

低氧预适应对小鼠海马神经保护作用机制研究

——基于TSC1/mTOR/自噬信号通路

齐瑞芳^{1,2}, 李娜^{1,2}, 吕军^{1,2}, 石瑞丽^{1,2}, 马宝慧^{1,2}, 时静华^{1,2}, 郝肖琼^{1,2}, 邵国^{1,2,3*}

1. 内蒙古科技大学包头医学院基础医学与法医学院, 包头 014040

2. 内蒙古低氧适应转化医学重点实验室, 包头 014040

3. 广东省深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心, 深圳 518172

摘要 为研究低氧预适应(HPC)对小鼠海马神经保护作用的机制,采用Western Blot方法检测对照组、低氧组、低氧预适应组3组实验小鼠的TSC1、mTOR和磷酸化mTOR及LC3蛋白的表达,验证TSC1/mTOR/自噬通路是否参与HPC对小鼠海马的神经保护作用。通过体外HT22细胞转染TSC1-peGFP,给予低氧刺激后,采用MTS法检测细胞活性,进一步确定TSC1在低氧条件下的神经保护作用。结果显示,HPC可增加小鼠低氧耐受时间;与对照组相比,HPC组TSC1蛋白表达升高,磷酸化mTOR蛋白表达下降;体外转染eGFP-TSC1质粒组与空载组相比,细胞活性增强。结果表明HPC可能通过上调TSC1表达,下调mTOR磷酸化水平激活自噬对小鼠海马发挥神经保护作用。

关键词 低氧预适应;TSC1;mTOR;自噬;神经保护

缺血/低氧预适应(ischemic/hypoxic preconditioning, I/HPC)是一种内源性的细胞保护机制,通过预先给予短暂的亚致死性缺血/低氧,可增加机体对随后致命的缺血/低氧的耐受^[1-2]。这种保护作

用可发生在心、脑、肾脏等脏器中。大脑虽然只占体重的2%左右,但其耗氧量达到20%^[3]。大脑的氧气供应不足或血流量减少会导致神经元和非神经细胞发生明显的代谢变化,从而造成不同程度的

收稿日期:2021-05-15;修回日期:2021-12-14

基金项目:国家自然科学基金项目(81660307,82060337);内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS03093);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY20171);包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-BSJJ-202003);包头医学院花蕾计划项目(HL2020001,HL2020006,HL2020014,HL2020027)

作者简介:齐瑞芳,副教授,研究方向为低氧预适应神经保护,电子信箱:qirui Fang123@163.com;邵国(通信作者),教授,研究方向为低氧预适应脑保护的表现遗传,电子信箱:shao_guo_china@163.com

引用格式:齐瑞芳,李娜,吕军,等.低氧预适应对小鼠海马神经保护作用机制研究——基于TSC1/mTOR/自噬信号通路[J].科技导报,2022,40(13):107-113;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2022.13.011

神经解剖学损伤和相关的神经缺陷。大脑中最脆弱的区域是脑干、海马区 and 大脑皮层。海马区是与学习和记忆有关的脑区,缺血/低氧损伤会引起学习和记忆能力下降,因此对海马区缺血/低氧保护的研究具有重要的现实意义^[4]。脑缺血/缺氧主要是脑卒中、新生儿缺氧性脑病和各种神经退行性等疾病发生和发展的重要因素。

HPC的机制非常复杂且不明确,可能涉及多种效应器,例如代谢抑制,细胞外和细胞内防御机制的激活,神经元兴奋/抑制平衡的改变以及炎症后遗症的减少^[5]。有研究报道低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)可能参与了HPC对海马CA1锥体神经元对随后的短暂性脑缺血的神经保护作用^[6]。IPC可通过诱导结节硬化因子1(tuberous sclerosis complex1, 简称TSC1, 又名hamartin)上调、激活自噬途径而增加CA1脑区神经细胞的缺血耐受,自噬赋予对缺血的神经保护作用^[7]。而HPC能否通过调节TSC1/mTOR/自噬通路对小鼠海马区发挥神经保护作用,以及TSC1是否在HPC发挥神经保护中起到关键作用,目前有关研究较少,这可能是一种研究HPC机制的新思路。本研究通过建立小鼠整体低氧预适应模型,通过Western Blot检测TSC1、mTOR、磷酸化mTOR、LC3蛋白的表达,确定TSC1/mTOR/自噬通路是否参与HPC对小鼠海马区的神经保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

癌症研究所(Institute of Cancer Research, ICR)成年雄性小鼠,体重18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司中心。

1.2 实验细胞

小鼠海马神经元HT22细胞系购自北京协和细胞所。

1.3 试剂与仪器

TRIzol和反转录试剂盒购自美国Invitrogen公

司,RIPA裂解液购自杭州碧云天生物技术公司,兔抗TSC1、mTOR、磷酸化mTOR(Ser2448)、LC3多克隆抗体购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的驴抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Alexa FluorTM594山羊抗兔IgG购自美国Invitrogen公司;DMEM培养基购自美国Gibco公司,Neon™ Transfection System电转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,CellTiter 96® Aqueous单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)购自美国Promega公司,Annexin V/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。垂直电泳槽和蛋白电泳仪购自美国Bio Rad公司,化学发光仪购自上海天能科技有限公司,实时全光谱激光共聚焦显微镜Nikon A1购自日本Nikon公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组

将ICR小鼠随机分为正常对照组(control)、低氧处理组(hypoxia)和低氧预适应组(HPC),模型建立完毕后(模型方法见1.4.2),分别于0、1、2、3、4 d后处死小鼠,冰上分离海马组织,样品冻于-80℃备用。

1.4.2 HPC模型的建立

采用吕国蔚的HPC模型进行实验。将ICR小鼠置于125 mL玻璃瓶中,用胶塞密封,待小鼠出现喘息式呼吸时,将其取出(此时为小鼠呼吸耐受的极限),此时的小鼠为低氧处理组即hypoxia组,HPC组的小鼠需在呼吸恢复后再次放入新的玻璃瓶中继续进行低氧,如此反复4次。Control组的小鼠作为空白对照组不做处理。

1.4.3 Western Blot

将冻于冰箱的样品取出,冰上解冻,每个海马组织中加入300 μ L的RIPA裂解液,3 μ L蛋白酶及磷酸酶抑制剂,超声波细胞破碎仪辅助裂解。充分裂解后,4℃ 12000 r/min离心15 min,取上清,BCA法进行蛋白定量。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,mTOR和LC3按照每孔蛋白15 μ g上样,而TSC1按照每孔30 μ g上样。电泳条件:上层浓缩胶恒流10 mA,下层分离胶恒流15 mA;接着转膜,条件为400 mA恒流过夜,将蛋白转移到PVDF膜。封闭:5%脱脂奶粉室温1 h,洗膜TBST 3次,每次10

min; 4℃孵育一抗(各抗体浓度均为 1:1000)过夜。TBST洗膜洗膜3次,每次10 min,室温孵育辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二抗(1:1000)1 h; TBST洗膜3次,每次10 min, ECL发光,采用Image J进行图像灰度值测定^[8]。

1.4.4 HT22细胞培养

使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基培养HT22细胞,培养条件为37℃ 5%CO₂。

1.4.5 细胞分组和低氧模型建立

本研究将HT22细胞分为空载质粒组和TSC1过表达组,依据前期的实验方法,本实验低氧采用的条件为:1%O₂刺激13 h,6 h复氧,进行后续的实验^[9]。

1.4.6 电转染

取生长状态良好的HT22细胞,按照电转染试剂盒提供的方法进行电转染。将细胞分为空载质粒组(Vector组)和TSC1组(即TSC1过表达组),电转染条件为电压1200 mV、2次脉冲、时间20 ms。转染结束后,将HT22细胞按照10⁵/孔的密度种于96孔板中,24 h后在荧光倒置显微镜下观察细胞,如细胞已长至融合度为60%~70%作用时,给予1%O₂的低氧刺激13 h,6 h复氧,进行细胞活性检测^[9]。本实验的转染效率大约为30%左右。

1.4.7 细胞活性检测

使用单溶液细胞增殖检测试剂(MTS)检测细胞活性。细胞电转染低氧复氧处理结束后,取出96孔板,每孔中直接加入20 μL的MTS液,放入37℃培养箱中避光孵育3 h。使用酶标仪在490 nm处检测细胞OD值。细胞活性计算公式为:细胞活性=[(TSC1组OD值-调零孔OD值)/(空载组OD值-调零孔OD值)]×100%。

1.4.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

将处理结束的HT22细胞,按照说明书收集其上清培养液至离心管中;向培养细胞的皿中加入3 mL预冷的PBS,清洗2次,并将PBS同时收集至相应的离心管中;1000 r/min离心5 min,去上清;用胰酶消化培养皿中的细胞,放置在倒置显微镜下观察细胞形态,当发现培养皿中的细胞发生皱缩现象时,立即弃去胰酶,加入含有10%胎牛血清的完全

培养基终止消化,将细胞吹散,收集至离心管中;阳性对照组放入提前准备好的55℃水浴锅中,加热5 min;将收集好的细胞和阳性对照组的细胞均放入离心机,1000 r/min离心5 min;弃去上清,加入3 mL预冷的PBS清洗细胞,用手将管底的细胞轻轻弹起,1000 r/min离心5 min,弃上清,重复3次;向管底的细胞中加入1 mL的1×Binding Buffer,用手轻轻弹起,将细胞悬浮,将细胞悬液移至流式管中每管500 μL,相应标记后进行染色,室温下避光染色15 min(注:所有收集细胞的离心管均需放置在冰上操作)。结果判定:右下象限即Q2区代表为早期凋亡细胞,右上象限即Q4区为晚期凋亡细胞,左上象限即Q1区为不能存活的坏死细胞,左下象限即Q3区为活细胞。凋亡率(%)=早期凋亡百分比+晚期凋亡百分比。

1.4.9 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 研究结果

2.1 HPC可增加低氧耐受时间

本研究发现随着低氧次数的增加,小鼠的低氧耐受时间逐渐增加,曲线接近线性关系(图1, $n=15$),此结果表示HPC可增加小鼠对低氧的耐受。

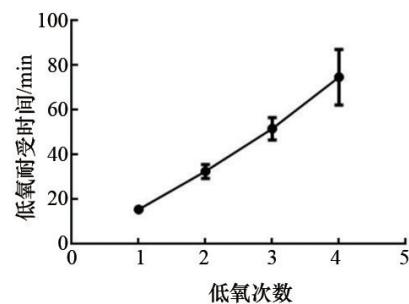
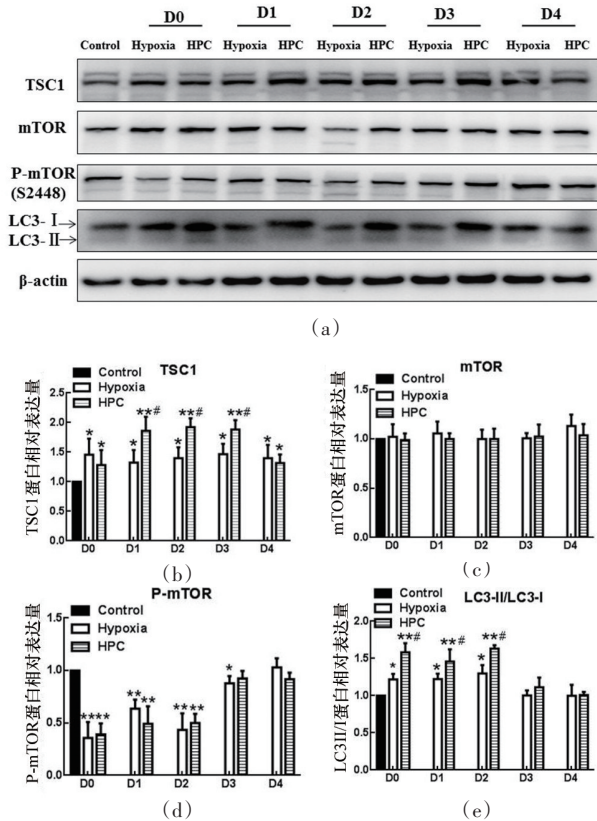


图1 低氧次数对小鼠耐受时间的影响

2.2 HPC上调TSC1蛋白表达,下调磷酸化mTOR,激活自噬

用Western Blot方法检测小鼠总海马区TSC1蛋白表达与低氧时间关系。结果如图2所示,与对

对照组相比,低氧组 TSC1 在 0~4 d 处死的小鼠海马区中均被上调;在低氧预适应组中, TSC1 与对照组相比在 0~4 d 也被上调,在第 1~3 d, HPC 组 TSC1 的表达要高于其对应的低氧组,差异具有统计学意义 ($P<0.05, n=6$),提示 TSC1 的表达可能是由 HPC 所引起的而不是低氧刺激。第 4 d 时 TSC1 在 HPC 组出现下降的趋势。



(a) HPC 处理后小鼠海马区 TSC1、mTOR、P-mTOR 及 LC3 蛋白印迹典型的图片;(b) TSC1 蛋白的相对表达量;(c) mTOR 蛋白的相对表达量;(d) P-mTOR 蛋白的相对表达量;(e) LC3-II/LC3-I 蛋白比值的相对表达

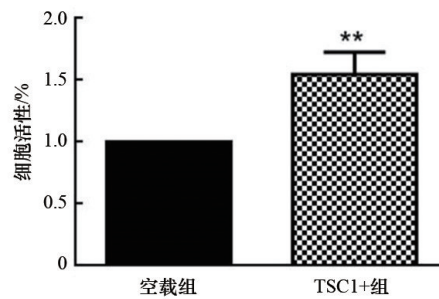
图2 HPC 对小鼠海马区 TSC1、mTOR、P-mTOR 及 LC3-II/LC3-I 蛋白比值的影响

低氧和低 HPC 对各组间总 mTOR 的影响不大,没有统计学差异。磷酸化 mTOR (Ser2448) 蛋白的表达在低氧组在 0~2 d 均表现出明显的下调的趋势 ($P<0.01, n=6$),从第 3 天开始其表达开始恢复,但仍低于对照组 ($P<0.05, n=6$);HPC 组在 0, 1, 2 d 表现出下降趋势 ($P<0.01, n=6$),在第 3 天基本上恢复正常,但低氧组与 HPC 组没有明显差异。自噬标记物

LC3 的变化,与对照组相比, HPC 组的 LC3-II/LC3-I 蛋白比值与对照组相比其值上调 ($P<0.01, n=6$),且 HPC 与低氧组比也具有统计学差异 ($P<0.05, n=6$)。以上结果提示由 TSC1/mTOR/自噬信号通路可能参与了 HPC 对小鼠海马区神经保护,而 TSC1 可能是 HPC 发挥神经保护的关键分子。

2.3 低氧条件下 TSC1 增加 HT22 细胞活性

HT22 细胞瞬时电转染 TSC1-peGFP 和空载质粒后,待其生长 24 h 后给予 13 h 的 1% 的低氧刺激,接着进行 6 h 的复氧,随后用 MTS 方法检测 HT22 细胞活性。MTS 结果显示:设空载质粒组 (vector 组) 相对活性为 1,过表达 TSC1 基因后 HT22 细胞在低氧刺激后,细胞的活性为 (1.545 ± 0.08),与空载组相比有显著性差异 ($P<0.01, n=6$,图 3)。结果提示 TSC1 在低氧条件下可增加细胞活性。



**表示 $P<0.01$ vs Vector 组

图3 低氧条件下 TSC1 对 HT22 细胞活性的影响

2.4 低氧条件下 TSC1 可降低 HT22 细胞凋亡

HT22 细胞转染 TSC1-peGFP 和空载质粒后,待细胞生长 24 h 后镜下观察细胞,给予 13 h 的 1% 的低氧刺激,接着进行 6 h 的复氧后,使用流式细胞仪检测 HT22 细胞的凋亡。以未做处理的细胞设为对照组,其凋亡率为 0。空载组细胞低氧刺激后,凋亡率为 (36.48 ± 3.77)%,HT22 细胞过表达 TSC1 基因受到低氧刺激后,凋亡的比例下降为 (23.43 ± 4.99)%,与空载质粒低氧组相比有差异具有统计学意义 ($P<0.05, n=6$,图 4)。结合 2.3 和 2.4 的结果,表明 TSC1 在小鼠海马 HT22 细胞受到低氧刺激时,可通过增加 HT22 细胞的活性降低细胞凋亡发挥神经保护作用。

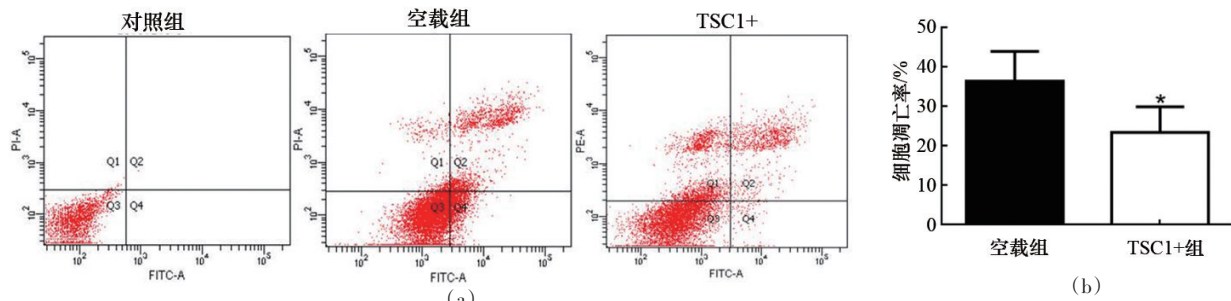


图4 TSC1在低氧条件下对细胞凋亡的影响

3 结论

低氧/缺血是临床常见的生理/病理过程,由其引发的疾病对人类的健康造成极大的威胁,并给社会带来极大的经济负担。HPC可通过重复低氧增加低氧耐受时间从而对小鼠发挥神经保护作用。有研究报道HPC影响大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小胶质细胞的极化,减轻脑神经损伤,对MCAO模型具有保护作用^[10]。HPC所涉及的机制较多且尚不明确。本研究以TSC1/mTOR/自噬信号通路为切入点,通过研究HPC对小鼠海马区TSC1/mTOR/自噬信号通路各基因表达的变化,确认此通路是否参与了HPC对小鼠海马区的神经保护,结果显示HPC可上调TSC1的表达,而下调磷酸化mTOR的表达进而激活自噬,且TSC1在其中发挥重要的作用。

TSC1又被称为hamartin,是由人类TSC1基因编码的蛋白质。TSC1基因N端有一跨膜结构域可与TSC2(tuberin)的结构域结合形成TSC1/TSC2复合体^[11]。TSC2蛋白含有一个GTP酶活化蛋白(GTPase-activating protein, GAP)结构域。GAP将小GTP酶Rheb(Ras-homology enriched in brain)由Rheb-GTP转化为无活性的Rheb-GDP结合形式。小GTP酶Rheb是雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)的直接上游激活蛋白^[12]。mTOR作为核心组件存在于雷帕霉素靶蛋白复合物mTORC1中,mTORC1是各种生理状态(例如氨基酸水平和能量状态)的主要整合者,以促进细胞生长和增殖^[13]。因此,TSC1/TSC2复合体实际发挥着抑制mTORC1活性的作用^[14]。通过mTORC1可

调节细胞的生长、增殖、能量、环境应激和自噬等活动^[15]。TSC1/TSC2复合体的表达受环境压力和能量的影响。在压力(DNA损伤,HPC)或低能量的情况下,它被激活并调节蛋白质合成^[16]。而在氧气消耗(即低氧)的条件下,mTORC1信号受到抑制^[17]。这与本研究的结果符合,HPC可通过上调TSC1的表达下调磷酸化mTOR对小鼠海马区发挥神经保护作用。通过体外过表达TSC1后,给予小鼠海马HT22细胞低氧刺激,与空载质粒组相比,过表达TSC1可增加细胞活性、减少细胞凋亡,说明增加TSC1基因表达,可增加对低氧的耐受。

自噬是进化过程中高度保守的分解代谢机制。它主要降解短命蛋白,自噬还通过溶酶体消除改变的细胞器、长寿命和错误折叠的蛋白质^[18]。可以通过多种形式的化学和物理应激诱导,包括内质网应激和缺氧,在哺乳动物应激反应中起着不可或缺的作用。影响自噬活性的调节机制比较复杂,其中包括Hif和mTOR等信号通路^[19]。在低氧条件下,自噬的激活可以在体内外增加神经细胞对低氧的耐受,推测激活自噬可增加维持神经细胞功能能量供应,进而提高了细胞在低氧条件下的存活^[20]。在体外缺血模型中,Hif脯氨酰羟化酶抑制剂通过诱导自噬发挥保护作用^[21]。但是并不是所有的自噬激活都是有益的,过度自噬也可能导致自噬依赖性细胞死亡^[22]。本研究前期通过体外培养HT22细胞给予自噬抑制剂,结果显示,在HPC中自噬的激活发挥神经保护作用而非自噬依赖性死亡^[8]。推测本实验中自噬的增加,可能是HPC对小鼠海马保护作用的机制之一。本研究的结果为进一步丰富对HPC海马区神经元神经保护分子机制的认识,为临

床脑缺血/低氧疾病有效的治疗靶点提供可靠的实验依据,具有潜在的实际应用价值。

参考文献(References)

- [1] Li S, Ren C, Stone C, et al. Hamartin: An endogenous neuroprotective molecule induced by hypoxic preconditioning[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 582368.
- [2] 齐瑞芳, 张晓璐, 邵国. 氧气的适应性机制及低氧预适应研究进展[J]. *科技导报*, 2020, 38(2): 86-91.
- [3] Mai C, Mankoo H, Wei L, et al. TRPM2 channel: A novel target for alleviating ischaemia-reperfusion, chronic cerebral hypo-perfusion and neonatal hypoxic-ischaemic brain damage[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(1): 4-12.
- [4] Zhu M, Xu M, Zhang K, et al. Effect of acute exposure to hypobaric hypoxia on learning and memory in adult Sprague-Dawley rats[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019, 367: 82-90.
- [5] Li S, Hafeez A, Noorulla F, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia[J]. *Progress in Neurobiology*, 2017, 157: 79-91.
- [6] Lee J C, Tae H J, Kim I H, et al. Roles of HIF-1 α , VEGF, and NF- κ B in ischemic preconditioning-mediated neuroprotection of hippocampal CA1 pyramidal neurons against a subsequent transient cerebral ischemia [J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(9): 6984-6998.
- [7] Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, et al. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(3): 351-357.
- [8] 赵志军, 曹菡, 刘宇通, 等. 低氧预适应对 HT22 细胞自噬的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2021, 37(1): 79-83.
- [9] Qi R, Zhang X, Xie Y, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases hypoxia tolerance-dependent autophagy in mouse neuronal cells by initiating the TSC1/mTOR pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109219.
- [10] Huang L, Wu S, Li H, et al. Hypoxic preconditioning relieved ischemic cerebral injury by promoting immunomodulation and microglia polarization after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Brain Research*, 2019, 1723: 146388.
- [11] Lim J S, Gopalappa R, Kim S H, et al. Somatic mutations in TSC1 and TSC2 cause focal cortical dysplasia [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2017, 100(3): 454-472.
- [12] Li Z, Kong Y, Song L, et al. Plk1-mediated phosphorylation of TSC1 enhances the efficacy of rapamycin[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(11): 2864-2875.
- [13] Kim J, Guan K L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 63-71.
- [14] Dong P, Wang X, Liu L, et al. Dampened VEPH1 activates mTORC1 signaling by weakening the TSC1/TSC2 association in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 73(6): 1446-1459.
- [15] Magaway C, Kim E, Jacinto E. Targeting mTOR and metabolism in cancer: Lessons and innovations[J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1.
- [16] Engin A B, Engin A, Gonul II. The effect of adipocyte-macrophage crosstalk in obesity-related breast cancer [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2019, 62(3): 201-222.
- [17] Yeo E J. Hypoxia and aging[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 51(6): 1-15.
- [18] Jawhari S, Ratinaud M H, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: A survival-prone 'menage-a-trois'[J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7(10): e2434.
- [19] Wang Y, Zhang H. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 67-83.
- [20] Herrera M I, Udovin L D, Toro-Urrego N, et al. Neuroprotection targeting protein misfolding on chronic cerebral hypoperfusion in the context of metabolic syndrome [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2018, 12: 339.
- [21] Singh A, Wilson J W, Schofield C J, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an in-vitro ischaemia model[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1597.
- [22] Tang D, Kang R, Berghe T V, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Research*, 2019, 29(5): 347-364.

Mechanism of hypoxic preconditioning on neuroprotective effect of mouse hippocampus——Based on TSC1/mTOR/autophagy signaling pathway

QI Ruifang^{1,2}, LI Na^{1,2}, LV Jun^{1,2}, SHI Ruili^{1,2}, MA Baohui^{1,2}, SHI Jinghua^{1,2}, HAO Xiaoqiong^{1,2}, SHAO Guo^{1,2,3*}

1. Preclinical and Forensic Medicine, Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China
2. Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine of Inner Mongolia, Baotou 014040, China
3. Center for Translational Medicine, Third People's Hospital, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, shenzhen 518172, China

Abstract The purpose of this study is to understand the neuroprotective mechanism of hypoxic preconditioning (HPC) on mouse hippocampus. ICR mice were divided into the control group, hypoxia group and HPC group. Western Blot was used to detect the protein expression of TSC1, mTOR, phosphorylated mTOR and LC3 to ascertain whether TSC1/mTOR/autophagy pathway was involved in the neuroprotective effect of HPC on mice hippocampus. In order to further study the role of TSC1 in hypoxia, TSC1 pEGFP was transfected into HT22 cells in vitro. After hypoxia stimulation, the viability of cells was detected by MTS assay to determine the neuroprotective effect of TSC1 under hypoxia. Results showed that HPC increased the hypoxia tolerance time of mice, the expression of TSC1 protein increased and the expression of P-mTOR protein decreased in HPC group compared with those in the control group, and that the cell viability of TSC1-peGFP plasmid group was increased compared with that in the vector group. The results suggested that HPC played the neuroprotective role in the hippocampus of mice by activating autophagy through up-regulating the expression of TSC1 while down-regulating mTOR phosphorylation level.

Keywords hypoxic preconditioning; TSC1; mTOR; autophagy; neuroprotection ●



(责任编辑 徐丽娇)