

[文章编号] 1000-1182(2010)01-0005-04

人体口腔微生物组研究最新进展

薛晶 肖丽英 周学东

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 随着人类基因组计划的成功实施,越来越多的科学家开始关注人体第二基因组——微生物组。本文简要介绍人体微生物组、人体口腔微生物组以及微生物基因研究新技术的最新进展。

[关键词] 口腔微生物群; 微生物组; 测序技术

[中图分类号] R 37 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.01.002

The latest progress in studies of human oral microbiome XUE Jing, XIAO Li-ying, ZHOU Xue-dong. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] With the successful implementation of Human Genome Project, more and more scientists started to pay attention on the second genome of human body: Microbiome. This paper will briefly introduce the latest developments of the Human Microbiome Project, the human oral microbiome research, and new technologies of microbial gene research.

[Key words] oral microbiota; microbiome; sequencing technique

随着生命科学研究的不断发展,人类迈入后基因组时代。人体的健康决定于基因与环境的相互作用,目前大量的研究集中在分析人的基因组成与疾病易感性和药物敏感性的关系上。但是,在体内发挥作用、影响人们生老病死的不仅有人的基因,还有大量的共生微生物的基因,其遗传信息的总和称为微生物组。只有人体基因组与微生物组“和谐一致,协调行动”才能保证人体的健康。因此,在研究基因与人体健康关系时一定不能忽略共生微生物的基因。2007年12月美国《科学》杂志预测:人体共生微生物的研究将可能是国际科学研究在未来取得突破的7个重要领域之一。本文将简要介绍人体微生物组、人体口腔微生物组以及微生物基因研究新技术的最新进展。

1 人体微生物组

在人体内部或体表活跃着数以万计的微生物个体,包括细菌、古细菌、真菌和病毒等。这些微生物占人体总身体质量的1%~2%,数量估计是人体细胞和生殖细胞数量的10倍,它们对人体的健康有着至关重要的作用,如帮助消化食物、合成维生素

等,而同时还有一些微生物则可能导致疾病。这些生活在人类体内的微生物被称为微生物群,它们的基因组被定义为微生物组。人体微生物组的概念最先由Lederberg等^[1]提出,指的是在人体内或者表面存在的生态群落中共生、共栖和致病的微生物的总称。如果将人定义为一个微生物和人体细胞的复合体,人类基因的范畴就包括人类基因组和微生物组的组合,人的新陈代谢功能也混合了人和微生物的特性,人类是由细菌和人体细胞共同组成的一个“超生物体”。

目前对健康和疾病状态下这些细菌、真菌和其他微生物的作用还所知甚少。最近的研究显示,微生物在疾病方面,如溃疡、心脏病和肥胖症等中扮演着重要的角色。为揭示人体健康、疾病状态与人体微生物组的关系,美国国立卫生研究院(national institutes of health, NIH)于2007年12月19日宣布启动一项新的基因工程——人体微生物组项目(human microbiome project, HMP)^[2]。

作为NIH生物医学研究路标计划的一部分,NIH将在未来5年内在HMP上投资1.5亿美元。其主要目标之一是阐明微生物组及影响构成微生物分布和进化的因素,以更好地理解人类遗传及生理多样性,其结果可能为当代人类进化提供一个新的视角,即:迅速发展的科学技术、人类的生活方式和生物圈发生的变革,是否影响着“微观进化”,从而影

[收稿日期] 2009-12-26; [修回日期] 2010-01-20

[作者简介] 薛晶(1980—),男,云南人,讲师,博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501481

响人类对健康和各种疾病的易感性。通过宏基因组学方法和传统基因组DNA测序方法的协调应用, HMP将为进一步研究人体相关微生物群落奠定坚实的基础。

HMP的研究目标是确定个体之间是否有共同的核心人体微生物组的存在, 加深对人体微生物组的变化是否与人体健康状况相关的理解, 开发实现上述目标所需要的新技术和生物信息学工具, 处理伴随HMP项目相关的伦理、法律和社会问题。

HMP的实施主要包括以下内容: 首先对500种新的参考细菌的基因组进行序列测序, 通过合并其他国际资助项目获得的微生物基因组信息, 从而形成涵盖大约1 000种微生物基因组的数据库; 然后研究人员将对取自于健康志愿者身体5个部位(消化道、口腔、皮肤、鼻腔和女性泌尿生殖道)组织样本内的微生物群落进行分析; 最后将从患有特定疾病的志愿者体内获得样本, 从而可以将微生物组在人体特定区域的存在及变化情况与特定的疾病建立联系。

目前人体微生物组仍是一个未知的领域, HMP的最终目的是通过研究获得的数据、工具和资源更充分地了解其变化在人类健康和疾病中的作用, 它的实施将对疾病的预防、诊断及治疗产生重大的影响^[3-4]。

2 人体口腔微生物组

健康人的口腔包含有超过600种不同的细菌、病毒和真菌等微生物物种, 大部分可以相互关联并形成生物膜, 抵抗机械清除力或抗生素治疗, 但在环境变化或其他口腔情况(如个人口腔卫生质量)变化触发时它们也可成为致病微生物。大量的临床研究^[5]显示, 口腔微生物群与龋病和牙周病有着密切的关系。随着人体微生物组项目的开展, 对人体口腔微生物组的研究也日渐增多, NIH牙颌颌面研究所(national institute of dental and craniofacial research, NIDCR)于2008年启动了第一个口腔微生物组综合数据库——人体口腔微生物组数据库(human oral microbiome database, HOMD)。HOMD于2008年3月25日正式对公众开放, 它是由美国波士顿福赛斯研究所和伦敦国王学院的科学家联手建立的, 对口腔细菌的类型、新陈代谢、致病能力等进行了详细记录, 提供了它们的数千种基因。该数据库的网站地址为<http://www.homd.org>。数据库的详细资料将口腔细菌的DNA、蛋白质信息和相关论文关联在一起^[6], 方便使用者查询。

HOMD的目标是提供大约600种人体口腔原核生

物物种群落的全面信息。这些微生物物种的44%可培养并已命名; 11%可培养但尚未命名; 还有45%无法培养, 但可用分子生物学研究手段, 通过它们的16S rRNA序列来辨认其DNA指纹。16S rRNA序列是科学家们在过去20年中用来识别微生物遗传信息的独特指纹。这一序列信息可以使微生物通过一个家族树来显示它们的相互关系。对于那些DNA已被测序的微生物, HOMD提供在线工具来查看和分析它们的基因和蛋白质。每个数据库中的信息类别都是相互关联的, 易于检索、注释, 并经常更新。HOMD提出了一个对目前未命名物种的命名方案, 使菌株、克隆以及从任何实验室探测得到的数据可以直接链接到一个稳定的有名参考微生物实体。HOMD将序列信息与表型、系统发育、临床和书目信息数据等相关联。全部和部分口腔细菌的基因组序列已被确定为HOMD项目和人体微生物组项目的一部分, HOMD同时提供可方便查看所有公开口腔细菌基因组的工具^[7-8]。

NIDCR Lawrence Tabak博士认为, HOMD的建立填补了尖端研究的需要, 口腔微生物组包含极其丰富的数据, HOMD未来将成为科学家查看和检索口腔微生物群信息、形成新的科学假设和获得计算发现的重要搜索引擎, 并最终开发出更完善的生物治疗方法来控制口腔疾病^[9]。

除了HOMD外, 人们还开展了对正常人口腔唾液微生物组和核心微生物组的研究。Nasidze等^[10]学者分别从北美、南美、欧洲、亚洲以及非洲等不同地区提取了120个人的唾液样本, 通过对这些唾液样本的14 115个16S rRNA基因进行测序和分析, 结果识别出了101种已知的细菌类, 其中有39种是从未在口腔中发现过的。此外, 还至少发现了64种未知的细菌类。这些研究结果提示口腔微生物组因个体的不同在组成上也存在着很大的差异, 并且不受任何地区结构的影响。研究旨在建立健康个体唾液细菌的范围, 以期对未来的疾病诊断提供帮助。Zaura等^[11]学者利用454焦磷酸测序技术检测了3名正常高加索人口腔内5个部位的微生物组。结果发现, 在正常人口腔中有3 600种独特序列, 超过500种不同的分类单元或“物种级”表型和88~104种高级分类群(属或更具包容性的类群)。每个单独的样品平均藏匿有266种“物种级”表型, 颊部样本多样性最小, 牙齿邻面样本多样性最高。主成分分析结果显示来源于牙面的样本占据了所有部位的主要构成。从3个个体微生物组测序结果分析可知, 高级分类群、“物种级”表型和独特序列都有一个较大的重叠, 84%的高级分类群, 75%的分类单元和65%

的独特序列至少在3个微生物组中的2个存在。这3个个体的总共6 315个独特序列中有1 660个相同序列,这1 660个相同序列,即“核心微生物组”贡献了66%的测序内容,重叠的分类单元贡献了94%的内容,而几乎所有的内容(99.8%)都属于共享的高级分类群。研究证实,不同的健康人口腔细菌大部分微生物组是相同的,提示可能存在健康口腔核心微生物组。

如何使口腔微生物组有助于健康和疾病防治吸引了许多细胞生物学家、微生物学家和免疫学家越来越多的兴趣,这些研究将明确如何调控微生物群才能使其有助于维持健康,如在龋齿和牙周病中通过干扰微生物的群落动力而发挥预防作用。另一方面,相关研究人员目前也正在探讨口腔微生物群和某些全身性疾病之间的联系。

3 口腔微生物组研究新技术

对口腔微生物组的认识很大程度上依赖于研究手段。根据Staley等^[12]的观点,低于1%的微生物可以在实验室环境下生长,提示以培养技术为基础研究口腔微生物菌群的复杂性和基因多态性具有严重偏差。现代生物技术以DNA为基础的一系列研究方法,如16S rRNA基因技术、高通量指纹技术、宏基因组学技术以及下一代测序技术,使人类可以在结构复杂性和基因多态性的意义下更清晰地研究和了解人体微生物菌群^[13]。

3.1 16S rRNA基因测序技术

1985年开始应用的PCR技术开启了对以前未知微生物群落的非培养依赖性分析和鉴别,包括口腔生物膜中的常驻微生物。Woese^[14]发现,16S rRNA构成了原核细菌核糖体亚基的一个保守序列。所有物种的16S rRNA序列的部分区域是高度保守的,而其他区域则变化较大。保守的区域,可从基因组DNA序列扩增16S rRNA序列,而多变的区域则经常根据系统发育用于生物分类。因此,16S rRNA序列对基因组研究特别有用,可以帮助确定在一个给定的样本中有哪些生物分类群的存在以及它们的丰度如何。编码16S rRNA基因顺序的保守性和多样性使从种属水平构建细菌进化树关系成为可能。16S rRNA序列可从2个方面获得:通过宏基因组DNA样本使用不同的引物专门地扩增获得,也可通过宏基因组DNA序列的传统全基因组鸟枪法测序随机获得。一般来说,第2种方法获得的16S rRNA序列会减少,但同时消除了PCR反应的误差。

3.2 高通量指纹技术

采用高通量指纹技术检测环境微生物群落,可

以直接检测从微生物群落样本中提取的核酸,以PCR为基础,如变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gelelectrophoresis, DGGE)^[15],温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)^[16],末端限制性酶切片长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)^[17-18]。这些技术已经被学者广泛地用来研究人体口腔微生物的种属。

DGGE/TGGE是一种以PCR为基础的微生物群落分析方法,将特定微生物群落DNA库中的标记基因进行PCR扩增。PCR混合产物进行DGGE/TGGE,不同顺序成分的DNA在不同变性浓度下变性,表现出凝胶上的不同条带,形成不同的条带模式,理论上认为一个条带就代表菌落中的一种不同种属的细菌。实验所获得的指纹图谱反应了群落的结构,包括其复杂性以及每一个被检测种属的相对含量。将凝胶上的条带进行回收、克隆及测序,便可鉴定对应微生物的种属。

T-RFLP是广泛应用于环境微生物群落的评价及不同生态系统复杂性和基因多态性比较的替代性分子学技术,也是以PCR为基础,对一定的目标基因进行PCR扩增,使用荧光标记的引物,得到有荧光标志的PCR混合产物。由于从不同种属细菌扩增来的目标基因可能在不同的位置含有不同数量的限制性内切酶片段,用特定的内切酶水解PCR产物,就会产生不同反应的被测微生物群落特征的条带模式,或“指纹”。由于末端限制性酶切片长度可由已知的16S rRNA或其他目标基因序列预知,因此建立数据库相对较容易,每次T-RFLP所测的结果可以通过将结果峰与已有数据库进行比较而进行便捷的阐释。

指纹技术较16S rRNA基因测序技术虽然可对整个微生物群落进行分析,获得微生物组的情况,然而,不同指纹技术的研究结果很难进行比较,并且不能检测微生物的分类和功能^[13]。

3.3 宏基因组学技术

“宏基因组”是由Handelsman等^[19]1998年提出的,包含了比可培养微生物大得多的遗传信息,其定义是生物环境中全部微小生物遗传物质的总和。宏基因组目前主要是指环境样品中细菌和真菌的基因组总和,其文库既包括了可培养的和未培养的微生物遗传信息,因此提供了获得新生物活性物质的机会。宏基因组学的基本方法是分析微生物环境中的基因组组合,直接分离未培养微生物基因组DNA,将其克隆到可培养的微生物中,最后筛选出所需的。

3.4 焦磷酸测序技术

焦磷酸测序技术是近年来发展起来的一种新的下一代序列分析技术，它通过核苷酸和模板结合后释放的焦磷酸引发酶级联反应，促使荧光素发光并进行检测，是一个理想的遗传分析技术平台，既可进行序列分析，又可进行基于序列分析的单核苷酸多态性检测及等位基因频率测定等^[20]。焦磷酸测序技术的建立与应用使得高通量准确测定特征序列、有效进行微生物的分型鉴定成为可能。

焦磷酸测序技术的核心是由4种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应，这4种酶分别为：DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶，反应底物为5'-磷酸硫酸、荧光素，反应体系还包括待测序DNA单链和测序引物。在每一轮测序反应中，只加入一种dNTP，若该dNTP与模板配对，聚合酶就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团。焦磷酸基团可最终转化为可见光信号，并由焦磷酸测序仪器转化为一个峰值，每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目是成正比的。然后加入下一种dNTP，继续DNA链的合成。每一个dNTP的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来，以荧光信号的形式实时记录模板DNA的核苷酸序列。

4 结语

人类口腔微生物与人体始终处于动态生态平衡状态，为维护人体的健康发挥重要的作用，也与多种口腔疾病的发生发展有密切关系，因此，对这些微生物的基因进行全面测序和对它们的生理功能进行深入解析，可为各类疾病的预防和治疗带来全新的思路和方法。人类口腔微生物组数据库的建立为人们了解、认知复杂的口腔微生物环境提供了一个崭新的平台，为各种口腔疾病的预防和治疗奠定了基础。

[参考文献]

[1] Lederberg J, McCray AT. "Ome sweet" omics—a genealogical treasury of words[J]. *Scientist*, 2001, 15(7) 8.
 [2] NIH. Human microbiome project : Overview[EB/OL]. [2009-11-05]. <http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>.
 [3] NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, et al. The NIH human microbiome project[J]. *Genome Res*, 2009, 19(12) 2317-2323.
 [4] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human micro-

biome project[J]. *Nature*, 2007, 449(7164) 804-810.
 [5] Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota : Living with a permanent guest[J]. *DNA Cell Biol*, 2009, 28(8) 405-411.
 [6] Baranova O. Human oral microbiome database[EB/OL]. [2009-12-30]. <http://www.homd.org/>.
 [7] Bethesda MD. Database of human oral microbiome launched[EB/OL]. [2008-03-27]. <http://www.scicasts.com/component/content/article/1710-database-of-human-oral-microbiome-launched>.
 [8] Kelly J. Human oral microbiome database launched [EB/OL]. [2008-03-26]. <http://www.medicalnewstoday.com/articles/101607.php>.
 [9] Kuska B. March 25, 2008—Scientists launch first comprehensive database of human oral microbiome[EB/OL]. [2009-10-27]. <http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchResults/NewsReleases/ArchivedNewsReleases/NewsReleases2008/OralMicrobiome.htm>.
 [10] Nasidze I, Li J, Quinque D, et al. Global diversity in the human salivary microbiome[J]. *Genome Res*, 2009, 19(4) 636-643.
 [11] Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, et al. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1) 259.
 [12] Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1985, 39 321-346.
 [13] Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects : Tools, techniques, and challenges[J]. *Genome Res*, 2009, 19(7) :1141-1152.
 [14] Woese CR. Bacterial evolution[J]. *Microbiol Rev*, 1987, 51(2) : 221-271.
 [15] Nakatsu CH. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Soil Sci Soc Am J*, 2007, 71 562-571.
 [16] Anderson IC, Cairney JW. Diversity and ecology of soil fungal communities : Increased understanding through the application of molecular techniques[J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6(8) 769-779.
 [17] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(11) 4516-4522.
 [18] Thies JE. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms[J]. *Soil Sci Soc Am J*, 2007, 71 : 579-591.
 [19] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes : A new frontier for natural products[J]. *Chem Biol*, 1998, 5(10) 245-249.
 [20] Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing[J]. *Genome Res*, 2001, 11(1) 3-11.

(本文编辑 汤亚玲)