

引用:胡睿智,张方博,田纪祥,张东,赵晓昂.基于网络药理学、分子对接及动物实验研究显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的作用机制[J].中医药导报,2026,32(1):57-63.

# 基于网络药理学、分子对接及动物实验研究显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的作用机制<sup>\*</sup>

胡睿智,张方博,田纪祥,张东,赵晓昂  
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

**[摘要]** 目的:利用网络药理学、分子对接和动物实验验证相结合研究显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的作用机制。方法:通过网络药理学结合分子对接预测显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的核心靶点和潜在作用机制。动物实验构建环磷酰胺致免疫力低下小鼠模型,通过迟发型变态反应实验和血清溶血素的形成实验分别观察两者联用是否增强细胞免疫和体液免疫功能,再结合蛋白质印迹(Western blotting)法实验验证网络药理学研究预测的靶点。结果:发现显齿蛇葡萄的主要化学成分有25个,林下山参有22个,作用靶点共684个,与免疫增强相关的交集靶点共244个,其中核心靶点有STAT3、SRC、PIK3R1、PIK3CA、HSP90AA1、PIK3CB、AKT1、PIK3CD、PTPN11和EGFR。基因本体(GO)富集分析结果主要涉及磷酸化、细胞凋亡过程的负调控、外源性刺激的反应和炎症反应等。京都基因与基因组百科本书(KEGG)富集分析结果主要涉及PI3K/Akt信号通路、EGFR酪氨酸抑制剂抵抗、AGE/RAGE信号通路和Ras信号通路等。分子对接结果表明两者联用的有效成分与筛选出的核心靶点密切结合。动物实验研究结果表明两者联用显著提高免疫力低下小鼠的细胞免疫和体液免疫功能,Western blotting实验研究结果显示,两者联合能抑制小鼠脾脏组织STAT3蛋白的表达。结论:显齿蛇葡萄联合林下山参可能通过调节脾脏组织STAT3信号通路的表达,增强免疫力低下小鼠模型的细胞免疫和体液免疫功能。

**[关键词]** 显齿蛇葡萄;林下山参;免疫增强;网络药理学;分子对接;STAT3信号通路;小鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)01-0057-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.01.009

Study on the Immunoenhancement Mechanism of Ampelopsis Grossedentata Combined with Mountain-Cultivated Ginseng Based on Network Pharmacology, Molecular Docking, and Animal Experiments

HU Ruizhi, ZHANG Fangbo, TIAN Jixiang, ZHANG Dong, ZHAO Xiaogang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the immunoenhancement mechanism of Ampelopsis grossedentata combined with mountain-cultivated ginseng using network pharmacology, molecular docking, and animal experiments. Methods: The core targets and potential mechanism were predicted via network pharmacology and molecular docking. An immunosuppressed mouse model was induced by cyclophosphamide. The delayed-type hypersensitivity test and the serum hemolysin assay were conducted to assess cellular and humoral immune functions, respectively. Western blotting was performed to verify the targets predicted by network pharmacology. Results: Network pharmacology revealed 25 main chemical components from Ampelopsis grossedentata and 22 from mountain-cultivated ginseng. A total of 684 potential targets for these components were identified, with 244 overlapping targets related to immunoenhancement. Core targets including STAT3, SRC, PIK3R1, PIK3CA, HSP90AA1, PIK3CB, AKT1, PIK3CD, PTPN11, and EGFR were screened. Gene ontology (GO) enrichment analysis indicated that biological processes were primarily associated with phosphorylation, negative regulation of apoptotic process, response to external stimulus, and inflammatory response. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

\*通信作者:赵晓昂,女,主管药师,研究方向为新药及保健食品研发

(KEGG) enrichment analysis suggested involvement in pathways such as the PI3K/Akt signaling pathway, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, AGE/RAGE signaling pathway, and Ras signaling pathway. Molecular docking showed good binding affinity between the active components and the core targets. Animal experiments demonstrated that the combination significantly enhanced both cellular and humoral immune functions in immunosuppressed mice. Western blotting results indicated that the combination inhibited the expression of STAT3 protein in spleen tissue. Conclusion: The combination of *Ampelopsis grossedentata* and mountain-cultivated ginseng may enhance cellular and humoral immunity in immunosuppressed mice by modulating the STAT3 signaling pathway in the spleen.

[Keywords] *ampelopsis grossedentata*; mountain-cultivated ginseng; immunoenhancement; network pharmacology; molecular docking; STAT3 signaling pathway; mice

显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang] 又名“白茶、莓茶或藤茶”，为葡萄科蛇葡萄属的野生藤本植物，主要分布在四川、江西、湖南等长江流域地区；最早记载于清代《草本便方》<sup>[1]</sup>，因其清热解毒、利湿消肿等功效被广泛在土家族和瑶族民间药方中。现代研究发现显齿蛇葡萄幼嫩茎叶中黄酮类化合物含量高达43.4%~45.5%，也是主要的有效成分<sup>[2]</sup>；其具有增强免疫、抗氧化、抗炎、镇痛、保肝和抗肿瘤等功效<sup>[3-4]</sup>。显齿蛇葡萄叶于2013年正式被审批为药食两用的新食品原料<sup>[5]</sup>，在食品保健方面有诸多前景。

林下山参 (forest-cultivated ginseng) 是五加科人参属人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 干燥的根及根茎，经人工育种，生长于在野外环境下10年之后采挖，又名“籽海”；其含有皂苷、挥发油、多糖及微量元素等多种活性成分，具有抑菌、镇静、抗氧化、增强免疫及抗疲劳等作用<sup>[6-7]</sup>。本研究将显齿蛇葡萄叶与林下山参联合使用，利用网络药理学和分子对接预测两者联用增强机体免疫功能的作用靶点，再构建环磷酰胺致免疫力低下的小鼠模型，结合动物实验验证研究两者联用增强免疫功能的药效和作用机制。

## 1 材 料

1.1 实验动物 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级BALB/c小鼠60只，雌雄各半，体质量(20±2)g，8~10周龄，购于北京维通利华实验动物技术有限公司。动物生产许可证号：SCXK(京)2021-0004；动物质量合格证号：1100112011024246，110011201102427。实验期间小鼠饲养于中国中医科学院中药研究所动物房，动物使用许可证号：SYXK(京)2019-0003。动物房为屏障系统，人工光照，温度为20~22℃，湿度为40%~70%，12 h/12 h明暗周期，换气次数为15次/h。实验结束时，戊巴比妥钠腹腔麻醉后处死小鼠。本实验经过中国中医科学院中药研究所动物实验伦理委员会批准 (2022B083)。

1.2 实验药物与制备 显齿蛇葡萄叶和林下山参均购于安徽亳州中药材市场，经中国中医科学院中药研究所青蒿素研究中心张东副研究员鉴定确定为显齿蛇葡萄的干燥茎叶和林下山参的干燥根茎。将200 g显齿蛇葡萄叶依次加入10倍和5倍量去离子水，100℃煎煮2 h，取滤渣复煎一次，合并滤液，浓缩至生药量2.0 g/mL。林下山参(100 g)也按上述操作步骤进行提取，浓缩至生药量1.0 g/mL。

1.3 实验试剂 环磷酰胺 (HPLC纯度≥97%，批号：X16M10Y84172)、SA缓冲液 (批号：L18J12G139257) 和文齐氏液 (批号：

762BW51) 均购于上海源叶生物科技有限公司；4%绵阳红细胞 (sheep red blood cells, SRBC, 批号：20210119)、补体 (豚鼠血清, 批号：119T768) 和RIPA裂解液 (批号：20210923) 均购于北京索莱宝生物科技有限公司；戊巴比妥钠 (分装, 批号：20201119) 购于美国Sigma公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒 (批号：OB184659, 美国ThermoFisher公司)；STAT3 抗体 (批号：20230314)、phospho-STAT3 抗体 (批号：20230817) 和β-actin 抗体 (批号：20230526) 均购于美国Cell Signaling Technology公司；增强化学发光 (ECL) 超敏发光液 (批号：1529203) 购于美国Millipore公司。

1.4 实验仪器 精密电子天平 (德国Sartorius Quintix公司, 型号：3102-1CN)；低温高速台式离心机 (德国Eppendorf公司, 型号：5452R)；多功能荧光酶标仪 (美国Molecular Devices公司, 型号：SpectraMax M5)；电泳仪 (北京六一仪器厂, 型号：DYY-6C)；全自动化学发光凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司, 型号：GenoSens 2000)。

## 2 方 法

2.1 化学成分及靶点筛选 药物相似性 (druglikeness, DL) 和口服生物利用度 (oral availability, OB) 是评估吸收、分布、代谢、排泄特性 (absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME) 的重要指标。OB≥30% 可以反映中药的化学成分被吸收进入人体循环的速度与程度较高，DL≥0.18 的化学成分与已知药物的相似性较高，作为药物主要活性成分的可能性较大。因此以OB≥30%且DL≥0.18为标准来收集具有良好ADME特性的中药活性化学成分<sup>[8]</sup>。通过检索TCMSP数据库 (<https://tcmsp-e.com/>) 和HERB数据库 (<http://herb.ac.cn/>)，以OB≥30%和DL≥0.18为筛选标准，筛选出林下山参及显齿蛇葡萄叶中化学成分，并确定各成分对应的InChI号<sup>[9]</sup>；将获得药物化学成分的InChI号置于PubChem数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜寻Canonical SMILES号；再利用SwissTargetPrediction平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，选定“Homo sapiens”物种，搜集化学成分的靶点<sup>[10-11]</sup>。

2.2 免疫相关靶点 筛选以“免疫 (Immunity)”为关键词，查询OMIM数据库 (<https://omim.org/>) 和GeneCards数据库 (<https://www.genecards.org/>)，将检索结果导出并去重，作为免疫相关的疾病靶点<sup>[12]</sup>。

2.3 药物-疾病靶点网络构建 通过对比分析药物靶点与疾病靶点，取其交集，得到药物-疾病之间的共同靶点。将获得

的共同靶点导入String数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)，构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)以描述各靶点间的相互作用。选择蛋白种类为“Homo sapiens”，最低阈值为“highest confidence”(0.900)，其他保持默认数值，获取蛋白互作关系<sup>[13-14]</sup>。采用Cytoscape 3.7.2软件，构建PPI图，并构建药物-化学成分-作用靶点互作网络图。

**2.4 基因本体(Gene Ontology, GO)功能与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** 将药物与疾病的交集靶点导入David数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)，进行GO功能和KEGG通路的富集分析<sup>[15]</sup>。

**2.5 分子对接** 从核心靶点中挑选degree值最高的4个靶点最为最佳受体，将其输入Uniprot数据库获取蛋白结构。经PyMol 2.6.0软件脱离水分子及配体后，使用AutoDock-Tools 4.2.6为其增添氢原子及电荷；选择上述degree值最高的10个活性成分作为配体，查阅Pubchem数据库获取三维结构，Open Babel GUI 2.4.1转化格式后导入AutoDock-Tools 4.2.6依次与经处理过的蛋白受体进行分子对接<sup>[16]</sup>，以探究药物成分与蛋白受体间生物互作关系。

**2.6 模型构建及给药方法** 实验第1天，环磷酰胺40 mg/kg连续腹腔注射10 d, 1次/d，导致小鼠免疫功能低下。从第11天给药组开始灌胃给予不同浓度的显齿蛇葡萄和林下山参提取物，共连续21 d，模型组灌胃给予等体积去离子水，至实验结束<sup>[17-19]</sup>。

**2.7 实验分组** 将60只小鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、显齿蛇葡萄联合林下山参低剂量组(联合低剂量组)和高剂量组，其中正常对照组和模型组为每组10只，联合给药组为每组20只。联合给药组各组内随机分为2个小组，一组进行细胞免疫功能检测，一组进行体液免疫功能检测。正常对照组自由饮水饮食，不做任何处理；模型组和联合给药组均腹腔注射环磷酰胺，同时模型组灌胃等体积去离子水；联合高剂量组中显齿蛇葡萄和林下山参灌胃给药的剂量分别为0.8 g/kg和0.4 g/kg，联合低剂量组分别为0.4 g/kg和0.2 g/kg。本实验的给药剂量依据前期预实验的剂量而定。

**2.8 细胞免疫功能** 采用腹腔注射2% SRBC方式进行造模，每只小鼠注射0.20 mL。致敏4 d后，测量左后足趾部同一部位的厚度3次，取平均值。在测量部位皮下注射20% SRBC 20  $\mu$ L/只，注射后24 h后，测量左后足趾部同一位置的厚度3次，取平均值。以肿胀度(根据前后足趾厚度的差值)表示迟发型变态反应(DTH)的程度<sup>[20-22]</sup>。

**2.9 体液免疫功能** 腹腔注射生理盐水配制的2% SRBC 0.20 mL/只。4 d后，摘眼球取血1.50 mL, 2 000 r/min(离心半径15 cm)离心10 min，收集上清液。上清液用SA缓冲液稀释300倍，取0.10 mL于96孔板内，依次加入10% SRBC 0.05 mL，补体0.10 mL(SA缓冲液按1:8稀释)。37 °C水浴30 min，置于冰水中终止反应。1 500 r/min离心10 min(离心半径15 cm)，取上清液0.05 mL，加入文齐氏液0.15 mL。设半数溶血孔，取10% SRBC 12.5  $\mu$ L，加文齐氏液0.20 mL至另一张96孔板，充分混匀10 min后，以对照组做空白，540 nm分别测定各管光密度值(OD)，溶血素的量以半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示，其计算公式

为：HC<sub>50</sub>=样品OD值/SRBC半数溶血时的OD值×稀释倍数<sup>[23]</sup>。

**2.10 Western blotting(蛋白质印迹)检测** STAT3和p-STAT3蛋白表达实验结束，迅速摘取各实验组小鼠的脾脏，RIPA裂解液裂解，BCA蛋白浓度测定试剂盒检测各样本的总蛋白浓度。每孔上样40  $\mu$ g，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，PVDF转膜，5%脱脂奶粉进行封闭，4 °C孵育一抗包括STAT3抗体和p-STAT3抗体(稀释比例1:1 000)过夜，洗涤，加入二抗，室温孵育90 min后，洗涤3次，加入ECL超敏发光液显影，ImageJ软件分析各条带灰度值， $\beta$ -actin为内参。

**2.11 统计学方法** 采用SPSS 20.0统计软件处理数据，计量资料以“均数±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结 果

**3.1 显齿蛇葡萄联合林下山参的化学成分和作用靶点** 将检索出的化学成分进行汇总，显齿蛇葡萄的主要化学成分有25个，林下山参的主要化学成分有22个。将其化学成分通过数据库查询靶点后去重，两者的作用靶点共有684个。

**3.2 免疫相关的疾病靶点** 通过OMIM和Genecard数据库得到与免疫相关的疾病靶点共2 508个，其中与成分交集的靶点共244个(见图1)，作为林下山参联合显齿蛇葡萄叶增强免疫的潜在靶点。

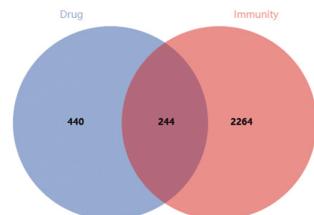


图1 显齿蛇葡萄联合林下山参的化学成分靶点与免疫相关的交集靶点 Venn 图

**3.3 药物-化学成分-作用靶点PPI图的构建** 将疾病与药物交集的244个靶点导入STRING平台，得到关键节点244个和856条边，利用Cytoscape 3.7.2软件构建药物-化学成分-作用靶点PPI图(见图2)。经过半数degree、closeness和betweenness筛选，最终得到个70节点和429条边，其中核心靶点degree排名前10的依次为STAT3、SRC、PIK3R1、PIK3CA、HSP90AA1、PIK3CB、AKT1、PIK3CD、PTPN11和EGFR。(见图3)

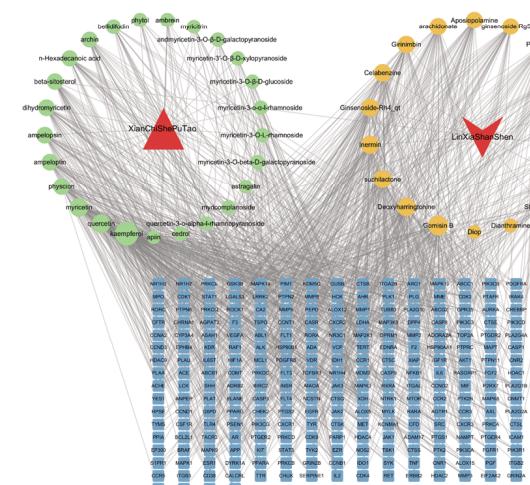


图2 显齿蛇葡萄联合林下山参-化学成分-作用靶点的PPI图

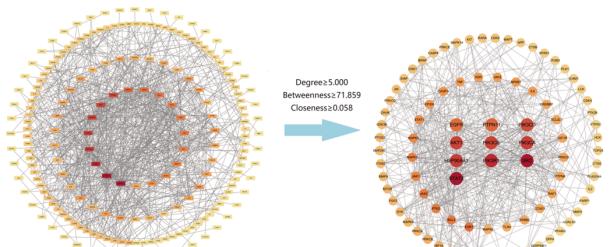


图3 显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的核心靶点筛选图

3.4 GO功能与KEGG通路富集分析 GO富集结果发现,显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的作用机制与993个生物过程(biological process, BP)、126个细胞组成(cellular component, CC)和204个分子功能(molecular function, MF)相关( $P<0.05$ )。筛选 $P$ 值排名前10的分析结果作图(见图4A),BP主要涉及凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)、外源性刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)、细胞增殖的正调控(positive regulation of cell proliferation)及炎症反应(inflammatory response)等相关生物过程。CC主要包括受体复合体(receptor complex)、质膜(plasma membrane)和细胞质(cytoplasm)等细胞组成。MF主要涉及蛋白激酶活性(protein kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)和ATP结合(ATP binding)等分子功能。

KEGG富集分析选择 $P$ 值排名前10的通路(见图4B),主要涉及PI3K/Akt信号通路(PI3K/Akt signaling pathway)、EGFR酪氨酸抑制剂抵抗(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、AGE/RAGE信号通路(AGE/RAGE signaling pathway in diabetic complications)、Ras信号通路(Ras signaling pathway)和细胞黏附(Focal adhesion)等。

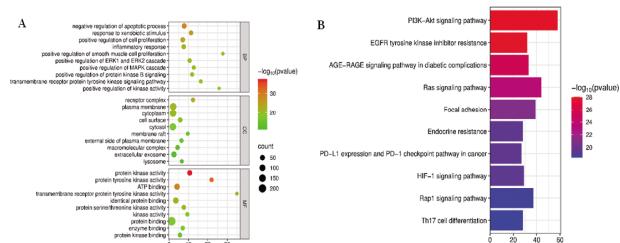


图4 显齿蛇葡萄联合林下山参增强免疫的潜在靶点

GO(A)和KEGG(B)富集分析

3.5 分子对接分析 根据3.3筛选出degree值较大的4个蛋白(STAT3、SRC、PIK3R1和PIK3CA)作为受体,与degree值排名前10位的活性成分(Kaempferol、Gomisin B、Quercetin、DeoxyHarringtonine、Myricetin、Suchilactone、Inermin、Ginsenoside-Rh4、Celabenzine和Arachidonate)进行分子对接。结合能反映了受体与配体的结合程度,结合能越小,其能量越低,结合态愈稳定,表明受体蛋白与配体成分见有较好的亲和性。其中Ginsenoside-Rh4对各受体蛋白结合的最为牢固,其次为Suchilactone。Ginsenoside-Rh4为林下山参中稀有皂苷,可抑制多种癌细胞的活性,并促进癌细胞凋亡<sup>[24-27]</sup>。Suchilactone是显齿蛇葡萄叶中的重要活性成分,促进癌细胞凋亡,治疗白血病和病毒感染,提高免疫系统活性等。分子对接结果显示,以显齿蛇葡萄叶中的活性成分Suchilactone与PIK3CA以及林下

山参中的活性成分Ginsenoside-Rh4与SRC有最好的亲和能力,结合能均为-10.3 kcal/mol(见图5)。查阅文献发现其都具有增强机体免疫的作用,选择4个核心靶点与各活性成分的结合能排名前两位的实验结果绘制三维谱图,结果显示与4个核心靶点结合的主要活性成分是显齿蛇葡萄叶中的Suchilactone以及林下山参中的Ginsenoside-Rh4和Inermin(见图6)。同时选取信号通路最下游的重要核内转导分子STAT3,后续利用动物实验对其表达变化进行了验证。

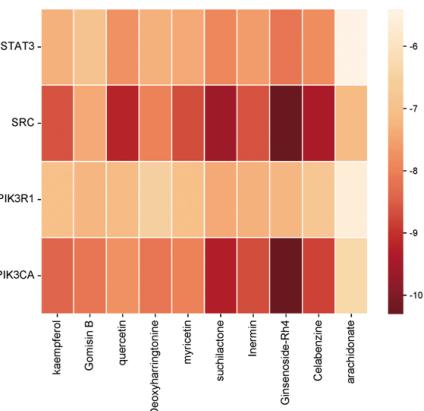
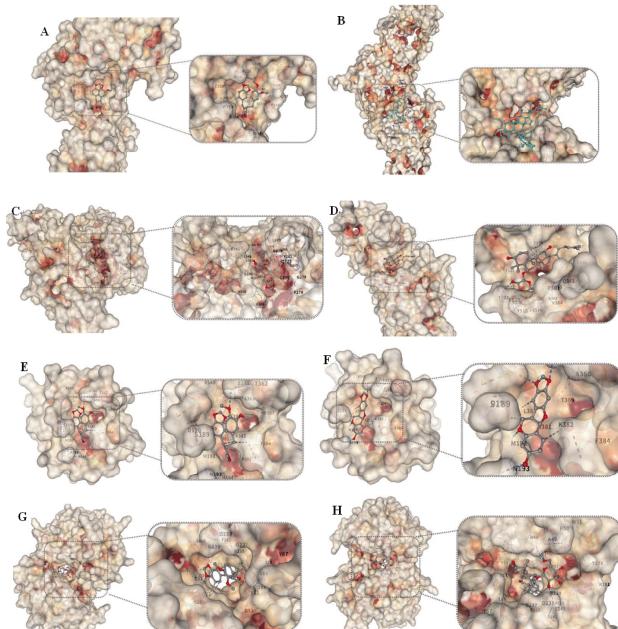


图5 4个受体蛋白和10个活性成分的分子对接结合能表(kcal/mol)



注: A.Suchilactone—STAT3, -7.9 kcal/mol; B.Ginsenoside-Rh4—STAT3, -8.1 kcal/mol; C.Suchilactone—SRC, -9.6 kcal/mol; D.Ginsenoside-Rh4—SRC, -10.3 kcal/mol; E.Suchilactone—PIK3R1, -7.4 kcal/mol; F.Inermin—PIK3R1, -7.3 kcal/mol; G.Suchilactone—PIK3CA, -9.3 kcal/mol; H.Ginsenoside-Rh4—PIK3CA, -10.3 kcal/mol。

图6 3个主要活性成分与4个核心靶点的分子对接图

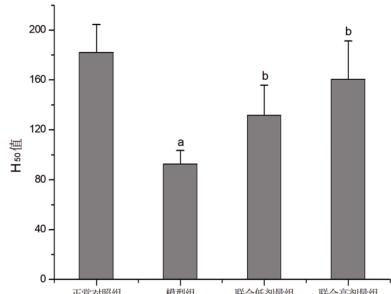
3.6 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠细胞免疫功能的影响 与正常对照组比较,模型组足趾肿胀度显著降低( $P<0.01$ )(见表1、图7)。与模型组比较,联合低剂量组和联合高剂量组足趾肿胀度均明显升高( $P<0.05$ )。结果说明

两者联用能增强免疫力低下小鼠模型的细胞免疫功能。

表1 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下小鼠细胞免疫功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

组别	n	足趾肿胀度
正常对照组	10	0.94±0.28
模型组	10	0.32±0.09 <sup>a</sup>
联合低剂量组	10	0.57±0.12 <sup>b</sup>
联合高剂量组	10	0.68±0.11 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

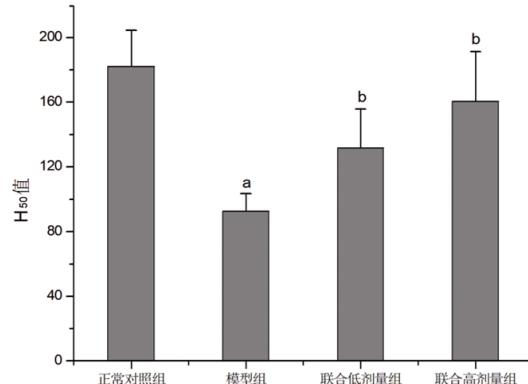
图7 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠细胞免疫功能的影响 (n=10)

3.7 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠体液免疫功能的影响 与正常对照组比较,模型组 $HC_{50}$ 值显著降低( $P<0.01$ )(见表2、图8)。与模型组比较,联合低剂量组和联合高剂量组 $HC_{50}$ 值均明显升高( $P<0.05$ )。结果说明两者联用能增强免疫力低下小鼠模型的体液免疫功能。

表2 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下小鼠体液免疫功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$HC_{50}$
正常对照组	10	182.13±22.45
模型组	10	92.72±10.60 <sup>a</sup>
联合低剂量组	10	131.63±24.04 <sup>b</sup>
联合高剂量组	10	160.44±30.98 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

图8 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠体液免疫功能的影响 (n=10)

3.8 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠脾脏STAT3表达的影响 与正常对照组比较,模型组p-STAT3/STAT3比值显著升高( $P<0.01$ )(见表3、图9~10)。与模型组比

较,联合高剂量组p-STAT3/STAT3比值明显降低( $P<0.05$ )。结果说明两者联用能抑制免疫力低下小鼠脾脏组织STAT3蛋白的表达。

表3 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下小鼠脾脏STAT3表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	p-STAT3/STAT3
正常对照组	3	0.27±0.06
模型组	3	0.85±0.08 <sup>a</sup>
联合低剂量组	3	0.76±0.09
联合高剂量组	3	0.60±0.11 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

p-STAT3

STAT3

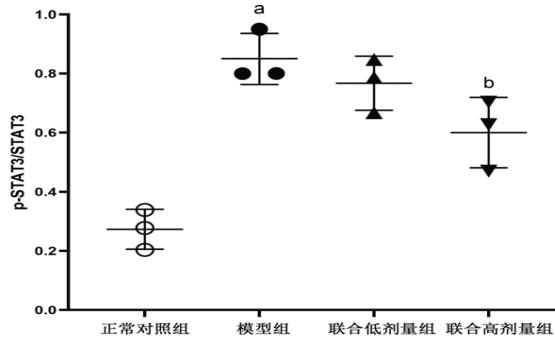
$\beta$ -actin

86 kDa

86 kDa

45 kDa

图9 Western blotting法检测显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠脾脏STAT3表达的图片



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

图10 显齿蛇葡萄联合林下山参对免疫力低下模型小鼠脾脏STAT3表达的影响 (n=3)

#### 4 讨 论

本研究通过网络药理学筛选出显齿蛇葡萄的主要活性成分有25个,林下山参的主要化学成分有22个,作用靶点共有684个,与免疫增强相关的交集靶点共244个。通过构建PPI网络发现核心靶点有STAT3、SRC、PIK3R1、PIK3CA、HSP90AA1、PIK3CB、AKT1、PIK3CD、PTPN11和EGFR。GO功能富集分析研究结果主要涉及细胞凋亡过程的负调控、外源性刺激的反应、细胞增殖的正调控和炎症反应等。KEGG富集分析研究结果主要涉及PI3K/Akt信号通路<sup>[28]</sup>、EGFR酪氨酸抑制剂抵抗<sup>[29]</sup>、AGE/RAGE信号通路<sup>[30]</sup>、Ras信号通路<sup>[31]</sup>和细胞黏附<sup>[32]</sup>等;分子对接结果发现活性成分与核心靶点有较好的结合能力。文献报道以上分子信号通路与肿瘤免疫时炎症反应、免疫逃逸和免疫检查点的调节等生物过程密切相关。

动物实验通过构建环磷酰胺致免疫力低下小鼠模型,通过迟发型变态反应实验观察细胞免疫功能,通过血清溶血素的形成实验观察体液免疫功能结果表明,结果表明与模型组比较,联合低和高剂量组足趾肿胀度均显著增加,且 $HC_{50}$ 值均

明显升高。研究结果说明显齿蛇葡萄联合林下山参能提高免疫力低下小鼠的细胞及体液免疫功能。

根据网络药理学及分子对接研究结果提供的线索,显齿蛇葡萄和林下山参联用增强免疫的核心靶点可能与STAT3分子相关,使用Western blotting法进一步验证了此蛋白在小鼠脾脏组织中的表达。研究结果表明,与模型组比较,联合用药高剂量组STAT3蛋白表达降低,说明两者联合能抑制免疫力低下模型小鼠脾脏组织STAT3蛋白的表达,与网络药理学研究的靶点预测结果一致。

STAT3为细胞内信号转导因子,外界刺激如细胞因子和生长因子等信号分子与膜受体结合激活下游分子,磷酸化受体结合STAT3分子的SH2结构域<sup>[33-34]</sup>。STAT3被酪氨酸激酶磷酸化后,形成二聚体并移位至细胞核,结合下游靶基因的启动子区域,通过与其它转录因子的相互作用,调控基因转录,影响细胞的增殖、分化、凋亡和免疫调节等多种生物学过程<sup>[35-36]</sup>。在机体免疫反应中,STAT3参与调控树突状细胞的发育和功能,巨噬细胞的炎症信号传导,促进IgG分泌,参与浆细胞的分化、Th17细胞的生成及Tfh细胞的发育。STAT3表达降低则会导致IgE综合征、多发性硬化症等诸多免疫缺陷疾病。上述研究均说明STAT3与机体免疫调节功能有密切关联。

显齿蛇葡萄和林下山参各自增强正常小鼠的免疫功能均有报道,如:显齿蛇葡萄叶水提物增强正常小鼠的细胞免疫功能和NK细胞活性<sup>[3]</sup>,林下山参冻干粉增强正常小鼠的体液免疫及NK细胞活性<sup>[7]</sup>,但将两者联用增强免疫的研究尚未见报道。本研究利用网络药理学和分子对接预测显齿蛇葡萄和林下山参联用增强免疫的分子机制,并结合动物实验证明两者联合可能通过调节STAT3信号通路,增强免疫力低下模型小鼠的细胞免疫和体液免疫功能。本研究也存在不足之处,如:未设置显齿蛇葡萄或林下山参单独使用的实验组别,无法比较两者联用的效果是否强于单独用药;未检测两者联用对NK细胞活性的影响。

综上所述,本研究为显齿蛇葡萄和林下山参的联合使用增强免疫提供了实验数据和理论依据,关于两者联用何种功效成分对小鼠免疫功能具有增强作用以及确切机制,仍然需要更深入的实验研究从细胞和分子等不同层面来阐明,后续将会结合系统的化学分析和分子生物学实验等来验证具体的化学成分和调控蛋白,以阐释两者联用对STAT3相关通路的调控机制。

## 参考文献

- [1] 曾晓艳,刘塔斯,龚力民,等.民族药小叶显齿蛇葡萄的生药学研究[J].中药材,2023,46(9):2172-2177.
- [2] 贺奥城,郎一帆,黄智超,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的显齿蛇葡萄化学成分分析[J].中药材,2024,47(8):1986-1994.
- [3] 赵晓昂,张东,张方博.显齿蛇葡萄叶水提物增强正常小鼠免疫功能的试验研究[J].中国食品添加剂,2025,36(6):8-12.
- [4] 邱盼子,谢谦,黄涛,等.显齿蛇葡萄醇提物含药血清对脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7炎症模型的抗炎作用[J].中医药导报,2024,30(10):27-31.
- [5] 关于批准显齿蛇葡萄叶等3种新食品原料的公告(2013年第10号)[J].中国食品添加剂,2014(1):225-226.
- [6] 赵晓昂,王云,李友明,等.基于系统药理学解析林下山参联合米糠脂肪烷醇抗疲劳的作用机制[J].中南药学,2023,21(9):2354-2361.
- [7] 文涛,王文思,杨鸿武,等.林下山参冻干粉对小鼠的免疫调节作用[J].中国卫生检验杂志,2019,29(18):2181-2184.
- [8] 谢丹枫,王能,陈紫莹,等.基于数据挖掘的国家名老中医抗肿瘤用药规律及核心复方解析[J].世界中医药,2020,15(18):2726-2734.
- [9] YEE J L, HUANG C Y, YU Y C, et al. Potential mechanisms of GuiZhi Fuling Wan in treating endometriosis: An analysis based on TCMSP and Dis Ge NET databases[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329:118190.
- [10] 李小敏,张佳涵,梁宏轩,等.基于数据挖掘探究溪黄草药用成分及潜在抗癌的作用机制[J].现代医药卫生,2024,40(6):930-935,940.
- [11] GFELLER D, MICHELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules[J]. Bioinformatics, 2013, 29(23):3073-3079.
- [12] 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.
- [13] 张傲,李然,刘立萍,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨苓桂术甘汤改善非酒精性脂肪性肝病的潜在作用机制[J].中医临床研究,2024,16(4):9-15.
- [14] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1):D638-D646.
- [15] SHERMAN B T, HAO M, QIU J, et al. DAVID a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1):W216-W221.
- [16] 陈帅,刘军舰,尚海涛,等.基于网络药理学、分子对接及实验探讨茵陈蒿汤调节阻塞性黄疸氧化应激的作用机制[J].天津医科大学学报,2021,27(6):595-602.
- [17] 张少辉,李思媛,温梦昕,等.扶正固表方对免疫低下小鼠免疫功能的实验研究[J].天津中医药大学学报,2024,43(6):531-537.
- [18] 杨杨,李根,马婧威,等.四种环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠模型的对比研究[J].实验动物科学,2023,40(2):1-9.
- [19] 刘泽坤,马俊丽,李艳,等.环磷酰胺诱导的小鼠免疫低下模型的方法学考察及金樱子提取物联合益生菌调节免疫功能的研究[J].中国免疫学杂志,2024,40(8):1701-1708.

- [20] 苏鹏涛,杨劝生,赵强,等.红茂草挥发油干预角叉菜胶致大鼠足肿胀的代谢组学研究[J].生物化工,2020,6(3):59-61,65.
- [21] YANG F, LI R, LIU W T, et al. Unveiling the anti-inflammatory effects and mechanisms of LM49 in a carrageenan-induced acute inflammation model[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2025, 34(1):41-54.
- [22] 何静,安晔,张朝绅.复方黑参滴丸与复方黑参丸药效学实验比较研究[J].药学实践与服务,2025,43(1):17-21.
- [23] 张方毅,郭遂成.红参水提物增强小鼠免疫力实验研究[J].国际中医中药杂志,2019,41(11):1219-1224.
- [24] 王雪莲,孟亚红,孙丽华.人参皂苷Rh4调控ERK和AKT信号通路对T-ALL细胞凋亡的影响[J].中国免疫学杂志,2021,37(10):1186-1190.
- [25] 陈钧.人参皂苷Rh4对食管鳞癌转移的抑制作用及机制研究[D].西安:西北大学,2022.
- [26] 蒋弘波.人参皂苷Rh4抗胃腺癌作用及机制研究[D].西安:西北大学,2022.
- [27] BAI X, DUAN Z G, DENG J J, et al. Ginsenoside Rh4 inhibits colorectal cancer via the modulation of gut microbiota-mediated bile acid metabolism[J]. *J Adv Res*, 2025, 72:37-52.
- [28] O'DONNELL J S, MASSI D, TENG M W L, et al. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 48:91-103.
- [29] PENG S L, WANG R, ZHANG X J, et al. EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 165.
- [30] PALANISSAMI G, PAUL S F D. AGEs and RAGE: Metabolic and molecular signatures of the glycation-inflammation axis in malignant or metastatic cancers [J]. *Explor Target Antitumor Ther*, 2023, 4(5):812-849.
- [31] JHA M K, SARODE A Y, SAHA B. Ras isoforms selectively regulate antigen-specific immune response[J]. *Cytokine*, 2020, 126:154914.
- [32] JIANG H, HEGDE S, KNOLHOFF B L, et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy[J]. *Nat Med*, 2016, 22(8): 851-860.
- [33] SHI D D, TAO J J, MAN S L, et al. Structure, function, signaling pathways and clinical therapeutics: The translational potential of STAT3 as a target for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(6):189207.
- [34] ZOU S L, TONG Q Y, LIU B W, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):145.
- [35] BUTTURINI E, CARCERERI DE PRATI A, MARIOTTI S. Redox regulation of STAT1 and STAT3 signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19):7034.
- [36] MYERS S A, GOTTSCHALK R A. Mechanisms encoding STAT functional diversity for context-specific inflammatory responses[J]. *Curr Opin Immunol*, 2022, 74:150-155.

(收稿日期:2025-04-01 编辑:刘国华)