

基于网络药理学与实验验证探讨绿原酸通过 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 通路改善脑缺血再灌注损伤的作用机制

蒋晓路¹, 文红福¹, 沈媛¹, 张文¹, 张俊¹, 许仁露¹, 李卫东^{2*}

1. 川北医学院, 四川南充 637000

2. 川北医学院附属医院 急诊科, 四川南充 637000

摘要: 目的 基于网络药理学和分子对接技术预测绿原酸治疗脑缺血再灌注损伤 (CIRI) 的潜在作用靶点和信号通路, 并通过大鼠体内实验验证绿原酸是否通过调控表皮生长因子受体 (EGFR)/磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路发挥神经保护作用。方法 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、GeneCards 等数据库筛选绿原酸作用靶点与 CIRI 疾病靶点的交集, 采用 STRING 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 运用 DAVID 进行基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 使用 AutoDock 进行分子对接验证。采用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞/再灌注 (MCAO/R) 模型。通过神经功能评分、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC)、病理观察、蛋白免疫印迹法 (Western blotting)、免疫组化及 TUNEL 染色评估绿原酸的神经保护效应及其对 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 通路的影响。结果 网络药理学分析筛选出 64 个交集靶点, EGFR、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、人表皮生长因子受体 2 (ERBB2) 为核心靶点, 主要富集于 PI3K/Akt 信号通路和细胞凋亡通路。分子对接显示绿原酸与核心靶点结合能良好 ($-23.4 \sim -33.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)。动物实验显示, 与模型组相比, 绿原酸治疗显著改善神经功能缺损, 缩小脑梗死体积, 改善神经元病理损伤; 下调 p-EGFR 表达, 上调 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 水平; 降低促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达, 升高抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 表达, 减少神经元凋亡, 且呈剂量相关性 ($P < 0.05, 0.01$)。表皮生长因子 (EGF) 激动剂可部分逆转绿原酸的神经保护作用 ($P < 0.05, 0.01$), 加重脑损伤, 上调 p-EGFR 并抑制下游 PI3K/Akt/mTOR 通路。结论 绿原酸通过抑制 EGFR 过度磷酸化激活, 激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 抑制神经元凋亡, 减轻 CIRI, 发挥神经保护作用。EGFR 激动剂可部分阻断绿原酸的神经保护效应, 证实 EGFR 可能是绿原酸发挥作用的关键上游靶点。

关键词: 绿原酸; 网络药理学; 分子对接; EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 脑缺血再灌注损伤; 神经保护

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)05-1591-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.011

Exploring mechanism of chlorogenic acid in ameliorating cerebral ischemia-reperfusion injury via EGFR/PI3K/Akt/mTOR pathway based on network pharmacology and experimental validation

JIANG Xiaolu¹, WEN Hongfu¹, SHEN Yuan¹, ZHANG Wen¹, ZHANG Jun¹, XU Renlu¹, LI Weidong²

1. North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

2. Department of Emergency Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Abstract: Objective To predict the potential targets and signaling pathways of chlorogenic acid in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) based on network pharmacology and molecular docking, and to validate whether chlorogenic acid exerts neuroprotective effects by regulating the epidermal growth factor receptor (EGFR)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway through *in vivo* experiments in rats. **Methods** The intersection of chlorogenic acid action targets and CIRI disease targets was screened using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology

收稿日期: 2026-01-06

基金项目: 四川省医学会科研项目 (S22101); 川北医学院附属医院博士科研启动基金 (202002); 市校科研合作专项项目 (CBY25-ZXB02)

作者简介: 蒋晓路, 硕士研究生, 住院医师, 从事脑缺血再灌注损伤相关研究。E-mail: jiangxiaolu@nsmc.edu.cn

*通信作者: 李卫东, 博士, 主任医师, 从事脑缺血再灌注损伤相关研究。E-mail: lwd10000@126.com

Database and Analysis Platform (TCMSP), GeneCards and other databases. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed using STRING, GO and KEGG enrichment analyses were performed using DAVID, and molecular docking was validated using AutoDock. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was established using the filament method. The neuroprotective effects of chlorogenic acid and its influence on the EGFR/PI3K/Akt/mTOR pathway were evaluated through neurological function scoring, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, pathological observation, Western blotting analysis immunohistochemistry, and TUNEL staining. **Results** Network pharmacology analysis identified 64 intersection targets, with EGFR, CASP3, SRC, and ERBB2 as core targets, which were mainly enriched in the PI3K/Akt signaling pathway and apoptosis pathway. Molecular docking showed good binding affinity between chlorogenic acid and core targets (binding energies ranging from -23.4 to -33.9 kJ·mol⁻¹). Animal experiments demonstrated that compared with the model group, chlorogenic acid treatment significantly improved neurological dysfunction, reduced cerebral infarction volume, and ameliorated neuronal pathological damage; Downregulated p-EGFR expression while upregulating p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR levels; Decreased the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Cleaved-Caspase-3, increased anti-apoptotic protein Bcl-2 expression, and reduced neuronal apoptosis in a dose-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$). EGF agonist partially reversed the neuroprotective effects of chlorogenic acid ($P < 0.05, 0.01$), exacerbated brain injury, upregulated p-EGFR, and inhibited the downstream PI3K/Akt/mTOR pathway. **Conclusion** Chlorogenic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia-reperfusion injury by downregulating EGFR expression, activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, and inhibiting neuronal apoptosis. The EGFR agonist can partially block the neuroprotective effects of chlorogenic acid, confirming that EGFR may be the key upstream target through which chlorogenic acid exerts its effects. **Key words:** chlorogenic acid; network pharmacology; molecular docking; EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuroprotection

缺血性脑卒中长期威胁人类健康, 该病发病人数众多, 相当比例患者发病后遗留不同程度神经功能障碍, 部分患者甚至因此失去生命, 发病率、致残率和病死率均居高不下^[1]。临床医生救治此类患者时常面临一个棘手问题: 阻塞血管被成功疏通、血流重新进入缺血区域后, 患者病情有时不但没有好转, 反而出现恶化。这一现象被命名为脑缺血再灌注损伤 (CIRI): 即脑组织缺血一定时间后恢复血流灌注, 脑损伤反而加重的病理现象。其发生机制复杂, 涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、线粒体功能障碍等多个病理环节^[2-3]。溶栓治疗虽能恢复缺血脑组织的血流灌注, 但再灌注带来的二次打击严重限制了临床疗效和应用窗口期, 很多原本有望康复的患者因此错失最佳恢复时机。深入探究 CIRI 发生机制, 寻找有效的神经保护策略, 对改善缺血性脑卒中患者预后意义重大。

绿原酸是广泛存在于金银花、杜仲、咖啡等植物中的天然多酚类化合物, 具有显著的抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种生物学活性^[4]。近年来研究表明, 绿原酸对阿尔茨海默病、帕金森病及脑缺血损伤等多种神经系统疾病具有保护作用^[5-6]。然而, 绿原酸发挥神经保护作用的具体分子机制及关键作用靶点尚未完全阐明, 限制了其临床转化应用。

表皮生长因子受体 (EGFR) /磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) /哺乳动物雷帕霉素

靶蛋白 (mTOR) 信号通路是调控细胞生存、增殖、凋亡的经典通路, 在神经系统疾病中发挥重要作用^[7]。研究发现, 激活该通路可促进神经元存活, 抑制凋亡, 对 CIRI 具有保护作用^[8-9]。然而, 绿原酸是否通过调控 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路发挥神经保护作用仍不清楚, 有待深入研究。

网络药理学基于疾病-基因-靶点-药物的多维网络, 从系统生物学层面阐释药物作用机制, 为中药现代化研究开辟了新途径^[10]。分子对接技术能够在分子水平上预测药物与靶点的结合模式和亲和力, 为机制研究提供理论依据^[11-12]。

本研究采用网络药理学和分子对接技术系统预测绿原酸治疗 CIRI 的潜在作用靶点和信号通路, 并通过构建大鼠大脑中动脉阻塞/再灌注 (MCAO/R) 模型, 结合神经功能评估、组织病理学观察、蛋白质免疫印迹、免疫组化及细胞凋亡检测等多种技术手段, 验证绿原酸是否通过调控 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路发挥神经保护作用, 并运用 EGFR 激动剂进行反向验证, 以期绿原酸治疗缺血性脑卒中提供理论基础与实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 108 只, 体质量 280~320 g, 购自川北医学院实验动物中心, 动物许可证号 SCXK (川) 2023-0018。大鼠饲养于 SPF 级动物

房, 温度 (22±2) °C, 湿度 50%~60%, 12 h/12 h 光照/黑暗循环, 自由摄食饮水。本研究经川北医学院动物伦理委员会批准 (批准号 NSMC-2025080), 严格遵循 3R 原则 (Replacement、Reduction、Refinement) 和《实验动物管理条例》。

1.2 药物与试剂

绿原酸对照品 (质量分数≥98%, 上海吉至生化科技有限公司, 批号 20240315); 表皮细胞生长因子 (EGF, 美国 MCE 公司, 货号 HY-P7109); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC, Sigma 公司, 货号 T8877); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司, 货号 KGA7072); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液 (货号 PC0020、R0010, 北京索莱宝科技有限公司); 一抗兔抗 p-EGFR、EGFR、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、cleaved-Caspase-3、β-actin、HRP 标记山羊抗兔二抗 (货号 AF3044、AF6043、AF3241、AF6241、AF0016、AF626、AF3308、AF6308、AF0120、AF6139、AF7022、AF7018、SA00001-2) 抗体, 均购自武汉三鹰生物有限公司。

1.3 仪器

Allegra X-30R 高速冷冻离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司); Scientz-IID 超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳及转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 化学发光凝胶成像分析系统 (上海天能科技有限公司); Multiskan FC 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); RM2235 石蜡切片机 (德国徕卡显微系统有限公司); BX53 正置光学显微镜 (日本奥林巴斯); DT-200 动物脑温维持加热垫 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学预测

2.1.1 绿原酸作用靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)、PubChem 数据库检索绿原酸的化学结构, 获取其 SMILES 格式。将 SMILES 导入 SwissTargetPrediction 数据库和 PharmMapper 数据库, 预测绿原酸的潜在作用靶点。同时检索 PubMed、Web of Science 等文献数据库, 补充文献报道的绿原酸作用靶点。合并去重后, 将靶点名称通过 UniProt 数据库统一转换为基因名。

2.1.2 CIRI 相关疾病靶点获取 以 “cerebral ischemia reperfusion injury” “stroke” “brain ischemia” 为关键词, 在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、DrugBank 数据库、TTD 数据库中检索 CIRI 相关疾病靶点。去除重复靶点后, 通过 UniProt 数据库统一基因名称。

2.1.3 绿原酸改善 CIRI 靶点的筛选 将绿原酸的作用靶点与 CIRI 的疾病靶点导入 Venny 2.1 在线工具绘制 Venn 图, 获取两者的交集靶点, 即绿原酸治疗 CIRI 的潜在作用靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选 将交集靶点导入 STRING 数据库 (version 11.5) 构建 PPI 网络, 设置物种为 “Homo sapiens”, 最低相互作用评分 (minimum required interaction score) 设为 0.400 (medium confidence), 隐藏游离节点。将获得的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络可视化分析。利用 CytoNCA 插件计算网络拓扑参数, 包括度 (degree) 值、介数中心性 (BC) 和接近中心性 (CC), 以 Degree、BC、CC 的中位数为筛选标准, 筛选出核心关键靶点。

2.1.5 基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 3 个方面。设置 $P < 0.05$ 为筛选条件, 选取前 20 个条目, 利用微生信 R 语言 (version 4.5.0) 进行可视化分析, 绘制气泡图和柱状图。

2.1.6 分子对接验证 从 PubChem 数据库下载绿原酸的 SDF 格式三维结构文件, 利用 ChemBio3D 软件进行能量最小化处理, 保存为 MOL2 格式。从 RCSB PDB 数据库下载核心靶点蛋白的三维晶体结构 (PDB 格式), 使用 PyMOL 2.5.0 软件去除水分子和原配体, 添加氢原子。利用 AutoDock Tools 1.5.6 软件对受体蛋白和配体小分子进行加氢、加电荷、设置旋转键等预处理, 保存为 PDBQT 格式。采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接, 设置活性位点中心坐标和 Grid Box 大小, 运行对接程序, 获取结合能。结合能 $\leq -20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示配体与受体结合活性较好, $\leq -29.26 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示结合活性良好。使用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化分析。

2.2 动物实验验证

2.2.1 实验分组与给药方案 108 只 SD 大鼠适应

性饲养 7 d 后, 按随机数字表法分为 6 组, 每组 18 只。对照组仅分离血管不插入线栓; 建立 MCAO/R 模型, 分为模型组 (ip 等体积 0.9%氯化钠溶液), 绿原酸低、高剂量 (25、50 mg·kg⁻¹) 组 (剂量参考 Kim^[13]在脑缺血大鼠模型中的有效剂量范围 15~60 mg·kg⁻¹), EGF (10 μg·kg⁻¹) 组^[14-15]; 绿原酸+EGF 组 ip 绿原酸 50 mg·kg⁻¹+EGF 10 μg·kg⁻¹。绿原酸用 0.9%氯化钠溶液溶解配制, EGF 用含 0.1%牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解配制。各组于造模前 30 min 开始给药 (预处理给药), 造模后 24 h 内每 12 小时给药 1 次, 连续 7 d。

2.2.2 MCAO/R 模型建立 采用改良 Longa 线栓法^[6]建立 MCAO/R 模型。大鼠 ip 3%戊巴比妥钠 (45 mg·kg⁻¹) 麻醉, 仰卧位固定于手术台上, 颈部备皮消毒。沿颈部正中做纵行切口, 钝性分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA)。用动脉夹暂时夹闭 CCA 和 ICA 近心端, 在 ECA 根部结扎后剪一小口, 将硅胶包被的尼龙单丝线栓从 ECA 残端插入, 沿 ICA 向颅内推进 18~20 mm (以感到轻微阻力为宜), 阻断大脑中动脉 (MCA) 起始部的血流。缝合切口, 缺血 2 h 后轻轻拔出线栓, 恢复血流灌注。对照组仅分离血管, 不插入线栓。手术过程中使用加热垫维持大鼠肛温在 (37.0±0.5) °C。

2.2.3 神经功能缺损评分 (mNSS) 分别于再灌注后第 1、3、5 及 7 天, 采用改良 mNSS 评分^[17]评估大鼠神经功能受损程度。评分系统涵盖运动、感觉、平衡及反射 4 个维度, 总分 18 分, 分值越高代表损伤越严重 (表 1)。评分由 2 名受训人员采用双盲法进行并取平均值。在第 7 天评分结束后, 每组随机选取 6 只大鼠用于 TTC 染色及组织病理学检测, 6 只用于 Western blotting 检测, 另 6 只用于免疫组化及 TUNEL 染色分析。

2.2.4 TTC 染色检测脑梗死体积 mNSS 评分后, 每组随机选取 6 只大鼠, ip 过量戊巴比妥钠处死, 断头快速取脑。将脑组织置于 -20 °C 冰箱预冷 5 min, 冠状切成 2 mm 厚脑片, 共 5 片。将脑片浸入 2% TTC 溶液, 37 °C 避光孵育 30 min, 期间轻摇。PBS 漂洗后, 4%多聚甲醛固定过夜。Image J 软件测量梗死面积 (白色区域) 和总脑面积, 计算梗死体积百分比。

脑梗死体积=(对侧半球体积-患侧非梗死区体积)/对侧半球体积

表 1 mNSS 评分
Table 1 mNSS score

测试项目	测试内容及评分标准	分值
运动功能 测试	提尾悬空时对侧前肢屈曲	1
	提尾悬空时对侧后肢屈曲	1
	头部向损伤侧偏转>10°	1
	向对侧转圈	1
	向对侧跌倒	1
	不能自主行走	1
感觉功能 测试	触觉试验: 一侧明显延长或不能在 1 min 内去除胶布	1
	本体感觉试验: 前肢置于桌边不能及时缩回	1
平衡功能 测试	宽度 7 cm 平衡木上停留时间<6 s	1
	宽度 5 cm 平衡木上停留时间<6 s	1
	宽度 3 cm 平衡木上停留时间<6 s	1
	直径 3 cm 圆形平衡木上停留时间<6 s	1
	直径 2 cm 圆形平衡木上停留时间<6 s	1
反射及异常测试	直径 1 cm 圆形平衡木上停留时间<6 s	1
	耳廓反射缺失	1
	角膜反射缺失	1
	惊吓反射缺失	1
	出现癫痫发作、偏瘫或肌阵挛	1
总分	分数越高表示神经功能缺损越严重	18

2.2.5 苏木精-伊红 (HE) 与 Nissl 染色 每组随机选取 6 只大鼠, 麻醉后经左心室灌注 0.9%氯化钠溶液和 4%多聚甲醛。取脑, 4%多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度 5 μm)。HE 染色: 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇复水, 苏木素染色 5 min, 伊红染色 2 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。Nissl 染色: 切片脱蜡复水后, 0.1% Cresyl violet 溶液染色 10 min, 95%乙醇分化, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜下观察缺血侧皮层神经元形态。

2.2.6 Western blotting 检测 取缺血侧大脑皮层组织约 50 mg, 加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂, 冰上匀浆, 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清。BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白 (30 μg) 进行 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入一抗 p-EGFR (1:1 000)、EGFR (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-Akt (1:2 000)、Akt (1:2 000)、p-mTOR (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、Bax (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、cleaved-Caspase-3 (1:1 000)、β-actin

(1:5000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后, ECL 化学发光显色, Image J 软件分析灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

2.2.7 免疫组化检测 石蜡切片脱蜡复水, 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 柠檬酸钠缓冲液高压修复抗原, 5% BSA 封闭。滴加一抗 EGFR (1:200)、PI3K (1:200)、Akt (1:200), 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤后, 加入生物素标记二抗, 室温孵育 30 min。加入链霉亲和素-HRP, 室温孵育 20 min。DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明封片。光镜下观察, 每个切片随机选取 5 个视野, Image J 软件计算阳性免疫组化细胞数。

2.2.8 TUNEL 染色检测神经元凋亡 采用 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡。石蜡切片脱蜡复水, 蛋白酶 K 工作液 37 °C 消化 20 min, PBS 洗涤。加入 TUNEL 反应混合液, 37 °C 避光孵育 60 min。DAPI 复染细胞核 5 min, 抗荧光猝灭封片。荧光显微镜下观察, 每个切片随机选取 5 个视野, 计数 TUNEL 阳性细胞 (绿色荧光) 和 DAPI 阳性细胞总数 (蓝色荧光), 计算凋亡指数。

凋亡指数 = TUNEL 阳性细胞数 / 总细胞数

2.2.9 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验, 方差齐性检验采用 Levene 检验。符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 不符合正态分布的数据采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。

3 结果

3.1 网络药理学预测结果

3.1.1 绿原酸-CIRI 作用靶点分析 通过 TCMSP、PubChem 数据库检索获得绿原酸潜在作用靶点 100 个; 以 “cerebral ischemia reperfusion injury” 为关键词, 从 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库筛选获得 CIRI 相关靶点 3 942 个。经 Venny 2.1 工具绘制韦恩图取交集, 得到绿原酸干预 CIRI 的潜在作用靶点 64 个 (图 1)。

3.1.2 绿原酸干预 CIRI 的潜在靶点 PPI 网络构建与核心靶点筛选 将 64 个交集靶点导入 STRING 11.5 数据库构建 PPI 网络, 设置物种为 “Homo sapiens”,

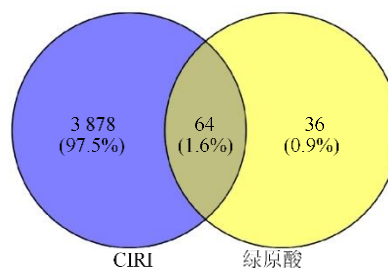


图 1 绿原酸与 CIRI 的共同作用靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of common target points between chlorogenic acid and CIRI

最低相互作用评分 ≥ 0.4 , 隐藏游离节点。结果显示, 网络包含 40 个节点、250 条边, 平均节点度 (degree) 值为 12.5, PPI 富集 $P < 1.0 \times 10^{-16}$, 表明靶点间存在显著相互作用。

将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.9.1 进行可视化及拓扑分析 (图 2), 节点大小和颜色深度与 degree 值成正比。分析结果显示, degree 值排名前 8 位的核心靶点依次为 Akt1 (degree=43)、EGFR (degree=36)、胱天蛋白酶 3 (CASP3) (degree=35)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) (degree=32)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (SRC) (degree=30)、人表皮生长因子受体 2 (ERBB2) (degree=27)、MTOR (degree=26) 和 MMP2 (degree=25), 提示上述靶点可能是绿原酸干预 CIRI 的关键靶点。

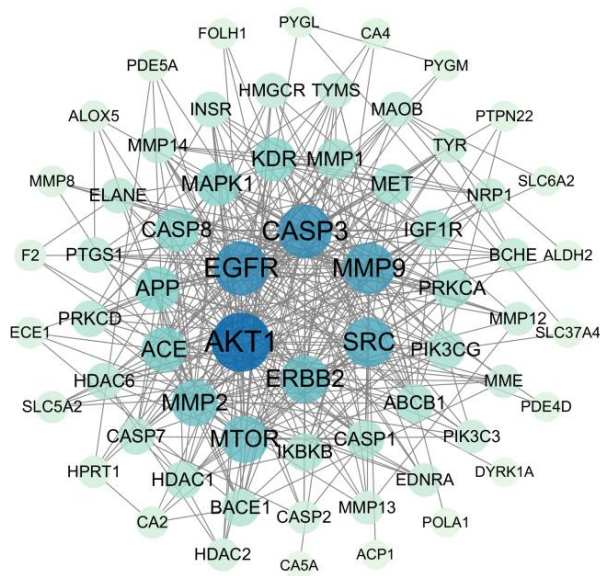


图 2 绿原酸干预 CIRI 的潜在靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of potential targets for chlorogenic acid in treatment of CIRI

3.1.3 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析 对 64 个交集靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析, 结果见图 3。GO 分析显示, BP 主要涉及细胞迁移正向调控、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联反应调控、磷酸化调控及对外部刺激的反应等; CC 主要定位于囊泡腔、细胞质、膜筏及血浆脂蛋白颗粒等; MF 主要包括磷酸转移酶活性、受体酪氨酸激酶活性、蛋

白激酶结合及金属内肽酶活性等。KEGG 分析显示, 靶点主要富集于癌症相关通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药及细胞凋亡通路等, 其中癌症相关通路及 PI3K-Akt 信号通路富集最为显著。上述结果提示, 绿原酸可能通过调控 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路干预 CIRI, 为后续实验研究提供了理论依据。

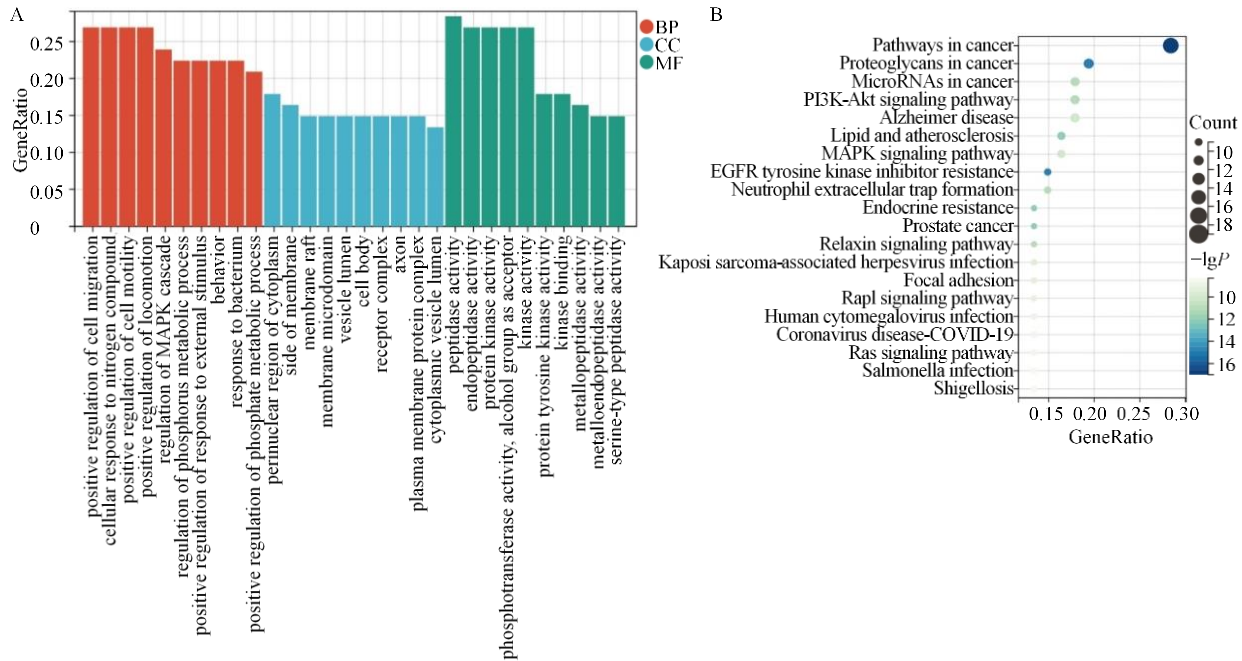


图 3 绿原酸干预 CIRI 的潜在靶点 GO (A) 功能富集和 KEGG (B) 通路富集分析

Fig. 3 GO (A) and KEGG (B) pathway enrichment analysis of potential targets for chlorogenic acid against CIRI

3.1.4 “绿原酸-靶点-CIRI 通路”网络构建与分析 将交集靶点及 KEGG 富集通路导入 Cytoscape 构建“绿原酸-靶点-通路”网络 (图 4), 包含 1 个药物节点、42 个靶点节点和 24 条通路节点。拓扑分析显示, EGFR、MAPK1、CASP3、MMP9、SRC、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ (PIK3CG) 等靶点 degree 值较高, 为核心靶点; PI3K-Akt、MAPK、Rap1、TNF 等信号通路与多个核心靶点广泛关联。结果提示, 绿原酸可能通过调控 EGFR/PI3K/Akt 等关键靶点及相关信号通路发挥抗 CIRI 作用。

3.1.5 分子对接结果 将绿原酸与 CASP3、EGFR、ERBB2、MMP2、MMP9 及 SRC 进行分子对接分析 (图 5), 同时为验证 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 通路关键靶点, 补充对 Akt1、MTOR 及 PI3K 进行分子对接分析 (图 5)。结果显示, 绿原酸与上述 9 个靶点均具有良好的结合活性。图 5 中, 绿原酸与 ERBB2

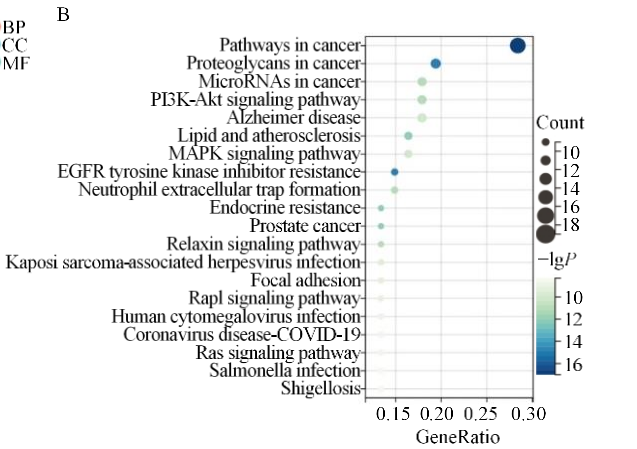


图 4 绿原酸-靶点-CIRI 通路网络图

Fig. 4 Chlorogenic acid-target-CIRI pathway network

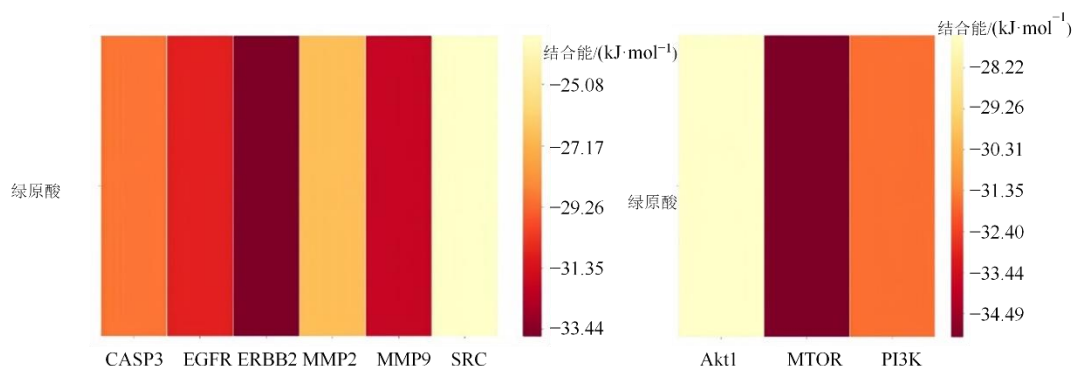


图 5 绿原酸与核心靶点的分子对接结合能热图

Fig. 5 Heatmap of molecular docking binding energies between chlorogenic acid and core targets

的结合能最低 ($-33.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 结合亲和力最强; 靶点的自由结合能均小于 $-29.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明绿原其次为 MMP9 ($-32.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) 和 EGFR ($-30.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); 除 SRC ($-23.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) 外, 其余 5 个酸与上述靶点具有较强的结合潜力。补充分子对接中, 绿原酸与 MTOR 的结合能最低 ($-35.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 结合亲和力最强; 其次为 PI3K ($-31.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) 和 Akt1 ($-27.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 3 个靶点的自由结合能均小于 $-25.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 提示绿原酸可有效作用于 PI3K/Akt/mTOR 通路的关键节点。对接模式示意图 (图 6) 结果显示绿原酸与 Akt1 结合位点涉及 ASN-54、GLN-79、ASN-53、LYS-14、ARG-86、ARG-23、TYR-18 及 ILE-19 等多个关键残基, 氢键距离为 $1.8\sim 2.9 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA}=0.1 \text{ nm}$); 与 MTOR 结合位点涉及 ARG-73、GLU-2038、GLU-2032 及 SER-2035 等残基, 氢键距离为 $1.2\sim 2.2 \text{ \AA}$; 与 PI3K 结合位点涉及

LYS-636、ILE-663 及 ASP-761 等残基, 氢键距离为 $1.9\sim 2.7 \text{ \AA}$, 表明绿原酸可与 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 通路多个关键靶点形成稳定的氢键相互作用, 提示其可能通过调控该通路发挥干预 CIRI 的作用。

3.2 实验验证结果

3.2.1 绿原酸对 MCAO/R 大鼠 mNSS 评分的影响
术后第 1、3、5、7 天采用 mNSS 评估大鼠神经功能 (图 7)。对照组大鼠无神经功能缺损, 各时间点 mNSS 评分均为 0, 与对照组相比, 模型组大鼠在各时间点 mNSS 评分均显著升高 ($P<0.001$), 表明出现严重的神经功能缺损。与模型组相比, 绿原酸干预显著降低了 mNSS 评分, 且绿原酸高剂量组改善效果优于低剂量组, 呈现明显的剂量和时间相关性趋势。引入 EGFR 激动剂后, EGF 组评分较模型组进一步升高 ($P<0.05$); 同时, EGF 显著逆转了绿原酸高剂量对评分的改善作用 (与绿原酸高剂量组相比,

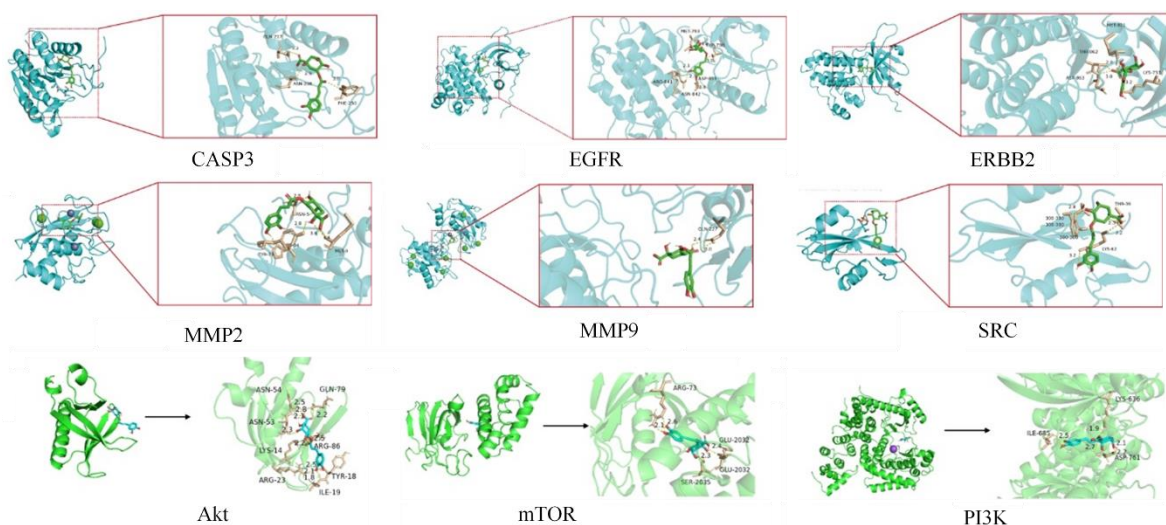


图 6 绿原酸与核心靶点的分子对接相互作用模式

Fig. 6 Molecular docking interaction diagrams of chlorogenic acid with core targets

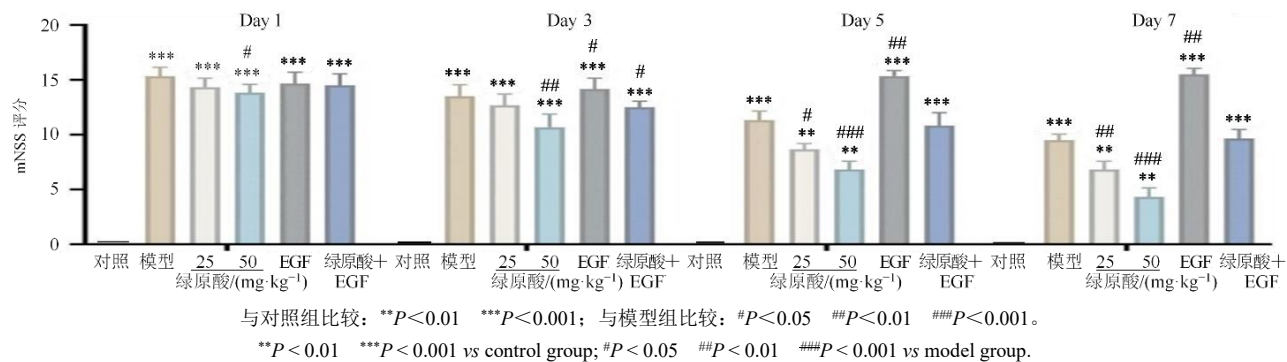


图 7 绿原酸及 EGFR 激动剂对 MCAO/R 大鼠 mNSS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effects of chlorogenic acid and EGFR agonist on mNSS in MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

$P < 0.01$)。上述结果提示, 绿原酸通过抑制 EGFR 信号通路减轻脑缺血再灌注诱导的神经功能损伤。

3.2.2 绿原酸对大鼠 CIRI 后脑梗死体积的影响及 EGFR 激动剂的干预作用 TTC 染色结果显示 (图 8-A), 对照组脑组织呈均匀红色, 无梗死灶; 模型组右侧大脑半球出现明显苍白色梗死区, 主要累及皮层和纹状体。统计分析 (图 8-B) 显示, 与对照组相比, 模型组脑梗死体积显著增加 (38%~40%, $P < 0.001$)。与模型组相比, 绿原酸干预后, 绿原酸低剂量组梗死体积降至约 30% ($P < 0.01$), 绿原酸高剂量组降至约 10% ($P < 0.01$), 呈剂量相关性保护作用。

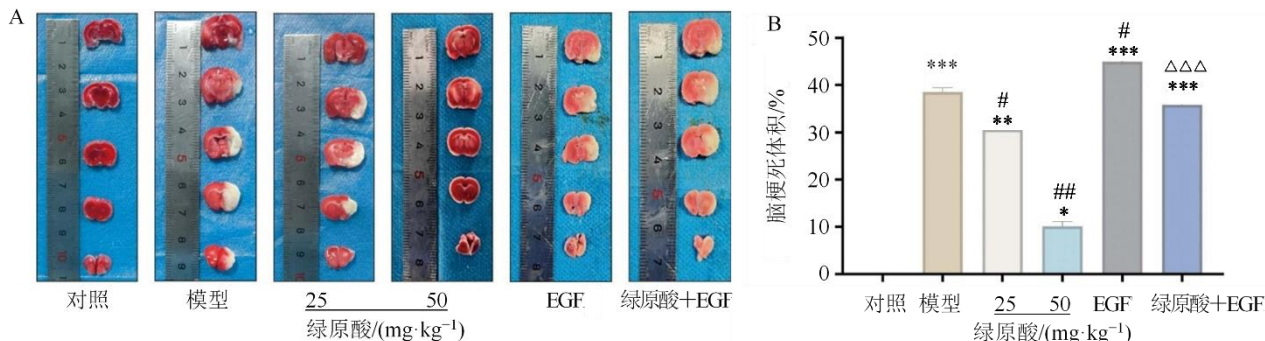
为验证 EGFR 通路在绿原酸神经保护中的作用, 引入 EGF 进行研究。与模型组相比, EGF 组梗死体积增至约 45% ($P < 0.05$), 表明激活 EGFR 通路加重损伤。与绿原酸高剂量组相比, 绿原酸+EGF 组梗死体积回升至约 35% ($P < 0.001$), 部分逆转了绿原酸的保护效应。上述结果提示绿原酸的保护机

制可能涉及对 EGFR 通路活性的精细调控。

3.2.3 绿原酸改善脑缺血再灌注大鼠脑组织病理形态损伤及 EGFR 通路的介导作用 HE 染色结果显示 (图 9), 对照组皮层神经元形态正常, 排列规则, 胞核清晰, 胞质均匀, 无明显病理改变。模型组则表现为典型缺血性损伤特征: 神经元数量减少、排列松散, 可见核固缩、核碎裂及胞体皱缩, 并伴有显著的间质水肿和空泡变性。

经绿原酸处理后, 高、低剂量组均显示不同程度的组织学改善。绿原酸低剂量组损伤有所缓解, 但仍存在部分病理改变; 绿原酸高剂量组效果更佳, 神经元结构趋于正常, 坏死细胞及空泡变性明显减少。

在 EGFR 通路验证实验中, EGF 组损伤程度与模型组相当或更重。而绿原酸+EGF 组相较于单纯绿原酸高剂量组, 损伤明显加重, 表现为神经元紊乱和空泡化增加, 但整体仍优于模型组。这表明 EGF 可部分抵消绿原酸的保护效应, 提示绿原酸可能通过调控 EGFR 通路活性发挥神经保护作用。



A-大鼠脑组织 TTC 染色; B-大鼠脑梗死体积百分比; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与绿原酸高剂量组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

A-TTC staining of rat brain tissues; B-cerebral infarct volume percentage; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs high-dose chlorogenic acid group.

图 8 绿原酸及 EGFR 激动剂对 MCAO/R 大鼠脑梗死体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Effects of chlorogenic acid and EGFR agonist on cerebral infarct volume in MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

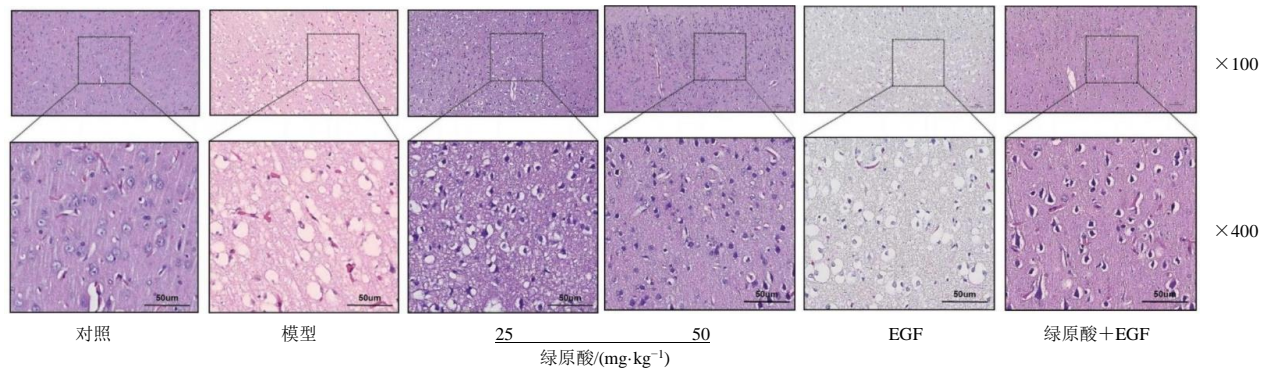


图 9 绿原酸及 EGFR 激动剂对 MCAO/R 大鼠脑组织病理形态的影响

Fig. 9 Effect of chlorogenic acid and EGFR agonist on histopathological morphology of brain tissue in MCAO/R rats

尼氏 (Nissl) 染色结果 (图 10) 显示, 对照组大脑皮层神经元排列规则、结构完整, 胞质尼氏体丰富、着色深蓝。模型组神经元数目显著减少, 排列紊乱, 胞质着色变浅或消失, 呈现典型的尼氏体溶解表现。与模型组比较, 绿原酸低、高剂量组神经元损伤均有所改善, 表现为细胞排列趋于规整, 尼氏体溶解减轻。绿原酸高剂量组改善更为明

显, 神经元形态及尼氏体分布接近对照组。EGF 组神经元损伤程度与模型组相近, 尼氏体溶解明显。与绿原酸高剂量组比较, 绿原酸+EGF 组神经元胞质着色减弱, 尼氏体含量降低, 提示 EGF 可部分逆转绿原酸的神经保护作用。上述结果表明, 绿原酸对 CIRI 的保护作用可能与调控 EGFR 信号通路相关。

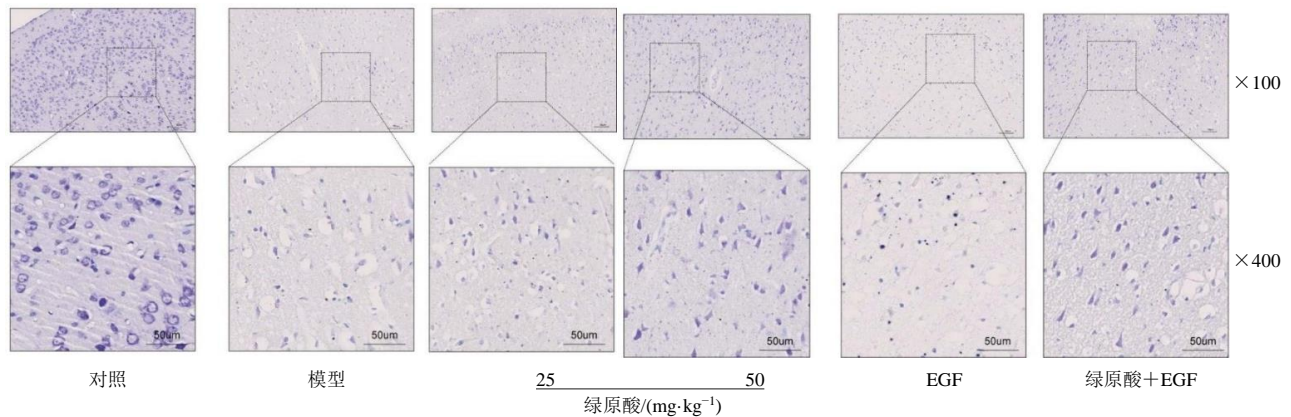


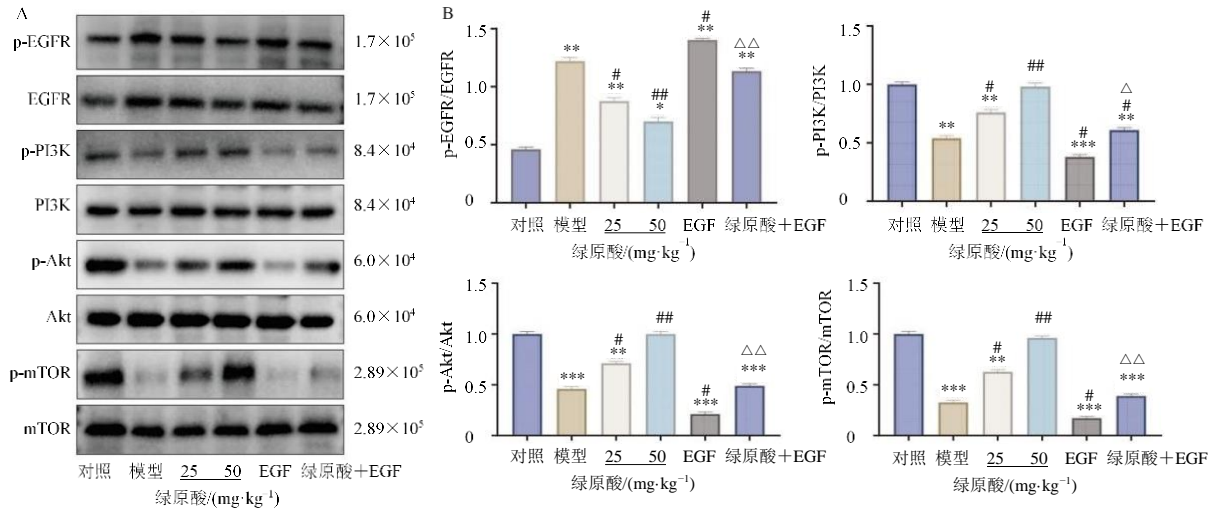
图 10 绿原酸及 EGFR 激动剂对 MCAO/R 大鼠皮层神经元尼氏体的影响

Fig. 10 Effect of chlorogenic acid and EGFR agonist on Nissl bodies in cortical neurons of MCAO/R rats

3.2.4 绿原酸对 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果 (图 11), 与对照组比较, 模型组 p-EGFR/EGFR 显著升高, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 及 p-mTOR/mTOR 均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明缺血再灌注可诱导 EGFR 过度活化并抑制下游通路信号传导。与模型组比较, 绿原酸干预组 p-EGFR/EGFR 显著降低, 下游各蛋白磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且绿原酸高剂量组改善效果优于绿原酸低剂量组, 呈剂量相关性。

与模型组比较, EGF 组 p-EGFR/EGFR 进一步升高, 下游蛋白磷酸化水平进一步降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与绿原酸高剂量组比较, 绿原酸+EGF 组上述指标变化趋势逆转 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明, 绿原酸可通过抑制 EGFR 过度活化, 恢复 PI3K/Akt/mTOR 信号通路传导, 从而发挥神经保护作用。

3.2.5 绿原酸对凋亡相关蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果 (图 12) 显示, 与对照组比较, 模型组 Bax 及 cleaved Caspase-3 表达显著升高, Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型

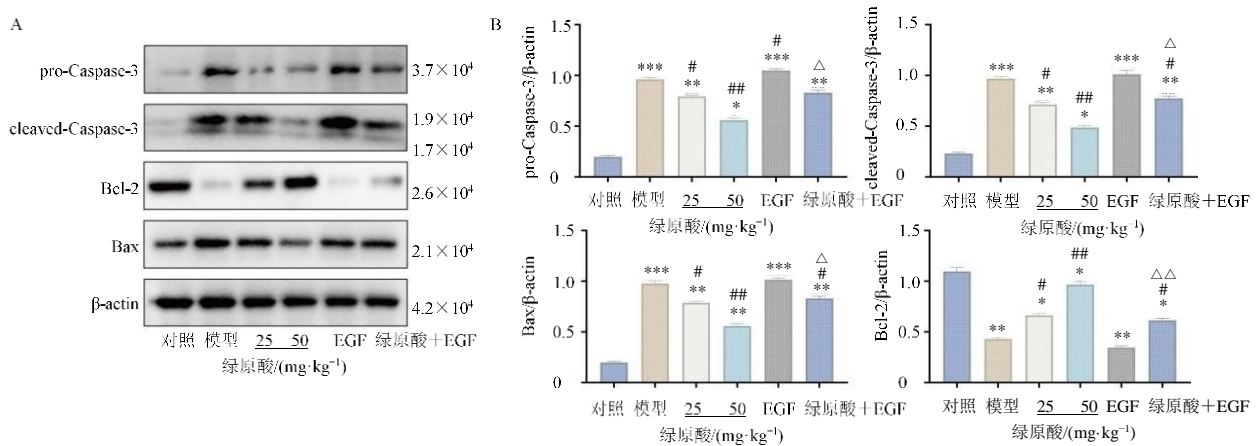


A-Western blotting; B-各蛋白相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与绿原酸高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

A-Western blotting of. B-quantitative analysis of relative protein expression levels; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs high-dose chlorogenic acid group.

图 11 绿原酸对 MCAO/R 大鼠 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 11 Effect of chlorogenic acid on EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-Bcl-2、Bax、pro-Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 的 Western blotting; B-Bcl-2、Bax、pro-Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与绿原酸高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

A-Western blotting of Bcl-2, Bax, pro-Caspase-3 and cleaved Caspase-3. B-quantitative analysis of the relative protein expression levels; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs high-dose chlorogenic acid group.

图 12 绿原酸对 MCAO/R 大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 12 Effect of chlorogenic acid on expression of apoptosis-related proteins in brain tissue of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组比较, 绿原酸干预组 Bax 及 cleaved Caspase-3 表达显著下调, Bcl-2 表达显著上调 ($P < 0.05, 0.01$), 且绿原酸高剂量组效果优于绿原酸低剂量组, 呈剂量相关性。与模型组比较, EGF 组凋亡相关蛋白表达进一步恶化 ($P < 0.01$)。与绿原酸高剂量组比较, 绿原酸+EGF 组上述蛋白表达变化趋势逆转 ($P < 0.05, 0.01$)。以上结果表明, 绿原酸可通过抑制 EGFR 过度活化, 上调 Bcl-2/Bax 比值, 抑制 Caspase-

3 活化, 从而减轻神经元凋亡。

3.2.6 免疫组化检测 EGFR、PI3K、Akt 蛋白表达
采用免疫组化法检测各组大鼠脑组织 EGFR、PI3K 及 Akt 蛋白表达。与对照组比较, 模型组 EGFR 阳性表达显著升高, PI3K 及 Akt 阳性表达显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 绿原酸干预组 EGFR 表达显著下调, PI3K 及 Akt 表达显著上调 ($P < 0.05, 0.01$), 且绿原酸高剂量组效果优于绿原酸低剂量

组, 呈剂量相关性。与模型组比较, EGF 组 EGFR 表达进一步升高, Akt 表达进一步降低 ($P < 0.01$)。与绿原酸高剂量组比较, 绿原酸+EGF 组上述蛋白表达变化趋势逆转 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明, 绿原酸可通过抑制 EGFR 异常活化, 上调 PI3K/Akt 信号通路, 发挥神经保护作用。见图 13。

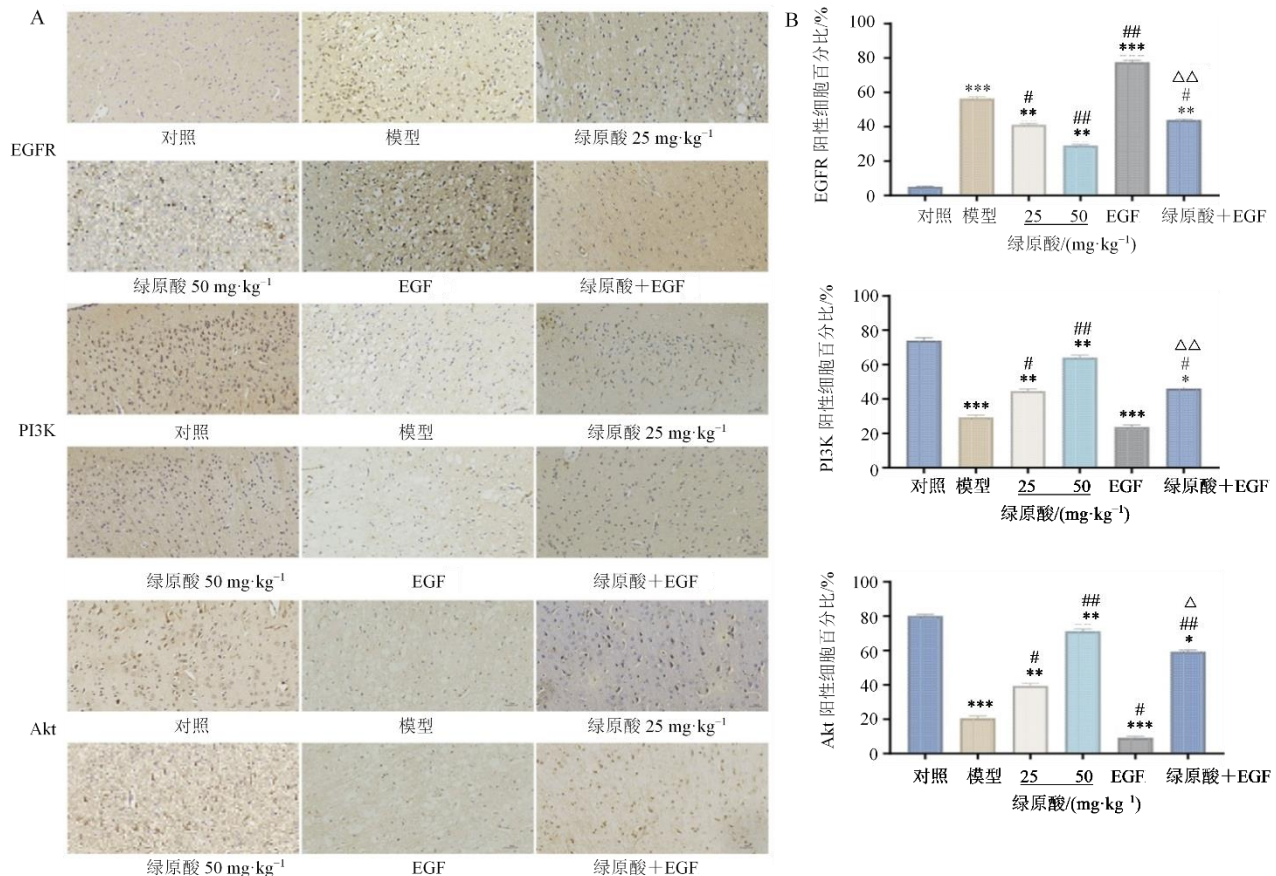
3.2.7 绿原酸对神经元凋亡的影响 采用 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织神经细胞凋亡情况 (图 14)。与对照组比较, 模型组 TUNEL 阳性细胞比例显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 绿原酸干预组凋亡细胞比例显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且绿原酸高剂量组效果优于绿原酸低剂量组, 呈剂量相关性。与模型组比较, EGF 组凋亡细胞比例进一步升高 ($P < 0.01$)。与绿原酸高剂量组比较, 绿原酸+EGF 组凋亡细胞比例显著回升 ($P < 0.01$)。以上结果表

明, 绿原酸可通过调控 EGFR/PI3K/Akt 信号通路, 减轻缺血再灌注诱导的神经细胞凋亡。

4 结论

缺血性脑卒中是严重危害人类健康的脑血管疾病, 及时恢复血流灌注是挽救缺血脑组织的关键措施, 但再灌注过程本身会引发一系列复杂的病理生理反应, 导致脑损伤进一步加重, 即 CIRI^[18]。CIRI 的病理机制复杂, 涉及氧化应激、炎症反应、钙超载、线粒体功能障碍、细胞凋亡等多个环节, 其中神经元凋亡是导致神经功能缺损的重要因素^[3, 19]。因此, 探索有效的神经保护策略, 抑制神经元凋亡, 对改善 CIRI 预后具有重要意义。

绿原酸是一种广泛存在于中药及天然植物中的多酚类化合物, 具有显著的抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种生物学活性^[4]。近年研究表明, 绿原酸对多

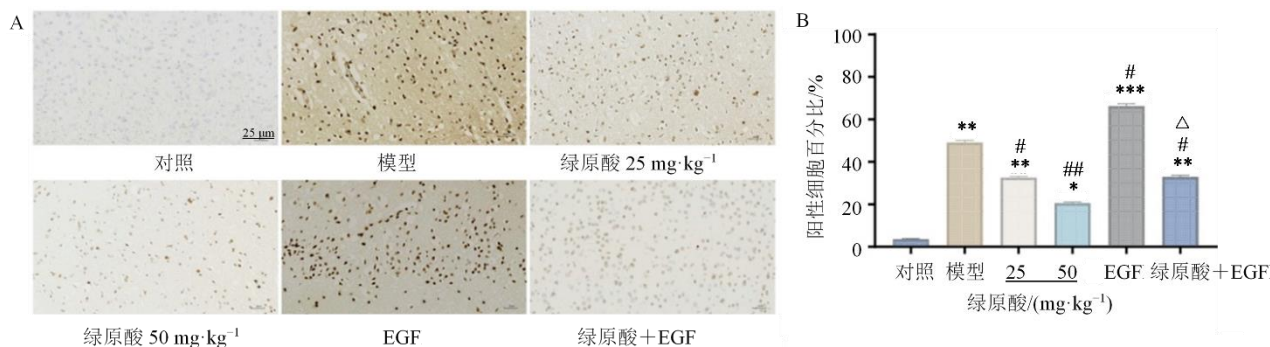


A-免疫组化染色 ($\times 400$); B-阳性细胞百分比; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与绿原酸高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

A-representative immunohistochemistry images ($\times 400$); B-quantitative analysis of percentage of positive cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs high-dose chlorogenic acid group.

图 13 绿原酸通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路调节 MCAO/R 大鼠脑组织相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 13 Effect of chlorogenic acid on expression of EGFR/PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in brain tissue of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-大鼠脑组织 TUNEL 染色 ($\times 400$); B-TUNEL 阳性细胞百分比; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与绿原酸高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ 。
A-TUNEL staining images in brain tissue of rats ($\times 400$); B-percentage of TUNEL-positive cells; $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs high-dose chlorogenic acid group.

图 14 绿原酸对 MCAO/R 大鼠脑组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 14 Effect of chlorogenic acid on cell apoptosis in brain tissue of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

种神经系统疾病具有保护作用。Kim 等^[20]研究发现, 绿原酸可通过抑制小胶质细胞活化和炎症反应, 减轻脂多糖诱导的神经炎症。Shen 等^[21]报道, 绿原酸通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) /血红素氧合酶 1 (HO-1) 通路, 减轻氧化应激, 对 CIRI 具有保护作用。然而, 绿原酸发挥神经保护作用的分子机制尚未完全阐明, 限制了其临床转化应用。网络药理学基于系统生物学和网络分析理论, 从整体角度阐释药物与疾病的相互作用, 符合中医药“多成分、多靶点、多途径”的作用特点, 为揭示中药作用机制提供了新思路^[10]。本研究首先通过网络药理学方法, 系统预测绿原酸治疗 CIRI 的潜在靶点和作用通路。结果显示, 绿原酸与 CIRI 共有 64 个交集靶点, PPI 网络分析筛选出 EGFR、CASP3、SRC、ERBB2、MMP9、MMP2 等核心靶点, 提示这些靶点在绿原酸治疗 CIRI 中发挥关键作用。GO 功能富集分析显示, 交集靶点主要参与细胞对氮化化合物的反应、蛋白修饰与磷酸化正向调控、细胞迁移正向调控等生物学过程, 这与 CIRI 的病理机制高度吻合。KEGG 通路富集分析显示, 交集靶点显著富集在 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡通路等, 其中 PI3K-Akt 通路富集最显著, 提示该通路在绿原酸治疗 CIRI 中发挥核心作用。

分子对接技术可从分子水平评估药物与靶点的结合能力, 验证网络药理学预测结果的可靠性。本研究结果显示, 绿原酸与 EGFR、ERBB2、CASP3、MMP2、MMP9、SRC 等核心靶点均具有良好的结

合活性, 结合能均小于 $-29.26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 其中与 ERBB2 的结合能最低 ($-33.86 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 其次为 MMP9 ($-32.19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) 和 EGFR ($-29.26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。对接模式分析显示, 绿原酸主要通过氢键和疏水相互作用与靶点蛋白活性位点结合, 构象稳定。上述结果从分子水平支持了网络药理学预测的可靠性, 为后续体内实验验证提供了理论依据。

EGFR/PI3K/Akt/mTOR 信号通路是调控细胞生存、增殖、分化和凋亡的经典通路, 在神经系统中发挥重要作用^[22]。EGFR 是受体酪氨酸激酶家族成员, 其活化后可通过多种机制调控下游信号通路。EGFR 的过度激活与多种病理状态相关^[23]。在 CIRI 过程中, EGFR 的异常激活可能通过负反馈机制抑制下游 PI3K/Akt/mTOR 通路的正常功能, 从而加重神经元损伤。PI3K 是细胞内重要的信号转导分子, 活化后产生第二信使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸, $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ (PIP3), 招募并激活 Akt。活化的 p-Akt 通过磷酸化多种底物发挥抗凋亡作用, 包括激活 mTOR、抑制促凋亡蛋白 Bad、激活转录因子 CREB 等^[24]。mTOR 是细胞生长和代谢的中心调控因子, p-mTOR 可促进蛋白合成, 抑制细胞凋亡^[25]。因此, 维持 PI3K/Akt/mTOR 通路的适度活化对神经元存活至关重要。

在动物实验验证部分, 本研究采用经典的 MCAO/R 模型模拟临床缺血性脑卒中, 评估绿原酸的神经保护作用及其分子机制。结果显示, MCAO/R 模型大鼠表现出明显的神经功能缺损、脑梗死体积增大、神经元损伤和凋亡增加, 成功复制

了 CIRI 的病理特征。绿原酸干预（尤其是高剂量）显著改善 mNSS，缩小脑梗死体积，减轻神经元损伤，降低神经元凋亡，表现出明显的神经保护作用，且呈剂量相关性。这与文献报道的绿原酸神经保护作用一致^[26-27]。

机制研究方面，Western blotting 和免疫组化结果显示，MCAO/R 后大鼠缺血侧皮层 p-EGFR/EGFR 显著升高，而下游 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 均显著降低。这一结果提示，CIRI 可诱导 EGFR 过度激活，进而通过某种机制抑制下游 PI3K/Akt/mTOR 生存信号通路，促进神经元凋亡。绿原酸干预后，p-EGFR/EGFR 比值显著下调，同时下游各蛋白磷酸化水平显著回升，且呈剂量相关性。凋亡蛋白检测结果显示，绿原酸可显著下调促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达，上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达，升高 Bcl-2/Bax。上述结果表明，绿原酸可通过抑制 EGFR 过度磷酸化激活，解除其对下游信号通路的抑制，恢复 PI3K/Akt/mTOR 通路的正常传导功能，从而抑制神经元凋亡。值得注意的是，免疫组化结果亦显示绿原酸干预后 EGFR 总蛋白阳性细胞数有所下调，可能源于以下 2 种间接机制：（1）促进受体内吞与降解：绿原酸与 EGFR 结合后，可能不仅抑制了其激酶活性（降低 p-EGFR），还可能通过改变 EGFR 的构象，加速 EGFR 受体的内吞，并引导其进入溶酶体途径进行降解，从而导致细胞表面及总 EGFR 蛋白水平的下降^[28]。（2）负反馈转录调控机制：绿原酸通过抑制 EGFR 的异常激活，阻断了下游促增殖/促炎转录因子[如激活蛋白-1 (AP-1)、核因子- κ B (NF- κ B) 或信号传导及转录激活因子 (STAT) 家族成员]的活化，上述转录因子活性的降低可能减弱了其对 EGFR 基因启动子的正向转录刺激，从而在转录水平上产生负反馈，导致 EGFR mRNA 及蛋白表达的继发性下调（该机制有待后续转录组学实验进一步验证）。

为进一步验证 EGFR 在绿原酸神经保护作用中的关键上游调控地位，本研究设置 EGFR 激动剂 EGF 干预组进行机制验证。结果显示，EGF 干预后，p-EGFR/EGFR 表达进一步升高，下游磷酸化蛋白水平进一步降低，mNSS 升高，脑梗死体积增大，神经元凋亡加重，证实 EGFR 过度激活可加重 CIRI。更为重要的是，绿原酸高剂量+EGF 联合用药组与单纯绿原酸高剂量组相比，EGF 部分逆转了绿原酸的神经保护作用，表现为 p-EGFR 水平回升、下游

蛋白磷酸化水平下降及神经损伤加重。上述结果有力证明，绿原酸是通过抑制 EGFR 过度磷酸化激活，解除其对下游 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的抑制作用，从而发挥神经保护效应，EGFR 是绿原酸发挥作用的关键上游靶点。

关于 EGFR 过度激活导致下游 PI3K/Akt/mTOR 信号减弱的分子机制，现有研究从多个角度进行了探讨。Tomas 等^[28]指出，受体持续异常激活可触发内吞作用增强及溶酶体降解途径激活，使质膜表面功能性信号复合物数量显著减少，从而削弱下游信号传递效率。Bhalla 等^[29]的研究则揭示了另一层面的调控机制：EGFR 过度激活状态可通过负反馈回路诱导蛋白酪氨酸磷酸酶表达上调，进而加速 PI3K 及其下游效应分子的去磷酸化过程。此外，Stiles 等^[30]发现 EGFR 异常激活能够募集磷酸酶与张力蛋白同源物基因 (PTEN) 等内源性抑制因子，直接拮抗 PI3K/Akt 轴的活化。值得注意的是，Wee 等^[31]提出在疾病应激条件下，EGFR 可能发生信号偏向性转换，优先激活 MAPK 等促凋亡、促炎通路，而对维持细胞存活的 PI3K/Akt/mTOR 通路激活效率明显降低。绿原酸正是通过纠正 EGFR 的异常激活状态，使 PI3K/Akt/mTOR 信号网络恢复正常功能，从而发挥神经保护作用。

本研究仍存在一定局限性。验证工作仅在大鼠 MCAO/R 模型中完成，尚未扩展至其他种属动物或体外细胞实验体系。其次，EGFR 过度激活抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路的具体分子事件，本研究未作深入探讨。绿原酸长期用药的疗效稳定性及潜在不良反应也有待系统评价。最后，向临床转化的相关研究尚未开展。后续工作应着力于在多种实验模型中重复验证绿原酸的神经保护效应，进一步解析 EGFR 与下游信号网络之间的精细调控机制，并全面评估其临床应用前景。

综上，本研究将网络药理学、分子对接与体内实验相结合，对绿原酸改善 CIRI 的作用机制进行了较为系统的探索。研究发现，CIRI 可导致 EGFR 过度激活，进而抑制下游 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，促进神经元凋亡。绿原酸可通过抑制 EGFR 过度磷酸化激活，恢复 PI3K/Akt/mTOR 通路功能，上调 Bcl-2 表达，下调 Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达，抑制神经元凋亡，减轻 CIRI。EGFR 激动剂 EGF 可部分逆转绿原酸的保护作用，证实 EGFR 是绿原酸发挥神经保护作用的关键靶点。本研究为绿原酸治

疗缺血性脑卒中提供了理论依据和实验支持,也为开发新型神经保护药物提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feigin V L, Stark BA, Johnson C O, et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.
- [2] Lin L, Wang X. Ischemia-reperfusion injury in the brain: Mechanisms and potential therapeutic strategies [J]. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 2016, 5(4): 213.
- [3] Wu L Q, Xiong X X, Wu X M, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 28.
- [4] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 67-74.
- [5] Cantero-Téllez A, Moreno-Fierros L, Gutiérrez-Ospina G, et al. Systemic neuroprotection by chlorogenic acid: Antioxidant and anti-inflammatory evaluation in early neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid in mice [J]. *Neurochem Res*, 2025, 50(2): 113.
- [6] Li Y J, Shi W, Li Y D, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2008, 26(1): 13-21.
- [7] Zhang Z G, Yang X F, Song Y Q, et al. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 72: 101464.
- [8] Chen S P, Peng J H, Sherchan P, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.
- [9] Gao C, Liu Y Z, Jiang Y H, et al. Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3 β pathway in streptozotocin-induced Alzheimer rat model [J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(3): 261-269.
- [10] Zhang R Z, Zhu X, Bai H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [11] Ferreira L G, Dos Santos R N, Oliva G, et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13384-13421.
- [12] 梁爽, 唐源, 兰天, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨雷公藤红素调控铁死亡抑制胃癌的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(7): 2385-2395.
- [13] Liang S, Tang Y, Lan T, et al. Mechanism of celastrol on inhibiting gastric cancer by regulating ferroptosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(7): 2385-2395.
- [14] Lee K, Lee J S, Jang H J, et al. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 689(1/2/3): 89-95.
- [15] Tang Y Y, Tong X H, Li Y, et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the protective effects of epidermal growth factor receptor activation against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 662: 219-226.
- [16] Tamatani M, Ogawa S, Nuñez G, et al. Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide [J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5(10): 911-919.
- [17] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [18] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [19] Pan J, Konstas A A, Bateman B, et al. Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, MR imaging, and potential therapies [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(2): 93-102.
- [20] Jurcau A, Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 14.
- [21] Kim S H, Park S Y, Park Y L, et al. Chlorogenic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-1 β expression by inhibiting JAK2/STAT3 activation in RAW264.7 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9224-9232.
- [22] Zheng Y H, Li L Y, Chen B W, et al. Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 84.
- [23] Qin C, Yang S, Chu Y H, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 215.

- [23] Karar J, Maity A. PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 51.
- [24] Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas J M, Hernández-Damián J, et al. The role of PI3K/Akt/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2694-2701.
- [25] Saxton R A, Sabatini D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976.
- [26] Heitman E, Ingram D K. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid [J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20(1): 32-39.
- [27] Nguyen V, Taine E G, Meng D H, et al. Chlorogenic acid: A systematic review on the biological functions, mechanistic actions, and therapeutic potentials [J]. *Nutrients*, 2024, 16(7): 924.
- [28] Tomas A, Futter C E, Eden E R. EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(1): 26-34.
- [29] Bhalla U S, Ram P T, Iyengar R. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network [J]. *Science*, 2002, 297(5583): 1018-1023.
- [30] Stiles B, Groszer M, Wang S Y, et al. PTENless means more [J]. *Dev Biol*, 2004, 273(2): 175-184.
- [31] Wee P, Wang Z X. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways [J]. *Cancers*, 2017, 9(5): 52.

[责任编辑 齐静雯]