



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Gut Microbiota and Health-Article

通过原位观察揭示人体肠道微生物组的重建和动态变化

刘小林^{a,b}, 戴敏^c, Yue Ma^{a,b}, 赵娜^a, Ziyu Wang^{a,b}, Ying Yu^{a,b}, Yakun Xu^{a,b}, Huijie Zhang^d, Liyuan Xiang^c, He Tian^e, 税光厚^e, 张发明^{c,f,*}, 王军^{a,b,*}

^a CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

^c Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

^d Clinical Trial Center Office, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

^e State Key Laboratory of Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

^f Key Lab of Holistic Integrative Enterology, Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2020

Revised 2 March 2021

Accepted 16 March 2021

Available online 6 May 2021

关键词

昼夜节律

重建

宏基因组

宏转录组

代谢组

经内窥镜肠管

摘要

人体肠道微生物组主要通过使用粪便样本进行研究,这种做法已经得到了关于胃肠道微生物群的组成和功能的重要知识。然而,这种对粪便材料的依赖限制了对胃肠道其他位置(原位)微生物动力学的研究,并且粪便样本不能随时获得,这也阻碍了在更精细的时间尺度(如小时)下进行分析。在我们的研究中,我们利用结肠途径经内镜肠内导管(一种最初为粪便微生物群移植开发的技术)每天两次对回盲部微生物组进行采样;然后对这些样品进行宏基因组和宏转录组学分析。从5名健康志愿者身上共收集了43份回盲部样本及28份尿液和粪便样本。在5名志愿者中分析的回盲部和粪便微生物组被发现在宏基因组分析中相似,但它们的活性基因(宏转录组)被发现高度不同。两种微生物组在泻药暴露后都受到干扰;随着时间的推移,它们表现出与治疗前状态的差异减少,从而证明了作为肠道微生物组的先天特性——恢复力,尽管它们在我们的观察时间窗口内没有完全恢复。白天和夜间对回盲部微生物组的采样显示,在一系列细菌种类和功能途径中存在昼夜节律,特别是与短链脂肪酸产生相关的细菌,如痤疮丙酸杆菌和辅酶A生物合成II。自相关分析和波动分解进一步表明了昼夜振荡的显著周期性。粪便和尿液样本中的代谢组学分析反映了肠道微生物组的扰动和恢复,表明肠道微生物组对参与宿主健康的诸多关键代谢物的重要贡献。这项研究为人体肠道微生物组及其内在恢复力和昼夜节律以及这些对宿主的潜在后果提供了新的见解。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

对人体肠道微生物组的研究揭示了微生物群落在宿主健康和疾病中的关键作用[1]。然而,大多数研究中所采用的微生物群落来自粪便。尽管这一来源提供了胃肠道

(GI) 微生物生态系统的有力表征,但其本身也存在局限性。粪便微生物组在很大程度上代表了微生物群落沿胃肠道过渡的最后阶段,大量的生物地理学分析揭示了粪便微生物与发生重要生物过程的不同GI断面的区别[2]。例如,位于胃肠道中部的回盲部微生物组的多样性相对高于粪便

* Corresponding author.

E-mail address: fzhang@njmu.edu.cn (F. Zhang), junwang@im.ac.cn (J. Wang).

微生物组，尽管二者几乎共享所有主要类群[3-5]。由于粪便中的大多数细菌和古菌来自腔管内容物，因此粪便微生物组也是黏膜微生物组（即位于与宿主串扰的亲密界面并与免疫系统特异性相互作用的群落）的不良指标[6-7]。此外，很少在短时间间隔内连续采集粪便样本；相反，由于人体生理学的原因，这些样本往往每天都要采集。这阻碍了以更精细的分辨率对群落动态变化进行研究，如在小鼠模型中观察到的昼夜循环，并已证明与宿主生理稳态密切相关[8-10]。

大多数人体肠道微生物组的时间序列研究避免了有意的挑战或压力，但人体肠道微生物群中的扰动是常见的，并影响其组成和功能[11-12]；此外，随之而来的动态变化是环境压力下群落稳健性的常见指标。极端的饮食变化与健康人体肠道微生物组的快速变化有关[11-12]，而更长期限的饮食习惯与更广泛的微生物组群（称为肠型）有关[13-14]。肠道微生物组会对多种抗生素产生明显的反应[15-16]，并且在最后一次给药后数月或数年内可检测到其影响，尽管此类研究通常是回顾性的[17-19]。在经过感染治疗或药物治疗后，在事件或干预后的几天内持续监测人体肠道微生物组[20]。一项关于粪便微生物群移植（FMT）的研究表明，外来微生物组可部分建立和取代原有的肠道微生物组，从而形成原有和新肠道微生物组的嵌合体[21]。在结肠镜检查前，也可利用渗透性泻药（被广泛用于治疗便秘），其能够去除大部分胃肠道微生物组[22-23]。此外，它们还与小鼠连续给药一周后肠道微生物群的长期变化有关，对宿主肠道和免疫稳态产生负面影响[8]。

在临床实践中，健康个体在停用渗透性泻药后的几天内，其粪便微生物群通常会恢复到此前的生理状态。该重建过程提供了一个机会，用来检查健康人体肠道微生物组的动态变化和稳健性，以及量化强烈扰动后微生物组的变化[24-25]。结肠途径经内镜肠道植管术（TET）是在内窥镜检查下，通过肛门将一根导管植入盲肠或回肠末端，以重复施用FMT或给药[26-27]。此外，利用TET管还可对肠道内液体进行采样，并有助于服用渗透性泻药后粪便微生物组和回盲部微生物组的原位分析。在本研究中，我们邀请了健康的志愿者入组，并要求志愿者服用渗透性泻药；随后，通过TET采样以及后续的宏基因组、宏转录组和代谢组分析，每天检查粪便微生物组的重建动态变化，以及每隔12 h检查回盲部微生物组的重建动态变化。这种方法还促进了对可能有助于宿主昼夜节律的精细分辨率动态的调查。

2. 材料和方法

2.1. TET的准备和程序

在这项研究期间，志愿者被要求留在南京，并继续正常饮食。所有志愿者的饮食均为混合搭配，包括肉类、蔬菜和碳水化合物。在进行结肠镜检查的前一天晚上，要求志愿者口服2000 mL聚乙二醇电解质渗透性泻药溶液用于肠道准备。志愿者在麻醉下接受常规结肠镜检查。在对整个结肠进行评估后，将TET管（直径为2.7 mm；FMT-DT-F-27/1350；南京法迈特科技发展有限公司）通过内窥镜通道插入盲肠，这是一种已上市的器械。利用两枚内窥镜夹（ROCC-D-26-195-C；南微医学科技股份有限公司）将TET管的环固定在盲肠壁上。我们在2016年之前的报道首次详细阐述出TET程序[26]。用医用胶带将远端TET管固定在志愿者左臀部皮肤上。在临床实践中，结肠TET已被推荐用于洗涤菌群移植[28]。

2.2. 样本采集

样品采集流程图如图1所示。在服用渗透性泻药之前收集粪便和尿液样本，然后在结肠TET后每天收集粪便和尿液样本，直到TET管脱落。所有样品在测序前保存于-80 °C。每天两次（上午10:00和晚上10:00），使用注射器通过TET管采集盲肠液样本。当通过结肠管进行采样时，志愿者被指示以右侧卧位躺下。通过TET管快速向盲肠内注入总量为10~20 mL的37 °C的生理盐水（静脉注射使用标准），快速冲洗盲肠壁。然后用5 mL注射器从盲肠吸出液体。然后保留液体进行进一步处理，以获得微生物组。根据需要重复这一过程，以收集足够数量的样本。盲肠液样本在收集后30 min内保存于-80 °C。本研究获南京医科大学第二附属医院机构审查委员会批准（[2018]-IIT-004-LP-01）。获得所有志愿者的书面知情同意。

2.3. 宏基因组和宏转录组测序

为了进行宏基因组测序，根据制造商的说明，使用QIAamp PowerFecal DNA试剂盒（Qiagen，德国）从所有5名健康志愿者的28份解冻粪便样本和43份回盲样本中提取总肠道微生物基因组DNA。对于宏转录组测序，使用RNeasy PowerMicrobiome Kit（Qiagen，德国）从样本中提取和分离总RNA，其中，核糖体RNA（rRNA）使用RiboMinu转录组分离试剂盒（Thermo Fisher Scientific，美国），该试剂盒利用rRNA互补探针结合和去除rRNA。提取的DNA和RNA分别用Illumina NovaSeq PE150平台测序。

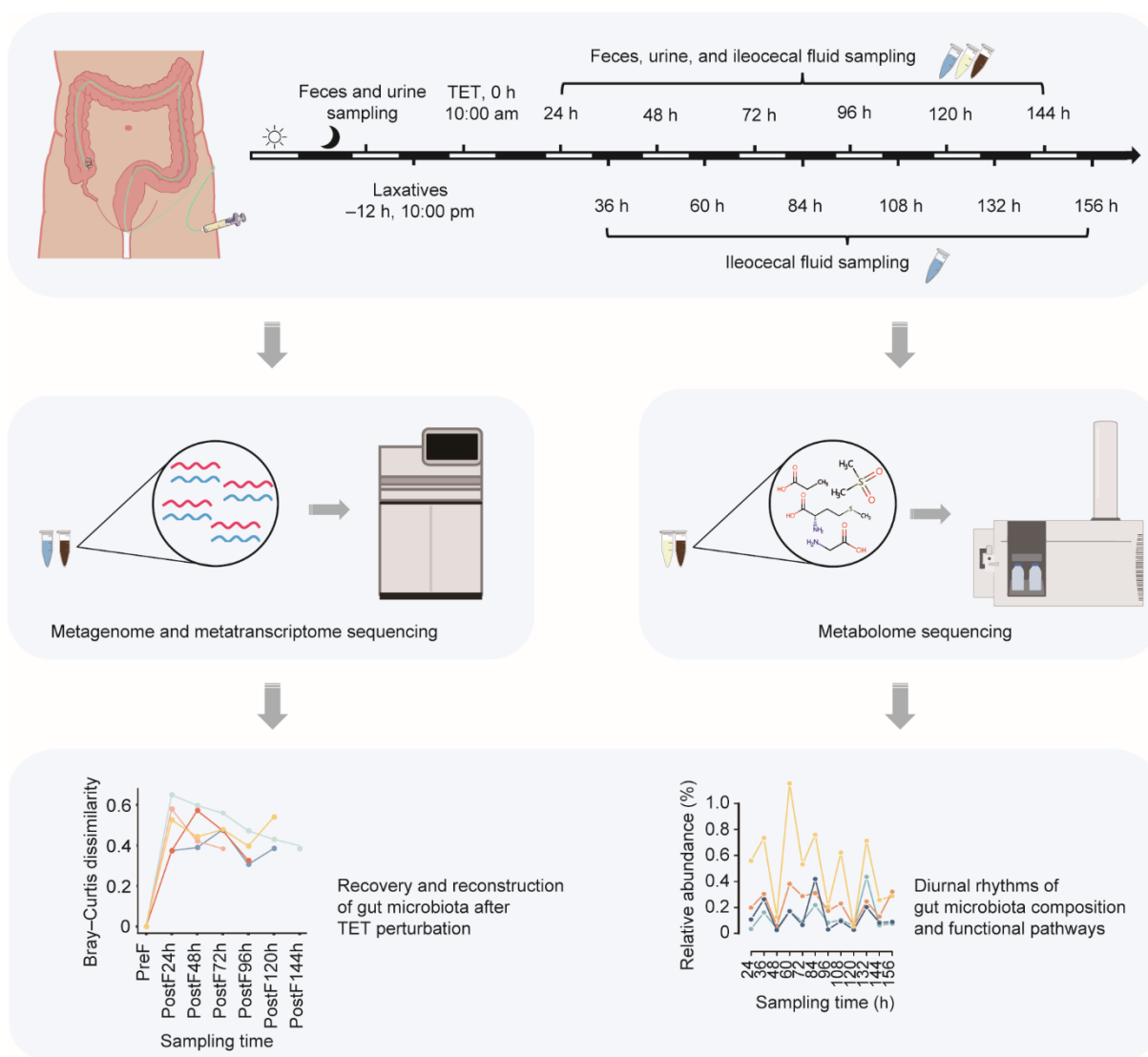


图1. 样本采集、测序及分析流程图。蓝色：回盲；黄色：尿液；棕色：粪便。

2.4. 分类和功能分析

通过 KneadData 0.7.2[†]对获得的原始测序读数进行质量控制，使用 Trimmomatic 0.36 软件对低质量读数进行过滤去除，采用去污算法去除宿主读数[29]。经过质量控制，样本在宏基因组和宏转录组数据中的平均读数为 2900 万。对于宏基因组分析，所有样本总共使用了 1.21 亿个读数，细分到相同的采样深度；7000 万个读数用于宏转录组分析，每个样本的测序深度相同。

利用 MetaPhlan2 2.0 和 HUMAnN2-0.11.2 进行分类和功能分析。按照 Franzosa 等[30]报道的宏基因组和宏转录组分析方法，使用 HUMAnN2-0.11.2 分析综合读数。在功能分析和成分分析中，使用 MetaPhlan2 2.0 对 Bowtie2 比较生成的中间文件进行物种注释和物种丰度计算[31–32]。结合 HUMAnN2 和 MetaPhlan2 生成的数据集，分析物种

组成和代谢途径；所有 28 份粪便样本和 43 份回盲样本均用于下游分析。简而言之，从回盲和粪便样本的宏基因组数据中分别获得 220 种和 245 种细菌以及 445 种和 411 种已鉴定的通路。对于宏转录组数据，在回盲部和粪便样本中分别发现了 78 个和 84 个菌种以及 269 种和 231 种已鉴定的通路。

2.5. 粪便和尿液样本中代谢物的鉴定和定量

通过参考 Dunn 等[33]和 Hou 等[34]发表的研究，对粪便和尿液样本中的代谢物进行了鉴定和定量。利用 ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm (2.1 mm \times 100 mm; Waters, 爱尔兰) 色谱柱和 Agilent 1290 II UPLC Sciex QTOF 5600 PLUS (美国) 液相色谱质谱仪，全部分析均在以下条件下采用电喷雾电离 (ESI) 模式进行：幕气，35；离子喷

[†] <http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata>

雾电压, 5500 V (正离子模式); 离子喷雾电压, -4500 V (负离子模式); 温度, 450 °C; 离子源气体1, 50; 离子源气体2, 50。

2.6. 统计分析

2.6.1. 宏基因组和宏转录组分析

采用 `Vegan2.5-6`[†] (用于生态数据分析的 R 包) 对粪便和回盲部样本的组成及功能数据集进行主坐标分析 (PCoA)。对每名志愿者分别计算渗透性泻药治疗后粪便样本与治疗前粪便样本之间的 Bray-Curtis 不一致性, 并利用 `ggplot2 3.2.1`[‡] (针对长矩阵数据可视化的 R 包) 进行可视化。对于回盲部样本, 由于微生物组多样性和粪便样本之间的某些相似性, 治疗前采集的粪便样本被用作渗透性泻药治疗前采集回盲部样本的可能替代物。

2.6.2. 人体肠道微生物组的昼夜节律图谱分析

在每 12 h 采集一次的回盲部样本中, 通过特定策略监测相对丰度的变化, 选择具有昼夜振荡的代谢途径。首先, 计算在每一采样时间每条代谢通路的相对丰度值减去上一个采样时间对应的值, 并提取每一志愿者个体中每条途径的所有值的符号。随后, 通过指定替代符号, 即 “+, -, …” 或 “-, +, …” 作为参考阵列, 生成两个长度相同的数组。最后, 将样本阵列与参考阵列进行了比较。选择与两个参考阵列中的任何一个完全匹配 (100%) 的那些, 并选择它们所代表的路径。

利用该策略选择了具有昼夜节律的菌种, 并补充了额外的统计检验, 旨在检测节律振荡。利用先前选定相对丰度的严格昼夜波动, 对菌种和代谢通路开展 Box-Pierce 和 Ljung-Box 检验, 以考察这些数据是否具有滞后的自相关性。利用自相关函数 (ACF) 计算具有显著性的代谢通路或菌种的自相关系数并进行可视化。此后, 利用 R 包预测 8.13 中的傅里叶函数计算外部回归量, 并利用 `arima.auto` 函数构建差分自回归移动平均模型 (ARIMA), 预测未来两天的变化。此外, 利用 R 中的 `stl()` 函数将波动性分解为节律性和趋势性波动。

2.6.3. 代谢组学分析以及与宏基因组/宏转录组的相关性

通过偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 对获得的代谢组数据集进行分析, 以确定粪便和尿液样本中渗透性泻药治疗所衍化的代谢物, 投影重要变量性 (VIP) 大于 1,

p 值小于 0.05 ($VIP > 1, p < 0.05$)。利用 `mixOmics 6.6.2` [35] 进行 PLS-DA, 这是一种用于组学数据分析的 R 包。R 包 `psych 1.8.12`^{††} 中的 `corr.test` 函数用于计算组学之间的相关系数矩阵, 包括宏基因组和宏转录组中菌种和代谢通路及粪便或尿液中代谢物之间的相关性。随后, 选择粪便和尿液样本中具有相同相关性的交叉对, 并利用 `Cytoscape 3.7.2` 对这些相关系数矩阵进行可视化 [36]。为研究代谢物水平上的重建状态, 还采用了代谢组的 Bray-Curtis 距离, 以服用泻药前样本为参考点, 对粪便和尿液样本的代谢物开展了动态变化分析。此外, 对粪便和尿液代谢组中代谢物的 Bray-Curtis 不一致性, 以及粪便宏基因组和宏转录组中菌种和通路的不一致性, 利用 Mantel 检验, 分别评估组学数据之间的相关性。使用 `MetaboAnalyst`^{‡‡} 的富集分析模型对渗透性泻药后粪便代谢组中不同的代谢物进行了富集分析。

3. 结果

对 5 名健康志愿者进行了渗透性泻药治疗、结肠镜检查 and 结肠 TET。在泻药治疗前以及在 TET 保持原位时每天收集粪便样本 (图 1)。每天上午 10:00 和晚上 10:00 分别采集回盲液, 利用注射器通过 TET 采集, 并用生理盐水冲洗。从 5 名志愿者的总共 28 份粪便样本和 43 份回盲部样本中提取宏基因组 DNA 和 RNA, 并在 Illumina Nova-Seq 平台上进行宏基因组和宏转录组测序分析 [37–38]。同时, 对每位志愿者采集尿液样本, 并与同一采样时间的粪便样本一并进行代谢组分析。

3.1. 粪便和回盲部微生物群在组成和功能上存在差异

对固定 (基于 DNA) 和活跃 (基于 RNA) 微生物群落分析揭示出它们在粪便样本和回盲部样本中的独特特征。在渗透性泻药治疗前采集的粪便样本中, 固定群落主要以 *Alistipes putredinis*、*Bacteroides stercoris*、*Prevotella stercorea*、*Faecalibacterium prausnitzii* 和 *Bacteroides massiliensis* 等菌种为主。尽管如此, 这些微生物菌种/属在 RNA 读长中并不总是占多数; 相反, 在基于 RNA 的调查中, *Ruminococcus torques*、*Methanobrevibacter*、*Subdoligranulum*、*Faecalibacterium prausnitzii* 和 *Ruminococcus obeum* 等菌种更为突出 [附件 A 中的图 2 (a) 和图 S1、

[†] <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/>

[‡] <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/>

^{††} <https://cran.r-project.org/web/packages/psych/>

^{‡‡} <https://cran.r-project.org/web/packages/psych/>

图 S2]。通过功能通路分析扩展了这一观察结果。宏基因组 DNA 中丰度最高的通路是腺苷核糖核苷酸从头生物合成、尿苷单磷酸 (UMP) 生物合成、尿苷二磷酸 (UDP)-*N*-乙酰尿酰五肽生物合成 II (含赖氨酸)、UDP-*N*-乙酰胞壁酰-五肽生物合成 I (含内消旋二氨基庚二酸盐), 以及肽聚糖生物合成 I (含内消旋二氨基庚二酸盐) [图 2 (a) 和图 S1、图 S2]。在宏转录组中, 腺苷核糖核苷酸从头生物合成的丰度最高, 但另一方面, 糖酵解 IV 和 III、淀粉降解 V 和糖异生 I 也出现在 RNA 读长最高的通路中 [图 2 (a) 和图 S1、图 S2]。在回盲部样本和结肠镜检查后的粪便样本中观察到类似的差别。基于 DNA 的微生物组成或功能分析, 虽然被广泛使用, 但并不代表微生物群落在活性方面的实际状态。在基于 DNA 的图谱分析中, 诸多高丰度的类群在 RNA 转录方面不太活跃, 而在宏转录组分析中高表达的众多代谢通路在宏基因组 (DNA) 读长中表达非常低 [图 2 (b) 和 (c)]。对于诸多菌种以及代谢通路而言, 反之亦然。

原位采集的回盲部微生物组与粪便微生物组相比, 在分类学和功能通路方面存在本质差异, 这些差异主要体现在主动转录基因 (宏转录组) 上。在 DNA 水平上, 回盲部样本和粪便样本之间的菌种组成和通路非常相似, 无显著差异 [图 2 (d) ~ (g)]。然而, 在转录组水平上, 粪便和回盲部样本显示出显著差异。例如, *Collinsella_unclassified*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium adolescentis* 和 *Ruminococcus obeum* 等菌种在回盲部微生物组中高度活跃, 而 *Parabacteroides_unclassified*、*Subdoligranulum_unclassified*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Bacteroides uniformis* 和 *Bacteroides vulgatus* 在粪便中极其活跃 [附件 A 中的图 2 (d) ~ (g) 和图 S3]。在功能通路方面, 腺苷核糖核苷酸从头生物合成、糖酵解 IV 和 III 以及鸟苷核糖核苷酸从头生物合成在粪便微生物组 RNA 中富集, 表明代谢活动高, 而糖异生 I、 β -D-葡萄糖醛酸和 D-葡萄糖醛酸降解的超级通路、硫氨基酸生物合成的超级通路、tRNA 加工和二磷酸脱氧胸苷 (dTDP)-*N*-乙酰硫胺生物合成可能是回盲部样本中最活跃的部分 (图 S3)。

3.2. 渗透性泻药治疗后粪便微生物群动态重建

在渗透性泻药强烈干扰后, 每个志愿者的粪便微生物组 (H1、H2、H3、H4 和 H5) 在结肠镜检查后的几天内表现出动态恢复或重建。与治疗前相比, 在 DNA 和 RNA 水平上, 泻药治疗后最早采集的粪便样本显示出细菌组成的差异。在基于 DNA 的分析中, 最早的使用泻药后的粪便样本中的主要类群是拟杆菌 *Bacteroides plebeius*、*Bac-*

teroides massiliensis、*Bacteroides stercoris*、*Bacteroides vulgatus* 和 *Megamonas_unclassified*, 而在治疗前粪便样本中则是 *Alistipes putredinis*、*Bacteroides stercoris*、*Prevotella stercorea*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Bacteroides massiliensis* [图 3 (a)]。这一发现表明, 在被冲洗的过程中, 不同物种对泻药的敏感性不同, 或者在泻药治疗和下一次排便之间的短时间内, 生长或恢复有所不同。根据 RNA 分析提示的活性成员, 粪便样本中最活跃的物种在泻药治疗前从 *Ruminococcus torques*、*Methanobrevibacter_unclassified*、*Subdoligranulum_unclassified*、*Faecalibacterium prausnitzii* 和 *Ruminococcus obeum* 变为 *Parabacteroides_unclassified*、*Ruminococcus torques*、*Collinsella_unclassified*、*Collinsella aerofaciens*, 在泻药治疗后立即使用 *Dorea longicatena* [图 3 (a)]。在基于 DNA 和 RNA 的分析中, 泻药还导致代谢途径丰度的变化。在停止泻药治疗后, 最丰富的途径立即改变为腺苷核糖核苷酸从头生物合成、UDP-Nacetylmuramoyl 五肽生物合成 II (含赖氨酸)、奎辛生物合成、鸟苷核糖核苷酸从头合成和 DNA 中的 S-腺苷-L-蛋氨酸环 I, 以及鸟苷核糖核苷酸从头生物合成、糖酵解 IV 和 III 及 RNA 中的淀粉降解 V [图 3 (a) 和图 S1]。

在随后的几天里, 五分之四志愿者的粪便宏基因组和宏转录组显示出恢复的趋势, 这可以通过宏基因组和宏转录组与原始图谱的差异随时间减少的趋势来证明, 特别是在菌种方面 [图 3 (b) ~ (e)]。尽管如此, 与 Bray-Curtis 差异相比, RNA 的恢复率没有显著提高。这一发现可能是由于 RNA 的变化更大, 且 RNA 恢复存在一定的滞后, 这导致恢复不如在 DNA 中观察到的那样明显 [图 3 (b) ~ (e)]。PCoA 和成分分析均表明, 在某些时间点与通便前粪便微生物群偏离得更远后, 通便后粪便微生物组倾向于变得与通便前微生物组更加相似 (附录 A 中的图 S1 和图 S4)。微生物组菌种之间的相互作用, 以及宿主的生理因素, 可能有助于微生物组在扰动后的恢复, 并可能赋予微生物群落个体化的恢复能力。

由于对回盲部微生物组无法在没有结肠清洁和 TET 管残留的情况下进行分析, 因此使用回盲部含量样本测量微生物组的恢复情况可能不可行。然而, 回盲部微生物组的动态是显著的。此外, 更短的采样间隔意味着回盲微生物组的动力学可以用比粪便样本更精确的时间分辨率进行研究。尽管在同一个人和同一天的不同样本类型 (即回盲内容物和粪便样本) 中观察到成分和功能的差异, 但回盲微生物组在很大程度上反映了粪便微生物组的动态。这一发现表明, 回盲微生物组的变化最终促成了粪便样本中观

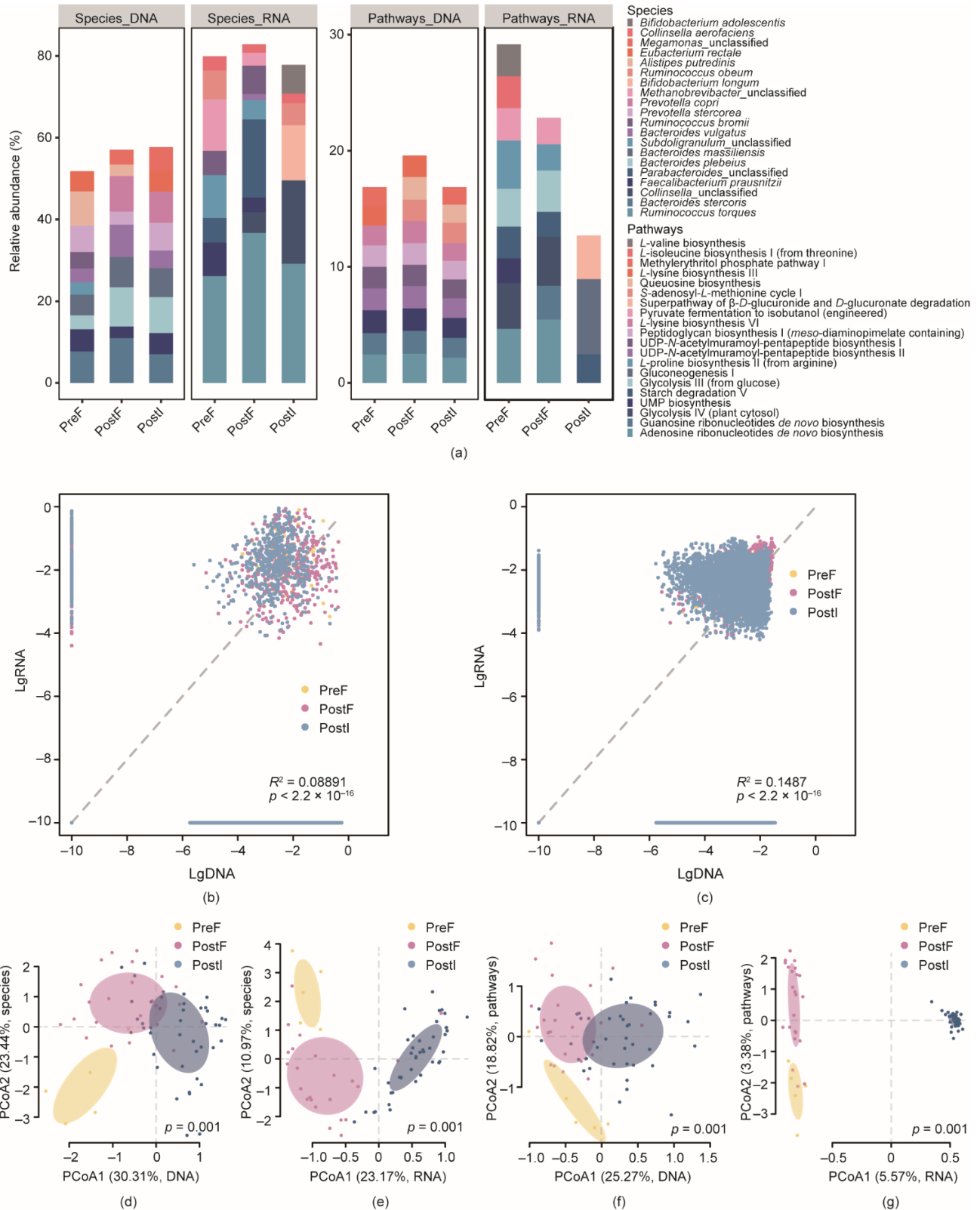


图2. 粪便和回盲部微生物组在组成和功能上存在差异。(a) 在菌种和功能通路水平上的相对丰度概述(不同颜色代表不同菌种或通路)。相对丰度是三组中所有个体的平均值: 渗透前的粪便样本(PreF, $n = 5$)、渗透后的粪便样本(PostF, $n = 23$)和渗透后的回盲样本(PostI, $n = 43$)。4个小图分别显示来自宏基因组(菌种DNA)和宏转录组(species RNA)的菌种组成,以及来自宏基因组的通路(pathway_DNA)和来自宏转录组的通路(pathway RNA)。各组内菌种和通路的贡献量分别按比例求和为1。宏基因组与宏转录组衍生菌种的组成(b)和功能的比较(c)。x轴和y轴显示出宏基因组(DNA)和宏转录组(RNA)中菌种和通路的lg10相对丰度;前面添加了一个很小的数字(10^{-10}),以避免负的无限值。(d)~(g)排便和回盲样本在物种组成和功能通路上的差异。在菌种(d,e)和功能途径(f,g)水平上,宏基因组(DNA)和宏转录组(RNA)组成的PCoA。样本按采样时间和位置(PreF、PostF、PostI)分组,椭圆显示出95%的置信区间(CI)。UMP: 一磷酸尿苷; UDP: 二磷酸尿苷。

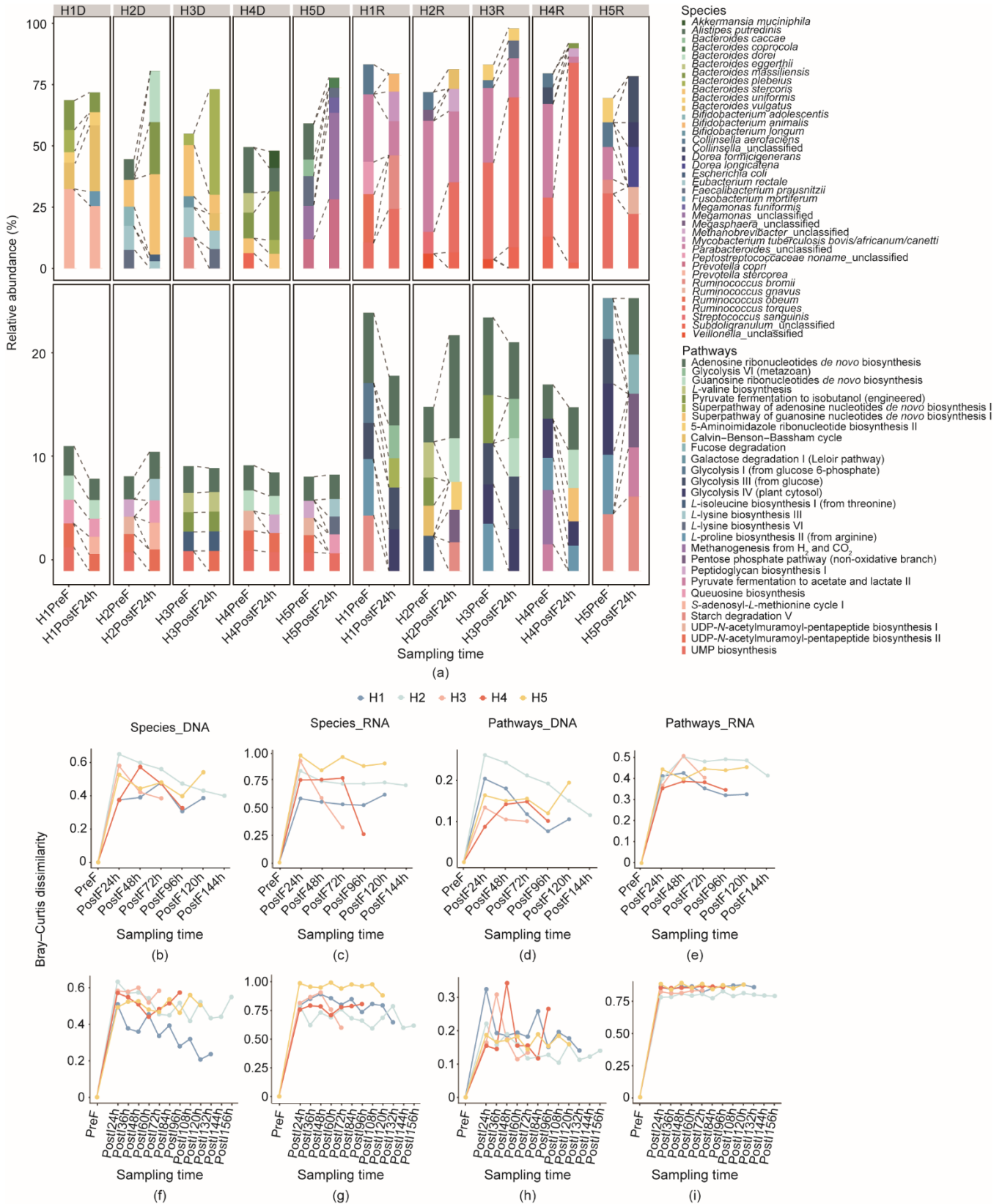


图3. 暴露于渗透性泻药后，粪便和回盲部样本的组成和功能的动态重建。(a) 在菌种和功能通路水平上，渗透前的粪便微生物组与泻药治疗后的早期存在明显差异。不同颜色代表两组中每名志愿者 (H1、H2、H3、H4、H5) 的不同菌种/通路；渗透前 (Pref) 和结肠镜检查后 24 h (PostF24 h)，基于 4 个数据集，分别为宏基因组的菌种 (species_DNA) 和宏转录组的菌种 (species_RNA) 以及宏基因组的通路 (pathway_DNA) 和宏转录组的通路 (pathway_RNA)。HnD 和 HnR 分别代表个体 *n* 的 DNA 和 RNA。在每一个体中，服用渗透性泻药 (PostF、PostI) 后的 (b~e) 粪便和 (f~i) 回盲部样本与干扰前的粪便样本 (Pref) 的 (b~i) Bray-Curtis 差异。HnD 和 HnR 分别代表个体 *n* 的 DNA 和 RNA。

察到的动力学[图3 (f) ~ (i)]。通过DNA和RNA分析以及主要代谢途径确定的主要物种在回盲样本和排泄粪便样本中显示出类似的变化。主要物种的例子包括元基因组读数中的拟杆菌 *Bacteroides plebeius*、*Bacteroides stercoris* 和 *Faecalibacterium prausnitzii*，以及元转录组读数中的 *Collinsella aerofaciens* 和 *Ruminococcus torque* (图S2)。显性代谢途径的实例包括腺苷核糖核苷酸从头生物合成途径、*S*-腺苷-*L*-蛋氨酸循环I、UDP-*N*-乙酰基壁酰五肽生物合成II及 *L*-赖氨酸生物合成VI (在宏基因组读数中) 和淀粉降解V (在宏转录组读数中) (图S1和图S2)。每个志愿者的回盲样本和使用泻药前排泄的粪便样本之间的相对差异表明，在至少一个宏基因组/宏转录组测量中，五分之三的个体呈现下降趋势，反映了泻药治疗后收集的粪便样本的趋势[图3 (f) ~ (i) 和附录A中的图S5]。因此，可以假设回盲微生物组也恢复到与泻药治疗前相似的分类/功能组成，从而证明了其自身对扰动的恢复能力[24]。

3.3. 细菌组成和功能途径显示盲肠的昼夜节律

每隔12 h收集人体回盲部微生物组样本的能力为原位研究胃肠道微生物组的昼夜节律提供了独特的机会。使用每天上午10:00和晚上10:00通过TET管收集的回盲样本，可以研究DNA和RNA水平上物种组成和代谢途径的动态变化。

首先，基于宏基因组和宏转录组分析中不同细菌种类的分类估计，白天采集的样本和晚上采集的样本之间的总体群落结构存在可检测的差异[图4 (a) ~ (d) 和图S2]。此外，在每个志愿者中，不同的物种在DNA丰度方面表现出规律性的波动，其中一些由两个或多个个体共享，包括 *Streptococcus parasanguinis*、*Dorea longicatena*、*Propionibacterium acnes*、*Ruminococcus lactaris*、*Lachnospiraceae bacterium_5_1_63FAA* 和 *Haemophilus haemolyticus*。虽然基于DNA的丰度估计揭示了不同分类群的细胞数量变化，但基于RNA的分析表明，就总体基因表达(或转录活性)而言，许多细菌物种具有昼夜节律，即 *Coprococcus comes*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*、*Ruminococcus lactaris*、*Ruminococcus gnavus*、*Ruminococcus torques*、*Subdoligranulum_unclassified* 和 *Mitsuokella_unclassified*。志愿者中具有昼夜节律的细菌有一些差异：例如，H2中发现的数量相对较低，可能是因为从该个体中采集的回盲样本数量最多。这一发现还表明回盲微生物组中微生物组动力学的个性化特征，以及不同分类群的不同繁殖率/代谢活动。

主要是在转录组数据中进行进一步筛选，以确定出具有显著昼夜节律的通路。该分析再次揭示出代谢途径的个体化振荡模式，揭示了每名志愿者中发现的4-41条代谢通路[图4 (e) ~ (h)]。在这些途径中，嘌呤核苷碱基降解I、辅酶A生物合成II、*L*-赖氨酸生物合成I和III、5-氨基咪唑核糖核苷酸生物合成I、蔗糖降解III (蔗糖转化酶) 以及 *L*-赖氨酸、*L*-苏氨酸和 *L*-蛋氨酸生物合成II的超级通路由两名或更多名志愿者共享，而其余通路则仅限于一名志愿者。

相比之下，宏基因组数据中相应的代谢通路未显示出明显的波动模式，表明这些通路的转录调节是昼夜模式的基础，而不是宏基因组中基因拷贝的增加或减少。代谢途径的一般类别与短链脂肪酸(SCFA)的产生有关，包括丙酮酸发酵生成乙酸和乳酸盐II，乙酰-CoA发酵生成丁酸盐II，以及宏转录组数据中的乙炔降解。这些代谢通路一般在白天比较活跃，而在夜间则不那么活跃。

时间序列滞后自相关检验证明了昼夜节律的显著性；在DNA和RNA中分别检测到17条和15条具有显著昼夜节律的代谢途径。在这些途径中，不同志愿者中最重要的是 *L*-异亮氨酸生物合成II，*myo*-肌醇、*chiro*-肌醇和 *scillo*-肌醇的降解，鸟苷核苷酸降解的超途径，产酸丙酮丁醇梭菌发酵的途径以及DNA样品中的 *L*-谷氨酰胺生物合成III，和辅酶A生物合成II，3-脱氢奎尼酸的分支酸盐生物合成，磷酸泛酸生物合成I，*L*-天冬氨酸和 *L*-天冬酰胺生物合成的超途径，以及RNA样品中的嘌呤核苷碱基降解I (图5和图S6，附录A)。这些代谢途径中的大多数(7/10)与辅酶A生物合成有关，辅酶A有助于SCFA的生物合成。此外，与SCFA生物合成功能相关的物种也发生了显著变化，如痤疮丙酸杆菌。

此外，将昼夜节律波动分解为昼夜变化和长期趋势，并观察到昼夜节律波动和趋势之间的密切振幅。此外，长期趋势似乎是可恢复，而昼夜节律波动表明回盲部微生物组的周期性(图5和图S6)。利用傅里叶函数计算得出的具有外部回归因子的ARIMA模型的预测结果也表明，这些代谢途径和菌种的相对丰度显示出良好的未来昼夜节律，但没有恢复的趋势(附件A中的图S7)。

3.4. 结肠镜检查后，粪便和尿液代谢组以及微生物组组成一同恢复

研究了泻药治疗前收集的粪便和尿液代谢组，以及结肠镜检查后获得的粪便样本，以进一步证明肠道微生物组紊乱和恢复对宿主的潜在影响。首先，结肠镜检查后，粪便代谢组与通便前样品相比显示出显著差异(附录A中的

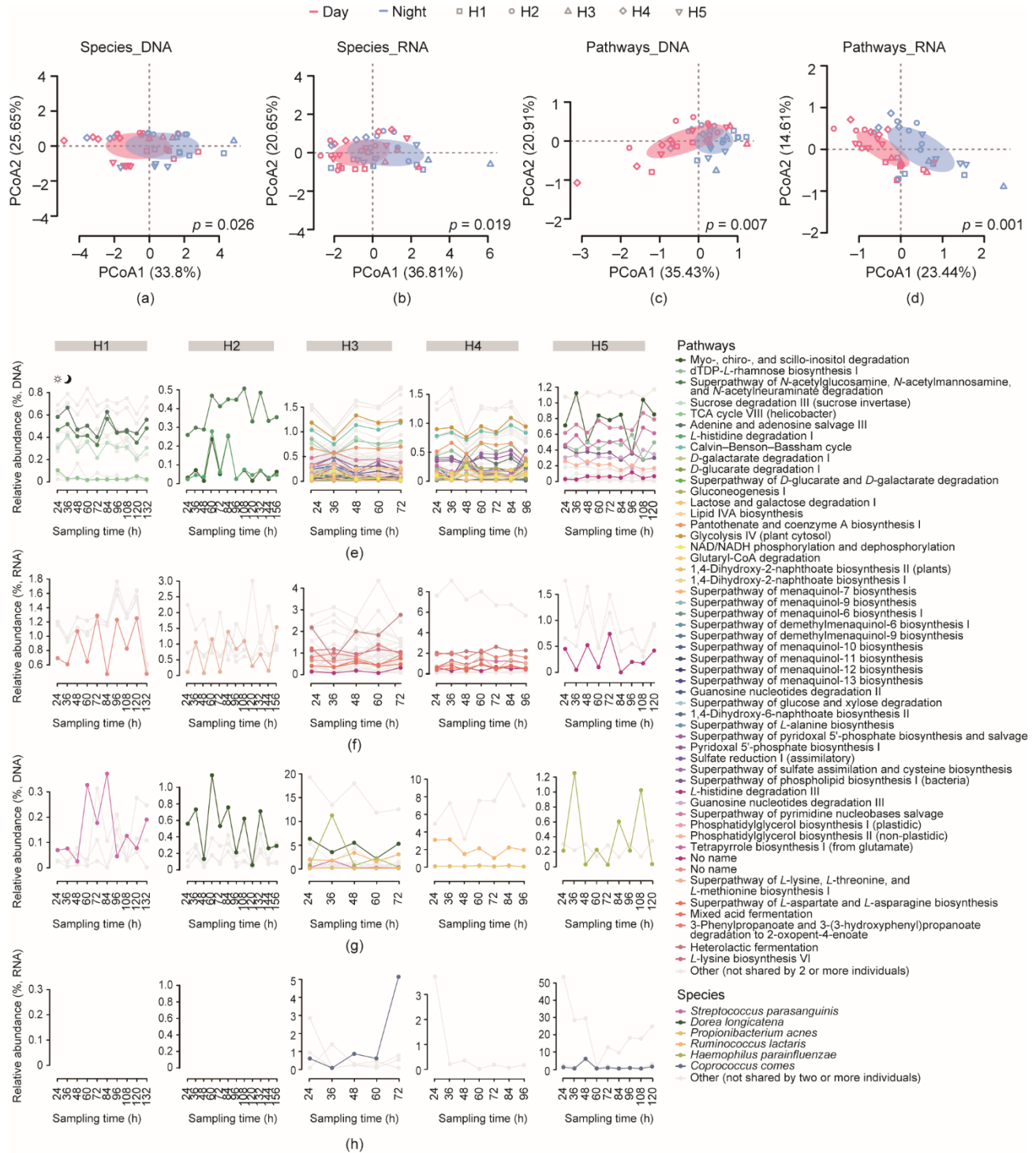


图4. 回盲部样本中肠道微生物组的功能通路和菌种的昼夜节律。(a) ~ (d) PCoA显示回盲部样本中肠道微生物组在菌种和功能上的昼夜差异。椭圆显示出95%的置信区间，椭圆的不同颜色代表不同的采样时间（白天和晚间）。不同点的形状代表不同的志愿者个体。表现为昼夜振荡的代谢途径（e-f）和菌种（g-h）通过监测其相对丰度的变化来确定。两名或多名志愿者个体共享的通路和菌种用彩色表示，而只有一个个体表现出昼夜振荡的通路和菌种用灰色表示。TDP：二磷酸胸苷；TCA：三羧酸循环；脂质 IVA：作为脂质 A 生物合成通路中间体的四酰化脂质 A；NAD：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；NADH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

图 S8)。由于渗透性泻药的作用，代谢产物的丰度显著降低，特别是瓜氨酸、N-乙酰-L-蛋氨酸、L-谷氨酸、N-乙酰谷氨酸、异苯脱氧胆酸、亚油酸、油酸、5-羟基吡啶乙酸、泛酸、黄嘌呤、氧嘌呤醇、4-三甲基氨基丁酸和石胆

酸 (VIP>1, FDR<0.05) (图 S8)。

结肠镜检查后，粪便样本中的代谢组被动态重建，并与微生物组恢复密切相关，导致与干扰前粪便样本的代谢组相对相似 (图 S8 和图 6)。结肠镜检查后粪便样本的分

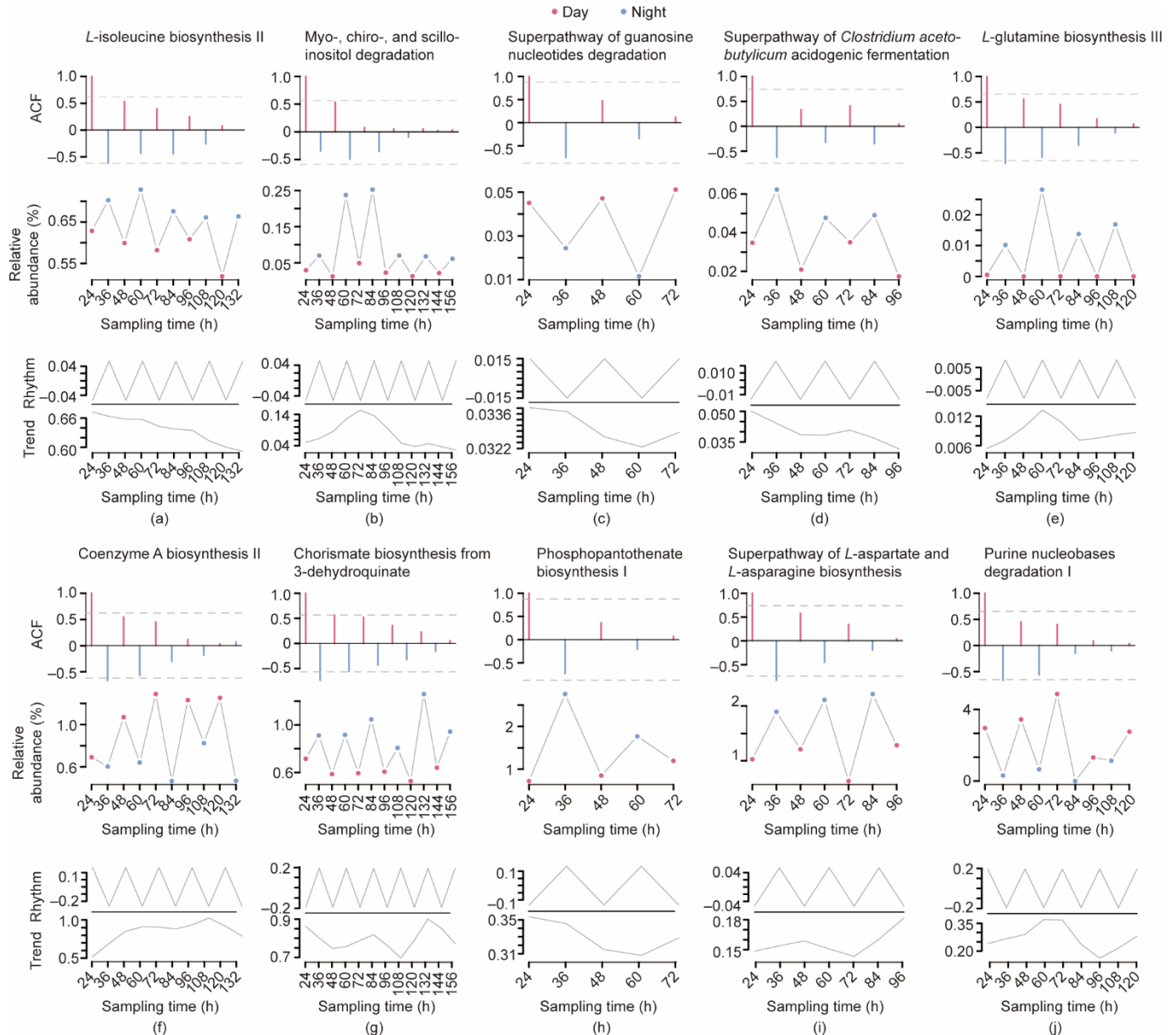


图5. 具有最显著昼夜振荡的代谢途径。在Box-Pierce和Ljung-Box检验中选择了具有最显著 p 值的10条重要代谢通路（分别对应于DNA和RNA中的H1、H2、H3、H4和H5）作为示例，(a)~(e)宏基因组，(f)~(j)宏转录组。每张图片中从上到下的三个小图分别表示这10条代谢通路时间序列的滞后ACF、原始相对丰度波动以及原始相对丰度波动的节律分解和趋势分解。在底部基因包中，“趋势”表示除节律振荡之外的长期变化，“节律”则表示节律振荡。详细分析方法见第2节。

析揭示了细菌类群/代谢途径和代谢产物之间的诸多关联。然而，在不同程度上，活性菌种的组成（由宏转录组数据确定）与代谢组学变化的关联性最强，正如Mantel检验所揭示的（菌种组成的Bray-Curtis距离vs代谢物的Bray-Curtis距离， $r = 0.38$ ， $p = 0.001$ ），而基于DNA的细菌组成与粪便代谢物之间的相关性低得多且不显著（ $r = 0.13$ ， $p = 0.085$ ）。总之，粪便代谢产物在渗透性泻药治疗期间也受到干扰，并在治疗停止后与肠道微生物组一起重建；因此，重建可能影响宿主的代谢。

微生物组也有助于尿液代谢组组成和重建的变化，尽

管程度低于粪便代谢组（图S8和图6）。随着肠道微生物的耗尽，尿液代谢组中减少的代谢物较少，最突出的代谢物只有近乎显著的减少（7-甲基黄嘌呤，VIP > 0， $p = 0.087$ ）。与粪便样本相比，结肠镜检查后收集的尿液样本的代谢组显示了较少但仍可检测到的恢复，反映了肠道微生物组的转变（图S8）。确定出代谢物与微生物类群/代谢通道之间的关联，其中烟酰胺、1-3-二甲基尿酸和4-三甲氨基丁酸在尿液和粪便代谢组之间出现重叠（附件A中的图S9）。再次，如Mantel检验所揭示的，活性菌种组成与代谢组之间存在显著相关性（ $r = 0.28$ ， $p = 0.001$ ）。尽

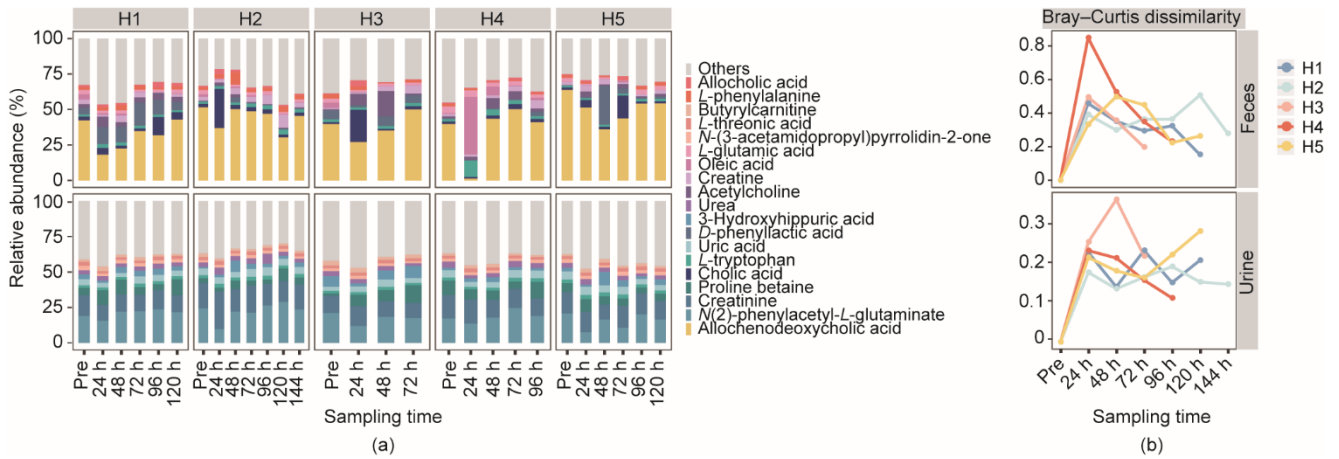


图6. 暴露于渗透性泻药后，粪便和尿液样本中代谢物的动态重建。(a) 在每一采样时间每一名个体志愿者（H1、H2、H3、H4和H5）中相对丰度最高的10种主要代谢物的柱状图，包括渗透前和渗透后收集的粪便和尿液样本；(b) 服用渗透性泻药后（Post）粪便或尿液样本与干预前（Pre）样本的Bray-Curtis差异。

管如此，这种相关性低于粪便代谢组中的相关性，可能是微生物组的直接输入较少以及宿主代谢活动的影响较大的结果。因此，肠道微生物组的紊乱也改变了尿液代谢组，且其恢复与微生物组重建再次相关。

对粪便中表现为减少的代谢物的进一步富集分析表明，微生物组衍生代谢物在诸多生理和病理状况中的潜在重要性。代谢分析[39]表明，这些代谢物的变化与许多代谢综合征显著相关，包括Hartnup病和短肠病，以及中枢神经系统疾病，如癫痫和精神分裂症（附件A中的图S10）。这一发现再次证实，肠-脑轴的功能主要是通过各种微生物组代谢物进行的。富集结果还包括受昼夜变化影响的代谢物（10倍富集，显著值为15）。由于某些代谢物在很大程度上取决于肠道微生物组的存在，因此可以假设肠道微生物组的昼夜变化是代谢物本身昼夜变化的基础。

4. 讨论

在本研究中，最初设计用于结肠递送粪便微生物群或药物的结肠TET技术被用于在泻药治疗后连续收集粪便样本以及原位回盲样本。对收集的样品进行了宏基因组、宏转录组和代谢组学分析，以描述人体肠道微生物组多层的组成、功能和动力学。该研究还揭示了微生物组组成和功能重建的个体性，这通常显示了肠道微生物组内部恢复力的共同特征。在原位和固定时间点对回盲微生物组进行采样的能力首次为人类肠道微生物组的昼夜模式或昼夜节律提供了独特的见解。从特定的细菌群和代谢途径来看，这种节律发生在整个社区水平。

当在DNA（“固定”）和RNA（“活跃”）水平上

检查细菌种类和代谢途径时，它们可以具有不同的模式[37–38]。在排泄粪便样本中，一组细菌物种，包括瘤胃球菌属、*Subdoligranum*属和粪杆菌属的成员，在转录和代谢方面具有高度活性。这些细菌是丁酸盐的产生者，已知丁酸盐对宿主的代谢和免疫至关重要，尤其是在几种代谢紊乱和自身免疫紊乱的情况下[40–43]。主要的代谢途径是腺苷核糖核苷酸从头生物合成，这与三磷酸腺苷（ATP）的产生以及DNA和RNA的能量循环有关。除此途径外，转录组数据中高度活跃的所有其他代谢途径都与营养物质代谢（如葡萄糖代谢）有关，而与细胞结构（如细胞壁成分）有关的途径在DNA样品中最为丰富。这一发现表明，在针对微生物生理活动不同部分的途径中存在转录的异质调节。

在使用泻药清洗结肠后，粪便微生物组首先在组成和功能上显示出成分和功能的显著变化；然而与治疗前的微生物组相比，这些差异在随后的时间点逐渐减少。考虑到同时采集的回盲部样本与粪便样本之间的紧密联系，可以得出回盲部微生物组也在动态重建的结论。这种重建具有高度个体特异性的特征，即不同的菌种/代谢通路在每名志愿者个体中恢复到更相似的丰度。尽管如此，微生物组重建也显示出微生物恢复力的共同特征，即它们与服用泻药前的微生物组在总体上变得越来越相似。诸多研究已报道出肠道微生物组在急性紊乱后的长期稳定性和恢复力，包括饮食干预、药物治疗等[24,44–46]。服用一剂泻药后微生物组的变化再次证明了这种恢复力，其建立在微生物物种内部相互作用的基础上[47–49]。

每天两次定期的回盲部采样为人体消化道微生物组的昼夜模式提供了有意义的见解。在回盲部样本的宏转录组分析中，产生丁酸盐的细菌再次构成了显示出强烈昼夜模

式特征的大多数菌种。这可能是对食物摄入和（或）胃肠道内宿主生理移位的反应[50]。与短链脂肪酸产生相关的代谢通路属于最突出的昼夜模式之一，这些短链脂肪酸已被认为是影响宿主昼夜节律的关键因素[10,51]。最近有报告指出，宿主肠道上皮细胞的昼夜节律可受MyD88依赖性组蛋白脱乙酰酶3（HDAC3）基因表达变化的影响，众所周知，HDAC的活性也受短链脂肪酸的影响[52–54]。这些发现不仅揭示出菌群在白天或夜间的复制动力学和代谢活动，而且还可为肠道微生物群这一通路——宿主串扰——提供最终的微生物线索。

与之前对小鼠进行的一项研究相比[8]，本研究中的志愿者在结肠镜检查前只服用了一剂结肠清洁泻药。因此，肠道微生物组显示出恢复，而非长期的菌群失调——这一发现与临床观察一致，即结肠镜检查通常与消化系统的长期不良反应无关。在本研究中，由于TET管脱落后，相应的回盲肠采样不再可行，因此没有采集足够长时间的粪便样本来确定肠道微生物组是否显示完全恢复。如果采用2~4枚夹子进行内窥镜固定，结肠TET管在结肠内停留的时间通常为1~2周[55]。对回盲部样本代谢组的分析也存在局限性，因为回盲部样本经过冲洗处理，稀释程度无法确定，这增加了代谢量化的难度。最后，宿主反应只能通过粪便和尿液样本的代谢组来推断；尽管如此，依然观察到与微生物组相似的恢复，这一发现再次证实了肠道微生物组对代谢物的贡献。此外，大部分微生物组衍生代谢物可能是重要的代谢和中枢神经系统功能的基础，再次证实了肠道微生物组对宿主代谢和肠-脑轴的贡献。尽管如此，对宿主反应的更直接测量，包括宿主肠道上皮基因的表达，目前在人类中尚无法实现，只能在动物实验中进行研究。

总之，本研究以比以往观察更精细的时间分辨率，调查了泻药干预后肠道微生物组重建以及相应的回盲部微生物组的原位重建。首次提供了人体回盲部微生物组在组成和功能水平上昼夜模式的直接证据。在多组学水平上对粪便和回盲部微生物组动态变化的解读，有助于理解肠道微生物生态系统本身，以及其如何潜在地影响包括昼夜节律在内的宿主生理过程。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划(2018YFC2000500)、中国科学院战略性先导科技专项(XDB29020000)、国家自然科学基金(31771481、91857101和81873548)、江苏省基础研究计划(BE2018751)，以及江苏省医学创新团队(F. Zhang)的大力支持。

Compliance with ethics guidelines

Xiaolin Liu, Min Dai, Yue Ma, Na Zhao, Ziyu Wang, Ying Yu, Yakun Xu, Huijie Zhang, Liyuan Xiang, He Tian, Guanghou Shui, Faming Zhang, and Jun Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Authors' contribution

Jun Wang and Faming Zhang designed this study; Xiaolin Liu, Yue Ma, and Na Zhao analyzed the data; Min Dai collected the samples; Jun Wang wrote the manuscript; Jun Wang, Faming Zhang, Xiaolin Liu, and Min Dai reviewed the manuscript; and Jun Wang, Faming Zhang, Min Dai, Huijie Zhang, and Liyuan Xiang provided the samples. All authors read and approved the final manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.015>.

References

- [1] Lynch JB, Hsiao EY. Microbiomes as sources of emergent host phenotypes. *Science* 2019; 365(6460):1405–9.
- [2] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14(1):20–32.
- [3] Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Cvitkovitch DG, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep* 2011; 1(1):170.
- [4] Yasuda K, Oh K, Ren B, Tickle T, Franzosa E, Wachtman L, et al. Biogeography of the intestinal mucosal and luminal microbiome in the rhesus macaque. *Cell Host Microbe* 2015; 17(3):385–91.
- [5] Zeng Y, Zeng D, Zhou Y, Niu L, Deng J, Li Y, et al. Microbial biogeography along the gastrointestinal tract of a red panda. *Front Microbiol* 2018; 9:1411.
- [6] Ahern PP, Maloy KJ. Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. *Immunology* 2020; 159(1):4–14.
- [7] Manuzak JA, Zevin AS, Cheu R, Richardson B, Modesitt J, Hensley-McBain T, et al. Antibiotic-induced microbiome perturbations are associated with significant alterations to colonic mucosal immunity in rhesus macaques. *Mucosal Immunol* 2020; 13(3):471–80.
- [8] Tropini C, Moss EL, Merrill BD, Ng KM, Higginbottom SK, Casavant EP, et al. Transient osmotic perturbation causes long-term alteration to the gut microbiota. *Cell* 2018; 173(7):1742–54.e17.
- [9] Wang Y, Kuang Z, Yu X, Ruhn KA, Kubo M, Hooper LV. The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science* 2017; 357(6354):912–6.
- [10] Kuang Z, Wang Y, Li Y, Ye C, Ruhn KA, Behrendt CL, et al. The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3. *Science* 2019; 365(6460):1428–34.

- [11] Gasparri AJ, Crofts TS, Gibson MK, Tarr PI, Warner BB, Dantas G. Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. *Gut Microbes* 2016; 7(5):443–9.
- [12] David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505(7484):559–63.
- [13] Johnson AJ, Vangay P, Al-Ghalith GA, Hillmann BM, Ward TL, Shields-Cutler RR, et al. Daily sampling reveals personalized diet–microbiome associations in humans. *Cell Host Microbe* 2019; 25(6):789–802.e5.
- [14] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334 (6052):105–8.
- [15] Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* 2019; 570(7762):462–7.
- [16] Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 2018; 555(7698):623–8.
- [17] Haak BW, Lankelma JM, Hugenholtz F, Belzer C, de Vos WM, Wiersinga WJ. Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74(3):782–6.
- [18] Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. LifeLines cohort study. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016; 352(6285):565–9.
- [19] Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 2016; 352(6285):560–4.
- [20] Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol Med* 2016; 22(6):458–78.
- [21] Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Herczeg R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* 2016; 352(6285):586–9.
- [22] Bharucha AE, Lacy BE. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation. *Gastroenterology* 2020; 158(5):1232–49.e3.
- [23] Luthra P, Camilleri M, Burr NE, Quigley EMM, Black CJ, Ford AC. Efficacy of drugs in chronic idiopathic constipation: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019; 4(11):831–44.
- [24] Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489(7415): 220–30.
- [25] Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev* 2012; 70(Suppl 1):S2–9.
- [26] Peng Z, Xiang J, He Z, Zhang T, Xu L, Cui B, et al. Colonic transendoscopic enteral tubing: a novel way of transplanting fecal microbiota. *Endosc Int Open* 2016; 4(6):E610–3.
- [27] Ding X, Li Q, Li P, Zhang T, Cui B, Ji G, et al. Long-term safety and efficacy of fecal microbiota transplant in active ulcerative colitis. *Drug Saf* 2019; 42(7): 869–80.
- [28] Fecal Microbiota Transplantation-standardization Study Group. Nanjing consensus on methodology of washed microbiota transplantation. *Chin Med J* 2020; 133(19):2330–2.
- [29] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30(15):2114–20.
- [30] Franzosa EA, McIver LJ, Rahnnavard G, Thompson LR, Schirmer M, Weingart G, et al. Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nat Methods* 2018; 15(11):962–8.
- [31] Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods* 2012; 9(8):811–4.
- [32] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012; 9(4):357–9.
- [33] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011; 6(7):1060–83.
- [34] Hou W, Zhong D, Zhang P, Li Y, Lin M, Liu G, et al. A strategy for the targeted metabolomics analysis of 11 gut microbiota–host co-metabolites in rat serum, urine and feces by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2016; 1429:207–17.
- [35] Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA, Schneidman D. mixOmics: an R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput Biol* 2017; 13(11):e1005752.
- [36] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13(11):2498–504.
- [37] Mehta RS, Abu-Ali GS, Drew DA, Lloyd-Price J, Subramanian A, Lochhead P, et al. Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men. *Nat Microbiol* 2018; 3(3):347–55.
- [38] Schirmer M, Franzosa EA, Lloyd-Price J, McIver LJ, Schwager R, Poon TW, et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat Microbiol* 2018; 3(3):337–46.
- [39] Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* 2019; 68(1):e86.
- [40] Jin M, Kalainy S, Baskota N, Chiang D, Deehan EC, McDougall C, et al. Faecal microbiota from patients with cirrhosis has a low capacity to ferment non-digestible carbohydrates into short-chain fatty acids. *Liver Int* 2019; 39(8): 1437–47.
- [41] Vital M, Howe A, Bergeron N, Krauss RM, Jansson JK, Tiedje JM. Metagenomic insights into the degradation of resistant starch by human gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84(23):e01562–18.
- [42] Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn’s disease. *Digestion* 2016; 93(1):59–65.
- [43] Rosario D, Benfeitas R, Bidkhorji G, Zhang C, Uhlen M, Shoaie S, et al. Understanding the representative gut microbiota dysbiosis in metformin-treated type 2 diabetes patients using genome-scale metabolic modeling. *Front Physiol* 2018; 9:775.
- [44] Liu H, Han M, Li SC, Tan G, Sun S, Hu Z, et al. Resilience of human gut microbial communities for the long stay with multiple dietary shifts. *Gut* 2019; 68(12):2254–5.
- [45] Ng KM, Aranda-Díaz A, Tropini C, Frankel MR, Van Treuren W, O’Loughlin CT, et al. Recovery of the gut microbiota after antibiotics depends on host diet, community context, and environmental reservoirs. *Cell Host Microbe* 2019; 26(5):650–65.e4.
- [46] Liu C, Zhang J, Li M, Zhao L, Ji C, Ma Q. Alterations and structural resilience of the gut microbiota under dietary fat perturbations. *J Nutr Biochem* 2018; 61: 91–100.
- [47] MacPherson CW, Mathieu O, Tremblay J, Champagne J, Nantel A, Girard SA, et al. Gut bacterial microbiota and its resistome rapidly recover to basal state levels after short-term amoxicillin-clavulanic acid treatment in healthy adults. *Sci Rep* 2018; 8(1):11192.
- [48] Goethel A, Turpin W, Rouquier S, Zanella G, Robertson SJ, Streutker CJ, et al. *Nod2* influences microbial resilience and susceptibility to colitis following antibiotic exposure. *Mucosal Immunol* 2019; 12(3):720–32.
- [49] Mortensen MS, Hebbelstrup Jensen B, Williams J, Brejnrod AD, O’Brien Andersen L, Röser D, et al. Stability and resilience of the intestinal microbiota in children in daycare—a 12 month cohort study. *BMC Microbiol* 2018; 18(1):223.
- [50] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 294(1):1–8.
- [51] Tahara Y, Yamazaki M, Sukigara H, Motohashi H, Sasaki H, Miyakawa H, et al. Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue. *Sci Rep* 2018; 8(1):1395.
- [52] Segers A, Desmet L, Thijs T, Verbeke K, Tack J, Depoortere I. The circadian clock regulates the diurnal levels of microbial short-chain fatty acids and their rhythmic effects on colon contractility in mice. *Acta Physiol* 2019; 225(3): e13193.
- [53] Fellows R, Denizot J, Stellato C, Cuomo A, Jain P, Stoyanova E, et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun* 2018; 9(1):105.
- [54] Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem* 2008; 19 (9):587–93.
- [55] Zhang T, Long C, Cui B, Buch H, Wen Q, Li Q, et al. Colonic transendoscopic tube-delivered enteral therapy (with video): a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2020; 20(1):135.