

文章编号:1003-2754(2019)05-0395-06

HIF-1 α 对大鼠创伤后认知功能障碍的影响研究

张启财¹, 张 赛², 孙中磊³

摘要: 目的 提高低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的水平对大鼠颅脑创伤(Traumatic Brain Injury, TBI)后认知功能障碍的影响及其机制初步探索。方法 将大鼠随机分为3组: sham组、TBI组、脯氨酸羟化酶(Prolyl Hydroxylase, PHD)抑制剂组, TBI组和PHD抑制剂组均采用皮质撞击致伤法构建模型; TBI完成3 d后每组大鼠随机取10只, 取海马组织, 采用Western blot法检测HIF-1 α 及其下游蛋白表达水平, 荧光原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测神经细胞凋亡; 1 m后采用Morris水迷宫试验检测大鼠记忆功能, 取海马组织, 检测认知功能障碍相关蛋白。结果 大鼠TBI术后3 d TBI组与sham组相比HIF-1 α 、促血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)表达水平升高($P < 0.01$), 差异具有统计学意义, PHD抑制剂组与TBI组相比HIF-1 α 、VEGF、EPO表达水平升高($P < 0.01$), 差异具有统计学意义; 大鼠TBI术后1 m TBI组与sham组相比平均逃避潜伏期延长($P < 0.01$), 目标象限停留时间与穿越平台次数减少($P < 0.01$), 海马组织中淀粉样蛋白 β 1-42(β -amyloid peptide1-42, A β 1-42)、tau含量明显升高($P < 0.01$), 差异具有统计学意义; PHD抑制剂组与TBI组相比平均逃避潜伏期缩短($P < 0.01$), 目标象限停留时间与穿越平台次数增加($P < 0.01$), 海马组织中A β 1-42、tau含量明显减少($P < 0.01$), 差异具有统计学意义。结论 提高HIF-1 α 的表达水平可明显改善大鼠神经功能预后, 提高大鼠记忆水平, 减少TBI大鼠的海马组织中A β 1-42和tau的含量, 减少大鼠TBI后认知功能障碍的发生, 为TBI后认知功能障碍的治疗及预防提供一个新的靶点。

关键词: 颅脑创伤; 低氧诱导因子-1 α ; 认知功能障碍; 淀粉样蛋白 β 1-42; tau; 促血管内皮生长因子; 促红细胞生成素

中图分类号: R749.1+2 文献标识码: A

Effect of HIF-1 α on post-traumatic cognitive disorder in rats ZHANG Qicai, ZHANG Sai, SUN Zhonglei. (Department of Neurology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of changing the level of HIF-1 α on cognitive impairment after traumatic brain injury (TBI) in rats and its mechanism. **Methods** Rats were randomly divided into three groups: sham group, TBI group, PHD inhibitor group, TBI group and PHD inhibitor group. Cortical impact injury was used to construct the model. Three days after completion of TBI, 10 rats in each group were randomly selected, hippocampus tissue was taken, HIF-1 α and its downstream protein levels were detected by Western blot, and neuronal apoptosis was detected by fluorescent TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Morris water maze test was performed one month later. The memory function of rats was measured, and the hippocampus was taken to detect dementia-related proteins. **Results** The expression levels of HIF-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Erythropoietin (EPO) in TBI group were significantly higher than those in sham group 3 days after TBI ($P < 0.01$). The expression levels of HIF-1 α , vascular endothelial growth factor and EPO in Prolyl Hydroxylase (PHD) inhibitor group were significantly higher than those in TBI group ($P < 0.01$). The average escape latency of TBI group was longer than that of sham group one month after TBI operation ($P < 0.01$), the target quadrant residence time was less than that of traversing the platform ($P < 0.01$), and the contents of amyloid protein beta-42 (A β 1-42) and tau in hippocampus tissue were significantly increased ($P < 0.01$), the difference was significant between PHD inhibitor group and TBI group. Compared with the control group, the average escape latency was shortened ($P < 0.01$), the target quadrant residence time and platform crossing times were increased ($P < 0.01$), and the contents of A β 1-42 and tau in hippocampus were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Increasing the expression level of HIF-1 α can significantly improve the prognosis of neurological function, improve the memory level of rats, reduce the content of A β 1-42 and tau in hippocampus tissue of TBI rats, reduce the incidence of dementia after TBI rats, and provide a new target for the treatment and prevention of dementia after TBI.

Key words: TBI; HIF-1 α ; Cognitive disorder; A β 1-42; Tau; VEGF; EPO

研究表明颅脑创伤 (Traumatic Brain Injury, TBI) 可增加认知功能障碍发生的风险^[1,2]。认知功能障碍的主要表现为A β 升高, 尤其是A β 的寡聚形式在神经元中的毒性作用, 最终导致神经突触传递失败^[3,4]。神经细胞生理需要持续供应氧和葡萄糖, TBI后的大脑组织中发现有氧糖酵解减少, 导致

收稿日期: 2019-03-05; 修订日期: 2019-05-05

基金项目: 国家重点研究发展计划 (2016YFC1101500)

作者单位: (1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 武警特色医学中心, 天津 300162; 3. 枣庄矿业集团中心医院, 山东 枣庄 277800)

通讯作者: 张 赛, E-mail: 1602288522@qq.com

细胞存活机制丧失,这与其他潜在的致病过程结合,最终导致神经变性增加认知功能障碍的风险^[5]。代谢减退可能改变淀粉样蛋白 β 前体蛋白(amyloid β precursor protein, APP)的表达和转换,最终导致A β 的产生和清除失衡^[6,7]。APP的过度表达、A β 的产生和清除的不平衡可能是由于认知功能障碍患者的额叶、顶叶、枕叶皮质和纹状体的葡萄糖代谢缺乏所致,认知功能障碍患者大脑皮质存在氧化能代谢缺陷^[8]。这种与能量相关的代谢应激导致APP代谢改变并导致认知功能障碍中的淀粉样变性^[9]。

脯氨酸羟化酶(Prolyl Hydroxylase, PHD)可以识别低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) odd区脯氨酸残基Pro402和N-TAD区的Pro564,使之发生羟基化,进而经过希佩尔林道蛋白介导而进行泛素化降解。在缺氧条件或PHD抑制剂存在时,PHD羟基化活性下降,阻碍了HIF-1 α 的降解,使HIF-1 α 稳定表达并积累,从而激活下游靶基因^[10]。因此,PHD抑制剂被本研究采用作为提高HIF-1 α 水平的药物。

缺氧诱导因子(HIF)是以适应缺氧改善葡萄糖代谢的细胞转录因子。在其他几种疾病中发生作用,包括癌症炎症反应、抗细胞凋亡、血管生成和恶性细胞增殖^[11,12]。虽然最近的实验研究证明其稳定表达在大脑中具有神经保护作用,但它在认知功能障碍中的确切作用很少^[13]。因此,关于HIF在认知功能障碍中作为神经保护剂的可能对医学研究具有重要意义。本研究探讨了HIF在认知功能障碍中的作用及其未来前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠60只,6~8周龄,体重200~300g,由人民解放军军事医学科学院动物实验中心提供,SCXK-(军)2012-0004,饲养环境为清洁级动物室(SPF级)。

1.1.2 主要实验器材与材料 电子脑皮质撞击仪(eCCI, Custom&Design),石蜡切片机(Leica),荧光显微镜(OLYMPUS),低温离心机(深圳柯俊公司粉碎仪, Morris水迷宫(上海欣软科技有限公司),PHD抑制剂(MK-8617, MedchemExpress), Anti-Rabbit A β 1-42(Abcam), Anti-Rabbit tau(Abcam), Anti-Rabbit β -Tubulin(Abcam), Anti-Rabbit HIF-1 α (Abcam), Anti-Rabbit - VEGF(Abcam), Anti-Rabbit-EPO(Abcam), TUNEL 荧光试剂盒(Roche)。

1.2 方法

1.2.1 建立TBI大鼠模型 将大鼠随机分为sham组(20只)、TBI组(20只)、PDH抑制剂组(10只)。采用皮质撞击致伤法建立大鼠TBI模型^[8],术前6h禁食水。实验组大鼠经4%水合氯醛10ml/kg腹腔注射麻醉后,头部剃毛,取俯卧固定于立体定向仪上,常规消毒铺巾。沿矢状切开头皮,剥离骨膜,以凶点为原点(AP: -2.5 mm L; 2.5 mm)(AP: -2.5 mm R; 2.5 mm)分别行颅钻钻孔(直径约4.0 mm),显露硬脑膜,并保持其完整无损。将eCCI打击壁调整至与垂直方向呈20°角,使用3mm打击帽精确打击右侧大脑皮质以造成弥漫性轴索损伤。实验组的打击参数为(AP: -2.5 mm R; 2.5 mm H; 3 mm),打击速率均为5 m/s,打击最低点持续时间均为200 ms。TBI后处理创口彻底止血,缝合头皮。sham组仅磨除颅骨,不进行打击操作。

1.2.2 PDH抑制剂干预 大鼠造模后PDH抑制剂组给予15 mg/kg腹腔注射^[14],1次/d,连续3d。sham组和TBI组分别注射等体积的生理盐水。

1.2.3 Western blot法检测大鼠海马组织淀粉样蛋白 β 1-42(β -amyloid peptide1-42, A β 1-42)、tau、HIF-1 α 、促血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO) 用BCA蛋白质测定试剂盒评估蛋白质浓度。使用十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质并转移至聚偏二氟乙烯膜。用含0.1%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲盐水(PBS)在室温下将膜封闭1h,然后PBST洗涤后与PBST中的下一级抗体温育过夜:兔抗A β 1-42(1: 1000),兔抗tau(1: 1000),兔抗tau(1: 1000),兔抗HIF-1 α (1: 1000),兔抗VEGF(1: 1000),兔抗EPO(1: 1000),兔抗 β -Tubulin(1: 1000)。将膜与山羊抗兔二抗(1: 2000)在室温下孵育1h。使用增强的化学发光系统(ECL试剂盒)检测免疫反应性条带,并使用ImageJ 1.42q软件程序分析图像。

1.2.4 细胞凋亡检测 将脑组织进行抗原修复蛋白酶K(Roche)30 min,然后用PBS洗涤3次。根据分析试剂盒使用说明书进行TUNEL溶液制备和染色。两名观察者使用倒置荧光显微镜在400 \times 放大率下获得CA1区段细胞定量。细胞凋亡(%)等于阳性细胞数/(阳性细胞+阴性细胞) \times 100%。

1.2.5 大鼠 Morris 水迷宫试验 水迷宫体直径 120 cm,高 35 cm。内壁涂黑,宫体内充满自来水,水温保持在 25 ± 2 °C。逃生平台直径 10 cm,高 30 cm,置于宫体内坐标位置的第一象限,且低于水面 0.5 cm。将自由活动的大鼠分别从四个象限随机放入水中,让其在逃生中寻找隐藏平台。大鼠的活动通过水池上方固定的摄像头进行图像采集并用 Ethovision3.0 软件进行处理。试验包括寻找水下平台的定位航行和去除平台后的空间探索两部分,主要观察指标有:(1)定位航行试验大鼠从 31 d 开始连续 5 d 从各个象限找到平台的时间,记录为平均逃避潜伏期;(2)空间探索试验在 36 d,撤掉平台,从第 II 象限入水,记录 50 s 内大鼠在目标象限内游泳时间和穿越目标平台象限次数。

1.2.6 统计处理 采用 Graphpad Prism 5.0 和 SPSS 13.0 软件分析数据。组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHD 抑制剂提高 TBI 大鼠海马组织 HIF-1 α 表达水平 与 sham 组相比,TBI 组 HIF-1 α 水平明显升高($P < 0.01$),差异具有统计学意义;与 TBI 组比,PHD 抑制剂组 HIF-1 α 水平明显升高($P < 0.01$),差异具有统计学意义。结果表明 PHD 抑制剂可使 TBI 模型大鼠脑组织中 HIF-1 α 的水平升高(见表 1、图 1)。

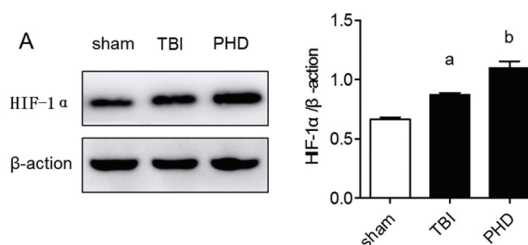
2.2 提高 HIF-1 α 表达促进海马组织 VEGF、EPO 表达水平 与 sham 组相比,TBI 组 VEGF、EPO 水平明显升高($P < 0.01$),差异具有统计学意义;与 TBI 组比,PHD 抑制剂组 VEGF、EPO 水平明显升高($P < 0.01$),差异具有统计学意义。结果表明提高

HIF-1 α 水平可使 TBI 模型大鼠脑组织中 VEGF、EPO 的水平升高(见表 2、图 2)。

表 1 各组大鼠海马组织 HIF-1 α 蛋白相对含量
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	HIF-1 α
sham	0.663 \pm 0.0193
TBI	0.872 \pm 0.0159 ^a
PHD	1.099 \pm 0.0554 ^b

注:TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$



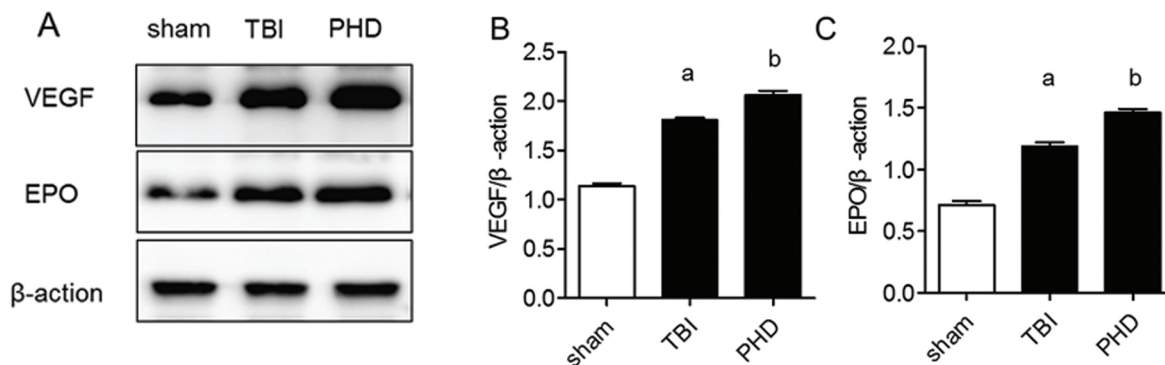
TBI 组与 sham 组相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 1 PHD 抑制剂促进海马组织 HIF-1 α 表达水平

表 2 各组大鼠海马组织 VEGF、EPO 蛋白相对含量
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	VEGF	EPO
sham	1.142 \pm 0.0227	0.712 \pm 0.0327
TBI	1.806 \pm 0.0253 ^a	1.190 \pm 0.0447 ^a
PHD	2.060 \pm 0.0452 ^b	1.459 \pm 0.0439 ^b

注:TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$



TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 2 HIF-1 α 促进海马组织 VEGF、EPO 表达水平

2.3 提高 HIF-1 α 表达抑制海马组织 A β 1-42、tau 表达水平 与 sham 组相比, TBI 组 A β 1-42、tau 水平明显升高($P < 0.01$), 差异具有统计学意义; 与 TBI 组比, PHD 抑制剂组 A β 1-42、tau 水平明显降低($P < 0.01$)。结果表明 PHD 抑制剂可抑制 TBI 模型大鼠脑组织中 A β 1-42、tau 水平表达水平(见表 3、图 3)。

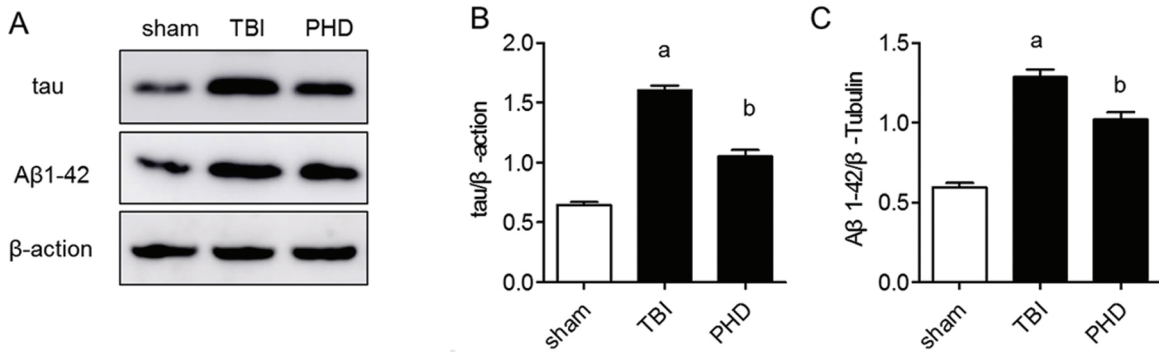
2.4 HIF-1 α 减少 TBI 后神经细胞凋亡 与 sham 组相比, TBI 组细胞凋亡比率明显升高($P < 0.01$), 差异具有统计学意义; 与 TBI 组相比, PHD 抑制剂组细胞凋亡比率明显降低($P < 0.01$), 差异具

有统计学意义。结果表明提高 HIF-1 α 水平抑制 TBI 模型大鼠海马组织早期神经细胞凋亡(见图 4)。

表 3 各组大鼠海马组织 tau、A β 1-42 蛋白相对含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

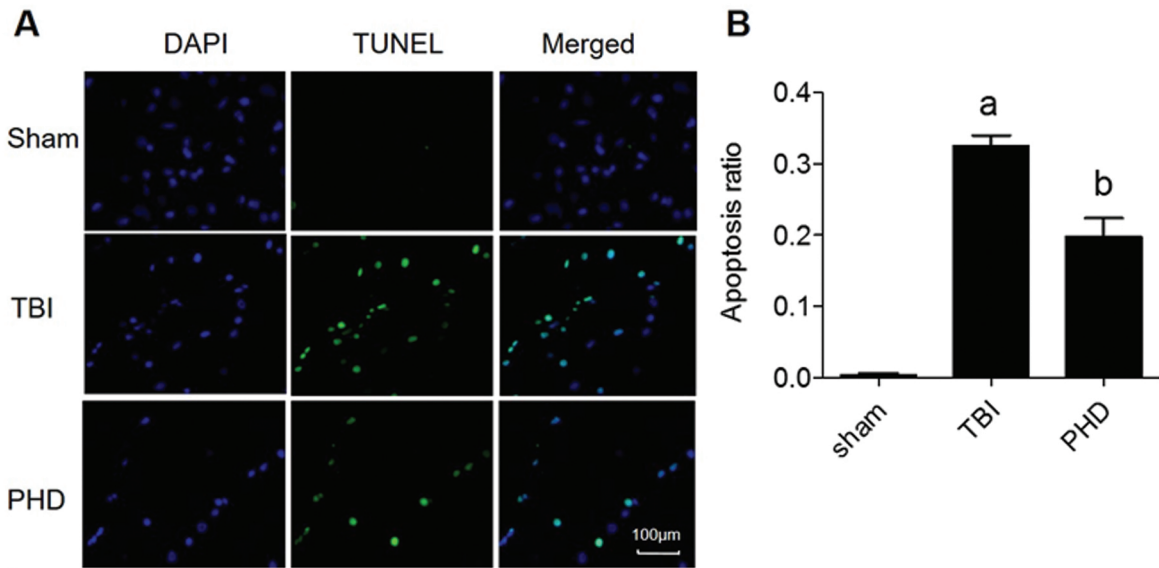
组别	Tau	A β 1-42
sham	0.644 \pm 0.02392	0.594 \pm 0.0277
TBI	1.607 \pm 0.0390a	1.286 \pm 0.0451a
PHD	1.051 \pm 0.0533 ^b	1.021 \pm 0.0444 ^b

注: TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$; PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$



TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$; PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 3 HIF-1 α 表达抑制海马组织 A β 1-42、tau 表达水平



TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$; PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 4 HIF-1 α 减少 TBI 后神经细胞凋亡

2.5 HIF-1 α 改善大鼠神经功能

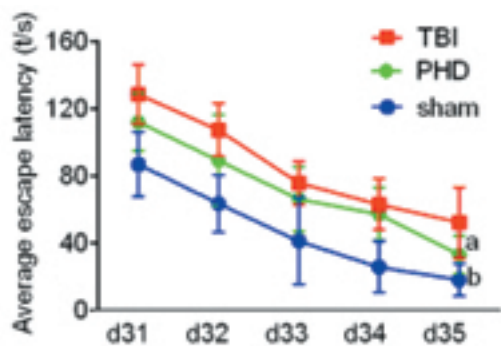
2.5.1 缩短 TBI 大鼠逃避潜伏期 在 5 d 时的定位航行的实验中,与 sham 组相比,TBI 组大鼠的逃避潜伏显著延长($P < 0.01$);与 TBI 组相比,PHD 组的逃避潜伏期显著缩短($P < 0.01$)(见表 4、图 5)。

2.5.2 缩短 TBI 大鼠在目标象限内游泳时间和穿越目标平台象限次数 与 sham 组相比,TBI 组大鼠在目标象限内游泳时间及跨越隐匿平台的次数显著减少($P < 0.01$),与 TBI 组相比,PHD 组在目标象限内游泳时间及跨越隐匿平台的次数显著增加($P < 0.01$)(见表 5、图 6)。

表 4 各组大鼠逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	31d	32 d	33 d	34 d	35 d
sham	63.55 \pm 16.97	63.55 \pm 16.97	41.23 \pm 25.95	25.84 \pm 15.37	18.11 \pm 9.84
TBI	128.39 \pm 17.52	107.37 \pm 15.63	75.73 \pm 12.86	63.14 \pm 15.37	52.05 \pm 21.23 ^a
PHD	112.10 \pm 16.95	89.23 \pm 26.88	66.16 \pm 19.26	57.23 \pm 15.85	33.09 \pm 11.29 ^b

注:TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$



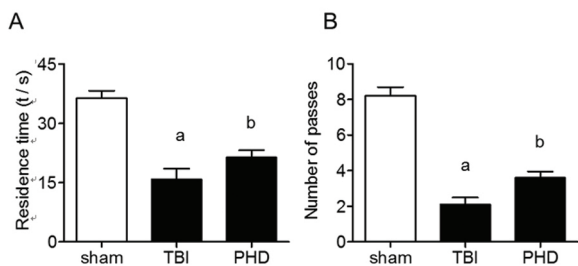
TBI 组与 sham 相比 a: $P < 0.01$;PHD 抑制剂组与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 5 各组大鼠逃避潜伏期

表 5 各组大鼠在目标象限内游泳时间和穿越目标平台象限次数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	目标象限停留时间(t/s)	穿越目标象限平台次数
Sham	36.28 \pm 6.15	8.20 \pm 1.55
TBI	15.78 \pm 8.62 ^a	2.10 \pm 1.23 ^a
PHD	21.35 \pm 5.66 ^b	3.60 \pm 1.15 ^b

注:与 sham 相比 a: $P < 0.01$;与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$



与 sham 组相比 a: $P < 0.01$;与 TBI 组相比 b: $P < 0.01$

图 6 各组大鼠在目标象限内游泳时间和穿越目标平台象限次数

3 讨论

TBI 导致的缺血缺氧性改变是 TBI 后认知功能障碍的诱因。缺氧是运动神经元死亡的主要原因,已在各种神经退行性疾病中得到证实。这种效应归因于缺乏葡萄糖和氧气难以满足运动神经元的能量需求^[15]。根据 Schubert 等的研究, $A\beta$ 参与星形胶质细胞活化与 HIF-1 α 表达的长期下降有关^[16]。为此,本研究通过提高 HIF-1 α 的表达水平初步探索其对认知功能障碍的影响及其机制。

最近 的 体 外 和 体 内 研 究 证 明 了 HIF-1 α 对 $A\beta$ 诱导的海马细胞凋亡的改善作用,HIF-1 和 HIF-2 均被发现 在 发 育 中 的 大 脑 缺 氧 缺 血 损 伤 的 急 性 和 晚 期 阶 段 作 为 保 护 剂^[17]。Liu 等 研 究 表 明 认 知 功 能 障 碍 患 者 的 脑 HIF-1 α 水 平 降 低 与 葡 萄 糖 转 运 蛋 白 -1 和 葡 萄 糖 转 运 蛋 白 -3 的 下 调 相 关,HIF-1 α 水 平 降 低 损 害 葡 萄 糖 摄 取 和 代 谢,最 终 导 致 O-乙 酰 氨 基 葡 萄 糖 降 低 和 tau 的 进 一 步 过 度 磷 酸 化^[18]。这 一 研 究 结 果 也 得 到 了 Deng 等 的 进 一 步 证 实^[19]。并 且 在 本 研 究 的 结 果 中(见 图 2)也 证 实 了 提 高 HIF-1 α 水 平 能 有 效 抑 制 tau 及 $A\beta_{1-42}$ 的 水 平。

$A\beta$ 积 聚 和 低 灌 注 可 能 引 起 VEGF 的 上 调^[20],而 VEGF 诱 导 的 血 管 生 成 可 以 增 加 运 动 神 经 元 的 血 液 供 应,这 一 点 从 使 用 带 有 突 变 型 超 氧 化 物 歧 化 酶 的 腺 病 毒 载 体 的 研 究 中 可 见 证 实^[21]。Lunn 等 表 明 VEGF 可 以 增 加 轴 突 生 长,促 进 神 经 发 生,抑 制 caspase-3 诱 导 的 细 胞 调 亡,这 种 作 用 是 通 过 PI3K/Akt 信 号 传 导 介 导 的^[22]。此 外,VEGF 的 过 度 表 达 可 导 致 微 血 管 的 形 成,从 而 延 缓 小 鼠 神 经 元 的 死 亡^[23]。除 此 之 外,EPO 也 可 以 介 导 神 经 保 护 作 用。重 组 人 EPO 能 够 预 防 运 动 神 经 元 炎 症 和 调 亡^[24]。其 机 制 是 通 过 介 导 脑 源 性 神 经 营 养 因 子 的 形 成;促

进抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达^[25]。这在本研究中的蛋白免疫印迹实验及荧光 TUNEL 实验中得到了证实,提高 HIF-1 α 水平促进 VEGF 和 EPO 的表达水平(见图 1),有效抑制 TBI 后神经细胞的凋亡(见图 3),从分子水平上为大鼠 TBI 后神经功能恢复提供了有力的依据。并且大鼠的 Morris 水迷宫试验同样支持提高 HIF-1 α 水平有效改善 TBI 大鼠记忆功能这一论断(见图 4、图 5)。

大鼠 TBI 与认知功能障碍的发生有直接关系。而提高 HIF-1 α 水平可以有效的减少 TBI 引起的 A β 1-42 和 tau 蛋白水平的升高,为预防和治疗 TBI 后认知功能障碍提供了新的思路。因此,我们推断提高 HIF-1 α 水平对大鼠 TBI 后认知功能障碍可起到有效的预防和治疗作用。

[参考文献]

- [1] McDonald SJ, Sun M, Agoston DV, et al. The effect of concomitant peripheral injury on traumatic brain injury pathobiology and outcome [J]. *J Neuroinflamm*, 2016, 13(1): 1-14.
- [2] Leoncarrion J, Leondominguez U, Pollonini L, et al. Synchronization between the anterior and posterior cortex determines consciousness level in patients with traumatic brain injury (TBI) [J]. *Brain Res*, 2012, 1476(14): 22-30.
- [3] Klein WL. Synaptotoxic amyloid- β oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(Suppl 1): S49-S65.
- [4] Senthikumar S, Aaron T, Jayakumar R. Pathogenesis of Abeta oligomers in synaptic failure [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2013, 10(3): 316-323.
- [5] Harris RA, Lauren T, Cumming RC. Age-dependent metabolic dysregulation in cancer and Alzheimer's disease [J]. *Biogerontol*, 2014, 15(6): 559-577.
- [6] Ferreira IL, Resende R, Ferreira E, et al. Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(10): 1193-1206.
- [7] Lou D, Du Y, Huang D, et al. Traumatic Brain Injury Alters the Metabolism and Facilitates Alzheimer's Disease in a Murine Model [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(6): 4928-4939.
- [8] Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, et al. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(18): 13623-13628.
- [9] Webster MT, Pearce BR, Bowen DM, et al. The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells [J]. *J Neural Transm*, 1998, 105(8-9): 839-853.
- [10] Neitemeier S, Dolga AM, Honrath B, et al. Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(5): e2214.
- [11] Simon F, Bockhorn M, Praha C, et al. Deregulation of HIF1-alpha and hypoxia-regulated pathways in hepatocellular carcinoma and corresponding non-malignant liver tissue-influence of a modulated host stroma on the prognosis of HCC [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2010, 395(4): 395-405.
- [12] Takasaki C, Kobayashi M, Ishibashi H, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α affects tumor proliferation and antiapoptosis in surgically resected lung cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(2): 295-300.
- [13] Neitemeier S, Dolga AM, Honrath B, et al. Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(5): e2214.
- [14] Ashok BS, Ajith TA, Sivanesan S. Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(3): 327-334.
- [15] Tankersley CG, Christine H, Rothstein JD. Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(3): 926-932.
- [16] David S, Thomas S, Barbara B. The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 29(7): 1323-1334.
- [17] Trollmann R, Gassmann M. The role of hypoxia-inducible transcription factors in the hypoxic neonatal brain [J]. *Brain Dev*, 2009, 31(7): 503-509.
- [18] Ying L, Fei L, Khalid I, et al. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(2): 359-364.
- [19] Deng Y, Li B, Liu Y, et al. Dysregulation of Insulin Signaling, Glucose Transporters, O-GlcNAcylation, and Phosphorylation of Tau and Neurofilaments in the Brain: Implication for Alzheimer's Disease [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5): 2089-2098.
- [20] Taya T, Scott M, Seth L. Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Brain*, 2015, 138(Pt 4): 1059.
- [21] Bogaert E, Van Damme P, Van Den Bosch L, et al. Vascular endothelial growth factor in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases [J]. *Muscle Nerve*, 2006, 34(4): 391-405.
- [22] Lunn JS, Sakowski SA, Kim B, et al. Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration [J]. *Dev Neurobiol*, 2009, 69(13): 871-884.
- [23] Wang Y, Mao XO, Xie L, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(2): 304-307.
- [24] Seong-Ho K, Youngchul K, Hyun Young K, et al. Recombinant human erythropoietin suppresses symptom onset and progression of G93A-SOD1 mouse model of ALS by preventing motor neuron death and inflammation [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 25(7): 1923-1930.
- [25] Barbara V, Stefano B, Emanuela C, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Neurochem*, 2010, 93(2): 412-421.