

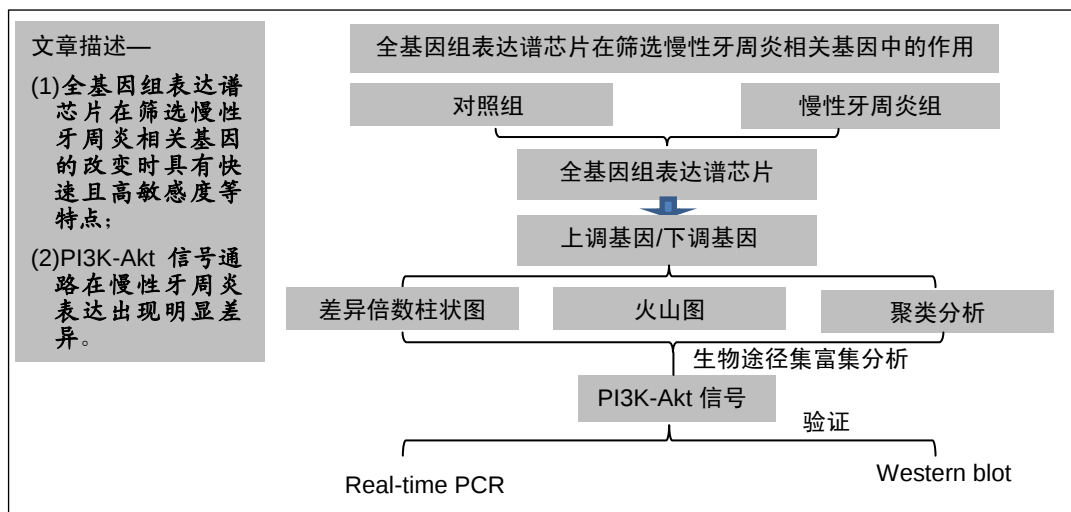
全基因组表达谱芯片在筛选慢性牙周炎相关基因中的作用

吴慧¹, 许诺², 王倩³, 史春³, 姜龙² (¹海南医学院第一附属医院口腔科, 海南省海口市 570102; ²大连医科大学中山学院, 辽宁省大连市 116000; ³大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2723

ORCID: 0000-0002-5099-3878(吴慧); 0000-0002-4258-2470(许诺)

文章快速阅读:



吴慧, 女, 1985 年生, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔基础医学科研、口腔内科学的研究。

共同第一作者: 许诺, 女, 1984 年生, 硕士, 副教授, 主治医师, 主要从事口腔医学相关教学与研究。

通讯作者: 姜龙, 讲师, 大连医科大学中山学院, 辽宁省大连市 116000

文献标识码: A

投稿日期: 2019-12-02

送审日期: 2019-12-04

采用日期: 2020-01-10

在线日期: 2020-03-30



文题释义:

全基因组表达谱芯片: 通过高通量平行检测基因的一种优越技术手段, 可以在全基因的范围中检测慢性牙周炎的差异基因, 进而快速的从分子水平为慢性牙周炎的治疗提供实验基础。

PI3K/Akt 信号通路: 广泛存在于各种细胞中, 在细胞的增殖、分化、存活、凋亡、炎症等方面发挥着重要作用, 并且该信号通路参与了以骨破坏为主要特征的骨质疏松、骨关节炎、骨肉瘤等疾病中。PI3K 是位于细胞内的一种磷脂酰肌醇 3 激酶, 可以激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 后, 激活下游因子, 进而影响细胞的增殖与凋亡。

摘要

背景: 全基因组表达谱芯片是一种用于基因表达研究的技术手段, 具有高度敏感性以及特异性, 它可以在全基因组范围内检测与慢性牙周炎相关的差异基因, 从而高效快速地发现与慢性牙周炎密切相关的因子。

目的: 应用全基因组表达谱芯片筛选慢性牙周炎相关基因。

方法: 选取 15 例正畸拔牙患者正常牙周膜组织作为对照组, 21 例慢性牙周炎患者牙周组织。比对 4 例慢性牙周炎组织和 4 例正常组织的全基因组表达谱芯片, 筛选出上调基因及下调基因。通过 Real-Time PCR(7 例正常及 13 例患者)和 Western Blot(4 例正常及 4 例患者)对 2 组牙周膜组织中差异基因 PI3K-Akt 信号通路的表达进行验证。实验方案由海南医学院第一附属医院伦理委员会批准(批准号: HNM20180034)并获得所有患者的知情同意。

结果与结论: ①全基因组表达谱芯片结果分析发现慢性牙周炎样本中均存在显著差异表达的上调基因 1 565 个, 下调基因 1 849 个; ②富集分析发现其中在慢性牙周炎中 PI3K-Akt 信号通路表达有显著差异($P < 0.001$); ③Real-Time PCR 及 Western Blot 检测发现 PI3K 及 Akt 的 mRNA 和蛋白在慢性牙周炎中较对照组表达高($P < 0.05$); ④结果说明, 全基因组表达谱芯片在筛选慢性牙周炎相关基因的改变时具有快速且高敏感度等特点。PI3K-Akt 信号通路在慢性牙周炎表达出现明显差异, 为慢性牙周炎的治疗提供实验依据。

关键词:

慢性牙周炎; 全基因组表达谱芯片; PI3K; Akt; GO 分析; 上调基因; 下调基因

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

辽宁省自然科学基金(20180550563), 项目负责人: 史春

Wu Hui, Master, Attending physician, Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, Hainan Province, China

Xu Nuo, Master, Associate professor, Attending physician, Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Wu Hui and Xu Nuo contributed equally to this work.

Corresponding author: Jiang Long, Lecturer, Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Screening chronic periodontitis-related genes using whole-genome expression profiling

Wu Hui¹, Xu Nuo², Wang Qian³, Shi Chun³, Jiang Long² (¹Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, Hainan Province, China; ²Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; ³School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Whole-genome expression profiling is a technical method for gene expression research, with high sensitivity and specificity. This technique can be used to detect differential genes related to chronic periodontitis in the whole genome, therefore efficiently and quickly finding chronic periodontitis-related factors.

OBJECTIVE: To screen genes related to chronic periodontitis by using the whole-genome expression profiling.

METHODS: Normal periodontal ligament tissue of 15 patients with orthodontic extraction was selected as control group, and periodontal tissue of 21 patients with chronic periodontitis was selected as experimental group. To screen up-regulated and down-regulated genes, the genome-wide expression profile chips of four chronic periodontitis tissues and four healthy tissues were compared. The expression of the differential gene PI3K-Akt signal pathway was verified by real-time PCR (7 normal cases and 13 cases of chronic periodontitis) and western blot (4 normal cases and 4 cases of chronic periodontitis). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University (approval No. HNM20180034) and informed consent was obtained from each patient.

RESULTS AND CONCLUSION: Analysis of the whole genome expression profile chip revealed that 1 565 up-regulated genes and 1 849 down-regulated genes were significantly differentially expressed in chronic periodontitis samples. The enrichment analysis revealed that the expression of PI3K-Akt signaling pathway was significantly different in chronic periodontitis ($P < 0.001$). Real-time PCR and western blot assay results indicated that PI3K and Akt expression was higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). All the findings indicate that the genome-wide expression profile chip is fast and highly sensitive to screen the changes in chronic periodontitis-related genes. Significantly differential expression of PI3K-Akt signal pathway in chronic periodontitis provides an experimental basis for the treatment of chronic periodontitis.

Key words: chronic periodontitis; genome-wide expression profile chip; PI3K; AKT; GO analysis; up-regulated gene; down-regulated gene

Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20180550563 (to SC)

0 引言 Introduction

慢性牙周炎是机体对细菌等病原刺激物产生的免疫应答反应, 导致牙周组织区域出现牙槽骨的吸收, 最终导致牙齿的脱落^[1-6]。细菌作用于牙周组织后造成了骨组织吸收量增大, 并且多于新形成的骨组织的量, 其主要是成骨细胞与破骨细胞之间的平衡状态被打乱^[7-15]。全基因组表达谱芯片是具有高通量平行检测优越性的一种技术手段, 用于基因表达研究, 具有高度敏感性以及特异性^[16-18]。它可以在全基因组范围内检测与慢性牙周炎相关的差异基因, 从而高效快速地发现与慢性牙周炎密切相关的因子^[9, 19-23]。目前学者都在寻找慢性牙周炎治疗的靶向因子, 而全面了解慢性牙周炎的基因改变, 筛选慢性牙周炎相关基因, 将为解决这一问题提供了可靠的实验室依据。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 临床试验、分组对照观察。

1.2 时间及地点 于2018年2月至2019年11月在海南医学院第一附属医院口腔科完成。

1.3 对象 选取15例正畸拔牙患者正常牙周膜组织作为对照组, 21例慢性牙周炎患者牙周组织, 通过牙周手术中刮取的牙周组织。实验方案由海南医学院第一附属医院伦理委员会批准(批准号: HNM20180034)并获得所有患者的知情同意。对照组男性6例, 女性9例; 年龄为23-37岁; 慢性牙周炎组男性8例, 女性13例; 年龄为27-40岁。两组之间性别、年龄比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

两种牙周组织中, 4例正常牙周膜组织及4例慢性牙周炎患者牙周膜组织进行全基因组表达谱芯片试验, 筛选慢性牙周炎上调及下调相关基因。7例正常牙周膜组织及13例慢性牙周炎患者牙周膜组织进行Real time PCR验证。4例正常牙周膜组织及4例慢性牙周炎患者牙周膜组织进行Western Blot验证。

1.3.1 慢性牙周炎样本纳入标准 患者需要进行牙周手术且患者年龄大于18岁; 曲面断层显示有的牙槽骨吸收, 且2个或2个以上牙齿探诊深度(PD) ≥ 6 mm。

1.3.2 排除标准 患者患有糖尿病、高血压等全身系统性疾病。

1.4 材料 人全基因组芯片(华联生物科技股份有限公司); SYBR[®] Premix ExTaqM II (TaKaRa); p-PI3K抗体(abcam); PI3K抗体(Elabscience); Akt抗体(Elabscience); p-Akt抗体(abcam); ECL 发光液(Thermo Fisher Scientific); PVDF膜(Merck Millipore); Trizol(TaKaRa)。

1.5 方法

1.5.1 全基因组表达谱芯片

(1)RNA萃取: 将牙周炎及对照组样本置于EP管中, 并进行研磨。加0.2 mL氯仿, 4 °C, 12 000 r/min 离心10 min, 取上层水相至EP管。加体积分数80%乙醇1 mL混匀, 4 °C, 7 600 r/min离心5 min, 弃乙醇, 室温干燥5 min, 取30 μ L DEPC Treated DDW 溶解, -80 °C储存备用。吸收光谱分析RNA 浓度和纯度。

(2)样品制备: RNA 样品扩增后, 进行荧光标定反应及Phalanx OneArrayTM杂交反应, 将NewOAHyb Buffer置于加热板加热60 °C约10 min, 对空白芯片与完成前杂交的芯片, 备用储存于50 °C烘箱, 于芯片口处加215 μ L预热的aRNA mixture, 套第二层热缩膜, 置于50 °C杂交烘箱旋转架16 h, 打开芯片于小盒清洗液中于42 °C震荡烘箱放置芯片摇洗5 min, 杂交清洗液II置于芯片中, 弃杂交清洗液II加25 °C杂交清洗液II摇洗后在杂交清洗液III垂直向5 s, 离心并甩干芯片, 避光扫描。

1.5.2 Real-Time PCR检测PI3K及Akt的mRNA表达 样本组织提取RNA, 取出临床样本组织, 用研磨棒抵住EP管底端于冰盒上间断研磨至匀浆状; 将样品室温放置5-10 min, 使核酸于核蛋白完全分离或4 °C 12 000 r/min离心10 min; 加200 μ L氯仿于样本EP管中, 剧烈震荡30 s, 室温放置3 min

或4℃ 12 000 r/min离心10 min; 吸200 μL上层水相至EP管; 加入100 μL无水乙醇, 混匀, 小离心机离心1.0~2.0 min; 10 000 r/min离心30 s, 弃掉收集管中液体。

引物序列, GAPDH: GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC与TGG TGA AGA CGC CAG TGG A; PI3K: AGC ATT GGG ACC TCA CAT TAC ACA与ACT GGA AAC ACA GTC CAT GCA CAT A; Akt: AGC GAC GTG GCT ATT GTG AA与CAC GTT GGT CCA CAT CTG。

1.5.3 Western Blot检测PI3K及Akt蛋白表达 取临床慢性牙周炎组织以及正常组织分别为实验组和对照组, 置于冻存管中放-80℃贮存备用。

提取样本总蛋白, 测量蛋白浓度, 蛋白变性, 根据目的蛋白的分子量大小选择10%的分离胶, 转膜, 封闭、一抗孵育(抗体浓度PI3K及Akt为1:500, p-PI3K、p-Akt及GAPDH为1:1 000), 二抗孵育、显影, 用BIO-RAD凝胶成像系统采集蛋白印迹结果, 使用Image Lab软件进行蛋白印迹结果分析。

1.6 主要观察指标 ①差异倍数柱状图、火山图及聚类分析检测全基因组表达谱芯片的上调及下调基因; ②生物途径富集分析检测慢性牙周炎中差异明显信号通路; ③Real-Time PCR及Western Blot 验证PI3K及Akt是否与芯片筛选结果相一致。

1.7 统计学分析 采用SPSS 17.0 for windows中卡方检验分析男女比例; *t* 检验及单因素方差分析对芯片结果、Real-Time PCR及Western Blot的结果进行检测, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 全基因组表达谱芯片结果

2.1.1 正常及慢性牙周炎牙周膜组织全基因组表达谱芯片实验结果($n=4$) 差异倍数柱状图结果显示所有检出的基因探针于分组比对中讯号差异的分布。差异倍数以Rosetta Resolver 7.2软件误差模型计算得出, 随后通过Amersham Pairwise Ration Builder进行组间比较。柱状图的横坐标以log2表示差异倍数, 纵坐标则代表探针数目。一般情况下此图显示出正态分布, 代表比对中的上/下调基因大致相当, 见图1。

火山图结果显示分组比对中差异基因探针的分布。横坐标为差异倍数(fold change, log2), 纵坐标以负log(*P*值)代表差异的显著性。图中每一个点为一个检出的基因探针(不含控制探针及flagged探针), 见图2。Rosetta Resolver® System进行全基因表达谱芯片的数据前处理分析。采用R3.0.3版本, 从聚分析采用package功能, 主成分分析采用R内建的prcomp功能, 当有过少的差异基因出现时执行ANOVA, one-way ANOVA中*P* 值小于0.00。结果显示慢性牙周炎样本中均存在显著差异表达的上调基因1 565个, 下调基因1 849个。

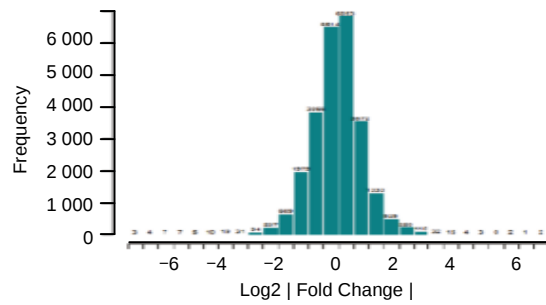
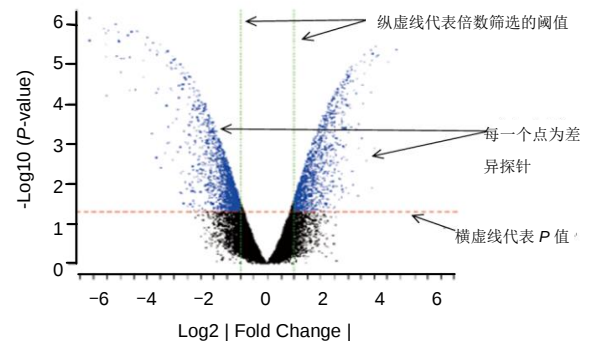


图1 两组全基因组表达谱芯片实验差异倍数柱状图

Figure 1 Histogram of multiples of difference in whole-genome expression profile microarray experiments

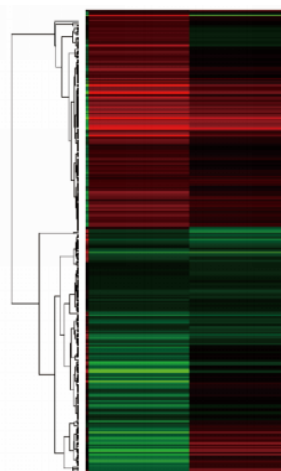


图注: 差异表达基因的筛选阈值为 $|Fold\ change| \geq 1$ 且 P 值 < 0.05

图2 对照组对比慢性牙周炎临床样本火山图

Figure 2 Volcano plot of clinical samples of chronic periodontitis in comparison with control group

2.1.2 无监督层次聚类分析实验样本间整体基因表达的相似性 聚类分析的相关数据包含基因名称的聚类图。聚类分析是通过数据建模简化数据的一种方法, 目的在于获得数据的分布状况, 观察每一簇数据的特征。并以距离指标描述样本簇之间的关联性, 见图3。分析中以差异表达基因探针讯号差异(该探针在所有芯片间的讯号值差异大于31 000)筛选出的294基因探针进入分析。



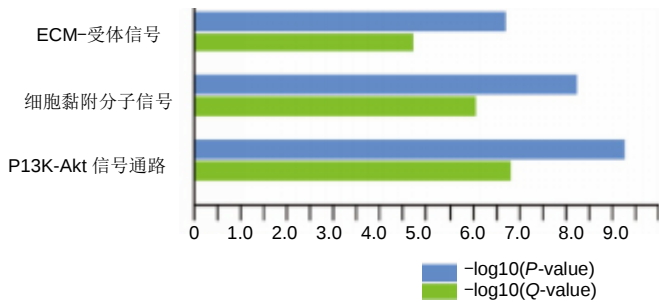
图注: 通过聚类分析可视化重复及样本间的相似性。图中每一行为一张芯片, 每一列为一个基因探针。色阶标示探针讯号上/下调的变化幅度。线的长度则代表距离指标, 同簇样本或基因的相似性高

图3 聚类分析检测全基因组表达谱芯片的上调及下调基因

Figure 3 Cluster analysis of up- and down-regulated genes using the whole genome expression profile chip

2.1.3 功能富集分析 以差异基因进行生物途径富集分析。所有组别结果、芯片表达量与KEGG反应路径图、分析逻辑、详细结果与其他组生物途径富集分析相关数据,

结果显示排名前3的信号通路主要是: PI3K-Akt信号通路、细胞黏附分子信号以及ECM-受体信号。见图4。



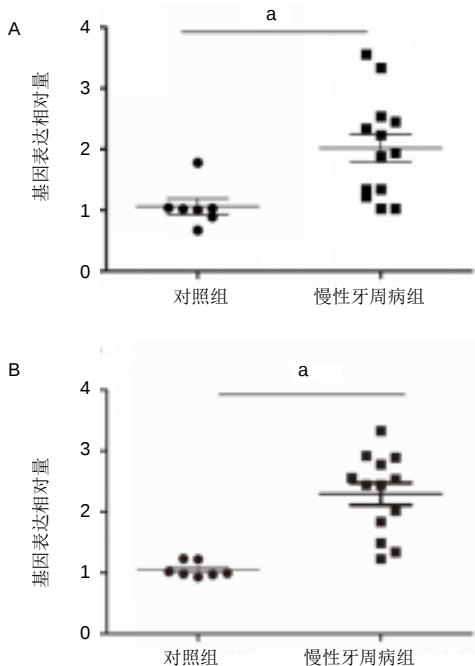
图注: 纵坐标为排序前十的生物途径名称, 横坐标对 P 值及 q 值 (Benjamini) 取负 $\log$ 值以表示富集的显著性

图4 生物途径富集分析

Figure 4 Enrichment analysis of biological pathways

2.2 PI3K-Akt信号通路在慢性牙周炎中的表达 通过上述结果发现PI3K-Akt信号通路在慢性牙周炎样本中表达增高, 差异非常有显著性意义($P < 0.001$), 因此将对PI3K-Akt信号通路在慢性牙周炎临床样本基因及蛋白水平的表达进行验证。

2.2.1 Real-Time PCR检测PI3K-Akt mRNA的表达情况 7例正常牙周膜组织及13例慢性牙周炎患者牙周膜组织进行Real time PCR验证。结果显示PI3K及Akt在慢性牙周炎临床样本中基因表达水平增高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其结果与芯片结果一致。见图5。

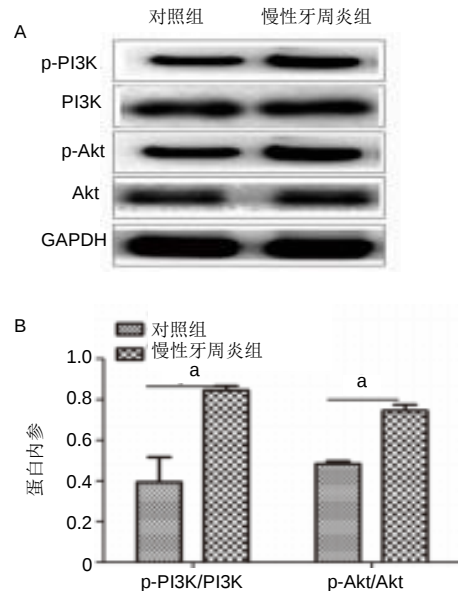


图注: 图A为2组样本中PI3K mRNA表达; B为2组样本中Akt mRNA表达。^a $P < 0.05$

图5 两组牙周膜组织临床样本中PI3K及Akt的mRNA表达

Figure 5 mRNA expression of PI3K and Akt in clinical samples of periodontal ligament tissue in two groups

2.2.2 Western Blot检测PI3K-Akt蛋白表达情况 4例正常牙周膜组织及4例慢性牙周炎患者牙周膜组织进行Western Blot验证。结果显示p-PI3K/PI3K及p-Akt/Akt在慢性牙周炎临床样本中蛋白表达水平增高, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其结果与芯片结果一致。见图6。



图注: 图A为2组样本中Akt、p-Akt、p-PI3K及PI3K蛋白的表达; B为2组样本中p-PI3K/PI3K与p-Akt/Akt比值。^a $P < 0.05$

图6 两组牙周膜组织临床样本中PI3K及Akt蛋白表达

Figure 6 PI3K and Akt protein expression in clinical samples of periodontal ligament tissue in two groups

3 讨论 Discussion

全基因组表达谱芯片是目前研究疾病基因特异性表达的主要方法之一, 它不仅改善了之前只是针对于单一基因或者少数基因进行分析的缺点, 它可以更广泛的对疾病进行全面的提取所能采集到的全部生物学信息, 进而从分子生物学的基因角度对疾病进行快速及高通量的分析^[24-26]。

慢性牙周炎的主要特征是细菌刺激机体产生防御反应, 造成了牙槽骨出现了骨组织的破坏^[9, 27-29]。其主要原因是病原刺激物促进了破骨细胞的增殖量多余成骨细胞的增殖量^[30-31]。PI3K/Akt信号通路广泛存在于各种细胞中, 在细胞的增殖、分化、存活、凋亡、炎症等方面发挥着重要作用, 并且该信号通路参与了以骨破坏为主要特征的骨质疏松、骨关节炎、骨肉瘤等疾病中^[32-37]。PI3K是位于细胞内的一种磷脂酰肌醇3激酶, 可以激活丝氨酸/苏氨酸激酶Akt后, 激活下游因子, 进而影响细胞的增殖与凋亡^[38-43]。

此次研究通过采用HunmanOneArray Plus全基因组表达图谱进行基因芯片筛选, 发现在所检测的慢性牙周炎临床样本采用差异倍数柱状图、火山图检测全基因组表达谱芯片的上调及下调基因, 结果显示慢性牙周炎样本中均存在显著差异表达的上调基因1 565个, 下调基因1 849个。试验采用的是表达谱基因芯片较常见的全基因组测序及转

录组测序芯片而言,其改进了以前针对单一或少数基因分析的缺点,它可以最广泛全面的提取所能采集到的生物信息,综合分析疾病发展过程中多基因的功能其表达,具有高通量、速度快等特点。有学者通过全基因组测序发现在慢性牙周炎中ECM-受体相互作用、细胞黏附分子、焦点粘连等信号通路密切相关。

为了更好的检测基因差异,采用聚类分析筛选出的294基因探针进入分析,之后以差异基因进行生物途径富集分析。所有组别结果、芯片表达量与KEGG反应路径图、分析逻辑、详细结果与其他组生物途径富集分析相关数据,结果显示排名前3的信号通路主要是:PI3K-Akt信号通路、细胞黏附分子信号以及ECM-受体信号。而由于目前关于PI3K-Akt信号通路在慢性牙周炎中的研究较少,且其是此次基因芯片筛选出的首条通路,通过Real-Time PCR及Western Blot在慢性牙周炎临床样本中对PI3K-Akt 信号通路的表达进行了验证,结果表明PI3K及Akt在慢性牙周炎中较对照组表达高,此结果与芯片筛选结果相一致。Western Blot的结果显示PI3K及Akt在慢性牙周炎及对照组中表达差异不明显,之后检测了p-PI3K/PI3K及p-Akt/Akt的蛋白表达情况,结果显示p-PI3K/PI3K及p-Akt/Akt的蛋白表达在慢性牙周炎表达增高,其结果表明PI3K及Akt是通过其磷酸化发挥其调节慢性牙周炎的骨破坏及炎症相关的功能。研究表明PI3K-Akt信号通路与炎症密切相关,在胃溃疡患者的胃黏膜中发现PI3K-Akt信号通路表达增高,试验发现在慢性牙周炎患者中PI3K-Akt信号通路表达增高,可能与其与炎症密切相关有关。此次研究通过全基因组表达图谱筛选出PI3K-Akt信号通路在慢性牙周炎中为重要的信号通路,但是其在慢性牙周炎中起到的作用,以及其在炎症通路中的作用,需要进一步细胞学实验进行验证。

作者贡献: 试验为第一作者和通讯作者共同设计,其他作者参与试验,第一作者成文和审核。

经费支持: 该文章接受了“辽宁省自然科学基金(20180550563)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 试验由海南医学院第一附属医院伦理委员会批准(批准号: HNM20180034)。

知情同意问题: 所有患者对试验完全知情同意,并签署知情同意书。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] FENG X, LIU J. Association between IL-1A (-889C/T) polymorphism and susceptibility of chronic periodontitis: a meta-analysis. *Gene*. 2020;729:144227.
- [2] MOONEN CG, BUURMA KG, FARUQUE MR, et al. Periodontal therapy increases neutrophil extracellular trap degradation. *Innate Immun*. 2019;1753425919889392.
- [3] NARIMIYA T, KANZAKI H, YAMAGUCHI Y, et al. Nrf2 activation in osteoblasts suppresses osteoclastogenesis via inhibiting IL-6 expression. *Bone Rep*. 2019;11:100228.
- [4] SCHULZ S, SCHLITT A, HOFMANN B, et al. Periodontal pathogens and its role in cardiovascular outcome. *J Clin Periodontol*. 2020;47(2):173-181.
- [5] NARDI C, CALISTRI L, PIETRAGALLA M, et al. Electronic processing of digital panoramic radiography for the detection of apical periodontitis. *Radiol Med*. 2020;125(2):145-154.
- [6] PAN W, WANG Q, CHEN Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019;11(3):30.
- [7] DUTZAN N, ABUSLEME L. T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1197: 107-117.
- [8] KHOURY RD, PRADO RFD, MATOS FS, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104590.
- [9] MINTY M, CANCEIL T, SERINO M, et al. Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019;20(4): 449-459.
- [10] ZHANG Z, YUAN W, DENG J, et al. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) regulates neutrophils infiltration and periodontal tissue destruction in an experimental periodontitis. *Mol Immunol*. 2019;117: 110-121.
- [11] ASA'AD F, MONJE A, LARSSON L. Role of epigenetics in alveolar bone resorption and regeneration around periodontal and peri-implant tissues. *Eur J Oral Sci*. 2019;127(6): 477-493.
- [12] VELIDANDLA S, BODDURU R, BIRRA V, et al. Distribution of Periodontal Pockets Among Smokers and Nonsmokers in Patients with Chronic Periodontitis: A Cross-sectional Study. *Cureus*. 2019;11(9): e5586.
- [13] WAGNER MC, CAVAGNI J, GAIO EJ, et al. Effect of red wine and its major components on periodontitis and systemic inflammation in rats. *J Int Acad Periodontol*. 2019;21(4): 139-147.
- [14] WANG Y, LI Y, SHAO P, et al. IL1beta inhibits differentiation of cementoblasts via microRNA-325-3p. *J Cell Biochem*. 2020; 121(3):2606-2617.
- [15] ZHONG W, PENG Y, YUE E, et al. Gingival crevicular fluid levels of SLIT3 are increased in periodontal disease. *Oral Dis*. 2020;26(1):182-192.
- [16] HARGADON KM. Whole Genome Expression Microarray Analysis of Highly Versus Poorly Tumorigenic Murine Melanoma Cell Lines Provides Insights into Factors That Regulate Tumor Growth, Metastasis, and Immunogenicity. *Front Immunol*. 2015;6:452.
- [17] WEI Y, CHEN L, XU H, et al. Mitochondrial Dysfunctions Regulated Radioresistance through Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Signaling Pathway of NF-kappaB/PI3K/AKT2/mTOR. *Radiat Res*. 2018;190(2): 204-215.

- [18] XU X, FENG L, LIU Y, et al. Differential gene expression profiling of gastric intraepithelial neoplasia and early-stage adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(47): 17883-17893.
- [19] FREIRE JMO, CHAVES HV, TEIXEIRA AH, et al. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. *PLoS One*. 2019;14(11): e0223800.
- [20] GUSTAFSSONN, AHLQVIST J, NASLUND U, et al. Associations among Periodontitis, Calcified Carotid Artery Atheromas, and Risk of Myocardial Infarction. *J Dent Res*. 2019: 22034519885362.
- [21] LI H, ZHONG X, LI W, et al. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on experimental periodontitis and AhR/NF-kappaB/NLRP3 inflammasome pathway in a mouse model. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180713.
- [22] MAJZOUB J, BAROOTCHI S, TAVELLI L, et al. Guided tissue regeneration combined with bone allograft in infrabony defects: Clinical outcomes and assessment of prognostic factors. *J Periodontol*. 2019 Nov 4. doi: 10.1002/JPER.19-0336.
- [23] SHI T, JIN Y, MIAO Y, et al. IL-10 secreting B cells regulate periodontal immune response during periodontitis. *Odontology*. 2019 Nov 7. doi: 10.1007/s10266-019-00470-2.
- [24] JOEHANES R, ZHANG X, HUAN T, et al. Integrated genome-wide analysis of expression quantitative trait loci aids interpretation of genomic association studies. *Genome Biol*. 2017 18(1):16.
- [25] CHO H, CHOU HH. Thermodynamically optimal whole-genome tiling microarray design and validation. *BMC Res Notes*. 2016;9:305.
- [26] ARTHUR L M, TURNBULL A K, WEBBER V L, et al. Molecular changes in lobular breast cancers in response to endocrine therapy. *Cancer Res*. 2014; 74(19): 5371-5376.
- [27] DESCHAMPS-LENHARDT S, MARTIN-CABEZAS R, HANNEDOUCHE T, et al. Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2019;25(2):385-402.
- [28] BAUS-DOMINGUEZ M, GOMEZ-DIAZ R, TORRES-LAGARES D, et al. Differential Expression of Inflammation-Related Genes in Down Syndrome Patients with or without Periodontal Disease. *Mediators Inflamm*. 2019; 2019: 4567106.
- [29] BOYAPATI R, SWARNA C, DEVULAPALLI N, et al. Unveiling the Link between Prostatitis and Periodontitis. *Contemp Clin Dent*. 2018;9(4):524-529.
- [30] MARTON I J, HORVATH J, LABISCSAK P, et al. Salivary IL-6 mRNA is a Robust Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2019; 8(11). Pii: E1958.
- [31] NIAZI FH, KOPPULU P, TANVIR SB, et al. Clinical efficacy of photodynamic therapy in the treatment of necrotizing ulcerative periodontitis among HIV seropositive patients: A randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019: 101608.
- [32] BISHOP JA, GAGAN J, BAUMHOER D, et al. Sclerosing Polycystic "Adenosis" of Salivary Glands: A Neoplasm Characterized by PI3K Pathway Alterations More Correctly Named Sclerosing Polycystic Adenoma. *Head Neck Pathol*. 2019 Oct 11. doi: 10.1007/s12105-019-01088-0.
- [33] CHENG M, HUANG W, CAI W, et al. Growth hormone receptor promotes osteosarcoma cell growth and metastases. *FEBS Open Bio*. 2020;10(1):127-134.
- [34] DONG C, WANG X, LI N, et al. microRNA-mediated GAS1 downregulation promotes the proliferation of synovial fibroblasts by PI3K-Akt signaling in osteoarthritis. *Exp Ther Med*. 2019;18(6):4273-4286.
- [35] IHLE CL, PROVERA MD, STRAIGN DM, et al. Distinct tumor microenvironments of lytic and blastic bone metastases in prostate cancer patients. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1): 293.
- [36] IRELLI A, SIRUFO M M, SCIPIONI T, et al. mTOR Links Tumor Immunity and Bone Metabolism: What are the Clinical Implications? *Int J Mol Sci*. 2019;20(23). pii: E5841.
- [37] SHEIKH-ZEINEDDINI N, SAFAROGHLI-AZAR A, SALARI S, et al. C-Myc inhibition sensitizes pre-B ALL cells to the anti-tumor effect of vincristine by altering apoptosis and autophagy: Proposing a probable mechanism of action for 10058-F4. *Eur J Pharmacol*. 2019:172821.
- [38] WANG Z, ZHAO Y, PHIPPS-GREEN A, et al. Differential DNA methylation of networked signaling, transcriptional, innate and adaptive immunity, and osteoclastogenesis genes and pathways in gout. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Nov 18. doi: 10.1002/art.41173.
- [39] WATRAS A, WUJCZYK M, ROECKEN M, et al. Investigation of Pyrophosphates KYP207Co-Doped with Lanthanide Ions Useful for Theranostics. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9(11) . pii: E1597.
- [40] WU S, ZHAO F, ZHAO J, et al. Dioscin improves postmenopausal osteoporosis through inducing bone formation and inhibiting apoptosis in ovariectomized rats. *Biosci Trends*. 2019;13(5): 394-401.
- [41] WU TC, CHEN JS, WANG CH, et al. Activation of heme oxygenase-1 by Ginkgo biloba extract differentially modulates endothelial and smooth muscle-like progenitor cells for vascular repair. *Sci Rep*. 2019;9(1):17316.
- [42] XU W, LI J, TIAN H, et al. MicroRNA1865p mediates osteoblastic differentiation and cell viability by targeting CXCL13 in nontraumatic osteonecrosis. *Mol Med Rep*. 2019; 20(5): 4594-4602.
- [43] ZHANG Y, CAO X, LI P, et al. LncRNA NKILA integrates RXFP1/AKT and NF-kappaB signalling to regulate osteogenesis of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(1):521-529.