



周学东, 1987年毕业于华西医科大学, 获医学博士学位, 1988年赴丹麦留学。现任四川大学华西口腔医学院主任医师、教授, 博士生导师, 口腔疾病研究国家重点实验室主任。主要从事口腔微生物与口腔病、全身疾病的基础与临床研究。主持国家“十五”、“十一五”、“十二五”科技攻关及“973 前期”、国家重点专项、自然科学基金重点项目等课题 10 项。发表论文 100 余篇, 获国家级、省部级科技成果奖 8 项。

主编《实用口腔微生物学与技术》《口腔微生态学》《口腔生物膜与感染》《口腔微生物图谱》等专著 16 部。获中国青年科技奖、国家教学名师奖、卫生部有突出贡献的中青年专家等, 任中华口腔医学会副会长、国际牙医师学院 ICD 中国区主席、国际牙科研究会 IADR 中国区主席等。

人类口腔微生物组学研究: 现状、挑战及机遇

周学东^{1,2*}, 徐健³, 施文元^{4*}

¹ 四川大学华西口腔医院, 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川成都 610041

² 四川大学华西口腔医院, 牙体牙髓病科, 四川成都 610041

³ 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 单细胞研究中心, 山东青岛 266101

⁴ 美国加州大学洛杉矶分校牙学院, 加州 洛杉矶 90095

摘要: 全球超过一半的人口患有口腔疾病, 其医护费用与全球十大常见死亡病因的花费相当, 而且口腔感染与早产、动脉粥样硬化、肝硬化、糖尿病、阿尔茨海默病等全身性或慢性疾病显著相关, 因此, 口腔微生物组一直是人类微生物组计划的主要研究对象之一。与人体其他部位比较, 口腔微生物组研究具有取样快捷、宿主反应表征方便、干预手段直接有效等特点; 同时, 超过 65% 的口腔细菌类群已可培养, 诸多代表性菌株的全基因组信息已破译。因此口腔微生物组在菌群内部调控网络及其与宿主互作机制、局部感染对远隔器官的影响机制、以及基于菌群的慢病早期预警等微生物组研究核心科学问题上具备作为模式研究体系与技术示范对象的重要优势。本文在分析口腔微生物组学国际、国内研究现状的基础上, 建议尽快启动中国人口腔微生物组计划(China human oral microbiome project, CHOMP), 通过产学研协同攻关, 开拓基于口腔菌群的口腔及全身系统性疾病的个体化预防、诊断及治疗策略。

关键词: 口腔微生物组, 口腔疾病, 全身系统性疾病, 中国人口腔微生物组计划

基金项目: 国家自然科学基金(81430011, 31425002, 81670978)

*通信作者。周学东, Tel: +86-29-85501841, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn; 施文元, Tel: +01-310-825-8356, E-mail: wshi@dentistry.ucla.edu

收稿日期: 2017-02-14; 修回日期: 2017-04-09; 网络出版日期: 2017-04-14

人体的健康不但依赖于人体自身的基因组,而且由人体共生菌群所塑造与影响。这一“人体微生物组”赋予了人类不依赖于自身进化而获得的复杂个体特征,以至于已被称为“人体第二基因组”。作为人体微生物组的重要定殖部位,人类口腔微生物数量庞大、种类丰富,是微生物-微生物、微生物-宿主之间相互作用的重要竞技场,也是美国国立卫生院人类微生物组计划(human microbiome project, HMP)的主要研究对象之一。新一代测序技术和信息分析技术的联用已将口腔微生物组学研究从低分辨率的单菌种调查迅速提升至高维度的群落整体研究。这些工作正在深入揭示口腔微生物组对口腔乃至全身健康的影响,挖掘其在疾病诊断及治疗效果预测中的作用,推动着口腔微生物组在精准医学(precision medicine)实践过程中的重要贡献。本文在分析口腔微生物组学研究国际、国内现状的基础上,阐述了启动中国人口腔微生物组计划(China human oral microbiome project, CHOMP)的战略意义,以期把握“中国微生物组研究计划”这一契机,发展基于口腔菌群的口腔及全身系统性疾病的个体化预防、诊断及治疗策略,建立与推广中国口腔微生物组产业化技术标准,加速口腔微生物组学研究成果的临床应用,从而为口腔精准医疗(precision oral medicine)做出应有的贡献。

1 口腔及口腔微生物组

口腔是消化道的起始部分,前接口裂与外界环境相通,后经咽峡与咽、呼吸系统及消化系统延续,是人体内部与外界环境物质传递与交换的重要场所,也是病原菌及毒性物质侵入机体的门户。除自身的组织及分泌物(如牙齿、黏膜、舌、唾液)外,

人类口腔中定殖了超过 600 种不同的细菌、病毒、真菌、支原体及衣原体等微生物物种,这些微生物统称为口腔微生物组(oral microbiome)^[1-2]。

1.1 口腔微生物组学研究的重要临床意义和社会意义

口腔微生物组是人体五大菌库之一,是 HMP 重点关注的人体部位(肠道、口腔、皮肤、鼻腔以及泌尿生殖道)。口腔微生物组生态失衡不仅可诱发多种口腔疾病,如龋病、牙髓根尖周病、牙周病、智齿冠周炎、颌骨骨髓炎,还与肿瘤、糖尿病、类风湿性关节炎、心血管疾病、早产等全身疾病紧密相关,对人类健康影响重大^[3]。口腔医学作为与临床医学并列的一级学科,推动全民口腔健康对社会经济发展具有重要意义。根据国际牙科研究协会和美国牙科研究协会(IADR/AADR)报道,口腔疾病影响了全球近 39 亿人,2010 年全球用于牙科疾病治疗的直接费用总计 2980 亿美元,间接费用总计 1440 亿美元,与全球十大常见死亡病因的花费相当^[4]。未经治疗的恒牙龋齿是最常见的口腔疾病,影响全球 35%的人口,重度牙周炎和未经治疗的乳牙龋齿分别影响 11%和 9%的全球人口^[4]。鉴于口腔微生物组与口腔及全身健康的密切关系,美国政府 2015 年启动的“全民个体微生物组检测项目”再次将口腔、皮肤及肠道微生物群落作为主要监测对象,旨在通过大规模人群微生物群落研究,将人类微生物组学研究结果进行临床转化,从人类“第二基因组”中寻找更加精准的疾病预警分子标记。基于口腔疾病诊疗的临床特点,口腔微生物组学研究较人体其他部位微生物组学研究具有取材经济便捷、易于干预和科普教育推广等优势。此外,口腔是环境微生物与人体交流的重要窗口,因此,口腔微生物组学研究将在“中国微生物

组研究计划”中扮演连接环境与人体微生物组学研究的重要纽带，具有重要的战略地位。

1.2 口腔是人体微生物组研究中的领先模式体系

微生物学从孕育、诞生到发展，以至成为生命科学中的一个不可忽略的重要分支，始于人类对口腔微生物的研究。早在 300 多年前，荷兰人列文·虎克使用自制的显微镜，从牙齿表面白色软垢中首次观察到了细菌这种微小的生命体，这一事件被公认为是微生物学的起源^[5]。口腔微生物群落是典型的生物膜，而人类最常见的感染性疾病如龋齿和牙周病是迄今研究最透彻的、由生物膜引发的疾病。口腔生物膜具有多种群特性，是研究微生物之间、微生物-宿主间相互作用的最理想模型之一，也是微生物组学研究的经典模型^[6]。相较于人体其他部位，迄今已有超过 65% 的口腔微生物类群可在体外培养，其代表株的全基因组信息大多数已被破译，而且用于验证口腔微生物致病性的体外多重感染模型及动物模型也相对成熟，这些都为以口腔为模式生态系统的疾病相关人体微生物组学研究的功能验证提供了重要支撑。无独有偶，一些先进的微生物组研究思路与技术手段是依托口腔微生物组率先开发与示范的，如尚难培养微生物的培养技术(SHI 培养基)^[7]、基于荧光原位杂交的高分辨率生物膜空间分布成像方法^[8]、基于特异性抗菌多肽的菌群结构精准调控手段^[9]、基于菌群的新发性儿童慢病的预警方法^[10]等。因此，也许列文·虎克将深为欣慰的是，在其辞世近 3 个世纪之后，口腔微生物组仍然是微生物组研究方法学开发的最佳测试载体之一。

2 口腔微生物组学研究国际前沿

采用高通量宏基因组学技术，从微生物群落

整体出发，是当前研究微生物组与疾病间关系的热点和趋势。宏基因组学技术的发展包括两个方向：一是揭示微生物群落多样性、种群结构及其变化、微生物间相互关系及微生物与环境间的关系；二是通过筛查功能基因，发现微生物群落功能基因及其产物。通过这两方面的研究，达到全面了解微生物群落结构及功能、发掘微生物资源、揭示微生物与疾病间关系的目标。目前，口腔微生物组学研究主要集中于以下方面：(1) 口腔微生物组的生理特点及影响因素；(2) 口腔及全身疾病状态下口腔微生物组的变化；(3) “不可培养”微生物的致病性研究；(4) 人体健康与疾病状态对口腔微生物组的精细调节在疾病风险预警及治疗效果预测中的运用。

2.1 口腔微生物组及其影响因素

口腔微生物组的特点主要包括：(1) 种类复杂：目前全球最大的口腔微生物组数据库 HOMD (human oral microbiome database; www.homd.org) 已收录有 13 门 619 种口腔微生物，其中 65% 的微生物可在实验室培养^[11]。事实上，人类口腔微生物组的复杂程度远超 HOMD 所收录的物种范围。Keijsers 等人发现口腔微生物涵盖 22 个细菌门的 318 个细菌属，其中唾液、菌斑分别定殖了 5600 及 10000 个种系型^[12]。(2) 多层次多位点分布：口腔内既含有脱落表面(黏膜)，也有非脱落的固体表面(牙面及义齿表面)，同时还含有流动的唾液，定殖于不同介质表面(中)的口腔微生物组存在显著的空间特异性。例如，牙菌斑菌群、黏膜菌群、唾液菌群的组成存在显著差异，牙菌斑内定殖的微生物丰富度最高，唾液次之，颊黏膜最低^[13]。Gizani 等人^[14]联合使用高通量测序及常规分析技术分析了健康个体唾液、龈上菌斑、龈下菌斑、

舌部和颊黏膜等生态位点的微生物组,结果显示牙面和舌部微生物数量较其他部位多。Huse 等人^[15]对 200 名志愿者唾液、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 个口腔位点的微生物组进行对比分析,发现棒状杆菌属在口内各位点分布具有差异性:马氏棒状杆菌几乎全部存在于龈上菌斑中,而银色棒状杆菌大部分存在于唾液当中,在硬腭菌群中几乎不存在,提示口腔微生物组的位点特异性,即不同生态栖息位点具有不同的多样性特征。(3) 年龄及牙列更替压力:Dominguez^[16]在新生儿分娩 5 分钟之内收集其口腔标本并对其中的微生物构成进行分析,结果发现顺产胎儿的口腔微生物组的组成与母体产道中的微生物相似,而剖腹产胎儿的口腔微生物组成则与母体的皮肤微生物组成相似。值得注意的是,初生婴儿的口腔、肠道、皮肤微生物组之间并没有差异存在^[16],因而不同部位的微生物的分化时间及过程值得深入研究。健康个体发育成长过程中口腔微生物组发生着动态变化,即随着年龄增长及牙列的更替,口腔微生物组出现生理性改变,不同年龄组人群的微生物组成具有特异性:乳牙列期菌群以变形菌门为优势菌,具有更多的不动杆菌属、莫拉菌属等;在混合牙列、恒牙列期,菌群以拟杆菌门为主;随着年龄增长,拟杆菌门(普氏菌属为主)、韦荣球菌科、螺旋体菌门以及 TM7 丰度逐渐增加^[17]。周学东等人^[13]横向比较研究了 3 天至 76 岁不同年龄段人群的口腔微生物组成,发现恒牙列期(青少年期)唾液微生物以厚壁菌门为主,乳牙列期与恒牙列期(成人期)变形菌门为优势菌,而梭菌属在混合牙列、恒牙列期(老年期)丰度较高。牙菌斑及黏膜菌群也表现出随年龄及牙列替换而改变的特征,提示随着年龄增长存在微生物组的转变。(4) 具有个体间

差异性:Nasidze 等人对全球 12 个国家和地区 120 例健康人群唾液样本进行分析,发现口腔菌群具有个体特异性,但几乎不受地理位置的影响^[18]。

(5) 具有个体内相对稳定性:口腔微生物组在同一个体不同时间点出现的差异性显著低于肠道、皮肤等部位^[19]。Lazarevic 等人^[20]分析了健康个体 29 天内 3 个不同时间点的唾液样本,发现唾液微生物组在 5 天内保持稳定,提示个体的口腔微生物组在短时期内具有相对稳定性。(6) 与遗传背景相关:同卵双生子之间的口腔微生物组相似性高于异卵双生子,提示宿主遗传背景对口腔微生物组结构与功能具有一定影响^[21]。(7) 与口腔及全身系统性疾病密切相关:可实时反映人体健康与疾病状态^[3],在疾病预测及治疗预后评估中具有一定运用前景。

2.2 口腔微生物组与口腔疾病

口腔感染性疾病主要包括龋病、牙龈炎、牙周炎、根尖周炎以及颅颌面部其他软组织和间隙感染。绝大多数口腔感染性疾病为非特异性感染,口腔微生物组以群体的方式参与和(或)促进了疾病的进程。龋病发生发展过程中口腔菌群组成、结构及功能均发生了显著改变,多种细菌在龋病及健康人群之间的分布均有显著差异。更为重要的是,在龋病临床症状出现之前即可检测到口腔微生物组的异常。例如,“奶瓶龋”临床症状出现前,患儿牙面上定殖的口腔微生物群落 α 及 β 多样性均有显著提升,与龋洞已形成儿童的口腔微生物群落相似性增加而与健康儿童口腔微生物群落的相似性减小^[10];成年患龋者健康牙齿上定殖的口腔菌群,其物种间“共现关系”(co-occurrence)明显异于无龋者,微生态群落拓扑结构复杂程度显著降低。在牙龈炎的发生过程中,口腔微生物组的改变是循序渐进而非跳跃式的,改变的程度

与临床症状密切相关,这种改变在同一个体牙龈炎反复出现时具有可重复性^[22]。牙周炎是程度较牙龈炎更严重的牙周组织疾病。牙周炎患者口腔微生物菌群中的梭杆菌、卟啉单胞菌、螺旋体属、产线菌属、优杆菌属、坦纳菌属、霍氏菌属、微单胞菌属、消化链球菌、卡氏菌属等相对丰度显著高于健康人群;而奈瑟菌属、棒状杆菌属、二氧化碳噬纤维菌属、放线菌属等低于健康人群^[23-25]。此外,牙周炎患者口腔微生物组成的改变进一步引入了群落功能基因结构^[23]及基因表达谱系^[26]的改变。其他口腔疾病,如根尖周炎^[27-28]、口臭^[29]、口腔扁平苔藓^[30-31]等患者的口腔微生物组组成与健康人群相比同样存在显著差异。

2.3 口腔微生物组与全身系统性疾病

早在 1891 年, Miller 提出了口腔病灶感染学说,指出口腔微生物感染可进入与其毗邻或较远的身体其他部位,导致多种全身系统性疾病;随后, Billing 等学者推测,感染的牙齿可能是类风湿性关节炎、肾炎、心内膜炎等疾病的病因;该学说的支持者认为,牙菌斑及其代谢产物可进入血液循环系统,导致多种系统性或退行性改变^[32]。因此,通过拔除患牙来治疗全身系统性疾病不仅在牙学界,也在医学界广为流行^[32]。然而,口腔病灶学说一直未得到足够的重视及理论支持。近年来,随着微生物组学研究的深入,口腔微生物组与多种重大慢性非传染性疾病间的关联逐渐被证实,包括消化系统疾病、心血管疾病、肿瘤、早产、糖尿病、类风湿性关节炎、神经系统疾病等。

2.3.1 消化系统疾病: 幽门螺杆菌的主要传播途径包括粪-口途径、口-口途径和胃-口途径。研究发现,幽门螺杆菌在口腔普遍存在,是口腔微生物组的成员之一。Miyabayashi 等人^[33]发现,幽门螺杆菌感染性胃炎的系统性抗菌治疗效果与口腔

中幽门螺杆菌的定殖情况有关,提示口腔的健康状况将直接或间接地影响胃部幽门螺杆菌的感染和再感染。牙龈卟啉单胞菌是口腔常驻菌群,其可导致肠道微生物群落结构紊乱,参与肠道炎症发生^[34-35]。另一口腔常驻菌——具核梭杆菌在正常情况下几乎无法在肠道中检测出,但该细菌在病理状态下可定殖于肠道,在结直肠癌和炎症肠病中发挥重要作用^[36-37],并与结肠癌预后密切相关^[38]。阑尾中可检测出多种口腔常驻细菌(如双球菌属、微单胞菌属和梭杆菌属等),梭杆菌属与阑尾炎严重程度密切相关^[39]。有学者发现肝硬化患者肠道微生物组内含有口腔细菌的入侵^[40],这些入侵的口腔微生物可能通过促进小肠内细菌的过度繁殖而参与肝硬化的发生。通过对肝硬化患者以及肝硬化并发肝性脑病患者粪便微生物群落 16S rRNA 序列分析,发现唾液链球菌可移位到肝硬化患者肠道并过度增殖,是肝硬化以及肝硬化并发肝性脑病的重要诱因^[41]。此外,不良口腔卫生保健行为可改变口腔菌丛,引起肠道微生物失衡,导致炎症肠病的发生^[42]。

2.3.2 心血管疾病: 心血管疾病是指发生于心脏和血管循环系统的病变,包括冠心病、心内膜炎、心肌梗死等,是一类具有较高致死率的多发性疾病。大量横断面研究、病例分析和流行病学调查显示,牙周炎是心血管疾病发生发展的重要危险因素。牙周炎患者牙周袋内牙龈上皮易发生破损,有助于细菌进入全身循环系统,导致菌血症,或异位定殖于体内其他器官。与牙周炎发生密切相关的牙龈卟啉单胞菌可侵袭并定殖于患者动脉粥样硬化斑块中^[43],几乎所有的动脉硬化粥样斑块中均可检出牙龈卟啉单胞菌。此外,动脉粥样硬化斑块还可含有链球菌、韦荣菌、具核梭杆菌、福赛斯坦纳菌^[44-46];梭杆菌、链球菌、奈瑟菌的

分布水平甚至与该疾病的危险信号如血浆胆固醇的水平相关^[43]。牙周病相关细菌可能通过破坏机体免疫,刺激细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子,引起相关炎症及血管内皮损伤,促进动脉粥样硬化斑块形成。

2.3.3 口腔癌:研究发现,口腔癌表面和癌体组织内均存在着特异性微生物,其组成与正常黏膜微生物具有显著差异。Mager 等人^[47]发现,口腔鳞状细胞癌患者唾液中的牙龈二氧化碳噬纤维菌、产黑色素普雷沃菌和缓症链球菌含量明显增加,将这 3 种细菌作为诊断标志物,可诊断约 80% 的口腔鳞状细胞癌,因此,3 种细菌具有作为口腔鳞状细胞癌诊断指标的潜在价值。此外,口腔微生物组也可能参与了远隔器官肿瘤的发生或被远隔器官发生的肿瘤所影响。以胰腺癌为例,患者唾液微生物组中缓症链球菌及长奈瑟菌在胰腺癌患者唾液中的比例较健康人群明显低^[48]。

2.3.4 胚胎发育:妊娠期宫内感染可能导致诸多孕期并发症,是早产的危险因素之一。早产胎儿与足月产胎儿的胎盘微生物群落组成存在明显不同,说明胎盘微生物群落与早产之间可能存在关联。Mendz 等人^[49]通过 Meta 分析发现 761 名早产孕妇中 349 人有宫内感染,病原体多达 87 种,其中除了生殖道病原体外,还包括呼吸道病原体以及常见口腔微生物。与阴道、肠道、呼吸道等位点相比,胎盘微生物群落组成与口腔微生物最相似^[50]。动物模型研究进一步证实,将人唾液和龈下菌斑微生物样本注射入大鼠尾静脉,胎盘中定殖的细菌多为口腔细菌^[51]。在羊水中测出的二氧化碳嗜纤维菌、福赛斯坦纳菌、齿垢密螺旋体、微小消化链球菌、血链球菌、口腔链球菌及伴放线放线杆菌等口腔细菌^[51],提示口腔细菌可能通过入侵羊水,在局部产生病理效应从而导致早产

风险升高。

2.3.5 糖尿病:糖尿病是一种常见的内分泌疾病,由于胰岛素分泌绝对或者相对不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低引起。目前普遍认为,糖尿病与牙周炎之间存在着双向影响关系:糖尿病病人的牙周炎易感性高于血糖正常人群,而牙周炎的有效控制对血糖的控制具有举足轻重的影响。口腔微生物群落作为牙周炎的始动因子,是导致牙周炎症的“罪魁祸首”。牙周炎患者牙周袋内的口腔微生物与人体免疫系统发生复杂的交互作用,产生持续的慢性炎症,部分口腔微生物还可进入血液循环。大量研究证实糖尿病的发生与牙周炎相关:牙周炎可导致全身系统性炎症因子升高,如细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等,并增加机体氧化应激水平,影响胰岛素敏感性和血糖代谢。牙周微生物感染导致的人体炎症反应很可能是促进糖尿病发生的机制之一。与非糖尿病牙周炎患者相比,糖尿病伴牙周炎患者龈下菌群的整体群落结构发生显著改变,多种细菌在两者间出现差异性富集^[52]:兼性双球菌、艾肯菌、月形单胞菌、放线菌、梭杆菌在群落中的比例显著升高^[53]且部分细菌如二氧化碳噬纤维菌属的绝对计数在龈下菌群中也有显著改变^[54]。

2.3.6 类风湿性关节炎:类风湿性关节炎是一种病因未明的以滑膜炎症和关节破坏为主的系统性自身免疫性疾病。关于类风湿性关节炎的病因尚不清楚,其中微生物与类风湿性关节炎的相关性近年来受到诸多关注。流行病学研究显示,牙周炎在类风湿性关节炎患者中普遍存在^[55]。近期研究发现,类风湿性关节炎患者的口腔微生物组存在显著生态失调^[56]。牙周厌氧菌牙龈卟啉单胞菌及伴放线放线杆菌均可通过其毒力因子促进类风湿性关节炎的疾病进程^[55]。

2.3.7 神经系统疾病：偏头痛反复发作于一侧或两侧颞部的搏动性头痛，多见于女性，发病率约为男性的 3–4 倍，发病年龄多见于 25–34 岁。含硝酸盐类食物经细菌代谢产生亚硝酸盐，并最终还原为一氧化氮，被认为是引起偏头痛主要原因之一。近期研究发现，偏头痛患者口腔微生物组编码与硝酸盐、亚硝酸盐和一氧化氮代谢相关酶的基因显著富集，提示口腔中的细菌可能通过“硝酸盐–亚硝酸盐–一氧化氮”途径参与偏头痛的发生^[57]。

阿尔茨海默病是一种起病隐匿、进行性、发展性的神经系统退行性疾病，临床症状包括记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等。早在 20 世纪 90 年代，Miklossy 等人就提出，口腔微生物与阿尔茨海默病的发生有密切关系^[58]；通过分子生物学技术手段从脑组织中检测到口腔源性螺旋体^[59]及牙龈卟啉单胞菌脂多糖^[60]，给予了这一假说有力的支持。口腔细菌及其释放的内毒素在侵入大脑后，可能使小胶质细胞活化，进一步导致促炎症细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 的释放，而脑组织长时间暴露于高浓度的 TNF- α 和 IL-1 中，可使细菌或内毒素更容易渗入脑组织加重疾病临床症状^[61]。

2.4 “不可培养”微生物的致病性研究

宏基因组学技术的快速发展使得高通量解析口腔微生物组的变化、发掘新的可疑致病菌成为可能。然而，对于新的、可疑的、尚未被培养的致病菌(群)，其毒力及致病机制验证是主要的技术瓶颈。目前的研究策略主要包括：(1) “不可培养”口腔微生物的可培养化。Tian 等人在对常用培养基关键营养成分进行深入分析的基础上，开发研制了新一代 SHI 培养基^[62]。经 PCR-DGGE 及 454 焦磷酸测序验证，SHI 培养基可最大限度还原口

腔微生物群落多样性及组成。在此基础上成功地从口腔微生物组中分离出以往认为不可培养的细菌，如微生物界“暗物质”TM7，并研究了该菌种的形态学特征、生长特点及致病性^[7]，为深入探究口腔微生物组在人体健康及疾病中的作用奠定了重要基础。(2) 菌群功能/状态的单细胞功能成像、分选与测序。既然菌群中大部分细胞难以培养，绕过细菌分离培养难关，直接通过单细胞功能成像技术，实现菌群功能/状态的实时识别也是一种策略。现有的活体单细胞表型分析技术，如荧光流式细胞仪，通常无法分析没有生物标识物或无法标记的微生物细胞。而基于单细胞拉曼成像的拉曼组与元拉曼组技术^[63]，可无需标记、不依赖于细胞扩增，在单个细菌细胞精度快速测量针对特定底物的细胞活性^[64]、细胞中化合物种类与含量^[65-66]、细胞应激反应及其机制^[67]、药敏性与耐药性^[68]、物种之间的代谢互作^[69]等关键表型。在此基础上，近期发明的单细胞拉曼弹射分选技术^[70]、单细胞拉曼流式分选技术^[71]、单细胞微液滴分选技术^[72]等共同组成的“活体单细胞拉曼分选”(RACS)技术体系^[73]可根据活体细胞的功能，在单细胞精度实现菌群功能及状态的实时识别，进而实现基于功能分选的单细胞测序和单细胞培养^[63]。

2.5 口腔微生物组在疾病风险与治疗效果预测中的作用

口腔作为消化系统的入口，为连通人体内外的交通枢纽。口腔微生物组受到人体健康与疾病状态的精细调节，并可敏感地对这些调节因素迅速产生适应性调整，放大机体发生的临床前症状。此外，口腔微生物组在疾病状态下的改变具有渐进式、可重复性的特点。口腔微生物组的以上特点提示其在疾病的风险预警及疗效预测中具有重

要价值。

以龋病为例,传统龋病风险评估措施包括单一细菌的微生物参数(如变异链球菌和乳杆菌菌落计数)、唾液生化参数(唾液流速、pH 值、缓冲能力检测)、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^[74]。上述评估参数和检测模型存在根本的局限性^[75],如主观性、费时费力、无法远程监控,并且基于“既往龋病经历”的风险评估无法弥补龋病已带来的不可逆性损伤。因此,这些龋病风险评估模型尚未能得到广泛的临床应用。Teng 等人通过高通量测序技术发现口腔菌群变化先于龋病临床症状出现,基于此构建了“龋病的菌群指数”(microbial indicators of caries, MiC)^[10]。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,能够在临床龋病发生之前(即亚健康状态)时,以 81%的准确率预测儿童早期龋的发生,可有效帮助医生在疾病出现前进行临床干预,达到早期预防、早期诊断的目的。该课题组同时对牙龈炎的菌群预测模型进行了探究,通过监测牙龈炎康复、发展和再康复过程中牙菌斑菌群结构和功能变化,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,命名为“牙龈炎的菌群指数”(microbial index of gingivitis, MiG)^[22]。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,在病人友好度、可重复性、可比较性等方面具有关键优势。此外,菌群结构的变化有望反映远期疗效。指导患者正确清洁牙齿及使用漱口水是牙龈炎发作时常规的临床处理。龈上洁治、刷牙、刷牙-漱口水联合使用均可缓解患者临床症状、通过推动疾病状态下的微生

物组向健康状态回复达到疾病治愈目的。这 3 种口腔护理方式均有特征性的牙龈菌群变化图谱,其中洁牙(目前业界公认最有效的牙龈炎治疗方式)导致了最广谱、最显著的菌群结构变化,而常规牙膏的使用仅导致 5 个细菌属的丰度改变^[76]。以洁牙后菌群变化特征为参照,研究人员提出了各种牙龈健康护理方案“相对菌群恢复程度指数”(简称 RMRI)的概念^[76]。这一指数可纵向反映每种方式在处理过程中的菌群动态变化,进而推测远期临床效果,指导医生适时调整治疗方案,达到最佳临床效果。

此外,类风湿性关节炎患者的口腔微生物群落与健康人相比存在显著失调,这种生态失调可通过类风湿性关节炎的治疗而恢复,且恢复程度与患者对治疗的反应密切相关;根据口腔及肠道微生物菌群元基因组关联分析,构建人群分类诊断模型在区分健康人及类风湿性关节炎患者的诊断准确率接近 100%,提示口腔微生物群落可根据机体疾病的恢复情况进行适应性调整,对全身疾病的发生、发展及预后具有极高的敏感性^[56]。

一些基于微生物组的治疗技术突破也来自于口腔。例如,我们开发了一类名为“目标特异性抗菌多肽”(specifically targeted anti-microbial peptides, STAMPs)的新型抗菌素。每个 STAMP 由 1 个非特异性的杀菌模块和 1 个针对特定菌种的目标结合模块 2 个部分组成。其工作原理是目标结合模块特异性地结合病菌,进而通过与其连接的杀菌模块来杀灭该菌。我们根据口腔致龋菌——变异链球菌的信息素(competence-stimulating peptide, CSP)蛋白序列设计了 STAMP 目标结合模块,从而将杀菌模块靶向投送到变异链球菌。这种 STAMPs 可从诸多物种组成的微生物群落中清除变异链球菌,同时不影响种系关系相近却非致龋的其他口腔链球

菌, 具有在不破坏正常菌群结构功能的前提下选择性杀灭病原菌的潜力^[9, 77]。这一基于变异链球菌的靶向抗菌技术也为设计和制备针对其他病原菌或服务于人体其他部位的 STAMPs 奠定了良好的基础。

3 口腔微生物组学国内研究现状

经过多年的发展, 我国口腔微生物组学研究已具备了较好基础, 在科学问题探讨、科研队伍培养、基础设施建设等方面取得了长足进展, 人才队伍颇具规模、科研成果不断涌现。

基础研究方面, 我国口腔微生物学家采用各种高通量分析技术, 在宏基因组学层面对口腔微生物组进行了系统研究。通过分析双生子^[21]、不同年龄(新生儿、婴幼儿期、青少年、成人、老人)^[13]、不同民族^[78]人群的口腔微生物组样本, 解析了生理状态下口腔微生物组的特点及影响因素, 绘制了口腔微生物“核心微生物组”结构图^[13], 并提出了更为科学的“口腔核心微生物组”概念, 即应针对人群不同年龄/牙列阶段口腔内环境的生态学特点, 对“口腔核心微生物组”进行个性化划分^[13]; 通过研究龋病^[10, 79-80]、牙周病^[22-23, 76]、扁平苔藓^[30]患者口腔微生物组, 确定了口腔菌群结构与这些疾病的关联性; 通过监测微生物结构和功能的动态变化, 揭示了中国典型人群中口臭发展过程的微生物的改变, 为口臭的前期诊断提供了新的思路^[81]; 通过研究全身系统性疾病(白血病^[82]、放化疗^[83]、头颈部肿瘤^[84]、HIV^[85]、糖尿病^[52])患者的口腔微生物组, 进一步明确了口腔微生物组在全身系统性疾病发生及发展中的作用。同时, 我国学者根据口腔内不同生态位点中菌群分布的规律在国际上首次提出了龋病的菌群指数 MiC^[10]、牙

龈炎的菌群指数 MiG^[22]、以及用于客观评价牙龈健康护理方案的相对菌群恢复程度指数 RMRI^[76], 并通过类风湿性关节炎示范了口腔微生物群落在全身疾病诊断及预后判断中的潜在作用^[56]。

在平台建设方面, 四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室通过 20 多年来对口腔微生物资源的保藏研究, 结合多地域、多民族、不同年龄阶段健康与疾病人群口腔微生物群落的临床资料与微生物宏基因组学大数据, 创立了首个中国人口腔微生物资源数据库, 建立了临床样本收集、分离鉴定保藏、样本信息管理技术规程, 并提供细菌 16S rRNA 序列信息的比对功能, 根据临床样本基因序列, 预测口腔微生物分型及相关临床信息, 为研究发病机制、临床防治新技术提供重要的共享资源。随着四川大学华西口腔医院国家口腔疾病临床研究中心建设的深化, 加强口腔微生物与全身健康的多中心研究, 建立基于口腔微生物群落信息的疾病预警系统将成为该中心的工作重点之一。

此外, 在微生物组大数据分析技术方面, 中科院青岛生物能源所单细胞中心以口腔微生物组为模式体系, 通过发展 Parallel-Meta 等一系列算法和软件^[86-91], 建立了对海量元基因组数据进行有效组织管理、质量监控与大规模数据比对分析的微生物组大数据引擎。与该中心开发的拉曼组、元拉曼组, 以及单细胞拉曼分选、测序与培养等新技术与新仪器^[63-73]相结合, 这些努力为基于口腔微生物组的慢病诊断和预警技术平台奠定了良好的基础。

4 启动中国口腔微生物组计划的战略意义及发展规划建议

截至 2016 年, 有资料可查的国际微生物组研

究计划有 13 项与人类健康相关。美国、加拿大、爱尔兰和法国是这些计划的主要参与国家。中国科学家积极参与了人类肠道宏基因组计划(MetaHIT)和国际微生物组联盟(IHMC)计划。从国际科技竞争态势和服务国家需求出发,启动中国微生物组研究计划已势在必行。目前,世界各国对人体微生物组的研究投入主要集中于肠道,在口腔微生物组学研究领域投入相对较少。美国 2012–2014 年 3 个财政年对于口腔微生物组学研究的投入仅占人体微生物组学研究总投入的 5%左右,远落后于肠道微生物组学研究(>55%)^[92],与口腔医学作为与临床医学并列的一级学科的学科地位不符。口腔与肠道作为解剖结构的延续,口腔微生物组与肠道微生物组是人体最重要的两大“菌库”。单纯针对口腔微生物组或肠道微生物组的研究并不能全面解析微生物在人体疾病发生发展过程中的作用与机制,限制了疾病防治临床新技术的研发。因此,从整体出发,深入研究口腔微生物群落与肠道微生物群落交互作用,有望成为我国疾病微生物组学研究的特色,并极有希望在该领域实现国际领跑。

在围绕人类口腔微生物组学研究所开展的口腔医学未来格局的竞争中,中国与美国尚处于同一起跑线,亟需国家大力投入与布局,立足国情,明确自身优势,启动中国人口腔微生物组计划(China human oral microbiome project, CHOMP),加速利用我国巨大的口腔疾病临床资源转化为促进口腔临床诊疗技术进步的战略资源,把握我国口腔医学国际领跑的重要契机,在国际微生物组学研究中掌握更大的主动权与话语权。对于启动和实施中国口腔微生物组计划有以下几点建议:

(1) 建议启动国家层面的中国人口腔微生物组计划,依托国家重点实验室及国家临床研究中心等国家级研究平台的引领与辐射作用,成立中

国人口腔微生物组研究计划联盟,组织全国专家进行顶层优化设计,规划口腔微生物组研发路线图,明确发展各阶段目的,将政府、患者、临床医生、微生物学家、分子生物学家、计算科学家及生物信息学家有机地结合及统一起来。

(2) 基础研究目标是解决临床实际,产生更多具有中国自主知识产权的理论、临床新技术新方法、临床指南和专家共识。中国人口腔微生物组计划必须与临床转化医学紧密结合,围绕口腔与全身重大疾病防治,解决临床实际问题。建议基于中国人口腔微生物组的生物学特性,围绕国人常见口腔与全身疾病开展基于口腔微生物组的疾病个体化精准治疗,创建疾病风险预警与预后评估系统,推动口腔微生物组学研究成果的临床转化。在此基础上,建立产业共识,明确努力方向,推广中国口腔微生物组学产业化技术标准,加速科技成果的产业化进程,构建高效的人才培养、成果推广体系和高水平的创新平台。

(3) 建立国家级口腔微生物组数据中心,实现大数据集成与综合应用。海量数据的解析与挖掘是微生物组研究的关键环节之一,只有建立可靠、灵活和安全的大数据引擎和可视化工具,实现数据的规范化存储及中心内数据在云端的安全实时共享,才有可能实现口腔微生物组服务与支撑精准医疗产业的潜力。

(4) 加强国内外交流合作,针对学术领域的重点和热点,加强学科交叉,特别重视口腔与肠道微生物组学研究的协同创新,组织相关研讨会、产业论坛,举办国际学术会议、推广国际口腔及人体微生物组学研究最新科技成果和技术标准。

5 结语

人类的“第一基因组”(人类基因组)及“第二基

因组”(人类微生物组)共同决定了人体的疾病健康状况。将“人类微生物组”计划的研究结果用于临床,从“第二基因组”中寻找更加精准的疾病早期诊疗的分子标记,是最终实现个性化精准医疗的根本途径。口腔微生物组是口腔疾病及全身系统性疾病窗口;而且在人体微生物组学的核心科学问题探讨与共性技术开发方面,口腔作为一个模式研究体系具有诸多特色与优势。因此,中国口腔微生物组学研究应抓住机遇,整合信息化医疗技术、基因组技术和人体微生物基因组技术,切实推动微生物组学研究成果在口腔医学领域的应用。

致谢

特别感谢四川大学华西口腔医学院徐欣副教授和美国加州大学洛杉矶分校何雪松副教授在本文撰写过程中所提供的各方面协助。

参考文献

- [1] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5002-5017.
- [2] Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 137-143.
- [3] He JZ, Li Y, Cao YP, Xue J, Zhou XD. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica*, 2015, 60(1): 69-80.
- [4] Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global economic impact of dental diseases. *Journal of Dental Research*, 2015, 94(10): 1355-1361.
- [5] He XS, Shi WY. Oral microbiology: past, present and future. *International Journal of Oral Science*, 2009, 1(2): 47-58.
- [6] Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi WY, He XS. Ecology of the oral microbiome: beyond bacteria. *Trends in Microbiology*, 2017, doi: 10.1016/j.tim.2016.12.012.
- [7] He XS, McLean JS, Edlund A, Yooseph S, Hall AP, Liu SY, Dorrestein PC, Esquenazi E, Hunter RC, Cheng GH, Nelson KE, Lux R, Shi WY. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(1): 244-249.
- [8] Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(6): E791-E800.
- [9] Guo LH, McLean JS, Yang Y, Eckert R, Kaplan CW, Kyme P, Sheikh O, Varnum B, Lux R, Shi WY, He XS. Precision-guided antimicrobial peptide as a targeted modulator of human microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(24): 7569-7574.
- [10] Teng F, Yang F, Huang S, Bo CP, Xu ZZ, Amir A, Knight R, Ling JQ, Xu J. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota. *Cell Host & Microbe*, 2015, 18(3): 296-306.
- [11] Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database*, 2010, 2010: baq013.
- [12] Keijser BJB, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, ten Gate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*, 2008, 87(11): 1016-1020.
- [13] Xu X, He JZ, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang KK, Guo Q, Liu XH, Zhou Y, Cheng L, Li MY, Li YQ, Li Y, Shi WY, Zhou XD. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 699-710.
- [14] Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 2009, 19(3): 193-200.
- [15] Huse SM, Ye YZ, Zhou YJ, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One*, 2012, 7(6): e34242.
- [16] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11971-11975.
- [17] Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijsers B. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Medical Genomics*, 2011, 4: 22.
- [18] Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, 2009, 19(4): 636-643.
- [19] Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 2009, 326(5960): 1694-1697.
- [20] Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*, 2010, 11: 523.
- [21] Du Q, Wang Y, Xu X, Li YQ, Li MY, Zou J, Zhou XD. Analysis of the oral microbiota in twin children. *West China Journal of Stomatology*, 2014, 32(2): 182-185. (in Chinese)
杜芹, 王艳, 徐欣, 李雨庆, 李明月, 邹静, 周学东. 双生子儿童口腔微生物群组结构分析. *华西口腔医学杂志*, 2014, 32(2): 182-185.
- [22] Huang S, Li R, Zeng XW, He T, Zhao HL, Chang A, Bo CP, Chen J, Yang F, Knight R, Liu JQ, Davis C, Xu J. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *The ISME Journal*, 2014, 8(9): 1768-1780.
- [23] Li Y, He JZ, He ZL, Zhou Y, Yuan MT, Xu X, Sun FF, Liu CC, Li JY, Xie WB, Deng Y, Qin YJ, VanNostrand JD, Xiao LY, Wu LY, Zhou JZ, Shi WY, Zhou XD. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *The ISME Journal*, 2014, 8(9): 1879-1891.
- [24] Wang JF, Qi J, Zhao H, He S, Zhang YF, Wei SC, Zhao FQ. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1843.
- [25] Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1176-1185.
- [26] Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio*, 2014, 5(2): e01012-14.
- [27] Siqueira Jr JF, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2009, 107(6): 870-878.
- [28] Siqueira Jr JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2002, 94(3): 281-293.
- [29] Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2): 558-563.
- [30] Wang K, Lu WX, Tu QC, Ge YC, He JZ, Zhou Y, Gou YP, Van Nostrand JD, Qin YJ, Li JY, Zhou JZ, Li Y, Xiao LY, Zhou XD. Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22943.
- [31] Wang K, Miao TY, Lu WX, He JZ, Cui BM, Li JY, Li Y, Xiao LY. Analysis of oral microbial community and Th17-associated cytokines in saliva of patients with oral lichen planus. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59(3): 105-113.
- [32] Pizzo G, Guiglia R, Russo LL, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *European Journal of Internal Medicine*, 2010, 21(6): 496-502.
- [33] Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2000, 5(1): 30-37.
- [34] Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, Ohno H, Yamazaki K. Oral administration of *P. gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134234.
- [35] Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4828.
- [36] Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, Allen-Vercoe E, Holt RA. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*, 2013, 1: 16.

- [37] Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 2015, 24(5): 373-385.
- [38] Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, Yang JH, Dou RX, Masugi Y, Song MY, Kostic AD, Giannakis M, Bullman S, Milner DA, Baba H, Giovannucci EL, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Garrett WS, Huttenhower C, Meyerson M, Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, 2016, 65(12): 1973-1980.
- [39] Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Ryan CA, Dempsey EM, Murphy B, Andrews E, Cotter PD, Stanton C, Ross RP. Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *mBio*, 2013, 4(1): e00366-12.
- [40] Qin N, Yang FL, Li A, Prifti E, Chen YF, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu LJ, Zhou JW, Ni SJ, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan CH, Ding WC, Chen YT, Hu XJ, Zheng BW, Qian GR, Xu W, Ehrlich SD, Zheng SS, Li LJ. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*, 2014, 513(7516): 59-64.
- [41] Zhang ZG, Zhai HQ, Geng JW, Yu R, Ren HQ, Fan H, Shi P. Large-scale survey of gut microbiota associated with MHE via 16S rRNA-based pyrosequencing. *The American Journal of Gastroenterology*, 2013, 108(10): 1601-1611.
- [42] Singhal S, Dian D, Keshavarzian A, Fogg L, Fields JZ, Farhadi A. The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 2011, 56(1): 170-175.
- [43] Fåk F, Tremaroli V, Bergström G, Bäckhed F. Oral microbiota in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2): 573-578.
- [44] Ford PJ, Gemmell E, Hamlet SM, Hasan A, Walker PJ, West MJ, Cullinan MP, Seymour GJ. Cross-reactivity of GroEL antibodies with human heat shock protein 60 and quantification of pathogens in atherosclerosis. *Oral Microbiology and Immunology*, 2005, 20(5): 296-302.
- [45] Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, Herrera D, Sanz M. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, 2011, 82(10): 1469-1477.
- [46] Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *Journal of Periodontology*, 2007, 78(4): 677-682.
- [47] Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*, 2005, 3: 27.
- [48] Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, Paster BJ, Joshipura K, Wong DTW. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*, 2012, 61(4): 582-588.
- [49] Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 58.
- [50] Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology*, 1996, 67(10s): 1103-1113.
- [51] Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1789-1796.
- [52] Zhou M, Rong RC, Munro D, Zhu CX, Gao X, Zhang Q, Dong QF. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61516.
- [53] Casarin RCV, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 2013, 48(1): 30-36.
- [54] Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. *Capnocytophaga* spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. *Journal of Periodontology*, 2005, 76(2): 194-203.
- [55] Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *Journal of Periodontology*, 2005, 76(11-s): 2066-2074.
- [56] Zhang X, Zhang DY, Jia HJ, Feng Q, Wang DH, Liang D, Wu XN, Li JH, Tang LQ, Li Y, Lan Z, Chen B, Li YL, Zhong HZ, Xie HL, Jie ZY, Chen WN, Tang SM, Xu XQ, Wang XK, Cai

- XH, Liu S, Xia Y, Li JY, Qiao XY, Al-Aama JY, Chen H, Wang L, Wu QJ, Zhang FC, Zheng WJ, Li YZ, Zhang MR, Luo GW, Xue WB, Xiao L, Li J, Chen WT, Xu X, Yin Y, Yang HM, Wang J, Kristiansen K, Liu L, Li T, Huang QC, Li YR, Wang J. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, 2015, 21(8): 895-905.
- [57] Gonzalez A, Hyde E, Sangwan N, Gilbert JA, Viirre E, Knight R. Migraines are correlated with higher levels of nitrate-, nitrite-, and nitric oxide-reducing oral microbes in the American gut project cohort. *mSystems*, 2016, 1(5): e00105-16.
- [58] Miklossy J. Alzheimer disease -- a spirochetosis?//Giacobini E, Becker RE. Alzheimer Disease. Boston: Birkhäuser, 1994: 41-45.
- [59] Riviere GR, Riviere KH, Smith KS. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiology and Immunology*, 2002, 17(2): 113-118.
- [60] Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, 36(4): 665-677.
- [61] Dickstein JB, Moldofsky H, Hay JB. Brain-blood permeability: TNF- α promotes escape of protein tracer from CSF to blood. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 279(1): R148-R151.
- [62] Tian Y, He X, Torralba M, Yooseph S, Nelson KE, Lux R, McLean JS, Yu G, Shi W. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Molecular Oral Microbiology*, 2010, 25(5): 357-367.
- [63] Xu J, Ma B, Su XQ, Huang S, Xu X, Zhou XD, Huang WE, Knight R. Emerging trends for microbiome analysis: from single-cell functional imaging to microbiome big data. *Engineering*, 2017, 3(1): 66-70.
- [64] Berry D, Mader E, Lee TK, Wobken D, Wang Y, Zhu D, Palatinszky M, Schintlmeister A, Schmid MC, Hanson BT, Shterzer N, Mizrahi I, Rauch I, Decker T, Bocklitz T, Popp J, Gibson CM, Fowler PW, Huang WE, Wagner M. Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(2): E194-E203.
- [65] Ji YT, He YH, Cui YB, Wang TT, Wang Y, Li YG, Huang WE, Xu J. Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(12): 1512-1518.
- [66] Wang TT, Ji YT, Wang Y, Jia J, Li J, Huang S, Han DX, Hu Q, Huang WE, Xu J. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 58.
- [67] Teng L, Wang X, Wang XJ, Gou HL, Ren LH, Wang TT, Wang Y, Ji YT, Huang WE, Xu J. Label-free, rapid and quantitative phenotyping of stress response in *E. coli* via ramanome. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34359.
- [68] Tao YF, Wang Y, Huang S, Zhu PF, Huang WE, Ling JQ, Xu J. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D₂O-labeled single-cell raman microspectroscopy. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(7): 4108-4115, doi: 10.1021/acs.analchem.6b05051.
- [69] Wang Y, Song YZ, Tao YF, Muhamadali H, Goodacre R, Zhou NY, Preston GM, Xu J, Huang WE. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(19): 9443-9450.
- [70] Wang Y, Ji YT, Wharfe ES, Meadows RS, March P, Goodacre R, Xu J, Huang WE. Raman activated cell ejection for isolation of single cells. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10697-10701.
- [71] Zhang PR, Ren LH, Zhang X, Shan YF, Wang Y, Ji YT, Yin HB, Huang WE, Xu J, Ma B. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(4): 2282-2289.
- [72] Zhang Q, Zhang PR, Su YT, Mou CB, Zhou T, Yang ML, Xu J, Ma B. On-demand control of microfluidic flow via capillary-tuned solenoid microvalve suction. *Lab on a Chip*, 2014, 14(24): 4599-4603.
- [73] Zhang Q, Zhang PR, Gou HL, Mou CB, Huang WE, Yang ML, Xu J, Ma B. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting. *Analyst*, 2015, 140(18): 6163-6174.
- [74] Mejåre I, Axelsson S, Dahlén G, Espelid I, Norlund A, Tranæus S, Twetman S. Caries risk assessment. A systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2014, 72(2): 81-91.
- [75] Tellez M, Gomez J, Pretty I, Ellwood R, Ismail AI. Evidence on existing caries risk assessment systems: are they predictive

- of future caries? *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 2013, 41(1): 67-78.
- [76] Huang S, Li Z, He T, Bo CP, Chang JL, Li L, He YY, Liu JQ, Charbonneau D, Li R, Xu J. Microbiota-based signature of gingivitis treatments: a randomized study. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24705.
- [77] Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi FX, Anderson MH, Shi WY. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(11): 3651-3657.
- [78] Jiao KL, Zhu YJ, Xie PY, LI JP, Wu F, Zhou JY, Li ZQ, Yu ZH. Oral microbial community structure of periodontitis patients between Dongxiang and Yugurs in Gansu Province. *Journal of Oral Science Research*, 2015, 31(4): 365-369. (in Chinese)
焦康礼, 朱玉娟, 谢沛原, 李俊平, 吴芳, 周建业, 李志强, 余占海. 甘肃东乡及裕固族牙周炎口腔微生物群落结构研究. *口腔医学研究*, 2015, 31(4): 365-369.
- [79] Ling ZX, Kong JM, Jia P, Wei CC, Wang YZ, Pan ZW, Huang WJ, Li LJ, Chen H, Xiang C. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 2010, 60(3): 677-690.
- [80] Yang F, Zeng XW, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W, Chen J, Wang DM, Huang RR, Chang XZ, Chain PS, Xie G, Ling JQ, Xu J. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *The ISME Journal*, 2012, 6(1): 1-10.
- [81] Ren W, Xun Z, Wang ZC, Zhang Q, Liu XN, Zheng H, Zhang Q, Zhang YF, Zhang LS, Wu CY, Zheng SG, Qin N, Ehrlich SD, Li YH, He XS, Xu T, Chen T, Chen F. Tongue coating and the salivary microbial communities vary in children with halitosis. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24481.
- [82] Wang Y, Xue J, Zhou XD, You M, Du Q, Yang X, He JZ, Zou J, Cheng L, Li MY, Li YQ, Zhu YP, Li JY, Shi WY, Xu X. Oral microbiota distinguishes acute lymphoblastic leukemia pediatric hosts from healthy populations. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102116.
- [83] Hu YJ, Wang Q, Jiang YT, Ma R, Xia WW, Tang ZS, Liu Z, Liang JP, Huang ZW. Characterization of oral bacterial diversity of irradiated patients by high-throughput sequencing. *International Journal of Oral Science*, 2013, 5(1): 21-25.
- [84] Hu XS, Zhang Q, Hua H, Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncology*, 2016, 56: e6-e8.
- [85] Zhang F, He SH, Jin JQ, Dong GY, Wu HK. Exploring salivary microbiota in AIDS patients with different periodontal statuses using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 55.
- [86] Su XQ, Wang XT, Jing GC, Ning K. GPU-Meta-Storms: computing the structure similarities among massive amount of microbial community samples using GPU. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 1031-1033.
- [87] Su XQ, 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(19): 2493-2501.
- [88] Su XQ, Hu JQ, Huang S, Ning K. Rapid comparison and correlation analysis among massive number of microbial community samples based on MDV data model. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6393.
- [89] Jing GC, Sun Z, Wang HL, Gong YH, Huang S, Ning K, Xu J, Su XQ. Parallel-META 3: comprehensive taxonomical and functional analysis platform for efficient comparison of microbial communities. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40371.
- [90] Su XQ, Pan WH, Song BX, Xu J, Ning K. Parallel-META 2.0: enhanced metagenomic data analysis with functional annotation, high performance computing and advanced visualization. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89323.
- [91] Yang P, Su XQ, Ou-Yang L, Chua HN, Li XL, Ning K. Microbial community pattern detection in human body habitats via ensemble clustering framework. *BMC Systems Biology*, 2014, 8: S7.
- [92] Stulberg E, Fravel D, Proctor LM, Murray DM, LoTempio J, Chrisey L, Garland J, Goodwin K, Graber J, Harris MC, Jackson S, Mishkind M, Porterfield DM, Records A. An assessment of US microbiome research. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 15015.

Human oral microbiome: progress, challenge and opportunity

Xuedong Zhou^{1,2*}, Jian Xu³, Wenyuan Shi^{4*}

¹ State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

² Department of Operative Dentistry and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

³ Single-Cell Center, Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China

⁴ School of Dentistry, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California 90095, USA

Abstract: Oral diseases affect over half of world's population and cost the health care the same budget as for the top ten mortality diseases. Moreover, oral infections are associated with systemic or chronic diseases such as preterm birth, atherosclerosis, cirrhosis, diabetes and Alzheimer's disease. Hence, oral microbiome has always been one of the major targets of Human Microbiome Projects. Compared to other body sites, oral microbiome research is characterized by easily-accessible sampling, convenience in phenotyping host responses and directness and high efficacy of intervention approaches. In addition, over 65% of oral bacteria groups are deemed culturable, and genomes of representative strains from these groups have mostly been sequenced. Therefore, oral microbiome is becoming an exceptional research model and basis of technological demonstration for the fundamental questions of human microbiome research, such as inter-species interaction networks, impact of local infection on remote organs, and predictive modeling of chronic diseases, etc. By reviewing the recent scientific and technological progresses in oral microbiome study, here we advocate for the initiation of China Human Oral Microbiome Project (CHOMP), which calls for the collaborative and synergistic efforts from academic, clinical and industrial fronts for exploring and developing strategies and solutions for personalized prognosis, diagnosis and therapy for oral and systemic diseases based on oral microbiome.

Keywords: oral microbiome, oral diseases, systemic diseases, China Human Oral Microbiome Project

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81430011, 31425002, 81670978)

*Corresponding author. Xuedong Zhou, Tel: +86-29-85501841, E-mail: zhouxid@scu.edu.cn; Wenyuan Shi, Tel: +01-310-825-8356, E-mail: wshi@dentistry.ucla.edu

Received: 14 February 2017; Revised: 9 April 2017; Published online: 14 April 2017