

# 基于机器学习和生物信息学分析的脂肪酸代谢 相关基因在牙周炎中的作用研究

陈宇翔<sup>1,2</sup> 赵安娜<sup>1,2</sup> 杨浩然<sup>1,2</sup> 杨霞<sup>1</sup> 程婷婷<sup>1,2</sup> 饶先琦<sup>1,2</sup> 李自良<sup>1,2</sup>

1.昆明医科大学附属口腔医院, 昆明 650000;

2.云南省口腔医学重点实验室, 昆明 650000

**[摘要]** **目的** 通过机器学习和生物信息学方法研究脂肪酸代谢相关基因在牙周炎中的作用。**方法** 从GEO数据库下载牙周炎数据集GSE10334和GSE16134, GeneCards数据库下载脂肪酸代谢相关基因集。通过R语言“limma”包筛选牙周炎中差异表达的脂肪酸代谢相关基因(DEFAMRGs), 并进行功能富集和通路分析。进一步用递归特征消除、最小绝对收缩和选择算子和Boruta算法确定枢纽DEFAMRGs, 并用其构建诊断模型且进行内部和外部验证。利用一致性聚类分析构建枢纽DEFAMRGs相关的牙周炎亚型。利用CIBERSORT软件分析牙龈组织的免疫细胞浸润, 并探究枢纽DEFAMRGs和免疫细胞之间的相关性。**结果** 共筛选出113个牙周炎DEFAMRGs。富集分析结果表明, DEFAMRGs主要和免疫炎症反应以及免疫细胞趋化相关。最终确定8个枢纽DEFAMRGs(BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1和RIF1)并构建了诊断模型(AUC=0.967), 基于此将牙周炎分为两个亚型。此外, 枢纽DEFAMRGs与不同免疫细胞群体之间存在显著的相关性, 其中相关性较高的免疫细胞是肥大细胞和树突状细胞。**结论** 该研究为牙周炎的发生发展机制提供新的见解和思路, 基于枢纽DEFAMRGs构建的诊断模型可为牙周炎的诊断和治疗提供新的方向。

**[关键词]** 牙周炎; 脂肪酸代谢; 生物信息学; 机器学习; 免疫浸润

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024214



本文链接 开放科学标识码

## Role of fatty acid metabolism-related genes in periodontitis based on machine learning and bioinformatics analysis

Chen Yuxiang<sup>1,2</sup>, Zhao Anna<sup>1,2</sup>, Yang Haoran<sup>1,2</sup>, Yang Xia<sup>1</sup>, Cheng Tingting<sup>1,2</sup>, Rao Xianqi<sup>1,2</sup>, Li Ziliang<sup>1,2</sup>

1. Stomatological Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Stomatology, Kunming 650000, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82360185)

Correspondence: Li Ziliang, E-mail: 1752114604@qq.com

**[Abstract]** **Objective** This study aims to investigate the role of genes related to fatty acid metabolism in periodontitis through machine learning and bioinformatics methods. **Methods** Periodontitis datasets GSE10334 and GSE16134 were downloaded from the GEO database, and the fatty acid metabolism-related gene sets were obtained from the GeneCards database. Differentially expressed fatty acid metabolism-related genes (DEFAMRGs) in periodontitis were screened using the “limma” R package. Functional enrichment and pathway analyses were conducted. Recursive Feature Elimination, Least Absolute Shrinkage and Selection Operator, and Boruta algorithm were used to determine hub DEFAMRGs and construct diagnostic models with internal and external validation. Subtypes of periodontitis related to hub DEFAMRGs were constructed using consistency clustering analysis. CIBERSORT was used to analyze immune cell infiltration in gingival tissues and explore the correlation between hub DEFAMRGs and immune cells. **Results** A total of 113 periodontitis DE-

**[收稿日期]** 2024-06-02; **[修回日期]** 2024-07-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82360185)

**[作者简介]** 陈宇翔, 硕士, E-mail: 474482766@qq.com

**[通信作者]** 李自良, 副主任医师, 博士, E-mail: 1752114604@qq.com

com

related to hub DEFAMRGs were constructed using consistency clustering analysis. CIBERSORT was used to analyze immune cell infiltration in gingival tissues and explore the correlation between hub DEFAMRGs and immune cells. **Results** A total of 113 periodontitis DE-

FAMRGs were screened out as a result. The enrichment analysis results indicate that DEFAMRGs are mainly associated with immune inflammatory responses and immune cell chemotaxis. Finally, 8 hub DEFAMRGs (BTG2, CXCL12, FABP4, CLDN10, PPBP, RGS1, LGALS1, and RIF1) were identified and a diagnostic model (AUC=0.967) was constructed, based on which periodontitis was divided into two subtypes. In addition, there is a significant correlation between hub DEFAMRGs and different immune cell populations, with mast cells and dendritic cells showing higher correlation. **Conclusion** This study provides new insights and ideas for the occurrence and development mechanism of periodontitis and proposes a diagnostic model based on hub DEFAMRGs to provide new directions for diagnosis and treatment.

**[Key words]** periodontitis; fatty acid metabolism; bioinformatics; machine learning; immune infiltration

牙周炎是一种以牙周组织破坏为主要特征的慢性炎症性疾病，其发病率较高，是造成全球慢性疾病负担的最重要的口腔疾病之一<sup>[1]</sup>。牙周炎的病因复杂，涉及环境、生活方式、饮食和遗传等多种因素<sup>[2-3]</sup>。异常免疫炎症反应被认为是促进软组织炎症和牙槽骨吸收的主要机制，而一些代谢相关的系统性疾病与机体的炎症免疫反应有着紧密联系，可通过改变全身状况以及免疫/微生物组反应来促进牙周炎持续发展<sup>[4]</sup>。所以评估患者代谢状态对于牙周炎的预防有着重要意义。

脂肪酸代谢是人体代谢活动的重要组成部分，其参与机体多项生理功能的调节，并与机体炎症免疫反应和全身状态相互关联。脂肪酸代谢产物可作为信号分子影响炎症细胞的活化状态，而炎症反应也会影响脂肪酸代谢通路中相关酶的活性以及基因的表达，进而可能增加代谢性疾病的发生风险<sup>[5-6]</sup>。牙周炎作为一种与机体免疫和全身状态密切相关的慢性炎症性疾病，与脂肪酸代谢之间存在着密切关系。近年来，越来越多研究表明脂肪酸代谢异常与牙周炎之间存在双向促进的关系，两者互为风险因素<sup>[7-12]</sup>。相关研究发现血清脂肪酸谱与牙周炎的疾病活动性相关，且患有脂肪酸代谢异常及其相关并发症的人群发生牙周炎的几率显著上升<sup>[7-10]</sup>。此外，牙周炎也会显著增加脂肪酸代谢异常及其相关并发症的发病风险<sup>[11]</sup>，例如一项研究显示牙周炎可使血脂异常的发生率增加15%<sup>[12]</sup>。

脂肪酸代谢异常与牙周炎之间相互影响的机制尚未明确，目前主要认为与免疫炎症及骨代谢异常相关。首先，脂肪酸代谢异常可以通过多种机制来促进牙周炎的发生发展。研究显示脂肪酸代谢异常患者的血液中脂肪酸过氧化物 (fatty acid peroxidation product, FAPP)、脂质过氧化物 (lipid hydroperoxide, LPO) 以及饱和脂肪酸 (saturated fatty acid, SFA) 的含量显著上调<sup>[13-15]</sup>。FAPP

和LPO是与牙周炎相关的氧化损伤中最常被研究的毒性代谢产物，其可造成细胞内环境紊乱并损伤细胞结构和功能，进而参与牙周组织炎症和破坏的进程等<sup>[13-14]</sup>。SFA类似于脂多糖，其能与Toll样受体4及髓样分化蛋白2形成蛋白复合体，通过激活下游信号通路直接加重牙周炎症<sup>[15]</sup>。此外脂肪酸代谢异常患者较强的氧化应激水平也可通过多种途径干扰骨代谢，进而诱导牙周炎的发生和发展<sup>[16-17]</sup>。另一方面，牙周炎也可通过某些机制加重脂肪酸代谢异常。研究显示牙周炎患者的牙周组织中游离脂肪酸受体以及脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白显著上调，这可能引起细胞摄入过量的游离脂肪酸，最终导致脂肪酸代谢紊乱和过氧化反应的增加<sup>[18-19]</sup>。以上机制涉及众多细胞、分子及信号通路，且存在复杂的交叉作用。然而，目前关于脂肪酸代谢相关基因 (fatty acid metabolism related genes, FAMRGs) 在牙周炎中作用的研究较少，相关病理生理过程和基因调控机制尚未明确。

本研究通过使用基因表达库 (gene expression omnibus, GEO) 和 GeneCards 数据库的公共数据集，识别了牙周炎差异表达脂肪酸代谢相关基因 (differentially expressed fatty acid metabolism related genes, DEFAMRGs)，然后通过多种机器学习方法筛选枢纽 DEFAMRGs，并初步构建了一个牙周炎的诊断列线图模型。此外通过一致性聚类分析，本研究对枢纽 DEFAMRGs 相关的牙周炎亚型进行了初步探索，并比较了不同牙周炎亚型中枢纽 DEFAMRGs 的表达差异。最后，本研究分析了牙周炎中免疫细胞的浸润水平，并对枢纽 DEFAMRGs 与各种免疫细胞的相关性进行分析。该研究可为牙周炎和脂肪酸代谢的相关基础研究提供初步参考，同时可为临床上脂肪酸代谢异常人群在牙周炎的预防、早期诊断和个性化治疗等方面提供一定的帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据获取与处理

通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 检索牙周炎的相关数据集。纳入标准为: 1) 样本来自牙龈组织; 2) 存在疾病组和对照组样本; 3) 所有样本来自于智人。最终选择的数据集为 GSE10334 和 GSE16134。其中, GSE10334 包括 247 例样本 (炎性牙龈 183 例, 健康牙龈 64 例), GSE16134 包括 310 例样本 (炎性牙龈 241 例, 健康牙龈 69 例)。FAMRGs 来自 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)。对基因芯片数据集的原始数据进行背景校正和归一化处理。

### 1.2 牙周炎差异表达脂肪酸代谢相关基因的鉴定

在 GSE10334 数据集中, 利用 R 语言 “limma” 包筛选牙周炎的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 筛选阈值设置为  $P < 0.05$  且  $|\log FC| \geq 1$ 。将牙周炎的 DEGs 与 GeneCards 数据库获得的 FAMRGs 取交集, 获得牙周炎 DEFAMRGs。使用 R 语言 “ggVennDiagram” 包绘制 DEGs 与 FAMRGs 的韦恩图, 使用 R 语言 “ggplot2” 包绘制牙周炎 DEFAMRGs 的火山图, 并使用 R 语言 “pheatmap” 包绘制牙周炎 DEFAMRGs 的热图。

### 1.3 牙周炎 DEFAMRGs 的富集分析

为了进一步分析 DEFAMRGs 的功能和作用途径, 使用 R 语言 “clusterProfiler” 包对其进行了基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 以  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

### 1.4 基于机器学习方法筛选枢纽 DEFAMRGs

为了进一步鉴定对牙周炎的诊断具有关键意义的枢纽 DEFAMRGs, 本研究使用最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)、递归特征消除 (recursive feature elimination, RFE) 和 Boruta 三种机器学习算法, 在 GSE10334 数据集中对 DEFAMRGs 进行进一步的筛选, 并将筛选结果取交集获得枢纽 DEFAMRGs。LASSO 算法可以降低模型复杂度、避免过拟合, 并提高模型的泛化能力<sup>[20]</sup>。RFE 算法常用于处理高维数据, 它能迭代去除对模型影响较小的特征从而提高模型性能<sup>[21]</sup>。Boruta 算法是一种与随机森林相结合的特征选择算法, 可以用于确定显著影响目标变量的特征, 从而提高模型的泛

化能力<sup>[22]</sup>。本研究使用 R 语言 “glmnet” 包来实现 LASSO 算法, 以最小  $\lambda$  值为阈值。使用 R 语言 “caret” 包来实现 RFE 算法, 以最小交叉验证错误为阈值。使用 R 语言 “Boruta” 包实现 Boruta 算法, 并将确定无效特征的阈值设置为 0.05。使用 R 语言 “ggVennDiagram” 软件包绘制三种机器学习算法筛选结果的韦恩图。

### 1.5 基于枢纽 DEFAMRGs 构建和验证牙周炎诊断模型

以 GSE10334 为训练集, 基于枢纽 DEFAMRGs 构建牙周炎诊断的列线图模型。以 GSE10334 为内部验证集, GSE16134 为外部验证集, 利用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线来对枢纽 DEFAMRGs 的诊断能力进行验证, 并对列线图模型的诊断效能进行评价。此外, 使用校准曲线来评估模型的预测准确性和稳定性, 并通过决策曲线来展示不同阈值下的真阳性率和假阳性率之间的关系, 以直观地反映模型在不同决策点下的性能表现。本研究使用 R 语言 “rms” 包构建列线图, 使用 R 语言 “pROC” 包来绘制 ROC 曲线, 使用 R 语言 “calibrate” 包绘制校准曲线, 使用 R 语言 “DecisionCurve” 包绘制决策曲线。

### 1.6 一致性聚类分析

基于枢纽 DEFAMRGs 对牙周炎患者进行一致性聚类分析, 构建不同枢纽 DEFAMRGs 相关的牙周炎亚型, 并比较不同牙周炎亚型中枢纽 DEFAMRGs 的差异。一致性聚类分析是使用 R 语言 “ConsensusClusterPlus” 包来实现的。

### 1.7 免疫浸润分析

为了进一步探索免疫过程在牙周炎疾病进展中的作用, 本研究使用 GSE10334 数据集进行了免疫浸润分析。此分析基于 CIBERSORT 算法, 采用由 22 个免疫细胞基因 (LM22) 组成的参考集, 通过 Web 分类工具 (<http://CIBERSORT.stanford.edu/>) 来实现。使用 R 语言 “ggplots” 包和 “pheatmap” 包对免疫细胞浸润的结果进行可视化。Pearson 相关性分析用于确定不同免疫细胞之间的相关性, 以及免疫细胞丰度与枢纽 DEFAMRGs 表达之间的相关性。使用 R 语言 “corrplot” 来对相关性的结果进行可视化。

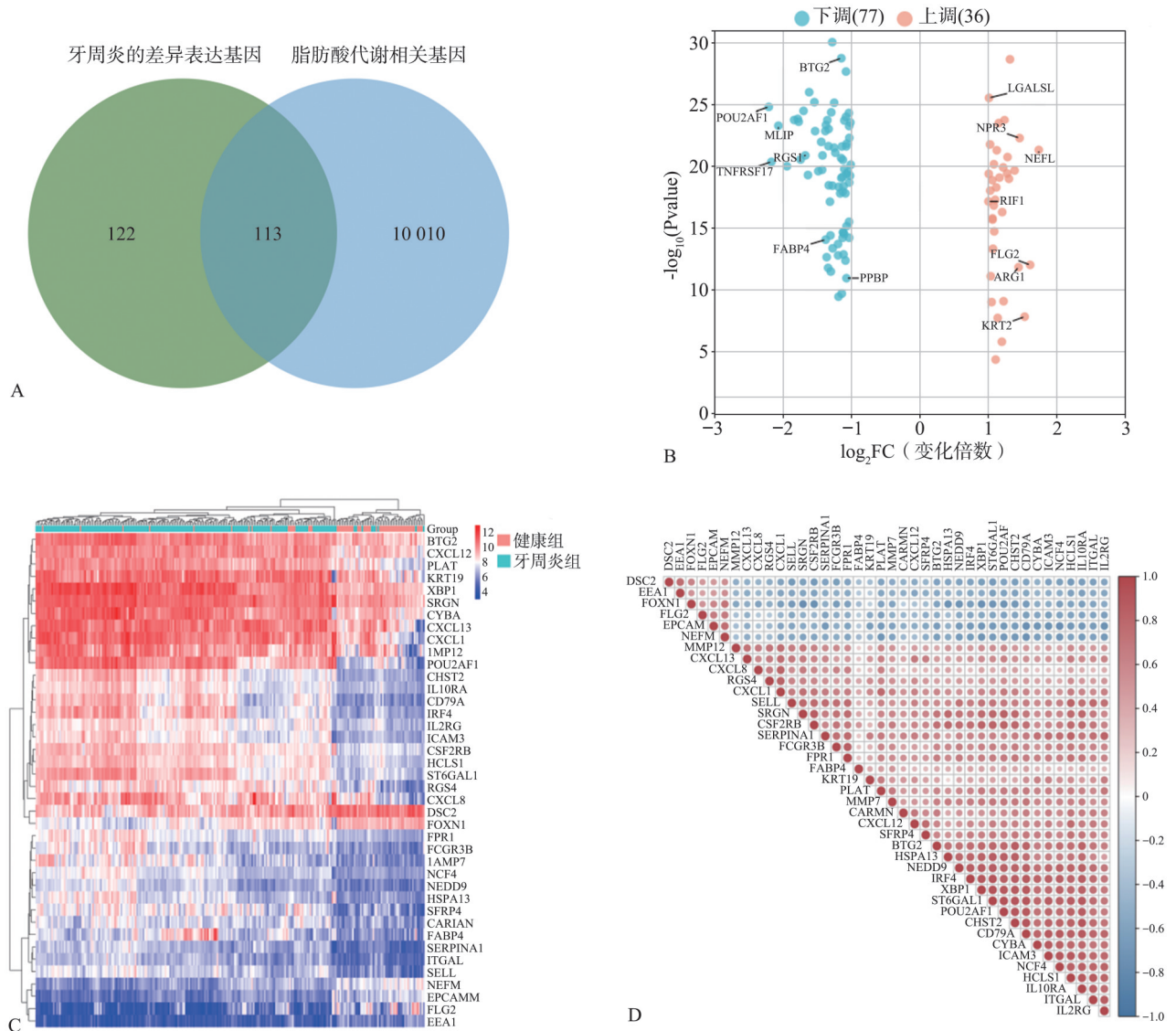
## 2 结果

### 2.1 牙周炎 DEFAMRGs 的鉴定结果

本研究共识别出 113 个牙周炎 DEFAMRGs (在

健康组中36个基因显著上调、77个基因显著下调(图1A、B)。热图直观地显示了113个DEFA-

MRGs中的前40个基因的表达水平(图1C),相关性热图展示了各基因之间的相关性(图1D)。



A: 牙周炎 DEGs 与 FAMRGs 的韦恩图; B: DEFA-MRGs 的火山图 (红色为上调基因, 蓝色为下调基因); C: DEFA-MRGs 中前 40 个基因的热图 (行和列分别表示基因和样本); D: DEFA-MRGs 中前 40 个基因的相关性热图。

图 1 牙周炎 DEFA-MRGs 的鉴定结果

Fig 1 Identification results of DEFA-MRGs in periodontitis

### 2.2 牙周炎 DEFA-MRGs 富集分析结果

GO 富集分析显示, 在生物学过程 (biological process, BP) 中, DEFA-MRGs 主要富集在对细菌来源分子的反应、对脂多糖的反应、中性粒细胞脱颗粒、参与免疫反应的中性粒细胞激活以及对细菌来源的分子的细胞反应中 (图 2A); 在细胞成分 (cellular component, CC) 中, 主要富集在角质化包膜、三级颗粒、分泌颗粒膜、质膜外侧和血小板 α 颗粒中 (图 2B); 在分子功能 (molecular function, MF) 中, 主要富集在 CXCR 趋化因子受体结合、趋化因子活性、趋化蛋白受体结合、皮

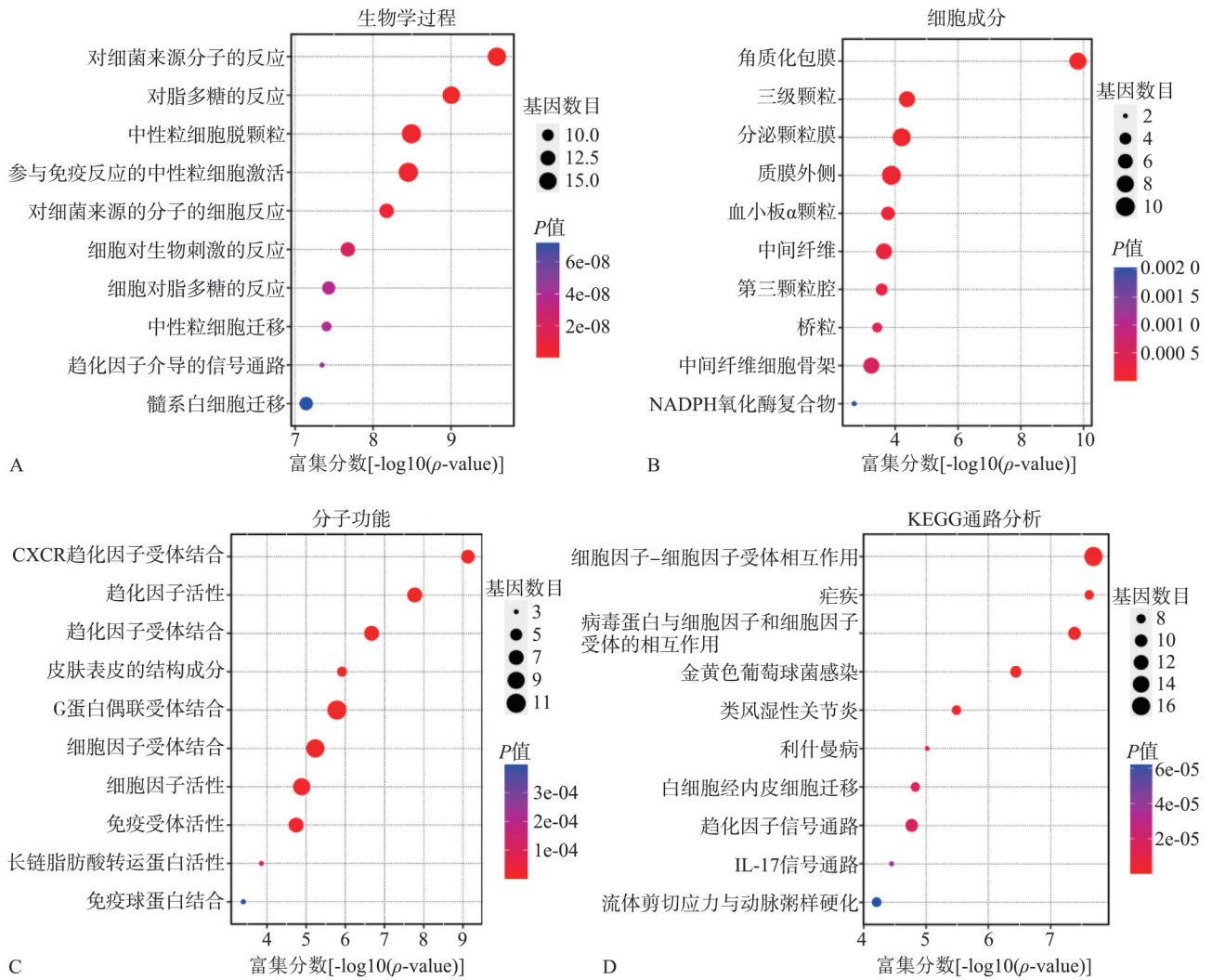
肤表皮结构成分和 G 蛋白偶联受体结合中 (图 2C)。KEGG 通路富集分析显示, DEFA-MRGs 在与细胞因子-细胞因子受体相互作用、疟疾、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、金黄色葡萄球菌感染和类风湿性关节炎相关的通路中显著富集 (图 2D)。

### 2.3 机器学习筛选枢纽 DEFA-MRGs 的结果

本研究使用 LASSO 算法筛选出 13 个枢纽 DEFA-MRGs (图 3A、B), 使用 RFE 算法筛选出 21 个枢纽 DEFA-MRGs (图 3C), 使用 Boruta 算法筛选出 70 个枢纽 DEFA-MRGs (图 3D)。最后对三种机

器学习算法的筛选结果取交集, 获得8个枢纽 DE-FAMRGs, 包括 BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN-

10、PPBP、RGS1、LGALS1 和 RIF1 (图 4A1)。



A-C: GO富集分析结果; D: KEGG通路分析结果。

图 2 DEFAMRGs的功能富集和通路分析结果

Fig 2 Functional enrichment and pathway analysis of DEFAMRGs

### 2.4 基于枢纽 DEFAMRGs 构建和验证牙周炎诊断模型的结果

本研究以 GSE10334 数据集为训练集, 基于枢纽 DEFAMRGs 构建了牙周炎的诊断列线图模型 (图 4A2)。使用内部 (GSE10334) 和外部 (GSE-16134) 数据集对 8 个枢纽 DEFAMRGs

以及诊断模型的预测能力进行验证。在内部验证集 GSE10334 中, BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1 和 RIF1 的 AUC 值均大于 0.7 (图 4B1)。列线图模型的 AUC 值为 0.958 (95%CI 0.924-0.991) (图 4B2)。决策曲线表明该模型具有良好的临床适用性 (图 4B3)。校准曲线表明该模型具有较好的准确性和可靠性, 可以准确预测牙周炎的发生 (图 4B4)。在外部验

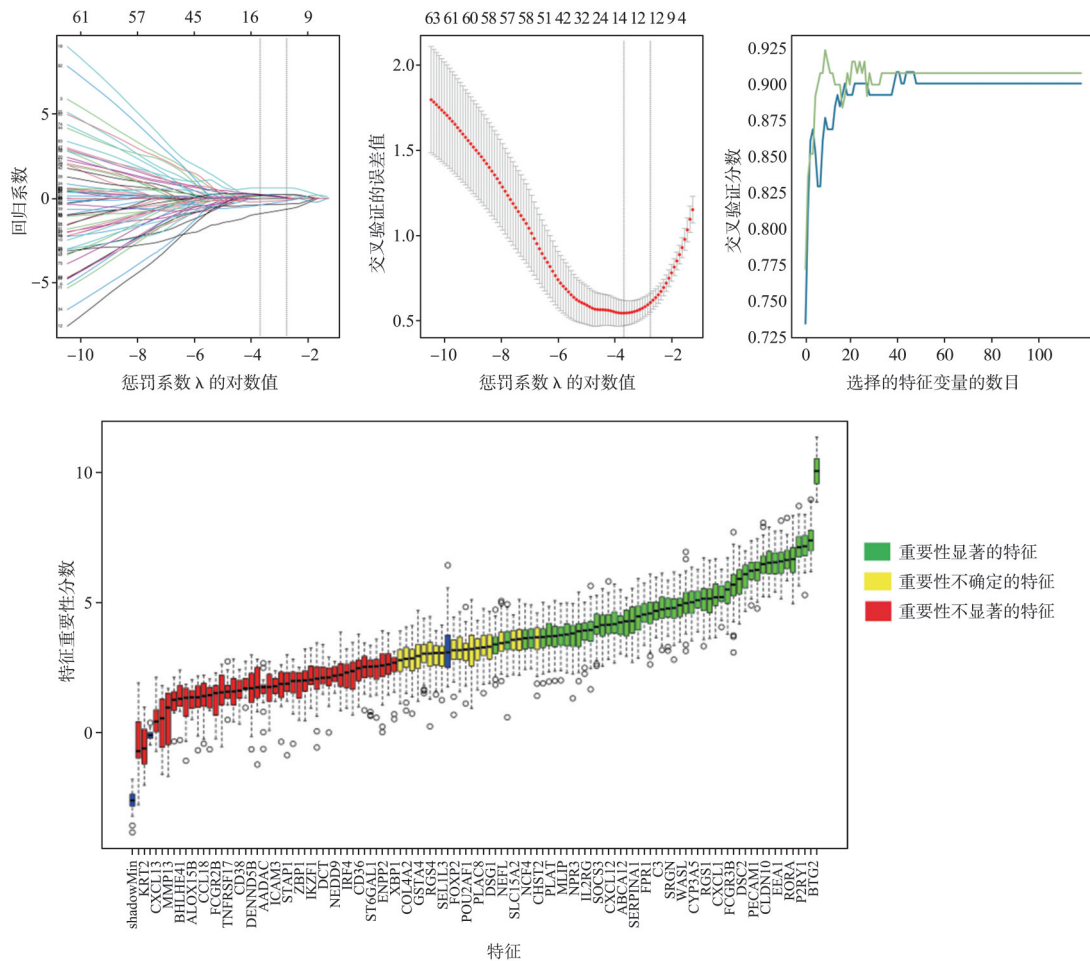
证集 GSE16134 中, BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1 和 RIF1 的 AUC 值均大于 0.7 (图 4C1)。列线图模型的 AUC 值为 0.967 (95%CI 0.938-0.997) (图 4C2)。且决策曲线和校准曲线的结果表明, 该模型具有良好的分类、判别能力和临床有效性 (图 4C3、C4)。

### 2.5 牙周炎一致性聚类分析结果

本研究基于枢纽 DEFAMRGs, 对 GSE10334 数据集中的 247 个样本进行一致性聚类分析, 以构建不同的牙周炎亚型。结果显示, 当聚类数 k=2 时达到最佳的聚类效果 (图 5A-C)。此时 247 个样本被分为了聚类 1 (n=170) 和聚类 2 (n=77), 且主成分分析显示它们之间存在显著差异 (图 5D)。跟踪图展示了样本分配在 k 值变化时的稳定性 (图

5E)。此外，8个枢纽DEFAMRGs在不同亚型牙周炎之间均存在显著差异（图5F）。亚型1（ $n=170$ ）和亚型2（ $n=77$ ）在牙周炎患病率上存在显著差异（ $P<0.001$ ），亚型1的患病率（95.3%）显著高于亚型2（27.3%）（表1）。在基因表达特征方面，亚型1和亚型2间在8个枢纽基因上均存在显著差异（ $P<0.001$ ）。相对于亚型2，亚型1的BTG2、CXCL-

12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1基因表达水平显著上调，LGALSL和RIF1基因表达水平显著下调（表1）。这些结果进一步阐明了枢纽DEFAMRGs在牙周炎发病机制中的重要作用，而基于枢纽DEFAMRGs构建的牙周炎亚型，可为临床上脂肪代谢紊乱人群的牙周炎分类、诊断和治疗提供依据。



A: 113个牙周炎DEFAMRGs的LASSO系数分布；B: LASSO回归的10倍交叉验证，最终确定最佳参数 $\lambda=0.025$ ；C: RFE算法进行特征筛选的示意图；D: Boruta算法特征筛选结果。

图3 使用机器学习方法筛选枢纽DEFAMRGs的示意图

Fig 3 Schematic diagram of using machine learning methods to screen hub DEFAMRGs

### 2.6 免疫浸润分析结果

本研究通过分析牙周炎和健康样本的免疫细胞浸润，以及枢纽DEFAMRGs表达与免疫细胞浸润之间的关系，以探索其与牙周炎宿主免疫过程之间的潜在联系。图6A显示了免疫细胞之间的Pearson相关性，图6B显示了每个样本的免疫细胞浸润的百分比。枢纽DEFAMRGs与牙周炎免疫细胞浸润之间的相关性分析结果显示，RIF1和LGALSL与活化的树突状细胞和肥大细胞呈显著的负相关。CLDN10、FABP4和RGS1与活化的树

突状细胞和活化的肥大细胞表现出显著的正相关性，CXCL12和BTG2也与记忆B细胞、静息NK细胞和活化的肥大细胞显示出显著的正相关，而与 $\gamma\delta$ T细胞细胞显示出负相关。此外，PPBP仅与M0巨噬细胞呈正相关，与其他免疫细胞无显著相关性（图6C）。免疫细胞丰度的对比结果表明，相比于健康个体，牙周炎患者的幼稚B细胞、记忆B细胞、浆细胞、辅助T细胞、M1巨噬细胞和中性粒细胞显著较高。相反，在牙周炎患者中，活化记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞、调节性T细胞（Treg）、活化

NK细胞、静息树突状细胞、活化树突状细胞和静息肥大细胞的比例显著较低(图6D)。这些结果表

明在牙周炎的发生和发展过程中, 枢纽DEFAM-RGs和宿主免疫过程之间有着密切的关系。

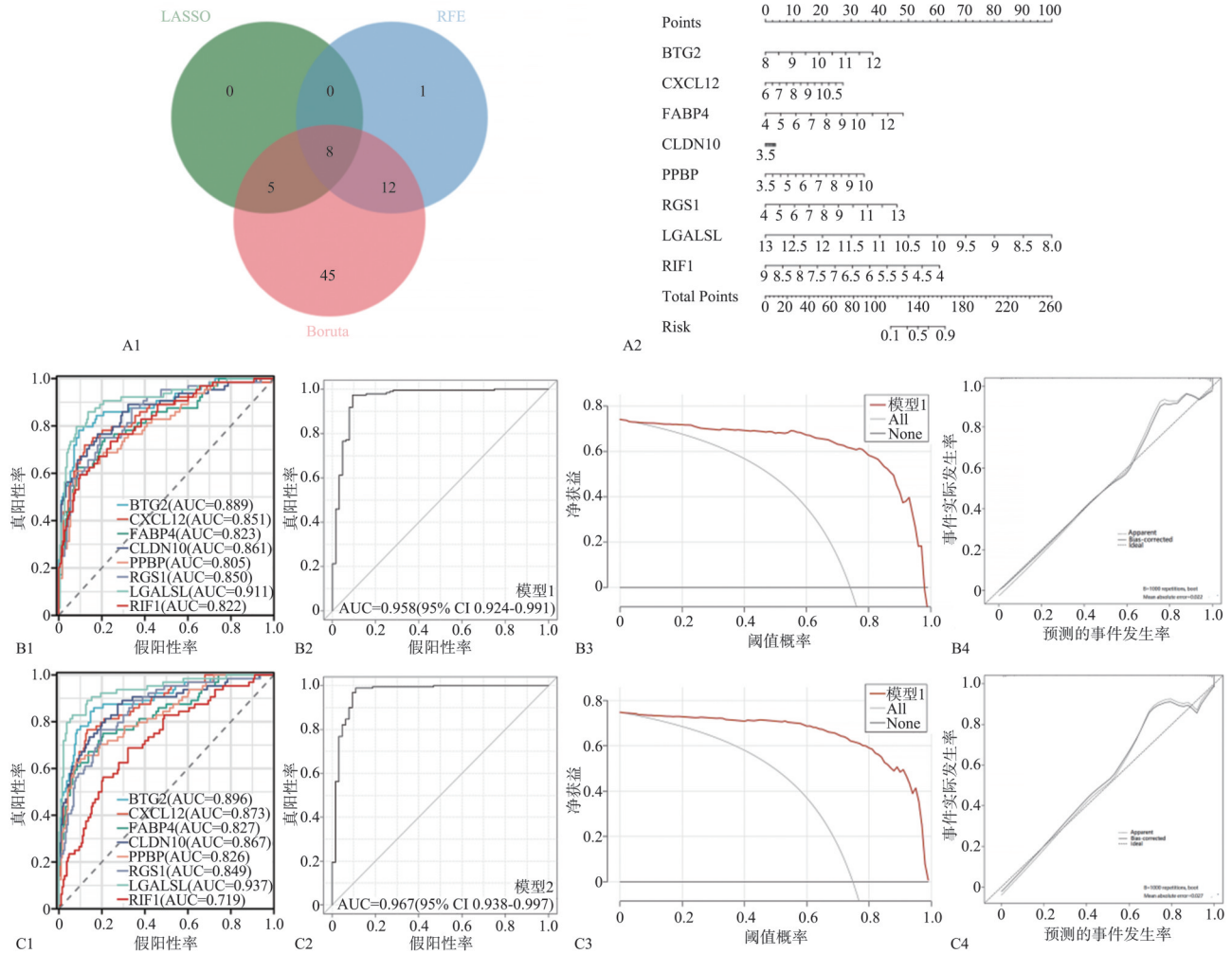


图 4 列线图模型的构建和验证结果

Fig 4 Construction and validation results of nomogram model

### 3 讨论

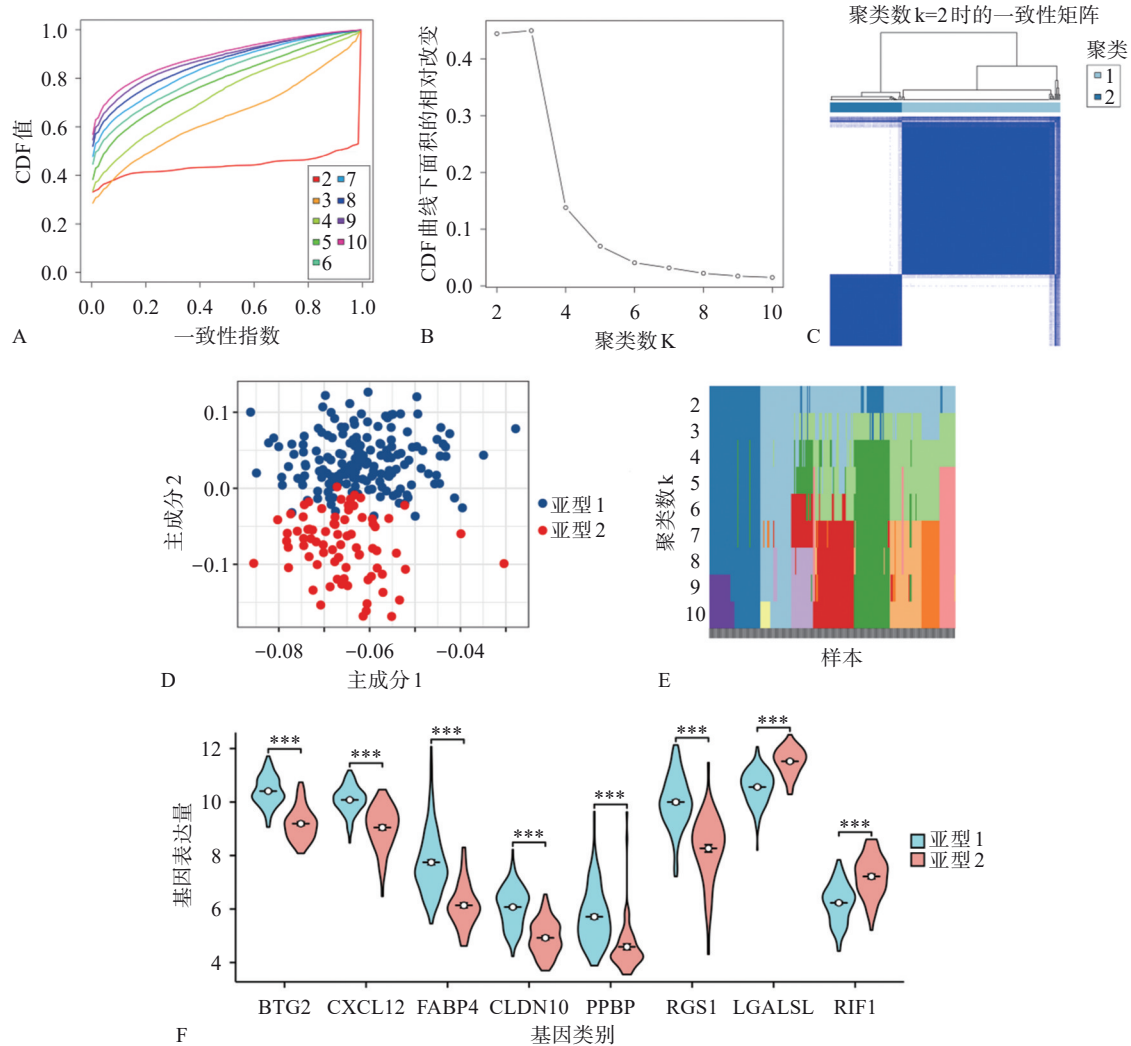
牙周炎的病因复杂, 其发生发展与机体的代谢和免疫状态密切相关。而脂肪酸代谢是机体代谢和免疫过程的关键环节, 与机体蛋白质代谢、糖代谢及内分泌功能状态之间相互影响, 并在炎症免疫反应的调控中起到关键作用<sup>[23]</sup>。相关研究表明脂肪酸代谢与多种慢性疾病的发生发展密切相关, 肥胖个体、患有心血管疾病或2型糖尿病的患者血液中游离脂肪酸水平显著升高<sup>[24-26]</sup>。而牙周炎作为一种与全身健康状况密切联系的慢性炎症

性疾病, 与脂肪酸代谢之间也存在潜在联系。探索脂肪酸代谢与牙周炎的共同生物标志物或分子路径, 并分析其与免疫细胞浸润之间的关系, 有助于揭示它们之间的相互作用机制, 进而有可能为脂肪酸代谢异常的患者在牙周炎的诊断和治疗方面提供新的临床见解和指导。

本研究基于 GeneCards 和 GEO 数据库, 共识别出 113 个牙周炎 DEFAMRGs。GO 富集分析显示, 这些基因显著富集于对细菌来源分子的反应、对脂多糖的反应、中性粒细胞脱颗粒等生物学过程; 角质化包膜、三级颗粒、分泌颗粒膜等细胞成分; CXCR 趋化因子受体结合、趋化因子活性、

趋化蛋白受体结合等生物学功能。在KEGG通路中牙周炎DEFAMRGs主要富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用等通路上。以上结果表明，脂肪酸代谢在炎症和免疫反应中起着重要的调节作用，其主要通过调控细胞因子释放和免疫细胞趋化等方面来影响牙周炎的进展。Rocha等<sup>[27]</sup>的研究

表明脂肪酸代谢会影响炎症相关基因的表达，饱和脂肪酸的摄入与血液中促炎细胞因子和趋化因子水平的提高有关，这与本研究相符。此外相关研究也表明脂肪酸代谢与免疫细胞激活、增殖和迁移密切相关，在炎症过程中一些免疫细胞会释放脂肪酸代谢产物如烯丙二酸、白三烯和前列腺素作为信号分子参与炎症和免疫反应的调节<sup>[28]</sup>。



A: k=2-10的共识聚类累积分布函数(CDF); B: k=2-10的CDF曲线下面积的相对变化; C: 牙周炎样本共现比例矩阵的热图; D: 2种牙周炎亚型的主成分分析; E: 跟踪图显示了不同k值下样本分配的稳定性; F: 牙周炎亚型1和亚型2之间中枢DEFAMRGs表达差异的小提琴图; \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 5 基于枢纽DEFAMRGs的牙周炎一致性聚类分析结果

Fig 5 Cluster analysis results of periodontitis consistency based on hub DEFAMRGs

本研究采用LASSO、RFE和Boruta算法筛选得到8个枢纽DEFAMRGs (BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1和RIF1)，并构建了牙周炎的诊断模型。在内部和外部验证中，该诊断模型的AUC值均大于0.9，表明其具有较强的预测能力。此外决策曲线和校准曲线的结果也表明，该模型具有良好的准确性和临床

有效性。此外本研究发现的8个枢纽DEFAMRGs在内部和外部验证中AUC值均大于0.7，提示这些脂肪酸代谢相关基因在牙周炎的诊断中有一定的潜在价值。根据既往文献，这8个枢纽DEFAMRGs可通过各种机制来影响牙周炎的进展，各基因的主要机制如下：BTG2是BTG/Tob家族的成员，主要负责调节转录、翻译和细胞功能，如增

殖、凋亡和生长<sup>[29]</sup>。Li等<sup>[30]</sup>的一项研究揭示了牙周炎和口腔鳞状细胞癌之间的miRNA串扰,结果表明BTG2是最关键的候选miRNA失调基因之一。CXCL12是一种趋化因子蛋白,主要参与活化白细胞的趋化作用,并在牙周炎骨免疫微环境中发挥关键作用。Mahandoda等<sup>[31]</sup>报道,在牙龈炎和牙周炎患者中CXCL12的表达显著上调。FABP4属于脂肪酸结合蛋白家族,在牙周炎进展中发挥重要作用。Kim等<sup>[32]</sup>的一项研究表明,牙周病原体可以通过调节FABP4的表达来刺激巨噬细胞的脂质摄取。另一项研究表明牙周治疗可显著降低牙周炎患者的血清FABP水平<sup>[33]</sup>。CLDN10是编码紧密连接蛋白的关键基因,该蛋白在各种组织中维持上皮屏障的完整性。研究表明,CLDN10可调节细胞旁通透性和离子穿过上皮细胞层的转运,故其可能通过调控上皮屏障的完整性来影响牙周炎的进展<sup>[34]</sup>。PPBP是CXC趋化因子家族中的一种血小板衍生生长因子,其可能作为中性粒细胞的强效化学引诱

剂和激活剂来参与牙周炎的进程。Zeng等<sup>[35]</sup>报道,炎症牙龈组织中PPBP的表达显著高于健康牙龈组织。RGS1编码G蛋白信号通路中的一个负调节因子,在调节T细胞和B细胞的活化和增殖过程中发挥重要作用,且深刻影响着与细胞信号通路相关的各种生理过程,包括神经传递、内分泌调节和免疫反应<sup>[36]</sup>。LGALS1编码影响乳糖代谢和半乳糖凝集素表达的蛋白质,它通过与半乳糖凝集素相互作用调节细胞反应,影响粘附、迁移和免疫反应<sup>[37]</sup>。RIF1是一种对调节DNA复制时间和维持基因组稳定性至关重要的基因。研究表明RIF1主要负责协调DNA复制、端粒维持和DNA修复过程,其失调与各种疾病的发生密切相关<sup>[38]</sup>。上述作用机制是基于当前文献对这些基因功能的普遍理解。然而牙周炎的生物学机制可能涉及多种因素之间的复杂相互作用,未来还需要进一步的研究来分析这些基因在牙周炎中的作用。

表 1 不同亚型牙周炎的特征

Tab 1 Characteristics of different subtypes of periodontitis

类别	亚型1 (n=170)	亚型2 (n=77)	P值
BTG2	10.344 (10.057, 10.832)	9.147 (8.757, 9.560)	<0.001
CXCL12	10.093 (9.800, 10.394)	9.126 (8.575, 9.608)	<0.001
FABP4	7.536 (6.981, 8.372)	6.044 (5.629, 6.592)	<0.001
CLDN10	6.154 (5.497, 6.585)	4.891 (4.508, 5.398)	<0.001
PPBP	5.557 (4.867, 6.270)	4.333 (4.098, 4.862)	<0.001
RGS1	9.988 (9.383, 10.648)	8.420 (7.592, 9.072)	<0.001
LGALS1	10.642 (10.132, 11.015)	11.572 (11.24, 11.890)	<0.001
RIF1	6.283 (5.710, 6.684)	7.228 (6.673, 7.739)	<0.001
牙周状态 [n (%)]			<0.001
健康	8 (4.7)	56 (72.7)	
牙周炎	162 (95.3)	21 (27.3)	

注: BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1和RIF1的基因表达水平表示为中位数(四分位距)。

基于8个枢纽DEFAMRGs,本研究进一步采用一致性聚类算法对牙周炎样本进行了聚类分析。聚类算法是一种常用的无监督学习方法,它可以根据数据的相似性自动将数据划分为不同的类别。在医疗领域,聚类算法可以用于疾病分类和诊断,可以根据某些特征将患者分为不同的亚型或群体,使得医生能够更好地了解患者的病情特点,为疾病预防、诊断和个性化治疗提供依据<sup>[39]</sup>。本研究最终将牙周炎患者分为了两个亚型,亚型1的牙周炎患病率显著高于亚型2,此外亚型1的BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1基因表达水平显著上调, LGALS1和RIF1基因表达水平显著下调。根据该结果可推测BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1的表达水平与牙

周炎的发生率成正相关, LGALS1和RIF1的表达水平与牙周炎的发生率成负相关。这些结果为更深入地理解和解释牙周炎与脂肪酸代谢之间的关系提供了有力的证据。此外,在临床中通过对牙周组织样本进行基因表达分析,并根据本研究的结果对牙周炎的亚型进行判断。医生可以对患者的牙周炎患病风险进行评估,并将患者归类到相应的风险群体中。这种方法有助于医生给出有针对性的建议,从而降低患者牙周炎风险并提高治疗效果。此外,在本研究基础上研究人员可以进一步探索个性化疗法,通过调节基因表达或修复基因缺陷来对与脂肪酸代谢异常相关的牙周炎进行精准治疗。

根据富集分析, DEFAMRGs主要富集在免疫

炎症反应和免疫细胞趋化等生物功能和通路上，因此本研究对牙龈组织进一步进行了免疫浸润分析。结果显示，牙周炎患者牙龈组织中幼稚B细胞、记忆B细胞、浆细胞、辅助T细胞、M1巨噬细胞和中性粒细胞的比例显著高于对照组。相反，活化记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞、调节性T细胞（Treg）、活化NK细胞、静息树突状细胞、活化树突状细胞

和静息肥大细胞的比例显著低于对照组，该结果与既往研究相比具有很高的致性<sup>[40]</sup>。各类免疫细胞在牙周炎进展中发挥着不同的作用，淋巴细胞中对牙周炎的进展有促进作用的是辅助性T细胞、Th17和记忆B淋巴细胞，而调节性T细胞、B10细胞则可以显著抑制炎症反应<sup>[41-44]</sup>。

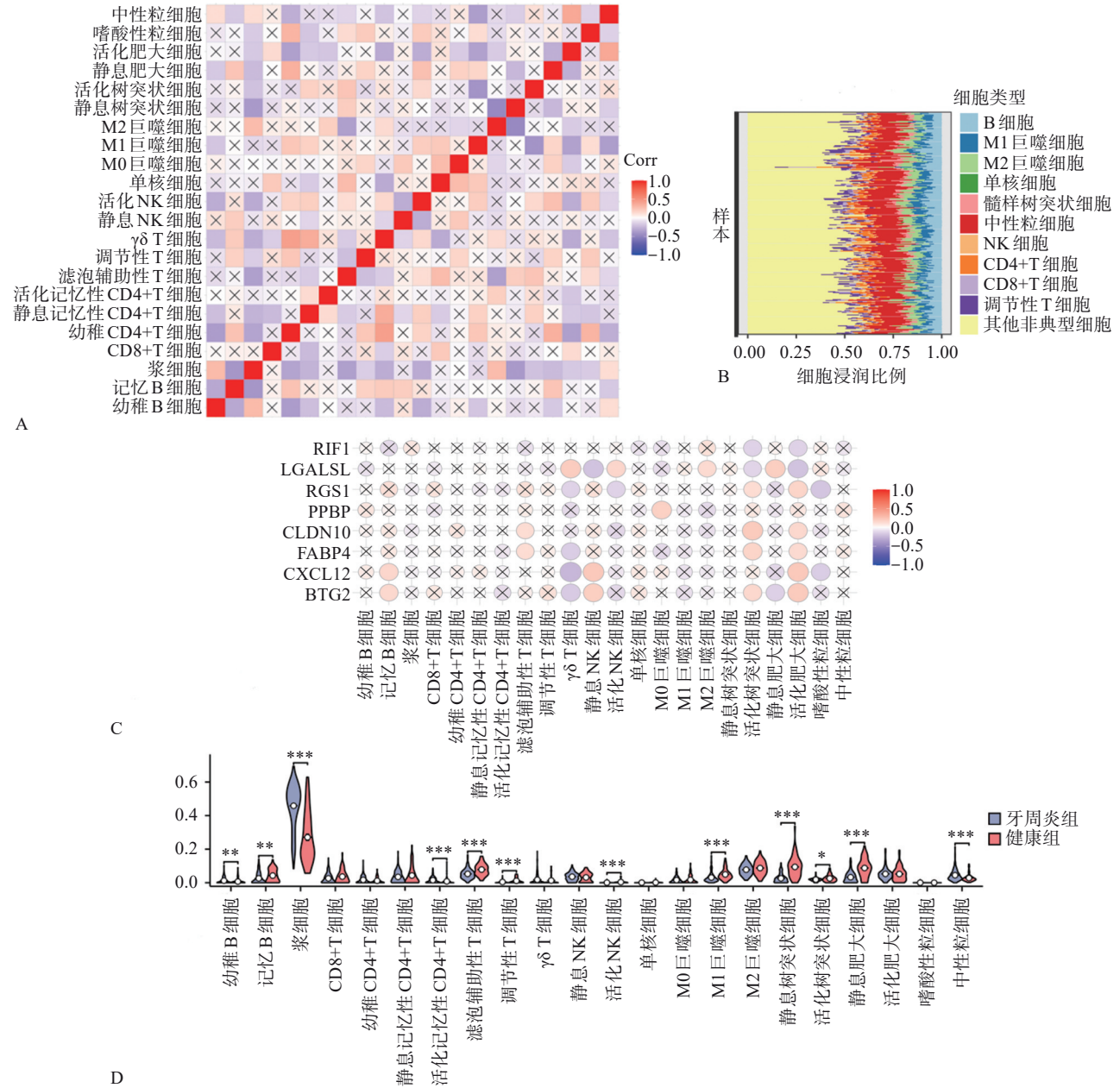


图 6 免疫浸润分析结果

A: 牙周炎免疫细胞之间的 Pearson 相关性分析 (“x”表示无显著相关性); B: GSE10334中每个样本的免疫细胞浸润率; C: 枢纽DEFAMRGs与免疫细胞之间的 Pearson 相关性分析 (“x”表示无显著相关性); D: 健康组和牙周炎组中22种免疫细胞表达水平的小提琴图; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 6 免疫浸润分析结果

Fig 6 Immune infiltration analysis results

M1巨噬细胞是一种促炎型巨噬细胞，它们可以分泌促炎细胞因子如肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 等来促进炎症反应，引发牙龈组

织炎症反应，引发牙龈组织炎症反应，引发牙龈组织炎症反应。

织的炎症和破坏<sup>[45]</sup>。Treg细胞对于维持健康牙周组织的稳态至关重要,并可能与一些患者的牙龈炎病变不继续进展有着密切联系。本研究牙周炎样本中Treg细胞比例显著低于对照组,这也验证了既往研究中所报道的Treg细胞可以抑制免疫应答而减轻牙周炎的病理过程的观点<sup>[46]</sup>。NK细胞可以抑制菌斑微生物对健康牙龈的侵袭,但NK细胞的过度活化会导致组织损伤和牙槽骨吸收。Seidel等<sup>[47]</sup>认为,NK细胞通过细胞因子产生、细胞毒作用、树突状细胞串扰和自身免疫反应而在牙周炎进展中主要起到促炎作用。但也有研究的观点与之相反<sup>[48]</sup>,因此NK细胞在牙周炎发生发展过程中的具体作用还需进一步研究。

此外本研究还分析了枢纽DEFAMRGs表达与免疫细胞浸润之间的关系,结果显示枢纽DEFAMRGs与不同免疫细胞群体之间的存在显著相关性。其中与枢纽DEFAMRGs相关性最高的免疫细胞是肥大细胞,它在RIF1、LGALS1、LDN10、FABP4、RGS1、CXCL12和BTG2调控牙周炎中均起着重要作用。其次是活化的树突状细胞,其在RIF1、LGALS1、CLDN10、BTG2、FABP4和RGS1调控牙周炎中起着重要作用。肥大细胞与牙周炎的发生发展具有密切联系。作为一种在牙周炎进展中明显失调的免疫细胞,肥大细胞可以作为牙周炎的标志物<sup>[49]</sup>。相关研究表明,与健康组织相比牙周炎组织中肥大细胞的计数和密度显著升高<sup>[50]</sup>。肥大细胞可以通过多种机制促进牙周炎的发生发展:首先,肥大细胞可以释放多种炎症介质,如组胺、前列腺素和白三烯等,这些介质可以引起局部血管扩张、渗透性增加和炎症细胞的趋化,从而加剧牙周组织的炎症反应<sup>[51]</sup>。此外肥大细胞是促炎细胞因子如IL-1、TNF和IL-33的潜在来源,这些细胞因子可以诱导免疫细胞活化和募集,并通过多种机制介导牙周组织的局部炎症和破坏<sup>[51]</sup>。另外,牙龈卟啉单胞菌可激活应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)和NF- $\kappa$ B信号通路来诱导肥大细胞产生IL-31,IL-31可通过下调牙龈上皮细胞中紧密连接分子claudin-1的表达引起牙龈上皮屏障功能障碍<sup>[52]</sup>。除了以上机制外,肥大细胞还可影响牙周组织中的胶原蛋白成熟而诱导牙周病的发生发展<sup>[53]</sup>。在牙周炎的发生发展过程中树突状细胞也扮演着重要角色:首先,树突状细胞在牙龈固有层原位成熟,除了释放促炎细胞因子和趋化因子外,其还可与CD4<sup>+</sup>T细胞形成免疫复合物来调节T细胞相

关的免疫反应进而调控牙周炎症反应<sup>[54]</sup>。其次,牙龈树突状细胞的表征与牙周病的发生相关,研究表明在牙周炎患者的牙龈组织中浆细胞样树突状细胞显著增加<sup>[55]</sup>。此外有研究显示,牙龈卟啉单胞菌可诱导树突状细胞分泌外泌体来促进牙周炎症和牙槽骨吸收,在实验性牙周炎的病理生理过程中起着关键作用<sup>[56]</sup>。

综上所述,本研究将机器学习结合到生物信息学当中,筛选出了在牙周炎进展中具有关键作用的8个脂肪酸代谢相关基因,分别为BTG2、CXCL12、FABP4、CLDN10、PPBP、RGS1、LGALS1和RIF1。基于这些基因,本研究构建了牙周炎的诊断列线图模型,并根据基因表达量的不同将牙周炎分为了两个亚型。此外还探讨了牙周炎与健康组的免疫细胞的浸润特征,并发现肥大细胞和树突状细胞是枢纽DEFAMRGs调控牙周炎的炎症免疫反应过程中较为关键的免疫细胞。总之,该研究为深入探索牙周炎与脂肪酸代谢关联的分子机制提供了初步参考,同时可为临床上脂肪酸代谢异常人群在牙周炎的预防、早期诊断和个性化治疗策略的制定上提供一定帮助。但仍存在一定的局限性,该研究得出的结论基于公共数据库,缺乏实验验证可能会使结果产生偏差,需要在以后的实验研究中进一步验证。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Cui Y, Tian G, Li R, et al. Epidemiological and sociodemographic transitions of severe periodontitis incidence, prevalence, and disability-adjusted life years for 21 world regions and globally from 1990 to 2019: an age-period-cohort analysis[J]. *J Periodontol*, 2023, 94(2): 193-203.
- [2] Wen X, Li H, Li S, et al. Associated factors of periodontitis and predicted study among young man in China: a population-based cross-sectional study[J]. *BMC Public Health*, 2024, 24(1): 1235.
- [3] Lin J, Pei T, Yang H. Association between modifiable lifestyle pattern and periodontitis: a cross-sectional study based on NHANES[J]. *BMC Oral Health*, 2024, 24(1): 591.
- [4] Nepomuceno R, Vallerini BF, da Silva RL, et al. Systemic expression of genes related to inflammation and lipid metabolism in patients with dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(4): 2715-2722.

- [5] Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, et al. Lipid signaling in adipose tissue: connecting inflammation & metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(4): 503-518.
- [6] Calder PC. Functional roles of fatty acids and their effects on human health[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2015, 39(1 Suppl): 18S-32S.
- [7] Ma WT, Zou ZL, Yang LS, et al. Exploring the bi-directional relationship between periodontitis and dyslipidemia: a comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Oral Health*, 2024, 24(1): 508.
- [8] Salminen A, Määttä AM, Mäntylä P, et al. Systemic metabolic signatures of oral diseases[J]. *J Dent Res*, 2024, 103(1): 13-21.
- [9] Alves-Costa S, Leite FRM, Ladeira LLC, et al. Behavioral and metabolic risk factors associated with periodontitis in Brazil, 1990-2019: a multidimensional analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Clin Oral Investig*, 2023, 27(12): 7909-7917.
- [10] Bitencourt FV, Nascimento GG, Costa SA, et al. The role of dyslipidemia in periodontitis[J]. *Nutrients*, 2023, 15(2): 300.
- [11] Gomes-Filho IS, Freitas TOB, Cruz SSD, et al. Periodontitis in individuals with few remaining teeth and a high gingival bleeding index increases the probability of dyslipidemia[J]. *J Periodontol*, 2023, 94(10): 1243-1253.
- [12] Mirzaei A, Shahrestanaki E, Malmir H, et al. Association of periodontitis with lipid profile: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2022, 21(2): 1377-1393.
- [13] Veljovic T, Djuric M, Mirnic J, et al. Lipid peroxidation levels in saliva and plasma of patients suffering from periodontitis[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(13): 3617.
- [14] Zhao Y, Zheng ZW, Zhang MH, et al. Design, synthesis, and evaluation of mono-carbonyl analogues of curcumin (MCACs) as potential antioxidants against periodontitis [J]. *J Periodontal Res*, 2021, 56(4): 656-666.
- [15] Sun Y, Yin YY, Yang SH, et al. Lipotoxicity: The missing link between diabetes and periodontitis[J]. *J Periodontal Res*, 2024, 59(3): 431-445.
- [16] Mohideen K, Chandrasekar K, Ramsridhar S, et al. Assessment of oxidative stress by the estimation of lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) in patients with chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Dent*, 2023, 2023: 6014706.
- [17] Patil RT, Dhadse PV, Salian SS, et al. Role of oxidative stress in periodontal diseases[J]. *Cureus*, 2024, 16(5): e-60779. DOI:10.7759/cureus.60779.
- [18] Li G, Robles S, Lu ZY, et al. Upregulation of free fatty acid receptors in periodontal tissues of patients with metabolic syndrome and periodontitis[J]. *J Periodontal Res*, 2019, 54(4): 356-363.
- [19] Soubiya, Madaiah H, Tarannum F, et al. Association of adipocyte fatty acid-binding protein and tumor necrosis factor alpha with periodontal health and disease: a cross-sectional investigation[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2021, 18: 79.
- [20] Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Sparse inverse covariance estimation with the graphical lasso[J]. *Biostatistics*, 2008, 9(3): 432-441.
- [21] Chen Q, Meng ZP, Liu XY, et al. Decision variants for the automatic determination of optimal feature subset in RF-RFE[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(6): 301.
- [22] Kursa MB, Rudnicki WR. Feature selection with the Boruta Package[J]. *J Stat Soft*, 2010, 36(11): 1-13.
- [23] Zhou X, Zhu X, Zeng H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity[J]. *Febs J*, 2023, 290(3): 584-599.
- [24] Kokotou MG, Mantzourani C, Batsika CS, et al. Lipidomics analysis of free fatty acids in human plasma of healthy and diabetic subjects by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1189.
- [25] Kersten S. Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(12): 731-739.
- [26] Ni Y, Zhao LJ, Yu HY, et al. Circulating unsaturated fatty acids delineate the metabolic status of obese individuals[J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(10): 1513-1522.
- [27] Rocha DM, Bressan J, Hermsdorff HH. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review[J]. *Revista Paulista De Med*, 2017, 135(2): 157-168.
- [28] Das UN. Essential fatty acids and their metabolites in the pathobiology of inflammation and its resolution[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1873.
- [29] Kim SH, Jung IR, Hwang SS. Emerging role of anti-proliferative protein BTG1 and BTG2[J]. *BMB Rep*, 2022, 55(8): 380-388.
- [30] Li Z, Fu R, Wen X, et al. Network analysis reveals miRNA crosstalk between periodontitis and oral squamous cell carcinoma[J]. *BMC Oral Health*, 2023, 23(1): 19.
- [31] Mahanonda R, Champaiboon C, Subbalekha K, et al.

- Human memory B cells in healthy gingiva, gingivitis, and periodontitis[J]. *J Immunol*, 2016, 197(3): 715-725.
- [32] Kim DJ, Rho JH, Woo BH, et al. Periodontal pathogens modulate lipid flux via fatty acid binding protein 4[J]. *J Dent Res*, 2019, 98(13): 1511-1520.
- [33] Li X, Tse HF, Yiu KH, et al. Periodontal therapy decreases serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein in systemically healthy subjects: a pilot clinical trial[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(3): 308-314.
- [34] Hadj-Rabia S, Brideau G, Al-Sarraj Y, et al. Multiplex epithelium dysfunction due to CLDN10 mutation: the HELIX syndrome[J]. *Genet Med*, 2018, 20(2): 190-201.
- [35] Zeng WJ, Liu JR, Ouyang XY, et al. The expression levels of chemotaxis-related molecules CXC chemokine receptor 1, interleukin-8, and pro-platelet basic protein in gingival tissues[J]. *J Dent Sci*, 2024, 19(1): 58-63.
- [36] Moratz C, Harrison K, Kehrl JH. Regulation of chemokine-induced lymphocyte migration by RGS proteins[J]. *Methods Enzymol*, 2004, 389: 15-32.
- [37] Hara A, Niwa M, Noguchi K, et al. Galectin-3 as a next-generation biomarker for detecting early stage of various diseases[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 389.
- [38] Kong NN, Liu ZY, Chan YW. RIF<sub>1</sub> suppresses the formation of single-stranded ultrafine anaphase bridges via protein phosphatase 1[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(2): 112032.
- [39] McLachlan GJ. Cluster analysis and related techniques in medical research[J]. *Stat Methods Med Res*, 1992, 1(1): 27-48.
- [40] Han NN, Liu YT, Du J, et al. Regulation of the host immune microenvironment in periodontitis and periodontal bone remodeling[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3158.
- [41] Kimura K, Kitaura H, Fujii T, et al. Anti-c-Fms antibody inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis *in vivo*[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 64(2): 219-227.
- [42] Huang HL, Long LY, Zhou PP, et al. mTOR signaling at the crossroads of environmental signals and T-cell fate decisions[J]. *Immunol Rev*, 2020, 295(1): 15-38.
- [43] Garlet GP, Sfeir CS, Little SR. Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs[J]. *J Dent Res*, 2014, 93(9): 834-839.
- [44] Balmert SC, Donahue C, Vu JR, et al. *In vivo* induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis[J]. *J Control Release*, 2017, 261: 223-233.
- [45] Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage polarity and disease control[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 144.
- [46] Alvarez C, Rojas C, Rojas L, et al. Regulatory T lymphocytes in periodontitis: a translational view[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 7806912.
- [47] Seidel A, Seidel CL, Weider M, et al. Influence of natural killer cells and natural killer T cells on periodontal disease: a systematic review of the current literature[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9766.
- [48] Wilensky A, Chaushu S, Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis[J]. *Periodontol 2000*, 2015, 69(1): 128-141.
- [49] Wang HY, Wei RQ, Deng TJ, et al. Identifying immunorelated diagnostic genes and immune infiltration signatures for periodontitis and alopecia areata[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 110880.
- [50] Rathod S, Raj A, Wanikar I. Quantitative analysis of mast cell count and density in chronic periodontal disease[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2018, 22(2): 107-111.
- [51] Tetè G, D'orto B, Ferrante L, et al. Role of mast cells in oral inflammation[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(4 Suppl. 1): 65-70.
- [52] Tada H, Nishioka T, Takase A, et al. Porphyromonas gingivalis induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier[J]. *Cell Microbiol*, 2019, 21(3): e12972. DOI:10.1111/cmi.12972.
- [53] Ribeiro LSFE, dos Santos JN, Rocha CAG, et al. Association between mast cells and collagen maturation in chronic periodontitis in humans[J]. *J Histochem Cytochem*, 2018, 66(6): 467-475.
- [54] El-Awady AR, Elashiry M, Morandini AC, et al. Dendritic cells a critical link to alveolar bone loss and systemic disease risk in periodontitis: immunotherapeutic implications[J]. *Periodontol 2000*, 2022, 89(1): 41-50.
- [55] Sharawi H, Heyman O, Mizraji G, et al. The prevalence of gingival dendritic cell subsets in periodontal patients [J]. *J Dent Res*, 2021, 100(12): 1330-1336.
- [56] Elsayed R, Elashiry M, Liu YT, et al. Microbially-induced exosomes from dendritic cells promote paracrine immune senescence: novel mechanism of bone degenerative disease in mice[J]. *Aging Dis*, 2023, 14(1): 136-151.