

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002388

促红细胞生成素衍生肽通过 PI3K/Akt 信号转导通路 对小鼠肾缺血再灌注损伤保护作用

张晓利, 胡威利

(新乡医学院第三附属医院肾病风湿科, 新乡 453000)

【摘要】目的:探究促红细胞生成素衍生肽对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及对 PI3K/Akt 信号转导通路的影响。**方法:**将小鼠分为假手术组、模型组和研究组,复制肾缺血再灌注损伤动物模型,在手术前 6 h 模型组腹腔注射促红细胞生成素衍生肽,假手术组和模型组腹腔注射生理盐水。使用苦味酸速率法检测各组小鼠血清中血肌酐(serum creatinine, Scr),使用酶学速率法检测各组小鼠血清中尿氮素(blood urea nitrogen, BUN)水平;病理切片检查肾脏病理变化;原位末端标记法分析肾脏细胞凋亡;Western blot 检测肾脏蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartate protease, Caspase-3)蛋白表达水平。**结果:**模型组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平明显高于假手术组,研究组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平明显低于模型组($P<0.05$);研究组肾脏的病理损伤程度明显弱于模型组,仅有少部分肾小管上皮细胞出现肿胀,少见肾小管上皮细胞坏死脱落,肾小管管腔正常,模型组小鼠的肾脏病理损伤评分明显大于假手术组,研究组小鼠的肾脏病理损伤评分明显小于模型组($P<0.05$);模型组小鼠的肾小管上皮细胞凋亡评分明显大于假手术组,研究组小鼠的肾小管上皮细胞凋亡评分明显小于模型组($P<0.05$);模型组小鼠肾脏中 Caspase-3 蛋白表达水平明显高于假手术组, Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平明显低于假手术组($P<0.05$);研究组小鼠肾脏中的 Caspase-3 蛋白表达水平明显低于假手术组, Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平明显高于假手术组($P<0.05$)。**结论:**促红细胞生成素衍生肽对肾缺血再灌注有明显改善作用,该作用可能是通过调控 PI3K/Akt 信号转导通路调控机体凋亡蛋白的表达来实现的。

【关键词】促红细胞生成素衍生肽;肾缺血再灌注损伤;PI3K/Akt 信号转导通路;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】R692

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-07-01

Protective effect of erythropoietin derived peptide on renal ischemia-reperfusion injury in mice through PI3K/Akt signal transduction pathway

Zhang Xiaoli, Hu Weili

(Department of Nephropathy and Rheumatism, The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical university)

【Abstract】Objective: To explore the protective effect of erythropoietin derived peptide on renal ischemia-reperfusion injury in mice and to investigate its influence on PI3K/Akt signal transduction pathway. **Methods:** The mice were divided into the sham operation group, the model group and the study group. The animal model of renal ischemia-reperfusion injury was repeated. Erythropoietin derived peptide was injected into the abdominal cavity of mice in the model group 6 hours before operation, and normal saline was injected into the abdominal cavity in the sham operation group and the model group. Serum creatinine(Scr) in different groups was detected by picric acid rate method, urine nitrogen(BUN) level was detected by enzymology rate method, renal pathological changes were examined through pathological section, renal cell apoptosis was analyzed by in situ end labeling, and expression levels of p-Akt, protein kinase B(Akt), phosphorylated protein kinase B(p-Akt), cysteine aspartate protease(caspase-3) were detected by Western blot. **Results:** Levels of SCR and BUN in the model group were significantly higher than those in the sham operation group, while in the study group were significantly lower than those in the model group($P<0.05$). The renal pathological damage in the study group was significantly weaker than that in the model group, only a small part of the renal tubular epithelial cells were swollen, rare renal tubular epithelial cells had necrosis and abscission and the renal tubular lumen was normal. The score of renal pathological injury was significantly higher than that in the sham operation group, and in the study group was significantly lower than that in the model group($P<0.05$). The apoptosis score of the renal tubular epithelial cells in the model group was significantly

作者介绍: 张晓利, Email: zhangxiaoli329@163.com,

研究方向: 肾小球疾病的基础与临床研究。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200324.1341.008.html>

(2020-03-25)

higher than that in the sham operation group, and in the study group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The expression level of renal caspase-3 protein in the model group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$) and the expression level of Akt and p-Akt protein in the operation group was significantly lower than that in the sham operation group ($P < 0.05$); the expression level of renal caspase-3 protein in the study group was significantly lower than that in the sham operation group, and the expression level of Akt and p-Akt protein was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$).

Conclusion: Erythropoietin derived peptide has a significant improvement on renal ischemia-reperfusion, which may be achieved by regulating PI3K/Akt signal transduction pathway and regulating the expression of apoptotic protein.

[Key words] erythropoietin derived peptide; renal ischemia-reperfusion injury; PI3K/Akt signal transduction pathway; cysteine aspartate protease

缺血再灌注损伤在机体的多个器官均会发生,是临床中常见的病症。肾脏是机体的重要器官,具有高灌注的特点,缺血再灌注损伤的发病率较高。肾脏的缺血再灌注导致肾小管、肾小球的内皮细胞损伤,肾小管间质纤维化,严重降低肾脏功能^[1]。促红细胞生成素是肾脏分泌的一种激素,在临床上广泛应用于治疗性贫血。近年来国内外研究发现促红细胞生成素具有减轻炎症、促进血管新生、抗细胞凋亡、抗缺血再灌注损伤的作用^[2]。临床中如果将促红细胞生成素作为治疗肾缺血再灌注损伤的药物,则需要较高的促红细胞生成素给药剂量,然而较高剂量的促红细胞生成素会导致红细胞过量增多、血液黏度过度增高、降低血液灌注、增高血栓形成风险等严重的不良反应^[3]。这些不良反应加重组织器官的缺血再灌注损伤。促红细胞生成素衍生肽是以促红细胞生成素结构为基础、人工合成的一种含有 11 个氨基酸的线性多肽^[4]。研究显示没有促红细胞生成素所具有的不良反应,但其他的药理作用和促红细胞生成素相似^[5]。朱建峰等^[6]研究显示重组人促红细胞生成素可以通过调节 PI3K/Akt 信号转导通路对缺血后处理大鼠心脏保护作用。故本研究通过建立小鼠肾缺血再灌注损伤动物模型,检测促红细胞生成素衍生肽对肾缺血再灌注损伤的保护作用及对 PI3K/Akt 信号转导通路的影响。

1 资料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康 C57BL/6 小鼠 30 只,雌雄各半,体质量 20~25 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可合格证编号为 SCXK(沪)2017-0005。动物购买后适应性喂养 1 周。

1.2 主要试剂及仪器

促红细胞生成素衍生肽(上海科肽生物科技有限公司),

蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 兔抗小鼠多克隆抗体、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 兔抗小鼠多克隆抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine aspartate protease, Caspase-3) 兔抗小鼠多克隆抗体(美国 Sigma 公司)。

倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),石蜡切片机(德国徕卡公司),电泳仪(北京六一仪器厂),全自动生化检测仪(日本日立公司)。

1.3 方法

1.3.1 肾缺血再灌注损伤小鼠模型复制 将 30 只小鼠按数字表法随机分为假手术组、模型组、研究组,每组各 10 只小鼠。腹腔注射 1.0% 的戊巴比妥钠麻醉,取平卧位,固定体姿,备皮,沿腹部正中切线开腹,钝性分离并充分暴露肾蒂,用无创动脉夹夹闭双侧肾蒂造成肾缺血,肾脏颜色由鲜红色立刻变为紫黑色。假手术组仅作分离肾蒂操作,用微血管夹夹闭模型组、研究组小鼠左肾的肾蒂,时间为 45 min,造成左肾缺血状态,放开微血管夹,恢复左侧肾的血液供应,造成左侧肾缺血后再灌注的状态。将腹腔内肠道复位,关闭腹腔,缝合伤口,消毒。

1.3.2 给药及取材 假手术组和模型组于术前 6 h 腹腔注射生理盐水,研究组于术前 6 h 腹腔注射浓度为 15 nmol/kg 的促红细胞生成素衍生肽,3 组腹腔注射体积均为 0.1 mL/10 g。术后每 6 h 给促红细胞生成素衍生肽和生理盐水。术后 48 h 处死动物,取血液和肾脏。血液静置后离心,收集血清,保存于 -80 °C 冰箱中;部分肾脏保存于 10% 甲醛溶液中;部分肾脏保存于 -80 °C 冰箱中。

1.3.3 指标检测

1.3.3.1 肾功能检测 使用全自动生化检测仪,使用苦味酸速率法检测各组小鼠血清中肌酐(serum creatinine, Scr),使用酶学速率法检测各组小鼠血清中尿氮素(blood urea nitrogen, BUN)水平。

1.3.3.2 肾脏病理变化 肾脏 10% 甲醛固定,脱水,石蜡包埋,石蜡切片,脱蜡,HE 染色,封片,在光学显微镜下观察肾脏的病理变化。在 400 倍显微镜下,选择 5 个视野,每个视野选择 10 个肾小管部分,使用 Palters 标准对肾小管的病理变化进行评分,评分依据为:肾小管明显扩张、细胞扁平 1 分;

刷状缘损伤 1 分、刷状缘脱落 2 分;细胞膜有体积较大的泡状凸起 1 分、细胞浆空泡 1 分;肾小管间质水肿 1 分;肾小管内有脱落的坏死细胞但没有形成管型或者片状 1 分、肾小管内有脱落的坏死细胞且有形成管型或者片状 2 分。评价每个视野肾小管的病理变化,取平均值为最终值。

1.3.3.3 原位末端标记法分析肾脏细胞凋亡 取肾脏组织,石蜡常规包埋,4.0 μm 切片,脱蜡至水,二甲苯透明,乙醇脱水,抗原热修复,与蛋白酶 K 作用,胎牛血清封闭非特异性反应,TUENL 溶液,3%甲醇阻断内源性过氧化物酶,羊血清封闭非特异性抗原,加二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)、氧化酶(peroxidase, POD)显色,苏木精复染,封片,在光学显微镜下观察。细胞凋亡标准:细胞核呈现为棕褐色或棕黄色。在 400 倍光学显微镜下,在外髓质中随机选择 5 个视野,计数每个视野中的凋亡细胞数,取 5 个视野的平均值为最终值。进行肾脏细胞凋亡程度评分。评分标准:1 $\leq$ 凋亡细胞 $\leq$ 10 为 1 分;11 $\leq$ 凋亡细胞 $\leq$ 20 为 2 分;21 $\leq$ 凋亡细胞 $\leq$ 30 为 3 分;31 $\leq$ 凋亡细胞 $\leq$ 40 为 4 分;41 $\leq$ 凋亡细胞为 5 分。

1.3.3.4 Western blot 检测肾脏 Caspase-3、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平 取肾脏组织,匀浆,提取总蛋白,电泳分离蛋白,转膜至硝酸纤维素膜(nitrocellulose, NC),洗膜,在 Caspase-3 兔抗小鼠多克隆抗体(1:800)、Akt 兔抗小鼠多克隆抗体(1:800)和 p-Akt 兔抗小鼠多克隆抗体(1:800)溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜,在二抗溶液中室温孵育 2 h,洗膜,滴加显色剂,暗室中曝光胶片。

1.4 统计学处理

用 SPSS 20.0 统计软件对本研究中的数据进行统计处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料用率(%)表示。对于组间计量资料先进行单因素方差分析,然后用 LSD- t 检验分析两组差异;组间计数资料的差异用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中 Scr 和 BUN 水平比较

对各组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平进行比较。结果显

示模型组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平明显高于假手术组(均 $P=0.000$),研究组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平明显低于模型组(均 $P=0.000$)(表 1)。

表 1 各组小鼠血清中 Scr 和 BUN 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Scr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术组($n=20$)	20.11 $\pm$ 3.56	11.35 $\pm$ 2.06
模型组($n=20$)	35.57 $\pm$ 5.68	23.97 $\pm$ 4.79
研究组($n=20$)	24.81 $\pm$ 3.71	13.88 $\pm$ 2.67
F 值	64.204	77.943
P 值	0.000	0.000

2.2 各组小鼠肾脏病理形态及病理损害评分比较

假手术组小鼠肾脏的肾小管、肾小管间质等组织结构正常,没有损伤;模型组小鼠很多肾小管的上皮细胞出现肿胀、空泡变性,部分肾小管上皮细胞出现片状坏死脱落,肾小管管腔扩张;研究组肾脏的病理损伤程度明显弱于模型组,仅有少部分肾小管上皮细胞出现肿胀,少见肾小管上皮细胞坏死脱落,肾小管管腔正常。模型组小鼠的肾脏病理损伤评分明显大于假手术组($P=0.000$),研究组小鼠的肾脏病理损伤评分明显小于模型组($P=0.000$)(表 2、图 1)。

表 2 各组小鼠肾脏病理损伤评分($\bar{x}\pm s$)

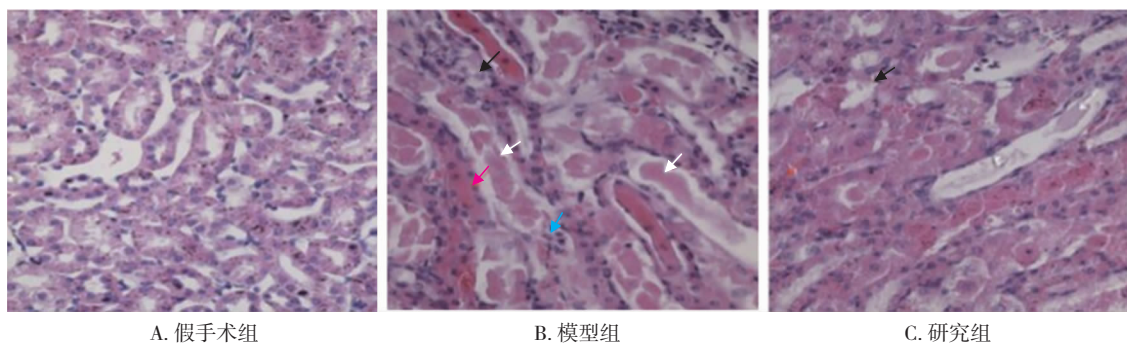
组别	损伤评分
假手术组($n=20$)	15.32 $\pm$ 2.15
模型组($n=20$)	24.67 $\pm$ 4.25
研究组($n=20$)	16.73 $\pm$ 3.49
F 值	43.727
P 值	0.000

2.3 各组小鼠肾小管上皮细胞凋亡评分比较

对各组小鼠肾小管上皮细胞凋亡评分进行比较。结果显示模型组小鼠的肾小管上皮细胞凋亡评分明显大于假手术组($P=0.000$),研究组小鼠的肾小管上皮细胞凋亡评分明显小于模型组($P=0.000$)(表 3、图 2)。

2.4 各组小鼠肾脏中 Caspase-3、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平比较

对各组小鼠肾脏中 Caspase-3、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水



注:图中红色箭头示肾间质充血;白色箭头示蛋白管型;黑色箭头示死亡细胞;蓝色箭头示炎性细胞浸润

图 1 各组小鼠肾脏病理形态

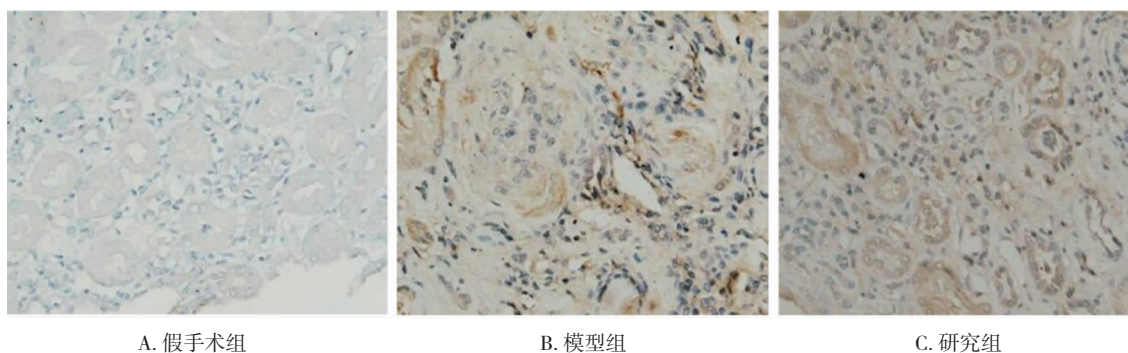


图2 各组小鼠肾小管上皮细胞凋亡

平比较。结果显示模型组小鼠肾脏中 Caspase-3 蛋白表达水平明显高于假手术组 ($P=0.000$), Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平明显低于假手术组 ($P=0.003, P=0.004$); 研究组小鼠肾脏中的 Caspase-3 蛋白表达水平明显低于假手术组 ($P=0.000$), Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平明显高于假手术组 ($P=0.007, P=0.000$) (表 4、图 3)。

表 3 各组小鼠肾小管上皮细胞凋亡评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡评分
假手术组 ($n=20$)	1.51 ± 0.15
模型组 ($n=20$)	3.89 ± 0.23
研究组 ($n=20$)	2.01 ± 0.17
F 值	905.925
P 值	0.000

表 4 各组小鼠肾脏中 Caspase-3、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Akt	p-Akt	Caspase-3
假手术组 ($n=20$)	0.55 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.61 ± 0.03
模型组 ($n=20$)	0.84 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.83 ± 0.05
研究组 ($n=20$)	0.58 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.60 ± 0.06
F 值	224.412	152.889	144.857
P 值	0.000	0.000	0.000

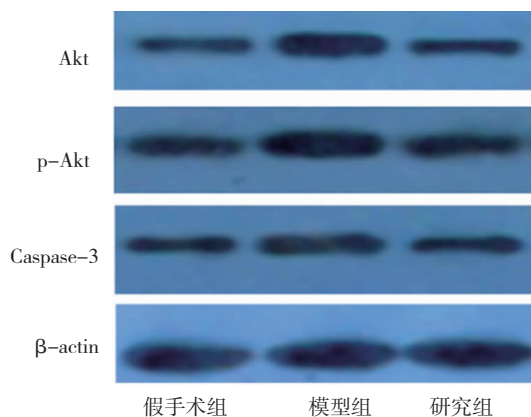


图3 各组小鼠肾脏中 Caspase-3、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平

3 讨论

促红细胞生成素是肾脏分泌的一种激素,在临床上广泛应用于治疗性贫血。近年来动物体内研究发现,促红细胞生成素可以有效改善缺血再灌注对肾脏造成的损伤^[7]。有研究发现促红细胞生成素起到预防和改善肾缺血再灌注损伤的最低给药剂量是 500 U/kg,但促红细胞生成素的给药剂量为 100 U/kg 时即可产生明显的促进红细胞生成作用,如果体内红细胞生成过多会导致血液黏度过度增高、降低血液灌注、增高血栓形成风险等严重不良反应。促红细胞生成素保护作用的剂量明显高于促红细胞生成的剂量^[8-9]。这一问题阻碍了促红细胞生成素预防和改善肾缺血再灌注损伤。Brines M 等^[4]在促红细胞生成素的空间结构基础之上合成了由 11 个氨基酸残基所组成的线性多肽——促红细胞生成素衍生肽。研究发现促红细胞生成素衍生肽可以和体内的促红细胞生成素受体结合,可以产生保护作用,但不会影响红细胞增殖^[5]。这项研究提示促红细胞生成素衍生肽在不产生血液黏度过度增高、降低血液灌注、增高血栓形成风险等严重不良反应的情况下预防和治疗缺血再灌注损伤。已经有研究表明促红细胞生成素衍生肽可以改善心肌缺血再灌注损伤。

肾移植、肾脏外科手术、肾脏体外冲击波碎石等操作均会对肾脏造成缺血再灌注损伤,是临床中常见的疾病^[10-11]。肾脏的缺血再灌注所造成的损伤明显严重于单纯的缺血损伤,严重的肾小管损伤、肾小球内皮细胞损伤、肾小管间质纤维化、肾脏功能降低是导致急性肾功能衰竭的重要原因^[12]。多年来国内外学者试图寻找能有效预防和治理肾缺血再灌注损伤的药物和治疗方法,但每种方法均不能有

效解决该问题。本研究采用夹闭缺血后再放开灌注小鼠单侧肾蒂的方法复制小鼠肾缺血再灌注损伤动物模型,模型组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平、肾小管上皮细胞凋亡评分明显高于假手术组;模型组小鼠很多肾小管的上皮细胞出现肿胀、空泡变性,部分肾小管上皮细胞出现片状坏死脱落、肾小管管腔扩张。上述结果说明使用夹闭和放开小鼠单侧肾蒂的方法成功复制肾缺血再灌注损伤模型。另外,研究发现研究组小鼠血清中的 Scr 和 BUN 水平、病理损伤程度、肾脏病理损伤评分及肾小管上皮细胞凋亡评分明显低于模型组,说明促红细胞生成具有很好的改善肾缺血再灌注损伤的作用。

肾缺血再灌注损伤的过程中有多种生物活性因子和信号转导通路参与,这些生物活性因子水平异常变化及信号转导异常激活,引起细胞凋亡和坏死,降低肾功能的正常发挥^[13-14]。PI3K/Akt 信号转导通路是机体中重要的细胞凋亡信号转导通路,该信号转导通路的激活,可以调控下游凋亡蛋白和凋亡基因表达,调控细胞凋亡^[15]。Caspase-3 是机体重要的凋亡因子,机体中 Caspase-3 水平增高,会促进细胞凋亡^[16]。PI3K/Akt 信号转导通路在缺血再灌注损伤过程中起重要作用。本研究通过促红细胞生成素衍生肽干预的肾缺血再灌注损伤小鼠肾脏中的 Akt、p-Akt 和 Caspase-3 蛋白表达水平均较模型组减少,说明促红细胞生成素衍生肽可能是通过调控 PI3K/Akt 信号转导通路调控机体凋亡蛋白的表达实现降低肾缺血再灌注损伤。

综上所述,促红细胞生成素衍生肽对肾缺血再灌注有明显改善作用,这种改善作用可能是通过调控 PI3K/Akt 信号转导通路调控机体凋亡蛋白的表达来实现的。

参 考 文 献

- [1] Koo TY, Lee JG, Yan JJ, et al. The P2X7 receptor antagonist, oxidized adenosine triphosphate, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by expansion of regulatory T cells[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(2): 415-431.
- [2] Wang J, Hong Z, Zeng C, et al. NADPH oxidase 4 promotes cardiac microvascular angiogenesis after hypoxia/reoxygenation *in vitro*[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69: 278-288.

- [3] Zhao XF, Liu YH, Han ZM, et al. Effect of erythropoietin on the expression of dynamin-related protein-1 in rat renal interstitial fibrosis[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(6): 2065-2071.
- [4] Brines M, Patel NS, Villa P, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(31): 10925-10930.
- [5] Ueba H, Brines M, Yamin M, et al. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14357-14362.
- [6] 朱建峰, 秦 俭, 赵 倩, 等. 重组人促红细胞生成素对缺血后处理大鼠心脏保护作用及对 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(7): 822-825.
- [7] Zhang J, Zhao D, Na N, et al. Renoprotective effect of erythropoietin via modulation of the STAT6/MAPK/NF- κ B pathway in ischemia/reperfusion injury after renal transplantation[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 41(1): 25-32.
- [8] Liu C, Shen Z, Liu Y, et al. Sevoflurane protects against intestinal ischemia-reperfusion injury partly by phosphatidylinositol 3 kinases/Akt pathway in rats[J]. *Surgery*, 2015, 157(5): 924-933.
- [9] Weltelt L, Rondinelli B, Bello R, et al. A single dose of erythropoietin reduces perioperative transfusions in cardiac surgery: results of a prospective single-blind randomized controlled trial[J]. *Transfusion*, 2015, 55(7): 1644-1654.
- [10] Yao M, Rogers M, Csanyi G, et al. Thrombospondin-1 activation of signal-regulatory protein- α stimulates reactive oxygen species production and promotes renal ischemia reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(6): 1171-1186.
- [11] Pasek JC, Wang X, Colbran RJ. Differential CaMKII regulation by voltage-gated calcium channels in the striatum[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 9(68): 234-243.
- [12] Ruan Y, Wang L, Zhao Y, et al. Carbon monoxide potentially prevents ischemia-induced high-mobility group box 1 translocation and release and protects against lethal renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(3): 525-537.
- [13] Bi W, Bi Y, Gao X, et al. Indole-TEMPO conjugates alleviate ischemia-reperfusion injury via attenuation of oxidative stress and preservation of mitochondrial function[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(9): 2545-2568.
- [14] Che N, Ma Y, Xin Y. Protective role of fucoidan in cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(3): 272-278.
- [15] Zhang J, Zou YR, Zhong X, et al. Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signaling[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2015, 20(4): 266-272.
- [16] Zhu QW, Li YG. Berberine attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing the activation of PI3K/AKT signaling[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(3): 978-984.

(责任编辑:冉明会)