

基于生物信息学方法和细胞实验探讨葛根素治疗口腔黏膜下纤维化的潜在作用路径



鲁汝清, 郭 盛, 彭佳梅, 李熠洁, 刘 根

长沙市口腔医院牙体美容科 (长沙 410004)

【摘要】目的 基于网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和细胞实验探究葛根素治疗口腔黏膜下纤维化 (oral submucous fibrosis, OSF) 的潜在作用路径。**方法** 联合 TCSP、Comparative Toxicogenomics Database 和 PharmMapper 数据库检索葛根素作用靶点, 通过 GeneCards、DisGeNet 和 OMIM 数据库检索 OSF 疾病靶点, 取二者交集靶点, 构建蛋白质互作网络并筛选核心靶点。对核心靶点进行基因本体论 (Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析。利用 AutoDock 4.2.6 软件开展分子对接, 选取优势复合物通过 GROMACS 2020.6 软件进行分子动力学模拟, 以验证结合稳定性。探究不同浓度葛根素对 HaCaT 细胞存活率的影响后, 将细胞分为空白组、模型组、葛根素低剂量组、葛根素中剂量组和葛根素高剂量组, 检测各组细胞中 TNF、MMP2、EGFR、MMP9 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 共筛选出 400 个葛根素靶点和 969 个 OSF 靶点, 得到 81 个交集靶点。GO 及 KEGG 分析提示其作用机制主要涉及细胞群体增殖的正调控、细胞外空间、AGE-RAGE 信号通路等。分子对接及分子动力学模拟结果显示, TNF、MMP2、EGFR、MMP9 等核心靶点与葛根素均具有较强结合能力, 构象稳定, 氢键结合持久。体外实验显示, 模型组 TNF、MMP2、EGFR、MMP9 的 mRNA 及蛋白表达水平与空白组相比均显著上调 ($P < 0.01$); 经葛根素干预后, 各剂量组上述指标均显著下调 ($P < 0.05$)。**结论** 葛根素治疗 OSF 的分子机制可能与抑制 TNF、MMP2、EGFR、MMP9 等细胞因子的表达相关, 涉及炎症反应的抑制、细胞外基质降解、细胞增殖分化和上皮-间充质转化等过程。

【关键词】 葛根素; 口腔黏膜下纤维化; 生物信息学; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟; 细胞实验

【中图分类号】 R 781.5 **【文献标识码】** A

Exploring the potential pathway of puerarin in the treatment of oral submucous fibrosis based on bioinformatics methods and cell experiments

LU Ruqing, GUO Sheng, PENG Jiamei, LI Yijie, LIU Gen

Department of Dental Cosmetology, Changsha Stomatological Hospital, Changsha 410004, China

Corresponding author: LIU Gen, Email: kaige19890610@163.com

【Abstract】Objective To investigate the potential mechanism of puerarin in the treatment of oral submucous fibrosis (OSF) using an integrated strategy combining network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulation and cellular experiments.

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202504030

通信作者: 刘根, Email: kaige19890610@163.com

<https://slyyx.whuzhmedj.com/>

Methods Putative targets of puerarin were retrieved from the TCMSP, Comparative Toxicogenomics Database and PharmMapper databases. OSF-related targets were collected from GeneCards, DisGeNet and OMIM databases. The overlapping targets between puerarin and OSF were identified, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed to screen for core targets. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed on these core targets. Molecular docking was carried out using AutoDock 4.2.6 software, and the top-ranked complexes were subjected to molecular dynamics simulation using GROMACS 2020.6 software to validate binding stability. After assessing the effects of different puerarin concentrations on HaCaT cell viability, the cells were divided into five groups: blank control, model, low-dose puerarin, medium-dose puerarin and high-dose puerarin groups. The mRNA and protein expression levels of TNF, MMP2, EGFR and MMP9 were detected in each group. **Results** A total of 400 puerarin targets and 969 OSF-related targets were screened, yielding 81 overlapping targets. GO and KEGG analyses indicated that the potential mechanisms primarily involve the positive regulation of cell population proliferation, the extracellular space, and the AGE-RAGE signaling pathway. Molecular docking and molecular dynamics simulation demonstrated strong binding affinity of puerarin to core targets like TNF, MMP2, EGFR and MMP9, with stable conformational binding and persistent hydrogen bond interactions. In vitro experiments confirmed that compared to the blank control group, the mRNA and protein expression levels of TNF, MMP2, EGFR and MMP9 were significantly upregulated in the model group ($P < 0.01$). Puerarin treatment significantly reversed these increases in all dose groups compared to the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The molecular mechanism by which puerarin treated OSF was potentially associated with the suppression of key factors such as TNF, MMP2, EGFR and MMP9. This involved the inhibition of inflammatory responses, regulation of extracellular matrix degradation, and modulation of cell proliferation, differentiation, and epithelial-mesenchymal transition.

【Keywords】 Puerarin; Oral submucous fibrosis; Bioinformatics; Network pharmacology; Molecular docking; Molecular dynamics simulation; Cell experiments

口腔黏膜下纤维化 (oral submucous fibrosis, OSF) 是一类极具挑战性的口腔黏膜病症, 呈现出慢性隐匿发展的态势, 且存在恶性转化风险^[1-3]。从病理特征来看, OSF 以口腔黏膜下层纤维组织异常增生及胶原过度沉积为主要表现, 随着病情进展, 黏膜弹性逐渐丧失、质地变硬^[4-5]。患病个体常遭受张口困难、口腔疼痛及吞咽障碍等症状困扰, 生活质量急剧下降。据流行病学调查显示, 约 7%~13% 的 OSF 患者可能进展为口腔鳞状细胞癌, 严重威胁其生命健康^[6]。目前, 临床上针对 OSF 的治疗手段相对有限。现有治疗方案多以对症处理为主, 如通过抗炎药物减轻炎症反应, 运用物理治疗手段改善患者张口受限的症状^[7-10]。然而, 上述治疗方法由于未能精准锚定 OSF 的发病根源, 难以逆转纤维化进程, 患者病情反复迁延的情况较为常见。尽管已有研究证实炎症相关通路、氧化应激通路等与 OSF 存在关联^[11], 但具体作用

路径仍不明确。

葛根素 (Puerarin) 作为从豆科植物葛根中分离得到的代表性异黄酮类成分, 具备多元化的药理作用, 在抗炎、抗氧化及免疫调控等多个生物学领域均展现出突出的活性优势^[12-13]。研究发现, 葛根素能够通过多种途径干预纤维化进程, 如抑制成纤维细胞的增殖和活化、减少胶原蛋白等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成与沉积、调节相关信号通路等^[14-16]。网络药理学通过整合“药物-靶点-疾病”网络, 可系统性解析中药多成分、多靶点的作用模式^[17-18]。分子对接与分子动力学模拟则能从原子层面验证药物与靶点的结合活性及构象稳定性^[19-20]。三者与细胞实验联用可构建“虚拟预测-结构验证-体外实证”的完整研究体系。本研究基于该体系, 筛选葛根素干预 OSF 的关键靶点, 明确其表达调控规律, 以期 OSF 的靶向治疗提供新的药物候选及实验依据。

1 资料与方法

1.1 网络药理学、分子对接及分子动力学模拟分析

1.1.1 药物靶点

首先,将葛根素的英文名称“Puerarin”输入 TC MSP 数据库 (https://www.tcmssp-e.com/load_intro.php?id=43) 中,以生物利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为筛选标准,获取葛根素潜在作用靶点。同时,将 mol2 格式的葛根素文件上传至 PharmMapper 在线数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 中,并以结合能 Score ≥ -5.0 kcal/mol 为筛选条件,获取该化合物作用的人类相关靶点。在 Comparative Toxicogenomics Database 数据库 (<https://ctdbase.org/>) 中以“Puerarin”作为关键词补充检索相关靶点,合并上述 3 个数据库结果并去除重复值,最终得到葛根素作用靶点集合。

1.1.2 疾病靶点

针对 OSF 疾病相关靶点的筛选工作可分三步开展。首先,从 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中调取满足靶点关联评分 ≥ 5.0 的候选基因;其次,在 DisGeNet 数据库 (<https://disgenet.com/>) 中以蛋白-疾病关联一致性评分 ≥ 0.4 为阈值进行靶点筛选;最后,整合 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 中收录的所有 OSF 疾病相关靶点。对上述三个数据库所获靶点数据集进行合并后,通过去重处理剔除重复条目,最终得到 OSF 疾病靶点整合列表。

1.1.3 药物与疾病交集靶点

使用 Venny 在线工具 (<https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/example.html>) 获得二者的交集靶点,作为葛根素治疗 OSF 的主要候选靶点。

1.1.4 药物-疾病靶点蛋白质互作网络

将筛选得到的药物-疾病交集靶点上传至 STRING 12.0 在线数据库 (<https://cn.string-db.org/>),在参数设置方面,明确限定物种为智人,并将蛋白互作关系的置信度评分阈值设定为 ≥ 0.7 ,以此为条件构建蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。待网络构建完成后,将所有的网络节点与交互关系数据导出为 TSV 格式文件,用于后续的拓扑结构分析。

1.1.5 药物-疾病靶点的核心网络图

将 TSV 格式的 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件。借助 CytoHubba 插件,应用“degree”拓扑算法对靶点进行排序,以核心靶点用于后续分析和可视化。

1.1.6 基因本体论功能和京都基因与基因组百科全书通路富集分析

核心靶点的基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析依托 DAVID 功能富集分析数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 开展。其中,生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 是 GO 富集分析的三大核心层面内容;统计学显著性判定标准设定为校正后 P 值 < 0.05 。为直观呈现富集分析结果,选取 GO 与 KEGG 富集分析排名前 20 的条目,利用微生信在线可视化平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化图谱绘制。

1.1.7 分子对接

使用 PyMOL 2.5.0 软件对排名前 10 的核心靶蛋白的 3D 结构进行预处理 (如去水分子、修复氨基酸)。从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载葛根素的 2D 结构 (CID: 5280807),经 Open Babel 3.1.1 软件转换为 3D 结构并优化。使用 AutoDock 4.2.6 软件在靶点活性口袋中心执行对接模拟。选择最低结合能的构象,并使用 PyMOL 2.5.0 软件进行可视化。

1.1.8 分子动力学模拟

选取葛根素与 TNF、MMP2、EGFR 及 MMP9 的最优对接复合物,采用 GROMACS 2020.6 软件开展 100 ns 分子动力学模拟。以 GROMOS96 54a7 力场构建系统拓扑,选用 TIP3P 水模型对复合物进行溶剂化处理,将其置于十二面体盒子中。通过添加 0.15 mol/L NaCl 中和系统电荷,随后进行能量最小化处理。依次进行 10 ns NVT 恒温平衡 (300 K, V-rescale 热浴) 与 10 ns NPT 恒压平衡 (1 bar, Parrinello-Rahman 压浴),最终以 2 fs 步长执行生产模拟。模拟过程中每隔 10 ps 保存轨迹文件,采用 GROMACS 2020.6 软件内置工具分析均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、均方根涨落 (root mean

square fluctuation, RMSF)、回转半径(radius of gyration, Rg)、溶剂可及表面积(solvent accessible surface area, SASA)及氢键数量(hydrogen bonds, HBs), 系统评估复合物结合稳定性及构象动态变化。

1.2 实验细胞株和主要试剂

人永生化角质形成细胞(HaCaT, 武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: CL-0090); CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: C0038); Trizol 试剂(上海赛默飞世尔科技公司, 货号: 15596018CN); Master qPCR Mix(北京擎科生物科技有限公司, 货号: TSE201); qRT-PCR 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司, 货号: 2489SHC65); TNF- α 、MMP2、EGFR、MMP9、GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号分别为 17590-1-AP、10373-2-AP、18986-1-AP、10375-2-AP、60004-1-Ig)。

1.3 药品

葛根素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(货号: P111270, 含量 $\geq 98\%$)。

1.4 仪器

荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, QuantStudio 3 型); 高速冷冻离心机(德国 Thermofisher 公司, LYNX6000 型); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司, Mini-PROTEAN Tetra System 型); 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司, FlexStation 3 型); 显影仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, myECL 型)。

1.5 实验验证

1.5.1 细胞培养

HaCaT 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中常规培养。待细胞融合度达 80%~90% 时, 消化传代。

1.5.2 细胞存活率

称取 19.65 mg 葛根素粉末(纯度 $\geq 98.92\%$), 溶于 1 mL DMSO 中配制成 50 mM 母液, 经无菌滤膜过滤后冻存。实验时使用相应培养液稀释至所需浓度, 确保 DMSO 终浓度 $\leq 0.1\%$ 。设置 0 μM 、1 μM 、2 μM 、4 μM 、8 μM 、10 μM 的 6 个葛根素实验组^[14], 每组 3 个复孔。将 HaCaT 细胞(6×10^3 /孔)接种于 96 孔板中。贴壁后, 更换为上述浓度的葛根素培养液干预 24 h。按照 CCK-8 试剂盒说明书步骤, 加入工作液孵育 2 h, 于 450 nm 波长处测定吸光度(optical density, OD)值。

1.5.3 实验分组

依据 CCK-8 结果, 2 μM 、4 μM 、8 μM 的葛根素浓度可用于后续实验的低、中、高剂量梯度设置。实验共分 5 组: 空白组(正常培养液), 模型组(含槟榔碱 50 $\mu\text{g/mL}$ 的培养液^[21]), 葛根素低剂量组(含 2 μM 葛根素、槟榔碱 50 $\mu\text{g/mL}$), 葛根素中剂量组(含 4 μM 葛根素、槟榔碱 50 $\mu\text{g/mL}$), 葛根素高剂量组(含 8 μM 葛根素、槟榔碱 50 $\mu\text{g/mL}$)。所有细胞均处理培养 24 h。

1.5.4 qRT-PCR 实验

提取的 RNA 样本被逆转录合成 cDNA, 使用 SYBR PCR master Mix 进行预变性及循环扩增。所有目的基因的表达均以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

1.5.5 Western blot 实验检测各组细胞中相关蛋白表达水平

收集细胞, 加含 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 离心 15 min 取上清。采用 BCA 法测蛋白浓度后, 按 4 : 1 加 5 倍上样缓冲液, 沸水浴 5 min 变性。使用 10% SDS-PAGE 凝胶, 80 V 恒压电泳 30 min 后调 120V 至溴酚蓝达胶底。

表1 基因引物信息

Table 1. Gene primer information

引物名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	产物长度 (bp)
TNF	CTCATCTACTCCCAGGTCCTTTC	CGATCGCGCTGATGGTGTG	82
MMP2	CCTACACCAAGAACTTTCGTCTG	GTGCCAAGGTCAATGCAGGAG	88
EGFR	ACAGCATAGACGACACCTTCCTC	TGGCCTTGGACACTGGAGACTG	115
MMP9	GGACCAACCACACAACATCCC	GGGCAAAGCGCTCGTCAATC	81
GAPDH	CTTTGGATCGTGAAGGACTC	GTAGAGGGCAGGGATGATGTTTCT	150

PVDF 膜甲醇激活后, 150 mA 恒流湿转 1.5 h。用 5% 脱脂奶室温封闭 1.5 h, 加 TNF- α 一抗 (1:1 000)、MMP2 一抗 (1:800)、EGFR 一抗 (1:3 000)、MMP9 一抗 (1:1 500) 与 GAPDH 一抗 (1:200 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后加二抗 (1:5 000) 室温孵 1 h, 再洗膜。最后, 经 ECL 显影, Image J 定量, 以目的蛋白与内参灰度比得出相对表达量。

1.5.6 统计分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析处理, 计量资料以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。首先对数据进行正态性检验与方差齐性检验, 确认符合参数检验条件后, 多组间整体差异比较采用单因素方差分析。组间两两比较采用 LSD- t 检验, 其中空白组与模型组进行基线差异对比, 模型组与各葛根素剂量组进行干预效果差异分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, 所有统计检验均为双侧检验。

2 结果

2.1 网络药理学、分子对接及分子动力学模拟结果

2.1.1 药物与疾病靶点交集结果

经数据库筛选, 从 TCMSP、PharmMapper 和 Comparative Toxicogenomics Database 分别获得 55、286 和 145 个葛根素靶点, 去重后共得到 400 个唯一的药物靶点。从 GeneCards、DisGeNet 和 OMIM 数据库共检索到 969 个 OSF 疾病靶点。将这两组靶点进行映射, 共筛选出 81 个交集靶点, 见图 1。

2.1.2 蛋白质互作网络

基于 81 个关键交集靶点, 利用 STRING 12.0 数据库构建 PPI 网络。该互作网络由 81 个靶点蛋白作为节点, 蛋白间共存在 987 对有效相互作用关系 (以边的形式呈现), 且网络的平均节点 Degree 值达 24.4, 见图 2。

2.1.3 靶点核心网络图

在 Cytoscape 软件中筛选出 Degree 值排名前 10 位的核心靶点, 分别是 MMP9、ALB、TNF、IL6、AKT1、EGF、PTGS2、EGFR、MYC 和 MMP2, 见图 3。

2.1.4 GO和KEGG分析结果

GO 分析结果显示, 在 BP 层面, 靶点主要富集于细胞群体增殖的正调控、基因表达正调控、

凋亡过程负调控等 (图 4-A); 在 CC 层面, 主要富集于细胞外空间、细胞外区域、细胞外基质等 (图 4-B); 在 MF 层面, 主要富集于同种蛋白结合、细胞因子活性、丝氨酸型内肽酶活性等 (图 4-C)。KEGG 通路富集分析结果表明, 这些靶点与癌症途径、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、AGE-RAGE、HIF-1、MAPK 和 FoxO 等信号通路密切相关 (图 4-D)。

2.1.5 分子对接结果

结果显示, 排名前 10 的核心靶蛋白复合物的结合能均 < -5.0 kJ/mol, 葛根素小分子可成功嵌入靶蛋白的活性口袋内, 并通过形成多个氢键稳定结合构象, 提示葛根素与核心靶点具有较强的结合活性, 见表 2、图 5。

2.1.6 分子动力学模拟结果

RMSD 分析显示, 葛根素与 TNF、MMP2、EGFR 及 MMP9 复合物的 RMSD 值在模拟初期 (约 20 ns 内) 存在一定波动, 随后均趋于平稳, 整体 RMSD 值分别维持在约 0.15~0.30 nm、0.15~0.25 nm、0.25~0.35 nm 和 0.20~0.35 nm 范



图1 葛根素与口腔黏膜下纤维化交集靶点的Venn图
Figure 1. Venn diagram of the intersection target of Puerarin and oral submucous fibrosis

注: Puerarin, 葛根素; OSF, oral submucous fibrosis, 口腔黏膜下纤维化。

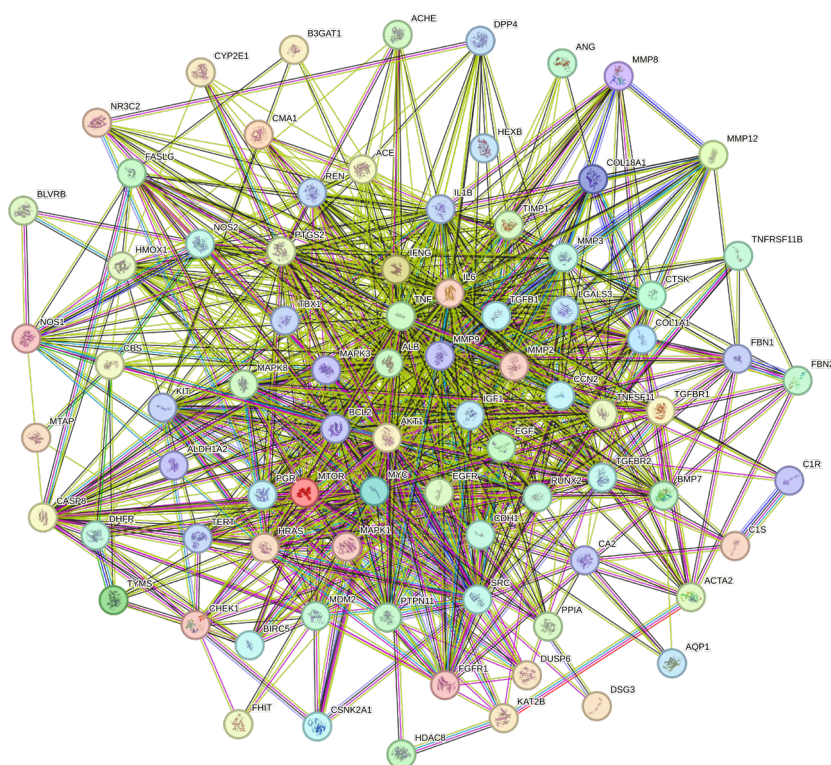


Figure 2. Protein–protein interaction network of the intersection target of Puerarin and oral submucous fibrosis

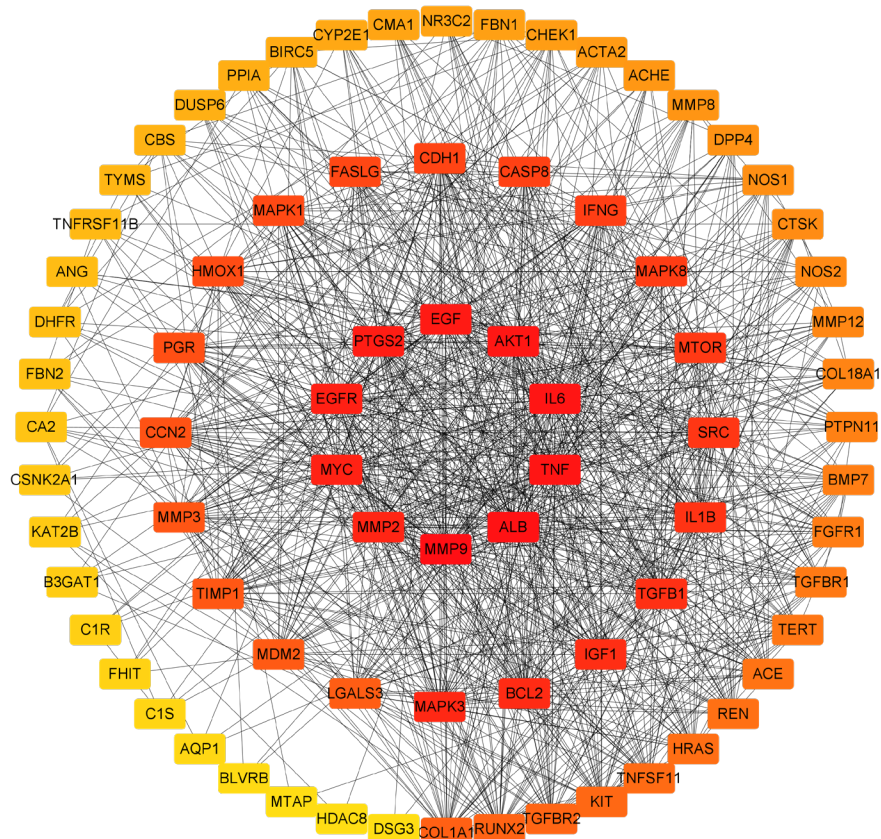


Figure 3. Core network diagram of the intersection target of Puerarin and oral submucous fibrosis

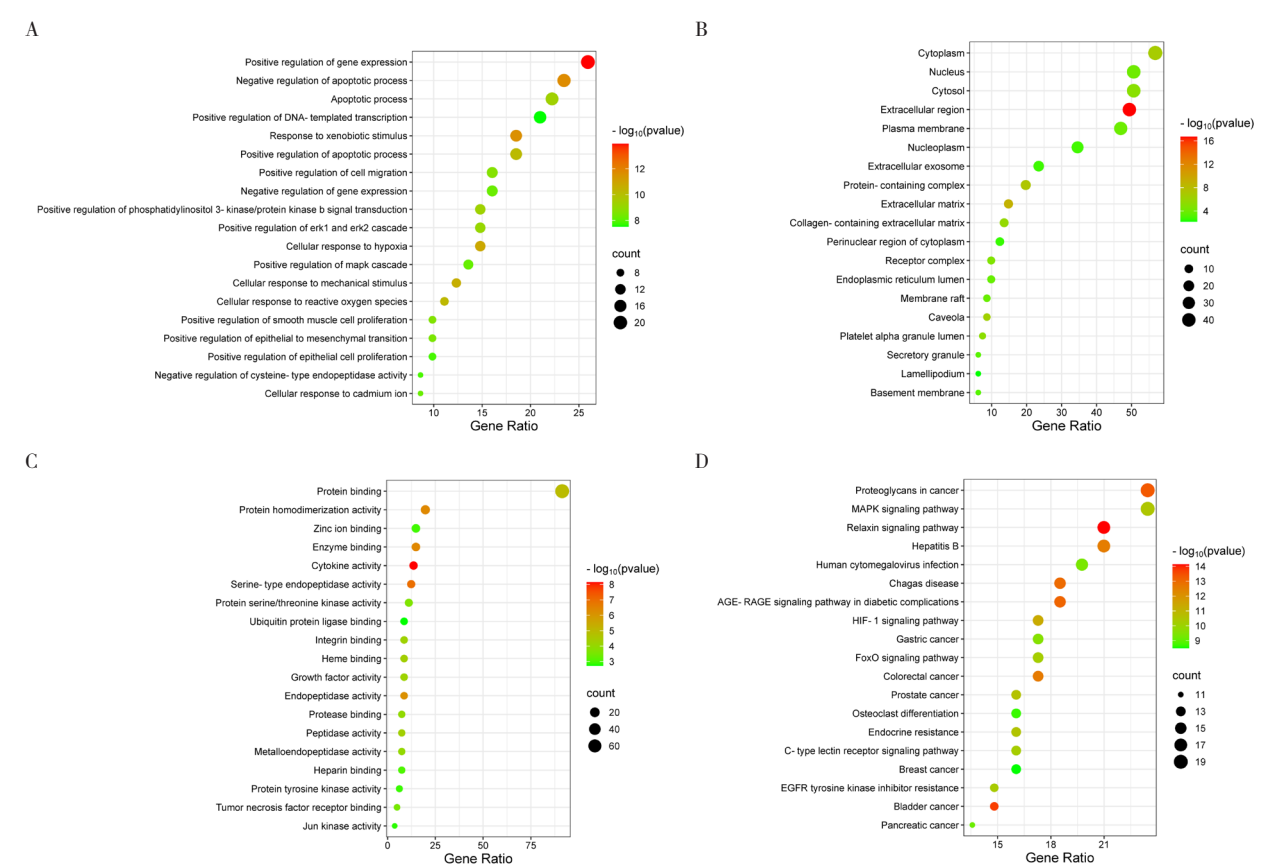


图4 葛根素与口腔黏膜下纤维化交集靶点的基因本体论和京都基因和基因组百科全书富集分析结果
Figure 4. Results of Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis of the intersection target of Puerarin and oral submucous fibrosis
注：A. 生物过程；B. 细胞组分；C. 分子功能；D. 京都基因和基因组百科全书富集分析气泡图。

表2 葛根素与核心靶点的结合能
Table 2. Binding energy of Puerarin to core targets

核心靶点	结合能 (kJ/mol)
TNF	-8.7
MMP2	-8.6
EGFR	-8.5
MMP9	-8.5
ALB	-8.3
MYC	-8.0
PTGS2	-7.9
EGF	-7.0
IL6	-6.7
AKT1	-6.7

围内，表明复合物在模拟后期构象稳定，未发生显著结构漂移（图 6-A）。RMSF 分析表明，TNF、MMP2、EGFR 及 MMP9 蛋白活性口袋关键残基的 RMSF 值普遍低于 0.25 nm，尤其在结合区域残基的柔性显著降低，提示葛根素的结合有效限制了活性口袋局部构象的波动（图 6-B）。Rg 分析显示，4 个蛋白体系的 Rg 值在整个模拟过程中分别稳定在约 1.40~1.55 nm、1.95~2.05 nm、

1.45~1.55 nm 和 1.70~1.80 nm 区间，波动幅度较小，表明葛根素结合后各靶蛋白三级结构紧致性良好，未出现明显松散或伸展现象（图 6-C）。SASA 分析显示，复合物的 SASA 值在模拟过程中分别围绕 80~88 nm²、152~168 nm²、92~100 nm² 和 117~126 nm² 小幅波动，结合后活性口袋区域的 SASA 较结合前普遍降低，表明葛根素的结合减少了活性位点与溶剂的接触（图 6-D）。HBs 统计显示，葛根素与各靶点之间在模拟过程中形成的氢键数量分别在 1~3、1~3、1~4 和 1~4 个范围内动态波动，且在超过 85% 的模拟时间内能稳定维持至少 1~2 个氢键，说明葛根素与靶点之间存在持续且较为稳定的结合相互作用（图 6-E）。

2.2 细胞实验验证结果

2.2.1 细胞存活率

如表 3 所示，与 0 μM 对照组相比，1 μM、2 μM、4 μM、8 μM 浓度的葛根素处理 24 h 对细胞活力无显著影响（P > 0.05）。然而，当浓度

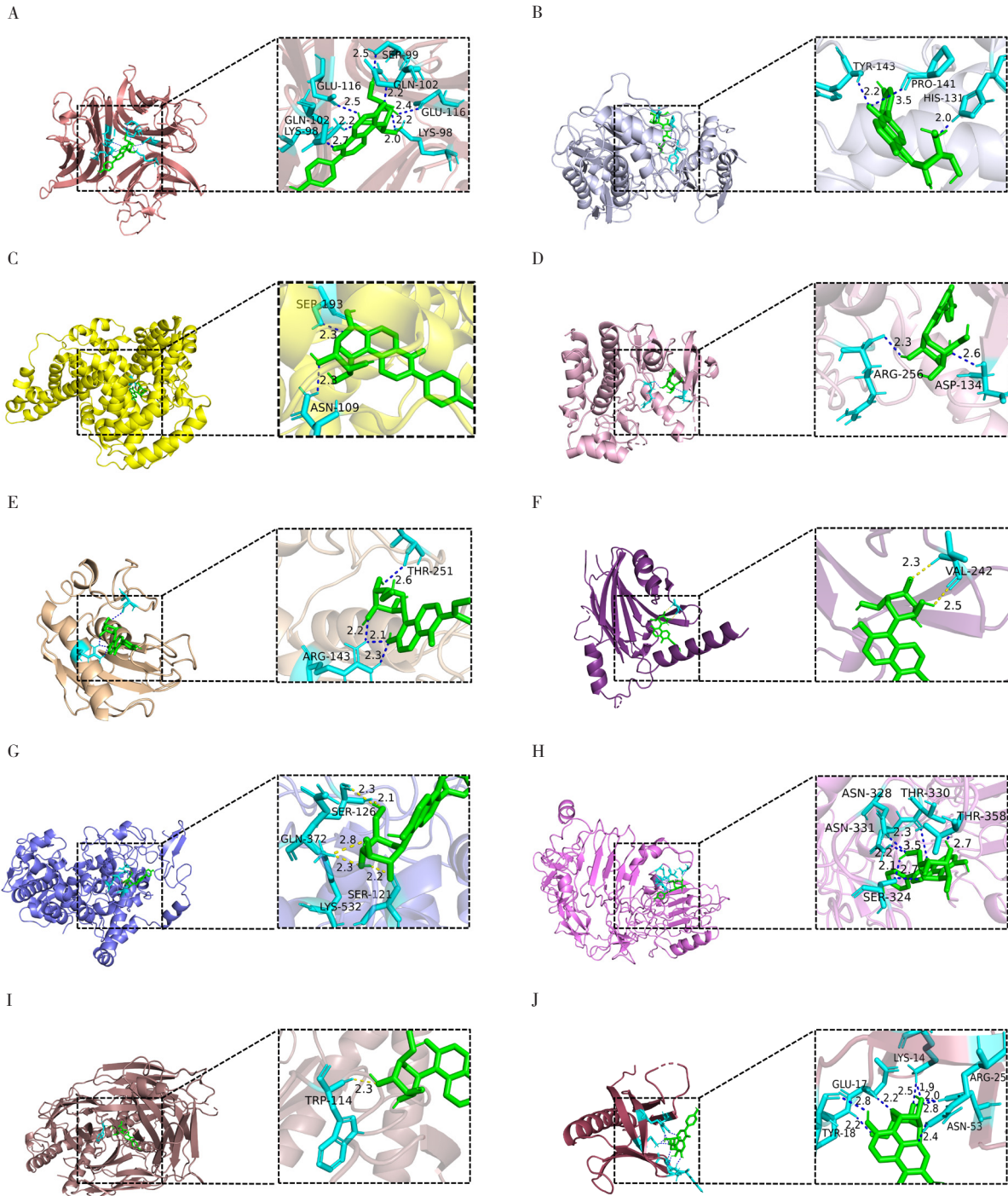


图5 葛根素与核心靶点的分子对接可视化结果

Figure 5. Visualization results of molecular docking between Puerarin and core targets

注：A. 葛根素与TNF；B. 葛根素与MMP2；C. 葛根素与EGFR；D. 葛根素与MMP9；E. 葛根素与ALB；F. 葛根素与MYC；G. 葛根素与PTGS2；H. 葛根素与EGF；I. 葛根素与IL6；J. 葛根素与AKT1。

达 10 μM 时，细胞活力显著下降 ($P < 0.01$)。因此，本研究选择 2 μM 、4 μM 、8 μM 作为后续实验的低、中、高剂量组浓度。

2.2.2 qRT-PCR实验结果

选择分子对接结果中结合能最低的 4 个核

心靶点 (TNF、MMP2、EGFR 和 MMP9) 进行 qRT-PCR 验证。如表 4 所示，与空白组相比，模型组中 4 个靶点的 mRNA 相对表达量均显著升高 ($P < 0.01$)；经葛根素干预后，各剂量组上述指标均显著下调 ($P < 0.05$)，提示葛根素可能通过

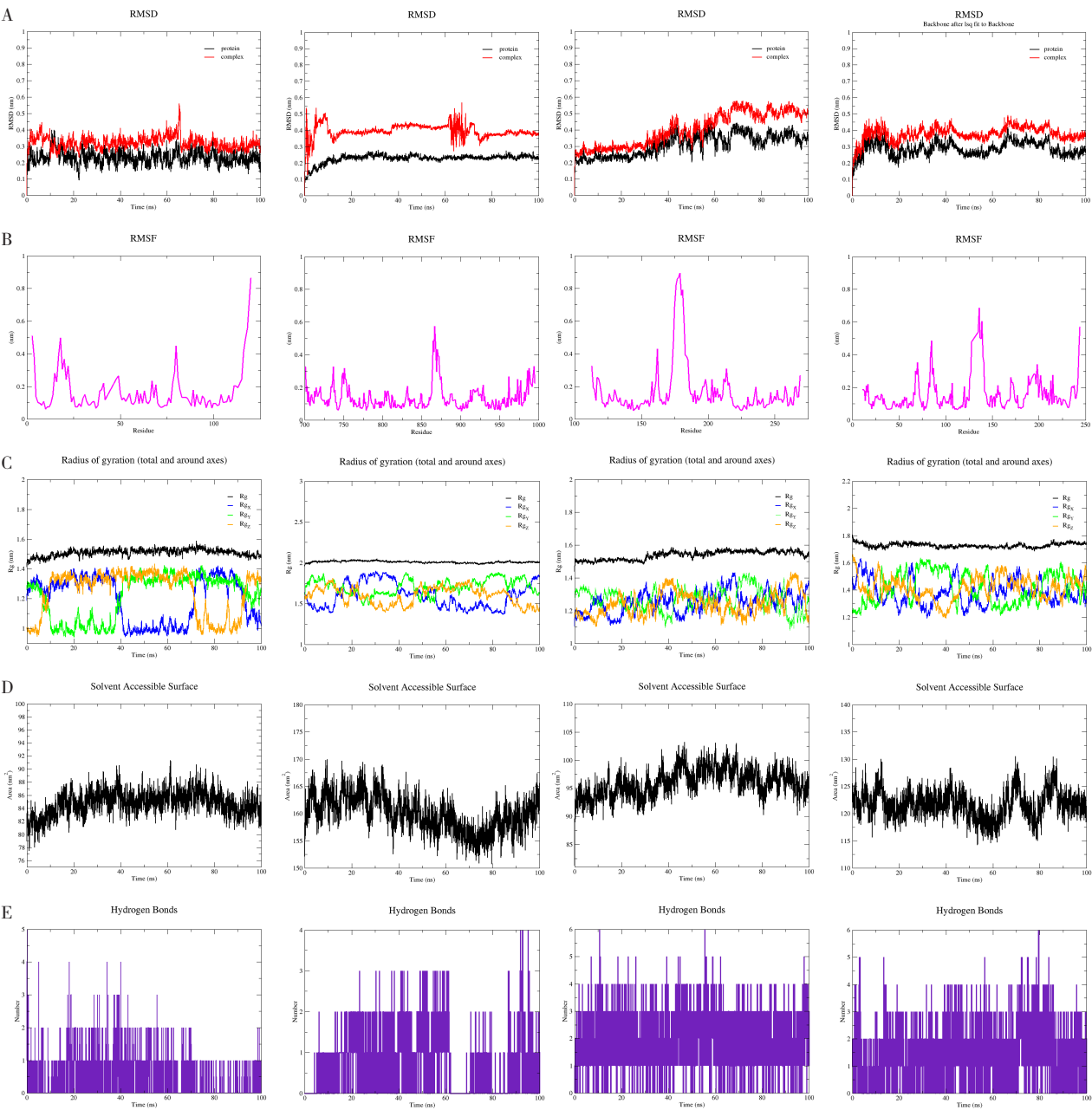


图6 葛根素与核心靶点的分子动力学模拟结果

Figure 6. Molecular dynamics simulation results of Puerarin and core targets

注：A. 葛根素与TNF、MMP2、EGFR及MMP9（从左至右，下同）复合物各RMSD随模拟时间变化图；B. TNF、MMP2、EGFR及MMP9蛋白各氨基酸残基RMSF图；C. TNF、MMP2、EGFR及MMP9蛋白各Rg（总半径及各轴半径）随模拟时间变化图；D. 葛根素与TNF、MMP2、EGFR及MMP9复合物各SASA随模拟时间变化图；E. 葛根素与TNF、MMP2、EGFR及MMP9各结合HBs随模拟时间变化图。

表3 不同浓度葛根素对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)	
Table 3. Effects of different concentrations of Puerarin on cell viability ($\bar{x} \pm s$)	
葛根素浓度 (μM)	细胞存活率 (%)
0	100.00 $\pm$ 0.00
1	100.17 $\pm$ 1.08
2	99.28 $\pm$ 0.68
4	98.67 $\pm$ 0.71
8	98.36 $\pm$ 0.18
10	92.14 $\pm$ 0.19**

注：与0 μM 药物浓度组比较，** $P < 0.01$ 。

抑制这些关键基因的转录来发挥治疗 OSF 的作用。

2.2.3 Western blot实验结果

如图 7、表 5 所示，与空白组相比，模型组中 4 个蛋白的表达量均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，葛根素低、中、高剂量组均能显著降低 TNF- α 、MMP2、EGFR 及 MMP9 蛋白的表达量 ($P < 0.05$)，提示葛根素可能通过抑制这些关键蛋白的表达来发挥治疗 OSF 的作用。

表4 qRT-PCR检测核心靶点的mRNA表达水平 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4. The mRNA expression levels of core targets detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μM)	TNF	MMP2	EGFR	MMP9
空白组	0	1.01 ± 0.04	0.96 ± 0.02	0.84 ± 0.05	1.03 ± 0.04
模型组	0	1.79 ± 0.03 ^{##}	1.57 ± 0.05 ^{##}	1.65 ± 0.07 ^{##}	1.61 ± 0.04 ^{##}
葛根素低剂量组	2	1.53 ± 0.03 ^{**}	1.30 ± 0.03 ^{**}	1.41 ± 0.08 [*]	1.45 ± 0.05 [*]
葛根素中剂量组	4	1.31 ± 0.04 ^{**}	1.24 ± 0.08 ^{**}	1.36 ± 0.03 ^{**}	1.33 ± 0.06 ^{**}
葛根素高剂量组	8	1.23 ± 0.10 ^{**}	1.05 ± 0.03 ^{**}	0.97 ± 0.08 ^{**}	1.09 ± 0.02 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

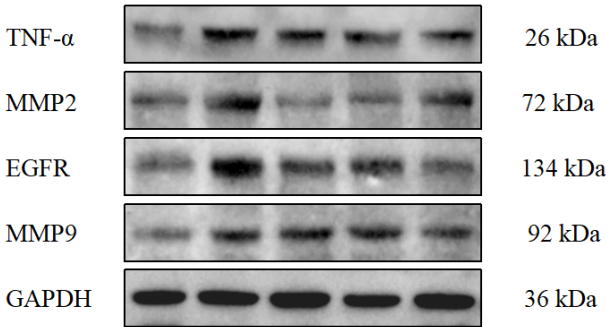


图7 Western blot检测TNF、MMP2、EGFR和MMP9的蛋白表达量
Figure 7. Detection of protein expression levels of TNF, MMP2, EGFR and MMP9 by Western blot

表5 TNF、MMP2、EGFR和MMP9的蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5. Protein expression levels of TNF, MMP2, EGFR and MMP9 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μM)	TNF	MMP2	EGFR	MMP9
空白组	0	1.28 ± 0.07	1.34 ± 0.08	1.35 ± 0.08	1.17 ± 0.06
模型组	0	2.71 ± 0.03 ^{##}	2.53 ± 0.11 ^{##}	3.09 ± 0.07 ^{##}	1.98 ± 0.06 ^{##}
葛根素低剂量组	2	1.81 ± 0.06 ^{**}	1.39 ± 0.08 ^{**}	2.04 ± 0.09 ^{**}	1.82 ± 0.02 [*]
葛根素中剂量组	4	1.46 ± 0.09 ^{**}	1.48 ± 0.15 ^{**}	1.85 ± 0.02 ^{**}	1.79 ± 0.07 [*]
葛根素高剂量组	8	1.38 ± 0.03 ^{**}	1.52 ± 0.02 ^{**}	1.59 ± 0.08 ^{**}	1.45 ± 0.03 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

OSF 作为一种严重影响口腔健康的疾病，其慢性进展特性及潜在癌变风险对患者的身心健康和生活质量构成重大威胁。目前临床治疗手段的局限性凸显了深入探究其发病机制和寻找有效治疗方法的紧迫性。本研究基于生物信息学分析和细胞实验技术对葛根素治疗 OSF 的作用机制进行了系统剖析，以期为该领域研究提供了参考依据。

本研究通过网络药理学筛选出葛根素与 OSF 的交集靶点，其中 TNF、MMP2、EGFR 及 MMP9 等核心靶点在 PPI 网络中占据关键位置。TNF 作为炎症反应的核心介质，其过度表达可加剧 OSF 的纤维化进程^[22]。葛根素可能通过抑制 TNF 的表达，阻断炎症级联反应，从而减轻黏膜损伤^[23]。

MMP2 和 MMP9 在细胞外基质的动态平衡中发挥着关键作用。在 OSF 患者体内，MMP2 和 MMP9 的异常高表达打破了细胞外基质合成与降解的平衡，进而引发口腔黏膜下层纤维组织过度增生和胶原沉积^[24-25]。葛根素可能通过调控 MMP2 和 MMP9 恢复 OSF 中的胶原代谢平衡，从而改善口腔黏膜的纤维化病变。EGFR 在细胞的增殖、分化中发挥关键作用，其异常激活与 OSF 的发生发展密切相关^[26]。葛根素作用于 EGFR 靶点，或许可以精准调节细胞的增殖分化信号通路，纠正 OSF 中细胞的异常增殖和分化状态，从而发挥治疗作用。这些发现与唐智群等关于中药多靶点干预纤维化的研究结果一致^[27]，进一步验证了葛根素的多元功效。

GO 分析结果显示，葛根素治疗 OSF 的靶点显著富集于细胞群体增殖的正调控、凋亡过程负

调控等。在 OSF 的病理进程中,细胞的增殖和凋亡平衡被严重破坏,细胞增殖异常活跃,同时凋亡机制受到抑制,致使纤维组织不断累积,加重了纤维化程度^[28]。葛根素能够调节这些关键生物学过程,推测其可能通过促进细胞凋亡或抑制异常增殖,重新建立细胞增殖和凋亡的平衡,进而有效遏制纤维组织的过度生长。KEGG 通路富集分析显示,葛根素治疗 OSF 与癌症途径、AGE-RAGE、HIF-1 等信号通路密切相关。以 HIF-1 信号通路为例,有研究显示,在 OSF 的发展进程中,HIF-1 的表达上调^[29]。HIF-1 激活一系列涉及多个纤维化相关的下游基因的表达,如促进 VEGF 表达,引发血管生成异常,为纤维化创造有利条件;同时,HIF-1 还能调节成纤维细胞的功能,促使其增殖并分泌大量细胞外基质成分,导致细胞外基质过度沉积,进一步加重纤维化^[30]。葛根素可能通过抑制 HIF-1 α 的表达和活性,抑制下游纤维化相关基因转录,最终缓解 OSF 病情。而与癌症途径的关联则提示,OSF 与癌症在某些分子机制层面存在共性,葛根素对相关靶点和通路的调节作用,不仅有助于缓解 OSF 病情,还可能在降低 OSF 恶性转化风险方面发挥潜在作用,但仍需大量深入研究加以验证。

分子对接及分子动力学模拟为葛根素与核心靶点的相互作用提供了直接的结构生物学证据。结果显示,葛根素与 TNF、MMP2、EGFR 及 MMP9 等核心靶点具有较高的结合活性,结合能均小于 -5.0 kJ/mol。同时,100 ns 分子动力学模拟证实,葛根素可与上述 4 个蛋白形成稳定的复合物结构,并通过限制靶点活性口袋柔性、优化蛋白结构紧致性、维持持久氢键作用及稳定低能量构象等,保障了结合作用的稳定性。体外实验证实,葛根素显著下调了 TNF、MMP2、EGFR、MMP9 的 mRNA 及蛋白表达,与上述预测结果一致。这一发现与冯奕晨^[31]关于槟榔促纤维化机制的研究形成对比,凸显了葛根素的治疗潜力。此外,朱可可等^[32]通过丹玄口康的研究强调了中药复方在 OSF 治疗中的多靶点优势,本研究进一步明确了葛根素单体的作用机制。张妮^[33]的分子对接研究为葛根素与靶点结合提供了补充证据,支持其结合活性。

综上所述,本研究基于生物信息学方法,并通过细胞实验探讨了葛根素治疗 OSF 的复杂分

子机制,涉及多个关键靶点、信号通路及细胞生理过程的改变,并进一步通过体外细胞实验初步验证了核心作用靶点。这些研究结果为进一步理解 OSF 的发病机制提供了重要线索,同时也为开发针对 OSF 的治疗策略和药物靶点提供了参考依据。然而,葛根素在体内的作用是一个复杂的过程,仍有许多问题需要进一步深入研究,如缺乏体内实验及药代动力学数据、各靶点之间的相互作用关系、信号通路的交叉调控机制以及在不同个体中的差异等。未来的研究应致力于进一步阐明这些复杂的机制,以期 OSF 的有效防治提供更具针对性和高效的解决方案,最终改善患者的生活质量并降低 OSF 的疾病负担。

参考文献

- 1 陈灵,杜永秀,徐普,等.口腔黏膜下纤维性变的治疗研究进展[J].河北医药,2024,46(17):2675-2679,2685.[Chen L, Du YX, Xu P, et al. Research progress of the treatment of oral submucosal fibrous[J]. Hebei Medical Journal, 2024, 46(17): 2675-2679, 2685.] DOI: [10.3969/j.issn.1002-7386.2024.17.026](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-7386.2024.17.026).
- 2 Wang M, Duan C, Wei Y, et al. Prevalence of oral submucous fibrosis across diverse populations: a systematic review and meta-analysis[J]. PeerJ, 2024, 12: e18385. DOI: [10.7717/peerj.18385](https://doi.org/10.7717/peerj.18385).
- 3 Pavan Kumar B, Narra P, Vidya Devi V, et al. Prevalence of premalignant conditions and their transformation into oral cancers: a clinical study[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2024, 16(Suppl 3): S2563-S2565. DOI: [10.4103/jpbs.jpbs_1084_23](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_1084_23).
- 4 陈冠君,符晓,冼海瑜,等.133 例口腔黏膜下纤维性变癌变的病理及临床生物学行为研究[J].国际口腔医学杂志,2024,51(5):532-537.[Chen GJ, Fu X, Xian HY, et al. Retrospective study on the pathological and clinical biological behavior of 133 cases of oral squamous cell carcinomas originated from oral submucous fibrosis[J]. International Journal of Stomatology, 2024, 51(5): 532-537.] DOI: [10.7518/gjkq.2024075](https://doi.org/10.7518/gjkq.2024075).
- 5 R K, Chandra A, Raja D, et al. Exploring the role of angiogenesis in fibrosis and malignant transformation in oral submucous fibrosis: a systematic review and meta-analysis[J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2024, 50(5): 243-252. DOI: [10.5125/jkaoms.2024.50.5.243](https://doi.org/10.5125/jkaoms.2024.50.5.243).
- 6 Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: a systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype[J]. Head Neck, 2020, 42(3): 539-555. DOI: [10.1002/hed.26006](https://doi.org/10.1002/hed.26006).
- 7 Chen X, Xie H, Guo J. Drug treatment for oral submucous fibrosis: an update[J]. BMC Oral Health, 2023, 23(1): 748. DOI: [10.1186/s12903-023-03488-9](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03488-9).
- 8 Chitlange NM, Phansopkar P. Physiotherapeutic approach in oral submucous fibrosis: a systematic review[J]. Cureus, 2023, 15(11): e48155. DOI: [10.7759/cureus.48155](https://doi.org/10.7759/cureus.48155).

- 9 Nerkar Rajbhaj A, Kulkarni TM, Shete A, et al. A comparative study to evaluate efficacy of curcumin and aloe vera gel along with oral physiotherapy in the management of oral submucous fibrosis: a randomized clinical trial[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22(S1): 107–112. DOI: [10.31557/APJCP.2021.22.S1.107](https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.S1.107).
- 10 Singh N, Hebbale M, Mhapuskar A, et al. Effectiveness of aloe vera and antioxidant along with physiotherapy in the management of oral submucous fibrosis[J]. *J Contemp Dent Pract*, 2016, 17(1): 78–84. DOI: [10.5005/jp-journals-10024-1806](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1806).
- 11 Rai V, Bose S, Saha S, et al. Evaluation of oxidative stress and the microenvironment in oral submucous fibrosis[J]. *Heliyon*, 2019, 5(4): e01502. DOI: [10.1016/j.heliyon.2019.e01502](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01502).
- 12 Wang J, Ge S, Wang Y, et al. Puerarin alleviates UUO-induced inflammation and fibrosis by regulating the NF- κ B p65/STAT3 and TGF β 1/Smads signaling pathways[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3697–3708. DOI: [10.2147/DDDT.S321879](https://doi.org/10.2147/DDDT.S321879).
- 13 Chang Y, Guo A, Jing Y, et al. Immunomodulatory activity of puerarin in RAW264.7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppression mice[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(2): 223–229. DOI: [10.1080/08923973.2021.1885043](https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1885043).
- 14 Jian J, Wang D, Xiong Y, et al. Puerarin alleviated oxidative stress and ferroptosis during renal fibrosis induced by ischemia/reperfusion injury via TLR4/Nox4 pathway in rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2023, 38: e382523. DOI: [10.1590/ach382523](https://doi.org/10.1590/ach382523).
- 15 Xue Z, Zhao F, Sang X, et al. Combination therapy of tanshinone IIA and puerarin for pulmonary fibrosis via targeting IL6–JAK2–STAT3/STAT1 signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5883–5898. DOI: [10.1002/ptr.7253](https://doi.org/10.1002/ptr.7253).
- 16 Huang GR, Wei SJ, Huang YQ, et al. Mechanism of combined use of vitamin D and puerarin in anti-hepatic fibrosis by regulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(36): 4178–4185. DOI: [10.3748/wjg.v24.i36.4178](https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4178).
- 17 Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116306. DOI: [10.1016/j.jep.2023.116306](https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116306).
- 18 Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682–690. DOI: [10.1038/nchembio.118](https://doi.org/10.1038/nchembio.118).
- 19 Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4331. DOI: [10.3390/ijms20184331](https://doi.org/10.3390/ijms20184331).
- 20 Wang T, Wu MB, Chen ZJ, et al. Fragment-based drug discovery and molecular docking in drug design[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(1): 11–25. DOI: [10.2174/1389201015666141122204532](https://doi.org/10.2174/1389201015666141122204532).
- 21 邹红, 陈双双, 潘世杰, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨三七总皂苷调控铁死亡干预口腔黏膜下纤维化的作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(5): 48–56. [Zou H, Chen SS, Pan SJ, et al. Mechanism of Panax notoginseng saponins in regulating ferroptosis for intervention in oral submucous fibrosis based on network pharmacology and experimental validation[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2024, 40(5): 48–56.] DOI: [10.13412/j.cnki.zyyl.20231120.002](https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20231120.002).
- 22 Abdul Aziz Shaikh S, Denny EC, Kumarchandra R, et al. Evaluation of salivary tumor necrosis factor α as a diagnostic biomarker in oral submucosal fibrosis and squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a cross-sectional observational study[J]. *Front Oral Health*, 2024, 5: 1375162. DOI: [10.3389/froh.2024.1375162](https://doi.org/10.3389/froh.2024.1375162).
- 23 Xie SF, Xie H, Guo JC, et al. Puerarin mediated miR–30b–5p targeting fibroblast activation protein against oral submucous fibrosis[J]. *Biocell*, 2024, 48(4): 591–599. DOI: [10.32604/biocell.2024.046691](https://doi.org/10.32604/biocell.2024.046691).
- 24 Shrestha A, Carnelio S. Evaluation of matrix metalloproteinases–2 (MMP–2) and tissue inhibitors of metalloproteinases–2 (TIMP–2) in oral submucous fibrosis and their correlation with disease severity[J]. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*, 2013, 11(44): 274–281. DOI: [10.3126/kumj.v11i4.12521](https://doi.org/10.3126/kumj.v11i4.12521).
- 25 Venugopal A, Uma Maheswari TN. Expression of matrix metalloproteinase–9 in oral potentially malignant disorders: a systematic review[J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2016, 20(3): 474–479. DOI: [10.4103/0973-029X.190951](https://doi.org/10.4103/0973-029X.190951).
- 26 Jyothi Meka N, Ugrappa S, Velpula N, et al. Quantitative immunoexpression of EGFR in oral potentially malignant disorders: oral leukoplakia and oral submucous fibrosis[J]. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2015, 9(3): 166–174. DOI: [10.15171/joddd.2015.031](https://doi.org/10.15171/joddd.2015.031).
- 27 唐智群, 鲍喆焯, 聂敏. 红花–牛膝治疗口腔黏膜下纤维化作用机制的网络药理学分析[J]. *药学研究*, 2024, 43(3): 220–226. [Tang ZQ, Bao ZX, Nie M. Analysis of the mechanism of safflower–achyranthes bidentata treating oral submucous fibrosis based on network pharmacology[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2024, 43(3): 220–226.] DOI: [10.13506/j.cnki.jpr.2024.03.003](https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2024.03.003).
- 28 Zhu B, Jiang Q, Que G, et al. Role of autophagy and apoptosis in atrophic epithelium in oral submucous fibrosis[J]. *J Oral Sci*, 2020, 62(2): 184–188. DOI: [10.2334/josnurd.19-0170](https://doi.org/10.2334/josnurd.19-0170).
- 29 张琳, 谭劲, 刘一平, 等. 姜黄素通过调控 HIF–1 α /miR–760/LTBP2 机制抑制口腔黏膜下纤维化的效果研究[J]. *中医药导报*, 2024, 30(1): 1–4. [Zhang L, Tan J, Liu YP, et al. Effect of Curcumin on inhibiting oral submucosal fibrosis by regulating HIF–1 α /miR–760/LTBP2 axis[J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2024, 30(1): 1–4.] DOI: [10.13862/j.cn43-1446/r.2024.01.001](https://doi.org/10.13862/j.cn43-1446/r.2024.01.001).
- 30 Hande AH, Chaudhary MS, Gadail AR, et al. Significance of HIF–1 α and CD105 in establishing oral squamous cell carcinoma associated with oral submucous fibrosis a distinct clinicopathological entity[J]. *J Cancer Res Ther*, 2022, 18(1): 33–41. DOI: [10.4103/jcr.JCRT_591_20](https://doi.org/10.4103/jcr.JCRT_591_20).
- 31 冯奕晨. 基于网络药理学分析探讨槟榔促进口腔黏膜下纤维化的活性成分及其潜在分子作用机制[J]. *中国医学工程*, 2023, 31(9): 9–14. [Feng YC. Active components of Areca catechu promoting oral submucous fibrosis and its potential molecular

- mechanism based on network pharmacological analysis[J]. China Medical Engineering, 2023, 31(9): 9–14.] DOI: [10.19338/j.issn.1672-2019.2023.09.002](https://doi.org/10.19338/j.issn.1672-2019.2023.09.002).
- 32 朱可可, 周蓉, 王志豪, 等. 基于网络药理学和实验探讨丹玄口康治疗口腔黏膜下纤维化作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1485–1492. [Zhu KK, Zhou R, Wang ZH, et al. Mechanism of Danxuankoukang in treating oral submucosal fibrosis based on network pharmacology and experiment[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2022, 42(9): 1485–1492.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.011).
- 33 张妮. 复方丹参滴丸治疗口腔黏膜下纤维化的作用机制的网络药理学分析及分子对接研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021. [Zhang N. Network pharmacology analysis and molecular docking study on the mechanism of Compound Danshen Dripping Pills in the treatment of oral submucosal fibrosis[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021.] DOI: [10.27288/d.cnki.gsxyu.2021.000962](https://doi.org/10.27288/d.cnki.gsxyu.2021.000962).

收稿日期: 2025 年 04 月 07 日 修回日期: 2026 年 01 月 01 日
本文编辑: 张 苗 黄 笛

引用本文: 鲁汝清, 郭盛, 彭佳梅, 等. 基于生物信息学方法和细胞实验探讨葛根素治疗口腔黏膜下纤维化的潜在作用路径[J]. 数理医药学杂志, 2026, 39(1): 45–57. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202504030](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202504030).
Lu RQ, Guo S, Peng JM, et al. Exploring the potential pathway of puerarin in the treatment of oral submucous fibrosis based on bioinformatics methods and cell experiments[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2026, 39(1): 45–57. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202504030](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202504030).