基于16S rRNA基因测序的眼表菌群组成及其 影响因素分析

陈昭宇, 阎晓然*

青岛大学青岛市市立医院眼科,山东 青岛

收稿日期: 2025年5月5日; 录用日期: 2025年5月28日; 发布日期: 2025年6月6日

摘要

目的:基于16SrRNA高通量测序,分析眼表菌群的物种组成与多样性,探讨影响眼表菌群结构的可能因素,为丰富眼表微生态认识及其在眼表疾病中的作用提供数据支撑。方法:选取2024年5月至10月于青岛市市立医院眼科体检的60名健康受试者,采集其结膜囊拭子样本,采用16SrRNA基因测序技术对眼表菌群进行分析。利用Alpha多样性指数和Beta多样性分析评估菌群多样性差异,分析比较各组间菌群结构变化。结果:1)变形菌门、放线菌门、厚壁菌门共占比94.12%,构成了眼表微生物群落的主要部分。优势菌属包括假单胞菌属、弧菌属、棒状杆菌属等。2)年龄组间眼表微生物的Alpha多样性无显著差异,Beta多样性分析显示老年组微生物群落结构发生改变。老年组变形菌门丰度下降,而放线菌门和拟杆菌门丰度增加;假单胞菌属、弧菌属、短芽孢杆菌属丰度下降,棒状杆菌属丰度增加。3)性别组间微生物多样性及群落结构无统计学差异。结论:16SrRNA基因测序可揭示眼表菌群结构发生变化,未发现性别对菌群结构的影响。

关键词

16S rRNA高通量测序,眼表微生态,菌群组成,年龄,性别差异

Analysis of Ocular Surface Microbiota Composition and Influencing Factors Based on 16S rRNA Gene Sequencing

Zhaoyu Chen, Xiaoran Yan*

Department of Ophthalmology, Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: May 5th, 2025; accepted: May 28th, 2025; published: Jun. 6th, 2025

*通讯作者。

Abstract

Objective: This study aimed to analyze the composition and diversity of the ocular surface microbiota using 16S rRNA high-throughput sequencing, and to examine potential factors affecting its community structure, in order to contribute to the understanding of ocular surface microecology and its implications in ocular surface diseases. Methods: A total of 60 healthy individuals undergoing routine ophthalmic examinations at Oingdao Municipal Hospital between May and October 2024 were enrolled. Conjunctival swab samples were collected and subjected to 16S rRNA gene sequencing to assess the ocular surface microbiota. Alpha diversity indices and Beta diversity analyses were employed to evaluate differences in microbial diversity and to compare structural variations of the microbiota among different groups. Results: 1) The ocular surface microbiota was dominated by Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes, which together accounted for 94.12% of the total abundance. The dominant genera included Pseudomonas, Vibrio, and Corynebacterium. 2) No significant differences were observed in Alpha diversity among different age groups; however, Beta diversity analysis indicated that microbial community structure changed in the elderly group. Specifically, the relative abundance of Proteobacteria decreased, while Actinobacteria and Bacteroidetes increased. And, Pseudomonas, Vibrio, and Brevibacillus decreased, while Corynebacterium increased in the elderly, 3) No statistically significant differences in microbial diversity or community structure were found between male and female participants. Conclusion: 16S rRNA gene sequencing can reveal the diversity of the ocular surface microbiota, but the results are influenced by multiple factors. A relatively stable core microbiota and dominant genera are present on the ocular surface of healthy individuals. In the elderly population, structural changes in the ocular surface microbiota are observed, while no significant differences are found between sexes.

Keywords

16S rRNA High-Throughput Sequencing, Ocular Surface Microecology, Microbial Composition, Age, Gender Difference

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

CC O Open Access

1. 引言

眼表作为人体直接暴露于外部环境的黏膜屏障,是宿主免疫系统与外源微生物接触的第一道防线。 眼表微生物群(Ocular Surface Microbiota, OSM)是指定植于结膜、角膜及泪膜等眼表组织的共生性微生物 群落。在生理状态下,这些微生物与宿主维持动态平衡,可通过竞争营养、产生抗菌因子以及激活先天 与适应性免疫反应,构建抵御病原体侵袭的生态屏障,从而维持眼表稳态[1]。若该生态平衡被破坏, 可能诱发包括干眼症、角膜炎、结膜炎等多种眼表疾病[2]-[4]。因此,深入研究眼表微生物的组成特征 及其影响因素,对于阐明其在眼部疾病中的作用机制,并开发基于微生态的诊疗策略具有重要临床意 义。

由于泪液的持续冲刷及其富含 IgA、乳铁蛋白和溶菌酶等多种抗菌因子的特点,眼表的微生物负荷 相对较低,加之样本采集和微生物检测的技术挑战,眼表微生态的研究仍处于初步阶段。目前常用的研 究手段包括传统培养法、高通量基因测序及宏基因组测序等。传统培养法受限于微生物的可培养性,难 以全面揭示低丰度或难培养细菌的多样性[5]。宏基因组测序在揭示微生物功能基因及代谢通路方面具有 优势,但其对环境 DNA 的高灵敏性也可能放大污染背景,增加实验成本及结果解读难度[6]。相比之下, 高通量测序可通过扩增保守区并解析可变区,快速、准确地鉴定大多数细菌的分类信息,成为目前应用 最广泛的微生物研究技术之一[7]。

基于上述考虑,本研究采用 16S rRNA 高通量测序技术,对健康人群眼表菌群的物种组成与多样性 进行系统分析,并探讨年龄与性别等因素对菌群结构的影响,以期为丰富眼表微生态认识及其在眼表疾 病中的作用提供数据支撑。

2. 对象和方法

2.1. 研究对象

本研究选取 2024 年 5 月~2024 年 10 月于青岛市市立医院眼科体检的 60 名健康受试者为研究对象, 受试者年龄 21~82 岁(M=41 岁,Q1=26 岁、Q3=69 岁),其中男性 25 人,女性 35 人。纳入标准:(1) 一般状况及精神状态良好;(2)自愿参与本研究,并能够配合取样。排除标准:(1)患有眼表疾病、青光 眼、葡萄膜炎及感染性眼部疾病者;(2)合并全身感染或局部感染、糖尿病、自身免疫性疾病者;(3)近 6 个月内有眼部外伤史及眼部手术史者;(4)近 6 个月内使用任何滴眼液(包括抗生素、类固醇类药物及 各种非处方药)者;(5)佩戴角膜接触镜者。(6)孕妇或哺乳期女性。本研究方案经青岛市市立医院医学伦 理委员会审核批准(批文号:KTLL202306154),并获得了所有受试者的知情同意。

2.2. 方法

2.2.1. 样本采集

在经紫外线消毒的治疗室中严格按照无菌标准进行样本采集。在受检眼结膜囊内滴入1 滴盐酸奥布 卡因滴眼液进行表面麻醉,点眼后2分钟嘱受试者向上注视,向下拉开下眼睑,用无菌拭子在结膜下穹 窿处采样,拭子由内眦部转动到外眦部,重复3次,避免拭子接触眼睑和睫毛。将采样拭子置于2ml无 菌离心管中,转至-80℃冰箱冻存备用。"空气拭子"作为阴性对照与受试者样本同时采集,即在无菌拭 子上滴1 滴盐酸奥布卡因滴眼液后将拭子暴露在受试者附近的空气中同样的时间,然后保存于无菌离心 管中放至-80℃冰箱冻存。

2.2.2. 样本 DNA 提取、PCR 扩增和测序

按照 ALFA-SEQ Magnetic Pharyngeal swab & Saliva DNA Kit (广州方舟生物安全科技有限公司,中国)核酸提取试剂盒的实验指导在生物安全柜内完成所有样本微生物群落 DNA 提取。利用 Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)检测微生物群落 DNA 的纯度和浓度,并在 1%琼脂糖凝胶上进行质量检测。取50 ng DNA 样品,用 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3')通用区引物对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增完成后将所有产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, CA, USA)回收 PCR 产物。按照 ALFA-SEQ DNA Library Prep Kit 标准流程进行文库构建,使用 Qubit4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)测量文库的浓度,采用 Illumina NovaSeq 平台对检测合格的文库进行双端测序。

2.2.3. 生物信息学分析

利用 fastp (an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, version 0.14.1)软件对高通量测序的原始序列 (Raw Reads)进行过滤,得到高质量序列(Clean Reads)。使用 USEARCH 平台进行操作性分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)聚类,设定 97%为相似度阈值。使用 R 语言包计算 Sobs 指数、Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数、Pielou_evenness 指数对微生物 Alpha 多样性进行量化。基于样本相似性

距离矩阵进行主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)及相似性分析(Analysis of similarities, Anosim)计算 Beta 多样性。采用 SILVA 数据库进行物种注释。

2.2.4. 统计学分析

采用 IBM SPSS statistics 27.0 软件整理分析数据。计量资料首先用 Shapiro-Wilk 方法进行正态性检验,符合正态分布的数据以均数 ± 标准差表示,非正态分布数据以中位数(四分位数间距)表示。在进行统计分析之前,用 Levene 检验评估方差齐性,若数据符合正态分布且方差齐性者采用独立样本 t 检验或方差分析,若不符合上述条件,则采用 Mann Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验。计数资料采用卡方检验,在样本量或理论频数较小时使用 Fisher 精确检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 样本和测序数据特征

本研究共采集了 60 例健康受试者的结膜囊拭子样本,其中 15 例样本未能获得足够的扩增产物,最终 45 例样本成功完成测序及生物信息学分析,样本阳性率为 75%。其中,尼龙植绒拭子样本检出率为 92.5% (37/40),棉拭子样本检出率为 40% (8/20),两种拭子检出率差异有统计学意义(P<0.001)。所有"空 气拭子"样本中未提取到足量微生物 DNA。45 个样本测序下机数据量(Raw Reads)为 3,401,032,平均产 生 75,578 条序列,获得高质量序列为 3,018,254,有效数据率为 88.75%。

3.2. 物种稀释曲线分析

稀释曲线是用于评估测序深度是否足以反映样本中物种丰富度的曲线。对所有样本的测序数目进行 稀释曲线分析,如图1所示,随着测序条数的加大,稀释曲线逐渐趋于平缓,检测到的物种数目不再增加,表明测序深度满足实验要求。



图 1. 稀释曲线

3.3. 眼表菌群的分类组成

本研究中45 例样本共注释到31 个门,68 个纲,191 个目,310 个科,648 个属,对各个物种分类水 平上的菌群分布进行分析,详见图2。在门水平上,相对丰度位于前8位的菌群为变形菌门、放线菌门、 厚壁菌门、拟杆菌门、蓝藻门、异常球菌门、髌骨菌门以及目前无法分类的菌门。其中,变形菌门、放线 菌门和厚壁菌门共占比94.12%。在属水平上,相对丰度>1%的菌属为假单胞菌属、弧菌属、棒状杆菌属、 伯克霍尔德氏菌、短芽孢杆菌属、葡萄球菌属、不动杆菌属、链球菌属、乳杆菌属以及不能分类的属。





Figure 2. Species composition of all samples at phylum, class, order, family and genus levels 图 2. 所有样本在门、纲、目、科、属水平上的物种组成

3.4. 年龄分组的物种多样性分析

根据受试者年龄分为青年组(<40 岁, n = 24)、中年组([40 岁, 65 岁], n = 18)、老年组(>65 岁, n = 18)。三组样本阳性率差异有统计学意义(P < 0.05, Cramer's V = 0.4)。两两比较显示,青年组阳性率高于中年组(P < 0.01)(表 1)。

Table	1. Detection results of	of samples ir	n different	age g	roups
表1.	各年龄分组样本检出	出情况			-

年龄组	样本例数	阳性例数(%)	阴性例数(%)	P值
青年组	24	22 (91.7%)	2 (8.3%)	0.01
中年组	18	9 (50%)	9 (50%)	
老年组	18	14 (77.8%)	4 (22.2%)	
总计	60	45	15	

注: Fisher 精确检验。

3.4.1. 各年龄组 OTUs 韦恩图分析

基于 97%相似性水平聚类,三组共获得 10,946 个 OTUs,其中,青年组获得 7533 个 OTUs,中年组获得 2019 个 OTUs,老年组获得 2754 个 OTUs (图 3)。



Young

Figure 3. Venn plots of OTUs cluster analysis for the young, middle-aged and elderly groups 图 3. 青、中、老年组 OTUs 聚类分析 Venn 图

3.4.2. 各年龄组组间 Alpha 多样性分析

青年组、中年组、老年组三组间的 Sobs 指数、Chao1 指数、Simpson 指数、Shannon 指数无显著差异 (P > 0.05, Kruskal-Wallis H 检验) (图 4)。

3.4.3. 各年龄组组间 Beta 多样性分析

对青、中、老年组进行 PCoA 分析,如图 5 所示,青年组和中年组的大部分样本聚集在一起,而老年组的大多数样本与二者分离,提示老年组眼表菌群组成与青年组和中年组存在差异。Anosim 分析表明 老年组与青、中年组样本的微生物群落构成差异有统计学意义(R = 0.37, P < 0.001)。





Figure 4. Alpha diversity index box plots for the young, middle-aged and elderly groups 图 4. 青、中、老年组 Alpha 多样性指数箱图



Figure 5. PCoA analysis diagram of samples from the young, middle-aged and elderly groups 图 5. 青、中、老年组样本的 PCoA 分析图

3.4.4. 各年龄组组间物种差异分析

在老年组中,变形菌门(53.09%)的相对丰度低于青年组(H = 12.21, P < 0.05),放线菌门(31.79%)的相 对丰度高于青年组(H = 15.83, P < 0.05),拟杆菌门(3.59%)的相对丰度高于青年组(0.24%)(H = 12.64, P < 0.05),而厚壁菌门(8.88%)的相对丰度差异不显著(P > 0.05)。在属水平上,老年组与青年组相比,假单胞 菌属、弧菌属和短芽孢杆菌属的相对丰度降低(P < 0.05),棒状杆菌的相对丰度升高(P < 0.05)(图 6)。

应用 LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)方法进行物种差异分析,设定 LDA 阈值为 4,结果如图 7 所示。在青年组中,变形菌门、假单胞菌属和弧菌属为富集的优势菌群;中年组中,短芽孢杆菌属为主要差异菌属;老年组中,放线菌门、拟杆菌门和棒状杆菌属显著富集。

3.5. 性别分组的物种多样性分析

将所有样本按照性别分为女性(n = 29)和男性(n = 16)两组,基于两组样本的 OTUs 进行 Alpha 多样性 和 Beta 多样性分析。结果显示,男性和女性两组的 Chao1 指数、Simpson 指数、Shannon 指数、 Pielou_evenness 指数不具有统计学差异(P > 0.05, Mann Whitney U 检验)(图 8)。NMDS 分析图显示,两 组样本分布较为集中,且具有大部分重叠,提示两组样本间物种相似度较大(图 9)。Anosim 分析表明男、 女两组样本的微生物群落构成无显著差异(R = 0.03, P > 0.05)。







Figure 7. LEfSe analysis of the young, middle-aged and elderly groups 图 7. 青、中、老年组 LEfSe 分析



Figure 8. Box plots of Alpha diversity indices between gender groups 图 8. 性别分组 Alpha 多样性指数箱图



Figure 9. NMDS analysis between gender groups 图 9. 性别分组 NMDS 分析图

4. 讨论

本研究共采集 60 例结膜囊拭子样本,其中有 15 例因微生物 DNA 含量不足未能获得有效扩增产物, 最终 45 例样本完成测序。对于 15 例未能获得足够扩增产物的样本,考虑一方面是由于眼表存在多种抗 菌机制[8],健康眼表微生物负荷未达到 PCR 扩增所需的最低检测限;另一方面采样拭子的选择对采样结 果亦可能产生影响,本研究发现采用尼龙植绒拭子样本阳性检出率明显高于棉拭子。植绒拭子利用尼龙 纤维的垂直排列方式,形成"毛刷状"表面,不仅增加了与样本的接触面积,还因其非吸水性材质能快 速释放所吸附的细胞和 DNA,适用于低生物量样本的采集[9]。而棉拭子由天然棉纤维缠绕而成,纤维结 构紧密,易吸水但释放效率低,在微生物捕获及后续 DNA 提取效率方面存在不足,降低微生物 DNA 的 回收率[10],从而影响了扩增成功率。此外,样本保存及处理过程可能导致微生物 DNA 的降解或丢失。 45 例阳性样本的测序数据表现出较高的数据质量,稀释曲线趋于饱和,说明本次测序深度可反应样本中 主要微生物群落结构。"空气拭子"样本中未检出有效微生物序列,提示在采集样本及实验操作过程中 未观察到明显外源污染。

本研究结果显示变形菌门、放线菌门、厚壁菌门相对丰度总和达到了 94.12%,构成了眼表微生物群 落的主要部分,与既往健康人眼表微生物研究的结果一致[11]。这表明在菌门水平上独立的健康个体眼表 微生物群组成是相似的,支持了健康眼表存在"核心微生物群"的概念,即在生理状态下,眼表存在一 组相对稳定且普遍存在的微生物群落,它们对维持眼表的稳态和功能发挥着重要作用[1] [12] [13]。

在本研究中,相对丰度 >1%的主要菌属有假单胞菌属、弧菌属、棒状杆菌属等。假单胞菌属为优势 菌属,这一结果与 Dong 等[14]的研究结果相符。然而,Zhou 等[15]研究中该菌属的丰度不足 1%。分析 原因可能与取样部位不同有关,本研究采集结膜下穹窿部样本,而其研究样本取自上睑结膜。已有研究 表明,眼表不同解剖部位微生态结构存在差异,穹窿部菌群更丰富且以需氧菌为主[16]。此外,眼表作为 直接暴露于外部环境的黏膜系统,其微生态特征易受到多种环境因素影响。Deng 等[17]在对中国多个城 市健康人群进行比较研究时发现,眼表微生物群落在不同地理区域存在显著差异,提示气候条件、环境 暴露与生活方式在微生物定植中具有重要作用。本研究发现弧菌属在所有优势菌属中相对丰度位于第二, 而目前尚无弧菌属在眼表正常定植的相关报道。弧菌属是一类广泛存在于海洋和咸淡水环境中的革兰氏 阴性菌[18]。本研究受试者均来自青岛沿海地区,其日常生活中可能通过海风携带的气溶胶、海产品的处 理与摄入、海水活动等方式频繁接触海洋相关微生物。该菌是通过瞬时接触从外部环境中随机引入眼表, 还是通过与结膜囊内的微生物群落相互作用而稳定存在,需要进一步研究。上述差异提示属水平菌群分 析可能受取样部位、地理分布、环境暴露等多种因素影响,在眼表微生态研究中需综合考虑技术因素与 人群背景。

年龄增长伴随着免疫功能减弱、泪液分泌减少及眼表结构退化等生理变化,这些因素可能通过改变 局部微环境影响微生物的定植,进而参与眼表稳态的调控[19]。本研究发现不同年龄组间眼表微生物 Alpha 多样性无显著差异,但 Beta 多样性 PCoA 分析显示老年组菌群结构发生变化。在门水平上,老年 组变形菌门的相对丰度下降,而放线菌门和拟杆菌门的相对丰度上升;在属水平上,老年组假单胞菌属、 弧菌属和短芽孢杆菌属的相对丰度降低,而棒状杆菌属显著增加。此外,本研究观察到不同年龄组间样 本阳性率存在统计学差异,青年组阳性率较高,提示中老年人群微生物检测难度增加,可能与泪液减少、 微生物负荷下降有关。未来研究中应注意年龄因素在低生物量样本检测中的重要性,采取增加采样量及 优化提取方法等措施,提高中老年组样本的扩增效率与代表性。Wen 等[20]研究同样发现年轻与老年人 群在微生物组成、代谢功能和抗生素耐药基因方面存在显著差异,进一步支持了年龄对眼表微生态的调 节作用。已有研究指出,棒状杆菌可通过影响巨噬细胞活性,参与干眼症等慢性炎性眼病的免疫调控过 程[21]。同时,干眼患者眼表富含拟杆菌,而假单胞菌、变形菌含量降低[22]。结合本研究数据推测,老 年人群眼表菌群结构的变化,可能与其更高的干眼症、睑板腺功能障碍等免疫相关疾病的发病风险密切 相关。

性别作为人体重要的生理变量,在肠道、口腔和皮肤等微生态系统中已被证实可调节微生物群的组成与功能[23]-[25],但其对眼表微生态的具体影响尚不明确。本研究将样本按性别分组,比较微生物多样性后发现,男性与女性在 Alpha 多样性及 Beta 多样性方面均无显著差异,提示性别对眼表菌群整体结构的影响较小。与本研究结果一致,Zhou 等[15]亦未发现性别对眼表菌群结构具有显著影响。然而,Wen 等[20]报道男性与女性在 Beta 多样性上存在统计学差异,Ozkan 等[26]也指出男性的 Shannon 指数高于女性。上述结果提示,不同研究中性别差异的观察结果不一致,可能与样本量、年龄分层、研究区域及分析方法等因素有关。尽管本研究未观察到性别在眼表微生物多样性和群落结构方面的显著影响,但性别相关的激素水平、泪液组成和免疫调控机制可能对眼表微生态存在潜在调节作用[27][28]。雌激素和雄激素分别影响泪液分泌与睑板腺功能,而这些因素在微生物定植中发挥关键作用[29]。尤其是在围绝经期或激素水平显著波动的人群中,眼表菌群可能发生改变,值得进一步研究。鉴于本研究样本量有限,且未纳入激素水平、生理周期等变量,尚无法完全排除性别对眼表微生态的影响。未来研究将在扩大样本量基础上,结合激素检测、生理状态评估等指标,深入探讨性别因素在眼表微生态稳态调控中的作用机制。

尽管本研究较系统地描述了健康人群眼表菌群的组成特征及其与年龄、性别之间的关系,但仍存在 一定局限性。首先,本研究基于 16S rRNA 高通量测序,仅能对微生物进行分类学鉴定,无法深入分析其 功能特征,如代谢通路、毒力因子或抗药性基因等,限制了对微生物与宿主相互作用机制的揭示。其次, 本研究为横断面设计,未能动态评估菌群结构随时间或生理状态的变化,限制了对菌群稳定性和演替规 律的判断。虽然纳排标准控制了部分混杂因素,但尚未系统采集受试者的饮食习惯、环境暴露、系统用 药史等信息,可能对菌群结构产生潜在影响。未来将结合宏基因组学、代谢组学及动物模型等进一步探 讨关键菌属在眼表稳态维持及疾病发生中的具体作用。

5. 结论

16SrRNA 高通量测序技术可较为全面地揭示眼表菌群的组成与多样性,但其结果仍可能受到微生物 丰度低、样本采集方式、DNA 提取效率及数据分析方法等多种因素影响。健康人群眼表存在一组相对稳 定的"核心菌群",主要包括变形菌门、放线菌门和厚壁菌门。老年人群眼表微生物群落结构发生改变, 部分菌门与菌属的丰度发生重构,提示微生物群落可能在老年人群眼表疾病的发生发展中具有潜在作用。 本研究未发现性别因素对眼表菌群整体结构的显著影响,但其潜在调控机制尚需进一步结合激素水平、 生理状态等变量深入探讨。

参考文献

- St Leger, A.J., Desai, J.V., Drummond, R.A., Kugadas, A., Almaghrabi, F., Silver, P., *et al.* (2017) An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal Γδ T Cells. *Immunity*, **47**, 148-158. <u>https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.014</u>
- [2] Ozkan, J., Majzoub, M.E., Coroneo, M., Thomas, T. and Willcox, M. (2023) Ocular Microbiome Changes in Dry Eye Disease and Meibomian Gland Dysfunction. *Experimental Eye Research*, 235, Article 109615. https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109615
- [3] Shivaji, S., Jayasudha, R., Chakravarthy, S.K., Sai Abhilash, C.R., Sai Prashanthi, G., Sharma, S., et al. (2021) Alterations in the Conjunctival Surface Bacterial Microbiome in Bacterial Keratitis Patients. Experimental Eye Research, 203, Article 108418. <u>https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108418</u>
- [4] Liang, Q., Li, J., Zhang, S., Liao, Y., Guo, S., Liang, J., et al. (2020) Characterization of Conjunctival Microbiome Dysbiosis Associated with Allergic Conjunctivitis. Allergy, 76, 596-600. <u>https://doi.org/10.1111/all.14635</u>
- [5] 李斌斌, 吴丹妮, 聂国兴, 等. 未/难培养微生物可培养策略研究: 机遇与挑战[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 832-844.
- [6] Gu, W., Miller, S. and Chiu, C.Y. (2019) Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 319-338. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751
- [7] Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012) Ultra-High-Throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms. The ISME Journal, 6, 1621-1624. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8</u>
- [8] McDermott, A.M. (2013) Antimicrobial Compounds in Tears. *Experimental Eye Research*, 117, 53-61. https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.014
- [9] Wise, N.M., Wagner, S.J., Worst, T.J., Sprague, J.E. and Oechsle, C.M. (2021) Comparison of Swab Types for Collection and Analysis of Microorganisms. *Microbiology Open*, 10, e1244. <u>https://doi.org/10.1002/mbo3.1244</u>
- [10] 郭艳飞. 不同采样拭子材质和洗脱方式对表面微生物收集的影响[J]. 中国医药指南, 2021, 19(4): 24-26.
- [11] Delbeke, H., Younas, S., Casteels, I. and Joossens, M. (2020) Current Knowledge on the Human Eye Microbiome: A Systematic Review of Available Amplicon and Metagenomic Sequencing Data. Acta Ophthalmologica, 99, 16-25. <u>https://doi.org/10.1111/aos.14508</u>
- [12] Huang, Y., Yang, B. and Li, W. (2016) Defining the Normal Core Microbiome of Conjunctival Microbial Communities. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 643.e7-643.e12. <u>https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.008</u>
- [13] Petrillo, F., Pignataro, D., Lavano, M.A., Santella, B., Folliero, V., Zannella, C., et al. (2020) Current Evidence on the Ocular Surface Microbiota and Related Diseases. *Microorganisms*, 8, Article 1033. https://doi.org/10.3390/microorganisms8071033
- [14] Dong, Q., Brulc, J.M., Iovieno, A., Bates, B., Garoutte, A., Miller, D., et al. (2011) Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. Investigative Opthalmology & Visual Science, 52, 5408-5413. <u>https://doi.org/10.1167/iovs.10-6939</u>
- [15] Zhou, Y., Holland, M.J., Makalo, P., Joof, H., Roberts, C.H., Mabey, D.C., et al. (2014) The Conjunctival Microbiome in Health and Trachomatous Disease: A Case Control Study. *Genome Medicine*, 6, Article No. 99. https://doi.org/10.1186/s13073-014-0099-x
- [16] Ozkan, J., Willcox, M., Wemheuer, B., Wilcsek, G., Coroneo, M. and Thomas, T. (2019) Biogeography of the Human Ocular Microbiota. *The Ocular Surface*, 17, 111-118. <u>https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.11.005</u>
- [17] Deng, Y., Wen, X., Hu, X., Zou, Y., Zhao, C., Chen, X., et al. (2020) Geographic Difference Shaped Human Ocular Surface Metagenome of Young Han Chinese from Beijing, Wenzhou, and Guangzhou Cities. *Investigative Opthalmology* & Visual Science, 61, 47. <u>https://doi.org/10.1167/iovs.61.2.47</u>
- [18] Yildiz, F.H. and Visick, K.L. (2009) Vibrio Biofilms: So Much the Same Yet So Different. *Trends in Microbiology*, 17, 109-118. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004</u>
- [19] Galletti, J.G. and de Paiva, C.S. (2021) The Ocular Surface Immune System through the Eyes of Aging. *The Ocular Surface*, **20**, 139-162. <u>https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.02.007</u>
- [20] Wen, X., Miao, L., Deng, Y., Bible, P.W., Hu, X., Zou, Y., et al. (2017) The Influence of Age and Sex on Ocular Surface

Microbiota in Healthy Adults. *Investigative Opthalmology & Visual Science*, **58**, 6030-6037. <u>https://doi.org/10.1167/iovs.17-22957</u>

- [21] Qi, Y., Wan, Y., Li, T., Zhang, M., Song, Y., Hu, Y., et al. (2021) Comparison of the Ocular Microbiomes of Dry Eye Patients with and without Autoimmune Disease. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, Article 716867. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716867
- [22] Li, Z., Gong, Y., Chen, S., Li, S., Zhang, Y., Zhong, H., et al. (2019) Comparative Portrayal of Ocular Surface Microbe with and without Dry Eye. Journal of Microbiology, 57, 1025-1032. <u>https://doi.org/10.1007/s12275-019-9127-2</u>
- [23] He, S., Li, H., Yu, Z., Zhang, F., Liang, S., Liu, H., et al. (2021) The Gut Microbiome and Sex Hormone-Related Diseases. Frontiers in Microbiology, 12, Article 711137. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711137</u>
- [24] Liu, X., Tong, X., Jie, Z., Zhu, J., Tian, L., Sun, Q., *et al.* (2023) Sex Differences in the Oral Microbiome, Host Traits, and Their Causal Relationships. *I Science*, **26**, Article 105839. <u>https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105839</u>
- [25] SanMiguel, A. and Grice, E.A. (2014) Interactions between Host Factors and the Skin Microbiome. *Cellular and Molec*ular Life Sciences, 72, 1499-1515. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-014-1812-z</u>
- [26] Ozkan, J., Nielsen, S., Diez-Vives, C., Coroneo, M., Thomas, T. and Willcox, M. (2017) Temporal Stability and Composition of the Ocular Surface Microbiome. *Scientific Reports*, 7, Article No. 9880. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10494-9
- [27] Mantelli, F., Moretti, C., Macchi, I., Massaro-Giordano, G., Cozzupoli, G.M., Lambiase, A., et al. (2015) Effects of Sex Hormones on Ocular Surface Epithelia: Lessons Learned from Polycystic Ovary Syndrome. Journal of Cellular Physiology, 231, 971-975. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.25221</u>
- [28] Nuzzi, R. and Caselgrandi, P. (2022) Sex Hormones and Their Effects on Ocular Disorders and Pathophysiology: Current Aspects and Our Experience. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, Article 3269. https://doi.org/10.3390/ijms23063269
- [29] Gupta, P.D., Johar, K., Nagpal, K. and Vasavada, A.R. (2005) Sex Hormone Receptors in the Human Eye. Survey of Ophthalmology, 50, 274-284. <u>https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2005.02.005</u>