

网络出版时间:2022-08-30 14:34 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220829.1639.015.html

沉默肌动蛋白样 6A 对胰腺癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响

林振宇¹,董庆泰¹,张建新²,钟彬¹,张涛²,尚作宏²,殷微²,李中虎²,马丹丹²,金炜东^{1,2}

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.015

摘要 目的 探讨沉默肌动蛋白样 6A (ACTL6A) 对胰腺癌细胞系 SW1990 细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。方法 利用 Oncomine 数据库分析 ACTL6A mRNA 在胰腺癌组织与正常胰腺组织的表达差异。构建沉默 ACTL6A 质粒及 siRNA 阴性对照质粒,分别转染至胰腺癌细胞系 SW1990 细胞中,作为 siRNA-ACTL6A 组与 siRNA-NC 组。采用 CCK-8 法、凋亡实验、划痕实验和 Transwell 实验分别检测沉默 ACTL6A 对 SW1990 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移能力的影响。基因富集分析 (GSEA) 预测 ACTL6A 在胰腺癌中调控的可能信号通路。两组间比较使用独立样本 *t* 检验。结果 ACTL6A 在胰腺癌组织中的表达高于正常胰腺组织 ($P < 0.05$)。CCK-8 实验结果显示 siRNA-ACTL6A 组 24、48 h 的吸光度值均低于 siRNA-NC 组,差异有统计学意义 ($t = 5.840、8.454, P < 0.01$)。划痕实验和 Transwell 实验结果显示,siRNA-ACTL6A 组划痕愈合率、侵袭细胞数均明显低于 siRNA-NC 组,差异有统计学意义 ($t = 3.960、4.464, P < 0.05$),而 siRNA-ACTL6A 组细胞凋亡率明显高于 siRNA-NC 组,差异有统计学意义 ($t = 12.192, P < 0.001$)。GSEA 研究结果显示,ACTL6A mRNA 高表达组在细胞周期通路、核苷酸切除修复、碱基切除修复、DNA 复制、癌症信号通路、NOTCH 信号通路等相关基因集出现上调 ($P < 0.05$)。当 ACTL6A 基因表达上调时,上述通路被激活。结论 ACTL6A 在胰腺癌组织中高表达,沉默 ACTL6A 可促进胰腺癌细胞的凋亡,抑制其增殖、迁移和侵袭能力。其在胰腺癌发生发展的机制可能是 ACTL6A 基因的上调激活细胞周期通路、核苷酸切除修复、碱基切除修复、DNA 复制、癌症信号通路、NOTCH 信号通路等所致。

关键词 肌动蛋白样 6A;胰腺癌;沉默;增殖;凋亡;迁移;侵袭

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1589-06

2022-08-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81902501)

作者单位:¹南方医科大学第一临床医学院,广州 510515

²中部战区总医院普通外科,武汉 430070

作者简介:林振宇,男,硕士研究生;

金炜东,男,副主任医师,责任作者,E-mail:jwdong1972@163.com;

马丹丹,女,主管技师,责任作者,E-mail:tjmadandan@163.com

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,发病率和病死率逐年上升,其 5 年生存率小于 8%^[1]。2020 年统计数据显示,在 185 个国家 36 种恶性肿瘤中,胰腺癌是肿瘤导致死亡的主要原因之一,排名第 7 位^[2]。其具有早期诊断率低,中晚期时常伴随着病灶转移,疗效欠佳且预后差等特点。因此提高胰腺癌的早期诊断率,寻找新的肿瘤基因治疗靶点迫在眉睫。

ACTL6A 基因编码肌动蛋白相关蛋白家族成员,并且与传统的肌动蛋白具有显著的氨基酸序列同源性。ACTL6A 是 ATP 依赖性 SWI/SNF 样 BRG1/BRM 相关因子复合体的重要组成部分,参与人体内多种生理过程,包括囊泡运输、调控基因转录、纺锤体定向、核迁移和染色质重塑^[3]。ACTL6A 与前列腺癌^[4]、肝癌^[5]、胶质瘤^[6]、胆管癌^[7]等多种肿瘤的发生发展密切相关。但目前其在胰腺癌中的表达和作用尚不明确,该研究主要通过探讨沉默 ACTL6A 对胰腺癌细胞增殖、侵袭、转移及凋亡的影响,分析 ACTL6A 在胰腺癌中的细胞生物学功能。

1 材料与方法

1.1 基因表达差异分析 利用 Oncomine 数据库检索 ACTL6A 在胰腺癌组织及正常胰腺组织中的基因表达差异。在 Oncomine 数据库筛选“ACTL6A”基因,设定条件为:“normal vs cancer”、“pancreatic cancer”、“mRNA”,获得各个研究中胰腺癌组织与正常胰腺组织中的表达情况,并行荟萃分析。

1.2 细胞培养及转染 ① SW1990 细胞系培养于 DMEM 培养基(含 10% 的胎牛血清),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。② 取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板,待贴壁后,使用阳离子脂质载体 Lipofectamine 2000 将沉默 ACTL6A 质粒及 siRNA 阴性对照质粒分别转染 SW1990 细胞作为 siRNA-ACTL6A 组与 siRNA-NC 组。

1.3 CCK-8 实验 取对数生长期 siRNA-ACTL6A

组与 siRNA-NC 组细胞接种于 96 孔板,每组设置 3 个复孔。分别于培养 24、48 h 后加入 10% CCK-8 试剂,每孔 10 μ l,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 2 h。最后进行检测(酶标仪波长 450 nm),记录吸光度(absorbance, A)值。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 用胰酶消化 siRNA-ACTL6A 组与 siRNA-NC 组细胞,5 000 r/min 离心 5 min,重悬后制成细胞悬浮液,调整细胞悬液浓度为 1.0×10^5 /ml,接种于 96 孔板中,每孔中加入细胞悬液 0.2 ml,培养 48 h 后,PBS 清洗 2 次;低温下加入 Binding Buffer 重悬细胞。室温避光条件下取 100 μ l 细胞悬液加入 5 μ l 的 AnnexinV-FITC 和 Propidium Iodide,静置 10 min。最后加入 400 μ l Binding Buffer 混匀,流式细胞仪检测细胞凋亡。每组设置 3 个复孔。

1.5 Transwell 实验 用胰酶消化 siRNA-ACTL6A 组与 siRNA-NC 组细胞,1 000 r/min 离心 5 min,取沉淀用 DMEM 重悬,形成单细胞悬液,调整细胞密度为 1.0×10^6 /ml。每孔取 100 μ l 细胞悬液并接种到含有无血清培养基的 Transwell 小室上层中。下室内加入 500 μ l 有血清的 DMEM 高糖培养基。置入配养箱中培育 24 h 后,在室温下每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 PBS 洗去甲醛,棉签擦去上室未迁移细胞,0.5% 结晶紫染液染色 15 min,自然风干后在显微镜下以 200 倍放大观察染色细胞。每组设置 3 个复孔。

1.6 划痕实验 用胰酶消化 siRNA-ACTL6A 组与 siRNA-NC 组细胞,1 000 r/min 离心 5 min,取沉淀用 DMEM 重悬,形成单细胞悬液,铺于 6 孔板中培养,待细胞铺满贴壁,用 10 μ l 消毒枪头垂直划痕,PBS 洗 3 次,使用显微镜记录此时的细胞图像并记录划痕宽度,记为 0 h;加入无血清 DMEM 培养基置于培养箱中培养,48 h 后再用拍摄显微镜记录此时的细胞图像并记录划痕宽度,放大图片倍数为 200 倍。

1.7 GSEA 富集分析 收集癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中 ACTL6A 在胰腺癌中的基因表达数据。以胰腺癌患者 ACTL6A mRNA 表达水平的中位数为分割点将患者划分 ACTL6A 高表达组与 ACTL6A 低表达组。基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)是基于 JAVA 语言的一款基因富集分析软件,本研究利用 GSEA 软件进行 KEGG 通路富集分析。每次分析进行 1 000 次基因组排列。校正 P 值及错误发现率

(false discovery rate, FDR)均小于 0.05 的基因组被认为差异具有显著性。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较使用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACTL6A mRNA 在胰腺癌组织及正常胰腺组织中的基因表达差异 Oncomine 数据库中有 4 项子研究符合筛选条件。4 项子研究分别为 BadesaPancreas、Lacobuzio-Donahue Pancreas2、Pei Pancreas 及 Segara Pancreas,共包含 117 个胰腺癌组样本及 66 个正常胰腺组织样本。对其进行荟萃分析,结果显示 ACTL6A 在胰腺癌组织中的表达水平高于正常胰腺组织($P < 0.05$)。见图 1。

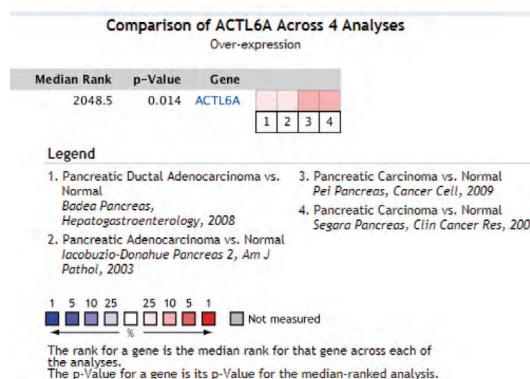


图1 ACTL6A 在胰腺癌组织和正常胰腺组织中的表达差异

2.2 沉默 ACTL6A 抑制胰腺癌 SW1990 细胞的增殖 CCK-8 法实验表明,与 siRNA-NC 组相比,siRNA-ACTL6A 组胰腺癌 SW1990 细胞的增殖能力明显下降,在 24、48 h 吸光度值差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。表明沉默 ACTL6A 抑制胰腺癌细胞的增殖。

表1 CCK-8 法检测胰腺癌细胞的增殖($\bar{x} \pm s$)

时间	siRNA-NC 组	siRNA-ACTL6A 组	t 值	P 值
24 h	1.084 $\pm$ 0.049	0.817 $\pm$ 0.063	5.840	0.004
48 h	1.069 $\pm$ 0.040	0.632 $\pm$ 0.080	8.454	0.001

2.3 沉默 ACTL6A 促进了胰腺癌 SW1990 细胞的凋亡 细胞凋亡实验结果如图 2 所示,siRNA-ACTL6A 组的凋亡率明显高于 siRNA-NC 组($t = 12.192$, $P < 0.001$),表明沉默 ACTL6A 明显促进了胰腺癌细胞的凋亡。

2.4 沉默 ACTL6A 抑制了胰腺癌 SW1990 细胞的侵袭 Transwell 实验结果如图 3 所示, siRNA-ACTL6A 组侵袭细胞数较 siRNA-NC 组明显减少 ($t = 4.464$, $P < 0.05$)。表明沉默 ACTL6A 抑制胰腺癌细胞的侵袭。

2.5 沉默 ACTL6A 抑制了胰腺癌 SW1990 细胞的迁移 划痕实验结果如图 4 所示, 48 h 后 siRNA-ACTL6A 组愈合率较 siRNA-NC 组低, 差异有统计学

意义 ($t = 3.960$, $P < 0.05$)。表明沉默 ACTL6A 抑制胰腺癌细胞的迁移。

2.6 GSEA 信号通路富集分析 GSEA 研究结果显示: ACTL6A mRNA 高表达组在细胞周期通路、核苷酸切除修复、碱基切除修复、DNA 复制、癌症信号通路、NOTCH 信号通路等相关基因集出现上调 ($P < 0.05$)。当 ACTL6A 基因表达上调时, 上述通路被激活。结果如表 2 和图 5 所示。

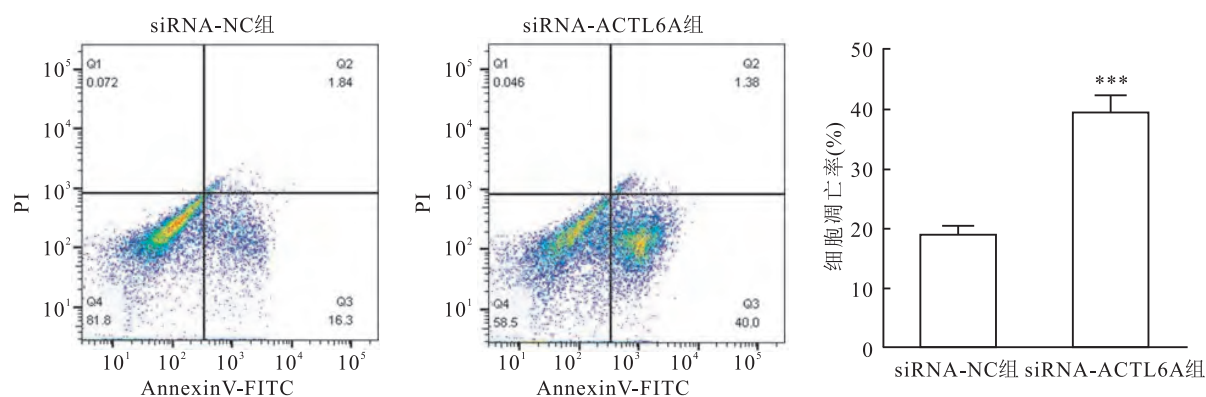


图2 沉默 ACTL6A 促进 SW1990 细胞的凋亡

与 siRNA-NC 组比较: *** $P < 0.001$; Q1 区: 机械损伤; Q2 区: 晚期凋亡或坏死; Q3 区: 早期凋亡细胞; Q4 区: 正常存活

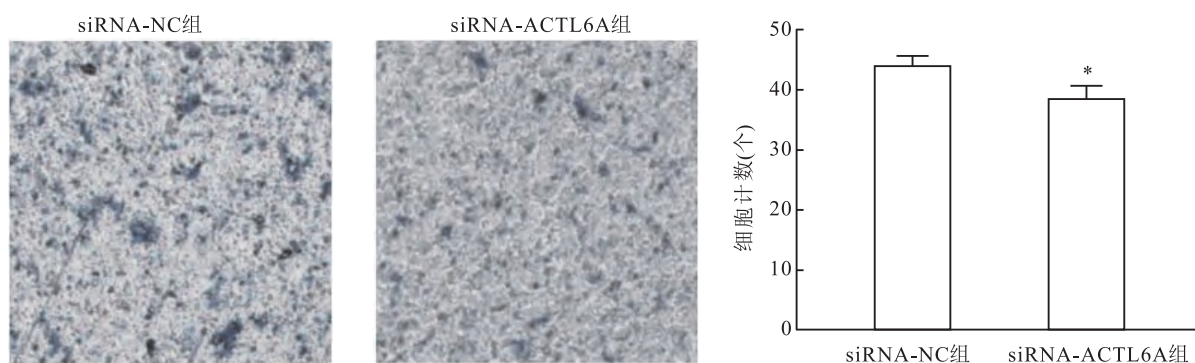


图3 沉默 ACTL6A 抑制 SW1990 细胞的侵袭 ×200

与 siRNA-NC 组比较: * $P < 0.05$

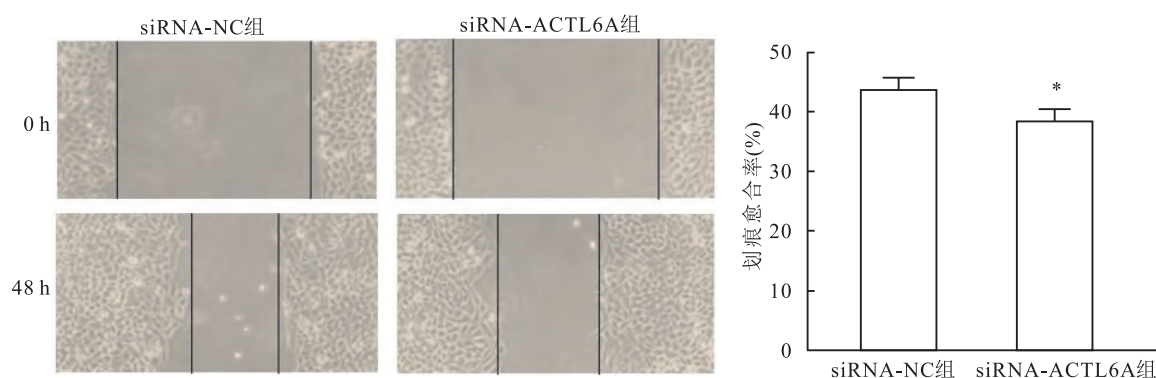


图4 沉默 ACTL6A 抑制 SW1990 细胞的迁移 ×200

与 siRNA-NC 组比较: * $P < 0.05$

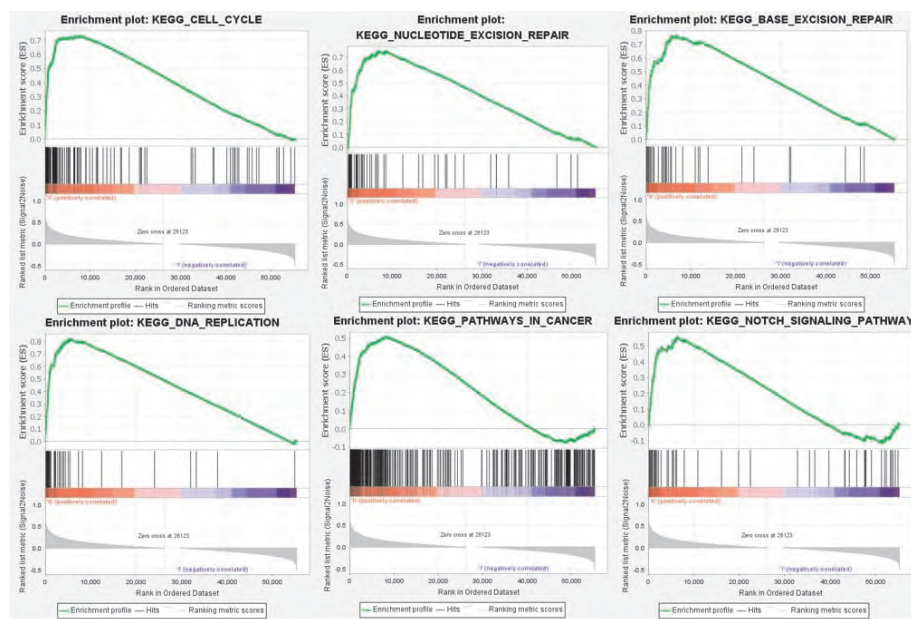


图5 基因集 GSEA 的富集图

表2 高表达 ACTL6A 的 GSEA 富集结果

信号通路名称	富集分数 (NES)	校正 P 值	FDR
细胞周期信号通路	2.13	0.000	0.004
核苷酸切除修复信号通路	2.05	0.000	0.005
碱基切除修复信号通路	1.97	0.000	0.003
DNA 复制信号通路	1.92	0.000	0.007
癌症信号通路	1.79	0.004	0.020
NOTCH 信号通路	1.77	0.002	0.022

3 讨论

胰腺癌因其高侵袭性和转移性,目前治疗该疾病仍然面临诸多困难。随着基因治疗技术的发展,分子靶向治疗已成为胰腺癌诊疗的热点。由于缺乏胰腺癌特异的分子靶点,不利于胰腺癌的早期诊断、治疗及预后的评估。因此深入探索胰腺癌发病潜在的分子靶点对于疾病的诊疗至关重要。

研究表明,ACTL6A 在多种癌症中高度表达,Jin et al^[4]发现,同正常前列腺组织相比,ACTL6A 在前列腺癌组织中的表达显著升高,并且与雄激素受体的表达密切相关。Xiao et al^[5]同样发现,ACTL6A 于人肝细胞癌组织及细胞系中高表达。在胶质瘤组织中的 ACTL6A 表达水平高于正常脑组织且 ACTL6A 的高表达与不良预后相关^[6]。本研究,Oncomine 数据库分析结果显示 ACTL6A 在胰腺癌组织中的表达水平高于正常胰腺组织。与相关文献^[4-6]报道一致,均有力证实 ACTL6A 在胰腺癌中

高表达。

本研究中,体外细胞学实验结果表明沉默 ACTL6A 抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭及迁移,并促进其凋亡。研究^[8]显示 ACTL6A 在卵巢癌中过表达,并且 ACTL6A 过表达与预后不良相关。体外沉默 ACTL6A 可抑制卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移,并降低葡萄糖利用、乳酸生成和丙酮酸水平。Shrestha et al^[9]发现 ACTL6A 可促进鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和迁移,并且 ACTL6A 基因敲除可显著抑制其细胞生物学功能。在胆管癌组织中,ACTL6A 呈现异常表达,沉默 ACTL6A 基因后,人胆管癌 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭能力受到明显抑制^[7]。Jian et al^[10]研究发现 ACTL6A 的过表达促进了乳腺癌细胞增殖和肿瘤生长,而沉默 ACTL6A 则抑制了乳腺癌细胞增殖和肿瘤生长。本研究结果证实 ACTL6A 在胰腺癌中表现为癌基因特性,可能具备作为胰腺癌新治疗靶点的潜力。

近年来研究发现胰腺癌相关基因突变多集中于 DNA 损伤修复、细胞周期调控、TGF- β 信号通路、染色质调节、轴突导向通路等^[11]。Zhong et al^[12]研究发现在急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 患者中 ACTL6A 的表达异常升高,其体外实验证实沉默 ACTL6A 基因能够促进 NB4 和 HL-60 细胞的分化,表明 ACTL6A 在 APL 分化中具有重要作用,进一步机制研究发现,ACTL6A 是通过 SOX2 和 Notch1 信号传导途径来促进细胞的分化。

Xiao et al^[5]研究表明 ACTL6A 通过激活 NOTCH 信号通路促进肝细胞癌转移和上皮-间质转化, ACTL6A 不仅通过 SOX2 激活 NOTCH1 信号通路, 而且还通过 SOX2 影响肝癌细胞的生物学行为。Zhang et al^[8] 发现在卵巢癌组织中, ACTL6A 和 PGK1 的表达呈正相关, ACTL6A 过表达增加 PGK1 表达, 而敲低 ACTL6A 则相反。ACTL6A 表达改变通过下调 PGK1 抑制卵巢癌细胞体内致瘤性。在喉鳞癌细胞中, ACTL6A 的敲除抑制了 Yes 相关蛋白 (YAP) 介导的信号通路的激活, 而 YAP 的重新激活显著逆转了 ACTL6A 沉默介导的喉鳞癌细胞增殖和侵袭的抑制^[13]。Li et al^[14] 研究发现 ACTL6A 的表达可能通过 S6K1/pS6 通路促进食管鳞状细胞癌细胞周期的再分配来影响细胞的增殖和 DNA 合成。本研究中, 利用 GSEA 富集分析预测 ACTL6A 在胰腺癌中发挥功能的可能信号通路, 结果显示 ACTL6A 在胰腺癌中发挥功能的可能信号通路有细胞周期通路、NOTCH 信号通路等, 与文献^[5,14] 报道一致。除此之外, 还有核苷酸切除修复信号通路、碱基切除修复信号通路、DNA 复制信号通路、癌症信号通路等, 可为 ACTL6A 在胰腺癌中的机制研究提供更多线索和思路。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] Dion V, Shimada K, Gasser S M. Actin-related proteins in the nucleus: life beyond chromatin remodelers [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(3): 383-91.
- [4] Jin M L, Kim Y W, Jeong K W. BAF53A regulates androgen receptor-mediated gene expression and proliferation in LNCaP cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 618-23.
- [5] Xiao S, Chang R M, Yang M Y, et al. Actin-like 6A predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma and promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1256-71.
- [6] Chen X C, Xiang Z J, Li D C, et al. ACTL6A knockdown inhibits cell migration by suppressing the AKT signaling pathway and enhances the sensitivity of glioma cells to temozolomide [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(2): 175.
- [7] 康晓亮. ACTL6A 基因在胆管癌中的表达及生物学特性的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [8] Zhang J, Zhang J, Wei Y, et al. ACTL6A regulates follicle-stimulating hormone-driven glycolysis in ovarian cancer cells via PGK1 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 811.
- [9] Shrestha S, Adhikary G, Xu W, et al. ACTL6A suppresses p21 (Cip1) expression to enhance the epidermal squamous cell carcinoma phenotype [J]. *Oncogene*, 2020, 39(36): 5855-66.
- [10] Jian Y, Huang X, Fang L, et al. Actin-like protein 6A/MYC/CDK2 axis confers high proliferative activity in triple-negative breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 56.
- [11] Bailey P, Chang D K, Nones K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 47-52.
- [12] Zhong P Q, Zhong L, Yao J J, et al. ACTL6A interacts with p53 in acute promyelocytic leukemia cell lines to affect differentiation via the Sox2/Notch1 signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2019, 53:390-9.
- [13] Dang Y, Zhang L, Wang X. Actin-like 6A enhances the proliferative and invasive capacities of laryngeal squamous cell carcinoma by potentiating the activation of YAP signaling [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52(6): 453-63.
- [14] Li R Z, Li Y Y, Qin H, et al. ACTL6A promotes the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells and correlates with poor clinical outcomes [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14:199-211.

Effects of ACTL6A knockdown on proliferation, apoptosis, migration and invasion of pancreatic cancer cells

Lin Zhenyu¹, Dong Qingtai¹, Zhang Jianxin², Zhong Bin¹, Zhang Tao²,
Shang Zuohong², Yin Wei², Li Zhonghu², Ma Dandan², Jin Weidong^{1,2}

(¹The First School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515;

²Dept of General Surgery, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070)

Abstract Objective To investigate the effects of actin like 6A (ACTL6A) knockdown on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of SW1990 cells in pancreatic cancer. **Methods** The Oncomine database was used to analyze the expression of ACTL6A mRNA in the tissues of pancreatic cancer and normal pancreas. The plasmid of knockdown ACTL6A and siRNA negative control were established and transfected into SW1990 cell line as siRNA-

ACTL6A group and siRNA-NC group. CCK-8, cell apoptosis experiment, Wound healing and Transwell assay were used to determine the effects of ACTL6A knockdown on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of SW1990 cells. GSEA predicted a possible pathway regulated by ACTL6A in pancreatic cancer. T-test was used between the two groups. **Results** The expression of ACTL6A in pancreatic cancer tissues was higher than that in normal pancreatic tissues ($P < 0.05$). The results of CCK-8 assay showed that the absorbance of siRNA-ACTL6A group at 24 and 48 h were lower than those in the siRNA-NC group, and the difference was statistically significant ($t = 5.840, 8.454, P < 0.01$). The results of Wound healing assay and Transwell assay showed that the healing rate and the number of invasive cells in siRNA-ACTL6A group were both lower than those in the siRNA-NC group. The difference was statistically significant ($t = 3.960, 4.464, P < 0.05$), but the apoptosis rate of siRNA-ACTL6A group was significantly higher than that of the siRNA-NC group, and the difference was statistically significant ($t = 12.192, P < 0.001$). GSEA results showed that the group with high expression of ACTL6A mRNA was up-regulated in cell cycle, nucleotide excision repair, base excision repair, DNA replication, pathways in cancer, NOTCH signaling pathway and other related gene sets ($P < 0.05$). These pathways were activated when the expression of ACTL6A was up-regulated. **Conclusion** ACTL6A is highly expressed in pancreatic cancer tissues. ACTL6A knockdown promotes the cell apoptosis of SW1990 cells, and inhibits proliferation, invasion and migration of SW1990 cells. The mechanism of the occurrence and development of ACTL6A in pancreatic cancer is attributed to the activation of cell cycle, nucleotide excision repair, base excision repair, DNA replication, pathways in cancer, NOTCH signaling pathway.

Key words actin like 6A; pancreatic cancer; knockdown; proliferation; apoptosis; migration; invasion

(上接第 1588 页)

Effects of hypoxic preconditioning on energy metabolism of mitochondria in mouse hippocampal HT22 cells

Qi Ruifang^{1,2}, Li Na^{1,2}, Wang Lijun¹, Lv Jun¹, Shi Ruili¹, Ma Baohui¹,
Shi Jinghua¹, Hao Xiaoqiong¹, Shao Guo³

(¹Dept of Physiology, College of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; ²Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine of Inner Mongolia, Baotou 014040; ³Translational Medicine Center of The Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen City of Guangdong Province, Shenzhen 518172)

Abstract Objective To investigate the effect of hypoxic preconditioning (HPC) on mitochondrial energy metabolism in mouse hippocampal HT22 cells and its possible mechanism. **Methods** In this paper, mouse hippocampal nerve cells HT22 were divided into control group, hypoxia group, HPC group, and the levels of adenosine triphosphate (ATP) and reactive oxygen species (ROS) in each group were measured for observing the effect of HPC on cell mitochondrial metabolism. Western blot was used to detect the expression of target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR protein and autophagy substrate P62 protein; cellular immunofluorescence was used to detect phosphorylated mTOR, and LysoTrackerTM probe was used to detect lysosomes. **Results** Compared with the control group, the ATP level was significantly decreased and the ROS level was increased in the hypoxia group. Exposed to HPC, the ATP level was increased and the ROS level was decreased. Compared with the control group, the expression of phosphorylated mTOR was down-regulated and the expression of autophagy substrate P62 was down-regulated in the HPC group. **Conclusion** HPC may affect the energy metabolism of HT22 cells through the mTOR/autophagy signaling pathway, thereby exerting a protective effect on the HT22 cells.

Key words hypoxic preconditioning; mitochondrial metabolism; mTOR; autophagy; neuroprotection