

## 研究报告

## 不同妊娠状态下女性口腔微生物的结构差异性

冉丽华<sup>1</sup>, 冯阳<sup>2</sup>, 杨正艳<sup>1</sup>, 李月恒<sup>\*1</sup>, 蒋丹<sup>\*1</sup>

1 重庆医科大学附属口腔医院, 重庆 401147

2 重庆市长寿区妇幼保健院, 重庆 401220

冉丽华, 冯阳, 杨正艳, 李月恒, 蒋丹. 不同妊娠状态下女性口腔微生物的结构差异性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 323-339.

RAN Lihua, FENG Yang, YANG Zhengyan, LI Yueheng, JIANG Dan. Differences in oral microbiota structure of females in different states of pregnancy[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 323-339.

**摘要:** 【背景】妊娠期妇女口腔微生物改变与口腔疾病及全身性疾病之间有显著相关性。【目的】比较不同妊娠状态下女性口腔微生物结构的差异, 探讨该差异与不同妊娠状态间的关联性。

【方法】选取 18 名孕妇和 9 名非孕妇为研究对象[(28.2±3)岁], 分为妊娠期糖尿病组[gestational diabetes mellitus, GDM, 年龄(28.9±3.6)岁, 孕周(30.1±3.2)周]、妊娠期非糖尿病组[non-diabetic pregnant women, PW, 年龄(27.9±3.0)岁, 孕周(28.6±4.7)周]和非妊娠期非糖尿病组[non-pregnant women, NPW, 年龄(27.7±2.1)岁], 每组 9 名, 收集口腔唾液(saliva, S)和龈上牙菌斑(supragingival dental plaque, D), 采取 Illumina NovaSeq 测序平台针对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区进行测序, 以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释, 利用 QIIME 软件对样本进行生物信息学分析。【结果】三组中唾液及牙菌斑微生物差异比较显示: D-GDM 中二氧化碳嗜纤维菌属检出量高于 D-PW, 而月形单胞菌属检出量显著低于 D-PW; S-GDM 中产气单胞菌属、拟杆菌属等厌氧菌属检出量高于 S-PW, 韦荣氏菌属检出量低于 S-PW; D-PW 中纤毛菌属、普氏菌属和月形单胞菌属检出量显著高于 D-NPW; D-NPW 中产气单胞菌属、放线杆菌属、二氧化碳嗜纤维杆菌属、奈瑟菌属、链球菌属和劳特罗氏菌属等检出量高于 D-PW; S-PW 中韦荣氏菌属、普氏菌属、链球菌属和卟啉单胞菌属检出量低于 S-NPW; D-GDM 中福赛斯坦纳菌属、纤毛菌属检出量高于 D-NPW, 劳特罗氏菌属检出量低于 D-NPW; S-GDM 中密螺旋体属、弯曲杆菌属检出量高于 S-NPW, 链球菌属低于 S-NPW。在种水平上, S-GDM 菌群中具核梭杆菌检出量显著高于 S-PW, S-GDM 菌群中牙龈卟啉单胞菌及福赛斯坦纳菌检出量与 S-PW 差异无统计学意义, 产黑普氏菌检出量低于 S-PW; S-PW 中牙龈卟啉单胞菌、产黑普氏菌和福赛斯坦纳菌检出量均显著高于 S-NPW。【结论】孕妇妊娠期糖尿病将增加口腔微生物群厌氧菌检出率, GDM 与牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌和产黑普氏菌等牙周炎致病菌相关性不能确定。

**关键词:** 妊娠期糖尿病; 口腔微生物; 唾液; 龈上牙菌斑

资助项目: 重庆市医学科研项目(卫生健康委员会和科技局联合) (2021MSXM312)

This work was supported by the Chongqing Medical Scientific Research Project (Joint Project of Chongqing Health Commission and Science and Technology Bureau) (2021MSXM312).

\*Corresponding authors. E-mail: LI Yueheng, yf@hospital.cqmu.edu.cn; JIANG Dan, 500218@hospital.cqmu.edu.cn

Received: 2023-03-13; Accepted: 2023-09-26; Published online: 2023-11-08

## Differences in oral microbiota structure of females in different states of pregnancy

RAN Lihua<sup>1</sup>, FENG Yang<sup>2</sup>, YANG Zhengyan<sup>1</sup>, LI Yueheng<sup>\*1</sup>, JIANG Dan<sup>\*1</sup>

1 Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China

2 Chongqing Changshou Health Center for Women and Children, Chongqing 401220, China

**Abstract:** [Background] The oral microbiota changes have significant correlations with oral diseases and systemic diseases in pregnant women. [Objective] To compare the oral microbiota structure of females in different pregnancy states and explore the correlation between the structure difference and different pregnancy states. [Methods] Eighteen pregnant women and nine non-pregnant women were selected for the study and assigned into three groups ( $n=9$ ): gestational diabetes mellitus (GDM, mean age of  $(28.9\pm 3.6)$  years, mean pregnancy of  $(30.1\pm 3.2)$  weeks), non-diabetic pregnant women (PW, mean age of  $(27.9\pm 3.0)$  years, mean pregnancy of  $(28.6\pm 4.7)$  weeks) and non-pregnant women (NPW, mean age of  $(27.7\pm 2.1)$  years). Oral saliva (S) and supragingival dental plaque (D) samples were collected. The Illumina Novaseq platform was used to sequence the V3–V4 variable region of bacterial 16S rRNA. SILVA was used for the taxonomical annotation of the characteristic sequences, and QIIME was employed to perform the bioinformatics analysis. [Results] The D-GDM samples had higher detection rate of *Capnocytophage* and lower detection rate of *Selenomonas* than the D-PW samples. The S-GDM samples had higher detection rate of anaerobic bacteria such as *Aeromonas* and *Bacteroides* than the S-PW samples and lower detection rate of *Veillonella* than the S-PW samples. The D-PW samples had higher detection rates of *Leptotrichia*, *Prevotella*, and *Selenomonas* and lower detection rates of *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Capnocytophage*, *Neisseria*, *Lautropia*, and *Streptococcus* than the D-NPW samples. The S-PW samples had lower detection rate of *Veillonella*, *Prevotella*, *Streptococcus*, and *Porphyromonas* than the S-NPW samples. The D-GDM samples had high detection rate of *Tannerella* and *Leptotrichia* and lower detection rate of *Roseburia* than the D-NPW samples. The S-GDM samples had high detection rates of *Treponema* and *Campylobacter* and lower detection rate of *Streptococcus* than the S-NPW samples. At the species level, the S-GDM samples had higher detection rate of *Fusobacterium nucleatum*, similar detection rates of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*, and lower detection rate of *Prevotella nigrescens* than the S-PW samples. The S-PW samples had high detection rates of *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, and *T. forsythia* than the S-NPW samples. [Conclusion] GDM will increase the detection rate of anaerobic bacteria in the oral cavity, and the correlations between GDM and periodontitis-causing bacteria such as *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *P. nigrescens* are uncertain.

**Keywords:** gestational diabetes mellitus; oral microbiota; saliva; supragingival dental plaque

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是妊娠期常见并发症之一,我国 GDM 发病率为 12.8%–16.7%,且逐年升高<sup>[1]</sup>。GDM 与妊娠不良结局有显著相关性。例如,妊娠期糖尿病妇女剖腹产、早产和巨大儿的几率增加,婴儿大于胎龄患有呼吸窘迫综合征或新生儿黄疸需要进入新生儿重症监护室的几率增高<sup>[2]</sup>。GDM 妇女除增加不良妊娠结局风险外,长期并发症还包括 2 型糖尿病和心血管疾病,后代的并发症包括儿童肥胖和葡萄糖不耐受<sup>[3]</sup>。

口腔微生物可以通过血源、呼吸道和消化道等途径迁移到口腔外的器官,并通过口腔微生物来源的炎性介质、免疫反应产物等扩散至其他部位以发挥致病作用,导致炎症性疾病<sup>[4]</sup>。研究发现妊娠期间女性体内雌激素、孕酮等激素水平急剧上升,并且免疫和代谢系统的改变对口腔微生物产生显著影响<sup>[5]</sup>。

相对妊娠期非糖尿病(non-diabetic pregnant women, PW)而言,有学者发现 GDM 孕妇口腔细菌在妊娠中期检出率及菌群数量均明显增高<sup>[6]</sup>,但关于 GDM 与口腔微生物群关系的研究仍较少。本研究采用横断面研究方法,使用 Illumina NovaSeq 测序平台分析比较不同妊娠状态下女性口腔微生物结构的差异,尝试分析该差异变化与不同妊娠状态间可能的相关性,探讨 GDM 对口腔微生物的潜在影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

随机选取重庆市长寿区妇幼保健院于 2022 年 1 月进行产检的 18 名孕妇为研究对象,其中 9 名孕妇患妊娠期糖尿病(GDM),9 名孕妇未患妊娠期糖尿病(PW),招募 9 名非妇产科医院来源的健康非孕适龄女性(non-pregnant women, NPW)。整个试验过程的细节和随后的数据发表均经重

庆医科大学附属口腔医院伦理委员会批准 [(2020)097]。

纳入标准:

- (1) 年龄 $\geq 20$ 岁;
- (2) 具有独立读写能力;
- (3) 知情同意,自愿参加研究。

排除标准:

- (1) 除妊娠期糖尿病外其他严重系统疾病(如高血压、冠心病);
- (2) 妊娠前患糖尿病;
- (3) 除牙周疾病外其他口腔疾病(如黏膜、肿瘤等疾病)。

各组纳入标准:

妊娠期糖尿病组:根据国际糖尿病和妊娠研究组协会(International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups, IADPSG) 2011 年推荐的诊断标准,依据口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)结果并由专科医生检查诊断为 GDM,经产检确认的妊娠中晚期 GDM 患者,口内无龋齿,采用改良 Loe-Silness 龈炎指数测量为轻度牙龈炎<sup>[7]</sup>,无全身性疾病或先天性疾病、无发育畸形和无身体其他部位存在细菌或严重感染,近 3 个月内未使用抗生素、氟化物(包括含氟牙膏、氟化食盐等)和微生态调节剂以及口腔矫治者。

妊娠期非糖尿病组:妊娠中晚期,血糖无异常,口内无龋齿,采用改良 Loe-Silness 龈炎指数测量为轻度牙龈炎,无全身性疾病或先天性疾病、无发育畸形和无身体其他部位存在细菌或严重感染,近 3 个月内未使用抗生素、氟化物(包括含氟牙膏、氟化食盐等)和微生态调节剂以及口腔矫治者。

非妊娠期非糖尿病组:口内无龋齿,采用改良 Loe-Silness 龈炎指数测量为无牙龈炎,无全身性疾病或先天性疾病、无发育畸形和无身

体其他部位存在细菌或严重感染,近3个月内未使用抗生素、氟化物(包括含氟牙膏、氟化食盐等)和微生态调节剂以及口腔矫治者。

## 1.2 样本收集及处理

在研究对象知情同意下,进行口腔唾液及龈上牙菌斑采集:由同一专业人员采集对象的唾液(saliva, S)和龈上牙菌斑(supragingival dental plaque, D),收集未刺激唾液5–10 mL于15 mL的无菌离心管中,立即放置于冰盒中;牙周探针刮取16/26/11/31/36/46牙位的龈上牙菌斑,融入含有2 mL PBS溶液的无菌5 mL EP管中。收集的唾液和龈上牙菌斑立即放置于冰盒中,并于口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室中将采集的唾液及龈上牙菌斑在4 °C、5 000 r/min离心15 min,取唾液及龈上牙菌斑的沉淀物,冻存于–80 °C冰箱,送检。

## 1.3 生物信息学分析

用 Trimmomatic v0.33 软件对测序得到的 raw reads 进行过滤,然后使用 cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除,得到不包含引物序列的 clean reads,使用 USEARCH v10 软件通过 overlap 对每个样品的 clean reads 进行拼接,然后根据不同区域的长度范围对拼接后数据进行长度过滤;使用 UCHIME v4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列得到最终有效数据(effective reads)。使用 USEARCH 软件对 reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU。以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释,可得到每个特征对应的物种分类信息,进而在各水平(界、门、纲、目、科、属和种)统计各样品群落组成,利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表。

## 1.4 统计学分析

计量资料用均数表示,计数资料用个数(例)及比例(%)表示,利用 Shannon 测量  $\alpha$  多样性并

使用  $t$  检验对不同组间的  $\alpha$  多样性指数进行差异评估,利用加权 UiFrac 计算组间距离分析组间  $\beta$  多样性(PERMANOVA、PCoA),利用 Metastats 软件对组间的物种丰度数据进行  $t$  检验,得到  $P$  值,最后根据  $P$  值( $P < 0.05$ )筛选出导致 2 组样品组成差异的物种;利用 LEfSe 两两分析各样本间菌群差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 研究对象特征

研究对象分组:妊娠期糖尿病组[GDM,年龄(28.9±3.6)岁,孕周(30.1±3.2)周]、妊娠期非糖尿病组[PW,年龄(27.9±3.0)岁,孕周(28.6±4.7)周]、非妊娠期非糖尿病组[NPW,年龄(27.7±2.1)岁,非月经期];其中 GDM 组与 PW 组中研究对象均患有轻度慢性牙龈炎,NPW 组中各研究对象均未患牙周疾病;GDM 组与 PW 组胎龄差异无统计学意义,3 组年龄差异无统计学意义。

### 2.2 口腔微生物群多样性分析

Illumina NovaSeq 6000 平台对 54 个样品测序共获得 4 302 545 对 reads,双端 reads 质控、拼接后共产生 4 278 445 条 clean reads,每个样品至少产生 61 900 条 clean reads,平均产生 79 230 条 clean reads。使用 USEARCH 软件对 reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类、获得 798 个 OTU。样本稀释曲线(图 1)显示,当测序深度达到 3 000 趋于平稳,属水平上各组物种相对丰度累积曲线图(图 2)显示,由红色箱子组成的物种累积曲线及绿色箱子组成的共有量曲线均趋于平缓,由此表明抽样样本序列充分,测序数据量足以反映样品中绝大多数的物种多样性,可以进行数据分析。

$\alpha$  多样性是衡量特定生态系统内物种丰富度及多样性的方法,利用 Chao1、Shannon 指数(表 1,表 2)及等级丰度曲线(图 3)衡量。Chao1

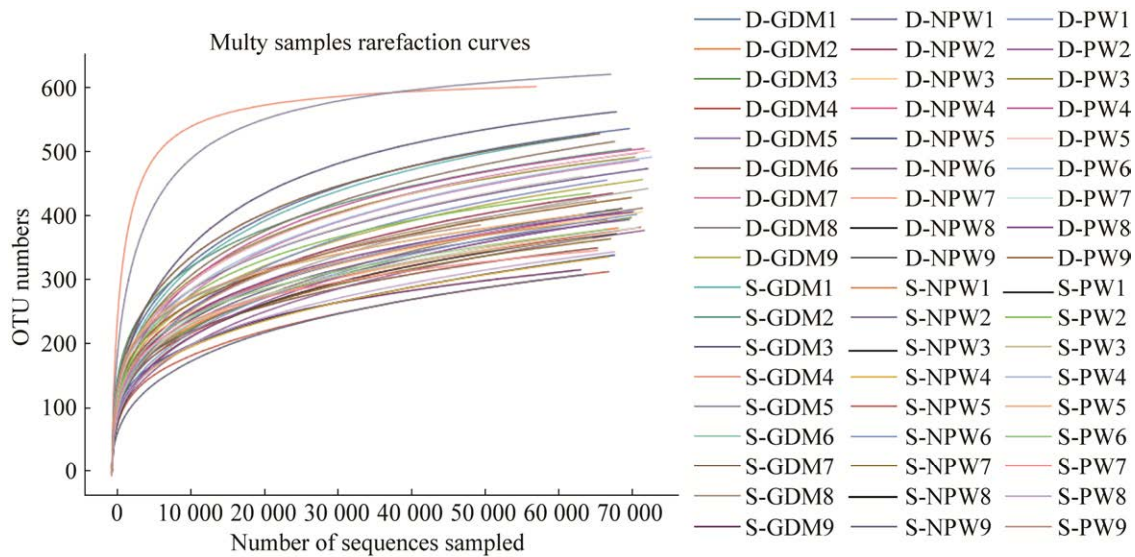


图 1 总样本稀释曲线

Figure 1 Total samples rarefaction curves.

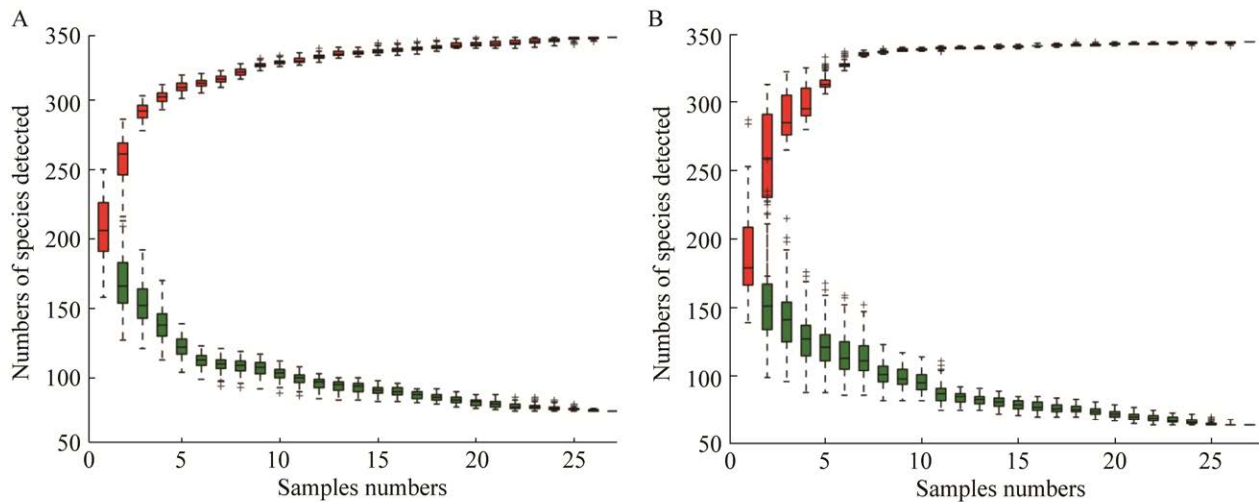


图 2 属水平物种相对丰度累积曲线图

Figure 2 The cumulative curve of relative abundance of species at the species level. A: D-GDM, D-PW and D-NPW. B: S-GDM, S-PW and S-NPW.

指数表示物种丰富度，Shannon 指数表示物种组成的均匀性，数值越高则物种丰富度及均匀性越高，GDM、PW 和 NPW 两两之间牙龈斑微生物群 Chao1 及 Shannon 指数无明显差异 ( $P>0.05$ )；唾液微生物中 GDM Chao1 指数高于 PW、NPW ( $P<0.05$ )；但 GDM 及 PW 组唾液微

生物群中 Shannon 指数显著高于 NPW 组 ( $P<0.05$ )。等级丰度曲线横坐标为按物种丰度排序的序号，纵坐标为对应的物种的相对丰度，曲线越宽表示物种的组成越丰富，曲线越平坦表示物种组成的均匀程度越高，结果显示 D-GDM、D-PW 和 D-NPW 这 3 组丰富度及均

表 1 各组 Shannon 和 Chao1 指数值

Table 1 Shannon and Chao1 index value of each group

Group	Chao1 index	Shannon index
D-GDM	546.07±17.06	5.815 4±0.09
S-GDM	577.48±24.21	6.026 2±0.27
D-PW	549.15±17.95	5.715 9±0.13
S-PW	509.71±19.85	5.656 1±0.12
D-NPW	540.26±12.48	5.840 6±0.11
S-NPW	482.06±21.79	4.991 7±0.10

表 2 不同组间比较 Chao1 和 Shannon 的 P 值

Table 2 P values of Chao1 and Shannon were compared among different groups

Group	Chao1 (P)	Shannon (P)
D-GDM/D-PW	0.902 5	0.525 4
S-GDM/S-PW	0.045 9	0.230 1
D-GDM/D-NPW	0.787 0	0.863 5
S-GDM/S-NPW	0.009 8	0.002 6
D-NPW/D-PW	0.689 6	0.475 0
S-NPW/S-PW	0.363 3	0.000 5

均匀度无显著差异; S-GDM 丰富度大于 S-PW 和 S-NPW, S-GDM 均匀度大于 S-NPW, S-NPW 与 S-PW 丰富度无显著差异。

$\beta$  多样性是比较不同生态系统在物种多样

性方面的相似程度。基于 Weighted-UniFrac 算法计算各组间的距离和 PERMANOVA 的检验方法检测各组间物种组成差异性, PERMANOVA 分析得到的  $R^2$  表示不同分组对样品差异的解释度, 即分组方差与总方差的比值,  $R^2$  越大表示分组对差异的解释度越高, 分组差异越大,  $P < 0.05$  时说明检验的可信度高。在牙菌斑中 NPW 与 PW 组差异最大 ( $R^2 = 0.349$ ,  $P = 0.001$ ); 在唾液微生物群中 3 组仍未见明显差异(图 4)。通过 Weighted-UniFrac 矩阵计算的 PCoA 分析结果显示 D-GDM、D-PW 和 D-NPW 这 3 组中任意两组间微生物有部分重叠, 其中 D-PW 和 D-NPW 中大部分微生物存在明显的差异; S-GDM 和 S-PW、S-GDM 和 S-NPW 之间大部分重叠, S-NPW 和 S-PW 微生物群明显分离(图 5)。

### 2.3 口腔微生物群落结构

根据各组门水平物种分布柱状图(图 6)发现, 无论是唾液微生物群还是牙菌斑微生物群, 在门水平分布的前 5 类均为厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭杆菌门(*Fusobacteriota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)

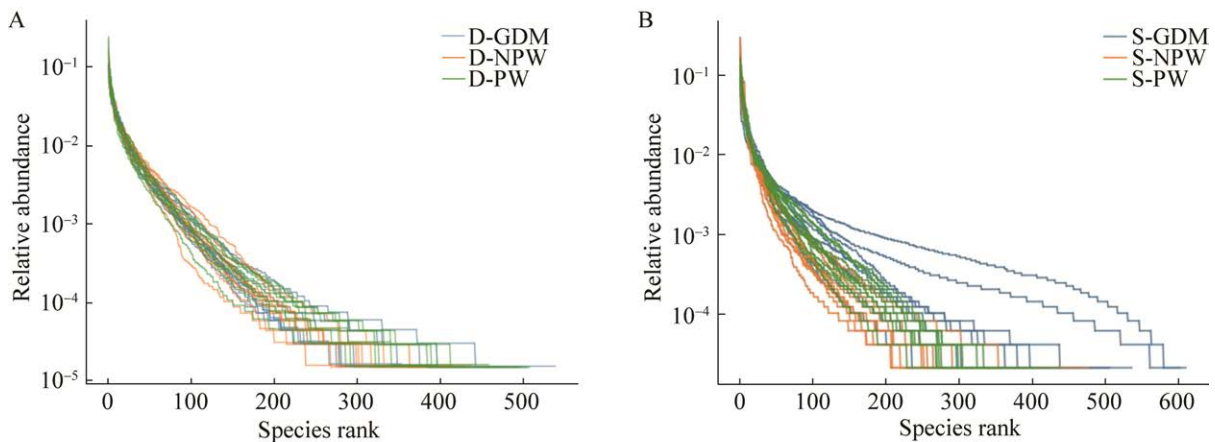


图 3 各组等级丰度曲线

Figure 3 Each group of rank abundance curve. A: D-GDM, D-NPW and D-PW. B: S-GDM, S-NPW and S-PW.

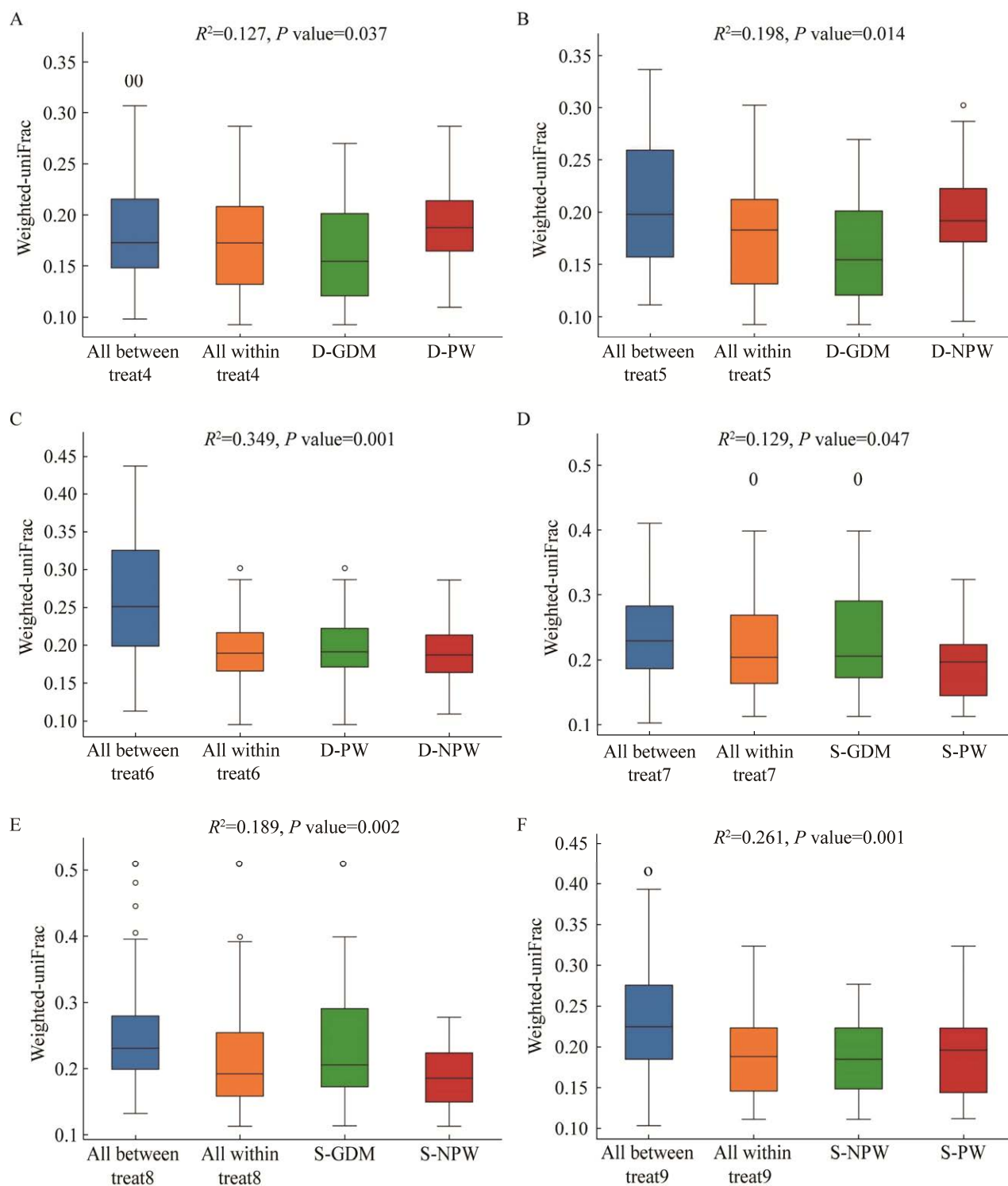


图 4 基于加权 UiFrac 矩阵算法的 PERMANOVA 分析箱型图

Figure 4 PERMANOVA analysis box graph based on weighted UiFrac matrix algorithm. A: D-GDM and D-PW. B: D-GDM and D-NPW. C: D-NPW and D-PW. D: S-GDM and S-PW. E: S-GDM and S-NPW. F: S-NPW and S-PW.

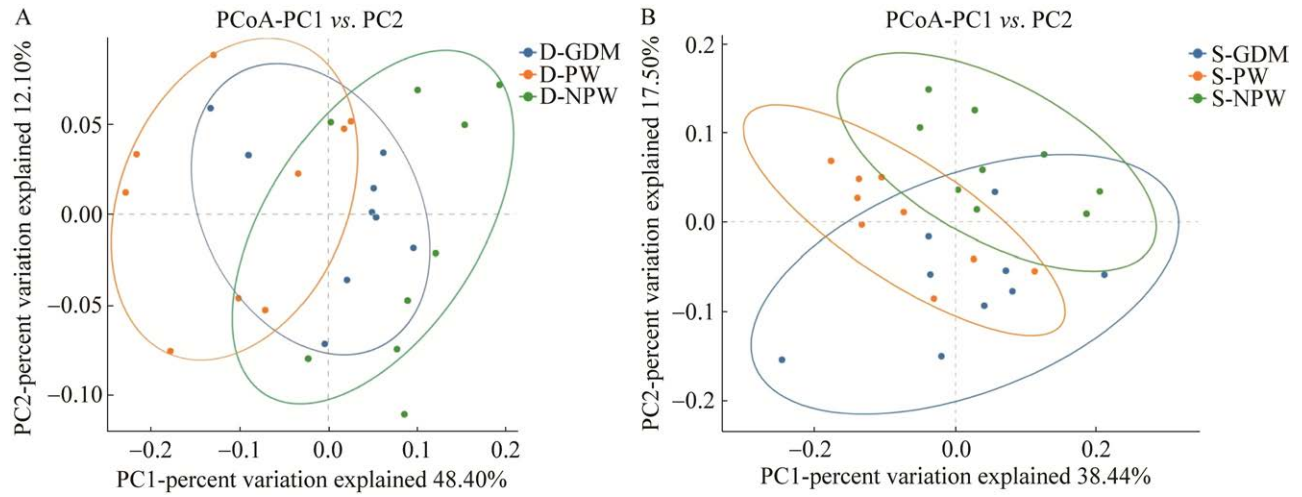


图 5 基于加权 UniFrac 矩阵的 PCoA 分析图

Figure 5 PCoA analysis chart based on Weighted-UniFrac matrix. A: D-GDM, D-PW and D-NPW. B: S-GDM, S-PW and S-NPW.

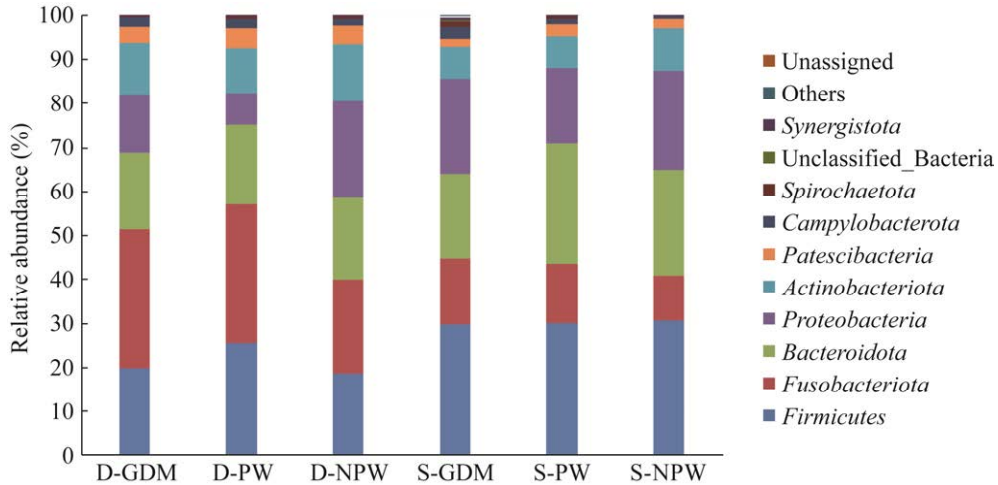


图 6 各组门水平物种分布柱状图

Figure 6 Histogram of species distribution at the level of each phylum.

和放线菌门(*Actinobacteriota*)。当比较 GDM、PW 和 NPW 这 3 组口腔微生物组细菌在种水平上共享数量时,发现与唾液相比,牙菌斑中 3 组共享的细菌数量更多,且总菌种数量差异较小;而唾液微生物组中,3 组共享细菌数量相对较少,其中 S-GDM 细菌总量明显高于 S-PW 及 S-NPW,且独属菌种也多于其他两组。GDM 微生物总检出数量均比其他两组多(图 7)。

生物分类级别从低到高分类依次为种、属、科、目、纲、门和界<sup>[8]</sup>, 研究发现不同物种水平分类等级越高,两微生物群落之间的差异性越小,在属、科水平上比较不同组间微生物群差异,敏感度更高<sup>[9]</sup>。因此本文利用 Metastats 软件对组间的属水平物种丰度数据进行 *t* 检验并对不同组微生物群进行差异性分析( $P < 0.05$ ), 以及 LEfSe 在属水平进行组间微生物群差异性分析。



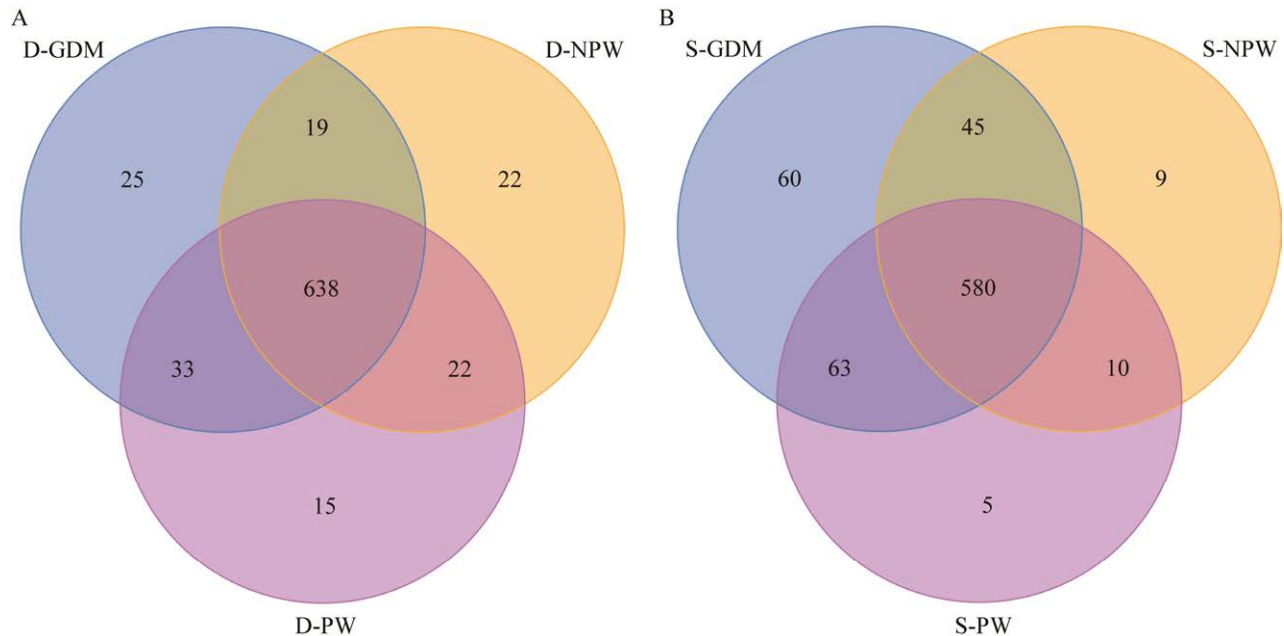


图 7 组间 Venn 图(种水平) A: 牙菌斑微生物组. B: 唾液微生物组

Figure 7 Venn diagram between groups (species level). A: Plaque microbiota. B: Saliva microbiota.

D-GDM 中二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophage*) 高于 D-PW; D-PW 中月形单胞菌属(*Selenomonas*) 显著高于 D-GDM。S-GDM 中产气单胞菌属(*Aeromonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*) 高于 S-PW 的菌属; 韦荣氏菌属(*Veillonella*) 低于 S-PW (表 3, 表 4)。

D-PW 中纤毛菌属(*Leptotrichia*)、普氏菌属和月形单胞菌属显著高于 D-NPW; 然而 D-NPW 中伴放线集簇杆菌属(*Aggregatibacter*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、二氧化碳嗜纤维杆菌属、奈瑟菌属(*Neisseria*)、

链球菌属和劳特罗氏菌属(*Lautropia*) 高于 D-PW。S-PW 中韦荣菌属、普氏菌属、链球菌属和卟啉单胞菌属低于 S-NPW (表 5, 表 6)。

D-GDM 中福赛斯坦纳菌属、纤毛菌属高于 D-NPW; 劳特罗氏菌属低于 D-NPW。S-GDM 中密螺旋体属(*Treponema*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*) 高于 S-NPW; 链球菌属低于 S-NPW (表 7, 表 8, 图 8)。

在种水平上比较各组菌群中牙周致病菌检出率, D-GDM 菌群中牙龈卟啉单胞菌(0.018, 0.006,  $P=0.89$ )及福赛斯坦纳菌检出率(0.010, 0.003,  $P=0.70$ )水平高于 D-PW, 但是无统计学意义, 而 D-GDM 菌群中产黑普氏菌水平低于 D-PW ( $P<0.05$ )。S-GDM 菌群中具核梭杆菌显著高于 S-PW ( $P=0.02$ ), 其次 S-GDM 菌群中牙龈卟啉单胞菌及福赛斯坦纳菌水平高于 S-PW ( $P>0.05$ ), 而产黑普氏菌水平低于 S-PW ( $P<0.05$ )。PW 中牙龈卟啉单胞菌、产黑普氏菌和福赛斯坦纳菌均显著高于 S-NPW ( $P<0.05$ )。

表 3 GDM 与 PW 牙菌斑微生物差异

Table 3 The difference of plaque microorganism between GDM and PW groups

Item	<i>Capnocytophage</i>	<i>Selenomonas</i>
D-GDM	0.052 70±0.003 240	0.036 30±0.005 460
D-PW	0.028 50±0.005 900	0.080 50±0.013 000
<i>P</i>	0.002	0.004

表 4 GDM 与 PW 唾液微生物差异

Table 4 The difference of salivary microorganism between GDM and PW groups

Item	S-GDM	S-PW	P
<i>Aeromonas</i>	0.000 53±0.000 334	0.000 01±0.000 006	0.001
<i>Bacteroides</i>	0.003 10±0.001 870	0.000 14±0.000 045	0.003
<i>Bifidobacterium</i>	0.000 51±0.000 328	0.000 02±0.000 009	0.003
<i>Lactobacillus</i>	0.001 11±0.000 699	0.000 10±0.000 031	0.006
<i>Veillonella</i>	0.064 70±0.013 700	0.101 00±0.009 840	0.048

表 5 NPW 与 PW 牙菌斑微生物差异

Table 5 The difference of plaque microorganism between NPW and PW groups

Item	D-NPW	D-PW	P
<i>Leptotrichia</i>	0.132 00±0.016 600	0.254 00±0.018 700	0.001
<i>Prevotella</i>	0.036 10±0.007 400	0.061 30±0.005 660	0.023
<i>Selenomonas</i>	0.029 50±0.004 720	0.080 50±0.013 000	0.002
<i>Aggregatibacter</i>	0.042 90±0.017 400	0.010 80±0.002 290	0.008
<i>Haemophilus</i>	0.009 93±0.002 690	0.001 34±0.000 491	0.003
<i>Actinobacillus</i>	0.000 32±0.000 213	0.000 01±0.000 001	0.006
<i>Capnocytophage</i>	0.071 60±0.006 790	0.028 50±0.005 900	0.001
<i>Neisseria</i>	0.096 90±0.022 000	0.036 50±0.015 500	0.026
<i>Streptococcus</i>	0.058 60±0.005 940	0.033 30±0.005 300	0.007
<i>Lautropia</i>	0.032 00±0.005 260	0.004 02±0.001 250	0.001

表 6 NPW 与 PW 唾液微生物差异

Table 6 The difference of salivary microorganism between NPW and PW groups

Item	<i>Veillonella</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Porphyromonas</i>
S-NPW	0.052 40±0.008 730	0.037 40±0.004 110	0.187 00±0.023 300	0.075 90±0.009 400
S-PW	0.101 00±0.009 840	0.057 20±0.004 660	0.096 40±0.008 790	0.046 00±0.006 730
P	0.002	0.007	0.002	0.020

表 7 GDM 与 NPW 牙菌斑微生物差异

Table 7 The difference of plaque microorganism between GDM and NPW groups

Item	<i>Tannerella</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Lautropia</i>
D-GDM	0.017 20±0.001 980	0.232 00±0.020 300	0.008 59±0.003 540
D-NPW	0.007 41±0.001 210	0.132 00±0.016 600	0.032 00±0.005 260
P	0.003	0.004	0.003

表 8 GDM 与 NPW 唾液微生物差异

Table 8 The difference of salivary microorganism between GDM and NPW groups

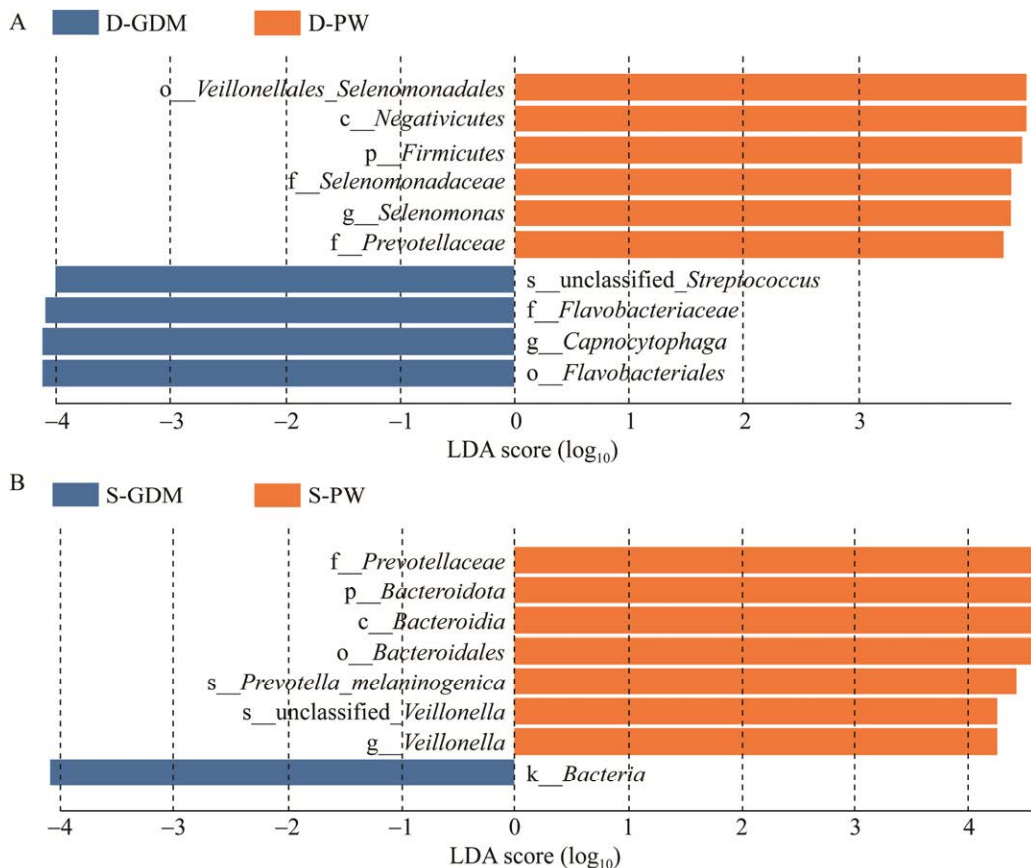
Item	<i>Treponema</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Streptococcus</i>
S-GDM	0.012 20±0.003 560	0.025 90±0.004 950	0.085 50±0.012 000
S-NPW	0.000 92±0.000 329	0.003 65±0.000 728	0.187 00±0.023 500
P	0.001	0.001	0.001

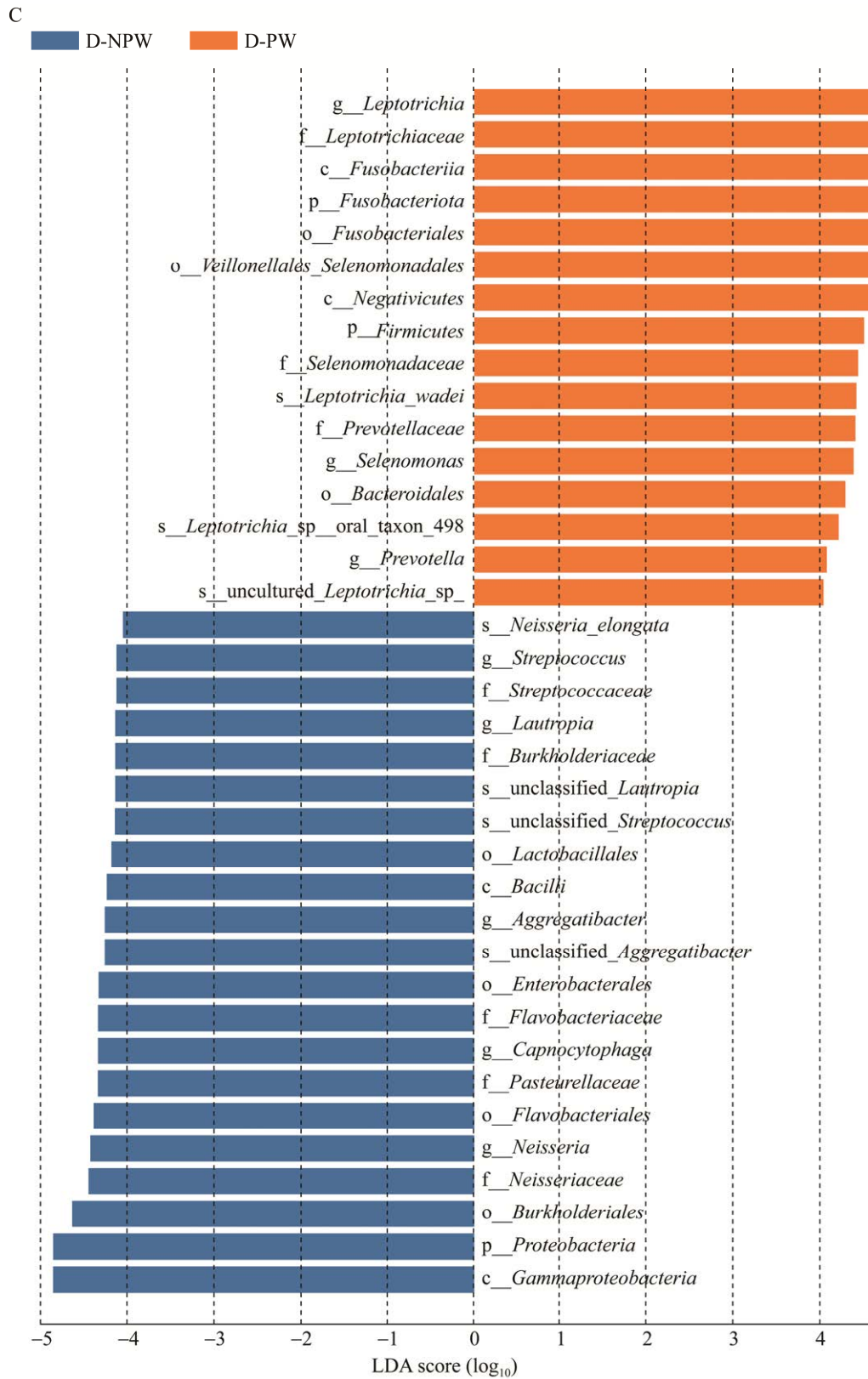
### 3 讨论

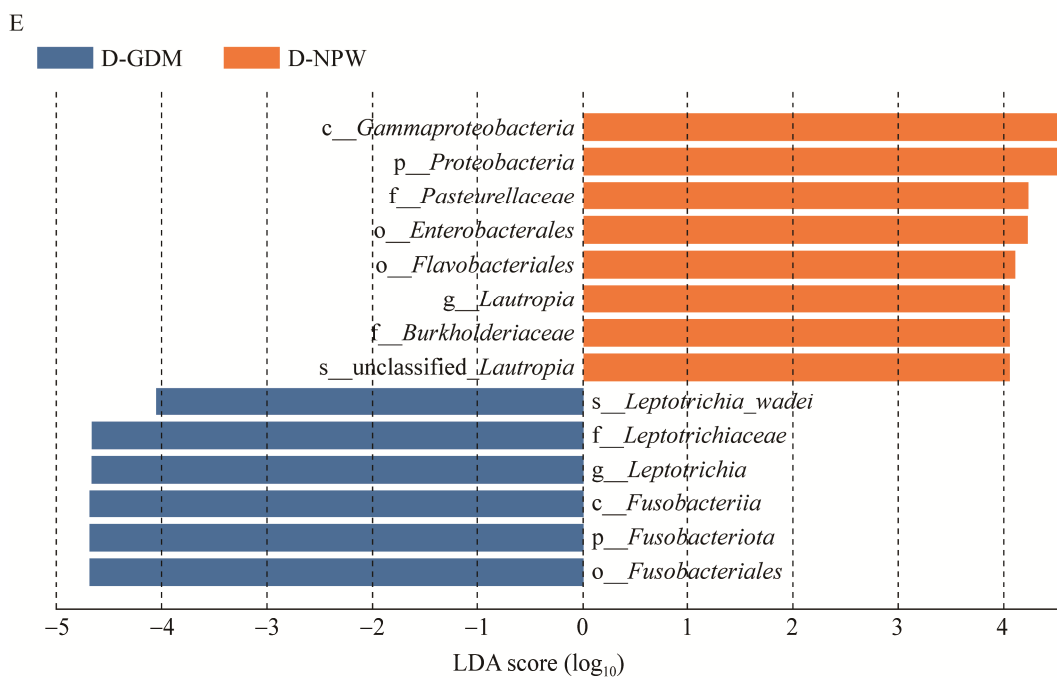
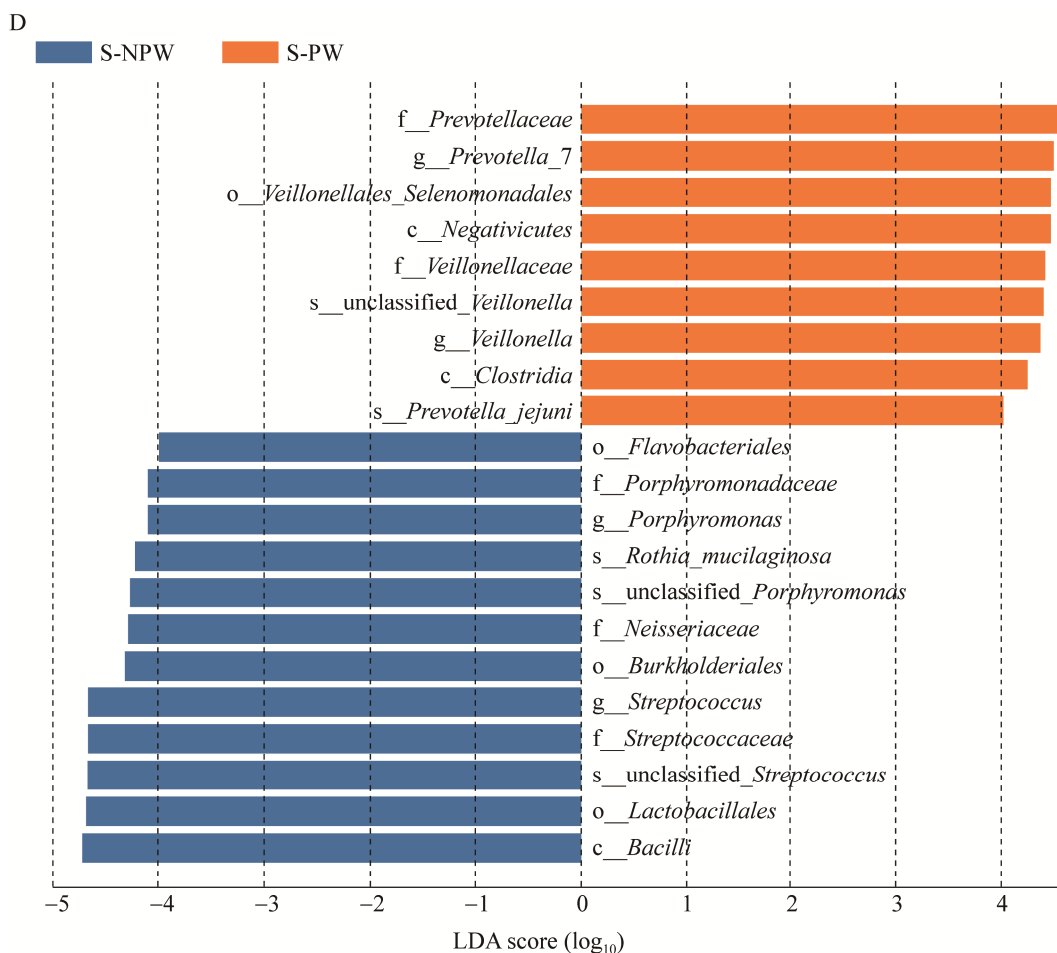
研究通过 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变量扩增子测序技术对 9 名 GDM、9 名 PW 和 9 名 NPW 进行口腔微生物群特征性分析。

本研究结果显示 GDM 牙菌斑及唾液菌群  $\alpha$  多样性无显著差异, PW 和 GDM 唾液菌群  $\alpha$  多样性指数显著高于 NPW ( $P < 0.05$ ), 但牙菌斑菌群无显著差异, 这说明妊娠引起的生理变化可能会增加唾液菌群多样性, 而对牙菌斑无显著影响, 妊娠期糖尿病对妊娠期女性口腔微生物多样性影响较小。在牙菌斑 3 组中任意两组间微生物群结构有差异: 其中 D-PW 与 D-NPW 组间差异  $>$  D-GDM 与 D-NPW 组间差异  $>$  D-GDM 与 D-PW 组间差异 ( $R^2 = 0.349 > R^2 = 0.198 > R^2 = 0.127$ ), 说明妊娠这一生理过程

对龈上菌斑微生物组成的影响力高于妊娠期糖尿病对龈上菌斑微生物组成的影响。PW 和 GDM 唾液微生物群结构无显著差异; PCoA 分析显示 S-PW 微生物结构与 S-NPW 有差异, 说明妊娠对唾液中菌群结构产生影响, 但目前对于孕妇唾液中微生物群改变的机制还未得到确切的阐述, 有学者研究认为菌群改变与孕妇体内激素变化有关<sup>[10]</sup>, 也有学者猜测其变化可能与妊娠期免疫变化相关<sup>[11]</sup>。Crusell 等<sup>[11]</sup>比较 GDM 和 PW 唾液中  $\alpha$  多样性无显著差异, 加权的 UniFrac 距离表示的群落结构无差异 ( $R^2 = 0.3, P = 0.58$ ), 与本研究结果相一致。同样, 在 Li 等<sup>[12]</sup>的研究中, 发现 GDM 和 PW 中牙菌斑和唾液菌群分为不同的簇, 但是其  $\alpha$  多样性无显著性差异。有研究者发现 GDM 口腔菌群 observed-species 指数和 Chao1 指数低







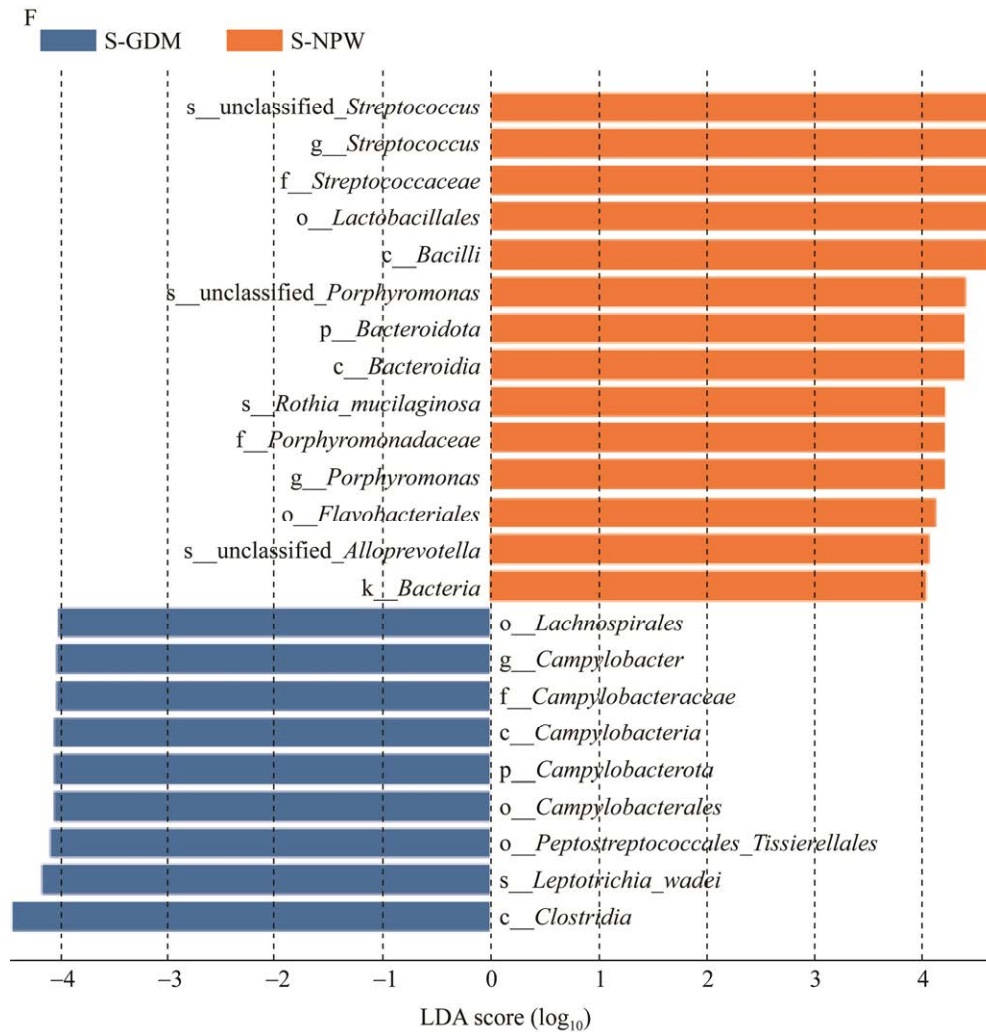


图 8 LDA 值分布柱状图

Figure 8 LDA value distribution histogram (LDA score > 4.0). A: D-GDM and D-PW. B: S-GDM and S-PW. C: D-PW and D-NPW. D: S-PW and S-NPW. E: D-GDM and D-NPW. F: S-GDM and S-NPW.

于 PW, 但是仍然不具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )<sup>[13]</sup>。综上, GDM 与 PW 唾液和牙菌斑微生物群  $\alpha$  多样性及两组间菌群结构无显著差异的可能原因: GDM 这一全身因素可能对妊娠期女性口腔菌群结构影响力不大, 或者是 GDM 血糖水平还不足以引起口腔微生物群多样变化。一项关于 PW 与 NPW 口腔菌群的分析发现 PW 各时期口腔菌群丰度高于 NPW, 尤其是妊娠早期<sup>[14]</sup>。Lin 等<sup>[15]</sup>发现 PW 唾液微生物群 Shannon 指数显著高于 NPW。女性在妊娠的整个过程中, 口

腔唾液菌群  $\alpha$  多样性并未出现显著的波动<sup>[16]</sup>。众多研究<sup>[17-19]</sup>表明妊娠期口腔菌群丰富度高于一般人群, 这可能与妊娠引起的激素水平、代谢和免疫水平变化相关, 也可能是妊娠期女性饮食习惯变化导致。

在本研究中从属水平而言, GDM 唾液及牙菌斑中检出量显著高于 PW ( $P < 0.05$ ) 的菌属多为厌氧菌, 说明 GDM 可能导致口腔内厌氧菌数量增加, 从而破坏口腔微生物群平衡。研究发现糖尿病患者的高血糖状态为牙周细菌, 特

别是厌氧菌提供了丰富的营养<sup>[20]</sup>；糖化血红蛋白的吸氧能力较差，导致局部氧压下降<sup>[21]</sup>；高血糖还会增加血液黏度和血小板聚集，进一步加重组织缺氧<sup>[22]</sup>。因此当妊娠期妇女患 GDM 时，高血糖状态可能会导致口腔微生物群失衡的风险更高，因而当孕妇诊断为 GDM 后需引起重视，严格控制血糖和保持口腔良好卫生。同时有研究表明，口腔微生物群能通过炎症介质或者直接迁移到口腔外，引起其他部位出现病理变化而导致疾病发生，如糖尿病<sup>[4]</sup>；人体唾液中牙龈卟啉单胞菌与体内血糖水平相关，尤其与 OGTT-0 血糖水平呈正相关<sup>[23]</sup>，然而目前关于口腔微生物在 GDM 中的发病机制却少有研究。

在种水平上比较 GDM 和 PW 口腔菌群牙周致病菌的检出量结果，虽然该研究中尚未明确 GDM 与牙周炎致病菌之间存在正相关但 GDM 将导致口腔菌群中部分牙周致病菌数量增加，如唾液中具核梭杆菌。有研究发现牙周炎可以加重 GDM 症状，使得血糖难以控制<sup>[24]</sup>。学者<sup>[12]</sup>发现 GDM 及牙周炎患者口腔微生物中链球菌属及韦荣氏菌属均下降，认为 GDM 与牙周炎之间的关系可能与这两个属的丰度降低有关。因此 GDM 与牙周炎的关系以及与口腔微生物关系还需要进一步研究。

本研究发现 GDM 和 PW 两组在牙菌斑及唾液微生物群中出现不同的结果，而且 Venn 图结果显示唾液微生物共享细菌数量更少，这说明口腔是一个复杂的生态系统，不同口腔生态对影响因子的反应有差异，其中唾液和龈上微生物群差异变化可能来源于多种因素，可能是唾液中含有更高浓度葡萄糖，为细菌提供丰富的营养，此外，唾液中多种抗菌因子、炎症因子等介质可能对菌群有影响，而牙齿表面为龈上菌斑提供了不同的细菌黏附受体，生物膜

内部的协同和拮抗作用也可能会介导菌群不同的定植和分布<sup>[25]</sup>。有学者<sup>[16]</sup>发现 GDM 唾液中的优势菌属有纤毛菌属、奈瑟氏菌属、卟啉单胞菌属、普氏菌属、链球菌属和韦荣氏菌属，同时也有研究者发现口腔微生物群中纤毛菌属、奈瑟菌属、链球菌属和韦荣氏菌属这 4 种菌属具有复杂的互相协作关系，并且与糖代谢密切相关，因此该研究者认为可以用此来表明 GDM 作为一种代谢性疾病的发生发展<sup>[26]</sup>。

在属水平上，该研究中比较 PW 和 NPW 口腔微生物群，并未发现口腔致病菌富集于妊娠期妇女口腔菌群中；但在种水平上，S-PW 中牙周致病菌，如牙龈卟啉单胞菌、变黑普氏菌及福赛斯坦纳菌，显著高于 S-NPW。妊娠期间各种因素的变化，都可导致口腔微生物群发生改变，其中雌性激素被认为是可以促进多种细菌增殖的积极因素，如双歧杆菌、乳酸杆菌等<sup>[27]</sup>。Fujiwara 等<sup>[14]</sup>研究发现与一般人群比较，孕妇唾液中牙龈卟啉单胞菌检测量增加 5%，白色念珠菌的检出量明显增高。Balan 等<sup>[16]</sup>对 40 名孕妇和分娩后 6 周妇女进行口腔唾液和龈下菌斑取样及检测，发现妊娠期间唾液及龈下菌斑中普雷沃菌属、梭杆菌属等口腔致病菌检出量增加。但在该研究中不能明确支持妊娠期导致口腔致病菌显著增加。此外，有研究结果表明，妊娠期女性产前进行口腔疾病治疗，达到无疾病状态，发现口腔微生物群中副血链球菌在术后 1 周开始下降，福赛斯坦纳菌、齿垢密螺旋体和直肠弯曲杆菌等牙周致病菌于术后第 2 周明显下降，且口腔健康状况明显好转<sup>[28-29]</sup>。这说明产前口腔治疗能够降低口腔致病的检出量，进行口腔治疗是有意义的。

但是在该研究中仍存在不足：(1) 虽然根据样本稀释曲线及物种相对丰度累积曲线结果表明，样本测序数据可以反映大多数的物种多样

性,但是每组样本量较少;(2) 研究中孕期女性根据是否患 GDM 分为两组,而在正常女性中缺少患糖尿病组;(3) 研究对象是患有轻度牙龈炎,并未纳入患有牙周炎的妊娠期女性,因而而在该研究中不能确定 GDM 与牙周炎之间的关系;(4) 二代微生物测序结果只能精确至属水平,因而在种水平上比较不同组间差异时误差较大,但是在该研究中因样本遗失无法进一步补充 qPCR 数据。综上,为了获得更准确的妊娠期妇女口腔微生物多样性研究结果以及进一步分析牙周疾病与 GDM 口腔微生物群之间的相关性,还需要设计更严格的、更大样本量的临床研究。

## 4 结论

妊娠期妇女口腔微生物多样性较一般女性发生显著改变,且相较于菌斑而言唾液微生物变化更加明显,从种水平上,S-PW 中牙龈卟啉单胞菌、变黑普氏菌及福赛斯坦纳菌等致病菌均显著高于 S-NPW,但从属水平上研究并未发现 PW 口腔微生物致病性较 NPW 显著增加;GDM 唾液中厌氧菌检出率较 PW 高,说明患妊娠期糖尿病对口腔微生物有影响,虽然结果并未得出 GDM 与牙周致病菌呈正相关。综上,PW 与 NPW 相比、GDM 与 PW 相比口腔微生物群均有轻微改变,这表明妊娠这一生理机能及高血糖环境可能会影响口腔微生物群结构及丰度,因此孕妇尤其是患 GDM 的孕妇更加需要注意口腔清洁,警惕由口腔微生物群变化导致的口腔疾病。

## REFERENCES

- [1] GAO C, SUN X, LU L, LIU F, YUAN J. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal Diabetes Investigation*, 2019, 10: 154-162.
- [2] YE W, LUO C, HUANG J, LI C, LIU Z, LIU F. Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ*, 2022, 25; 377: e067946.
- [3] MOOM JH, JANG HC. Gestational diabetes mellitus: diagnostic approaches and maternal-offspring complications[J]. *Diabetes and Metabolism Journal*, 2022, 46(1): 3-14.
- [4] HAN Y, WANG X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation[J]. *Journal of Dental Research*, 2013, 92: 485-491.
- [5] SILVA AFC, GONCALVES CRC, COSTA CAL, ABREU FTÉB, FONTOURA NCMC. Systemic alterations and their oral manifestations in pregnant women[J]. *Journal of Obstetrics Gynaecology Research*, 2017, 43(1): 16-22.
- [6] YAO H, XU D, ZHU Z, WANG G. Gestational diabetes mellitus increases the detection rate and the number of oral bacteria in pregnant women[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(11): e14903.
- [7] GUMUS P, ÖZCAKA Ö, CEYHAN OB, AKCALI A, LAPPIN DF. Evaluation of biochemical parameters and local and systemic levels of osteoactive and B-cell stimulatory factors in gestational diabetes in the presence or absence of gingivitis[J]. *Journal Periodontol*, 2015, 86(3): 387-397.
- [8] 程俊. 《本草纲目》动物部科技序列探微[C]//湖北省科学技术史学会年会论文集, 2017: 128-139. CHENG J. A probe into the science and technology sequence of animal department in compendium of materia medica[C]//Hubei Society for the History of Science and Technology, 2017: 128-139 (in Chinese).
- [9] YANG I, KNIGHT AK, DUNLOP AL, CORWIN EJ. Characterizing the subgingival microbiome of pregnant African American women[J]. *Journal of Obstetric Gynecologic and Neonatal Nursing*, 2019, 48(2): 140-152.
- [10] ORTIZ SBJ, LEGORRETA HM, RODRIGUEZ SM. Influence of gestational hormones on the bacteria-induced cytokine response in periodontitis[J]. *Mediators of Inflammation*, 2021, 18: 5834608.
- [11] CRUSELL MKW, BRINK LR, NIELSEN T, ALLIN HK, HANSEN T, DAMM P. Gestational diabetes and the human salivary microbiota: a longitudinal study during pregnancy and postpartum[J]. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2020, 20(1): 69.
- [12] LI X, ZHENG J, MA X, ZHANG B, ZHANG J, WANG W. The oral microbiome of pregnant women facilitates gestational diabetes discrimination[J]. *Journal of*



- Genetics and Genomics, 2021, 48(1): 32-39.
- [13] 张欣, 王佩, 马良坤, 刘俊涛, 张继志. 妊娠期糖尿病患者口腔菌群和肠道菌群特征分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2021, 37(5): 654-659.  
ZHANG X, WANG P, MA LK, LIU JT, ZHANG JZ. Characteristics of oral flora and intestinal flora in pregnant women with diabetes[J]. Journal of Practical Stomatology, 2021, 37(5): 654-659 (in Chinese).
- [14] FUJIWARA N, TSURUDA K, IWAMOTO Y, KATO F, ODAKI T, YAMANEET N, HORI Y, HARASHIMA Y, SAKODA A, TAGAYA A, KOMATSUZAWA H, SUGAI M, NOGUCHI M. Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women[J]. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2017, 8(1).
- [15] LIN W, JIANG W, HU X, GAO L, AI D, PAN H, NIU C, YUAN K, ZHOU X, XU C, HUANG Z. Ecological shifts of supragingival microbiota in association with pregnancy[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 15(8): 24.
- [16] BALAN P, CHONG YS, UMASHANKAR S, SWARUP S, LOKE WM, LOPEA V, HE HG, SENEVIRATNE CJ. Keystone species in pregnancy gingivitis: a snapshot of oral microbiome during pregnancy and postpartum period[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2360.
- [17] YE C, KAPILA Y. Oral microbiome shifts during pregnancy and adverse pregnancy outcomes: hormonal and immunologic changes at play[J]. Periodontology 2000, 2021, 87(1): 276-281.
- [18] CARRILLO AA, FIGUERO E, HERRERA D, BASCONES MA. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm[J]. Journal of Clinical Periodontology, 2010, 37: 230-240.
- [19] ZAKARIA ZZ, AL RS, AI ARS, FARAH H, ELAMIN M, NADER R, BOUABIDI S, SULEIMAN SE, NASR S, AI-ASMAKH, M. Physiological changes and interactions between microbiome and the host during pregnancy[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 824925.
- [20] 曾红燕, 杨圣辉, 刘颖. 2型糖尿病患者慢性牙周炎龈下菌群分析[J]. 临床口腔医学杂志, 2004(8): 453-455.  
ZENG HY, YANG SH, LIU Y. Analysis of subgingival flora of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes[J]. Journal of Clinical Stomatology, 2004(8): 453-455 (in Chinese).
- [21] PIETROPAOLI D, TATONE CD, ALESSANDRO AM, MONACO A. Possible involvement of advanced glycation end products in periodontal diseases[J]. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2010, 23: 683-691.
- [22] PANENI F, BECKMAN JA, CREAGER MA, COSENTINO F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I[J]. European Heart Journal, 2013, 34: 2436-2443.
- [23] WU Y, BIBLE PW, LONG S, MING W K, DING W, LONG Y, WEN X, LI X, DENG X, DENG Y, GUO S, DOCI CL, WEI L, CHEN H, WANG Z. Metagenomic analysis reveals gestational diabetes mellitus-related microbial regulators of glucose tolerance[J]. Acta diabetologica, 2020, 57(5): 569-581.
- [24] ABARIGA SA, WHITCOMB BW. Periodontitis and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. BMC Pregnancy and Childbirth, 2016, 16: 344.
- [25] KANAM AM, KAHAROVA D, ZAURA E. Acquisition and establishment of the oral microbiota[J]. Periodontology 2000, 2021, 86(1): 123-141.
- [26] 张森. 孕晚期妊娠期糖尿病与母体肠道、口腔菌群的相关性研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士论文, 2020.  
ZHANG M. Study on the relationship between diabetes in the third trimester of pregnancy and maternal intestinal and oral flora[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2020 (in Chinese).
- [27] PELZER ES, ALLAN JA, THEODOROPOULOS C, ROSS T, BEAGLEY KW, KNOX CL. Hormone-dependent bacterial growth, persistence and biofilm formation-a pilot study investigating human follicular fluid collected during IVF cycles[J]. PLoS One, 2012, 7: e49965.
- [28] WU TT, SOHN M, MANNING S, BEBLAVY R, GILL S, QUATAERT S, VASANI S, JANG H, ZENG Y, BRUNO J, VAZQUEZ A, FISCELLA K, XIAO J. Metagenomic analysis examines oral microbiome changes and interplay with immune response following prenatal total oral rehabilitation[J]. Journal of translational medicine, 2023, 21(1): 172.
- [29] JANG H, JALLAD ALN, WU TT, ZENG Y, FADAAK A, MALMSTROM H, FISCELLA K, XIAO J. Changes in *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* and oral health conditions following prenatal total oral rehabilitation among underserved pregnant women[J]. Heliyon, 2021, 7(8): e07871.