

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.10.007

文章编号: 1005-8982 (2024) 10-0038-09

实验研究·论著

基于糖尿病骨质疏松细胞模型探究 ELAVL1 对破骨细胞铁死亡的调控作用*

黄碧¹, 蒋洁², 邵挥戈¹

(1. 长沙市中心医院, 湖南 长沙 410011; 2. 长沙市医疗急救中心, 湖南 长沙 410011)

摘要: **目的** 探究胚胎致死性异常视觉样蛋白1(ELAVL1)是否通过破骨细胞死亡调控糖尿病骨质疏松症(DOP)。**方法** 选取2021年1月—2023年2月长沙市中心医院就诊的50例DOP患者和50例糖尿病但不伴随骨质疏松的患者作为研究对象, 分别作为DOP组和对照组。比较两组患者血清ELAVL1、GPX4、Nrf2、ACSL4水平差异, 分析ELAVL1与铁死亡相关基因(GPX4、Nrf2、ACSL4)的相关性。采用50 ng/mL RANKL 孵育小鼠骨髓源性巨噬细胞RAW264.7以诱导破骨分化。对DOP组进行亚分组, 以患者血清ELAVL1含量的平均值(14.94 ng/mL)为标准, 分为ELAVL1低表达组(血清ELAVL1<14.94 ng/mL, 28例)及ELAVL1高表达组(血清ELAVL1>14.94 ng/mL, 22例)。将破骨细胞分为对照组、高糖组、高糖+sh-NC组、高糖+sh-ELAVL1组, 比较各组ELAVL1、GPX4、核因子红细胞系2相关因子2(Nrf2)、酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)、活性氧、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、总铁含量、铁离子(Fe^{2+})表达量、线粒体膜电位。**结果** ELAVL1高表达组与ELAVL1低表达组性别构成、年龄、糖尿病病程、BMI比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。ELAVL1高表达组T-score值低于ELAVL1低表达组($P<0.05$), 血清 β -CTX、血清PINP高于ELAVL1低表达组($P<0.05$)。DOP组血清GPX4、Nrf2比对照组低($P<0.05$), ACSL4比对照组高($P<0.05$)。经Pearson相关性分析结果表明, DOP患者血清ELAVL1表达与ACSL4呈正相关($r=0.689, P<0.05$), 与GPX4、Nrf2呈负相关($r=-0.312$ 和 -0.447 , 均 $P<0.05$), 血清ELAVL1与ACSL4呈正相关($r=0.689, P<0.05$), 血清ELAVL1与GPX4呈负相关($r=-0.559, P<0.05$), 血清ELAVL1与Nrf2呈负相关($r=-0.669, P<0.05$)。高糖组GPX4、Nrf2 mRNA较对照组降低($P<0.05$), ELAVL1、ACSL3 mRNA较对照组升高($P<0.05$), 高糖+sh-ELAVL1组GPX4、Nrf2 mRNA较高糖+sh-NC组升高($P<0.05$), ELAVL1、ACSL3 mRNA较高糖+sh-NC组降低($P<0.05$)。高糖组GPX4、Nrf2蛋白较对照组降低, ELAVL1、ACSL4蛋白较对照组升高($P<0.05$), 高糖+sh-ELAVL1组GPX4、Nrf2蛋白较高糖+sh-NC组升高($P<0.05$), ELAVL1、ACSL4蛋白较高糖+sh-NC组降低($P<0.05$)。高糖组总铁含量及 Fe^{2+} 表达量较对照组升高($P<0.05$), 高糖+sh-ELAVL1组较高糖+sh-NC组降低($P<0.05$)。高糖组MDA较对照组高($P<0.05$), GSH较对照组低($P<0.05$), 高糖+sh-ELAVL1组MDA较高糖+sh-NC组低, GSH较高糖+sh-NC组高($P<0.05$)。**结论** 高糖条件诱导破骨细胞铁死亡, ELAVL1与DOP铁死亡有关, 敲低ELAVL1可抑制高糖诱导的破骨细胞铁死亡。

关键词: 糖尿病骨质疏松; 破骨细胞; 铁死亡; 胚胎致死性异常视觉样基因1

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Investigating roles of ELAVL1 in regulating ferroptosis of osteoclasts based on cell models of diabetic osteoporosis*

Huang Bi¹, Jiang Jie², Shao Hui-ge¹

(1. Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410011, China; 2. Changsha Medical Emergency Center, Changsha, Hunan 410011, China)

收稿日期: 2023-06-11

* 基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(No:2023JJ30066)

Abstract: Objective To explore whether embryonic lethal abnormal visual-like protein 1 (ELAVL1) regulates osteocyte death to affect diabetic osteoporosis (DOP). **Methods** DOP patients ($n = 50$) and diabetes mellitus patients without osteoporosis ($n = 50$) hospitalized in Changsha Central Hospital from January 2021 to February 2023 were included as the DOP group and the control group, respectively. The serum levels of ELAVL1, GPX4, Nrf2 and ACSL4 were compared between the two groups of patients, and the correlations between ELAVL1 and ferroptosis-related genes (GPX4, Nrf2, ACSL4) were analyzed. The macrophage cell line RAW264.7 derived from bone marrow of mice were incubated with 50 ng/mL of RANKL to induce their differentiation into osteoclasts. The DOP group was subcategorized based on the average serum ELAVL1 level (14.94 ng/mL) of patients, dividing them into the low ELAVL1 expression group (serum ELAVL1 < 14.94 ng/mL, 28 cases) and the high ELAVL1 expression group (serum ELAVL1 > 14.94 ng/mL, 22 cases). Osteoclasts were divided into the control group, the high glucose group, the high glucose + sh-NC group, and the high glucose + sh-ELAVL1 group, and levels of ELAVL1, GPX4, Nrf2, ACSL4, ROS, MDA, GSH, total iron, and Fe^{2+} as well as the mitochondrial membrane potential were compared among the groups. **Results** There was no difference in the sex composition, the age, the course of diabetes mellitus, or BMI between the low ELAVL1 expression group and the high ELAVL1 expression group ($P > 0.05$). Compared with the low ELAVL1 expression group, the T-score was lower ($P < 0.05$) and the serum levels of β -CTX and PINP were higher in the high ELAVL1 expression group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the serum levels of GPX4 and Nrf2 were lower ($P < 0.05$) and the serum level of ACSL4 was higher in the DOP group ($P < 0.05$). As demonstrated by Pearson correlation analysis, the serum level of ELAVL1 was positively correlated with that of ACSL4 ($r = 0.689$, $P < 0.05$) but negatively correlated with the serum levels of GPX4 and Nrf2 ($r = -0.312$ and -0.447 , both $P < 0.05$) in DOP patients. The serum level of ELAVL1 was positively correlated with that of ACSL4 ($r = 0.689$, $P < 0.05$) but negatively correlated with that of GPX4 ($r = -0.559$, $P < 0.05$) and that of Nrf2 ($r = -0.669$, $P < 0.05$). The mRNA expressions of GPX4 and Nrf2 in the high glucose group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), while the mRNA expressions of ELAVL1 and ACSL4 in the high glucose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The mRNA expressions of GPX4 and Nrf2 in the high glucose + sh-ELAVL1 group were higher than those in the high glucose + sh-NC group ($P < 0.05$), while the mRNA expressions of ELAVL1 and ACSL4 in the high glucose + sh-ELAVL1 group were lower than those in the high glucose + sh-NC group ($P < 0.05$). The protein expressions of GPX4 and Nrf2 in the high glucose group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), while the protein expressions of ELAVL1 and ACSL4 in the high glucose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The protein expressions of GPX4 and Nrf2 in the high glucose + sh-ELAVL1 group were higher than those in the high glucose + sh-NC group ($P < 0.05$), while the protein expressions of ELAVL1 and ACSL4 in the high glucose + sh-ELAVL1 group were lower than those in the high glucose + sh-NC group ($P < 0.05$). The levels of total iron and Fe^{2+} in the high glucose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), whereas those in the high glucose + sh-ELAVL1 group were lower than those in the high glucose + sh-NC group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the level of MDA was higher ($P < 0.05$) but the level of GSH was lower ($P < 0.05$) in the high glucose group. Compared with the high glucose + sh-NC group, the level of MDA was lower ($P < 0.05$) but the level of GSH was higher ($P < 0.05$) in the high glucose + sh-ELAVL1 group ($P < 0.05$). **Conclusions** High glucose condition triggers ferroptosis of osteoclasts. ELAVL1 is significantly associated with the ferroptosis in DOP, and knockdown of ELAVL1 inhibits the ferroptosis of osteoclasts induced by high glucose.

Keywords: diabetic osteoporosis; osteoblast; ferroptosis; ELAVL1

糖尿病是一种慢性代谢性疾病。胰岛素缺乏或抵抗导致人体内难以维持正常的血糖水平,从而诱导糖尿病发生^[1-2]。据世界卫生组织统计,约4.22亿成年人(≥ 18 周岁)确诊为糖尿病患者,占全球成年人总数的8.5%。糖尿病骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)是常见的糖尿病并发症。有研究指出47.51%(172/362)糖尿病患者伴有骨质减少或

骨质疏松症,并认为糖尿病患者的低密度脂蛋白胆固醇、体质量指数等指标是DOP的独立危险因素^[3]。骨形成与骨吸收的协调活动是维持骨稳态的关键所在,成骨细胞与破骨细胞相互协调,保障骨更新及骨再生。糖尿病在一定程度上破坏骨形成与骨吸收之间的动态平衡^[4]。在机制上,糖尿病通过影响成骨细胞及破骨细胞的分化和成熟抑制骨更新

及骨再生。对破骨细胞而言,高血糖在一定程度上诱导破骨细胞分化,增强骨吸收活性^[5]。一项实验室研究证实,高糖可通过影响巨噬细胞极化促进破骨细胞分化^[6]。铁死亡是影响 DOP 发生、发展的核心因素。在 DOP 大鼠模型股骨组织中可观察到铁过载、铁死亡蛋白表达异常及氧化应激,抑制铁死亡可改善 DOP 大鼠模型的骨流失^[7-8]。在 DOP 中,破骨细胞与铁死亡息息相关。高血糖诱导的铁过载通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)促进破骨细胞分化^[9-11]。在破骨分化过程中,破骨细胞对游离铁的需求显著增加,并引起铁饥饿现象,诱导铁死亡相关蛋白表达发生改变,导致破骨细胞对铁死亡易感^[12-13]。由此可见,破骨细胞铁死亡在 DOP 骨稳态失衡中发挥重要作用。

胚胎致死性异常视觉样蛋白 1(embryonic lethal abnormal visual-like protein 1, ELAVL1)是一种在体内广泛表达的 RNA 结合蛋白,参与转录后调控^[14-15]。ELAVL1 是调控疾病与健康的核心因子,可调控 mRNA 稳定性的生物学活性,调控诸多骨稳态相关基因,因此在骨质疏松症中发挥重要的调控作用^[16]。在 DOP 中,ELAVL1 在骨组织中表达上调,并可通过触发铁死亡抑制成骨细胞分化^[17]。小鼠骨质疏松症模型显示,在破骨细胞中 ELAVL1 参与调控铁死亡抑制因子谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)mRNA 稳定性^[18],提示 ELAVL1 与破骨细胞铁死亡的潜在联系。上述研究表明 ELAVL1 在 DOP 发病机制中发挥作用。然而尚无证据证明 ELAVL1 通过破骨细胞铁死亡调控 DOP 的作用机制。基于上述研究,笔者推测 ELAVL1 可能参与调控 DOP 发病机制,通过自身介导的铁死亡机制,影响破骨细胞介导的骨吸收,并通过诱导破骨细胞铁死亡促进 DOP 的发生、发展过程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠骨髓源性巨噬细胞 RAW264.7(美国模式培养物集存库),RANKL(美国 Med Chem Express 公司),DMEM 培养基、链霉素-青霉素混合液(美国 Gibco 公司),酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜均购自日本 Olympus 公司,电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪均购自

美国 Bio-Rad 公司,离心机(转子型号 FA-241.5,美国 Eppendorf 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司),聚偏二氯乙烯膜(美国 Millipore 公司),ELAVL1 抗体(ab200342,美国 Abcam 公司,1:1 000),GPX4 抗体(ab125066,美国 Abcam 公司,1:1 000),Nrf2 抗体(12721,美国 Cell signaling Technology 公司),ACSL4 抗体(ab155282,美国 Abcam 公司,1:10 000),GAPDH 抗体(ab8245,美国 Abcam 公司,1:10 000),二抗(ab6721,美国 Abcam 公司,1:10 000),GPX4 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(ELK4775,武汉科鹿生物科技有限公司),Nrf2 ELISA 试剂盒(Ab277397,美国 Abcam 公司),ELAVL1 ELISA 试剂盒(ELK5159,武汉科鹿生物科技有限公司),ACSL4 ELISA 检测试剂盒(ELK8993,武汉科鹿生物科技有限公司)。JC-1 法检测线粒体膜电位检测试剂盒(C2003S,上海碧云天生物科技有限公司),活性氧类(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(S0033S,上海碧云天生物科技有限公司)。MDA 检测试剂盒(S0131S,上海碧云天生物科技有限公司),GSH 检测试剂盒(S0053,上海碧云天生物科技有限公司),细胞总铁含量检测试剂盒(E-BC-K880-M,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),细胞铁含量检测试剂盒(E-BC-K881-M,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),RIPA 裂解液(P0013C,上海碧云天生物科技有限公司),逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)荧光定量试剂盒(B639277-0050,上海生工生物工程有限公司),ECL 显色液(P0018S,上海碧云天生物科技有限公司)。shRNA 阴性对照(sh-NC)、ELAVL1 shRNA(sh-ELAVL1)、正反向引物均由上海生工生物工程有限公司设计并合成。

1.2 临床资料收集

选取 2021 年 1 月—2023 年 2 月长沙市中心医院就诊的 50 例 DOP 患者和 50 例糖尿病但不伴随骨质疏松的患者分别作为 DOP 组和对照组。纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②骨密度 T-score 值 ≤ -2.5 ;③1 年内未使用影响骨代谢的药物;④纳入研究前 1 年内未进行糖尿病治疗。排除标准:①伴其他糖尿病急性并发症;②严重的心肝肺肾脾疾病;③患其他免疫性疾病;④合并恶性肿瘤;⑤合并精神障碍。

DOP 组男性 23 例,女性 27 例;年龄 45~96 岁,平均(68.03±13.11)岁;体质量指数(body mass index, BMI)18.52~25.32 kg/m²,平均(21.51±1.43)kg/m²;平均糖尿病病程(7.08±2.02)年;平均 T-score 值-3.1(-3.8,-2.5);平均血清β-异构 C-端肽(β-isomerized C-terminal telopeptide, β-CTX)(290.22±34.86)pg/mL;平均血清 I 型胶原氨基端肽原(procollagen type I N-terminal propeptide, PINP)(40.26±11.44)pg/mL。对照组男性 26 例,女性 24 例;32~81 岁,平均(61.28±10.87)岁;BMI 19.14~26.10 kg/m²,平均(22.23±1.53)kg/m²;平均糖尿病病程(6.73±2.74)年;平均 T-score 值为-0.1(-1.0, 1.0);平均血清β-CTX(238.01±31.32)pg/mL;平均血清 PINP(32.61±11.01)pg/mL。对 DOP 组进行亚分组,以患者血清 ELAVL1 含量的平均值(14.94 ng/mL)为标准,分为 ELAVL1 低表达组(血清 ELAVL1<14.94 ng/mL, 28 例)及 ELAVL1 高表达组(血清 ELAVL1>14.94 ng/mL, 22 例)。患者均签署知情同意书,本研究获得医院伦理委员会批准(No:2022-S0227)。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 检测血清 ELAVL1、GPX4、Nrf2、ACSL4 水平 为探究 DOP 中 ELAVL1 与铁死亡通路间的关系,本研究收集两组患者血清样本,检测血清 ELAVL1 及铁死亡相关基因。铁死亡相关基因包括 GPX4、核因子红细胞系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)。患者空腹 8 h 后收集静脉血液,4℃静置过夜后以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液用于 ELISA 检测。根据试剂盒说明书,取 96 孔酶标板,每孔加入 100 μL 样品或标准品,37℃孵育 80 min。移除液体,每孔加入 200 μL 洗涤液,洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 生物素化抗体工作液,37℃下反应 50 min。移除液体,使用洗涤液洗涤 3 次,每孔加入 100 μL HRP 酶工作液,37℃下反应 50 min。移除液体,洗涤液洗涤 5 次。加入 TMB 显色液(90 μL/孔),37℃下反应 20 min。加入反应终止液(50 μL/孔),采用酶标仪读取 450 nm 处吸光度值。根据标准曲线计算血清 ELAVL1、GPX4、Nrf2、ACSL4 水平。

1.3.2 破骨细胞诱导分化 小鼠骨髓源性巨噬细胞 RAW264.7 接种于 24 孔板,使用含 50 ng/mL

RANKL 的 DMEM 培养基(10% 胎牛血清+1% 链霉素青霉素混合液)^[19],每 2 天更换 1 次培养基,孵育 6 d 后使用 TRAP 染色鉴定破骨细胞。

1.3.3 细胞分组及处理 将诱导成功的破骨细胞分为对照组、高糖组、高糖+NC shRNA 组(高糖+sh-NC 组)、高糖+ELAVL1 shRNA 组(高糖+sh-ELAVL1 组)。对照组采用含 5.5 mmol/L D-葡萄糖的细胞培养基孵育 3 d。高糖组使用含 30 mmol/L 葡萄糖的细胞培养基孵育 3 d^[20]。高糖+sh-NC 组通过脂质体转染试剂盒转染 sh-NC 至细胞,48 h 后更换为含 30 mmol/L D-葡萄糖的细胞培养基,孵育 3 d。高糖+sh-ELAVL1 组先转染 sh-ELAVL1 至细胞,转染结束后更换培养基为含 30 mmol/L 葡萄糖的细胞培养基,继续孵育 3 d。

1.3.4 DCFH-DA 探针检测 ROS 含量 氧化应激指标 ROS 是诱导细胞铁死亡的重要指标,ROS 水平是细胞中评估铁死亡发生的重要指标。使用无血清细胞培养基稀释 DCFH-DA 探针(探针:培养基=1:1 000, v/v;探针最终浓度=10 μmol/L)。移除各组细胞培养基后,加入稀释后的 DCFH-DA 探针,37℃孵育 20 min,小心吸去液体,使用无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次。通过激光共聚焦扫描显微镜观察(Ex/Em=488 nm/525 nm)。此外本研究采用 4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染料标记细胞核。

1.3.5 总铁含量及铁离子(Fe²⁺)含量检测 铁死亡是一种铁依赖的细胞死亡形式,铁过载是触发铁死亡的关键因素。因此,总铁含量及 Fe²⁺含量是反映铁死亡的核心指标。收集 1×10⁶ 个细胞,根据细胞总铁比色法测试盒或细胞 Fe²⁺含量检测试剂盒说明书加入 0.2 mL 裂解缓冲液,4℃下裂解 10 min。4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。加入 80 μL 显色液,37℃孵育 40 min,使用酶标仪检测 593 nm 处吸光度值,结合标准曲线计算总铁含量或 Fe²⁺含量。

1.3.6 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位 铁死亡细胞往往表现为线粒体功能障碍。线粒体膜电位降低是线粒体功能障碍的主要特征。因此,可通过检测线粒体膜电位评估细胞铁死亡是否发生。移除细胞培养基,加入 1 mL PBS 溶液清洗细胞。清洗结束后,加入 1 mL 细胞培养基。加入 1 mL JC-1 染色工作液,37℃孵育 20 min。移除液体,加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 2~3 次。加入 2 mL 细胞培养基,使

用荧光显微镜观察(Ex/Em=490 nm/530 nm)。

1.3.7 细胞 MDA 及 GSH 检测 单独测定 ROS 无法满足全面评估细胞氧化应激水平的需求。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是脂质过氧化的最终产物。而谷胱甘肽(Glutathione, GSH)水平参与清除 ROS,可用于反映细胞的抗氧化水平,因此是重要的氧化应激指标。氧化应激是诱导铁死亡的生理基础,因此 MDA 和 GSH 可用于反映细胞铁死亡。收集细胞样品:0.25% 胰蛋白酶消化细胞 2 min,加入含血清的细胞培养基终止反应,小心吹打细胞至全部脱落,以 3 000 r/min 离心 1 min,移除上清液。加入含血清的培养基重悬细胞。MDA 检测:取部分细胞样品,加入 RIPA 裂解液,待细胞充分裂解后,4 ℃、9 600 r/min 离心 10 min,取上清液。使用 BCA 检测试剂盒检测上清液蛋白浓度。取 0.1 mL 上清液,加入 MDA 工作液,100 ℃ 反应 15 min。待溶液冷却至室温后,以 3 000 r/min 离心 10 min,通过酶标仪检测溶液吸光度值,根据标准曲线计算 MDA 表达量。GSH 检测:取部分细胞样品,加入蛋白去除试剂 M,充分混匀后结合液氮及 37 ℃ 水浴进行 2 次快速冻融。4 ℃、9 600 r/min 离心 10 min,取上清液用于 GSH 检测。根据试剂盒说明书依次加入 GSH 清除辅助液和 GSH 清除工作液,25 ℃ 下反应 1 h。加入总谷胱甘肽工作液,25 ℃ 孵育 5 min。加入 0.5 mg/mL NADPH,立即使用酶标仪检测 412 nm 处的吸光度值,结合标准曲线计算总谷胱甘肽及氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)表达量,GSH 表达量=总谷胱甘肽-GSSG。

1.3.8 细胞总 RNA 提取 取各组细胞,移除细胞培养基,加入 1 mL TRIzol(R0016,上海碧云天生物科技有限公司),室温静置 5 min。加入氯仿,室温静置 3 min。4 ℃ 下 10 600 r/min 离心 15 min,小心吸取上层无色水相至新离心管中。加入异丙醇,混匀后室温静置 10 min。4 ℃ 下 10 600 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 75% 乙醇重悬沉淀,4 ℃ 下 8 400 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 DEPC 水重悬 RNA 沉淀。

1.3.9 RT-PCR 检测 GPX4、Nrf2、ASCL4 mRNA 表达 本研究拟通过荧光定量 PCR 定量 ELAVL1 及铁死亡相关基因在高糖诱导破骨细胞模型中的表达。铁死亡相关基因包括 GPX4、Nrf2、ASCL4,通过一步法对 PCR 试剂盒进行逆转录及荧光定量。取 RNA 样品(待测 RNA 及正反引物),根据说明书混合,使用无 RNA 酶的去离子水定容至 20 μ L。

ELAVL1 正向引物:5'-CGCAGAGATTCAGGTTCTCC-3',反向引物:5'-CCAAACCCTTTGCACTTGTT-3',长度均 20 bp;GPX4 正向引物:5'-GTAACCAGTTCGGG AAGCAG-3',反向引物:5'-TGTCGATGAGGAACTGT GGA-3',长度均 20 bp;Nrf2 正向引物:5'-AGCAGGA CATGGAGCAAGTT-3',反向引物:5'-GACCACAGTTG CCCACTTCT-3',长度均 20 bp;ASCL4 正向引物:5'-C CGACCTAAGGGAGTGATGA-3',反向引物:5'-CCTG CAGCCATAGGTAAAGC-3',长度均 20 bp;GAPDH 正向引物:5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC-3',反向引物:5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3',长度均 22 bp。反应条件:50 ℃ 逆转录 5 min,95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火/延伸/采集信号 30 s,共循环 40 次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 GPX4、Nrf2、ASCL4 mRNA 相对表达量。

1.3.10 Western blotting 检测 GPX4、Nrf2、ASCL4 蛋白表达 收集细胞样品加入 RIPA 裂解液,待细胞充分裂解后,4 ℃、9 600 r/min 离心 10 min,取上清液。通过 BCA 检测试剂盒检测上清液蛋白浓度。每条泳道加入 20 μ g 蛋白样品,通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,冰浴条件下通过转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜。加入含 5% 脱脂牛奶的封闭液,室温孵育 1 h。移除封闭液,加入一抗稀释液,4 ℃ 孵育过夜。回收抗体稀释液,加入辣根过氧化物酶交联的二抗稀释液,37 ℃ 孵育 1 h。回收二抗稀释液。滴加 ECL 显色液,避光孵育 5 min。采用凝胶成像仪获取蛋白条带影像,以 GAPDH 为内参蛋白,计算 GPX4、Nrf2、ASCL4 蛋白相对表达量,蛋白相对表达量=待测蛋白灰度值/GAPDH 蛋白灰度值。

1.4 统计与方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,比较用 t 检验方、方差分析或秩和检验,方差分析的两两比较用 Tukey's 法;计数资料以构成比或率(%)表示,比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELAVL1 高表达组与 ELAVL1 低表达组临床资料比较

ELAVL1 高表达组与 ELAVL1 低表达组性别构

成、年龄、糖尿病病程、BMI 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组 T-score 值、血清 β -CTX、血清 PINP 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), ELAVL1 高表达组 T-score 值低于 ELAVL1 低表达组, 血清 β -CTX、血清 PINP 高于 ELAVL1 低表达组。结果表明 ELAVL1 表达升高与 DOP 发生、发展有关。见表 1。

2.2 DOP 组与对照组 GPX4、Nrf2、ACSL4 水平比较

DOP 组与对照组 GPX4、Nrf2、ACSL4 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), DOP 组血清 GPX4、

Nrf2 比对照组低, ACSL4 比对照组高。见表 2。

2.3 DOP 患者血清 ELAVL1 表达与血清 ACSL4、GPX4、Nrf2 的相关性分析

Pearson 相关性分析结果表明, DOP 患者中血清 ELAVL1 表达与 ACSL4 呈正相关 ($r = 0.689, P = 0.000$), 与 GPX4、Nrf2 呈负相关 ($r = -0.312$ 和 $-0.447, P = 0.000$), 血清 ELAVL1 与 ACSL4 呈正相关 ($r = 0.689, P = 0.000$), 血清 ELAVL1 与 GPX4 呈负相关 ($r = -0.559, P = 0.000$), 血清 ELAVL1 与 Nrf2 呈负相关 ($r = -0.669, P = 0.000$)。由此可见, 在 DOP 发生和发展过程中 ELAVL1 与铁死亡息息相关。见图 1。

表 1 ELAVL1 高表达组与 ELAVL1 低表达组临床资料比较

| 组别 | n | 男/女/例 | 年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$) | 糖尿病病程/(年, $\bar{x} \pm s$) | BMI/(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$) | T-score 值 [M(P ₂₅ , P ₇₅)] | 血清 β -CTX/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$) | 血清 PINP/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$) |
|----------------|----|-------|--------------------------|-----------------------------|--|---|---|-----------------------------------|
| ELAVL1 高表达组 | 22 | 8/14 | 66.45 \pm 13.28 | 7.30 \pm 1.92 | 21.38 \pm 1.29 | -3.2(-3.7, -2.6) | 310.15 \pm 30.87 | 45.30 \pm 11.99 |
| ELAVL1 低表达组 | 28 | 15/13 | 69.25 \pm 12.83 | 6.90 \pm 2.07 | 21.61 \pm 1.53 | -3.0(-3.8, -2.5) | 274.94 \pm 29.59 | 36.31 \pm 9.24 |
| $\chi^2/t/Z$ 值 | | 1.469 | 0.740 | 0.875 | 0.533 | 207.500 | 4.014 | 2.936 |
| P 值 | | 0.226 | 0.463 | 0.386 | 0.597 | 0.048 | 0.002 | 0.005 |

表 2 DOP 组与对照组 GPX4、Nrf2、ACSL4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | GPX4/(ng/mL) | Nrf2/(ng/mL) | ACSL4/(pg/mL) |
|-------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| DOP 组 | 63.39 \pm 18.14 | 4.73 \pm 1.15 | 1 332.51 \pm 176.99 |
| 对照组 | 82.27 \pm 16.71 | 7.49 \pm 1.74 | 1 201.23 \pm 181.50 |
| t 值 | 5.356 | 9.249 | 3.625 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

2.4 各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 mRNA 和蛋白相对表达量比较

各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。高糖组

GPX4、Nrf2 mRNA 较对照组降低 ($P < 0.05$), ELAVL1、ACSL3 mRNA 较对照组升高 ($P < 0.05$), 高糖 + sh-ELAVL1 组 GPX4、Nrf2 mRNA 较高糖 + sh-NC 组升高 ($P < 0.05$), ELAVL1、ACSL3 mRNA 较高糖 + sh-NC 组降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。高糖组 GPX4、Nrf2 蛋白较对照组降低 ($P < 0.05$), ELAVL1、ACSL4 蛋白较对照组升高 ($P < 0.05$), 高糖 + sh-ELAVL1 组 GPX4、Nrf2 蛋白较高糖 + sh-NC 组升高 ($P < 0.05$), ELAVL1、ACSL4 蛋白较高糖 + sh-NC 组降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 2。

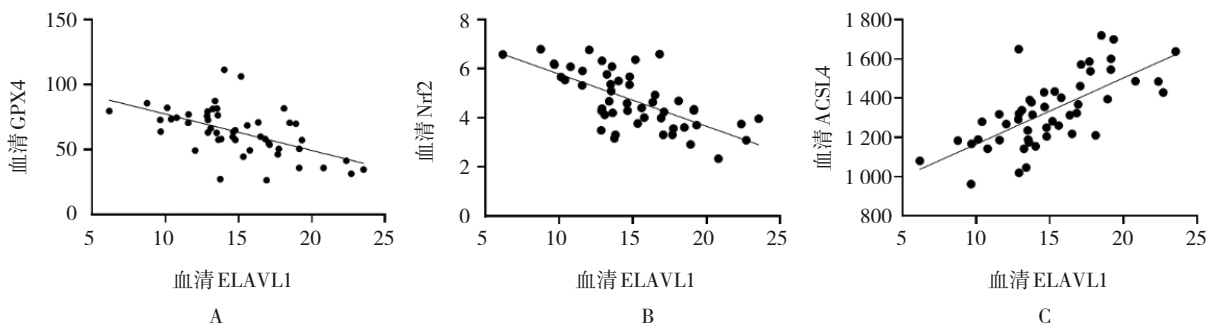


图 1 DOP 患者血清 ELAVL1 与血清 GPX4、Nrf2、ACSL4 的相关性散点图

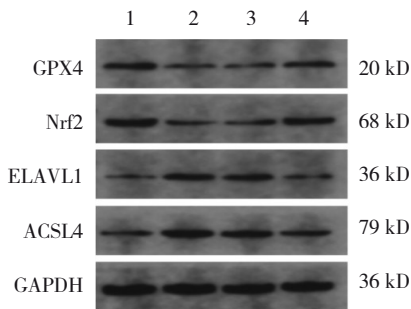
表 3 各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | GPX4 mRNA | Nrf2 mRNA | ELAVL1 mRNA | ACSL4 mRNA |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 1.00 ± 0.09 | 1.00 ± 0.12 | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.10 |
| 高糖组 | 0.37 ± 0.01 | 0.48 ± 0.03 | 1.78 ± 0.10 | 1.47 ± 0.19 |
| 高糖+ sh-NC组 | 0.40 ± 0.09 | 0.46 ± 0.01 | 1.88 ± 0.24 | 1.53 ± 0.05 |
| 高糖+ sh-ELAVL1组 | 0.80 ± 0.02 | 0.73 ± 0.03 | 1.21 ± 0.10 | 1.11 ± 0.10 |
| F 值 | 47.130 | 33.630 | 18.170 | 9.166 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.006 |

上述结果证实, DOP 细胞模型表现为 ELAVL1、ACSL4 表达上调, GPX4、Nrf2 表达下调, 表明 DOP 细胞模型伴有 ELAVL1 上调及铁死亡发生, 而敲低 ELAVL1 可逆转 DOP 体外细胞模型中铁死亡相关蛋白表达。

表 4 各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | GPX4 蛋白 | Nrf2 蛋白 | ELAVL1 蛋白 | ACSL4 蛋白 |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 0.47 ± 0.01 | 0.60 ± 0.01 | 0.20 ± 0.01 | 0.31 ± 0.01 |
| 高糖组 | 0.24 ± 0.01 | 0.29 ± 0.01 | 0.49 ± 0.01 | 0.66 ± 0.04 |
| 高糖+ sh-NC组 | 0.26 ± 0.01 | 0.30 ± 0.01 | 0.50 ± 0.01 | 0.62 ± 0.01 |
| 高糖+ sh-ELAVL1组 | 0.43 ± 0.01 | 0.58 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | 0.39 ± 0.01 |
| F 值 | 301.800 | 679.600 | 459.800 | 158.400 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |



1: 对照组; 2: 高糖组; 3: 高糖+ sh-NC组; 4: 高糖+ sh-ELAVL1组。

图 2 各组 GPX4、Nrf2、ELAVL1、ACSL4 蛋白条带图

2.5 各组总铁含量及 Fe²⁺ 含量比较

各组总铁含量及 Fe²⁺ 含量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 高糖组较对照组升高 ($P < 0.05$), 高糖+ sh-ELAVL1 组较高糖+ sh-NC 组降低 ($P <$

0.05)。表明敲低 ELAVL1 可降低 DOP 体外细胞模型中的总铁含量及 Fe²⁺ 含量。见表 5。

表 5 各组总铁含量、Fe²⁺ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 总铁含量/($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | Fe ²⁺ 含量 |
|----------------|------------------------------------|---------------------|
| 对照组 | 25.07 ± 1.35 | 1.01 ± 0.04 |
| 高糖组 | 44.73 ± 2.24 | 2.01 ± 0.23 |
| 高糖+ sh-NC组 | 43.40 ± 1.93 | 1.98 ± 0.11 |
| 高糖+ sh-ELAVL1组 | 30.67 ± 1.94 | 1.16 ± 0.05 |
| F 值 | 51.960 | 32.270 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

2.6 各组 MDA、GSH 表达量比较

各组 MDA、GSH 表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 高糖组 MDA 较对照组高 ($P < 0.05$), GSH 较对照组低 ($P < 0.05$), 高糖+ sh-ELAVL1 组 MDA 较高糖+ sh-NC 组低, GSH 较高糖+ sh-NC 组高 ($P < 0.05$)。见表 6。

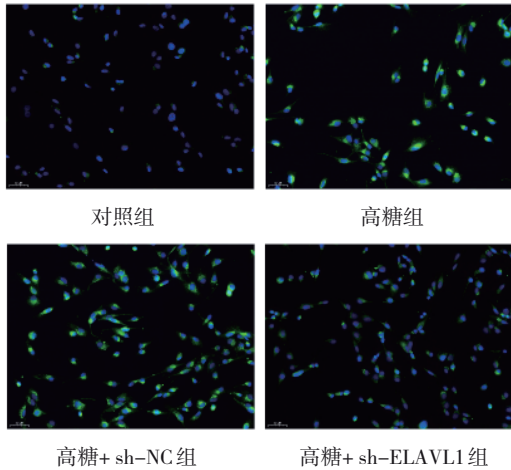
表 6 各组 MDA、GSH 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | MDA/($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | GSH |
|----------------|-----------------------------------|-------------|
| 对照组 | 20.27 ± 1.68 | 1.04 ± 0.07 |
| 高糖组 | 51.60 ± 3.30 | 0.53 ± 0.10 |
| 高糖+ sh-NC组 | 51.20 ± 2.12 | 0.55 ± 0.07 |
| 高糖+ sh-ELAVL1组 | 35.60 ± 2.92 | 0.83 ± 0.07 |
| F 值 | 66.780 | 19.750 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 |

2.7 各组 ROS 检测、线粒体膜电位结果

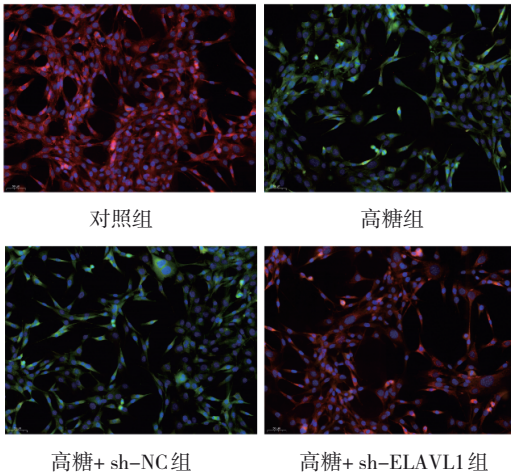
DCFH-DA 探针标记 ROS 检测结果显示, DOP 细胞模型中 DCFH-DA 探针标记的 ROS 多于对照组。高糖+ sh-NC 组 ROS 与高糖组无明显变化。高糖+ sh-ELAVL1 组 ROS 少于高糖+ sh-NC 组。见图 3。

线粒体膜电位结果显示, 与对照组比较, 高糖组红光减少, 绿光增加, 表明线粒体膜电位降低。与高糖组比较, 高糖+ sh-ELAVL1 组线粒体膜电位无明显差异。相较于高糖+ sh-NC 组, 高糖+ sh-ELAVL1 组膜电位上升 (红光增加, 绿光减少)。线粒体膜电位结果表明高糖环境引起 MC3T3 细胞线粒体损伤, 而敲低 ELAVL1 可逆转高糖诱导的线粒体损伤。见图 4。



绿色荧光为 DCFH-DA 标记的 ROS; 蓝色荧光为 DAPI 探针标记的细胞核。

图 3 各组细胞 ROS 检测 (× 200)



红光减少, 绿光增加, 表明线粒体膜电位降低; 红光增加, 绿光减少, 表明线粒体膜电位上升; 蓝色荧光为 DAPI 探针标记的细胞核。

图 4 各组线粒体膜电位检测 (× 200)

3 讨论

铁死亡在 DOP 发生、发展过程中发挥重要作用。本研究发现在 DOP 患者血清中铁死亡相关蛋白水平异常, 其中 GPX4 及 Nrf2 表达下调, 而 ACSL4 表达上调, 糖尿病微环境激活骨细胞铁死亡, 引起脂质过氧化及铁过载^[21]。GE 等^[22]采用含 DOP 患者血清的细胞培养基孵育成骨细胞培养, 并通过总铁含量、MAD、GSH、GPX4 等铁死亡指标评估细胞铁死亡, 其研究证实含 DOP 患者血清的细胞培养基可触发成骨细胞铁死亡。本研究通过临床数据证明铁死亡与 DOP 发病机制之间的潜在联系。

本研究结果发现, 高糖诱导的破骨细胞出现铁

死亡现象。破骨细胞是一种具有高能量需求的细胞, 其分化过程高度依赖糖脂代谢和能量代谢, 而高血糖环境可在一定程度上诱导细胞代谢活动, 进而促进破骨细胞分化^[23]。AN 等^[10]研究证明高糖条件可增加破骨细胞介导的骨吸收。在破骨分化过程中, 大量线粒体在破骨细胞中发生, 导致细胞对铁的需求增加, 从而引起转铁蛋白受体 1 表达上调, 促进铁摄取^[24]。然而大量铁摄入将导致铁过载, 这一现象促进 ROS 积累及过氧化作用, 并因此导致破骨细胞对铁死亡易感。NI 等^[13]证实破骨细胞分化过程伴随有铁饥饿和铁自噬, 两者共同诱导铁死亡发生。本研究结果表明, 高糖诱导的破骨细胞表现为 GPX4、Nrf2 表达下调, ACSL4 表达上调, 同时细胞中 ROS、MAD、总铁含量、Fe²⁺ 含量增加, 而 GSH 及线粒体膜电位明显降低, 提示高糖诱导破骨细胞铁死亡。由此可见, 高糖诱导破骨细胞分化的同时亦可触发破骨细胞铁死亡, 进一步破坏成骨与破骨细胞之间的协调活动。

本研究验证了 ELAVL1 在高糖诱导破骨细胞铁死亡中的作用机制。ELAVL1 可与 RNA 靶标的内含子及 3'-非翻译区 (3'-UTR) 结合, 在转录后水平上参与 mRNA 的剪切、稳定、翻译^[25-26]。新近研究指出 ELAVL1 是激活铁自噬诱导铁死亡的关键因子^[27]。由此可见, ELAVL1 与铁死亡息息相关, ELAVL1 表达异常可能影响铁死亡发生。本研究结果发现 ELAVL1 在 DOP 患者血清样本中水平上升。同时, 本研究通过 Pearson 法检验血清 ELAVL1 与铁死亡相关蛋白的相关性, 结果表明血清 ELAVL1 与 GPX4、Nrf2 呈负相关, 但血清 ELAVL1 与 ACSL4 呈正相关, 提示在 DOP 中 ELAVL1 表达与铁死亡关系密切。DENG 等^[18]指出 ELAVL1 介导破骨细胞中铁死亡相关基因的转录后调控表达。该研究证实 ELAVL1 与破骨细胞铁死亡的潜在联系, 同时也提示 ELAVL1 可能在高糖诱导的破骨细胞中通过铁死亡参与 DOP 发病机制。在本研究结果中, 高糖引起 ELAVL1 在破骨细胞中的表达上调, 敲低 ELAVL1 可逆转高糖诱导的破骨细胞铁死亡, 反向证实高糖诱导的 ELAVL1 表达上调是调控破骨细胞铁死亡的重要因素。

综上所述, 本研究证实高糖条件诱导破骨细胞铁死亡, ELAVL1 与 DOP 铁死亡相关, 敲低 ELAVL1 可抑制高糖诱导的破骨细胞铁死亡。本研究提供了一条基于破骨细胞铁死亡的 DOP 调控机制, 并为 DOP 相关研究提供了潜在靶点。然而目前尚不明确

ELAVL1 通过何种方式调控高糖诱导的破骨细胞铁死亡,这也是本研究的主要不足。本研究拟在后续研究中结合靶向预测网站挖掘 ELAVL1 的下游 RNA 靶标,探究 ELAVL1 调控破骨细胞铁死亡的确切靶点和作用机制。

参 考 文 献 :

- [1] MARIADOSS A V A, SIVAKUMAR A S, LEE C H, et al. Diabetes mellitus and diabetic foot ulcer: etiology, biochemical and molecular based treatment strategies via gene and nanotherapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113134.
- [2] DEFEUDIS G, MAZZILLI R, TENUTA M, et al. Erectile dysfunction and diabetes: a melting pot of circumstances and treatments[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2022, 38(2): e3494.
- [3] HUANG R, WANG H Y, SHEN Z Y, et al. Increased glycemic variability evaluated by continuous glucose monitoring is associated with osteoporosis in type 2 diabetic patients[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 861131.
- [4] 任明诗, 丁羽, 李子涵, 等. 成骨细胞与破骨细胞相互调节作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(6): 822-827.
- [5] YE X S, JIANG J J, YANG J, et al. Specnuezhenide suppresses diabetes-induced bone loss by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, 54(8): 1080-1089.
- [6] CHEN M, LIN W M, YE R, et al. PPAR β/δ agonist alleviates diabetic osteoporosis via regulating M1/M2 macrophage polarization[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 753194.
- [7] 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.
- [8] 张志达. 黄芩素调控 SLC7A11/GPX4 轴抑制铁死亡预防糖尿病性骨质疏松的机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [9] BAO J H, YAN Y X, ZUO D H, et al. Iron metabolism and ferroptosis in diabetic bone loss: from mechanism to therapy[J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1178573.
- [10] AN Y N, ZHANG H F, WANG C, et al. Activation of ROS/ MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [11] 黎森, 何琪, 曾嘉旭, 等. 骨科相关疾病发生发展中的铁超载[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(17): 2723-2728.
- [12] ISHII K A, FUMOTO T, IWAI K, et al. Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation[J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 259-266.
- [13] NI S, YUAN Y, QIAN Z, et al. Hypoxia inhibits RANKL-induced ferritinophagy and protects osteoclasts from ferroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 169: 271-282.
- [14] MA Q C, LU Q L, LEI X X, et al. Relationship between HuR and tumor drug resistance[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(7): 1999-2014.
- [15] 陈禹鑫, 殷文婕, 蒋壮, 等. RNA 结合蛋白 ELAVL1 与肿瘤进展的关系研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(13): 65-70.
- [16] KOTA S K, LIM Z W, KOTA S B. Elavl1 impacts osteogenic differentiation and mRNA levels of genes involved in ECM organization[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 606971.
- [17] REN Y F, YANG M W, WANG X D, et al. ELAV-like RNA binding protein 1 regulates osteogenesis in diabetic osteoporosis: involvement of divalent metal transporter 1[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 546: 111559.
- [18] DENG M S, LUO J, CAO H, et al. METTL14 represses osteoclast formation to ameliorate osteoporosis via enhancing GPX4 mRNA stability[J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(9): 2057-2068.
- [19] ZHENG D L, CUI C L, SHAO C, et al. Coenzyme Q10 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulation of mitochondrial apoptosis and oxidative stress in RAW264.7 cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(7): e22778.
- [20] WITTRANT Y, GORIN Y, WOODRUFF K, et al. High d(+) glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *Bone*, 2008, 42(6): 1122-1130.
- [21] YANG Y Q, LIN Y X, WANG M Q, et al. Targeting ferroptosis suppresses osteocyte glucolipotoxicity and alleviates diabetic osteoporosis[J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 26.
- [22] GE W W, JIE J, YAO J, et al. Advanced glycation end products promote osteoporosis by inducing ferroptosis in osteoblasts[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(4): 140.
- [23] 石玉. 能量代谢在成骨和破骨细胞中的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(5): 501-509.
- [24] DA W C L, TAO L, ZHU Y. The role of osteoclast energy metabolism in the occurrence and development of osteoporosis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 675385.
- [25] OSMA-GARCIA I C, CAPITAN-SOBRINO D, MOUYSSSET M, et al. The RNA-binding protein HuR is required for maintenance of the germinal centre response[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6556.
- [26] SCHULTZ C W, PREET R, DHIR T, et al. Understanding and targeting the disease-related RNA binding protein human antigen R (HuR)[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2020, 11(3): e1581.
- [27] SUI M X, XU D, ZHAO W Y, et al. CIRBP promotes ferroptosis by interacting with ELAVL1 and activating ferritinophagy during renal ischaemia-reperfusion injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(13): 6203-6216.

(李科 编辑)

本文引用格式: 黄碧, 蒋洁, 邵挥戈. 基于糖尿病骨质疏松细胞模型探究 ELAVL1 对破骨细胞铁死亡的调控作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(10): 38-46.

Cite this article as: HUANG B, JIANG J, SHAO H G. Investigating roles of ELAVL1 in regulating ferroptosis of osteoclasts based on cell models of diabetic osteoporosis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(10): 38-46.