

## 咽喉反流患者唾液菌群与反流症状相关性分析

崔小缓<sup>1-6</sup>, 尹龙龙<sup>7</sup>, 张延平<sup>1-6</sup>, 蒋兴旺<sup>1-6</sup>, 李丽娜<sup>1-6</sup>

1. 中国人民解放军总医院第六医学中心 耳鼻咽喉头颈外科医学部, 北京 100037

2. 听觉与平衡觉全国重点实验室, 北京 100853

3. 国家耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心, 北京 100853

4. 聋病教育部重点实验室, 北京 100853

5. 聋病防治北京市重点实验室, 北京 100853

6. 中国人民解放军总医院第八医学中心 耳鼻咽喉头颈外科, 北京 100091

7. 河北北方学院, 河北 张家口 075051

**摘要:** **目的** 研究咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)患者唾液菌群与反流症状的相关性。**方法** 选取2022年2月至2022年11月就诊于解放军总医院第八医学中心耳鼻咽喉头颈外科门诊反流症状指数(reflux symptom index, RSI)评分>13分、质子泵抑制剂诊断性治疗显效的34例患者为LPR组,34例健康志愿者为对照组,留取唾液标本,提取DNA,扩增16S片段V3-V4区并进行测序,对测序结果进行生物信息学分析,对LEfSe分析的差异菌与RSI评分中9个症状评分及总分的相关性进行分析,使用SPSS 25.0软件对数据进行统计学处理。**结果** LEfSe分析显示鼠乳杆菌、乳酸杆菌科、乳酸杆菌属、普雷沃菌科、普雷沃菌属、拟杆菌目、拟杆菌纲、拟杆菌门等30个物种在LPR组患者唾液中富集,厚壁菌门、杆菌纲、假单胞菌属等28个物种在对照组唾液中富集。相关分析显示拟杆菌门、拟杆菌纲、拟杆菌目、普雷沃菌科、普雷沃菌属相对丰度与胃烧灼感、胸痛、消化不良或胃疼症状评分呈现正相关,普雷沃菌属的相对丰度与该症状的相关系数具有统计学意义( $P<0.05$ ),口腔普雷沃菌相对丰度与吞咽食物、液体和药片困难呈正相关( $P<0.05$ ),乳酸杆菌科、乳酸杆菌属相对丰度与RSI总分呈负相关( $P<0.05$ )。**结论** LPR患者唾液菌群失调与反流症状相关,调整菌群失调可能有助于减轻患者症状。

**关键词:** 咽喉反流;唾液菌群;反流症状指数;相关性分析

中图分类号:R766.5

文献标志码:A

文章编号:1673-3770(2024)06-0078-07

**引用格式:** 崔小缓,尹龙龙,张延平,等. 咽喉反流患者唾液菌群与反流症状相关性分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2024,38(6):78-84. CUI Xiaohuan, YIN Longlong, ZHANG Yanping, et al. Study of the association between salivary microbiota and reflux symptoms in patients with laryngopharyngeal reflux[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(6):78-84.

### Study of the association between salivary microbiota and reflux symptoms in patients with laryngopharyngeal reflux

CUI Xiaohuan<sup>1-6</sup>, YIN Longlong<sup>7</sup>, ZHANG Yanping<sup>1-6</sup>, JIANG Xingwang<sup>1-6</sup>, LI Lina<sup>1-6</sup>

1. Senior Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

2. State Key Laboratory of Hearing and Balance Science, Beijing 100853, China

3. National Clinical Research Center for Otolaryngologic Diseases, Beijing 100853, China

4. Key Laboratory of Hearing Science, Ministry of Education, Beijing 100853, China

5. Beijing Key Laboratory of Hearing Impairment Prevention and Treatment, Beijing 100853, China

6. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

7. Hebei North University, Zhangjiakou 075051, Hebei, China

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between salivary microbiota and symptoms in laryngopharyngeal reflux (LPR) patients. **Methods** Patients with a reflux symptom index (RSI) score>13 and an apparent response after 8 weeks of proton pump

收稿日期:2024-03-01

基金课题:北京市自然科学基金面上项目(7242136)

通信作者:张延平。E-mail:yizhan28@163.com

inhibitor medication were enrolled as the LPR group in the Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Eighth Medical Center, Chinese PLA General Hospital from February 2022 to November 2022. Another 34 matched healthy volunteers were enrolled as the control group. Their saliva samples were collected, and salivary microbiota was detected and analysed by 16S rRNA gene sequencing. The correlation between differential bacteria in LEfSe analysis and RSI scores was investigated. SPSS 25.0 software was used for statistical analysis. **Results** LEfSe difference analysis showed that *Lactobacillus\_murinus*, Lactobacillaceae, Lactobacillus, Prevotellaceae, *Prevotella*, Bacteroidales, Bacteroidia, Bacteroidetes and other 30 species were enriched in the LPR group. Firmicutes, Bacilli, *Pseudomonas* and other 28 species were enriched in the control group. The correlation analysis demonstrated that the relative abundance of Bacteroidetes, Bacteroidetes, Bacteroidetes, Prevotellaceae and *Prevotella* were positively correlated with the symptom score of gastric burning sensation, chest pain, dyspepsia or stomachache, and the relative abundance of *Prevotella* was significantly correlated with the above symptoms ( $P<0.05$ ). The relative abundance of *Prevotella\_oralis* was positively correlated with the symptom score of difficulty to swallow food, liquids, and tablets ( $P<0.05$ ). The relative abundance of Lactobacillaceae and *Lactobacillus* was negatively related to the total score of RSI. **Conclusion** The salivary dysbiosis might be related to the reflux symptoms of LPR patients and modify the imbalance of ecology in saliva *might* help to alleviate the symptoms.

**Key words:** Laryngopharyngeal reflux; Salivary microbiota; Reflux symptom index; Correlation analysis

咽喉反流 (laryngopharyngeal reflux, LPR) 是指与胃十二指肠内容物反流直接或间接作用相关的上呼吸道 (upper aerodigestive tract, UAT) 炎症, 可引起 UAT 黏膜形态学改变<sup>[1]</sup>。多中心研究显示, LPR 在中国三甲医院耳鼻喉头颈外科门诊患者中占比为 10.15%<sup>[2]</sup>。LPR 与多种疾病相关, 但是本病的发病机制尚不完全清楚。口腔是人体第二大储菌库, 定植有大量微生物<sup>[3-4]</sup>, 其中主要为细菌, 它们不仅在龋齿、牙周病和黏膜病变等口腔疾病中发挥作用, 还与多种全身性疾病密切相关<sup>[3,5-7]</sup>, 对 LPR 的研究也发现患者唾液和咽喉部出现了菌群失调<sup>[8-9]</sup>, 可能参与了 LPR 的发生和发展, 但其临床意义还不清楚。

LPR 的症状复杂多样, 缺乏特异性, 了解其症状的相关因素、快速控制症状是临床树立患者治疗信心的重要环节。LPR 患者的症状与多种因素有关, 目前多数研究聚焦于症状与生活习惯、嗜好以及情绪状态之间的联系<sup>[10-11]</sup>, 而且这些研究都是基于问卷调查结果, 受患者主观因素影响较大, 目前有关 LPR 症状与客观指标相关的研究还比较少见。一项研究表明 GERD 患者肠道菌群失调与反流症状呈正相关<sup>[12]</sup>, Zhong 等<sup>[13]</sup>证明了消化不良患者十二指肠细菌负荷与症状严重程度相关, 提示肠道菌群失调与消化不良、反流症状密切相关, 但 LPR 患者唾液菌群的变化与反流症状关系的相关性尚未见报道。为进一步探索唾液菌群与 LPR 患者反流症状的关系, 本研究对 LPR 患者唾液标本进行 16S rRNA 基因测序及生物信息学分析, 通过分析患者唾液差异菌相对丰度与反流症状评分表中 (Reflux Syndrome Index, RSI) 各症状评分及总评分之间的相关性, 进一步探讨 LPR 患

者唾液菌群变化的临床意义及对改进疾病治疗方案的可能作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2022 年 2 月至 2022 年 11 月就诊于解放军总医院第八医学中心耳鼻咽喉头颈外科门诊 RSI 评分 > 13 分并经过 8 周艾司奥美拉唑镁肠溶片 (20 mg, 口服, 2 次/d) 诊断性治疗显效 (症状基本消失, RSI ≤ 13) 的患者为 LPR 组, 无咽部症状的健康志愿者 (RSI < 13 分) 为对照组。所有参与者均在专人指导下填写 RSI 评分表, 并留取治疗前唾液标本。

纳入标准: ①年龄 18 ~ 78 岁; ②无严重全身疾病和精神疾病; ③签署知情同意书; ④无益生菌和益生元服用习惯。

排除标准: ①糖尿病、高血压、恶性肿瘤、呼吸系统疾病、内分泌疾病、心脏病、心律失常、心源性胸痛、脑血管意外、上消化道病变或其他严重全身疾病者; 咽部良恶性肿瘤、扁桃体肥大等咽喉部疾病者; 既往有咽喉部或上腹部手术史者; ②近期使用对自主神经功能有影响的药物者, 如使用胆碱能激动剂或拮抗剂、肾上腺素能激动剂或拮抗剂、神经肌肉阻断剂、麻醉前用药、抗精神病药、免疫调节剂及前列腺素类药物者; ③长期抽烟或酗酒者; ④采集唾液标本前 24 h 内饮用含咖啡因、乙醇的饮料, 饮食结构发生重大变化的患者; ⑤妇女月经期、孕妇或哺乳期妇女; ⑥近 1 个月口服抗生素及质子泵抑制剂者; ⑦上呼吸道感染患者及痊愈 2 周内者; ⑧患有急性口腔感染者; ⑨中途需加用影响试验结果判断的药物者。所有研究对象自愿参加实验, 并书面签订知情同意书, 实验符合中华

人民共和国国务院颁布的医疗机构管理条例的相关规定,经解放军总医院医学伦理委员会批准(批准号:2022110130901725),并完成临床研究注册(注册号:ChiCTR2300067507)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 唾液标本采集

按照唾液采集及活菌保存套装(上海格微生物科技有限公司)说明书收集病例和对照组患者的唾液标本。患者晨起空腹、刷牙后嗽出的第一口唾液约 1 mL,通过漏斗收集入标本瓶中,摇晃使标本浸入标本液中,迅速将瓶盖拧紧并-80 °C 冰箱存储待检测。

### 1.2.2 16S rRNA 基因测序

16S rRNA 基因测序由微基生物科技(上海)有限公司完成。采用 2 步聚合酶链式反应扩增的方法进行建库。采用 V3-V4 区的特异引物进行扩增,每个样本含不同的分子标签(barcode),PCR 产物采用凝胶回收试剂盒(Axygen 公司,美国)纯化,FTC-3000™ real-timePCR 仪(枫岭公司,上海)进行实时荧光定量,按照等摩尔比进行混匀;扩增添加测序需要的接头和文库的分子标签(barcode)序列,而后进行 illumina 高通量测序(Illumina 公司,美国)及生物信息学分析<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 生物信息学分析

具体分析见既往研究<sup>[8]</sup>,LEfSe 差异分析采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)来估算每个物种丰度对差异效果影响的大小,找出对样本分组划分产生显著性差异影响的物种。

### 1.2.4 LPR 组和对照组间 LEfSe 分析差异菌与临床症状的相关性分析

将 LPR 组和对照组间 LEfSe 分析发现的差异菌与 RSI 总分及 9 个症状评分(9 个症状如下:①声嘶或发音障碍;②持续清嗓;③痰多或鼻涕倒流;④吞咽食物、液体或药片困难;⑤进食后咳嗽或躺下后咳嗽;⑥呼吸困难或反复窒息发作;⑦烦人的咳嗽;⑧咽部异物感;⑨胃烧灼感、胸痛、消化不良或反酸)进行相关分析,研究唾液菌群与 LPR 症状的相关性。

## 1.3 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件。采用双侧检验,正态分布的定量指标以  $\bar{x} \pm s$  表示,非正态分布的定量指标以中位数和上下四分位数 [ $M(Q_1, Q_3)$ ] 表示。定量资料的组间比较采用成组设计的  $t$  检验或 Wilcoxon 秩和检验,分类数据采用卡方检验或精确概率法。Spearman 相关分析对差异菌与症状评分的相关性

进行检验,检验水准均设  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料分析

共纳入符合纳入标准的 52 例患者,均给予 PPI 治疗,其中 12 例治疗 2~5 周自觉症状改善或消失后自行停药、1 例因个人原因未用药和 1 例未按时用药退出实验,4 例规律治疗 8 周后 RSI 评分 > 13 分未纳入,最终纳入 34 例为 LPR 组、34 例为对照组,两组间年龄、BMI 和性别差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。详细信息见表 1。

表 1 LPR 组和对照组基本资料  
Table 1 Basic data between LPR group and control group

观察指标	LPR 患者 (34 例)	对照组 (34 例)	$P$
年龄/岁	33.82±10.90	30.53±7.82	>0.05
性别/ $n$ (%)			>0.05
男性	22(64.71)	18(52.94)	
女性	12(35.29)	16(47.06)	
BMI	23.651±2.981	23.71±3.891	>0.05

### 2.2 LPR 患者症状(RSI)评分分析

LPR 患者 RSI 总分为(20.71±4.39)分,9 个症状评分:咽部异物感(4.18±1.36)分,持续清嗓(3.71±1.51)分,痰多或鼻涕倒流(3.50±1.75)分,声嘶或发音障碍(2.68±2.11)分,烦人的咳嗽(1.82±1.77)分,进食后咳嗽或躺下后咳嗽(1.53±1.56)分,呼吸困难或反复窒息发作(1.29±1.87)分,胃烧灼感、胸痛、消化不良或胃疼(1.21±1.30)分,吞咽食物、液体或药片困难(0.79±1.15)分。每个症状出现频率见表 2。

表 2 LPR 患者反流 9 个症状及总评分特点  
Table 2 Characteristics of a reflux symptoms index and total scores in LPR patients

症状分类	评分	患者数	症状占比/%
声嘶或发音障碍	2.68±2.11	20	58.82
持续清嗓	3.71±1.51	33	97.06
痰多或鼻涕倒流	3.50±1.75	30	88.24
吞咽食物、液体或药片困难	0.79±1.15	14	41.18
进食后咳嗽或躺下后咳嗽	1.53±1.56	22	64.71
呼吸困难或反复窒息发作	1.29±1.87	19	55.88
烦人的咳嗽	1.82±1.77	24	70.59
咽部异物感	4.18±1.36	32	94.12
胃烧灼感、胸痛、消化不良或反酸	1.21±1.30	21	61.76
RSI	20.71±4.39		

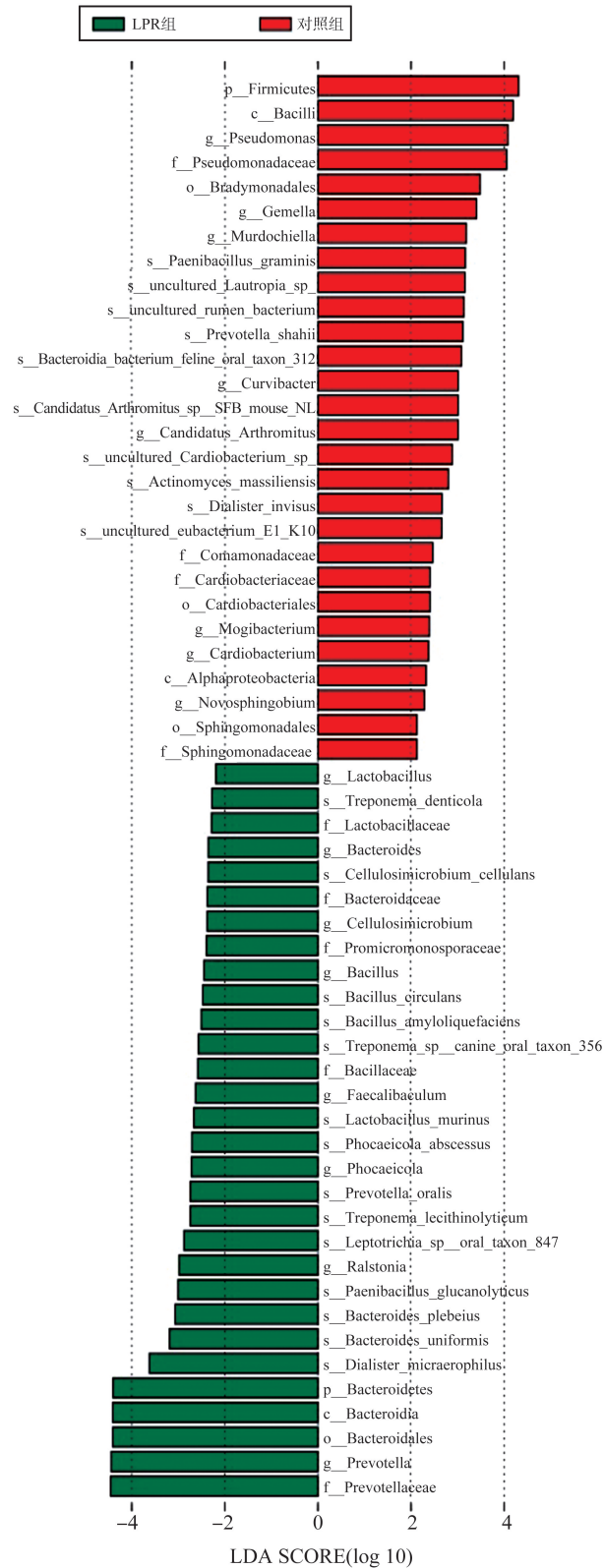


图 1 LfSe 差异分析 LPR 组与健康对照组物种间差异  
Figure 1 LfSe comparison of salivary microbiota between LPR group and control group, highlighting enriched taxa with an LDA score >2.0 at different classification levels

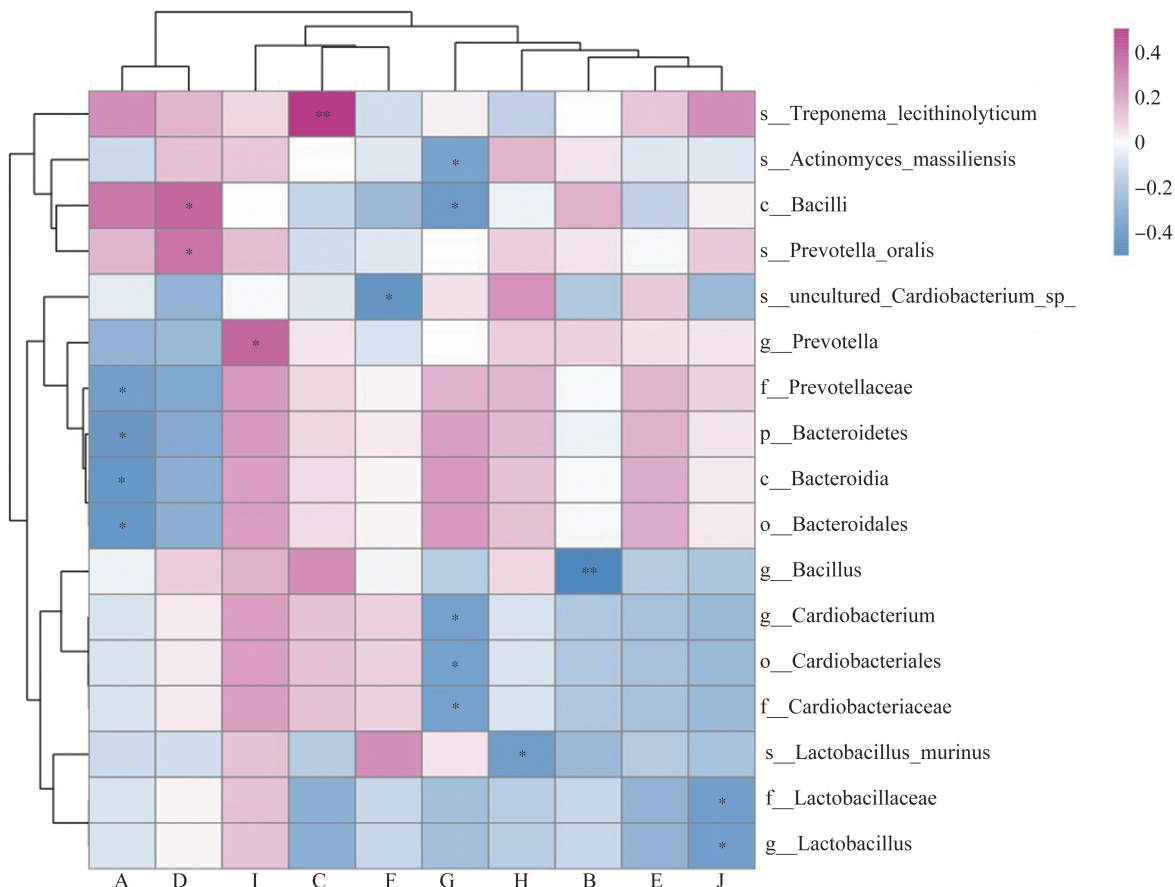
### 2.3 LfSe 分析结果

在  $P < 0.05$ 、LDA 值  $> 2$  的条件下, LPR 组和

对照组中差异有统计学意义的物种共有 58 个, 其中鼠乳杆菌 (*Lactobacillus\_murinus*)、乳酸杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、普雷沃菌科 (*Prevotellaceae*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌目 (*Bacteroidales*)、拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 等 30 个物种在 LPR 组患者唾液中富集, 厚壁菌门 (*Firmicutes*)、杆菌纲 (*Bacilli*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、鞘脂单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*) 等 28 个物种在对照组唾液中富集。见图 1。

### 2.4 LfSe 分析差异菌与 RSI 症状评分相关性

LfSe 分析两组间差异菌相对丰度与 LPR 组 RSI 总分及 9 个症状评分之间 Spearman 相关性发现, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) ( $\gamma = -0.409$ )、拟杆菌纲 (*Bacteroidia*) ( $\gamma = -0.420$ )、拟杆菌目 (*Bacteroidales*) ( $\gamma = -0.420$ )、普雷沃菌科 (*Prevotellaceae*) ( $\gamma = -0.381$ ) 与声音嘶哑或发音障碍呈负相关 ( $P < 0.05$ ); 杆菌纲 (*Bacilli*) ( $\gamma = 0.389$ ) 和口腔普雷沃菌 (*Prevotella\_oralis*) ( $\gamma = 0.348$ ) 与吞咽食物、液体或药片困难呈现正相关 ( $P < 0.05$ ); 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)、拟杆菌目 (*Bacteroidales*)、普雷沃菌科 (*Prevotellaceae*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 相对丰度与胃烧灼感、胸痛、消化不良或胃疼症状评分呈现正相关, 其中普雷沃菌属 ( $\gamma = 0.383$ ) 与该症状的相关系数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 解卵磷脂密螺旋体 (*Treponema\_lecithinolyticum*) ( $\gamma = 0.514$ ) 与痰过多或鼻涕倒流呈现正相关 ( $P < 0.01$ ); 不可培养的心杆菌 (*uncultured\_Cardiobacterium\_sp\_*) ( $\gamma = -0.427$ ) 与呼吸困难或反复窒息发作呈现负相关 ( $P < 0.05$ ); 鼠乳杆菌 (*Lactobacillus\_murinus*) ( $\gamma = -0.392$ ) 与咽部异物感呈现负相关 ( $P < 0.05$ ); 心杆菌目 (*Cardiobacteriales*) ( $\gamma = -0.366$ )、心杆菌科 (*Cardiobacteriaceae*) ( $\gamma = -0.366$ )、心杆菌属 (*Cardiobacterium*) ( $\gamma = -0.371$ )、杆菌纲 (*Bacilli*) ( $\gamma = -0.403$ )、马西放线菌 (*Actinomyces\_massiliensis*) ( $\gamma = -0.359$ ) 与烦人的咳嗽呈现负相关 ( $P < 0.05$ ); 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) ( $\gamma = -0.509$ ) 等与持续清嗓呈现负相关关系 ( $P < 0.01$ ); 乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) ( $\gamma = -0.382$ )、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) ( $\gamma = -0.382$ ) 与 RSI 总分呈现负相关 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



注:纵坐标代表菌相对丰富,横坐标的字母分别代表反流 9 个症状及症状总评分。

图 2 LEfSe 分析差异菌与 RSI 症状评分相关性分析

A: 声嘶或发生障碍; B: 持续清嗓; C: 痰过多或鼻涕倒流; D: 吞咽食物、液体或药片困难; E: 进食后或躺下后咳嗽; F: 呼吸  
困难或窒息发作; G: 烦人的咳嗽; H: 咽部异物感; I: 胃灼热、胸痛、消化不良或胃酸; J: RSI 总分

Figure 2 Investigate the correlation between differential bacteria in LEfSe analysis and RSI scores

A: Hoarseness or a problem with your voice; B: Clearing your throat; C: Excess throat mucus or postnasal drip; D: Difficulty swallowing food, liquids, or pills; E: Coughing after you ate or after lying down; F: Breathing difficulties or choking episodes; G: Troublesome or annoying cough; H: Sensations of something sticking in your throat or a lump in your throat I. Heartburn, chest pain, indigestion, or stomach acid coming up; J: total

### 3 讨论

唾液菌群是从口腔表面脱落的细菌的集合体<sup>[14]</sup>,喉、舌和扁桃体是其主要来源,由于检测唾液菌群可以反映 UAT 中微生物的状况<sup>[15-16]</sup>,越来越多的研究开始关注 LPR 患者的唾液菌群改变情况<sup>[8,17]</sup>。唾液中菌群结构的改变可能与 LPR 的发生和发展有关,但对其结果的临床意义目前研究还比较少。多数 LPR 患者的临床症状缺乏特异性,RSI 量表归纳总结了 LPR 患者常见的 9 类症状,临床发现患者评分情况个体差异较大,目前原因还不清楚。有研究发现 60.6% 的 GERD 患者存在肠道微生物生态失调(其中 39.4% 为小肠细菌过度生长),有微生物生态失调的患者更有可能出现腹胀和打嗝症状,存在菌群失调组和无菌群失调组患者的食管酸暴露时间和反流发作次数相似,但菌群失调患者的反流事

件与症状正相关,尤其是存在小肠细菌过度生长的患者<sup>[18]</sup>,提示 GERD 患者的症状与肠道菌群存在相关性。LPR 为 UAT 的慢性炎症,其发生发展与唾液菌群关系密切,因此 LPR 患者的症状也有可能和唾液菌群有关,不同的菌群组成可能与 LPR 患者不同的症状有关<sup>[19]</sup>,但相关研究尚未见报道。

为了探索 LPR 患者症状的相关因素,本研究采用 16S rDNA 高通量测序技术研究了 LPR 患者唾液菌群与正常人的差异,并分析了差异菌相对丰度与 RSI 评分之间的相关性。我们研究发现拟杆菌门、拟杆菌纲、拟杆菌目、普雷沃菌科、普雷沃菌属与胃灼热感、胸痛、消化不良或胃疼症状呈现正相关;口腔普雷沃菌与吞咽食物、液体和药片困难呈正相关,而乳酸杆菌科、乳酸杆菌属与 RSI 总分呈现负相关。

普雷沃菌是拟杆菌门的厌氧革兰阴性菌,近年来的研究发现普雷沃菌是哺乳动物相关微生物群落

常见和大量存在的微生物之一<sup>[20]</sup>。研究发现普雷沃菌属在 pH5.0 以上的环境中均可生存,但在 pH5.6-6.0 弱酸环境中相对丰度最高<sup>[21]</sup>,倾向于与其他微生物或有害物质协同引起人类疾病<sup>[20]</sup>,其在健康与疾病中的作用、在微生物菌群中的角色以及在宿主和菌群相互作用中的影响都还不清楚。普雷沃菌通常被认为是共生菌,很少参与感染,鉴于普雷沃菌的大量定植和低致病性,人类很可能与普雷沃菌共同进化,产生了互惠关系。然而,新出现的研究将普雷沃菌丰度和特定菌株的增加与炎症性疾病联系起来,使人类对普雷沃氏菌的认识再次达到新的高度<sup>[20]</sup>。研究发现普雷沃菌与反流性疾病存在密切关系,多数研究提示普雷沃菌属等革兰阴性菌在 GERD 患者唾液<sup>[22]</sup>、口腔<sup>[23]</sup>、下呼吸道<sup>[24]</sup>富集,普雷沃菌与链球菌的比值还与患者的腰臀比和食管裂孔疝长度有关,也是 Barrett 食管的危险因素<sup>[25]</sup>,因此普雷沃菌与 GERD 的发生和发展密切相关。此外,有些 LPR 患者同时合并 GERD,因此 RSI 量表中存在一些胃肠相关的症状,如胃烧灼感、胸痛、消化不良或胃疼,而本研究显示唾液中普雷沃菌的相对丰度与上述症状呈正相关,再次提示普雷沃菌可能在 GERD 发生和发展中起重要作用,也提示我们对于 LPR 此类症状评分偏高的患者可以尝试同时使用抗厌氧菌药物,如甲硝唑控制口腔及咽喉部普雷沃菌的浓度,可能有助于快速控制此类细菌相关的症状,树立患者继续治疗的信心。

乳酸杆菌属于嗜酸性革兰阳性菌,属于人类固有的微小菌群,定植于身体的各个部位,主要通过竞争性排斥和对致病菌的抗菌活性,促进菌群平衡,在维护人类健康方面发挥着重要作用。口腔中也定植有多种类型乳酸杆菌,研究发现多种乳杆菌表现出高的抗菌活性和对环境 pH 值、胆汁的高耐受性,是有潜力用作维护口腔健康的益生菌<sup>[26]</sup>,食用含有益生菌乳酸杆菌的产品已被证明可以降低龋齿风险和口腔携带变异链球菌的风险<sup>[27,28]</sup>。乳酸杆菌还具有抗基因毒性和抗炎作用,可以通过募集 pH2AX/RAD51 加速胆汁诱导的食管上皮黏膜细胞 DNA 损伤的修复,并减少食管细胞中 NF- $\kappa$ B 相关的炎症,在预防 GERD 患者的 Barrett 食管和食管腺癌方面具有重要意义<sup>[29]</sup>。日本研究人员发现从健康志愿者胃液中分离的 *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 不仅具有抗幽门螺旋杆菌作用,还可通过减少胃中胃泌素阳性细胞的数量来抑制小鼠的胃酸分泌,上述作用不仅有利于增强“三重疗法”根除幽门螺旋杆菌的作用,还可预防根除幽门螺旋杆菌后可能引起的

GERD<sup>[30]</sup>,因此对于该病的预防和治疗都具有重要意义。我们的研究提示与正常对照组相比,LPR 患者唾液中鼠乳杆菌、乳酸杆菌科、乳酸杆菌属富集,而对于 LPR 患者来说,反流相关症状越重、RSI 评分越高,鼠乳杆菌、乳酸杆菌科、乳酸杆菌属丰度越低,提示乳酸杆菌由于其耐酸和耐胆汁的特性,能够在 LPR 患者唾液中幸存,而对于 LPR 患者而言,总体症状严重的患者唾液中乳酸杆菌相对缺乏,提示对于治疗 RSI 评分偏高的患者,适度补充以乳酸杆菌为代表的益生菌可能有助于快速控制整体症状。

本研究还具有有一些局限性,首先我们诊断 LPR 的标准为 PPI 诊断试验,还存在一定的主观性,其次我们只是在北方人群中开展上述研究,结果可能在一定程度上受地域差异的影响,还需要今后开展多中心临床试验进一步探索其中的规律。

本研究对 LPR 患者唾液菌群的变化及 LPR 患者和健康志愿者间存在差异的唾液菌群与反流症状的相关性进行研究,发现 LPR 患者唾液中存在普雷沃菌、乳酸杆菌等微生物富集,而且普雷沃菌相对丰度与有些反流症状存在正相关、乳酸杆菌相对丰度与 RSI 总分负相关,提示抑制普雷沃菌可能有助于减轻 LPR 患者部分症状,而补充乳酸杆菌可能有助于减轻 LPR 患者的总体症状,上述结果为进一步探索 LPR 患者微生物组学的临床意义提供了有意义的试验数据。

## 参考文献:

- [1] Lechien JR, Akst LM, Hamdan AL, et al. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux disease: state of the art review [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 160(5): 762-782. doi:10.1177/0194599819827488
- [2] Xiao SF, Li JR, Zheng HL, et al. An epidemiological survey of laryngopharyngeal reflux disease at the otorhinolaryngology-head and neck surgery clinics in China [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2020, 277(10): 2829-2838. doi:10.1007/s00405-020-06045-0
- [3] Belstrøm D. The salivary microbiota in health and disease [J]. *J Oral Microbiol*, 2020, 12(1): 1723975. doi:10.1080/20002297.2020.1723975
- [4] Chen T, Yu WH, IZARD J, et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information [J]. *Database*, 2010, 2010: baq013. doi:10.1093/database/baq013
- [5] Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The oral microbiota is modified by systemic diseases [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(2): 148-156. doi:10.1177/0022034518805739

- [6] Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, et al. Systemic diseases caused by oral infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(4): 547-558. doi:10.1128/CMR.13.4.547
- [7] Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, et al. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke[J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 485. doi:10.1038/ncomms1491
- [8] 崔小媛, 尹龙龙, 张延平, 等. 咽喉反流患者唾液菌群初步研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2023, 58(6): 572-578. doi:10.3760/cma.j.cn115330-20230224-00084  
 CUI Xiaohuan, YIN Longlong, ZHANG Yanping, et al. A preliminary study on salivary microbiota of patients with laryngopharyngeal reflux[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2023, 58(6): 572-578. doi:10.3760/cma.j.cn115330-20230224-00084
- [9] Chen H, Wang H, Yang F, et al. Distinct microbiota dysbiosis in patients with laryngopharynx reflux disease compared to healthy controls[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2022, 279(7): 3569-3579. doi: 10.1007/s00405-022-07327-5.
- [10] 陈函, 杨帆, 王茂鑫, 等. 咽喉反流性疾病患者症状与体征的关系及相关危险因素研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2022, 30(6): 573-576. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2022.06.001  
 CHEN Han, YANG Fan, WANG Maixin, et al. Study on the relationship between symptoms and signs and related risk factors in patients with laryngopharyngeal reflux disease [J]. *Journal of Audiology and Speech Pathology*, 2022, 30(6): 573-576. doi:10.3969/j.issn.1006-7299.2022.06.001
- [11] 崔小媛, 张延平, 阎小妍, 等. 耳鼻咽喉科门诊成年患者的睡眠状况与咽喉反流性疾病的相关性[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(10): 754-759. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.10.009  
 CUI Xiaohuan, ZHANG Yanping, YAN Xiaoyan, et al. Relationship between sleep status and laryngopharyngeal reflux disease in adult patients in Otolaryngology clinic [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2019, 54(10): 754-759. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.10.009
- [12] Haworth JJ, Boyle N, Vales A, et al. The prevalence of intestinal dysbiosis in patients referred for antireflux surgery[J]. *Surg Endosc*. 2021; 35(12): 7112-7119. doi: 10.1007/s00464-020-08229-5
- [13] Zhong L, Shanahan ER, Raj A, et al. Dyspepsia and the microbiome; time to focus on the small intestine [J]. *Gut*. 2017;66(6): 1168-1169. doi:10.1136/gutjnl-2016-312574
- [14] Zhu H, Yip H C, Cheung M K, et al. Convergent dysbiosis of upper aerodigestive microbiota between patients with esophageal and oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2023. 152(9): 1903-1915, doi:/10.1002/ijc.34460.
- [15] Copeland E, Leonard K, Carney R, et al. Chronic rhinosinusitis: potential role of microbial dysbiosis and recommendations for sampling sites [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 57. doi:10.3389/fcimb.2018.00057
- [16] Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease[J]. *Cell Microbiol*, 2014, 16(7): 1024-1033. doi:10.1111/cmi.12308
- [17] Zheng XW, Zheng YJ, Chen T, et al. Effect of laryngopharyngeal reflux and potassium-competitive acid blocker (P-CAB) on the microbiological comprise of the laryngopharynx[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2024, 170(5): 1380-1390. doi:10.1002/ohn.682
- [18] Haworth JJ, Boyle N, Vales A, et al. The prevalence of intestinal dysbiosis in patients referred for antireflux surgery[J]. *Surg Endosc*, 2021, 35(12): 7112-7119. doi: 10.1007/s00464-020-08229-5
- [19] Lechien JR, De Vos N, Everard A, et al. Laryngopharyngeal reflux: the microbiota theory[J]. *Med Hypotheses*, 2021, 146: 110460. doi:10.1016/j.mehy.2020.110460
- [20] Tett A, Pasolli E, Masetti G, et al. Prevotella diversity, niches and interactions with the human host[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(9): 585-599. doi: 10.1038/s41579-021-00559-y
- [21] Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KA, et al. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92940. doi:10.1371/journal.pone.0092940
- [22] Liang T, Liu F, Liu LJ, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the oral microbiota of reflux esophagitis patients[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 732613. doi:10.3389/fcimb.2021.732613
- [23] Szanskaya LS, Gulua MM, Gilmiyarov EM, et al. The dental status of patients with gastroesophageal reflux disease depending on the intake of proton pump inhibitors [J]. *Stomatologiia*, 2020, 99(5): 25-31. doi: 10.17116/stomat20209905125
- [24] Krishnan U, Singh H, Tedla N, et al. Presence of gastric pepsinogen in the Trachea is associated with altered inflammation and microbial composition[J]. *Infect Immun*, 2020, 88(12): e00455-e00420. doi:10.1128/IAI.00455-20
- [25] Park CH, Lee SK. Exploring esophageal microbiomes in esophageal diseases; a systematic review [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2020, 26(2): 171-179. doi: 10.5056/jnm19240