DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20260211

高糖损伤对成骨细胞铁死亡及纤毛改变诱导骨质疏松的机制研究

常业飞，李伟*

（云南省第三人民医院，云南 昆明 650011）

【摘要】目的 探究高糖损伤诱导成骨细胞死亡的骨质疏松机制。**方法** 研究对象选取SD大鼠24只及成骨细胞（MC3T3-E1）。大鼠随机分为对照组及研究组各12只，对照组给予安慰剂，研究组建立糖尿病骨质疏松模型；成骨细胞随机分为正常组（12个样本）、高糖组（6个样本）、高糖+METTL3抑制组（6个样本）。检测两组大鼠骨矿物质密度（BMC），骨矿物质含量（BMD），血清碱性磷酸酶（ALP）、骨钙素（OCN）、铁蛋白水平；观察大鼠骨组织中ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA表达。观察各组细胞ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1蛋白表达及细胞纤毛状态。**结果** 动物实验结果显示，研究组BMC、BMD、血清OCN、ALP水平低于对照组，血清铁蛋白水平高于对照组（P<0.05）；免疫组化结果显示，SLC7A11和GPX4蛋白在对照组中高表达，而在研究组中低表达；蛋白印迹分析和qRT-PCR结果显示，研究组ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA相对表达低于对照组（P<0.05）。细胞实验结果显示，高糖组ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白相对表达显著低于正常组、高糖+METTL3抑制组（P<0.05），正常组和高糖+METTL3抑制组比较差异无统计学意义（P>0.05）；高糖组METTL3、ASK1蛋白相对表达显著高于正常组、高糖+METTL3抑制组（P<0.05），正常组和高糖+METTL3抑制组比较差异无统计学意义（P>0.05）。免疫荧光检测结果显示，正常组细胞中细胞纤毛旺盛，高糖组表现为纤毛数量减少及长度降低，高糖+METTL3抑制逆转了高糖引起的纤毛数量及长度变化。**结论** 高糖损伤诱导的成骨细胞存在铁死亡及细胞纤毛减少，高糖损伤引起的骨质疏松机制可能与METTL3/ASK1细胞通路引起的铁死亡及纤毛改变有关。

【关键词】高糖损伤；成骨细胞；骨质疏松；作用机制；METTL3；ASK1

中图分类号：R587.1，R681　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096−8965（2026）02−0086−07

Mechanism of osteoporosis induced by high glucose injury through osteoblast ferroptosis and ciliary changes

Chang Yefei, Li Wei*

(The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650011, Yunnan, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of high glucose-induced osteoblast cell death and osteoporosis. **Methods** Twenty-four SD rats and osteoblasts (MC3T3-E1) were included in the study. The rats were randomly divided into control group (n=12) and study group (n=12). The control group was given placebo, and a diabetic osteoporosis model was established in the study group. Osteoblasts were randomly divided into normal group (12 cell samples), high glucose group (6 cell samples), and high glucose + METTL3 inhibition group (6 cell samples). BMC, BMD, the levels of ALP, OCN, and ferritin in serum were measured; the relative protein and mRNA expressions of ALP, Runx2, SLC7A11, and GPX4 in bone tissue of rats were observed. The protein expressions of ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1, and the condition of cell cilia were observed in the three groups of cells. **Results**

收稿日期：2025-08-21；**修回日期：**2025-11-14

基金项目：云南省科技计划项目（202101BA070001-225）

通信作者：李 伟（1978-），男，湖北武汉人，副主任医师，主要从事糖尿病内分泌方面研究，E-mail：894214847@qq.com

The results of animal experiments showed that the study group had significantly lower BMC, BMD, and serum OCN and ALP levels and a significantly higher serum ferritin level than the control group (P<0.05). Immunohistochemical showed that SLC7A11 and GPX4 were highly expressed in the control groups but were significantly decreased in the study group. Western blotting and qRT-PCR showed that the relative expressions of ALP, Runx2, SLC7A11, and GPX4 protein and mRNA in the study group were lower than those in the control group (P<0.05). Cell experiments showed that the relative expressions of ALP, Runx2, SLC7A11, and GPX4 proteins in the high glucose group were significantly lower than those in the normal group and the high glucose + METTL3 inhibition group (P<0.05). There was no significant difference between normal group and high glucose + METTL3 inhibition group (P>0.05). The relative expressions of METTL3 and ASK1 proteins in the high glucose group were significantly higher than those in the normal group and the high glucose + METTL3 inhibition group (P<0.05). There was no significant difference between normal group and high glucose + METTL3 inhibition group (P>0.05). Immunofluorescence results showed that the cell cilia were abundant in the normal group, the number and length of cilia in the high glucose group were decreased, and high glucose + METTL3 inhibition reversed the changes in the number and length of cilia caused by high glucose. **Conclusion** High glucose induces ferroptosis and cilia reduction in osteoblasts, and the mechanism of osteoporosis induced by high glucose may be related to ferroptotic cell death and ciliary changes caused by the METTL3/ASK1 signaling pathway.

【**Keywords**】High glucose injury; Osteoblast; Osteoporosis; Mechanism of action; METTL3; ASK1

糖尿病和骨质疏松症既存在因果关系，也可由同一类诱因引发，如糖皮质激素诱导的糖尿病和骨质疏松症，越来越多的证据表明糖尿病与骨质疏松症之间的相关性，同时表明糖尿病是骨质疏松症发生的独立危险因素，糖尿病患者中骨质疏松症发病率是非糖尿病患者的4～5倍[1-3]。骨质疏松症是骨质净流失和/或骨形成和吸收之间平衡紊乱导致的微结构异常的结果。骨质疏松症的机制涉及各个方面且尚未阐明[4-5]。铁死亡是一种新型的程序性细胞死亡，已被证明是小鼠骨质流失的原因，而骨质流失与骨质疏松症密切相关[6]。铁元素失调在糖尿病患者中也很常见，铁元素平衡失衡是导致骨质疏松的关键因素，高糖条件下二价金属转运蛋白1的表达增加诱导铁死亡，引发成骨细胞自噬和凋亡，导致成骨功能受损。此外，有研究指出初级纤毛在促进骨形成过程中发挥着重要作用，且糖尿病在骨折愈合过程中会影响成骨细胞纤毛形成进而干扰骨折愈合[7]。本文基于铁死亡及纤毛损伤探究高糖损伤诱导成骨细胞死亡的骨质疏松机制。

1 材料与方法

1.1 材料

样本来源：实验选取SD大鼠24只，3月龄，体质量300～400 g，动物生产许可证号：SCXK（沪）2020-0004。样本量计算方法：

$$n = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 \times 2\sigma^2}{\delta^2}$$

本研究中α=0.05，β=0.10，σ=1.36，δ=2.55，计算得最小样本量为6例。本研究方案经云南省第三人民医院伦理委员会批准（批号：20231224）。

成骨细胞（MC3T3-E1）来自普诺赛生物有限公司，样本获取后于6孔板中培养。

主要试剂：METTL3抑制物（中国上海GenePharma公司，1014315）；膜联蛋白V-FITC/PI凋亡检测试剂盒（北京生物海洋生物技术有限公司，232705）；SLC7A11（赛默飞世尔科技公司，PAB15842）、GPX4（赛默飞世尔科技公司，2880S）、METTL3（赛默飞世尔科技公司，A00191）、ASK1（赛默飞世尔科技公司，MA5-15861）、ALP（赛默飞世尔科技公司，PA5-106391）、OCN（赛默飞世尔科技公司，MA1-20786）、β-actin（赛默飞世尔科技公司，MA1-140）一抗（赛默飞世尔科技公司，P1-417）；DyNAmo HS SYBR Green qPCR试剂盒（赛默飞世尔科技公司，PP-245）；免疫组化染色试剂盒（赛默飞世尔科技公司，PAS-525）。

主要仪器：双能X射线骨密度仪（美国Hologic公司，HX-223）；Coulter型高速冷冻离心机（美国Beckman公司，ZZ1402）；SpectraMax M5型多功能

酶标仪（美国Molecular Devices公司，HDX175）等。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

大鼠随机分为对照组和研究组，每组12只。对照组饲喂正常饮食16周，研究组饲喂高糖/高脂饮食16周。16周时，研究组腹腔注射链脲佐菌素（Streptozotocin，STZ），剂量为30 mg/kg体重，对照组腹腔注射等量生理盐水。连续3 d血糖水平超过16.7 mmol/L，2～4周仍超过16.7 mmol/L被认为是糖尿病模型建立成功。注射STZ后继续饲喂该饲料16周，出现骨质流失表型为糖尿病骨质疏松模型建立成功。大鼠取外周静脉血待检，处死后取第4腰椎，零下80℃保存待测。

1.2.2 细胞干预方案

取成骨细胞（MC3T3-E1细胞系）样本，在6孔板中培养，随机分为正常组（12个样本）、高糖组（6个样本）、高糖+METTL3抑制组（6个样本），正常组行常规培养；高糖组连续暴露于25 mmol/L葡萄糖和0.2 mmol/L棕榈酸；高糖+METTL3抑制组在高糖组基础上加用METTL3抑制剂。所有细胞连续干预14 d。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 骨矿物质密度和含量检测

处死前，大鼠腹腔注射10%水合氯醛（0.03 mL/kg）麻醉，使用双能X射线骨密度仪评估骨矿物质密度（Bone Mineral Density，BMD）和骨矿物质含量（Bone Mineral Content，BMC）。

1.2.3.2 酶联免疫吸附试验

取大鼠外周静脉血，低速离心后去上清液，使用酶联免疫吸附试验检测血清ALP、OCN、铁蛋白水平。

1.2.3.3 免疫组化染色

将载玻片干燥，取大鼠第4腰椎组织切片，二甲苯、乙醇脱蜡。100℃下行载玻片表位检索，煮沸30 min后用3%过氧化氢孵育。切片用5%的BSA阻断，SLC7A11、GPX4一抗孵育过夜。采用缺乏特异性靶结合的同型对照抗体对正常大鼠骨组织染色，排除假阳性结果。山羊抗兔二抗孵育并用3,3-二氨基联苯胺染色。反应结束时，用哈里斯苏木精反染色。用95%和100%乙醇和二甲苯洗涤脱水后，用永久贴载介质覆盖组织切片，光学显微镜下观察。

1.2.3.4 免疫荧光实验

用PBS洗涤细胞并用4%多聚甲醛固定。固定细胞用0.05% Triton X-100透化，然后与乙酰化α-微管蛋白一抗（T6793）在4℃下孵育过夜，与Alexa Fluor 647缀合的抗小鼠抗体作为检测纤毛的二抗。将结果与匹配的对照抗体进行比较。

1.2.3.5 RNA分离和定量逆转录PCR（qRT-PCR）

将大鼠的第4腰椎骨组织置于1 mL组织裂解缓冲液里，使其充分裂解。裂解后的组织置于冰浴环境中的玻璃研磨器内，细致研磨至形成均匀的匀浆状态。将匀浆置于4℃条件下裂解30 min后，离心20 min。对于成骨细胞，同样先使用1 mL组织裂解缓冲液进行裂解处理后离心。之后，运用TRIzol试剂从离心后的样本中提取总RNA。获取总RNA后，利用Hifair Ⅲ第一链cDNA合成Super Mix试剂，将RNA逆转录合成为cDNA。在定量PCR检测环节，选用Mx3000P Real-Time PCR系统，并采用Hieff qPCR SYBR Green Master Mix试剂，严格按照试剂制造商提供的操作说明，开展定量实时PCR实验。*β-actin*作为内参基因。依据$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法对实验数据进行计算分析。使用的引物如下：

SLC7A11 正义：5'-GGTCCATTACCAGCTTTTGTACG-3'，

反义：5'-AATGTAGCGTCCAAATGCCAC-3'；

GPX4 正义：5'-GGGCTACAACGTCAAATTCG-3'，

反义：5'-TCCACTTGATGGCATTTCCC-3'；

ALP 正义：5'-AGAACAGAACTGATGTGGAATATGAA-3'，

反义：5'-CAGTGCGGTTCCAGACATAGT-3'；

Runx2 正义：5'-TTCAAGGTTGTAGCCTCGGAG-3'，

反义：5'-TCAAAGTGAAACTCTTGCCTCGT-3'；

β-actin 正义：5'-AGCCATCTACGTAGCCATCCA-3'，

反义：5'-TATCCGGAGTCCATCACGTG-3'。

1.2.3.6 蛋白质印迹分析

选取大鼠的第4腰椎骨组织，置于1 mL组织裂解缓冲液内裂解。随后转移至冰浴环境玻璃研磨器内，充分研磨至形成匀浆。4℃持续裂解30 min，离心20 min。成骨细胞同样裂解后离心。之后，采用添加了1%苯基甲基磺酰氟的RIPA裂解缓冲液，对成骨细胞中的蛋白质进行提取。提取得到的蛋白质样本，通过蛋白质转印技术转移到PVDF膜上。转印完成后，使用含5%脱脂奶粉的Tris缓冲盐水（其中含有0.05% Tween-20，即TBST）对PVDF膜进行封闭处理，以减少非特异性结合。封闭结束后，将PVDF膜分别与针对SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1、ALP、OCN以及β-actin等靶蛋白的一抗在室温条件下共同孵育过夜，使一抗与相应靶蛋白充分结合。孵育结束后，用TBST对PVDF膜进行多次洗涤，以去除未结合的一抗。之后，将PVDF膜与二抗

IgG在室温下共同孵育2 h，使二抗与一抗结合。孵育完成后，将PVDF膜浸入增强型化学发光溶液中，使结合在膜上的抗体–抗原复合物产生化学发光信号。随后，在无光的暗室环境中对PVDF膜进行显影处理，显影完成后，仔细观察膜上的条带，并使用成像设备进行拍照记录。以β-actin作为标准，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS21.0软件进行统计分析。计量资料以平均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用独立样本t检验，多组比较使用单因素方差分析，多重比较采用LSD-t检验，P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠BMC、BMD、血清OCN、ALP、铁蛋白水平比较

研究组BMC、BMD、血清OCN、ALP水平低于对照组，血清铁蛋白水平高于对照组（P<0.05）（见表1）。

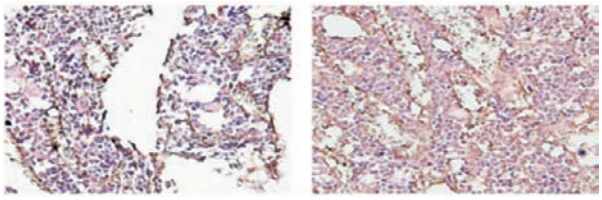
2.2 免疫组化染色结果

免疫组化研究显示，使用SLC7A11和GPX4（两种主要的铁死亡抑制标记蛋白）的特异性抗体时，观察到SLC7A11和GPX4高表达，而在糖尿病大鼠骨组织中明显降低。提示糖尿病骨质流失大鼠骨组织中可能存在铁死亡。检测染色图像见图1。

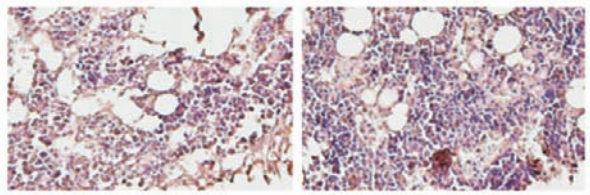
表1 两组大鼠BMC、BMD、血清OCN、ALP、铁蛋白水平比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 1 Comparison of BMC, BMD, serum OCN, ALP, and ferritin levels between two groups of rats

组别	BMC（g）	BMD（g/cm²）	OCN（ng/mL）	ALP（ng/mL）	铁蛋白（μg/dL）
对照组	0.38±0.03	1.17±0.05	7.05±1.14	17.23±2.06	79.21±5.04
研究组	0.29±0.02	1.11±0.04	3.92±1.03	7.41±1.34	162.37±7.25
t	8.647	3.246	7.057	13.842	32.626
P	<0.001	0.040	<0.001	<0.001	<0.001



A：两组SLC7A11表达



B：两组GPX4表达

注：左侧为对照组，右侧为研究组。

图1 两组大鼠SLC7A11、GPX4表达（×200，标尺=100 μm）

Figure 1 Expression of SLC7A11 and GPX4 in two groups of rats

2.3 两组大鼠ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA相对表达

研究组ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA相对表达低于对照组（P<0.05）（见表2），蛋白印迹图见图2。

2.4 各组细胞ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1蛋白相对表达

高糖组ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白相对表达显著低于正常组、高糖+METTL3抑制组（P<0.05），正常组和高糖+METTL3抑制组比较差异无统计学意义（P>0.05）（见表3），蛋白印迹图见图3A、3B；高糖组METTL3、ASK1蛋白相对表达显著高于正常组、高糖+METTL3抑制组（P<0.05），正常组和高糖+METTL3抑制组比较差异无统计学意义（P>0.05）（见表3），蛋白印迹图见图3C。

表2 两组大鼠ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA相对表达（$\bar{x} \pm s$）

Table 2 Relative protein and mRNA expressions of ALP, Runx2, SLC7A11, and GPX4 in rats of two groups

组别	ALP		Runx2		SLC7A11		GPX4	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
对照组	0.99±0.10	1.01±0.10	1.02±0.10	1.04±0.09	1.23±0.12	1.19±0.12	0.86±0.09	0.89±0.09
研究组	0.54±0.05	0.56±0.06	0.75±0.08	0.76±0.08	0.78±0.08	0.73±0.07	0.41±0.04	0.45±0.05
t	13.943	13.367	7.304	8.055	10.809	11.470	15.828	14.804
P	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



A：两组ALP、Runx2蛋白表达　　B：两组SLC7A11、GPX4蛋白表达

图2　两组大鼠ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白表达

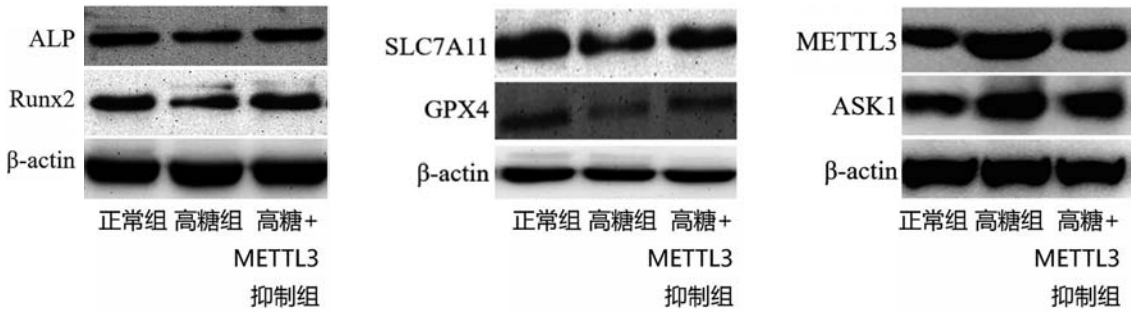
Figure 2　Protein expression of ALP, Runx2, SLC7A11, and GPX4 in two groups of rats

表3　各组细胞ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1蛋白相对表达比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 3　Comparison of relative protein expression of ALP, Runx2, SLC7A11, GPX4, METTL3, and ASK1 in each group of cells

组别	ALP	Runx2	SLC7A11	GPX4	METTL3	ASK1
对照组	0.76±0.07*	1.04±0.10*	0.95±0.10*	1.01±0.11*	0.51±0.05*	0.84±0.09*
高糖组	0.42±0.05	0.81±0.08	0.61±0.06	0.73±0.07	0.86±0.09	1.52±0.16
高糖+METTL3抑制组	0.75±0.07*	1.05±0.11*	0.93±0.09*	0.99±0.10*	0.49±0.05*	0.89±0.09*
F	109.561	23.284	60.387	32.533	118.992	123.703
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：*表示与高糖组比较，*P*<0.05。



A：ALP、Runx2蛋白表达　　B：SLC7A11、GPX4蛋白表达　　C：METTL3、ASK1蛋白表达

图3　各组细胞ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4、METTL3、ASK1蛋白表达

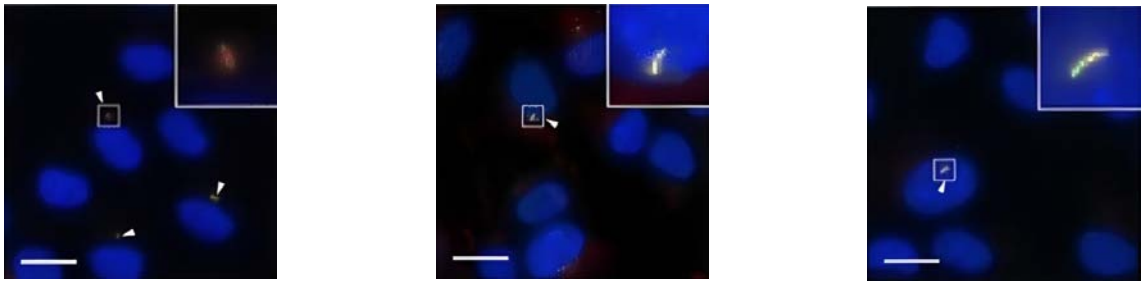
Figure 3　Protein expression of ALP, Runx2, SLC7A11, GPX4, METTL3, and ASK1 in each group of cells

2.5　各组细胞纤毛形态

免疫荧光检测结果显示，正常组细胞中细胞纤毛旺盛，高糖组表现为纤毛数量减少及长度降低，高糖+METTL3抑制逆转了高糖引起的纤毛数量及长度变化（见图4）。

3　讨论

目前已有研究证实糖尿病与骨质疏松的共存，糖尿病性骨质疏松的机制在不同的糖尿病患者群体中存在异质性和多样性，可能受到各种因素的影响，



A：正常组免疫荧光检测结果　　B：高糖组免疫荧光检测结果　　C：高糖+METTL3抑制组免疫荧光检测结果

图4　各组细胞纤毛形态（x400，标尺=100 μm）

Figure 4　Ciliary morphology of each cell group

如年龄、肥胖、糖尿病病程、并发症、糖尿病合并症甚至药物[8]。已提出的主要可能机制包括糖基化终末产物的增加、活性氧（Reactive Oxygen Species，ORS）的过量产生、钙磷代谢紊乱、胰岛素缺乏和炎症等。过量的ROS导致氧化应激导致线粒体功能障碍和细胞死亡可能是最重要的机制之一。铁依赖性非凋亡细胞凋亡在包括糖尿病在内的许多年龄相关疾病的发病和进展中起着至关重要的作用。铁死亡是导致糖尿病恶化的一个重要因素，并对骨组织功能产生重大影响，因此，探讨铁死亡在高糖高脂所致糖尿病骨质疏松中是否及如何起作用具有重要的意义[9-10]。

3.1 高糖损伤引起铁死亡机制分析

本研究建立模拟2型糖尿病常见代谢异常表现和类似人类2型糖尿病缓慢发病机制的大鼠模型，为评估糖尿病后发生的骨功能缺陷程度，用X射线骨密度仪扫描检测BMC和BMD的变化。与对照组相比，研究组BMC或BMD水平明显降低。此外，与对照组大鼠相比，研究组大鼠血清中代表性骨形成标志物ALP和OCN水平显著降低。研究组大鼠表现为骨量较低。本研究发现研究组大鼠血清铁蛋白本身水平明显高于对照组。免疫组化研究显示，使用同型对照抗体对照组大鼠骨组织无特异性染色，使用针对SLC7A11和GPX4的特异性抗体时，观察到这两种主要的铁死亡抑制标记蛋白高表达，而在糖尿病大鼠骨组织中明显降低。提示糖尿病骨质流失大鼠骨组织中可能存在铁死亡。在本研究建立的糖尿病骨质流失大鼠模型中发现，与对照组大鼠相比，循环铁蛋白水平（体内铁储存的生物标志物）和血清铁水平显著升高。免疫组化结果显示，研究组SLC7A11和GPX4的表达显著降低，提示糖尿病骨质丢失大鼠骨组织中可能存在铁死亡。骨质疏松症以低骨密度和骨微结构恶化为特征，提示铁死亡的存在可能在成骨功能受损中起重要作用，导致骨量降低，骨微结构恶化加剧。在小鼠成骨前细胞中进行的体外研究进一步证实了铁死亡与成骨功能障碍有关的观点。我们发现用高糖处理成骨细胞不仅抑制成骨细胞分化和矿化，而且还会引发与铁中毒相关的成骨细胞死亡且高糖损伤同样引起大鼠ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA相对表达降低。所有这些结果表明铁死亡与成骨功能障碍密切相关。然而，体内研究的结果并没有明确铁死亡介导糖尿病大鼠骨质流失的具体调控机制。因此，需要进一步的研究解释骨质下垂在糖尿病骨质流失的发病和进展中的确切作用。

3.2 高糖损伤引起METTL3/ASK1通路变化分析

ASK1是一种在多种依赖ROS的细胞死亡进程中发挥关键调控作用的因子，铁凋亡这类细胞死亡过程也在其调控范围内。ASK1不仅参与氧化铝纳米颗粒诱导的海马神经元铁凋亡的调控，还借助ASK1-p38/MAPK通路，在冷应激引发的铁凋亡进程中扮演重要角色[11-12]。ASK1参与众多ROS依赖性细胞死亡过程，在多个信号级联反应中充当枢纽角色。ASK1蛋白作为MAP激酶通路里的关键丝氨酸/苏氨酸激酶，主要投身于细胞凋亡、炎症反应以及应激信号转导等生理过程。它能够促进线粒体依赖性的caspase激活，进而参与细胞凋亡过程，最终引发骨代谢失衡，具体表现为破骨细胞活性增强或者成骨细胞功能减弱，从而参与到骨质疏松的病程中[13]。METTL3与骨质疏松、关节炎以及骨肉瘤等骨相关疾病的发生、发展密切相关。有研究指出，METTL3的表达通过增加m6A对MYD88RNA的修饰，上调MYD88的表达水平，进而激活NF-κB通路，抑制成骨进程[14]。不过，关于METTL3的表达和骨质疏松发生发展之间的关系，目前存在争议。近年来，部分研究揭示了METTL3/ASK1蛋白通路在骨质疏松症中的作用，并提出了不同的分子机制[15]。然而，目前关于METTL3/ASK1作用及机制的文献数量较少，对于METTL3/ASK1蛋白通路是否在糖尿病骨质疏松的成骨细胞铁死亡过程中发挥作用，尚不明确。在本研究中，为探究高糖损伤成骨是否与METTL3/ASK1蛋白通路存在关联，采用METTL3抑制剂对高糖损伤细胞进行干预处理。实验结果显示，各组细胞ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白的相对表达量差异具有统计学意义。其中，高糖组细胞的ALP、Runx2、SLC7A11、GPX4蛋白相对表达量显著低于正常组以及高糖+METTL3抑制组（$P<0.05$），而正常组与高糖+METTL3抑制组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。这一结果证实，METTL3抑制能够逆转高糖损伤导致的成骨细胞铁标记蛋白降低以及骨形成标志物异常，进而逆转高糖损伤引发的骨细胞损伤，提示METTL3可能通过上调ASK1/p38信号通路，参与高糖诱导的骨质疏松过程。此外，凋亡抑制蛋白GPX4和SLC7A11表达被显著抑制的相关证据，也支持ASK1/p38通路的激活与铁死亡存在关联。

3.3 高糖损伤引起纤毛变化机制

原发纤毛的缺失或功能障碍会导致骨缺损[16]。初级纤毛是从细胞膜突出的毛发状细胞器，它作为化学和机械刺激的传感器调节包括骨骼在内许多器

官的发育和功能[17]。鞭毛内运输（Intraflagellar Transport，IFT）复合物对于纤毛组装和功能至关重要。IFT作为沿着纤毛轴丝的双向运输系统，作用是将蛋白质从基体穿梭到由IFT-B复合物介导的尖端（顺行运输），以及由IFT介导的从纤毛尖端穿梭到细胞体（逆行运输）[18]。IFT蛋白突变会导致纤毛缺失和/或功能障碍，并与各种骨疾病相关，成骨细胞前体细胞中纤毛丢失会导致显著的生长迟缓和骨质减少，进而成骨减少，引发骨质疏松[19-20]。本研究进一步对高糖损伤引起的成骨细胞纤毛变化进行了研究，结果发现正常组细胞中纤毛旺盛，高糖组表现为纤毛数量减少及长度降低，高糖+METTL3抑制逆转了高糖引起的纤毛数量减少及长度变化，证实高糖损伤引起的骨质疏松还与成骨细胞纤毛损伤有关，且细胞纤毛变化同样与METTL3相关蛋白通路有关。

总而言之，高糖损伤诱导的成骨细胞死亡存在铁死亡及细胞纤毛减少，高糖损伤引起的骨质疏松机制可能与METTL3/ASK1细胞通路引起的铁死亡性细胞凋亡及纤毛改变有关。

参考文献

[1] DARJANI A, NICKHAH N, EMAMI M H H, et al. Assessment of the prevalence and risk factors associated with glucocorticoid-induced diabetes mellitus in pemphigus vulgaris patients[J]. Acta Medica Iranica, 2017, 55(6): 375-380.

[2] 潘颖, 李君, 李婷. 血清miR-155与糖尿病并发骨质疏松症患者骨密度丢失的关系[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2023, 24(4): 308-310.

[3] 梁伟杰, 王永飞, 李健豪, 等. ERS-GSK-3β信号通路介导高糖引起H9c2心肌细胞坏死性凋亡[J]. 解剖学研究, 2020, 42(3): 197-203.

[4] 周米露, 赵锐, 王大庆, 等. 基于PI3K/AKT信号通路探讨Netrin-1对糖尿病性白内障大鼠晶状体上皮细胞的保护作用[J]. 解剖学研究, 2021, 43(6): 577-583.

[5] 嵇星辰, 王明欣, 陈少华, 等. 中国绝经后2型糖尿病患者骨质疏松影响因素的Meta分析[J]. 中国全科医学, 2023, 26(4): 504-511.

[6] WANG X D, MA H D, SUN J, et al. Mitochondrial ferritin deficiency promotes osteoblastic ferroptosis via mitophagy in type 2 diabetic osteoporosis[J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200(1): 298-307.

[7] CHINIPARDAZ Z, LIU M, GRAVES D, et al. Diabetes impairs fracture healing through disruption of cilia formation in osteoblasts[J]. Bone, 2021, 153: 116176.

[8] 张苑, 程冉, 贺佳, 等. 鸢尾素、骨膜素及内脏脂肪面积与中老年男性2型糖尿病合并骨质疏松症相关性的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2023, 31(2): 92-98.

[9] 郑颖, 王港, 胡琳, 等. 糖尿病骨质疏松来源颌骨骨髓间充质干细胞成骨分化能力的研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2024, 22(2): 65-70.

[10] 马欢欢, 王晓晖, 王晶, 等. miRNA介导p38MAPK信号通路调控成骨细胞在糖尿病性骨质疏松症中的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2023, 16(1): 80-87.

[11] HATTORI K, ISHIKAWA H, SAKAUCHI C, et al. Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway [J]. EMBO Rep, 2017, 18(11): 2067-2078.

[12] LI H, ZHU L, WENG Z, et al. Sesamin attenuates UVA-induced keratinocyte injury via inhibiting ASK-1-JNK/p38 MAPK pathways[J]. J Cosmet Dermatol, 2024, 23(1): 316-325.

[13] HATTORI K, ICHIJO H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in regulated necrosis[J]. Cell Cycle, 2018, 17(1): 5-6.

[14] YU J, SHEN L, LIU Y, et al. The m6A methyltransferase METTL3 cooperates with demethylase ALKBH5 to regulate osteogenic differentiation through NF-κB signaling[J]. Mol Cell Biochem, 2020, 463(1): 203-210.

[15] CHEN X, HUA W, HUANG X, et al. Regulatory role of RNA N6-methyladenosine modification in bone biology and osteoporosis[J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 911.

[16] 刘梅, 谢星, 匡继林. 通管方对输卵管炎性不孕模型大鼠NLRP3/Caspase-1细胞焦亡通路的影响[J]. 中医药导报, 2023, 29(2): 8-13.

[17] 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.

[18] NAKAYAMA K, KATOH Y. Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors[J]. J Biochem, 2018, 163(3): 155-164.

[19] HANDA A, VOSS U, HAMMARSJÖ A, et al. Skeletal ciliopathies: A pattern recognition approach[J]. Jpn J Radiol, 2020, 38: 193-206.

[20] YUAN X, CAO J, HE X, et al. Ciliary IFT80 balances canonical versus non-canonical hedgehog signalling for osteoblast differentiation[J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 11024.