

铁过载对Wnt信号诱导的ST2细胞成骨分化的作用及机制

罗岑 武异洵 刘忻钰 涂小林*

(重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 该研究探究铁过载对Wnt信号诱导的小鼠骨髓基质细胞(ST2)成骨分化的作用及其可能的机制。采用柠檬酸铁铵(FAC)模拟铁过载微环境,用碱性磷酸酶(ALP)染色及生化定量检测成骨分化水平, qRT-PCR检测成骨分化标志基因 Alp 、 $Runx2$ 、 Osx 、 $Coll1$ 以及Wnt信号靶基因 $Smad6$ 、 $CyclinD1$ 、 $Lef1$ 、 $BMP4$ 的mRNA表达水平,免疫荧光法检测 β -catenin入核情况。结果显示,铁过载剂量依赖性抑制Wnt信号诱导的ST2成骨分化,同时显著降低Wnt信号诱导的成骨分化标志基因及Wnt信号靶基因的表达($P<0.05$),且铁过载抑制Wnt信号诱导的 β -catenin入核。综上所述,铁过载抑制Wnt信号诱导的ST2细胞成骨基因和Wnt靶基因的表达,并通过抑制 β -catenin入核而抑制ST2细胞成骨分化。

关键词 铁过载; Wnt信号; 成骨分化

The Effect and Mechanism of Iron Overload in Wnt Signaling-Induced Osteoblast Differentiation of ST2 Cells

LUO Cen, WU Yixun, LIU Xinyu, TU Xiaolin*

(Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of iron overload on osteoblast differentiation of mouse bone marrow stromal cells (ST2) mediated by Wnt signaling and its possible mechanism. FAC (ferric ammonium citrate) was used to mimic the iron overload microenvironment. The expression and activity of alkaline phosphatase were detected to evaluate osteoblast differentiation level. The mRNA expression of osteoblast marker genes Alp , $Runx2$, Osx , $Coll1$ and Wnt target genes $Smad6$, $CyclinD1$, $Lef1$, $BMP4$ were detected by qRT-PCR. Nuclear localization of β -catenin in the cells was detected by immunofluorescence. These results showed that iron overload dose-dependently inhibited Wnt signaling-induced osteoblast differentiation of ST2, and significantly reduced the expression of Wnt signaling-induced osteoblast marker genes and Wnt target genes ($P<0.05$). Besides, iron overload inhibited Wnt signaling-induced β -catenin entry into the nucleus. In conclusion, iron overload inhibits the osteoblast differentiation of ST2 induced by Wnt signaling via inhibiting the entry of β -catenin into the nucleus.

Keywords iron overload; Wnt signaling; osteoblast differentiation

骨质疏松症是一种世界性的慢性疾病,其特点是骨量降低、骨微结构恶化、骨折风险增加^[1]。目前,骨质疏松症已经成为一个重要的公共健康问题,每年

影响着全世界数百万人,随着人口的逐渐老龄化,这一情况日益加剧。以往对骨质疏松症的机制研究主要集中在钙和维生素D的生物学功能方面。近年研究

收稿日期: 2021-01-23 接受日期: 2021-03-08

国家自然科学基金(批准号: 81672118)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63651934, E-mail: xiaolint@hotmail.com

Received: January 23, 2021 Accepted: March 8, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672118)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63651934, E-mail: xiaolint@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5526>

发现, 铁代谢与骨质疏松密切相关, 铁代谢紊乱影响骨内稳态^[2]。临床研究表明, 镰刀状红细胞病^[3]、地中海贫血、遗传性血色素沉着病^[4]、血红蛋白病和绝经后骨质疏松^[5]等多种慢性铁积累疾病伴有骨质弱化、骨量降低、骨质疏松等特点。此外, 在不同的动物模型中, 铁过载会导致骨质疏松的表型, 这意味着过量的铁对骨骼是有害的^[6]。细胞研究表明, 铁过载选择性地抑制骨髓间充质干细胞的骨形成^[7], 而不影响软骨和成脂肪分化^[8-9]; 铁螯合剂去铁铵(deferoxamine, DFO)恢复了碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性和钙沉积^[10], 同时DFO被认为会激活Wnt/ β -catenin信号从而促进成骨分化以及血管形成^[11]。

Wnt/ β -catenin信号通路作为骨发育的五大信号之一, 对骨骼的发育, 骨细胞分化、生长、凋亡及以骨量调节等都有十分重要的作用, 尤其是在成骨细胞的分化、成熟中至关重要。而目前铁过载对成骨的不利作用与Wnt信号的关系尚未见相关报道。

铁过载已被证实是骨质疏松的独立危险因素^[12]。但铁过载影响成骨的机制目前尚未被清楚报道, 需要进一步深入研究。而Wnt信号又在成骨分化过程中起关键性的作用^[13]。因此, 本研究探究了铁过载对Wnt信号诱导的ST2成骨分化的作用及机制, 旨在为慢性铁积累疾病诱发的骨代谢异常的治疗提供新的理论依据和研究方向。

1 材料与方法

1.1 细胞

Wnt3a细胞、L-ctrl细胞及ST2细胞购于美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC)。Wnt3a细胞是指由Wnt3a表达载体转染L细胞后从含G418的培养基中筛选得到的稳转株, Wnt3a细胞是一种小鼠皮下结缔组织细胞, 形态呈成纤维细胞样。Wnt3a细胞分泌有生物活性的Wnt3a蛋白, 是目前Wnt3a条件培养基最好的细胞来源, L-ctrl细胞是不表达Wnt3a的空载对照L细胞。

1.2 试剂

BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; CHIR99021(C91)购自美国MedChemExpress公司; α -MEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; 青、链霉素及胰酶购自美国HyClone公司; TRIzol、逆转录及实时荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;

PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 Wnt3a培养基和L-ctrl条件培养基

Wnt3a细胞和L-ctrl细胞于含10% FBS的 α -MEM培养基中培养3天后更换新的培养基并收集上清, 之后不消化细胞只是每隔2天再次更换新的培养基并收集上清, 连续4次后更换细胞, 混匀所有上清后通过后续实验测定合适的Wnt3a培养基与 α -MEM培养基的使用比例。

1.4 细胞培养

ST2细胞用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的 α -MEM培养基培养, 当ST2细胞密度大约为90%时用胰酶消化传代, 或以 3.0×10^4 个/孔的密度接种于24孔板中, 再置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养。

1.5 ALP染色

按实验设计处理ST2细胞3天后用PBS清洗2次, 4%多聚甲醛常温固定10~15 min。然后用BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒配制染色液于37 $^{\circ}$ C避光孵育15~30 min显色, 染色达到要求后去除显色液并及时拍照保存。

1.6 ALP生化定量

按实验设计处理ST2细胞3天后每孔加入300 μ L裂解液, 超声破碎细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min, 取上清液加入显色底物, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 加入终止液后测定样品在405 nm处的吸光度(D)值。同时吸取上清液加入BCA工作液, 测定562 nm处的吸光度值。以405 nm与562 nm处的吸光度值的比值作为样品的ALP生化定量。

1.7 qRT-PCR

Trizol法提取细胞总RNA, 通过反转录得到cDNA, cDNA反应液进行5倍稀释后, 作为qRT-PCR反应的模板。相对表达量采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}分析, 以GAPDH的表达水平作为标准。所使用的引物见表1。

1.8 免疫荧光

按照实验设计将细胞接种于24孔板中过夜贴壁, 然后加入C91和柠檬酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC)作用于ST2细胞24 h。TBS洗涤后用4%甲醛固定10 min, 0.25% Triton X-100透化30 min, 5% BSA室温封闭30 min。再与一抗(兔抗大鼠 β -catenin, 用1% BSA按1:150稀释)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。加入山羊抗兔荧光抗体(用1% BSA按1:100稀释)于室温下避光作用30 min, 然后加入少量细胞核染料DAPI。在

荧光显微镜下观察并拍照保存。随机选取10个显微镜视野对 β -catenin染色阳性细胞及总细胞进行计数,并计算出 β -catenin染色阳性细胞的百分比。

1.9 统计分析

每组实验均独立重复3次,定量数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析比较多组间差异, t 检验比较两组间差异。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wnt3a诱导ST2细胞成骨分化

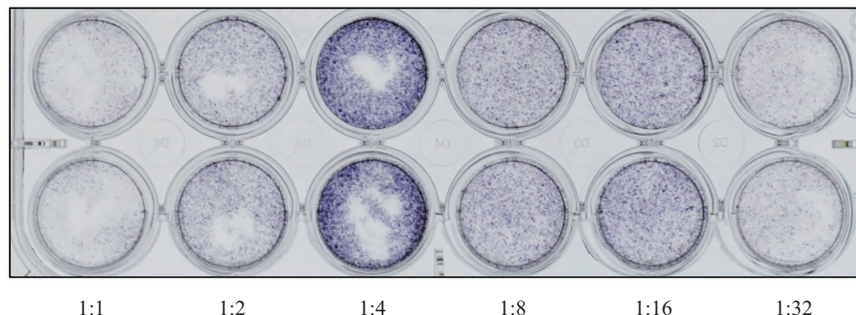
Wnt3a是Wnt信号通路的配体,激活的Wnt信号

对成骨细胞具有重要作用^[14]。前期我们首先验证了Wnt3a促进成骨细胞分化的作用^[14]。ST2细胞在含有Wnt3a的条件培养基中培养后,早期成骨分化的标志物ALP活性明显高于在L-ctrl1对照培养基中培养的ST2细胞。在此基础上收集Wnt3a细胞上清,测定Wnt3a条件培养基与 α -MEM基础培养基最合适的比例。用ALP染色检测Wnt3a培养基与 α -MEM培养基的比例在1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32时ST2细胞的成骨分化作用,结果显示Wnt3a培养基与 α -MEM培养基的比例为1:4时具有最强的促成骨分化作用(图1),因此,后续实验使用比例为1:4的Wnt3a

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i>	Forward: GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT Reverse: GCC TTC TCC ATG GTG GTG GTG AA
<i>Alp</i>	Forward: ACA CCA ATG TAG CCA AGA ATG TCA Reverse: GAT TCG GGC AGC GGT TAC T
<i>Runx2</i>	Forward: CCG TGG CCT TCA AGG TTG T Reverse: TTC ATA ACA GCG GAG GCA
<i>Col1</i>	Forward: GAC AGG CGA ACA AGG TGA CAG AG Reverse: CAG GAG AAC CAG GAG AAC CAG GAG
<i>Osx</i>	Forward: CCC TTC TCA AGC ACC ATT GG Reverse: AAG GGT GGG TAG TCA TTT GCA TA
<i>BMP4</i>	Forward: GAG GAG TTT CCA TCA CGA AGA Reverse: GCT CTG CCG AGG AGA TCA
<i>Smad6</i>	Forward: GTT GCA ACC CCT ACC ACT TC Reverse: GGA GGA GAC AGC CGA GAA TA
<i>CyclinD1</i>	Forward: GTG CGT GCA GAA GGA GAT TGT Reverse: CTC ACA GAC CTC CAG CAT CCA
<i>Lef1</i>	Forward: TGA GCG GCA GAG CAA GTC CAA Reverse: GGC AGA CTC CAA TGG GTA GCT



ALP染色检测经不同比例的Wnt3a培养基与 α -MEM培养基处理3天后ST2细胞的成骨分化水平。

ALP staining was used to detect the osteoblast differentiation of ST2 cells treated with different proportions of Wnt3a and α -MEM mediums for three days.

图1 Wnt3a诱导ST2细胞成骨分化

Fig.1 Wnt3a induces the osteoblast differentiation of ST2 cells

培养基与 α -MEM培养基诱导ST2细胞成骨分化。

2.2 铁过载剂量依赖性抑制Wnt3a诱导的ST2细胞成骨分化

选用浓度为50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的FAC处理ST2细胞, FAC能有效模拟发生在铁过载患者血浆中的非转铁蛋白结合铁(non-transferrin-bound iron, NTBI)^[15]。目前, 临床上发现的铁过载病人最高的血清铁浓度为1 100 $\mu\text{g/dL}$ 即200 $\mu\text{mol/L}$ ^[16], 不需要检测更高的铁浓度, 因为在临床铁过载的疾病患者中没有发现更高的血清铁浓度^[17]。ALP染色结果显示, FAC剂量依赖性地抑制Wnt3a诱导的ST2成骨分化(图2A), 而DFO剂量依赖性地恢复ST2的成骨分化(图2B), ALP活性检测也表明, Wnt3a组成骨分化显著高于L-ctrl对照组, 而随着FAC浓度增加Wnt3a的促成骨分化作用被抑制(图2C)。然而加入铁螯合剂DFO去除铁后成骨分化逐渐恢复(图2D)。综上所述, 铁过载剂量依赖性地抑制ST2成骨分化, 而铁螯合剂DFO可以消除铁过载的抑制作用。

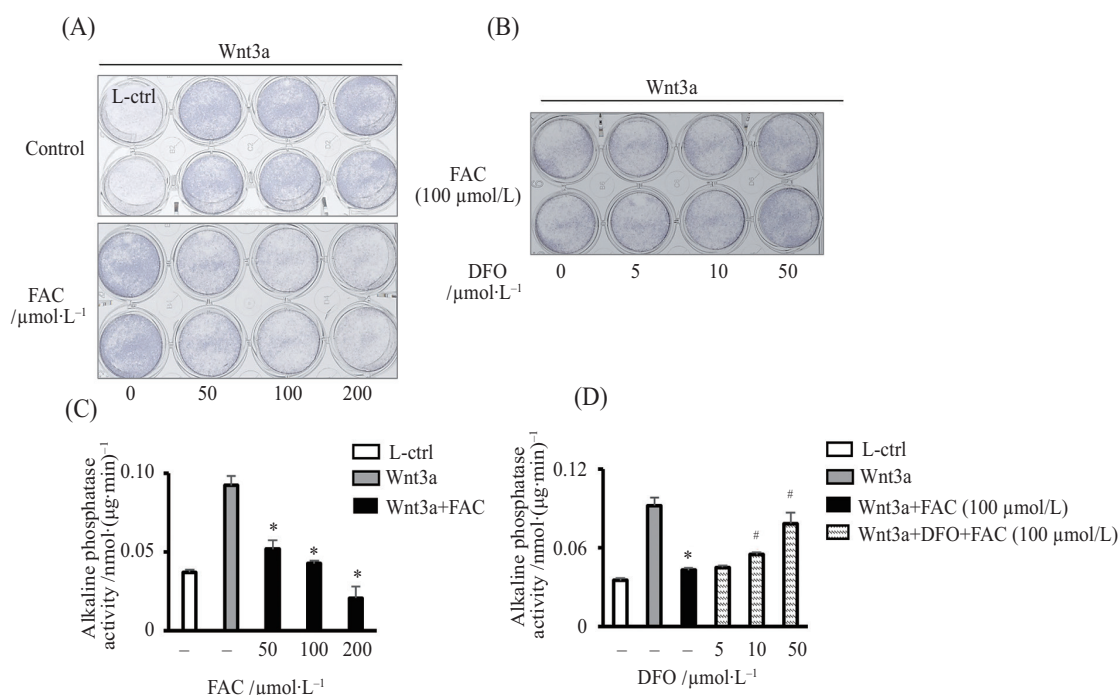
2.3 铁过载抑制C91诱导的ST2细胞成骨分化

为了进一步明确铁过载对Wnt信号的作用, 选用Wnt信号通路小分子激活剂C91, 其选择性抑制

GSK-3 α/β 从而促进 β -catenin入核, 进而激活Wnt信号。用不同浓度的C91(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)单独作用于ST2细胞作为对照组, FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)+C91(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)同时加入作为实验组, 观察FAC对C91诱导成骨分化的影响。ALP染色及生化定量检测显示, 实验组铁过载显著抑制C91诱导的ST2成骨分化(图3A和图3B), 这表明铁过载同时也抑制C91诱导的ST2成骨分化。以上结果再次提示, 铁过载抑制Wnt信号通路。

2.4 铁过载抑制Wnt信号诱导的ST2细胞成骨基因表达

用DMSO、Wnt3a、Wnt3a+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)及C91(5 $\mu\text{mol/L}$)、C91(5 $\mu\text{mol/L}$)+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理ST2, 然后利用qRT-PCR检测成骨分化标志基因*Alp*、*Runx2*、*Osx*、*Col1*的表达情况。结果显示, Wnt3a+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组的成骨分化基因*Alp*、*Runx2*、*Osx*、*Col1*的mRNA水平显著低于Wnt3a组($P<0.05$), 同样, C91(5 $\mu\text{mol/L}$)+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组的成骨分化基因*Alp*、*Runx2*、*Osx*、*Col1*的mRNA水平显著低于C91(5 $\mu\text{mol/L}$)组($P<0.05$), 这说明铁过

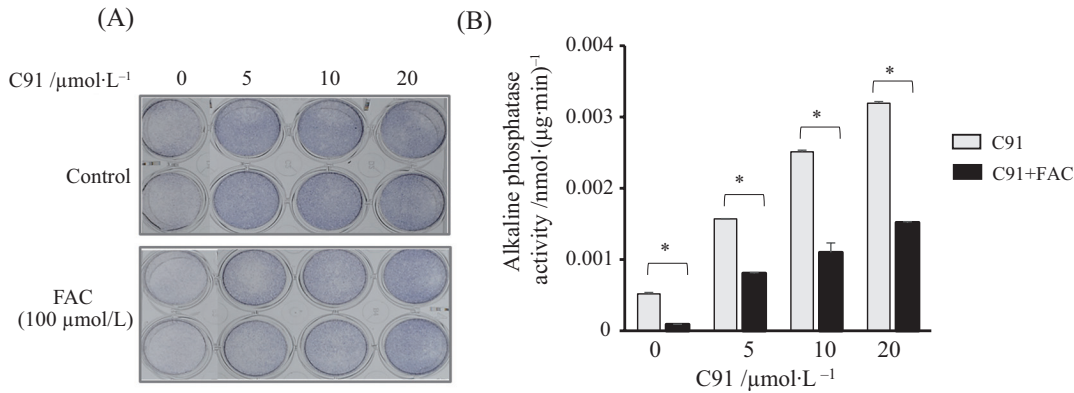


A: ALP染色检测FAC对Wnt3a诱导的ST2细胞成骨分化的作用, L-ctrl为Wnt3a的阴性对照。B: ALP染色检测DFO挽救FAC对Wnt3a诱导ST2成骨分化的抑制作用。C、D: ALP生化定量检测。* $P<0.05$, 与Wnt3a组相比; # $P<0.05$, 与Wnt3a+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)组相比。“-”表示没加处理。

A: ALP staining was used to detect the effect of FAC on Wnt3a-induced osteogenic differentiation of ST2 cells. L-ctrl was the negative control of Wnt3a. B: ALP staining was used to detect the effect of DFO on Wnt3a-induced osteogenic differentiation of ST2 cells. C,D: quantitative detection of ALP biological activity. * $P<0.05$ vs Wnt3a group; # $P<0.05$ vs Wnt3a+FAC (100 $\mu\text{mol/L}$) group. “-” means no treatment.

图2 铁过载剂量依赖性抑制Wnt3a诱导的ST2细胞成骨分化

Fig.2 Iron overload dose-dependently inhibits Wnt3a-induced osteogenic differentiation of ST2 cells

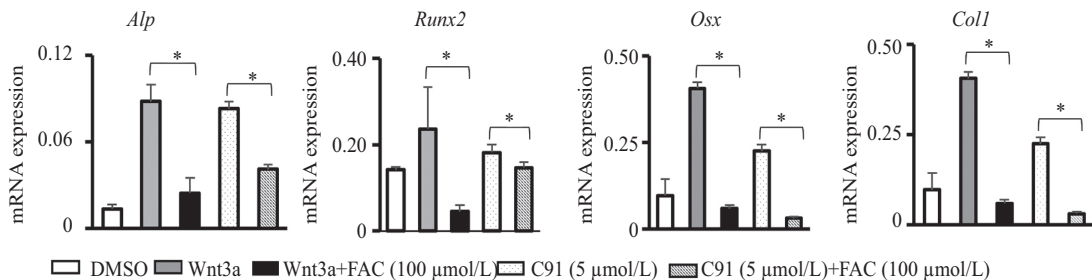


A: ALP染色检测FAC抑制C91诱导的ST2成骨分化, control为不同浓度C91(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)处理ST2的对照组, FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)组为同时加不同浓度C91处理ST2的实验组。B: ALP生化定量检测。* $P < 0.05$ 。

A: ALP staining was used to detect the inhibition of C91-induced osteogenic differentiation of ST2 cells by FAC. The control group was treated with different concentrations of C91 (0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$), and the FAC (100 $\mu\text{mol/L}$) group was the experimental group treating ST2 cells with different concentrations of C91. B: quantitative detection of ALP biological activity. * $P < 0.05$.

图3 铁过载抑制C91激活Wnt信号诱导的ST2细胞成骨分化

Fig.3 Iron overload inhibits the osteogenic differentiation of ST2 cells induced by C91-activated Wnt signal



qRT-PCR检测成骨分化标志基因*Alp*、*Runx2*、*Osx*、*Coll*的表达水平。* $P < 0.05$ 。

qRT-PCR was used to detect the expression of osteoblast genes *Alp*, *Runx2*, *Osx*, and *Coll*. * $P < 0.05$.

图4 铁过载抑制Wnt信号激活诱导的ST2细胞成骨分化基因表达

Fig.4 Iron overload inhibits the expression of ST2 cells osteoblast genes induced by Wnt signal activation

载同时抑制由Wnt3a和C91激活的Wnt信号诱导的ST2成骨分化基因表达(图4)。

2.5 铁过载抑制Wnt信号靶基因表达

为了验证铁过载对Wnt信号靶基因的作用, 设置处理组DMSO、Wnt3a、Wnt3a+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)及C91(5 $\mu\text{mol/L}$)、C91(5 $\mu\text{mol/L}$)+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)组分别作用于ST2细胞, 用qRT-PCR检测Wnt信号靶基因*Smad6*、*CyclinD1*、*Lef1*、*BMP4*的表达情况。结果显示, Wnt3a+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组的Wnt信号靶基因的mRNA水平显著低于Wnt3a组($P < 0.05$), 同样C91(5 $\mu\text{mol/L}$)+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组的Wnt信号靶基因的mRNA水平显著低于C91(5 $\mu\text{mol/L}$)组($P < 0.05$) (图5A), 这表明铁过载抑制由Wnt3a和C91激活的Wnt信号靶基因的表达。

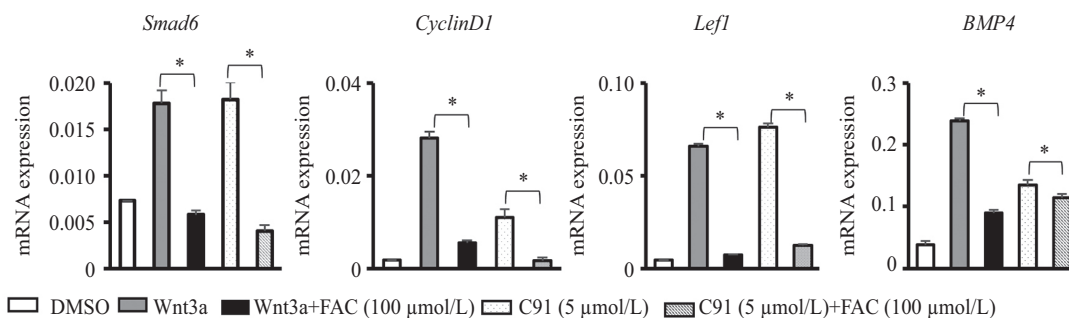
2.6 铁过载抑制C91诱导的 β -catenin入核

深入探究铁过载抑制Wnt信号从而抑制ST2

成骨分化的机制, β -catenin是经典Wnt信号通路的重要下游因子, 进入细胞核内激活Wnt下游靶基因表达, 免疫荧光染色结果显示, 经C91(5 $\mu\text{mol/L}$)处理的ST2细胞表达的 β -catenin荧光强度显著高于FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组, 同时C91诱导的 β -catenin表达被FAC显著抑制(图6A)。同时计算 β -catenin入核染色阳性细胞的百分比(图6B), 结果也显示, C91(5 $\mu\text{mol/L}$)+FAC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组的 β -catenin阳性细胞显著低于C91(5 $\mu\text{mol/L}$)处理组($P < 0.05$), 这表明铁过载是通过减少 β -catenin入核从而抑制Wnt信号进而抑制ST2成骨分化的。

3 讨论

近年来研究发现, 铁代谢与骨质疏松之间的关系不容忽视^[2]。与铁过载有关的疾病常常并发骨稳态异常相关的疾病。探索铁过载导致骨稳态异

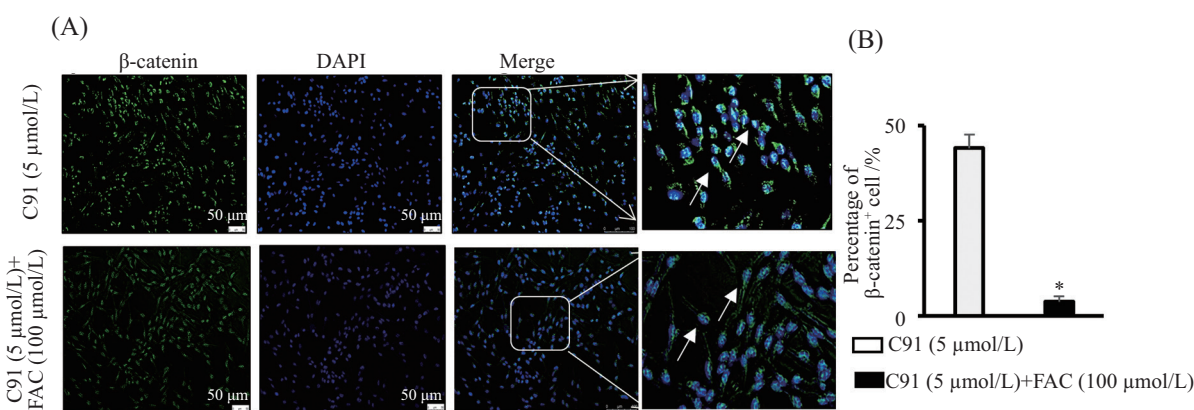


qRT-PCR检测Wnt信号靶基因*Smad6*、*CyclinD1*、*Lef1*、*BMP4*的表达水平。* $P < 0.05$ 。

The expression of Wnt target genes *Smad6*, *CyclinD1*, *Lef1* and *BMP4* were detected by qRT-PCR. * $P < 0.05$.

图5 铁过载抑制Wnt信号靶基因的表达

Fig.5 Iron overload inhibits the expression of Wnt target genes



A: 免疫荧光染色检测β-catenin入核, 绿色荧光为β-catenin, 蓝色荧光DAPI为细胞核, 白框表示放大区域, 白色箭头表示入核的β-catenin。B: β-catenin染色阳性细胞计数。* $P < 0.05$ 。

A: immunofluorescence was used to detect the entry of β-catenin into the nucleus. The green fluorescence was β-catenin, and the blue fluorescence DAPI was nucleus. The white box indicates the enlarged area. The white arrows represent the β-catenin entering the nucleus. B: β-catenin staining positive cell count. * $P < 0.05$.

图6 铁过载抑制β-catenin入核

Fig.6 Iron overload inhibits β-catenin from entering into the nucleus

常的机制将有助于预防和治疗相关疾病。而Wnt/β-catenin作为骨发育的重要信号通路参与了成骨细胞的整个分化过程^[18]。除此以外有研究表明, 在皮肤衰老过程中铁过载通过Fenton反应产生活性较高的羟基氧自由基, 促进机体活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平升高^[8]。ROS可以与T细胞因子(T-cell factor, TCF)/淋巴样增强因子(lymphoid enhancing factor, LEF)竞争性结合β-catenin信号通路, 从而抑制Wnt/β-catenin通路^[19]。以上研究都表明, 铁过载导致骨质疏松、骨丢失的作用机制可能和Wnt信号有密切的关系。

YAMASKI和HAGIWARA^[19]研究了铁离子对MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化的影响。他们发现, 铁以一种剂量依赖的方式抑制MC3T3-E1细胞的活力及成骨分化功能, 减少Col1、Alp的表达。这与

本研究的发现非常类似, 此外, 也有研究发现, 铁过载抑制PI3K/AKT/FOX3a/DUSP14信号通路^[20], 抑制成骨细胞的生长和矿化, 进而诱导成骨细胞增殖的G₁期细胞周期阻滞^[21]。而Wnt信号作为骨发育的五大信号之一, 对于成骨细胞生长、分化、矿化及增殖都至关重要, 但铁过载对Wnt信号的影响未见相关报道。

本研究结果显示, Wnt3a可以激活Wnt信号, 诱导ST2细胞成骨分化, 而FAC可以剂量依赖性地抑制Wnt3a对ST2成骨分化的作用。FAC同样可以显著抑制小分子药物C91激活Wnt信号诱导的ST2成骨分化。其机制可能是抑制β-catenin的表达及入核。

综上所述, 本研究证明FAC剂量依赖性地抑制Wnt3a和C91诱导的ST2成骨分化, 并发现其机制可能是铁过载抑制Wnt/β-catenin信号转录激活。然而,

铁过载抑制 β -catenin入核的机制还需要深入研究。Wnt3a激活Wnt信号上游, C91作用Wnt信号中游, 因此铁过载抑制Wnt信号的作用部位也需进一步探索。本研究为探讨铁过载导致骨质疏松、骨丢失的机制提供新的方向, 为其防护与治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

- [1] COLL P P, PHU S, HAJJAR S H, et al. The prevention of osteoporosis and sarcopenia in older adults [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2021, doi: 10.1111/jgs.17043.
- [2] D'AMELIO P, CRISTOFARO M A, TAMONE C, et al. Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss [J]. *Bone*, 2008, 43(6): 1010-5.
- [3] OSUNKWO I. An update on the recent literature on sickle cell bone disease [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2013, 20(6): 539-46.
- [4] ANGELOPOULOS N G, GOULA A K, PAPANIKOLAOU G, et al. Osteoporosis in HFE2 juvenile hemochromatosis. A case report and review of the literature [J]. *Osteoporos Int*, 2006, 17(1): 150-5.
- [5] FELDBRIN Z, LUCKISH A, SHARGORODSKY M. Effects of long-term risedronate treatment on serum ferritin levels in postmenopausal women with osteoporosis: the impact of cardiovascular risk factor load [J]. *Menopause*, 2016, 23(1): 55-9.
- [6] CHEN X, YANG J, DONG D, et al. Iron overload as a high risk factor for microgravity-induced bone loss [J]. *Acta Astronaut*, 2019, 164(11): 407-14.
- [7] CHANG Y K, LIU Y P, HO J H, et al. Amine-surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(9): 1499-506.
- [8] LI G F, PAN Y Z, SIROIS P, et al. Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(10): 2403-8.
- [9] ZARJOU A, JENEY V, AROSIO P, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(1): 164-72.
- [10] CASALE M, CITARELLA S, FILOSA A, et al. Endocrine function and bone disease during long-term chelation therapy with deferasirox in patients with β -thalassemia major [J]. *Am J Hematol*, 2014, 89(12): 1102-6.
- [11] BASCHANT U, RAUNER M, BALAIAN E, et al. Wnt5a is a key target for the pro-osteogenic effects of iron chelation on osteoblast progenitors [J]. *Haematologica*, 2016, 101(12): 1498-507.
- [12] JENEY V. Clinical impact and cellular mechanisms of iron overload-associated bone loss [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 77.
- [13] TU X, DELGADO-CALLE J, CONDON K W, et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(5): E478-86.
- [14] TU X, JOENG K S, NAKAYAMA K I, et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(1): 113-27.
- [15] CABANTCHIK Z I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 45.
- [16] BORRIELLO A, CALDARELLI I, SPERANZA M C, et al. Iron overload enhances human mesenchymal stromal cell growth and hampers matrix calcification [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(6): 1211-23.
- [17] MESSER J G, KILBARGER A K, ERIKSON K M, et al. Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures [J]. *Bone*, 2009, 45(5): 972-9.
- [18] ZHANG X, CHEN Q, LIU J, et al. Parthenolide promotes differentiation of osteoblasts through the Wnt/ β -Catenin signaling pathway in inflammatory environments [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2017, 37(9): 406-14.
- [19] YAMASAKI K, HAGIWARA H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191(2/3): 211-5.
- [20] XIA D, WU J, XING M, et al. Iron overload threatens the growth of osteoblast cells via inhibiting the PI3K/AKT/FOXO3a/DUSP14 signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, doi: 10.1002/jcp.28217.
- [21] CEN W J, FENG Y, LI S S, et al. Iron overload induces G1 phase arrest and autophagy in murine preosteoblast cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6779-89.