DOI:10.16016/j.2097-0927.202107009

中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群特征分析及临床意义

杨 睿[1],张 巧[2],王 彦[1],李 红[2],任之栋[1],马千里[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[1];401121 重庆,北部宽仁医院慢性呼吸疾病管理与康复中心[2]

[**摘要**] **目的** 探索稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者的气道微生物群组特征及其临床意义。**方法** 采集2019年8月至2020年1月就诊于陆军军医大学第二附属医院的44例临床稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者的诱导痰标本,提取DNA后,采用PacBio SMRT测序技术对细菌16S rRNA和真菌ITS序列进行测序,通过对测序数据的层次聚类分析确定出2个亚组,分析组间细菌、真菌菌群及相关临床指标的差异。**结果** 通过对44例受试者的细菌测序数据聚类分析鉴定出2组聚类簇,与较大的聚类簇(A1组,$n=32$)相比,较小的聚类簇(A2组,$n=12$)以嗜血杆菌处于其细菌菌群的优势地位为特征,展示出了更高的痰中性粒细胞百分比($Z=-4.14$,$P<0.001$)和更低的FEV_1% pred($t=2.15$,$P=0.037$)。在细菌菌群结构上,2组聚类簇之间α多样性(Chao1指数和Simpson指数,$P<0.001$)和β多样性(Adonis,$R^2=0.290$,$P=0.001$)差异都具有统计学意义;LEfSe分析提示在种水平上,A1组显著富集肺炎链球菌、副流感嗜血杆菌、具核梭杆菌、奇异劳特普罗菌、脑膜炎奈瑟氏菌、牙龈卟啉单胞菌、产黑色素普雷沃氏菌、苍白普雷沃氏菌、青枯劳尔氏菌,A2组则富集流感嗜血杆菌。在真菌菌群结构上,2组在α多样性上未观察到显著差异(Chao1指数,$P=0.230$;Simpson指数,$P=0.097$),而在β多样性上两组差异显著(Adonis,$R^2=0.068$,$P=0.002$);LEfSe分析提示在种水平上,A1组富集裂褶菌,而A2组则富集变色栓菌、白囊耙齿菌。进一步互作网络分析则提示A2组较A1组展现出了更多的菌属之间的相关关系,且A2组菌属之间的关联强度较A1组更强。**结论** 在稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者中,存在以流感嗜血杆菌作为其气道优势定植菌的亚组,该亚组在细菌及真菌菌群结构上与非流感嗜血杆菌优势组存在显著差异,并在临床上表现为更严重的气道炎症水平和更差的肺功能特征。

[**关键词**] 中性粒细胞;哮喘;诱导痰;菌群

[**中图法分类号**] R562.2; R372 [**文献标志码**] A

Features and clinical significance of airway microbiota in patients with neutrophilic asthma

YANG Rui[1], ZHANG Qiao[2], WANG Yan[1], LI Hong[2], REN Zhidong[1], MA Qianli[1] [1]Institute of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Center for Chronic Respiratory Disease Management and Rehabilitation, North-Kuanren General Hospital, Chongqing, 401121, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the characteristics and clinical significance of airway microbiota in the patients with neutrophilic asthma. **Methods** Induced sputum samples were collected from 44 patients with clinically stable neutrophilic asthma attending the second Affiliated Hospital of Army Medical University from August 2019 to January 2020. After DNA extraction, 16S rRNA and internal transcribed space (ITS) sequencing were performed by PacBio Sequel Systems. Two subgroups were identified by hierarchical cluster

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81670012,81670037)

[**通信作者**] 马千里,E-mail:cqmql@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

analysis on sequencing data, and the differences in their bacterial and fungal microbiota and clinical characteristics were explored. **Results** Hierarchical clustering analysis of bacterial sequencing data from 44 subjects identified 2 clusters. Compared to the larger cluster (group A1, $n=32$), the smaller cluster (group A2, $n=12$) was characterized by a predominance of *Haemophilus* in their bacterial microbiota, and the patients in this group demonstrated a higher percentage of sputum neutrophils ($Z=-4.14$, $P<0.001$) and poorer FEV_1% pred ($t=2.15$, $P=0.037$). In bacterial microbiota, there were significant differences in both α-diversity (Chao1 and Simpson indexes, $P<0.001$) and β-diversity (Adonis, $R^2=0.290$, $P=0.001$) between the 2 groups. At the species level, LEfSe analysis revealed that the group A1 was significantly enriched in *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lautropia mirabilis*, *Neisseria meningitides*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella pallens* and *Ralstonia solanacearum*, while the group A2 was enriched in *Haemophilus influenzae*. In fungal microbiota, no significant differences were observed between the 2 groups in α-diversity (Chao1 index, $P=0.230$; Simpson index, $P=0.097$), whereas significant differences were observed between their β-diversity (Adonis, $R^2=0.068$, $P=0.002$). At the species level, LEfSe analysis revealed that the group A1 was enriched in *Schizophyllum commune*, and group A2 was enriched in *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus*. Interaction network analysis indicated that group A2 showed more correlations between genus than group A1, and the strength of association between genus was more intense. **Conclusion** Among the patients with stable neutrophilic asthma, there is a subgroup characterized by the presence of *Haemophilus influenzae* as its airway predominant colonizing bacteria, which differs significantly from the non-*Haemophilus influenzae* dominant group in terms of bacterial and fungal microbiota, and presents clinical characteristics with more severe airway inflammation and poorer lung function.

[**Key words**] neutrophils; asthma; induced sputum; microbiota

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81670012, 81670037). Corresponding author: MA Qianli, E-mail: cqmql@163.com

支气管哮喘(哮喘)是一种呼吸科最常见的由多种细胞以及细胞组分参与的慢性气道炎性疾病,在不同国家中影响了1%~18%的人口[1],已成为我国公共卫生领域面临的主要挑战之一。目前研究已经证实哮喘存在多种可被识别的表型,其中根据痰液中嗜酸性粒细胞及中性粒细胞的比例区分哮喘气道炎症表型的方式得到了广泛关注[2-3]。既往研究多注重于嗜酸性粒细胞增多型哮喘,但近年有研究提示约有50%哮喘患者的气道炎症以非嗜酸性粒细胞(尤其是中性粒细胞)浸润为主[4],这部分患者在气道气流受限严重程度、症状控制及激素治疗反应性上都与嗜酸性粒细胞增多型哮喘患者存在显著差异[5-6],是难治性哮喘的主要类型。

中性粒细胞增多型哮喘气道炎症的机制尚不明确。随着高通量测序技术的不断进步,针对人体微生物组(主要包括细菌、真菌、病毒)的研究获得快速发展,人们已经认识到哮喘患者与健康人、不同表型的哮喘患者之间的气道菌群组成存在差异,并提出其可能对气道炎症类型造成影响[7-10]。目前在气道微生物组领域的研究多集中于细菌菌群方面,而真菌定植作为影响宿主免疫的一个重要因素,与哮喘发病及严重程度都存在密切的关系[11-12],成为哮喘患者呼吸道微生态研究不可或缺的重要环节。因此,为了更全面地揭示真实临床稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者的气道微生物组特征,本研究采集了44例稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者的诱导痰样本,基于PacBio SMRT测序技术,根据对测序数据的层次聚类分析,确定出2个亚组(A1组和A2组),并进一步探究了其细菌、真菌菌群特征及其相关临床指标的差异,为从呼吸道微生物群落角度更多了解中性粒细胞增多型哮喘及探寻其可治疗特征提供线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究是基于慢性气道疾病患者气道微生物负荷和丰度与临床特征关系研究的事后分析,该研究经陆军军医大学第二附属医院医学伦理委员会批准,并在中国临床试验注册中心注册(ChiCTR1900024871),受

试者在参加研究前均取得了书面的知情同意书。重要的入组标准为受试者需符合 2019 全球哮喘倡议指南(Global Initiative for Asthma, GINA)[1],且诱导痰中性粒细胞百分比≥65%。受试者的主要排除标准包括:近 3 个月内存在哮喘急性加重史;入组前 4 周内因任何原因口服或静脉使用过抗生素或抗真菌药物;受试者患有任何其他可能干扰研究最佳条件的慢性呼吸系统疾病,包括(但不限于)哮喘-慢阻肺重叠、活动性肺结核、慢性支气管炎、支气管扩张症、肺部肿瘤、肺间质疾病、囊性纤维化等疾病。

访视时采集患者的人口统计学数据及相关临床资料。使用哮喘控制测试(asthma control test,ACT)来评估受试者的症状。参照美国胸科协会/欧洲呼吸协会(ATS/ERS)指南[13]进行患者肺功能的测定。受试者使用吸入性糖皮质激素的剂量被转换为氟替卡松剂量。

1.2 痰微生物组 PacBio 全长测序

1.2.1 诱导痰样本采集和 DNA 提取 诱导痰的采集过程参照欧洲呼吸学会诱导痰工作组提供的方法[14]:在收集痰液样本之前,患者需用无菌水漱口 2 次,在吸入沙丁胺醇后,通过反复超声雾化吸入 3%的生理盐水获得诱导痰样本,并在 1 h 内对样本进行细胞分类及处理。DNA 提取过程参照我们的前期研究[15],在 37 ℃下,使用 4 倍体积的 2%二硫苏糖醇(DTT)将痰细胞团块完全消化,经过 1 300 r/min 低速离心 5 min 后,去除沉淀部分,上清部分经过 12 000 r/min、5 min 高速离心后,留取沉淀部分用于 DNA 提取。DNA 提取采用天根 DNA 提取试剂盒(DP302-02,具体操作步骤见试剂盒说明书),并使用 NanoDrop ND2000 紫外分光光度计检测提取物的浓度和纯度。所有提取出的 DNA 在测序之前于-20 ℃保存。

1.2.2 16S rRNA 和 ITS 基因测序 对于细菌 16S rRNA 基因,使用正向引物 27F(5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′)和反向引物 1492 R(5′-ACCTTGTTACGACTT-3′)进行两步 PCR 扩增过程。真菌 ITS 基因则使用引物 ITS1F(5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′)和 LR3(5′-CCGTGTTTCAAGACGGG-3′)进行扩增。PCR 扩增完成后对其产物进行回收纯化、荧光定量和文库构建后进行上机测序。测序过程使用 PacBio Sequel 平台的单分子实时测序技术(single molecule real-time, SMRT)完成。使用 QIIME2(2019.4)软件和 R 软件(3.6.1)对原始测序数据进行处理。在去除嵌合体后,使用 VSEARCH 软件以 97%的相似度将剩余的高质量序列聚类为可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),并将丰度低于总序列数 0.001%的 OTU 过滤。使用 BLASTn 比对 NCBI NT 数据库后通过 BROCC 算法进一步产生每个 OTU 的分类学注释,BROCC 算法的阈值被设定为 100%。最后以最小测序深度的 90%对所有的 OTU 进行重新采样,产生抽平后的 OTU 表用于后续分析。

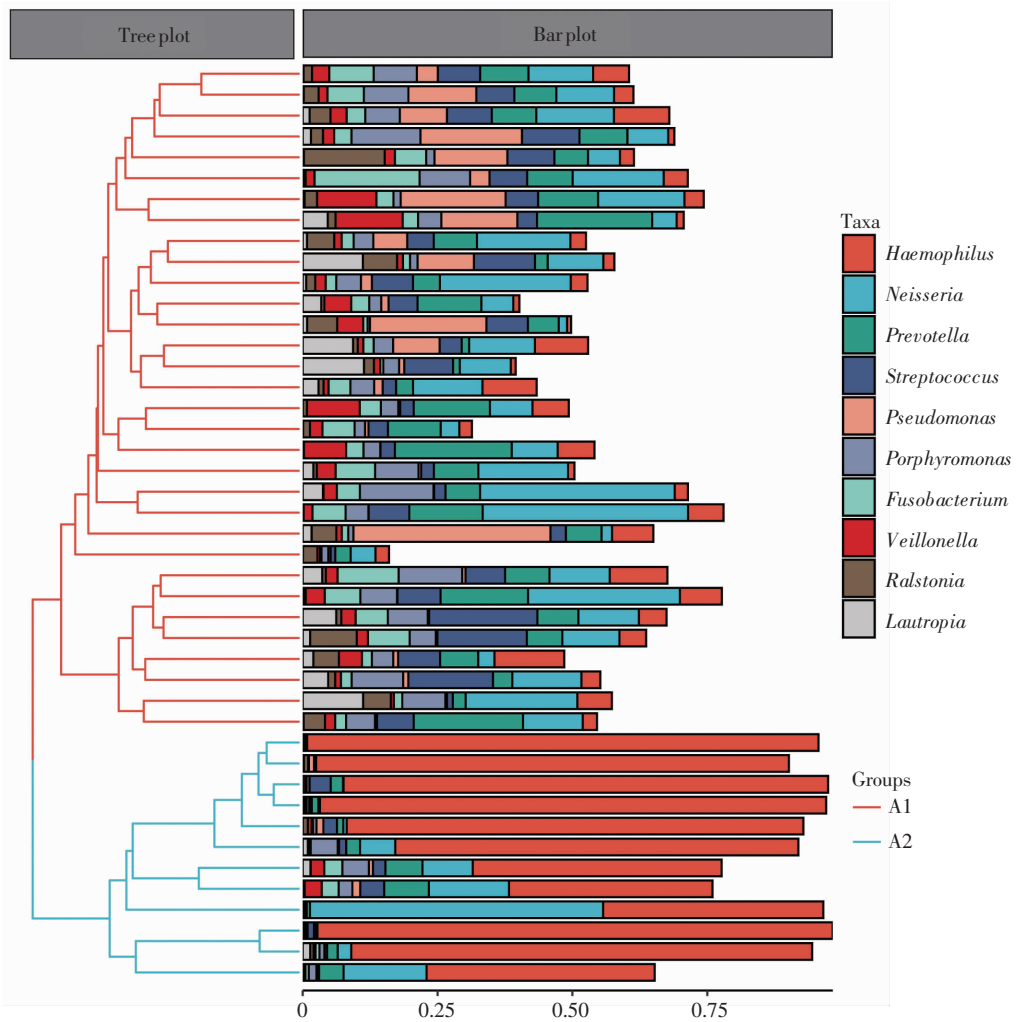
1.3 生物信息学和统计学分析

基于非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)的层次聚类分析被用于对测序数据进行聚类,根据聚类结果将患者群分类为 A1 组和 A2 组。对于菌群的 α 多样性,本研究采用 Chao1 指数来表征微生物群落的丰富度,采用 Simpson 指数来表征微生物群落的多样性。采用 Wilcoxon 秩和检验及 Dunn 检验作为事后检验来比较组间 α 多样性。基于 Bray-curtis 距离的非度量多维尺度分析(nonmetric multidimensional scaling, NMDS)和非参数多元方差分析(adonis)被用于揭示菌群 β 多样性的变化。线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析被用于确定组间的差异物种,其中 LDA 阈值设置为 3,丰度过滤阈值设定为 0.005。此外,互作网络分析基于各组平均相对丰度排名前 25 位的细菌属及丰度前 15 位的真菌属之间的 Spearman 相关系数构建(经 FDR 校正后 $P<0.05$ 且 $|r|>0.5$),使用 R(3.6.1)软件中的 igraph 包将网络划分成不同模块,并使用 Cytoscape(3.7.2)软件进行可视化。对于受试者临床数据的正态性检验使用 Kolmogorov-Smirnov 检验,对于计数资料采用 Fisher's 精确检验,计量资料则采用 Wilcoxon 秩和检验或 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况

细菌 16S rRNA 测序数据的层次聚类分析结果显示,受试者被聚类为 A1 组($n=32$)和 A2 组($n=12$)2 组(图 1)。2 组在年龄、性别、BMI 指数、吸入性糖皮质激素剂量(inhaled corticosteroids, ICS)、吸烟情况等方面差异无统计学意义(表 1)。A2 组受试者的 FEV_1% pred 显著低于 A1 组($t=2.15$,$P=0.037$)、痰中性粒细胞百分比则显著高于 A1 组($Z=-4.14$,$P<0.001$),而 A1 组受试者则拥有更高的痰嗜酸性粒细胞百分比($Z=-2.38$,$P=0.017$)。



左侧为层次聚类树图,右侧为各样本中丰度排名前十位的细菌属

图 1 基于 UPGMA 的层次聚类分析

表 1 中性粒细胞增多型哮喘入组患者的一般情况[例,$M(P_{25},P_{75})$,$\bar{x}\pm s$]

组别	n	男性	年龄/岁	BMI/kg·m^{-2}	ICS/μg·d^{-1}	吸烟	FEV_1pred(%)	FEV_1/FVC(%)	痰中性粒细胞(%)	痰嗜酸性粒细胞(%)	ACT 评分
A1 组	32	10	53.59±13.61	23.84±3.60	500(200,1 000)	9	81.25±19.86	67.68±12.55	77.85(71.28,86.31)	1.10(0.52,3.50)	22.00(19.25,24.00)
A2 组	12	7	59.33±15.16	23.91±4.81	500(250,1 000)	3	66.48±21.36	59.93±16.16	90.22(87.34,93.12)	0.34(0.07,1.00)	21.50(15.75,23.00)
t/Z		−	−1.20	−0.05	−0.26	−	2.15	1.68	−4.14	−2.38	−1.17
P		0.164	0.234	0.960	0.805	1.000	0.037	0.100	<0.001	0.017	0.255

2.2 气道微生物组概述

经过抽平后共获得 2 364 个细菌 OTUs,其中 A1 组的 OTUs 在 249 个属的 375 个种获得注释,A2 组的 OTUs 在 157 个属的 244 个种获得注释。真菌 OTUs 共 434 个,其中 A1 组的 OTUs 在 95 个属的 110 个种获得注释,A2 组的 OTUs 在 55 个属的 61 个种获得注释。

对于细菌分类学组成,在属水平上(表 2),A1 组平均相对丰度前 5 位的是奈瑟氏菌属(*Neisseria*,12.74%)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*,8.59%)、链球菌属(*Streptococcus*,6.86%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*,5.94%)、卟啉菌属(*Porphyromonas*,5.29%);而 A2 组以嗜血杆菌属(*Haemophilus*,72.78%)处于优势地位,其余丰度较高的菌属为奈瑟氏菌属(*Neisseria*,8.69%)、卡他莫拉菌属(*Moraxella*,2.76%)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*,2.51%)、链球菌属(*Streptococcus*,1.43%)。在种水平上(表 3),A1 组丰度排名靠前的是脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*,8.92%)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*,4.45%)、青枯劳尔

氏菌(*Ralstonia solanacearum*,2.75%)、奇异劳特普罗菌(*Lautropia mirabilis*,2.70%)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*,2.00%);A2 组则以流感嗜血杆菌占主导地位(*Haemophilus influenzae*,72.08%),除脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*,6.35%)外,其余菌种丰度均小于 2%。

对于属水平上的真菌分类学组成(表 2),A1 组丰度前五位的菌属为假丝酵母菌属(*Candida*,8.20%)、链格孢菌属(*Alternaria*,7.78%)、曲霉菌属(*Aspergillus*,6.25%)、枝孢菌属(*Cladosporium*,5.63%)、裂褶菌属(*Schizophyllum*,5.19%);A2 组以栓菌属(*Trametes*,15.31%)、曲霉菌属(*Aspergillus*,13.02%)、耙齿菌属(*Irpex*,4.25%)、布勒掷孢酵母菌属(*Bullera*,3.97%)、*Phaeoisaria* 菌属(2.92%)为主。在种水平上(表 3),A1 组在白假丝酵母菌(*Candida albicans*,7.25%)、裂褶菌(*Schizophyllum commune*,5.19%)、*Papiliotrema flavescens*(2.38%)丰度较高;A2 组以变色栓菌(*Trametes versicolor*,15.31%)、白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*,4.25%)、布勒掷孢酵母菌(*Bullera unica*,3.97%)丰度排名靠前。

2.3 细菌菌群

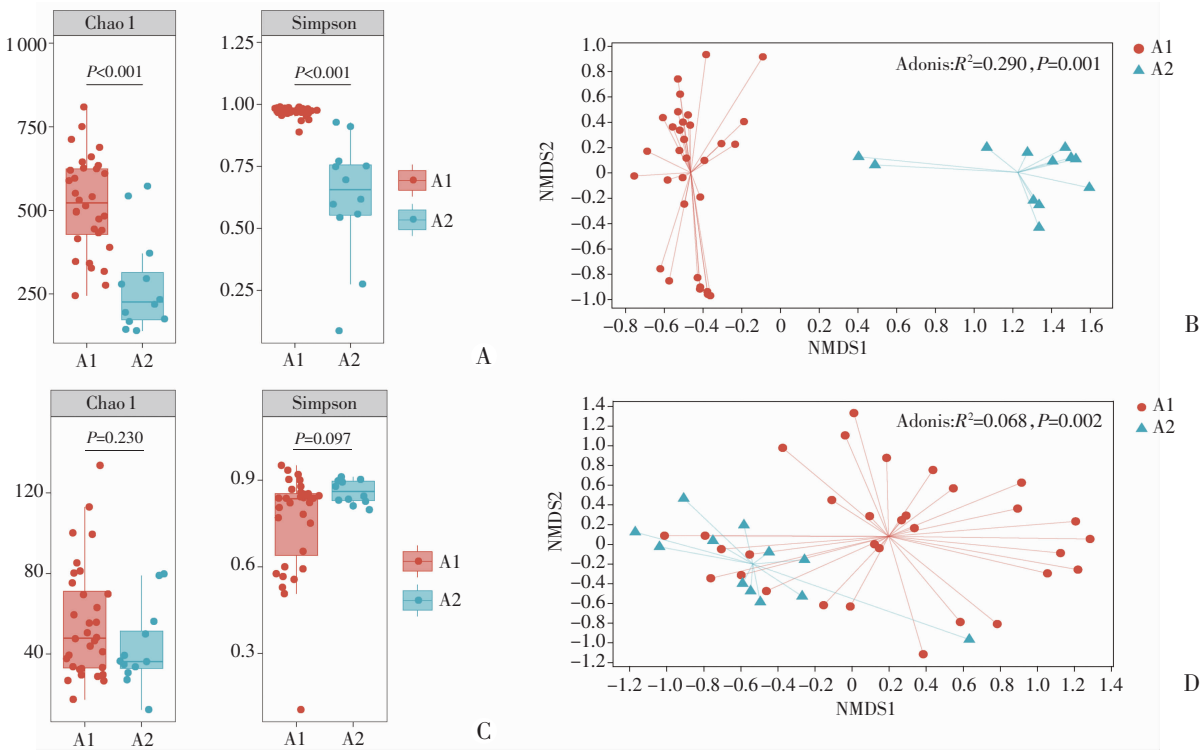
2.3.1 细菌菌群 α、β 多样性比较 与 A1 组相比,A2 组在 α 多样性上展现了更低的 Chao1 指数和 Simpson 指数(图 2A,$P<0.001$),表明 A2 组无论是在细菌群落的丰富度和多样性方面均低于 A1 组。且基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析同样显示出两组之间在 β 多样性上存在显著差异(图 2B,Adonis,$R^2=0.290$,$P=0.001$),提示两组在细菌菌群结构上存在明显差异。

表 2 中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群属水平上各组的细菌及真菌平均相对丰度

细菌属	A1 组	A2 组	真菌属	A1 组	A2 组
Haemophilus	4.83	72.78	*Candida*	8.20	0.03
Prevotella	8.59	2.51	*Alternaria*	7.78	2.54
Streptococcus	6.86	1.43	*Aspergillus*	6.25	13.02
Pseudomonas	5.94	0.46	*Cladosporium*	5.63	1.25
Porphyromonas	5.29	1.43	*Schizophyllum*	5.19	<0.01
Neisseria	12.74	8.69	*Trametes*	1.08	15.31
Fusobacterium	4.39	0.75	*Papiliotrema*	2.38	1.76
Veillonella	3.17	0.69	*Irpex*	0.13	4.25
Moraxella	0.01	2.76	*Bullera*	<0.01	3.97
Alloprevotella	1.35	1.31	*Phaeoisaria*	<0.01	2.92

表 3 中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群种水平上各组的细菌及真菌平均相对丰度

细菌属	A1 组	A2 组	真菌属	A1 组	A2 组
Haemophilus influenzae	1.25	72.08	*Candida albicans*	7.25	0.03
Streptococcus pneumoniae	4.45	1.03	*Schizophyllum commune*	5.19	<0.01
Ralstonia solanacearum	2.75	0.30	*Papiliotrema flavescens*	2.38	1.76
Lautropia mirabilis	2.70	0.37	*Candida parapsilosis*	0.95	<0.01
Haemophilus parainfluenzae	2.00	0.48	*Sistotrema brinkmannii*	0.83	<0.01
Neisseria meningitidis	8.92	6.35	*Trametes versicolor*	0.31	15.31
Alloprevotella tannerae	1.12	1.19	*Irpex lacteus*	0.13	4.25
Neisseria lactamica	<0.01	1.19	*Bullera unica*	<0.01	3.97
Prevotella melaninogenica	1.71	0.49	*Sarocladium zeae*	0.62	1.37
Porphyromonas gingivalis	1.61	0.26	*Malassezia restricta*	0.11	1.00



A、C:分别为细菌菌群、真菌菌群 Chao1 指数、Simpson 指数;B、D:分别为细菌菌群、真菌菌群的 NMDS 分析

图 2 中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群细菌及真菌菌群多样性比较

2.3.2 细菌差异物种鉴定 LEfSe 分析提示(图 3A),在属水平上,A1 组富集韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、密螺旋体属(*Treponema*)、链球菌属(*Streptococcus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、劳尔氏菌属(*Ralstonia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、卟啉菌属(*Porphyromonas*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)、孪生球菌属(*Gemella*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、大豆根瘤菌属(*Bradyrhizobium*);A2 组则显著富集嗜血杆菌属(*Haemophilus*)。

相较于 A2 组,A1 组在种水平上显著富集肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、奇异劳特普罗菌(*Lautropia mirabilis*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、产黑色素普雷沃氏菌(*Prevotella melaninogenica*)、苍白普雷沃氏菌(*Prevotella pallens*)、青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*);A2 组受试者则拥有更高的流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的相对丰度。值得注意的一点是流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌虽都属于嗜血杆菌属,但二者却在不同组别富集。

2.4 真菌菌群

2.4.1 真菌菌群 α、β 多样性比较 对于真菌菌群结构,本研究未观察到两组在 α 多样性指数上的显著差异(图 2C)。虽然 A2 组受试者展现出了比 A1 组更高的 Simpson 指数,但差异并不具有统计学意义($P=0.097$)。此外,通过基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析对组间差异进行比较发现,优势组与非优势组在真菌菌群结构上具有显著差异(图 2D,Adonis,$R^2=0.068$,$P=0.002$)。

2.4.2 真菌差异物种鉴定 通过 LEfSe 分析提示(图 3B),在属水平上 A1 组富集枝孢菌属(*Cladosporium*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*);A2 组则在栓菌属(*Trametes*)、耙齿菌属(*Irpex*)拥有更高的相对丰度。在种水平上 A1 组富集裂褶菌(*Schizophyllum commune*);而 A2 组则富集变色栓菌(*Trametes versicolor*)、白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)。

2.5 互作网络分析

为了探索 2 组患者的气道菌群互作关系是否存在不同,本研究基于细菌及真菌属水平的物种丰度使用 Spearman 相关系数(经 FDR 校正后 $P<0.05$ 且 $|r|>$

0.5)构建了互作网络。发现与A1组(图4A)比较,A2组(图4B)展示出更多且更紧密的物种之间的相关关系,2组在互作网络物种构成上也表现出了较大不同。A1组中链球菌属(*Streptococcus*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、卟啉菌属(*Porphyromonas*)拥有与其他菌属较高的连接度。而在A2组中,弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、卟啉菌属(*Porphyromonas*)、梭形杆菌属(*Fusobacterium*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)拥有比其他菌属较高的连接度。值得注意的是,在中性粒细胞哮喘患者中,卟啉菌属(*Porphyromonas*)无论是在嗜血杆菌优势或非优势组,其在互作网络中都处于较重要的位置。在本研究中仅有较少细菌属与真菌属之间的相关关系被观察到,在*A1*组中观察到了链球菌属(*Streptococcus*)与红酵母菌属(*Rhodotorula*)之间的互斥关系、与小脆柄菇属(*Psathyrella*)之间的共现关系。而在*A2*组中,嗜血杆菌属(*Haemophilus*)与马拉色氏菌属(*Malassezia*)存在显著的共现关系,而它们又与奈瑟氏菌属(*Neisseria*)存在互斥关系。

3 讨论

中性粒细胞增多型哮喘因其与难治性哮喘、重症哮喘等关系密切,已成为哮喘临床研究中关注的重点之一。本研究入组受试者均为中性粒细胞增多表型,通过聚类分析的方法将患者归类到2个聚类簇,发现在细菌及真菌菌群结构上两者均存在显著差异。其中A2组平均流感嗜血杆菌相对丰度达到了72.08%,处于整个菌群结构中的绝对优势地位,我们称其为流感嗜血杆菌优势组(对应的称另一组为非流感嗜血杆菌优势组)。流感嗜血杆菌作为一种常见的潜在致病菌,可促进IL-17介导的免疫反应并可在哮喘小鼠模型中诱导中性粒细胞炎症[16],亦有研究指出流感嗜血杆菌是引起哮喘患者激素治疗反应性差及儿童持续性喘息的主要病原体[17-18],其呼吸道定植情况与哮喘患者的气道高反应性及控制水平存在相关性[7, 19-20]。此前有研究提出在稳定期哮喘患者中可能存在以气道高嗜血杆菌定植、高痰中性粒细胞百分比、IL-1β及TNF-α等相关炎症因子升高为特征的亚组[21],但既往研究并未针对特定气道炎症表型做进一步分析。本研究则进一步确认了在中性粒细胞增多型哮喘患者中同样存在

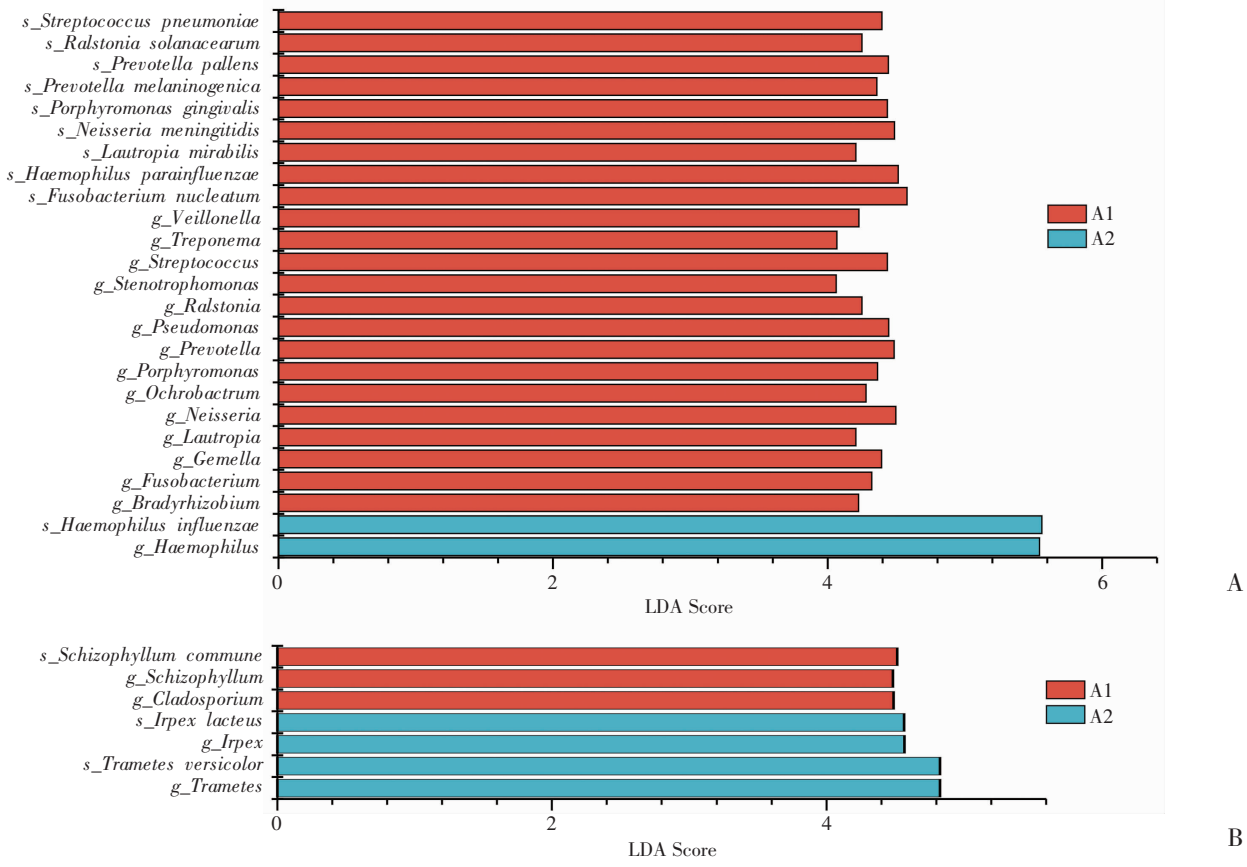
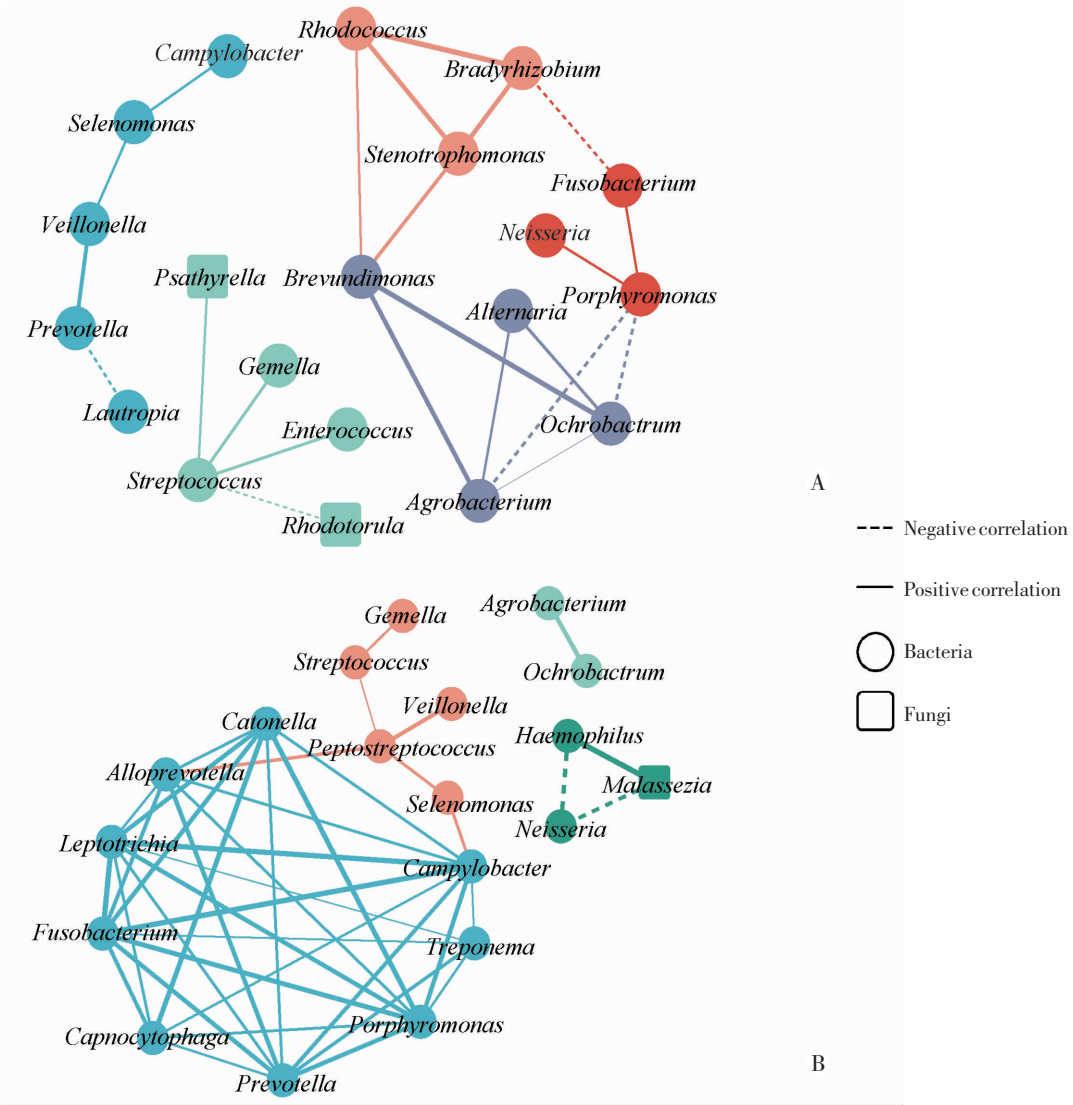


图3 中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群细菌(A)及真菌(B)差异物种鉴定



图中不同颜色代表不同的模块单元;连线的粗细代表相关关系强弱,实线表示正相关,虚线表示负相关;圆形代表细菌属,方形代表真菌属

A:A1 组;B:A2 组

图 4 中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群互作网络分析

以气道高流感嗜血杆菌定植为特征的亚组,且并非所有中性粒细胞增多型哮喘患者都是流感嗜血杆菌占优势。非优势组相较于优势组显著富集肺炎链球菌、副流感嗜血杆菌、具核梭杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、苍白普雷沃氏菌等菌种。需要指出是,我们发现虽然流感嗜血杆菌与副流感嗜血杆菌同属于嗜血杆菌属,但二者却分别富集于不同的组别,提示了在后续研究中应更加注重种水平上的精确注释与分析。近年来,长期阿奇霉素治疗对于哮喘患者降低其病情恶化风险、改善生存质量的作用已被广泛认知[22],目前已经证实长期阿奇霉素治疗与流感嗜血杆菌负荷降低有关[23]。虽然在本研究中高嗜血杆菌定植的患者占总体比例有限,但仍然在一定程度上提示了将其作为可治疗特征的可能性。

目前对于气道菌群的研究多关注于细菌菌群,但真菌在慢性气道炎症性疾病的发生、发展过程中扮演的角色同样不应忽略。本研究通过对中性粒细胞增多型哮喘患者的真菌菌落特征的分析,发现中性粒细胞哮喘患者的嗜血杆菌优势组与非优势组的真菌菌群结构存在差异。HUANG 等[24]的研究提示栓菌属可作为哮喘患者的潜在生物标志物,本研究则进一步发现在嗜血杆菌优势组栓菌属及耙齿菌属呈显著富集。枝孢菌及裂褶菌作为常见的真菌致敏源,可在室内和室外空气中被检测到,前者已被证实可在小鼠模型中导致

气道高反应性及气道重塑[25],后者则可诱导 IL-17 介导的中性粒细胞气道炎症[26]。本研究发现,相较于优势组,二者在非优势组展现出了更高的相对丰度。有观点认为微生物平衡的破坏可能是造成哮喘的原因之一,在健康条件下可以同时发现共生的真菌和细菌共同参与构成呼吸道微生态,而在疾病状态下细菌-细菌、细菌-真菌、真菌-真菌之间的共现关系都会发生较大改变[9, 27]。通过互作网络分析,本研究发现优势组与非优势组在菌属之间的互作关系上表现出了较大差异,二者不仅在网络节点的构成上存在较大差异,而且优势组展示出了更多且更强的菌属之间的相关关系。在一定条件下,如抗生素使用、疾病的急性加重等情况下,菌群互作关系的长期动态改变亦是下一步值得关注的重点之一。

本研究还存在以下不足,首先是样本量较少,尤其是优势组仅有 12 例。这可能由该类型患者总体分布特征引起,本研究主要研究目标在于中性粒细胞增多型哮喘患者气道菌群特征的探索分析,并非其流行病学特征,因此,研究结果仍需要进一步的大样本、多中心研究来明确。其次,由于目前真菌数据库相较于细菌数据库仍有待完善,且本研究在物种分类学注释时,为了获取更加可靠的注释信息,将 BROCC 算法阈值设定为 100%,故真菌菌群的注释效率相较于细菌稍差。

本研究收集了 44 例稳定期中性粒细胞增多型哮喘患者的痰样本进行 16S rRNA 及 ITS 测序,并通过聚类分析的方法确定出了 2 个亚组,比较系统地描述了 2 组在细菌和真菌菌群之间的差异,丰富了慢性气道炎症性疾病的微生物组研究数据,为未来进一步研究气道微生物定植和宿主免疫反应之间的相互作用,以及寻找潜在的可治疗特征提供了线索。

参考文献:

[1] Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention, 2019. [J/OL]. 2019 [2021-07-05]. https://www.ginasthma.org.

[2] SIMPSON J L, SCOTT R, BOYLE M J, *et al*. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum[J]. Respirology, 2006, 11(1): 54-61. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2006.00784.x.

[3] 屈小雪,刘雅莉,王健美,等. 不同炎症表型哮喘常用生物学标志物进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(06): 1349-1355. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.033.
QU X X, LIU Y L, WANG J M, *et al*. Progress in common biomarkers for different inflammatory phenotype asthma[J]. J Clin Pathol Res, 2019, 39(06): 1349-1355. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.06.033.

[4] DOUWES J, GIBSON P, PEKKANEN J, *et al*. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms [J]. Thorax, 2002, 57(7): 643-648. DOI: 10.1136/thorax.57.7.643.

[5] SHAW D E, BERRY M A, HARGADON B, *et al*. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma[J]. Chest, 2007, 132(6): 1871-1875. DOI: 10.1378/chest.07-1047.

[6] BERRY M, MORGAN A, SHAW D E, *et al*. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma[J]. Thorax, 2007, 62(12): 1043-1049. DOI: 10.1136/thx.2006.073429.

[7] DURACK J, LYNCH S V, NARIYA S, *et al*. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 140(1): 63-75. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.08.055.

[8] TAYLOR S L, LEONG L, CHOO J M, *et al*. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(1): 94-103. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.044.

[9] LIU H Y, LI C X, LIANG Z Y, *et al*. The interactions of airway bacterial and fungal communities in clinically stable asthma[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1647. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01647.

[10] 时国朝,黄春容. 呼吸道及肠道微生物菌群与支气管哮喘的发病及治疗[J]. 诊断学理论与实践, 2019, 18(3): 241-245. DOI: 10.16150/j.l671-2870.2019.03.001.
SHI G C, HUANG C R. Correlation of microbial flora in respiratory and intestinal tract with pathogenesis of asthma and its treatment[J]. J Diagn Concepts Pract, 2019, 18(3): 241-245. DOI: 10.16150/j.l671-2870.2019.03.001.

[11] VAN WOERDEN H C, GREGORY C, BROWN R, *et al*. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 69. DOI: 10.1186/1471-2334-13-69.

[12] MARSLAND B J, GOLLWITZER E S. Host-microorganism interactions in lung diseases[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(12): 827-835. DOI: 10.1038/nri3769.

[13] MILLER M R, HANKINSON J, BRUSASCO V, *et al*. Standardisation of spirometry[J]. Eur Respir J, 2005, 26(2): 319-338. DOI: 10.1183/09031936.05.00034805.

[14] GUIOT J, DEMARCHE S, HENKET M, *et al*. Methodology for Sputum Induction and Laboratory Processing[J]. J Vis Exp, 2017(130). DOI: 10.3791/56612.

[15] YANG X, LI H, MA Q, *et al*. Neutrophilic asthma is associated with increased airway bacterial burden and disordered community composition[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 9230234. DOI: 10.1155/2018/9230234.

[16] ESSILFIE A T, SIMPSON J L, HORVAT J C, *et al*. Haemophilus influenzae infection drives IL-17-mediated neutrophilic allergic airways disease[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(10): e1002244. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002244.

[17] DE SCHUTTER I, DREESMAN A, SOETENS O, *et al*. In young children, persistent wheezing is associated with bronchial bacterial infection: a retrospective analysis[J]. BMC Pediatr, 2012, 12: 83. DOI: 10.1186/1471-2431-12-83.

[18] GOLEVA E, JACKSON L P, HARRIS J K, *et al*. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(10): 1193-1201. DOI: 10.1164/rccm.201304-0775OC.

[19] SIMPSON J L, DALY J, BAINES K J, *et al*. Airway dysbiosis: Haemophilus influenzae and Tropheryma in poorly controlled asthma[J]. Eur Respir J, 2016, 47(3): 792-800. DOI: 10.1183/13993003.00405-2015.

[20] 李涛,李希萍,高文英,等. 不同哮喘控制水平患者流感嗜血杆菌感染程度及其与炎症因子水平的相关性[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(8): 940-943, 951. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201908017.
LI T, LI X P, GAO W Y, *et al*. The level of Haemophilus infection and its correlation with inflammatory levels in patients with different asthma control levels[J]. Chin J Microecol, 2019, 31(8): 940-943, 951. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201908017.

[21] DIVER S, RICHARDSON M, HALDAR K, *et al*. Sputum microbiomic clustering in asthma and chronic obstructive pulmonary disease reveals a Haemophilus-predominant subgroup[J]. Allergy, 2020, 75(4): 808-817. DOI: 10.1111/all.14058.

[22] GIBSON P G, YANG I A, UPHAM J W, *et al*. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2017, 390(10095): 659-668. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31281-3.

[23] TAYLOR S L, LEONG L, MOBEGI F M, *et al*. Long-term azithromycin reduces haemophilus influenzae and increases antibiotic resistance in severe asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(3): 309-317. DOI: 10.1164/rccm.201809-1739OC.

[24] HUANG C, YU Y, DU W, *et al*. Fungal and bacterial microbiome dysbiosis and imbalance of trans-kingdom network in asthma[J]. Clin Transl Allergy, 2020, 10: 42. DOI: 10.1186/s13601-020-00345-8.

[25] DENIS O, VAN DEN BRULE S, HEYMANS J, *et al*. Chronic intranasal administration of mould spores or extracts to unsensitized mice leads to lung allergic inflammation, hyper-reactivity and remodelling[J]. Immunology, 2007, 122(2): 268-278. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02636.x.

[26] HANASHIRO J, MURAOSA Y, TOYOTOME T, *et al*. Schizophyllum commune induces IL-17-mediated neutrophilic airway inflammation in OVA-induced asthma model mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 19321. DOI: 10.1038/s41598-019-55836-x.

[27] SHARMA A, LAXMAN B, NAURECKAS E T, *et al*. Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes[J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 144(5): 1214-1227. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.06.025.

(收稿:2021-07-01;修回:2021-08-09)
(编辑 邓强庭)