

论著·基础研究

吸入汽车尾气对小鼠肺部菌群的影响

石 鑫, 陈 倩, 李婷华, 张 彦, 董 珂

上海交通大学 医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025

[摘要] **目的**·观察小鼠在吸入汽车尾气后其肺组织和肺部菌群的变化, 评估汽车尾气造成的空气污染对处于高浓度微环境暴露的人群呼吸系统可能产生的影响。**方法**·将 10 只 C57BL/6 小鼠随机分为实验组和对照组, 实验组连续 5 d (1 h/d) 暴露于汽车尾气环境, 对照组不处理。取小鼠右下肺叶组织, 通过 16S rRNA 测序技术分析肺部菌群组成, 并对肺组织进行病理切片镜检。**结果**·实验组与对照组的肺组织病理变化无明显差异, 但 2 组的菌群组成和丰度存在明显差异。在门水平, 实验组相比对照组厚壁菌门显著增加, 拟杆菌门和变形菌门显著减少; 在属水平, 厚壁菌门的增加主要与粪球菌属的增加有关, 拟杆菌门的减少与噬纤维菌属的减少有关, 变形菌门的减少与苍白杆菌属、甲基杆菌属和不动杆菌属的减少有关, *Amycolatopsis* 属也显著减少。**结论**·短期暴露在汽车尾气环境中, 会改变小鼠肺部菌群的物种组成和丰度, 但未观察到肺组织病变。

[关键词] 肺部菌群; 可吸入颗粒物; 汽车尾气; 16S rRNA

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.02.006 **[中图分类号]** R378 **[文献标志码]** A

Effects of inhaling vehicle exhaust on lung microbiome in mice

SHI Xin, CHEN Qian, LI Ting-hua, ZHANG Yan, DONG Ke

Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To observe the changes of lung tissue and lung microbiome in mice after inhalation of vehicle exhaust, and to assess the impact of air pollution caused by vehicle exhaust on the respiratory system of the population. **Methods**·Ten C57BL/6 mice were divided into experimental group and control group randomly. Experimental group was inflicted with continuous exposure to automobile exhaust for 5 d (1 h/d), while the control group was exposed to clean air. After a 5-day of environmental exposure, the lung microbial composition was analyzed by 16S rRNA pyrosequencing and the structure of the lung tissue was assessed by histological analysis. **Results**·There was no significant difference in pathological changes of lung tissue between the experimental group and the control group. However, there were significant differences in the composition and abundance of bacteria in the experimental and control groups. At the phylum level, comparing with the control group the Firmicutes was significantly increased in the experimental group, while the Bacteroidetes and Proteobacteria were significantly reduced. At the genus level, the increase of the Firmicutes was mainly related to the increase of the *Coprococcus*. The reduction of the Bacteroidetes was related to the reduction of *Cytophaga* while the reduction of the Proteobacteria was related to three main strains namely *Ochrobactrum*, *Methylobacterium* and *Acinetobacter*. *Amycolatopsis* was also reduced significantly. **Conclusion**·Short-term exposure to vehicle exhaust conditions changes the species composition and abundance of lung microbiome in mice, but no lung tissue lesions were observed.

[Key words] lung microbiome; particulate matter; vehicle exhaust; 16S rRNA

空气污染对人群健康造成的影响被广泛关注。随着社会经济的不断发展和工业化进程的不断加快, 汽车的使用量日渐增大。发动机尾气排放成为空气污染的主要来源之一^[1-2]。已有相关的研究^[3-4]表明, 与汽车尾气相关的空气污染 (traffic-related air pollution, TRAP) 与儿童的慢性呼吸道疾病有关。流行病学调查和实验数据证实: 短时间或者长时间暴露在空气污染的环境中, 有造成呼吸道疾病、心血管疾病、肺癌等疾病发病率和病死率升高的风险^[5]。菌群对维持机体的健康状态起着重要的作用, 菌群失调会

严重影响机体健康。在很长的一段时间里, 研究人员一直认为肺部是无菌的。随着 16S rRNA 测序技术等检测技术的发展, Hilty 等^[6]首次通过基因测序技术发现肺部并非无菌, 而是有菌群存在的。肺部菌群组成的变化不仅与呼吸道疾病的产生有关, 甚至会增加疾病的发作风险^[7-8]。一些关于人群呼吸道疾病的研究发现, 这些患者的肺部菌群的种群丰富度和物种多样性都发生了明显变化。但是, 对于肺部菌群在吸入汽车尾气后发生的变化及菌群变化与相关疾病之间的关系, 研究还比较少。上海作为国际化大都

[基金项目] 上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目——传染病与卫生微生物学 (15GWZK0102); 上海交通大学 2016 年晨星计划 (Shanghai Three-Year Plan of Key Subjects Construction in Public Health——Infectious Diseases and Pathogenic Microorganism, 15GWZK0102; Shanghai Jiao Tong University SMC Young Research Award, 2016)。

[作者简介] 石 鑫 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: xs_shixin@163.com。

[通信作者] 董 珂, 电子信箱: kiwidong@126.com。



市,城市机动车数量日益更多,TRAP也日渐严重。为了从人体健康的角度比较各种污染排放的危害,有学者提出污染物吸入因子(intake fraction, IF)的概念,将其定义为由污染源排放的物质最终被人体吸收或消化的量占总排放量的比例。在微观尺度下,即不同的微环境区域中,人群的污染物暴露浓度差异较大^[9]。本实验研究小鼠在吸入汽车尾气后其肺组织和肺部菌群结构的变化,以此评估因汽车尾气造成的空气污染对处于高浓度微环境暴露的人群呼吸系统可能产生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性 C57BL/6 小鼠 10 只,8~10 周龄,购自上海交通大学医学院实验动物科学部。动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0018,动物使用许可证号为 SYXK(沪)2013-0050。对小鼠的处理和处死过程均符合动物福利和伦理原则。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 将 10 只小鼠随机分为 2 组,每组 5 只;实验组记为 T 组,未处理的对照组记为 L 组。将实验组小鼠放入汽车尾气吸入装置,在汽车怠速状态下,让排气管正对着鼠笼吹气 1 h,连续 5 d。

1.2.2 肺组织采集 将对照组和实验组小鼠颈椎脱臼处死并取材。解剖小鼠,取部分右下肺叶组织置 4% 多聚甲醛溶液固定,余下肺组织用液氮冻存。

1.2.3 DNA 抽提及测序 用磁珠将肺组织置于上海净信 JXFSTRP-15 组织匀浆仪内匀浆,65 Hz、100 s,重复 3 次。取 2 mL 组织匀浆液,采用 DNA 抽提试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit)进行抽提,产物置于 -80 °C 保存。将目标片段进行 PCR 扩增,上游引物(338 bp)序列是 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3',下游引物(806 bp)序列是 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'(W=A 或 T, V=A、C 或 G)。将扩增产物回收、纯化并进行荧光定量。制备测序文库后进行高通量测序分析。

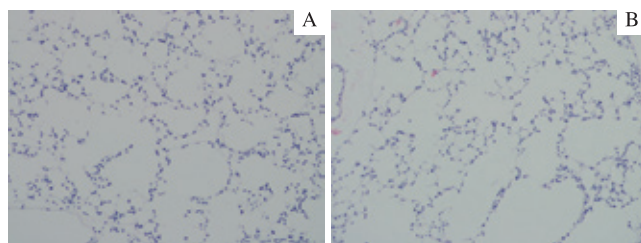
1.2.4 病理切片制备及染色 石蜡包埋后的肺组织在切片机上切片,每片厚度 5 μm,对切片进行苏木精-伊红(H-E)染色,并封片。

2 结果

2.1 肺组织形态学观察

实验组和对照组小鼠的肺组织形态学没有明显差异,

短期的汽车尾气吸入后,未能观察到实验小鼠的肺部病理变化(图 1)。



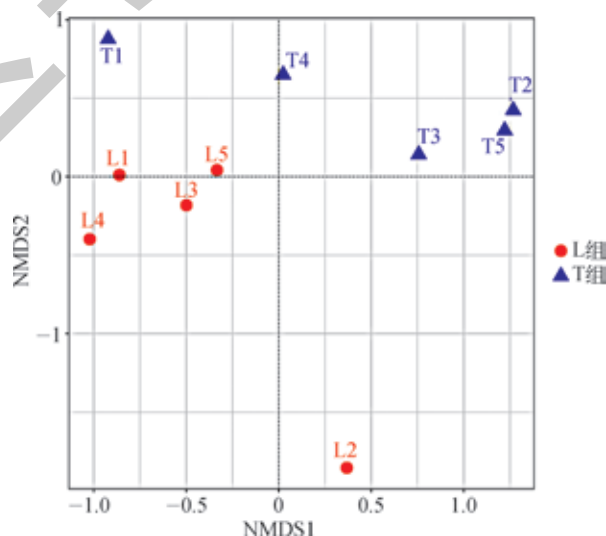
注: A. L 组; B. T 组。

图 1 吸入汽车尾气 1 周后小鼠肺组织形态学变化 ×200

Fig 1 Morphological changes of lung tissue in mice after inhaling vehicle exhaust for 1 week ×200

2.2 肺部菌群多样性变化

通过 Illumina MiSeq 平台对全部样本进行 16S rRNA 测序,共计得到 592 933 个原始序列,剔除低质量序列后,共有 435 731 个序列用于后续的分析。将这些序列以 97% 的相似度作为可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)划分阈值,将序列归并为 4 871 个 OTU,其中 2 296 个 OTU 为实验组和对照组共有。通过 β 多样性分析研究不同样本之间群落结构的差异。从图 2 中可以看出,T2、T3、T5 这 3 个样本之间的微生物群落结构相似度相对较高;而样本 L2 与其他各样本微生物群落结构相似度最低。Weighted UniFrac 距离的 Adonis/PERMANOVA 多元方差分析和置换检验的结果显示组间差异具有统计学意义($F=3.3917$, $P=0.031$),即实验组与对照组的菌群组成之间存在显著差异。



注: 每个点代表一个样本,不同颜色的点属于不同样本组;两点之间的距离越近,表明 2 个样本之间的微生物群落结构相似度越高,差异越小。在对照组中,L2 样本与其他样本之间的群落结构差异较大;在实验组中,T2、T3、T5 的群落结构较为接近,而与 T1、T4 的群落结构存在差异。

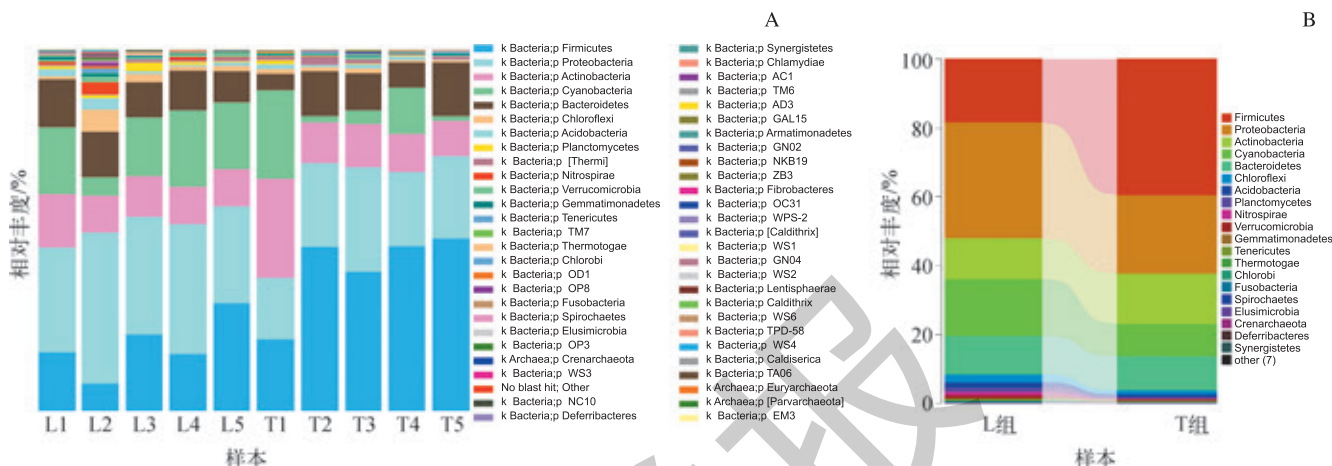
图 2 Weighted UniFrac NMDS 分析的样本二维排序图

Fig 2 Two-dimensional sorted graph of samples analyzed by Weighted UniFrac NMDS

2.3 肺部菌群组成分析

为了研究吸入汽车尾气对小鼠肺部菌群的影响,对10个样本进行了菌群物种组成成分分析。在图3中展示了门级别

的物种组成及其丰度分布情况。从图3B中可以看出,在门水平,相比实验组,对照组的厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度明显增高,而拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度明显降低。



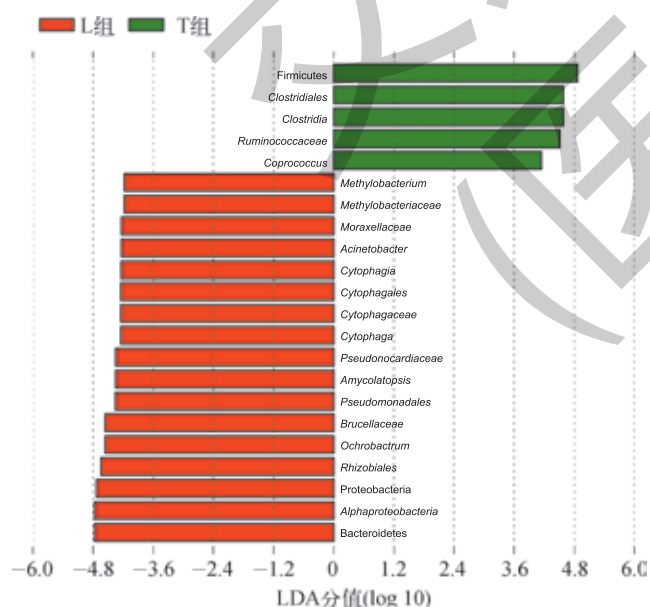
注: A. 门级别的物种组成(横坐标依据样本名排列,每个柱形图代表一个样本,并以颜色区分各分类单元;纵坐标代表各分类单元的相对丰度,柱子越长,该分类单元在对应样本中的相对丰度越高);B. 门级别的物种丰度分布(横坐标依据组别排列,每个柱形图代表一个样本组,并以颜色区分各分类单元;纵坐标代表各分类单元的相对丰度,柱子越长,该分类单元在对应样本中的相对丰度越高)。

图3 菌群物种组成及其丰度分布情况

Fig 3 Species composition and abundance distribution

通过 LEfSe (linear discriminant analysis effect size) 分析进一步发现:在门水平,实验组相比对照组厚壁菌门显著增加,拟杆菌门和变形菌门显著减少;在属水平,厚壁菌的增加主要与粪球菌属的增加有关,拟杆菌门的减少与噬纤维菌属的减少有关,变形菌门(Proteobacteria)的减

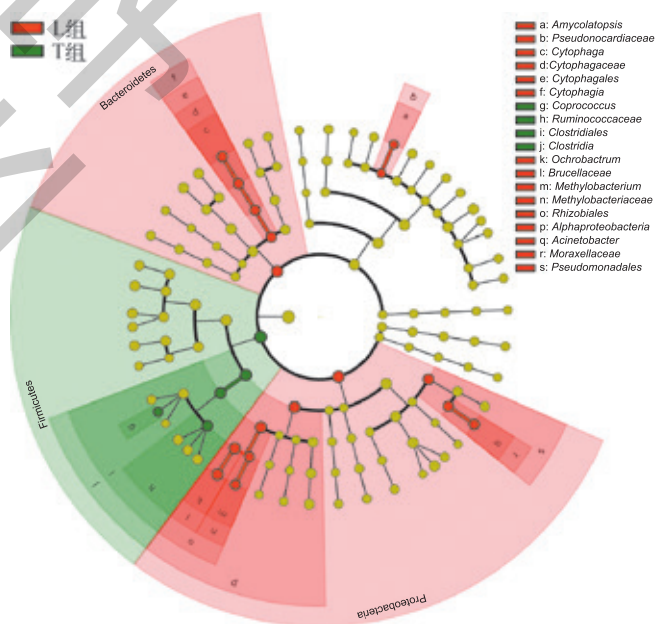
少与苍白杆菌属、甲基杆菌属和不动杆菌属等3个菌属的减少有关,此外 *Amycolatopsis* 属也显著减少(图4)。将具有组间差异的分类单元基于分类等级树绘制成图5,从图中可以看出具有差异的分类单元之间的种属关系。



注:纵坐标为组间具有显著差异的分类单元;横坐标是对应分类单元的线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)差异分析对数得分值,并按照得分值大小进行排序,长度越长表明该分类单元的差异越显著。

图4 组间具有显著差异的分类单元

Fig 4 Taxon between taxonomic groups with significant difference



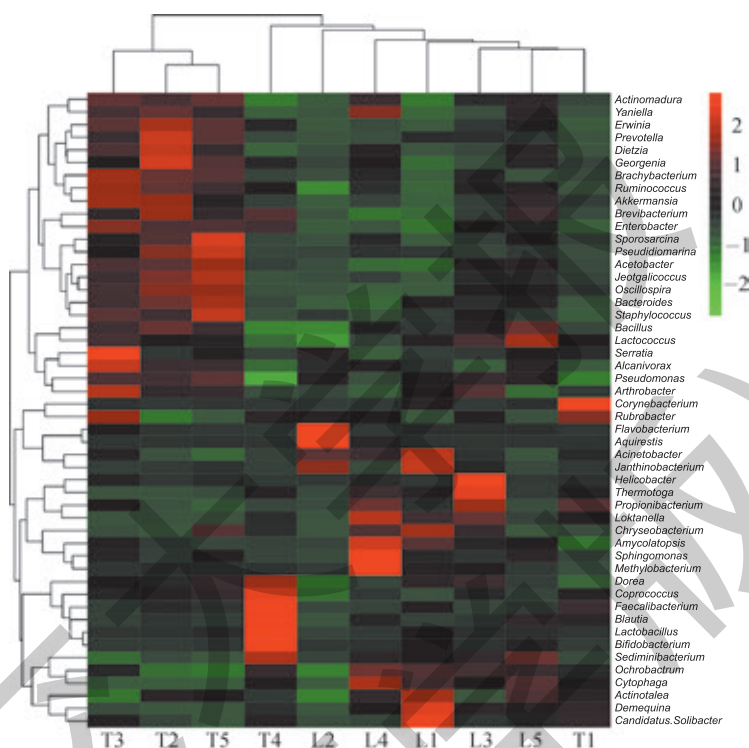
注:分类等级树展示了样本群落中从门到属(由内圈到外圈)所有分类单元的等级关系,节点大小对应于该分类单元的平均相对丰度;黄色节点代表未体现出明显组间差异的分类单元,而绿色和红色则表明这些分类单元体现出显著的组间差异,且在该色所代表分组样本中丰度较高。

图5 基于分类等级树的组间差异分类单元展示图

Fig 5 Grouping of taxonomic units based on classification level tree

将 10 个样本中丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图 (图 6)。热图结果显示: 样品的聚类上聚为两大簇, T3、T2、T5 是一簇, 其他几个样品聚为另一簇; 丰度前 50 的属隶属于 16 个纲。实验组 T3、T2、T5, 各样本中丰度最高的属分别是沙雷菌属、乔治菌属和芽孢八叠球菌属。T4 样本中丰度最高的属是双歧杆菌属和乳酸杆菌属。L2 样本中丰度最高的属是黄杆菌属和 *Aquirestis* 菌属。L4 样

本中丰度最高的属是甲基杆菌属。L1 样本中丰度最高的属是 *Candidatus*、*Solibacter* 菌属。L3 样本中丰度最高的属是螺杆菌属。L5 样本中丰度最高的属是乳球菌属, 但该样本丰度最高的属的丰度值高于其他几个样本中丰度最高的属。T1 样本中丰度最高的属是棒杆菌属。整体而言, 丰度较高的菌群主要有放线菌纲, 芽孢杆菌纲, 黄杆菌纲和 α 、 γ 、 ε - 变形杆菌纲。



注: 样本先按照彼此之间组成的相似度进行聚类, 根据聚类结果横向依次排列。同样, 分类单元也按照彼此在不同样本中分布的相似度进行聚类, 根据聚类结果纵向依次排列。红色代表在对应样本中丰度较高的属, 绿色代表丰度较低的属。

图 6 结合聚类分析的属水平群落组成热图

Fig 6 Heat map combining cluster analysis of level with community composition

3 讨论

近年来, 关于肺部菌群和呼吸道相关疾病的关系逐渐为人们所重视。有多项研究^[10-11]结果表明, 罹患肺部疾病的人群其肺部菌群组成与正常的健康对照者相比有显著差异。越来越多的研究^[11-12]发现, 肺部菌群的变化与一些呼吸系统疾病, 如哮喘、肺纤维化等相关。TRAF 是造成慢性呼吸道疾病的重要环境因素之一。有研究^[4]发现, TRAF 使哮喘和慢性阻塞性肺病的发生率上升。对慢性呼吸道疾病患者肺部菌群的研究^[13-15]发现, 这些患者的肺部菌群的种群丰富度和物种多样性都发生了明显变化。已经有研究^[7, 13-14]证实, 吸入污染的空气会使肺部菌群组成发生变化。一项对于大鼠在发动机尾气和生物质燃料环境中暴露 4 周后肺部菌群和免疫稳态的研究^[16]发现, 实验组大鼠肺部菌

群丰富度和多样性明显高于对照组, 在科水平, 梭菌科、生丝单胞菌科、动球菌科、生丝微菌科、韦荣球菌科和 *Brocadiaceae* 明显增多, 但气球菌科、假单胞菌科、丛毛单胞菌科、草酸杆菌科和柄杆菌科所占比例降低。另外一项对于大鼠在发动机尾气和生物质燃料环境中暴露 7 个月大鼠肺功能的研究^[2]发现, 大鼠的肺功能减退, 肺气肿以及小气道出现重塑。

Poroyko 等^[17]研究发现, 通过构建脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 引发的肺部急性损伤 (acute lung injury, ALI) 的小鼠模型, 以小鼠肺支气管灌洗液为样本, 抽提 DNA 后使用 16S rRNA 测序并分析小鼠的肺部菌群变化, 主坐标分析和相似性分析都表明小鼠的肺部菌群组成发生了变化。但是, 以小鼠为模型的吸入汽车尾气对肺组织和肺部菌群影响的相关研究还比较少。我们针对小鼠吸入

汽车尾气后肺组织的形态学变化以及肺部菌群的变化设计了本实验,探究了吸入汽车尾气对小鼠肺部健康状况的影响。本研究发现,在吸入1周汽车尾气后,小鼠的肺部菌群发生了变化。在门水平,实验组相比对照组厚壁菌门显著增加,拟杆菌门和变形菌门显著减少,革兰阳性(gram-positive, G^+)细菌所占比例增高,革兰阴性(gram-negative, G^-)细菌所占比例降低;在科水平,瘤胃菌科的比例增高,甲基杆菌科、布鲁菌科、莫拉菌科和假诺卡菌科的比例降低;在属水平,厚壁菌的增加主要与粪球菌属的增加有关,拟杆菌的减少与噬纤维菌属的减少有关,变形菌门的减少与苍白杆菌属、甲基杆菌属和不动杆菌属3个菌属的减少有关,此外拟无枝酸菌属也显著减少。本实验中,没有观察到肺组织形态学的变化。有研究^[18]指出,高水平的LPS可能能够减少哮喘的发作。在本研究中发现,肺部菌群中 G^+ 比例明显增高,这是否与呼吸道疾病发生有关,还需要进一步研究。目前,关于肺部菌群 G^+/G^- 比值变化与呼吸道疾病相互关系的报道仍不多见。

本研究也得到了菌群丰富度和多样性发生改变的结果,但具体发生变化的细菌种类及比例与大鼠模型中的结果有差异,这可能是由于实验所选择的动物品系以及环境暴露的时间长短不同等原因所导致。结合以上实验结果,我们认为,在吸入汽车尾气后,实验动物肺部菌群的变化并不是一过性的,而是动态的。另外,短时间的吸入汽车尾气会影响鼠的肺部菌群的物种组成和丰富度,并不会造成肺组织病变;但是,较长时间的环境暴露是否会改变小鼠肺部菌群的物种组成和丰富度,同时造成肺组织病理及的功能变化,还有待于进一步的研究。

随着社会的不断发展,由空气污染造成的一系列问题亟待解决。尽管在本研究中并没有观察到短时间的空气污染暴露造成小鼠肺部病理性变化,但是,小鼠肺部菌群种类及丰度的改变给我们发出了警示:由于身高低于成人使得呼吸道距离汽车排气管更近的未成年人以及从事汽车维修、司机等职业的人群,即使在短时间内暴露在高浓度微环境,也需要做好防护措施,由此引发的一系列的健康及社会问题也需要得到持续的关注。

参·考·文·献

- [1] Laumbach RJ, Kipen HM. Respiratory health effects of air pollution: update on biomass smoke and traffic pollution[J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(1): 3-11.
- [2] Fang H, Liao B, Pu J, et al. Exposure to ambient particulate matter induced COPD in a rat model and a description of the underlying mechanism[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45666-45680.
- [3] Khreis H, Nieuwenhuijsen MJ. Traffic-related air pollution and childhood asthma: recent advances and remaining gaps in the exposure assessment methods[J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(3): 312-320.
- [4] Lindgren A, Strohm E, Montn  mery P, et al. Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden[J]. Int J Health Geograph, 2009, 8(1): 2-16.
- [5] Gao J, Woodward A, Vardoulakis S, et al. Haze, public health and mitigation measures in China: a review of the current evidence for further policy response[J]. Sci Total Environ, 2017, 578: 148-157.
- [6] Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8578.
- [7] He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: comparison of PM2.5 and coarse PM collected during the haze events in a Chinese city[J]. Inhal Toxicol, 2016, 28(14): 706-718.
- [8] Huang YJ, Nariya S, Harris JM, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: associations with disease features and severity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(4): 874-884.
- [9] 金陶胜,傅立新,杜譔. 吸入因子:汽车尾气污染健康影响的一种评价方法[J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(2): 182-184.
- [10] Dickson RP, Erbdownward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease[J]. Exp Rev Respir Med, 2013, 7(3): 245-257.
- [11] Coburn B, Wang PW, Caballero JD, et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10241-10252.
- [12] Dickson RP, Huffnagle GB. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(7): e1004923.
- [13] Yu G, Gail MH, Consonni D, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features[J]. Genom Biol, 2016, 17(1): 163-174.
- [14] Rylance J, Kankwatira A, Nelson DE, et al. Household air pollution and the lung microbiome of healthy adults in Malawi: a cross-sectional study[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 182-188.
- [15] Zhang Q, Cox M, Liang Z, et al. Airway microbiota in severe asthma and relationship to asthma severity and phenotypes[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152724.
- [16] Li N, Fang H, Liao B, et al. Exposure to ambient particulate matter alters the microbial composition and induces immune changes in rat lung[J]. Respir Res, 2017, 18(1): 143-152.
- [17] Poroyko V, Meng F, Meliton A, et al. Alterations of lung microbiota in a mouse model of LPS-induced lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309(1): L76-L83.
- [18] Durack J, Boushey HA, Lynch SV. Airway microbiota and the implications of dysbiosis in asthma[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2016, 16(8): 52-64.

[收稿日期] 2017-10-17

[本文编辑] 吴 洋

