

引文格式:陈红,文小凤,邓裕华,魏来,彭广华.干眼患者眼表宏基因组研究[J].眼科新进展,2017,37(2):129-132.  
doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0034

【应用研究】

# 干眼患者眼表宏基因组研究<sup>△</sup>

陈红 文小凤 邓裕华 魏来 彭广华

作者简介:陈红,女,1988年10月出生,安徽人,在读硕士研究生。研究方向:儿童眼病。联系电话:18311426245; E-mail: syjh102990@sohu.com; ORCID: 0000-0002-2079-0746

About CHEN Hong: Female, born in October, 1988. Post graduate student. Tel: 18311426245; E-mail: syjh102990@sohu.com; ORCID: 0000-0002-2079-0746

收稿日期:2016-12-15  
修回日期:2017-01-10  
本文编辑:付中静

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31271400、31470065);国家重点基础研究发展计划(编号:2013CB967001)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院 眼科(陈红,彭广华); 510060 广东省广州市,中山大学中山眼科中心,眼科学国家重点实验室(文小凤,邓裕华,魏来)

通讯作者:彭广华, E-mail: ghp@zhu.edu.cn; ORCID: 0000-0003-3813-6942. 魏来, E-mail: weil9@mail.sysu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-3300-8506

Received date: Dec 15, 2016  
Accepted date: Jan 10, 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 31271400, 31470065); National Key Basic Research Program of China (No: 2013CB967001)

From the Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA (CHEN Hong, PENG Guang-Hua), Beijing 100853, China; From the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University (WEN Xiao-Feng, DENG Yu-Hua, WEI Lai), Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Responsible author: PENG Guang-Hua, E-mail: ghp@zhu.edu.cn; ORCID: 0000-0003-3813-6942. WEI Lai, E-mail: weil9@mail.sysu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-3300-8506

健康的眼表对于正常视功能的维持极为重要。虽然眼表存在着多种抵抗微生物定植的机制,但大多数人的眼表仍存在相对稳定的微生物群落<sup>[5-6]</sup>。有研究表明微生物能够促进耐受性树突状细胞及调节性

## Study of ocular surface macro genome in dry eye patients

CHEN Hong, WEN Xiao-Feng, DENG Yu-Hua, WEI Lai, PENG Guang-Hua

【Key words】 dry eye; ocular surface microbiota; metagenomic shotgun sequencing; antibiotic resistance genes

【Abstract】 Objective To investigate the difference in ocular surface microbiota between dry eye patients and healthy subjects, and discuss the role of microbiota in dry eye. Methods Twenty cases of dry eye patients and 90 cases of healthy subjects were collected in the PLA General Hospital and Zhongshan Ophthalmic Center. The samples of conjunctiva impression cytology were collected from all subjects, and then metagenomic shotgun sequencing was performed following the DNA extraction. The differences in alpha diversity and metabolic pathways of the ocular surface microbiota between dry eye patients and healthy subjects were evaluated. Results There was no significant difference in alpha diversity of the microbial community between dry eye patients and healthy subjects ( $P = 0.13$ ). However, an increase of 15 species and a decrease of 10 species were detected on the ocular surface of dry eye patients. The enriched antibiotic resistance genes in dry eye patients were more than healthy subjects.

Conclusion Although the alpha diversity of the microbial community on ocular surface between dry eye patients and healthy subjects are not distinguishable, a significant difference could be found in relative abundance and metabolic pathways, suggest that these specific microbiome may be related to the pathogenesis and disease progression of dry eye.

【中图分类号】 R777.34

【关键词】 干眼;眼表微生物组;宏基因组测序;抗性基因

【摘要】 目的 通过比较干眼患者和健康受试者眼表宏基因组的异同探讨眼表微生物组的改变在干眼发病机制中的作用。方法 在解放军总医院眼科和中山大学中山眼科中心收集干眼患者20例及健康受试者90名。对所有受试者双眼进行结膜印迹细胞样本采集,提取核酸后进行宏基因组测序。通过计算Shannon指数比较两者微生物群落 $\alpha$ 多样性的差异;对两者微生物种群的相对丰度及代谢途径进行生物信息学分析。并对微生物中的抗生素抗性基因进行比对。结果 干眼患者眼表微生物的 $\alpha$ 多样性与健康受试者相比差异无统计学意义( $P = 0.13$ )。干眼患者眼表15种微生物的相对丰度较高,健康受试者10种微生物的相对丰度较高,且在代谢途径上存在着差异。干眼患者眼表微生物中的抗生素抗性基因明显多于健康受试者。结论 虽然干眼患者眼表微生物的多样性与健康受试者相似,但某些特定微生物种群的相对丰度及代谢途径存在特征性的改变,表明这些特定的微生物种群可能与干眼的发病机制有关。

近年来干眼在我国的发病率逐渐上升,已成为影响人们生活质量的一类常见的重要眼表疾病<sup>[1]</sup>。虽然干眼的发病机制尚不明确,但很多研究证实,免疫介导的炎症反应在干眼的发生发展中起着重要的作用<sup>[2-4]</sup>,抗炎治疗已被纳入干眼的治疗规范中。眼表是眼内组织和外部环境之间天然的生物屏障,T细胞的产生,通过NKT细胞调节细胞因子分泌,从而发挥免疫调控作用<sup>[7-8]</sup>。目前微生物组的研究多集中于肠道<sup>[9-10]</sup>,对于眼表微生物组的报道尚少。因而,本研究通过宏基因组测序对干眼患者和健康

受试者眼表微生物组的生物群落多样性、相对丰度及代谢途径进行比较,并分析其抗生素抗性基因,从而揭示眼表微生物组的改变在干眼发病机制中的作用,为干眼的治疗提供新的思路和靶点。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 研究对象** 2014年9月至2016年1月在解放军总医院眼科门诊以及中山大学中山眼科中心门诊,各由一名经过标准化训练的研究人员,共收集20例(40眼)干眼患者和同期90名(180眼)健康受试者。干眼的诊断标准采用中华医学会眼科学分会角膜病学组达成的干眼临床诊疗专家共识(2013年)<sup>[1]</sup>。排除标准:有其他眼部疾病、过敏性疾病及全身性疾病;近期使用过激素或者抗生素类药物;近期配戴过角膜接触镜。本研究通过伦理委员会审查,所有受试者均自愿参加并签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 爱尔凯因滴眼液(爱尔康公司,美国),硫酸新霉素滴眼液(中山眼科中心自制),结膜印迹试纸(Millipore公司,美国;0.45  $\mu\text{m}$ , REF: HAWP01300), MasterPure 核酸提取试剂盒(Epicentre公司,英国),Bioruptor 非接触式超声破碎仪(Diagenode公司,比利时),LightCycler 96 荧光定量PCR仪(Roche公司,德国),KAPA LTP 文库构建试剂盒(Kapa公司,美国),HiSeq PE Cluster Kit v4和HiSeq SBS V4 250 Cycle Kit 测序试剂盒、HiSeq 2500 测序仪(Illumina公司,美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 结膜印迹细胞样本的采集** 受试者双眼滴爱尔凯因滴眼液,1~3 min后嘱受试者双眼向上看,用无菌镊取无菌的结膜印迹试纸贴于受试者眼球下方的球结膜,嘱受试者勿眨眼,10 s后取出印迹试纸置于无菌的离心管中。采用同样的方法对受试者另一眼进行样本采集。样本采集结束后,受试者双眼滴硫酸新霉素滴眼液。

**1.2.2 结膜印迹细胞样本核酸的提取** 按 MasterPure 核酸提取试剂盒说明书行结膜印迹细胞样本DNA提取。样本中加入300  $\mu\text{L}$  裂解液和1  $\mu\text{L}$  蛋白酶K,涡旋10 min后65  $^{\circ}\text{C}$  孵育15 min;加入5  $\mu\text{g}$  核糖核酸酶A混匀,去除RNA,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育30 min后置于冰上3~5 min。加入150  $\mu\text{L}$  MPC蛋白沉淀剂,用力涡旋10 s后,10 000 g,4  $^{\circ}\text{C}$  离心10 min 沉淀蛋白。离心后取上清,加500  $\mu\text{L}$  异丙醇,翻转混匀30~40次后4  $^{\circ}\text{C}$  离心10 min 沉淀DNA。体积分数70%乙醇洗2次,将DNA沉淀溶解于15  $\mu\text{L}$  无菌水中。

### 1.2.3 宏基因组测序和测序数据的处理

**1.2.3.1 宏基因组测序** 取100 ng DNA作为起始量,使用超声破碎仪将其打断为300~400 bp的DNA片段,按照KAPA LTP文库构建试剂盒的说明书进行DNA测序文库的构建。使用HiSeq PE Cluster Kit v4和HiSeq SBS V4 250 Cycle Kit 测序试剂盒

在HiSeq2500测序平台进行宏基因组测序。

**1.2.3.2 测序数据分析** (1)原始数据的预处理,首先通过FastQC软件对所有的读长进行质量控制。使用Fastx toolkit软件去除低质量、重复的读长以及可能的接头序列。使用HiSAT2<sup>[11]</sup>和DeconSeq<sup>[12]</sup>软件去除人类的读长从而获得非人类的序列。(2)测序数据分析,使用BWA0.7.5a<sup>[13]</sup>软件将非人的序列在我们定制的微生物参考基因组数据库中进行比对,包含了1432种2974株细菌的基因组,4984株病毒的基因组以及68种75株真菌的基因组。根据种水平的分类单位对测序序列进行分类,每个种类水平微生物相对丰度的计算是将每个样本根据其基因组的大小以及比对上的总的微生物读长进行标准化以后,用每个微生物种类中比对上的总的读长的比例来表示。在每个样本中取500条微生物序列计算Shannon指数<sup>[14]</sup>来表示其微生物群落 $\alpha$ 多样性;使用DIAMOND软件<sup>[15]</sup>将非人读长在抗生素抗性基因数据库(antibiotic resistance gene database, ARDB)中进行比对;使用HUMAN2软件<sup>[16]</sup>计算微生物KEGG通路的丰度。样本间微生物种类和功能通路的差异用LDA效应值(通过LefSe软件计算)<sup>[17]</sup>表示。干眼患者眼表微生物组中分类的网络图使用Cytoscape软件(v3.3.0)绘制。

**1.3 统计学分析** 本研究采用SPSS 17.0统计学软件分析数据。对于干眼患者与健康受试者年龄、眼表微生物相对丰度比较采用 $t$ 检验;对于干眼患者与健康受试者眼表微生物群落 $\alpha$ 多样性的比较采用非参数Mann-Whitney  $U$ 检验,对微生物富集抗体基因比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 干眼患者和健康受试者的一般临床资料** 本研究共纳入20例(40眼)干眼患者,其中男5例,女15例,平均年龄为51.1岁;90名(180眼)健康受试者,其中男44例,女46例,平均年龄为46.2岁。干眼患者与健康受试者的平均年龄比较差异无统计学意义( $P = 0.59$ )。

**2.2 干眼患者和健康受试者眼表微生物宏基因组测序数据的质量** 对纳入本研究的受试者双眼进行结膜印迹细胞样本采集,干眼患者组共收集40份结膜印迹细胞样本,健康受试者共收集180份结膜印迹细胞样本。对220份结膜印迹细胞样本进行宏基因组测序后,干眼患者总的读长数的平均值为73 971 091,其中非人读长的平均百分比为2.8%;健康受试者总的读长数的平均值为45 470 847,其中非人读长的平均百分比为3.3%。

**2.3 干眼患者与健康受试者眼表微生物组的群落多样性** 干眼患者眼表微生物群落Shannon指数的平均值( $1.376 \pm 0.387$ )高于健康受试者( $1.487 \pm 0.641$ ),表明干眼患者眼表微生物群落的 $\alpha$ 多样性高于健康受试者,但差异无统计学意义( $P = 0.13$ ,图

1),表明干眼患者与健康受试者眼表微生物的群落构成差异无统计学意义。

图1 干眼患者与健康受试者眼表微生物群落α多样性(Shannon 指数)的比较

2.4 干眼患者与健康受试者眼表微生物组中差异显著的微生物种类及其代谢通路 宏基因组测序结果显示,两组眼表微生物组中具有显著差异的微生

物中,干眼患者眼表 15 种微生物的相对丰度较高,健康受试者眼表 10 种微生物的相对丰度较高(图 2),无共同的优势种群,表明在干眼患者眼表微生物组中,这些特定微生物种群的相对丰度与健康受试者存在着差异。

通过对这些微生物种群参与的代谢途径进行分析发现,干眼患者眼表微生物组中,路邓葡萄球菌与其他微生物共享的代谢途径最多;而在健康受试者眼表微生物组中,缓症链球菌参与的代谢途径最多。

2.5 干眼患者与健康受试者眼表微生物组中抗性基因差异 在干眼患者及健康受试者眼表微生物组中富集的抗生素抗性基因中(图 3),干眼患者眼表微生物中的抗生素抗性基因明显多于健康受试者,在干眼患者中,LDA 效应值 >2.5 的抗性基因多达 44 个,而健康受试者中仅 15 个。在干眼患者眼表微生物组中出现最多的抗生素抗性基因是 BL2b-tem1,在健康受试者眼表微生物中最多的抗性基因是大环内酯类抗性基因(ErmX)。

图2 干眼患者与健康受试者眼表微生物组中具有差异的代表性微生物种类及其代谢通路的网络图。不同颜色的结点代表不同门、不同种属的微生物;结点的大小表示该结点与其他结点共享代谢途径的多少,结点之间的连线代表两者共享的代谢通路

### 3 讨论

健康人的眼表定居着相对稳定的微生物群落,这些微生物对于健康眼表以及正常视功能的维持具有极其重要的作用。近年来,随着二代测序技术的应用和普及,使我们对眼表微生物的认识更加深入和全面。越来越多的研究表明,眼部许多疾病的发生发展,如葡萄膜炎<sup>[18]</sup>、青光眼<sup>[19]</sup>以及眼部的炎症性疾病<sup>[20]</sup>等,与微生物密切相关。微生物能够促进耐受性树突状细胞及调节性 T 细胞的产生,通过 NKT 细胞调节细胞因子的分泌,从而发挥其免疫调控的作用<sup>[7-8]</sup>。

GRAHAM 等<sup>[21]</sup>采用传统的细菌培养技术和 16S rDNA PCR 技术比较干眼患者和正常人眼表细菌组成的差异,发现 *Bacillus sp.* 和 *Klebsiella oxytoca* 仅存在于干眼患者的眼表,表明干眼患者眼表的微生物组成发生了改变。然而传统的培养技术和 16S rDNA PCR 技术对于微生物的鉴别能力有限,而且不能识别新的物种。因而,本研究采用宏基因组测序技术对 20 例干眼患者和 90 名健康受试者眼表微生物组的生物群落多样性、相对丰度及代谢途径进行比较,并对其抗生素抗性基因进行分析,从而探讨眼表微生物组的改变在干眼发病机制中的作用。

本研究结果显示,干眼患者与健康受试者眼表微

有关,同时表明眼表微生物的生态平衡对于维持健康眼表的重要作用,其具体机制尚待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识 (2013 年). 中华眼科杂志 [J]. 2013, 49(1): 73-75. CORNEAL DISEASE GROUP OF OPHTHALMOLOGICAL SOCIETY, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Experts consensus about clinical diagnosis and treatment of dry eye [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49(1): 73-75.
- [2] STEVENSON W, CHAUHAN SK, DANA R. Dry eye disease; an immune-mediated ocular surface disorder [J]. *Arch Ophthalmol*, 2012, 130(1): 90-100.
- [3] NA KS, HWANG KY, LEE HS, CHUNG SH, MOK JW, JOO CK. Wakayama symposium: interface between innate and adaptive immunity in dry eye disease [J]. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15(Suppl 1): 159.
- [4] STEM ME, SCHAUMBURG CS, PFLUGFELDER SC. Dry eye as a mucosal autoimmune disease [J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(1): 19-41.
- [5] ZEGANS ME, VAN GELDER RN. Consideration in understanding the ocular surface microbiome [J]. *Am J Ophthalmol*, 2014, 158(3): 420-422.
- [6] MILLER D, IOVIENO A. The role of microbial flora on the ocular surface [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009, 9(5): 466-470.
- [7] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, ENDO TA, NAKATO G, TAKAHASHI D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. *Nature*, 2013, 504(7840): 446-450.
- [8] ARPAIA N, AMPBELL C, FAN X, DIKIY S, VAN DVJ, DEROOS P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation [J]. *Nature*, 2013, 504(7480): 451-455.
- [9] MASLOWSKI KM, VIEIRA AT, NG A, KRANICH J, SIERRO F, YU D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 [J]. *Nature*, 2009, 461(7268): 1282-1286.
- [10] SCHIRMER M, SMEKENS SP, VLAMAKIS H, JAEGER M, OOSTING M, FRANZOSA EA, et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity [J]. *Cell*, 2016, 167(4): 1125-1136.
- [11] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [12] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17288.
- [13] LL H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [14] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, HALL JR, HARTMANN M, HOLLISTER EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [15] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [16] ABUBUCKER S, SEQATA N, GOLL J, SCHUBERT AM, IZARD J, CANTAREL BL, et al. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome [J]. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(6): e1002358.
- [17] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60.
- [18] HORAI R, ZARATE-BLADES CR, DILLENBURG-PILLA P, CHEN J, KIELCZEWSKI JL, SILVER PB, et al. Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged Site [J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 343-353.
- [19] ASTAFUROV K, ELHAWY E, REN L, DONG CQ, IBOIN C, HYMAN L, et al. Oral microbiome link to neurodegeneration in glaucoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e104416.
- [20] MILLER D, IOVIENO A. The role of microbial flora on the ocular surface [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009, 9(5): 466-470.
- [21] GRAHAM JE, MOORE JE, JIRU X, MOORE JE, GOODALL EA, DOOLEY JSG, et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5616-5623.
- [22] FRANK KL, DEL POZO JL, PATEL R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(1): 111-133.

图3 干眼患者与健康受试者眼表微生物组中富集的抗性基因比较。横坐标为 LDA 效应值,表示具有差异的抗性基因的富集程度;纵坐标为健康受试者和干眼患者眼表微生物组中富集的抗性基因的名称;绿色为干眼患者眼表微生物组中富集的抗性基因,红色为健康受试者眼表微生物组中富集的抗性基因

生物组的群落构成较为相似,差异无统计学意义。然而干眼患者眼表 15 种微生物的相对丰度较高,健康受试者 10 种微生物的相对丰度较高;同时在干眼患者的眼表微生物组中,路邓葡萄球菌与其他微生物共享的代谢途径最多。路邓葡萄球菌属于凝固酶阴性葡萄球菌,通常被认为是人体皮肤常居菌,由于具有多种潜在的毒力因子,导致比其他的凝固酶阴性葡萄球菌具有更高的致病性<sup>[22]</sup>。而在健康受试者眼表微生物组中,缓症链球菌参与的代谢途径最多。这表明虽然干眼患者眼表微生物的多样性与健康受试者相似,但某些特定种属的微生物在相对丰度及代谢途径上存在着显著的差异。

虽然抗生素药物是目前治疗感染性疾病最有效的药物,但其在诱导致病菌产生耐药性的同时,可引起正常菌群产生耐药性。本研究中干眼患者眼表微生物中的抗生素抗性基因显著增多,可能与干眼患者中抗生素药物的使用量较高有关,提示在干眼患者的临床治疗中,抗生素药物的应用需谨慎。

综上所述,本研究表明虽然干眼患者眼表微生物的多样性与健康受试者相似,但某些特定微生物种群的相对丰度及其代谢途径存在特征性的改变,提示这些特定的微生物种群可能与干眼的发病机制