

· 论 著 ·

新型冠状病毒肺炎后肺间质纤维化与口咽部菌群失衡的相关性

陈玉¹ 周欣佑² 蔡昀朴² 章从恩³ 聂秀红¹

【摘要】目的 探索口咽部菌群失衡在新型冠状病毒肺炎后肺间质纤维化(PCPF)发生与发展中的作用及潜在机制。**方法** 采用横断面病例对照研究,选择2022年12月至2023年5月因新型冠状病毒肺炎(COVID-19)于首都医科大学宣武医院住院治疗并完成出院后2年随访的康复患者为研究对象。根据随访时高分辨率计算机断层扫描影像学表现,将患者分为纤维化组和非纤维化组。Mann-Whitney *U*检验比较两组患者口咽部微生物菌群 α 多样性;采用非度量多维尺度分析(NMDS)与主坐标分析(PCoA)评估两组菌群 β 多样性;以Benjamini-Hochberg法进行FDR校正分析门、属、种的丰度差异,并采用Spearman秩相关分析其与临床症状及运动耐量间的相关性。**结果** 共纳入83例患者,其中纤维化组43例,非纤维化组40例。随访2年时,纤维化组患者出现更多的呼吸道症状,mMRC评分($U=676.0, P=0.008$)、BCSS评分($U=625.0, P=0.029$)、CAT评分($t=2.127, P=0.036$)和CET评分($U=538.5, P=0.002$)均显著高于非纤维化组,但6 min步行距离(6MWD)更短($U=598.5, P=0.017$)。微生物组分析显示,纤维化组患者口咽微生物 α 多样性显著升高(Chao1指数: $U=580.5, P=0.010$; Shannon指数: $U=557.0, P=0.005$; Simpson指数: $U=513.0, P=0.001$; Faith系统发育多样性指数: $U=579.0, P=0.010$; Simpson e指数: $U=577.0, P=0.010$; Heip e均匀度指数: $U=529.0, P=0.035$)。 β 多样性分析显示两组患者菌群结构明显分离。菌群分类学分析显示,纤维化组患者普雷沃菌属($U=358.0, P<0.001$)、韦荣菌属($U=418.0, P<0.001$)及链球菌属($U=538.0, P=0.003$)等潜在促炎性菌群相对丰度较非纤维化组患者显著增加,而奈瑟菌属($U=226.0, P<0.001$)显著减少。部分差异显著菌种如*Streptococcus parasanguinis*丰度与mMRC评分($r=0.24, P=0.04$)和CAT评分($r=0.27, P=0.02$)呈正相关;*Fusobacterium C_periodonticum D*的丰度与CAT评分($r=-0.30, P<0.001$)和Warrick评分($r=-0.26, P=0.02$)均呈负相关,而与6MWD($r=0.26, P=0.02$)呈正相关;*Veillonella A rogosa*及*Streptococcus infantis*均与Warrick评分呈负相关($r=-0.30, P<0.01, r=-0.28, P=0.01$),均具有统计学意义。**结论** PCPF患者存在持续的口咽部菌群失衡,其特征与临床症状及功能受损密切相关。口咽微生物可能成为PCPF风险评估的潜在非侵入性生物标志物及新型治疗靶点。

【关键词】 肺间质纤维化; 新型冠状病毒; 口咽微生物组; 菌群失衡; 16S rRNA基因测序

Correlation between pulmonary interstitial fibrosis and oral-pharyngeal microbial dysbiosis in patients with post-coronavirus disease 2019 Chen Yu¹, Zhou Xinyou², Cai Yunpu², Zhang Congen³, Nie Xiuhong¹. ¹Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Xuanwu Hospital Capital Medical University, 100053 Beijing, China; ²Capital Medical University, 100069 Beijing, China; ³Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University, 100050 Beijing, China
Corresponding author: Nie Xiuhong, Email: xiuhongnie@126.com.

【Abstract】Objective To investigate the role and potential mechanisms of oropharyngeal microbiota dysbiosis in the development and progression of post-coronavirus disease 2019 (COVID-19) pulmonary fibrosis (PCPF). **Methods** A cross-sectional case-control study was conducted, enrolling recovered patients

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2026.03.001

基金项目: 2025年首都医科大学临床本科科研创新项目(No. XSKY2025365)

作者单位: 100053 北京, 首都医科大学宣武医院呼吸与危重症医学科¹; 100069 北京, 首都医科大学²; 100050 北京, 首都医科大学附属北京友谊医院药学部³

通信作者: 聂秀红, Email: xiuhongnie@126.com

who had been hospitalized for COVID-19 in Xuanwu Hospital, Capital Medical University, from December 2022 to May 2023, and had completed a 2-year follow-up after discharge. According to high-resolution computed tomography findings during follow-up, patients were classified into fibrosis group and non-fibrosis group. The α -diversity of the oropharyngeal microbiota between the two groups were compared by Mann-Whitney U test; β -diversity was assessed by non-metric multidimensional scaling (NMDS) and principal coordinates analysis (PCoA). Differences in taxonomic abundance at the phylum, genus and species levels were analyzed by Benjamini-Hochberg method with false discovery rate (FDR) correction. Spearman's rank correlation was applied to evaluate the associations between microbial taxa and clinical symptoms as well as exercise capacity. **Results** Total of 83 patients were enrolled, 43 cases in fibrosis group and 40 cases in non-fibrosis group. During the 2-year follow-up, patients in fibrosis group had more respiratory symptoms and anxiety. Patients in fibrosis group showed significantly higher scores than non-fibrosis group in mMRC scale ($U = 676.0$, $P = 0.008$), BCSS score ($U = 625.0$, $P = 0.029$), CAT score ($t = 2.127$, $P = 0.036$), CET score ($U = 538.5$, $P = 0.002$) and Hamilton Anxiety Rating Scale score ($U = 634.0$, $P = 0.039$). The 6-minute walking distance of patients in fibrosis group was shorter ($U = 598.5$, $P = 0.017$). Microbiome analysis revealed significantly elevated α -diversity of oropharyngeal microbiota in fibrosis group (Chao1 index: $U = 580.5$, $P = 0.010$; Shannon index: $U = 557.0$, $P = 0.005$; Simpson index: $U = 513.0$, $P = 0.001$; Faith's phylogenetic diversity: $U = 579.0$, $P = 0.010$; Simpson's evenness index: $U = 577.0$, $P = 0.010$; Heip's evenness index: $U = 529.0$, $P = 0.035$). β -diversity analysis showed distinct separation of microbial community structure between the two groups. Taxonomic analysis demonstrated that the relative abundances of potential pro-inflammatory taxa, including *Prevotella* ($U = 358.0$, $P < 0.001$), *Veillonella* ($U = 418.0$, $P < 0.001$) and *Streptococcus* ($U = 538.0$, $P = 0.003$), were significantly increased in fibrosis group, whereas *Neisseria* ($U = 226.0$, $P < 0.001$) was markedly decreased. Correlation analysis indicated that the abundance of *Streptococcus parasanguinis* was positively associated with mMRC ($r = 0.24$, $P = 0.04$) and CAT ($r = 0.27$, $P = 0.02$). In contrast, *Fusobacterium periodonticum* abundance was negatively correlated with CAT ($r = -0.30$, $P < 0.01$) and Warrick score ($r = -0.26$, $P = 0.02$), but positively correlated with 6MWD ($r = 0.26$, $P = 0.02$). Furthermore, *Veillonella rogosae* and *Streptococcus infantis* were both significantly negatively correlated with Warrick score ($r = -0.30$, $P < 0.01$; $r = -0.28$, $P = 0.01$). **Conclusions** Patients with post-COVID-19 pulmonary fibrosis exhibited persistent oropharyngeal microbial dysbiosis, which is closely associated with clinical symptoms and functional impairment. The oropharyngeal microbiome might serve as a potential non-invasive biomarker for risk assessment and a novel therapeutic target for post-COVID-19 pulmonary fibrosis.

【Key words】 Pulmonary fibrosis; Coronavirus disease 2019; Oropharyngeal microbiome; Microbial dysbiosis; 16S rRNA gene sequencing

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 后肺间质纤维化 (post-COVID-19 pulmonary fibrosis, PCPF) 是 COVID-19 患者急性期康复后出现的一种严重并发症, 可引起呼吸功能损害及长期呼吸道症状, 严重影响患者的生活质量和远期预后^[1]。Han 等^[2] 从 COVID-19 住院患者出院后 2 年随访的胸部 CT 发现, 39% 患者存在肺部异常, 其中 23% 表现为纤维化样改变 (结构扭曲伴牵拉性支气管扩张或蜂窝状改变), 16% 表现为非纤维化改变, 如磨玻璃影或网状结构异常。另外一项荟萃分析综合 618 篇文献得出 PCPF 患病率高达 44.9%^[3]。

新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 导致 II 型肺泡上皮反复损伤为 PCPF 启动事件^[4]。感染诱发的转化生长因子- β , 白细胞介素 (interleukin, IL) -4、IL-6 和 IL-13 等细胞因子的分泌, 推动 PCPF 的发生和发展^[5]。同时, 既往研究还发现上皮间质转化、氧化应激、宿主免疫失调等也参与 PCPF 的发病过程中^[6-7], 但具体发病机制目前仍不明确。

近年来, 人类微生物组在调节宿主免疫稳态及慢性炎症性疾病中的作用受到广泛关注^[8]。

“肠-肺轴”这一概念揭示了肠道微生物可通过免

疫和炎症通路影响呼吸系统疾病的发生发展,既往研究证实肠道菌群变化与急性COVID-19的疾病严重程度密切相关^[9]。然而,相较于肠道微生态,口咽部这一直接参与呼吸道防御的关键生态位在PCPF中的作用仍缺乏系统性研究。

口咽部是SARS-CoV-2的主要入侵门户,也是整合吸入病原、定植微生物群和宿主免疫反应的重要免疫界面。咽部菌群可调节局部黏膜免疫,并通过微量误吸影响下呼吸道微环境^[10]。有研究发现,在COVID-19急性期,患者口咽微生物组稳态被打破,且这种失衡状态在病毒清除后持续存在,提示口咽菌群可能在PCPF发生和发展过程中发挥重要作用^[11]。因此,本研究对COVID-19患者康复出院2年后的口咽微生物组进行系统分析,明确PCPF患者的口咽部微生物组特征,以期为PCPF的早期诊断和临床干预提供新的理论依据,现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

本研究为横断面病例对照研究,纳入2022年12月至2023年5月因COVID-19于首都医科大学宣武医院住院治疗并完成出院后2年随访的患者,COVID-19诊断及分型依据《新型冠状病毒感染诊疗方案(试行第十版)》^[12]。因SARS-CoV-2感染住院患者共1 305例,住院期间死亡140例,剔除符合排除标准的619例(其中大多数为入院前已确诊或影像学提示存在基础肺间质病变或其他慢性肺部疾病,或无可用胸部影像学以排除上述基础病变),342例拒绝随访(含因行动不便无法来院复查者),最终完成2年随访204例,其中资料完整者152例,筛选出43例PCPF患者入纤维化组。选择同期住院、病情程度相似但在2年后肺内病灶完全吸收的COVID-19患者作为对照(非纤维化组),旨在控制急性期病情的混杂影响,最大限度减少选择偏倚。

纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②符合COVID-19诊断标准且住院资料完整。③2年随访时完成了检查及问卷评分。排除标准:①既往患有间质性肺病或其他慢性肺部疾病者;②活动性恶性肿瘤;③长期使用免疫抑制剂或抗纤维化药物。④采样前4周内急性呼吸道感染或口腔炎症性疾病(如急性咽喉炎、牙周脓肿)者;⑤近2周内接受过口腔侵入

性治疗或使用过抗菌药物、益生菌者。

本研究经首都医科大学宣武医院伦理委员会批准(审批号:2025-042-001),所有样品采集及资料调查均取得患者的知情同意并签字确认。

二、研究方法

1. 收集基线资料:从电子病历系统收集急性感染期COVID-19患者年龄、性别、身体质量指数(body mass index, BMI)、是否吸烟、合并症、急性期临床症状、病情严重程度和治疗情况等。

2. 随访资料收集:患者出院2年随访时,所有受试者均接受问卷调查、活动耐力测定,高分辨率计算机断层扫描(high-resolution computed tomography, HRCT)及口咽拭子采样。

3. 影像学评估:入组患者住院期间均出现肺部病毒性肺炎的影像特征。出院2年随访时,所有患者行HRCT(德国西门子公司生产的64层CT扫描仪,层厚0.625 mm)。设盲后由两名放射科医师独立判读,采用Warrick评分系统进行半定量评估。Warrick评分包括病变类型(磨玻璃影、胸膜不规则、小叶间隔或胸膜下线样增厚、蜂窝影、胸膜下气囊:1~5分)及受累范围(1~3段:1分、4~9段:2分、>9段:3分),总分0~30分, ≥ 7 分定义为PCPF^[13]。

4. 口咽拭子采集与测序:随访患者清水漱口后,使用一次性无菌棉签采集口咽拭子,样本即刻保存于 -80°C 冰箱。

使用VAMNE Stool/Soil DNA Extraction Kit试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,中国)提取总微生物基因组DNA。提取的DNA浓度通过Qubit™ 3.0荧光计(Invitrogen™,赛默飞世尔科技公司,美国)和Qubit™ dsDNA HS Assay Kit(Invitrogen™,赛默飞世尔科技公司,美国)进行定量,并通过琼脂糖凝胶电泳(使用西班牙进口琼脂糖及EB红色荧光核酸染料,青岛拓邦生物科技有限公司,中国)评估其完整性。

采用多重PCR技术构建靶向16S rRNA基因全长(覆盖V1~V9区)的测序文库。本研究所用16S全长扩增引物(27F和1492R)参考Guo等^[14]所采用的引物体系,并由苏州泓迅生物科技股份有限公司(中国)合成。PCR扩增产物经纯化及连接步骤后,最终文库质量通过Agilent 2100 Bioanalyzer系统(安捷伦科技公司,美国)配合High Sensitivity DNA Kit(安捷伦科技公司,美国)进行确认。

高保真循环共识测序产生的测序读段,经QIIME2生物信息学分析平台的DADA2插件进行去噪和质控处理,最终生成高质量的扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)。所得ASVs丰度表用于后续的微生物组分析。

三、统计学处理

采用SPSS 26.0软件对研究数据进行统计学分析。计数资料(性别、吸烟、合并高血压、合并糖尿病、合并冠心病,有无抗病毒治疗,重-危重病例,高浓度氧疗)以例(%)表示,采用Pearson卡方检验。符合正态分布的计量资料,如慢性阻塞性肺疾病评估测试(chronic obstructive pulmonary disease assessment test, CAT)评分以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。年龄、BMI、住院时长、改良医学研究委员会呼吸困难量表(modified Medical Research Council dyspnea scale, mMRC)评分,气短、咯嗽和痰量综合量表(breathlessness, cough and sputum scale, BCSS)评分、咳嗽评估测试(cough evaluation test, CET)评分以及6分钟步行距离(6-minute walk distance, 6MWD)评分均呈非正态分布,以中位数(四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。微生物组数据分析中, α 多样性指标包括Shannon指数、Simpson指数、Simpson e 指数、Chao1指数和Faith系统发育多样性(Faith's PD)指数,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。 β 多样性基于Bray-Curtis(或

UniFrac)距离构建距离矩阵。采用PERMANOVA评估组间群落结构差异,差异丰度分析使用Benjamini-Hochberg法进行FDR校正。Spearman秩相关用于评估微生物特征与临床变量的相关性。以 P 值(或经FDR校正的 q 值) < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、纤维化组和非纤维化组 COVID-19 患者基线资料

1. 基线资料:纤维化组和非纤维化组 COVID-19患者年龄、性别、BMI和吸烟史等基线人口学特征,以及急性期相关临床特征如合并高血压、糖尿病、冠心病,入院前发热占比、入院前症状天数、入院时Warrick评分、给予激素或抗病毒治疗、重-危重病患者比例、高浓度氧疗和住院时长等差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表1,提示两组患者基线特征具有良好可比性。

2. 随访资料:2年随访时,纤维化组 COVID-19患者mMRC评分($U = 676.0$ 、 $P = 0.008$)、BCSS评分($U = 625.0$ 、 $P = 0.029$)、CAT评分($t = 2.127$ 、 $P = 0.036$)、CET评分($U = 538.5$ 、 $P = 0.002$)和HRCT的Warrick评分($U = 0.055$ 、 $P < 0.001$)均显著高于非纤维化组患者,而6MWD显著缩短($U = 598.5$ 、 $P = 0.017$),差异均有统计学意义,

表1 纤维化组和非纤维化组 COVID-19 患者基线资料

基线资料	纤维化组 (43 例)	非纤维化组 (40 例)	统计量	P 值
年龄 [$M(P_{25}, P_{75})$, 岁]	67.00 (62.00, 69.00)	62.50 (49.50, 69.75)	$U = 676.0^a$	0.093
男性 [例 (%)]	30 (69.77)	21 (52.5)	$\chi^2 = 2.608^b$	0.106
BMI [$M(P_{25}, P_{75})$, kg/m^2]	26.44 (24.56, 29.06)	25.95 (22.96, 27.76)	$U = 662.0^a$	0.071
吸烟 [例 (%)]	12 (27.91)	8 (20.00)	$\chi^2 = 0.708^b$	0.400
高血压 [例 (%)]	32 (74.41)	22 (55.00)	$\chi^2 = 3.438^b$	0.064
糖尿病 [例 (%)]	21 (48.84)	12 (30.00)	$\chi^2 = 3.070^b$	0.080
冠心病 [例 (%)]	20 (46.51)	11 (27.50)	$\chi^2 = 3.201^b$	0.074
入院前发热 [例 (%)]	35 (81.40)	34 (85.00)	$\chi^2 = 1.424^b$	0.233
入院前症状天数 [$M(P_{25}, P_{75})$, d]	5.00 (3.00, 6.00)	5.00 (4.00, 6.00)	$U = 829.5^a$	0.778
入院时 Warrick 评分 [$M(P_{25}, P_{75})$]	3.00 (2.00, 3.00)	3.00 (2.00, 4.00)	$U = 676.5^a$	0.078
激素治疗 [例 (%)]	36 (83.72)	32 (80.00)	$\chi^2 = 0.194^b$	0.660
抗病毒治疗 [例 (%)]	24 (55.81)	23 (57.50)	$\chi^2 = 0.024^b$	0.877
重-危重度病例 [例 (%)]	25 (58.14)	16 (40.00)	$\chi^2 = 2.728^b$	0.099
高浓度氧疗 ($\text{Fio}_2 \geq 50$) [例 (%)]	10 (23.26)	5 (12.50)	$\chi^2 = 1.619^b$	0.203
住院时长 [$M(P_{25}, P_{75})$, d]	15.00 (11.00, 21.00)	12.00 (8.00, 18.00)	$U = 650.0^a$	0.055

注: ^a 为 Mann-Whitney U 检验, ^b 为 Pearson 卡方检验

见表2。

二、纤维化组和非纤维化组 COVID-19 患者口咽微生物菌群

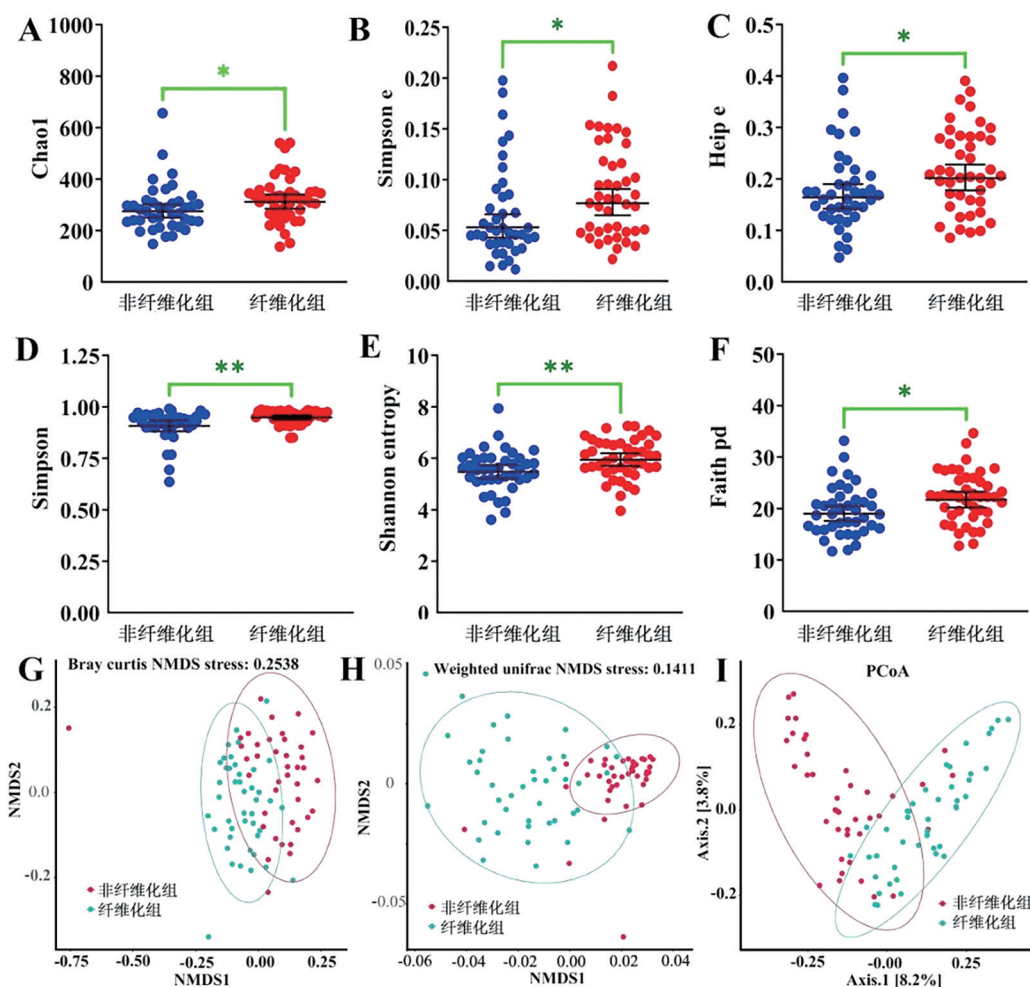
口咽微生物组 α 多样性分析显示,纤维化组患者样本内微生物多样性及丰度均显著高于非纤维化组患者(图1A~F):Chao1丰度指数显著增加

($U = 580.5$ 、 $P = 0.010$),Shannon和Simpson指数均显著升高($U = 557.0$ 、 $P = 0.005$, $U = 513.0$ 、 $P = 0.001$),且其Faith系统发育多样性指数显著升高($U = 579.0$ 、 $P = 0.010$);另外,PCPF患者Simpson e均匀度指数和Heip e均匀度指数均高于非纤维化组患者($U = 577.0$ 、 $P = 0.010$, $U = 529.0$ 、

表2 纤维化组和非纤维化组 COVID-19 患者随访资料

临床参数	纤维化组 (43 例)	非纤维化组 (40 例)	统计量	P 值
mMRC 评分 [$M (P_{25}, P_{75})$]	1 (1, 2)	1 (0, 2)	$U = 676.000^a$	0.008
BCSS 评分 [$M (P_{25}, P_{75})$]	3 (1, 4)	2 (1, 2)	$U = 625.000^a$	0.029
CAT 评分 ($\bar{x} \pm s$)	11.14 ± 5.48	8.55 ± 5.6	$t = 2.127$	0.036
CET 评分 [$M (P_{25}, P_{75})$]	7 (5, 8)	5 (5, 6)	$U = 538.500^a$	0.002
6MWD [$M (P_{25}, P_{75})$, min]	410 (365, 465)	450 (187, 540)	$U = 598.500^a$	0.017
Warrick 评分 [$M (P_{25}, P_{75})$]	9 (7, 14)	0 (0, 3)	$U = 0.055^a$	< 0.001

注:^a为 Mann-Whitney U 检验,^b为独立样本 t 检验。mMRC 评分:改良医学研究委员会呼吸困难量表评分、BCSS 评分:气短、咳嗽和痰量综合量表评分、CAT 评分:慢性阻塞性肺疾病评估测试评分、CET 评分:咳嗽评估测试评分、6MWD:6 分钟步行距离



注:图A~F为COVID-19康复患者有/无肺间质纤维化者口咽微生物群的 α 多样性指标,A为Chao1指数、B为Simpson均匀度、C为Heip均匀度、D为Simpson指数、E为Shannon entropy指数、F为Faith系统发育多样性指数。图G~I为基于 β 多样性排序的样本间群落结构比较,G为基于Bray-Curtis不相似性的NMDS、H为基于加权UniFrac距离的NMDS、I为主坐标分析(PCoA)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

图1 纤维化组和非纤维化组 COVID-19 患者口咽微生物菌群分析

$P = 0.035$), 差异均有统计学意义。

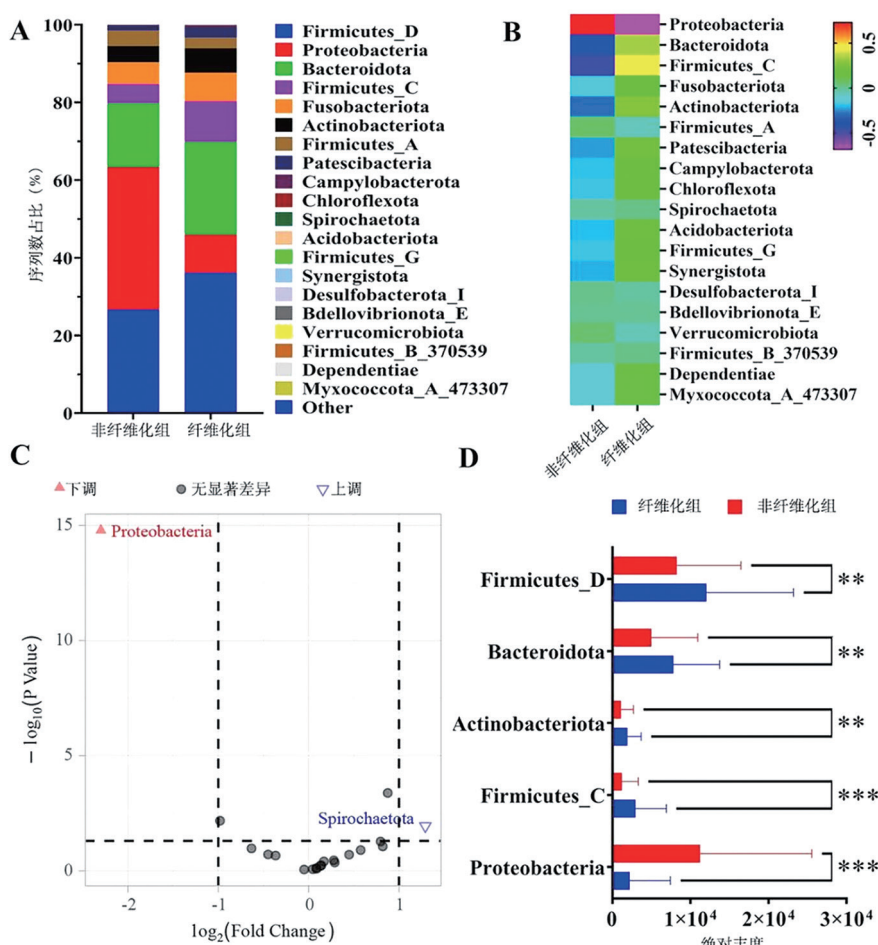
β 多样性分析显示, 无论基于Bray-Curtis不相似性和加权UniFrac距离的非度量多维标度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS), 还是主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA), 两组患者整体菌群结构存在明显分离(图1 G~I)。

三、PCPF 患者口咽部菌群分类学特征

为明确导致PCPF患者菌群失衡的分类学特征, 多层级的菌群组成结果显示, 在门水平, PCPF患者菌群组成存在显著偏移(图2)。较非纤维化组COVID-19患者, PCPF患者变形菌门(Proteobacteria)相对丰度显著降低($U = 191.0$ 、 $P < 0.001$), 而放线菌门(Actinobacteriota)和拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门部分亚

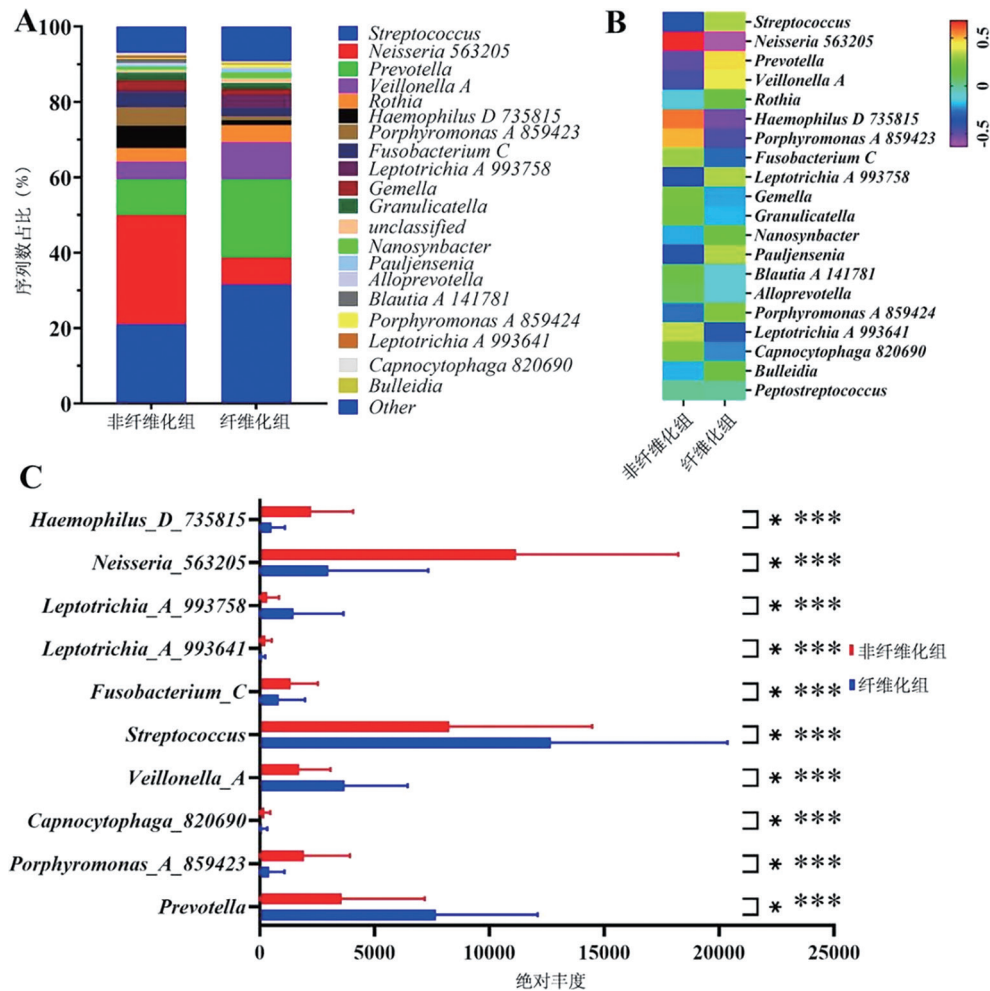
群(Firmicutes C、Firmicutes D)相对丰度显著升高, 差异有统计意义($U = 523.0$ 、 $P = 0.002$, $U = 531.0$ 、 $P = 0.002$, $U = 392.0$ 、 $P < 0.001$, $U = 561.0$ 、 $P = 0.006$)。

在属水平(图3), PCPF患者共鉴定出121个细菌属, 其中27个属的相对丰度较非纤维化组COVID-19患者差异具有统计学意义(经FDR校正的 $q < 0.05$)。PCPF患者菌群为潜在促炎性菌属, 如链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、韦荣球菌属(*Veillonella*)及纤毛菌属(*Leptotrichia*)显著富集($U = 538.0$ 、 $P = 0.003$; $U = 358.0$ 、 $P < 0.001$, $U = 418.0$ 、 $P < 0.001$, $U = 356.0$ 、 $P < 0.001$)。相反, 通常被认为属于健康口腔微生物组的菌属, 如卡氏噬毛单胞菌属(*Capnocytophaga*)和奈瑟菌属



注: A 为门水平相对丰度的堆叠条形图, 显示样本中整体群落组成模式; B 为基于微生物谱相似性对样本进行层次聚类的门水平相对丰度热图; C 为 DESeq2 火山图显示纤维化组与非纤维化组患者间差异丰度的门类; D 为柱状图比较各组间选定菌门的绝对数量分析。 $^*P < 0.05$ 、 $^{**}P < 0.01$ 、 $^{***}P < 0.001$

图2 PCPF 患者门水平微生物群组成及差异



注：A为属水平相对丰度的堆叠条形图，显示样本中整体群落组成模式；B为基于微生物谱相似性对样本进行层次聚类的属水平相对丰度热图；C为柱状图比较各组间选定菌属的绝对数量分析。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

图3 PCPF患者属水平微生物群组成及差异

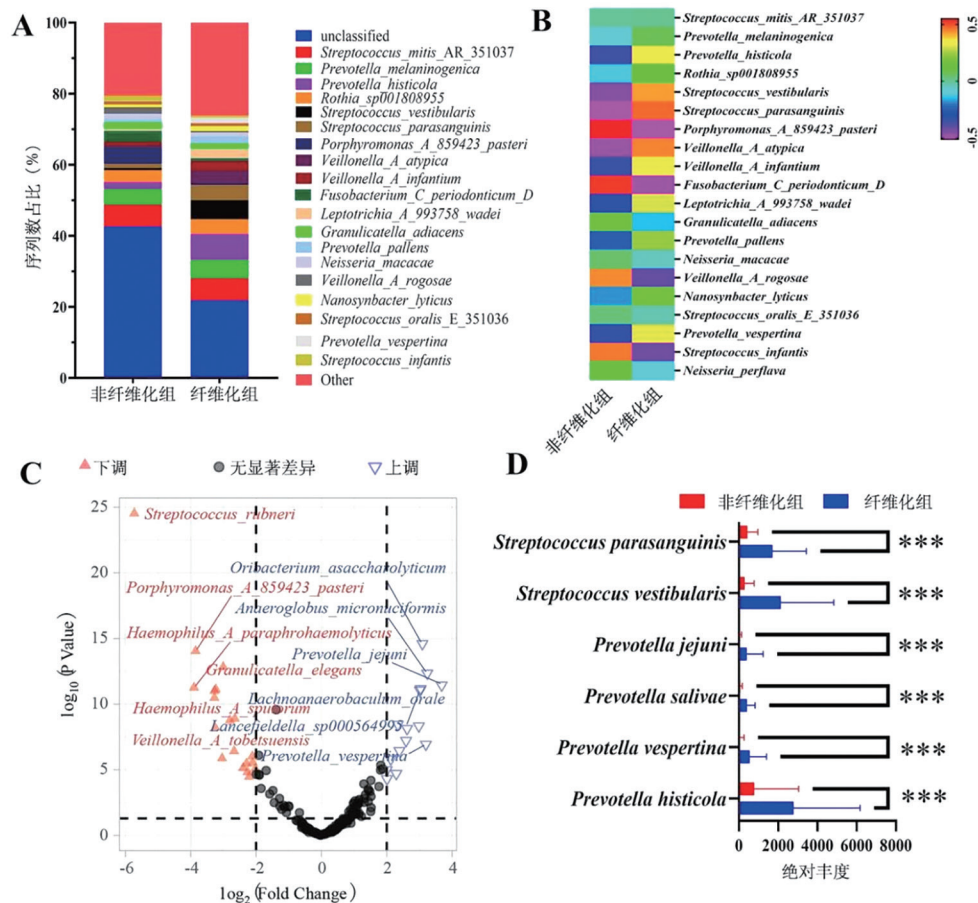
（*Neisseria*）相对丰度则显著减降低（ $U = 484.0$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 226.0$ 、 $P < 0.001$ ）。

在种水平（图4），PCPF患者和非纤维化组COVID-19患者共鉴定出72个存在显著差异的物种。PCPF患者中多种普雷沃菌如*Prevotella histicola*、*P. vespertina*、*P. salivae*和*P. jejuni*相对丰度显著升高（ $U = 352.0$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 444.5$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 218.5$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 294.5$ 、 $P < 0.001$ ）。链球菌中的*Streptococcus vestibularis*和*S. parasanguinis*显著升高（ $U = 309.0$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 276.0$ 、 $P < 0.001$ ），韦荣球菌的*Veillonella atypica*和*V. infantium*相对丰度显著升高（ $U = 251.0$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 330.0$ 、 $P < 0.001$ ），而*V. rogosae*、*S. infantis*和*Porphyromonas 859423 pasteri*相对丰度显著降低（ $U = 349.0$ 、 $P < 0.001$ ， $U = 393.5$ 、 $P < 0.001$ ，

$U = 182.0$ 、 $P < 0.001$ ）。

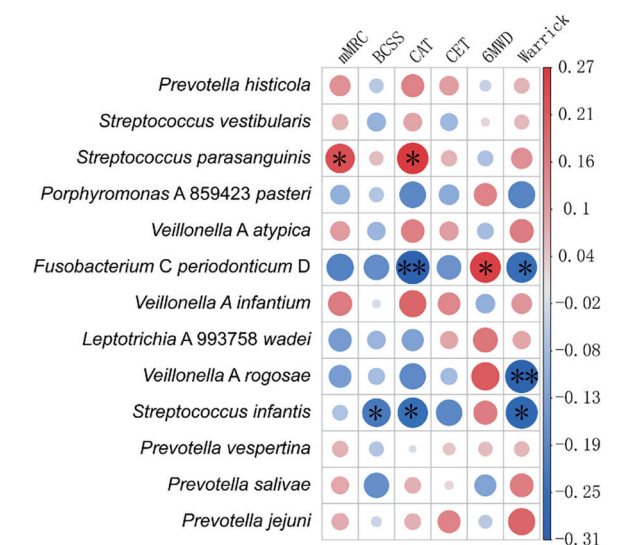
四、PCPF患者口咽部微生物与临床特征的相关性

采用Spearman相关性分析PCPF患者和非纤维化组COVID-19患者临床指标与口咽部差异菌群间的关系。图5所示，部分丰度差异的物种与随访时患者的症状负担、运动耐量及影像学纤维化程度呈显著相关。*S. parasanguinis*与mMRC（ $r = 0.24$ 、 $P = 0.04$ ）和CAT评分（ $r = 0.27$ 、 $P = 0.02$ ）呈正相关。*Fusobacterium C periodonticum D*与CAT评分（ $r = -0.30$ 、 $P < 0.01$ ）及随访时HRCT的Warrick评分（ $r = -0.26$ 、 $P = 0.02$ ）呈显著负相关，而与6MWD（ $r = 0.26$ 、 $P = 0.02$ ）呈正相关。*V. rogosae*与*S. infantis*与随访时HRCT的Warrick评分（ $r = -0.30$ 、 $P < 0.01$ 、 $r = -0.28$ 、 $P = 0.01$ ）均呈显著负相关，其中*S. infantis*与BCSS评分（ $r = -0.22$ 、



注：A 为种水平相对丰度的堆叠条形图，显示各样本中最常见的物种；B 为物种丰度的层次聚类热图，基于群落组成展示样本聚类情况；C 为 DESeq2 火山图，识别纤维化组和非纤维化组患者间丰度存在显著差异的物种；D 为选定差异丰度物种的绝对定量分析。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

图4 PCPF 患者种水平微生物群组成及差异



注：细胞颜色编码相关系数（红色为正相关、蓝色为负相关），颜色越深表示绝对值越大。椭圆表示相关强度，形状越窄表示相关性越强。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

图5 PCPF 患者差异物种与症状负担 / 运动耐受性 / HRCT 的 Warrick 评分的相关性

$P = 0.04$), CAT评分 ($r = -0.25$ 、 $P = 0.02$) 也呈显著负相关, 具有统计学意义。

讨论

本研究基于COVID-19住院患者出院后2年的随访人群, 比较发生/未发生COVID-19后肺纤维化患者的口咽微生物组学特征。结果表明, PCPF患者不仅症状负担更重, 运动耐量受损, 且其口咽部微生物组存在持续性失衡。表现为微生物多样性及群落结构改变, 并伴随多种潜在促炎菌群富集。上述发现提示, SARS-CoV-2感染后长期肺部结构异常可能与口咽微生态紊乱及其相关免疫炎症反应存在关联。

本研究发现, PCPF患者口咽微生物组 α 多样性显著升高。 α 多样性升高在肠道微生态研究中通常被认为是更健康的标志, 但在呼吸道疾病的临床意

义可能并不相同。气道及口咽部微生物丰富度和均匀性均增加,可能反映局部微生态受损,部分被优势菌群抑制的低丰度病原菌大量繁殖。既往研究也支持这一结论,O'Dwyer等^[15]分析511例特发性肺纤维化患者的口咽拭子微生物组数据,发现低口腔微生物 α 多样性与更好的临床结局相关。肺间质纤维化动物模型亦可见肺部微生物组 α 多样性显著增加^[16]。COVID-19相关研究也证实,有持续长新冠症状人群的口腔微生物 α 多样性显著高于无症状组,且群落结构存在显著分离^[17]。因此,PCPF患者口咽部菌群 α 多样性升高不应被解释为健康标志,更可能是SARS-CoV-2感染后微生态持续恢复失败的标志。

分类学数据显示,两组患者口咽微生物均以口腔常驻菌群为主,但PCPF患者中*Prevotella*、*Veillonella*和*Streptococcus*等菌属富集,而常见共栖菌*Neisseria*相对减少。这一模式提示口咽微生态由相对稳定的共栖状态向偏厌氧、偏炎症驱动的群落结构迁移。这种偏移可通过“口咽-下气道轴”对肺部产生持续压力。在COVID-19康复期,气道上皮受损与黏液纤毛清除能力下降,使来自口咽的异常菌群通过微量误吸持续输入下气道^[18]。这些来自上游的失衡信号转化为持续的低度免疫刺激,参与塑造并维持了下气道的促纤维化微环境^[19-20]。

*Prevotella*是革兰阴性厌氧菌,属于肠道、口腔和阴道微生物群重要成员,可通过激活TLR2通路,促进抗原递呈细胞分泌IL-23和IL-1,诱导Th17反应,进一步招募中性粒细胞并加剧局部炎症^[21-22]。中性粒细胞激活后释放弹性蛋白酶、MMP-8/9及中性粒细胞胞外陷阱,损伤肺泡上皮细胞、降解细胞外基质成分,诱导成纤维细胞分化,促进肺间质纤维化形成^[23]。同时,有研究发现Th-17细胞及其分泌的IL-17在肺纤维化组织中均高表达,且与疾病严重程度呈正相关^[24]。因此,*Prevotella*在PCPF患者口咽部富集,可能与慢性炎症反应及促纤维化微环境形成有关。

*Veillonella*是一种机会致病菌,依赖乳酸代谢,通过改变局部pH与氧化应激状态,间接促进其他病原菌定植,被视为“辅助病原体”^[11]。在COVID-19急性期和长新冠患者中,均有研究证实口咽部或上下呼吸道中*Veillonella*丰度显著增加^[25-26],与本研究结果一致。本研究还发现韦荣球菌属内不同物种呈现不同变化,纤维化组中*V. A atypica*和*V. A*

*infantium*显著富集,而*V. A rogosae*丰度显著降低。口腔微生物组学研究曾发现,*V. A atypica*和*V. A infantium*在龋齿患者口腔丰度更高,而*V. A rogosae*则与健康菌斑相关^[27]。提示*V. A rogosae*可能代表相对健康的口咽微环境,其在纤维化组患者丰度降低提示口咽部微生态失衡。

*Streptococcus*在PCPF患者中也呈富集趋势,进一步凸显PCPF微生物组的促炎特性。链球菌可激活上皮细胞TLR2/NF- κ B通路,促进IL-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等促炎因子释放,招募中性粒细胞并放大炎症^[28]。既往研究证实链球菌属在COVID-19急性期显著升高,并与疾病严重程度相关^[29],而且COVID-19后残留肺功能异常患者的肺泡灌洗液中链球菌丰度显著高于健康对照^[30]。这提示*Streptococcus*富集可能与感染后持续性气道炎症及肺部异常修复有关。

此外,本研究观察到部分差异菌群与临床指标(如mMRC、CAT、6MWD及Warrick评分)存在显著相关性,提示口咽部菌群改变可能与症状负担、运动功能受损和纤维化程度相关。然而,PCPF发生常始于急性感染损伤及后续异常修复阶段^[4],本研究在2年随访时观察到的口咽菌群异常更适合被解释为与PCPF并存的长期病理状态的伴随特征,或作为纤维化状态下慢性免疫失衡的放大因子,而不宜直接解释为纤维化的原发始动因素。这一点也与本研究的横断面病例对照设计一致,即本研究能够揭示相关性,但尚不能建立明确的时间顺序和因果关系。

本研究的优势在于随访时间较长,并采用高分辨率测序方法对PCPF患者口咽微生物组特征进行了系统分析。临床意义上,本研究结果提示口咽微生物组具有成为PCPF远期随访辅助分层指标的潜力。与支气管镜或肺泡灌洗液相比,口咽拭子采样具有非侵入性、可重复性强和临床操作简便等优势,更适用于长期动态监测。然而,本研究仍存在一定局限。首先,本研究为单中心横断面病例对照分析,样本量有限,影响结果的外推性。其次,口咽拭子采样仅在出院后2年,缺乏急性期及恢复早期的连续微生物学资料,因而无法明确菌群变化与纤维化形成之间的时间关系。第三,尽管本研究已尽量控制基线水平的一致性,但仍有很多因素未纳入分析,例如病毒阳性持续时间,激素累积使用量,病毒二次感染等可能会干扰口咽部微生物组的

表型特征。第四,本研究采用16S rRNA测序,主要从分类学层面描述菌群结构,尚不能解析关键菌群的功能潜能、代谢产物及其与宿主免疫通路之间的相互作用。未来应结合宏基因组、转录组、代谢组及体内外功能实验,进一步验证口咽-下气道轴在PCPF中的生物学作用。

综上,本研究表明PCPF患者在SARS-CoV-2感染2年后仍存在持续的口咽微生物菌群失衡,提示口咽微生物组可能参与PCPF的长期病理进展,其特征性菌群变化有望作为非侵入性生物标志物,为该类患者的临床风险评估与长期随访管理提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Duong-Quy S, Vo-Pham-Minh T, Tran-Xuan Q, et al. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: facts--challenges and futures: a narrative review[J]. *Pulm Ther*,2023,9(3):295-307.
- [2] Han X, Chen L, Fan Y, et al. Longitudinal assessment of chest CT findings and pulmonary function after COVID-19 infection[J]. *Radiology*,2023,307(2):e222888.
- [3] Hama Amin BJ, Kakamad FH, Ahmed GS, et al. Post COVID-19 pulmonary fibrosis; a meta-analysis study[J]. *Ann Med Surg (Lond)*,2022,77:103590.
- [4] 中国研究型医院学会呼吸病学专业委员会,北京中西医结合学会呼吸病分会. 新型冠状病毒感染引起的肺间质病变诊断和治疗专家建议[J]. *中华结核和呼吸杂志*,2020,43(10):827-833.
- [5] Lazar M, Sandulescu M, Barbu E C, et al. The role of cytokines and molecular pathways in lung fibrosis following SARS-CoV-2 infection: a physiopathologic (re)view[J]. *Biomedicines*,2024,12(3):639.
- [6] Niayesh-Mehr R, Kalantar M, Bontempi G, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis: lessons from idiopathic pulmonary fibrosis and COVID-19[J]. *Cell Commun Signal*,2024,22(1):542.
- [7] Sardarni U K, Byrareddy S N. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: Mechanisms, biomarkers, and therapeutic perspectives[J]. *Clin Transl Discov*,2025,5(1):e70034.
- [8] Wilde J, Slack E, Foster K R. Host control of the microbiome: mechanisms, evolution, and disease[J]. *Science*,2024,385(6706):ea di3338.
- [9] Yeoh Y K, Zuo T, Lui G C Y, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19[J]. *Gut*,2021,70(4):698-706.
- [10] Senel S. An overview of physical, microbiological and immune barriers of oral mucosa[J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(15):7821(1-15).
- [11] Gao M, Wang H, Luo H, et al. Characterization of the human oropharyngeal microbiomes in SARS-CoV-2 infection and recovery patients[J]. *Adv Sci (Weinh)*,2021,8(20):e2102785.
- [12] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染诊疗方案(试行第十版) [EB/OL]. (2023-01-06)[2026-01-28]. <https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/06/5735343/files/5844ce04246b431dbd322d8ba10afb48.pdf>
- [13] Tardella M, Di Carlo M, Carotti M, et al. Ultrasound B-lines in the evaluation of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis: Cut-off point definition for the presence of significant pulmonary fibrosis[J]. *Medicine (Baltimore)*,2018,97(18):e0566.
- [14] Guo L, Wang X, Lin Y, et al. Microorganisms that are critical for the fermentation quality of paper mulberry silage[J]. *Food Energy Secur*,2021,10(4):e304.
- [15] O'Dwyer DN, Kim JS, Ma SF, et al. Commensal oral microbiota, disease severity, and mortality in fibrotic lung disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2024,209(9):1101-1110.
- [16] Hou S, Wang X, Guo J, et al. Triangle correlations of lung microbiome, host physiology and gut microbiome in a rat model of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Sci Rep*,2024,14(1):28743.
- [17] Xu J, Wu D, Yang J, et al. Adult outpatients with long COVID infected with SARS-CoV-2 Omicron variant. Part 1: oral microbiota alterations[J]. *Am J Med*,2025,138(4):732-741.
- [18] Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, et al. The microbiome and the respiratory tract[J]. *Annu Rev Physiol*,2016,78(1):481-504.
- [19] Salisbury ML, Han MK, Dickson RP, et al. Microbiome in interstitial lung disease: from pathogenesis to treatment target[J]. *Curr Opin Pulm Med*,2017,23(5):404-410.
- [20] Gaeckle NT, Pragman AA, Pendleton KM, et al. The oral-lung axis: the impact of oral health on lung health[J]. *Respir Care*,2020,65(8):1211-1220.
- [21] Huang Y, Tang J, Cai Z, et al. Prevotella induces the production of Th17 cells in the colon of mice[J]. *J Immunol Res*,2020,2020:9607328.
- [22] Larsen JM. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease[J]. *Immunology*,2017,151(4):363-374.
- [23] Crowley LE, Stockley RA, Thickett DR, et al. Neutrophil dynamics in pulmonary fibrosis: pathophysiological and therapeutic perspectives[J]. *Eur Respir Rev*,2024,33:240139.
- [24] Senoo S, Higo H, Taniguchi A, et al. Pulmonary fibrosis and type-17 immunity [J]. *Respir Investig*,2023,61(5):553-562.
- [25] Shengli M, Fan, Z, Fengxia, Z, et al. Metagenomic analysis reveals oropharyngeal microbiota alterations in patients with COVID-19[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2021(6):191.
- [26] Huang P, Yang Z, Zhan C, et al. Alteration of the airway microbiota is associated with the progression of post-COVID-19 chronic cough in adults: a prospective study[J]. *J Genet Genomics*,2024,51(10):1111-1120.
- [27] Zhou P, Manoil D, Belibasakis GN, et al. *Veillonellae*: beyond bridging species in oral biofilm ecology[J]. *Front Oral Health*,2021,2:774115.
- [28] Ge Y, Tang G, Fu Y, et al. The impact of environmental factors on respiratory tract microbiome and respiratory system diseases[J]. *Eur J Med Res*,2025,30(1):236.
- [29] Gupta A, Bhanushali S, Sanap A, et al. Oral dysbiosis and its linkage with SARS-CoV-2 infection[J]. *Microbiol Res*,2022,261:127055.
- [30] Smith DJF, Teng NMY, Denny E K, et al. The respiratory microbiome in patients with post-COVID-19 residual lung abnormalities resembles that of healthy individuals and is distinct from idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *ERJ Open Res*,2025,11(3):00826-2024.

(收稿日期: 2026-01-29)

(本文编辑: 孙荣华)

陈玉, 周欣佑, 蔡昀朴, 等. 新型冠状病毒肺炎后肺间质纤维化与口咽部菌群失衡的相关性 [J/OL]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2026, 20(3): 129-138.