

基于网络药理学和细胞实验验证姜黄素对槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化的抑制作用

张志云¹, 陈迪路^{1,2}, 杨冬梅², 卜兰兰^{2*}

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉金银潭医院药剂科, 湖北省传染病临床医学研究中心, 湖北 武汉 430023; 2. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 通过网络药理学结合细胞实验验证探讨姜黄素对槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化的影响。**方法** 通过 TCSP 数据库获得姜黄素的靶点, PubChem 数据库获取姜黄素 3D 结构, 导入 PharmMapper 进行药物靶点预测; NCBI 数据库得到口腔黏膜下纤维化靶点, 得到共有靶点, 绘制韦恩图。通过 STRING 数据库构建 PPI 网络, Cytoscape 3.9.1 软件构建网络模型, DAVID 平台进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, AutoDock 软件进行分子对接, PyMol 软件可视化处理。通过槟榔碱构建口腔黏膜下纤维化 HaCaT 细胞, 并采用 siCav-1 进行干预, 考察姜黄素对口腔黏膜下纤维化及其关键通路和靶点表达的影响。**结果** 共获得 22 个姜黄素和口腔黏膜下纤维化共有靶点。PPI 网络筛选得到 1 个关键子网络。GO 富集分析发现, 姜黄素干预口腔黏膜下纤维化与 Cav-1 等多种生物功能相关。KEGG 结果显示, 细胞焦亡密切相关的 NOD 样受体信号通路 PPI 网络中的关键子网络之一紧密联系。实验表明, 姜黄素能降低 HaCaT 细胞 LDH、IL-1 β 、IL-18、ROS 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$); 姜黄素可降低 HaCaT 细胞 Collagen-I、Cav-1、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$); 进一步研究发现, 敲低 HaCaT 细胞 Cav-1 后细胞焦亡和纤维化均被抑制, 且姜黄素和 siCav-1 同时干预与单独干预比较上述蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)。**结论** 姜黄素可通过调控 Cav-1 抑制槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化进程, 该机制可能参与其减轻槟榔碱诱导的口腔黏膜下纤维化, 具体机制有待后续进一步研究。

关键词: 姜黄素; 口腔黏膜纤维化; caveolin-1 (Cav-1); HaCaT 细胞; 焦亡; 网络药理学

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4203-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.049

口腔黏膜下纤维化是一种慢性和炎症性的口腔黏膜疾病^[1]。咀嚼槟榔是口腔黏膜下纤维化主要的致病因子^[2], 其发展进程与咀嚼槟榔的频率及维持的时间呈剂量依赖性, 槟榔中槟榔碱是主要的影响因子^[3]。

细胞焦亡是一种与炎症相关的细胞程序性死亡方式, 与纤维化呈正相关^[4]。纤维化是慢性和持续性损伤发病机制中的内在因素, 组织的持续性损伤会导致分泌细胞外基质的成纤维细胞活化、过度纤维化, 最终造成不可逆性组织损伤^[5]。组织胚胎学研究表明, 在炎症反应开始之前, 组织可以愈合而不形成疤痕, 这表明炎症可能是导致纤维化的重要原因^[6]。总之, 炎症物质和促炎细胞因子参与了纤维化的发生发展进程, 因此, 抑制焦亡进而减轻炎症反应可能是改善纤维化的可行策略。

姜黄素具有抗炎等多种药理活性。研究表明, 姜黄素

能降低口腔黏膜下纤维化发生发展密切相关结缔组织生长因子水平, 并且姜黄素能改善口腔黏膜下纤维化引发的烧灼感和张口度^[7-8]。以上研究表明, 姜黄素可能是控制口腔黏膜下纤维化的有效药物。因此, 本实验采用网络药理学和系统生物学理论, 通过构建“姜黄素-靶点-口腔黏膜下纤维化”多层次网络, 初步预测姜黄素治疗口腔黏膜下纤维化的作用机制^[9-10], 旨在为口腔黏膜下纤维化治疗提供新的方向和理论依据。

1 材料

1.1 细胞 人永生角质形成细胞系 HaCaT, 批号 SCSP-5091, 由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 试剂 姜黄素 (批号 08511, 美国 Sigma 公司, 纯度 $\geq 98\%$); 槟榔碱 (批号 DQ0092, 成都德思特生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); DMEM 高糖完全培养基 (批号 ZQ-

收稿日期: 2024-07-25

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2022JJ40314); 湖南中医药大学自然科学基金 (Z2023XJYB12); 湖南中医药大学本科生科研创新基金项目 (2023BKS174)

作者简介: 张志云 (1978—), 主管药师, 研究方向为中西医结合治疗口腔黏膜下纤维化疾病。Tel: 18086632510, E-mail: 731918568@qq.com

***通信作者:** 卜兰兰 (1983—), 博士, 讲师, 研究方向为纤维化相关疾病机制及药效。Tel: 18974978203, E-mail: lanlan_bu@hnu.edu.cn

121, 上海中乔新舟生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (批号 CW0014S, 北京康为世纪生物科技有限公司); DCFH-DA 活性氧检测试剂盒、CCK8 试剂盒、LDH 检测试剂盒、Hoechst33342/PI 染色试剂盒 (批号 S0033S、C0037、C0016、C1056, 上海碧云天生物技术股份有限公司); PVDF 膜 (批号 ISEQ00010, 美国 Millipore 公司); IL-18 ELISA 检测试剂盒、IL-1 β ELISA 检测试剂盒、NLRP3、Collagen- I、Cav-1、caspase-1、IL-18、IL-1 β 抗体、山羊抗兔二抗 (批号 KE00193、KE00021、27458-1-AP、14695-1-AP、16447-1-AP、22915-1-AP、10663-1-AP、16806-1-AP、SA00001-2, 美国 Proteintech 公司); GSDMD-N 抗体 (批号 ab215203, 英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 ix 73 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); FC 型酶标仪、Forma 3 系列 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统、Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学 通过 TCMSP 等数据库 (<http://lsp.tcmssp.php/>) 获得姜黄素相关靶点, 将 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到的姜黄素 3D 结构导入 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 进行药物靶点预测。在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的 “Gene” 模块, 输入 “oral submucosal fibrosis”, 得到口腔黏膜下纤维化靶点, 得到共有靶点, 并构建韦恩图。通过 STRING 数据库 (<https://STRING-db.org>) 进行 PPI 网络构建, 并导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建网络模型并分析; 通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。利用 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 筛选并下载分辨率小于 2.5 Å 的靶点的结晶复合式, 结合上述得到的姜黄素 3D 结构, 采用 AutoDock 软件进行分子对接, 运用 PyMol 软件进行可视化处理。

2.2 HaCaT 细胞的培养、模型构建及给药 HaCaT 细胞与口腔角质形成细胞的来源、性质、功能相似度高, 并且在先前的口腔疾病研究中, 口腔角质形成细胞经常被 HaCaT 细胞系所取代, 现已广泛应用于槟榔碱造模致口腔黏膜下纤维化等口腔黏膜研究中^[11-12]。因此, 本实验选择了该细胞模型。将 HaCaT 细胞加入完全培养基 (DMEM 高糖培养基+10% FBS+1% 青霉素/链霉素) 于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中常规培养。细胞密度为 90% 左右时, 用 DMEM 高糖培养基配制槟榔碱 (200 μmol/L) 干预 HaCaT 细胞, 构建口腔黏膜下纤维化模型^[13]。将含 10 mmol/L 姜黄素的 DMSO 溶液加入含 200 μmol/L 槟榔碱的 DMEM 高糖完全培养基 (DMSO 浓度小于 1%) 后, 斡旋混匀至所需浓度后给药。

2.3 CCK8 法检测细胞存活率 将对数生长期的 HaCaT 细胞消化后制成细胞悬液, 以 5.0×10³/孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 加入不同浓度姜黄素 (0、2.5、5、

10、20、40 μmol/L) 和槟榔碱 (0、50、100、200、400、800 μmol/L) 的培养液分别干预 24、48 h, 每组设置 5 个复孔。每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 置于培养箱中孵育 1 h, 采用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值, 取平均值, 计算细胞存活率, 公式为细胞存活率 = (A_{实验组}/A_{对照组}) ×100%。

2.4 LDH 释放实验 将细胞密度为 90% 左右的 HaCaT 细胞分为对照组、模型组和姜黄素低、中、高剂量组, 对照组不做任何处理, 模型组加入 200 μmol/L 槟榔碱处理 24 h, 姜黄素低、中、高剂量组分别加入 2.5、5、10 μmol/L 姜黄素和 200 μmol/L 槟榔碱处理 24 h。收集各组细胞上清液, 严格按照相关试剂盒说明书操作, 检测 LDH 释放水平。

2.5 Hoechst33342/PI 染色法观察细胞形态变化 分组处理同 “2.4”, 收集各组细胞, 加入 4 ℃ PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 5 μL/mL Hoechst33342 染色液和 5 μL/mL PI 染色液覆盖, 4 ℃ 下避光孵育 25 min, PBS 洗涤, 于荧光显微镜下观察和拍照。

2.6 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平 分组处理同 “2.4”, 收集各组细胞, 使用无血清培养基将 10 mmol/L DCFH-DA 稀释成 10 μmol/L。去除细胞培养液后, 加入 1 ml 10 μmol/L DCFH-DA, 于 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 20 min, 无血清培养基洗涤 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 于荧光显微镜下观察和拍照。

2.7 ELISA 法检测细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 水平 分组处理同 “2.4”, 收集各组细胞上清液, 严格按照相关试剂盒说明书操作, 检测细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 水平。

2.8 细胞转染 Cav-1 质粒由长沙艾碧维生物科技有限公司合成, 序列见表 1。转染前, 将细胞接种于 6 孔板中用不含双抗的完全培养基培养, 待细胞密度为 70% 时加入 2 mL 含 siRNA-lipo2000 混合液 (245 μL Opti-MEM I+5 μL lipo2000+250 μL 含 100 nmol/L siRNA 的 Opti-MEM I) 的完全培养基置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。通过 Western blot 法验证是否成功。验证成功后, 分为空白组、造模组、姜黄素组、siCav-1 组、姜黄素+siCav-1 组。空白组不做任何处理; 造模组加入 200 μmol/L 槟榔碱处理 24 h; 姜黄素组加入 10 μmol/L 姜黄素和 200 μmol/L 槟榔碱处理 24 h; siCav-1 组先加入 100 nmol/L siRNA-lipo2000 混合液处理 48 h, 再加入 200μmol/L 槟榔碱处理 24 h; 姜黄素+siCav-1 组先加入 100 nmol/L siRNA-lipo2000 混合液处理 48 h, 再加入 10 μmol/L 姜黄素和 200 μmol/L 槟榔碱处理 24 h。

2.9 Western blot 法检测细胞 Cav-1、Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达 分组处理分别同 “2.4” “2.8”, 收集各组细胞, 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解, 提取蛋白, BCA 法检测蛋白含量, 取等质量蛋白进行变性, 加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶, 上样, 电泳, 湿

表 1 基因序列

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
SiCav1-01	GCAUUUGGAAGGCCAGCUUTT	AAGCUGGCCUCCAAAUGCTT
SiCav1-02	GCAGUUGUACCAUGCAUUATT	UAAUGCAUGGUACAACUGCTT
SiCav1-03	CCGCAUCAACUUGCAGAAATT	UUUCUGCAAGUUGAUGCGGTT

转法转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h，分别加入 Cav-1、Collagen-I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 抗体（1：1 000），4 ℃ 下孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000）室温孵育 2 h，使用化学发光辣根过氧化物酶底物显影，以 GAPDH 为内参，通过 Image-Pro Plus 软件计算蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0、SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，数据分布的正态性和方差齐性分别以 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene 检验确定，多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 *t* 检验，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学研究

3.1.1 共有靶点获得 共得到 155 个姜黄素相关靶点，246 个口腔黏膜下纤维化相关靶点，共获得 22 个姜黄素和口腔黏膜下纤维化共有靶点，韦恩图见图 1。

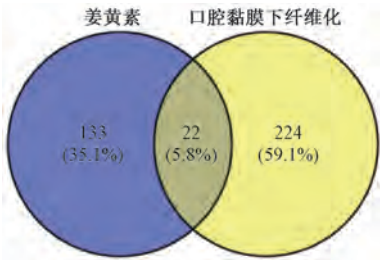


图 1 姜黄素-口腔黏膜下纤维化共有靶点韦恩图

3.1.2 PPI 网络构建 将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化，发现 1 个关键的子网络。见图 2。

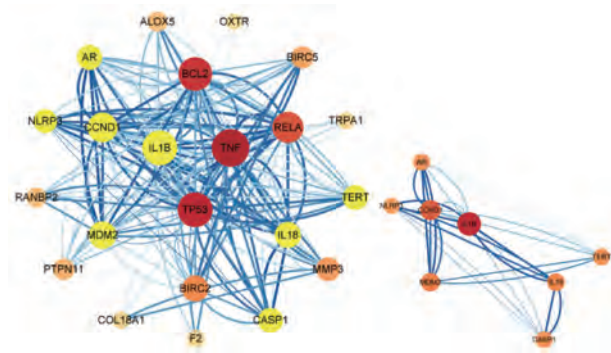


图 2 姜黄素-口腔黏膜下纤维化共有靶点相互作用网络

3.1.3 GO 富集分析 对姜黄素干预口腔黏膜下纤维化的作用及机制进行 GO 富集分析，分别得到细胞对化学应激的反应、炎症反应的调节、对氧气水平下降的反应等 1 181 个生物进程；小窝（caveola, Cav-1）、炎症小体复合体和

核膜等 4 个细胞组成；蛋白质 N 端结合、伴侣结合和转录共激活因子结合等 34 个分子功能，根据 *P*<0.05，选出排名靠前的条目。见图 3。

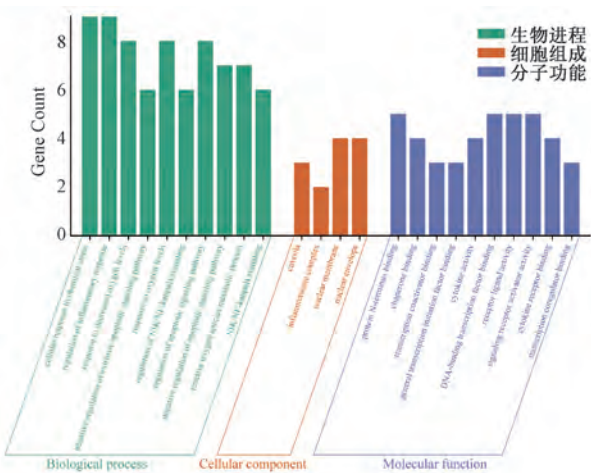


图 3 姜黄素-口腔黏膜下纤维化靶点 GO 功能富集分析

3.1.4 KEGG 富集分析 姜黄素干预口腔黏膜下纤维化的通路涉及 34 条，根据 *P*<0.05，选出排名前十的通路，见图 4。主要涉及 NOD 样受体信号通路、细胞凋亡、坏死等。其中，NOD 样受体信号通路（图 5）的靶点（红框部分）主要涉及姜黄素-口腔黏膜下纤维化网络的核心子网络，并且 NOD 样受体家族含 pyrin 结构域 3（NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3）是该信号通路关键靶点，与细胞焦亡密切相关。

3.1.5 分子对接分析 姜黄素与 Cav-1 结合能为 -3.64 kcal/mol，可视化显示，匹配度良好，化合物与靶点结合的最优构象以氢键的方式呈现，结合活性良好，见图 6。

3.2 细胞实验研究

3.2.1 姜黄素和槟榔碱干预浓度和时间筛选 与 0 μmol/L 姜黄素组比较，随着姜黄素浓度的增加细胞活力降低（*P*<0.05，*P*<0.01），且呈浓度依赖性，当姜黄素浓度低于 10 μmol/L 时，无明显细胞毒性（*P*>0.05），因此，选择低、中、高剂量分别为 2.5、5、10 μmol/L 处理细胞 24 h 进行后续研究。与 0 μmol/L 槟榔碱组比较，随着槟榔碱浓度的增加细胞活力降低（*P*<0.05，*P*<0.01），24 h 的 IC₅₀ 值为 212 μmol/L，故选取 200 μmol/L 槟榔碱干预细胞 24 h 为造模条件进行后续实验。见图 7。

3.2.2 姜黄素对 HaCaT 细胞形态变化的影响 对照组细胞生长状态良好，呈现典型的上皮样细胞形态；模型组细胞改变原有的形状，表现出较小的肿胀（焦亡垂体），并在质膜破裂前产生多个气泡状突起（红色三角指示的细胞），呈现典型的细胞焦亡特征；与模型组比较，姜黄素各剂量组

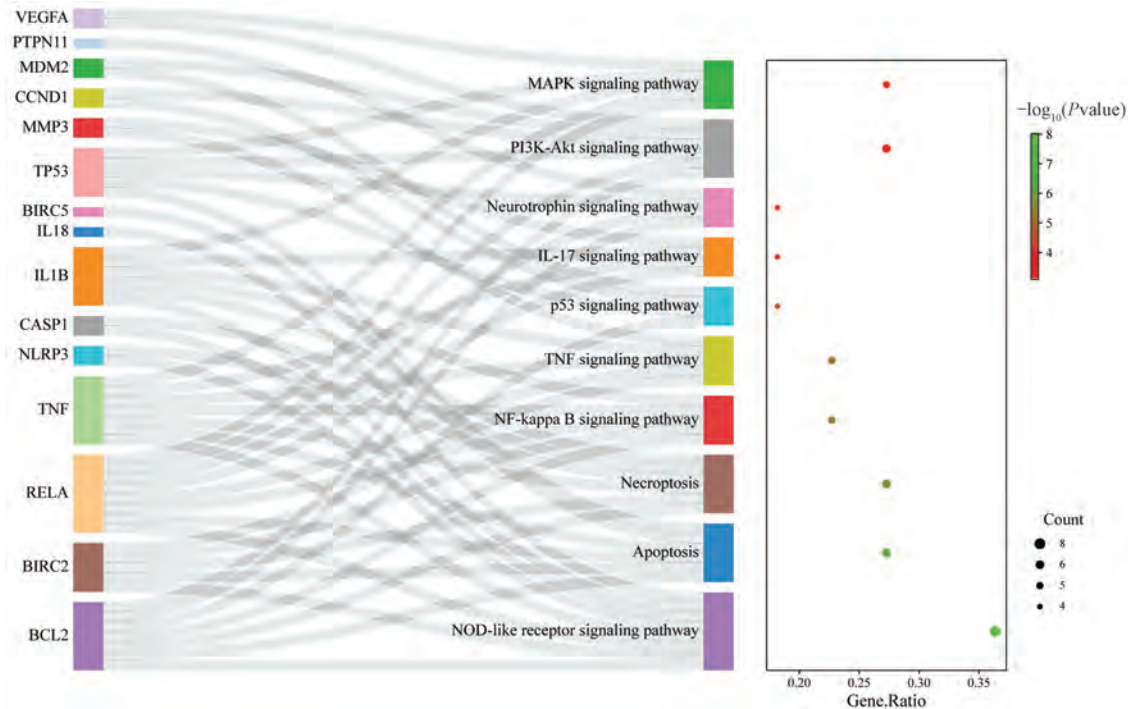


图 4 姜黄素-口腔黏膜下纤维化靶点 KEGG 通路富集分析

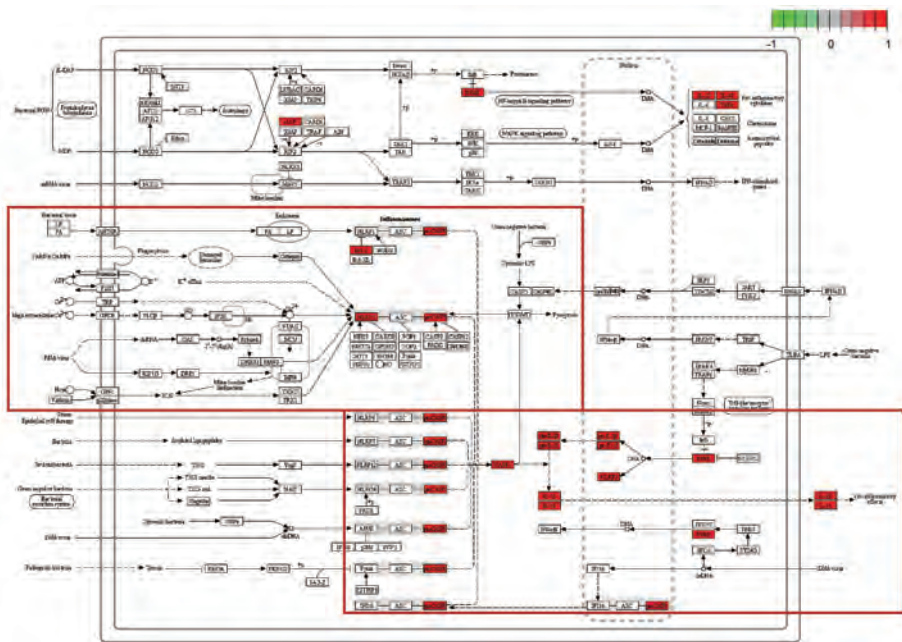


图 5 NOD 样受体信号通路

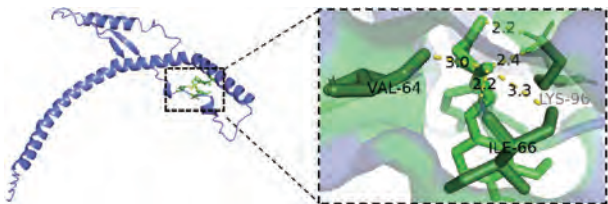
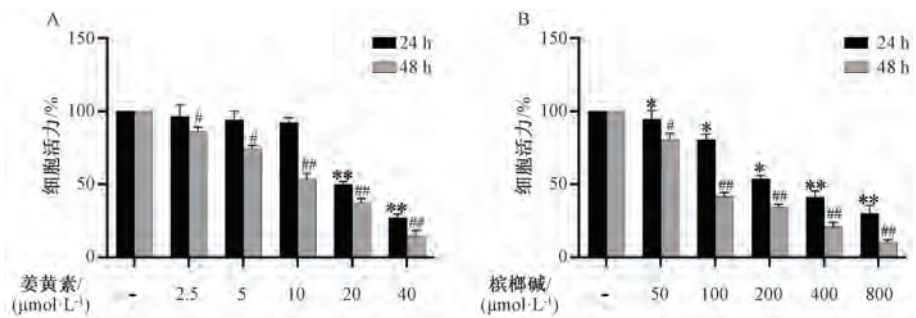


图 6 姜黄素与 Cav-1 分子对接的可视化图

发生焦亡的细胞数量减少，并呈剂量依赖性，见图 8。

3.2.3 姜黄素对 HaCaT 细胞焦亡的影响 与对照组比较，模型组 PI 荧光颜色呈高红色且强度升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，姜黄素各剂量组 PI 红色荧光强度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性。与对照组比较，模型组细胞 LDH 水平升高 ($P<0.01$)，与模型组比较，姜黄素各剂量组细胞 LDH 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见图 9。

3.2.4 姜黄素对 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞内 ROS 水平升高 ($P<0.01$)；与模型



注：与 24 h 0 μmol/L 姜黄素（槟榔碱）组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 48 h 0 μmol/L 姜黄素（槟榔碱）组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 7 不同时间和姜黄素、槟榔碱浓度处理对 HaCaT 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

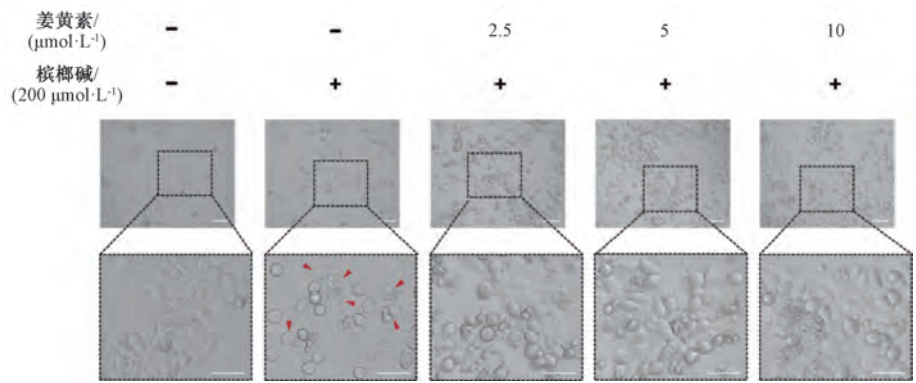


图 8 姜黄素对 HaCaT 细胞形态的影响 ($\times 200$)

组比较，姜黄素各剂量组细胞内 ROS 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见图 10。

3.2.5 姜黄素对 HaCaT 细胞上清液 IL-1β、IL-18 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞上清液 IL-1β、IL-18 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，姜黄素各剂量组细胞上清液 IL-1β、IL-18 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 11。

3.2.6 姜黄素对 HaCaT 细胞 Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组细胞 Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，姜黄素各剂量组细胞 Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 12。

3.2.7 姜黄素抑制 HaCaT 细胞焦亡与 Cav-1 相关 GO 富集分析表明，姜黄素抑制 HaCaT 细胞焦亡与细胞组成中的 Cav-1 表达密切相关。与对照组比较，模型组细胞 Cav-1 表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，姜黄素中、高剂量组细胞 Cav-1 表达降低 ($P<0.05$)，见图 13A ~ 13B。因此，本实验进一步采用 Cav-1 干扰链进行验证，由图 13C 可知，siCav-1-03 干扰效果最佳，故选用此干扰链进行后续实验。

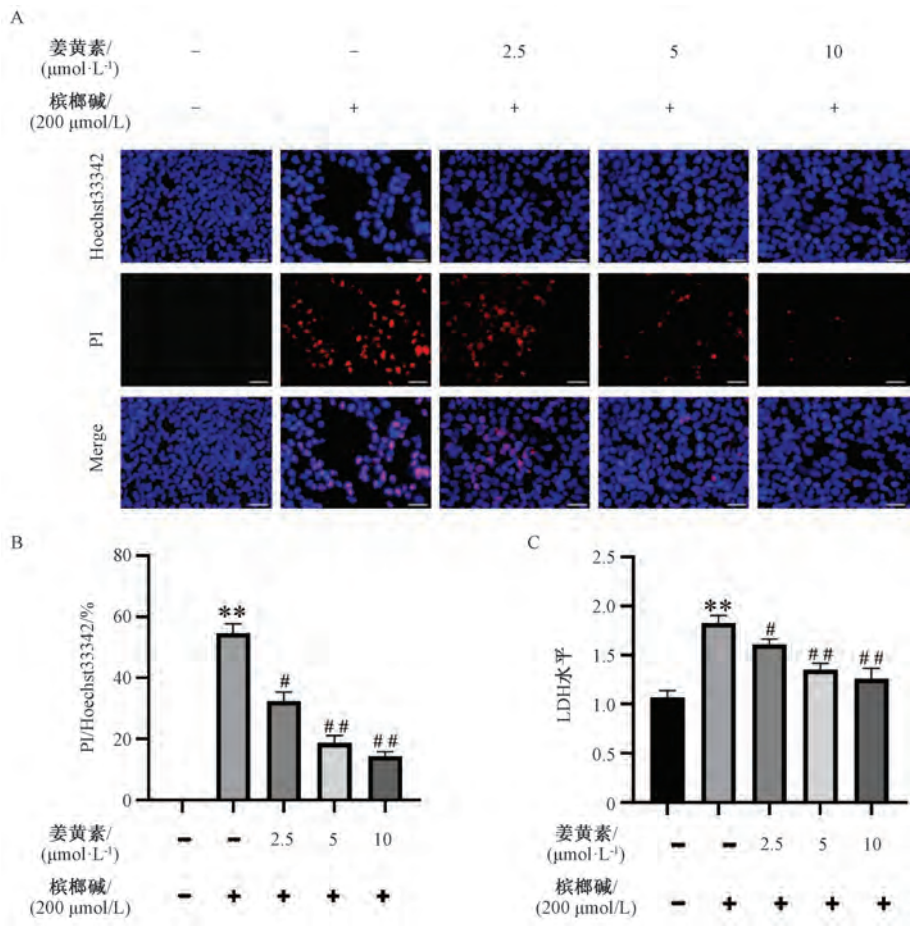
3.2.8 姜黄素通过调控 Cav-1 抑制 HaCaT 细胞焦亡和纤维化 与空白组比较，造模组细胞 Cav-1、Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与造模组比较，姜黄素组和 siCav-1 组细胞 Cav-1、Collagen- I、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、

IL-1β、IL-18 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 14。提示姜黄素通过抑制 Cav-1 减轻 HaCaT 细胞焦亡，减轻 HaCaT 细胞纤维化。

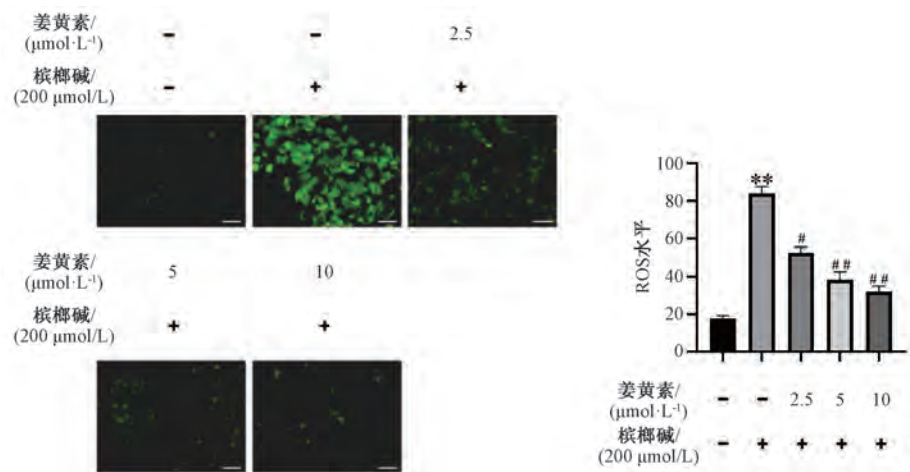
4 讨论

口腔黏膜下纤维化是一种以慢性炎症、上皮萎缩和口腔黏膜上皮下层细胞外基质（extracellular matrix, ECM）沉积为特征的纤维化疾病^[14]。姜黄素作为姜黄的有效成分，具有抗脏器纤维化的潜能，可通过不同途径发挥抗肺、肝、心、肾纤维化作用^[15]。证据表明，姜黄素对口腔黏膜下纤维化的治疗具有潜在活性，其局部应用在口腔黏膜下纤维化患者中表现出显著的治疗效果^[16]。槟榔碱的长期摄入是导致口腔黏膜下纤维化的主要危险因素。因此，探索姜黄素是否能够抑制槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞口腔黏膜下纤维化具有重要的意义。

已有研究表明，槟榔对原代人牙龈成纤维细胞促纤维化基因的表达几乎没有直接影响，但槟榔能够通过激活 HaCaT 细胞的 TGF-β 炎症途径诱导胶原蛋白等基质成分激活原代人牙龈成纤维细胞促进口腔黏膜下纤维化的发生发展^[17]。此外研究发现，槟榔碱能诱导 HaCaT 细胞形态学改变，但对成纤维细胞无影响，并且 HaCaT 细胞对槟榔碱诱导的细胞毒性比成纤维细胞更敏感，这可能是槟榔碱诱导的口腔黏膜下纤维化上皮萎缩和胶原纤维进行性积累的原因^[18]。因此，槟榔碱诱导 HaCaT 细胞的炎症反应可能与槟榔碱诱导的口腔黏膜下纤维化密切相关。本实验表明，姜黄素能使槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞趋于正常状态，并降低



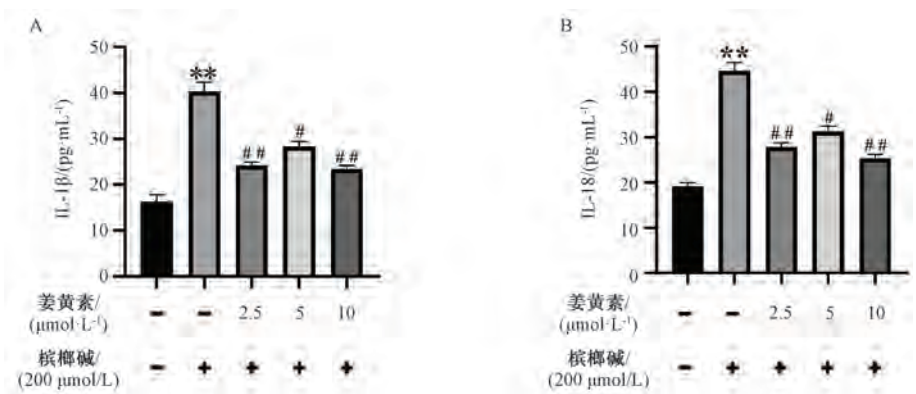
注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 9 姜黄素对 HaCaT 细胞焦亡的影响 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 10 姜黄素对 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

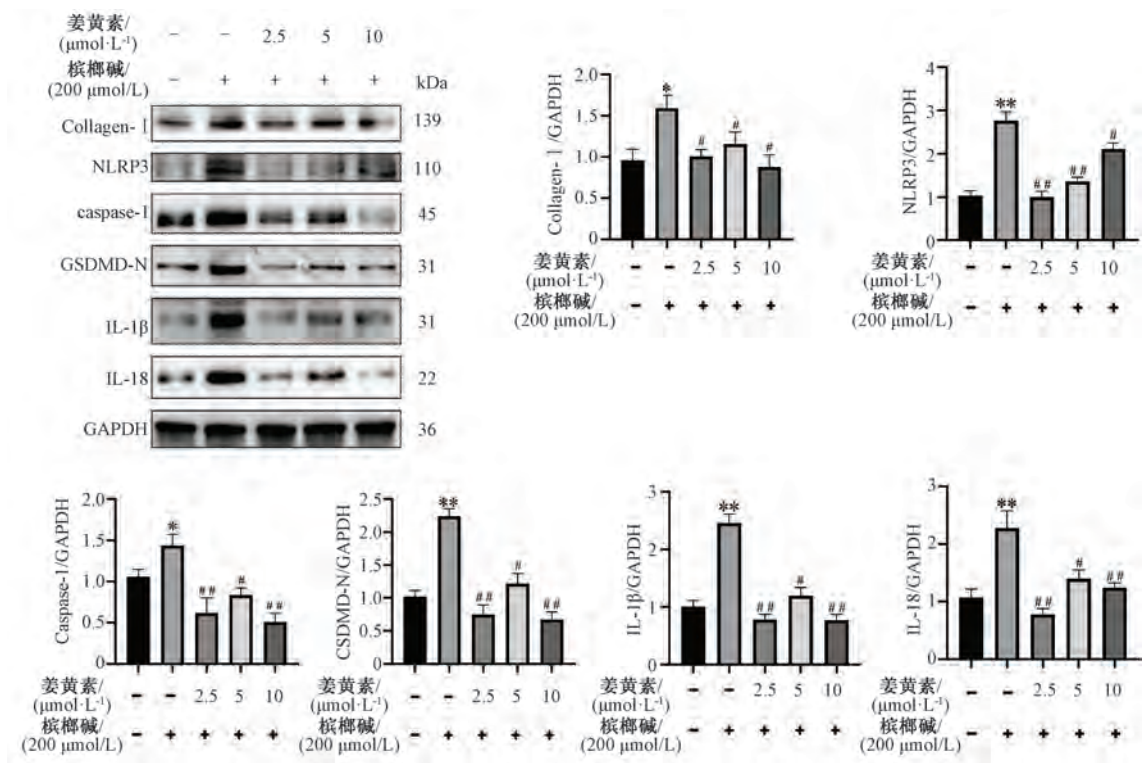
纤维化因子 Collagen- I 水平，抑制 HaCaT 细胞纤维化的进程。基于此，本实验首先通过网络药理学方法探讨姜黄素治疗口腔黏膜下纤维化的潜在靶点及相关机制。结果显示，姜黄素治疗口腔黏膜下纤维化的 PPI 网络涉及 1 个核心子网络，包括白介素 18 (interleukin 18, IL-18)、白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、NLRP3、caspase-1 等靶点。进一

步通过结合 KEGG 通路分析发现，该子网络中的核心靶点与 NOD 样受体信号通路相匹配，NOD 类受体家族中的 NLRP3 能够将病原体相关分子模式分子识别为损伤相关分子模式分子，在纤维化中起着关键作用^[19]。通过深度分析发现，该信号通路与经典细胞焦亡密切相关，细胞焦亡又称细胞炎性坏死，主要表现形式是细胞肿胀至细胞膜破裂，



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 11 姜黄素对 HaCaT 细胞上清液 IL-1β、IL-18 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



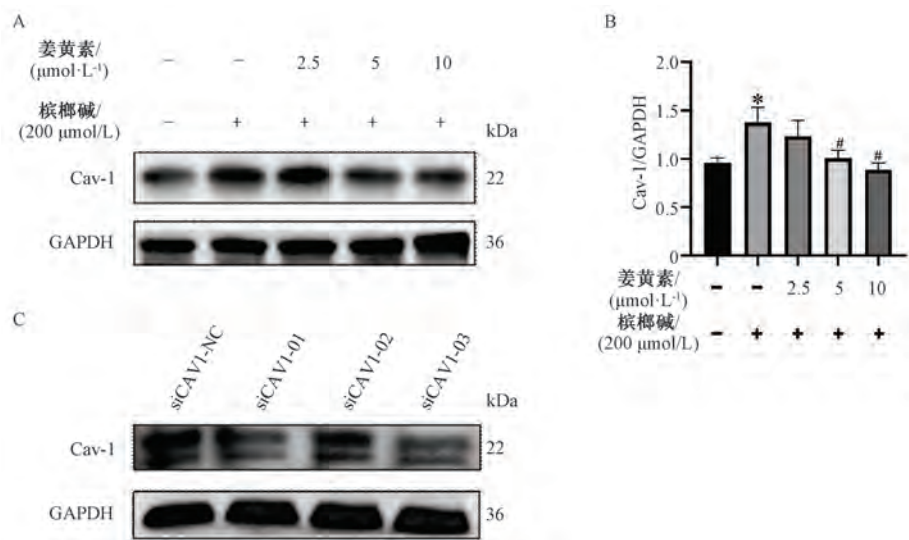
注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 12 姜黄素对 HaCaT 细胞 Collagen-1、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

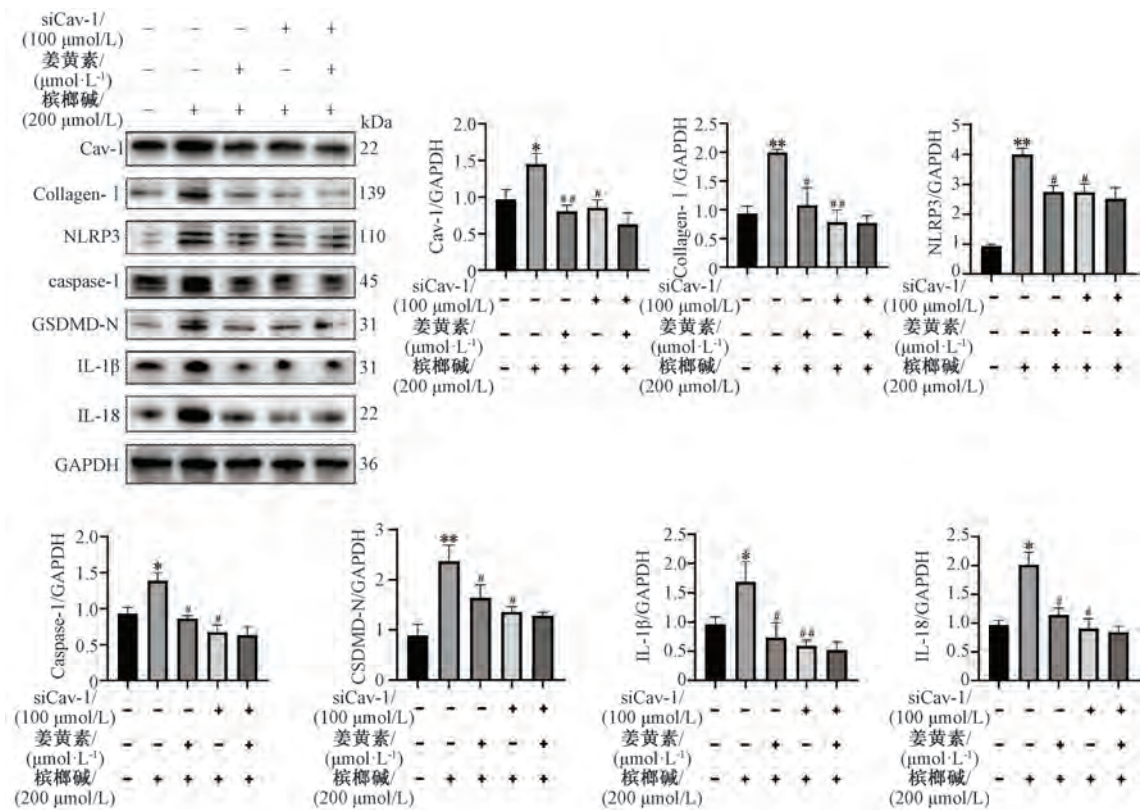
然后引出细胞内容物和大量促炎症因子的释放进而激活强烈的炎症反应^[20]，其核心是 gasdermin 介导，目前研究显示 caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18、NLRP3 等蛋白在经典细胞焦亡途径中发挥重要作用^[21]。此外，ROS 也是活化 NLRP3 炎症小体的关键调控信号，外界等 NLRP3 激活剂能够诱导 ROS 产生，ROS 可作为共同的信号激活 NLRP3 炎性小体，进而导致 caspase-1 依赖性细胞焦亡^[22]。另有研究表明，槟榔碱能够通过促进活性氧（reactive oxygen species, ROS）的生成增加 ECM 的合成，诱导口腔黏膜下纤维化的发生发展^[23]。You 等^[24]研究也发现槟榔碱诱导的口腔黏膜下纤维化与细胞焦亡相关。基于上述网络药理学相关结果，本实验使用槟榔碱干预 HaCaT 细胞构建口腔黏膜下纤维化

体外模型，并通过姜黄素进行干预，本实验研究表明，姜黄素能降低槟榔碱干预的 HaCaT 细胞内 ROS 水平和上清液 IL-1β、IL-18 炎症因子水平；并下调 HaCaT 细胞 NLRP3、caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1β 蛋白表达。提示姜黄素可通过抑制 HaCaT 细胞焦亡而减轻槟榔碱诱导的口腔黏膜下纤维化。

在此基础上，进一步分析了 GO 富集分析结果，姜黄素抑制槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化进程与细胞组成中的小窝密切相关。小窝是细胞膜内陷形成的烧瓶状质膜微区，主要由胆固醇、鞘磷脂、蛋白质组成，小窝蛋白-1（caveolin-1, Cav-1）是其主要蛋白成分，Cav-1 是一种多种功能的膜信号蛋白，包括调节细胞增殖、分化、



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。
图 13 姜黄素抑制 HaCaT 细胞焦亡与 Cav-1 相关 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与造模组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 14 姜黄素通过调控 Cav-1 抑制 HaCaT 细胞焦亡和纤维化 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

凋亡，参与细胞胞吞以及维持胆固醇稳态等^[25]。本实验发现，姜黄素能抑制槟榔碱干预后 HaCaT 细胞 Cav-1 表达，使用 siCav-1 转染 HaCaT 细胞后，槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化相关蛋白被抑制。提示姜黄素可能通过调控 Cav-1 抑制槟榔碱诱导的 HaCaT 细胞焦亡和纤维化进程。

综上所述，槟榔碱能够诱导 HaCaT 细胞焦亡和纤维化

进而促进口腔黏膜下纤维化的发生发展，而姜黄素能够通过调控 Cav-1 抑制 HaCaT 细胞焦亡和纤维化缓解口腔黏膜下纤维化。值得持续关注与深入研究，在今后的研究工作中，通过建立口腔黏膜下纤维化动物模型进一步在整体水平阐明姜黄素在抑制口腔黏膜下纤维化中的作用，将为口腔黏膜下纤维化的药物干预提供新的靶点及实验基础。

参考文献:

[1]

Peng Q, Li H Y, Chen J, *et al.* Oral submucous fibrosis in Asian countries [J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49 (4): 294-304.

[2]

Shen Y W, Shih Y H, Fuh L J, *et al.* Oral submucous fibrosis: a review on biomarkers, pathogenic mechanisms, and treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7231.

[3]

Yuwanati M, Ramadoss R, Kudo Y, *et al.* Prevalence of oral submucous fibrosis among areca nut chewers: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oral Dis*, 2023, 29 (5): 1920-1926.

[4]

Byrne N J, Soni S, Takahara S, *et al.* Chronically elevating circulating ketones can reduce cardiac inflammation and blunt the development of heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2020, 13: e006573.

[5]

Wynn T A, Ramalingam T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028-1040.

[6]

Henderson N C, Rieder F, Wynn T A. Fibrosis: From mechanisms to medicines [J]. *Nature*, 2020, 587 (7835): 555-566.

[7]

Deng Y T, Chen H M, Cheng S J, *et al.* Arecoline-stimulated connective tissue growth factor production in human buccal mucosal fibroblasts: Modulation by curcumin[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(9): 99-105.

[8]

Yadav M, Aravinda K, Saxena V S, *et al.* Comparison of curcumin with intralesional steroid injections in oral submucous fibrosis-A randomized, open-label interventional study [J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2014, 4(3): 169-173.

[9]

Li L H, Du B, Zhang H Y, *et al.* A network pharmacology approach to explore the mechanisms of exrian decoction in polycystic ovary syndrome[J]. *Chin Med*, 2018, 13(1): 46.

[10]

王凤雪, 高 宇, 刘海波. 中药网络药理学研究流程及代表性数据库工具 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (6): 1111-1118.

[11]

Khan I, Pant I, Narra S, *et al.* Epithelial atrophy in oral submucous fibrosis is mediated by copper (II) and arecoline of areca nut[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10): 2397-2412.

[12]

Peng W, Liu Y J, Hu M B, *et al.* Using the “ target constituent removal combined with bioactivity assay ” strategy to investigate the optimum arecoline content in charred areca nut[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(3): e40278.

[13]

Li L, Gu L Q, Yao Z G, *et al.* Arecoline suppresses epithelial cell viability by upregulating tropomyosin-1 through the transforming growth factor-β/Smad pathway [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 1244-1251.

[14]

Lin F, Xiao T, Wang B S, *et al.* Mechanisms and markers of malignant transformation of oral submucous fibrosis[J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e23314.

[15]

Yu Y H, Sun J H, Wang R, *et al.* Curcumin management of myocardial fibrosis and its mechanisms of action: a review[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(8): 1675-1710.

[16]

Kumar A, Harsha C, Parama D, *et al.* Current clinical developments in curcumin-based therapeutics for cancer and chronic diseases [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (12): 6768-6801.

[17]

Khan I, Kumar N, Pant I, *et al.* Activation of TGF-β pathway by areca nut constituents: a possible cause of oral submucous fibrosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51806.

[18]

Li M, Gao F, Zhou Z S, *et al.* Arecoline inhibits epithelial cell viability by upregulating the apoptosis pathway: implication for oral submucous fibrosis [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (5): 2422-2428.

[19]

Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 642-654.

[20]

Platnich J M, Muruve D A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670(5): 4-14.

[21]

Shi J J, Gao W Q, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254.

[22]

Tian K J, Yang Y, Zhou K, *et al.* The role of ROS-induced pyroptosis in CVD [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1116509.

[23]

Chang M C, Chan C P, Chen Y J, *et al.* Areca nut components stimulate ADAM17, IL-1α, PGE2 and 8-isoprostane production in oral keratinocyte: role of reactive oxygen species, EGF and JAK signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16879-16894.

[24]

You Y H, Huang Y, Wang D, *et al.* Angiotensin (1-7) inhibits arecoline-induced migration and collagen synthesis in human oral myofibroblasts *via* inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4668-4680.

[25]

杨 阳, 张 纲. Caveolae/Caveolin-1 在间充质干细胞成骨分化中的作用 [J]. 生物医学工程学杂志, 2016, 33 (4): 821-824.