

雌二醇调控PI3K/Akt通路在大鼠肺泡II型上皮细胞 缺氧/复氧损伤中的作用

杨会^{1#} 李珊珊^{1#} 陈磊杰² 王忠慧¹ 龚伶俐¹ 廖珊¹ 陈帘璞¹ 叶克中¹ 赵敏^{1*}

(¹昆明医科大学第三附属医院麻醉手术科, 昆明 650118; ²昆明医科大学第二附属医院骨科, 昆明 650106)

摘要 该文探讨了雌二醇在大鼠肺泡II型上皮细胞(AECII)缺氧/复氧(H/R)损伤中的作用及其机制。使用AECII构建H/R损伤模型, 将AECII细胞随机分为正常对照组(NC组)、缺氧/复氧损伤组(HR组)、不同浓度雌二醇预处理+缺氧/复氧损伤组(E2+HR组)。倒置显微镜观察各组细胞形态学变化; CCK-8法检测各组细胞活力; ELISA法检测细胞培养物上清中IL-6、TNF- α 的水平; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; Western blot检测Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 和Caspase-3的表达水平。结果显示, 与NC组相比, 其余各组细胞活力显著下降, IL-6、TNF- α 表达水平显著增加, 细胞凋亡水平增加, Akt、P-Akt、P-Gsk3 β 表达水平降低, Caspase-3表达水平增加; 与HR组相比, E2+HR组细胞活力升高, IL-6、TNF- α 表达水平降低, 细胞凋亡水平降低, Akt、P-Akt、P-Gsk3 β 蛋白表达水平升高, Caspase-3蛋白表达水平降低。由此提示, PI3K/Akt信号通路参与了大鼠AECII的H/R损伤过程; 雌二醇可减轻H/R引起的大鼠AECII损伤, 其机制与激活PI3K/Akt信号通路、减少细胞凋亡、增加细胞活力有关。

关键词 雌二醇; PI3K/Akt通路; 缺氧/复氧损伤; 肺泡II型上皮细胞

The Role of PI3K/Akt Pathway Regulated by Estradiol in Hypoxia/Reoxygenation Injury of Rat Alveolar Epithelial Type II Cells

YANG Hui^{1#}, LI Shanshan^{1#}, CHEN Leijie², WANG Zhonghui¹, GONG Lingli¹,

LIAO Shan¹, CHEN Lianpu¹, YE Kezhong¹, ZHAO Min^{1*}

(¹Department of Anesthesia and Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, China;

²Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106, China)

Abstract This study investigated the role and mechanism of estradiol in H/R (hypoxia/reoxygenation) injury of rat AECII (alveolar epithelial type II cells). AECII were used to establish H/R injury model, which were randomly divided into normal control group (NC group), hypoxia/reoxygenation injury group (HR group) and estradiol pretreatment with different concentrations+hypoxia/reoxygenation injury group (E2+HR group). The morphological changes of cells in each group were observed using inverted microscope. Cell viability was detected by cell counting kit-8 assay, and apoptosis rate was detected by flow cytometry. The levels of IL-6 and TNF- α in cell culture supernatant were determined by ELISA. The expression levels of Akt, P-Akt, Gsk3 β , P-Gsk3 β and Caspase-3 were

收稿日期: 2022-09-28 接受日期: 2022-11-30

云南省教育厅科学研究基金(批准号: 2022J0200)和云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金(批准号: 202201AY070001-166)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13529351126, E-mail: zm750618@163.com

Received: September 28, 2022 Accepted: November 30, 2022

This work was supported by the Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education (Grant No.2022J0200) and the Grants from the Science and Technology Department of Yunnan Province, Kunming Medical University Joint Special Project (Grant No.202201AY070001-166)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13529351126, E-mail: zm750618@163.com

measured by Western blot assays. The results showed that compared with NC group, the cell viability decreased, apoptosis rates increased significantly in the other groups. The expression of IL-6 and TNF- α increased significantly, the expression of Akt, P-Akt, and P-Gsk3 β decreased, and Caspase-3 expression increased. E2+HR group had a higher cell viability, lower expression of IL-6 and TNF- α , and lower apoptosis rate compared with HR group. The expression of Akt, P-Akt and P-Gsk3 β increased, while Caspase-3 expression decreased. These results elucidate that PI3K/Akt signaling pathway is involved in H/R injury of rat AECII. Estradiol can reduce AECII injury induced by H/R in rats, and its mechanism is related to activating PI3K/Akt signal pathway, reducing cell apoptosis and promoting cell viability.

Keywords estradiol; PI3K/Akt pathway; hypoxia/reoxygenation injury; alveolar epithelial type II cells

肺缺血再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)是指肺组织经过一段时间缺血处理后重新恢复血流灌注,缺血导致的肺组织损伤非但没有减轻反而加重的现象。临床上,LIRI常发生于肺移植、心肺联合移植、体外循环、失血性休克、肺栓塞或局部晚期肺癌的扩大手术等过程中。目前,LIRI的发病机制尚未被完全阐明,其可能与缺血再灌注过程中自由基大量产生、炎症反应激活、内质网应激、细胞内钙超载、细胞凋亡等有关。因此,深入解析LIRI的病理发生过程,对于精准预防和治疗肺血管阻断再通后导致的肺损伤及改善预后具有重要的研究意义和临床价值。

PI3K/Akt/Gsk3 β 信号转导通路的激活与调控在细胞凋亡中发挥着重要的生物学功能^[1-2],抑制细胞凋亡是进行LIRI后肺保护的主要方式之一^[3-4]。胞外信号分子激活PI3K/Akt通路,引起Ser9位点磷酸化导致Gsk3 β 失活,从而减少了相关凋亡蛋白如Caspase-3等的激活,降低了核蛋白的分解与DNA链的断裂,抑制了细胞凋亡^[5-6]。雌二醇(estradiol, E2)是人体重要的类固醇激素,其可以调控炎症、免疫等反应,还有促进血管再生、保护血管内皮功能的作用。研究表明,雌二醇对多种器官的缺血再灌注损伤都具有保护作用,可能与减少氧自由基产生量、抑制细胞凋亡等有关,其与PI3K/Akt信号通路也有着千丝万缕的联系。因此,本实验通过建立大鼠肺泡II型上皮细胞(type II alveolar epithelia cells, AECII)缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤细胞模型,探讨雌二醇在大鼠AECII H/R损伤中的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞与试剂

大鼠AECII由中国科学院上海生命科学研究院

细胞资源中心提供;胎牛血清、DMEM培养基购自美国Hyclone公司;大鼠IL-6、TNF- α ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;CCK-8试剂盒及Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 、Caspase-3抗体均购自美国Abcam公司;细胞凋亡检测试剂盒购自武汉Elabscience公司;雌二醇购自北京索莱宝科技有限公司;PBS(0.01 mol/L, pH7.4)等由云南省肺癌重点实验室自备。

1.2 细胞模型制备及分组

将细胞从-80 °C冰箱中取出,37 °C水浴1 min使其融化,经过1 000 r/min离心5 min后吸弃上清,加入2 mL含10%胎牛血清的DMEM培养液重悬细胞,并将其转移到T25培养瓶中,加入适量培养基,仔细标记后放置于5% CO₂、37 °C的细胞培养箱中培养,根据细胞状态每1~2天更换细胞培养基,待细胞密度大于80%时,按1:3的比例对细胞进行传代。将细胞随机分为正常对照组(NC组)、缺氧/复氧损伤组(HR组)、雌二醇预处理+缺氧/复氧损伤组(E2+HR组)。^①HR组造模方法:将对数生长期AECII细胞的DMEM完全培养基更换为无血清的F12K培养基,于常氧培养箱中预处理1 h。随后将细胞培养液换为“缺血培养液”——无糖的氧糖剥夺液OGD液,并置于缺氧培养箱(94% N₂、5% CO₂、1% O₂)内缺氧处理6 h,之后再次更换细胞培养液为无血清的F12K培养基,在常氧培养箱内复氧处理24 h。^②E2+HR组在造模开始前加入不同浓度雌二醇(2.5、10、20、30 nmol/L)预处理细胞12 h^[7]。^③NC组细胞不做缺氧复氧处理,其余操作均与HR组同步进行。

1.3 CCK-8检测雌二醇对正常AECII细胞的毒性作用以及对各组细胞活力的影响

将对数生长期的AECII细胞按每孔 1×10^4 个细胞接种于96孔板,各组细胞处理结束后,弃去培养液并

用PBS洗涤, 每孔加入110 μL CCK-8混合液, 常氧培养箱中孵育30 min, 每组设6个复孔, 且加设空白对照组, 用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(D)值。

1.4 IL-6、TNF- α 水平测定

细胞处理结束后, 收集各组细胞上清液, 每孔加入100 μL 标准品或细胞上清液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, 弃液、甩干, 然后每孔加入100 μL 生物素标记抗体(抗体稀释比例为1:1 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h; 弃液、甩干, 洗板3次, 加入100 μL 辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h; 弃液、甩干, 洗板5次, 加入90 μL 底物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10~20 min; 加入50 μL 终止液终止反应, 立即在450 nm波长处测量各孔 D 值。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

细胞处理结束后, 按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书操作; 把细胞培养液转移至离心管内, PBS洗涤贴壁细胞1次, 加入胰酶消化细胞; 室温孵育细胞至轻轻吹打可以吹打下来时, 吸除胰酶, 避免胰酶消化不足或者消化过度。加入收集的细胞培养液, 轻轻吹打至均匀, 转移至离心管内, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 1 mL PBS轻轻重悬细胞并计数, 1 000 r/min离心5 min收集细胞; 用预冷的PBS溶液洗涤细胞2次, 每次均以300 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min收集细胞, 并尽量去除PBS溶液; 加入100 μL 结合缓冲液重悬细胞; 加入5 μL Annexin V-FITC染色液和10 μL PI染色液后混匀; 室温下避光孵育10~15 min, 随后加入400 μL 结合缓冲液, 混匀, 置于冰上, 立即用流式细胞仪检测。

1.6 Western blot检测Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 和Caspase-3的表达水平

细胞处理结束后, 加入500 μL RIPA裂解液(1:100), 提取各组细胞蛋白。蛋白定量后上样进行凝胶电泳, 并转膜至PVDF膜上(湿转), 随后用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 用鼠抗Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 、Caspase-3抗体(抗体稀释比例均为1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床孵育过夜后, TBST洗膜4次, 用辣根过氧化物酶标记的对应二抗(抗体稀释比例均为1:2 000)室温孵育2 h。使用免疫条带ECL法显色, 应用荧光化学发光成像系统进行图像采集, 采用Image Lab软件分析条带。

1.7 统计学分析

所有数据均应用SPSS 23.0软件进行分析。数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较使用LSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.000 1$ 。

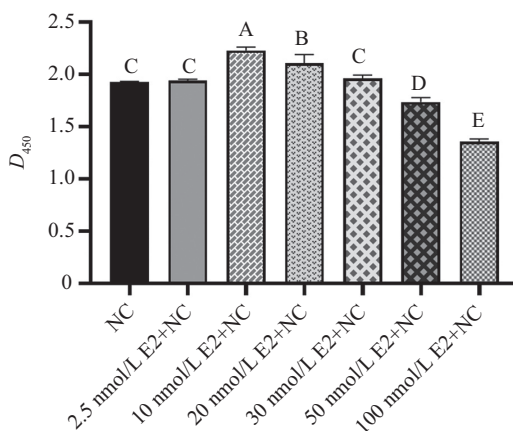
2 结果

2.1 不同浓度雌二醇对正常AECII细胞毒性的影响

雌二醇对正常AECII细胞的毒性与其浓度相关, 2.5 nmol/L雌二醇处理组与NC组相比细胞活力无明显差异, 从10 nmol/L雌二醇处理开始随着浓度的增加, 细胞活力明显下降。与NC组相比, 50、100 nmol/L雌二醇处理后细胞活力显著降低($P<0.05$)(图1)。

2.2 细胞形态学变化

倒置显微镜下可见NC组细胞贴壁生长, 呈梭



NC: 正常对照组; E2: 雌二醇。A、B、C、D、E不同字母表示组间比较有统计学差异($P<0.05$), 相同字母表示组间比较无统计学差异($P>0.05$)。NC: normal control group; E2: estradiol. Different letters of A, B, C, D and E indicate that there is a statistical difference between groups ($P<0.05$), and the same letter indicates that there is no statistical difference between groups ($P>0.05$).

图1 不同浓度雌二醇对正常AECII细胞的毒性作用

Fig.1 Toxic effect of estradiol at different concentrations on normal AECII cells

形、扁圆形等,细胞核、细胞膜完整,上清液干净;其余各组细胞经过HR后,贴壁细胞数量明显减少,细胞形态发生改变,细胞变圆或长出分支,有些细胞呈颗粒状,细胞膜完整、但胞核脆裂,上清液浑浊。与HR组比较,E2+HR组贴壁细胞相对较多,脱落的细胞减少(图2)。

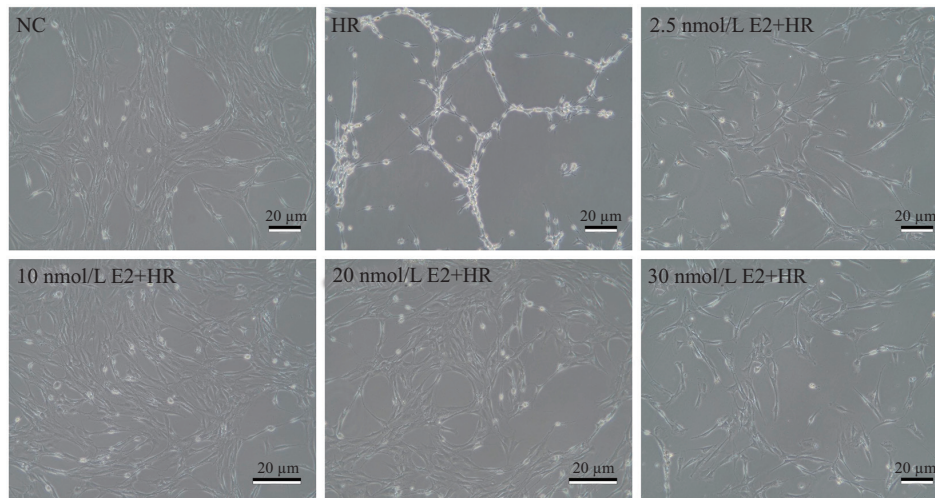
2.3 各组细胞活力检测

与NC组相比,其余各组细胞活力均明显下降($P<0.05$);与HR组相比,不同浓度E2+HR组细胞活力

有所恢复但较NC组仍为低($P<0.05$),其中10 nmol/L和20 nmol/L E2预处理组细胞活力恢复最为明显(图3)。因此,选择相对较小的浓度10 nmol/L作为后续实验中E2处理细胞的浓度。

2.4 IL-6、TNF- α 水平检测

与NC组相比,HR组和E2+HR组IL-6表达水平显著升高[(53.00 \pm 1.96) pg/mL、(25.58 \pm 0.98) pg/mL vs (10.74 \pm 0.27) pg/mL]($P<0.05$);与HR组相比,E2+HR组IL-6表达量减少($P<0.05$);与NC组相比,HR组和E2+HR

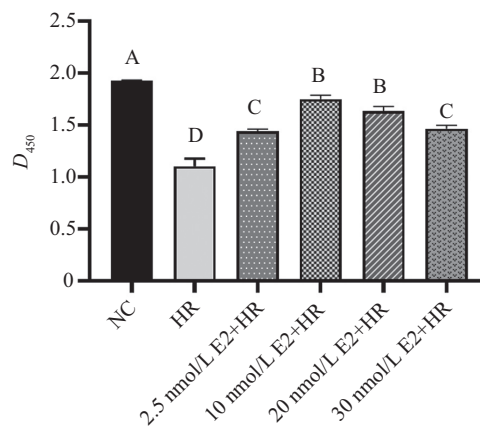


NC: 正常对照组; HR: 缺氧/复氧损伤组; E2: 雌二醇。

NC: normal control group; HR: hypoxia/reoxygenation injury group; E2: estradiol.

图2 NC组、HR组及不同浓度雌二醇预处理组在光镜下的细胞形态学变化

Fig.2 Morphological changes of cells in NC group, HR group and different concentrations of estradiol pretreatment groups under light microscope

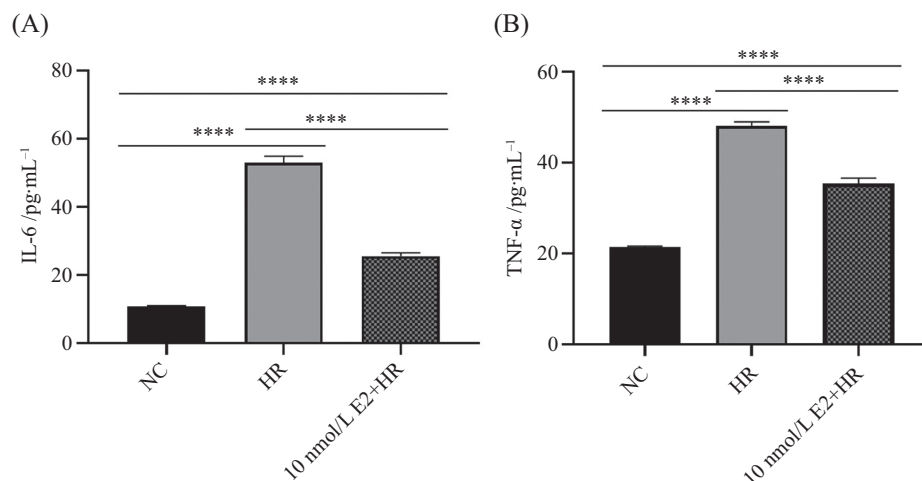


NC: 正常对照组; HR: 缺氧/复氧损伤组; E2: 雌二醇。A、B、C、D不同字母表示组间比较有统计学差异 $P<0.05$, 相同字母表示组间比较无统计学差异 $P>0.05$ 。

NC: normal control group; HR: hypoxia/reoxygenation injury group; E2: estradiol. Different letters of A, B, C and D indicate that there is a statistical difference between groups ($P<0.05$), and the same letter indicates that there is no statistical difference between groups ($P>0.05$).

图3 CCK-8检测NC组、HR组及不同浓度雌二醇预处理组细胞活力变化

Fig.3 CCK-8 was used to detect the changes of cell viability in NC group, HR group and different concentrations of estradiol pretreatment groups



A: ELISA检测IL-6表达水平; B: ELISA检测TNF- α 表达水平。NC: 正常对照组; HR: 缺氧/复氧损伤组; E2: 雌二醇。**** $P < 0.0001$ 。

A: the expression of IL-6 was detected by ELISA; B: the expression of TNF- α was detected by ELISA. NC: normal control group; HR: hypoxia/reoxygenation injury group; E2: estradiol. **** $P < 0.0001$.

图4 NC组、HR组及E2+HR组IL-6、TNF- α 表达水平

Fig.4 IL-6 and TNF- α expression in NC, HR and E2+HR groups

组TNF- α 表达水平显著升高[(48.08 \pm 0.92) pg/mL、(35.49 \pm 1.14) pg/mL vs (21.48 \pm 0.21) pg/mL]($P < 0.05$); 与HR组相比, E2+HR组TNF- α 表达量减少($P < 0.05$)(图4)。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

细胞处理结束后, NC组、HR组和E2+HR组细胞凋亡率检测结果分别为(2.60 \pm 0.10)%、(6.83 \pm 0.31)%、(4.53 \pm 0.21)%。与NC组相比, 其余各组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$); 与HR组相比, E2+HR组细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)(图5)。

2.6 Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 和Caspase-3表达水平检测

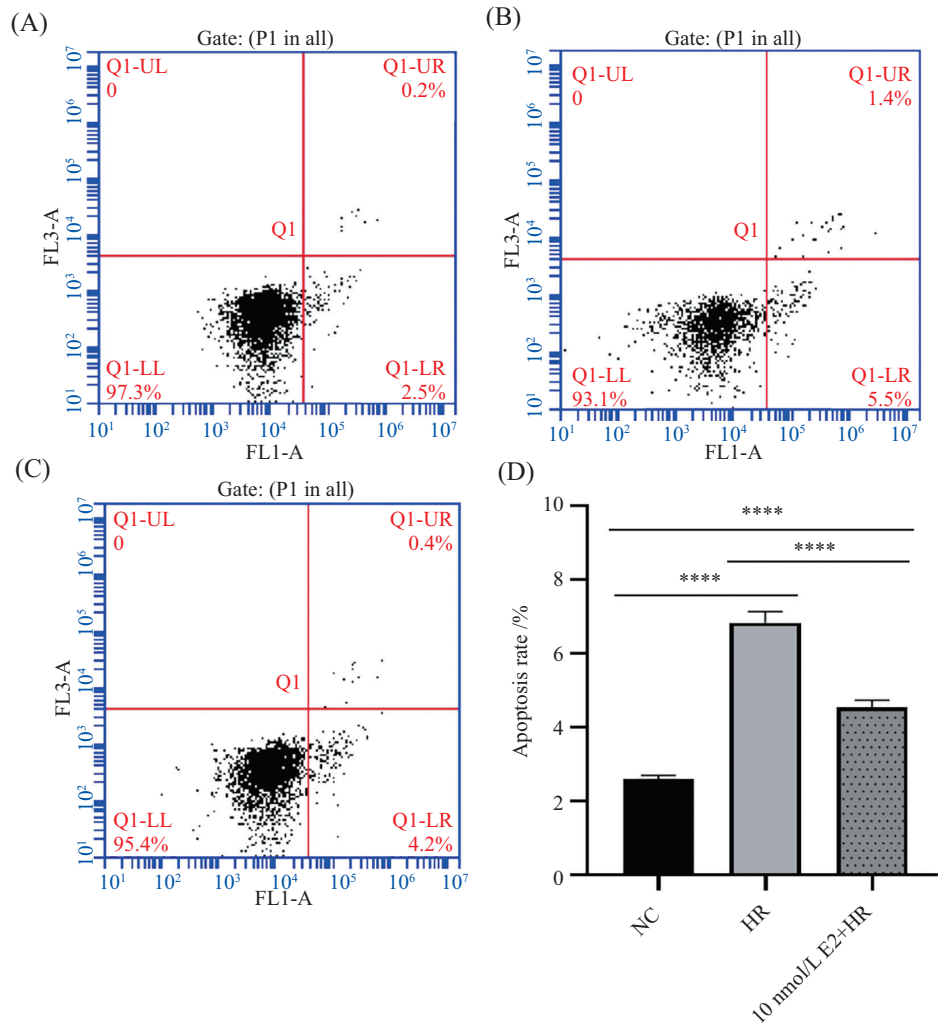
与NC组相比, HR组和E2+HR组Akt、P-Akt、P-Gsk3 β 表达水平降低, Caspase-3表达水平增加($P < 0.05$); 与HR组相比, E2+HR组Akt、P-Akt、P-Gsk3 β 表达水平升高, Caspase-3表达量减少($P < 0.05$); 另外, HR组Gsk3 β 表达水平高于NC组($P < 0.05$), 其余组间Gsk3 β 表达水平无显著差异($P > 0.05$)(图6)。

3 讨论

在本实验中, 作者设计并建立了AECII缺氧/复氧损伤细胞模型, 通过不同浓度雌二醇的干预, 检测了各组细胞活力, IL-6、TNF- α 水平, 细胞凋亡情况以及Akt、P-Akt、Gsk3 β 、P-Gsk3 β 、Caspase-3表达水平, 从而了解雌二醇调控PI3K/Akt通路在AECII缺氧/复氧损伤中的部分保护作用机制。

研究表明约20%术后早期死亡与LIRI有关, LIRI是肺移植术后及肺循环阻断术后呼吸衰竭及其他相关并发症的首要原因。LIRI可以促进多种炎症因子(例如IL-6、IL-1和TNF- α 等)的表达、释放^[8-9]。这些炎症因子通过改变促炎因子及抗炎因子的表达, 促进中性粒细胞在肺组织中的聚集和活化, 引起肺组织的炎性损伤, 从而影响肺泡表面活性物质的功能, 导致细胞功能紊乱, 进而加重肺组织的损伤。本实验结果显示, 雌二醇对正常AECII细胞的毒性与其浓度相关, 随着雌二醇预处理浓度的增加, AECII的细胞活力明显下降, 以50、100 nmol/L雌二醇最为明显, 其中10 nmol/L和20 nmol/L雌二醇预处理后AECII的细胞活力恢复最为明显, 因此后续实验我们选择10 nmol/L雌二醇预处理细胞; 与NC组相比, 其余各组细胞形态学发生明显变化, 细胞活力显著下降, IL-6、TNF- α 表达量增加, AECII损伤加重, 提示H/R损伤模型构建成功。

大量的研究从基础到临床多角度探讨如何减轻LIRI^[10-12], 其机制涉及氧化应激损伤^[13-15]、钙超载、内质网应激损伤、炎性损伤^[16]、自噬和凋亡^[17]等众多路径及病理生理过程。抑制细胞凋亡是进行LIRI后肺保护的主要方式之一。除了细胞凋亡信号的传递直接参与调节细胞凋亡过程外, 许多调节分子也参与其中。PI3K/Akt/Gsk3 β 作为经典的细胞信号转导通路, 参与了细胞增殖和细胞凋亡等众多



A: 流式细胞仪检测NC组细胞凋亡水平; B: 流式细胞仪检测HR组细胞凋亡水平; C: 流式细胞仪检测10 nmol/L E2+HR组细胞凋亡水平。NC: 正常对照组; HR: 缺氧/复氧损伤组; E2: 雌二醇。**** $P < 0.0001$ 。

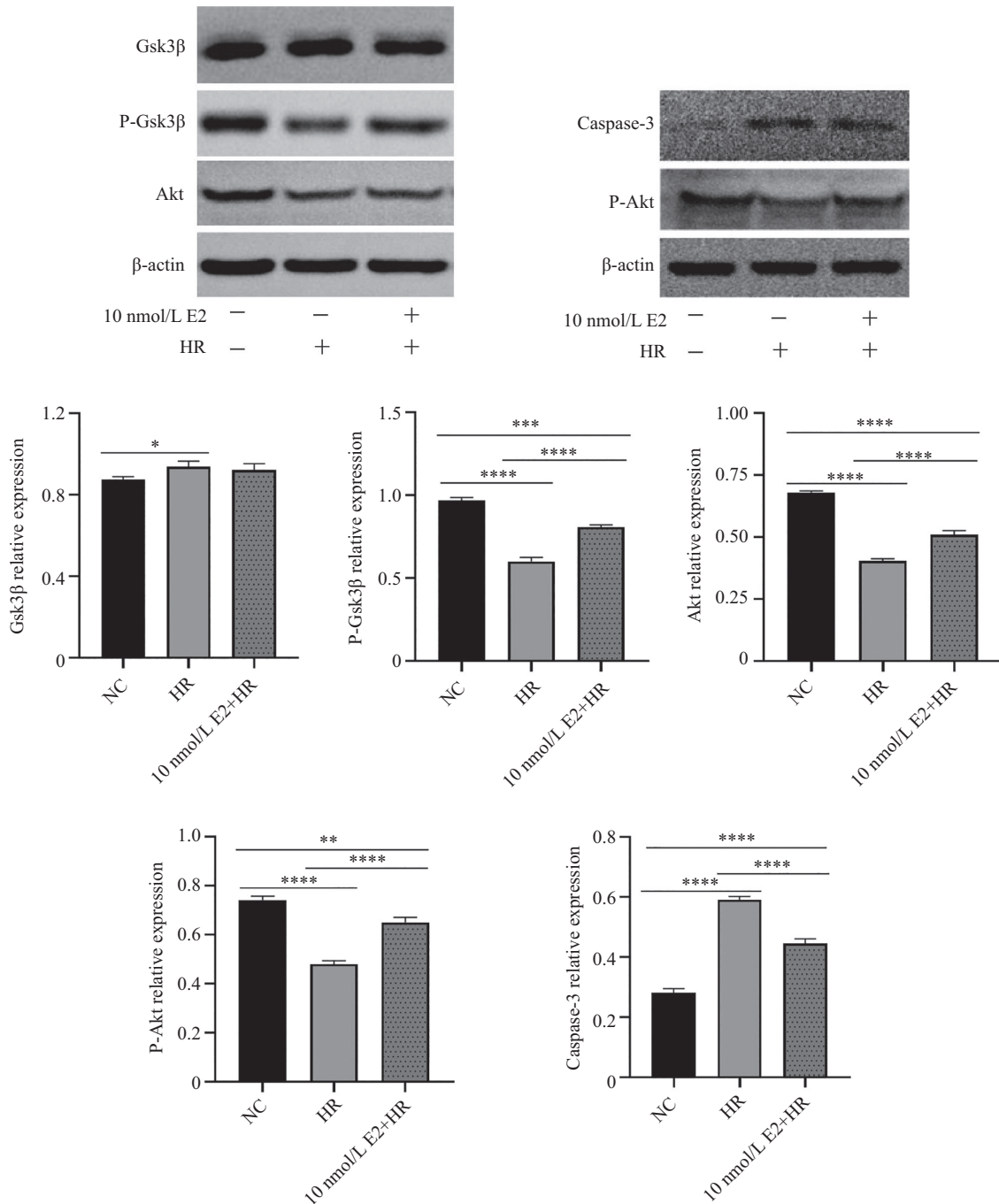
A: the level of apoptosis in NC group was detected by flow cytometry; B: the level of apoptosis in HR group was detected by flow cytometry; C: the level of apoptosis in 10 nmol/L E2+HR group was detected by flow cytometry. NC: normal control group; HR: hypoxia/reoxygenation injury group; E2: estradiol. **** $P < 0.0001$.

图5 NC组、HR组及E2+HR组细胞凋亡率比较

Fig.5 Comparison of apoptosis rates among NC, HR and E2+HR groups

过程。近年来大量研究提示该信号通路在缺血再灌注损伤以及器官保护等领域发挥了重要的作用。在生理、病理状态下,机体的免疫功能存在着非常大的性别差异,女性比男性有着更高的免疫球蛋白水平,对外源性抗原所引发的体液、细胞免疫反应也较强。在应激反应过程中,雄性激素可以抑制免疫反应,而雌性激素则可以增强免疫功能^[18]。研究发现,发情前期的雌鼠在创伤后器官功能可以保持相对正常,而发情期的雌鼠和雄鼠由于体内较低的雌激素水平,心脏和肝脏的功能受到明显抑制,雌激素似乎对机体所产生的有害因素有着某种保护作用^[19]。在动物心肌梗死模型中应用雌二醇后,可

以观察到心肌细胞凋亡数量和心肌梗死面积都明显减少^[20]。随着雌二醇研究越来越深入,更多的研究结果显示,雌二醇对多种器官的缺血再灌注损伤具有保护作用,其通过影响PI3K/Akt信号转导,抑制了炎症及凋亡信号转导,在骨、神经系统、心血管、肠道功能方面表现出了明显的保护作用^[21-24]。然而,在雌二醇对肺缺血再灌注损伤的保护作用方面的研究目前国内外还鲜有报道。因此,在本研究中通过应用雌二醇预处理AECII观察其对AECII H/R损伤的影响及作用机制。研究结果显示,与NC组相比,其余各组经过H/R损伤后Akt、P-Akt表达水平降低,Gsk3 β 表达水平增加,P-Gsk3 β 表达水平降



NC: 正常对照组; HR: 缺氧/复氧损伤组; E2: 雌二醇。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。
 NC: normal control group; HR: hypoxia/reoxygenation injury group; E2: estradiol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图6 NC组、HR组以及E2+HR组Gsk3β、P-Gsk3β、Akt、P-Akt和Caspase-3表达情况
 Fig.6 Gsk3β, P-Gsk3β, Akt, P-Akt and Caspase-3 expression in NC, HR and E2+HR group

低, 从而诱导细胞凋亡, 使得细胞凋亡率升高, Caspase-3表达增加; 而经过雌二醇预处理后PI3K/Akt信号通路被激活, Akt、P-Akt、P-Gsk3β表达水平有所回升, 从而抑制细胞凋亡, 使得细胞凋亡率明显下降, Caspase-3表达量减少。由此说明AECII经过H/R损伤后, PI3K/Akt信号通路被抑制, 这进而上调

了细胞凋亡水平, 加重了大鼠AECII的损伤程度, 而雌二醇预处理则减轻了这一损伤过程。

综上所述, 本研究提示PI3K/Akt信号通路参与了大鼠AECII的H/R损伤; 雌二醇可减轻H/R引起的大鼠AECII损伤, 其机制与激活PI3K/Akt信号通路、减少细胞凋亡、增加细胞活力有关。

参考文献 (References)

- [1] WEN B L, YU T, SHENG N C, et al. Rosmarinic acid ameliorates pulmonary ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 860994.
- [2] JUN L L, DONG D L, SONG C, et al. Sevoflurane preconditioning inhibits pulmonary apoptosis via PI3K/AKT in dog cardiopulmonary bypass model [J]. *Heart Surg Forum*, 2022, 25(3): 374-80.
- [3] GROSS G J, BAKER J E, MOORE J, et al. Abdominal surgical incision induces remote preconditioning of trauma (RPCT) via activation of bradykinin receptors (BK2R) and the cytochrome P450 epoxygenase pathway in canine hearts [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(6): 517-22.
- [4] GROSS G J, HSU A, GROSS E R, et al. Factors mediating remote preconditioning of trauma in the rat heart central role of the cytochrome P450 epoxygenase pathway in mediating infarct size reduction [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013, 18(1): 38-45.
- [5] TU Y, WAN L, FAN Y, et al. Ischemic preconditioning-mediated miRNA-21 protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via PTEN/Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75872.
- [6] HAN D, SUN J J, FAN D K, et al. Simvastatin ameliorates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced pulmonary endothelial barrier dysfunction by restoring cell-cell junctions and actin cytoskeleton dynamics via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5586-96.
- [7] 叶劲涛, 李锋涛, 宋焕瑾, 等. 人皂苷Rg1对氧糖剥夺/复氧复糖损伤PC12细胞的保护机制[J]. *中国组织工程研究*(YE J T, LI F T, SONG H J, et al. Ginsenoside Rg1 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in PC12 cells [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2019, 23(7): 1090-6.
- [8] ZHU B, YANG J R, CHEN S F, et al. The attenuation of lung ischemia reperfusion injury by oxymatrine [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 333-6.
- [9] GAO W, ZHAO J, KIM H, et al. Alpha1-Antitrypsin inhibits ischemia reperfusion induced lung injury by reducing inflammatory response and cell death [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2014, 33(3): 309-15.
- [10] CANBAZ S, DURAN E, EGE T, et al. The effects of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia-reperfusion injury during coronary artery surgery [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 51(2): 57-61.
- [11] RONG J, YE S, LIANG M Y, et al. Receptor for advanced glycation end products involved in lung ischemia reperfusion injury in cardiopulmonary bypass attenuated by controlled oxygen reperfusion in a canine model [J]. *ASAIO J*, 2013, 59(3): 302-8.
- [12] RONG J, YE S, WU Z K, et al. Controlled oxygen reperfusion protects the lung against early ischemia-reperfusion injury in cardiopulmonary bypasses by downregulating high mobility group box 1 [J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(4): 183-91.
- [13] MINZ M, HEER M, ARORA S, et al. Oxidative status in stable renal transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(7): 2020-1.
- [14] FONSECA I, REGUENGO H, ALMEIDA M, et al. Oxidative stress in kidney transplantation: malondialdehyde is an early predictive marker of graft dysfunction [J]. *Transplantation*, 2014, 97(10): 1058-65.
- [15] KAMIJYO Y, WANG L, MATSUMOTO A, et al. Long-term improvement of oxidative stress via kidney transplantation ameliorates serum sulfatide levels [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16(6): 959-67.
- [16] SHARMA A K, MULLOY D P, LE L T. NADPH oxidase mediates synergistic effects of IL-17 and TNF- α on CXCL1 expression by epithelial cells after lung ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(1): 69-79.
- [17] NG C S, WAN S, YIM A P. Pulmonary ischemia-reperfusion injury: role of apoptosis [J]. *Eur Respir J*, 2005, 25(2): 356-63.
- [18] KOICHI I, AKI E, SHINYA A, et al. Control of immunity and allergy by steroid hormones [J]. *Allergol Int*, 2022, 71(4): 432-6.
- [19] JARRAR D, WANG P, CIOFFI W G, et al. The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: 1015-21.
- [20] 钱鲁, 李卓远, 张素勤. 雌二醇对小鼠急性心肌梗死再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *温州医学院学报*(QIAN L, LI Z Y, ZHANG S Q. The protective effect of estradiol on cardiac function in ischemia reperfusion injury via MIF-AMPK signal pathway [J]. *Journal of Wenzhou Medical University*), 2021, 51(7): 548-53.
- [21] DONG X F, XU H Y, YI N L, et al. 17 β -estradiol on the expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) mitophagy, and the PI3K/Akt signaling pathway in ATDC5 chondrocytes *in vitro* [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 2(24): 1936-47.
- [22] HAN X, JIANG Y L, JIA L H, et al. 17 β -estradiol attenuates intracerebral hemorrhage-induced blood-brain barrier injury and oxidative stress through SRC3-mediated PI3K/Akt signaling pathway in a mouse model [J]. *ASN Neuro*, 2021, 13: 17590914211038443.
- [23] SONJA Z, EMINA S M, MILAN O, et al. Involvement of PI3K, Akt and RhoA in oestradiol regulation of cardiac iNOS expression [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2019, 17(3): 307-18.
- [24] QING H M, JUN L, YING C, et al. β -estradiol adjusts intestinal function via ER β and GPR30 mediated PI3K/AKT signaling activation to alleviate postmenopausal dyslipidemia [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114134.