

1,7-二甲基黄嘌呤对氧糖剥夺再灌注神经元细胞和缺血再灌注损伤小鼠脑组织的保护作用及其机制

王晓榕^{1,2} 李雨欣^{1,2} 徐锐^{1,2} 张照龙^{1,2}

(1 青岛大学基础医学院,山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院介入医学科)

[摘要] 目的 探究 1,7-二甲基黄嘌呤(paraxanthine)对氧糖剥夺再灌注(OGD/R)神经元细胞以及缺血再灌注(I/R)损伤模型小鼠脑组织的保护作用及作用机制。方法 将皮质原代神经元细胞分为对照组、OGD/R组、OGD/R+paraxanthine组,分别给予正常神经元培养基培养、OGD/R处理和 OGD/R+paraxanthine处理。通过 CCK-8 实验检测三组神经元细胞的细胞活力,通过蛋白免疫印迹实验检测三组神经元细胞中磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)相对表达水平。将 C57BL/6 小鼠随机分为 Sham 组、I/R 组和 I/R+paraxanthine 组,分别进行假手术(仅颈外动脉造口)、I/R 模型构建(栓塞大脑中动脉 1.5 h 后恢复血流)和 I/R 模型构建+paraxanthine 治疗(血流恢复即刻腹腔注射 paraxanthine)。血流再灌注 24 h 后,采用改良神经损伤严重程度评分(mNSS)评估各组小鼠神经功能缺损情况,使用 TTC 染色方法观察各组小鼠脑梗死体积并计算梗死部分占全脑体积百分比。结果 OGD/R+paraxanthine 组神经元细胞的细胞活力显著高于 OGD/R 组($F=115.30, t=3.86, P<0.05$);相较于对照组,OGD/R 组和 OGD/R+paraxanthine 组神经元细胞的 p-Akt 相对表达水平显著升高($F=15.07, t=9.81, 4.55, P<0.05$)。与 I/R 组相比较,I/R+paraxanthine 组小鼠 mNSS 显著降低,脑梗死体积百分比显著性下降($F=49.05, 675.30, t=2.33, 9.12, P<0.05$)。结论 Paraxanthine 对 OGD/R 所致神经元损伤及 I/R 后小鼠脑组织梗死有一定保护作用,其机制可能与 paraxanthine 上调神经元细胞中的 p-Akt 水平有关。

[关键词] 1,7-二甲基黄嘌呤;再灌注损伤;缺氧缺血,脑;神经元;原癌基因蛋白质 c-akt;神经保护;脑梗死;缺血性卒中;疾病模型,动物

[中图分类号] R743

[文献标志码] A

Protective effects of 1, 7-dimethylxanthine on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-treated neuronal cells and ischemia/reperfusion-injured mouse brain tissue and the underlying mechanism

WANG Xiaorong, LI Yuxin, XU Rui, ZHANG Zhaolong (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the protective effects of 1, 7-dimethylxanthine (paraxanthine) on oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-treated neuronal cells and on the brain tissue of model mice with ischemia/reperfusion (I/R) injury, as well as the underlying mechanism. **Methods** Primary cortical neurons were divided into a control group, an OGD/R group, and an OGD/R+paraxanthine group, which were treated with normal neuronal culture medium, OGD/R, and OGD/R plus paraxanthine, respectively. The viability of neurons in the three groups was measured by CCK-8 assay. The expression level of phosphorylated protein kinase B (p-Akt) in the neurons from the three groups was detected by Western blot. C57BL/6 mice were randomly divided into a Sham group, an I/R group, and an I/R+paraxanthine group. Mice in the Sham group underwent sham operation (external carotid arteriotomy only), those in the I/R group were subjected to I/R model establishment (middle cerebral artery occlusion for 1.5 h followed by reperfusion), and those in the I/R+paraxanthine group received I/R model establishment plus paraxanthine treatment (intraperitoneal injection of paraxanthine immediately after reperfusion). At 24 h after reperfusion, the modified neurological severity score (mNSS) was used to assess the degree of neurological impairment in each group. TTC staining was used to observe the cerebral infarct volume in each group, and the percentage of infarct volume relative to the total brain volume was calculated. **Results** The neuronal viability in the OGD/R+paraxanthine group was significantly higher than that in the OGD/R group ($F=115.30, t=3.86, P<0.05$). Compared with the control group, the relative expression levels of p-Akt in the OGD/R group and the OGD/R+paraxanthine group were significantly increased ($F=15.07, t=9.81, 4.55, P<0.05$). Compared with the I/R group, the mNSS of mice in the I/R+paraxanthine group was significantly decreased ($F=49.05, t=2.33, P<0.05$), and the cerebral infarct volume was significantly reduced ($F=675.30, t=9.12, P<0.05$). **Conclusion** Paraxanthine has a certain protective effect against OGD/R-induced neuronal injury and I/R-induced cerebral infarction in mice. The underlying mechanism may be related to the upregulation of p-Akt levels in neurons.

[收稿日期] 2025-12-12; [修订日期] 2026-03-02
[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2024-MH302)
[通信作者] 张照龙, Email: qduhzl@126.com

[KEY WORDS] 1, 7-dimethylxanthine; Reperfusion injury; Hypoxia-ischemia, brain; Neurons; Proto-oncogene proteins c-akt; Neuroprotection; Brain infarction; Ischemia stroke; Disease models, animal

缺血性脑卒中对人类健康构成严重威胁,其全球范围内的致死率与致残率均居各类疾病前列^[1-2]。缺血性脑卒中患者在血液供应恢复后可能出现脑缺血再灌注(I/R)损伤,是影响急性缺血性脑卒中患者预后的主要因素^[1,3]。I/R 损伤的机制非常复杂,临床上也缺乏有效的干预措施^[1,4],因此,深入探究其病理机制并寻找新的防治策略,已成为当务之急。目前认为保护神经元是治疗和预防 I/R 损伤的关键之一^[3]。神经元损伤的机制之一是氧化应激过程中包括活性氧(ROS)等物质的增多以及抗氧化物质的减少^[5-6]。因此,及时清除生成的过氧化物或上调抗氧化物质水平,对于维持细胞稳态与预防 I/R 损伤具有关键作用。

1,7-二甲基黄嘌呤(paraxanthine)是一种天然膳食成分,也是咖啡因在人体内的主要代谢产物^[7]。研究显示,咖啡因及其代谢产物 paraxanthine 主要通过以下两种途径发挥抗炎作用,一方面他们可以降低单核细胞和中性粒细胞的趋化活性,另一方面,它们还能降低人血液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平^[8]。研究显示,灌胃 paraxanthine 小鼠在前肢握力测试和跑步机耐力训练中,表现出显著的运动激活作用、觉醒促进作用和多巴胺能作用^[7],其可以通过升高海马神经元细胞内的谷胱甘肽(GSH)水平而发挥神经保护作用^[9],但是 paraxanthine 对 I/R 所致神经元损伤是否具有保护作用尚不明确。本研究通过观察 paraxanthine 对于氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)损伤神经元细胞及对 I/R 损伤模型小鼠脑组织损伤的作用,并进一步探讨其具体作用机制,旨在探索缺血性脑卒中患者再灌注后神经功能缺损的有效临床干预手段,最终为临床治疗该病提供新的可行方案。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

C57BL/6 小鼠 30 只,约 7 周龄,体质量 21~24 g,全部购自山东朋悦实验动物科技有限公司。饲养于青岛大学 SPF 级别动物饲养平台,室内光照充足,温度保持在 20~26 °C,湿度 40%~70%,通风良好,且昼夜节律固定,小鼠自由摄食饮水。原代神经元细胞由青岛大学生物纳米制药联合实验室提供。

Paraxanthine 和 Cell Counting Kit-8 试剂盒均采购于上海陶术生物科技有限公司;多聚 D-赖氨酸和 ECL 发光液均采购于美国 Sigma 公司;Neuro-basal 培养基、B-27 补充剂及 L-谷氨酰胺采购于美

国 Gibco 公司;磷酸化 Akt 蛋白(p-Akt)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗和二抗(山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG)采购于武汉三鹰生物技术有限公司;PMSF 采购于上海碧云天生物技术股份有限公司;蛋白免疫印迹封闭用脱脂奶粉等采购于国药集团化学试剂有限公司;2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)、组织细胞固定液(4% PFA)及 RIPA 裂解液购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 皮质原代神经元细胞处理及分组

预先用多聚赖氨酸包被好 48 孔或 6 孔细胞培养板。随后,将皮质原代神经元细胞按 3×10^8 个/L 或 1.5×10^9 个/L 密度分别进行接种^[10],每种实验均设置 3 个重复孔。向接种后的细胞培养板中加入新鲜配制的神经元专用培养基(含 50 mL Neuro-basal 培养基、1% B-27 补充剂、0.5 μ mol/L 的 L-谷氨酰胺和 1% 青霉素-链霉素溶液),并将其置于含体积分数 0.05 CO₂、37 °C 的恒温细胞培养箱中培养 7 d,神经元培养期间需每 3 d 更换一半原培养基为新鲜培养基(用新鲜培养基替换等量旧液),同时定期观察神经元细胞生长状况。培养至第 7 天时,对神经元的细胞形态进行镜下观察,当其状态理想、胞体饱满、突触形态正常且连续时,将细胞分为对照组、OGD/R 组和 OGD/R + paraxanthine 组三组。对照组细胞在原培养条件下继续培养 7.5 h;OGD/R 组和 OGD/R + paraxanthine 组神经元细胞的培养基更换为脱氧无葡萄糖培养基,再置于 37 °C、含体积分数 0.95 N₂/体积分数 0.05 CO₂ 的环境当中继续培养 1.5 h,缺氧缺糖处理结束以后向 OGD/R + paraxanthine 组细胞培养基当中加入 40 μ mol/L 的 paraxanthine,OGD/R 组细胞培养基中加入等体积 DMSO,再置于 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中继续培养 6 h。

1.3 CCK-8 实验检测各组细胞的细胞活力

在 48 孔板中完成各组细胞的处理后,小心弃去原培养液,在避光条件下加入新鲜配制好的 CCK-8 工作液(CCK-8 原液和神经元培养基比例为 1:9),同时设置无细胞的空白对照孔(只加等体积 CCK-8 工作液),继续避光培养 6 h。使用 SpectraMAX ABS 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)进行每组细胞的吸光度值检测,检测波长为 450 nm,并根据测量数据计算各组的细胞活力。

1.4 蛋白免疫印迹实验检测各组细胞中 p-Akt 表达水平

收集 6 孔板中处理结束后的各组细胞,置于预先

配置好的蛋白裂解液(PMSF : RIPA = 1 : 100)中,提取细胞中的总蛋白。使用 SDS-PAGE 凝胶电泳将所得的样品中的蛋白质逐一进行分离。随后将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白通过转膜程序转移至 PVDF 膜(美国 Cytiva 公司)上,转膜成功后将其浸没于 5% 的脱脂牛奶中,室温条件封闭 2 h,结束后依次加入稀释好的一抗 p-Akt(1 : 2 000)及 β -actin(1 : 4 000),在 4 °C 条件下孵育过夜。次日于室温条件下继续孵育 30 min,然后使用 TBST 清洗条带 3 次,每次持续 10 min,然后室温条件下二抗孵育 1 h,TBST 清洗条带 3 次,每次持续 10 min,最后进行显影并获取结果。使用 ImageJ 软件分析各组蛋白条带的灰度值,以 β -actin 作为内参,计算出各组细胞中 p-Akt 相对表达水平。

1.5 动物分组及处理

C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为假手术(Sham)组、I/R 组和 I/R + paraxanthine 组三组,每组各 10 只小鼠,使用 4% 异氟烷对小鼠进行适度麻醉,然后剪开其颈部皮肤,分离周围组织以暴露一侧颈动脉。Sham 组小鼠仅于颈外动脉上进行造口处理,不阻塞其大脑中动脉;I/R 组小鼠颈外动脉造口成功后,取尺寸与小鼠的体质量适配的线栓插入至大脑中动脉中,阻塞 1.5 h 以后再拔出,随后恢复血流灌注 12 h,成功制备小鼠脑 I/R 模型^[10];在 I/R + paraxanthine 组小鼠制备脑 I/R 模型过程中,分别在血流恢复第 0 小时和第 3 小时,通过腹腔注射给予 40 mg/kg 的 paraxanthine。之后各组小鼠均继续正常饲养 24 h,并观察状态。整个处理过程中,I/R 组 4 只小鼠死亡,I/R + paraxanthine 组有 2 只小鼠死亡。

1.6 各组小鼠神经功能缺损程度评估及脑梗死体积百分比计算

各组小鼠处理结束并常规饲养 24 h 后,首先采用改良神经损伤严重程度评分(mNSS)评估各组小鼠的神经功能缺损程度。各组小鼠行为学评估结束后,以 4% 异氟烷进行麻醉后,将小鼠脑组织完整剥离并行冠状切片,共计 6 片,厚度 2 mm。小鼠的脑组织切片在使用含有 2% TTC 溶液的磷酸盐缓冲液染色 20 min 后,置于 4% PFA 溶液中,4 °C 下固定过夜。使用日本 Seiko Epson 公司扫描仪观察切片并拍照,为避免继发性水肿所致的假阳性结果,同时应测量对侧半球的正常体积和同侧半球的正常体积^[11]。所有图像的相关操作,包括获取、处理和分析,均严格在盲法条件下进行。小鼠脑梗死体积百

分比采用 ImageJ 软件计算。脑梗死体积百分比 = (对侧红色区域体积 - 同侧红色区域体积) / (对侧半球脑组织总体积 \times 2) \times 100%。

1.7 统计学处理

所有数据的统计分析采用 GraphPad Prism 软件完成。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行各组间的整体比较,采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著统计学意义。

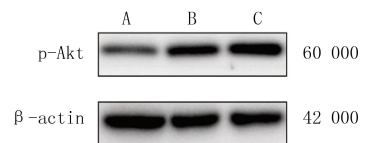
2 结 果

2.1 Paraxanthine 对神经元细胞活力的影响

CCK-8 实验结果显示,对照组、OGD/R 组以及 OGD/R + paraxanthine 组细胞的细胞活力分别为 (100.00 \pm 3.24)%、(49.00 \pm 4.93)%、(63.79 \pm 4.35)% , 各组间比较差异具有显著性 ($F = 115.30, P < 0.05$), 其中, OGD/R 组和 OGD/R + paraxanthine 组细胞的细胞活力均显著性低于对照组 ($t = 14.96, 11.56, P < 0.05$), OGD/R + paraxanthine 组显著高于 OGD/R 组 ($t = 3.86, P < 0.05$)。

2.2 各组细胞中 p-Akt 表达水平比较

蛋白免疫印迹实验结果显示,对照组、OGD/R 组和 OGD/R + paraxanthine 组细胞中 p-Akt 蛋白的相对表达水平分别为 0.56 \pm 0.07、1.04 \pm 0.08、1.39 \pm 0.40, 各组间比较差异有显著性 ($F = 15.07, P < 0.05$)。OGD/R 组、OGD/R + paraxanthine 组细胞中 p-Akt 相对表达水平显著性高于对照组 ($t = 9.81, 4.55, P < 0.05$), OGD/R 组与 OGD/R + paraxanthine 组细胞间相比较,差异无显著意义 ($P > 0.05$)。见图 1。



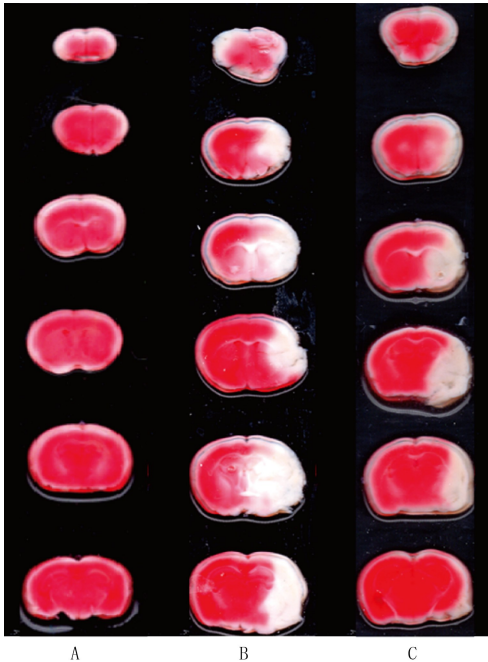
A: 对照组, B: OGD/R 组, C: OGD/R + paraxanthine 组

图 1 各组细胞中 p-Akt 表达水平比较

2.3 各组小鼠脑组织当中脑梗死体积百分比以及 mNSS 比较

Sham 组、I/R 组及 I/R + paraxanthine 组小鼠脑组织中脑梗死体积百分比依次为 0、(43.63 \pm 2.44)%、(30.05 \pm 0.84)%。各组间比较差异有显著性 ($F = 675.30, P < 0.05$); 与 Sham 组相比, I/R 组小鼠的梗死体积百分比显著上升 ($t = 31.00, P < 0.05$), 与 I/R 组相比, I/R + paraxanthine 组小鼠的

脑梗死体积百分比显著下降($t = 9.12, P < 0.05$)。见图2。Sham组、I/R组、I/R+paraxanthine组小鼠mNSS依次为0、(5.92±1.73)、(4.17±1.95)分,各组间的比较差异有显著性($F = 49.05, P < 0.05$);与Sham组相比,I/R组小鼠的mNSS显著性升高($t = 11.85, P < 0.05$),与I/R组相比,I/R+paraxanthine组小鼠的mNSS显著性降低($t = 2.33, P < 0.05$)。



A Sham, B I/R组, C I/R+paraxanthine组; TTC染色, 图中

白色部分为梗死脑组织,红色部分为正常脑组织

图2 各组小鼠脑梗死区域比较

3 讨论

脑组织I/R损伤的病理机制错综复杂,涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡及血脑屏障破坏等多个相互关联的生物学过程^[12-13]。其中,氧化应激被认为是启动和放大损伤级联反应的关键环节。I/R过程中会生成大量的ROS,可直接攻击细胞膜、蛋白质和DNA,导致神经元损伤甚至死亡。GSH是大脑中主要的抗氧化物质^[14],通过清除自由基与维持氧化还原平衡,发挥关键性保护作用。因此,探寻能够提升GSH水平或增强其抗氧化能力的化合物,已经成为I/R保护策略的研究热点之一。目前研究表明,paraxanthine可通过增加细胞内GSH水平发挥神经保护作用^[9],提示其可能具有治疗氧化应激相关神经系统疾病的潜力。

本研究结果显示,在体外实验中,OGD/R处理后原代神经元细胞的细胞活力显著性下降,在给予

paraxanthine干预以后,神经元细胞的细胞活力得以显著提升。说明paraxanthine对OGD/R诱导的神经元损伤具有保护作用,可抑制细胞死亡的进程或促进细胞生存信号的激活,但具体机制仍需进一步实验明确。

本研究结果显示,paraxanthine干预可显著降低I/R损伤小鼠的mNSS和脑梗死体积百分比,提示经paraxanthine治疗后,I/R损伤小鼠的感觉、运动及反射等神经功能显著改善,脑梗死体积下降,paraxanthine可显著减轻I/R损伤小鼠脑组织损伤程度,促进I/R损伤小鼠神经功能恢复。实验中出现的个别小鼠死亡,可能与手术操作过程中的技术失误或个体差异有关,后续需通过扩大样本量和优化手术操作来提高模型的稳定性和重复性。

PI3K/Akt信号通路是神经元调控的重要通路之一^[12],Akt通路参与多种病理反应^[15-16],其中,与神经系统损伤有关的疾病包括阿尔兹海默症^[17]、帕金森综合征^[18]、卒中^[19]和脊髓损伤^[20]等。已有研究表明,Akt磷酸化后可通过抑制凋亡相关蛋白、增强抗氧化酶活性以及调节炎症反应等多种途径,减轻脑I/R损伤对小鼠大脑皮质神经元的损伤^[21]。此外,Akt作为PI3K信号通路的核心激酶,其被磷酸化激活后,可通过调控合成及再生两条途径上调GSH水平,在多种细胞中已被证实,例如在卵母细胞^[22]、乳腺上皮细胞^[23]、PC12细胞^[24]和胃癌细胞^[25]等细胞实验中均显示出了上述的作用机制;而p-Akt又通过调控GSH合成来对抗氧化应激^[23]。本研究依据此理论,初步探讨了paraxanthine对ODG/R和I/R损伤的保护机制,实验结果显示,与对照组相比,OGD/R组及OGD/R+paraxanthine组神经元细胞当中的p-Akt水平均显著升高,而OGD/R组与OGD/R+paraxanthine组间差异无显著性,提示paraxanthine可能通过维持或者协同OGD/R诱导的p-Akt高表达,从而介导其神经保护作用。

综上所述,paraxanthine可显著性提高I/R损伤大脑皮质神经元细胞的细胞活力,并显著减轻了I/R损伤小鼠脑组织的损伤程度,促进了I/R损伤小鼠的神经功能恢复,其作用机制可能与神经元细胞中p-Akt水平上调有关。本研究有可能为缺血性脑卒中的预防和干预提供有价值的靶点。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的全部动物实验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL-

30493)。全部实验过程均严格遵照《实验动物管理条例》开展。

作者声明:王晓榕、李雨欣、张照龙参与了研究设计;王晓榕、徐锐、张照龙参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] RUAN Z H, CAO G S, QIAN Y S, et al. Single-cell RNA sequencing unveils Lrg1's role in cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating various cells[J]. J Neuroinflammation, 2023,20(1):285.
- [2] GBD 2015 DALYS AND HALE COLLABORATORS. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015; A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. Lancet, 2016,388(10053):1603-1658.
- [3] KALOGERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Ischemia/reperfusion[J]. Compr Physiol, 2016,7(1):113-170.
- [4] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion: From mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011,17(11):1391-1401.
- [5] HUANG G N, ZANG J K, HE L Z, et al. Bioactive nanoenzyme reverses oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in neurons under ischemic stroke[J]. ACS Nano, 2022,16(1):431-452.
- [6] WANG S Y, SHI X J, XIONG T L, et al. Inhibiting mitochondrial damage for efficient treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury through sequential targeting nanomedicine of neuronal mitochondria in affected brain tissue[J]. Adv Mater, 2024,36(50):e2409529.
- [7] JÄGER R, PURPURA M, WELLS S D, et al. Paraxanthine supplementation increases muscle mass, strength, and endurance in mice[J]. Nutrients, 2022,14(4):893.
- [8] HORRIGAN L A, KELLY J P, CONNOR T J. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe [J]. Pharmacol Ther, 2006,111(3):877-892.
- [9] MATSUMURA N, KINOSHITA C, BHADHPRASIT W, et al. A purine derivative, paraxanthine, promotes cysteine uptake for glutathione synthesis[J]. J Pharmacol Sci, 2023,151(1):37-45.
- [10] FLURI F, SCHUHMAN M K, KLEINSCHNITZ C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research[J]. Drug Des Devel Ther, 2015,9:3445-3454.
- [11] CUI Y, ZHANG Z L, LV M F, et al. Chromatin target of protein arginine methyltransferases alleviates cerebral ischemia/reperfusion-induced injury by regulating RNA alternative splicing[J]. iScience, 2024,27(1):108688.
- [12] ZHANG M, LIU Q, MENG H, et al. Ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Sig Transduct Target Ther, 2024,9(1):12.
- [13] PENG Y Q, SUN H, XU F, et al. Activation of BDNF-TrkB-PI3K-AKT signaling pathway by Tong-Qiao-Huo-Xue Decoction facilitates nerve regeneration and mitigates cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Phytomedicine, 2025,145:156966.
- [14] BAXTER P S, HARDINGHAM G E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2016,100:147-152.
- [15] ZHAO T F, QI Y Y, LI Y, et al. PI₃ Kinase regulation of neural regeneration and muscle hypertrophy after spinal cord injury[J]. Mol Biol Rep, 2012,39(4):3541-3547.
- [16] LIAO M S, LONG X Y, CHEN Y C, et al. PARP9 exacerbates apoptosis and neuroinflammation *via* the PI3K pathway in the thalamus and hippocampus and cognitive decline after cortical infarction[J]. J Neuroinflammation, 2025,22(1):43.
- [17] LIU S, XU L T, SHEN Y, et al. Qingxin Kaiqiao Fang decreases Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease *via* the PI3K/Akt/GSK3 β pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2024,318(Pt B):117031.
- [18] FARID H A, SAYED R H, EL-SHAMARKA M E, et al. PI3K/AKT signaling activation by roflumilast ameliorates rotenone-induced Parkinson's disease in rats [J]. Inflammopharmacology, 2024,32(2):1421-1437.
- [19] SHI C S, HU Q, FANG S L, et al. microRNA-204-5p ameliorates neurological injury *via* the EphA4/PI3K/AKT signaling pathway in ischemic stroke[J]. ACS Chem Neurosci, 2023,14(11):2060-2073.
- [20] LI C J, QIN T, JIN Y X, et al. Cerebrospinal fluid-derived extracellular vesicles after spinal cord injury promote vascular regeneration *via* PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Orthop Translat, 2023,39:124-134.
- [21] ZHENG T, JIANG T T, MA H X, et al. Targeting PI3K/Akt in cerebral ischemia reperfusion injury alleviation: From signaling networks to targeted therapy [J]. Mol Neurobiol, 2024,61(10):7930-7949.
- [22] QI Y T, XIA W, TAO C Y, et al. AQP7-mediated mitochondrial redox homeostasis in vitrified oocytes: A genetic mechanism of PI3K/AKT signaling regulation[J]. Genes, 2025,16(7):730.
- [23] LIEN E C, LYSSIOTIS C A, JUVEKAR A, et al. Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI(3)K/Akt-driven breast cancer[J]. Nat Cell Biol, 2016,18(5):572-578.
- [24] LI C C, PAN Z, XU T J, et al. Puerarin induces the upregulation of glutathione levels and nuclear translocation of Nrf2 through PI3K/Akt/GSK-3 β signaling events in PC12 cells exposed to lead[J]. Neurotoxicol Teratol, 2014,46:1-9.
- [25] XIA L, CHEN Y Q, LI J T, et al. B7-H3 confers stemness characteristics to gastric cancer cells by promoting glutathione metabolism through AKT/pAKT/Nrf2 pathway[J]. Chin Med J, 2023,136(16):1977-1989.