

[文章编号] 1000-1182(2015)06-0555-06

· 专家论坛 ·

口腔微生物群落在口腔与全身疾病预警中的作用

徐欣 何金枝 周学东

口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院(四川大学), 成都 610041

[摘要] 口腔微生物群落是指定植于人体口腔的微生物集合, 多以生物膜形式行使微生物生理学功能。当微生物群落与宿主间生态关系失衡时, 可诱发多种口腔感染性疾病, 包括龋病、牙髓根尖周病、牙周病、智齿冠周炎、颌骨骨髓炎等, 严重危害口腔健康。更为重要的是, 口腔微生物群落与口腔肿瘤、糖尿病、类风湿性关节炎、心血管疾病及早产等系统性疾病紧密相关, 口腔微生物群落结构特征可作为口腔及全身健康预警的重要标记。随着“人类微生物组计划”及其他微生物宏基因组学相关项目的开展, 人们对口腔微生物群落的认识不断深入, 已获得了海量大数据信息。在“后微生物组计划”时代如何有效地将微生物群落大数据转化为具有实际运用价值的临床诊疗手段, 进而为患者提供有效的个性化医疗服务将是推动口腔疾病乃至全身疾病“精准医疗”的重大前沿问题。本文拟从常见口腔及相关系统性疾病微生物群落研究进展入手, 阐述口腔微生物群落信息在疾病发生、发展及预后预警中的作用, 提出建立基于口腔微生物群落疾病预警系统的必要性, 为实现口腔疾病及相关系统疾病的个性化诊疗提供新的思路。

[关键词] 口腔微生物群落; 疾病预警; 口腔感染性疾病; 系统疾病; 宏基因组学

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.06.001

Oral microbiota: a promising predictor of human oral and systemic diseases Xu Xin, He Jinzhi, Zhou Xuedong. (State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] A human oral microbiota is the ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms found in human oral cavity. Oral microbiota exists mostly in the form of a biofilm and maintains a dynamic ecological equilibrium with the host body. However, the disturbance of this ecological balance inevitably causes oral infectious diseases, such as dental caries, apical periodontitis, periodontal diseases, pericoronitis, and craniofacial bone osteomyelitis. Oral microbiota is also correlated with many systemic diseases, including cancer, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, and preterm birth. Hence, oral microbiota has been considered as a potential biomarker of human diseases. The “Human Microbiome Project” and other metagenomic projects worldwide have advanced our knowledge of the human oral microbiota. The integration of these metadata has been the frontier of oral microbiology to improve clinical translation. By reviewing recent progress on studies involving oral microbiota-related oral and systemic diseases, we aimed to propose the essential role of oral microbiota in the prediction of the onset, progression, and prognosis of oral and systemic diseases. An oral microbiota-based prediction model helps develop a new paradigm of personalized medicine and benefits the human health in the post-metagenomics era.

[Key words] oral microbiota; disease prediction; oral infectious diseases; systemic diseases; metagenomics

从人体微生物组中寻找更加精准的疾病诊疗分子标记, 是当前微生物学研究的国际前沿。人类自身的数十万亿细胞所携带的遗传信息, 构成了人类

的“第一基因组”, 而每个个体携带超过10 000种、总量数十亿的微生物遗传信息的总和构成了人类的“第二基因组”, 即人体微生物组^[1]。人类“第一基因组”及“第二基因组”共同决定了人体健康与疾病状态。在人类基因组计划完成后, 美国国立卫生研究院(National Institute of Health, NIH)于2007年底启动了针对“第二基因组”的“人类微生物组计划”(human microbiome project, HMP), 旨在

[收稿日期] 2015-09-15; **[修回日期]** 2015-09-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81430011, 81170959, 81-200782); 四川大学优秀青年学者基金资助项目(2082604184224)

[作者简介] 徐欣, 副教授, 博士, E-mail: xin.xu@scu.edu.cn

[通信作者] 周学东, 教授, 博士, E-mail: zhouxu@scu.edu.cn

通过绘制人体五大部位（口腔、鼻腔、阴道、肠道、皮肤）微生物基因组结构，解析微生物菌群结构变化对人类健康的影响^[2]。人类微生物组计划掀起了全球微生物组学研究热潮，众多国际顶级学术期刊先后发布了这一研究领域的阶段性成果^[3-6]。在HMP取得阶段性成果基础上，美国政府于2015年启动了“全民个体微生物组检测项目”，开展大规模人群微生物群落信息研究，旨在以口腔、皮肤及肠道微生物群落为主要研究靶点，将“人类微生物组计划”的研究结果进行临床转化，从“第二基因组”中寻找更加精准的疾病预警分子标记。

1 口腔微生物群落是口腔及全身健康的重要标记

作为人体微生物群落的重要组成部分之一，口腔微生物群落因取材方便、与口腔及全身健康关系密切，成为HMP及“全民个体微生物组检测项目”的重点关注对象。

口腔微生物群落是指定植于人体口腔的微生物集合^[7]，这些微生物多以生物膜形式组成复杂群落，行使微生物的生理学功能。当与宿主处于平衡状态时，口腔微生物群落可阻止外源性致病菌的入侵，发挥生理性屏障作用；当微生物群落与宿主间生态关系失衡时，可诱发多种口腔慢性感染性疾病，包括龋病、牙髓根尖周病、牙周病、智齿冠周炎、颌骨骨髓炎等，严重危害口腔健康。更为重要的是，口腔微生物可以作为病灶，与全身系统性疾病关系密切。

2 以监测个别“致病菌”为手段的临床策略未能有效进行疾病防治

传统“致病菌”理论指导下的疾病诊疗策略并未有效降低龋病、牙周病的发病率，在一些地区和人群中甚至出现了逐年上升的趋势。第三次全国口腔健康流行病学调查显示，龋病发病率在5岁儿童达66.0%，成年人达88.1%，老年人则高达98.4%；牙周病患率成年人高达80%~97%^[8]。由于龋病、牙周病与全身系统性疾病之间存在密切联系，上述口腔常见疾病患病率居高不下也增加了人群罹患糖尿病^[9]、冠心病^[10]、类风湿性关节炎^[11]、中风^[12]、肥胖^[13]、动脉粥样硬化^[14]、早产及低体重新生儿^[15]的风险；因此，建立更为全面、科学、有效的疾病预警系统，实现口腔疾病及相关系统性疾病个性化诊疗，是有效防治口腔感染性疾病及口腔相关全身性疾病的迫切要求。

3 基于微生物群落整体信息的研究为口腔感染性疾病及相关系统性疾病预警提供了新思路

简化论的局限性促使学者们通过“整体论”来研究口腔微生物群落。随着宏基因组学、宏转录组学、蛋白质组学等领域的快速发展，基于大数据组学思路的疾病研究策略变得具有可操作性。近期的研究结果显示，微生物群落改变是导致口腔多种感染性疾病的关键因素，根据群落信息有望对尚无临床症状的高危人群做出早期预警；另外，口腔微生物群落结构与功能受到口腔及全身疾病状态的影响，可作为上述疾病发展与预后的生物标记。

3.1 龋病相关研究

龋病发生过程中菌群组成和结构均发生了显著改变；龋病的优势菌不是单一的变异链球菌，而是由10个菌种共同构成的复杂细菌群落^[16]；除变异链球菌外，韦荣菌属、放线菌属、颗粒菌属、纤毛菌属、硫单胞菌属、双歧杆菌属、普雷沃菌属等多种细菌均与龋病密切相关^[17-20]；唾液菌群的结构和功能均可作为预测成人龋病发生的标记^[21-22]。学者^[23]发现儿童口腔不同位点菌群的结构和功能均可反映龋病情况，并首次提出了“龋病菌群指数”（microbial index of caries, MiC），根据该指数不仅可作为诊断口腔健康状态的生物学指标，同时可在龋病临床症状出现之前，预测龋病发生风险。

3.2 牙髓根尖周病相关研究

根尖周炎是发生于牙齿根尖周组织的感染性疾病，多继发于龋病，根管治疗是目前治疗根尖周病最有效的方法；然而即使经过完善的根管治疗，仍有4%~15%的患牙迁延不愈，发展成为难治性根尖周炎，表现为复发性根尖周脓肿和进行性骨质破坏，是牙髓根尖周病的巨大临床挑战。目前认为，难治性根尖周炎是以微生物感染为始动因子的多因素疾病，治疗过程中未完全清理的根管内及根尖孔外生物膜，以及唾液污染带入根管内导致的新感染在难治性根尖周炎的发展中具有重要地位。研究^[24]发现，难治性根尖周炎根尖区微生物的变异度较初次感染大，根尖区微生物可以在根尖孔外表面定植，造成继发感染，成为难治性根尖周炎迁延复发的主要原因。目前在难治性根尖周区已检测到包括产丙酸丙酸杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、口腔普雷沃菌、微小微单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、具核梭杆菌及福赛斯坦纳菌等在内的口腔微生物^[24-26]；因此，根据根管充填前根管内微生物的组成对患者罹患难治性根尖周炎的风险进行评估，有针对性采取

进一步的治疗措施(如预防性倒充填等),对提高患者的生活质量及患牙保存率具有重要意义。

3.3 牙周病相关研究

与龋病类似,牙周病也是微生物群落结构与功能改变所导致的口腔感染性疾病。Griffen等^[27]发现,牙周炎患者龈下菌斑中约有120种细菌丰度较健康人群上升,而53种细菌丰度下降。除牙龈卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体和福赛斯坦纳菌外,包括拟杆菌、隐藏真杆菌、牙髓卟啉单胞菌、栖牙普雷沃菌、微小消化链球菌、消化链球菌、龈沟产线菌、脱硫球茎菌、小杆菌、互养菌、龈沟螺杆菌等在内的多种细菌均被认为与牙周炎的发生密切相关^[28-31]。笔者团队前期研究^[32]发现,牙周炎患者龈下菌斑微生物组成多样性与健康人群明显不同,39个细菌属在健康及疾病人群间差异性分布;牙周炎患者微生物群落功能基因发生明显改变,且毒力因子、糖胺聚糖代谢及嘌呤代谢相关的编码基因在牙周炎患者龈下菌斑中大量富集,而氨基酸合成相关基因呈现相反趋势。学者^[33-34]在比较分析口腔内不同生态位点菌群分布规律基础上,根据口腔微生物群落信息建立了“牙龈炎菌群指数”(microbial index of gingivitis, MiG),该指数在41位志愿者的验证群体中准确率达95%;他们还发现存在因菌斑组成不同而牙龈炎易感程度不同的两类人群,以8个细菌属构建牙龈炎微生物易感模型区分易感人群的准确率达74%。

3.4 口腔癌相关研究

口腔癌发病率在人类常见恶性肿瘤中排第6位,患者5年生存率低于50%,属预后较差、毁容性疾病。找寻与口腔癌发生、发展及预后相关的分子标记,是提高患者生存率、改善生存质量的临床重要问题。研究发现,口腔癌表面和癌体组织内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。口腔癌患者唾液微生物中,机会性致病菌的丰度较健康人群显著增加,不同肿瘤患者唾液微生物组的相似度较健康人群间更高^[35];因此,对口腔菌群的检测可能成为鳞癌筛查的潜在方法。口腔微生物群落不仅可参与口腔癌的发生、发展,肿瘤的发生还可改变局部微环境,促进特定种类细菌在肿瘤表面及内部的定植;肿瘤的有效治疗可通过纠正微环境促使微生物群落恢复到健康状态^[36],提示通过检测口腔微生物群落可对口腔癌的远期疗效做出早期判断。

3.5 糖尿病相关研究

糖尿病是以高血糖为特征的代谢性疾病。糖尿病可增加牙周炎的发病风险及严重程度,是牙周炎发生、发展的重要危险因素^[37]。研究发现,1型糖尿

病患者牙周炎部位牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌及弯曲菌属检出率较高^[38];2型糖尿病患者牙周炎部位牙龈卟啉单胞菌、假丝酵母菌属检出率高,而福赛斯坦纳菌检出率较低^[39-40]。Casarin等^[41]采用微生物群落16S rRNA高通量测序发现,2型糖尿病患者龈下菌斑中的菌群组成与非糖尿病患者间存在显著差异,多种细菌在两者间出现差异性富集。这种微生物群落的差异性富集可能与糖尿病人高血糖所导致的龈下菌斑微环境改变及宿主免疫系统破坏有关^[42],提示口腔微生物群落特征可作为反映该疾病状态的潜在标志。

3.6 类风湿性关节炎相关研究

类风湿性关节炎是一种自身免疫性疾病,在全球范围内影响数千万人,并由于心脑血管等全身性并发症导致大量患者死亡。微生物因素作为该疾病的激发因子之一,在疾病发生、发展中起着重要作用。近期研究发现,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;进一步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%^[44],提示口腔微生物群落对全身疾病的发生、发展及预后具有极高的敏感性,可根据机体疾病的恢复情况进行适应性调整。

3.7 心血管疾病研究

几乎所有的动脉粥样硬化斑块中均可检出卟啉单胞菌、韦荣菌及链球菌;而口腔牙周袋内梭杆菌、链球菌、奈瑟菌的分布水平更是与动脉粥样硬化的危险信号如血浆胆固醇水平相关。目前认为,口腔菌群可通过其表面胶原样分子及血小板凝集相关蛋白促进血栓形成;革兰阴性菌释放的脂多糖,可通过刺激宿主释放免疫调节因子与T细胞受体结合或与内皮细胞结合促进动脉粥样硬化斑块的发生^[43]。此外,口腔菌群的毒力因子如菌毛、内毒素等可通过牙周组织破坏造成上皮屏障缺损,进入血液循环并影响血管内皮细胞功能,导致内皮功能紊乱、动脉粥样硬化等疾病。因此,口腔微生物群落参与了心血管疾病的发生发展,可作为了解该疾病的重要窗口。

3.8 早产相关研究

尽管早产原因尚不明确,但妊娠期内感染被认为是早产的相关因素。对胎盘微生物样本测序研究表明,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最相似^[43]。将人唾液和龈下菌斑分别注射入鼠尾静脉中,发现胎盘中定植的细菌

多为奈瑟菌、消化链球菌、毗邻颗粒链球菌、惰性聚集杆菌、链球菌及韦荣菌等口腔共生菌^[44]。此外,在产妇的羊水中还检测到了伯杰菌,其16S rDNA序列与产妇龈下菌斑中的一致,而在阴道等处并未检出,提示伯杰菌可能与早产相关^[45]。其他口腔细菌,如二氧化碳嗜纤维菌、单核细胞增多性李斯特菌、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也在羊水中被相继检出^[46],提示口腔细菌可能更容易定植于胎盘,其毒力因子在胎盘局部产生病理效应从而诱发早产。Offenbacher等^[47]在20世纪90年代首次报道了牙周病与早产的相关性。牙周炎症主要可通过两条途径对妊娠结局产生影响:1)牙周疾病可导致宿主炎症因子,如白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、基质金属蛋白酶、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 等上升,导致早产^[48];2)某些细菌成分(如脂多糖)也可在牙周炎时入血,刺激羊膜绒毛膜产生前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)和TNF- α ,造成胎膜破裂,引发早产^[49]。临床研究发现,有效的牙周治疗可以降低局部及全身炎症细胞因子的含量,延长孕期,降低早产的发生率^[50]。也有研究^[51]指出,牙周病与低出生体质量、子痫、流产等有一定联系,但与早产的关系并不明确。笔者认为,妊娠期妇女在激素水平变化的作用下,口腔局部组织对菌斑等局部刺激因素的反应性增强,炎症反应随之增强,炎性细胞因子、激素及其他刺激物释放入血引起宫颈成熟和功能性雌激素撤退,就有可能诱发早产。

综上所述,口腔微生物群落结构与功能信息在预测疾病的发生及治疗预后方面具有巨大潜能;基于口腔微生物群落生物学大数据,建立基于微生物群落整体信息的预警系统,是防治口腔感染性疾病及相关全身系统疾病的有效手段。

4 基于微生物群落信息的临床诊疗尚面临诸多技术瓶颈

在HMP等微生物宏基因组学研究项目推动下,利用高通量测序技术,对口腔微生物群落的认识得以不断深入,并获得了海量大数据信息。如何有效地将生物学大数据转化为具有实际运用价值的临床诊疗手段,进而为患者提供有效的个体化医疗服务尚有大量问题亟待解决,成为了制约后续转化研究的关键。

4.1 临床样本采集的标准化

口腔微生态系作为仅次于肠道微生态系的复杂

系统,其不同生态位点内微生物群落物种组成及基因种类均存在显著差异,这种差异不仅与宿主的健康及疾病状态相关,同时受到宿主年龄、性别、牙列状态、民族、居住区域等遗传及环境因素的影响。课题组前期通过各种高通量分析技术,发现口腔典型微生态境内细菌的分布模式存在显著差异。厚壁菌为唾液及颊黏膜的优势菌门,而变形菌、厚壁菌、拟杆菌及梭杆菌为龈上菌斑优势菌门;口腔细菌组成随着人的年龄及牙列状态改变呈现波动状态,颊黏膜菌群中螺旋体的丰度随着年龄的增长而呈现递增趋势^[52]。上述研究结果提示,样品采集过程中是否细致化、部位是否细分化、采集对象年龄是否个性化将对检查结果准确性产生重要影响;不同研究单位之间样本采集流程是否标准化可严重影响数据的可比性及重复性。

4.2 微生物群落大数据分析流程的标准化

目前对微生物群落高通量测序所产生的大数据进行质控、物种生物学归类、丰度及物种间进化关系分析,并基于群落结构对基因功能进行预测均耗时较长;因而,是否能减低测序成本、优化分析流程,同时获取对疾病预警的高特异性、高灵敏度微生物群落信息是基于口腔微生物群落的个性化疾病预警服务能够大规模开展的重要因素。

4.3 横断面研究结果需在前瞻性研究中进一步检验

人群横断面研究所获得群落差异原因复杂,可受到个体间遗传差异、菌群随机变异等因素干扰,获得的健康与疾病组之间的菌群差异图谱可信度和准确性较低。更重要的是,单纯的横断面研究仅能提示微生物群落改变与疾病发生的相关性,并不能明确微生物群落与疾病发生的“因果关系”。疾病的发生、发展是一个缓慢过程,宿主和微生物在疾病的不同发展阶段均具有显著的异质性,基于前期横断面研究所获取的微生物群落与疾病相关性信息亟待前瞻性的临床研究验证,以明确核心微生物菌群与疾病的“因果关系”,并通过对人群的追踪随访,验证、调整、完善基于口腔微生物群落信息的疾病预警阈值与效能。

5 建立国人口腔微生物群落疾病预警系统,实现疾病个体化诊疗

以口腔微生物群落结构与功能为研究对象,采用系统生物学研究手段,建立基于口腔微生物群落大数据的口腔感染性疾病及系统性疾病预警系统,有望实现基于人类“第二基因组”的疾病精准医疗。加快开发集高效能宏基因组数据库搜索、对比、分

析、可视化等功能为一体大数据分析处理系统,深度整合当前已发布的各种口腔微生物群落大数据信息,可为构建疾病相关口腔微生物群落数据库奠定基础。另一方面,应充分利用国内丰富的临床资源优势 and 人才优势,标准化志愿者临床信息及生物学样本的采集流程,完善疾病相关口腔微生物群落数据库及标准化数据分析流程,进一步发现、验证口腔微生物群落结构及其功能改变与人类健康及疾病状态间的关系。通过前瞻性队列研究,检验口腔微生物群落在疾病发生及治疗预后中的预警效能,最终有望将微生物群落基础研究结果转化为预测疾病发生风险的新技术,为患者提供个性化早期风险预警及治疗预后服务。

[参考文献]

- [1] Lederberg J, McCray A. "Ome sweet" omics—a genealogical treasury of words[J]. *Scientist*, 2001, 15(7):8.
- [2] NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, et al. The NIH human microbiome project[J]. *Genome Res*, 2009, 19(12):2317-2323.
- [3] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. *Nature*, 2012, 486(7402):207-214.
- [4] Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research[J]. *Nature*, 2012, 486(7402):215-221.
- [5] Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, et al. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome[J]. *Science*, 2012, 336(6086):1255-1262.
- [6] Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy[J]. *Cell*, 2012, 150(3):470-480.
- [7] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome[J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(19):5002-5017.
- [8] 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, 2008:60-102.
- [9] Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(12):738-748.
- [10] Dietrich T, Jimenez M, Krall Kaye EA, et al. Age-dependent associations between chronic periodontitis/edentulism and risk of coronary heart disease[J]. *Circulation*, 2008, 117(13):1668-1674.
- [11] Zhang X, Zhang D, Jia HX, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8):895-905.
- [12] Sfyroeras GS, Roussas N, Saleptsis VG, et al. Association between periodontal disease and stroke[J]. *J Vasc Surg*, 2012, 55(4):1178-1184.
- [13] Suvar J, D'Aiuto F, Moles DR, et al. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review[J]. *Obes Rev*, 2011, 12(5):e381-e404.
- [14] Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials[J]. *J Clin Periodontol*, 2009, 36(Suppl 10):15-19.
- [15] Rakoto-Alson S, Tenenbaum H, Davideau JL. Periodontal diseases, preterm births, and low birth weight: findings from a homogeneous cohort of women in Madagascar[J]. *J Periodontol*, 2010, 81(2):205-213.
- [16] Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease[J]. *ISME J*, 2012, 6(1):46-56.
- [17] Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3):1001-1009.
- [18] Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries[J]. *Caries Res*, 2010, 44(5):485-497.
- [19] Ling Z, Kong J, Jia P, et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing[J]. *Microb Ecol*, 2010, 60(3):677-690.
- [20] Tanner AC, Kent RL Jr, Holgersen PL, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy[J]. *J Dent Res*, 2011, 90(11):1298-1305.
- [21] Yang F, Ning K, Chang X, et al. Saliva microbiota carry caries-specific functional gene signatures[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(2):e76458.
- [22] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations[J]. *ISME J*, 2012, 6(1):1-10.
- [23] Teng F, Yang F, Huang S, et al. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(3):296-306.
- [24] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited[J]. *J Dent Res*, 2009, 88(11):969-981.
- [25] Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, et al. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12):8738-8743.
- [26] Su L, Gao Y, Yu C, et al. Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular bio-

- film[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010, 110(1):e40-e44.
- [27] Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing[J]. *ISME J*, 2012, 6(6): 1176-1185.
- [28] Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2006, 21(1):6-11.
- [29] Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis[J]. *J Dent Res*, 2003, 82(5):338-344.
- [30] Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, et al. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8):3944-3955.
- [31] Paster BJ, Olsen I, Aas JA, et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites[J]. *Periodontol* 2000, 2006, 42:80-87.
- [32] Li Y, He J, He Z, et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients[J]. *ISME J*, 2014, 8(9):1879-1891.
- [33] Huang S, Yang F, Zeng X, et al. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis[J]. *BMC Oral Health*, 2011, 11:33.
- [34] Huang S, Li R, Zeng X, et al. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota[J]. *ISME J*, 2014, 8(9):1768-1780.
- [35] Pushalkar S, Mane SP, Ji X, et al. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 61(3):269-277.
- [36] Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(3):e1003933.
- [37] Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 1993, 16(1):329-334.
- [38] Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(4):637-646.
- [39] Campus G, Salem A, Uzzau S, et al. Diabetes and periodontal disease: a case-control study[J]. *J Periodontol*, 2005, 76(3):418-425.
- [40] Sardi JC, Duque C, Camargo GA, et al. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis—a pilot study[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(10):1098-1105.
- [41] Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis[J]. *J Periodont Res*, 2013, 48(1): 30-36.
- [42] Ohlrich EJ, Cullinan MP, Leichter JW. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota[J]. *J Oral Microbiol*, 2010, 2. doi:10.3402/jom.v2i0.5818.
- [43] Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(Suppl 1):4592-4598.
- [44] Fardini Y, Chung P, Dumm R, et al. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(4):1789-1796.
- [45] Han YW, Ikegami A, Bissada NF, et al. Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4):1475-1483.
- [46] Baud D, Greub G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(9):1312-1322.
- [47] Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight[J]. *J Periodontol*, 1996, 67(10 Suppl):1103-1113.
- [48] Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(4 Suppl):S170-S180.
- [49] Jiang H, Xiong X, Su Y, et al. A randomized controlled trial of pre-conception treatment for periodontal disease to improve periodontal status during pregnancy and birth outcomes[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2013, 13:228.
- [50] Jeffcoat M, Parry S, Sammel M, et al. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth[J]. *BJOG*, 2011, 118(2):250-256.
- [51] Michalowicz BS, Durand R. Maternal periodontal disease and spontaneous preterm birth[J]. *Periodontol* 2000, 2007, 44:103-112.
- [52] Xu X, He J, Xue J, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities[J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17(3):699-710.