



专论与综述

宏基因组学及其在口腔微生物研究中的应用

李玉姣¹ 钱飞² 王丹¹ 田宇^{*1}

1 军事口腔医学国家重点实验室 口腔疾病国家临床医学研究中心 陕西省口腔医学重点实验室 第四军医大学口腔医院牙体牙髓病科 陕西 西安 710032

2 军事口腔医学国家重点实验室 口腔疾病国家临床医学研究中心 陕西省口腔医学重点实验室 第四军医大学口腔医院修复科 陕西 西安 710032

摘要: 宏基因组是指环境中所有微生物的遗传物质总和。宏基因组学技术可以最大限度地利用环境中的微生物资源,受到了国内外微生物研究者的重点关注。口腔中寄居着大量的微生物群落,以往对口腔疾病微生物的研究大多局限于单纯的细菌培养技术,然而,由于培养技术的局限性,部分微生物很难或根本不能培养,宏基因组学技术打破了这一局限性,帮助人类发掘更丰富的口腔微生物资源。最近,以宏基因组学测序为基础的研究描绘出了口腔生态系统的图谱,越来越多的实验证明口腔微生物组在各种口腔疾病甚至全身系统性疾病中的重要作用。同时,这也为基于人类微生物组的诊断和治疗开辟了新的途径。本综述旨在说明宏基因组学是研究人类口腔疾病及全身疾病相关微生物的得力工具,而且具有广阔的发展前景,同时也讨论了宏基因组学在应用中有待克服的局限性。

关键词: 宏基因组学, 口腔微生物, 口腔疾病, 宏基因组测序

Metagenomics and its application in the study of oral microorganisms

LI Yujiao¹ QIAN Fei² WANG Dan¹ TIAN Yu^{*1}

1 State Key Laboratory of Military Stomatology, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Stomatology, Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

2 State Key Laboratory of Military Stomatology, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Stomatology, Department of Prosthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Metagenome refers to the sum of genetic material of all the microorganisms in an environment. The technology of metagenomics can make the best use of microbial resources in the environment, which has attracted increasing attention of microbiological researchers at home and abroad. There is a large number of microorganisms in the oral cavity, and the available studies about the microorganisms causing oral diseases are mostly limited to bacterial culture method. However, some microorganisms are difficult

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81970929)

***Corresponding author:** E-mail: tianyu@fmmu.edu.cn

Received: 27-01-2021; **Accepted:** 04-03-2021; **Published online:** 07-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81970929)

***通信作者:** E-mail: tianyu@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-27; **接受日期:** 2021-03-04; **网络首发日期:** 2021-05-07

or unable to be cultured. Metagenomics technology will break this limitation and help to explore more oral microbial resources. Recent studies based on metagenomic sequencing have mapped the oral ecosystem, and more and more experiments have proved the role of oral microbiome in oral diseases and even systemic diseases. At the same time, these studies pave a new way for the diagnosis and treatment based on human microbiome. This review demonstrates that metagenomics is a powerful tool for the study of microorganisms related to human oral diseases and systemic diseases and has a broad development prospect, and also discusses the limitations to be overcome in the application of metagenomics.

Keywords: metagenomics, oral microorganisms, oral diseases, metagenomic sequencing

口腔微生物组作为人体五大菌库之一, 因其与人类口腔疾病甚至全身系统性疾病的发生发展密切相关而受到了广泛关注^[1]。以往对口腔疾病微生物群落的研究大多局限于单纯的细菌培养技术, 但往往效率不高, 而且具有培养局限性。根据最新扩展的人类口腔微生物组数据库(Human Oral Microbiome Database, HOMD)可知, 只有 57% 的口腔细菌种类得到了正式命名, 13% 的口腔细菌种类被培养但未命名, 而 30% 的口腔细菌尚未被培养得到^[2]。随着宏基因组测序技术和下一代测序(Next-Generation Sequencing, NGS)平台的进步, 有可能获得之前依靠传统培养技术不能得到的口腔微生物。宏基因组学是一种微生物研究方法, 也可称为元基因组学, 其研究对象是环境微生物的全部基因组, 研究手段是功能筛选和测序分析, 目的是研究微生物的多样性、相互关系、种群结构、基因功能等。宏基因组学技术目前常用的 2 种方法包括全宏基因组散弹测序(Whole Metagenome Shotgun Sequencing, WMS)和 16S 核糖体 RNA (16S Ribosomal RNA, 16S rRNA)编码基因测序, 这 2 种方法都需要读取样本中存在的微生物的 16S rRNA 基因序列, 并将它们与序列数据库进行比对, 以确定该样本中存在的不同微生物的相对数量及多样性等。

宏基因组学技术的运用使微生物间相互作用与基因组和空间信息结合起来, 打破了传统微生物分离培养技术的局限性, 极大地拓宽了微生物资源的利用空间, 通过对口腔微生物的深入研究, 可以全面了解口腔微生物菌群结构及功能, 揭示微

生物与口腔疾病间的关系, 从而为临床上口腔疾病的防治提供理论基础, 已经成为国际生命科学以及微生物研究中最重要的前沿和热点^[3]。

1 宏基因组学

宏基因组学的发展经历了环境基因组学、微生物基因组学到人类宏基因组学的阶段。1991 年 Schmidt 等^[4]通过使用最小化特定序列选择的方法, 对太平洋微浮游生物种群的 16S rRNA 基因序列进行了表征, 提出了环境基因组学的概念, 并构建了第一个通过克隆环境样品 DNA 得到的噬菌体文库。1998 年正式启动了环境基因组计划, 此项计划由美国环境健康科学研究所首次提出。后来随着微生物领域的进展, 特定环境中的微生物逐渐受到了重点关注。1998 年, Handelsman 等^[5]率先提出了宏基因组的概念, 指环境中所有微小生物的遗传物质总和。宏基因组学基本技术流程如图 1 所示。

1.1 环境样品总 DNA 的提取

提取高质量的样本总 DNA 是构建宏基因组文库重要的一步^[6]。现在市面上已有多种 DNA 提取试剂盒, 并且很多学者仍在继续探索改良宏基因组 DNA 的提取方法^[7]。

1.2 宏基因组文库的构建^[8]

1.2.1 载体系统选择

载体在促使基因或基因簇在重组克隆子中表达或提高表达量中起着十分重要的作用。通常用于 DNA 克隆的载体包括质粒、黏粒和细菌人工染色体等。

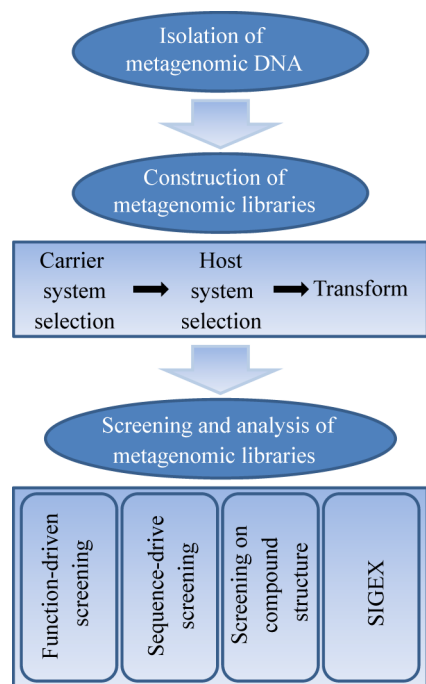


图 1 宏基因组学技术流程图

Figure 1 The process of metagenomic technology

1.2.2 宿主系统选择

宿主菌株的选择需要考虑到转化效率、稳定性以及目标性状的筛选等。常用的宿主主要有大肠埃希氏菌及链霉菌属和假单胞菌属，其中大肠埃希氏菌是最理想和最常用的宿主。

1.2.3 转化

在宏基因组克隆中，转化即是指通过合适的方法使宿主细胞处于感受态。有 CaCl_2 法和电转化法 2 种，目前一般采用电转化法。

1.3 宏基因组文库的筛选

宏基因组文库的筛选技术大致可分为 4 类^[9]。

1.3.1 功能驱动的筛选

功能驱动的筛选特点是只对能在宿主中表达的基因进行筛选，依据其表达特性可筛选到人类需要的酶类、抗生素类等产物^[10]。其局限性是此种筛选方法工作量大，效率相对较低。

1.3.2 序列驱动的筛选

序列驱动的筛选特点是根据现有的已知功能序列进行筛选。其局限性是无法筛选得到与已知

功能序列不相同的新基因。

1.3.3 化合物结构水平的筛选

化合物结构水平的筛选特点是根据化合物的结构不同进行筛选，可以筛选出具有新结构的化合物。其局限性是筛选出的新化合物可能无生物活性，筛选成本高。

1.3.4 底物诱导的筛选

底物诱导的筛选特点是通过利用底物诱导目标基因表达来进行筛选。其局限性是对目标基因的结构性和适应性很敏感，并且不能利用无法进入细胞质的底物^[11]。在适用的条件下，这种筛选方式可以成为一个非常有效的工具，特别是工业上可以用来筛选与抗生素生产或小分子诱导的生物催化剂等相关的基因^[12]。

2 宏基因组学在口腔微生物研究领域的两大应用

由于口腔微生物与人类健康密切相关，对口腔微生物的培养与研究由来已久。传统的微生物多样性研究依赖于分离培养技术，仍有 30% 的口腔微生物种群无法被培养得到^[2]。近年来，随着宏基因组学技术的发展，丰富了口腔微生物研究的成果，从整体上揭示了人体口腔微生物组的多样性及群落功能。宏基因组学技术在口腔微生物研究领域主要应用于 2 个方面。

2.1 口腔微生物群落结构多样性和相互关系的研究

宏基因组学技术的应用可揭示口腔微生物群落多样性、种群结构及其变化和微生物间相互关系，以及微生物与口腔不同环境间的关系；运用的技术手段主要为 16S rRNA 基因测序和 DNA-DNA 杂交芯片(如美国福赛斯研究中心开发的人类口腔微生物芯片)；人类口腔微生物组数据库储存了人类口腔微生物的丰富信息，由美国福布斯研究中心和英国国王学院于 2008 年创建，之后随着宏基因组学在口腔微生物领域的不断应用，越来越多的实验研究丰富了此数据库成果。Wu 等^[13]通过

16S rRNA 基因序列分析了具有不同患龋经历的同卵双胞胎唾液和牙菌斑中的微生物群落,并测定了各分类群的丰富度、多样性和相对丰度的差异,结果表明,患龋者唾液中链球菌、奈瑟氏菌、嗜血杆菌和韦龙氏菌的比例较高,牙菌斑中奈瑟氏菌、棒状杆菌、卟啉单胞菌和细毛菌比例较高,这为探索遗传及环境因素对人体口腔微生物群组多样性及菌群构成的影响提供了理论基础。Luo 等^[14]通过 16S rRNA 基因微阵列芯片技术测定儿童唾液细菌谱,共检出 94 种菌群,分属于 6 个细菌门 30 个属,而且在患者中观察到的菌群多样性高于健康样本,从而为龋病病因学研究提供了依据。

运用宏基因组学技术发现健康人口腔中的菌群组成大多是相似的,这提示了“口腔核心微生物组”的存在^[15],即在不同的健康个体口腔中能够保持相同的口腔微生物组,这些丰富的口腔核心微生物组将维持健康口腔生态系统的动态平衡和功能稳定性。Takeshita 等^[16]利用 16S rRNA 基因的下一代测序技术,确定了日本久山镇 2 343 名成年居民的唾液微生物区系组成;在已鉴定的 550 个种级操作分类单元中,72 个分类单元是共同的,占有个体的 75%,这支持了健康“口腔核心微生物组”的概念。

2.2 筛查口腔微生物群落功能基因,发现新型功能基因及其产物

宏基因组学技术通过构建宏基因组学文库可对口腔微生物群落的功能基因进行筛查并发现新基因。运用的技术手段主要为全基因组散弹枪法测序及功能基因 DNA-DNA 杂交芯片,如美国俄克拉荷马大学开发研制的人类微生物组功能基因芯片。Nasidze 等^[17]分析了来自 120 名健康人(全球 12 个地区各 10 名)唾液样本的 14 115 个部分 16S rRNA 基因序列,这些序列可以归入 101 个已知细菌属,其中 39 个属以前未在人类口腔中报道过;而且系统发育分析表明,还有 64 个未知属存

在,此研究结果进一步表明,探索人类唾液微生物群中的巨大多样性将有助于阐明其在人类健康和疾病中所起的作用,有助于识别对研究人类种群历史具有潜在信息的物种。

抗生素耐药性正威胁着人们的健康,深入探索微生物功能发挥方式和耐药性的产生机制显得极为重要。不少学者开始利用宏基因组学技术对口腔微生物的耐药功能基因进行筛查。吴丹等^[18]通过提取牙菌斑构建 Fosmid 宏基因组文库,筛选得到了一个四环素耐药型基因 *tet(M)*,说明通过构建宏基因组文库的方法筛选牙菌斑培养菌群中的抗生素耐药基因是可行的。另外,Reynolds 等^[19]利用宏基因组技术在人类口腔唾液宏基因组中发现了可能产生异源二聚体 ABC 转运体的新基因 *TetAB(60)*,*TetAB(60)*是专门产生四环素和替加环素从而使大肠埃希氏菌宿主对这些抗生素产生高水平耐药性的基因。最近 Reynolds 等^[20]又利用功能宏基因组学方法从人类唾液宏基因组中识别并描述了一个四环素抗性克隆 *TT31* 基因,测序表明其同时编码 *tet(M)*和 *tet(L)*基因,由此提出在 *TT31* 基因中克隆的 *Tn916* 元件可能代表了祖先 *Tn916*。总之,利用宏基因组学技术对口腔微生物群的耐药功能基因进行筛查,深入了解群落微生物间的相互作用方式,为人类抗感染及耐药性问题提供了新的思路。目前筛查口腔微生物群落功能基因的研究尚不多,但随着借助宏基因组学技术发掘新的功能基因,口腔微生物领域的研究也将会更加深入和完善。

宏基因组学技术在口腔微生物中的研究仍有一定局限性,其不能在基因水平上描绘出微生物生态系统的动态发展。要明确口腔疾病微生物发生发展的原因,不仅要找出与其相关的微生物组成及比例,还应了解它们通过协同拮抗作用发挥功能的具体机制,对参与整个致病过程的蛋白质及代谢物进行研究。因此除了宏基因组学之外,宏转录组学、宏蛋白组学及宏代谢组学技术也逐渐被

应用于口腔微生物的研究之中。如阮文华等^[21]采用宏蛋白质组学技术研究了重度低龄儿童龋和无龋儿童唾液微生物群落的特征,结果无龋儿童唾液微生物来源于 19 个门 1 216 个种,而重度低龄儿童龋唾液微生物来源于 24 个门 1 698 个种,说明重度低龄龋儿童唾液微生物群落结构比无龋儿童复杂可能与龋病的产生及唾液微生态失衡有关。Kressirer 等^[22]通过对儿童龋齿进行宏转录组学分析发现,功能图谱揭示了龋和无龋的酶活性差异,并阐明了冠龋和牙本质龋在细菌组成和潜在基因表达方面的显著差异,其中牙本质龋微生物以甘油激酶、尿嘧啶 DNA 糖苷酶表达最高。随着 4 种宏组学技术的发展及人类对口腔微生物研究的不断探索,多组学联用正成为微生物研究中的热点,可为口腔疾病及某些系统性疾病的诊断和治疗提供深厚的理论基础。这 4 种宏组学技术关系如图 2 所示。

3 宏基因组学在口腔疾病及全身疾病相关微生物的研究进展

随着宏基因组学的运用,人类对口腔微生物的认识逐渐深入,越来越多的证据^[1,23]表明口腔微生物组在各种健康状况中扮演着重要角色,不仅包括口腔疾病,还有全身系统性疾病^[24]。这说明口腔微生物区系可能为口腔疾病及某些系统性疾病的诊断和治疗提供潜在的生物标志物。

3.1 宏基因组学在牙周病微生物中的研究

牙周病是由于口腔微生物和宿主免疫之间相互作用导致的较为复杂的慢性炎症性疾病^[25]。深入了解牙周病相关微生物群的结构对于牙周病的诊断以及促进临床精准诊疗至关重要。过去几十

年里,很多学者通过研究发现了牙周病相关微生物,例如伴放线聚集杆菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛氏类杆菌、齿垢密螺旋体、核梭杆菌和中间普氏菌等^[26-27]。近年来,随着宏基因组学等分子生物学技术的运用,对牙周病微生物多样性的研究已逐渐深入,多项研究发现,在牙周病患者中卟啉单胞菌属、密螺旋体属、小单胞菌属、纤溶因子属的数量较多,而在健康对照组中链球菌、普氏菌属、月形单胞菌属、罗氏菌属含量较高^[28-30]。另外在功能研究方面也进行了探究,除了一些已知的牙周病原体外,宏基因组学技术还发现了新的病原体,如拟杆菌科(未鉴定的科)、白色念珠菌、肠杆菌科(未鉴定的菌种)、TM7 属(TM7 spp.)等^[31]。通过比较宏基因组学的分析结果,可以揭示牙菌斑微生物群落相互作用的机制,并在全基因组范围内表征与牙周炎相关的细菌制剂及其功能^[32],从而为牙周病微生物的精准治疗提供依据。因此,后续对牙周病微生物的研究应在扩大样本量的基础上对测序数据继续进行深入分析,寻找更多的差异菌群及差异功能基因之间的作用机制,并需要进一步验证差异物种与相关小分子代谢通路的具体联系,从而更进一步了解完善口腔微生物在牙周炎发生发展中的作用机制。

3.2 宏基因组学在龋病微生物中的研究

目前认为变异链球菌、乳杆菌和放线菌与龋病的发生和发展密切相关,但是口腔微生物在龋病发生发展过程中的具体机制仍不明确。不少学者利用宏基因组学技术对龋病微生物多样性及相互关系进行了探究。隋文等^[33]应用 16S rRNA 基因的高通量宏基因组测序技术发现龋病儿童与无龋

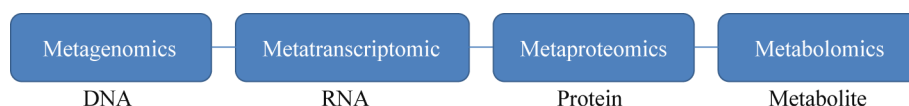


图 2 4 种宏组学技术用于微生物研究示意图

Figure 2 Schematic diagram of the application of four kinds of metagenomic techniques in microbiological research

儿童间菌斑内菌群结构存在差异, 韦荣球菌属、厚壁菌门和普雷沃菌属升高, 提示这些细菌可能与龋病的发生有关。Jiang 等^[34]利用 16S rRNA 基因高通量测序技术对老年人龋病患者口腔标本的菌群结构及多样性进行了深入分析, 并与健康无龋老年人口腔标本进行比较, 发现优势菌门包括变形杆菌、拟杆菌、纤毛虫、梭杆菌、放线杆菌和糖化菌在不同类群中基本一致, 但相对丰度不同; 与有龋组相比, 无龋组的微生物区系之间表现出更复杂的聚集关系。这为进一步阐明老年人龋病的微生物病原学探究提供了理论基础。此外, 在龋病微生物功能基因方面, 为了弥补 16S rRNA 基因高通量测序技术的局限性, Al-Hebshi 等^[35]采用全宏基因组散弹枪测序, 结合高分辨率分析算法, 对 30 名患龋或无龋儿童的龈上微生物群进行了分析, 共鉴定出细菌 406 种 726 株, 噬菌体 34 株, 并在菌种和菌株水平上确定了核心菌群, 其中普雷沃氏菌、韦荣球菌、放线菌、奇异菌与根面龋相关性最强; 值得注意的是, 研究还发现了与噬菌体的相关性: 链球菌噬菌体 M102 与龋有关, 而嗜血杆菌噬菌体 HP1 与无龋有关。Baker 等^[36]通过深度宏基因组学技术对 23 名患龋儿童和 24 名牙齿健康儿童的口腔微生物组及 38 种宿主细胞因子和趋化因子进行了分析, 发现的 42 种新的分类群极大地扩展了许多已知口腔分支的全基因组, 包括糖细菌分支 G3 和 G6。这项对口腔微生物群和宿主免疫标志物的高分辨率测序研究为龋病研究提供了重要线索, 将填补我们在理解口腔微生物生态学及其与发病机制关系方面的一个重要知识空白。

这些实验结果说明了微生物组和龋齿在群落变化及其相互作用和功能水平上具有新的尚未发现的联系, 需要继续利用宏基因组学技术筛查新的功能基因, 并结合宏蛋白组学、宏代谢组学等技术探索与健康相关的物种和生化途径的背后机制, 从而进一步深入了解微生物生态学如何影响

龋病的发病机制, 并开发益生菌或靶向抑菌剂等口腔疾病治疗药物。这就打开了探索的新视角, 将会使我们对龋病致病菌群、牙齿和龋病之间的关系产生新的见解, 从而为龋病的病因学研究以及临床防治提供更好的思路。

3.3 宏基因组学在口腔癌微生物中的研究

口腔癌是全球报告的 10 种最常见的癌症之一, 超过 90% 的口腔肿瘤被确认为鳞状细胞癌^[37]。口腔癌是一种多因素疾病, 遗传与环境都对其发生发展起到了一定的作用。已知的危险因素有吸烟、大量饮酒、咀嚼槟榔、营养素缺乏等, 但是约 15% 的口腔鳞癌不能用上述主要危险因素来解释^[38], 这就需要研究者去探索其他的潜在危险因素。近几十年中, 学者们已经进行了一些研究, 这些研究结果均表明了口腔癌与微生物之间的联系^[39]。已知的与口腔鳞癌密切相关的特定细菌有链球菌、普雷沃氏菌、牙龈卟啉单胞菌等^[40]。Mok 等^[41]用 16S rRNA 基因测序描述了正常人、口腔潜在恶性疾病 (Oral Potentially Malignant Disorders, OPMD) 患者和口腔癌患者相关口腔微生物区系之间的群落变异, 分子方差分析显示, 正常组和口腔癌组相关的口腔微生物区系之间有显著差异, 但 OPMD 组和其他 2 组之间无显著差异, 并且与 OPMD 相关的口腔微生物群在正常组和癌症组之间存在重叠。这些发现表明, 口腔微生物可能是区分正常、OPMD 和癌症患者的潜在生物标志物。相信随着宏基因组学技术的发展与在口腔癌研究中的广泛应用, 口腔微生物区系的变化有望成为口腔鳞癌及早预防和精准诊疗的指标。

3.4 宏基因组学在糖尿病患者口腔微生物中的研究

多项研究表明, 慢性高血糖状态导致各种器官功能障碍, 不仅口腔疾病的发生率增加, 而且口腔疾病的严重程度也增加, 包括牙周病^[42-43]、龋齿^[44-45]和口干症 (慢性口干)^[46]等。Long 等^[47]通

过对 98 名糖尿病患者、99 名肥胖非糖尿病患者和 97 名正常体重非糖尿病患者的口腔微生物进行 16S rRNA 基因高通量测序,发现糖尿病患者组中放线菌门的 5 个科和 7 个属,尤其是流动杆菌属、棒状杆菌属和双歧杆菌属均较对照组减少,这说明口腔放线菌门中可能有细菌类群与糖尿病的风险相关。这与肠道微生物组的研究中放线菌门的双歧杆菌属与降低糖尿病和肥胖的风险有关的结论相一致^[48-49]。糖尿病患者肠道微生物的研究比口腔微生物的研究更加深入,已经达到了通过调节肠道微生物来干预糖尿病的水平^[50-52]。李宗泽等曾用 16S rRNA 基因扩增测序法分析 2 型糖尿病患者与正常人口腔菌群结构,结果发现幽门螺杆菌在 2 型糖尿病患者中丰度较高,与正常人比较差异具有统计学意义^[53]。幽门螺杆菌是否与 2 型糖尿病存在相关性尚具有争议,需进一步利用全基因组学技术深入探究口腔微生物菌群结构与 2 型糖尿病之间的关系。由此可以展望,通过利用宏基因组学技术对糖尿病患者口腔微生物进行深入探索,不仅能发现口腔微生物与肠道微生物的联系,还可能通过调节口腔微生物对糖尿病患者的高发口腔疾病进行生物学预防及精准化治疗。

3.5 宏基因组学在心血管疾病患者口腔微生物中的研究

微生物感染是心血管疾病的重要危险因素,已经有多项研究证明动脉粥样硬化斑块中检测到的微生物与牙周病的病原体有关^[54-56]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)似乎对于心血管系统疾病具有独特及多方面的致病特性, Pg 被发现存在于动脉粥样硬化斑块中,并且与内皮细胞损伤和血管壁增厚有关^[57]。最近有实验发现牙龈卟啉单胞菌通过 NF- κ B-BMAL1-NF- κ B 信号传导回路促进动脉粥样硬化^[58]。Farrugia 等^[59]通过实验评估了牙龈卟啉单胞菌的外膜囊泡(Outer Membrane Vesicles, OMV)对牙周内皮的影响,结果表明牙龈假单胞菌的 OMV 介导了血管

通透性的增加,这很可能是通过一种涉及内皮细胞-细胞粘附素蛋白水解的机制。Menon 等^[60]采用下一代宏基因组高通量测序法对冠状动脉患者和无任何冠状动脉疾病临床症状的龋病患者口腔微生物进行测序分析,结果发现冠心病患者与龋病患者口腔微生物菌群的组成具有相似性,仅有少部分菌属比例发生变化。目前原始实验研究的证据并不能证明口腔细菌感染与心血管疾病发生之间的因果关系,未来还需要更多的探索,比如利用宏基因组学等新的技术方式和路径去深入研究和总结。如果通过进一步的研究能证实这种因果关系,口腔微生物将可能成为心血管疾病潜在的干预治疗目标之一。

3.6 宏基因组学在类风湿关节炎患者口腔微生物中的研究

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种自身免疫疾病,主要表现为慢性滑膜炎,其进行性病变导致的组织功能障碍及全身并发症会使患者的生活质量严重下降^[61]。多项临床研究^[62-64]表明,RA 与牙龈卟啉单胞菌等牙周病(Periodontal Disease, PD)致病菌之间存在潜在联系。因此,口腔微生物群及其与宿主黏膜免疫的相互作用可能在类风湿关节炎的发生发展中起着不可或缺的作用。最近 Liu 等^[65]利用 Illumina MiSeq 对 RA、PD 和健康受试者的口腔微生物进行了宏基因组学焦磷酸测序,结果发现 PD 组中牙龈卟啉单胞菌、普雷沃特氏菌和韦罗氏菌的数量相比健康受试者明显增多,而链球菌、双歧杆菌的数量则减少;RA 组和 PD 组无论是微生物多样性还是丰富度都无明显差异;而且还发现了 PD 组和 RA 组的密螺旋体在从门到属的各个分类水平上都明显高于健康组,这提示我们某些密螺旋体微生物的变化可能成为探索 RA 和 PD 发病机制及生物学诊疗的方向之一。

总之,牙周炎和类风湿性关节炎的发生发展之间的某种联系提高了找到疾病病因及进展的新预测标记物的可能性,通过宏基因组学测序技术

在 RA 中的深入研究, 将来牙周炎治疗或许可能作为常规类风湿性关节炎免疫疗法的辅助或作为预防策略的一部分。

3.7 宏基因组学在消化系统疾病患者口腔微生物中的研究

随着高通量宏基因组测序技术的快速发展, 人类对口腔和肠道微生物群落的认识不断深入, 研究^[66-67]发现, 口腔微生物组和肠道微生物组在丰度和功能上存在一定重叠, 口腔微生物与消化道疾病有着密切的关系。在某些情况下口腔微生物在消化道的异位定殖可能会导致消化道疾病^[68-69]。炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)是一种慢性特发性的炎症性肠道疾病。Qi 等^[70]采用 16S rRNA 基因测序方法对 22 例 IBD 患者和 8 例健康对照者的唾液微生物区系进行了测定, 结果发现 IBD 患者中唾液微生物区系生物多样性和组成改变, 糖化细菌、杆状芽孢杆菌、细毛菌、普氏杆菌等口腔生物被膜形成菌的数量明显增加, 表明唾液微生物区系失调可能参与了 IBD 的发病。此外, 口腔微生物与消化道肿瘤如结肠癌的发生发展也有着密切关系。有研究^[71-73]证明, 结肠腺瘤和结肠癌中富含的很多细菌与典型的口腔常驻细菌有关, 包括梭形杆菌、自生菌、放线菌、小单胞菌、消化链球菌、卟啉单胞菌和溶杆菌等。以后还需要更深入地了解口腔病原体在消化道疾病发病机制中的确切作用, 为将来针对口腔细菌的新型诊断和治疗干预措施的发展奠定基础。同时, 为了更加清楚地了解口腔菌群变化与消化道疾病之间的临床相关性, 对消化道疾病患者口腔健康状况的流行病学调查研究进一步地流行病学队列研究也是必要的。

4 展望

口腔微生物群落的结构特征和功能分析可作为口腔以及全身健康检测的重要标记, 对这些微生物的基因进行全面测序以及对它们的生理功能进行深入解析, 可为人体各类口腔疾病甚至全身疾病

的预防和治疗带来全新的思路和方法。宏基因组学技术使全面、深入研究可培养与不可培养口腔微生物组成为可能, 但目前口腔微生物组在宏基因组学功能基因层面的研究仍有一定的局限性, 比如靶基因在宿主细胞中的表达不佳, 以及对基因产物的活性检测效率低下等, 这就需要开发新的高通量测序工具扩展宏基因组筛选的范围; 其次只利用宏基因组学技术尚不能从基因水平上很好地解释生态系统的动态性及微生物与环境之间的相互作用特征, 结合其他方法如宏转录组、宏蛋白质组和宏代谢组分析等宏组学技术, 可为口腔微生物组的功能动力学提供更好的前景; 再者, 宏基因组学数据测量具有变异性和复杂性, 导致跨研究的整合分析方面十分困难, 因此有必要进一步努力使宏基因组学数据库标准化, 这将需要进行更多的大规模和纵向试验研究。相信随着全基因组测序数据质量的提高和测序成本的降低, 未来引入临床诊断将成为可能, 可以快速地诊断甚至可以预测出一些常见及不常见的口腔疾病及全身疾病的发生, 通过早期干预和诊疗降低发病率。综上所述, 宏基因组学技术的不断发展为口腔微生物的研究提供了更加前沿的手段和更广阔的前景, 在口腔微生物研究领域中有许多未知等待着我们去探索, 有更多研究空白需要我们去填补。

REFERENCES

- [1] Zhang YH, Wang X, Li HX, Ni C, Du ZB, Yan FH. Human oral microbiota and its modulation for oral health[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 99: 883-893
- [2] Escapa IF, Chen T, Huang YM, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New insights into Human nostril microbiome from the expanded human oral microbiome database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract[J]. *mSystems*, 2018, 3(6): e00187-18
- [3] Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics[J]. *Front Genet*, 2015, 6: 348
- [4] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(14): 4371-4378

- [5] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249
- [6] Simon C, Daniel R. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries[A]//Streit WR, Daniel R. *Metagenomics: Methods and Protocols*[M]. New York: Humana Press, 2017: 1-12
- [7] Davis A, Kohler C, Alsallaq R, Hayden R, Maron G, Margolis E. Improved yield and accuracy for DNA extraction in microbiome studies with variation in microbial biomass[J]. *BioTechniques*, 2019, 66(6): 285-289
- [8] Weiland-Bräuer N, Langfeldt D, Schmitz RA. Construction and screening of marine metagenomic large insert libraries[A]//Streit WR, Daniel R. *Metagenomics: Methods and Protocols*[M]. New York: Humana Press, 2017: 23-42
- [9] Ngara TR, Zhang HJ. Recent advances in function-based metagenomic screening[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2018, 16(6): 405-415
- [10] Madhavan A, Sindhu R, Parameswaran B, Sukumaran RK, Pandey A. Metagenome analysis: a powerful tool for enzyme bioprospecting[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(2): 636-651
- [11] Uchiyama T, Miyazaki K. Substrate-induced gene expression screening: a method for high-throughput screening of metagenome libraries[A]//Streit WR, Daniel R. *Metagenomics: Methods and Protocols*[M]. Totowa: Humana Press, 2010: 153-168
- [12] Villamizar GAC, Nacke H, Daniel R. Function-based metagenomic library screening and heterologous expression strategy for genes encoding phosphatase activity[A]//Streit WR, Daniel R. *Metagenomics: Methods and Protocols*[M]. New York, NY: Springer, 2017: 249-260
- [13] Wu HL, Zeng BH, Li BL, Ren B, Zhao JH, Li MY, Peng X, Feng MY, Li JY, Wei H, et al. Research on oral microbiota of monozygotic twins with discordant caries experience-*in vitro* and *in vivo* study[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7267
- [14] Luo AH, Yang DQ, Xin BC, Paster BJ, Qin J. Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition[J]. *Oral Diseases*, 2012, 18(6): 595-601
- [15] Zaura E, Keijser BJF, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 259
- [16] Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, Shimazaki Y, Akifusa S, Ninomiya T, Kiyohara Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the hisayama study[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22164
- [17] Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome[J]. *Genome Research*, 2009, 19(4): 636-643
- [18] Wu D, Cheng G, Li J, Zhu BL, Wei SC. Screening antibiotic resistance genes of cultured dental plaque with a metagenomic approach[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(6): 1041-1048 (in Chinese)
- 吴丹, 程功, 李晶, 朱宝利, 魏世成. 牙菌斑培养菌群宏基因组文库构建及抗生素耐药基因筛选[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(6): 1041-1048
- [19] Reynolds LJ, Roberts AP, Anjum MF. Efflux in the oral metagenome: the discovery of a novel tetracycline and tigecycline ABC transporter[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1923
- [20] Reynolds LJ, Anjum MF, Roberts AP. Detection of a novel, and likely ancestral, *Tn916*-like element from a human saliva metagenomic library[J]. *Genes*, 2020, 11(5): 548
- [21] Ruan WH, Huang ML, Gao QK, Sun C, Jin LL, Wu YQ. Salivary microbial community structure in the children with severe early childhood caries: metaproteomics study[J]. *Stomatology*, 2019, 39(8): 673-678 (in Chinese)
- 阮文华, 黄美丽, 高其康, 孙超, 金玲玲, 吴滢倩. 基于唾液宏蛋白质组学的重度低龄儿童龋患者唾液微生物群落分析[J]. *口腔医学*, 2019, 39(8): 673-678
- [22] Kressirer CA, Chen T, Lake Harriman K, Frias-Lopez J, Dewhirst FE, Tavares MA, Tanner AC. Functional profiles of coronal and dentin caries in children[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2018, 10(1): 1495976
- [23] Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease[J]. *Oral Diseases*, 2017, 23(3): 276-286
- [24] Willis JR, Gabaldón T. The human oral microbiome in health and disease: from sequences to ecosystems[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 308
- [25] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3: 17038
- [26] Témoin S, Wu KL, Wu V, Shoham M, Han YW. Signal peptide of FadA adhesin from *Fusobacterium nucleatum* plays a novel structural role by modulating the filament's length and width[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(1): 1-6
- [27] Malm S, Jusko M, Eick S, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Acquisition of complement inhibitor serine protease factor I and its cofactors C4b-binding protein and factor H by *Prevotella intermedia*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34852
- [28] Chen WP, Chang SH, Tang CY, Liou ML, Tsai SJJ, Lin YL. Composition analysis and feature selection of the oral microbiota associated with periodontal disease[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 3130607
- [29] Chen JZ, Wu XW, Zhu DT, Xu M, Yu YC, Yu LY, Zhang WH. Microbiota in human periodontal abscess revealed by 16S rDNA sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1723
- [30] Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease[J]. *Periodontology* 2000, 2020, 83(1): 14-25
- [31] Patini R, Staderini E, Lajolo C, Lopetuso L, Mohammed H,

- Rimondini L, Rocchetti V, Franceschi F, Cordaro M, Gallenzi P. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(18): 5775-5788
- [32] Wang JF, Qi J, Zhao H, He S, Zhang YF, Wei SC, Zhao FQ. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1843
- [33] Sui W, Zhu H, Gao WL, Hong YL. Study on microbial communities related to childhood caries based on high-throughput sequencing technology[J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2019, 35(12): 711-714 (in Chinese)
隋文, 朱宏, 高文丽, 洪咏龙. 基于高通量测序技术研究儿童龋病口腔微生物群落结构[J]. *临床口腔医学杂志*, 2019, 35(12): 711-714
- [34] Jiang Q, Liu J, Chen L, Gan N, Yang DQ. The oral microbiome in the elderly with dental caries and health[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 442
- [35] Al-Hebshi NN, Baraniya D, Chen T, Hill J, Puri S, Tellez M, Hasan NA, Colwell RR, Ismail A. Metagenome sequencing-based strain-level and functional characterization of supragingival microbiome associated with dental caries in children[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2019, 11(1): 1557986
- [36] Baker JL, Morton JT, Dinis M, Alvarez R, Tran NC, Knight R, Edlund A. Deep metagenomics examines the oral microbiome during dental caries, revealing novel taxa and co-occurrences with host molecules[J]. *Genome Research*, 2021, 31(1): 64-74
- [37] Pushalkar S, Mane SP, Ji XJ, Li YH, Evans C, Crasta OR, Morse D, Meagher R, Singh A, Saxena D. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2011, 61(3): 269-277
- [38] Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, Chen T, Johnson NW. Inflammatory bacteriome and oral squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Dental Research*, 2018, 97(6): 725-732
- [39] Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome and oral cancer-the probable nexus[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2020, 24(2): 361-367
- [40] Karpiński TM. Role of oral microbiota in cancer development[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(1): 20
- [41] Mok SF, Karuthan C, Cheah YK, Ngeow WC, Rosnah Z, Yap SF, Ong HKA. The oral microbiome community variations associated with normal, potentially malignant disorders and malignant lesions of the oral cavity[J]. *The Malaysian Journal of Pathology*, 2017, 39(1): 1-15
- [42] Winning L, Patterson CC, Neville CE, Kee F, Linden GJ. Periodontitis and incident type 2 diabetes: a prospective cohort study[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2017, 44(3): 266-274
- [43] Genco RJ, Borgnakke WS. Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies[J]. *Periodontology* 2000, 2020, 83(1): 40-45
- [44] Lima AKA, Amorim dos Santos J, Stefani CM, Almeida de Lima AD, Damé-Teixeira N. Diabetes mellitus and poor glycemic control increase the occurrence of coronal and root caries: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2020, 24(11): 3801-3812
- [45] Lima DLF, Saintrain MVL, Neri JR, Beck O, Malet P, Moizan JAH, Doucet J. Oral health complications in Brazilian and French diabetic older people: a comparative study[J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2019, 84: 103905
- [46] Sato T, Mito K, Ishii H. Relationship between impaired parasympathetic vasodilation and hyposalivation in parotid glands associated with type 2 diabetes mellitus[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2020, 318(5): R940-R949
- [47] Long J, Cai Q, Steinwandel M, Hargreaves MK, Bordenstein SR, Blot WJ, Zheng W, Shu XO. Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk[J]. *Journal of Periodontal Research*, 2017, 52(3): 636-643
- [48] Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects[J]. *Obesity: Silver Spring, Md*, 2010, 18(1): 190-195
- [49] Wu XK, Ma CF, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang XY, Yu PB, Zhao CA, Li LC, Zhou AP, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes[J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(1): 69-78
- [50] Xourgia E, Papazafiropoulou A, Papanas N, Melidonis A. Anti-diabetic treatment leads to changes in gut microbiome[J]. *Frontiers in Bioscience: Landmark Edition*, 2019, 24: 688-699
- [51] Akash MSH, Fiayyaz F, Rehman K, Sabir S, Rasool MH. Gut microbiota and metabolic disorders: advances in therapeutic interventions[J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2019, 39(4): 223-237
- [52] Kocsis T, Molnár B, Németh D, Hegyi P, Szakács Z, Bálint A, Garami A, Soós A, Márta K, Solymár M. Probiotics have beneficial metabolic effects in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 11787
- [53] Li ZZ, Zhao Z, Zhang WF, Tao R, Sun XF, Tian Y. Analysis of oral microbial diversity in patients with type 2 diabetes mellitus by 16S ribosome DNA amplicon sequencing[J]. *Translational Medicine Journal*, 2017, 6(3): 151-156 (in Chinese)
李宗泽, 赵泽, 张文菲, 陶荣, 孙雪飞, 田宇. 16S 核糖体 DNA Amplicon 测序法分析 2 型糖尿病患者口腔微生物多样性[J]. *转化医学杂志*, 2017, 6(3): 151-156

- [54] Ramírez JH, Parra B, Gutierrez S, Arce RM, Jaramillo A, Ariza Y, Contreras A. Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study[J]. Australian Dental Journal, 2014, 59(1): 29-36
- [55] Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, Flores-Ramírez R. Periodontal disease, systemic inflammation and the risk of cardiovascular disease[J]. Heart, Lung & Circulation, 2018, 27(11): 1327-1334
- [56] Sanz M, Marco del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, Chapple I, Dietrich T, Gotsman I, Graziani F, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report[J]. Journal of Clinical Periodontology, 2020, 47(3): 268-288
- [57] Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease[J]. Periodontology 2000, 2020, 83(1): 90-106
- [58] Xie MR, Tang QM, Nie JM, Zhang C, Zhou X, Yu SL, Sun JW, Cheng X, Dong NG, Hu Y, et al. BMAL1-downregulation aggravates *Porphyromonas gingivalis*-induced atherosclerosis by encouraging oxidative stress[J]. Circulation Research, 2020, 126(6): e15-e29
- [59] Farrugia C, Stafford GP, Murdoch C. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles increase vascular permeability[J]. Journal of Dental Research, 2020, 99(13): 1494-1501
- [60] Menon T, Gopalakrishnan SN, Balasubramanian R, Justin SR. Characterisation of the human oral microbiome in patients with coronary artery disease using next-generation sequencing of 16S rRNA amplicons[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2017, 35(1): 101-104
- [61] Sparks JA. Rheumatoid arthritis[J]. Annals of Internal Medicine, 2019, 170(1): ITC1-ITC16
- [62] Eriksson K, Fei GZ, Lundmark A, Benchimol D, Lee L, Hu YOO, Kats A, Saevarsdottir S, Catrina AI, Klinge B, et al. Periodontal health and oral microbiota in patients with rheumatoid arthritis[J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(5): 630
- [63] Beyer K, Zaura E, Brandt BW, Buijs MJ, Brun JG, Crielaard W, Bolstad AI. Subgingival microbiome of rheumatoid arthritis patients in relation to their disease status and periodontal health[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0202278
- [64] Cheng ZJ, Meade J, Mankia K, Emery P, Devine DA. Periodontal disease and periodontal bacteria as triggers for rheumatoid arthritis[J]. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2017, 31(1): 19-30
- [65] Liu XH, Tian K, Ma XR, Wang SS, Luo CM, Du Q. Analysis of subgingival microbiome of periodontal disease and rheumatoid arthritis in Chinese: a case-control study[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(7): 1835-1842
- [66] Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples[J]. Genome Biology, 2012, 13(6): R42
- [67] Zhang X, Zhang DY, Jia HJ, Feng Q, Wang DH, Liang D, Wu XN, Li JH, Tang LQ, Li Y, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. Nature Medicine, 2015, 21(8): 895-905
- [68] Atarashi K, Suda W, Luo CW, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives Th1 cell induction and inflammation[J]. Science, 2017, 358(6361): 359-365
- [69] Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Hein R, Schmidt TM, Kamada N. The bacterial connection between the oral cavity and the gut diseases[J]. Journal of Dental Research, 2020, 99(9): 1021-1029
- [70] Qi Y, Zang SQ, Wei J, Yu HC, Yang Z, Wu HM, Kang Y, Tao H, Yang MF, Jin L, et al. High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota dysbiosis in association with inflammatory bowel disease[J]. Genomics, 2021, 113(1): 664-676
- [71] Thomas AM, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, Beghini F, Manara S, Karcher N, Pozzi C, et al. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation[J]. Nature Medicine, 2019, 25(4): 667-678
- [72] Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment[J]. Cell Host & Microbe, 2013, 14(2): 207-215
- [73] Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum*-symbiont, opportunist and oncobacterium[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(3): 156-166