

研究报告

16S rRNA 基因克隆文库分析比较牙周炎患者和健康人口腔唾液微生物多样性

吴芳¹ 李俊平¹ 汪珍珍¹ 王译彬¹ 焦康礼² 周建业² 李志强^{2*} 余占海^{1*}

(1. 兰州大学口腔医学院 甘肃 兰州 730000)

(2. 甘肃省口腔疾病研究重点实验室培育基地 西北民族大学 甘肃 兰州 730030)

摘要:【目的】通过对同一地区、同一民族牙周炎患者和健康人的唾液微生物群落结构的分析, 探寻牙周炎患者口腔微生物的多样性。【方法】采集甘肃东乡族自治县的东乡族牙周炎患者和健康人唾液各 5 例, 分别记作 DP (东乡牙周) 和 DH (东乡健康), 提取细菌总 DNA, 构建 16S rRNA 基因克隆文库, 测序后利用 MOTHUR、MEGA 4.0、ClustalX 3.0 等软件对测序结果进行分析。【结果】所有样本共检测出 115 个 OTUs (DP 60, DH 75), 归属于 6 个门, 27 个属。TM7 是 DP 组特有的优势菌门。仅在 DP 组中检测到的优势菌属是梭菌属(*Fusobacterium*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*) 和 TM7_genera。【结论】发现牙周炎患者与健康人口腔唾液微生物存在一定差异。其中, TM7、梭菌属和消化链球菌属在牙周病中的作用值得进一步研究。

关键词: 东乡族, 牙周炎, 微生物, 16S rRNA 基因

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360124, 31560159); International Science and Technology Cooperation Program in Gansu Province (No. 144WCGA167); The Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZYP2015012)

***Corresponding author:** E-mail: LI Zhi-Qiang: xbmulzq@163.com; YU Zhan-Hai: yuzhanhai@lzu.cn

Received: October 16, 2015; **Accepted:** January 08, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 11, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360124, 31560159); 甘肃省国际科技合作专项(No. 144WCGA167); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. ZYP2015012)

***通讯作者:** E-mail: 李志强: xbmulzq@163.com; 余占海: yuzhanhai@lzu.cn

收稿日期: 2015-10-16; **接受日期:** 2016-01-08; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-11

Comparison of oral microbial diversity between periodontitis patients and healthy people by 16S rRNA gene clone library

WU Fang¹ LI Jun-Ping¹ WANG Zhen-Zhen¹ WANG Yi-Bin¹ JIAO Kang-Li²
ZHOU Jian-Ye² LI Zhi-Qiang^{2*} YU Zhan-Hai^{1*}

(1. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

(2. Key Laboratory of Oral Diseases of Gansu Province, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: **[Objective]** To compare oral microbial diversity between periodontitis patients and healthy people by analyzing the saliva microbial community structure in the same region with same nationality. **[Methods]** We collected 10 saliva samples from 10 subjects (5 from periodontitis patients, 5 from healthy people) and marked DP (Dongxiang periodontitis patients) and DH (Dongxiang healthy people). Saliva samples' DNA was extracted and the 16S ribosomal RNA gene clone library was constructed. The sequencing results were analyzed by software such as MOTHUR, MEGA 4.0, and ClustalX 3.0. **[Results]** A total of 115 OTUs (DP 60; DH 75) were obtained and all OTUs were classified into 6 phyla and 27 genera. TM7 was the unique dominant phyla in DP group. The dominant genera in DP group only included: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, TM7_genera. **[Conclusion]** There is a certain difference of oral microbial community structure between Dongxiang periodontitis and healthy people. The roles of *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, TM7_genera in oral cavity of periodontitis patients may deserve further study.

Keywords: Dongxiang, Periodontitis, Microbial, 16S rRNA gene

牙周炎是一种由细菌侵犯牙龈和牙周组织而引起的慢性非特异性、破坏性疾病。有数据显示牙周炎影响了全球大约 1/5 人的健康^[1]。牙周炎不仅能破坏人类口腔健康,更能影响心、肺、肾等重要器官的功能^[2-3]。然而,牙周炎的细菌病因学发病机制尚不明了。目前公认的牙周可疑致病菌有伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *A.a*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*)、福氏类杆菌(*Bacteriodes forsythus*, *B.f*)等 11 种细菌^[4]。值得注意的是,口腔是一个包含多种微生物的复杂环境,且其中的每一个个体微生物均有可能参与疾病的发生发展过程,即使是低丰度的成员依然可能作为复杂的群落行为表现的关键物种^[5]。目前,口腔中能检测分离出约 700 种微生物^[1],而可被培养的微生物仅 60%^[2]。许多学者研究发现一些未获培养的微生物可能与牙周炎发生发展密切相关^[6-8]。

另外,地区、个人口腔卫生习惯、种族等都影响口腔微生物群落结构,从而引起口腔疾病^[3,9-10]。

为了尽可能避免这些因素的影响,本课题以甘肃省临夏回族自治州东乡族自治县常住东乡族人口为研究对象,该地区居民日常以面食、土豆、羊肉为主,饮食结构单一,有自己独特的文化背景、生活和风俗习惯。由于交通不便很少与外界沟通,所以人群相对固定,生活贫穷,医疗条件有限,口腔保健意识匮乏。且东乡族信仰伊斯兰教,伊斯兰教有其独特的文化及生活习惯,其禁烟禁酒。同一地区,同一民族,同一信仰等这些稳定的背景给本次研究口腔微生物多样性提供了有利的条件。

因此,本研究选择东乡族牙周炎患者和健康人口腔唾液为样本,应用 16S rRNA 基因克隆文库方法分析口腔唾液多样性,并确定优势菌群,对微生物的群落结构多样性进行了初步分析,以探讨牙周炎患者和健康人口腔唾液微生物菌群的差异。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2013年9月依照第三次全国口腔流行病学调查

标准^[4], 在甘肃省临夏回族自治州东乡族自治县采集年龄在 37 岁-50 岁之间的东乡族常住人口流行病学资料和口腔唾液。该研究得到兰州大学医学道德伦理委员会批准。试验对象知情并签署同意书。同时符合以下标准: (1) 排除系统性疾病、嗜烟酒史; (2) 取口腔唾液标本前 1 个月内受试者无抗生素使用史; (3) 排除口腔溃疡或智齿冠周炎、妊娠期或哺乳期; (4) 牙周炎患者牙周袋探诊深度(PD)≥4 mm, 附着丧失(AL)≥3 mm, 健康人 PD≤3 mm。

1.2 主要仪器和试剂

超微量紫外分光光度计 Q5000 (Quawell), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; DTC 基因扩增热循环仪, 西安市天隆科技有限公司; TGL-16M 型高速台式冷冻离心机, 长沙市湘仪离心机仪器有限公司; 力康 Heal Force SMART-NE 超纯水器, 上海康雷分析仪器有限公司; 中科美菱 DW-HL340 型-86 °C 低温冰箱, 北京博宇宝威实验设备有限公司; ZEALWAY GR60DF 型立式自动压力蒸汽灭菌器, 厦门致微仪器有限公司; 恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司。OMEGA 基因组 DNA 提取试剂盒、pMD18-T vector 试剂盒、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物 8F、1492R 均购自大连宝生物工程有 限公司; 酵母提取物、琼脂粉、胰蛋白胨均购于北京索莱宝科技有限公司; 氯化钠, 天津市凯通化学试剂有限公司; 氨苄青霉素、琼脂糖凝胶回收试剂盒, 上海生工生物工程有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样本采集: 餐后 2 h, 嘱受试者用 10 mL 无菌生理盐水漱口, 采集非刺激性唾液于 30 mL 的无菌 EP 管中^[11], 并将其用无水乙醇固定。样本分别为 5 名牙周炎患者(DP)和 5 名健康者(DH)。

1.3.2 提取 DNA: 参照 OMEGA DNA 提取试剂盒说明书进行样本 DNA 提取。

所提取的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳(0.5%)检测。同时, 取约 1 μL 所提取的 DNA 样品于分光光度计上检测其含量及 OD₂₆₀/OD₂₈₀。含量均在 40 mg/L 以

上, OD 值在 1.7-2.1 之间。

1.3.3 PCR 扩增: PCR 扩增所用引物 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增所用反应体系: 10×Buffer 5 μL, dNTPs (5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 模板 1 μL, *Taq* DNA 酶(5 U/μL) 1 μL, 用无菌 ddH₂O 补足 50 μL 体系。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.4 16S rRNA 基因克隆文库构建: 将 PCR 产物纯化回收, 随后与 pMD18-T 连接并进行 *E. coli* DH5α 转化, 涂在含 100 mg/L Amp^r 的 LB 培养基^[12] 上 37 °C 培养过夜。每个平板挑取 200 个菌落, 并将阳性菌落进行 M13 PCR 筛选, 然后建立 16S rRNA 基因克隆文库。随机挑选 50 个阳性克隆菌液送至华大基因公司测序。

1.4 生物信息学分析

将 500 个(其中每个样本随机挑选 50 个)阳性克隆子进行测序(序列读长均为 830 bp, 单向测序), 剔除嵌合体, 利用 ClustalX 3.0、BioEdit 等软件对所得序列进行编辑和对比, 并应用 MOTHUR 软件计算操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs), NCBI 和 RDP 数据库进行比对; 应用软件 MEGA 4.0 生成物种进化树及丰度信息。最后, 所有的统计分析均采用 SPSS 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 OTU 分类

共获得 417 条合格序列, 以 97% 序列相似性为阈值, 用 MOTHUR 软件计算 417 个序列共获得 115 个 OTUs (DP: 60, DH: 75) (图 1)。

2.2 稀释曲线

根据样本的 OTU 数据, 做出两组样本的稀释曲线(图 2)。稀释曲线是从样本中随机抽取一定数量的个体, 统计出这些个体所代表物种数目, 并以个体数与物种数来构建曲线。当稀释曲线上升缓慢并趋于平坦时, 克隆文库中的测序量完全能够代表克

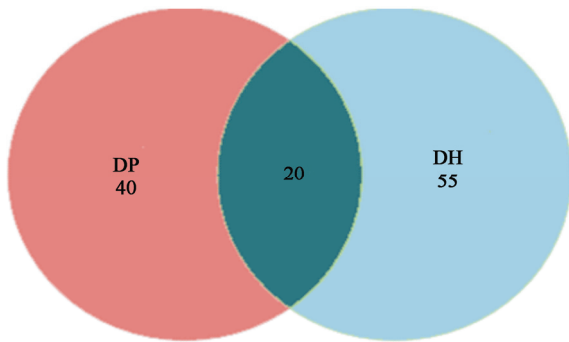


图1 OTU 交集维恩图

Figure 1 Intersected Venn diagram of OUT

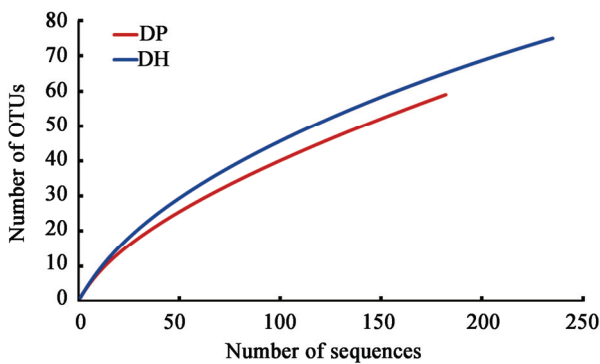


图2 唾液微生物 16S rRNA 基因克隆文库的稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curves generated for 16S rRNA genes clone library in saliva

隆构建文库中微生物的多样性。本实验获得的稀释曲线处于缓慢上升趋势,表明样本中还有少量未能被检测的 OTU,可能与我们样本量不足有关。

2.3 群落结构分析

2.3.1 门分布图: DP组和DH组的优势菌门分布(含量>1%)如图3所示, DP组和DH组共有优势菌门是:拟杆菌门(Bacteroidetes, DP 11%, DH 4.3%)、梭杆菌门(Fusobacteria, DP 4.0%, DH 3.3%)、变形菌门(Proteobacteria, DP 23.1%, DH 30.6%)和厚壁菌门(Firmicutes, DP 53.8%, DH 52.8%)。在DP组中未检测到蓝藻菌门(Cyanobacteria/Chloroplast), DH中为1.3%,在DH组中未检测到TM7, TM7在DP中含量为1.2%。

2.3.2 属分布图: DP组和DH组的菌属分布如图4所示, DP组有13个优势菌属, DH组有11个优势

菌属, 共有的优势菌属有9个, 其中DP组的优势菌属是普氏菌属(*Prevotella*, 1.20%)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*, 3.01%)、梭菌属(*Fusobacterium*, 2.14%)、纤毛菌属(*Leptotrichia*, 1.20%)、奈瑟菌属(*Neisseria*, 11.4%)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*, 2.14%)、伴放线放线杆菌属(*Aggregatibacter*, 3.16%)、韦永氏球菌属(*Veillonella*, 4.22%)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*, 1.20%)、颗粒链菌属(*Granulicatella*, 1.20%)、链球菌属(*Streptococcus*, 40.3%)、孪生球菌属(*Gemella*, 6.02%)和TM7_genera 1.20%。DH组中优势菌有普氏菌属(*Prevotella*, 2.13%)、纤毛菌属(*Leptotrichia*, 2.13%)、奈瑟菌属(*Neisseria*, 3.83%)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*, 5.11%)、伴放线放线杆菌属(*Aggregatibacter*, 2.55%)、韦永氏球菌属(*Veillonella*, 3.83%)、颗粒链菌属(*Granulicatella*, 1.70%)、链球菌属(*Streptococcus*, 36.3%)、孪生球菌属(*Gemella*, 2.13%)假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1.28%)和 *Streptophyta* 1.28%。

2.3.3 系统发育关系: 两组样本的中菌的进化关系见图5。

3 讨论

随着分子生物理论与技术的发展, 16S rRNA 基因克隆文库法无需分离培养微生物, 大大增加了人们检测和鉴定口腔中“非培养”微生物的能力^[13]。16S rRNA 基因克隆文库法首先利用特定引物来扩增 16S rRNA 基因片段, 然后将扩增的片段转化、克隆到质粒载体中进行测序, 最后与数据库中的 16S rRNA 基因序列进行比对, 以分析微生物多样性。该技术已被广泛应用于环境微生物和人体微生物生态系(如口腔、肠道等)^[14]。在具有高通量、速度快等^[1]优点的新一代测序不断涌现的时期, 16S rRNA 基因克隆文库法凭借其能够保存质粒菌株便于后续研究及具有更准确的测序读长等优点, 仍是一种有效的微生物多样性研究分析方法。唾液中的微生物来自口腔不同位点, 能够提供整个口腔中微

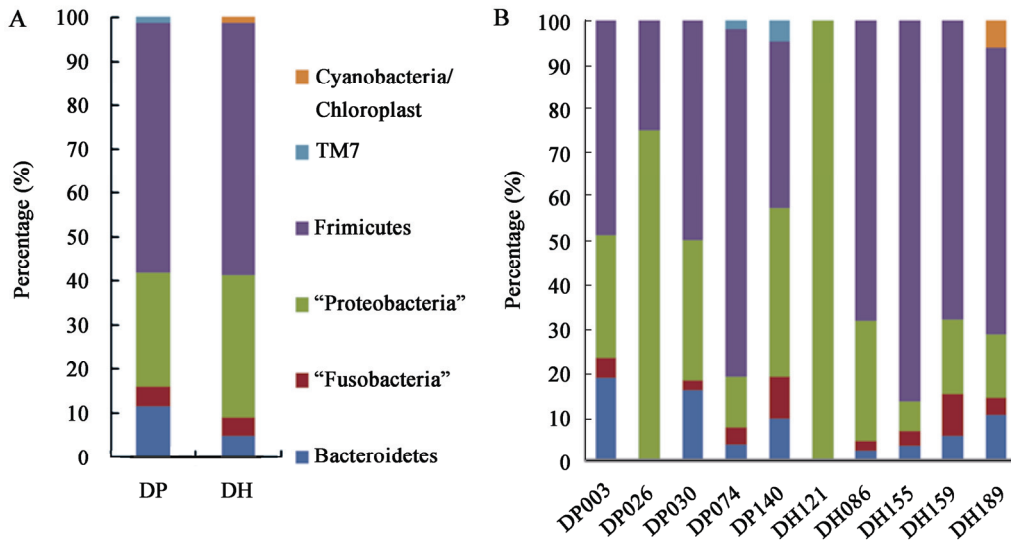
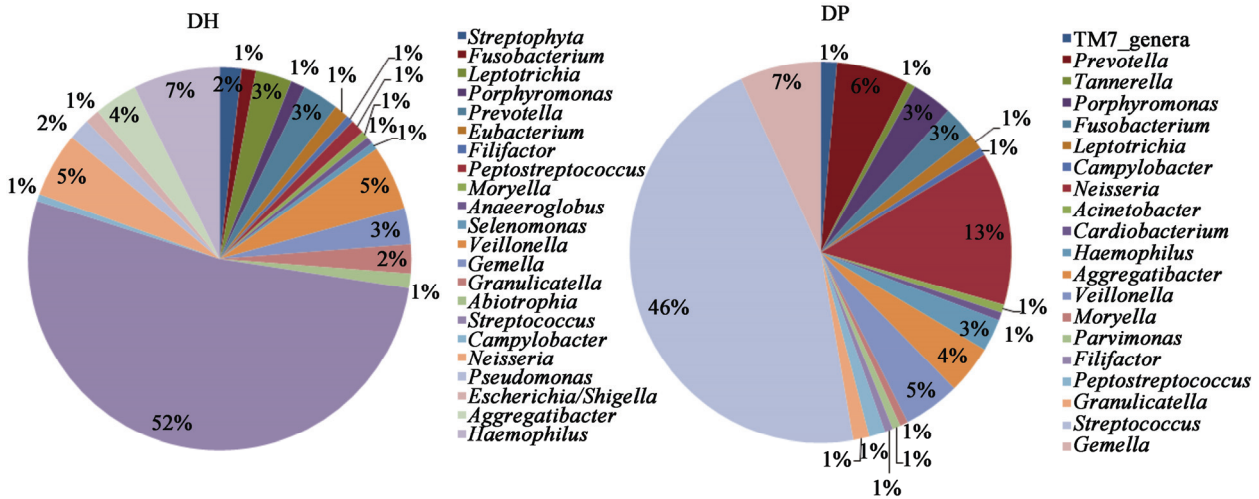


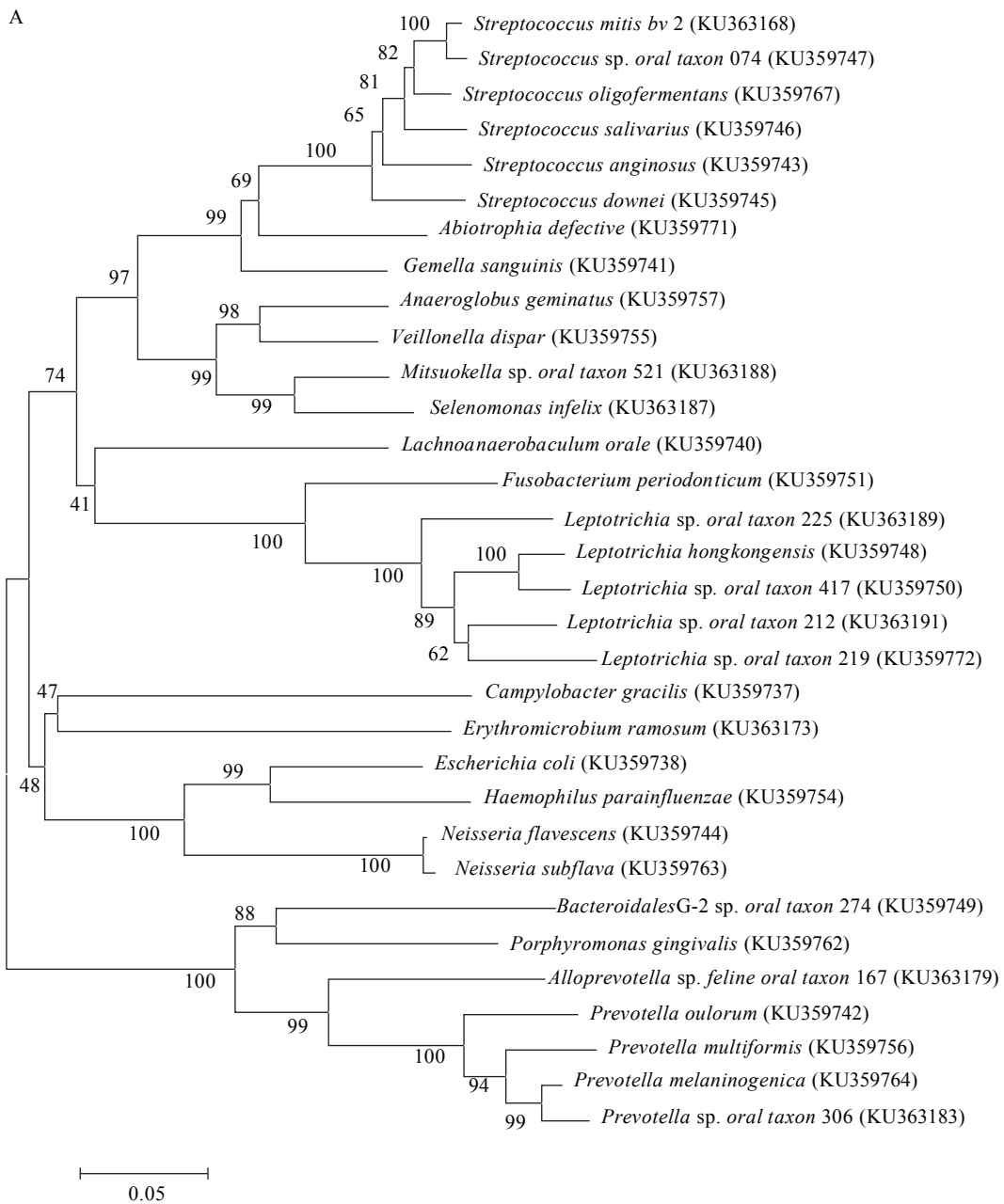
图 3 DP 及 DH 组群落优势菌门之间的相对丰度

Figure 3 Relative abundance of phyla members of the oral communities between DP and DH

注: 图中分别是 DP 组和 DH 组的优势菌门丰度(A)和两组中每个样的优势菌门的丰度(B). 其中 Y 轴表示百分比含量; X 轴分别表示两组样及每个受试者的口腔唾液样本. 菌门信息根据中间图例进行颜色编码.

Note: The figure shows the dominant phyla abundance of DP and DH groups and the dominant phyla abundance of each sample in two different groups. Y-axis represents the percentage of the content, and X-axis represents the saliva sample between two groups and each subject. The phyla information is color-coded according to the legend in the middle.





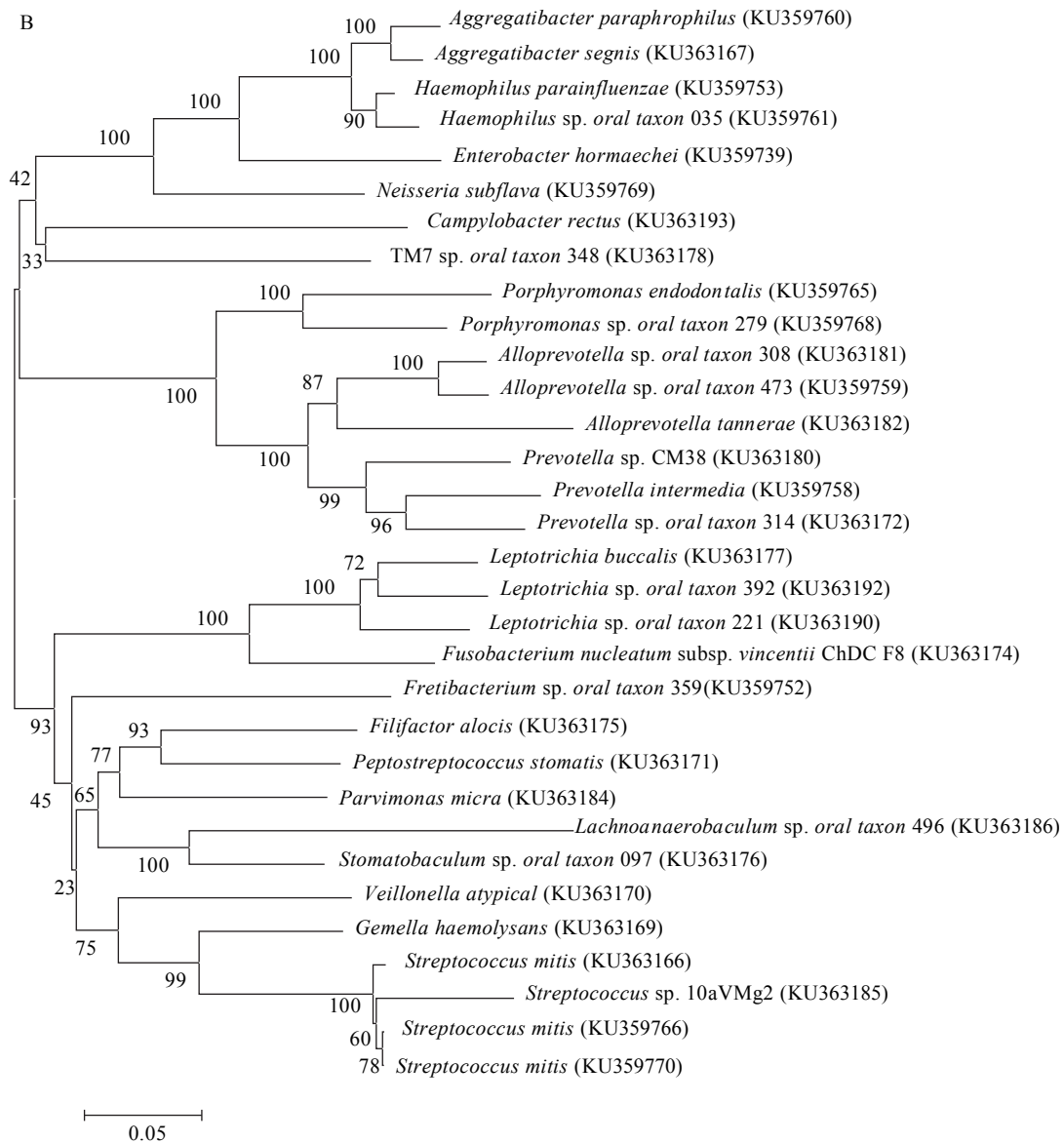


图 5 DH 组和 DP 唾液微生物系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of DH and DP groups from individual saliva samples

注: A: DH 组样本发育树; B: DP 组样本发育树. 括号中的数字代表提交序号, 分支节点上的数字表示每 1 000 次 Bootstrap 分析所支持的次数, 线段表示 5% 序列差异的分支长度.

Note: A: Phylogenetic tree of DH group; B: Phylogenetic tree of DP group. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number. The number next to the nodes represent the bootstrap values of 1 000 replications. The scale bar represents 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

生物群落信息^[6-8],且其相对稳定,被认为是最合适的实验样本。经过多年的深入分析,唾液已作为诊断健康和疾病状态的一种生物标记物^[13-17]。

本实验共得到 417 条合格序列,获得 115 个 OTUs (DP: 60, DH: 75), 两组样本的覆盖度均大于 75%, 由此可见,本次实验覆盖度良好^[18]。DP 组的优势菌门(含量>1%)是:拟杆菌门、梭杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和 TM7; DH 组的优势菌门是:蓝藻菌门、拟杆菌门、梭杆菌门、变形菌门和厚壁菌门等。其中 TM7 仅在 DP 组中检出,提示其与牙周炎相关。TM7 在很多环境被检测到,但不能被培养且不能划分于任何菌门,故将其划分为独立的菌门,其命名来自于 Torf、Mittlere Schicht、Clone7^[19]。Liu 等通过对 5 名牙周炎患者牙菌斑样本进行检测分析检出 TM7,并提示 TM7 可能与牙周炎相关^[20]。更有学者研究发现, TM7 在牙周炎患者口腔中含量明显高于健康人^[7,21]。综上所述, TM7 可能是牙周可疑致病菌。然而,因为 TM7 不能被培养,故未见相关的动物实验验证其致病性。因此,牙周炎与 TM7 的关系有待进一步明确。另外,我们在 DH 组中检测到优势菌门:蓝藻菌门(DP 组中未发现)。蓝藻菌门被认为是反映植物叶绿体的菌门^[22], Dewhirst 等认为在口腔中发现蓝藻菌并不足为奇,因为人类是吃植物的^[19], Crielaard 等也在健康人口腔中发现了少量蓝藻菌门^[23]。然而,蓝藻菌门是否在健康人口腔微生物群落中有一定意义,目前还不明确。我们样本量有限且没有更多的相关研究,因此有待进一步探索。DH121 样本在 RDP 中分类只有变形菌门,还有一些不能分类的菌,这可能与本实验随机挑选的 50 个阳性克隆子有关。

本实验 DP 组的优势菌属为:卟啉单胞菌属、伴放线放线菌属、链球菌属、普氏菌属、链球菌属、梭杆菌属、嗜血杆菌和纤毛菌属等。其中卟啉单胞菌属、梭菌属、消化链球菌属和 TM7_genera 仅在 DP 组中检测到,在 DH 组中未检测到。卟啉单胞菌具有明显牙周致病性^[24],是目前公认的可疑牙周致病菌之一^[2,4];我们的结果也证实了这一点。Dinis

等研究表明, TM7 与牙周炎相关^[25]。Socransky 等^[26]和 Darveau^[27]研究显示卟啉单胞菌属和梭菌属与牙周炎密切相关;Colombo 等研究显示消化链球菌属可能与牙周炎密切相关^[21]。综上所述,梭菌属和消化链球菌属可能与牙周炎相关,但要明确它们的关系还有待进一步研究。另外,随着分子生物学技术的发展,提示牙周炎可能并非由单一细菌或几种细菌所导致的,而可能是微生物群落结构的改变所引起的。

以往认为“Red-complex”与牙周炎密切相关(Socransky 和 Haffajee 提出将牙龈卟啉单胞菌、坦纳菌和齿垢密螺旋体称为“Red-complex”)。然而, Al-hebshi 等在也门慢性牙周炎患者菌斑相关微生物的实验中发现“Red-complex”在慢性牙周炎中呈低丰度^[28]。同时, Olson 等在牙周炎患者牙菌斑中发现“Red-complex”也成低丰度^[2],这与我们的实验结果(坦纳菌在 DP 组含量很低, DP 组未发现齿垢密螺旋体)相似。由此可见,“Red-complex”在牙周炎患者口腔中并非完全呈高丰度,牙周炎细菌学发病机制较为复杂,至今还尚未明确。牙周炎的细菌病因学发病机制依然处于探索阶段,通过多样性手段明确牙周炎的细菌病因学发病机制以及致病微生物是我们目前所面临的艰巨的任务。

4 结束语

本实验通过 16S rRNA 基因克隆文库的方法研究甘肃东乡地区牙周炎人群与健康人群的口腔微生物,发现东乡疾病组与东乡健康组口腔微生物存在一定的差异性。然而,口腔中微生物菌群不是稳定不变的,它们的种类和数量取决于多种因素,有益菌和致病菌之间的平衡被破坏,则会导致牙周炎的发生和发展^[24]。这为研究带来了许多困难。明确牙周炎相关致病微生物及其菌落结构还有待于生物分子技术的发展及多样性研究手段的进步。

参考文献

- [1] Darby I, Phan L, Post M. Periodontal health of dental clients in a community health setting[J]. Australian Dental Journal, 2012, 57(4): 486-492

- [2] Olson JC, Cuff CF, Lukomski S, et al. Use of 16S ribosomal RNA gene analyses to characterize the bacterial signature associated with poor oral health in West Virginia[J]. *BMC Oral Health*, 2011, 11: 7
- [3] Scannapieco FA. The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections[J]. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2013, 35(20): 163-169
- [4] Zhou C, Zhang YH. A review of the progress in periodontology[J]. *Practical Journal of Clinical Medicine*, 2007, 4(2): 7-8 (in Chinese)
周村, 张蕴惠. 牙周病研究进展[J]. *实用医院临床杂志*, 2007, 4(2): 7-8
- [5] Li Y, He JZ, Xiao LY, et al. Oral microbiome and diseases[J]. *International Journal of Stomatology*, 2014, 41(1): 118-122 (in Chinese)
李燕, 何金枝, 肖丽英, 等. 口腔微生物组与疾病[J]. *国际口腔医学杂志*, 2014, 41(1): 118-122
- [6] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3770-3783
- [7] Dinis JM, Barton DE, Ghadiri J, et al. In search of an uncultured human-associated TM7 bacterium in the environment[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21280
- [8] Ouverney CC, Armitage GC, Relman DA. Single-cell enumeration of an uncultivated TM7 subgroup in the human subgingival crevice[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6294-6298
- [9] Moynihan P. The interrelationship between diet and oral health[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2005, 64(4): 571-580
- [10] Bik EM, Long CD, Armitage GC, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(8): 962-974
- [11] Du Q, Tian K, Zou J, et al. PCR-DGGE analysis of the oral microbiota in twins of mixed dentition[J]. *Practical Journal of Clinical Medicine*, 2013, 10(3): 62-64 (in Chinese)
杜芹, 田鲲, 邹静, 等. 混合牙列双生子儿童口腔微生物菌群结构的变性梯度凝胶电泳分析[J]. *实用医院临床杂志*, 2013, 10(3): 62-64
- [12] Lei Y. Microbial diversity research of saliva from caries Yugurs and Han[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou university, 2014: 1-49 (in Chinese)
雷燕. 裕固族与汉族龋病唾液菌群多样性研究[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2014: 1-49
- [13] Liu WQ, Mao ZC, Yang YH, et al. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene Library[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10): 1344-1350 (in Chinese)
刘玮琦, 郝振川, 杨宇红, 等. 应用16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(10): 1344-1350
- [14] Brands B, Vianna ME, Seyfarth I, et al. Complementary retrieval of 16S rRNA gene sequences using broad-range primers with inosine at the 3'-terminus: implications for the study of microbial diversity[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(1): 157-167
- [15] Takeshita T, Nakano Y, Kumagai T, et al. The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(1): 65-78
- [16] Belström D, Fiehn NE, Nielsen CH, et al. Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2014, 41(2): 104-112
- [17] Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, et al. Translational and clinical applications of salivary diagnostics[J]. *Advances in Dental Research*, 2011, 23(4): 375-380
- [18] Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, et al. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2010. DOI: 10.3402/jom.v2i0.5104
- [19] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5002-5017
- [20] Liu B, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e37919
- [21] Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray[J]. *Journal of Periodontology*, 2009, 80(9): 1421-1432
- [22] Peterson SN, Snesrud E, Liu J, et al. The dental plaque microbiome in health and disease[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58487
- [23] Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health[J]. *BMC Medical Genomics*, 2011, 4: 22
- [24] Xiao G, Wu J, Chen YY. Subgingival flora analysis of chronic periodontitis[J]. *Journal of Practical Medical Techniques*, 2006, 13(18): 3239-3240 (in Chinese)
肖刚, 吴坚, 陈月燕. 慢性牙周炎相关菌群分析[J]. *实用医技杂志*, 2006, 13(18): 3239-3240
- [25] Dinis JM, Barton DE, Ghadiri J, et al. In search of an uncultured human-associated TM7 bacterium in the environment[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21280
- [26] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 1998, 25(2): 134-144
- [27] Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(7): 481-490
- [28] Al-hebshi NN, Shuga-Aldin HM, Al-Sharabi AK, et al. Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis[J]. *BMC Oral Health*, 2014, 14: 13