

基于 *16S rDNA* 基因测序分析原发性高血压患者眼表菌群特征

张婷¹, 杨杨², 李爽乐³, 向圣锦⁴, 曹文斋²

1. 四川卫生康复职业学院健康人文研究中心, 四川 自贡 643000; 2. 自贡市第一人民医院心血管内科;
3. 自贡市第一人民医院眼科; 4. 温州医科大学附属眼视光医院中医眼科

摘要: **目的** 基于 *16S rDNA* 高通量测序分析原发性高血压患者眼表菌群的构成及特征, 为高血压相关眼病的预防及治疗提供新思路。 **方法** 选择 2022 年 7 月至 12 月自贡市第一人民医院门诊就诊的 60 例原发性高血压患者为高血压组, 选择同期 30 名健康志愿者为对照组。通过高通量测序技术对眼表细菌 *16S rDNA* 基因的 V3~V4 可变区进行检测, 比较两组眼表菌群的差异。 **结果** 测序共得到 6 544 987 条有效序列, 3 748 个操作分类单元 (OTUs), 其中高血压组特有 OTUs 为 1 296 个, 对照组特有 OTUs 为 476 个。多样性分析显示, 高血压组菌群 α 多样性的基于丰度的覆盖估计值 (ACE) 指数 [494.03(356.68, 888.36) 比 385.86(333.99, 502.88), $Z=-2.019$, $P=0.043$] 及 Chao1 指数 [387.50(260.00, 558.10) 比 343.15(256.45, 413.55), $Z=-2.009$, $P=0.045$] 高于对照组, β 多样性分析显示两组间群落结构存在差异 ($P<0.05$)。菌群相对丰度分析显示, 高血压组放线菌门丰度 [0.203(0.123, 0.319) 比 0.117(0.058, 0.181), $Z=-2.441$, $P=0.015$]、棒状杆菌属丰度 [0.123(0.051, 0.230) 比 0.034(0.017, 0.100), $Z=-2.822$, $P=0.004$] 高于对照组。特征性细菌线性判别分析显示, 与对照组相比, 高血压组放线菌门及放线菌纲, 棒状杆菌目及棒状杆菌科、棒状杆菌属丰度增高。功能分析发现高血压组在烟酸和烟酰胺代谢、花生四烯酸代谢、核黄素代谢等 14 条通路上富集。 **结论** 高血压患者较健康人群的眼表菌群在多样性、相对丰度及特征性菌类方面发生了显著变化。

关键词: 眼表菌群; 眼表微生物; 高血压; *16S rDNA*

Characteristics of ocular surface microbiota in patients with essential hypertension by *16S rDNA* gene sequencing

ZHANG Ting¹, YANG Yang², LI Shuangle³, XIANG Shengjin⁴, CAO Wenzhai²

1. Department of Health Humanities Research, Sichuan Vocational College of Health and Rehabilitation, Zigong, Sichuan 643000; 2. Department of Cardiology, Zigong First People's Hospital; 3. Department of Ophthalmology, Zigong First People's Hospital; 4. Department of TCM Ophthalmology, Wenzhou Medical University Affiliated Optometry Hospital

Abstract: **Objective** To analyze the composition and characteristics of ocular surface microbiota in patients with essential hypertension based on high-throughput sequencing of *16S rDNA*, and provide new ideas for the prevention and treatment of hypertension related eye diseases. **Methods** Sixty patients with essential hypertension who visited the outpatient department of Zigong First People's Hospital from July 2022 to December 2022 were selected as the hypertension group (HTN group), and 30 healthy volunteers from the same period were selected as the control group (Ctrl group). High-throughput sequencing technology was used to detect the V3-V4 variable regions of the *16S rDNA* gene in ocular surface bacteria, and the differences between the two groups were compared. **Results** A total of 6 544 987 valid sequences and 3 748 operational taxonomic units (OTUs) were obtained through sequencing, including 1 296 OTUs unique to the HTN group and 476 OTUs unique to the Ctrl group. Diversity analysis showed that the abundance-based coverage estimator (ACE) index [494.03 (356.68, 888.36) vs 385.86 (333.99, 502.88), $Z=-2.019$, $P=0.043$] and Chao1 index [387.50 (260.00, 558.10) vs 343.15 (256.45, 413.55), $Z=-2.009$, $P=0.045$] of the HTN group were higher than those of the Ctrl group, and β diversity analysis revealed distinct microbial community structures between the two groups ($P<0.05$). The analysis of relative abundance of microbiota showed that the abundance of actinobacteria [0.203(0.123, 0.319) vs 0.117(0.058, 0.181),

doi: 10.16439/j.issn.1673-7245.2025-0053

基金项目: 四川省科技厅项目(25KPZP0281); 浙江省卫健委课题(2022ZX013); 自贡市重点科技计划项目(2021ZCYKY05); 四川卫生康复职业学院校级科研团队(CWKY-TD24-10); 自贡市卫健委高层次人才科技孵化项目(WJW-GCCRC005)

通信作者: 曹文斋, E-mail: caowenzhai@163.com(张婷, 杨杨并列第一作者)

$Z=-2.441, P=0.015]$ and corynebacterium $[0.123(0.051, 0.230)$ vs $0.034(0.017, 0.100)$, $Z=-2.822, P=0.004]$ in the HTN group was significantly higher than that in the Ctrl group. Characteristic bacterial linear discriminant analysis showed that compared with the Ctrl group, the abundance of actinobacteria, actinobacteria, corynebacteriales, and corynebacteriaceae in the HTN group increased. Functional analysis revealed that 14 pathways enriched in the HTN group, including nicotinate and nicotinamide metabolism, arachidonic acid metabolism, and riboflavin metabolism. **Conclusion** The ocular surface microbiota of hypertensive patients has changed significantly in diversity, relative abundance and characteristic fungi compared with healthy individuals.

Keywords: ocular surface flora; ocular surface microbiota; hypertension; 16S rDNA

高血压是全球性的严重健康问题,据2023年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布的《全球高血压报告》显示^[1],全球约有13亿高血压患者,在30~79岁成人中高血压患病率为33%,其中53.5%的患者血压没有得到有效控制,导致心、脑、肾、眼等靶器官损害,严重威胁患者的生命健康。高血压导致的眼部损害包括视网膜、脉络膜、视神经等损害,并与青光眼^[2]、白内障^[3]等眼病有关。视网膜病变为高血压眼部最早、最常见并发症,13%~70%患者会出现此并发症^[4-5]。目前已知的发病机制包括微循环障碍、炎症介导、氧化应激、内皮损伤、血管新生等^[2,6]。此外,高血压还可导致患者眼红指数^[7]和干眼症发病率^[8]增加,泪液中炎性因子白细胞介素-1 β (interleukin-1beta, IL-1 β)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)上调^[9],眼部稳定性下降,生理稳态和视觉功能受损,但高血压是否会导致患者的眼表环境改变还需进一步研究。

眼表菌群是由一组组成相对稳定、长期定植于眼球表面的角膜、结膜上皮和眼表泪膜的微生物群体,包括真菌、细菌和病毒等。眼表菌群具有强大的免疫调节功能,通过与眼表组织的互利共生维持眼部与体内平衡^[10]。现有研究发现,多种眼部疾病如结膜炎^[11]、睑缘炎^[12]、干眼症^[13]及睑板腺功能障碍^[14]以及慢性全身性疾病,如糖尿病^[15]、帕金森病^[16]、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染^[17]等均会导致眼表菌群紊乱。然而高血压是否会带来眼表菌群的改变,高血压眼病又是否异常的与眼表菌株有关尚未有研究。本研究旨在利用16S rDNA基因高通量测序技术,探讨原发性高血压患者眼表菌群组成和特定细菌,为后续高血压相关眼病的预防及治疗提供新视角和新思路。

1 对象与方法

1.1 对象 选择自贡市第一人民医院2022年7月至

2022年12月门诊就诊的60例原发性高血压患者为高血压组,同期体检中心的30名健康志愿者作为对照组。本研究经自贡市第一人民医院医学伦理委员会批准(伦理研2021年第40号),所有研究对象均签署知情同意书。

高血压组纳入标准:①符合原发性高血压的诊断,即未使用降压药的情况下,非同日测量3次血压,收缩压 ≥ 140 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)和/或舒张压 ≥ 90 mmHg,同时排除继发性高血压,伴或不伴视网膜病变者;②年龄 ≥ 18 岁;③近3个月内未佩戴角膜接触镜、无眼部用药史、无眼部手术及外伤史;④一般状态良好,能够配合取样。排除标准:①继发性高血压;②有角膜溃疡、青光眼、白内障、翼状胬肉、结膜炎、角膜炎等眼部疾病者;③妊娠期或哺乳期女性;④除高血压及高血压并发症以外的其他慢性全身性疾病如糖尿病、艾滋病、干燥综合征等及使用免疫抑制剂者。

对照组纳入标准:①非高血压患者;②年龄 ≥ 18 岁;③近3个月内未佩戴角膜接触镜、无眼部用药史、无眼部手术及外伤史;④一般状态良好,能够配合取样。排除标准:①有角膜溃疡、青光眼、白内障、翼状胬肉、结膜炎、角膜炎等眼部疾病者;②妊娠期或哺乳期女性;③其他慢性全身性疾病如糖尿病、艾滋病、干燥综合征等及使用免疫抑制剂者。

1.2 样本量计算 由于现有文献缺乏高血压眼表菌群的相关数据,本研究以预实验棒状杆菌属相对丰度作为分析指标,纳入高血压和对照组各5例。预实验结果显示高血压组和对照组棒状杆菌属相对丰度分别为11.24和6.28,高血压组的标准差为5.99,对照组的标准差是2.19。采用两组总体均数假设检验,选取 $\alpha=0.05$ (双侧检验),把握度 $1-\beta=0.9$,样本量高血压组比对照组为2:1,公式如下^[18]:

$$n_1 = \frac{k+1}{k} \left[\frac{(t_\alpha + t_\beta) s_c}{\delta_1 - \delta_0} \right]^2$$

公式中, $n_1:n_2=1:k$, $t_\alpha=1.96$, $t_\beta=1.28$, s_c =标准差, $\delta_1-\delta_0$ =两均数差。采用样本量计算软件PASS 2021 Means 菜单下的Two-Sample T-Tests Allowing Equal Variance 对该指标计算后可知,高血压组和对照组分

别需要样本为 48 例和 24 例。考虑到脱落率为 20%，本研究高血压组和对照组分别纳入 60 例和 30 例。

1.3 方法

1.3.1 研究对象基本信息的收集 通过在门诊/体检中心询问获取患者的基线资料,如年龄、吸烟史(每日吸烟量 ≥ 1 支,连续吸烟时间 ≥ 1 年或戒烟未滿3年)^[19]、饮酒史[日均饮酒至少 50 g 白酒(酒精 30 g 以上)]^[19],现场测量获取身高、体重、血压等数据。体重指数=体重(kg)/身高²(m²)。

1.3.2 样本采集 样本采集在固定的治疗室进行。取样环境先经紫外线消毒 30 min 后方可采样。受试者采样前清洁眼睑皮肤后仰卧位于治疗床上。取样者戴帽子、口罩、无菌手套后进行采样。受试者滴盐酸丙美卡因滴眼液 1 滴,闭目 30 s 后向上看。采样者用无菌棉棒压下眼睑暴露结膜囊,持无菌棉拭子轻微压力涂擦下睑结膜、球结膜、泪阜,重复 2 次^[20],过程中禁止接触睫毛和外睑皮肤,确保采样过程中未受到眼部皮肤等组织污染。同时使用无菌镊子抽取 4 个空白无菌拭子,点盐酸丙美卡因滴眼液做空白对照,排除污染产生的假阳性结果。采样后迅速将拭子置于 1.5 mL 无菌离心管并放入冰盒中,于 1 h 内送入实验室,-80 °C 冻存,1 周内提取 16S rDNA。整个采样过程均无菌操作。

1.3.3 16S rDNA 高通量测序 利用美国 Invitrogen 公司生产的 DNA 提取试剂盒(Quant-iT™ Broad-Range DNA)从眼表样本中提取微生物群落基因组 DNA;依照说明书要求,提取的 DNA 通过 1.5% 琼脂糖凝胶检测质量,DNA 纯度及浓度使用 Thermo Nano Drop One 检测仪测量。合格品通过 BioRadS1000 PCR 仪进行扩增,扩增对象为 16S rDNA V3~V4 区。

PCR 引物序列为 319F:5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3',806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物按照凝胶提取试剂盒说明,从 1.5% 的琼脂糖凝胶中提纯,采用荧光定量进行 PCR。按 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® 标准流程进行测序文库构建,测序平台为 Illumina MiSeqPE301+8+8+301。

1.3.4 生物信息学分析 (1)对所获得的序列筛选后进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)归并划分(软件 usearch -fastq_mergepairs v10)。(2)菌群多样性分析(R 语言 vegan 包 v 3.5.1):采用 alpha 多样性分析[基于丰度的覆盖估计值(abundance-based coverage estimator, ACE)指数、Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数]得到与物种内多样性相关的信息。以基于欧式距离的主成分分析(principal components analysis, PCA)来呈现物质间 β 多样性,采用相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM)和差异性分析

(analysis of dissimilarities, Adonis)量化评估组间群落结构的差异。(3)物种差异性分析(R 语言 vegan 包 v 3.5.1):利用群落丰度数据进行组间差异性比较,采用统计学方法评估差异物种。(4)微生物组学中的差异分析方法(LDA effect size, LEfSe)及影响因子分析(软件 LEfse 1.0):为检测不同群体间的差异菌群,区分不同生物特性的物种,寻找稳固的群体间差异标志物,对所有分类等级进行差异性分析,识别群体间的物种丰度差异。(5)菌群功能预测(软件 PICRUSt2 v 2.3.0-b):采用系统发育重建未观察状态法(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, PICRUSt)对 OTU 丰度数据进行标准化,然后将 OTU 对应的 greengene id 比对到京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库获得 Pathway 信息,再通过 PICRUSt 分析获得预测的菌群功能。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 软件 27.0、R 软件 v 3.5.1 对数据进行处理及统计学分析。计数资料以例(%)表示,组间比较采用卡方(χ^2)检验。计量资料,符合正态分布用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或协方差分析;非正态分布则用中位数(P_{25} , P_{75})表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基线资料 两组患者的基线资料比较见表 1。两组患者年龄、性别、吸烟及饮酒史差异无统计学意义($P>0.05$)。高血压组体重指数、收缩压、舒张压高于对照组(均 $P<0.05$)。高血压组高血压病程为(6.19 \pm 2.25)年,其中 1 级高血压 20 例(33.33%),2 级高血压 33 例(55.00%),3 级高血压 7 例(11.67%),均服用抗高血压药,采用基思-瓦格纳-巴克(Keith-Wagener-Barker, KWB)分级法^[4]对高血压组高血压性视网膜病变分级,轻度及以下(I 级及以下)高血压性视网膜病变 37 例(61.67%),中度(II 级)16 例(26.66%),重度(III 级、IV 级)7 例(11.67%)。

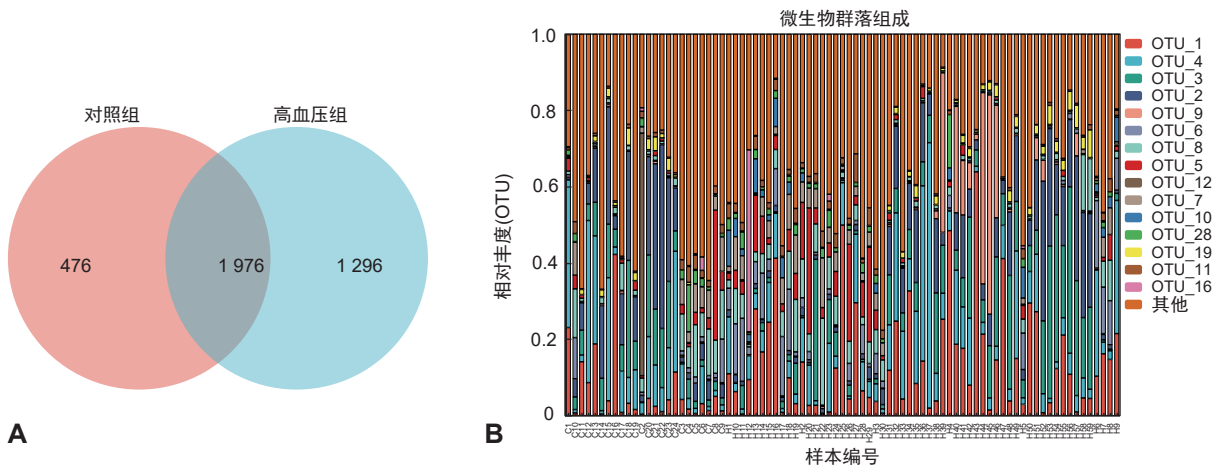
2.2 样本测序汇总 90 例样本中,83 例样本测序成功(1 例高血压组样本,6 例对照组样本未能产生足够的 16S rDNA 基因扩增产用于测序分析),剪切过滤共得到 6 544 987 条有效序列,共得到 3 748 个 OTU,两组共有的 OTU 个数为 1 976 个,高血压组比对照组拥有更多的特有 OTU 个数,见图 1A。83 例样本在 OTU 水平上的群落组成见图 1B。物种累积曲线显示随样本量增加逐渐趋于平坦,表明样品微生物群落检测比率饱和且样本量充足,见图 2。

2.3 眼表菌群多样性分析 样品内多样性(α 多样性)分析结果显示(图3),高血压组眼表菌群 ACE 指数、Chao1 指数高于对照组(均 $P < 0.05$),而 Simpson 指数、Shannon 指数与对照组差异无统计学意义。进一步控制协变量(性别、年龄、体重指数、吸烟史、饮酒史)后,采用协方差分析进行比较,结果与之前一致(表2),

表明高血压患者眼表菌群丰度增加,而菌群多样性无明显变化。样品间多样性(β 多样性)结果显示(图4),两组样本的眼表菌群分布有所不同,进一步采用 ANOSIM 相似性分析和 Adonis 多元方差分析,结果显示两组群落显著不同(分别 $R=0.113, P=0.009; F=2.010, P=0.032$)。

表 1 高血压组与对照组基线资料

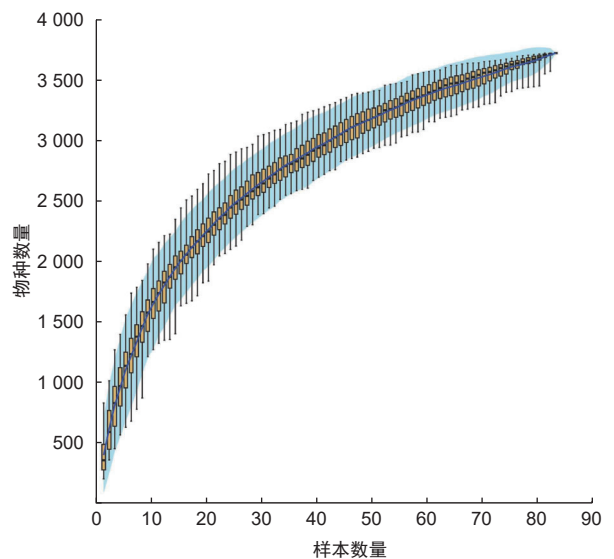
组别	例数	年龄(岁)	性别[例(%)]		吸烟史[例(%)]	饮酒史[例(%)]	体重指数(kg/m ²)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
			男	女					
高血压	60	58.53±14.28	36 (60.0)	24 (40.0)	26(43.3)	22 (36.7)	22.15±0.59	165.74±9.83	98.20±4.64
对照	30	55.09±14.46	17 (56.7)	13 (43.3)	10 (33.3)	9 (30.0)	21.26±0.61	114.81±6.87	69.50±3.17
t^2 值		1.073	0.092		0.833	0.394	6.671	25.410	30.470
P 值		0.286	0.761		0.358	0.528	<0.001	<0.001	<0.001



注: A 为 OTU 水平下的韦恩图; B 为菌群群落组成柱状图,横坐标 C 为对照组, H 为高血压组。OTU 为操作分类单元,是对测序的序列筛选并划分得出。高血压组 $n=59$,对照组 $n=24$ 。

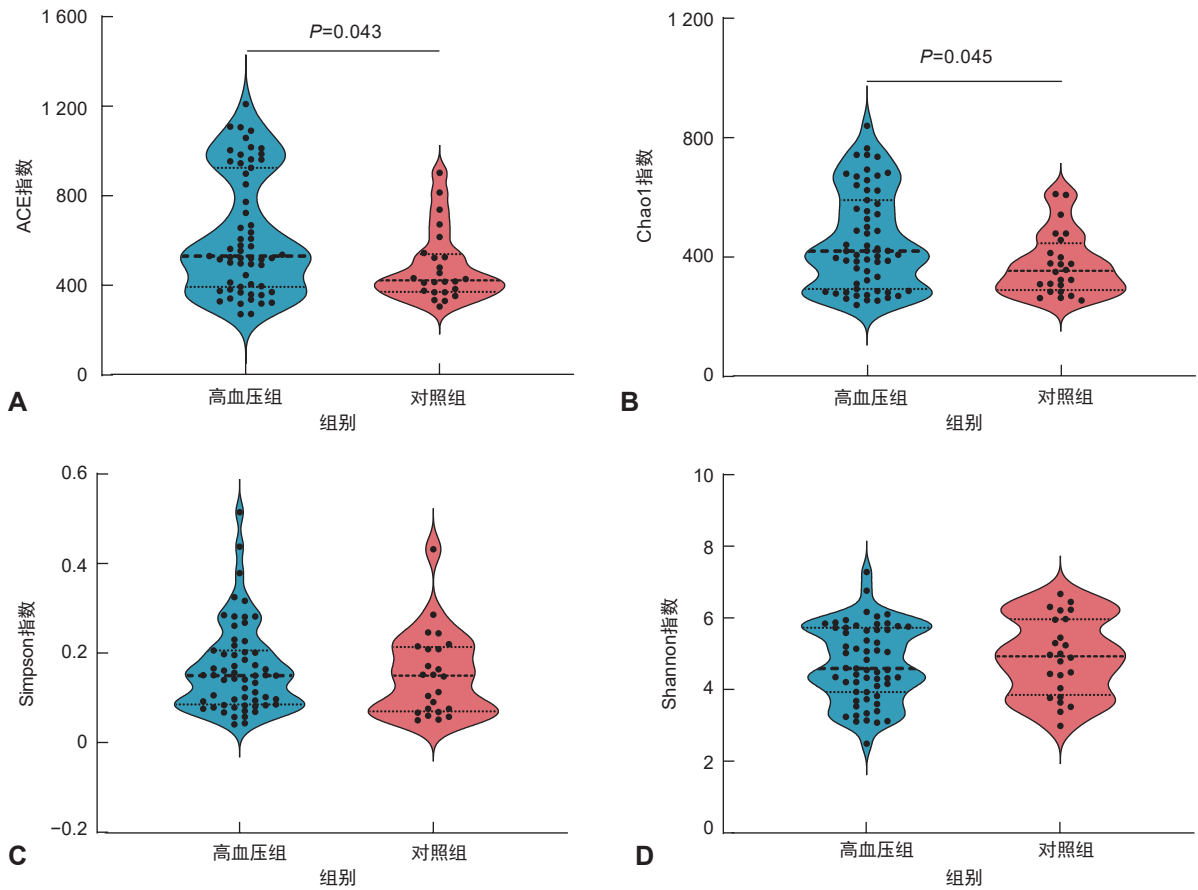
图 1 眼表样本菌群物种组成

2.4 菌群分布特征 在门水平上(图5),高血压患者和健康对照人群的眼表菌群主要为变形杆菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes),而高血压组眼表菌群中放线菌门(Actinobacteriota)丰度明显高于对照组($Z=-2.441, P=0.015$)(表3)。属水平上(图6),高血压组眼表的棒状杆菌属(Corynebacterium)丰度高于对照组($Z=-2.882, P=0.004$),进一步控制协变量(性别、年龄、BMI、吸烟史、饮酒史)后采用协方差分析进行比较,结果与之前一致(表3)。高血压组眼表的优势菌群主要为棒状杆菌属(Corynebacterium)、不动杆菌属(Acinetobacter)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、罗尔斯通菌属(Ralstonia)、沙雷氏菌属(Serratia);对照组优势菌群为罗尔斯通菌属(Ralstonia)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、不动杆菌属(Acinetobacter)、芽孢杆菌科未分类菌属(unclassified_f_Bacillaceae)。



注:横坐标为样本量;纵坐标为对样本进行总体的随机抽样后操作分类单元数目。总样本 $n=83$ 。

图 2 物种累积曲线



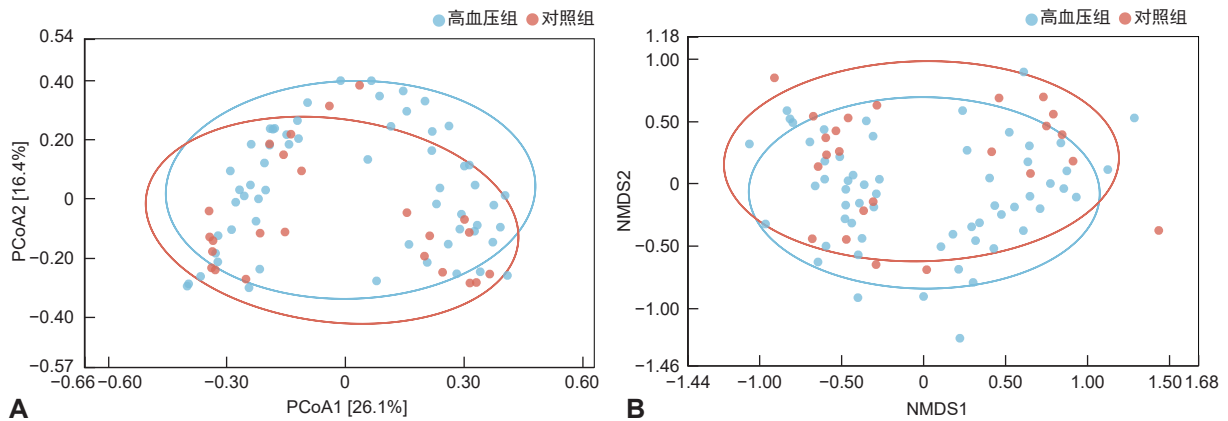
注: ACE为基于丰度的覆盖估计值。A为ACE指数; B为Chao1指数; C为Simpson指数; D为Shannon指数。高血压组 $n=59$, 对照组 $n=24$ 。

图3 两组样本眼表菌群的 α 多样性分析

表2 两组眼表菌群 α 多样性分析 [中位数 (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	ACE指数	Chao1指数	Simpson指数	Shannon指数
高血压	59	494.03 (356.68, 888.36)	387.50 (260.00, 558.10)	0.13 (0.07, 0.19)	4.31 (3.65, 5.45)
对照	24	385.86 (333.99, 502.88)	343.15 (256.45, 413.55)	0.13 (0.05, 0.19)	4.65 (3.70, 5.68)
Z值		-2.019	-2.009	-0.588	0.763
P值		0.043	0.045	0.557	0.445
F值*		5.387	6.254	0.694	0.797
P值*		0.023	0.010	0.407	0.375

注: *采用协方差分析, 协变量有性别、年龄、体重指数、吸烟史、饮酒史。ACE为基于丰度的覆盖估计值。



注: OTU为操作分类单元。A为菌群OTU水平上主成分分析, 横坐标表示一个主成分(PCoA1), 纵坐标表示另一个主成分(PCoA2), 百分比表示主成分对样品差异的贡献。B为菌群OUT水平上无量纲多维标定法(NMDS)分析。点为各样本的指数值, 曲线为置信椭圆, 是数据在降维后的空间中的分布情况, 代表椭圆内覆盖了该组样本坐标点的95%的可能分布范围。高血压组 $n=59$, 对照组 $n=24$ 。

图4 两组样本眼表菌群的 β 多样性分析

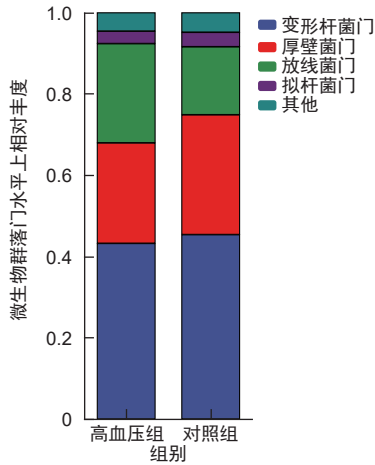


图5 门水平上两组样本眼表菌群结构的差异分析(高血压组 n=59, 对照组 n=24)

表3 门和属上两组差异菌群相对丰度

组别	例数	放线菌门	棒状杆菌属
高血压	59	0.203(0.123, 0.319)	0.123(0.051, 0.230)
对照	24	0.117(0.058, 0.181)	0.034(0.017, 0.100)
Z值		-2.441	-2.822
P值		0.015	0.004
F值*		2.240	2.563
P值*		0.049	0.045

注: *采用协方差分析, 协变量有性别、年龄、体重指数、吸烟史、饮酒史。

2.5 基于LEfSe分析的特征性细菌 为进一步探讨两组眼表中的差异菌群, 采用LEfSe分析, 将线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)评分>3的菌群纳入分析, 结果显示高血压组和对照组眼表菌群的优势种群和系统发育分布存在一定差异(图7), 高血压组

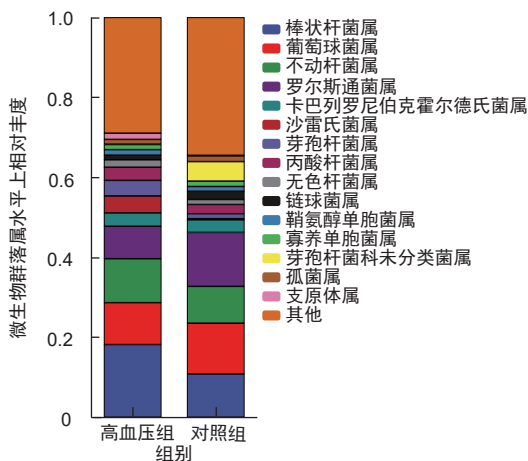
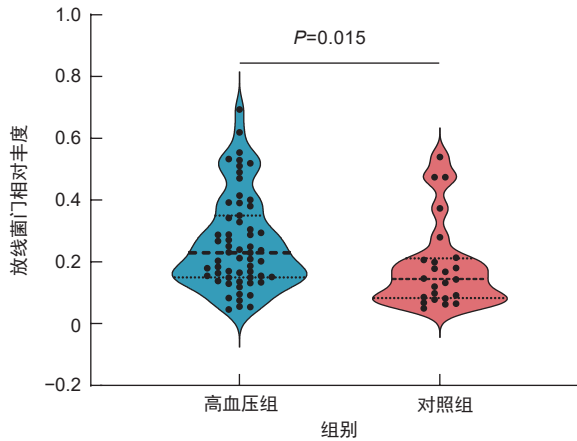


图6 属水平上两组样本眼表菌群结构的差异分析(高血压组 n=59, 对照组 n=24)

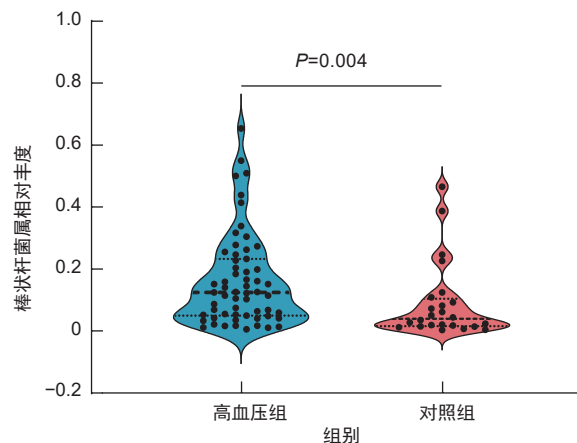
3 讨论

越来越多研究证据表明眼表存在一定数量的“核心微生物”, 对调节局部免疫功能、维持眼表健康具有重要作用^[21]。Dong等^[22]利用脱氧核糖核酸测序和



眼表显著增高的菌群为放线菌门及放线菌纲, 棒状杆菌目及棒状杆菌科、棒状杆菌属, 而伯克氏菌目(Burkholderiales)及伯克氏菌科(Burkholderiaceae), 巴斯德菌科(Pasteurellaceae)等在对照组眼表菌群中显著增加。

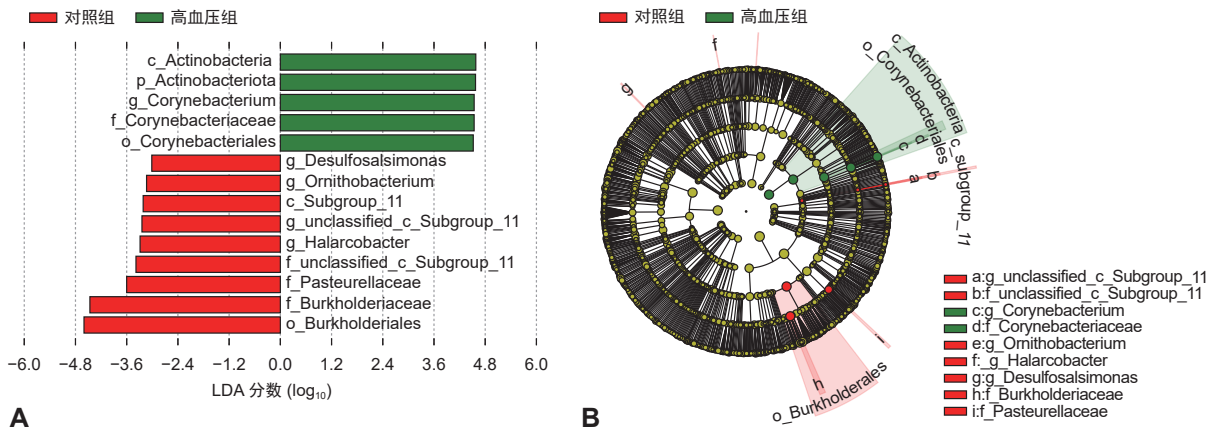
2.6 高血压患者眼表菌群功能预测 与对照组相比, 高血压组在14个代谢通路上存在差异, 烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)、花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、核黄素代谢(riboflavin metabolism)、真核生物的核糖体生物合成(ribosome biogenesis in eukaryotes)、铁载体基因非核糖体肽的生物合成(biosynthesis of siderophore group non-ribosomal peptides)、神经活动配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)等信号通路在高血压组表现得更显著(均P<0.05, 图8)。



16S rRNA 基因测序技术发现, 眼表丰度最高为变形菌门, 放线菌门和厚壁菌门, 假单胞菌属、棒状杆菌属、不动杆菌属、葡萄球菌属及链球菌属等5个属被认为是眼表的“核心菌群”。本研究发现健康对照在门水平上与既往研究结果一致, 但在属水平上存在菌株的异质

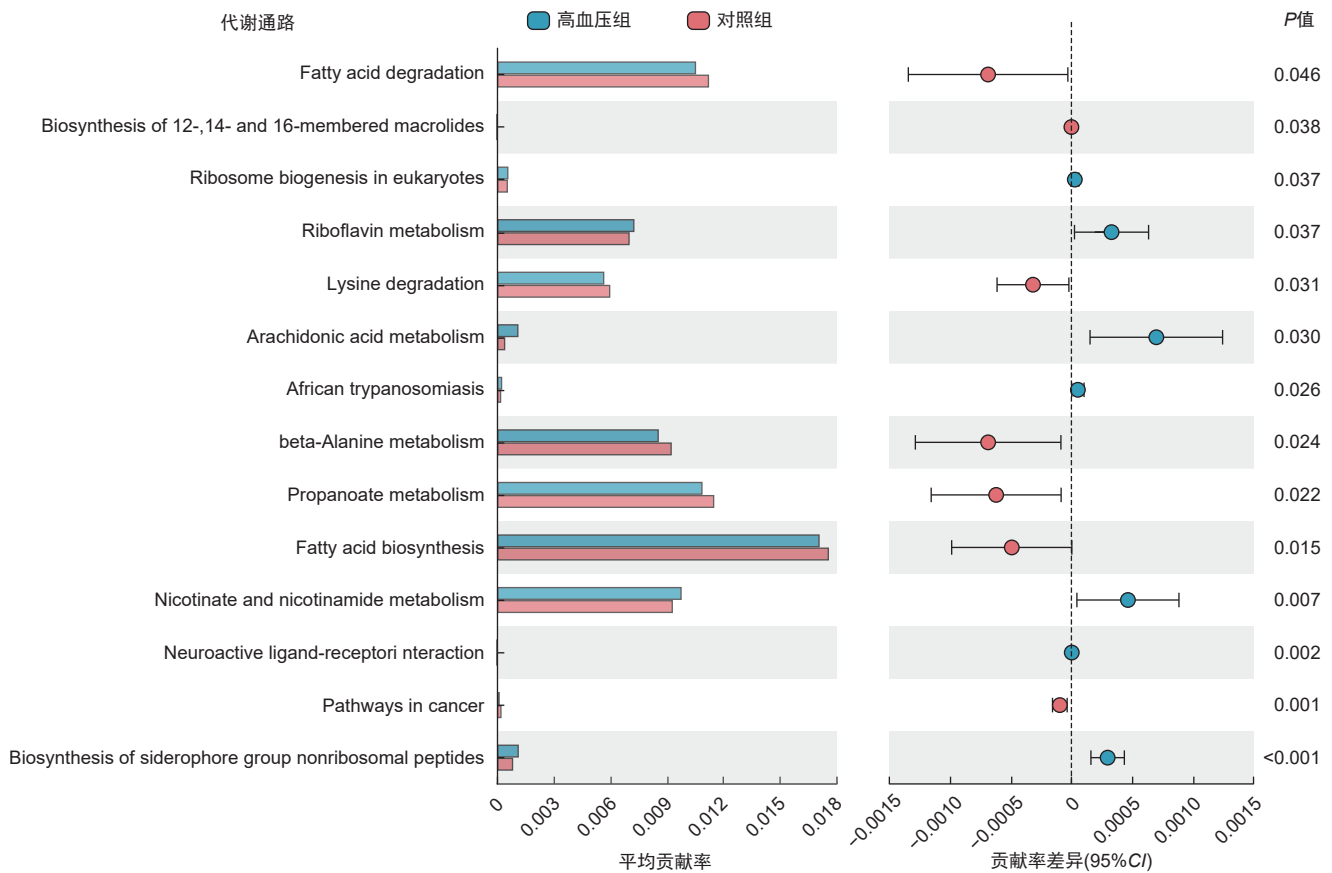
性,除上述核心菌群外,罗尔斯通菌属、卡巴列罗尼伯克霍尔德氏菌属在健康人体眼表中丰度较高。因此,

健康人眼表微生物群落组成的细节仍有待进一步明确。



注: A 为两组样本显著差异物种的 LDA 评分直方图,柱状图的长度代表 LDA SCORE 的大小,即不同组间显著差异物种的影响程度;B 为两组样本显著差异菌群的进化分支图。菌名前 p, c, o, f, g, s 前缀分别代表 phylum(门)、class(纲)、order(目)、family(科)、genus(属)、species(种) 6 个不同的分类层级。Actinobacteria 为放线杆菌纲; Actinobacteriota 为放线杆菌门; Corynebacterium 为棒状杆菌属; Corynebacteriaceae 为棒状杆菌科; Corynebacteriales 为棒状杆菌目; Burkholderiaceae 为伯克氏菌科; Pasteurellaceae 为巴斯德菌科; Halarcobacter 为嗜盐弓形杆菌属; Ornithobacterium 为鸟杆菌属; Desulfosalsimonas 为脱硫单胞菌属。高血压组 $n=59$, 对照组 $n=24$ 。

图 7 两组样本眼表菌群的线性判别分析(LDA)



注: Fatty acid degradation 为脂肪酸降解; Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides 为 12-, 14-和 16-环内酯的生物合成; Ribosome biogenesis in eukaryotes 为真核生物的核糖体生物合成; Riboflavin metabolism 为核黄素代谢; Lysine degradation 为赖氨酸降解; Arachidonic acid metabolism 为花生四烯酸代谢; African trypanosomiasis 为非洲锥虫病; beta-Alanine metabolism 为 β -丙氨酸代谢; Propanoate metabolism 为丙酮代谢; Fatty acid biosynthesis 为脂肪酸合成; Nicotinate and nicotinamide metabolism 为烟酸和烟酰胺代谢; Neuroactive ligand-receptor interaction 为神经活动配体-受体相互作用; Pathways in cancer 为癌症通路; Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides 为铁载体基因非核糖体肽的生物合成。

图 8 眼表菌群基因功能预测(高血压组 $n=59$, 对照组 $n=24$)

本研究数据表明,高血压组眼表菌群物种丰度高于健康对照,且两组样本菌群组成不同。在门和属水平上,高血压组眼表菌群中放线菌门和棒状杆菌属丰度明显高于对照组。之前有研究报道在翼状胬肉^[23]、睑缘炎^[24]、干眼症^[8]及干燥综合征^[25]患者眼表上,棒状杆菌数目显著增加,本研究结果与之类似。众所周知,棒状杆菌属隶属放线菌门,属于革兰氏染色阳性杆菌,常存在于人类口腔、鼻腔、咽喉部、外耳道、眼结膜中,为条件致病菌。棒状杆菌的免疫调节作用已被证实,其通过 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)激活 I κ B(inhibitor of NF- κ B) 激酶,驱动核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路,导致细胞持续释放促炎因子 IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),引发慢性炎症,导致微环境破坏^[26]。此外,其还诱导眼表黏膜 T 细胞产生 IL-17^[21],介导异常血管重塑及神经纤维退变^[27],最终导致眼表屏障功能受损。代谢伯克氏菌目(Burkholderiales)及伯克氏菌科(Burkholderiaceae)广泛存在于水和土壤等多种生态环境中,包括具有致病性的属和环境友好的属。研究发现其包含大量的未知的生物合成基因簇,生物信息学预测这些基因簇能够编码不同类型的化合物,如非核糖体多肽(nonribosomal peptide synthetase, NRPs)、聚酮化合物(polyketide, PKs)等,从而发挥抗菌、抗真菌,抑制病原体定植等活性^[28]。在健康人群眼表中其丰度相对较高,可能与其环境友好的属含量增高有关,从而更好发挥菌群的免疫调节作用,以维持眼表稳态。

烟酰胺(nicotinamide, NAM)是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)的前体,补充烟酰胺可以提升 NAD 水平。NAD 对视网膜神经节细胞的体细胞、轴突和树突状神经具有保护作用,补充烟酰胺能减少由眼内高压引起的视网膜神经节细胞的损伤^[29]。NAM 可以通过减轻氧化应激反应而抑制人视网膜色素上皮细胞系 19(adult retinal pigment epithelial cell line-19, ARPE-19)发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),减轻高血压、糖尿病等所致眼底新生血管纤维化^[30]。因此,本研究推测烟酰胺通路的激活可能与高血压视网膜病变及病程有关。沉默调节蛋白(Sirtuins)是一类依赖 NAD⁺的去乙酰化酶,其活性直接受细胞内 NAD⁺水平调控,调节关键的代谢过程、炎症反应等生物学过程^[31]。Sirtuins 能抑制 NF- κ B 等促炎通路,减少炎症因子(如 IL-6、TNF- α)释放,从而减轻炎症损伤^[32]。此外, Sirtuin 家族蛋白可调节杯状细胞分泌黏蛋白 5AC(mucin 5AC, MUC5AC),增强泪膜稳定性,发挥免疫屏障功能^[33]。因此,烟酰胺代谢通路激活后可能通过增强黏膜屏障、修复泪膜和抑制炎症间接调控眼表的微

环境及常驻菌群。

本研究探究了高血压患者眼表菌群的构成特点和特定细菌,为后续研究眼表菌群在高血压相关眼病发生发展中的潜在作用奠定了前期基础。但研究也存在一定的局限性。首先,纳入的研究对象数量较少,研究结果的推广性受到一定的限制,后续研究还需扩大样本量,覆盖不同年龄层、性别及地域,以增加结论的推广性及可靠性。其次,本研究只能说明高血压患者眼表菌群和健康人群存在差异,可能参与眼表免疫调节,并影响高血压眼病的发生发展,但其中的核心菌群及具体的生物学机制还有待进一步研究。最后,本研究纳入的高血压患者均接受了抗高血压药治疗,后续还需详细收集抗高血压的药物种类、剂量等情况,以及职业、用眼习惯等人口学变量,进一步探究环境-菌群-药物-高血压之间的交互作用。

综上所述,本研究发现人体眼表存在众多的微生物群,且高血压患者眼表存在特定的微生物群落。未来有望通过菌群移植、开发眼部益生菌药物等手段来调节眼表菌群,为高血压患者提供精准治疗方案,以维持眼部稳态,减缓高血压眼病的疾病进展。

利益冲突声明 所有作者声明无利益冲突

本主题国内外已有的结论

• 人体眼表有相对稳定菌群定植,其对维持眼表稳态,促进眼部健康,维持机体免疫具有重要意义。国内外研究主要集中在人口学变量(年龄、性别)及感染性/免疫性眼表病变所致的眼表菌群改变。

本文特色与见解

• 本文通过 16S rDNA 高通量测序技术解析原发性高血压患者的眼表菌群特征,发现高血压患者眼表菌群多样性增加,菌落具有一定的特征性,放线菌门及棒状杆菌属在眼表富集。

参考文献

[1] Kario K, Okura A, Hoshida S, et al. The WHO global report 2023 on hypertension warning the emerging hypertension burden in globe and its treatment strategy[J]. Hypertens Res, 2024, 47(5): 1099-1102.
 [2] 郝静,陈志杰,刘法,等. 视网膜中央静脉阻塞后发生新生血管性青光眼的危险因素和预测模型建立[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(5): 780-784.
 [3] Latebo AA, Assefa NL, Ferede TW, et al. Prevalence of cataract and its associated factors among adults aged 40 years and above living in Durame town, Southern Ethiopia, 2023: a community-based cross-sectional study[J]. BMJ Open, 2024, 14(12): e089741.
 [4] 张佳,王艳丽,宋晓丛,等. 张家口市高血压视网膜病变患者情况调

- 查及危险因素分析[J]. 基础医学与临床, 2024, 44(6): 853-857.
- [5] 沈丽, 李娟娟, 黄俊. 高血压患者眼底血管变化与分期和危险分层及心脏功能的关系研究[J]. 心血管病防治知识, 2022, 12(1): 13-16.
- [6] Lee M, Leskova W, Eshaq RS, et al. Mechanisms of retinal photoreceptor loss in spontaneously hypertensive rats[J]. *Exp Eye Res*, 2024, 247: 110065.
- [7] 王莎莎, 许斐平, 何杰, 等. 应用非接触性眼表综合分析仪观察T2DM和/或高血压患者的眼表特征[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(6): 1017-1021.
- [8] Aldawsari SA, Alzaidi N, Abdalla Elsayed M, et al. Prevalence and determinants of symptomatic dry eye disease among adult urban residents of high-altitude areas of Southwest Saudi Arabia: a survey[J]. *Clin Ophthalmol*, 2023, 17: 2687-2695.
- [9] Mravec Bencurova D, Vyborny P, Dankova P. Comparative analysis of tear cytokines in patients with glaucoma, ocular hypertension, and healthy controls[J]. *Int Ophthalmol*, 2023, 43(10): 3559-3568.
- [10] 张婷, 杨庭树, 向圣锦, 等. 眼表菌群与慢性全身性疾病关系的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(2): 177-181.
- [11] 赵荣超, 李洁平, 赵岩, 等. 1350例眼结膜囊分泌物病原菌及耐药性分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(2): 270-272.
- [12] Wang C, Dou X, Li J, et al. Composition and diversity of the ocular surface microbiota in patients with blepharitis in Northwestern China[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 768849.
- [13] 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.
- [14] Zhao F, Zhang D, Ge C, et al. Metagenomic profiling of ocular surface microbiome changes in meibomian gland dysfunction[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(8): 22.
- [15] 王丽敏, 常田, 高山俊, 等. 2型糖尿病患者眼表菌群的构成研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(7): 572-578.
- [16] Kusbeci T, Kusbeci OY, Aktepe OC, et al. Conjunctival flora in patients with Parkinson's disease[J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(4): 251-256.
- [17] Liu Q, Xu ZY, Wang XL, et al. Changes in conjunctival microbiota associated with HIV infection and antiretroviral therapy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(12): 1.
- [18] 吴圣贤, 王成祥. 临床研究样本含量计算[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 23-25.
- [19] 卢国连, 潘伟杰, 冷发敏. 老年高血压患者C型凝集素样受体-2与继发性心脑血管疾病的关系[J]. 中华高血压杂志(中英文), 2025, 33(3): 286-289.
- [20] Doan T, Akileswaran L, Andersen D, et al. Paucibacterial microbiome and resident DNA virome of the healthy conjunctiva[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(13): 5116-5126.
- [21] St Leger AJ, Desai JV, Drummond RA, et al. An ocular commensal protects against corneal infection by driving an interleukin-17 response from mucosal $\gamma\delta$ T cells[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 148-158. e5.
- [22] Dong K, Pu J, Yang J, et al. The species-level microbiota of healthy eyes revealed by the integration of metataxonomics with culturomics and genome analysis[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 950591.
- [23] 惠娜, 秦莉, 黎黎. 翼状胬肉患者眼表微生物菌群分析[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(11): 1989-1993.
- [24] 高瑞, 孙旭光, 王智群, 等. 睑缘炎患者眼表微生物检测及相关临床分析[J]. 眼科, 2016, 25(2): 118-122.
- [25] 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.
- [26] Altonsy MO, Kurwa HA, Lauzon GJ, et al. *Corynebacterium tuberculo-stearicum*, a human skin colonizer, induces the canonical nuclear factor- κ B inflammatory signaling pathway in human skin cells[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2020, 8(1): 62-79.
- [27] 黄姗姗, 段芳. Müller细胞介导的IL-17信号通路与糖尿病视网膜病变之间关系的研究进展[J]. 眼科学报, 2024, 39(10): 512-519.
- [28] 王雪. 伯克氏菌重组系统的研究与应用[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [29] Tribble JR, Otmani A, Sun S, et al. Nicotinamide provides neuroprotection in glaucoma by protecting against mitochondrial and metabolic dysfunction[J]. *Redox Biol*, 2021, 43: 101988.
- [30] 周丽. 烟酰胺通过减轻氧化应激抑制人视网膜色素上皮细胞的上皮间质转化[D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [31] Chen M, Tan J, Jin Z, et al. Research progress on Sirtuins (SIRT) family modulators[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116481.
- [32] Shen P, Lin W, Huang Y, et al. Wutou decoction attenuates rheumatoid arthritis in rats through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 3): 118921.
- [33] 陈国明, 陈智尧. 针刺对去势雌兔干眼症模型的炎症因子及MUC5AC、MUC19表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2017, 33(8): 55-59.

收稿日期: 2025-03-04 责任编辑: 刘莉