

## 2 型及非 2 型支气管哮喘患者呼吸道共生微生物网络的作用特征

**【摘要】目的** 研究 2 型及非 2 型支气管哮喘（简称哮喘）患者呼吸道共生微生物网络的作用特征。**方法** 基于哮喘患者队列的前瞻性研究。采集 2021 年 5 月至 2022 年 5 月，首都医科大学附属北京朝阳医院呼吸与危重症学科收治的 55 例哮喘患者 [男 25 例，女 30 例，中位年龄 47.7 岁（年龄范围 34.3~63.0 岁）] 及来自首都医科大学附属北京朝阳医院体检中心的 12 名健康对照者的呼吸道诱导痰样本；根据呼出气一氧化氮（FeNO）水平，将哮喘患者分为高 FeNO 组 22 例（FeNO $\geq$ 40ppb，即 2 型哮喘组）、低 FeNO 组 33 例（FeNO $<$ 40ppb，即非 2 型哮喘组）。对所有呼吸道诱导痰样本进行宏基因组二代测序并进行微生物群落多样性、组成特征、共生网络特征和代谢功能预测等生物信息学分析。采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行组间比较，采用线性判别分析（LEfSe）方法比较各组间的菌群组成差异。R 语言用于微生物网络分析。此外，还采用 PICRUST 预测微生物群落的代谢功能特征。**结果** 健康对照组微生物群落中，厚壁菌门和变形菌门的占比（分别为 29%和 21%）均少于哮喘组患者（低 FeNO 组分别占 37%和 33%，高 FeNO 组分别占 42%和 26%）。低 FeNO 组的微生物网络有 64 对边，形成了 16 个群落；约 75%的节点特征向量中心度的数值在 0~0.05，25%的节点的特征向量中心度的数值在 0.10~0.45； $\kappa$ -核分解有 4 层，大约 42%的顶点在中心的 2 层。高 FeNO 组的微生物网络有 80 对边，形成了 18 个群落；81%的节点特征向量中心度的数值在 0~0.05，19%的节点的特征向量中心度的数值在 0.10~0.35； $\kappa$ -核分解有 8 层，21%的顶点位于中心的 2 层。低 FeNO 组和高 FeNO 组的主要功能差

异表现在代谢途径（包括糖类、脂类、氨基酸和能量代谢）、抗药性、生物膜传输、信号传导、胞间通讯、细胞修复中。**结论** 与非 2 型哮喘患者相比，2 型哮喘患者的呼吸道微生物菌群的  $\alpha$ -多样性更高，变形菌门的微生物含量更低，微生物网络更为聚集；两种内型哮喘患者的代谢功能预测结果有显著差异。

**【关键词】** 哮喘； 微生物组； 内型； 网络

支气管哮喘（简称哮喘）是一种慢性气道疾病。根据是否存在 2 型炎症，哮喘可分为 2 型哮喘和非 2 型哮喘，2 型哮喘以高呼出气一氧化氮（FeNO）、高嗜酸性粒细胞计数为特征 [1- 2]。这两种内型对糖皮质激素的治疗反应差别非常明显，其呼吸道微生态的特征可能是原因之一 [3]。随着宏基因组二代测序以及生物信息学的发展，两种类型患者呼吸道的不同微生态特征及其与炎症类型的关联得以被揭示 [4- 10]。比如 2 型哮喘患者的呼吸道菌群中含有更高比例的放线菌门，且其含量与嗜酸性粒细胞计数明显正相关 [11- 12]。

除了菌群组成不同，呼吸道菌群之间彼此的相互作用也和哮喘的症状和炎症类型有关，其微生物共生网络的特征对于代谢和病理过程非常重要 [13- 15]。本研究的目的是探讨 2 型和非 2 型哮喘患者呼吸道共生微生物网络的特征差异。

## 对象与方法

### 一、研究对象

基于哮喘患者队列的前瞻性研究。本研究纳入 2021 年 5 月至 2022 年 5 月，首都医科大学附属北京朝阳医院呼吸与危重症学科收治的 55 例哮喘患者及北京朝阳医院体检中心体检的 12 名健康对照者，收集其呼吸道诱导痰样本。

哮喘患者纳入标准：（1）符合 2024 版《全球哮喘管理和预防策略》 [16] 中哮喘的诊断标准；（2）患者本人完全理解并同意本临床医疗研究的目的和实

施，能配合医师完成诱导痰的采集。排除标准：（1）接受免疫抑制剂或长期类固醇激素治疗的恶性肿瘤、慢性自身免疫性疾病患者；（2）心肝脑肾等重要脏器严重受损者；（3）严重精神疾病患者；（4）妊娠或哺乳期患者。本研究已经过首都医科大学附属北京朝阳医院伦理委员会审查会批准 [（2020）425 号]，参与本研究的哮喘患者及健康对照者均签署知情同意书。

根据 FeNO 水平，再将纳入的 55 例哮喘患者再分为高 FeNO 组 22 例（FeNO  $\geq$ 40ppb [17- 18]，即 2 型哮喘组）和低 FeNO 组 33 例（FeNO <40ppb，即非 2 型哮喘组）。

## 二、诱导痰采集和肺功能的测定

诱导痰采集步骤按照指南相关内容进行 [19- 20]。首先在雾化前 10min 让患者吸入沙丁胺醇 200~400  $\mu$ g，以防止患者出现哮喘急性发作；嘱患者用清水漱口、擤鼻，以 3%氯化钠注射液对患者雾化 10~15min 后，嘱患者用清水漱口，将唾液尽量吐净，用力咳出深部的痰液到无菌容器中。如果此过程患者没有痰液咳出，则再次以 4%氯化钠注射液雾化吸入 5~10min，再次嘱患者用力咳出深部的痰液到无菌容器中。痰液咳出后及时送检。

肺功能根据《中国国家肺功能测定指南》 [21]，采用耶格 Masterscreen PFT System 肺功能仪进行测定。肺功能的测定时间为完成诱导痰操作前。

## 三、DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E. Z. N. A. <sup>®</sup> soil 试剂盒（美国 Omega Bio- tek 公司）说明书进行总 DNA 抽提，DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量；用 338F（5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3'）和 806R（5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT3'）引物对 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增，扩增程序为：9

5°C预变性 3min, 27 个循环 (95°C变性 30s, 55°C退火 30s, 72°C延伸 30s), 最后 72°C延伸 10 min (PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型)。扩增体系为 20  $\mu$ l, 4  $\mu$ l 5 $\times$ tiFastPfu 缓冲液, 2  $\mu$ l 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8  $\mu$ l 引物 (5  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ l FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板。

Illumina MiSeq 测序: 使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (美国 Axygen Biosciences 公司) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2%琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST (美国 Promega 公司) 进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台 (美国 Illumina 公司) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE2 $\times$ 300 的文库。

构建文库步骤: (1) 连接“Y”字形接头; (2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; (4) 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。

利用 Illumina 公司的 Miseq PE 300 平台进行测序 [22- 23]。

#### 四、微生物网络分析和统计学分析

采用 SPSS25.0 软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 计数资料以例 (%) 表示。组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 采用线性判别分析 (LEfSe) 方法来比较各组间的细菌组成差异, 将 P 值设为 0.05。用 R 语言 [24- 25] 运行微生物组多变量关联线性模型 (MaAsLins), 以检验微生物组与临床变量之间的关联, 包括以下 R 包: taxa [26]、ggplot2、mix Omics [27]、Tax4Fun2 [27- 28]、network [29]。R 的模块 Igraph (version 1.2.5) [30] 用于微生物网络分析。此外, 还利用 PCRUSt 平台预测了京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 中微生物群落的功能谱 [31]。

1. 菌群共存网络的构建：首先，运用 R 语言里的 `corr.test` 函数分组计算了单个组别中所有菌种之间的 Spearman 相关性系数，得到相关性系数矩阵和 P 值矩阵；并且采用 Benjamini 和 Hochberg false discovery rate (FDR) 方法矫正上述步骤中所得到的 P 值。其次，基于 Spearman 相关性矩阵和校正后的 P 值矩阵建立两组呼吸道菌群共存网络。Spearman 相关系数和校正后的 P 值的阈值分别为 0.6 和 0.001。网络中的每一个节点 (Node) 代表一个菌种，连接节点之间每一个边 (Edge) 代表各菌种之间的相关性。菌群共存网络的构建是应用 R 语言中的 `graph_from_adjacency_matrix` 函数。

2. 网络拓扑结构的基础分析：为了更好地了解所构建网络的拓扑结构，我们采用 R 语言中的 `igraph` 包中的相关函数计算并获得一系列基础的网络参数，其中包括边数 (number of edges)、节点数 (number of nodes)、连接性 (connectance)、平均度 (average degree)、平均介数 (average betweenness)、平均路径长度 (average path length)、平均最近邻度 (average nearest-neighbor degree)、直径 (diameter)、聚集系数 (clustering coefficient)、介数中心性 (betweenness centralization)、度中心性 (degree centralization)、模块性 (modularity)、模块数 (number of modules)。此外，对网络中单个节点的度和介数中心性进行计算。应用网络 k 核分解方法计算并展示了两组菌群共存网络结构。

## 结果

### 一、受试哮喘患者特征描述

表 1 列出了受试哮喘患者 (高、低 FeNO 组) 的临床指标。高 FeNO 组大多数小气道指数 [用力呼出 25%、50%、75% 肺活量的呼气流速 (MEF25、MEF50、MEF7

5) 及 MEF<sub>25</sub>/MEF<sub>75</sub>] 的数值均低于低 FeNO 组 (均 P<0.05)。高 FeNO 组的血清 IgE 和嗜酸性粒细胞计数显著高于低 FeNO 组 (均 P<0.01)。高 FeNO 组和低 FeNO 的中性粒细胞计数、体重指数、ACT 评分等方面差异无统计学意义。

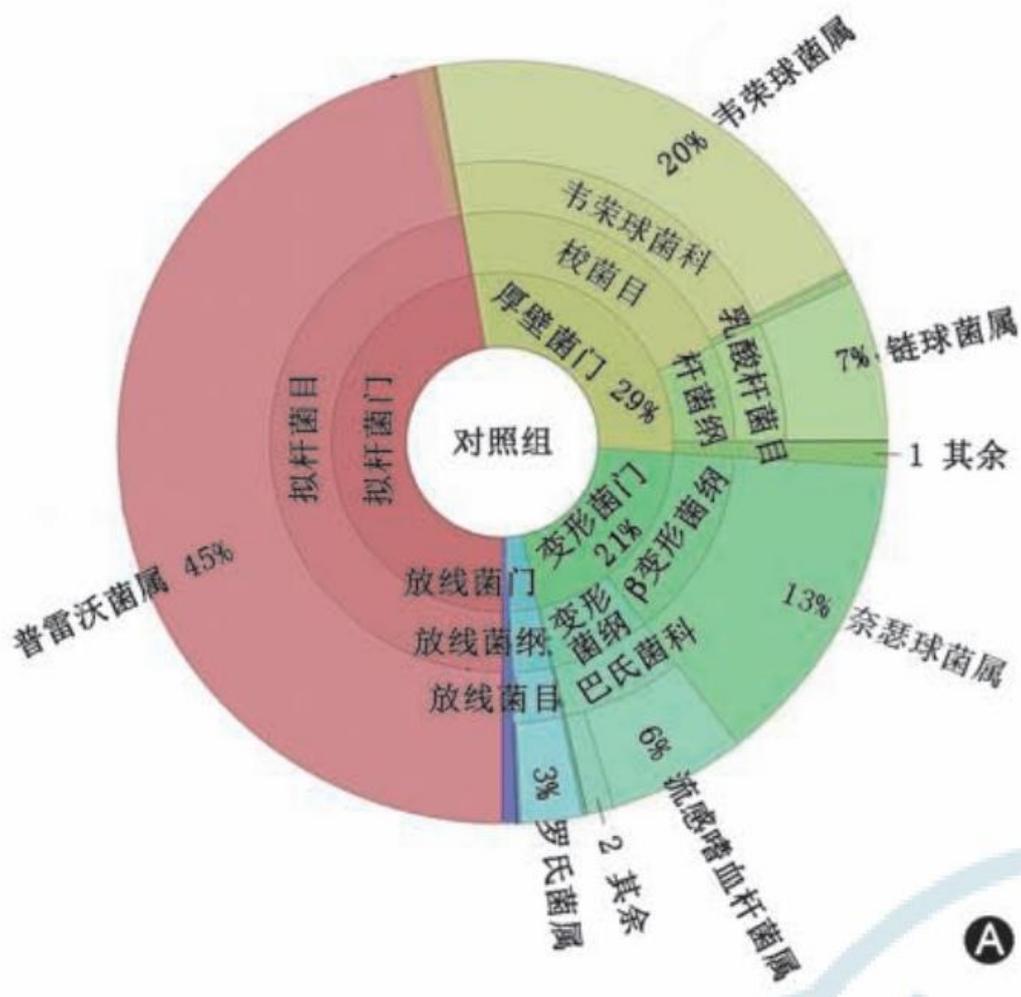
表 1 受试哮喘患者一般情况( $\bar{x} \pm s$ )

项目	高 FeNO 组	低 FeNO 组	t( $\chi^2$ )值	P 值
例数	22	33	0.00	-
年龄(岁)	46.5±12.2	48.8±14.2	1.08	0.408
男(例)	41	48	(0.00)	-
过敏(例)	100	64	(0.00)	-
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	25.66±4.39	25.35±4.19	(0.38)	0.706
FeNO(ppb)	78.41±37.28	22.24±8.42	110.02	0.001
血清 IgE( $\mu$ g/L)	441.45±390.57	206.59±176.45	98.07	0.004
嗜酸性粒细胞计数 <sup>a</sup> ( $\times 10^9$ /L)	0.83±0.69	0.29±0.25	97.42	0.005
ACT 评分(分)	20.81±3.82	22.00±3.49	0.61	0.558
AQLQ 评分(分)	83.15±19.73	87.48±14.32	0.38	0.627
肺活量(L)	3.46±0.89	3.68±0.94	0.65	0.529
FVC(L)	3.43±0.91	3.66±0.94	0.35	0.729
FEV <sub>1</sub> (L)	2.33±0.78	2.78±0.85	69.53	0.042
FEV <sub>1</sub> /FVC(%)	79.98±13.63	88.82±12.09	68.33	0.038
PEF(L/s)	6.58±2.30	7.60±2.11	0.37	0.702
MEF <sub>25</sub> (L/s)	0.57±0.31	0.91±0.62	79.38	0.003
MEF <sub>50</sub> (L/s)	2.00±1.07	2.89±1.48	70.09	0.030
MEF <sub>75</sub> (L/s)	4.34±2.21	5.81±2.56	71.42	0.029
MMEF(L/s)	1.64±1.05	2.25±1.22	74.15	0.017
白细胞计数( $\times 10^9$ /L)	8.41±2.10	7.74±1.66	0.98	0.333
中性粒细胞计数( $\times 10^9$ /L)	4.52±1.55	4.69±1.29	64.17	0.083

注:FeNO:呼出气一氧化氮;IgE:免疫球蛋白E;ACT:哮喘控制测试;AQLQ:哮喘生活质量调查问卷;FEV<sub>1</sub>:第一秒用力呼气容积;FVC:用力肺活量;FEV<sub>1</sub>/FVC:第一秒用力呼气容积与用力肺活量比值;PEF:呼气峰值流量;MEF<sub>25</sub>:用力呼出25%肺活量的呼气流速;MEF<sub>50</sub>:用力呼出50%肺活量的呼气流速;MEF<sub>75</sub>:用力呼出75%肺活量的呼气流速;MMEF:最大呼气中段流量;<sup>a</sup>缺失17例患者数据;-表示无数据

## 二、菌群组成

不同组受试人群的诱导痰菌群组成如图 1 所示。与健康对照组相比,两组哮喘患者微生物群落中观察到变形菌门的细菌丰度均更多。在门的水平,低 FeNO 组和高 FeNO 组的差异主要在厚壁菌门和变形菌门,包含了普雷沃菌属、韦荣球菌属、链球菌属、奈瑟菌属和嗜血杆菌属。在低 FeNO 组,厚壁菌门和变形菌门分别占 37%和 33%;在高 FeNO 组,厚壁菌门和变形菌门则分别了 42%和 26%。而健康对照组厚壁菌门和变形菌门的占比均少于哮喘组患者(分别为 29%和 21%)。



A



### 三、不同组别受试人群的微生物共生网络

我们以 Spearman 相关系数为基础，选择绝对值 $>0.6$  且显著性水平 $<0.001$  的关联构建了微生物共生网络。

如表 2 和图 2 所示，低 FeNO 组的微生物网络有 64 对边，形成了 16 个群落。高 FeNO 组的微生物网络有 80 对边，形成了 18 个群落。健康对照组的微生物网络有 75 对边，形成了 12 个群落。

如表 2 所示，低 FeNO 组和高 FeNO 组的微生物共生网络有较为接近的边数和节点数。但是，在一些网络参数对比上则差异明显。高 FeNO 组的微生物共生网络的所有参数都高于低 FeNO 组的微生物共生网络，表明高 FeNO 组的微生物共生网络更为密切和紧密。

**表 2** 低、高呼出气一氧化氮(FeNO)组网络拓扑结构参数比较

组别	节点数 (个)	边数(对)	群落数 (个)	平均介数	图密度
低 FeNO 组	64	122	16	20.44	0.061
高 FeNO 组	80	203	18	52.01	0.064

组别	平均度	平均边 介数	平均路径 长度	聚类 系数	平均模块 度	直径
低 FeNO 组	3.81	8.57	2.67	0.45	0.37	5.51
高 FeNO 组	5.08	15.21	3.07	0.60	0.32	5.57

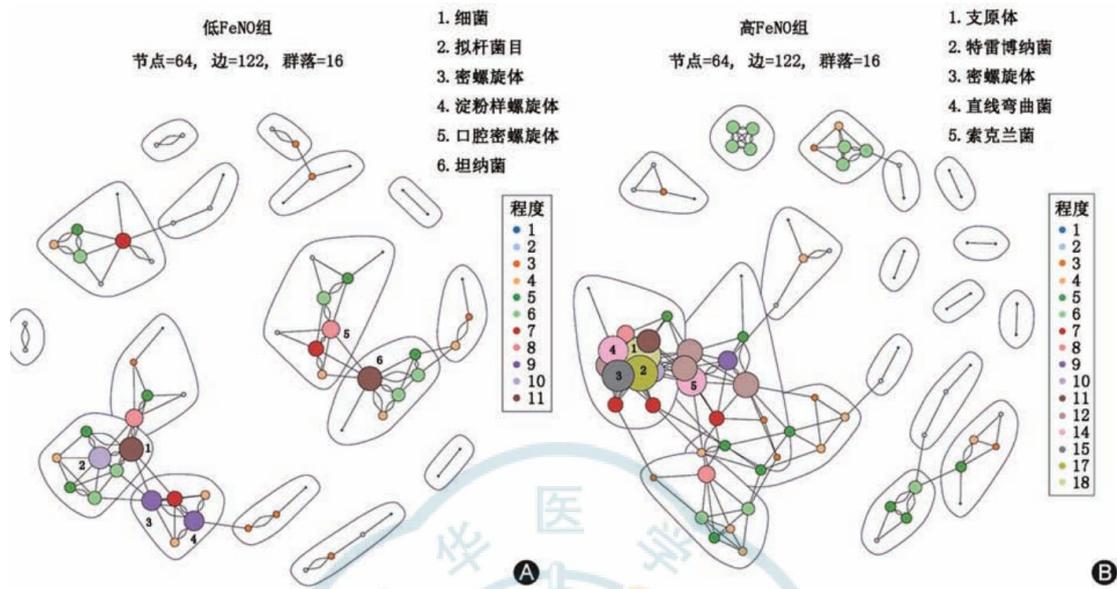


图2 低、高呼气一氧化碳氮(FeNO)组微生物共生网络 A. 低 FeNO 组; B. 高 FeNO 组

如图 3 所示，低 FeNO 网络中节点的介数中心度明显低于高 FeNO 组网络，也就是说，低 FeNO 网络中的微生物彼此之间的重要性不如高 FeNO 组网络。此外，低 FeNO 网络中，约 75% 的节点特征向量中心度的数值在  $0 \sim 0.05$ ，25% 的节点的特征向量中心度的数值在  $0.10 \sim 0.45$ 。高 FeNO 网络中，81% 的节点特征向量中心度的数值在  $0 \sim 0.05$ ，19% 的节点的特征向量中心度的数值在  $0.10 \sim 0.35$ 。即低 FeNO 组网络的微生物组分布更为集中，而高 FeNO 组网络中微生物群分布更为广泛。

$\kappa$  - 核分解结果是根据其核心性在连续的层上显示顶点。越高的层表示核心度越高，在低 FeNO 组网络中有 4 层，并且大约 42% 的顶点在中心的 2 层中。在高 FeNO 组网络中，则有 8 层，21% 的顶点位于中心的 2 层，即高 FeNO 组网络更为集中。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/166140232115011013>