

脆弱拟杆菌 BF839 治疗儿童自闭症谱系障碍的疗效和安全性

一项随机临床试验



背景：脆弱拟杆菌在治疗自闭症谱系障碍（ASD）中的临床应用尚不清楚。因此，本随机、双盲、安慰剂对照研究旨在探讨脆弱拟杆菌 BF839 治疗儿童 ASD 的疗效和安全性。

方法：我们对 60 名被诊断患有自闭症的 2-10 岁儿童进行了研究，参与者在 16 周内服用 BF839 粉剂(10 克/条，含 $\geq 10^6$ CFU/条的活菌，每天两条)或安慰剂。主要结果是自闭症行为检查表(ABC)得分，次要结果为儿童自闭症评定量表(CARS)、社会反应量表(SRS)、婴儿至初中生社交能力正常发展(S-M)、胃肠道症状评定量表(GSRS)评分和粪便微生物组成分。评估在第 0 天、第 8 周和第 16 周进行。

结果：与安慰剂组相比，BF839 组在第 16 周时的 ABC 肢体和物体使用评分有显著改善，这在年龄小于 4 岁的 ASD 儿童中更为明显。在基线 CARS 评分 >30 分的儿童中与安慰剂组相比，BF839 组在第 16 周时的 ABC 总分、ABC 身体和物体使用评分 CARS 评分和 GSRS 评分均有显著改善。BF839 组仅有两名患者(6.67%)出现轻度腹泻。与基线和安慰剂组比较，BF839 组在干预后双歧杆菌丰度显著增加，肠道微生物编码的神经活性化合物代谢功能发生变化。

结论：BF839 可显著、安全地改善 ASD 患儿的异常行为和胃肠道症状。

1. 简介

自闭症谱系障碍(ASD)是一种广泛的神经发育障碍,以语言障碍、社交障碍、兴趣受限和重复刻板行为为特征⁽¹⁾。在中国,自闭症的患病率呈逐年上升趋势,已达到1%⁽²⁾。遗憾的是,目前尚缺乏针对 ASD 的有效治疗策略。

ASD 患者通常会出现一系列胃肠道症状,这些症状可通过 GSRS 进行评估^(3,4)。这些症状包括便秘、腹泻、恶心、排便不规律、腹部不适和呕吐⁽³⁾。值得注意的是,这些症状与自闭症的严重程度密切相关⁽⁴⁾。肠道微生物群通过微生物群-肠道-大脑轴⁽⁵⁾参与自闭症的发病机制,从而影响肠胃功能和活动^(6,7)。单菌株或多菌株益生菌可降低 ASD 患者的 ABC 总分、CARS 评分、SRS 评分和 GSRS 评分,从而改善他们的自闭行为和胃肠道症状⁽⁸⁻²³⁾。此外,益生菌补充剂在临床实践中也被用于治疗患者。然而,不同类型的益生菌补充剂在改善 ASD 核心症状方面的效果仍不明确。

脆弱拟杆菌被认为是第二代益生菌⁽²⁴⁾。2013 年,Hsiag 等人⁽⁹⁾报道了无毒的脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)菌株 NCTC9343 可以改善 ASD 小鼠模型的刻板行为和焦虑行为,这表明脆弱拟杆菌具有治疗 ASD 的潜力。脆弱拟杆菌 BF839 是一种无毒的肠道共生菌⁽²⁵⁾,可用于治疗自身免疫性疾病⁽²⁶⁾、预防肠道和呼吸道疾病以及促进儿童身体生长发育⁽²⁷⁾。图腾益生菌液(Totem ProbioticFluid)⁽²⁸⁾由脆弱拟杆菌 BF839 发酵制成,已被批准为安全的食品原料^(28,29)。BF839 可以改善脆性 X 综合征小鼠的社会新奇偏好和学习记忆⁽³⁰⁾。此外,它在治疗难治性癫痫⁽³¹⁾和自身免疫相关性癫痫⁽³²⁾方面也有临床疗效。我们假设 BF839 可以在临床上改善 ASD 患者的行为表现。因此,我们探讨了 BF839 治疗小儿 ASD 的疗效和安全性。

2. 材料与方法

2.1 参与者

我们纳入了 2020 年 8 月至 2021 年 9 月期间在广州医科大学第二附属医院就诊的 ASD 儿童。本研究根据《赫尔辛基宣言》的指导方针进行，并得到了广州医科大学第二附属医院伦理委员会的批准（项目编号 2019-hs-43）。所有参与本研究的受试者均获得了书面的知情同意。该研究已在中国临床试验注册中心注册（临床试验注册号 ChiCTR2000035006）。

纳入标准如下：(1) 年龄 2-10 岁，(2) 符合《精神障碍诊断与统计手册》第五版、自闭症诊断观察计划和/或自闭症诊断访谈修订版的 ASD 诊断标准；(3) 维持原有康复训练/治疗超过 3 个月；(4) 监护人配合完成相应评估。

排除标准为：(1) 合并精神病或发育障碍；(2) 服用精神药物；(3) 患有严重的心、肺、肝、肾或造血疾病(包括不稳定型心绞痛、未控制的哮喘、活动性胃出血和癌症)以及(4) 在入组前 1 个月内接受过抗生素、益生菌、生酮饮食、粪便移植、质子泵抑制剂、其他有胃肠道影响的治疗方案以及其他 ASD 治疗方案。

退出标准如下：(1) 失去随访；(2) 不可接受的不良反应或严重不良事件；(3) 在研究期间改变治疗方案；(4) 未按要求服用益生菌(用量不足试验用量的 20%)

2.2 研究方法

2.2.1 实验设计

这项随机、双盲、安慰剂对照研究是按照试验报告综合标准指南⁽³³⁾进行的。通过 Python(一种跨平台的计算机编程语言)生成的随机数字表进行隐蔽随机分配，将参与者(1:1)分配到益生菌组或安慰剂组。根据预实验的初步观察结果和之前的一份报告⁽¹⁴⁾，安慰剂作为辅助疗法可使 ABC 总分降低 5%，加上我们预实

验的降低率为 35%，并设定阿尔法值为 0.05、功率效应值为 80%、比率为 1，我们计算出所需样本量为 48 个(每组 24 个)。考虑到 20%的失访率，共招募了 60 名患者(每组 30 名)。随访评估在第 0 天、第 8 周和第 16 周进行。随机化、分配隐藏和解除盲法均由盲法统计学家完成。为确保分配隐藏，实验用品存放在试验产品仓库中，并使用具有相同外观的相应编码盒。此外，所有治疗粉剂都使用相同的包装。研究人员、患者及其监护人均为双盲。只有在所有参与者完成为期 16 周的试验后才会解除盲法。

2.2.2 干预措施

BF839 组使用的是 BF839 粉剂(10 克/条，活菌数 $>10^6$ CFU/条)，而安慰剂组只使用麦芽糊精(10 克/条)。根据食品感官评估方法⁽³⁴⁾，可以确定两组产品在气味和味道方面都具有高度相似性。患者每天两次用温水冲服其中一种产品，每次一条，连续服用 16 周。在干预期间，所有患者均保持原有的教育康复训练。试验产品由广州图腾生命医学研究有限公司提供。

2.2.3 用于观察、样品收集和测序分析的指标

主要结果是 ABC 评分。次要结果为 CARS、SRS、S-M、GSRS 评分和粪便微生物组。上述结果在第 0 天、第 8 周和第 16 周进行监测。ABC、SRS、S-M 和 GSRS 由父母或看护人完成，而 CARS 则由医生完成。

2.2.3.1 所使用的评估工具概述

2.2.3.1.1 ABC

该量表⁽³⁵⁾列出了小儿自闭症的 57 种行为特征。它由五个分量表组成：感觉(9 个条目，30 分)、关系(12 个条目，35 分)、身体和物体使用(12 个条目，28 分)、语言(13 个条目，31 分)以及社交和自助(11 个条目，25 分)。ABC 分值越高，表明 ASD 行为症状越严重。

2.2.3.1.2 CARS

CARS 的每个项目⁽³⁵⁾都采用 4 分制评分。此外，CARS 涵盖 15 个主要领域：人际关系、仿、情感反应、身体和物体使用、与无生命物体的关系、对环境变化的适应、视觉反应、听觉反应、近端感官反应、焦虑反应、语言交流、非语言交流、智力功能和总体印象。总分为 60 分，分数越高，表示 ASD 行为症状越严重。

2.2.3.1.3 SRS

这个量表⁽³⁵⁾包括 65 个项目，每个项目按 4 分制评分。它用于筛选 4-18 岁的个体的社会沟通和互动以及限制性行为(总分：0-195)。具体来说，它评估了以下几个领域：社会意识(0-24 分)、社会认知(0-36 分)、社会沟通(0-66 分)、社会动机(0-33 分)和自闭症行为习惯(0-36 分)子量表。得分越高，说明社交障碍越严重。

2.2.3.1.4 S-M

该量表⁽³⁵⁾用于评估儿童的各种生活技能。它包括 132 个项目，分布在六个领域：独立生活、运动、家庭作业、交往参与集体活动和自我管理。每个项目得一分，总分相加。根据年龄组和分数范围确定相应的标准分。标准分越高，表示社交能力越强。

2.2.3.1.5 GSRS

该量表⁽³⁶⁾评估胃肠道症状，由 15 个问题组成，分为 5 个领域，涵盖胃肠道系统：腹泻、便秘、腹痛、反流和消化不良。问卷回答采用 7 分李克特量表评分，“1”表示没有症状，“7”表示症状出现频率或强度最高。分数越高，表示胃肠道症状越严重。

2.2.3.2 粪便样本采集

从 21 名随机患者在第 0 天和第 16 周收集粪便。我们分别从安慰剂组和脆弱拟杆菌 BF839 组中选取了 9 名和 12 名患者；然而，在第 16 周时每组各有一名患者未收集到粪便样本，因此分别得到 17 个和 23 个样本。使用无菌粪

便样本采集试剂盒在家中在相同时间点收集粪便样本，然后加入 DNA 保存液。样本在室温下被运往深圳零一生命科技股份有限公司进行检测。在测序前，所有样本都储存在 -80°C 下。

2.2.3.3 粪便样本的 DNA 提取和宏基因组测序

从 200 毫克粪便中通过一系列化学处理和离心步骤提取 DNA。关于这些处理的更多详细信息在补充材料 S1 中提供。总 DNA 大于 1 微克且亮度比在 1.8 – 2.0 的样本用于测序。使用 NEBNext® Ultra™ DNA 文库制备试剂盒构建测序文库，并且为每个样本添加索引序列。使用 Illumina 高通量测序平台对生成的 DNA 文库进行测序。文库构建如下：首先通过超声将 DNA 片段化至大约 350 个碱基对，然后进行末端修复、添加 A 尾，并通过聚合酶链式反应（PCR）添加 Illumina 接头。使用 AMPure XP 系统纯化 PCR 产物。为确保文库质量，使用安捷伦 2100 确定文库片段长度的分布，此外，通过定量 PCR 确定有效文库浓度。

2.2.3.4 DNA 质量控制

共对来自 21 名患者的 (40) 份样本进行测序；生成原始基础数据 253.32 Gbp。使用 Trimmomatic 软件中的测序数据质量控制软件 (fastq_trim_filter_v5_EMBL) 对原始数据进行质量控制，其中 (1) 去除单个序列中带有 >3 N 碱基的适配器序列和序列，(2) 分别使用 30 bp 和 20 bp 的长度和质量阈值去除低质量序列。测序数据使用 SOAP2 (2.20 版本) 比对工具与人类基因组 GRCh38 进行比对。此外，以 90% 的相似性阈值去除宿主污染。在质量控制步骤后，数据集中共保留 249.35 Gbp (清洗后的数据) 用于下游分析。

2.2.3.5 与参考基因组的比对以及肠道代谢模块预测

如先前所述进行基因组比对并计算相对丰度 (37)。随后，使用基于模块的分析方法以及代谢数据库 MetaCyc 预测与基因编码相关的肠道代谢模块，如先前所述 (38)。简而言之，使用 SOAP2 (版本 2.20) 将测序数据与参考基因组进行比对，以在相似性大于 90% 的序列中筛选出最佳比对序列作为最终比对结

果。如先前所述计算相对基因丰度 (39)。通过对注释基因的相对丰度进行求和和归一化获得京都基因与基因组百科全书直系同源 (KO) 数据库中的相对丰度。相反, 肠道代谢模块的丰度是从包含肠道代谢模块的 KO 数据库中的组合计算得出。

2.2.3.6 物种注释

使用 MetaPhlAn (默认参数) 进行物种注释, 并在门、属和种水平上计算物种丰度。

2.2.3.7 生物信息学分析

所有生物信息学分析均使用 R3.6.3 进行。利用物种水平丰度文件计算样品的观察物种数 (计数) 和 Shannon 多样性 MetaPhlAn 来评估粪便样本中微生物群多样性的变化。利用 MetaPhlAn 的种级丰度文件计算布雷-柯蒂斯距离相似矩阵, 然后进行主坐标分析, 确定微生物群组成的变化。此外, 我们使用纯素 R 包进行了方差分析的多变量排列分析 (999 个排列测试), 以确定微生物群组成根据群体和时间的差异。

2.2.4 安全性指标

记录与治疗相关的不良事件, 包括恶心、呕吐、腹泻、便秘、胀气加重和皮疹, 并在第 0 天、第 8 周和第 16 周进行监测。

2.2.5 统计方法

疗效在完整的分析集中进行评估, 其中包括所有接受过至少一次干预后评估的随机患者。所有统计分析均使用 SPSS 22.0 版 (SPSS, Inc. 正态分布和非正态分布的测量数据分别以均数+标准差 ($\bar{x} \pm s$) 和中位数 (四分位数) [M(Q1, Q3)] 值表示; 组间比较分别采用 t 检验和 Mann-whitneyU 检验; 组内比较分别采用配对 t 检验和 Wilcoxon 符号秩检验。相关分析采用皮尔逊相关系数。计数数据以病例数 (%) 表示; 组间比较采用卡方检验或费雪精确检验。统计学显著性设为 $p < 0.05$ 。

3 结果

3.1 基线特征

在 2020 年 8 月 31 日至 2021 年 9 月 10 日期间筛选的 98 名患者中，我们纳入了 60 名患者（53 名男性和 7 名女性；中位年龄为 4.23 (3.21, 5.17) 岁；年龄范围为 2.30 - 10.00 岁；安慰剂组：n = 30，脆弱拟杆菌 BF839 组：n = 30）。在年龄、性别、病程、体重和身高等人口统计学指标以及孤独症行为量表（ABC）、儿童孤独症评定量表（CARS）、社交反应量表（SRS）、感觉统合量表（S-M）和胃肠道症状评定量表（GSRS）等临床指标方面，组间无显著差异（ $p > 0.05$ ）。患者的基线特征如表 1 所示。

在研究期间有 3 名患者退出。安慰剂组中的一名患者由于新冠疫情限制未能按时返回进行 8 周随访而退出。脆弱拟杆菌 BF839 组中的两名患者在四周后由于出现轻度腹泻的不良事件且其父母撤回同意而退出。最终，57 名患者完成了实验（图 1），安慰剂组和脆弱拟杆菌 BF839 组分别有 29 名和 28 名患者。未报告其他不良事件。

3.2 临床症状与胃肠道症状之间的相关性

我们观察到孤独症行为量表（ABC）的总分、感觉、交往、身体及物体使用、语言、社交和自理得分与胃肠道症状评定量表（GSRS）得分显著正相关（ $p < 0.05$ ）（补充表 S1）。

3.3 8 周和 16 周后组间评分改善情况比较

在第 16 周时，脆弱拟杆菌 BF839 组在孤独症行为量表（ABC）的身体及物体使用得分方面与安慰剂组相比有显著改善（ -4.68 ± 6.29 对比 -1.07 ± 5.73 , $p = 0.026$ ）。此外，脆弱拟杆菌 BF839 组在 ABC 总分（ -15.43 ± 18.62 对比 -9.40 ± 17.09 ）、社交反应量表（SRS）得分（ -13.89 ± 17.95 对比 -12.28 ± 17.10 ）、标准感觉统合量表（S-M）得分 [1.00 (0.00, 1.00) 对比 0.00 (0.00, 0.00)] 和胃肠道症状评定量表（GSRS）得分 [-3.00 ($-4.75, 2.75$)

对比 0.00 (-3.50, 3.00)] 方面比安慰剂组有非显著的更好改善 ($p > 0.05$)。在第 8 周时, 安慰剂组在 ABC 总分和 ABC 交往得分方面与基线相比有显著改善 ($p < 0.05$)。此外, 经过 16 周的干预后, 脆弱拟杆菌 BF839 组和安慰剂组与基线相比均有显著改善 ($p < 0.05$)。脆弱拟杆菌 BF839 组在 ABC 总分、ABC 分量表得分 (感觉得分除外)、儿童孤独症评定量表 (CARS) 得分、SRS 得分和 SRS 意识得分方面有所提高。同时, 安慰剂组在 ABC 总分、ABC 分量表得分 (身体及物体使用得分和社交及自理得分除外)、CARS 得分、SRS 得分、SRS 认知得分和 SRS 沟通得分方面也有所改善。结果总结在表 2 中。

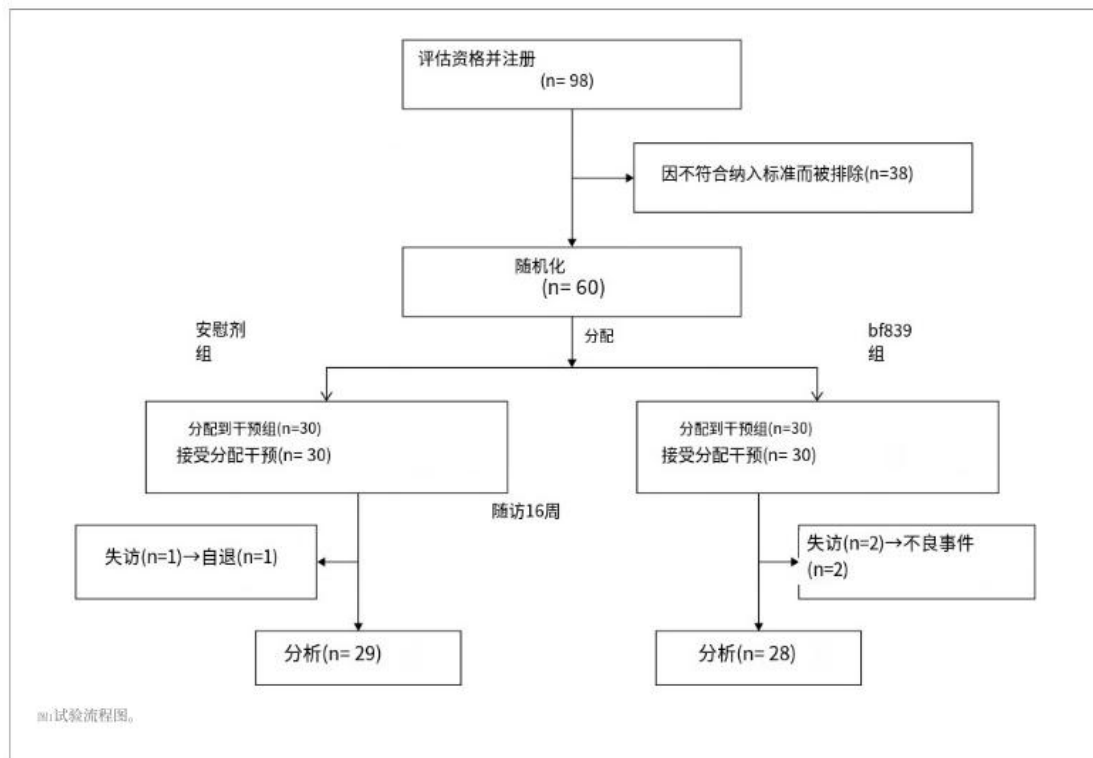
3.4 组间年龄评分改善情况比较

我们根据年龄 (<4 岁和≥4 岁) 进行了进一步的亚组分析。在年龄<4 岁的儿童中, 与安慰剂组相比, 脆弱拟杆菌 BF839 组在 16 周后 ABC 身体及物体使用得分有显著改善 (-4.85 ± 4.60 对比 1.50 ± 3.87, $p = 0.001$)。此外, 在第 16 周时, ABC 总分和 ABC 各分量表得分、儿童孤独症评定量表 (CARS) 得分、标准感觉统合量表 (S-M) 得分和胃肠道症状评定量表 (GSRS) 得分与安慰剂组相比有非显著的更好改善 ($p > 0.05$)。

表 1 两组 ASD 患儿的基线人口学和临床特征 (n = 60 例, 随机组)。

特征	安慰剂组 (n = 30)	BF839 小组 (n = 30)
年龄[年, $M(Q_1, Q_3)$]	4.20 (3.50, 5.33)	4.20 (3.00, 5.17)
性别 (病例, %)		
-女性	3 (10.00)	4 (13.33)
-男	27 (90.00)	26 (86.67)
病期[年, $M(Q_1, Q_3)$]	1.70 (1.00, 2.00)	1.50 (1.00, 3.00)
重量[千克, $M(Q_1, Q_3)$]	16.00 (14.00, 20.50)	16.50 (13.88, 19.00)
高度 (厘米; $\bar{x} \pm s$)	105.35 ± 10.26	105.77 ± 11.61
ABC 评分 ($\bar{x} \pm s$)	52.13 ± 22.88	53.33 ± 22.40
CARS 评分 ($\bar{x} \pm s$)	32.00 ± 8.40	32.35 ± 7.51
SRS 评分 ($\bar{x} \pm s$) ^a	102.17 ± 24.81	104.56 ± 23.17
S-M 标准分 [$M(Q_1, Q_3)$]	9.00 (8.00, 9.50)	8.50 (8.00, 9.00)
GSRS 评分 [$M(Q_1, Q_3)$]	23.00 (19.50, 25.50)	21.50 (19.00, 26.75)

^aSRS 量表只对年龄大于 4 岁的儿童进行评估 (安慰剂组: n = 18; BF839 组: n = 16)。



在第 8 周观察到类似的趋势,但不如第 16 周明显。在第 8 周,只有 BF839 组在 ABC 感觉得分方面比基线有显著更好的改善 ($p < 0.05$)。在第 16 周,与基线相比,BF839 组在 ABC 总分、ABC 分量表得分(交往和社交及自理除外)、CARS 得分和标准感觉统合量表得分方面有显著改善 ($p < 0.05$)。相比之下,在安慰剂组中只有 ABC 感觉得分和 CARS 得分有显著改善 ($p < 0.05$)。结果总结在表 3 中。

在年龄 ≥ 4 岁的儿童中,在干预 8 周和 16 周后组间改善情况没有差异。在第 8 周时,只有安慰剂组在 ABC 总分、ABC 语言得分和 ABC 社交及自理得分方面与基线相比有显著改善 ($p < 0.05$)。然而,在 16 周后,BF839 组在 ABC 总分和 ABC 分量表得分(感觉得分和交往得分除外)、儿童孤独症评定量表(CARS)得分和标准感觉统合量表(S-M)标准化得分方面与基线相比有显著差异 ($p < 0.05$),而安慰剂组仅在 ABC 总分和 CARS 得分方面有显著改善 ($p < 0.05$)。结果总结在补充表 S2 中。

3.5 根据基线疾病严重程度评分改善的组间比较

我们根据基线疾病严重程度(CARS 评分: <30 和 ≥ 30)进行了进一步的亚组分析。在基线 CARS 评分 ≥ 30 的儿童中,与安慰剂组相比,BF839 组在 ABC 总分(-

19.71±24.12 比- 5.05±16.58, $p = 0.047$)、ABC 身体和物体使用评分(- 5.71 ±8.26 比- 0.32±5.88, $p = 0.034$)和 CARS 评分(- 5.57±5.79 比- 2.11±3.70, $p = 0.044$)方面均有显著改善。此外, BF839 组在第 8 周和第 16 周的 GSRS 评分均有显著改善 [- 3.50 (- 7.36, - 1.25)vs. 0.00 (- 3.00, 3.00), $p = 0.045$]和 [- 3.50 (- 7.13, - 1.25)vs. 2.00 (- 3.00, 3.00), $p = 0.014$]。在第 8 周, 安慰剂组和 BF839 组在 S-M 标准化评分方面的改善均明显优于基线($p < 0.05$)。在第 16 周, 与基线相比, BF839 组在 ABC 总分、ABC 语言评分、CARS 评分、标准 S-M 评分和 GSRS 评分方面均有显著改善($p < 0.05$)。相比之下, 安慰剂组只有 CARS 评分有显著改善($p < 0.05$)。结果总结于表 4。

在基线儿童孤独症评定量表(CARS)得分 <30 的儿童中,干预 8 周和 16 周后组间改善情况没有显著差异($p > 0.05$)。在第 8 周时,与基线相比, BF839 组在 ABC 感觉得分和标准感觉统合量表(S-M)标准化得分方面有显著改善($p < 0.05$), 而安慰剂组在 ABC 总分和 ABC 语言得分方面有显著改善($p < 0.05$)。经过 16 周的干预后,与基线相比, BF839 组和安慰剂组均有显著改善($p < 0.05$)。BF839 组在 ABC 总分、ABC 分量表得分(交往得分除外)、S-M 标准化得分和 CARS 得分方面有所提高。同时, 安慰剂组在 ABC 总分、ABC 语言得分、ABC 社交及自理得分以及 CARS 得分方面有所改善。结果总结在补充表 S3 中。

表 2 干预 8 周和 16 周后 ASD 儿童得分的组间比较 [$\bar{x} \pm s/M(Q1, Q3)$, 完整分析集]

规模	基线 (0 天)		治疗 8 周后与基线的差异			治疗 16 周后与基线的差异		
	安慰剂组	BF839 组	安慰剂组	BF839 组	p 值	安慰剂组	BF839 组	p 值
病例数	30	30	29	28		29	28	
ABC 总分	52.13 ± 22.88	53.33 ± 22.40	-6.00 ± 11.24 ^a	-6.39 ± 24.01	0.937	-9.40 ± 17.09 ^a	-15.43 ± 18.62 ^a	0.204
感官	9.57 ± 5.73	9.83 ± 4.78	0.38 ± 4.34	0.18 ± 7.05	0.897	-0.03 ± 4.50 ^a	-0.68 ± 7.11	0.679
相关	11.53 ± 5.74	10.73 ± 5.91	-1.66 ± 4.12 ^a	-0.71 ± 5.61	0.472	-2.00 ± 4.56 ^a	-1.57 ± 6.06 ^a	0.761
身体和物体使用	5.97 ± 6.23	8.87 ± 8.59	-0.55 ± 3.10	-0.89 ± 8.51	0.840	-1.07 ± 5.73	-4.68 ± 6.29 ^a	0.026 ^a
语言	14.37 ± 6.69	13.63 ± 6.06	-1.76 ± 5.41	-1.79 ± 7.89	0.988	-2.93 ± 6.65 ^a	-3.86 ± 6.04 ^a	0.583
社会和自助	10.70 ± 5.04	10.63 ± 5.95	-0.93 ± 5.68	-1.04 ± 5.36	0.943	-1.43 ± 5.16	-2.58 ± 4.55 ^a	0.378
病例数	30	30	29	28		29	28	
CARS 得分	32.00 ± 8.40	32.35 ± 7.51	-1.03 ± 3.25	-1.27 ± 4.01	0.810	-3.00 ± 4.97 ^a	-4.31 ± 5.31 ^a	0.338
病例数	18	16	17	14		18	15	
SRS 分数	99.90 ± 24.21	99.41 ± 22.81	-4.39 ± 14.70	-5.04 ± 18.50	0.887	-12.28 ± 17.10 ^a	-13.89 ± 17.95 ^a	0.732
认识	12.86 ± 3.24	12.21 ± 2.61	-0.46 ± 2.47	-0.15 ± 2.60	0.655	-1.62 ± 3.48	-1.48 ± 2.81 ^a	0.870
认知	20.31 ± 4.78	19.41 ± 4.94	-0.57 ± 3.46	-0.54 ± 5.10	0.978	-2.45 ± 4.36 ^a	-2.11 ± 2.91	0.737
交流	36.27 ± 9.60	34.55 ± 8.84	-2.29 ± 6.02	-1.04 ± 6.94	0.483	-4.48 ± 6.61 ^a	-4.41 ± 7.38	0.968
动机	15.67 ± 4.05	16.38 ± 5.14	-0.18 ± 3.91	-1.62 ± 4.19	0.198	-1.17 ± 4.05	-2.30 ± 5.19	0.369
礼仪	14.79 ± 6.86	16.86 ± 6.84	-0.89 ± 4.13	-1.69 ± 5.00	0.524	-2.55 ± 5.10	-3.59 ± 4.49	0.422
病例数	30	30	29	28		29	28	
S-M 标准化总分	9.00 (8.00, 9.50)	8.50 (8.00, 9.00)	0.00 (0.00, 0.00)	1.00 (0.00, 1.00)	0.268	0.00 (0.00, 0.00)	1.00 (0.00, 1.00)	0.154
病例数	30	30	29	28		29	28	
GSRS 分数	23.00 (19.50, 25.50)	21.50 (19.00, 26.75)	-1.00 (-3.00, 3.00)	-2.00 (-4.75, 3.75)	0.767	0.00 (-3.50, 3.00)	-3.00 (-4.75, 2.75)	0.138

^a与安慰剂组相比, $P < 0.05$ 。
^b与基线相比 $p < 0.05$ 。
在进行 SRS 评估时, BF839 组有一名 4 岁以上的儿童退出, 安慰剂组和 BF839 组分别有一名儿童在第 8 周未完成问卷调查。

3.6 肠道菌群的变化

在第 16 周，微生物群多样性的变化在组间无显著差异(图 2A)。此外，在第 0 天和第 16 周之间没有明显的微生物群变化(图 2A)。相比之下，在 BF839 组中，与第 0 天相比，第 16 周的微生物群多样性没有显著下降(图 2A)。此外，主坐标分析(PCoA)显示，在第 0 天，以及安慰剂组第 0 天和第 16 周之间，微生物群组成在组间无显著差异($p = 0.58$) ($p = 0.94$) (图 2B)。然而，在第 16 周，以及在第 0 天至第 16 周，BF839 组的微生物群组成在组间存在显著差异($p = 0.043$) ($p = 0.002$) (图 2B)。

更精细的分类学分析揭示了在物种水平上由干预过程驱动的粪便微生物群的调节。在第 0 天时组间丰度没有显著差异。然而，与第 16 周的安慰剂组相比，第 16 周的 BF839 组显示出假链状双歧杆菌、长双歧杆菌、两歧双歧杆菌和粪柯林斯菌的丰度增加，以及口腔链球菌、多形拟杆菌、产气荚膜梭菌、柯氏柔嫩梭菌、远藤氏韦荣球菌、变异梭杆菌、新立茨氏菌和奥尔登梭菌的丰度降低(图 2C)。组内比较表明，安慰剂组在第 16 周时副流感嗜血杆菌的丰度高于第 0 天。此外，与第 0 天相比，BF839 组在第 16 周时假链状双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、大肠杆菌和屎肠球菌的丰度更高，而博氏梭菌 CAG59、多形拟杆菌、狄氏副拟杆菌、人罗斯拜瑞氏菌、厚壁菌门细菌 CAG83、博氏梭菌、柠檬梭菌和结肠厌氧棍状菌的丰度降低(图 2C)。

表 3 两组小于 4 岁的自闭症儿童在干预 8 周和 16 周后得分提高情况的比较($\bar{x} \pm s/M(Q1, Q3)$)，完整分析集。

规模	基线 (0 天)		治疗 8 周后与基线的差异			治疗 16 周后与基线的差异		
	安慰剂组 ($n = 12$)	BF839 组 ($n = 14$)	安慰剂组 ($n = 12$)	BF839 组 ($n = 13$)	p 值	安慰剂组 ($n = 12$)	BF839 小组 ($n = 13$)	p 值
ABC 总分	51.42 $\pm$ 5.55	54.50 $\pm$ 7.23	-1.17 $\pm$ 14.29	-12.15 $\pm$ 28.79	0.245	-6.42 $\pm$ 15.96	-20.23 $\pm$ 23.92 ^a	0.106
感官	10.50 $\pm$ 1.61	10.29 $\pm$ 1.53	0.58 $\pm$ 4.78	-1.85 $\pm$ 6.12 ^a	0.283	-0.25 $\pm$ 4.88 ^a	-2.08 $\pm$ 6.63 ^a	0.444
相关	11.83 $\pm$ 1.82	11.00 $\pm$ 1.80	-0.75 $\pm$ 2.67	-2.62 $\pm$ 6.20	0.346	-1.58 $\pm$ 2.84	-2.85 $\pm$ 7.46	0.588
身体和物体使用	4.42 $\pm$ 1.35	9.36 $\pm$ 1.96	-0.33 $\pm$ 2.77	-0.92 $\pm$ 10.85	0.857	1.50 $\pm$ 3.87	-4.85 $\pm$ 4.60 ^a	0.001 ^a
语言	13.92 $\pm$ 2.07	14.36 $\pm$ 1.86	-0.42 $\pm$ 6.37	-2.92 $\pm$ 9.16	0.439	-2.83 $\pm$ 7.51	-5.31 $\pm$ 7.35 ^a	0.415
社会和自我帮助	10.75 $\pm$ 1.16	10.21 $\pm$ 1.66	1.75 $\pm$ 6.74	-1.38 $\pm$ 4.48	0.181	-0.083 $\pm$ 5.65	-3.00 $\pm$ 5.93	0.221
CARS 得分	33.33 $\pm$ 2.31	32.07 $\pm$ 2.11	-0.67 $\pm$ 2.67	-1.38 $\pm$ 4.81	0.646	-2.67 $\pm$ 2.99 ^a	-5.23 $\pm$ 6.47 ^a	0.223
S-M 标准 范围	8.00 (8.00, 9.75)	9.00 (8.75, 9.25)	0.00 (0.00, 0.75)	0.00 (0.00, 1.00)	0.485	0.00 (0.00, 1.00)	1.00 (0.00, 1.00) ^a	0.585
GSRS 分数	22.50 (19.25, 24.00)	21.50 (18.75, 28.00)	-1.50 (-6.00, 3.75)	-2.00 (-6.00, 2.50)	0.849	0.00 (-4.00, 3.00)	-2.00 (-5.50, 1.00)	0.155

^a与安慰剂组相比， $P < 0.05$ 。

^b与基线相比 $p < 0.05$ 。

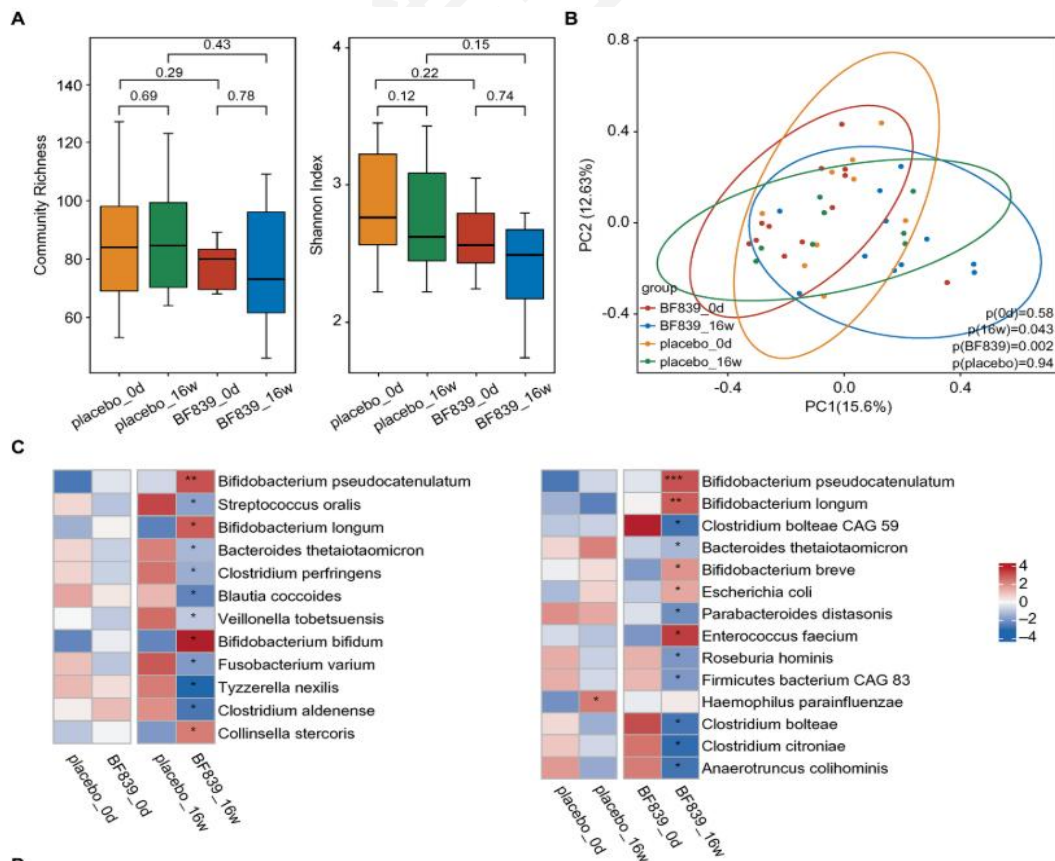
表 4 两组基线 CARS 得分 ≥ 30 分的 ASD 儿童在接受 8 周和 16 周干预后得分改善情况的比较 [$\bar{x} \pm s/M$ (Q1, Q3), 完整分析集]。

规模	基线 (0 天)		治疗 8 周后与基线的差异			治疗 16 周后与基线的差异		
	安慰剂组 (n = 19)	BF839 组 (n = 15)	安慰剂组 (n = 19)	BF839 组 (n = 14)	p 值	安慰剂组 (n = 19)	BF839 小组 (n = 14)	p 值
ABC 总分	58.63 $\pm$ 4.33	65.27 $\pm$ 5.78	-3.73 $\pm$ 12.80	-5.21 $\pm$ 29.00	0.861	-5.05 $\pm$ 16.58	-19.71 $\pm$ 24.12 ^a	0.047 ^a
感官	11.05 $\pm$ 1.01	12.00 $\pm$ 1.27	0.26 $\pm$ 4.09	1.00 $\pm$ 7.20	0.712	0.21 $\pm$ 4.26	-1.29 $\pm$ 8.20	0.500
相关	12.47 $\pm$ 1.24	14.33 $\pm$ 1.46	-1.16 $\pm$ 4.31	-1.50 $\pm$ 5.89	0.848	-1.21 $\pm$ 4.22	-3.79 $\pm$ 6.96	0.234
身体和物体使用	7.42 $\pm$ 1.39	12.13 $\pm$ 2.63	-0.53 $\pm$ 3.08	-0.07 $\pm$ 11.15	0.884	-0.32 $\pm$ 5.88	-5.71 $\pm$ 8.26	0.034 ^a
语言	15.58 $\pm$ 1.30	15.87 $\pm$ 1.54	-0.32 $\pm$ 5.88	-2.29 $\pm$ 9.93	0.516	-0.84 $\pm$ 6.75	-4.57 $\pm$ 7.03 ^b	0.134
社会和自我帮助	12.10 $\pm$ 1.09	11.67 $\pm$ 1.77	-0.21 $\pm$ 6.47	0.00 $\pm$ 5.19	0.921	-0.47 $\pm$ 5.74	-3.14 $\pm$ 5.70	0.195
CARS 得分	35.58 $\pm$ 0.98	38.40 $\pm$ 1.39	-1.16 $\pm$ 3.37	-1.86 $\pm$ 4.20	0.600	-2.11 $\pm$ 3.70 ^a	-5.57 $\pm$ 5.79 ^a	0.044 ^a
S-M 标准 范围	8.00 (8.00, 9.00)	8.00 (7.00, 9.00)	0.00 (0.00, 0.00) ^f	0.00 (-0.25, 1.00) ^g	0.702	0.00 (0.00, 1.00)	0.50 (0.00, 1.00) ^f	0.393
GSRS 分数	23.00 (20.00, 24.00)	22.00 (20.00, 31.00)	0.00 (-3.00, 3.00)	-3.50 (-7.36, -1.25)	0.045 ^a	2.00 (-3.00, 3.00)	-3.50 (-7.13, -1.25) ^b	0.014 ^a

^a与安慰剂组相比, $P < 0.05$ 。

^b与基线相比 $p < 0.05$ 。

我们对肠道代谢功能模块进行了综合分析。这些发现是基于反映菌群内潜在代谢能力的微生物基因组分析。我们观察到, 在第 0 天, 肠道微生物编码的神经活性化合物的代谢功能在组间没有显著差异。然而, 在第 16 周, BF839 组在蔗糖降解 II、丙氨酸降解 I、4-氨基丁酸酯降解、缬氨酸降解、核糖降解、苏氨酸降解 II 和乙醇生产 I 等代谢功能上均显著增加, 也显著降低。



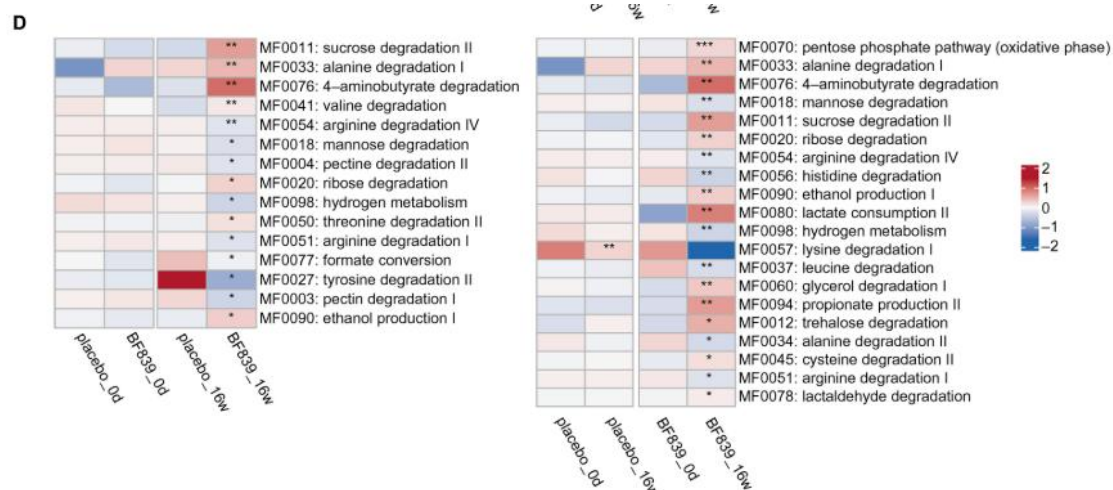


图2 肠道菌群的变化。(A)安慰剂组和BF839组第0天和第16周粪便微生物多样性在物种水平上的差异。左图:群落丰度。右图:多样性指数。箱形图要素:中心线:中位数;箱形图的末端:上下四分位数;点:离群值。(B)安慰剂组和BF839组在第0天和第16周的PCoA评分, 每组样本的颜色不同。(C)物种水平上微生物群的组间差异。左图:分别为第0天和第16周的组间丰度比较。第16周组间微生物丰度差异显著, 第0天组间差异不显著。右图:第0天和第16周组内微生物丰度的比较。与第0天相比, 两组在第16周的丰度都有显著的增加/减少。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(D)肠道代谢模块(GMMs)分析。左图:分别为第0天和第16周肠道代谢模块分布的组间比较。第16周组间差异显著, 第0天组间差异不显著。右图:第0天和第16周肠道代谢模块分布的组内比较。与第0天相比, 两组在第16周的丰度均有显著的增加/减少。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

在一些代谢功能, 包括精氨酸降解 IV、甘露糖降解、果胶降解 II、氢代谢、精氨酸降解 I、甲酸转化、酪氨酸降解 II 和果胶降解 I, 与安慰剂组在第 16 周相比(图 2D)。组内比较表明, 与第 0 天相比, 安慰剂组在第 16 周显示赖氨酸降解 I 减少; 相比之下, BF839 组在第 16 周表现出戊糖磷酸途径(氧化阶段)、丙氨酸降解 I、4-氨基丁酸酯降解、蔗糖降解 II、核糖降解、乙醇生产 I、乳酸消耗 II、甘油降解 I、丙酸生产 II、海藻糖降解、半胱氨酸降解 II 和乙醛降解, 以及甘露糖降解、精氨酸降解 IV、组氨酸降解、氢代谢、亮氨酸降解、丙氨酸降解 II 和精氨酸降解 I 与第 0 天相比显著降低(图 2D)。

4 讨论

我们观察到 ABC 总分与 GSRS 评分之间以及每个 ABC 子量表得分与 GSRS 评分之间呈正相关, 这与先前的报道一致⁽²¹⁻²³⁾。这表明, 随着腹泻、便秘、腹痛、反流、消化不良等胃肠道症状的加重, 自闭症异常行为更加明显, 因此改善胃肠道症状可以减轻自闭症症状。

干预 16 周后, 安慰剂组和 BF839 组的 ABC 总分、SRS 评分和 CARS 评分均较基线显著降低, 表明 ASD 异常行为和社会互动有显著改善。值得注意的是, 两组都接受了康复训练, 这是一种被广泛认可的自闭症治疗方法, 得到了现有研究的

支持^(40, 41)，因为它能够改善 ASD 行为。此外，随着患者在干预过程中年龄的增长，由于大脑的成熟和生活经验的积累，语言、社交和自助能力的自然改善可能已经发生^(42, 43)。然而，发育能力水平仍低于正常儿童。因此，安慰剂组的 ASD 行为可以得到改善，这与上述原因有关。

值得注意的是，与安慰剂组相比，BF839 组在第 16 周的 ABC 身体和物体使用评分上有显著改善，这在年龄<4 岁的 ASD 儿童中更为明显。在基线 CARS 评分 ≥ 30 的儿童中，与安慰剂组相比，BF839 组在第 16 周时 ABC 总分、ABC 身体和物体使用评分、CARS 评分和 GSRS 评分均有显著改善。据我们所知，这是第一个随机、双盲、安慰剂对照的临床试验，表明益生菌可以显著改善 ASD 的整体症状，特别是身体和物体的使用，这反映了刻板的行为。

与安慰剂组相比，BF839 组在<4 岁儿童的 ABC 身体和物体使用评分中在第 16 周有显著改善，但在 ≥ 4 岁儿童中无显著改善。此外，BF839 组在<4 岁儿童的所有量表得分上的改善均大于 ≥ 4 岁儿童。这些结果重申了早期干预 ASD 儿童的重要性⁽⁴⁴⁾，并建议<4 岁可能是益生菌干预的有效窗口期。

Liu 等人⁽¹³⁾报告称，在自闭症患者中进行为期 4 周的干预后，安慰剂组和植物乳杆菌 128 (PS128) 组之间的 ABC1 总分和 SRS 评分没有显著差异。同样，Kong 等人⁽¹⁴⁾报告称，在自闭症患者中进行为期 16 周的干预后，PS128 组和安慰剂组之间的 ABC 总分、ABC 子项得分、SRS 总分和 SRS 子项得分没有显著差异。Arnold 等人⁽¹⁸⁾观察到，在包含多种菌株包括四种乳酸杆菌菌株（干酪乳杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种）、三种双歧杆菌菌株（长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和短双歧杆菌）、一种嗜热链球菌菌株和淀粉的益生菌组和安慰剂组之间，经过 19 周的干预后，ABC2 中的刻板行为和不当言语得分以及 SRS 得分没有显著差异。相比之下，我们的研究结果表明，BF839 在改善自闭症儿童的行为症状方面具有出色的疗效。

赵等人⁽²⁰⁾报道，在肠镜和胃镜粪便微生物群移植(FMT)后 2 个月，CARS 评分下降 10.8%(对照组仅下降 0.8%， $p < 0.001$)。在我们的研究中，在基线 CARS 评分 ≥ 30 的儿童中，BF839 组和安慰剂组分别降低了 14.50%(5.57/38.40) 和 5.93% (2.11/35.58) ($p = 0.044$) (表 4)，这与 FMT 的疗效一致。然而，赵⁽²⁰⁾和我们本研究的不良事件发生率分别为 29.2%和 6.67%(2/30)，表明 BF839 在安

全性和可操作性方面具有优势。

关于胃肠道症状,在基线 CARS 评分 ≥ 30 的儿童中,与安慰剂组相比,BF839 组在干预 8 周和 16 周时的 GSRS 评分均有显著改善。这表明 BF839 能显著改善 ASD 患儿的胃肠功能,这与以往报道一致⁽⁴⁵⁾。

值得注意的是,在基线 CARS 评分 <30 的儿童中,所有量表得分的改善在组间没有差异,这可能是由于边缘性 ASD 儿童需要更长的治疗时间,因为短期改善的空间较小或量表评估的敏感性不够。

脆弱拟杆菌及其荚膜多糖 a (PSA) 是被探索最多的单一共生菌群/共生因子⁽⁴⁶⁾。非致毒性脆弱拟杆菌具有深远的生理作用⁽⁴⁷⁾,包括预防结肠炎动物模型中的肠道炎症⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾、预防实验性自身免疫性脑脊髓炎^(51,52)和激活肠道感觉神经元⁽⁵³⁾。Hsiao 等人⁽⁹⁾认为脆弱拟杆菌 NCTC9343 可以通过改变 4-乙基磺酸苯基酯(4-EPS)和吲哚酰-3-丙烯酰甘氨酸的代谢来减轻 MIA 小鼠后代的焦虑样行为。这些代谢物可以影响血清中 5-羟色胺(5-HT)的水平,从而影响海马的学习和记忆。ASD 中与肠道微生物群功能相关的多种机制已被提出,包括免疫激活/功能障碍、细菌毒素(如内毒素、酚类、对甲酚和 4-EPS)、代谢物或产物(如丙酸和其他短链脂肪酸)的发酵变化,以及游离氨基酸代谢失调⁽⁵⁴⁾。

与健康儿童相比,ASD 儿童的双歧杆菌(*Bifidobacterium* spp,⁵⁵⁻⁵⁷)和细孔菌(*Veillonella* spp,⁵⁸)明显减少。某些双歧杆菌产生 GABA⁽⁵⁹⁾;因此,ASD 患儿的 GABA 水平较低。GABA 与谷氨酸的代谢密切相关,谷氨酸是大脑中主要的兴奋性神经递质⁽⁶⁰⁾。谷氨酸水平降低与焦虑、社交障碍和行为障碍的严重程度相关,这些都是 ASD 的典型症状^(61,62)。这表明 GABA/谷氨酸异常可能在 ASD 的病理中起着至关重要的作用^(61,63)。此外,在自闭症儿童中也有氨基酸失调的报道⁽⁶⁴⁾,肠道微生物群参与氨基酸代谢。此外,长双歧杆菌 NCC3001 可以通过迷走神经使感染性结肠炎小鼠的焦虑样行为和海马脑源性神经营养因子水平正常化⁽⁶⁵⁾。相比之下,我们观察到 BF839 组与安慰剂组和基线时的丰度相比,假芽双歧杆菌、长双歧杆菌和两歧双歧杆菌的丰度增加。我们的研究结果表明,BF839 可以促进 ASD 患儿肠道双歧杆菌的生长,从而显著改变一些神经活性化合物的代谢。这可能是 BF839 在 ASD 儿童中观察到的有效性的因素之一。尽管如此,这种疗效背后的详细机制仍不清楚。

研究表明，蔗糖和核糖体代谢途径⁽⁶⁶⁾、支链氨基酸分解代谢功能⁽⁶⁷⁾和戊糖磷酸代谢途径⁽⁶⁸⁾的异常与 ASD 的发生密切相关。蔗糖代谢途径已被发现对神经退行性疾病具有保护作用⁽⁶⁹⁾，而核糖体蛋白可能在维持认知功能方面起着至关重要的作用⁽⁷⁰⁾。支链氨基酸分解代谢途径的增加，如亮氨酸含量的降低，与自闭症有关⁽⁶⁷⁾。此外，戊糖磷酸途径在自闭症小鼠中受损⁽⁶⁸⁾。在上述代谢途径中，我们观察到，与第 0 天和安慰剂组相比，干预 16 周后，BF839 组蔗糖降解 II、缬氨酸降解、核糖降解代谢和戊糖磷酸途径的代谢功能显著增加。同时，亮氨酸降解代谢功能明显降低。这可能解释了 BF839 在治疗儿童 ASD 方面的有效性。然而，这种作用背后的具体机制尚不清楚。此外，上述发现是基于反映菌群内潜在代谢能力的微生物基因组分析。ASD 患者神经活性化合物的确切变化仍需要进一步的代谢组学分析来证实。

我们的研究结果在使用益生菌治疗神经发育障碍方面具有重要的实践和理论意义。本研究结果可能为 ASD 提供一种新的、安全有效的治疗策略。然而，考虑到 ASD 患者长期预后的重要性，本研究的一个局限性是干预时间短。需要进一步的队列研究来观察 BF839 在 ASD 儿童中的长期效果和安全性。

数据可得性声明

本研究中呈现的原创贡献包含在文章/补充材料中，进一步查询可直接联系通讯作者。

伦理声明

人体研究经广州医科大学第二附属医院批准。这些研究是按照当地立法和机构要求进行的。参与者提供了参与本研究的书面知情同意书。

作者贡献

C-hL: 概念化、数据策展、形式分析、资金获取、调查、方法论、软件、验证、写作-原稿、写作-评审编辑。TZ: 调查、方法论、可视化、写作-原稿、写作-评审与编辑。C-wL: 数据策展，软件，写作-审查和编辑。D-yL: 数据管理，软件，写作-审查和编辑。Y-yL: 调查，资源，写作-审查和编辑。B-mL: 资源，

写作-审查和编辑。S-qC: 资源, 写作-审查和编辑。Y-hD: 概念化、方法论、项目管理、监督、写作-原稿、写作-审编。

资助

作者声明, 本文的研究、创作和/或出版获得了资金支持。本研究由广州市卫生健康科技项目资助, 批准号 20201A011081。

鸣谢

衷心感谢广州图腾生命医学研究有限公司在 BF839 及安慰剂产品生产方面的合作。感谢深圳市 01 生命研究有限公司对本研究提供的菌群检测和技术指导。作者在此感谢所有参与本次研究的患者。此外, 作者还要感谢 Editage (www.editage)。editage.cn) 的英文编辑工作。

参考文献:

1. Tang, T, Zhu, J, Guo, M, Lai, X, Li, YY, Yang, T, et al. Relationship of constipation and sleep disorders with emotional and behavioral problems in children with autism spectrum disorder. J Chongqing Med Univ. (2020) 45:85–90. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.001940

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

2. Yin, DG, He, Z, XYm, D, Wang, QC, Liao, XB, Dai, NH, et al. Meta-analysis of the risk factors for autism in Chinese children. Matern Child Health Care China. (2001) 33:2877–80. doi: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2018.12.81

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

3. Revicki, DA, Wood, M, Wiklund, I, and Crawley, J. Reliability and validity of the gastrointestinal symptom rating scale in patients with gastroesophageal reflux disease. Qual Life Res. (1998) 7:75–83. doi: 10.1023/a:1008841022998

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

4. Gan, H, Su, Y, Zhang, L, Huang, G, Lai, C, Lv, Y, et al. Questionnaire-based analysis of autism spectrum disorders and gastrointestinal symptoms in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. Front Pediatr. (2023) 11:1120728. doi: 10.3389/fped.2023.1120728

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

5. Alam, R, Abdolmaleky, HM, and Microbiome, ZJR. Inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *Am J Med Genet B.* (2017) 174:651 – 60. doi: 10.1002/ajmg.b.32567

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

6. Fung, TC, Olson, CA, and Hsiao, EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.* (2017) 20:145 – 55. doi: 10.1038/nn.4476

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

7. Kong, X, Liu, J, Cetinbas, M, Sadreyev, R, Koh, M, Huang, H, et al. New and preliminary evidence on altered oral and gut microbiota in individuals with autism spectrum disorder (ASD): implications for ASD diagnosis and subtyping based on microbial biomarkers. *Nutrients.* (2019) 11:2128. doi: 10.3390/nu11092128

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

8. Tabouy, L, Getselter, D, Ziv, O, Karpuj, M, Tabouy, T, Lukic, I, et al. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* (2018) 73:310 – 9. doi: 10.1016/j.bbi.2018.05.015

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

9. Hsiao, EY, McBride, SW, Hsien, S, Sharon, G, Hyde, ER, McCue, T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* (2013) 155:1451 – 63. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

10. Wang, X, Yang, J, Zhang, H, Yu, J, and Yao, Z. Oral probiotic administration during pregnancy prevents autism-related behaviors in offspring induced by maternal immune activation via anti-inflammation in mice. *Autism Res.* (2019) 12:576 – 88. doi: 10.1002/aur.2079

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

11. El-Ansary, A, Bacha, AB, Ben Bjørklund, G, Al-Orf, N, Bhat, RS, and Moubayed, N. Abed K probiotic treatment reduces the autistic-like excitation/inhibition imbalance in juvenile hamsters induced by orally administered propionic acid and clindamycin. *Metab Brain Dis.* (2018) 33:1155 – 64. doi: 10.1007/s11011-018-0212-8

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

12. Goo, N, Bae, HJ, Park, K, Kim, J, Jeong, Y, Cai, M, et al. The effect of fecal microbiota

transplantation on autistic-like behaviors in Fmr1 KO mice. *Life Sci.* (2020) 262:118497. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118497

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

13. Liu, YW, Liong, MT, Chung, YE, Huang, HY, Peng, WS, Cheng, YF, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on children with autism spectrum disorder in Taiwan: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients.* (2019) 11:820. doi: 10.3390/nu11040820

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

14. Kong, XJ, Liu, J, Liu, K, Koh, M, Sherman, H, Liu, S, et al. Probiotic and oxytocin combination therapy in patients with autism spectrum disorder: a randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot trial. *Nutrients.* (2021) 13:1552. doi: 10.3390/nu13051552

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

15. Li, YQ, Sun, YH, Liang, YP, Zhou, F, Yang, J, and Jin, SL. Effect of probiotics combined with applied behavior analysis in the treatment of children with autism spectrum disorder: a prospective randomized controlled trial. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* (2021) 23:1103 – 10. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2108085

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

16. Parracho, HMRT, Gibson, GR, Knott, F, Bosscher, D, Kleerebezem, M, and McCartney, ALA. Double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *Int J Probiotics Prebiotics.* (2010) 5:69 – 74.

[Google Scholar](#)

17. Wang, Y, Li, N, Yang, JJ, Zhao, DM, Chen, B, Zhang, GQ, et al. Probiotics and fructo-oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder. *Pharmacol Res.* (2020) 157:104784. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104784

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

18. Arnold, LE, Luna, RA, Williams, K, Chan, J, Parker, RA, Wu, Q, et al. Probiotics for gastrointestinal symptoms and quality of life in autism: a placebo-controlled pilot trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* (2019) 29:659 – 69. doi: 10.1089/cap.2018.0156

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

19. Sanctuary, MR, Kain, JN, Chen, SY, Kalanetra, K, Lemay, DG, Rose, DR, et al. Pilot study of

probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. PLoS One. (2019) 14:e0210064. doi: 10.1371/journal.pone.0210064

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

20. Zhao, H, Gao, X, Xi, L, Shi, Y, Peng, L, Wang, C, et al. Fecal microbiota transplantation for children with autism spectrum disorder. Gastrointest Endosc. (2019) 89:AB512–3. doi: 10.1016/j.gie.2019.03.857

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

21. Tomova, A, Husarova, V, Lakatosova, S, Bakos, J, Vlkova, B, Babinska, K, et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. Physiol Behav. (2015) 138:179–87. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.10.033

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

22. Kałużna-Czaplińska, J, and Błaszczuk, S. The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. Nutrition. (2012) 28:124–6. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.002

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

23. Adams, JB, Johansen, LJ, Powell, LD, Quig, D, and Rubin, RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. BMC Gastroenterol. (2011) 11:22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

24. Chang, CJ, Lin, TL, Tsai, YL, Wu, TR, Lai, WF, Lu, CC, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. J Food Drug Anal. (2019) 27:615–22. doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.011

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

25. Zhang, JJ, Yu, LX, Xu, LZ, Wang, WY, Zhang, HJ, Pang, ZH, et al. Isolation and identification of a nontoxic strain of Bacteroides fragilis. Ningxia Med J. (1991) 13:216–8.

[Google Scholar](#)

26. Lin, CH, Zeng, T, Deng, YH, Yang, WL, and Xiong, JL. Treatment of psoriasis vulgaris using Bacteroides fragilis BF839: a single-arm, open preliminary clinical study. Chin J Biotechnol. (2021) 37:3828–35. doi: 10.13345/j.cjb.210198

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

27. Zhang, JJ, Zhang, HM, Zhang, Y, Zhang, HG, Bi, L, Zhang, XC, et al. Study of the clinical application of *Bacteroides fragilis* (BF839) solution. *Chin J Biol.* (1995) 8:63–5. doi: 10.13200/j.cjb.1995.02.63.zhangjj.006

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

28. Feng, SZ, and Zhang, HP. The research progress of *Bacteroides fragilis*. *Microbiol China.* (2015) 42:1366–71. doi: 10.13344/j.microbiol.china.140778

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

29. National Health Commission of the People's Republic of China. New Resource Foods (Before 2007). December 1, 2007. Health New Food Standards (1997) No. 7. Available at: <https://slps.jdxx.net.cn/xwfb/gzcx/PassFileQuery.jsp>

[Google Scholar](#)

30. Lin, CH, Zeng, T, Lin, JH, Xiao, F, Duan, XL, Chen, SQ, et al. Improvement in the learning and memory abilities and social novelty preference in *Fmr1*KO mice by *Bacteroides fragilis* (BF839). *Chin J Neuromed.* (2022) 21:341–34. doi: 10.3760/cma.j.cn115354-20211220-00835

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

31. Deng, YH, Lin, CH, and Cao, DZ. The beneficial effect of *Bacteroides fragilis* (BF839) as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study. *J Epilepsy.* (2021) 7:288–95. doi: 10.7507/2096-0247.20210046

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

32. Lin, CH, Zeng, T, Wu, QY, Cao, DZ, Li, BM, and Deng, YH. Efficacy of *Bacteroides fragilis* 839 in the treatment of newly diagnosed “probable autoimmune-related epilepsy”. *J Epilepsy.* (2022) 8:298–304. doi: 10.7507/2096-0247.202204008

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

33. Butcher, NJ, Monsour, A, Mew, EJ, Chan, AW, Moher, D, Mayo-Wilson, E, et al. Guidelines for reporting outcomes in trial reports: the CONSORT-outcomes 2022 extension. *JAMA.* (2022) 328:2252–64. doi: 10.1001/jama.2022.21022

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

34. Kilcast, D. Sensory evaluation of food—principles and practices 1998. *Food Qual Prefer.* (1998) 9:291–2. doi: 10.1016/S0950-3293(98)00004-4

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

35. Yang, YF. Rating scales for children's developmental behavior and mental health—published book. *Chin J Child Health Care*. (2016) 24:1011.

[Google Scholar](#)

36. Souza, GS, Sardá, FA, Giuntini, EB, Gumbrevicius, I, Morais, MB, and Menezes, EW. Translation and validation of the Brazilian Portuguese version of the gastrointestinal symptom rating scale (GSRS) questionnaire. *Arq Gastroenterol*. (2016) 53:146–51. doi: 10.1590/S0004-28032016000300005

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

37. Qin, J, Li, Y, Cai, Z, Li, S, Zhu, J, Zhang, F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. (2012) 490:55–60. doi: 10.1038/nature11450

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

38. Valles-Colomer, M, Falony, G, Darzi, Y, Tigchelaar, EF, Wang, J, Tito, RY, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol*. (2019) 4:623–32. doi: 10.1038/s41564-018-0337-x

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

39. Vieira-Silva, S, Falony, G, Darzi, Y, Lima-Mendez, G, Garcia Yunta, R, Okuda, S, et al. Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat Microbiol*. (2016) 1:16088. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.88

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

40. Liu, C, Lu, B, Zhang, Y, Xu, C, Peng, F, Ma, L, et al. Clinical efficacy of structured institution-based teaching programme combined with family rehabilitation training in treatment of childhood autism. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. (2015) 17:1277–81. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.12.004

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

41. Bhat, S, Acharya, UR, Adeli, H, Bairy, GM, and Adeli, A. Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. *Rev Neurosci*. (2014) 25:841–50. doi: 10.1515/revneuro-2014-0056

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

42. Tuerk, C, Anderson, V, Bernier, A, and Beauchamp, MH. Social competence in early childhood:

an empirical validation of the social model. *J Neuropsychol.* (2021) 15:477 – 99. doi: 10.1111/jnp.12230

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

43. Cao, M, Huang, H, and He, Y. Developmental Connectomics from infancy through early childhood. *Trends Neurosci.* (2017) 40:494 – 506. doi: 10.1016/j.tins.2017.06.003

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

44. MacDonald, R, Parry-Cruwys, D, Dupere, S, and Ahearn, W. Assessing progress and outcome of early intensive behavioral intervention for toddlers with autism. *Res Dev Disabil.* (2014) 35:3632 – 44. doi: 10.1016/j.ridd.2014.08.036

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

45. Shaaban, SY, El Gendy, YG, Mehanna, NS, El-Senousy, WM, El-Feki, HSA, Saad, K, et al. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: a prospective, open-label study. *Nutr Neurosci.* (2018) 21:676 – 81. doi: 10.1080/1028415X.2017.1347746

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

46. Eribo, OA, du Plessis, N, and Chegou, NN. The intestinal commensal, *Bacteroides fragilis*, modulates host responses to viral infection and therapy: lessons for exploration during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* (2022) 90:e0032121. doi: 10.1128/IAI.00321-21

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

47. Erturk-Hasdemir, D, and Kasper, DL. Finding a needle in a haystack: *Bacteroides fragilis* polysaccharide A as the archetypical symbiosis factor. *Ann N Y Acad Sci.* (2018) 1417:116 – 29. doi: 10.1111/nyas.13660

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

48. An, D, Oh, SF, Olszak, T, Neves, JF, Avci, FY, Erturk-Hasdemir, D, et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell.* (2014) 156:123 – 33. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.042

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

49. Mazmanian, SK, Round, JL, and Kasper, DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* (2008) 453:620 – 5. doi: 10.1038/nature07008

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

50. Dasgupta, S, Erturk-Hasdemir, D, Ochoa-Reparaz, J, Reinecker, HC, and Kasper, DL. Plasmacytoid dendritic cells mediate antiinflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell Host Microbe*. (2014) 15:413 – 23. doi: 10.1016/j.chom.2014.03.006

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

51. Ochoa-Repáraz, J, Mielcarz, DW, Ditrio, LE, Burroughs, AR, Begum-Haque, S, Dasgupta, S, et al. Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. *J Immunol*. (2010) 185:4101 – 8. doi: 10.4049/jimmunol.1001443

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

52. Ochoa-Reparaz, J, Mielcarz, DW, Wang, Y, Begum-Haque, S, Dasgupta, S, Kasper, DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol*. (2010) 3:487 – 95. doi: 10.1038/mi.2010.29

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

53. Mao, YK, Kasper, DL, Wang, B, Forsythe, P, Bienenstock, J, and Kunze, WA. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nat Commun*. (2013) 4:1465. doi: 10.1038/ncomms2478

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

54. Ding, HT, Taur, Y, and Walkup, JT. Gut microbiota and autism: key concepts and findings. *J Autism Dev Disord*. (2017) 47:480 – 9. doi: 10.1007/s10803-016-2960-9

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

55. Kang, DW, Adams, JB, Gregory, AC, Borody, T, Chittick, L, Fasano, A, et al. Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. (2017) 5:10. doi: 10.1186/s40168-016-0225-7

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

56. Wang, L, Christophersen, CT, Sorich, MJ, Gerber, JP, Angley, MT, and Conlon, MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*. (2011) 77:6718 – 21. doi: 10.1128/AEM.05212-11

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

57. Liu, F, Li, J, Wu, F, Zheng, H, Peng, Q, and Zhou, H. Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry*. (2019) 9:43. doi: 10.1038/s41398-019-0389-6

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

58. Strati, F, Cavalieri, D, Albanese, D, De Felice, C, Donati, C, Hayek, J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. (2017) 5:24. doi: 10.1186/s40168-017-0242-1

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

59. Srikantha, P, and Mohajeri, MH. The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci*. (2019) 20:2115. doi: 10.3390/ijms20092115

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

60. Shen, J. Modeling the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle. *Front Neuroenerg*. (2013) 5:1. doi: 10.3389/fnene.2013.00001

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

61. Horder, J, Petrinovic, MM, Mendez, MA, Bruns, A, Takumi, T, Spooren, W, et al. Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Transl Psychiatry*. (2018) 8:106. doi: 10.1038/s41398-018-0155-1

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

62. Wieronska, JM, Stachowicz, K, Nowak, G, and Pilc, A. The loss of glutamate-GABA harmony in anxiety disorders. *InTech* (2011). 135–56. doi: 10.5772/19919

[Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

63. Perna, S, Alalwan, TA, Alaali, Z, Alnashaba, T, Gasparri, C, Infantino, V, et al. The role of glutamine in the complex interaction between gut microbiota and health: a narrative review. *Int J Mol Sci*. (2019) 20:5232. doi: 10.3390/ijms20205232

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

64. Smith, AM, King, JJ, West, PR, Ludwig, MA, Donley, ELR, Burrier, RE, et al. Amino acid dysregulation metabotypes: potential biomarkers for diagnosis and individualized treatment for subtypes of autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry*. (2019) 85:345–54. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.08.016

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

65. Bercik, P, Park, AJ, Sinclair, D, Khoshdel, A, Lu, J, Huang, X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil.* (2011) 23:1132–9. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

66. Yin, H, Wang, Z, Liu, J, Li, Y, Liu, L, Huang, P, et al. Dysregulation of immune and metabolism pathways in maternal immune activation induces an increased risk of autism spectrum disorders. *Life Sci.* (2023) 324:121734. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121734

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

67. Tărlungeanu, DC, Deliu, E, Dotter, CP, Kara, M, Janiesch, PC, Scalise, M, et al. Impaired amino acid transport at the blood brain barrier is a cause of autism spectrum disorder. *Cell.* (2016) 167:1481–1494.e18. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.013

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

68. Liu, M, Chen, Y, Sun, M, Du, Y, Bai, Y, Lei, G, et al. *Auts2* regulated autism-like behavior, glucose metabolism and oxidative stress in mice. *Exp Neurol.* (2023) 361:114298. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114298

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

69. Zeng, Y, Nie, C, Min, J, Liu, X, Li, M, Chen, H, et al. Novel loci and pathways significantly associated with longevity. *Sci Rep.* (2016) 6:21243. doi: 10.1038/srep21243

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)

70. Zhang, B, Hu, X, Li, Y, Ni, Y, and Xue, L. Identification of methylation markers for diagnosis of autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis.* (2022) 37:219–28. doi: 10.1007/s11011-021-00805-5

[PubMed Abstract](#) | [Crossref Full Text](#) | [Google Scholar](#)