

高通量测序研究种植体周围炎龈下微生物多样性*

李志杰¹, 王少果², 李跃烘¹, 涂东祥¹, 刘世云³, 聂红兵¹, 李志强¹, 张菊梅^{1△}

1. 西北民族大学 口腔医学院 口腔医学国家民委重点实验室(兰州 730030); 2. 兰州大学 口腔医学院(兰州 730000);
3. 兰州石化总医院 护理部(兰州 730060)

【摘要】 目的 利用高通量测序,研究口腔种植体周围炎龈下微生物的多样性,为种植体周围炎微生物学病因的研究提供思路。方法 刮取种植体周围炎患者(D组)及正常种植修复患者(N组)龈下菌斑,利用 Illumina Miseq 测序平台,对 16S rRNA V4 区进行双端测序;通过 Mothur 等软件进行群落结构的多样性分析。结果 9 个样本总测 156 507 条序列,共 4 402 个操作分类单位(OTU);在 D 组中的优势菌属为:新月形单胞菌属(*Selenomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)及梭杆菌属(*Fusobacterium*)等,在 N 组中的优势菌属为:梭杆菌属、韦荣球菌属(*Veillonella*)及链球菌属(*Streptococcus*)等;PcoA 检测显示两组微生物群落结构差异明显。LEfSe 检测发现,在门、纲、目、科及属的水平上,两组均具有差异。结论 种植体周围炎的发生发展不仅是牙周炎相关致病微生物的作用,而且与口腔微生物群落结构中菌属的变化有关;密螺旋体属(*Treponema*)、草螺旋菌属(*Herbaspirillum*)、*Butyricimonas* 及 *Phaeobacter* 等菌属在种植体周围炎及健康患者中存在差异,提示它们可能与种植体周围炎的发生发展密切相关。

【关键词】 微生物多样性 种植体周围炎 高通量测序

Study on Microbial Diversity of Peri-implantitis Subgingival by High-throughput Sequencing LI Zhi-jie¹, WANG Shao-guo², LI Yue-hong¹, TU Dong-xiang¹, LIU Shi-yun³, NIE Hong-bing¹, LI Zhi-qiang¹, ZHANG Ju-mei^{1△}. 1. School of Stomatology, the Key Lab of Stomatology of State Ethnic Affairs Commission, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. Nursing Department, Lanzhou Petrochemical General Hospital, Lanzhou 730060, China
△ Corresponding author, E-mail: flower084@163.com

【Abstract】 **Objective** To study microbial diversity of peri-implantitis subgingival with high-throughput sequencing, and investigate microbiological etiology of peri-implantitis. **Methods** Subgingival plaques were sampled from the patients with peri-implantitis (D group) and non-peri-implantitis subjects (N group). The microbiological diversity of the subgingival plaques was detected by sequencing V4 region of 16S rRNA with Illumina Miseq platform. The diversity of the community structure was analyzed using Mothur software. **Results** A total of 156 507 gene sequences were detected in nine samples and 4 402 operational taxonomic units (OTUs) were found. *Selenomonas*, *Pseudomonas*, and *Fusobacterium* were dominant bacteria in D group, while *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Streptococcus* were dominant bacteria in N group. Differences between peri-implantitis and non-peri-implantitis bacterial communities were observed at all phylogenetic levels by LEfSe, which was also found in PcoA test. **Conclusion** The occurrence of peri-implantitis is not only related to periodontitis pathogenic microbe, but also related with the changes of oral microbial community structure. *Treponema*, *Herbaspirillum*, *Butyricimonas* and *Phaeobacte* may be closely related to the occurrence and development of peri-implantitis.

【Key words】 Microbial diversity Peri-implantitis High-throughput sequencing

种植体周围炎作为种植修复后最常见的并发症之一,是影响种植修复成败的重要因素之一,严重者

甚至导致种植体脱落^[1],从而给患者的身心健康造成影响。近年来的研究表明,微生物因素在种植体周围炎发病过程中扮演着重要角色^[2]。随着分子生物学技术的发展与运用,对种植体周围炎的微生物病因学研究已经达到分子水平,然而大多都采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)或 16S rRNA 克隆文库的方法,通量较低,对细菌的识别深度不够。本研究首次利用 Illumina Miseq 高通量测序平台对种植体周

* 甘肃省自然科学基金项目(No. 1208RJZA201)、西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. 39120130030)、兰州市科技局项目(No. 2013-3-74)和西北民族大学科研创新团队项目(No. xbmuctd-2011-1)资助

△ 通讯作者, E-mail: flower084@163.com

围炎龈下微生物多样性进行研究, 以期对种植体周围炎的微生物病因学研究提供实验基础。

1 材料及方法

1.1 样本采集、龈下微生物总 DNA 的提取及 16S rRNA V4 区测序

于 2012 年 6 月至 2014 年 6 月, 在西北民族大学口腔医院种植修复患者中筛选种植体周围炎患者 5 例(D 组: 1, 2, 3, 16, 17), 正常种植修复患者 4 例(N 组: 8, 11, 13, 18)。种植体周围炎诊断如下: 探诊深度[probing depth (PD)] \geq 5 mm, 牙龈指数[gingival index (GI)] \geq 2, X 线片显示种植体周围牙槽骨吸收达 3 个螺纹。以上检查均由同一名从事临床种植 15 年以上的医师完成。同时还符合以下标准: ①无先天性疾病和系统性疾病(如糖尿病, HIV 等); ②取标本前 4 个月内无抗生素使用史; ③非妊娠期或哺乳期妇女。该研究得到西北民族大学医学道德伦理委员会批准并在受试者知情同意和知情选择的情况下进行。

样本采集方法: 去除龈上菌斑及软垢, 干燥、隔湿患牙, 以无菌剔挖器深入龈下, 沿种植体周围顺时针轻轻刮取龈下菌斑, 无水乙醇保存并立即送至实验室进行 DNA 提取。提取方法参照 OMEGA 微生物基因组提取试剂盒(OMEGA 公司, 美国)说明书进行。将样本 DNA 40 μ L 送至上海派森诺生物科技有限公司合成引物(V4 区引物: F, 5'-TGGGYDTAAAGNG-3'; R: 5'-TACNVGGGTA TCTAATCC-3')并进行 16S rRNA V4 区测序。

1.2 多样性分析

1.2.1 α 多样性分析 应用软件 Mothur(<http://www.mothur.org/>)中的 summary.single 命令, 计算 5 种常用的生物多样性指数: Chao、Ace、Simpson、Shannon 和 Coverage 指数。

1.2.2 稀释曲线 根据获得的操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU) 数据, 以测序样本的序列数为横坐标, 得到的 OUT 值作为纵坐标绘出每个样品的稀释曲线, 当曲线趋于平坦时, 说明测序数据量合理。

1.2.3 物种丰度差异性分析 在门和属两个层次

上对同类的 OTU 进行聚类, LEfSe 法, (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>); 应用软件 MEGAN4 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>)生成物种进化树及丰度信息。

1.2.4 PCoA 分析及聚类分析 利用 Unifrac 在线分析 9 例样本的主成分; 利用 Cluster 3.0 及 Java Treeview 软件, 将属水平上的分类信息分别按照样品和分类进行聚类后绘出 heatmap 图。

1.3 统计学方法

两组样本生物多样性指数间的比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本信息

我们选取 9 例口腔种植修复患者作为志愿者, 5 例炎症, 4 例正常。每人采集 1 份样本后形成样本群体(D 和 N 组)(表 1)。

表 1 本研究样本信息和相关临床检查

Table 1 Characteristics of subjects and clinical data in this study

Group	Sample No.	Sex	Age (yr.)	PD (mm)	GI
D	1	Male	46	5	2
D	2	Male	48	5	3
D	3	Female	20	5	2
D	16	Male	51	6	3
D	17	Female	42	5	2
N	8	Male	46	2	0
N	11	Female	38	3	1
N	13	Female	25	2	0
N	18	Male	49	1	0

D: Peri-implantitis subjects; N: Non-peri-implantitis subjects; PD: Probing depth; GI: Gingival index

2.2 样本 α 多样性

用 Illumina Miseq 平台对细菌 16S rRNA 进行龈下微生物多样性检测。获得 156 507 条平均读长为 225 bp 的优质序列(每样本读取平均 17 390 条)。应用软件 Mothur 中的 summary.single 命令, 计算 5 种常用的生物多样性指数, 两组样本有着相似的多样性指数(P>0.05, 表 2), 盖度均大于 95%, 说明样本合理。

2.3 稀释曲线

表 2 两组样本的多样性指数

Table 2 Diversity indexes calculated for subjects

Group	n	Chao	Ace	Simpson	Shannon	Coverage
D	5	2 050.96 \pm 428.32	2 924.12 \pm 562.29	0.039 \pm 0.02	4.85 \pm 0.94	0.97 \pm 0.01
N	4	2 041.75 \pm 452.83	2 506.57 \pm 374.20	0.090 \pm 0.09	4.03 \pm 0.66	0.96 \pm 0.01
P		0.976	0.245	0.141	0.185	0.202

随着样本序列的增加,获得的 OTU 数目变化不大,说明测序数据量合理(图 1)。

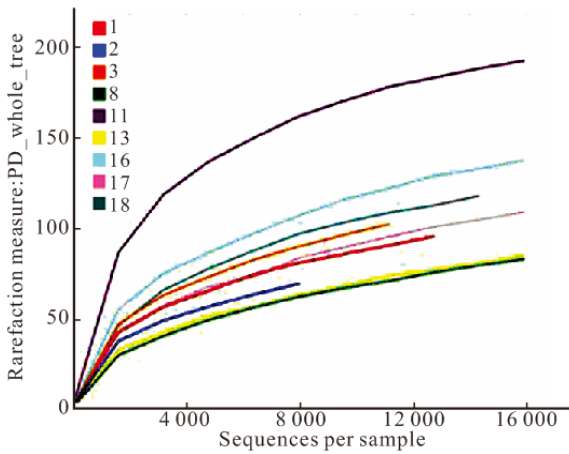


图 1 D 组和 N 组各样本的稀释曲线

Fig 1 The rarefaction curves for the abundance in D and N group

2.4 物种丰度差异性

2.4.1 种植体周围炎组和正常组中的差异菌属 LEfSe 法计算出 D 组和 N 组中的差异菌属,柱形图表示在两组中的差异菌属信息,红色表示在 D 组中高出,绿色表示在 N 组中高出;所有菌在门、纲、目、科、属水平的差异信息用饼形图表示,饼形图红色表示在 D 组中高出,绿色表示在 N 组中高出,最内圈表示门水平的差异,依次往外的圈表示纲、目、科、属。红色扇形面积表示在此范围内的菌均有差异(图 2)。

在门的水平:螺旋体门(*Spirochaetes*)在 D 组高出;在纲的水平:螺旋体纲(*Spirochaetes*)及变形菌纲(*Betaproteobacteria*)在 D 组高出;在目的水平:螺旋体目(*Spirochaetales*)及支原体目(*Mycoplasmatales*)*在 D 组高出;在科的水平:螺旋体科(Spirochaetaceae)、支原体科(Mycopla-*

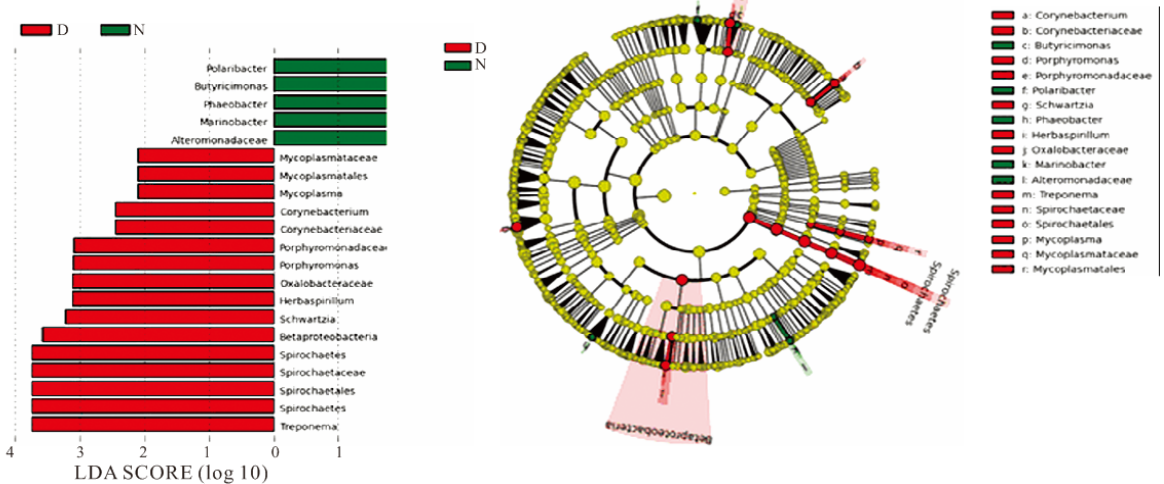


图 2 D 组和 N 组的差异菌门及菌属信息

Fig 2 The most frequent phyla and frequent genus in D and N group

smataceae)、紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*)、棒状杆菌科(*Corynebacteriaceae*)及草酸杆菌科(*Oxalobacteraceae*)在 D 组高出,交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)在 N 组高出;在属的水平:密螺旋体属(*Treponema*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、*Schwartzia*、支原体属(*Mycoplasma*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)及棒状杆菌属(*Corynebacterium*)在 D 组高出;而 *Butyricimonas*、*Phaeobacter*、极地杆菌属(*Polaribacter*)及交替单胞菌属在 N 组高出。

2.4.2 种植体周围炎组和正常组中的优势菌属 D 组中优势菌属(>1%)分别为:新月形单胞菌属(*Selenomonas*), 10.3%;假单胞菌属(*Pseudo-*

monas), 9.0%;梭杆菌属(*Fusobacterium*), 7.7%;链球菌属(*Streptococcus*), 4.9%;密螺旋体属, 4.8%;产线菌属(*Filiactor*), 2.6%;消化链球菌属(*Peptostreptococcus*), 2.1%;真细菌属(*Eubacterium*), 1.8%;韦荣球菌属(*Veillonella*), 1.7%;*Schwartzia*, 1.6%;奈瑟菌属(*Neisseria*), 1.5%;草螺菌属、放线菌属(*Actinomyces*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)、二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)、孪生球菌属(*Gemella*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、卟啉单胞菌属、*Parvimonas*、*Sediminibacterium* 等均为 1% 左右。N 组的优势菌属为梭杆菌属, 20.7%;韦荣球菌属, 6.9%;链球菌属, 6.0%;产线菌属, 5.7%;假单胞菌属, 3.7%;

放线菌属, 2.6%; 消化链球菌属, 2.4%; 新月形单胞菌属, 2.2%; 孪生球菌属, 1.4%; *Pseudoramibacter*, 1.3% 等。

2.5 PCoA 分析及聚类分析

2.5.1 PCoA 分析

图中的一个点代表一个样品, 基于 3 种主成分, 颜色相同的点属于同一种分组, 两个点之间的距离越近, 说明两个样品的微生物群落差异越小(图 3)。本研究采用主成分 PC1 和次要成分 PC2 分析, PC1 贡献度为 33.12%, PC2 贡献度为 28.27%, 说明两组间差异有统计学意义。

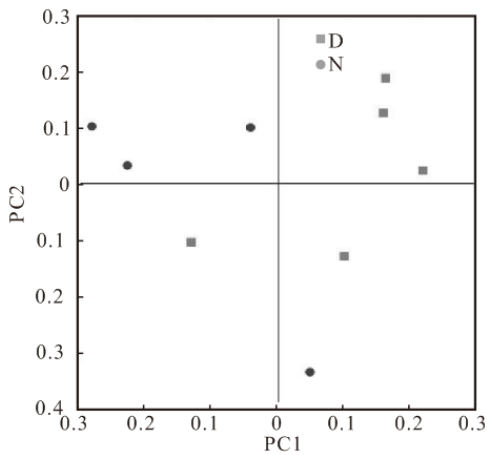


图 3 D 组和 N 组的主成分分析

Fig 3 Weighed and normalized Principal Component Analysis (PCoA) of in D and N group

2.5.2 聚类分析

分别按照所有样品和分类在属水平聚类后绘出 heatmap 图(图略), 其中, *Leptospirillum*、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomina*)、布氏杆菌属(*Brucella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等菌属的含量在 D 组所有样本均高于 N 组所有样本; *Solobacterium*、*Sulfitobacter*、*Blastopirellula*、*Mogibacterium* 等菌属含量在 D 组所有样本均低于 N 组所有样本。

3 讨论

Illumina Miseq 高通量测序平台因其可以更完全地覆盖特定可变区, 故能更准确的获得微生物群落多样性的组成信息, 测序原理精确、数据准确度高, 用于研究复杂样品的微生物群落的组成, 具有先进性^[3]。16S rRNA 存在于所有生物中, 由于其结构与功能上的高度保守性, 目前作为微生物分类研究中最常用的分子钟, 该基因有 9 个高变区(V1~V9), V4 区是其最准确的区域之一^[4]。在本研究中, 我们利用 Illumina Miseq(2×250)平台, 并基于

16S rRNA V4 高变区来研究种植体周围炎龈下微生物多样性, 尚属首次。但是, 由于种植体周围炎样本采集困难, 龈下菌斑中微生物含量较低, 本次研究共采集 20 例样本, 仅有 9 例满足测序要求, 因此, 如何提高种植体周围炎这样低 DNA 含量的样本的测序能力, 值得进一步研究。

本次研究直接采集种植体周围炎龈下菌斑, 具有直接性及代表性。我们对所有样本的 OTU 分类及 α 多样性进行了分析。平均每样测序 17 000 条以上, 测序深度良好, 去除嵌合体后共得到 156 507 条序列。以 97% 序列相似性为阈值, 共获得 4 402 个 OTU。另外, 其中 133 条序列不能识别, 提示在种植体周围可能存在目前研究手段还不能识别的菌属。稀释曲线平缓, 盖度均大于 95%, 显示本次研究的覆盖度良好。而 16S rRNA 克隆文库法测序的结果中, 总测序只有几百至一千多个克隆^[5]。高通量测序深度明显要高于 DGGE 或 16S rRNA 克隆文库法等方法。

本研究对两组的微生物群落结构进行了分析。种植体周围炎优势菌属与已报道的唾液中的优势菌属相比较发现, 链球菌属、放线菌属、奈瑟菌属及韦荣球菌属有检出, 但是相对含量较低^[6], 这暗示着种植体周围炎的微生物群落结构与唾液中的微生物有联系, 但由于其处于厌氧环境, 微生物群落结构不尽相同。

种植体周围炎因其临床表现与牙周炎有许多相似之处, 因此很多学者对这两种疾病之间的相关性做了很多研究^[7]。Casado 等^[8]的研究结果显示, 牙周炎患者种植修复后患种植体周围炎的风险是健康者的 4 倍。放线杆菌属、卟啉单胞菌属等是公认的牙周致病菌属, 而 Ata-Ali 等^[9]的研究表明, 这两种菌属也是种植体周围炎组织中主要分布的细菌, 但与健康的种植体周围相比, 其微生物结构更为复杂。Quirynen 等^[10]的研究也表明, 种植体周围炎的微生物中活跃的可能不止是牙周炎致病菌属。在对样本主成分进行分析时, 我们发现 D 组集中于二、三、四象限, 而 N 组主要集中于第一象限, 说明两组间确实存在差异。进一步利用 LEfSe 法分析两组细菌的群落组成时, 发现在属的水平上, 密螺旋体属、草螺菌属、*Schwartzia*、支原体属、卟啉单胞菌属及棒状杆菌属在 D 组高出; *Butyricimonas*、*Phaeobacter*、极地杆菌属及交替单胞菌属在 N 组高出。且密螺旋体属、草螺菌属、*Schwartzia* 及卟啉单胞菌属均为 D 组的优势菌属, 而密螺旋体属、卟

淋单胞菌属与牙周炎的发生发展相关^[11]。这说明种植体周围炎相关的细菌与牙周炎的致病菌的确存在一定的联系。但是,除了这些疑似牙周炎致病菌外,还有支原体属、新月形单胞菌属、假单胞菌属等菌属在种植体周围炎中的作用值得关注。da Silva 等^[12]运用了 16S rRNA 克隆技术来研究种植体周围炎中微生物的多样性,结果显示健康种植体龈下微生物中放线菌属、奇异菌属(*Atopobium*)、*Gemella*、金氏菌属(*Kingella*)等菌属含量较多,而在种植体周围炎中,梭杆菌属、小类杆菌属(*Dialister*)及链球菌属等菌属含量较高,并说明种植体周围炎中主要以厌氧菌为主。Koyanagi 等^[13]的研究发现种植体周围炎较牙周炎的微生物多态性丰富,且牙周炎相关致病菌在种植体周围炎中呈现出较低的检出率。Tamura 等^[14]的研究表明种植体周围炎适合专性厌氧细菌的生长,不仅是牙周相关的细菌在种植体周围炎中起作用,而且有其他大量的革兰阴性菌也在种植体周围炎中发挥着作用。Al-Radha 等^[15]的研究结果表明,种植体周围菌斑中大约有 26 种微生物,致病菌种类在菌斑样本中的比例分别为:浅牙周袋内为 82%,中度牙周袋内为 51%,而深牙周袋内为 63%,并发现病变的早期主要为梭杆菌和普氏菌属,随着病变的发展出现微生物的多样性。由此可见,既往低通量研究的结果也很好地支持了本研究的结果。

综上所述,种植体周围炎细菌的生存环境虽然处在厌氧环境中,但呈现出了丰富的微生物多态性。与此同时,种植体周围炎由于受到解剖位置及病理因素的影响,其致病相关微生物与牙周致病微生物有联系,但仍可能有其他的致病微生物参与病变的进程。种植体周围微生物与唾液中的微生物也有联系,但存在差异。种植体周围炎相关细菌或优势菌属在其发生发展中的功能,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Norowski PA Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009; 88(2): 530-543.
- 2 Bürgers R, Witecy C, Hahnel S, *et al.* The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*.

- Arch Oral Biol, 2012; 57(7): 940-947.
- 3 Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, *et al.* Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics*, 2014; 15: 96. doi: 10.1186/1471-2164-15-96.
- 4 Zhao L, Wang G, Siegel P, *et al.* Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. *Sci Rep*, 2013; 3: 1163. doi: 10.1038/srep01163.
- 5 Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, *et al.* Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2013; 40(3): 218-226.
- 6 Yang F, Zeng X, Ning K, *et al.* Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J*, 2011; 6(1): 1-10.
- 7 Swierkot K, Lottholz P, Flores-de-Jacoby L. Mucositis, peri-implantitis, implant success, and survival of implants in patients with treated generalized aggressive periodontitis: 3- to 16-year results of a prospective long-term cohort study. *J Periodontol*, 2012; 83(10): 1213-1225.
- 8 Casado PL, Pereira MC, Duarte ME, *et al.* History of chronic periodontitis is a high risk indicator for peri-implant disease. *Braz Dent J*, 2013; 24(2): 136-141.
- 9 Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernández AJ, *et al.* Peri-implantitis: associated microbiota and treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2011; 16(7): e937- e943.
- 10 Quirynen M, Van Assche N. Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *J Clin Periodontol*, 2011; 38(6): 581-589.
- 11 Spyraakis F, Cellini B, Bruno S, *et al.* Targeting cystalysin, a virulence factor of *Treponema denticola*-supported periodontitis. *Chem Med Chem*, 2014; 9(7): 1501-1511.
- 12 da Silva ES, Feres M, Figueiredo LC, *et al.* Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. *Clin Oral Implants Res*, 2014; 25(10): 1192-1199.
- 13 Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, *et al.* Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol*, 2010; 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5104.
- 14 Tamura N, Ochi M, Miyakawa H, *et al.* Analysis of bacterial flora associated with peri-implantitis using obligate anaerobic culture technique and 16S rDNA gene sequence. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013; 28(6): 1521-1529.
- 15 Al-Radha AS, Pal A, Petteimerides AP. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dent*, 2012; 40(11): 989-998.

(2014-09-15 收稿, 2014-12-16 修回)

编辑 余琳