



## 研究报告

## 青少年痤疮面部皮肤微生物群落结构变化

郑玉梅<sup>1</sup> 孟若琳<sup>2</sup> 彭海悦<sup>2</sup> 蒋锐<sup>2</sup> 宋丽雅<sup>\*1</sup> 董坤<sup>1</sup> 何聪芬<sup>1</sup>

1 北京工商大学理学院 北京市植物资源研究开发重点实验室化妆品协同创新中心 北京 100048

2 北京市十一学校 北京 100048

**摘要:**【背景】青少年痤疮是一种最常见的慢性炎症性损容性皮肤病,与痤疮丙酸杆菌的异常增殖有关。【目的】探究痤疮皮损区与附近无明显皮损区微生物组成与健康对照的差异,为从微生态角度防治痤疮提供理论基础。【方法】利用细菌 16S rRNA 基因 V1–V2 区和真菌 TIS1 高通量测序技术分析北京地区 16 岁青少年面部痤疮皮肤细菌和真菌群落结构,将痤疮皮损区与附近无明显皮损区微生物组成与健康组进行比较,寻找差异菌群。【结果】痤疮患者面部皮损区与附近无明显皮损区细菌多样性(Shannon 指数)较健康对照组显著性降低( $P < 0.001$ ),主要与丙酸杆菌(痤疮丙酸杆菌)和葡萄球菌(表皮葡萄球菌 PM221)显著性上升相关,而痤疮皮损区与附近无明显皮损区细菌组成无显著性差异。痤疮患者皮损区与附近无明显皮损区较健康对照组真菌丰富度(Chao1 指数)显著性上升( $P < 0.05$ ),与限制性马拉色菌的显著上升相关。【结论】面部皮肤微生物变化与青少年痤疮的发生相关。本研究为从微生物角度防治痤疮提供理论依据。

**关键词:** 青少年痤疮, 高通量测序, 群落结构, 细菌多样性, 真菌多样性

## Variation of skin microbial community in adolescent acne

ZHENG Yu-Mei<sup>1</sup> MENG Ruo-Lin<sup>2</sup> PENG Hai-Yue<sup>2</sup> JIANG Rui<sup>2</sup> SONG Li-Ya<sup>\*1</sup>  
DONG Kun<sup>1</sup> HE Cong-Fen<sup>1</sup>

1 Beijing Technology and Business University, Beijing Key Lab of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048, China

2 Beijing National Day School, Beijing 100048, China

**Abstract:** [Background] Adolescents acne is one of the most common chronic inflammatory dermatitis associated with abnormal proliferation of *Propionibacterium acnes*. [Objective] The aim of this study was to explore the difference of microbial composition between the acne skin and healthy control, and to provide theoretical basis for the prevention and treatment of acne from the perspective of microecology. [Methods] Bacterial 16S rRNA gene V1–V2 region sequencing and fungal TIS1 region sequencing technology were used to analyze the bacterial and fungal community structure of facial acne skin in 16-year-old teenagers in Beijing. Bacterial and fungal composition in adolescent acne with lesions and nearby areas without obvious lesions, as well as healthy controls, were investigated. [Results] Compared to the healthy samples, the skin bacterial diversity of adolescent with acne was significantly decreased

**Foundation item:** Graduate Research Capacity Improvement Program in 2019

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-68984937; E-mail: songly@th.btbu.edu.cn

**Received:** 24-02-2019; **Accepted:** 01-07-2019; **Published online:** 09-09-2019

基金项目: 2019 年研究生科研能力提升计划项目

**\*通信作者:** Tel: 010-68984937; E-mail: songly@th.btbu.edu.cn

收稿日期: 2019-02-24; 接受日期: 2019-07-01; 网络首发日期: 2019-09-09

( $P < 0.001$ ), and the abundance of *Propionibacterium* (*P. acnes*) and *Staphylococcus* (*Staphylococcus epidermidis* PM221) decreased significantly. While there was no significant difference in the bacterial composition between the acne lesion area and the nearby no obvious lesion area. The fungal richness (Chao1 index) and the abundance of *Malassezia restricta* of the adolescent acne group was significantly higher than that of the healthy control group ( $P < 0.05$ ). **[Conclusion]** The change of skin microbial composition is associated with the occurrence of adolescents acne. This study provided theoretical basis for the prevention and treatment of acne from the perspective of microorganisms.

**Keywords:** Adolescent acne, High throughput sequencing, Community structure, Bacterial diversity, Fungal diversity

皮肤是人体最大的器官, 作为四大菌库之一, 皮肤表面定殖着数以亿计的微生物, 称为皮肤正常微生物群, 其可调节宿主先天性和适应性免疫系统发出的信号, 帮助宿主抵御外部病原菌的入侵<sup>[1-2]</sup>。痤疮是一种最常见的发生于毛囊皮脂腺的慢性炎症性损容性皮肤病, 好发于面部, 影响容貌, 极易反复发生, 已成为了全球第八大常见病<sup>[3]</sup>, 分为青春期前痤疮、青春期痤疮(青少年痤疮)和青春期后痤疮(成人型痤疮), 其中青春期痤疮发病率最高, 影响着中国 50%–86% 的青少年<sup>[4-6]</sup>, 对患者的外观和心理造成很多不良影响<sup>[7-8]</sup>, 因此, 了解青少年痤疮的发病因素对于疾病的治疗具有重要意义。青少年痤疮的发生受多种复杂因素的影响, 包括遗传因素<sup>[9]</sup>、饮食<sup>[7,10]</sup>、雄激素增加导致的皮脂分泌增加<sup>[11]</sup>、毛囊皮脂腺导管角化异常<sup>[12-13]</sup>、痤疮丙酸杆菌引起的免疫反应及先天性免疫反应<sup>[14-16]</sup>等。

大量研究表明青少年痤疮与痤疮丙酸杆菌相关<sup>[17-18]</sup>, 但其微生物学基础仍然不清楚。目前研究结果显示痤疮患者面部皮损中表皮葡萄球菌及颗粒丙酸杆菌等菌种的阳性率也高于正常人, 头状葡萄球菌及微球菌的阳性率均低于正常人<sup>[19-20]</sup>, 表明痤疮的发展还与其他微生物相关, 但这些大多都是基于培养的方法, 且没有严格的年龄分段, 但统计资料分析发现, 诱发青春期痤疮和成人痤疮发生的因素有一定的差别<sup>[21]</sup>, 在内分泌水平方面, 青春期的睾酮/雌二醇比值较成人型痤疮组来得高, 且青春期皮肤微生物组成与成人存在差异<sup>[22]</sup>, 是皮肤微生物重新趋于稳定的时期, 微生物学基础较为复杂, 因此对青春期痤疮皮肤微生物进行有针对性的研究

具有重要意义。本研究采用高通量测序技术探究了 16 岁青春期痤疮皮损与未明显皮损区细菌与真菌组成多样性, 及与健康对照组之间的差异, 为从微生物角度治疗与预防痤疮提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

受试对象为 16 岁中学生, 由皮肤科医生参照“中国痤疮治疗指南(2014 年修订版)”根据皮损性质将痤疮分为 3 度 4 级<sup>[23]</sup>: 轻度(I 级): 仅有粉刺; 中度(II 级): 患者有粉刺, 并有中等数量的丘疹和脓疱, 总病灶数在 31–50 个之间; 中度(III 级): 患者有大量丘疹和脓疱, 伴有少于 3 个结节, 总病灶数在 51–100 个之间; 重度(IV 级): 结节, 囊肿。借助痤疮患者的临床分级选定中度痤疮且病程大于 2 年患者和健康对照组, 排除有糖尿病、自身免疫性疾病及其他皮肤病者, 受试者在一个月之内, 受试者面部皮肤表面不能涂抹任何抗生素或激素类产品, 且一个月内未口服过任何抗生素或抗菌类药品。痤疮组 15 人(男性 7 例, 女性 8 例), 健康组 8 人(男性 4 例, 女性 4 例)。本研究符合 2013 年修订的《赫尔辛基宣言》([www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html](http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html))的要求, 所有受试者了解整个实验目的和过程, 并签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂和仪器

NaCl、吐温-20, 国药集团化学试剂北京有限公司; 溶菌酶, 北京百灵威科技有限公司; DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN 公司; AxyPrep DNA

Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences 公司。超微量分光光度计, Thermo 公司; PCR 仪, ABI 公司; QuantiFluor™-ST 微型荧光计, Promega 公司; Illumina MiSeq 测序系统, Illumina 公司。

### 1.3 样本采集

受试者均被要求取样前 8 h 不能进行面部清洁和涂抹任何化妆品; 取样过程中, 实验人员取两支无菌棉拭子蘸取润湿液(0.9% NaCl-0.1%吐温-20), 分别在受试者面颊皮肤左右对称部位  $4 \times 2 \text{ cm}^2$  区域擦拭 25 次, 期间注意转动棉拭子, 持续时间约 15 s, 然后将棉拭子放入收集管内。采集过后, 样品放于干冰中保存, 随后转入  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 并尽快提取 DNA。将提取得到的 DNA 送上海美吉生物医药有限公司进行测序。

本研究共取得样本 35 个, 痤疮皮损部位样本入组 A 组, 共 15 例; 痤疮附近未明显皮损部位样本入组 A-H 组, 共 12 例; 健康对照入组 H 组, 共 8 例。

### 1.4 DNA 抽提和 PCR 扩增

本研究采用 QIAGEN 的 DNeasy Blood & Tissue Kit 提取皮肤表面细菌总 DNA。具体步骤参照试剂盒说明书。DNA 浓度和纯度采用超微量分光光度计进行检测, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量; 用上游引物 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和下游引物 338R (5'-TGCTG CCTCCCGTAGGAGT-3') 对细菌 16S rRNA 基因 V1-V2 可变区进行 PCR 扩增, 用上游引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和下游引物 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 对真菌的内源转录间隔区(ITS1-ITS2)进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  (细菌)或  $53 \text{ }^\circ\text{C}$  (真菌) 30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  45 s, 27 (细菌)或 37 (真菌)个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min。细菌 PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): 5 $\times$ FastPfu DNA 聚合酶缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 上游和下游引物(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ , FastPfu 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 10 ng DNA 模板, 牛血清白蛋白 0.2  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。真菌 PCR

反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物和下游引物(5  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ , rTaq 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 10 ng DNA 模板, 牛血清白蛋白 0.2  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.5 Illumina MiSeq 测序

使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluor™-ST 微型荧光计定量检测 PCR 产物。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE300 的测序策略。构建文库步骤:(1) 连接“Y”字形接头;(2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段;(3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集;(4) 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行测序。

### 1.6 数据处理

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接:(1) 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口开始截去后端碱基, 去除质控后长度低于 50 bp 的序列;(2) Barcode 需精确匹配, 引物允许 2 个碱基的错配, 去除模糊碱基;(3) 根据重叠碱基 Overlap 将两端序列进行拼接, Overlap 需大于 10 bp。去除无法拼接的序列。使用 UPARSE 软件(Version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类; 使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释, 比对 SILVA 数据库(SSU123), 设置比对阈值为 70%。

### 1.7 统计学分析

两组间检验采用维尔克森秩和检验(Wilcoxon rank-sum test),  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。ANOSIM 分析, 即相似性分析(Analysis of similarities)是一种非参数检验, 用来检验组间(两组或多组)的差异是否显著大于组内差异, 从而判断分组是否有意义。ANOSIM 中统计值为  $R$  值, 理论范围为  $-1$  到  $+1$ , 实际  $R$  值一般从 0 到 1。 $R$  值越接近 1 表示

组间差异越大于组内差异, *R* 值越小则表示组间和组内没有明显差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 青少年寻常痤疮患者面部皮肤细菌组成变化

#### 2.1.1 数据质控与物种注释

将高通量测序得到的原始数据进行整理、过滤后, 获得有效序列用于后续分析。35 个样本共得到 141 万条有效序列, 序列长度介于 281–360 bp 之间, 平均约为 331 bp。在 97% 的相似水平下, 对样本进行聚类 and 注释, 共得到 1 593 个 OTU, 归属于 22 个菌门 580 个菌属 1 154 个菌种。

#### 2.1.2 Alpha 多样性分析

痤疮组(A)与健康组(H)相比, 物种丰富度无显著性差异(图 1A), 但物种多样性显著低于健康组 ( $P < 0.01$ , 图 1B); 痤疮患者面部皮损区与附近无明显皮损区皮肤细菌丰富度和多样性均无显著差异, 说明青少年痤疮患者面部皮肤细菌群落组成与同阶段健康人不同。

#### 2.1.3 Beta 多样性分析

由主坐标分析(PCoA)可以看出, 健康组和痤疮组样本间细菌组成和丰度存在差异(图 2A)。

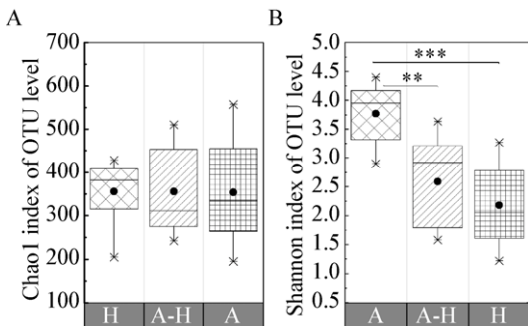


图 1 细菌物种组成 Chao1 指数(A)和 Shannon 指数(B)柱状图(OTU 水平)

Figure 1 The histogram of Chao1 index (A) and Shannon index (B) at OTU level

注: 本研究采用 Chao1 指数和 Shannon 指数类评估三组在 OTU 水平的阿尔法多样性。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ 。  
Note: The alpha diversity at the OTU levels of the three groups were summarized by using Chao1's taxon richness and Shannon's diversity evenness (combining taxon richness and evenness). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

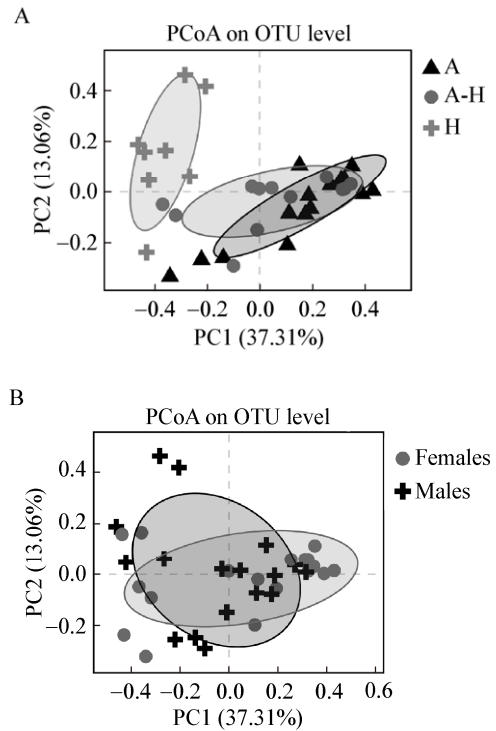


图 2 细菌物种组成 PCoA 图(OTU 水平)

Figure 2 PCoA diagram of bacterial OTU composition

注: PCoA, 即主坐标分析, 是一种非约束的数据降维分析方法, 本研究采用 Bray\_curtis 距离算法, 主要考虑物种丰度。  
A: A 组、A-H 组、H 组三组样本间主坐标分析; B: 男性(Males)和女性(Females)组样本间主坐标分析。

Note: PCoA (Principal coordinate analysis) is a non-constrained data dimensionality reduction analysis method; Bray\_curtis distance algorithm was adopted to mainly consider species abundance between samples in this study. A: PCoA among samples of A, A-H and H groups; B: PCoA among samples of males and females groups.

ANOSIM 相似性分析结果也表明健康组与痤疮病灶处和及其附近区域细菌组成差异显著, 组间的差异显著大于组内差异, 分组有意义(A & H 组:  $R = 0.7273$ ,  $P = 0.001$ ; A-H & H 组:  $R = 0.5716$ ,  $P = 0.001$ ); 痤疮病灶处与附近未明显皮损部位细菌组成存在一定差异, 但无显著性; 说明青少年痤疮患者病灶处与附近区域细菌组成与健康人群相比均已发生变化, 与 Alpha 多样性结果相一致。为了排除性别的影响, 利用主坐标分析探究 35 个样本在性别间的差异, 结果显示两组样本分布离散且相互重合(图 2B)。

### 2.1.4 痤疮组与健康组在不同分类水平上细菌组成差异

分别在门、属、种 3 个水平比较不同组间细菌群落结构差异。门水平结果显示 3 组面部皮肤细菌主要由厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)组成,占比大于 90% (图 3)。痤疮皮损组(A 组)相较于健康对照组(H 组)放线菌显著性升高( $P<0.05$ ), 变形菌(*Proteobacteria*)、拟杆菌(*Bacteroidetes*)和梭杆菌(*Fusobacterium*)均显著性下降( $P<0.05$ ), 且痤疮病灶处附近无明显皮损区域变形菌(*Proteobacteria*)和梭杆菌(*Fusobacterium*)相较健康组也发生显著变化( $P<0.01$ ), 变化趋势同痤疮皮损组。细菌组成随 H 组、A-H 组、A 组顺序变化, 说明青少年痤疮患者面部皮肤细菌组成相较于健康组发生了改变, 部分菌群已发生显著变化, 皮损处变化更显著。

属水平上健康组(H 组)面部皮肤细菌主要由无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus*)、链球菌(*Streptococcus*)、红球菌(*Rhodococcus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和奈瑟氏菌(*Neisseria*)等组成(表 1)。在痤疮组丙酸杆菌(*Propionibacterium*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)

丰度显著性升高( $P<0.05$ ), 在痤疮患者皮肤细菌组成中具有统治地位, 其他菌属均系下降。说明痤疮组皮肤细菌多样性显著降低可能与丙酸杆菌(*Propionibacterium*)与葡萄球菌(*Staphylococcus*)显著性上升相关。进一步将差异性菌群与物种多样性指数(Shannon 指数)进行相关性分析, 结果显示样本中细菌物种多样性变化与差异菌属丰度存在显著相关性( $P<0.01$ ), 与丙酸杆菌(*Propionibacterium*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)丰度显著负相关( $P<0.001$ ), 面部皮肤细菌多样性随着丙酸杆菌(*Propionibacterium*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)的升高而降低。

3 组种水平上共检测到 1 154 个菌种, 其中丰度大于 0.5%且有分类命名主要有 15 种, 占比大于 30%, 主要为好热黄无氧芽孢菌(*Anoxybacillus flavithermus* WK1), 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* PM221), 庆生红球菌(*Rhodococcus qingshenqii*)、棒状杆菌(*Corynebacterium tuberculostearicum*)和红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis* PR4)等, 其中有显著性差异有以下 13 种(表 2)。国内外基于培养的研究<sup>[19,24]</sup>结果表

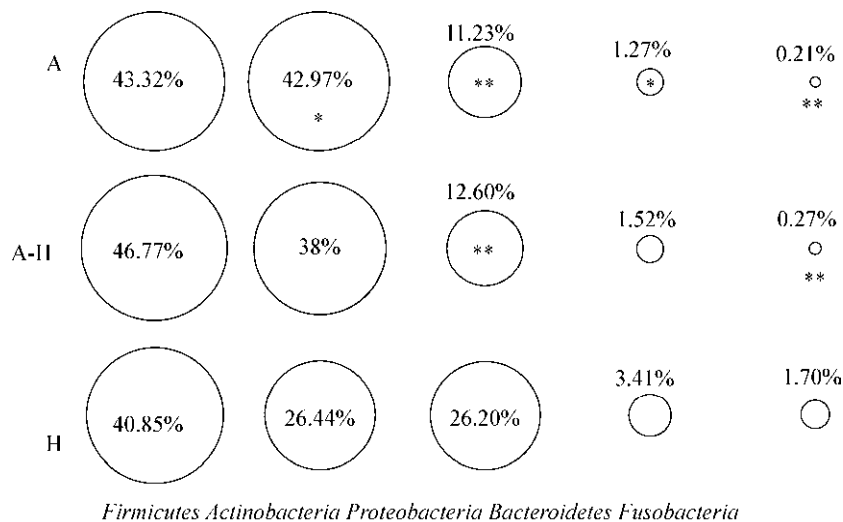


图 3 门水平上细菌物种组成气泡图

Figure 3 Bubbles diagram of bacterial composition at phylum level

注: 气泡大小代表物种丰度大小。\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; 仅显示丰度大于 1% 的物种。

Note: The size of the bubbles represents the abundance of phylum. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; Only phylum with abundance >1% were shown.

表 1 属水平皮肤细菌组成

Table 1 Skin bacterial composition on genus level

On genus level	Percent of community abundance			P value (Wilcoxon rank-sum text)			Correlation with Shannon index (Spearman)	
	H (%)	A-H (%)	A (%)	A:H	A-H:H	A:A-H	Rho	P value
<i>Anoxybacillus</i>	14.82	14.87	13.00	0.540	0.671	0.479	0.324	0.057
<i>Streptococcus</i>	13.29	2.44	1.61	0.000	0.002	0.393	0.806	0.000
<i>Rhodococcus</i>	11.25	4.51	1.60	0.005	0.070	0.075	0.704	0.000
<i>Staphylococcus</i>	5.88	26.52	26.84	0.003	0.015	0.788	-0.641	0.000
<i>Neisseria</i>	5.67	0.49	0.39	0.009	0.015	0.826	0.581	0.000
<i>Pseudomonas</i>	5.01	1.83	1.36	0.007	0.010	0.317	0.577	0.000
<i>Actinomyces</i>	3.54	0.58	0.27	0.000	0.002	0.479	0.820	0.000
<i>Acinetobacter</i>	3.28	1.95	2.20	0.146	0.298	0.421	0.371	0.028
<i>Rothia</i>	2.64	0.32	0.11	0.000	0.001	0.981	0.730	0.000
<i>Propionibacterium</i>	2.54	25.84	36.76	0.000	0.000	0.137	-0.751	0.000
<i>Micrococcus</i>	2.48	2.43	0.65	0.349	0.671	0.575	0.458	0.006
<i>Corynebacterium_1</i>	2.11	2.26	2.50	0.723	0.729	0.575	0.282	0.100
<i>Lautropia</i>	1.99	0.09	0.04	0.001	0.006	0.641	0.592	0.000
<i>Leptotrichia</i>	1.24	0.10	0.10	0.033	0.045	0.732	0.481	0.003
<i>Porphyromonas</i>	1.10	0.19	0.18	0.031	0.097	0.942	0.708	0.000
<i>Gemella</i>	1.02	0.20	0.13	0.001	0.006	0.393	0.685	0.000
<i>Veillonella</i>	1.02	0.15	0.18	0.003	0.008	0.526	0.689	0.000
Others	21.12	15.25	12.08	-	-	-	-	-

注: 仅显示在健康(H)组丰度大于 1% 的物种.

Note: Only genera with abundance greater than 1% in healthy (H) group were shown.

表 2 种水平皮肤细菌组成

Table 2 Skin bacterial composition on species level

On species level	Percent of community abundance			P value (Wilcoxon rank-sum text)		
	H (%)	A-H (%)	A (%)	A:H	A-H:H	A:A-H
<i>Staphylococcus epidermidis</i> PM221	2.91	9.94	14.39	0.005	0.008	0.196
<i>Rhodococcus qingshenqii</i>	8.90	3.62	1.25	0.005	0.059	0.060
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	2.35	0.87	0.35	0.005	0.070	0.092
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp.	1.88	0.18	0.07	0.000	0.001	0.083
<i>Acinetobacter junii</i> CIP64.5	1.31	0.72	0.55	0.042	0.154	0.060
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1.28	0.23	0.17	0.004	0.019	0.542
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1.33	0.07	0.05	0.001	0.006	0.825
<i>Propionibacterium granulosum</i>	0.10	0.38	1.20	0.015	0.023	0.575
<i>Rothia dentocariosa</i>	1.21	0.19	0.04	0.000	0.003	0.575
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp.	0.81	0.84	0.42	0.049	0.563	0.102
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.12	0.11	0.05	0.001	0.005	0.714
<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC11537	0.61	0.20	0.11	0.003	0.015	0.213
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp.	0.53	0.31	0.11	0.018	0.729	0.043

注: 仅显示在健康(H)组丰度大于 0.5% 的物种.

Note: Only species with abundance greater than 0.5% in healthy (H) group were shown.

明寻常痤疮面部皮损中主要细菌为痤疮丙酸杆菌与表皮葡萄球菌, 本研究结果痤疮面部皮肤主要细菌为丙酸杆菌某未命名种与表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* PM221), 遗憾的是, 未能鉴定出痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium*

*acnes*), 但已有结果与早期报道相符。与健康组相比, 痤疮组表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* PM221) 和颗粒丙酸杆菌(*Propionibacterium granulosum*)都显著性上升, 而其他菌种均显著性下降。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一

个典型的致病菌,但其在痤疮组显著性下降,与国内基于培养的研究中报道大学生痤疮皮损中主要为金黄色葡萄球菌的结果不同<sup>[25]</sup>,具体原因有待进一步研究。人源葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)可以产生羊毛硫抗生素抑制致病菌的生长,参与皮肤免疫屏障的构建<sup>[26-27]</sup>,其在痤疮患者病灶处显著性下降,大量皮肤常驻菌丰度也显著下降,并伴随细菌多样性下降,从一定程度上反应痤疮患者皮肤微生态屏障被破坏。

将痤疮组含量最高的未鉴定种对应的 OTU 代表序列进行新的数据库比对, 比对数据库为 GreenGene (Release 13.5 <http://greengenes.secondgenome.com/>), 比对结果显示痤疮组含量最高的菌种为痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*), 组间比较结果如图 4 所示。

## 2.2 青少年寻常痤疮面部皮肤真菌组成变化

### 2.2.1 数据质控与物种注释

将高通量测序得到的原始数据进行整理、过滤后, 获得有效序列用于后续分析。35 个样本共得到 205 万条有效序列, 序列长度介于 201–360 bp, 平均约为 266 bp。在 97% 的相似水平下, 对样本进行聚类 and 注释, 共得到 962 个 OTU, 归属于 6 个菌门 315 个菌属 540 个菌种。

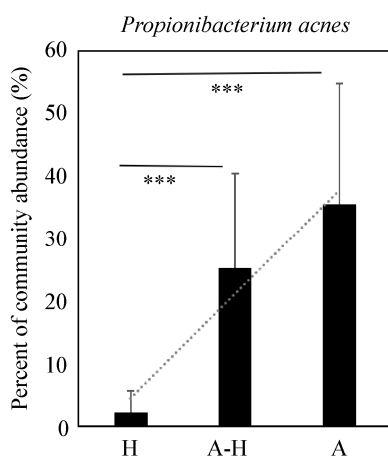


图 4 痤疮丙酸杆菌丰度柱状图

Figure 4 Histogram of *Propionibacterium acnes* abundance

Note: \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.2.2 Alpha 与 Beta 多样性分析

痤疮组与正常对照组相比, 真菌物种多样性无显著性差异, 但痤疮组物种丰富度相较于健康组显著升高( $P < 0.05$ ), 说明青少年痤疮患者面部皮肤真菌组成较健康人群也存在变化。但 PCoA 结果显示, 3 组组间差异并不显著, ANOSIM 组间相似性分析结果也一致。

### 2.2.3 痤疮组与健康组在不同分类水平上真菌组成差异

分别在门、属、种 3 个水平比较不同组间真菌群落结构差异, 结果如下:

#### (1) 门属水平

门水平上痤疮组与健康组面部皮肤真菌主要由子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)组成, 占比大于 90%, 组间比较无显著性差异。属水平上主要有链格孢属(*Alternaria*)、马拉色菌(*Malassezia*)、曲霉(*Aspergillus*)、热霉(*Thermomyces*)、假霉样真菌(*Pseudallescheria*)和假丝酵母(*Candida*)等组成(图 5A), A 组与 H 组具有显著性差异的菌属主要为枝顶孢属(*Acremonium*), A-H 组与 A 组和 H 组无显著性差异物种。已有研究表明马拉色菌为痤疮患者的主要感染源之一<sup>[28-29]</sup>, 本研究结果痤疮皮损区马拉色菌(*Malassezia*)相对含量明显高于健康组, 但无统计学差异。

#### (2) 种水平

种水平上丰度大于 1% 的可命名真菌物种共检测到 16 个, A 组与 H 组相比具有显著性差异的有限制性马拉色菌(*Malassezia restricta*)和 *Acremonium alternatum*。限制性马拉色菌(*Malassezia restricta*)丰度在痤疮组(A)显著高于 H 组, 而 *Acremonium alternatum* 丰度显著低于 H 组(图 5B)。马拉色菌可通过脂酶水解甘油三酯释放十八烯酸等刺激性不饱和脂肪酸, 十八烯酸可影响皮肤角质细胞钙离子通道活性, 破坏表皮屏障功能, 因此推测限制性马拉色菌(*Malassezia restricta*)也可能对痤疮皮损的发展具有重要作用, 这与 Akaza 等<sup>[29]</sup>报道一致。

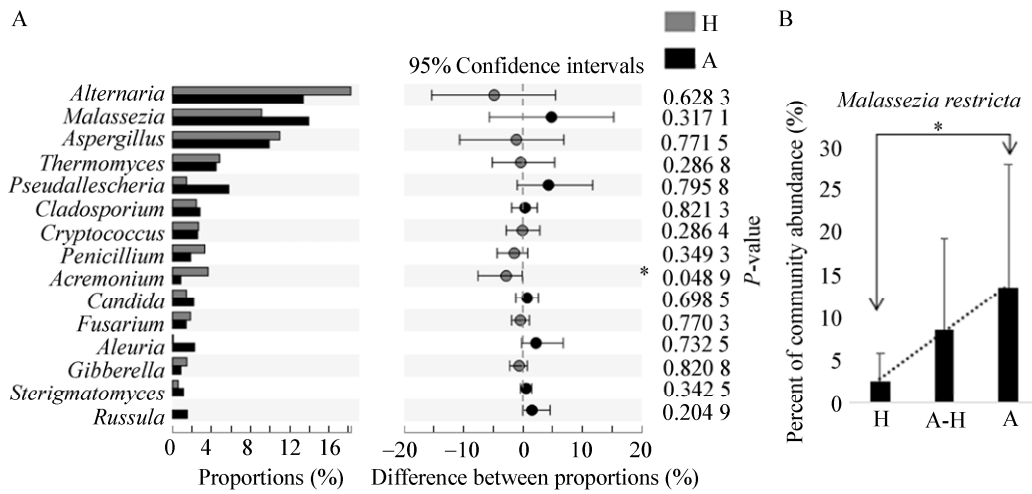


图5 真菌物种组成比较

Figure 5 Comparison of fungal composition

注: A: 属水平物种丰度 Wilcoxon 秩和检验结果; 仅显示丰度大于 1% 的物种. B: 限制性马拉色菌平均丰度柱状图. \*:  $P < 0.05$ .  
 Note: A: Wilcoxon rank-sum test results of fungal community at the genus level; Only species with abundance > 1% were shown. B: A histogram of the mean abundance of *Malassezia restricta*. \*:  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

本文采用高通量测序技术研究了 16 岁青少年面部痤疮与正常皮肤细菌和真菌组成, 共检测到 1 154 个细菌种和 540 个真菌种。我们选取的志愿者均来自高中一年级的学生, 由于刚刚踏入高中生活, 学习生活和身心都是处于一个高度变化的发展过程中, 是青少年痤疮的一个高发阶段。我们先探讨了 16 岁青少年正常面部皮肤的微生物组成, 并以此作为基线来研究青少年痤疮的皮肤微生物变化。正常青少年面部皮肤细菌主要由厚壁菌 (*Firmicutes*)、放线菌 (*Actinobacteria*) 和变形菌 (*Proteobacteria*) 组成 3 大细菌组成, 丰度比例较为均匀; 属水平上主要以无氧芽孢杆菌 (*Anoxybacillus*)、链球菌 (*Streptococcus*)、红球菌 (*Rhodococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 和奈瑟氏菌 (*Neisseria*) 等为主, 物种多样性高, 各菌属分布也较为均衡; 种水平上以好热黄无氧芽孢菌 (*Anoxybacillus flavithermus* WK1)、庆生红球菌 (*Rhodococcus qingshenqii*) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis* PM221) 为主要菌种。真菌主要由子囊菌 (*Ascomycota*) 和担子菌 (*Basidiomycota*) 组成, 其中链格孢属 (*Alternaria*)、马拉色菌 (*Malassezia*) 和曲霉 (*Aspergillus*) 等为优势

菌属。这与成年人以丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 和马拉色菌 (*Malassezia*) 为主的微生物组成存在一定差异<sup>[30-31]</sup>, 可能与青春期少年皮肤状态与成人不同有关。

Chao1 和 Shannon 指数以及样品间 Beta 多样性比较结果显示痤疮组细菌物种丰度与健康组无显著性差异, 但物种多样性显著低于健康组。痤疮皮肤中丙酸杆菌 (主要为痤疮丙酸杆菌) 和葡萄球菌 (主要为表皮葡萄球菌) 显著性上升, 链球菌和红球菌等其他菌属均显著下降, 这与 Lehtimäki 等报道的进入青春期丙酸杆菌等放线菌上升引起的细菌多样性下降类似<sup>[32]</sup>。由于菌群之间存在拮抗作用, 或许在痤疮皮损皮肤中丙酸杆菌和葡萄球菌在争夺有限的生存空间中处于优势, 限制了其他常驻菌和低丰度菌群的生长, 导致皮肤细菌稳态的失衡。这些下降的常驻菌中又包含着大量对皮肤有益的菌群, 例如人源葡萄球菌可以产生羊毛硫抗生素抑制致病菌的生长, 参与皮肤免疫屏障的构建<sup>[26-27]</sup>。而同时, 痤疮丙酸杆菌的大量增殖又会加重痤疮皮损<sup>[33]</sup>, 这些都表明痤疮的发展与整个皮肤微生态的失衡密切相关, 想要彻底改善痤疮, 恢复患者的微生态平衡也至关重要。



值得进一步探讨的是表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*), 其作为皮肤共生菌之一, 通常情况下对皮肤是无害甚至有益的。大量研究报告其在维护皮肤屏障<sup>[27,34]</sup>等方面具有重要作用, 且在免疫方面还可抑制痤疮丙酸杆菌等引起的炎症反应<sup>[35-37]</sup>, 但当免疫缺陷的时候它又会转变成重要的感染体, 产生毒性物质——脂肪酸修饰酶, 分解脂肪酸为胆固醇<sup>[38]</sup>。表皮葡萄球菌在痤疮组显著性上升, 究竟是皮肤微生态屏障的保护机制, 还是损伤来源, 还需要更多的研究来进行验证。总之盈满则亏, 维持一个好的微生态平衡才是皮肤健康的关键, 所以我们在治疗痤疮时可以从抑制有害菌群和促进有益菌群两方面出发, 恢复痤疮皮肤的微生态平衡, 增强痤疮皮肤的微生态屏障功能, 而不是一味地使用抗生素。

痤疮组与正常对照组相比, 真菌物种多样性无显著性差异, 但痤疮组物种丰富度显著高于健康组, 说明真菌组成也随着痤疮皮损而变化, 真菌主要表现为限制性马拉色菌的显著性上升。本研究结果与 Akaza 等针对痤疮脓疱内微生物研究中限制性马拉色菌数量高于球菌马拉色菌的结果一致<sup>[29]</sup>。值得注意的是我们还发现 *Acremonium alternatum* 在痤疮组显著性下降, 其可能对疾病的恢复有益。

痤疮患者面部皮损区与附近无明显皮损区皮肤细菌和真菌丰富度和多样性均无显著差异, 但痤疮皮损区微生物组成与健康组的差异大于无明显皮损区与健康组的差异, 细菌和真菌组呈随健康组、痤疮未皮损组、皮损组顺序变化, 说明青少年痤疮患者面部相对健康皮肤细菌和真菌组成也发生了改变, 这或许是受皮损区微生物变化的影响, 也或者菌群的变化可能预示着痤疮的进一步发展。

#### 4 结论

痤疮患者皮损部位和附近无明显皮损部位微生物组成与健康组存在显著差异, 其中细菌组成变化较为明显, 而皮损部位与附近无明显皮损部位物

种组成无显著性差异; 痤疮患者面部皮肤细菌多样性显著下降, 与丙酸杆菌和葡萄球菌的显著上升相关, 种水平上痤疮丙酸杆菌、表皮葡萄球菌和颗粒丙酸杆菌显著性上升, 而人源葡萄球菌等其他皮肤常驻菌下降; 痤疮组皮肤真菌丰度较健康组显著性上升, 主要表现为限制性马拉色菌的显著性上升。表皮葡萄球菌是研究较多的皮肤有益菌, 其在痤疮组异常升高中的利弊作用还需要进一步的研究来证明。本研究为从微生物角度防治痤疮提供了理论依据。

#### REFERENCES

- [1] Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 427-436
- [2] Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity[J]. *Science*, 2014, 346(6212): 954-959
- [3] Salomon JA, Wang HD, Freeman MK, et al. Healthy life expectancy for 187 countries, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden Disease Study 2010[J]. *The Lancet*, 2013, 380(9859): 2144-2162
- [4] Xiang LH, Ma Y. Progress of acne treatment[J]. *Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-Venereology*, 2017, 24(4): 227-231 (in Chinese)  
项蕾红, 马英. 痤疮治疗的进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2017, 24(4): 227-231
- [5] Qiao L, Zhou J, Ma HQ. Risk factors analysis of acne in adolescents[J]. *China Medical Abstract of Dermatology*, 2014, 31(5): 284-287 (in Chinese)  
乔莉, 周俊, 马慧群. 青少年痤疮风险因素分析[J]. *中国医学文摘: 皮肤科学*, 2014, 31(5): 284-287
- [6] Wei B, Pang Y, Zhu H, et al. The epidemiology of adolescent acne in North East China[J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2010, 24(8): 953-957
- [7] Huang XY, Zhang JL, Li J, et al. Daily intake of soft drinks and moderate-to-severe acne vulgaris in Chinese adolescents[J]. *The Journal of Pediatrics*, 2019, 204: 256-262.e3
- [8] Zaenglein AL. Acne vulgaris[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 379(14): 1343-1352
- [9] Evans DM, Kirk KM, Nyholt DR, et al. Teenage acne is influenced by genetic factors[J]. *British Journal of Dermatology*, 2005, 152(3): 579-581
- [10] Melnik B. Acne vulgaris: rolle der diät[J]. *Hautarzt*, 2010, 61(2): 115-125
- [11] Tom WL, Barrio VR. New insights into adolescent acne[J]. *Current Opinion in Pediatrics*, 2008, 20(4): 436-440
- [12] Webster GF. The pathophysiology of acne[J]. *Cutis*, 2005, 76(2 Suppl): 4-7
- [13] Bergfeld WF. The pathophysiology of acne vulgaris in children and adolescents, Part 1[J]. *Cutis*, 2004, 74(2): 92-97

- [14] Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, et al. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2018, 32(S2): 5-14
- [15] Choi EJ, Lee HG, Bae IH, et al. *Propionibacterium acnes*-derived extracellular vesicles promote acne-like phenotypes in human epidermis[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2018, 138(6): 1371-1379
- [16] Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(8): 3158-3165
- [17] Olutunmbi Y, Paley K, English III JC. Adolescent female acne: etiology and management[J]. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, 2008, 21(4): 171-176
- [18] Till AE, Goulden V, Cunliffe WJ, et al. The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ[J]. British Journal of Dermatology, 2000, 142(5): 885-892
- [19] He LS, Lu YH, Gao SY, et al. The comparative study of acne vulgaris and normal skin microorganisms[J]. Chinese Journal of Dermatovenereology, 2017, 31(4): 378-382 (in Chinese)  
何丽莎, 路永红, 高诗燕, 等. 寻常痤疮与正常人皮肤微生物的对比[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(4): 378-382
- [20] Dreno B, Martin R, Moyal D, et al. Skin microbiome and *acne vulgaris*: *Staphylococcus*, a new actor in acne[J]. Experimental Dermatology, 2017, 26(9): 798-803
- [21] Hong KZ. Differential risk factors and outcomes in patients with classical persistent, and adult-onset acne[D]. Shanghai: Master's Thesis of Fudan University, 2012 (in Chinese)  
洪恺志. 成人型痤疮和青春期痤疮各因素的分析比较[D]. 上海: 复旦大学硕士学位论文, 2012
- [22] Shi Y, Zeng DN, Chi L, et al. The influence of age and gender on skin-associated microbial communities in urban and rural human populations[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141842
- [23] Xiang LH. Guideline for diagnosis and treatment of acne (the 2014 revised edition)[J]. Journal of Clinical Dermatology, 2015, 44(1): 52-57 (in Chinese)  
项蕾红. 中国痤疮治疗指南(2014 修订版)[J]. 临床皮肤科杂志, 2015, 44(1): 52-57
- [24] Nakajima A, Ikeda F, Kanayama S, et al. Antimicrobial activities of ozenoxacin against isolates of propionibacteria and staphylococci from Japanese patients with acne vulgaris[J]. Journal of Medical Microbiology, 2016, 65(8): 745-750
- [25] Hou J, Liu CL, Huang R, et al. Investigation on pathogenic analysis of college student acne[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2011, 20(2): 272-274 (in Chinese)  
侯建, 柳臣兰, 黄蓉, 等. 大学生痤疮的病原学调查分析[J]. 中国美容医学, 2011, 20(2): 272-274
- [26] Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis[J]. Science Translational Medicine, 2017, 9(378): eaah4680
- [27] Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(3): 143-155
- [28] Youn NH, Cha SH, Park SD. Malassezia yeasts in acne vulgaris[J]. Korean Journal of Dermatology, 2002, 40(12): 1453-1460
- [29] Akaza N, Akamatsu H, Numata S, et al. Microorganisms inhabiting follicular contents of facial acne are not only *Propionibacterium* but also *Malassezia* spp.[J]. The Journal of Dermatology, 2016, 43(8): 906-911
- [30] Shibagaki N, Suda W, Clavaud C, et al. Aging-related changes in the diversity of women's skin microbiomes associated with oral bacteria[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10567
- [31] Grice EA, Dawson Jr TL. Host-microbe interactions: *Malassezia* and human skin[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 40: 81-87
- [32] Lehtimäki J, Karkman A, Laatikainen T, et al. Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45651
- [33] Bakry OA, Samaka RM, Sebika H, et al. Toll-like receptor 2 and *P. acnes*: do they trigger initial acne vulgaris lesions?[J]. Analytical and Quantitative Cytology and Histology, 2014, 36(2): 100-110
- [34] Nodake Y, Matsumoto S, Miura R, et al. Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe—a blinded randomized clinical trial[J]. Journal of Dermatological Science, 2015, 79(2): 119-126
- [35] Xia XL, Li ZH, Liu KW, et al. Staphylococcal LTA-induced miR-143 inhibits *Propionibacterium acnes*-mediated inflammatory response in skin[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2016, 136(3): 621-630
- [36] Wang YH, Kuo S, Shu MY, et al. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 411-424
- [37] Li DQ, Lei H, Li ZH, et al. A novel lipopeptide from skin commensal activates TLR2/CD36-p38 MAPK signaling to increase antibacterial defense against bacterial infection[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58288
- [38] Kumar B, Pathak R, Mary PB, et al. New insights into acne pathogenesis: exploring the role of acne-associated microbial populations[J]. Dermatologica Sinica, 2016, 34(2): 67-73