

高通量测序技术在口腔疾病中的应用进展

谷小杰 毕良佳

摘要 高通量测序技术即下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)或深度测序,广泛应用于全基因组和转录组的测序、基因组修饰的鉴定和蛋白质相互作用的分析。高通量测序技术不仅可以全面认识口腔微生物群落在健康和疾病状态下的特征,而且可以认识某种口腔微生物的生物功能及其在群落中的作用。对患者健康和患病细胞的基因组、外显子或转录组高通量测序的见解已经能够改善许多口腔疾病的诊断分类、预测和治疗选择。目前高通量测序技术在口腔疾病研究中应用广泛,本文将从高通量测序技术平台的发展及高通量测序技术在龋病、牙周病、口腔鳞状细胞癌和其他口腔疾病中的应用进行综述。

关键词 高通量测序 测序平台 口腔疾病 口腔微生物

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.08.003

口腔作为人体“门户”,有高度多样性、独特性的微生物群落,口腔微生物之间的物理、化学相互作用和口腔微生物和宿主之间的相互作用的失衡会导致口腔及全身疾病的发生。口腔疾病的发生常伴随着某种特征致病微生物的比例上升,因此不仅需要全面认识口腔微生物群落在健康和疾病状态下的特征,还需了解某种口腔微生物的生物功能及其在群落中的作用。高通量测序技术是目前最常用的不依赖于培养技术的分析微生物群落组成和功能的分子生物学方法,能够直接和全面地分析微生物的基因序列。高通量测序技术不仅能深入研究口腔微生物与口腔疾病的关系,而且从根本上改变了人们对人类健康和疾病背后的遗传学和表观遗传学分子基础的理解。对患者健康和患病细胞的基因组、外显子或转录组进行测序的见解已经能够改善许多口腔疾病的诊断分类、预测和治疗选择。本文就高通量测序技术平台的发展及高通量测序技术在口腔疾病研究中的应用进行讨论。

一、高通量测序技术

1. 高通量测序技术概述:高通量测序技术又名下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)或深度测序,其特征是大规模平行测序,同时进行数百万到数十亿个独立测序反应。相较于第1代测序 Sanger 测序技术,具有节省时间、低成本、高通量和高精确的特点。高通量测序可分为靶向测序、全基因组测

序(whole genome sequencing, WGS)和转录组测序。靶向测序中包括靶向扩增子测序和全外显子组测序(whole exome sequencing, WES),靶向扩增子测序聚焦于单个或者多个目标基因,例如鉴定细菌的 16S rRNA 基因、真菌的 18S rRNA 基因及内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)。

2. 高通量测序技术平台及应用进展:大部分短读第2代测序平台采用合成测序(sequencing by synthesis, SBS),但不同平台的核心技术有所区别。Roche454 焦磷酸测序是最早出现的第2代测序系统,原理是酶联化学发光反应,通过检测 DNA 合成反应时释放的焦磷酸来读取碱基信息,该技术以实现 100 倍的产量增加而使第1代技术发生了革命性的变化,因其成本较高,目前其配套的测序仪已停产。

Illumina 测序是第2代测序市场的主流平台,其核心技术为桥式 PCR 和可逆终止子技术。Illumina 目前有4个台式平台和两个大规模平台,台式测序仪(iSeq、MiniSeq、MiSeq 和 NextSeq)适用于规模较小的实验,例如细菌基因组分析、转录组分析及 WES,大规模测序平台主要适用于 WES 和 WGS。Illumina 测序的优点是高输出、高精度、低成本、应用多样性、跨平台兼容性能优以及文库制备的多样性。

美国 Life Technologies 公司推出的 IonTorrent 离子半导体测序将合成测序与大量平行微孔阵列匹配,每个微孔阵列都有专用传感器,将核苷酸序列直接转换为半导体芯片上的数字信息。其配套测序仪 Ion-PGM 是目前市场上最便宜的测序仪,近年来推出的 Ion GeneStudio S5 系列测序仪改变了仪器盒和试剂,文库制备更容易,运行时间更短^[1]。主要应用于靶

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81670994)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科

通讯作者:毕良佳,教授,博士生导师,电子信箱:biliangjia66@

163.com

向测序、外显子测序、转录组测序、小基因组测序、液体活检及染色质免疫沉淀测序。

第 3 代长读测序平台克服了第 2 代测序平台处理复杂、无法解析重复/较大基因序列、GC 偏好性等缺点,无需 PCR 扩增,进行超长读长测序^[2]。美国 PacBio 公司开发的单分子实时测序(single molecule real-time, SMART)是第一个流行的第 3 代测序技术,采用边合成边测序的策略,技术核心是零模波导孔(zero mode waveguide, ZMW)。单分子实时测序省去了克隆扩增步骤,与第 2 代测序技术比较,具有文库制备时间短、运行速度快、长读长测序等优点。随着平台的更新和进步,错误率已从 13% 降至 3%。主要应用于 WGS、靶向测序、全长 mRNA 测序、复杂群体测序及表观遗传检测。

另一个代表性的第 3 代测序技术是纳米孔单分子测序技术(oxford nanopore technologies, ONT)。这项技术检测每个碱基通过纳米孔时的特征电流变化,得到碱基测序^[3]。纳米孔不仅可以直接进行 DNA 测序,还可以直接测序 RNA 和蛋白质。但是其错误率极高,达 15%,仍需要进一步改进。

二、高通量测序在口腔疾病中的应用

1. 龋病:龋病是多种微生物和饮食依赖性疾,其特征是随着时间的推移形成产酸生物膜或牙菌斑,导致釉质表面脱矿,最终在临床上出现龋洞的慢性破坏性疾病。在龋病病因学方面,随着高通量技术的发展,测序分析已经鉴定出与体内龋病发展不同阶段密切相关的微生物。现代生态学观点认为,产酸和耐酸物种聚集,导致环境酸化,低 pH 值趋使口腔微生态失衡,最终导致龋病、牙周炎等感染性疾病的发展。Xiao 等^[4]应用 454 焦磷酸技术对细菌 16S rDNA 序列 V1 ~ V3 高变区扩增测序,共对 160 例健康和不同程度龋病患者的龈上菌斑采样,检测到 122 个属,453 种独立微生物。健康人群龈上菌斑的微生物多样性高于龋病患者,随着龋病程度加重,多样性逐渐降低,产酸菌导致 pH 值逐渐下降。最近的测序分析发现,在未检测到变异链球菌的龋病患者中,发现一组产酸和耐酸菌与龋病高度相关^[5]。对晚期牙本质龋的 454 焦磷酸测序结果表明,牙本质龋中乳杆菌属、普氏菌属、阿托波菌属、奥尔森菌属、放线菌属丰度较高,龋病进展相关菌种在 pH 值梯度上选择性聚集。高通量技术大样本追踪,纵向研究龋病进程中的微生物群落组成和结构变化,对龋病相关致龋菌有更深刻的认识。

在龋病诊断方面,Teng 等^[6]追踪研究了 50 例 4 岁儿童两年的菌斑和唾液微生物群并进行 454 焦磷酸测序,发现普雷沃菌是低龄儿童龋的主要预测因子,并且提出了一个龋齿的微生物指标预测模型,作为预测未来龋齿发病的方法。在龋病治疗方面,依据低 pH 值条件下,产酸菌及耐酸菌不断作用导致矿物质流失的病因学理念。Liang 等^[7]设计了一款添加叔胺(TA)改良的树脂黏接剂 TA@ RAs,它可以响应脱矿-再矿化的临界 pH 值,通过 TAs 的质子化和去质子化作用获得可逆的抗菌效应。Liang 等^[7]又采用高通量基因测序分析显示,TA@ RAs 能增加唾液生物膜的多样性,表明新型材料有助于调节微生物群向健康稳态方向发展。

2. 牙周病:牙周病是口腔复杂微生物稳态失衡与宿主免疫反应相互作用的慢性炎症性疾病,特征是牙周软组织炎症和硬组织丧失。高通量测序技术可以深入研究健康与不同疾病状态下的口腔微生物群落组成和结构,鉴定牙周相关致病菌群。对牙周病患者和健康患者龈下微生物的测序发现,慢性牙周炎和侵袭性牙周炎与龈下微生物的较高 α 多样性和均匀度有关。在门水平上,牙周炎优势菌门为拟杆菌门、梭杆菌门、互养菌门和螺旋体门^[8]。拟杆菌门、螺旋体门、互养菌门在广泛性侵袭性牙周炎患者龈下菌斑中占主导地位^[9]。Saccharibacteria(TM7)门与牙龈炎关联性最强^[10]。在属水平上,普氏菌属、卟啉单胞菌属和密螺旋体属等是牙周炎的优势菌属^[11];链球菌属、嗜血杆菌属、纤毛菌属与牙龈炎高度相关^[8]。高通量测序不仅能够认识微生物群落组成结构,同时能探究微生物代谢途径、功能基因。许多功能基因和代谢途径在牙周病菌群中过度表达,主要参与细菌趋化、鞭毛组装和毒素合成。有研究者应用高通量测序技术与转座子插入诱变技术相结合的转座子测序技术(transposon sequencing, Tn-seq)鉴定牙龈卟啉单胞菌必须基因和毒力基因,这有助于确定特异性治疗靶点^[12]。

高通量测序技术可以动态分析疾病发展过程中与疾病治疗前后的微生物群落变化,有利于制定有效的预防和治疗策略。牙周炎患者龈下菌斑微生物群落存在生物多样性及差异,与探诊深度有关。Shi 等^[13]比较分析健康人群、慢性牙周炎和侵袭性牙周炎不同位点龈下微生物组成,结果表明某些细菌与牙周袋深度呈线性相关。慢性牙周炎中支原体、产酸菌属、消化链球菌等和牙周袋深度呈正相关,侵袭性牙周炎中棒状杆菌和克雷伯菌和牙周袋深度呈正相关。

杨万娟等^[14]证实牙周基础治疗可以改变广泛性侵袭性牙周炎和重度慢性牙周炎患者龈下菌群的组成和结构,降低群落多样性,群落功能预测降低氨基酸代谢、甲烷代谢和肽酶等群落功能。

高通量测序技术可以进行大规模基因组测序,精准确定基因表达谱,鉴定牙周易感基因,鉴定和验证牙周诊断的生物学标志物。Kim 等^[15]采用深度测序法对健康人和牙周炎患者的 10 个牙龈组织的 RNA 进行分析,共检出牙周炎组织中 400 个上调基因,主要包括防御/免疫蛋白、受体、蛋白酶和信号分子基因,牙周炎 62 个下调的基因主要是细胞骨架蛋白和结构蛋白基因,这为牙周炎的发病机制提供了新的见解。

3. 口腔鳞状细胞癌:口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的头颈部恶性肿瘤之一。单一病原体仍无法解释与微生物群相关的致癌条件的复杂性,共生微生物群对肿瘤的发生和发展有更广泛的影响。当前研究结果表明,OSCC 肿瘤组织内优势菌属为二氧化碳噬纤维菌属、梭杆菌属、卟啉单胞菌属等^[16-18]。OSCC 唾液中富集菌属多为链球菌属、普氏菌属、韦荣菌属等^[19, 20]。虽然现有测序结果物种组成有差异,但是都观察到炎症相关的微生物丰度增加,包括铜绿假单胞菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌等,进一步基因功能预测表明,与脂多糖、肽酶合成相关等促炎性细胞因子基因表达显著增加。值得注意的是,具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌等牙周病病原体与 OSCC 高度相关,体外动物实验研究证实牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌具有致癌性,牙周炎已经被视为是口腔癌的危险因素。Perera 等^[21]应用 Illumina 测序平台揭示了一种与 OSCC 相关的异常真菌群,其特征是物种多样性较低,白色念珠菌相对丰度增加。高通量测序技术描述口腔癌相关口腔微生物群特征作出了重大贡献,口腔微生物群落的改变可作为预测 OSCC 病的诊断工具,具有潜在的应用价值。Lee 等^[22]比较健康、上皮癌前病变、口腔鳞癌患者的唾液样本,芽胞杆菌属、肠球菌属、细小球菌属、消化链球菌属和斯莱克菌属等 5 个属在上皮癌前病变组和癌症组之间比较,差异无统计学意义,可作为诊断口腔癌,尤其是上皮癌前病变-癌症转变的标志物。

高通量测序技术能够大规模、高精确快速检测 OSCC 全基因组、转录组,研究分析 OSCC 基因变化,从而为 OSCC 发生机制的研究和早期诊断和治疗提供基础。Su 等^[23]将 120 个 OSCC 样本进行了全外显子组测序,并对其中 2 个样本进行全基因组测序,揭

示了反映病因和预后相关性的口腔鳞状细胞癌分子亚群,确定了口腔鳞癌基因组编码区突变情况。某些基因的突变可驱动癌症的进展,基于高通量测序的癌症驱动基因突变分析有助于研究癌症进展过程。Al-hebshi 等^[24]鉴定出 20 个 OSCC 的候选新驱动基因以及驱动途径,为 OSCC 的遗传异质性提供了进一步的证据。

高通量测序可以鉴别与诊断和预后相关的生物学标志物,选择合适的药物靶点,设计个体化治疗方案,实现“精确医学”。循环 miRNA 是诊断和评估疾病进展和转移的理想生物学标志物,Chang 等^[25]对正常、白斑和 OSCC 患者的血浆应用高通量测序进行检测,筛选各组间表达差异的 miRNA,发现 miR-423-5p 和 miR-222-3p 在口腔癌组织中显著过表达,参与多种癌症通路,3 个 miRNA(miR-222-3p、miR-150-5p 和 miR-423-5p)有助于监测从口腔白斑到 OSCC 的恶性进展,并作为早期发现口腔癌的潜在生物学标志物。Padhi 等^[26]筛选出 104 例 OSCC 患者,运用高通量测序技术和比较基因组再交研究复发性 OSCC 和非复发性 OSCC 患者 CDKN2A/p16 的表达水平。发现与非复发性肿瘤比较,复发性肿瘤中 CDKN2A/p16 的下调大于 5 倍,CDKN2A/p16 表达缺失的复发病例预后差,生存率低。

4. 其他口腔疾病:复发性阿弗他口炎(recurrent aphthous stomatitis, RAS)是普通人群中最常见的口腔黏膜疾病,以浅圆形溃疡为特征。幽门螺杆菌被认为与 RAS 相关,但仍存在很多争议。Kim 等^[27]使用高通量测序技术证明了 RAS 与口腔唾液及黏膜微生物菌群失调相关,并发现唾液链球菌的减少和约氏不动杆菌的增加与 RAS 风险相关。Yang 等^[28]对 24 例患者正常口腔黏膜和口腔溃疡的细菌标本进行高通量测序分析,认为 RAS 的发生与大肠杆菌和 *Alloprevotella* 的增加以及链球菌的减少显著相关。

牙髓感染的治疗主要是应用根管治疗对根管系统进行局部消毒,消除感染源,抗菌药物可作为控制急性感染的辅助措施。Moraes 等^[29]评价抗生素对急性原发性牙髓炎患者口腔环境细菌群落多样性、结构和代谢途径的影响,发现预先使用抗生素患者的牙髓腔微生物代谢途径发生了改变,需要进一步研究确定先前接触抗生素是否会引起牙髓腔细菌毒力特性的表达从而影响治疗的疗效。

三、展 望

在过去 10 年中,高通量测序的投资和运行成本

已大幅下降,高通量测序技术广泛应用于口腔疾病研究的各个领域。高通量测序技术对理解口腔疾病的分子基础、常见病和罕见病的诊断以及再生疗法的发展有深远的影响,对疾病的早期诊断和个性化治疗提供了基础,对实现“精确医学”有着巨大的临床意义,此外其作为一种明确的病原体鉴定和宏基因组分析的技术手段具有前所未有的前景。高通量测序技术平台仍在不断更新和发展,未来需要进一步提高精确度、运行时间,并降低成本,以满足临床应用的需

参考文献

- Mehrotra M, Duose DY, Singh RR, *et al.* Versatile ion S5XL sequencer for targeted next generation sequencing of solid tumors in a clinical laboratory[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e181968
- 高海明, 赵彦艳. 第二代及三代测序技术在遗传学诊断中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 646–654
- Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly[J]. Genom Proteom Bioinform, 2016, 14(5): 265–279
- Xiao C, Ran S, Huang Z, *et al.* Bacterial diversity and community structure of supragingival plaques in adults with dental health or caries revealed by 16S pyrosequencing[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1145
- Eriksson L, Lif Holgersson P, Esberg A, *et al.* Microbial complexes and caries in 17-year-olds with and without Streptococcus mutans[J]. J Dent Res, 2017, 97(3): 275–282
- 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
- Liang J, Liu F, Zou J, *et al.* PH-responsive antibacterial resin adhesives for secondary caries inhibition[J]. J Dent Res, 2020, 99(12): 1368–1376
- Park OJ, Yi H, Jeon JH, *et al.* Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions[J]. J Dent Res, 2015, 94(7): 921–927
- Schulz S, Porsch M, Grosse I, *et al.* Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects[J]. Arch Oral Biol, 2019, 99: 169–176
- Al-Kamel A, Baraniya D, Al-Hajj WA, *et al.* Subgingival microbiome of experimental gingivitis: shifts associated with the use of chlorhexidine and N-acetyl cysteine mouthwashes[J]. J Oral Microbiol, 2019, 11(1): 1608141
- Tsai CY, Tang CY, Tan TS, *et al.* Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2018, 51(2): 226–234
- Hutcherson JA, Gogeneni H, Yoder Himes D, *et al.* Comparison of inherently essential genes of Porphyromonas gingivalis identified in two transposon-sequencing libraries[J]. Mol Oral Microbiol, 2016, 31(4): 354–364
- Shi M, Wei Y, Hu W, *et al.* The subgingival microbiome of periodontal pockets with different probing depths in chronic and aggressive periodontitis: a pilot study[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018,

8: 124

- 杨万娟, 徐杰. 牙周炎患者龈下菌斑菌群的高通量测序分析[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(3): 157–165
- Kim YG, Kim M, Kang JH, *et al.* Transcriptome sequencing of gingival biopsies from chronic periodontitis patients reveals novel gene expression and splicing patterns[J]. Hum Genomics, 2016, 10(1): 28
- Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, *et al.* Inflammatory bacteriome and oral squamous cell carcinoma[J]. J Dent Res, 2018, 97(6): 725–732
- Chang C, Geng F, Shi X, *et al.* The prevalence rate of periodontal pathogens and its association with oral squamous cell carcinoma[J]. Appl Microbiol Biot, 2019, 103(3): 1393–1404
- Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, *et al.* The oral microbiota may have influence on oral cancer[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 476
- Yang S, Huang H, Fan W, *et al.* Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer[J]. Oral Oncol, 2018, 77: 1–8
- Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, *et al.* 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment[J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 51320–51334
- Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, *et al.* A dysbiotic mycobiome dominated by Candida albicans is identified within oral squamous-cell carcinomas[J]. J Oral Microbiol, 2017, 9(1): 1385369
- Lee W, Chen H, Yang S, *et al.* Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer[J]. Sci Rep - Uk, 2017, 7(1): 16511–16540
- Su S, Lin C, Liu Y, *et al.* Exome sequencing of oral squamous cell carcinoma reveals molecular subgroups and novel therapeutic opportunities[J]. Theranostics, 2017, 7(5): 1088–1099
- Al-Hebshi NN, Li S, Nasher AT, *et al.* Exome sequencing of oral squamous cell carcinoma in users of Arabian snuff reveals novel candidates for driver genes[J]. Int J Cancer, 2016, 139(2): 363–372
- Chang Y, Weng S, Yang S, *et al.* A three-MicroRNA signature as a potential biomarker for the early detection of oral cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 758
- Padhi SS, Roy S, Kar M, *et al.* Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2017, 73: 27–35
- Kim YJ, Choi YS, Baek KJ, *et al.* Mucosal and salivary microbiota associated with recurrent aphthous stomatitis[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(Suppl 1): 57
- Yang Z, Cui Q, An R, *et al.* Comparison of microbiomes in ulcerative and normal mucosa of recurrent aphthous stomatitis (RAS)-affected patients[J]. BMC Oral Health, 2020, 20(1): 128
- Moraes LC, Lang PM, Arcanjo RA, *et al.* Microbial ecology and predicted metabolic pathways in various oral environments from patients with acute endodontic infections[J]. Int Endod J, 2020, 53(12): 1603–1617

(收稿日期: 2021-03-19)

(修回日期: 2021-03-24)