

牙周炎牙根根面微生物群落结构比较*

张菊梅¹, 周建业¹, 薄磊², 胡晓潘¹, 焦康礼¹, 李志杰¹, 李跃烘¹, 李志强^{1△}

1. 西北民族大学甘肃省口腔疾病研究重点实验室培育基地 西北民族大学口腔医学国家民委重点实验室
西北民族大学口腔医学院(兰州 730030); 2. 兰州军区空军机关医院 体检中心(兰州 730000)

【摘要】目的 利用高通量测序,研究牙周炎患牙根面微生物的群落结构,为牙周炎的进展研究提供实验依据。**方法** 选取同一牙周炎患者的6颗Ⅲ度松动患牙,分别刮取根颈(RN组)、根中(RM组)、根尖(RT组)菌斑及组织,利用Illumina Miseq测序平台,对16S rRNA V3V4区进行双端测序;通过Mothur、Qiime和SPSS等软件分析根面不同部位微生物的群落结构及差异。**结果** 主坐标分析(PCoA)显示,RM与RT组微生物群落结构较接近,但二者与RN组有明显区别;3组共检出13个菌门,优势菌门(丰度>1%)共7个;184种菌属中检出优势菌属(丰度>1%)29个,其中拟杆菌门_[G-6]及消化链球菌科_[XI][G-4]丰度会随着采样部位的深入而增加($P<0.05$),而普雷沃菌属、月形单胞菌属、棒状杆菌属及欧森氏菌属的丰度随着采样部位的深入而减少($P<0.05$)。**结论** 牙周炎患牙根面微生物群落结构具有一定的部位特异性。

【关键词】 牙周炎 根面 微生物群落结构

Microbial Community Structure on the Root Surface of Patients with Periodontitis ZHANG Ju-mei¹, ZHOU Jian-ye¹, BO Lei², HU Xiao-pan¹, JIAO Kang-li¹, LI Zhi-jie¹, LI Yue-hong¹, LI Zhi-qiang^{1△}. 1. Key Laboratory of Oral Diseases of Gansu Province, Northwest University for Nationalities; Key Laboratory of Stomatology of State Ethnic Affairs Commission, Northwest University for Nationalities; School of Stomatology, Northwest University For Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. Medical Examinationj Center, Air Force Authority Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730000, China

△ Corresponding author, E-mail: lizhiqiang6767@163.com

【Abstract】 Objective To study the microbial community structure on the root surface of patients with periodontitis. **Methods** Bacterial plaque and tissues from the root neck (RN group), root middle (RM group) and root tine (RT group) of six teeth with mobility III in one patient with periodontitis were sampled. The V3V4 region of 16S rRNA was sequenced on the Illumina MiSeq platform. The microbial community structure was analyzed by Mothur, Qiime and SPSS software. **Results** The principal component analysis (PCoA) results indicated that the RM samples had a similar microbial community structure as that of the RT samples, which was significant different from that of the RN samples. Thirteen phyla were detected in the three groups of samples, which included 7 dominant phyla. 29 dominant genera were detected in 184 genera. The abundance of *Bacteroidetes*_[G-6] and *Peptostreptococcaceae*_[XI][G-4] had a positive correlation with the depth of the collection site of samples ($P<0.05$), while the abundance of *Prevotella*, *Selenomonas*, *Corynebacterium* and *Olsenella* had a negative correlation with the depth of the collection site of samples ($P<0.05$). **Conclusion** There is region-specificity of microbial community structure on the root surface of patients with periodontitis.

【Key words】 Periodontitis Root surface Microbial community structure

牙周炎是累及牙周支持组织的慢性感染性疾病,不仅是口腔健康的“头号杀手”,而且是多种全身性疾病的危险因素,严重影响人类的健康。研究显示,人类口腔的微生物群落结构与口腔疾病密切相关,如果口腔微生态系统被打破,则会导致牙周病及

其它口腔疾病的发生^[1]。然而以往多基于唾液、龈沟液和龈下菌斑等进行牙周炎的病因学研究^[2],鲜见对根面微生物群落结构分布的研究报道。因此,本研究首次利用Illumina Miseq高通量测序平台,对牙周炎患牙根面微生物群落结构进行研究,为牙周炎的进展研究提供实验依据。

1 材料及方法

1.1 样本采集

选择在西北民族大学口腔医院就诊的1例牙周

* 国家自然科学基金地区基金项目(No. 31360124/C0309)、甘肃省青年科技基金计划项目(No. 1606RJYA238)、西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. 31920150050)和甘肃省科技支撑计划项目(No. 144WCGA167)资助

△ 通信作者, E-mail: lizhiqiang6767@163.com

炎患者(女,62 岁),其 6 颗患牙(14,21,34,35,36,42)被诊断为Ⅲ度松动。病史满足以下条件:①无吸烟史;②无先天性疾病和系统性疾病[如糖尿病,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染等];③ 3 月内无抗生素使用史;④非妊娠期或哺乳期妇女。患者均知情同意,并经西北民族大学伦理委员会批准。样本采集方法:2%盐酸利多卡因局部浸润麻醉、用棉卷蘸干牙面及周围牙龈后隔湿。以牙钳悬空拔除该 6 颗患牙,拔牙创常规处理。患牙拔出后即刻用无菌剔挖器刮取每颗患牙根颈(RN 组)1/3、根中(RM 组)1/3 及根尖(RT 组)1/3 的根面菌斑及组织,每颗牙齿的每部位计为 1 份样本,分别记为 RN 组:1A,2A,3A,4A,5A,6A;RM 组:1B,2B,3B,4B,5B,6B;RT 组:1C,2C,3C,4C,5C,6C。其中 2A 在实验途中污染,从样本中剔除,共 17 个样本进入统计。以上操作均由同一名医生完成。

1.2 根面微生物总 DNA 的提取及 16S rRNA V3V4 区测序

样本采集后,立即送至实验室进行细菌总 DNA 提取。提取方法参照细菌微量 DNA 提取试剂盒说明书进行。将细菌总 DNA 40 μL 送至上海派森诺生物科技有限公司,利用 Illumina Miseq 平台进行 16S rRNA V3V4 区测序(引物:U341F:5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3',U806R:5'-GGAC TACNNGGGTATCTAAT-3')。测序后对有效序列进行过滤和去除嵌合体处理,得到最终用于后续分析的优质序列。

1.3 OTU 聚类

利用 Qiime 软件对上述实验获得的优质序列按相似度 0.97 进行聚类,获得操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs)数值,选取每个类最长的序列为代表序列。并对序列数据库进行比对,获得每个 OTU 分类学信息。利用 Mothur 软件生成组间 OTUs 的维恩图。

1.4 微生物 Alpha 多样性分析及 Beta 多样性分析

根据各样品物种丰富度情况,应用 Mothur 软件,计算 2 种常用的生物群落多样性指数:Shannon 指数和 Simpson 指数。利用 SPSS 统计学软件对 RN 组、RM 组和 RT 组进行组间方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。根据样品之间物种的进化信息以及物种的丰度信息,利用 Qiime 软件进行 unifrac 分析,得到样品差异的距离矩阵。对得到的样品之间的距离矩阵信息,进行主坐标分析(principal coordinates analysis,PCoA),绘制 PCoA 图。

1.5 微生物群落结构分析

应用软件 Mothur 中的 metastats 命令,比较 13 菌门、184 菌属口腔微生物在 3 组样本间的丰富度的差异情况。组间比较采用方差分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 测序总体情况

17 个样本共获得 826 939 个优质序列。聚类后获得 8 801 个 OTUs。根据获得的 OTUs 数据,绘制维恩图(图 1)。维恩图显示,1 059 个 OTUs (12.03%)同时存在于 3 组,而 RN、RM 及 RT 组各自独有的 OTUs 数目分别为:1 579 (17.94%),2 426 (27.57%),2 134 (24.25%)。



图 1 RN、RM、RT 组 OTUs 数据维恩图
Fig 1 Venn diagram of RN, RM and RT samples

2.2 Alpha 多样性分析及 Beta 多样性分析

见图 2。Simpson 及 Shannon 指数在 3 组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);PCoA 分析显示:PC1 贡献度为 66.48%,PC2 贡献度为 14.96%。

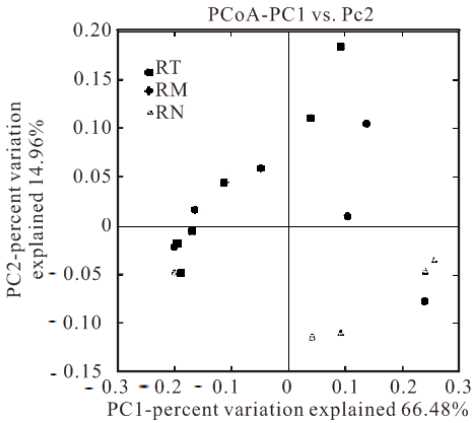


图 2 主坐标分析
Fig 2 Weighed and normalized Principal Component Analysis (PCoA)

在 PC1 主成分及 PC2 主成分上, RN 组与 RM、RT 组均位于不同象限, RM 和 RT 组较为接近, 但二者与 RN 组有明显区别。

2.3 微生物群落结构分析

2.3.1 优势菌门及菌属分析 3 组共检出 13 个菌门, 包括: 放线菌门 (*Actinobacteria*), 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*), 衣原体门 (*Chlamydiae*), 绿弯菌门 (*Chloroflexi*), 厚壁菌门 (*Firmicutes*), 梭杆菌门 (*Fusobacteria*), GN02, 变形菌门 (*Proteobacteria*), SR1, 螺旋体门 (*Spirochaetes*), 互养菌门 (*Synergistetes*), TM7, 软壁菌门 (*Tenericutes*)。其中优势菌门(丰度>1%)共 7 个, 在 RN 组中存在 6 个优势菌门, RM 组中存在 7 个优势菌门, RT 组中存在 7 个优势菌门, 各优势菌门分别在 RN、RM 和 RT 组中的丰度见图 3。

对 184 种菌属的丰度进行分析, 结果检出优势菌属(丰度>1%)共 29 个, 其中在 RN 组中检测到 15 个优势菌属, RM 组中检测到 20 个优势菌属, RT 组中检测到 21 个优势菌属, 29 种优势菌属分别在 RN、RM 和 RT 组中的丰度见图 4。

2.3.2 差异菌属分析 184 个菌属中, 拟杆菌门_ [G-6](在 RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 0.00%、0.00%、0.02%)及消化链球菌科_ [XI][G-4](在

RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 0.12%、0.32%、0.54%)的丰度随着采样部位的深入而增加 ($P<0.05$), 而普雷沃菌属(在 RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 18.66%、10.78%、3.77%)、月形单胞菌属(在 RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 4.94%、3.98%、1.63%)、棒状杆菌属(在 RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 3.22%、0.42%、0.13%)及欧森氏菌属(在 RN、RM 和 RT 组的丰度分别为 0.49%、

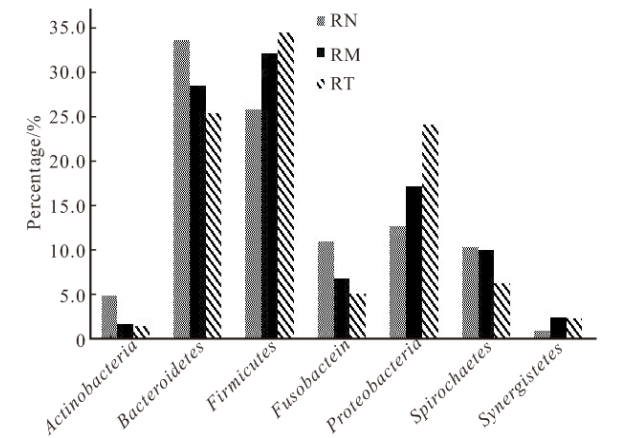


图 3 优势菌门丰度图
Fig 3 Abundance of the dominant phyla

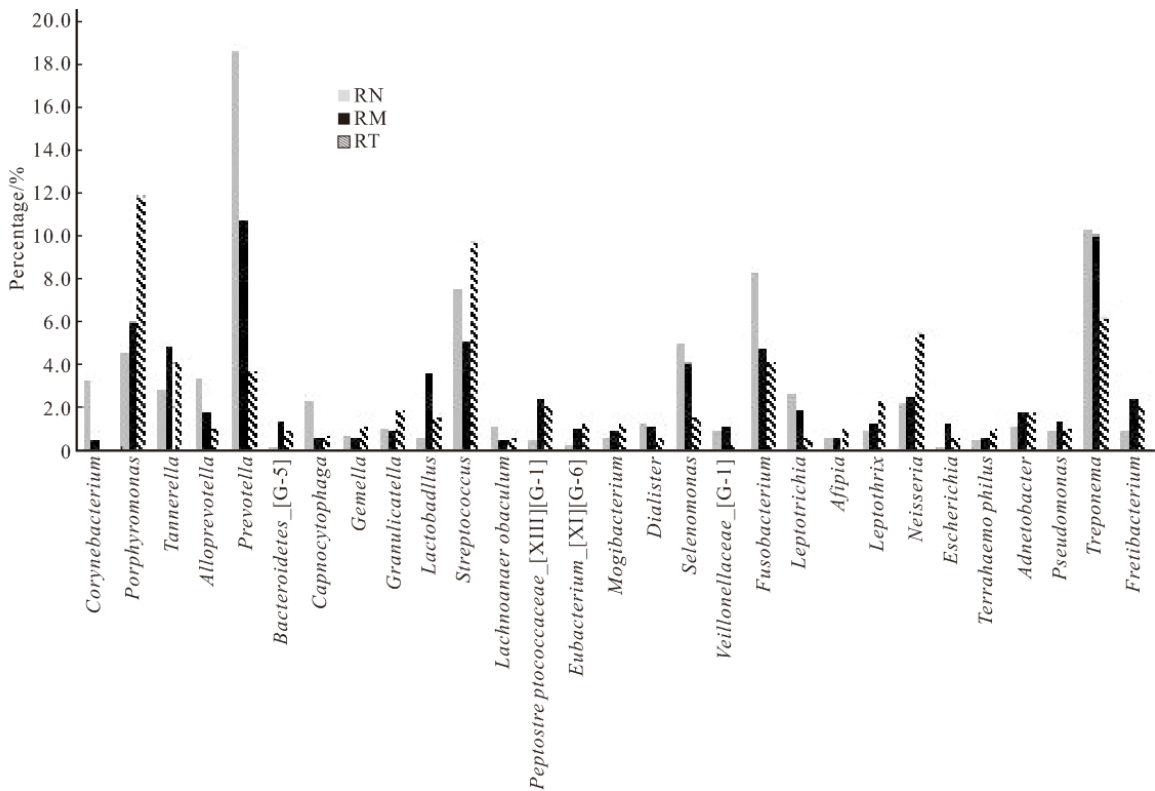


图 4 优势菌属丰度图
Fig 4 Abundance of the dominant genera

0.32%、0.07%)的丰度随着采样部位的深入而减少($P<0.05$)。

3 讨论

本研究中,我们对同一患者的多个患牙的根面微生物群落结构进行检测,排除了不同患者因为年龄、地域、饮食、口腔卫生习惯等因素可能导致的口腔中微生物群落结构分布的个体内和个体间的差异^[3],具有创新性。本次研究利用 Illumina MiSeq (2×250)平台,并基于 16Sr RNA V3V4 双区测序,17个样本总共测得 987 004 有效序列,其中 826 939 优质序列,聚类后获得 8801 个 OTUs。每样本平均 OTUs 数目与以往报道的牙周炎微生物群落结构的研究数据相近^[4]。由维恩图可以看出,3组共有的 OTUs 仅占全部 OTUs 数目的 12.03%,而3组各自独有的 OTUs 数目均高于 17%,这提示牙周炎根面不同部位均有微生物检出,且根面微生物群落结构可能随着采样部位的深入而不同。

在根颈、根中及根尖的微生物多样性比较中,Alpha 多样性在各组间无明显差异,即微生物的数量及丰度在牙周炎牙齿根面无明显区别,提示微生物的数量及丰度在牙周炎进展中的作用值得进一步研究。PCoA 分析显示,根中及根尖部的微生物群落结构较为相似,但与根颈部有明显的区别,提示微生物群落结构的变化不仅是牙周炎发生的主要原因^[5],也有可能是其发展的主要原因。

在3个不同部位的微生物群落结构的比较中,除了互养菌门在根颈部含量略低(0.88%)之外,7个优势菌门(放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、梭杆菌门、变形菌门、螺旋体门、互养菌门)在3组中的含量均高于1%。ABUSLEME 等^[6]在牙周炎患者的龈下菌斑中检测到的优势菌门为:螺旋体门、互养菌门、厚壁菌门以及绿弯菌门,PARK 等^[7]的结果为:拟杆菌门、梭杆菌门、互养菌门以及螺旋体门,GRIFFEN 等^[8]的结果为:放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、梭杆菌门、变形菌门及螺旋体门。结合我们的结果可以推测,虽然其丰度有差异,但是牙周炎根面的优势菌门在种类上是恒定的。

在差异菌属中,普雷沃菌属、月形单胞菌属、棒状杆菌属及欧森氏菌属等菌属的含量会随着采样部位的深入而减少($P<0.05$),而拟杆菌门_[G-6]及消化链球菌科_[XI][G-4]的含量随着采样部位的深入而增加($P<0.05$)。JAKUBOVICS 等^[9]的研究发现,在牙龈炎的进展过程中,普雷沃菌属的含量

显著增加。

KISTLER 等^[10]的研究发现,牙龈炎患者龈下菌斑中,普雷沃菌属的含量较健康人和牙周炎患者高,而月形单胞菌属等的含量与探诊出血指数呈正相关。HUANG 等^[11]的研究发现,普雷沃菌属及月形单胞菌属等与牙龈的炎症程度相关。结合我们的研究结果表明,普雷沃菌属及月形单胞菌属在牙周炎的发病初期具有重要作用。

棒状杆菌属是革兰氏阳性杆菌,需氧或兼性厌氧。近几年的研究证实,该菌属的多数菌种为条件致病菌,可使免疫低下患者发生各类感染。ZORINA 等^[12]的研究发现,棒状杆菌属在侵袭性牙周炎的发病发展中可能是作为一种保护性菌属发挥作用。NAKANO 等^[13]在1例女性患者口腔中,对1颗反复发作牙龈炎且具有不规则舌侧沟的左下侧切牙的龈下及唾液微生物的研究发现,棒状杆菌属的检出率与探诊出血和牙齿松动度可能没有明显的关系而与是否存在牙龈炎症明显相关。结合我们的研究结果表明,棒状杆菌属也可能在牙周炎的发病初期具有作用。而欧森氏菌属被认为与龋病的发病相关^[4,14],在牙周炎发病中的研究较少,其在牙周炎发病中的作用仍有待明确。

拟杆菌门_[G-6]、消化链球菌科_[XI][G-4]的含量随着采样部位的深入而增加,提示这两种菌属可能与牙周炎的发展相关。有研究^[15]也证实,拟杆菌门与牙周炎的进展相关。ABUSLEME 等^[6]研究发现,拟杆菌门_[G-6]、消化链球菌科_[XIII][G-1]等菌属只存在于牙周炎患者的龈下,而不存在于健康人,且差异具有显著性($P<0.05$)。结合我们的研究结果,提示拟杆菌门_[G-6]和消化链球菌科_[XI][G-4]与牙周炎发展的关系值得关注。

综上所述,微生物群落结构的改变与牙周炎的发生发展相关,其中,普氏菌属、月形单胞菌属及棒状杆菌属丰富度的改变可能与牙周炎的发生相关,而拟杆菌门_[G-6]及消化链球菌科_[XI][G-4]这两种菌属丰度的改变则可能与牙周炎的进展破坏有关,但其具体机制仍待深入研究。

参 考 文 献

- [1] KIRST ME, LI EC, ALFANT B, *et al.* Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(2): 783-793. (下转第 856 页)

- [3] HOU XE, DAHLSTRÖM A. Synaptic vesicle proteins and neuronal plasticity in adrenergic neurons. *Neurochem Res*, 2000,25(9/10):1275-1300.
- [4] SONG SH, AUGUSTINE GJ. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. *Mol Cells*, 2015, 38(11): 936-940.
- [5] CHEN J, YU S, FU Y, *et al.* Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*, 2014(8):276[2015-11-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161164/>. doi: 10. 3389/fncel. 2014. 00276.
- [6] 张荣军, 游 潮, 蔡博文, 等. Feeney 法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12): 1015-1018.
- [7] BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.

(2015 - 12 - 09 收稿, 2016 - 03 - 11 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 851 页)

- [2] MARCHESAN JT, MORELLI T, MOSS K, *et al.* Association of Synergistetes and Cyclodipeptides with Periodontitis. *J Dent Res*, 2015, 94(10): 1425-1431.
- [3] CHAPPLE IL, GENCO R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases; consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 2013, 84(4 Suppl): S106-S112.
- [4] ZHOU J, JIANG N, WANG S, *et al.* Exploration of human salivary microbiomes-insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147039[2015-11-03]. dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147039.
- [5] GURSOY UK, KÖNÖNEN E, PUSSINEN PJ, *et al.* Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis; a cumulative approach. *Dis Markers*, 2011, 30(6): 299-305.
- [6] ABUSLEME L, DUPUY AK, DUTZAN N, *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 2013, 7(5): 1016-1025.
- [7] PARK OJ, YI H, JEON JH, *et al.* Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res*, 2015, 94(7): 921-927.
- [8] GRIFFEN AL, BEALL CJ, CAMPBELL JH, *et al.* Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*, 2012, 6(6): 1176-1185.
- [9] JAKUBOVICS NS. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *J Mol Biol*, 2015, 427(23): 3662-3675.
- [10] KISTLER JO, BOOTH V, BRADSHAW DJ, *et al.* Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71227[2015-11-03]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071227>.
- [11] HUANG S, YANG F, ZENG X, *et al.* Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health*, 2011(11): 33[2015-11-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152152>. doi: 10.1186/1472-6831-11-33.
- [12] ZORINA OA, PETRUKHINA NB, BASOVA AA, *et al.* Identification of key markers of normal and pathogenic microbiota determining health of periodontium by NGS-sequencing 16S-rDNA libraries of periodontal swabs. *Stomatologiia (Mosk)*, 2014, 93(6): 25-31.
- [13] NAKANO K, MIYAMOTO E, NEMOTO H, *et al.* Clinical and microbiological evaluations of mandibular lateral incisor with radicular-gingival groove. *Pediatric Dental Journal*, 2007, 17(1): 93-99.
- [14] KIANOUSH N, ADLER CJ, NGUYEN KA, *et al.* Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92940[2015-11-03]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092940>.
- [15] PAES BATISTA DA SILVA A, BARROS SP, MOSS K, *et al.* Microbial profiling in experimentally induced biofilm overgrowth among patients with various periodontal states. *J Periodontol*, 2016, 87(1): 27-35.

(2016 - 03 - 17 收稿, 2016 - 08 - 25 修回)

编辑 沈 进