

• 临床研究 •

基于高通量测序技术分析特应性皮炎患者皮肤微生物菌群多样性

福建省福州市皮肤病防治院皮肤科 (福州 350025) 黄彬彬 张 弘 何小蓉 周 帆 翁立强 龚晓盼 郑礼宝¹

【摘 要】 目的 采用 16S rDNA、ITS 测序技术研究特应性皮炎患者皮肤微生物菌群多样性。**方法** 收集本院 25 例特应性皮炎患者 (实验组) 及 22 例健康人 (正常对照组), 取皮损处 (PL 组) 及无皮损处 (PN 组) 皮肤菌群样本, 正常对照组取相应部位菌群样本 (N 组)。提取样品 DNA 行 illumina 高通量测序。**结果** 基于 16S rDNA 多样性指数分析显示, PL 组 shannon 指数低于 PN、N 组 (均 $P < 0.01$), simpson 指数低于 PN、N 组 (均 $P < 0.01$), 表明特应性皮炎患者皮损处细菌菌群多样性显著性降低。3 组间 β 多样性差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 3 组间菌群组成差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。同时, ITS 多样性指数分析显示特应性皮炎患者皮损处真菌菌群多样性升高。**结论** 通过 16S rDNA 以及 ITS 测序技术应用于特应性皮炎皮肤微生物组学研究, 证实了特应性皮炎患者皮肤菌群多样性与正常皮肤存在一定差异, 皮肤表面微生物菌群与特应性皮炎的发病密切相关。

【关键词】 特应性皮炎; 16S rDNA; ITS; 生物多样性

【中图分类号】 R753.9 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)01-0005-03

Analysis of skin microbiota diversity in patients with atopic dermatitis based on high throughput sequencing

HUANG Binbin, ZHANG Hong, HE Xiaorong, ZHOU Fan, WENG Liqiang, GONG Xiaopan, ZHENG Libao.
Dermatology Hospital of Fuzhou, Fuzhou, Fujian 350025, China

【Abstract】 Objective To analyze the skin microbiota diversity in patients with atopic dermatitis (AD) using 16S rDNA and ITS sequencing. **Methods** Twenty-five patients with AD and 22 healthy controls were collected from the Dermatology Hospital of Fuzhou. Skin swabs were collected from lesional skin (PL group) and non-lesional skin (PN group) of the patients with AD, as well as from the corresponding body sites of the healthy controls (N group). DNA was extracted from the samples and subjected to high throughput sequencing for diversity index analysis. **Results** 16S rDNA diversity index analysis showed that shannon index in PL group was significantly lower than PN and N group ($P < 0.01$) with simpson index higher in PN and N group ($P < 0.01$), indicating that the diversity of bacterial flora in skin lesions of AD patients decreased substantially. There was significant difference in the composition of microflora among the three groups ($P = 0.001$). Meanwhile, ITS diversity analysis showed that the diversity of fungal flora in the skin lesions of AD patients increased. **Conclusion** 16S rDNA and ITS sequencing technology were applied to study the microbiome of atopic dermatitis. The results of this study confirmed that the diversity of AD skin bacteria were different from that of normal people. The microflora of skin surface is closely related to the pathogenesis of atopic dermatitis.

【Key words】 atopic dermatitis; 16S rDNA; ITS; biodiversity

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种常见的慢性瘙痒性、炎症性皮肤病。近年来 AD 的发病率逐渐上升, 其发病机制尚不完全清楚, 目前研究表明皮肤菌群紊乱、免疫异常、皮肤屏障功能障碍等因素是发病的重要环节^[1]。现有研究表明 AD 患者的皮损部位细菌多样性降低及金黄色葡萄球菌可诱发和加重本病^[2], 但既往研究多集中于

AD 患者的肠道菌群的失衡, 对于皮肤的菌群研究仅局限于细菌群落或真菌群落。本研究同时采用 16S rDNA 和 ITS 测序技术, 检测 AD 患者皮损处与非皮损处菌群与正常人相应部位的菌群, 探讨 AD 患者皮肤表面微生物菌群多样性对疾病的影响, 为今后微生物治疗特应性皮炎提供新思路。

基金项目: 福州市科技计划项目 (2019-S-94); 福州市皮肤病与医学美容医学中心建设项目 (2018080309); 福州市临床重点专科建设项目 (201807111)

1 通信作者, Email: fzspzlb@126.com

1 对象与方法

1.1 对象：纳入 2020 年 3 月至 2021 年 4 月本院皮肤科诊治的特应性皮炎患者 25 例为实验组，所有患者均符合 AD 的诊断标准且属于急性发作期，其中男 13 例，女 12 例；年龄 2~65 (13.23 ± 1.91) 岁。22 例本院职工以及子女作为正常对照组，其中男 10 例，女 12 例；年龄 3~32 (19.96 ± 3.31) 岁。纳入标准：受试者 30 天内未使用过抗生素治疗，皮肤取样的前 7 天未接受试验性新治疗；无紫外线、单克隆抗体、全身免疫抑制剂等治疗史；无其他疾病。本研究通过本院伦理委员会批准（榕皮医 [2020] 13 号），所有受试者及监护人均签署知情同意书；对有能力作出同意参加临床试验决定的儿童，须征得本人同意。

1.2 皮肤菌群标本采样：采样部位为 AD 患者急性渗出皮损以及前臂曲侧无皮损区域；正常对照组取前臂曲侧。采样方法：在采样部位选取 5cm × 5cm 区域，将医用无菌棉签在湿润液中湿润，在目标区域反复擦拭 20 次以上，采集完成后将拭子头折断放入保存管中，盖上保存管盖。实验组皮损处编号为 PL，非皮损处编号为 PN，顺序依次为 1~25 号，正常对照组编号为 N1~N22。

1.3 DNA 提取、扩增和测序：样本中微生物 DNA 采用蛋白酶 K 裂解结合酚氯仿抽提的方法，抽提的 DNA 利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。选择 16S rDNA 基因的 V3~V4 区以及 ITS 的 ITS1 为扩增和测序片段。采用 Novaseq 6000 SP 500 Cycle Reagent Kit (Illumina USA) 在微基生物科技有限公司完成测序及分析。

1.4 统计学分析方法：采用 SPSS 20.0 软件，两组间年龄比较使用两独立样本 *t* 检验，Kruskal-Wallis 秩和检验对 α 多样性进行差异分析，ANOSIM 函数对 β 多样性 (Weighted. unifracs distance) 进行差异分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序结果：72 个样本经 16S rDNA 测序，得到优化后序列数为 2 213 034 条，平均长度 457.78 bp。72 个样本经 ITS 测序，得到优化后序列数为 2 870 904 条，平均长度 288.11 bp。

2.2 多样性分析：

2.2.1 α 多样性分析：基于 16S rDNA 测序，3 组间 ace 指数、chao 指数、shannon 指数、simpson 指数差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 ace 指数

的差异分析中，PL 组 (222.96 ± 18.38) 显著高于 PN (154.62 ± 16.05) 组以及正常对照组 (154.66 ± 16.80)；在 chao 指数差异分析中，PL 组 (222.91 ± 18.92) 高于 PN 组 (150.04 ± 16.16) 和正常对照组 (155.83 ± 17.73)。PL 组 shannon 指数 (1.99 ± 0.24) 小于 PN 组 (2.89 ± 0.17) 和正常对照组 (3.00 ± 0.14)，且 simpson 指数 (0.40 ± 0.07) 大于 PN 组 (0.17 ± 0.04) 和正常对照组 (0.12 ± 0.01)。基于 ITS 测序，PL 组 ace 指数、chao 指数、shannon 指数大于 PN 组以及正常对照组，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。simpson 指数差异无统计学意义 (图 1 见封三)。

2.2.2 β 多样性分析：细菌水平上，基于进化关系的 β 多样性 PCoA 分析结果显示，3 组样本之间的细菌群落具有差异性，差异具有统计学意义 ($R = 0.1931$, $P = 0.001$) (图 2A、2B 见封三)。真菌水平上，基于进化关系的 β 多样性 PCoA 分析结果显示，3 组样本之间的真菌群落具有差异性，差异具有统计学意义 ($R = 0.094$, $P = 0.001$) (图 2C、2D 见封三)。

3 讨论

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种异质性疾病，不同地区 AD 患者的皮肤微生物菌群特点存在差异^[3]。环境和遗传因素都被认为有助于 AD 的发展，其中个人和家族特应性疾病史是 AD 发生发展的高危因素，约 70% 的患者伴有家族特应性疾病史^[4]。AD 在发达国家儿童的发病率为 10%~20%，成人的发病率为 2%~10%。我国儿童的患病率也从 2002 年的 3% 增长到 2016 年的 13%^[5]。目前越来越多的证据表明微生物组紊乱是 AD 发病的重要因素，但利用人类微生物组治疗 AD 的能力尚未完全实现^[6]。因此，探究其潜在发病机制，根据微生物组信息并为治疗 AD 患者提供有效的诊疗方案仍然十分重要。本研究通过 16SrDNA、ITS 测序技术对闽东地区 AD 患者皮损处、非皮损处以及正常人的皮肤进行微生物测序，研究不同分组人群间的皮肤菌群差异，为 AD 的进一步研究提供了新的依据。

既往研究表明特应性皮炎患者缺乏正常的皮肤微生物多样性^[7]，我们研究了不同患者间不同微生物丰度指标之间的差异。ace 和 chao 指数反映样品中群落的丰富度，shannon 指数以及 simpson 指数反映群落的多样性，shannon 指数越高、simpson 指数越低则认为群落具有越大的多样性。本研究细

菌分析显示, PL 组 ace 指数、chao 指数高于其他组, 表明 PL 组物种的数量显著增加; shannon 指数低于其他组, 同时 simpson 指数高于其他组, 表明特应性皮炎患者皮损处细菌菌群多样性低于另外两组。由于既往研究中广泛报道了真菌在 AD 中的重要作用^[8], 因此, 我们进一步分析了不同分组间真菌多样性, 结果显示特应性皮炎患者皮损处真菌多样性高于非皮损处以及正常人。在既往的研究中广泛报道了马拉色菌属在 AD 中的重要作用, 尽管有证据表明马拉色菌属促进 AD 的发展, 但马拉色菌与 AD 的发病机制和关系仍有部分无法解释, 已有研究表明马拉色菌属诱导的 AD 会产生多种免疫原性蛋白质, 这些蛋白质会引发特异性 IgE 抗体的产生, 并可能诱导促炎细胞因子的释放^[9], 这可能是马拉色菌属促进 AD 的发展的原因之一, 但仍需要进一步研究。

尽管我们全面分析研究了闽东地区特应性皮炎患者皮肤微生物菌群多样性, 但不可避免地存在一些缺点, 例如样本较少、采样部位单一等。总而言之, 不同的皮肤微生物群落在塑造人体正常表皮状态方面发挥了重要作用, 本研究为进一步研究 AD 发病中的微生物组奠定基础, 为 AD 的治疗提供了新的研究思路。

参考文献

[1] Williams M R, Gallo R L. Evidence that Human Skin Micro-

biome Dysbiosis Promotes Atopic Dermatitis [J]. J Investigative Dermatol, 2017, 137 (12): 2460-2461.

[2] Kong H H, Oh J, Deming C, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis [J]. Genome Res, 2012, 22 (5): 850-859.

[3] Zhang E, Tanaka T, Tajima M, et al. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects [J]. Microbiol Immunol, 2011, 55 (9): 625-632.

[4] Slattery M J, Essex M J. Specificity in the association of anxiety, depression, and atopic disorders in a community sample of adolescents [J]. J Psychiatr Res, 2011, 45 (6): 788-795.

[5] Roduit C, Frei R, Depner M, et al. Phenotypes of Atopic Dermatitis Depending on the Timing of Onset and Progression in Childhood [J]. JAMA Pediatr, 2017, 171 (7): 655.

[6] Chan S, Cornelius V, Cro S, et al. Treatment Effect of Omalizumab on Severe Pediatric Atopic Dermatitis: The ADAPT Randomized Clinical Trial [J]. JAMA Pediatr, 2020, 174 (1): 29-37.

[7] Li W, Xu X, Wen H, et al. Inverse association between the skin and oral microbiota in atopic dermatitis [J]. J Invest Dermatol, 2019, 139 (8): 1779-1787. e12.

[8] 苏惠春, 姚煦, 王宝玺. 皮肤微生物群与特应性皮炎 [J]. 中华皮肤科杂志, 2016, 49 (10): 754-757.

[9] Limon J J, Skalski J H, Underhill D M. Commensal Fungi in Health and Disease [J]. Cell Host Microbe, 2017, 22 (2): 156-165.

• 临床研究 •

NDC1 基因在肝癌中的诊断及预后价值的生物信息学分析

南京医科大学附属江苏盛泽医院普外科 南京医科大学康达学院盛泽临床医学院 (苏州 215228) 吴嘉旭
胡明超 王 强 俞文渊 许 华¹

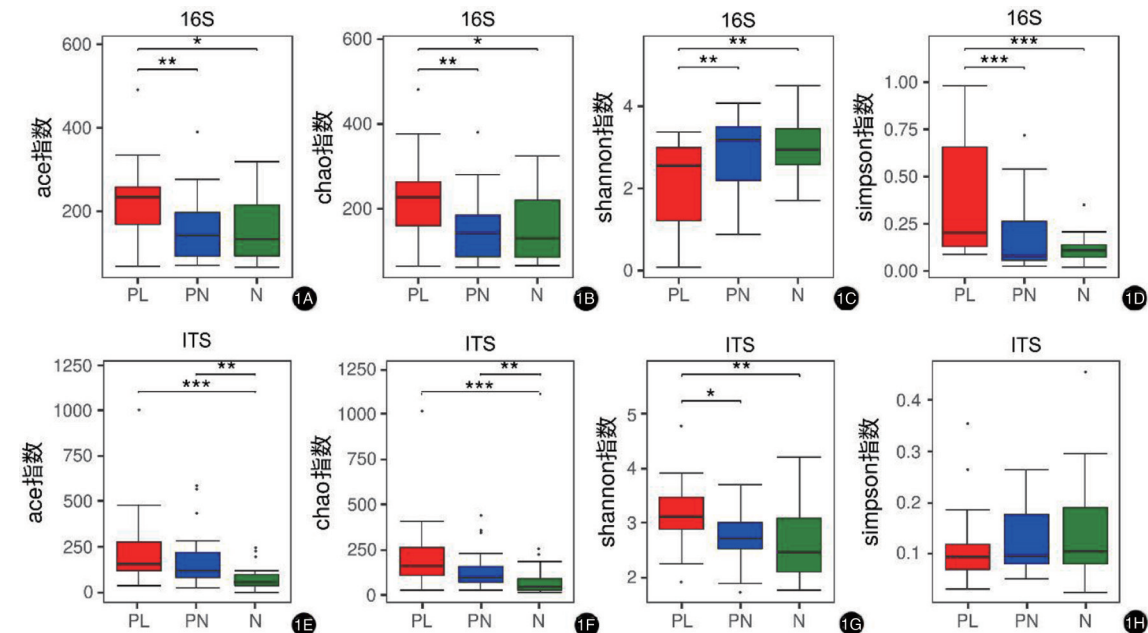
【摘 要】 目的 基于生物信息学的方法研究 NDC1 基因用于肝癌的诊断及预后评估方面的作用。**方法** 以 TCGA 数据库和 GTEx 为发现数据库, 使用软件下载所有肝癌患者以及健康人的 level 3 HTSeq-TPM 格式的 RNA 测序结果, 绘制箱式图及点图用于统计 NDC1 基因在肝癌组织及正常组织中的差异化表达情况, 并使用 GEPIA 作为验证数据库进行佐证。绘制受试者曲线来评估 NDC1 基因用于诊断肝癌的效能。根据 NDC1 基因表达量的中位数将患者区分为 NDC1 高表达和低表达两组, 研究肝癌患者的临床病理特征以及预后情况和 NDC1 基因表达的关系。绘制生存曲线, 探究 NDC1 基因的高低表达与 LIHC 患者的生存情况的关系。**结果** 肝癌患者的 NDC1 的表达量为 2.16 (1.746~2.64), 明显大于正常组织中的 1.449 (1.263~1.644), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 同样的, 在 55 对配对组织中, NDC1 基因在肝癌组织中的表达量 3.47

基金项目: 苏州市医学重点学科 (SZXK202126); 南京医科大学康达学院科研发展基金 (KD2022KYJJZD015)

1 通信作者

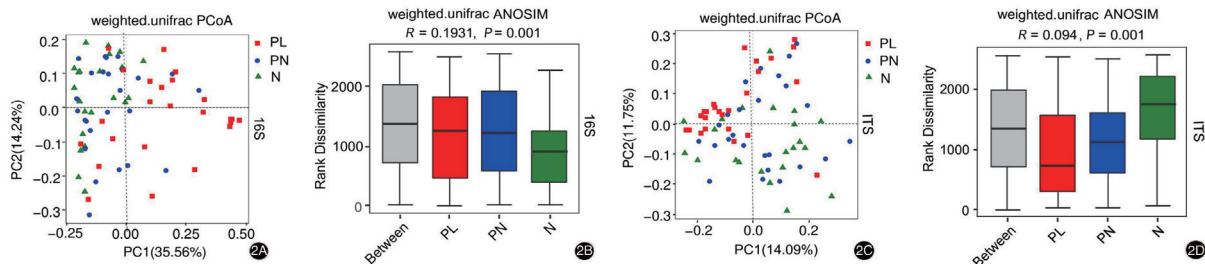
基于高通量测序技术分析特应性皮炎患者皮肤微生物菌群多样性

(见正文第 5 页)



注：16S rDNA 测序显示 PL 组 shannon 指数低于其他组；simpson 指数高于其他组。ITS 测序显示 PL 组 shannon 指数高于其他组；simpson 指数低于其他组。

图 1 α 多样性分析



注：主坐标分析法显示细菌以及真菌 β 多样性差异分析具有统计学意义。

图 2 三组样本细菌及真菌主坐标分析

三甲胺-N-氧化物协同 RAS 诱导动脉粥样硬化发展机制研究

(见正文第 96 页)

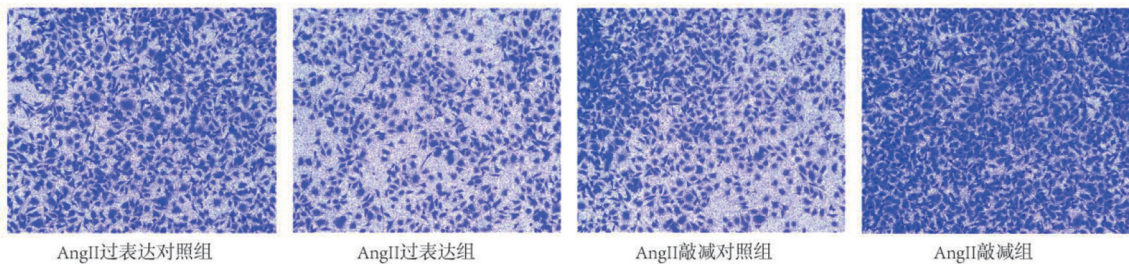


图 3 Ang II 表达变化对 TMAO 调节 HUVECs 细胞迁移的影响情况 (结晶紫染色 ×100)