

强直性脊柱炎患者口腔菌群的多样性及差异性研究

丁泓百¹, 杨 阳², 沈 逸³, 边艳琴³, 刘 扬¹, 朱 琦^{2,3*}

¹上海中医药大学, 上海

²上海中医药大学附属光华医院关节内科, 上海

³上海市中医药研究院中西医结合关节炎研究所, 上海

Email: *zhuqigh540@126.com

收稿日期: 2021年3月7日; 录用日期: 2021年4月7日; 发布日期: 2021年4月14日

摘 要

目的: 通过高通量测序探究强直性脊柱炎患者口腔菌群的紊乱情况, 分析口腔菌群与疾病活动度的相关性。方法: 选取强直性脊柱炎患者66名, 健康对照者31名纳入本次研究。收集所有研究对象的非刺激性唾液, 提取DNA进行16SrRNA高通量测序, 检测所有研究对象的口腔菌群组成, 并进行菌群多样性分析, 分析AS患者与健康对照者的菌群差异。收集患者临床信息, 分析菌群与临床疾病活动的相关性。结果: 我们的研究在所有受试者口腔中共发现菌群17个门(Phylum), 32个纲(Class), 63个目(Order), 115个科(Family), 224个属(Genus)。α多样性分析显示强直性脊柱炎患者的口腔菌群丰度及多样性大于健康组($P < 0.05$)。β多样性分析显示患者口腔菌群的组成和健康组之间存在一定差异, 但无法完全分开($P > 0.05$)。差异性分析显示患者口腔菌群在门水平有1种菌群, 在科水平有3种菌群, 在属水平有11种菌群的丰度与健康志愿者有差异($P < 0.05$)。相关性分析显示在属水平有29种菌群与患者的ESR或CRP相关, 19种菌群与ASDAS或BASDAI相关($P < 0.05$)。AS患者口腔中fusobacteriae_unclassified与ESR、ASDAS-ESR呈正相关, 且AS患者口腔中fusobacteriae_unclassified丰度高于健康志愿者。结论: 强直性脊柱炎患者存在口腔菌群紊乱的现象, 且菌群紊乱与疾病活动具有一定相关性。

关键词

强直性脊柱炎, 口腔菌群, 16SrRNA测序, 相关性

Diversity and Difference of Oral Flora in Patients with Ankylosing Spondylitis

Hongbai Ding¹, Yang Yang², Yi Shen³, Yanqin Bian³, Yang Liu¹, Qi Zhu^{2,3*}

¹Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

*通讯作者。

文章引用: 丁泓百, 杨阳, 沈逸, 边艳琴, 刘扬, 朱琦. 强直性脊柱炎患者口腔菌群的多样性及差异性研究[J]. 临床医学进展, 2021, 11(4): 1509-1517. DOI: 10.12677/acm.2021.114216

²Department of Rheumatology, Shanghai Guanghua Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

³Arthritis Institute of Intergrated Traditional and Western Medicine, Shanghai Chinese Medicine Research Institute, Shanghai

Email: *zhuqigh540@126.com

Received: Mar. 7th, 2021; accepted: Apr. 7th, 2021; published: Apr. 14th, 2021

Abstract

Objective: To investigate the relationship of oral flora disorder in ankylosing spondylitis by analyzing the differences of oral flora among ankylosing spondylitis patients and healthy controls, and to study the correlation between oral flora disorder and disease activity in ankylosing spondylitis. **Methods:** 66 ankylosing spondylitis patients and 31 healthy controls were enrolled in the study. The non-irritating saliva of all subjects was collected to extract DNA for 16SrRNA high-throughput sequencing using Illumina Miseq platform. The oral flora composition of all subjects was detected and analyzed to look for the differences between ankylosing spondylitis patients and healthy controls. The correlation between oral flora disorder and disease activity in ankylosing spondylitis is analyzed. **Result:** Results found that it consisted of 17 Phylums, 32 classes, 63 orders, 115 families, and 224 Genus in the oral cavity of all subjects in our study. The results from a diversity analysis showed that the abundance and diversity of oral flora in ankylosing spondylitis patients group were greater than those in healthy group ($P < 0.05$). Although there was a certain difference of the composition of the oral flora between ankylosing spondylitis patients group and the healthy group, there was no statistic difference in β diversity ($P > 0.05$). Compared with healthy control group, the difference analysis showed that there was 1 species in the Phylums level, 3 species in the family level, 11 species in the genus level of bacteria different between AS patients and healthy volunteers ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that there are 29 species associated with ESR or CRP in patients, 19 species are associated with ASDAS or BASDAI, ($P < 0.05$). The Fusobacteriaceae_unclassified in the oral cavity of AS patients was positively correlated with ESR and ASDAS-ESR, and the abundance of Fusobacteriaceae_unclassified in AS oral cavity was higher than that in normal subjects. **Conclusions:** There is a disorder in the oral flora of patients with ankylosing spondylitis. The disorder of oral flora was associated with disease activity.

Keywords

Ankylosing Spondylitis, Oral Flora, 16SrRNA Sequencing, Relevance

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

强直性脊柱炎(Ankylosing Spondylitis, AS), 是一种以累及脊柱, 骶髂关节及外周关节为主要特点的慢性免疫性炎症性疾病。HLA-B27 的发现揭示遗传因素在 AS 发病中的地位, 然而单纯依靠遗传因素并不能解释疾病的发病机制, 近年来随着第二代测序技术的发展, 微生物作为重要的环境因素再次成为研究的热点。口腔是外来物质进入人体最主要的途径, 大量微生物通过口腔进入人体, 使口腔成为人体除肠道外含微生物最多的部位, 已经发现超过 600 种微生物定殖在口腔中, 因此口腔微生态的稳定与人体健

康息息相关[1]。已有的研究发现口腔菌群的紊乱不光与牙周炎、龋齿、口腔癌等口腔内病变相关，同时也与冠心病、糖尿病等系统性疾病有关[2]。现阶段关于 AS 患者口腔菌群的研究相对较少，但是口腔菌群与其他风湿病如类风湿关节炎、干燥综合征等的相关性已经得到肯定[3]。因此对于强直性脊柱炎患者口腔菌群的研究将有利于进一步阐明其发病因素及发病机制。

2. 材料与方法

2.1. 一般资料

研究对象来源于光华脊柱关节炎前瞻性队列研究(GHSPICS)。具体为 2017 年 12 月至 2018 年 8 月上海市光华中西医结合医院关节内科的门诊或住院的强直性脊柱炎患者，正常组全部来自患者的健康家属共 31 名。共纳入符合标准的强直性脊柱炎患者共计 66 名，平均年龄为 40.68 ± 13.76 岁。平均病程为 151.23 ± 112.81 月。HLA-B27 阳性的患者 60 名，占总体的 90.9%。具有吸烟史的患者 26 名，占总体的 34.4%。健康志愿者共计 31 名，平均年龄为 35.9 ± 19.2 ，与 AS 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)，本部分将所有研究对象分为强直性脊柱炎组(66 名)及健康志愿者组(31 名)。

2.2. 纳入和排除标准

纳入标准：AS 患者需符合 1984 年修订的纽约标准[4]，或国际脊柱关节炎评估工作组(ASAS) 2010 年关于中轴 SPA 的分类标准[5]。排除标准：①使用抗生素的患者：包括入组前 3 个月内接受过全身大剂量抗生素治疗者、长期全身性使用抗生素者或长期使用抗菌性漱口水的受试者；②合并其他风湿免疫病的患者，包括且不限于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合症等；③合并有严重且未控制的心、脑、肝、肾、造血系统、内分泌系统、神经精神系统疾病，肿瘤或免疫缺陷的患者；④妊娠或哺乳期女性；⑤理解能力差，不能完成研究评估量表者。

2.3. 研究方法

收集所有受试者的口腔非刺激性唾液并提取 DNA，分组编号，采用口腔菌群 16SrRNA 测序中 V3-V4 区的通用引物 341F 和 785R 进行 PCR 扩增。质检后通过 IlluminaMiseq 进行 16SrRNA 测序。通过 CRF 表收集患者的一般资料及临床信息，包括年龄、性别 Bath AS 疾病活动指数(BASDAI) [6]、强直性脊柱炎疾病活动度评分(ASDAS) [7]、C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)。

2.4. 统计学分析

扩增子分析使用 QIIME1 软件进行 OUT 数据的处理，使用 R 语言进行多样性分析，主成分分析统计使用 Adonis 检验。使用 SPSS21.0 对数据进行分析，两组间比较时符合正态分布的数据使用独立样本的 t 检验，不符合正态分布的数据使用 Mann-Whitney U 检验。相关性检验中满足正态分布的数据使用 Pearson 相关性检验，不满足正态分布的数据使用 Spearman 相关性检验。对于计量资料使用均值 \pm 标准差表示，计数及等级资料使用中位数 + 四分位数表示。P 值小于 0.05 表明有统计学差异。

3. 结果

3.1. 强直性脊柱炎及健康志愿者口腔菌群的组成情况

本研究纳入的共计 97 个研究对象唾液样本中口腔菌群中发现了 17 个门(Phylum)，32 个纲(Class)，63 个目(Order)，115 个科(Family)，224 个属(Genus)。AS 组共计检测出 57,853 个 OTU，平均每个患者检测出 876.6 个 OTU，健康组共计检测出 17,683 个 OTU，平均每个受试者检测出 570.4 个 OTU。

3.2. 强直性脊柱炎患者及健康志愿者口腔菌群在不同水平的组成

强直性脊柱炎患者及正常人口腔菌群组成在门水平上一共发现 17 种菌群，所有受试者在门水平中，厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)五门菌群占口腔菌群总量的 94.8%，为口腔菌群门水平的优势菌群。在科水平上一共发现 115 种菌群，其中链球菌科(Streptococcaceae)、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、奈瑟氏菌科(Neisseriaceae)、紫单胞菌(Porphyrromonadaceae)、Leptotrichiaceae、肉杆菌科(Carnobacteriaceae)、韦荣球菌科(Veillonellaceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)、巴斯德氏菌科(Pasteurellaceae) 10 科菌属占总体的 79% 以上，为口腔菌群在科水平的优势菌群。在属水平上一共发现 214 种菌群，其中链球菌属(Streptococcus)、普氏菌属(Prevotella)、罗氏菌属(Rothia)、奈瑟菌属(Neisseria)、纤毛菌属(Leptotrichia)、卟啉单胞菌属(Porphyrromonas)、颗粒链菌属(Granulicatella)、韦永氏球菌属(Veillonella)、梭杆菌属(Fusobacterium)、Gemellaceae_unclassified、嗜血杆菌属(Haemophilus)、Bulleidia、放线菌属(Actinomyces)、奇异菌属(Atopobium)、Oribacterium，15 种菌属占总体的 84% 以上，为口腔菌群属水平的优势菌群，见图 1。

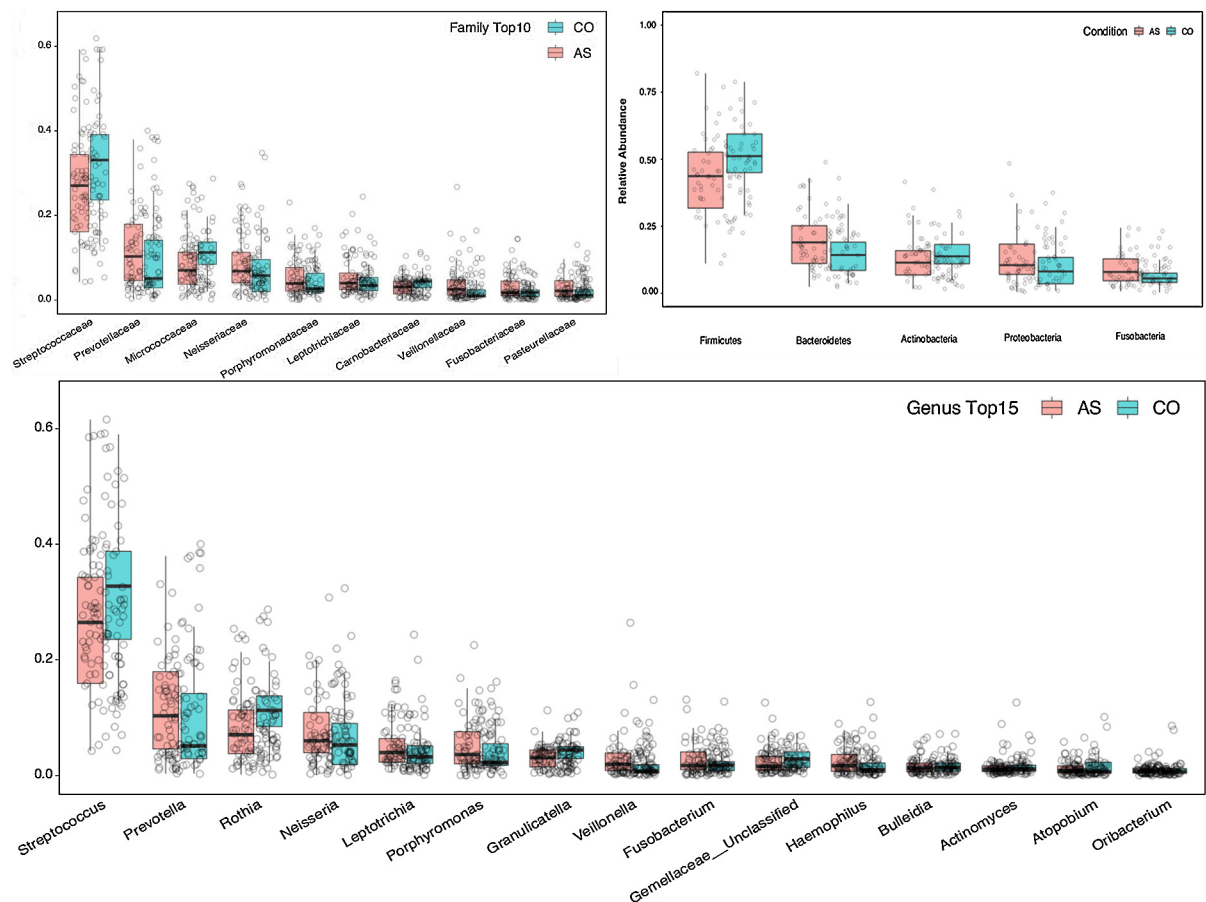


Figure 1. Dominant flora of oral flora in different levels

图 1. 不同水平口腔菌群的优势菌群

3.3. 强直性脊柱炎患者和健康志愿者口腔菌群的多样性分析

利用秩和检验比较 AS 组和健康组的 α 多样性指数，显示 AS 组的 Observed otus 指数、chao1 指数、shannon 指数、simpson 指数均高于健康组。见表 1。

Table 1. α diversity analysis of differences between AS and healthy control
表 1. 强直性脊柱炎患者与健康志愿者口腔菌群 α 多样性分析

| | shannon | simpson | chao1 | observed_otus |
|------|-----------------|-----------------|-----------------------|---------------------|
| AS 组 | 6.16 \pm 0.92 | 0.94 \pm 0.04 | 2043.58 \pm 1221.77 | 876.56 \pm 440.46 |
| CO 组 | 5.67 \pm 0.55 | 0.93 \pm 0.03 | 1182.08 \pm 393.58 | 570.39 \pm 145.74 |
| P 值 | 0.013 | 0.049 | 0.002 | 0.002 |

β 多样性分析中主成分分析显示 AS 患者口腔菌群的组成和健康志愿者之间可能存在一定差异, 但无法完全分开($P = 0.075$, $R^2 = 0.0202$), 见图 2。

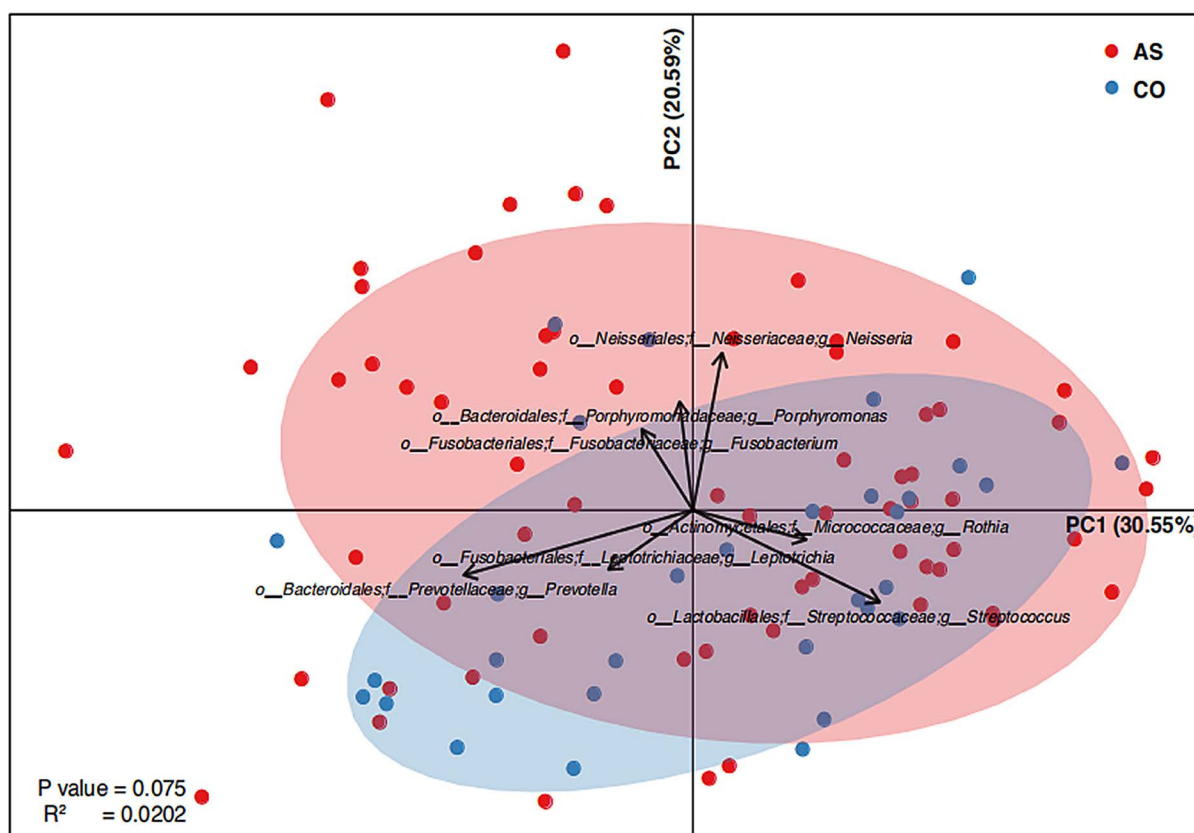
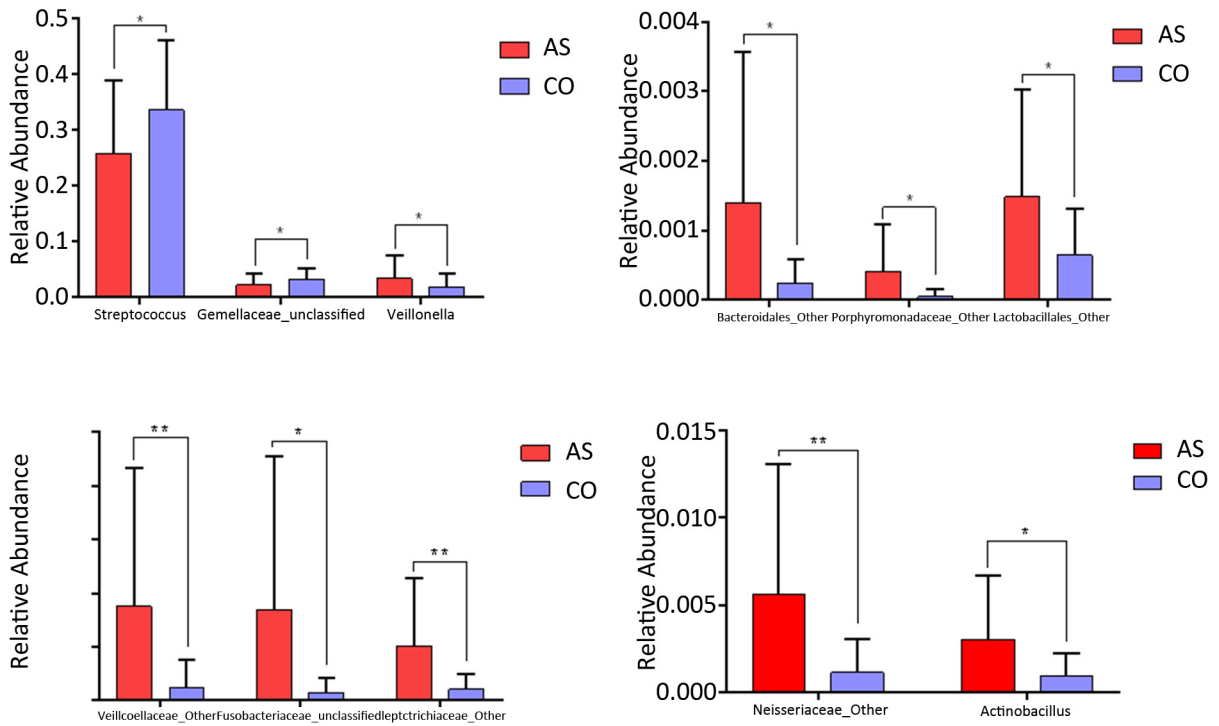


Figure 2. β diversity analysis of differences between AS and healthy control

图 2. 不强直性脊柱炎患者与健康志愿者口腔菌群 β 多样性分析

3.4. 强直性脊柱炎患者和健康志愿者口腔菌群的差异性分析

通过比较不同菌群在两组间的差异, 显示患者在门水平有 1 种菌群, 在科水平有 3 种菌群, 在属水平有 11 种菌群的丰度与健康志愿者有差异, 其中属水平 AS 患者口腔中链球菌属(*Streptococcus*), *Gemellaceae_unclassified* 的丰度低于健康组, 而韦荣球菌属(*Veillonella*), *Neisseriaceae_other*, 放线杆菌 (*Actinobacillus*), *Veillonellaceae_other*, *Fusobacteriaceae_unclassified*, *Lactobacillale_other*, *Bacteroidales_other*, *Leptotrichiaceae_other*, *Porphyromonadaceae_other* 的丰度高于健康组, 且差异具有统计学意义, 图 3。



注：*表示 P 值小于 0.01；**表示 P 值小于 0.001。

Figure 3. Differences of oral flora between AS and healthy control in genus levels

图 3. 强直性脊柱炎患者和健康志愿者口腔菌群在属水平的差异

3.5. 口腔菌群与疾病活动度的相关性

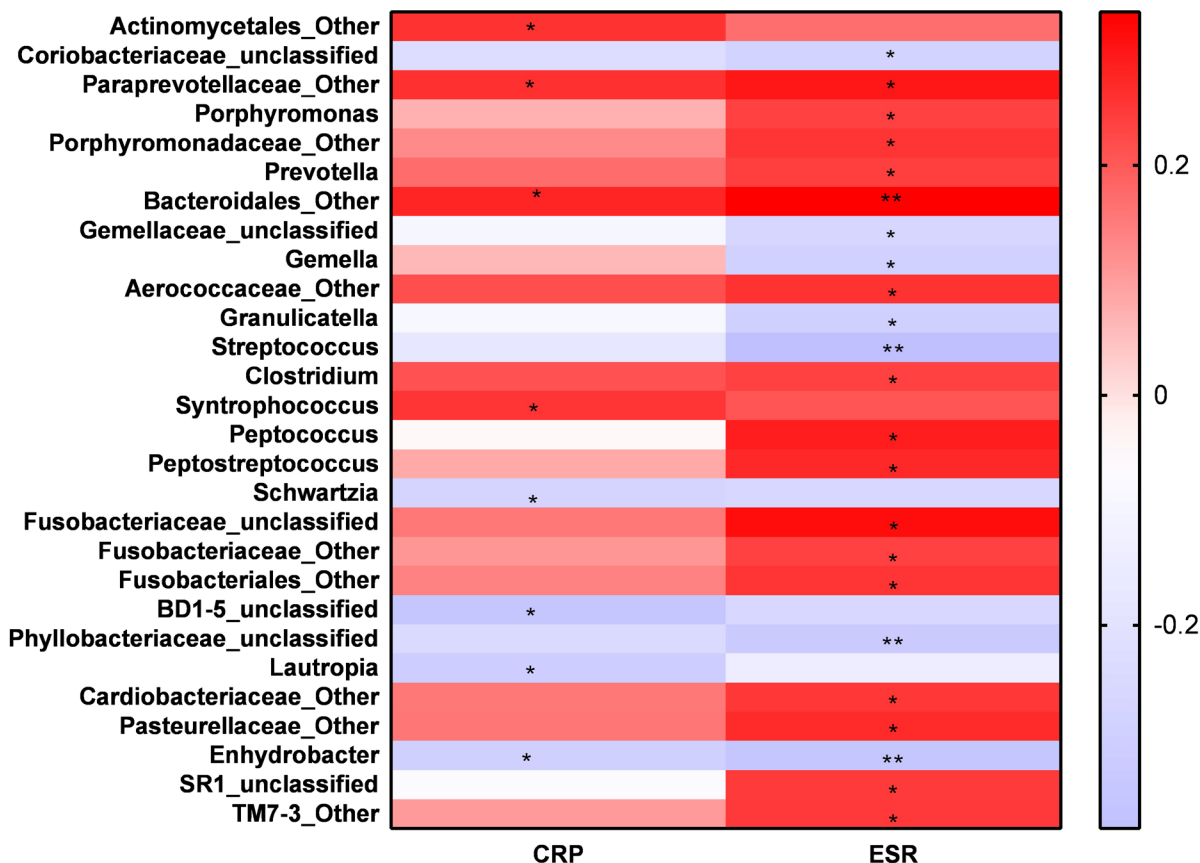
通过 Spearman 相关性分析，比较属水平口腔菌群与疾病活动度的相关性，并用热图展示出来。菌群与实验室指标的相关性研究中共有 29 种菌群与 ESR、CRP 相关，其中丰度前十的包括链球菌属(*Streptococcus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、颗粒链菌属(*Granulicatella*)、Gemellaceae、SR1、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)、劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)、Fusobacteriaceae_unclassified、Bacteroidales_other，见图 4。

口腔菌群与疾病活动指标的相关性发现共有 19 种微生物与疾病的活动相关，包括劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)、坦纳菌属(*Tannerella*)、梭杆菌科(*Fusobacteriaceae*)、Leptotrichiaceae_other、RF39、丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、施瓦茨氏菌属(*Schwartzia*)、Coriobacteriaceae_unclassified、Cardiobacteriaceae_other 等，见图 5。

此外，AS 患者口腔中丰度升高的 Fusobacteriaceae_unclassified 与患者的 ESR、ASDAS-ESR 均呈正相关。

4. 讨论

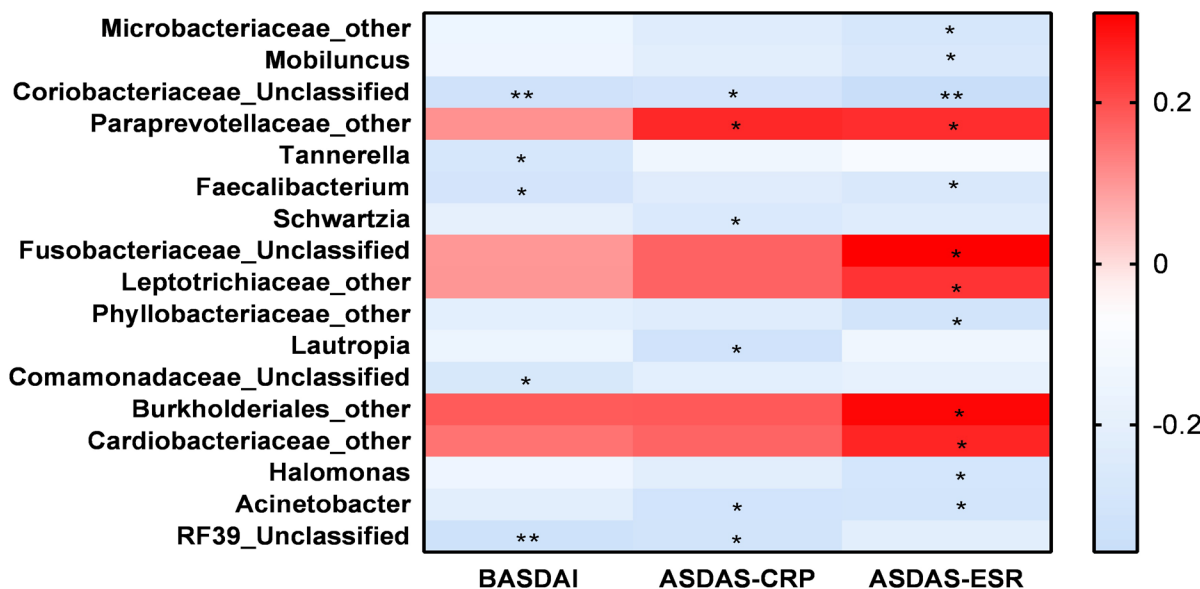
强直性脊柱炎是一种累及脊柱及外周关节的慢性风湿病，炎性肠病为其关节外受累的特征之一，因此既往菌群与 AS 相关性的研究多集中于肠道菌群[8]。研究显示 AS 患者肠道菌群存在紊乱的情况，且肠道菌群可能参与到疾病的进展中[9]。然而鲜有研究揭示口腔菌群与 AS 的联系。口腔菌群是指定植于口腔表面的菌落的集合，以生物膜的形式存在，行使其生理功能。最新的研究显示 AS 患者有严重的口腔健康问题，但是未发现菌群的紊乱，这可能与研究的样本量相关[10]。



注：*表示 P 值小于 0.05；**表示 P 值小于 0.01。

Figure 4. Correlation analysis of oral flora and laboratory indicators

图 4. 口腔菌群与实验室指标的相关性



注：*表示 P 值小于 0.05；**表示 P 值小于 0.01。

Figure 5. Correlation analysis of oral flora and disease activity indicators

图 5. 口腔菌群与疾病活动指标的相关性

我们的研究在两组受试者唾液中共计检测出 75,536 个 OTU, 通过分析将口腔菌群分为 17 个门(Phylum), 32 个纲(Class), 63 个目(Order), 115 个科(Family), 224 个属(Genus), 并发现不同水平的优势菌群。对比上海一项关于正常人口腔菌群的研究发现菌群在优势菌群的组成结构上相似, 但是部分菌群在其占总体比例上却相差较大[11]。

α 及 β 多样性指数是用于评估菌群多样性, 代表了菌群的丰度及均匀度和评估两样本间菌群的组成差异。我们的研究以患者健康家属作为健康对照组, 尽量排除饮食等因素的影响, 结果发现 AS 组的 α 指数均高于健康组, 表明 AS 患者口腔菌群的丰度高于健康组。而 β 多样性分析显示两组间存在一定差异, 但差异无统计学意义, 表明 AS 组和健康组在菌群组成结构上差异不大, 可能与测序的样本量相关。

ESR、CRP、BASDAI 及 ASDAS 是临床上常用的评估疾病活动的指标[12] [13]。我们的研究发现多个菌群与疾病评估指标相关, 表明菌群与疾病活动具有一定的相关性。此外在 AS 患者中丰度升高的 *Fusobacteriaceae_unclassified* 与患者的 ESR、ASDAS-ESR 均相关, 但由于菌群分类研究的不完善, 关于 *Fusobacteriaceae_unclassified* 的资料很少, 其与疾病活动的关系需要进一步研究。

菌群与免疫系统的相关性一直是研究的热点, 我们的研究发现 AS 患者口腔菌群存在紊乱的现象, 且部分菌群的紊乱与疾病的活动相关, 提示我们口腔菌群可能参与到强直性脊柱炎的疾病进展中去。但是由于菌群分类资料的不完善及样本数量的限制, 口腔菌群与疾病的联系需要进一步研究, 同时最新的研究也显示, 绝大多数口腔菌群可以转移到肠道中去, 提示我们对于 AS 口腔菌群的研究可以结合肠道菌群考虑[14]。

基金项目

上海市科委中医引导类项目(16401930500); 上海市卫计委中医三年行动计划(ZY3-LCPT-1-1009); 上海市长宁区卫计委特色专科建设项目(20152002); 上海市卫生和计划生育委员会中医药科研专项课题(2016LP050)。

参考文献

- [1] Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., *et al.* (2010) The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, **192**, 5002-5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- [2] He, J., Li, Y., Cao, Y., *et al.* (2015) The Oral Microbiome Diversity and Its Relation to Human Diseases. *Folia Microbiologica*, **60**, 69-80. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0342-2>
- [3] 杨阳, 朱琦. 口腔菌群与风湿病相关性的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(2): 137-140.
- [4] Van der Linden, S., Valkenburg, H.A. and Cats, A. (1984) Evaluation of Diagnostic Criteria for Ankylosing Spondylitis. A Proposal for Modification of the New York Criteria. *Arthritis & Rheumatology*, **27**, 361-368. <https://doi.org/10.1002/art.1780270401>
- [5] Boonen, A., *et al.* (2010) ASAS/WHO ICF Core Sets for Ankylosing Spondylitis (AS): How to Classify the Impact of AS on Functioning and Health. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **69**, 102-107. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.104117>
- [6] Machado, P., *et al.* (2011) Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): Defining Cut-Off Values for Disease Activity States and Improvement Scores. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **70**, 47-53. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138594>
- [7] Roussou, E. and Sultana, S. (2010) The Bath Ankylosing Spondylitis Activity and Function Indices (BASDAI and BASFI) and Their Correlation with Main Symptoms Experienced by Patients with Spondyloarthritis. *Clinical Rheumatology*, **29**, 869-874. <https://doi.org/10.1007/s10067-010-1411-9>
- [8] Van, P.L., Vanf, E., Jacques, P., *et al.* (2013) Microscopic Gut Inflammation in Axial Spondyloarthritis: A Multiparametric Predictive Model. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **72**, 414-417. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202135>
- [9] 杨阳, 朱琦. 肠道菌群与脊柱关节炎相关性的研究进展[J]. 现代免疫学, 2018(4): 328-332.

-
- [10] Bisanz, J.E., Praema, S., Murray, T.W., *et al.* (2016) The Oral Microbiome of Patients with Axial Spondyloarthritis Compared to Healthy Individuals. *PeerJ*, **4**, e2095. <https://doi.org/10.7717/peerj.2095>
- [11] 史聪, 蔡丽婷, 邵方洋, 等. 上海地区汉族健康成年人唾液微生物菌群结构分析[J]. 同济大学学报(医学版), 2018(4): 29-34.
- [12] Yildirim, K., Erdal, A., Karatay, S., *et al.* (2004) Relationship between Some Acute Phase Reactants and the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Southern Medical Journal*, **97**, 350-353. <https://doi.org/10.1097/01.SMJ.0000066946.56322.3C>
- [13] 宋婧, 周凌, 陈凌, 等. 病情活动性指标 ASDAS、RAPID3 和 BASDAI 在判断强直性脊柱炎患者疾病活动度中的比较[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(8): 909-913.
- [14] Schmidt, T.S.B., Hayward, M.R., Coelho, L.P., *et al.* (2019) Extensive Transmission of Microbes along the Gastrointestinal Tract. *eLife*, **8**, e42693. <https://doi.org/10.7554/eLife.42693>