



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

吸烟对下呼吸道微生物菌群结构的影响研究

王丽娜^{1,2}, 卢震钰², 王颖², 李媛², 云春梅², 孙德俊^{1,2}, 高笑宇²

【摘要】 背景 随着高通量测序技术的发展, 研究者们发现下呼吸道有大量微生物菌群定植。研究显示, 吸烟对下呼吸道微生物菌群结构及组成有显著影响, 且其变化可能与肺部疾病有关, 但其具体机制尚不清楚。目的 通过痰液微生物高通量测序技术分析吸烟对下呼吸道微生物菌群结构的影响, 以预测其对机体生命活动的影响。方法 选取2018年10月至2019年10月于内蒙古自治区人民医院健康体检中心招募的志愿者55例为研究对象。按照吸烟情况, 将研究对象分为吸烟组(22例)和不吸烟组(33例)。采用高通量测序技术分析痰液微生物, 分析吸烟对微生物丰度与菌群结构组成的影响、吸烟对微生物菌群结构的影响、差异微生物间的相关性及预测差异微生物的功能。结果 吸烟组 Shannon 指数高于不吸烟组, Simpson 指数低于不吸烟组 ($P < 0.05$)。Adonis 检验及主成分分析(PCA)结果显示, 吸烟组与不吸烟组 β 多样性指数比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。韦恩图分析结果显示, 吸烟组和不吸烟组共有菌群1146个, 不吸烟组独有菌群1080个, 吸烟组独有菌群841个。在纲水平上, 按照菌群相对丰度降序排列, 差异菌群前5位分别是芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、梭杆菌纲(*Fusobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)。纲水平微生物在吸烟组中的优势菌群为:*Bacilli*、*Bacteroidia*、*Fusobacteriia*。在属水平上, 按照菌群相对丰度降序排列, 差异菌群前5位分别是链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)。属水平微生物在吸烟组中的优势菌群为:*Streptococcus*、*Prevotella*、*Porphyromonas*。吸烟组和不吸烟组下呼吸道共有1纲、2目、1科、8属及8种差异微生物。其中吸烟组增加的菌群为 *Selenomonadales* 目、巨球形菌属(*Megasphaera*)、*Faucicola* 属、*Sphaerochaeta* 属、*Shuttleworthia* 属、*Anaeroglobus* 属、巨球形菌(*Megasphaera micronuciformis*)、*Spirochaeta canine oral taxon 379*、未分类的普氏菌(*Uncultured Prevotella*)、*Prevotella sp. oral clone FW035*; 不吸烟组增加的菌群为鞘脂杆菌纲(*Sphingobacteriia*)、鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*)、噬几丁质科(*Chitinophagaceae*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)、弧菌属(*Vibrionimonas*)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、真口腔普雷沃氏菌(*Prevotella veroralis*)、*Catonella sp. oral clone FL037*、噬淀粉密螺旋体(*Treponema amylovorum*)、咽峡链球菌(*Streptococcus anginosus*)。吸烟组和不吸烟组的差异微生物(属水平)间均呈正相关($r \geq 0.6$)。吸烟组和不吸烟组主要在物质合成、降解和运输相关通路上存在差异。吸烟组功能富集的生命活动包括: 安沙霉素类生物合成、赖氨酸生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、泛酸盐和辅酶A生物合成、蛋白运输等; 不吸烟组主要富集的生命活动包括: 甲苯降解、霍乱弧菌致病循环、柠檬烯和蒽烯降解、光合作用、二噁英降解等。结论 吸烟能够增加下呼吸道微生物菌群相对丰度, 影响微生物菌群结构组成, 改变相关物质合成、降解和运输通路, 吸烟暴露下下呼吸道微生物组的功能改变可能会影响宿主的内环境稳态, 打破体内免疫系统的平衡, 从而引发肺部疾病。

【关键词】 吸烟; 呼吸系统; 微生物群

【中图分类号】 R 163 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.008

王丽娜, 卢震钰, 王颖, 等. 吸烟对下呼吸道微生物菌群结构的影响研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2022, 30(1): 70-77. [www.syxnf.net]

WANG L N, LU Z Y, WANG Y, et al. Effect of smoking on microflora structure of lower respiratory tract [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2022, 30(1): 70-77.

Effect of Smoking on Microflora Structure of Lower Respiratory Tract WANG Lina^{1,2}, LU Zhenyu², WANG Ying², LI Yuan², YUN Chunmei², SUN Dejun^{1,2}, GAO Xiaoyu²

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960013); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2019PT350001); 中央引导地方科技发展资金项目(ZYZ20200486); 内蒙古自治区人民医院博士科研启动资金(2019BS08); 2017年度内蒙古自治区卫生计生科研计划项目(201703001)

1.014000 内蒙古自治区包头市, 内蒙古科技大学包头医学院 2.010017 内蒙古自治区呼和浩特市, 内蒙古自治区人民医院国家卫生健康委员会慢阻肺诊治重点实验室 内蒙古自治区呼吸疾病重点实验室

通信作者: 高笑宇, E-mail: xiaoyugao2015@hotmail.com

1. Baotou Medical College, Science & Technology of Inner Mongolia University, Baotou 014000, China

2. Key Laboratory of National Health Commission for the Diagnosis & Treatment of COPD/Inner Mongolia Key Laboratory of Respiratory Diseases, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China

Corresponding author: GAO Xiaoyu, E-mail: xiaoyugao2015@hotmail.com

【 Abstract 】 **Background** With the development of high-throughput sequencing technology, a large microflora colonization of the lower respiratory tract has been found. Studies have shown that smoking has a significant effect on the structure and composition of the lower respiratory tract microflora and that changes may be associated with lung disease, but the exact mechanism is unclear. **Objective** To analyze the effect of smoking on microflora structure of lower respiratory tract by high-throughput sequencing of sputum microorganisms to predict its impact on the vital activity of the organism. **Methods** Fifty-five volunteers recruited at the Health Examination Center of the Inner Mongolia People's Hospital from October 2018 to October 2019 were selected as the study subjects. The study subjects were divided into smoking group (22 cases) and non-smoking group (33 cases) according to their smoking status. High-throughput sequencing technology was used to analyze sputum microorganisms, the effects of smoking on microbial abundance and flora structural composition, the effects of smoking on microbial flora structure and correlation between differential microorganisms were analyzed, and the function of differential microorganisms was predicted. **Results** The Shannon index in the smoking group was higher than that in the non-smoking group, and the Simpson index was lower than that in the non-smoking group ($P < 0.05$). Adonis test and principal component analysis (PCA) showed that there was a statistically significant difference in the β diversity index between the smoking group and the non-smoking group ($P < 0.05$). The results of the Wayne plot analysis showed that there were 1 146 floras in the smoking and non-smoking groups, 1 080 unique floras in the non-smoking group, and 841 unique floras in the smoking group. At class level, in descending order of relative abundance of the flora, the top 5 differential floras were *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Fusobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria*. The dominant groups of microorganisms at the class level in the smoking group were: *Bacilli*, *Bacteroidia*, and *Fusobacteriia*. At the genus level, the top 5 differential groups in descending order of relative abundance were *Streptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Neisseria*. The dominant groups of genus-level microorganisms in the smoking group were *Streptococcus*, *prevotella*, and *Porphyromonas*. There were one class, two orders, one family, eight genera and eight differential microorganisms in the lower respiratory tract of the smoking and non-smoking groups. The increased groups in the smoking group were the order *Selenomonadales*, the genera *Megasphaera*, *Faucicola*, *Sphaerochaeta*, *Shuttleworthia*, *Anaeroglobus*, *Megasphaera micronuciformis*, *Spirochaeta canine oral taxon 379*, *Uncultured Prevotella*, and *Prevotella sp. oral clone FW035*; the increased groups in the non-smoking group were *Sphingobacterium class*, *Sphingobacteriales* order, *Chitinophagaceae* family, *Burkholderia*, *Vibrionimonas* genus, *Ralstonia* genus, *Prevotella veroralis*, *Catonella sp. oral clone FL037*, *Treponema amylovorum*, and *Streptococcus anginosus*. There was a positive correlation between the differential microorganisms (genus level) in both the smoking and non-smoking groups ($r \geq 0.6$). The smoking and non-smoking groups differed mainly in the pathways related to substance synthesis, degradation and transportation. Life activities that were functionally enriched in the smoking group included: biosynthesis of ansamycins and lysine, mutual transformation of pentose and glucuronic acid, biosynthesis of pantothenate and coenzyme A, and protein export, etc.; life activities that were mainly enriched in the non-smoking group included: toluene degradation, pathogenic cycle of *V. cholerae*, degradation of limonene and pinene, photosynthesis, and dioxin degradation, etc. **Conclusion** Smoking can increase the relative abundance of lower respiratory microbiota, affect the structural composition of microflora, and change the synthesis, degradation and transportation pathways of related substances, and functional changes of respiratory microbiome exposed to cigarette smoking may affect physiological homeostasis of hosts, disrupt the balance of the immune system in vivo, and thus cause lung diseases.

【 Key words 】 Smoking; Respiratory system; Microbiota

吸烟每年造成约 700 多万人死亡, 已成为全球重要公共卫生问题之一^[1]。世界卫生组织估计, 全世界每天死于吸烟者达 8 000 人; 在发达国家中, 吸烟与 80%~90% 肺癌患者的死亡有关, 与 75% 支气管炎及肺气肿患者的死亡有关, 与 25% 心脏病患者的死亡有关^[2]。研究发现, 30% 癌症患者的死亡与吸烟有关^[3]。在我国, 吸烟者已超过 3 亿人, 每年死于烟草相关疾病的人数高达百万^[4]。

香烟烟雾通过口腔进入气道扩散至肺部, 由香烟烟

雾引发的机体改变从上、下呼吸道开始。痰液是机体自然状态下的气道分泌物, 具有丰富的细胞和生化物质成分, 能够客观反映气道状态以及肺部生理学特征。研究表明, 微生物可通过“肺-肠轴”联合作用影响机体的病理生理状态, 从而导致机体疾病的易感性^[5]。本研究通过痰液微生物高通量测序技术分析吸烟对下呼吸道微生物菌群结构的影响, 以预测其对机体生命活动的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 10 月至 2019 年 10 月于

内蒙古自治区人民医院健康体检中心招募的志愿者 55 例为研究对象。其中男 30 例,女 25 例;年龄 18~65 岁,平均 (46.1 ± 11.6) 岁。纳入标准:(1)近 1 个月内未使用抗生素或免疫抑制剂;(2)年龄 18~70 岁;(3)近 4 周无发热、咳嗽和上呼吸道症状等急性呼吸道疾病;(4)对本研究知情同意,并签署知情同意书。排除标准:(1)已知有任何肺部疾病史或肺功能检测异常史者;(2)有严重的心脏、消化、神经、内分泌系统疾病者。按照吸烟情况,将研究对象分为吸烟组(22 例)和不吸烟组(33 例),其中吸烟的定义为一生中连续或累积吸烟 6 个月或以上^[6]。吸烟组中男 22 例,女 0 例;年龄 30~66 岁,平均 (51.9 ± 9.8) 岁。不吸烟组中男 8 例,女 25 例;年龄 17~56 岁,平均 (42.2 ± 11.1) 岁。吸烟组男性占比 ($\chi^2=30.556, P < 0.001$)、年龄 ($t=-3.331, P=0.002$) 高于不吸烟组,差异有统计学意义。本研究经内蒙古自治区人民医院伦理委员会批准。本研究对象无职业暴露,生活燃料主要以天然气和电为主,无生物燃料暴露。

1.2 痰液微生物高通量测序技术

1.2.1 样本采集与处理 参考文献[7]对研究对象进行痰诱导,取 0.3 g 痰栓,加入 0.1% 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)混匀,37 °C 水浴处理 15 min,室温 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 7 cm),弃上清液,将沉淀置于 -80 °C 冰箱保存待用。

1.2.2 DNA 提取与测序 使用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组总 DNA,将其寄送至上海天昊生物科技有限公司进行微生物扩增子测序,该技术在 Illumina HiSeq 2000 平台上进行操作。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验;计数资料以相对数表示,组间比较采用 χ^2 检验。 α 多样性指数(包括 Shannon 指数和 Simpson 指数,用于度量微生物菌群丰度和多样性)、差异微生物比较采用 Wilcoxon rank-sum test 秩和检验。 β 多样性指数(用于测度群落的物种多样性沿着环境梯度变化的速率或群落间物种组成的多样性)比较采用 Adonis 检验,基于 Bray-Curtis 距离进行主成分分析(principal component analysis, PCA),采用散点图表示微生物菌群结构的多样性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用韦恩图表示吸烟组和不吸烟组共有和独有的菌群数量。采用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验筛选不同分组间菌群相对丰度存在显著差异的物种,用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)评估每个菌群相对丰度差异显著的物种的效应值(即 LDA 值,默认进行 log 以 10 为底的对数转化,绝对值越大则越易区分组别)(以 $|LDA \text{ 值}| > 2$ 且 $P < 0.05$

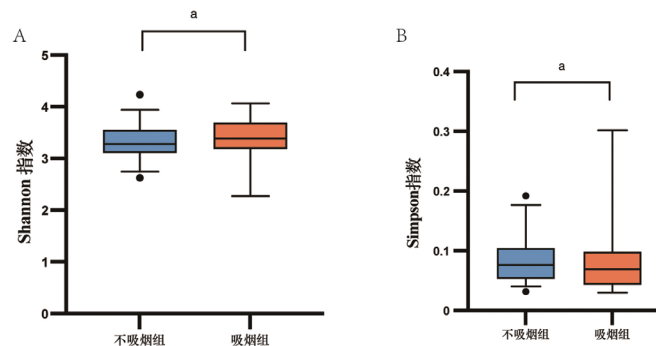
作为差异筛选阈值)。优势物种网络图分析说明:选择至少在 60% 的样本中出现的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU),计算物种之间的 Pearson 相关系数,选择 $P < 0.05$ 的相关 OTU。功能预测分析中,对组间菌群相对丰度差异显著的功能基于京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库中富集的通路绘制条形图。

2 结果

2.1 吸烟对微生物丰度与菌群结构组成的影响 吸烟组 Shannon 指数高于不吸烟组 ($\chi^2=0.418, P=0.016$), Simpson 指数低于不吸烟组 ($\chi^2=0.458, P=0.026$),差异有统计学意义,见图 1。Adonis 检验及 PCA 结果显示,吸烟组与不吸烟组 β 多样性指数比较,差异有统计学意义 ($R^2=0.096, P=0.048$),见图 2。韦恩图分析结果显示,吸烟组和不吸烟组共有菌群 1 146 个,不吸烟组独有菌群 1 080 个,吸烟组独有菌群 841 个,见图 3。

2.2 吸烟对微生物菌群结构的影响 在纲水平上,按照菌群相对丰度降序排列,差异菌群分别是芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、梭杆菌纲(*Fusobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、厌氧菌纲(*Negativicutes*)、梭菌纲(*Clostridia*)、黄杆菌纲(*Flavobacteria*)以及其他纲。纲水平微生物在吸烟组中的优势菌群为:*Bacilli*(不吸烟组占 31.27%,吸烟组占 30.19%)、*Bacteroidia*(不吸烟组占 28.79%,吸烟组占 29.33%)、*Fusobacteriia*(不吸烟组占 5.96%,吸烟组占 6.11%),见图 4A。

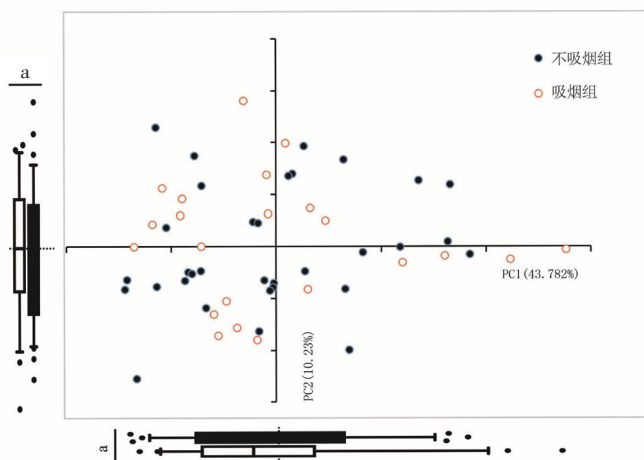
在属水平上,按照菌群相对丰度降序排列,差异菌群分别是链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、



注: A 为 Shannon 指数, B 为 Simpson 指数; ^a 表示 $P < 0.05$

图 1 吸烟组与不吸烟组 α 多样性指数比较的箱式图

Figure 1 Box plot of α diversity index comparison between smoking group and non-smoking group



注: 横坐标 (PC1) 和纵坐标 (PC2) 为样本间差异解释度最大的两个主要成分; ^a 表示 $P < 0.05$

图2 吸烟组与不吸烟组 β 多样性指数比较的散点图

Figure 2 Scatter plot of β diversity index comparison between smoking group and non-smoking group

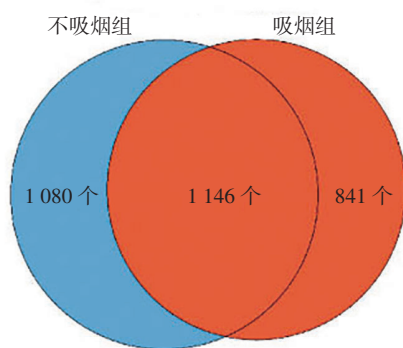


图3 吸烟组与不吸烟组菌群数量的韦恩图

Figure 3 Venn diagram of the number of bacteria in smoking group and non-smoking group

颗粒链菌属 (*Granulicatella*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、孪生球菌 (*Gemella*)、罗斯氏菌属 (*Rothia*) 以及其他菌属。属水平微生物在吸烟组中的优势菌群为: *Streptococcus* (不吸烟组占 24.24%, 吸烟组占 23.71%)、*Prevotella* (不吸烟组占 15.36%, 吸烟组占 14.06%)、*Porphyromonas* (不吸烟组占 8.00%, 吸烟组占 9.05%), 见图 4B。

比较吸烟组和不吸烟组下呼吸道菌群相对丰度差异显著的微生物, 共有 1 纲、2 目、1 科、8 属及 8 种差异微生物。其中吸烟组增加的菌群为 *Selenomonadales* 目、巨球形菌属 (*Megasphaera*)、*Faucicola* 属、*Sphaerochaeta* 属、*Shuttleworthia* 属、*Anaeroglobus* 属、巨球形菌 (*Megasphaera micronuciformis*)、*Spirochaeta canine oral taxon 379*、未分类的普氏菌 (*Uncultured Prevotella*)、*Prevotella sp.oral clone FW035*; 不吸烟组增加的菌群为鞘脂杆菌纲 (*Sphingobacteriia*)、鞘脂杆菌目 (*Sphingobacteriales*)、噬几丁

质科 (*Chitinophagaceae*)、伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*)、弧菌属 (*Vibrionimonas*)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*)、真口腔普雷沃氏菌 (*Prevotella veroralis*)、*Catonella sp.oral clone FL037*、噬淀粉密螺旋体 (*Treponema amylovorum*)、咽峡炎链球菌 (*Streptococcus anginosus*), 见图 5。

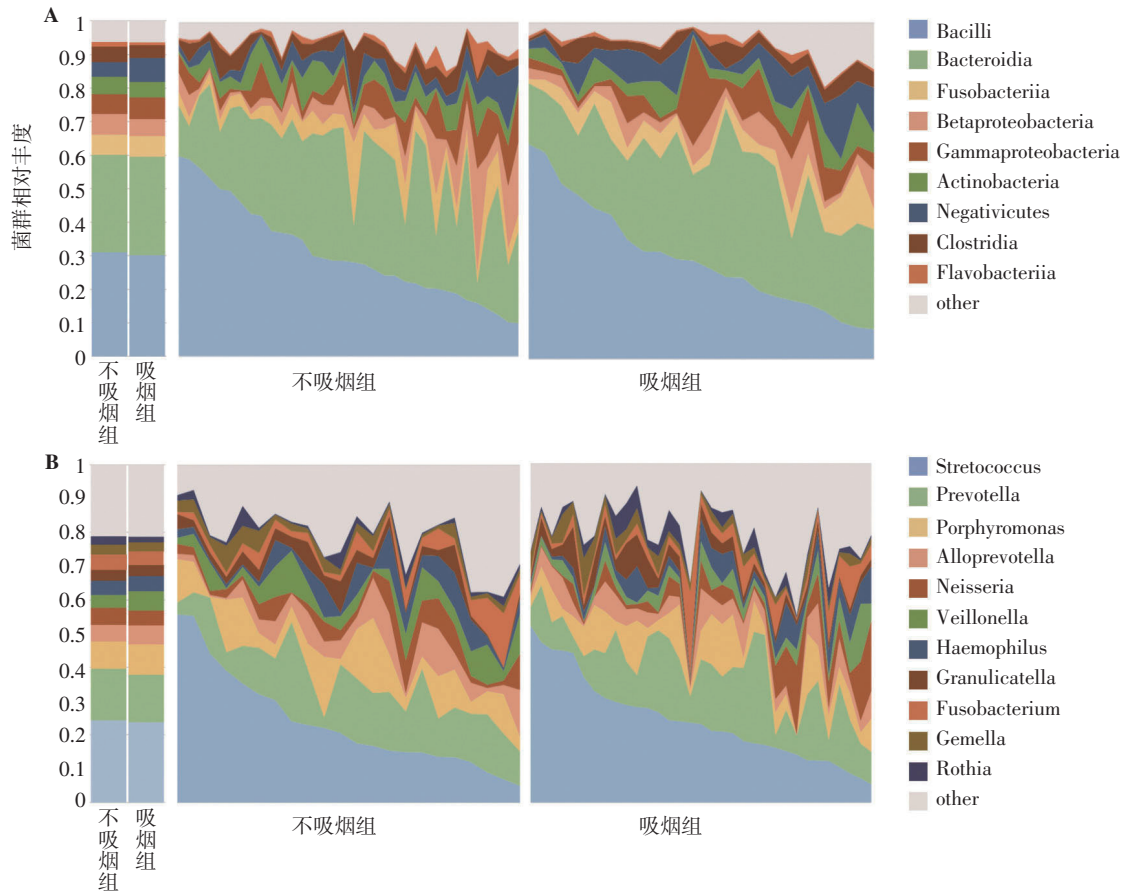
2.3 差异微生物间的相关性分析 对吸烟组和不吸烟组的差异微生物 (属水平) 进行相关性分析, 结果显示, 吸烟组和不吸烟组的差异微生物 (属水平) 间均呈正相关 ($r \geq 0.6$), 这些差异微生物分别来自 *Negativicutes* 纲、*Bacilli*、*Bacteroidia*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria* 和丹毒丝菌纲 (*Erysipelotrichia*) 的 24 个属, 见图 6。

2.4 差异微生物的功能预测 基于差异微生物的 OTU 结果, 预测吸烟组和不吸烟组差异微生物的功能, 见图 7。吸烟组和不吸烟组主要在物质合成、降解和运输相关通路上存在差异。吸烟组功能富集的生命活动包括: 安沙霉素类生物合成 (ko01051)、赖氨酸生物合成 (ko00300)、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 (ko00040)、泛酸盐和辅酶 A 生物合成 (ko00770)、蛋白运输 (ko03060) 等; 不吸烟组主要富集的生命活动包括: 甲苯降解 (ko00623)、霍乱弧菌致病循环 (ko05111)、柠檬烯和蒎烯降解 (ko00903)、光合作用 (ko00195)、二噁英降解 (ko00621) 等。

3 讨论

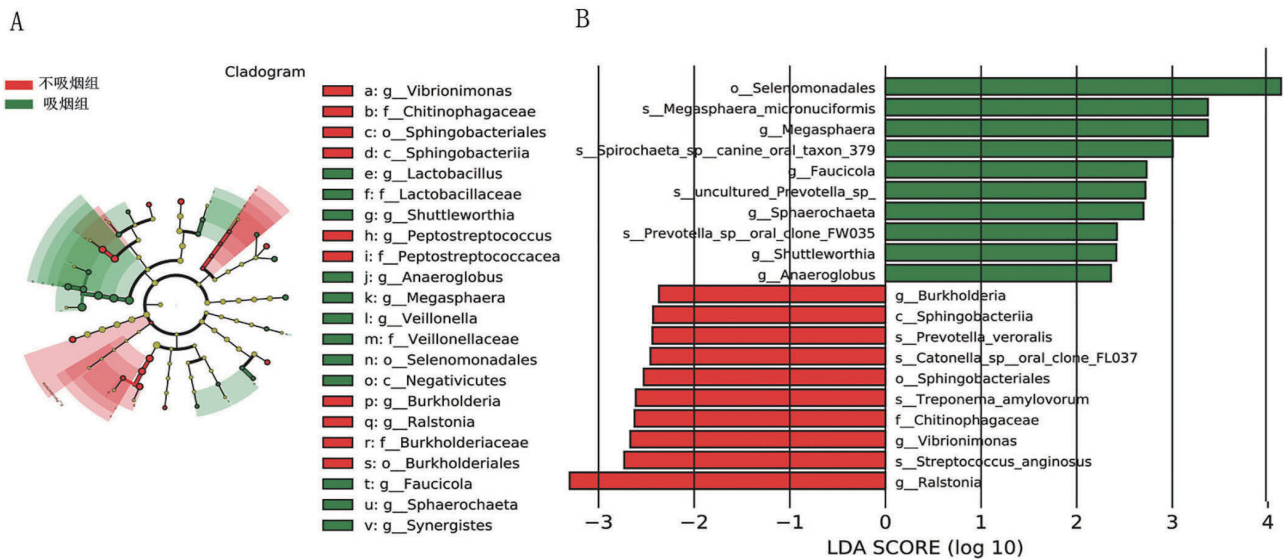
吸烟是全球可预防的主要死因和致残原因, 是世界上主要的公共卫生问题之一。中国吸烟者的比例在全球最高, 卷烟消费量占全球 40% 以上^[8], 每年因吸烟死亡的人数占全球死亡人数的 11.5%^[9]。烟草可增加心血管系统疾病、呼吸系统疾病、生殖系统疾病、牙周疾病以及癌症等的发生风险, 是导致疾病的重要危险因素^[10]。香烟烟雾是一种气溶胶, 由气体和固态颗粒组成, 目前鉴定出其包含 4 700 多种物质, 包括中性气体、碳氧化物、氮氧化物等^[11], 这些颗粒经气道吸入, 大颗粒沉积到气管、支气管, 小颗粒沉积到肺泡, 不能被有效清除, 从而导致慢性炎症, 这可能在肺部疾病的进展中起到促进作用^[12]。目前, 吸烟的危害已经明确, 但是其作用机制还不完全清楚。本研究通过痰液微生物高通量测序技术分析吸烟对下呼吸道微生物菌群结构的影响, 从微生物角度评估吸烟的危害, 以期揭示吸烟对机体产生危害的作用机制。

本研究结果显示, 吸烟组男性占比、年龄高于不吸烟组, 可能与样本量较小有关, 但目前并没有文章表示患者年龄及性别会对气道菌群结构产生影响。本研究结果显示, 吸烟组 Shannon 指数高于不吸烟组, Simpson 指数低于不吸烟组, 表明吸烟增加微生物菌群丰度。Adonis 检验及 PCA 结果显示, 吸烟组与不吸烟组 β 多



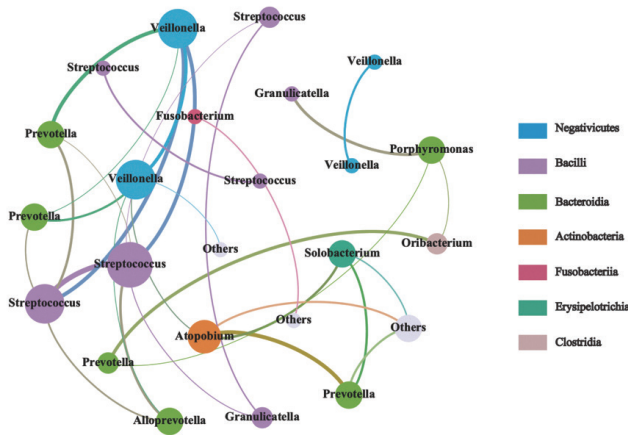
注：A 为纲水平，B 为属水平；左边的柱状图为不吸烟组 / 吸烟组全部样本的菌群组成情况，右边的堆积图为不吸烟组 / 吸烟组各样本的微生物组成情况

图 4 吸烟组和不吸烟组优势物种网络图
Figure 4 Map of dominant species networks in smoking group and non-smoking group



注：A 中树枝中红色节点表示不吸烟组中菌群相对丰度高于吸烟组的物种，绿色节点表示吸烟组中菌群相对丰度高于不吸烟组的物种，黄色节点表示两组间菌群相对丰度并无明显差异的物种；节点直径与菌群相对丰度成正比；每层节点由内向外分别表示门 / 纲 / 目 / 科 / 属 / 种，每层物种标记的注释从外向内表示门 / 纲 / 目 / 科 / 属 / 种，门水平的注释显示在最外环上，而其他水平的注释显示在右侧的图例中。B 中线性判别分析 (LDA) 阈值为 2.0。柱状图的长度代表 LDA 值

图 5 吸烟组与不吸烟组的差异微生物
Figure 5 Differential bacteria between smoking group and non-smoking group



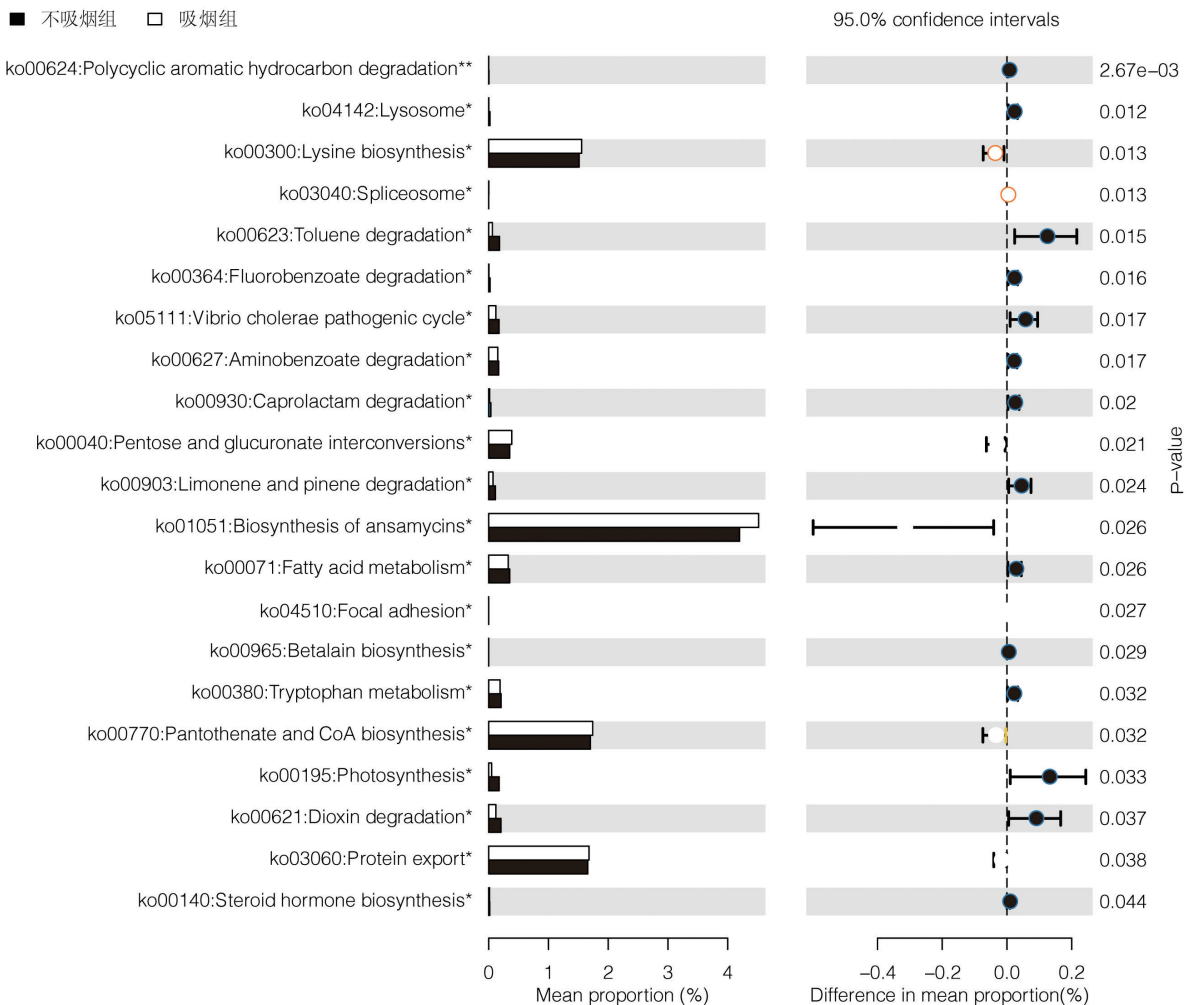
注: 每个点代表一个操作分类单元 (OTU) (属水平), 点大小与菌群相对丰度呈正相关, 不同颜色代表不同纲。物种种类 > 20 种时, 菌群相对丰度 < 1% 的 OTU 的物种注释合并为 Others。图中连线均为正相关, 筛选条件为 $r \geq 0.6$

图 6 吸烟组和不吸烟组差异微生物的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis of different microorganisms between smoking group and non-smoking group

多样性指数比较有统计学差异, 表明吸烟对微生物菌群结构组成的影响较大。韦恩图分析结果显示, 吸烟组和不吸烟组共有菌群 1 146 个, 不吸烟组独有菌群 1 080 个, 吸烟组独有菌群 841 个, 表明吸烟可以改变人体的气道菌群数量。

据报道, 香烟烟雾处理后小鼠下呼吸道中相对丰度较高的菌群包括: γ -变形杆菌纲、 α -变形杆菌纲、芽孢杆菌纲、 β -变形杆菌纲、梭菌纲和放线菌纲^[13]; 在属水平上最丰富的 3 种菌群为嗜盐单胞菌属、鞘脂单胞菌属和乳酸菌属^[14]。本研究结果显示, 在纲水平上, 按照菌群相对丰度降序排列, 排名前 5 位的差异菌群分别是 *Bacilli*、*Bacteroidia*、*Fusobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*; 在属水平上, 按照菌群相对丰度降序排列, 排名前 5 位的差异菌群分别是 *Streptococcus*、*Prevotella*、*Porphyromonas*、*Alloprevotella*、*Neisseria*; 表明人与小鼠下呼吸道菌群具有一定差异, 提示不同物种间下呼吸道菌群结构可能



注: 柱状图展示了两组差异微生物在京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库中富集的通路, 右侧是 95% 置信区间以及 P 值

图 7 吸烟组和不吸烟组差异微生物的功能

Figure 7 Differential microbial functions between smoking group and non-smoking group

有所不同。一项对吸烟者和非吸烟者口腔咽拭子微生物的研究发现,在属水平上,吸烟可增加放线菌属、韦荣氏球菌属、奈瑟菌属、罗斯氏菌属和普雷沃菌属的相对丰度^[15]。本研究结果显示,吸烟组中 *Veillonella* 的相对丰度增加, *Neisseria*、*Rothia* 以及 *Prevotella* 的相对丰度均下降,这可能是由于上、下呼吸道微生物菌群结构差异导致的。另一项研究发现,吸烟者口腔中链球菌属和巨球型菌属的相对丰度增加^[16],且烟雾暴露程度越高,巨球型菌属的相对丰度越高^[17]。本研究也发现,吸烟组中上述两个菌属的相对丰度增加了,表明吸烟这一暴露因素可能会对上、下呼吸道菌群造成相同的影响。在肠道中吸烟增加丹毒丝菌纲和链状细菌的相对丰度^[18],本研究得到了类似的结果,吸烟会影响下呼吸道中 *Erysipelotrichia* 的数量。综上,吸烟对上、下呼吸道以及肠道微生物具有潜在的作用,并且受到影响的微生物的变化在不同组织器官中具有一致性。

据报道,健康肺组织中的优势菌群在属水平上为普氏菌、韦永氏菌、链球菌、假单胞菌、梭杆菌,并存在少量嗜血杆菌和奈瑟菌^[19-20];在门水平上为变形杆菌、厚壁菌门、梭杆菌、放线菌和拟杆菌等^[21-22]。本研究结果显示,纲水平微生物在吸烟组中的优势菌群为: *Bacilli*、*Bacteroidia*、*Fusobacteria*;属水平微生物在吸烟组中的优势菌群为: *Streptococcus*、*Prevotella*、*Porphyromonas*。对比发现,本研究结果与上述研究结果^[19-20]有一定差异,主要为本研究吸烟组优势菌群没有假单胞菌,而增加了 *Porphyromonas*、*Gemella* 以及 *Rothia* 等。目前,关于吸烟对下呼吸道微生物菌群结构影响的相关研究较少,主要集中于口腔和肠道微生物。研究表明,无论吸烟者牙周状况如何(健康、牙龈炎或牙周炎),其牙周微生物菌群均处于失调状态,吸烟的牙龈炎/牙周炎患者经治疗后临床症状消失,但其微生物稳态仍然处于失调状态,分析原因为尼古丁暴露影响变形链球菌、血链球菌和念珠菌的生物膜形成^[14]。在胃肠道中,吸入的香烟烟雾通过抗菌活性和肠道微环境调节等不同机制诱导胃肠道微生物菌群失调^[23]。吸烟对肠道的影响包括肠道微生物组的变化、黏膜通透性增加和黏膜免疫反应受损。然而,吸烟对肠道微生物菌群结构失调的影响及潜在机制在很大程度上是未知的^[24]。综上,吸烟对于机体不同部位微生物稳态的影响比较明确,其作用主要集中于对黏膜和免疫反应的影响,然而,上述作用的途径与机制尚不清楚。

长期吸烟会使机会性致病菌在相关组织器官持续定植,导致疾病持续加重或进展^[25-27]。本研究结果显示,本研究对吸烟组和不吸烟组的差异微生物(属水平)进行相关性分析,结果显示,吸烟组和不吸烟组的差异微生物(属水平)间均呈正相关($r \geq 0.6$),这些差异微

生物分别来自 *Negativicutes* 纲、*Bacilli*、*Bacteroidia*、*Actinobacteria*、*Fusobacteria* 和 *Erysipelotrichia* 的 24 个属,说明长期吸烟对下呼吸道菌群的数量变化具有影响。本研究基于差异微生物的 OTU 结果,预测吸烟组和不吸烟组差异微生物的功能,结果显示,吸烟组和不吸烟组主要在物质合成、降解和运输相关通路上存在差异。吸烟组功能富集的生命活动包括:安沙霉素类生物合成、赖氨酸生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、泛酸盐和辅酶 A 生物合成、蛋白运输等;不吸烟组主要富集的生命活动包括:甲苯降解、霍乱弧菌致病循环、柠檬烯和蒎烯降解、光合作用、二噁英降解等。说明菌群结构的变化会影响人体代谢和多种生理功能。一项针对美国成年人的口腔微生物学研究发现,吸烟者中与有氧代谢(三羧酸循环和氧化磷酸化)途径相关的微生物菌群相对丰度降低,而与氧无关的代谢(糖酵解、果糖、半乳糖和蔗糖代谢以及光合作用)途径相关的微生物菌群相对丰度升高;并且差异菌群表征的代谢与苯乙烯和甲苯降解、三羧酸循环和氧化磷酸化呈正相关,而与糖酵解和其他碳水化合物代谢途径呈负相关^[28]。这可能与吸烟造成的无氧或兼性厌氧环境有关。综上,吸烟通过作用于机体的代谢途径而影响其生命活动及状态。

本研究尚存在一定局限性:首先,吸烟组没有女性受试者入选,因为我国的吸烟者绝大部分是男性,女性较少;其次,本研究采集的样本为痰液,口腔中的微生物可能对测序结果造成影响;最后,本研究样本量较小。今后有必要在长期随访的更大样本量的队列研究中确定吸烟对下呼吸道菌群的影响。

综上所述,吸烟能够增加下呼吸道微生物菌群相对丰度,影响微生物菌群结构组成,改变相关物质合成、降解和运输通路,吸烟暴露下呼吸道微生物组的功能改变可能会影响宿主的内环境稳态,打破体内免疫系统的平衡,从而引发肺部疾病。

作者贡献:王丽娜进行文章的构思与设计,研究的可行性分析,撰写论文;王颖、李媛进行样本的收集和处理;云春梅、孙德俊进行文献的收集与整理;卢震钰进行文章校对;高笑宇负责文章的质量控制及审校,并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] AGAKU I T, KING B A, DUBE S R. Current cigarette smoking among adults—United States, 2011 [J]. *MMWR*, 2014, 63(2): 29-34.
- [2] STANLEY K, STJERNSWÄRD J. Lung Cancer—a worldwide health problem [J]. *Chest*, 1989, 96(1): 1S-5.
- [3] Centers for Disease Control. The Surgeon General's 1989 Report on Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress

- (Executive Summary) [J].MMWR, 1989, 38 (S2): 1-32.
- [4] 肖琳. 中国青少年烟草使用现状研究 [J]. 中国青年研究, 2016 (9): 85-89.DOI: 10.3969/j.issn.1002-9931.2016.09.012.
- [5] SHIBUYA A, SHIBUYA K.Exploring the gut fungi-lung allergy axis [J].Cell Host Microbe, 2018, 24 (6): 755-757.DOI: 10.1016/j.chom.2018.11.012.
- [6] World Health Organisation.Guidelines for controlling and monitoring the tobacco epidemic [M].Geneva: World Health Organisation, 1998.
- [7] 陈华萍, 王子, 李瑾, 等. 诱导痰细胞分类检查技术及应用 [J]. 中华肺部疾病杂志 (电子版), 2020, 13 (3): 399-402.DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2020.03.026.
CHEN H P, WANG Z, LI J, et al.Application of inducing sputum cell classification [J].Chinese Journal of Lung Diseases (Electronic Edition), 2020, 13 (3): 399-402.DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2020.03.026.
- [8] GBD Tobacco Collaborators.Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015 [J].Lancet, 2017, 389 (10082): 1885-1906.DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30819-X.
- [9] CHEN Z M, PETO R, ZHOU M G, et al.Contrasting male and female trends in tobacco-attributed mortality in China: evidence from successive nationwide prospective cohort studies [J].Lancet, 2015, 386 (10002): 1447-1456.DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00340-2.
- [10] STÄMPFLI M R, ANDERSON G P.How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer [J].Nat Rev Immunol, 2009, 9 (5): 377-384.DOI: 10.1038/nri2530.
- [11] BORGERDING M, KLUS H.Analysis of complex mixtures——cigarette smoke [J].Exp Toxicol Pathol, 2005, 57: 43-73. DOI: 10.1016/j.etp.2005.05.010.
- [12] LING S H, VAN EEDEN S F.Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2009, 4: 233-243.DOI: 10.2147/copd.s5098.
- [13] LI K J, CHEN Z L, HUANG Y, et al.Dysbiosis of lower respiratory tract microbiome are associated with inflammation and microbial function variety [J].Respir Res, 2019, 20 (1): 272.DOI: 10.1186/s12931-019-1246-0.
- [14] HANIOKA T, MORITA M, YAMAMOTO T, et al.Smoking and periodontal microorganisms [J].Jpn Dent Sci Rev, 2019, 55 (1): 88-94.DOI: 10.1016/j.jdsr.2019.03.002.
- [15] KARABUDAK S, ARI O, DURMAZ B, et al.Analysis of the effect of smoking on the buccal microbiome using next-generation sequencing technology [J].J Med Microbiol, 2019, 68 (8): 1148-1158.DOI: 10.1099/jmm.0.001003.
- [16] NOLAN-KENNEY R, WU F, HU J Y, et al.The association between smoking and gut microbiome in Bangladesh [J].Nicotine Tob Res, 2020, 22 (8): 1339-1346.DOI: 10.1093/ntr/ntz220.
- [17] XIE T Q, WANG Y C, ZOU Z J, et al.Environmental tobacco smoke exposure and breastfeeding duration influence the composition and dynamics of gut microbiota in young children aged 0-2 years [J].Biol Res Nurs, 2021, 23 (3): 382-393.DOI: 10.1177/1099800420975129.
- [18] SATO N, KAKUTA M, UCHINO E, et al.The relationship between cigarette smoking and the tongue microbiome in an East Asian population [J].J Oral Microbiol, 2020, 12 (1): 1742527.DOI: 10.1080/20002297.2020.1742527.
- [19] BECK J M, YOUNG V B, HUFFNAGLE G B.The microbiome of the lung [J].Transl Res, 2012, 160 (4): 258-266.DOI: 10.1016/j.trsl.2012.02.005.
- [20] DICKSON R P, ERB-DOWNWARD J R, MARTINEZ F J, et al.The microbiome and the respiratory tract [J].Annu Rev Physiol, 2016, 78 (1): 481-504.DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238.
- [21] MOFFATT M F, COOKSON W O.The lung microbiome in health and disease [J].Clin Med (Lond), 2017, 17 (6): 525-529. DOI: 10.7861/clinmedicine.17-6-525.
- [22] CHARLSON E S, BITTINGER K, HAAS A R, et al.Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract [J].Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184 (8): 957-963.DOI: 10.1164/rccm.201104-0655OC.
- [23] BERKOWITZ L, PARDO-ROA C, SALAZAR G A, et al.Mucosal exposure to cigarette components induces intestinal inflammation and alters antimicrobial response in mice [J].Front Immunol, 2019, 10: 2289.DOI: 10.3389/fimmu.2019.02289.
- [24] GUI X H, YANG Z L, LI M D.Effect of cigarette smoke on gut microbiota: state of knowledge [J].Front Physiol, 2021, 12: 673341.DOI: 10.3389/fphys.2021.673341.
- [25] SAVIN Z, KIVITY S, YONATH H, et al.Smoking and the intestinal microbiome [J].Arch Microbiol, 2018, 200 (5): 677-684.DOI: 10.1007/s00203-018-1506-2.
- [26] HUANG C R, SHI G C.Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases [J].J Transl Med, 2019, 17 (1): 225.DOI: 10.1186/s12967-019-1971-7.
- [27] CAPURSO G, LAHNER E.The interaction between smoking, alcohol and the gut microbiome [J].Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31 (5): 579-588.DOI: 10.1016/j.bpg.2017.10.006.
- [28] WU J, PETERS B A, DOMINIANNI C, et al.Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults [J].ISME J, 2016, 10 (10): 2435-2446.DOI: 10.1038/ismej.2016.37.

(收稿日期: 2021-08-12; 修回日期: 2021-11-08)

(本文编辑: 崔丽红)