

# 基于网络药理学方法探究白首乌影响颌下腺分泌功能的作用机制

张霞<sup>1,2</sup>,袁岸<sup>1,2</sup>,雷紫琴<sup>1,2</sup>,  
杨若聪<sup>1,2</sup>,黄张君<sup>3</sup>,沈才洪<sup>3</sup>,曾南<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>西南特色中药资源国家重点实验室;<sup>2</sup>成都中医药大学药学院,成都 611137;<sup>3</sup>泸州品创科技有限公司,泸州 646000

**摘要:**运用网络药理学方法探究白首乌对颌下腺分泌功能的潜在作用机制,并通过小鼠实验进行初步验证。通过检索白首乌活性成分的相关信息并分析类药性,获得疾病相关靶点,与活性成分靶点进行蛋白质相互作用(PPI)分析。并对交集靶点基因进行富集分析,找到口干症状的体内靶点,发掘出疾病-靶点-化合物的对应关系,找到与口干症相关的成分(群)。开展动物实验验证,观察其对小鼠饮水量及颌下腺组织中毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M3 (CHRM3)mRNA 表达、水通道蛋白 5(AQP5)蛋白表达的影响。研究分析得到白首乌 10 个成分符合类药五原则,发现药物靶点 80 个,疾病靶点 3 539 个,两者共同靶点 24 个,涉及细胞凋亡信号通路、p53 信号通路、VEGF 信号通路等 22 条信号通路,能通过调控 CHRM3、胺氧化酶(MAOB)、谷氨酸受体 2 亚基(GRIA2)、内皮型一氧化氮合酶(NOS3)相关靶点影响唾液分泌。实验表明,白首乌醇提物连续灌服可使小鼠唾液分泌有一定提高趋势,上调颌下腺 CHRM3 mRNA 及其下游信号传导效应蛋白 AQP5 蛋白表达水平,且对颌下腺组织无病理损伤。研究结果初步表明白首乌的主要活性成分可能通过影响 CHRM3、AQP5 来促进唾液分泌。

**关键词:**网络药理学;白首乌;口干症;颌下腺;唾液分泌

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0119-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.019

## Exploring the mechanism of bunge auriculate root affecting the secretory function of submandibular gland based on network pharmacology

ZHANG Xia<sup>1,2</sup>, YUAN An<sup>1,2</sup>, LEI Zi-qin<sup>1,2</sup>,  
YANG Ruo-cong<sup>1,2</sup>, HUANG Zhang-jun<sup>3</sup>, SHEN Cai-hong<sup>3</sup>, ZENG Nan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

<sup>3</sup>Luzhou Pinchuang Technology Co., Ltd., Luzhou 646000, China

**Abstract:** The potential mechanism of bunge auriculate root on the secretory function of the submandibular gland was investigated by using the method of network pharmacology, and the preliminary verification was carried out by mouse experiments. By searching the relevant information of the active components of bunge auriculate root, analyzing the drug-likeness, and obtaining disease-related targets, and protein-protein interaction (PPI) analysis was carried out with the targets of the active components. We also performed enrichment analysis of intersecting target genes to find *in vivo* targets of dry mouth symptoms, uncover disease-target-compound correspondence, and find the ingredients (groups) associated with dry mouth. Then, animal experiments were carried out to verify its effects on water intake and the expression of muscarinic acetylcholine receptor M3 (CHRM3) mRNA and aquaporin 5 (AQP5) protein in submaxillary gland tissues of mice. The study analysis obtained 10 components in line with the rule of five, found 80 drug targets, 3 539 disease targets, and 24 common targets for both, involving

收稿日期:2022-02-24 接受日期:2022-04-18

基金项目:国家自然科学基金(81473399);四川省固态酿造技术创新中心建设项目(2021ZYD0102)

\*通信作者 E-mail:zengnan966@126.com

22 signaling pathways such as apoptosis, p53 signaling pathway, and VEGF signaling pathway, and affecting salivary fraction by regulating CHRM3, amine oxidase (MAOB), glutamate receptor 2 (GRIA2), and nitric oxide synthase, endothelial (NOS3) related targets. The experiment showed that continuous oral ethanol extract of bunge auriculate root caused a certain tendency to increase salivary secretion in mice, and upregulated the expression level of CHRM3 mRNA and its downstream signal transduction effector protein AQP5 protein in the submandibular gland, without pathological damage to submandibular gland tissue. It is suggested that the main active constituents of bunge auriculate root could promote salivary secretion by affecting CHRM3 and AQP5.

**Key words:** network pharmacology; bunge auriculate root; xerostomia (dry mouth); submaxillary salivary gland; salivary secretion

白首乌为萝藦科 (Asclepiadaceae) 鹅绒藤属 (*Cynanchum* Linn.) 植物, 根据其主要产地不同分为 3 种, 分别是耳叶牛皮消 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight.)、戟叶牛皮消 (*C. bungei* Decne.) 及隔山牛皮消 (*C. wilfordii* Hemsl.) 的块根, 是我国特有的传统药食同源药材之一, 尤以耳叶牛皮消为滨海特色植物资源<sup>[1,2]</sup>。其味甘、苦, 性微温, 含有蛋白质、磷脂、游离氨基酸多种营养成分, 具有滋补肝肾、益精血、壮筋骨、乌须发、止痛和延年益寿功效, 食用和药用价值较高<sup>[3,4]</sup>。其在我国江苏省滨海县作为地方食品已有 100 余年历史, 一直被用作滋补药物或保健食品<sup>[5]</sup>。

滨海县大规模耳叶牛皮消的种植, 是白首乌的主要药材来源。而白首乌的产业化发展也推进了当地的经济<sup>[6,7]</sup>, 其中衍生品牌“百年白首”保健酒已上市多年, 接受度良好, 但亦有消费者反映长期饮用出现“口干”表现, 由此推测可能与保健酒中主要药物白首乌的醇溶性成分有关, 为进一步优化该产品的质量, 推进当地药材经济的发展, 本研究采用网络药理学研究方法探究白首乌是否引起口干症状, 并采用小鼠实验初步观察其醇提物对与小鼠唾液分泌有关指标的影响, 探究其是否真实存在致口干作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 药材

白首乌 (批号 20200715, 由泸州品创科技有限公司提供)。按照 52% 乙醇与药材的比例 10:1, 先适量 52% 乙醇浸泡 48 h, 再以适当的流速渗漉 48 h, 收集渗漉液, 浓缩干燥, 即得到白首乌醇提物, 得率为 1.31%。

### 1.2 动物

SPF 级 ICR 小鼠, 6 周龄, 体质量 22 ~ 24 g, 雌雄各半, 购于北京斯贝福实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于成都中医药大学药学院动物观察室, 许可证号 SYXK (川) 2020-124。本实验所有动物在 24 h 明暗周期的环境中饲

养, 昼夜各 12 h, 温度 (25 ± 1) °C, 相对湿度 40% ~ 60%。本实验符合动物实验伦理学标准, 得到成都中医药大学实验动物伦理委员会的批准, 审批号 TCM-2017-312。

### 1.3 药品与试剂

AQP5 兔源单克隆抗体 (Cat: 59558S, 美国 Cell Signaling Technologies 公司);  $\beta$ -actin 兔源多克隆抗体 (Cat: AF7018, Affinity Antibody 公司); HRP-羊抗兔 IgG (Lot: BST16F17B16C54, 武汉博士德生物工程有限公司); 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (Cat: RE-03014, 成都福际生物技术有限公司); FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂 (Cat: KR118-02, 天根生化科技 (北京) 有限公司); Super-Real 荧光定量预混试剂增强版 (Cat: FP205-02, 天根生化科技 (北京) 有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Cat: P0012, 上海碧云天生物技术有限公司); UltraSignal 超敏 ECL 化学发光底物 (Cat: 4AW011-100, 北京四正柏生物科技有限公司); 苏木素染液 (批号: CR2102133, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 伊红染液 (批号: CR2101094, 武汉塞维尔生物科技有限公司)。

### 1.4 仪器

ST16R 低温高速冷冻离心机, 3001 型高级多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KZ-II 高效组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); DYY-6C 型电泳仪电源 (北京市六一仪器厂); Bio-Rad ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); RS36 型全自动染色机 (常州派斯杰医疗设备有限公司)。

### 1.5 构建小分子化合物结构数据库及靶点预测

白首乌主要含有 C<sub>21</sub> 甾体酯苷类、苯乙酮类、萜类、生物碱、氨基酸等成分, 其成分目前检测到 75 个<sup>[5]</sup>。以这 75 个成分通过中药系统药理学资料和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 构建其小分子化合物数据库。首先根据 TCMSP 中化合物信息, 以 OB ≥ 10%, DL ≥ 0.04 为活性

筛选指标<sup>[8]</sup>,并提取其蛋白质靶点。另外,根据 Lipinski 类药五原则<sup>[9]</sup>筛选,小分子药物应满足:①氢键供体数目 < 5;②相对分子质量 < 500;③脂水分系数 < 5;④氢键受体数目 < 10;⑤可旋转键数目不超过 10。从 TCMS 中检索化合物的蛋白质靶点,从 UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) 数据库中提 取基因名称,将药物的靶点名称进行矫正统一。

### 1.6 口干症作用靶点的筛选

利用在线数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、DisGeNet (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 搜索关键词“xerostomia”“dry mouth”得到与口干症相关的作用靶点,及疾病靶点。将整理所得靶点与“1.5”项下成分对应靶点进行交集,得到白首乌影响口干症的靶点。

### 1.7 目标基因功能富集分析

GO 分析是为了研究所涉及靶点基因所参与的细胞组分 (cellular component, CC), 具有的生物过程 (biological process, BP), 和分子功能 (molecular function, MF), 以此描述基因产物在细胞中的位置, 多个步骤的有序的生物过程, 及单基因产物的功能等<sup>[10]</sup>。因此采用主要成分对应所有靶点基因进行整体分析, 使用 DAVID 6.8 (<https://david-d.ncicrf.gov/>) 在线功能注释工具进行 GO 富集分析, 以错误发现率 FDR ≤ 0.05 为标准进行筛选。

### 1.8 网络构建与分析

将药物筛选得到的口干症靶点, 使用 Cytoscape 3.7.2 构建白首乌活性成分-靶点网络图, 导出其相关的拓扑数据如度值、介数等, 并运用“Network Analyzer”功能分析其拓扑学属性。度值和介数是评价一个节点在网络中比重的重要拓扑学参数。度值可反映网络中某节点与其他节点的链接数目, 介数反映了网络中所有最短的路径中经过该节点的路径数目与最短路径总数的比值<sup>[11]</sup>。选择富集得到的 KEGG 通路中  $P$  value < 0.05 的靶点, 利用 Cytoscape 软件中的 ClueGo 对靶点进行二次分析, 可视化得到 KEGG 通路网络。为研究靶点蛋白之间的联系, 通过 STRING 对上述靶点基因研究得到 PPI 数据结果, 直观分析关键蛋白。

### 1.9 动物实验验证

#### 1.9.1 分组及给药

取健康 SPF 级 ICR 小鼠 28 只, 雌雄各半, 按体重、性别随机分为 2 组: 白首乌醇提组 (1 g 原生药/kg)、空白对照组, 每组 14 只, 雌雄各半。小鼠按

0.1 mL/10 g 体积灌胃相应药液 (10%), 1 次/天, 每天上午 9 点灌胃, 连续灌胃 30 天, 空白对照组给予等量纯净水。小鼠饲养过程中每隔 3 天称量小鼠体重并按体重变化调整灌胃量, 每隔两天于上午九点灌胃前称重每笼小鼠剩余水量。

#### 1.9.2 病理形态学观察

实验第 30 天, 末次灌胃 1 h 后, 处死小鼠, 剖取双侧颌下腺腺体组织, 一侧颌下腺立即用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 5 μm 厚切片, 常规苏木精-伊红染色, 镜下拍照并观察颌下腺组织的病理形态学变化。每张切片先于 40 倍下观察全部组织, 观察大体情况, 选择要观察的区域采集 100 倍和 400 倍图片, 观察具体变化情况。

#### 1.9.3 Western blot 测定 AQP5 蛋白表达量

称取 15 ~ 20 mg 小鼠颌下腺组织, RIPA (含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂) 裂解获得上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白含量, 所有样本总蛋白调至等浓度。每个样品分别上样 30 μg, 经电泳、转膜后, 5% BSA 封闭液中封闭 1.5 h。一抗 (1:5 000) 孵育过夜, 二抗 (1:3 000) 中孵育反应 1.5 h, 显影。

#### 1.9.4 RT-PCR 测定 CHRM3 mRNA 表达水平

称取 15 ~ 20 mg 小鼠颌下腺组织, 按照试剂盒要求提取总 RNA, 检测总 RNA 浓度和纯度, 采用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂进行逆转录。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 66 °C 退火 30 s。PCR 反应体系为 2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL, cDNA 模板 4 μL, 上游和下游引物各 0.6 μL, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 4.8 μL, 以 β-actin 为内参进行实时荧光定量聚合酶链式反应。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增片段大小 Amplified fragment size (bp)
CHRM3	F: GTTCGGTAGACGGACTGG	231
	R: ACGTGCTTGCTCACTTGCTC	
β-actin	F: ACAGCTGAGAGGAAATCGTG	274
	R: AGAGGTCTTACGGATGTCAACG	

#### 1.9.5 统计学分析

采用统计软件 SPSS 23.0 进行实验数据统计, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量数据符合正态性分布的采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 或  $t$  检验, 不符合正

态者则采用非参数检验法分析,  $P < 0.05$  为两组之间存在统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 白首乌与口干症相关靶点-成分筛选及症状-靶点-成分网络构建

通过 SwissADME 在线平台 (<http://www.swissadme.ch/>) 分析类药性, 分析得到 10 个成分均符合类药五原则(见表 2)。使用 Cytoscape 3.7.2 构建白首乌潜在活性成分-靶点分析网络图, 网络中有 10 个成分, 80 个靶蛋白, 共有 91 个节点, 137 条边。其中前列腺素 G/H 合成酶 1 (prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1)、前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、 $\beta_2$  肾上腺素能受体 (beta-2 adrenergic receptor, ADRB2)、 $\alpha$ -1A 肾上腺素能受体 (alpha-1A adrenergic receptor, ADRA1A)、cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚基  $\alpha$  (cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha, PRKACA)、MAOB、GRIA2、LTA-4 水解酶 (leukotriene A-4 hydro-

lase, LTA4H) 等为主要的靶点。靶点中有 31 个靶点 (38.27%) 对应两个以上小分子。

数据库中共搜集到 3 539 个与口干症状相关的靶点, 将其与白首乌成分对应靶点进行交集得到 24 个靶点, 即为白首乌与口干症状相关的靶点。进一步根据 24 个口干症状相关靶点筛选作用的成分, 使用 Cytoscape 3.7.2 构建网络图(见图 1)。网络中有 1 个症状, 7 个成分, 24 个靶蛋白, 共有 32 个节点, 63 条边。即与口干症状相关的成分可能  $\beta$ -谷甾醇、甲基丁香酚、东莨菪素、阿魏酸甲酯、异嗪皮啶、异落叶松脂素、吐叶醇(见表 3)。而 MAOB、GRIA2、NOS3、诱导型一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, inducible, NOS2)、ADRB2、CHRM3 等为主要的靶点。其中, 值得注意的是 CHRM3 为乙酰胆碱受体, 释放的乙酰胆碱与腺泡细胞表面 M3 受体的结合能触发二级信号传导级联反应, 引起  $Ca^{2+}$  浓度增加, 导致胞质内 AQP5 经囊泡向腺泡细胞顶膜转运, 从而使腺泡细胞维持唾液正常的分泌与输出<sup>[12]</sup>。

表 2 白首乌的潜在活性成分及其参数

Table 2 Potential active ingredients and their parameters of bunge auriculate root

编号 No.	成分 Ingredient	TCMSP ID	分子量 Molecular weight	OB (%)	DL
1	白桦脂酸 Betulinic acid	MOL000211	456.78	55.38	0.78
2	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	MOL000358	414.79	36.91	0.75
3	环阿屯醇 Cycloartenol	MOL003578	426.8	38.69	0.78
4	东莨菪素 Scopoletin	MOL000040	192.18	27.77	0.08
5	异嗪皮啶 Isofraxidin	MOL005723	222.21	52.32	0.1
6	阿魏酸甲酯 Ferulic acid methyl ester	MOL006212	208.23	34.62	0.07
7	甲基丁香酚 Methyl Eugenol	MOL000207	178.25	73.36	0.04
8	吐叶醇 Vomifoliol	MOL002722	224.33	29.01	0.08
9	异落叶松脂素 Isolariciresinol	MOL001786	360.44	15.08	0.39
10	腺苷 Adenosine	MOL001787	267.28	15.98	0.18

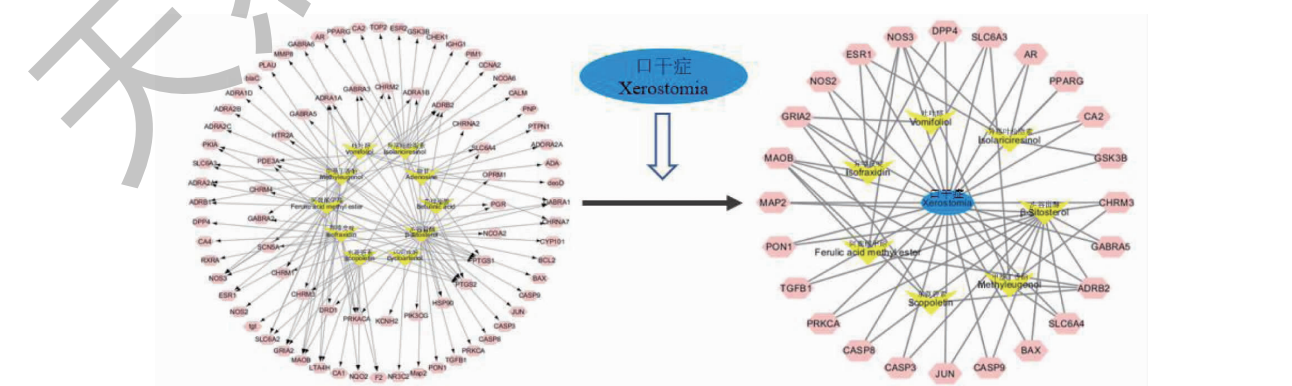


图 1 白首乌与口干症之间关系的疾病-成分-靶点网络图

Fig. 1 Disease-components-target network of the relationship between xerostomia and bunge auriculate root

表 3 与口干症有关的成分靶点信息

Table 3 Component-target information which related to xerostomia

编号 No.	成分 Ingredient	靶点 Target
1	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	CHRM3、GABRA5、ADRB2、SLC6A4、BAX、CASP9、JUN、CASP3、CASP8、PRKCA、TGFB1、PON1、MAP2
2	甲基丁香酚 Methyleugenol	CHRM3、ADRB2、SLC6A4、MAOB、NOS3、SLC6A3
3	东莨菪素 Scopoletin	ADRB2、MAOB、GRIA2
4	阿魏酸甲酯 Ferulic acid methyl ester	ADRB2、MAOB、NOS3、SLC6A3
5	异喹皮啶 Isofraxidin	MAOB、GRIA2、NOS2、ESR1、NOS3、DPP4
6	异落叶松脂素 Isolariciresinol	ESR1、NOS3、AR、PPARG、CA2、GSK3B
7	吐叶醇 Vomifoliol	GRIA2

## 2.2 蛋白间相互作用关系

利用交集得到的 24 个靶点,通过 STRING 平台进行 PPI 分析。可视化得到图 2,24 个节点,64 条

边,平均节点度 5.33,平均局部聚集系数 0.49。通过对网络拓扑参数分析发现 CASP3、JUN、NOS3、PPARG 等基因的排名非常重要。

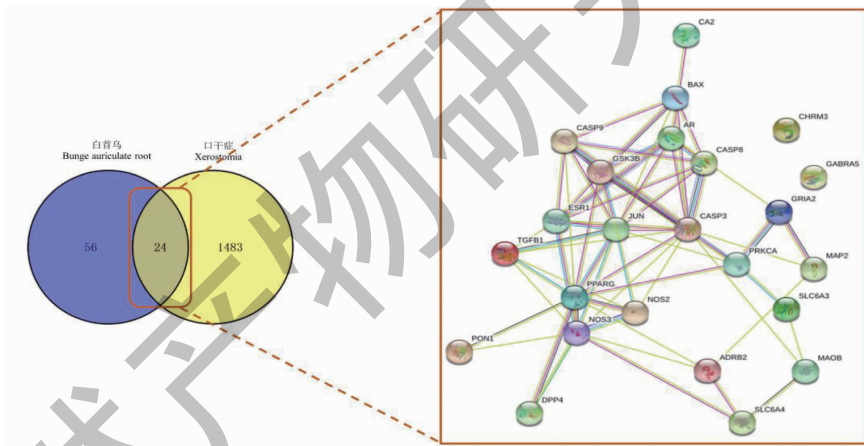


图 2 交集基因的维恩图和蛋白质相互作用网络图

Fig. 2 Intersecting gene Venn diagrams and protein-protein interaction networks

## 2.3 白首乌与口干症状的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

为了分析靶点功能,对其 24 个靶点进行 GO 分析。白首乌与口干症状相关靶点主要涉及的基因功能各提取前 10 个基因,得到图 3。这些靶点与凋亡信号通路,及对雌二醇、药物、脂多糖、缺氧等反应的生物过程相关,涉及细胞质、质膜、线粒体等细胞组分,而且涉及蛋白质的活性、酶的结合、一氧化氮合

酶活性等分子功能。按  $P < 0.05$  富集到 22 条通路,可视化得到图 4。形状越大表明所占比例越多,其重要性也越高。其与 Apoptosis、p53、IL-17、VEGF 信号通路等密切相关。

## 2.4 白首乌对小鼠饮水量的影响

如图 5 所示,白首乌醇提取物组与空白组小鼠在灌胃过程中其饮水量无明显变化,提示白首乌醇提取物可能不会引起小鼠口腔干燥症状。

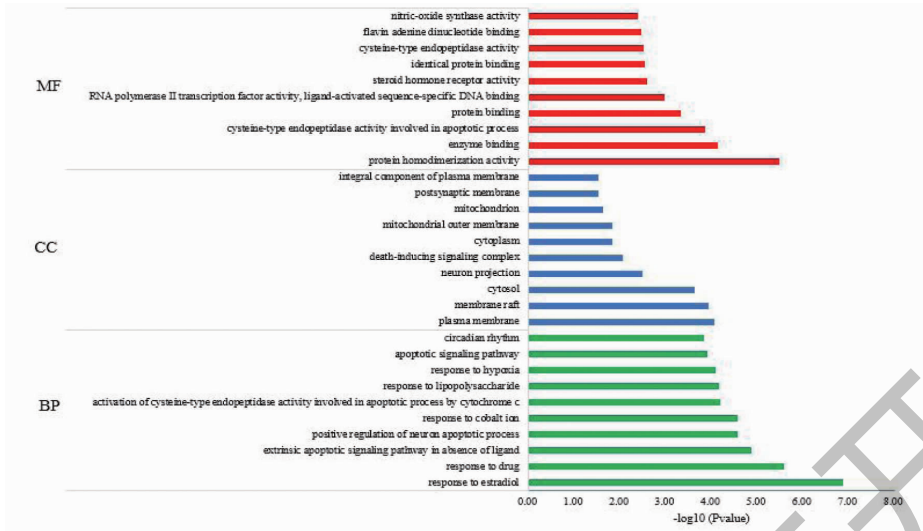


图3 GO功能分析

Fig. 3 GO function analysis

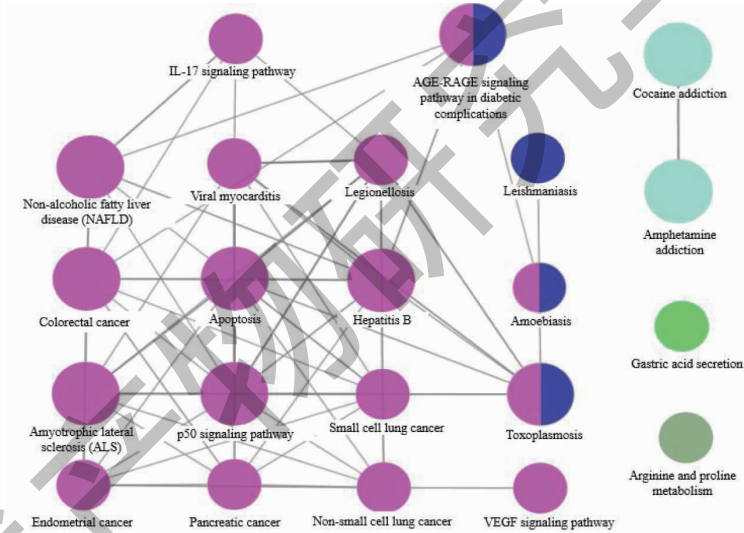


图4 KEGG富集分析图

Fig. 4 KEGG enrichment analysis chart

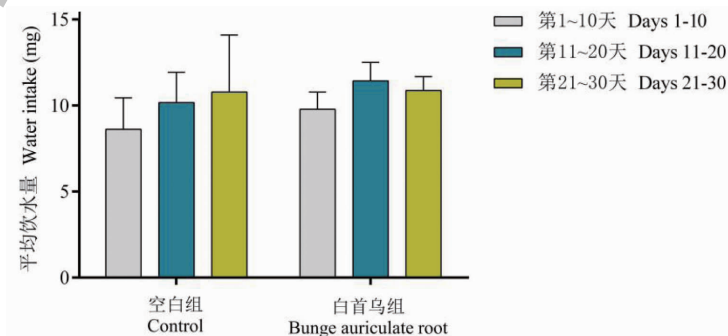


图5 白首乌对小鼠饮水量的影响

Fig. 5 Effects of bunge auriculate root on water intake in mice

### 2.5 小鼠颌下腺病理组织学变化

由图 6 可见,连续灌胃给予白首乌醇提取物,与空白组小鼠比较,小鼠颌下腺无明显病理变化,其颌下腺组织被膜较薄;小叶分泌部腺泡结构基本正常,

腺泡呈泡状或管泡状结构,未见明显变性或坏死;小叶内闰管、导管及颗粒曲管、小叶间导管等导管结构完整清晰。提示白首乌醇提物的连续给予对该靶器官无病理损伤表现。

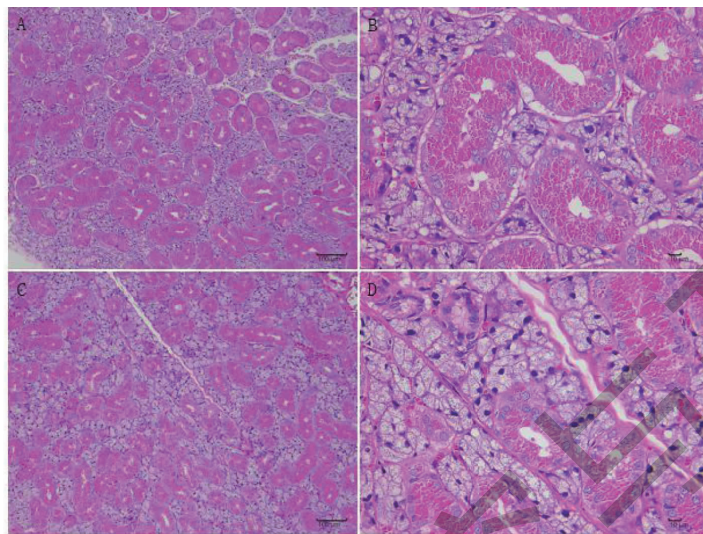


图 6 白首乌对小鼠颌下腺病理形态学的影响(HE 染色)

Fig. 6 Effect of bunge auriculate root on pathological morphology of mice submandibular gland (HE staining)

注:A:空白组( $\times 100$ ),B:空白组( $\times 400$ ),C:白首乌组( $\times 100$ ),D:白首乌组( $\times 400$ )  
Note: A: Control group ( $\times 100$ ), B: Control group ( $\times 400$ ), C: Bunge auriculate root group ( $\times 100$ ), D: Bunge auriculate root group ( $\times 400$ ).

### 2.6 白首乌对小鼠颌下腺组织 CHRM3 mRNA 表达及 AQP5 蛋白表达的影响

由图 7 可知,与空白组比较,连续灌服给予白首乌醇提取物可使小鼠颌下腺组织 CHRM3 mRNA 相对表达量明显升高( $P < 0.05$ ),提示白首乌可能会影

响胆碱受体表达。与空白组比较,白首乌醇提取物连续灌服小鼠,可使小鼠颌下腺 AQP5 蛋白表达水平上调( $P < 0.05$ ),提示白首乌可能通过影响 AQP5 来促进唾液分泌和输出。

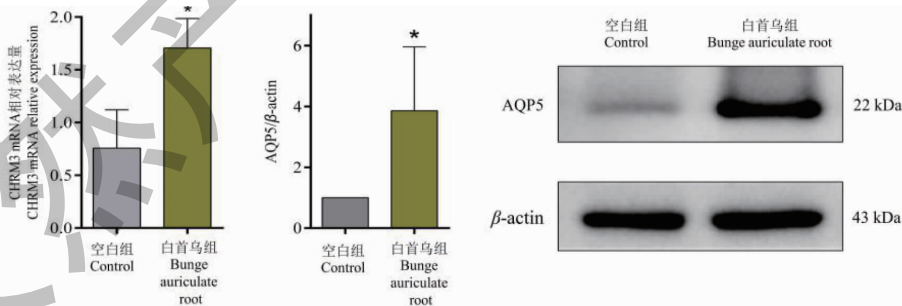


图 7 颌下腺 CHRM3 mRNA 相对表达量及 AQP5 蛋白表达水平( $n = 7$ )

Fig. 7 Relative expression of CHRM3 mRNA and AQP5 protein expression level in submandibular gland ( $n = 7$ )

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ 。Note: Compared with control,\* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论与结论

口腔干燥症(简称口干症)一般是指因唾液分泌减少引起的口腔干燥状态或感觉,多种因素可诱发口腔干燥症状,如多种疾病或接受医疗服务时因医源性伤害会诱发,其患病率约 0.29% ~ 0.77%

[13]。其为一种自觉口干的症状,而非一种独立性疾病,分为唾液量减少引起的真性口干和无唾液量改变的假性口干两大类[14,15]。口干症的病因较多,且在一定程度上影响患者的生活质量及相应健康问题。如口腔疾病、干燥综合征、贫血、营养缺乏、糖尿

病、抑郁症、睡眠障碍、口腔放射治疗等均会引起口腔干燥,服用某些药物或注入抗癌剂等也会引起口腔干燥<sup>[16,17]</sup>。该症状的病理机制认识上常被认为是继发于人体新陈代谢减慢,躯体各部分组织器官功能退化,黏膜腺体萎缩,腺体导管变性等,从而引起 M3 受体破坏、M3 受体和 AQP5 数量减少,导致机体唾液腺分泌功能减弱或丧失<sup>[18]</sup>。对于其治疗,目前临床上主要采用毛果芸香碱、盐酸西维美林等类胆碱或肾上腺素药物,存在副作用较多,不能长期使用等不足之处<sup>[19]</sup>。

本次研究为探究白首乌的醇溶性成分是否会引起唾液减少诱发口干症状,首先采用网络药理学研究方法,针对白首乌是否与口干症相关进行了分析与靶点预测,结果筛选得到 ADRB2、CHRM3、GRIA2、NOS3、NOS2 等主要靶点,涉及到  $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol)、甲基丁香酚(methyleugenol)、东莨菪素(scopoletin)、阿魏酸甲酯(ferulic acid methyl ester)、异嗪皮啶(isofraxidin)等相关重要成分。其中 CHRM3 属于 G 蛋白偶联受体超家族,是由 460 ~ 590 个氨基酸组成的一种单链跨膜糖蛋白,该家族目前有 5 个成员。目前诸多研究表明,CHRM3 在外分泌腺体功能中有着重要的地位,其在外分泌腺如唾液腺和泪腺中表达,能调节唾液腺和泪腺的副交感神经活动,从而影响着外分泌腺体的分泌功能<sup>[20]</sup>。主要分布于外分泌腺,影响唾液腺的唾液分泌,可与神经系统释放的乙酰胆碱和神经肽结合触发二级信号转导级联反应,使  $Ca^{2+}$  浓度增加,激活 Cl 通道,促进水分、电解质的分泌<sup>[21]</sup>。研究发现,敲除 CHRM3 基因的小鼠唾液分泌量与正常小鼠相比显著减少,明确表明 CHRM3 参与了唾液分泌的整个过程<sup>[22]</sup>。AQP5 是特异性跨膜转运水分子的蛋白,也是最早被确定分布在唾液腺腺泡细胞的一种蛋白,其分布于腺泡腔的顶膜、侧膜和导管上皮细胞中,构成涎腺唾液分泌的主要水分子通道,参与水的分泌、吸收及细胞内外水平衡,能显著增加细胞膜水通透性<sup>[23-25]</sup>,对调节水分转运速率,维持唾液的分泌具有重要作用<sup>[26]</sup>。研究发现,AQP5 经过胞内蛋白激酶 A (PKA) 的激活后,进行磷酸化反应,可使该通道形成快速的“闸门”效应,以维持正常唾液分泌<sup>[27]</sup>。唾液腺上皮细胞中 AQP5 蛋白表达量减少可导致唾液量减少;或 AQP5 异常分布,即 AQP5 的表达由腺泡上皮细胞顶膜转移至基侧膜,造成水分子从腺泡细胞顶膜向基侧膜的逆向转运,则水分子

的转运功能发生异常,可加重唾液分泌的减少<sup>[28]</sup>。已有研究证明,经 CHRM3 激动剂刺激后可使 AQP5 从细胞质向细胞膜转运,从而增加唾液的分泌量<sup>[29]</sup>。由此,表明 CHRM3 及其下游信号转导效应蛋白 AQP5 参与水分子转运调节,主要维持唾液腺正常分泌。基于上述 CHRM3 及 AQP5 对唾液分泌调控的分析,本研究进一步观察了白首乌醇提物连续灌服 30 天对小鼠唾液分泌量、颌下腺组织结构及 CHRM3 mRNA、AQP5 蛋白表达水平的影响,发现小鼠颌下腺组织无明显病理改变,而唾液分泌呈上升趋势,CHRM3 mRNA 相对表达量及 AQP5 蛋白表达水平上调,由此初步验证了网络药理学研究结果。

综上,基于网络药理学研究方法对白首乌的活性成分与口干症(唾液分泌)相关靶点进行了分析,初步明确了白首乌的主要活性成分可能会通过调控 CHRM3、MAOB、GRIA2、NOS3、NOS2、ADRB2 相关靶点影响唾液分泌;进一步实验表明,白首乌醇提物连续灌服可使小鼠唾液分泌有一定提高趋势,使颌下腺 CHRM3 mRNA 及其下游信号转导效应蛋白 AQP5 蛋白表达上调,且对颌下腺组织无病理损伤,初步验证了网络药理学的预测结果,并提示白首乌醇提物无致口干症状的作用。研究结果为后续开展白首乌对唾液腺功能的影响及作用机制研究,及应用于口腔干燥综合征治疗等方面提供了一定理论支撑。

#### 参考文献

- Zhang SY, Sun XL, Xu LC, et al. Identification of three different original plants of bunge auriculate root [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2021, 44: 2305-2308.
- Zhu HF. Antioxidant activities of several Chinese edible and medicinal herbs [D]. Taian: Shandong Agricultural University (山东农业大学), 2009.
- Ding B, Chen X. Production of *Cynanchum auriculatum* Beer [J]. Liquor-Making Sci Technol (酿酒科技), 2019(8): 84-88.
- Sun Y, Liu Z, Wang J, et al. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of four acetophenones from the Chinese medicinal plant *Cynanchum bungei* Decne [J]. Ultrason Sonochem, 2013, 20(1): 180-186.
- Chen WH, Zhang ZZ, Ban YF, et al. *Cynanchum bungei* Decne and its two related species for "*Cynanchum auriculatum*": a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 243:



- 112110.
- 6 Yin X, Ding YF, Shao JZ, et al. Research progress on Cynanchi Bungei Radix [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50:992-1000.
  - 7 Zhu ZX. Jiucheng joins hands with the hometown of Shouwu-Luzhou Binhai to jointly create a "century-old Baishou" health wine [J]. China Food Safe Mag (食品安全导刊), 2014(19):36-37.
  - 8 Cheng L, Pan GF, Zhang XD, et al. Yindanxinnaotong, a Chinese compound medicine, synergistically attenuates atherosclerosis progress [J]. Sci Rep-UK, 2015, 5:12333.
  - 9 Lei QL, Huang YL, Zhong Q, et al. Anti-inflammatory mechanism of Scutellariae Radix based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49:3523-3530.
  - 10 Xu WH, Zheng JH, Zhao Y, et al. Molecular biological mechanism of tanshinone IIA in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and bioinformatics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50:1131-1140.
  - 11 Geng SN, Yang L, Li YJ, et al. Anti-tumor metastasis mechanism of Zingiberis Rhizoma based on network pharmacology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42:2658-2668.
  - 12 Sumida T, Tsuboi H, Iizuka M, et al. Functional role of M3 muscarinic acetylcholine receptor (M3R) reactive T cells and anti-M3R autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome [J]. Autoimmun Rev, 2010, 9:615-617.
  - 13 Chen YC, Shi P, Liu J. Discussion on the inducing factors and related problems of xerostomia [J]. Clin Misdiagn Misther (临床误诊误治), 2012, 25(4):88-90.
  - 14 Bertram U. Xerostomia. Clinical aspects, pathology and pathogenesis [J]. Acta Odontol Scand, 1967, 25 (Suppl 49):1-126.
  - 15 Millsop JW, Wang EA, Fazel N. Etiology, evaluation, and management of xerostomia [J]. Clin Dermatol, 2017, 35:468-476.
  - 16 Choi JH, Kim MJ, Kho HS. Oral health-related quality of life and associated factors in patients with xerostomia [J]. Int J Dent Hyg, 2021, 19:313-322.
  - 17 Tanasiewicz M, Hildebrandt T, Obersztyń I. Xerostomia of various etiologies: a review of the literature [J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25:199-206.
  - 18 Bombardieri M, Argyropoulou OD, Ferro F, et al. One year in review 2020: pathogenesis of primary Sjögren's syndrome [J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38(4):S3-S9.
  - 19 Cifuentes M, Del Barrio-Díaz P, Vera-Kellet C. Pilocarpine and artificial saliva for the treatment of xerostomia and xerophthalmia in Sjögren syndrome: a double-blind randomized controlled trial [J]. Brit J Dermatol, 2018, 179:1056-1061.
  - 20 Qin Y, Lin CZ, Sun H, et al. Study on the influence of Yiqiyangyin Quyu formulae on AQP5 and M3R expression of Sjögren's Syndrome submandibular gland cells [J]. J Emerg Tradit Chin (中国中医急诊), 2017, 26(1):5-8.
  - 21 Luo HC, Li P, Xiao WG. Expression of muscarinic receptor 3 and aquaporin 5 in patients with Sjögren's syndrome in the labial glands [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2011, 27(1):79-81.
  - 22 Wang D, Yuan Z, Inoue N, et al. Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1810:543-554.
  - 23 Moore M, Ma T, Yang B, et al. Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5 [J]. Exp Eye Res, 2000, 70:557-562.
  - 24 Liu D, Qin Y, Xie ZM, et al. Effects of Yiqi Yangyin Quyu recipe containing serum on AQP5 and M3R of human submandibular gland cells with Sjögren's syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2019, 39:330-334.
  - 25 Ma T, Song Y, Gillespie A, et al. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels [J]. J Biol Chem, 1999, 274:20071-20074.
  - 26 Wang D, Qin Z, Zhou DX, et al. M3 receptor agonists induce nuclear translocation of AQP5 and lipid rafts in rat parotid cells [J]. Basic Clin Med (基础医学与临床), 2015, 35:237-239.
  - 27 Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, et al. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands [J]. Am J Physiol-Gastr L, 2001, 281(1):G247-G254.
  - 28 Lu Y, Chen Y, Wang YN, et al. Effect of Banxia Qinlian Decoction on Th17 / IL-17 immune inflammatory way of Sjögren's syndrome NOD model mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2015, 35:612-617.
  - 29 Lee BH, Gauna AE, Perez G, et al. Autoantibodies against muscarinic type 3 receptor in Sjögren's syndrome inhibit aquaporin 5 trafficking [J]. PLoS one, 2013, 8(1):e53113.