

本文引用: 曾繁佐, 欧阳银, 陈博威, 刘镇奎, 易健, 刘英飞, 田丰铭, 宁晚玲, 杨璐宁, 刘柏炎. 基于网络毒理学及实验验证探讨槟榔对口腔黏膜下纤维化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(8): 1448-1458.

基于网络毒理学及实验验证探讨槟榔对 口腔黏膜下纤维化的影响

曾繁佐¹, 欧阳银¹, 陈博威¹, 刘镇奎², 易健¹, 刘英飞¹, 田丰铭¹, 宁晚玲¹,
杨璐宁¹, 刘柏炎^{3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 3. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

[摘要] **目的** 基于网络毒理学方法和体内实验验证探讨槟榔对口腔黏膜下纤维化的影响及作用机制。**方法** 通过 TCSMP 和 Swiss 数据库筛选槟榔潜在活性成分对应靶点, 利用 GeneCards、Disgenet 数据库得到口腔黏膜下纤维化(oral submucosal fibrosis, OSF)疾病相关靶点。将交集靶点上传至 STRING 数据平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 再采用 Metascape 数据平台进行基因本体(gene ontology, GO)功能和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。采用槟榔水提取液低、中、高浓度干预大鼠口腔黏膜, 大鼠开口度、病理形态学、免疫组织化学等检测对网络毒理学结果进行验证。**结果** 网络毒理学结果表明槟榔 52 个成分中含有 587 个相关靶点, OSF 相关靶点 761 个, 二者交集靶点 72 个。PPI 网络分析结果显示, 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、细胞凋亡调节因子 Bcl-2(apoptosis regulator Bcl-2, BCL2)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞肿瘤抗原 p53(cellular tumor antigen p53, TP53)可能是槟榔影响 OSF 的关键靶点。KEGG 通路富集分析获得 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、松驰素信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。动物实验结果显示, 中、高剂量组开口度值较对照组、低剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$), HE 染色、Masson 染色表明中、高剂量组出现不同程度的纤维化病变, 免疫组织化学结果提示槟榔水提取液上调 IL-6、TNF- α 等炎症因子, 且呈一定的剂量相关性。**结论** 槟榔可能通过上调 IL-6、TNF- α 等关键炎症因子以介导炎症反应诱导口腔黏膜下纤维化的发生。

[关键词] 槟榔; 口腔黏膜下纤维化; 网络毒理学; 实验验证; 炎症反应; 病理形态学

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.08.014

Effects of betel nut on oral submucosal fibrosis based on network toxicology and experimental verification

ZENG Fanzuo¹, OUYANG Yin¹, CHEN Bowei¹, LIU Zhenkui², YI Jian¹, LIU Yingfei¹, TIAN Fengming¹,
NING Wanling¹, YANG Luning¹, LIU Baiyan^{3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Liaoning University of Chinese Medicine,
Shenyang, Liaoning 110847, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of betel nut on oral submucosal fibrosis (OSF) and its mechanism of action based on network toxicology and in vivo experimental verification. **Methods** Targets corresponding to the potential active ingredients of betel nut were screened through TCSMP and Swiss databases, and OSF-related targets were obtained using

[收稿日期] 2024-04-15

[基金项目] 横向课题: 槟榔及其成分靶向对口腔黏膜安全性评价。

[通信作者] * 刘柏炎, 男, 博士, 二级教授, 博士研究生导师, E-mail: liubaiyan@126.com。

GeneCards and Disgenet databases. The intersection targets were uploaded to the String data platform to construct a protein-protein interaction (PPI) network, and then the Metascape data platform was used to perform gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. The oral mucosa of rats was treated with the aqueous extract of betel nut at low, medium, and high concentrations respectively, and the results of network toxicology were verified by the measurement of mouth opening degree, pathomorphological examination, and immunohistochemical analysis in the rats. **Results** The network toxicology analysis showed that there were 587 related targets in the 52 ingredients of betel nut and 761 OSF-related targets, of which there were 72 intersection targets. PPI network analysis indicated that interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), apoptosis regulator Bcl-2 (BCL2), epidermal growth factor receptor (EGFR), and cellular tumor antigen p53 (TP53) may be the key targets of betel nut affecting OSF. PI3K-Akt, AGE-RAGE, and relaxin signaling pathways, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and other signaling pathways were obtained by KEGG pathway enrichment analysis. The animal experiments showed that the mouth opening degrees of the medium- and high-dose groups were significantly different from those of the control group and low-dose group ($P < 0.05$). HE staining and Masson staining showed that the medium- and high-dose groups had different degrees of fibrotic lesions. Immunohistochemical analysis suggested that the aqueous extract of betel nut upregulated the levels of inflammatory factors such as IL-6 and TNF- α , and this upregulation exhibited a certain dose-dependent relationship. **Conclusion** Betel nut may induce OSF by upregulating key inflammatory factors such as IL-6 and TNF- α , thereby mediating the inflammatory response.

[**Keywords**] betel nut; oral submucosal fibrosis; network toxicology; experimental verification; inflammatory response; pathomorphology

槟榔是棕榈科常绿乔木植物槟榔的成熟种子,作为传统中药使用历史悠久,首载于 1 700 年前晋代的《药录》,具有杀虫消积、行水降气、截疟的功效,用于治疗绦虫病、蛔虫病、姜片虫病、虫积腹痛、积滞泻痢、里急后重、水肿脚气、疟疾等疾病^[1]。现代药理研究亦表明,槟榔具有驱虫杀虫^[2-3]、促胃肠运动^[4-5]、降脂^[6]、抗抑郁^[7]、抗病毒^[8]等多种作用,在治疗疾病方面有巨大的治疗潜力。但流行病学研究显示,咀嚼槟榔是导致口腔黏膜下纤维化(oral submucosal fibrosis, OSF)的关键因素之一^[9-11]。

OSF 是一种具有慢性进展性、癌变倾向性的口腔黏膜疾病,以口腔硬化、张口受限为临床特征。有关 OSF 确切的发病机制仍不清楚,基因、自身免疫、营养和环境在内的各种因素都与 OSF 的发生发展密切相关^[12],目前主流观点认为咀嚼槟榔是发病的主要病因^[9-11,13],既往研究通过单体活性成分实验证实,槟榔中的槟榔碱、槟榔次碱、去甲槟榔碱、去甲槟榔次碱等生物碱是其主要致病因素^[14-15],但槟榔活性成分较为复杂,OSF 是否仅受以上 4 种成分影响,及其具体作用机制仍不明晰。因此,明确槟榔是如何诱导 OSF 具有重要现实意义。

网络毒理学是源于网络药理学的一种方法,通过结合系统生物学对药物进行毒理分析和预测。目前并未有研究发现网络毒理学具有特有的毒理学靶点,因本身源于网络药理学发展而来,故研究思路与网络药理学大致相通^[16]。本研究通过药物成分、疾病、

靶标、基因等数据库,利用可视化分析软件构建槟榔的潜在活性成分、相关靶点、疾病与通路相互作用网络,并进一步通过动物实验进行验证,以阐明槟榔与 OSF 之间的作用关系。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,6~8 周龄,体质量(200 $\pm$ 25) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号 SCXK (湘)2018-0008]。实验动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房。动物饲养室温度为 20~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50%~60%,人工照明在明暗之间交替使用(12 h 光照/12 h 黑暗),自由进食饮水。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号:ZYFY20230701-001)。

1.2 药品与试剂

槟榔购自湖南省面某著名名牌(生产许可证号:SC13143030600055、批号:20230801),并制备成不同浓度的槟榔水提取液。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体(50 μL ,批号:DF6078)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体(50 μL ,批号:TF7014)均购自美国 Affinity 公司。

1.3 仪器

病理组织漂白干燥机(中国派斯杰公司,型号:PH60);组织脱水机(型号:STP-120)、包埋机(型号:

HistoStar)、染色机(型号:Gemini AS)均购自美国赛默飞公司;智能组织切片成像系统(美国 Perkin Elmer, 型号 Vectra3)。

2 方法

2.1 网络毒理学研究

2.1.1 槟榔的活性成分筛选及潜在作用靶点收集 通过 TCSPMP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com.hnucm.opac.vip/tcmsp.php>)检索槟榔活性成分,根据外用药物吸收特点^[17],筛选相对分子量 ≤ 500 的活性成分,不采取将类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为纳入条件,因为如槟榔碱 DL 值为 0.03,依然具有良好的生物学活性。通过 SwissTarget Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对槟榔中所得到的 52 个化合物进行靶点收集,同时通过中国知网、PubMed 等对上述化合物进行靶点补充。将可能性(Probability)设置为大于 0,删除重复值后得到槟榔潜在靶点信息。

2.1.2 OSF 潜在靶点的获取 分别在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)数据、Disgenet 数据库(<https://www.disgenet.org/>)以“Oral submucous fibrosis”为关键词收集 OSF 靶点信息,取两者靶点信息的并集为最终靶点信息。

2.1.3 筛选共同靶点 将活性成分与疾病获得的相关靶点输入 Venn 数据库(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)在线平台,得到交集靶点,绘制 Venn 图。

2.1.4 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图 在 STRING 平台(<https://cn.string-db.org.hnucm.opac.vip/>)导入潜在作用靶点信息,限定物种“Homo sapiens”,选择中等置信度 0.400,隐藏游离节点,得到潜在靶点蛋白相互作用关系,导出 csv 格式文件,运用 cytoscape 3.10.0 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein protein interaction, PPI)网络图,并进行拓扑学分析。

2.1.5 GO 功能和京都基因与 KEGG 通路富集分析 将筛选得到的药物与疾病的交集靶点导入 Metascape 数据库(<http://metascape.org>),设置物种为“Homo sapiens”,进行基因本体(gene ontology, GO)功能和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,通过微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制气泡图。并利用 cytoscape3.10.0 软件进行活性成分-靶点-通路网络图的构建。

2.2 动物实验验证

2.2.1 槟榔水提取液制备 槟榔经浸泡、煎煮、过滤

后,继续加水煎煮过滤一次,两次所得的滤液经过合并后,用旋转蒸发仪浓缩得到提取液的原液,即高剂量槟榔水提取液($12.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),用蒸馏水分别以 10、100 倍稀释成中剂量槟榔水提取液($1.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低剂量槟榔水提取液($0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),过滤除菌,分装保存于 -20°C 冰箱备用。

2.2.2 实验分组与干预 槟榔水提取液低、中、高剂量设计方案,参考各地文献报道及白皮书报道^[18],拟定摄入 7 g 槟榔为低剂量(轻度成瘾者),摄入 70 g 槟榔为中剂量(中度成瘾者),摄入 700 g 槟榔为高剂量(重度成瘾者)。按 70 kg 成人与 200 g 大鼠初始体重药量折算表换算,低、中、高剂量分别设为 $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

随机将 24 只 SD 大鼠分为对照组、低剂量组($0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中剂量组($1.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高剂量组($12.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。除对照组蘸取生理盐水外,其他各组采用医用棉签蘸取不同浓度的槟榔水提取液涂擦大鼠左侧口腔黏膜 30 s,每天处理 1 次,干预后禁食禁水 2 h,持续 16 周。

2.2.3 观察指标 (1)大鼠一般情况观察:实验过程中每天观察大鼠口腔黏膜变化、精神、毛色改变、进食进水等情况;每月测量大鼠体质量。(2)口腔情况:黏膜色泽,黏膜损伤与否(斑块、溃疡或肿物),纤维条索情况,口腔开口度测量(戊巴比妥麻醉大鼠后使用弹簧测力计对上下牙施加开口拉力,上下各 2 N,并使用游标卡尺测量上下颌切牙切段距离为被动开口度,每只重复测量 3 次取平均值,精确至 0.02 mm)^[19]。(3)组织病理形态学检测:戊巴比妥麻醉大鼠后,取左侧颊黏膜置于 4%多聚甲醛中浸泡、固定,经过脱水、透明、包埋、切片等流程后,进行 HE 染色、Masson 染色及免疫组织化学染色,在光镜下观察大鼠口腔黏膜上皮的形态变化并使用 ImageJ 软件计算平均光密度得到 IL-6、TNF- α 炎症因子的表达值。

2.2.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槟榔活性成分的获取

通过 TCSPMP 数据库检索,得到槟榔有效成分 52 个,根据分子量 ≤ 500 进行筛选,获得槟榔的潜在活性成分 52 个(表 1)。

3.2 成分靶点、疾病靶点以及共同作用靶点的筛选 将潜在活性成分导入 Swiss 数据库得到作用靶

表 1 槟榔的潜在活性成分
Table 1 The potential active constituents of betel nut

序号	TCSMP 编号	活性成分	分子量	OB	DL
1	MOL010481	4,4'-二氯二苯砜 (4,4'-dichlorodiphenyl sulfone)	287.2	70.57	0.10
2	MOL010482	苯-1,2-二羧酸二己酯 (dihexyl phthalate)	334.5	43.74	0.24
3	MOL010483	脱氢乙酸 (dehydroacetic acid)	168.2	52.02	0.04
4	MOL010484	己二酸二异辛酯 (diisooctyl adipate)	370.6	29.15	0.31
5	MOL010485	二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid)	302.5	45.66	0.21
6	MOL010486	糠酸乙酯 (ethyl furoate)	140.2	29.09	0.02
7	MOL010487	去甲槟榔碱 (guvacoline)	141.2	32.67	0.02
8	MOL010488	顺式-10-十七烯酸 (10Z-heptadecenoic acid)	268.5	34.42	0.12
9	MOL010489	白西尼多 (resivit)	306.3	30.84	0.27
10	MOL010490	1,3-双 (3-苯氧基苯氧基)苯 [m-bis(m-phenoxyphenoxy)benzene]	446.5	20.95	0.94
11	MOL010491	原花青素 A1 (procyanidin A1)	576.5	15.07	0.40
12	MOL010492	槟榔碱 (arekolin)	155.2	40.70	0.03
13	MOL000012	花生四烯酸 (arachic acid)	312.6	16.66	0.19
14	MOL000131	亚油酸 (linoleic acid)	280.5	41.90	0.14
15	MOL001385	9-氧代壬酸 (9-oxononanoic acid)	172.3	19.60	0.03
16	MOL001393	肉豆蔻酸 (myristic acid)	228.4	21.18	0.07
17	MOL001396	十五烷酸 (pentadecanoic acid)	242.5	20.18	0.08
18	MOL001399	二十二烷 (docosane)	310.7	8.37	0.18
19	MOL001501	十七烷酸 (daturic acid)	270.5	18.51	0.12
20	MOL001739	棕榈油酸 (zoomaric acid)	254.5	35.78	0.10
21	MOL001749	双[(2R)-2-乙基己基]苯-1,2-二羧酸酯 bis[(2R)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-di-carboxylate	390.6	43.59	0.35
22	MOL000197	月桂烯 (myrcene)	136.3	24.96	0.02
23	MOL000198	(R)-芳樟醇 [(R)-linalool]	154.3	39.80	0.02
24	MOL001993	二十三烷酸 (tricosanoic acid)	354.7	15.29	0.30
25	MOL002032	邻苯二甲酸二正辛酯 (dioctyl phthalate)	390.6	40.59	0.40
26	MOL002095	邻苯二甲酸二甲酯 (diethyl phthalate)	222.3	52.19	0.07
27	MOL000234	L-柠檬烯 (L-limonen)	136.3	38.09	0.02
28	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-六甲基四二十碳-2,6,10,14,18,22-己烯 [(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene]	410.8	33.55	0.42
29	MOL002850	丁基化羟基甲苯 (butylated hydroxytoluene)	220.4	40.02	0.07
30	MOL000301	2-月桂酸 (2-lauroleic acid)	198.3	31.42	0.04
31	MOL000305	月桂酸 (lauric acid)	200.4	23.59	0.04
32	MOL003484	菲 (phenanthrene)	178.2	25.70	0.10
33	MOL003505	(2-丁烯亚基)乙酸 (panosorb)	112.1	30.82	0.01
34	MOL000399	二十二烷酸 (docosanoate)	340.7	15.69	0.26
35	MOL000004	原花青素 B1 (procyanidin B1)	578.6	67.87	0.66
36	MOL000041	L-苯基丙氨酸 ((2S)-2-azaniumyl-3-phenylpropanoate)	165.2	41.62	0.04
37	MOL004365	异薄荷醇 (isomenthol)	156.3	55.30	0.03
38	MOL004454	(10-反式,12-顺式) 共轭亚油酸 ((10E,12Z)-octadeca-10,12-dienoic acid)	280.5	41.70	0.14
39	MOL004647	十三烷酸 (tridecanoic acid)	214.4	22.32	0.05
40	MOL000555	高乳黄铜碱 (homoarecoline)	169.3	52.03	0.03
41	MOL005833	槟榔次碱 (arecaine)	141.2	84.34	0.02
42	MOL005835	去甲槟榔次碱 (guvacine)	127.2	98.35	0.02
43	MOL005838	异去甲槟榔次碱 (isoguvacine)	127.2	72.17	0.02

表 1(续)

序号	TCSMP 编号	活性成分	分子量	OB	DL
44	MOL000635	香兰素 (vanillin)	152.2	52	0.03
45	MOL000663	木蜡酸 (lignoceric acid)	368.7	14.90	0.33
46	MOL000675	油酸 (oleic acid)	282.5	33.13	0.14
47	MOL000676	邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate)	278.4	64.54	0.13
48	MOL000069	棕榈酸 (palmitic acid)	256.5	19.30	0.10
49	MOL000073	表儿茶素 (ent-epicatechin)	290.3	48.96	0.24
50	MOL000813	α -D-吡喃甘露糖 (alpha-D-mannopyranose)	180.2	20.71	0.04
51	MOL000860	硬脂酸 (stearic acid)	284.5	17.83	0.14
52	MOL000869	正二十二烷 (heneicosane)	296.7	8.41	0.15

点,筛选并去除重复值后,得到槟榔活性成分靶点 587 个,依据 GeneCards 和 Disgenet 数据库中对 OSF 进行靶点检索,经过数据筛选、合并及去除重复值后,得到 761 个靶点,之后将槟榔活性成分靶点与 OSF 相关靶点输入 Venny2.1 取交集(图 1),得到 72 个共同作用靶点,作为槟榔影响 OSF 的潜在靶点。

3.3 PPI 网络图的构建

将槟榔 52 个活性成分和 OSF 交集靶点导入 STRING 数据库中进行 PPI 分析,去除未参与 PPI 的游离靶点,从而得到 72 个靶点构成的 PPI 网络。将得到的数据导入 Cytoscape 3.10.0 软件中进行可视化处理及拓扑分析,如图 2 所示。以节点表示共

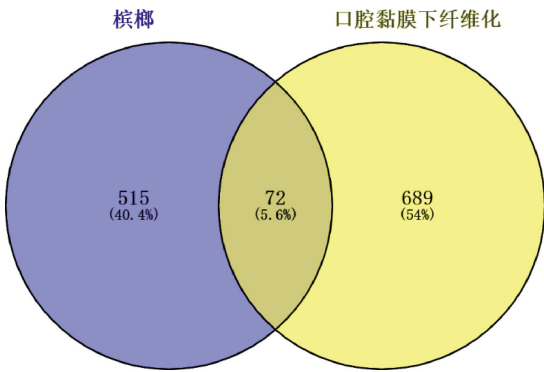


图 1 槟榔活性成分靶点与疾病靶点的 venn 图
Fig.1 Venn diagram of active ingredient target and disease target of betel nut

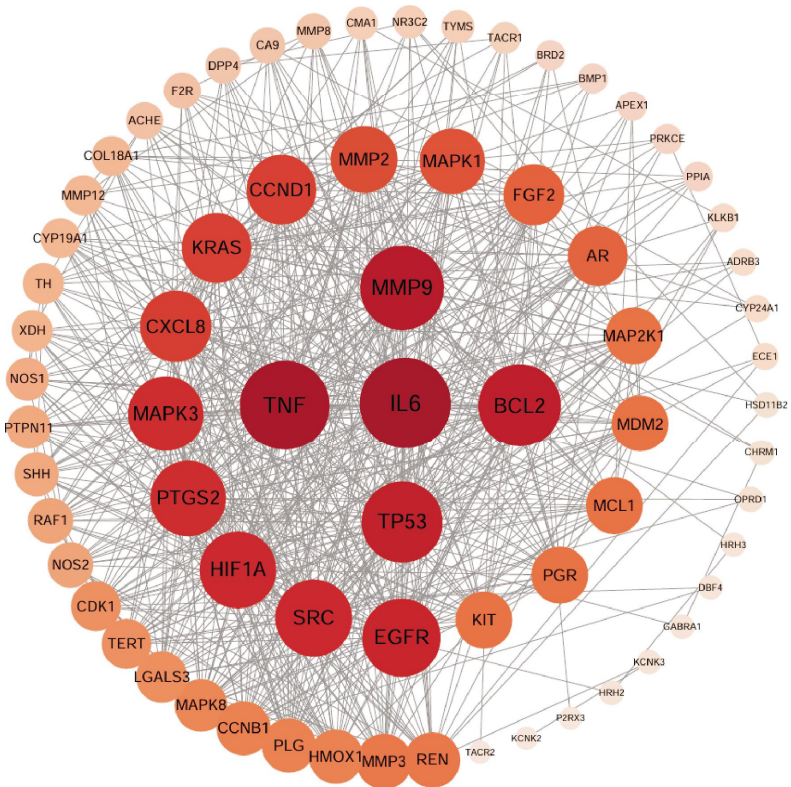


图 2 活性成分与疾病交集靶点的 PPI 网络图
Fig.2 PPI network diagram of active ingredients and disease intersection targets

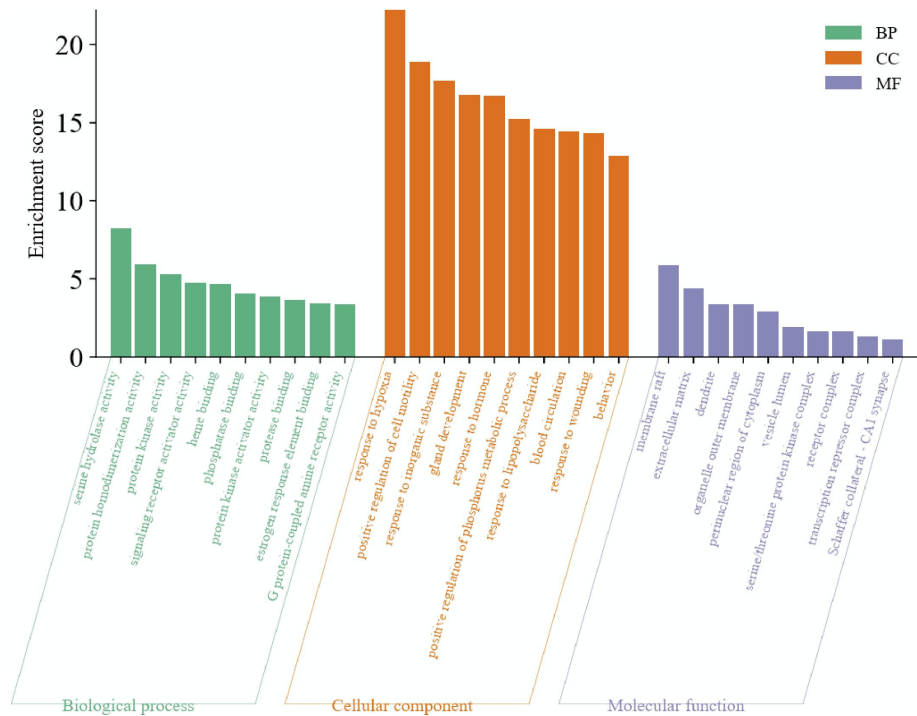


图 3 GO 功能富集分析

Fig.3 GO functional enrichment analysis

同作用靶点,每条边代表节点之间的相互作用关系,并以节点大小对应度值大小以反映节点的重要性,节点越大则表示其在该网络中越重要。拓扑分析显示交集靶点中 IL-6、MMP-9、TP53、TNF、BCL2、EGFR 等可能是关键的核心靶点。

3.4 GO 功能和 KEGG 富集分析

将交集靶点导入 Metascape 数据库中进行 GO 功能富集分析($P<0.01$),主要包括生物过程、细胞组分和分子功能分析,如图 3 所示。生物过程(biological process, BP)相关条目 3 908 条,主要涉及缺氧反应、细胞运动的正向调节、磷代谢过程的正向调节、蛋白质转运的调节等方面;细胞组分(cellular component, CC)相关条目 324 条,主要涉及膜筏、细胞外基质、细胞器外膜、细胞质核周区等方面,分子功能(molecular function, MF)相关条目 542 条,主要涉及各类蛋白结合、酶类活性、受体活化等方面。进一步进行 KEGG 通路富集分析,并根据 P 值的大小和富集基因数目筛选,如图 4 所示,主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等方面。

3.5 成分-靶点-通路网络图的构建

如图 5 所示,根据 KEGG 通路富集分析结果从而构建槟榔潜在活性成分-靶点-通路网络,度值作为衡量节点重要性的关键指标,以节点的大小来反

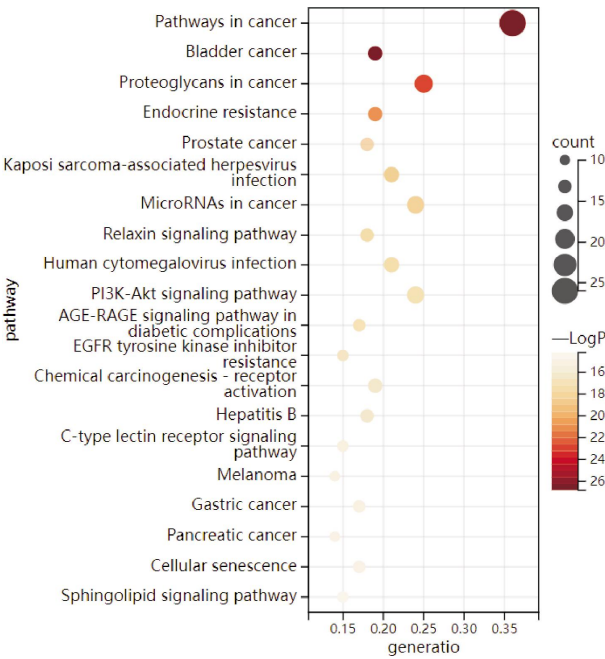


图 4 KEGG 通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis

注:气泡的大小代表该通路上基因富集的数量,气泡越大代表富集的基因数目越多;而气泡的颜色代表富集的显著性,颜色越重,代表富集结果越显著。

映度值大小,节点度值越大,表明成分与靶点或靶点与通路之间关联程度越高,在槟榔影响 OSF 的过程中发挥关键作用。槟榔活性成分度值排名靠前



图 7 各组大鼠颊黏膜及开口度情况

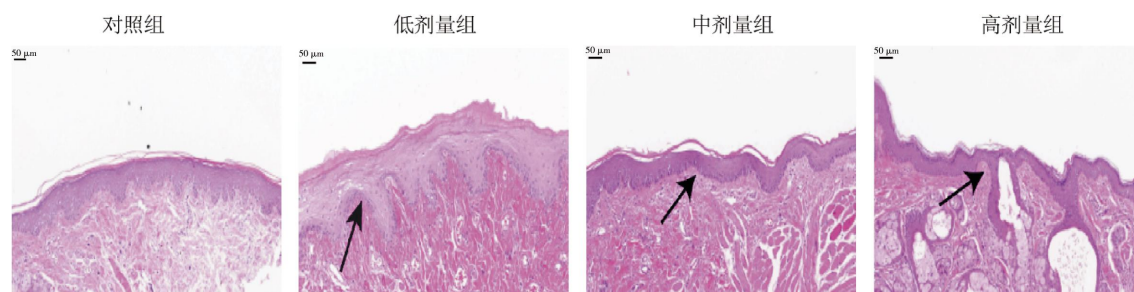
Fig.7 Buccal mucosa and opening of rats in each group

注:A:16 周高剂量组大鼠颊黏膜局部苍白、僵硬;B:16 周空白组、BL-L 组大鼠颊黏膜肉眼未见异常;16 周各组开口度变化情况;与对照组相比较,* $P<0.05$;与低剂量组相比较,# $P<0.05$ 。

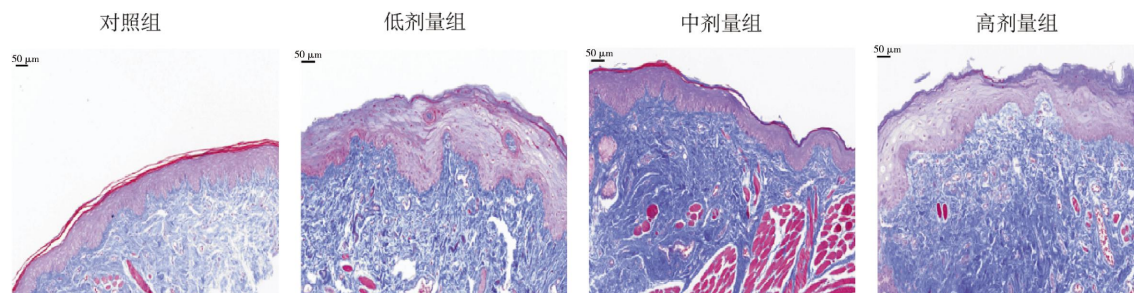
3.6.3 病理形态学检测 HE 染色结果提示,中、高剂量组大鼠颊黏膜出现不同程度上皮层变薄,棘突变浅、甚至消失,固有层明显增厚,胶原纤维呈无序、波形的外形排列,血管数量减少,伴有炎性细胞浸润,并可见类玻璃样变,且高剂量组出现细胞空泡。低剂量组黏膜下胶原纤维增多,少量粉红色沉积物堆积,而正常组皮层结构基本正常,棘突未出现变平或消失。Masson 染色结果显示,对照组大鼠颊黏膜提示淡蓝色胶原纤维分布在黏膜固有层,排列疏松;

而槟榔水提取液各组颊黏膜固有层的胶原纤维沉积地厚而致密,颜色呈深蓝色,且中、高剂量组更加明显。详见图 8—9。

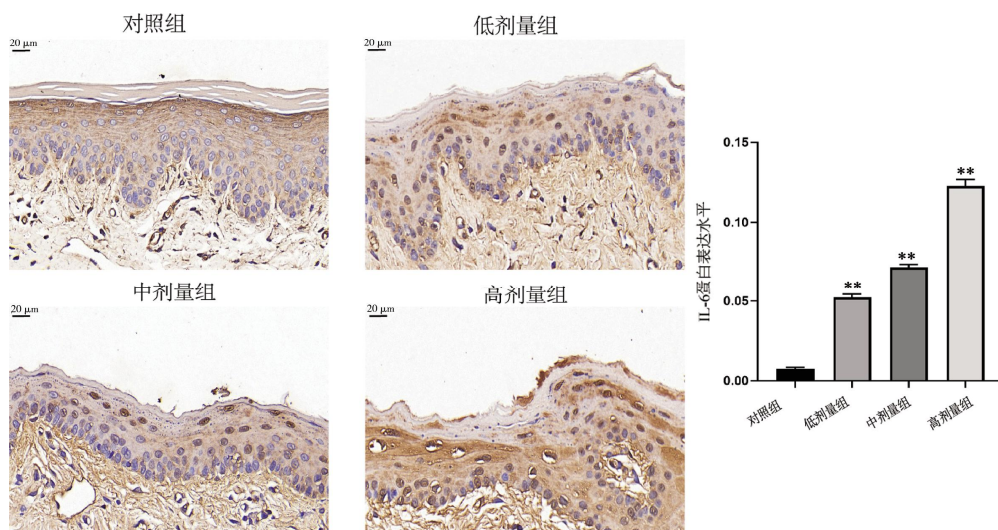
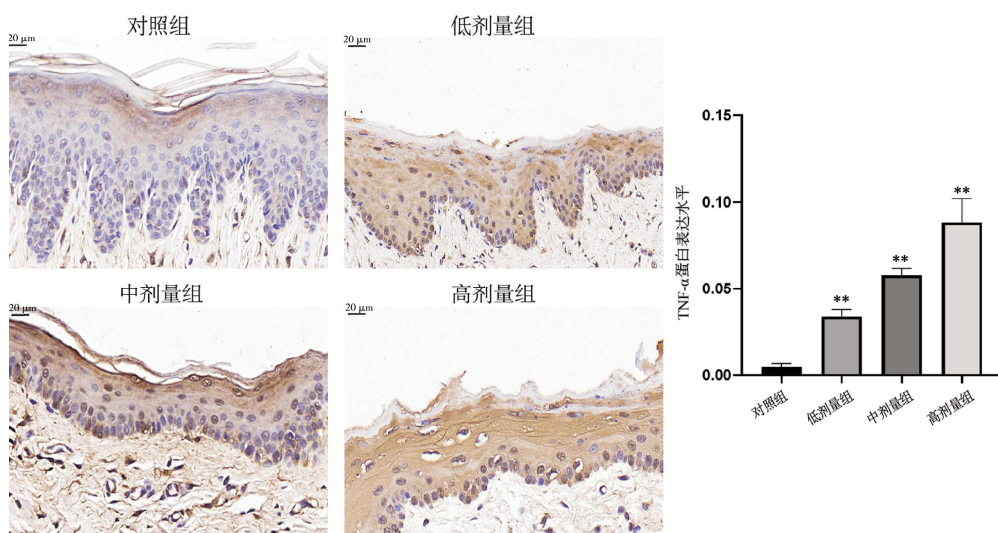
3.6.4 槟榔水提取液对大鼠口腔黏膜 IL-6、TNF- α 的影响 免疫组织化学染色结果显示,与对照组相比较,低、中、高剂量槟榔水提取液均可升高了 IL-6、TNF- α 的表达,且呈剂量依赖性($P<0.01$)。表明槟榔水提取液可能通过上调 IL-6、TNF- α 等关键炎性因子来诱导 OSF。详见图 10—11。

图 8 大鼠颊黏膜 HE 染色 (20 $\times$, $n=6$, 50 m)Fig.8 HE staining of rat buccal mucosa (20 $\times$, $n=6$, 50 m)

注:黑色箭头所标记为口腔黏膜棘突处;低剂量黏膜下出现少量粉红色沉积物,为胶原蛋白、纤维蛋白等堆积。

图 9 大鼠颊黏膜 Masson 染色 (20 $\times$, $n=6$, 50 m)Fig.9 Masson staining of rat buccal mucosa (20 $\times$, $n=6$, 50 m)

注:Masson 染色中胶原呈蓝紫色。

图 10 IL-6 免疫组化结果($\times 63, n=6, 20 \mu\text{m}$)Fig.10 IL-6 immunohistochemical results ($\times 63, n=6, 20 \mu\text{m}$)注:与对照组相比较, ** $P < 0.01$ 。图 11 TNF- α 免疫组化结果($\times 63, n=6, 20 \mu\text{m}$)Fig.11 TNF- α immunohistochemical results ($\times 63, n=6, 20 \mu\text{m}$)注:与对照组相比较, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

本研究根据网络毒理学共筛选出 52 个潜在活性成分,得到成分对应靶点 587 个和疾病对应靶点 761 个,以及两者的交集靶点 72 个。PPI 网络拓扑分析显示度值前 6 的核心蛋白是 IL-6、MMP-9、TP53、TNF、Bcl-2、EGFR,这些可能是槟榔影响 OSF 的关键靶点。IL-6 是炎症和修复的关键因子,在纤维化病变发挥重要作用^[20]。研究发现,OSF 标本培养的成纤维细胞中 IL-6 水平升高,同时证明了槟榔碱能够刺激人类口腔颊黏膜中 IL-6 mRNA 的表达^[21,24]。MMP-9 可以催化弹性和胶原蛋白的降解,LI 等人^[22]

发现槟榔碱可以下调 MMP-2、MMP-9 的表达,并同时上调金属蛋白抑制酶的水平使得胶原蛋白增加。TP53 调节细胞增殖和分化,在口腔潜在恶性和恶性疾病中发挥重要作用。研究证实,在 OSF 病理组织中 TP53 的水平较正常口腔黏膜显著升高^[23]。TNF 和 IL-6 一样,是重要的炎症因子,OSF 水平患者较正常人升高^[24]。在 Bcl-2 是细胞凋亡的重要调节因子,有研究表明,其可能通过抑制细胞凋亡在 OSF 癌变中发挥重要作用^[25]。EGFR 作为生长因子,调节细胞的生长、增殖和分化。GO 功能富集分析显示,槟榔的活性成分发挥作用主要涉及缺氧反应、细胞运动的正向调节、磷代谢过程的正向调节、蛋白质转

运的调节等过程,这些活性成分可能通过作用在膜筏、细胞外基质、细胞器外膜、细胞质核周区等组分来影响各类蛋白结合、酶类活性、受体活化等功能。KEGG 通路富集分析获得 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、松弛素信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等信号通路。PI3K-Akt 信号通路调节各种细胞过程,如细胞凋亡、细胞增殖、蛋白质合成等,是最重要细胞内通路之一,如 PI3K/Akt 抑制剂 LY2940002 可以抑制 OSF 细胞的迁移和侵袭以及血管生成,从而达到治疗效果^[26];同时 PI3K-Akt 信号通路通过促进促纤维化生长因子、细胞因子和趋化因子的合成和分泌,从而使得成纤维细胞转化为肌纤维细胞,在肺、肝、心脏纤维化等疾病中发挥重要作用^[27-29];此外,PI3K-Akt 信号通路是重要的炎症信号通路之一,通过激活 NF- κ B 后发生一系列级联反应,促进成纤维细胞 IL-6、TNF- β 等炎症因子的增加^[30]。AGE-RAGE 信号通路可以激活 NF- κ B、MAPK 等通路,从而介导炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等生命过程,如通过 RAGE-MAPK 信号通路增加大鼠牙髓细胞中 S100A8、A9、IL-1 β 的炎症因子表达^[31]。松弛素是一种肽激素,通过激活多种通路抑制炎症、活化成纤维细胞、重塑基质发挥抗纤维化作用^[32]。研究表明,松弛素通过调节成纤维细胞合成和分泌前胶原酶和胶原蛋白,促进 MMP-1、MMP-8 的表达在纤维化占有重要地位^[33-34]。此外,KEGG 通路富集分析显示多条癌症通路与 OSF 密切相关。OSF 是公认的癌前病变,部分 OSF 会进展为口腔鳞状细胞癌,其过程主要涉及长期慢性非消退性炎症,诱导上皮细胞的恶性转化,导致获得各种恶性生物表型^[35-36]。槟榔活性成分-靶点-通路网络图显示,槟榔活性成分居于前位的是亚油酸、10Z-十七碳烯酸、二十碳五烯酸、邻苯二甲酸二丁酯,其中亚油酸、10Z-十七碳烯酸、二十碳五烯酸为脂肪酸,且槟榔中以亚油酸为主要成分^[37],研究表明发炎的牙龈组织中中亚油酸等不饱和脂肪酸的含量明显增加,与炎症反应密切相关^[38];也有研究证实邻苯二甲酸二丁酯干预肝细胞后,氧化应激水平明显升高,IL-6、IL-1、TNF- α 等炎症因子表达增加,同时诱导肝细胞凋亡^[39]。

基于网络毒理学结果,我们发现炎症反应与槟榔活性成分、OSF 以及参与两者的通路均有密切联系,故选择 IL-6、TNF- α 等关键炎症因子作为可能的作用靶点,进一步进行动物实验探讨槟榔水提取液对 OSF 的作用机制。通过开口度测量、HE 染色及

Masson 染色实验,发现中、高剂量组对口腔黏膜损伤较对照组、低剂量更为严重,引起开口度值明显减小,使得大鼠张口受限,并导致黏膜上皮层变薄,固有层明显增厚,胶原纤维呈无序波状排列,血管数量减少,伴有炎性细胞浸润,并从蛋白水平发现槟榔呈剂量依赖性地上调 IL-6、TNF- α 等炎症因子,是其可能诱导 OSF 机制之一。

综上所述,本研究通过网络毒理学方法,较为系统地分析了槟榔导致 OSF 的潜在活性成分、关键靶点和信号通路,并通过动物实验进行验证,揭示了槟榔上调 IL-6、TNF- α 等炎症因子是其诱导 OSF 的作用机制之一。我们还发现,槟榔活性成分中除了生物碱对 OSF 具有明显的诱导作用之外,亚油酸为主的脂肪酸对其也有影响,然而,目前尚未有文献报道脂肪酸对 OSF 的具体作用机制,课题组后续将进行下一步的实验探索。此外,本研究并未对炎症因子进行更深层次的上下游机制研究,后期还需要进一步的实验和临床验证来证实。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 381-382.
- [2] 郑敏圆. 槟榔种子生物碱类杀虫活性成分鉴定及其配方研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [3] YAMSON E C, TUBALINAL G A S P, VILORIA V V, et al. Anthelmintic effect of betel nut (Areca catechu) and neem (Azadirachta indica) extract against liver fluke (Fasciola spp.)[J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2019, 6(1): 44-49.
- [4] 蒋志, 曹立幸, 陈其城, 等. 槟榔对健康人胃肠动力的作用研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(6): 464-469.
- [5] 邹百仓, 魏兰福, 魏睦新. 槟榔对功能性消化不良模型大鼠胃运动的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(1): 6-8.
- [6] BYUN S J, KIM H S, JEON S M, et al. Supplementation of Areca catechu L. extract alters triglyceride absorption and cholesterol metabolism in rats[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2001, 45(6): 279-284.
- [7] 裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 24-32.
- [8] 王小燕, 张美英, 王亚峰, 等. 槟榔提取物体外抗柯萨奇病毒 B3 及单纯疱疹病毒 1 型和乙型肝炎病毒的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2954-2955.
- [9] ZHANG S S, LI W H, GAO Y J, et al. Betel-quid and oral submucous fibrosis: A cross-sectional study in Hunan Province, China[J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2012, 41(10): 748-754.
- [10] TANG J G, JIAN X F, GAO M L, et al. Epidemiological survey of oral submucous fibrosis in Xiangtan City, Hunan Province, China[J]. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 1997, 25

- (2): 177–180.
- [11] GUPTA P C, SINOR P N, BHONSLE R B, et al. Oral submucous fibrosis in India: A new epidemic[J]. The National Medical Journal of India, 1998, 11(3): 113–116.
- [12] XU H, LYU F Y, SONG J Y, et al. Research achievements of oral submucous fibrosis: Progress and prospect[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6631856.
- [13] TILAKARATNE W M, KLINIKOWSKI M F, SAKU T, et al. Oral submucous fibrosis: Review on aetiology and pathogenesis[J]. Oral Oncology, 2006, 42(6): 561–568.
- [14] LI Z, FU Y, HU Y, et al. Low-dose arecoline regulates distinct core signaling pathways in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma, BMC Oral Health, 2023, 23(1): 171.
- [15] LI M, DENG Z, XIE C, et al. Fibroblast activating protein promotes the proliferation, migration, and activation of fibroblasts in oral submucous fibrosis, Oral Dis, 2024 Apr, 30(3): 1252–1263.
- [16] 谢晓, 刘敏, 杨敏, 等. 网络毒理学在中药研究中的应用现状与思考[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2024, 43(1): 1–6, 68.
- [17] 曹日曲. 基于数据挖掘的中医药外治黄褐斑的网络药理学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [18] 朱思睿, 杨艳伟, 赵曼曼, 等. 槟榔碱对大鼠体外胚胎肢芽发育的影响[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(23): 2157–2165.
- [19] 杨博, 符梦凡, 唐瞻贵. 槟榔碱及机械刺激构建大鼠口腔黏膜下纤维化模型[J]. 华西口腔医学杂志, 2019, 37(3): 260–264.
- [20] LI Y, ZHAO J, YIN Y, et al. The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5405–5414.
- [21] TSAI C H, YANG S F, CHEN Y J, et al. Regulation of interleukin-6 expression by arecoline in human buccal mucosal fibroblasts is related to intracellular glutathione levels[J]. Oral Diseases, 2004, 10(6): 360–364.
- [22] LI X, LING T Y, GAO Y J, et al. Arecoline and oral keratinocytes may affect the collagen metabolism of fibroblasts[J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2009, 38(5): 422–426.
- [23] VARUN B R, RANGANATHAN K, RAO U K, et al. Immunohistochemical detection of p53 and p63 in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis[J]. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2014, 5(3): 214–219.
- [24] HAQUE M F, MEGHJI S, KHITAB U, et al. Oral submucous fibrosis patients have altered levels of cytokine production[J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2000, 29(3): 123–128.
- [25] 张睿. 口腔黏膜下纤维化及其癌变组织中细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 的表达研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [26] 刘小溪, 殷霄, 房博. PI3K/Akt 信号介导血管生成参与口腔黏膜下纤维化形成的机制研究[J]. 联勤军事医学, 2023, 9(10): 822–826.
- [27] XU Y, WANG X, HAN D, et al. Revealing the mechanism of Jiegeng Decoction attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via PI3K/Akt signaling pathway based on lipidomics and transcriptomics[J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154207.
- [28] ZHANG Z L, SHANG J, YANG Q Y, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 29.
- [29] QIN W M, CAO L H, MASSEY I Y. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2021, 476(11): 4045–4059.
- [30] LI L, SUN W, WU T, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway[J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 794: 61–68.
- [31] NAKAJIMA Y, INAGAKI Y, KIDO J, et al. Advanced glycation end products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells[J]. Oral Diseases, 2015, 21(3): 328–334.
- [32] NG H H, SHEN M, SAMUEL C S, et al. Relaxin and extracellular matrix remodeling: Mechanisms and signaling pathways[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2019, 487: 59–65.
- [33] UNEMORI E N, AMENTO E P. Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(18): 10681–10685.
- [34] HIRATE Y, YAMAGUCHI M, KASAI K. Effects of relaxin on relapse and periodontal tissue remodeling after experimental tooth movement in rats[J]. Connective Tissue Research, 2012, 53(3): 207–219.
- [35] MURTI P R, BHONSLE R B, PINDBORG J J, et al. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period [J]. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 1985, 13(6): 340–341.
- [36] SHARMA M, FONSECA F P, HUNTER K D, et al. Loss of oral mucosal stem cell markers in oral submucous fibrosis and their reactivation in malignant transformation[J]. International Journal of Oral Science, 2020, 12: 23.
- [37] 周文化, 李忠海, 张海德, 等. 槟榔果仁油提取及其脂肪酸分析[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(8): 38–41.
- [38] CI EK Y, OZMEN I, CANAK I V, et al. Content and composition of fatty acids in normal and inflamed gingival tissues[J]. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 2005, 72(3): 147–151.
- [39] CUI Y, ZHANG X T, YIN K, et al. Dibutyl phthalate-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in grass carp hepatocytes and the therapeutic use of taxifolin[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 764: 142880.