

产黑普氏菌刺激原代人口腔角质细胞的时间序列基因表达谱研究

邵如如, 郑章龙, 徐盼, 郭艺婷, 何园

(同济大学口腔医学院·同济大学附属口腔医院口腔黏膜病教研室,上海牙组织修复与再生工程技术研究中心,上海 200072)

【摘要】目的 基于时间序列分析,研究产黑普氏菌(*Prevotella melaninogenica*, *Pm*)刺激原代人口腔角质形成细胞(primary human oral keratinocytes, pHOKs)后基因表达的时间趋势,以探究*Pm*与pHOKs相互作用的潜在机制。**方法** 利用生物信息学方法分析pHOKs分别与*Pm*共培养4、24 h后的高通量测序结果,使用Mfuzz聚类算法将具有相似时间表达模式的基因划分聚类,并进行GO、KEGG以及STRING网络分析,进一步利用Cytoscape软件取交集得到枢纽基因(Hub基因)。采用实时荧光定量PCR检测Hub基因的表达。**结果** *Pm*刺激pHOKs 4、24 h分别有1 456个和1 386个差异表达基因。通过Mfuzz将其划分为3个聚类,其中簇1基因随时间延长其表达呈现下降的趋势,主要参与上皮细胞分化和上皮细胞向间充质细胞转化等生物学过程;簇2基因随时间延长其表达呈现上升的趋势,主要参与细菌感染、视黄醇代谢等过程;簇3基因表达在刺激前期上调、后期下调,主要参与细胞因子相关信号通路等过程。在PPI网络中筛选出簇1 Hub基因为VEGFA、GDNF;簇2中的Hub基因为PTGS2、ICAM1等;簇3中的Hub基因为IL-6、CCL2等。RT-qPCR检测结果显示,VEGFA、PTGS2、IFIT1、IRF1与测序数据中随着时间延长基因的表达趋势一致。**结论** 本研究对*Pm*刺激pHOKs过程中相关生物学分子的动态模式进行了深度挖掘,发现与视黄醇代谢相关的基因以及负调控EMT的基因在OLP中异常表达,*Pm*入侵上皮细胞后可能通过一些适应性机制逃避免疫监视,该发现有助于进一步探究*Pm*在口腔扁平苔藓中的致病机理。

【关键词】 产黑普氏菌; 人口腔角质形成细胞; 时间序列分析

【中图分类号】 R781.5⁺9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2023)05-0640-08

The time series gene expression profiles of primary human oral keratinocytes stimulated by *Prevotella melaninogenica*

SHAO Ruru, ZHENG Zhanglong, XU Pan, GUO Yiting, HE Yuan

(Department of Oral Medicine, Stomatological Hospital and Dental School of Tongji University, Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China)

【Abstract】Objective To investigate the time trend of gene expression of primary human oral keratinocytes(pHOKs) stimulated with *Prevotella melaninogenica*(*Pm*), and to explore the potential mechanism of interaction between *Pm* and pHOKs. **Methods** The high-throughput sequencing results of pHOKs co-cultured with *Pm* after 4 h and 24 h were analyzed using bioinformatics methods. Mfuzz clustering algorithm was used to cluster genes with similar temporal expression patterns, and GO, KEGG and STRING network analysis were utilized. Hub genes were obtained using Cytoscape. RT-qPCR was used to detect the expression of Hub genes. **Results** A total of 1 456 and 1 386 differentially expressed genes (DEGs) in pHOKs were screened out after stimulated by *Pm* for 4 h and 24 h, respectively. These genes were divided into three clusters based on Mfuzz. The expression of cluster 1 genes showed a downward trend with time, which were mainly involved in biological processes such as

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(82170961、81870764)

作者简介: 邵如如(1996—),女,硕士. E-mail: 1301885882@qq.com

通信作者: 何园. E-mail: drheyuan@tongji.edu.cn

epithelial cell differentiation and epithelial-to-mesenchymal transition. Cluster 2 genes showed an upward trend with time, which were mainly involved in bacterial infection and retinol metabolism. Cluster 3 genes were up-regulated in the early stage of stimulation and down-regulated in the late stage, which were mainly involved in cytokine-related signaling pathways. VEGFA and GDNF were selected as Hub genes in cluster 1 within the PPI network. Hub genes in cluster 2 were PTGS2, ICAM1, etc. Hub genes in cluster 3 were IL-6, CCL2, etc. The results of RT-qPCR showed that VEGFA, PTGS2, IFIT1, and IRF1 were consistent with the expression trend of the genes in the sequencing data over time.

Conclusion The study has revealed the dynamic patterns of pHOKs stimulated by *Pm*, and suggests that genes related to retinol metabolism and genes negatively regulating EMT are abnormally expressed in oral lichen planus(OLP) and *Pm* may evade immune surveillance through some adaptive mechanisms after invading epithelial cells. It is helpful to further explore the pathogenic mechanism of *Pm* in OLP.

【Key words】 *Prevotella melaninogenica*; primary human oral keratinocytes; time series analysis

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是一种常见的口腔黏膜慢性炎症性疾病。据估计,该疾病影响了大约 1% 的普通人群,平均发病年龄约为 60 岁,女性较为多见。该疾病被 WHO 归类于口腔潜在恶性疾病,恶性转化率为 0.44%~1.4%。OLP 病理学表现为固有层存在具有带状外观的炎性浸润以及上皮基底细胞层液化变性,浸润的淋巴细胞主要 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞,其发病机制目前尚不清楚^[1]。

微生物在维持口腔健康方面起着重要的作用。特定情况下,微生物与人体之间的动态平衡被打破,导致菌群失衡,一些共生菌群转化成致病菌,诱发多种疾病^[2]。近年来,微生物感染在 OLP 发病机制中的作用引起人们的广泛关注,最近多个研究证明了 OLP 患者的唾液和组织样本中微生物群落多样性和组成与健康受试者相比存在显著差异^[3-4]。本课题组前期研究发现,OLP 患者颊黏膜表面微生物群落结构与健康人群相比明显不同。进一步通过高通量测序分析发现,产黑普氏菌(*Prevotella melaninogenica*, *Pm*) 在 OLP 颊黏膜表面构成比显著增加,并且 *Pm* 侵入 OLP 组织的上皮层和固有层^[5-6], 这均提示我们 *Pm* 可能在 OLP 的发生发展中起到重要作用。

本研究对 *Pm* 刺激原代人口腔角质形成细胞(primary human oral keratinocytes, pHOKs) 的转录组测序数据,通过 Mfuzz 包进行时间序列分析,以探讨相关生物学分子的动态模式以及 *Pm* 与宿主细胞相互作用的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 *Pm*-pHOKs 细胞共培养模型及转录组数据的获取

Pm-pHOKs 细胞共培养模型及转录组数据来自

课题组前期郭等人的研究^[7]。

1.2 数据预处理和差异表达基因的筛选

用 HTSeq 分别对共培养组和对照组样本进行 reads 计数。使用 DESeq2 进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选, Ashr 算法对 logFC 进行校正。取差异倍数绝对值 ≥ 1 且 $P \leq 0.01$ 的基因筛选为差异具有统计学意义的 DEGs。

1.3 DEGs 的聚类分析

用于软聚类微阵列数据的 Mfuzz^[8] 克服了传统聚类的弱点。在这项研究中, Mfuzz 用于进行 DEGs 的聚类分析。其中 C 值设为 3, m 值为 3.71。分别在 *Pm* 处理不同时间下筛选具有一致表达趋势的基因。根据聚类结果鉴定上调基因和下调基因,簇中上调基因表现为持续上升趋势,下调基因表现为持续下降趋势。

1.4 功能富集分析

利用 R 语言富集常用包 ClusterProfiler 分别对 3 个簇中包含的基因进行功能富集分析,包括基因本体论“生物学过程”注释类别和重要的京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)途径。校正后 $P < 0.05$ 表示 DEGs 的显著富集的 GO 和 KEGG 途径。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用网络和模块分析

用于检索相互作用基因的搜索工具 STRING 是一种探索潜在蛋白质-蛋白质相互作用的在线工具,它由已知的和预测的 PPI 组成。分别提取 3 个簇中的 DEGs,利用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)进行蛋白-蛋白互作分析。使用 Cytoscape 软件(版本 3.9.1)对蛋白互作结果进行可视化,进一步利用 Cytohubba 插件对 DEGs 按 EPC、Degree、

Closeness、MNC 算法计算评分位于前 10 的基因,再取交集,得到枢纽基因(Hub 基因)。

1.6 HaCaT 细胞培养

将 HaCaT 细胞(中国科学院细胞库)接种于含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基(Hyclone, 美国)中,并在 37 °C, 5% CO₂ 环境下培养。培养基 2~3 d 更换 1 次。常规传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.7 细菌培养

将 *P. melaninogenica* (ATCC® 25845™) 涂布于厌氧基础血平板,厌氧环境下培养,挑取单个菌落接种于厌氧基础肉汤中,置于 37 °C 摇床过夜培养,用新鲜肉汤将菌液稀释至 OD₆₀₀ 为 0.1,培养至对数期收集菌液,离心(离心半径 10 cm, 3 000 r/min, 5 min)弃上清液,PBS 清洗 3 次后,用新鲜培养基调整 OD₆₀₀ = 1.0,用于实验。

1.8 实时荧光定量 PCR 验证 Hub 基因

将 HaCaT 细胞以 2 × 10⁵ 个/mL 的细胞密度均匀种植于 12 孔板,24 h 后去除培养基,PBS 清洗 3 次后加入不含胎牛血清的 DMEM 培养基,感染组和对照组分别吸取 1 μL 菌液和 1 μL 的 DMEM 培养基,放置于含 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱内培养 4、24 h 后去除培养基,PBS 清洗 3 次,加入 TRIzol 试剂,冰上孵育 5 min 后将 RNA 收集至离心管内,氯仿法提取 RNA。根据反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)说明书将每个样本的总 RNA 转化为 cDNA。根据实时荧光定量试剂盒(TaKaRa, 日本)说明,确定相应的反应条件: 95 °C 30 s, 随后进行 40 个 95 °C 5 s 和 60 °C 31 s 的循环。所有样本一式 3 份。GAPDH 作为内部对照,所用引物信息见表 1。

表 1 关键基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of key genes

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GDNF	GGCAGTGCTTCTAGAA-GAGA	AAGACACAACCCCGGTT-TTTG
PTGS2	CTGGCGCTCAGCCATAC-AG	CGCACTTATACTGGTCA-AATCCC
IRF1	ATGCCCATCACTCGGAT-GC	CCCTGCTTTGTATCGGC-CTG
IFIT1	TTGATGACGATGAAATG-CCTGA	CAGGTCACCAGACTCCT-CAC
GAPDH	GGACCTGACCTGCCGTC-TAG	GTAGCCCAGGATGCCCT-TGA

1.9 统计学处理

目的基因相对表达量采用 CT 对比法确定水平

(2^{-ΔΔCt})。采用单因素方差分析对多组数据间进行比较, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 筛选

通过分析 *Pm* 刺激 pHOKs 的高通量测序数据发现,在本次测序所获取的全部基因中,相较于对照组,4 h 组与 24 h 组分别有 1 455 个、1 385 个基因的表达存在统计学差异,见图 1。

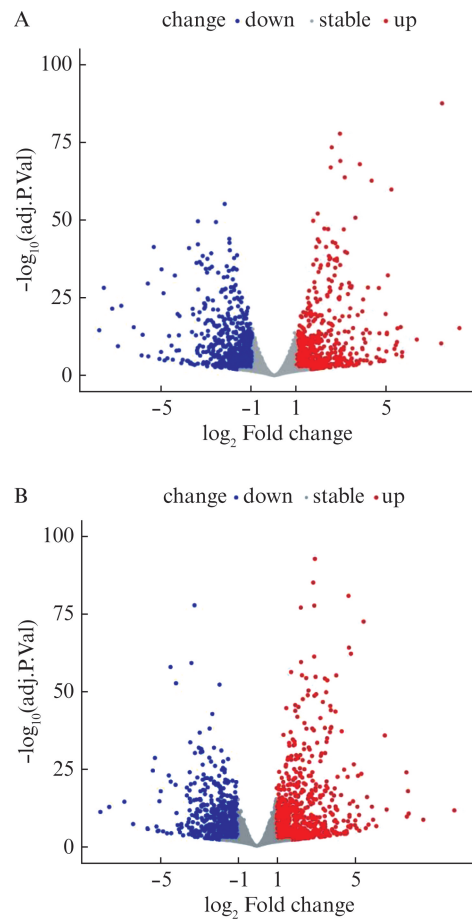


图 1 实验组和对照组的基因表达

Fig. 1 Gene expression in experimental and control groups

A: *Pm* 与 pHOKs 共培养 4 h 组的火山图; B: *Pm* 与 pHOKs 共培养 24 h 组的火山图

2.2 DEGs 的聚类分析

通过软 Mfuzz 聚类算法,将 4 h 和 24 h 组的 DEGs 按照其随时间变化表达的相似性分为 3 个簇,分别获得簇 1(包括 561 个基因),簇 2(包括 262 个基因),和簇 3(包括 303 个基因)。簇 1 中的基因随时间延长其表达呈现下降的趋势,相反,簇 2 中的基因表达值呈现上升的趋势,簇 3 的基因表达值在刺激前期(4 h)显著上调,后期(24 h)显著下调,见图 2。

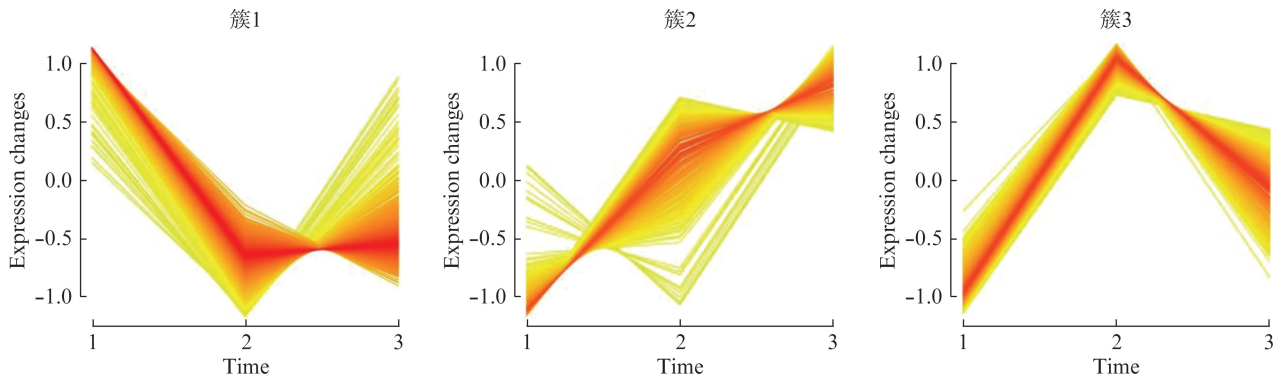


图 2 3 个聚类的基因表达变化

Fig. 2 The gene expression changes in three clusters

2.3 DEGs 的 GO 功能富集分析

图 3 显示了 3 个簇包含的 DEGs 生物学过程功能富集结果。其中,横轴代表各个簇,纵轴代表 GeneOntology 数据库中对应 GO 的条目名称。与簇 1 中的 DEGs 相关的生物学过程为上皮细胞分化的调控、上皮细胞向间充质细胞转化的负调控、间充质细胞生长。簇 2 中的 DEGs 主要富集的生物学过程为细菌来源的分子的反应、对脂多糖的反应、烯烃化合物代谢过程、二萜代谢过程、视黄醇代谢过程、细胞对生物刺激的反应。簇 3 中的 DEGs 主要富集的生物学过程为对脂多糖的反应、细胞因子介导的信号通路、白细胞迁移、细胞趋化作用、对 IL-1 的反应。

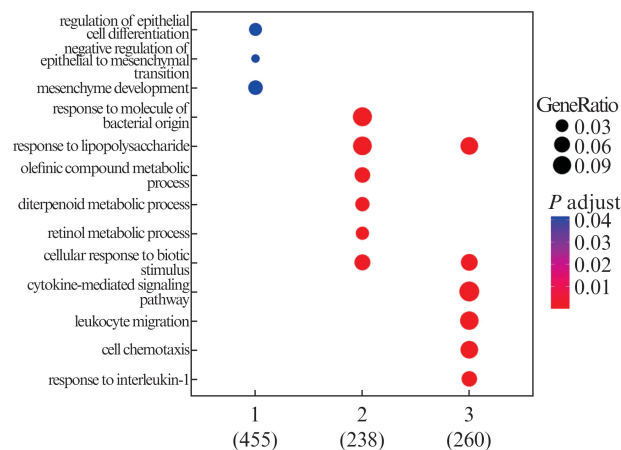


图 3 差异表达基因 GO 功能富集分析结果示意图

Fig. 3 Schematic diagram of GO function enrichment analysis of differentially expressed genes

2.4 DEGs 的信号通路分析

对 3 个簇中的 DEGs 进行了 KEGG 信号通路分析,如图 4 所示,簇 1 中的基因没有富集到相关通路,簇 2 中的基因主要参与金黄色葡萄球菌感染、类风湿性关节炎、TNF 信号通路、IL-17 信

号通路、甾类激素生物合成、细胞因子与细胞因子相互作用等通路。簇 3 中的基因主要富集在类风湿性关节炎、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、细胞因子与细胞因子相互作用、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用、癌症中的转录失调、脂质和动脉粥样硬化、Toll 样受体信号通路等通路。

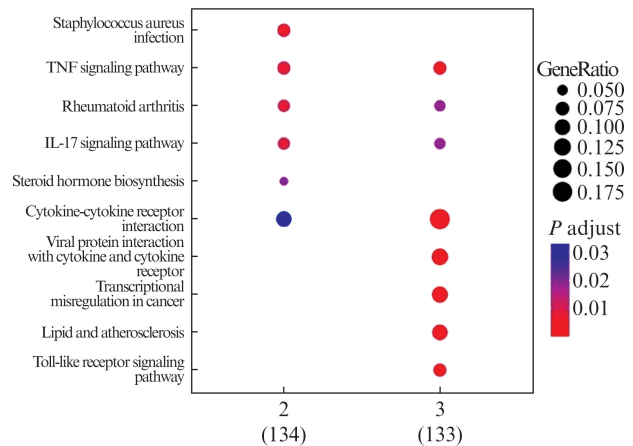


图 4 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

2.5 PPI 网络和 Hub 基因

通过利用 STRING 在线工具,构建 3 个簇中 DEGs 的 PPI 网络,见图 5。

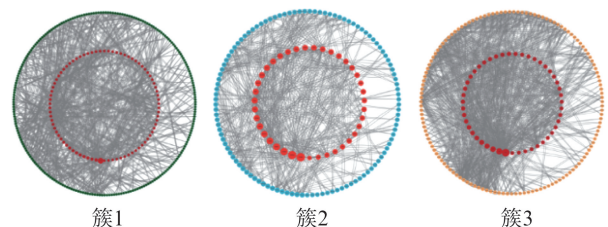


图 5 3 个聚类中差异基因的 PPI 网络

Fig. 5 PPI networks of differentially expressed genes in the three clusters

在 PPI 网络中筛选出簇 1 中的 2 个 Hub 基因为 VEGFA、GDNF; 簇 2 中的 8 个 Hub 基因分别为 CSF2、CCL5、CXCL1、PTGS2、ICAM1、CD86、

MYD88、TNFAIP3; 簇 3 中的 8 个 Hub 基因分别为 TNF、IL-6、CXCL8、CXCL10、CCL2、IRF1、MX1、IFIT1, 见图 6。

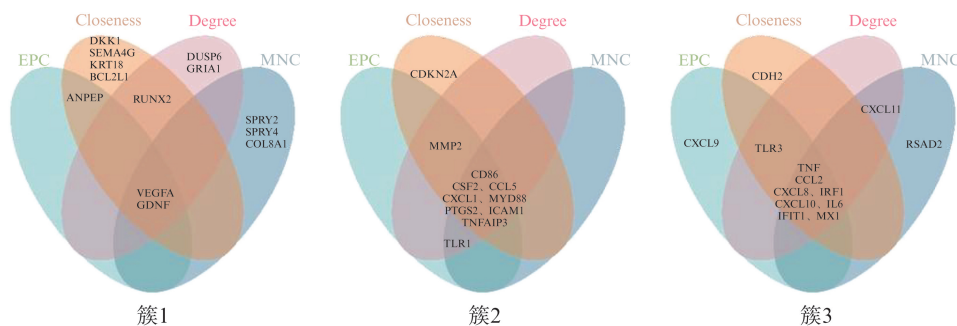


图 6 用 Cytohubba 插件中 4 种不同算法所确定的 Hub 基因
Fig. 6 Hub genes identified by using four different algorithms in the Cytohubba plugin

2.6 实时荧光定量 PCR 验证结果

随机选取 3 个簇中部分 Hub 基因进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果表明, 簇 1 中的 GDNF 在 4 h 时与对照组相比显著下调 ($P < 0.05$), 24 h 时下调趋势更为显著 ($P < 0.01$)。而簇 2 中的基因 PTGS2 则随着时间延长其表达量逐渐上调。簇 3 中的基因 IRF1 及 IFIT1 在 4 h 时均显著上调 ($P < 0.01$), 而 24 h 时与对照组相比差异无统计学意义, 实时荧光定量 PCR 结果与转录组测序结果一致, 见图 7。

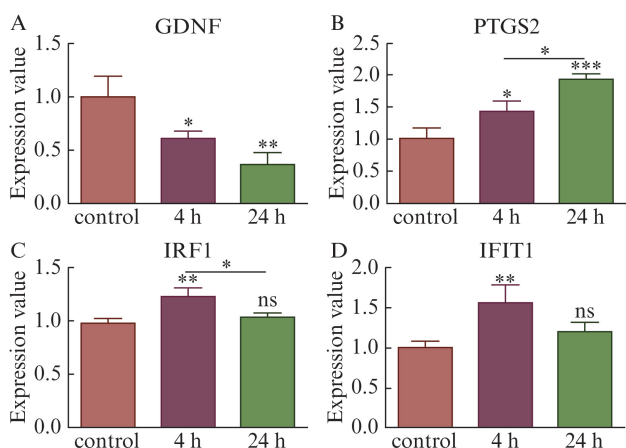


图 7 实时荧光定量 PCR 验证 RNA-Seq 结果
Fig. 7 The results of RNA-Seq were verified by Real-time quantitative PCR

A: 簇 1 中的 Hub 基因 GDNF 的 mRNA 表达水平; B: 簇 2 中的 Hub 基因 PTGS2 的 mRNA 表达水平; C: 簇 3 中的 Hub 基因 IRF1 的 mRNA 表达水平; D: 簇 3 中的 Hub 基因 IFIT1 的 mRNA 表达水平

3 讨 论

宿主和微生物之间的相互作用在时间和空间上是高度动态的, 特别是在感染的情况下, 病原体数量、微生物表型和宿主反应的性质通常会随着时间

的推移而发生巨大变化^[9]。对时间序列中动态变化的基因的探究有助于更好地理解宿主与微生物相互作用的机制, 为疾病预防与临床治疗提供信息。故本研究基于时间序列分析, 对 *Pm* 刺激 pHOKs 的 RNA-seq 数据进行数据挖掘, 根据数据的特点及需要采用 Mfuzz 算法将 DEGs 划分为 3 个聚类, 并对每个聚类中的基因进行 GO、KEGG 以及 STRING 网络分析, 并筛选出 Hub 基因, 利用实时荧光定量 PCR 对部分基因进行验证。

Mfuzz 算法可以对来自不同时间点的 DEGs 进行聚类, 以显示它们的渐进式表达式动态^[10]。分析微阵列数据时常用的方法是聚类技术, 但通常是基于硬聚类方法, 即其中一个基因(或样本)被精确地分配到一个聚类。然而, 硬聚类存在信息丢失等缺点。相比之下, 软聚类方法可以将一个基因分配到多个聚类, 它克服了传统硬聚类技术的不足, 并具有进一步的优势^[11]。除了 Mfuzz 算法之外, 还有一些类似的基于模糊聚类的算法, 例如: Fuzzy C-means (FCM) 算法^[12]、Possibilistic C-means (PCM) 算法等^[13]。

上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程, 已被证明为一种可逆过程^[14]。当负调控上皮细胞向间充质细胞转化过程相关基因下调时可促进 EMT, 上皮细胞失去细胞-细胞连接和基底-顶端极性。此前有研究报道称 EMT 相关标志物 claudin-1, claudin-4 和 E-钙黏蛋白在 OLP 中的表达与对照组相比显著降低。提示 OLP 的上皮层存在细胞黏附和极性失调^[15]。本研究结果显示, 簇 1 中的基因与上皮细胞向间充

质细胞转化的负调控相关,提示 EMT 可能是 OLP 的早期病理过程,当 *Pm* 与口腔角质形成细胞相互作用,可激活 EMT,使上皮去极化并破坏其紧密和黏附,导致细菌进一步地侵入上皮与固有层。

此外,簇 2 的差异表达基因随时间延长其表达持续上调,通过 GO 分析提示与视黄醇代谢过程相关。进一步分析数据发现,在 *Pm* 刺激原代人口腔角质形成细胞模型中与视黄醇代谢途径相关的基因 AKR1B10 的表达显著上调。AKR1B10 是视黄酸代谢中的关键酶,即醛固酮还原酶家族 1 成员 B10。目前研究表明,AKR1B10 在乳腺癌^[16],口腔鳞状细胞癌^[17],肺癌^[18],肝癌^[19],喉癌^[20]等肿瘤中过表达,此外 AKR1B10 的上调还见于银屑病、瘢痕疙瘩、特应性皮炎等患者的皮肤慢性炎症中。OLP 相关转录组数据集 GSE52130^[21]中,AKR1B10 的表达水平较健康人群的上皮样本高,提示该基因可能在 OLP 病理过程中起到重要作用。

簇 3 中的基因主要富集于与对脂多糖的反应、细胞因子介导的信号通路、白细胞迁移、细胞趋化作用等生物学过程相关,其表达在刺激前期上调,后期下调。有研究发现一些微生物已经进化出许多适应性机制逃避免疫监视,如牙龈卟啉单胞菌通过利用宿主自噬机制在牙龈上皮细胞中成功存活^[22],此外牙龈卟啉单胞菌能够在细胞间传播,有学者研究发现牙龈卟啉单胞菌的细胞间易位是通过基于肌动蛋白的膜突起介导,绕过了将细菌释放到细胞外基质中的需要,从而避开免疫系统的清除^[23]。综合上述,我们推测早期 *Pm* 黏附于上皮细胞表面,细胞分泌细胞因子、趋化因子和防御素等免疫效应物抵抗其入侵。后期 *Pm* 可能通过类似机制入侵上皮细胞,逃避免疫监视,从而导致炎症的慢性迁延与复发。对 *Pm* 可能产生的适应性机制进行研究有助于深入理解 OLP 的病理过程。

本研究进一步筛选了 3 个簇的 Hub 基因,簇 1 中的 GDNF 负责编码神经营养因子,该因子的下调与炎症性肠病患者的屏障功能降低密切相关^[24-25]。在本研究中 GDNF 的转录在 *Pm* 刺激的 pHOKs 中显著下调,这表明 GDNF 可能在介导 *Pm* 刺激后 pHOKs 屏障功能障碍中发挥重要作用。簇 2 中 PTGS2 又称为 COX2,是产生疼痛介质 PGE2 的重要酶,PGE2 的水平升高可能使周围感觉神经敏感,导致疼痛信号更频繁地传递到大脑^[26]。有学者发现与 OLP 网状型相比,糜烂型病变中 COX-2 的表达

显著增加^[27]。临床上,OLP 患者通常会表现为口腔的烧灼感或疼痛症状,这可能与 *Pm* 刺激后 pHOKs 中 COX-2 表达升高有关。此外簇 2 中还包括基因 GM-CSF,有文献报道,口腔鳞状细胞癌患者存在唾液微生物组生态失调,产黑普氏菌的丰度较高,且患者唾液中 IL-8、IL-6、TNF- α 、GM-CSF 和 IFN- γ 显著升高,表明产黑普氏菌有可能增加口腔鳞癌患者口腔唾液中 GM-CSF 的表达,促进鳞癌的发展^[28]。提示 OLP 中 GM-CSF 的表达上调可能与产黑普氏菌的毒力相关。我们还注意到簇 3 的 Hub 基因包括 IL-6,研究表明铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)分泌的胞外毒力蛋白 LasB 是炎症反应的触发因素,在 PA 感染急性期,LasB 激发宿主产生大量促炎细胞因子,如 IL-6^[29]。同时 LasB 可降解宿主细胞表面受体及细胞因子,直接破坏宿主组织细胞和免疫防御系统。如在囊性纤维化患者中,LasB 下调 IL-6/STAT3 通路,抑制上皮细胞修复,导致慢性炎症的建立和维持^[30]。故推测早期 *Pm* 刺激 pHOKs 诱导免疫反应,导致促炎因子 IL-6 上调,后期 *Pm* 可能产生某种毒力因子通过直接降解免疫介质 IL-6 或间接下调 IL-6 的产生来逃避免疫调节。为检验转录组数据是否准确,随机选取 4 个 Hub 基因进行实时荧光定量 PCR 检测,结果表明测定结果与转录组测序结果得到的差异基因表达变化趋势一致,表明本研究中转录组测序得到的数据是可信的。

本研究旨在通过时间序列分析,全面了解口腔角质形成细胞对 *Pm* 感染反应的动态变化。通过研究我们发现与视黄醇代谢相关的基因以及负调控 EMT 的基因在 OLP 中异常表达可能与 *Pm* 入侵上皮细胞有关,并且 *Pm* 入侵上皮细胞后可能通过一些适应性机制逃避免疫监视,从而导致慢性炎症持续存在。这些发现将有助于更好地理解 *Pm* 在 OLP 的发生发展过程中与宿主细胞相互作用的潜在机制,同时为 *Pm* 感染所致疾病的发病机理研究提供一定的参考,为 *Pm* 感染相关疾病的预防和临床治疗提供理论基础。但本研究仍存在一些局限性:在本次实验中,只选择了 3 个时间点收集样本,对于分析的结果有待进一步通过扩大不同时间点的样本量来验证。此外我们只分析了部分基因,还有更多生物分子信息有待深入研究。针对已挖掘的关键基因,后续将在实验样本中验证其在 *Pm* 与细胞相互作用中发挥的功能,以期在 *Pm* 感染相关疾病的临床治疗提供理论基础和实验证据。

【参考文献】

- [1] ALRASHDAN M S, CIRILLO N, MCCULLOUGH M. Oral lichen planus: a literature review and update [J]. Arch Dermatol Res, 2016,308(8): 539-551.
- [2] LI Z R, LIU Y, ZHANG L. Role of the microbiome in oral cancer occurrence, progression and therapy[J]. Microb Pathog, 2022,169: 105638.
- [3] WANG X W, ZHAO Z B, TANG N, et al. Microbial community analysis of saliva and biopsies in patients with oral lichen planus[J]. Front Microbiol, 2020,11: 629.
- [4] YU F Y, WANG Q Q, LI M, et al. Dysbiosis of saliva microbiome in patients with oral lichen planus[J]. BMC Microbiol, 2020,20(1): 75.
- [5] XU P, SHAO R R, ZHANG S, et al. The mechanism on *Prevotella melaninogenica* promoting the inflammatory progression of oral lichen planus [J]. Clin Exp Immunol, 2022,209(2): 215-224.
- [6] 谭正午,徐盼,郭艺婷,等.产黑普氏菌破坏上皮屏障紧密连接在口腔扁平苔藓发病机制中的作用[J].同济大学学报(医学版),2021,42(4): 459-466.
- [7] 郭艺婷,韩文豪,徐盼,等.原代人口腔角质细胞在产黑普氏菌作用后的转录组分析[J].口腔疾病防治,2022,30(9): 620-629.
- [8] KUMAR L, E FUTSCHIK M. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data [J]. Bioinformatics, 2007,2(1): 5-7.
- [9] HAUSMANN A, HARDT W D. Elucidating host-microbe interactions *in vivo* by studying population dynamics using neutral genetic tags [J]. Immunology, 2021,162(4): 341-356.
- [10] ZHENG X Y, GUO J S, CAO C Y, et al. Time-course transcriptome analysis of lungs from mice infected with hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* via aerosolized intratracheal inoculation [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022,12: 833080.
- [11] YANG C H, DING M J, SHAO G Q, et al. Kcnk3, Ggta1, and Gpr84 are involved in hyperbaric oxygenation preconditioning protection on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Brain Res, 2021, 239(12): 3601-3613.
- [12] KRASNOV D, DAVIS D, MALOTT K, et al. Fuzzy C-means clustering: a review of applications in breast cancer detection [J]. Entropy, 2023,25(7): 1021.
- [13] GU Y X, NI T G, JIANG Y Z. Deep possibilistic C-means clustering algorithm on medical datasets [J]. Comput Math Methods Med, 2022,2022: 3469979.
- [14] SALIEM S S, BEDE S Y, COOPER P R, et al. Pathogenesis of periodontitis — A potential role for epithelial-mesenchymal transition [J]. Jpn Dent Sci Rev, 2022,58: 268-278.
- [15] HÄMÄLÄINEN L, SOINI Y, PASONEN-SEPPÄNEN S, et al. Alterations in the expression of EMT-related proteins claudin-1, claudin-4 and claudin-7, E-cadherin, TWIST1 and ZEB1 in oral lichen planus [J]. J Oral Pathol Med, 2019,48(8): 735-744.
- [16] CAO Z, DELFINO K, TIWARI V, et al. AKR1B10 as a potential novel serum biomarker for breast cancer: a pilot study [J]. Front Oncol, 2022,12: 727505.
- [17] FANG C Y, LIN Y H, CHEN C L. Overexpression of AKR1B10 predicts tumor recurrence and short survival in oral squamous cell carcinoma patients [J]. J Oral Pathol Med, 2019,48(8): 712-719.
- [18] LIU W W, SONG J, DU X H, et al. AKR1B10 (Aldo-keto reductase family 1 B10) promotes brain metastasis of lung cancer cells in a multi-organ microfluidic chip model [J]. Acta Biomater, 2019,91: 195-208.
- [19] WU T G, KE Y, TANG H R, et al. Fidarestat induces glycolysis of NK cells through decreasing AKR1B10 expression to inhibit hepatocellular carcinoma [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021,23: 420-431.
- [20] LIU J X, BAN H Y, LIU Y F, et al. The expression and significance of AKR1B10 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Sci Rep, 2021,11(1): 18228.
- [21] GASSLING V, HAMPE J, AÇIL Y, et al. Disease-associated miRNA-mRNA networks in oral lichen planus [J]. PLoS One, 2013,8(5): e63015.
- [22] LEE J S, SPOONER R, CHOWDHURY N, et al. *In situ* intraepithelial localizations of opportunistic pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Filifactor alocis*, in human gingiva [J]. Curr Res Microb Sci, 2020,1: 7-17.
- [23] ROBERTS J S, ATANASOVA K R, LEE J, et al. Opportunistic pathogen *Porphyromonas gingivalis* modulates danger signal ATP-mediated antibacterial NOX2 pathways in primary epithelial cells [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017,7: 291.
- [24] MEIR M, KANNAPIN F, DIEFENBACHER M, et al. Intestinal epithelial barrier maturation by enteric glial cells is GDNF-dependent [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1887.

- [25] 张树辉,张灿,秘晨晓,等. 肠道微生物群系对炎症性肠病发生发展影响的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版),2022,48(6): 1644-1649.
- [26] MA W Y, ST-JACQUES B, DUARTE P C. Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012,16(6): 527-540.
- [27] BABY T K, BINDHU P R, PILLAI R K, et al. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in oral lichen planus and normal oral mucosa[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2022,65(1): 8-12.
- [28] RAI A K, PANDA M, DAS A K, et al. Dysbiosis of salivary microbiome and cytokines influence oral squamous cell carcinoma through inflammation[J]. *Arch Microbiol*, 2021,203(1): 137-152.
- [29] BASTAERT F, KHEIR S, SAINT-CRIQ V, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB subverts alveolar macrophage activity by interfering with bacterial killing through downregulation of innate immune defense, reactive oxygen species generation, and complement activation[J]. *Front Immunol*, 2018,9: 1675.
- [30] SAINT-CRIQ V, VILLERET B, BASTAERT F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway[J]. *Thorax*, 2018,73(1): 49-61.