

• 综 述 •

眼表菌群分布和眼表疾病的地理多样性研究进展*

李周瑜 综述, 胡 柯, 王文娟, 计 岩[△] 审核

(重庆医科大学附属第一医院眼科/眼科学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] 大多数人的眼表存在着相对稳定的微生物群落, 微环境的改变与眼表健康状态密切相关。16S rDNA/rRNA 高通量测序技术的使用大大提升了对眼表微生物群落的认识。人类眼睛, 尤其是结膜直接暴露在不断变化的环境中, 了解眼表菌群是否存在可识别的微生物群差异非常重要, 这些差异有助于解释眼表疾病的地理多样性。该文为应用 16S rDNA/rRNA 高通量测序对眼表疾病地理多样性进行阐释提供了新思路。

[关键词] 眼表菌群; 微生物地理多样性; 16S rDNA 高通量测序; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.07.019 **中图法分类号:**R77

文章编号:1009-5519(2023)07-1170-05 **文献标识码:**A

Distribution of ocular surface flora and geographical diversity of ocular surface diseases*LI Zhouyu, HU Ke, WAN Wenjuan, JI Yan[△]

(Department of Ophthalmology/ Key Laboratory of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] Most people's ocular surface hosts relatively stable microbial communities, and the change of microenvironment is closely related to the health of ocular surface. The use of 16S rDNA/rRNA high-throughput sequencing technology has greatly improved the understanding of microbial communities of the ocular surface. The human eyes, especially the conjunctiva, are directly exposed to the ever-changing environments, and it is important to know if there are identifiable microbiome differences in the ocular surface flora, which is helpful to explain the geographic diversity of ocular surface diseases. This paper provides a new way to interpret the geographical diversity of ocular surface diseases by 16S rDNA/rRNA high-throughput sequencing.

[Key words] Ocular surface flora; Microbial geographical diversity; 16S rDNA/rRNA high-throughput sequencing; Review

21 世纪最激动人心的发现之一无疑是微生物如何影响人类健康。微生物生态系统与人体相互作用, 影响人体健康。在人体内的每个黏膜区域均具有一个独特的微生物群落。一方面每个微生物群落特征由人体部位的因素决定, 如 pH 值和含氧量; 另一方面通过与环境的相互作用, 微生物群落进一步重塑, 如地方饮食差异、抗生素的使用等。

人体共生着约 100×10^{12} 个细菌、病毒及真菌等微生物, 这些微生物组成了人体中不同的微生态系统, 其互相联系又互相拮抗, 完成营养、代谢、免疫等重要生理功能^[1]。如人体存在具有免疫调节能力的肠-眼轴^[2], 多种眼病的发生及发展、治疗及预后与肠道微生物的组成及其失衡密切相关。有研究表明, 肠

道菌群具有地理多样性^[3], 而眼表黏膜长期暴露于外界环境中直接与周围空气接触, 因此, 猜测人体眼表菌群也具有地理多样性, 其菌群的组成变化可更直接地反映眼表疾病的发生及发展, 分析健康居民眼表菌群组成对了解各种疾病的病理生理学至关重要。

人体眼表由黏膜上皮(包括角膜上皮和结膜上皮)表面覆盖泪膜而组成, 通过与其他成分(如免疫细胞、激素、小分子物质及微生物群落等)相互作用形成眼表微环境。正常的眼表微环境对维持眼表健康至关重要。大多数人眼表存在相对稳定的微生物群落, 包括细菌、真菌及病毒等微生物种类, 即“眼表核心微生物群”, 其共同作用调节局部免疫功能, 对抗感染, 但数量最多且最重要的是细菌^[4]。大量研究证实, 眼

* 基金项目: 重庆市科技局面上基金项目(cstc2020jcyjmsxmX0829); 重庆市教育委员会科技项目(KJQN202000445)。

[△] 通信作者, E-mail: j_ycw@163.com。

表微生物菌群的丰度与年龄、性别、季节有关^[5-6],但菌群组成结构不随时间而改变^[7],也就是说眼表菌群构成是稳定的。过去有研究发现,地理位置不会影响眼表的微生物菌群,但最近有研究表明,眼表微生物菌群具有地理多样性,地理环境改变可调节眼表核心菌群的共生状态。

众所周知,疾病的患病率受多因素影响,表现出地理异质性。在生活条件欠发达的高原地区,缺氧、高寒等极端气候对人体各有不同的影响,如高原极寒气候,日温差可在 20℃ 以上,高原居民末梢血管长期处于收缩状态,导致皮肤易产生干裂、冻伤和擦伤等。在冬季的高原,冰雪覆盖面大,光反射率增大,居住和生活在高原者吸收的辐射能增加,就紫外线来说,其辐射强度与海拔呈正相关,海拔每增加 300 m,紫外线辐射增加 2.1%~3.8%^[8],所以,高原居民更易患眼病^[9]。

高原在世界范围内的分布十分广泛,在平原、高原、丘陵、山地、盆地 5 种基本地形中,高原面积约占 45%。在中国,海拔在 3 000 m 以上的高原地区占全国总面积的 1/6,常住人口达 8 000 万。因此,了解高原居民眼睛表面是否存在可识别的与平原居民有差异的微生物群十分重要,有助于益生菌类眼科治疗药物的开发和应用。然而关于高原居民眼表核心菌群的数据较少且零碎,现对目前相关研究进行回顾,以阐述眼表核心菌群及疾病种类的地理异质性,期望建立高原居民眼表核心菌群基线,以有助于今后有关眼表菌群和疾病地理多样性研究。

1 眼表微生物菌群的取样、培养及鉴定方法

1.1 取样 目前,大多数研究采用的方法是以拭子于结膜囊取样,从结膜穹隆内侧至外侧取样,操作时拭子禁止接触眼周皮肤、眼睑及睫毛。取样 1 周后可再次重复取样。其他眼表取样方法还包括取泪液、脱落睫毛和结膜印迹试纸。

1.2 培养及鉴定方法 传统细菌培养和鉴定方法广泛用于临床,但其依赖于实验室培养和细菌形态学特征,且受各种理化因素影响较大,包括样本剂量、采样方法、培养基类型、大气条件、温湿度和培养时间,因而阳性检出率较低,不利于验证眼表微生物的地理多样性。随着生物技术的飞速发展,基于基因组序列的分子鉴定方法被广泛关注,包括宏观基因组测序、聚合酶链反应-单链构象多态性分析、变性梯度凝胶电泳、16S rDNA/rRNA 等。以 16S rDNA 高通量测序为代表的分子生物学鉴定方法不受理化因素的限制,具有保守性、普遍存在性及特征性,阳性检出率可高

达 90% 以上。此外,16S rDNA 检测为非培养性分析技术,结果不受抗生素使用的干扰,并适用于鉴定死菌和尚无法培养的细菌,能全面、精确地鉴定眼表细菌菌群的种属组成和丰度,因此,16S rDNA 高通量测序技术目前被广泛用于生物研究。

2 地理位置与眼表微生物菌群的分布

使用传统培养法可观察到眼表菌群由革兰阳性菌和革兰阴性菌组成,如常见的革兰阳性菌凝固酶阴性葡萄球菌,较少见的丙酸杆菌、棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、微球菌、芽孢杆菌、乳杆菌,以及罕见的革兰阴性菌铜绿假单胞菌、肠杆菌、大肠杆菌、变形杆菌、不动杆菌等,国内外研究结果基本一致。然而传统方法在检测和(或)鉴定可培养和(或)生长缓慢的细菌方面存在局限性,只能观察到眼部微生物群的一小部分^[10]。但 16S rRNA 高通量测序技术可克服这个限制,能更广泛、更真实地表征眼表微生物群的多样性。目前,眼表核心菌群的定义为假定核心菌群属的所占比例为所有检测到的菌群属的 1% 及以上^[10]。

在亚洲区域一项来自中国华东地区的研究表明,棒状杆菌、假单胞菌、葡萄球菌、不动杆菌、链球菌、细粒虫、厌氧球菌、大芬戈尔德菌、西蒙斯菌、韦荣球菌均为眼表核心微生物群^[4]。而由韩国学者提供的数据显示,其研究中有 8 个丰度大于 1% 的菌群属,分别为棒状杆菌、链霉菌、根瘤菌、鞘氨醇单胞菌、雷氏菌、奈瑟菌、不动杆菌和假单胞菌^[11]。与另一项来自日本的研究结果不同,文中提及眼表微生物群属居前 3 位者分别为棒状杆菌、丙酸菌及前项研究未提及的奈瑟菌^[12]。

一项来自北美洲迈阿密市的大样本研究应用了 16S rDNA 高通量测序,结果显示,眼表核心菌群包括假单胞菌、丙酸杆菌、根瘤菌、棒状杆菌、不动杆菌、短波单胞菌、葡萄球菌、水杆菌、鞘氨醇单胞菌、链球菌、链霉菌常见 12 个菌群属为眼表核心菌群^[10]。该研究样本的核心菌群组成与中国学者的研究结果有差异,厌氧菌、大芬戈尔德菌、西蒙斯菌、韦荣球菌不属于该研究的核心菌群之一,同样水杆菌和鞘氨醇单胞菌也未被纳入中国研究样本的核心菌群中,其次奈瑟菌也未在该项研究中被指出。一项始于沙眼流行地区——西非的冈比亚的研究对象为 105 名冈比亚健康志愿者,结果显示,棒状杆菌、链球菌、丙酸杆菌、芽孢杆菌、葡萄球菌、拉索氏菌在其结膜微生物中所占比例超过 1%,而在上述两项研究中提到的核心菌群之一假单胞菌被认为最不常见,其所占比例远小

于 1%^[13]。

来自澳洲的一项研究表明,棒状杆菌、不动杆菌、假单胞菌、鞘氨醇单胞菌、链球菌、马西利亚菌、罗氏菌所占比例超过 1%,可假设为人眼表核心菌群^[7]。其中马西利亚菌和罗氏菌均未出现在前几项核心菌群构成中。罗氏菌在一些研究中被认为是条件致病菌,而其在该项研究中为眼表核心菌之一。可见地理位置可能影响人体眼表核心菌群的组成。

3 地理位置与眼表疾病

地理位置不仅影响眼表微环境的改变,使眼表核心菌群组成不尽相同,还可能影响疾病的发生演化,从而导致眼病特征致病菌的变化。

3.1 干眼病和睑板腺功能障碍 近年来,干眼病已成为一个不可避免的公共卫生问题,影响着全球数亿人的生活质量。一项来自印度的对照研究比较了高原地区居民与低海拔地区居民干眼病患病率的差异,结果显示,高海拔组居民中有 20% 被诊断为干眼病,低海拔组居民中只有 9% 被诊断为干眼病;其还对高原常住者和暂居者进行了比较,结果显示,常住者患病率明显高于暂居者(分别为 54%、26%)^[14]。随着海拔高度的改变,不仅干眼病患病率有显著差异,且干眼病的致病菌也可能有差异。一项来自中国西安市的研究表明,佩洛单胞菌为干眼病的特征菌^[15];然而另一项来自中国广东省的研究表明,干眼病的特征菌为拟杆菌^[16],以上研究均来自中国,得出的结论不完全一致。2017 年国际泪膜与眼表协会将干眼病分为水液缺乏型干眼病和蒸发型干眼病两类,目前,睑板腺功能障碍被认为是导致蒸发型干眼病最常见的原因^[17]。在西方人口中睑板腺功能障碍患病率为 5%~20%,而在亚洲人口中患病率却达到 45%~70%^[18]。

3.2 翼状胬肉 是由外界刺激引起的局部球结膜纤维血管组织的一种慢性炎症性病变,通常侵及角膜,是一种潜在的致盲疾病^[19]。就华人而言,翼状胬肉患病率具有明显的地理差异性,在平均海拔 15 m 的新加坡地区翼状胬肉在华人群体中的患病率为 7.0%^[19];而一项在平均海拔 127.95 m 的中国哈尔滨市进行的研究表明,翼状胬肉患病率为 6.4%^[20],以上两地区患病率基本一致。但在相对海拔较高的地区,翼状胬肉患病率却表现出明显差异,一项在平均海拔 3 700 m 的青海省泽库县进行的流行病学研究表明,翼状胬肉患病率达 14.5%^[21];而在平均海拔 1 500 m 的澳大利亚维多利亚州翼状胬肉患病率仅为 1.2%^[22]。因此,海拔高度是否成为翼状胬肉患病的

危险因素尚需进一步探索。此外澳洲学者发现,与健康结膜组织比较,假单胞菌可被认为是翼状胬肉的特征菌^[23]。

3.3 电光性眼炎 据文献报道,与生活在平原地区者比较,登山者受到的眼部光毒性明显更高^[24]。因随着海拔升高,大气吸收的紫外线辐射下降,环境中紫外线辐射量增加,人眼暴露于此更易患急性光毒性疾病,如电光性眼炎^[25]。电光性眼炎又称为雪盲,是患者急性暴露于紫外线的辐射中引起的眼部炎症性疾病。由此,可合理推论相较于低海拔地区居民,高原居民的眼睛若不施行任何保护措施更易受到电光性眼炎的困扰^[26]。

3.4 白内障 作为高致盲眼疾之一,白内障患病率具有明显的地理差异性。居住在新加坡的华人白内障发生率为 11.1%^[27]。而中国幅员辽阔,各地区报道的患病率有所差异,随海拔上升,紫外线辐射量增加,白内障患病率也随之增加^[28],与北美洲和澳洲的研究结论一致^[29-30],即随海拔上升,紫外线辐射量增加,白内障患病率也随之增加。地理位置不仅影响白内障患病率,而且引发白内障术后感染的致病菌也有差异。过去通过传统细菌培养和鉴定法认为金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌是引起白内障术后眼内炎和角膜炎的潜在病原体,但目前缺乏准确的数据资料验证,现临床医生通过高通量测序法可更加准确地定位致病菌。一项法国的个案报道发现,马西莉亚菌会引发白内障术后慢性眼内炎的发生^[31];3 例同样是来自法国不同地区的一项案例发现,根瘤菌会引起白内障术后眼内炎导致视力骤降^[32]。普雷沃氏菌被英国临床医生发现是导致白内障术后眼内炎的原因之一^[33]。

3.5 瘢痕性睑内翻和倒睫 沙眼是一种高度聚集性的眼病,发生率与地区差异有明显的相关性^[34]。一项 meta 分析结果显示,随气温升高,沙眼患病率降低,而海拔正是量化气温的客观指标,即随着海拔升高,气温降低,沙眼患病率也随之降低。众所周知,沙眼是引起瘢痕性睑内翻和倒睫的主要原因之一^[35],瘢痕性睑内翻和倒睫发生率与海拔是否也呈负相关? 有研究表明,对沙眼引起的瘢痕性睑内翻和倒睫,海拔变化对其患病率无明显的影响^[34]。

4 小 结

眼表疾病患病率具有明显的地理异质性,而眼表微环境的改变与疾病的发生及发展密切相关,传统培养鉴定方法易受各种理化因素影响,细菌检测阳性率低、稳定性差。新一代测序和生物信息学方法(如

16SrRNA 高通量测序)鉴定的眼表微生物群阳性率高。为应用 16S rDNA/rRNA 高通量测序对眼表疾病地理多样性进行阐释提供了新思路。

参考文献

- [1] TURNBAUGH P J, LEY R E, HAMADY M, et al. The human microbiome project[J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 804-810.
- [2] KUGADAS A, WRIGHT Q, GEDDES-MCALISTER J, et al. Role of microbiota in strengthening ocular mucosal barrier function through secretory IgA[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(11): 4593-600.
- [3] LEVIN D, RAAB N, PINTO Y, et al. Diversity and functional landscapes in the microbiota of animals in the wild [J]. *Science*, 2021, 372(6539): eabb5352.
- [4] HUANG Y, YANG B, LI W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(7): 643.
- [5] EDER M, FARINA N, SANABRIA R R, et al. Normal ocular flora in newborns delivered in two hospital centers in argentina and paraguay [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2005, 243(11): 1098-1107.
- [6] WEN X, MIAO L, DENG Y, et al. The influence of age and sex on ocular surface microbiota in healthy adults[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(14): 6030-6037.
- [7] OZKAN J, NIELSEN S, DIEZ-VIVES C, et al. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9880.
- [8] GODAR D E, WENGRAITIS S P, SHREFFLER J, et al. UV doses of Americans [J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 73(6): 621-629.
- [9] WILLMANN G, FISCHER M D, SCHATZ A, et al. Retinal vessel leakage at high altitude[J]. *JAMA*, 2013, 309(21): 2210-2212.
- [10] DONG Q, BRULC J M, IOVIENO A, et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8): 5408-5413.
- [11] HAM B, HWANG H B, JUNG S H, et al. Distribution and diversity of ocular microbial communities in diabetic patients compared with healthy subjects [J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(3): 314-324.
- [12] SUZUKI T, SUTANI T, NAKAI H, et al. The microbiome of the meibum and ocular surface in healthy subjects[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(2): 18.
- [13] ZHOU Y, HOLLAND M J, MAKALO P, et al. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: A case control study[J]. *Genome Med*, 2014, 6(11): 99.
- [14] GUPTA N, PRASAD I, HIMASHREE G, et al. Prevalence of dry eye at high altitude: A case controlled comparative study[J]. *High Alt Med Biol*, 2008, 9(4): 327-334.
- [15] QI Y, WAN Y, LI T, et al. Comparison of the ocular microbiomes of dry eye patients with and without autoimmune disease[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 716867.
- [16] LI Z, GONG Y, CHEN S, et al. Comparative portrayal of ocular surface microbe with and without dry eye[J]. *J Microbiol*, 2019, 57(11): 1025-1032.
- [17] CRAIG J P, NICHOLS K K, AKPEK E K, et al. TFOS DEWS II definition and classification report[J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 276-283.
- [18] DING J, SULLIVAN D A. Aging and dry eye disease[J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(7): 483-490.
- [19] ANG M, LI X, WONG W, et al. Prevalence of and racial differences in pterygium: A multiethnic population study in Asians [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(8): 1509-1515.
- [20] LI Z, CUI H. Prevalence and associated factors for pterygium in a rural adult population (the southern harbin eye study) [J]. *Cornea*, 2013, 32(6): 806-809.
- [21] LU P, CHEN X, KANG Y, et al. Pterygium in tibetans: A population-based study in China [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 35(9): 828-833.
- [22] MCCARTY C A, FU C L, TAYLOR H R. Epi-

- demology of pterygium in victoria, australia [J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(3):289-292.
- [23] OZKAN J, CORONEO M, WILLCOX M, et al. Identification and visualization of a distinct microbiome in ocular surface conjunctival tissue[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(10):4268-4276.
- [24] EL CHEHAB H, BLEIN J P, HERRY J P, et al. Ocular phototoxicity and altitude among mountain guides[J]. J Fr Ophtalmol, 2012, 35(10):809-815.
- [25] WILLMANN G. Ultraviolet keratitis; From the pathophysiological basis to prevention and clinical management[J]. High Alt Med Biol, 2015, 16(4):277-282.
- [26] GRIFONI D, CARRERAS G, SABATINI F, et al. UV hazard on a summer's day under Mediterranean conditions, and the protective role of a beach umbrella[J]. Int J Biometeorol, 2005, 50(2):75-82.
- [27] TAN A G, KIFLEY A, THAM Y C, et al. Six-year incidence of and risk factors for cataract surgery in a multi-ethnic asian population; The singapore epidemiology of eye diseases study [J]. Ophthalmology, 2018, 125(12):1844-1853.
- [28] ZHU M, YU J, GAO Q, et al. The relationship between disability-adjusted life years of cataracts and ambient erythemal ultraviolet radiation in China[J]. J Epidemiol, 2015, 25(1):57-65.
- [29] TAYLOR H R, WEST S K, ROSENTHAL F S, et al. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation[J]. N Engl J Med, 1988, 319(22):1429-1433.
- [30] JAVITT J C, TAYLOR H R. Cataract and latitude[J]. Doc Ophthalmol, 1994, 88(3/4):307-325.
- [31] CHIQUET C, BOISSET S, PECHINOT A, et al. Massilia timonae as cause of chronic endophthalmitis following cataract surgery[J]. J Cataract Refract Surg, 2015, 41(8):1778-1780.
- [32] MOREAU-GAUDRY V, CHIQUET C, BOISSET S, et al. Three cases of post-cataract surgery endophthalmitis due to Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4):1487-1490.
- [33] AMISSAH-ARTHUR K N, FAROOQ T A, et al. Rare case of post-cataract-surgery prevotella endophthalmitis diagnosed by polymerase chain reaction DNA sequencing[J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(3):463-466.
- [34] BERO B, MACLEOD C, ALEMAYEHU W, et al. Prevalence of and risk factors for trachoma in oromia regional state of ethiopia; Results of 79 population-based prevalence surveys conducted with the global trachoma mapping project [J]. Ophthalmic Epidemiol, 2016, 23(6):392-405.
- [35] BURGERT-BRUCKER C R, ADAMS M W, MINGKWAN P, et al. Community-level trachoma ecological associations and the use of geospatial analysis methods; A systematic review[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022, 16(4):e0010272.

(收稿日期:2022-07-06 修回日期:2022-11-20)