。在一些实施方案中,改变受试者中的肠道微生物群的组成包括对受试者施用包含诸如拟杆菌属细菌的细菌的组合物。在一些实施方案中,改变受试者中的肠道微生物群的组成包括粪便移植。在一些实施方案中,改变受试者中的肠道微生物群的组成包括益生菌治疗。

[0102] 多种受试者是可治疗的。通常地,此类受试者为哺乳动物,其中该术语被广泛地用来描述哺乳动物纲内的有机体,所述哺乳动物纲内的有机体包括以下目:食肉目(carnivore)(例如,狗和猫)、啮齿目(rodentia)(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)、和灵长类(primates)(例如,人类、黑猩猩和猴子)。在优选的实施方案中,受试者为人类。

[0103] 在本文公开的方法中,对需要治疗的受试者施用的例如拟杆菌属细菌(例如脆弱拟杆菌)的细菌的量可根据多种参数确定,所述多种参数诸如:受试者的年龄、体重、响应、待治疗的受试者的状况;焦虑、ASD、或具有ASD的一种或更多种症状的病理状况的类型以及严重程度;细菌被包括于其中的组合物的形式;施用路径;以及所需的疗法。状况的严重程度可例如通过标准预后评价方法来部分地评价。与以上所讨论的可比的方案可被用于兽医学。例如,可滴定细菌的量以确定用于对需要治疗的受试者施用的有效量。本领域普通技术人员应领会,主治医生会知道由于毒性或器官功能紊乱,如何以及何时终止、中断或调节细菌的施用。相反地,主治医生也会知道如果临床反应不足(排除毒性)将治疗调整到较高水平。

[0104] 用于评价ASD受试者对益生菌治疗的敏感性的方法

[0105] 本文提供了用于评价罹患ASD的受试者对益生菌治疗的敏感性的方法。该方法可包括:确定受试者中的脆弱拟杆菌响应性代谢物的水平;以及将受试者中的脆弱拟杆菌响应性代谢物的水平与罹患ASD和一种或更多种胃肠紊乱的受试者中的代谢物的参考水平比较,其中受试者中的代谢物的血液水平与参考水平之间基本上一致表明受试者对益生菌治疗是敏感的,所述益生菌治疗例如脆弱拟杆菌益生菌治疗。在一些实施方案中,该方法包括确定受试者中的两种或更多种脆弱拟杆菌响应性代谢物的水平;以及将受试者中的两种或更多种脆弱拟杆菌响应性代谢物中的每一种的水平与两种或更多种脆弱拟杆菌响应性代谢物中的每一种的参考水平比较,其中在受试者中的代谢物的血液水平与参考水平之间基本上一致表明受试者对益生菌治疗增加的敏感性。

[0106] 代谢物的水平可以是在受试者的循环中的代谢物的水平。例如,代谢物的水平为在受试者的血液或其他体液(例如,脑脊液、胸膜液、羊水、精液、或唾液)中的代谢物的水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为受试者中的代谢物的血液水平。代谢物的血液水平可以是例如代谢物的血清水平或血浆水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为受试者中

的代谢物的尿液水平。

[0107] 脆弱拟杆菌响应性代谢物

[0108] 如本文使用的,术语“脆弱拟杆菌响应性代谢物”指其水平已被确定被脆弱拟杆菌治疗改变的代谢物。例如,在脆弱拟杆菌治疗之后在受试者的循环中的代谢物的水平可被改变。在一些实施方案中,在脆弱拟杆菌治疗之后,在受试者的血液、血清、血浆、体液(脑脊液、胸膜液、羊水、精液、或唾液)、尿液、和/或粪便中代谢物的水平被改变。在脆弱拟杆菌治疗之后脆弱拟杆菌响应性代谢物在水平上可被增加或减少。在一些实例中,在用脆弱拟杆菌治疗的ASD受试者中ASD相关代谢物在行为表现的改善上发挥着成因的作用。在一些实例中,脆弱拟杆菌响应性代谢物也是ASD相关代谢物。在一些实例中,ASD相关代谢物也是脆弱拟杆菌响应性代谢物。

[0109] 如本文公开的,脆弱拟杆菌响应性代谢物能通过将在受试者例如罹患ASD的受试者中的代谢物的治疗前水平与脆弱拟杆菌治疗后受试者中的代谢物的水平比较来确定。本领域普通技术人员将领会,个体间可存在代谢物水平上的变化性,并且可建立脆弱拟杆菌响应性代谢物的参考水平作为代表在罹患一种或更多种GI紊乱的ASD受试者的群体中的代谢物的水平的值用于比较。在一些实施方案中,在罹患ASD的受试者中脆弱拟杆菌响应性代谢物与参考水平相比具有增加的水平。在一些实施方案中,在罹患ASD的受试者中脆弱拟杆菌响应性代谢物与参考水平相比具有减少的水平。

[0110] 在表2中提供了脆弱拟杆菌响应性代谢物的非限制性实例。

[0111] 表2. 示例性脆弱拟杆菌响应性代谢物

[0112]

肌氨酸(N-甲基甘氨酸)	肌苷
天冬氨酸	腺苷
3-脲基丙酸盐/酯	5'-单磷酸腺苷(AMP)
戊二酸盐/酯 (glutarate) (戊二酸盐/酯 (pentanedioate))	5'-单磷酸鸟苷(5'-GMP)
酪氨酸	尿酸盐/酯
3-(4-羟苯基)乳酸盐/酯	2'-脱氧胞苷
3-丙基丙酸盐/酯(氯化肉桂酸盐/酯)	尿嘧啶
血清素(5HT)	假尿苷
3-甲基-2-氧代丁酸盐/酯	烟酰胺
3-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	硫酸苯邻二酚
4-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	水杨酸盐/酯
异丁酰肉毒碱	硫酸雌马酚
2-甲基丁酰肉毒碱	赤藓糖醇
异戊酰基肉毒碱	十二烷二酸盐/酯
2-羟基丁酸盐/酯(AHB)	十四烷二酸盐/酯
精氨酸	十六烷二酸盐/酯
鸟氨酸	十八烷二酸盐/酯
2-氨基丁酸盐/酯	十一烷二酸盐/酯
4-胍基丁酸盐/酯	12-HETE
5-氧代脯氨酸	丙酰基肉毒碱
甘氨酸缬氨酸	丁酰肉毒碱
γ -谷氨酰基色氨酸	戊酰肉毒碱
TDTEDKGEFLSEGGV	3-脱氢肉毒碱
TDTEDKGEFLSEGGVR	己酰肉毒碱
山梨醇	辛酰肉毒碱
丙酮酸盐/酯	胆碱
核糖醇	手性肌醇
核糖	松醇
核酮糖	3-羟基丁酸盐/酯(BHBA)
木糖醇	1,2-丙二醇
柠檬酸盐/酯	1-亚油酰甘油磷脂酰乙醇胺
延胡索酸盐/酯	1-花生四烯酰甘油磷脂酰乙醇胺
苹果酸盐/酯	2-花生四烯酰甘油磷脂酰乙醇胺
亚油酸盐/酯(18:2n6)	1-硬脂酰丙三基磷脂酰肌醇
亚麻酸盐/酯[α 或 γ ; (18:3n3 或 6)]	1-亚油酰甘油磷脂酰肌醇

	二高-亚麻酸盐/酯(20:3n3 或 n6)	1-花生四烯酰甘油磷脂酰肌醇
	二十二碳五烯酸盐/酯(n3 DPA; 22:5n3)	1-棕榈酰缩醛磷脂酰乙醇胺
	二十二碳五烯酸盐/酯(n6 DPA; 22:5n6)	次黄嘌呤
	二十二碳六烯酸盐/酯(DHA; 22:6n3)	二十碳烯酸盐/酯(20:1n9 或 11)
	庚酸盐/酯(7:0)	二高-亚油酸盐/酯(20:2n6)
	壬酸盐/酯(9:0)	二十碳三烯酸 (20:3n9)
	月桂酸盐/酯(12:0)	肾上腺素盐/酯(22:4n6)
	豆蔻酸盐/酯(14:0)	8-羟基辛酸盐/酯
	棕榈酸盐/酯(16:0)	3-羟基癸酸盐/酯
[0113]	棕榈油酸盐/酯(16:1n7)	16-羟基棕榈酸盐/酯
	十七酸盐/酯(17:0)	13-HODE + 9-HODE
	硬脂酸盐/酯(18:0)	12,13-羟基十八-9(Z)-烯酸盐/酯
	油酸盐/酯(18:1n9)	9,10-羟基十八-12(Z)-烯酸
	十八碳四烯酸盐/酯(18:4n3)	己二酸盐/酯
	辛二酸盐/酯 (suberate) (辛二酸盐/酯 (octanedioate))	2-羟基戊二酸盐/酯
	癸二酸盐/酯 (sebacate) (癸二酸盐/酯 (decanedioate))	庚二酸盐/酯 (pimelate) (庚二酸盐/酯 (heptanedioate))
	壬二酸盐/酯 (azelate) (壬二酸盐/酯 (nonanedioate))	

[0114] ASD的诊断

[0115] 本文还公开了用于在受试者中诊断ASD的方法。在一些实施方案中,该方法包括:确定肠道中的细胞因子的水平以及受试者中的一种或更多种ASD相关代谢物的水平;以及检测肠道中的细胞因子的水平和受试者中的ASD相关代谢物的至少一种或更多种的水平与非孤独症受试者中的细胞因子和代谢物的参考水平相比是否有改变,凭借在肠道中的细胞因子的量和一种或更多种代谢物中的至少一种的水平上的改变指示受试者罹患ASD。

[0116] 在一些实施方案中,该方法包括:确定受试者中的ASD相关代谢物的水平;以及检测在受试者中的ASD相关代谢物的水平与非孤独症受试者中的代谢物的参考水平比较是否有改变,凭借在ASD相关代谢物的水平上的改变指示受试者罹患ASD。在一些实施方案中,该方法包括:确定受试者中的两种或更多种ASD相关代谢物的水平;以及检测在受试者中的两种或更多种ASD相关代谢物的水平与非孤独症受试者中的代谢物的参考水平比较是否有改变,凭借在两种或更多种ASD相关代谢物中的至少两种的水平上的改变来指示受试者罹患ASD。

[0117] 如本文公开的,ASD相关代谢物的水平可以是在受试者的循环中的代谢物的水平。例如,代谢物的水平可以是在受试者的血液或其它体液(例如,脑脊液、胸膜液、羊水、精液、或唾液)中的代谢物的水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为受试者中的代谢物的血液水平。代谢物的血液水平可以是例如代谢物的血清水平或血浆水平。在一些实施方案中,代谢物的水平为在受试者中的代谢物的尿液水平。

[0118] 本领域普通技术人员将领会,非孤独症群体中的个体间可存在代谢物的水平和/或细胞因子的水平的变化性。并且因此,可建立代谢物的参考水平作为代表在非孤独症群

体中的代谢物的水平的值用于比较,并且可建立细胞因子的参考水平如代表在非孤独症群体中的细胞因子的水平的值用于比较。在一些实施方案中,在罹患ASD的受试者中ASD相关代谢物与ASD相关代谢物的参考水平相比具有增加的水平。在一些实施方案中,罹患ASD的受试者中ASD相关代谢物与ASD相关代谢物的参考水平相比具有减少的水平。在一些实施方案中,罹患ASD的受试者中的细胞因子的水平与细胞因子的参考水平相比是增加的。在一些实施方案中,在罹患ASD的受试者中细胞因子的水平与细胞因子的参考水平相比是减少的。本文描述了ASD相关代谢物,并且在表1中提供了可在该方法中使用的ASD相关代谢物的非限制性实例。

[0119] 在一些实施方案中,细胞因子为白细胞介素-6 (IL-6)。在一些实施方案中,一种或更多种ASD相关代谢物包括参与色氨酸代谢的代谢物、参与脂肪酸代谢的代谢物、参与嘌呤代谢的代谢物、羟乙酸盐/酯、咪唑丙酸盐/酯、N-乙酰色氨酸、或其任何组合。参与色氨酸代谢的代谢物的非限制性实例包括4-乙基苯硫酸盐/酯、吡啶丙酮酸盐/酯、吡啶基-3-丙烯酰甘氨酸、或血清素。在一些实施方案中,ASD相关代谢物为4-乙基苯硫酸盐/酯、吡啶丙酮酸盐/酯、吡啶基-3-丙烯酰甘氨酸、或血清素。

[0120] 在本公开内容中公开的方法中,受试者中的代谢物的水平可通过本领域已知的任何常规方法来确定,所述本领域已知的任何常规方法包括但不限于色谱分析法、液相色谱法、体积排阻色谱、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法、质谱分析法、串联质谱法、基质辅助激光解吸/电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱法、电喷射离子化 (ESI) 质谱法、表面增强激光解吸/电离飞行时间 (SELDI-TOF) 质谱法、四极杆-飞行时间 (Q-TOF) 质谱法、大气压光离子质谱法 (APPI-MS)、傅里叶变换质谱法 (FTMS)、基质辅助激光解吸/电离-傅里叶变换离子回旋共振 (MALDI-FT-ICR) 质谱法、次级离子质谱法 (SIMS)、放射免疫分析法、基于微射流芯片的分析法、荧光检测、化学发光检测、或其组合。

实施例

[0121] 在以下实施例中更详细地公开以上讨论的实施方案的一些方面,以下实施例绝非意图限制本公开内容的范围。

[0122] 实验材料和方法

[0123] 以下实验方法被用于以下描述的实施例1-8。

[0124] 动物及MIA

[0125] 从较大的妊娠雌性群随机选择妊娠C57BL/6N (Charles River;Wilmington,MA),并且根据在Smith等人,2007中所描述的方法用盐水或20mg/kg聚 (I:C) 于E12.5时腹腔注射。所有的动物试验经Caltech IACUC批准。

[0126] 脆弱拟杆菌处理

[0127] 在3周龄时,将跨单独窝的盐水和聚 (I:C) 后代关进相同处理组的4个非同窝生仔畜后代的笼子中,以形成随机化试验设计 (Lazic,2013)。随机选择聚 (I:C) 与盐水处理组中的笼子用于用脆弱拟杆菌或媒介物处理,隔天处理,持续6天。为了排除生命早期应激对神经发育和行为的任何混杂影响,不通过口腔强饲法施用悬浮液。对于脆弱拟杆菌处理,将 10^{10} cfu新长成的脆弱拟杆菌悬浮在1mL 1.5%碳酸氢钠中,与4mL无糖苹果酱混合并涂在四份标准食物颗粒上。对于媒介物处理,对盐水和聚 (I:C) 动物饲喂食物颗粒上苹果酱中的

1.5%碳酸氢钠。苹果酱和颗粒在施用后的48小时被每个处理组的小鼠完全吃光。相同的程序被用于用缺PSA的突变体脆弱拟杆菌和多形拟杆菌处理。

[0128] 肠通透性测定

[0129] 将成年小鼠禁食4小时,随后用0.6g/kg 4kDa FITC-葡聚糖(Sigma Aldrich)口腔强饲。4小时后,通过心脏穿刺来收集血液样品并通过SST真空采血管(Becton Dickinson)旋转(spun)。利用xFluor4分光计(Tecan)立即读取FITC-葡聚糖标准品和3×稀释的血清在521nm处的FITC荧光强度。对小鼠饲喂在饮用水中的3%硫酸葡聚糖钠盐(DSS;MP Biomedicals),持续7天,以化学诱导结肠炎。

[0130] 体外免疫测定

[0131] 在Hsiao等人,2012中描述了用于Treg和Gr-1的流式细胞术以及CD4+T细胞体外刺激的方法。简单地说,从脾和肠系膜淋巴结将细胞收获在完全RPMI中。对于脾细胞的亚型分型,用Gr-1 APC、CD11b-PE、CD4-FITC和Ter119-PerCP-Cy5.5(Biolegend)对细胞染色。对于Treg的检测,在GolgiPLUG(BD Biosciences)的存在下用PMA/离子霉素刺激脾细胞4小时,封闭Fc受体并用CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-APC和Ter119-PerCP-Cy5.5标记。利用FACSCalibur细胞计数器(BD Biosciences)加工样品并利用FlowJo软件(TreeStar)分析。对于CD4+T细胞刺激测定,在具有PMA(50ng/ml)和离子霉素(750ng/ml)的完全RPMI中在37°C和5%(vol/vol)CO₂下培养10⁶CD4+T细胞3天。每天,收集上清液用于ELISA测定以根据制造商的说明(eBioscience)检测IL-6和IL-17。

[0132] IL-6口腔强饲以及体外结肠培养

[0133] 对于体内测定,用在1.5%碳酸氢钠中的5μg无载体重组小鼠IL-6(eBioscience)强饲成年小鼠。强饲后4h时,将远端结肠、中间结肠和近端结肠的1cm区域切下、在HBSS中洗涤并加工用于qRT-PCR,如以上描述的。对于体外测定,处死成年小鼠并将远端结肠、中间结肠以及近端结肠的1cm区域切下、洗涤并平分,用于在完全RPMI培养基中用0-80ng/ml IL-6培养结肠。培养4小时后,收获结肠碎片并加工用于qRT-PCR,如以上所描述的。

[0134] 肠的qRT-PCR、蛋白质印迹、以及细胞因子谱

[0135] 在HBSS中洗涤远端结肠、中间结肠和近端结肠以及小肠的1cm区域并且a)在冰冷的Trizol中均质化,用于根据Hsiao和Patterson,2011的RNA提取和反转录;或b)在包含无EDTA的蛋白酶抑制剂(Roche)的组织提取试剂I(Invitrogen)中均质化,用于蛋白测定。对于SYBR green qRT-PCR,从Primerbank(Harvard)获得验证过的引物组。对于细胞因子谱系分析(profiling),由在City of Hope(Duarte,CA)的临床免疫生物学相关研究实验室在Luminex FLEXMAP 3D平台上运行小鼠20-路的细胞因子阵列(Invitrogen)。根据标准方法进行蛋白质印迹并用以1:100稀释的兔抗claudin 8或兔抗claudin 15(Invitrogen)来探测。

[0136] 微生物DNA提取、16S rRNA基因扩增及焦磷酸测序

[0137] 利用MoBio PowerSoil试剂盒依照作为NIH人类微生物组计划的部分的基准的实验方案从小鼠粪球提取细菌基因组DNA。利用包含用于454-焦磷酸测序的接头序列的单独编码的通用引物来PCR扩增16S rRNA基因的V3-V5区域。利用多路的454-Titanium焦磷酸测序仪在Baylor College of Medicine的人类基因组测序中心进行测序。

[0138] 16S rRNA基因序列分析

[0139] FASTA和质量文件从用于在Baylor College of Medicine的宏基因组和微生物组研究的Alkek中心获得并经质量过滤。<200bp和>1000bp的序列以及包含任何引物错配、条形码错配、多义碱基、超过六个碱基的均聚物串、或低于30的平均质量得分的序列被丢弃。然后利用QIIME 1.6软件包 (Caporaso等人, 2010b) 分析经质量过滤的序列。然后利用USearch pipeline (Edgar, 2010; Edgar等人, 2011) 以97%的序列相似性指数检查序列的嵌合体并聚类为运算分类单元 (operational taxonomic units, OTU)。随后利用基本局部比对算法搜索工具 (BLAST) 分类器 (Altschul等人, 1990), 基于小亚基非冗余参考数据库发布 111 (small subunit non-redundant reference database release 111) (Quest等人, 2013) 以0.001最大e-值对OTU指定分类学上的分类。然后这些分类被用于生成所有OTU在不同分类水平上的分类汇总。对于基于树的 α -和 β 多样性分析, 利用PyNAST (Caporaso等人, 2010a) 比对每个OTU的代表序列并且利用FastTree (Price等人, 2009) 基于这种比对构建系统树。利用基于100次迭代、利用来自每个样品的2082个序列的稀疏 (rarefaction) 的非参数检验来计算并在多个组之间比较 α 多样性估算 (通过Observed Species and Faith's phylogenetic diversity [PD]; (Faith, 1992)) 和均匀度 (通过Simpson's evenness and Gini Coefficient; (Wittebolle等人, 2009))。对于 β 多样性, 使用每个样品2160个序列的均匀抽样, 并利用加权或不加权的UniFrac (Lozupone和Knight, 2005) 来计算。利用Analysis of Similarity (ANOSIM; Fierer等人2010) 以两两配对 (盐水 (S) 与聚 (I:C) (P)、聚 (I:C) (P) 与聚 (I:C) + 脆弱拟杆菌处理 (P+BF)) 的方式以999种排列来比较 β 多样性以确定统计差异。

[0140] 特定OTU的鉴定的鉴定

[0141] 使用以下三种互补的 (complimentary) 分析将在盐水和聚 (I:C) 处理组之间、以及在聚 (I:C) 和聚 (I:C) + 脆弱拟杆菌处理组之间有区别的关键OTU利用无偏方法从由QIIME生成的OTU表鉴定出: (1) Metastats比较 (White等人, 2009); (2) 在Genboree微生物组工具集 (Riehle等人, 2012) 中的Random Forests算法, 首先根据QIIME (Knights等人, 2011) 并且随后结合Boruta特征选择; 以及 (3) 基于Galaxy平台的LDA Effect Size分析 (LEfSe; (Segata等人, 2011))。只有在处理组之间显著地不同的OTU是用于进一步分析的候选 (对于 (1) 和 (3) $p < 0.05$, 并且在Random Forests以及通过Boruta算法的后续鉴定的精确度上 > 0.0001 的平均增加)。利用在线界面 (<http://metastats.cbcb.umd.edu>) 用QIIME生成的任何两个处理组的OTU表进行Metastats分析。在QIIME软件包 (Breiman, 2001; Knights等人, 2011) 中使用Random Forests算法基于1000棵树和10倍交叉验证同时比较两个处理组来鉴定差别OTU, 并且所述Random Forests算法被进一步验证并与Boruta特征选择算法结合, 如在Genboree Microbiome工具集 (Kursa和Rudnicki, 2010; Riehle等人, 2012) 中实现的。只有由Boruta算法证实的那些OTU被限定为有差异的。观察到的错误率和计算的错误率之间的比例被用作对Random Forests Analyses的置信度的量度: 对于盐水与聚 (I:C) 该比例为5.0 (具有 0.1 ± 0.21 的估计误差) 并且对于聚 (I:C) 与聚 (I:C) + 脆弱拟杆菌为2.86 (具有 0.23 ± 0.22 的估计误差)。为了克服由三种方法中的任一种造成的任何错误标记, 只有由以上三种方法中的至少两种鉴定出的OTU被限定为有差异的。对于图1A-图1D中的分析, 被MIA显著地改变的OTU通过比较盐水组与聚 (I:C) 组来鉴定。对于图6A-图6F中的分析, 比较聚 (I:C) 组与聚 (I:C) + 脆弱拟杆菌组, 并且只报道仅已由图1A-图1D中的分析鉴定出的那些

OTU。

[0142] 然后将关键OTU利用SINA比对器 (<http://www.arb-silva.de/aligner/>; Pruesse 等人, 2012) 比对, 利用Arb (Ludwig等人, 2004) 与SILVA参考数据库发布111 (Quast等人, 2013) 比较并利用FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 可视化。通过从OTU表提取关键OTU的相对丰度生成其热图。然后首先通过OTU并且随后通过样品将这些数据标准化(因此在一行或列中的所有值的平方和等于1), 并且利用Cluster 3.0 (de Hoon 等人, 2004) 通过相关性来聚类。最后, 利用Java TreeView (Saldanha, 2004) 使丰度数据可视化。

[0143] 脆弱拟杆菌定殖测定

[0144] 在开始用脆弱拟杆菌或媒介物处理后1、2和3周时, 从MIA后代和对照后代无菌地收集粪便样品。如以上所描述的用脆弱拟杆菌处理无菌小鼠以作为阳性对照。利用QIAamp DNA Stool Mini试剂盒 (Qiagen) 从粪便样品分离DNA。根据Odamaki等人, 2008, 50ng DNA被用于用脆弱拟杆菌特异的5' TGATTCCGCATGGTTTCATT 3' (SEQ ID NO:1) 和5' CGACCCATAGAGCCTTCATC 3' (SEQ ID NO:2) 以及通用16S引物5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 3' (SEQ ID NO:3) 和5' ATTACCGCGGCTGCTGGC 3' (SEQ ID NO:4) 进行qPCR。

[0145] 行为测试

[0146] 如在Hsiao等人, 2012以及Malkova等人, 2012中所描述的对成年MIA后代和对照后代进行行为测试。从6周龄开始以前脉冲抑制 (pre-pulse inhibition)、开场探究 (open field exploration)、埋珠 (marble burying)、社交 (social interaction) 以及成鼠超声发声 (adult ultrasonic vocalizations) 这种顺序来测试小鼠, 各行为测试之间至少5天。脆弱拟杆菌处理组和对照组的行为数据 (图10A-图10F) 代表了从用于PPI和开场测试的3-5个独立的小鼠群、用于埋珠的2-4群、用于雄性成鼠超声发声的2群以及用于社交的1群的多窝收集的累积结果。跨行为测试之间在样品大小上的差异反映了在我们的实验性研究期间实施特定测试时的差异。

[0147] 前脉冲抑制。PPI测试被用作感觉门控的量度并且根据在Geyer和Swerdlow, 2001以及Smith等人, 2007中所描述的程序进行并分析。简单地说, 使小鼠适应SR-LAB惊恐反应系统的测试室 (San Diego Instruments) 5分钟, 提供六次120db白噪音脉冲 (惊恐刺激) 并且然后使经受无惊恐、只有惊恐刺激、5db前脉冲和惊恐或15db前脉冲和惊恐的14个随机区组。通过压电式电传感器记录惊恐反应, 并且百分比PPI被限定为: $[(\text{只有惊恐刺激} - 5 \text{或} 15 \text{db前脉冲和惊恐}) / \text{只有惊恐刺激}] * 100$ 。

[0148] 开场探究。开场测试被广泛地用于测量啮齿动物中的焦虑样行为以及运动行为。将小鼠放在50×50cm的白色Plexiglas玻璃盒子中10分钟。高架摄像机记录场次, 并且利用Ethovision软件 (Noldus) 以分析活动的距离, 以及进入中央区 (中央17平方cm) 的次数和在中央区停留的时间。

[0149] 埋珠。埋珠是在啮齿动物中引起的重复行为, 类似于在孤独症个体中观察到的那些 (Silverman等人, 2010b)。根据在Thomas等人, 2009以及Malkova等人, 2012中所描述的方法进行并分析该测试。使小鼠习惯含有4cm碎杉木铺垫层的新的测试笼10分钟并且然后转移到新的住房笼。在测试笼中将18个玻璃珠 (15cm直径) 等距地6×3排列。将小鼠放回测试笼并且记录在10分钟内所掩埋的珠的数目。

[0150] 社交能力及社会偏好。根据从Sankoorikal等人,2006以及Yang等人,2011改良的方法进行并分析社交测试。简单地说,使测试小鼠习惯在每一个侧室中含有明显的交互筒(interaction cylinder)的40×60cm Plexiglas三室装置10分钟。在随后的10分钟场次中测试社交能力,其中给予测试小鼠访问在一个交互筒(社会性物体)中的新的同性别、年龄匹配的小鼠或在相对室的另一个交互筒中的新的玩具(绿色粘球)的机会。在最后的10分钟场次测试社会偏好,其中给予测试小鼠访问现已熟悉的小鼠(来自之前的社交能力场次的刺激小鼠)或新的不熟悉同性别、年龄匹配的小鼠的机会。在每一场次中,用Ethovision软件(Noldus)追踪测试小鼠的轨迹。社交能力数据展示为对小鼠比对玩具的偏好:在社交室中的时间百分比-在非社交室中的时间百分比,并且社会偏好数据展示为对不熟悉的小鼠比对熟悉的小鼠的偏好:在不熟悉的小鼠的室中的时间的百分比-在熟悉的小鼠的室中的时间的百分比。对于室进入、进入接触区(交互筒周围7×7平方cm)和在接触区停留的时间测量类似的指数。

[0151] 成鼠超声发声。雄性小鼠发出USV回应雌性小鼠为通讯的重要形式(Portfors, 2007)。根据在Grimsley等人,2011;Scattoni等人,2011;以及Silverman等人,2010a中所描述的方法测量成年雄性响应于新的雌性暴露的USV发出。使成年雄性在测试之前独居一周并且在测试之前的开始四天使每天对不熟悉的成年雌性小鼠暴露20分钟,以提供标准化的性体验史并为在社会优势上的不同调整。在测试日,在暴露于新的年龄匹配的雌性之前使小鼠习惯新笼10分钟。利用UltraSoundGate扩音器和音频系统(Avisoft Bioacoustics)记录USV 3分钟。在512FFT长度处快速傅里叶变换之后利用Avisoft的SASLab Pro软件分析录音并通过基于阈值的算法以5ms保存时间检测。展示的数据反映了在3分钟的场次中发出的呼叫的持续时间及次数。

[0152] 代谢组学筛选

[0153] 通过心脏穿刺从行为上验证的成年小鼠收集血清。由Metabolon, Inc在GC/MS、LC/MS和LC/MS/MS平台上提取并分析样品。通过用有机水性溶剂连续提取,利用Turbo Vap系统(Zymark)浓缩并真空干燥来移除蛋白级分。对于LC/MS和LC/MS/MS,在含有>11种注射标准液的酸性或碱性LC-相容的溶剂中复原样品并在具有线性离子阱前端和傅立叶变换离子回旋共振质谱仪后端的Waters ACQUITY UPLC和Thermo-Finnigan LTQ质谱仪上运行。对于GC/MS,将样品在干氮下利用双三甲基-甲硅烷基-三氟乙酰胺衍生化并利用电子轰击离子化在Thermo-Finnigan Trace DSQ快速扫描单-四极质谱仪上分析。通过与纯化的标准品的代谢组库条目比较来鉴定化学实体。在对每种化合物log转化并用最低观察值归因后,利用带比较的两因素ANOVA分析数据。

[0154] 4EPS分析和检测

[0155] 利用在Burlingham等人,2003以及Grimes,1959中所报道的用于芳基硫酸盐合成的程序的变化形式来制备4-乙基苯硫酸钾(图15A)。在回流苯(20ml,通过经过活性氧化铝柱干燥)中用三氧化硫吡啶络合物(Sigma-Aldrich, 5.92g, 37.2mmol)处理4-乙基苯酚(Sigma-Aldrich, 5.00g, 40.9mmol)。3.5小时之后,使得到的溶液冷却至室温,在该点产物结晶。通过过滤分离提供为白色结晶固体的7.93g粗吡啶4-乙基苯硫酸盐。将1.00g这种物质溶于10mL在乙腈中的3%三乙胺并且通过二氧化硅凝胶塞(Silicycle, 粒径32-63μm)来过滤,用在乙腈中的3%三乙胺洗脱。然后将滤液浓缩,并将产生的残渣溶于20mL去离子水

中并通过Dowex 50WX8离子交换树脂柱(K^+ 型)来洗脱,用20mL去离子水漂洗。再重复一次离子交换过程,并且产生的溶液在真空下浓缩以提供为白色粉末的618mg (55%总产量) 4-乙基苯硫酸钾(图15A)。

[0156] 可信的4-乙基苯硫酸钾的 1H 和 ^{13}C NMR谱被记录在Varian Inova 500光谱仪上并且被相对于内部DMSO- d_5 (1H , $\delta=2.50$; ^{13}C , $\delta=39.52$) 报告。利用具有以混合电离模式(电喷雾离子化(ESI)以及大气压化学电离(APCI))的Agilent G1978A Multimode source的Agilent 6200Series TOF获得高分辨率质谱(HRMS)。4-乙基苯硫酸钾的光谱数据如下: 1H NMR (DMSO- d_6 , 500MHz) δ 7.11-7.04 (m, 4H), 2.54 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.15 (t, $J=7.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 126MHz) δ 151.4, 138.3, 127.9, 120.6, 27.5, 16.0;对 $C_8H_9O_4S[M-K]^-$ 计算的HRMS (Multimode-ESI/APCI) 201.0227,发现201.0225。

[0157] 利用装备光电二极管阵列检测器并连接到model G1946C single quadrupole electrospray质谱仪的Agilent 110 Series HPLC系统通过LC/MS来分析可信的4EPS以及血清样品。利用Agilent Zorbax XDB-C18柱(4.6mm \times 50mm \times 5 μ m粒径)在25 $^\circ$ C得到HPLC分离。利用选择性离子监测对 m/z 200.9以及580ms/离子的驻留时间的离子来检测4EPS离子,电喷雾毛细管被设定在3kV。利用0-50%乙腈的10分钟线性梯度,发现当在0.05%三氟乙酸和乙腈中洗脱时,可信的钾4EPS具有6.2分钟的保留时间。对于小鼠血清中的4EPS的定量,通过绘制可信的钾4EPS的已知浓度对分析物浓度的总离子计数峰面积来构建剂量响应曲线($R^2=0.9998$;图15B)。用乙腈将小鼠血清样品稀释四倍并在4 $^\circ$ C、10,000g下离心3分钟。将10 μ l上清液直接地注射入HPLC系统中。

[0158] 4EPS充足实验

[0159] 从3周龄至6周龄每天用盐水或30mg/kg 4EPS钾盐腹腔注射野生型小鼠。通过在腹腔注射30mg/kg 4EPS之后在多个时间测量血清4EPS水平来生成剂量响应曲线(图15C)。从6周龄至9周龄如以上所描述的对小鼠进行行为测试。

[0160] 统计分析

[0161] 利用Prism软件(Graphpad)进行统计分析。对数据的正态分布进行评价并在图中绘制为平均值 \pm SEM。利用双尾不配对Student t检验和Welch修正评价在两个处理组(即对照与4EPS)之间的差异。利用单因素ANOVA和邦弗朗尼事后检验(Bonferroni post hoc test)评价在多个组之间(盐水和聚(I:C)和聚(I:C)+脆弱拟杆菌/多形拟杆菌)的差异。两因素重复测量ANOVA和邦弗朗尼事后检验被用于PPI和CD4+T细胞刺激数据的分析。有比较的两因素ANOVA被用于代谢物数据的分析。考虑到本研究的个体随机设计,样本量表示每个处理组的个体小鼠的数目(Lazic, 2013)。在图中通过 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 标示从以上测试产生的显著差异。在图中标示了值得注意的近显著差异($0.05<p<0.1$)。值得注意的不显著(及不近显著)差异由“n.s”在图中标示。

[0162] 实施例1

[0163] 免疫激活的母体的后代表现出人类ASD的GI症状

[0164] 表现出ASD的主要的行为和神经病理学症状的成年MIA后代(Malkova等人, 2012),也被发现在肠屏障完整性上表现出显著的缺陷,如通过口服施用的FITC-葡聚糖穿过肠上皮细胞层并进入循环的增加的转运所反映的(图1A,左图)。这种MIA相关的在肠通透性上的增加与在用于引发实验性结肠炎的化学品葡聚糖硫酸钠(DSS)处理的小鼠中所观察到的

相似(图1A,左图)(Wirtz等人,2007)。在3周龄的MIA后代中在肠通透性上的缺陷是可检测的(图1A,右图),表明在幼年期间异常就已建立。为了评价MIA后代中增加的肠通透性的分子基础,检测MIA后代的结肠的紧密连接成分ZO-1(TJP1)、ZO-2(TJP2)、ZO-3(TJP3)、occludin以及claudins(CLDN)1、2、3、4、7、8、12、13和15(Holmes等人,2006)。与在表现GI异常的ASD儿童的亚类中发现的肠漏表型相一致,来自成年MIA后代的结肠表现出ZO-1、ZO-2、occludin和claudin 8的转录子的减少的表达,以及claudin 15mRNA的增加的表达(图1B)。在成年MIA后代的小肠中也观察到缺乏的ZO-1表达(图2A),表明在肠屏障完整性上的普遍的缺陷。

[0165] 增加的通透性在若干种肠疾病以及ASD的亚类中被观察到,并且通常地与炎症的迹象有关系(Hering等人,2012;Turner,2009;White,2003)。除了在紧密连接成分的表达上的改变之外,发现来自成年MIA后代的结肠表现出增加的白细胞介素-6(IL-6)mRNA和蛋白水平(图1C和1D)以及减少的细胞因子/趋化因子IL-12p40/p70、IP-10、MIG和MIP-1a水平(图1D)。来自MIA后代的小肠还表现出改变的细胞因子/趋化因子谱(图2C)。肠细胞因子的改变并不伴随明显的GI病理,如通过来自苏木精和曙红染色切片的粗上皮细胞形态的组织学检查所评价的。然而,与免疫相关信号转导因子的改变一致,发现来自成年MIA后代的肠系膜淋巴结和脾含有减少的水平调节性T细胞以及由CD4+T辅助细胞过度响应产生的IL-6和IL-17,这暗示着促炎性表型(图3A-图3D)(Hsiao等人,2012)。在ASD个体的亚类中观察到支持肠免疫激活的相似发现(Onore等人,2012)。

[0166] 鉴于上述,本实施例显示了,免疫激活母体的成年后代表现出增加的肠通透性以及异常的肠细胞因子谱,在小鼠模型中重现了ASD相关的GI症状。

[0167] 实施例2

[0168] MIA后代表现出肠微生物群的生态失调

[0169] 在本实施例中检查了正常肠微生物群的破坏和ASD小鼠模型中的GI功能障碍之间的潜在联系。

[0170] 为了评价MIA是否引起微生物群改变,通过从用聚(I:C)或盐水处理的母体的成年后代分离的样品的16S rRNA基因测序来调查粪便微生物群体。 α 多样性即物种丰富度和均匀度在对照和MIA后代之间并无显著地差异,如通过Faith's系统发育多样性(PD)指数、和观察到的物种(分别地 $p=1.0000$ 和 0.2790)的数目以及Gini系数和Simpson均匀度指数(分别地 $p=0.5430$ 和 $p=0.2610$;图4A和图4B)所测量的。与之相比,测量微生物群落之间的系统发育相似程度的不加权的UniFrac分析揭示了MIA对成年后代的肠微生物群的强烈影响(图5A-图5E)。MIA样品集簇通过主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA;ANOSIM $R=0.2829$, $p=0.0030$)与对照明显区分,表明来自MIA后代的肠细菌的全体成员(membership)与对照相比强烈变化(图5A)。当来自占我们的调查中的全部读数的大约90.1%(在S和P组中的51,586个读数中的46,484个)的梭菌纲和拟杆菌纲(Bacteroidia)的序列通过PCoA($R=0.2331$, $p=0.0070$;图5B)被排他地检查时,MIA对改变肠微生物群的组成的影响更明显,但是当梭菌纲和拟杆菌纲序列被特别地从所有其他细菌纲的PCoA排除时($R=0.1051$, $p=0.0700$;图5C)则不是。这表明,在梭菌纲和拟杆菌纲运算分类单元(OTU)的多样性上的改变是在MIA后代和对照之间的肠微生物群差异的主要驱动因素。

[0171] 在任何样品中均被检测到的1474个OTU中的67个OTU在处理组之间有区别,所述67

个OTU包括被指定为细菌科毛螺菌科、瘤胃球菌科、丹毒丝菌科、产碱杆菌科、紫单胞菌科 (Porphyromonadaceae)、普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae)、和理研菌科 (Rikenellaceae), 以及未分类的拟杆菌目的那些 (图5D)。这些67个区别OTU中, 19个在对照样品中更丰富并且 48个在MIA样品中更丰富。与PCoA的结果 (图5A-图5C) 一致, 将MIA后代与对照区别开来的 OTU的大多数被指定为拟杆菌纲 (67个OTU中的45个; 67.2%) 和梭菌纲 (67个OTU中的17个; 25.4%), 然而少数剩余的区别OTU属于变形菌纲 (Proteobacteria) (3个OTU; 4.5%) 和其它纲 (柔壁菌门 (Tenericutes) 和未分类的, 各1个OTU; 3.0%)。有趣地, 紫单胞菌科、普雷沃氏菌科、和很多未分类的拟杆菌目 (45个区别拟杆菌OTU中的36个; 80%)、和毛螺菌科 (14个区别梭菌OTU中的8个; 57%) 在MIA后代中更丰富。相比之下, 瘤胃球菌科 (2个OTU)、丹毒丝菌科 (2个OTU)、和 β 变形菌纲产碱杆菌科 (2个OTU) 在对照后代中更丰富 (图5D)。这些数据表明, 特定的毛螺菌科连同其它拟杆菌物种在MIA病理中发挥重要作用, 而其它类群可具有保护作用。重要地, 在MIA后代和对照之间在梭菌纲 ($13.63 \pm 2.54\%$ vs $14.44 \pm 2.84\%$ 平均值 \pm SEM; Student's t-检验 $p=0.8340$) 和拟杆菌纲 ($76.25 \pm 3.22\%$ vs $76.22 \pm 3.46\%$ 平均值 \pm SEM; Student's t-检验 $p=0.9943$) 的总体相对丰度上没有显著差异 (图5E, 左图), 表明在稀有OTU的全体成员上的改变驱动实验组之间在肠微生物群上的重大改变。

[0172] 在较不突出的细菌纲中也观察到在分类学多样性上的不同, MIA后代表现出与对照相比显著地减少的产芽胞菌纲 (Erysipelotrichi) 的相对丰度 ($0.15 \pm 0.03\%$ v.s. $0.74 \pm 0.25\%$ 平均值 \pm SEM; Student's t-检验 p 值 = 0.0334) (图5E, 右图)。总体来说, 发现MIA导致肠微生物群的失调, 主要通过细菌梭菌纲和拟杆菌纲的特定OTU中的改变驱动。在被分类为梭菌目 (Clostridiales) 中的毛螺菌科和瘤胃球菌科的OTU中的改变与在患有ASD的受试者的粪便中的增加的梭菌属 (Clostridium) 物种的报道平行发生 (Finegold等人, 2012)。总而言之, 在小鼠中将MIA建模为主要的孤独症风险因素不仅引起ASD的行为的和神经病理学的特征 (Boksa, 2010), 还引起类似于在ASD个体的亚类中所描述的那些的GI症状。本文展示的数据显示MIA能被用作患有共病GI问题的人类ASD的模型。

[0173] 实施例3

[0174] 脆弱拟杆菌处理改善MIA后代中的肠屏障完整性

[0175] 肠道微生物群在肠上皮细胞的发育、维持和修复中发挥着重要作用 (Sharma等人, 2010; Turner, 2009)。为了确定靶向肠微生物群是否会影响MIA相关GI异常的发展或持续, 在断奶时用人类共生菌脆弱拟杆菌处理后代, 并且然后在8周龄时测试GI异常。引人注目地, 脆弱拟杆菌处理修正MIA后代中的肠通透性 (图6A)。另外, 脆弱拟杆菌处理改善MIA相关的、在CLDN 8和CLDN 15的基因表达上的变化, 但是对TJP1、TJP2或OCLN mRNA的表达水平无显著影响 (图6B)。在结肠中的claudin 8和claudin 15的蛋白水平上观察到相似变化, 伴随由脆弱拟杆菌处理引起的恢复 (图6C-图6D)。在来自MIA后代的小肠中未观察到脆弱拟杆菌对紧密连接表达的这种影响 (图2B), 与拟杆菌属物种主要地在结肠中被发现的事实一致。同样, 在益生菌施用之前GI缺陷的存在 (图1A, 右图) 暗示了脆弱拟杆菌能治疗MIA后代中的ASD相关病理。

[0176] 脆弱拟杆菌处理还使在结肠IL-6mRNA和蛋白水平上的MIA相关增加恢复至在对照小鼠中发现的那些 (图6E-图6F)。在MIA后代的结肠和小肠两者中其它细胞因子的水平均被改变 (图1D和图2C), 但是这些不被脆弱拟杆菌处理影响, 揭示了对IL-6的特异性。该发现与

MIA模型中对IL-6的关键作用一致(Smith等人,2007)。改变的肠细胞因子谱可形成在MIA后代中观察到的增加的肠通透性的基础,如包括IL-6的数种细胞因子被报道调节紧密连接并调控肠屏障完整性(Suzuki等人,2011;Turner,2009)。还发现重组IL-6处理能调节体内和体外结肠器官培养物中的claudin 8和claudin 15两者的结肠水平(图7A-图7C),暗示了脆弱拟杆菌介导的结肠IL-6水平的恢复可成为其对肠通透性影响的基础。总而言之,这些发现表明,脆弱拟杆菌处理MIA后代逆转在GI屏障完整性上的缺陷,并修正在紧密连接和细胞因子表达上的改变。

[0177] 实施例4

[0178] 脆弱拟杆菌处理恢复MIA后代中的微生物群变化

[0179] 除了改善MIA后代中的GI生理之外,脆弱拟杆菌处理引起对肠微生物群的组成的长期影响。在由PCoA得到的总体水平(ANOSIM $R=0.0060$ $p=0.4470$)或在微生物群丰富度(PD: $p=0.2980$,观察到的物种: $p=0.5440$)和均匀度(Gini: $p=0.6110$,Simpson均匀度: $p=0.5600$)上未观察到显著差异(图8A、图4A-图4B)。但是,在评价将成年MIA后代与对照区别开来的特定关键OTU时,脆弱拟杆菌处理的修正作用是明显的(图8B)。特别地,用脆弱拟杆菌处理的MIA后代在将MIA与对照后代区别开来的67个OTU中的6个的相对丰度上表现出完全恢复(未被认定为区别MIA和对照后代的28个其它OTU可区别MIA后代和已用脆弱拟杆菌处理的那些)。这6个OTU被分类学地指定为未分类的拟杆菌纲和科毛螺菌科的梭菌纲(图8B)。值得注意地,在不存在脆弱拟杆菌的持续定殖的情况下发生这些改变,所述脆弱拟杆菌的持续定殖在从处理的MIA后代分离的粪便和盲肠样品中仍然不可检测,如通过实时定量PCR所评价的(图9A-图9B)。有趣地,在MIA后代中被提高的10种毛螺菌科中的4种被脆弱拟杆菌处理修正(图5D和图8A-图8C)。另外,脆弱拟杆菌处理使2个拟杆菌纲OTU的相对丰度恢复至在对照中所观察到的水平(图8B)。被MIA改变并被脆弱拟杆菌处理恢复的6个OTU的系统发育重建揭示了,该两个拟杆菌纲OTU一起聚类入单系类群(图8C)。另外,被MIA显著地改变并被脆弱拟杆菌修正的毛螺菌科OTU聚类入2个单独的单系类群(图8C)。这些结果表明,尽管用脆弱拟杆菌处理MIA后代可能不导致脆弱拟杆菌自身的持续定殖,但是其能修正毛螺菌科以及未分类的拟杆菌目的相关微生物的特定类群的相对丰度。

[0180] 总而言之,该实施例表明用脆弱拟杆菌处理MIA后代能改善参与MIA相关的共生微生物群的生态失调的特定变化并修正与在孤独症个体的亚类中所观察到的相似的GI异常。

[0181] 实施例5

[0182] 脆弱拟杆菌处理修正ASD相关行为异常

[0183] 为了探索GI失调对核心ASD行为异常的潜在影响,调查了脆弱拟杆菌处理是否影响MIA后代中的ASD相关行为这一问题。

[0184] 在多种行为测定中发现成年MIA后代表现出ASD的主要行为特征。开场探究包括在开放的场地标绘动物的运动以测量行进和焦虑(Bailey和Crawley,2009)。MIA后代表现出减少的进入场地中央的次数和在场地中央停留的时间,但是在指示焦虑样行为的活动总里程上无差异(图10A;将盐水(S)与聚(I:C)(P)比较)。前脉冲抑制(PPI)任务测量当在较低强度的刺激(“前脉冲”)之后进行时,动物抑制其响应声调(“脉冲”)的惊恐的能力。在PPI上的缺陷是受损的感觉运动门控的量度,并且在包括孤独症的若干神经发育障碍中被观察到(Perry等人,2007)。MIA后代表现出减少的响应5或15db前脉冲的PPI(图10B)。埋珠测试测

量小鼠对重复地进行不被焦虑混乱的天生的挖掘行为的倾向(Thomas等人,2009)。MIA后代与对照相比表现出增加的刻板的埋珠行为(图10C),这将重复行为建模为核心ASD症状。鉴于发出若干类型的呼叫并在不同的社会范例间不同的结构模块中使用,超声发声被用来测量小鼠的通讯(Grimsley等人,2011;Scattoni等人,2011;Silverman等人,2010b)。MIA后代表现出在通讯方面的ASD相关缺陷,如由响应社会性遭遇而发出的超声发声的减少的次数和持续时间所表明的(图10D)。最后,三室社会性测试被用于测量在社交上的ASD相关损害(Silverman等人,2010a)。社交能力通过相比新的物体小鼠对与新的小鼠交互的偏好来示例,而社会新奇性(社会偏好)的特征在于相比熟悉的小鼠偏好与不熟悉的交互。MIA后代表现出在社交能力和社会偏好两者上的缺陷(图10E-图10F)。总而言之,除了ASD相关的焦虑和缺乏的感觉运动门控之外,这些行为测定评价了ASD的主要诊断症状,已被广泛地用于对ASD小鼠模型的表型分型(Han等人,2012;Novarino等人,2012;Schmeisser等人,2012;Silverman等人,2010a;Tabuchi等人,2007;Tsai等人,2012;Won等人,2012)。

[0185] 引人注目地,用脆弱拟杆菌口服处理改善了很多这些ASD-相关行为异常。在开场中脆弱拟杆菌处理的MIA后代不表现焦虑样行为(图10A;将聚(I:C)(P)与聚(I:C)+脆弱拟杆菌(P+BF)相比),如由在中央进入的次数和在开场的中央停留的持续时间上的恢复所显示的。脆弱拟杆菌改善了MIA后代中的感觉运动门控,如由增加的响应5db和15db前脉冲的联合PPI所表明的(图10B),对声的刺激惊恐强度无显著影响(数据未显示)。脆弱拟杆菌处理的MIA后代还表现出减少的刻板埋珠的水平以及恢复的通讯行为,如由增加的超声发声次数和持续时间所例证的(图10C-图10D)。有趣地,脆弱拟杆菌处理使由MIA后代发出的每次呼叫的持续时间提高至超出在盐水对照中所观察到的的水平(图10D),暗示着尽管倾向于通讯的常态化(与对照相比在发出的呼叫的次数上无差异),在产生的呼叫类型和长音节的丰富度上有质的差异。

[0186] 尽管脆弱拟杆菌处理的MIA后代表现出改善的通讯的、重复的、焦虑样和感觉运动的行为,但是其在社交能力和社会偏好上仍然缺乏(图10E)。有趣地,这与通过对ASD个体(Canitano和Scandurra,2008)以及CNTNAP2敲除小鼠的ASD的遗传的小鼠模型(Penagarikano等人,2011)施用利培酮,无能力改善社会行为平行发生。这些数据表明与其它行为相比,在支配社会行为的电路(circuitry)或回路(circuit)可塑性上有根本的不同,以及脆弱拟杆菌处理在MIA后代中ASD相关行为缺陷的改善期间调整特定的大脑回路。

[0187] 另外,响应脆弱拟杆菌处理的行为改善与在MIA后代中的系统免疫上的改变无关(图3A-图3C)并且不依赖于多聚糖A(PSA),多聚糖A是以前被鉴定为由脆弱拟杆菌产生的给予免疫调节作用的分子(图3E)(Mazmanian等人,2008;Ochoa-Reparaz等人,2010;Round和Mazmanian,2010)。此外,行为的改善并不是对脆弱拟杆菌特异性的,因为用多形拟杆菌的相似处理,在MIA后代中也显著地改善焦虑样、重复的和通讯的行为(图11A-图11D)。这与我们发现脆弱拟杆菌处理并不导致脆弱拟杆菌在GI道中持续定殖(图9A-图9B)相一致,并且可通过引起驻留微生物群的长期变化来发挥作用(参见图4A-图4D)。

[0188] 实施例6

[0189] 血清代谢组被MIA和脆弱拟杆菌处理调整

[0190] 代谢组研究已显示在很多肠外组织中发现了肠道微生物产物,并且在小鼠和人类中源自微生物群的分子可影响代谢的、免疫学的和行为的表型(Bercik等人,2011;

Blumberg和Powrie,2012;Hooper等人,2012;MacFabe,2012;Matsumoto等人,2012;Nicholson等人,2012)。在本实施例中,检查了可能性。

[0191] 基于气相色谱/液相色谱和质谱 (GC/LC-MS) 联用的代谢组谱系分析被用于鉴定在血清代谢物中的MIA相关的变化。分析了2,400种代谢物并在来自成年小鼠的血清中检测了这些中的322种代谢物,横跨氨基酸(94)、肽(15)、碳水化合物(22)、能量(10)、脂质(128)、核苷酸(23)、异生物质(19)和辅因子和维生素(11)超级途径(表4)。有趣地,MIA导致所检测的所有血清代谢物的8%的统计学上显著的改变(表3)。此外,出生后脆弱拟杆菌处理对血清代谢组具有显著影响,改变所检测的所有代谢物的34%(表4和图12A-图12B)。

表 3.在成年盐水对聚(I:C)后代中被改变的血清代谢物

[0192]

超级途径	子途径	代谢物	变化倍数	p-值
------	-----	-----	------	-----

[0193]

氨基酸	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	N-乙酰丝氨酸	0.73	0.0354
氨基酸	丙氨酸和精氨酸代谢	β -丙氨酸	0.46	0.0500
氨基酸	谷氨酸代谢	谷氨酰胺	1.2	0.0173
氨基酸	组氨酸代谢	反式尿刊酸	1.71	0.0240
氨基酸	组氨酸代谢	咪唑丙酸盐/酯	1.35	0.0161
氨基酸	苯丙氨酸和酪氨酸代谢	苯乙酰甘氨酸	0.71	0.0821
氨基酸	苯丙氨酸和酪氨酸代谢	苯酚硫酸盐/酯	0.68	0.0092
氨基酸	色氨酸代谢	吲哚丙酮酸盐/酯	1.57	0.0240
氨基酸	色氨酸代谢	血清素	1.15	0.0804
氨基酸	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢	3-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	0.75	0.0152
氨基酸	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢	4-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	0.7	0.0072
氨基酸	半胱氨酸、甲硫氨酸、SAM、牛磺酸代谢	半胱氨酸	0.73	0.0582
氨基酸	尿素循环; 精氨酸、脯氨酸代谢	精氨酸	0.87	0.0761
氨基酸	尿素循环; 精氨酸、脯氨酸代谢	鸟氨酸	0.68	0.0956
氨基酸	多胺代谢	5-甲基硫代腺苷	1.34	0.0425
肽	二肽	甘氨酰缬氨酸	0.48	0.0077
肽	纤维蛋白原裂解肽	TDTEDKGEFLSEGG GVR	1.8	0.0567
碳水化合物	糖酵解、糖异生、丙酮酸盐/酯代谢	3-磷酸甘油酸盐/酯	0.51	0.0265
碳水化合物	糖酵解、糖异生、丙酮酸盐/酯代谢	磷酸烯醇丙酮酸盐/酯	0.56	0.0344
碳水化合物	核苷酸糖、戊糖代谢	核糖	1.44	0.0499
碳水化合物	核苷酸糖、戊糖代谢	木糖	1.34	0.0827
脂质	必需脂肪酸	二十二碳五烯酸盐/酯(n3 DPA; 22:5n3)	0.75	0.0988
脂质	必需脂肪酸	二十二碳五烯酸盐/酯(n6 DPA; 22:5n6)	0.83	0.0970
脂质	必需脂肪酸	二十二碳六烯酸盐/酯(DHA; 22:6n3)	0.8	0.0965
脂质	长链脂肪酸	硬脂酸盐/酯	0.88	0.0491
脂质	长链脂肪酸	二十碳烯酸盐/酯	0.61	0.0151
脂质	长链脂肪酸	二高-亚油酸盐/酯(20:2n6)	0.79	0.0614
脂质	长链脂肪酸	肾上腺素盐/酯	0.82	0.0923
脂质	脂肪酸, 一羟基的	13-HODE+9-HODE	0.72	0.0489

[0194]

脂质	脂肪酸, 二羧酸盐/酯	十八烷二酸盐/酯	0.83	0.0413
脂质	类二十烷酸/盐/酯	12-HETE	0.69	0.0152
脂质	肌醇代谢	肌醇	0.86	0.0817
脂质	溶血脂质	1-棕榈酰甘油磷脂酰乙醇胺	0.81	0.0868
脂质	溶血脂质	1-油酰基甘油磷脂酰乙醇胺	0.7	0.0169
脂质	溶血脂质	1-十五酰基甘油磷脂酰胆碱	1.43	0.0505
脂质	溶血脂质	1-棕榈油酰甘油磷脂酰胆碱	1.49	0.0388
脂质	溶血脂质	1-硬脂酰甘油磷脂酰肌醇	0.64	0.0059
脂质	溶血脂质	1-棕榈酰缩醛磷脂酰乙醇胺	0.73	0.0399
辅因子和维生素	血红蛋白和卟啉代谢	胆红素(E,E)	2.68	0.0496
辅因子和维生素	泛酸盐/酯和 CoA 代谢	泛酸盐/酯	1.33	0.0643
辅因子和维生素	苯甲酸盐/酯代谢	4-乙基苯硫酸盐/酯	46.39	0.0359
辅因子和维生素	化学品	羟乙酸盐/酯(羟基醋酸盐/酯)	1.17	0.0498
辅因子和维生素	食物成分/植物	麦角硫因	0.72	0.0688
辅因子和维生素	食物成分/植物	硫酸雌马酚	0.78	0.0315

在聚(I:C)注射的母体的 10 周龄后代对对照中的血清代谢物的水平上的值得注意的变化 (p<0.10)的汇总。提取血清样品并由 Metabolon, Inc.通过 GC/LC-MS 分析。利用两因素 ANOVA 和比对分析数据。另外的细节在实验程序中提供。

[0195]

表 4. 在脆弱拟杆菌处理后在盐水和聚(I:C)后代中被改变的血清代谢物

超级途径	子途径	生物化学名称	平台	I:C-脆弱拟杆菌对照	
	丙氨酸和天冬氨酸代谢	肌氨酸(N-甲基甘氨酸)	GC/MS	0.64	
		天冬氨酸	GC/MS	0.76	
		3-脲基丙酸盐/酯	LC/MS pos	0.64	
	赖氨酸代谢		戊二酸盐/酯 (glutarate) (戊二酸盐/酯 (pentanedioate))	GC/MS	0.78
			酪氨酸	LC/MS pos	0.85
			3-(4-羟苯基)乳酸盐/酯	LC/MS neg	0.81
			3-苯基丙酸盐/酯(氢化肉桂酸盐/酯)	LC/MS neg	0.60

[0196]

		血清素(5HT)	LC/MS pos	1.26
	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢	3-甲基-2-氧代丁酸盐/酯	LC/MS neg	0.68
		3-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	LC/MS neg	0.67
		4-甲基-2-氧代戊酸盐/酯	LC/MS neg	0.63
		异丁酰肉毒碱	LC/MS pos	0.68
		2-甲基丁酰肉毒碱	LC/MS pos	0.66
		异戊酰基肉毒碱	LC/MS pos	0.76
		2-羟基丁酸盐/酯(AHB)	GC/MS	0.64
		尿素循环; 精氨酸、脯氨酸代谢	精氨酸	LC/MS pos
	鸟氨酸		GC/MS	0.66
	丁酸盐/酯代谢	2-氨基丁酸盐/酯	LC/MS pos	0.76
	胍基和乙酰胺基代谢	4-胍基丁酸盐/酯	LC/MS pos	0.65
		5-氧代脯氨酸	LC/MS neg	0.80
肽		二肽	甘氨酸缬氨酸	LC/MS pos
	γ -谷酰基色氨酸		LC/MS pos	0.77
	纤维蛋白原裂解肽	TDTEDKGEFLSEGGGV*	LC/MS pos	1.43
		TDTEDKGEFLSEGGGVR*	LC/MS pos	3.46
		山梨醇	GC/MS	0.63
		丙酮酸盐/酯	GC/MS	0.58
		核糖醇	GC/MS	0.74
		核糖	GC/MS	1.97
		核酮糖	GC/MS	0.68
		木糖醇	GC/MS	1.62
能量	克雷布斯循环	柠檬酸盐/酯	GC/MS	0.80
		延胡索酸盐/酯	GC/MS	0.64
		苹果酸盐/酯	GC/MS	0.69
脂质	必需脂肪酸	亚油酸盐/酯(18:2n6)	LC/MS neg	0.64
		亚麻酸盐/酯[α 或 γ ; (18:3n3或6)]	LC/MS neg	0.62
		二高-亚麻酸盐/酯(20:3n3或n6)	LC/MS neg	0.69
		二十二碳五烯酸盐/酯(n3 DPA; 22:5n3)	LC/MS neg	0.72
		二十二碳五烯酸盐/酯(n6 DPA; 22:5n6)	LC/MS neg	0.70
		二十二碳六烯酸盐/酯(DHA; 22:6n3)	LC/MS neg	0.77
	长链脂肪酸	庚酸盐/酯(7:0)	LC/MS neg	0.81
		壬酸盐/酯(9:0)	LC/MS neg	0.81
		月桂酸盐/酯(12:0)	LC/MS neg	0.85
		豆蔻酸盐/酯(14:0)	GC/MS	0.70
		棕榈酸盐/酯(16:0)	LC/MS neg	0.72

[0197]

	棕榈油酸盐/酯(16:1n7)	GC/MS	0.70
	十七酸盐/酯(17:0)	GC/MS	0.60
	硬脂酸盐/酯(18:0)	LC/MS neg	0.75
	油酸盐/酯(18:1n9)	GC/MS	0.56
	十八碳四烯酸盐/酯(18:4n3)	LC/MS neg	0.66
	二十碳烯酸盐/酯(20:1n9 或 11)	LC/MS neg	0.59
	二高-亚油酸盐/酯(20:2n6)	LC/MS neg	0.63
	二十碳三烯酸 (20:3n9)	LC/MS neg	0.74
	肾上腺素盐/酯(22:4n6)	LC/MS neg	0.75
	8-羟基辛酸盐/酯	LC/MS neg	0.72
	3-羟基癸酸盐/酯	LC/MS neg	0.51
	16-羟基棕榈酸盐/酯	LC/MS neg	0.70
	13-HODE + 9-HODE	LC/MS neg	0.50
脂肪酸, 二羟基的	12,13-羟基十八烷-9(Z)-烯酸盐/酯	LC/MS neg	0.54
	9,10-羟基十八烷-12(Z)-烯酸	LC/MS neg	0.48
脂肪酸, 二羧酸盐/酯	己二酸盐/酯	GC/MS	0.62
	2-羟戊二酸盐/酯	GC/MS	0.83
	庚二酸盐/酯 (pimelate) (庚二酸盐/酯 (heptanedioate))	GC/MS	0.61
	辛二酸盐/酯 (suberate) (辛二酸盐/酯 (octanedioate))	LC/MS pos	0.69
	癸二酸盐/酯 (sebacate) (癸二酸盐/酯 (decanedioate))	LC/MS neg	0.64
	壬二酸盐/酯 (azelate) (壬二酸盐/酯 (nonanedioate))	LC/MS neg	0.72
	十二烷二酸盐/酯	LC/MS neg	0.65
	十四烷二酸盐/酯	LC/MS neg	0.57
	十六烷二酸盐/酯	LC/MS neg	0.54
	十八烷二酸盐/酯	LC/MS neg	0.53
	十一烷二酸盐/酯	LC/MS neg	0.66
类二十烷酸/盐/酯	12-HETE	LC/MS neg	0.57
脂肪酸代谢 (也称 BCAA 代谢)	丙酰基肉毒碱	LC/MS pos	0.79
	丁酰肉毒碱	LC/MS pos	0.64
脂肪酸代谢	戊酰肉毒碱	LC/MS pos	0.56
	3-脱氢肉毒碱*	LC/MS pos	0.71
	己酰肉毒碱	LC/MS pos	0.58
	辛酰肉毒碱	LC/MS pos	0.69
	胆碱	LC/MS pos	0.79
	手性肌醇	GC/MS	0.66
	松醇	GC/MS	0.61

[0198]	酮体	3-羟基丁酸盐/酯(BHBA)	GC/MS	0.66
		1,2-丙二醇	GC/MS	0.83
		1-亚油酰甘油磷脂酰乙醇胺*	LC/MS neg	0.71
		1-花生四烯酰甘油磷脂酰乙醇胺*	LC/MS neg	0.76
		2-花生四烯酰甘油磷脂酰乙醇胺*	LC/MS neg	0.78
		1-硬脂酰甘油磷脂酰肌醇	LC/MS neg	0.66
		1-亚油酰甘油磷脂酰肌醇*	LC/MS neg	0.59
		1-花生四烯酰甘油磷脂酰肌醇*	LC/MS neg	0.61
		1-棕榈酰缩醛磷脂酰乙醇胺*	LC/MS neg	0.72
			次黄嘌呤	GC/MS
	肌苷		LC/MS neg	8.36
	腺苷		LC/MS pos	5.63
	5'-单磷酸腺苷(AMP)		LC/MS pos	20.92
	嘌呤代谢, 包含鸟嘌呤	5'-单磷酸鸟苷(5'-GMP)	LC/MS pos	5.74
	嘌呤代谢, 尿酸盐/酯 代谢	尿酸盐/酯	LC/MS neg	0.84
	2'-脱氧胞苷	LC/MS pos	1.32	
嘧啶代谢, 包含尿嘧啶	尿嘧啶	GC/MS	0.64	
	假尿苷	LC/MS neg	0.89	
烟酸盐/酯 和烟酰胺代 谢	烟酰胺	LC/MS pos	0.79	
		硫酸苯邻二酚	LC/MS neg	0.77
	药物	水杨酸盐/酯	LC/MS neg	0.68
		硫酸雌马酚	LC/MS neg	0.70
	糖、糖的替 代品、淀粉	赤藓糖醇	GC/MS	0.79

[0199] 实施例7

[0200] 脆弱拟杆菌处理修正MIA诱导的血清代谢物的水平

[0201] 本实施例显示脆弱拟杆菌介导的肠道屏障完整性的改善阻止在血清代谢物水平上的改变。

[0202] 4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)、吡啶丙酮酸盐/酯和几种其它的血清代谢物被MIA处理显著地改变并且被脆弱拟杆菌处理恢复至对照水平(图13A)。MIA后代表现出在4-乙基苯硫酸盐/酯(4EPS)的血清水平上的突出的、46倍的增加,其被脆弱拟杆菌处理显著地减少(图13A)。而且,发现与常规定殖的小鼠相比,无菌小鼠表现出几乎无法检测的血清4EPS水平,表明血清4EPS源自共生微生物群或主要地由其调整(图13B)。4EPS曾被认为是尿毒症毒素,如同对甲酚(4-甲基苯酚),被鉴定为人类孤独症的可能的尿生物标志物的相关代谢物(Altieri等人,2011;Persico和Napolioni,2013)。MIA后代也表现出升高的血清对甲酚水平,尽管所述升高并未达到统计上的显著(表4)。4EPS具有与对甲酚的有毒的硫酸化形式(4-甲基苯硫酸盐/酯;4MPS)相近的结构相似度这一事实是有趣的,因为这两种代谢物可表现出功能重叠(图14A)并且将在MIA模型中观察到的代谢物异常与在人类ASD中观察到的那些联系起来。

[0203] 除了4EPS之外, MIA后代表现出显著增加的血清吲哚丙酮酸盐/酯水平, 吲哚丙酮酸盐/酯是色氨酸代谢途径的关键分子, 其被脆弱拟杆菌处理恢复至对照水平(图13A)。吲哚丙酮酸盐/酯通过色氨酸分解代谢生成并且, 像4EPS, 吲哚丙酮酸盐/酯被认为是由肠道微生物产生的(Smith和Macfarlane, 1997)(图14B)。而且, 在于MIA后代中观察到的血清吲哚丙酮酸盐/酯上的提高与在于人类孤独症中观察到的另一种主要色氨酸代谢物吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸(IAG)上的升高相似, 吲哚基-3-丙烯酰甘氨酸被认为是对ASD的尿生物标志物(Bull等人, 2003)。有趣地, IAG参与GI内稳态并且由细菌色氨酸代谢生成(Keszthelyi等人, 2009)。值得注意的是, MIA后代表现出增加的血清血清素水平($0.05 < P < 0.10$), 其反映了在色氨酸代谢的另一个途径上的改变并且暗示孤独症的血血清素过多(hyperserotonemia)的内在表型(Mulder等人, 2004)。重要地, 已知共生微生物群影响含吲哚的色氨酸代谢物和血清素的血清水平(Wikoff等人, 2009)。MIA还引起改变的血清羟乙酸盐/酯、咪唑丙酸盐/酯和N-乙酰丝氨酸水平(图13A), 其被脆弱拟杆菌处理修正。

[0204] 本实施例证实了在MIA后代中特定的代谢物被改变并且被脆弱拟杆菌处理正常化。

[0205] 实施例8

[0206] 血清代谢物引起ASD相关行为

[0207] 在特定的代谢物的系统生物利用度上MIA依赖性增加并被脆弱拟杆菌恢复暗示了在MIA后代中这些分子在ASD相关行为中发挥着成因的作用。本实施例检查了实验性地增加血清中由肠道细菌影响的所有代谢物中最显著的4EPS是否足够在首次用于实验的小鼠中引起任何ASD相关的行为异常。

[0208] 通过用三氧化硫-吡啶复合物处理4-乙基苯酚, 之后离子交换, 产生4EPS钾盐来化学地合成4EPS(图15A-图15C)(Burlingham等人, 2003; Grimes, 1959)。从3周龄(此时在MIA后代中检测到增加的肠通透性, 参见图1A)到6周龄(此时行为测试开始)每天用4EPS或盐水媒介物腹腔内地处理小鼠。

[0209] 引人注目地, 对首次用于实验的野生型小鼠全身施用4EPS足够引起与在MIA后代中所观察到的相似的焦虑样行为(图13C)。相对于媒介物处理的对照, 暴露于4EPS的小鼠在开场中移动了可比的里程, 但是在中央区域停留更少的时间(图13C)。值得注意地, 与未处理的盐水后代相比, 媒介物处理的对照表现出焦虑样行为的症状(进入中央的次数: 14.5 ± 1.1 对 23.7 ± 1.4 ; 在中央停留的时间(s): 29.4 ± 5.4 对 46.4 ± 4.2 ; 里程(m): 35.6 ± 1.8 对 37.6 ± 1.0 , 将在图13C中的媒介物处理的小鼠(Veh.)和在图10A中的盐水后代(S)相比)。这反映了在小鼠和人类中慢性应激(每天注射)对升高焦虑水平的众所周知的影响(Bailey和Crawley, 2009; Bourin等人, 2007)。同样, 在PPI测试中, 4EPS处理的小鼠表现出增加的对非条件初级刺激响应的惊恐强度程度, 但是在PPI中无显著改变(图13D), 代表了焦虑相关的惊恐反射的强化(Bourin等人, 2007)。而且, 在4EPS处理和对照处理的小鼠中在重量上无差异, 并且因此无体重对所测量的惊恐强度的混杂作用。相反地, 在埋珠或USV行为上在4EPS处理的和盐水处理的小鼠之间无显著差异(图15D和图15E), 暗示了提高的血清4EPS水平特异地促进焦虑样行为。

[0210] 实施例9

[0211] 孤独症谱系障碍(ASD)的治疗

[0212] 本实施例例证了罹患ASD的患者的治疗。

[0213] 患者被鉴定为罹患ASD。确定在受试者中4EPS的血液水平。通过口服施用对患者施用具有脆弱拟杆菌的组合物。期望脆弱拟杆菌的施用改变在患者中的4EPS的血液水平以及肠道微生物群的组成。还期望细菌的施用会减轻在患者中的ASD的一种或更多种症状,诸如改善行为表现。

[0214] 实施例10

[0215] 孤独症谱系障碍 (ASD) 的治疗

[0216] 本实施例例证了罹患ASD的患者的治疗。

[0217] 患者被鉴定为罹患ASD。确定在患者中的4-甲基苯硫酸盐/酯的尿液水平。通过口服施用对患者施用具有脆弱拟杆菌的组合物。期望脆弱拟杆菌的施用改变在患者中的4-甲基苯硫酸盐/酯的尿液水平以及肠道微生物群的组成。还期望细菌的施用会减轻在患者中的ASD的一种或更多种症状,诸如改善行为表现。

[0218] 以上说明和实施例详述了本发明的某些优选的实施方案并描述了由发明者考虑的最佳模式。但是应领会,无论在文本中上述可以如何详细的出现,本发明可以很多种方式实施并且本发明应根据所附的权利要求及其任何等价物解释。尽管以上本申请已被详细描述,本领域技术人员应理解可做多种变形而不偏离本发明的精神。

[0219] 在本申请中,单数的使用可包括复数除非另有特别声明或除非如本领域技术人员根据本公开内容所理解的单数是唯一的功能实施方案。因此,例如,“一(a)”可指多于一个,以及“一个实施方案”可指描述适用于多个实施方案。另外地,在本申请中,“和/或”表示“和”的包容性意义以及,可选地,“或”的排他性意义均适用于列表。因此,列举应被理解为包括列举的项的所有可能的组合并且还排除其它项的每一个项。加上这个术语并非意图对术语“和”或“或”的单独使用指示任何特殊的意义。阅读该具体的公开内容后,此类术语的意义对本领域技术人员将是明显的。

[0220] 本文所提及的所有参考包括但不限于公布的和未公布的专利申请、专利、文本书籍、参考文献等,至其尚未的范围,通过应用全部特此并入。如果所并入的文献及相似材料的一个或更多个与包含在包括但不限于定义的术语、术语使用、所描述的技术等的说明书中的公开内容不同或相矛盾,说明书意图替代和/或优先于任何此类矛盾的材料。

[0221] 如在本文中所使用的术语“包括(comprising)”与“包含(including)”、“含有(containing)”或“特征在于”同义并且是包含的或开放式的且不排除另外的、未列举的元素或方法步骤。

序列表

- <110> 加州理工学院
<120> 孤独症谱系障碍的诊断和治疗
<130> CALTE.088A
<150> 61/694,679
<151> 2012-08-29
<160> 4
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 1
tgattccgca tggtttcatt 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 2
cgacccatag agccttcattc 20
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 3
actcctacgg gaggcagcag t 21
<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4

attaccgcgg ctgctggc 18

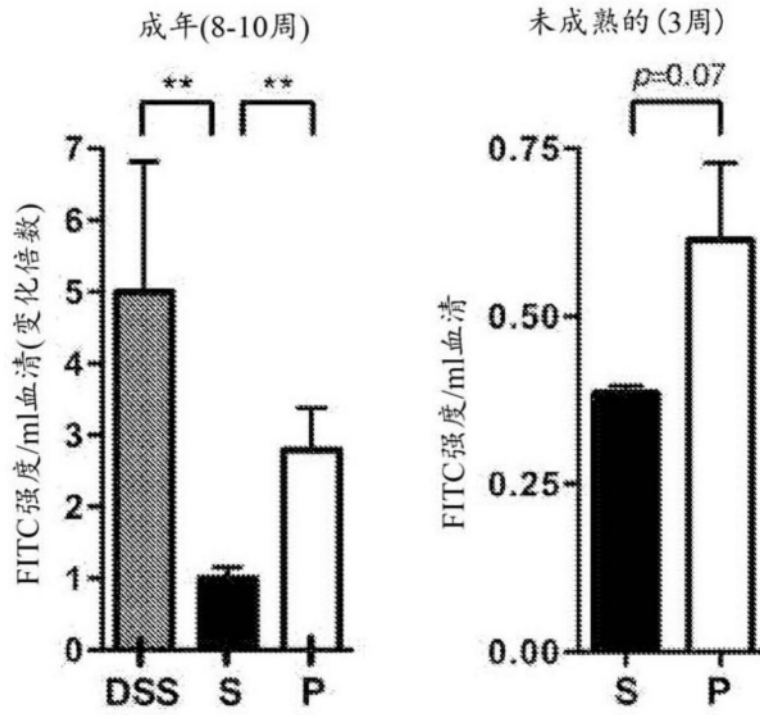


图1A

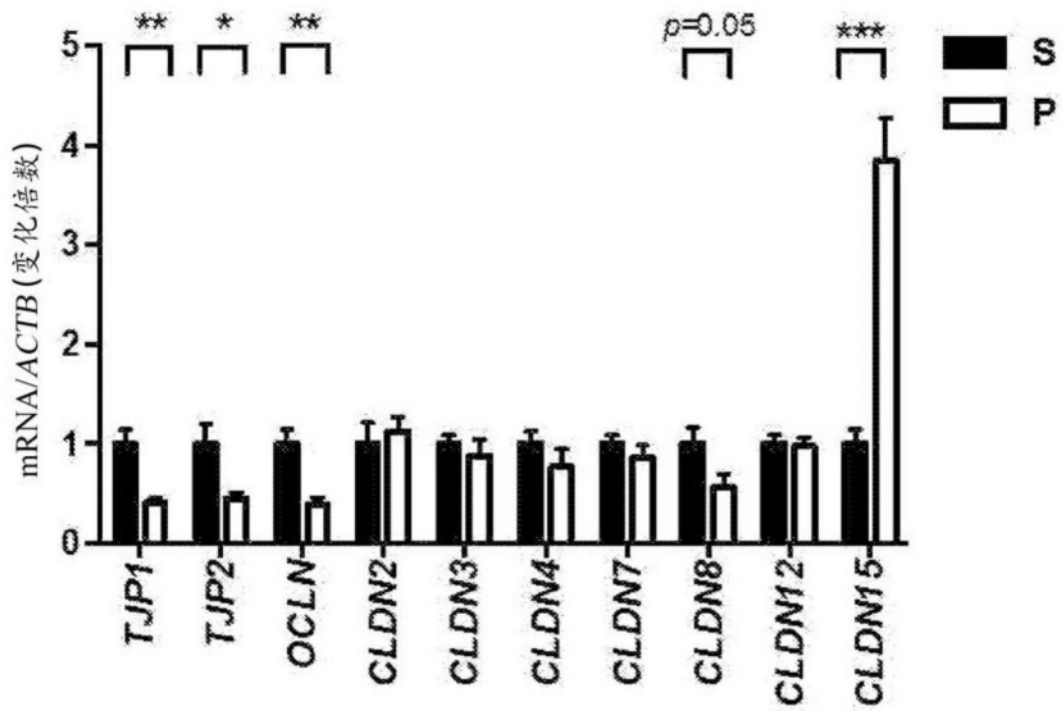


图1B

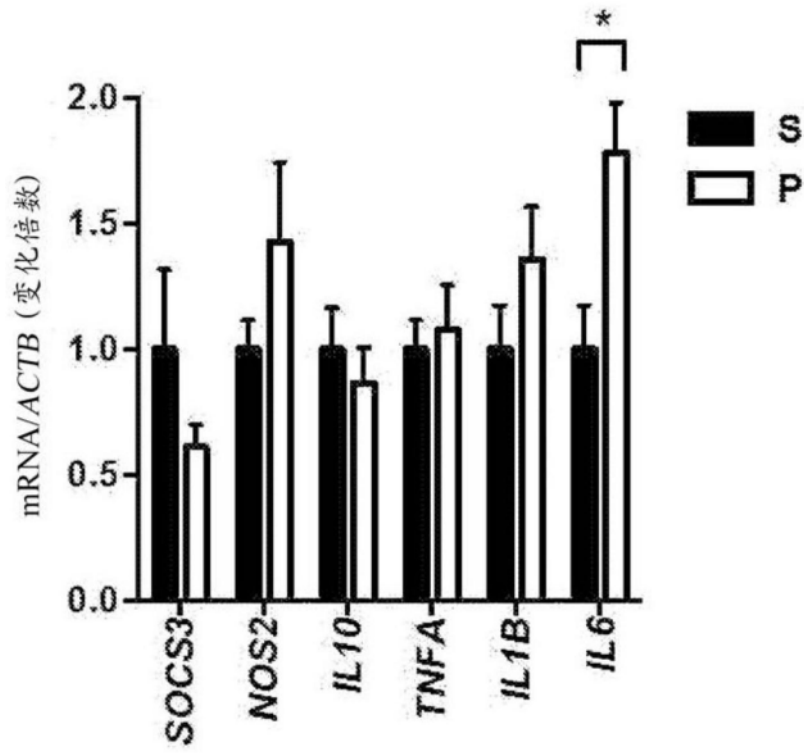


图1C

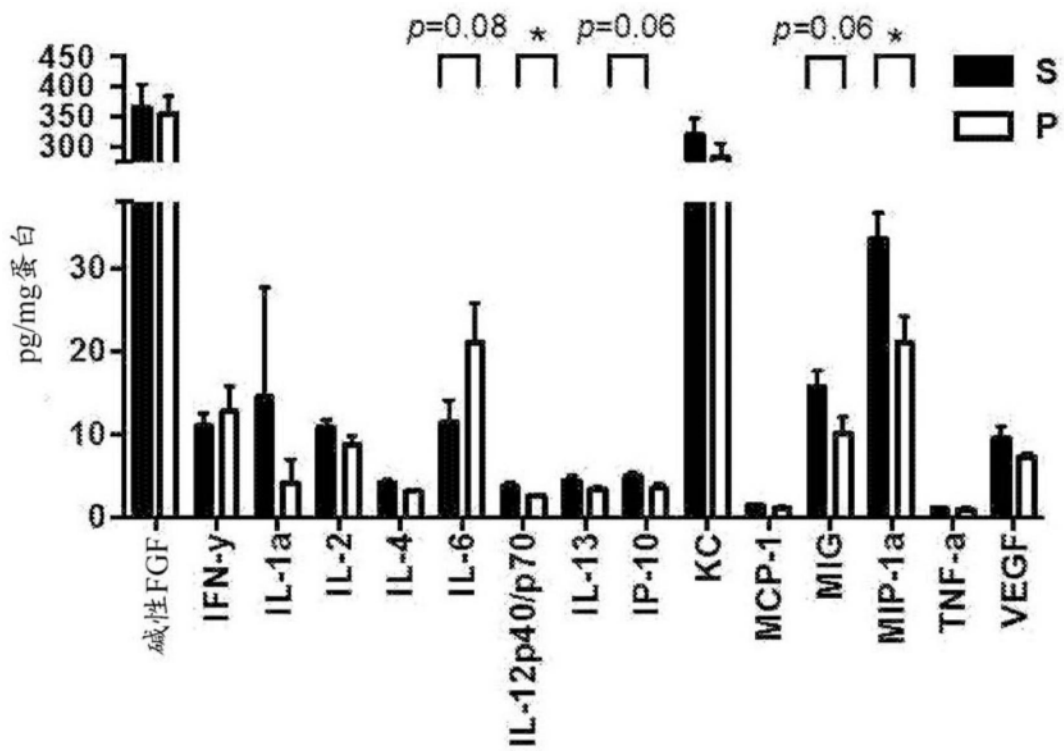


图1D

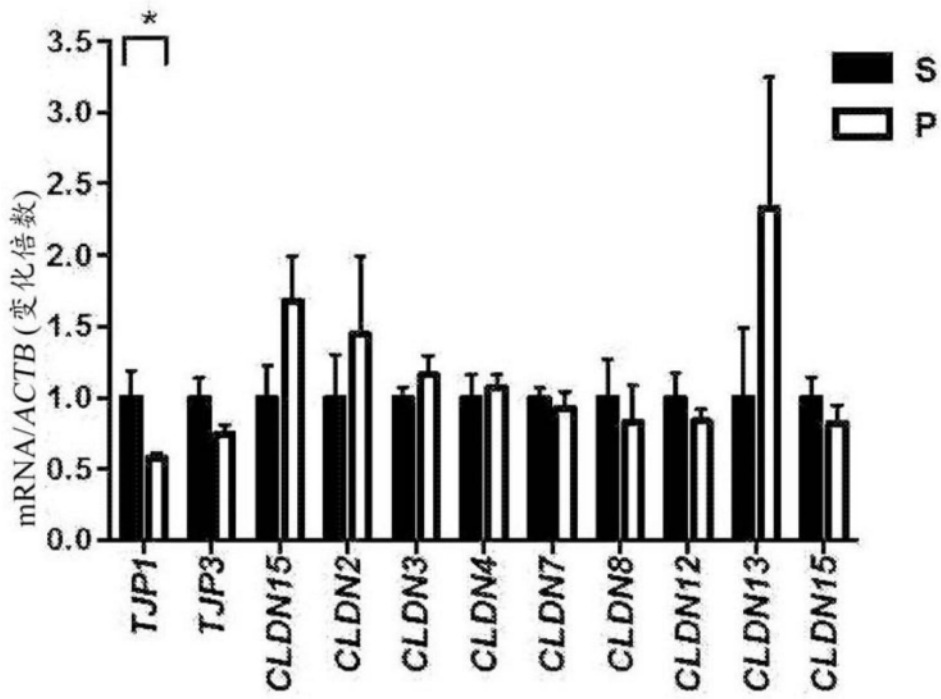


图2A

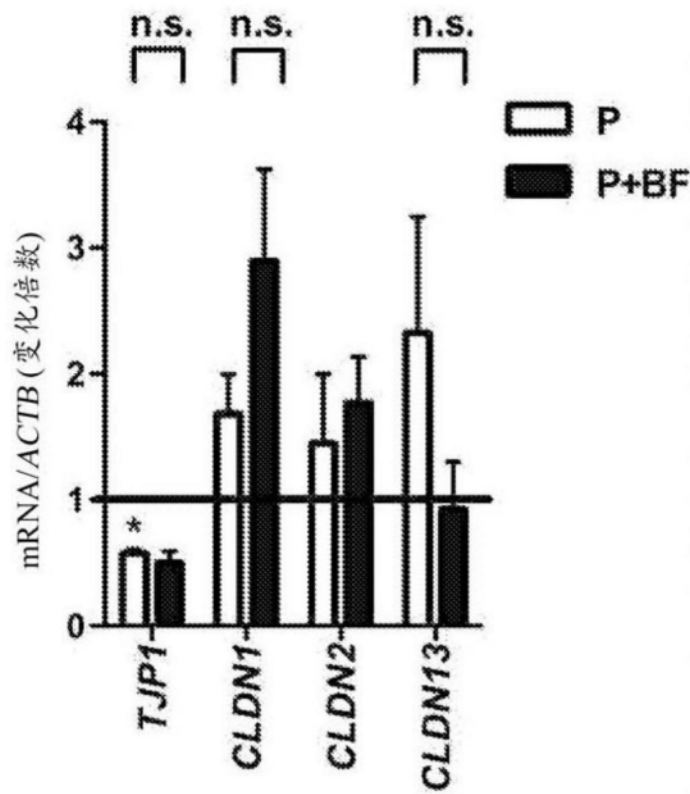


图2B

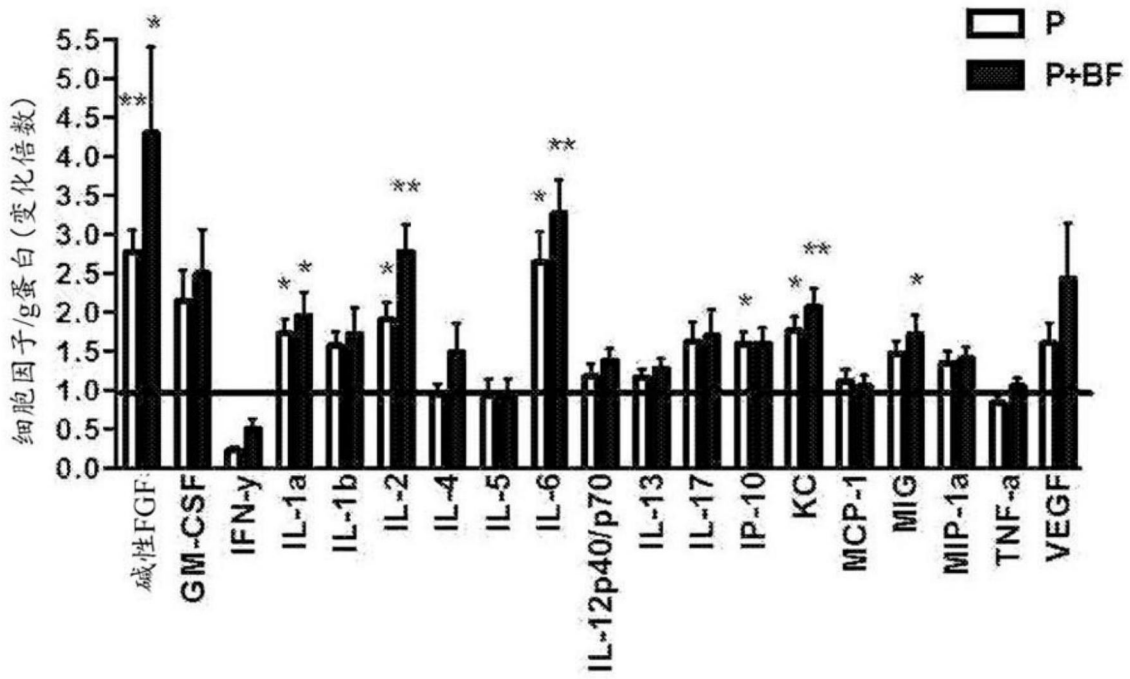


图2C

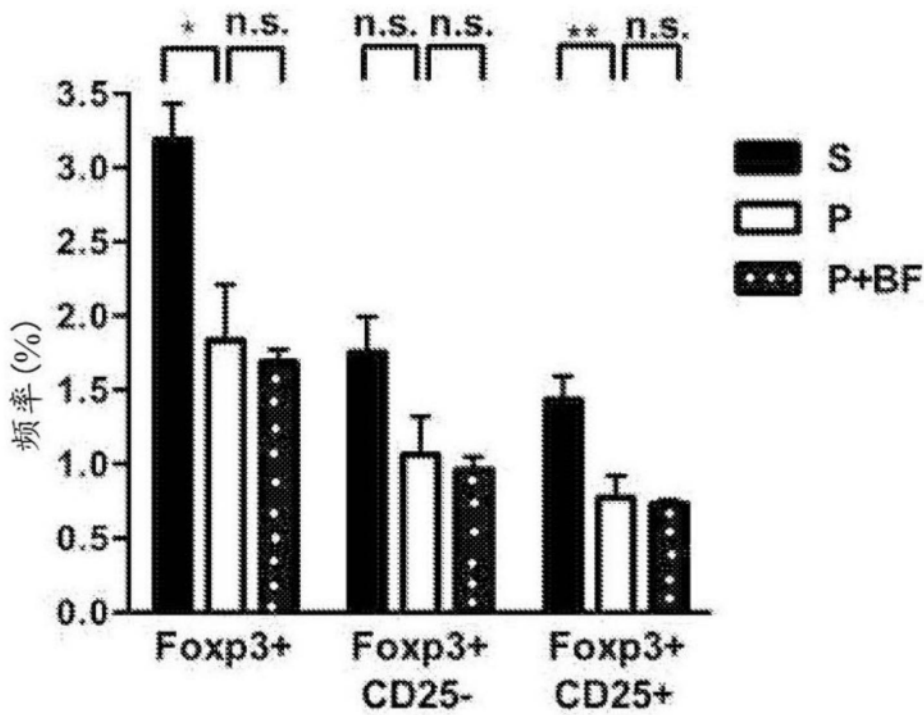


图3A

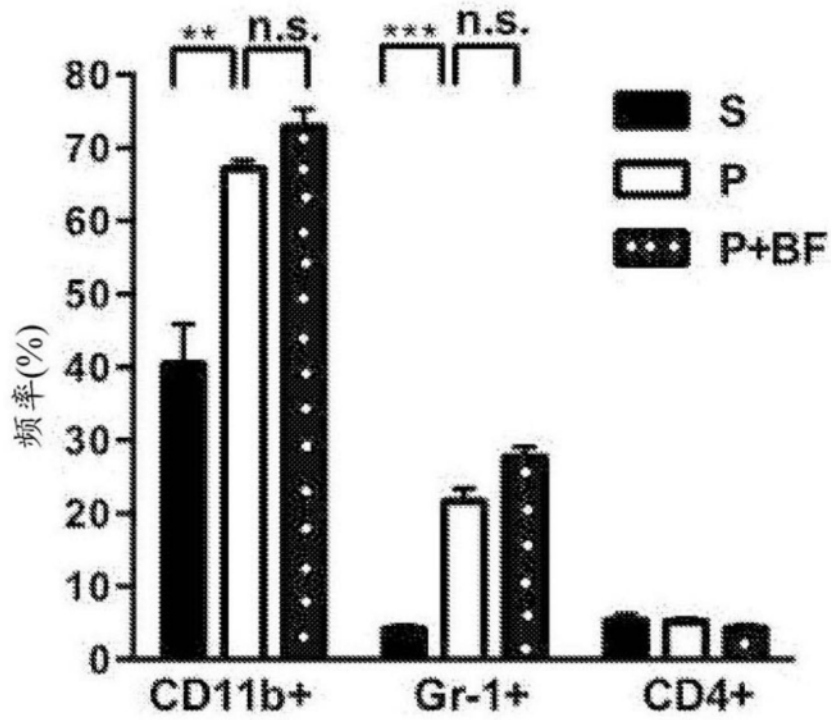


图3B

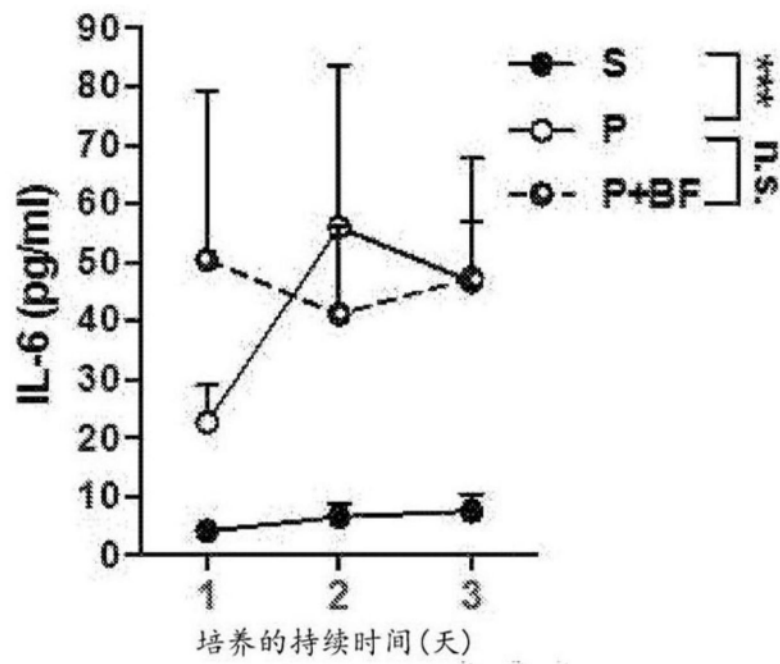
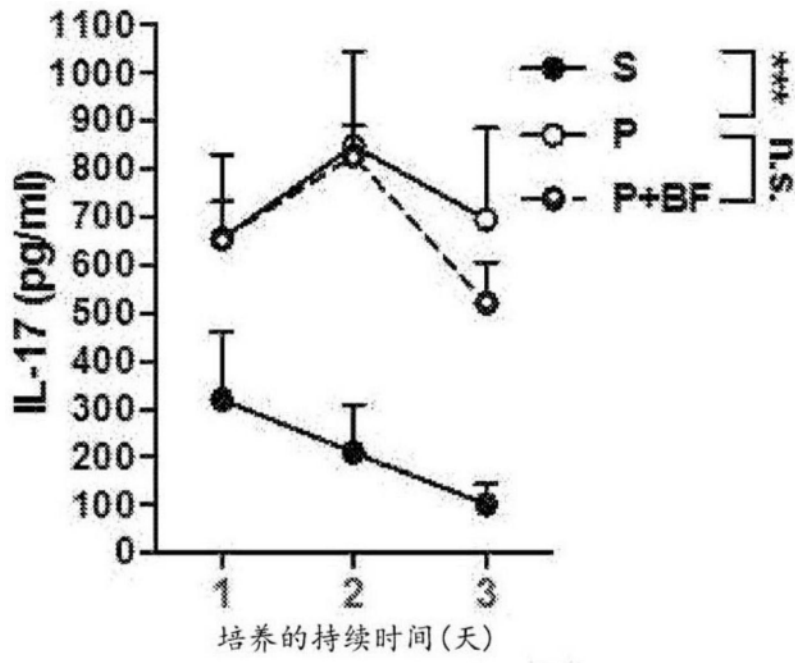


图3C

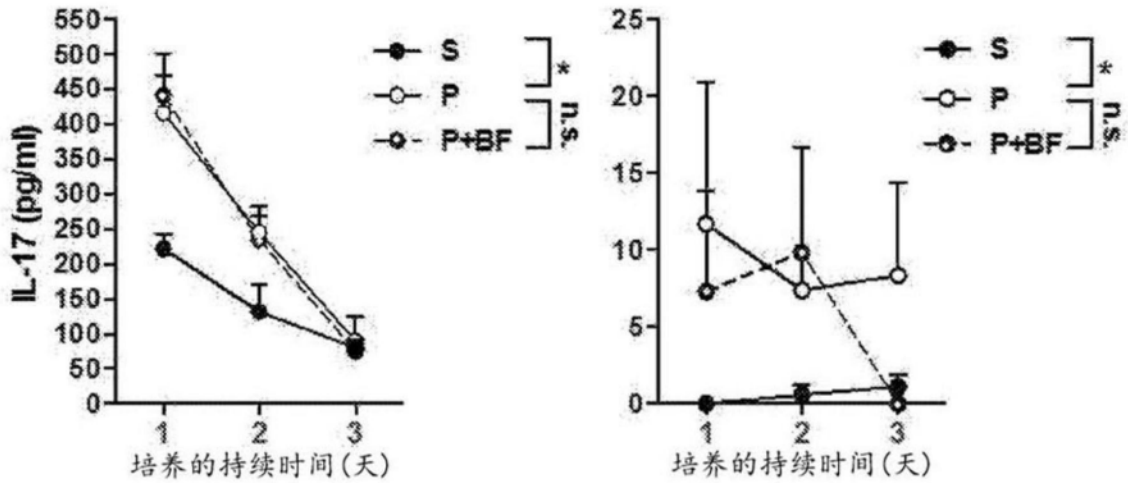


图3D

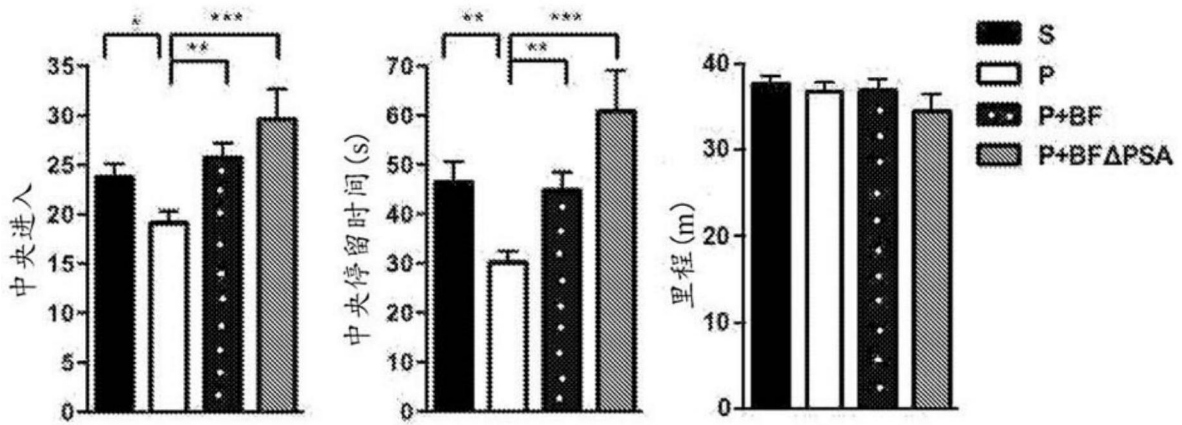


图3E

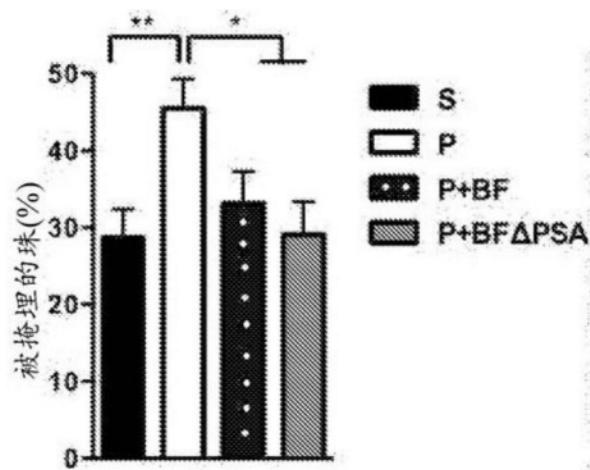


图3F

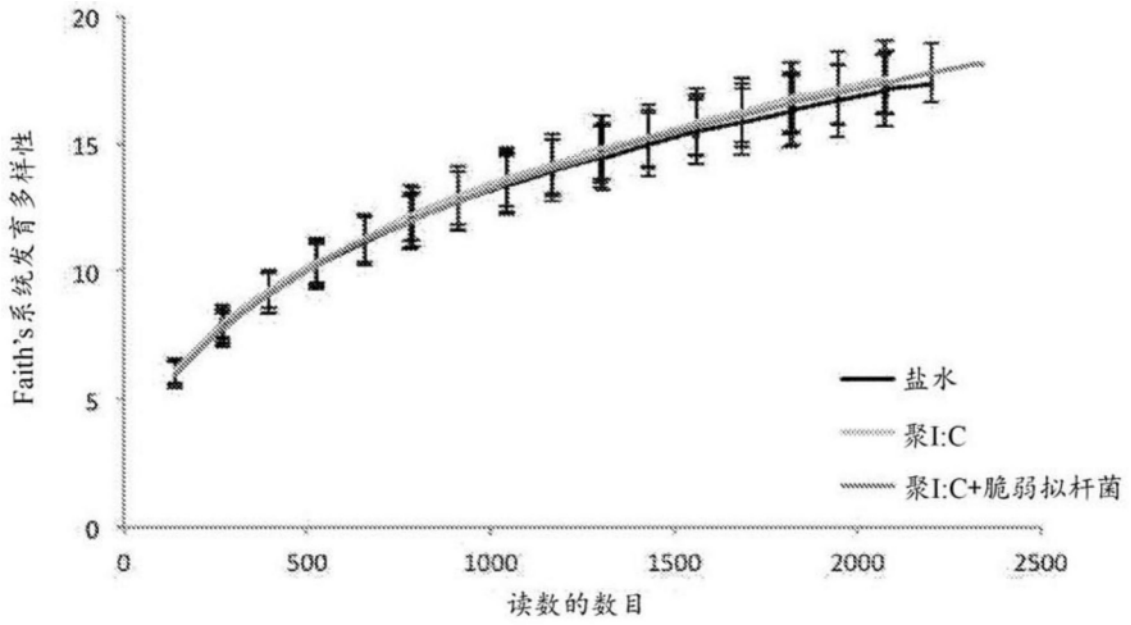


图4A

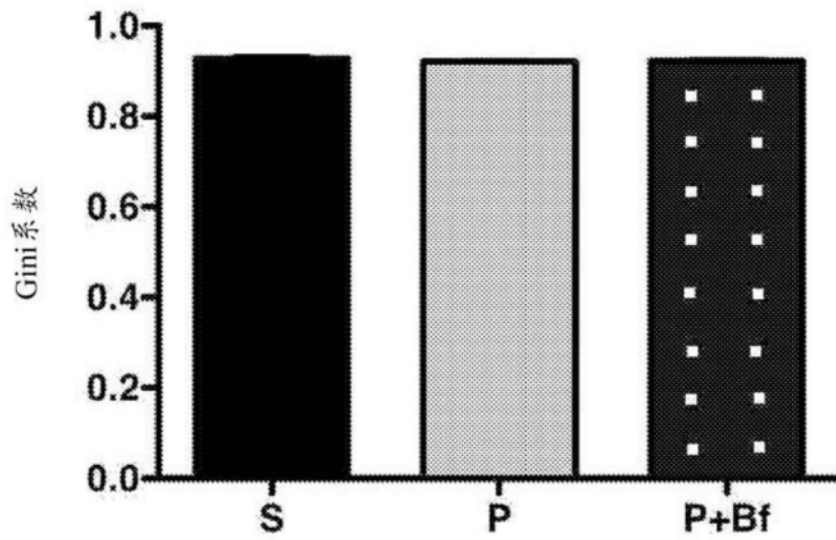


图4B

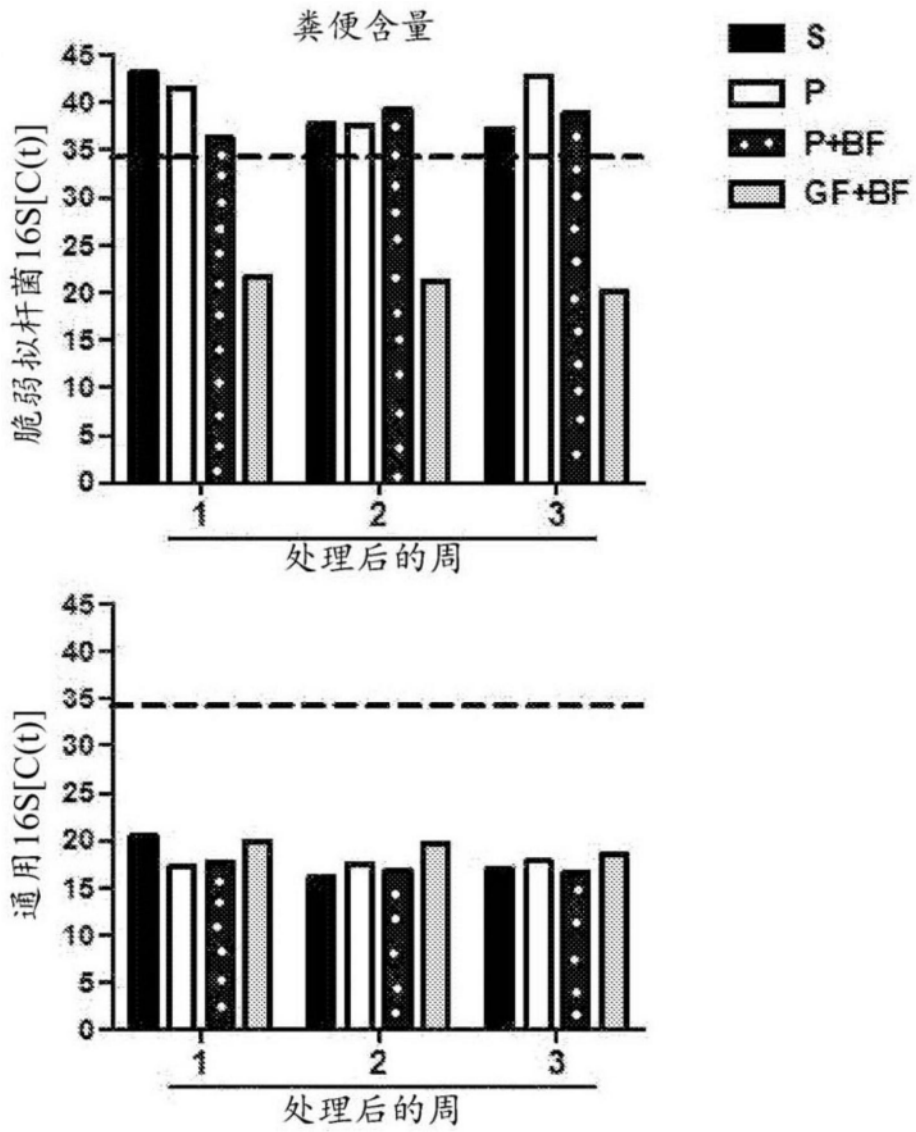


图4C

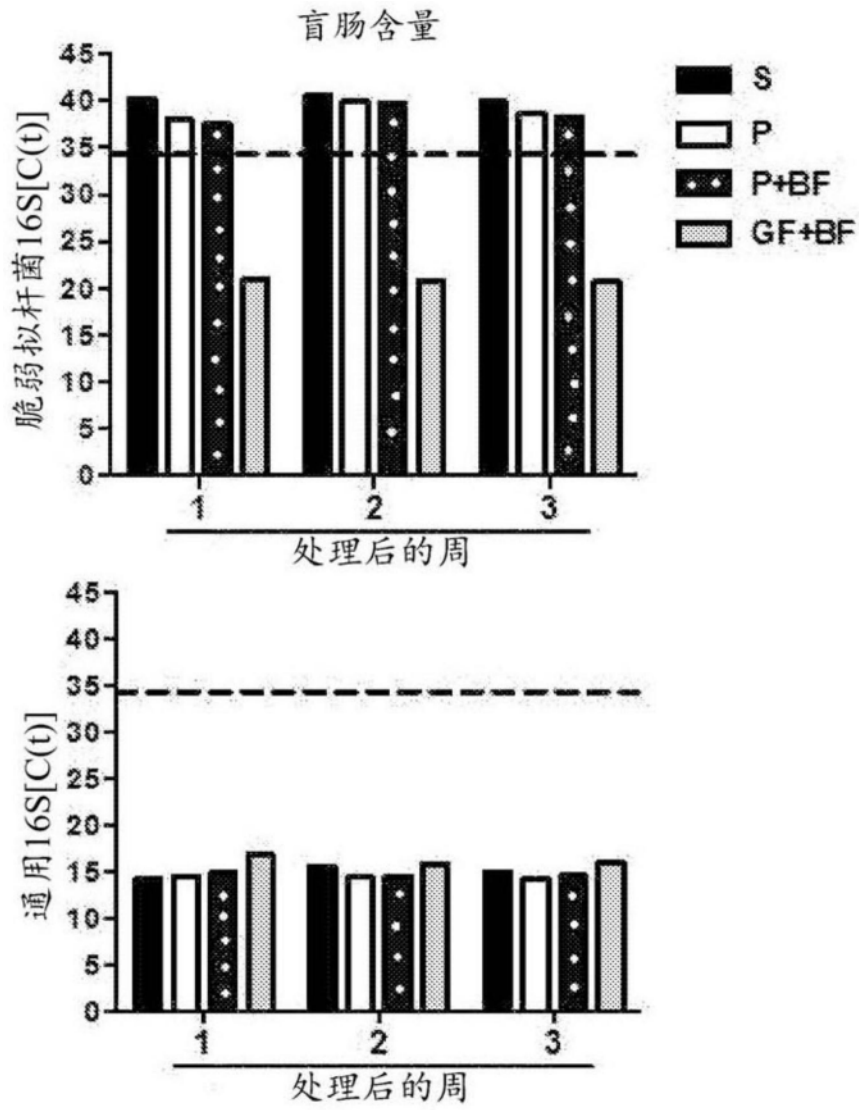


图4D

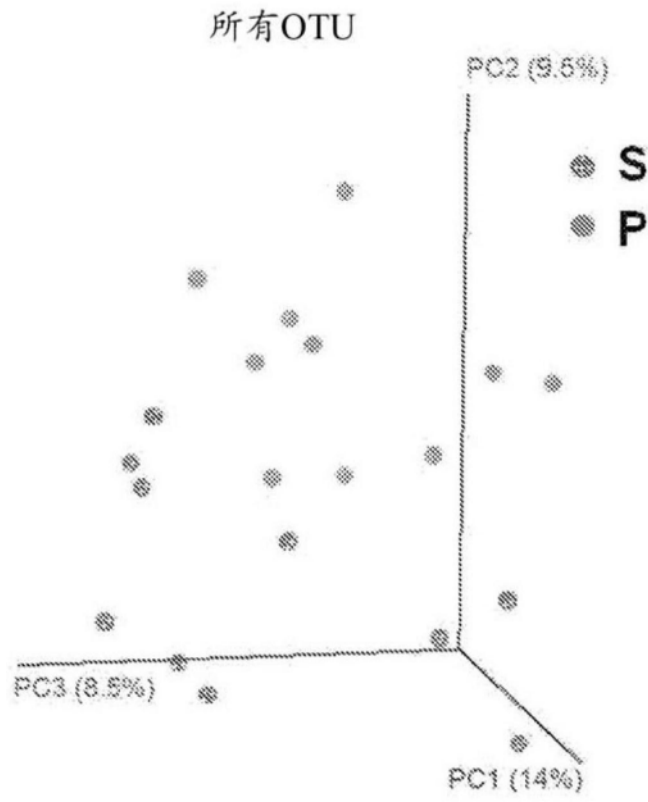


图5A

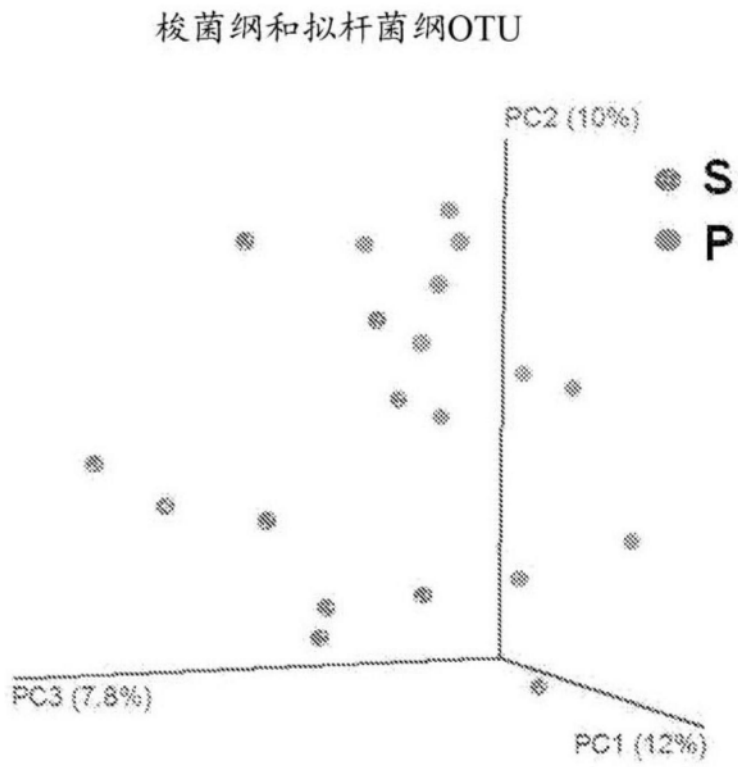


图5B

除了梭菌纲和拟杆菌纲之外的所有OTU

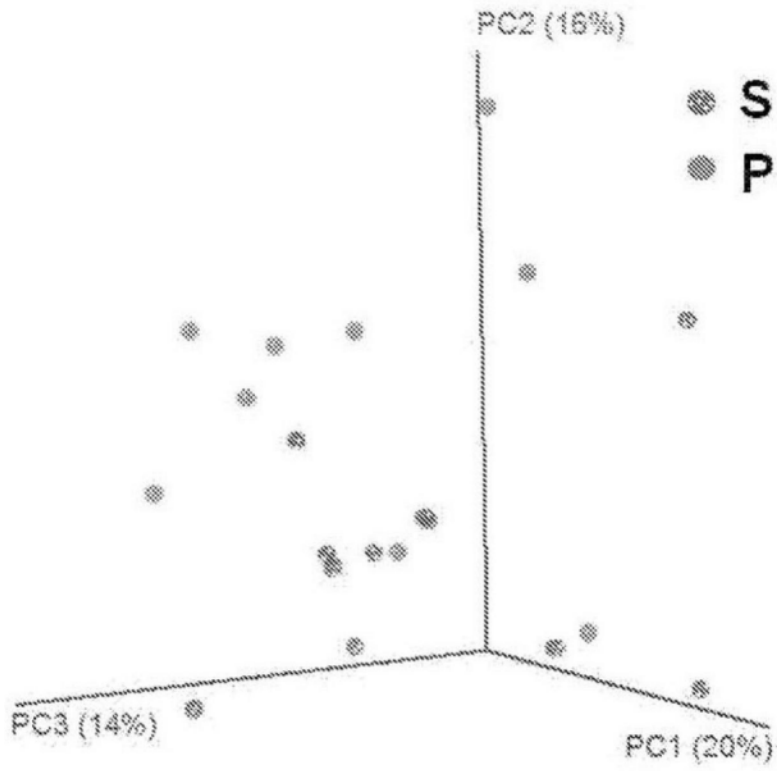


图5C

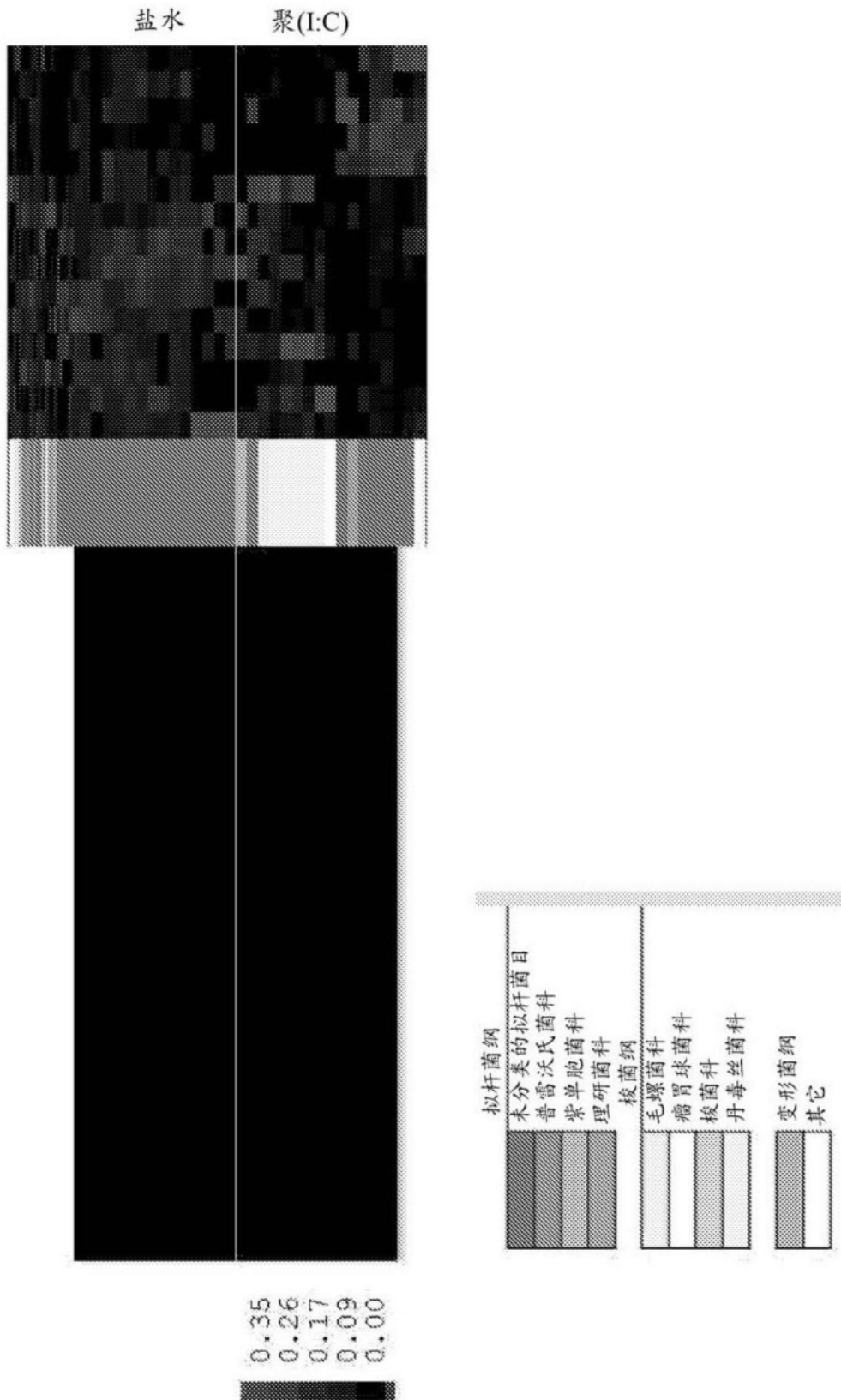


图5D

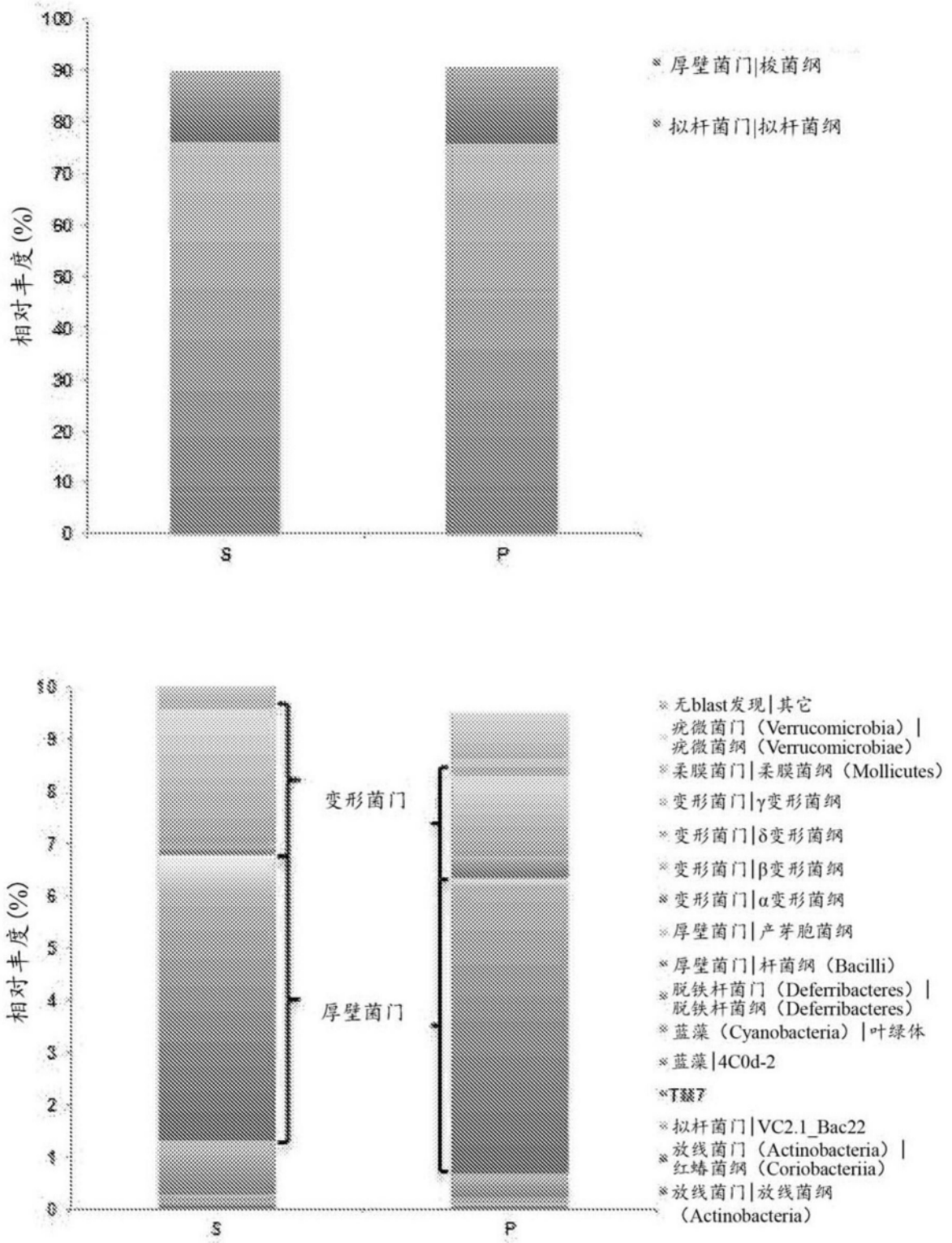


图5E

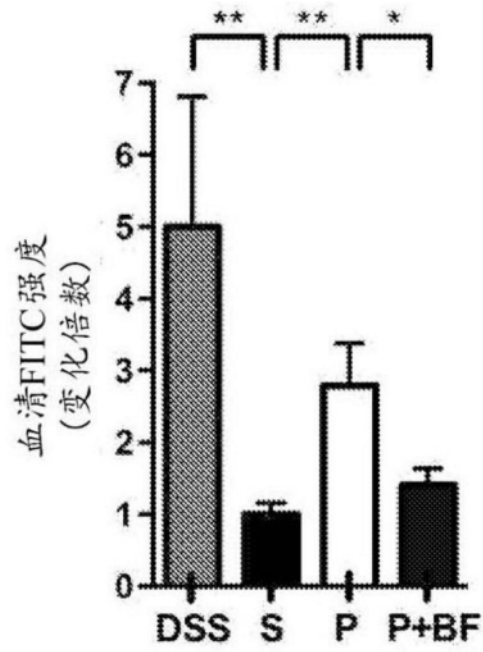


图6A

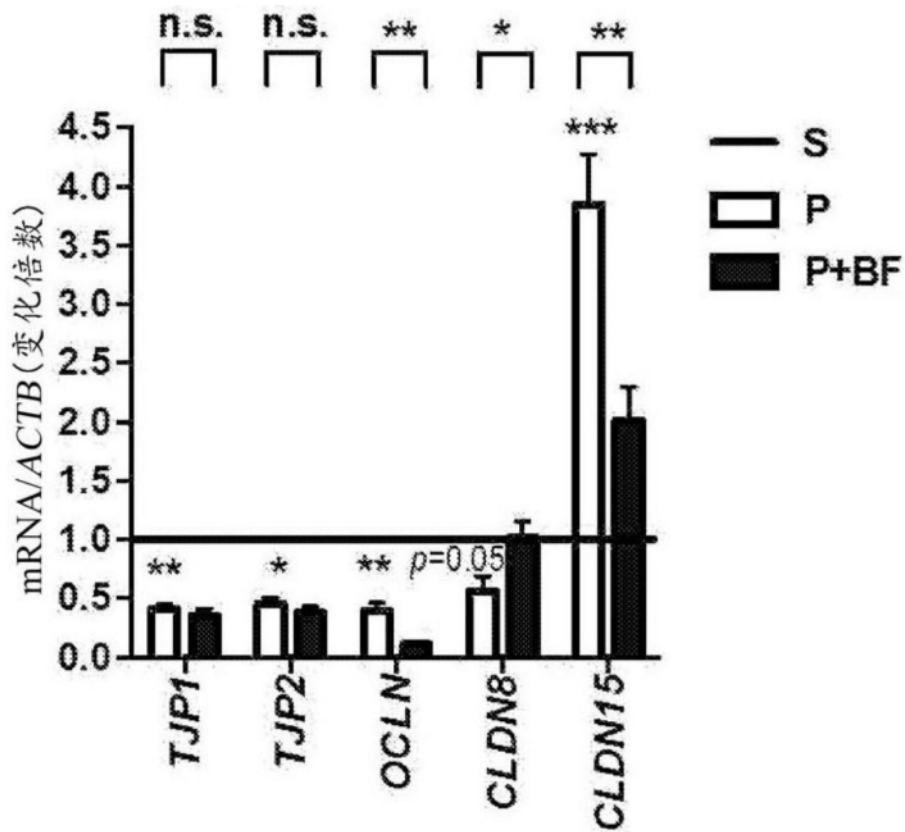


图6B

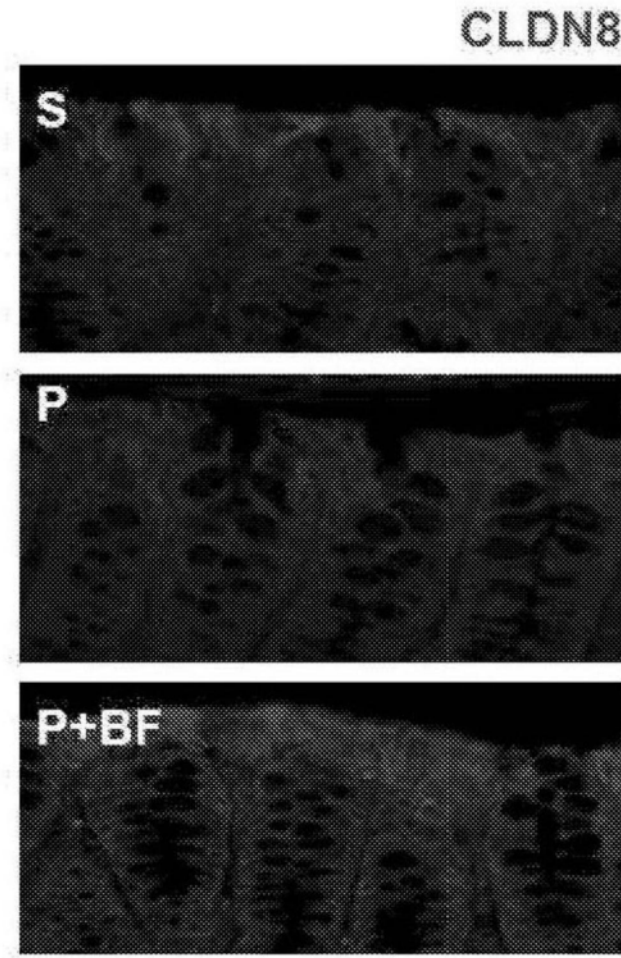


图6C

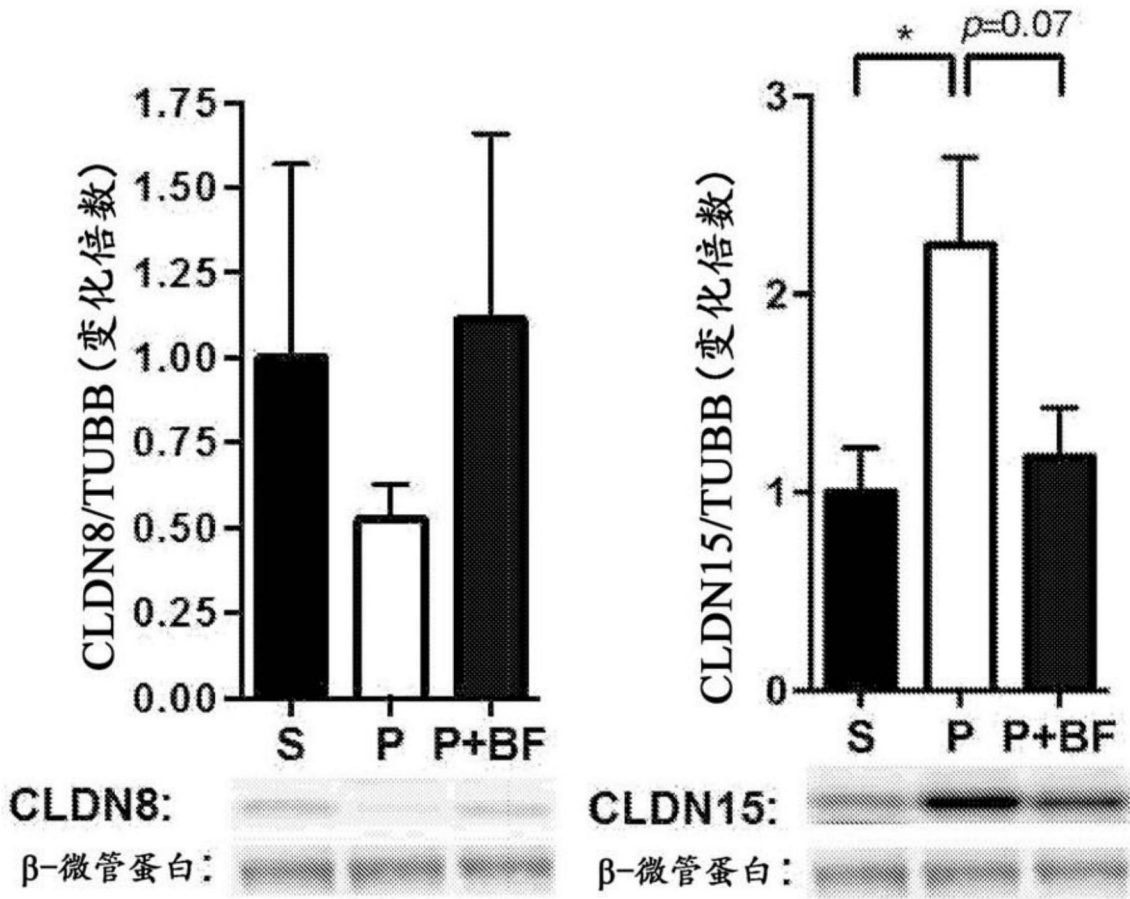


图6D

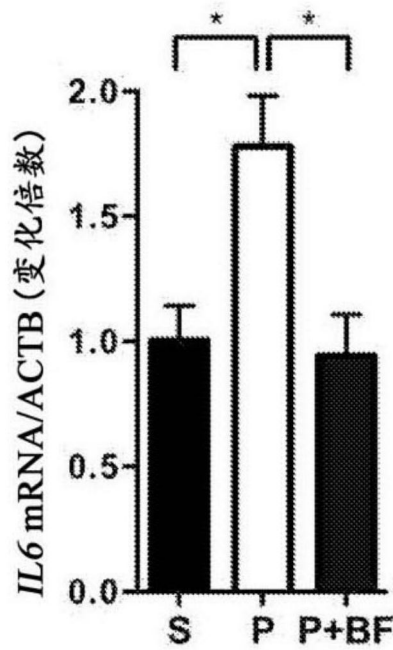


图6E

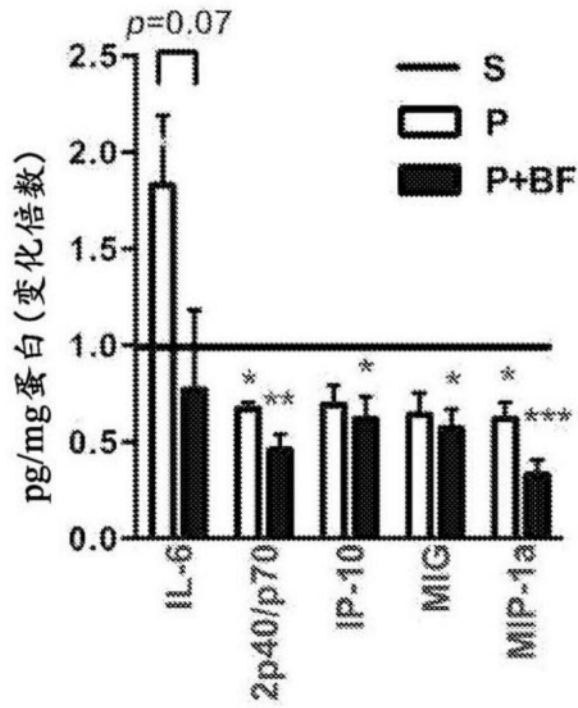


图6F

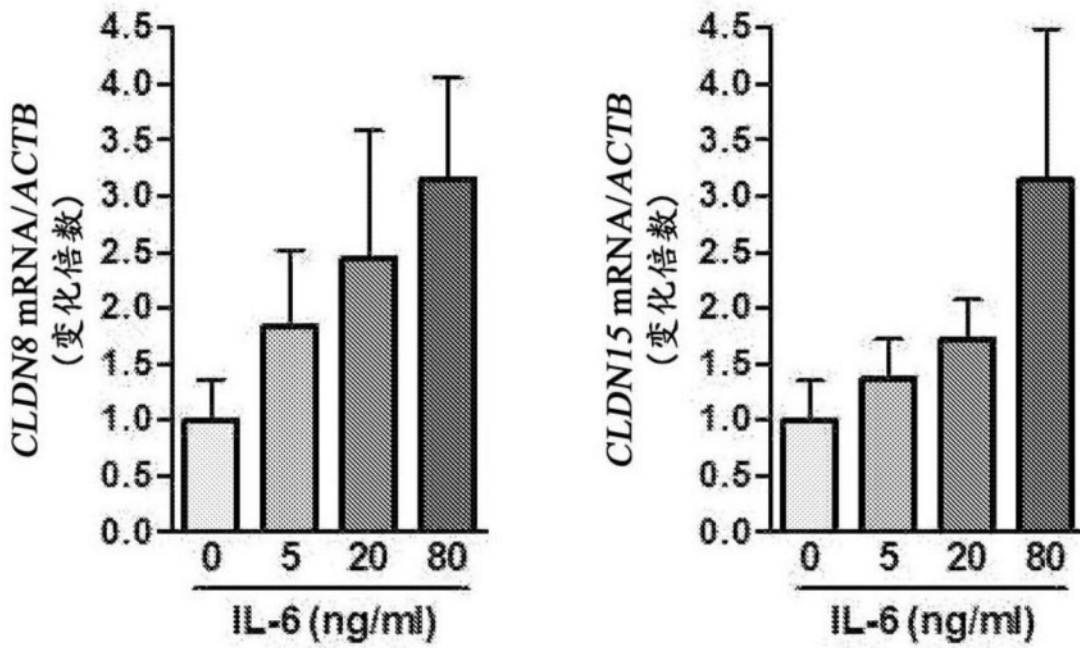


图7A

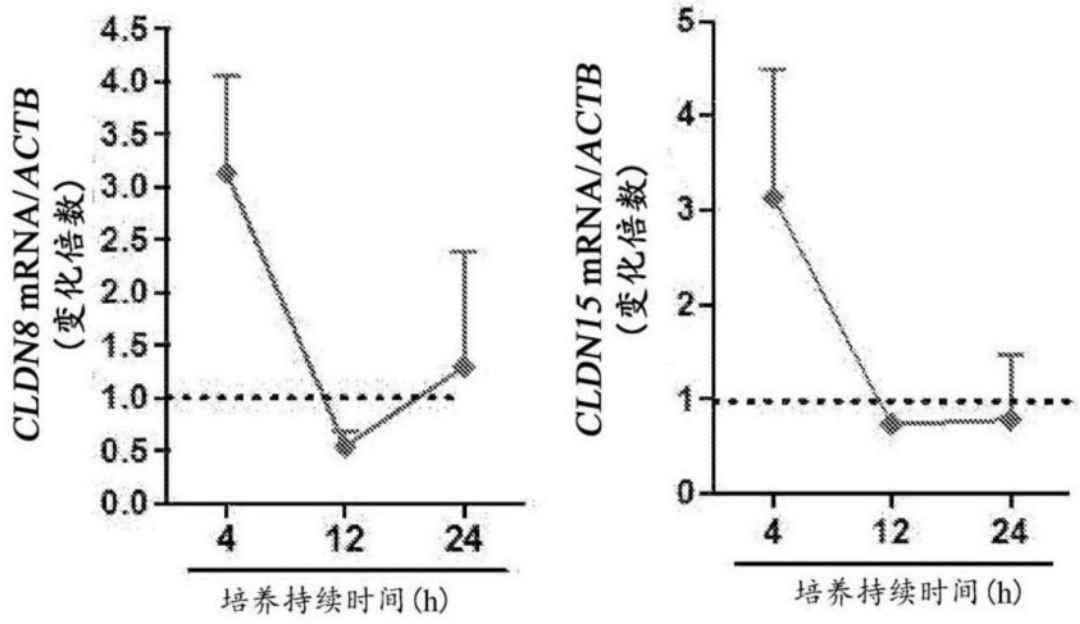


图7B

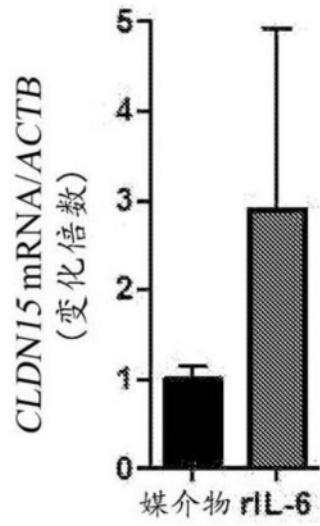
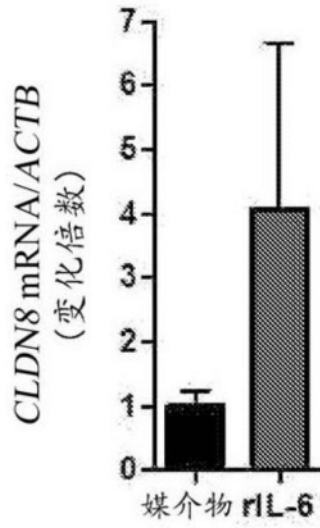


图7C

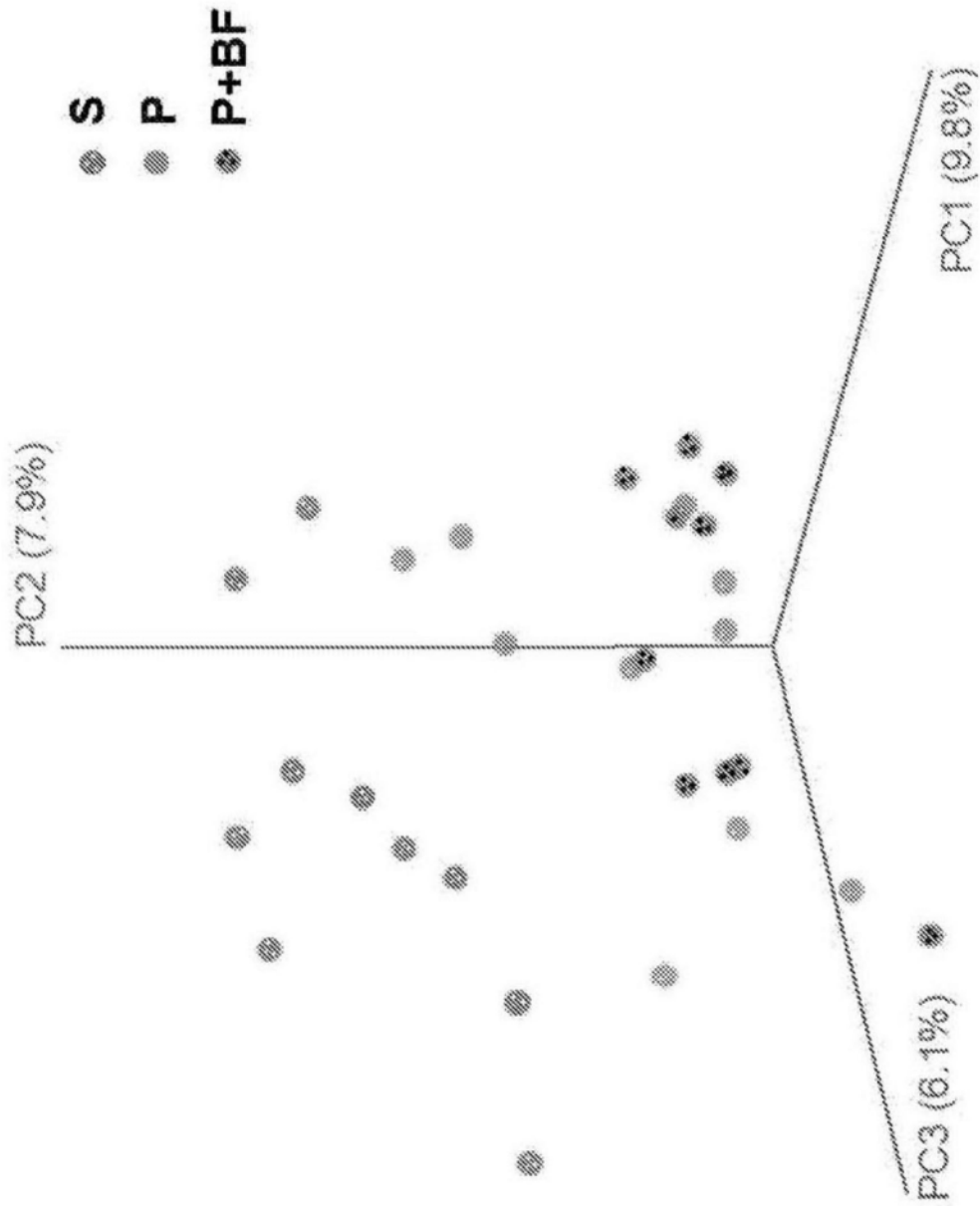


图8A

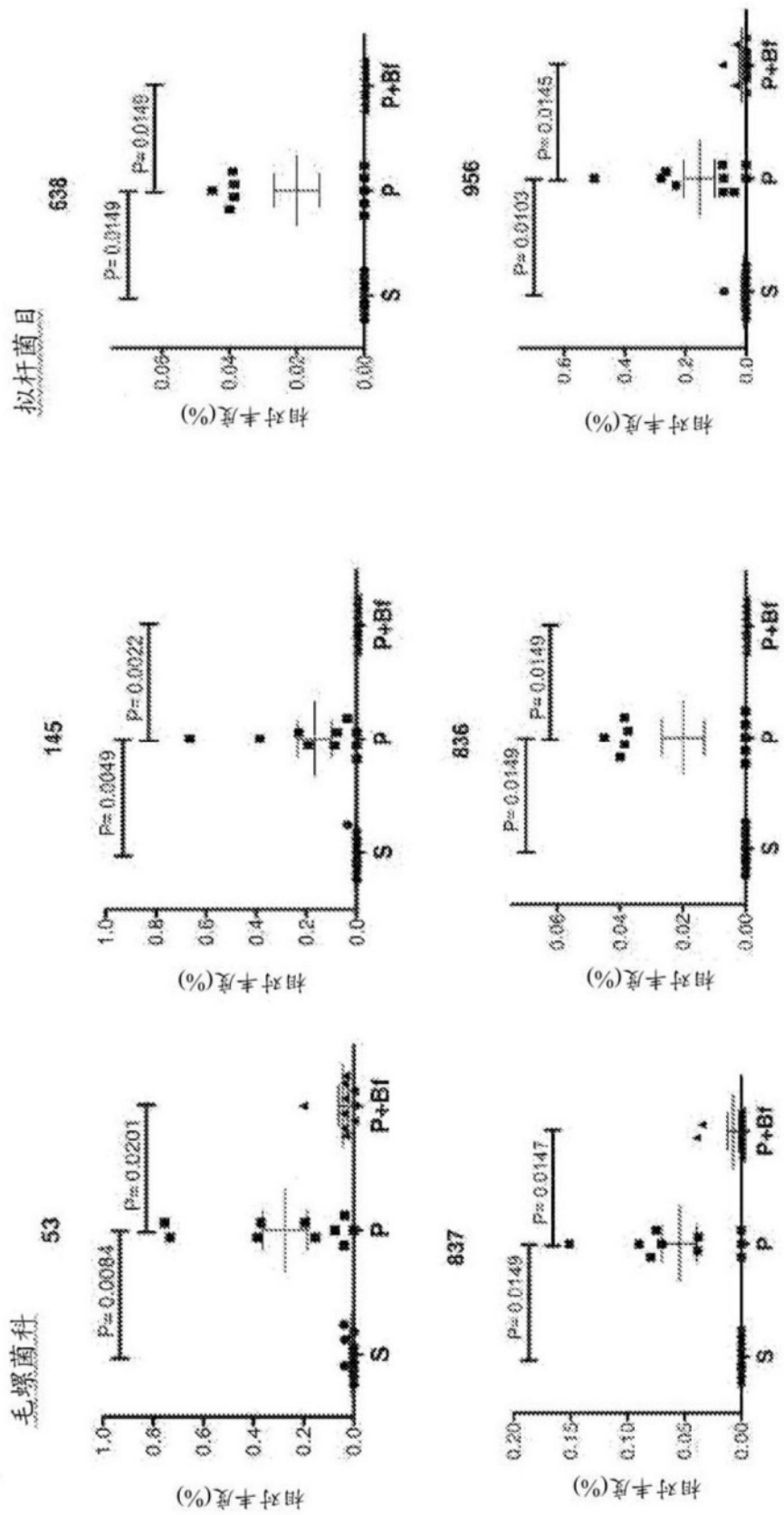


图8B

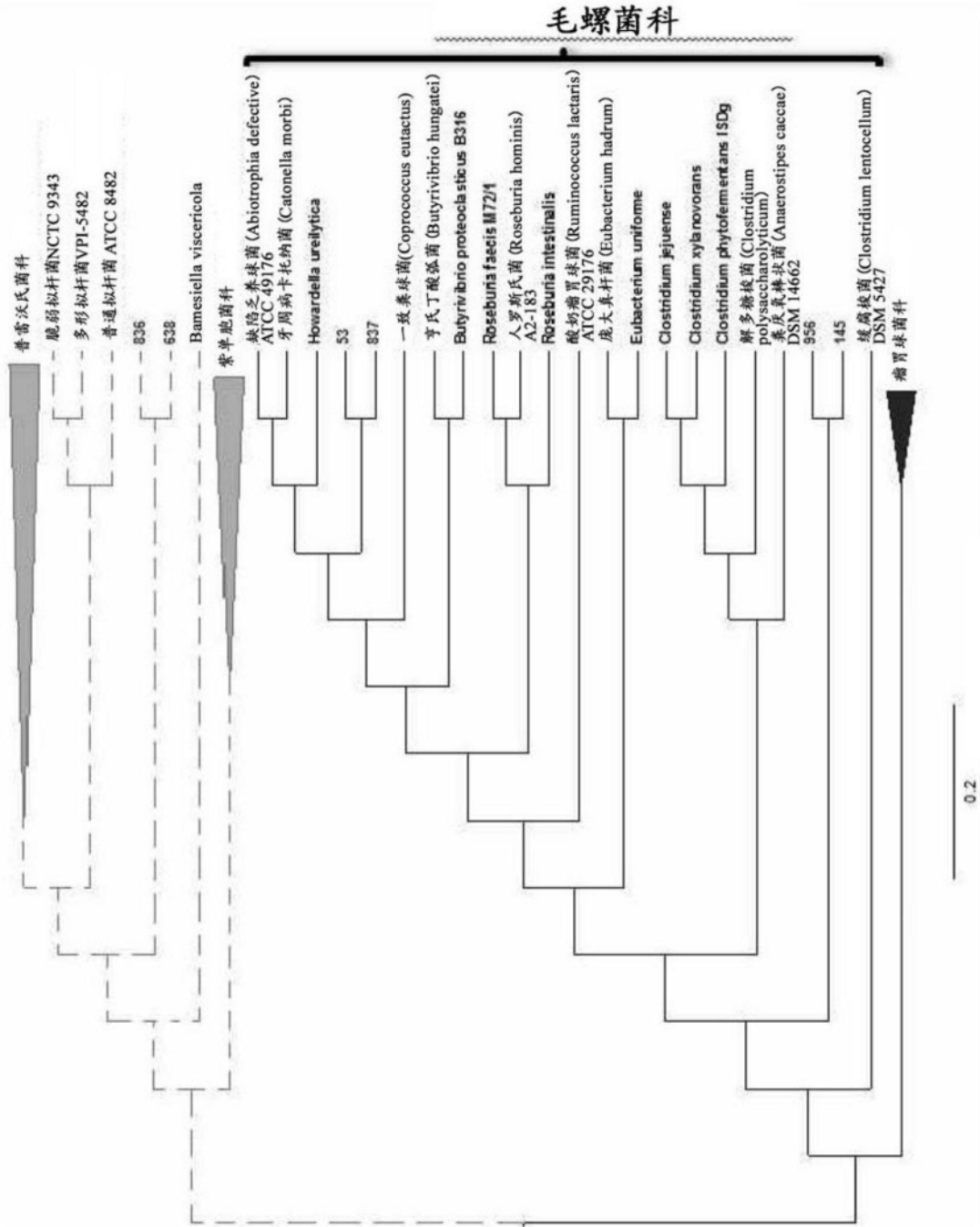


图8C

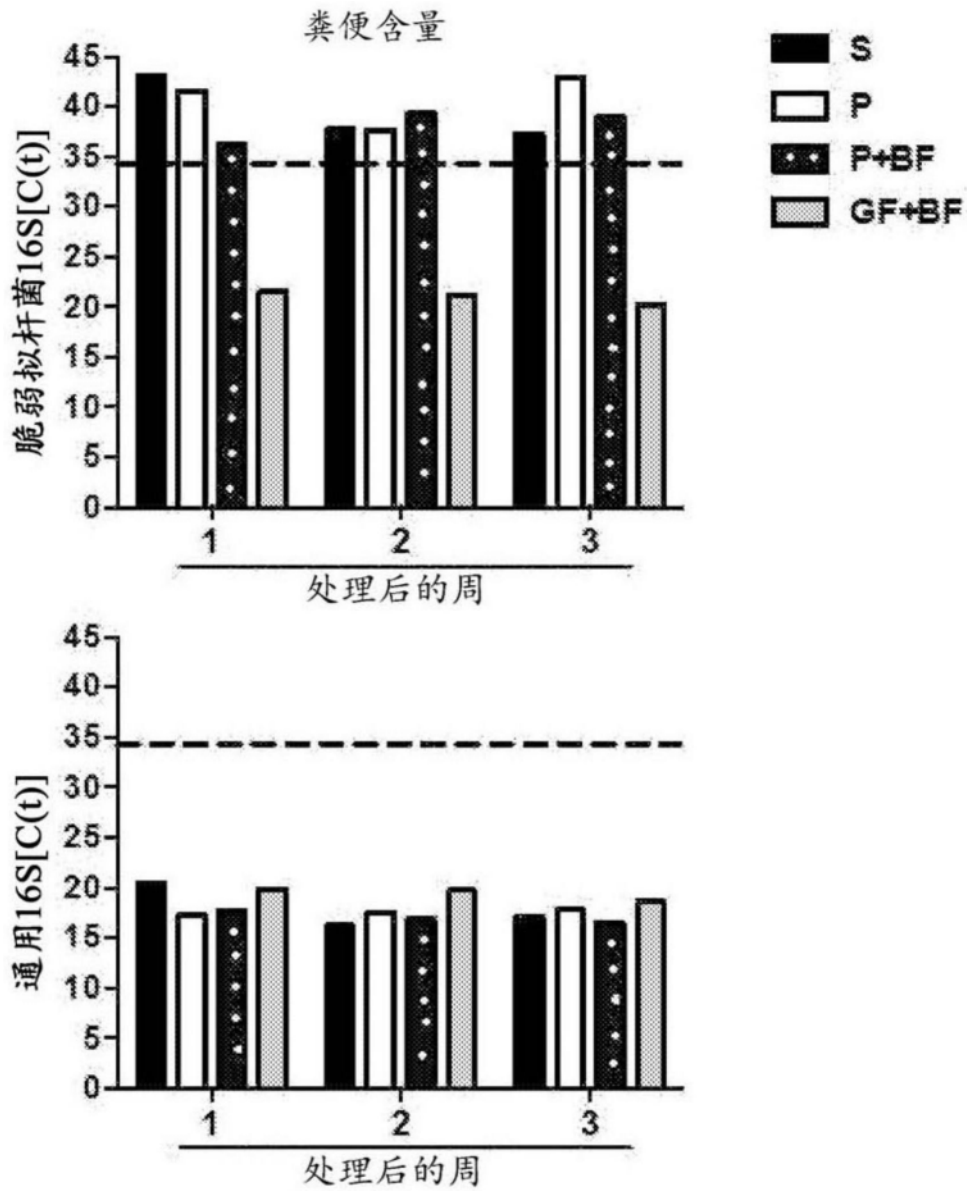


图9A

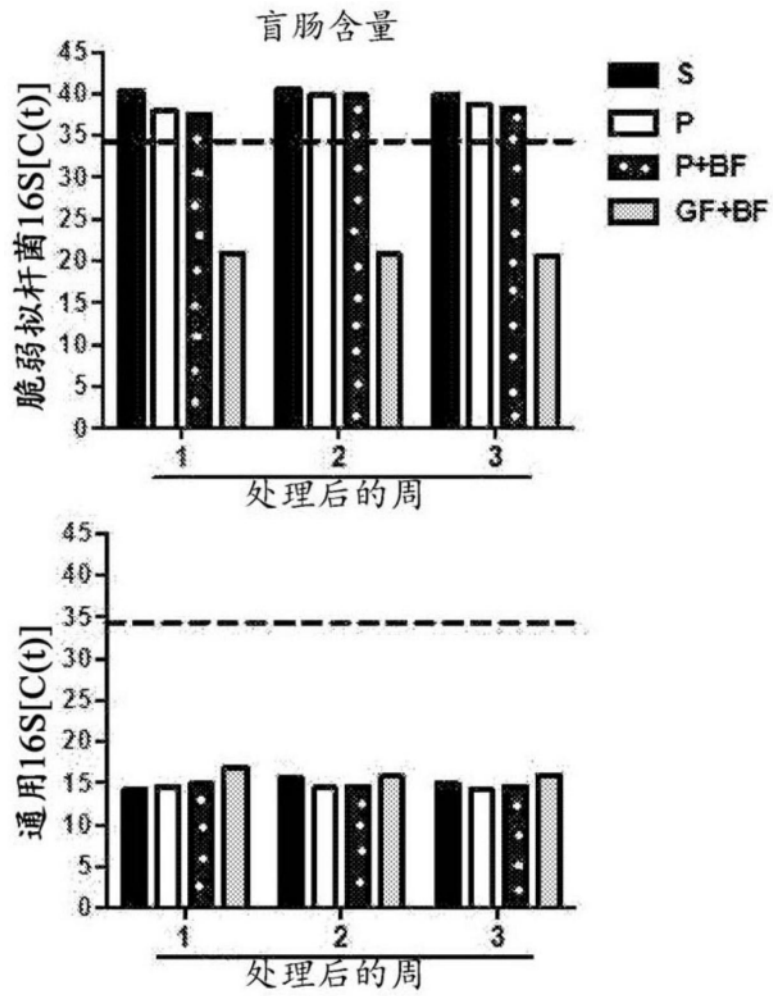


图9B

焦虑和行进：开场探究

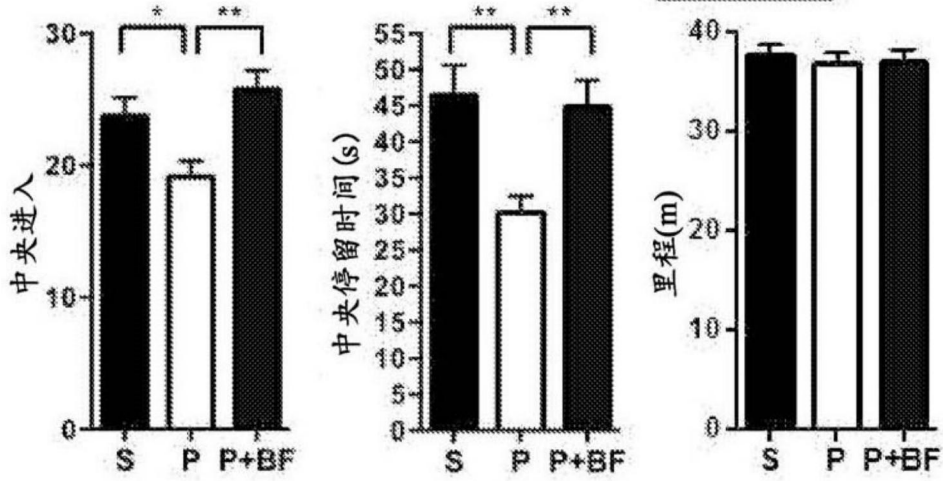


图10A

感觉运动门控：
前脉冲抑制

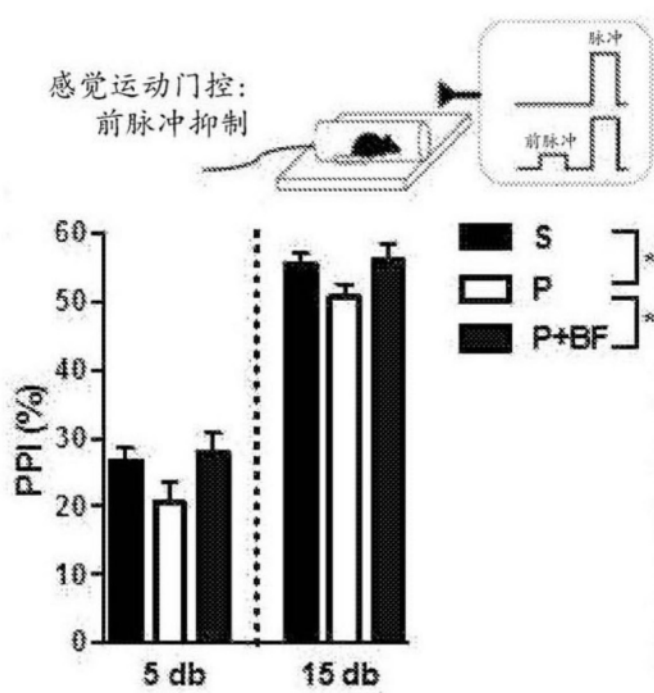


图10B

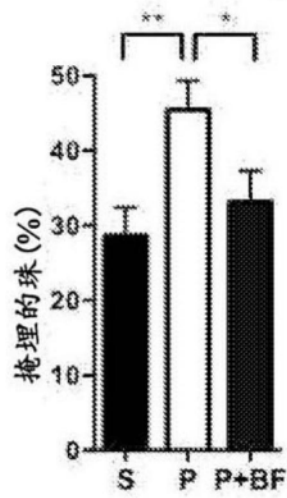
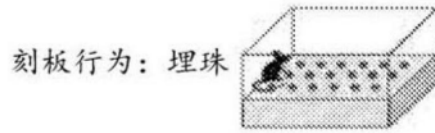


图10C

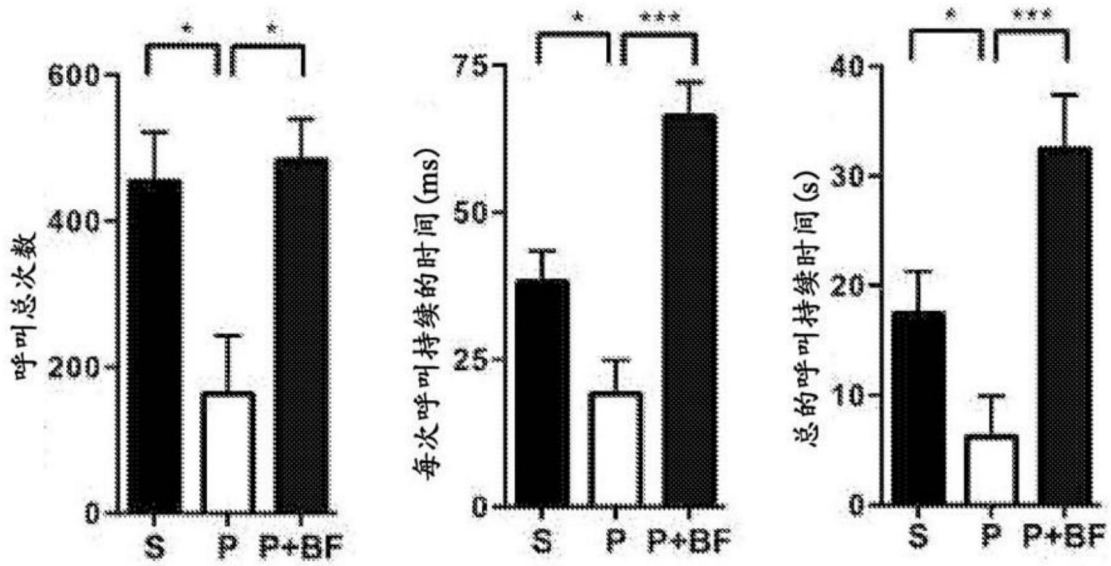
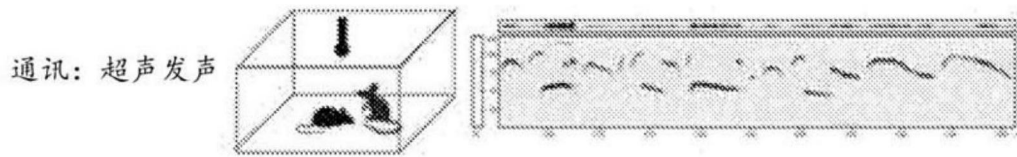


图10D

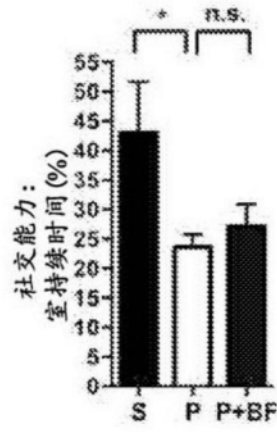
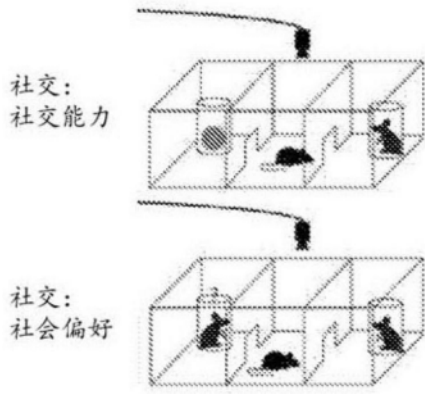


图10E

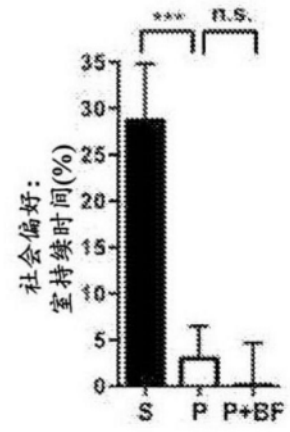


图10F

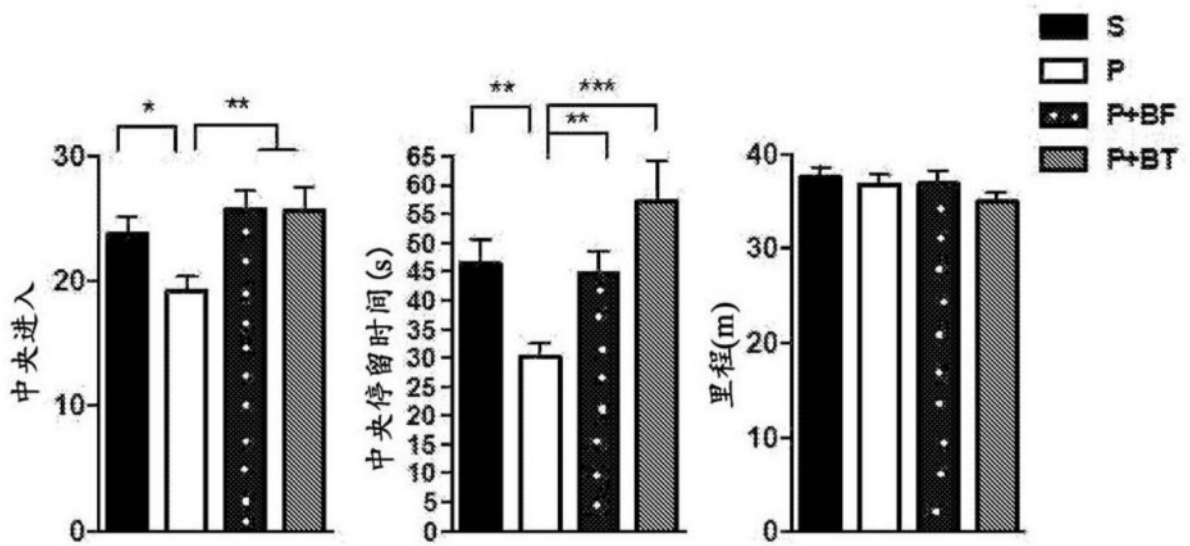


图11A

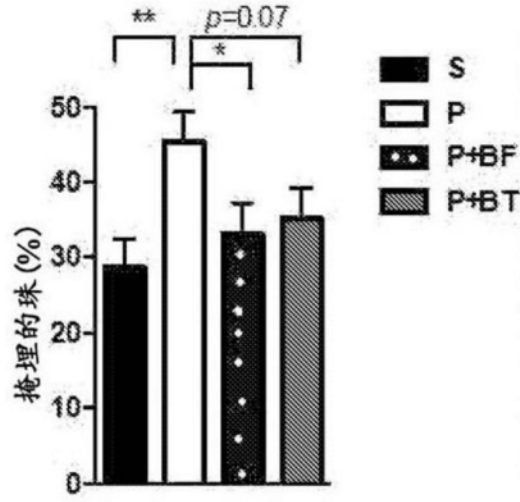


图11B

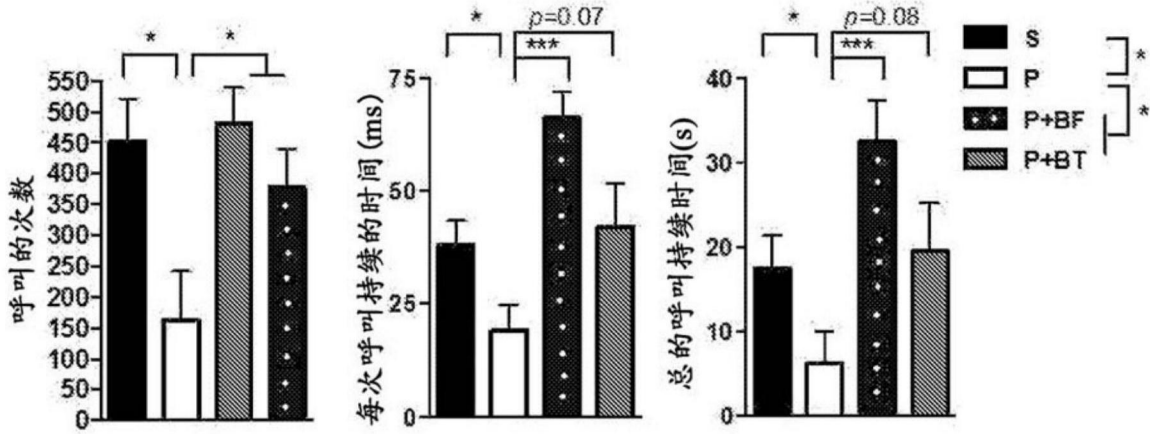


图11C

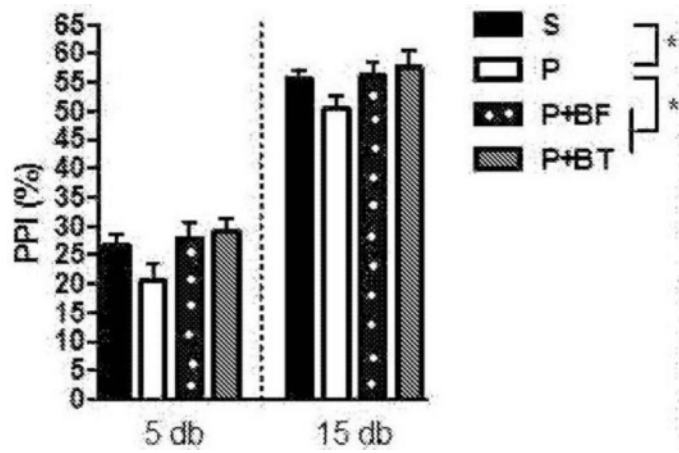


图11D

超级途径	代谢物	P	P+SF
氨基酸	肌氨酸(N-甲基甘氨酸)		
	天冬氨酸		
	3-脲基丙酸盐/酯		
	戊二酸盐/酯(戊二酸盐/酯)		
	酪氨酸		
	3-(4-羟苯基)乳酸盐/酯		
	3-苯基丙酸盐/酯(氢化肉桂酸盐/酯)		
	血清素(5HT)		
	3-甲基-2-氧代戊酸盐/酯		
	3-甲基-2-氧代丁酸盐/酯		
	4-甲基-2-氧代戊酸盐/酯		
	异丁酰肉毒碱		
	2-甲基丁酰肉毒碱		
	异戊酰肉毒碱		
	2-羟基丁酸盐/酯(AHB)		
	精氨酸		
	鸟氨酸		
	2-氨基丁酸盐/酯		
	4-氨基丁酸盐/酯		
	5-氧代脯氨酸		
肽	甘氨酸脯氨酸		
	γ-谷氨酰基氨酸		
	TDTEDKGEFLSEGGGV TDTEDKGEFLSEGGVVR		
碳水化合物	山梨醇		
	丙酮酸盐/酯		
	核糖		
	核酮糖		
	核糖醇		
能量	木糖醇		
	柠檬酸盐/酯		
	延胡索酸盐/酯		
核苷酸	苹果酸盐/酯		
	次黄嘌呤		
	肌苷		
	腺苷		
	5'单磷酸腺苷(AMP)		
	5'单磷酸鸟苷(5'-GMP)		
	尿酸盐/酯		
	2'-脱氧胞苷		
辅因子	尿嘧啶		
	假尿苷		
外源性物质	烟酰胺		
	硫酸苯尔二酚		
	水杨酸盐/酯		
	硫酸雌马酚		
脂质	赤藓糖醇		
	胆碱		
	手性肌醇		
	松醇		

图12A

对盐水的 变化倍数
< 0.5
0.5-0.6
0.6-0.7
1.0-2.0
> 5.0

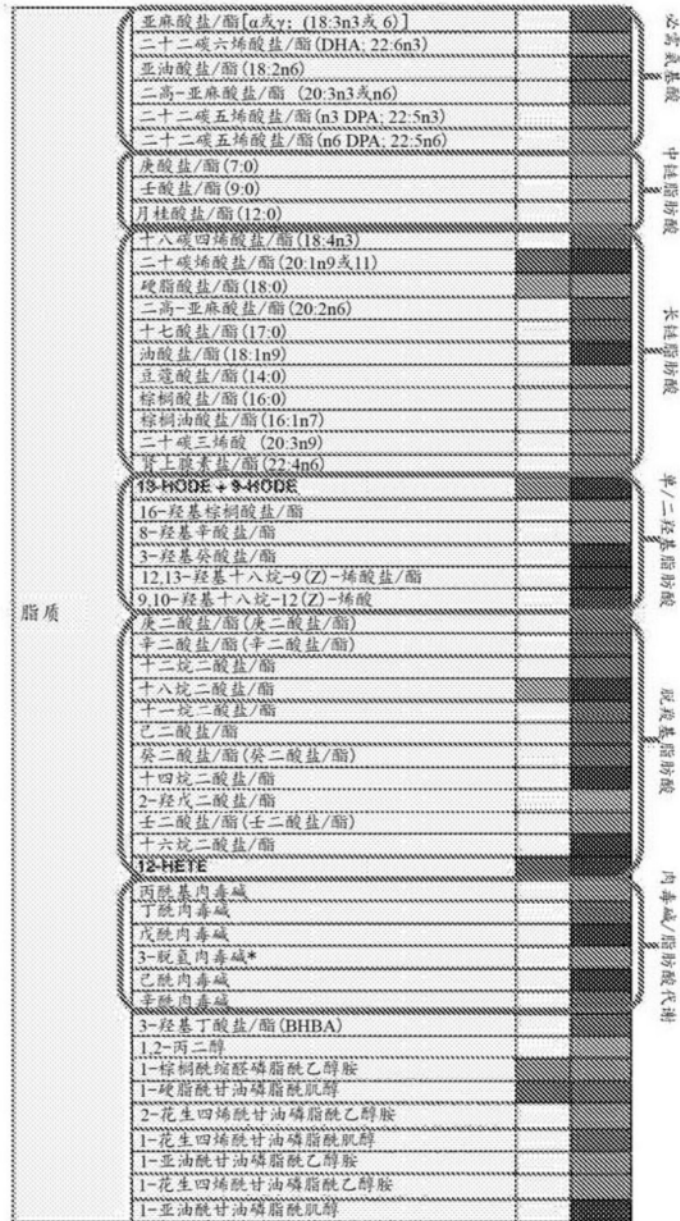


图12B

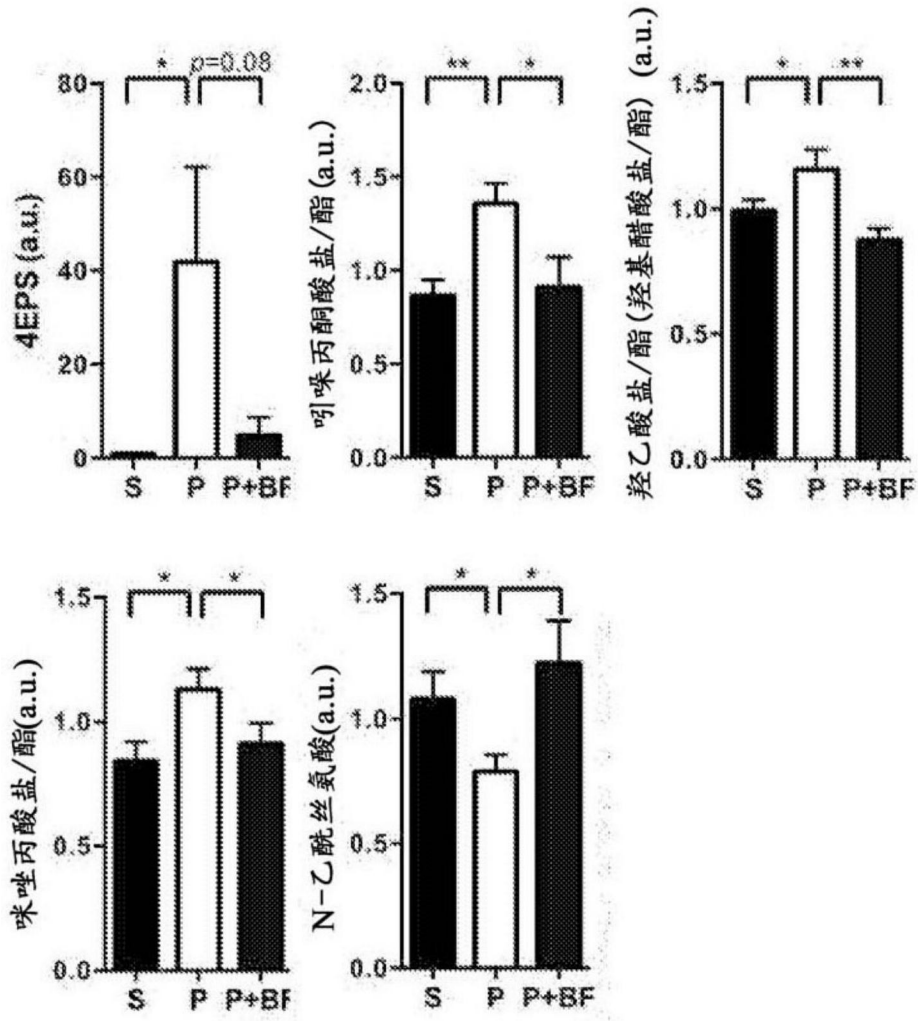


图13A

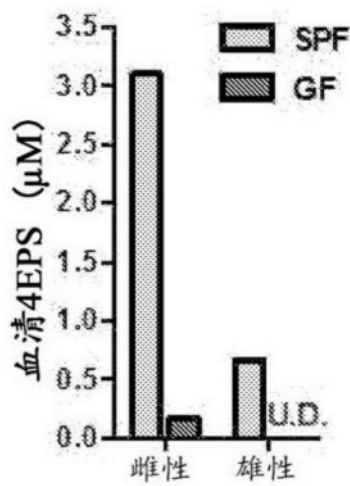


图13B

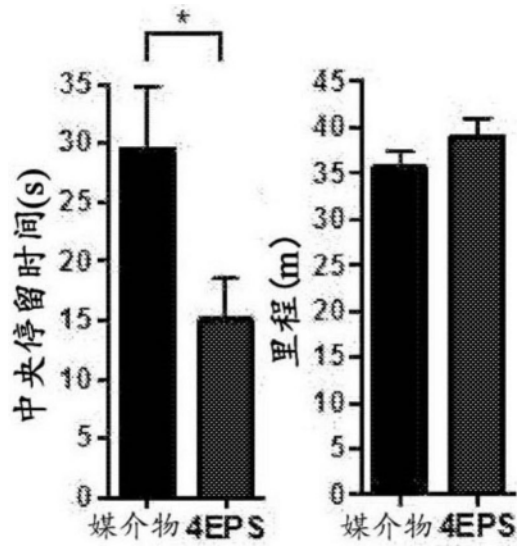


图13C

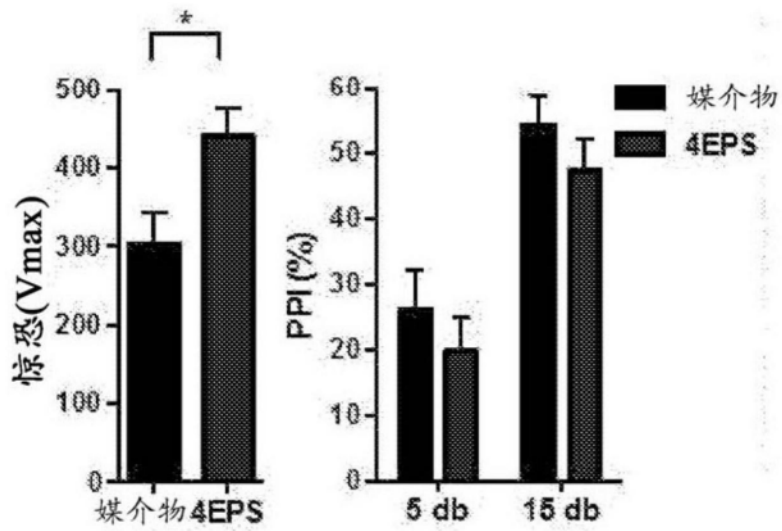


图13D

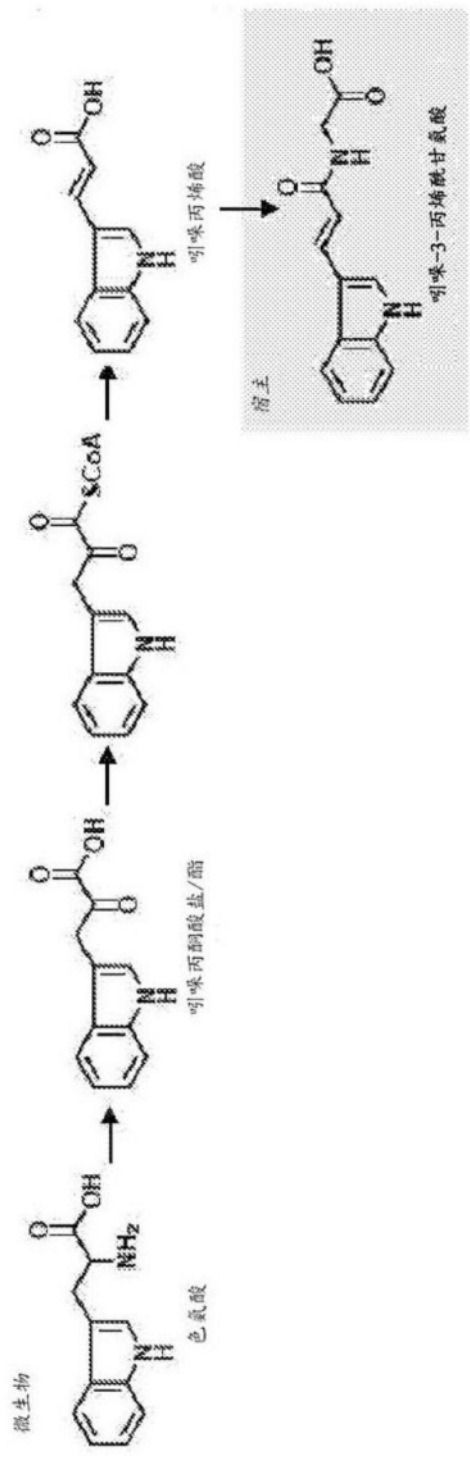


图14B

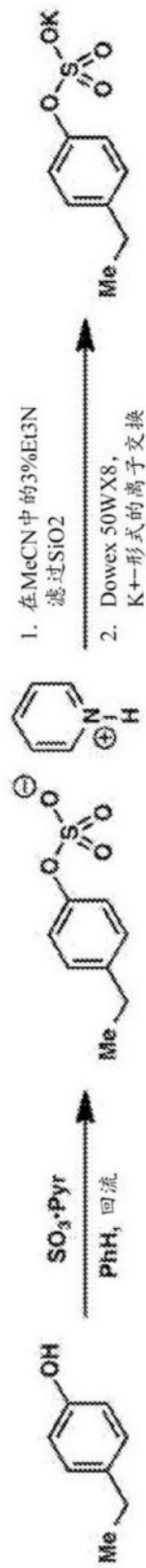


图15A

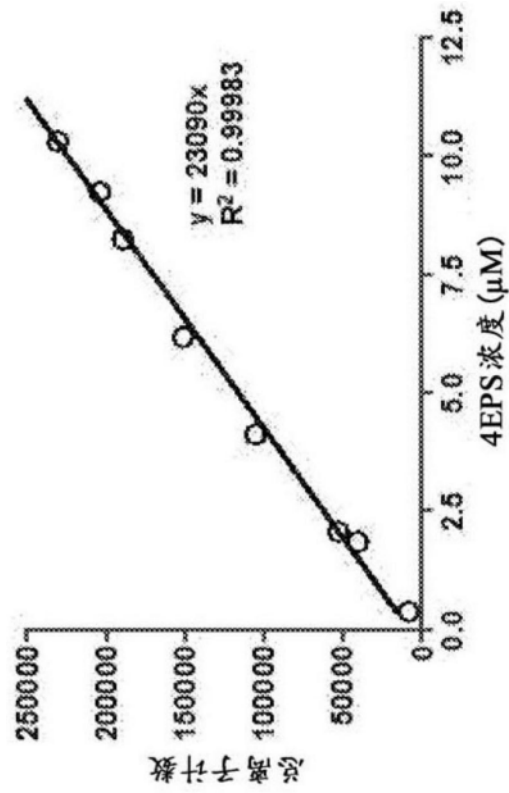


图15B

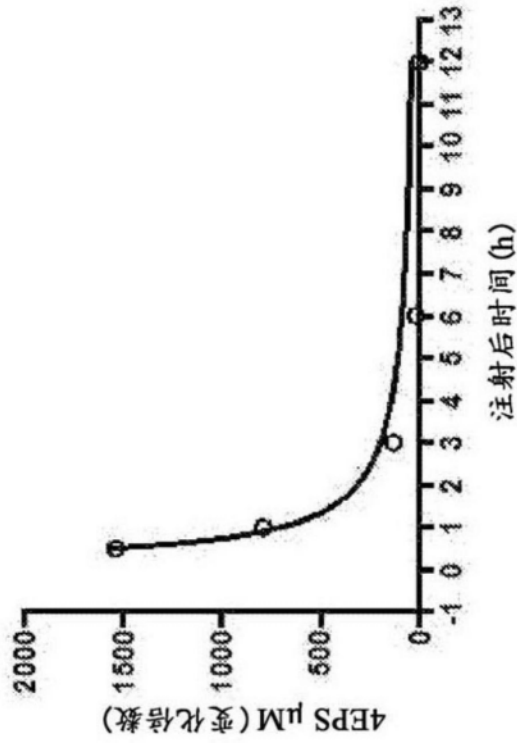


图15C

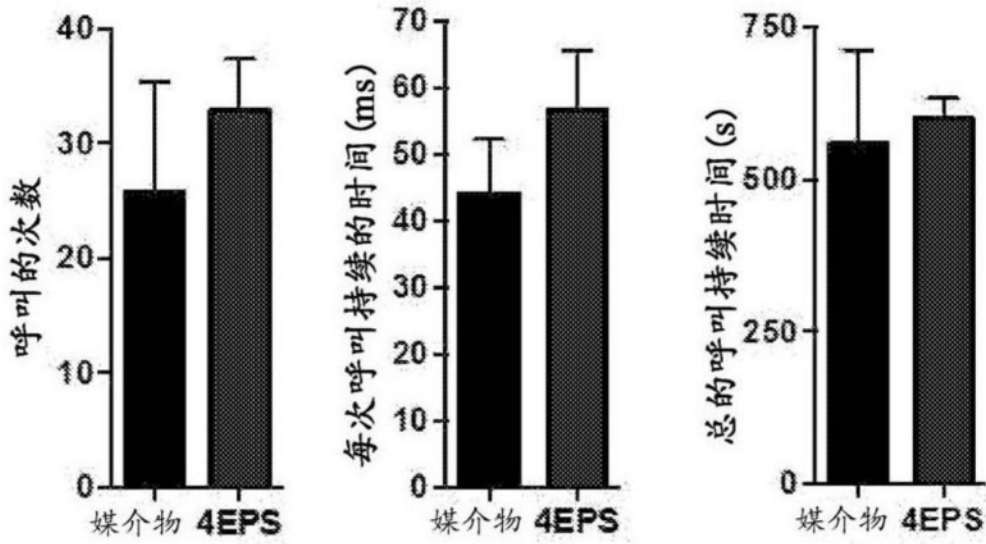


图15D



图15E