·基础研究·

PGC-1α启动子甲基化介导在热大鼠预适应延缓运动疲劳中的机制研究

赵海涛[1] 曹庆雷[1,3] 邓中原[2]

摘要

目的：探讨热预适应通过调节过氧化物酶体增殖物活化受体γ协同刺激因子-1α（peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α，PGC-1α）基因的启动子甲基化修饰从而延缓运动疲劳发生的机制。

方法：选取12只8周龄雄性SD大鼠随机分成热预适应组（n=6）与正常对照组（n=6），热预适应组经过42℃热应激处理15min，每天间隔处理3次，连续处理7d，结束后每组取3只SD大鼠采集肌肉组织进行启动子甲基化检测，随后利用生物信息学软件预测SD大鼠肌肉组织中PGC-1α基因的CpG岛，针对CpG岛设计检测引物，采用重亚硫酸盐的测序法分析肌肉组织内PGC-1α基因启动子区CpG岛的甲基化程度，同时采用Western Blot法检测PGC-1α蛋白表达情况。将每组的另3只大鼠进行跑台一次性力竭运动，记录力竭时间。

结果：热预适应处理显著延缓了运动疲劳的发生。同时，与对照组PGC-1α基因启动子区域CpG岛高度甲基化（50.20%±3.13%或48.78%±3.38%）相比，热预适应处理显著降低了PGC-1α基因的甲基化（18.57%±2.12%或19.80%±1.99%），但热预适应组PGC-1α基因的蛋白表达量却显著高于对照组。因此，SD大鼠在1w的热预适应过程中PGC-1α基因启动子区CpG岛的甲基化模式发生了显著变化，即随着热预适应处理时间的增加，PGC-1α基因启动子区甲基化程度逐渐降低，但PGC-1α基因的表达量显著升高。

结论：对大鼠进行热预适应处理可以通过降低PGC-1α启动子的甲基化水平增加PGC-1α基因的表达量，这可能是热预适应通过PGC-1α基因启动子甲基化水平的改变延缓运动疲劳发生的机制之一。

关键词 过氧化物酶体增殖物活化受体γ协同刺激因子-1α；运动疲劳；热预适应；CpG岛；甲基化

中图分类号：R493 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-1242（2022）-10-1306-06

Study on the mechanism of PGC-1 α promoter methylation mediated by thermal pre adaptation in delaying exercise fatigue/ZHAO Haitao，CAO Qinglei，DENG Zhongyuan//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine，2022，37（10）：1306—1311

Abstract

Objective： To investigate the mechanism of heat pre-adaptation-induce delaying of exercise fatigue by regulating the promoter methylation modification of peroxisomeproliferator-activated receptor-γ coactivator-1α（PGC-1α）.

Method： Twelve male Sprague Dawley rats（SD rats）of 8 weeks old were randomly divided into two groups：the heat pre-adaptation group（n=6）and the normal control group（n=6）. The heat pre-adaptation group was treated with heat shock at 42℃ for 15min，3 times a day，and 7 days continuously. After that，muscle tissue was collected in 3 rats of each group for promoter methylation detection，and then the PGC-1α gene in the muscle tissue was predicted by bioinformatics software. The methylation degree of CpG island in the promoter region of PGC-1α gene was analyzed by bisulfite sequencing，and the change of PGC-1α protein content was detected by Western Blot. The other three rats in each group ran on the treadmill and the exhaustion time was recorded.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.10.003

1 北京科技大学体育部，北京，100083；2 郑州大学农学院；3 通讯作者

第一作者简介：赵海涛，男，副教授；收稿日期：2020-06-03

Result: The heat pre-adaptation significantly delayed the occurrence of exercise fatigue. At the same time, the results showed that the heat pre-adaptation significantly reduced the methylation of PGC-1α gene (18.57%±2.12% or 19.80%±1.99%), when compared that in the the control group (50.20%±3.13% or 48.78%±3.38%). However, the protein expression of PGC-1α gene in the heat pre-adaptation group was significantly higher than that in the control group. Therefore, the methylation pattern of CpG island in PGC-1α gene promoter region changed significantly during one week of heat pre-adaptation. With the increase of heat pre-adaptation time, the methylation degree of PGC-1α gene promoter region decreased gradually, while the expression of PGC-1α gene increased significantly.

Conclusion: These results indicate that heat pre-adaptation can increase the expression of PGC-1α gene by reducing the methylation level of PGC-1α promoter, which may be one of the mechanisms of heat pre-adaptation delaying the occurrence of exercise fatigue by changing the methylation level of PGC-1α promoter.

Author's address Dept. of Physical Education, University of Science and Technology Beijing, 100083

Key word peroxisome proliferator-activated receptor gamma-costimulatory factor-1α; exercise fatigue; thermal preconditioning; CpG island; methylation

过氧化物酶体增殖物活化受体γ协同刺激因子-1α(peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α,PGC-1α)作为核受体转录共激活因子,是一种多功能辅助活化因子,同时亦是核受体发挥功能的重要伴侣分子,主要的作用为直接调节线粒体的生物合成、诱导线粒体增殖及调节机体的能量代谢与肥胖等[1—2]。近年来的研究发现,PGC-1α作为骨骼肌中的重要调控因子,在骨骼肌的运动适应机制中发挥重要作用,如长时间运动诱导骨骼肌产生的生理性适应就与PGC-1α基因的表达相关[3],运动促进骨骼肌PGC-1α基因的表达且PGC-1α基因的表达水平与运动强度呈正相关[4]。小鼠实验表明,长时间的运动会使骨骼肌组织的PGC-1α基因的mRNA水平显著增加[5],注射拟肾上腺素类药物同样也会导致PGC-1α基因转录水平增加[6],此外,体外研究发现,通过去甲肾上腺素处理肌肉细胞系,PGC-1α可以被快速激活[7],这表明机体的运动调控与PGC-1α基因的表达密不可分。

基因表达受多种调控因素的影响,如基因启动子的甲基化修饰、乙酰化修饰、磷酸化修饰;细胞因子、生长因子的刺激;胞内转录因子的调控等等,其中,基因启动子的甲基化修饰作为基因表达调控的重要方式,越来越受到研究者们的广泛关注,成为研究基因表达调控的首要选择之一。基因启动子的甲基化修饰主要发生于启动子区域和外显子区域富含"CG"二核苷酸且一般长度>200bp的CpG岛(CpG island)上。在哺乳动物中,CpG岛呈现出两种状态:一种为分散的状态,另一种为高度聚集的状态[8]。在机体的正常组织中,分散状态的CpG岛为主要的甲基化修饰状态,约70%—90%的甲基化修饰发生在该状态下的CpG岛。根据人类基因组序列草图分析结果显示,人类基因组序列中CpG岛的含量约为28890个,在大部分的染色体中,每1Mb就存在5—15个CpG岛,如此高分布的CpG岛与基因的表达密度呈现显著相关[9—10]。某些管家基因的启动子区存在CpG岛,其上存在的甲基化修饰对于调控管家基因的表达十分重要,CpG岛的甲基化修饰程度高则显著抑制管家基因的表达[10],因此,CpG岛的甲基化修饰被认为是可以控制基因表达的长期、稳定的抑制修饰。由于CpG岛为富含双核苷酸"CG"的碱基片段,在人类基因组内,CG碱基的含量大约为40%且不均匀的分布于基因组内,在某些DNA片段上CG碱基的含量可高达60%以上,该区域的甲基化修饰水平较高,但基因的表达水平较低;在另一些区域CG碱基的含量只有33%左右,该区域的甲基化修饰水平较低,但基因的表达水平较高,因此CG碱基含量的差别在基因表达调控中扮演着重要的角色[11]。在PGC-1α基因的启动子区确定"CG"的含量和分布对确定该基因的甲基化修饰程度的高低十分重要。

前期研究发现,热预适应处理可以延缓运动疲劳的发生,而机体的运动行为与PGC-1α基因的表达密切相关,是否热预适应处理影响了PGC-1α基因的表达从而延缓了运动疲劳的发生呢?热预适应处理会通过怎样的机制影响PGC-1α基因的表达,

是否通过调节PGC-1α基因的甲基化修饰影响该基因的表达？针对上述问题，本实验选用热预适应处理的SD大鼠和普通对照SD大鼠为研究对象，观察热预适应SD大鼠肌肉组织中PGC-1α基因启动子甲基化修饰程度的变化及表达量的变化，从而进一步阐明热预适应延缓运动疲劳的机制，为今后研究如何延缓运动疲劳的发生提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本次试验选取12只8周雄性SPF级SD大鼠（购置于军事医学科学院实验动物中心），饲养于首都师范大学实验动物中心，温度21±3℃，相对空气湿度为50%—60%，昼∶夜=12∶12（8—20时为白昼）。大鼠随机分为两组，3只/笼分组进行处理。所有的实验程序均经动物伦理审查委员会批准，实验方案符合实验动物管理和使用规程。

1.2 实验方法

1.2.1 高温热预适应处理及力竭运动处理：将6只热预适应组SD大鼠经麻醉后置于42℃恒温水浴箱，控制水深度，防止大鼠窒息，处理15min后，置于室温静置1h，反复处理3次，连续处理7d[12]。6只对照组SD大鼠仅做麻醉处理，麻醉剂量同实验组一致，不限制大鼠活动。在热预适应处理完成后，分别在各组中取3只大鼠快速脱颈处死，收集大腿内侧骨骼肌进行启动子甲基化检测；将另外各组中的3只大鼠进行跑台一次性力竭运动。

一次性力竭运动以5m/min开始，无坡度，同时按照1m/min进行增加，直至终强度25m/min，直到力竭。在运动过程中用微电流及强光进行刺激并强迫运动。最后，在大鼠经反复声光电刺激及人工驱赶也不能继续运动，并且四肢瘫软，眼神无光，翻转后无法进行翻正反射，即确定为达到力竭状态，记录力竭时间[12]。室内温度（21±3）℃，相对空气湿度为50%—60%。

1.2.2 生物信息学预测：从UCSC（University of California, Santa Cruz）基因组数据库中获取大鼠PGC-1α基因的启动子序列，即从PGC-1α基因转录起始位点选取上游2000bp及下游200bp序列，利用在线软件（https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss _cpgplot/）分析预测PGC-1α基因的启动子CpG岛。

1.2.3 启动子甲基化分析：使用动物基因组DNA提取试剂盒提取肌肉组织的基因组DNA，随后对基因组DNA进行亚硫酸氢盐处理，针对PGC-1α启动子区域CpG岛设计引物（表1）并扩增进行测序。根据测序数据，将相邻的2个及以上CpG位点合并成1个位点进行统计学分析，进而分析不同处理组PGC-1α的甲基化程度即甲基化发生百分比。

1.2.4 PGC-1α蛋白含量Western Blot检测：将收集的骨骼肌组织在液氮中研磨，利用蛋白裂解液提取总蛋白。12000g，4℃离心15min收取上清，接着采用常规的BCA法测定蛋白。上清的浓度，将所用样品的浓度调制相同配置蛋白样品，随后将蛋白样品100℃水浴加热5min，采用SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜。转膜完成后，含5%脱脂奶粉的封闭液室温封闭1h，将相应分子大小的条带裁剪出来后，采用一抗4℃孵育过夜。结束后，TBST洗膜3次，每次5min。在室温条件下，孵育相应的二抗1 h后，TBST洗膜3次，每次5min，使用ECL法显影成像并保存，采用ImageJ软件对图像进行灰度扫描，利用GraphPad（Version 8.4.2）进行数据统计。

表1 引物序列信息

引物名称	引物序列	启动子区域
1F	5'-CGGCAGCCGGCGGAGTCGGGGAGCCCACGTGATGGCCC-3'	-1550—-2015bp
1R	5'-CGCCGAGAGTTCCCGTCCCCTCGGCCATTCCCTTCCCCCCTCCTTTTCTTTATTTGCG-3'	

1.3 统计学分析

采用独立样本t检验分析，数据结果采用均数±标准差表示，同时$P<0.05$为显著性差异。

2 结果

2.1 SD大鼠热预适应延缓运动疲劳的实验模型效果

为检测热预适应对于缓解运动疲劳是否存在效果，将进行了热预适应处理后的SD大鼠进行跑台一次性力竭运动实验，检测SD大鼠的力竭运动时间。结果表明，热预适应组SD大鼠的力竭运动时

间为（285.32±31.84）min，对照组为（163.24±22.66）min，表明SD大鼠经过1周的热预适应后显著延缓了运动疲劳的发生（P=0.0116），这也与我们前期的研究结果相一致。

2.2 SD大鼠PGC-1α基因启动子区域CpG岛预测

运用生物信息学软件EMBOSS-Cpgplot（https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/mboss_cpgplot/）对PGC-1α基因5'端转录起始位点上游2000bp至200bp的5'UTR区域的启动子序列进行分析，运用CpG岛预测网站对SD大鼠PGC-1α基因启动子区CpG岛进行预测。在200bp的窗口中，每次平移1bp，统计观测值（Obs）与期望值（Exp）的比值，Obs/Exp值大于等于0.6同时CG含量大于等于50%则初步定义为CpG岛。结果发现在PGC-1α基因启动子中存在1个CpG岛（位于启动子序列-1506—-2049bp处，翻译的起始位点定义为+1bp），全长543bp。见图1。

2.3 SD大鼠热预适应延缓运动疲劳过程中PGC-1α基因启动子区-1506— -2049bp处的甲基化检测

该区域共有64个CpG位点，通过高通量测序可以检测到其中的59个CpG位点的甲基化水平（表2）。在对照组1、2（对照组1、2为2个生物学重复，每个重复3个样本混合）中，该区域内的59个CpG位点的甲基化水平几乎都高于热预适应1、2组（热预适应1、2为2个生物学重复），对照组的平均甲基化水平为50.20%±3.13%或48.78%±3.38%，而热预适应组仅为18.57%±2.12%或19.80%±1.99%，统计结果明显低于对照组（P<0.05）。

2.4 SD大鼠热预适应延缓运动疲劳过程中PCG-1α基因表达情况

为确定热预适应延缓运动疲劳过程是否对PCG-1α基因的表达产生影响，采用蛋白免疫印迹方法检测SD大鼠热预适应组与对照组中PGC-1α的蛋白表达水平。结果发现，与对照组相比，热预适应组中PGC-1α基因的蛋白表达水平与对照组相比显著升高。灰度扫描分析显示，热预适应组PGC-1α的蛋白表达量是对照组的1.79倍（P<0.01）。见图2。

图1 SD大鼠PGC-1α基因启动子区域CpG岛预测结果

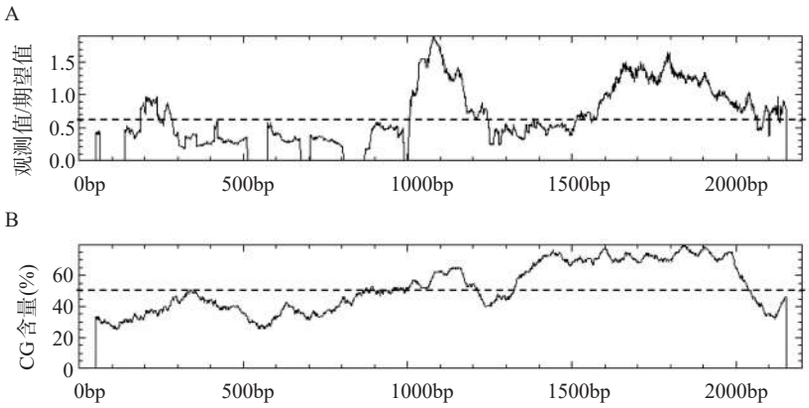
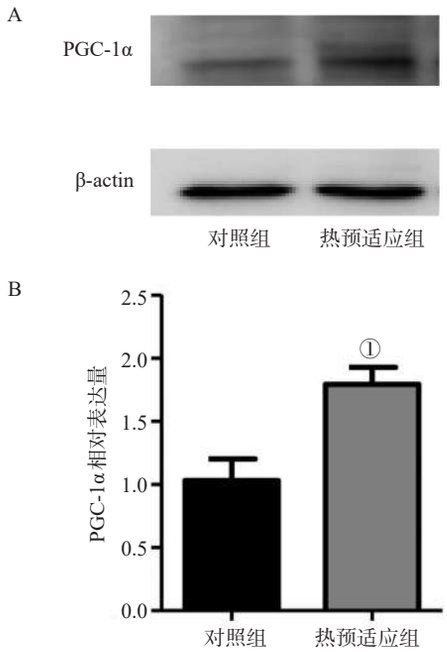


图2 SD大鼠热预适应延缓运动疲劳过程中PCG-1α蛋白的表达情况



A：Western-Blot法检测PCG-1α蛋白的表达水平；B：蛋白含量分析。①P<0.01。

3 讨论

热预适应是指将机体反复置于高温环境中诱导机体提高自身保护性和平衡因素的一种方法[13]。热预适应的保护性作用的研究存在于诸多领域，其中在脑保护研究中较为深入，对于其保护性机制研究主要集中在热预适应诱导热休克蛋白的表达，热休

表2 −450bp—15bp区域59个甲基化水平

CpG位点	对照1	对照2	热预适应1	热预适应2
CpG_1	10%	0%	0%	0%
CpG_2	10%	10%	10%	0%
CpG_3	10%	0%	0%	0%
CpG_4—7	60%	40%	30%	20%
CpG_8	40%	60%	10%	10%
CpG_9—11	80%	60%	10%	10%
CpG_12	40%	80%	40%	40%
CpG_13	50%	70%	30%	10%
CpG_14	20%	40%	0%	20%
CpG_15—17	70%	50%	30%	10%
CpG_18	50%	30%	10%	10%
CpG_19	40%	60%	30%	40%
CpG_20	50%	50%	0%	30%
CpG_21	60%	70%	20%	0%
CpG_22	50%	20%	30%	40%
CpG_23	50%	40%	0%	20%
CpG_24	10%	80%	20%	10%
CpG_25	50%	20%	40%	0%
CpG_26	20%	70%	10%	20%
CpG_27	50%	40%	10%	30%
CpG_28	20%	80%	20%	10%
CpG_29—30	50%	20%	40%	30%
CpG_31	30%	20%	0%	20%
CpG_32	40%	40%	20%	20%
CpG_33	50%	30%	40%	40%
CpG_34—36	80%	60%	30%	40%
CpG_37	50%	70%	30%	40%
CpG_38	70%	60%	20%	10%
CpG_39	50%	40%	40%	0%
CpG_40	60%	80%	30%	30%
CpG_41	80%	40%	40%	0%
CpG_42	60%	30%	0%	0%
CpG_43	90%	70%	30%	0%
CpG_44	80%	40%	10%	10%
CpG_45	50%	20%	0%	0%
CpG_46	60%	80%	10%	10%
CpG_47	60%	70%	0%	10%
CpG_48	50%	40%	0%	20%
CpG_49	50%	20%	40%	40%
CpG_50	40%	80%	0%	40%
CpG_51	50%	60%	40%	30%
CpG_52	60%	80%	30%	40%
CpG_53	70%	50%	20%	30%
CpG_54	60%	70%	0%	30%
CpG_55	80%	40%	20%	20%
CpG_56	90%	80%	0%	10%
CpG_57	80%	80%	20%	30%
CpG_58	10%	20%	10%	20%
CpG_59	20%	30%	40%	20%
平均甲基化	50.20%±3.13%	48.78%±3.38%	18.57%±2.12%	19.80%±1.99%

克蛋白在多种中枢性疾病或损伤中产生了有效的保护作用从而降低了对中枢神经系统的损害[14]。近年来，热预适应在运动损伤预防研究中也有所涉及，例如有研究发现机体经过热预适应后，机体中的热休克蛋白和抗氧化水平提高，进而可以达到保护机体骨骼肌的作用，避免或者延缓了运动疲劳及运动损伤的发生[15—17]。

PGC-1α作为骨骼肌中氧化代谢的中心调控因子，对调节骨骼肌和整体机体的代谢平衡发挥重要的作用。研究表明，PGC-1α基因可以调控机体的脂肪酸β氧化、氧化磷酸化，以及多种涉及线粒体功能维持的基因表达。除此之外，PGC-1α还能够促进血管生成基因及肌纤维类型转换基因的表达。先前的研究表明，运动可以提高小鼠骨骼肌中PGC-1α基因的mRNA水平[4]，但具体的机制并不清楚。基因启动子甲基化程度的改变是基因调控的重要方式之一，尤其是外界环境发生变化时，机体部分基因的启动子中的CpG岛会发生甲基化改变，通常甲基化程度越高，基因的表达越会被抑制，反之基因启动子甲基化程度降低，该基因的表达则会升高，基因表达的改变是机体响应外界环境变化的结果。前期研究表明，在PGC-1α基因低表达的组织中，发现PGC-1α基因的启动子序列中的甲基化岛呈现高度甲基化，而PGC-1α基因高表达的组织中则其甲基化程度较低[5]。因此在本研究中，为确定DNA甲基化是否参与PGC-1α基因的表达，在大鼠热预适应处理组与对照组中，检测了PGC-1α基因的启动子甲基化水平。结果表明，对照组PGC-1α基因启动子的甲基化水平（50.20%±3.13%或48.78%±3.38%）高于热预适应组（18.57%±2.12%或19.80%±1.99%），同时，检测PGC-1α基因的表达水平发现，热预适应组PGC-1α基因的表达水平与对照组相比显著提高（图2）。本结果在一定程度上解释了预适应过程中PGC-1α基因表达水平升高的现象。

机体会通过自我不断调节来适应环境的改变，在运动训练中，提前进行预适应是常用的方法，经过一段时间适应逆境环境，会诱导机体产生自我保护性的改变，使其具备抗击新的不良刺激的条件，常被用于机体损伤的保护机制研究，如缺血预适应、低氧预适应等，在多种损伤、疾病过程中可以起到保护器官、组织等作用[18—20]。热预适应作为自身适应性调节研究中的一种，其缓解运动疲劳的说法得到了广泛的认可，但具体的机制尚不明确。本研究表明热

预适应通过降低PGC-1α基因启动子甲基化水平上调了PGC-1α基因的表达水平,由于PGC-1α为有氧运动适应的中心调控因子,PGC-1α基因的高表达有利于局部肌肉组织和全身能量代谢的平衡,从而可以延缓运动疲劳,在一定程度上揭示了在骨骼肌中热预适应延缓运动疲劳的机制,对于PGC-1α基因在热预适应过程中的调控有了进一步的认识,这为今后更加深入的理解热预适应调控的机制奠定了基础。然而,热预适应过程中导致的PGC-1α基因的甲基化水平降低究竟受到哪些分子的具体调控尚未可知,探讨更为具体的分子机制将会是今后关注的重点。

4 结论

热预适应延缓运动疲劳发生可能途径之一是通过降低PGC-1α启动子甲基化水平,进而提高PGC-1α基因的蛋白表达量来实现的。

参考文献

[1] Norrbom J, Sallstedt EK, Fischer H, et al. Alternative splice variant PGC-1α-b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011,301(6):E1092—1098.

[2] Zhang Y, Huypens P, Adamson AW, et al. Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1α[J]. J Biol Chem,2009,284(47):32813—32826.

[3] Yoshioka T, Inagaki K, Noguchi T, et al. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1α gene[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009, 381(4):537—543.

[4] Ruas JL, White JP, Rao RR, et al. A PGC-1α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy[J]. Cell,2012,151(6):1319—1331.

[5] Tadaishi M, Miura S, Kai Y, et al. Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1α mRNA: a role of beta(2)-adrenergic receptor activation[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2011,300(2):E341—349.

[6] Miura S, Kai Y, Kamei Y, et al. Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1α (PGC-1α) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise [J]. Endocrinology,2008,149(9):4527—4533.

[7] Miura S, Kawanaka K, Kai Y, et al. An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1α) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation [J]. Endocrinology,2007,148(7):3441—3448.

[8] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start-sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet,2012,13 (7):484—492.

[9] Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(6):3740—3745.

[10] Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, et al. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development[J]. J Clin Invest,2001,108 (8):1195—1204.

[11] Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control [J]. Curr Opin Genet Dev,2002,12(2):198—209.

[12] 曹庆雷,李小兰,邓中原.热预适应对大鼠中枢疲劳后脑神经递质DA、5-HT、NE分泌的影响研究[J].山东体育学院学报,2019,35(1):58—63.

[13] Duveau V, Arthaud S, Serre H, et al. Transient hyperthermia protects against subsequent seizures and epilepsy-induced cell damage in the rat[J]. Neurobiol Dis,2005,19(1—2):142—149.

[14] Xiao C, Mileva-Seitz V, Seroude L, et al. Targeting HSP70 to motoneurons protects locomotor activity from hyperthermia in drosophila[J]. Dev Neurobiol, 2007, 67 (4): 438—455.

[15] Wright HE, Selkirk GA, McLellan TM. HPA and SAS responses to increasing core temperature during uncompensable exertional heat stress in trained and untrained males[J]. Eur J Appl Physiol,2010,108(5):987—997.

[16] Turturici G, Sconzo G, Geraci F.Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases[J]. Biochem Res Int,2011, 2011:618127.

[17] Sharma HS. Hyperthermia influences excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in the central nervous system. an experimental study in the rat using behavioural, biochemical, pharmacological, and morphological approaches[J]. J Neural Transm (Vienna),2006,113(4):497—519.

[18] Liu W,Liu K,Tao H,et al.Hyperoxia preconditioning:the next frontier in neurology?[J].Neurol Re,2012,34(5):415—421.

[19] Steiger HJ, Haenggi D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications[J]. Acta Neurochir (Wien),2007,149(1):1—10.

[20] Hawaleshka A,Jacobsohn E.Ischaemic preconditioning:mechanisms and potential clinical applications[J]. Can J Anaesth, 1998,45(7):670—682.