

研究报告



吸烟对健康人群唾液微生物组的影响

蒋刘一琦¹ 包黎明¹ 钱巧霞¹ 金力^{1,2} 王久存^{*1,2}

1 复旦大学生命科学学院 上海 200438

2 复旦大学泰州健康科学研究院 江苏 泰州 225300

摘要:【背景】吸烟是重要的公共健康问题,可能通过改变唾液微生物组影响口腔健康甚至全身健康。【目的】探究吸烟对中国健康人群唾液微生物组的影响,为研究吸烟在疾病发展中的作用提供线索。【方法】收集 167 位健康个体的唾液样本,利用 HiSeq 高通量测序技术对样品中 16S rRNA 基因 V3–V4 区进行测序,分析比较吸烟者和非吸烟者的唾液微生物组的多样性、群落结构和物种丰度,并预测功能组成,探究吸烟对唾液微生物组的影响。【结果】吸烟对唾液微生物组的 α 多样性影响较小,但是在微生物组组成上,吸烟组中奈瑟菌属、艾肯菌属、二氧化碳嗜纤维属等细菌明显减少,而普雷沃氏菌属、韦荣氏球菌属、放线菌属、奇异菌属和巨球型菌属等细菌明显增加。在功能上, PICRUST 的预测结果显示吸烟组富集不依赖氧气的代谢功能,非吸烟组富集需要氧气参与的代谢功能。【结论】吸烟可能会通过改变唾液微生物组,造成微生物组功能途径的变化,进而引发与吸烟相关的疾病。

关键词: 吸烟, 唾液微生物组, 高通量测序, 功能预测

Effect of smoking on salivary microbiome

JIANG Liu-Yi-Qi¹ BAO Li-Ming¹ QIAN Qiao-Xia¹ JIN Li^{1,2} WANG Jiu-Cun^{*1,2}

1 School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

2 Taizhou Institute of Health Sciences, Fudan University, Taizhou, Jiangsu 225300, China

Abstract: [Background] Smoking has become one of the foremost public health problem, which may affect oral health and even host health by changing the salivary microbiome. [Objective] To study the effects of smoking on the salivary microbiome of healthy Chinese people, and to provide enlightenment for the role of smoking in disease-development. [Methods] We collected saliva samples from 167 healthy volunteers, using high-throughput HiSeq sequencing technology for sequencing 16S rRNA gene sequence in the V3–V4 region of samples to research the salivary microbiome of current smokers and never smokers. [Results] The α diversity of the salivary microbiome did not show a significant difference between current smokers and never smokers. However, the relative abundance of the genera *Neisseria*,

Foundation items: Shanghai Major Science and Technology Program (2017SHZDZX01); National Key Research and Development Program of China (2017YFC0907002)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-31246606; E-mail: jcwang@fudan.edu.cn

Received: 17-07-2020; **Accepted:** 14-08-2020; **Published online:** 22-08-2020

基金项目: 上海市市级科技重大专项(2017SHZDZX01); 国家重点研发计划(2017YFC0907002)

***通信作者:** Tel: 021-31246606; E-mail: jcwang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2020-07-17; **接受日期:** 2020-08-14; **网络首发日期:** 2020-08-22

Eikenella and *Porphyromonas* reduced in current smokers, whereas the genera *Prevotella*, *Veillonella*, *Atopobium*, *Actinomyces* and *Megasphaera* were significantly increased. Functional analysis from PICRUSt showed that decreased abundance of aerobic metabolism pathways and increased abundance of oxygen-independent carbohydrate metabolism pathways in current smokers. **[Conclusion]** Smoking is a factor influencing salivary microbiome, and then potentially leading to the shifts in functional pathways with implications for smoking-related diseases.

Keywords: Smoking, Salivary microbiome, High-throughput sequencing, Functional prediction

吸烟已经成为当今世界最重要的公共健康问题之一。近 30 年来,中国烟草消费量急剧增加。2015 年的调查数据显示,中国成年男性的吸烟率为 52.1%^[1]。吸烟是许多疾病的危险因素,如咽喉癌、大肠癌、口腔癌、胃溃疡、牙周炎等^[2-4]。

口腔是最早接触烟草和烟雾并受其影响的部位。人类的口腔中定殖着 700 多种微生物,统称为口腔微生物组^[5]。越来越多的证据表明口腔微生物组对口腔健康乃至全身健康具有重要的作用,口腔微生物组的失调可能会导致牙周炎、龋齿、癌症等疾病的发生^[6]。此外,研究发现不同人群口腔微生物组的多样性和组成存在差异,这一差异可能与宿主的饮食习惯、生活环境、遗传背景等有关^[7-10]。因此,在某一特定人群中观察到的口腔微生物组变化的结果可能不适用于另一人群,即需要对不同人群进行研究,以更好地理解口腔微生物组在健康中的作用。

多项研究表明,吸烟会影响口腔微生物组,但研究结果并不完全一致^[3,11-15]。这可能是由于采集的人群、样本量、采样位置以及实验方法等因素的不同所致。考虑到先前的研究主要来自于西方国家,对中国人群的关注很少,尤其缺少对中国健康人群的研究,所以探究吸烟对中国健康人群口腔微生物组的影响,对填补口腔微生物组对健康影响的知识空缺具有重要意义。

唾液作为口腔微生物组的采集部位之一,具有易于收集且无创的特征。而且与其他位置的口腔微生物相比,唾液微生物具有可通过唾液的转移与肠道微生物发生相互作用、进而影响宿主健

康的特点,因此,唾液微生物组是疾病诊断和预后的理想标志物。

综上,本研究收集了 167 名健康个体的唾液样品,并通过对样品中 16S rRNA 基因 V3-V4 区序列进行测序,评估吸烟对唾液微生物组的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

从江苏泰州人群健康跟踪调查项目(Taizhou longitudinal study, TZL)中选取健康受试者。纳入标准:(1) 未患有龋齿、牙周病、心血管疾病、病毒感染、自身性疾病、代谢疾病及肿瘤等疾病;(2) 一个月内未使用抗生素药物;(3) 女性不在妊娠期。最终纳入 167 名受试者,年龄在 20-60 岁之间,平均年龄为 38.29±9.87 岁。其中,从不吸烟者为 90 人,平均年龄为 37.01±9.61 岁;吸烟者为 77 人,平均年龄为 39.78±10.02 岁,两组间年龄没有统计学差异。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒,Axygen 公司。PCR 仪、电泳仪和凝胶成像系统,Bio-Rad 公司;HiSeq 2000 测序仪,Illumina 公司。

1.3 样本采集

所有受试者在样品采集前 30 min 内无进食、咀嚼口香糖或使用漱口水等。使用 50 mL 无菌离心管收集唾液 2 mL,并存放于-80 °C 冰箱内。

1.4 DNA 抽提与测序

使用 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 的提取,用

琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。对细菌基因组 DNA 的 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, 正向引物为 338F (5'-GTACTCCTACGGGAG GCAGCA-3'), 反向引物为 806R (5'-GTGGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 反应体系(20 μ L): 5 \times FastPfu DNA 聚合酶缓冲液 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.8 μ L, FastPfu 聚合酶(5 mol/L) 0.4 μ L, DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据 Illumina DNA 文库制备说明书构建基因文库, 在 Illumina HiSeq 2000 平台进行测序。

1.5 数据处理

利用 FLASH V1.2.11^[16]和 QIIME V1.9.0^[17]软件对测序得到的原始数据进行拼接、筛选, 得到有效序列。按照 97% 的相似度进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类。运用 RDP Classifier 与 GreenGene V13.8 数据库进行物种注释分析, 用 PICRUSt V1.1.0 软件^[18]对细菌的功能进行预测。通过计算 Shannon、Simpson 等 α 多样性指数, 比较 α 多样性差异; 基于 Bray-Curtis 距离进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 以表征 β 多样性。

1.6 统计学分析与图表绘制

两组间采用 Wilcoxon rank-sum test 检验比较 α 多样性、差异细菌, P 值小于 0.05 表明差异有统计学意义。运用 Adonis 检验比较两组间 β 多样性, 用 Spearman Rank 进行差异细菌的相关性分析。运用 LEfSe 比较两组间的菌群功能差异, LDA 的筛选值为 2。运用 Cytoscape 3.7^[19]进行网络图的绘制, 使用 R 语言 3.5.0 完成其他图表的绘制。

2 结果与分析

2.1 样本信息及测序数据统计

167 个样本测序共获得 9 457 730 条有效序

列。在 97% 的相似水平下, 对样本进行聚类 and 注释, 共得到 4 001 个 OTU, 归属于 18 个菌门 106 个菌科 193 个菌属。吸烟组和非吸烟组的志愿者信息见表 1。

2.2 α 多样性分析

吸烟组(current)与非吸烟组(never)比较, α 多样性(图 1, Shannon 指数和 Simpson 指数)无显著差异。

2.3 β 多样性分析

在 OTU 水平上, 基于 Bray-Curtis 距离对所有样品进行主成分分析后发现, 吸烟组和非吸烟组比较存在一定的差异, 差异具有统计学意义 (Adonis: $R^2=0.025$ 1, $P=0.002$; 图 2)。

表 1 吸烟组和非吸烟组志愿者信息

Table 1 The information of subjects in smoking group and non-smoking group

Items	Current (n=77)	Never (n=90)	P value
Age, Mean (SD)	39.78 (10.02)	37.01 (9.61)	0.08
Young (21-35), n	27	37	
Middle (36-50), n	38	46	
Aged (>50), n	12	7	

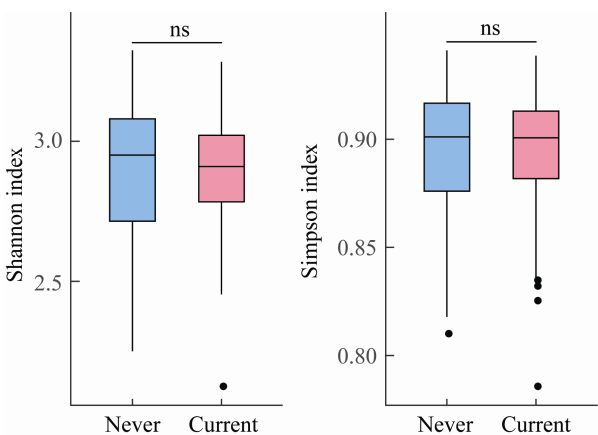


图 1 唾液菌群的 Shannon 指数和 Simpson 指数箱型图

Figure 1 Boxplot of Shannon index and Simpson index

注: Never: 非吸烟组; Current: 吸烟组. ns: $P>0.05$.

Note: Never: Non-smoking group; Current: Smoking group. ns: $P>0.05$.

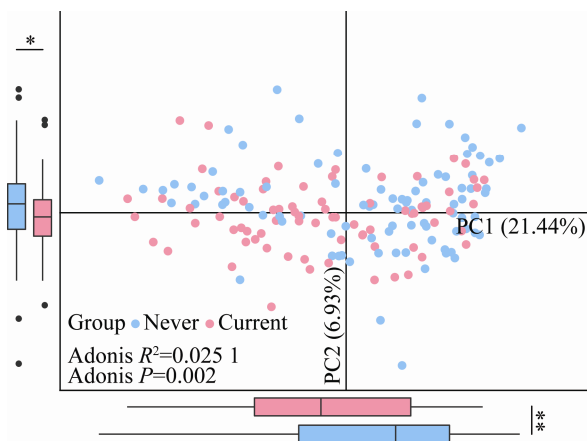


图2 基于 OTU 水平的 PCA 分析

Figure 2 PCA of bacterial OTU composition

注: Never: 非吸烟组; Current: 吸烟组. 每个点代表一个样本, 粉色的点为吸烟组, 蓝色的点代表非吸烟组. 箱型图展示了吸烟组(粉色)和非吸烟组(蓝色)在 PC1 和 PC2 上的差异. 使用 Adonis 进行检验(左下角). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

Note: Never: Non-smoking group; Current: Smoking group. Each point represented one sample, pink indicated smoking group, blue indicated non-smoking group. Box plots quantified the dissimilarity of PC1 and PC2 between the two groups. The Adonis test was used to determine significance between the two groups (shown in the lower left). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

2.4 唾液菌群的组成与差异

非吸烟组和吸烟组的唾液菌群组成见图 3。在门水平上(图 3A), 按照相对丰度从高到低依次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 非吸烟组: 35.62%; 吸烟组: 39.46%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 非吸烟组: 24.48%; 吸烟组: 27.37%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 非吸烟组: 24.19%; 吸烟组: 17.16%)、梭杆菌门(*Fusobacteria*, 非吸烟组: 7.04%; 吸烟组: 6.04%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 非吸烟组: 2.77%; 吸烟组: 4.03%)。

在属水平上(图 3C), 按照相对丰度从高到低, 前十位依次是普雷沃氏菌属 1 (*Prevotella1*, 非吸烟组: 19.12%; 吸烟组: 22.63%)、奈瑟菌属(*Neisseria*, 非吸烟组: 14.46%; 吸烟组: 10.06%)、普雷沃氏菌属 2 (*Prevotella2*, 非吸烟组: 8.07%; 吸烟组: 8.78%)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*, 非吸烟组: 7.01%; 吸烟组: 9.03%)、链球菌属 (*Streptococcus*, 非吸烟组: 7.56%; 吸烟组: 7.46%)、卟啉单胞菌属

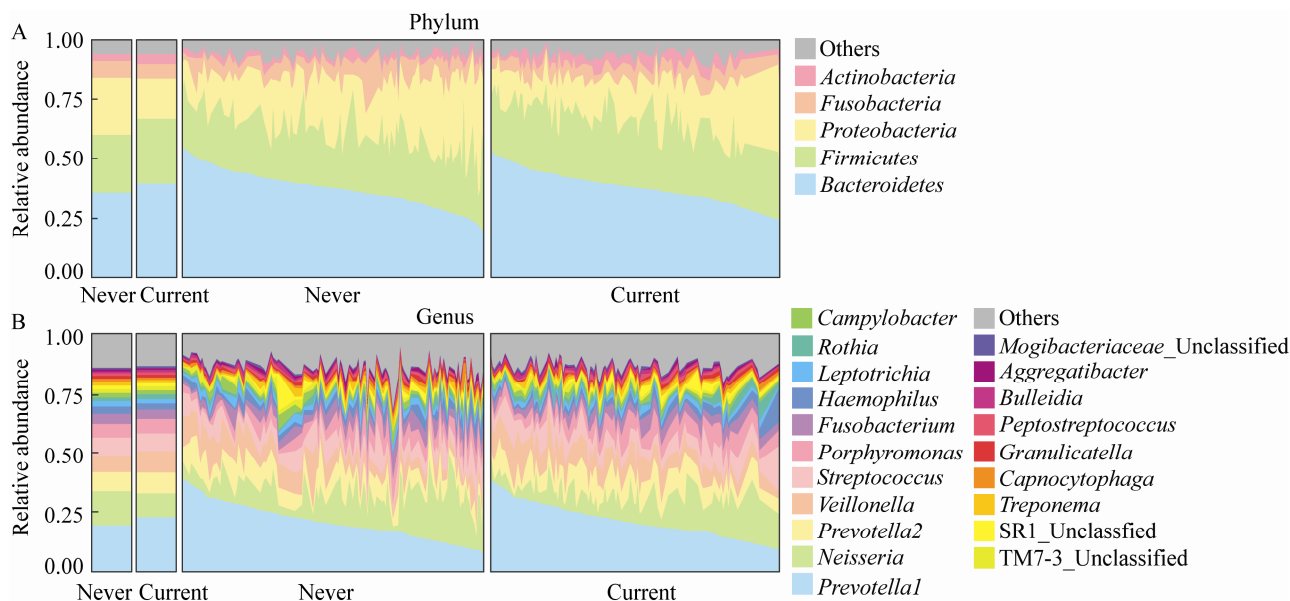


图3 吸烟者和非吸烟者的唾液菌群构成

Figure 3 Composition of salivary microbiome of smokers and non-smokers

注: Never: 非吸烟组; Current: 吸烟组. 柱状图(左)为非吸烟组/吸烟组全部样本的细菌组成情况. 堆积图(右)为非吸烟组/吸烟组各样本的细菌组成情况. A: 门水平; B: 属水平.

Note: Never: Non-smoking group; Current: Smoking group. Bar plot (Left) showed the bacterial composition of all samples in smoking group/non-smoking group. Area plot showed the bacterial composition of each sample in smoking group/non-smoking group. A: Phylum level; B: Genus level.

(*Porphyromonas*, 非吸烟组:5.68%; 吸烟组:6.08%)、梭杆菌属(*Fusobacterium*, 非吸烟组: 4.17%; 吸烟组: 3.85%)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*, 非吸烟组: 3.05%; 吸烟组: 2.49%)、纤毛菌属(*Leptotrichia*, 非吸烟组: 2.21%; 吸烟组: 1.74%)、罗斯氏菌属(*Rothia*, 非吸烟组: 1.59%; 吸烟组: 2.14%)。

通过 Wilcoxon rank-sum test 检验比较两组间的差异细菌, 发现多个优势菌门和优势菌属存在差异(图 4)。在门水平上(图 4A), 与非吸烟组相

比, 吸烟组中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度显著升高, 变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度显著下降。

在属水平上(图 4B), 与非吸烟组相比, 吸烟组中普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、韦荣氏球菌(*Veillonella*)、布雷德菌属(*Bulleidia*)、放线菌属(*Actinomyces*)、巨球形菌属(*Megasphaera*)、奇异菌属(*Atopobium*)和毛螺菌属(*Moryella*)的相对丰度显

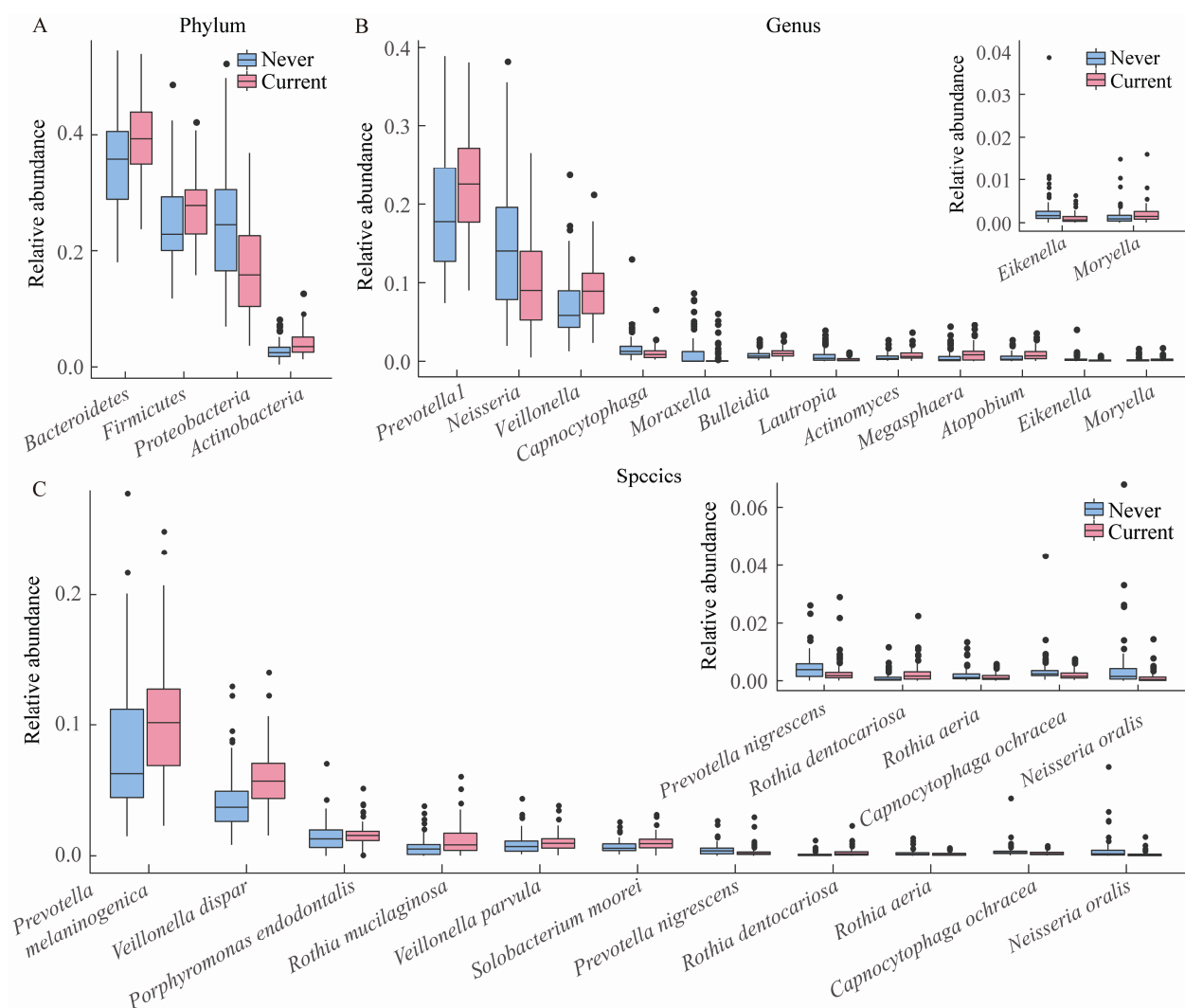


图 4 吸烟者与非吸烟者的差异细菌

Figure 4 Differential bacteria between smokers and non-smokers

注: Never: 非吸烟组; Current: 吸烟组. 仅展示相对丰度大于 0.1% 的差异细菌. A: 门水平; B: 属水平; C: 种水平. 右上角的箱型图进一步展示了相对丰度较低的菌属和菌种.

Note: Never: Non-smoking group; Current: Smoking group. Only differential bacteria with relative abundance >0.1% were shown. A: Phylum level; B: Genus level; C: Species level. The box plot (upper right) further showed the genus and species with low relative abundance.

著升高, 奈瑟菌属(*Neisseria*)、二氧化碳嗜纤维属(*Capnocytophaga*)、莫拉菌属(*Moraxella*)、劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)和艾肯菌属(*Eikenella*)的相对丰度显著降低。在种水平上, 共检测到 246 个具有分类命名的菌种, 其中相对丰度大于 0.1%且存在显著差异的有 11 种。黑色素杆菌(*Prevotella melaninogenica*)、殊异韦荣菌(*Veillonella dispar*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、粘滑罗斯菌(*Rothia mucilaginosa*)、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)、梭状芽孢杆菌(*Solobacterium moorei*)和龋齿罗氏菌(*Rothia dentocariosa*)等菌种富集于吸烟组, 变黑普氏菌(*Prevotella nigrescens*)、黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga ochracea*)和口腔奈瑟菌(*Neisseria oralis*)等菌种富集于非吸烟组。

2.5 差异细菌的相关性分析

对吸烟组和非吸烟组之间存在差异的菌属进

行相关性分析, 发现富集于同一组的细菌之间均呈显著正相关, 而富集于不同组的细菌之间均呈显著负相关(图 5)。

2.6 唾液菌群的功能预测

基于 PICRUSt 的预测结果, 运用 LDA 方法判定吸烟组和非吸烟组存在差异的功能, 发现部分唾液菌群功能存在显著差异(图 6)。

差异分析结果显示, 吸烟组和非吸烟组主要在遗传信息处理和代谢相关的通路上存在差异。核糖体(ribosome)、DNA 修复和重组蛋白(DNA repair and recombination proteins)、氨酰-tRNA 的生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)、DNA 复制蛋白(DNA replication proteins)、果糖和甘露糖代谢(fructose and mannose metabolism)、半乳糖代谢(galactose metabolism)、淀粉和蔗糖的代谢(starch and sucrose metabolism)等功能富集于吸烟组。

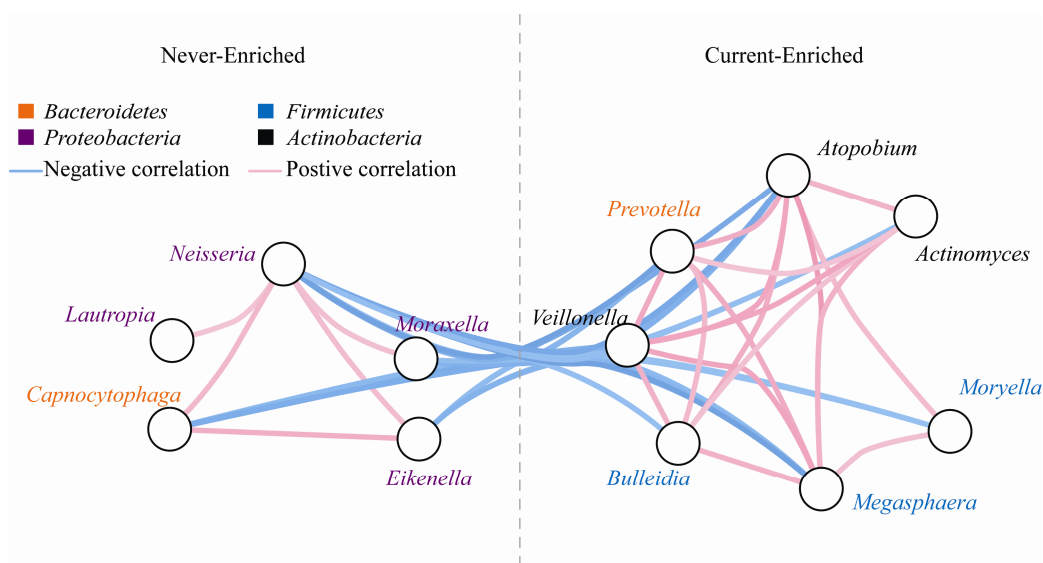


图 5 差异细菌的相关性分析

Figure 5 Correlations of differential bacteria

注: 使用 Spearman rank 计算差异细菌间的相关性. 仅显示相关性(rho 值)大于 0.4 或小于 -0.4 的关联. 每个圆圈代表一个属. 位于虚线左边的细菌富集于非吸烟组(never), 位于虚线右边的细菌富集于吸烟组(current). 线的颜色表示相关性的类型, 蓝色代表负相关, 粉色代表正相关, 颜色越深, 相关性越强. 菌属名称的颜色代表其所对应的门水平分类.

Note: The correlation of differential bacteria was calculated by spearman rank. Only correlations with rho value >0.4 or <-0.4 were shown. Each circle represented one genus. Genus enriched in non-smoking group (never) were shown on the left side, while genus enriched in smoking group (current) were shown on the right side. Connect lines in blue or pink indicated negative or positive correlation respectively, and darker color showed stronger correlation. The color of genus name represented the phylum level.

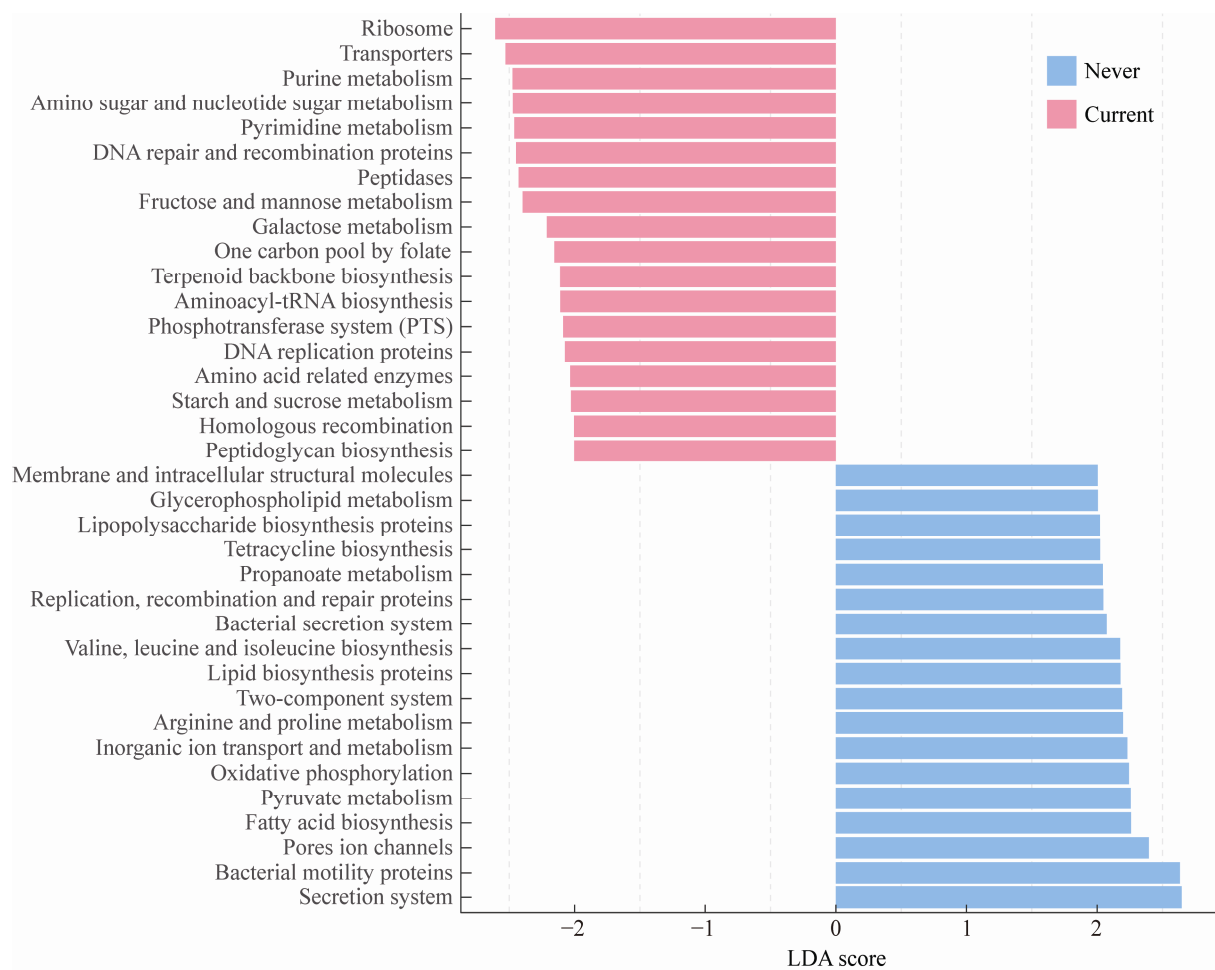


图 6 唾液菌群的功能差异
Figure 6 Functional differences of salivary microbiome
注：柱状图展示了 KEGG Level 3 的结果。粉色代表该功能富集于吸烟组(current)，蓝色代表该功能富集于非吸烟组(never)。分析时 LDA 阈值设置为 2.0。柱状图的长度代表差异功能的 LDA 值大小。LDA 值的绝对值越大代表差异越显著。
Note: The bar plot showed the results of KEGG Level 3. Pink represented the functions enriched in smoking group (current), and blue represented the functions enriched in non-smoking group (never). The threshold on the LDA score was set to 2.0. The length of bar represented the LDA score, and the larger the LDA score, the better the function differentiates.

缬氨酸和亮氨酸及异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、精氨酸和脯氨酸的代谢(arginine and proline metabolism)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、脂质生物合成蛋白(lipid biosynthesis proteins)、脂肪酸的生物合成(fatty acid biosynthesis)、脂多糖生物合成蛋白质(lipopolysaccharide biosynthesis proteins)、甘油磷脂的代谢(glycerophospholipid metabolism)等功能富集于非吸烟组。

3 讨论与结论
全世界约有 20 亿人使用烟草产品，与烟草相关的疾病每年至少导致 400 万人死亡^[20]。近年来，与烟草相关的疾病，包括心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、克罗恩病和各类癌症的发生率更是急剧上升^[21]。这些数据都表明吸烟在人类疾病发生中具有潜在的危害。然而新的证据已经表明，主动吸烟或暴露于二手烟环境都与潜在病原菌的定殖有关^[22-23]。但目前关于吸烟对中国人群口腔微生物组影响的研究十分有限。基于此，本研究收

集了 167 名健康个体的唾液样本, 利用 16S rRNA 基因扩增子测序法探究了吸烟对唾液微生物组的影响。

前人研究发现, 吸烟会造成唾液微生物组的 α 多样性下降^[12,24], 但也有报道指出, 吸烟者和非吸烟者唾液微生物组的 α 多样性没有显著差异^[25]。在本研究中, Shannon 指数和 Simpson 指数的比较结果显示, 吸烟对唾液微生物组的 α 多样性不会造成显著影响, 但相比非吸烟组, 吸烟组唾液微生物组的 α 多样性有下降趋势。在 β 多样性上, PCA 的分析结果显示吸烟组和非吸烟组的唾液微生物组的结构存在一定差异, 表明吸烟会对唾液微生物组造成一定的影响。

虽然人体唾液微生物组中含有多种微生物, 但拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)被认为是最主要的 5 个菌门^[26], 这与本研究结果相一致。在本研究中, 167 个样本的唾液微生物均发现了上述 5 个菌门, 平均总相对丰度为 94.08%。其中, 主要包含普雷沃氏菌属 1 (*Prevotella1*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、普雷沃氏菌属 2 (*Prevotella2*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、链球菌属(*Streptococcus*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)和罗斯氏菌属(*Rothia*)等菌属, 上述菌属均常见于人类口腔^[26]。

先前的研究表明, 吸烟会改变健康人群唾液微生物组的组成, 但是研究结果不尽相同。一项针对美国健康人群的大型研究发现, 吸烟会导致唾液微生物中变形菌门的相对丰度降低, 放线菌门的相对丰度升高^[14]。另一项针对约旦健康人群的研究发现, 吸烟者的唾液微生物组中厚壁菌门增加, 而变形菌门和梭杆菌门减少^[12]。在本研究中, 与非吸烟组相比, 吸烟组的变形菌门、厚壁菌门、放线菌门以及拟杆菌门的相对丰度发生明显变化。

为进一步明确吸烟对唾液微生物组的影响, 本研究比较了属水平和种水平的细菌差异, 发现吸烟对多个菌属和菌种的相对丰度造成了影响。在属水平上, 有研究发现, 吸烟会导致健康人唾液中奈瑟菌属、二氧化碳嗜纤维属(*Capnocytophaga*)和劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)的减少^[12,25,27], 这与本研究结果相符。本研究还发现, 吸烟组的艾肯菌属(*Eikenella*)相对丰度降低, 这与某些疾病状态的唾液微生物改变一致, 如在牙周炎患者的口腔黏膜中奈瑟菌属和艾肯菌属的相对丰度降低^[28]。

此外, 本研究结果显示, 吸烟组中普雷沃氏菌属、韦荣氏球菌属、放线菌属(*Actinomyces*)、奇异菌属(*Atopobium*)和巨球型菌属(*Megasphaera*)等菌属的相对丰度显著升高。有研究表明, 韦荣氏球菌属和放线菌属中的某些细菌能够参与硝酸盐的还原反应, 将硝酸盐转化为亚硝酸盐, 将进一步将亚硝酸盐转化为致癌的亚硝胺和促炎的一氧化氮^[29-30]。由于吸烟能够增加硝酸盐和生物碱的口服摄入量, 因此这些微生物可能会通过参与硝酸盐的代谢对人体健康产生重要影响^[31]。普雷沃氏菌属、韦荣氏球菌属和放线菌属的部分细菌可以产生硫化氢, 被认为是口腔恶臭的来源^[32]。因此, 这些细菌属的相对丰度增加可能是造成吸烟者口腔存在异味的原因之一。另外有报道指出, 吸烟会造成唾液中链球菌属(*Streptococcus*)的相对丰度增加^[12,24], 但是本研究中链球菌属的相对丰度无显著变化。

在种水平上, Lin 等发现吸烟组富集粘滑罗斯菌(*Rothia mucilaginosa*)、连翘坦纳氏菌(*Tannerella forsythia*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、普雷沃菌(*Prevotella* spp.)和 *Eubacterium saepenum* 等细菌^[27]。本研究结果也显示, 吸烟组中粘滑罗斯菌和黑色素杆菌(*Prevotella melaninogenica*)的相对丰度增加。此外, 本研究还发现吸烟会造成健康人唾液中的牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)和梭状芽孢杆菌(*Solobacterium moorei*)

相对丰度增加。有报道指出, 牙髓卟啉单胞菌与慢性牙周炎存在关联^[33], 而梭状芽孢杆菌被发现与口臭相关^[34]。上述结果为吸烟引起口腔疾病提供了潜在解释, 并为预测和治疗疾病提供了潜在靶点。

对差异菌属进行相关性分析发现, 富集于同一个组的细菌之间呈现强正相关, 而富集于不同组的细菌之间呈现强的负相关。由于细菌定殖生态位主要由营养、空间环境和代谢等因素决定^[35], 因此该强共现网络的出现提示我们吸烟在物种选择中起关键作用。

PICRUSt 预测结果显示, 与非吸烟者相比, 吸烟者唾液微生物组的部分功能发生显著变化。在吸烟者中, 有氧代谢相关的途径(氧化磷酸化)相对丰度显著降低, 而不依赖氧气的代谢途径(果糖、半乳糖、蔗糖等糖代谢)的相对丰度明显上升, 这可能与吸烟造成的缺氧环境有关^[36]。

综上所述, 本研究表明吸烟会影响人体唾液微生物组, 其可能会通过降低健康正常唾液细菌的丰度和增加有害菌的丰度破坏唾液微生物组的稳态, 从而导致与吸烟相关疾病的患病风险增加。未来的研究需要进一步通过宏基因组的方法验证吸烟对唾液微生物组功能的影响, 并确定与吸烟相关的口腔细菌是否介导吸烟对健康的影响。此外, 还应该进一步探究差异细菌是否可以作为诊断性生物标记物, 预测与吸烟相关疾病的发生。

REFERENCES

- [1] Zou XN, Jia MM, Wang X, et al. Changing epidemic of lung cancer & tobacco and situation of tobacco control in China[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2017, 20(8): 505-510 (in Chinese)
邹小农, 贾漫漫, 王鑫, 等. 中国肺癌和烟草流行及控烟现状[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(8): 505-510
- [2] Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5): 377-384
- [3] Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, et al. Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(11): 4730-4738
- [4] Warren GW, Alberg AJ, Kraft AS, et al. The 2014 Surgeon general's report: "The health consequences of smoking—50 years of progress": a paradigm shift in cancer care[J]. Cancer, 2014, 120(13): 1914-1916
- [5] Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology[J]. Periodontology 2000, 2005, 38(1): 135-187
- [6] Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, et al. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 3944-3955
- [7] Takeshita T, Matsuo K, Furuta M, et al. Distinct composition of the oral indigenous microbiota in South Korean and Japanese adults[J]. Scientific Report, 2014, 4: 6990
- [8] Li J, Quinque D, Horz HP, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa[J]. BMC Microbiology, 2014, 14: 316
- [9] Bhushan B, Yadav AP, Singh SB, et al. Diversity and functional analysis of salivary microflora of Indian Antarctic expeditionaries[J]. Journal of Oral Microbiology, 2019, 11(1): 1581513
- [10] Nasidze I, Li J, Schroeder R, et al. High diversity of the saliva microbiome in Batwa Pygmies[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23352
- [11] Morris A, Beck JM, Schloss PD, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013, 187(10): 1067-1075
- [12] Al-Zyoud W, Hajjo R, Abu-Siniyeh A, et al. Salivary microbiome and cigarette smoking: a first of its kind investigation in Jordan[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(1): 256
- [13] Karabudak S, Ari O, Durmaz B, et al. Analysis of the effect of smoking on the buccal microbiome using next-generation sequencing technology[J]. Journal of Medical Microbiology, 2019, 68(8): 1148-1158
- [14] Wu J, Peters BA, Dominianni C, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults[J]. The ISME Journal, 2016, 10(10): 2435-2446
- [15] Karasneh JA, Al Habashneh RA, Marzouka NAS, et al. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis[J]. BMC Oral Health, 2017, 17(1): 64
- [16] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [17] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336

- [18] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821
- [19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504
- [20] DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review[J]. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2004, 567(2/3): 447-474
- [21] Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 225
- [22] Brook I, Gober AE. Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of smokers and nonsmokers[J]. *Chest*, 2005, 127(6): 2072-2075
- [23] Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers[J]. *Journal of Periodontology*, 2000, 71(4): 562-567
- [24] Yu GQ, Phillips S, Gail MH, et al. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 3
- [25] Wirth R, Maróti G, Mihók R, et al. A case study of salivary microbiome in smokers and non-smokers in Hungary: analysis by shotgun metagenome sequencing[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2020, 12(1): 1773067
- [26] Belstrøm D. The salivary microbiota in health and disease[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2020, 12(1): 1723975
- [27] Lin DD, Hutchison KE, Portillo S, et al. Association between the oral microbiome and brain resting state connectivity in smokers[J]. *Neuroimage*, 2019, 200: 121-131
- [28] Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003, 30(12): 1031-1037
- [29] Doel JJ, Benjamin N, Hector MP, et al. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity[J]. *European Journal of Oral Sciences*, 2005, 113(1): 14-19
- [30] Liddle L, Burleigh MC, Monaghan C, et al. Variability in nitrate-reducing oral bacteria and nitric oxide metabolites in biological fluids following dietary nitrate administration: an assessment of the critical difference[J]. *Nitric Oxide*, 2019, 83: 1-10
- [31] Kato I, Vasquez AA, Moyerbrailean G, et al. Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer[J]. *Journal of Epidemiological Research*, 2016, 2(2): 92-101
- [32] 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
- [33] Lombardo Bedran TB, Marcantonio RAC, Spin Neto R, et al. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2012, 4(1): 10123
- [34] Vancauwenberghe F, Dadamio J, Laleman I, et al. The role of *Solobacterium moorei* in oral malodour[J]. *Journal of Breath Research*, 2013, 7(4): 046006
- [35] Keddy PA. Assembly and response rules: two goals for predictive community ecology[J]. *Journal of Vegetation Science*, 1992, 3(2): 157-164
- [36] Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD. The effect of cigarette smoking on anaerobiosis in the oral cavity[J]. *Journal of Periodontology*, 1975, 46(2): 82-85