【临床经验】

35 例儿童特应性皮炎患者的皮肤菌群特征与润肤剂治疗研究

万朋杰[1]，李梅云[1]，韦艳霞[2]，陈　戟[1*]
（1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心皮肤科，上海 200127；2. 徐州医科大学病原生物学与免疫学教研室，江苏徐州 221004）

摘要：目的 比较婴儿期和儿童期特应性皮炎（atopic dermatitis，AD）患儿肘窝处皮损与非皮损的菌群差异，并分析润肤剂治疗对轻度儿童期 AD 患儿皮肤菌群的影响。**方法** 采用自身对照研究方法，使用 Illumina MiSeq 测序平台对 AD 患儿皮损与非皮损处、润肤剂治疗前后同一皮损处皮肤表面菌群 16S 核糖体 DNA 基因 V3 ～ V4 区进行高通量测序，比较皮损处与非皮损处以及润肤剂治疗前后的菌群差异。**结果** 共 35 例 AD 患儿纳入研究。与邻近非皮损处的正常皮肤相比，AD 患儿肘窝部皮损葡萄球菌属丰度明显升高，菌群 α 多样性明显下降，两者差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；婴儿期及儿童期 AD 患儿菌群多样性未见明显差异；润肤剂治疗后 1 个月金黄色葡萄球菌由优势菌转变为非优势菌。**结论** 婴儿期及儿童期 AD 患儿皮损处均以葡萄球菌属定植为主，未见随年龄改变而出现的菌群构成差异改变；单纯润肤剂治疗可使轻度 AD 患儿皮损处的金黄色葡萄球菌由优势菌转变为非优势菌。

关键词：特应性皮炎；儿童；菌群失调；润肤剂
中图分类号：R758.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2023）10-1068-07
DOI：10.13683/j.wph.2023.10.009

Study on the characteristics of skin microflora and emollient therapy in pediatric patients with atopic dermatitis

WAN Pengjie[1], LI Meiyun[1], WEI Yanxia[2], CHEN Ji[1*]
（*1. Department of Dermatology, Shanghai Children's Medical Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China; 2. Department of Pathogenic Biology and Immunology/School of Stomatology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China*）

Abstract: ***Objective*** To compare the difference of microbiota between lesions and non-lesions of elbow fossa in children with infantile atopic dermatitis（AD） and childhood AD, and to analyze the effect of emollient therapy on skin microbiota in mild pediatric AD patients. ***Methods*** By using self-control study, Illumina MiSeq sequencing platform was used to sequence the V3—V4 region of 16S ribosome DNA gene on the skin surface of AD children with and without skin lesions, and on the same skin lesion before and after treatment with emollient. The differences of microbiota between skin lesions and non-skin lesions and before and after treatment with emollient were compared. ***Results*** A total of 35 children with AD were included in the study. Compared with the normal skin without skin lesions, the abundance of staphylococci in AD elbow lesions was significantly increased and the α diversity of microbiota decreased significantly（$P<0.05$）, and there was no significant difference between infantile AD and childhood AD. One month after treatment, *Staphylococcus aureus* changed from dominant microbiota to non-dominant microbiota. ***Conclusion*** Staphylococci colonization is the dominant bacteria in the skin lesions of infants with AD and childhood AD, and there is no difference in the composition of microbiota with age, and emollient treatment can change *Staphylococcus aureus* in skin lesions of mild childhood AD patients from dominant microbiota to non-dominant microbiota.

Key words: atopitc dermatitis; children; microbiota dysbiosis; emollient

收稿日期：2022-12-15
作者简介：万朋杰，主治医师，研究方向：儿童特应性皮炎的诊治与皮肤屏障功能研究。
通信作者：陈戟，主任医师，研究方向：小儿过敏性疾病的诊断和治疗。
基金项目：国家自然科学基金青年项目（82203910）；上海交通大学医工交叉研究课题（YG2021QN112）；上海儿童医学中心院级临床研究课题（LY-SCMC2020-05）

特应性皮炎（atopic dermatitis，AD）是儿童常见的慢性复发性炎症性皮肤病，表现为皮肤干燥、慢性湿疹样皮炎和剧烈瘙痒[1]。根据患者年龄可分为婴儿期、儿童期、青少年和成人期以及老年期4个阶段[2]，其中婴儿期发病率最高[3—4]。AD发病机制尚未完全清楚，目前认为主要是遗传性表皮屏障功能障碍与宿主微生物菌群相互作用；屏障功能缺陷与过敏原的暴露导致先天性和适应性免疫应答障碍，从而触发和维持炎症反应状态[5—6]。文献[7]显示，AD患者皮肤表面菌群多样性下降，且皮损处存在金黄色葡萄球菌的定植，并与发病严重程度呈正相关，但AD患儿相关研究较少。本研究拟采用自身对照的方法，分析AD患儿皮损区与邻近非皮损区的皮肤菌群构成差异，进一步探讨儿童AD的发病机制；同时，对轻度儿童期AD患儿仅予以润肤剂治疗干预，采集肘窝皮损处治疗前和治疗1个月后同一部位皮肤菌群样本，以初步探讨润肤剂对皮损菌群的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

纳入2020年10月至2021年10月在上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心皮肤科就诊的AD患儿35例。纳入标准：①符合Williams诊断标准者[8]。②年龄0～12周岁。③有肘窝部位皮损。④入选前12 h被检测部位未使用任何外用制剂，且未沐浴。⑤在入选前1周内受检皮肤表面未涂抹任何抗菌类药物或激素类药物。⑥入选前1个月内未口服过任何抗菌类药物。本研究经上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心伦理委员会批准（SCMCIRB-K2019071-2），所有入组研究对象的监护人均已签署知情同意书。

1.2 研究方法

根据年龄将患儿分为婴儿期（0～＜2周岁）及儿童期（2周岁～＜12周岁）。对儿童期AD患儿使用AD严重程度评分（severity scoring of atopic dermatitis，SCORAD）进行评估，包括病变范围、皮损严重程度和主观评分[9]。由接受过统一培训的儿童皮肤科医生进行皮肤检查，评估病变范围、皮损严重程度并填写。主观评分部分，7岁以下患儿由父母评分，7岁及以上患儿自主评分。SCORAD总分为0～103分，＜25分为轻度，25～50分为中度、＞50分为重度。

收集轻度儿童期AD患儿，予以单纯全身使用富含亚油酸-神经酰胺的润肤剂治疗（一日2次）。治疗前和治疗后1个月，对其肘窝皮损进行样品采集。将无菌脱脂棉签用无菌生理盐水蘸湿，在实验目的区域来回摩擦50次，持续时间大概30 s。除上述患儿，所有其他患儿入选后均进行肘窝处样本采集，采集后标记姓名、编号，并储存于−80 ℃冰箱，然后干冰运送至上海锐翌生物科技有限公司进行检测。

1.3 DNA提取、测序及分析

根据试剂盒说明书抽提总DNA，检测DNA浓度和纯度，利用Thermo NanoDrop 2000紫外微量分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳进行总DNA质量检测。16S核糖体（ribosome，r）DNA扩增选择区域为V3～V4区，使用的通用引物为341F和806R。在通用引物的5'端加上适合Illumina Miseq PE250测序的index序列和接头序列，完成特异性引物的设计。引物方向如下：正向（5'-3'）CCTACGGGRSGCAGCAG（341F）；反向（3'-5'）：GGACTACVVGGGTATCTAATC（806R）。

基于Usearch软件，在97%的一致性水平上对代表性序列进行菌群组成及菌群差异分析，包括分类操作单元聚类分析；α多样性分析（包括Shannon指数、Chao指数、Simpson指数等）；β多样性分析包括主坐标分析（principal coordinates analysis，PCoA）等；采用LEfSe分析法评估每个种属丰度组间差异。

1.4 统计学方法

本研究采用I-Sanger生物信息云平台（http://www.i-sanger.com）R的stats包和python的scipy包进行统计分析。定量变量如符合正态分布，采用均数和标准差表示，组间比较采用*t*检验；如不符合正

态分布，采用中位数和四分位数间距表示，组间比较采用非参数秩和检验。定性变量采用频数和构成比表示，组间比较采用 Fisher 确切概率法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入 AD 患儿 35 例，其中男性 17 例，女性 18 例，中位年龄为 4.8 岁（3 月龄～ 11.9 岁）。婴儿期 AD 患儿 16 例，其中男性 8 例，女性 8 例，中位年龄 6 月（3 月龄～ 1.9 岁）；儿童期 AD 患儿 19 例，其中男性 9 例，女性 10 例，中位年龄 6.5 岁（2.8 岁～ 11.9 岁）。婴儿期 AD 患儿与儿童期 AD 患儿性别比例、年龄等一般资料比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

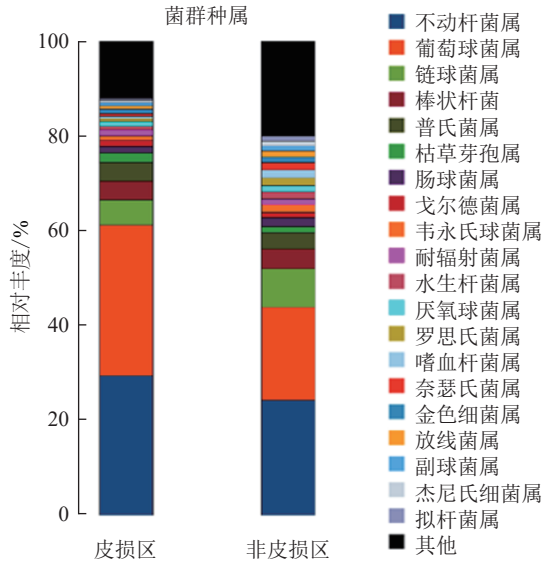


图 1 在属水平上皮损区与非皮损区的菌群分布差异

Figure 1 At the genus level, the difference in the distribution of microbiota between lesion area and non-lesion area

2.2 皮损区与非皮损菌区群差异性分析

与邻近非皮损处相比，AD 患儿皮损处在菌属水平上葡萄球菌属明显增多（图 1）。通过 LEfSe 检验分析 AD 皮损处与非皮损处差异显著性物种，结果提示，AD 皮损处可见菌属水平上葡萄球菌属富集，在菌种水平上主要以沃氏葡萄球菌、松鼠葡萄球菌及马氏葡萄球菌富集明显；而 AD 非皮损处无上述菌种的明显富集。通过 α 多样性分析 AD 皮损处与非皮损处菌群丰富度和多样性，结果显示，α 多样性明显下降（Chao 指数，$P<0.05$），见图 2。β 多样性分析结果显示，AD 皮损处与非皮损处菌落的构成比比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

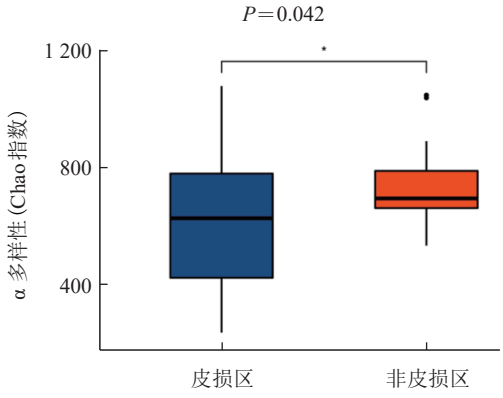


图 2 AD 皮损区与邻近非皮损区 α 多样性的比较

Figure 2 The comparation of α diversity of AD lesion and the ajacent areas

2.3 不同年龄组 AD 患儿菌群差异性分析

婴儿期 AD 患儿与儿童期 AD 患儿的皮损处菌群 α 多样性和 β 多样性比较均无显著性差异；使用秩和检验分析也未见明显差异物种，但使用 LEfSe 检验分析发现金黄色葡萄球菌在婴儿期 AD 组中富集，见图 3。

2.4 儿童期 AD 组皮损治疗前后菌群分析

对 5 例儿童期 AD 患儿润肤剂使用前后经配对 t 检验显示，1 个月后 SCORAD 评分由治疗前的（12.46±1.60）分下降至（7.34±3.93）分，差异有统计学意义（$t=3.802$，$P=0.019$）；未见不良反应发生。虽然治疗前后皮损处的 α 多样性和 β 多样性并未见明显差异，但金黄色葡萄球菌在治疗前属明显优势菌，而治疗后属于非优势菌，见图 4。

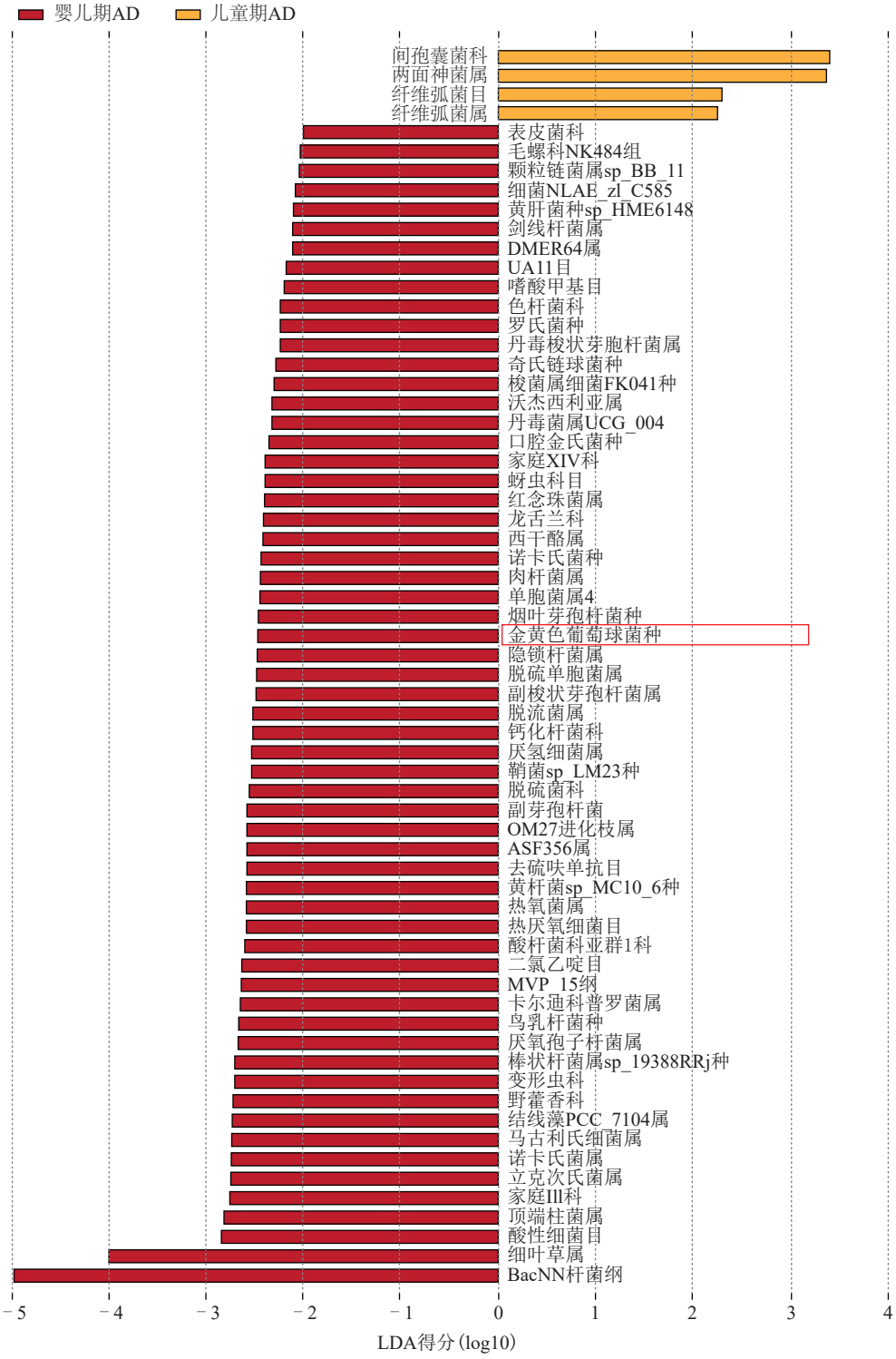


图 3　不同年龄组 AD 患儿菌群分析结果

Figure 3　Microbial analysis results of AD children in different age groups

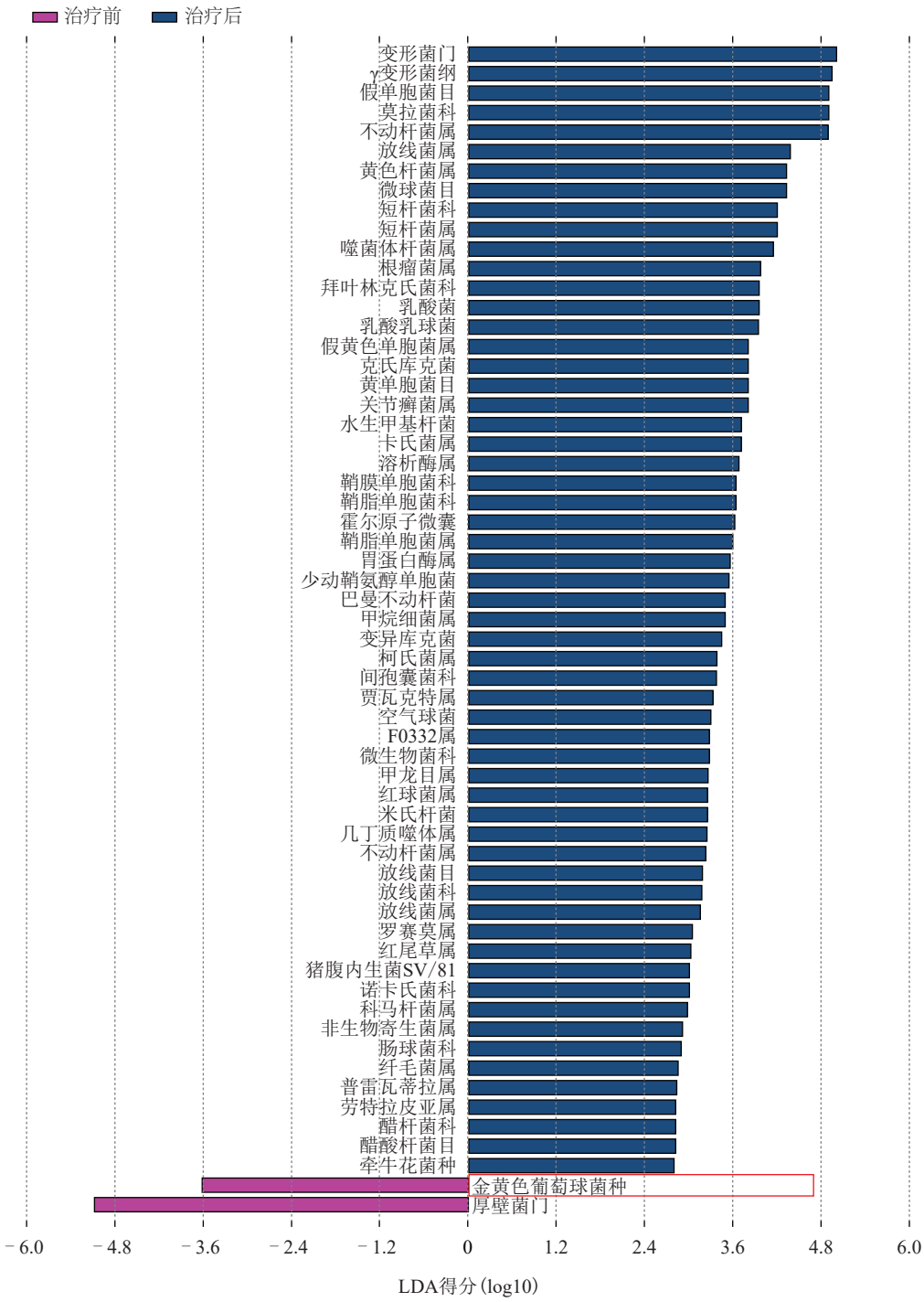


图 4 儿童期 AD 患儿治疗前后菌群分析结果

Figure 4 Microbial analysis results of pediatric AD patients before and after treatment

3 讨论

AD 是儿童皮肤科最常见的具有家族遗传倾向的慢性炎症性复发性皮肤疾病，影响约 30% 的儿童，其中 50% 发展出现哮喘、过敏性鼻炎等的“特应性进程”[10—11]。早在一出生，婴儿的皮肤表面就有大量的微生物定植，这对于婴儿期免疫系统的启动和成熟至关重要。随着对皮肤菌群与 AD 关系的研究不断深入，菌群失调在 AD 发病中的作用越来越受到重视。本研究借助 Illumina Miseq 测序平台对 AD 患儿（包括婴儿期和儿童期）皮损区与邻近非皮损区表面细菌的 16SrDNA 基因 V3 ～ V4 区进行高通量测序，比较其结构差异。

本研究显示，与邻近非皮损区相比，无论婴儿期 AD 患儿还是儿童期 AD 患儿均观察到葡萄球菌属在皮损区明显增多，在婴儿期 AD 患儿皮损处观察到明显的金黄色葡萄球菌富集；AD 皮损处与邻近非皮损处相比，菌群 α 多样性明显下降，这与以往研究观点相一致[12—13]。金黄色葡萄球菌属于葡萄球菌属，作为儿童最常见的皮肤疾病，60%AD 在婴儿出生第 1 年内发病，金黄色葡萄球菌不仅在婴儿 AD 发病时明显增多，在婴儿发病前 2 个月就出现明显增多，而共生菌表皮葡萄球菌出现下降[14]。另有转录组分析表明，金黄色葡萄球菌数量与皮肤屏障基因（与紧密连接形成相关）、某些金属蛋白酶和辅助性 T 细胞（helper T cell，Th）2 通路细胞因子的变化有关[13]。与以往报道不同的是本研究结果显示，沃氏葡萄球菌在上海地区 0 ～ 12 岁轻度 AD 患儿中富集，而以往未见类似情况报道。沃氏葡萄球菌是存在于人体皮肤的革兰阳性葡萄球菌，属于皮肤共生菌的一种，并可通过产生耐甲氧西林金黄色葡萄球菌群体感应肽抑制剂保护皮肤免受特应性或坏死性损伤[15]，这可能与本研究所纳入 AD 患儿年龄分布在 0 ～ 12 岁有关，也可能与所收集的皮损处 AD 病变程度不等有关；提示在今后的研究中应进一步扩大样本量，且依据疾病严重程度进行分层分析。

润肤剂是公认的 AD 基础治疗。对于 AD 发生前已有经皮水丢失增加且具有特应性家族史的高危患儿，早期持续性预防性使用润肤剂能延缓 AD 的发生[16]。对于轻度 AD 患者，润肤剂单用或与外用药物联合使用均可起到良好的治疗作用。研究表明，完整的皮肤屏障功能可减少金黄色葡萄球菌的定植，而金黄色葡萄球菌的定植又可导致表皮屏障功能的破坏，加剧 Th2 为主的免疫反应[17]。外用润肤剂可改善患者的皮肤屏障功能及 AD 症状，减少金黄色葡萄球菌的定植，恢复皮肤的微生物多样性，但此类研究多集中在成年 AD 患者[18—19]，AD 患儿相关研究甚少。Glatz 等[20] 研究有特应性家族史的 6 月龄婴儿皮肤屏障参数、AD 发病和细菌 16SrRNA 基因序列，确定润肤剂的使用可以作为易患 AD 儿童的预防措施。在一项随机双盲对照研究中，对 60 例中度 AD 成年患者随机使用含有非致病细菌生物量的丝状玻璃体（产品 A）和其他润肤剂（产品 B）进行为期 1 个月的临床观察，发现使用产品 A 可显著改善患者临床症状并恢复微生物菌群多样性；不同的润肤剂对皮肤有不同的作用，仅部分类型的润肤剂具有改善皮肤屏障、防止刺激物引发皮疹加重的能力[21]。以往研究表明，富含亚油酸 - 神经酰胺的润肤剂能减轻卡泊三醇诱导的 AD 模型小鼠的皮肤炎症，修护皮肤屏障，但对于 AD 患儿皮损的影响未见相关报道[22]。本研究显示，5 例轻度 AD 患儿富含亚油酸 - 神经酰胺的润肤剂治疗 1 个月后，SCORAD 评分明显下降，金黄色葡萄球菌由治疗前的优势菌转变为非优势菌，这与既往研究相一致，说明润肤剂的应用能帮助减少金黄色葡萄球菌的定植，恢复皮肤菌群的多样性。但因受当时新型冠状病毒肺炎疫情影响，收集到的样本极其有限，统计学上同一皮损治疗前后其 α 多样性和 β 多样性并未见明显差异，需要进一步增加样本量进行深入研究。

4 结论

总之，笔者观察到婴儿期 AD 和儿童期 AD 患儿皮损均存在葡萄球菌属的明显增加，并伴有菌群多样性下降；短期（1 个月）单用润肤剂治疗轻度儿

童期AD患儿耐受性好，可使得金黄色葡萄球菌由优势菌转为非优势菌，需要进一步增加样本量进行深入探讨。

致谢：感谢上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心程颖、刘晓依、何欢、陈琢医生在病例收集中给予的支持帮助。

参考文献：

[1] Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis[J]. Lancet, 2020, 396(10247): 345-360.

[2] 中华医学会皮肤性病学分会免疫学组, 特应性皮炎协作研究中心. 中国特应性皮炎诊疗指南(2020版)[J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(2): 81-88.

[3] Guo Y, Li P, Tang J, *et al*. Prevalence of atopic dermatitis in Chinese children aged 1—7 ys[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29751.

[4] Drucker AM, Wang AR, Li WQ, *et al*. The burden of atopic dermatitis: summary of a report for the National Eczema Association[J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(1): 26-30.

[5] Stander S. Atopic dermatitis[J]. N Engl J Med, 2021, 384(12): 1136-1143.

[6] Darlenski R, Kozyrskyj AL, Fluhr JW, *et al*. Association between barrier impairment and skin microbiota in atopic dermatitis from a global perspective: unmet needs and open questions[J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 148(6): 1387-1393.

[7] Wan P, Chen J. A Calm, dispassionate look at skin microbiota in atopic dermatitis: an integrative literature review[J]. Dermatol Ther(Heidelb), 2020, 10(1): 53-61.

[8] Williams HC, Jburney PG, Pembroke AC, *et al*. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for atopic dermatitis. Ⅲ. Independent hospital validation[J]. Br J Dermatol, 1994, 131(3): 406-416.

[9] None. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus report of the European Task Force on atopic dermatitis[J]. Dermatology, 1993, 186(1): 23-31.

[10] Bieber T. Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(1): 21-40.

[11] Zhong Y, Samuel M, van Bever H, *et al*. Emollients in infancy to prevent atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Allergy, 2022, 77(6): 1685-1699.

[12] Van Mierlo MMF, Pardo LM, Fieten KB, *et al*. The skin and nose microbiome and its association with *filaggrin* gene mutations in pediatric atopic dermatitis[J]. Dermatology, 2022, 238(5): 928-938.

[13] Fyhrquist N, Muirhead G, Prast-Nielsen S, *et al*. Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4703.

[14] Meylan P, Lang C, Mermoud S, *et al*. Skin colonization by staphylococcus aureus precedes the clinical diagnosis of atopic dermatitis in infancy[J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(12): 2497-2504.

[15] Severn MM, Cho YK, Manzer HS, *et al*. The commensal staphylococcus warneri makes peptide inhibitors of MRSA quorum sensing that protect skin from atopic or necrotic damage[J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(12): 3349-3352.

[16] Elias PM. Optimizing emollient therapy for skin barrier repair in atopic dermatitis[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2022, 128(5): 505-511.

[17] Ahn K, Kim BE, Kim J, *et al*. Recent advances in atopic dermatitis[J]. Curr Opin Immunol, 2020, 66: 14-21.

[18] Seite S, Flores GE, Henley JB, *et al*. Microbiome of affected and unaffected skin of patients with atopic dermatitis before and after emollient treatment[J]. J Drugs Dermatol, 2014, 13(11): 1365-1372.

[19] Lynde CW, Andriessen A, Bertucci V, *et al*. The skin microbiome in atopic dermatitis and its relationship to emollients[J]. J Cutan Med Surg, 2016, 20(1): 21-28.

[20] Glatz M, Jo JH, Kennedy EA, *et al*. Emollient use alters skin barrier and microbes in infants at risk for developing atopic dermatitis[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192443.

[21] Danby SG, Andrew PV, Taylor RN, *et al*. Different types of emollient cream exhibit diverse physiological effects on the skin barrier in adults with atopic dermatitis[J]. Clin Exp Dermatol, 2022, 47(6): 1154-1164.

[22] 王孝盼, 权晟, 陈利红, 等. 富含亚油酸-神经酰胺的润肤剂在特应性皮炎鼠模型中的作用研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(11): 647-650.

(编辑：王 佳)