

DOI: 10.13376/j.cblls/2017090

文章编号: 1004-0374(2017)07-0660-09



徐健, 中国科学院青岛生物能源与过程所研究员、单细胞研究中心主任、功能基因组团队负责人; 山东省能源生物遗传资源重点实验室主任。1997年北京大学生物技术学士, 2003年华盛顿大学计算机科学硕士和生物化学博士。2004—2008年于华盛顿大学基因组研究院任基因型组装和分析团队负责人。2008年入选中科院“百人计划”并全职加入中科院青岛生物能源与过程所。获2013年中科院百篇优秀博士论文(作为导师)、首届中组部万人计划青年拔尖人才计划(2012)、科技部中青年科技创新领军人才推进计划(2013)、基金委国家杰出青年科学基金(2014)、中国青年科技奖(2015)等荣誉。主要以微藻固定二氧化碳、共生菌群与健康等为模式研究体系, 通过单细胞分析仪器系列的合作研制和应用示范, 揭示单细胞精度的微生物组调控与进化机制, 设计与组装功能性的细胞群体。论文发表于 *Science*、*Cell Host Microbe*、*Nature Communications* 等 80 余篇, 专利或专利申请 19 项。

基于微生物组的口腔“亚健康状态”检测

黄适^{1,3}, 滕飞^{1,3}, 杨芳², 朱鹏飞^{1,3}, 苏晓泉^{1,3}, 马波^{1,3}, 徐健^{1,3*}

(1 中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞研究中心, 青岛 266101;

2 青岛市市立医院口腔医学中心, 青岛 266000; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 口腔亚健康是指口腔处于健康与疾病状态之间的一种状态, 其灵敏辨别与准确检测对于维护儿童和成人体的身心健康均具重大意义。最新研究表明, 口腔共生菌群的特异性结构或功能变化可先于口腔临床症状出现, 因此具备预测疾病发生的潜力。首先, 综述了口腔菌群与口腔内生态位、宿主年龄、疾病状态等的关联, 讨论了基于口腔菌群定义与检测牙齿、牙周组织的亚健康状态的现有证据及潜力; 其次, 以微生物组大数据和单细胞分析为例, 探讨了新一代微生物组分析技术的最新进展和应用前景。基于微生物组的口腔亚健康状态检测与机制研究, 将为口腔乃至全身的精准医疗与精准护理提供新思路和新工具。

关键词: 口腔菌群; 疾病预警; 亚健康; 龋病; 牙周疾病; 宏基因组; 单细胞技术

中图分类号: Q93; R781 文献标志码: A

Detection of sub-optimal state of oral health via oral microbiota

HUANG Shi^{1,3}, TENG Fei^{1,3}, YANG Fang², ZHU Peng-Fei^{1,3}, SU Xiao-Quan^{1,3}, MA Bo^{1,3}, XU Jian^{1,3*}

(1 Single-Cell Center, Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences,

Qingdao 266101, China; 2 Oral Research Center, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266101, China;

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The state of “sub-optimal health” (SoH), an intermediate phase between the healthy state and the diseased state, is of crucial importance for promoting the wellbeing of both child and adult populations. Recent findings

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31425002); 医学部重点项目(81430011); 中国科学院前沿科学重点研究计划

*通信作者: E-mail: xujian@qibebt.ac.cn

revealed that specific structural and functional alteration of oral microbiota can precede the emergence of clinical symptoms in oral cavity, suggesting oral microbiota can be employed for predicting disease onsets. Here we reviewed the correlation of oral microbiota with oral ecological niche, host development and type and state of oral infections, and discussed current evidence as well as the potential of defining and detecting SoH of both teeth and gum tissues via microbiota. Furthermore, we introduced the recent development of new-generation microbiota analysis technologies, using big-data platform and single-cell analysis as examples. Further studies that detect and dissect SoH based on oral microbiota will lead to new ways of thinking and novel solutions for precision medicine and personalized care of both oral ecosystem and whole human body.

Key words: oral microbiota; disease prediction; sub-optimal health; caries; periodontal diseases; metagenomics; single-cell analysis

1 共生菌群应用于检测人体亚健康的意义

1.1 “口腔亚健康状态”的定义与意义

1996年,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)在《迎接21世纪的挑战》的报告中指出:“21世纪的医学,不应继续以疾病为主要研究对象,而应以人类健康作为医学研究的主要方向。”然而,何谓“健康”,根据1989年WHO的定义,“健康”是指生理、心理及社会适应三个方面全部良好的一种状况,但严峻的事实是,完全健康者通常仅占人群的15%左右;而介于健康和亚健康两种状态之间的人群可占人群的60%~70%,这些“沉默的大多数”则处于不同程度的“亚健康”(sub-optimal health, SoH)状态^[1-3]。中华中医药学会在2006年对亚健康做出了明确定义,认为它是人体处于健康和疾病之间的一种状态^[4],亦即没有明显的病态特征,但由某种医学检验指数提示的一种心理行为或者身体特性处于某种失调的状态。显然,“亚健康”状态不仅描述了人群内不同个体均可能存在的一个特殊健康状况,亦刻画了每个个体从健康发展至疾病过程中的重要中间过渡阶段。因此,亚健康状态的检测对于健康的保持和疾病的预防具有极其重要的临床和科学意义,是精准医学的核心目标之一。

相较于身体的系统健康,作为人体的重要组成部分,口腔健康有其特殊的角色和地位。世界卫生组织将口腔健康标准定义为:牙齿清洁、无龋齿、无疼痛感、牙龈颜色正常、无出血现象^[5]。因此,口腔健康要求具有良好的口腔卫生、健全的口腔功能及没有口腔疾病。根据多次全国口腔流行病学调查的结果,中国人群大多都达不到这一健康标准,普遍存在一种或多种口腔问题;问卷调查表明,普通人群认为这些问题属于口腔亚健康状态^[6]。考虑到口腔健康的生理和病理特点,与人体亚健康的定义

相似,口腔亚健康定义是:口腔处于健康与疾病状态之间的一种状态,该状态下存在一种或多种可逆转的、可预防的早期口腔问题^[7]。依照功效性牙膏的国家行业标准和卫生标准,这些口腔问题的范围是:牙菌斑、早期龋齿、早期牙龈炎、一过性牙本质敏感、牙渍、口臭等^[6]。这些口腔问题的细分种类较多,但它们的根源都来自于牙菌斑的堆积和成熟。牙菌斑是未矿化的细菌沉积物,是细菌和基质(唾液糖蛋白、细菌细胞外多糖)黏附于牙面或修复体上形成的生态系统;细菌在其中生长、繁殖和衰亡,并进行着复杂的物质代谢活动,在条件适当时可致牙体和牙周疾患。因此,这些口腔问题的实质是口腔微生物的问题^[5,8-11]。

1.2 通过菌群检测口腔“亚健康状态”的意义

近年的研究表明,共生菌群(亦称“人体微生物组”)与人类的健康与疾病状态息息相关^[12]。那么,亚健康状态的检测可否通过菌群检测实现呢?这也是人类微生物计划最重要的研究目标之一^[12-13]。选择口腔生态系统作为微生物组监测亚健康状态的模式研究对象,不论从临床应用还是基础研究的角度来看,都具有重要的优势和特色。

首先,口腔菌斑性疾病(牙龈炎和龋病)的预防具有巨大临床意义。发生在口腔的菌斑性疾病(如龋病、牙周疾病),被认为是人类最普遍、经济负担最沉重的慢性感染性疾病之一。牙龈炎在我国成年人中发病率高达80%~97%,其发生是由于牙菌斑的积累^[14]和随之发生的菌斑微生物组与宿主组织的相互作用^[15-16]。尽管没有结合上皮的根方迁移,牙龈仍然红肿并且探诊出血。此外,慢性牙龈炎可以进展为牙周炎;牙周炎是不可逆的牙周组织感染,以牙槽骨丧失,牙周附着消失,牙周袋形成,牙齿松动移位,最终牙齿缺失为临床特征^[8,17-18]。龋病是发生在牙齿的慢性感染性疾病,也是儿童口腔中

发生率最高一类疾病^[19-20]。通常情况下,致龋性食物糖(特别是蔗糖和精制碳水化合物)紧紧贴附于牙面,使得唾液蛋白形成获得性膜并牢固地附着于牙面;在适宜温度下,生物膜中微生物长时间在菌斑深层产酸,侵袭牙齿,使之脱矿,并进而破坏有机质,导致牙齿组织的缺损(即龋洞),乃至整个牙齿缺失^[21]。早期龋病进展到一定程度则发展为不可逆的牙体组织损坏。WHO对186个国家的人群口腔健康进行长达20年的纵向调查结果显示^[22],龋病仍影响着60%~90%的学龄儿童和大部分成年人;而中国第三次口腔健康流行病学调查初步结果也显示^[23],我国五岁儿童乳牙龋病的患病率达66%。婴幼儿龋(early childhood caries, ECC)具有发病年龄早、发展速度快、自主症状不明显、病损广泛等特征,可引发一系列感染和剧烈疼痛,而且还大幅提高了成年后的患龋风险。同时,ECC还影响咀嚼功能、发音功能和颌颌发育,甚至导致错颌畸形,从而严重影响患者生活质量。尤其关键的是,一旦症状发生,ECC就难以逆转。此外,口腔健康还与全身性疾病,如糖尿病^[24]、心血管疾病^[25]等显著相关,给社会和个人带来沉重的经济负担^[5]。因此,这些口腔感染的风险评估和预警策略一直是业界的迫切需求和研究重点。

其次,与人体其他部位相比,口腔菌群作为亚健康状态的“传感器”,对于菌群预测疾病的方法学研究具有重要的优势。首先,口腔作为消化系统的入口,为连通人体内外的交通枢纽,其内软硬组织表面不同生态龛位密集定植大量微生物,与人体自身发生相互作用,与人的健康与疾病状态关系密切^[26]。其次,口腔内不同生态龛位表面的菌群取样相对容易、无创,易于为受试者接受,并且通过对受试者进行简单培训,甚至可以训练其自行取样(例如唾液、刷牙菌斑等),达到远程监控目的,适于开展长期跟踪观察。最后,相较于其他疾病的发生与发展(糖尿病、肿瘤等全身性疾病),口腔疾病(龋病、牙周病等)相对容易监测。例如,最常见的口腔慢性疾病一般病程都相对较短(例如,牙龈炎可以在数周之内完成发生、发展和恢复的过程;儿童龋齿病程较长,但一般认为其发病过程在一到两年内);同时,儿童龋病的发病年龄比较集中,四到六岁是高发期。这些特征都意味着,口腔疾病的易感人群和易感年龄段比较容易追踪和监控,有利于开展基于菌群纵向追踪观察的疾病预测研究。此外,最新研究还发现,不同于肠道菌群,口腔菌

斑的结构通常较为稳定。在目前已经测试的范例中,口腔菌斑在不同疾病状态下的差异显著大于自然人群中患者个体之间的差异^[27]。因此,在诊断和预测一些慢性感染性疾病方面,口腔菌群可能比肠道菌群更具优势。

2 认识口腔菌群时空动态变化是检测口腔亚健康状态的基础

长期以来,利用人体微生物组预警慢性疾病始终面临巨大挑战。主要原因是:一,在微生物层面,亚健康状态存在与否以及其在病程中的时间跨度都需要长期的纵向追踪实验进行确认和挖掘;二,菌群随时空的变化也可能干扰宿主健康状态相关菌群标识物的甄别和挖掘^[28]。一方面,在人体口腔的空间维度上,共生菌群的分布和结构存在巨大差异。对于特定的亚健康状态或疾病状态,处于不同生态位的口腔菌群与其关联强度亦相差甚远。另一方面,在时间维度上共生菌群随宿主年龄增加而发生特征性改变(特别是婴幼儿时期),体现为其多样性和组成跟随宿主生长发育过程中特殊时期的生理、食物和环境接触的改变而发生显著变化^[29-31]。虽然近几年,口腔菌群时空特征与临床口腔健康(疾病)状况的关联研究正受到关注并逐步展开,但其与宿主亚健康状态的关系研究仍鲜有报道。

2.1 空间位点的影响和考虑

由于其特殊的解剖结构和生理特征,口腔中形成了各种各样的微生物栖息地,如齿、舌、颊、腭、牙龈、牙槽骨、龈沟及唾液等。研究表明,这些栖息地在氧含量、养分有效性、温度及宿主的免疫反应等方面存在差异,因而也造就了口腔微生物的组成多样性^[32-33]。因此,口腔位点的选择对于实验设计非常重要^[34]。

所有的口腔位点共享着大部分口腔微生物,但是不同微生物类群的比例可能会随着栖居部位的不同而有所差异。Gizani等^[32]应用高通量测序分析健康个体唾液、龈上菌群、龈下菌斑、舌部和颊黏膜等5个生态位点的微生物组,结果显示与黏膜和唾液相比,牙齿和舌部呈现了更高的微生物负载。Huse等^[35]对200个个体的唾液、龈上菌斑、硬腭、腭扁桃体、舌背、颊黏膜、龈下菌斑、角化牙龈等8个口腔位点的菌群进行对比分析,发现龈下菌斑的菌群多样性最高,龈上菌斑次之,且棒状杆菌属(*Corynebacterium*)在各位点分布具有差异性:如马氏棒状杆菌(*C. matruchotii*)几乎全部存在于龈上

菌斑中, 而银色棒状杆菌 (*C. argentoratense*) 大部分存在于唾液当中, 在硬腭菌群中几乎不存在, 提示口腔微生物是位点特异性的, 不同的生态栖息位具有不同的多样性特征。此外, Costello 等^[36] 将健康人的口腔菌群和全身各部位的微生物组成信息进行了比较分析, 结果显示口腔部位的微生物有别于肠道、皮肤、阴道等部位栖居的菌群, 可以通过特定的微生物和其丰度特征鉴定其部位来源。综上, 口腔微生物的组成信息有别于人体其他部位, 而且口腔内部不同位点来源的菌群也存在异质性, 提示口腔生态位是影响口腔微生物群落分布的重要因素。更重要的是, 本课题组发现, 不同口腔位点对于口腔亚健康状态 (如龋病发生前状态) 的预警能力亦具有位点特异性^[37]。因此, 在“亚健康”菌群研究中应该充分考虑菌群的空间分布特性, 避免因位点选择而影响亚健康菌群研究的高效性和敏感性。

2.2 宿主年龄的影响和考虑

健康个体的口腔微生物群落在时间轴上存在显著的变异和波动。微生物在机体分娩后便可定植于口腔, 其后随着饮食的转变、新口腔生态龛位的出现 (乳牙萌出和乳恒牙替换) 及个体的发育成熟等, 可在不同年龄阶段形成特异的口腔微生物群落^[31,38]。

健康个体发育成长 (甚至衰老) 过程中的菌群动态变化可为预警宿主不同时期“亚健康”状态提供良好的参照系。从胎儿时期开始, 口腔微生物便早期定植于羊水^[39-40], 表现在胎盘微生物群落组成 (以普雷沃菌 (*Prevotella*) 与奈瑟菌 (*Neisseria*) 为主) 与口腔菌群最相似^[39], 至此口腔微生物群落正式开启与人类相伴终身之旅。这一生的相伴中, 人体内共生微生物菌群并非一成不变。新生儿生产方式的不同会显著改变新生儿菌群构成, 如顺产婴儿的菌群与母亲相似 (以乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 及纤毛菌属 (*Leptotrichia*) 为主), 而剖腹产婴儿的菌群多来自于体表微生物和环境^[41], 5 个月后婴儿就形成不同于母亲的自身菌群 (如链球菌属在婴儿口腔中检出率明显高于成人^[42]), 固体食物加入使得婴儿菌群更趋向于成人化, 而逐渐形成成人菌群结构一般需要到 2~3 岁^[43]。即使 3 岁之后, 宿主菌群仍处于一个动态变化过程, 而非像成人菌群那样相对稳定^[44]。如乳牙列期、混合牙列期和恒牙列期的口腔菌群仍在不断变化: 乳牙列时, 菌群以变形菌门 (*Proteobacteria*) 为优势菌, 具有更多的不动杆菌属、莫拉菌属等; 在混合

牙列、恒牙列中, 菌群以拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 为主; 并随着年龄增长, 拟杆菌门 (普氏菌属为主)、韦荣球菌科 (*Veillonellaceae* family)、螺旋体菌门 (*Spirochaetes*) 以及 TM7 丰度逐渐增加^[45]。Ling 等^[46] 应用高通量测序分析中国浙江地区健康成人和儿童的唾液微生物组成, 结果显示摩拉氏菌属 (*Moraxella*)、纤毛菌属 (*Leptotrichia*)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、真杆菌属 (*Eubacterium*)、奈瑟氏菌科 (*Neisseriaceae*)、黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*) 和 *SR* 等细菌在两组人群中具有显著差异。Cephas 等^[42] 研究母亲与其婴儿的唾液微生物构成, 发现成人的口腔菌群较之婴儿阶段具有更高的物种多样性。Crielaard 等^[38] 探讨牙列替换期间唾液细菌组的改变与年龄的关系, 发现拟杆菌门 (普氏菌属为主)、韦荣球菌科 (*Veillonellaceae*)、螺旋体菌门 (*Spirochaetes*) 以及 TM7 的丰度随着年龄增长逐渐增加。Xu 等^[47] 横向比较研究了个体出生后 3 天至 76 岁不同年龄段的微生物组成, 发现恒牙列期 (青少年期) 唾液微生物以厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为主, 乳牙列期与恒牙列期 (成人期) 变形菌门 (*Proteobacterium*) 为优势菌, 而梭菌属 (*Fusobacteria*) 在混合牙列、恒牙列期 (老年期) 丰度较高; 同时, 菌斑及黏膜中菌群也表现出随年龄改变的特征, 提示随着年龄增长, 可能存在微生物群落结构的转变。Lazarevic 等^[48] 收集健康个体连续 29 天内 3 个不同时间点的唾液样本, 探讨口腔微生物组在短期内的变异性, 结果显示唾液微生物组至少在 5 天内保持稳定, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、梭菌目 (*Clostridiales*) 是同个体不同时间内组成最相似的菌群, 推测唾液微生物组在短期内具有稳定性。而到了老年期, 由于牙齿数目的减少、咀嚼功能的失调、饮食结构等原因, 菌群结构显著不同于其他任何年龄, 物种多样性降低, 有益菌如双歧杆菌属 (*Bifidobacteria*)、拟杆菌属 (*Bacteriodes*) 和梭菌属 (*Clostridium*) 丰度降低, 且个体间差异性非常大^[49-51]。上述研究结果提示, 年龄这一时间因素是影响健康口腔微生物群落分布的重要因素, 不同年龄阶段的口腔微生物组成具有异质性^[31,52]。因此, 在亚健康相关的菌群纵向追踪研究中, 应注重年龄跨度的选择及如何避免年龄因素的影响。

3 菌群可用于检测牙齿的亚健康状态

目前检测口腔亚健康状态的医学方法依然具有诸多局限性。以早期龋病为例, 目前, 已有大量研

究利用各种临床检查、实验室分析和调查问卷参数来进行龋病风险评估,包括单菌的微生物参数(如变形链球菌 *Streptococcus mutans* 和乳杆菌 *Lactobacillus* spp. 的菌落计数)、唾液生化参数(诸如唾液 pH 值以及缓冲能力)、既往龋病经历、个体口腔卫生状况、刷牙习惯、饮食习惯及社会经济条件等^[53]。但是,上述评估参数以及基于这些参数的检测模型仍存在根本的局限性^[54],表现为以下几个方面。(1)很多危险因素是基于主观的评判,例如口腔卫生状况、刷牙习惯、饮食习惯以及社会经济条件等,容易产生人为偏差,导致不同研究之间难于对比和重复验证。(2)无论是唾液生化性能检测、微生物检测还是个体口腔健康状况等参数,信息的收集都相对复杂,涉及多种临床检查、实验室检查和问卷调查结果,费时费力,且都需要受试者的椅旁配合,无法达到远程监测。(3)即使是文献中所报道的、公认最可靠的高风险参数“既往龋病经历”,都不可避免龋病评估的 X 线辐射风险。且更重要的是,此时基于“既往龋病经历”的风险评估已经无法弥补龋病带来的不可逆性损伤,更无法在龋病发生前达到预警的目的^[27]。此外,某些龋敏感儿童并无既往龋病经历即发展出猛性龋^[55]。(4)现有方法对于成年人,特别是老年人龋病的评估能力较好,但是对于儿童龋病的预测却非常有限^[54]。因此,这些已有的龋病风险评估模型尚未能得到广泛的临床应用。

上述方法无法有效评估龋病风险根源在于忽略口腔共生菌群对于维持健康和引发疾病的关键作用。目前,大量研究已证实当微环境发生改变时(如蔗糖摄入量和频率的增加,唾液流量或流速的改变等),生物膜内菌群结构失衡向脱矿一方倾斜,不

断的恶性循环致使脱矿持续进行进而导致牙齿龋坏^[10,56-57]。无疑,从理解口腔菌群及其与疾病关系的机制入手,方可有望突破上述研究瓶颈,从而构建有效的检测口腔牙体亚健康状态的方法。最近,本课题组基于口腔内不同部位菌群分布的规律,监测了龋病发生、龋病进展和健康对照这三组、共 50 名 4~6 岁儿童的龈上牙菌斑和唾液菌群,发现菌群变化与儿童年龄密切相关,而且先于龋病症状的出现。通过区分与年龄和疾病状态分别相关的微生物,发明了“龋病的菌群指数”(microbial indicators of caries, MiC)^[37]。MiC 能够在临床龋病发生之前(即亚健康状态时),以 81% 的准确率预测 ECC 的发病。与口腔微生物计数法、唾液化学特征检测、个体基础口腔状况评估、个人情况问卷调查(如,个人卫生习惯)等目前常用的龋病风险评估方法相比,MiC 不依赖于牙医或患者之主观判断,也不依赖于细菌培养,因而在准确性、客观性、可重复性、可比较性等方面具有核心优势(图 1)。

4 口腔菌群可用于检测牙周组织(牙龈)的亚健康状态

目前对于牙龈亚健康状态的检测(如牙龈炎)则更为单一和主观,即以医生的“视诊”和“探诊”作为唯一标准,但牙龈炎作为一种口腔菌斑性疾病,其发病机制仍是菌斑微生物失衡所致,因此,以口腔菌群为切入点进行牙龈(或早期牙龈炎)的检测具有重要的意义。本课题组基于口腔内不同部位菌群分布规律^[58],通过监测 50 位志愿者在牙龈炎康复、发展和再康复过程中的牙菌斑菌群结构和功能变化,发现了与牙龈炎严重程度显著相关的 15 个

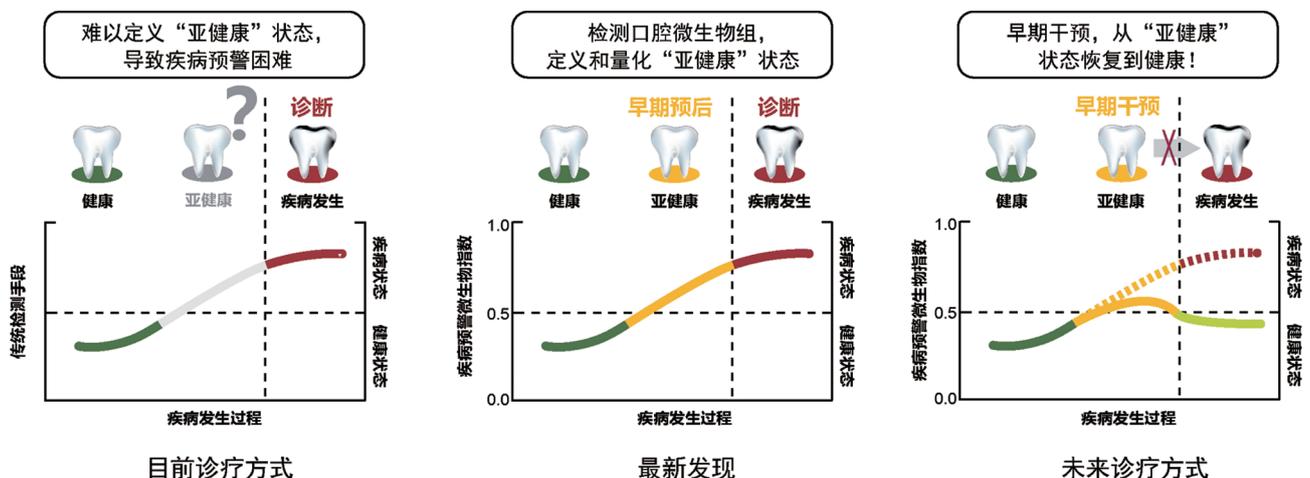


图1 基于微生物组定义和检测口腔亚健康状态,实现慢性口腔疾病的个体化预警与干预

细菌属, 并以此提出了一种基于微生物的新型口腔感染严重程度诊断方法。此项命名为“牙龈炎的菌群指数”(microbial index of gingivitis, MiG)的新方法在含 41 位志愿者的验证群体中准确率为 95%。此研究还发现, 因牙菌斑组成不同, 人群可分为牙龈炎“敏感型”和“耐受型”两类, 以 8 个细菌属构建的“牙龈炎微生物易感指数”(MiG-sensitivity)区分该类型的准确率达到 74%, 从而揭示了人群中牙龈炎易感性迥异的一个重要因素。与基于“视诊”和“探诊”的传统牙龈炎诊断手段相比, MiG 作为一种“非侵害性”、不依赖于牙医主观判断的新型检测方法, 在患者友好度、可重复性、可比较性等方面具有关键优势。

尽管目前针对人群个体的牙龈炎菌群时间序列实验数据还很匮乏, 但初步证据表明, 从健康状态到牙龈炎的发生发展过程中, 牙龈菌斑的结构与功能变化是一个渐进的过程^[27,59-60]。因此, 通过在更高的时间精度监测菌群在牙龈从健康到牙龈炎的发展过程中的动态变化, 揭示菌群结构/功能与宿主牙龈健康程度关联性的过程特征, 将能够探讨通过菌群检测“牙龈亚健康”的可能性。

牙龈炎区别于龋病的显著特征在于其自身的可逆性, 该特征对于评价临床措施对亚健康状态的干预效果尤为重要。本课题组最新研究发现, 菌群结构的变化能够反映与刻画牙龈健康护理策略的微生物生态干预的过程特征^[59]。基于宏基因组学和代谢组学技术手段, 研究人员对于刷牙清洁、使用含有抑菌成分的牙膏和漱口水、常规口腔护理牙膏等三种不同的口腔护理方法下的牙龈菌斑动态变化进行了比较, 发现每一种口腔护理方式均有特征性的牙龈菌群变化图谱。刷牙清洁(目前业界公认最有效的牙龈炎治疗方式)带来了最广泛、最显著的菌群结构变化, 共有 44 个细菌属的丰度在治疗过程中显著改变。在牙膏和漱口水相结合的这一护理方式中, 共有 14 个细菌属丰度显著改变, 而常规牙膏的使用仅仅带来其中 5 个细菌属的丰度改变。于是, 研究人员提出了以刷牙菌群变化特征为参照的各种牙龈健康护理方案的“相对菌群恢复程度指数”(简称 RMRI)概念。这一指数不仅可以形象、客观地在横向上比较不同护理方式的优劣, 还能从纵向上反映每种方式在处理过程中的菌群演化机制和临床效果的动态变化。因此, 这种“微生物组标尺”可作为牙龈护理效果判别和指导牙龈护理产品开发的客观标准之一。

5 研究展望

第一, 以更高时空精度监测的疾病发生过程菌群的实验设计, 是深入探讨菌群检测亚健康之机制的当务之急。首先, 时间范围问题。目前大多研究主要关注 3 岁前(包括胎儿、新生儿及婴幼儿)的口腔菌群从简单到成人化的早期定植进程, 以及老年人口腔菌群和衰老的关系(菌群老化), 而忽略了占人口最大比例的年龄层, 特别是学龄前儿童这个生长发育重要时期口腔微生物菌群随年龄增长的演替规律。其次, 观测时长和频率问题。对于 1 岁前儿童口腔菌群多为高频率采样的纵向研究, 但是观测持续时间相对较短。然而, 其他年龄阶段则多为横断面的大尺度粗放检测, 如把宿主口腔菌群一生的阶段简单地分为无牙合期、乳牙列期、混合牙列期、恒牙列期(可细分为早期、成人期、老年期)等。因此, 针对口腔疾病易感时期进行高频采样, 以确定微生物组可监控的亚健康阶段, 这对于口腔疾病的预防至关重要。

第二, 建立宿主年龄和地域等因素如何影响基于菌群的亚健康模型, 是菌群检测亚健康技术尽快服务于临床的关键, 亦是微生物组精准医学的核心之一。人体共生菌群不仅可反映宿主的健康状态, 同时亦受到宿主的年龄、地域、饮食、生活习惯(如吸烟)、自身基因等影响, 但这些因素对于共生菌群的影响程度如何、其对于利用共生菌群进行亚健康监测是利是弊、同一因素是否对不同疾病和不同个体表现出同质性还是异质性影响, 目前对这些问题仍知之甚少。例如, 就宿主年龄来说, 一方面, 因为健康个体口腔菌群构成在宿主不同生长发育阶段具有特征性^[45], 如宿主在出生短短一年中口腔菌群都会因生产方式、喂养方式、固体食物引入等而出现特定阶段其固有的特征^[43,61], 所以需考量建立针对不同宿主生长发育阶段及年龄层的亚健康检测模型的必要性; 另一方面, 是否可利用口腔菌群的年龄特征以检测宿主的亚健康状态, 因为共生菌群随年龄变化改变的特征中可包含着大量人体健康状况的信息^[37], 可反映宿主的生理年龄, 如本课题组发现, 在 4~6 岁健康儿童中, 口腔菌群的发育带有明显的宿主生理年龄特征, 进而提出了“口腔菌群年龄”(oral microbiota age, OMA)这一概念^[37]。健康儿童的 OMA 与其生理年龄大体保持一致, 但在 ECC 风险升高乃至发病的儿童中, 其 OMA 则显著偏离了儿童生理年龄, 所以提示 OMA 可以作为亚健康检测模型的重要参数, 甚至独立作为检测指数。

已有研究证明,不同地域个体口腔菌群的基线存在根本性差异^[29]。因此,口腔菌群的年龄特征可能在宿主生活地域间存在不同。针对不同的口腔疾病,建立通用的亚健康预警模型或者地域特定的模型是关系到未来实际应用的重要问题。

第三,单细胞分析方法学平台的建立,将有潜力实现更快、更经济且更精确的“亚健康”检测。基于菌群的“亚健康”检测从根本上取决于菌群分析方法学的选择和创新。目前菌群结构和功能的检测主要是基于对16S等基因或全部DNA的元基因组测序(metagenome sequencing)方法。但是该方法还很昂贵、也较慢(目前通常需要至少48小时^[62]),这是目前元基因组测序方法无法进入医院检验中心直接服务患者的主要技术因素之一。更重要的是,元基因组测序方法通常只能测量菌群的结构或通过基因多样性预测菌群拥有的代谢途径,而通常无法直接测量菌群在“该特定情况”下的整体功能或其组分的个体功能(也就是说,无法呈现菌群的“实时”状态)。那么,既然菌群中大部分细胞难以培养,是否能够通过单细胞功能成像技术,实现菌群功能/状态的实时识别,从而更快、更便宜且更精确地实现“亚健康”检测呢,但现有的活体单细胞表型分析技术,如荧光流式细胞仪(FACS)通常无法分析没有生物标识物或无法标记的细胞。针对这些挑战,本课题组与合作者们示范了一系列通过单细胞拉曼光谱的微生物细胞功能识别方法,如定量地测量单个活体细胞中特定底物下的细胞活性^[63]、细胞应激反应与耐药性^[64]、底物利用与传递^[65]、细胞中化合物种类与含量(如甘油三酯^[66]、淀粉^[67]等)。同时,发展了单细胞拉曼弹射分选技术^[68]、单细胞拉曼流式分选技术^[69]、单细胞微液滴分选技术^[70]等,构建了“活体单细胞拉曼分选”(RACS)技术体系^[71]。这些较为系统的方法学和仪器研制工作,为根据活体细胞的功能,在单细胞精度,不需培养而实现菌群功能及状态的实时识别奠定了基础,从而服务于更快、更便宜且更精确的实时“亚健康”检测。

第四,涵盖口腔菌群及其相对应的宿主信息的微生物组大数据整合、挖掘算法和软件创新,是菌群检测亚健康研究进一步拓展与深化的前提和保障。首先,针对微生物群落的结构、功能解析与可视化,本课题组设计了Parallel-META流程,相对于传统的计算通量提高了近20倍^[72-73];同时,针对海量样本的精确比较,Meta-Storms算法实现了微生物群落样本基于进化二叉树的量化比较^[74-75];

而对于大规模微生物组的系统性分析,MDV数据计算模型^[76]可以将微生物组数据从不同的多个角度进行全方位解析,显著改进了海量数据的质控、比较、挖掘和可视化等关键技术环节。这些工作为建立首个针对中国人群牙龈健康乃至口腔健康诊断和预防的微生物组大数据系统提供了平台技术。

最后,在人体其他部位,尤其是肠道的微生物组研究中,一些研究通过长期追踪个体菌群变化,也初步证明菌群能够对未来疾病的发生进行可靠的“预测”^[28,37,77-78]。例如,Kostic等^[77]利用儿童肠道菌群发育信息在1型糖尿病发生前一年半左右就观察到未来患病儿童肠道细菌的异常,并最终准确预测了疾病的发生。Karlsson等^[78]根据血糖浓度不同的145名欧洲妇女的肠道菌群信息建立了基于肠道菌群的糖尿病预测模型。另外,Gevers等^[28]报道了通过对肠道不同位点菌群的采集和分析,鉴定了一系列与克罗恩病(Crohn's disease)显著相关的细菌标记物,并建立了预测模型。这些研究不仅在微生物范畴定义了不同慢性病的亚健康状态,而且为逆转亚健康状态指出了治疗靶点和最佳治疗时机。随着不同疾病、不同部位、以不同人群为模式的亚健康之菌群定义的逐渐涌现,微生物组在保护人类健康方面的潜力将得以更深入、更全面、更迅速地呈现。

[参 考 文 献]

- [1] Wang W, Yan Y. Suboptimal health: a new health dimension for translational medicine. *Clin Transl Med*, 2012, 1: 28
- [2] Cui HZ, Wang LM, Zhao X, et al. Metabonomics-based study of clinical urine samples in suboptimal health with different syndromes. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 509134
- [3] Ding HJ, He JC, Wang WW. The sub-health evaluation based on the modern diagnostic technique of traditional Chinese medicine [C]. *Proceedings of the First International Workshop on Education Technology and Computer Science*, Vol I, 2009, 269-73
- [4] Li G, Xie F, Yan S, et al. Subhealth: definition, criteria for diagnosis and potential prevalence in the central region of China. *BMC Public Health*, 2013, 13: 446
- [5] Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol 2000*, 2011, 55: 87-103
- [6] 中华人民共和国卫生部. 牙膏功效评价(WS/T326-2010). 口腔护理用品工业, 2010, 12: 11-5
- [7] 司燕, 冯希平. 口腔临床研究经验交流会纪要. *中华口腔医学杂志*, 2016, 51: 640
- [8] Loesche W. Dental caries and periodontitis: contrasting two infections that have medical implications. *Infect Dis*

- Clin North Am, 2007, 21: 471-502
- [9] Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, 2011, 10: 497-506
- [10] Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*, 2012, 7: e47722
- [11] 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: 1176-85
- [12] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project. *Nature*, 2007, 449: 804-10
- [13] NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res*, 2009, 19: 2317-23
- [14] Moore LV, Moore WEC, Cato EP, et al. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res*, 1987, 66: 989-95
- [15] Handfield M, Baker HV, Lamont RJ. Beyond good and evil in the oral cavity: insights into host-microbe relationships derived from transcriptional profiling of gingival cells. *J Dent Res*, 2008, 87: 203-23
- [16] Offenbacher S, Barros SP, Paquette DW, et al. Gingival transcriptome patterns during induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Periodontol*, 2009, 80: 1963-82
- [17] Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol* 2000, 1997, 15: 15-24
- [18] Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*, 2009, 80: 436-46
- [19] Anderson M. Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. *Pediatr Dent*, 2002, 24: 377-85
- [20] Eaton KA, Santini A. Report of the UK oral and dental health research summit. *Prim Dent Care*, 2010, 17: 123-6
- [21] Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14547-52
- [22] Rassool GH. WHO releases new report on global problem of oral diseases. *J Adv Nurs*, 2004, 47: 344
- [23] 齐小秋. 第三次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008
- [24] Zhou M, Rong R, Munro D, et al. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One*, 2013, 8: e61516
- [25] Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: S4592-8
- [26] 徐欣, 何金枝, 周学东. 口腔微生物群落在口腔与全身疾病预警中的作用. *华西口腔医学杂志*, 2015, 35: 555-60
- [27] Huang S, Li R, Zeng X, et al. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *ISME J*, 2014, 8: 1768-80
- [28] Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 2014, 15: 382-92
- [29] Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 2012, 486: 222-7
- [30] Song SJ, Lauber C, Costello EK, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife*, 2013, 2: e00458
- [31] Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, et al. Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Res*, 2012, 22: 2146-52
- [32] Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, et al. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent*, 2009, 19: 193-200
- [33] Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res*, 2002, 81: 53-7
- [34] Nyvad B, Crielaard W, Mira A, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*, 2013, 47: 89-102
- [35] Huse SM, Ye Y, Zhou Y, et al. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One*, 2012, 7: e34242
- [36] Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 2009, 326: 1694-7
- [37] Teng F, Yang F, Huang S, et al. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota. *Cell Host Microbe*, 2015, 18: 296-306
- [38] 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. *BMC Med Genomics*, 2011, 4: 22
- [39] Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 237ra65
- [40] Baud D, Greub G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17: 1312-22
- [41] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11971-5
- [42] Cephas KD, Kim J, Mathai RA, et al. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PLoS One*, 2011, 6: e23503
- [43] Backhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, 2015, 17: 690-703
- [44] Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, et al. The human milk microbiome: a potential influence on mammary health and bacterial colonization of the infant gut. *FASEB J*, 2010,

- 24: 206-5
- [45] 杜芹, 邹静, 李雨庆, 等. 健康儿童口腔微生物的定植. 国际口腔医学杂志, 2016, 43: 57-61
- [46] Ling Z, Liu X, Wang Y, et al. Pyrosequencing analysis of the salivary microbiota of healthy Chinese children and adults. *Microb Ecol*, 2013, 65: 487-95
- [47] Xu X, He J, Xue J, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*, 2015, 17: 699-710
- [48] Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*, 2010, 11: 523
- [49] O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science*, 2015, 350: 1214-5
- [50] Patrignani P, Tacconelli S, Bruno A. Gut microbiota, host gene expression, and aging. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48: S28-31
- [51] Saraswati S, Sitaraman R. Aging and the human gut microbiota-from correlation to causality. *Front Microbiol*, 2014, 5: 764
- [52] De Wit R, Bouvier T. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ Microbiol*, 2006, 8: 755-8
- [53] Mejare I, Axelsson S, Dahlen G, et al. Caries risk assessment. A systematic review. *Acta Odontol Scand*, 2014, 72: 81-91
- [54] Tellez M, Gomez J, Pretty I, et al. Evidence on existing caries risk assessment systems: are they predictive of future caries? *Community Dent Oral Epidemiol*, 2013, 41: 67-78
- [55] Hallett KB. The application of caries risk assessment in minimum intervention dentistry. *Aust Dent J*, 2013, 58: S26-34
- [56] Russell RR. Changing concepts in caries microbiology. *Am J Dent*, 2009, 22: 304-10
- [57] Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol*, 2011, 12: R50
- [58] 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
- [59] Huang S, Li Z, He T, et al. Microbiota-based signature of gingivitis treatments: a randomized study. *Sci Rep*, 2016, 6: 264705
- [60] Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, et al. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One*, 2013, 8: e71227
- [61] Subramanian S, Huq S, Yatsunenko T, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*, 2014, 510: 417-21
- [62] Quinn RA, Navas-Molina JA, Hyde ER, et al. From sample to multi-omics conclusions in under 48 hours. *mSystems*, 2016, 1: e00038-16
- [63] Berry D, Mader E, Lee TK, et al. Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E194-203
- [64] Teng L, Wang X, Wang X, et al. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome. *Sci Rep*, 2016, 6: 34359
- [65] Wang Y, Song Y, Tao Y, et al. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. *Anal Chem*, 2016, 88: 9443-50
- [66] Wang T, Ji Y, Wang Y, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 58
- [67] Ji Y, He Y, Cui Y, et al. Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae. *Biotechnol J*, 2014, 9: 1512-8
- [68] Wang Y, Ji Y, Wharfe ES, et al. Raman activated cell ejection for isolation of single cells. *Anal Chem*, 2013, 85: 10697-701
- [69] Zhang P, Ren L, Zhang X, et al. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release. *Anal Chem*, 2015, 87: 2282-9
- [70] Zhang Q, Zhang P, Su Y, et al. On-demand control of microfluidic flow via capillary-tuned solenoid microvalve suction. *Lab Chip*, 2014, 14: 4599-603
- [71] Zhang Q, Zhang P, Gou H, et al. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting. *Analyst*, 2015, 140: 6163-74
- [72] Su X, Pan W, Song B, et al. Parallel-META 2.0: enhanced metagenomic data analysis with functional annotation, high performance computing and advanced visualization. *PLoS One*, 2014, 9: e89323
- [73] Yang P, Su X, Ou-Yang L, et al. Microbial community pattern detection in human body habitats via ensemble clustering framework. *BMC Syst Biol*, 2014, 8: S7
- [74] Su X, Wang X, Jing G, et al. GPU-Meta-Storms: computing the structure similarities among massive amount of microbial community samples using GPU. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1031-3
- [75] Su X, Xu J, Ning K. Meta-Storms: efficient search for similar microbial communities based on a novel indexing scheme and similarity score for metagenomic data. *Bioinformatics*, 2012, 28: 2493-501
- [76] Su X, Hu J, Huang S, et al. Rapid comparison and correlation analysis among massive number of microbial community samples based on MDV data model. *Sci Rep*, 2014, 4: 6393
- [77] Kostic AD, Gevers D, Siljander H, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe*, 2015, 17: 260-73
- [78] Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 2013, 498: 99-103