

人体鼻咽部微生物群落多样性研究进展

刘晓峰 李晓然*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院 云南 昆明 650500)

摘要: 定植于鼻咽部的微生物与人体始终处于动态生态平衡, 对于维持人体健康发挥着重要作用, 也与多种上呼吸道疾病的发生发展有密切关系。鼻咽部微生物之间及其与宿主之间的相互作用是引发人体上呼吸道疾病的重要因素。微生物的培养方法与分子生物学技术的结合使人们越来越深入地了解人体鼻咽部微生物群落的组成和结构。定植于人体鼻咽部的微生物以肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)等潜在致病菌为主。本文将分别从鼻咽部微生物与机体的平衡关系、鼻咽部微生物群落的研究方法以及鼻咽部微生物群落的组成及其相互关系三个方面, 综述近年来鼻咽部微生物群落结构的相关研究进展, 从而为指导实践提供可靠的理论依据。

关键词: 鼻咽部, 微生物群落, 多样性

Advances in the diversity of nasopharyngeal microbial communities

LIU Xiao-Feng LI Xiao-Ran*

(College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: The microbial flora located in human nasopharynx keeps a dynamic balance with the human body. It plays an important role in maintaining the human health, and related with various upper respiratory tract diseases. The relationship within nasopharynx microbes, and between microbes and host, is the key cause of human upper respiratory tract diseases. The development of culture-dependent and -independent molecular methods in microbial communities research provide a useful tool to learn more about the composition and structure of human nasopharyngeal microbial communities. It demonstrated that the dominant floras located in human nasopharynx were *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, which were considered as potential pathogens in nasopharynx. In this work, the development in nasopharyngeal microbial community research was reviewed in the following three aspects: the balance between nasopharyngeal microbe and the human body; method in nasopharyngeal microbial community research; and the composition of nasopharyngeal microbial community and the internal relationship among them. This review summarized the progress on this field for the reference of the future work.

Keywords: Nasopharynx, Microbial community, Diversity

基金项目: 云南省科技厅项目(No. KKS201226110)

*通讯作者: Tel: 86-871-592-0759; ✉: LiXR1984@126.com

收稿日期: 2013-05-21; 接受日期: 2013-08-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-08-27

分子微生物生态学是分子生物学实验技术应用于微生物生态学研究领域而发展形成的一门交叉学科,在研究微生物生态系统组成结构、功能的分子机理以及微生物与生物和非生物环境之间相互关系等方面显示了巨大的潜力^[1]。自然界中的微生物群落在其生存环境的大部分生化转化中具有重要的作用。

微生物群落的组成随着人体部位的不同以及个体的不同而不同,这主要依赖于宿主和环境因素,例如,营养来源、湿度、黏膜的结构和免疫情况^[2-4]。不仅仅细菌群落的组成和动力学特征,其群落的密度在不同的部位也有很大的差异,例如,排泄物中密度为 10^{11} – 10^{12} 细胞数/g^[5],而在人体鼻咽部的密度只有 10^4 – 10^5 细胞数/cm²^[6]。一般来说,微生物通常定殖在宿主每一处暴露于外界的身体表面,包括皮肤、口腔、呼吸道、泌尿生殖道和胃肠道。鼻咽部是腭帆平面以上的部分,向前经鼻后孔通鼻腔,位于联系鼻、耳、口、呼吸道的枢纽位置,因此鼻咽部也是许多微生物定殖的主要部位,具有较高的微生物群落多样性。在鼻咽部后上壁的黏膜内有丰富的淋巴组织,称为咽扁桃体。咽扁桃体中的微生物群落在多种上呼吸道感染与非传染性疾病中具有重要作用,例如中耳炎、鼻窦炎、及鼻咽部腺样体(咽扁桃体)肥大等。上呼吸道感染是小儿时期常见的疾病,其中包括鼻、咽、喉的感染,临床一般统称为上感。人的鼻咽部可认为是上呼吸道感染的起源部位^[7]。鼻咽部的微生物与人体始终处于动态生态平衡状态,对于维护人体的健康发挥着重要作用,也与多种上呼吸道感染等疾病的发生发展有密切关系。

随着现代科学技术的发展,越来越多的新技术、新方法用于鼻咽部微生态领域的研究,也因为对鼻咽部微生物的研究有利于鼻咽部疾病的预防和治疗,使得人们对鼻咽部微生态的认识不断深入。本研究主要综述了近年来有关鼻咽部微生物群落多样性方面的研究进展。

1 鼻咽部微生物与机体的平衡关系

正常菌群是微生物与其宿主在共同的进化过程中形成的对人体有益的微生物菌群。通常情况下,人们仅片面的看到了鼻咽部正常菌群的致病作用,也就是引起内源性感染的作用,而忽视了其正常的生理作用。其实不然,正常情况下,鼻咽部正常菌群之间以及正常菌群中多种微生物之间,互相依存,互相制约,构成一种生态平衡,发挥着重要的生理作用,例如生物拮抗作用、营养作用以及免疫作用^[8]。这些存在于人体表和体腔的正常菌群大部分与细胞密切接触,在很大程度上参与人体供能、交换物质、传递遗传信息等生命活动。同样,人体鼻咽部的正常菌群对于维持人体健康也具有不容忽视的作用,它能够通过竞争关系抑制定殖在鼻咽部的致病菌群的生长,或者通过分泌细菌素杀死致病菌群,以维持人体的正常生理功能。在平衡状态中,这个细菌的生态系统有利于维持人体的生理健康,例如,通过刺激免疫系统和作为防御机制来抵御病原菌的入侵等^[9]。

微生态失调是正常微生物群落之间和正常微生物与宿主之间的微生态平衡,在各种因素的影响下,由生理性组合转变为病理性组合的状态。人体鼻咽部的微生物在正常情况下不致病,当生态失调时,菌群数量会发生改变。此时,某些致病菌会成为鼻咽部的优势菌群,从而引起口腔黏膜感染、鼻炎、咽喉炎、扁桃体炎,甚至全身感染。这些病的发生都与鼻咽部的微生态失调有关^[8]。另外,一些新细菌的定殖也会打破鼻咽部微生物群落的生态平衡,导致病原菌乘虚而入,引起急性中耳炎、肺炎甚至脑膜炎等疾病的发生^[10]。

上呼吸道肺炎链球菌的定殖是导致中耳炎的一个常见因素。中耳炎主要是由肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、黏膜炎莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)引起的,而且可能导致长期的听力障碍。人体感染中耳炎之前,定殖在上呼吸道的肺炎链球菌一定与其中的微生物群落存在竞争关系。一

旦菌群之间的平衡关系被打破,人体的正常生理功能就会受到影响。加深对上呼吸道微生物群落的认识有利于中耳炎的预防及治疗。这些致病菌群通常与肺炎链球菌、流感嗜血菌以及黏膜炎莫拉菌有关。对于儿童来说,鼻咽部微生物的定殖是导致细菌性肺炎和中耳炎这两种疾病的先决条件。从全球来看,肺炎是导致五岁以下儿童死亡的主要原因^[11]。肺炎链球菌是引起这个年龄段儿童患肺炎的首要因素,而且能够导致患败血病和脑膜炎等感染性疾病。全球每年大约有80万婴儿死于由肺炎链球菌引起的疾病中,其中很大一部分发生在低收入的国家^[12]。中耳炎是儿科细菌性感染疾病中发生频率最高的,大约80%的儿童在三岁的时候会感染此病^[13]。

总之,在各种因素的作用下,正常生理状态下的鼻咽部微生物群落之间,鼻咽部微生物群落与宿主之间,保持着一种动态平衡关系,共同维系着宿主鼻咽部的健康。

2 鼻咽部微生物群落的研究方法

2.1 传统的微生物培养法

从传统上讲,主要利用基于培养的技术对鼻咽部微生物群落进行研究,该技术曾在实验室广泛使用。但是基于培养的方法研究微生物群落多样性要求必须在实验室中对微生物进行分离培养,但以现有的实验技术和条件,能够在实验室分离培养的微生物只占自然界已经检测到微生物的一小部分。Amann等^[14]曾根据微生物原位的、不依赖于培养的微生物系统发育学研究结果认为:在自然界中,通过实验室人工培养方法已经被分离和描述的微生物物种数量仅占估计数量的1%~5%,而其余95%~99%微生物种群还仍然未被分离和认识。因此,人们不能利用传统的微生物技术获得微生物多样性的真正概貌。另外,鼻咽部中存在的多种致病菌的培养条件是非常严格的。不仅对实验操作者本身有一定的危险性,而且有可能由于操作不慎使致病菌污染实验室,因此极大地限制了研究的广泛性。徐红云等^[15]对高原地区健康少年鼻咽部需氧

及兼性厌氧菌群分析中,就利用了微生物生态学的实验方法分离培养到7个菌属12种细菌,其中奈瑟氏菌、链球菌及葡萄球菌是健康少年鼻咽部的优势菌群。van den Bergh等^[16]利用纯培养的方法分析了986个鼻咽部样品,鉴定出在小儿上呼吸道感染中起主要作用的4种细菌,分别是肺炎链球菌、流感嗜血菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌。

2.2 不依赖培养的分子生物学方法

鉴于微生物培养法的局限性,近年来,利用不依赖培养的方法研究人体微生物群落多样性的实验越来越普遍。自从Woese^[17]和Pace^[18]提出将分子生物学方法用于微生物多样性的研究,微生物分子生态学得到了长足的发展,其应用于细菌、古生菌和真核微生物的研究革命性地促进了人们对于复杂环境中微生物组成结构和动力学的认识。

2.2.1 基于16S rDNA的分子生物学方法:近年来,基于16S rDNA的分子生物学技术的兴起对依靠培养的技术进行了补充。这些技术能够鉴定和定量小型生物群,而且也可提供分类法来预测种系发育关系。本课题组李晓然等^[19-20]对微生物分子生态学研究方法及其存在的缺陷做过详细的系统介绍,并且综述了微生物分子生态学发展历史及研究现状。克隆文库可以被测序,通常在种或属的水平上鉴定生物群落的组成,指纹图谱技术可以分析微生物群落结构,而斑点杂交技术或荧光原位杂交技术能够测定特殊类群的丰度。如今,利用传统分子生态学方法研究微生物群落多样性的实验已经非常普遍。Lemon等^[21]利用不依赖培养的分子生物学方法,采用16S rDNA微点阵和克隆文库的技术测定了鼻孔和口咽后壁的微生物群落多样性。Kwambana等^[22]通过利用基于16S rDNA的末端限制性长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析的方法,研究了冷藏处理对小儿鼻咽部的微生物群落产生的影响。

随着分子生物学的发展和科学技术的不断进步,从传统的纯培养技术及目前常用的不依赖培养的微生物研究技术变性梯度凝胶电泳(Denaturing

gradient gel electrophoresis, DGGE)和实时荧光定量 PCR (Quantitative real time PCR, qPCR)技术,到第 2 代测序平台的出现,尤其是宏基因组理论的提出,需要更多的研究来探讨鼻咽部微生物群落多样性。自从 Hamady 等^[23]建立了在不同样品 PCR 引物上分别添加序列标签(Barcode)来作为高通量测序后根据序列区分不同样品的标记,高通量测序技术越来越广泛地应用到微生物群落多样性的分析中。Costello 等^[4]在利用基于 16S rDNA 的高通量测序的研究中得到这样的结论,在整个人体微生物的定殖部位中,共检测到了 22 种细菌门,但是大多数的序列都属于以下 4 种细菌门:放线菌门(36.6%)、硬壁菌门(34.3%)、变形菌门(11.9%)以及拟杆菌门(9.5%)。而每个不同的部位都有其独特的优势菌群。综合比较各项第二代测序平台,只有罗氏 454 的焦磷酸测序(Pyrosequencing)平台更加适合应用于微生物群落多样性分析,也得到了广泛的应用。Wos-Oxley 等^[24]利用基于 16S rDNA 的指纹图谱法研究了 40 个人的前鼻孔中微生物群落多样性,然后选择了 6 个具有代表性的样品进一步用焦磷酸测序,估计其微生物多样性。Laufer 等^[25]利用 454 焦磷酸高通量测序的方法研究了患中耳炎和未患中耳炎的小儿鼻拭子的微生物多样性,对于小儿中耳炎的防治具有重要的作用。Bogaert 等^[26]通过对 16S rDNA 的 V5-V6 高变区运用添加 Barcode 的焦磷酸高通量测序分析了 96 个健康儿童鼻咽部的微生物群落在不同季节的多样性。

2.2.2 宏基因组学技术:“宏基因组”最早由 Handelsman 等^[27]提出,主要是指所有微生物基因组的总和,提取环境样品的 DNA,使用限制性内切酶将其打断至合适的大小,构建宏基因组文库,然后利用基因组学的研究策略研究环境样品所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。其文库包括了可培养的和未培养的微生物遗传信息,因此提供了获得新生物活性物质的机会。人类微生物组分析是宏基因组学技术未来一个重要的发展方向,同时也是人类基因组计划(Human genome project)

的延伸。

在短短几年内,宏基因组学研究已渗透到各个领域,包括海洋、土壤、热液口、热泉、人体口腔及胃肠道等,并在医药、替代能源、环境修复、生物技术、农业、生物防御等各方面显示了重要的价值,尤其在水体宏基因组学^[28-31]和土壤宏基因组学^[32-35]中应用非常广泛。黄循柳等^[36]曾系统地综述了宏基因组学技术的研究策略及其最新的研究进展。Nakamura 等^[37-38]通过宏基因组学技术研究了鼻咽部吸出物中的流感病毒,并且综述了宏基因组学分析的可行性。虽然目前利用宏基因组学技术研究人体鼻咽部微生物群落多样性的例子非常缺乏,但是随着宏基因组学技术的快速发展,它在这一领域的研究将会越来越广泛。总的来说,宏基因组学技术为微生物多样性研究提供了巨大的平台。

近年来,我们越来越倾向于利用不依赖于培养的方法研究人体某部位的微生物群落多样性。尤其是有许多关于人体皮肤微生物群落多样性的报道^[39-42],这些报道使我们对人体皮肤微生物的多样性有了比较全面的认识。但是,对于人体鼻咽部的微生物群落结构的认识比较欠缺,关于这方面的研究相对来说还比较缺乏。

3 鼻咽部的微生物群落及其相互关系

3.1 鼻咽部微生物群落的组成

鼻子和喉咙是病原菌定殖的主要部位,而这些病原菌的定殖很容易引起感染。鼻咽部存在有链球菌与流感嗜血菌,这两种菌数量大,而且正常人都可检查出来,链球菌仍以甲型溶血与非溶血性菌种为主,其次肺炎双球菌也占很高比重,再次是奈氏菌属,这四类细菌几乎占全部活菌数的 90%以上^[10]。寄生在人体鼻咽部的微生物可以分为三大类,分别是常住菌、过路菌以及介于二者之间的微生物。上述定殖在鼻咽部的微生物在正常情况下不具有致病性。

鼻咽部寄生的微生物群落像肺炎链球菌,流感嗜血菌,黏膜炎莫拉菌,金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*)是小儿时期导致上呼吸道感染疾病的主要源头,这些微生物群落也是健康小孩鼻咽部常见的过路菌。除此之外,鼻咽部的多种微生物群落在与宿主相互作用的同时始终保持着动态平衡^[43]。大多数的儿童童年早期肺炎链球菌在鼻咽部至少会定殖一次,而这种情况在成人时期很少发生^[44]。对于金黄色葡萄球菌来说,一般10%–35%的儿童^[45-47]和大约35%的成人^[48]都会有这种病原菌的定殖。肺炎链球菌是一种定殖在健康人群鼻咽部的条件致病菌。它可引起肺炎、中耳炎、败血症、脑膜炎等疾病,在世界上有很高的发病率和死亡率,尤其是儿童和老人。尽管链球菌是人体鼻咽部^[49]和皮肤表面^[40-41]的优势菌群,但是存在于前鼻孔的链球菌丰度比较低。人体前鼻孔是金黄色葡萄球菌定殖的主要部位,这里的金黄色葡萄球菌构成了鼻咽部微生物群落的一部分^[21]。大约20%的人,体内都有金黄色葡萄球菌定殖^[50]。虽然正常情况下,前鼻孔中携带的金黄色葡萄球菌是没有致病性的,但是其携带的致病菌仍是引起侵入性感染的主要原因^[51]。研究发现,有棒杆菌属的某些种定殖的个体,由于金黄色葡萄球菌引起的疾病发病率会降低^[52]。Wos-Oxley等^[21]的研究结果表明肉杆菌科中的懒惰狡诈球菌(*Dolosigranulum pigrum*)具有较高的丰度,懒惰狡诈球菌能够引起人的上呼吸道疾病,表明懒惰狡诈球菌是组成鼻中优势群落的一部分,除此之外,这个研究第一次描述了棒状杆菌在前鼻孔微生物群落中的分布情况。尽管前鼻孔微生物群落中的许多细菌种群已经被分离出来,一部分未被培养的放线菌目也具有相当高的丰度^[42,53]。

3.2 鼻咽部微生物之间的相互作用

在健康小孩上呼吸道中有大量的致病性病原菌和呼吸道病毒定殖,在健康个体中病原菌之间的关系仍然是一个有待于继续研究的领域。利用常规的微生物培养法鉴定出了肺炎链球菌属、流感嗜血杆菌属、卡他莫拉菌属和金黄色葡萄球菌属,流感嗜血菌属的存在有利于肺炎链球菌的定殖,而金黄

色葡萄球菌属的存在对肺炎链球菌的定殖具有消极影响^[16]。在2004年,Regev-Yochay等^[54]和Bogaert等^[55]通过研究分别证实了健康儿童鼻咽部的金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌的定殖量呈负相关关系,表明这两种菌种之间存在竞争关系。多篇研究报道证实,鼻咽部的固有细菌群落能够抑制像金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和流感嗜血杆菌等病原菌的定殖,也就是所谓的细菌干扰现象^[53,56-57]。

Brogden等^[10]和Klugman等^[58]研究证实,人类所患的上呼吸道感染等疾病(中耳炎和肺炎等)是多种微生物共同作用导致的,其中有的存在协同作用,有的存在拮抗作用。van den Bergh等^[16]也经研究证明,肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和黏膜炎莫拉菌之间都存在共生关系,而与金黄色葡萄球菌之间却存在拮抗作用。Ren等^[59]也得到了相似的结论,即没有致病性的缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)与金黄色葡萄球菌之间,以及唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)与酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)之间均不存在共存共生关系,而金黄色葡萄球菌的亚种之间能够共生,表明这些菌种倾向于在相似的环境中生存。总的来说,肺炎链球菌、流感嗜血菌和黏膜炎莫拉菌的定殖都会引起某些呼吸道疾病。肺炎链球菌与金黄色葡萄球菌之间存在拮抗作用很难共生^[16,55,60]。肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌之所以存在拮抗作用可能是因为肺炎链球菌分泌的抗菌素抑制了金黄色葡萄球菌的生长^[61]。Regev-Yochay等^[54]通过研究也证实,在儿童体内肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌的生长趋势呈负相关关系,尤其是疫苗型菌株来说更为明显。有利于肺炎链球菌定殖的因素,对金黄色葡萄球菌具有抑制作用。同时,与肺炎链球菌有关的疫苗能够降低肺炎链球菌在鼻咽部的定殖。而由于金黄色葡萄球菌与肺炎链球菌之间存在的拮抗作用,使得肺炎链球菌疫苗的使用会增加金黄色葡萄球菌定殖数量及相关疾病的发生。

3.3 鼻咽部微生物与宿主之间的相互作用

正常生理状态下,鼻咽部的微生物群落与宿主之间保持着动态平衡。一方面,鼻咽部的物理化学环境为各种微生物提供了生长繁殖条件;另一方面,鼻咽部各种微生物群落之间存在着多种相互作用,包括营养竞争、协同作用、拮抗作用等,这些相互作用使鼻咽部各种微生物能够在正常生理状态下保持着动态平衡,而对宿主没有致病作用。

细菌定殖是指细菌在消化道、上呼吸道、泌尿生殖道等部位黏膜表面持续存在而未出现宿主反应和不利作用,显微镜下见微生物黏附于细胞或在滞留的黏液分泌物中生长。定殖可以是细菌和宿主之间建立长期持续的共生关系或是无害关系的一步,也可转化为感染和疾病的第一步^[62]。致病菌的定殖是导致宿主患疾病的生理基础。定殖发生的条件细菌必须具有黏附力、适宜的环境和有相当的数量。当定殖菌致病力强、数量多及机体防御机能不良时,会进一步发生定殖菌的感染^[63]。定殖不是感染,但却是感染的重要来源和最危险的因素。

肺炎链球菌是一种常见的革兰氏阳性致病菌,同时也是定殖在鼻咽部的主要条件致病菌。所有的肺炎链球菌都能黏附在人口腔上皮细胞或鼻咽部。Swiatho等^[64]提出,肺炎链球菌的定殖依赖于其对呼吸道上皮的黏附,而无症状的定殖主要是肺炎链球菌与细胞表面的糖类(N-乙酰氨基葡萄糖)结合,这种结合被肺炎链球菌表面黏附素A(Pneumococcal surface adhesin A, PasA)等细胞壁相关表面蛋白所调节。肺炎链球菌表面蛋白和人鼻咽部上皮细胞表面受体结合而黏附和定殖于上呼吸道。肺炎链球菌对宿主细胞的黏附是其定殖的生物基础,主要依赖于细菌表面蛋白质与真核细胞表面糖基的结合^[65]。

在中耳炎等疾病中肺炎链球菌等致病菌一般都聚集于鼻咽部,宿主对这些致病菌具有一定程度的免疫防御作用,一旦细菌毒力超过了机体防御能力,则发生细菌定殖与感染。有研究表明,呼吸道、中耳道和咽鼓管上皮细胞可以分泌抗菌成分,如溶

菌酶、乳铁传递蛋白, β -防御素等免疫分子,这些免疫分子对鼻咽部的致病菌具有抑制作用。例如, Lee等^[66]的研究结果显示,在放射性测定中溶菌酶对两种血清型肺炎链球菌有明显的抑制作用。初步证实了宿主细胞分泌的抗菌肽等固有免疫分子构成了黏膜表面的第一道防线。

除了鼻咽部菌群之间以及鼻咽部菌群与宿主之间的相互作用会引起菌群的变化,一些全身性疾病(如艾滋病、放化疗病人等)也会引起鼻咽部菌群的变化。人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)感染导致的获得性免疫缺陷综合征(Acquired immune-deficiency syndrome, AIDS),它使人体免疫功能产生缺陷,丧失对微生物的抵御能力,是一种致死性疾病。AIDS及HIV感染可在鼻咽部出现各种临床症状、体征、微生物及病理学改变。李瑞玉等^[67]通过对89例HIV阳性青年人咽部临床观察发现HIV阳性患者均存在不同程度的咽部症状,如咽痛、咽部干燥等,据分析,产生这些症状的主要原因为细菌、真菌、病毒等引起。其咽部细菌培养物为溶血性链球菌、肺炎链球菌、葡萄球菌等。刘坤等^[68]通过研究鼻咽癌放疗前后的咽部菌群变化,发现与放疗前相比,放疗后照射区域的链球菌属、葡萄球菌属、白色念珠菌和绿脓杆菌检出增加,而放线菌属和奈瑟菌属检出减少。由此可知,鼻咽癌放疗可影响咽部的微生态平衡,能够导致局部微生物菌群种类和数量的变化,是导致鼻咽癌放疗后患者发生感染的重要原因之一。

上呼吸道是引起感染的通道,研究鼻咽等部位的微生物群落结构能够进一步加深我们对引起上呼吸道感染的致病菌的认识。定殖在鼻咽部的正常微生物群落,也是防止致病菌过度发育和引起上呼吸道感染的第二道屏障。大多数关于鼻和喉咙部位微生物群落的研究都集中在一种或几种致病菌的传播上。鼻子、鼻孔和前鼻孔的最外部是皮肤到鼻腔的过度区。鼻孔有助于过滤吸入的空气,这些空气中也含有许多微生物^[69-70]。通常情况下,在进行

宏基因组分析(微生物群落多样性分析)之前通常要冷冻保藏,然而冷藏的过程会对微生物群落的组成产生负面影响。Kwambana 等^[22]通过研究冷藏处理对小儿鼻咽部微生物群落产生的影响,证实了冷冻贮藏对于微生物群落的组成和相对丰度的影响是不容忽视的。鼻孔中常见的微生物大都属于棒杆菌属、丙酸杆菌属、葡萄球菌属,其中包括致病菌金黄色葡萄球菌^[71]。临近鼻腔处的优势菌群是棒杆菌科和链球菌科的某些种^[72]。许多环境、基因以及社会经济因素都会影响某一菌种在人体鼻咽部的定殖。鼻咽部中微生物之间的关系是非常复杂的,通常情况下小儿体中会定殖至少一种血清型肺炎链球菌,同时还有其他致病菌,例如:流感嗜血杆菌和黏膜炎莫拉菌,还存在一些正常菌群。

4 前景与展望

鼻咽部的微生物群落作为人体微生态系统的一个重要组成部分,在维持上呼吸道健康状态中发挥重要作用,当它与机体的平衡关系被打破时,可导致多种上呼吸道感染疾病的产生。目前对鼻咽部微生物群落的研究并不十分深入,虽然已经有一些新技术新方法开始应用于鼻咽部微生物群落结构的研究,但仍有待于进一步改进。相信随着科学技术的进步,将会有更多更好的技术方法应用于鼻咽部微生物群落的研究,从而使人们对鼻咽部微生物群落的认识更加深入;而且,研究鼻咽部的微生物群落结构对于预防及治疗上呼吸道感染具有积极作用。

近些年来,鉴于治疗上呼吸道感染药物的副作用,微生态制剂应运而生。微生态制剂一般是指用人正常微生物群落的成分或其促进成分制成的制剂。通过直接调节该部位的微生态平衡治愈疾病,可以替代或部分替代传统的抗生素疗法,为更方便且无副作用地防治疾病的发生提供了广阔的发展空间。

参考文献

- [1] 张惠文, 张倩茹, 周启星. 分子微生物生态学及其研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, 12(2): 286-292.

- [2] Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(4): 279-290.
- [3] Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease[J]. Nature, 2007, 449(7164): 811-818.
- [4] Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time[J]. Science, 2009, 326(5960): 1694-1697.
- [5] Salonen A, Nikkila J, Jalanka-Tuovinen J, et al. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(2): 127-134.
- [6] Biesbroek G, Sanders EAM, Roeselers G, et al. Deep sequencing analyses of low density microbial communities: working at the boundary of accurate microbiota detection[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32942.
- [7] Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 206-206.
- [8] 陈世钰. 口腔鼻咽部正常菌群与健康[J]. 湖北民族学院学报, 2007, 24(2): 72.
- [9] Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota?[J]. Nature Review Microbiology, 2009, 7(12): 887-894.
- [10] Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE. Human polymicrobial infections[J]. The Lancet, 2005, 365(9455): 253-255.
- [11] Wardlaw T, Salama P, Johansson EW, et al. Pneumonia: the leading killer of children[J]. Lancet, 2006, 368(9541): 1048-1050.
- [12] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates[J]. The Lancet, 2009, 374(9693): 893-902.
- [13] Murphy TF, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 49(1): 124-131.
- [14] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [15] 徐红云, 太照英, 龚学华, 等. 高原地区健康少年鼻咽部需氧及兼性厌氧菌群分析[J]. 中国微生态学杂志, 1996, 8: 33-34.
- [16] van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JWA, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47711.
- [17] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(2): 221-271.
- [18] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734-740.

- [19] 李晓然, 曾丹宁, 栾建军. 微生物分子生态学研究方法及其存在的缺陷[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 228-232.
- [20] 李晓然, 吕毅, 宫路路, 等. 微生物分子生态学发展历史及研究现状[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4): 366-369.
- [21] Lemon K. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx[J]. mBio, 2010, 1(3): e00129-00110.
- [22] Kwambana BA, Mohammed NI, Jeffries D, et al. Differential effects of frozen storage on the molecular detection of bacterial taxa that inhabit the nasopharynx[J]. BMC Clinical Pathology, 2011, 11: 2.
- [23] Hamady M, Walker JJ, Harris JK, et al. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex[J]. Nature Methods, 2008, 5(3): 235-237.
- [24] Wos-Oxley ML, Plumeier I, von Eiff C, et al. A poke into the diversity and associations within human anterior nares microbial communities[J]. The ISME Journal, 2010, 4(7): 839-851.
- [25] Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, et al. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children[J]. mBio, 2011, 2(1): e00245.
- [26] Bogaert D, Keijsers B, Huse S, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17035.
- [27] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249.
- [28] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science, 2004, 304(5667): 66-74.
- [29] Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, et al. Comparative metagenomics of microbial communities[J]. Science, 2005, 308(5721): 554-557.
- [30] Martin-Cuadrado AB, Lopez-Garcia P, Alba JC, et al. Metagenomics of the deep mediterranean, a warm bathypelagic habitat[J]. PLoS One, 2007, 2(9): e914.
- [31] Sabet S, Chu WP, Jiang SC. Isolation and genetic analysis of haloalkaliphilic bacteriophages in a North American soda lake[J]. Microbial Ecology, 2006, 51(4): 543-554.
- [32] Fierer N, Breitbart M, Nulton J, et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 7059-7066.
- [33] Treusch AH, Kletzin A, Raddatz G, et al. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(9): 970-980.
- [34] Kim KH, Chang HW, Nam YD, et al. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 5975-5985.
- [35] Biver S, Steels S, Portetelle D, et al. *Bacillus subtilis* as a tool for screening soil metagenomic libraries for antimicrobial activities[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(6): 850-855.
- [36] 黄循柳, 黄仕杰, 郭丽琼, 等. 宏基因组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1058-1066.
- [37] Nakamura S, Yang CS, Sakon N, et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing Approach[J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4219.
- [38] Nakamura S, Nakaya T, Iida T. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing[J]. Experimental Biology and Medicine, 2011, 236(8): 968-971.
- [39] Dekio I, Hayashi H, Sakamoto M, et al. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling[J]. Journal of Medical Microbiology, 2005, 54(12): 1231-1238.
- [40] Gao Z, Tseng Ch, Pei Z, et al. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(8): 2927-2932.
- [41] Fierer N, Hamady M, Lauber CL, et al. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(46): 17994-17999.
- [42] Grice EA, Kong HH, Renaud G, et al. A diversity profile of the human skin microbiota[J]. Genome Research, 2008, 18(7): 1043-1050.
- [43] Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease[J]. Lancet Infectious Diseases, 2004, 4(3): 144-154.
- [44] Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings[J]. Clinical Infectious Diseases, 2004, 38(5): 632-639.
- [45] Nakamura MM, Rohling KL, Shashaty M, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population[J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2002, 21(10): 917-921.
- [46] Shopsin B, Mathema B, Martinez J, et al. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community[J]. Journal of Infectious Diseases, 2000, 182(1): 359-362.
- [47] Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, et al. Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12): 5718-5725.
- [48] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1997, 10(3): 505-520.
- [49] Pettigrew MM, Gent JF, Revai K, et al. Microbial interactions during upper respiratory tract infections[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(10): 1584-1591.
- [50] Williams RE. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*:

- its prevalence and importance[J]. Bacteriological Reviews, 1963, 27: 56-71.
- [51] von Eiff C, Becker K, Machka K, et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. New England Journal of Medicine, 2001, 344(1): 11-16.
- [52] Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp.[J]. Journal of Hospital Infection, 2000, 44(2): 127-133.
- [53] Brook I. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis[J]. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2005, 133(1): 139-146.
- [54] Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, et al. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children[J]. Jama-Journal of the American Medical Association, 2004, 292(6): 716-720.
- [55] Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children[J]. The Lancet, 2004, 363(9424): 1871-1872.
- [56] Brook I. Bacterial interference[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1999, 25(3): 155-172.
- [57] Benninger M, Brook I, Bernstein JM, et al. Bacterial interference in upper respiratory tract infections: A systematic review[J]. American Journal of Rhinology & Allergy, 2011, 25(2): 82-88.
- [58] Klugman KP, Madhi SA. Pneumococcal vaccines and flu preparedness[J]. Science, 2007, 316(5821): 49-50.
- [59] Ren T, Glatt DU, Nguyen TN, et al. 16S rRNA survey revealed complex bacterial communities and evidence of bacterial interference on human adenoids[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(2): 535-547.
- [60] van Gils EJM, Hak E, Veenhoven RH, et al. Effect of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Staphylococcus aureus* colonisation in a randomised controlled trial[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20229.
- [61] Selva L, Viana D, Regev-Yochay G, et al. Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(4): 1234-1238.
- [62] 吴文娟, 张友祥, 卢洪洲. 真菌定殖与感染的认识[J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(5): 481-483.
- [63] 徐焱, 王丹华, 徐英春. 新生儿重症监护病房中部分定殖细菌定殖特点及变化规律[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(3): 209-212.
- [64] Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, et al. Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Infection and Immunity, 2002, 70: 412-415.
- [65] 孟江萍, 尹一兵. 肺炎链球菌致病机理的最新研究进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 39-41.
- [66] Lee HY, Andalibi A, Webster P, et al. Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*[J]. BMC Infectious Diseases, 2004, 4(12): 1-12.
- [67] 李瑞玉, 林吉生, 江淑萍. 89例 HIV 阳性青年人咽部临床观察[J]. 耳鼻咽喉-头颈外科, 2001, 8(2): 119-120.
- [68] 刘坤, 王冀川, 王捷, 等. 鼻咽癌放疗后咽部菌群的变化[J]. 肿瘤预防与治疗, 2008, 21(4): 415-417.
- [69] Brodie EL, DeSantis TZ, Parker JPM, et al. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(1): 299-304.
- [70] Fierer N, Liu Z, Rodriguez-Hernandez M, et al. Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(1): 200-207.
- [71] Tuomanen E. Microbial inhabitants of humans-Their ecology and role in health and disease[J]. Science, 2005, 308(5722): 635-635.
- [72] Rasmussen TT, Kirkeby LP, Poulsen K, et al. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity[J]. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2000, 108(10): 663-675.