

涎腺腺样囊性癌患者口腔微生物多样性研究

刘兴 杨其芬 甘宁 杨德琴

重庆医科大学附属口腔医院种植科 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室

重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147

[摘要] 目的 探讨涎腺腺样囊性癌(SACC)患者口腔微生物的多样性和群落差异。方法 采集13例SACC患者与10例健康人的唾液样本,提取其口腔菌群的总DNA,经通用引物扩增16S rRNA基因,利用高通量测序平台进行细菌16S rRNA基因(V3-V4)区高通量测序分析后,利用Mothur软件分析微生物的多样性和群落结构。结果 SACC组优势种群有16种(相对丰度>1%),依次是:链球菌属(36.68%),奈瑟菌属(8.55%),普雷沃菌属_7(7.53%),韦荣球菌属(6.37%)等。对照组优势种群有15种,依次有:链球菌属(18.41%),奈瑟菌属(18.20%),普雷沃菌属_7(8.89%),卟啉单胞菌属(6.20%),梭杆菌属(5.86%),韦荣球菌属(5.82%)等。2组间有统计学差异的菌门包括厚壁菌门、变形菌门、梭杆菌门($P<0.05$)。有统计学差异的菌属包括链球菌属、奈瑟菌属和卟啉单胞菌属($P<0.05$),而嗜二氧化碳噬细胞菌属仅在SACC患者中检出。结论 SACC患者的唾液微生物与健康人群唾液微生物的种群结构存在明显差异。

[关键词] 涎腺腺样囊性癌; 高通量测序; 唾液; 微生物多样性

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.03.015



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Oral microbiological diversity in patients with salivary adenoid cystic carcinoma Liu Xing, Yang Qifen, Gan Ning, Yang Deqin. (Dept. of Implant, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences; Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401147, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (31571508, 31371473); The Key Project of Yuzhong District Science and Technology Commission (2012); The Science and Technology Project of Yubei District Chongqing [grant No. 2017 (agriculture society) 45]. Correspondence: Yang Deqin, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn.

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to identify the differences in microbial diversity and community in patients with salivary adenoid cystic carcinoma (SACC). **Methods** Saliva was collected from 13 patients with SACC confirmed by histopathological diagnosis and 10 healthy control subjects. Total metagenomic DNA was extracted. The DNA amplicons of the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene were generated and subjected to high-throughput sequencing. Microbial diversity and community structure were analyzed with Mothur software. **Results** A total of 16 genera of dominant bacteria in the SACC group were found, including *Streptococcus* (36.68%), *Neisseria* (8.55%), *Prevotella_7* (7.53%), and *Veillonella* (6.37%), whereas 15 dominant bacteria in the control group were found, including *Streptococcus* (18.41%), *Neisseria* (18.20%), *Prevotella-7* (8.89%), *Porphyromonas* (6.20%), *Fusobacterium* (5.86%) and *Veillonella* (5.82%). The statistically different phyla between the two groups were *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Fusobacterium* ($P<0.05$). The statistically different genera between the two groups were *Streptococcus*, *Neisseria* and *Porphyromonas* ($P<0.05$), and *Capnocytophaga* was only detected in patients with SACC. **Conclusion** Significant differences were observed in the oral microorganisms between the two groups.

[Key words] salivary adenoid cystic carcinoma; high-throughput sequencing; saliva; microbial diversity

[收稿日期] 2018-11-19; **[修回日期]** 2019-03-05

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31571508, 31371473); 渝中区科委重点项目(2012); 重庆市渝北区科委课题[2017(农社)45]

[作者简介] 刘兴,住院医师,硕士, E-mail: 2362585980@qq.com

[通信作者] 杨德琴,教授,博士, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

研究证实,20%的癌症与微生物感染有关^[1],如幽门螺杆菌感染是胃癌的主要致病因素之一^[2];EB病毒感染与Burkitt淋巴瘤、鼻咽癌^[3-4]的发生密切相关

关; 伤寒沙门氏菌感染也已证实与胆囊癌的发生密切相关^[5]。口腔作为微生物重要的栖息环境之一, 包含有多种微生物定居, 如细菌、真菌、螺旋体及病毒等。已有大量实验研究证实口腔疾病的发生、发展与口腔微生物群落结构的改变密切相关。除龋病与牙周炎外, 口腔微生物与肿瘤也密切相关, 如口腔中的幽门螺杆菌对胃部肿瘤的发生和发展有着重要作用^[6], 口腔链球菌属在鳞状细胞癌组织中的定植增加已被大量实验所证实^[7-8]。腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) 是临床常见的一种涎腺肿瘤, 发病率居涎腺恶性肿瘤的第2位。其多发生于涎腺组织, 且侵袭性强, 具有嗜神经生长的生物学特点, 早期即可发生神经侵袭和远处转移, 出现面瘫、疼痛、麻木等神经损伤症状^[9]。研究^[10]证实当腮腺发生慢性炎症时, 在腺体中可检测出细菌, 而在复发性腮腺炎临床缓解期时, 腺体内也存在隐性的感染。在对青少年复发性腮腺炎的研究中, 静止期唾液标本中80%的唾液标本可培养出细菌, 且唾液中的检测出的优势致病菌与其活动期标本中检测出的优势菌相同, 由此可见唾液腺与口腔微生物紧密相关。本实验利用高通量测序平台对涎腺腺样囊性癌 (salivary adenoid cystic carcinoma, SACC) 患者及健康受试者的唾液微生物群落结构进行研究, 以求能够初步认识SACC患者与健康人群口腔微生物的多样性和群落差异, 为后期的研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集对象和方法

采集重庆医科大学附属口腔医院经组织学检查确诊的13例SACC患者, 年龄 (57.26±5.34) 岁。其中男性7例, 女性6例; 肿瘤发生在腮腺、颌下腺、舌下腺、上腭者分别为5、2、4、2例; 抽烟者5例, 饮酒者4例。SACC组纳入标准: 1) 根据组织病理学最新确认的SACC患者; 2) 无其他口腔疾病, 如黏膜疾病、龋病、牙周炎、急性口腔感染、口腔念珠菌感染等。排除标准: 1) 接受过抗肿瘤治疗, 包括放化疗及手术治疗; 2) 系统性疾病及先天性疾病 (如糖尿病、肝炎); 3) 3个月内抗生素使用史, 2周内局部抗菌治疗史; 4) 妊娠期或哺乳期妇女。

随机收集10例健康者作为对照组, 年龄 (57.60±5.32) 岁。男性和女性各5例; 抽烟者5例, 饮酒者4例。纳入标准: 1) 与SACC组年龄、性别相当; 2) 无其他口腔疾病, 如黏膜疾病、龋病、牙周炎、急性口腔感染、口腔念珠菌感染等。排除标准: 1) 3个月内抗生素使用史, 2周内局部抗菌治疗史。2)

系统性疾病及先天性疾病 (如糖尿病、肝炎、HIV等); 3) 妊娠期或哺乳期妇女。

受试者唾液采集前1 h内不进食、饮酒、喝含咖啡因的饮料等, 且12 h内未实施口腔保健。该研究得到重庆医科大学医学伦理道德委员会批准, 受试者签署知情同意书。于当日早上8~9点收集无刺激性唾液, 将每次收集的唾液置于5 mL的预装新鲜EDTA的EP管中, 封口膜封闭管口, 放置冰袋后运送到实验室并-80 ℃下储存, 直到下一步的DNA提取和磷酸测序分析。

1.2 DNA提取

利用Promega基因组DNA提取试剂盒 (Promega公司, 美国) 提取唾液样本微生物总DNA, 提取方法严格按照说明书进行, 提取DNA于-80 ℃冻存, 备用。

1.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增16S rRNA基因V3-V4区

使用通用引物V3-V4 (338F-806R) 进行细菌16S rRNA基因V3-V4区的扩增, 338F: ACTCCTACGGGAGGCAGCA; 806R: GGACTACHVGGGT-WTCTAAT。采用Axyprep DNA Gel Extraction Kit (Axy gen scientific公司, 美国) 进行PCR扩增, 全部样本按照要求重复3遍。之后对PCR产物行2%琼脂糖电泳检测产物, AxyPrep DNA凝胶试剂盒回收PCR产物, 使用Tris-HCl洗脱, 然后使用QuantiFluor-ST荧光定量系统对PCR产物进行定量测定。检测合格的PCR纯化产物进行16S rDNA高通量测序, 由上海美吉生物科技有限公司完成。

1.4 测序结果分析

每个样本测序获得双端序列, 双端序列之间依据重叠关系进行拼接, 同时对序列质量和拼接效果进行质控过滤。根据序列首尾两端的条码和引物序列区分, 优化有效序列。使用QIIME 1.8.0软件对原始数据进行处理, 采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 代表序列进行分类学分析, 比对Silva数据库 (Release128 <http://www.arb-silva.de>), 根据分类学层次[门 (Phyla)、属 (Genera)]分析微生物的群落结构和物种丰度。通过主成分分析 (principal component analysis, PCA), 以展示两组间的物种结构特征 (β多样性)。计算菌群多样性Simpson指数和丰富度ACE指数以展示口腔唾液菌群的多样性。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对实验数据进行统计分析, 组间样本在不同分类水平上进行单一因素方差和检

验差异性分析, 检出率比较采用卡方检验, 两组样本均数的比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 稀释曲线

根据获得的OTU数据绘制稀释曲线, 每个样品的稀释曲线见图1。由稀释曲线可知, 当序列超过20 000后, 随着样本序列的增加, 获得的OTU数目变化不大, 说明本次实验数据可靠, 测序数目达到要求。

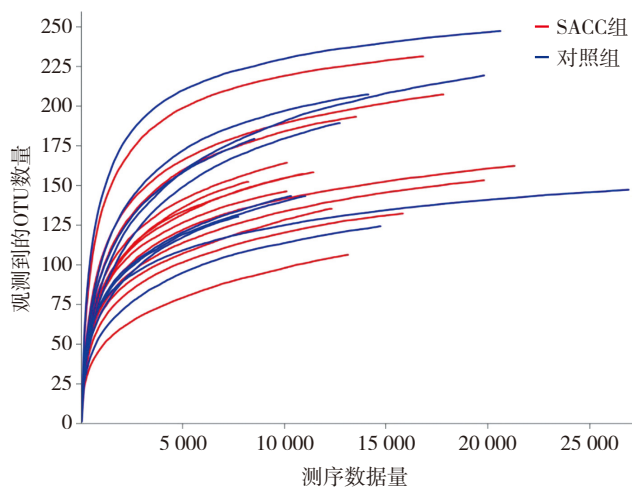


图1 稀释曲线

Fig 1 Rarefaction curves

2.2 高通量测序基本分析

通过Illumina MiSeq测序平台对SACC患者和对照组口腔唾液样本进行生物多样性检测, 共获得404 647条平均读长为444 bp的优质序列(平均每样本读取17 592条)。按照最小样本序列数抽平后,

在相似度97%水平上聚类OTU, 获得SACC患者、对照组的微生物物种注释数目分别为289、282 OTUs, SACC组的总观察物种数量多于对照组。

2.3 群落结构分析

通过Ribosomal Database Project (RDP) 数据库进行相似性比对和物种注释, 在门、属分类层次下对各样品物种丰度进行统计(图2)。分析表明SACC组的优势菌门(相对丰度>1%)是厚壁菌门(52.17%), 拟杆菌门(19.70%), 变形菌门(13.18%), 放线菌门(6.72%), 梭杆菌门(6.03%)。对照组的优势菌门主要是厚壁菌门(34.30%), 变形菌门(23.66%), 拟杆菌门(21.67%), 梭杆菌门(10.09%), 放线菌门(7.68%)。有统计学差异的依次为厚壁菌门($P=0.006$), 变形菌门($P=0.024$), 梭杆菌门($P=0.017$)。

2.4 优势菌属比较分析

基于97%的相似性类聚进行物种注释, 分析微生物的物种组成比例及丰度。结果显示, SACC组优势种群有16种(相对丰度>1%), 主要依次是: 链球菌属(36.68%), 奈瑟菌属(8.55%), 普雷沃菌属_7(7.53%), 韦荣球菌属(6.37%), 放线菌属(4.42%), 普雷沃菌属(4.10%), 梭杆菌属(3.39%)等。对照组优势种群有15种(相对丰度>1%), 主要依次是: 链球菌属(18.41%), 奈瑟菌属(18.20%), 普雷沃菌属_7(8.89%), 卟啉单胞菌属(6.20%), 梭菌属(5.86%), 韦荣球菌属(5.82%), 放线菌属(4.82%), 纤毛菌属(4.16%)等。有统计学差异的依次为链球菌属($P=0.005$), 奈瑟菌属($P=0.012$), 卟啉单胞菌属($P=0.044$), 而嗜二氧化碳噬细胞菌属仅在SACC组中检出。

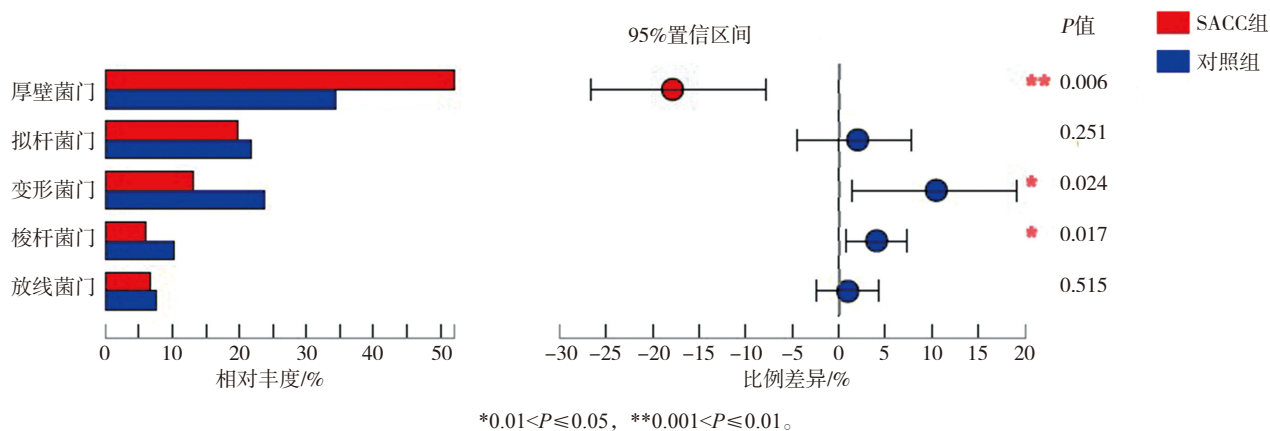


图2 优势菌门比较

Fig 2 Comparison of dominant bacteria phyla

2.5 微生物群落结构分析

通过PCA对SACC患者和对照组口腔唾液样本进行 β 多样性分析, 以比较微生物群落的构成, 评估微

生物群落间的差异。由图3可见2组人群的分离趋向, 表明SACC患者和对照组口腔唾液样本的细菌群落组成存在明显差异。

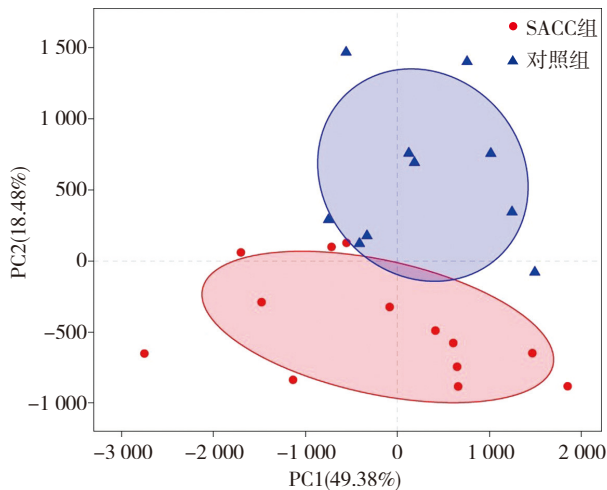


图3 SACC组和对照组唾液微生物群落结构比较

Fig 3 Comparison of saliva microbial community structure between SACC group and control group

2.6 微生物多样性分析

基于OTU统计进行微生物多样性和丰度分析表明, SACC组检出的可观察物种数量(289个OTUs)多于对照组(282个OTUs), 此结果与高通量测序获得的Simpson多样性指数结果相一致, SACC组OTU数及Simpson多样性指数(0.12 ± 0.08)高于对照组(0.09 ± 0.05), 但二者间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。SACC组和对照组ACE指数分别为 176.87 ± 23.54 、 186.76 ± 36.78 , 对照组的微生物丰富度高于SACC组, 但二者间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

唾液是一种混合性液体, 包含了唾液腺分泌液、龈沟液和黏膜渗出液等, 储存了大量的人类口腔微生物和口腔局部组织以及身体其他部位感染微生物和病毒的RNA和DNA等基因信息。口腔微生物可以以群体的方式引起各种口腔疾病, 群体中的每一个个体均参与了疾病的发生发展过程, 即使是低丰度的成员依然可能作为复杂的群落行为表现的关键物种^[11]。研究^[12-14]发现, 微生物及其产物, 包括内毒素、酶和代谢副产品, 对宿主细胞有毒性作用, 可以通过引起基因突变或信号通路的改变直接影响上皮细胞的增殖和生存。此外, 微生物还可通过激活宿主细胞来产生间接影响, 比如中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞、成纤维细胞和上皮细胞, 产生活性氧、反应性氮、活性脂质和代谢物及基质金属蛋白酶, 可引起DNA的损伤上皮细胞^[15-17]。本研究利用高通量测序技术对SACC患者和健康受试者唾液中细菌DNA的16S rRNA进行测序, 通过找出序列的差异来分析微生物群落结构的组成, 可以

快速鉴定出尚不能人工培养的微生物。而且, 对于样本中含量较低的种属, 高通量测序技术也可以进行测序^[18], 并具有覆盖度高的优点。

测序后对物种进行注释筛选, 统计了SACC组与对照组门水平和属水平两个分类学水平的数量, 以及分析了两组的微生物多样性、丰度及群落结构。研究发现, SACC组OTU数量高于对照组, 但二者间差异无统计学意义。Wolf等^[19]运用Illumina MiSeq测序平台对13名口咽鳞状细胞癌患者和11名健康受试者的唾液样本进行微生物多样性分析, 发现2组间微生物多样性和丰度无统计学差异, 与本研究结果相同。虽然SACC患者与健康受试者唾液微生物多样性和丰度无统计学差异, 但不能代表2组的微生物结构无差异。与Ahn等^[20]采用16S rRNA基因焦磷酸测序分析健康人唾液微生物的多样性, 发现唾液中最主要的类群是厚壁菌门一样, 本研究发现厚壁菌门在SACC组和对照组里为丰度最高的菌门, 但SACC组厚壁菌门的丰度明显高于对照组。这与Pushalkar等^[21]运用454焦磷酸测序技术检测口腔鳞状细胞癌患者唾液的结果一致。推测厚壁菌门中可能含有更多的与癌症相关的菌属。

与门水平差异结果相对应的是, SACC患者唾液中链球菌属(属于厚壁菌门)为丰度最高的菌属, 与Pushalkar等^[21]在口腔鳞状细胞癌患者唾液中发现的链球菌属的丰度高于其他菌属一样。2组研究还发现在口腔鳞状细胞癌和SACC患者唾液中, 链球菌属的含量均高于健康对照组。同时, Nagy等^[22]检测口腔鳞状细胞癌组织表面的生物膜, 发现链球菌属在癌组织表面的检出量高于健康组织表面。推测这种变化可能是由于口腔微环境的改变干扰正常的微生物群, 从而有利于条件致病菌的繁殖。

本实验结果还发现, 奈瑟菌属和卟啉单胞菌属在对照组的含量高于SACC组。Wolf等^[19]在对口咽鳞状细胞癌患者和Pushalkar等^[21]对口腔鳞状细胞癌患者唾液的研究中, 同样发现奈瑟菌属在健康对照组的含量高于癌症组。与本实验结果相反的是, Pushalkar等^[21]发现卟啉单胞菌属在口腔鳞状细胞癌患者唾液中的含量高于健康对照组。值得注意的是嗜二氧化碳噬细胞菌属, 作为一种厌氧菌, 虽然在SACC组唾液中的含量不高, 但只能从SACC组的唾液中检出, 而Sakamoto等^[23]研究发现能够从口腔癌患者的颈部淋巴结中分离出该种细菌。然而以上2组间有统计学差异的菌属是否是SACC和口腔癌的致病菌以及在口腔癌症的发生发展过程中所起的作用还需进一步的研究来证明, 以期为后期的预防和诊治提供理论依据。

综上所述, 本文初步研究了SACC患者口腔微生物的基本组成和种群差异, 发现了SACC患者口腔微生物与健康受试者在唾液微生物群落结构上存在明显差异。应该注意的是16S rRNA基因分析有其自身的局限性, 如目前检测16S rRNA序列并不能检测活细菌。因此, 接下来的研究会将16S rRNA基因分析和传统培养的检测方法相结合, 或是通过进一步队列研究以阐明口腔微生物与疾病的关系。

[参考文献]

- [1] Blaser MJ. Understanding microbe-induced cancers[J]. Cancer Prev Res, 2008, 1(1): 15-20.
- [2] Marshall BJ, Windsor HM. The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention[J]. Med Clin North Am, 2005, 89(2): 313-344.
- [3] Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma[J]. Lancet, 1964, 1(7335): 702-703.
- [4] Kim KI, Kim YS, Kim HK, et al. The detection of Epstein-Barr virus in the lesions of salivary glands[J]. Pathol Res Pract, 1999, 195(6): 407-412.
- [5] Shukla VK, Singh H, Pandey M, et al. Carcinoma of the gallbladder: is it a sequel of typhoid[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(5): 900-903.
- [6] Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, et al. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*[J]. Helicobacter, 2010, 15(1): 30-37.
- [7] Ganly I, Yang L, Morris L, et al. Association of the oral microbiome with cigarette smoking and oral cancer[J]. Oral Oncol, 2011, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.179.
- [8] Sakamoto H, Naito H, Ohta Y, et al. Isolation of bacteria from cervical lymph nodes in patients with oral cancer[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44(10): 789-793.
- [9] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 3-18, 315-316.
Qiu WL. Oral and maxillofacial surgery[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 3-18, 315-316.
- [10] Konno A, Ito E. A study on the pathogenesis of recurrent parotitis in childhood[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl, 1979, 88(6 Pt 4 Suppl 63): 1-20.
- [11] Kato H, Yoshida A, Awano S, et al. Quantitative detection of volatile sulfur compound-producing microorganisms in oral specimens using real-time PCR[J]. Oral Dis, 2005, 11 (Suppl 1): 67-71.
- [12] Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer[J]. J Intern Med, 2000, 248(3): 171-183.
- [13] Lax AJ, Thomas W. How bacteria could cause cancer: one step at a time[J]. Trends Microbiol, 2002, 10(6): 293-299.
- [14] Lax AJ. Opinion: bacterial toxins and cancer—a case to answer[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(4): 343-349.
- [15] Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, et al. Environmental and chemical carcinogenesis[J]. Seminars Cancer Biol, 2004, 14(6): 473-486.
- [16] Peek RM Jr, Mohla S, DuBois RN. Inflammation in the genesis and perpetuation of cancer: summary and recommendations from a national cancer institute-sponsored meeting [J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8583-8586.
- [17] Chen PC, Pan CC, Kuo C, et al. Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(1): 57-61.
- [18] Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(Suppl 11): 7-16.
- [19] Wolf A, Moissl-Eichinger C, Perras A, et al. The salivary microbiome as an indicator of carcinogenesis in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma: a pilot study [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5867.
- [20] Ahn J, Yang LY, Paster BJ, et al. Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison [J]. PLOS One, 2011, 6(7): e22788.
- [21] Pushalkar S, Mane SP, Ji XJ, et al. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011, 61(3): 269-277.
- [22] Nagy KN, Sonkodi I, Szöke I, et al. The microflora associated with human oral carcinomas[J]. Oral Oncol, 1998, 34(4): 304-308.
- [23] Sakamoto H, Naito H, Ohta Y, et al. Isolation of bacteria from cervical lymph nodes in patients with oral cancer[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44(10): 789-793.

(本文编辑 杜冰)