

网络药理学联合实验验证揭示枸杞干预糖尿病牙周炎的多靶点机制

雷莎莎¹, 陈 勋¹, 赖 爽¹, 牟雁东^{1,2}

1. 电子科技大学医学院, 四川 成都 610054; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)口腔医学中心, 四川 成都 610072

【摘要】 目的 探讨枸杞干预糖尿病牙周炎的分子机制。**方法** 利用网络药理学筛选枸杞活性成分与糖尿病牙周炎的共同靶点, 构建 PPI 网络并筛选核心靶点, 并进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析; 进一步构建“成分-靶点-通路”多维网络, 通过分子对接验证核心成分与靶点的结合能力。体外实验评估枸杞提取物对人脐静脉内皮细胞迁移、巨噬细胞炎症基因的表达及大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。**结果** 网络药理学筛选出 36 种活性成分及 60 个共同靶点(核心靶点: AKT1、IL6、TNF), 富集分析显示靶点涉及 AGE-RAGE 糖尿病并发症等通路。多维网络显示槲皮素等核心成分通过调控 AGE-RAGE 等通路协同作用于关键靶点; 分子对接证实槲皮素等与核心靶点结合良好。体外实验结果显示: 枸杞提取物可促进人脐静脉内皮细胞迁移; 下调巨噬细胞促炎基因 *Tnf*、*Il6* 的表达, 并上调抗炎基因 *Il10* 的表达; 增强 AGEs 处理的大鼠骨髓间充质干细胞 ALP/ARS 染色, 并上调成骨基因 *Alp*、*Runx2*、*Bglap* 的表达。**结论** 枸杞可能通过抑制 AGE-RAGE 通路减少炎症因子释放, 协同改善血管功能与成骨分化, 促进糖尿病牙周骨缺损修复。

【关键词】 枸杞; 糖尿病牙周炎; 网络药理学; 分子对接; 分子机制

【中图分类号】 R285.5; R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-6170(2026)03-0066-06

Network pharmacology combined experimental verification reveals the multi-target mechanism of lycium barbarum intervention in diabetes periodontitis LEI Sha-sha¹, CHEN Xun¹, LAI Shuang¹, MU Yan-dong^{1,2} 1. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China; 2. Stomatology Centre, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital (Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610072, China

【Corresponding author】 MU Yan-dong

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of Lycium barbarum L. (LB) in the intervention of diabetic periodontitis (DP). **Methods** Network pharmacology was used to screen the common targets of LB active components and DP. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed to identify core targets followed by GO and KEGG pathway enrichment analyses. A "component-target-pathway" multi-dimensional network was further established. Molecular docking was performed to validate the binding affinity between core components and key targets. In vitro, experiments were conducted to evaluate the effects of LB extract on HUVECs migration, macrophage inflammatory gene expression and BMSC osteogenic differentiation. **Results** Network pharmacology identified 36 active components and 60 common targets. The core targets were AKT1, IL-6 and TNF. Enrichment analysis showed that these targets were mainly involved in pathways such as AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications. The multi-dimensional network demonstrated that core components like quercetin synergistically regulated key targets via pathways such as AGE-RAGE. Molecular docking further confirmed their strong binding affinity. In vitro experiments further showed that LB extract promoted the HUVECs migration, down-regulated the expression of pro-inflammatory genes such as *Tnf* and *Il-6* and upregulated anti-inflammatory gene such as *Il-10* in macrophages. It enhanced ALP/ARS staining as well as the expression of osteogenic genes such as *Alp*, *Runx2* and *Bglap* in AGEs-treated BMSCs. **Conclusions** LB may reduce the inflammatory factor release by inhibiting the AGE-RAGE pathway. Thus, it synergistically improves the vascular function and osteogenic differentiation, thereby, promotes the bone defect repair in diabetic periodontitis.

【Key words】 Lycium barbarum L.; Diabetic periodontitis; Network pharmacology; Molecular docking; Molecular mechanism

牙周炎是糖尿病的第六大并发症^[1], 二者存在双向促进关系: 高血糖通过促进活性氧生成、加剧氧化应激^[2], 上调促炎因子、削弱中性粒细胞功能等方式加重牙周损伤; 而牙周病原菌及其产物进入循环后可诱发全身性炎症, 促进胰岛素抵抗^[3], 增加血糖控制难度。目前, 传统牙周治疗对血糖控制不佳者效果有限, 且缺乏可同步调控血糖与牙周炎

症的药物, 长期使用抗生素亦存在耐药风险。因此, 开发多靶点治疗策略具有重要临床意义。

枸杞作为传统中药, 含多糖、黄酮、生物碱等多种活性成分^[4], 具有免疫调节与抗炎作用。古籍记载其可“补肾益精、强筋健骨”, 常用于骨伤治疗。既往研究显示枸杞提取物不仅改善糖代谢紊乱^[5], 还能通过调控巨噬细胞极化缓解炎症^[6]。文献报道显示, 2.0 mg/ml 枸杞提取物在抗氧化、抗炎及促血管生成等方面均表现出明确的生物学效应^[7, 8], 提示枸杞可能成为治疗糖尿病牙周炎 (diabetic periodontitis, DP) 的潜在候选药物。作为一种多成分天

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (编号: 82470953); 成都市科学技术局基金项目 (编号: 2024-YF09-00026-SN)

【通讯作者】 牟雁东

然药物,枸杞具有多靶点、整体调节的特点,与中医药治疗理念相契合。本研究整合网络药理学与实验验证,系统解析枸杞干预 DP 的关键靶点与作用网络,构建“成分-靶点-通路”多维模型,旨在揭示其分子机制,并为靶向药物开发提供理论依据。该策略融合传统中药理论与现代生物学方法,有望为 DP 治疗开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究于 2024 年 12 月至 2025 年 7 月进行。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)、小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(mouse leukemia cells of monocyte macrophage, RAW264.7)及大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)均购自中国科学院上海细胞库。枸杞提取物(宁夏天仁枸杞生物科技股份有限公司,中国宁夏);脂多糖(LPS, Solarbio, 中国北京);晚期糖基化终末产物(AGEs, 博奥森, 中国北京);DMEM 培养基(Gibco, 美国);胎牛血清(FBS, Gibco, 美国);成骨诱导液:DMEM 基础培养基中添加 10% FBS、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗坏血酸、10 mM β -甘油磷酸钠及 100 nM 地塞米松;ALP 染色试剂盒(碧云天, 中国上海);ARS 染色试剂盒(赛业生物, OriCell, 中国广州);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 qPCR 试剂盒均购自艾科瑞生物(中国湖南);实时定量 PCR(RT-qPCR)引物由艾科瑞生物工程合成。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学分析 从 TCMSP 与 BATMAN-TCM 数据库获取枸杞组分,结合口服利用度($OB \geq 30\%$)与类药性($DL \geq 0.18$)筛选活性成分,预测其靶点并经 UniProt 统一基因命名。通过 GeneCards 与 OMIM 收集“diabetic periodontitis”相关靶点。利用 Venny 2.1 获取药物-疾病交集靶点,导入 STRING 11.5 构建蛋白质相互作用网络(PPI)(置信度 ≥ 0.9),Cytoscape 提取核心靶点。借助 DAVID 进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。进一步采用 Cytoscape 3.9.0 构建“成分-疾病-靶点”及“成分-通路-靶点”网络。利用 AutoDock Vina 对

核心成分与靶点进行分子对接验证,蛋白与配体结构分别源自 PDB 与 PubChem,预处理后完成对接及可视化。

1.2.2 体外实验 将生长状态良好的 HUVECs 以 5×10^5 /孔密度接种于 6 孔培养板中,形成单层后划痕。随后用无菌 PBS 轻轻洗涤细胞 2~3 次,去除脱落细胞及碎片。根据实验分组更换相应处理培养基;正常对照组加入含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基;糖尿病模拟组在含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基中添加 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AGEs^[9];干预组在糖尿病模拟组基础上加入枸杞提取物(购自宁夏天仁枸杞生物科技股份有限公司)至终浓度为 2.0 mg/ml。于划痕后 0 h 及 24 h,在倒置相差显微镜下观察并拍摄划痕区域图像,采用 Image J 软件测量划痕宽度,愈合率(%)=(初始划痕面积-当前划痕面积/初始划痕面积)/初始划痕面积 $\times 100\%$ ^[10]。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.3 RT-qPCR RAW264.7 和 BMSCs 分别用于探究枸杞提取物对炎症及成骨相关基因表达的影响。以 LPS 刺激 RAW264.7 细胞构建炎症模型,细胞分为三组:对照组(常规培养基)、糖尿病组(含 100 ng/ml LPS 的培养基)^[11]及枸杞提取物干预组(含 100 ng/ml LPS 和 2.0 mg/ml 枸杞提取物的培养基)。各组细胞共培养 24 h 后收集样本。BMSCs 亦分为三组:对照组(常规成骨诱导培养基培养);糖尿病组(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AGEs 的成骨诱导培养基培养)^[12];枸杞提取物干预组(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AGEs 和 2.0 mg/ml 枸杞提取物的成骨诱导培养基培养)。各组细胞继续培养 7 d,每 2~3 d 更换一次相应培养基,维持诱导环境稳定。以 *Actb* 为内参基因,检测炎症相关基因肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *Tnf*)、白细胞介素-6 (interleukin-6, *Il6*)、白细胞介素-10 (interleukin-10, *Il10*) 及成骨相关基因碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, *Alp*)、Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、骨钙素 (bone gamma-carboxyglutamate protein, *Bglap*) 的表达水平,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
<i>Alp</i> (兔)	CATCGCTATCAGCTAATGCACA	ATGAGGTCCAGGCCATCCAG
<i>Runx2</i> (兔)	CATGCCCGGAATGATGAG	TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
<i>Bglap</i> (兔)	GCTGAAGCCTGACCCATCTC	GTCCTCGTCATCATCGTCCA
<i>Actb</i> (兔)	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG
<i>Tnf</i> (鼠)	GCCAGGAGGGAGAACAGAAACTC	GGCCAGTGAGTAAAGGGACA
<i>Il6</i> (鼠)	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA
<i>Il10</i> (鼠)	TGGGTGAGAAGCTGAAGACC	TGGCCTTGTAGACACCTTGG
<i>Actb</i> (鼠)	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

1.2.4 碱性磷酸酶 (ALP) 与茜素红 S (ARS) 染色 BMSCs 接种于 6 孔板 (1×10^5 /孔) 并诱导成骨分化 (分组同 1.2)。ALP 染色 (诱导 14 天) 与 ARS 染色 (诱导 21 天) 前, 细胞均经 4% 多聚甲醛固定 10 min 及 PBS 清洗。随后分别加入 ALP 染色液 (避光 30 min) 或 1% 茜素红 S 染液 (pH 4.2, 30 min) 进行染色, 洗涤后拍照记录。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析, 计量资料均以均数 \pm 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较使用 Dunnett 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析与分子对接验证 网络药理学筛选出枸杞 36 种活性成分及其 207 个作用靶点。通过与 GeneCards 和 OMIM 数据库获得的 1014 个

DP 靶点取交集, 得到 60 个共同作用靶点 (图 1a)。基于交集靶点构建蛋白互作 (PPI) 网络 (图 1b), 拓扑分析识别出 AKT1、IL6 与 TNF 为关键枢纽节点; 按连接度排序, 前 10 位核心靶点依次为 AKT1、IL6、TNF、TP53、PPARG、CASP3、IL1B、HIF1A、TGFB1 和 ESR1 (图 1c)。GO 与 KEGG 富集分析 (图 1d、1e) 显示, 这些靶点显著富集于基因表达调控、缺氧反应等生物过程, 以及 AGE-RAGE 信号通路、流体剪切力与动脉粥样硬化及脂质与动脉粥样硬化通路等相关通路。进一步的“成分-靶点-通路”网络分析 (图 1f) 鉴定出槲皮素、 β -谷甾醇和豆甾醇为枸杞的核心活性成分。如图 1g 所示, 这些成分作为枢纽, 通过 AGE-RAGE 等核心通路整合, 共同调控 AKT1、IL6、TNF 等关键节点, 形成了多靶点协同作用网络。

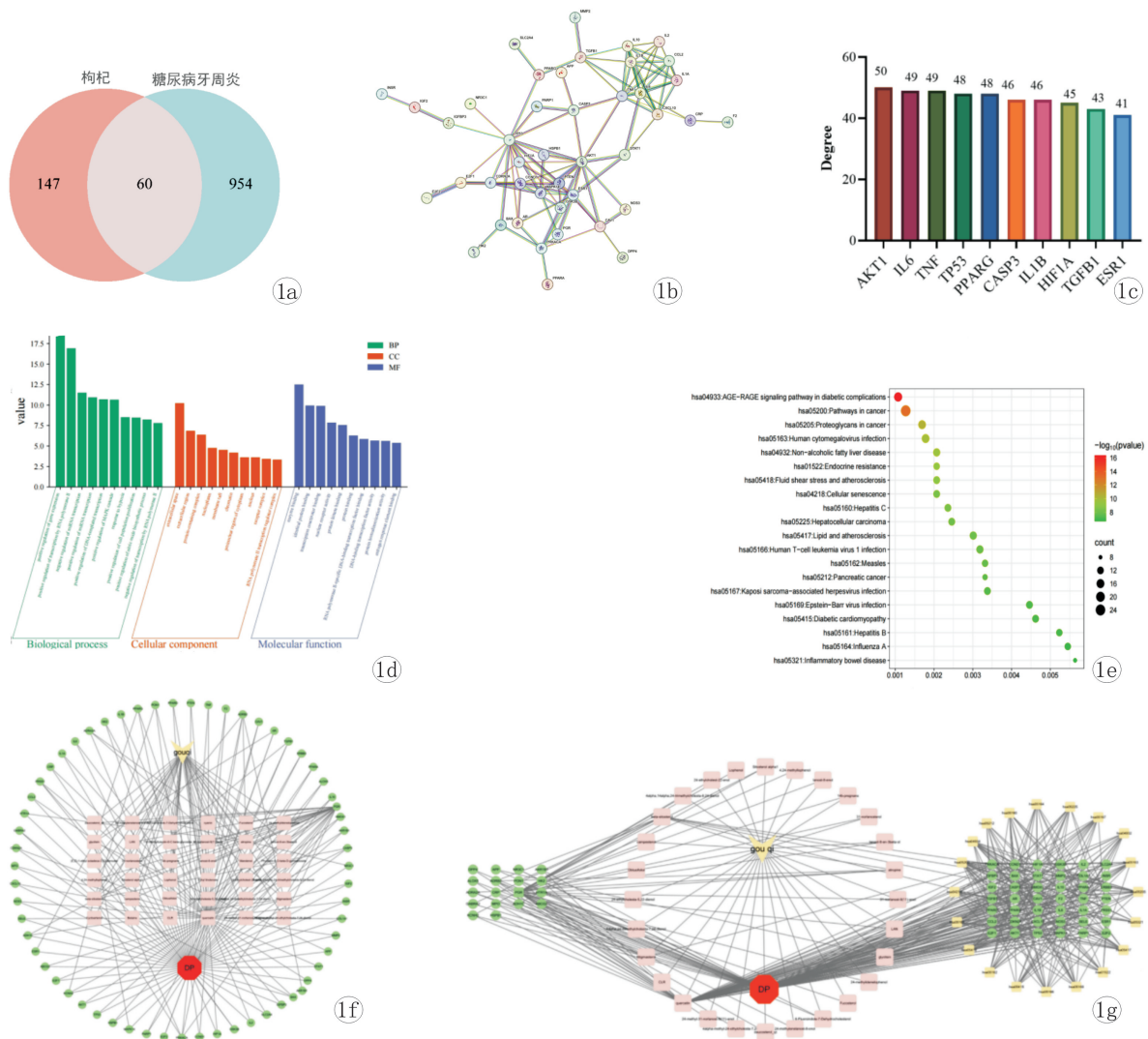


图 1 枸杞提取物干预糖尿病牙周炎的网络药理学分析 a: 药物-疾病交集靶点韦恩图; b: PPI 网络; c: 核心靶点连接度排序; d: GO 分析 Top10 条目; e: KEGG 分析 Top20 通路; f: 成分-疾病-靶点网络; g: 成分-通路-靶点网络

分子对接显示: 所有复合物的结合自由能均 ≤ -5.0 kcal/mol, 见表 2。其中, β -谷甾醇和豆甾醇与 TNF

的结合活性最高 (-10.1 kcal/mol)。分子对接模式图 (图 2) 显示所有复合物均能形成稳定的氢键网络。

表 2 有效活性成分与核心分子对接结果 (kcal/mol)

配体与受体	AKT1	IL6	TNF
槲皮素	-5.5	-5.4	-6.3
β -谷甾醇	-8.3	-7.7	-10.1
豆甾醇	-8.2	-8.9	-10.1

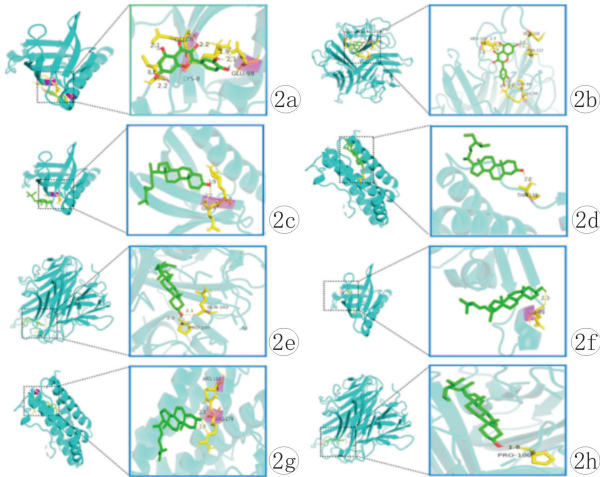


图 2 核心活性成分与关键靶点的分子对接模式图 a: 槲皮素与 AKT1; b: 槲皮素与 TNF; c: β -谷甾醇与 AKT1; d: β -谷甾醇与 IL6; e: β -谷甾醇与 TNF 的结合模式; f: 豆甾醇与 AKT1; g: 豆甾醇与 IL6; h: 豆甾醇-TNF

2.2 枸杞提取物对内皮功能保护作用 划痕培养 24 小时后, 正常对照组细胞表现出较强的迁移能力, 划痕间隙明显缩小; 而糖尿病模型组细胞迁移显著受到抑制, 划痕愈合缓慢。与糖尿病组相比, 在加入 2.0 mg/ml 枸杞提取物干预后, HUVECs 的迁移能力得到明显改善, 表现为划痕闭合速度加快, 愈合率显著提高(图 3a)。划痕愈合率统计分如图所示(如图 3b); 糖尿病组的愈合率显著低于正常对照组($P < 0.05$), 而枸杞干预组的愈合率较 AGEs

模型组显著提升($P < 0.001$)。

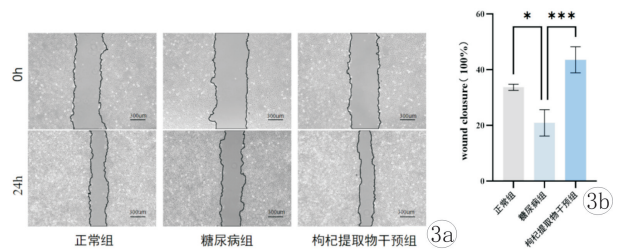


图 3 枸杞提取物对 HUVECs 迁移的影响 a: 划痕实验图像; b: 划痕愈合率。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

2.3 枸杞提取物对体外炎症基因表达的调控作用 RT-qPCR 结果显示, 与糖尿病模型组相比, 枸杞提取物干预可显著下调促炎基因(如 *Tnf*、*Il6*)的表达并上调抗炎基因 *Il10* 的表达。见图 4。

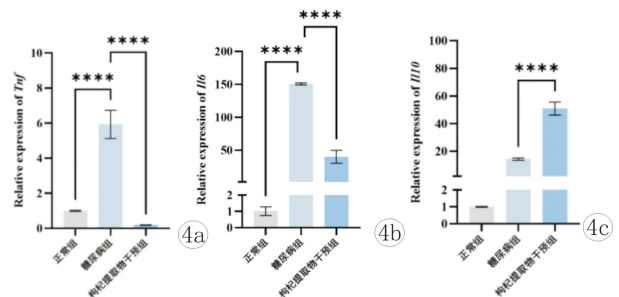


图 4 枸杞提取物对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 a: *Tnf*; b: *Il6*; c: *Il10* * $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$

2.4 枸杞促进糖尿病牙周炎体外模型中的成骨分化 ALP 与 ARS 染色结果表明(图 5a), AGEs 处理组染色明显减弱, 而枸杞提取物干预后染色增强; RT-qPCR 结果进一步显示(图 5b), 枸杞提取物可显著上调 AGEs 处理的大鼠 BMCSs 的 *Alp*、*Runx2*、*Bglap* 基因表达($P < 0.05$)。

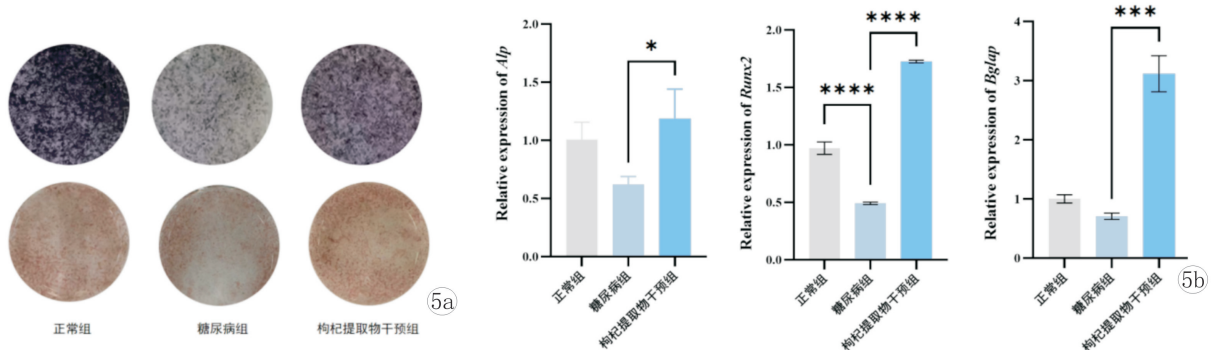


图 5 枸杞提取物对 BMSCs 成骨分化的影响 a: ALP 与 ARS 染色; b: 成骨基因 mRNA 表达 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

3 讨论

本研究整合网络药理学与实验验证, 系统阐释了枸杞干预糖尿病牙周炎的多成分、多靶点作用机制, 为 DP 的辅助治疗策略制定提供了新的理论依据与科学支撑。

网络药理学分析鉴定出槲皮素、 β -谷甾醇和豆甾醇等枸杞主要活性成分, 均具有抗炎、抗氧化及免疫调节作用。槲皮素作为黄酮类化合物的代表, 展现出多方面的生物效应: ①清除氧自由基, 显著改善氧化应激状态; ②调控炎症相关信号通路, 有

效抑制促炎因子表达;③具有调节血糖^[13, 14]和促进骨形成的双重功效^[15]。植物甾醇类成分 β -谷甾醇在免疫调节方面同样表现突出^[16]。研究表明,该成分能够有效抑制炎症相关介质的生成^[17],并对高糖环境诱导的足细胞氧化应激及炎症反应具有明显的缓解作用^[18]。分子对接结果显示,这些核心成分(包括豆甾醇)均与 AKT1、IL6、TNF 等关键靶点表现出较高的结合亲和力,从理论上揭示了枸杞通过多种活性成分协同发挥治疗作用。KEGG 富集分析表明糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、糖尿病心脏病、流体剪切力与动脉粥样硬化以及脂质与动脉粥样硬化等通路在枸杞干预 DP 过程中发挥核心调控作用,这些通路及慢性炎症反应及免疫调节密切相关。AGE-RAGE 通路机制主要体现在三个方面:①调控氧化应激:氧化应激是牙周炎发生发展的关键因素之一^[19],晚期糖基化终产物的异常积累可诱导活性氧大量生成,造成牙周组织损伤。②抑制炎症反应:RAGE/NF- κ B 通路激活促进 TNF- α 、IL-6 等促炎因子过度表达^[20]。③骨代谢调节:AGE-RAGE 信号通路可通过激活 PI3K-AKT 信号轴,一方面调控胰岛素分泌及血糖稳态,另一方面通过影响破骨细胞分化与骨吸收功能参与牙周炎进展^[21]。上述机制共同构成“氧化应激—炎症反应—骨代谢平衡”调控网络,为阐释枸杞“多成分-多靶点-多通路”作用模式提供系统生物学依据。

糖尿病及其并发症(包括 DP)与免疫失调、血管功能障碍及成骨分化受损密切相关。在糖尿病微环境中,AGEs 通过与血管内皮细胞表面受体结合,诱发炎症、氧化应激和内皮损伤^[22],导致骨缺损区血供不足、愈合延迟;同时,巨噬细胞由 M1 向 M2 型转化受阻^[23],持续炎症进一步阻碍组织修复。基于上述机制,本研究选用 HUVECs、RAW264.7 和 BMSCs 三种细胞模型,分别在 100 ng/ml LPS^[11]与 100 μ g/ml AGEs^[12]诱导的糖尿病模拟环境中,评估枸杞提取物的保护作用。功能实验显示,枸杞提取物可促进 HUVECs 迁移,可下调 RAW264.7 促炎基因(*Tnf*、*Il6*)表达、上调抗炎基因(*Il10*)表达;同时其可增强 AGES 处理的 BMSCs 细胞 ALP/ARS 染色强度,并上调成骨基因(*Alp*、*Runx2*、*Bglap*)表达。上述结果与预测靶点(AKT1/TNF/IL6)及 AGE-RAGE 通路高度吻合,表明枸杞可能通过抑制 AGE-RAGE 通路,减少下游炎症因子释放,协同改善血管功能与成骨分化,从而促进糖尿病骨缺损修复。

本研究构建了“网络药理学预测→分子对接→细胞功能验证”三位一体的研究体系,以系统阐释枸杞干预 DP 的机制。细胞实验验证网络预测的可

靠性:枸杞提取物可下调 *Tnf*、*Il6* 表达,并促进 AGEs 诱导下成骨基因(*Alp*、*Runx2*、*Bglap*)转录,证实其对 AGE-RAGE 通路下游事件的调控作用。值得注意的是,基因与染色变化幅度并不完全同步,提示成骨分化中存在基因-蛋白解耦现象。当然,本研究亦存在局限性,网络药理学预测的结果有待通过更深入的分子生物学实验(如 Western blot、基因敲低等)予以最终证实;推动相关成果向临床转化,亦是未来的重要研究方向。综上所述,本研究通过上述整合性策略,初步建立了“成分-靶点-通路”相互作用调控网络,为枸杞应用于糖尿病牙周炎的防治提供了理论基础与潜在靶点。

【参考文献】

- [1] Wu CZ, Yuan YH, Liu HH, et al. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus [J]. BMC Oral Health, 2020,20(1):204.
- [2] Buranasin P, Kominato H, Mizutani K, et al. Influence of reactive oxygen species on wound healing and tissue regeneration in periodontal and peri-implant tissues in diabetic patients [J]. Antioxidants (Basel), 2023,12(9):1787.
- [3] Fan Y, Lin Z, Cheng L, et al. Levels of peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells and glycaemic control level in patients with both type 2 mellitus diabetes and stage III-IV periodontitis: a randomized controlled trial in Chinese population [J]. BMC Oral Health, 2025, 25(1):1065.
- [4] Li Y, Wang X, Sa Y, et al. A comparative UHPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach reveals the metabolite profiling of wolfberry sourced from different geographical origins [J]. Food Chem X, 2024,21(10):101221.
- [5] Yang C, Ma L, Ma J, et al. Lycium barbarum leaf flavonoids ameliorate high fructose induced insulin resistance in mice by regulating blood glucose and gut microbiota composition [J]. Food Biosci, 2024,62:105087.
- [6] Liu ZC, Yu WW, Zhou HC, et al. Lycium barbarum polysaccharides ameliorate LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells and modify the behavioral score of peritonitis mice [J]. J Food Biochem, 2021,45(10):e13889.
- [7] Li R, Qu S, Qin M, et al. Immunomodulatory and antiviral effects of Lycium barbarum glycopeptide on influenza a virus infection [J]. Microb Pathog, 2023,176:106030.
- [8] Zhong W, Liao W, Xu L, et al. Lycium-barbarum polysaccharide-loaded dual-crosslinked rigid hydrogel enhances bone healing in diabetic bone defects by scavenging reactive oxygen species [J]. Adv Healthc Mater, 2025,14(11):e2404741.
- [9] Yang Y, Wang L, Zhou Y, et al. Antioxidant-enriched autologous biogel promoted diabetic wound healing by remodeling inherent post-traumatic inflammatory patterning and restoring compromised micro-environment homeostasis [J]. Regen Biomater, 2022,9:c23.
- [10] Greene CJ, Anderson S, Barthels D, et al. DPSC products accelerate wound healing in diabetic mice through induction of SMAD molecules [J]. Cells, 2022,11(15):2409.