

· 临床研究 ·

## 基于16S核糖体RNA高通量测序前瞻性分析50岁及以上重度烧伤患者早期肠道菌群变化

秦浩<sup>1,2</sup>, 谢卫国<sup>3</sup>, 陈小虹<sup>2</sup>, 刘蒙<sup>2</sup>, 田霞<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>武汉科技大学医学部医学院, 湖北 武汉 430065; <sup>2</sup>武汉大学同仁医院暨武汉市第三医院消化内科, <sup>3</sup>烧伤科, 湖北 武汉 430000

**[摘要]** 目的: 借助16S核糖体RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)高通量测序分析50岁及以上重度烧伤患者早期肠道菌群变化, 为50岁及以上重度烧伤患者应用肠道菌群干预策略提供依据。方法: 按照入排标准纳入13例重度烧伤患者(Burn组)和同期12例健康志愿者(Control组)。收集两组临床资料及粪便样本, 并对样本进行16S rRNA V4区基因测序, 分析各类菌属的相对丰度; 用Rarefy方法进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)划分, 使用Z-score对差异菌群进行标准化, 构建差异菌群热图, 通过QIIME软件分析粪便菌群 OTU 数目及多样性指数; 利用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)解析优势菌群; 通过PICRUST2软件预测菌群功能丰度; 使用R语言中的igraph包对试验样本属水平差异菌行相关性可视化分析。结果: 重度烧伤患者早期肠道菌群以厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)为主。23种菌属在两组间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。差异菌群热图可见Control组的菌群丰度略优于Burn组。LEfSe分析表明, 与Control组相比, Burn组的肠道菌群物种数目在1个门、2个纲、6个目、6个科和10个属中显著增加, 两组差异微生物分布分支图提示Burn组以芽孢杆菌纲为主要区别标志菌群, Control组以梭菌纲为主要标志菌群。京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)功能预测分析提示两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。联合网络可视化分析发现厚壁菌门影响最大, 在可检测到的菌属中共有136对菌属彼此间具有一定的正相关或负相关性( $|r| > 0.3, P < 0.05$ ), 以协同作用为主。结论: 50岁及以上重度烧伤患者早期肠道菌群与健康同龄人存在显著差异, 有益菌种类及丰度减少, 厌氧菌比例显著升高, 不同菌群间存在一定的协同及拮抗作用。

**[关键词]** 烧伤; 肠道菌群; 菌群多样性; 高通量核苷酸测序

**[中图分类号]** R372

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2025)04-523-12

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN241105

## Prospective analysis of early gut microbiota changes in severe burn patients aged 50 and above based on 16S rRNA high-throughput sequencing

QIN Hao<sup>1,2</sup>, XIE Weiguo<sup>3</sup>, CHEN Xiaohong<sup>2</sup>, LIU Meng<sup>2</sup>, TIAN Xia<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, Department of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065;

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology, <sup>3</sup>Department of Burns, Tongren Hospital of Wuhan University & Wuhan Third Hospital, Wuhan 430000, China

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the early changes in the gut microbiota of patients aged 50 and above with severe burns using high-throughput sequencing of 16S ribosomal RNA (16S rRNA), and to provide a basis for applying intestinal flora intervention strategies in this patient population. **Methods:** Thirteen patients with severe burns (burn group) and twelve healthy volunteers (control group) were enrolled according to the inclusion and exclusion criteria. Clinical data and fecal samples were collected from both groups, and 16S rRNA V4 region gene sequencing was performed to assess the relative abundance of various bacterial taxa. The Rarefy method was employed to generate operational taxonomic units (OTUs), and Z-score normalization was applied to identify differentially abundant bacteria. A heatmap for differential bacterial communities was constructed. The number of fecal microbiota OTUs and

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82100559); 湖北省自然科学基金(2019CFB749)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: hcwy100@163.com (ORCID: 0000-0003-0733-0697)

diversity indices were analyzed using QIIME. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was used to identify dominant bacterial groups. The functional abundance of the microbiota was predicted using PICRUSt2 software. The correlations among differential bacterial taxa at the genus level were visualized using the igraph package in R language. **Results:** The early gut microbiota of severe burn patients was predominantly composed of Firmicutes and Bacteroidota. Twenty-three bacterial genera exhibited significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ). The heatmap of differential bacterial communities indicated that the burn group had a slightly lower abundance of microbial taxa than the control group. LEfSe analysis indicated that, compared to the control group, the burn group exhibited a significant increase in bacterial species in one phylum, two classes, six orders, six families, and ten genera. The differential microbial distribution dendrogram suggested that Bacilli were the primary distinguishing marker for the burn group, while Clostridia were the main marker for the control group. KEGG functional prediction analysis indicated no significant differences between the two groups ( $P > 0.05$ ). Combined network visualization analysis revealed that Firmicutes exerted the greatest influence, with 136 bacterial genera showing significant positive or negative correlations ( $|r| > 0.3, P < 0.05$ ), primarily through synergistic interactions. **Conclusion:** In patients aged 50 and above with severe burns, there are significant differences in early gut microbiota compared to healthy peers of the same age. The abundance of beneficial bacterial species is reduced, the proportion of anaerobic bacteria is significantly increased. Additionally, there are certain synergistic and antagonistic interactions among different microbial communities.

**[Key words]** burn; intestinal microbiota; microbial diversity; high-throughput nucleotide sequencing

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(04): 523-534]

重度烧伤对人体是一种毁灭性的伤害。据文献统计,每年有超过30万人因烧伤而死亡<sup>[1]</sup>。一般而言,烧伤面积超过30%或Ⅲ度烧伤面积超过10%,即可认定为重度烧伤<sup>[2]</sup>。尽管临床治疗方法不断改进,如液体复苏、早期肠内营养和积极手术等,但重度烧伤患者的病死率仍较高<sup>[3]</sup>。

肠道微生物群是一个由超过100万亿个细菌组成的复杂系统,发挥着维持肠上皮屏障完整性和肠道环境稳态的重要作用<sup>[4]</sup>。严重烧伤时,有效循环血容量减少导致肠黏膜缺氧,破坏肠道上皮屏障,使肠道内微生物通过受损的肠黏膜进入体循环,导致细菌易位和内毒素血症<sup>[5]</sup>。

年龄 $\geq 50$ 岁是烧伤预后不良的独立危险因素<sup>[6]</sup>。目前肠道菌群研究主要集中在20~50岁人群<sup>[7]</sup>,但临床证据显示,高龄仍是烧伤患者死亡的重要原因<sup>[8]</sup>。Romanowski等<sup>[9]</sup>的研究表明50岁及以上烧伤患者的死亡风险增加,故本研究选择50岁及以上的年龄组作为独立变量进行分析。

16S核糖体RNA(16S ribosomal RNA, 16S rRNA)基因已被广泛用作分子标记,以探索各种环境中的进化关系和微生物组成<sup>[10]</sup>。因其大小合适并具有遗传保守性,成为细菌系统分类中常用的分子时钟。本研究通过16S rRNA高通量测序技术,前瞻性分析50岁及以上重度烧伤患者早期肠道菌群的变化,从微观角度初步揭示此年龄段肠道菌群的特征,以期对50岁及以上重度烧伤患者的微生态治疗

提供有价值的参考。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取2023年10月—2024年5月在武汉市第三医院烧伤科入院的13例重度烧伤患者(Burn组),其中男8例,女5例,年龄(65 $\pm$ 8)岁,烧伤占总体表面积(total body surface area, TBSA)的(28 $\pm$ 12)% , Ⅲ度烧伤面积(14 $\pm$ 8)% TBSA。使用采集勺在患者入院后1周左右采集成形粪便中段里的标本,置于粪便采集管并放置于-80℃超低温冰箱保存。纳入标准:①年龄50~75岁,男女不限;②烧伤类型为火焰伤及热液烧伤;③符合重度烧伤诊断标准:烧伤总面积 $\geq 30\%$  TBSA,或Ⅲ度烧伤总面积 $\geq 10\%$  TBSA,或虽不足上述百分比,但有严重临床症状如休克、复合伤等;④烧伤后24 h内入院,预计需要住院治疗48 h以上。排除标准:①仅在门诊对症处理,未住院治疗;②合并严重心、肺、肝、肾及神经系统疾病,或合并消化道肿瘤、严重糖尿病、严重高血压、自身免疫性疾病;③明确拒绝参与本研究;④有严重的精神系统疾病,无法配合研究。

在同一时期,武汉市第三医院体检中心纳入12名健康志愿者作为健康组(Control组)。志愿者年龄50~70岁,其中男5名,女7名。在体检当日采集其粪便标本,并按照规范程序保存于-80℃超低温冰箱。纳入标准:①身体健康,饮食、睡眠正常,无

吸烟、饮酒等, 每日可正常排成形粪便1~2次; ②近2个月内无抗生素服用史; ③无合并严重心、肺、肝、肾及神经系统疾病, 无合并消化道肿瘤、严重糖尿病、严重高血压、自身免疫性疾病; ④精神状态正常, 同意且能够自主配合本项目。

本研究为前瞻性观察性研究, 经武汉市第三医院生物医学研究伦理委员会批准(批号: 武三医伦KY2024-009), 实验对象均签署知情同意书。

## 1.2 方法

### 1.2.1 高通量16S rRNA基因测序分析

将冷冻粪便样本通过粪便采集管送至武汉美益添生物医药有限公司进行高通量16S rRNA基因测序分析。主要步骤为①粪便样本总DNA的提取与质检: 包括样本均质、菌体收集和保存、细胞裂解、DNA提取与沉淀收集, 最后进行DNA质检。②PCR扩增及产物纯化: 采用16S rRNA基因V3~V4区域的通用引物, 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')与805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), 所有引物均含有特定的条码序列。③文库构建: 对扩增好的PCR产物进行混样建库, 加上测序接头, 进行PCR扩增后用磁珠分选去掉引物二聚体等小片段, 并记录文库index信息。④上机测序: 文库检测合格后, 按照有效浓度及目标下机数据量的需求将不同文库进行pooling后上机测序, 扩增子测序平台为Illumina MiSeq, 测序策略为PE250。

### 1.2.2 菌群结构、功能预测及差异菌相关性分析

①使用R语言的dada2软件包去除错误序列, 即去噪(denoise), 将质量检查的序列聚类为扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)。②通过QIIME(v1.9.1)软件进行样本菌群操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数目分析。③使用Rarefy方法标准化样本序列, 将样本序列与Silva数据库(release 138, SSURef\_NR99)进行序列比对, 确定样本中每条序列的分类等级(界、门、纲、目、科、属、种), 记录各样本的菌群分类信息, 分析各类菌属在样本中的相对丰度。④使用标准的Z-score对两组存在的差异菌相对丰度进行标准化, 构建差异菌的菌群热图。Z-score=(相对标准丰度-平均值)/标准差, 其中, Z-score将相对丰度进行标准化, 缩小数量级, 可避免因数值过大或过小造成数据偏差。⑤通过QIIME(v1.9.1)计算样本菌群Alpha多样性指数, 包括丰度指数(Chao1指数和Ace指数)、多样性指数(Shannon指数)。⑥基于样本菌群的相对丰度, 行样本菌群Beta多样性分析。⑦利用线性判别

分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)研究两组菌群从门到属水平的变化, 具体步骤为: 首先采用非参数Kruskal-Wallis秩和检验检测两分组间丰度差异显著的物种; 再利用成组的Wilcoxon秩和检验检查显著差异物种在亚组之间是否都趋于同一分类; 最后用LEfSe分析对数据进行降维和评估差异显著物种的影响力, 即LDA评分。挖掘二者之间具有统计学差异的生物标志。⑧通过PICRUSt2软件预测菌群的功能丰度。⑨使用R语言中的igraph包对试验样本属水平差异菌行相关性可视化分析。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 26.0统计软件对数据进行分析。计量资料中符合正态分布的数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用独立样本t检验; 不符合正态分布的数据采用中位数(四分位数)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示, 组间比较采用Wilcoxon秩和检验, 定性资料、无序分类资料采用卡方检验, 有序分类资料使用Kruskal-Wallis检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Burn组和Control组基本资料比较

分析比较两组样本的年龄、性别、身高、体重、体重指数(body mass index, BMI)等, 结果提示差异均无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

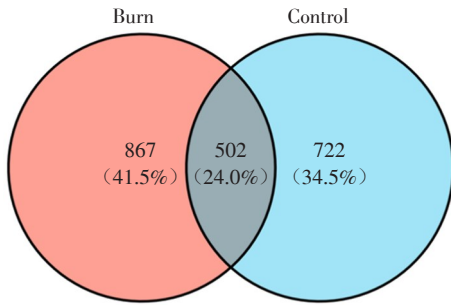
表1 研究对象基本资料

Variable	Burn(n=13)	Control(n=12)	$t/\chi^2$	P
Age(years, $\bar{x} \pm s$ )	65 ± 8	60 ± 7	1.161	0.120
Sex[n(%)]			0.987	0.320
Male	8(61.5)	5(41.7)		
Female	5(38.5)	7(58.3)		
Weight(kg, $\bar{x} \pm s$ )	62.23 ± 10.35	64.58 ± 12.45	0.515	0.611
Height(cm, $\bar{x} \pm s$ )	162.92 ± 10.14	166.75 ± 8.75	1.015	0.321
BMI(kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	23.41 ± 3.04	23.04 ± 2.97	0.312	0.758

### 2.2 Burn组和Control组粪便菌群OTU数目

25例样本共获得4 630 409条序列, 使用R语言的dada2软件包去除错误序列(denoise)后筛选4 063 918条有效高质量序列, 共获得2 091条OTU, 测序覆盖度达99.0%以上, 测序深度足够, 可以覆盖样本的绝大部分微生物。韦恩图可直观展示各组样本的物种分布情况, 如图1所示。两组样本共有的OTU数目为502个, 占总数的24.0%。其中Burn

组独有 867 个 OTU, 占总数的 41.5%, Control 组独有 722 个 OTU, 占总数的 34.5%。



The different colors of the ellipses represent distinct groups, the overlapping areas indicate the number of shared OTUs among the groups, while the non-overlapping sections reflect the number of OTUs unique to each group.

图1 两组 OTU 数目韦恩图

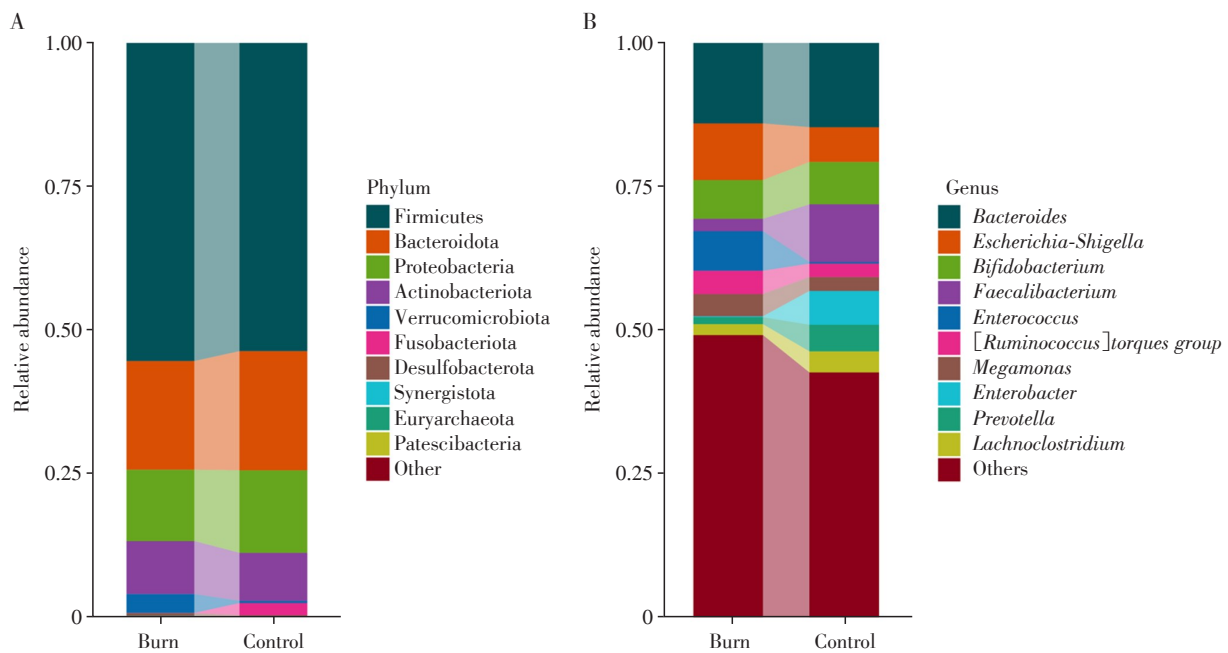
Figure 1 Venn diagram of the numbers of OTUs in two groups

### 2.3 Burn 组和 Control 组粪便细菌结构组成分析

在门水平, 两组试验样本平均相对丰度排名前 10 的肠道微生物如图 2A 所示。两组平均相对丰度在 0.01% 以上的菌门有 4 个, 其中厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)为两组样本中的优势菌门, 其次为变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteriota)。在两组样本中, 除厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门(Fusobacteriota)、

脱硫杆菌门(Desulfobacterota)、Synergistota 门、广古菌门(Euryarchaeota)、Patescibacteria 门( $P > 0.05$ )外, Burn 组中的疣微菌门(Verrucomicrobiota)明显高于 Control 组( $P < 0.01$ )。进一步分析两组间厚壁菌门与拟杆菌门比值(Firmicutes/Bacteroidota, F/B), 发现 Burn 组 F/B 值为 2.93, 较 Control 组的 2.59 有所升高。

而在属水平上, 相对丰度最高的 10 个菌属从高到低依次为拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、大肠埃希菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、扭矩瘤胃球菌属(*[Ruminococcus] torques group*)、巨单胞菌属(*Megamonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、*Lachnoclostridium* 菌属(图 2B)。通过对两组粪便样本进行高通量测序, 在可检测到的 203 个菌属中, 发现 23 种菌属在两组间的分布存在显著差异。相比 Control 组, Burn 组的厌氧菌属(*Abiotrophia*)、放线菌属(*Actinomyces*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridioides*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)等数目明显升高( $P < 0.05$ , 表 2), 而 Control 组的琼脂杆菌属(*Agathobacter*)、丁酸弧菌属(*Anaerostipes*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)等显著高于 Burn 组( $P < 0.05$ , 表 2)。



A: Comparison of the relative abundance of bacteria at the phylum level. B: Comparison of the relative abundance of bacteria at the genus level.

图2 细菌门属水平相对丰度对比

Figure 2 Comparative analysis of the relative abundance of bacteria at the phylum and genus levels

表2 Control组和Burn组患者烧伤早期粪便菌群属水平比较

Table 2 Comparison of fecal microbiota counts at the genus level between the control group and the burn group during the early post-injury period

Group	Control(n=12)	Burn(n=13)	W	P
<i>Abiotrophia</i>	0	0.823(0, 1.510)	126.5	0.003
<i>Actinomyces</i>	0	8.509(4.666, 11.666)	130.0	0.004
<i>Agathobacter</i>	124.961(8.200, 310.514)	0.823(0, 50.369)	34.0	0.018
<i>Akkermansia</i>	1.372(0.721, 3.671)	5.902(3.019, 146.302)	127.5	0.008
<i>Anaerostips</i>	76.308(33.762, 135.974)	23.880(13.999, 57.780)	32.0	0.013
<i>Blautia</i>	300.632(182.670, 538.168)	158.379(56.682, 186.514)	37.0	0.028
<i>Clostridioides</i>	0	1.372(0, 1.647)	126.0	0.002
<i>Desulfovibrio</i>	0	3.843(0, 5.627)	111.5	0.048
<i>Eisenbergiella</i>	0	0.549(0.137, 1.372)	119.0	0.018
<i>Enterococcus</i>	0.961(0, 13.484)	28.959(22.096, 135.871)	136.0	0.002
<i>Faecalibacterium</i>	910.888(579.101, 1 410.490)	60.387(5.490, 203.533)	26.5	0.006
<i>Fusicatenibacter</i>	75.48(11.082, 113.844)	0	32.0	0.011
<i>Gordonibacter</i>	0	1.098(0, 3.431)	117.0	0.018
<i>Holdemanella</i>	1.853(0.789, 2.505)	0	16.0	<0.001
<i>Lachnospiraceae</i> UCG-004	21.273(15.268, 48.584)	0.274(0, 13.999)	28.0	0.007
<i>Lactobacillus</i>	2.265(0, 25.802)	12.901(4.392, 48.035)	115.0	0.046
<i>Peptostreptococcus</i>	0	0.274(0, 1.510)	115.0	0.017
<i>Prevotella</i>	12.803(8.509, 27.027)	0	41.0	0.045
<i>Romboutsia</i>	11.871(3.397, 165.070)	0.823(0, 23.194)	33.5	0.016
<i>Rothia</i>	0	2.333(0.412, 4.255)	123.5	0.011
<i>Tyzerella</i>	3.774(1.029, 36.987)	0	23.5	0.002
[ <i>Clostridium</i> ] <i>innocuum</i> group	4.530(1.200, 6.682)	42.408(6.450, 208.473)	126.0	0.010
[ <i>Ruminococcus</i> ] <i>gauvreauii</i> group	1.441(0, 7.000)	0	39.0	0.005

已有相关文献将Z-score评分用于肠道菌群方面的研究<sup>[11]</sup>,通过经Z-score标准化后的两组差异菌群热图对比可见,在两组差异菌群相对丰度排名前20位的菌群中,Control组的粪便样本菌群丰度略优于Burn组。相比Control组,Burn组的粪便样本中,优势菌属主要为无毒梭菌属([*Clostridium*] *innocuum* group)、放线菌属、阿克曼氏菌属等;而Control组的粪杆菌属、梭形杆菌属(*Fusicatenibacter*)、毛螺旋菌属 UCG-004(*Lachnospiraceae* UCG-004)等菌属为主要优势菌属(图3)。

#### 2.4 Burn组和Control组粪便菌群Alpha多样性与Beta多样性差异分析

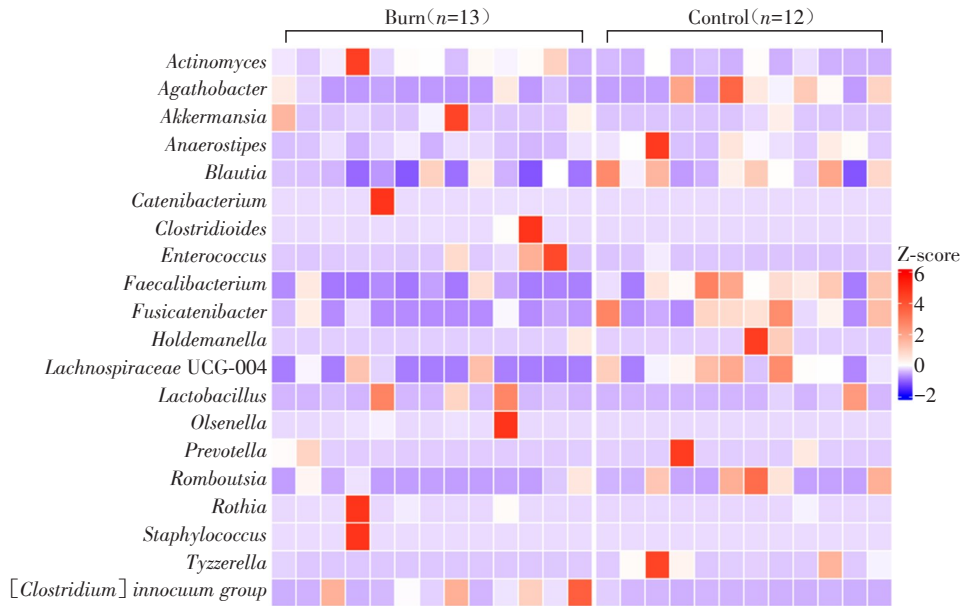
Alpha多样性常用的指标包括OTU数目、Ace指数、Chao1指数、Shannon指数等,这些数值越大说明该样本的物种越丰富。本研究纳入的Burn组和Control组两组样本的Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数变化相似( $P$ 均>0.05,图4),与Control组相比,Burn组早期Alpha多样性差异无统计学意义,提示重度烧伤患者早期相比健康志愿者肠道菌

群的物种多样性与物种丰富度差异无统计学意义。

Beta多样性是衡量不同样本之间微生物群落组成和分布差异的重要指标。本研究发现,两组样本的肠道菌群构成差异有统计学意义( $r=0.060$ ,  $P=0.015$ ,图5A)。进一步通过比较细菌群落加权Bray-Curtis距离发现,两组肠道菌群之间具有显著差异( $r=0.146$ ,  $P=0.019$ ,图5B)。

#### 2.5 Burn组和Control组菌群差异分析

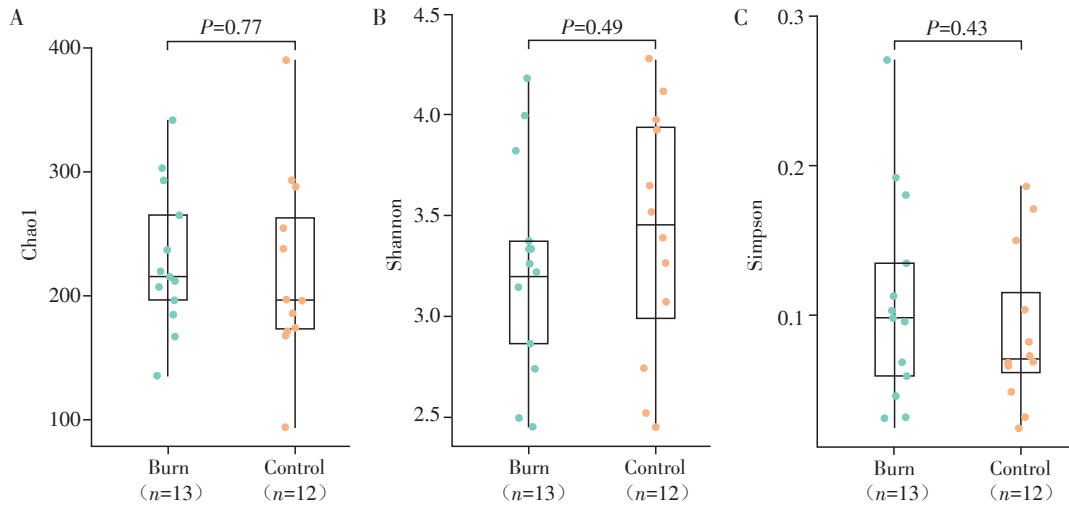
为了更深入地了解烧伤患者肠道菌群的变化,采用LEfSe分析鉴定两组的细菌生物标志物。Control组的梭菌纲(Clostridia)与Burn组的芽孢杆菌纲(Bacilli)LDA评分>4。与Control组相比,Burn组肠道菌群物种数目在1个门、2个纲、6个目、6个科和10个属中相对富集。在属水平上,Burn组可观察到阿克曼氏菌属、梭状芽孢杆菌属、放线菌属等菌属富集,而Control组主要富集布劳特氏菌属、霍尔曼氏菌属(*Holdemanella*)、粪杆菌属等菌属,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图6A)。如菌群微生物分布分支图所示,Burn组以芽孢杆菌纲为



The 13 and 12 colored blocks in the figure from left to right represent the fecal samples from 13 patients with severe burns and 12 healthy volunteers, respectively.

图3 两组粪便差异菌群热图

Figure 3 Heatmap of differential gut microbiota in the two groups



A: Chao1 index. B: Shannon index. C: Simpson index.

图4 Alpha多样性分析

Figure 4 Alpha diversity analysis

主要标志菌群, Control组以梭菌纲为主要标志菌群(图6B)。

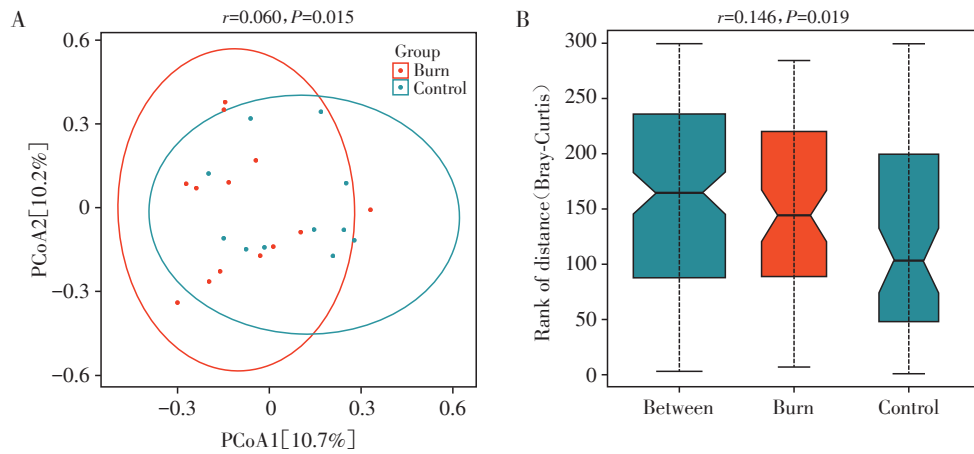
### 2.6 Burn组和Control组粪便菌群功能预测分析

PICRUSt2是一款基于标记基因序列来预测功能丰度的软件。本研究运用PICRUSt2行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)功能预测,分析两组粪便样本微生物组的基因功能和组成的潜在差异。从通路

二级分类确定了主要功能, Burn组与Control组之间无明显差异( $P > 0.05$ , 图7)。

### 2.7 属水平差异菌相关性可视化分析

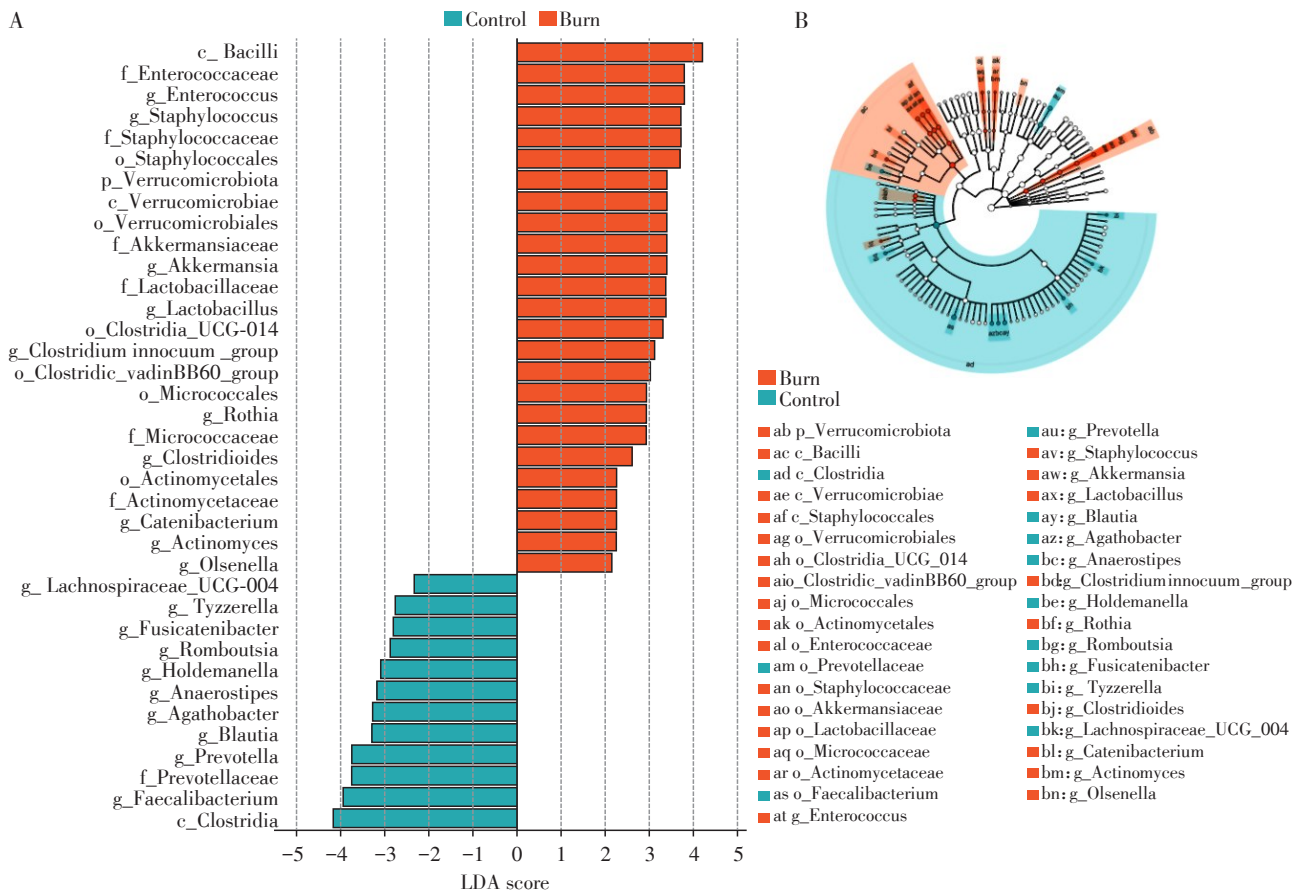
运用R语言中的igraph包选取两组样本属水平差异菌的相对丰度计算其Spearman相关系数,进一步挖掘菌群之间存在的内部联系。取Spearman相关系数 $\geq 0.5$ 且 $P < 0.05$ 作为筛选条件时,在可检测到的菌属中共检测出136对菌属彼此间具有相关



A: Represents the principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity, where PCoA1 reflects the differences between the two groups with a contribution rate of 10.70%, and PCoA2 reflects the differences with a contribution rate of 10.20%. B: Weighted Bray-Curtis clustering distance matrix for the two samples. Between: the inter-group differences between the two sample groups.

图5 Beta多样性分析

Figure 5 Beta diversity analysis



A: Bar chart illustrating the microbial distribution between the burn group and the control group. The colors of the bars indicate the different groups, while the lengths of the bars reflect the LDA scores, representing the magnitude of significant differences in species between the groups. B: Phylogenetic tree depicting the microbial distribution between the burn group and the control group. The concentric circles represent different taxonomic levels from phylum to genus, with each small circle at a given level representing a specific classification. The diameter of each small circle corresponds to its relative abundance at that classification level.

图6 两组差异菌 LefSe 分析

Figure 6 LefSe analysis of differential microbiota between the two groups

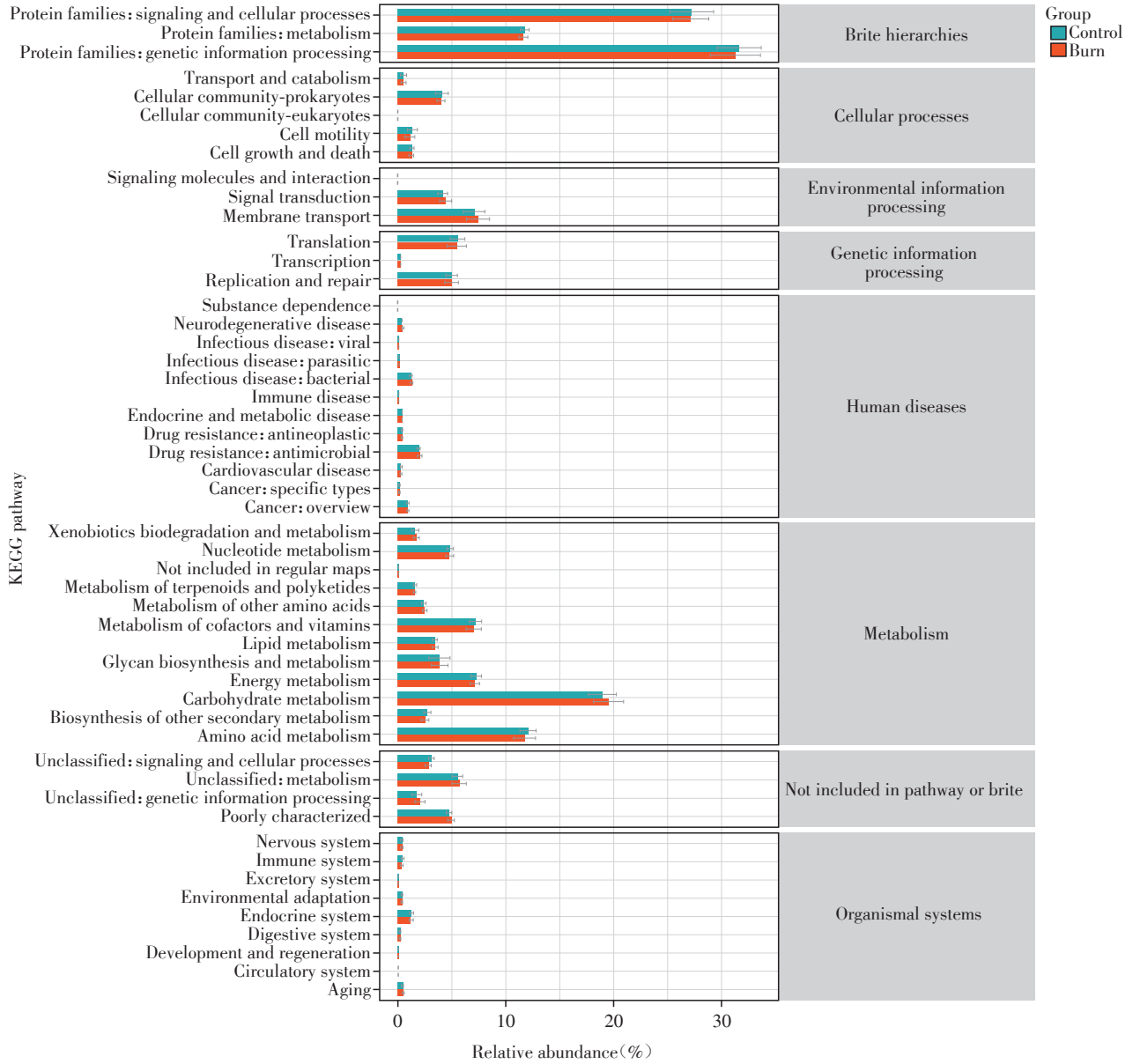


图7 KEGG功能相对丰度条形图

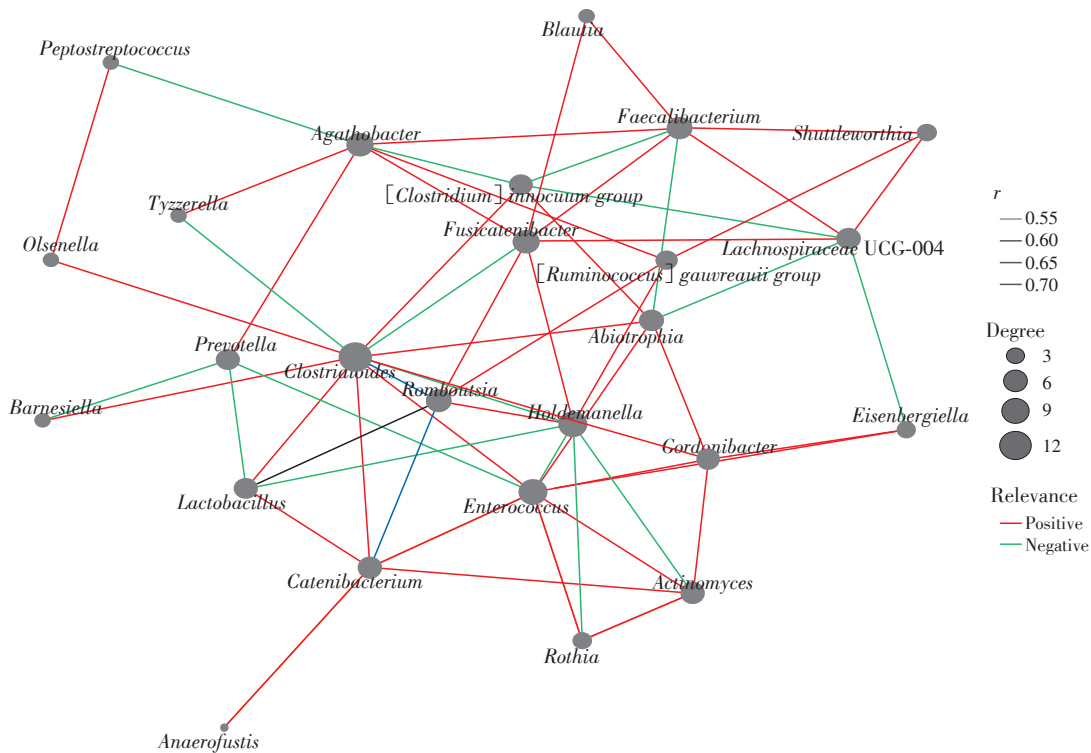
Figure 7 Bar chart of relative abundance of KEGG functional categories

性, 菌种间的相互作用以协同作用为主(图8)。在具有相关性的菌属中, 厚壁菌门下的菌属与其他门类的菌属具有最大的相关性。相关性网络节点数最多的属包括高氏瘤胃球菌属([*Ruminococcus*] *gawreaii* group)、无毒梭菌属、普雷沃氏菌属、*Romboutsia* 属、罗斯氏菌属(*Rothia*)以及霍尔曼氏菌属。其中, 与高氏瘤胃球菌属具有相关性的菌属共有8类, 乏氧菌属与其呈负相关, 其余7种呈正相关; 与无毒梭菌属具有相关性的菌属共有11类, 其中呈正相关的菌属有6类, 呈负相关的菌属有5类; 与普雷沃氏菌属具有相关性的菌属共有9类, 其中琼脂杆菌属与其呈正相关; 与霍尔曼氏菌属具有

相关性的菌属有11类, 其中4类呈正相关, 7类呈负相关; 与 *Romboutsia* 属具有相关性的菌属共有9种, 其中3类呈负相关, 7类呈正相关; 与罗斯氏菌属具有相关性的菌属共有7类, 其中4类呈正相关, 3类呈负相关。

### 3 讨论

随着老龄化加速, 50岁及以上烧伤患者比例逐年上升<sup>[12]</sup>, 给烧伤中心带来严峻挑战<sup>[13]</sup>。肠道微生态是维持肠道屏障功能的重要系统<sup>[14-15]</sup>。然而, 严重烧伤引发的应激反应破坏了肠道微环境稳态, 导致微生物群类型、数量及分布异常, 细菌易位至肠



The size of each node represents the number of connections it has with other nodes (degree), while the thickness of the lines between nodes indicates the absolute value of the correlation coefficients. Red lines denote positive correlations, whereas green lines indicate negative correlations.

图8 属水平差异菌相关性网络图

Figure 8 Correlation network diagram of differentially abundant genera at the genus level

系膜淋巴结,加重局部及全身炎症反应<sup>[16-17]</sup>,进而导致病情恶化和住院时间延长。本研究利用16S rRNA高通量测序技术,分析比较了13例50岁及以上重度烧伤患者与12例同龄健康人粪便微生物群的差异。研究表明,健康肠道的微生物群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门等组成<sup>[18]</sup>。但当细菌生长比例失衡时,可能会对机体造成伤害<sup>[13]</sup>。本研究发现, Burn组F/B值较Control组有所升高,提示烧伤患者肠道微生态存在失衡。F/B值对维持肠道正常稳态有重要影响,并能反映细菌群落的变化<sup>[7,19]</sup>。

重度烧伤患者肠道菌群在数量、多样性和种类上存在显著差异<sup>[20]</sup>。本研究的Beta多样性分析也支持了这一结论,尤其在属水平的物种丰度分析中 Burn组表现出不同于Control组的肠道菌群组成。本研究发现烧伤患者的有益菌如粪杆菌属、丁酸弧菌属、普雷沃氏菌属、布劳特氏菌属等菌属水平显著降低。粪杆菌属<sup>[21]</sup>、丁酸弧菌属<sup>[22]</sup>等是人体肠道内丁酸的主要产生菌,而以丁酸为代表的短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)是肠道细胞的重要能量来源。SCFA能够增强黏液产生、促进肠上皮细

胞紧密连接及诱导肠道免疫细胞的抗炎反应,从而维持肠道稳态,是机体内不可或缺的重要成分<sup>[1]</sup>。丁酸菌的减少导致肠道微血管内皮细胞收缩和细胞间隙扩大,引发内皮屏障损伤和液体渗漏,造成组织水肿和器官功能障碍<sup>[23]</sup>。因此,早期的肠内营养干预对烧伤患者至关重要,以补充短链脂肪酸,维持患者肠道屏障和整体健康。此外, Burn组的布劳特氏菌属丰度显著降低。研究表明,该菌属的代谢产物对50岁及以上人群认知功能具有保护作用,且在该人群中富集<sup>[24]</sup>。故推测其降低可能会对患者的认知造成不利影响。

本研究发现烧伤患者黏液相关性菌属丰度升高。在 Burn组中,阿克曼氏菌属等丰度水平升高,与Zha等<sup>[25]</sup>研究结果一致。阿克曼氏菌属是疣微菌门下的代表属,以降解肠道内黏蛋白而著称,对肠道健康至关重要<sup>[26]</sup>。Zha等<sup>[25]</sup>的研究还指出,阿克曼氏菌属在烧伤早期的丰度呈现出先升高后下降再升高的趋势,并在肠道内发挥产生与降解黏液的“双重效应”,它能够在营养不良的条件下利用宿主黏液中的黏蛋白提供能量,通过动态调控维持烧伤患者肠道黏液屏障的稳定。同时, Burn组的乳杆菌

属丰度高于 Control 组,这与郭在文等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。乳杆菌属通过 SCFA(尤其是丁酸)为应激条件下的肠上皮细胞提供能量,促进黏液蛋白合成。已有研究表明,乳杆菌属等可以提高 50 岁及以上烧伤患者的免疫力,降低机体对感染的易感性<sup>[13]</sup>。上述过程可为临床实践中的烧伤患者肠道管理提供重要依据。在早期干预中,调节包括阿克曼氏菌属在内的肠道微生物群的丰度,可能在重建健康肠道屏障方面发挥重要作用。

健康人群的肠道主要由厌氧菌主导<sup>[15]</sup>。一方面,烧伤引起的生理及免疫功能改变影响了肠道环境并加剧局部缺氧,从而造成了 Burn 组如放线菌属、梭状芽孢杆菌属、脱硫弧菌属等厌氧菌丰度进一步升高。研究表明,梭状芽孢杆菌属与烧伤患者感染性腹泻存在一定关联<sup>[27]</sup>。另一方面,部分厌氧菌丰度的升高可能具备一定的临床预示意义,如以脱硫弧菌为首的菌属丰度可作为临床上推断早期严重烧伤时间的预测指标<sup>[23]</sup>。但细菌过量繁殖也可能增加感染风险,已有临床研究证实脱硫弧菌数量增多是肠息肉和溃疡性结肠炎发病的一个重要特征<sup>[28]</sup>。因此,临床上可通过更精准的抗生素策略或益生菌干预维持烧伤患者肠道微生态平衡,以减少并发症并优化治疗效果。

烧伤早期肠道菌群富集在多类代谢过程中,同时发挥修复、转录、细胞生长和死亡等功能<sup>[23]</sup>。本研究两组间 KEGG 功能预测分析差异不明显,由于样本量较少,且两组对象的主要功能菌群仍以厚壁菌门和拟杆菌门为主,推测其菌群可能在相似的代谢途径中富集,因而两组菌群在功能上相似。后续可扩大样本量行进一步分析。通过本研究的网络分析发现,两组样本差异菌群之间存在明显的协同作用。其中相关性最大的两类分别是高氏瘤胃球菌属和霍尔曼氏菌属,二者之间存在显著正相关( $r=0.661, P < 0.001$ ),提示二者可能存在协同作用。在一项关于甘肃小檗(*Berberis kansuensis*, BK)对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)小鼠的实验中<sup>[29]</sup>,BK 降低了 T2DM 小鼠肠道内高氏瘤胃球菌属与霍尔曼氏菌属的相对丰度,进而显著降低了 T2DM 小鼠的空腹血糖、糖化血清蛋白、脂多糖、胰岛素抵抗指数等相关指标,从而起到一定的降糖作用。上述结果表明,肠道菌群之间的协同关系或许在疾病的调控中发挥重要作用。因此,烧伤患者肠道菌群内部的相互作用是否也会影响其病情恢复,值得进一步深入研究,以揭示其潜在的

机制。

近年来,基于微生物群的治疗逐渐应用于感染性疾病和胃肠道疾病。如粪便微生物群移植(fecal microbiota transplantation, FMT)已用于治疗艰难梭菌感染、肠道免疫缺陷、顽固性便秘、代谢性疾病、肠道过敏乃至炎症性肠病等<sup>[30-31]</sup>,并取得了良好的效果。本研究基于 16S rRNA 高通量测序技术,分析了两组对象的粪便菌群丰度,探讨烧伤对 50 岁及以上人群肠道菌群的影响,为临床早期实施肠道菌群干预策略提供理论支持。然而,本研究为单中心研究,样本量小,后续可进行多中心研究,以及扩大样本量,进一步证实肠道菌群变化在重度烧伤患者早期风险评估、干预管理以及改善预后方面的价值。

综上,本研究初步揭示,50 岁及以上重度烧伤患者在烧伤早期肠道菌群处于失衡状态,表现为厌氧菌属丰度升高、有益菌属丰度降低。这种结构性异常及代谢紊乱增加了患者感染和营养不良的风险。未来研究应进一步探讨菌属间的相互作用机制,并验证 FMT 等微生态干预措施在烧伤患者中的疗效,为临床治疗提供科学依据。

#### 利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

#### Conflict of Interests:

All authors declared that they have no competing interests.

#### 作者贡献声明:

秦浩负责数据统计分析、数据整理、作图及文章撰写;谢卫国、陈小红、刘蒙负责研究指导、论文审阅;田霞负责实验设计、论文指导、论文审阅、经费支持。

#### Author's Contributions:

QIN Hao was responsible for statistical analysis, data organization, figure preparation, and manuscript writing; XIE Weiguo, CHEN Xiaohong, and LIU Meng were responsible for research guidance and manuscript review; TIAN Xia was responsible for experimental design, manuscript mentorship, review, and funding support.

#### [参考文献]

- [1] LUCK M E, HERRNREITER C J, CHOUDHRY M A. Gut microbial changes and their contribution to post-burn pathology[J]. Shock, 2021, 56(3): 329-344
- [2] SALLAM H S, URVIL P, SAVIDGE T C, et al. Ghrelin abates bacterial translocation following burn injury by improving gastric emptying[J]. Neurogastroenterol Motil, 2020, 32(2): e13742
- [3] KNOEDLER S, MATAR D Y, KNOEDLER L, et al. Asso-

- ciation of age with perioperative morbidity among patients undergoing surgical management of minor burns [J]. *Front Surg*, 2023, 10: 1131293
- [4] CHEN J J, HE S R, FANG L, et al. Age-specific differential changes on gut microbiota composition in patients with major depressive disorder[J]. *Aging*, 2020, 12(3): 2764-2776
- [5] BECKMANN N, PUGH A M, CALDWELL C C. Burn injury alters the intestinal microbiome's taxonomic composition and functional gene expression [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205307
- [6] WALLACE D, SLOAN K, WILLIAMS D, et al. Poverty and frailty are not related to each other with regard to outcomes in middle-aged and older patients with burn injuries[J]. *J Burn Care Res*, 2023, 44(3): 517-523
- [7] YU H J, JING C, XIAO N, et al. Structural difference analysis of adult's intestinal flora basing on the 16S rDNA gene sequencing technology[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(24): 12983-12992
- [8] GREENHALGH D G. Management of burns[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(24): 2349-2359
- [9] ROMANOWSKI K S, CURTIS E, PALMIERI T L, et al. Frailty is associated with mortality in patients aged 50 years and older[J]. *J Burn Care Res*, 2018, 39(5): 703-707
- [10] PAN P P, GU Y C, SUN D L, et al. Microbial diversity biased estimation caused by intragenomic heterogeneity and interspecific conservation of 16S rRNA genes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2023, 89(5): e0210822
- [11] LI B Z, YAN Y Q, ZHANG T G, et al. Quercetin reshapes gut microbiota homeostasis and modulates brain metabolic profile to regulate depression-like behaviors induced by CUMS in rats[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1362464
- [12] WU H, XI M M, XIE W G. Epidemiological and clinical characteristics of older adults with burns: a 15-year retrospective analysis of 2 554 cases in Wuhan Institute of Burns[J]. *BMC Geriatr*, 2023, 23(1): 162
- [13] DYAMENAHALLI K, CHOY K, FRANK D N, et al. Age and injury size influence the magnitude of fecal dysbiosis in adult burn patients[J]. *J Burn Care Res*, 2022, 43(5): 1145-1153
- [14] 陈柔柔, 李娜, 赫荣波, 等. 新诊断2型糖尿病合并高尿酸血症患者的临床特征及肠道菌群变化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(8): 1125-1132
- CHEN R R, LI N, HE R B, et al. The study of clinical features and gut microbiome of newly diagnosed type 2 diabetes patients with hyperuricemia [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Science)*, 2022(8): 1125-1132
- [15] 潘艳艳, 范友芬, 李吉良, 等. 基于16S核糖体RNA高通量测序的特重度烧伤患者肠道菌群动态变化分析[J]. 中华烧伤杂志, 2020, 36(12): 1159-1166
- PAN Y Y, FAN Y F, LI J L, et al. Analysis of the dynamic changes in gut microbiota in patients with extremely severe burns by 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing technology [J]. *Chin J Burns*, 2020, 36(12): 1159-1166
- [16] MCMAHAN R H, BOE D M, WALRATH T M, et al. Aging, cutaneous burn injury and multi-organ complications: the role of the gut[J]. *Adv Geriatr Med Res*, 2022, 4(2): e220004
- [17] MCMAHAN R H, BOE D, GIESY L E, et al. Advanced age worsens respiratory function and pulmonary inflammation after burn injury and this correlates with changes in the fecal microbiome in mice [J]. *J Burn Care Res*, 2024: irae101
- [18] YOO S, JUNG S C, KWAK K, et al. The role of prebiotics in modulating gut microbiota: implications for human health[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4834
- [19] WANG T T, GAO L, YANG Z J, et al. Restraint stress in hypertensive rats activates the intestinal macrophages and reduces intestinal barrier accompanied by intestinal flora dysbiosis[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1085-1110
- [20] 郭在文, 宋明明, 章杰, 等. 基于16S核糖体RNA高通量测序的严重烧伤患者早期肠道菌群变化分析及代谢功能预测的前瞻性研究[J]. 中华烧伤杂志, 2021, 37(12): 1122-1129
- GUO Z W, SONG M M, ZHANG J, et al. Prospective study on the analysis of intestinal microflora changes and prediction on metabolic function in severe burn patients at early stage by 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing [J]. *Chinese Journal of Burns*, 2021, 37(12): 1122-1129
- [21] YANG C L, LIU S, LI H X, et al. The effects of Psyllium husk on gut microbiota composition and function in chronically constipated women of reproductive age using 16S rRNA gene sequencing analysis [J]. *Aging*, 2021, 13(11): 15366-15383
- [22] XIONG L L, WU Y N, SHU Q L, et al. The pharmacological mechanism of Xiaoyaosan polysaccharide reveals improvement of CUMS-induced depression-like behavior by carbon source-triggered butyrate-producing bacteria [J]. *J Appl Microbiol*, 2023, 134(4): lxad052
- [23] HOU B C, ZHANG H L, ZHOU L N, et al. In silico analysis of intestinal microbial instability and symptomatic markers

- in mice during the acute phase of severe burns[J]. BMC Microbiol, 2024, 24(1): 124
- [24] REN T Z, GAO Y Y, QIU Y H, et al. Gut microbiota altered in mild cognitive impairment compared with normal cognition in sporadic Parkinson's disease[J]. Front Neurol, 2020, 11: 137
- [25] ZHA X L, SU S, WU D, et al. The impact of gut microbiota changes on the intestinal mucus barrier in burned mice: a study using 16S rRNA and metagenomic sequencing[J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkad056
- [26] WALRATH T, NAJARRO K M, GIESY L E, et al. Remote burn injury in aged mice induces colonic lymphoid aggregate expansion and dysbiosis of the fecal microbiome which correlates with neuroinflammation[J]. Shock, 2023, 60(4): 585-593
- [27] HOJATI A. An insight into the clostridioides difficile infection-related diarrhea[J]. Burns, 2023, 49(3): 736-737
- [28] LI Y Y, SUN J W, CHEN L, et al. Structural characteristics of a polysaccharide from *armillariella tabescens* and its protective effect on colitis mice *via* regulating gut microbiota and intestinal barrier function[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 277: 133719
- [29] XU T, GE Y M, DU H, et al. Berberis kansuensis extract alleviates type 2 diabetes in rats by regulating gut microbiota composition [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113995
- [30] HAIFER C, PARAMSOTHY S, KAAKOUSH N O, et al. Lyophilised oral faecal microbiota transplantation for ulcerative colitis (LOTUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(2): 141-151
- [31] PETTIT N N, SHAEER K M, CHAHINE E B. Live biotherapeutic products for the prevention of recurrent *Clostridioides difficile* infection [J]. Ann Pharmacother, 2024, 58(12): 1204-1217

[收稿日期] 2024-10-22

(本文编辑: 蒋 莉)

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆  
<http://jnm. njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询  
稿件审理情况。