

乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的网络药理学研究及生物学验证

梁晖¹, 林嘉荣¹, 陈嘉意², 莫业南², 卢钊宇¹, 麦建玲¹, 张坚², 林启展¹ (1. 广东省中医院, 广东 广州 510120; 2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 基于网络药理学并辅以初步生物学验证探讨乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的分子机制。**方法** 通过网络药理学分析从乌梅含漱液中筛选出 124 个活性成分, 利用 Genecards、OMIM、Disgenet、TTD、DrugBank 等数据库检索尿毒症口干症的疾病靶点预测。采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“药物活性成分-治疗尿毒症口干症潜在靶点”网络, 将活性成分与预测疾病靶点的二者进行分子对接验证, 借助 R 3.6.3 软件的 ggplot2 包及 clusterProfiler 将关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。最后以硫酸阿托品诱导 5/6 肾切除大鼠制备尿毒症口干症大鼠模型为研究材料, 采用低、高不同剂量乌梅含漱液干预, 从大鼠唾液分泌、唾液腺病理组织学以及关键靶标蛋白表达等多种指标, 进行多个层面的验证性实验, 验证前期计算机模拟结果的可靠性。**结果** 计算机模拟实验预测结果表明, 124 个活性药效分子作用于 46 个关键靶点, 其中核心靶点为 EGFR、ESR1、TP53、MCM2、NTRK1、XPO1、FN1、CDK2、CUL3、APP, 分子对接结果发现活性成分与 ESR1、CDK2 结合性能良好。靶标主要作用涉及炎症反应、氧化应激反应、受体活性及生物化学过程调控等多种生物过程, 参与炎症、氧化应激、细胞凋亡、信号转导及其他等 20 条信号通路。生物学验证实验结果表明, 经乌梅含漱液的干预后, 明显增加了尿毒症口干症大鼠的平均唾液流量, 减轻了颌下腺组织受损程度, 且增加了分子对接筛选的靶标 ESR1 蛋白的表达量。**结论** 乌梅含漱液的药效分子可能作用于 ESR1 核心靶标, 通过调节 PI3K/Akt 等多条信号通路发挥药效, 为进一步开展乌梅含漱液治疗尿毒症口干症作用机制的研究提供了新思路和新方法。

关键词: 网络药理学; 尿毒症口干症; 乌梅含漱液; 唾液分泌; 作用机制; 验证实验; ESR1; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1785-12

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.008

Network Pharmacology Study and Biological Verification of Wumei Gargle in the Treatment of Xerostomia due to Uremia

LIANG Hui¹, LIN Jiarong¹, CHEN Jiayi², MO Yenan², LU Zhaoyu¹, MAI Jianling¹, ZHANG Jian², LIN Qizhan¹ (1. Guangdong Hospital of TCM, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism of Wumei gargle in treating xerostomia due to uremia based on network pharmacology and biological verification. **Methods** We screened 124 active components from Wumei gargle by network pharmacology analysis, and used Genecards, OMIM, Disgenet, TTD, DrugBank and other databases to search for disease target predictions of xerostomia due to uremic. The active ingredients-potential target network was constructed by Cytoscape 3.8.0 software. The active ingredient and the predicted disease target were verified by molecular docking. With the aid of the ggplot2 package and clusterProfiler of R 3.6.3 software, the key target of Wumei gargle in treating xerostomia due to uremia was analyzed by GO and KEGG enrichment. Finally, the rat model of xerostomia due to uremia was established by using atropine induced 5/6 nephrectomy. Low- and

收稿日期: 2021-02-04

作者简介: 梁晖, 女, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医药治疗透析并发症。Email: 1273885601@qq.com。通信作者: 林启展, 男, 主任医师, 研究方向: 中医药治疗慢性肾衰竭及透析并发症。Email: linqizhan656635@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A020215113); 广东省中医院张琪学术经验传承工作室项目(E43712)。

high-dose of *Wumei* gargle were used for intervention. Salivary secretion, histopathology of salivary gland and expression of key target proteins in rats were used to verify the reliability of computer simulation. **Results** The prediction results of computer simulation experiments showed that 124 active pharmacodynamic molecules act on 46 key targets, among which the core targets are EGFR, ESR1, TP53, MCM2, NTRK1, XPO1, FN1, CDK2, CUL3, APP. The results of molecular docking found that the active ingredients have good binding properties with ESR1 and CDK2. The main role of the target was related to a variety of biological processes, such as inflammation, oxidative stress, receptor activity and regulation of biochemical process. Moreover, 20 signal pathways including inflammation, oxidative stress, apoptosis, signal transduction and others are involved. The results of biological verification experiments showed that after the intervention of *Wumei* gargle, the average saliva flow of model rats was significantly increased, the damage of submandibular gland tissue was reduced, and the expression of the target protein ESR1 was increased. **Conclusion** The active components in *Wumei* gargle may mainly act on the core target of ESR1 and regulate multiple signal pathways such as PI3K/Akt to exert pharmacological effects. The study provides new ideas and new methods for further research on mechanism of *Wumei* gargle.

Keywords: Network pharmacology; xerostomia due to uremia; *Wumei* gargle; saliva secretion; mechanism of action; validation experiment; ESR1; rats

尿毒症口干症是广泛存在于透析患者并严重影响患者生活质量的并发症,现代医学对其发病机制仍未完全了解。普遍认为^[1]多种机制参与其发展,可能的影响因素包括唾液流率及唾液成分的改变、血管紧张素Ⅱ水平增高、未控制的糖尿病、药物副作用、尿毒症毒素及限制水分摄入等有关,而其中的唾液分泌减少及成分改变则为其重要原因;患者会因口干而摄入水分过多导致容量超负荷,增加了心脑血管并发症发生率及死亡风险,造成了极大的医疗负担。

在祖国医学中,唾液被认为属于“津液”范畴,口干症主要病机多为阴虚津伤。国医大师张琪^[2]认为,乌梅味酸性平,具敛虚火而生津液止口渴的作用,多用于呕吐腹泻、口干烦渴;而甘草味甘性平,益脾气而生津液。两药相合体现酸甘化阴治法内涵,达到化阴生津之用。在既往临床研究^[3-4]中发现,乌梅含漱液可明显增加患者唾液分泌量,并有效改善其口干症状,但其作用靶点及分子机制仍有待探索。本研究运用网络药理学的方法并辅以生物学实验验证的研究策略,筛选乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的活性成分和潜在靶点,并对其关键机制进行分析,以期阐释其可能的药效物质基础和分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂、药物制备及仪器

1.1.1 实验动物 健康成年的雄性 SD 大鼠 30 只, SPF

级, 6~8 周龄, 体质量(200±20)g。购于南方医科大学动物实验中心, 动物许可证号: SCXK(粤)2016-0041; 动物质量合格证号: 44002100019231。经广东省中医院实验动物伦理委员会批准, 批准编号为: 2017055。

1.1.2 试剂 硫酸阿托品注射液(1 mL:0.5 mg, 国药准字 H41020324), 河南润弘制药股份有限公司, 批号: 1709871; ESR1, 美国 Santa Cruz 公司, 批号: Lot#L0319; β -Actin 兔多克隆 IgG 抗体(4970S), 购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: D17F11; 异氟烷, 瑞沃德生命科技有限公司, 批号: 1902801; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: SJ266764)、RIPA 裂解液(批号: SJ286784), 美国 Thermo 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 药物及制备 乌梅含漱液组方为乌梅颗粒 4.2 g (相当于饮片 30 g, 批号: 1602071)、甘草颗粒 1 g (相当于饮片 6 g, 批号: 1603074), 皆购于江阴天江药业有限公司。二者溶于温开水 200 mL, 放置 4℃冰箱备用。

1.1.4 仪器 VMR 动物麻醉机, 美国 MATRX 公司; cobas8000 全自动生化分析仪, 瑞士罗氏公司; BT-125D 电子天平, 德国 Sartorius 公司; RM2245 组织切片机、H11210 恒温展片机, 德国 Leica 公司; BX61 显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 化学发光成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; Histosta 石蜡包埋机、Excelsior™ ES 全自动组织脱水机, 美国 Thermo Fisher 公司; BX45 光学显微镜, 日本 OLYMPUS

公司。

1.2 乌梅含漱液活性成分及其活性成分对应靶点的筛选 检索中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)^[5]、TCM-MESH 数据库^[6]、ETCM 数据库 (The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine)^[7], 筛选条件为口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[8]; 然后根据中国知网、PubMed 等数据库对剩余的不符合上述标准的成分再进行查询, 并结合文献判断是否需要纳入这个成分, 整理出乌梅含漱液提高尿毒症口干症唾液流量的最终有效成分。并使用 TCMSP 数据库及 Uniprot 数据库转换得到活性成分对应的作用靶点。

1.3 尿毒症口干症靶点的收集及乌梅含漱液治疗尿毒症口干症潜在作用靶点的筛选 以“uremia”或“uremic”或“uraemia”与“xerostomia”为关键词在 Genecards^[9]、在线人类孟德尔遗传 (人类在线孟德尔遗传, OMIM)^[10]、Disgenet^[11]、TTD^[12]、DrugBank^[13] 数据库检索尿毒症口干症的作用靶点, 并进行筛选, 获得尿毒症口干症疾病靶点。使用 R 语言插件 VennDiagram 对乌梅含漱液活性成分的作用靶点与尿毒症口干症相关靶点进行映射取交集, 交集为乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的潜在作用靶点。通过 Cytoscape 3.8.0 构建乌梅含漱液“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”网络, 采用软件内置的 network analyzer 分析工具分析网络特征参数, 以研究乌梅含漱液较为重要成分和靶点及之间关系。

1.4 构建乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的蛋白质互作网络构建及关键靶点筛选 将筛选得到的乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的潜在靶点导入 STRING 蛋白质互作数据库, 构建蛋白质互作网络 (protein-protein interaction, PPI), 并根据 Cytoscape 3.8.0 中的插件 Cytohubba 功能筛选出乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的核心靶点蛋白。

1.5 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症核心活性成分-关键靶点分子对接验证 首先将“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”网络模型中“Degree”节点参数均值作为参考条件, 以此筛选出大于均值的核心活性成分, 进入 TCMSP 数据库, 下载相关核心活性成分的 MOL2 文件, 之后再进入 RSB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 下载关键靶点蛋白的 3D 结构文件 (PDB 格式), 利用 Autodock 软件分别对受体靶蛋白和活性成分小分子进行预处理, 包括去水加氢、

加电荷、赋予原子类型等处理; 设置格点大小和位置并进行格点参数计算, 进行半柔性分子对接, 寻找受体小分子活性成分与靶点蛋白大分子作用的最佳构象, 并预测其结合模式和亲和力。最后利用 Pymol 软件对得到的结果进行可视化处理。

1.6 富集分析 使用 R 3.6.3 软件的 ggplot2 包及 cluster Profiler^[14] 包对乌梅含漱液-尿毒症口干症-基因数据集进行 GO 及 KEGG 分析, 设置 P 值 Cutoff = 0.05, Q 值 Cutoff = 0.05, 按显著性排序, 将 GO 三部分及 KEGG 中各自前 10 条富集加压以气泡图展示。

1.7 模型复制及处理 利用 SPSS 软件产生随机数字从 28 只大鼠中随机抽取 6 只作为正常对照组, 其余均给予 5/6 肾切除模型复制: 大鼠予 2.0% 戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉后备皮、消毒, 在距左肋骨下缘、脊柱旁开 1.5 cm 处皮肤做一纵向切口, 暴露左侧肾脏, 小心剥离肾包膜及肾上腺, 动脉夹夹闭左侧肾蒂。剪切掉左肾上、下极 2/3 肾实质, 创面止血后, 将残肾还纳入腹腔, 逐层缝合。1 周后切去右肾, 麻醉及手术过程相同, 即制备成 5/6 肾切除大鼠模型^[15-16]。后参照 Yanagi Y 等^[17]的方法: 在大鼠尾静脉注射硫酸阿托品 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 建立尿毒症口干症大鼠模型。所有大鼠在气麻下于大鼠的后颊部用镊子放入 1 个 60 mg 的干燥无菌脱脂棉球, 测定大鼠的 5 min 唾液分泌量。以电子天平上称湿质量, 唾液分泌量 (mg) = 棉球湿质量 - 干质量。根据唾液流率下降至正常大鼠的 50% 为产生口渴的标准, 以肌酐大于 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、尿素氮大于 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、唾液分泌量少于 $24 \text{ mg} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ 为模型复制成功。

最终模型复制成功大鼠 18 只; 死亡 4 只, 可能与切除肾组织过多、术中出血过多或术后护理不当有关。通过 SPSS 软件产生随机数字将模型复制成功的 18 只大鼠随机分成 3 组, 分别为模型组、乌梅含漱液高剂量组、乌梅含漱液低剂量组, 每组 6 只。

中药组按照大鼠 (200 g) 体表面积与成人表面积 (70 kg) 比计算中药量, 换算系数为 0.001 8。模型复制成功第 14 天后高剂量组给予原浓度药液, 低剂量组给予 1 mL 混悬液配生理盐水 3 mL 配成 25% 浓度药液, 以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药液灌胃; 模型组按照每日 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蒸馏水灌胃。每日 1 次, 连续 28 d。各组大鼠自由饮水、摄食。

1.8 标本采集及制作

1.8.1 血清肌酐、尿素氮及唾液分泌变化 治疗前眼眶取血, 使用罗氏自动生化分析仪检测尿素氮 (Blood urea, Urea)、血肌酐 (Serum creatinine, Scr),

并使用动物麻醉机进行异氟烷气体麻醉，异氟烷浓度为 2%，氧气流量为 0.6 L·min⁻¹。大鼠麻醉成功后，测定大鼠 5 min 唾液分泌量。治疗 28 d 后，腹主动脉采血检测上述指标及 5 min 唾液分泌量。

1.8.2 颌下腺组织 HE 染色 根据动物伦理原则，于末次给药后次日采取过量麻醉法处死大鼠(动物尸体保存于动物实验中心专用的低温冰箱，由医院统一进行无害化处理)，分离双侧颌下腺，颌下腺以 4% 的多聚甲醛固定 24 h 后，使用全自动组织脱水机酒精逐级脱水。二甲苯透明后石蜡包埋，切成 5 μm 厚的薄片，HE 常规染色，显微镜下观察各组颌下腺病理变化。

1.8.3 Western Blot 法检测 ESR1 蛋白 颌下腺组织在 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂混合液中裂解，于 4 ℃以 12 000 r·min⁻¹(离心半径 7 cm)离心 30 min 后取上清液，使用 BCA 蛋白试剂盒检测蛋白浓度。蛋白质样品(50 g)与 3×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合变性后在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳，并湿转移到聚偏二氟乙烯膜。膜暴露于封闭缓冲液 2 h，并与 ESR1 (1:200)或 β-actin (1:2 000)在 4 ℃过夜，随后在室温下使用 HRP 标记的抗兔或抗小鼠 IgG (1:3 000)。利用化学发光成像系统对信号进行捕获和分析，并用 ImageJ 图像分析软件测定目的条带的总灰度值，以目的条带的真实光强度与 β-actin 条带真实光强度的比值并均一化比值作为该

目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乌梅含漱液活性成分及其活性成分对应靶点的筛选 从 TCMSP 数据库获取到 40 个乌梅成分，根据 OB 和 DL 参数筛选初步获得 8 个成分，并根据文献报道补充亚油酸^[18]、柠檬酸、L-苹果酸、齐墩果酸、熊果酸^[19]、戊酸、异戊酸、月桂酸、棕榈酸、苦杏仁苷^[20]、愈创木酚、鼠李素^[21]、槲皮苷^[22]，共获得 21 个活性成分。根据 OB 和 DL 参数从 TCMSP 初步筛选出甘草 93 个成分，剔除 3 个未查询到靶点的成分，通过查阅文献补充原儿茶酸^[23]、异甘草素、齐墩果酸^[24]、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷、樱黄素^[25]、东莨菪内酯、芸香叶苷、芒柄花苷、新甘草苷^[26]、异槲皮苷、甘草次酸、柚皮苷、牡荆苷、甘草黄酮醇、熊果酸、紫云英苷^[27]，获得 107 个活性成分。两者重复成分 4 个，共获得 124 个活性成分(见表 1)。并使用 TCMSP 数据库及 Uniprot 数据库转换得到 124 个活性成分对应的 190 个活性成分作用靶点。

表 1 乌梅含漱液的活性成分
Table 1 Active ingredients of Wumei gargle

序号	命名	成分	序号	命名	成分
1	WM1	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	61	GC44	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one
2	WM2	beta-sitosterol	62	GC45	liquiritin
3	WM3	Stigmasterol	63	GC46	licopyranocoumarin
4	WM4	campest-5-en-3beta-ol	64	GC47	Glyzaglabrin
5	WM5	Methyl arachidonate	65	GC48	Glabridin
6	WM6	CLR	66	GC49	Glabranin
7	WM7	EIC	67	GC50	Glabrene
8	WM8	citric acid	68	GC51	Glabrone
9	WM9	MLT	69	GC52	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone
10	WM10	Iva	70	GC53	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone
11	WM11	WLN:QV4	71	GC54	Eurycarpin A
12	WM12	Guasol	72	GC55	(-)-Medicocarpin
13	WM13	lauric acid	73	GC56	Sigmoidin-B
14	WM14	Rhamnetin	74	GC57	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one
15	WM15	palmitic acid	75	GC58	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one
16	WM16	Thujin	76	GC59	Isoglycyrol
17	WM17	Amygdalin			
18	GC1	Inermine			

(续表 1)

序号	命名	成分	序号	命名	成分
19	GC2	DFV	77	GC60	Isolicoflavonol
20	GC3	Mairin	78	GC61	HMO
21	GC4	Jaranol	79	GC62	1-Methoxyphaseollidin
22	GC5	Medicarpin	80	GC63	Quercetin der.
23	GC6	Pinocembrin	81	GC64	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin
24	GC7	isorhamnetin	82	GC65	licochalcone a
25	GC8	sitosterol	83	GC66	3'-Methoxyglabridin
26	GC9	Lupiwighteone	84	GC67	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol
27	GC10	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	85	GC68	Inflacoumarin A
28	GC11	formononetin	86	GC69	icos-5-enoic acid
29	GC12	Calycosin	87	GC70	Kanzonol F
30	GC13	naringenin	88	GC71	6-prenylated eriodictyol
31	GC14	(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydroprano[2,3-f]chromen-4-one	89	GC72	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin
32	GC15	euchrenone	90	GC73	7-Acetoxy-2-methylisoflavone
33	GC16	glyasperin B	91	GC74	8-prenylated eriodictyol
34	GC17	glyasperin F	92	GC75	gadelaidic acid
35	GC18	Glyasperin C	93	GC76	Vestitol
36	GC19	Isotrifoliol	94	GC77	Gancaonin H
37	GC20	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	95	GC78	Licoagrocarpin
38	GC21	kanzonols W	96	GC79	Glyasperins M
39	GC22	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	97	GC80	Glycyrrhiza flavonol A
40	GC23	Semilicoisoflavone B	98	GC81	Licoagroisoflavone
41	GC24	Glepidotin A	99	GC82	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid
42	GC25	Glepidotin B	100	GC83	Odoratin
43	GC26	Phaseolinisoflavan	101	GC84	Phaseol
44	GC27	Glypallichalcone	102	GC85	Xambioona
45	GC28	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	103	GC86	dehydroglyasperins C
46	GC29	Licochalcone B	104	GC87	protocatechuic acid
47	GC30	licochalcone G	105	GC88	isoliquiritigenin
48	GC31	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	106	GC89	nicotiflorin
49	GC32	Licoricone	107	GC90	Narcissoside
50	GC33	Gancaonin A	108	GC91	Scopoletol
51	GC34	Gancaonin B	109	GC92	rutin
52	GC35	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	110	GC93	Hirsutrin
53	GC36	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	111	GC94	18 β -glycyrrhetic acid
54	GC37	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	112	GC95	naringin
55	GC38	Glycyrin	113	GC96	Licoflavonol
56	GC39	Licocoumarone	114	GC97	Prunetin
57	GC40	Licoisoflavone	115	GC98	Ononin
58	GC41	Licoisoflavone B	116	GC99	vixin
59	GC42	licoisoflavanone	117	GC100	neoliquiritin
60	GC43	shimpterocarpin	118	GC101	Astragalin
			119	GC102	Glycyrol
			120	GC103	Gancaonin G
			121	A	kaempferol
			122	B	quercetin
			123	C	oleanolic acid
			124	D	ursolic acid

2.2 尿毒症口干症靶点的收集及乌梅含漱液治疗尿毒症口干症潜在作用靶点的筛选 检索 Genecards、OMIM、Disgenet、TTD、DrugBank 等 5 个疾病数据库, 分别得到靶点个数为 327、0、3、0、0 个。将得到的靶点汇总并去除重复靶点, 最终得到 327 个疾病靶点。利用 R 语言插件 VennDiagram 将乌梅含漱液活性成分作用靶点与尿毒症口干症靶点取交集, 得到 46 个共同靶点, 即为乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的潜在作用靶点, 并绘制韦恩图(图 1)。

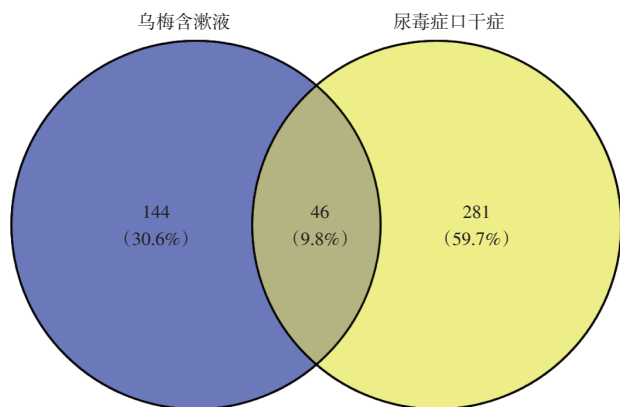


图 1 乌梅含漱液活性成分作用靶点与尿毒症口干症相关靶点的韦恩(Venn)图

Figure 1 Venn diagram of the relationship between the target of effective components of Wumei gargle and the target of xerostomia due to uremia

使用 Cytoscape 软件对“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”数据库进行可视化网络绘制(图 2)。图 2 中六边形节点代表活性成分, 其中 A、B、C、D 代表甘草与乌梅共同的活性成分山柰酚、槲皮素、齐墩果酸、熊果酸, 此外甘草(GC)中有 102 个活性成分、乌梅(WM)有 16 个活性成分(甘草及乌梅各有 1 个活性成分没有对应的治疗尿毒症口干症潜在作用靶点, 故去除); 菱形节点代表 46 个治疗尿毒症口干症潜在作用靶点。节点越大, 表示 Degree 值(度值)越大。在网络中度值较高的节点为网络的核心节点, 如潜在靶点 ESR1(Degree=105)、AR(Degree=102)、PTGS2(Degree=102)、NOS2(Degree=98)、PPARG(Degree=95)、PIM1(Degree=93)等, 这些靶点可能为乌梅含漱液治疗尿毒症口干症起到核心的作用; 而活性成分如槲皮素(B)(Degree=39)、山柰酚(A)(Degree=23)等可能为乌梅含漱液发挥药效的主要活性成分。

2.3 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症蛋白质相互作用网络分析及关键作用靶点筛选结果 将 46 个潜在的关键靶点导入 String 数据库^[28]获取蛋白质相互作用关系, 物种选择人类, 得到 46 个关键节点及 543 条边, 平均节点值 23.6。再将获得数据导入 Cytoscape 软件, 根据 Cytoscape 软件中的插件 Cytohubba 计算出在网络中的前 10 位关键靶点(如图 3)。

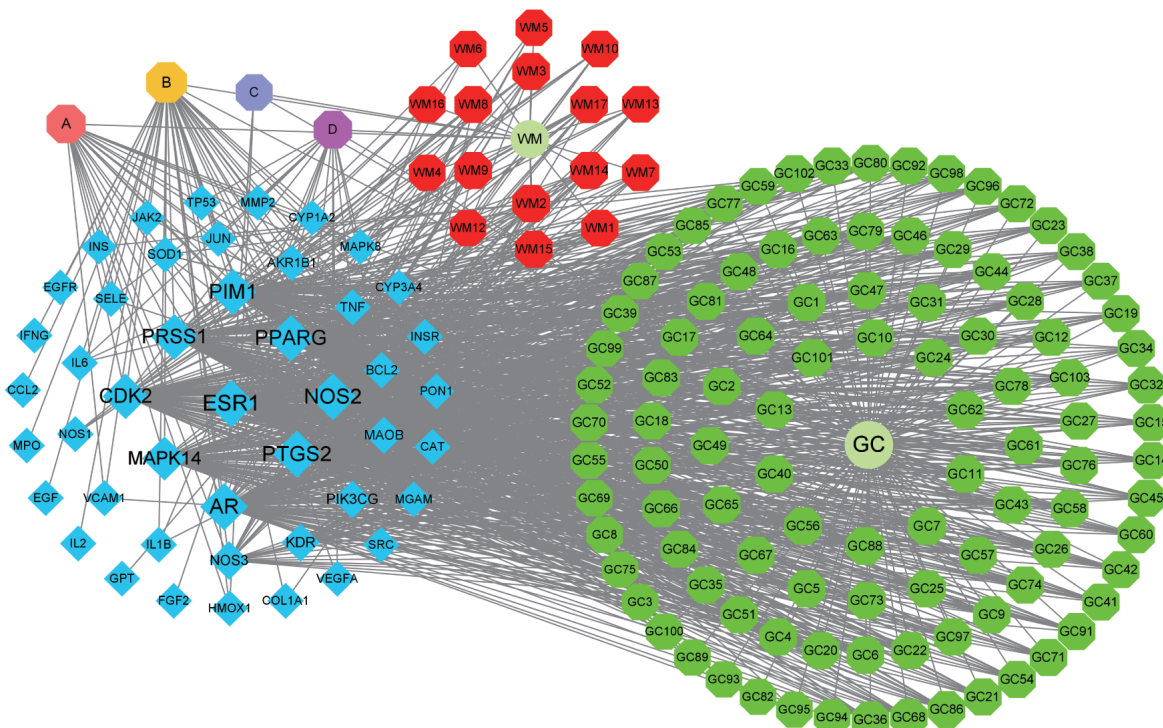


图 2 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”可视化调控网络

Figure 2 Visual regulation network of “active ingredient-potential disease target” for the treatment of xerostomia due to uremia with Wumei gargle

Cytohubba-MCC 得分较高者表明这些靶点基因在网络中具有重要地位,可作为其有效成分作用的靶点基因,包括 EGFR、ESR1、TP53、MCM2、NTRK1、XPO1、FN1、CDK2、CUL3、APP。

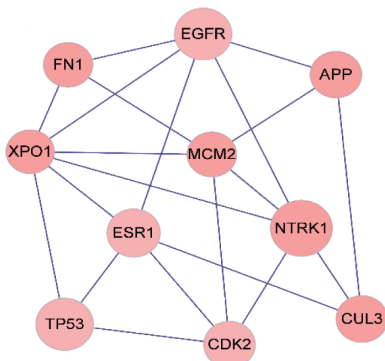


图 3 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症关键靶点的 PPI 网络
Figure 3 PPI network of key targets related to the treatment of xerostomia due to uremia with Wumei gargle

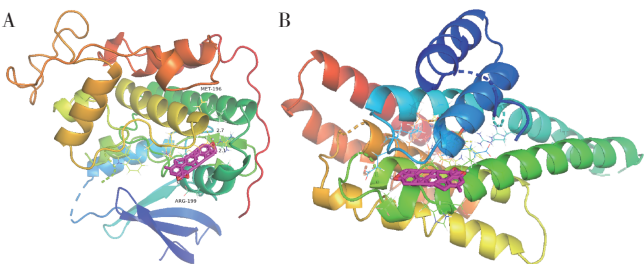
2.4 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症核心活性成分与关键靶蛋白的分子对接结果 通过对“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”(图 2)模型中“Degree”参数的分析,在此筛选出了位列前 4 位的活性化合物:槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)、柚皮素(naringenin)、熊果酸(ursolic acid),分别与对应的 EGFR、ESR1、TP53、MCM2、NTRK1、XPO1、FN1、CDK2、CUL3、APP 等关键靶点进行半柔性分子对接。在分子对接评价中,当结合能小于 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时说明具有较佳的结合活性,当其小于 $-7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时则有强烈的结合活性。本研究分子对接结果显示,乌梅含漱液与尿毒症口干症关键作用靶点结合能大部分小于 $-7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明乌梅含漱液的核心活性成分与尿毒症口干症的关键靶点蛋白间有着良好的结合性能,其结合构象稳定,见表 2。其中 CDK2、ESR1 与 ursolic acid 具有强烈结合活性,见图 4。故推测药效分子可能主要通过 CDK2、ESR1 这些靶点发挥药效作用。

2.5 富集分析结果 使用 R 3.6.3 软件的 ggplot2 包及 clusterProfiler^[14]包对乌梅含漱液-尿毒症口干症-基因数据集进行 GO 及 KEGG 分析。设置 $P < 0.05$,得出 2 251 个 GO 条目和 152 条 KEGG 通路。在 GO 功能富集的 2 251 条生物学功能条目中,涉及细胞对刺激的反应、氧化应激反应、炎症反应、受体活性及生物化学过程调控等方面。在 152 条 KEGG 通路富集中,涉及 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、松弛素信号通路等经典通路。按显

表 2 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症活性成分与关键靶蛋白的分子对接结果

Table 2 Docking results of lateral reactivity components with key target proteins for the treatment of Uremia xerostomia with Wumei Gargle

成分来源	活性成分	核心靶点	RSB ID	结合能/($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)
乌梅、甘草	ursolic acid	CDK2	6q4g	-14.87
乌梅、甘草	ursolic acid	ESR1	7nfw	-13.62
乌梅、甘草	ursolic acid	TP53	4cz5	-12.45
乌梅、甘草	quercetin	CDK2	6q4g	-8.41
乌梅、甘草	quercetin	EGFR	6di9	-8.86
乌梅、甘草	quercetin	ESR1	7nfw	-8.27
乌梅、甘草	quercetin	TP53	4cz5	-6.65
甘草	naringenin	CDK2	6q4g	-9.58
甘草	naringenin	ESR1	7nfw	-9.65
乌梅、甘草	kaempferol	CDK2	6q4g	-8.98
乌梅、甘草	kaempferol	ESR1	7nfw	-7.41



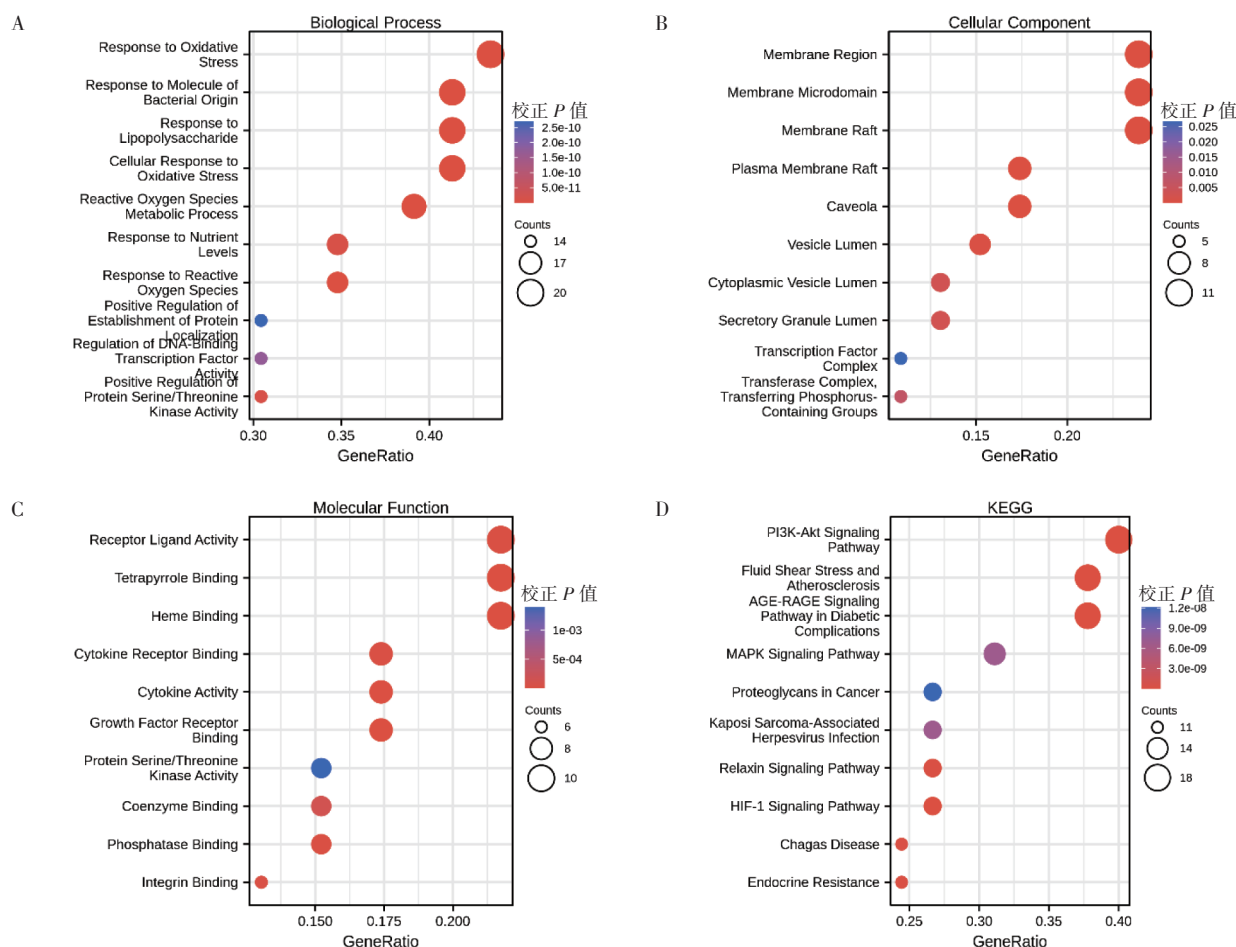
注: A. CDK2-Ursolic acid; B. ESR1-Ursolic acid
图 4 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症关键靶点与活性成分的复合结构图

Figure 4 The composite structure diagram of key targets and active ingredients for the treatment of xerostomia due to uremia with Wumei gargle

著性排序,将 GO 三个部分及 KEGG 前 10 条富集加压以气泡图展示。见图 5。

富集分析提示乌梅含漱液可能通过抗炎、细胞对刺激的反应等生物学功能治疗尿毒症口干症,而综合“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”网络、PPI 网络的拓扑分析结果,ESR1 的 Degree 值均排名靠前,被认为是乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的关键靶点,分子对接结果显示 ESR1 与主要活性成分具有强烈结合活性,特选择 ESR1 进行下一步动物实验验证。

2.6 乌梅含漱液对尿毒症口干症大鼠血清肌酐、尿素氮、唾液分泌及颌下腺病理形态的影响 如表 3 所示,与正常对照组比较,模型组的肌酐、尿素氮水平平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示尿毒症模型复制成功;模型组平均唾液流量降低,差异



注：A.GO-BP(生物学过程)分析；B.GO-CC(细胞组分)分析；C.GO-MF(分子功能)分析；D.KEGG 分析

图 5 乌梅含漱液治疗尿毒症口干症作用靶点富集气泡图

Figure 5 Bubble diagram of target enrichment of *Wumei* gargle for the treatment of xerostomia due to uremia

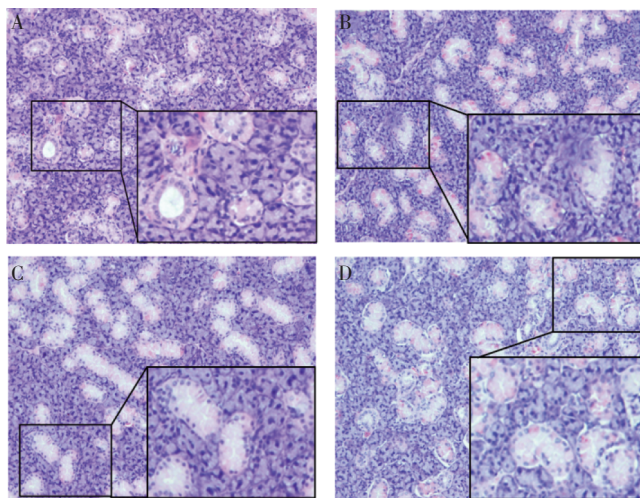
表 3 乌梅含漱液对尿毒症口干症模型大鼠血清肌酐、尿素氮及唾液分泌的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effects of *Wumei* gargle on Scr、Urea and saliva secretion in rats with xerostomia due to uremia($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	肌酐/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	尿素氮/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	5 min 内唾液分泌量/mg
正常对照组	33.4 ± 2.51	6.12 ± 0.9	41.01 ± 14.48
模型组	$64.83 \pm 9.15^*$	$9.95 \pm 1.96^*$	$20.82 \pm 5.49^{**}$
乌梅含漱液低剂量组	69.33 ± 4.72	10.17 ± 3.6	$33.76 \pm 6.01^{**}$
乌梅含漱液高剂量组	65.67 ± 9.14	9.77 ± 3.02	$41.63 \pm 10.18^{**}$

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

有统计学意义($P < 0.01$)，提示尿毒症口干症模型复制成功。与模型组比较，乌梅含漱液低、高剂量组平均唾液分泌量明显增加，差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而与正常对照组比较，乌梅含漱液高剂量组平均唾液分泌量的差异无统计学差异($P > 0.05$)。这些结果提示乌梅含漱液组有增加唾液流量的作用，且高剂量组更为明显。



注：A. 正常对照组；B. 模型组；C. 乌梅含漱液低剂量组；D. 乌梅含漱液高剂量组

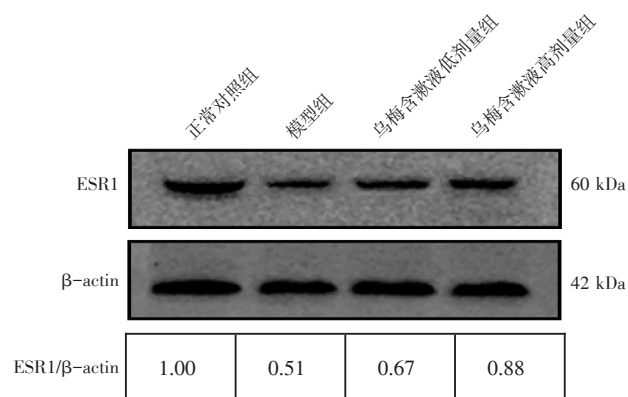
图 6 各组对尿毒症口干症大鼠颌下腺组织病理形态的影响(HE 染色, $\times 400$)

Figure 6 Effect of *Wumei* gargle on the pathological morphology of submandibular gland tissue in rats with xerostomia due to uremia(HE, $\times 400$)

如图 6 所示,通过苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察大鼠颌下腺组织病理学变化,与正常对照组比较,模型组出现纹状管结构紊乱,颗粒导管炎症及水肿等病理改变增多。而与模型组比较,乌梅含漱液组纹状管结构紊乱及颗粒导管炎症等病理改变减轻。

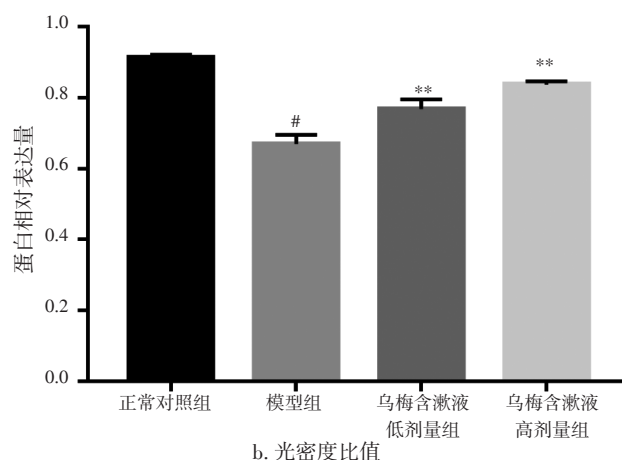
以上结果提示经乌梅含漱液处理后可改善尿毒症口干症模型大鼠唾液腺损伤,提高唾液分泌量,其中以乌梅含漱液高剂量组的改善作用较为明显。

2.7 各组对尿毒症口干症大鼠颌下腺组织 ESR1 蛋白



a. Western Blot 的检测结果

表达的影响 如图 7 所示,与正常对照组比较,模型组的 ESR1 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。然而与模型组的表达比较,经乌梅含漱液干预后,ESR1 表达均呈明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示乌梅含漱液组能提高 ESR1 的表达,且高剂量组增加 ESR1 表达的趋势更为明显。以上结果与网络药理学推测 ESR1 为乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的靶目标相吻合,说明乌梅含漱液可能通过提高 ESR1 表达、减轻唾液腺损伤从而增加唾液分泌量,治疗尿毒症口干症。



b. 光密度比值

注:与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$

图 7 各组对尿毒症口干症大鼠颌下腺组织 ESR1 蛋白表达的影响

Figure 7 The expression of ESR1 proteins in submandibular gland tissue of rats with xerostomia due to uremia

3 讨论

口干症是维持性血透患者的主要并发症之一,根据文献报道约有 28.2%~66.7%的透析患者有明显口干症状^[29],有文献证实唾液的分泌与肾功能的盛衰密切相关^[30]。中医学认为口干症归于“燥症”的范畴^[31],与人体津液的盈亏与输布密切相关。透析患者的口干症更是与透析短时间内脱水所造成局部阴液不足有着密切的关系,病机以阴虚风燥为主,故宜用酸甘化阴治疗。乌梅含漱液是取之于中医治法中的“酸甘化阴”补法之意,由乌梅与甘草配伍而成,其中的乌梅酸味收、涩,甘草甘味补、和、缓,二药相配,酸甘相合,化生阴液,以解口干之症。有研究^[32-33]提示乌梅含漱液能缓解血液透析口渴多饮患者的口渴症状、减少透析间期体重增加量及降低透析间期体重增加相对值,但都只停留在临床观察上,均未对其作用机制进行进一步探讨。因此有效判定乌梅含漱液所含的关键药效成分及其

核心作用靶点,对该方的阐明作用机理与指导临床具有重要意义。

本研究首先从网络药理学探讨乌梅含漱液药效成分作为研究的切入点。通过分析乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的“活性成分-治疗尿毒症口干症潜在作用靶点”网络,推测槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)以及熊果酸(ursolic acid)等成分是乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的主要活性成分。槲皮素、山柰酚及熊果酸均为乌梅与甘草共同的活性成分。槲皮素作为天然的黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗氧化、免疫抑制等的药理作用,对感染、心血管疾病、糖尿病、肿瘤和自身免疫病等疾病的治疗及预防具有重要的临床意义^[34-36]。槲皮素在炎症反应方面的作用是目前生命科学的研究热点之一。Ayako Takahashi 的研究^[37]表明槲皮素可通过直接上调和抑制辐射诱导的氧化应激从而间接维持 AQP5 的表达,同时抑制炎症反应,增加唾液分泌水平。

山柰酚亦属于黄酮类化合物,有抗菌、抗氧化、抗炎等多种功效,可通过降低 PI3K/Akt 信号通路磷酸化水平^[38],减少细胞凋亡,抑制炎症反应,故推测这可能是山柰酚干预口干症途径之一。而熊果酸是齐墩果酸的同分异构体,其具有抗感染、抗菌、抗变态反应、降低血糖等多种生物学效应,有研究^[39]报道熊果酸可通过三萜酸结构上的羟基和羧基从而抑制口腔病原菌,减轻炎症反应。另一方面,从 GO 功能分析,可以发现乌梅含漱液参与的氧化应激反应、炎症反应、受体活性及生物化学过程调控与槲皮素、山柰酚、熊果酸在唾液腺分泌的特性相一致。而本研究亦从动物实验证实乌梅含漱液确实有提高大鼠的唾液分泌量、修复唾液腺损伤的功效。

通过构建 PPI 网络发现,乌梅含漱液治疗尿毒症口干症与表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)、雌激素受体 1(Estrogen Receptor 1, ESR1)、纤维连接蛋白 1(Fibronectin 1, FN1)、细胞周期蛋白依赖激酶 2(Cyclin Dependent Kinase 2, CDK2)、泛素连接酶 Cullin3 (Cullin 3, CUL3)等 46 个靶点蛋白有着密切关系。ESR1 是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子受体。有研究^[40]表明雌激素能上调去卵巢大鼠腮腺中唾液分泌的靶分子 AQP-5;另外也可明显增加大鼠下颌腺 nNOS 和 TRPV1 表达,通过 nNOS 和 TRPV1 调控下颌腺唾液分泌功能^[41],推测 ESR1 作为雌激素的受体可能在唾液腺的维持和功能中发挥重要作用,但至今未有相关的报道。由于 EGFR 的反式激活与唾液分泌相关的 G 蛋白偶联受体(GPCR)的激活有着密切相关的细胞效应,故 EGFR 被看作唾液分泌重要的因子^[42]。CDK2 是启动 DNA 复制的重要因子,对细胞周期具有加速作用,与唾液腺损伤相关^[43]。FN1 是细胞与结缔组织之间重要的黏连蛋白质,在恶性唾液腺肿瘤导致的唾液腺损伤中呈现断续现象^[44]。CUL3 是 Cullin 蛋白家族亚型中的一种,其在细胞周期、信号转导等生理过程中起到重要作用,是蛋白泛素化降解领域的热点,能正向调节 NF- κ B 通路,负向调节 NRF2 信号通路,抑制内源性抗氧化基因转录^[45],且其在唾液腺中亦有中等量的表达,故也与唾液分泌密切相关。

通过对乌梅含漱液与尿毒症口干症共有的关键靶点进行 GO 功能注释及 KEGG 分析,发现多数基因富集在氧化应激及炎症直接或间接相关的通路上,从

排名第一的 PI3K-Akt 信号通路可以发现,其参与促进细胞生长及存活,介导炎症的发生发展,在多种细胞生物学过程中起着至关重要的作用,有研究^[46]提示激活 PI3K/Akt/eNOS 通路能改善干燥综合征大鼠临床症状,提高唾液流率,降低大鼠颌下腺组织病理评分,减轻颌下腺组织炎症损伤,降低血液流变学指标,改善干燥综合征大鼠的临床症状。

促进编码 PI3K/Akt 通路上游效应子的几种基因的转录因子之一是雌激素,其包括受体配体,信号适配子均可起到激活 PI3K/Akt 通路;同时核外雌激素的刺激可通过胰岛素样生长因子 1 受体(Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-IR)激活 PI3K/Akt 通路^[47],抑制细胞凋亡。同时有研究^[48]表明补充雌激素状态后会抑制唾液腺中 Rb Ap48m RNA 的过表达, E2F-1 及 ARF 表达,从而降低 p53 表达,抑制细胞凋亡,故雌激素对唾液腺具有保护作用。该研究亦表明雌激素能通过特异性作用于 NO/PGI2 途径从而调控唾液腺中血管收缩与舒张之间的平衡,进而在一定程度上对唾液腺分泌功能产生影响。ESR1 作为雌激素受体可能参与到唾液分泌这一生物学过程中。但既往的研究^[49]提示唾液腺中主要以 ESR2 表达为主,而不是 ESR1,故多数研究均围绕 ESR2 进行。查阅 THE HUMAN PROTEIN ATLAS 数据库,发现在 RNA 水平,在唾液腺中 ESR1 表达量与 ESR2 的表达量相当,从而说明 ESR1 可作为药物的靶点作用于唾液腺上。本研究通过乌梅含漱液潜在活性成分与关键靶蛋白的分子对接,发现其潜在活性成分与尿毒症口干症的核心靶点蛋白间有着良好的结合性能,结合构象稳定,其中的关键靶蛋白 ESR1 与乌梅含漱液的主要活性成分具有强烈结合活性,推测乌梅含漱液的活性成分可能通过 ESR1 调节相关信号通路,发挥治疗尿毒症口干症的效用,这为下一步的研究提供了方向。

为了验证以上预测结果,本研究选择乌梅含漱液对尿毒症口干症颌下腺组织的 ESR1 的表达进行实验验证,并观察各组模型大鼠颌下腺病理组织的损伤情况,以验证乌梅含漱液是否通过 ESR1 治疗尿毒症口干症。结果显示,乌梅含漱液可上调 ESR1 的表达,并呈剂量依赖,同时减轻唾液腺组织损伤,改善唾液分泌功能。这进一步验证了网络药理学预测药物作用于疾病靶点的可行性。但本研究未深入研究 ESR1 与 PI3K/Akt 信号通路的直接关系,仅通过

既往已发表的研究推断,故将在以后的研究中进行进一步探讨。

综上所述,本研究通过口服生物利用度及类药性筛选、分子对接模拟、网络互作模型构建等计算机模拟多种手段,挖掘乌梅含漱液治疗尿毒症口干症作用的疾病靶点及相关生物学通路,从“活性成分-疾病靶点-生物学通路”角度揭示乌梅含漱液治疗尿毒症口干症的作用机理;随后以硫酸阿托品诱导 5/6 肾切除大鼠制备尿毒症口干症大鼠模型为研究材料,采用低、高不同剂量的乌梅含漱液干预;然后从唾液分泌量、唾液腺组织损伤情况、关键靶标蛋白表达等多种指标,进行动物、组织、分子等多个层次的检测,验证了前期计算机模拟结果的可靠性。结果表明,本方可明显提高硫酸阿托品诱导 5/6 肾切除大鼠的唾液流量,减轻唾液腺损伤,其机制可能是通过 ESR1 等关键靶点作用于 PI3K/Akt 等多条信号通路有关,为从抗炎、抗氧化、细胞对外来刺激反应等多个方面共同发挥治疗尿毒症口干症的作用。

参考文献:

- [1] 李阿敏, 赵云飞, 潘如胜, 等. 维持性血液透析患者口渴的干预研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(10): 938-940.
- [2] 张佩青. 国医大师张琪[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 127-129.
- [3] 王谨, 谢秀荣, 周晓春, 等. 乌梅含漱液与喷雾剂对健康人唾液腺分泌影响的对比分析[J]. 全科护理, 2014, 12(18): 1633-1635.
- [4] 李玉洁. 基于酸甘化阴理论乌梅喷雾剂对全麻腰椎术后口干和胃肠功能障碍的临床应用研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [5] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6(1): 13.
- [6] ZHANG R Z, YU S J, BAI H, et al. TCM-Mesh: The database and analytical system for network pharmacology analysis for TCM preparations[J]. Rep, 2017, 7(1): 2821.
- [7] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine[J]. Nucleic Acids Res. 2019, 47 (D1): D976-D982.
- [8] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15290.
- [9] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator[J]. Database(Oxford), 2010, baq020.
- [10] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTECATTE F, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: 789-798.
- [11] PIERO J, BRAVO L, QUERALT R N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants[J]. Nucleic Acids Res. 2017, 45 (D1): 833-839.
- [12] CHEN X, JI Z L, CHEN Y Z. TTD: Therapeutic Target Database [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 412-415.
- [13] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): 1074-1082.
- [14] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. Omics: a journal of integrative biology, 2012, 16(5): 284-287.
- [15] LU Z, XIE Y, LIU X, et al. Effect of 5/6 nephrectomized rat serum on epithelial-to-mesenchymal transition in vitro[J]. Ren Fail, 2011, 33(6): 600-608.
- [17] SARI D, PUTRI M W, LEKSONO T P, et al. Calcitriol ameliorates kidney injury through reducing podocytopathy, tubular injury, inflammation and fibrosis in 5/6 subtotal nephrectomy model in rats [J]. The Kobe journal of medical sciences, 2020, 65(5): E153-E163.
- [18] YANAGI Y, YASUDA M, HASHIDA K, et al. Mechanism of salivary secretion enhancement by Byakkokaninjinjinto[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(3): 431.
- [19] NEMETH M, MILLESI E, WAGNER K H, et al. Saliva cortisol responses to altered plasma PUFA patterns in guinea pigs[J]. British Journal of Nutrition, 2018: 1-12.
- [20] 唐荣伟, 田玫瑰, 唐玲, 等. 乌梅的¹H-NMR指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2644-2647.
- [21] 张华月, 李琦, 付晓伶. 乌梅化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(S1): 296-300.
- [22] 杨莹菲, 胡汉昆, 刘萍, 等. 乌梅化学成分、临床应用及现代药理研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 415-418.
- [23] 李昕, 王瑞, 李肖莉, 等. 不同加工方法乌梅UPLC特征图谱及模式识别研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(11): 76-81.
- [24] 贾世山, 马超美, 李英和, 等. 甘草叶中酚酸和黄酮甙类成分的分离鉴定[J]. 药学学报, 1992(6): 441-444.
- [25] 刘育辰, 陈有根, 王丹, 等. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251-1255.
- [26] 黄雨婷, 迟宗良, 王姝梅, 等. 甘草中的黄酮类成分及其抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1532-1537.
- [27] 张丹丹. 浅谈甘草成分及其功效[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(21): 128-129.
- [28] 王新绘, 李金耀, 刘晓颖, 等. 甘草及其有效成分对免疫系统调节作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 392-395.
- [29] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage,

- supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [30] BOSSOLA M. Xerostomia in patients on chronic hemodialysis: an update[J]. *Seminars in Dialysis*, 2019, 32(1).
- [31] 李翠娟, 杨剑, 巩振东, 等. 正常体质-肾虚体质-肾虚证候大鼠腮腺AQP1变化规律研究[J]. *现代中医药*, 2020, 40(6): 9-14.
- [31] 吴建波. 尿毒症规律血液透析阶段的中医证候学特点[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(6): 333-335.
- [32] 叶景云, 陈佩仪, 张洁婷. 乌梅喷雾剂对血液透析口渴多饮病人透析间期体重的影响[J]. *护理研究*, 2018, 32(18): 2918-2921.
- [33] 梁晖. 乌梅含漱液对维持性血液透析口渴患者的临床观察及唾液流率与相关因子研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [34] 张志琴, 朱双雪. 槲皮素的药理活性与临床应用研究进展[J]. *药学研究*, 2013, 32(7): 400-403.
- [35] 孙佳, 叶丽红. 槲皮素抗癌作用研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2012, 28(3): 159-160.
- [36] 赵蕾, 赵雪梅, 马朋, 等. 槲皮素抗肿瘤作用的研究新进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2013, 27(3): 78-81.
- [37] TAKAHASHI A, INOUE H, MISHIMA K, et al. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e011608.
- [38] 吴骞, 丁榆德, 程刚. 山柰酚通过PI3K/Akt信号通路对口腔癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响[J]. *中药材*, 2020, 43(12): 3045-3049.
- [39] CUNHU L, SILVA M, FURTADO N, et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens[J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007, 62(9-10): 668-672.
- [40] 白芸, 秦丽华, 张义, 等. 去卵巢大鼠腮腺AQP-5、STIM1及Orai1的表达变化[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2019, 20(3): 156-160.
- [41] 白芸, 秦丽华, 张义, 等. 雌激素和黑升麻对去卵巢大鼠下颌腺神经型一氧化氮合酶及瞬时受体电位香草酸亚型1表达的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2019, 67(3): 188-193.
- [42] SLOMIANY B L, SLOMIANY A. Src-kinase-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in salivary mucin secretion in response to β -adrenergic G-protein-coupled receptor activation[J]. *Inflammopharmacology*, 2004, 12(3): 233-245.
- [43] 郑小东, 蒲涛, 罗义, 等. 术前不同剂量碘¹³¹治疗对甲状腺癌细胞的杀伤效应及对唾液腺功能的影响[J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(11): 1562-1565.
- [44] 张晓珊, 刘媛如. 纤维连接蛋白在涎腺上皮性肿瘤中的免疫组织化学[J]. *实用口腔医学杂志*, 1991, 7(1): 9-10.
- [45] 李衍辉, 梁雅灵, 徐勇. 泛素连接酶Cullin3的研究进展[J]. *广东医学*, 2015, 36(20): 3239-3241.
- [46] 宋维海, 李琴, 茅建春. 一贯煎对干燥综合征模型大鼠及颌下腺PI3K/Akt/eNOS通路的影响[J]. *中药材*, 2020, 43(7): 1725-1729.
- [47] 张骋, 徐西林, 赵军, 等. 针刺调控雌激素及PI3K/AKT/mTOR通路改善绝经后骨质疏松症研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(5): 45-49.
- [48] 刘姝雅, 郭亚娟, 贾静. 围绝经期口干症发生机制研究进展[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2017, 18(2): 122-124.
- [49] VÄLIMAA H, SAVOLAINEN S, SOUKKA T, et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands[J]. *Journal of Endocrinology*, 2004, 180(1): 55-62.

(编辑: 修春)