

积雪草苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究

王 策

南阳医学高等专科学校基础医学部, 河南 南阳 473000

摘 要: **目的** 研究积雪草苷(AC)对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 初步探讨其机制。**方法** 40只SPF级Wistar大鼠, 随机分为假手术组、心肌缺血再灌注模型组及积雪草苷低、中、高剂量组, 每组8只。积雪草苷低、中、高剂量组分别以2.5、5.0、10.0 mL/kg体质量的剂量连续ig药液14 d, 药液质量浓度1.5 mg/mL。其他各组同时点ig 0.5%羧甲基纤维素钠溶液。除假手术组外, 其他各组结扎左冠状动脉前降支, 使心肌缺血30 min, 再灌注60 min。用7020全自动生化分析仪检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性和丙二醛(MDA)水平; ELISA法测定血清中C反应蛋白(CRP); TUNEL法检测各组大鼠缺血心肌细胞凋亡; RT-PCR法检测B细胞白血病/淋巴瘤-2基因(Bcl-2)和与Bcl-2相关的x蛋白(Bax)的mRNA表达。**结果** 与模型组比较, 积雪草苷各剂量组均能降低血清中LDH、CK-MB活性及MDA的量($P<0.05$), 升高血清中SOD活性($P<0.05$); 降低血清中CRP水平($P<0.05$); 降低心肌细胞凋亡指数($P<0.05$); 积雪草苷各组凋亡基因Bcl-2表达水平上升($P<0.05$), Bax表达水平下降($P<0.05$), Bcl-2/Bax比值升高($P<0.05$)。**结论** 积雪草苷预处理能通过减少心肌细胞凋亡、抗脂质过氧化物产生及抗炎症反应等机制, 对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用。

关键词: 积雪草苷; 缺血再灌注; 心肌细胞凋亡; C反应蛋白; 脂质过氧化物

中图分类号: R542.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2015)02-0151-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.007

Protective effect of asiaticoside on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Ce

Department of Basic Medicine, Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of asiaticoside (AC) on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats and study the protective mechanisms. **Methods** Forty SPF Wistar rats were selected and randomly divided into Sham-operated group (SH group), myocardial I/R model group (I/R group), AC low-dose group (AC-L group), AC middle-dose group (AC-M group), and AC high-dose group (AC-H group), there were eight rats in each group. Rats in the AC-L, AC-M, and AC-H groups were administered with AC at the dose of 2.5, 5.0, and 10.0 mL/kg by ig for 14 d, respectively, with the drug concentration of 1.5 mg/mL. While the rats in the other groups were given 0.5% solution of sodium carboxymethyl cellulose by ig at the same time. Except the rats in the SH group, left anterior descending coronary arteries of rats in other groups were ligated, the time of myocardial ischemia was 30 min, and the time of reperfusion was 60 min. The serum superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK-MB) activity, and malondialdehyde (MDA) content were detected by 7020 Automatic Biochemical Analyzer; Serum C-reactive protein (CRP) content was measured by ELISA. The ischemic myocardium apoptosis was detected by TUNEL method. The mRNA expressions of B-cell leukemia /lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated x protein (Bax) were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the I/R group, AC in each dose group could significantly reduce the levels of LDH, CK, and MDA in serum ($P<0.05$), obviously elevate the activity of SOD in serum ($P<0.05$), markedly decrease the level of CRP in serum ($P<0.05$), and remarkably reduce the index of myocardial apoptosis ($P<0.05$); AC in each dose group could increase the expression level of Bcl-2, decrease the expression level of Bax, and increase the ratio of Bcl-2/Bax. **Conclusion** AC by pretreatment has the protective effect on myocardial I/R injury in rats, the mechanisms may be related with reducing the myocardial apoptosis, anti-lipid peroxides, and anti-inflammatory. **Key words:** asiaticoside; ischemia-reperfusion; myocardial apoptosis; C-reactive protein; lipid peroxides

收稿日期: 2014-12-25

基金项目: 河南省南阳市 2012 年科技发展计划 (2012GG066)

作者简介: 王 策, 研究方向为基础医学。E-mail: nyyz0226@163.com Tel: (0377)63526123

缺血再灌注是临床心血管科常见病理现象,常见于溶栓治疗、冠状动脉介入治疗、冠状动脉支架植入、冠状动脉搭桥术等疾病。缺血再灌注对人类健康危害程度非常大,医务工作者对于心肌缺血再灌注的探索从未停止。积雪草为伞形科积雪草属植物,干燥全草入药,具有清热利湿、消肿解毒、活血化瘀、利尿之功效^[1],在我国传统医学中外用及内服治病已有两千多年历史。积雪草主要活性成分为三萜皂苷类物质,作者在前期的研究中发现积雪草的五环三萜皂苷类提取物积雪草苷具有良好的抗大鼠心肌梗死后心肌纤维化的作用^[2],国内李桂桂等^[3]报道羟基积雪草苷能预防离体大鼠心肌缺氧复氧损伤,对在体大鼠急性心肌缺血损伤具有一定的作用。在此研究基础上,本研究通过建立大鼠心肌缺血再灌注模型,以心肌酶学、C反应蛋白、心肌细胞凋亡及凋亡基因表达为观察指标,采用分子生物学和形态学相结合的研究方法,进一步深入研究积雪草苷对心肌缺血再灌注的保护作用,以期为中心肌缺血再灌注损伤干预开辟新的途径。

1 材料和方法

1.1 动物

40只SPF级Wistar大鼠,7~8周龄,体质量230~270g,购自河南省实验动物中心,合格证号SCXC(豫)2013-0003。

1.2 药物和试剂

积雪草苷片[上海现代制药股份有限公司,产品批号20120301,规格6mg/片(以积雪草总苷计)];C反应蛋白(CRP)ELISA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)、免疫染色洗涤液、蛋白酶K、抗荧光淬灭封片液(武汉博士德生物工程有限公司)、DAPI染液(江苏碧云天生物技术研究所);TaKaRa Total RNA提取试剂盒、TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2试剂盒(大连宝生物工程有限公司)等。

1.3 仪器

TKR-200C小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备公司);BL-420E+生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);TGuide-M16自动核酸提取仪(北京天根生化科技有限公司);PTC-200 PCR热循环仪(美国Bio-Rad公司);DNAJY3000+型多用途电泳仪、凝胶图像分析系统(北京东迅天地医疗仪器有限公司);Olympus荧光显微镜(日本Olympus

公司);TU-1901双束紫外可见分光光度计(美国Hach公司);20PR-5型低温离心机、7020全自动生化分析仪(日本日立公司)等。

1.4 分组及给药

40只大鼠适应性喂养3d后,随机分为假手术对照组、心肌缺血再灌注模型组和积雪草苷低、中、高剂量组,每组8只。各组动物以普通饲料分笼喂养,饲养环境温度22~24℃,湿度52%~58%,12h明暗交替。积雪草苷用0.5%羧甲基纤维素钠溶液配成质量浓度1.5mg/mL的混悬液,积雪草苷低、中、高剂量组分别按2.5、5、10mL/kg体质量的剂量ig药液(参考临床用药量,按人与大鼠体表面积之比换算)。假手术组和模型组同时点按5mL/kg体质量给予0.5%羧甲基纤维素钠溶液。各组大鼠每日早晚给药各1次,连续给药14d。

1.5 大鼠心肌缺血再灌注模型制作及采样

各组大鼠分组喂养14d后,参照文献方法制作大鼠心肌缺血再灌注模型^[4]。先称质量,再ip 10%水合氯醛300mg/kg麻醉后仰卧位固定于小动物解剖台上,常规行气管插管,连接HX-100E型MS4000小动物呼吸机辅助呼吸(潮气量12~15mL/kg,呼吸频率70~80次/min,呼吸比1:2)。开胸,完全暴露心脏,以5~0号手术线结扎左冠状动脉前降支,结扎后心肌颜色先变白而后变紫绀同时心电图标II导联或aVR导联ST段即刻抬高或倒置时,提示结扎成功。假手术组组左冠状动脉前降支只穿线不结扎,其余各组行缺血再灌注。结扎30min后松解结扎线,再灌注60min。再灌注60min后处死大鼠,于低温条件下迅速取出心脏,用1℃0.9%氯化钠溶液洗净残血,取结扎线下心脏中段横截面心肌组织,将其分成两份,一份用10%福尔马林中固定24h,再常规固定、包埋和制片,供检测心肌细胞凋亡指数(AI)。另一份置于-80℃超低温冰箱迅速冷冻,供检测B细胞白血病/淋巴瘤-2基因(Bcl-2)和与Bcl-2相关的x蛋白(Bax)表达。

1.6 检测指标

1.6.1 血清心肌酶学及丙二醛(MDA)测定 于再灌注60min时自腹主动脉采血2mL,用20PR-5型低温离心机以3000r/min离心10min取血清,用7020全自动生化分析仪检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性及MDA水平。

1.6.2 血清CRP检测 各组大鼠分别于冠状动脉

结扎 30 min 时自腹主动脉取血, 用 20PR-5 型低温离心机在 4 ℃ 下以 3 000 r/min 离心 10 min 取血清, 用 ELASA 定量检测试剂盒检测 CRP, 实际操作步骤严格按照 ELASA 试剂盒说明书进行。

1.6.3 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡 具体操作步骤严格按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行。将石蜡包埋心肌组织制成 2 μm 冰冻切片, 用抗荧光淬灭封片液封片后, 在荧光显微镜下观察: 未凋亡心肌细胞发出蓝色荧光, 凋亡心肌细胞核发出绿色荧光^[5]。心肌细胞 AI 的计算: 在 200 倍视野下, 标记每张切片缺血区和非缺血区, 在每张切片的缺血区随机摄取 5 个视野, 记录每个视野的绿色荧光及蓝色荧光心肌细胞核数, 推算出心肌凋亡细胞总数和心肌细胞总数, 再按公式 $AI = \text{心肌凋亡细胞总数} / \text{心肌细胞总数}$, 计算出 AI。以 5 个视野 AI 值的平均值作为各标本的心肌细胞 AI 值。

1.6.4 RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达 ①总 RNA 提取: 精确称取 -80 ℃ 冷冻保存的心肌组织 100 mg, 研碎后加入 1 mL Trizol 试剂匀浆, 提取总 RNA。具体操作步骤严格按 TaKaRa Total RNA 试剂盒说明书进行。提取液用紫外分光光度计测定 260、280 nm 处总 RNA 吸光度 (A) 值, 若所测 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0, 提示提取液 RNA 纯度达到要求^[6]。②RT-PCR: RT-PCR 反应即是由 RTase 将 RNA 反转录为 cDNA, 再扩增 cDNA 的反应。TaKaRa

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒可在同一反应管中连续进行此反应, 此反应需 30 个循环。具体操作步骤严格按 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒说明书进行。③产物检测及分析: PCR 结束后, 每只试管各取出 PCR 产物 5 μL, 分别加入 6 倍溴酚蓝缓冲液 1 μL 混合后, 上样于 2% 琼脂糖凝胶上进行稳压电泳, 电压设定为 7 V/cm, 45 min 后, 将电泳条带置于凝胶成像分析系统下, 观察、拍摄图像, 确定所分离的片段符合预期长度。

1.7 统计分析

测量数据用 SPSS15.0 软件包处理, 正态计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。两间组均数比较用 t 检验, 多组间均数比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 LDH、CK-MB、SOD 活性及 MDA 水平比较

与假手术组比, 模型组大鼠血清 LDH、CK-MB 及 MDA 显著升高, SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 积雪草苷预处理各组 LDH、CK-MB 及 MDA 水平均显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$); 与积雪草苷预处理低剂量组比较, 高、中剂量组 LDH、CK-MB、SOD 活性及 MDA 水平均有显著统计学差异 ($P < 0.05$); 高、中剂量组之间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 LDH、CK-MB、SOD 活性及 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison on activity of LDH, CK-MB, SOD in serum and MDA level of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	LDH/(U·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
假手术	—	148.37 ± 8.52	2.05 ± 1.01	0.75 ± 0.26	2.37 ± 0.83
模型	—	88.21 ± 3.87*	7.68 ± 1.36*	6.27 ± 1.09*	4.83 ± 0.16*
积雪草苷	2.5	108.19 ± 7.60 [#]	5.51 ± 1.07 [#]	4.86 ± 1.12 [#]	3.75 ± 1.18 [#]
	5.0	129.05 ± 8.11 ^{#Δ}	3.46 ± 1.12 ^{#Δ}	2.83 ± 1.14 ^{#Δ}	2.78 ± 1.07 ^{#Δ}
	10.0	126.22 ± 7.01 ^{#Δ}	3.53 ± 1.13 ^{#Δ}	2.71 ± 1.21 ^{#Δ}	2.83 ± 1.23 ^{#Δ}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与积雪草苷低剂量组比较: ^Δ $P < 0.05$; 下同

* $P < 0.05$ vs SH group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs AC-L group; same as below

2.2 各组大鼠血清 CRP 比较

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 CRP 含量显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示心肌梗死后发生了炎症反应。与模型组比较, 积雪草苷预处理各组 CRP 含量均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示积雪草苷具有抗心肌梗死引起的炎症反应作用; 与积雪草苷预处理低剂量组比, 高、中剂量组 CRP 含量均显著降低, 差异有统计学

意义 ($P < 0.05$); 高、中剂量组之间差异无统计学意义, 提示积雪草苷作用效果并不随着药物浓度增大而增大。见表 2。

2.3 积雪草苷对心肌细胞凋亡的影响

缺血区心肌组织切片经荧光染色处理后在荧光显微镜下可看到: 正常心肌细胞核呈蓝色荧光, 着色浅而均匀; 凋亡细胞核固缩, 或碎为不规则状, 呈现绿色明亮的强荧光, 见图 1。由图 1 可知, 假手术

组可见有少量散在的绿色荧光染色细胞核；模型组绿色荧光染色细胞数量明显增多；积雪草苷低、中、高剂量组的绿色荧光染色细胞较 IR 组明显减少，提示大鼠经积雪草苷治疗后心肌凋亡细胞明显减少。AI 结果见表 3。由见表 3 可知，与假手术组比较，模型组大鼠 AI 显著升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与模型组比，积雪草苷预处理各组 AI 均显著降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高、中剂量组 AI 较低剂量组显著降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高、中剂量组之间差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠血清 CRP 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of the content of serum CRP in each group rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	CRP/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	26.32±1.16
模型	—	257.25±2.35*
积雪草苷	2.5	176.36±2.09 [#]
	5.0	105.51±2.38 ^{#Δ}
	10.0	109.87±2.16 ^{#Δ}

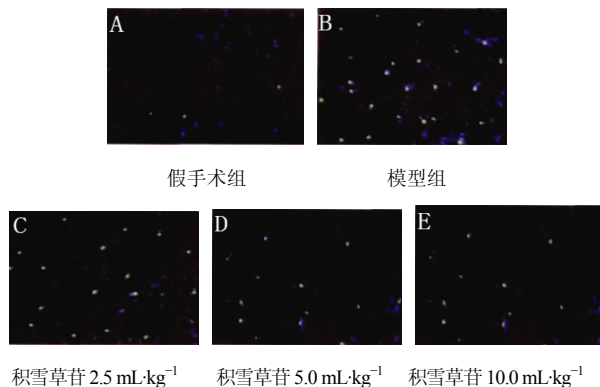


图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡荧光染色结果

Fig. 1 Fluorescent staining for myocardial apoptosis of rats in each group

表 3 各组大鼠心肌细胞凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison on myocardial apoptosis index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	AI/%
假手术	—	2.34±0.97
模型	—	20.07±2.16*
积雪草苷	2.5	16.76±2.05 [#]
	5.0	12.25±1.53 ^{#Δ}
	10.0	11.97±1.68 ^{#Δ}

2.4 积雪草苷对心肌凋亡蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果见表 4。与假手术组比较，模型组 Bcl-2 表达下降，Bax 表达上升，Bcl-2/Bax 比值下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与模型组比较，积雪草苷预处理各组 Bcl-2 表达均上升，Bax 表达均下降，Bcl-2/Bax 比值均上升，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高、中剂量组 Bcl-2 表达较低剂量组显著上升，Bax 表达显著下降，Bcl-2/Bax 比值显著上升，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；高、中剂量组之间差异无统计学意义。

表 4 各组大鼠心肌凋亡蛋白 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Expression levels of Bcl-2 and Bax mRNA of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2/Bax
假手术	—	1.57±0.03	0.47±0.04	3.34±0.02
模型	—	0.68±0.04*	0.94±0.05*	0.72±0.06*
积雪草苷	2.5	0.89±0.03 [#]	0.75±0.02 [#]	1.19±0.04 [#]
	5.0	1.17±0.12 ^{#Δ}	0.61±0.13 ^{#Δ}	1.92±0.11 ^{#Δ}
	10.0	1.15±0.09 ^{#Δ}	0.58±0.05 ^{#Δ}	1.97±0.07 ^{#Δ}

3 讨论

缺血性心脏病是临床心血管科常见病和多发病，以冠状动脉粥样硬化心脏病最为多见，而冠心病常常在溶栓治疗、冠状动脉介入治疗、冠状动脉支架植入、冠状动脉搭桥术等情况下发生缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤的机制非常复杂，其机制尚未完全清楚。国内外学者^[7-10]认为缺血再灌注后伴随炎症反应，炎症细胞浸润、释放炎症因子，造成血管内皮细胞受损，同时钙超载等多种因素参与其中。笔者认为氧自由基损伤在这一过程中发挥着关键作用。心肌在发生缺血再灌注损伤时，体内氧自由基与内源性氧自由基清除酶之间失去平衡，氧自由基大量产生，攻击细胞膜和细胞器膜，发生脂质过氧化反应，使细胞受伤，产生大量 MDA，故 MDA 可反映脂质过氧化程度，间接反映细胞损伤的程度。由本研究结果显示，缺血再灌注模型组血清 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$)，表明再灌注对心肌细胞膜发生了损伤。当心肌细胞膜完整性受到破坏时，内源性 LDH、CK-MB 便释放入血液中，导致浓度升高，故血清中 LDH、CK-MB 活性可作为判断心肌细胞受损程度的敏感指标。SOD 是体内

重要的内源性抗氧化酶,其活性高低可反映机体清除氧自由基能力的大小。从本实验结果来看,积雪草苷预处理各组血清MDA、LDH及CK-MB活性均显著降低($P<0.05$),血清中SOD活性显著升高($P<0.05$),提示积雪草苷预处理具有明显的抗脂质氧化反应的作用。

已有研究表明,心肌缺血再灌注损伤过程中伴随着炎症反应,炎症反应加重缺血再灌注损伤,炎症反应也是缺血再灌注损伤干预的重要靶点。CRP是重要的炎症信号通路之一,其可促进炎症介质的释放^[3]。CRP浓度的变化为心肌梗死危险性提供预后。本研究结果显示,积雪草苷预处理各组CRP浓度显著降低($P<0.05$),提示其有抗缺血再灌注损伤引起的炎症反应作用。缺血再灌注后心脏的生理功能受到破坏,而且心肌正常的组织结构也受到损伤。其受损的最主要表现形式是细胞凋亡。本实验结果显示,积雪草苷预处理各组均可降低心肌细胞AI($P<0.05$),上调凋亡基因Bcl-2的表达,降低Bax的表达,使Bcl-2/Bax比值上升。本实验中心肌细胞凋亡检测及Bcl-2、Bax表达结果均提示,积雪草苷预处理对缺血再灌注所致大鼠心肌细胞凋亡具有保护作用。

综上所述,积雪草苷预处理能通过减少心肌细胞凋亡、抗脂质过氧化物产生及抗炎症反应等机制,对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用。此研究结果也为积雪草苷的进一步开发提供动物实验依据。

参考文献

- [1] 段晓彦,李宏树,王丽红,等. 积雪草及其活性成分的国内外研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2009, 18(3): 252-255.
- [2] 王 策. 积雪草苷对心肌梗大鼠心肌纤维化影响的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(8): 19-22.
- [3] 李桂桂,卞广兴,任建平,等. 羟基积雪草苷对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 药学通报, 2007, 42(5): 475-480.
- [4] Skovsted G F, Kruse L S, Larsen R, *et al.* Heart ischaemia-reperfusion induces local up-regulation of vasoconstrictor endothelin ETB receptors in rat coronary arteries downstream of occlusion [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(11): 2726-2738.
- [5] Yang J, Chen L, Yang J, *et al.* MicroRNA-22 targeting CBP protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through anti-apoptosis in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(1): 555-561.
- [6] 宋旭东,陈爱华,刘映峰,等. 香芹酚预处理减轻小鼠心肌缺血再灌注时氧化应激及细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(11): 1624-1627.
- [7] Tas M H, Simsek Z, Ayan A, *et al.* Effects of tirofiban maintenance duration on myocardial perfusion defect severity in anterior myocardial infarction [J]. *Adv Ther*, 2013, 30(9): 834-844.
- [8] Yang X, Pinto D S, Chakrabarti A K. Optimizing reperfusion in patients with STEMI: a critical evaluation of pharmacologic and non-pharmacologic strategies [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2013, 13(6): 399-406.
- [9] Sivaraman V, Yellon D M. Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2014, 19(1): 83-96.
- [10] Wang Y, Zhang Z Z, Wu Y, *et al.* Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(10): 861-867.