

牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡差异表达 mRNA 的生物信息学分析

阮毅¹ 艾俊¹ 江春² 招洛丹¹ 夏昕¹ 刘墨¹

¹中山大学孙逸仙纪念医院牙周科,广州 510120; ²中山大学孙逸仙纪念医院泌尿外科,广州 510120

通信作者:刘墨,Email:liumo@mail.sysu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)W83与ATCC33277外膜囊泡mRNA表达谱的差异。方法 超速离心法分离W83和ATCC33277来源的外膜囊泡,进行粒径检测、电镜及Western blot鉴定;高通量测序检测W83和ATCC33277外膜囊泡mRNA表达谱,筛选差异表达的mRNA,进行基因本体论(GO)注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。结果 牙龈卟啉单胞菌W83和ATCC33277分离的外膜囊泡符合囊泡特征;W83外膜囊泡中鉴定出1629个mRNA,ATCC33277外膜囊泡中鉴定出1505个mRNA,差异表达的mRNA共594个。差异具有统计学意义的mRNA参与的途径包括生物膜形成-霍乱弧菌($P=0.011$)、核糖体($P=0.015$)和细菌双组分调节系统($P=0.026$)。结论 牙龈卟啉单胞菌W83与ATCC33277外膜囊泡mRNA表达存在差异。

【关键词】 牙龈卟啉单胞菌; 外膜囊泡; 高通量筛选; 双组分信号转导系统

基金项目: 国家自然科学基金(81502350); 广东省自然科学基金(2016A030313352、2017A030313501)

引用著录格式: 阮毅,艾俊,江春,等. 牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡差异表达mRNA的生物信息学分析[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(3):135-141.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.03.002

Bioinformatics analysis of differentially expressed mRNA in outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*

Ruan Yi¹, Ai Jun¹, Jiang Chun², Zhao Luodan¹, Xia Xin¹, Liu Mo¹

¹Department of Periodontics, The Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; ²Department of Urology, The Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Liu Mo, Email: liumo@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To study the difference of mRNA expression profiles in the outer-membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W83 and ATCC33277. **Methods** The outer membrane vesicles derived from W83 and ATCC33277 were separated by ultracentrifugation. After the particle size detection, transmission electron microscopy, and Western blot, the outer membrane vesicles identified; the high-throughput sequencing technology was used to detect the mRNA expression profiles of outer membrane vesicles of W83 and ATCC33277. Membrane vesicle mRNA expression profile, which was screened out with differentially expressed mRNA, was performed by Gene Ontology annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis. **Results** Outer membrane vesicles isolated from W83 and ATCC33277 met the characteristics of vesicles. We identified 1629 mRNAs in W83 outer membrane vesicles, and 1505 mRNAs in ATCC33277 outer membrane vesicles and screened out differentially expressed mRNAs. A total of 594 items was identified. Through GO analysis and KEGG analysis of differentially expressed mRNAs, the pathways related to differential genes include biofilm Formation - *Vibrio cholerae* ($P = 0.011$), ribosome ($P = 0.015$), bacterial two-component regulation system ($P =$

0.026) with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** There are different expressed mRNA between W83 and ATCC33277.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; Outer membrane vesicles; High-Throughput screening assays; Two-component signal transduction system

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81502350); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313352, 2017A030313501)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.03.002

牙周炎是牙周致病菌引起的牙周支持组织进行性破坏的慢性炎症性疾病^[1],其与多种全身系统性疾病如糖尿病、动脉粥样硬化、口腔癌和消化系统肿瘤等密切相关^[2-4]。研究表明,牙周病患者相较于非牙周病患者的口腔癌风险增加将近2倍^[4]。此外,流行病学调查显示牙周炎与口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)的相对危险度为4.52,呈正相关关系。

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是一种革兰阴性厌氧菌,是牙周炎主要致病菌之一。Ha等^[5-6]连续5周使用*P. gingivalis*对舌鳞癌细胞进行感染,结果显示舌鳞癌细胞形态发生上皮-间质转化,且白细胞介素8(IL-8)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达水平增高。Woo等^[7]通过将感染*P. gingivalis*的舌鳞癌细胞与未感染*P. gingivalis*的舌鳞癌细胞进行对比发现,感染*P. gingivalis*的舌鳞癌细胞对紫衫醇产生了更高的耐药性,且肺内转移灶数量更多。这些研究表明,*P. gingivalis*可能促进舌鳞癌的发展。*P. gingivalis*根据编码FimA蛋白的*fimA*基因开放阅读框核苷酸序列的差异,分为I(ATCC33277)、I b、II、III、IV(W83)和V等6种基因型。Wang等^[8]通过Mate分析表明,II和IV型在牙周病患者中分布较高。也有研究表明,感染*P. gingivalis* W83的小鼠牙周组织的破坏比感染*P. gingivalis* ATCC33277的小鼠更严重^[9]及W83对牙周炎的炎症标志物内皮细胞间黏附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达的促进作用比ATCC33277更明显^[10]。大量研究结果也表明,II和IV型是高毒力菌株,而I型则是低毒力菌株^[11]。*P. gingivalis*可产生大量外膜囊泡。外膜囊泡是富含微生物成分、毒素和毒力因子的膜封闭实体^[12-13],能克服上皮屏障,将脂多糖和其他毒力因子转运到宿主细胞的细胞质中。*P. gingivalis*产生的囊泡包含多种毒力因子,如脂多糖和牙龈蛋白酶。外膜囊泡有助于*P. gingivalis*与宿主的相互作用及*P. gingivalis*的定植。有研究表明,外膜囊泡是增强宿主与病原体之间相互作用的有效载体,是

*P. gingivalis*重要的致病机制之一^[12]。

外膜囊泡在肿瘤发生、发展过程中的作用已成为目前的研究热点,为明确*P. gingivalis*外膜囊泡在舌鳞癌发生、发展过程中的作用,本文选取两种*P. gingivalis*菌株W83和ATCC33277,利用高通量测序技术检测其外膜囊泡mRNA表达谱,筛选出其中差异表达的mRNA,对差异表达的mRNA进行基因本体论(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析,初步分析*P. gingivalis*通过外膜囊泡促进舌鳞癌发生、发展可能的机制。

材料与方 法

一、材料

哥伦比亚血平板(广州永津生物科技有限公司),*P. gingivalis* W83和ATCC33277菌种(广东省菌种中心),Grp94抗体(Abcam,英国),TSG101抗体(Abcam,英国)。

二、细菌培养

W83和ATCC33277于细菌超净台上接种至哥伦比亚血平板后,置入厌氧培养罐后抽出氧气加入85% N₂、10% H₂和5% O₂,于37℃恒温细菌培养箱中培养7~14 d。

三、收集细菌及产物

细菌生长至血平板90%后于细菌超净台上用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗,使用离心管收集冲洗液。

四、提取外膜囊泡

将上述冲洗液300 g离心15 min,吸取上清液,弃沉淀;2000 g离心30 min,吸取上清液,弃沉淀;10 000 g离心30 min,吸取上清液,弃沉淀;200 000 g离心70 min,小心吸取上清液,留取沉淀,用PBS缓冲液重悬沉淀,用0.22 μm超滤膜过滤,配平;200 000 g离心70 min,弃上清液,用少量PBS重悬,0.22 μm超滤膜过滤2~3次,所得沉淀即为外膜囊泡。常规使用保存于4℃,长期保存冻存于-80℃。

五、通过粒径分析、电镜、Western blot 进行外膜囊泡鉴定

1. 粒径分析:新鲜提取的外膜囊泡 PBS 重悬成 1 mL,用 Nano Sight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪对新提取的外膜囊泡进行粒径分析,重复 3 次。外膜囊泡粒径需分布较集中且粒径小于 500 nm。

2. 电镜分析:将新鲜提取的外膜囊泡 PBS 重悬,将 20 μ L 样本液滴到铜网上,室温下静置 3 min,染色,透射电镜下观察结果。

3. Western blot 测定外膜囊泡表面特异性分子标志:新鲜提取的外膜囊泡加入等体积的 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,振荡,加 Loading buffer 后于水浴箱中 95 $^{\circ}$ C 煮 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存待用,上样,加入兔抗人 Grp94 (1:1000)、兔抗人 TSG101 (1:1000),孵育二抗。曝光。

六、外膜囊泡 RNA 的提取

200 μ L 的外膜囊泡中加入 1 mL 的 QIAzol Lysis Reagent,孵育 5 min;加入 3.5 μ L miR Neasy Serum/Plasma Spike-In Control;加入 200 μ L 三氯甲烷,孵育 3 min;4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 15 min;收集约 600 μ L 上层水相,加入 900 μ L 无水乙醇后吹打混合;吸取 700 μ L 样本液加入至 RNeasy Min Elute 离心柱置于 2 mL 的收集管中,8000 g 离心 15 s;加入 700 μ L Buffer RWT 至 RNeasy Min Elute 离心柱,8000 g 离心 15 s;加入 500 μ L Buffer RPE 至 RNeasy Min Elute 离心柱,8000 g 离心 15 s;加入 500 μ L 80%乙醇溶液至 RNeasy Min Elute 离心柱,8000 g 离心 2 min;将 RNeasy Min Elute 离心柱打开盖子于 12 000 g 离心干燥 5 min;加入 14 μ L 不含 RNA 的蒸馏水至 RNeasy Min Elute 离心柱,12 000 g 离心 1 min 洗脱 RNA;紫外分光光度计下测所提取 RNA 的纯度和浓度,-80 $^{\circ}$ C 下保存。

七、外膜囊泡基因高通量测序分析

对 W83 和 ATCC33277 外膜囊泡差异表达 mRNA 进行 GO 分析和 KEGG 分析,初步明确两者之间的差异性,由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

八、统计学处理方法

Nano Sight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪的 W83 和 ATCC33277 外膜囊泡粒径数据进行分析统计,各项数据参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

使用 edge R 软件对样本间基因表达量进行差异分析,利用 FDR 与 log2FC 来筛选差异基因,筛选条件为 FDR < 0.05 且 |log2FoldChange| > 1。

将全体差异基因向 GO 数据库的各 term 映射,并计算每个 term 的基因数,得到某个 GO 功能的基因列表及基因数目;然后用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著富集的 GO 条目。

在生物体内,不同基因相互协调行使其生物学功能,基于 Pathway (代谢通路) 的分析有助于更进一步了解基因相关的代谢网络。KEGG 是关于 Pathway 的主要公共数据库。Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的 Pathway。

结 果

一、外膜囊泡粒径分析

通过纳米颗粒分析仪可知,两种外膜囊泡的粒径大小较为集中(图 1、表 1),二者符合外膜囊泡理论粒径。

表 1 ATCC33277 和 W83 外膜囊泡粒径统计学数据($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	平均数	众数	标准差
ATCC33277	1 mL	128.1 \pm 6.6	85.0 \pm 6.2	53.6 \pm 5.5
W83	1 mL	381.0 \pm 3.9	381.9 \pm 29.2	97.5 \pm 2.0

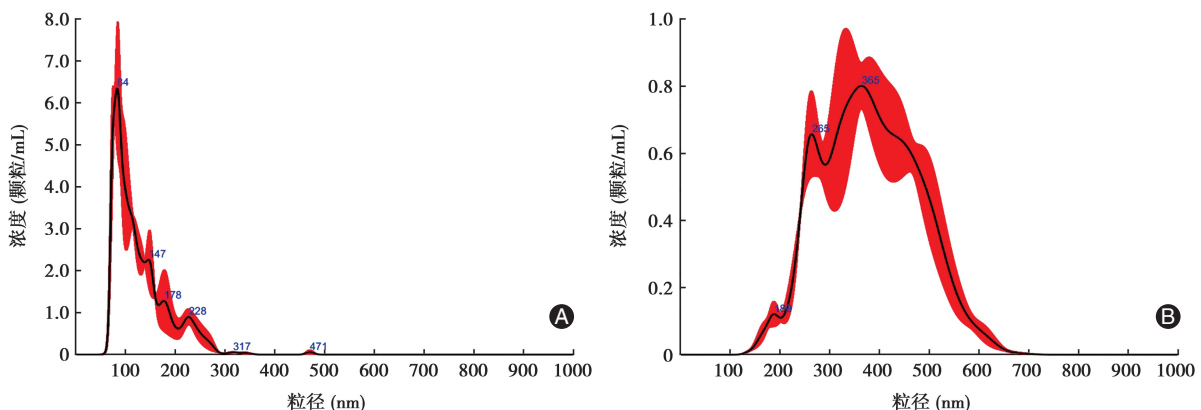


图 1 ATCC33277 和 W83 外膜囊泡通过纳米颗粒分析仪得到的粒径分布图 A:ATCC33277;B:W83;两者均符合外膜囊泡的粒径分布特征

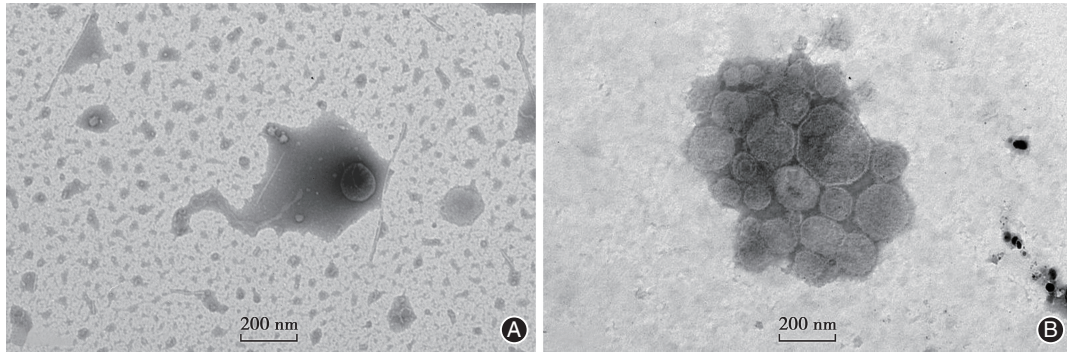


图2 ATCC33277和W83外膜囊泡通过负染在电镜下观察 A:ATCC33277;B:W83;呈圆形或类圆形囊泡,双层膜结构

二、外膜囊泡透射电镜负染观察

透射电镜负染观察外膜囊泡形态呈圆形或类圆形囊泡,双层膜结构。ATCC33277和W83外膜囊泡电镜图(图2),符合外膜囊泡在电镜下的特征。

三、Western blot 测定外膜囊泡表面特异性分子标志

根据 Western blot 结果显示,W83和ATCC33277来源的外膜囊泡 Grp94、TSG101 均呈阳性表达(图3)。

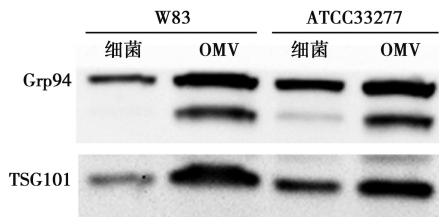


图3 W83和ATCC33277的Western blot结果 Grp94和TSG101蛋白在W83和ATCC33277细菌本身和外膜囊泡(OMV)中的均阳性表达

四、外膜囊泡已知 mRNA 表达量及表达差异

通过高通量测序检测到W83外膜囊泡的mRNA数量为1629条,ATCC33277外膜囊泡的mRNA数量为1505条,在两种囊泡中均发现了牙龈素和血凝素等毒力因子。挑选出2个样本间的差异表达共594个,其中362个上调、232个显著下调(图4、表2)。

五、外膜囊泡已知 mRNA 差异表达GO注释

本课题组对ATCC33277和W83差异表达基因进行GO分析,主要从分子功能、生物学过程、细胞组分3个方面进行分析。其中生物学过程中代谢过程所占最高,其次是细胞过程、单生物过程等。在细胞组分方面,细胞、细胞组分、大分子化合物等的合成在差异性基因的表达过程中区别较大。在分子功能方面:差异最多的是结合,催化活性、结构分子活性等。通过统计学分析,以 $P < 0.05$ 作为GO分析结果的阈值,*P.gingivalis* W83、ATCC33277外膜囊

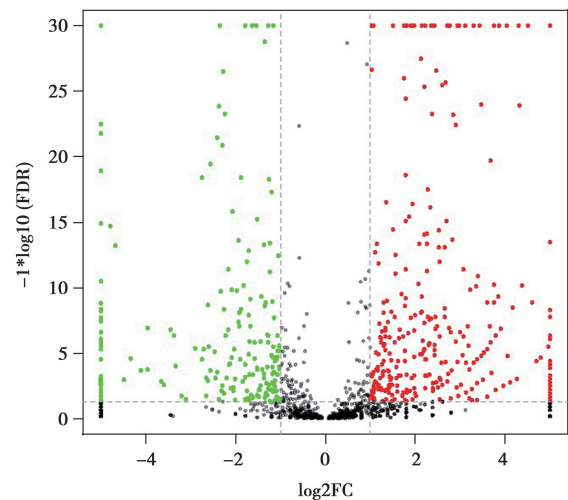


图4 W83和ATCC33277外膜囊泡表达基因利用FDR与log2FC来筛选差异基因表达图(火山图) 红色(W83相对于ATCC33277表达量上调)和绿色(表达量下调)的点表示基因的表达量有差异(判断标准为 $FDR < 0.05$,且差异倍数2倍以上),黑色的点为没有差异

表2 W83和ATCC33277外膜囊泡中部分与牙龈卟啉单胞菌致病因子相关的差异基因

基因	ATCC33277	W83	P值	描述
<i>hagA</i>	17	69	<0.000 000 36	血凝素 <i>hagA</i>
<i>mfa1</i>	218	49	<0.000 000 71	Mfa1膜蛋白
<i>mfa2</i>	34	4	<0.000 829 45	Mfa1菌毛相关蛋白

泡在GO数据库包括细胞组分、分子功能和生物过程3个方面差异无统计学意义(图5)。

六、外膜囊泡已知 mRNA 差异表达KEGG富集

为明确差异基因在生化代谢途径及信号转导途径的差异表达,对差异表达基因进行KEGG生物通路分析发现与差异基因相关通路有81条,其中主要涉及生物膜形成-霍乱弧菌、核糖体、细菌双组分调节系统、ABC转运子、鞘脂代谢、苯丙氨酸代谢、阿卡波糖和有效霉素的生物合成等(图6)。其中以 $P < 0.05$ 作为KEGG分析结果阈值,其中具有统计学

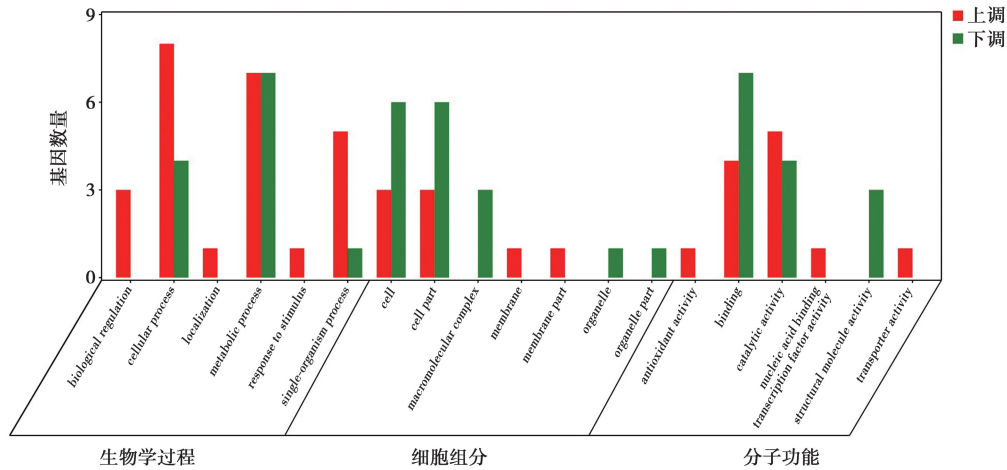


图5 W83和ATCC33277外膜囊泡差异表达基因在生物学过程、细胞组分、分子功能三个方面的差异

意义的3条途径则分别是生物膜形成-霍乱弧菌、核糖体、细菌双组分调节系统(表3)。

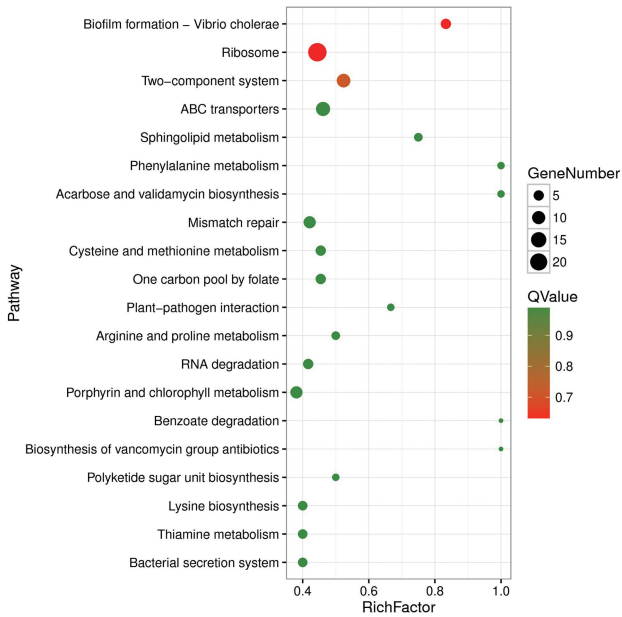


图6 W83和ATCC33277外膜囊泡的差异表达基因行KEGG富集分析后得到的前20条通路

表3 W83和ATCC33277外膜囊泡的差异表达基因行KEGG富集分析具有统计学意义(P < 0.05)的途径

通路名称	具有途径注释的候选基因	与途径相关的所有基因	P值
生物膜形成-霍乱弧菌	5	6	0.011
核糖体	24	54	0.015
细菌双组分调节系统	11	21	0.026

讨论

目前认为, *P.gingivalis* 的致病机制主要包括以下几方面: (1)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS): 是

炎症反应的主要介质。研究表明 *P.gingivalis* 的LPS可以在缺氧条件下诱导牙周炎中 Caspase-1的激活和 IL-1 β 的成熟^[14]; Leira等^[15]使用LPS诱导大鼠建立牙周炎模型,在牙周炎大鼠血清中淀粉样 β 蛋白水平升高; LPS抑制巨噬细胞M2的活化,导致牙周炎M1/M2活化失衡,形成了高炎症环境,促进牙周炎的发展^[16]。(2)血凝素:是 *P.gingivalis* 黏附和生物膜形成的主要介质,具有促进炎症作用。这些蛋白质通过附着、聚集和裂解红细胞使 *P.gingivalis* 摄取铁和血红素。(3)牙龈素:属于半胱氨酸蛋白酶家族,可出现于 *P.gingivalis* 的外膜、囊泡和细胞外结构中,是重要的毒力因子,可通过C5a途径操纵M1巨噬细胞的极化,进而影响局部的炎症状况^[17]。(4)Toll样受体:研究表明在牙周炎的发生、发展过程,Toll样受体介导免疫过程和炎症反应可导致更持久的牙周支持组织的破坏^[18]。(5)菌毛:表达两种特有菌毛由长菌毛(FimA蛋白为主要成分,FimC、FimD、FimE作为辅助结构蛋白)和短菌毛(Mfa蛋白亚单位)组成,介导细菌和多种分子黏附于口腔基质,包括唾液分子、乳铁蛋白和细菌等。FimA的表达对 *P.gingivalis* 侵袭宿主起着重要作用;长菌毛的次要成分(FimC、FimD、FimE)也参与了外膜囊泡对宿主细胞的侵入^[19]。(6)外膜囊泡:外膜囊泡因其不易被酶蛋白降解,作为载体使其内含物包括毒力因子等传递至远处的细胞,是增强宿主与病原体之间相互作用的有效载体。外膜囊泡进入细胞主要通过利用宿主细胞受体进入细胞和脂质筏内吞作用两种途径^[20]。研究发现,外膜囊泡相对于细菌本身可以更有效的刺激巨噬细胞产生IL-6、IL-10、IL-18、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等促凋亡因子,说明外

膜囊泡可能因为毒力因子的富集表现出比 *P. gingivalis* 更强的毒性,且跟细胞凋亡相关^[21]。

在本研究通过超速离心法提取 *P. gingivalis* 外膜囊泡,后通过粒径分析、透射电镜、Western blot 检测 TSG101 和 Grp94 的表达情况。为进一步明确 ATCC33277 和 W83 两种 *P. gingivalis* 外膜囊泡之间存在的差异,本研究通过提取外膜囊泡 RNA,进行高通量测序。通过对 W83 外膜囊泡和 ATCC33277 的外膜囊泡 mRNA 表达量进行检测,检测出 W83 外膜囊泡有 1505 和 ATCC33277 有 1629 个 mRNA,显著差异表达的 mRNA 有 594 个,其中上调的 mRNA 有 362 个、下调的 mRNA 有 232 个。其中的部分表达基因包括 *hagA* 基因、牙龈素敏感配体 A 相关基因调节着 *P. gingivalis* 毒力因子血凝素和牙龈素的表达,且 *maf1* 基因、*maf2* 基因参与着菌毛的组成,以上提示着两种菌种致病性的差异性。将差异 mRNA 进行 GO 分析结果表示着 *P. gingivalis* W83 和 ATCC33277 在分子功能、生物学过程、细胞组分 3 个方面无明显差异。通过 KEGG 富集分析,发现具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 3 条途径则分别是生物膜形成-霍乱弧菌、核糖体、细菌双组分调节系统。*P. gingivalis* 可能通过上皮细胞或恶性肿瘤细胞向间充质转化、参与肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的侵袭 3 个方面在口腔鳞癌的发生、发展过程中发挥重要作用^[22]。Ha 等^[5-6]连续 4 周使用 *P. gingivalis* 对舌鳞癌细胞感染,结果显示舌鳞癌细胞形态发生变化,呈长条形,且 IL-8 和 MMP 的表达水平增高表明舌鳞癌细胞的迁移与侵袭能力增强。*P. gingivalis* 双组分调节系统是具有 5 个完整的双组分系统,其中包括 *P. gingivalis* 的 2 个基因 *fimR* 和 *fims* 编码 1 个由反应调节因子 (FimR) 和传感器组氨酸激酶 (FimS) 组成的双组分信号转导系统 (FIMS/FimR)。本研究采用的两种菌株在 FimA 蛋白的表达过程中是不同的, FIMS/FimR 则对 Fim 基因簇存在着正调控的关系,即对菌毛的产生有调控作用。另外,有文献表明菌毛介导外膜囊泡的产生和对细胞的侵袭和迁移能力产生影响^[23-24]。下一步本课题组将探究 W83 及 ATCC33277 生物学行为的影响。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Astuti SD, Utomo IB, Setiawatie EM, et al. Combination effect of laser diode for photodynamic therapy with doxycycline on a wistar rat model of periodontitis[J]. BMC Oral Health, 2021, 21(1):80. DOI:10.1186/s12903-021-01435-0.
- [2] Cecero G, Annunziata M, Iuorio MT, et al. Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(6):272. DOI: 10.3390/medicina56060272.
- [3] Michaud DD, Fu Z, Shi J, et al. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk[J]. Epidemiol Rev, 2017, 39(1):49-58. DOI:10.1093/epirev/mxx006.
- [4] Ye L, Jiang Y, Liu W, et al. Correlation between periodontal disease and oral cancer risk: A meta-analysis[J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(Supplement):C237-C240. DOI: 10.4103/0973-1482.200746.
- [5] Ha NH, Woo BH, Kim DJ, et al. Prolonged and repetitive exposure to Porphyromonas gingivalis increases aggressiveness of oral cancer cells by promoting acquisition of cancer stem cell properties[J]. Tumour Biol, 2015, 36(12):9947-9960. DOI:10.1007/s13277-015-3764-9.
- [6] Ha NH, Park DG, Woo BH, et al. Porphyromonas gingivalis increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs[J]. Cytokine, 2016, 86:64-72. DOI: 10.1016/j.cyt.2016.07.013.
- [7] Woo BH, Kim DJ, Choi JI, et al. Oral cancer cells sustainedly infected with Porphyromonas gingivalis exhibit resistance to Taxol and have higher metastatic potential[J]. Oncotarget, 2017, 8(29):46981-46992. DOI:10.18632/oncotarget.16550.
- [8] Wang H, Zhang W, Wang W, et al. The prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in patients with chronic periodontitis: A meta-analysis[J]. PLoS One, 2020, 15(10):e0240251. DOI:10.1371/journal.pone.0240251.
- [9] Werheim ER, Senior KG, Shaffer CA, et al. Oral Pathogen Porphyromonas gingivalis Can Escape Phagocytosis of Mammalian Macrophages[J]. Microorganisms, 2020, 8(9):1432. DOI:10.3390/microorganisms8091432.
- [10] Zhang D, Zheng H, Zhao J, et al. Porphyromonas gingivalis induces intracellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells through the nuclear factor-kappaB pathway, but not through the p38 MAPK pathway[J]. J Periodontol Res, 2011, 46(1):31-38. DOI:10.1111/j.1600-0765.2010.01305.x.
- [11] Kristoffersen AK, Solli SJ, Nguyen TD, et al. Association of the *rgpB* gingipain genotype to the major fimbriae (*fimA*) genotype in clinical isolates of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis[J]. J Oral Microbiol, 2015, 7:29124. DOI: 10.3402/jom.v7.29124.
- [12] Ho MH, Chen CH, Goodwin JS, et al. Functional Advantages of Porphyromonas gingivalis Vesicles[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0123448. DOI:10.1371/journal.pone.0123448.
- [13] Veith PD, Chen YY, Gorasia DG, et al. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors[J]. J Proteome Res, 2014, 13(5):2420-2432. DOI: 10.1021/pr401227e.

- [14] Cheng R, Liu W, Zhang R, et al. Porphyromonas gingivalis - Derived Lipopolysaccharide Combines Hypoxia to Induce Caspase - 1 Activation in Periodontitis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 474. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00474.
- [15] Leira Y, Iglesias-Rey R, Gómez-Lado N, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide - induced periodontitis and serum amyloid-beta peptides [J]. Arch Oral Biol, 2019, 99: 120-125. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.008.
- [16] Yu S, Ding L, Liang D, et al. Porphyromonas gingivalis inhibits M2 activation of macrophages by suppressing α - ketoglutarate production in mice [J]. Mol Oral Microbiol, 2018, 33 (5) : 388-395. DOI: 10.1111/omi.12241.
- [17] Hou Y, Yu H, Liu X, et al. Gingipain of Porphyromonas gingivalis manipulates M1 macrophage polarization through C5a pathway [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017, 53 (7) : 593-603. DOI: 10.1007/s11626-017-0164-z.
- [18] Jia L, Han N, Du J, et al. Pathogenesis of Important Virulence Factors of Porphyromonas gingivalis via Toll-Like Receptors [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 262. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00262.
- [19] Mantri CK, Chen CH, Dong X, et al. Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of Porphyromonas gingivalis [J]. Microbiologyopen, 2015, 4 (1) : 53-65. DOI: 10.1002/mbo3.221.
- [20] Gui MJ, Dashper SG, Slakeski N, et al. Spheres of influence: Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles [J]. Mol Oral Microbiol, 2016, 31(5): 365-378. DOI: 10.1111/omi.12134.
- [21] Fleetwood AJ, Lee MKS, Singleton W, et al. Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by Porphyromonas gingivalis and Its Outer Membrane Vesicles [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 351. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00351.
- [22] de Mendoza ILI, Mendia XM, de la Fuente AMG, et al. Role of Porphyromonas gingivalis in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review [J]. J periodontal Res, 2020, 55(1): 13-22. DOI: 10.1111/jre.12691.
- [23] Wu J, Lin X, Xie H. Porphyromonas gingivalis short fimbriae are regulated by a FimS/FimR two - component system [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271 (2) : 214-221. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00722.x.
- [24] Hirano T, Beck DAC, Wright CJ, et al. Regulon controlled by the GppX hybrid two component system in Porphyromonas gingivalis [J]. Mol Oral Microbiol, 2013, 28 (1) : 70-81. DOI: 10.1111/omi.12007.

(收稿日期: 2021-03-31)

(本文编辑: 王嫚)