

用于皮肤分型的标志物组合及其应用

技术领域

5 本发明涉及生物医药领域，具体地涉及用于皮肤分型的标志物组合及其应用。

背景技术

随着微生物组计划的推出，人们逐渐认识到，与肠道类似，人体表面亦存在大量的微生物。肠道研究已提示微生物-宿主间的相互作用以及通过粪菌移植、益生菌、益生元的策略可改变肠道微生态，进而改善肠道稳态。皮肤微生态的研究进展相对滞后，特别缺乏大规模人群的宏基因组数据。基于北美人群的宏基因组数据提示皮肤微生物在组成上个体差异性大但稳定性高，即个体随时间空间变化其微生物组成相对稳定，具有极强的个人特征。本项研究基于中国汉人群的数据再次证实了个体差异性的存在，并发现微生物组成与宿主一系列皮肤表型存在显著关联，皮肤微生物可作为改善皮肤表型的潜在新手段、新靶点。

然而极强的个体差异性为研发设计普适的护肤产品、药品提出了严峻挑战。通过进一步统计学分析，我们发现尽管个体差异大，但在人群水平依然存在一些主要特征和规律，通过这些特征的组合能将人群进行分型，从而解决个体差异性大的问题。皮肤分型能很好的满足低水平上(low resolution)的“精准”/“个性化”护理。例如,目前常用的一种皮肤分型——“干性”、“中性”、“油性”皮肤，即根据宿主皮肤的水油特征分型；与之类似，但不同的是我们的这项研究不是水油特征，而是基于皮肤微生物组特征，对人群进行分型。从而有助于工业界针对不同皮肤型，开发出更适合特定人群的护肤产品、药品，达到一定程度上的“精准”/“个性化”护理，有效改善皮肤稳态。

因此，本领域迫切需要开发新的用于皮肤分型、判断皮肤老化的方法，提供一种新的诊断、分型手段。

发明内容

30 本发明的目的在于基于皮肤微生物组特征，对人群进行分型,从而有助于工业界针对不同皮肤型，开发出更适合特定人群的护肤产品、药品。提供新的用

于皮肤分型、判断皮肤状态的方法，提供一种新的诊断、分型手段。

本发明将关注目标锁定在主导皮肤分型的两株细菌——奥斯陆莫拉菌（*Moraxella osloensis*）和痤疮丙酸杆菌（*Cutibacterium acnes*）以及在宿主的健康和疾病中扮演重要角色的、皮肤上丰富的细菌定植体之一——表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）上。首先，在汉族人群大规模样本的宏基因组数据中，确定了三株目标皮肤共生菌在面部的分布丰度与宿主皮肤表型之间的相关性，而后进行 QPCR 实验验证，确定了一株可促进皮肤衰老的细菌——奥斯陆莫拉菌（*M.osloensis*）。

10 在本发明的第一方面，提供了一种奥斯陆莫拉菌（*M.osloensis*）或其检测试剂的用途，用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断或表征皮肤状态或用于制备一试剂或试剂盒，所述试剂或试剂盒用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断或表征皮肤状态。

在另一优选例中，所述皮肤状态包括：皮肤年龄、皮肤含水量、皮肤弹性、
15 皮肤颜色、皮肤衰老程度。

在另一优选例中，基于选自下组的一种或多种表型判断皮肤的衰老程度：卟啉、油脂、含水量、光泽度、毛孔面积、皮肤黄值、毛孔大小、色斑。

在另一优选例中，所述试剂或试剂盒还包括检测痤疮丙酸杆菌（*C.acnes*）的试剂。

20 在另一优选例中，所述试剂或试剂盒还包括检测牛眼莫拉氏菌(*Moraxella bovoculi*)和/或冷杆菌属(*Psychrobacter sp.*)的试剂。

在另一优选例，所述试剂或试剂盒还包括检测贪婪丙酸杆菌（*Propionibacterium avidum*）、颗粒丙酸杆菌（*Propionibacterium granulosum*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、痤疮丙酸噬菌体和/或葡萄球菌噬菌体的试剂。

25 在另一优选例中，所述试剂或试剂盒还包括检测表皮葡萄球菌（*S. epidermidis*）的试剂。

本发明第二方面提供了一种标志物组合，所述标志物组合包括奥斯陆莫拉菌（*M.osloensis*）和痤疮丙酸杆菌（*C.acnes*）。

在另一优选例中，所述标志物组合还包括牛眼莫拉氏菌(*Moraxella bovoculi*)
30 和/或冷杆菌属(*Psychrobacter sp.*)。

在另一优选例中,所述标志物组合还包括贪婪丙酸杆菌(*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌(*Propionibacterium granulosum*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、痤疮丙酸噬菌体和/或葡萄球菌噬菌体。

在另一优选例中,所述标志物组合还包括表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)。

5 在另一优选例中,所述标志物组合用于(a) 皮肤分型;和/或(b) 判断皮肤状态。

在另一优选例中,所述皮肤状态包括:皮肤年龄、皮肤含水量、皮肤弹性、皮肤颜色、皮肤衰老程度。

在另一优选例中,基于选自下组的一种或多种表型判断皮肤的衰老程度:卟啉、油脂、含水量、光泽度、毛孔面积、皮肤黄值、毛孔大小、色斑。

10 在另一优选例中,所述的标志物或标志物组合来源于皮肤样品,较佳地,来源于全身皮肤或面部皮肤,更佳地,来源于面颊、额头、鼻翼。

在另一优选例中,所述标志物或标志物组合来源于亚洲人群的皮肤样品。

在另一优选例中,所述标志物或标志物组合来源于面颊、额头、鼻翼样品。

15 在另一优选例中,通过下组的一种或多种方法对所述标志物组合中的各个标志物的水平进行检测:测序、PCR、蛋白定量检测。

在另一优选例中,对所述标志物组水平检测的方法还包括选自下组的一种或多种方法:特征基因定量 PCR、qPCR、实时定量 PCR、宏基因组学分析、16s RNA 测序、质谱分析、蛋白质免疫印迹。

20 在另一优选例中,所述标志物组合中的所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量)(C)的比例(M/C)符合以下条件时: $M/C \leq 1.3$,较佳地, $M/C \leq 0.8$,更佳地 $M/C \leq 0.4$,则皮肤类型为 C 型(或 I 型),其表型包括:油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

25 在另一优选例中,所述标志物组合中的所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量)(C)的比例(M/C)符合以下条件时: $0.3 \leq M/C \leq 2.5$,较佳地, $0.3 \leq M/C \leq 2.3$,更佳地, $0.8 \leq M/C \leq 1.8$,则皮肤类型为混合型(或 II 型),其表型包括:油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

30 在另一优选例中,所述标志物组合中的所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量)(C)的比例(M/C)符合以下条件时:

$M/C \geq 0.5$, 较佳地, $M/C \geq 1.8$, 更佳地, $M/C \geq 2.2$, 则皮肤类型为 M 型(III 型), 其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低, 皮肤弹性差, 皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中, 来源于面颊处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时:
5 $M/C \leq 0.8$, 较佳地, $M/C \leq 0.75$, 则皮肤类型为 C 型(或 I 型), 其表型包括油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中, 来源于面颊处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时:
10 $0.75 \leq M/C \leq 2$, 较佳地, $0.8 \leq M/C \leq 1.7$, 则皮肤类型为混合型(或 II 型), 其表型包括: 油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中, 来源于面颊处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时:
15 $M/C \geq 1.7$, 则皮肤类型为 M 型(III 型), 其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低, 皮肤弹性差, 皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中, 对于来源于额头处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时: $M/C \leq 1.5$, 较佳地, $M/C \leq 1.25$, 则皮肤类型为 C 型(或 I 型), 其表型包括油
20 脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中, 来源于额头处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时:
25 $1.25 \leq M/C \leq 2.5$, 较佳地, $1.3 \leq M/C \leq 2.2$, 皮肤类型为混合型(或 II 型), 其表型包括: 油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中, 来源于额头处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件时:
30 $M/C \geq 2$, 较佳地, ≥ 2.2 , 则皮肤类型为 M 型(III 型), 其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低、皮肤弹性差、皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中, 对于来源于鼻翼处样本, 所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量) (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量) (C)的比例(M/C)符合以下条件

时： $M/C \leq 0.5$ ，较佳地， $M/C \leq 0.35$ ，皮肤类型为 C 型(或 I 型)，其表型包括油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中，来源于鼻翼处样本，所述奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时：

- 5 $0.35 \leq M/C \leq 0.7$ ，较佳地， $0.35 \leq M/C \leq 0.6$ ，更佳地， $0.35 \leq M/C \leq 0.55$ ，皮肤类型为混合型(或 II 型)，其表型包括：油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中，来源于鼻翼处样本，所述奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时：

- 10 $M/C \geq 0.5$ ，较佳地， $M/C \geq 0.55$ ，皮肤类型为 M 型(III 型)，其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低，皮肤弹性差，皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

本发明第三方面提供了一种皮肤分型或判断皮肤状态的方法，所述方法包括：

- (1) 提供一来源于待测对象皮肤的样品，对样品标志物组合中各个标志物的水平（如含量）进行检测，所述组合包括以下标志物：奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌，分别获得奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)和痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)；
- 15

- (2) 基于奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)，或将所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)进行比较，从而对待测对象的皮肤进行分型、和/或判断皮肤状态。
- 20

在另一优选例中，所述待测对象来源于亚洲人群。

在另一优选例中，步骤(2)中，根据奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的相对值(比如 M/C)对皮肤进行分型，或判断样本的皮肤状态。

- 25 在另一优选例中，所述的皮肤状态包括皮肤年龄、皮肤含水量、皮肤弹性、皮肤颜色、皮肤衰老程度。

在另一优选例中，用选自下组的一种或多种方法对待测对象的样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)和痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)进行确定：测序、PCR、蛋白定量检测。

- 30 在另一优选例中，对所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)和痤

疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的检测方法还包括选自下组的一种或多种方法：特征基因定量 PCR、qPCR、实时定量 PCR、宏基因组学分析、16s RNA 测序、质谱分析、蛋白质免疫印迹。

在另一优选例中，所述样品中的所述奥斯陆莫拉菌的 (M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： M/C $\leq$ 1.3，较佳地，M/C $\leq$ 0.8，更佳的 M/C $\leq$ 0.4，则皮肤类型为 C 型(或 I 型)，其表型包括：油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中，所述样品中的所述奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时：
10 0.3 $\leq$ M/C $\leq$ 2.5，较佳地，0.3 $\leq$ M/C $\leq$ 2.3，更佳地，0.8 $\leq$ M/C $\leq$ 1.8，则皮肤类型为混合型(或 II 型)，其表型包括：油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中，所述样品中的所述奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： M/C $\geq$ 0.5，
15 较佳地，M/C $\geq$ 1.8，更佳地，M/C $\geq$ 2.2，则皮肤类型为 M 型(III 型)，其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低、皮肤弹性差、皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中，来源于面颊处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： M/C $\leq$ 0.8，较佳地，M/C $\leq$ 0.75，则皮肤类型为 C 型(或 I 型)，其表型包括油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中，来源于面颊处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： 0.75 $\leq$ M/C $\leq$ 2，较佳地，0.8 $\leq$ M/C $\leq$ 1.7，则皮肤类型为混合型(或 II 型)，
25 其表型包括：油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中，来源于面颊处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： M/C $\geq$ 1.7，则皮肤类型为 M 型(III 型)，其表型包括皮肤油脂含量低、
30 含水量较低、皮肤弹性差、皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中，对于来源于额头处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的

水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $M/C \leq 1.5$ ，较佳地， $M/C \leq 1.25$ ，则皮肤类型为 C 型(或 I 型)，其表型包括油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中，来源于额头处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平
5 （如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $1.25 \leq M/C \leq 2.5$ ，较佳地， $1.3 \leq M/C \leq 2.2$ ，皮肤类型为混合型(或 II 型)，其表型包括：油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中，来源于额头处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平
10 （如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $M/C \geq 2$ ，较佳地， ≥ 2.2 ，则皮肤类型为 M 型(III 型)，其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低、皮肤弹性差、皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中，对于来源于鼻翼处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合
15 以下条件时： $M/C \leq 0.5$ ，较佳地， $M/C \leq 0.35$ ，皮肤类型为 C 型(或 I 型)，其表型包括油脂含量高、含水量高、皮肤弹性好、皮肤衰老程度低、皮肤颜色光亮。

在另一优选例中，来源于鼻翼处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下
20 条件时： $0.35 \leq M/C \leq 0.7$ ，较佳地， $0.35 \leq M/C \leq 0.6$ ，更佳地， $0.35 \leq M/C \leq 0.55$ ，皮肤类型为混合型(或 II 型)，其表型包括：油脂含量中等、含水量中等、皮肤弹性一般、皮肤衰老程度中等、皮肤颜色中等。

在另一优选例中，来源于鼻翼处样本，所述样品中的奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下
25 条件时： $M/C \geq 0.5$ ，较佳地， $M/C \geq 0.55$ ，皮肤类型为 M 型(III 型)，其表型包括皮肤油脂含量低、含水量较低、皮肤弹性差、皮肤衰老程度高、皮肤颜色暗沉。

在另一优选例中，所述相对值符合如下条件： $M/C \leq 1.3$ 时皮肤为 C 型， $M/C \geq 0.5$ 时皮肤为 M 型。

在另一优选例中，所述相对值符合如下条件： $0.3 \leq M/C \leq 2.5$ 时皮肤为混合型。

30 在另一优选例中，所述奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）(M)提高时，则表明皮肤状态为皮肤年龄增加、肤色发黑发黄，皮肤含水量降低、皮脂以及卟啉

含量降低。

本发明第四方面提供了一种皮肤分型和/或检测皮肤状态的试剂组合，所述试剂组合包括用于检测本发明第二方面所述的组合中各个标志物的试剂。

5 在另一优选例中，所述试剂用于检测各个标志物的水平（如含量）。

在另一优选例中，所述试剂包括用选自下组的一种或多种方法检测本发明第二方面所述的组合中各个标志物的水平的物质：测序、PCR、蛋白定量检测。

在另一优选例中，对所述标志物水平的检测的方法还包括：特征基因定量 PCR、qPCR、实时定量 PCR、宏基因组学分析、16s RNA 测序、质谱分析、蛋白质免疫
10 印迹。

在另一优选例中，所述试剂组合包括：

第一检测试剂，所述第一检测试剂用于检测奥斯陆莫拉菌的水平(M)；和/或

第二检测试剂，所述第二检测试剂用于检测痤疮丙酸杆菌的水平(C)。

15 本发明第五方面提供了一种试剂盒，所述的试剂盒包括本发明第二方面所述的试剂组合。

在另一优选例中，本发明第二方面所述的组合中各个标记物用作标准品。

本发明第六方面提供了一种对待测对象的皮肤进行分型和/或判断待测对象的皮肤状态的系统，所述系统包括：

20 (a) 特征接收模块，所述特征接收模块用于接收皮肤样本特征数据；所述的特征数据包括：皮肤样本中的奥斯陆莫拉菌(M)和痤疮丙酸杆菌(C) 各自的定量信息；

(b) 计算处理模块，用于计算来自所述特征接收模块的特征数据，从而获得各个特征各自的比例或各个特征之间的比例关系；并且基于所获得的各自的比例或各个特征之间的比例关系，与皮肤分型或特征表征的标准值进行比较，从而得出皮肤
25 分型和/或皮肤状态的判断结果；和

(c) 结果输出模块，所述输出模块用于接收并输出判断结果。

在另一优选例中，所述的对象是人。

在另一优选例中，所述对象为亚洲人群。

30 在另一优选例中，所述对象包括男人和女人。

在另一优选例中，所述的对象包括婴幼儿、青少年或成年人。

在另一优选例中，所述定量信息包括奥斯陆莫拉菌(M)和痤疮丙酸杆菌(C)各自的水平（如含量）。

在另一优选例中，所述比例关系包括皮肤样本中的奥斯陆莫拉菌(M)和痤疮丙酸杆菌(C)各自水平（如含量）的相对值，比如 M/C 。

在另一优选例中，所述系统可对皮肤状态至少分为两型。

5 在另一优选例中，所述定量信息的获取方法包括：测序、PCR、蛋白定量检测。

在另一优选例中，所述定量信息的获取方法还包括：特征基因定量 PCR、qPCR、实时定量 PCR、宏基因组学分析、16s RNA 测序、质谱分析、蛋白质免疫印迹。

在另一优选例中，所述的特征接收模块包括样本采集仪、特征信号输入端。

10 在另一优选例中，所述的计算处理模块包括一处理器，以及一储存器，其中所述的储存器中存储有皮肤型和/或皮肤状态的阈值信息。

在另一优选例中，所述的输出模块包括任何终端，优选显示器、打印机、平板电脑(PAD)、智能手机。

在另一优选例中，所述的各模块通过有线或无线方式连接。

15 本发明第七方面提供了一种筛选改善皮肤状态物质或成分的方法，包括：

(a) 提供一筛选菌，所述筛选菌是奥斯陆莫拉菌(M)、痤疮丙酸杆菌(C)、或包含奥斯陆莫拉菌和/或痤疮丙酸杆菌的筛选菌（混合菌）；

(b) 将待筛选的物质或成分与所述筛选菌进行共培养，并检测奥斯陆莫拉菌或痤疮丙酸杆菌各自的水平（如含量）；或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平（如相对含量）(M/C)；

20

(c) 根据(b)培养后奥斯陆莫拉菌或痤疮丙酸杆菌各自的水平（如含量）；或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平（如相对含量）(M/C)，从而判断所述待筛选的物质或成分为改善皮肤状态物质或成分。

在另一优选例中，当奥斯陆莫拉菌的含量或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平（如相对含量）(M/C)提高时，则表明所述待筛选的物质或成分为用于治疗痤疮的物质。

25

在另一优选例中，当奥斯陆莫拉菌的水平（如含量）下降或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平（如相对含量）(M/C)下降时，则表明所述待筛选的物质或成分为皮肤抗衰老物质。

30 在另一优选例中，当痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）提高或痤疮丙酸杆菌与奥斯陆莫拉菌之间的相对水平（如相对含量）(C/M)提高时，则表明所述待筛选的物质或成分为皮肤抗衰老物质。

在另一优选例中，当痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）降低或痤疮丙酸杆菌与奥斯陆莫拉菌之间的相对水平（如相对含量）(C/M)降低时，则表明所述待筛选的物质或成分为用于治疗痤疮的物质。

5 本发明第八方面提供了一种本发明第二方面所述的标志物组合或本发明第四方面所述的试剂组合的用途，用于制备一试剂盒，所述试剂盒用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断或表征皮肤状态。

本发明第九方面提供了一种本发明第二方面所述的标志物组合或本发明第四方面所述的试剂组合的用途，用于筛选改善皮肤状态的物质或成分。

10 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

15 图1显示了采样皮肤部位示意图。

图 2 显示了汉族人群面部皮肤的微生物组成。

图 3 显示了不同部位最佳聚类数分析。

图 4A、B 显示了额头的聚类结果，其中的箱型图分别表示两组组内样本间的平均距离，红线代表不同组样本间的平均距离。4A 是 JS 散度(Jensen-Shannon
20 divergence)，4B 是 Bray-Curtis 相异度 (Bray-Curtis dissimilarity)。

图 4C、D 显示了额头的痤疮丙酸杆菌或奥斯陆莫拉菌的相对水平，每个点代表一个样本。

图 4E、F 显示了脸颊的聚类结果，其中的箱型图分别表示两组组内样本间的平均距离，红线代表不同组样本间的平均距离。4E 是 JS 散度(Jensen-Shannon
25 divergence)，4F 是 Bray-Curtis 相异度 (Bray-Curtis dissimilarity)。

图 4G、H 显示了脸颊的痤疮丙酸杆菌或奥斯陆莫拉菌的相对水平，每个点代表一个样本。

图 4I、J 显示了鼻翼的聚类结果，其中的箱型图分别表示两组组内样本间的平均距离，红线代表不同组样本间的平均距离。4I 是 JS 散度(Jensen-Shannon
30 divergence)，4J 是 Bray-Curtis 相异度 (Bray-Curtis dissimilarity)。

图 4K、L 显示了鼻翼的痤疮丙酸杆菌或奥斯陆莫拉菌的相对水平，每个点代表一个样本。

图 5 显示了不同皮肤型间的差异微生物，颜色代表微生物的相对水平，每一列为一个样本，每一行为一种微生物。

5 图 6 显示了不同皮肤型的微生物网络特征,左侧为 M-cutotype 富集的微生物种类，右侧为 C-cutotype 富集的微生物种类。每个点代表一个种，每个颜色的花束代表一个种。由图可见一种皮肤型内部富集微生物相互间呈正相关，与另一皮肤型的富集物种呈负相关，不同的皮肤型展现出不同的微生物网络构成。

10 图 7 显示了不同皮肤型皮肤微生物基因的功能富集差异。

图 8 显示了不同皮肤型间的表型差异。

图 9 显示了奥斯陆莫拉菌与年龄以及皮肤表型之间的相关性分析：校正后 P 值小于 0.05。

图 10 显示了 aceA/aceB 基因富集于 M-Cutotype。

15 图 11 显示了 beta-Carotene 合成通路富集于 M-Cutotype。

图 12 显示了奥斯陆莫拉菌上清液和空白对照组处理人角质形成细胞 HaCaT 的 RNAseq 差异表达基因的功能富集分析。

图 13 显示了奥斯陆莫拉菌对多种水溶性碳源化合物的利用。左图为 CCK-8 试剂盒测得，右图为 Dye mix A 测得。

20 图 14 显示了利用新加坡华人皮肤宏基因组数据验证皮肤型的结果。

图 15 显示了利用菲律宾、意大利皮肤宏基因组数据验证皮肤型的结果。

图 16 显示了三株皮肤共生菌的物种水平与宿主表型之间的相关性热图。

图 17 显示了奥斯陆莫拉菌 - HaCaT -QPCR 结果图。

图 18 显示了痤疮丙酸杆菌 - HaCaT -QPCR 结果图。

25 图 19 显示了表皮葡萄球菌 - HaCaT -QPCR 结果图。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，首次发现奥斯陆莫拉菌可用于表征皮肤状态或用于皮肤分型，并且本发明还首次发现了一种新的标志物组合：奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌。本发明的标志物组合可(a)皮肤分型；和/或(b)判断皮肤

30

状态，具有高灵敏性、高特异性的优点，具有重要的应用价值。在此基础上，发明人完成了本发明。

术语

5 本发明所用术语具有相关领域普通技术人员通常理解的含义。然而，为了更好地理解本发明，对一些定义和相关术语的解释如下：

根据本发明，术语“标志物组合”是指两种及两种以上标志物的组合。

根据本发明，标志物质的水平通过两种微生物的存在含量和/或表现量的比值确定。

10 根据本发明，术语“个体”指动物，特别是哺乳动物，如灵长类动物，最好是人。

根据本发明，术语如“一”、“一个”和“这”不仅指单数的个体，而是包括可以用来说明特定实施方式的通常的一类。

如本文所用，在提到具体列举的数值中使用时，术语“约”意指该值可以从15 列举的值变动不多于 1%。例如，如本文所用，表述“约 100”包括 99 和 101 之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

需要说明的是，在此提供术语的解释仅为了使本领域技术人员更好地理解20 本发明，并非对本发明限制。

奥斯陆莫拉菌，*Moraxella Osloensis*, *M.osloensis*, 后面简称 M 菌

奥斯陆莫拉菌，莫拉菌属，杆菌，革兰氏阴性，化能有机营养菌。不能利用碳水化合物产酸。

25

痤疮丙酸杆菌, *Cutibacterium acnes*, *C.acnes*, 后面简称 C 菌

痤疮丙酸杆菌，放线菌门放线菌纲放线菌目丙酸杆菌科丙酸杆菌属的一种，为革兰氏阳性杆菌。人类皮肤重要的定植菌，参与维持皮肤健康，也可作为寻常痤疮的病原菌。

30

表皮葡萄球菌, *Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*

是滋生于生物体表皮上的一种革兰氏阳性球菌，存在于人体的皮肤，阴道等部位，因常堆聚成葡萄串状，故命名为表皮葡萄球菌。

5 皮肤分型

在本发明中，可将皮肤进一步分为 M-Cutotype 型（简称 M 型）、混合型、C-Cutotype 型（简称 C 型）。

C-Cutotype

10 如本文所用，术语“C-Cutotype”、“C 型”可互换使用，是指基于微生物的皮肤分型中的一种类型，其特征为高水平聚集痤疮丙酸杆菌(*C.acnes*)。

M-Cutotype

如本文所用，术语“M-Cutotype”、“M 型”可互换使用，是指基于微生物的
15 皮肤分型中的一种类型，其特征为高水平聚集奥斯陆莫拉菌(*M. osloensis*)。

皮肤弹性

如本文所用，皮肤弹性取决但不限于皮肤含水量、胶原蛋白、弹性蛋白和天然脂肪等含量是否充足。

20

皮肤颜色

如本文所用，皮肤颜色取决但不限于皮肤光泽度、皮肤肤色、黄值等。

皮肤衰老程度

25 如本文所用，皮肤衰老取决但不限于皮肤卟啉增加，皮肤含水量及光泽度下降，毛孔变大且面积增大、皮肤油脂不平衡以及皮肤暗沉等现象。

检测方法

利用采集器，例如无菌棉签，蘸取采菌液，反复摩擦采菌部位，获得微生物样本。通过常见的分子生物学手段对可表征 M 菌或 C 菌的水平（如含量）
30 进行检查，例如以下方式可获得 M/C 比例：1.16sRNA 测序；2.宏基因组测序；

3.针对两物种特征序列设计引物，再使用 qPCR 可获得 M/C 比例；4.对两种菌的特异表达蛋白或代谢产物进行检测达到定量的目的，例如质谱分析、蛋白质免疫印迹等。

5 试剂盒

在本发明中，本发明的试剂盒包括本发明第二方面所述的组合和/或本发明第四方面所述的试剂组合。

在另一优选例中，本发明第一方面所述的组合中各个标志物用作标准品。

10 本发明的主要优点包括：

(1) 本发明以奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌作为标志物组合用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断皮肤状态，如含水量、皮肤弹性，和/或老化程度，具有高灵敏性、高特异性的优点，具有重要的应用价值。

(2) 本发明首次在亚洲人群发现奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌可作为标志物组合用于(a) 将皮肤分型为 M-Cutotype 型、混合型和/或 C-Cutotype 型；和/或(b) 判断皮肤状态。

(3) 本发明首次发现了一种不同于以往以宿主生理驱动作为分类依据(油性皮肤、干性皮肤、湿性皮肤)的新分类方式，新的分类方式以皮肤微生物作为分类依据，鉴定出了三种具有不同特征的皮肤型。而对这 3 种皮肤型进行分析，结果提示我们宿主生理所造成的营养差异可能是产生不同皮肤型的驱动因素。而且不同皮肤型所具有的微生物组群落可能会通过发挥特定的功能反作用于宿主皮肤，对皮肤健康和皮肤外观产生一定的影响。因此，对皮肤型的进一步研究可能有助于个性化医疗的发展，以更好地维持皮肤健康。

(4) 本发明首次发现 M 菌与皮肤表型的相关性，与年龄正相关，并且与一些皮肤衰老表型相关，如随着 M 菌的水平升高，皮肤油脂下降，含水量下降，光泽度下降，黄值(皮肤暗沉)升高；与痤疮的一些典型特征相关，如随着 M 菌增加，油脂下降，卟啉(多为 C 菌代谢产物，可促炎)下降，毛孔面积下降。

(5) 本发明首次发现，提高痤疮丙酸杆菌相对水平（如含量），M 型皮肤可向 C 型皮肤调整，可用于皮肤抗衰老。

(6) 本发明首次发现，提高奥斯陆莫拉菌相对水平（如含量），C 型皮肤可向 M 型皮肤调整，用于治疗痤疮。

(7) 本发明首次发现，将单菌与皮肤表型做相关性分析，探究皮肤微生物是否可能导致宿主皮肤表型的变化，提供微生物与宿主之间相互作用研究的新见解和新角度。

(8) 本发明首次发现，利用细菌上清液处理宿主表皮细胞，在分子水平探究细菌与宿主之间的相互作用关系，而不只局限于相关性研究。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

如无特别说明，本发明实施例中所用的试剂和材料均为市售产品。

通用方法
1.相关性分析：

1) 皮肤微生物样本采集与宏基因组测序

招募上海常住人口作为本研究的志愿者。所有参与本研究的志愿者者会接受上海市皮肤病医院皮肤科医师的检查，以排除受试部位有皮炎湿疹、痤疮、银屑病、感染等皮肤病变，确保在过去 6 个月内没有任何皮肤疾病，同时排除过去 6 个月内使用全身或局部的抗生素治疗的志愿者。最后纳入 294 名的 20 岁 - 65 岁的健康受试者，其中男性 (M) 46 名，女性 (F) 248 名 (表 1)。

表 1 受试者人口统计学数据

年龄段	男性	女性	合计
21-35	16	58	74
36-50	19	112	131
51-65	11	78	89
合计	46	248	294

受试者在采样当天仅使用清水洗脸，且在采样前一天避免使用任何护肤品或化妆品。采样地点保持室内温度为 20 摄氏度，湿度为 50%。实验人员用蘸有 0.15M NaCl 和 0.1% Tween20 溶液的专用无菌拭子反复擦拭受试者额头

(Fh)、面颊(Ch)和鼻旁(Ns)三个部位约 4cm² 的区域, 来回 20 次。然后将拭子折断, 置于 1.5ml 无菌 EP 管中, 于-80℃下冻存留待对其进行皮肤微生物基因组 DNA 的提取, 采样部分示意图如图 1 所示。

通过全基因组扩增法对样本进行扩增, 然后进行宏基因组测序, 最终获得了 822 个面部皮肤微生物样本测序数据。通过 SOAP2 (版本 2.21) 计算每个基因的相对丰度, 再根据每个基因的比对结果, 计算来自同一菌种的基因相对丰度之和, 该值代表该菌种的相对丰度。

2) 皮肤表型测量

对294名汉族受试者进行的所有表型测量均在温度为 20 摄氏度, 湿度为 50%的室内环境中进行。进行测试前, 待测者静坐休息 30 分钟以上, 确保其血液循环在可能的体力活动后能恢复到正常水平。表型测量的区域与微生物采集部位一致。分别用下述仪器 (表2) 对皮肤皮脂含量(sebum)、角质层含水量 (hydration)、经表皮失水率 (TEWL)、皮肤pH值、卟啉 (porphyrin)、肤色 (L*a*b)、色斑 (lentigines)、毛孔 (pores_area)、血管扩张 (telangiectasia)、皱纹 (elasticity) 等表型进行测量。

表2 表型测量仪器

测量表型	仪器
皮脂	Sebumeter® SM815
pH值	Skin-pH-Meter PH 900
角质层含水量	MositureMeterD Compact device
经表皮失水率	Vapometer®
卟啉、肤色、色斑、毛孔、血管扩张、皱纹	VISIA-CR

3) 细菌丰度与皮肤表型相关性分析

基于 R 软件的psych 包 (版本2.0.12) 对各种菌群在294名中国汉族人群面部分布的物种水平和皮脂含量、角质层含水量、经表皮失水率、皮肤pH值、色斑、卟啉、肤色、毛孔等表型进行相关性分析 (Spearman Rank方法), 以评估菌株水平和表型的相关性; 并对相关性分析结果的 P 值进行 FDR 检验, 校正后 P 值<0.05 表示差异具有统计学意义。用 R 包 pheatmap (版本 1.0.12) 绘制相关性热图作为结果展示。蓝色, 负相关; 红色: 正相关; 斯皮

尔曼相关性的显著水平：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

2. 基质金属蛋白酶（MMP）表达实验：

1) 菌株上清液的准备

- 5 i. 挑取自皮肤获得的冻存菌液，采用三区划线法分别划板至对应培养皿进行培养。待平板上生长出单菌落，挑取单菌落分别至对应培养基进行液体培养；
- ii. 培养 24 h 后，对细菌培养液抽提基因组 DNA，并进行 16S rDNA 检测，确认三株细菌培养液依旧为目标菌株，无染菌情况存在；
- 10 iii. 将已确认的菌进行液体培养，并分别设置无细菌接种的纯培养基为对照组；
- iv. 将培养后的菌液用酶标仪检测 600 nm 处的吸光值约为 0.8；
- v. 将三株细菌菌液用 0.22 μm 滤器过滤两次，除去细菌菌体，保留细菌上清液。纯培养基对照组进行同样操作；
- vi. 将所得过滤细菌上清液和纯培养基上清液放入-80 °C内储存，待用。

2) 细菌上清液孵育 HaCaT 细胞

- 15 i. 培养人角质细胞（HaCaT 细胞） 1×10^6 个。设置菌液上清处理组（实验组）和纯培养基对照组，每组三个重复。轻轻晃动培养板，使细胞分布均匀，放入 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱培养。表 3 为本发明使用的三种细菌；
- ii. 继续于培养箱内孵育 24 h，弃去细胞培养液，加入 PBS 轻微冲洗。而后
- 20 每皿加入胰酶，放入细胞培养箱消化 5 min 后离心 800 $\times$ g，5 min，收集细胞。

表 3 细菌培养基列表

	实验组	对照组
奥斯陆莫拉菌	细菌上清液：10% DMEM = 1:25	R2A 培养基：10% DMEM = 1:25
痤疮丙酸杆菌	细菌上清液：10% DMEM = 1:25	RCM 培养基：10% DMEM = 1:25
表皮葡萄球菌	细菌上清液：10% DMEM = 1:25	LB 培养基：10% DMEM = 1:25

	25	
--	----	--

3) 抽提细胞 RNA

- i. 将收集的 HaCaT 细胞或原代成纤维细胞加入 Trizol 试剂, 室温放置 10 min;
- ii. 向离心管内加入三氯甲烷, 振荡混匀后, 静置 5 min;
- iii. 13200 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 吸取上层水相 (约 200 μL) 于另一 mL 离心管内;
- iv. 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 5 min;
- v. 13200 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 弃上清, 可观察到管底有白色沉淀;
- vi. 加入 75% 乙醇 (无水乙醇与 DEPC 水配制, 现配现用, 且用前需放置于 -20 °C 冷却), 轻轻振荡, 使管底 RNA 沉淀悬浮;
- vii. 13200 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 弃上清; 重复以上两步;
- viii. 空离 2 min, 并用移液器尽可能吸尽残留的乙醇, 打开离心管盖, 室温晾干 5 min;
- ix. 加入 DEPC 水溶解 RNA 后, 使用 NanoDrop 测定 RNA 的纯度和浓度, 每个样本 RNA 浓度调平为 200 ng/μL。

4) cDNA 合成

- i. 本实验使用 Vazyme 公司的 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行反转录 PCR 合成 cDNA。
- ii. 取共 1 μg 总 RNA 进行反转录反应, 剩余 RNA 于 -80 °C 保存;
- iii. 进行反转录前, 首先将去除 RNA 样本中可能混杂的基因组 DNA。在 RNase-free 八连排管内中配制基因组 DNA 去除反应混合液 (RNA sample: 4 × gDNA wiper Mix: RNase-free ddH₂O=5: 4: 7), 用移液器轻轻吹打混匀后, 再加入体积比 0.25 倍的 5 × HiScript qRT Super Mix 混合。
- iv. 将前述产物置于 PCR 仪内, 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s。反转录过程完成, 将产物立即用于 qPCR 反应, 或在 -20 °C 保存。

5) 实时定量 PCR (Real-time PCR)

- i. 本实验使用 QIAGEN 公司的 QuantiFast SYBR Green PCR Kit 进行实

时定量PCR (Real-time PCR)，检测基因的相对表达水平。

ii. 将下表 4 中引物用 DEPC 水配制成 2 μM，混匀，待用；

表4 人引物序列

Primer Name	Sequence (5'to 3')
<i>MMP1-F</i>	GGGGCTTTGATGTACCCTAGC (SEQ ID NO.1)
<i>MMP1-R</i>	TGTCACACGCTTTTGGGGTTT (SEQ ID NO.2)
<i>MMP10-F</i>	CTCTGGAGTAATGTCACACCTCT (SEQ ID NO.3)
<i>MMP10-R</i>	TGTTGGTCCACCTTTCATCTTC (SEQ ID NO.4)
<i>MMP12-F</i>	CATGAACCGTGAGGATGTTGA (SEQ ID NO.5)
<i>MMP12-R</i>	GCATGGGCTAGGATTCCACC (SEQ ID NO.6)
<i>MMP13-F</i>	CCAGACTTCACGATGGCATTG (SEQ ID NO.7)
<i>MMP13-R</i>	GGCATCTCCTCCATAATTTGGC (SEQ ID NO.8)

- iii. 在 384 孔板内配制 Real-time PCR 反应体系， Primers (2 μM) : cDNA:
- 5 SYBR Master Mix (2×) =1: 4: 5;
- iv. 将 384 孔板置于离心机内，4 °C，3000 rpm ，离心 3 min。将 384 孔板置于 QuantStudioTM 7 Flex Real-Time PCR System 内进行 RT- PCR 反应, 反应程序如下表 5;

表5 Real-time PCR程序

Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
1	95.0	4 min	1
2	95.0	15 s	38
2	60.0	36 s	38
3	95.0	15 s	1
3	60.0	15 s	1
3	95.0	15 s	1

10

- v. 使用 QuantStudioTM Real-Time PCR Software 对实验结果进行统计处理，进一步按照 $2^{-\Delta\Delta T}$ 方法计算每个样本中基因的相对表达量，最终在 GraphPad Prism 5.0 软件中，采用 T-test 检验方法对实验结果进行分析并作图。显著性水平：*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

实施例 1 汉族人群面部皮肤微生物组的组成

研究对象：本研究经复旦大学生命科学学院伦理委员会批准，招募 294 名上海常住健康受试者作为本研究的志愿者。其中男性(M)46 名，女性(F)248 名。
5 采集头面部额头(Fh)、面颊(Ch)和鼻旁(Ns)三个部位的皮肤微生物(请参考图 1)。

通过宏基因组测序手段，结合生物信息分析，系统地描述了中国汉族人群健康皮肤微生物组的组成和功能特征。通过与人类微生物组计划(HMP)的美国人皮肤微生物样本数据相比对，我们发现中国人群中存在一种相对水平显著高于美国人的细菌——奥斯陆莫拉(*M. osloensis*)，奥斯陆莫拉菌在新加坡华人中
10 均相对水平较高，此菌种可能是东亚人群皮肤菌群的特征菌株之一(请参考图 2)。

实施例 2 基于皮肤微生物组的群体分型分析

皮肤微生物组与肠道微生物组一样，会受到多种因素的影响，且存在显著的个体差异性。在研究中，本发明借鉴肠型的方法，基于皮肤微生物对人群进行分型并探究产生分型的驱动因素，以寻找皮肤微生物组背后的潜在规律，并为临床诊断提供新划分标准。

本发明筛选了三个部位皮肤微生物组数据没有缺失的受试者，总计为 247 人。

20 基于皮肤微生物组的数据，对这 247 个受试者进行皮肤型的鉴定。首先，使用 PAM 方法分别对三个部位的样本进行聚类，并用 CH 指数确定最佳的簇数。请参考图 3，CH 指数的结果显示，当簇数为 2 时 CH 指数的得分最高，因此三个部位中最佳簇数都为 2 类。

基于该结果，本发明对样本进行分型分析，分为 2 类，并分别使用 JSD 距离和 Bray-Curtis 距离对三个部位的样本的分型结果进行 PCoA 分析。请参考
25 图 4A~L，结果显示，三个部位的样本分型结果均能被有效分为 2 类，且对该分类贡献度最大的微生物分别为痤疮丙酸杆菌、奥斯陆莫拉菌，即一类富集痤疮丙酸杆菌，另一类富集奥斯陆莫拉菌。根据这一结果，我们将两种皮肤型(cutotype)分别命名为 C-Cutotype 和 M-Cutotype。

30 本发明基于额头的皮肤微生物组数据分析了 C-Cutotype 和 M-Cutotype 的差异菌群。请参考图 5，颜色代表微生物的相对水平（比如，相对丰度），每

一列为一个样本，每一行为一种微生物。差异分析的结果显示，可能由于菌群之间的相互影响，某些微生物更偏好于某一种皮肤型。比如，C-Cutotype 中富集贪婪丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、葡萄球菌属、痤疮丙酸噬菌体和葡萄球菌噬菌体。而 M-Cutotype 中则富集牛眼莫拉氏菌 (*Moraxella bovoculi*) 和冷杆菌属(*Psychrobacter sp.*)。

本发明基于差异菌群的相对水平进行了相关性分析，并用网络图的形式进行展现。请参考图 6，结果显示，在同一种皮肤型中富集的微生物之间存在强烈的正相关，而富集于不同皮肤型之间的微生物之间存在强烈的负相关。这一分析结果说明，富集于同一种皮肤型的微生物可能分别占据不同的生态位，彼此之间形成了稳定的生态网络，构建了一个强有力的微生物群落，以抵御其他微生物包括机会性和潜在病原性微生物的新定植。

基于此 247 人，共计 741 样本，我们给出皮肤型的分型依据 M 菌与 C 菌水平（如含量）的比值（M/C）如表 6 所示。

表 6

	C 型	混合型	M 型
面颊	≤ 0.75	$0.75 < M/C < 1.68$	≥ 1.68
额头	≤ 1.24	$1.24 < M/C < 2.18$	≥ 2.18
鼻翼	≤ 0.34	$0.34 < M/C < 0.55$	≥ 0.55

基于微生物的来源部位不同，具体分型的参考值不同，临床应用时的皮肤分型采样原则：亟待改善的面部皮肤部位，再参照以上数据分型。

此外，C 菌全名痤疮丙酸杆菌，其水平（如丰度）与皮肤痤疮关系紧密。M 菌的相关报道极少，本发明的研究首次发现 M 菌与皮肤表型的相关性，与年龄正相关，并且与一些皮肤衰老表型相关。

发明人进行了受试者肤质与 M/C 变化实验，得到表 2 结果，显示 M/C 比与肤质有关。随着 M 菌的水平升高，皮肤油脂下降，含水量下降，光泽度下降，黄值(皮肤暗沉)升高；与痤疮的一些典型特征相关，如随着 M 菌增加，油脂下降，卟啉(多为 C 菌代谢产物，可促炎)下降，毛孔面积下降。

表 7 列举了相关表型与 M/C 值得相关性，所列表型均为显著相关($p < 0.05$)。

表 7

位置	变量 1	变量 2	相关系数	P 值
Fh 额头	卟啉	M/C ratio	-0.4788	2.30E-16
	油脂	M/C ratio	-0.2592	2.24E-05

	含水量	M/C ratio	-0.1782	3.87E-03
	光泽度	M/C ratio	-0.1585	1.03E-02
	毛孔面积	M/C ratio	-0.1405	2.32E-02
Ck 面颊	卟啉	M/C ratio	-0.4103	1.65E-12
	含水量	M/C ratio	-0.2876	1.35E-06
	油脂	M/C ratio	-0.2217	2.22E-04
Ns 鼻旁	卟啉	M/C ratio	-0.3722	1.35E-10
	皮肤黄值	M/C ratio	0.1993	8.16E-04
	毛孔大小	M/C ratio	-0.1383	2.09E-02
	毛孔面积	M/C ratio	-0.1320	2.75E-02
	油脂	M/C ratio	鼻旁未测	
	含水量	M/C ratio	鼻旁未测	

实施例 3 微生物皮肤型的生物学意义

基于基因水平（如丰度）谱，对样本进行了 PCoA 分析，结果显示两种皮肤型能够有效分开，说明在功能上两种皮肤型存在显著差异。具体地，C-Cutotype 的基因富集于碳水化合物和甾醇的代谢和脂肪酸的合成，而 M-Cutotype 中微生物组的基因更多与氨基酸、芳香族化合物和一些脂类的合成如肌醇等相关。过去的研究报道痤疮丙酸杆菌可利用碳水化合物作为碳源，基因功能富集的结果亦发现 C-Cutotype 中有 17 个 KEGG 功能模块都与磷酸转移酶系统(PTS)有关。在原核生物中，该系统已知负责碳水化合物转运和磷酸化，与葡萄糖、麦芽糖、乳糖、果糖和纤维二糖的代谢能力有关，这可能反映出了 C-Cutotype 依赖于碳水化合物作为营养来源。反之，之前对奥斯陆莫拉菌的研究发现，该微生物无法利用任何碳水化合物，依赖脂肪酸和醇类作为碳源。这进一步说明可能两种皮肤型构成了两种营养需求不同的群落。

由于皮肤微环境是皮肤微生物的生长环境，决定了微生物可获取的营养物质。因此，为了探究皮肤表型是否是导致不同皮肤型的驱动因素，我们进一步分析了两种皮肤型的表型差异。请参考图 7，结果发现，两种皮肤型在角质层水分、油脂、皮肤肤色上具有显著差异。相比之下，C-Cutotype 的油脂、含水量更高，而 M-Cutotype 的皮肤则更加干燥。由于油脂是微生物的主要营养来源，因此该结果进一步提示我们营养需求的差异是导致不同皮肤型的驱动因

素。

此外, M-Cutotype 的皮肤表型特点与老年人的皮肤特点相似, 因此, 我们比较了两种皮肤型的年龄是否存在差异。请参考图 8, 与预期一致, M - Cutotype 组的年龄显著大于 C-Cutotype, 但是进一步分析发现, 在不同年龄段中都存在 C-Cutotype 和 M-Cutotype, 也就是老年人中有 C-Cutotype, 年轻人中存在 M-Cutotype。因此, 我们猜测年龄不是真正的决定因素, 营养需求是直接决定因素。而年龄的差异可能是由于衰老过程中宿主生理的变化影响了皮肤表型, 从而导致 M-Cutotype 的年龄更大。

10 实施例 4 奥斯陆莫拉菌与皮肤衰老表型的相关性

本研究采集了 248 名上海常住健康女受试者的额头(Fh)、面颊(Ch)和鼻旁(Ns)三个部位的皮肤菌群, 分析了奥斯陆莫拉菌与年龄以及皮肤表型进行相关性分析, 通过计算 Spearman 系数并用 FDR 方法对 P 值进行校正, 采用校正后 P 值小于 0.05 为筛选标准。请参考图 9, 结果发现, 三个部位的奥斯陆莫拉菌水平均与年龄存在显著正相关, 与卟啉存在显著负相关。此外, 与面颊斑点呈正相关, 与面颊角质层水分、油脂以及额头的油脂含量呈负相关性。此外, 奥斯陆莫拉菌与其它衰老表型也存在弱正相关的趋势。

实施例 5 M 菌皮肤衰老的潜在靶点

20 在 M-Cutotype 中, 我们观察到皮肤微生物组的异柠檬酸裂解酶(aceA)和苹果酸合成酶(aceB)基因富集。而这些基因的功能与乙醛酸循环有关, 有研究证明了乙醛酸循环会参与乙氧基的分解代谢, 这些结果为皮肤微生物参与辛基苯酚类聚氧乙烯醚(OPEs)降解提供了基础。而 OPE 降解形成的烷基酚和短聚氧基代谢物具有内分泌干扰活性。其中, 烷基酚乙氧基化物(APE)具有类似雌激素活性, 已有实验证明这类化合物在体内与体外均能模拟雌二醇的作用, 被称为环境雌激素。因此, 皮肤微生物有可能会干扰雌二醇的产生, 而雌二醇对防治皮肤老化至关重要(请参考图 10)。

1. 请参考图 11, 基因功能差异分析的结果显示 M-Cutotype 富集于 β -胡萝卜素合成的通路, 该结果说明 M-Cutotype 可能会合成更多的 β -胡萝卜素。而 β -胡萝卜素与皮肤变黄有关。

2. 我们使用 M 菌的培养液刺激角质形成细胞, 使用转录组学的方法探索

M 菌的潜在致老化机制。

RNA-Seq 差异表达基因的信号通路富集分析提示奥斯陆莫拉菌可通过信号通路影响皮肤细胞，主要包括调控胶原的合成与分解。请参考图 12，RNAseq 结果提示差异基因大量富集于胶原代谢过程、细胞外基质分解等与老化表型强烈相关的生物学过程。

实施例 6 调节奥斯陆莫拉菌水平的方法

在前面的分析中，已知奥斯陆莫拉菌跟年龄、皮肤衰老表型有一定关联。本研究中利用单一的皮肤表面化合物孵育奥斯陆莫拉菌，通过检验活菌数量，从而反应出微生物对不同皮肤表面化合物的利用情况，以及特定化合物对奥斯陆莫拉菌的毒性。最终通过调节奥斯陆莫拉菌偏好化合物或毒性化合物的量，可以调控奥斯陆莫拉菌的生长，从而达到延缓衰老的目的。

请参考图 13，本研究中利用 CCK-8 和 Dye mix A 两种方法探究 32 种皮肤表面化合物对奥斯陆莫拉菌生长的影响。化合物分别为：L-赖氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-精氨酸、牛胆酸、肌酸酐、D-葡萄糖、L-乳酸、甘油、2-羧基苯甲醛、尿素、SDS、L-苏氨酸、L-色氨酸、甘氨酸、L-蛋氨酸、L-丝氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-胱氨酸、L-酪氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-鸟氨酸盐酸盐、L-瓜氨酸、L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-丙氨酸、D-天冬氨酸、反式-4-羟基-L-脯氨酸、尿酸、牛磺酸。其中，L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸对奥斯陆莫拉菌的生长具有显著促进作用，而 SDS 具有显著抑制作用。

实施例 7 其他国家人群检测

为了验证所获得的皮肤型是否广泛存在，我们下载了多个公开数据，基于不同种族、不同部位、不同健康状况的皮肤微生物组数据对皮肤型的存在进行验证。

首先我们使用了新加坡华人肘窝部位(湿润类型)的皮肤宏基因组数据，该数据中存在患有特异性皮炎(AD)的患者和健康人群。请参考图 14 结果发现，该数据的样本可以被有效分为 2 类，且与之前的结果相同，一类富集痤疮丙酸杆菌，另一类富集奥斯陆莫拉菌，该结果提示我们皮肤型的存在不受到皮肤健康状况和部位的影响。

进一步，我们使用了菲律宾儿童(头皮和颈部)和意大利人银屑病的公开皮肤宏基因组数据，发现了一致的结果，请参考图 15，分型结果显示人群能够有效分为两类，一类为 C-Cutotype，另一类为 M-Cutotype。

5 综上，本发明证明了皮肤型广泛存在，且不受皮肤部位、种族、健康状况等影响。

实施例 8 皮肤状态分型系统

依据前述实施例我们研发了一种皮肤状态分型系统，所述系统包含特征接收模块、计算处理模块以及结果输出模块，各模块通过有线或无线方式连接，其分型步骤如下：

- (a) 采集受试者面部的皮肤微生物样本并进行检测，进一步产生皮肤样本特征数据。所述皮肤样本特征数据为奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌各自的水平。其中采集部位同实施例 1 所述，检测方法如检测方法所述。
- (b) 将所述皮肤样本特征数据自所述特征接收模块输入该系统。
- 15 (c) 所述处理模块接收来自特征接收模块的皮肤样本特征数据，计算定量出来的奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌各自的比例或彼此之间的相对比例，并且基于所获得的各自的比例或彼此之间的相对比例，与皮肤分型或特征表征的标准值进行比较，从而得出皮肤分型和/或皮肤状态的判断结果
- (d) 结果输出模块，所述输出模块可为任何终端，例如显示器、打印机、平板电脑(PAD)、智能手机等，用于接收并输出判断结果。
- 20

所述系统包括一存储器，其中所述存储器中存储有标准值的阈值信息。

所述皮肤分型和/或皮肤状态对应的标准值为：

皮肤类型为 C 型(或 I 型)：当所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量)(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $M/C \leq 1.3$ ，
25 较佳地， $M/C \leq 0.8$ ，更佳的 $M/C \leq 0.4$ 。该表型的皮肤状态：油脂、含水量更高、皮肤弹性好。

皮肤类型为 M 型(III 型)：当所述样品中的所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)与所述痤疮丙酸杆菌的水平(如含量)(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $M/C \geq 0.5$ ，较佳地， $M/C \geq 1.8$ ，更佳地， $M/C \geq 2.2$ 。该表型的皮肤状态：油脂、
30 含水量较差，皮肤弹性差，皮肤衰老程度高。

皮肤类型为混合型(或 II 型)：当所述奥斯陆莫拉菌的水平(如含量)(M)

与所述痤疮丙酸杆菌的水平（如含量）(C)的比例(M/C)符合以下条件时： $0.3 \leq M/C \leq 2.5$ ，较佳地， $0.3 \leq M/C \leq 2.3$ ，更佳地， $0.8 \leq M/C \leq 1.8$ 。该表型的皮肤状态介于 C 型与 M 型间。

5 实施例 9 细菌与皮肤表型做相关性分析

基于 R 软件对奥斯陆莫拉菌、痤疮丙酸杆菌和表皮葡萄球菌的物种水平和宿主面部 3 个部位（脸颊、额头和鼻旁）的皮脂含量、角质层含水量、经表皮失水率、皮肤 pH 值、色斑、卟啉、肤色、毛孔等宿主皮肤表型进行相关性分析，以评估菌株水平和表型的相关性。

10 结果显示，图 16：三个部位的细菌丰度与表型之间的相关性结果具有一致性，即奥斯陆莫拉菌与年龄、肤色发黑发黄呈正相关，与皮肤含水量、皮脂以及卟啉含量呈负相关。痤疮丙酸杆菌与奥斯陆莫拉菌正好呈现相反趋势。表皮葡萄球菌与色斑呈负相关，与表皮含水量呈现正相关。以上提示，三种菌与皮肤的衰老有一定关联。

15

实施例 10 细菌上清液处理皮肤细胞的分子水平验证

将奥斯陆莫拉菌、痤疮丙酸杆菌和表皮葡萄球菌的细菌上清液分别处理宿主表皮中含量最多的细胞——角质形成细胞（HaCaT 细胞系），通过 QPCR 探究被孵育后的细胞表达谱的改变情况，主要关注与胶原降解和细胞外基质组装相关的基因——基质金属蛋白酶（MMPs）。特别是，MMPs 负责降解细胞外基质（ECM）蛋白，促进光老化。通过分子水平的验证，探究细菌与宿主皮肤表型的关联。

20 QPCR 结果显示，图 17-19，经过奥斯陆莫拉菌菌液上清处理后的 HaCaT 细胞，其 MMP1、MMP10、MMP12 和 MMP13 的表达量相较于对照组显著升高，而痤疮丙酸杆菌和表皮葡萄球菌上清液处理 HaCaT 细胞后，MMPs 表达量无显著性差异。表明，奥斯陆莫拉菌可促进宿主皮肤衰老，同时也说明，皮肤微生物促进皮肤衰老，并不是普遍效应，而是特定菌株具有的效应。

30 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文章被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申

请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种奥斯陆莫拉菌或其检测试剂的用途，其特征在于，用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断或表征皮肤状态；或用于制备一试剂或试剂盒，所述试剂
5 或试剂盒用于(a) 皮肤分型；和/或(b) 判断或表征皮肤状态。
2. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述皮肤状态包括：皮肤年龄、皮肤含水量、皮肤弹性、皮肤颜色、皮肤衰老程度。
3. 一种标志物组合，其特征在于，所述标志物组合包括奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌。
- 10 4. 如权利要求3所述的标志物组合，其特征在于，所述标志物组合还包含(a)牛眼莫拉氏菌(*Moraxella bovoculi*)和/或冷杆菌属(*Psychrobacter* sp.)；和/或(b) 贪婪丙酸杆菌(*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌(*Propionibacterium granulosum*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、痤疮丙酸噬菌体和/或葡萄球菌噬菌体。
- 15 5. 一种皮肤分型或判断皮肤状态的方法，其特征在于，所述方法包括：
(1) 提供一来源于待测对象皮肤的样品，对样品标志物组合中各标志物的水平进行检测，所述组合包括以下标志物：奥斯陆莫拉菌和痤疮丙酸杆菌，分别获得奥斯陆莫拉菌的水平 (M)和痤疮丙酸杆菌的水平 (C)；
(2) 基于奥斯陆莫拉菌的水平 (如含量) (M)，或将所述样品中的奥斯陆莫
20 拉菌的水平 (M)与痤疮丙酸杆菌的水平 (C)进行比较，从而对待测对象的皮肤进行分型、和/或判断皮肤状态。
6. 如权利要求5所述的方法，其特征在于，步骤(2)中，根据奥斯陆莫拉菌的水平 (M)与痤疮丙酸杆菌的水平 (C)的相对值(比如 M/C)对皮肤进行分型，或判断样本的皮肤状态。
- 25 7. 一种皮肤分型和/或检测皮肤状态的试剂组合，其特征在于，所述试剂组合包括用于检测权利要求3所述的组合中各个标志物的试剂。
8. 一种试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒包括权利要求7所述的试剂组合。
9. 一种对待测对象的皮肤进行分型和/或判断待测对象的皮肤状态的系
30 统，其特征在于，所述系统包括：

(a) 特征接收模块，所述特征接收模块用于接收皮肤样本特征数据；所述的特征数据包括：皮肤样本中的奥斯陆莫拉菌(M)和痤疮丙酸杆菌(C)各自的定量信息；

5 (b) 计算处理模块，用于计算来自所述特征接收模块的特征数据，从而获得各个特征各自的比例或各个特征之间的比例关系；并且基于所获得的各自的比例或各个特征之间的比例关系，与皮肤分型或特征表征的标准值进行比较，从而得出皮肤分型和/或皮肤状态的判断结果；和

(c) 结果输出模块，所述输出模块用于接收并输出判断结果。

10 10. 如权利要求 9 所述的系统，其特征在于，所述定量信息的获取方法包括：测序、PCR、蛋白定量检测。

11. 一种筛选改善皮肤状态物质或成分的方法，其特征在于，包括：

(a) 提供一筛选菌，所述筛选菌是奥斯陆莫拉菌(M)、痤疮丙酸杆菌(C)、或包含奥斯陆莫拉菌和/或痤疮丙酸杆菌的筛选菌；

15 (b) 将待筛选的物质或成分与所述筛选菌进行共培养，并检测奥斯陆莫拉菌或痤疮丙酸杆菌各自的水平；或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平 (M/C)；

(c) 根据(b)培养后奥斯陆莫拉菌或痤疮丙酸杆菌各自的水平；或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平 (M/C)，从而判断所述待筛选的物质或成分为改善皮肤状态物质或成分。

20 12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，步骤 (c) 中奥斯陆莫拉菌的水平提高，或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平 (M/C)提高，或痤疮丙酸杆菌的水平降低，或痤疮丙酸杆菌与奥斯陆莫拉菌之间的相对水平 (C/M)降低时，所述待筛选的物质或成分为用于治疗痤疮的物质；和/或步骤 (c) 中奥斯陆莫拉菌的水平下降，或奥斯陆莫拉菌与痤疮丙酸杆菌之间的相对水平 (M/C)下降，或痤疮丙酸杆菌的水平提高，或痤疮丙酸杆菌与奥斯陆莫拉菌之间的相对水平(C/M)提高，所述待筛选的物质或成分为皮肤抗衰老物质。

13. 一种权利要求 3 所述的标志物组合或权利要求 7 所述的试剂组合的用途，其特征在于，(a)用于制备一试剂盒，所述试剂盒用于皮肤分型，和/或判断或表征皮肤状态；和/或(b)用于筛选改善皮肤状态的物质或成分。

30