

HIF-1 α 修饰的骨髓间充质干细胞增强 其抗PC12细胞缺氧损伤作用

周艳芳^{1,2} 蔡拓² 莫世静² 邓宇斌^{2*}

(¹广东医学院病理生理学教研室, 东莞 523808; ²中山大学附属第一医院, 转化医学中心实验室, 广州 510080)

摘要 该文探讨了HIF-1 α 修饰的大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对缺氧损伤所致神经样PC12细胞凋亡的作用及其可能机制。PC12细胞分别与MSCs、HIF-1 α -MSCs细胞在缺氧环境下体外共培养,分为正常组、缺氧组、MSCs组及HIF-1 α -MSCs组。MTT检测不同缺氧时间PC12细胞活性。HE染色观察PC12细胞形态。Hoechst 33258染色与Annexin V-FITC双染色法检测PC12细胞凋亡。RT-PCR及细胞免疫荧光检测caspase-3的mRNA及蛋白质水平。MTT结果显示,PC12细胞活性随着缺氧时间而下降,缺氧12 h细胞活性下降至45.1%。与正常组相比,缺氧组PC12细胞凋亡率明显增高,caspase-3的mRNA和蛋白质水平明显上调,两者有显著差异($P < 0.05$)。与缺氧组相比,MSCs组及HIF-1 α -MSCs组的凋亡率降低($P < 0.05$),caspase-3的mRNA和蛋白质水平下调($P < 0.05$),且HIF-1 α -MSCs组更为明显($P < 0.05$)。结果证明,HIF-1 α 修饰的MSCs能增强MSCs的抗PC12缺氧损伤作用,其机制可能与HIF-1 α -MSCs降低PC12细胞caspase-3基因表达有关。

关键词 HIF-1 α ; 骨髓间充质干细胞; PC12细胞; 缺氧; 细胞凋亡

Protective Effect of HIF-1 α Modified Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Hypoxia-induced PC12 Cell Injury

Zhou Yanfang^{1,2}, Cai Tuo², Mo Shijing², Deng Yubin^{2*}

(¹Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

²Research Center of Translational Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sun University, Guangzhou 510080, China)

Abstract This article investigated the effect of HIF-1 α -modified bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on PC12 cells under hypoxia and its mechanism. PC12 cells were co-cultured with MSCs or HIF-1 α -MSCs under hypoxic conditions, which were randomized into control group, hypoxia group, MSCs group, HIF-1 α -MSCs group. Cell viability was measured at different time point by MTT assay. Morphological changes of PC12 cells were detected by HE staining; the apoptotic rates were detected by Hoechst 33258 staining and Annexin V-FITC assay; either mRNA or protein level of caspase-3 was detected by RT-PCR or immunofluorescence. The results of MTT showed that PC12 cell viability decreased with increasing hypoxia time; the cell viability decreased to 45.1% after hypoxia 12 h. Compared with the control group, the apoptosis rate, the RNA and protein levels

收稿日期: 2015-06-11 接受日期: 2015-09-14

国家自然科学基金(批准号: 30901547)、广东省自然科学基金(批准号: 2015A030313186)、广东省医学科研基金(批准号: B2012265)与东莞市科技局项目(批准号: 2014108101049)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-37616451, E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn

Received: June 11, 2015 Accepted: September 14, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30901547), Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2015A030313186), Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (Grant No.B2012265) and Dongguan Municipal Science and Technology Bureau (Grant No.2014108101049)

*Corresponding author. Tel: +86-20-37616451, E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2015-10-22 10:59:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151022.1059.002.html>

of caspase-3 were increased in hypoxia group ($P<0.05$). Compared with the hypoxia group, MSCs and HIF-1 α -MSCs could reduce apoptosis rate of PC12 cells and caspase-3 expression ($P<0.05$), which were more effective in HIF-1 α -MSCs group ($P<0.05$). It is proved that the HIF-1 α -modified bone marrow mesenchymal stem cells enhanced protective effect of MSCs on PC12 cells damaged by hypoxia, which was related to the downregulation of caspase-3 expression.

Keywords HIF-1 α ; bone marrow mesenchymal stem cells; PC12 cells; hypoxia; apoptosis

已有研究证实,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在体外培养的条件下,能分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其他具有神经营养活性的细胞因子,参与损伤修复,从而改善脑缺血神经功能^[1]。

HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)作为低氧反应的一种核转录调节因子在脑缺血缺氧时被上调,并通过调控其下游靶基因(*VEGF*、*EPO*和*SDF-1*)的转录、表达,以调控无氧代谢、血管生成、红细胞增加、细胞迁移分化等,促进机体对缺氧产生一系列的适应反应,从而在缺血疾病中发挥重要作用。

HIF-1 α 蛋白稳定性和转录活性均受细胞内氧浓度的调节,在常氧态下 α 亚基可被泛素蛋白酶系统降解。本课题组构建突变型HIF-1 α 慢病毒载体,慢病毒感染MSCs使其在常氧状态下能稳定表达HIF-1 α 。本实验探讨在缺氧条件下, HIF-1 α -MSCs对缺氧损伤所致的神经元样PC12细胞凋亡的影响及其可能机制,为HIF-1 α 基因修饰的MSCs治疗脑缺血提供实验依据和研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

SD大鼠,雄性(购自中山大学实验动物中心),体重60~80 g,清洁级。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株PC12由中山大学中山医学院冯建强教授惠赠。MEM/F12培养基购于Gibco-BRL公司,按说明书配制,4℃保存。特级胎牛血清购于以色列Kibbutz beit haemek公司,分装后,-20℃保存。RT-PCR试剂盒购于Fermentas公司;Hoechst 33258、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自Sigma公司。第402位脯氨酸(Pro402)及第564位脯氨酸(Pro564)突变的HIF-1 α 慢病毒载体(mHIF-1 α -EGFP)为本室保存。

1.2 MSCs的培养及条件培养的制备

清洁级SD大鼠(60~80 g),脱臼处死,无菌条件

下取双侧股骨,暴露骨髓腔,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基冲出骨髓腔中的骨髓细胞,轻吹打成单细胞悬液,按 1×10^7 /mL接种于25 cm²塑料培养瓶中,37℃、饱和湿度、5% CO₂的培养箱中培养。每3~4 d换液1次。当细胞扩增铺满80%时,以 5×10^5 /mL的密度进行传代培养。传至第五代时,突变HIF-1 α 慢病毒载体转染MSCs,获得稳定表达HIF-1 α 的MSCs供后续实验使用。

1.3 PC12细胞缺氧损伤模型建立及与MSCs共培养

取对数生长的PC12细胞,按5 000/孔接种于96孔板中。24 h后,换上含2% FBS的培养基,将孔板置于95% N₂和5% CO₂的缺氧盒中进行缺氧实验,0, 3, 6, 12, 24 h后MTT实验检测细胞毒性。PC12细胞与MSCs共培养共分4组:正常组、缺氧组、MSCs组及HIF-1 α -MSCs组。取PC12细胞,用含10% FBS的完全培养基配制成50 000/mL密度的单细胞悬液,接种于Transwell小室6孔板中;同时取 1×10^4 /mL MSCs和HIF-1 α -MSCs细胞接种于Transwell小室插入式小皿中(孔径为0.3 μ m),培养24 h后,将培养基吸出,换上含2% FBS的培养基。将Transwell小室孔板置于95% N₂和5% CO₂的缺氧盒中进行缺氧实验,缺氧12 h后检测各项指标。

1.4 HE染色观察细胞形态

将Transwell小室孔板中PC12细胞用PBS液漂洗2次(每次2 min),加入新鲜配制的4%多聚甲醛,4℃固定细胞10 min。PBS液洗2次后(每次2 min),苏木素染色1~1.5 min;自来水洗数次,洗去苏木素和浮色,加氨水;浸入稀盐酸酒精进行分色数秒;放入伊红染色1~2 min;依次浸入80%、95%、100%酒精脱水2~3 min;二甲苯I透明10 min;二甲苯II透明10 min;中性树胶封片,镜下观察并拍照。

1.5 Hoechst 33258染色计数检测细胞凋亡率

将PC12细胞用PBS液漂洗2次(每次2 min),4%多聚甲醛4℃固定细胞10 min。PBS液洗涤2次后,Hoechst 33258染色液(5 μ g/mL)染色10 min, PBS液

洗涤3次后(每次5 min), 封片液封片后荧光显微镜观察。随机选择4个视野拍照, 计数细胞, 取平均值。

1.6 Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡

将PC12细胞用PBS液漂洗2次, 用不含EDTA的胰酶消化收集, PBS洗涤细胞2次, 收集 $(1\sim 5)\times 10^5$ 细胞; 500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞后, 5 μL Annexin V-FITC与Propidium Iodide混匀; 室温避光反应15 min, 流式细胞仪检测。

1.7 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

按Trizol试剂说明书提取细胞RNA。按照逆转录试剂盒的说明操作得到cDNA。设计引物序列如表1, 由广州瑞真生物技术有限公司合成。PCR反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性60 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s; 34个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。取PCR产物, 应用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统扫描并进行灰度分析。

1.8 细胞免疫荧光

将Transwell小室孔板中PC12细胞用PBS液漂洗2次; 4%多聚甲醛固定10 min; PBS漂洗5 min; 0.5%

Triton穿孔15 min; PBS漂洗2次, 每次5 min; 1% BSA封闭30 min; 加入1% BSA稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS漂洗2次, 每次5 min; 加入1% BSA稀释的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h; PBS漂洗2次, 每次5 min; 加5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Hoechst 33258染核, 室温避光孵育5 min; 荧光显微镜观察、拍照。用Image Pro Plus软件分析荧光强度。

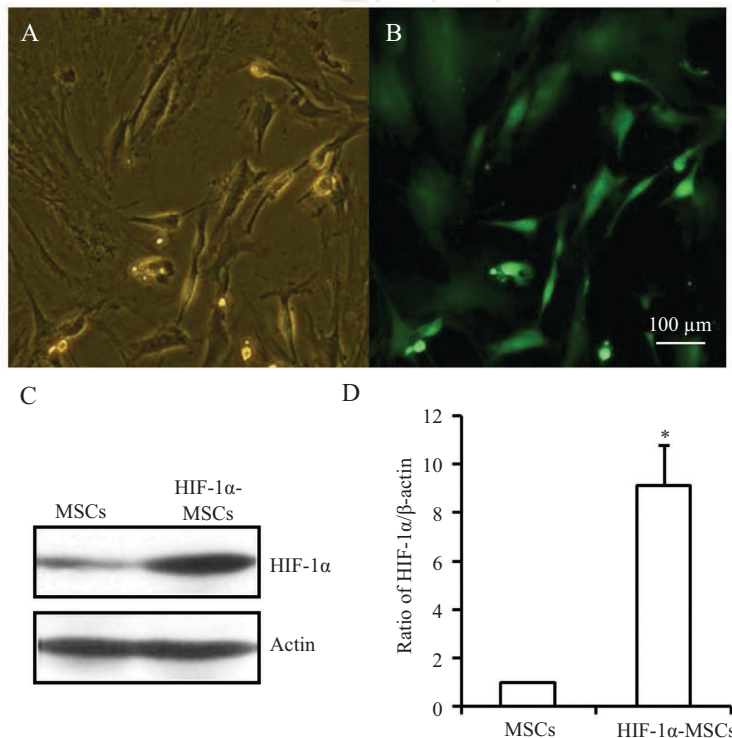
1.9 统计学处理

实验所有数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 使用SPSS 17.0统计软件分析, 组间比较采用 t 检验和方差分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α -MSCs的形态及蛋白表达

携带HIF-1 α 及绿色荧光蛋白基因的慢病毒感染第五代MSCs, 转染48 h后收获稳定表达HIF-1 α 基因的MSCs, 荧光显微镜观察细胞形态, Western blot检测HIF-1 α 蛋白表达。结果显示, 转染48 h后的MSCs发绿色荧光, 在常氧态下能稳定表达HIF-1 α 蛋白(图1)。



A: HIF-1 α -MSCs倒置显微镜图片; B: HIF-1 α -MSCs荧光显微镜图片; C: Western blot检测MSCs与HIF-1 α -MSCs细胞中HIF-1 α 蛋白表达; D: MSCs与HIF-1 α -MSCs细胞中HIF-1 α 蛋白的相对表达值。* $P<0.05$, 与MSCs组比较。

A: the inverted microscope image of HIF-1 α -MSCs; B: the fluorescence microscopy image of HIF-1 α -MSCs; C: protein expression of HIF-1 α by Western blot in MSCs cells and HIF-1 α -MSCs cells; D: the relative value of the expression of HIF-1 α protein in MSCs cells and HIF-1 α -MSCs cells. * $P<0.05$ vs MSCs group.

图1 HIF-1 α -MSCs的细胞形态及HIF-1 α 蛋白表达

Fig.1 The cell morphology and HIF-1 α protein expression of HIF-1 α -MSCs

表1 PCR 引物与产物长度

Table 1 PCR primers and product length

基因	PCR引物	产物长度(bp)
Gene	PCR primers	Product length (bp)
β -actin	The forward primer: 5'-TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA-3' The reverse primer: 5'-AAC ACA GCC TGG ATG GCT AC-3'	195
Caspase-3	The forward primer: 5'-CAG CCA CAA TAC AAT ACC-3' The reverse primer: 5'-CAG TGC TCC AAC TCT TCA-3'	328

2.2 HIF-1 α -MSCs对PC12细胞活性及形态学的影响

MTT结果显示, 与正常组相比, PC12细胞缺氧后的细胞活性下降, 具有时间依赖性(图2)。其中缺

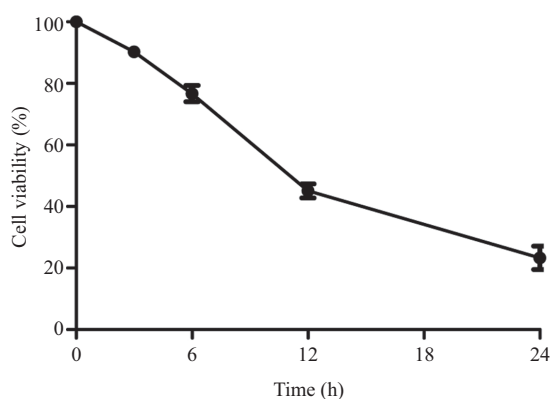


图2 MTT检测PC12细胞活性

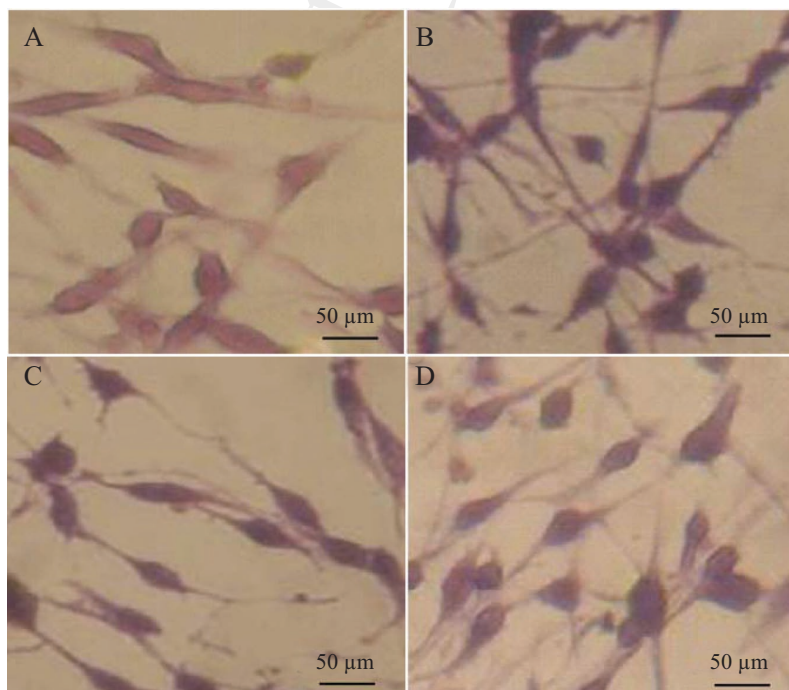
Fig.2 The cell viability of PC12 cell by MTT assay

氧12 h后, 细胞活性下降至50%以下, 确定缺氧12 h为后续实验的作用时间。进一步HE染色观察缺氧前后细胞形态的改变。结果显示, 缺氧12 h后, PC12细胞胞体肿胀, 胞内变性颗粒增多, 部分细胞碎裂死亡。与缺氧组相比, MSCs组和HIF-1 α -MSCs共培养组中的PC12细胞胞体肿胀较轻, 细胞死亡数较少, 提示MSCs及HIF-1 α -MSCs对PC12细胞缺氧损伤有保护作用(图3)。

2.3 HIF-1 α -MSCs对PC12细胞凋亡的影响

Hoechst 33258染色结果显示, 正常组PC12细胞染色质分布均匀, 为均匀低强度荧光; 缺氧组PC12细胞核呈浓缩致密的固缩形态; MSCs组及HIF-1 α -MSCs组中细胞核呈浓缩致密的固缩形态的凋亡细胞较缺氧组明显减少(图4)。

进一步应用流式细胞术比较各组细胞的凋亡

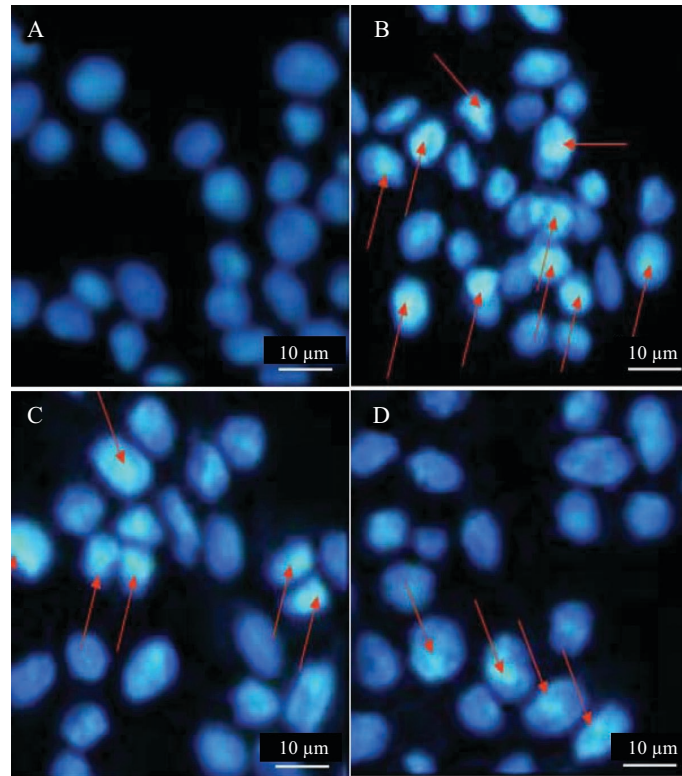


A: 正常组; B: 缺氧组; C: MSCs组; D: HIF-1 α -MSCs组。

A: control group; B: hypoxia group; C: MSCs group; D: HIF-1 α -MSCs group.

图3 HE染色检测PC12细胞形态学变化

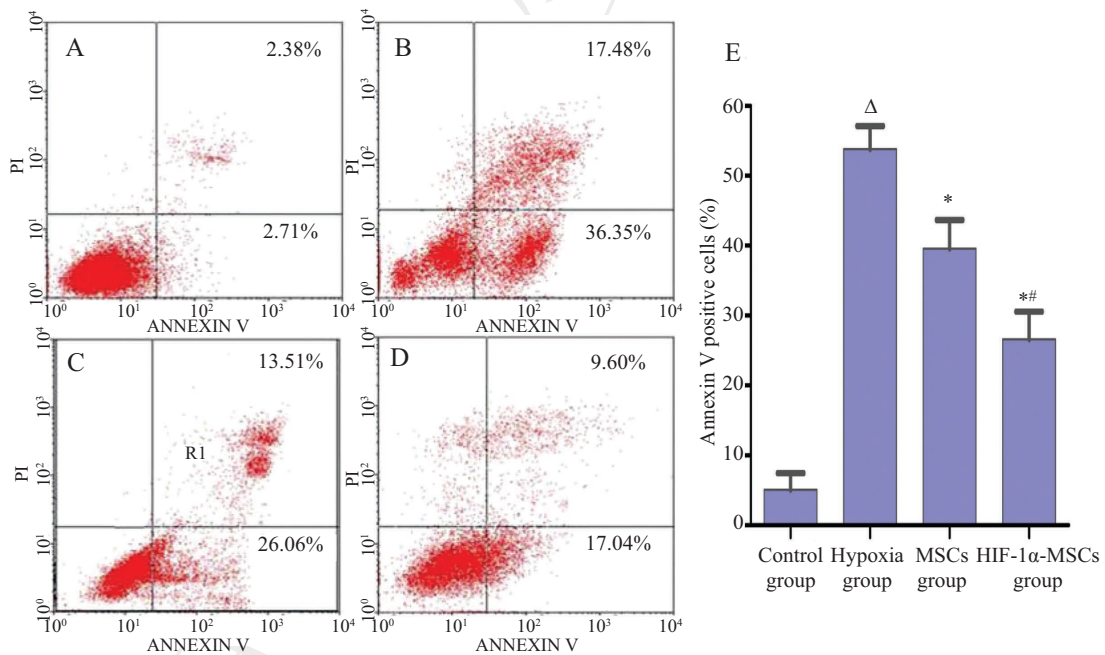
Fig.3 The morphological changes of PC12 cells by HE staining



A: 正常组; B: 缺氧组; C: MSCs组; D: HIF-1 α -MSCs组。箭头所示为凋亡细胞的凋亡小体。
 A: control group; B: hypoxia group; C: MSCs group; D: HIF-1 α -MSCs group. Arrows indicated apoptotic body in apoptosis cells.

图4 Hoechst 33258染色检测细胞凋亡

Fig.4 The apoptosis detected by Hoechst 33258 staining

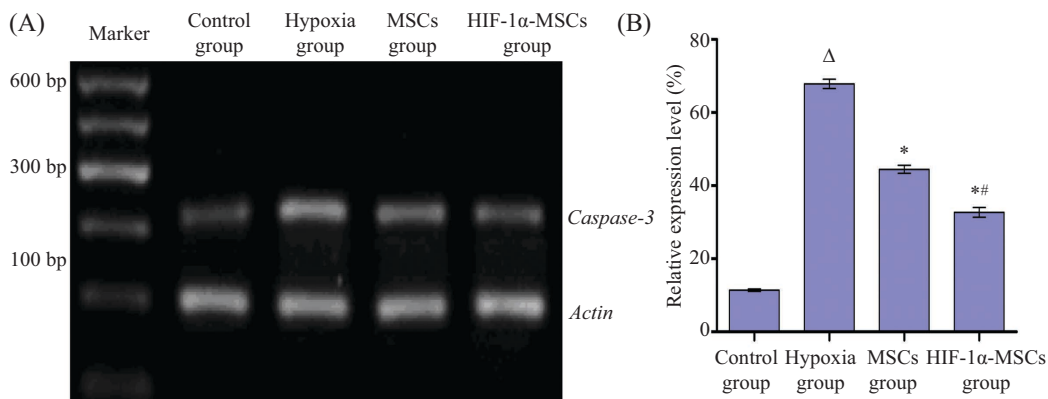


A: 正常组; B: 缺氧组; C: MSCs组; D: HIF-1 α -MSCs组; E: 各组细胞凋亡率。 $\Delta P < 0.05$, 与正常组比较; $*P < 0.05$, 与缺氧组比较; $\#P < 0.05$, 与MSCs组比较。

A: control group; B: hypoxia group; C: MSCs group; D: HIF-1 α -MSCs group; E: apoptotic rate in each group. $\Delta P < 0.05$ vs control group; $*P < 0.05$ vs hypoxia group; $\#P < 0.05$ vs MSCs group.

图5 流式细胞术检测细胞凋亡率

Fig.5 The apoptotic rate detected by flow cytometry

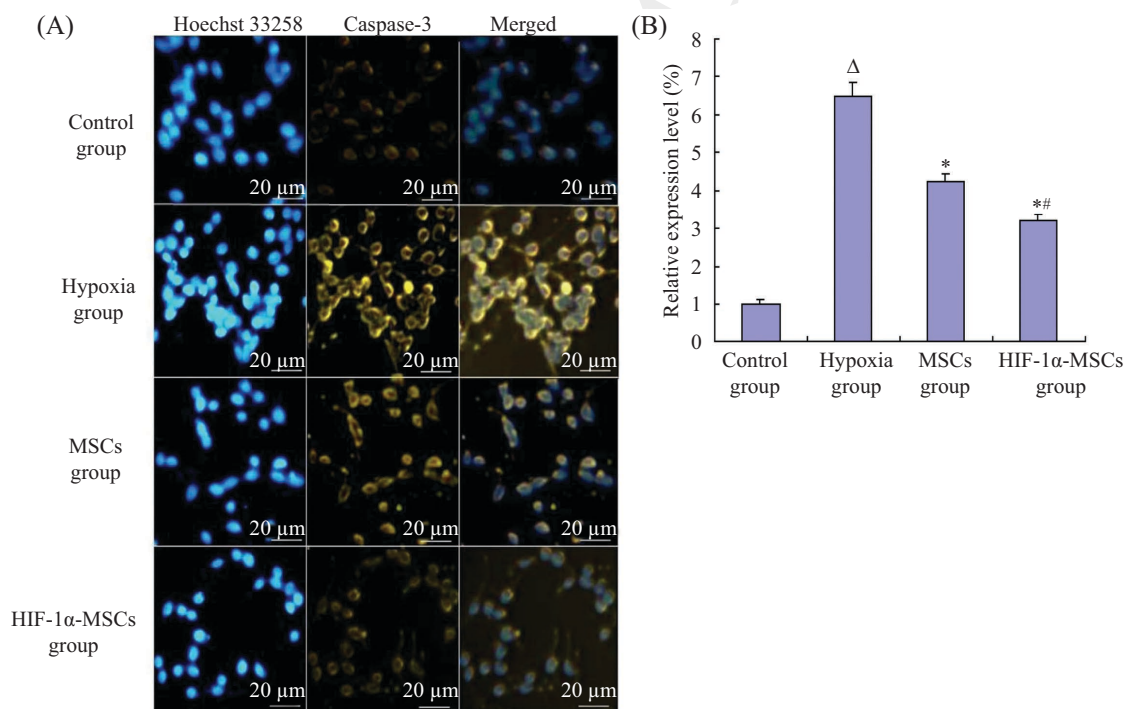


A: 各组的caspase-3 mRNA水平; B: 各组caspase-3 mRNA水平相对值。^Δ $P < 0.05$, 与正常组比较; ^{*} $P < 0.05$, 与缺氧组比较; ^{**} $P < 0.05$, 与MSCs组比较。

A: the mRNA levels of caspase-3 in each group; B: the relative expression level of caspase-3 mRNA in each group. ^Δ $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs hypoxia group; ^{**} $P < 0.05$ vs MSCs group.

图6 RT-PCR检测caspase-3 mRNA水平

Fig.6 The caspase-3 mRNA expression detected by RT-PCR



A: 各组caspase-3免疫荧光图; B: 各组caspase-3荧光强度表达水平相对值。^Δ $P < 0.05$, 与正常组比较; ^{*} $P < 0.05$, 与缺氧组比较; ^{**} $P < 0.05$, 与MSCs组比较。

A: the immunofluorescence images of caspase-3 in each group; B: the immunofluorescence relative expression level of caspase-3 in each group. ^Δ $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs hypoxia group; ^{**} $P < 0.05$ vs MSCs group.

图7 Caspase-3的免疫荧光染色

Fig.7 The immunofluorescence staining of caspase-3

率。正常组、缺氧组、MSCs组及HIF-1 α -MSCs组的凋亡率分别为5.09% \pm 2.4%、53.83% \pm 3.31%、39.57% \pm 4.11%、26.64% \pm 3.93%(图5)。与缺氧组比较, MSCs和HIF-1 α -MSCs组PC12细胞凋亡率均降低($P < 0.05$)。结果表明, MSCs及HIF-1 α -MSCs均能抑制PC12细胞缺氧所致的细胞凋亡, 且HIF-1 α -MSCs

作用更为明显, 提示HIF-1 α -MSCs对缺氧导致的PC12细胞损伤具有一定的保护作用。

2.4 HIF-1 α -MSCs对PC12细胞caspase-3的mRNA及蛋白质表达的影响

RT-PCR及免疫荧光分别检测caspase-3 mRNA及蛋白质水平改变, 结果显示, 与正常组相比, 缺氧

组caspase-3 mRNA及蛋白质水平明显上调($P<0.05$)。与缺氧组相比, MSCs组与HIF-1 α -MSCs组, caspase-3 mRNA及蛋白质水平降低($P<0.05$), 且HIF-1 α -MSCs组下降更为明显($P<0.01$)(图6和图7)。

3 讨论

MSCs具有来源丰富、增殖容易、免疫原性较低等优势, 是基因治疗的理想载体细胞。大量研究发现, 体外培养和移植入体内的MSCs能分泌多种细胞因子与神经营养因子[如VEGF、脑源性营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)等], 减少脑缺血组织的神经细胞凋亡、增加内源性神经干细胞迁移和分化、促进血管新生, 从而促进缺血性脑损伤神经功能的修复^[1-2]。

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是由 α 和 β 亚基组成的二聚体, 广泛参与缺氧诱导产生的特异应答。HIF-1的生物效应主要决定于HIF-1 α 亚基。脑缺血半暗带区HIF-1 α 的高表达能诱导下游多种靶基因如血管内皮生长因子(VEGF)^[3]、促红细胞生成素(EPO)^[4-5]等的转录, 这些基因产物能发挥促血管生成、重建细胞代谢、促进红细胞增殖、抑制神经细胞凋亡、促进内源性神经干细胞再生、促进干细胞的增殖及迁移等作用^[6-9]。抑制HIF-1 α 功能后, 脑缺血局部的损伤面积增大, 预后恶化^[10-11]。Tomita等^[12]发现, 敲除HIF-1基因的成年大鼠出现明显的神经元变性、脑水肿和空间感知障碍, 胚胎出现明显的脉管发育障碍, 且端脑有大量神经元凋亡。Javorina等^[6]发现, HIF-1基因敲除的成年大鼠脑组织内VEGF mRNA水平明显下降, 黑质区多巴胺神经元的标记分子如酪氨酸羟化酶降低, 而促存活基因Bcl-2表达降低, 促凋亡蛋白酶caspase-3激活。

因此, 在脑缺血缺氧损伤的发展过程中, 促进HIF-1 α 的表达可通过靶基因促进神经元再生和分化, 抑制神经元凋亡, 从而发挥促神经修复作用。缺氧或一些药物预处理可诱导HIF-1表达增加, 促进糖的转运和酵解, 加强无氧代谢, 促进细胞自噬, 减少细胞凋亡^[5,13-15]。本课题组前期构建稳定表达的HIF-1 α -MSCs, 促进其分泌VEGF、SDF-1、NGF等多重营养因子, 移植脑缺血动物模型体内后, 发现能明显抑制神经细胞凋亡, 促进内源性的神经干细胞向缺血损伤区域迁移, 对脑缺血损伤的修复有良好

的治疗效果^[1,16]。

本实验进一步将HIF-1 α -MSCs与神经元样PC12细胞体外共培养, 观察HIF-1 α -MSCs对缺氧损伤所致PC12细胞凋亡的作用及其可能机制。结果发现, MSCs、HIF-1 α -MSCs分别与PC12细胞共培养, 均能明显降低缺氧时PC12细胞的凋亡率, 下调凋亡基因caspase-3的表达, 提示MSCs、HIF-1 α -MSCs均对PC12细胞的缺氧损伤有抑制效应, 其中HIF-1 α -MSCs对PC12细胞缺氧损伤的保护作用更为显著。推测其保护机制可能是HIF-1 α 转染MSC后表达上调, 促进其下游靶基因VEGF等营养因子的表达, 旁分泌作用于PC12细胞, 抑制PC12细胞caspase-3基因的表达, 从而抑制细胞凋亡。本研究结果为MSCs作为细胞治疗的载体细胞, 治疗脑缺血疾病提供了新的实验依据和研究思路。

参考文献 (References)

- Deng YB, Ye WB, Hu ZZ, Yan Y, Wang Y, Takon BF, *et al*. Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. *Neurol Res* 2010; 32(2): 148-56.
- Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res* 2008; 1195: 104-12.
- Matsuda T, Abe T, Wu JL, Fujiki M, Kobayashi H. Hypoxia-inducible factor-1 α DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model. *Neurol Res* 2005; 27(5): 503-8.
- Mo SJ, Zhong Q, Zhou YF, Deng DB, Zhang XQ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells prevent the apoptosis of neuron-like PC12 cells via erythropoietin expression. *Neurosci Lett* 2012; 522(2): 92-7.
- Liu J, Narasimhan P, Yu F, Chan PH. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke* 2005; 36(6): 1264-9.
- Milosevic J, Maisel M, Wegner F, Leuchtenberger J, Wenger RH, Gerlach M, *et al*. Lack of hypoxia-inducible factor-1 α impairs midbrain neural precursor cells involving vascular endothelial growth factor signaling. *J Neurosci* 2007; 27(2): 412-21.
- Li L, Qu Y, Li J, Xiong Y, Mao M, Mu D. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Res* 2007; 1180(14): 133-9.
- Lee HJ, Ryu JM, Jung YH, Oh SY, Lee SJ, Han HJ. Novel pathway for hypoxia-induced proliferation and migration in human mesenchymal stem cells: Involvement of HIF-1 α , FASN, and mTORC1. *Stem Cells* 2015; 33(7): 2182-95.
- Azevedo MM, Tsigkou O, Nair R, Jones JR, Jell G, Stevens MM. Hypoxia inducible factor-stabilizing bioactive glasses for directing mesenchymal stem cell behavior. *Tissue Eng Part A*

- 2015; 21(1/2): 382-9.
- 10 Li L, Qu Y, Li J, Xiong Y, Mao M, Mu D. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Res* 2007; 1180: 133-9.
- 11 Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, Dragatsis I, Johnson RS, Chavez JC. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 α increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2007; 27(23): 6320-32.
- 12 Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N, *et al.* Defective brain development in mice lacking the HIF-1 α gene in neural cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(19): 6739.
- 13 Liu J, Hao H, Huang H, Tong C, Ti D, Dong L, *et al.* Hypoxia regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells through enhanced autophagy. *Int J Low Extrem Wounds* 2015; 14(1): 63-72.
- 14 Jones NM, Bergeron M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(9): 1105-14.
- 15 Sun X, Fang B, Zhao X, Zhang G, Ma H. Preconditioning of mesenchymal stem cells by sevoflurane to improve their therapeutic potential. *PLoS One* 2014; 9(3): e90667.
- 16 Zhong Q, Zhou Y, Ye W, Cai T, Zhang X, Deng DY. Hypoxia-inducible factor 1- α -AA-modified bone marrow stem cells protect PC12 cells from hypoxia-induced apoptosis, partially through VEGF/PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cells Dev* 2012; 21(14): 2703-17.