

klotho 通过 IGF-1/PI3K 调控滋养层细胞胰岛素抵抗影响妊娠期糖尿病发生的机制研究

惠淑宁,董利琴

(西安医学院第一附属医院产科,陕西 西安 710003)

[摘要]目的 本研究旨在探讨 klotho 通过 IGF-1/PI3K 信号通路调控滋养层细胞的胰岛素抵抗(IR)影响妊娠期糖尿病(GDM)发生的作用机制。**方法** 利用 The Human Protein Atlas 数据库预测 klotho 在胎盘中的表达情况,使用人胎盘滋养层细胞 HTR-8-Svneo 细胞系建立 IR 模型。使用 shRNA 技术降低 klotho 基因在细胞中的表达。实验分为 4 组:对照组(Control 组)、IR 组、IR+shRNA-klotho 组和 IR+shRNA-klotho-NC 组(IR+shRNA 组阴性对照)。利用 RT-qPCR 检测 klotho mRNA 表达,CCK-8 法评估细胞增殖,TUNEL 法检测细胞凋亡,Western 印记检测相关蛋白表达,并通过葡萄糖摄取实验评估细胞的葡萄糖摄取能力。**结果** 数据库研究显示,klotho 在胎盘中有较高水平的表达。研究发现,与 Control 组相比,IR 组细胞的 klotho mRNA 表达水平显著升高($t=6.063, P<0.001$),24h 与 48h 细胞增殖能力减弱($t=5.312, 8.647, P<0.001$),凋亡率上升($t=6.258, P<0.001$)。而通过 shRNA 转染降低 klotho 表达后,相较于 IR+shRNA-klotho-NC 组,IR+shRNA-klotho 组 24h 与 48h 细胞增殖能力得到改善($t=5.082, 11.092, P<0.001$),凋亡率降低($t=4.640, P<0.001$)。Western 印记检测结果显示,与对照组相比,IR 组细胞中 klotho 蛋白表达量显著升高($t=7.842, P<0.001$),胰岛素样生长因子 1(IGF-1)蛋白表达量显著下降($t=6.950, P<0.001$),且 IGF-1R、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)和 IRS-1 蛋白磷酸化水平也显著下降($t=3.813, 3.075, 8.733, P<0.05$)。降低 klotho 表达后,相较于 IR+shRNA-klotho-NC 组,IR+shRNA-klotho 组细胞 klotho 蛋白表达量则明显下降($t=6.558, P<0.001$),而 IGF-1 明显上升($t=8.206, P<0.001$),IGF-1R、PI3K 和 IRS-1 蛋白磷酸化水平也显著上升($t=4.601, 3.296, 12.326, P<0.05$)。此外,相较于 Control 组,IR 组细胞的葡萄糖摄取量显著降低($t=5.788, P<0.001$),而降低 klotho 表达后,相较于 IR+shRNA-klotho-NC 组,IR+shRNA-klotho 组细胞葡萄糖摄取量显著升高($t=4.173, P<0.001$)。**结论** 降低 klotho 表达可以改善滋养层细胞的 IR,促进滋养层细胞增殖,降低凋亡,并提高葡萄糖摄取能力,并推测是通过 IGF-1/PI3K 信号通路调控产生效应。这些发现为理解和治疗 GDM 提供了新的分子靶点。

[关键词] klotho;胰岛素抵抗;妊娠期糖尿病;IGF-1/PI3K 信号通路;滋养层细胞

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2025.07.005

[中图分类号] R173

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-5293(2025)07-0033-08

Mechanism of klotho gene regulation on insulin resistance in trophoblast cells through IGF-1/PI3K signaling pathway to affect development of gestational diabetes mellitus

HUI Shuning, DONG Liqin

(Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Shannxi Xi'an 710003, China)

[Abstract] **Objective** To explore mechanism by which klotho regulates insulin resistance (IR) in trophoblast cells through insulin like growth factor 1 (IGF-1)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway to affect development of gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** The Human Protein Atlas (HPA) database was used to predict expression of klotho in human placenta. The human placental trophoblast HTR-8-Svneo cell line was used to establish an IR model by treating cells with different concentrations of insulin. The expression of klotho gene in the cells was reduced using shRNA technology. The human placental trophoblast cells in the experiment were divided into four groups: control group, IR group, IR + shRNA-klotho group, and IR + shRNA-klotho-NC group (negative control for IR + shRNA). Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect klotho mRNA expression; CCK-8 reagent assay was used to assess proliferation of the cells; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) was used to detect apoptosis of the cells; Western blotting was used to detect expression of related protein in the cells and glucose uptake test was used to assess glucose uptake capacity of the cells. **Results** The studies from the HPA database show that klotho is expressed at relatively high level in the placenta. In our study, it was found that compared to the control group, expression of klotho mRNA in the trophoblast cells in the

[收稿日期] 2024-12-04

[作者简介] 惠淑宁(1989—),女,主治医师,研究方向:围产医学。

[通讯作者] 董利琴,副主任医师。

IR group was significantly higher ($t=6.063, P<0.001$), while cell proliferation ability weakened at both 24h and 48h ($t=5.312$ and 8.647 respectively, both $P<0.001$), with an increased apoptosis rate ($t=6.258, P<0.001$). After reducing klotho expression through shRNA transfection, compared to the IR+shRNA-klotho-NC group, the proliferation ability of the trophoblast cells in the IR+shRNA-klotho group improved at both 24h and 48h ($t=5.082$ and 11.092 respectively, both $P<0.001$), and the apoptosis rate decreased ($t=4.640, P<0.001$). Western blot analysis showed that expression of klotho protein in the cells in the IR group was significantly higher than that in the control group ($t=7.842, P<0.001$), while expression of IGF-1 protein was significantly lower than that in the control group ($t=6.950, P<0.001$), and phosphorylation levels of IGF-1 receptor (IGF-1R), PI3K, and insulin receptor substrate 1 (IRS-1) were also significantly lower ($t=3.813, P<0.001$; $t=3.075, P=0.003$; $t=8.733, P<0.001$). After the expression of klotho was reduced, the expression amount of IGF-1 protein in the trophoblast cells in the IR+shRNA-klotho group was significantly lower than that in the trophoblast cells in the IR+shRNA-klotho-NC group ($t=6.558, P<0.001$), while the level of IGF-1 and the phosphorylation levels of IGF-1R, PI3K and IRS-1 protein also significantly higher ($t=8.206, P<0.001$; $t=4.601, P<0.001$; $t=3.296, P=0.002$; $t=12.326, P<0.001$). Furthermore, compared to the control group, the glucose uptake of the trophoblast cells in the IR group was significantly lower ($t=5.788, P<0.001$). After the expression of klotho gene was reduced, compared to the IR+shRNA-klotho-NC group, the glucose uptake of the trophoblast cells in the IR+shRNA-klotho group was significantly higher ($t=4.173, P<0.001$). **Conclusion** Reducing expression of klotho gene can improve IR in trophoblast cells, promote cell proliferation, reduce cell apoptosis, and enhance glucose uptake. It is hypothesized that these effects exert through the IGF-1/PI3K signaling pathway. These findings provide new molecular targets for understanding and treating GDM.

[Key words] klotho gene; insulin resistance; gestational diabetes mellitus; IGF-1/PI3K signaling pathway; trophoblast cell

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是孕期首次诊断的高血糖状态, 全球患病率约 14%, 在我国约为 17.5%~18.9%^[1-2]。其发病率随着孕妇体重和年龄增加而上升^[3]。GDM 对母婴健康有短期和长期不良影响, 并使孕妇未来患 II 型糖尿病的风险增加七倍^[4]。此外, GDM 子女也面临更高的心脏代谢疾病风险^[5]。

GDM 的发生受多种因素影响, 包括环境因素和遗传因素, 但其确切的发病机制尚未完全明确^[6-7]。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 被认为是 GDM 一个重要的病理性基础。当机体发生 IR 时, 血液中的葡萄糖难以转运至组织细胞内并进行糖异生作用, 导致血糖浓度升高^[8]。胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 在分子结构上与胰岛素类似, 血液中 IGF-1 过高时可导致高胰岛素环境, 进一步加剧 IR^[9]。活化的 IGF-1 受体和胰岛素受体可磷酸化胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS), 进而激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 及下游的级联反应, 促进细胞摄取葡萄糖, 通路中任何环节发生异常均可能导致 IR 的发生^[5, 9-11]。另外, IR 的发生与胎盘也密切相关。胎盘是在妊娠期形成的一个临时性器官, 可分泌多种激素和细胞因子进入母体循环系统, 其异常分泌促进了母体妊娠期 IR 的发生, 其机制可能与 GDM 孕妇胎盘中胰岛素和 IGF-1

信号过度激活相关^[8]。胎盘滋养层细胞增殖、侵袭和凋亡过程是维持胎盘稳态的关键因素, 其功能异常时可能引发妊娠相关疾病^[12]。

klotho 是在 1997 年发现的与衰老密切相关的基因, 在机体老龄化及相关疾病的调控中扮演着重要角色^[13]。已有研究证明, klotho 在多个生物学过程中发挥作用, 包括心脏功能保护等^[14]。klotho 可介导 IGF-1R/FOXO3a 调控 B 细胞非霍奇金淋巴瘤发生发展过程, 提示 klotho 是 IGF-1R 的上游分子, 且可能具有调节 IGF-1 在体内表达的作用^[15-16]。

本研究将利用人胎盘滋养层细胞 HTR-8-Svneo 细胞系建立 IR 模型, 研究 klotho 调控 IGF-1/PI3K 通路在细胞增殖、细胞凋亡、葡萄糖摄取能力以及胰岛素信号通路中的变化, 以明确其在 IR 中的作用机制, 进一步明确其如何影响 GDM 的发生, 为 GDM 的预防和治疗提供新的视角

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 细胞

人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8-Svneo (CL-0765 武汉普诺赛)。

1.1.2 试剂

HTR-8-Svneo 细胞专用培养基 (CM-0765 武汉

普诺赛);shRNA、阴性对照质粒由生工生物工程(上海)有限公司合成;葡萄糖(Glu)测试盒 Glucose Uptake-Glo™ Assay(J1341 普洛麦格(北京));重组人胰岛素(I8830 北京索莱宝);总 RNA 提取试剂(Trizol)(B511311 上海生工);AMV 反转录试剂盒(B600020 上海生工);CCK-8 试剂盒(CA1210 北京索莱宝);多聚甲醛(P0099 上海碧云天);一步法 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒(E-CK-A320 武汉伊莱瑞特)、抗荧光淬灭剂(E-IR-R119 武汉伊莱瑞特);高效 RIPA 裂解液(R0010 北京索莱宝);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010,上海碧云天);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(P0015 上海碧云天);klotho 抗体(ab181373 上海爱博抗);IGF-1 抗体(ab133542 上海爱博抗);IGF-1R 抗体(ab182408 上海爱博抗);p-IGF-1R 抗体(ab39398 上海爱博抗);PI3K 抗体(ab191606 上海爱博抗);p-PI3K 抗体(ab138364 上海爱博抗);IRS-1 抗体(ab131487 上海爱博抗)和 p-IRS-1 抗体(ab109543 上海爱博抗);IgG 二抗(30000-0-AP 武汉三鹰)。

1.1.3 仪器

恒温细胞培养箱(天津泰斯特);细胞孔板(上海碧云天);多功能酶标仪(TECAN);电泳仪(北京六一);超速离心机(湖南湘仪);超净工作台(苏净安泰)。

1.2 生物信息学分析

通过 The Human Protein Atlas(HPA)数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)分析 klotho 在人体各组织中的表达情况,特别是在胎盘中的表达。

1.3 细胞培养与建模

HTR-8-Svneo 细胞选用专用培养基(RPMI-1640+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素溶液)置于 5%CO₂、37℃细胞培养箱中培养过夜。将 HTR8-S/Vneo 细胞(1×10⁵个/孔)接种到 24 孔板,5%CO₂、37℃条件下培养 24h,待细胞密度达到 80%左右时,

加入不同浓度的胰岛素(0、1、5、10、20、50μmol/L)处理不同时间(24、36、48、60h)诱导细胞产生 IR。然后用相应试剂盒检测各组细胞葡萄糖消耗量,以确定最适胰岛素处理浓度和处理时间。

1.4 转染与分组

1.4.1 转染

将产生胰岛素抵抗的 IR-HTR-8-Svneo 细胞选用专用培养基(RPMI-1640+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素溶液)置于 5%CO₂、37℃细胞培养箱中培养过夜。更换无血清专用培养基,将细胞(1×10⁵个/孔)接种至 24 孔板上,待细胞生长密度达到 80%左右进行转染操作。将 shRNA-klotho 和 shRNA-klotho-NC 质粒分别转染至细胞中,转染成功后更换为专用培养基继续培养。

1.4.2 分组

IR-HTR-8-Svneo 细胞经 shRNA-klotho 和 shRNA-klotho-NC 质粒分别转染后,设为 IR+shRNA-klotho 组和 IR+shRNA-klotho-NC 组。另外设置对照组(无转染,无胰岛素抵抗)和 IR 组(转染,具胰岛素抵抗),用专用培养基培养。

1.5 RT-qPCR 法检测细胞中 klotho mRNA 的表达

收集各组细胞,使用总 RNA 提取试剂(Trizol)提取细胞总 RNA,并参照 AMV 反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用 SYBR green 试剂盒进行 RT-qPCR 反应。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖情况

将 HTR-8S/Vneo 细胞以 4×10³个/孔接种到 96 孔板中,并设置空白对照组,每组包含 5 个重复孔。分别于 0、12、24 和 48 h 向每个孔中添加 10μL 的 CCK-8 试剂,并将 96 孔板置于 37℃培养箱中培养 2h,在 450nm 处用分光光度计测量每孔 OD 值,计算细胞的相对活力。

表 1 klotho 及内参 GAPDH 引物序列

Table 1 Sequences of klotho gene and prime of internal reference protein of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

引物序列	上游引物	下游引物
klotho	5'-AGCAATCTGGTCTGAATAAACTGG-3'	5'-AGCAATCTGGTCTGAATAAACTGG-3'
GAPDH	5'-TGATCTAAAGCCACGCCTCC-3'	5'-GGGACCATTAGTGGGTGAGC-3'

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡情况

将细胞爬片放置于 24 孔培养板中,随后将不同组细胞以每孔 1×10^5 个接种其中,使细胞贴壁于爬片上生长,置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养 24 小时。使用 PBS 溶液洗涤爬片,并浸入 4% 的多聚甲醛固定液中固定 15min。固定后,再次使用 PBS 洗涤爬片,置于 0.2% Triton X-100 通透液中通透 10min。PBS 洗涤爬片,在每个样本上滴加 $100\mu\text{L}$ 的 TdT 平衡缓冲液并置于湿盒中平衡 30min。之后,向每个样本中加入 $50\mu\text{L}$ 的 TdT 标记工作液,在湿盒中避光反应 60min。向样本滴加 DAPI 工作液对细胞核进行染色,室温下避光孵育 5min。最后再加入抗荧光淬灭封片液,使用荧光显微镜观察并记录细胞的荧光图像。

1.8 Western 印记检测 klotho、IGF-1/PI3K 通路及相关蛋白的表达

收集各组细胞并加入 1mL 裂解液,裂解 30min 后, $12\,000\text{r/min}$ 离心 15min,收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转移到 PVDF 膜上,封闭 2h。然后依次加入 klotho($1:1\,000$ 稀释)、IGF-1($1:1\,500$ 稀释)、IGF-1R($1:1\,000$ 稀释)、p-IGF-1R($1:500$ 稀释)、PI3K($1:1\,000$ 稀释)、p-PI3K($1:500$ 稀释)、IRS-1($1:500$ 稀释)、p-IRS-1($1:1\,000$ 稀释)一抗,在 4°C 下孵育过夜。洗去一抗,用对应二抗在室温下孵育 2 小时以增强检测信号。洗去二抗,扫描胶片并使用 Image J 软件对目标条带光密度值进行分析,以 GAPDH 为参

照,计算各蛋白的相对表达量。

1.9 细胞葡萄糖吸收检测

取各组细胞接种于 96 孔培养板中,培养 24h。用试剂盒检测细胞对葡萄糖的摄取量,并计算各组细胞葡萄糖消耗量。

1.10 统计学方法

采用 Graphpad prism 9 软件进行统计学分析,数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,独立实验至少重复三次。当 $P < 0.05$ 时,被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Klotho 在胎盘中的表达情况

HPA 数据库显示,klotho RNA 及蛋白质在胎盘组织中具有一定水平的表达,见图 1~2。

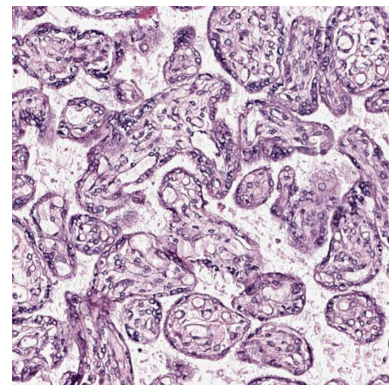


图 1 klotho 蛋白在胎盘组织中的表达情况(HPA 数据库)

Fig.1 Expression of klotho protein in human placental tissues (from HPA database)

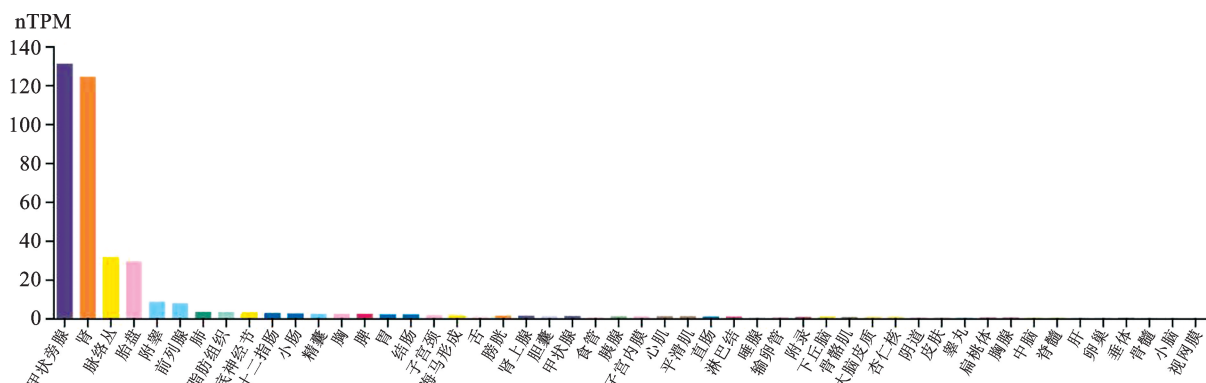


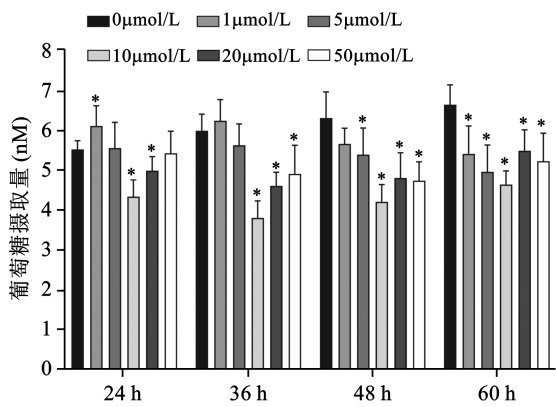
图 2 klotho RNA 在人体各组织中的表达情况(HPA 数据库)

Fig.2 Expression of klotho RNA in different human body tissues (from HPA database)

2.2 胰岛素抵抗 HTR-8-Svneo 细胞模型构建

经过 $10\mu\text{mol/L}$ 、36h 处理的 HTR8-SVneo 细

胞对葡萄糖摄取量最少,与 36h 、 $0\mu\text{mol/L}$ 组相比存在统计学差异 ($t = 9.061, P < 0.001$),见图 3。



注:与 0 μ mol/L 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 不同浓度胰岛素处理 HTR-8-Svneo 细胞
不同时间后对葡萄糖摄取量的影响

Fig.3 Effect on glucose uptake of HTR-8/SVneo cells
at different time points after being treated
with different concentrations of insulin

2.3 各组细胞 klotho mRNA 表达水平

RT-qPCR 检测各组 HTR-8-Svneo 细胞 klotho mRNA 的相对表达水平,实验发现,与 control 组相比,IR 组细胞 klotho mRNA 的相对表达水平显著升高($t = 6.063, P < 0.001$);与 IR + shRNA-klotho-NC 组相比,IR + shRNA-klotho 组细胞 klotho

mRNA 的相对表达水平明显降低($t = 4.068, P < 0.001$);IR 组与 IR + shRNA-klotho-NC 组无明显差异($P > 0.05$),见表 2。

表 2 各组细胞 klotho mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression levels of klotho mRNA in the
trophoblast cells in the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	klotho mRNA
Control 组	0.767 $\pm$ 0.082
IR 组	1.183 $\pm$ 0.147 *
IR+shRNA-klotho-NC 组	1.133 $\pm$ 0.121
IR+shRNA-klotho 组	0.817 $\pm$ 0.117 [#] Δ

注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 IR 组比较, [#] $P < 0.05$;与 IR + shRNA-klotho-NC 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 各组细胞增殖能力比较

四组细胞在 0h 时未观察到细胞活力有差异($P > 0.05$)。在 24、48h 时,相较于 Control 组,IR 组细胞活力显著降低($t = 5.312、8.647, P < 0.001$)。相较于 IR + shRNA-klotho-NC 组,IR + shRNA-klotho 组细胞活力则明显升高($t = 5.082、11.092, P < 0.001$)。IR 组和 IR + shRNA-klotho-NC 组细胞活力无明显差异($P > 0.05$),表 3。

表 3 各组细胞活力、凋亡率水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Viability and apoptosis rate of the trophoblast cells in the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力(%)			凋亡率(%)
	0h	24h	48h	
Control 组	50.17 $\pm$ 9.75	100.67 $\pm$ 14.01	136.00 $\pm$ 11.01	6.22 $\pm$ 0.99
IR 组	49.50 $\pm$ 8.31	64.50 $\pm$ 9.05 *	89.50 $\pm$ 7.23 *	11.05 $\pm$ 1.32 *
IR+shRNA-klotho-NC 组	50.83 $\pm$ 7.14	69.83 $\pm$ 10.13 *	85.17 $\pm$ 3.31 *	10.37 $\pm$ 1.91 *
IR+shRNA-klotho 组	50.50 $\pm$ 4.14	101.33 $\pm$ 11.31 [#] Δ	130.17 $\pm$ 9.37 [#] Δ	6.78 $\pm$ 0.88 [#] Δ

注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 IR 组比较, [#] $P < 0.05$;与 IR + shRNA-klotho-NC 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.5 各组细胞凋亡情况比较

相较于 Control 组,IR 组细胞凋亡率显著升高($t = 6.258, P < 0.001$)。相较于 IR + shRNA-klotho-NC 组,IR + shRNA-klotho 组细胞凋亡率降低($t = 4.640, P < 0.001$)。IR 组和 IR + shRNA-klotho-NC 组细胞凋亡率则无明显差异($P > 0.05$)。见图 4,表 3。

2.6 各组细胞 klotho、IGF-1/PI3K 通路及相关蛋白的表达水平

与 Control 组比较,IR 组细胞 klotho 蛋白表达

量显著升高($t = 7.842, P < 0.001$),IGF-1 蛋白表达量则显著下降($t = 6.950, P < 0.001$),IGF-1R、PI3K 和 IRS-1 蛋白磷酸化水平也显著下降($t = 3.813、3.075、8.733, P < 0.05$)。相较于 IR + shRNA-klotho-NC 组,IR + shRNA-klotho 组细胞 klotho 蛋白表达量则明显下降($t = 6.558, P < 0.001$),IGF-1 明显上升($t = 8.206, P < 0.001$),IGF-1R、PI3K 和 IRS-1 蛋白磷酸化水平也显著上升($t = 4.601、3.296、12.326, P < 0.05$)。IR 组和 IR + shRNA-klotho-NC 组细胞蛋白表达量无明显差异($P > 0.05$),见图 5。

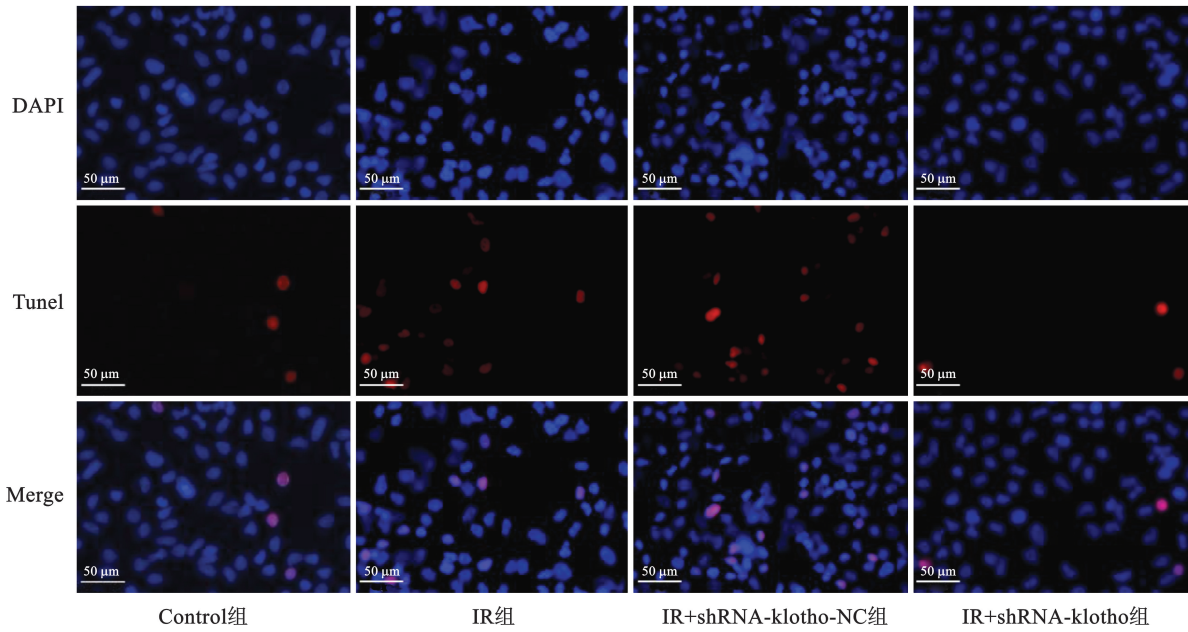


图 4 各组细胞凋亡情况比较

Fig.4 Apoptosis of the trophoblast cells in the four groups by TUNEL staining

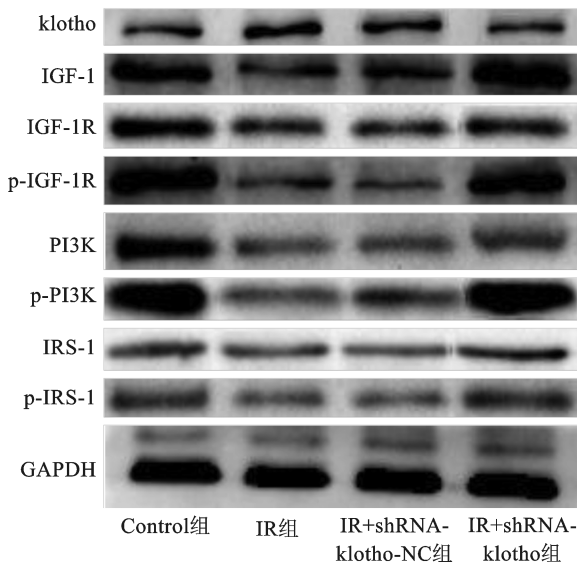


图 5 各组细胞 klotho、IGF-1、IGF-1R、p-IGF-1R、PI3K、p-PI3K、IRS-1、p-IRS-1 的相对表达量

Fig.5 Relative expression amounts of klotho, IGF-1, IGF-1R, p-IGF-1R, PI3K, p-PI3K, IRS-1 and p-IRS-1 in the trophoblast cells in the four groups

2.7 各组细胞葡萄糖摄取情况比较

相较于 Control 组, IR 组细胞葡萄糖摄取量显著降低($t=5.788, P<0.001$)。相较于 IR+shRNA-klotho-NC 组, IR+shRNA-klotho 组细胞葡萄糖摄取量显著升高($t=4.173, P<0.001$)。IR 组和 IR+shRNA-klotho-NC 组比较则无明显差异($P>0.05$), 表 4。

表 4 各组细胞葡萄糖摄取情况($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Glucose uptake of the trophoblast cells in the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	Control 组	IR 组	IR+shRNA-klotho-NC 组	IR+shRNA-klotho 组
葡萄糖摄取量(nmol/L)	6.93 ± 1.19	$4.03 \pm 0.30^*$	$4.42 \pm 0.76^*$	$5.97 \pm 0.50^{\# \Delta}$

注:与 Control 组比较, $^* P<0.05$;与 IR 组比较, $^{\#} P<0.05$;与 IR+shRNA-klotho-NC 组相比, $^{\Delta} P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 GDM 的背景与病理机制

GDM 是妊娠期妇女血糖异常最为常见的一种病症,由遗传及环境因素共同导致,严重影响母婴健康。年龄、产次、糖尿病家族史、多囊卵巢综合征、肥胖被认为是妊娠期妇女 GDM 的独立危险因素^[17]。GDM 的病理机制尚未完全明确,但 IR 是其主要的病理学特征。在正常的妊娠过程中,葡萄糖优先被发育中的胎儿利用,导致母体的胰岛素敏感性逐渐降低。这种 IR 通常从妊娠中期开始出现,并在妊娠晚期加剧。当胰岛 β 细胞的功能无法代偿不断增加的 IR 时, GDM 便可能发生^[5]。因此,积极寻找 IR 相关治疗靶点,对于更深入认识 GDM 的发病机制及更好地改善 GDM 患者临床治疗及预后均具有十分重要的意义。

3.2 Klotho 基因的基本特性与生物学作用

klotho 作为一个衰老基因被人类所发现,序列全长约 50kb,含有 5 个外显子和 4 个内含子。klotho 主要表达于远端肾小管及脑脉络丛,甲状旁腺、前列腺、胎盘等组织也有一定表达,在机体中起着抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡、抗纤维化等多种生物学效应^[18]。随着近年来研究的深入,人们发现 klotho 与多种恶性肿瘤的发病机制密切相关,如乳腺癌^[19]、甲状腺癌^[20]、肝癌^[21]、卵巢癌^[22]等。研究发现,klotho 在 A549 肺癌细胞系中的表达较低,而 klotho 过表达对 A549 细胞的增殖表现出抑制作用,推测其机制可能与激活促凋亡的 Bim 蛋白和抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关^[23]。例如,李媛等^[24]发现 klotho 表达上调可抑制 PI3K/AKT 通路的活化。杨莎莎等^[25]同样证实了 klotho 可以改善高糖作用下肾小球系膜细胞的活力,降低凋亡率,并加强细胞抗氧化能力以及减少炎症反应,其机制可能部分通过激活 PI3K/AKT 通路以抑制细胞内质网应激,从而对肾小球系膜细胞发挥保护作用。本研究通过 HPA 数据库证实了 klotho 在胎盘中具有一定水平的表达。本研究结果显示,产生 IR 的 HTR-8-Svneo 细胞中 klotho 表达量明显升高,细胞活力下降,凋亡率增高。shRNA-klotho 质粒转染的 HTR-8-Svneo 细胞中 klotho 表达量下降,细胞活力和凋亡率相较于 IR 组得到明显改善。这提示 klotho 对产生 IR 的滋养层细胞具有保护作用。

3.3 Klotho 通过调节 IGF-1/PI3K 信号通路在妊娠期糖尿病中的潜在作用

klotho 能够特异性与胰岛素受体和 IGF-1 受体结合,阻止其磷酸化,导致胰岛素和 IGF-1 细胞内信号传导减弱,表现为对这些激素的敏感性降低,从而诱导了 IR^[26]。胰岛素通路的激活依赖于一系列蛋白分子的磷酸化级联反应,当细胞对胰岛素和 IGF-1 的反应下降时,也减少其下游分子 IRS、PI3K 及 Akt 的磷酸化。PI3K/Akt 信号通路是经典的调控细胞合成和代谢的信号通路,在细胞增殖、分化、凋亡等多个生物过程中发挥重要作用。Lin 等^[27]研究也发现 klotho 的表达上调加重了 GDM 滋养层细胞的 IR,可能通过 IGF-1/PI3K/Akt/mTOR 通路介导。本研究结果显示,产生 IR 的 HTR-8-Svneo 细

胞内 IGF-1、IGF-1R、p-IGF-1R、PI3K、p-PI3K、IRS-1、p-IRS-1 蛋白表达量显著下降,细胞对葡萄糖摄取能力也减弱。而 shRNA-klotho 质粒转染的 HTR-8-Svneo 细胞中 IGF-1、IGF-1R、p-IGF-1R、PI3K、p-PI3K、IRS-1、p-IRS-1 蛋白表达量明显提升,对葡萄糖摄取能力也得到改善。这与上述结果相似。

3.4 研究局限

本研究探讨了 klotho 通过 IGF-1/PI3K 信号通路对滋养层细胞 IR 的影响,为深入解析 GDM 的发病机制提供了新的视角。然而,该研究也存在一些不足之处。首先,本研究主要在体外细胞模型中进行,其结果需要在体内模型或临床样本中进一步验证。其次,尽管研究观察到了 klotho 表达变化对 IR 及相关信号通路的影响,但对于 klotho 在 GDM 中的具体作用机制和临床应用的可行性仍需更深入的研究。因此,未来的研究需要在更广泛的层面上评估 klotho 在 GDM 中的作用,并探索其在临床治疗中的潜在应用。

3.5 结论

综上所述,本研究通过体外实验模型揭示了 klotho 在调节滋养层细胞 IR 中的重要作用,并指出 klotho 通过 IGF-1/PI3K 信号通路对其具有显著影响。研究结果表明,降低 klotho 在细胞中的表达能够抑制细胞凋亡、促进增殖和葡萄糖摄取能力,改善滋养层细胞的 IR 状态,这为 GDM 的预防和治疗提供了新的分子靶点和理论基础。

[参考文献]

- [1]Liu Y, Li D Y, Bolatai A, et al. Progress in research on biomarkers of gestational diabetes mellitus and preeclampsia[J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 2023;3807-3815.
- [2]Wang H, Li N, Chivese T, et al. IDF diabetes atlas: estimation of global and regional gestational diabetes mellitus prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria[J]. Diabetes research and clinical practice, 2022, 183: 109050.
- [3]蔡丽萍, 林珊, 姚观昀. 妊娠年龄及孕早期糖耐量水平与妊娠期糖尿病的关系探究[J]. 糖尿病新世界, 2022, 25(18): 47-50.
- [4]You H, Hu J, Liu Y, et al. Risk of type 2 diabetes mellitus

- after gestational diabetes mellitus: A systematic review & meta-analysis[J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2021, 154(1): 62-77.
- [5] Ruszała M, Niebrzydowska M, Pilszyk A, et al. Novel biomolecules in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11578.
- [6] 周华. 妊娠期糖尿病发病机制相关研究进展[J]. *实用妇产科内分泌电子杂志*, 2021, 8(18): 42-46.
- [7] Onat T, Demir Caltekin M, Turksoy V A, et al. The relationship between heavy metal exposure, trace element level, and monocyte to HDL cholesterol ratio with gestational diabetes mellitus [J]. *Biological trace element research*, 2021, 199(4): 1306-1315.
- [8] 崔佳玉, 赵文芳. 妊娠期胰岛素抵抗发生机制研究进展[J]. *中国医药导刊*, 2024, 26(2): 165-170.
- [9] Li X, Lin S, Yang X, et al. When IGF-1 Meets Metabolic Inflammation and Polycystic Ovary Syndrome[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 138: 112529.
- [10] 郝玉洁, 张军. 妊娠期糖尿病发病机制的研究现状及进展[J]. *中国医药*, 2023, 18(10): 1587-1591.
- [11] 赖玉婷, 葛莉, 黄萍萍, 等. PI3K/AKT 信号通路在妊娠期糖尿病中的作用研究进展[J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(1): 234-7.
- [12] 钱利强, 潘熠斌, 王佩欣, 等. 复发性自然流产患者绒毛中滋养层细胞的变化[J]. *全科医学临床与教育*, 2022, 20(5): 413-415, 380.
- [13] Abraham C R, Li A. Aging-suppressor Klotho: Prospects in diagnostics and therapeutics [J]. *Ageing Research Reviews*, 2022, 82: 101766.
- [14] 王一平, 医学分子生物学. Klotho 通过调控巨噬细胞极化延缓心脏衰老的作用及机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2025.
- [15] Feng L, Li B, Xi Y, et al. Aerobic exercise and resistance exercise alleviate skeletal muscle atrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt pathway in mice with myocardial infarction[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2022, 322(2): C164-C176.
- [16] 蔡新喜, 谢巧金. 血清 GH、IGF-1、klotho 水平与儿童生长发育的关系[J]. *医学理论与实践*, 2023, 36(17): 3008-3009, 3028.
- [17] 张蕾, 连文文. 妊娠期糖尿病流行病学特征及危险因素分析[J]. *中国公共卫生管理*, 2024, 40(3): 416-418, 425.
- [18] 刘伟霞, 王栋, 胡晓舟, 等. 百令胶囊联合羟苯磺酸钙胶囊治疗糖尿病肾病的临床效果及对患者血清 α -klotho 蛋白, YKL-40, Vaspain 水平的影响[J]. *联勤军事医学*, 2021, 35(12): 877-880.
- [19] Shmulevich R, Nissim T B K, Wolf I, et al. Klotho rewires cellular metabolism of breast cancer cells through alteration of calcium shuttling and mitochondrial activity[J]. *Oncogene*, 2020, 39(24): 4636-4649.
- [20] Wu Q, Jiang L, Wu J, et al. Klotho Inhibits Proliferation in a RET Fusion Model of Papillary Thyroid Cancer by Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway[J]. *Cancer Management Res*, 2021, 13: 4791-4802.
- [21] Chi Z, Teng Y, Liu Y, et al. Association between klotho and non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis based on the NHANES 2007-2016[J]. *Annals of Hepatology*, 2023, 28(5): 101125.
- [22] Al-Zahrani M H, Yahya F M, Assidi M, et al. Klotho promoter methylation status and its prognostic value in ovarian cancer[J]. *Molecular and Clinical Oncology*, 2021, 15(3): 181.
- [23] Matsumoto M, Ogawa N, Fukuda T, et al. Protein interaction networks characterizing the A549 cells Klotho transfected are associated with activated pro-apoptotic Bim and suppressed Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 2130.
- [24] 李媛, 孙锁锋. 山茱萸多糖通过上调 klotho 表达和抑制 PI3K/AKT 通路对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响[J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(10): 2887-2893.
- [25] 杨莎莎, 周利. Klotho 通过激活 PI3K/AKT 通路抑制肾小球系膜细胞内质网应激介导的细胞凋亡研究[J]. *四川医学*, 2019, 40(10): 1010-1016.
- [26] Gao X K, Rao X S, Cong X X, et al. Phase separation of insulin receptor substrate 1 drives the formation of insulin/IGF-1 signalosomes [J]. *Cell discovery*, 2022, 8(1): 60.
- [27] Lin L, Wang X, Zhao W, et al. Upregulation of Klotho aggravates insulin resistance in gestational diabetes mellitus trophoblast cells[J]. *Genetics Research*, 2022, 2022(1): 1500768.

[专业责任编辑: 米 阳]

[中文编辑: 刘昕田; 英文编辑: 杨周岐]