

# 大黄酚改善缺血再灌注诱导的急性肾损伤的机制研究

杨雪<sup>1,2</sup>, 王燕青<sup>3</sup>, 邓敏<sup>1,2</sup>, 铁璐<sup>2\*</sup>, 李琳琳<sup>1,4\*</sup>

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 北京大学基础医学院, 北京 100191; 3. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006; 4. 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017)

**摘要:** 肾脏缺血再灌注损伤 (ischemic reperfusion injury, IRI) 是导致急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的主要原因, 预后不良且死亡率高。有报道提示大黄酚具有肾脏保护作用, 但其对 IRI 的影响及机制尚不清楚。本研究旨在探索大黄酚对 IRI 诱导的 AKI 的影响及其作用机制。通过建立小鼠单侧肾脏 IRI 模型, 观察肾脏组织病理变化, 检测血清中肌酐、尿素氮水平及肾组织中细胞凋亡、线粒体自噬相关蛋白的表达; 建立肾小管上皮细胞 (human kidney-2, HK-2) 缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 测定其线粒体膜电位水平及活性氧含量; 筛选大黄酚与 AKI 的相关作用靶点并进行功能富集分析, 对核心靶点、关键通路进行验证。动物实验经北京大学实验动物伦理委员会批准 (编号: LA2021503)。结果显示, 与假手术组相比, IRI 组小鼠血清肌酐、尿素氮水平升高, 肾组织结构明显遭到破坏, 肾损伤分子 (KIM1)、凋亡相关蛋白 (cleaved-caspase 3、caspase 3、cytochrome C)、线粒体自噬蛋白 (PINK1) 表达增加, 而大黄酚可呈剂量依赖性地改善上述病理变化, 并能够显著提高 H/R 条件下 HK-2 细胞线粒体膜电位, 抑制活性氧产生; 通过网络药理学分析发现 *HSP90AA1* 和 *PIK3R1* 为关键靶点, 主要富集于磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通路, 验证发现大黄酚能够显著降低 H/R 条件下 HK-2 细胞 *HSP90AA1* 和 *PIK3R1* mRNA 水平, 并增加 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平。综上, 大黄酚可能通过靶向调节 *HSP90AA1*、*PIK3R1*, 并活化 PI3K/Akt 通路, 减少细胞凋亡, 调节线粒体自噬, 提高线粒体膜电位, 抑制活性氧产生, 进而改善由 IRI 诱导的 AKI, 为急性肾损伤提供了潜在治疗方案。

**关键词:** 大黄酚; 急性肾损伤; 缺血再灌注损伤; 网络药理学; 线粒体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1295-11

## Mechanism of chrysophanol in improving acute kidney injury induced by ischemia reperfusion

YANG Xue<sup>1,2</sup>, WANG Yan-qing<sup>3</sup>, DENG Min<sup>1,2</sup>, TIE Lu<sup>2\*</sup>, LI Lin-lin<sup>1,4\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 4. Key Laboratory of Active Components of Xinjiang Natural Medicine and Drug Release Technology, Urumqi 830017, China)

**Abstract:** Kidney ischemia reperfusion injury (IRI) is a leading cause of acute kidney injury (AKI) with a poor prognosis and high mortality rate. Recent studies have reported that chrysophanol may have a renal protective effect, but its specific impact and mechanism on IRI remain unclear. This study aimed to explore the effects and mechanisms of chrysophanol on AKI induced by IRI. By utilizing a unilateral kidney IRI mouse model, histopathological changes in the kidney, serum levels of creatinine and urea nitrogen, and protein expressions of

收稿日期: 2024-02-22; 修回日期: 2024-04-01.

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发项目 (2023B02010); 中央引导地方科技发展资金项目.

\*通讯作者 Tel: 13325539393, E-mail: llltougao@sina.com;

Tel: 13501268196, E-mail: tielu@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0154

apoptosis and mitophagy in kidney tissue were examined. Additionally, a hypoxia/reoxygenation (H/R) model of human kidney-2 (HK-2) cells was established to measure mitochondrial membrane potential levels and reactive oxygen species (ROS). Functional enrichment analysis was performed to screen relevant targets of chrysophanol and AKI, and to verify key targets and pathways. The animal experiments conducted in this study were ethically approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Peking University (No. LA2021503). The findings indicate that the IRI group exhibited elevated levels of creatinine and urea nitrogen in serum, significant renal tissue damage, and increased expression of renal injury markers (KIM1), apoptosis-related proteins (cleaved-caspase 3, caspase 3, cytochrome C), and mitochondrial autophagy protein (PINK1) compared to the sham surgery group. Chrysophanol treatment ameliorated the aforementioned pathological changes in a dose-dependent manner in an IRI model. Additionally, it exhibited significant improvements in mitochondrial membrane potential and inhibition of ROS production in HK-2 cells subjected to H/R conditions. Through network pharmacological analysis, HSP90AA1 and PIK3R1 were identified as key targets primarily enriched in the phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway. Real-time quantitative PCR (qPCR) validation confirmed that chrysophanol significantly decreased *HSP90AA1* and *PIK3R1* mRNA levels in HK-2 cells under H/R conditions, while also enhancing the protein expressions of p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt. In conclusion, chrysophanol has the potential to enhance AKI by selectively modulating *HSP90AA1* and *PIK3R1*, activating the PI3K/Akt pathway, decreasing apoptosis, regulating mitochondrial autophagy, enhancing mitochondrial membrane potential, and suppressing ROS production. These findings suggest that chrysophanol could serve as a promising therapeutic option for the treatment of AKI.

**Key words:** chrysophanol; acute kidney injury; ischemia reperfusion injury; network pharmacology; mitochondria

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是一种以肾功能快速衰竭为特征的严重临床综合征, 具有高发病率、预后不良且死亡率高的特点, 被认为是引发慢性肾病和终末期肾病的独立风险因素<sup>[1,2]</sup>。AKI的发病机制复杂且多样化, 缺血再灌注损伤 (ischemic reperfusion injury, IRI)、梗阻性损伤、脓毒血症、肾脏微循环障碍、炎症和感染等均可能导致 AKI<sup>[3]</sup>。其中, IRI 是造成 AKI 最主要的途径, 临床上多发生于肾移植、肾部分切除术、复杂心血管手术等过程中<sup>[4]</sup>。IRI 诱导的 AKI 主要表现为肾小管上皮细胞的损伤和凋亡、炎症反应的激活及活性氧的产生和自噬激活等<sup>[5]</sup>。研究发现, 肾小管上皮细胞中的线粒体功能损伤在 IRI 发展过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。肾小管上皮细胞重吸收过程主要依靠线粒体脂肪酸氧化来提供能量, 线粒体功能障碍会导致其丰度降低、肿胀和嵴结构破坏, 而线粒体过度碎片化必然会影响肾小管上皮细胞的功能<sup>[6-8]</sup>。目前, 临床尚缺乏有效的预防措施和治疗药物用于已确诊的 AKI。

大黄酚 (chrysophanol, 也称 1,8-二羟基-3-甲基蒽醌) 是从大黄 (*Rhei Radix et Rhizoma*) 中分离的一种天然蒽醌衍生物, 具有抗癌、抗病毒、抗糖尿病、抗炎、抗原虫、降血脂、保肝、神经保护、抗溃疡和抗肥胖等多种药理作用<sup>[9,10]</sup>。研究表明, 大黄酚能够通过阻断核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 的 p50/p65 异二聚

体, 对局灶性脑 IRI 小鼠模型的缺血性脑损伤具有长期的神经保护作用<sup>[11]</sup>。最近有研究表明, 大黄酚具有肾脏保护作用的潜力, 如 Dou 等<sup>[12]</sup>发现大黄酚可以改善慢性肾病小鼠的肾功能, 延缓转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 刺激诱导的人肾细胞纤维化过程; Lin 等<sup>[13]</sup>证实大黄酚可以防止急性肾损伤转化为慢性肾病; Gu 等<sup>[14]</sup>还表明大黄酚可以显著降低慢性肾病小鼠的血肌酐水平, 改善肾纤维化, 并对肾足细胞显示出良好的保护作用。然而, 关于大黄酚对 IRI 诱导的急性肾损伤的潜在保护作用研究甚少, 其作用机制尚不清楚。

本研究采用体内小鼠肾脏 IRI 模型及体外肾小管上皮细胞缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 观察大黄酚对 IRI 肾脏组织病理变化, 探究大黄酚对肾小管上皮细胞线粒体稳态的影响, 并结合网络药理学分析, 探索大黄酚与 AKI 的相关作用靶点及通路, 以进一步阐明大黄酚改善肾脏缺血再灌注损伤的机制, 为临床预防缺血再灌注导致的急性肾损伤及新药研发提供理论依据。

## 材料与方法

**试剂与仪器** 肌酐检测试剂盒 (C011-2-1)、尿素氮检测试剂盒 (C013-2-1) 均购于南京建成生物工程研究所有限公司; PEG-400 (A611781-0500) 购于生工生

物工程(上海)股份有限公司; 二甲基亚砷(0231) 购于美国 Amresco 公司; 苏木精-伊红染液(ZLI-9039) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 胎牛血清(900-108) 购于北京拜尔迪生物技术有限公司; 胰蛋白酶(T1300) 购于北京索莱宝科技有限公司; DMEM 培养基(CM15019) 购于中科迈晨(北京) 商贸有限公司; MitoSOX Red (M36008)、BCA 蛋白定量试剂盒(23225)、反转录试剂盒(K1622) 均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; JC-1 线粒体膜电位试剂盒(C2006) 购于上海碧云天生物技术有限公司; NovoStart@SYBR qPCR SuperMix Plus (E096-01B) 购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司。 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, sc-47778)、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, Opa1, sc-5372)、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1, sc-33796)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K, sc-8010) 均购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 20301707-1) 购于美国 BioWorld 公司; 动力相关蛋白 1 (dynamain-related protein 1, Drp1, 8570s)、线粒体融合蛋白 1 (mitofusin 1, Mfn1, 14739s)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2, 9482s)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein I light chain 3, LC3, 4108S)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 3498S) 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 细胞色素 C (cytochrome C, 66264-1) 购于美国 Proteintech 公司; 螯合体 1 (sequestosome 1, p62, A11250)、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase 3, caspase 3, A19654) 均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; 活化的 caspase 3 (cleaved caspase 3, ab214430) 购于英国 Abcam 公司; 磷酸化 PI3K (p-PI3K, T40116)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt, T55561)、磷酸化 Akt (p-Akt, T40067) 均购于艾比玛特生物医药(上海) 有限公司。

台式高速冷冻离心机(5417R) 购于德国 Eppendorf 公司; 全自动酶标仪 (Mutliscan MK3) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 倒置荧光显微镜 (IX71-22PHFL) 购于日本 Olympus Corporation 公司; 小型垂直电泳槽(1658001)、电泳仪 (PowerPac HC) 均购于美国 Bio-Rad Laboratories 公司; 实时荧光定量核酸扩增检测仪 (Mx3000P) 购于美国 Agilent Technologies 公司; 激光共聚焦显微镜 (TCS-SP8) 购于德国 Leica 公司。

**实验动物及小鼠单侧肾脏缺血再灌注损伤模型的建立** C57BL/6 小鼠, 雄性, 8~10 周龄, 20~25 g, 购

自北京大学医学部实验动物中心, 许可证号为 SCXK(京) 2022-0009。在温度( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度( $40 \pm 5$ )% 的条件下, 自由饮水、饮食, 12 h 光照/黑暗交替。所涉及动物实验均按照欧共体使用实验动物指南进行, 并经北京大学实验动物伦理委员会批准(LA2021503)。

根据课题组前期预实验结果绘制的量效关系曲线, 选择了 3 个最合适的剂量进行后续研究。将实验动物随机分为 5 组: ① 假手术 (Sham) 组; ② 缺血再灌注 (IRI) 组; ③ IRI + 大黄酚 ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组; ④ IRI + 大黄酚 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组; ⑤ IRI + 大黄酚 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组。预给药组分别腹腔注射不同剂量大黄酚, Sham 组与 IRI 组给予等量的 10% DMSO + 90% PEG-400, 每天 1 次。连续给药 7 天后, IRI 组与预给药组: 摘除左侧肾脏, 夹闭右侧肾蒂, 结扎 35 min 后去除动脉夹, 待肾脏变回红色视为灌注成功。Sham 组右侧肾脏不做处理。再灌注 24 h 后, 取血清和肾脏放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存, 用于后续研究。

**肾小管上皮细胞 HK-2 培养及缺氧复氧模型的建立** HK-2 细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养。当 HK-2 细胞生长融合至 80% 时, 随机分为 ① 对照 (control) 组: 普通孵箱培养; ② H/R 组: 无血清  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DMEM 培养基培养 24 h 后, 更换无血清  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DMEM 培养基, 置于缺氧孵箱 (混合气  $\text{N}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2 = 94:1:5$ ) 12 h 后, 复氧 8 h; ③ 大黄酚给药组: 在无血清  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DMEM 培养基加入不同浓度 ( $0.3$ 、 $1$ 、 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的大黄酚, 预给药 24 h, 其余处理与 H/R 组相同。

**血肌酐、血尿素氮水平检测** 按照肌酐和尿素氮测定试剂盒步骤测定小鼠血清中肌酐及尿素氮含量。

**H&E 染色** 取出各组小鼠右肾, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片后进行 H&E 染色, 显微镜下观察肾脏组织病理结构变化。

**线粒体膜电位 ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) 的测定** 采用线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 荧光探针法测定线粒体膜电位的水平。取指数生长期 HK-2 细胞, PBS 洗 3 次, 在  $37^{\circ}\text{C}$  暗处与 JC-1 染液孵育 20 min, 再用 PBS 洗 3 次, 置于荧光显微镜下观察拍照。使用 Operetta CLS 高含量分析系统获取图像, 分析染色后细胞, 将 530 nm 处的读数与 590 nm 处的读数 (530:590) 的比率视为相对  $\Delta\Psi\text{m}$  值。

**HK-2 细胞线粒体活性氧 (mtROS) 测定** 将 HK-2 细胞用 PBS 洗 3 遍, 加入  $100 \mu\text{L}$  染液 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MitoSox Red +  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hoechst),  $37^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 终止染色, PBS 洗 3 遍, 加入  $100 \mu\text{L}$  培养基, 采用激光共聚焦显微镜采集荧光图像, 激发光波长为

510 nm。

**网络分析** 以大黄酚为关键词在 TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、ETCM (<http://www.tcm-p.cn/ETCM/>)、Swiss Target Predict (<http://swisstargetprediction.ch/>)、Batman tcm (<http://bionet.npsb.org.cn/batman-tcm/index.php>)、Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、SuperPred (<https://prediction.charite.de/>)、SEA (<http://sea.edbc.org/>) 和 Phammapper (<https://www.lilab-ecust.cn/phammapper/>) 数据库检索药物相关靶点。以 AKI 为关键词在 OMIM (<https://www.omim.org/>)、Malacards (<https://www.malacards.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 Disgenet (<https://www.disgenet.org/>) 数据库检索疾病相关靶点, 利用 Excel 软件去除重复靶点。通过 VENNY 2.1 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 获取大黄酚-AKI 交集靶点绘制韦恩图, 并将靶点信息导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 以“Homo Sapiens”为条件并去除游离基因, 选择高置信度 (0.7), 构建蛋白质互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI)。利用 Cytoscape v3.10.0 软件构建药物-疾病网络模型, 以 degree 值筛选关键靶点。

将药物-疾病交集靶点信息导入 DAVID 平台 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), 对靶点进行 Wiki 及 KEGG 通路富集分析, 通过微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化,  $P < 0.05$  具有生物学意义。

**免疫印迹法 (Western blot)** 取小鼠肾脏组织或 HK-2 细胞, 加入 RIPA 裂解液制备总蛋白提取液。BCA 法测定蛋白质浓度。按 80 V, 30 min; 120 V, 90 min 进行电泳。采用三明治夹心法转膜, 200 mA 恒流, 时间根据目的蛋白分子量大小进行调整。转膜后封闭 1 h, 孵育一抗 (1:1 000), 4 °C 摇床过夜。TBST

洗涤后加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h 后曝光显影。

**实时荧光定量核酸扩增检测 (real-time quantitative PCR, qPCR)** 采用 TRIzol 试剂提取肾脏组织和 HK-2 细胞总 RNA, 测定总 RNA 浓度, 逆转录合成 cDNA。采用 Taqman SYBR 试剂盒进行实时定量 PCR 反应, 检测 *HSP90AA1*、*SRC*、*HSP90AB1*、*EGFR*、*ESR1*、*PIK3R1*、*PTPN11*、*MED1*、*PLCG1*、*RXRA* 基因 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

**统计学分析** 应用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验数据进行统计与分析。所有数据用均值 ± 标准差表示, 多组间的统计学差异使用 one-way ANOVA 检验进行评估。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 大黄酚对肾脏急性缺血再灌注损伤的改善作用

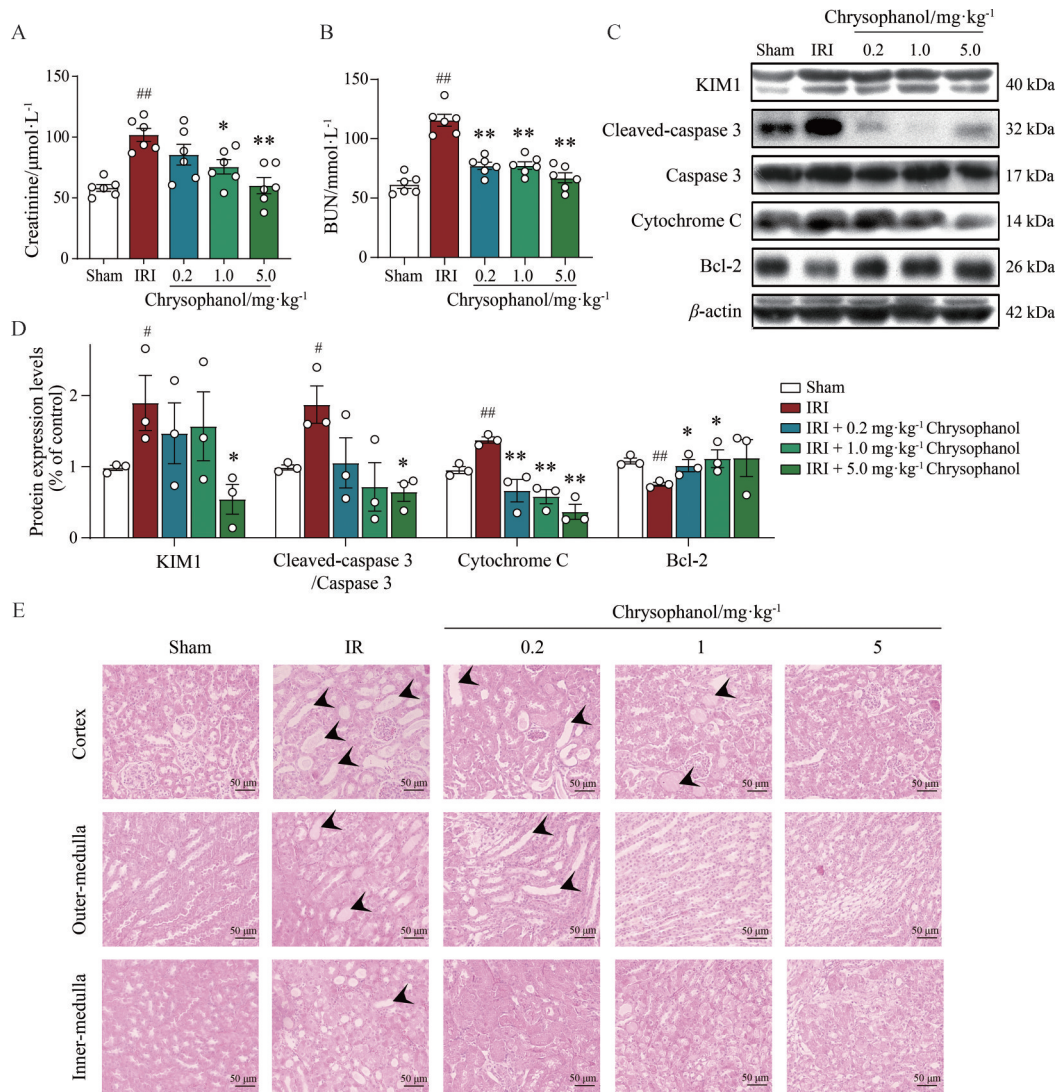
为研究大黄酚对肾脏 IRI 的影响, 本研究构建了单侧肾脏 IRI 小鼠模型。由图 1A~D 可知, 与假手术 (Sham) 组相比, IRI 组小鼠血清中肌酐、尿素氮水平明显升高, 肾脏组织中肾损伤蛋白 (KIM1)、凋亡蛋白 (cleaved-caspase 3/caspase 3、cytochrome C) 的表达量增加, Bcl-2 蛋白表达下降, 而不同剂量的大黄酚能够降低血清肌酐、尿素氮水平, 调节肾损伤蛋白和凋亡相关蛋白的表达水平, 且呈现剂量依赖性。H&E 染色结果显示, Sham 组肾组织形态完整, 肾小管及肾小球结构清晰, 而 IRI 组肾组织结构明显遭到破坏, 肾小管上皮细胞肿胀、变性, 肾小管扩张, 部分管腔内可见大量上皮细胞碎片, 肾脏外髓充血 (图 1E)。与 IRI 组相比, 不同剂量的大黄酚给药组肾损伤明显减少。上述结果证明, 大黄酚对肾脏缺血再灌注损伤小鼠的肾功能具有改善作用。

### 2 大黄酚对线粒体的影响

通过采用 Western blot 技术检测肾脏组织中线粒

**Table 1** qPCR primer sequences. *HSP90AA1*: Heat shock protein 90 alpha family class A member 1; *SRC*: Sarcoma; *EGFR*: Epidermal growth factor receptor; *HSP90AB1*: Heat shock protein 90 alpha class B member 1; *ESR1*: Estrogen receptor 1; *PIK3R1*: Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1; *PTPN11*: Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11; *MED1*: Mediator complex subunit 1; *PLCG1*: Phospholipase C gamma 1; *RXRA*: Retinoid X receptor alpha

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
<i>HSP90AA1</i>	Human	GCTTGACCAATGACTGGGAAG	AGTCCTCACAGTTATCCATGA
<i>SRC</i>	Human	GAGCGGCTCCAGATTGTCAA	CTGGGGATGTAGCCTGTCTGT
<i>EGFR</i>	Human	CCCACTCATGCTCTACAACCC	TCGCACTTCTTACACTTGCGG
<i>HSP90AB1</i>	Human	CATCTCCATGATTGGGCAGTT	CTTTGACCCGCCTCTCTTCTA
<i>ESR1</i>	Human	GAAAGGTGGGATACGAAAAGACC	GCTGTTCTTCTTAGAGCGTTTGA
<i>PIK3R1</i>	Human	TGGACGGCGAAGTAAAGCATT	AGTGTGACATTGAGGGAGTCG
<i>PTPN11</i>	Human	GAAGTGTGCAGATCTACCTCT	TCTGGCTCTCTCGTACAAGAAA
<i>MED1</i>	Human	GAGGGCATCAACATTGGTCA	AGATGAGAGCCCAGTCCATTC
<i>PLCG1</i>	Human	GGAAGACCTCACGGGACTTTG	GCGTTTTTCAGGCGAAATTC
<i>RXRA</i>	Human	GGACTGCCTGATTGACAAGC	TTCAGCCCATGTTTGCCTC



**Figure 1** Chrysophanol improves acute kidney injury (AKI) induced by ischemic reperfusion injury (IRI). A: Blood creatinine level ( $n = 6$ ); B: Blood urea nitrogen (BUN) level ( $n = 6$ ); C: Expression of kidney damage protein (KIM1), apoptotic protein (cleaved-caspase 3, caspase 3, cytochrome C, Bcl-2) in mouse kidney tissue by Western blot; D: Quantitative analysis of Figure 1C ( $n = 3$ ); E: H&E staining of kidney tissue. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ ; magnification,  $\times 400$ . Black arrows indicate the injured renal tubules.  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Sham group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs IRI group. KIM1: Kidney injury molecule 1; Bcl-2: B-cell lymphoma-2

体相关蛋白的表达发现,与 Sham 组相比,IRI 组肾组织中线粒体自噬蛋白 PINK1 的表达明显增加,LC3-II/LC3-I 的表达显著下降,而大黄酚预给药组能够显著降低 PINK1 的表达,并呈剂量依赖性升高 LC3-II/LC3-I 的表达,但其对分裂蛋白 (Drp1)、融合蛋白 (Mfn1、Mfn2、Opa1)、生物合成蛋白 (PGC-1 $\alpha$ ) 的表达水平没有显著影响 (图 2)。结果表明,大黄酚可能通过调节线粒体自噬而发挥肾功能保护作用。

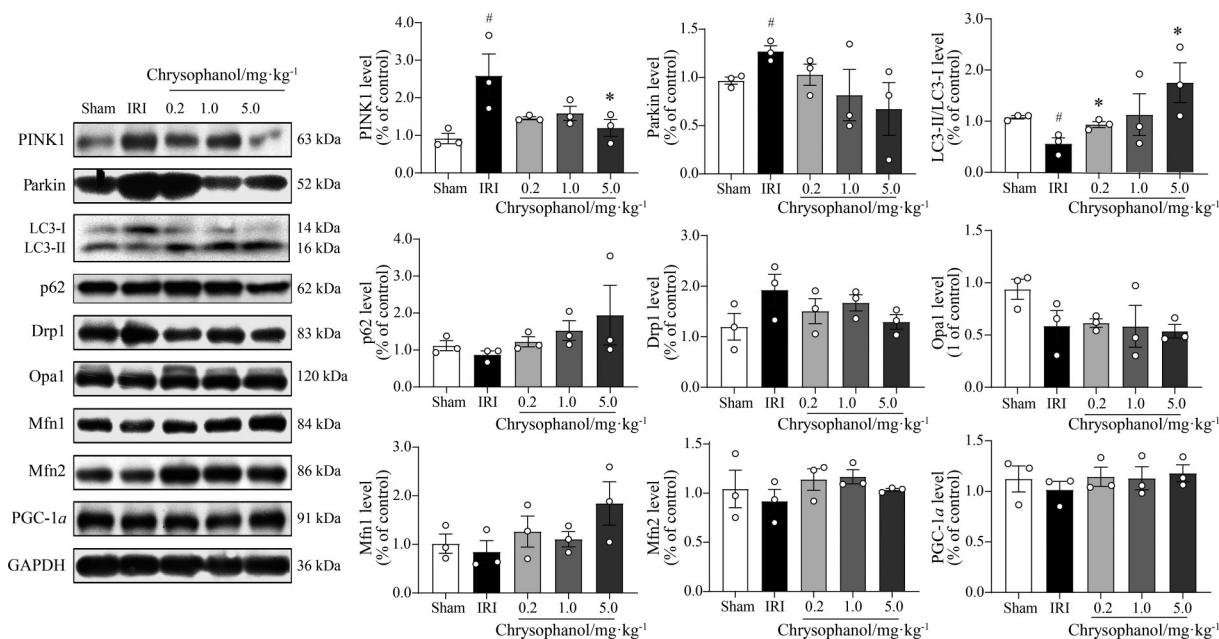
### 3 大黄酚对 HK-2 细胞线粒体膜电位、mtROS 的影响

采用肾小管上皮细胞 HK-2 构建 H/R 模型,从细胞水平研究大黄酚对肾脏缺血再灌注损伤时线粒体的影响。通过采用 JC-1 荧光探针法测定线粒体膜电位的

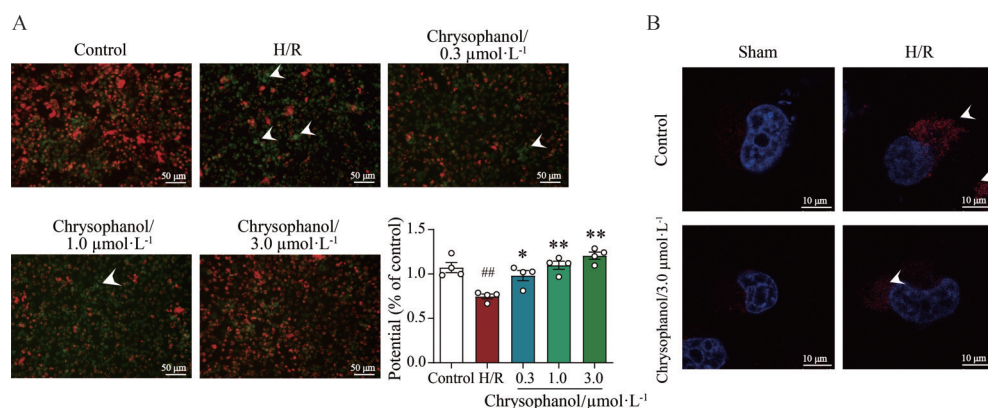
水平,发现缺氧复氧处理后 HK-2 细胞中的线粒体膜电位与对照组相比显著降低,而大黄酚能够呈剂量依赖性地提高 HK-2 细胞中线粒体膜电位水平 (图 3A)。同时,采用 MitoSox Red 染色法检测了 HK-2 细胞中 mtROS 水平,红色荧光越强,则 mtROS 的水平越高。实验结果显示,与对照组相比,H/R 组 HK-2 细胞中 mtROS 水平显著增加,而大黄酚 (3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够抑制 mtROS 的产生 (图 3B)。上述结果提示,大黄酚可以改善由缺氧复氧引发的线粒体功能损伤。

### 4 大黄酚-AKI 共同作用靶点及蛋白互作网络构建

以 AKI 为关键词在 OMIM、Malacards、Genecards、Disgenet 四大数据库检索得到 4 341 个不重复的潜在



**Figure 2** Effect of chrysophanol on mitochondria. The expression levels of mitochondrial autophagy proteins (PINK1, Parkin, LC3, p62), split protein (Drp1), fusion protein (Mfn1, Mfn2, Opa1), biosynthetic protein (PGC-1 $\alpha$ ) were measured in mouse kidney tissues by Western blot,  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs Sham group; \* $P < 0.05$  vs IRI group. PINK1: PTEN induced putative kinase 1; LC3: Microtubule-associated protein I light chain 3; p62: Sequestosome 1; Drp1: Dynamin-related protein 1; Mfn1: Mitofusin-1; Mfn2: Mitofusin-2; Opa1: Optic atrophy 1; PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1-alpha



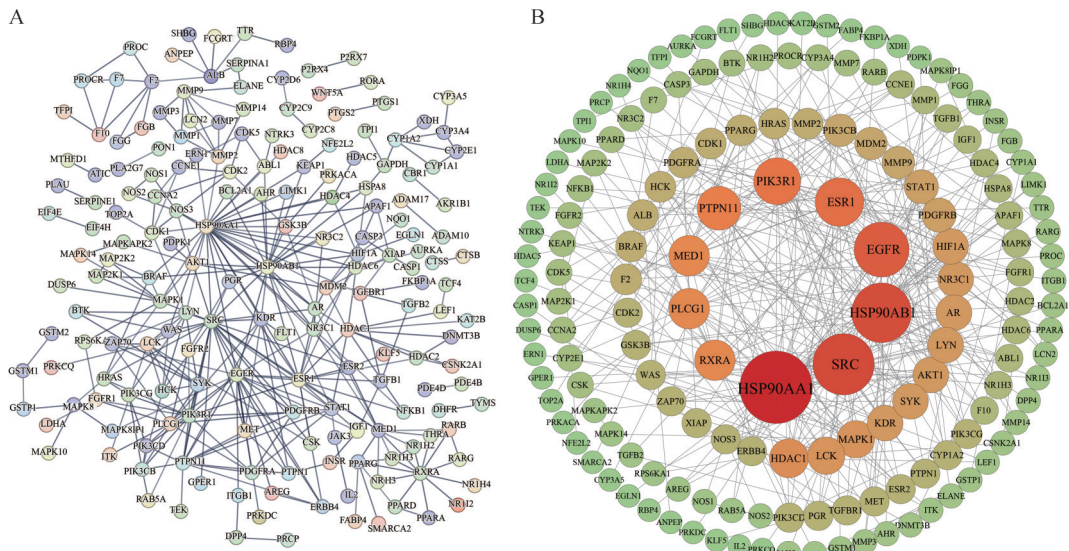
**Figure 3** Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen in HK-2 cells. A: Fluorescence image of mitochondrial membrane potential in hypoxia. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .  $n = 4, \bar{x} \pm s$ . ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs H/R group; B: Generated fluorescence image of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) in HK-2 cells. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . H/R: Hypoxia/reoxygenation

靶点, 以大黄酚为关键词在 TC MSP、ETCM、Swiss Target Predict、Batman tcm、Pubchem、SuperPred、SEA 数据库检索获得 539 个不重复的潜在靶点, 大黄酚与 AKI 的共同作用靶点有 305 个, 对这些靶点进行蛋白质互作网络 (PPI) 绘制 (图 4A), PPI 网络中有 304 个节点 (靶点蛋白), 350 条边 (蛋白相互作用)。将有相互作用的靶点结合信息导入 Cytoscape 构建大黄酚-AKI 网络模型, 并按节点度值从大到小进行排序, 以 degree 值筛选 top10 的关键靶点 (*HSP90AA1*、*SRC*、*HSP90AB1*、*EGFR*、*ESR1*、*PIK3R1*、*PTPN11*、*MED1*、*PLCG1*、*RXR $\alpha$* )

(图 4B)。

### 5 大黄酚-AKI 关键靶点验证

采用 HK-2 细胞构建 H/R 模型, 通过 qPCR 技术检测 HK-2 细胞中大黄酚-AKI 关键靶点 (*HSP90AA1*、*SRC*、*HSP90AB1*、*EGFR*、*ESR1*、*PIK3R1*、*PTPN11*、*MED1*、*PLCG1*、*RXR $\alpha$* ) 的基因水平, 发现与对照组相比, H/R 组的 *HSP90AA1* 和 *PIK3R1* 基因水平显著升高, 而大黄酚 (3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够明显抑制 *HSP90AA1* 和 *PIK3R1* 基因水平 (图 5)。结果提示, 大黄酚改善肾脏缺血再灌注损伤的作用机制可能与靶向抑制 *HSP90AA1* 和



**Figure 4** Network pharmacology analysis-key target acquisition and protein-protein interactions (PPI) network construction. A: PPI network diagram; B: Cytoscape constructs molecular interaction network, ranked by degree value from large to small

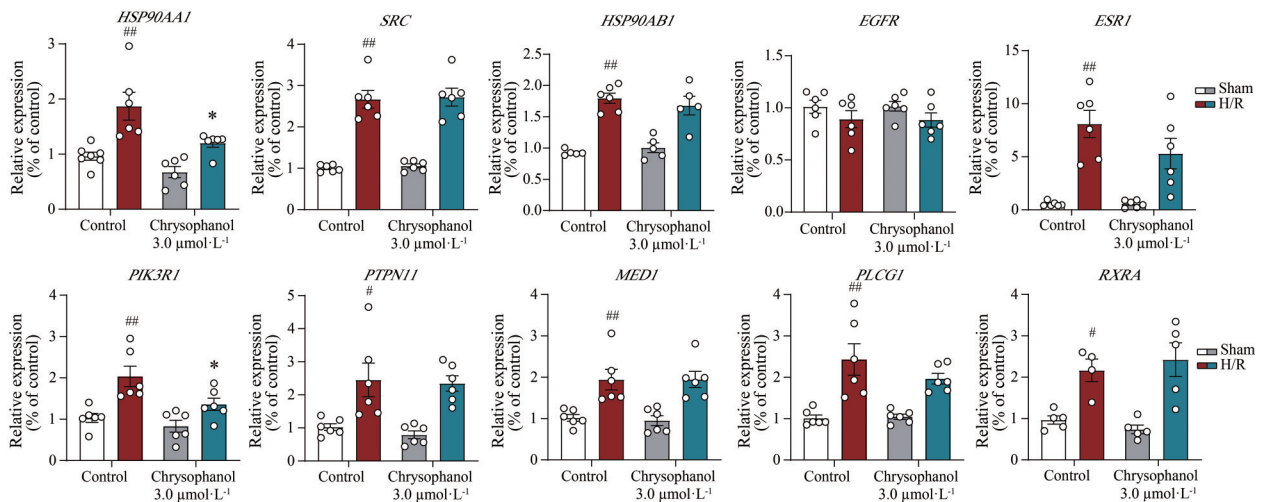
PIK3R1 有关。

### 6 大黄酚-AKI通路富集分析及验证

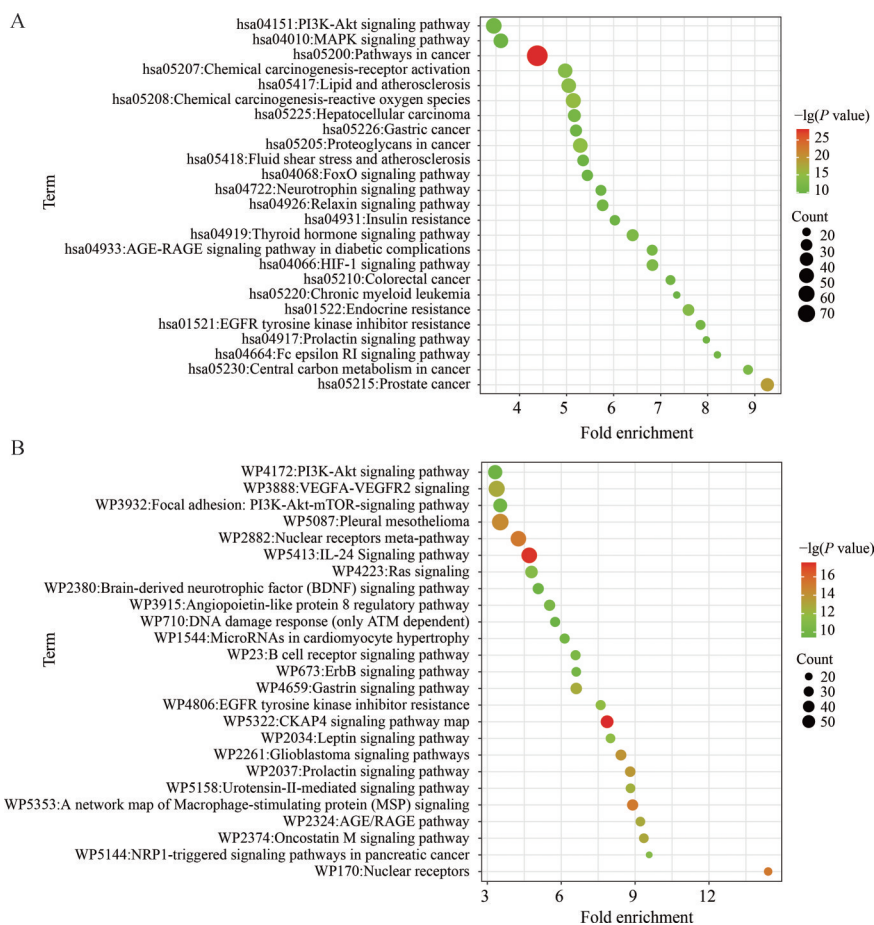
将大黄酚-AKI交集靶点信息导入 DAVID 平台, 对潜在靶点进行 Wiki 及 KEGG 通路富集分析, 发现在两种通路富集分析结果中均涉及 PI3K/Akt 通路, 且该信号通路在两种分析方法中均排列第一 (图 6)。采用 HK-2 细胞构建 H/R 模型对该信号通路进行验证, 发现与对照组比较, H/R 组 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达均显著降低, 而大黄酚 (3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 能够显著提高 H/R 条件下 HK-2 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平 (图 7)。上述结果提示, 大黄酚可能通过活化 PI3K/Akt 信号通路而发挥肾脏保护作用。

### 讨论

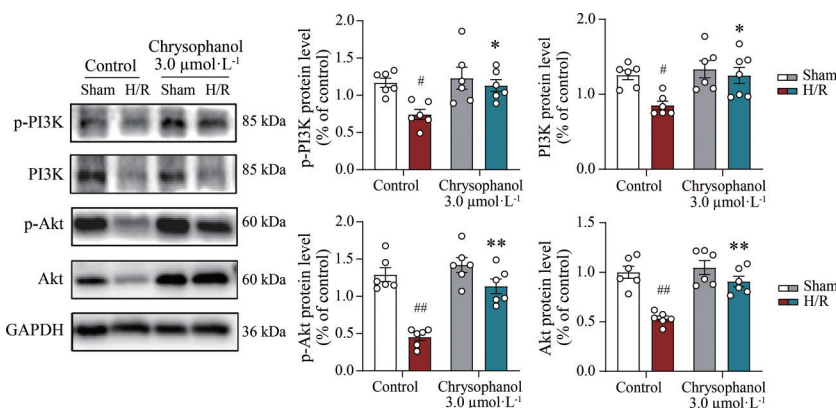
AKI 是一种以肾脏突发性功能障碍为特点的临床综合征。在过去的 20 年中, AKI 的发病率在全球范围内逐年上升, 尤其是在危重患者中, 其发生率可达到 30% 以上<sup>[1,15]</sup>。最终可能发展为需要透析甚至肾脏替代治疗的慢性肾病, 而肾脏替代治疗的患者死亡率高达 60%, 这对患者的生命安全构成了严重威胁<sup>[16]</sup>。由于其复杂的发病机制, 目前仍缺乏对 AKI 的治疗。有研究表明, 大黄酚对 AKI 具有潜在治疗作用。本研究通过体内缺血再灌注损伤模型和体外缺氧复氧模型, 并结合网络药理学分析探索大黄酚对 AKI 的影响及其作用机制。



**Figure 5** Validation of the H/R model targets in HK-2 cells. The expression of mRNA in H/R models *HSP90AA1*, *SRC*, *HSP90AB1*, *EGFR*, *ESR1*, *PIK3R1*, *PTPN11*, *MED1*, *PLCG1*, and *RXRA* were measured by qPCR.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.05$  vs H/R group



**Figure 6** Chrysophanol-AKI pathway enrichment analysis. A: KEGG functional enrichment analysis (top 25); B: Wiki functional enrichment analysis (top 25)



**Figure 7** Validation of the PI3K/Akt signaling pathway. The expression level of PI3K/Akt signal pathway proteins (p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt).  $n = 6, \bar{x} \pm s. ^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$  vs control group;  $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$  vs H/R group

首先, 本研究证实了大黄酚对 IRI 诱导的 AKI 具有保护作用, 并能够呈剂量依赖性地调节肾组织细胞凋亡相关蛋白 (cleaved-caspase 3/caspase 3、cytochrome C、Bcl2) 表达及改善肾组织形态结构。其中, 细胞色素 C 是线粒体 ATP 产生不可或缺的蛋白质, 当其从线粒体中释放时可触发 II 型细胞凋亡<sup>[17]</sup>。在生理条件下, cytochrome C 被磷酸化, 从而控制线粒体呼吸和细

胞凋亡<sup>[18]</sup>。当肾脏缺血再灌注损伤时, 肾小管上皮细胞中的线粒体内膜通透性转换孔被开启, 导致 cytochrome C 等关键因子进入细胞质, 促进 caspases 的表达和细胞凋亡; 线粒体通透性的显著增加会引发线粒体肿胀及嵴结构重塑, 进一步加剧 cytochrome C、mtDNA 等促凋亡因子的释放<sup>[19-22]</sup>。而 cytochrome C 从线粒体内膜释放的过程中, 会促使凋亡蛋白激活因子

1 (Apaf-1) 与 ATP 结合, 形成半胱天冬酶激活复合物, 进而驱动下游的 caspase 9, 并进一步激活 caspase 3 转化为 cleaved-caspase 3 (即活化的 caspase 3), 形成一个正反馈循环, 加速凋亡过程<sup>[18]</sup>。

此外, 线粒体通过产生 ATP、活性氧 (ROS) 和调节胞质钙水平, 在细胞的存活和死亡中扮演着关键角色<sup>[23,24]</sup>。肾脏的缺血再灌注损伤会破坏线粒体的稳态, 增强线粒体的分裂功能而抑制线粒体融合, 加上线粒体肿胀, 会导致肾小管上皮细胞中的大多数线粒体功能失调, 表现为短小破碎状<sup>[25]</sup>。过度碎片化的线粒体将导致膜电位水平和呼吸功能降低, ATP 产生减少及 ROS 含量增加, 进而触发炎症反应的激活以及 mtDNA 和线粒体蛋白改变等一系列不可逆损伤, 最终导致线粒体功能丧失和肾小管上皮细胞的凋亡<sup>[26]</sup>。本研究通过体外给予 HK2 细胞 H/R 模型不同剂量的大黄酚, 发现大黄酚能够显著提高缺氧复氧处理后 HK-2 细胞中线粒体膜电位水平, 并抑制 mtROS 的产生, 证明了大黄酚能够改善 AKI 引发的线粒体功能障碍。

经过进一步研究发现, 大黄酚对线粒体自噬相关蛋白 PINK1、LC3 的表达具有调节作用。目前研究表明, 线粒体自噬途径主要分为依赖泛素途径和非泛素依赖途径两大类, 而 PINK1 是泛素依赖途径的关键蛋白, 大多数细胞类型的线粒体自噬受 PINK1-Parkin 机制的调节<sup>[27]</sup>。PINK1 是一种位于胞质溶胶中的激酶, 被输入线粒体后在生理条件下降解<sup>[28]</sup>。由于蛋白质输入依赖于线粒体膜电位, 当线粒体去极化时, PINK1 因进入线粒体途径受阻而被滞留在外膜上; 累积的 PINK1 通过介导外膜上某些蛋白质 (pSer65-Ub) 的磷酸化招募并激活 E3 泛素连接酶 Parkin<sup>[29]</sup>。Parkin 泛素化线粒体外膜蛋白 (如 Mfn1 和 Mfn2) N-末端的赖氨酸残基, 从而靶向线粒体以通过自噬体降解<sup>[6]</sup>。此外, 非泛素依赖途径由线粒体自噬受体 (如 NIX、BNIP3 和 FUNDC1) 主导, 而这些受体都包含一个保守的 LC3 结合域。在缺氧的刺激下, 线粒体自噬受体可以通过耗散线粒体膜电位并与 LC3 相互作用, 将线粒体输送到自噬体来激活线粒体自噬<sup>[30-32]</sup>。线粒体自噬的适度激活发挥保护作用, Livingston 等<sup>[33]</sup>证明通过线粒体自噬的激活增加受损线粒体的清除率可防止线粒体功能丧失, 减弱 ROS 生成, 并减轻肾小管细胞凋亡和肾损伤。然而, 线粒体自噬激活有一个上限, 过度的线粒体自噬和广泛的免疫浸润是影响 IRI 的主要因素<sup>[34,35]</sup>。

结合差异表达基因分析和蛋白质相互作用网络分析的结果显示, 大黄酚可以通过调节 HSP90AA1、PIK3R1 的基因表达水平来发挥保护作用。多项研究表明, HSP90AA1、PIK3R1 在慢性肾小球肾炎、糖尿病

肾病、顺铂诱导的急性肾损伤、肾纤维化等肾脏疾病中均作为关键基因靶点<sup>[36-39]</sup>。其中, HSP90AA1 是热休克蛋白 90 (HSP90) 的 4 种亚型之一, 是一种 ATP 酶依赖性分子伴侣, 其在包括 Akt 在内的许多客户蛋白的稳定性中发挥着至关重要的作用<sup>[40]</sup>。Zhang 等<sup>[38]</sup>证明芍药花素能够诱导 HSP90AA1-Akt 复合物的形成, 导致 Akt 显著激活, 从而抑制细胞凋亡和炎症反应, 进一步缓解顺铂诱导的急性肾损伤。上述研究提示, 靶向 HSP90AA1 能够通过 Akt 通路缓解 AKI。

通过对大黄酚-AKI 共同作用靶点进行功能富集分析, 发现 PI3K/Akt 信号通路可能是大黄酚对 AKI 起保护作用的重要通路。PI3K/Akt 信号通路已被证明在调节不同系统中的有丝分裂信号传导、细胞凋亡、细胞增殖和存活中发挥关键作用<sup>[41]</sup>。研究发现, 通过激活 PI3K/Akt 介导的线粒体依赖性细胞凋亡信号通路, 能够保护肾功能免受 IRI 损伤, 防止肾小管细胞在体内和体外凋亡<sup>[42]</sup>, 上调 PI3K/Akt 磷酸化可以改善 IRI 损伤后的肾脏修复<sup>[43]</sup>。本研究通过验证发现, 大黄酚能够显著上调 H/R 条件下 HK-2 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达。此外, PIK3R1 为 PI3K 的负调节亚基, 研究显示槲皮素可以通过干扰 PIK3R1 抑制 PI3K/Akt 通路来有效缓解慢性肾功能衰竭<sup>[44]</sup>, 且 PIK3R1 的耗竭促进了细胞中 Akt 的磷酸化<sup>[45]</sup>。而本研究发现, PIK3R1 在 H/R 条件下基因表达增加, 大黄酚能够抑制其表达, 提示大黄酚可能通过靶向 PIK3R1 调节 PI3K/Akt 通路, 进而改善 IRI 诱导的急性肾损伤。

综上所述, 本研究结合网络药理学方法探究了大黄酚对缺血再灌注诱导的急性肾损伤的保护作用及其机制。研究结果提示, 大黄酚可改善由 IRI 诱导的 AKI, 其机制可能与调节 PI3K/Akt 信号通路及关键作用靶点 HSP90AA1、PIK3R1, 减少细胞凋亡, 调节线粒体自噬, 提高线粒体膜电位, 抑制 mtROS 产生有关, 为临床治疗缺血再灌注诱导的急性肾损伤提供了新的药物选择。

**作者贡献:** 铁璐和李琳琳负责本实验研究的设计; 王燕青和杨雪负责实验研究及数据分析; 杨雪和邓敏负责撰写并修订文章; 所有作者阅读和修改本论文。

**利益冲突:** 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Yang Y, Song M, Liu Y, et al. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163: 58-73.
- [2] Sawhney S, Marks A, Fluck N, et al. Post-discharge kidney function is associated with subsequent ten-year renal progression

- risk among survivors of acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2017, 92: 440-452.
- [3] Selewski DT, Symons JM. Acute kidney injury [J]. *Pediatr Rev*, 2014, 35: 30-41.
- [4] Kurzhaagen JT, Dellepiane S, Cantaluppi V, et al. AKI: an increasingly recognized risk factor for CKD development and progression [J]. *J Nephrol*, 2020, 33: 1171-1187.
- [5] Zhao X, Li Y, Wu S, et al. Role of extracellular vesicles in pathogenesis and therapy of renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115229.
- [6] Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13: 629-646.
- [7] Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302: F853-F864.
- [8] Emma F, Montini G, Parikh SM, et al. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12: 267-280.
- [9] Zhang J, Yan C, Wang S, et al. Chrysophanol attenuates lead exposure-induced injury to hippocampal neurons in neonatal mice [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9: 924-930.
- [10] Zhao YM, Fang YL, Li JC, et al. Neuroprotective effects of chrysophanol against inflammation in middle cerebral artery occlusion mice [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 630: 16-22.
- [11] Shim KS, Lee B, Ma JY. Water extract of *Rumex crispus* prevents bone loss by inhibiting osteoclastogenesis and inducing osteoblast mineralization [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 483.
- [12] Dou F, Ding Y, Wang C, et al. Chrysophanol ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114079.
- [13] Lin CH, Tseng HF, Hsieh PC, et al. Nephroprotective role of chrysophanol in hypoxia/reoxygenation-induced renal cell damage via apoptosis, ER stress, and ferroptosis [J]. *Biomedicines*, 2021, 9: 1283.
- [14] Gu M, Lu L, Wei Q, et al. Improved oral bioavailability and anti-chronic renal failure activity of chrysophanol via mixed polymeric micelles [J]. *J Microencapsul*, 2021, 38: 47-60.
- [15] Doyle JF, Forni LG. Acute kidney injury: short-term and long-term effects [J]. *Crit Care*, 2016, 20: 188.
- [16] Hsu C, Liu KD. Cardiovascular events after AKI: a new dimension [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25: 425-427.
- [17] Morevati M, Egstrand S, Nordholm A, et al. Effect of NAD<sup>+</sup> boosting on kidney ischemia-reperfusion injury [J]. *PLoS One*, 2021, 16: e0252554.
- [18] Wan J, Kalpage HA, Vaishnav A, et al. Regulation of respiration and apoptosis by cytochrome c threonine 58 phosphorylation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 15815.
- [19] Mahapatra G, Varughese A, Ji Q, et al. Phosphorylation of cytochrome c threonine 28 regulates electron transport chain activity in kidney: implications for AMP kinase [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 64-79.
- [20] Li X, Hu L, Zhu X, et al. The effect of caspase-3 in mitochondrial apoptosis activation on degradation of structure proteins of *Esox lucius* during postmortem storage [J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130767.
- [21] Birk AV, Chao WM, Bracken C, et al. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome *c*/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 2017-2028.
- [22] Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury [J]. *Nature*, 2010, 464: 104-107.
- [23] Bauer TM, Murphy E. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death [J]. *Circ Res*, 2020, 126: 280-293.
- [24] Brookes PS. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: C817-C833.
- [25] Zhang X, Agborbesong E, Li X. The role of mitochondria in acute kidney injury and chronic kidney disease and its therapeutic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11253.
- [26] Hao Y, Zhao L, Zhao JY, et al. Unveiling the potential of mitochondrial dynamics as a therapeutic strategy for acute kidney injury [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1244313.
- [27] Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 95-101.
- [28] Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment [J]. *EMBO Rep*, 2012, 13: 378-385.
- [29] Lu Y, Li Z, Zhang S, et al. Cellular mitophagy: mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. *Theranostics*, 2023, 13: 736-766.
- [30] Thomas RL, Kubli DA, Gustafsson AB. Bnip3-mediated defects in oxidative phosphorylation promote mitophagy [J]. *Autophagy*, 2011, 7: 775-777.
- [31] Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 19094-19104.
- [32] Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 177-185.
- [33] Livingston MJ, Wang J, Zhou J, et al. Clearance of damaged mitochondria via mitophagy is important to the protective effect of ischemic preconditioning in kidneys [J]. *Autophagy*, 2019, 15: 2142-2162.
- [34] Cao Y, Zheng J, Wan H, et al. A mitochondrial SCF-FBXL4 ubiquitin E3 ligase complex degrades BNIP3 and NIX to restrain mitophagy and prevent mitochondrial disease [J]. *EMBO J*, 2023, 42: e113033.

- [35] Chen RY, Li DW, Xie H, et al. Gene signature and prediction model of the mitophagy-associated immune microenvironment in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1117297.
- [36] Guo R, Shang JH, Ye RH, et al. Pharmacological investigation of indole alkaloids from *Alstonia scholaris* against chronic glomerulonephritis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154958.
- [37] Meng FD, Yuan L, Xu DJ, et al. Exploring the targets and molecular mechanism of glycyrrhetic acid against diabetic nephropathy based on network pharmacology and molecular docking [J]. *World J Diabetes*, 2023, 14: 1672-1692.
- [38] Zhang MY, Ma LJ, Jiang L, et al. Paeoniflorin protects against cisplatin-induced acute kidney injury through targeting HSP90AA1-Akt protein-protein interaction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116422.
- [39] Zhao WM, Wang ZJ, Shi R, et al. Analysis of the potential biological mechanisms of diosmin against renal fibrosis based on network pharmacology and molecular docking approach [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23: 157.
- [40] Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, et al. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene [J]. *Gene*, 2015, 570: 8-16.
- [41] Liu H, Wang L, Weng X, et al. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101195.
- [42] Liu HB, Meng QH, Huang C, et al. Nephroprotective effects of polydatin against ischemia/reperfusion injury: a role for the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 362158.
- [43] Wu H, Ye M, Yang J, et al. Nicorandil protects the heart from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum response-induced apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 2320-2332.
- [44] Tu H, Ma D, Luo Y, et al. Quercetin alleviates chronic renal failure by targeting the PI3K/Akt pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12: 6538-6558.
- [45] Lin Y, Yang Z, Xu A, et al. PIK3R1 negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition and stem-like phenotype of renal cancer cells through the Akt/GSK3 $\beta$ /CTNNB1 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8997.