

## 研究报告

## 慢性阻塞性肺疾病小鼠肠道免疫球蛋白 A 包被微生物组成及基因功能分析

康宇婷<sup>1</sup>, 李秋洁<sup>2</sup>, 邱卓然<sup>2</sup>, 续超<sup>2</sup>, 贾伟<sup>1,3</sup>, 汪澎湃<sup>\*1</sup>

1 宁夏医科大学总医院医学科学研究所 宁夏临床病原微生物重点实验室, 宁夏 银川 750004

2 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏 银川 750004

3 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏 银川 750004

康宇婷, 李秋洁, 邱卓然, 续超, 贾伟, 汪澎湃. 慢性阻塞性肺疾病小鼠肠道免疫球蛋白A包被微生物组成及基因功能分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2676-2689.

KANG Yuting, LI Qiujie, QIU Zhuoran, XU Chao, JIA Wei, WANG Pengtao. Composition and gene functions of intestinal IgA-coated microbiota in the mouse model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2676-2689.

**摘要:** 【背景】小气道免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 在慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的病理生理学中发挥着重要作用。然而肠黏膜来源的 IgA 在 COPD 病程中的作用及包被微生物群尚不明确。【目的】探讨 COPD 小鼠肠来源 IgA 包被肠道微生物组成、丰度及菌群基因功能变化。【方法】采用鼻腔滴入脂多糖和熏香烟法相结合建立 COPD 小鼠模型。收集 COPD 小鼠和野生型小鼠粪便样品各 12 份, IgA 磁珠分选 IgA 包被的肠道微生物菌群, 16S rRNA 基因高通量测序分析其组成及功能。【结果】通过比较两组肺组织切片染色、平均内衬间隔(mean linear intercept, mLI)和肺泡灌洗液炎症因子浓度证实 COPD 模型鼠建模成功。OTU 和主成分分析(principal component analysis, PCA)均发现两组间粪便样品中肠来源 IgA 包被微生物群落差异大, 具有可比性。 $\alpha$  多样性分析显示两组间物种多样性无显著统计学差异( $P>0.05$ )。物种组成分析显示: 两组肠来源 IgA 包被的菌群结构和菌群差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。COPD 组的菌群结构中显著富集的菌目是: 蛭弧菌目(*Bdellovibrionales*)、梭菌目(*Clostridiales*)和双歧杆菌目(*Bifidobacteriales*); 科层面分类中富集的主要是: 普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、类芽孢杆菌科(*Paenibacillaceae*)、蛭弧菌科(*Bdellovibrionaceae*)及双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*); 菌属层面分类上主要富集拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、狭义梭菌属(*Clostridium-sensu-stricto*)、苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、吸血弧菌属(*Vampirovibrio*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。菌群差异基因通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库通路富集分析

资助项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(2022AAC03470); 宁夏回族自治区重点研发计划(2021BEG03090)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2022AAC03470), and the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2021BEG03090).

\*Corresponding author. E-mail: wpt2023@nyfy.com.cn

Received: 2023-09-28; Accepted: 2023-11-06; Published online: 2023-12-19

结果显示 COPD 组细胞生长与死亡、核苷酸代谢以及消化系统相关通路明显上调, 而膜运输相关通路显著下调。【结论】COPD 小鼠肠来源 IgA 包被肠道微生物存在紊乱及基因功能失调。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 免疫球蛋白 A 包被肠道微生物; 16S rRNA 基因测序

## Composition and gene functions of intestinal IgA-coated microbiota in the mouse model of chronic obstructive pulmonary disease

KANG Yuting<sup>1</sup>, LI Qiuji<sup>2</sup>, QIU Zhuoran<sup>2</sup>, XU Chao<sup>2</sup>, JIA Wei<sup>1,3</sup>, WANG Pengtao<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology, Institute of Medical Sciences, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

<sup>2</sup> School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

<sup>3</sup> Center of Medical Laboratory, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

**Abstract: [Background]** Immunoglobulin A (IgA) secreted by small airways plays a key role in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, the role of IgA derived from intestinal mucosa in the pathogenesis of COPD and the IgA-coated microbiota remain unclear. **[Objective]** To investigate the composition, abundance, and differential gene functions of intestinal-derived IgA-coated gut microbiota in the mouse model of COPD. **[Methods]** A mouse model of COPD was established by intranasal instillation of lipopolysaccharide combined with cigarette smoking. Twelve fecal samples from COPD mice and 12 fecal samples from wild-type mice were collected. IgA magnetic beads were used to separate IgA-coated gut microbiota, followed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing. **[Results]** We examined the modeling of COPD in mice by comparing the staining of lung tissue sections, mean linear intercept (mLI), and inflammatory cytokine concentrations in the alveolar lavage fluid between the two groups. Both OTU and PCA showed that the intestinal IgA-coated microbiota in fecal samples were different and comparable between the two groups. The alpha diversity analysis showed no statistically significant difference in the species diversity between the two groups ( $P>0.05$ ). The structure of intestinal-derived IgA-coated microbiota had differences between the two groups ( $P<0.05$ ). In the COPD group, the bacterial orders that were significantly enriched were *Bdellovibrionales*, *Clostridiales*, and *Bifidobacteriales*; the mainly enriched bacterial families were *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae*, *Bdellovibrionaceae*, and *Bifidobacteriaceae*; and the mainly enriched bacterial genera were *Alloprevotella*, *Brevibacillus*, *Clostridium-sensu-stricto*, *Turicibacter*, *Faecalibacterium*, *Vampirovibrio*, and *Bifidobacterium*. The results of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes showed that the cell growth and death, nucleotide metabolism, and digestive system-related pathways in the COPD group were significantly up-regulated, while the membrane transport pathway was significantly down-regulated. **[Conclusion]** The COPD mice present altered intestinal-derived IgA-coated gut microbiota and gene dysfunction.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease; IgA-coated gut microbiota; 16S rRNA gene sequencing

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有肺部病变的异质性疾病, 临床表现为持续性肺部炎症, 主要累及肺实质和外周气道, 导致渐行性和不可逆的气流阻塞<sup>[1]</sup>, 而香烟烟雾暴露是引起 COPD 最主要的危险因素<sup>[2]</sup>。近年来 COPD 的患病率不断上升使其成为日益严重的全球健康问题, 预计到 2030 年将成为全球人口发病率和死亡率的第三大主要原因<sup>[3-4]</sup>。随着高通量测序的不断发展, 人们已逐渐认识到 COPD 与人类微生物群落之间的联系。虽然慢性阻塞性肺疾病是一种呼吸系统疾病, 气道微生物组与其之间的联系也已被普遍认可<sup>[5-6]</sup>, 但有研究表明 COPD 通常伴随着慢性胃肠道疾病的发生<sup>[7-8]</sup>, 因此肠道微生物组在 COPD 发生发展中引起了极大的关注。Chiu 等<sup>[9]</sup>发现在接受常规治疗的 COPD 患者中, 肠道微生物的一些群落变化与肺功能下降有关, 也表明了肠道微生物组在 COPD 中的潜在作用。同样有其他研究证实肠道微生物群组成显著影响香烟烟雾诱导的小鼠 COPD 发展, 并阐明了 COPD 中微生物群与“肠-肺轴”之间致病的联系<sup>[7]</sup>。因此肠道微生物也能很好地表征 COPD 的发生发展。

免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 主要由肠道、口腔和鼻腔等黏膜内层组织中的细胞分泌, 成人通常每天产生大约 3–5 g IgA<sup>[10]</sup>。产生的 IgA 二聚化后与肠上皮细胞基底外侧表面的聚合免疫球蛋白受体 (polymeric immunoglobulin receptor, pIgR) 结合并被内吞。转胞后, pIgR 裂解导致分泌型 IgA (secretory immunoglobulin A, SIgA) 释放<sup>[11]</sup>。在肠腔中, SIgA 与黏液构成第一道防线保护肠道上皮免受病原体和毒素的侵害。不仅如此, SIgA 还通过对肠道微生物的强大控制在维持肠道稳态方面起到不可或缺的作用<sup>[12]</sup>;

有研究证明 SIgA 可作为细菌代谢的碳源, 改变细菌基因表达并影响细菌运动<sup>[13]</sup>; 被其包被的细菌也有助于宿主新陈代谢, 并且对于保护人类肠道中的共生多样性至关重要<sup>[14]</sup>。

目前已有研究证明 COPD 患者血清 IgA 表达紊乱<sup>[15]</sup>, 在严重 COPD 的细支气管周围淋巴滤泡中会有 IgA 的产生<sup>[16]</sup>, 并且小气道 IgA 在 COPD 尤其是肺气肿表型的病理生理学中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。但肠黏膜来源的 IgA 在 COPD 病程中的作用却鲜有报道, 且肠黏膜来源 IgA 包被的微生物群组成在 COPD 发病机制中的作用知之甚少, 是否参与肠-肺串扰及其潜在机制还不明晰。

本研究以 COPD 的模型鼠为研究对象, 利用 16S rRNA 基因高通量测序技术对 COPD 小鼠及野生型小鼠粪便样品 16S rRNA 基因测序后进行生物信息学分析, 探讨 COPD 小鼠肠来源的 IgA 抗体包被菌群的组成及丰度变化, 评估微生物群与疾病的因果效应, 为“肠-肺轴”的相互影响提供科学依据, 为 COPD 的预防治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠购自武汉云克隆科技股份有限公司。24 只小鼠饲养于恒温、恒湿、12 h 明暗循环的环境, 自由饮食饮水, 适应性饲养 1 周后开始实验。根据小鼠平均体重分为 2 组, 每组 12 只, 分别为空气暴露组 (WT)、脂多糖+香烟烟雾暴露组 (COPD)。本研究涉及的所有动物程序均经宁夏医科大学动物研究伦理委员会批准, 动物伦理审查备案 (KYLL-2021-696)。

## 1.2 主要试剂和仪器

链霉亲和素包被磁珠及小鼠 IgA 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒,赛默飞世尔科技有限公司;生物素包被抗鼠 IgA 抗体, BD 公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、TE 缓冲液、天狼星红染液和 HE 染液,北京索莱宝科技有限公司;IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒,江莱生物公司。光学显微镜,尼康公司;玻璃熏箱,武汉云克隆科技股份有限公司;低温离心机, Eppendorf 公司。

## 1.3 COPD 模型小鼠的建立

SPF 级 C57BL/6 小鼠,适应性饲养 1 周,采用鼻腔滴入 LPS 加熏香烟的方法建立 COPD 小鼠动物模型,分别于第 1、29 天经鼻腔滴入 6  $\mu$ L LPS (5  $\mu$ g/ $\mu$ L),第 2–30 天(除第 29 天)采取熏香烟法,将小鼠放入自制的玻璃熏箱,10 支/次,30 min/次,2 次/d,5 d/周,共 4 周。观察对照组及实验组小鼠的一般情况(小鼠有无死亡,呼吸活动是否正常,有无脱毛、躁动、腹部胀大、呼吸急促等)。

## 1.4 小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)收集及炎症因子检测

小鼠造模成功后,随机取 5 只小鼠麻醉处死,充分暴露气管和肺部,沿着主支气管向双肺注入生理盐水,反复灌洗后合并灌洗液,根据试剂盒说明检测 BALF 上清中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量。

## 1.5 小鼠肺组织病理染色

取 1.4 中小鼠肺组织于 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h,行乙醇脱水、包埋和切片处理,按照 HE 染液试剂盒说明书进行 HE 染液染色。天狼星红染色:切片脱蜡至脱水后,加入天狼星红染液,滴染 1 h,冲洗 10 min,光学显微镜下拍照并分析组织病理学变化。

## 1.6 小鼠肠腔内 IgA 含量检测

将 1.4 中小鼠结肠纵向切开,刮出粪便和黏液并放入无菌 EP 管中,500  $\mu$ L PBS 重悬后,

2 500 r/min 离心 5 min,去除杂质收集上清,12 000 r/min 离心 5 次以沉淀细菌,收集沉淀备用,同时收集上清利用小鼠 IgA 定量 ELISA 试剂盒检测其含量,在 450 nm 处读取吸光度,并用标准曲线计算 IgA 的浓度。将浓度标准化为粪便重量。

## 1.7 IgA 筛选

取 1.6 中高速离心后所得细菌沉淀加入 1 mL PBS 重悬,400 r/min 离心取其上清后进行反复离心收集沉淀(4 次),加 1 mL PBS 重悬沉淀并在该样本中加入提前室温下孵育好的生物素包被抗鼠 IgA 抗体,然后将该混合物置于 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入适量链霉亲和素包被的磁珠孵育后将样本放在磁力架上,用洗液清洗至少 2 次(第 1 次的清洗上清保留作为后续阴性样本),丢弃上清,加入 200  $\mu$ L TE (pH 8.0)重悬后立即置于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

## 1.8 筛选后样本 16S rRNA 基因测序

利用磁珠法从小鼠粪便免疫球蛋白结合的富集样品中提取 DNA。细菌 16S rRNA 基因的 V3 和 V4 区在 Illumina HiSeq 上扩增并测序,每端 300 个循环。使用 Mothur v1.32 和 QIIME v1.8.9 等处理和分析序列。

## 1.9 数据处理及分析

对包括 12 个 COPD 小鼠和 12 个对照 WT 小鼠粪便共计 24 个样品进行了 16S rRNA 基因测序。对原始的测序数据进行如下处理:去低质量 reads、去除接头污染 reads、去除含 N 的 reads、去除低复杂度 reads,获得 clean data。将高质量的 clean data 用于后期分析;使用软件 FLASH v1.2.11 将 reads 拼接成 tags;再利用软件 USEARCH v7.0.1090 将 tags 聚类成 OTU 并与数据库比对、物种注释;基于 OTU 和注释结果进行样品物种多样性分析、组成分析、组间关键物种差异分析及物种功能分析等。使用 ACE、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数对样品的群落多样性进行评估,所有的统计及绘图使用 R 软

件完成。对于样品组间的差异统计,使用非参数检验方法 Wilcoxon 秩和检验,根据差异检验的  $P$  值默认标准  $P<0.05$  筛选出差异基因。再通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行代谢通路注释,获得菌群差异基因参与的主要生化代谢途径和信号转导途径。

## 2 结果与分析

### 2.1 COPD 模型鼠的评价

#### 2.1.1 肺组织切片染色

对小鼠肺组织取材后进行 HE 染色和天狼星红染色。HE 染色结果如图 1A 所示, WT 组

小鼠肺组织支气管壁光滑、上皮结构完整,肺泡结构清晰、大小均匀; COPD 组小鼠肺组织部分肺泡壁塌陷,肺泡不规则扩大并相互融合形成肺大疱;肺间质内可见一定程度的炎性细胞浸润,支气管壁平滑肌萎缩、黏膜皱襞增多,符合 COPD 病理改变。天狼星红染色结果如图 1A 所示, COPD 模型鼠肺组织中有明显可见的肺组织纤维化。

#### 2.1.2 肺组织平均内衬间隔(mean linear intercept, mLI)

平均内衬间隔的计算是将随机通过图片的两条线的长度除以线段通过的肺泡隔膜数。与对照组相比, COPD 组平均肺泡间隔明显增加 ( $P<0.01$ ) (图 1B), 因此 COPD 组肺泡破坏增加。

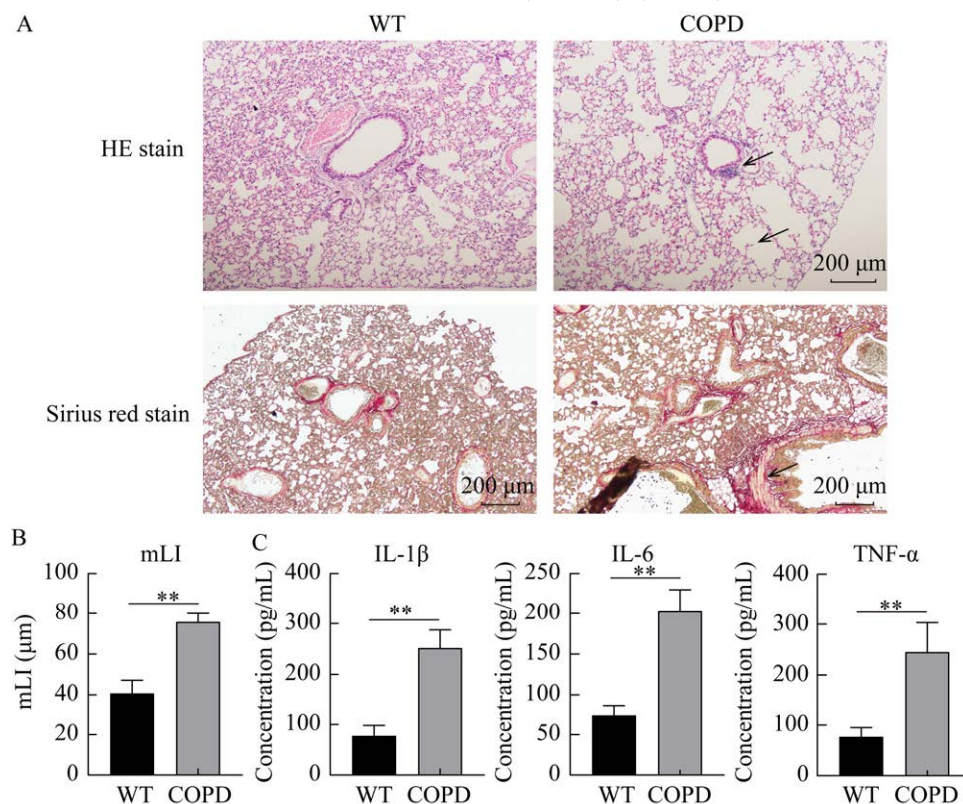


图 1 COPD 模型鼠(COPD)与对照组(WT)病理染色及炎症因子检测 A: 肺组织 HE 染色和天狼星红染色. B: 两组平均内衬间隔. C: 两组肺泡灌洗液炎症因子浓度. 从上至下箭头所指依次为: 气管阻塞、肺大疱形成, 胶原含量增加. \*\*:  $P<0.01$

Figure 1 Pathological staining and detection of inflammatory factors in COPD model mice (COPD) and control group (WT). A: HE staining and sirius red staining of lung tissue. B: Mean linear intercept between two groups. C: Inflammatory factors concentration in alveolar lavage fluid between two groups. From top to bottom, the arrows point to: tracheal obstruction, bullae, and increased collagen. \*\*:  $P<0.01$ .

### 2.1.3 肺泡灌洗液炎症因子浓度

收集小鼠肺泡灌洗液,利用 ELISA 检测两组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  浓度。结果如图 1C 所示,与对照组相比,COPD 模型鼠肺泡灌洗液炎症因子浓度均显著增加( $P<0.01$ )。

### 2.2 小鼠肠腔 IgA 定量检测

收集肠腔内容物检测 IgA 含量结果如图 2 所示,与对照组相比,COPD 模型鼠肠腔内 IgA 含量显著降低( $P<0.01$ )。

### 2.3 两组肠道菌群基因组测序 OTU 分析

在 97%相似度下聚类获得各样品 OTU 数量,绘制 Venn 图(图 3),初步分析 COPD 组和 WT 组 IgA 包被的肠道菌群 OTU 差异。如图 3 所示,两组小鼠粪便中共有的肠道菌群有 645 种,

WT 组特有的肠道菌群有 84 种;COPD 组特有的肠道菌群有 46 种。由核心 OTU 及各自特有 OTU 的数量可以看出 COPD 组 IgA 包被的肠道菌群 OTU 总量上较 WT 组稍低。

### 2.4 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

利用 PCA 将复杂数据进行降维分析,以简化两组样本的菌群丰度数据结构,如图 4 所示。COPD 组与 WT 组内值相对集中,但由于肠道微生物物种组成丰度存在明显个体特异性,因此组内样本间存在一定差异。通过组间比较可以发现两组间肠道微生物群落有较大差异,因此两组间具有可比性。

### 2.5 $\alpha$ 多样性分析

COPD 组和 WT 组样本的 coverage 均大于 99%,表示文库覆盖率高,即每份样品序列被测出的概率高。对两组样本进行  $\alpha$  多样性组间差异分析,如图 5 及表 1 所示。分析中使用  $\alpha$  多样性分析中的 4 个指标,从群落多样性指数(Simpson, Shannon)和丰富度指数(ACE, Chao1)研究分析粪便样品中微生物的多样性和丰富度。

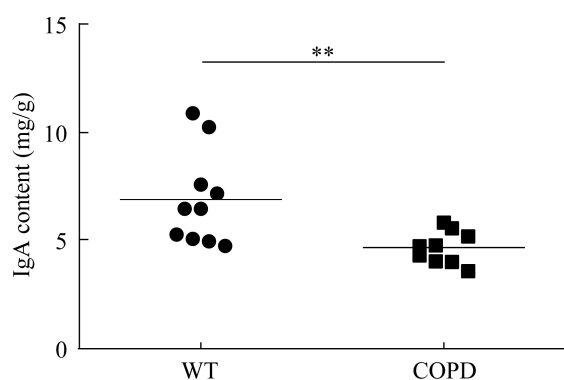


图 2 COPD 组和对照组肠腔内 IgA 含量  
Figure 2 Intra-intestinal IgA content in COPD group and control group. \*\*:  $P<0.01$ .

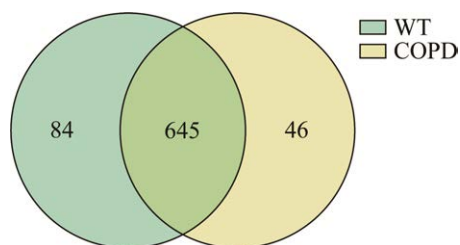


图 3 对照组与 COPD 组 OTU 的 Venn 图  
Figure 3 Venn plots of OTUs in the control group and COPD group.

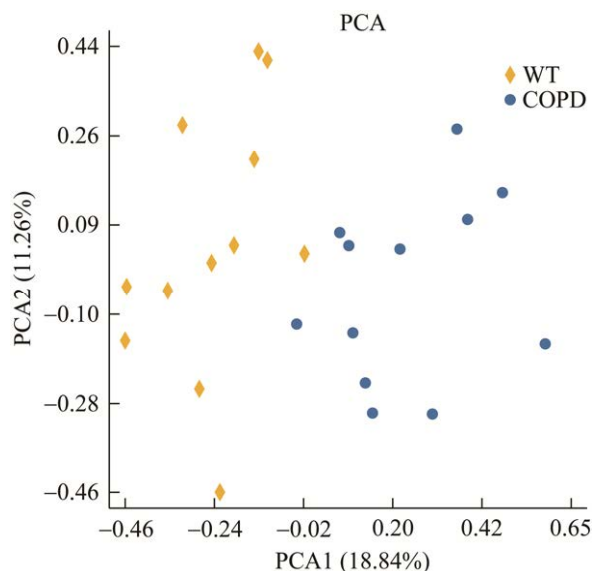


图 4 基于 OTU 水平的 PCA 分析  
Figure 4 PCA analysis based on OTU level.



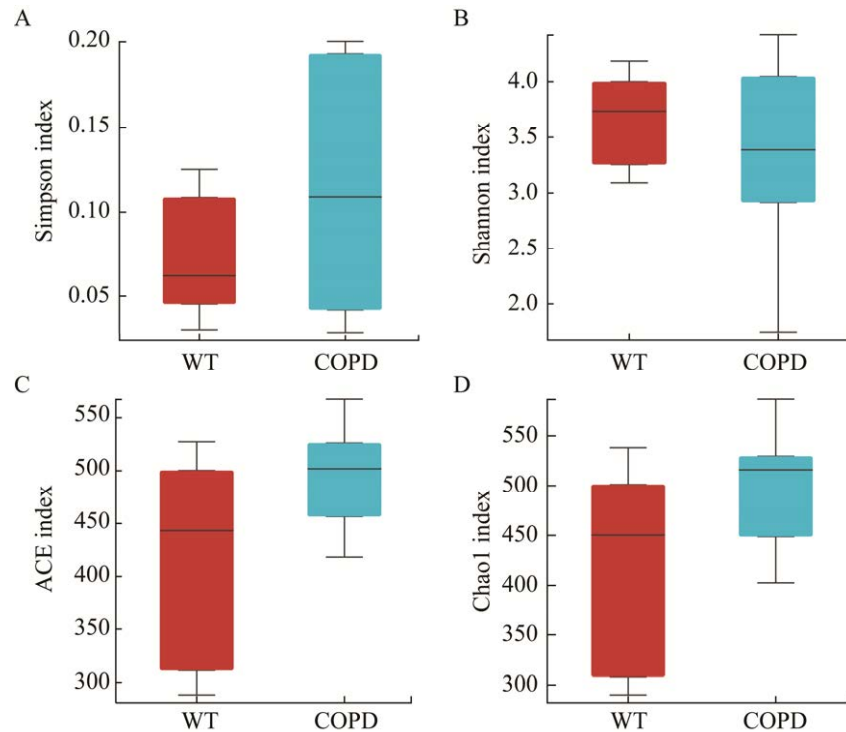


图5  $\alpha$ 多样性组间差异指标 A: Simpson指数. B: Shannon指数. C: ACE指数. D: Chao1指数

Figure 5 Alpha diversity differences between groups. A: Simpson index. B: Shannon index. C: ACE index. D: Chao1 index.

从 $\alpha$ 多样性各指数来看, COPD组的Simpson指数、ACE指数和Chao1指数均略高于WT组, Shannon指数略低于对照组(WT)。但进一步使用非参数检验方法Wilcoxon秩和检验进行组间比较分析多样性组间差异, 发现两组之间无显著统计学差异, 说明两组的菌群多样性差异不明显(表1)。

表1 两组肠道菌群 $\alpha$ 多样性各指标比较 IQR (P25, P75)

Table 1 Comparison of alpha diversity indicators of two groups of intestinal microbiota, IQR (P25, P75)

指数	WT组	COPD组	P值
Index	WT group	COPD group	P value
Simpson	0.06 (0.05, 0.11)	0.11 (0.04, 0.19)	0.551 17
Shannon	3.73 (3.25, 3.99)	3.38 (2.91, 4.04)	0.551 17
ACE	442.99 (311.03, 499.91)	501.54 (456.22, 525.83)	0.068 36
Chao1	449.95 (307.94, 500.65)	515.64 (448.38, 529.22)	0.059 66

IQR: 四分位间距; P25: 第25%百分位数; P75: 第75%百分位数

IQR: Interquartile range; P25: 25th percentile; P75: 75th percentile.

## 2.6 物种组成及关键物种差异分析

对两组OTU代表序列进行分析后得到每个OTU对应的物种分类信息。在门、科、属水平统计两组IgA包被的群落组成及差异, 并以物种丰度柱形图、关键物种差异比较柱形图的形式呈现。

结果显示, 在门水平上(图6), 两组样本中IgA包被的肠道微生物主要为10门: 变形菌门(*Proteobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、软壁菌门(*Tendericutes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、*Candidatus Saccharibacteria*、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、蓝菌门(*Cyanobacteria*)、脱铁杆菌门(*Deferribacteres*)以及放线菌门(*Actinobacteria*), 其中拟杆菌门和厚壁菌门在两组中均高度富集。在两组菌门富集中有显著差异的是: 拟杆菌门(COPD 70.64% vs. WT 55.18%,  $P<0.05$ )、变形菌门(COPD 2.25% vs. WT 19.29%,  $P<0.01$ )、疣微菌门(COPD 0.0025% vs. WT 0.4370%,  $P<0.001$ )。

在科水平上(图7), 两组样本中IgA包被的

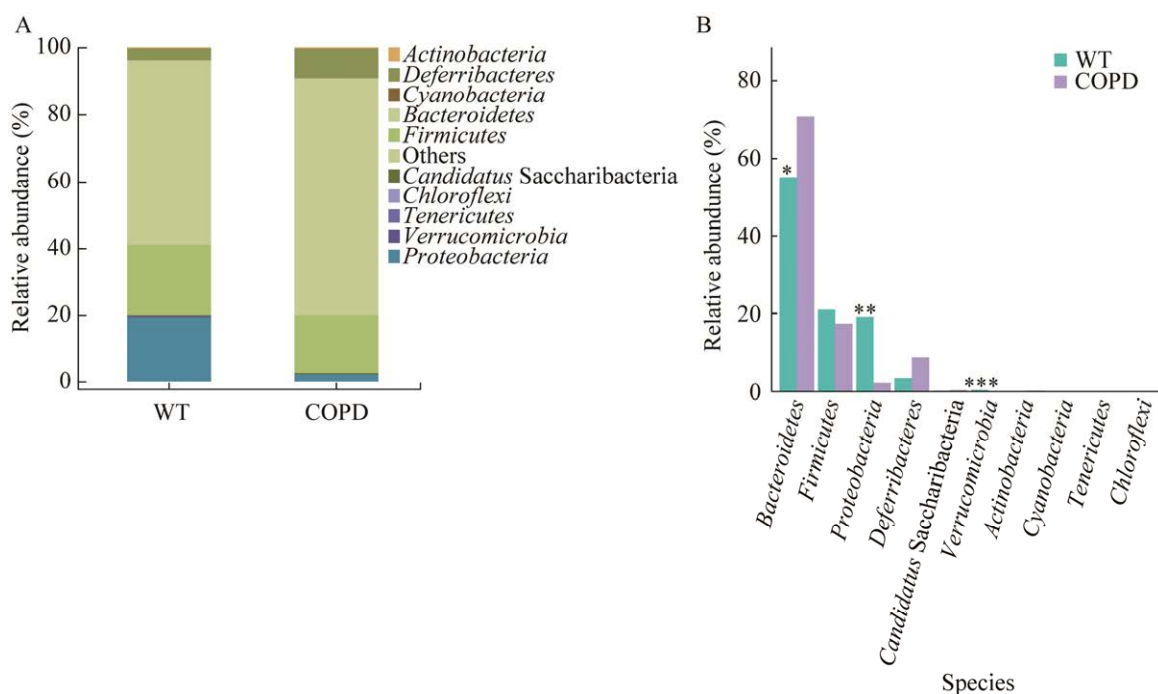


图 6 门水平物种组成(A)及关键物种差异比较(B)

Figure 6 Comparison of species composition (A) and key species differences (B) at the phylum level. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ . The same below.

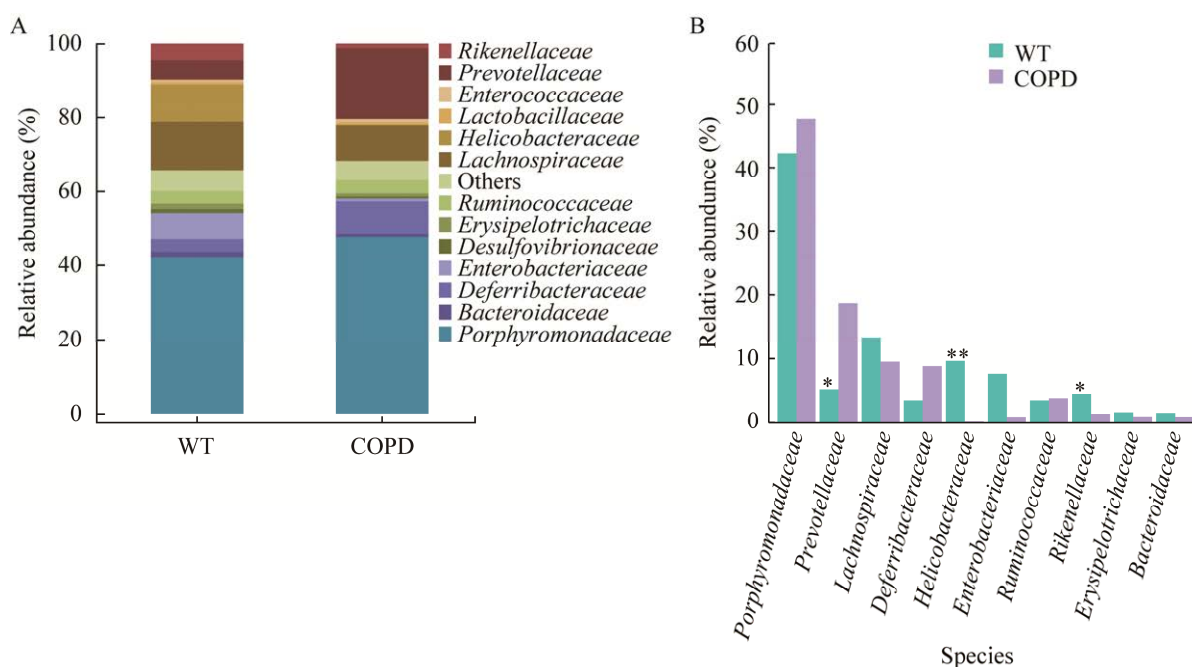


图 7 科水平物种组成(A)及关键物种差异比较(B)

Figure 7 Comparison of species composition (A) and key species differences (B) at the family level.



肠道微生物主要为 13 科, 其中紫单胞菌科 (*Porphyromonadaceae*) 相对丰度在两组样本中均最高, 但 COPD 组次要优势菌是普雷沃氏菌科 (*Prevotellaceae*) 而对照组 (WT) 是毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*); COPD 组第三优势菌是毛螺菌科, 而对照组 (WT) 是螺杆菌科 (*Helicobacteraceae*)。关键物种差异比较, 相较于对照组 (WT), COPD 组普雷沃氏菌科相对丰度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 理研菌科 (*Rikenellaceae*) 和螺杆菌科相对丰度显著降低。

在属水平上 (图 8), 两组样本均以 *Barnesiella* 为主要菌群。相较于 WT 组, COPD 组拟普雷沃氏菌属相对丰度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 另枝菌属 (*Alloprevotella*) ( $P < 0.05$ ) 和螺杆菌属 (*Helicobacter*) ( $P < 0.01$ ) 相对丰度显著降低。

## 2.7 线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe)

对两组样本进行 LEfSe 分析 (默认预设值为 2.0), 两组样本分析如图 9 所示: 两组菌群结构和菌群差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 对照组

(WT) 中显著富集的菌门是: 疣微菌门和变形菌门; 菌纲主要包括疣微菌纲和  $\epsilon$ -变形菌纲; 目层面分类中富集的主要是疣微菌目与弯曲杆菌目; 科层面分类中富集的主要包括: 疣微菌科、理研菌科以及螺杆菌科; 同时在菌属层面分类上, 另枝菌属、别样棒菌属与螺杆菌属富集最为显著。与对照组 (WT) 相比, COPD 小鼠肠来源 IgA 包被的菌群显著富集的菌目是: 蛭弧菌目 (*Bdellovibrionales*)、梭菌目 (*Clostridiales*) 与双歧杆菌目 (*Bifidobacteriales*); 科层面分类中富集的主要是: 普雷沃氏菌科、梭菌科 (*Clostridiaceae*)、类芽孢杆菌科 (*Paenibacillaceae*)、蛭弧菌科 (*Bdellovibrionaceae*) 以及双歧杆菌科 (*Bifidobacteriaceae*); 菌属层面分类上, 拟普雷沃氏菌属 (*Alloprevotella*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、狭义梭菌属 (*Clostridium-sensu-stricto*)、苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*)、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*)、吸血弧菌属 (*Vampirovibrio*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 与 COPD 密切相关。

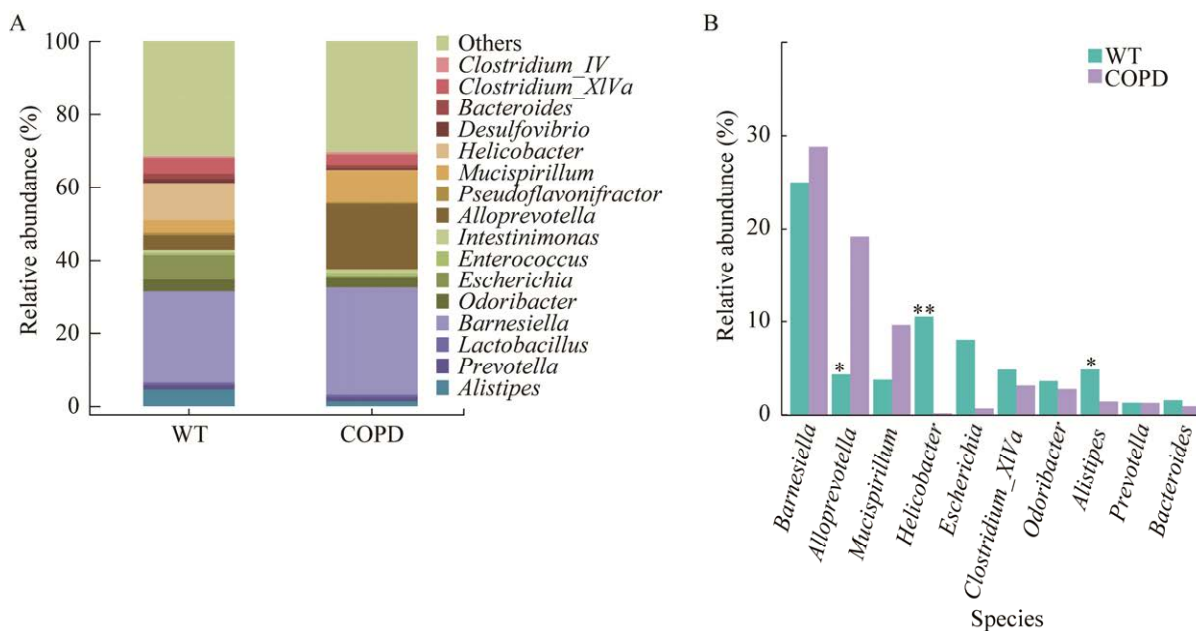


图 8 属水平物种组成(A)及关键物种差异比较(B)

Figure 8 Comparison of species composition (A) and key species differences (B) at the genus level.

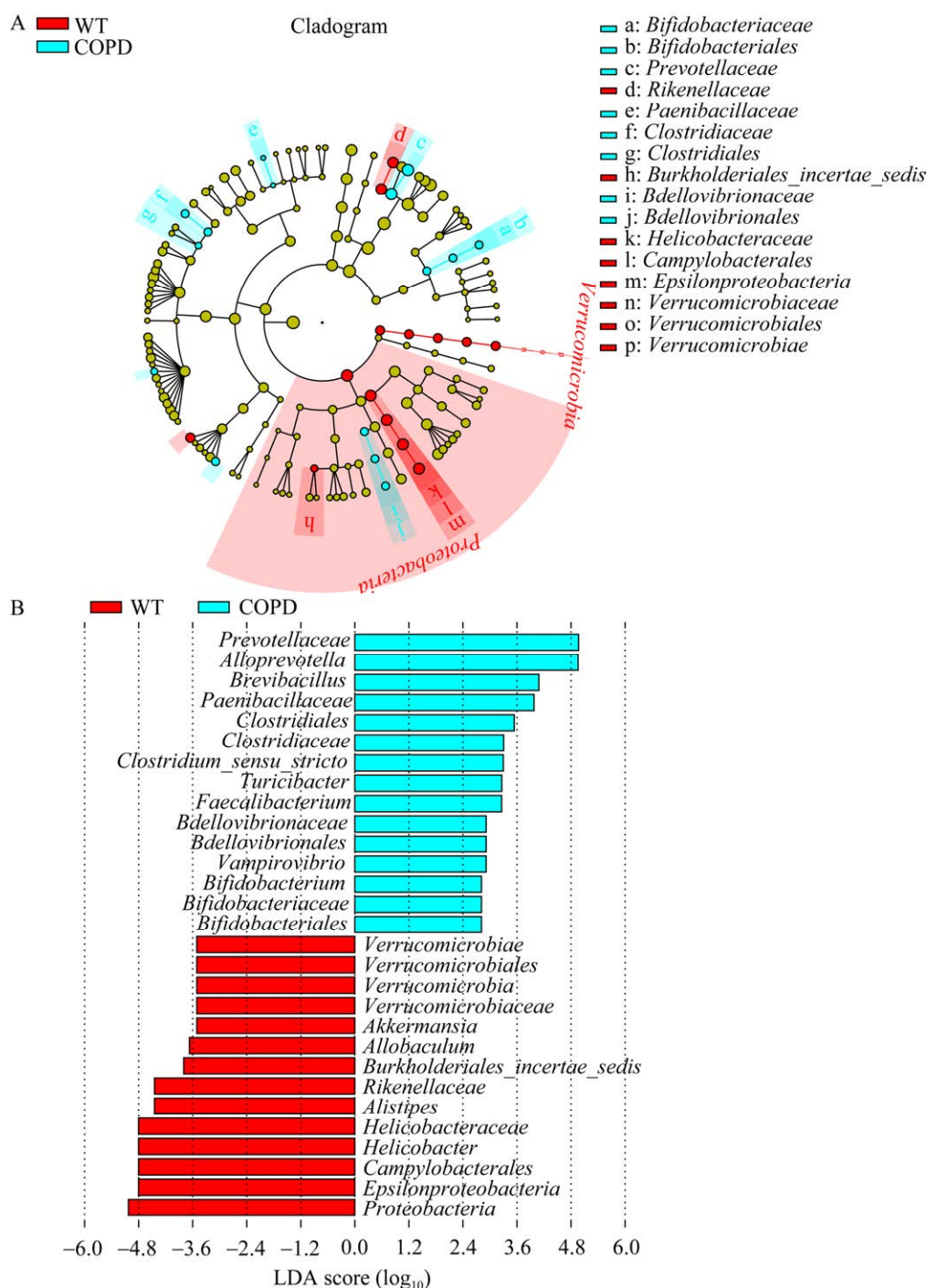


图 9 COPD 组和对照组物种组成 LEfSe 分析 A: 进化分支图. B: LDA 分布柱状图

Figure 9 LEfSe analysis of species composition in COPD group and control group. A: Evolutionary branching diagram. B: Histogram of LDA distribution.

## 2.8 菌群差异基因 KEGG 通路富集分析

以通路显著性富集分析来确定菌群差异基因参与的最主要代谢途径和信号转导途径。为探

究两组样本差异基因与代谢途径之间的复杂关系，我们对组间菌群差异基因进行 KEGG 富集分析，如图 10 所示，两组样本均主要富集到如

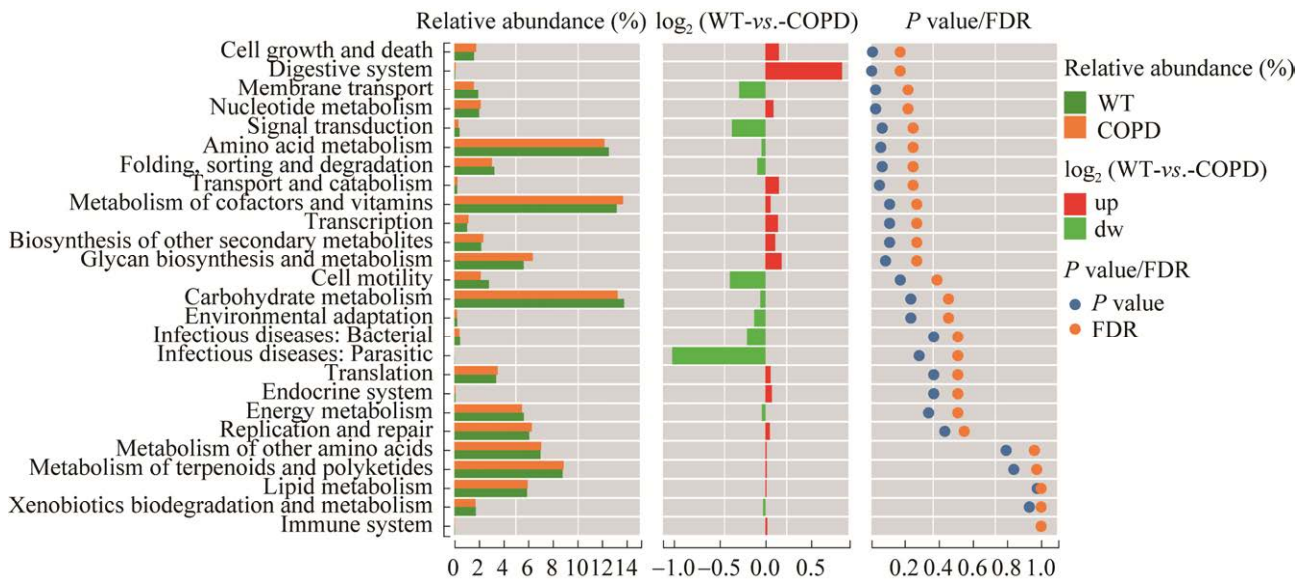


图 10 COPD 组和对照组菌群差异基因 KEGG 通路富集分析

Figure 10 Analysis of KEGG pathway enrichment of differentially expressed genes in the COPD group and control group microbiota.

氨基酸代谢、辅因子和维生素代谢、碳水化合物代谢、萜类化合物和聚酮类化合物代谢等。与 WT 组相比, COPD 组细胞生长与死亡( $P<0.05$ )、核苷酸代谢( $P<0.05$ )以及消化系统相关通路( $P<0.01$ )上调, 而膜运输相关通路下调( $P<0.05$ )。

### 3 讨论与结论

肠道微生物群包括细菌、真菌、古细菌、原生动物和病毒, 其中细菌占主要地位; 肠道微生物数量超 10 万亿, 总基因组也是人类基因组上百倍, 它们在维持机体免疫稳态方面发挥着重要作用<sup>[18-19]</sup>。

研究表明肠道微生物群不仅与肠道疾病有关, 还与大脑、肝脏和肺等远端器官的疾病有密切关系<sup>[20]</sup>。近年来持续的研究表明肠道微生物群与肺部免疫之间的联系, “肠-肺轴”的概念随之出现<sup>[21]</sup>。虽然肠道与呼吸道上皮结构有所不同, 但都是从内胚层起源最终形成消化器官和呼吸器官的后期形态<sup>[22]</sup>, 并且二者均与外界相通,

都有着丰富的细菌群落与黏膜屏障。最近的研究加深了人们对肠道和肺之间复杂的通讯途径的了解, 这种相互关系主要通过两种方式介导: 微生物代谢物以及肠道和肺中的免疫细胞迁移<sup>[23]</sup>。同样地, 机体中一个黏膜部位受到刺激后, 处于该位置的免疫细胞会发生扩散, 并向远处的其他黏膜部位迁移, 我们将这种过程定义为“共同黏膜免疫反应”<sup>[24]</sup>。在此过程中参与局部免疫反应的正是被激活的浆细胞和效应 T 细胞所分泌的 IgA。然而目前 COPD 病程中肠黏膜来源 IgA 包被的肠道微生物组成及多样性还不明确。

本研究利用 16S rRNA 基因高通量测序技术, 对 COPD 组和对照组共 24 份小鼠粪便样本进行了肠道微生物组分析, 发现与对照组小鼠相比, COPD 小鼠肠黏膜来源 IgA 包被肠道微生物在物种组成、丰度及差异基因功能等方面均存在显著差异。Venn 图显示, 对照组小鼠粪便中 IgA 包被的肠道菌群共有 729 个 OTU, 其中 84 个是其独有的; COPD 组 IgA 包被的肠道菌群共有

691 个 OTU, 其中有 46 个是唯一存在的; 两组小鼠特有的 OTU 可能与 COPD 的发生发展有关。基于 OTU 水平的 PCA 分析显示两组间肠道微生物组有较大差异, 但由于肠道微生物组成及相对丰度存在个体差异, 因此组内也有一定的差别。

在  $\alpha$  多样性分析中, 与 WT 组相比, COPD 组物种丰富度及物种多样性无明显统计学差异 (即  $P>0.05$ ), 可适当增加样本量做进一步验证。同样有研究发现, 患其他肺部疾病 (如支气管肺发育不良<sup>[25]</sup>、肺癌<sup>[26]</sup>), 肠道微生物群虽发生紊乱, 但  $\alpha$  多样性也无明显差异。

本研究结果显示, COPD 组 IgA 包被菌群在门水平上拟杆菌门富集显著升高; 目层面分类中显著富集的菌目是: 蛭弧菌目、梭菌目与双歧杆菌目; 科层面分类中显著富集的主要是: 普雷沃氏菌科、梭菌科、类芽孢杆菌科、蛭弧菌科以及双歧杆菌科; 菌属层面分类上, 拟普雷沃氏菌属、短芽孢杆菌属、狭义梭菌属、苏黎世杆菌属、粪杆菌属、吸血弧菌属和双歧杆菌属与 COPD 密切相关。这些菌群丰度上升可能与 COPD 疾病有着密不可分的联系, 或许可作为 COPD 候选粪菌标志物, 但识别疾病生物标志物, 还需要对菌株及其编码的基因和代谢产物进行更进一步的测试和验证。多项研究结果表明, COPD 肠道菌群变化主要以变形菌门、普雷沃菌属及粪肠球菌等水平增高, 乳杆菌及双歧杆菌等降低为主<sup>[27-28]</sup>, 本研究中 COPD 肠道 IgA 包被普雷沃氏菌科丰度也显著增高, 但拟杆菌、双歧杆菌、梭杆菌科富集明显。意味着肠道菌群及 IgA 包被菌群在病理条件下动态变化的高度复杂性。研究发现 IgA 是控制肠道细菌移位和黏膜免疫系统发育的关键因素<sup>[29]</sup>, 而肠道菌群代谢产生的短链脂肪酸(SCFAs)作为肠道和肺部之间代谢和免疫轴的关键环节<sup>[30]</sup>, 同样在维持免疫稳态上起

到重要作用 (如恢复 COPD 等疾病的支气管上皮功能<sup>[31]</sup>)。据此推测, COPD 进程中可能导致肠道 IgA 分泌紊乱从而包被一些产短链脂肪酸的“益生菌”, 如: 拟普雷沃氏菌属、狭义梭菌属、双歧杆菌属等, 使肠道 SCFAs 减少进一步导致 COPD 的发展。然而 COPD 的病理生理学和 SCFAs 在这些过程中的参与机制仍需要进一步研究。

与此同时, 在门水平上变形菌门和疣微菌门在对照组中富集显著。变形菌门的扩张是肠道生态失调的标志<sup>[32]</sup>, 但疣微菌门的阿克曼氏菌则是可以促进肠道黏液蛋白更新的肠道共生菌<sup>[33]</sup>。目前越来越多的证据表明, 肠道 SIgA 可以同时调节致病菌和益生菌: 一方面 IgA 能使致病菌聚集、失活, 阻止它们进行抗原呈递和免疫识别而促进其清除<sup>[34]</sup>; 另一方面 IgA 还可以与有益细菌结合, 使它们在黏液层中定殖来维持肠道稳态<sup>[35]</sup>。因此, IgA 能在多个维度上调节肠道细菌从而更好地维持肠道中的微生物平衡。

KEGG 富集分析结果表明与对照组相比, COPD 组肠道菌群基因功能在生物学代谢过程有一定差异。有研究表明在哮喘和过敏性气道疾病中肠道微生物的丰度改变并且发生代谢紊乱<sup>[33]</sup>。我们的富集分析结果显示细胞生长与死亡、核苷酸代谢以及消化系统相关通路明显上调, 而膜运输相关通路显著下调。说明 COPD 的发展不仅能改变肠道微生物的组成和丰度, 还能影响肠道菌群生物学代谢过程, 代谢是免疫调节的主导力量, 代谢途径的紊乱将导致 COPD 进一步加重。

综上所述, 本研究利用 16S rRNA 基因测序比较了 COPD 小鼠与野生型小鼠肠来源 IgA 抗体包被的肠道微生物的组成及其基因功能, 证实 COPD 小鼠肠道中存在 IgA 分泌失调、菌群失调及基因功能的紊乱, 为 IgA 对 COPD 病程的影



响提供相关依据。然而后续还应扩大样本量做进一步验证, IgA 对 COPD 肠道微生物影响的机制还需更深入的研究, 从而为 COPD 的预防和治疗提供新依据、新思路。

## REFERENCES

- [1] POTO R, LOFFREDO S, PALESTRA F, MARONE G, PATELLA V, VARRICCHI G. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): few certainties and many outstanding questions[J]. *Cells*, 2022, 11(10): 1720.
- [2] LANCET T. COPD: from an end-stage disease to lifelong lung health[J]. *The Lancet*, 2022, 400(10356): 863.
- [3] DAILAH HG. Therapeutic potential of small molecules targeting oxidative stress in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a comprehensive review[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2022, 27(17): 5542.
- [4] FU YS, KANG N, YU YP, MI Y, GUO JL, WU JY, WENG CF. Polyphenols, flavonoids and inflammasomes: the role of cigarette smoke in COPD[J]. *European Respiratory Review: an Official Journal of the European Respiratory Society*, 2022, 31(164): 220028.
- [5] YU SY, ZHANG HP, WAN LP, XUE M, ZHANG YF, GAO XW. The association between the respiratory tract microbiome and clinical outcomes in patients with COPD[J]. *Microbiological Research*, 2023, 266: 127244.
- [6] 吴士昱, 王林峰. 气道微生态与慢性阻塞性肺疾病[J]. *生命的化学*, 2022, 42(4): 684-690.  
WU SY, WANG LF. Role of airway microecology in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chemistry of Life*, 2022, 42(4): 684-690 (in Chinese).
- [7] LI NJ, DAI ZL, WANG Z, DENG ZS, ZHANG JH, PU JD, CAO WT, PAN TH, ZHOU YM, YANG ZW, LI J, LI B, RAN PX. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respiratory Research*, 2021, 22(1): 1-15.
- [8] KIRSCHNER SK, DEUTZ NEP, JONKER R, OLDE DAMINK SWM, HARRYKISSOON RI, ZACHRIA AJ, DASARATHY S, ENGELEN MPKJ. Intestinal function is impaired in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Clinical Nutrition*, 2021, 40(4): 2270-2277.
- [9] CHIU YC, LEE SW, LIU CW, LAN TY, WU LSH. Relationship between gut microbiota and lung function decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 1-year follow-up study[J]. *Respiratory Research*, 2022, 23(1): 10.
- [10] GUO JL, HAN X, HUANG WD, YOU YL, ZHAN JC. Interaction between IgA and gut microbiota and its role in controlling metabolic syndrome[J]. *Obesity Reviews*, 2021, 22(4): e13155.
- [11] TAKEUCHI T, OHNO H. IgA in human health and diseases: potential regulator of commensal microbiota[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1024330.
- [12] HAN X, GUO JL, QIN Y, HUANG WD, YOU YL, ZHAN JC. Dietary regulation of the SIgA-gut microbiota interaction[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(23): 6379-6392.
- [13] PABST O, IZCUE A. Secretory IgA: controlling the gut microbiota[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(3): 149-150.
- [14] PERRUZZA L, STRATI F, RANERI M, LI H, GARGARI G, REZZONICO-JOST T, PALATELLA M, KWEE I, MORONE D, SEEHUSEN F, SONEGO P, DONATI C, FRANCESCHI P, MACPHERSON AJ, GUGLIELMETTI S, GREIFF V, GRASSI F. Apyrase-mediated amplification of secretory IgA promotes intestinal homeostasis[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(3): 111112.
- [15] 江雁琼, 伍慧妍, 文艳琼. 慢阻肺急性加重期感染病原菌分布与机体免疫功能检测及其临床意义[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(2): 213-216.  
JIANG YQ, WU HY, WEN YQ. Detection and clinical significance of pathogen distribution and immune function in patients with AECOPD[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2019, 14(2): 213-216 (in Chinese).
- [16] LADJEMI MZ, MARTIN C, LECOCQ M, DETRY B, ABOUBAKAR NANA F, MOULIN C, WEYNAND B, FREGIMILICKA C, BOUZIN C, THURION P, CARLIER F, SERRÉ J, GAYAN-RAMIREZ G, DELOS M, OCAK S, BURGEL PR, PILETTE C. Increased IgA expression in lung lymphoid follicles in severe chronic obstructive pulmonary disease[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2019, 199(5): 592-602.
- [17] LIU H, TANG HY, XU JY, PANG ZG. Small airway immunoglobulin A profile in emphysema-predominant chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(16): 1915-1921.
- [18] CHOPYK DM, GRAKOU I. Contribution of the



- intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(3): 849-863.
- [19] ZHOU H, SUN J, YU B, LIU ZH, CHEN H, HE J, MAO XB, ZHENG P, YU J, LUO JQ, LUO YH, YAN H, GE LP, CHEN DW. Gut microbiota absence and transplantation affect growth and intestinal functions: an investigation in a germ-free pig model[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(2): 295-304.
- [20] TAN JY, TANG YC, HUANG J. Gut Microbiota and Lung Injury[M]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore, 2020: 55-72.
- [21] 沈俊希, 朱星, 陈云志, 李文. 基于“肺-肠”轴探讨肺肠菌群相互作用机制及与慢性阻塞性肺疾病的关系[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(8): 181-186.
- SHEN JX, ZHU X, CHEN YZ, LI W. Exploring relationship between lung and gut microbiota and their interaction and chronic obstructive pulmonary disease on lung-gut axis[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2023, 41(8): 181-186 (in Chinese).
- [22] NERURKAR NL, LEE C, MAHADEVAN L, TABIN CJ. Molecular control of macroscopic forces drives formation of the vertebrate hindgut[J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 480-484.
- [23] WYPYCH TP, WICKRAMASINGHE LC, MARSLAND BJ. The influence of the microbiome on respiratory health[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(10): 1279-1290.
- [24] ANAND S, MANDE SS. Diet, microbiota and gut-lung connection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2147.
- [25] FAN TQ, LU L, JIN R, SUI AH, GUAN RZ, CUI FJ, QU ZH, LIU DY. Change of intestinal microbiota in mice model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13295.
- [26] LIU F, LI JJ, GUAN YB, LOU YF, CHEN HY, XU MY, DENG DQ, CHEN J, NI BB, ZHAO L, LI HW, SANG H, CAI XS. Dysbiosis of the Gut Microbiome is associated with Tumor Biomarkers in Lung Cancer[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(11): 2381-2392.
- [27] SAVIN Z, KIVITY S, YONATH H, YEHUDA S. Smoking and the intestinal microbiome[J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(5): 677-684.
- [28] LIN J, YANG ZW, LIAO BL, PAN TH, PU JD, HAO BW, FU ZL, CAO WT, ZHOU YM, HE F, LI B, RAN PX. Chronic exposure to ambient particulate matter induces gut microbial dysbiosis in a rat COPD model[J]. *Respiratory Research*, 2020, 21(1): 271.
- [29] WANG L, PELGRIM CE, PERALTA MARZAL LN, KORVER S, van ARK I, LEUSINK-MUIS T, van HELVOORT A, KESHAVARZIAN A, KRANEVELD AD, GARSSSEN J, HENRICKS PAJ, FOLKERTS G, BRABER S. Changes in intestinal homeostasis and immunity in a cigarette smoke- and LPS-induced murine model for COPD: the lung-gut axis[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2022, 323(3): L266-L280.
- [30] KOTLYAROV S. Role of short-chain fatty acids produced by gut microbiota in innate lung immunity and pathogenesis of the heterogeneous course of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4768.
- [31] ASHIQUE S, de RUBIS G, SIROHI E, MISHRA N, RIHAN M, GARG A, REYES RJ, MANANDHAR B, BHATT S, JHA NK, SINGH TG, GUPTA G, SINGH SK, CHELLAPPAN DK, PAUDEL KR, HANSBRO PM, OLIVER BG, DUA K. Short chain fatty acids: fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2022, 368: 110231.
- [32] SORBARA MT, PAMER EG. Microbiome-based therapeutics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(6): 365-380.
- [33] RODRIGUES VF, ELIAS-OLIVEIRA J, PEREIRA ÍS, PEREIRA JA, BARBOSA SC, MACHADO MSG, CARLOS D. *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: a good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 934695.
- [34] ROLLENSKE T, BURKHALTER S, MUERNER L, von GUNTEN S, LUKASIEWICZ J, WARDEMANN H, MACPHERSON AJ. Parallelism of intestinal secretory IgA shapes functional microbial fitness[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 657-661.
- [35] BOWERMAN KL, REHMAN SF, VAUGHAN A, LACHNER N, BUDDEN KF, KIM RY, WOOD DLA, GELLATLY SL, SHUKLA SD, WOOD LG, YANG IA, WARK PA, HUGENHOLTZ P, HANSBRO PM. Disease-associated gut microbiome and metabolome changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5886.