

应用 16S rDNA 扩增子序列分析去卵巢骨丢失小鼠口腔菌群的变化

陈浩彬^{1,2}, 罗世城^{1,2}, 曹 祚^{1,2}, 张孜孜^{1,2}, 张书威^{1,2}, 隋 熠^{1,2}, 盛 晨¹, 石 斌^{2,3}, 罗 杨^{2,3}, 张立海^{1,2,3}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心骨科, 北京 100853; ³解放军总医院第四医学中心骨科医学部, 北京 100048

摘要:背景 口腔微生物失调加重了多种口腔疾病和系统性疾病的进程。进入绝经后期的妇女罹患口腔黏膜病和加速牙周骨质丢失的风险更高,但口腔菌群变化与女性进入绝经后期之间的联系尚不清楚。目的 应用 16S rDNA 扩增子测序,初步观察卵巢切除小鼠的口腔菌群结构变化。方法 16 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为卵巢切除 (ovariectomy, OVX) 组和假手术 (sham-operated, Sham) 组。卵巢切除术 4 周后对股骨进行显微 CT 扫描和骨密度与骨参数的分析,取小鼠口腔拭子进行 16S rDNA 高通量测序。结果 与 Sham 组比较,OVX 组骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度和骨小梁数量显著下降,骨表面积/骨体积和骨小梁分离度显著升高 ($P < 0.05$)。两组的口腔菌群共同含有 687 种 ASVs, Sham 组特有 1086 种, OVX 特有 930 种。OVX 组的 Chao1 指数与 Sham 组差异无统计学意义,但 Simpson 指数显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$)。门水平上 OVX 组的拟杆菌门和梭杆菌门丰度较 Sham 组下降 ($P < 0.05$)。属水平上 OVX 组的梭杆菌属、乳酸乳球菌属、萨特氏菌属等菌属的丰度相比 SHAM 组降低 ($P < 0.05$); 放线菌属等菌属的丰度相比 Sham 组升高 ($P < 0.05$)。LEfSe 分析结果显示,Sham 组厚壁菌门和芽孢杆菌纲 (Bacilli) 的相对丰度升高 ($P < 0.05$)。结论 卵巢切除小鼠出现骨丢失现象,并且口腔菌群的多样性和菌群结构发生了改变,初步为研究绝经后妇女口腔菌群改变与口腔疾病加重的关系提供依据。

关键词: 16S rDNA 序列分析; 绝经后期; 口腔; 微生物群; 绝经后骨质疏松

中图分类号: R781.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2023)04-0401-07

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2023.04.014

引用本文: 陈浩彬, 罗世城, 曹祚, 等. 应用 16S rDNA 扩增子序列分析去卵巢骨丢失小鼠口腔菌群的变化 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44 (4): 401-407, 封三.

Oral microbiota changes of bone loss mice induced by ovariectomy via 16S rDNA amplicon sequencing

CHEN Haobin^{1,2}, LUO Shicheng^{1,2}, CAO Zuo^{1,2}, ZHANG Gongzi^{1,2}, ZHANG Shuwei^{1,2}, SUI Yi^{1,2}, SHENG Chen¹, SHI Bin^{2,3}, LUO Yang^{2,3}, ZHANG Lihai^{1,2,3}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Orthopedics, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Senior Department of Orthopedics, the Fourth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: ZHANG Lihai. Email: zhanglihai74@qq.com

Abstract: Background The dysbiosis of oral microorganisms aggravates the process of several oral diseases and systemic diseases. Postmenopausal women are at increased risk of oral mucosal disease and accelerated periodontal bone loss, but the association between changes in oral microbiota and postmenopause in women is unclear. **Objective** To explore the changes of oral microbiota in ovariectomized mice via 16S rDNA amplicon sequencing. **Methods** Sixteen female C57BL/6J mice were randomly divided into Ovariectomy group (OVX) and sham-operated group (Sham). The femurs were taken for MicroCT scanning and bone mineral density and bone parameters analysis at 4 weeks after the operation, and the oral swabs samples were collected for 16S rDNA high-throughput sequencing. **Results** The bone mineral density, bone volume/total volume, trabecular thickness and trabecular number were decreased, while the bone surface area/bone volume and bone trabecular spacing were increased in OVX group ($P < 0.05$). Two groups of oral samples contained common 687 ASVs, OVX group contained specific 1086 ASVs and OVX group contained specific 930 ASVs. There was no significant difference in Chao1 index between OVX group and Sham group, Simpson index in OVX group was significantly lower than that in Sham group ($P < 0.05$). At the phylum level of oral samples, the relative abundance of Fusobacteriota and Bacteroidota in OVX group was decreased ($P < 0.05$). At the genus level, the relative abundance of Fusobacterium, Lactococcus, Sutterella and other genera in OVX group were decreased, Actinomyces and other

收稿日期: 2022-09-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2020YFC2004902)

作者简介: 陈浩彬, 男, 在读硕士, 医师。研究方向: 骨折与骨质疏松。Email: 1442859440@qq.com

通信作者: 张立海, 男, 博士, 主任医师, 教授, 科主任。Email: zhanglihai74@qq.com

genera were increased ($P < 0.05$). LEfSe analysis showed that the relative abundance of Firmicutes and Bacilli increased in the Sham group ($P < 0.05$). **Conclusion** Bone loss occurs in ovariectomized mice, and the diversity and structure of oral microbiota are changed, which preliminarily provides reference for the study of the relationship between the change of oral microbiota and the aggravation of oral diseases in postmenopausal women.

Keywords: 16S rDNA sequence analysis; postmenopause; mouth; microbiota; postmenopausal osteoporosis

Cited as: Chen HB, Luo SHCH, Cao Z, et al. Oral microbiota changes of bone loss mice induced by ovariectomy via 16S rDNA amplicon sequencing [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44 (4): 401-407, inside back cover.

绝经后期指女性进入绝经后的生命时期,这一时期女性卵巢功能衰退,体内的雌激素水平显著下降^[1],同时患系统性疾病的风险升高^[2]。近年来,越来越多的研究表明女性进入绝经后期罹患口腔黏膜病和加速牙周骨质丢失的风险更高,绝经后女性雌激素水平的下降会导致牙槽骨吸收加速,从而加重牙周炎等口腔疾病的进程^[3]。口腔菌群的紊乱被认为在口腔疾病和多种系统性疾病的发病和发展过程中发挥了重要作用,如糖尿病、系统性红斑狼疮和心血管疾病^[4]。虽然绝经后妇女发生口腔致病菌感染和患牙周疾病的风险升高^[5],但绝经后期是否会直接对口腔菌群的变化产生作用尚不清楚。本研究以卵巢切除诱导的骨丢失小鼠为模型,初步分析小鼠卵巢切除后口腔菌群的变化,为研究绝经后妇女口腔疾病的加重提供新的思路。

材料与方 法

1 实验动物 9周龄的雌性 C57BL/6J 小鼠 16 只,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,SPF 级条件下饲养,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~60%,适应性喂养 7 d 后进行实验。本实验经解放军总医院实验动物伦理委员会审批通过,伦理审批编号:2019-X15-44。

2 主要材料、试剂与仪器 戊巴比妥钠(军事医学科学院提供);3-0 手术缝合线[强生(中国)医疗器材有限公司];植绒口腔采样拭子(COPAN,意大利),eSwab 运送培养基保存液(COPAN,意大利);多聚甲醛(百奥康生物技术有限公司);Inveon MM CT(西门子,德国),Inveon Acquisition Workplace 扫描软件(西门子,德国),Inveon Research Workplace 分析软件(西门子,德国);COBRA_Exxim 重建软件;illumina NovaSeq 测序平台(北京诺禾致源科技股份有限公司)。

3 动物分组与模型建立 16 只小鼠随机分为卵巢切除(ovariectomy, OVX)组和假手术(sham-operated, Sham)组,每组 8 只。各组小鼠称重后用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,麻醉剂量为

50 mg/kg。OVX 组小鼠放置于俯卧位,碘伏消毒手术部位,沿小鼠背部中线胸腰段处皮肤做一处约 1 cm 纵形切口,并切开两侧肋脊角处肌层进入腹腔,找到并结扎两侧输卵管,切除卵巢。用 3-0 缝合线缝合肌层和皮肤并用碘伏消毒。Sham 组小鼠进行同样的消毒并切开皮肤和肌层进入腹腔,找到卵巢后切除周围与卵巢大小相似的脂肪组织,不结扎输卵管和切除卵巢,缝合肌层和皮肤后消毒。两组小鼠在术后腹腔注射抗生素,并在 SPF 级条件下继续饲养 4 周。

4 动物及样本处理 造模 4 周后,于清晨时用无菌的口腔采样拭子刷取小鼠口腔内壁和牙周,并保存于 eSwab 保存液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 转运。口腔样本采集过程中注意无菌操作,避免取样时环境中微生物的污染。过量戊巴比妥钠腹腔麻醉处死小鼠,取出完整股骨并保存于 4% 多聚甲醛固定液中,固定 7 d。

5 显微 CT 扫描及图像处理 对 Inveon MM CT 进行校准并扫描股骨样本,扫描参数:电压强度 60 kV,电流强度 220 μA ,曝光时间 1500 ms,有效像素值 8.89 μm 。二维图像重建为三维图像并进行分析。兴趣区域(region of interest, ROI)为股骨远端生长板下 0.5~1 mm 处骨松质。分析骨结构参数包括骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)、骨表面积/骨体积(bone surface area/bone volume, BS/BV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)和骨小梁分离度(trabecular spacing, Tb.Sp)。

6 16S rDNA 高通量测序 口腔菌群样本取样后,采用 CTAB 法对样本的 DNA 进行提取,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,取适量样本 DNA 用无菌水稀释至 1 ng/ μL 。以稀释后的 DNA 为模板进行 PCR,扩增区域为 16S V3~V4。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的条带进行回收。使用 DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试

剂盒进行文库构建，构建好的文库经过 Qubit 和 qPCR 定量，文库合格后，使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

7 测序数据分析 从下机数据中拆分出各样本数据，使用 FLASH 软件对样本的 Reads 进行拼接，使用 Fastp 软件进行高质量过滤，使用 Usearch 软件检测去除嵌合体序列，得到最终有效数据。使用 QIIME2 软件的 DADA2 模块降噪，并过滤掉丰度小于 5 的序列，获得扩增子序列变异 (amplicon sequence variants, ASVs) 与特征表，将得到的 ASVs 与数据库比对，从而得到每个 ASV 的物种信息；计算 Chao1 和 Simpson 指数并对 Alpha 多样性的组间差异进行分析；计算 Unifrac 距离，并使用 R 软件来绘制 PCA 降维图；使用 R 软件进行 *t* 检验，对两个比较组在门、纲、目、科和属 5 个分类水平上进行差异性检验并获得 *P* 值，筛选出 *P* 值小于 0.05 的物种即为组间显著差异性物种；通过 LEfSe 软件完成组间显著差异性物种分析，设置 LDA score 阈值为 4。

8 统计学分析 利用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析，符合正态分布和方差齐性的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，计量资料符合方差齐性时采用独立样本 *t* 检验进行两组间比较，计量资料不符合方差齐性时采用 Wilcoxon 秩和检验进行两组间比较，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 股骨样本显微 CT 结果 卵巢切除术后 4 周时，OVX 组小鼠的骨密度相较 Sham 组显著下降 (*P* = 0.0096)(图 1A)；同时 OVX 组骨体积分数 (*P* = 0.0179)、骨小梁厚度 (*P* = 0.0469) 和骨小梁数量 (*P* = 0.0338) 下降，骨表面积/骨体积 (*P* = 0.0432) 和骨小梁分离度显著升高 (*P* = 0.0384)(图 1B ~ 图 1F)；显微 CT 图像可见 OVX 组股骨骨松质量减少，小梁结构破坏 (图 1G)。说明卵巢切除的小鼠出现了骨丢失现象，模型建立成功。

2 口腔样本的 ASVs 分析 将 OVX 组和 Sham 组样本的共有与特有的 ASVs 绘制为韦恩图。ASVs 结果分析，两组的口腔菌群共同含有 687 种 ASVs，Sham 组特有 1086 种，OVX 特有 930 种 (图 2)。

3 物种相对丰度分析 根据 ASVs 注释结果和各样品特征表，获得门和属水平的物种丰度表，选取最大丰度排名前 10 的物种绘制物种相对丰度的柱形图 (图 3)。门水平上两组口腔样本相对丰度最高的是变形菌门 (Proteobacteria)，其次有厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteriota) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 等 (图 4A)。属水平上两组口腔样本相对丰度最高的是 Ralstonia 菌属，其次是假单胞菌属 (Pseudomonas)(图 4B)。

4 α 多样性指数差异分析 对菌群两组间 Chao1

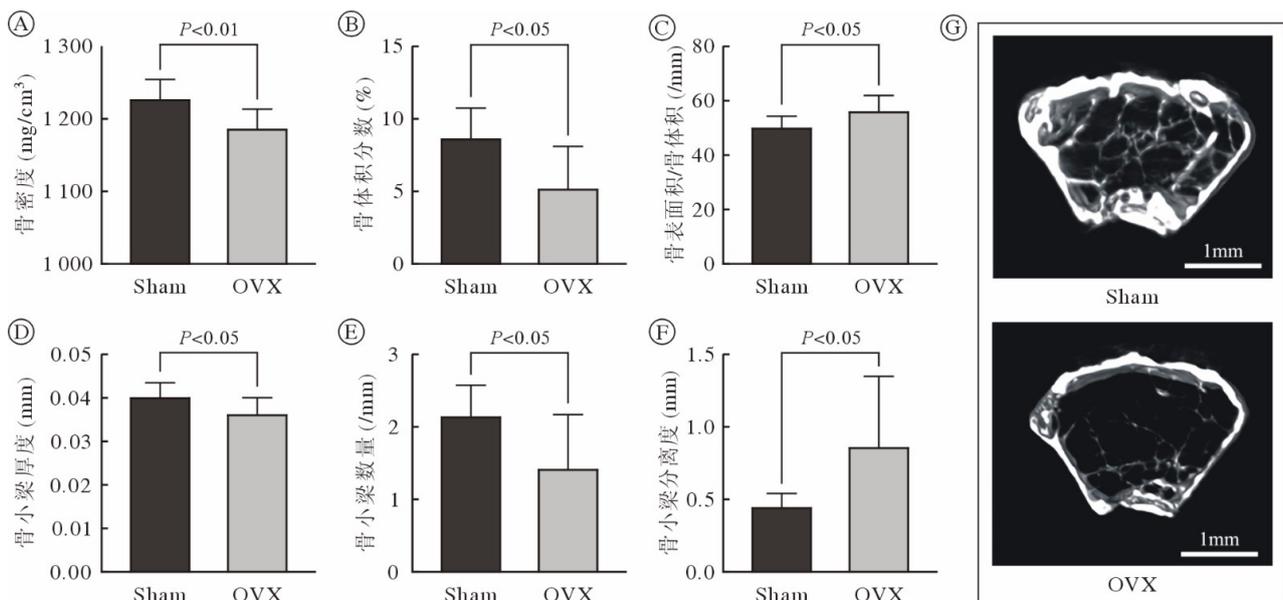


图 1 卵巢切除后小鼠股骨的显微 CT 结果

A: 骨密度 (BMD); B: 骨体积分数 (BV/TV); C: 骨表面积/骨体积 (BS/BV); D: 骨小梁厚度 (Tb.Th); E: 骨小梁数量 (Tb.N); F: 骨小梁分离度 (Tb.Sp); G: 股骨显微 CT 扫描图像

Fig.1 MicroCT results of the femur of mice after ovariectomy

A: Bone mineral density (BMD); B: Bone volume/total volume (BV/TV); C: Bone surface area/bone volume (BS/BV); D: Trabecular thickness (Tb.Th); E: Trabecular number (Tb.N); F: Trabecular Spacing (Tb.Sp); G: MicroCT scan of femur

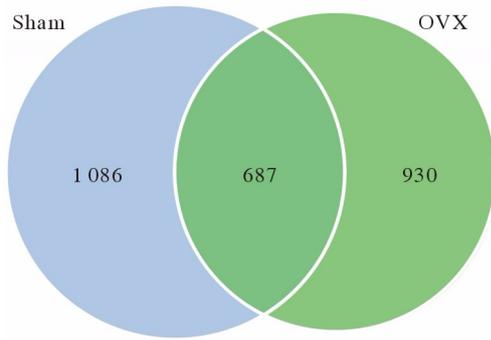


图2 口腔菌群的 ASVs 分析韦恩图
Fig.2 Venn diagram of ASVs analysis of oral microbiota

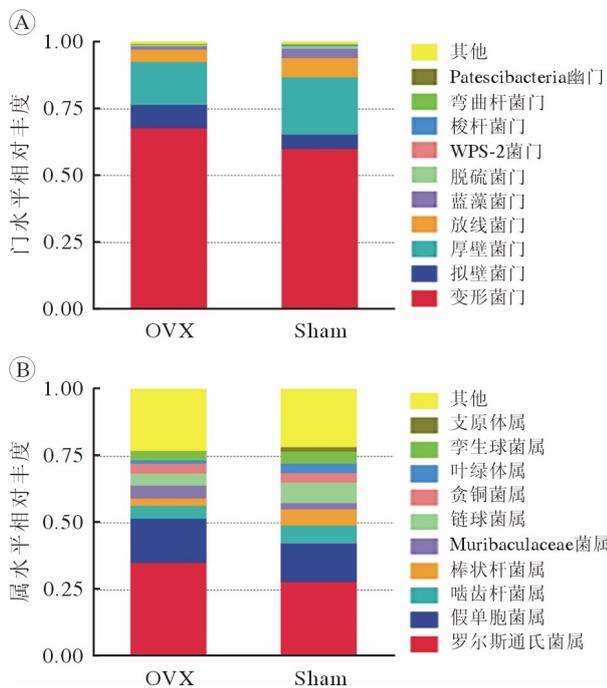


图3 口腔菌群各组门水平和属水平物种相对丰度柱形图
A: 门水平相对丰度; B: 属水平相对丰度
Fig.3 Relative abundance bar chart of species at phylum level and genus level for each group of oral microbiota
A: Relative abundance at phylum level; B: Relative abundance at genus level

和 Simpson 指数进行分析, 比较 OVX 组与 Sham 组之间菌群丰度和菌群多样性差异。结果显示, 口腔菌群中 OVX 组与 Sham 组的 Chao1 指数无统计学差异 (图 5A); 而 OVX 组的 Simpson 指数显著低于 Sham 组 (图 5B)。

5 主成分分析 主成分分析 (principal components analysis, PCA) 是一种基于 ASV 相对丰度分布对多维数据进行降维, 从而提取出数据中最主要的元素和结构的方法。基于 ASV 水平的 PCA 分析结果显示, OVX 组和 Sham 组的组内样本距离较小, 表明组内样本的物种结构构成相似, OVX 组和 Sham 组的组间彼此分开, 说明两组的样本间的

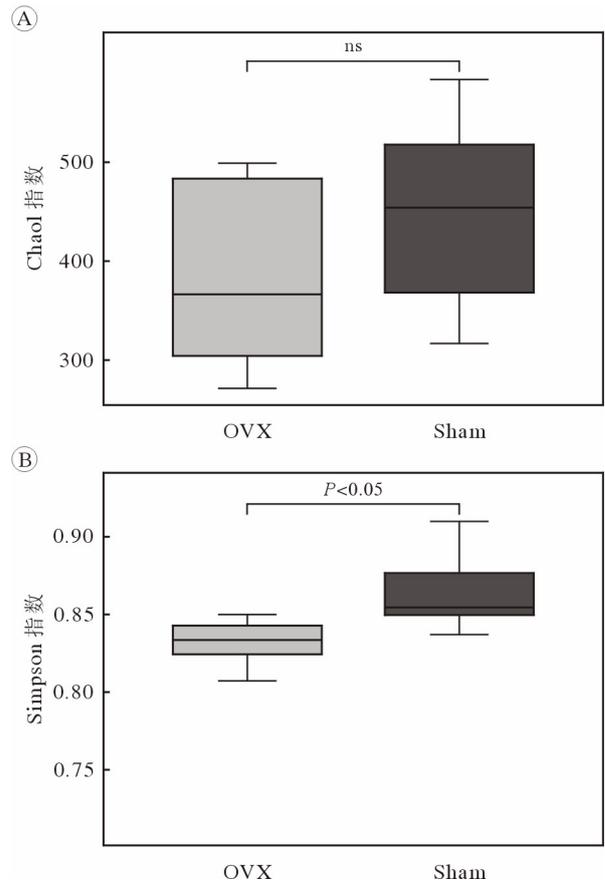


图4 各组样本菌群丰度和菌群多样性差异
A: Chao1 指数差异箱型图; B: Simpson 指数差异箱型图
Fig.4 The differences of microbiota abundance and microbiota diversity between each group
A: Box diagram of Chao1 index difference; B: Box diagram of Simpson index difference

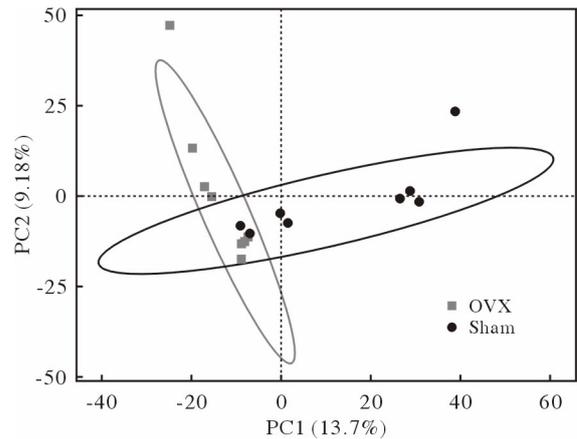


图5 口腔各组样本的 PCA 分析图
Fig.5 Principal components analysis (PCA) of oral species between each group

物种结构存在差异。

6 物种差异分析 通过 *t* 检验方法分析菌群在门、纲、目、科和属水平下组间有显著差异性的物种, 结果显示, 在门水平上, 相较于 Sham 组, OVX 组的拟杆菌门 ($P=0.0106$) 和梭杆菌门

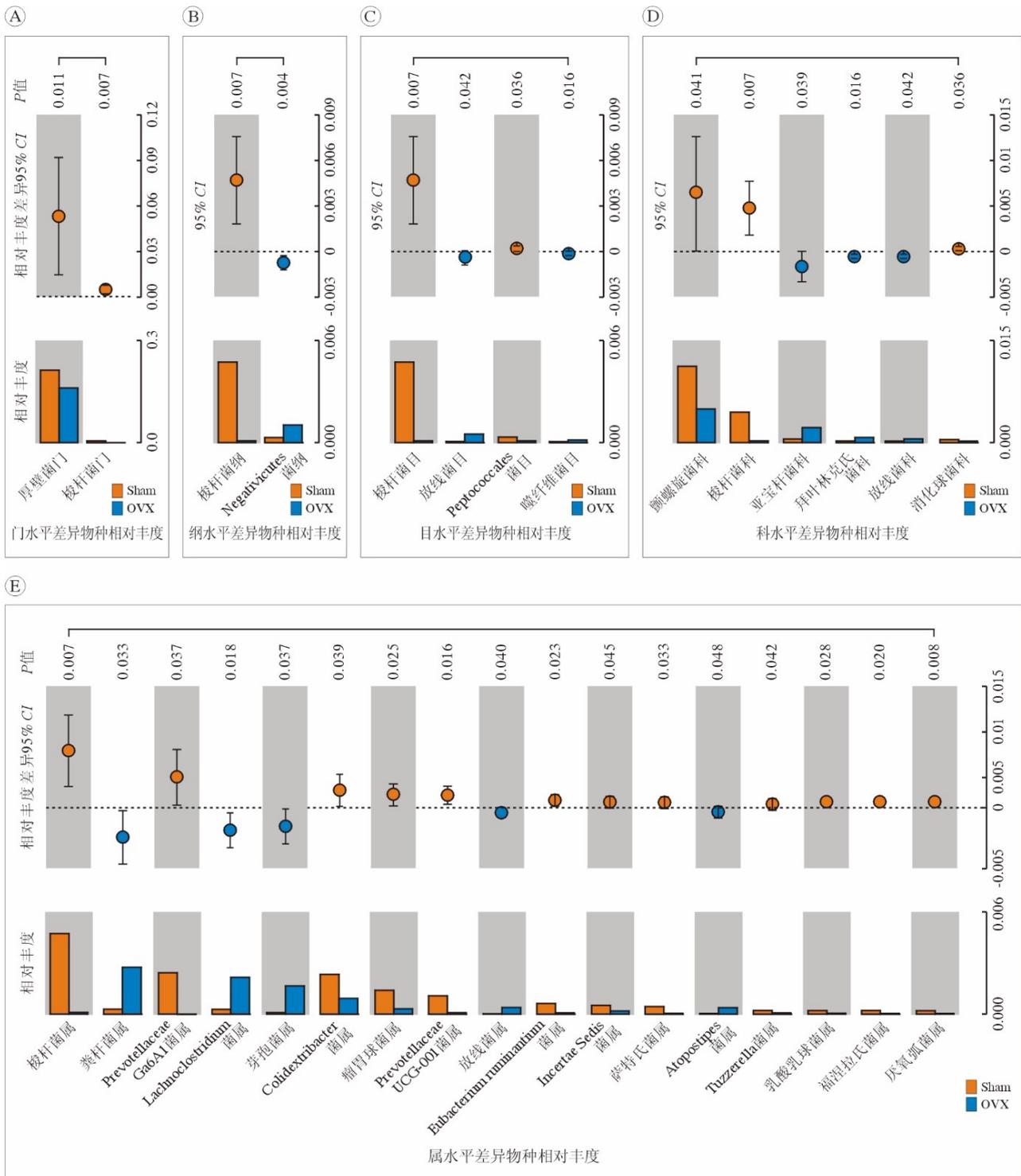


图 6 口腔各组物种相对丰度差异分析

A: 门水平物种相对丰度差异; B: 纲水平物种相对丰度差异; C: 目水平物种相对丰度差异; D: 科水平物种相对丰度差异; E: 属水平物种相对丰度差异

Fig.6 Differences in relative abundance of oral species among different groups

A: Differences in relative abundance at phylum level; B: Differences in relative abundance of species at class level; C: Differences in relative abundance of species at order level; D: Differences in relative abundance of species at family level; E: Differences in relative abundance of species at genus level species

(Fusobacteriota)($P=0.0069$) 丰度下降 (图 6A); 纲水平上, OVX 组梭杆菌纲 (Fusobacteriia) 丰度下降 ($P=0.0069$), Negativicutes 纲丰度上升 ($P=0.0045$) (图 6B); 目水平上 OVX 组噬纤维菌目 (Cytophagales)($P=0.0155$)、放线菌目 (Actinomycetales)($P=0.0416$) 上升, 梭杆菌目 (Fusobacteriales)($P=0.0069$)、Peptococcales 菌目 ($P=0.0365$) 下降 (图 6C); 科水平上拜叶林克氏菌科 (Beijerinckiaceae)($P=0.0163$)、芽孢杆菌科 (Bacillaceae)($P=0.0388$)、放线菌科 (Actinomycetaceae)($P=0.0416$) 上升, 梭杆菌科 (Fusobacteriaceae)($P=0.0069$)、消化球菌科 (Peptococcaceae)($P=0.0365$)、颤螺旋菌科 (Oscillospiraceae)($P=0.0414$) 下降 (图 6D); 属水平上, 口腔样本 OVX 组的梭杆菌属 (Fusobacterium)($P=0.0069$)、普雷沃氏菌 UCG-001 属 ($P=0.0157$)、福涅拉氏菌属 (*Fournierella*)($P=0.0201$)、瘤胃球菌属 (Ruminococcus)($P=0.0255$)、乳酸乳球菌属 (Lactococcus)($P=0.0276$)、萨特氏菌属 (Sutterella)($P=0.0333$) 等菌属的丰度相比 Sham 组降低; Lachnoclostridium 菌属 ($P=0.0179$)、普拉梭菌属 (Faecalibacterium)($P=0.0328$)、芽孢杆菌属 (Bacillus)($P=0.0374$)、放线菌属 (Actinomyces)($P=0.0404$)、Atopostipes 菌属 ($P=0.0483$) 等菌属的丰度相比 Sham 组升高 (图 6E)。LEfSe 分析结果显示, LDA score 大于 4 时, 厚壁

菌门和芽孢杆菌纲 (Bacilli) 的相对丰度在 Sham 组升高 (图 7)。

讨论

人体的皮肤和黏膜定植着大量的微生物, 以细菌为主, 主要定植的器官是口腔和胃肠道。长久的进化过程中机体与微生物之间形成了一种互利共生的关系, 而微生物失调会扰乱这种关系, 并可能诱发或加重疾病^[6-7]。口腔是人体第二大微生物聚集器官, 仅次于肠道。解剖学上口腔和肠道相连, 并同属于消化系统。口腔的免疫功能紊乱和微生物菌群变化与多种系统性代谢疾病相关, 如糖尿病、骨质疏松、阿尔茨海默病等^[8-9], 口腔菌群也被认为是系统性疾病新的潜在治疗靶点^[10]。但口腔微生物群是否参与了绝经后期口腔疾病的发生发展仍缺乏足够的证据。有研究发现绝经后未进行激素替代治疗患者更易罹患牙周疾病^[11]。对口腔致病菌定植的研究发现, 绝经后女性患者不仅牙周炎患病率更高, 口腔样本中也检出致病菌具核梭杆菌、牙卟啉单胞菌和伴放线杆菌^[12]。致病菌在绝经后伴牙周疾病患者的口腔中被发现, 但绝经后期卵巢功能衰退本身是否会直接影响口腔菌群的变化尚不明确。

卵巢切除术是建立小鼠绝经模型的常用方法, 通过小鼠雌激素缺乏模拟绝经状态^[13], 本研究通过卵巢切除术建立小鼠绝经模型, 并用显微 CT 扫描分析验证了卵巢切除后 4 周时, 小鼠已经出现了骨丢失和骨微结构破坏的现象, 这与目前相关的研究结论一致^[14], 并证实了我们小鼠绝经模型的成功建立。通过高通量序列分析口腔菌群变化, 发现 OVX 组和 Sham 组的菌群出现了各组特有的 1000 个左右的 ASVs 序列, 这说明在卵巢去势后, 小鼠的口腔的物种可能发生了变化。 α 多样性指数分析结果可信。Chao1 和 Simpson 指数分别是 α 多样性指数差异分析中描述菌群丰度和菌群多样性的指数。我们发现 OVX 组菌群的 Chao1 指数未产生显著改变, 而 Simpson 指数显著下降。说明卵巢去势后 4 周时, 小鼠口腔菌群丰度没有产生显著的差异, 但菌群的多样性下降了, 这也证实了去势后小鼠的口腔菌群结构发生了变化, 然而菌群 α 多样性与机体的健康的关系仍然存在争议, 有研究认为龋齿等口腔疾病患者的牙菌斑菌群的 α 多样性显著低于健康人群^[15], 而也有研究认为老年龋齿患者的口腔菌群 α 多样性并未产生差异性的改变^[16], 而吸烟等因素则能

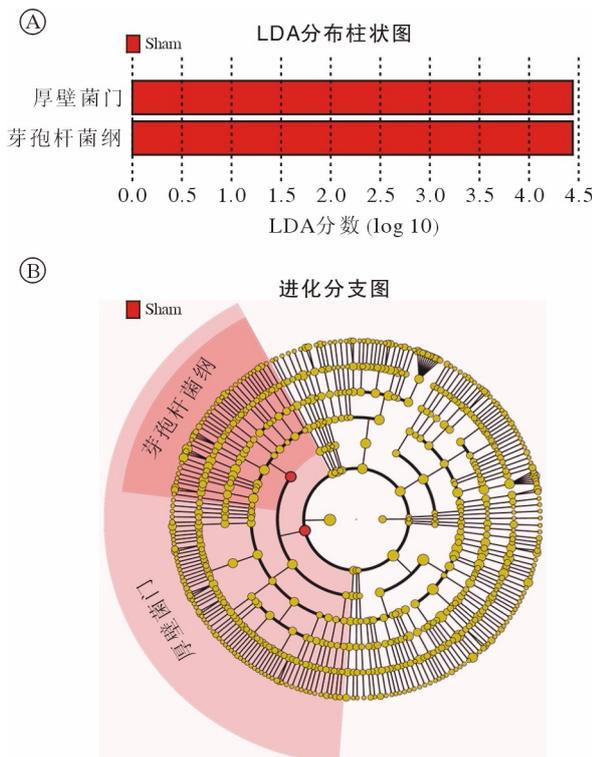


图 7 口腔各组样本的 LefSe 分析

Fig.7 LefSe analysis of oral species between each group

使口腔菌群的 α 多样性升高^[17]。

物种差异分析的结果显示, 卵巢去势后小鼠口腔菌群从门水平到属水平上都出现多个差异物种, 其中部分水平上的差异物种在相关疾病的研究中被提及。门水平上, 口腔拟杆菌门和梭杆菌门被认为与牙周炎和阿尔茨海默病等疾病存在相关性, 相比健康人群, 阿尔茨海默病伴中重度牙周炎患者被发现口腔拟杆菌门丰度降低, 而梭杆菌门丰度增高^[18], 但也有研究认为拟杆菌门同多种其他革兰阴性菌一致, 是牙周炎患者口腔的优势菌门之一^[19]; 纲水平上, Negativicutes 纲被发现与儿童龋齿的发病存在相关性^[20]; 属水平上, 有研究认为口腔乳酸乳球菌属可以抑制口腔病原体的作用, 抑制种植体周围炎和骨丢失^[21-22]。我们的结果发现口腔乳酸乳球菌属的丰度在 OVX 组中产生了下降, 这可能与绝经患者更易罹患牙周疾病相关; 放线菌属被认为与龋病的发生呈正相关^[23]。双膦酸盐相关性颌骨坏死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, BRONJ) 是双膦酸盐类药物治疗骨质疏松症中可能出现的并发症^[24], BRONJ 也被认为与双膦酸盐治疗绝经后骨质疏松时口腔放线菌聚集相关^[25], 我们的结果可能说明了放线菌属在进入绝经后期的过程中在口腔就产生了聚集。物种差异分析结果证明在多个物种水平上, 卵巢去势后小鼠的口腔菌的物种丰度产生了差异性的改变。但这些物种相对丰度的改变与口腔疾病的潜在关系仍需进一步探究。

雌激素水平下降导致的骨丢失被认为是加重绝经后期妇女牙周疾病的主要原因; 近年来, 牙周炎、牙槽骨丢失以及牙齿缺失也被证实与绝经后骨质疏松症的发病密切相关^[26]。而骨丢失是否参与了绝经后期对口腔菌群多样性和结构的影响仍需更多的证据支撑。本实验初步发现, 卵巢切除术后小鼠口腔菌群的多样性、菌群结构和物种构成均发生了变化。但在口腔菌群结构变化与机体骨代谢水平的联系以及绝经患者口腔菌群结构改变与口腔疾病恶化的因果关系等研究方面仍存在局限性。需要进一步实验探究和验证。

作者贡献 陈浩彬、罗世城、盛晨: 实验操作, 论文撰写; 张孜孜、张书威、曹祚: 数据收集; 隋熠: 数据整理, 统计学分析; 石斌、罗杨: 技术支持; 张立海: 研究指导, 论文修改, 经费

支持。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: 1442859440@qq.com。

参考文献

- 1 Armeni E, Paschou SA, Goulis DG, et al. Hormone therapy regimens for managing the menopause and premature ovarian insufficiency [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35 (6): 101561.
- 2 Pinkerton JV. Hormone therapy for postmenopausal women [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (5): 446-455.
- 3 Romandini M, Shin HS, Romandini P, et al. Hormone-related events and periodontitis in women [J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47 (4): 429-441.
- 4 Yangheng, Zhang, . Human oral microbiota and its modulation for oral health [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 883-893.
- 5 LaMonte MJ, Andrews CA, Hovey KM, et al. Subgingival microbiome is associated with alveolar bone loss measured 5 years later in postmenopausal women [J]. *J Periodontol*, 2021, 92 (5): 648-661.
- 6 Li XV, Leonardi I, Iliiev ID. Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Immunity*, 2019, 50 (6): 1365-1379.
- 7 许振国, 赵晓静, 刘博罕, 等. 口腔肠道微生物与心血管疾病关系的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39 (2): 175-177.
- 8 Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, et al. The oral microbiome: role of key organisms and complex networks in oral health and disease [J]. *Periodontol 2000*, 2021, 87 (1): 107-131.
- 9 Gao L, Xu TS, Huang G, et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body [J]. *Protein Cell*, 2018, 9 (5): 488-500.
- 10 Byrd KM, Gulati AS. The "gum-gut" axis in inflammatory bowel diseases: a hypothesis-driven review of associations and advances [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 620124.
- 11 Passos-Soares JS, Vianna MIP, Gomes-Filho IS, et al. Association between osteoporosis treatment and severe periodontitis in postmenopausal women [J]. *Menopause*, 2017, 24 (7): 789-795.
- 12 Hernández-Viguera S, Martínez-Garriga B, Sánchez MC, et al. Oral microbiota, periodontal status, and osteoporosis in postmenopausal females [J]. *J Periodontol*, 2016, 87 (2): 124-133.
- 13 Souza VR, Mendes E, Casaro M, et al. Description of ovariectomy protocol in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 303-309.
- 14 Chevalier C, Kieser S, Çolakoğlu M, et al. Warmth prevents bone loss through the gut microbiota [J]. *Cell Metab*, 2020, 32 (4): 575-590.
- 15 王诗维, 杨建军, 张松梓. 不同牙龋病状况患者龈上菌斑及龋损组织微生物多样性分析 [J]. *上海口腔医学*, 2022, 31 (2): 201-204.
- 16 Jiang Q, Liu J, Chen L, et al. The oral microbiome in the elderly with dental caries and health [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 442.