DOI:10.16016/j.1000-5404.201912166

类风湿关节炎患者舌苔菌群微生态研究

毛超飞,孙 辉,邹庆华,石 颖,杨 莉,万 萍,方勇飞 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院中医与风湿免疫科

[摘要] **目的** 从舌苔菌群微生态上研究类风湿关节炎患者疾病进展与菌群的关系。**方法** 使用口腔咽拭子刮取活动期(OP 组)、缓解期(OR 组)及健康对照组(OHC)各 10 例的舌苔,使用口腔拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒提取总 DNA,进行 16S rRNA 扩增并进行 Illumina MiSeq 高通量测序,对测序结果进行微生态分析。**结果** 3 组样本在菌群的多样性上差异无统计学意义($P>0.05$);3 组样本有着各自独有的菌属,其中 OP 组 7 个菌属,OR 组 4 个菌属,OHC 组 10 个菌属为各组独有;3 组样本的优势菌群组成相同,但是在菌群构成中差异具有统计学意义,主要在厚壁菌门、放线菌门、Episilonbacteraeota 菌门、变形菌门、奈瑟菌属、放线菌属、弯曲杆菌属和卟啉单胞菌属上(P 均<0.05)。进行 Beta 多样性分析,通过 PCA 分析以及层级聚类分析,OP 组和 OHC 组能够很好地聚集到一起,差异具有统计学意义。**结论** 类风湿关节炎患者舌苔菌群与健康人群存在差异,其中主要表现在放线菌属和弯曲杆菌属丰度增加,奈瑟菌属和卟啉单胞菌属丰度减少。

[关键词] 舌苔;菌群;类风湿关节炎;微生态
[中图法分类号] R241.25; R446.5; R593.22 [文献标志码] A

Microecology of tongue coating flora in patients with rheumatoid arthritis

MAO Chaofei, SUN Hui, ZOU Qinghua, SHI Ying, YANG Li, WAN Ping, FANG Yongfei Department of Traditional Chinese Medicine and Rheumatology Immunology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship between disease progression and microecology of tongue coating flora in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** A total of 30 tongue coating flora swabs were collected from 20 RA patients, including 10 in the active stage (OP group) and 10 in the remission stage (OR group), and 10 healthy individuals (OHC group). The total DNA extracted by rapid oral swab genomic DNA extraction kit was amplified with 16S rRNA and sequenced with high throughput Illumina MiSeq. The results were analyzed by microecology. **Results** There was no statistical difference in the diversity of 3 groups of samples ($P>0.05$). All the 3 groups of samples had their own unique genera, including 7 genera in OP group, 4 genera in OR group, and 10 genera in OHC group; The samples from 3 groups had the same composition of dominant flora, but obvious difference was seen in the composition of flora, mainly in *p_Firmicutes*, *p_Actinobacteria*, *p_Episilonbacteraeota*, *p_Proteobacteria*, *g_Neisseria*, *g_Actinomycetes*, *g_Campylobacter*, *and g_Porphyromonas* (all $P<0.05$). Through PCA analysis and hierarchical cluster analysis, OP group and OHC group can gather together well with significant differences. **Conclusion** There are differences between the flora of tongue coating in RA patients and healthy individuals. The abundances of *Actinomycetes* and *Campylobacter* are increased, while those of *Neisseria* and *Porphyromonas* are decreased.

[**Key words**] tongue coating; flora; rheumatoid arthritis; microecology

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81072921). Corresponding author: FANG Yongfei, E-mail: fangyongfei@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072921)
[通信作者] 方勇飞,E-mail:fangyongfei@qq.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一类以慢性滑膜炎症、多关节骨质破坏,并最终导致关节功能毁损的高致畸性的自身免疫性疾病。类风湿关节炎好发于女性,女性:男性比例大约为4:1[1]。类风湿关节炎发病机制不明,遗传、环境因素、免疫紊乱及黏膜损伤是导致类风湿发病的危险因素[2],近年来,各腔道微生物与类风湿关节炎的研究越来越多,揭示了微生物菌群与类风湿关节炎发病的关系。然而目前大多数研究集中在肠道微生物,对于口腔特别是舌苔菌群的研究较少。本研究即通过 Illumina MiSeq 高通量测序对舌苔菌群进行分析研究,探讨舌苔菌群微生态与类风湿关节炎发病的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 类风湿关节炎组(ORA) 选取于2019年5月至2019年9月于西南医院中医与风湿免疫科就诊的类风湿关节炎女性患者20例。根据DAS28(3,CRP)评分标准,将患者分为活动组(OP)10例及缓解组(OR)10例。纳入标准:①年龄40~60岁;②符合2010年ACR/EULAR类风湿关节炎分类标准确诊类风湿关节炎;③未使用或停用抗生素、糖皮质激素、生物制剂、羟氯喹等药物至少2个月以上。排除标准:①特殊饮食偏嗜;②合并口腔溃疡、龋齿等口腔疾病;③合并其他免疫相关疾病如狼疮、干燥综合征等;④合并糖尿病、高血压、心血管疾病等基础疾病。

1.1.2 健康对照组(OHC) 选取同期于我院健康体检的健康女性10例。纳入标准:①年龄40~60岁;②无糖尿病、高血压、心血管疾病、口腔等、免疫相关等疾病;排除标准:①特殊饮食偏嗜;②近期服用抗生素等药物。所有研究对象为已婚妇女 ,签署知情同意书,对所研究内容知悉。

1.2 材料与方法

1.2.1 样本采集与储存 受试者于晨起空腹情况下,用清水漱口后,医生用一次性密封咽拭子(扬州洋生医药科技有限公司 苏械注准20152640589)反复3次刮取舌体中后1/3处舌苔。样本立即放入密封套内并于零下-80 ℃冰箱内留存。

1.2.2 样本DNA的提取 使用bioteke口腔拭子基因组DNA快速提取试剂盒(离心柱型)提取口腔舌苔微生物总DNA,按照试剂盒使用说明进行总DNA提取,使用NanoDrop2000检测提取的DNA产物浓度及纯度。样本DNA存放于-20 ℃冰箱内留存。

1.2.3 PCR扩增及电泳 以提取样本总DNA为模板,338F-806R为引物序列对,对细菌16S rRNA区域V3和V4保守区域进行扩增。其中所用的引物序列:338上游:ACTCCTACGGGAGGCAGCAG,806下游:GGACTACHVGGGTWTCTAAT。PCR反应参数:①95 ℃预变形5 min;②95 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,循环30次;③72 ℃下继续延伸10 min后结束。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,扩增序列约750 bp。

1.2.4 Illumina Miseq测序 将所有样本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行Illumina Miseq平台进行双端序列测序。

1.2.5 信息学分析 通过Miseq对样本数据进行双端处理,质控过滤后得到优化序列,通过Usearch软件对优化数据进行聚类,将序列按照彼此的相似性(通常对97%相似水平下的OTU进行生物信息统计分析)分归为多个可操作分类单元OTU(Operational Taxonomic Units)将所得样本OTU数据与细菌16S rRNA数据库(silva132/16S_bacteria)进行序列比对,对样本数据进行菌群组成、Alpha多样性、Beta多样性、层级聚类等微生态分析。

1.3 统计学分析

所得样本数据采用SPSS 22.0进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 进行表示。3组样本间分析采用单因素方差分析或Kruskal- Wallis H秩和验检。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 基本信息

本研究中3组人群基线资料见表1。

表1 类风湿关节炎患者及健康受试者基本信息($\bar{x}\pm s$)

组别	n	年龄/岁	病程/年	DAS28(3,CRP)	RF阳性/例	CCP阳性/例
OP组	10	55.6±8.69	6.35±3.76	4.5±1.26	8	9
OR组	10	50.80±8.13	14.2±8.99	2.31±0.58	7	6
OHC组	10	49.40±5.74	—	—	0	0

2.2 测序信息

测序样本30例,共获取优质序列1 339 874条,碱基总长563 591 173 bp,平均序列长度420.63 bp,序列长度均在400~440 bp之间(图1)。

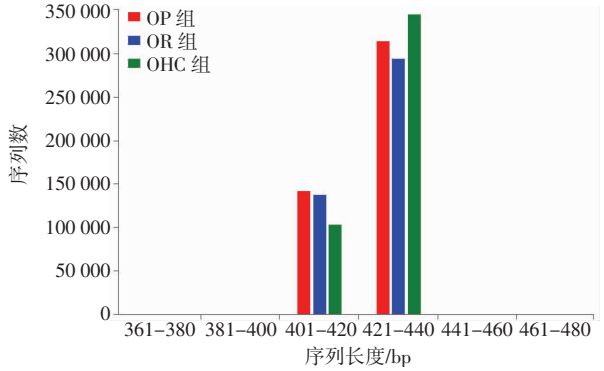


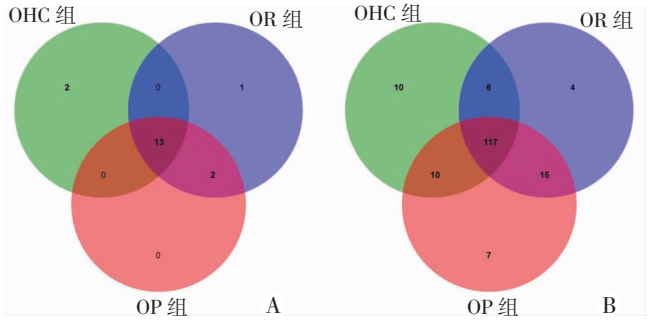
图1 类风湿关节炎患者及健康受试者样本序列长度分布情况

2.3 物种Alpha多样性分析

Alpha多样性分析可以反映微生物群落的丰富度和多样性。对样本进行Alpha多样性分析得到多样性指数统计表(表2),3组样本在物种多样性指数上差异无统计学意义(P均>0.05)。

2.4 菌群组成分析

2.4.1 物种Venn图分析 分别对3组样本与细菌16S rRNA数据库对比分析菌群组成,3组样本共检测出18个门、21个纲、55个目、93个科、169个属、306个种的细菌。对3组样本进行物种Venn图分析:门水平上,OHC组独有棒状杆菌门(Rokubacteria)及绿弯菌门(Chloroflexi),OR组独有异常球菌-嗜热菌门(Deinococcus-Thermus)(图2A);在属水平上,OHC独有的菌群有*Asteroleplasma*属,棒状杆菌属(*Rokubacteriales*),莫拉菌属(*Moraxellaceae*),纤毛菌属(*Leptotrichiaceae*),α-变形菌属(*Alphaproteobacteria*),放线菌属(*Actinobacteria*),微杆菌属(*Microbacterium*),Gitt-GS-136,*Actinomarinales*属,副杆菌属(*Parapedobacter*);OR独有的菌群有芽孢杆菌属(*Geobacillus*),*Candidatus_Brocadia*属,栖热菌属(*Thermus*),*Tepidimonas*属,OHC独有的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*),*Pelospora*属,斯卡多维亚氏菌属(*Scardovia*),泛菌属(*Pantoea*),脱硫微菌属(*Desulfomicrobium*),出牙菌属(*Gemmataceae*),拟斯卡多维亚氏菌属(*Alloscardovia*)(图2B)。



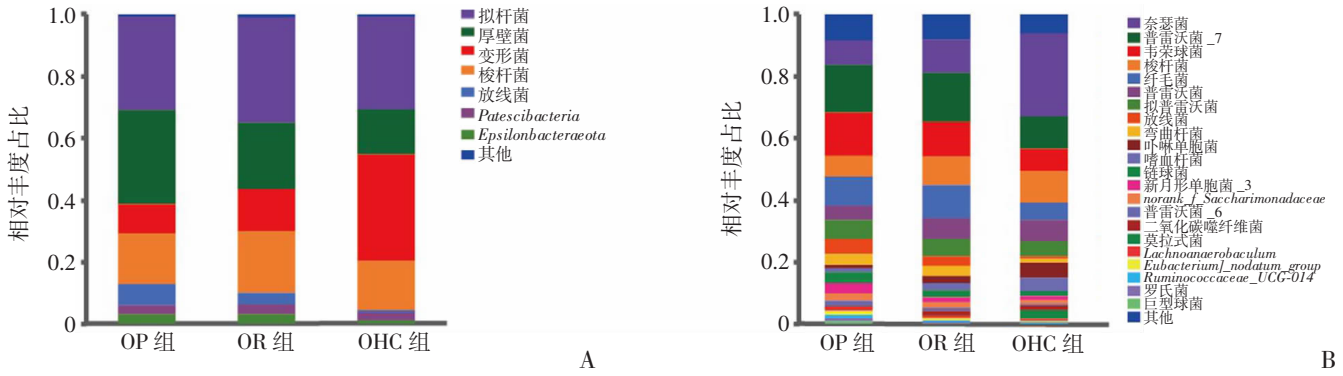
A:门水平,3组样本菌门相互包含关系;B:属水平,3组样本菌属相互包含关系

图2 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群物种组成

2.4.2 物种组成丰度占比分析 分别对3组样本物种组成丰度占比进行分析,在门水平上,3组样本中拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes),变形菌门(Proteobacteria),梭杆菌门(Fusobacteria),放线菌门(Actinobacteria),Patescibacteria菌门,Episilonbacteraeota菌门是优势菌门,占所有菌门的99%以上(图3A);属水平上,奈瑟菌属(*Neisseria*),普雷沃菌属-7(*Prevotella*-7),韦荣球菌属(*Veillonella*),梭杆菌属(*Fusobacterium*),纤毛菌属(*Leptotrichia*),普雷沃菌属(*Prevotella*),拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*),放线菌属(*Actinomycetes*),弯曲杆菌属(*Campylobacter*),卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)为优势菌属,占所有菌属的75%以上(图3B)。对丰度占比优势的物种进行统计学分析比较,在门水平上,3组样本在厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和Episilonbacteraeota菌门差异具有统计学意义,分别对有意义的菌门进行两两比较,其中OP组厚壁菌门、放线菌门、Episilonbacteraeota菌门丰度均高于OHC组,变形菌门丰度低于OHC组;OP组厚壁菌门丰度高于OR组;OR组变形菌门丰度低于OHC组(图4A)。在属水平上,3组样本在奈瑟菌属、放线菌属、弯曲杆菌属和卟啉单胞菌属上差异具有统计学意义,分别对有意义的菌属进行两两比较,其中OP组放线菌属和弯曲杆菌属丰度均高于OHC组,奈瑟菌属和卟啉单胞菌属丰度低于OHC组;OR组放线杆菌丰度高于OHC组(图4B)。

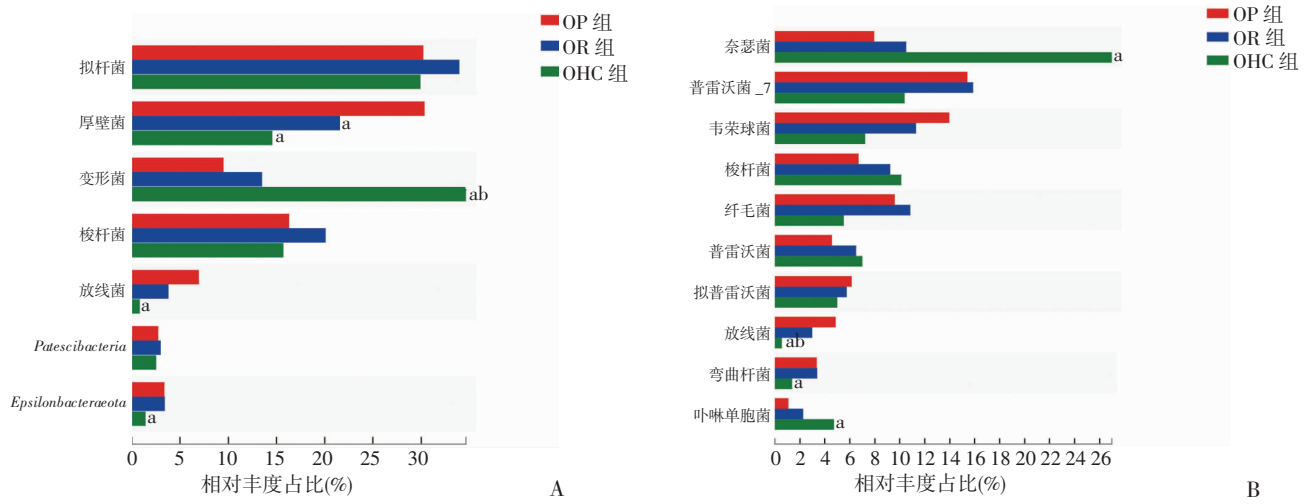
表2 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群物种多样性指数表 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	shannon指数	simpson指数	ace指数	chao指数
OP组	10	3.34±0.34	0.072 1±0.037 4	227.37±42.10	230.17±47.56
OR组	10	3.37±0.33	0.067 1±0.030 0	221.75±27.42	214.33±23.99
OHC组	10	3.10±0.27	0.099 7±0.036 2	207.74±31.20	220.33±42.87
整体比较(F,P)		2.22,0.13	2.57,0.10	0.88,0.43	0.33,0.72



A:门水平各组菌门相对丰度占比;B:属水平各组菌属相对丰度占比

图 3 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群物种相对丰度柱状分析

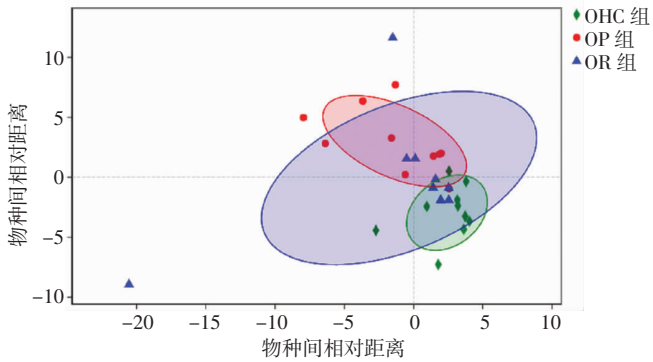


A:门水平上:3 组样本在厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和 Episilonbacteraeota 菌门上差异有统计学意义;B:属水平上:3 组样本在奈瑟菌属、放线菌属、弯曲杆菌属和卟啉单胞菌属上差异具有统计学意义 a:$P<0.05$,与 OP 组比较;b:$P<0.05$,与 OR 组比较

图 4 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群物种组成相对丰度比较

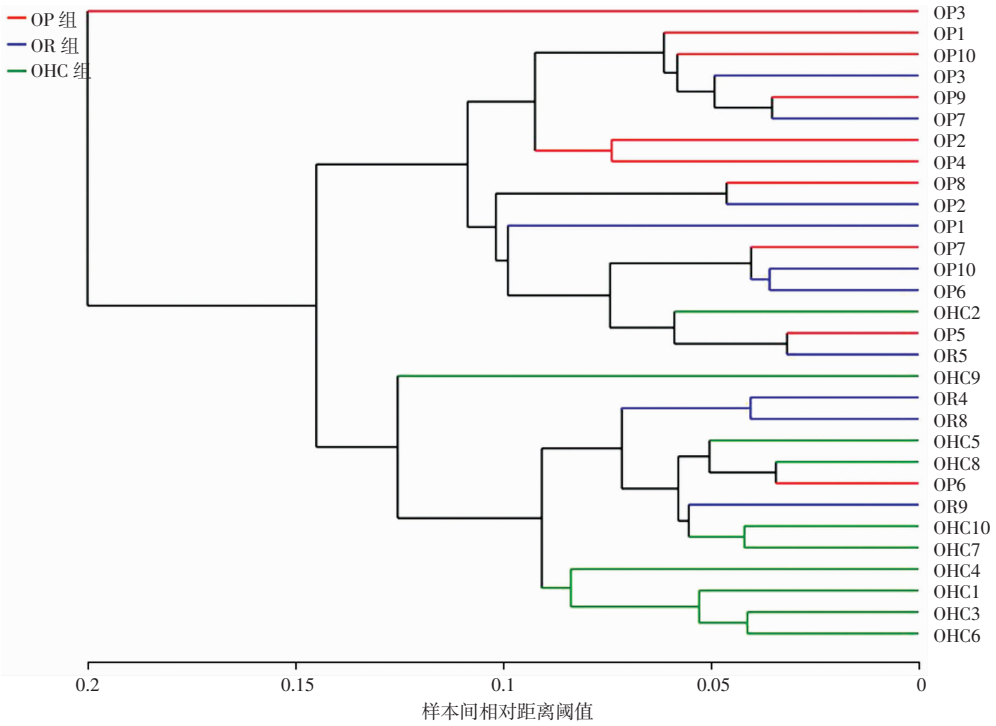
2.5 物种 Beta 多样性分析

通过分析不同样本群落组成可以反映样本间的差异和距离,PCA 运用方差分解,将多组数据的差异反映在二维坐标图上,坐标轴取能够最大反映样品间差异的两个特征值。如样本物种组成越相似,反映在 PCA 图中的距离越近。将 3 组样本进行 PCA 分析发现,3 组样本各自较好的聚集在一起,OP 组和 OHC 组能够明显区分开,差异具有统计学意义(图 5)。同时对 3 组样本进行层级聚类分析,可以看到 OP 组和 OHC 组样本很好的聚类到一起,OR 组则散布在 OP 与 OR 组中。由此可以看到,OR 组与 OHC 组两组样本菌群结构上具有差异(图 6)。



PCA 分析:OHC 组和 OP 组两者聚集区分明显

图 5 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群物种 PCA 分析



Cluster 层级聚类分析:OP 组与 OHC 组区分明显,OP 主要聚类图中上半部分,OHC 主要聚类于图中下半部分

图 6 类风湿关节炎患者及健康受试者舌苔菌群 Cluster 层级聚类分析

3 讨论

类风湿关节炎作为一类以关节滑膜细胞增生,炎症细胞浸润,血管翳形成为主要病理表现的免疫性疾病,其发病跟环境、遗传密切相关[3]。近年来,随着二代测序技术的发展,因具有高通量、短流快、成本低及高准确率等有点[4-5],越来越多的用于菌群失调与疾病的研究中。口腔作为人体重要组织,因其具有解剖结构复杂、直接与外界接触、良好的温湿环境以及具有丰富的营养源等特点,能够为微生物的成长发育提供适宜的环境以及营养物质,从而构成了复杂的口腔微生态环境。已有研究表明,类风湿关节炎患者早期就存在牙龈卟啉单胞菌感染,同时伴有牙周炎的患者其 ACPA 抗体阳性率更高[6-7],提示口腔菌群与类风湿发病密切相关。

口腔细菌通过不同的方式附着在口腔表面,因而形成生物膜[8]。口腔菌群紊乱与类风湿关节炎发病存在联系。LUNDBERG 等[9]研究发现牙龈卟啉单胞菌表达的细菌肽酰基精氨酸脱亚胺酶(Peptidylarginine Deiminase,PAD)能够瓜氨酸化内源性细菌和人类蛋白质,KONIG 等[10]研究发现放线菌产生的白细胞毒素能够杀死人的中性粒细胞,从而诱导中性粒细胞中高瓜氨酸化水平,而瓜氨酸化蛋白在早期类风湿关节炎诊治中具有重要意义。此外有研究对类风湿关节炎患者滑膜液分析发现其中有大量口腔菌群 DNA,并且这些患者的血清及滑膜液中也检测到对应的高滴度抗体,提示口腔菌群可移位到病变部位发挥重要作用[11]。

中医很早就有对“类风湿关节炎”的描述。RA 可归属于中医学“痹病”范畴。不同活动期的患者在舌苔表现上也存在不同。陈延强等[12]研究 RA 疾病活动度与舌苔的关系发现疾病活动度与舌苔的黄色程度呈正相关。王志中等[13]认为湿热痹阻的 RA 患者往往表现为疾病高活动性。湿热往往是黄腻苔形成的病因,舌苔黄而质腻者,为黄腻苔,主湿热、痰热、暑湿等邪蕴结,或为食积化腐,气机不畅[14]。因此舌苔的表现与 RA 的活动密切相关。

既往研究类风湿关节炎口腔菌群研究多集中在牙龈组织,而舌体作为口腔最大的软组织,覆盖于舌体表面的舌苔是临床医生诊疗中最易观察到的部位,而关于舌苔微生态研究很少。本研究即为类风湿关节炎患者舌苔菌群微生态研究。

本研究通过 Illumina MiSeq 高通量测序分析健康人群与类风湿关节炎患者舌苔菌群差异,分析结果显示:3 组样本在菌群的 Alpha 多样性上差异无统计学意义,说明各组之间在菌群种类的数量以及菌群的复杂程度上差异无统计学意义。各组之间有着各自独有的菌属,其中 OP 组 7 个菌属,OR 组 4 个菌属,OHC 组 10 个菌属为各组独有。对物种丰度进行统计分析,舌

苔菌群中优势的菌门有 7 种,优势的菌属有 10 种,3 组样本虽然在优势菌群组成相同,但是在菌群构成中差异具有统计学意义,主要在厚壁菌门、放线菌门、Episilonbacteraeota 菌门、变形菌门、奈瑟菌属、放线菌属、弯曲杆菌属和卟啉单胞菌属上。其中对两组之间进行统计分析发现,主要差异表现在 OP 与 OHC 以及 OR 与 OHC 之间,其中尤其以 OP 与 OHC 之间的差异最为明显,具体为 OP 组厚壁菌门、放线菌门、Episilonbacteraeota 菌门、放线菌属和弯曲杆菌属丰度高于 OHC 组,变形菌门、奈瑟菌属和卟啉单胞菌属丰度低于 OHC 组,OP 组厚壁菌门丰度高于 OR 组;OR 组变形菌门丰度低于 OHC 组,放线杆菌丰度高于 OHC 组。3 组样本进行 Beta 多样性分析,通过 PCA 分析以及层级聚类分析,OP 组和 OHC 组能够很好地聚集到一起,差异具有统计学意义,而 OR 组聚类则分布在两者之间。

综上,我们认为类风湿关节炎患者舌苔菌群与健康人群存在差异,其中主要表现在放线菌属和弯曲杆菌属丰度增加,奈瑟菌属和卟啉单胞菌属丰度减少。缓解期类风湿关节炎患者舌苔菌群组成向健康人群转变。舌苔菌群失调与类风湿关节炎发病存在相关性,通过改善口腔菌群,使舌苔菌群向健康人发展可能为改善类风湿关节炎症状、缓解疾病进展提供新的治疗方案,也可能是类风湿性关节炎疾病导致口腔菌群改变,其价值可作为疾病辅助诊断或疗效观察的指标。

参考文献:

[1] YU C, LI M T, DUAN X W, *et al*. Chinese registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): I. Introduction and prevalence of remission in Chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2018, 36(5): 836-840.

[2] HOLERS V M, DEMORUELLE M K, KUHN K A, *et al*. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction[J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(9): 542-557. DOI: 10.1038/s41584-018-0070-0.

[3] DEANEK D, DEMORUELLE M K, KELMENSON L B, *et al*. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis[J]. Best Pract Clinic Rheumatol, 2017, 31(1): 3-18. DOI: 10.1016/j.berh.2017.08.003.

[4] WANG Y, SHENG H F, HE Y, *et al*. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(23): 8264-8271. DOI: 10.1128/AEM.01821-12.

[5] DOMINGUEZ-BELLO M G, COSTELLO E K, CONTRERAS M, *et al*. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(26): 11971-11975. DOI: 10.1073/pnas.1002601107.

[6] DISSICK A, REDMAN R S, JONES M, *et al*. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study[J]. J Periodontol, 2010, 81(2): 223-230. DOI: 10.1902/jop.2009.090309.

[7] HENDLER A, MULLI T K, HUGHES F J, *et al*. Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis[J]. J Dent Res, 2010, 89(12): 1389-1394. DOI: 10.1177/0022034510381903.

[8] WEERKAMP A H, UYEN H M, BUSSCHER H J. Effect of Zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin[J]. J Dent Res, 1988, 67(12): 1483-1487. DOI: 10.1177/00220345880670120801.

[9] LUNDBERG K, WEGNER N, YUCEL-LINDBERG T, *et al*. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(12): 727-730. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.139.

[10] KONIG M F, ABUSLEME L, REINHOLDT J, *et al*. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(369): 369ra176. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaj1921.

[11] KEMPSELL K E, COX C J, HURLE M, *et al*. Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue[J]. Infect Immun, 2000, 68(10): 6012-6026. DOI: 10.1128/iai.68.10.6012-6026.2000.

[12] 陈延强, 谢丽萍. 类风湿关节炎湿热痹阻证的舌象与活动性指标关系的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(6): 1068-1070. DOI: 10.13192/j.ljtcm.2013.06.18.chenyq.082.
CHEN Y Q, XIE L P. Research on connection between tongue presentations of dampness-heat blockage of rheumatoid arthritis and index of disease activity[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2013, 40(6): 1068-1070. DOI: 10.13192/j.ljtcm.2013.06.18.chenyq.082.

[13] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322 例湿热痹阻型及寒湿痹阻型类风湿关节炎中医证型的客观化研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 466-470.
WANG Z Z, FANG Y F, LUO Y, *et al*. The objectivity research on 322 rheumatoid arthritis patients of dampness-heat impeding and cold-dampness impeding Chinese medical syndrome types[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2011, 31(4): 466-470.

[14] 李响. 舌苔形成的微生态学机制探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(6): 1102-1106. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2014.06.011.
LI X. Primary discussion of association of microecology and tongue coating[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2014, 41(6): 1102-1106. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2014.06.011.

(**收稿**:2019-12-18;**修回**:2020-02-07)
(编辑 邓强庭)