

DOI:10.13350/j.cjpb.231205

• 论著 •

# 尘肺病患者肺部感染的菌群结构分布及影像特征研究\*

朱胜康<sup>1</sup>,王静静<sup>2</sup>,翟荣存<sup>1</sup>,丁杰杰<sup>1</sup>,刘晓东<sup>1\*\*</sup>

(1. 铜陵市立医院放射科,安徽铜陵 244000;2. 铜陵市立医院呼吸与危重症医学科)

**【摘要】** 目的 尘肺病是一种全球性危害严重的职业病,其并发的肺部感染对患者的健康造成严重威胁。本研究旨在通过高分辨率计算机断层扫描(CT)和高通量测序探讨尘肺病患者肺部感染的菌群结构分布及影像特征,为尘肺病的预防、诊断和治疗提供新的视角和策略。 方法 铜陵市立医院呼吸与危重症医学科2021年1月-2023年10月收治的符合《职业性尘肺病的诊断》(GBZ70-2015)标准的尘肺病肺部感染患者15例,均进行肺部CT扫描,并采集肺泡灌洗液(BALF)进行微生物组分析。使用QIIME 2软件对测序数据进行处理和分析。 结果 对15例平均粉尘暴露 $18.07 \pm 7.16$ 年的尘肺病患者支气管镜肺泡灌洗液的16S rRNA基因扩增及测序分析表明,尘肺病患者的感染患者肺部微生物组存在明显的多样性,门水平前3微生物种类分别为厚壁菌门、变形菌门以及放线菌门;属水平的前3微生物种群分别为普氏菌属、链球菌属以及假单胞菌属;同时,Alpha多样性分析表明Shannon指数为 $4.20 \pm 1.52$ ,Phylogenetic Diversity多样性指数为 $8.11 \pm 2.54$ 。功能预测分析提示氨基酸代谢、能量代谢以及脂质代谢为尘肺病患者的微生物组主要参与的代谢功能。 结论 尘肺病可能会影响肺部微生物组的代谢功能,进而影响肺部的生理功能和病理过程。

**【关键词】** 尘肺病;肺部感染;计算机断层扫描;菌群结构;高通量测序;微生物组

**【中图分类号】** R378**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)12-1388-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1388-1392.]

## Study on the radiographic characteristics of pulmonary infections and the distribution of pulmonary microbial communities in pneumoconiosis patients

ZHU Shengkang<sup>1</sup>, WANG Jingjing<sup>2</sup>, ZHAI Rongcun<sup>1</sup>, DING Jiejie<sup>1</sup>, LIU Xiaodong<sup>1</sup> (1. Department of Radiology, Tongling Municipal Hospital, Tongling 244000, Anhui, China; 2 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Tongling Municipal Hospital) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** Pneumoconiosis, a globally prevalent occupational disease of grave detriment, poses a significant threat to health due to its concurrent pulmonary infections. This study aims to investigate the radiographic characteristics of pulmonary infections and the distribution of pulmonary microbial communities in pneumoconiosis patients, employing high-resolution computed tomography (HRCT) and high-throughput sequencing technologies. The goal is to offer fresh insights and strategies for the prevention, diagnosis, and treatment of pneumoconiosis. **Methods** This study included 15 patients with pneumoconiosis-related pulmonary infections, who met the diagnostic criteria for occupational pneumoconiosis (GBZ70-2015) and were admitted to the Department of Respiratory and Critical Care Medicine at Tongling City Hospital from January 2021 to October 2023. All patients underwent lung HRCT scans, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were collected for microbiome analysis. The sequencing data were processed and analyzed using QIIME 2 software. **Results** Analysis of the 16S rRNA gene amplification and sequencing of bronchoalveolar lavage fluid from 15 pneumoconiosis patients with an average dust exposure of  $18.07 \pm 7.16$  years revealed significant diversity in the pulmonary microbiota of the infected patients. At the phylum level, the top three microbial species were Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria; at the genus level, the top three microbial populations were Pseudomonas, Streptococcus, and Pseudomonas. Additionally, alpha diversity analysis showed a Shannon index of  $4.20 \pm 1.52$  and a Phylogenetic Diversity index of  $8.11 \pm 2.54$ . Functional prediction analysis suggested that amino acid metabolism, energy metabolism, and lipid metabolism are the main metabolic functions in which the microbiota of pneumoconiosis patients participate. **Conclusion** Pneumoconiosis may affect the metabolic functions of the pulmonary microbiota, thereby affecting pulmonary physiological functions and pathological processes.

**【Key words】** pneumoconiosis; pulmonary infections; computed tomography scan; microbial community structure; high-throughput sequencing; microbiome

\* 【基金项目】 安徽省科技厅项目(No. 1804h08020238)。

\*\* 【通讯作者】 刘晓东,E-mail:2095661189@qq.com

【作者简介】 朱胜康(1979-),男,安徽铜陵人,本科,副主任医师。主要研究方向:肺部影像。E-mail:Zhu\_sk@yeah.net

尘肺病(pneumoconiosis)是一种全球性的危害严重的职业病,是由长期吸入无机粉尘引起的<sup>[1]</sup>。全球有超过2000万人患有尘肺病,尤其在工业化或正在工业化的国家,尘肺病的发病率和死亡率都呈现出逐年上升的趋势。尘肺病患者的肺部容易发生感染,这对患者的生命健康构成了严重威胁<sup>[1-3]</sup>。

计算机断层扫描(CT)在尘肺病的诊断和评估中发挥重要作用。CT可提供关于肺部病理改变的详细信息,有助于医生对患者的病情进行精确评估。然而,尘肺病患者的肺部CT特征与肺部感染的关系以及与肺部菌群结构的关系目前尚未明确。微生物组(Microbiome)是指一个特定环境中的所有微生物群体,包括细菌、真菌、古菌、病毒等<sup>[4]</sup>,这些微生物组成的复杂网络共同构建了一个微观的生态系统,对宿主的健康状况和疾病发展具有深远影响。在人类体内,研究最为广泛的微生物组是肠道微生物组,该微生物组对于营养消化、免疫功能、以及心理行为等都有重要作用<sup>[5-7]</sup>。然而关于肺部微生物组的研究相对较少,其重要性也只是近年来开始受到重视。目前,新一代基因测序(Next-generation sequencing, NGS)技术不断发展,基于该技术的研究表明尘肺病患者的肺部感染与其肺部微生物群落的改变有关<sup>[8-10]</sup>。长期以来,肺部被认为是一个无菌的环境,然而近年来的研究揭示,健康肺部实际上也富含多样性的微生物群落<sup>[11]</sup>。这些微生物有助于保持肺部的内环境稳定,对抵抗病原体侵入、调节免疫反应以及影响呼吸系统疾病的发病等都有重要作用。尘肺病可能导致肺部微生物组的失衡,从而增加肺部感染的风险。

微生物组的研究可能为理解和治疗尘肺病提供全新的视角和工具。例如,如果发现特定的菌群在感染前就已经显著增加,则这些菌群可作为早期感染的预警指标。如果某些有益菌群在尘肺病患者中显著减少,可通过调整肺部微生物组的方法(例如,使用含有这些菌群的益生菌)来提高治疗效果。对肺部微生物组的研究也可能揭示尘肺病的新的疾病机制。本研究通过分析尘肺病患者的肺部CT特征以及肺部微生物谱,为尘肺病的预防、诊断和治疗提供新的视角和策略,以进一步改善患者的生活质量和预后。

## 对象与方法

### 1 病例

铜陵市立医院呼吸与危重症医学科2021年1月-2023年10月收治的尘肺病患者15例,均符合《职业性尘肺病的诊断》(GBZ70-2015)标准。入选标准:(1)年龄在44~93岁之间;(2)入选前3个月未接受过抗生素治疗或微生物组调节治疗;(3)对研究方法如CT

扫描或支气管镜取样无禁忌症。排除标准:(1)患者入选前1年内有肺部手术史;(2)孕妇或哺乳期妇女;(3)无法理解研究内容,或者无法配合完成研究的患者。

本研究本符合《赫尔辛基宣言》原则和临床规范,并经院伦理审批委员会批准,所有患者和受试者均签署知情同意书。

### 2 方法

**2.1 计算机断层扫描(CT)检查** 所有患者均使用64多排螺旋CT扫描仪(Philips Ingenuity 64CT)进行高分辨率CT检查。CT扫描在控制呼吸的情况下进行,以最小化运动伪影的影响。扫描参数:电压120kVp,电流自动调节,轴向扫描模式,层厚2.0 mm,层间距1.0 mm。扫描均从胸部顶部开始,到膈肌下方结束。扫描在患者平卧、深吸气屏气的情况下进行。所有扫描图像都以DICOM格式存储并用于后续分析。

**2.2 支气管镜肺泡灌洗液(BAL)采集** 患者在接受支气管镜检查和肺泡灌洗术之前接受全身麻醉以减少不适。检查期间,医生通过鼻孔或口腔插入支气管镜,然后将其引导至相应的肺段支气管,用生理盐水进行灌洗并回收BALF。采集的BALF立即置于液氮冷冻并转移保存在-80℃环境中备用。

**2.3 DNA提取** 采用QIAamp DNA Microbiome Kit(Qiagen, Germany)提取BALF中的DNA,按说明书方法操作。采用NanoDrop ND-1000(Thermo Fisher Scientific, USA)和Agarose Gel Electrophoresis对提取的DNA进行定量和质量控制。

**2.4 16S rRNA基因扩增及高通量测序** 以提取的DNA为模板PCR扩增16S rRNA基因。16S rRNA基因通用引物27F:5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3';1492R:5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3'。PCR反应体系为20 μL,其中包括2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix(KAPA Biosystems, USA)10 μL,引物各0.25 μmol/L,模板DNA 10 ng。PCR反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃再延伸5 min。采用2%琼脂糖凝胶电泳验证PCR产物。采用AMPure XP beads(Beckman Coulter, USA)纯化PCR产物,并使用Illumina NovaSeq平台(Illumina, USA)对纯化的PCR产物进行双端测序,测序长度为2×300 bp。

**2.5 数据处理及统计分析** 采用QIIME 2(Quantitative Insights Into Microbial Ecology)软件包处理测序数据。使用DADA2插件进行质量控制

(Filtering)、去噪(Denoising)、拼接(Merging)、以及ASVs(AmpliCon Sequence Variants)的推断和嵌合体的去除。使用SILVA数据库对ASVs进行分类,使用Phylogenetic Diversity和Shannon diversity指数评估微生物群落的多样性。使用R软件(v 4.1.2)进行统计学和部分生物信息学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 一般资料

15例尘肺病患者均为男性,平均( $70.33 \pm 16.94$ )岁,平均粉尘暴露史( $18.07 \pm 7.16$ )年,其中11例患者(73.3%)存在长期吸烟史。

### 2 尘肺病患者肺部CT影像特征

CT显示患者双肺呈现弥漫性、大小相近的结节并合并广泛网格状改变,通常位于上叶和外周部位,内见斑片状密度增高影(图1A)。部分患者双肺多发小结节,左肺上叶条片状影,右肺下叶外基底段椭圆形实变影,外缘宽基底与胸膜相连,内见小空泡影(图1B)。病程后期的患者肺部出现蜂窝状改变,表现为严重的肺部纤维化。同时,由于长期吸入矿物尘埃颗粒,患者双肺下叶多发斑片状密度增高影(图1C),双肺上叶多发斑片状密度增高影及小结节影,内见扩张支气管影,胸膜线明显增厚或局部区域的密度明显增加(图1D)。

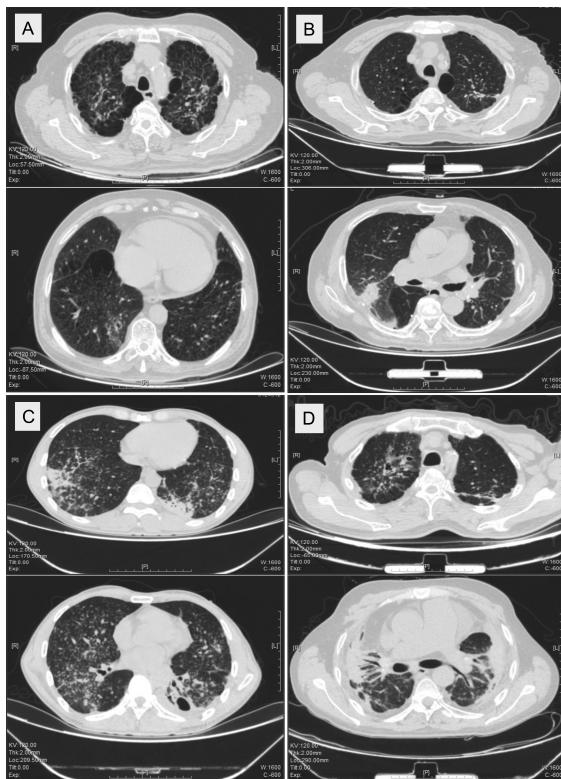


图1 典型尘肺病患者肺部感染CT扫描

Fig. 1 Representative CT scan images of pulmonary infections in pneumoconiosis patients

### 3 肺部微生物16S rRNA基因扩增及测序分析

以从患者的BALF中提取的DNA为模板PCR扩增16S rRNA基因并测序,测序数据经过barcode拆分后获得有效序列信息,结果如图2。其中数据拆分后有5例患者样品的序列数量为9 100,其余患者分别为9 000,9 300,9 200,9 400。

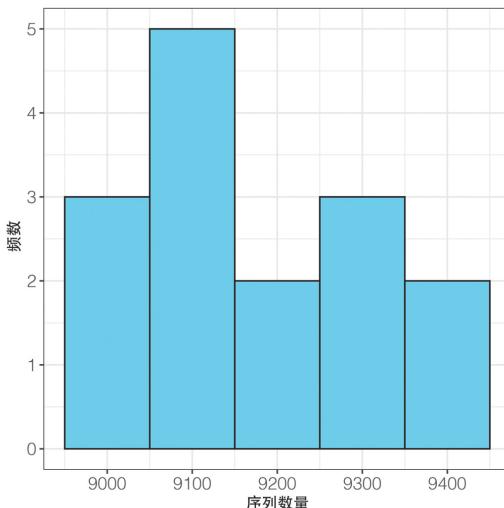


图2 数据拆分序列数目统计

Fig. 2 Descriptive data for number of sequences

使用QIIME 2软件中的DADA2插件对所有样品的全部原始序列(input)进行质量控制(filtered),去噪(纠正测序错误的序列,denoised),拼接(merged),并且去嵌合体(non-chimeric),形成操作分类单元(Operational Taxonomic Units,OUT),表1显示该过程各个步骤之后剩余序列数目。

表1 DADA2去噪生成OTU过程中的剩余序列数目统计

Table 1 Remaining Sequence Numbers in OTU Generation through DADA2 Denoising

标本名称 Sample ID	质量控制 Filtered	质控后 序列占比(%) Proportion after Filtered	去噪 序列 Denoised	拼接 序列 Merged	拼接序列 占比(%) Proportion of Merged	去嵌合体 序列 Non- chimeric	去嵌合体 序列占比(%) Proportion of Non-chimeric
P01_M	9450	83.32	9350	9250	81.56	9150	80.67
P02_M	9520	83.94	9420	9320	82.17	9220	81.29
P03_F	9630	84.91	9530	9430	83.14	9330	82.26
P04_M	9400	82.88	9300	9200	81.11	9100	80.23
P05_M	9350	82.44	9250	9150	80.67	9050	79.79
P06_F	9570	84.38	9470	9370	82.61	9270	81.73
P07_F	9680	85.35	9580	9480	83.58	9380	82.70
P08_M	9450	83.32	9350	9250	81.56	9150	80.67
P09_M	9320	82.17	9220	9120	80.41	9020	79.53
P10_M	9580	84.46	9480	9380	82.70	9280	81.82
P11_M	9440	83.23	9340	9240	81.47	9140	80.59
P12_M	9310	82.08	9210	9110	80.32	9010	79.44
P13_M	9670	85.26	9570	9470	83.49	9370	82.61
P14_M	9430	83.14	9330	9230	81.38	9130	80.50
P15_M	9550	84.20	9450	9350	82.44	9250	81.56

#### 4 尘肺病患者肺部微生物组成

对15例患者的BALF中扩增的16S rRNA基因全部有效序列进行聚类/去噪,形成OUT(特征序列)。选取OTU的代表性序列与Greengenes Database数据库(版本:13.8)进行比对,获得物种注释信息<sup>[12]</sup>。基于OTU的绝对丰度及注释信息,对每个样品在总共7个分类水平界门纲目科属种(Kingdom, Phylum, Class, Order, Family, Genus, Species)上的序列数目占总序列数的比例进行统计,以有效地评估样品的物种注释分辨率。图3为每个样品的OTU在各分类水平注释的相对程度。结果显示,尘肺病患者的肺泡灌洗液中,门(Phylum)水平的前三优势微生物种类分别为厚壁菌门(Fimicutes)、变形菌门(Proteobacteria)以及放线菌门(Actinobacteriota);属(Genus)水平的前三微生物种群分别为普氏菌属(Prevotella)、链球菌属(Streptococcus)、以及假单胞菌属(Pseudomonas)。

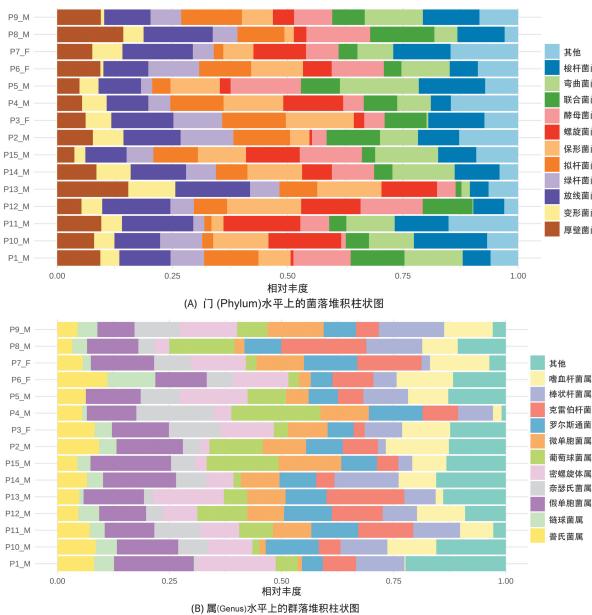


图3 尘肺病患者BALF中的微生物组成

Fig. 3 Microbial composition in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of pneumoconiosis patients

#### 5 尘肺病患者肺部微生物Alpha多样性

Alpha多样性指数是对某个样品中物种多样性的分析,包含样品中物种组成的丰富度和均匀度两个因素,通常用Shannon指数和Phylogenetic Diversity指数进行评估,指数越高,表明样品中的微生物多样性越复杂。其中,Shannon指数在计算时考虑到样品中的分类总数和每个分类所占的比例;Phylogenetic Diversity是基于系统发育树来计算的一种多样性指数,它用各个样品中OTU的代表序列计算出构建系统发育的距离,将某一样品中的所有代表序列的值加和,从而得到的数值<sup>[13-15]</sup>。

尘肺病患者BALF样品微生物Alpha多样性分析显示,尘肺病患者的肺部微生物多样性较高,其中,Shannon指数为 $4.20 \pm 1.52$ , Phylogenetic Diversity多样性指数为 $8.11 \pm 2.54$ (图4)。

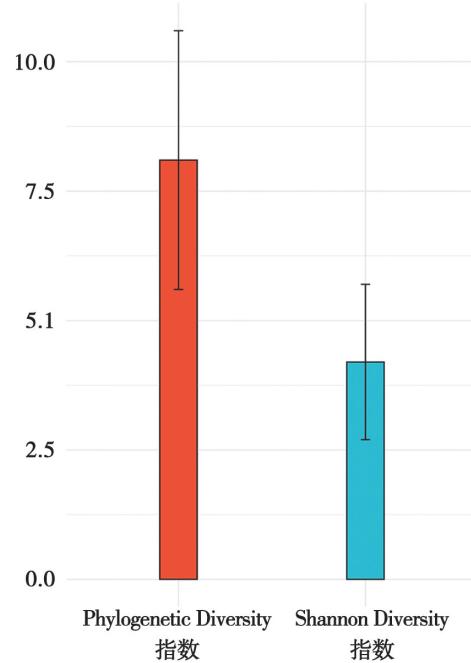


图4 尘肺病患者肺泡灌洗液菌群Alpha多样性分析

Fig. 4 Alpha diversity analysis of the microbiota in bronchoalveolar lavage fluid of pneumoconiosis patients.

#### 6 微生物群落功能预测

基于已测微生物基因组序列构建微生物基因功能预测谱,将测序得到的微生物组成映射到数据库中,对微生物代谢功能进行预测<sup>[16-17]</sup>。结果显示,尘肺病患者的微生物组参与的代谢功能主要为氨基酸代谢、能量代谢以及脂质代谢功能(图5)。

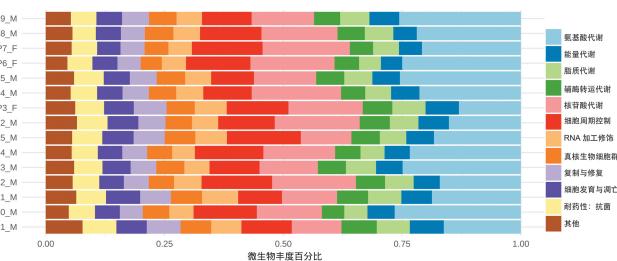


图5 尘肺病患者肺泡灌洗液微生物群代谢功能预测

Fig. 5 Prediction of metabolic function of alveolar lavage fluid microbiota in pneumoconiosis patients

#### 讨 论

尘肺病是一种全球性危害严重的职业病,其发病率和死亡率在工业化或正在工业化的国家中呈现出逐年上升的趋势。本研究检测分析了尘肺病患者肺部感染的影像特征和菌群结构分布,结果表明尘肺病患者的肺部微生物组存在明显的多样性,且这种多样性与

尘肺病的发病和发展有密切关系,与文献[18—19]的研究结果相吻合,显示了尘肺病与肺部微生物组的复杂关系。本研究结果表明尘肺病患者的肺部微生物组的主要代表物种为普氏菌属(Prevotella)、链球菌属(Streptococcus)和假单胞菌属(Pseudomonas),与代金娥等<sup>[19]</sup>报道的结果基本一致,说明这些菌群可能在尘肺病的发生发展中起重要作用。与已有文献报道相比,本研究采用的NGS技术具有更高的分辨率,能够检测到更多的微生物种类,如肺炎链球菌和黄曲霉。这些新检出的微生物在尘肺病发生发展中的作用有待进一步探讨。

本研究采用16S rRNA基因扩增和NGS技术对患者样品中的微生物组进行了检测和分析,上述方法能够准确地鉴定和定量检测样品中的微生物,而不仅仅是依赖传统的微生物培养和鉴定方法<sup>[20]</sup>,显示了NGS技术在微生物群落结构和功能研究中的重要性。

本研究结果显示,尘肺病患者肺部微生物组的功能主要与氨基酸代谢、能量代谢和脂质代谢有关。说明尘肺病可能会影响肺部微生物组的代谢功能,进而影响肺部的生理功能和病理过程。这为进一步探究尘肺病的病理机制提供了新的线索。

本次研究中的样品数量有限,可能会研究结果有一定影响。其次,由于为横断面研究,无法揭示尘肺病的发展过程中肺部微生物组的动态变化。此外,本研究依赖于16S rRNA基因扩增和测序技术,虽然这种技术能够提供详细的微生物群落信息,但也存在一些局限性,如对样品的质量和数量要求较高,数据分析复杂等,因此尚需通过更大的样本量和更深入的研究作进一步验证。

综上所述,本次研究揭示了尘肺病患者肺部感染的影像特征以及肺部微生物组的特点,为尘肺病的预防、诊断和治疗提供了新的视角和策略。

#### 【参考文献】

- [1] 包相华,邹茹,杨蓓,等.尘肺病合并肺部感染病原菌类型及感染危险因素分析[J].中国病原生物学杂志,2023,18(1):77-81.
- [2] Hua JT, Cool CD, Green FHY. Pathology and mineralogy of the pneumoconioses[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2023, 44(3): 327-339.
- [3] Popovic D, Kulas J, Tucovic D, et al. Lung microbiota changes during pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in rats[J]. Microbes Infect, 2023, 20:105186.
- [4] Acun PM, Sari G, Koyuncu A, et al. Factors affecting development of chronic obstructive pulmonary disease in pneumoconiosis cases: A cross-sectional study between 2017 and 2022 in Turkey[J]. J Occup Environ Med, 2023, 65(8):694-698.
- [5] Yuan X, Xie L, Shi Z, et al. Application of mNGS in the study of pulmonary microbiome in pneumoconiosis complicated with pulmonary infection patients and exploration of potential biomarkers[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13:1200157.
- [6] Raoof S, Shah M, Make B, et al. Lung Imaging in COPD Part 1: Clinical usefulness[J]. Chest, 2023, 164(1):69-84.
- [7] Brody H. The gut microbiome[J]. Nature, 2020, 577(7792):S5.
- [8] Druzhinin VG, Baranova ED, Matskova LV, et al. Sputum microbiota in coal workers diagnosed with pneumoconiosis as revealed by 16S rRNA gene sequencing[J]. Life (Basel), 2022, 12(6):830.
- [9] Wang W, Li Y, Han G, et al. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 alleviates the inflammatory response in asthma by regulating TLR2/TLR4 expression[J]. Front Nutr, 2022, 9:931427.
- [10] Guo J, Zhang B, Xiong Y, et al. The temporal characteristics of the disruption of gut microbiota, serum metabolome, and cytokines by silica exposure in wistar rats [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 252:114580.
- [11] Shi H, Zhao T, Geng R, et al. The associations between gut microbiota and chronic respiratory diseases: a Mendelian randomization study[J]. Front Microbiol, 2023, 14:1200937.
- [12] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [13] Wang Y, Sheng HF, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(23):8264-8271.
- [14] Belda E, Voland L, Tremaroli V, et al. Impairment of gut microbial biotin metabolism and host biotin status in severe obesity: effect of biotin and prebiotic supplementation on improved metabolism[J]. Gut, 2022, 71(12):2463-2480.
- [15] Tuomisto H. A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist[J]. Oecologia, 2010, 164(4):853-860.
- [16] Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):814-821.
- [17] Comeau AM, Douglas GM, Langille MG. Microbiome helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research[J]. mSystems, 2017, 2(1):e00127-16.
- [18] 荆茹,孟凡利,李旭东.不同分期矽肺患者气道细菌群落微生态研究[J].实用医学杂志,2023,39(9):1105-1110.
- [19] 代金娥,张吉颖,乔迪,等.尘肺病患者下呼吸道菌群结构特征研究[J].中华劳动卫生职业病杂志,2023,41(4):247-254.
- [20] Yuan X, Xie L, Shi Z, et al. Application of mNGS in the study of pulmonary microbiome in pneumoconiosis complicated with pulmonary infection patients and exploration of potential biomarkers[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13:1200157.

【收稿日期】 2023-08-10 【修回日期】 2023-11-04