

墨旱莲—女贞子治疗牙周炎的潜在成分及作用机制

郭梦茹¹ 张天翼² 黄靖雯² 黄莘越¹ 郑义² 张莉¹

1. 吉林大学口腔医院急诊科, 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院牙周科, 长春 130021

[摘要] **目的** 使用网络药理学与分子对接技术, 探讨墨旱莲-女贞子 (EPL-LLA) 治疗牙周炎的潜在靶点和分子机制, 并通过体外实验探究其生物相容性、对炎症相关因子的调控及抗氧化作用。**方法** 通过多种数据库筛选并预测 EPL-LLA 的活性成分和潜在靶点, 将其与牙周炎相关靶点取交集, 通过 STRING 数据库构建蛋白质相互作用网络 (PPI)。利用 Metascape 数据库进行基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。将节点值前 6 的药物活性成分与通过 PPI 筛选出的核心靶点进行分子对接, 并将结合能较好的结果进行可视化分析。建立体外细胞模型, 通过细胞计数试剂盒 (CCK-8)、实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针, 探究 EPL-LLA 的生物相容性、对炎症因子的调控作用及抗氧化作用。**结果** 经筛选, EPL 含有 13 种活性成分, 对应 220 个潜在靶点; LLA 含有 10 种活性成分, 对应 283 个潜在靶点; 牙周炎相关靶点 1 643 个; 三者共有 91 个交集靶点。交集靶点经 GO 和 KEGG 富集分析, 共筛选出 5 271 个条目和 253 条信号通路。分子对接结果证实节点值前 6 的药物活性成分与核心靶点能够较好地结合。CCK-8 实验显示浓度在 0.02 mg/mL 内的 EPL-LLA 具有良好的生物相容性 ($P < 0.05$); qRT-PCR 显示 EPL-LLA 降低牙龈卟啉单胞菌脂多糖刺激后巨噬细胞促炎因子 mRNA 的表达, 同时上调抑炎因子 mRNA 的表达 ($P < 0.05$); 利用 DCFH-DA 荧光探针检测证实 EPL-LLA 具有清除活性氧 (ROS) 的能力 ($P < 0.05$)。**结论** EPL-LLA 可通过多成分、多靶点、多通路治疗牙周炎, 为进一步研究其对牙周炎的治疗提供了理论依据。

[关键词] 牙周炎; 墨旱莲; 女贞子; 网络药理学; 分子对接; 巨噬细胞; 炎症因子; 氧化应激

[中图分类号] R781.4+2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2025049



本文链接 开放科学标识码

Mechanism of Eclipta prostrata L-Ligustrum lucidum Ait in the treatment of periodontitis

Guo Mengru¹, Zhang Tianyi², Huang Jingwen², Huang Xinyue¹, Zheng Yi², Zhang Li¹

1. Dept. of Emergency, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Dept. of Periodontics, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China

Supported by: Jilin Province Science and Technology Development Plan Project (YDZJ202301ZYTS013); Scientific Research Project of Education Department of Jilin Province (JJKH20250203KJ)

Correspondence: Zhang Li, E-mail: zhang_li99@jlu.edu.cn; Zheng Yi, E-mail: zhengyi8304@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the potential target and molecular mechanism of Eclipta prostrata L-Ligustrum Lucidum Ait (EPL-LLA) in the treatment of periodontitis by using network pharmacology and molecular docking technology, and to explore its biocompatibility, regulatory effects on inflammatory factors, and antioxidant activity through *in vitro* experiments. **Methods** The active components and potential targets of EPL-LLA were screened

and predicted through a variety of databases, and the intersection of EPL-LLA and periodontitis targets was selected. The protein interaction network (PPI) was analyzed by the string platform. The Metascape database was used for gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analy-

[收稿日期] 2025-02-12; **[修回日期]** 2025-05-14

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202301ZYTS013); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JJKH20250203KJ)

[第一作者] 郭梦茹, 住院医师, 硕士, E-mail: Guomr23@mails.jlu.edu.cn

[通信作者] 张莉, 副教授, 博士, E-mail: zhang_li99@jlu.edu.cn; 郑义, 副主任医师, 博士, E-mail: zhengyi8304@jlu.edu.cn

sis. The active ingredients from the top 6 degrees were docked with the core targets, and the results of binding energy were visualized. An *in vitro* cell model was established to evaluate the biocompatibility, modulation of inflammatory factors, and antioxidative effects of EPL-LLA through cell counting kit-8 (CCK-8), quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe assays. **Results** Screening revealed 13 active components in EPL corresponding to 220 potential targets, 10 active components in LLA corresponding to 283 potential targets, and 1 643 periodontitis-related targets, with 91 shared targets among the three. GO analysis of the shared targets yielded 5 271 entries, while KEGG enrichment analysis indicated involvement in 253 signaling pathways. Molecular docking confirmed stable binding between the top 6 active components and core targets. CCK-8 assays demonstrated good biocompatibility of EPL-LLA at concentrations 0.02 mg/mL ($P < 0.05$). qRT-PCR showed that EPL-LLA reduced the mRNA expression of pro-inflammatory factors in macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide while upregulating anti-inflammatory factor mRNA expression ($P < 0.05$). DCFH-DA fluorescence probe assays confirmed the reactive oxygen species (ROS)-scavenging capacity of EPL-LLA ($P < 0.05$). **Conclusion** EPL-LLA may treat periodontitis through multi-component, multi-target, and multi-pathway mechanisms, providing a theoretical basis for further research on its therapeutic potential.

[Key words] periodontitis; *Eclipta prostrata* L; *Ligustrum lucidum* Ait; network pharmacology; molecular docking; macrophage; inflammatory factors; oxidative stress

牙周炎是导致成年人牙齿脱落的主要病因, 并与心血管疾病^[1]、2型糖尿病等^[2]多种系统性疾病存在关联, 严重影响患者的生活质量。菌斑是牙周炎的始动因子, 通过洁治、刮治等物理手段清除菌斑是目前临床上治疗牙周炎的主要方法。然而, 牙周炎的发病机制复杂, 致病因素多样, 仅依靠单纯的物理治疗手段, 对牙周组织免疫炎症反应的调控尚不理想。全身或局部辅以抗生素等药物治疗, 虽在一定程度上能够提升治疗效果^[3], 但存在药物滥用和产生耐药性的问题^[4], 因此, 需要寻找和开发安全、经济、有效的药物。随着我国传统医学研究的进展, 中草药因其多组分、多靶点、多作用途径及来源广泛、不易产生耐药性等特点, 在牙周炎治疗领域正逐渐受到广泛的关注^[5]。

药对是指将两味药成对相配, 是中医用药的重要形式, 具有提高疗效、降低毒性和减少不良反应等优点。墨旱莲—女贞子 (*Eclipta prostrata* L-*Ligustrum lucidum* Ait, EPL-LLA) 是临床上常用的经典药对 (配伍比例为 1 : 1)^[6], 其应用历史可追溯至明代。吴旻辑在《扶寿精方》中详细记载了该药对的组方原理与临床应用, 强调其滋阴补肾、清热凉血的功效, 尤其适用于肝肾阴虚所致诸症。在中医理论中, 牙周炎归属于“牙宣”范畴, 其发病常与肝肾阴虚、虚火上炎相关^[7], 因此 EPL-LLA 可从整体上改善机体状态, 从而缓解牙周炎症。此外, 巨噬细胞释放的促炎因子^[8]和氧化应激^[9]在牙周炎的发生和发展中同样起着重要作

用, 因此降低炎症因子、减轻氧化应激对牙周炎的治疗具有重要意义。有研究表明 EPL-LLA 能够抑制白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 等炎症细胞因子释放^[10-11], 同时富含黄酮类、酚类等成分, 具有显著的抗氧化作用^[12-13]。综上所述, EPL-LLA 在治疗牙周炎方面展现出了一定的潜力, 有望被开发为一种新型的牙周炎辅助治疗药物。目前尚未有关于 EPL-LLA 治疗牙周炎的具体活性成分及其核心作用靶点的详细报道。

网络药理学是一种整合计算机科学与医学的多学科研究方法, 在中药研究中应用广泛。该方法从整体角度分析药物作用机理, 考虑药物的多成分、多靶点、多通路及多途径特性, 系统阐释药物与疾病间的相互作用关系, 为理解药物作用机制提供了新视角和工具^[14]。本研究采用网络药理学结合体外实验的方法, 旨在探索 EPL-LLA 治疗牙周炎的潜在活性成分及作用机制, 以期为该药对的后续实验研究及临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 网络药理学

1.1.1 检索药物活性成分及靶点

在 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 中, 依据吸收、分布、代谢和排泄标准参数——口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) \geq

0.18%^[15]，分别筛选出EPL和LLA的活性成分。随后，通过利用Swiss Target Prediction数据库^[16]预测这些成分的潜在作用靶点，并通过Cytoscape 3.10.2软件构建药物—活性成分—靶点网络关系图。

1.1.2 筛选牙周炎相关靶点

以“periodontitis”为关键词，分别在GeneCards数据库(www.genecards.org)^[17]、DrugBank数据库(https://go.drugbank.com)、TTD数据库^[18]和OMIM数据库(www.omim.org)中检索牙周炎的潜在靶点，将检索的靶点进行去重后得到牙周炎的相关靶点。

1.1.3 构建牙周炎—药物活性成分靶点交集及药物—活性成分—靶点—牙周炎网络关系图

将牙周炎相关靶点和EPL-LLA活性成分预测的靶点通过线上分析工具JVENN(http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html)取交集形成韦恩图，该交集靶点即为EPL-LLA活性成分治疗牙周炎的潜在作用靶点。将EPL-LLA的活性成分及与牙周炎交集靶点导入Cytoscape 3.10.2软件中，构建药物—活性成分—靶点—牙周炎网络关系图。

1.1.4 构建蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction network, PPI)关系图及筛选核心靶点

在STRING数据库(https://string-db.org)^[19]导入交集靶点，以蛋白间最低相互作用得分>0.4为信度依据，隐藏网络联结外的节点，形成PPI关系

图。利用Cytoscape 3.10.2软件中的CytoHubba插件分析筛选核心靶点，并形成核心靶点图。

1.1.5 基因本体论(gene ontology, GO)富集分析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

将交集靶点导入Metascape数据库(https://www.metascape.org/gp/index.html)中，进行GO和KEGG富集分析，以-log(P)值为依据，利用微生物信平台(http://www.bioinformatics.com.cn)将GO分析结果排在前10的内容绘制柱状图，KEGG分析排名前20的信号通路绘制为气泡图。

1.2 分子对接分析

选择药物—活性成分—靶点—牙周炎中的节点度(degree)值排名前6的药物活性成分与通过PPI网络筛选的10个核心靶点进行分子对接。通过PubChem数据库(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获得活性成分的3D结构，接着通过PDB数据库(https://www.rcsb.org)获得核心靶点的结构及身份标识号(表1)。通过分子图形软件PyMOL 3.0.3去除水分子和小分子配体后，利用Auto Dock Vina 1.1.2软件添加极性氢和科尔曼电荷进行进一步预处理，构建对接口袋，在受体蛋白上设置中心及参数，以保证蛋白完全被覆盖。分子对接后生成活性位点位置，并计算结合能和氢键数，使用PyMOL 3.0.3软件将结合能较好的分子对接结果进行可视化分析。

表 1 核心靶点信息表

Tab 1 Information of core targets

中文名称	英文名称	英文简写	身份标识号
B淋巴细胞瘤-2	B-cell lymphoma-2	BCL2	3B7O
肿瘤坏死因子	tumor necrosis factor	TNF	5M2J
缺氧诱导因子1 α	hypoxia inducible factor-1 α	HIF1A	3PXX
表皮生长因子受体	epidermal growth factor receptor	EGFR	1XKK
肿瘤蛋白p53	tumor protein P53	TP53	3LGF
雌激素受体1	estrogen receptor 1	ESR1	2BJ4
AKT丝氨酸/苏氨酸激酶1	AKT serine/threonine kinase 1	AKT1	1H10
核因子- κ B1	nuclear factor kappa B1	NF κ B1	4Q3J
基质金属蛋白酶9	matrix metalloproteinase 9	MMP9	1ITV
信号转导与转录激活因子3	signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	5AX3

1.3 体外实验

1.3.1 制备EPL-LLA水煎液

取EPL和LLA饮片(长春安国中药饮片有限公司)，按1:1精确称量，加入10倍量的超纯水，浸泡1h后，再煎煮1h，提取2次，合并滤液，经

浓缩调整至生药含量达200mg/mL，无菌分装、妥善封存备用^[20]。

1.3.2 主要试剂与仪器

杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(北京中生奥邦生物科技

有限公司), 胎牛血清 (武汉普诺赛生命科技有限公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (北京兰杰柯科技有限公司), 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) (北京酷来搏科技有限公司), 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、总 RNA 提取试剂 (Sigma 公司, 美国), 逆转录试剂盒、实时聚合酶链反应试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司), 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) (北京索莱宝科技有限公司)。

低温高速离心机 (OHAUS 公司, 美国)、实时荧光定量聚合酶链反应仪 (Roche 公司, 瑞士)、恒温培养箱 (SANYO 公司, 日本)、酶标仪 (Agilent 公司, 美国)、荧光倒置显微镜 (OLYMPUS 公司, 日本)。

1.3.3 CCK-8法检测细胞活力

实验分组如下。1) 空白组: 无细胞, 仅含 CCK-8 液与 DMEM 完全培养基; 2) 对照组: DMEM 完全培养基处理细胞; 3) 将 EPL-LLA 按不同浓度分为 5 组, 分别为 0.1、0.2、0.39、0.78、1.56 mg/mL。以 3×10^3 /孔的密度在 96 孔板中接种 RAW264.7 细胞, 孵育 24 h, 弃去旧培养基, 按实验分组加入不同浓度的 EPL-LLA, 分别在培养 24 h 和 48 h 后弃旧培养基, 加入含有 10% CCK8 溶液的新培养基, 进一步孵育 2 h。用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值, 计算细胞相对活力 (%) = (EPL-LLA 组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) \times 100%, 筛选出 3 个浓度的 EPL-LLA, 进行后续实时定量聚合酶链反应和抗氧化实验。

1.3.4 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测炎症因子的表达

实验分组如下。1) 对照组: 用 DMEM 完全培养基处理细胞; 2) LPS 组: 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS 处理细胞; 3) 0.05mg/mL EPL-LLA 组: 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS+0.05 mg/mL EPL-LLA 处理细胞; 4) 0.1 mg/mL EPL-LLA 组: 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS+0.1 mg/mL EPL-LLA 处理细胞; 5) 0.2 mg/mL EPL-LLA 组: 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS+0.2 mg/mL EPL-LLA 处理细胞。以 2×10^5 /孔的密度在 6 孔板中接种 RAW264.7 细胞, 孵育 24 h 使其贴壁。按实验分组用相应浓度的 EPL-LLA 进行 18 h 预处理, 然后加入 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS 处理

6 h。

提取每组细胞总 RNA 后通过逆转录合成 cDNA, 按实时聚合酶链反应试剂盒说明书进行后续实验, 以 β -肌动蛋白 (β actin, β -actin) 作为内参基因进行校正分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较法测定促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及抑炎因子 IL-10 mRNA 的表达水平。引物序列如表 2 所示。

表 2 qRT-PCR 的引物序列

Tab 2 Primer sequence of qRT-PCR

基因名称	引物序列 (5'-3')
β -actin	F: CTTGCAGCTCCTTCGTTGC
	R: ACGATGGAGGGGAATACAGC
TNF- α	F: GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG
	R: ACATTGAGGCTCCAGTGAATTCGG
IL-6	F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
	R: AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
IL-1 β	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG
	R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-10	F: GCTCTTACTGACTGGCATGAG
	R: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG

1.3.5 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)

分组同 1.3.4, 以 5×10^4 /孔的密度在 12 孔板中接种 RAW264.7 细胞, 孵育 24 h 使其贴壁。按实验分组用相应浓度的 EPL-LLA 进行 24 h 预处理, 然后加入 1 μ g/mL *P. gingivalis* LPS 处理 12 h。吸弃旧培养基, 每孔加入 500 μ L 无血清培养基稀释 (1:1 000) 的 DCFH-DA 探针, 黑暗条件下继续孵育 30 min 后, 使用无血清培养基清洗 3 次, 以保证未进入细胞内的探针被彻底清除。倒置荧光显微镜下观察荧光强度并拍照保存, 同时获取明场图像以展示细胞形态。使用 ImageJ 软件对荧光信号进行分析。

1.3.6 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行数据分析及绘图, 上述体外实验的结果重复 3 次, 所有结果均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较符合正态分布和方差齐性检验则采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学

2.1.1 检索药物活性成分及靶点

以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18\%$ 为标准, 从 TCMSP 数据库中筛选出 EPL 活性成分 10 个, LLA 的活性

成分13个,其中木犀草素和槲皮素为两者共有的活性成分(表3)。利用Swiss Target Prediction数据库预测上述活性成分的潜在作用靶点,经合并及去重后,分别得到EPL活性成分潜在作用靶点220

个和LLA活性成分潜在作用靶点283个。通过Cytoscape软件构建了药物—活性成分—靶点网络关系图(图1)。

表3 EPL-LLA活性成分信息表
Tab 3 EPL-LLA active components

项目	分子身份标识号码	活性成分	OB/%	DL/%
EPL 活性成分	MOL001790	蒙花苷	39.84	0.70
	MOL001689	金合欢素	34.97	0.24
	MOL002975	紫柳因	69.93	0.21
	MOL003378	去甲蟛蜞菊内酯	33.93	0.43
	MOL003389	3'-O-甲基香豌豆苷元	57.40	0.27
	MOL003398	红车轴草素	39.06	0.27
	MOL003402	去甲基蟛蜞菊内酯	72.12	0.42
	MOL003404	蟛蜞菊内酯	49.60	0.47
	MOL000006	木犀草素	36.16	0.24
	MOL000098	槲皮素	46.43	0.27
LLA 活性成分	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
	MOL000422	山奈酚	41.88	0.24
	MOL004576	花旗松素	57.84	0.27
	MOL005146	Lucidumoside D	48.86	0.70
	MOL005147	Lucidumoside D_qt	54.40	0.47
	MOL005169	(20S)-24-ene-3 β , 20-diol-3-acetate	40.22	0.81
	MOL005190	圣草酚	71.79	0.24
	MOL005195	丁香脂素二葡萄糖苷	83.12	0.79
	MOL005209	光泽乌头碱	30.10	0.74
	MOL005211	黄麻属苷	65.45	0.22
	MOL005212	Oltoriside_qt	103.23	0.77
	MOL000006	木犀草素	36.16	0.24
	MOL000098	槲皮素	46.43	0.27

2.1.2 筛选牙周炎相关靶点

以Relevance score值 ≥ 1 为标准,从GeneCards数据库筛选得到1 612个牙周炎相关基因靶点; DrugBank数据库提供了42个相关基因; TTD和OMIM数据库分别检索出1个和8个相关靶基因。通过对这4个数据库检索结果的整合和去重,最终确定了1 643个牙周炎相关靶点。

2.1.3 构建牙周炎—药物活性成分靶点交集及药物—活性成分—靶点—牙周炎网络关系图

利用线上在线分析工具JVENN对EPL和LLA活性成分的潜在作用靶点与牙周炎相关靶点取交集后共获得91个交集靶点(图2A)。同时基于Cytoscape 3.10.2软件构建出EPL-LLA治疗牙周炎的药物—活性成分—靶点—牙周炎网络关系图,见图2B。

2.1.4 构建PPI网络关系图及筛选核心靶点

将91个交集靶点导入STRING数据库形成PPI关系图(图3),在Cytoscape 3.10.2软件形成交集

靶点的可视化图形(图4),并利用CytoHubba插件分析进一步确定了TP53、AKT1、STAT3、BCL2、HIF-1A、MMP9、ESR1、EGFR、NF κ B1、TNF共10个核心靶点(图5),按其程度算法得分排序,用颜色表示节点程度。

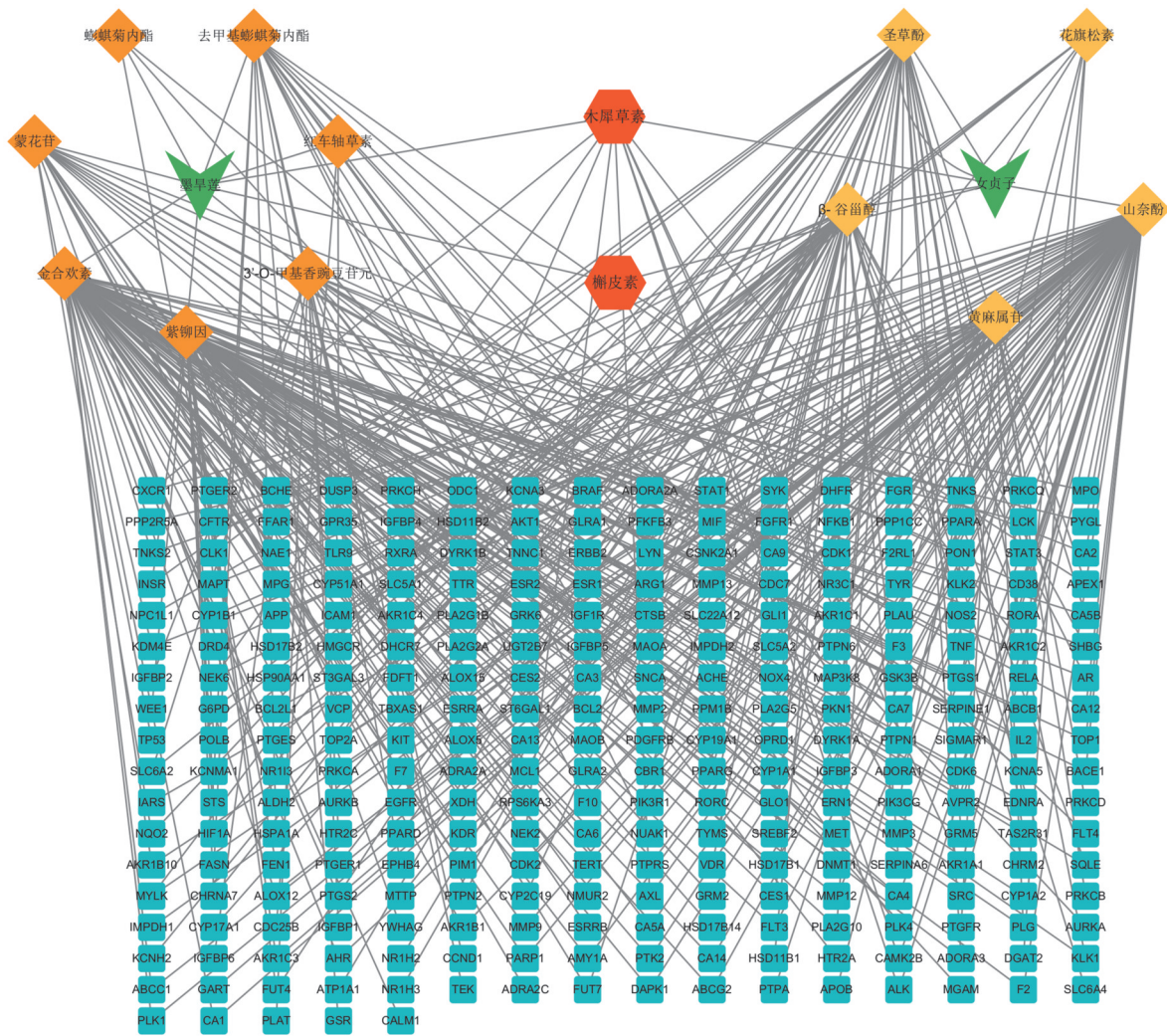
2.1.5 GO分析和KEGG通路富集分析

GO分析结果显示EPL-LLA改善牙周炎的生物过程(biological process, BP)共4 238个,主要包括激素反应、细胞迁移、运动正向调节及运动能力的正向调节等;细胞组分(cellular component, CC)共涉及348个,交集靶点主要定位于受体复合物、膜筏、膜微区、黏着斑等;根据分析显示分子功能(molecular function, MF)涉及685个,涉及蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性等。以 $-\log(P)$ 值为依据,将GO功能富集分析结果排在前十的内容,绘制柱状图(图6)。

KEGG分析结果显示交集靶点共涉及253条通

路, 主要包括: 癌症相关信号通路、磷脂酰肌醇3—激酶—蛋白激酶B (phos-phatidylinositol 3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路、丝裂

原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路等。将排名前二十的信号通路绘制为气泡图 (图7)。



“EPL” “LLA” 周围菱形节点代表药物活性成分, 红色六边形节点为两者共有成分; 中间部分的蓝色方形节点代表药物作用靶点; 灰色连接线代表节点间相互作用。

图 1 EPL-LLA-活性成分—靶点网络关系图

Fig 1 EPL-LLA-active component-target interaction network

2.2 分子对接结果及示意图

分子对接结合能越低表示受体与配体亲和力越好, 本研究结果显示6种重要活性成分与10个靶点结合能均低于-5.0 kcal/mol, 有较好的结合活性^[21], 其中各活性成分与靶点MMP9的结合最为密切 (表4)。主要活性成分与10个核心靶点均能较好的结合, 将每一种活性成分与其中一个靶点的对接可视化进行可视化展示 (图8), 进一步证实了EPL-LLA多成分、多靶点的作用。

2.3 体外实验

2.3.1 CCK-8实验结果

如图9所示, 当EPL-LLA浓度高于0.39 mg/mL

时, RAW264.7细胞的存活率开始下降, 结合24 h与48 h实验结果, 选择浓度为0.2、0.1、0.05 mg/mL的EPL-LLA, 进行后续实验。

2.3.2 炎症因子mRNA的表达

如图10所示, 与对照组相比, LPS组促炎因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的mRNA表达显著增加 ($P < 0.05$), 证明了炎症模型的成功构建, 抗炎因子IL-10 mRNA表达增加可能与激活细胞本身抗炎反应相关, 但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$); 与LPS组相比, 经不同浓度EPL-LLA处理后, 促炎因子表达水平明显降低而抗炎因子表达显著升高 ($P < 0.05$); 除TNF- α 以外, 其余炎症因子未表

现出明显的药物浓度依赖性。实验结果表明 EPL-LLA 抑制 P. gingivalis LPS 诱导巨噬细胞促炎因子表达的同时可上调抗炎因子的表达，说明该药对

可能通过抑制炎症反应和增强保护性反应，发挥抗炎和细胞保护作用。

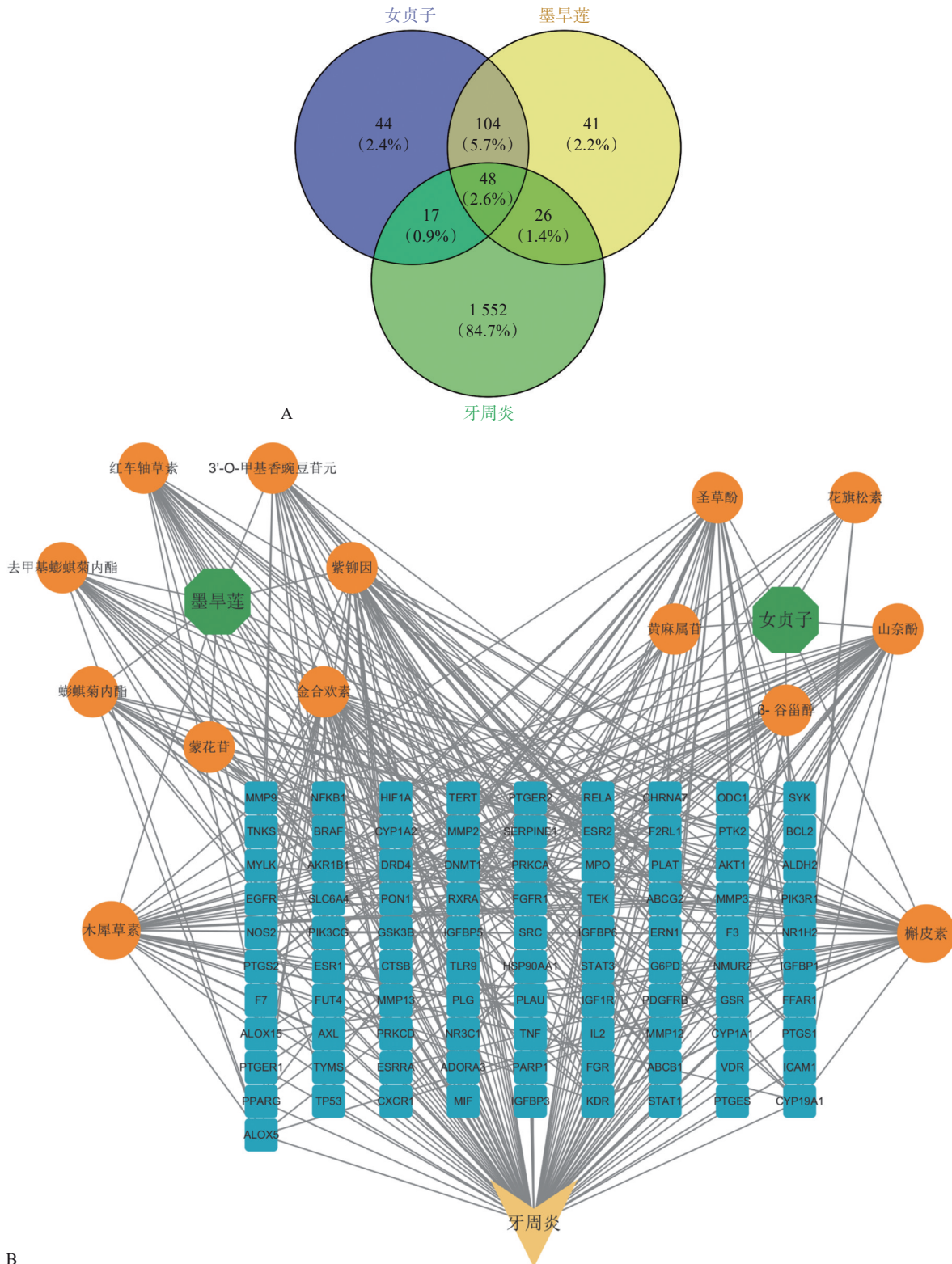
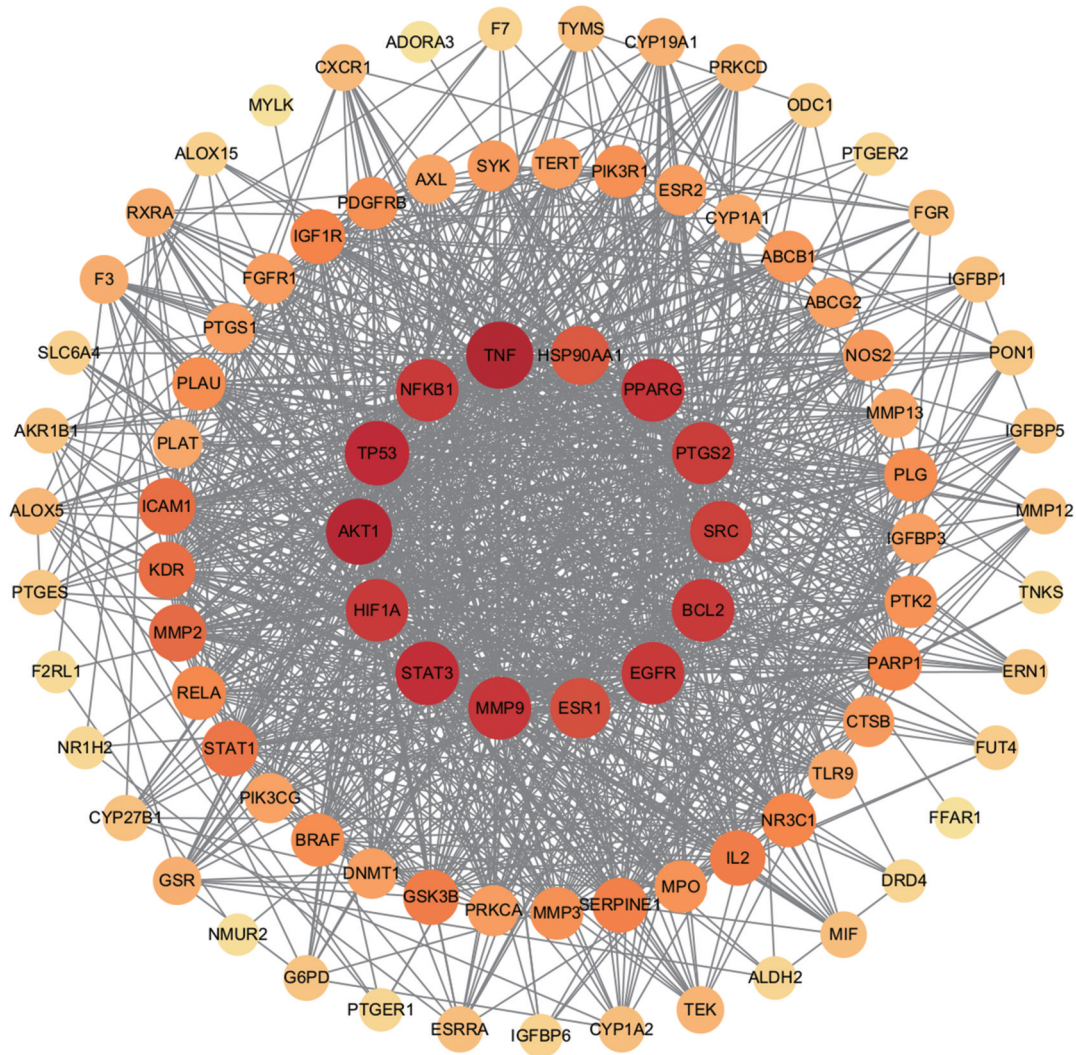


图 2 EPL-LLA-牙周炎交集靶点韦恩图及药物—活性成分—靶点网络关系图

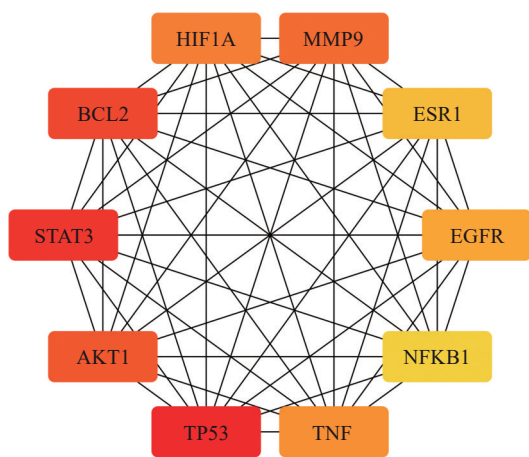
Fig 2 Venn diagram of the intersection target of EPL-LLA and periodontitis and medicinals-active components-targets network



每个圆形代表1个节点，颜色代表节点程度，灰色连接线代表节点相互作用。

图 4 PPI网络图的可视化处理结果

Fig 4 Visualization of the PPI network



图中每个方块代表1个节点，颜色表示节点程度，灰色连接线代表节点相互作用。

图 5 EPL-LLA 治疗牙周炎的核心靶点图

Fig 5 Diagram of core targets of EPL-LLA in the treatment of periodontitis

网络药理学分析揭示了EPL的主要活性成分为金合欢素、紫萼亭等；LLA的活性成分为圣草酚、山柰酚等；木犀草素与槲皮素是两者共同的活性成分。PPI中排名前十的TP53、AKT1、STAT3、BCL2、HIF-1A、MMP9、ESR1、EGFR、NF-κB1、TNF为药物活性成分治疗牙周炎核心靶点。木犀草素是天然类黄酮，能调控炎症信号通路抑制炎症介质、减轻牙周组织炎症^[24]；槲皮素显示出优异的抗氧化和抗炎特性，可降低人牙龈成纤维细胞中的ROS水平^[25-26]，以上研究说明EPL、LLA所共同含有的这两种物质能够从多机制协同治疗牙周炎。核心靶点AKT1是调节炎症和细胞分化的经典信号通路PI3K-Akt的关键分子。研究发现，柚皮苷能够通过AKT1/mTOR通路显著降低牙周组织中IL-6、TNF-α等炎症因子的表达水平，从而减轻牙周炎症^[27]。

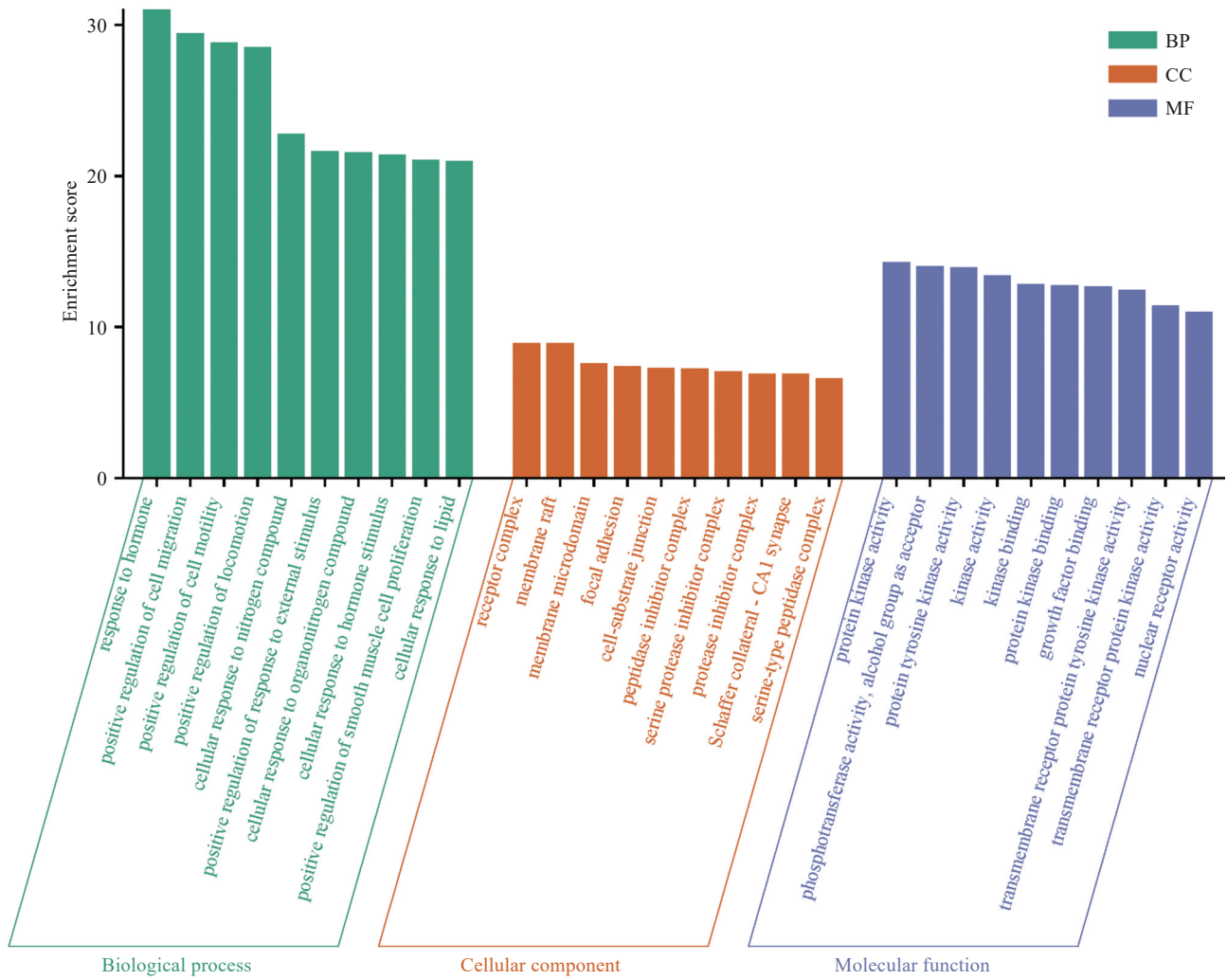


图 6 GO 富集分析

Fig 6 GO analysis

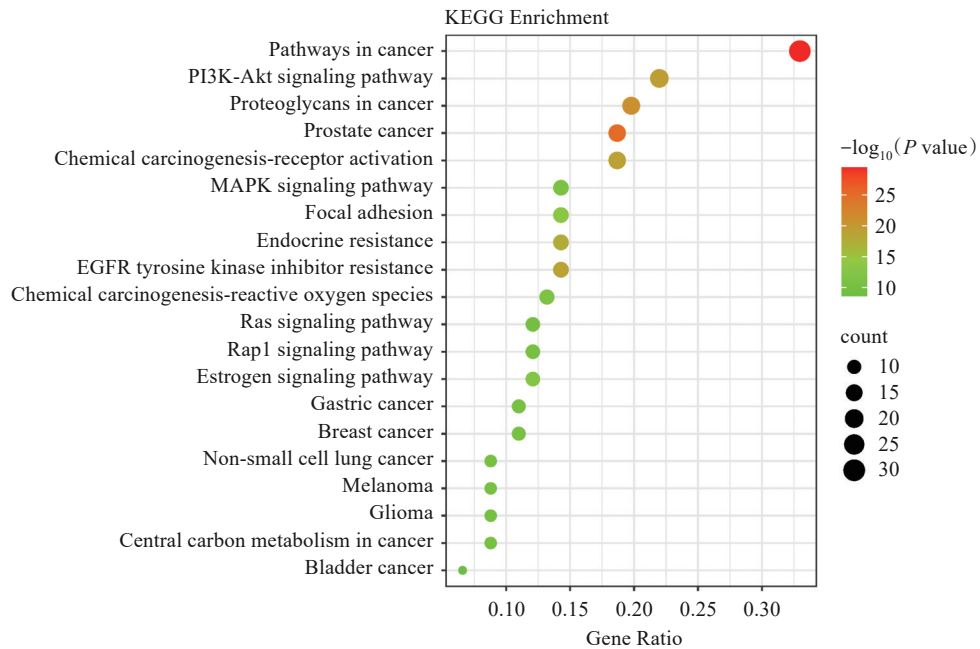


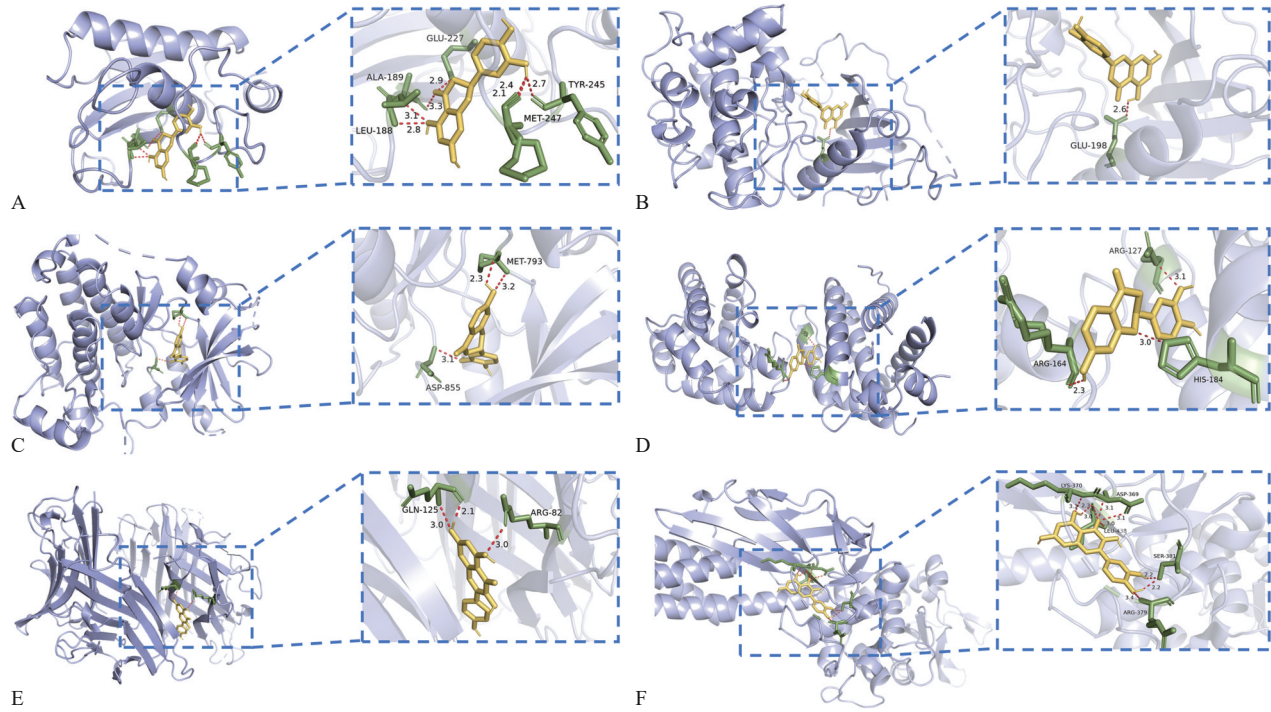
图 7 KEGG 通路富集分析

Fig 7 KEGG pathway enrichment analysis

表 4 EPL-LLA 治疗牙周炎的活性成分与核心靶点分子对接结果

Tab 4 Molecular docking results of components and core targets of EPL-LLA in the treatment of periodontitis

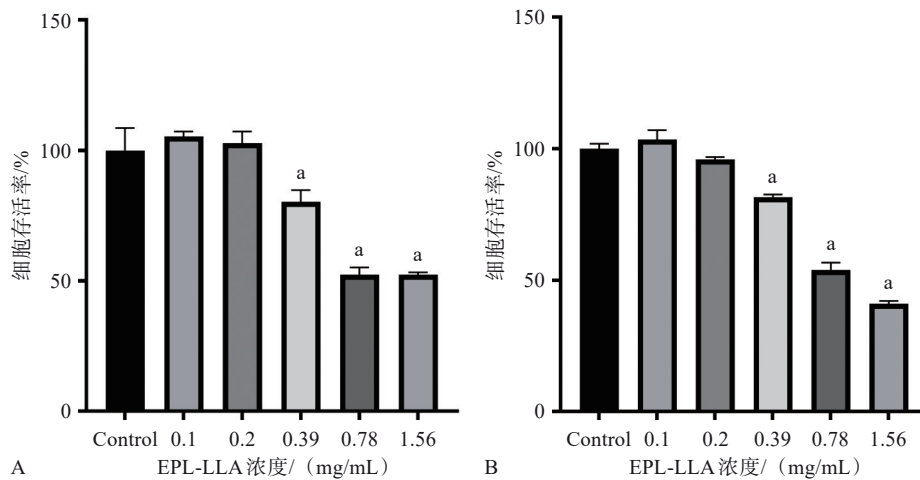
化合物	结合能/ (kcal/mol)									
	BCL2	TNF	HIF1A	EGFR	TP53	ESR1	AKT1	NFκB1	MMP9	STAT3
紫柳亭	-8.5	-7.9	-6.9	-9.2	-8	-6.8	-8	-6.6	-10.5	-7.5
木犀草素	-8.5	-7.9	-6.9	-8.9	-7.6	-6.6	-8.2	-6.9	-10.9	-7.8
金合欢素	-7.9	-7.4	-7	-8.7	-7.3	-6.8	-7.9	-6.8	-10.5	-7.6
槲皮素	-7.6	-7.4	-7	-6.5	-7.3	-6.7	-7.9	-6.8	-9.8	-8.1
山柰酚	-7.5	-8.0	-6.9	-8.7	-6.9	-6.8	-7.7	-7.2	-10	-7.8
圣草酚	-7.9	-9.0	-6.9	-9.0	-7.8	-6.9	-8.2	-6.9	-11	-7.6



A: 圣草酚-MMP9; B: 木犀草素-AKT1; C: 紫柳亭-EGFR; D: 紫柳亭-BCL2; E: 山柰酚-TNF; F: 槲皮素-STAT3。

图 8 分子对接结果示意图

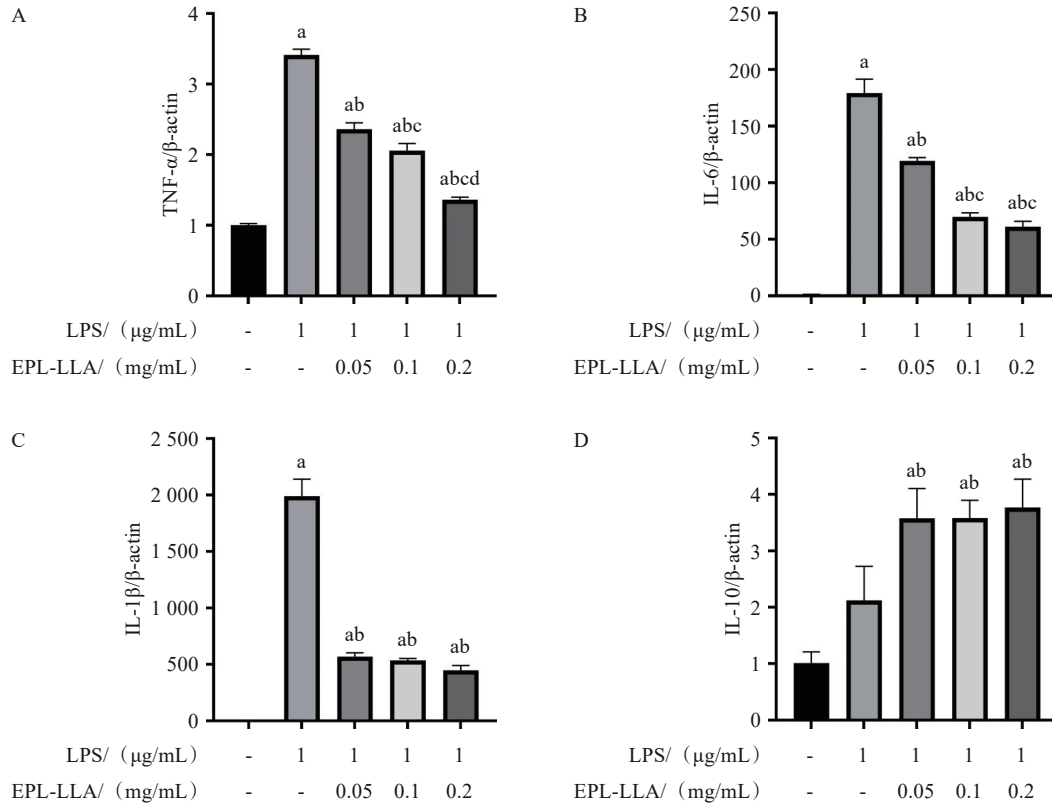
Fig 8 Schematic diagram of molecular docking results



A: 24 h; B: 48 h; a: 与对照组相比差异具有统计学差异, P<0.05。

图 9 EPL-LLA 对 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig 9 Effect of EPL-LLA on the activity of RAW264.7



A: TNF-α; B: IL-6; C: IL-1β; D: IL-10。a: 与对照组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$; b: 与LPS组相比, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$; c: 与0.05 mg/mL EPL-LLA组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$; d: 与0.1 mg/mL EPL-LLA组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

图 10 EPL-LLA对RAW264.7细胞炎症因子mRNA表达的影响

Fig 10 Effects of EPL-LLA on the mRNA expression of inflammatory factor in RAW264.7

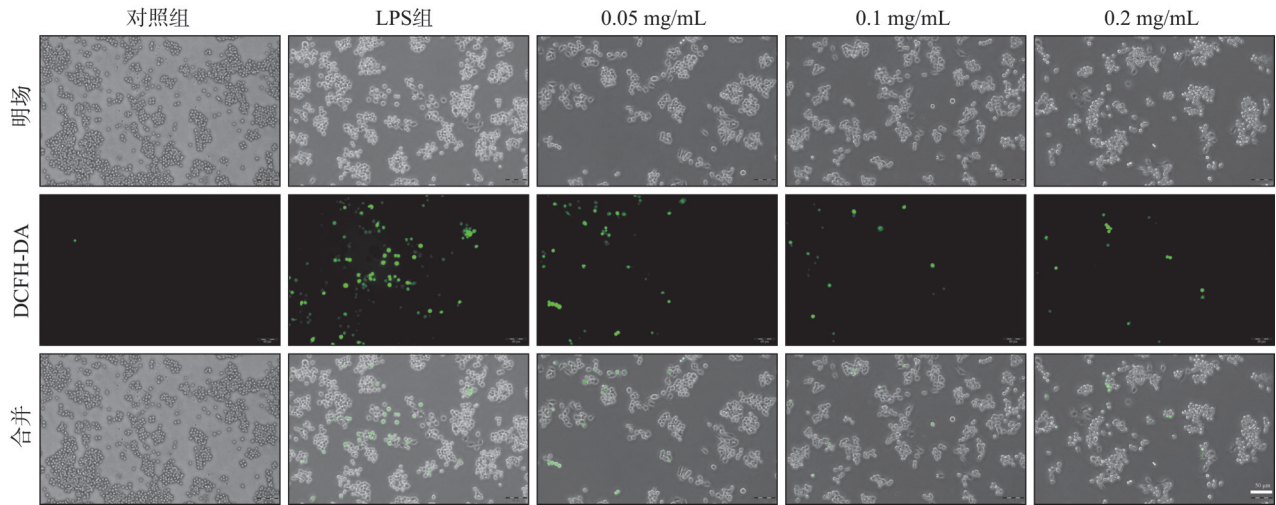


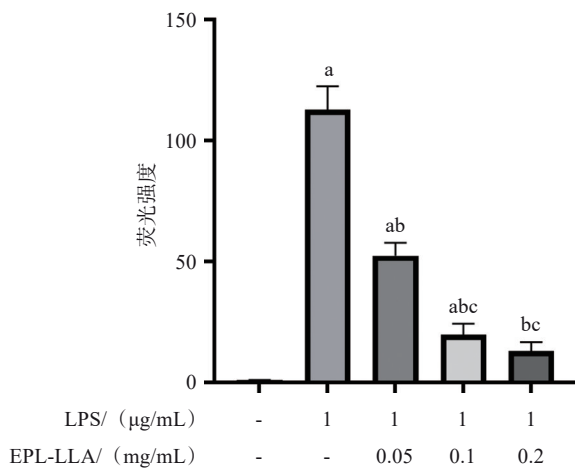
图 11 EPL-LLA对RAW264.7细胞ROS水平的影响 ×200

Fig 11 Effect of EPL-LLA on ROS levels in RAW264.7 ×200

交集靶点进行KEGG富集发现癌症相关信号通路、PI3K-Akt信号通路和MAPK信号通路等是EPL-LLA治疗牙周炎的潜在机制。PI3K-Akt信号通路是与炎症相关的经典通路,与牙周炎关系密切。研究发现,车前子甙通过抑制PI3K-Akt通路

减轻LPS诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应^[28],而骨形态发生蛋白-2则通过激活该通路促进成骨细胞分化^[29],为牙周组织再生提供潜在治疗策略。此外,小檗碱热敏水凝胶通过调控PI3K-Akt通路^[30],同时发挥抗炎和成骨双重作用,进一步凸

显了该通路在牙周炎治疗中的重要性。



a: 与对照组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$; b: 与 LPS 组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$; c: 与 0.05 mg/mL EPL-LLA 组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$; d: 与 0.1 mg/mL EPL-LLA 组相比差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

图 12 ROS 检测结果

Fig 12 ROS test results

分子对接是预测配体化合物与已知三维结构蛋白连接性的技术^[31], 结合能 < -5.0 kcal/mol 表示配体分子与受体蛋白之间具有良好的结合活性^[21]。EPL 和 LLA 的共有活性成分木犀草素与 NFκB1 的结合能较低 (-6.9 kcal/mol), 表明其可能通过抑制 NFκB1 的活性发挥抗炎作用。类似地, 槲皮素与 TNF 的结合能 (-7.4 kcal/mol) 显示其可能通过阻断 TNF 信号通路减轻炎症反应。核心靶点 AKT1 与所有活性成分均能较好的结合, 为 EPL-LLA 通过该靶点及 PI3K-Akt 通路治疗牙周炎提供了结构生物学层面的支持。

体外细胞实验证实 EPL-LLA 有良好的生物相容, 浓度在 0.02 mg/mL 内药效明显, 能够显著降低 *P. gingivalis* LPS 刺激后巨噬细胞促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 的表达, 同时上调抗炎因子 IL-10 的表达。此外, 荧光显微镜观察到 EPL-LLA 能够有效清除细胞内 ROS, 减轻氧化应激。上述结果为 EPL-LLA 应用于牙周炎的治疗提供了研究依据。

本研究的创新性在于将我国传统药对 EPL-LLA 用于牙周炎治疗, 并通过结合网络药理学、分子对接和体外实验, 揭示了 EPL-LLA 在牙周炎治疗中的作用及其发挥作用的可能机制。这种多层次的研究策略不仅为中药复方的作用机制研究提供了新的思路, 也为牙周炎的治疗提供了潜在的药物开发方向。尽管本研究取得了一定成果,

但仍存在一些局限性: 首先网络药理学和分子对接的预测结果需要进一步的体内实验验证; 其次体外实验仅针对巨噬细胞, 未涉及其他牙周炎相关细胞 (如成纤维细胞、上皮细胞)。未来研究可重点关注以下方向: 1) 开展动物实验, 验证 EPL-LLA 在体内牙周炎模型中的治疗效果; 2) 分离和鉴定 EPL-LLA 的活性成分, 研究其单独或联合作用机制; 3) 探索其抗氧化性, 并设计体内实验验证。4) 探索其在其他炎症性疾病中的潜在应用。

综上所述, 本研究通过多层次的研究策略, 揭示了 EPL-LLA 在牙周炎治疗中的作用机制。研究表明, EPL-LLA 可能通过多成分 (如木犀草素、槲皮素、金合欢素等)、多靶点 (如 NFκB1、TNF、AKT1 等)、多通路 (如 PI3K-Akt、MAPK 等) 的协同作用, 调控炎症反应、清除细胞内 ROS 以减轻氧化应激损伤, 从而发挥治疗牙周炎的作用。这些发现不仅为中医药在牙周炎治疗中的应用提供了理论依据, 也为其他复杂疾病的研究提供了方法学参考。

[参考文献]

[1] Priyamvara A, Dey AK, Bandyopadhyay D, et al. Periodontal inflammation and the risk of cardiovascular disease[J]. Curr Atheroscler Rep, 2020, 22(7): 28.

[2] Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: evidence, mechanisms, and implications[J]. Periodontol 2000, 2022, 89(1): 9-18.

[3] Mi L, Li JC, Hii ARK, et al. Dental cementum anchored microspheres embedded in a self-healing hydrogel for the antibacterial, anti-inflammation, osteogenic, and anti-osteoclastic management of periodontitis disease[J]. J Mater Chem B, 2024, 12(39): 9947-9962.

[4] Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, et al. Antibiotic resistance and persistence—implications for human health and treatment perspectives[J]. EMBO Rep, 2020, 21(12): e51034.

[5] 程成, 张薇, 朱波, 等. 中药抗常见耐药菌的作用及其机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(2): 229-233.

Cheng C, Zhang W, Zhu B, et al. Research progress on the effects and mechanisms of traditional Chinese medicine against common drug-resistant bacteria[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(2): 229-233.

- [6] Zuo JY, Park C, Doschak M, et al. Are the release characteristics of Erzhi pills in line with traditional Chinese medicine theory? A quantitative study[J]. *J Integr Med*, 2021, 19(1): 50-55.
- [7] Cao CF, Sun XP. Herbal medicine for periodontal diseases[J]. *Int Dent J*, 1998, 48(3 Suppl 1): 316-322.
- [8] Huang X, Shen H, Liu YR, et al. Fisetin attenuates periodontitis through FGFR1/TLR4/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107505.
- [9] Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, et al. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: we should treat it that way[J]. *Periodontol* 2000, 2020, 84(1): 45-68.
- [10] Luo QQ, Ding JY, Zhu LP, et al. Hepatoprotective effect of wedelolactone against concanavalin A-induced liver injury in mice[J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(4): 819-833.
- [11] 宋敏, 封安杰, 郭庆梅. 女贞子化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中国药房*, 2021, 32(24): 3064-3068.
- Song M, Feng AJ, Guo QM. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *ligustri lucidi fructus* and predictive analysis on quality markers [J]. *China Pharm*, 2021, 32(24): 3064-3068.
- [12] Yu M, Shen Z, Zhang S, et al. The active components of Erzhi wan and their anti-Alzheimer's disease mechanisms determined by an integrative approach of network pharmacology, bioinformatics, molecular docking, and molecular dynamics simulation[J]. *Heliyon*, 2024, 10(13): e33761.
- [13] Peng MM, Xia TY, Zhong YM, et al. Integrative pharmacology reveals the mechanisms of Erzhi Pill, a traditional Chinese formulation, against diabetic cardiomyopathy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 296: 115474.
- [14] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [15] Liu JT, Liu CP, Chen HQ, et al. Tongguan capsule for treating myocardial ischemia-reperfusion injury: integrating network pharmacology and mechanism study[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 437-448.
- [16] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [17] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [18] Zhou Y, Zhang YT, Zhao DH, et al. TTD: Therapeutic Target Database describing target druggability information[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1465-D1477.
- [19] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [20] 单梦丹, 钟应彬, 罗曼, 等. 基于网络药理学、分子对接及细胞实验验证探讨二至丸治疗多发性骨髓瘤的作用机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41(8): 2153-2161.
- Shan MD, Zhong YB, Luo M, et al. Exploration of the mechanism of Erzhi Wan in the treatment of multiple myeloma based on network pharmacology, molecular docking and cell experimental verification[J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2024, 41(8): 2153-2161.
- [21] 宋子毅, 杨超, 张云龙, 等. 基于基因表达综合数据库芯片挖掘结合网络药理学与分子对接探讨芒果苷治疗口腔黏膜下纤维化的机制研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2024, 42(4): 444-451.
- Song ZY, Yang C, Zhang YL, et al. Mechanism of mangiferin in the treatment of oral submucous fibrosis based on Gene Expression Omnibus database chip mining combined with network pharmacology and molecular docking[J]. *West China J Stomatol*, 2024, 42(4): 444-451.
- [22] Wang ZK, Pu R, Zhang J, et al. Association between life's essential 8 and periodontitis: evidence from NHANES 2009-2014[J]. *Clin Oral Investig*, 2024, 29(1): 37.
- [23] 刘相, 康文燕, 商玲玲, 等. 西格列汀通过阻断核因子- κ B信号通路抑制脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应[J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(2): 153-163.
- Liu X, Kang WY, Shang LL, et al. Sitagliptin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts by blocking nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *West China J Stomatol*, 2021, 39(2): 153-163.
- [24] Ma SJ, He HB, Ren XB, et al. Luteolin ameliorates periodontitis by modulating mitochondrial dynamics and macrophage polarization via the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 144: 113612.

- [25] Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Identification of quercitrin as a potential therapeutic agent for periodontal applications[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(7): 966-974.
- [26] Zhu HM, Cai C, Yu YK, et al. Quercetin-loaded bioglass injectable hydrogel promotes m6A alteration of Per1 to alleviate oxidative stress for periodontal bone defects[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(29): e2403412.
- [27] 吴泽钰. 柚皮苷通过 Akt/mTOR 通路介导自噬促进牙槽骨成骨的作用及机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2023.
- Wu ZY. Effect and mechanism of naringin mediating autophagy to promote alveolar bone osteogenesis through Akt/mTOR pathway[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2023.
- [28] Liu F, Huang X, He JJ, et al. Plantamajoside attenuates inflammatory response in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Microb Pathog*, 2019, 127: 208-211.
- [29] Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, et al. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 33361-33368.
- [30] Wang C, Liu C, Liang C, et al. Role of berberine thermosensitive hydrogel in periodontitis via PI3K/AKT pathway *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6364.
- [31] Gaillard T. Evaluation of AutoDock and AutoDock vina on the CASF-2013 benchmark[J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(8): 1697-1706.

(本文编辑 洪潇)

《人工智能在口腔领域的应用》出版发行

书籍名称: 人工智能在口腔领域的应用

原著: Kaan Orhan, Rohan Jagtap

主译: 金作林, 翟广涛, 牛丽娜

出版社: 人民卫生出版社

内容介绍: 近年来人工智能发展迅速, 在各个领域中均发挥了重要的作用。口腔行业是处在飞速发展中的行业, 各种新技术不断革新, 人工智能正在以多种方式改变口腔行业, 从提高诊断速度和准确性到治疗精度和疗效。本书籍详细讲述了人工智能的发展现状, 对口腔医学各个领域, 包括牙体牙髓病学、口腔修复学、口腔正畸学、颌面外科学、牙周学等各个学科及口腔医学教育领域的应用, 并对人工智能未来在口腔医学领域可能的应用进行展望。

