

硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞损伤的神经保护作用

郭林鑫¹, 赵凡睿², 李晏如¹, 刘春雷¹, 吴丹¹, 方丽¹, 闵伟红^{2*}

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 浙江农林大学 食品与健康学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 该研究以高糖诱导 HT-22 细胞为脑内胰岛素神经元损伤模型, 探讨硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞损伤的神经保护作用。结果表明, 硫胺素显著增加细胞内的葡萄糖消耗, 表现为葡萄糖摄取荧光探针 2-(N-(7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖 | 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose, 2-NBDG) 荧光强度和葡萄糖摄取浓度的增加, 显著增加高糖诱导下 HT-22 细胞内胰岛素分泌水平。蛋白免疫印迹试验表明硫胺素显著增加突触相关蛋白表达, 调节细胞内 β -Catenin/GSK-3 β 蛋白表达。综上, 硫胺素可能通过 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路, 调节细胞内葡萄糖消耗和摄取, 进而增加突触相关蛋白表达, 从而改善高糖诱导的神经元损伤。

关键词: 硫胺素; 高糖损伤; 2 型糖尿病; HT-22 细胞; 神经保护

Neuroprotective Effect of Thiamine on High Glucose-Induced HT-22 Cells

GUO Linxin¹, ZHAO Fanrui², LI Yanru¹, LIU Chunlei¹, WU Dan¹, FANG Li¹, MIN Weihong^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China;
2. College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In this work, high glucose-induced HT-22 cells were employed as a model of insulin neuron damage in the brain to evaluate thiamine's neuroprotective impact on HT-22 cell damage generated by high glucose. The results showed that thiamine significantly increased intracellular glucose consumption, as evidenced by an increase in fluorescence intensity and glucose uptake concentration of the glucose uptake fluorescent probe 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG), as well as a significant increase in insulin secretion in HT-22 cells induced by high glucose. Western blot tests showed that thiamine dramatically boosted synapse-related protein expression and regulated β -Catenin/GSK-3 β protein expression in cells. The above experimental results showed that thiamine may control intracellular glucose consumption and uptake through the β -Catenin/GSK-3 β signaling pathway, thus boosting the expression of synapse-related proteins and reducing high glucose-induced neuron damage.

Key words: thiamine; high glucose-induced damage; type 2 diabetes mellitus; HT-22 cell; neuroprotection

引文格式:

郭林鑫, 赵凡睿, 李晏如, 等. 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞损伤的神经保护作用[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(6): 16-24.

GUO Linxin, ZHAO Fanrui, LI Yanru, et al. Neuroprotective Effect of Thiamine on High Glucose-Induced HT-22 Cells[J]. Food Research and Development, 2025, 46(6): 16-24.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20210203125SF)

作者简介: 郭林鑫(1998—), 男(汉), 硕士研究生, 研究方向: 粮油生物转化。

*通信作者: 闵伟红(1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 发酵工程、粮油科学与深加工技术。

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)中最普遍的一种,临床占比超过80%,它的主要特征是高血糖、相对胰岛素缺乏和胰岛素抵抗,这些因素都会扰乱机体糖代谢,进而影响记忆功能^[1]。以初期学习记忆损伤为特征的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)与T2DM之间密切相关,也称为3型糖尿病(type 3 diabetes mellitus, T3DM)^[2]。研究发现,T2DM患者脑中伴随AD相关症状的发生^[3]。脑部影像学成像结果表明,AD与T2DM患者体内葡萄糖能量代谢均明显下降^[4],且研究进一步表明,脑内胰岛素在T2DM海马区的AD样病变发挥重要作用^[5]。T2DM患者大脑胰岛素水平下降,破坏大脑葡萄糖能量代谢平衡,引起认知障碍^[6]。大脑多个区域,如下丘脑、海马体、皮层等均有胰岛素受体分布,并具有源性胰岛素^[7]。使用外周药物治疗与AD相关的病变,会导致脑液中胰岛素水平升高^[8]。所以,提高脑内胰岛素水平是改善或缓解学习记忆障碍的重要手段之一。

硫胺素(thiamine)是一类常见的小分子活性物质,无法通过机体自身合成,必须通过饮食摄取^[9]。临床研究表明,AD患者脑内普遍存在硫胺素缺乏和代谢异常的现象^[10],这种缺乏会影响脑内能量代谢,损伤脑内神经元,进而引发AD的相关病变^[11]。硫胺素可以通过调整能量代谢相关酶的活性来发挥作用,有效降低血脂,从而减轻T2DM相关症状^[12]。同时,它参与神经递质合成,对神经冲动传导和神经元的生长发育起着至关重要的作用^[13]。在T2DM和AD患者血液和大脑中,硫胺素的稳态常常发生改变^[14],这会导致血糖紊乱,影响大脑对葡萄糖的利用;而硫胺素不足会导致脑内能量代谢下降。开发由T2DM引起的AD相关性病变的治疗手段与方法是当前亟需解决的科学问题。通过改善神经元细胞在高糖环境下脑内葡萄糖能量代谢,对预防AD症状发生具有重要意义。本研究采用高糖诱导HT-22小鼠海马神经元细胞损伤,探讨硫胺素对高糖诱导的HT-22细胞损伤的神经保护作用,以期硫胺素在T2DM所导致的神经相关性病变的研究中提供科学理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

HT-22小鼠海马神经元细胞:上海中乔新舟生物科技有限公司;α-淀粉酶(2000 U/mg)、α-葡萄糖苷酶(100 U/mg)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、甲基噻唑蓝[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、阿卡波糖、硫胺素(纯度>99%)、对硝基苯基葡萄糖苷(p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, PNPG)、D-(+)-葡萄糖(纯度>99.5%):美国Sigma-Aldrich公司;胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylene

diamine tetraacetic acid, EDTA)(0.25%):美国HyClone公司;双喹啉酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、苯甲磺酰氟(α-toluenesulfonyl fluoride, PMSF)、含放射免疫沉淀试验缓冲液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)的裂解液:上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、双抗:美国Thermo Fisher Scientific公司;DMEM高糖培养基:美国Gibco公司;葡萄糖试剂盒、胰岛素测试盒:南京建成生物工程研究所;葡萄糖摄取荧光探针2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖{2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose, 2-NBDG}:武汉安捷凯生物医药科技有限公司;磷酸盐缓冲液含吐温20(phosphate buffered saline with tween 20, PBST):上海源叶生物科技有限公司;突触素(synaptophysin, SYP)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、β-Catenin、GSK-3β:美国Cell Signal Technology公司;聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF):美国BIO-RAD Laboratories公司;抗Insulin和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP):爱博泰克生物科技有限公司;β-actin、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、FITC标记山羊抗兔IgG(H+L):武汉赛维尔生物科技有限公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液:大连美仑生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

CB150型细胞培养箱:德国Binder公司;DH100-4干式恒温器:杭州瑞诚仪器有限公司;SHP-250生化培养箱:上海精宏实验设备有限公司;Fluoroskan Ascent FL型酶标仪:美国Thermo Fisher Scientific公司;Image Quant LAS 500凝胶成像系统:美国GE Healthcare公司;MRc5荧光倒置显微镜:德国Carl Zeiss公司;UV-1700紫外可见分光光度计:日本SHIMADZU公司。

1.3 方法

1.3.1 α-葡萄糖苷酶抑制率和α-淀粉酶抑制率的测定

1.3.1.1 α-葡萄糖苷酶抑制率

参考文献[15]的方法,在含有50 μL PBS中加入20 μL浓度分别为0.1、0.4、0.8、1.2、1.5 mg/mL的硫胺素样品溶液(在含有10% DMSO的PBS中溶解),然后加入5 μL α-葡萄糖苷酶溶液(10 U/mL)。随后加入10 μL PNPG用于反应,混匀在37 °C条件下静置20 min。随后用150 μL的1 mol/L Na₂CO₃溶液以停止反应,酶标仪测定405 nm处的吸光度。阿卡波糖为阳性对照^[16]。α-葡萄糖苷酶抑制率(X,%)计算公式如下。

$$X = \frac{A_1 - B_1}{A_1} \times 100$$

式中:A₁为空白组(PBS)吸光度;B₁为处理组(硫

胺素/阿卡波糖)吸光度。

1.3.1.2 α -淀粉酶抑制率

参考文献[17]的方法,将 10 μ L α -淀粉酶溶液(10 U/mL)和 20 μ L 硫酸胺溶液(浓度分别为 0.1、0.4、0.8、1.2、1.5 mg/mL)混匀后,放置在 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱。随后加入 500 μ L 质量分数为 1% 的淀粉溶液反应 5 min,结束后加入 600 μ L 的 DNS 停止反应,然后放置在 100 $^{\circ}$ C 干式恒温器中 10 min,冷却后用紫外可见分光光度计在 540 nm 处测定吸光度。 α -淀粉酶抑制率(Y,%)计算公式如下。

$$Y = \frac{A_2 - B_2}{A_2} \times 100$$

式中: A_2 为空白组(PBS)吸光度; B_2 为处理组(硫酸胺/阿卡波糖)吸光度。

1.3.2 HT-22 细胞培养

细胞培养条件:HT-22 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱中,以含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素的 DMEM 培养基进行培养,在细胞融合达到约 86% 时,进行传代。

高糖培养基的制备:1.8 g D-葡萄糖添加在 10 mL 含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素的 DMEM 培养基中,0.22 μ m 滤膜过滤,制备 1 000 mmol/L 高糖母液。随后根据试验要求,将高糖溶液稀释成不同浓度。

1.3.3 MTT 试验

1.3.3.1 不同浓度硫酸胺对 HT-22 细胞活性影响

采集对数生长期细胞,在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液(每孔约 6×10^4 个细胞),在细胞培养箱中培养 24 h。弃除上清液,加入 100 μ L 含有不同浓度硫酸胺(25、50、100、300、600、800、1 000、1 200、1 600、2 000 μ mol/L)培养基孵育 24 h。去除上清液,加入 100 μ L 含有 5 mg/mL 的 MTT 培养液,继续培养细胞 4 h。吸出上清液,并添加 100 μ L DMSO,使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度^[18]。细胞活力(Z,%)按照下列公式计算。

$$Z = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

式中: A_{sample} 为处理组(高糖/硫酸胺、MTT、DMSO、细胞)吸光度; A_{control} 为空白对照组(MTT、DMSO、细胞)吸光度; A_{blank} 为对照组(MTT、DMSO)吸光度。

1.3.3.2 不同浓度高糖对 HT-22 细胞活性影响

同 1.3.3.1 中 96 孔板细胞培养方法,收集相同浓度细胞培养孵育后,培养基中葡萄糖浓度为 50、75、100、125、150、175、200 mmol/L 孵育 24 h。采用 MTT 试验测定细胞活力。

1.3.3.3 硫酸胺对高糖损伤 HT-22 细胞的保护

同 1.3.2 细胞培养方法,收集相同浓度细胞培养孵

育后,由 HT-22 细胞在合适的高糖浓度下培养作为模型组,然后去除上清液,加入 100 μ L 培养基,在不同硫酸胺浓度(600、800、1 000 μ mol/L)下于高糖环境孵育 24 h。空白组为正常培养,模型组为 1.3.3.2 筛选出的高糖损伤模型,采用 MTT 试验测定细胞活力。

1.3.4 葡萄糖消耗与摄取以及胰岛素分泌测定

1.3.4.1 葡萄糖消耗测定和胰岛素分泌测定

HT-22 细胞接种于细胞培养皿中,高糖损伤后,加入硫酸胺孵育,收集细胞培养液,以 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液,随后根据葡萄糖试剂盒和胰岛素试剂盒说明书进行操作。

1.3.4.2 2-NBDG 摄取检测

2-NBDG 是一种荧光标记的 2-脱氧葡萄糖的类似物。细胞在 12 孔板中由硫酸胺处理结束后,加入终浓度 100 μ mol/L 的 2-NBDG,在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 h,洗净后在荧光倒置显微镜下观察。

1.3.5 免疫荧光

将 HT-22 细胞在 6 孔板培养后用 PBS 清洗,用固定液进行细胞固定 20 min。使用 0.3% 的 PBST 渗透处理 10 min。PBST 清洗后用 5% 山羊血清在 24 $^{\circ}$ C 下封闭细胞 30 min,用抗 Insulin(1:100,体积比)孵育 15 h, PBST 清洗 3 次后, FITC 二抗避光孵育 1 h, DAPI 染色 5 min,用荧光倒置显微镜观察并分析。

1.3.6 蛋白免疫印迹

用预冷的 PBS 清洗细胞,并在冰上用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液进行裂解。在 4 $^{\circ}$ C 下进行 30 min 振荡后,将细胞以 10 000 \times g 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min。收集上清液,并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞中蛋白浓度。上样,电泳,转膜 1 h,清洗后在摇床封闭 2 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。洗膜后二抗孵育 1 h,洗膜,在 Image Quant LAS 500 凝胶成像系统中进行曝光并拍照,利用 ImageJ 软件分析。

1.4 数据处理与统计分析

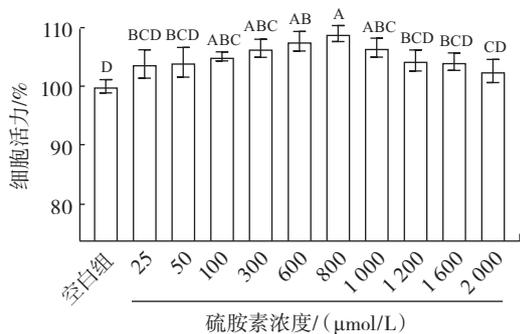
使用 GraphPad Prism 9.4 工具绘制数据图形,试验均进行 3 次,所有数值以平均值 \pm 标准差表示,使用 One-way ANOVA 分析评估显著性,不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$),不同大写字母表示各组间存在极显著性差异($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 HT-22 细胞活性研究

2.1.1 不同浓度硫酸胺对细胞活性的影响

硫酸胺作为一种在人体代谢中发挥至关重要作用的功能性小分子,在适当剂量下对细胞几乎无任何毒害作用^[19]。不同浓度硫酸胺对 HT-22 细胞活力的影响见图 1。



不同大写字母表示各组间存在极显著性差异($P<0.01$)。

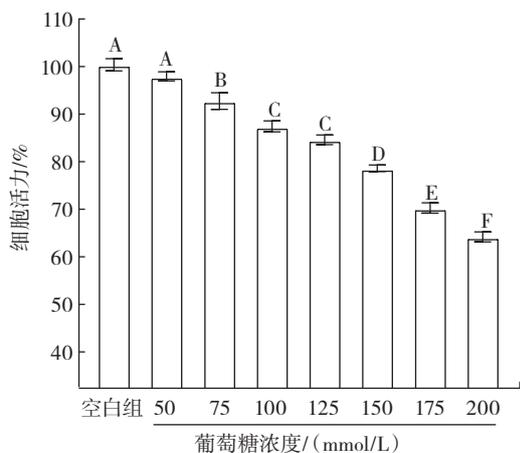
图1 不同浓度硫胺素对 HT-22 细胞活力的影响

Fig.1 Effect of various thiamine concentrations on viability of HT-22 cells

图1结果显示,与空白组相比,硫胺素在浓度为25~2 000 $\mu\text{mol/L}$ 下细胞活性增加;尤其在100、300、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下,细胞活性极显著增加($P<0.01$)。这一现象可能归因于硫胺素作为一种重要的辅酶,在体内参与了诸如转酮醛酸酶(ketol-acid reductoisomerase, KARI)反应等多种能量代谢酶促反应过程,进而推动了葡萄糖的代谢和能量的产生^[20]。因此,在一定浓度范围内,硫胺素能够有效提升神经元细胞的代谢活性,这在MTT试验中通过较高的吸光度得到了体现。因此,后续采用600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的硫胺素对高糖损伤的HT-22细胞进行神经保护作用研究。

2.1.2 不同浓度高糖对 HT-22 细胞活性的影响

T2DM患者大脑中持续的高血糖环境会引发细胞功能的紊乱,进而加速细胞凋亡过程,对神经细胞造成不可逆的损害,最终导致记忆功能障碍的发生^[21]。不同高糖环境下对HT-22细胞活力的影响见图2。



不同大写字母表示各组间存在极显著性差异($P<0.01$)。

图2 高糖环境下对 HT-22 细胞活力的影响

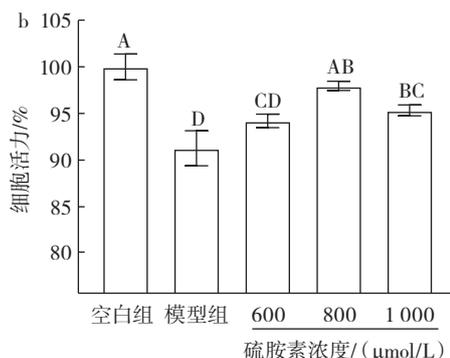
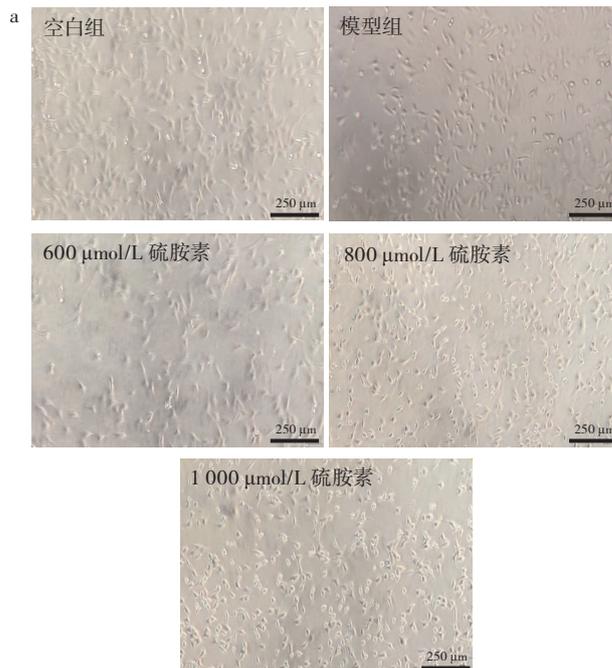
Fig.2 Effect of environment with elevated glucose levels on viability of HT-22 cells

由图2可知,随着葡萄糖浓度升高,HT-22细胞活

性逐渐降低,且与葡萄糖浓度之间存在着明显的依赖关系。与空白组相比,当葡萄糖浓度大于75 mmol/L时,细胞活力均极显著降低($P<0.01$)。为使细胞活力下降且不导致细胞大量死亡,因此选择葡萄糖浓度为75 mmol/L诱导HT-22细胞作为神经损伤模型。

2.1.3 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞活性的影响

硫胺素在适当浓度下能够改善HT-22细胞活力。不同浓度硫胺素对HT-22细胞在高糖环境损伤的保护作用见图3。



a. 细胞形态;b. 硫胺素对细胞的保护作用。不同大写字母表示各组间存在极显著性差异($P<0.01$)。

图3 硫胺素对 HT-22 细胞高糖损伤模型的保护作用

Fig.3 Protective effect of thiamine on high glucose-induced damage model of HT-22 cells

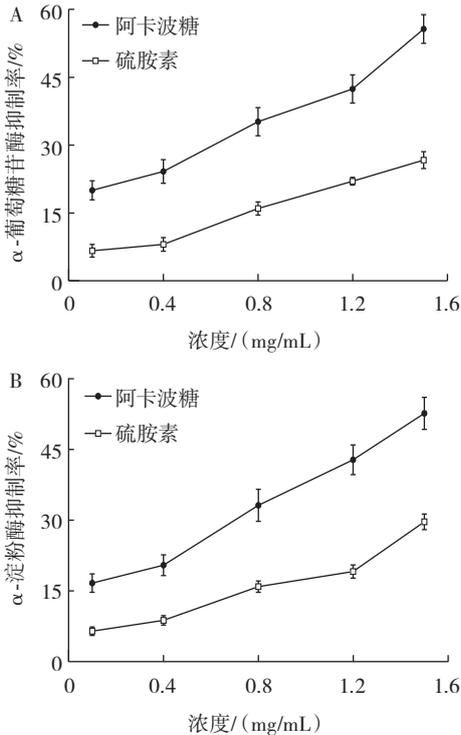
由图3a可知,HT-22细胞经75 mmol/L葡萄糖处理24 h后,模型组细胞出现了明显的损伤形态。这些细胞边缘变得模糊不清,胞体呈圆形,突触结构也发生了坍塌;然而用硫胺素(600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理后,HT-22细胞中的黏附性能与模型组细胞相比都具有较长的梭状形状,细胞边缘光滑,突触明显。由图3b可

知,与模型组相比,浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 硫胺素处理后细胞活性极显著增加;其中,800 $\mu\text{mol/L}$ 的硫胺素处理组细胞活性提高更为明显。以上试验结果表明,硫胺素对神经元细胞在高糖环境下具有增强细胞活性的作用。因此,选择 800 $\mu\text{mol/L}$ 硫胺素为模型损伤保护浓度。

2.2 硫胺素降血糖活性研究

2.2.1 硫胺素对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率的影响

体外 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率是衡量降糖效果的重要指标^[22]。 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制剂类似物可以大幅度降低这两种酶的活性^[23],这类药物常被 DM 患者用作口服的降糖药,然而,长期服用可能产生耐药性^[24]。硫胺素作为一种关键的辅酶,参与转酮醛酸酶反应,对糖代谢中的关键酶(α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶)具有抑制作用。这两种酶在糖代谢中发挥着不可或缺的作用: α -淀粉酶可以将淀粉分解为葡萄糖单元,而 α -葡萄糖苷酶则能将多种 α -糖基连接的底物水解成单糖。在这一系列反应中,转酮醛酸酶具有重要作用。硫胺素通过参与转酮醛酸酶反应,干扰了这些酶系统的正常功能,进而抑制了 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性^[25]。硫胺素对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用见图 4。



A. α -葡萄糖苷酶抑制率; B. α -淀粉酶抑制率。不同小写字母表示各组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 4 硫胺素对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

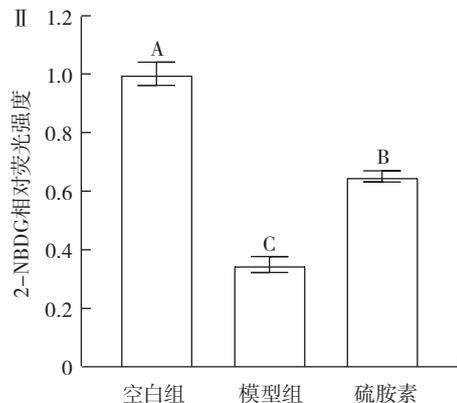
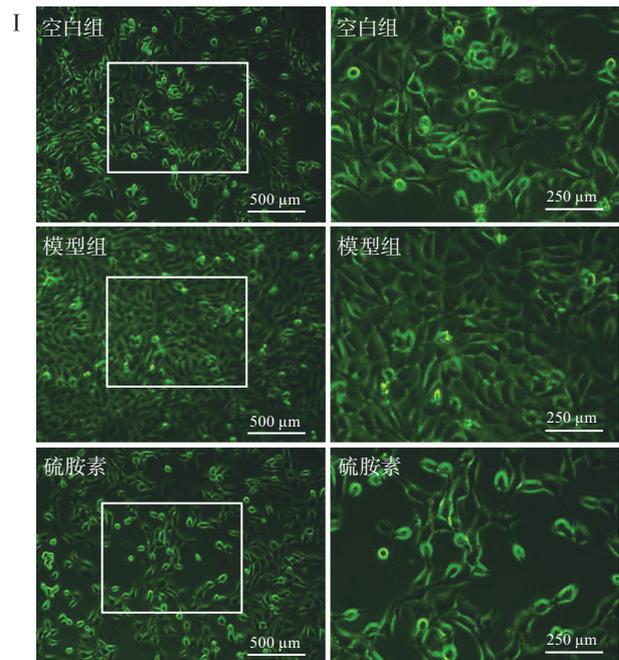
Fig.4 Inhibitory effects of thiamine on α -amylase and α -glucosidase

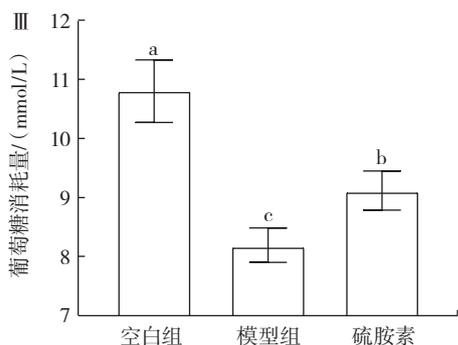
由图 4 可知,硫胺素浓度为 0.1~1.5 mg/mL 时,对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制效果呈现出明显的剂量依赖性;当硫胺素浓度为 1.5 mg/mL 时,对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率分别为 26.73% 和 29.68%。

2.2.2 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内葡萄糖消耗与摄取的影响

2-NBDG 作为一种荧光葡萄糖类似物,与 D-葡萄糖具有相同的转运体和类似代谢方式^[26]。因此,它常被用作荧光示踪剂,以监测哺乳动物细胞通过葡萄糖转运蛋白摄取 D-葡萄糖中的过程以及后续的葡萄糖代谢。硫胺素对 HT-22 细胞在高糖环境下对葡萄糖消耗和摄取的影响见图 5。

由图 5 可知,与空白组相比,模型组高糖诱导 HT-22 细胞内 2-NBDG 的荧光强度极显著下降,然而,在硫胺素处理后,与模型组相比,2-NBDG 的荧光强度极显著增加 ($P < 0.01$),表明硫胺素可以显著改善高血糖环境下的葡萄糖摄取与转运。与模型组相比,硫胺素





I. 2-NBDG 荧光; II. 2-NBDG 荧光强度定量; III. 葡萄糖消耗。不同大写字母表示各组间存在极显著性差异($P<0.01$),不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

图5 硫胺素对葡萄糖消耗和摄取的影响

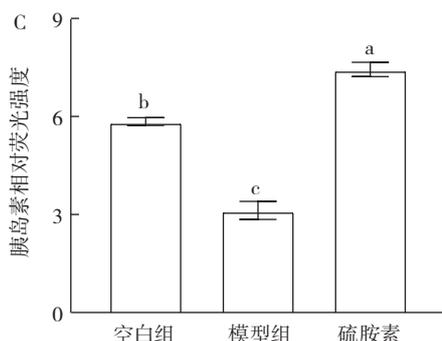
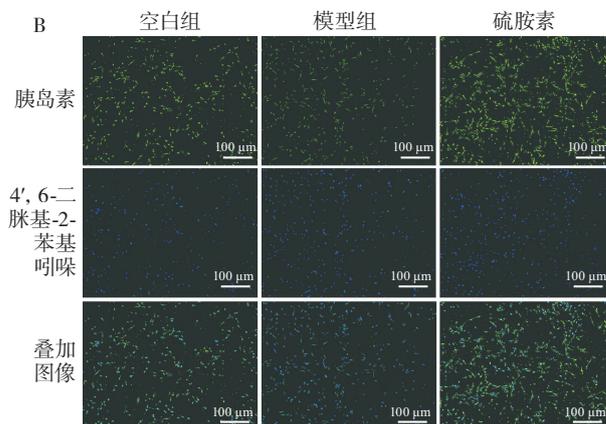
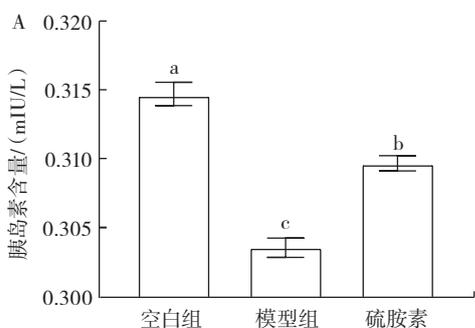
Fig.5 Effect of thiamine on glucose consumption and uptake

显著增加了高糖诱导 HT-22 细胞内的葡萄糖消耗($P<0.05$)。在 T2DM 的高糖环境下,细胞对葡萄糖的消耗能力受到影响,导致血糖浓度上升^[27],并且高糖环境还会影响细胞对葡萄糖的摄取,促使 T2DM 进一步恶化^[28]。因此,葡萄糖消耗和摄取能力强弱,也是反映降血糖能力高低的指标之一^[29-30]。以上研究结果表明,硫胺素可以显著改善高糖诱导 HT-22 细胞内葡萄糖消耗和摄取,具有良好的降血糖能力。

2.2.3 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内胰岛素含量的影响

高糖环境通过多种途径影响 HT-22 细胞的胰岛素分泌相关功能,硫胺素对 HT-22 细胞在高糖环境下的胰岛素分泌影响见图 6。

由图 6 可知,与空白组相比,模型组高糖诱导的 HT-22 细胞中,胰岛素含量显著降低;然而硫胺素处理后,与模型组相比细胞内胰岛素含量显著增加($P<0.05$)。硫胺素能够显著增加高糖诱导 HT-22 细胞内胰岛素的相对荧光强度($P<0.05$)。在高糖环境下,神经元细胞受到损伤,从而降低其葡萄糖的消耗和摄取能力,进一步导致胰岛素含量的下降,最终可能引发脑内葡萄糖能量代谢的失衡。结果表明,在高糖环境中,HT-22 细胞内胰岛素合成以及分泌能力减弱,而硫胺素显著促进高糖损伤 HT-22 细胞分泌胰岛素的



A. 培养基上清液中胰岛素含量;B. 胰岛素免疫荧光染色;C. 荧光强度定量。不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P<0.05$)。

图6 硫胺素对胰岛素分泌的影响

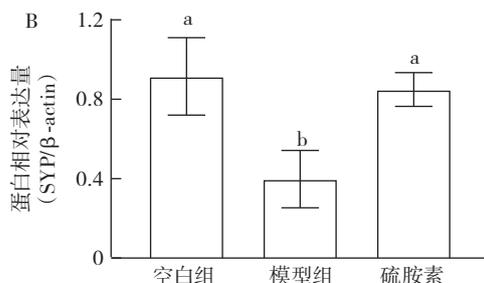
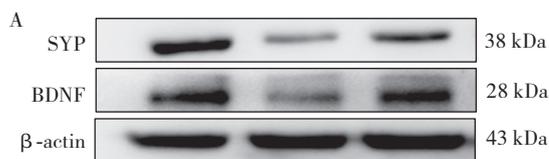
Fig.6 Effect of thiamine on insulin secretion

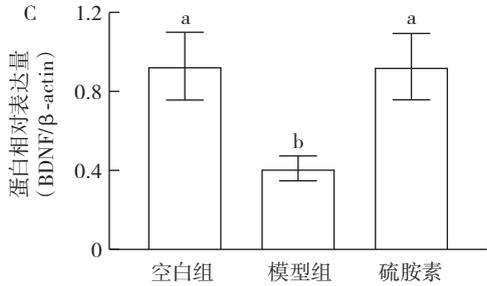
能力,从而有助于改善高糖诱导 HT-22 细胞神经元损伤。

2.3 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内突触相关蛋白的影响

神经元细胞内突触相关蛋白表达是衡量突触可塑性的重要指标。然而高糖内环境影响突触相关蛋白表达,进而可能导致神经元的损伤,硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内突触相关蛋白的影响如图 7 所示。

由图 7 可知,与空白组相比,高糖诱导 HT-22 细胞





A. 蛋白免疫印迹条带; B. SYP 蛋白定量分析; C. BDNF 蛋白定量分析。不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

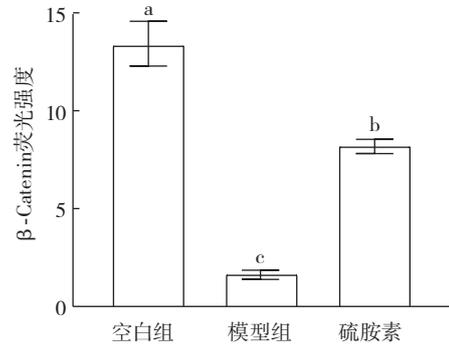
图7 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内突触相关蛋白的影响

Fig.7 Effect of thiamine on synapse-related proteins in HT-22 cells induced by high glucose

胞内 BDNF 和 SYP 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 然而硫胺素处理后, BDNF 和 SYP 蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$)。以上结果表明, 硫胺素可以增加突触相关蛋白表达, 进而增强损伤神经元突触可塑性。

2.4 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路的影响

高糖环境会导致 HT-22 细胞内的信号通路受到影响, 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路的影响如图 8 所示。

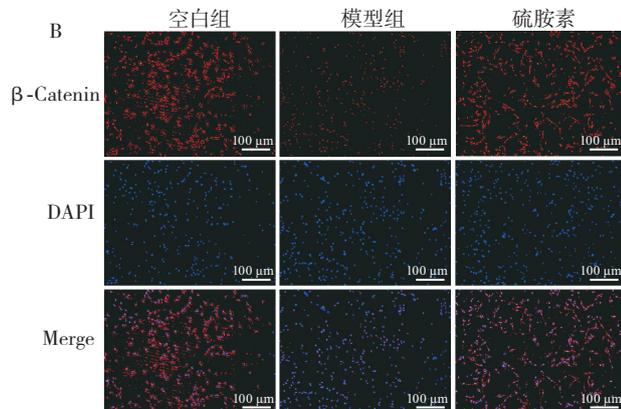
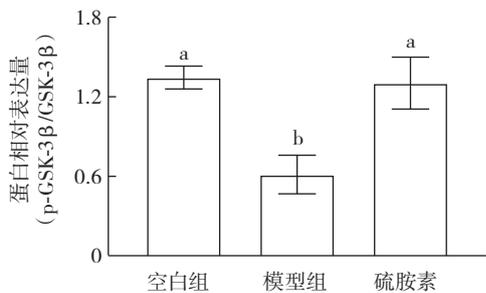
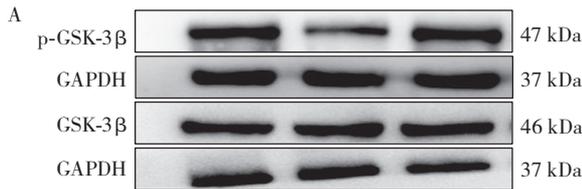


A. GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 蛋白表达水平; B. β -Catenin 荧光强度。不同小写字母表示各组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

图8 硫胺素对高糖诱导 HT-22 细胞内 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路的影响

Fig.8 Effect of thiamine on β -Catenin/GSK-3 β signaling pathway in HT-22 cells induced by high glucose

由图 8A 可知, 与空白组相比, 高糖诱导的 HT-22 细胞内 p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达量显著降低($P < 0.05$); 然而, 经过硫胺素处理后, p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达量显著增加($P < 0.05$)。同样, 硫胺素处理后还显著增强了高糖诱导 HT-22 细胞内 β -Catenin 荧光强度($P < 0.05$)。以上研究结果表明, 硫胺素能够通过增加 HT-22 细胞在高糖环境下的 p-GSK-3 β 及 β -Catenin 表达, 进而促进脑源性胰岛素分泌。



3 讨论

T2DM 患者体内高糖环境所引发的与 AD 相关的病变, 进而导致的认知功能障碍的具体机制尚未完全明确, 其中脑葡萄糖代谢减退引起能量代谢失衡被认为是认知功能障碍形成的主要诱因。长期的高血糖状态会干扰葡萄糖进入脑细胞的途径, 降低葡萄糖的消耗和摄取能力, 打破脑内葡萄糖能量代谢的失衡, 这种情况会进一步影响神经元细胞胰岛素的合成与分泌, 最终对大脑认知功能产生负面影响。因此, 对学习和记忆来说, 维持高糖环境下海马神经元细胞中葡萄糖能量代谢平衡显得尤为重要。在高糖内环境下, 胰岛素的分泌会减少, 从而导致葡萄糖无法得到充分利用。口服 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性抑制剂是治疗糖尿病的重要手段之一。 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶酶活性上升会促进胰岛素抵抗、损伤胰岛 B 细胞, 进而加重糖尿病的并发症。因此, 为了提高细胞内葡萄糖分解速度, 减少 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性, 对控制血糖水平和改善机体损伤具有重要作用。体外升糖能力酶活性抑制试验结果表明, 硫胺素能显著抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶酶活性, 具有优良的降血糖效果。高糖内环境会导致细胞对葡萄糖消耗和摄取能力下降^[27], 而硫胺素是参与能量产生的中间代谢的酶辅助因子^[12], 可以促进细胞对葡萄糖消耗与摄取。使

用试剂盒与荧光探针 2-NBDG 测定高糖环境下 HT-22 细胞内葡萄糖消耗与摄取,结果显示,高糖环境降低了神经元细胞对葡萄糖的消耗与摄取;而硫酸素干预后,显著提高了细胞对葡萄糖的消耗与摄取,这一效果可能与脑源性胰岛素的合成与分泌有关。

此外,在高血糖环境下,胰岛 B 细胞受损,进而影响胰岛素的分泌。脑源性胰岛素的分泌通过促进葡萄糖摄取和消耗,维持大脑能量代谢稳态^[6],进而调节与学习、记忆和认知相关的突触可塑性,最终影响认知功能。研究表明,硫酸素能通过调节胰岛素受体基因表达,促进胰岛素信号通路正常功能。为了深入探讨硫酸素对高糖环境下 HT-22 细胞内胰岛素合成与分泌功能的影响,本研究采用了免疫荧光试验对细胞内胰岛素进行荧光定位。结果表明,高糖环境会明显降低神经元细胞胰岛素合成和分泌,而硫酸素处理则能提升这种环境下胰岛素合成与分泌能力。同时,通过蛋白免疫印迹试验进一步证实,硫酸素能显著增加葡萄糖诱导的 HT-22 细胞内突触素和 BDNF 蛋白的表达,表明硫酸素具有增强体外胰岛素神经损伤细胞内突触可塑性的作用。此外,在高糖环境下,p-GSK-3 β 的水平会调控下游与胰岛素相关的基因表达,进而促进脑源性胰岛素的生成。通过蛋白免疫印迹和免疫荧光试验,分析了葡萄糖诱导的 HT-22 细胞内 p-GSK-3 β 和 β -Catenin 表达,试验结果显示,硫酸素能显著上调 p-GSK-3 β /GSK-3 β 表达水平和 β -Catenin 荧光强度。以上研究结果表明,硫酸素可能通过 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路,调节细胞内葡萄糖消耗和摄取,增加突触相关蛋白表达,从而改善高糖诱导的神经元损伤,这为硫酸素改善或缓解 T3DM 提供理论依据和参考。

4 结论

硫酸素对高糖诱导的 HT-22 细胞展现出显著的保护作用,有助于缓解神经元损伤。硫酸素能够显著抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性,进而促进葡萄糖的消耗与摄取,并提升胰岛素的分泌水平;此外,硫酸素还能增加突触相关蛋白表达,有效增强突触的可塑性,并通过调节 β -Catenin/GSK-3 β 信号通路,提高脑源性胰岛素合成与分泌能力,维持细胞内葡萄糖代谢及能量稳态,对葡萄糖诱导胰岛素神经损伤具有保护作用,为硫酸素改善或缓解 T3DM 提供理论依据和参考。

参考文献:

[1] GALICIA-GARCIA U, BENITO-VICENTE A, JEBARI S, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17): 6275.
[2] BOUKHALFA W, JMEL H, KHERIJI N, et al. Decoding the genetic relationship between Alzheimer's disease and type 2 diabetes: Potential risk variants and future direction for North Africa[J].

Frontiers in Aging Neuroscience, 2023, 15: 1114810.
[3] NGUYEN T T, TA Q T H, NGUYEN T K O, et al. Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3165.
[4] GONZÁLEZ A, CALFÍO C, CHURRUCÁ M, et al. Glucose metabolism and AD: Evidence for a potential diabetes type 3[J]. Alzheimer's Research & Therapy, 2022, 14(1): 56.
[5] RHEA E M, LECLERC M, YASSINE H N, et al. State of the science on brain insulin resistance and cognitive decline due to Alzheimer's disease[J]. Aging and Disease, 2023: 1688-1725.
[6] RAHHAL M N, GHARAIBEH N E, RAHIMI L, et al. Disturbances in insulin-glucose metabolism in patients with advanced renal disease with and without diabetes[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2019, 104(11): 4949-4966.
[7] SOTO M, CAI W K, KONISHI M, et al. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(13): 6379-6384.
[8] MCCLEAN P L, HÖLSCHER C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease[J]. Neuropharmacology, 2014, 76 (Pt A): 57-67.
[9] KUMAR R R, SINGH L, THAKUR A, et al. Role of vitamins in neurodegenerative diseases: A review[J]. CNS & Neurological Disorders Drug Targets, 2022, 21(9): 766-773.
[10] GIBSON G E, HIRSCH J A, CIRIO R T, et al. Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's Disease. Lessons from diabetes [J]. Molecular and Cellular Neurosciences, 2013, 55: 17-25.
[11] GONG Y S, HU K, YANG L Q, et al. Comparative effects of EtOH consumption and thiamine deficiency on cognitive impairment, oxidative damage, and β -amyloid peptide overproduction in the brain [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2017, 108: 163-173.
[12] ZHENG Y, MA A G, ZHENG M C, et al. B vitamins can reduce body weight gain by increasing metabolism-related enzyme activities in rats fed on a high-fat diet[J]. Current Medical Science, 2018, 38(1): 174-183.
[13] HUANG L, TIAN S L, ZHAO W H, et al. Electrochemical vitamin sensors: A critical review[J]. Talanta, 2021, 222: 121645.
[14] THORNALLEY P J, BABAEI-JADIDI R, AL ALI H, et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease[J]. Diabetologia, 2007, 50(10): 2164-2170.
[15] PENG X, ZHANG G W, LIAO Y J, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 207-215.
[16] WEN H X, TANG B W, STEWART A J, et al. Erythritol attenuates postprandial blood glucose by inhibiting α -glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1401-1407.
[17] ZAHARUDIN N, SALMEÁN A A, DRAGSTED L O. Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic α -amylase[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 1196-1203.
[18] CORREIA A S, SILVA I, OLIVEIRA J C, et al. Serotonin type 3 receptor is potentially involved in cellular stress induced by hydrogen peroxide[J]. Life, 2022, 12(10): 1645.
[19] CASSIANO L M G, OLIVEIRA M S, PIOLINE J, et al. Neuroinflammation regulates the balance between hippocampal neuron death and neurogenesis in an *ex vivo* model of thiamine deficiency [J]. Journal of Neuroinflammation, 2022, 19(1): 272.
[20] COLLIE J T B, GREAVES R F, JONES O A H, et al. Vitamin B₁ in

- critically ill patients: Needs and challenges[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017, 55(11): 1652-1668.
- [21] RAMSARAN A I, WANG Y, GOLBABAIE A, et al. A shift in the mechanisms controlling hippocampal engram formation during brain maturation[J]. *Science*, 2023, 380(6644): 543-551.
- [22] RIYAPHAN J, PHAM D C, LEONG M K, et al. In silico approaches to identify polyphenol compounds as α -glucosidase and α -amylase inhibitors against type-II diabetes[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1877.
- [23] SLOMSKI A. Trial compares glucose-lowering drugs for type 2 diabetes[J]. *JAMA*, 2022, 328(16): 1581.
- [24] ROBKHOB P, GHOSH S, BELLARE J, et al. Effect of silver doping on antidiabetic and antioxidant potential of ZnO nanorods[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 2020, 58: 126448.
- [25] ABDULLAH K M, AREFEEN A, SHAMSI A, et al. Insight into the *in vitro* antiglycation and *in vivo* antidiabetic effects of thiamine: Implications of vitamin B₁ in controlling diabetes[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(19): 12605-12614.
- [26] OGAWA T, SASAKI A, ONO K, et al. Uptake of fluorescent D- and L-glucose analogues, 2-NBDG and 2-NBDLG, into human osteosarcoma U2OS cells in a phloretin-inhibitable manner[J]. *Human Cell*, 2021, 34(2): 634-643.
- [27] ZHANG Y, XU G N, HUANG B Y, et al. Astragaloside IV regulates insulin resistance and inflammatory response of adipocytes via modulating CTRP3 and PI3K/AKT signaling[J]. *Diabetes Therapy*, 2022, 13(11): 1823-1834.
- [28] AHMED B, SULTANA R, GREENE M W. Adipose tissue and insulin resistance in obese[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 137: 111315.
- [29] SHARMA A, DUBEY R, BHUPAL R, et al. An insight on medicinal attributes of 1, 2, 3- and 1, 2, 4-triazole derivatives as α -amylase and α -glucosidase inhibitors[J]. *Molecular Diversity*, 2023: 3605-3634.
- [30] SEBASTIAN M J, KHAN S K, PAPPACHAN J M, et al. Diabetes and cognitive function: An evidence-based current perspective[J]. *World Journal of Diabetes*, 2023, 14(2): 92-109.

责任编辑:王艳
收稿日期:2024-03-23