

错颌畸形不同矫治器患者菌斑微生物多样性及群落分析*

谢思洪^{1,2,3}, 蒋倩^{1,2,3}, 陈虹^{1,2,3}, 郑蕾蕾^{2,3,4△}, 杨德琴^{1,2,3△}

1. 重庆医科大学附属口腔医院北部院区 牙体牙髓科(重庆 401147); 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室(重庆 401147);
3. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验(重庆 401147); 4. 重庆医科大学附属口腔医院北部院区 正畸科(重庆 401147)

【摘要】目的 比较无托槽隐形矫治和传统托槽固定矫治患者菌斑的菌群结构及其差异。**方法** 招募使用固定矫治器和隐形矫治器的正畸患者各10名,分别采集颊舌侧菌斑,利用Illumina测序平台,基于16S rDNA序列,对40个菌斑样本进行微生物多样性和群落结构分析。**结果** 固定矫治颊侧菌斑(FB组)的物种多样性、丰富度及均匀度均高于隐形矫治颊侧(IB组)及舌侧菌斑(IL组)($P<0.05$),固定矫治舌侧菌斑(FL组)表现出较大的个体差异;各组菌群结构总体相似,但一些细菌的相对丰度存在显著差异,其中IB组放线菌、罗氏菌等与龋病及牙周病相关的菌群相对丰度更高($P<0.05$);FB组具有显著差异的关键菌群较为丰富,包括粪杆菌、双歧杆菌、肠杆菌、乳酸杆菌等。**结论** 隐形矫治与固定矫治的菌斑微生物丰度、多样性和群落组成存在显著差异,且可能参与龋病、牙周病等正畸并发症的进展,无论佩戴何种矫治器,均需加强口腔卫生维护。

【关键词】 隐形矫治 固定矫治 菌斑生物膜 微生物

Microbial Diversity and Community Analysis of Dental Plaques in Orthodontic Patients Wearing Invisible Appliances and Fixed Appliances XIE Si-hong^{1,2,3}, JIANG Qian^{1,2,3}, CHEN Hong^{1,2,3}, ZHENG Lei-lei^{2,3,4△}, YANG De-qin^{1,2,3△}. 1. Department of Conservative and Endodontic Dentistry, North Branch, Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China; 2. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China; 3. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education Institutions, Chongqing 401147, China; 4. Department of Orthodontics, North Campus, Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China

△ Corresponding author, ZHENG Lei-lei, E-mail: zhengleileicqmu@hospital.cqmu.edu.cn; YANG De-qin, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the microbial diversity and community structure of dental plaques in orthodontic patients with invisible appliances and fixed appliances and to study the differences. **Methods** Ten orthodontic patients wearing invisible appliances (I) and ten wearing fixed appliances (F) were recruited. Dental plaques were collected from both buccal (B) and lingual (L) sides. Based on 16S rDNA, 40 dental plaque samples were analyzed after Illumina sequencing. **Results** The microbial diversity, abundance and evenness of the FB group were significantly higher than those of the IB and IL groups ($P<0.05$), while the FL group showed substantial individual differences. The community structures were generally similar among the four groups, but significant differences in the relative abundance of some bacteria were found. The IB group showed higher abundances of *Actinomycetes* and *Rosella* ($P<0.05$), which were considered to be involved in dental caries and periodontal diseases. Some key communities showing significant differences were significantly enriched in the FB group, including *Coprobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacterium*, *Lactobacillus*, etc.. **Conclusion** Dental plaques in patients wearing invisible appliances and fixed appliances showed significantly different microbial abundance, diversity and composition, which may be involved in orthodontic complications such as dental caries and periodontal diseases. Orthodontic patients need strengthened measures for oral hygiene maintenance, no matter what kind of appliances they wear.

【Key words】 Invisible orthodontic Fixed orthodontic Dental plaque Microbiota

错颌畸形是口腔临床三大常见疾病之一,对患者面部轮廓影响较大,严重危害患者的身心健康及生活质量^[1]。正畸治疗可改善错颌畸形患者牙颌面部的美观与功能,但传统固定矫治中的托槽、颊管等配件增加了口腔清洁

难度,为菌斑堆积提供了有利场所,从而促进龋病、牙周病等口腔疾病的发生,威胁正畸患者的口腔健康和治疗效果^[2-3]。近年来,具有美观舒适、摘戴简单、便于清洁等优点的无托槽隐形矫治器成为了正畸治疗新的选择^[4]。

口腔作为人体五大菌库之一,包含超过700种不同的微生物,它们与口腔健康状况密切相关^[5]。无托槽隐形矫治器是否会影响口腔微生态目前仍有争议^[6-8],其与传统托槽固定矫治对口腔微生态的影响是否具有差异也较少

* 国家自然科学基金项目(No. 31970783)和重庆市医学重点学科建设项目(2011年55号)资助

△ 通信作者,郑蕾蕾, E-mail: zhengleileicqmu@hospital.cqmu.edu.cn; 杨德琴, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

被报道,有待进一步研究。

由于唾液成分来自于口腔各生态位点,目前大多数学者选取唾液样本来探究正畸治疗对口腔菌群的影响^[9]。牙菌斑作为龋病、牙周病等正畸常见并发症的始动因子,其菌群结构的变化值得特别关注^[10]。本研究采取正畸患者的菌斑样本,基于高通量测序技术探究正畸治疗患者的口腔微生物群落特征,结合多元统计分析手段,比较无托槽隐形矫治和传统托槽固定矫治引起的牙菌斑生物膜群落结构的差异,以评估不同类型正畸矫治器对口腔微生态及口腔健康的潜在影响。

1 材料和方法

1.1 样本采集

本研究以2020年11月-2021年2月期间在重庆医科大学附属口腔医院正畸科就诊的患者作为研究对象,纳入标准为:①年龄18~35岁;②除第三磨牙外,口内无恒牙缺失;③无泛发性龋齿,无牙髓病及根尖周病;④无牙周病及口腔黏膜疾病;⑤取样前3个月内未接受过抗生素治疗;⑥无全身系统性疾病,无长期服药史等。参考相关研究文献,我们选取正在进行固定矫治及隐形矫治的正畸患者各10名,佩戴矫治器均达6个月以上^[11-13]。其中固定矫治组年龄(22.8±3.12)岁,佩戴矫治器(15.8±7.55)个月,隐形矫治组年龄(24.8±3.49)岁,佩戴矫治器(16.8±7.19)个月。各组样本基线资料包括性别、年龄及治疗时间等组间比较差异无统计学意义,具有可比性。该实验已获得本院伦理委员会批准(2021036)。整个实验过程已与

受试者沟通,均签署知情同意书。

受试者在菌斑采集前1 h须禁食禁饮。取样时以棉卷隔湿取样部位,用无菌挖匙刮取第一磨牙唇颊面及腭舌面龈上菌斑,置于装有1 mL PBS缓冲液的不菌EP管中,冰浴下运送至实验室-80 °C保存。

所有样本分为4组:①隐形矫治患者唇颊侧菌斑(1B组, $n=10$);②隐形矫治患者腭舌侧菌斑(1L组, $n=10$);③固定矫治患者唇颊侧菌斑(FB组, $n=10$);④固定矫治患者腭舌侧菌斑(FL组, $n=10$)。

1.2 DNA提取、PCR扩增及高通量测序

利用CTAB方法纯化分离样本中的基因组DNA,定量测定DNA的纯度及浓度^[14]。用特定的引物在30 μ L反应体系中扩增16S rDNA V3~V4高变区。具体引物片段为341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNVTGGTWTCTAAT-3'(生工生物工程上海股份有限公司)。30 μ L PCR反应体系: High-Fidelity PCR Master Mix 15 μ L, 引物各0.2 μ mol/L, 模板DNA 10 ng。PCR扩增条件为: 98 °C预变性1 min, 随后进入30个扩增循环,包括98 °C变性10 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 最后于72 °C保温5 min。将PCR产物进行混样、纯化,经精确定量和检测合格后,使用Illumina MiSeq平台进行高通量测序。

1.3 生物信息学分析

经Illumina MiSeq测序,共获得3 482 592个有效序列,平均每个样本87 065个序列,平均长度为628 bp。如图1红色箱线所示,Specaccum物种累积曲线表现由急剧上升逐

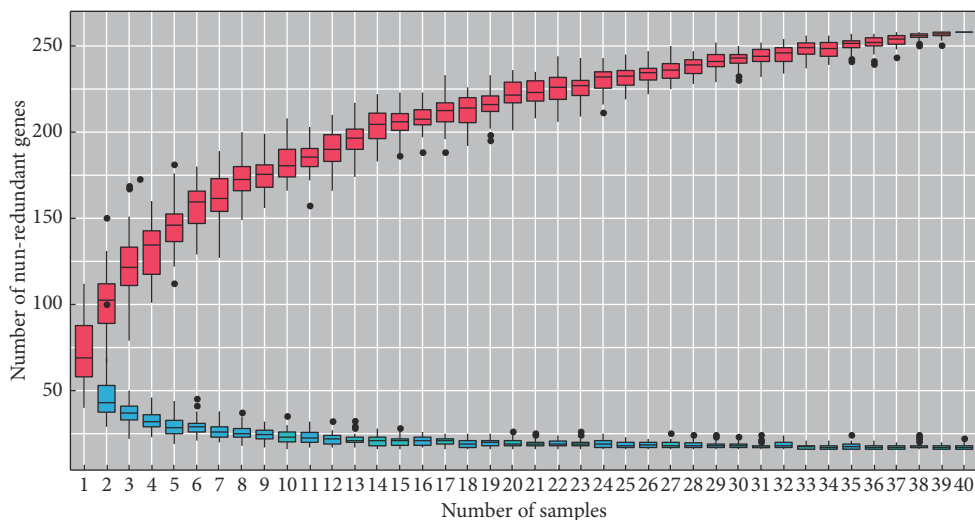


图1 Specaccum物种累积曲线

Fig 1 Species accumulation curve

Red box: The total number of species in the sample, and the total red box line constitutes the accumulation curve. Blue box: The number of common species in the sample taken, and the total blue box line forms the common quantity curve.

渐趋于平缓,表明此调查环境中物种的组成不会随着样本量的增加而发生变化;同时,共有量曲线(图1蓝色箱线)也反映了持续抽样下此环境中的共有物种也趋于饱和,说明每组实验抽样测序量充分,可以对本研究数据进行分析。

本实验基于DADA2方法对原始数据进行质量过滤和序列去噪,在各个水平(如门、科、属、种等)对细菌的种系发育信息进行分析^[45]。利用QIIME2软件计算各组样本Shannon、Simpson、Chao和ACE指数,以评估样本的Alpha多样性。采用基于系统发生树的方法通过加权主坐标分析(PCoA)进行Beta多样性分析,观察不同样本和组别间群落分布的差异。基于加权UniFrac距离的相似性分析(analysis of similarity, Anosim)对各组的物种组成和群落结构进行差异性检验。通过LEfSe分析检测物种丰度有显著性差异的微生物类群,从而筛选关键的生物标记物。

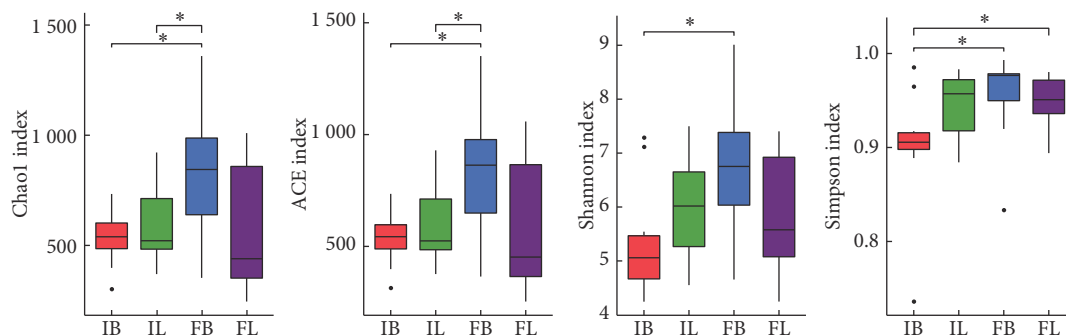


图2 Alpha多样性分析

Fig 2 Alpha diversity analysis

* $P < 0.05$.

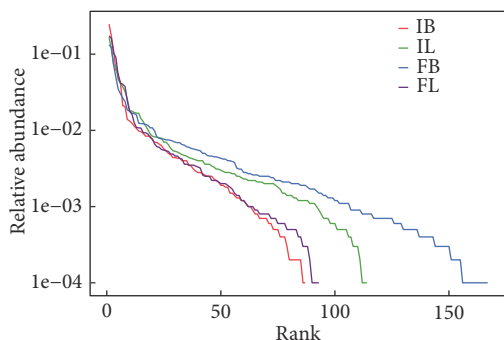


图3 等级-丰度曲线图

Fig 3 Rank-abundance curve

2.2 Beta多样性分析

采用PCoA主坐标分析法分析样品间物种多样性差异。如图4(左)所示,各组的物种主成分较类似,组内差异相对较小,但FB组样本点之间相距较远且比较分散。通过Anosim相似性分析(图4右),显示IB、IL、FL组的分

1.4 统计学方法

两组间Alpha多样性指数比较采用 t 检验,门和属水平各组间优势菌群相对丰度的比较采用ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Alpha多样性分析

通过计算Alpha多样性指数分析所有样本的物种多样性和丰富度。如图2所示,FB组菌斑的Chao1指数和ACE指数高于IB组及IL组菌斑($P < 0.05$),表明固定矫治颊侧菌斑物种丰度较高。Shannon指数和Simpson指数表明,FB组菌斑的菌群多样性高于IB组菌斑($P < 0.05$)。FB组菌斑与FL组菌斑相比,IB组菌斑与IL组菌斑相比,Alpha多样性无显著性差异($P > 0.05$)。等级-丰度曲线(图3)显示,FB组菌斑的丰富度及均匀程度最高,IL组菌斑丰富度高于IB组及FL组菌斑。

组信息较好,组间差异大于组内差异($R > 0, P < 0.05$)。

2.3 物种组成分析

本实验从40个菌斑样本中共检出可分类细菌35门80纲119目160科257属146种。各组样本中细菌的相对丰度如图5所示。其中,优势菌门主要包括:放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)厚壁菌门(*Firmicutes*)等。最主要的优势菌属有放线菌属(*Actinomyces*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、罗氏菌属(*Rothia*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)等。各组间优势菌基本一致,但相对丰度有所不同。

2.4 物种组间差异分析

如图6所示,IB组相较于FB组、IL组放线菌门及放线菌属相对丰度显著较高($P < 0.05$)。与FB组比较,罗氏菌属在IB组中相对丰度显著较高($P < 0.05$)。LEfSe分析组间具有显著差异的物种分类,筛选出关键菌群。如图7所

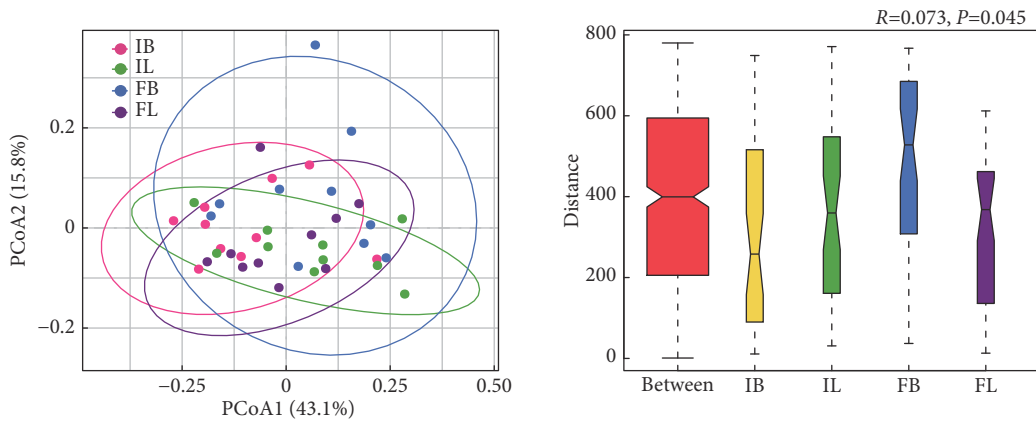


图 4 Beta多样性分析

Fig 4 Beta diversity analysis

Left: PCoA analysis; Right: Anosim analysis box diagram.

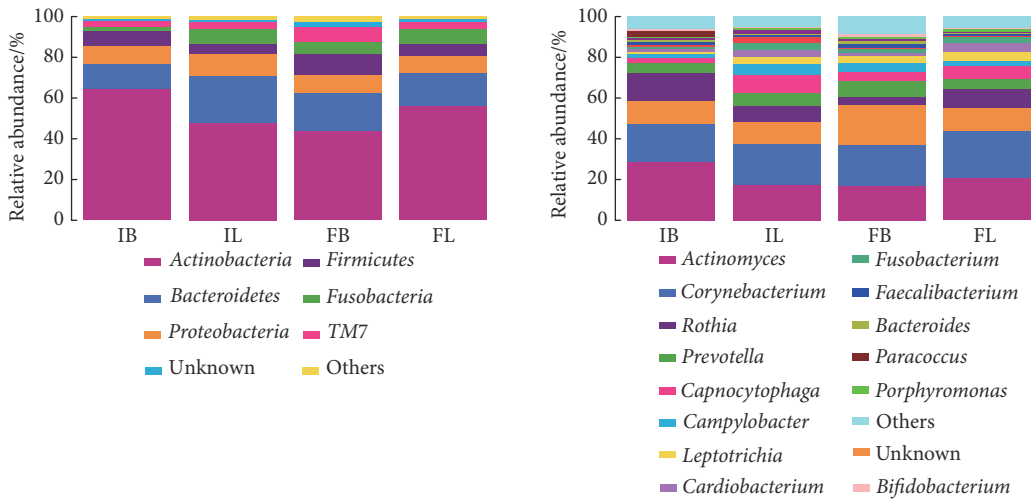


图 5 门及属水平细菌群落组成

Fig 5 Community composition at the phylum and genus level

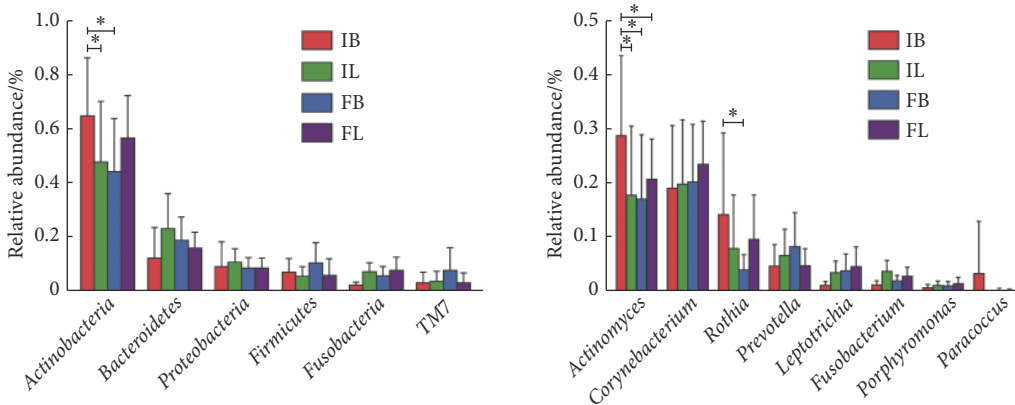


图 6 优势菌门及优势菌属相对丰度

Fig 6 Relative abundance of the dominant phyla and genera

*P<0.05.

示,丙酸杆菌科、纤毛菌属在FL组中显著富集,芽单胞菌门在IB和FB组中显著富集,梭杆菌门在IL组和FL组中相

对丰度较高。FB组具有显著差异的菌群种类较为丰富,包括粪杆菌、双歧杆菌、肠杆菌、乳酸杆菌、柯林斯氏

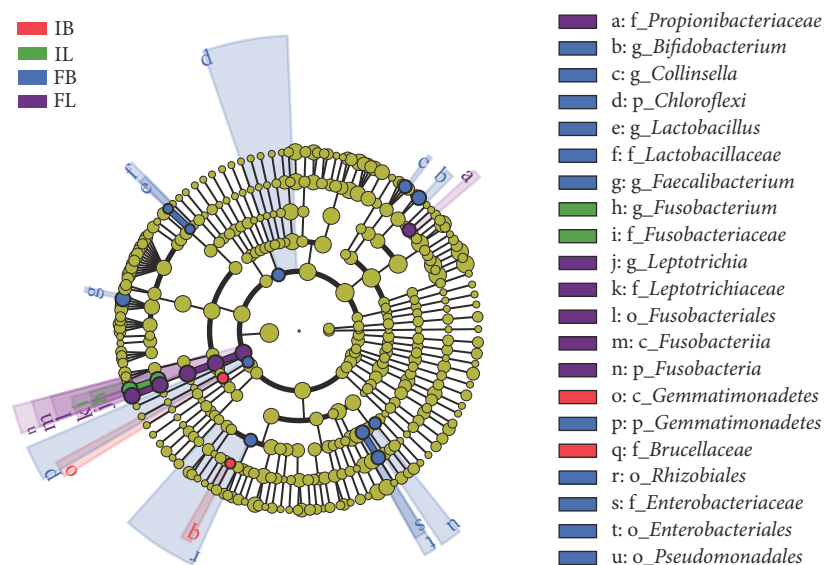


图 7 LefSe多级物种层级图

Fig 7 LefSe cladogram

菌、绿弯菌、假单胞菌等。

3 讨论

本研究采集了无托槽隐形矫治患者及传统托槽固定矫治患者的唇颊面及腭舌面菌斑样本,以初步了解佩戴不同类型矫治器的正畸患者的菌斑微生物群落差异,进一步探讨口腔微生物与口腔疾病之间的可能关系。

本研究结果表明,与隐形矫治颊舌侧菌斑相比,固定矫治患者的颊侧菌斑物种丰度及多样性更高,而固定矫治与隐形矫治患者的舌侧菌斑相比较,物种丰富度及多样性差异无统计学意义。这可能是由于固定矫治组中托槽、弓丝及其附件的存在为各种菌斑的堆积提供了良好的条件,使得颊侧菌斑的细菌群落结构变得相对复杂^[16]。从等级-丰度曲线和Beta多样性分析也可以看出,口腔微生物区系的丰富性和均匀性受两种不同正畸矫治器的影响。其中固定矫治颊侧组菌斑的丰富度最高,且样本间差异最大。研究结果与SUN等^[14]对固定矫治患者微生物菌群的研究结果一致,但与部分报道有所不同。有研究显示,与健康对照组相比,固定矫治与隐形矫治的物种丰富度及均匀度均更低,二者之间的物种多样性无显著差异^[11]。这些结果不一致的原因可能是由于受到取样时间、取样位点等因素的影响。通常多样性高的微生态环境比多样性低的微生态环境更稳定或更健康^[17]。健康人群菌斑细菌多样性高于患龋人群,且随着龋病程度的加重,多样性降低^[18]。从该角度来看,隐形矫治对口腔健康的维护不一定优于传统固定矫治,但这不能仅通过物种多样性判断,还需要联合具体物种组成进行分析。

为了进一步确定菌斑群落结构及组成的变化,我们在门和属水平上比较了佩戴两种不同矫治器的患者牙菌斑微生物的相对丰度。结果显示,口腔微生物菌群主要由放线菌门、拟杆菌门和变形菌门等优势菌群组成。这与已有研究结果基本一致,表明不同地区不同人种的口腔微生物群落均较为稳定^[19]。群落组成柱形图显示各组细菌群落结构基本相似,但相对丰度有所不同。值得注意的是,隐形矫治颊侧菌斑中,放线菌及罗氏菌的相对丰度比其他几组显著增高。放线菌是牙菌斑中早期定植的细菌之一,在佩戴矫治器的最初48 h生物膜定植过程中主要位于生物膜的内侧,促进口腔其它细菌的共聚集^[20]。

研究表明,放线菌与龋病的发生发展密切相关,可以通过多种途径将碳水化合物降解成有机酸^[21],在根面龋病损中的检出率及相对丰度较高^[22],也是牙髓病及牙周炎病变中的优势菌种之一^[23-24]。罗氏菌与龋病也有一定相关性,研究显示其存在于牙本质龋和龈下菌斑生物膜的厌氧环境中,在活动性龋齿的儿童中检出较多^[25]。因此,隐形矫治患者的菌斑微生物成分可能与龋病进展相关,可能导致白垩斑及龋病等正畸并发症的发生。另外,继往有研究报道隐形矫治组TM7的相对丰度显著高于固定矫治组,而隐形矫治更易发生与TM7相关的牙周并发症^[11, 26]。本研究结果中,固定矫治患者颊侧菌斑中的TM7菌门相较于其它组更高,虽然差异无统计学意义,但该菌群在不同矫治患者之间的表现仍需进一步探究。

本研究还基于物种丰度的LefSe分析,初步筛选出各组的潜在生物标志物。在固定矫治和隐形矫治患者的舌侧菌斑中,梭杆菌属及纤毛菌属显著较高,二者是口内常

见菌群,可以促进牙菌斑生物膜的形成^[27]。在固定矫治颊侧菌斑中,具有显著差异的菌群种类较为丰富,包括乳酸杆菌、柯林斯氏菌、绿弯菌等,同时也检出粪杆菌、双歧杆菌及肠杆菌等常见的肠道菌群。这与多样性分析结果相似,可见固定矫治颊侧菌斑的组成比其他组更为复杂。

本研究通过16S rDNA高通量测序技术,对无托槽隐形矫治患者及传统托槽固定矫治患者的牙菌斑样本进行了微生物群落差异分析。结果显示,隐形矫治和固定矫治颊侧牙菌斑的微生物丰度和多样性有显著差别,固定矫治的微生物群落多样性相对较高。隐形矫治与固定矫治微生物群落结构基本相似,但一些细菌的相对丰度存在显著差异,其中,与龋病及牙周病相关的微生物如放线菌、罗氏菌在隐形矫治颊侧菌斑中较高。因此,隐形矫治对口腔微生态及口腔健康仍可能产生不利影响。无论佩戴何种类型矫治器,都需要特别注意口腔卫生维护,以防龋病、牙周病等正畸并发症的发生。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- ZOU J, MENG M, LAW C S, *et al.* Common dental diseases in children and malocclusion. *Int J Oral Sci*, 2018, 10(1): 7.
- WISHNEY M. Potential risks of orthodontic therapy: A critical review and conceptual framework. *Aust Dent J*, 2017, 62(Suppl 1): 86–96.
- HUANG Y Z, ZHU Y R, YAN Y. A retrospective study of orthodontic treatment on anterior tooth displacement caused by periodontal disease. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(13): e25181[2022-01-21].<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025181>.
- WHITE D W, JULIEN K C, JACOB H, *et al.* Discomfort associated with Invisalign and traditional brackets: A randomized, prospective trial. *Angle Orthod*, 2017, 87(6): 801–808.
- ZARCO M F, VESS T J, GINSBURG G S. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*, 2012, 18(2): 109–120.
- PATHAK A K, SHARMA D S. Biofilm associated microorganisms on removable oral orthodontic appliances in children in the mixed dentition. *J Clin Pediatr Dent*, 2013, 37(3): 335–339.
- REGO R O, OLIVEIRA C A, DOS SANTOS-PINTO A, *et al.* Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *Am J Dent*, 2010, 23(6): 317–323.
- ZHAO R, HUANG R, LONG H, *et al.* The dynamics of the oral microbiome and oral health among patients receiving clear aligner orthodontic treatment. *Oral Dis*, 2020, 26(2): 473–483.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012, 486(7402): 207–214.
- SAMARANAYAKE L, MATSUBARA V H. Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dent Clin North Am*, 2017, 61(2): 199–215.
- WANG Q, MA J B, WANG B, *et al.* Alterations of the oral microbiome in patients treated with the Invisalign system or with fixed appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2019, 156(5): 633–640.
- GUO R, LIU H, LI X, *et al.* Subgingival microbial changes during the first 3 months of fixed appliance treatment in female adult patients. *Curr Microbiol*, 2019, 76(2): 213–221.
- ZHAO M, LIU M, CHEN W, *et al.* Salivary microbial changes during the first 6 months of orthodontic treatment. *Peer J*, 2020, 8: e10446[2022-01-19].<https://doi.org/10.1128/10.7717/peerj.10446>.
- SUN F, AHMED A, WANG L, *et al.* Comparison of oral microbiota in orthodontic patients and healthy individuals. *Microb Pathog*, 2018, 123: 473–477.
- CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 2016, 13(7): 581–583.
- JONGSMA M A, PELSER F D, VAN DER MEI H C, *et al.* Biofilm formation on stainless steel and gold wires for bonded retainers *in vitro* and *in vivo* and their susceptibility to oral antimicrobials. *Clin Oral Investig*, 2013, 17(4): 1209–1218.
- ZAURA E. Next-generation sequencing approaches to understanding the oral microbiome. *Adv Dent Res*, 2012, 24(2): 81–85.
- GROSS E L, LEYS E J, GASPAROVICH S R, *et al.* Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 4121–4128.
- XIAO C, RAN S, HUANG Z, *et al.* Bacterial diversity and community structure of supragingival plaques in adults with dental health or caries revealed by 16S pyrosequencing. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1145[2022-01-19].<https://doi.org/10.1128/10.3389/fmicb.2016.01145>.
- DIGE I, RAARUP M K, NYENGAARD J R, *et al.* *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology (Reading)*, 2009, 155(Pt 7): 2116–2126.
- TAKAHASHI N. Oral microbiome metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing"? *J Dent Res*, 2015, 94(12): 1628–1637.
- DENG L, ZOU L, WU J, *et al.* Voriconazole inhibits cross-kingdom interactions between *Candida albicans* and *Actinomyces viscosus* through the ergosterol pathway. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 53(6): 805–813.
- XIA T, BAUMGARTNER J C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *J Endod*, 2003, 29(9): 549–552.
- SHIMADA E, KATAOKA H, MIYAZAWA Y, *et al.* Lipoproteins of *Actinomyces viscosus* induce inflammatory responses through TLR2 in human gingival epithelial cells and macrophages. *Microbes Infect*, 2012, 14(11): 916–921.
- JAGATHRAKSHAKAN S N, SETHUMADHAVA R J, MEHTA D T, *et al.* 16S rRNA gene-based metagenomic analysis identifies a novel bacterial co-prevalence pattern in dental caries. *Eur J Dent*, 2015, 9(1): 127–132.
- SORO V, DUTTON L C, SPRAGUE S V, *et al.* Axenic culture of a candidate division TM7 bacterium from the human oral cavity and biofilm interactions with other oral bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(20): 6480–6489.
- BRADSHAW D J, MARSH P D, WATSON G K, *et al.* Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun*, 1998, 66(10): 4729–4732.

(2021-10-08收稿, 2022-03-02修回)

编辑 汤 洁