

## 基于网络药理、分子对接及实验验证探究葛根素治疗脑梗死的作用机制

吴艳芳, 袁日明, 阮啸锋, 陈金中\*

上海市嘉定区安亭医院, 上海 201800

**摘要:** **目的** 基于网络药理学、分子对接与细胞实验, 探究葛根素治疗脑梗死的神经保护机制。 **方法** 通过 SEA、CTD 等数据库预测葛根素的靶点, GeneCards、Pharmgkb 等数据库收集脑梗死靶点, 筛选药物与疾病交集靶点; 构建“药物-靶点-疾病”网络及蛋白相互作用 (PPI) 网络, 进行基因本体 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 利用分子对接技术验证葛根素与核心靶点的结合活性。体外实验采用 SH-SY5Y 细胞氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 模型, 设对照组、模型组、葛根素组, 以 MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测活性氧 (ROS) 水平及细胞凋亡率。RT-qPCR 与 Western blotting 分别检测丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、Fos 原癌基因 (FOS) mRNA 与磷酸化蛋白 (p-MAPK1、p-MAPK3) 及总蛋白表达变化。 **结果** 网络药理学筛选获得 82 个葛根素与脑梗死交集靶点, PPI 网络分析确定 MAPK3、MAPK1、FOS 为核心靶点, GO 与 KEGG 富集分析显示主要涉及凋亡调控、氧化应激反应及 MAPK 信号通路; 分子对接验证葛根素与 3 个核心靶点均具有良好结合活性。体外实验显示, 葛根素可显著提高 SH-SY5Y 细胞活力 ( $P < 0.001$ ), 降低 ROS 水平及细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 葛根素可下调 FOS mRNA 及 p-MAPK1、p-MAPK3、FOS 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 葛根素可能通过调节 MAPK3、MAPK1、FOS 靶点, 调控 MAPK 信号通路, 发挥抗氧化、抗凋亡的神经保护作用。

**关键词:** 葛根素; 脑梗死; 网络药理学; 分子对接; 神经保护; 丝裂原活化蛋白激酶; Fos 原癌基因

**中图分类号:** R285.5; R286.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)04-0905-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.005

## Mechanism of puerarin in treatment of cerebral infarction based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation

WU Yanfang, YUAN Riming, RUAN Xiaofeng, CHEN Jinzhong

Anting Hospital of Jiading District in Shanghai, Shanghai 201800, China

**Abstract: Objective** To explore the neuroprotective mechanism of puerarin in treatment of cerebral infarction based on network pharmacology, molecular docking, and cellular experiments. **Methods** Targets of puerarin were predicted using databases such as SEA and CTD, while targets related to cerebral infarction were collected from databases including GeneCards and Pharmgkb. The overlapping targets between the drug and the disease were screened. A “drug-target-disease” network and a PPI network were constructed, followed by GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. Molecular docking technology was used to verify the binding activity of puerarin to core targets. *In vitro* experiments were performed using the OGD/R model of SH-SY5Y cells, which were divided into control group, model group, and puerarin group. Cell viability was detected by MTT assay, and ROS levels and cell apoptosis rate were measured by flow cytometry. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the expression changes of MAPK1, MAPK3, and FOS mRNA level, as well as the expression of their phosphorylated proteins (p-MAPK1, p-MAPK3) and total proteins. **Results** A total of 82 overlapping targets between puerarin and cerebral infarction were identified through network pharmacology. PPI network analysis confirmed MAPK3, MAPK1, and FOS as core targets. GO and KEGG enrichment analyses showed that these targets were mainly involved in apoptosis regulation, oxidative stress response, and the MAPK signaling pathway. Molecular docking verified that puerarin had good binding activity with the three core targets. *In vitro* experiments showed that puerarin significantly increased the viability of SH-SY5Y cells ( $P < 0.001$ ), reduced ROS levels and cell apoptosis rate ( $P < 0.01$ ,  $0.001$ ). Puerarin

收稿日期: 2026-01-30

基金项目: 上海市嘉定区卫生系统重点专科建设资助项目 (ZK2024B02)

作者简介: 吴艳芳, 女, 主治医师, 本科, 研究方向为脑血管病、脑血管病介入治疗、神经重症。E-mail: 15021690857@163.com

\*通信作者: 陈金中, 男, 主治医师, 本科, 研究方向为呼吸危重症、脓毒症及多器官功能障碍综合征。E-mail: 578397564@qq.com

downregulated the abnormally increased expression of *FOS* mRNA, p-MAPK1, p-MAPK3, and FOS protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Puerarin may exert neuroprotective effects of antioxidation and anti-apoptosis by regulating the MAPK3, MAPK1, and FOS targets and modulating the MAPK signaling pathway.

**Key words:** puerarin; cerebral infarction; network pharmacology; molecular docking; neuroprotection; MAPK3; FOS

脑梗死是因动脉粥样硬化、血栓形成等核心病因导致脑部血管阻塞,血流中断后脑组织缺血、缺氧,最终发生坏死的常见脑血管疾病,是脑卒中最常见的类型,占有卒中病例的 70%~87%<sup>[1-3]</sup>。其主要病因包括动脉粥样硬化、血栓形成、栓塞等导致脑部血管狭窄或闭塞的核心因素,常与高血压、糖尿病、高脂血症等慢性疾病密切相关,这些因素共同加剧血管损伤风险<sup>[4]</sup>。部分脑梗死患者发病前可有短暂性脑缺血发作作为预警,常表现为肢体麻木、言语不清等短暂可逆症状,提示脑部血管已存在潜在病变风险<sup>[5]</sup>。脑梗死不仅临床发病率居高不下,且致残率、复发率显著偏高,严重威胁各年龄段人群健康并给家庭带来沉重照护负担,已成为我国亟待重点防控的重要公共卫生问题之一<sup>[6]</sup>。脑梗死的发病机制始于脑动脉被血栓或栓子堵塞,导致局部脑组织血流持续中断,进而引发缺氧缺糖状态,引发能量衰竭,细胞离子泵失灵,造成钙离子超载和兴奋性氨基酸(如谷氨酸)大量释放<sup>[4]</sup>。缺血缺氧引发的病理级联反应中,随之而来的是氧化应激,大量活性氧类自由基被诱导产生,直接攻击并损伤细胞膜脂质、功能蛋白及遗传物质 DNA,破坏细胞稳态<sup>[7]</sup>。同时神经炎症被激活,小胶质细胞和星形胶质细胞释放炎症因子,吸引免疫细胞浸润,进一步破坏血脑屏障<sup>[8]</sup>。这些过程共同触发细胞死亡途径,包括坏死、凋亡、铁死亡等<sup>[7]</sup>。

葛根素是从葛根中提取的天然异黄酮类化合物,具有抗氧化、抑制炎症因子释放、减少细胞程序性死亡、改善组织血流灌注等多种药理作用<sup>[9-10]</sup>。在脑梗死治疗中,葛根素可通过抑制核因子- $\kappa$ B、Toll 样受体 4/髓样分化因子 88 等炎症通路,减轻神经炎症;通过调节信号通路,减少神经元凋亡与自噬,保护血脑屏障<sup>[11]</sup>。动物实验显示,葛根素能有效缩小脑梗死体积、减轻脑组织水肿,改善动物运动协调及认知功能缺损,为临床转化提供支撑<sup>[12]</sup>。临床研究亦发现葛根素可提升脑血流灌注、降低白细胞介素(IL)-6 等炎症因子水平<sup>[13]</sup>。本研究旨在整合网络药理学、分子对接与体外细胞实验,通过多维度交叉验证,系统探究葛根素治疗脑梗死的核

心调控通路、潜在分子靶点及神经保护相关作用机制,为葛根素临床治疗脑梗死提供坚实的理论支撑与实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人 SH-SY5Y 细胞(美国典型培养物保藏中心,批号 CRL-2266)。

### 1.2 药物与试剂

葛根素(质量分数 $\geq 98\%$ )、无糖 DMEM 培养基、高糖 DMEM 培养基(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 B20446、R32209、R28175)、MTT 试剂(赛默飞世尔科技,批号 V13154)、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,批号 40302ES];活性氧(ROS)活性检测试剂盒(上海圣尔生物科技有限公司,批号 SB-R6033);TRIzol 试剂(赛默飞世尔科技,批号 15596026CN);BeyoRT™ Q cDNA 第一链合成试剂盒(赛默飞世尔科技,批号 D7190M);PowerUp™ SYBR Green 预混液(赛默飞世尔科技,批号 A25742);Fos 原癌基因(FOS)抗体(Abcam 公司,批号 ab222699);丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)抗体(Abcam 公司,批号 ab32081);p-MAPK1 抗体(Abcam 公司,批号 ab50011);丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)抗体(Abcam 公司,批号 ab32537);p-MAPK3 抗体(Abcam 公司,批号 ab50011)。

### 1.3 仪器

YQX-II 厌氧手套培养箱(上海川昱实验仪器有限公司);PH-XDS5 倒置显微镜(凤凰光学股份有限公司);BMC600 荧光显微镜(凤凰光学股份有限公司);Varioskan ALF 多功能酶标仪(赛默飞世尔科技);TD3 低速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Allegra C-24R 台式高速冷冻离心机[贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司];CytoFLEX S 流式细胞仪[贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司];CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];ChemiDoc Go 化学发光成像仪[伯乐生命医学产品

(上海)有限公司]; NanoDrop One/OneC RNA 浓度仪(赛默飞世尔科技); E-Gel™ Power Snap 电泳仪(赛默飞世尔科技)、iBright™ CL750 蛋白显影仪(赛默飞世尔科技)。

## 2 网络药理学研究方法

### 2.1 葛根素靶点的预测

以“puerarin”为关键词, SEA 数据库(<https://sea.bkslab.org/>)物种严格限定为“Homo sapiens”, 置信度阈值设定为 Score>0.8, 仅提取高可信度化学相似性关联蛋白质靶点; CTD 数据库(<https://ctdbase.org/>)聚焦“Chemical-Gene”关联类型, 筛选互作评分(Interaction Score)≥15 的靶点条目, 排除仅涉及毒理学关联的非功能靶点; SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)默认人类物种, 保留置信概率(Probability)≥0.5 的预测结果; Stitch 数据库(<http://stitch.embl.de/>)置信度分数设定为>0.7, 且仅保留直接相互作用靶点, 剔除间接关联冗余信息。所有预测靶点经 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)条目标注, 严格排除未经过实验验证的预测性蛋白, 保障靶点筛选的可靠性。

### 2.2 脑梗死靶点的收集

以“ischemic cerebral infarction”“ischemic stroke”“cerebral ischemic infarction”“ischemic brain infarction”为并列检索关键词, 在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)按关联度评分(relevance score)≥1 筛选关联靶点; PharmGKB 数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)限定关联类型为“disease-gene”, 仅提取经临床或实验验证的疾病相关靶点; OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)聚焦“phenotype-gene”关联条目, 严格纳入与疾病病理机制直接相关的致病基因或易感基因; DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)限定药物类型为“small molecule drug”“biotech drug”, 收集用于治疗该疾病的药物对应的作用靶点; TTD 数据库(<https://ttd.idrblab.cn/>)筛选“target type”为“protein”, 且“drug development phase”处于“approved”“clinical trial”阶段的靶点。所有数据库检索均统一物种为人类, 确保靶点的物种特异性与研究相关性。

### 2.3 葛根素治疗脑梗死的潜在作用靶点筛选

将经多数据库预测、Uniprot 规范化处理的葛根素靶点, 与从 GeneCards 等数据库筛选去重后的脑

梗死相关靶点, 共同导入具备交集分析与可视化功能的 Venny 2.1.0 工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 通过绘制韦恩图直观呈现两者重叠区域, 筛选出药物与疾病交集靶点。

### 2.4 构建“药物-靶点-疾病”网络

将经过多数据库筛选及 Uniprot 标准化处理的葛根素活性成分、脑梗死疾病靶点, 以及两者交集获得的潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.10.0 软件, 构建“药物-靶点-疾病”交互网络图。

### 2.5 蛋白相互作用(PPI)网络与核心靶点筛选

通过 STRING 数据库(<https://string-db.org/>), 以“homo sapiens”为物种、高置信度(high confidence)>0.9 为置信度, 勾选“hide disconnected nodes in the network”导出药物与疾病交集靶点的 TSV 格式 PPI 数据集。将其导入 Cytoscape 3.10.0 软件构建可视化网络后, 采用 CytoNCA 等插件进行多维度网络关联性指标分析, 明确指标筛选依据, 结合本研究网络拓扑结构特征, 设定筛选阈值为介数中心性(BC)≥中位数、接近中心性(CC)≥中位数、度中心性(DC)≥中位数、特征向量中心性(EC)≥中位数、局部平均连通性(LAC)≥中位数、网络中心性(NC)≥中位数作为辅助筛选指标, 排除网络中关联性弱、功能冗余的靶点。初筛后进一步通过“指标一致性验证”(即同时满足≥5 项指标阈值)进行 2 次筛选, 最终确定核心靶点, 该筛选策略可确保核心靶点既具备全局网络的关键调控地位, 又具有局部网络的紧密关联性。

### 2.6 基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

利用 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>), 限定物种为 homo sapiens 以保证人类特异性, 对前期筛选的药物与疾病交集靶点进行 GO 功能注释与 KEGG 信号通路富集分析。

### 2.7 分子对接

为验证葛根素与核心靶点的结合活性, 从全球最大免费化学信息库 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取葛根素 3D 结构并导出 SDF 格式文件作为配体, 通过收录实验测定大分子结构的 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心蛋白的 PDB 格式三维结构作为受体, 借助 CB-Dock2 在线工具(<https://cadd.labshare.cn/cbdock2>)进行分子对接及结合能计算, 筛选亲和力最优构象作为最终结果, 进而通过可视化分析明确两者结合模式。

### 3 实验验证方法

#### 3.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞经液氮复苏后,采用含 10%优质胎牛血清(营养与贴壁支持)及 1%双抗(青霉素-链霉素,抑杂菌)的 DMEM 高糖培养基,于 37 °C、饱和湿度 5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱常规培养。待细胞贴壁生长至培养瓶底面积 80%~90%汇合度时即可传代,按 1:5 比例接种至新培养瓶中持续培养。

#### 3.2 SH-SY5Y 细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型的建立

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞悬液,轻柔吹打混匀后稀释至 6×10<sup>4</sup>个/mL,以每孔 200 μL 均匀接种至 96 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养 24 h 至细胞贴壁稳定后弃上清,空白组换 200 μL 高糖 DMEM,模型组换无糖 DMEM;模型组入厌氧手套培养箱缺氧 6 h,结束后弃无糖 DMEM,换 200 μL 高糖 DMEM,在常氧条件下复氧 24 h。

#### 3.3 MTT 比色法测定葛根素对 OGD/R 处理的细胞的作用

按 3.1 项下方法处理 SH-SY5Y 对数期细胞,适宜密度铺板后 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养 24 h 贴壁稳定,弃上清;对照组换 200 μL 高糖 DMEM,模型组换无糖 DMEM,给药组加入含葛根素的无糖 DMEM;缺氧 6 h 后弃液,换高糖 DMEM 配制的 37.5、75.0、150.0 μmol/L 葛根素培养液,续培 24 h,另设只加培养基和 MTT 试剂的空白组,检测吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

#### 3.4 ROS 检测

将对数期 SH-SY5Y 细胞以 6×10<sup>4</sup>个/mL 接种 96 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养 24 h 贴壁,随机对照组(不进行 OGD/R 处理)、模型组(进行 OGD/R 处理)、葛根素组(模型组基础上给予 150 μmol/L 葛根素干预),各组处理后继续培养 24 h,加入 15 μmol/L DCFH-DA 探针轻柔混匀,37 °C 避光孵育 30 min,通过流式细胞仪检测荧光强度反映 ROS 水平。

#### 3.5 Annexin V-FITC/PI 流式染色法验证葛根素对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

按 3.4 项下方法分组处理 SH-SY5Y 对数期细胞,培养 24 h 后弃培养基,预冷 PBS 洗 2 次,加无 EDTA 胰酶消化,血清培养基终止,收集细胞悬液至流式管。4 °C、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 再洗 2 次离心,调细胞密度 1×10<sup>5</sup>个/mL。

加 500 μL 1×Binding Buffer,各加 5 μL Annexin V-FITC 和 PI,室温避光孵育 10~15 min,1 h 内流式检测。以 FL1 (Annexin V-FITC)、FL2 (PI) 为轴,计算早晚期凋亡率,实验独立重复 3 次。

$$\text{早晚期凋亡率} = (\text{Q2 象限细胞数} + \text{Q3 象限细胞数}) / \text{总细胞数}$$

#### 3.6 RT-qPCR 法检测 MAPK3、MAPK1、FOS mRNA 表达

按照 Trizol 试剂说明书提取各组 SH-SY5Y 细胞总 RNA,取 500 ng 合格 RNA,采用 BeyoRT™ Q cDNA 第一链合成试剂盒进行逆转录合成 cDNA,随后进行 RT-qPCR 分析。反应条件:95 °C 预变性 2 min、95 °C 变性 5 min、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 45 s,扩增 40 个循环。以熔解曲线单一峰、无杂峰为质控标准,检测 MAPK3、MAPK1、FOS mRNA 表达,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析相对表达量,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向 GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	反向 GAAGATGGTGATGGGATTTTC
FOS	正向 GGGAAAGGTAAGAAGCAGGC
	反向 GGGCTCTGTTGAGGCTCT
MAPK1	正向 GCGTGAGAACCGATTACAAG
	反向 AGGTCATACTCCTCAGGGTAGTC
MAPK3	正向 CAGAAGGTGACAGTGCTGGA
	反向 TGGTCTCCACGAAGAAGGAG

#### 3.7 Western blotting 检测 p-MAPK3、p-MAPK1 及 FOS 蛋白表达量

SH-SY5Y 细胞加入含蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min 提取总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量;经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、湿法转膜至 PVDF 膜、5%脱脂奶粉室温封闭 1 h、一抗(MAPK3、p-MAPK3、MAPK1、p-MAPK1、FOS,按 1:800 比例稀释)4 °C 孵育过夜、二抗室温孵育 1 h、ECL 化学发光试剂盒(依赖辣根过氧化物酶催化发光)标记,利用化学发光成像分析系统采集图像,经 Image J 软件背景校准后分析条带灰度积分值,以 GAPDH 为内参校正,计算目的蛋白相对表达量。

### 3.8 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.0 软件分析。组间整体差异用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验, 方差齐后两两比较用 LSD-*t* 检验。

## 4 结果

### 4.1 网络药理学与分子对接

**4.1.1 葛根素与缺血性脑梗死共同作用靶点的筛选** 对经 SEA、CTD 等多数据库预测并经 Uniprot 规范化处理的葛根素相关靶点, 与从 GeneCards 等数据库收集并经去重筛选的脑梗死作用靶点, 借助 Venny 2.1.0 软件进行交集分析并绘制韦恩图, 结果显示两者存在 82 个共同作用靶点, 见图 1。

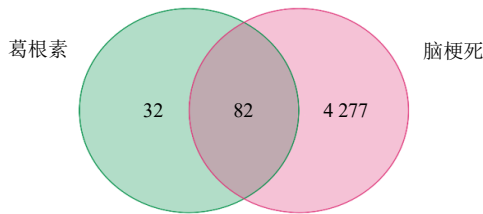


图 1 葛根素与脑梗死共有靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of common targets of puerarin and cerebral infarction

**4.1.2 “药物-靶点-疾病”网络的构建分析** 将经多数据库筛选、Uniprot 规范化处理后获得的葛

根素潜在靶点, 与脑梗死以及两者 82 个共同作用靶点导入 Cytoscape 3.10.0 软件, 采用网络可视化建模方法构建“药物-靶点-疾病”交互网络, 最终形成含 84 个节点和 164 条边的网络图, 见图 2。

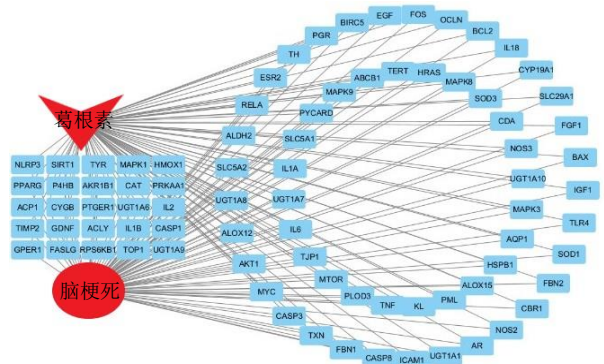


图 2 “药物-靶点-疾病”网络

Fig. 2 “Drug-target-disease” network

**4.1.3 交集靶点 PPI 网络构建及核心靶点筛选** 利用 STRING 数据库导入 82 个药物-疾病交集靶点, 将其导入 Cytoscape 3.10.0, 构建 PPI 网络图 (图 3A), 通过 CytoNCA 插件以 6 项中心性指标中位数为阈值, 初筛得 16 个节点、52 条边的网络 (图 3B), 二次筛选后获 MAPK3、MAPK1、FOS 3 个核心靶点及 3 条边 (图 3C、表 2)。

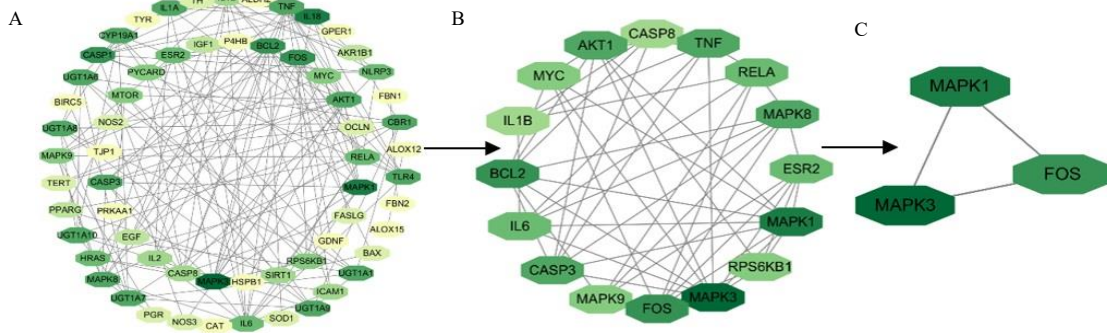


图 3 PPI 网络图 (A)、PPI 网络图第 1 次网络拓扑分析后 16 个靶点 (B)、PPI 网络图第 2 次网络拓扑分析后 3 个核心靶点 (C)

Fig. 3 PPI network diagram (A), 16 target points after the first network topology analysis of the PPI network diagram (B), 3 core target points after the second network topology analysis of the PPI network diagram (C)

表 2 葛根素治疗脑梗死的核心靶点

Table 2 Core targets of puerarin in treatment of cerebral infarction

靶点	度中心性	特征向量中心性	介数中心性	接近中心性	网络中心性	局部平均连通性
MAPK3	10	0.377	21.484	0.750	7.310	4.20
MAPK1	9	0.349	13.783	0.714	6.276	4.00
FOS	8	0.291	14.652	0.652	5.043	3.25

**4.1.4 葛根素与脑梗死交集靶基因的富集分析** GO 富集分析结果表明,生物过程(BP)主要涉及凋亡信号通路调控、外源性凋亡信号通路、外源性凋亡信号通路调控、对脂多糖的反应等,细胞组分(CC)主要涉及细胞质囊泡腔、囊泡腔、线粒体外膜、经典炎症小体复合物等,分子功能(MF)主要涉及葡萄糖醛酸转移酶活性、生长因子受体结合、蛋白质异源二聚化活性、细胞因子受体结合、类固醇结合等,见图 4。

KEGG 富集结果显示,这些通路主要包括脂质和动脉粥样硬化、沙门菌感染、化学致癌、致病性大肠杆菌、受体激活、感染、甲型流感、MAPK 等信号通路,见图 5。

**4.1.5 分子对接** 将从 PubChem 数据库获取的葛根素 3D 结构(SDF 格式)作为配体,与从 PDB 数据库下载的 MAPK3、MAPK1、FOS 3 个核心靶点的三维晶体结构(PDB 格式)分别通过 CB-Dock2 在线工具进行分子对接。分子对接稳定性以结合能为核心评价指标,结合能越低,配体与受体的结合

所需能量越少,形成的复合物空间构象越稳定,通常结合能<-5.0 kJ/mol 提示两者具有良好结合活性。结果显示,葛根素与 3 个核心靶点的结合能均活性良好,见表 3、见图 6。

**4.2 体外实验结果**

**4.2.1 葛根素对 SH-SY5Y 细胞活力的影响** 与模型组相比,葛根素 75.0、150.0 μmol/L 组细胞存活率显著升高(P<0.001),见图 7。

**4.2.2 流式细胞术检测葛根素对 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响** 与模型组相比,葛根素组细胞 ROS 阳性率显著降低(P<0.01),见图 8。

**4.2.3 流式细胞术检测葛根素对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响** 通过 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,与模型组相比,葛根素组细胞凋亡率显著降低(P<0.001),见图 9。

**4.2.4 葛根素对 SH-SY5Y 细胞中 MAPK3、MAPK1、FOS mRNA 表达的影响** 与模型组相比,葛根素组 FOS mRNA 表达显著降低(P<0.05),见表 4。

**4.2.5 Western blotting 检测葛根素对 SH-SY5Y 细**

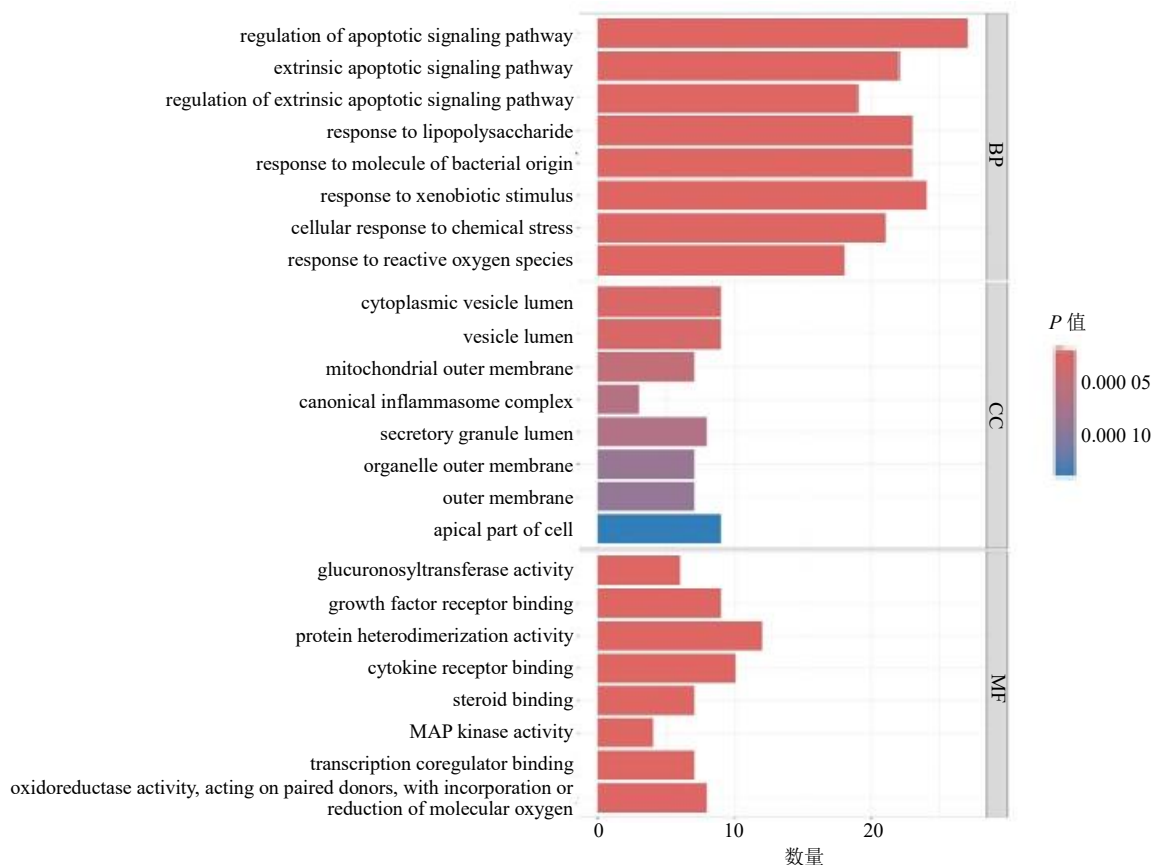


图 4 GO 功能富集分析  
Fig. 4 GO function enrichment analysis

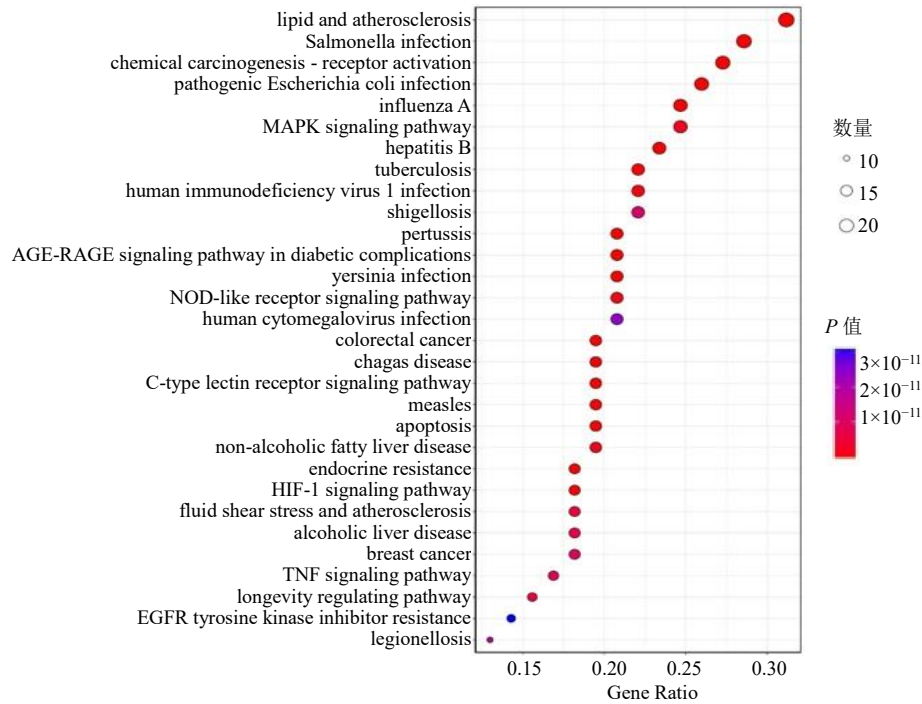


图 5 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 KEGG signaling pathway enrichment analysis

表 3 分子对接结果

Table 3 Molecular docking results

靶点	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )
MAPK3	-7.3
MAPK1	-7.7
FOS	-7.9

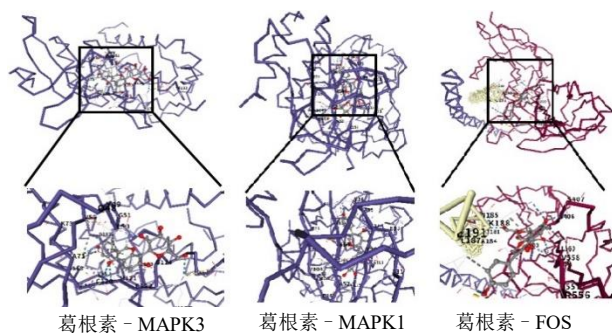
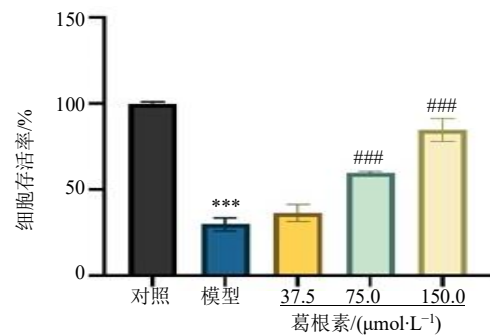


图 6 葛根素与核心靶点分子对接图

Fig. 6 Docking diagram of puerarin with the core target molecule

胞中 MAPK1、MAPK3、FOS 蛋白表达的影响 与模型组相比，葛根素组细胞中 p-MAPK1、p-MAPK3、FOS 蛋白的表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )，见图 10。

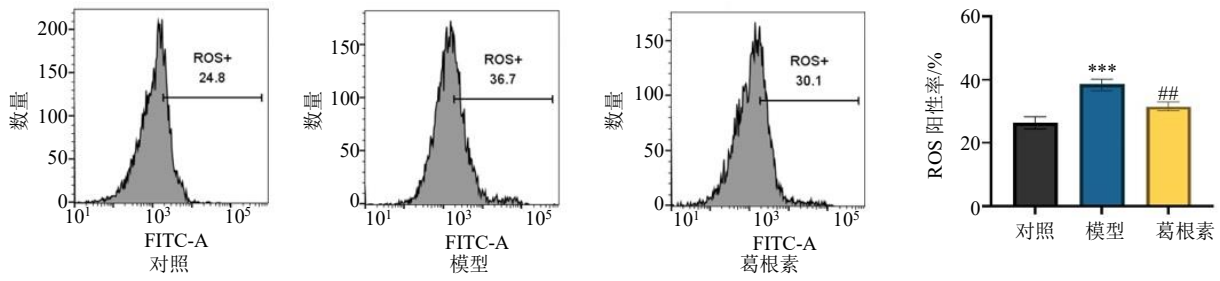


与对照组比较：\*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组比较：#### $P < 0.001$ 。  
\*\*\* $P < 0.001$  vs control group; #### $P < 0.001$  vs model group.

图 7 葛根素对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 7 Effect of puerarin on the viability of SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 5 讨论

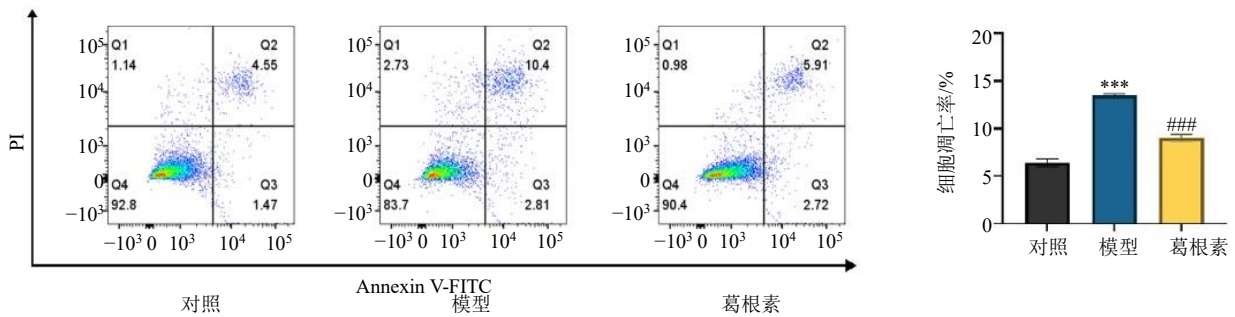
脑梗死作为临床高发且极具危害性的脑血管疾病，以高发病率、高致残率及高死亡率为显著特征，其病理生理机制呈现多环节、级联式复杂网络，核心始于脑血流灌注不足引发的能量代谢障碍，进而触发谷氨酸介导的兴奋性毒性、活性氧累积所致的氧化应激、细胞内钙稳态失衡引发的钙超载，伴随神经炎症级联反应激活及最终神经元凋亡等关键病理环节<sup>[14-15]</sup>。目前，临床上针对脑梗死常用的



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。  
 \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group.

图 8 流式细胞术检测葛根素对 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Flow cytometry analysis of the effect of puerarin on the ROS level in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。  
 \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 9 流式细胞术检测葛根素对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Flow cytometry analysis of the effect of puerarin on apoptosis of SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

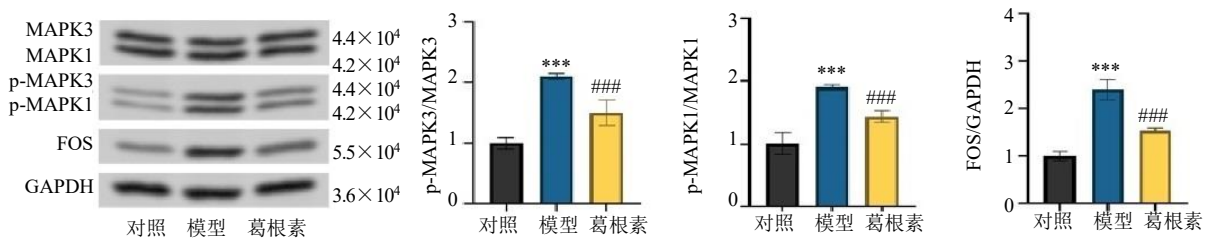
表 4 葛根素对 SH-SY5Y 细胞中 MAPK3、MAPK1、FOS mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effects of puerarin on the expression of MAPK3, MAPK1, and FOS mRNA in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	MAPK3 mRNA 表达量	MAPK1 mRNA 表达量	FOS mRNA 表达量
对照	—	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12
模型	—	1.08 ± 0.11	1.15 ± 0.22	2.94 ± 0.18*
葛根素	150	1.01 ± 0.20	1.03 ± 0.12	1.62 ± 0.23#

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

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group.



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。  
 \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ### $P < 0.001$  vs model group.

图 10 葛根素对 SH-SY5Y 细胞中 MAPK1、MAPK3、FOS 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of puerarin on the expression of MAPK1, MAPK3, and FOS proteins in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

血管再通治疗手段（如重组组织型纤溶酶原激活剂溶栓、机械取栓）虽能快速恢复脑血流并显效，但受限于严格时间窗，且易因缺血再灌注引发氧化应激、炎症反应等继发性脑损害<sup>[16-17]</sup>。因此，从传统天然药物中寻找具有多靶点、多途径神经保护作用的活性成分，已成为当前脑梗死防治研究的重要策略。葛根素作为中药葛根中提取的主要异黄酮类活性成分，现代药理学研究表明，其具有改善脑微循环、抗炎、抗氧化、抗凋亡及调控相关信号通路等广泛生物学效应<sup>[18-19]</sup>。本研究旨在整合网络药理学预测、分子对接验证及体外细胞实验的多维度交叉验证策略，系统探究葛根素治疗脑梗死的核心靶点、关键信号通路及潜在分子机制，为其临床辅助治疗脑梗死提供更为坚实的实验数据支撑与理论依据。

本研究最终获得了 82 个葛根素与脑梗死的共同作用靶点。结果提示葛根素并非通过单一信号通路或孤立靶点，而是通过调控涉及多通路交叉串扰的复杂生物分子网络，发挥神经保护及抗缺血性脑梗死的治疗作用。在核心靶点筛选方面，本研究最终锁定了 MAPK3、MAPK1、FOS 为排名前 3 位的核心靶点。MAPK 信号通路是细胞内核心的级联式信号转导系统，参与细胞增殖、分化、凋亡及炎症反应等关键生理病理过程，调控细胞命运与应激应答<sup>[20-21]</sup>。MAPK3 和 MAPK1 作为细胞外调节激酶（ERK）亚家族的重要成员，在脑缺血损伤中扮演着“双刃剑”的角色。虽然适度激活 ERK 通路可能促进神经元存活，但在缺血再灌注的病理环境下，过度激活的 ERK 通路往往通过磷酸化下游转录因子，加剧炎症反应和细胞凋亡<sup>[22]</sup>。FOS 蛋白则是早期快反应基因家族的一员，通常与 c-Jun 形成异二聚体激活蛋白-1（AP-1），作为转录因子调控下游应激反应基因表达<sup>[23-24]</sup>。本研究中，MAPK3、MAPK1 与 FOS 被筛选为核心靶点，提示葛根素极有可能通过干预 MAPK 信号通路及其下游转录因子 AP-1 的活性，从而在转录水平上调控缺血后的神经炎症和细胞凋亡进程。GO 功能与 KEGG 通路富集分析，进一步阐释了葛根素治疗脑梗死的潜在作用机制。GO 功能分析结果显示，葛根素的作用靶点显著富集于氧化应激相关对活性氧的反应、神经元特异性凋亡信号通路调控、外源性凋亡信号通路，与脑梗死病理核心高度契合。葛根素与脑梗死交集靶点的 KEGG 通路富集分析，突出了 MAPK 及脂质和动

脉粥样硬化等核心通路。其中，MAPK 信号通路与 AGE-RAGE 通路均与氧化应激和炎症反应密切相关，且 MAPK 通路常处于 AGE-RAGE 信号通路的上游或形成交互串扰<sup>[25]</sup>。这些生物信息学分析结果为后续实验验证指明了方向，即葛根素的神经保护作用可能主要归因于其抗氧化应激和抗凋亡特性，而这一过程可能由 MAPK 信号通路介导。为确证网络药理学预测的 MAPK3、MAPK1、FOS 核心靶点与葛根素的直接结合，本研究采用分子对接技术从 PubChem 数据库获取的葛根素 3D 结构与核心靶点 MAPK3、MAPK1、FOS 的晶体结构进行模拟对接。分子对接研究结果显示，葛根素与 MAPK3、MAPK1、FOS 的结合稳定。分子对接结果在微观分子层面印证了葛根素直接作用于 MAPK 信号通路关键节点的可能性，为后续基于该通路的实验验证提供了强有力的结构生物学依据。

SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞因具备典型神经元样形态与功能特性，广泛应用于脑血管疾病相关神经元损伤机制研究，常被用于模拟神经元生理功能及病理损伤过程。本研究采用 OGD/R 模型模拟体内缺血再灌注病理过程，系统探究葛根素的神经保护作用及潜在分子机制。首先，MTT 细胞活力实验表明，葛根素干预能够提高受损细胞的活力。结合 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果，葛根素能显著降低 OGD/R 损伤诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡率。实验结果与前文网络药理学 GO 分析中“凋亡信号通路调控”的预测高度一致，证实了葛根素通过抑制细胞凋亡途径保护神经元的假设。其次，缺血再灌注诱导的氧化应激是脑梗死继发性损伤的核心关键机制，过量 ROS 可直接攻击生物膜脂质引发过氧化、损伤功能蛋白及基因组 DNA，导致线粒体结构与功能障碍，最终通过线粒体凋亡通路触发神经元凋亡<sup>[26]</sup>。本研究通过流式细胞术检测细胞内 ROS 水平，结果显示葛根素干预后，ROS 水平显著降低。这一结果与 GO 富集分析中“对活性氧的反应”这一条目紧密呼应，表明清除过量 ROS、减轻氧化应激损伤是葛根素发挥神经保护作用的重要机制之一。在本研究中 MAPK3、MAPK1、FOS 被确定为核心靶点，且分子对接证实了良好的结合活性；研究表明 MAPK 通路在缺血缺氧条件下可被 ROS 等上游刺激激活，进而磷酸化下游的转录因子如 c-Fos（FOS 基因产物），促炎因子和促凋亡基因的转录，最终导致细胞死亡<sup>[27-29]</sup>。本研究 RT-

qPCR 与 Western blotting 结果进一步揭示葛根素的作用机制,葛根素干预可特异性下调 *FOS* mRNA 及 p-MAPK1、p-MAPK3、FOS 蛋白异常高表达,表明葛根素并非作用于 MAPK1、MAPK3 的转录过程,而是通过抑制其磷酸化活化及下游 FOS 的转录与翻译,阻断 MAPK 信号通路介导的促凋亡效应,与前文抗氧化、抗凋亡表型结果相互印证,为其神经保护作用提供了更可靠的证据。

本研究通过网络药理学、分子对接及体外 OGD/R 细胞模型,探究葛根素治疗脑梗死的神经保护作用及机制,证实其可改善 SH-SY5Y 细胞损伤,机制涉及清除 ROS、抑氧化应激及阻凋亡通路,核心靶点为 MAPK3、MAPK1 及 FOS,核心机制为抗氧化应激、抑神经细胞凋亡。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.缺血性卒中基层诊疗指南(实践版·2021)[J].中华全科医师杂志,2021,20(9):947-958.
- [2] Jabłońska M, Ribo M. Super large bore catheters in the treatment of stroke: Systematic review [J]. *J Neurointerv Surg*, 2026, 27: jnis-2026-025001.
- [3] 袁国宾,刘广志.缺血性卒中的诊治现状[J].实用心脑血管病杂志,2024,32(4):1-7.
- [4] Majumder D. Ischemic stroke: Pathophysiology and evolving treatment approaches [J]. *Neurosci Insights*, 2024, 19: 26331055241292600.
- [5] Barone V, Foschi M, Pavolucci L, et al. Enhancing stroke risk prediction in patients with transient ischemic attack: Insights from a prospective cohort study implementing fast-track care [J]. *Front Neurol*, 2024, 15: 1407598.
- [6] 高长玉,吴成翰,赵建国,等.中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)[J].中国中西医结合杂志,2018,38(2):136-144.
- [7] Li C, Luo Y P, Li S G. Mechanistic insights of neuronal death and neuroprotective therapeutic approaches in stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2026, 21(3): 869-886.
- [8] Shang T, Kuang B L, Shang Y X, et al. Microglia-astrocyte crosstalk in post-stroke neuroinflammation: Mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2025, 23(13): 1645-1665.
- [9] Liu T, Su K, Cai W Y, et al. Therapeutic potential of puerarin against cerebral diseases: From bench to bedside [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175695.
- [10] 黄亚光,王金凤,杜利鹏,等.葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [11] Chauhan P, Wadhwa K, Mishra R, et al. Investigating the potential therapeutic mechanisms of puerarin in neurological diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(12): 10747-10769.
- [12] Wan Q, Lu Q W, Luo S, et al. The beneficial health effects of puerarin in the treatment of cardiovascular diseases: From mechanisms to therapeutics [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(10): 7273-7296.
- [13] Wang D, Bu T, Li Y Q, et al. Pharmacological activity, pharmacokinetics, and clinical research progress of puerarin [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(11): 2121.
- [14] Salaudeen M A, Bello N, Danraka R N, et al. Understanding the pathophysiology of ischemic stroke: The basis of current therapies and opportunity for new ones [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(3): 305.
- [15] Long Z L, Zhu Y, Zhao H, et al. Ferroptosis in ischemic stroke: Mechanisms, pathological implications, and therapeutic strategies [J]. *Front Neurosci*, 2025, 19: 1623485.
- [16] Wang Q T, Liu N, Simo L, et al. A narrative review of reperfusion therapy in acute ischemic stroke: Emerging advances, current challenges, and future directions [J]. *Brain Circ*, 2025, 11(3): 187-199.
- [17] Cheng Z, Wang H R, Geng X K, et al. Time and tissue windows in futile reperfusion after ischemic stroke [J]. *Aging Dis*, 2024, 16(5): 2544-2552.
- [18] Liu X, Huang R, Wan J Y. Puerarin: A potential natural neuroprotective agent for neurological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114581.
- [19] 金明睿,张梅.葛根素对脑缺血保护作用及其机制的研究进展 [J]. *青岛大学学报:医学版*, 2023, 59(1): 155-158.
- [20] Ganguly P, Macleod T, Wong C, et al. Revisiting p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in inflammatory arthritis: A narrative of the emergence of MAPK-activated protein kinase inhibitors (MK2i) [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(9): 1286.
- [21] 秦庆庆,王一坤,阳庆林,等.p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路在骨肉瘤中的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2025, 41(1): 105-110.
- [22] Mao R, Wang L, Zhang H T, et al. Critical gene network and signaling pathway analysis of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in ischemic stroke [J]. *Front Mol Neurosci*, 2025, 18: 1604670.
- [23] Vasukutty A, Bhattarai P Y, Choi H S. Ebselen suppresses breast cancer tumorigenesis by inhibiting YTHDF1-mediated

- c-Fos expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(19): 9416.
- [24] Rahmi U, Goenawan H, Sylviana N, *et al.* Exercise induction at expression immediate early gene (c-Fos, ARC, EGR-1) in the hippocampus: A systematic review [J]. *Dement Neuropsychol*, 2024, 18: e20230015.
- [25] Deepu V, Rai V, Agrawal D K. Quantitative assessment of intracellular effectors and cellular response in RAGE activation [J]. *Arch Intern Med Res*, 2024, 7(2): 80-103.
- [26] Radziszewski M, Galus R, Łuszczynski K, *et al.* The RAGE pathway in skin pathology development: A comprehensive review of its role and therapeutic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(24): 13570.
- [27] Cui C, Jiang X, Wang Y M, *et al.* Cerebral hypoxia-induced molecular alterations and their impact on the physiology of neurons and dendritic spines: A comprehensive review [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2024, 44(1): 58.
- [28] Xiong Z K, Li Z H, Sima X Q, *et al.* Astaxanthin reduces TBPH-induced neurobehavioral deficits in mice by the ROS-ERK1/2-FOS pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 281: 116674.
- [29] Liang H, Jin X F, He T T, *et al.* Investigation of c-Fos/c-Jun signaling pathways in periostacum Cicadae's inhibition of EMT in gastric tissue [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(4): 537.

[责任编辑 高源]