DOI:10.16016/j.2097-0927.202403024

KIAA0753 减缓糖尿病抑制的成骨细胞糖代谢和能量代谢

李梦雪[1,2],王吉春[1,2],李乐泰[2],汪长东[1,2] 400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院分子医学与肿瘤研究中心[1],生物化学与分子生物学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 探讨 KIAA0753 对成骨细胞 MC3T3-E1 糖代谢及能量代谢的影响。**方法** 由基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)获取 Joubert 综合征患者基因表达数据集 GSE182286 并对其进行分析。构建 KIAA0753 过表达载体,实验分为对照组、高糖组和高糖+过表达 KIAA0753 组,采用 Western blot 检测在高糖条件下 KIAA0753 对 MC3T3-E1 细胞糖代谢相关蛋白糖原合酶 1(glycogen synthase 1, GYS1)、糖原磷酸化酶 L(glycogen phosphorylase L, PYGL)、葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter type 4, GluT4)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase muscle, PFKM)、丙酮酸脱氢酶磷酸酶 1(pyruvate dehydrogenase phosphatase 1, PDP1)、乙酰辅酶 A 羧化酶 α(acetyl-CoA carboxylase α, ACACA),以及线粒体相关蛋白过氧化物酶体增殖激活受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α, PGC-1α)、核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor 1, NRF1)、线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)的影响;通过检测细胞培养基中葡萄糖含量、细胞内的糖原含量和乳酸含量评估 KIAA0753 对糖代谢中间产物的影响;采用细胞免疫荧光和 ATP 含量检测 KIAA0753 对线粒体活性及功能的影响;采用 EdU 染色检测 KIAA0753 对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖的影响。**结果** KIAA0753 在 Joubert 综合症患者和高糖条件下表达下调($P<0.05$)。高糖抑制蛋白 GYS1、ACACA、PFKM、GluT4、PGC-1α、TFAM 和 NRF1 的表达,促进蛋白 PDP1 和 PYGL 的表达,减少糖原生成和细胞外葡萄糖的消耗,促进乳酸生成,而过表达 KIAA0753 后减缓了高糖的作用,促进蛋白 GYS1、ACACA、PFKM、GluT4、PGC-1α、TFAM 和 NRF1 的表达,抑制蛋白 PDP1 和 PYGL 的表达,增加糖原生成和细胞外葡萄糖的消耗,抑制乳酸生成($P<0.05$)。与高糖组相比,过表达 KIAA0753 在高糖条件下显著提升 MC3T3-E1 细胞线粒体的活性和膜电位,促进 ATP 的合成($P<0.05$),促进 MC3T3-E1 细胞的增殖($P<0.05$)。**结论** KIAA0753 能够促进成骨细胞的糖代谢并提升线粒体活性和功能,从而为机体提供更多能量。

[**关键词**] Joubert 综合征;成骨细胞;KIAA0753;糖代谢;线粒体;ATP

[**中图法分类号**] R343.23; R730.23; R737.25 [**文献标志码**] A

KIAA0753 promotes glucose and energy metabolism in osteoblasts inhibited by diabetes

LI Mengxue[1,2], WANG Jichun[1,2], LI Letai[2], WANG Changdong[1,2] [1]Molecular Medicine and Cancer Research Center, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of KIAA0753 on glucose and energy metabolism in mouse embryonic osteoblast precursor cell line MC3T3-E1. **Methods** The GSE182286 datasets of patients with Joubert syndrome acquired from the Gene Expression Comprehensive database were analyzed for the levels

[**基金项目**] 2022 年度教育部"春晖计划"合作科研项目(2022-2);重庆市科委面上项目(CSTB2022NSCQ-MSX0945);2023 年重庆市大学生创新课题(202337)

[**通信作者**] 汪长东,E-mail: wangchangdong@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of gene expression. After the cells with KIAA0753 overexpression were constructed and the experiment were divided into the control group, the high glucose group and the high glucose+overexpression KIAA0753 group, Western blotting was used to determine the effect of KIAA0753 on MC3T3-E1 cells under high glucose condition by detecting the expression of the glucose metabolism-related proteins, such as glycogen synthase 1 (GYS1), glycogen phosphorylase L (PYGL), glucose transporter type 4 (GluT4), phosphofructokinase muscle (PFKM), pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1), and acetyl-CoA carboxylase α (ACACA), as well as the mitochondria function-associated proteins, including peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α (PGC-1α), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM). The effect of KIAA0753 on the intermediates of glucose metabolism was analyzed by determining the contents of glycogen, glucose and lactic acid in the cell culture medium. Cellular immunofluorescence assay and adenosine triphosphate (ATP) assay were employed to measure the mitochondrial activity and function impacted by KIAA0753 in the cells under high glucose condition. The effect of KIAA0753 on the proliferation of MC3T3-E1 cells under high glucose was detected by EdU staining. **Results** The expression of KIAA0753 protein was downregulated in patients with Joubert syndrome and in MC3T3-E1 cells under high glucose conditions ($P<0.05$). High glucose resulted in inhibited protein expression of GYS1, ACACA, PFKM, GluT4, PGC-1α, TFAM and NRF1, enhanced protein levels of PDP1 and PYGL, reduced glycogen generation and consumption of extracellular glucose, and promoted production of lactic acid ($P<0.05$). While, overexpression of KIAA0753 could attenuate the effect of high glucose, that is, up-regulating the protein expression levels of GYS1, ACACA, PFKM, GluT4, PGC-1α, TFAM and NRF1, suppressing those of PDP1 and PYGL, enhancing glycogen generation and consumption of extracellular glucose, and inhibiting production of lactic acid ($P<0.05$). What's more, the overexpression also could elevate the activity and membrane potential of mitochondria, and promote the ATP synthesis ($P<0.05$) and cell proliferation ($P<0.05$) in MC3T3-E1 cells under high glucose. **Conclusion** KIAA0753 can promote glucose metabolism and improve mitochondrial activity and function in osteoblasts, consequently providing more energy to the body.

[**Key words**] Joubert syndrome; osteoblasts; KIAA0753; glucose metabolism; mitochondria; ATP

Supported by the "Chunhui Plan" Collaborative Research Project of Ministry of Education in 2022 (2022-2), the General Program of Chongqing Science and Technology Commission (CSTB2022NSCQ-MSX0945) and the College Student Innovation Project of Chongqing in 2023 (202337). Corresponding author: WANG Changdong, E-mail: wangchangdong@cqmu.edu.cn

纤毛病是由原纤毛形成或功能受损而引起的一类疾病[1],包括 Joubert 综合征、口面指综合征(oral-facial-digital syndrome, OFD)等[2]。KIAA0753 是一种原纤毛蛋白,具有调节原纤毛生成和原纤毛维持等功能。KIAA0753 突变将导致骨骼发育不良,引起骨骼类纤毛病,包括 Joubert 综合征[3]。Joubert 综合征临床症状表现为骨骼发育不良、生长迟缓、内分泌紊乱等,部分 Joubert 综合征患者患有 1 型糖尿病[4]。原纤毛功能障碍与骨骼发育缺陷之间的联系表明原纤毛及原纤毛蛋白在调控骨发育方面具有重要作用。

糖尿病是一种慢性代谢紊乱疾病,其特征是胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗[5]。糖尿病伴有高血糖,在细胞水平上诱导氧化应激反应、增加晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、增强细胞因子的表达等引起多种并发症[6]。在糖尿病小鼠中,FOXO1 转录因子下调软骨细胞和成骨细胞中原纤毛蛋白的表达[7]。原纤毛蛋白的缺失损害原纤毛的形成而影响骨发育,导致骨丢失[8]。研究表明原纤毛蛋白 IFT20 通过调控 TGF-β-Smad2/3-Glut1 介导的葡萄糖代谢控制成骨细胞的分化。IFT20 的缺失显著降低了葡萄糖的耐量,抑制了葡萄糖摄取和 ATP 的生成,导致糖代谢和能量代谢紊乱[9]。

因此,我们推测 KIAA0753 突变引起的骨发育不良与体内糖代谢紊乱和线粒体功能障碍有关。本研究分析基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中 Joubert 综合征患者的 RNA-seq 数据,检测 KIAA0753 在 Joubert 综合征患者和高糖条件下的表达。通过构建糖尿病细胞模型和过表达 KIAA0753 细胞体系,检测过表达 KIAA0753 对成骨细胞 MC3T3-E1

的糖原合成及分解,糖的有氧氧化及线粒体功能相关蛋白表达的影响;通过细胞免疫荧光实验检测过表达KIAA0753对细胞线粒体活性及膜电位的影响;同时利用ATP检测试剂检测过表达KIAA0753对细胞ATP合成的影响;最后通过EdU染色检测过表达KIAA0753对成骨细胞增殖的影响。以探讨在高糖条件下KIAA0753对成骨细胞MC3T3-E1的糖代谢及线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

成骨细胞系MC3T3-E1购于上海细胞库,pcDNA3.1-KIAA0753-FLAG质粒购于中国优宝生物;α-MEM培养基、胰蛋白酶和胎牛血清均购于美国Gibco公司;ATP检测试剂盒、BCA(bicinchoninic acid)检测试剂盒、Mito-Tracker Green(线粒体绿色荧光探针)、线粒体膜电位检测试剂盒(Rhodamine 123)和EdU检测试剂盒均购于中国碧云天公司;青-链霉素双抗溶液购于美国Hyclone公司;地塞米松、β-甘油磷酸、抗坏血酸均购于美国Sigma公司;糖原磷酸化酶L(glycogen phosphorylase L, PYGL)抗体购于中国Proteintech公司;糖原合酶1(glycogen synthase 1, GYS1)抗体、葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter type 4, GluT4)抗体、线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)抗体、乙酰辅酶A羧化酶α(acetyl-CoA carboxylase α, ACACA)抗体、丙酮酸脱氢酶磷酸酶1(pyruvate dehydrogenase phosphatase 1, PDP1)抗体、过氧化物酶体增殖激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α, PGC-1α)抗体、核呼吸因子1(nuclear respiratory factor 1, NRF1)抗体、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase muscle, PFKM)抗体、GAPDH抗体均购于中国Sangon Biotech公司;糖原测定试剂盒、乳酸测定试剂盒均购于中国南京建成公司;葡萄糖测定试剂盒购于中国北京普利莱公司;Lipofectamine© 2000 DNA转染试剂和KIAA0753抗体均购于美国Invitrogen公司;雅酶试剂盒购于中国雅酶生物公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 由GEO获取Joubert综合征患者基因表达数据集GSE182286,选取其中无任何处理的正常细胞和Joubert综合征患者的细胞测序数据进行分析,采用GEO2R分析GSE182286数据集基因的表达情况,并通过火山图进行展示。采用biolader分析工具(https://www.bioladder.cn/)分析差异基因的表达并绘制热图,采用Omicsbean分析工具(http://www.omicsbean.cn/)对差异表达基因进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析。采用String数据库(https://string-db.org/)分析与KIAA0753相互作用的蛋白。

1.2.2 细胞培养及分组 MC3T3-E1细胞采用α-MEM培养基(添加10%胎牛血清,1%青-链霉素双抗溶液)或成骨诱导分化培养基(在α-MEM培养基中添加50 mg/L抗坏血酸,10 mmol/L β-甘油磷酸,10^{-8} mol/L地塞米松)于37 ℃,5% CO_2培养箱中培养。实验分3组:①对照组为正常培养的细胞;②高糖组在α-MEM培养基中加入D-(+)-葡萄糖(终浓度为25 mmol/L)诱导MC3T3-E1细胞,构建糖尿病细胞模型;③高糖+过表达KIAA0753组在高糖组基础上通过Lipofectamine© 2000将pcDNA3.1-KIAA0753-FLAG质粒转染到MC3T3-E1细胞中,无血清培养基培养4 h后加入成骨诱导分化培养基,培养72 h。

1.2.3 Western blot检测 提取MC3T3-E1细胞的总蛋白,用BCA试剂盒测总蛋白的浓度,将蛋白上样缓冲液和蛋白原液混匀并煮沸10 min,用10%~15%的SDS-PAGE凝胶电泳,于含20%的甲醇电转液中转移蛋白,用5%脱脂牛奶封闭蛋白2 h。孵育一抗,于4 ℃摇床上过夜。在室温下孵育二抗1 h,用Bio-Rad凝胶分析软件检测蛋白信号。

1.2.4 糖原含量检测 取0.05 mL的细胞裂解液样品与0.15 mL糖原检测试剂盒中所带的碱溶液混匀后煮沸20 min,即为检测液。将检测液稀释10倍后与显色液混匀后煮沸5 min,冷却后于620 nm处测吸光度值[D(620)]。

1.2.5 葡萄糖检测 取5 μL的细胞培养基与195 μL的工作液混匀,于37 ℃反应20 min后在570 nm处测吸光度值[D(570)]。

1.2.6 乳酸检测 取20 μL的细胞裂解上清液和200 μL显色剂混匀,于37 ℃水浴中反应10 min后加入2 mL终止液,混匀后于530 nm处测吸光度值[D(530)]。

1.2.7 Mito-Tracker Green免疫荧光染色 MC3T3-E1细胞诱导完成后去除培养基,用37 ℃预热的无血清培养基清洗3次,加入37 ℃孵育30 min后的Mito-Tracker Green工作稀释液。37 ℃孵育40 min后弃掉工作液,用预热的培养基清洗3次。DAPI染液染色,每孔加300 μL,37 ℃放置30 min。弃掉DAPI染液,用预热的培养基清洗3次。取出细胞爬片并倒放在载玻片上于显微镜下观察。

1.2.8 线粒体膜电位检测 MC3T3-E1 细胞诱导完成后弃掉培养基,PBS 冲洗 1 次,加入 Rhodamine 123 染色液,37 ℃孵育 30 min 后去除染色液,用预热的培养基洗涤 2 次。DAPI 染液染色,每孔加 300 μL,37 ℃放置 30 min。弃掉 DAPI 染液,用预热的培养基清洗 3 次。取出细胞爬片倒放在载玻片上于显微镜下观察。

1.2.9 ATP 检测 将 ATP 检测试剂与稀释液按照体积比 1∶9 稀释成 ATP 工作液,蛋白原液与 ATP 裂解液按照体积比 1∶4 稀释,取 100 μL 的 ATP 工作液加入到 96 孔板中,室温放置 3 min 后将 20 μL 的蛋白稀释液与 ATP 工作液迅速混匀,用化学发光仪测定。

1.2.10 EdU 检测 MC3T3-E1 细胞诱导完成后,将 37 ℃预热的 EdU 工作液与 24 孔板中的培养基按照 1∶1 的体积加入,37 ℃孵育 2 h。去除培养液后用 PBS 清洗。每孔加入 300 μL 的 4% 多聚甲醛,静置 15 min 后用 PBS 清洗。每孔加入 300 μL 的 0.5% Triton X-100,静置 15 min 后用 PBS 清洗。每孔加入 150 μL 的 Click 反应液,避光孵育 30 min 后用 PBS 清洗。DAPI 染液染色,每孔加 300 μL,放置 7 min,弃掉 DAPI 染液后用 PBS 清洗。取出细胞爬片倒放在载玻片上于显微镜下观察。

1.3 统计学分析

每组实验均重复 3 次,使用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 组间数据比较采用 Student's t 检验,3 组及以上的数据比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIAA073 在 Joubert 综合征患者中表达下调

通过 GEO 数据库筛选出 GSE182286 数据集,对其中无任何处理的正常细胞和 Joubert 综合征患者的细胞测序数据进行分析。采用火山图展示所有基因的表达情况($P<0.05$,FC>1,图 1A),对差异基因进行热图绘制(图 1B),其中 KIAA0753 表达明显下调。同时对差异基因进行 GO 和 KEGG 功能分析,发现这些差异基因主要富集到胞外区域,参与生物调控,具有与其他蛋白相互结合的分子功能,并且这些差异基因主要富集在 PI3K-Akt 信号通路及癌症相关的信号通路中(图 1C、D),其中 PI3K-Akt 信号通路与糖代谢密切相关。通过 String 数据库对与 KIAA0753 具有相互作用的蛋白质进行分析发现,KIAA0753 与 10 种中心体相关的蛋白质之间存在相互作用,包括 OFD1、CEP120 蛋白等(图 1E),与原纤毛的生成密切相关。以上结果表明原纤毛蛋白 KIAA0753 可能与糖代谢的调控存在联系。

2.2 KIAA0753 促进葡萄糖转运

Western blot 检测结果显示,与对照组比较,高糖组 KIAA0753 和 GluT4 蛋白表达显著下调,而在高糖+过表达 KIAA0753 组 KIAA0753 和 GluT4 蛋白表达显著上调($P<0.05$,图 2)。表明高糖抑制葡萄糖的转运,在高糖条件下过表达 KIAA0753 可促进葡萄糖转运蛋白 GluT4 的表达,从而加速细胞摄取葡萄糖。

2.3 KIAA0753 促进糖原合成及抑制糖原分解

Western blot 结果显示:与对照组比较,高糖组 GYS1 蛋白表达显著降低,PYGL 蛋白表达显著升高;与高糖组比较,高糖+过表达 KIAA0753 组 GYS1 蛋白表达显著升高,PYGL 蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3A~C)。对细胞内糖原含量检测发现,高糖组糖原含量较对照组显著减少,而高糖+过表达 KIAA0753 组糖原含量较高糖组显著增加($P<0.05$,图 3D)。同时经高糖诱导 MC3T3-E1 细胞 48 h 后,检测细胞培养基中葡萄糖含量发现高糖组葡萄糖的消耗量较对照组显著减少,但高糖+过表达 KIAA0753 组葡萄糖的消耗量较高糖组显著增加($P<0.01$,图 3E)。以上结果表明高糖抑制糖原合成及促进糖原分解,而在高糖条件下过表达 KIAA0753 通过促进蛋白 GYS1 表达且抑制蛋白 PYGL 的表达,加速糖原合成及抑制糖原分解,加速细胞对葡萄糖的摄取,从而降低胞外葡萄糖的浓度。

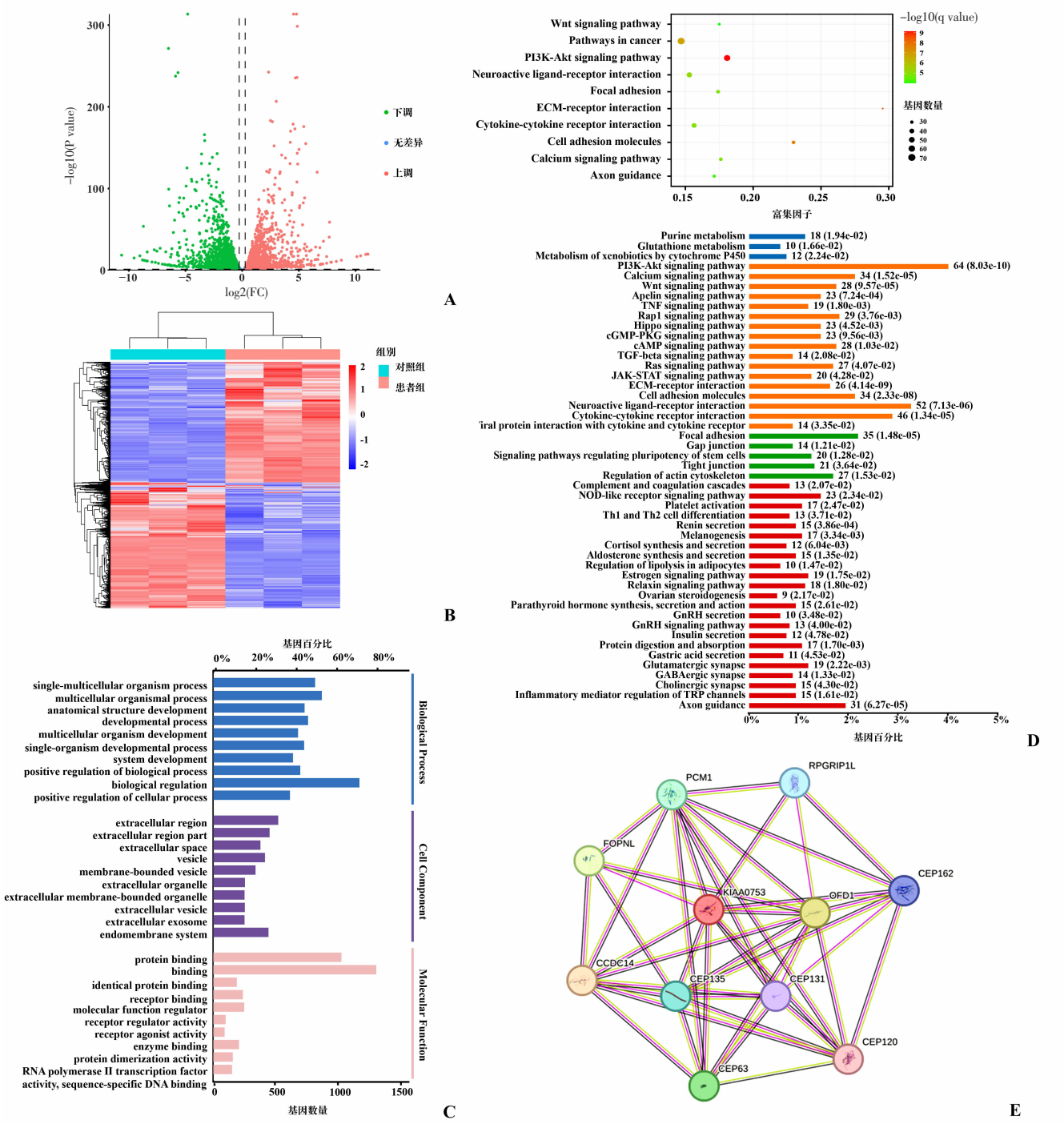
2.4 KIAA0753 促进糖的有氧氧化

Western blot 检测糖的有氧氧化相关蛋白结果显示:与对照组比较,高糖组 PFKM、ACACA 蛋白表达下调,PDP1 蛋白表达上调($P<0.01$),而高糖+过表达 KIAA0753 组逆转了高糖对蛋白 PFKM、ACACA 和 PDP1 表达的影响($P<0.05$,图 4A~E)。进一步对 MC3T3-E1 细胞中乳酸含量检测,发现高糖组乳酸含量较对照组显著升高($P<0.01$),而在高糖+过表达 KIAA0753 组乳酸含量较高糖组显著降低($P<0.05$,图 4F)。以上结果表明高糖抑制糖的有氧氧化,促进细胞内乳酸生成,而在高糖条件下过表达 KIAA0753 促进 PFKM 和 ACACA 蛋白表达,抑制 PDP1 蛋白表达,促进糖的有氧氧化,减少细胞内乳酸生成。

2.5 KIAA0753 增强线粒体功能及促进 ATP 合成

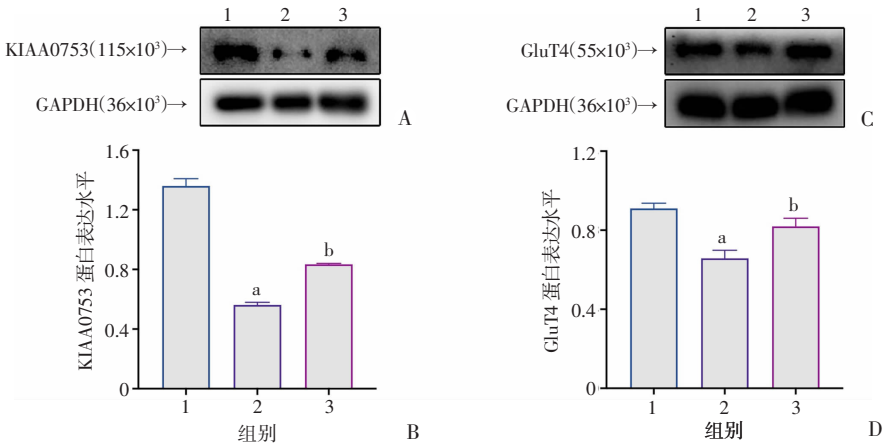
通过 Mito-Tracker Green 和 Rhodamine 123 检测成骨细胞线粒体的活性及线粒体膜电位。结果显示:与对照组比较,高糖组 MC3T3-E1 细胞的线粒体活性降低,线粒体膜电位下降;与高糖组比较,高糖+过表达 KIAA0753 组细胞线粒体活性增加,线粒体膜电位升高(图 5A、B)。Western blot 检测线粒体功能相关蛋白结

果显示,与对照组比较,高糖组 PGC-1α、TFAM 和 NRF1 蛋白表达显著降低(P<0.01);与高糖组比较,高糖+过表达 KIAA0753 组 PGC-1α、TFAM 和 NRF1 蛋白表达显著升高(P<0.01,图 5C~F)。同时检测成骨细胞 MC3T3-E1 中 ATP 的含量,结果显示高糖抑制 ATP 的合成,而过表达 KIAA0753 促进 ATP 生成(P<0.05,图 5G)。以上结果表明高糖降低了线粒体功能,而在高糖条件下过表达 KIAA0753 通过增强线粒体标志蛋白的表达和提高线粒体活性和膜电位,促进成骨细胞能量合成。



A:GSE182286 数据集基因表达情况的火山图;B:GSE182286 数据集差异基因表达的热图;C:GSE182286 数据集差异基因的 GO 富集分析;D:GSE182286 数据集差异基因 KEGG 通路富集分析;E:与 KIAA0753 相互作用的蛋白

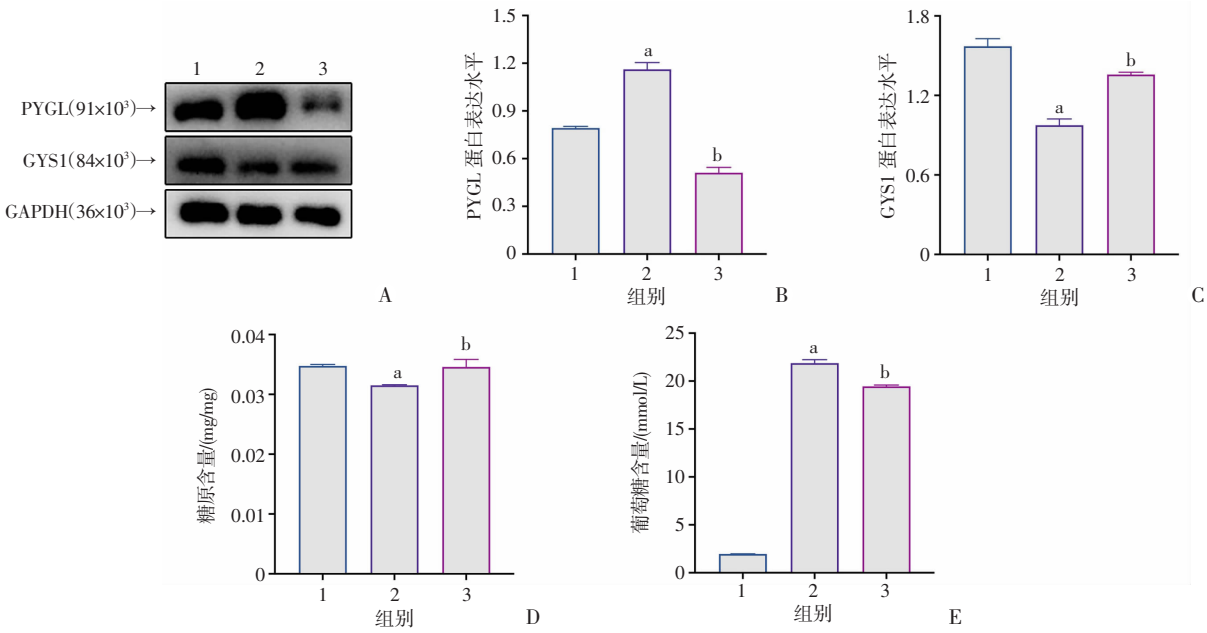
图 1　GSE182286 数据集基因表达和功能分析及 KIAA0753 互作蛋白分析



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+过表达 KIAA0753 组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高糖组比较

A、B:Western blot 检测 KIAA0753 蛋白表达及定量分析;C、D:Western blot 检测 GluT4 蛋白表达及定量分析

图 2 KIAA0753 在高糖下对成骨细胞葡萄糖转运蛋白的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+过表达 KIAA0753 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高糖组比较

A~C:Western blot 检测 PYGL、GYS1 蛋白表达及定量分析;D:糖原含量检测;E:葡萄糖含量检测

图 3 KIAA0753 在高糖下对成骨细胞糖原合成及分解的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

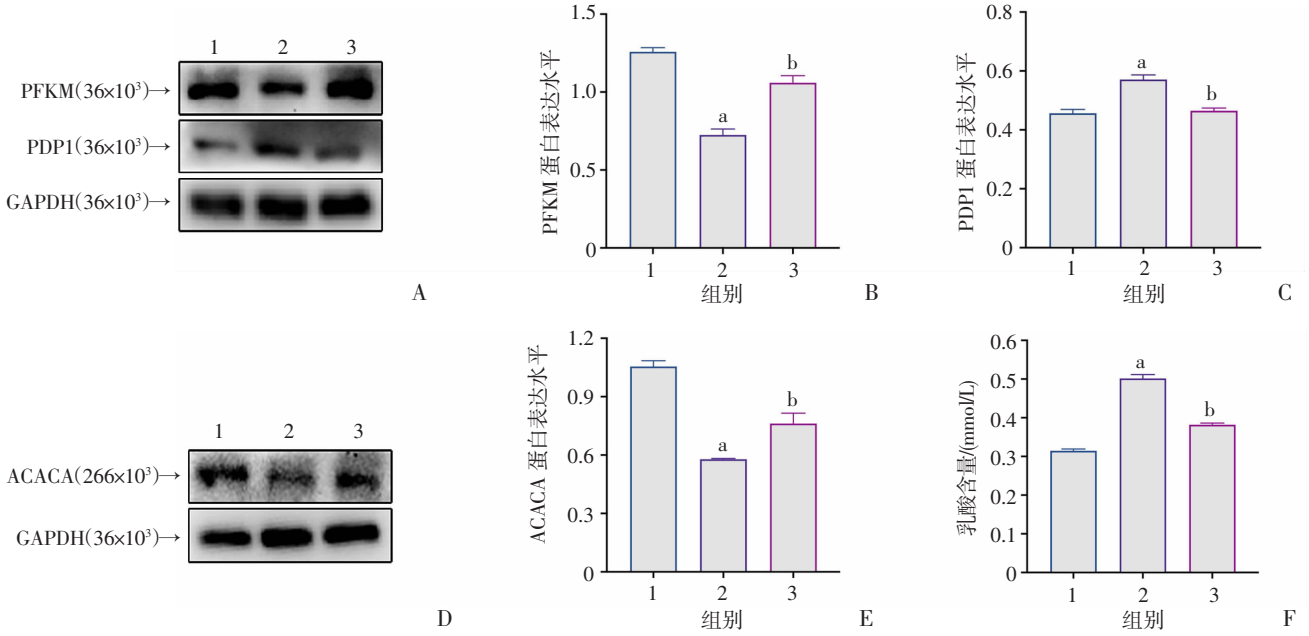
2.6 KIAA0753 促进成骨细胞增殖

为了进一步检测在高糖条件下过表达 KIAA0753 引起的代谢改变对 MC3T3-E1 细胞活性的影响,对 MC3T3-E1 增殖情况进行检测。EdU 染色结果显示:与对照组比较,高糖组 MC3T3-E1 细胞的 DNA 合成显著减少;与高糖组比较,高糖+过表达 KIAA0753 组 MC3T3-E1 细胞的 DNA 合成显著增加($P<0.05$,图 6A、B)。以上结果表明高糖抑制成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖,而在高糖条件下过表达 KIAA0753 促进成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖。

3 讨论

原纤毛能转导各种信号通路,在组织发育和机体动态平衡中具有关键作用[10]。原纤毛行使正常功能依赖于原纤毛的结构蛋白,而编码原纤毛相关蛋白的基因突变将导致原纤毛形态及功能受损从而引发疾病,这类疾病统称为“纤毛病”,涉及肾脏、脑、眼、心脏和骨骼器官系统[11]。原纤毛的生成和维持依赖于分子复合体各种组分的相互作用,包括 OFIP-OFD1-FOR20 复合体[12]。KIAA0753 也称为 MNR 或 OFIP,是中心体和中心粒周

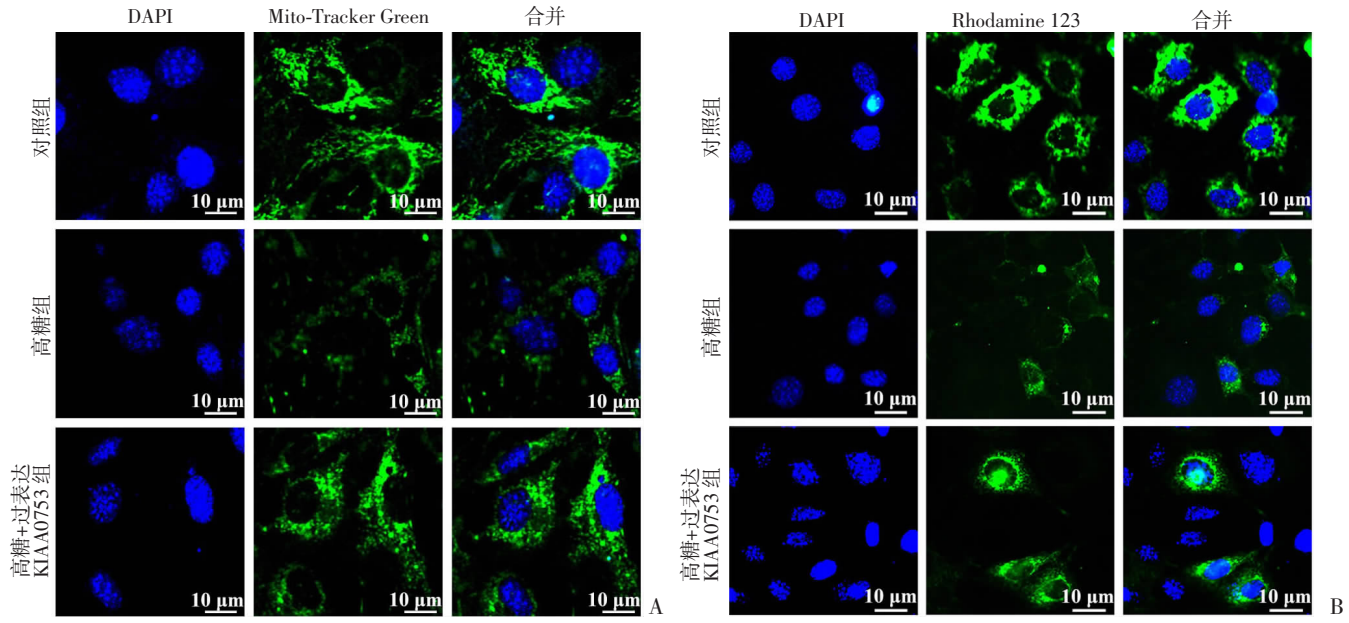
围卫星的一个组分,可与其他已知的卫星蛋白(如 PCM1、OFD1 和 FOR20)形成复合体[13]。KIAA0753 通过将 WDR62、CEP63 和 CDK2 募集到中心体来调节中心粒复制过程[14]。研究表明,KIAA0753 突变和缺失破坏原纤毛的生成,导致骨纤毛病,例如 Joubert 综合征和 OFD[15]。而骨是一种内分泌器官,影响大脑发育认知以及葡萄糖代谢。骨质量的主要决定因素之一是成骨细胞和破骨细胞进行持续重塑,这一过程消耗大量能量[16]。



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+过表达 KIAA0753 组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高糖组比较

A~C:Western blot 检测 PFKM、PDP1 蛋白表达及定量分析;D、E:Western blot 检测 ACACA 蛋白表达及定量分析;F:乳酸含量检测

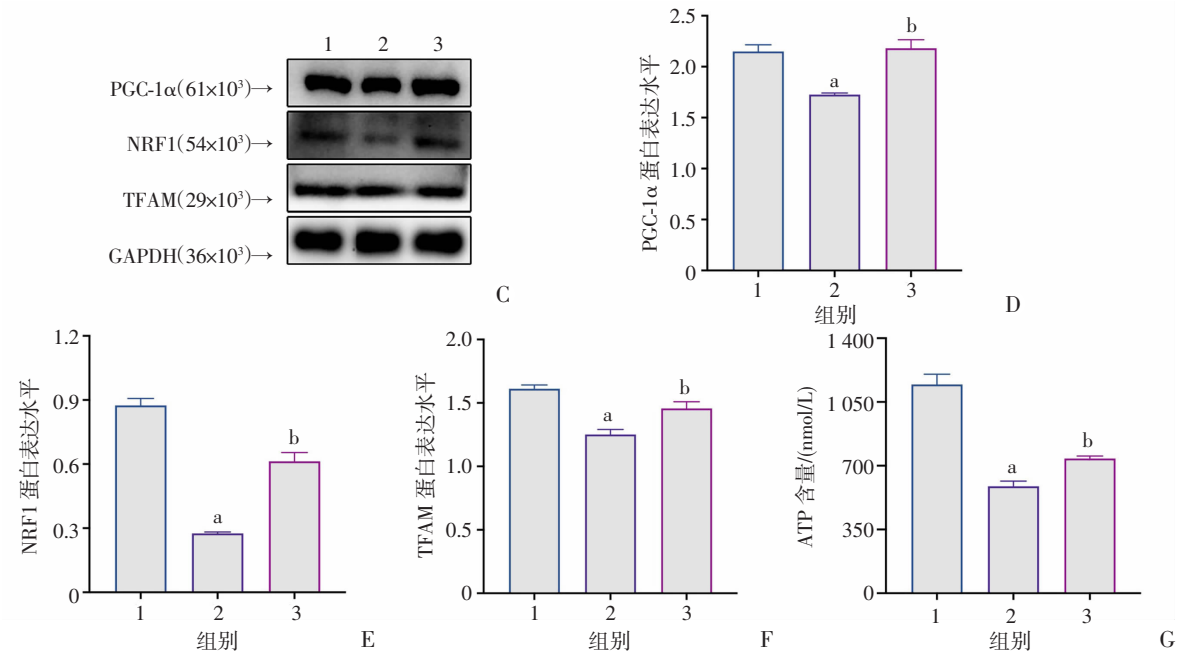
图 4　KIAA0753 在高糖下对成骨细胞糖的有氧氧化的影响　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:Mito-Tracker Green 染色;B:Rhoadmine 123 染色

图 5　KIAA0753 在高糖下对成骨细胞线粒体功能的影响　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

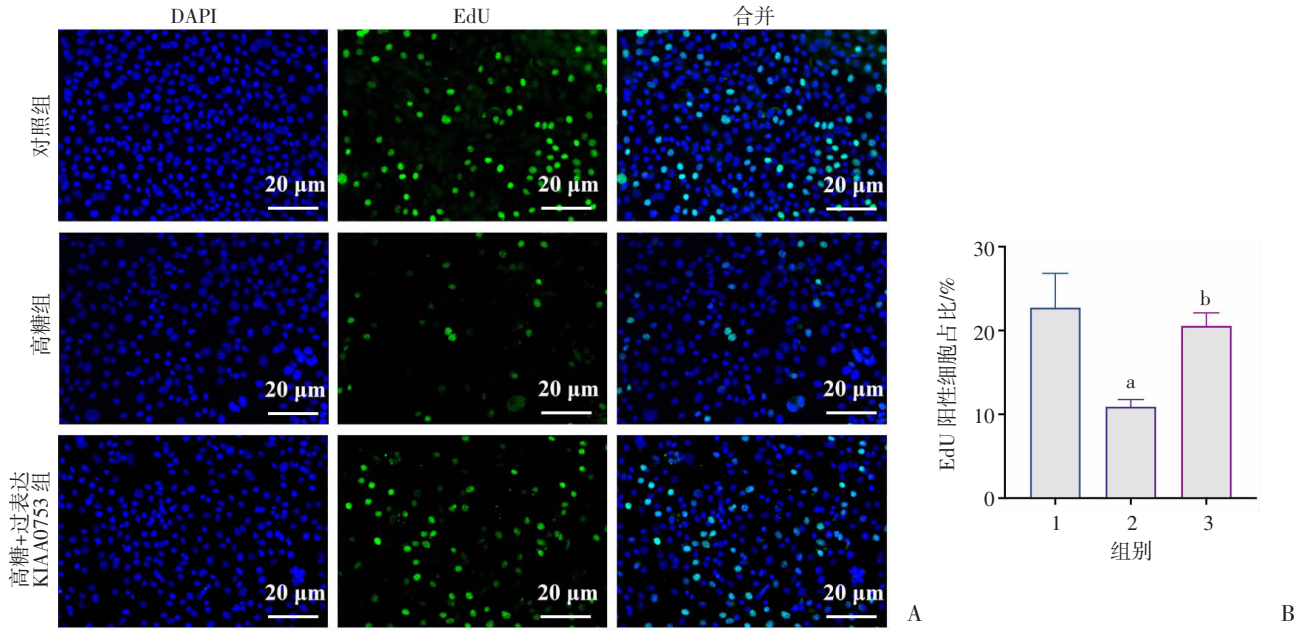
(图 5C~G 续下页)



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+过表达 KIAA0753 组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高糖组比较

C~F:Western blot 检测 PGC-1α、NRF1 和 TFAM 蛋白表达及定量分析;G:ATP 含量检测

续图 5 KIAA0753 在高糖下对成骨细胞线粒体功能的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+过表达 KIAA0753 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高糖组比较

A:EdU 染色;B:EdU 染色的阳性细胞的定量分析

图 6 KIAA0753 在高糖下对成骨细胞增殖的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

有研究显示,糖尿病下调原纤毛基因表达及影响原纤毛的形成,从而影响糖尿病患者的骨折愈合[17]。糖尿病是一种慢性代谢性疾病,其特征是胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗导致糖代谢紊乱[18]。血糖水平升高干扰成骨细胞分化,导致骨发育异常[19]。研究表明,1 型糖尿病患者的骨矿物质密度较正常人低[20]。本研究发现在基因 KIAA0753 突变的 Joubert 综合征患者中,差异表达基因显著富集在 PI3K-Akt 信号通路中。PI3K-Akt 信号通路不仅促进胰岛素刺激的葡萄糖的转运,而且还调节糖尿病引起的骨质疏松,改变成骨细

胞骨保护蛋白(osteoprotegerin,OPG)/NF-κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κ B ligand,RANKL)的比例,抑制成骨细胞凋亡,促进成骨细胞分化,增加骨形成[21]。成骨细胞中葡萄糖代谢的抑制是糖尿病骨形成受损的主要原因[22],我们推测 KIAA0753 突变导致骨发育异常可能与体内糖代谢紊乱有关。本研究通过构建 MC3T3-E1 糖尿病细胞模型和过表达 KIAA0753 细胞体系,发现高糖导致成骨细胞 MC3T3-E1 的糖代谢紊乱及线粒体功能障碍,并抑制细胞增殖,在高糖下过表达 KIAA0753 能够促进糖代谢、提升线粒体功能及细胞增殖能力,有助于恢复机体正常代谢。

糖尿病引起的糖代谢紊乱影响骨代谢,导致骨量减少,引发骨质疏松及骨折愈合缓慢[23]。葡萄糖是成骨细胞重要的能量来源,依赖于葡萄糖转运蛋白运输。成骨细胞表达葡萄糖转运蛋白家族(GluT1-4)中 4 个已知成员中的 3 个葡萄糖转运蛋白,即 GluT1、GluT3 和 GluT4,能更好地从外周血摄取葡萄糖[24]。葡萄糖分子沿浓度梯度被动扩散,通过 GluT 受体从细胞外转运到细胞内,经历糖酵解,随后进入三羧酸循环。GluT4 是骨骼肌中主要的葡萄糖转运体,转运葡萄糖的过程受到胰岛素水平的正向调控,而胰岛素水平异常或传递信号受损是产生糖尿病的基础[25]。研究表明糖尿病小鼠骨骼肌中 GluT4 蛋白水平显著降低,但激活 GluT4 蛋白的表达后,显著增加了骨骼肌的胰岛素敏感性,促进葡萄糖的动态平衡[26]。本研究结果表明过表达 KIAA0753 可逆转高糖的作用,显著提升 GluT4、GYS1、PFKM 和 ACACA 蛋白的表达,抑制 PYGL、PDP1 蛋白的表达。同时发现高糖条件下细胞内糖原含量和细胞培养基中的葡萄糖消耗量减少,细胞内乳酸生成增加,而在高糖下过表达 KIAA0753 后糖原含量和细胞培养基消耗量均增加,乳酸生成降低。我们推测 KIAA0753 一方面通过增加蛋白 GluT4 的表达加快成骨细胞摄取葡萄糖的速度来降低外周血糖浓度;另一方面上调 GYS1 蛋白表达和下调 PYGL 蛋白表达促进糖原合成和抑制糖原分解而降低外周血糖浓度;同时增强 PFKM 蛋白的表达和抑制 PDP1 蛋白的表达,减少乳酸合成,加速糖的有氧氧化发生及上调 ACACA 蛋白的表达,促进脂肪酸合成,增强细胞内葡萄糖的消耗来降低外周血糖的浓度。

成骨细胞主要通过糖的有氧氧化利用葡萄糖,并迅速产生 ATP。线粒体是 ATP 合成的主要细胞器,其功能受损也会促进 ROS 的生成、线粒体解耦联等。研究表明,糖尿病小鼠骨骼肌细胞线粒体的膜电位、ATP 和线粒体生物合成能力下降与 p-AMPK、PGC-1α 和 TFAM 表达下降有关。蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB,即 Akt)通过磷酸化 PGC-1α 来降低 PGC-1α 蛋白的表达,从而降低 FOXO1 活性,减弱肝脏中的糖异生。PGC-1α 能激活 TFAM 和线粒体 DNA 的复制,而抑制 AMPK/PGC-1α/TFAM 通路可导致线粒体数量减少,下调 ATP 的形成[27]。本研究通过 Mito-Tracker Green 染色和 Rhodamine 123 染色进行细胞免疫荧光实验发现高糖抑制了线粒体活性,降低了线粒体膜电位,而过表达 KIAA0753 后增加了线粒体活性,提高了线粒体膜电位。Western blot 结果表明高糖抑制了 PGC-1α、NRF1 和 TFAM 蛋白的表达,但过表达 KIAA0753 可逆转高糖的作用,促进 PGC-1α、NRF1 和 TFAM 蛋白的表达。同时检测到高糖抑制了 ATP 的合成,而在高糖中过表达 KIAA0753 后促进了 ATP 的合成。以上结果均说明在高糖中 KIAA0753 能够通过增加线粒体活性和功能,从而产生更多的能量来保证机体行使正常功能。

综上所述,本研究发现高糖导致成骨细胞的糖代谢和线粒体能量代谢紊乱,抑制细胞增殖,而过表达 KIAA0753 通过促进糖原合成及糖的有氧氧化,增强线粒体功能产生更多的能量并促进细胞增殖,使机体代谢恢复正常。本研究虽证明了 KAA0753 能促进成骨细胞的糖代谢和能量代谢,但具体的调控机制仍待进一步研究。

参考文献:

[1] MORAN A L, LOUZAO-MARTINEZ L, NORRIS D P, *et al*. Transport and barrier mechanisms that regulate ciliary compartmentalization and ciliopathies[J]. Nat Rev Nephrol, 2024, 20(2): 83-100. DOI: 10.1038/s41581-023-00773-2.

[2] MILL P, CHRISTENSEN S T, PEDERSEN L B. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease [J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(7): 421-441. DOI: 10.1038/s41576-023-00587-9.

[3] INSKEEP K A, ZARATE Y A, MONTEIL D, *et al*. Genetic and phenotypic heterogeneity in KIAA0753-related ciliopathies[J]. Am J Med Genet A, 2022, 188(1): 104-115. DOI: 10.1002/ajmg.a.62497.

[4] BACHMANN-GAGESCU R, DEMPSEY J C, BULGHERONI S, *et al*. Healthcare recommendations for Joubert syndrome [J]. Am J Med Genet A, 2020, 182(1): 229-249. DOI: 10.1002/ajmg.a.61399.

[5] COLE J B, FLOREZ J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications[J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(7): 377-390. DOI: 10.1038/s41581-020-0278-5.

[6] KYRIAZIS I D, HOFFMAN M, GAIGNEBET L, *et al*. KLF5 is induced by FOXO1 and causes oxidative stress and diabetic

cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2021, 128(3): 335-357. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316738.

[7] CHINIPARDAZ Z, YUAN G S, LIU M, *et al*. Diabetes impairs fracture healing through Foxo1 mediated disruption of ciliogenesis[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 299. DOI: 10.1038/s41420-023-01562-3.

[8] CHINIPARDAZ Z, LIU M, GRAVES D, *et al*. Diabetes impairs fracture healing through disruption of cilia formation in osteoblasts[J]. Bone, 2021, 153: 116176. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116176.

[9] LI Y, YANG S, LIU Y, *et al*. IFT20 governs mesenchymal stem cell fate through positively regulating TGF-β-Smad2/3-Glut1 signaling mediated glucose metabolism [J]. Redox Biol, 2022, 54: 102373. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116176.

[10] ANVARIAN Z, MYKYTYN K, MUKHOPADHYAY S, *et al*. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(4): 199-219. DOI: 10.1038/s41581-019-0116-9.

[11] ANDREU-CERVERA A, CATALA M, SCHNEIDER-MAUNOURY S. Cilia, ciliopathies and hedgehog-related forebrain developmental disorders[J]. Neurobiol Dis, 2021, 150: 105236. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.105236.

[12] CHEVRIER V, BRUEL A L, VAN DAM T J, *et al*. OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(3): 497-513. DOI: 10.1093/hmg/ddv488.

[13] CHANG C H, CHEN T Y, LU I L, *et al*. CEP120-mediated KIAA0753 recruitment onto centrioles is required for timely neuronal differentiation and germinal zone exit in the developing cerebellum[J]. Genes Dev, 2021, 35(21/22): 1445-1460. DOI: 10.1101/gad.348636.121.

[14] FIRAT-KARALAR E N, RAUNIYAR N, YATES J R 3rd, *et al*. Proximity interactions among centrosome components identify regulators of centriole duplication[J]. Curr Biol, 2014, 24(6): 664-670. DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.067.

[15] STEPHEN J, VILBOUX T, MIAN L, *et al*. Mutations in KIAA0753 cause Joubert syndrome associated with growth hormone deficiency [J]. Hum Genet, 2017, 136(4): 399-408. DOI: 10.1007/s00439-017-1765-z.

[16] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, *et al*. Mechanisms of bone development and repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696-711. DOI: 10.1038/s41580-020-00279-w.

[17] LIU J, CHENG Q F, WU X M, *et al*. Icariin treatment rescues diabetes induced bone loss via scavenging ROS and activating primary Cilia/Gli2/osteocalcin signaling pathway [J]. Cells, 2022, 11(24): 4091. DOI: 10.3390/cells11244091.

[18] HUGHES J W, CHO J H, CONWAY H E, *et al*. Primary cilia control glucose homeostasis via islet paracrine interactions[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(16): 8912-8923. DOI: 10.1073/pnas.2001936117.

[19] JIAO H L, XIAO E, GRAVES D T. Diabetes and its effect on bone and fracture healing[J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(5): 327-335. DOI: 10.1007/s11914-015-0286-8.

[20] HOUGH F S, PIERROZ D D, COOPER C, *et al*. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Mechanisms and evaluation of bone fragility in type 1 diabetes mellitus[J]. Eur J Endocrinol, 2016, 174(4): R127-R138. DOI: 10.1530/EJE-15-0820.

[21] XU Z, XU J, LI S, *et al*. S-Equol enhances osteoblastic bone formation and prevents bone loss through OPG/RANKL *via* the PI3K/Akt pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Front Nutr, 2022, 9: 986192. DOI: 10.3389/fnut.2022.986192.

[22] SONG F F, LEE W D, MARMO T, *et al*. Osteoblast-intrinsic defect in glucose metabolism impairs bone formation in type II diabetic male mice[J]. Elife, 2023, 12: e85714. DOI: 10.7554/eLife.85714.

[23] CHINIPARDAZ Z, LIU M, GRAVES D T, *et al*. Role of primary *Cilia* in bone and cartilage[J]. J Dent Res, 2022, 101(3): 253-260. DOI: 10.1177/00220345211046606.

[24] LI Z, FREY J L, WONG G W, *et al*. Glucose transporter-4 facilitates insulin-stimulated glucose uptake in osteoblasts [J]. Endocrinology, 2016, 157(11): 4094-4103. DOI: 10.1210/en.2016-1583.

[25] WU W W, XI W, LI H M, *et al*. Circular RNA circ-ACACA regulates proliferation, migration and glycolysis in non-small-cell lung carcinoma *via* miR-1183 and PI3K/PKB pathway[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(6): 1814-1824. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4549.

[26] CARTEE G D. Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle [J]. Diabetologia, 2015, 58(1): 19-30. DOI: 10.1007/s00125-014-3395-5.

[27] BHATTAMISRA S K, KOH H M, LIM S Y, *et al*. Molecular and biochemical pathways of catalpol in alleviating diabetes mellitus and its complications[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 323. DOI: 10.3390/biom11020323.

(收稿:2024-03-07;修回:2024-06-10)

(编辑 汪勤俭)