

网络出版时间:2024-09-25 09:59:45 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1718.025

基于 16S rDNA 测序的慢性牙髓炎 及根尖周炎感染根管内菌群多样性研究

李昱志^{1,2}, 苏旭², 陈晓涛², 徐洁², 赵莉²¹石河子大学医学院口腔医学系, 石河子 832000;²新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 乌鲁木齐 830000

摘要 目的 采用 16S rDNA 测序技术比较慢性牙髓炎和慢性根尖周炎患牙根管内微生物群落的构成差异, 了解微生物与牙髓疾病的关系。方法 临床采集需要进行根管治疗的慢性牙髓炎患牙和慢性根尖周炎患牙根管内微生物群落样本。提取样本中的细菌总 DNA, PCR 扩增其 16S rDNA 片段上的 V3-V4 高变区基因片段, 经 NovaSeq 测序后进行统计分析和生物信息学分析, 包括种系发育分析、多样性分析及组间差异分析。结果 总计收集到慢性牙髓炎患牙 6 颗, 慢性根尖周炎 7 颗, 经高通量测序后共得到 8 510 个操作分类单元 (OTU), 菌群多样性分析显示慢性牙髓炎和慢性根尖周炎在菌群构成的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中, 变形菌门、酸杆菌门及放线菌门在慢性牙髓炎患牙根管内相对丰度显著高于慢性根尖周炎。拟杆菌门和互养菌门的相对丰度在慢性根尖周炎患牙根管中显著增加。结论 牙髓疾病患牙根管中感染微生物存在复杂多样性。慢性牙髓炎和慢性根尖周炎感染根管内的微生物群落构成上具有一定差异, 根管内微生物组成的变化可能与牙髓疾病发生发展相关。

关键词 牙髓炎; 根尖周炎; 微生物组; 口腔菌群; 16S rDNA; 测序

中图分类号 R 781.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)09-1669-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.025

慢性牙髓炎和慢性根尖周炎是口腔科常见的细

菌感染性疾病。当细菌侵入根管系统引起牙髓感染, 则形成牙髓炎; 而根尖周炎多继发于牙髓感染, 通常是由于根管内长期存在感染未治疗而导致的根尖周组织炎症^[1]。早期常采用细菌培养法和生物化学等方法对患牙根管微生物群进行研究。但传统方法只能在环境中识别出可培育的优势菌群, 存在着关键菌群可能错失的风险^[2]。由于根管系统低氧环境和营养物质的匮乏, 使得根管感染形成以厌

2024-08-02 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项 (科技援疆计划) (编号: 2021E02071); 新疆第二医学院科研项目 (编号: ZR202401)

作者简介: 李昱志, 男, 硕士研究生;

赵莉, 女, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: rmyzhaoli@163.com

and after orthodontic treatment, the average overall facial changes in the high angle group were (-3.25 ± 0.22) mm, in the average angle group was (-3.28 ± 0.30) mm, and in the average low angle group was (-3.69 ± 0.36) mm. Compared with the other two groups, the changes in the low angle group decreased more, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mandibular angle area and temporal area decreased the most in the low angle group, which were (-2.78 ± 0.18) mm and (-2.27 ± 0.35) mm, respectively, and the difference was statistically significant compared with the other two groups ($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference among the other groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The whole face and all facial regions of the three groups had some negative changes, but the collapse in the mandibular angle area and the temporal muscle area of the low angle group was more obvious than that of the other two groups.

Key words orthodontic treatment; facial aesthetics; three-dimensional; class II malocclusion; vertical facial type; soft tissue; adult female**Fund programs** Key Research and Development Project of Anhui Province (No. 2022e070200592); Hefei Municipal Health Commission 2021 Applied Medical Research Project (No. Hwk2021yb019); Research Fund Project of Anhui Medical University (No. 2021xkj250)**Corresponding author** Han Shuang, E-mail: ellenshan623@126.com

氧菌为主的混合感染,并且在形态和功能上表现为附着在根管表面的菌群生物膜。但目前根管内感染微生物群落构成与牙髓疾病的发生发展的关系尚未完全明确。该研究对慢性牙髓炎和慢性根尖周炎患牙感染根管内菌群进行 16S rDNA 测序分析,比较慢性牙髓炎和慢性根尖周炎感染根管内菌群多样性差异,以期为慢性牙髓炎及根尖周炎的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2022 年 12 月 - 2023 年 5 月在新疆维吾尔自治区人民医院口腔科就诊的慢性牙髓炎和慢性根尖周炎的患者,征得其知情同意后纳入本研究。该研究已通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会批准(批件号:KY202305243)。

纳入标准参照《牙体牙髓病学》^[3]:① 慢性牙髓炎组:患牙可查及深龋,无穿髓孔,无深牙周袋,长期冷热刺激痛病史,叩诊无异常或轻度不适,牙髓温度测试为敏感或迟缓性痛,X 线片显示根尖周无骨质破坏影像学改变。② 慢性根尖周炎组:患牙可查及深龋,无深牙周袋,轻度叩痛或叩诊不适,牙髓温度测试无反应,有或无窦道,X 线片显示根尖周有骨质破坏影像学改变。

排除标准为:① 患牙曾行根管治疗;② 诊断为牙周牙髓联合病变的患牙;③ 孕妇和哺乳期患者;④ 有长期用药史或在过去 3 个月内服用过抗生素;⑤ 吸烟史。

1.2 根管内微生物样本收集 采样方法参照 Zargar et al^[4] 的研究:首先嘱受试者用 3% 双氧水含漱 1 min。橡皮障隔离患牙后使用碘伏棉球消毒牙齿表面,3% 次氯酸钠溶液冲洗牙齿表面。使用无菌钨钢车针磨除牙齿冠部的龋坏组织或旧充填材料,磨至近髓腔处时使用 3% 次氯酸钠溶液再次消毒窝洞和牙面,更换低速手机和无菌车针完成髓腔暴露。使用无菌的 10#K 锉畅通根管,配合根测仪达根管工作长度,反复切削根管壁。采集完成后,用无菌外科剪剪取 K 锉的工作刃部,放入 5 ml 无菌 Eppendorf 管中,随后在根管中注入 1 ml 无菌生理盐水浸润根管,先后置入 2 根 20# 无菌吸潮纸尖插入根管达工作长度,浸润 1 min 后将纸尖从根管中取出,置入到与锉同一 Eppendorf 管中, - 80 °C 冰箱保存备用。

1.3 DNA 提取、扩增和测序 使用 QIAamp DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)对所有根管内微生

物样本进行总 DNA 提取,并通过 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。选取 16S rDNA V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。靶向 16S rDNA 编码基因 V3-V4 高变区的通用 PCR 引物设计:341F—CCTACGGGNG-GCWGCAG; 805R—GACTACHVGGGTATCTAATCC。PCR 扩增使用参数如下,98 °C 变性 30 s,随后在 95 °C 下变性 10 s,进行 35 个循环,54 °C 退火 30 s, 72 °C 延长 45 s,72 °C 温育 10 min。根据 PCR 产物浓度将缓冲液与 PCR 产物混合,在 1.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。使用 AM Pure 试剂盒(美国 Beckman Coulter Genomics 公司)对扩增后合格的 PCR 产物进行纯化。对纯化后的 PCR 产物使用 Agilent 2100 生物分析仪(美国 Agilent 公司)和 Illumina(美国 Kapa Biosciences 公司)的文库定量试剂盒进行评估后,根据所需测序量按相应比例混合,使用 Illumina NovaSeq 6000 测序仪(美国 Illumina 公司)进行测序。

1.4 生物信息学分析 按照 Illumina 测序分析流程的协议,使用 QIIME2 2020.6 软件分析测序产生的序列(reads)。具体来说,根据配对末端序列的重叠关系,使用 SeqPrep 方法连接成对的序列片段(paired-end reads),其中配对序列之间的最小重叠长度设置为 5 bps。然后根据引物中插入的条码(barcode)将配对序列分配给单个样本,并通过 Illumina 测序数据的默认质量过滤程序进行过滤后得到优化序列(clean reads),用于后续生物信息学分析。

统计序列长度和碱基组成完全一致的序列即重复序列,提取非重复序列,以降低分析中间过程冗余计算量。对于去重复后的序列,根据重复序列次数从大到小排序。使用 UPARSE 软件(<http://drive5.com/UPARSE>)去除 singleton 序列,即在所有样本中只出现一次的序列。以 97% 的相似性对序列进行聚类,相似度大于 97% 的序列将聚为同一个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU),同时使用 denovo 模式去除嵌合体序列,最终产生的 OTU 代表序列将用于后续物种注释。

根据 OUT 聚类分析结果进一步分析:① 使用 mothur 软件的 Ribosomal Database Project (RDP) Classifier (<http://RDP.cme.msu.edu/>) 对比 Silva (<http://www.arb-silva.de>) 数据库,找出与 OTU 序列相似度最高且可信度达 80% 以上的物种信息用于 OTU 的物种注释,并统计各分类水平的物种分布;② 采用 Student *t* 检验进行多样性分析用于评估

单个样本的物种多样性,包括物种丰富度指数(Chao1 指数)、物种多样性指数(Shannon 指数);③多样性分析使用 UniFrac 算法进行对样本间进行主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA),比较组间在物种多样性方面的相似程度;④通过 LEfSe 分析和 Metastats 分析比较物种分类群间的变化和差异,并分析两组间丰度具有统计学差异的物种。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。正态分布检验采用 Shapiro-Wilk 检验,对于符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;偏态分布数据采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。计数资料采用 χ^2 检验比较。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料和测序数据 本研究共纳入 13 名符合标准的受试者,其中慢性牙髓炎组 6 例,慢性根尖周炎组 7 例。两组患者年龄($P = 0.353$)和性别($P = 0.751$)分布差异均无统计学意义(表 1)。经 NovaSeq 测序的筛选和质量控制后,慢性根尖周炎组共获得 371 779 条优化序列,慢性牙髓炎组共获得 400 357 条优化序列。

2.2 根管内菌群结构分析 绘制 Venn 图对两组患者根管内细菌菌群进行序列特征分析,慢性根尖周炎组特有 OTU 为 3 911 个,慢性牙髓炎组特有 OTU 为 4 150 个,两组共有的核心 OTU 为 449 个(图 1)。对两组序列进行物种分类学注释后,慢性根尖周炎组共检出 32 个菌门,慢性牙髓炎组共检出 28 个菌门(图 2)。其中,组成慢性根尖周炎组根管内群落 95% 成分的菌门包括:厚壁菌门(Firmicutes)(37%)、拟杆菌门(Bacteroidota)(28%)、变形菌门(Proteobacteria)(10%)、放线菌门(Actinobacteriota)(7%)、互养菌门(Synergistota)(6%)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)(2%)、酸杆菌门(Acidobacteriota)(2%)、梭杆菌门(Fusobacteriota)(2%)、绿弯菌门

(Chloroflexi)(1%)。组成慢性牙髓炎组根管内群落 95% 成分的菌门包括:厚壁菌门(Firmicutes)(36%)、变形菌门(Proteobacteria)(23%)、放线菌门(Actinobacteriota)(12%)、拟杆菌门(Bacteroidota)(10%)、酸杆菌门(Acidobacteriota)(6%)、梭杆菌门(Fusobacteriota)(3%)、绿弯菌门(Chloroflexi)(3%)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)(1%)、互养菌门(Synergistota)(1%)。除以上菌门外,其他菌门的丰度总和不到总序列的 5%,约有 0.01% 的序列不能归于任何菌门。

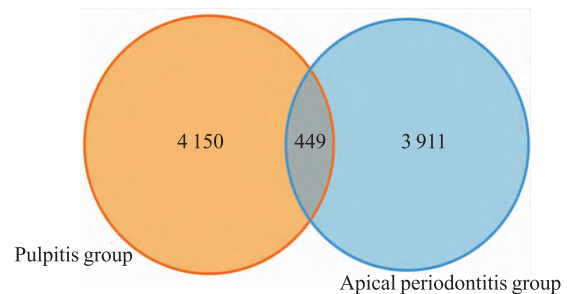


图 1 两组样本 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of apical periodontitis and pulpitis groups

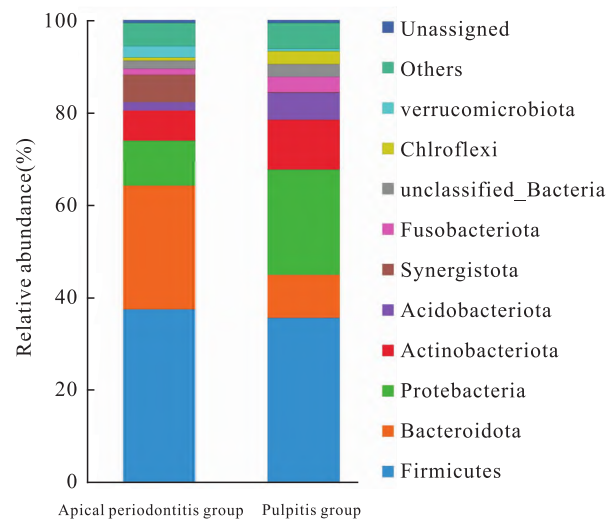


图 2 两组样本相对丰度前 10 的菌门比较

Fig. 2 Comparison of the relative abundance of top 10 bacterial taxa in apical periodontitis and pulpitis groups

表 1 受试者一般资料比较

Tab.1 Comparison of general information of subjects

Group	Patient (n)	Gender (male/female)	Age (Year)
Apical periodontitis	7	3/4	59.57 ± 18.81
Pulpitis	6	2/4	51.00 ± 11.38
F/ χ^2 value		0.124	0.687
P value		0.751	0.353

2.3 Alpha 多样性分析 使用 QIIME2 软件对两组样本菌群在 3% 差异水平条件下对 Alpha 多样性进行分析,包括菌群丰富度(Chao1 指数)和菌群多样性(Shannon 指数),结果如图 3 所示:慢性根尖周炎组和慢性牙髓炎组的 Chao1 指数差异无统计学意义($P > 0.05$),提示两组样本菌群数目丰富度无明显差异。而 Shannon 指数两组差异有统计学意义($P < 0.05$),提示慢性牙髓炎组根管内菌群多样性高于慢性根尖周炎组。

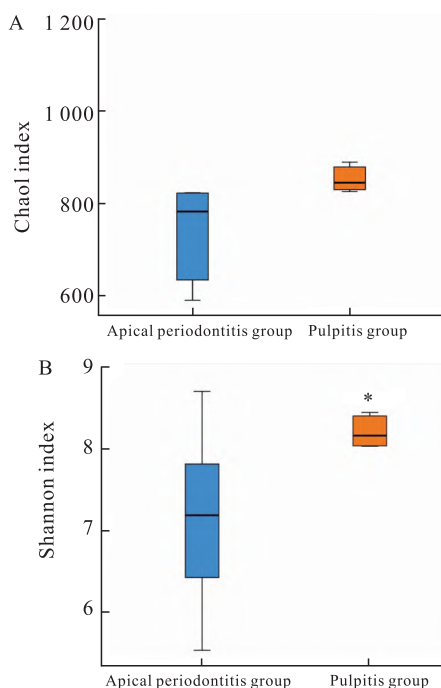


图 3 两组样本 Alpha 多样性分析比较

Fig. 3 Comparison of Alpha diversity analyses between pulpitis and apical periodontitis groups

A: Chao1 index; B: Shannon index; * $P < 0.05$ vs Apical periodontitis group.

2.4 样品间菌群多样性差异分析 通过基于加权的 UniFrac 系统发育距离矩阵计算样本间距离对两组样品间 β 值进行比较分析,并根据 PCoA 分析观察两组样本菌群构成的差异并反映在二维坐标图上。图 4 显示样本有根据病变分组聚类的趋势,且慢性根尖周炎组和慢性牙髓炎组的样本菌群构成之间具有差异(ANOSIM 检验, $P = 0.005$)。

2.5 组间样本差异物种分析 通过 Metastats 分析筛选出慢性根尖周炎组和慢性牙髓炎组间发挥关键作用的差异物种组成。结果显示,两组在门水平上差异有统计学意义的物种共有 10 种。如图 5 所示,包括酸杆菌门、变形菌门、蓝藻菌门、拟杆菌门、绿弯

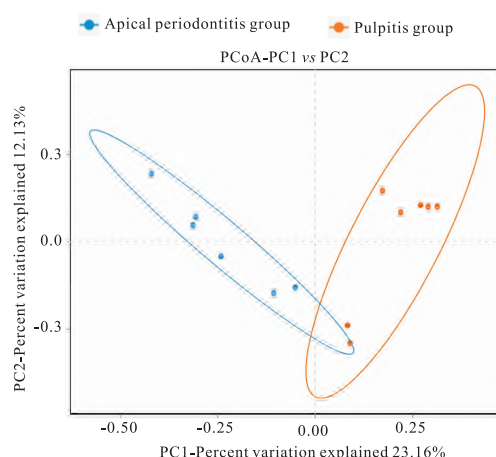


图 4 基于加权 UniFrac 距离矩阵的 PCoA 分析

Fig. 4 The plot of principal coordinates analysis showed intergroup distances

菌门、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)、疣微菌门、浮霉菌门(Planctomycetota)、互养菌门、放线菌门。利用 LEfSe 图对差异物种进行分析,并通过 LDA 值加以区分,如图 6 所示。变形菌门、酸杆菌门、罗氏菌属(Rothia)、绿弯菌门、放线菌属(Actinomyces)等物种的相对丰度在慢性牙髓炎组中较慢性根尖周炎组高($P < 0.05$)。而慢性根尖周炎组中欧尔森菌属(Olsenella)、金字塔杆菌属(Pyramidobacter)、牙髓卟啉单胞菌(Porphyrromonas endodontalis)、拟杆菌门等物种相对丰度较慢性牙髓炎组高($P < 0.05$)。上述具有显著差异的物种可能是区分慢性根尖周炎组和慢性牙髓炎组的潜在生物标志物(LDA > 2 , $P < 0.05$)。

3 讨论

现代微生物学观点认为,疾病的发生与环境微生物群落的组成失衡有关^[5]。正常状态下的牙齿根管系统是一个相对封闭的微生态环境,在健康牙齿根管中依然存在细菌,且与口腔正常菌群构成相似^[6]。当细菌通过深龋组织或微渗漏等途径侵入根管系统后,诱发牙髓组织炎症及损伤,最终可造成牙髓坏死及根尖周组织炎症^[4]。过去研究根管微生物主要采用传统的分离和培养的方法,然而体外环境中只有不到 1% 的细菌可以通过培养分离,使得其研究使用存在一定的局限性^[7]。随着分子生物学技术的发展,新一代高通量技术因其精确度高、覆盖面广、高通量的特点,已被广泛应用于口腔疾病微生物的研究^[8]。

本研究使用 Illumina NovaSeq 测序平台对采集

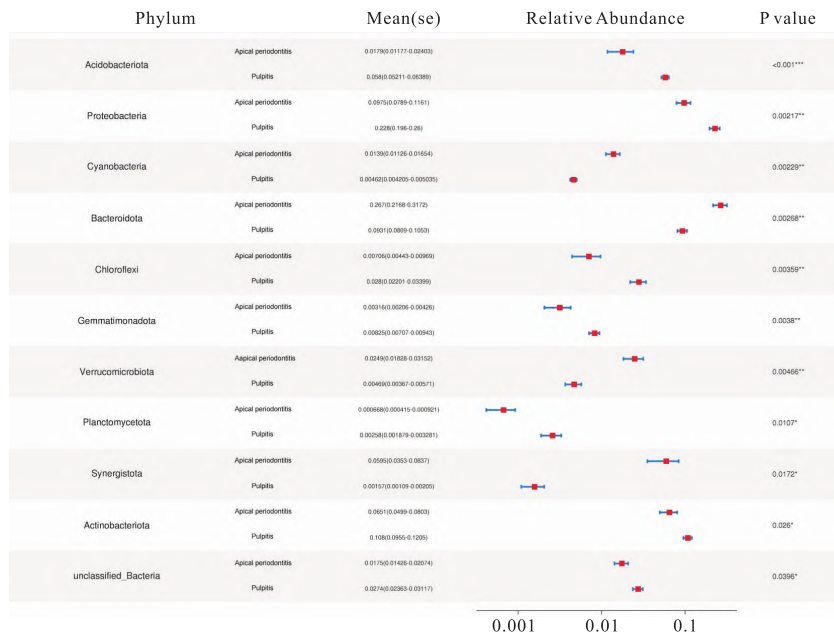


图5 两组样本间具有统计学差异的物种

Fig. 5 Metastats analysis of differential microbiota between pulpitis and apical periodontitis groups

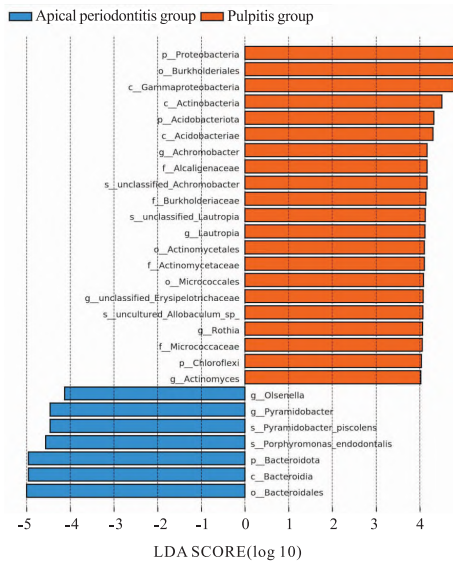


图6 两组差异物种的 LDA Score 阈值评分

Fig. 6 The LDA Score for the differentially abundant species between pulpitis and apical periodontitis groups

自6例慢性牙髓炎和7例慢性根尖周炎患者感染根管内样本进行分析,最终检测到558种细菌,反映出感染根管内微生物群落的复杂的物种多样性。通过进一步分析发现,慢性牙髓炎和慢性根尖周炎主要菌门的构成无明显差异,主要包括厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、变形菌门。通过Alpha多样性分析,发现慢性牙髓炎和慢性根尖周炎在菌群数目丰富度无明显差异,但慢性牙髓炎根管内菌群多样性高于

慢性根尖周炎。而主坐标分析结果表明样本分布呈现出根据病变状况聚类的趋势,说明牙髓和根尖周感染可能存在相关的某种群落构成模式。以上结果提示:在宿主免疫和环境等条件的相互作用下,随着牙髓状态和患牙临床症状的改变,根管内微生物群落也呈现出动态的变化。

菌群组成方面,在慢性牙髓炎和根尖周炎患牙根管内优势菌门中,拟杆菌门(Bacteroidota)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteriota)、放线菌门(Actinobacteriota)、互养菌门(Synergistota)这5个菌门差异有统计学意义。其中,变形菌门、酸杆菌门和放线菌门在慢性牙髓炎中相对丰度较高。变形菌门包括变形链球菌等,酸杆菌门包括乳酸杆菌等,放线菌门包括放线菌等,三者组成常见的致龋菌群^[9]。龋源性因素是导致慢性牙髓炎的最主要原因,深龋中病损前沿的微生物通过牙本质小管侵入牙髓,并成为启动牙髓炎症的早期定植者。龋源性微生物在牙髓中的定植改变了根管系统中相对稳定的环境,使其有利于后继微生物的定植生长并引起微生物群的变化。与相关研究^[10]类似,本研究结果也提示深龋病损前沿的微生物可能参与牙髓炎症的发生发展。在慢性根尖周炎感染根管内,拟杆菌门和互养菌门的相对丰度显著增高,提示拟杆菌门和互养菌门可能与慢性根尖周炎的发生密切相关。拟杆菌门包括卟啉单胞菌属和普雷沃菌属。研究表明,中间普雷沃菌、产黑普雷沃菌、牙龈卟啉单胞菌

和牙髓卟啉单胞菌在牙髓坏死的根管中检出率高,且与根尖周囊肿或脓肿密切相关^[8]。而本研究结果显示牙髓卟啉单胞菌在慢性根尖周炎中显著增多,普雷沃菌也较慢性牙髓炎增多,但差异无统计学意义,分析原因可能与本研究中病例选择、样本量大小和采样方法有关。此外,本研究显示慢性根尖周炎中锥形杆菌属的丰度显著高于慢性牙髓炎组,这与 Machado de Oliveira et al^[11]的研究结果类似,慢性根尖周炎患牙感染根管中互养菌属的阳性检出率为 21.8%,高于普雷沃氏菌属和卟啉单胞菌属,金字塔杆菌属归于条件致病菌互养菌门,当环境条件发生改变时,其可能利用其终末产物如氢分子在其他微生物感染中发挥协同作用^[12]。此外,本研究慢性根尖周炎组中相对丰度显著增加的还有齿龈欧氏菌属(*Olsenella*)。在以往研究中,齿龈欧氏菌属也被认为可能是根尖周感染的重要致病因子,且与脓肿和瘘管形成密切相关^[13]。

本研究通过测序分析慢性牙髓炎及根尖周炎感染根管内微生物群,发现了一些可能与慢性牙髓炎和慢性根尖周炎相关的物种。本研究仍然存在一些不足。首先,虽然绝大多数微生物能被本研究所使用的 16S rDNA 高通量测序技术检出,但仍有少量难以通过 V3-V4 高变区鉴别的物种,可能存在慢性牙髓炎和慢性根尖周炎相关的致病菌。其次,本研究仅初步讨论了慢性牙髓炎及根尖周炎感染根管内微生物群,发现牙髓根尖周病的发生发展可能与微生物群落失调有关,然而仅对微生物群落组成变化进行描述和分析还不足以达到对疾病发展本质的理解。再次,本研究样本量较小,这些都有可能影响实验结果。未来可通过扩大样本量以及采用宏基因组测序、转录组学、代谢组学及蛋白组学等技术深入了解微生物的空间分布变化及代谢功能变化^[14],对慢性牙髓炎及根尖周炎致病菌群进行更加全面细致地分析,更好地了解细菌微生物与牙髓炎及根尖周炎的关系,为牙髓疾病制定预防和治疗策略提供依据。

参考文献

- [1] Bordagaray M J, Fernández A, Garrido M, et al. Systemic and extraradicular bacterial translocation in apical periodontitis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 649925. doi: 10.3389/fcimb.2021.649925.
- [2] 刘静, 闫莉莉, 赵淑贤, 等. 宏基因组二代测序在肺部感染病原菌检测的应用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6): 1046 - 50. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.06.029.
- [2] Liu J, Yan L L, Zhao S X, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the detection of pathogenic bacteria of pulmonary infection [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(6): 1046 - 50. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.06.029.
- [3] 周学东, 陈智, 岳林. 牙体牙髓病学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 154 - 5.
- [3] Zhou X D, Chen Z, Yue L, et al. *Endodontics* [M]. 3 ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2020: 154 - 5.
- [4] Zargar N, Ashraf H, Marashi S M A, et al. Identification of microorganisms in irreversible pulpitis and primary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings [J]. *Clin Oral Investig*, 2020, 24(6): 2099 - 108. doi: 10.1007/s00784 - 019 - 03075 - 9.
- [5] Narengaowa, Kong W, Lan F, et al. The oral-gut-brain AXIS: the influence of microbes in Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 633735. doi: 10.3389/fncel.2021.633735.
- [6] Qian W H, Ma T, Ye M, et al. Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis [J]. *BMC Genomics*, 2019, Suppl 2: 189. doi: 10.1186/s12864 - 019 - 5474 - y.
- [7] Lewis W H, Tahon G, Geesink P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 225 - 40. doi: 10.1038/s41579 - 020 - 00458 - 8.
- [8] Brito L C N, Doolittle-Hall J, Lee C T, et al. The apical root canal system microbial communities determined by next-generation sequencing [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10932. doi: 10.1038/s41598 - 020 - 67828 - 3.
- [9] Peng X, Cheng L, You Y, et al. Oral microbiota in human systematic diseases [J]. *Int J Oral Sci*, 2022, 14(1): 14. doi: 10.1038/s41368 - 022 - 00163 - 7.
- [10] Liu Y M, Wang J J, Dong B J, et al. Prediction and validation of microbial community function from normal pulp to pulpitis caused by deep dentinal caries [J]. *Int Endod J*, 2023, 56(5): 608 - 21. doi: 10.1111/iej.13890.
- [11] Machado de Oliveira J C, Gama Tulio G V, Siqueira J F, et al. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis approach for bacterial identification in endodontic infections [J]. *Clin Oral Investig*, 2007, 11(2): 127 - 32. doi: 10.1007/s00784 - 006 - 0085 - 9.
- [12] Siqueira J F, Rôças I N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3314 - 9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3314 - 3319.2005.
- [13] Tzanetakis G N, Azcarate-Peril M A, Zachaki S, et al. Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing [J]. *J Endod*, 2015, 41(8): 1226 - 33. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.010.
- [14] Carter M M, Olm M R, Merrill B D, et al. Ultra-deep sequencing of Hadza hunter-gatherers recovers vanishing gut microbes [J]. *Cell*, 2023, 186(14): 3111 - 24. e13. doi: 10.1016/j.cell.2023.05.046.

(下转第 1687 页)

proliferation and tumor growth *via* mediating target genes and regulating cyclic RNA cyclization and biogenesis in a variety of cancers, including head and neck squamous cell carcinoma, carcinoma of colon, and prostate cancer. Through integrating and analyzing the link between ESRP1 and related cancers, provide new ideas for the treatment of tumor cells in which ESRP1 as a key factor.

Key words ESRP1; EMT; alternative splicing; colorectal cancer; breast cancer; lung cancer

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No: 82060540); Project for Enhancing Young and Middle-aged Teacher's Research Basis Ability in Colleges of Guangxi (No: 2022KY0541); Research Projects of the School Level in 2020 at Youjiang Medical University for Nationalities (No: yy2020ky028); Guangxi Zhuang Autonomous Region level College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (No: 202210599019)

Corresponding author Ye Guangbin, E-mail: ygb9064@126.com

(上接第 1674 页)

The root canal microbiota in apical periodontitis and pulpitis based on 16S rDNA sequencing

Li Yuzhi^{1,2}, Su Xu², Chen Xiaotao², Xu Jie², Zhao Li²

¹*Dept of Stomatology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000;*

²*Dept of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000*

Abstract Objective To analyze the relationship between microorganisms and endodontic disease by using 16S rDNA sequencing to compare the composition of the microbial community in the root canals of teeth with pulpitis and apical periodontitis. **Methods** Clinical samples were collected from teeth requiring root canal treatment. The total DNA of the bacteria in the samples and the gene fragments of the V3-V4 highly variable region on the 16S rDNA fragments were amplified through PCR. After sequencing by NovaSeq, statistical and bioinformatic analysis, including phylogenetic analysis, diversity analysis and analysis of group differences, were performed. **Results** In total, 6 teeth with pulpitis and 7 teeth with apical periodontitis were collected, and a total of 8 510 OTUs were obtained after next-generation sequencing, and the analysis of bacterial diversity showed that the difference between pulpitis and apical periodontitis in terms of the composition of the bacterial flora was statistically significant ($P < 0.05$). In particular, the relative abundance of Proteobacteria, Acidobacteriota and Actinobacteriota phylum was significantly higher in the roots of teeth affected by pulpitis than apical periodontitis. The relative abundance of Bacteroidota phylum and Synergistota phylum was significantly higher in the root canals of teeth with apical periodontitis. **Conclusion** There is a complex diversity of infecting microorganisms in the root canals of teeth affected by endodontic diseases. The microbial communities in the infected root canals of pulpitis and apical periodontitis show some differences, and changes in the microbial composition of the root canals may be associated with the development of endodontic diseases.

Key words pulpitis; apical periodontitis; microbiome; oral flora; 16S rDNA; sequencing

Fund programs Xinjiang Uygur Autonomous Region Regional Collaborative Innovation Special Fund (No. 2021E02071); Xinjiang Second Medical College Scientific Research Project (No. ZR202401)

Corresponding author Zhao Li, E-mail: rmyzhaoli@163.com