

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.12.003

· 基础研究 ·

不同龋敏感程度学龄前儿童的牙菌斑微生物群落研究

肖小芬¹, 何姗姗¹, 陈泳怡¹, 吴晓云², 郑雨燕¹

1. 暨南大学附属第二临床医学院 深圳市人民医院口腔医学中心, 广东 深圳(518020); 2. 暨南大学附属第二临床医学院 深圳市人民医院病案统计室, 广东 深圳(518020)

【摘要】 目的 通过高通量测序技术研究不同龋敏感程度学龄前儿童牙菌斑的菌群结构。方法 对96名3~6岁儿童进行口腔检查,根据乳牙龋失补牙面指数分为无龋组(31名)、低龄儿童龋组(29名)和重度低龄儿童龋组(36名),采集牙菌斑样本,提取DNA,使用Illumina HiSeq 2500测序平台进行高通量测序, Qiime分析细菌群落结构差异。结果 3组牙菌斑标本共发现12门31纲31目50科92属1104种细菌,绝大多数属于链球菌属(*Streptococcus*)、韦荣菌属(*Veillonella*)等9个优势菌属,3组微生物多样性相似($P > 0.05$)。重度低龄儿童龋组中韦荣菌属、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、巨球形菌属(*Megasphaera*)、斯卡多维亚菌属(*Scardovia*)等菌属丰度高于其余两组。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、韦荣菌属、乳杆菌属等与dmfs呈正相关,艾肯菌属(*Eikenella*)与dmfs呈负相关。Indicator Species分析显示奇异菌属(*Atopobium*)、韦荣菌属、巨球形菌属、斯卡多维亚菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属在重度低龄儿童龋组指示值较高。结论 不同龋敏感程度儿童牙菌斑微生物群落结构存在差异。韦荣菌属、巨球形菌属、斯卡多维亚菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属、奇异菌属可能是重度低龄儿童龋发生的指示菌属。

【关键词】 学龄前儿童; 龋病; 龋敏感程度; 低龄儿童龋; 重度低龄儿童龋; 牙菌斑; 微生物菌群; 高通量测序; 链球菌属; 韦荣菌属

【中图分类号】 R788 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)12-0763-06

【引用著录格式】 肖小芬,何姗姗,陈泳怡,等.不同龋敏感程度学龄前儿童的牙菌斑微生物群落研究[J].口腔疾病防治,2019,27(12):763-768.

Study on the dental plaque microbial community in preschool children with different caries sensitivity
XIAO Xiaofen¹, HE Shandan¹, CHEN Yongyi¹, WU Xiaoyun², ZHENG Yuyan¹. 1. Stomatological center of Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2. Medical records Statistics Office of Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China.

Corresponding author: ZHENG Yuyan, Email: swift_zheng@163.com, Tel: 86-755-22942997

【Abstract】 Objective To study the difference in the flora structure and gene function of dental plaque in caries-free and caries-active preschool children by 16S rRNA sequencing. **Methods** After oral examination of 96 preschool children aged 3-6 years, they were divided into 3 groups according to their decayed, missing and filled surface (dmfs) index: group CF with no caries ($n = 31$), group ECC with moderate early childhood caries ($n = 29$) and group SECC with severe early childhood caries ($n = 36$). Dental plaques were collected, and DNA was extracted and then underwent metagenomic sequencing by Illumina HiSeq 2500. The bacterial community structure was analyzed by Qiime. **Results** A total of 12 phyla, 31 classes, 31 orders, 50 families, 92 genera and 1104 species were found in the dental plaque samples of the three groups, most of which belonged to 9 dominant genera, including *Streptococcus*, *Veillonella*,



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【收稿日期】 2019-06-29; **【修回日期】** 2019-08-28

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2017A030310624); 深圳市科技局创新委员会资助项目(JCYJ20160422144656321)

【作者简介】 肖小芬, 主治医师, 硕士, Email: 75571646@qq.com

【通信作者】 郑雨燕, 主任医师, 硕士, Email: swift_zheng@163.com, Tel: 86-755-22942997

etc. The microbial diversity of the dental plaques in the three groups was similar ($P > 0.05$). *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, and *Scardovia* in the SECC group were significantly higher than those in the other two groups. There was a significant correlation between the decayed, missing and filled surface (dmfs) index and the genus. *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus* had a positive correlation with the dmfs index, while *Eikenella* had a negative correlation with the dmfs index. Indicator species analysis showed that *Atopobium*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Scardovia*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* had high indicative values in the SECC group. **Conclusion** There are significant differences in plaque microbiota among preschool children with different caries sensitivities. *Veillonella*, *Megasphaera*, *Scardovia*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Atopobium* may be the indicator genera of severe early children caries.

[Key words] preschool children; caries; caries sensitivity; early childhood caries; severe early childhood caries; dental plaque; microbiota; high-throughput sequencing; *Streptococcus*; *Veillonella*

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(12): 763-768.

儿童龋病是发病率居于首位的儿童疾病^[1],低龄儿童龋(early childhood caries, ECC),特别是重度低龄儿童龋(severe early childhood caries, S-ECC)可严重影响儿童的身心发展。调查显示,我国5岁儿童的龋病患病率高达71%^[2]。有研究报道,60%的龋病发生于36%的儿童中^[3],表明儿童龋病的分布并非平均,而是存在患龋风险较高的龋敏感儿童,牙菌斑是龋病发生的必要条件之一。近年来,以16S rRNA基因为基础的分子生物学技术使研究者能够在DNA水平进一步认识口腔环境的微生物多样性、群落结构及其与环境微生物的关系^[4]。本研究以无龋及不同龋敏感程度的学龄前儿童为研究对象,利用高通量测序技术,对牙菌斑标本中菌群结构进行定性和定量分析,探讨学龄前儿童牙菌斑的微生物多样性和差异,为ECC的病因学研究提供新的证据。

1 材料和方法

1.1 对象选择

2017年对深圳市罗湖区幼儿园3~6岁儿童进行口腔健康调查,根据乳牙龋失补牙面指数(decayed, missing and filled surface, dmfs),分为无龋组(caries free, CF组)、低龄儿童龋组(early childhood caries, ECC组)和重度低龄儿童龋组(severe early childhood caries, SECC组)。参照美国儿童牙科学会(American association of pediatric dentistry, AAPD)指南^[5],各组纳入标准为:CF组口腔检查正常且无龋,即龋失补指数dmfs=0;SECC组,满足上前牙出现光滑面龋或者dmfs ≥ 4 (3~4岁)、dmfs ≥ 5 (4~5岁)、dmfs ≥ 6 (5~6岁);ECC组,不满足CF及SECC组的均进入该组。入选儿童均为全口乳牙列,身体精神发育正常,2周内未全身使

用抗生素,2h内未进食。CF组31个样本、ECC组29个样本、SECC组36个样本,共96个样本纳入本次研究,年龄37~71个月,平均(55.7 \pm 7.0)个月。本研究获得深圳市人民医院伦理委员会批准,并征得儿童监护人同意。

1.2 样本采集

采用WHO《口腔健康调查基本方法》(1997年)的标准诊断龋病。用无菌探针采集菌斑,SECC组和ECC组取龋坏组织附近的牙面菌斑,CF组取上下颌第一乳磨牙颊侧颈1/3及上前牙唇面颈1/3菌斑,排除牙龈炎及牙周病。收集的牙菌斑置于含有1 mL生理盐水溶液的1.5 mL EP管中,-80℃冰箱保存。

1.3 提取DNA

采用E.Z.N.A.:emoji: stool DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)试剂盒进行样本基因组DNA提取,采用Qubit进行DNA浓度测定,并采用琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性,保存于-80℃备用。

1.4 高通量测序

样品DNA进行16S rRNA V3-V4区PCR扩增,采用Illumina HiSeq 2500测序平台进行测序,下机数据(Raw Data)使用readfq(<https://github.com/billz/readfq>)读取,经过数据拆分、去引物序列、PE Reads拼接、Tags质量及长度过滤和截取以去嵌合体后获得最终的有效数据(Effective Tags)。

1.5 构建操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)

应用Upars软件构建OTU,使用Qiime软件包(pick_closed_reference_otus.py)确定每个OTU的标记数并计算相对丰度。

1.6 统计学分析

1.6.1 菌群多样性分析 应用Qiime软件包princi-

pal_coordinates.py 进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 比较各组间细菌群落多样性。

1.6.2 组间群落结构差异性分析 使用R软件进行Anosim非参数检验, 比较组间和组内群落结构差异, 得到R值, R大于0, 说明组间差异显著, R小于0, 说明组内差异大于组间差异, 统计分析的可信度用P值表示, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

1.6.3 组间差异物种分析 使用metastat软件进行物种差异分析, 同时对多重检验的P值进行伪发现率校正获得Q值, 最后根据P值和Q值挑选出不同组间差异的物种。对组间相对丰度差异进行Kruskal-Wallis分析。

1.6.4 临床因子与牙菌斑群落结构的相关性分析 通过R软件(3.5.2)的vegan包进行多因素方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA), 计算dmfs与微生物物种间的spearman相关系数, 分析dmfs与微生物群落或物种之间的相关性。

1.6.5 乳牙龋病风险预测 指示种(indicator species)是一种基于统计学寻找指示物种的办法, 采用随机化过程对物种指标值的统计意义进行评价, 可以确定等级或非等级分类学方法所获得的相关分组的指示物种, 其使用也不依赖分类方法。通过R软件(3.5.2)labdsb包indval函数, 寻找龋病指示菌属。从3组样本中随机抽取70%样本(CF:22;ECC:20;SECC:26)作为训练集, 通过Indicator Species寻找龋病指示属, 并将剩下30%样本作为测试集, 运用随机森林算法(random forest, RF)进行预测, 绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)。根据指示菌对测试集进行分析, 通过ROC曲线下面积(area under curve, AUC)分析预测效果, AUC介于0.1和1之间, 数值越高预测效果越好。

2 结果

2.1 基于OTU的菌群多样性和构成分析

96份牙菌斑样本测序后共获得了5 964 124个高质量标签, 平均读取长度为418.7 bp。CF、ECC和SECC组分别确定了1 003、992和1 080个OTU, 占总OTU 82.5%, 各样本平均覆盖率超过97%, 表明本研究所确定的16S rRNA基因代表了大多数寄生于口腔菌斑的细菌类群。3组OTU数目差异无统计学意义($P = 0.866$)。PCA显示3组菌群多样性差异无统计学意义(图1)。Anosim分析表明CF

与SECC组($R = 0.034, P = 0.061$)、ECC与SECC组($R = 0.011, P = 0.291$)、CF与ECC组($R = -0.002, P = 0.455$)差异无统计学意义, 表明CF、ECC及SECC组菌群组成在系统发育上相同, 总体微生物构成相似。

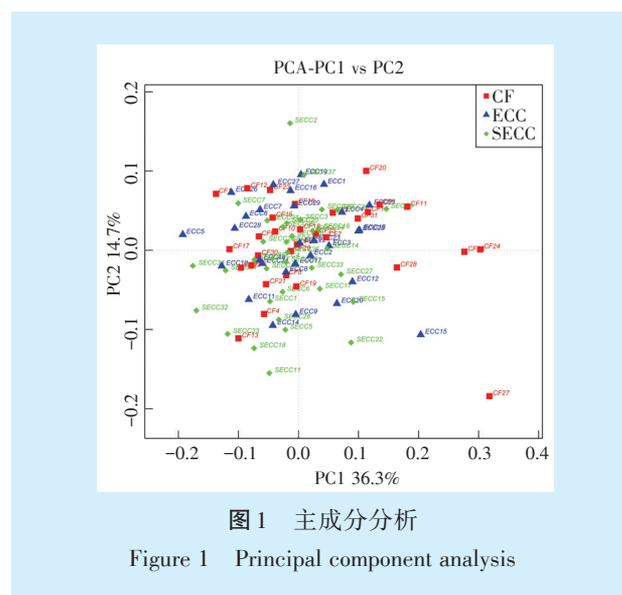


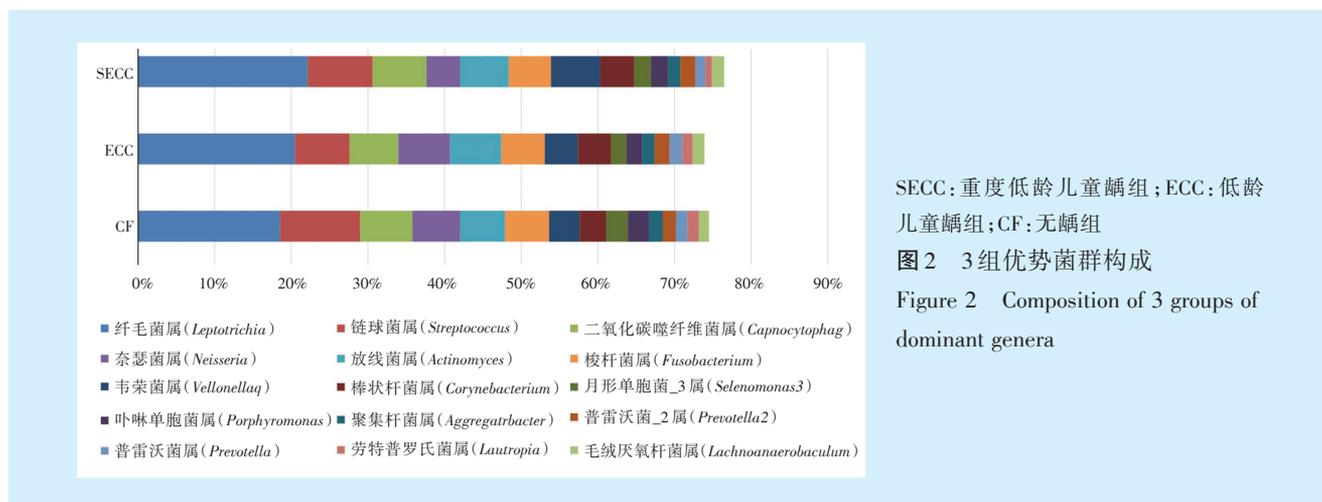
图1 主成分分析
Figure 1 Principal component analysis

2.2 3组牙菌斑微生物群落的组成

3组标本共发现12门31纲31目50科92属104种细菌。92个基于OTU的分类归属绝大多数属于以下9个优势菌属(平均 $> 0.5%$, 总体 $> 80%$): 纤毛菌属(*Leptotrichia*)、链球菌属(*Streptococcus*)、二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、放线菌属(*Actinomyces*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、韦荣菌属(*Veillonella*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、月形单胞菌属(*Selenomonas*)。其中韦荣菌属在SECC组较其他两组增高($P < 0.05$), 其余菌属3组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

进一步比较各组之间的差异物种, ECC与CF组相比, 其拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*) ($P < 0.05$)和猫科动物口腔拟杆菌属(*Bacteroidia bacterium feline oral taxon 312*) ($P < 0.05$)丰度较高, CF组丰度较高的为微杆菌属(*Microbacterium*) ($P < 0.01$, 表1)。

SECC和CF组相比(表2), SECC组丰度较高的为韦荣菌属($P < 0.05$)、普雷沃菌7属(*Prevotella*7, $P < 0.05$)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, $P < 0.01$)、巨型杆菌属(*Megasphaera*, $P < 0.05$)、奇异菌属(*Atopobium*, $P < 0.01$)、斯卡多维亚菌属(*Scardovia*, $P < 0.01$)、布雷德菌属($P < 0.05$); CF组丰度较高的为



SECC: 重度低龄儿童龋组; ECC: 低龄儿童龋组; CF: 无龋组
图2 3组优势菌群构成
Figure 2 Composition of 3 groups of dominant genera

表1 CF组与ECC组物种差异及丰度

Table 1 Species difference and abundance between CF and ECC

菌属	丰度平均值		P
	CF	ECC	
拟普雷沃菌属	0.003	0.006	0.046
猫科动物口腔拟杆菌属	8.56×10^{-6}	2.49×10^{-4}	0.016
微杆菌属	0.006	0	< 0.001

注 CF: 无龋组; ECC: 低龄儿童龋组

艾肯菌属 (*Eikenella*, $P < 0.05$)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*, $P < 0.01$)、河口微菌属 (*Aestuariimicrobium*, $P < 0.05$)。

表2 CF组与SECC组物种差异及丰度

Table 2 Species difference and abundance between CF and SECC

菌属	丰度平均值		P
	CF	SECC	
韦荣菌属	0.044	0.064	0.029
普雷沃菌7属	0.011	0.019	0.022
乳杆菌属	1.07×10^{-6}	4.07×10^{-4}	0.001
巨球形菌属	6.10×10^{-5}	0.001	0.020
奇异菌属	6.63×10^{-5}	4.97×10^{-4}	0.002
斯卡多维亚菌属	1.18×10^{-5}	2.42×10^{-4}	0.001
布雷德菌属	4.28×10^{-6}	2.95×10^{-5}	< 0.001
艾肯菌属	0.001	4.12×10^{-4}	0.046
鞘单胞菌属	1.09×10^{-4}	0	0.001
河口微菌属	2.12×10^{-4}	6.45×10^{-6}	0.017

注 CF: 无龋组; SECC: 重度低龄儿童龋组

SECC和ECC组相比(表3), SECC组中乳杆菌属 ($P < 0.01$)、巨球形菌属 ($P < 0.05$)、类斯氏菌属 (*Parascardovia*, $P < 0.01$)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*, $P < 0.01$) 丰度增高。ECC组丰度较高的为奈

瑟菌属 ($P < 0.05$)、拟普雷沃菌属 ($P < 0.05$)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*, $P < 0.05$)、卡托纳菌属 (*Catonella*, $P < 0.05$)、消化球菌属 (*Peptococcus*, $P < 0.01$)、河口微菌属 ($P < 0.05$)。

表3 ECC组与SECC组物种差异及丰度

Table 3 Species difference and abundance between ECC and SECC

菌属	丰度平均值		P
	ECC	SECC	
乳杆菌属	0	4.07×10^{-4}	0.001
巨球形菌属	3.20×10^{-5}	0.001	0.011
类斯氏菌属	0	2.58×10^{-5}	< 0.001
双歧杆菌属	0	3.50×10^{-5}	0.005
奈瑟菌属	0.067	0.044	0.049
拟普雷沃菌属	0.006	0.003	0.032
消化链球菌属	0.001	4.39×10^{-4}	0.011
卡托纳菌属	0.001	3.06×10^{-4}	0.038
消化球菌属	4.55×10^{-4}	1.47×10^{-4}	0.001
河口微菌属	1.33×10^{-4}	6.45×10^{-6}	0.046

注 ECC: 低龄儿童龋组; SECC: 重度低龄儿童龋组

2.3 菌斑微生物菌群与乳牙龋病严重程度的关系

PERMANOVA分析显示以下菌属与dmfs正相关: 韦荣菌属 ($r = 0.241$, $P = 0.043$)、乳杆菌属 ($r = 0.281$, $P = 0.006$)、斯卡多维亚菌属 ($r = 0.354$, $P = 0.001$)、双歧杆菌属 ($r = 0.266$, $P = 0.005$)、月形单胞菌4属 (*Selenomonas 4*, $r = 0.144$, $P = 0.018$); 而艾肯菌属与dmfs负相关 ($r = -0.265$, $P = 0.020$)。

2.4 乳牙龋病的潜在风险指标

通过Indicator Species分析不同组别菌属构成和相对丰度差异, 寻找龋病指示属, 得到差异物种(表4)。可见奇异菌属、韦荣菌属、巨球形菌属、斯卡多维亚菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属在SECC组

指示值较高;其余菌属除鞘单胞菌属外,都在ECC组指示值较高。

表4 3组样本Indicator Species分析

Table 4 Indicator species analysis of the three groups

菌属	指示值			富集组	P
	CF	ECC	SECC		
鞘单胞菌属	0.097	0	0	CF	0.043
拟普雷沃菌属	0.255	0.494	0.242	ECC	0.01
消化球菌属	0.158	0.4881	0.118	ECC	0.002
卡托纳菌属	0.247	0.451	0.217	ECC	0.048
消化链球菌属	0.165	0.436	0.105	ECC	0.011
瘤胃菌科TCG.014	0.254	0.406	0.264	ECC	0.038
奇异菌属	0.052	0.141	0.539	SECC	0.007
韦荣菌属	0.269	0.293	0.437	SECC	0.027
巨球形菌属	0.032	0.016	0.479	SECC	0.011
斯卡多维亚菌属	0.004	0.022	0.400	SECC	0.002
乳杆菌属	8.45×10^{-5}	0	0.249	SECC	0.004
双歧杆菌属	0	0	0.167	SECC	0.003

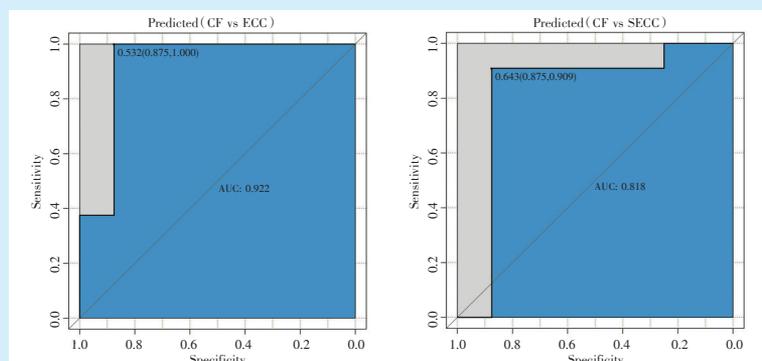
注 CF:无龋组;ECC:低龄儿童龋组;SECC:重度低龄儿童龋组

对龋病指示菌运用RF法进行预测,绘制ROC曲线(图3)。根据CF、ECC两组的指示菌对9个CF样本、9个ECC样本进行分析,其AUC值为0.922;根据CF、SECC两组的指示菌对9个CF样本、10个SECC样本进行分析,其AUC值为0.818,表明指示菌属的预测效果较好。

上述结果提示,奇异菌属、韦荣菌属、巨球形菌属、斯卡多维亚菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属菌属对于预测SECC风险具有潜在价值。大多数指示菌属指示值呈现出在CF组低而在ECC组高的特点,表明这些指示菌属可能是发生ECC的条件致病菌属。

3 讨论

以16S rRNA基因和OTU等为基础的高通量测序技术采用非微生物培养的方法,突破传统方法的局限,使人类口腔微生物菌落中物种多样性和



CF:无龋组;ECC:低龄儿童龋组;SECC:重度低龄儿童龋组

图3 CF与ECC、CF与SECC分类预测的ROC曲线图

Figure 3 ROC curves of classification prediction of CF and ECC, CF and SECC

种群结构等得到更深入的认识^[6]。本研究基于OTU的菌群结构分析显示3组研究对象的牙菌斑菌群多样性没有差异,包括链球菌属在内的多数优势菌属在3组间的差异没有统计学意义,这与既往“患龋儿童牙菌斑变异链球菌显著增高”的认识有所不同,可能与抽样与样本量限制有一定关系。但近年来一些运用高通量测序的研究也得到类似的“不同”结果:Jiang等^[7]发现无龋、中龋和高龋学龄前儿童龈上菌斑中的变异链球菌属丰度并无差异。Belda-Ferre等^[8]发现龋病患者龈上菌斑的优势菌群并非变异链球菌,而是10余个菌种构成的复杂群落。还有研究发现,在龋病群体中变异链球菌数量仅占总细菌群落的0.02%~0.73%,甚至质疑其作为龋齿主要病原体的重要性^[9-10]。因此牙菌斑微生物

群落结构特征仍有待进一步探究。

本研究结果显示3组牙菌斑群落结构存在差异,不同菌属存在丰度差异。其中韦荣菌属在SECC组中增高,并与dmfs呈正相关。传统观念认为变异链球菌为“致龋菌”^[11],而近年来微生物组研究的证据表明,韦荣菌属和变异链球菌与龋病病损高度相关^[12]。韦荣菌属经常与口腔链球菌在龋敏感人群中被共同检出^[13],其利用乳酸而非碳水化合物作为能量来源,因此依赖产生大量乳酸的链球菌,而乳酸分解代谢产生的乙酸盐也可能损害牙釉质^[12,14]。Do等^[15]也发现,口腔中的韦荣菌属与产酸菌的分布相关,在无龋婴幼儿口腔中,韦荣菌属分布水平较高者后来患龋率更高,因此认为,韦荣菌属可作为龋病早期的预警生物标

志物。

SECC组中乳杆菌属、斯卡多维亚菌属、双歧杆菌属等多个菌属的丰度也较高,且与dmfs强正相关。这与Tanner等^[10,16]研究结果相似,其发现环境酸性压力持续存在时,可检测到更多产酸和耐酸细菌,如非变异链球菌、放线菌、乳杆菌属、双歧杆菌属和斯卡多维亚菌属等物种,这些细菌可协同降低pH值、增强菌斑生物膜的酸化作用,可能加速龋病的发生发展,导致儿童早期重度龋这种范围广、进展快的严重龋病。这也说明了“致龋性”的细菌并不限于变异链球菌。SECC组中丰度较高的奇异菌属和普雷沃菌组菌属,与dmfs呈负相关的艾肯菌属,这些细菌在龋病发病机制中是旁观者、抑制或是积极作用还有待进一步研究阐明。

既往研究多将研究对象分为有龋及无龋两组进行分析,然而临床观察中可见,患龋低龄儿童可能有相似的生活方式,却表现出完全不同的龋坏严重程度,因此本研究将患龋组进一步分为有龋及重度龋组,旨在从牙菌斑微生物群落的角度比较不同龋敏感群体的差异。从研究结果可见,ECC与CF组的牙菌斑群落结构更相似,龋病指示菌属在两组均存在,在CF组表达较低而在ECC组表达增高,提示龋病发生存在条件致病菌,有龋与无龋人群之间没有绝对界限。当微环境改变时,条件致病菌丰度增加可能促进龋病发生,健康儿童因此患龋。Teng等^[17]也发现在龋病临床症状出现之前即可检测到口腔微生物组的异常。SECC组指示菌属的表达模式显示,韦荣菌属、奇异菌属指示值较另两组更高,巨球形菌属、斯卡多维亚菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属等在SECC组的指示值更是明显高于其他二组,表明上述菌属可能是发生儿童早期重度龋的指示菌属。

参考文献

- [1] Benjamin RM. Oral health: the silent epidemic[J]. Public Health Rep, 2010, 125(2): 158-159.
- [2] 中华人民共和国国家卫生及计划生育委员会. 国家卫生计生委发布全国第四次口腔健康流行病学调查结果[EB/OL]. (2017-09-19)[2019-11-26]. <http://www.nhfp.gov.cn/zhuozhuz/xwfb/201709/9b4d4a4ec1c54723820dbaedf97a6d26.shtml>.
- [3] 吴晓艳,王静雪,蔡婷,等. 重庆市学龄前儿童乳牙龋状况及影响因素分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2019, 37(1): 81-86.
- [4] Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, et al. Targeted next-generation sequencing can replace sanger sequencing in clinical diagnostics[J]. Hum Mutat, 2013, 34(7): 1035-1042.
- [5] American Academy of Pediatric Dentistry, American Academy of

- Pediatrics, American Academy of Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs. Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies[J]. Pediatr Dent, 2016, 27(7 Suppl): 31-33.
- [6] Colombo AP, Tanner AC. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective[J]. J Dent Res, 2019, 98(4): 373-385.
- [7] Jiang W, Jiang YT, Li CL, et al. Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Microb Ecol, 2011, 61(2): 342-352.
- [8] Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio RA, et al. The oral metagenome in health and disease[J]. ISME J, 2012, 6(1): 46-56.
- [9] Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions[J]. J Oral Microbiol, 2014, 6(1): 25443.
- [10] Tanner AC, Kressirer CA, Faller LL. Understanding caries from the oral microbiome perspective[J]. J Calif Dent Assoc, 2016, 44: 437-446.
- [11] Bowen WH, Burne RA, Wu H, et al. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(3): 229-242.
- [12] Jiang S, Gao X, Jin L, et al. Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 1978-1991.
- [13] Zhou J, Jiang N, Wang S, J. et al. Exploration of human salivary microbiomes - insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147039.
- [13] Zhou JY, Jiang N, Wang SG, et al. Exploration of human salivary microbiomes - Insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147039.
- [14] Knapp S, Brodal C, Peterson J, et al. Natural competence is common among clinical isolates of veillonella parvula and is useful for genetic manipulation of this key member of the oral microbiome [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7(7): 139-151.
- [15] Do T, Sheehy EC, Mulli T, et al. Transcriptomic analysis of three Veillonella spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5(25): 21-28.
- [16] Mira, A. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries[J]. J Clin Periodontol, 2017, 44(18): s23-s38.
- [17] Teng F, Yang F, Huang S, et al. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(3): 296-306.

(编辑 罗燕鸿,钱虹)



官网



公众号