

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.06.009

特发性膜性肾病患者黄腻苔与白腻苔舌苔菌群特征的 16S rRNA 全长测序研究

李艺含, 王新慧, 闫蕾, 余仁欢✉

中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场路甲 1 号, 100091

[摘要] **目的** 探究特发性膜性肾病 (IMN) 患者黄腻苔和白腻苔的舌苔菌群特征。**方法** 选择确诊为 IMN 的患者 24 例, 其中黄腻苔 13 例组成黄腻苔组, 白腻苔 11 例组成白腻苔组, 另招募健康人 10 例组成健康组。收集各组舌苔菌群样本, 运用 16S rRNA 全长测序技术对舌苔样本进行测序, 对舌苔菌群 Alpha 多样性、Beta 多样性、群落组成及差异进行微生物学信息分析, 并基于 MetaCyc 数据库进行菌群功能预测分析。**结果** 白腻苔组、黄腻苔组和健康组舌苔菌群之间 Alpha 多样性及 Beta 多样性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与健康组比较, 白腻苔组和黄腻苔组卟啉单胞菌属的相对丰度减少 ($P<0.05$)。黄腻苔组弯曲杆菌属、弯曲杆菌 *_sp002139875* 和胎儿弯曲杆菌的相对丰度较白腻苔和健康组增高; 白腻苔组生痰二氧化碳噬纤维菌的相对丰度较其他两组增高 ($P<0.05$)。菌群功能预测结果显示, 与健康组比较, 白腻苔组和黄腻苔组的磺胺内酯降解超级途径、雄烯二酮降解 I (需氧)、甲苯降解通路途径下调 ($P<0.05$); 与白腻苔组比较, 黄腻苔组丙酮酸发酵生成丙酸 I、琥珀酸发酵生成丁酸盐、甲苯降解途径下调, 而 D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸降解超级途径上调 ($P<0.05$)。**结论** IMN 患者舌苔菌群失调, 其中卟啉单胞菌属可能成为 IMN 的微生物学表征; 弯曲杆菌属、弯曲杆菌 *_sp002139875*、胎儿弯曲杆菌可能是 IMN 黄腻苔的标志菌; 生痰二氧化碳噬纤维菌可能是 IMN 白腻苔的标志菌种。

[关键词] 特发性膜性肾病; 舌苔菌群; 舌诊; 白腻苔; 黄腻苔

特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 是常见的原发性肾小球疾病, 是成人原发性肾病综合征的最常见原因, 病理特征为肾小球基底膜上皮细胞下大量免疫复合物的沉积伴基底膜增厚^[1], 临床表现为不同程度的蛋白尿, 可伴有血尿^[2]。近些年来我国 IMN 的发病率呈现明显的上升趋势^[3-4], 约 1/3 患者可逐渐进展至终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD)^[1]。舌诊是中医诊疗体系中最具特色的诊法。《灵枢·经别论》云: “有诸于内, 必行于外。” 舌内通五脏, 外系经络, 有病与否, 均可于舌决之^[5]。清代医家章虚谷在《医门棒喝》中言 “审舌垢即知其邪之寒热深浅”,

认为舌苔是疾病标实之邪的反映。本课题组前期研究发现, IMN 患者标实以水湿、湿浊、湿热多见, 白腻苔和黄腻苔为 IMN 的常见舌象特征^[6-7]。舌苔微生物作为口腔菌群的重要组成部分, 是影响舌苔形成的重要因素。疾病状态下, 舌苔的病理性变化与舌苔菌群的异常变化、疾病的发展密切相关^[8-9]。舌苔微生物可作为客观化的生物标志物, 为疾病的诊断和治疗提供参考依据。因此, 本研究基于 16S rRNA 全长高通量测序技术分析 IMN 患者黄腻苔与白腻苔的微生物群落多样性、物种组成和群落构成差异, 以及构成 IMN 患者不同舌象特征内在的舌苔菌群影响因素, 以期对 IMN 的中医临床辨证及舌诊客观化发展提供参考依据。本研究已获得中国中医科学院西苑医院伦理委员会批准 (批件号: 2020XLA001-2)。

基金项目: 国家自然科学基金 (82174362, 82205102); 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021A01208)

✉ 通讯作者: tezhonggeyu@vip.sina.com

1 临床资料

1.1 一般资料

本研究为探索性研究，受试者来源于2022年1月1日至2022年12月31日期间于中国中医科学院西苑医院肾病科门诊或病房就诊的IMN患者24例，其中男14例，女10例；平均年龄（52.68±10.54）岁。另外从中国中医科学院西苑医院保健科招募健康人10例（健康组），其中男4例，女6例；平均年龄（53.24±7.20）岁。与健康人比较，IMN患者年龄和性别比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。IMN患者中白腻苔11例（白腻苔组），黄腻苔13例（黄腻苔组）。表1示，白腻苔组和黄腻苔组患者一般资料比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），具有可比性。

1.2 诊断标准

IMN诊断标准参照《肾脏病学》^[10]、《肾活检病理学》^[11]及《改善全球肾脏病预后组织(KIDGO)临床实践指南》^[1]制定，满足以下一条即可诊断：1) 经肾组织活检，符合膜性肾病光镜、电镜及免疫荧光病理特点；2) 对于肾病综合征且血清抗磷脂酶A2受体(PLA2R)抗体检测阳性的患者在排除如肿瘤、肝炎等继发因素的情况下，可不需要肾活检。

舌苔诊断标准参考《中医诊断学》^[12]，腻苔：苔质厚不能透过舌苔得见舌质颜色，苔质颗粒细腻致密，融合成片，紧贴舌面，揩之不去，刮之不脱。苔色黄者为黄腻苔，苔色白者为白腻苔。薄白苔：舌苔均匀，薄白而湿润。

1.3 纳入标准

IMN患者纳入标准：1) 符合IMN诊断标准；2) 年龄>18周岁，性别不限；3) 符合白腻苔或

黄腻苔诊断标准；4) 无明显饮食偏嗜；5) 签署知情同意书。

健康人纳入标准：1) 近1个月内体检未发现明显疾病；2) 符合薄白苔标准；3) 无明显饮食偏嗜；4) 签署知情同意书。

1.4 排除标准

IMN患者排除标准：1) 由系统性红斑狼疮、肿瘤、病毒性肝炎等导致的继发性膜性肾病；2) 合并严重心、脑、肝、内分泌及造血系统等严重疾病；3) 长期服用镇静剂、抗生素、维生素B2等对舌象有影响的药物；4) 先天性裂纹舌、先天性齿痕舌、先天性剥落苔、先天性舌系带过短；5) 染苔；6) 过去2周内曾使用微生态活菌制剂如益生菌、益生元等；7) 过去2个月内使用过抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂、细胞毒类药物；8) 合并口腔疾病，如牙周炎、根尖周炎、龋齿、口臭；9) 长期接触有害物质，如酒精、烟草，或药物滥用等。

健康人排除标准：1) 过去2周内曾使用微生态活菌制剂如益生菌、益生元等；2) 过去2个月内使用过抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂、细胞毒类药物；3) 合并口腔疾病，比如牙周炎、根尖周炎、龋齿、口臭；4) 长期接触有害物质，如酒精、烟草，或药物滥用等。

2 方法

2.1 舌苔菌群样本的采集与储存

采样前准备：舌苔菌群于清晨受试者刷牙前及空腹状态下采集。采样前研究人员嘱受试者用无菌生理盐水漱口2或3次。采样时嘱受试者自然将舌伸出，研究人员用无菌拭子在受试者舌面中部前后来回适当用力刮取10次，以确保无菌拭子充分沾满舌苔样本。为保证对所有受试者取样手法、力度

表1 白腻苔组与黄腻苔组特发性膜性肾病患者一般资料比较

Table 1 Comparison of general data between the white greasy coating group and the yellow greasy coating group in patients with idiopathic membranous nephropathy

项目	白腻苔组 (11 例)	黄腻苔组 (13 例)	$t/Z/\chi^2$ 值	P 值
性别 (男/女) /例	7/4	7/6	0.24	0.70
年龄/岁, $\bar{x}\pm s$	49.18±12.79	54.15±9.80	-1.08	0.30
病程/年, $M(P_{25}, P_{75})$	6.00 (5.00, 8.00)	6.00 (4.5, 7.50)	0.14	0.71
24h-UTP/ g^{-1} , $M(P_{25}, P_{75})$	4.30 (1.42, 2.88)	4.04 (2.27, 5.80)	0.49	0.64
Scr/ $\mu mol\cdot L^{-1}$, $M(P_{25}, P_{75})$	73.91 (56.43, 91.39)	77.62 (62.12, 93.11)	-0.38	0.73
eGFR/ $ml\cdot min^{-1}\cdot 1.73 m^{-2}$, $\bar{x}\pm s$	98.66±22.14	89.77±20.57	1.02	0.32
TP/ $g\cdot L^{-1}$, $\bar{x}\pm s$	64.58±9.06	62.90±4.34	0.60	0.56
ALB/ $g\cdot L^{-1}$, $\bar{x}\pm s$	34.83±7.01	36.26±3.85	-0.63	0.54

注：24h-UTP，24小时尿蛋白定量；Scr，血肌酐；eGFR，估算肾小球滤过率；TP，总蛋白；ALB，白蛋白。

的一致性, 取样工作由一人完成。舌苔菌群采样完毕迅速放入装有无菌生理盐水的 EP 管中, 并将样本存放于 -80°C 冰箱中保存。舌苔样本转运过程中全程采用冷链运输。待所有标本采集完毕, 统一送至上海凌恩生物科技有限公司进行后续的舌苔菌群 DNA 的提取及测序。

2.2 舌苔菌群 16S rRNA 全长测序

采用蛋白酶 K (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, 批号: 3111069) 裂解抽提方法进行 DNA 提取。抽提后的 16S rDNA 样本按照白腻苔组、黄腻苔组和健康组进行分装。选取 16S rRNA 基因全长为测序区域, 通过通用引物 27F_1492R 对 16S rRNA 基因全长进行 PCR 扩增。根据制造商的说明, 使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen 公司, 批号: 11696505001) 从 2% 琼脂糖凝胶中提取和纯化扩增子, 回收 PCR 产物, 进行 Tris_HCl 洗脱, 用 2% 琼脂糖电泳进行定量检测。参照电泳初定量结果, 将 PCR 产物用 QuantiFlour™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行检测定量。最后进行 PacBio 文库构建与测序。

2.3 生物信息学分析

将 PacBio 测序得到的原始数据使用测序仪 (Pacific Biosciences 公司, 型号: Novaseq6000 PE250) 自带的 SMRTLINK (v9) 获得一致性循环共识测序 (CCS) 序列。之后为了便于分析, 对 CCS 序列按照彼此的相似性进行操作分类单元 (OTU) 聚类。为了探究 IMN 舌苔菌群特征, 对舌苔菌群进行 Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析、群落组成及差异分析。Alpha 多样性是反映微生物群落的丰富度和均匀度的综合性指标, 包括基于丰度覆盖度指数 (ACE)、菌群物种总数 (Chao1)、香农指数 (Shannon) 和辛普森指数 (Simpson) 等。其中, Chao1、ACE 指数主要估计群落中所包含的物种数目; Shannon、Simpson 指数可综合体现微生物群落

的多样性和均匀度。Beta 多样性分析是比较样本间的差异。本研究采用主坐标分析 (PCoA) 及非度量多维尺度分析 (NMDS) 进行 Beta 多样性分析。PCoA、NMDS 均是通过方差分析, 将样本微生物群落的差异反映于低维坐标图上, 从而更加直观地观察组间微生物群落的相似性及差异性。在 PCoA 分析中横坐标轴代表第一主成分, 纵坐标代表第二主成分, 百分比为成分对样本差异的贡献值。NMDS 分析结果的优劣性用胁迫系数 (stress) 来衡量, 通常认为 $\text{stress} < 0.2$ 时可用 NMDS 的二维点图表示, 其图形具有一定解释意义。另外, 采用 PICRUST2 软件基于 MetaCyc 数据库提供的通路注释信息, 对菌群的代谢功能信息进行预测。

2.4 统计学方法

采用 IBM SPSS 26.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐的多组间比较选择 F 检验, 两两比较采用 LSD 法; 若方差不齐, 则采用 H 检验, 两两比较使用 Mann-Whitney U 检验。不符合正态分布的计量资料用中位数和四分位数 [$M(Q_1, Q_3)$] 表示, 采用 H 检验, 两两比较采用 Bonferroni 法进行校正。计数资料以例 (%) 表示, 采用 Pearson 检验或 Fisher's 精确检验进行比较。检验水准 $\alpha = 0.05$, 不进行事后分析和 α 矫正。

3 结果

3.1 各组受试者舌苔菌群 Alpha 多样性分析

表 2 示, 白腻苔组、黄腻苔组和健康组舌苔菌群的 ACE、Chao1、Shannon 及 Simpson 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组受试者舌苔菌群 Beta 多样性分析

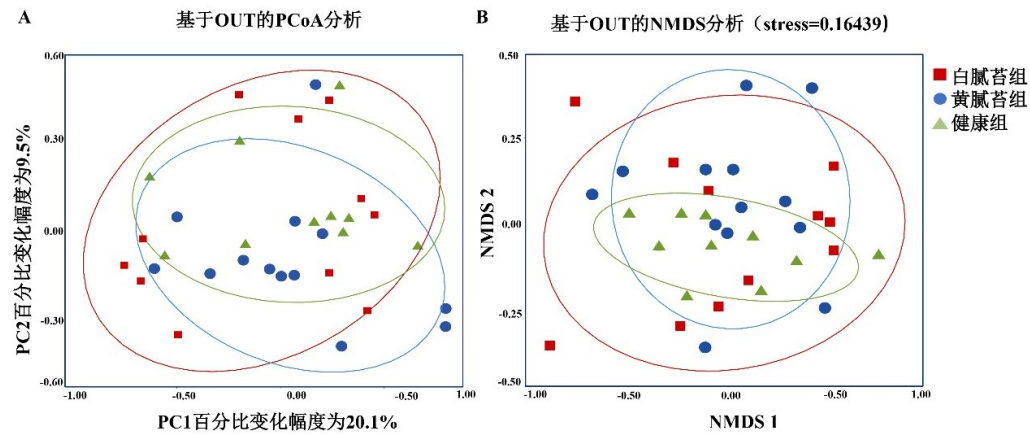
图 1A 示, 在第一主坐标轴 (PC1) 上有 20.1% 可能可以解释白腻苔组、黄腻苔组和健康组样本之间的群落结构差异, 而第二主坐标轴 (PC2) 显示了 9.5% 的样本变异, 差异无统计学意义 ($P = 0.47$)。

表 2 两组特发性膜性肾病患者及健康组舌苔菌群 Alpha 多样性分析比较

Table 2 Comparison of Alpha diversity analysis of tongue coating microbiome between the two groups of patients with idiopathic membranous nephropathy and the healthy group

组别	例数	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
白腻苔组	11	1948.08 (1071.02, 2281.99)	1877.53 (1092.18, 2035.19)	5.09 $\pm$ 0.31	0.97 (0.96, 0.98)
黄腻苔组	13	2356.19 (1639.10, 4016.18)	2115.62 (1617.86, 3444.68)	5.97 $\pm$ 0.69	0.96 (0.95, 0.97)
健康组	10	2551.22 (1383.91, 3460.45)	2230.81 (1355.05, 3027.55)	6.04 $\pm$ 0.56	0.97 (0.96, 0.98)
H/F 值		1.10	1.19	0.04	1.23
P 值		0.58	0.55	0.96	0.54

注: ACE, 丰富度覆盖度指数; Chao1, 菌群物种总数; Shannon, 香农指数; Simpson, 辛普森指数。



注：OUT，操作分类单元；PCoA，主坐标分析；PC1，主成分1；PC2，主成分2；NMDS 1，非度量多维尺度分析1；NMDS 2，非度量多维尺度分析2；每一个点代表一个样本，点与点之间的距离表示样本之间的差异程度。

图1 两组特发性膜性肾病患者及健康组舌苔菌群Beta多样性分析

Figure 1 Beta diversity analysis of tongue coating microbiome between the two groups of patients with idiopathic membranous nephropathy and the healthy group

图1B示，stress<0.2，说明该NMDS模型可以准确反映三组样本间舌苔群落的真实分布情况，三组样本NMDS分析差异无统计学意义（P=0.46）。

3.3 各组受试者舌苔菌群组成及差异分析

3.3.1 属水平舌苔菌群组成及差异分析 白腻苔组、黄腻苔组和健康组优势菌属（相对丰度位于0.01以内）构成大致相同。三组舌苔菌群按照相对丰度从高到低排列前10的菌属有普雷沃氏菌属、链球菌属、梭杆菌属、奈瑟氏菌属、拟普雷沃氏菌属、韦荣球菌属、弯曲杆菌属、颗粒链球菌属、纤毛菌属、马西利氏普雷沃氏菌。与白腻苔和健康组比较，黄腻苔组弯曲杆菌属相对丰度显著增加（P<0.05），见表3。

为了进一步探究属水平舌苔菌群构成差异，统计相对丰度在0.10~0.01之间的菌属，与健康组属水平相对丰度（0.02±0.02）相比较，白腻苔组（0.01±0.01）与黄腻苔组（0.02±0.02）卟啉单胞菌属的相对丰度显著减少（F=3.298，P=0.049）。3.3.2 种水平舌苔菌群组成及差异分析 种水平上，三组优势菌种（相对丰度在0.01以内）组成也大致相同。三组舌苔菌群菌种按照相对丰度从高到低排列前10的菌种有产黑色普雷沃菌、齿状芽孢杆菌_D、异戊丁香菌_坦纳拉菌、尿放线杆菌、动物奈瑟氏菌、瓦代纤毛菌_A、蒂蒙氏马西利普雷沃氏菌、小韦荣球菌_A、弯曲杆菌_sp002139875、胎儿弯曲杆菌。黄腻苔组弯曲杆菌_sp002139875与

表3 两组特发性膜性肾病患者及健康组舌苔菌群相对丰度前10位的优势菌属相对丰度比较

Table 3 Comparison of the relative abundance of the top 10 dominant genera in the tongue coating microbiome between the two groups of patients with idiopathic membranous nephropathy and the healthy group [x̄±s/M(Q ₁ , Q ₃)]						
组别	例数	普雷沃氏菌属	链球菌属	梭杆菌属	奈瑟氏菌属	拟普雷沃氏菌属
白腻苔组	11	0.18±0.09	0.07 (0.04, 0.10)	0.08±0.08	0.04 (0.00, 0.08)	0.04 (0.01, 0.07)
黄腻苔组	13	0.17±0.06	0.08 (0.02, 0.10)	0.08±0.06	0.06 (0.00, 0.12)	0.05 (0.03, 0.07)
健康组	10	0.20±0.05	0.10 (0.06, 0.14)	0.07±0.05	0.03 (0.00, 0.06)	0.05 (0.02, 0.08)
F/H值		0.67	0.66	0.11	0.69	0.82
P值		0.52	0.72	0.90	0.71	0.66
组别	例数	韦荣球菌属	弯曲杆菌属	颗粒链球菌属	纤毛菌属	马西利氏普雷沃氏菌
白腻苔组	11	0.06 (0.04, 0.08)	0.06±0.06 ^{a)}	0.03 (0.01, 0.05)	0.03 (0.01, 0.05)	0.03 (0.02, 0.04)
黄腻苔组	13	0.06 (0.03, 0.09)	0.11±0.08	0.03 (0.02, 0.04)	0.01 (0.00, 0.02)	0.03 (0.00, 0.06)
健康组	10	0.10 (0.04, 0.16)	0.05±0.03 ^{a)}	0.02 (0.01, 0.03)	0.04 (0.02, 0.06)	0.04 (0.01, 0.07)
F/H值		0.83	3.43	1.85	0.36	1.28
P值		0.45	0.05	0.40	0.84	0.53

注：a) 与黄腻苔组比较，P<0.05。

胎儿弯曲杆菌的相对丰度较白腻苔组和健康组显著升高 ($P<0.05$), 见表 4。

为了进一步探究种水平舌苔菌群构成差异, 统计相对丰度予 0.10~0.01 之前的菌种, 白腻苔组生痰二氧化碳噬纤维菌的相对丰度显著高于黄腻苔组和健康组 ($P<0.05$), 健康组中链球菌_sp001587175 的相对丰度显著高于黄腻苔组 ($P<0.05$), 见表 5。

表 4 两组特发性膜性肾病患者及健康组舌苔菌群相对丰度前 10 位的优势菌种丰度比较

Table 4 Comparison of the relative abundance of the top 10 dominant species in the tongue coating microbiome between the two groups of patients with idiopathic membranous nephropathy and the healthy group [$\bar{x}\pm s/M(Q_1, Q_3)$]

组别	例数	产黑色普雷沃菌	齿状芽孢杆菌_D	异戊丁香菌_坦纳拉菌	尿放线杆菌	动物奈瑟氏菌
白腻苔组	11	0.07±0.05	0.07±0.07	0.01 (0.00, 0.02)	0.01 (0.00, 0.02)	0.03±0.03
黄腻苔组	13	0.07±0.05	0.07±0.05	0.02 (0.00, 0.04)	0.01 (0.01, 0.01)	0.03±0.03
健康组	10	0.10±0.06	0.06±0.04	0.01 (0.00, 0.02)	0.01 (0.00, 0.02)	0.03±0.03
F/H 值		1.03	0.07	0.56	2.11	0.05
P 值		0.37	0.93	0.76	0.35	0.95
组别	例数	瓦代纤毛菌_A	蒂蒙氏马西利普雷沃氏菌	小韦荣球菌_A	弯曲杆菌_sp002139875	胎儿弯曲杆菌
白腻苔组	11	0.00 (0.00, 0.00)	0.01 (0.00, 0.02)	0.02 (0.01, 0.03)	0.01 (0.00, 0.02) ^{a)}	0.01 (0.01, 0.01) ^{a)}
黄腻苔组	13	0.01 (0.00, 0.02)	0.02 (0.01, 0.03)	0.01 (0.00, 0.02)	0.04 (0.02, 0.06)	0.03 (0.01, 0.05)
健康组	10	0.01 (0.01, 0.01)	0.02 (0.00, 0.04)	0.03 (0.01, 0.05)	0.03 (0.02, 0.04) ^{a)}	0.01 (0.00, 0.02) ^{a)}
F/H 值		0.23	2.25	3.39	7.86	11.94
P 值		0.89	0.33	0.18	0.02	<0.01

注: a) 与黄腻苔组比较, $P<0.05$ 。

表 5 两组特发性膜性肾病患者及健康组舌苔菌群相对丰度位于 0.1~0.01 之间的差异菌种

Table 5 Differential species with relative abundance between 0.1 and 0.01 [$M(Q_1, Q_3)$]

菌种	白腻苔组	黄腻苔组	健康组	H 值	P 值
生痰二氧化碳噬纤维菌	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00) ^{a)}	0.00 (0.00, 0.00) ^{a)}	12.01	<0.01
链球菌_sp001587175	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.01) ^{b)}	0.01 (0.00, 0.02) ^{a)}	6.88	0.03

注: a) 与白腻苔组比较, $P<0.05$; b) 与健康组比较, $P<0.05$ 。

表 6 两组特发性膜性肾病患者及健康组患者舌苔菌群差异代谢通路丰度比较

Table 6 Comparison of differential metabolic pathways in the tongue coating microbiome between the two groups of patients with idiopathic membranous nephropathy and the healthy group [$\bar{x}\pm s/M(Q_1, Q_3)$]

差异代谢通路途径	白腻苔组	黄腻苔组	健康组	F/H 值	P 值
丙酮酸发酵生成丙酸 I	2022.34±528.30	1860.51±550.50 ^{a)}	2699.34±769.28	5.649	0.008
琥珀酸发酵生成丁酸盐	333.53±273.16	308.91±140.84 ^{a)}	647.13±343.92	5.735	0.008
尿囊素降解 IV (厌氧)	13.08±9.68	17.57 (6.26, 28.87)	24.61±9.28	2.739	0.033
甲苯降解 I (需氧, 通过邻甲酚)	17.47±16.15	11.91 (4.04, 19.77) ^{a)}	48.72±27.96 ^{a) b)}	11.248	0.004
甲苯降解 II (需氧, 通过 4-甲基邻苯二酚)	17.47±16.15	11.91 (4.05, 19.76) ^{a)}	48.72±27.96 ^{a) b)}	11.248	0.004
D-葡萄糖降解 I	1.60 (0.20, 3.00)	2.29 (0.13, 4.70)	8.25 (0.21, 16.71)	6.023	0.049
D-半乳糖醛酸降解 I	1.56 (0.19, 2.93)	2.12 (0.10, 4.35)	7.57 (0.53, 14.59)	6.213	0.045
D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸降解超级途径	1.56 (0.19, 2.93)	2.12 (0.11, 4.35) ^{a)}	7.57 (0.53, 14.59)	6.213	0.045
L-精氨酸降解 II (AST 路径)	1.18 (0.25, 2.11)	1.25 (0.36, 2.14)	3.91 (0.32, 7.51)	6.857	0.033
甲苯降解 IV (需氧, 通过儿茶酚)	0.13 (0.16, 0.41)	0.00 (0.00, 0.00)	1.56 (0.59, 3.36) ^{a) b)}	10.594	0.005
雄烯二酮降解 I (需氧)	0.24 (0.30, 0.79)	0.64 (0.35, 1.62)	4.33 (0.12, 8.54) ^{a) b)}	8.406	0.015
磺酸内酯降解超级途径	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	1.48 (0.17, 3.13) ^{a) b)}	10.508	0.005

注: a) 与白腻苔组比较, $P<0.05$; b) 与黄腻苔组比较, $P<0.05$ 。

的磺酸内酯降解超级途径、雄烯二酮降解 I（需氧）、甲苯降解 IV（需氧，通过儿茶酚）、甲苯降解 II（需氧，通过 4-甲基邻苯二酚）、甲苯降解 I（需氧，通过邻甲酚）通路丰度较健康组显著下调（ $P < 0.05$ ）；黄腻苔组丙酮酸发酵生成丙酸 I 和琥珀酸发酵生成丁酸盐通路丰度较白腻苔组显著下调，而 D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸降解超级通路丰度较白腻苔组显著上调（ $P < 0.05$ ）；白腻苔组甲苯降解 II（需氧）（通过 4-甲基邻苯二酚）、甲苯降解 I（需氧，通过邻甲酚）通路丰度较黄腻苔组显著上调（ $P < 0.05$ ）。

4 讨论

中医理论指导下的辨证施治是治疗 IMN 的基石，舌苔变化是辨治 IMN 的关键要素。察舌苔可分为察苔质、苔色两部分。腻苔的形成多责之痰湿之邪，IMN 患者多脾肾亏虚，湿邪痰浊化生，熏蒸于舌面，发为腻苔。舌苔的黄、白可反映疾病不同的发展阶段，《伤寒论本论》云：“凡苔垢者，色白者为寒，白甚者，寒甚也，……热深入胃，则苔黄”，表明白苔多主表、主寒、主湿，苔色黄与热邪相关。IMN 患者多见脾肾气（阳）亏虚，化生水湿，上承于舌，垢于舌面，故见苔为白色，IMN 疾病进展，湿、痰、瘀邪逐渐化生，日久化热，熏蒸于舌，苔为黄色。

Alpha 多样性分析主要用于评估菌群的丰富度及均匀度。本研究 Alpha 多样性分析结果显示，白腻苔组、黄腻苔组 IMN 患者和健康组受试者舌苔菌群 ACE、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数差异无统计学意义，说明三组间丰富度与均匀度相似。Beta 多样性分析是比较样本间的差异，PCoA 分析和 NMDS 分析是 Beta 多样性分析的常用方法。本研究结果发现，白腻苔组、黄腻苔组和健康组之间的 PCoA 及 NMDS 距离矩阵差异无统计学意义，表明三组间的舌苔菌群无显著差异。

在具体菌群结构变化方面，与健康组比较，白腻苔组和黄腻苔组 IMN 患者舌苔菌群中的卟啉单胞菌属的相对丰度显著减少，卟啉单胞菌属多于温热环境中生存^[13]。IMN 病机之本在于肺、脾、肾三脏失司，化生水湿痰浊，阴邪内生，且 IMN 患者多以脾肾气（阳）亏虚为甚^[6-7]，大多畏寒怕冷，这可能是卟啉单胞菌属相对丰度在 IMN 患者舌苔菌群中下降的原因。与白腻苔组和健康组比较，黄腻苔组弯曲杆菌属、弯曲杆菌_sp002139875 和胎儿弯曲

杆菌明显富集。既往研究^[14-15]表明，黄腻苔患者舌苔群落中弯曲杆菌丰度明显增多，这与本研究结果一致。弯曲杆菌属是微需氧、革兰阴性菌属，胎儿弯曲杆菌和弯曲杆菌_sp002139875 是下属于弯曲杆菌属的菌种。弯曲杆菌是常见的致病菌，通常与胃肠道感染相关^[16-17]，可导致肠道屏障功能的破坏。肠道屏障的破坏可导致肠道内细菌、毒素等物质进入血液循环，引起免疫复合物在肾脏的沉积^[18]。另外，本研究亦显示，与黄腻苔组和健康组比较，白腻苔组生痰二氧化碳噬纤维菌的相对丰度明显升高。生痰二氧化碳噬纤维菌属于条件致病菌，可从牙周病变中分离出来^[19]。生痰二氧化碳噬纤维菌能够通过生物膜形成及调节宿主免疫来逃避免疫系统的监视，强调了生痰二氧化碳噬纤维菌在口腔及全身健康中的重要性^[20-21]，提示 IMN 白腻苔的形成可能与免疫炎症反应相关。

菌群功能预测结果显示，与健康组比较，白腻苔和黄腻苔组 IMN 患者舌苔菌群在磺酸内酯降解、甲苯降解、丙酮酸发酵等多个代谢途径的丰度值显著下调。这些代谢途径涉及有机酸和毒性物质的降解，具有对有害物质代谢处理能力^[22]，以上代谢途径丰度的下调，可能反映了 IMN 患者菌群在应对环境变化时的代谢适应性障碍，为进一步探讨菌群在 IMN 中的潜在病理机制提供了一定的理论依据。本研究结果显示，与白腻苔组比较，黄腻苔组丙酮酸发酵生成丙酸 I 和琥珀酸发酵生成丁酸盐通路丰度显著下调。丙酸盐、丁酸盐是常见的短链脂肪酸（SCFAs），主要由微生物群通过碳水化合物发酵而成^[23]。研究表明，丙酸盐与丁酸盐可以减轻肾脏免疫炎症反应、氧化损伤、纤维化、凋亡等间接保护肾脏^[24-25]。而丙酸盐与丁酸盐的生成减少，可能导致以上功能紊乱，从而加剧肾脏损伤，提示 IMN 黄腻苔的形成可能与丙酸盐和丁酸盐的生成减少有关。与黄腻苔组比较，白腻苔组甲苯降解途径丰度显著上调。甲苯本身对肾脏毒性较少，但其降解过程中的苯酚及其衍生物可能通过诱导氧化应激、细胞凋亡等途径对肾小管细胞具有直接毒性作用^[26-27]。IMN 白腻苔的形成可能与甲苯降解途径的上调有关。

综上所述，IMN 患者舌苔菌群失调，其中卟啉单胞菌属可能成为 IMN 患者的微生物学表征。弯曲杆菌属、弯曲杆菌_sp002139875、胎儿弯曲杆菌可能是 IMN 黄腻苔的标志菌；生痰二氧化碳噬纤维菌可能是 IMN 白腻苔的标志菌种。IMN 的发生可能与

磺酸内酯、雄烯二酮、甲苯降解等多个代谢途径的降解有关。这些舌苔菌群和功能的差异可能是 IMN 发生的原因。本研究所纳入的临床样本量较少, 研究结果代表性不足, 可能会导致一定程度的抽样偏倚, 未来仍需要进一步探索舌苔菌群及其代谢产物改变与 IMN 发病之间的关系。当然, 我们使用的 PICRUSt 利用 16S 标记基因仅能起到大致的代谢作用, 更加准确具体的代谢分析需要依赖更专业的非靶向代谢组学方法。

参考文献

- [1] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(4): S1-S276.
- [2] 刘春风, 刘红, 方艺, 等. 413 例成人特发性膜性肾病 (IMN) 临床及病理分析 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2013, 40(5): 516-522.
- [3] ZHU P, ZHOU FD, WANG SX, et al. Increasing frequency of idiopathic membranous nephropathy in primary glomerular disease: a 10-year renal biopsy study from a single Chinese nephrology centre [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2015, 20(8): 560-566.
- [4] TANG L, YAO J, KONG X, et al. Increasing prevalence of membranous nephropathy in patients with primary glomerular diseases: a cross-sectional study in China [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2017, 22(2): 168-173.
- [5] 陈群, 林雪娟. 舌与五脏六腑相关论 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2006, 12(8): 564-565.
- [6] 刘玉旋, 李平, 梁昌昌, 等. 276 例特发性膜性肾病中医证候分布及其影响因素分析 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(22): 3229-3234.
- [7] 闫蕾, 曾勤, 王新慧, 等. 特发性膜性肾病中医证候文献分析 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2021, 22(3): 234-236.
- [8] CUI J, HOU S, LIU B, et al. Species composition and overall diversity are significantly correlated between the tongue coating and gastric fluid microbiomes in gastritis patients [J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15(1): 60.
- [9] MOHAMMED MMA, KAWAS SA, QADHI GA. Tongue-coating microbiome as a cancer predictor: a scoping review [J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 132: 105271. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105271.
- [10] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 875-885.
- [11] 邹万忠. 肾活检病理学 [M]. 5 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2021: 101-106.
- [12] 李灿东. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 42-49.
- [13] GUILLOUX CA, LAMOUREUX C, BEAURUELLE C, et al. *Porphyromonas*: a neglected potential key genus in human microbiomes [J]. *Anaerobe*, 2021, 68: 102230. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102230.
- [14] 肖金禾, 金信妍, 樊英怡, 等. 哺乳期急性乳腺炎黄腻苔患者舌苔特异性菌群特征研究 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(13): 1150-1155.
- [15] 陈延强, 谢丽萍. 类风湿关节炎湿热痹阻证的舌象与活动性指标关系的研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(6): 1068-1070.
- [16] MOORE JE, CORCORAN D, DOOLEY JS, et al. *Campylobacter* [J]. *Vet Res*, 2005, 36(3): 351-382.
- [17] AWADA B, HINDY JR, CHALFOUN M, et al. Cervical osteomyelitis potentially caused by *Campylobacter fetus* [J]. *J Infect Public Health*, 2021, 14(9): 1233-1236.
- [18] KNAUF F, BREWER JR, FLAVELL RA. Immunity, microbiota and kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(5): 263-274.
- [19] FREDRICKS DN, SCHUBERT MM, MYERSON D. Molecular identification of an invasive gingival bacterial community [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(1): e1-e4.
- [20] DYER JK, PECK MA, REINHARDT RA, et al. HLA-D types and serum IgG responses to *Capnocytophaga* in diabetes and periodontitis [J]. *J Dent Res*, 1997, 76(12): 1825-1832.
- [21] DUQUE C, JOÃO MF, CAMARGO GA, et al. Microbiological, lipid and immunological profiles in children with gingivitis and type 1 diabetes mellitus [J]. *J Appl Oral Sci*, 2017, 25(2): 217-226.
- [22] WANG H, AINIWAER A, SONG Y, et al. Perturbed gut microbiome and fecal and serum metabolomes are associated with chronic kidney disease severity [J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 3.
- [23] ZHANG J, ZHANG H, LIU M, et al. Short-chain fatty acids promote intracellular bactericidal activity in head kidney macrophages from turbot (*scophthalmus maximus* L.) via hypoxia inducible factor-1 α [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 615536. doi: 10.3389/fimmu.2020.615536.
- [24] LI YJ, CHEN X, KWAN TK, et al. Dietary fiber protects against diabetic nephropathy through short-chain fatty acid-mediated activation of G protein-coupled receptors gpr43 and gpr109a [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(6): 1267-1281.
- [25] HUANG W, MAN Y, GAO C, et al. Short-chain fatty

- acids ameliorate diabetic nephropathy via GPR43-mediated inhibition of oxidative stress and NF- κ B signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:4074832. doi: 10.1155/2020/4074832.
- [26] SHIBATA K, HASHIMOTO T, HASUMI K, et al. Potent efficacy of *Stachybotrys microspora* triphenyl phenol-7, a small molecule having anti-inflammatory and antioxidant activities, in a mouse model of acute kidney injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 910:174496. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174496.
- [27] KIKUCHI K, SAIGUSA D, KANEMITSU Y, et al. Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1835.

16S rRNA Full-length Sequencing Study of Tongue Coating Microbiome Characteristics of Yellow and White Greasy Coatings in Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy

LI Yihan, WANG Xinhui, YAN Lei, YU Renhuan

Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091

ABSTRACT **Objective** To explore the characteristics of tongue coating microbiomes of yellow and white greasy coatings in patients with idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods** Twenty-four patients diagnosed with IMN were selected. Thirteen patients with yellow greasy coating were assigned to the yellow greasy group, and eleven patients with white greasy coating were assigned to the white greasy group. Additionally, ten healthy individuals were recruited as a control group. Tongue coating microbiome samples were collected from each group and analyzed using 16S rRNA full-length sequencing. The microbial diversity (Alpha and Beta diversity), community composition, and differences were analyzed. Furthermore, functional prediction of the microbiomes was performed based on the MetaCyc database. **Results** There was no significant difference in Alpha and Beta diversity among the tongue coating microbiomes of the yellow greasy group, white greasy group, and healthy group ($P > 0.05$). Compared to the healthy group, the relative abundance of *Porphyromonas* species was reduced in both the white greasy and yellow greasy groups ($P < 0.05$). The yellow greasy group showed an increased relative abundance of *Campylobacter* species, *Campylobacter_sp002139875*, and *Fetal Campylobacter*, compared to the white greasy and healthy groups. The white greasy group had a higher relative abundance of *Fibrobacteres* species, which are involved in phlegm production, than the other two groups ($P < 0.05$). Functional prediction analysis revealed that, compared to the healthy group, the white greasy and yellow greasy groups showed downregulation in the pathways of sulfonate ester degradation, androstenedione degradation I (aerobic), and toluene degradation ($P < 0.05$). In comparison to the white greasy group, the yellow greasy group showed downregulation in the pathways of pyruvate fermentation to propionate I, succinate fermentation to butyrate, and toluene degradation, while upregulating the superpathway of D-glucuronic acid and D-galacturonic acid degradation ($P < 0.05$). **Conclusion** The tongue coating microbiome in IMN patients is dysregulated, and *Porphyromonas* species may serve as a microbiological marker for IMN. *Campylobacter*, *Campylobacter_sp002139875*, and *Fetal Campylobacter* could be signature bacteria for yellow greasy tongue coating in IMN, while *Fibrobacteres* species associated with phlegm production may be signature bacteria for white greasy tongue coating. **Keywords** idiopathic membranous nephropathy; tongue coating microbiome; tongue diagnosis; white greasy coating; yellow greasy coating

(收稿日期: 2024-11-02; 修回日期: 2024-12-30)

[编辑: 王利芬]