

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.03.011

· 综述 ·

龋病相关微生物群落结构与功能的多组学研究进展

霍媛媛, 韩轩, 李雨庆 综述; 邹静 审校

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院儿童口腔科, 四川成都 (610041)

【摘要】 龋病作为一种感染性疾病,口腔微生物群落在其发生发展过程中的具体作用机制尚无定论。高通量测序技术及宏组学技术的应用为龋病病因研究和龋病的微生态防治提供了新的思路。本文从与龋病相关口腔微生物群落的基因组学、宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学及宏代谢组学等方面的研究进展进行综述。

【关键词】 龋病; 口腔微生物群落; 微生态; 宏基因组学; 宏转录组学; 宏蛋白质组学; 宏代谢组学

【中图分类号】 R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)03-0195-05

【引用著录格式】 霍媛媛, 韩轩, 李雨庆, 等. 龋病相关微生物群落结构与功能的多组学研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(3): 195-199.

A multiomics approach to study the associations between microbial communities and functions and dental caries HUO Yuanyuan, HAN Xuan, LI Yuqing, ZOU Jing. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Pediatric Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Zoujing, Email: zoujing1970@126.com, Tel: 0086-28-85503644

【Abstract】 The pathogenic mechanisms by which oral microbial communities affect the occurrence and development of dental caries remain unclear. Applications that make use of high-through put sequencing technologies and metaomics approaches to research dental caries etiology can provide new ideas about disease prevention and treatment. In this article, we review advanced research presented in metaomics studies, including genomic, metagenomic, metatranscriptomic, metaproteomic and metabolomics studies of dental caries.

【Key words】 Dental caries; Oral microbial community; Micro-ecology; Metagenomics; Metatranscriptomics; Metaproteomics; Metabolomics

几十年来,糖发酵及以变异链球菌(*Streptococcus mutans*)为代表的产酸菌一直被认为是龋病的主要病因,大多数预防措施和龋病风险评估方法也都是针对变异链球菌。近年来对龋损部位基于核酸的研究揭示了口腔中存在极其多样化的生态

系统,其中变异链球菌只是这个生态系统中极小的一部分。龋病相关微生物群落是指定植在口腔中的微生物中与龋病的发生发展有关的、多种微生物有规律的组合,龋病生态病因学理论认为龋病的发生发展是微生物群落失衡的结果^[1]。第二代高通量测序和宏基因组技术的发展使口腔微生物多样性被充分证实,牙菌斑中变异链球菌只占0.1%,龋损部位变异链球菌占0.7%~1.6%^[2-3]。因此有必要对口腔菌斑样本进行DNA和RNA的提取分析,进一步明确引起龋病发生和发展的微生物

【收稿日期】 2017-04-27; **【修回日期】** 2017-08-24

【基金项目】 国家自然科学基金(81470035)

【作者简介】 霍媛媛,医师,硕士研究生, Email: 450821467@qq.com

【通信作者】 邹静,教授,博士, Email: zoujing1970@126.com

“名单”,以及其表达的遗传目录。基于口腔微生物核酸的分析同时也对死亡的、一过性的或者惰性存在的微生物进行了计量,从而过高估计微生物的多样性并对分析造成干扰^[2]。要明确龋病发生发展的原因,不仅要找出与疾病相关的微生物“名单”,还应了解它们协同作用发挥功能的具体机制,包括对参与这个过程的蛋白质及代谢物进行研究,对多组学数据进行整合来研究^[3]。不同的组学方法已开始用于了解龋病发生发展的具体机制,从应用的角度看,龋病病因的多组学研究在口腔疾病的风险评估以及潜在的诊断价值上能提供更多的信息。本文将从其基因组学、宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学和宏代谢组学等方面对龋病相关口腔微生物的多组学研究进展进行综述。

1 基因组学与宏基因组学(genomics and metagenomics)

1.1 基因组学与宏基因组学的定义

基因组学是分子生物学中研究有机体中一整套的遗传物质的学科。而宏基因组学是研究直接从环境中获取的样本中的遗传物质,宏基因组学的研究可揭示细菌培养的方法所忽略的“巨大的”微生物多样性,为观察微生物世界提供了一个强大的“透镜”,有可能颠覆我们对整个生物世界的理解。新型的宏基因组学研究方法用于分析物种多样性时可以最小化假阳性率并获得可靠的相对丰度^[4]。

1.2 龋病患者微生物基因组具有鉴别特征

高通量测序是上世纪90年代中后期发展起来的测定DNA分子中核苷酸的精确顺序的方法,目前应用中的包括单分子实时测序(single-molecule real-time sequencing, pacific biosciences)、离子激流测序(ion semiconductor, ion torrent sequencing)、焦磷酸测序、合成测序(sequencing by synthesis, illumina)、连接测序(sequencing by ligation, SOLID sequencing)、新型纳米孔测序(nanopore sequencing)和链终止法测序(chain termination, sanger sequencing)等等。

新一代高通量在基因组学研究中的应用为认识群落结构、研究群落差异和功能提供了良好的契机。就唾液菌群中的细菌谱系和功能基因组成进行深入解析,阐释成人唾液微生物群落的生态特性,通过对龋活跃人群和健康人群的比较分析后发现两者在基因和群落结构上具有鉴别特征^[5]。

另外,有研究者利用基因组指纹图谱分析(genomic fingerprint analysis)对比了3~4岁的无龋儿童和重度低龄儿童龋(severe early childhood caries, S-ECC)患儿唾液中变异链球菌和表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)的基因型多样性,发现在3~4岁儿童中这两种细菌具有遗传多态性,且变异链球菌具有比表兄链球菌较高的遗传多态性,而S-ECC患儿中这两种细菌均比无龋患儿有更多的基因型^[6]。

1.3 龋病微生物群落的时空多样性

1.3.1 龋病微生物群落的时间多样性 微生物的群落组成变化影响着龋病的临床进展状态。龋病按临床进展状态分为活跃性龋和静止性龋。Neves^[7]用定量聚合酶链反应对患有ECC的儿童龋损部位的特定几种细菌种属进行识别和量化,结果显示双歧杆菌(*Bifidobacterium spp.*)和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)在牙本质活跃性龋坏中含量较高,而内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、轻型链球菌(*Streptococcus mitis*)和戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)在活跃性龋和不活跃性龋损样本中含量没有明显差异,非活跃性龋损部位变异链球菌相对较高,双歧杆菌和干酪乳杆菌与活跃性龋成明显正相关。嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)(OR = 15.1)和戈登链球菌(OR = 7.7)的阳性检测结果与活跃性龋明显相关。

1.3.2 龋病微生物群落的空间多样性 一个宏基因组学研究表明,在釉质龋的微生物群落中,编码参与饮食中的糖酵解、细胞表面粘附以及酸应激反应(acid stress responses)的基因过表达;而牙本质龋的微生物群落中,其复合糖酵解和酸应激反应的基因表达水平很低。

相反地,牙本质龋中过表达的基因包括:参与单糖和双糖的代谢的基因、参与编码渗透压应激反应(osmotic stress responses)的蛋白,比如甘油摄取蛋白(glycerol uptake proteins)和水通道蛋白(aquaporins)的基因、编码胶原粘附及纤维连接蛋白的基因以及编码一系列肽酶包括胶原酶(collagenases)和氨肽酶(aminopeptidases)的基因等^[8]。该研究认为龋病具有组织依赖性,关于龋病病因的探索需要更高的精度。

在龋病进展的不同阶段,龋病相关微生物群落结构不同,且不同个体之间也不相似,提示不同组别的微生物可能执行相同的功能。这是人类微生物组的宏基因组学研究的大概趋势,完全不同

的微生物类别组成可引起惊人的相似功能^[9]。将高通量测序与宏基因组学结合,可更好地揭示微生物群落中不同细菌在龋病发生发展中的作用。

2 宏转录组学(metatranscriptomics)

2.1 宏转录组学的定义

转录组是一个细胞或细胞群的所有的信使RNA分子,也被称为基因表达谱。宏转录组学研究包括mRNA的提取与分析,提供复杂微生物群落的基因调控和表达概况的信息。目前RNA测序技术迅速发展,逐渐取代了芯片为主导的转录组学技术^[10]。

2.2 口腔微生物宏转录组学的研究目标

基于微生物DNA分析技术对口腔微生物多样性的研究发现,龈上菌斑中约有500~700种细菌^[11-12]。而该估值在唾液中会更高,刺激性唾液中该估值达到1 000~2 000种^[13],可能是因为唾液与口内所有位点都有接触。

然而,无论是在早期龋、釉质龋还是牙本质中龋、深龋^[8, 14-16],在龋损部位其微生物种类估值急剧减少至100~200种。以上这些基于口腔微生物DNA的PCR扩增的研究中检测到的微生物中有些不具有活性且不会造成龋病进展。

以RNA为基础的数据^[17]可以识别积极参与转录的细菌,将样本中与龋相关的微生物种类缩减至40~160种,可推测这些微生物是龋坏组织中有活性的微生物。因此,探索龋病病因有必要对口腔微生物群落进行基于RNA的研究,即从转录水平进行分析,从而获得真正的龋病相关的微生物“名单”。

2.3 龋病在宏转录组学方面的研究

一项以口腔微生物RNA为基础、研究牙面菌斑的研究^[17]检测了进食前后的口腔生物膜中活跃的微生物群体,明确了摄入食物后活性增强的细菌,前提是这些细菌能酵解糖并产酸。

另外,通过人的口腔微生物鉴定芯片技术(human oral microbe identification microarray, HOMIM)分析了无龋儿童和S-ECC患儿的唾液和牙菌斑样本后结果显示,链球菌属(*Streptococcus*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)和放线菌属(*Actinomyces*)与S-ECC密切相关,可能是乳牙龋的潜在生物标志物。因此,宏转录组学为发现龋病标志物以预测疾病发生从而早期进行防治提供了可能。

通过宏转录组方法推测的龋相关的微生物列表中,变异链球菌在隐匿性牙本质龋洞中的活跃性

微生物中占0.02%,开放的牙本质龋占0.48%,釉质龋占0.73%^[18]。宏转录组的数据表明活性菌只是口腔生物膜中所有微生物群落中的一部分^[19],但仍具有很高的多样性。决定龋损部位的活性细菌,可能最终揭示龋病难以把握的微生物学病因,为患龋风险评估及早期预防开拓道路。目前已有学者利用生态建模技术(ecological modeling techniques)提出了口腔微生物的低龄儿童龋预测模型^[20],可以预见,若将该技术与宏转录组技术相结合运用于龋病的研究,将得到更有诊断价值的预测模型。

3 宏蛋白质组学(metaproteomics)

3.1 宏蛋白质组学的定义

蛋白质组是指在一定时间内由基因组、细胞、组织或生物体所表达的全部蛋白质组。更具体地说,它是在给定的时间内,在给定条件下,在给定的细胞或生物体中表达的蛋白质的集合。蛋白质组学是蛋白质组的研究,宏蛋白质组学是研究直接从环境中获得的样本中的蛋白质组的学科。虽然基因芯片(microarray)的研究可以揭示细胞中不同mRNA的相对量,但mRNA水平并不直接与相应的蛋白质表达水平成线性关系^[21]。研究口腔微生物的蛋白质组学有助于了解口腔微生物群落的功能输出,从而有可能通过促进或阻断某功能输出的方法来干预口腔疾病的发生发展。

3.2 口腔微生物组的宏蛋白质组学研究

运用“鸟枪法”(shotgun proteomics)研究人类口腔微生物组的宏蛋白质组发现了50种细菌属^[22]。Belda-Ferre等^[23]首次对人类口腔生物膜进行了宏蛋白质组学分析,建立了人类牙菌斑的第一个可用蛋白质库。同时发现,健康个体有较多的L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase)和精氨酸酶(arginine deiminase)系统,它们都参与pH缓冲,其他表达水平较高的蛋白质参与了胞外多糖的合成、铁代谢与免疫反应。

对有龋和无龋的成人口腔生物膜的蛋白质组学分析明确了参与L-乳酸脱氢酶、精氨酸酶系统的蛋白质,这些系统有助于pH缓冲,且在无龋个体的龈上菌斑中高表达^[24]。

这些研究为龋病的防治提供了更多可能性,已经有研究表明,精氨酸可以通过重塑口腔微生物群落改善口腔pH稳态^[25]。

另外,有研究者对比了龋病及牙周病患者与正常人唾液的宏蛋白质组^[26],结果显示,与正常组

相比,疾病组唾液中补体系统和炎症标志物显著过表达,而疾病组与正常组的细菌蛋白组图谱及功能注释具有相似性,这说明口腔疾病的状态与补体系统及炎症相关的蛋白质过表达有关,且唾液中的微生物不表达疾病相关的代谢特征。

3.3 宏蛋白组学研究与早期龋

口腔细菌生产的脲酶可生成氨,对口腔生态产生重大影响,从而影响口腔健康。关于早期(3~6岁)口腔环境的代谢平衡以及群落的生态研究揭示了脲酶活性与碱生成与牙菌斑组成之间的重要相关性^[27]。某些共生细菌,比如巴斯德菌(*pasteurellaceae*),其脲酶活性对口腔酸碱平衡有积极的影响,可在低糖消耗的牙菌斑中抑制耐酸菌及致龋菌,如纤毛菌(*Leptotrichia*)变异链球菌^[28]。然而,唾液中的脲酶活性增高与高龋风险和变异链球菌水平增高相关^[29]。这种情况表明,口腔早期细菌群落的蛋白质组相互作用非常复杂,某些蛋白质分子可作为龋病早期发现和预防的标记物。

因此,将对生态群落的组学研究和高通量的分析方法结合起来,可为早期龋的发生提供一个清晰、系统的描绘,且可以发现龋病早期诊断的潜在标志物^[30]。

4 宏代谢组学(metabolomics)

4.1 宏代谢组学的定义

代谢组是指生物样本中发现的小分子化合物的完整集合。代谢组学是对生物体内化学过程中涉及到的代谢产物的研究。具体来说,就是对特定细胞过程留下的独特化学“印迹”的系统研究,研究它们的小分子代谢物图谱。目前应用最广泛的代谢组学研究方法是气相色谱法(gas chromatography),特别是气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[31]。由口腔微生物群落中细菌的多样性及其组织依赖性可知,群落中的不同微生物组合行使不同的功能,成组的细菌也可能行使同一功能^[2]。因此有必要对微生物群落影响龋病发生发展的代谢过程进行研究,继而通过干预该过程来控制龋病的发展。

龋齿的生态学说认为,重点关注微生物群落代谢产物而忽略该过程中所涉及的微生物,可作为理解和控制疾病的一个线索^[32]。从应用的角度看,检测龋病相关的代谢谱,在患龋风险评估以及潜在的诊断价值上能提供更多的信息。

4.2 龋病相关宏代谢组学研究

关于早期口腔整个代谢组的分析表明,乳牙列、混合牙列和恒牙列患龋儿童的唾液中其代谢物各有不同。与正常组相比,其乳酸、乙酸和丁酸含量增高。且正常组儿童的唾液中,虽然口腔卫生习惯、社会经济学地位以及饮食不同,但其代谢物组成相似^[33]。此外,患龋儿童复合树脂修复治疗3个月后的唾液代谢组表现出丙酸、乙酸、丁酸和寡糖明显下降,并伴有变异链球菌和乳酸杆菌培养水平的下降^[34]。

对患龋儿童的唾液代谢组分析结果表明,参与精氨酸-脯氨酸代谢通路和连接精氨酸和碱生成的酸碱平衡中代谢产物具有突出作用^[24]。还有研究者对成人龈上菌斑中的微生物代谢组进行了糖酵解途径(embden-meyerhof-parnas pathway, EMP pathway)、戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway)和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)糖代谢方面的分析^[35],结果显示龈上菌斑中包含了除戊糖磷酸途径中赤鲜糖-4-磷酸(erythrose 4-phosphate)以外的所有糖代谢物。且在葡萄糖冲洗后,糖酵解途径中的葡萄糖-6-磷酸(glucose 6-phosphate)、果糖-6-磷酸(fructose 6-phosphate)、果糖1,6-二磷酸(fructose 1,6-bisphosphate)、磷酸二羟丙酮(dihydroxy-acetone phosphate)和丙酮酸以及戊糖磷酸途径中的6-磷酸葡萄糖酸(6-phosphogluconate)、核酮糖5-磷酸(ribulose 5-phosphate)和7-磷酸景天庚酮糖(sedoheptulose 7-phosphate),乙酰辅酶a(acetyl coa)增加。同时,糖酵解途径中的3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate)和磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenol-pyruvate),以及三羧酸循环中的琥珀酸(succinate),延胡索酸(fumarate)和苹果酸(malate)均下降。这些在龈上菌斑观察到的通路及代谢产物的变化类似于在链球菌和放线菌中的代谢谱整合。

龋病相关的微生物群落组成及群落之间的联系多样、巨大,相关代谢组学的研究仍有很大空间。

5 小结

尽管对人类口腔微生物的群落组成了解得越来越多,但是对于微生物的原位活动以及微生物与微生物、微生物与环境之间的相互作用了解仍然有限。关于龋病相关微生物组学的研究开展了很多,但仍有很大的研究空间,若能将微生物组学研究与高通量测序的方法结合起来应用在龋病病

因学的研究上,不仅将进一步揭示龋病在微生物组学方面的病因,同时将会为龋病的预防、患龋风险评估甚至治疗开辟出新的道路。

参考文献

- [1] Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes[J]. Microbiology, 2003, 149(2): 279-294.
- [2] Nyvad B, Crielaard W, Mira A, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective[J]. Caries Res, 2013, 47(2): 89-102.
- [3] Tanner AC, Faller LL. Understanding caries from the oral microbiome perspective[J]. J Calif Dent Assoc, 2016, 44(7): 437-446.
- [4] Dadi HT. SLIMM: species level identification of microorganisms from metagenomes[J]. Peer J, 2017, 5: e3138.
- [5] 凌均荣, 杨芳, 滕飞. 新一代高通量技术在龋病相关的口腔菌群宏基因组学研究中的应用[J]. 中华口腔医学研究杂志电子版, 2011, 5(4): 1-5.
- [6] Zhou Q. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries[J]. Int J Paediatr Dent, 2011, 21(6): 422-431.
- [7] Neves GB. Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions[J]. Clin Oral Investig, 2017, 21(6): 2053-2061.
- [8] Simon-Soro SA. A tissue-dependent hypothesis of dental caries[J]. Caries Res, 2013, 47(6): 591-600.
- [9] Vaishampayan PA. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant[J]. Genome Biol Evol, 2010, 2: 53-66.
- [10] Su Z, Fang H, Hong H, et al. An investigation of biomarkers derived from legacy microarray data for their utility in the RNA-seq era[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 523.
- [11] Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1407-1417.
- [12] Belda-Ferre BP. The oral metagenome in health and disease[J]. ISME J, 2012, 6(1): 46-56.
- [13] Simon-Soro SA. Microbial geography of the oral cavity[J]. J Dent Res, 2013, 92(7): 616-621.
- [14] Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, et al. Beyond *streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47722.
- [15] Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care[J]. Caries Res, 2004, 38(3): 182-191.
- [16] Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KA, et al. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92940.
- [17] Benitez-Paez BA. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 311.
- [18] Simon-Soro AG, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions[J]. J Oral Microbiol, 2014, 6: 25443.
- [19] Duran-Pinedo AE, Chen T, Teles R, et al. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis[J]. ISME J, 2014, 8(8): 1659-1672.
- [20] 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.
- [21] Schwanhaeusser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control[J]. Nature, 2011, 473(7347): 337-342.
- [22] Grassl N, Kulak NA, Pichler G, et al. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 44.
- [23] Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, et al. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease[J]. Proteomics, 2015, 15(20): 3497-3507.
- [24] Edlund A, Yang Y, Yooseph S, et al. Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during in vitro sugar metabolism[J]. ISME J, 2015, 9(12): 2605-2619.
- [25] Agnello M. Arginine improves pH homeostasis via metabolism and microbiome modulation[J]. J Dent Res, 2017, 96(8): 924-930.
- [26] Zhou Y. Metaproteomics of saliva identifies human protein markers specific for individuals with periodontitis and dental caries compared to orally healthy controls[J]. Peer J, 2016, 4: e2433.
- [27] Morou-Bermudez ME. Urease and dental plaque microbial profiles in children[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0139315.
- [28] Morou-Bermudez ME. Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(11): 1282-1289.
- [29] Morou-Bermudez ME. Urease activity as a risk factor for caries development in children during a three-year study period: a survival analysis approach[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(12): 1560-1568.
- [30] Gomez A, Nelson KE. The oral microbiome of children: development, disease, and implications beyond oral health[J]. Microb Ecol, 2017, 73(2): 492-503.
- [31] Ogbaga CC, Stepien P, Dyson BC, et al. Biochemical analyses of sorghum varieties reveal differential responses to drought[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154423.
- [32] Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives[J]. J Dent Res, 2011, 90(3): 294-303.
- [33] Fidalgo TS, Freitas-Fernandes LB, Angeli R, et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions[J]. Metabolomics, 2013, 9(3): 657-666.
- [34] Fidalgo TS, Freitas-Fernandes LB, Almeida FL, et al. Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment[J]. Metabolomics, 2015, 11(3): 583-593.
- [35] Takahashi NW, Mayanagi G. Metabolomics of supragingival plaque and oral bacteria[J]. J Dent Res, 2010, 89(12): 1383-1388.

(编辑 张琳)