

缺氧条件下 24-羟基胆固醇蓄积促进神经元衰老的机制研究

戴求龙¹, 王钰莹², 王娟娟³, 李立宏¹

(1.空军军医大学唐都医院急诊科, 西安 710038; 2.空军军医大学基础医学院病理学教研室, 西安 710000;

3.延安大学基础医学院病理学教研室, 延安 716000)

【摘要】目的:探讨缺氧对脑内胆固醇代谢稳态及神经元衰老的影响。**方法:**8~12 周龄的 C57BL/6 野生型雄性小鼠随机分为常氧(Normoxia)组和缺氧(Hypoxia)组;以缺氧处理小鼠海马神经元 HT22 细胞并分为对照(Control)组和缺氧(Hypoxia)组;以 10 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的 24-羟基胆固醇(24S-Hydroxycholesterol, 24S-OHC)处理 HT22 细胞并分为 Control 组和 24S-OHC 组。苏木精-伊红染色(hematoxylin-ensin, HE)和尼氏(nissl)染色观察脑组织结构;酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清、脑组织和细胞 24S-OHC 水平;微量法检测脑组织和细胞总胆固醇(total cholesterol, TC)与甘油三酯(triglyceride, TG)水平;蛋白质免疫印迹(western blot, WB)法检测脑组织和细胞胆固醇代谢相关酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR)、细胞色素 P450 家族 46 亚家族 A 成员 1(cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1, CYP46A1)、衰老相关蛋白细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A/p16)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A/p21)、磷酸化组蛋白(phospho-H2AX, γH2AX)和脂质合成相关分子抗硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl-Coenzyme A desaturase 1, SCD1)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FASN)、固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c)的表达水平;免疫组织化学染色检测脑内 CYP46A1 和 γH2AX 的表达;检测各组小鼠大脑组织中基因表达谱,筛选目标差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),对 DEGs 进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析;衰老相关 β 半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色评估细胞衰老情况;BODIPY 染色观察细胞脂滴蓄积情况。**结果:**与常氧组比较,缺氧组脑湿重差异无统计学意义($P=0.573$);Nissl 染色显示存活神经元数目减少;血清 24S-OHC 水平升高,脑内 24S-OHC 和 TG 含量增多,TC 含量减少(均 $P<0.05$);胆固醇合成酶 HMGCR 表达降低,胆固醇分解酶 CYP46A1 表达升高,p16、p21 和 γH2AX 表达增加(均 $P<0.05$);转录组学结果显示,在 GO 分析中炎症通路与脂质相关通路富集,在 KEGG 分析中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路和肿瘤蛋白 p53(tumor protein 53, p53)信号通路等与衰老相关通路富集。缺氧处理 HT22 细胞实验中,与 Control 组相比,Hypoxia 组细胞内 TC 含量减少,24S-OHC 含量增多(均 $P<0.05$);HMGCR 表达降低,CYP46A1 表达升高,p16、p21、 γH2AX 表达增加(均 $P<0.05$);SA- β -gal 阳性细胞明显增多。24S-OHC 处理 HT22 细胞实验中,与 Control 组相比,24S-OHC 组细胞内 TC 和 TG 含量均增多(均 $P<0.05$);细胞内脂滴含量明显增多($P<0.05$);HMGCR 和 CYP46A1 表达降低,SCD1、FASN 和 SREBP1c 表达升高,p16、p21 和 γH2AX 表达升高(均 $P<0.05$)。**结论:**慢性缺氧通过下调 HMGCR 和上调 CYP46A1 表达,诱导 24S-OHC 异常蓄积并触发 SREBP1c/SCD1 信号通路介导的脂毒性衰老。

【关键词】缺氧;胆固醇代谢;24-羟基胆固醇;神经元;衰老**【中图分类号】**R651.15**【文献标志码】**A

Mechanistic study on the promotion of neuronal senescence by 24-Hydroxycholesterol accumulation under hypoxic conditions

Dai Qiulong¹, Wang Yuying², Wang Juanjuan³, Li Lihong¹

(1.Department of Emergency Medicine, Tangdu Hospital of Air Force Medical University; 2.Department of Pathology,

School of Basic Medical Sciences, Air Force Military Medical University; 3.Department of Pathology,

School of Basic Medicine, Yan 'an University)

作者介绍:戴求龙, Email: dai15991706127@126.com,

研究方向:颅脑损伤。

通信作者:李立宏, Email: lihongli777@163.com。

基金项目:陕西省科技计划资助项目(编号:2024SF-YBXM-210)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260126.0951.004>

(2026-01-27)

【Abstract】Objective: This study aims to investigate the impact of hypoxia on cholesterol metabolic homeostasis in the brain and its effects on neuronal senescence. **Methods:** C57BL/6 wild-type male mice aged 8 to 12 weeks were randomly divided into normoxia (Normoxia) group and hypoxia (Hypoxia) group; HT22 cells of mouse hippocampal neurons treated with hypoxia were divided into control

(Control) group and hypoxia (Hypoxia) group; HT22 cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 24-hydroxycholesterol (24S-OHC) were divided into Control group and 24S-OHC group. Brain tissue structure was observed by HE and Nissl staining; serum, brain and cellular 24S-OHC levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels in brain and cells were measured by microassay; expression levels of cholesterol metabolism-related enzymes HMGCR, CYP46A1, senescence-associated proteins p16, p21, γH2AX and lipid synthesis-related molecules SCD1, FASN, SREBP1c in brain tissues and cells were detected by Western blot; expression of CYP46A1 and γH2AX in brain was examined by immunohistochemical staining; gene expression profiles in brain tissues of each group of mice were detected, target differentially expressed genes (DEGs) were screened, and GO and KEGG analyses were performed on DEGs; cellular senescence was evaluated by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining; cellular lipid droplet accumulation was observed by BODIPY staining. **Results:** Compared to the normoxia group, the hypoxia group showed no statistically significant difference in brain wet weight ($P=0.573$). Nissl staining demonstrated a reduction in surviving neuron numbers in the hypoxia group. Serum 24S-OHC levels were elevated, while cerebral 24S-OHC and triglyceride (TG) content increased, and total cholesterol (TC) content decreased in the hypoxia group (all $P<0.05$). The hypoxia group displayed reduced expression of cholesterol synthase HMGCR, increased expression of cholesterol catabolizing enzyme CYP46A1, and upregulated senescence markers p16, p21, and γH2AX (all $P<0.05$). Transcriptomic analysis revealed enriched inflammatory pathways and lipid-related pathways via GO analysis in the hypoxia group, while KEGG analysis highlighted significant enrichment in aging-associated pathways such as the PI3K-Akt and p53 signaling pathways. Hypoxia-treated HT22 cells exhibited reduced TC, increased 24S-OHC (all $P<0.05$), downregulated HMGCR, upregulated CYP46A1 (all $P<0.05$), elevated p16, p21, and γH2AX (all $P<0.05$), and more SA- β -Gal-positive cells. 24S-OHC-treated cells displayed increased TC and TG (all $P<0.05$), lipid droplet accumulation ($P<0.05$), reduced HMGCR and CYP46A1, upregulated SCD1, FASN, and SREBP1c, and elevated p16, p21, and γH2AX (all $P<0.05$). **Conclusion:** Chronic hypoxia induces abnormal 24S-OHC accumulation and triggers SREBP1c/SCD1-mediated lipotoxic senescence by downregulating HMGCR and upregulating CYP46A1 expression.

[Key words] hypoxia; cholesterol metabolism; 24S-Hydroxycholesterol; neurons; senescence

慢性缺氧作为脑血管疾病、高原脑病等病理状态的核心病理生理过程,可通过诱导能量代谢紊乱、氧化应激及兴奋性毒性等机制导致神经元损伤,进而引发认知功能障碍等临床症状^[1]。大脑作为全身耗氧量最高的器官,其功能维持高度依赖持续的能量供应与精细的代谢调控^[2]。近年来研究表明,缺氧不仅影响糖酵解和三羧酸循环等经典代谢通路^[3],更通过重塑氨基酸代谢谱发挥神经保护作用^[4]。因此,了解缺氧后大脑的病理生理变化和代谢改变,对改善缺氧导致的神经功能损伤至关重要。

脑胆固醇稳态对维持大脑正常生理功能尤其重要。胆固醇主要通过3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR)和固醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c)调控合成,但由于其不能够通过血脑屏障,需要在神经元中通过细胞色素P450家族46亚家族A成员1(cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1, CYP46A1)酶羟化为24-羟基胆固醇(24S-Hydroxycholesterol, 24S-OHC)才能排出大脑^[5]。临床研究表明,胆固醇代谢紊乱与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's

disease, PD)等神经退行性疾病密切相关^[6]。值得注意的是,作为脑内胆固醇代谢的主要终产物^[7],24S-OHC不仅是肝脏X受体(liver X receptors, LXRs)的高效激动剂^[8],在调节胆固醇代谢和神经元功能中起关键作用,更能通过影响辅助性T淋巴细胞17/调节性T淋巴细胞(T-helper 17/regulatory T lymphocyte, Th17/Treg)平衡和相关免疫反应来影响大脑损伤以及学习和记忆功能^[9]。最新研究证实AD患者脑脊液24S-OHC水平异常升高,提示其可能作为神经退行性变的生物标志物^[10-11]。缺氧能够引起神经退行性变,然而缺氧会对脑胆固醇稳态产生怎样的影响尚不清楚,有待进一步研究。

细胞衰老是一种增殖细胞停止分裂并永久性退出细胞周期的过程,通常伴有磷酸化组蛋白(phospho-H2AX, γH2AX)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A/p21)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A/p16)等蛋白的异常升高以及肿瘤蛋白p53(tumor protein 53, p53)信号通路的异常激活^[12]。此外,磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路

与衰老之间也存在联系,如基因组不稳定性、端粒损耗和表观遗传变化等衰老变化^[13]。近年研究发现,24S-OHC 能够诱导线粒体功能障碍,这一特性在调控氧化还原稳态、炎症状态以及诱导细胞死亡等方面发挥着极为关键的作用^[14]。这提示胆固醇代谢重新编程与细胞衰老存在潜在交互网络,但缺氧如何通过调控胆固醇代谢轴驱动脑衰老的分子机制仍有待揭示。

本研究旨在探讨缺氧后脑内胆固醇代谢的变化以及其引起神经元衰老的机制,揭示缺氧后胆固醇代谢重编程与神经元之间的关联,为缺氧性脑损伤的生理病理机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 8~12 周龄的 C57BL/6 野生型雄性小鼠 40 只购自空军军医大学动物中心,饲养于 SPF 清洁级动物房,室内温度 22~26 °C,湿度为 50%~60%。光照周期为 12 h/12 h 明暗交替(照明时间 8:00 至 20:00),实验期间保证饲料和饮水充足。所有动物实验符合动物伦理委员会的实验动物伦理学标准(动物伦理批号:IACUC-20230049)。

1.1.2 细胞 HT22 小鼠海马神经元细胞(Boster 公司,货号: CX0146)。

1.1.3 主要试剂与仪器 β -actin、HMGR、p21 和 p16 抗体(ABclonal 公司,货号: AC038, A19063, A19094, A0262); CYP46A1 抗体(Proteintech 公司,货号: 12486-1-AP); 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-Coenzyme A desaturase 1, SCD1) 和脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号: C12H5, C20G5); SREBP1c 抗体(Novus 公司,货号: NB600-582); γ H2AX 抗体(Bioss 公司,货号: bs-3185R); 抗兔和鼠二抗(英国 Abcam 公司,货号: ab6721, ab6892); 细胞衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 染色试剂盒(北京碧云天生物技术公司,货号: C0602); 24S-羟基胆固醇酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒(无锡天萃生物科技有限公司); 细胞总胆固醇 (total cholesterol, TC) 与甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号: BC1985, BC0625); 超敏增强型化学发光液(陕西普罗安蒂科技发展有限公司,货号: 10144-2); 总 RNA 提取试剂 (total RNA extractor, Trizol) 裂解液, BODIPY 493/503 染液和 Hoechst 染液(美国 Thermo 公司,货号: 15596018CN, D3922, H3569); 放射免疫沉淀法缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)(北京碧云天生物技术公司,货号: P0013B); 荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号: IX83)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及造模 动物实验分组及造模:将小鼠随机

分为 2 组(每组 $n=20$): 常氧(Normoxia)组、缺氧(Hypoxia)组。其中 Normoxia 组小鼠置于常规氧浓度下饲养, Hypoxia 组小鼠置于低氧箱[维持 $(8.0 \pm 0.5)\%$ 氧含量的状态]中进行缺氧暴露 14 d。细胞实验分组及造模:将 HT22 细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素/链霉素双抗的杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) 中,置于 5% CO_2 , 37 °C 细胞培养箱中进行常规培养。① 正常对照 (Control) 组常规培养; ② 缺氧实验 (Hypoxia) 组置于通有混合气体 (5% CO_2 , 94% N_2 , 1% O_2) 的缺氧培养箱中培养 24 h; ③ 给药 24S-OHC 实验 (24S-OHC) 组:常规培养条件下,往培养液中加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 24S-OHC 培养 24 h。

1.2.2 脑大体湿重 取 5 对小鼠麻醉后,迅速取脑组织并用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗,吸水纸吸水后放置于天平上称重,记录各组全脑质量,之后液氮速冻,用于后续实验。

1.2.3 组织学分析 取 3 对小鼠麻醉后,仰卧位固定于解剖板,75% 乙醇消毒胸腹部,剪开皮肤并暴露心脏,左心室插入灌流针头,剪开右心耳,缓慢推注预冷 PBS,当肝脏变白后切换至 4% 多聚甲醛灌注,直至动物四肢强直,迅速取全脑后放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,脱水后石蜡包埋,切成 5 μm 切片,用于形态学观察。按照染色方案对全脑冠状面进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin, HE) 和尼氏 (Nissl) 染色,在显微镜下观察海马区以及大脑皮层。

1.2.4 血清、脑组织和细胞 24S-OHC 含量检测 血清样品处理:收集小鼠全血标本于 1.5 mL EP 管中,室温放置 1 h,然后 3 000 r/min 离心 15 min,取上清待测。脑组织样品处理:取出 6 对小鼠同侧半脑组织,经预冷 PBS (pH 7.4) 冲洗后,按照组织质量 (g):PBS 体积 (mL) 为 1:10 的比例进行冰浴匀浆,5 000 g,4 °C 离心 10 min,取上清检测。细胞样品处理:用冷的 PBS 轻轻清洗细胞,然后用胰蛋白酶消化,800 r/min 离心 3 min 后收集细胞,再次用冷的 PBS 洗涤 3 次,按照每 1×10^6 个细胞中加入 200 μL PBS 重悬并冰浴超声使细胞破碎,1 500 g,4 °C 离心 10 min,取上清检测。按照 24S-OHC 酶联免疫吸附测定试剂盒说明书对得到的待测样检测 24S-OHC 含量,酶标仪 450 nm 处测定吸光度,血清 24S-OHC 含量以 ng/mL 表示,脑组织 24S-OHC 含量以 ng/g 脑组织表示,细胞 24S-OHC 含量以各组归一化数值表示。

1.2.5 TC 含量检测 组织样品制备:取出 6 对小鼠同侧半脑组织,按组织质量 (g) 与提取液体积 (mL) 1:10 的比例加入异丙醇混合提取液,冰浴条件下匀浆处理,10 000 g,4 °C 离心 10 min,取上清置冰上待测。细胞样品制备:常规分组处理细胞,收集细胞到离心管内,离心弃上清,加 1 mL 异丙醇,冰浴超声破碎细胞,10 000 g,4 °C 离心 10 min,取上清置冰上待测。按照 TC 含量检测试剂盒说明书对得到的待测样检测胆固醇含量,酶标仪 420 nm 处测定吸光度,脑组织胆固醇含量以 mg/g 脑组织表示,细胞胆固醇含量以各组归一化数值表示。

1.2.6 TG 含量检测 取出 6 对小鼠同侧半脑组织,按照组

织质量(g),与提取液体积(mL)1:10的比例加入正庚烷-异丙醇(1:1,V/V)混合提取液,于冰浴条件下匀浆,8 000 g,4 ℃离心 10 min,取上清待测。按照 TG 含量检测试剂盒说明书检测小鼠脑组织甘油三酯含量,酶标仪 420 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值,脑组织甘油三酯含量以 mg/g 脑组织表示,细胞甘油三酯含量以各组归一化数值表示。

1.2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测脑组织和 HT22 的蛋白表达水平 将细胞接种到 6 孔板中,接种密度 3×10^5 个/孔,待细胞贴壁后缺氧处理 24 h 或加药处理 24 h,用 RIPA 裂解液(含 PMSF 及磷酸酶抑制剂)在冰上裂解细胞 30 min,离心(4 ℃,12 000 r/min,15 min)后收集上清,吸取 2 μ L 使用 BCA 法定量,剩余上清加入 1/4 体积的 5 \times Loading 缓冲液,95 ℃煮样 10 min。组织样品制备:取出 2 对小鼠,处死后迅速取同侧半脑,去除小脑和嗅球,液氮速冻,加入 RIPA 裂解液,于冰上用 Polytron 组织匀浆机进行匀浆,匀浆完成后,使用移液器混匀,并分装到 2 mL EP 管中,于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清于 1.5 mL EP 管中,并取出 20~50 μ L,用于蛋白定量,其余蛋白立即加入 1/5 体积的 5 \times Loading 缓冲液,混匀后于 95 ℃煮样 10 min。得到的细胞和组织样品依次进行电泳,转膜,封闭,4 ℃孵育一抗(β -actin, 1:10 000; HMGR, 1:1 000; CYP46A1, 1:1 000; γ H2AX, 1:1 000; p16, 1:2 000; p21, 1:2 000; SCD1, 1:1 000; FASN, 1:1 000; SREBP1c, 1:1 000)过夜,次日用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with Tween, PBST)洗涤 3 遍后加入二抗(1:10 000)室温孵育 1 h, ECL 成像系统显色拍照。采用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.2.8 免疫组织化学染色 小鼠心脏灌注固定后取全脑,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,样本脱水后石蜡包埋,65 ℃烤片,二甲苯和梯度乙醇脱蜡,PBS 洗 3 次后用柠檬酸盐缓冲液(PH=6.0)进行抗原修复,PBS 洗去缓冲液,0.2% Triton X-100 孵育 10 min 透化组织,3% 过氧化氢孵育 10 min 以清除内源性过氧化物酶,即用型山羊血清封闭 40 min,甩去封闭液,加入 CYP46A1 抗体(1:200)和 γ H2AX 抗体(1:250)于湿盒内 4 ℃孵育过夜。第 2 天取出后复温,PBS 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,37 ℃孵育 40 min,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,之后苏木素染色 2 min 后分化(1% 盐酸乙醇),自来水清洗返蓝,梯度乙醇及二甲苯中脱水后,中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。采用 Image J 软件计算积分光密度(integrated optical density, IOD)和有效目标分布区域的面积(area),计算平均光密度(mean density),计算公式:平均光密度=积分光密度值/测量区域面积。

1.2.9 RNA-seq 测序及分析 取出 3 对小鼠,处死后迅速取全脑,去除小脑和嗅球,迅速放入液氮中速冻,随后转移至 -80 ℃冰箱。总 RNA 提取、样品的纯化、量化、cDNA 文库构建、高通量测序交由诺禾致源科技股份有限公司完成,获得各组脑组织的全基因表达谱。原始测序数据经过数据质量控制和清洗后,使用生物信息学软件 HISAT2 进行比对,采用 Htseq-count 进行表达量定量。最后,利用 DESeq 软件包

(Padj<0.05 且 log2Fold Change>1)鉴定差异表达基因,差异表达基因的功能注释和富集分析通过使用基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)路径分析来完成。

1.2.10 SA- β -gal 染色检测细胞衰老状态 在 12 孔板中预先加入灭菌的盖玻片,以每孔 1×10^5 个接种细胞于 12 孔板。次日早上细胞贴壁后,分别进行常氧与缺氧处理,继续培养 24 h。吸除细胞培养液,用 PBS 洗涤 1 次,加入 500 μ L β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15 min。吸除细胞固定液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min。吸除 PBS,按照试剂盒说明书配制染色工作液,每孔加入 500 μ L 工作液,37 ℃孵育过夜,普通光学显微镜下观察。

1.2.11 BODIPY 染色 在 12 孔板中预先加入灭菌的盖玻片,以每孔 1×10^5 个细胞接种于 12 孔板。次日早上细胞贴壁后,实验组加入终浓度为 10 μ mol/L 的 24S-OHC,对照组不进行任何处理,继续培养 24 h。吸出培养液,使用复温后的 PBS 清洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min。PBS 再次清洗 3 遍后,往每孔加入 BODIPY 493/503 荧光染料至浓度为 1 μ g/mL(使用 PBS 稀释),室温避光染色 20 min。使用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,每孔加入终浓度为 1 μ g/mL 的 Hoechst 33258 染液,室温避光孵育 2 min。PBS 清洗 3 次,每次 5 min,防淬灭荧光封片剂封片后置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行分析及绘图。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均进行正态性检验和方差齐性检验,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 缺氧导致小鼠脑内胆固醇代谢稳态异常

脑组织病理学评估显示,常氧组和缺氧组两组小鼠之间脑湿重差异无统计学意义($P=0.573$)(图 1A),但 Nissl 染色结果显示,相比常氧组,缺氧组海马区局灶神经元数目减少、固缩和排列紊乱,大脑皮层部分神经元表现为体积减小,染色变深,数目减少且排列紊乱(图 1B、C),提示本研究建立的缺氧模型造成了明显结构性损伤,说明缺氧性脑损伤模型构建成功。通过 ELISA 定量检测分析发现,缺氧组血清 24S-OHC 含量明显升高($P<0.001$)(图 1D)。考虑到 24S-OHC 主要由脑产生,进一步检测了脑内 24S-OHC 的含量,发现其脑内含量也明显升高($P=0.003$)(图 1D)。24S-OHC 是胆固醇代谢产物,为此检测了全脑胆固醇和甘油三酯含量,发现相较常氧组,缺氧组胆固醇含量降低($P=0.017$),甘油三酯含量升高($P=0.011$)(图 1E)。Western blot 结果表明,较常氧组,缺氧组胆固醇合成关键酶 HMGR 表达水平明显下降($P<0.001$),而胆固醇外排关键酶 CYP46A1 表达水平明显升高($P=0.015$)(图 1F~G)。以上结果提示缺氧处理小鼠 14 d 后,小鼠脑内胆固醇含量降低,羟化代谢增强。

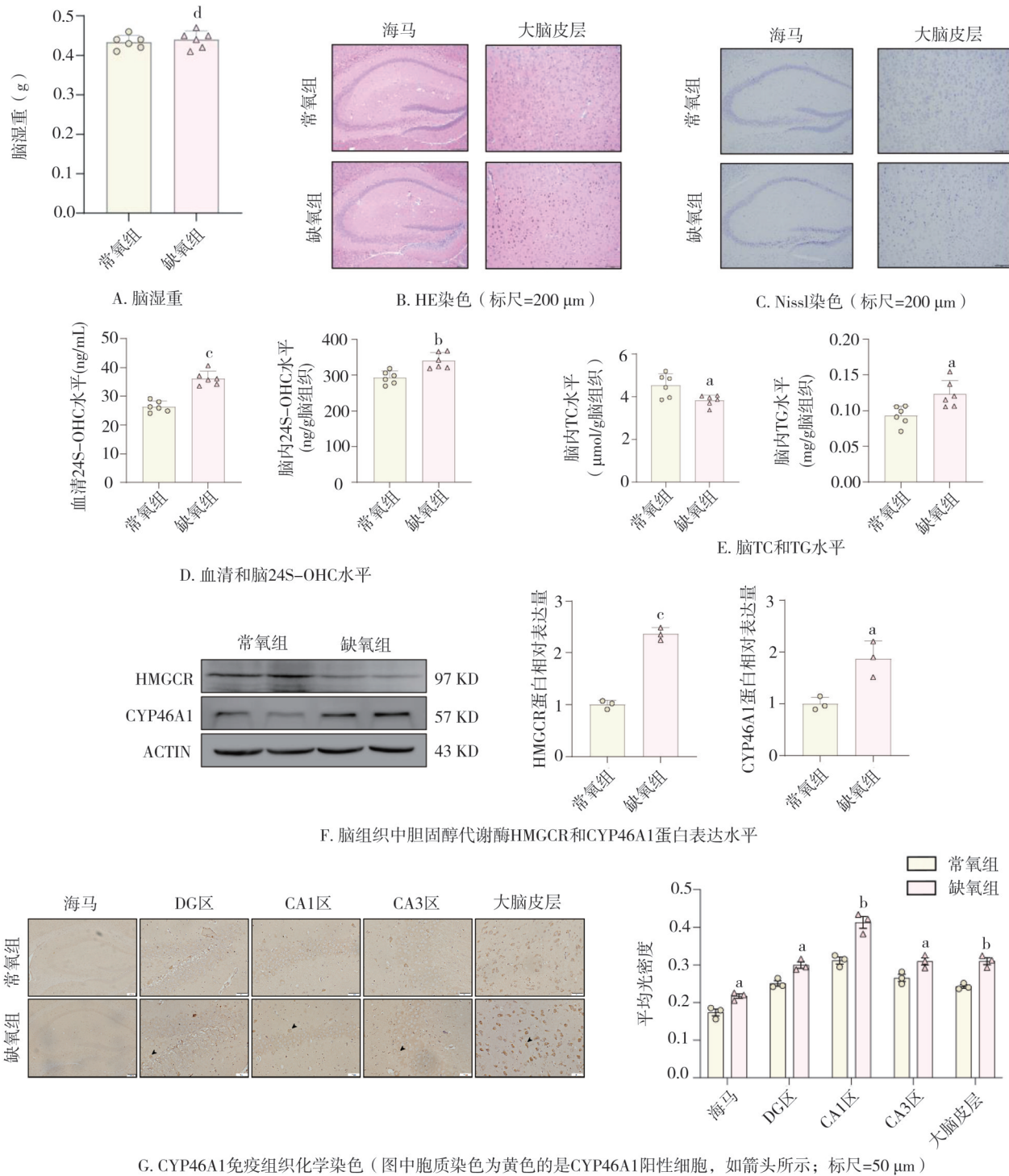
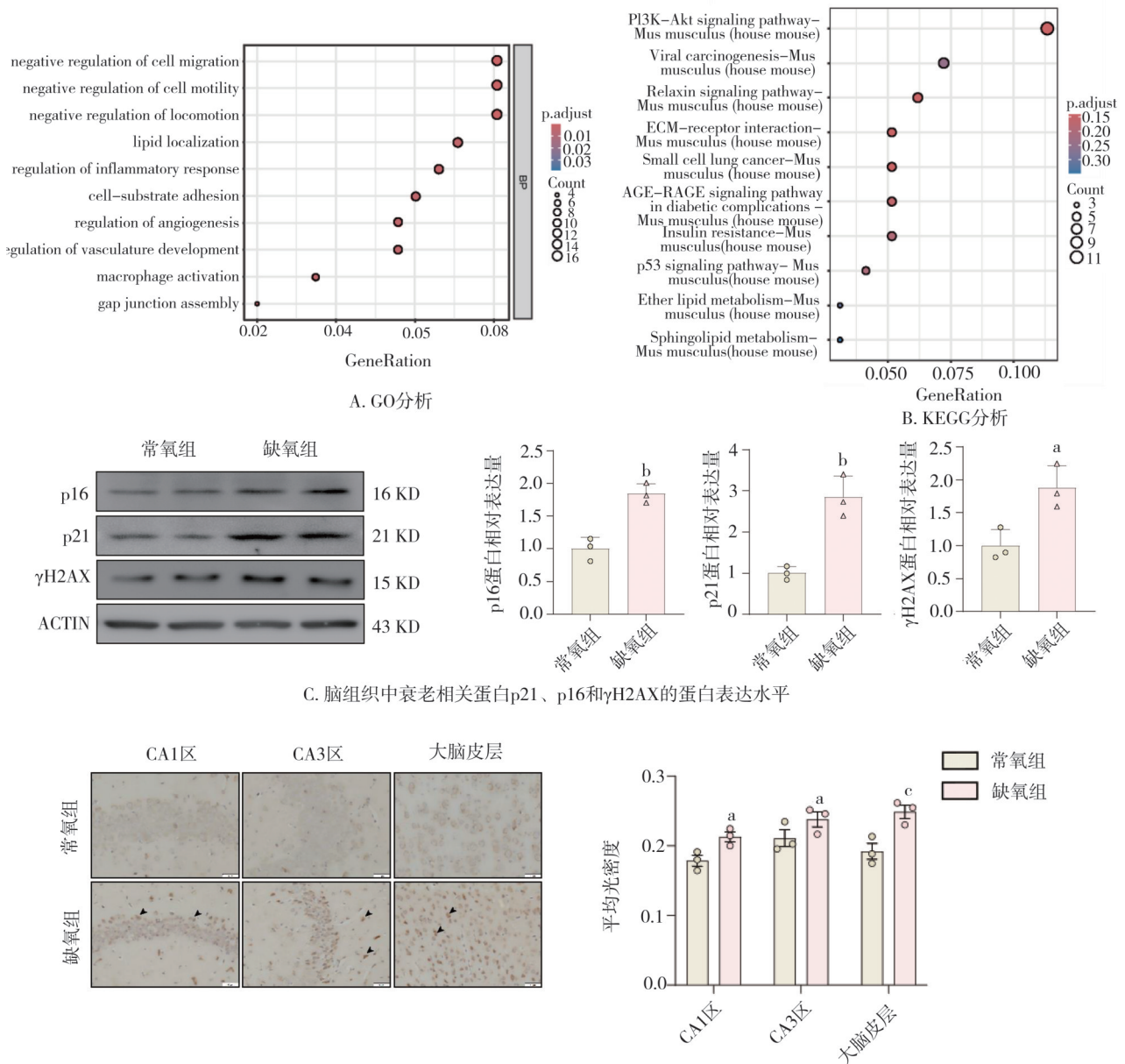


图1 缺氧导致小鼠脑内胆固醇代谢稳态异常

2.2 缺氧引起小鼠脑组织衰老加速

为系统阐释缺氧诱导脑衰老的分子调控网络,本研究采用RNAseq技术对缺氧组与常氧组小鼠大脑组织进行全转录组测序(每组n=3)。差异表达基因通路分析结果(图2A、B)显示:缺氧导致小鼠脑组织中脂质代谢异常,神经炎症激活;并且衰老相关通路PI3K-Akt和p53信号通路富集,提示缺氧

可能加速了小鼠脑组织的衰老。Western blot技术检测衰老相关蛋白的表达水平(图2C),相较常氧组,缺氧组细胞周期阻滞蛋白p16(P=0.003)和p21(P=0.004)蛋白表达升高;细胞衰老标志物γH2AX显著升高(P=0.021),免疫组化(CA1:P=0.031;CA3:P=0.099;大脑皮层:P=0.014)也证实了这一结果(图2D)。以上结果提示缺氧可以加速小鼠脑组织衰老。



C. 脑组织中衰老相关蛋白p21、p16和γH2AX的蛋白表达水平

D. γH2AX免疫组织化学染色 (图中胞质染色为黄色的为γH2AX阳性细胞, 如箭头所示; 标尺=50 μm)

注:a,与常氧组比较, $P<0.05$;b,与常氧组比较, $P<0.01$;c,与常氧组比较, $P>0.05$

图2 缺氧引起小鼠脑组织衰老加速

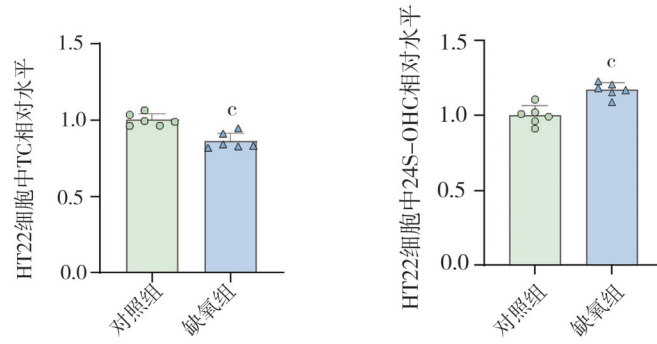
2.3 缺氧引起海马神经元细胞胆固醇代谢异常、加速衰老

为了进一步验证缺氧对神经元细胞的作用,本课题组运用小鼠海马神经元细胞系 HT22, 构建了细胞缺氧模型: 采用三气培养箱建立体外缺氧模型 (1% O₂、5% CO₂、94% N₂), 持续干预 24 h。通过试剂盒定量检测发现小鼠海马神经元细胞总胆固醇含量明显降低 ($P<0.001$), 24S-OHC 水平明显升高 ($P<0.001$) (图 3A); Western blot 结果显示, 较对照组, 缺氧组胆固醇代谢关键酶表达明显改变, 胆固醇合成限速酶 HMGCR 表达水平明显下降 ($P=0.005$), 胆固醇羟化酶 CYP46A1 表达水平明显升高 ($P<0.001$) (图 3B); β-gal 阳性细胞比例增加 ($P<0.001$) (图 3C), 细胞周期抑制蛋白 p16 ($P=$

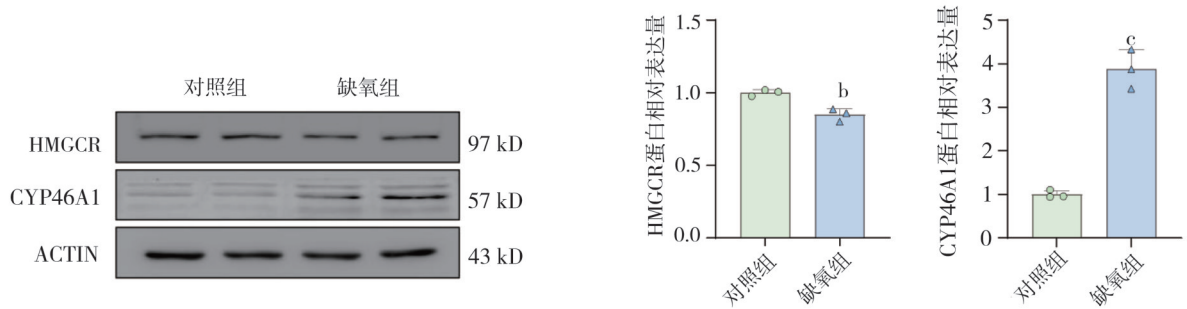
0.003) 和 p21 ($P<0.001$) 表达增加, DNA 损伤标志物 γH2AX 表达水平也明显升高 ($P=0.035$) (图 3D)。以上结果提示缺氧可以引起小鼠海马神经元胆固醇合成减少、24S-OHC 合成增加, 加速细胞衰老。

2.4 外源性 24S-OHC 通过诱导神经元脂质蓄积导致衰老

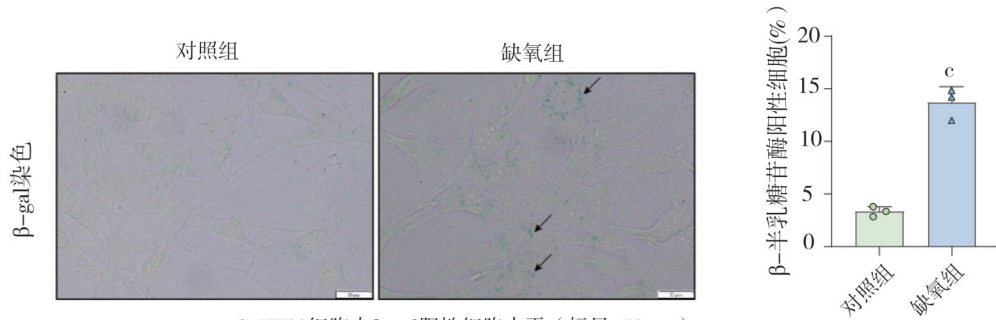
为深入探索 24S-OHC 在缺氧诱导衰老中的核心调控机制, 本研究采用外源性干预策略, 以小鼠海马神经元细胞系 HT22 为模型, 通过添加 10 μmol/L 24S-OHC 持续处理 24 h, 探究其对神经元胆固醇稳态及衰老表型的特异性影响。通过比色法定量分析检测试剂盒测量 HT22 细胞内的 TC 和 TG, 结果显示, 相对对照组, 24S-OHC 组 TC ($P=0.029$) 和 TG



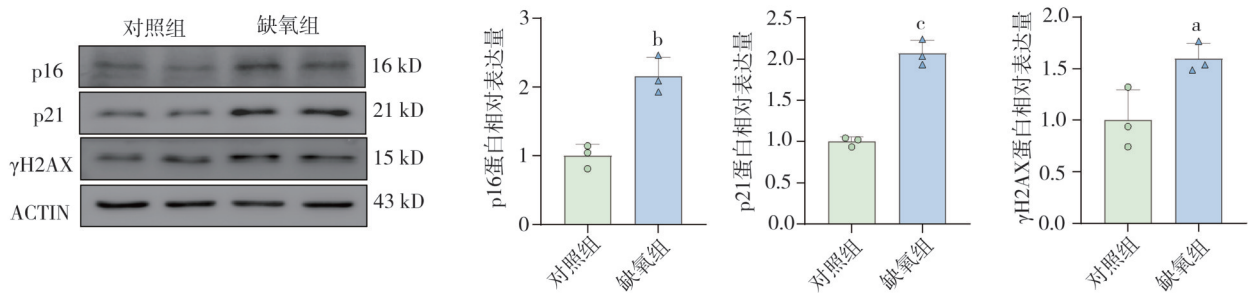
A. HT22 cells TC and 24S-OHC levels



B. HT22 cells cholesterol metabolism related protein HMGCR and CYP46A1 protein expression levels



C. HT22 cells β-gal positive cell levels (scale bar=50 μm)



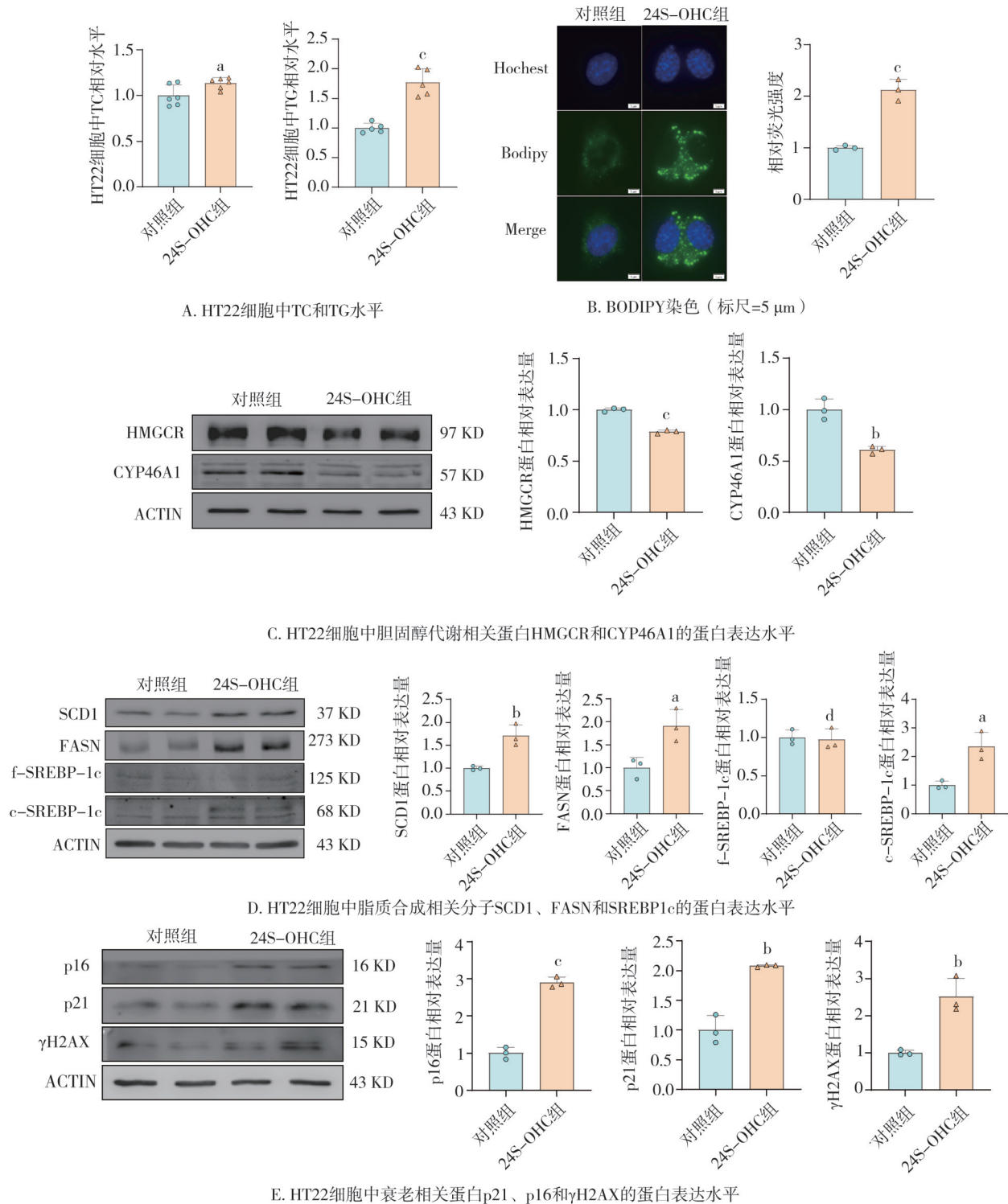
D. HT22 cells aging related protein p21, p16 and γH2AX protein expression levels

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与对照组比较, $P<0.01$;c,与对照组比较, $P<0.001$

图3 缺氧引起海马神经元细胞胆固醇代谢异常、加速衰老

($P<0.001$)含量增多(图4A);BODIPY染色结果提示细胞内脂滴明显增多($P<0.001$)(图4B);Western blot结果显示,HMGCR($P<0.001$)和CYP46A1($P=0.003$)表达水平明显下降(图4C),脂质合成关键分子SCD1($P=0.008$)、FASN($P=0.020$)和活性SREBP1c($P=0.011$)表达水平均明显升高(图

4D),衰老相关分子细胞周期抑制蛋白p16($P<0.001$)和p21($P=0.002$)表达水平明显升高,DNA损伤标志物γH2AX($P=0.006$)表达水平也明显升高(图4E)。以上结果提示缺氧通过增加24S-OHC合成,引起小鼠海马神经元脂质合成增多,促进细胞衰老。



注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与对照组比较, $P<0.01$;c,与对照组比较, $P<0.001$;d,与对照组比较, $P>0.05$

图4 外源性24S-OHC通过诱导神经元脂质蓄积导致衰老

3 讨论

大脑是机体器官中对缺氧敏感以及耗氧量较高的器官,重量仅占总质量的2%左右,但是耗氧量

占总耗氧量的23%^[2]。大脑能够敏感地感知氧含量的变化,长期慢性低氧也会对大脑结构及功能产生影响^[15]。本研究中,缺氧后小鼠全脑湿重未发生明显的改变,但在组织学水平上发现了大量神经元的

丢失,提示缺氧对脑产生的影响是一个慢性的过程,如不及时干预会对患者的神经功能和生活质量产生严重的影响。因此,了解缺氧后代谢的变化有助于认识到早期缺氧对脑产生的影响,为后续缺氧性脑损伤进一步进展的控制提供一定的理论支撑。

胆固醇是构成生物膜的重要组成部分,与膜结构和功能有关。大脑中的胆固醇含量极其丰富,大约 25% 的胆固醇位于大脑中,参与中枢神经系统的成熟,并参与信号转导、神经递质释放、突触发生和膜运输^[16]。脑胆固醇的不足会损害记忆形成,而过度积累不仅会阻碍突触可塑性,还会引发神经元凋亡。因此,维持脑胆固醇稳态对于确保适当的神经元功能和促进健康的大脑发育至关重要^[5]。本研究发现缺氧后脑内胆固醇代谢稳态发生了明显的变化,胆固醇代谢产物 24S-OHC 在血清和脑中均有升高,以及代谢酶 CYP46A1 表达的升高,提示脑内的胆固醇代谢加强;并且胆固醇和胆固醇合成酶 HMGCR 表达的减少,说明缺氧引起了脑内胆固醇的丢失。

细胞衰老可被多种细胞应激诱发,如 DNA 损伤、癌基因激活、氧化应激或外源性毒物暴露等,具有典型的细胞周期停滞、衰老相关分泌表型、大分子损伤及代谢紊乱 4 个特征^[12]。缺氧与衰老之间存在明显的关联,相关研究报道了脑缺氧会导致神经炎症^[17]、氧化应激^[18]和线粒体功能障碍^[19]。本研究表明,小鼠缺氧后产生了神经炎症,GO 富集分析提示细胞迁移和脂质代谢变化,KEGG 富集分析显示 PI3K-AKT 和 p53 通路的改变,这些结果均提示缺氧后细胞发生了衰老。为了进一步验证该观点,对衰老相关蛋白进行了检测,结果发现细胞周期调控蛋白 p16 和 p21 与 DNA 损伤修复相关蛋白 γ H2AX 明显升高,与前期结果一致。胆固醇代谢与衰老之间存在关联,相关研究报道了胆固醇能够通过调节衰老相关炎症在衰老过程中发挥作用,提出衰老细胞在溶酶体中积累胆固醇以维持衰老相关分泌表型^[20]。而在本研究中发现缺氧能够引起胆固醇代谢产物 24S-OHC 的异常升高,是否与衰老相关尚不清楚,值得进一步的探究。

神经元是大脑中一种非常重要的神经细胞,与胆固醇代谢密切相关。神经元是胆固醇代谢酶 CYP46A1 的主要表达细胞,通过将胆固醇代谢为

24S-OHC 消除脑内蓄积的胆固醇,是维持脑内胆固醇稳态的重要神经细胞^[21]。前面研究发现小鼠缺氧处理诱导胆固醇代谢产物 24S-OHC 在脑内异常升高,为此对海马神经元细胞进行缺氧处理,发现细胞内的胆固醇丢失及 24S-OHC 的升高,并伴有胆固醇合成酶的降低和代谢酶的升高,提示缺氧引起了神经元胆固醇代谢的紊乱。进一步探究了缺氧与神经衰老之间的关系,发现细胞周期调控蛋白 p16 和 p21 与 DNA 损伤修复相关蛋白 γ H2AX 升高,提示缺氧引起了神经元的衰老, β -半乳糖苷酶的细胞染色结果也证实了这一点。结合以上结果,缺氧引起了神经元中 24S-OHC 的异常升高与衰老,但 24S-OHC 与细胞衰老之间是否有联系尚不清楚。

24S-OHC 主要由脑产生,部分研究认为可以将其作为脑损伤的一种标志物^[22]。胆固醇的稳态与神经系统高级功能学习记忆密切相关,更多相关研究认为 24S-OHC 与阿尔茨海默病有关,但存在一定的争议^[10]。另外有研究发现 24S-OHC 通过坏死性凋亡(一种程序性坏死)诱导神经元细胞死亡^[23]。本研究用 24S-OHC 处理神经元后,发现引起了胆固醇代谢的紊乱,可能与其对神经元的负反馈调节有关。羟固醇对代谢调节至关重要,具有治疗潜力,有文献报道了肝脏中白细胞介素 22 受体亚基 $\alpha 1$ (interleukin 22 receptor subunit alpha 1, IL22RA1) 的缺失能通过调节羟固醇代谢从而促进肝脏脂肪变性^[24],说明 24S-OHC 可能与脂质代谢有关联。通过检测脂质合成关键酶的表达,发现 SREBP1c/SCD1 介导的脂质合成通路上调,并且发现 24S-OHC 能够引起神经元细胞的脂滴蓄积,造成了严重的脂毒性应激,会对细胞造成严重的损害,24S-OHC 组衰老相关标志蛋白 p16、p21 和 γ H2AX 的升高验证了这一点。这些结果证实了 24S-OHC 的异常增多,会通过激活 SREBP1c/SCD1 通路,引起神经元脂质异常增多,从而造成神经元的衰老。

综上所述,慢性缺氧通过下调 HMGCR 和上调 CYP46A1,造成 24S-OHC 异常蓄积,触发 SREBP1c/SCD1 介导的脂毒性以及衰老标志物 p16、p21 和 γ H2AX 的升高,引起神经元的衰老,揭示了缺氧引起神经元衰老的一种新机制,靶向胆固醇代谢-衰老交互网络可为缺氧相关神经退行性疾病提供精准治疗策略。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 戴求龙:实验设计、实验操作以及初稿撰写;王钰莹:文章框架设计、稿件润色;王娟娟:数据采集与分析,协助文章修改;李立宏:课题构思、经费支持、论文最终审定

参 考 文 献

- [1] Li XR, Zhu BY, Dong N, et al. Early detection of high-altitude hypoxic brain injury by *in vivo* electrochemistry[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2025, 64(4): e202416395.
- [2] Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(6): 724–738.
- [3] Bouthelier A, Aragonés J. Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2020, 1867(9): 118733.
- [4] Li KX, Zheng Y, Wang XM. The potential relationship between HIF-1 α and amino acid metabolism after hypoxic ischemia and dual effects on neurons[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 676553.
- [5] Gao Y, Ye SY, Tang YH, et al. Brain cholesterol homeostasis and its association with neurodegenerative diseases[J]. *Neurochem Int*, 2023, 171: 105635.
- [6] Pingale TD, Gupta GL. Novel therapeutic approaches for Parkinson's disease by targeting brain cholesterol homeostasis[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(7): 862–873.
- [7] Noguchi N, Saito Y, Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(3): 692–696.
- [8] Shafaati M, Olin M, Bävner A, et al. Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes *in vivo*: LXR regulation in the CYP46A1 transgenic mouse[J]. *J Intern Med*, 2011, 270(4): 377–387.
- [9] Wang T, Cui SS, Hao L, et al. Regulation of Th17/treg balance by 27-hydroxycholesterol and 24S-hydroxycholesterol correlates with learning and memory ability in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4370.
- [10] Gamba P, Giannelli S, Staurengi E, et al. The controversial role of 24-S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 740.
- [11] Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, et al. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime: 24-Hydroxycholesterol potentiates amyloid- β neurotoxicity[J]. *Aging Cell*, 2011, 10(3): 403–417.
- [12] Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular senescence: defining a path forward[J]. *Cell*, 2019, 179(4): 813–827.
- [13] Liu YQ, Liu Q, Zhang Z, et al. The regulatory role of PI3K in ageing-related diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 88: 101963.
- [14] Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, et al. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 18: 148–162.
- [15] Terraneo L, Samaja M. Comparative response of brain to chronic hypoxia and hyperoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1914.
- [16] Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases[J]. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164(6): 515–524.
- [17] Huang ZH, Luo ZW, Ovcjak A, et al. AD-16 protects against hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting neuroinflammation[J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(8): 857–870.
- [18] Odorcyk FK, Ribeiro RT, Roginski AC, et al. Differential age-dependent mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis induced by neonatal hypoxia-ischemia in the immature rat brain[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(5): 2297–2308.
- [19] Huan Y, Quan HL, Jia B, et al. High-altitude cerebral hypoxia promotes mitochondrial dysfunction and apoptosis of mouse neurons[J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1216947.
- [20] Roh K, Noh J, Kim Y, et al. Lysosomal control of senescence and inflammation through cholesterol partitioning[J]. *Nat Metab*, 2023, 5(3): 398–413.
- [21] Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(4): 254–264.
- [22] Lu FX, Fan SJ, Romo AR, et al. Serum 24S-hydroxycholesterol predicts long-term brain structural and functional outcomes after hypoxia-ischemia in neonatal mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(2): 312–323.
- [23] Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, et al. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 24666–24673.
- [24] Huang YP, Yu F, Ding Y, et al. Hepatic IL22RA1 deficiency promotes hepatic steatosis by modulating oxysterol in the liver[J]. *Hepatology*, 2025, 81(5): 1564–1582.

(收稿:2025-09-20;修回:2025-11-01;录用:2025-12-01)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

戴求龙,王钰莹,王娟娟,等. 缺氧条件下24-羟基胆固醇蓄积促进神经元衰老的机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(2): 206–215.