

骨细胞铁超载通过INSL3通路抑制成骨细胞成骨功能对绝经后骨质疏松症的影响的研究

刘少强¹ 邱雪² 李锐冬¹ 汪豪^{1*}

(¹重庆医科大学附属第二医院骨科关节外科, 重庆 400010; ²重庆市第十三人民医院心内科, 重庆 400000)

摘要 该文探究绝经后骨质疏松症中铁超载是否可引起骨细胞铁死亡及其他功能改变, 影响其对骨正常生理功能的调控从而引起骨质疏松症的发生, 并明确具体的机制。体外模拟骨细胞铁超载环境, 使用共培养探究骨细胞铁超载对成骨细胞成骨功能的影响, 使用转录组测序(RNA-Seq)寻找潜在的信号通路并进行验证。使用去卵巢小鼠模型体内模拟绝经后骨质疏松并进行干预, 使用组织学和影像学方法对骨皮质和骨小梁情况进行检测, 并检测铁死亡相关分子的变化情况。体外实验发现, 铁超载可诱导MLO-Y4细胞发生铁死亡。共培养结果表明, 骨细胞铁超载降低了MC3T3-E1细胞成骨矿化能力, 并抑制了成骨相关蛋白的表达。转录组测序结果表明MLO-Y4细胞铁超载抑制MC3T3-E1细胞的INSL3通路, 该文通过使用Western blot检测此通路的关键蛋白进行验证。ELISA检测发现铁超载干预引起MLO-Y4细胞炎症因子分泌增加。体内实验发现, 去卵巢模型的小鼠股骨骨皮质更薄, 骨小梁更疏松, 免疫组化结果表明其铁死亡水平更高, 而使用去铁胺进行干预能缓解骨质疏松。骨细胞铁超载能引起骨细胞铁死亡, 并通过成骨细胞的INSL3信号通路来抑制成骨作用, 从而促进绝经后骨质疏松症的进展。

关键词 绝经后骨质疏松症; 铁死亡; 骨细胞; INSL3信号通路

The Impact of Osteocytic Iron Overload on Postmenopausal Osteoporosis through Inhibiting the Osteoblast Osteogenesis via INSL3 Signaling Pathway

LIU Shaoqiang¹, QIU Xue², LI Ruidong¹, WANG Hao^{1*}

(¹Center for Joint Surgery, Department of Orthopedic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; ²Department of Cardiology, the Thirteenth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400000, China)

Abstract This study aimed to explore whether iron overload in postmenopausal osteoporosis condition can induce the ferroptosis and functional changes of osteocyte, thereby affecting its regulation of bone physiology and leading to osteoporosis, and to clarify the underlying mechanisms. An *in vitro* model of osteocytic iron overload was established, and co-culture experiments were conducted to examine the effects of osteocyte iron overload on the osteoblast osteogenesis. RNA-Seq was used to identify potential signaling pathways followed by validation. *In vivo* studies utilized ovariectomized mice to simulate postmenopausal osteoporosis. Cortex and trabecula were evaluated using histological and imaging techniques, along with measurements of ferroptosis-related proteins. *In vitro*, iron overload could induce the ferroptosis of MLO-Y4 cells. Co-culture results showed that osteocytic iron overload reduced the osteogenic mineralization ability of MC3T3-E1 cells and suppressed the expression of os-

收稿日期: 2025-05-18

接受日期: 2025-07-29

重庆市自然科学基金博士后项目(批准号: CSTB2023NSCQ-BHX0096)资助的课题

*通信作者。Tel: 18516587170, E-mail: haowang@hospital.cqmu.edu.cn

Received: May 18, 2025

Accepted: July 29, 2025

This work was supported by the Postdoctoral Program of Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTB2023NSCQ-BHX0096)

*Corresponding author. Tel: +86-18516587170, E-mail: haowang@hospital.cqmu.edu.cn

teogenic proteins. Transcriptomic sequencing revealed that iron overload of MLO-Y4 cells inhibited the INSL3 pathway in MC3T3-E1 cells. ELISA detected increased inflammatory cytokines secreted from MLO-Y4 cells under iron overload. *In vivo*, ovariectomized mice exhibited thinner bone cortex and more osteoporotic trabecula. Immunohistochemistry indicated higher ferroptosis level, while deferoxamine intervention alleviated osteoporosis. Osteocytic iron overload can induce ferroptosis, which suppresses the INSL3 signaling pathway in osteoblasts, inhibiting osteogenesis and promoting the progression of postmenopausal osteoporosis.

Keywords postmenopausal osteoporosis; ferroptosis; osteocyte; INSL3 signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis)是一种常见的骨病,以低骨量和骨微结构的破坏为主要特征。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是最常见的骨质疏松的类型之一。绝经后骨质疏松症是因为绝经后雌激素水平降低,从而导致破骨细胞分化和活性增加,骨吸收超过骨形成,从而引起骨快速丢失。这将引起骨矿物密度降低、骨微结构恶化、骨强度降低,从而增加脆性骨折的风险^[1]。在我国60岁以上的女性中约有33%患有绝经后骨质疏松症^[2]。国外的研究表明大约50%的绝经后女性会发生脆性骨折,导致疼痛、运动障碍和生活质量下降^[3]。因此预防和治疗绝经后骨质疏松对提升老年女性生活质量至关重要。

铁死亡(ferroptosis)是近年来发现的一种不同于坏死、凋亡、焦亡等方式的细胞程序性死亡方式。2003年DOLMA等^[4]发现使用小分子化合物erastin能够使细胞以一种不同于凋亡的方式死亡。2012年DIXON等^[5]进一步发现这种新死亡方式可以被铁螯合剂所抑制,但无法被凋亡抑制剂和坏死抑制剂所抑制,因此将这种死亡方式命名为铁死亡。进一步研究发现,铁死亡的细胞分子机制是细胞内过量的 Fe^{2+} 通过Fenton反应引起细胞内活性氧水平的升高,从而引起细胞膜和细胞器膜发生脂质过氧化,导致膜结构破裂进而导致细胞死亡^[6-7]。在绝经后骨质疏松症中可以检测到骨组织铁死亡水平升高,且目前已经证实铁死亡可能发生在骨细胞、成骨细胞和破骨细胞中^[8]。骨细胞铁死亡被证明能够增强破骨细胞的功能,从而促进骨质疏松症的进展^[9],而骨细胞铁死亡对成骨细胞功能的调控尚不明确。

松弛素家族肽(relaxin family peptide, RXFP)是松弛素的G蛋白偶联受体,松弛素是一种胰岛素样激素,具有多种功能,包括细胞外基质重塑、胶原降解和基质金属蛋白酶上调^[10]。有研究证明松弛素通

过靶向RXFP-1诱导破骨细胞生成,RXFP-1在破骨细胞中表达并由RANKL诱导^[11]。INSL3主要由间质细胞产生,特异性靶向G蛋白偶联受体RXFP2。INSL3/RXFP2通路被报道可以抑制成骨细胞成骨分化能力促进骨质疏松症的发生^[12-13]。因此,本实验旨在研究骨细胞铁超载是否可以通过INSL3通路影响成骨细胞的成骨功能,并通过体内及体外实验对骨细胞铁超载状况下成骨细胞成骨相关指标进行检测,以期进一步阐述骨细胞铁超载与绝经后骨质疏松症的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

MLO-Y4细胞系购自思泰默生物有限公司;MC3T3-E1购自中国科学院细胞库; α -MEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶EDTA购自Gibco公司;活性氧检测试剂盒、CCK-8试剂盒购自深圳市白鲨科技有限公司;柠檬酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC)、去铁胺(deferoxamine, DFO)、茜素红S染料购自Sigma-Aldrich公司;所有的ELISA试剂盒均购自Abcam公司;OCN、OPN、Runx2抗体购自Santa Cruz公司;其余抗体购自Proteintech公司。

1.2 细胞培养

MLO-Y4细胞和MC3T3-E1细胞均使用 α -MEM完全培养基(含10% FBS和1%青霉素/链霉素)进行培养。选取生长状态良好的细胞进行后续实验。当细胞生长到覆盖80%~90%培养皿时使用胰酶EDTA进行传代。

1.3 细胞活性检测

将MLO-Y4细胞接种在96孔细胞培养板中,接种密度为 5×10^3 /孔,使用不同的干预[不同浓度的FAC(0、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)]处理细胞24 h。然后将细胞用PBS洗涤2次,然后与含有10% CCK-8溶液的无血清 α -MEM培养基在37 °C孵育1 h。使用酶

标仪测量在450 nm波长处的吸光度值并记录。

1.4 ROS水平测定

将MLO-Y4细胞接种于6孔板或共聚焦皿中, 使用不同浓度的FAC干预1天后, 将细胞用PBS洗涤2次, 然后与含有10 μ mol/L DCF的无血清 α -MEM培养基在37 $^{\circ}$ C温育。30 min后, 用新鲜的无探针培养基替换染色溶液。使用共聚焦显微镜(FV3000, Olympus, 德国)观察细胞。并使用流式细胞仪(CytoFLOX, Beckman Coulter, 美国)进行检测, 使用FlowJo软件(FlowJo LLC, 美国)进行后续分析。

1.5 透射电子显微镜(TEM)观察MLO-Y4细胞线粒体结构

培养MLO-Y4细胞至对数生长期(70%~80%融合度), 并用FAC干预MLO-Y4细胞24 h后, 使用PBS洗涤细胞2次, 胰酶在37 $^{\circ}$ C消化2 min, 1 200 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min收集细胞, 然后用2.5%戊二醛固定并于4 $^{\circ}$ C下过夜。根据标准程序预处理细胞, 包括乙醇梯度脱水、树脂渗透、包埋与聚合、超薄切片、铀铅双染色。在透射电子显微镜(JEM-1400, JEOL, 日本)上观察线粒体的超微结构。

1.6 条件培养基收集

将MLO-Y4细胞分别在 α -MEM完全培养基、含有FAC的 α -MEM完全培养基, 含有DFO的 α -MEM完全培养基, 含有FAC和DFO的 α -MEM完全培养基中培养24 h后, 用PBS洗涤细胞2次, 随后四组都加入新的 α -MEM完全培养基, 培养24 h后收获条件培养基, 用于后续实验。

1.7 ELISA检测MLO-Y4细胞分泌的细胞因子浓度

收集四组条件培养基后以3 000 r/min在4 $^{\circ}$ C离心10 min后取上清液。在抗体预包被的微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体, 经过37 $^{\circ}$ C温育15 min, 并彻底洗涤, 用底物TMB显色, 用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值, 计算样品浓度。

1.8 茜素红染色

将MC3T3-E1细胞接种于24孔板中, 接种密度为 2×10^4 /孔, 经过成骨诱导分化14天后, 将细胞用PBS洗涤2次, 并用4%多聚甲醛室温下固定30 min。用茜素红溶液在室温下将细胞染色30 min。染色后, 用去离子水洗涤细胞2次。在倒置显微镜下观察拍照, 使用ImageJ软件对矿化结节进行定量分析。

1.9 转录组测序(RNA-Seq)

将MC3T3-E1细胞接种在6孔板中, 接种密度为

1×10^5 /孔, 培养基组成为50%的条件培养基和50%的 α -MEM完全培养基。当细胞生长到覆盖80%~90%培养皿时, 将培养基改为成骨分化培养基。成骨分化培养3天之后, 去除培养基, 使用PBS洗涤之后, 使用Trizol提取总RNA, 构建cDNA文库后, 使用Illumina测序平台进行测序。测序过程由武汉迈维代谢生物科技公司完成。

1.10 Western blot检测蛋白表达情况

收集处理后的细胞, 使用RIPA裂解液进行裂解, 提取总蛋白, 使用BCA法测定蛋白浓度。配制分离胶以及浓缩胶, 按每个加样孔约20 μ g蛋白量上样。电泳后转膜到孔径为0.45 μ m的PVDF膜上, 使用5%脱脂奶粉4 $^{\circ}$ C封闭过夜后将膜放入相应的一抗(OCN: sc-74495, Santa Cruz Biotechnology, 1:100; OPN: 22952-1-AP, Proteintech Group, 1:3 000; Runx2: 20700-1-AP, Proteintech Group, 1:1 000; ALP: sc-365765, Santa Cruz Biotechnology, 1:5 000; SL-C7A11: 26864-1-AP, Proteintech Group, 1:3 000; HO-1: 10701-1-AP, Proteintech Group, 1:3 000; GPX4: 67763-1-Ig, Proteintech Group, 1:3 000; Ferritin: 60875-5-Ig, Proteintech Group, 1:5 000; PKA: #4782, Cell Signaling Technology, 1:1 000; pPKA: #4781, Cell Signaling Technology, 1:1 000; MEK: 67872-1-Ig, Proteintech Group, 1:10 000; pMEK: 81304-1-RR, Proteintech Group, 1:10 000; ERK: 66192-1-Ig, Proteintech Group, 1:10 000; pERK: 80031-1-RR, Proteintech Group, 1:5 000; β -Tubulin: 80713-1-RR, Proteintech Group, 1:10 000)中, 在4 $^{\circ}$ C环境中摇床孵育过夜。室温孵育二抗(1:1 000) 1 h后, 使用化学发光成像系统(ChemiDoc Go, Bio-Rad, 美国)进行曝光。使用ImageJ对蛋白表达进行定量分析。

1.11 建立小鼠骨质疏松症模型

该动物研究方案经过重庆医科大学附属第二医院实验动物管理和使用委员会审核通过, 伦理编号为: IACUC-SAHCQMU-2024-00080。本研究使用32只11周龄雌性C57/BL6小鼠[购自重庆恩彼生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2021-0002]。将小鼠随机分为四组, 每组8只, 分别进行假手术操作(Sham组)、假手术操作及DFO干预(DFO组)、去卵巢手术操作(OVX组)、去卵巢手术操作及DFO干预(OVX+DFO组)。OVX组和OVX+DFO组的小鼠在戊巴比妥钠麻醉下进行双侧卵巢切除术以诱导绝

经后骨质疏松症, Sham组和DFO组做同一切口, 但仅切除卵巢上方的脂肪团。麻醉方式为用1%戊巴比妥钠按0.1 mL/10 g剂量进行腹腔注射。所有小鼠术后恢复7天, DFO组和OVX+DFO组腹腔注射DFO(100 mg/kg, 每3天注射1次, 持续8周)。Sham组和OVX组小鼠腹腔内注射生理盐水作为对照。最后通过过量吸入CO₂对小鼠进行安乐死操作, 并分离股骨用于进一步研究。

1.12 micro-CT分析

1.2步骤中分离得到的小鼠股骨使用micro-CT[VNC-102, 平生医疗科技(昆山)有限公司]进行扫描, 扫描电压为90 KV, 电流为0.09 mA, 扫描精度为10 μ m。对生长板上方0.5 mm, 高度为2 mm的区域内的骨小梁和骨皮质进行进一步分析。分析指标包括骨体积分数(bone volume fraction, BV/TV)、骨矿物质密度(bone mineral density, BMD)、骨小梁间距(trabecular separation, Tb.Sp)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁连接密度(connectivity density, Conn.D)、皮质骨厚度(cortical thickness, Ct.Th)、皮质骨面积(cortical area, Ct.ar)、皮质骨总面积(total cross-sectional area, Tt.ar)、皮质骨面积与总面积比值(cortical area fraction, Ct.ar/Tt.ar)。

1.13 HE染色及Masson染色

股骨使用4%的多聚甲醛在4 $^{\circ}$ C固定24 h, 经脱钙一周后进行石蜡包埋切片, 切片厚度为4 μ m。切片经常规操作二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化至蒸馏水。HE先使用苏木精室温染色(8 min), 伊红复染(2 min)。Masson用苏木精染细胞核(5 min), 丽春红染浆液(10 min), 苯胺蓝进行胶原纤维染色(5 min)。最后使用梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。使用正置显微镜进行观察并拍照。

1.14 免疫组织化学分析

股骨标本经脱钙、包埋、切片后, 将切片烘烤、二甲苯脱蜡后, 使用梯度乙醇进行水化(100%、95%、80%和75%, 各5 min)。使用微波法进行抗原修复后, 使用3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性10 min, 将样本与5% BSA在室温下孵育30 min以消除非特异性染色。将样品与谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(1:500)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 然后将样品与生物素化二抗(1:100)在37 $^{\circ}$ C孵育30 min。将样品在室温下用DAB染色25 s,

并在室温下用苏木精复染5 min。使用正置显微镜进行观察并拍照。

1.15 统计学分析

每个实验均进行3次独立的重复实验。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。多组数据使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较, 然后使用Bonferroni多重比较进行多组数据之间的相互比较。 $P<0.05$ 被认为具有统计学差异。所有统计分析均使用GraphPad Prism 10(GraphPad Software, 美国)进行分析作图。

2 结果

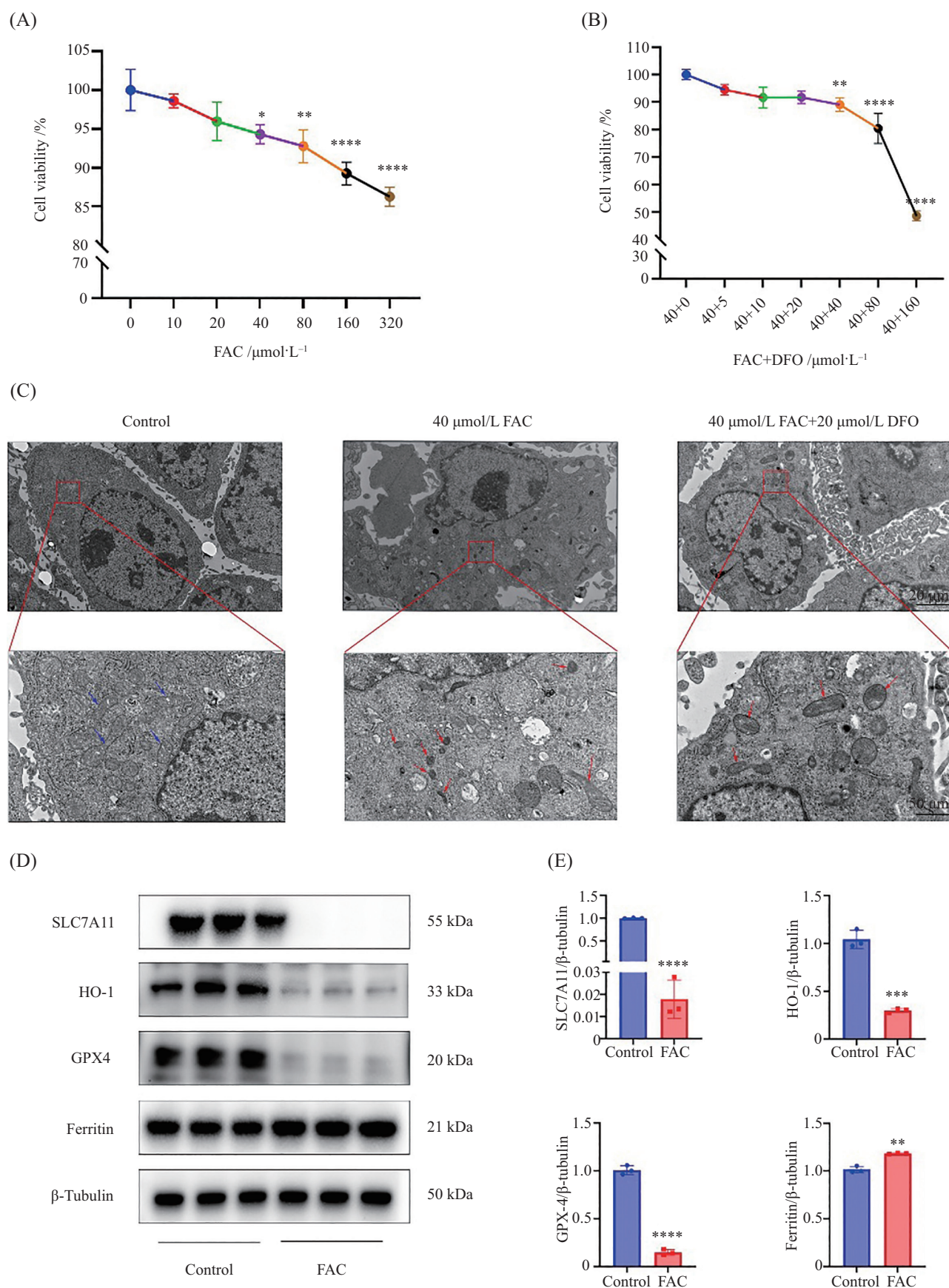
2.1 铁超载可诱导MLO-Y4细胞发生铁死亡

首先, 我们使用CCK-8实验评估后续干预MLO-Y4细胞的FAC和DFO的浓度。使用不同浓度的FAC单独干预MLO-Y4细胞, 在干预24 h之后, CCK-8结果表明FAC能显著抑制MLO-Y4细胞的活性, 且随着FAC浓度升高细胞活性降低。当FAC浓度达到40 μ mol/L时, 组间出现统计学差异($P<0.05$, 图1A), 因此我们选择此浓度进行后续实验。固定FAC浓度的同时加入不同浓度的DFO进行共同干预, CCK-8结果显示, 不同浓度的DFO也以剂量依赖性方式降低了MLO-Y4细胞活力, DFO浓度为40 μ mol/L时出现统计学差异($P<0.01$, 图1B)。在后续实验中, 我们使用的FAC和DFO的浓度分别为40 μ mol/L和20 μ mol/L。

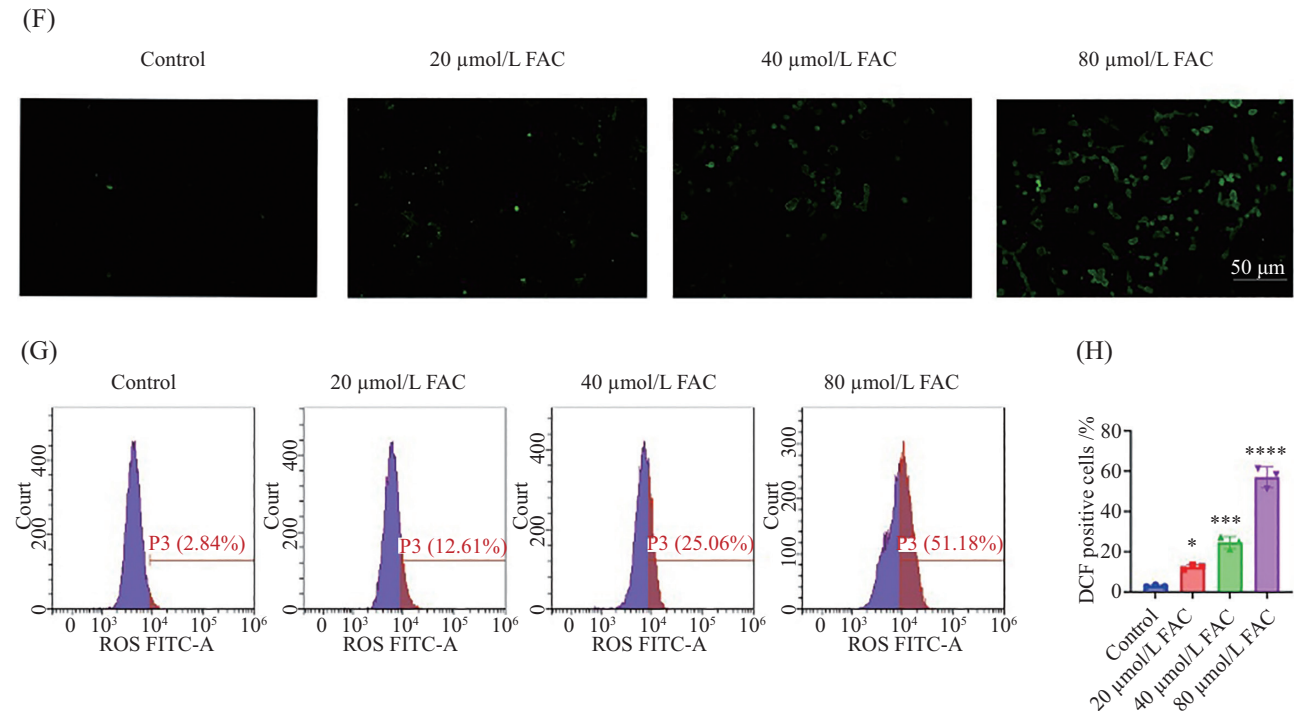
为了证明铁超载可以引起MLO-Y4细胞的铁死亡, 我们分别从线粒体形态、铁死亡相关蛋白的表达和活性氧三个方面对铁死亡水平进行检测。线粒体形态的变化被认为是铁死亡的关键特征, 我们发现在FAC处理的MLO-Y4细胞中能观察到线粒体皱缩、膜密度增加和线粒体嵴减少, 而DFO干预能部分逆转线粒体的这些变化(图1C)。使用Western blot来检测铁死亡相关蛋白的表达情况, 结果表明FAC干预能降低SLC7A11、HO-1、GPX4的表达水平, 提升Ferritin的表达水平(图1D~图1E)。活性氧检测显示, FAC干预提升了MLO-Y4细胞中活性氧的水平, 且随着FAC干预浓度增加, 活性氧含量升高(图1F~图1H)。上述结果表明铁超载能够导致MLO-Y4细胞发生铁死亡。

2.2 MLO-Y4细胞铁超载抑制MC3T3-E1细胞成骨分化

为了进一步明确MLO-Y4细胞铁超载对成骨细



续图1



A: 不同浓度的FAC(0、10、20、40、80、160、320 μmol/L)干预24 h对MLO-Y4细胞活力的影响; B: 40 μmol/L FAC和不同浓度的DFO(0、5、10、20、40、80、160 μmol/L)干预24 h对MLO-Y4细胞活力的影响; C: MLO-Y4细胞的代表性TEM图像(蓝色箭头: 正常线粒体。红色箭头: 异常线粒体); D: MLO-Y4细胞在铁超载(40 μmol/L FAC)情况下铁死亡相关蛋白表达情况代表性蛋白质印迹图; E: MLO-Y4细胞铁死亡相关蛋白表达水平的定量分析; F: 不同浓度的FAC(0、20、40、80 μmol/L)干预后MLO-Y4细胞DCF染色的代表性共聚焦图像; G、H流式细胞术分析用于定量不同浓度的FAC(0、20、40、80 μmol/L)干预后MLO-Y4细胞中的ROS水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与对照组(0 μmol/L FAC)相比。

A: effects of different concentrations of FAC (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μmol/L) on the viability of MLO-Y4 cells after treatment of 24 h; B: effects of 40 μmol/L FAC combined with different concentrations of DFO (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 μmol/L) on the viability of MLO-Y4 cells after treatment of 24 h; C: representative TEM images of MLO-Y4 cells (blue arrow: normal mitochondria; red arrow: abnormal mitochondria); D: representative Western blot images for ferroptosis-related proteins in MLO-Y4 cells under iron overload (40 μmol/L FAC); E: quantitative analysis for the expression of ferroptosis-related proteins in MLO-Y4 cells; F: representative confocal images of DCF-stained MLO-Y4 cells after different concentrations (0, 20, 40, 80 μmol/L) FAC treatment; G, H: flow cytometric analysis for quantifying ROS levels in MLO-Y4 cells after different concentrations (0, 20, 40, 80 μmol/L) FAC treatment. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs control group (0 μmol/L FAC).

图1 铁超载可诱导MLO-Y4细胞发生铁死亡, DFO干预可以部分逆转铁死亡

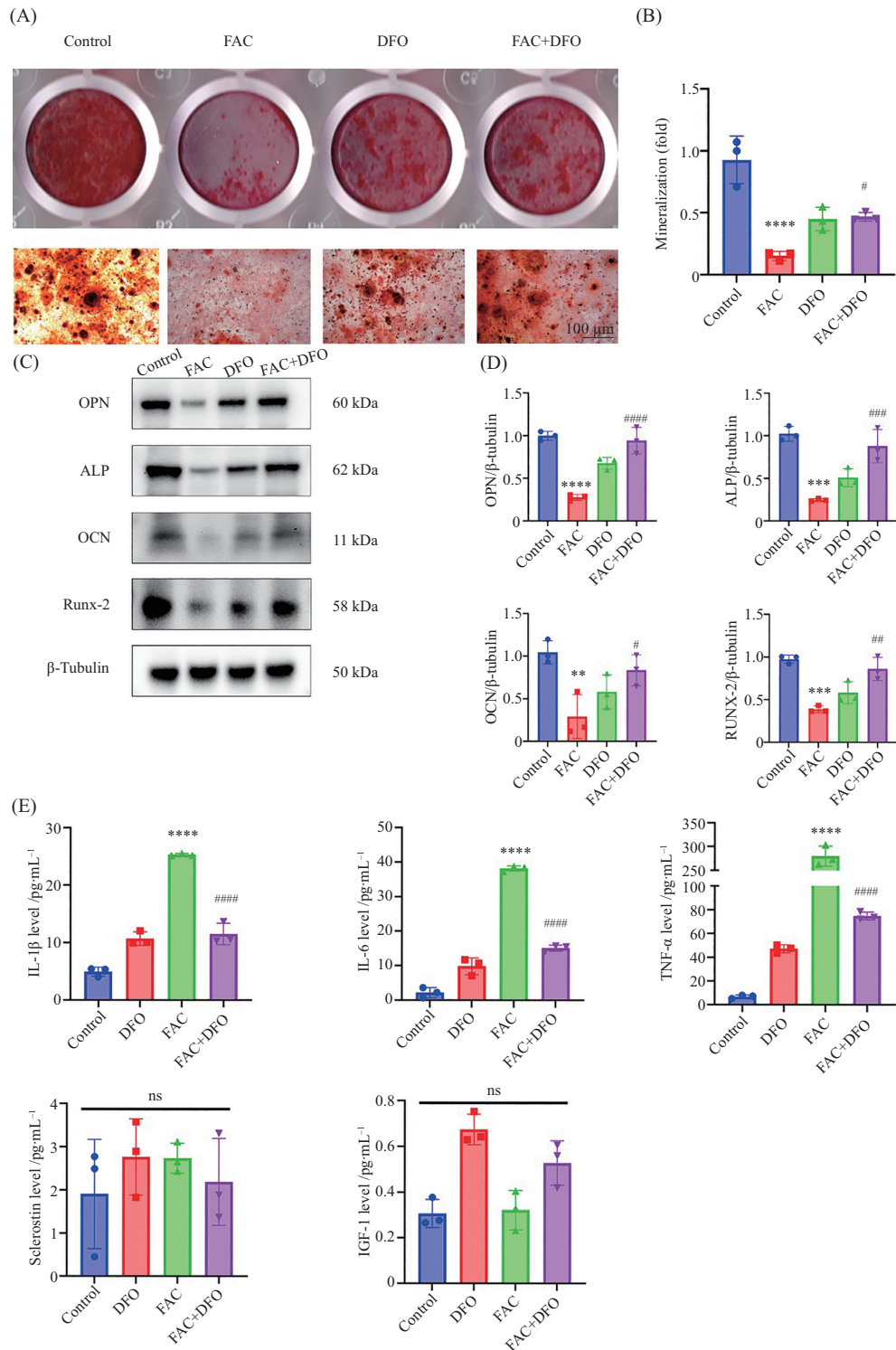
Fig.1 Iron overload treatment induced the ferroptosis of MLO-Y4 cells, and DFO treatment partially alleviated ferroptosis

胞分化的影响, 我们使用共培养的方式进行研究。收集不同方式干预的MLO-Y4细胞的条件培养基, 并将其用于MC3T3-E1细胞的成骨分化诱导, 再使用茜素红S染色评价成骨分化的情况。结果显示, 成骨诱导14天后, FAC处理的MLO-Y4细胞的条件培养基能抑制MC3T3-E1细胞的成骨分化, 而DFO能部分缓解这种抑制作用(图2A和图2B)。使用Western blot检测MC3T3-E1细胞成骨相关蛋白的表达情况, FAC干预的条件培养基能抑制MC3T3-E1细胞ALP、OPN、OCN和Runx2蛋白的表达, 而DFO共同干预的培养基则能缓解对上述蛋白的抑制($P<0.05$, 图2C和图2D)。

MLO-Y4细胞通过分泌作用抑制MC3T3-E1细胞的成骨分化。我们使用ELISA对MLO-Y4分泌的细胞因子进行检测, 发现铁超载环境下MLO-Y4细胞分泌的炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高($P<0.001$), 而Sclerostin、IGF-1在各组之间未见明显差异, 这说明MLO-Y4细胞可能通过分泌炎症因子抑制MC3T3-E1细胞的成骨分化(图2E)。

2.3 MLO-Y4细胞铁超载可能通过INSL3通路抑制MC3T3-E1细胞成骨分化

通过转录组测序进一步探索MLO-Y4细胞铁超载通过分泌作用对MC3T3-E1细胞的影响, 铁超载组和对照组相比有69个基因的表达存在显著性差异



A: 茜素红S染色的代表性图像; B: 茜素红S染色阳性面积的定量分析; C: 骨桥蛋白(OPN)、ALP、骨钙素(OCN)和Runx2的代表性蛋白质印迹图像; D: MC3T3-E1细胞中ALP、OPN、OCN和Runx2蛋白表达水平的定量分析; E: ELISA检测铁超载环境下MLO-Y4细胞分泌的细胞因子。
 $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$, 与control组比较; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.0001$, 与FAC组比较。ns表示无统计学差异。

A: representative images of Alizarin Red S staining; B: quantitative analysis of Alizarin Red S-positive areas; C: representative Western blot images of OPN, ALP, OCN, and Runx2 in MC3T3-E1 cells; D: quantitative analysis for the expression of OPN, ALP, OCN, and Runx2 in MC3T3-E1 cells; E: measurement of inflammatory cytokines secreted by MLO-Y4 cells using ELISA. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ vs control group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.0001$ vs FAC group; ns: not significant.

图2 MLO-Y4细胞铁超载抑制MC3T3-E1细胞成骨分化, DFO干预可以缓解抑制作用

Fig.2 Iron overload treated MLO-Y4 cells inhibited the osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells, and DFO treatment partially alleviated the inhibition

(图3A和图3B)。对差异基因进行KEGG和GO富集分析(图3C和图3D), KEGG富集分析结果显示, Relaxin信号通路存在显著差异, GSEA分析进一步表明, 在铁超载共培养时Relaxin通路受到明显抑制(图3E)。

检索相关文献发现, Relaxin信号通路主要通过INSL3介导对成骨细胞的作用。在INSL3干预的情况下, 使用MLO-Y4细胞的条件培养基进行干预, 并使用Western blot检测PKA、MEK、ERK蛋白的磷酸化情况。结果发现在INSL3的干预下, FAC干预的条件培养基能够抑制PKA、MEK和ERK的磷酸化, 而DFO共同干预的条件培养基能够部分缓解抑制作用(图3F和图3G)。这说明MLO-Y4细胞铁超载可能通过INSL3通路抑制MC3T3-E1的成骨分化。

2.4 micro-CT发现小鼠去卵巢可诱发骨质疏松症, DFO可缓解骨质疏松症

去除小鼠双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症动物模型, 并使用DFO干预进行相应治疗。取股骨远端进行micro-CT扫描, 并进行3D重建。股骨远端的3D重建图像显示, OVX组的小鼠股骨远端表现出更薄的皮质骨和更薄、更疏松、更小的骨小梁, 而DFO干预显著增加了骨皮质的厚度和骨小梁数量($P<0.001$, 图4A)。对股骨远端的骨皮质和骨小梁的参数进行定量分析, 和Sham组相比, OVX组表现出较低的骨体积分数(BV/TV)、骨矿物质密度(BMD)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁连接密度(Conn.D)、皮质骨厚度(Ct.Th)、皮质骨面积(Ct.ar)、皮质骨面积与总面积比值(Ct.ar/Tt.ar)和较高的骨小梁间距(Tb.Sp)。而DFO治疗显著抑制了OVX干预引起的骨体积分数(BV/TV)、骨矿物质密度(BMD)和骨小梁厚度(Tb.Th)的降低或减小($P<0.05$, 图4B~图4K)。

2.5 HE及Masson染色观察到去卵巢小鼠体内骨质疏松的发生, DFO能抑制骨质疏松发展

股骨远端进行脱钙并切片染色, 首先通过HE染色和Masson染色评估股骨远端骨组织的形态学变化。与micro-CT的结果相似, OVX组中能观察到更薄的皮质骨和更稀疏的骨小梁, DFO治疗则可使骨皮质厚度增加和骨小梁数量增加(图5A)。

2.6 小鼠去卵巢可诱发铁死亡, 铁死亡抑制剂DFO可降低铁死亡水平

使用免疫组化检测骨组织中GPX4的表达情况

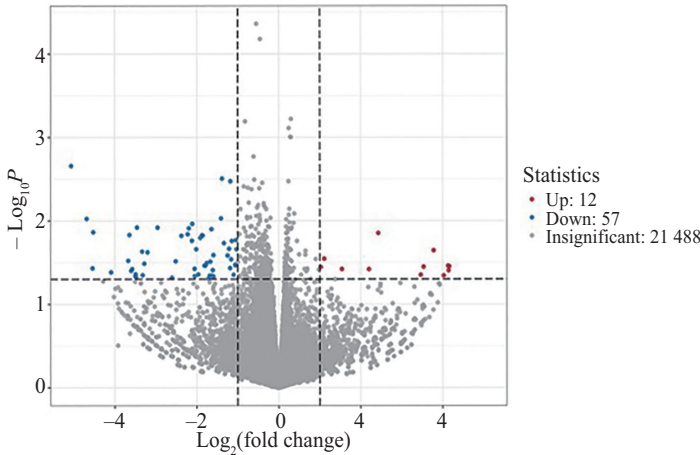
来评价骨组织中细胞铁死亡的程度。与Sham组相比, OVX降低了GPX4的表达水平, 而DFO处理则显著增加了OVX组小鼠体内GPX4阳性细胞的比例($P<0.001$, 图5B和图5C)。上述动物实验结果综合表明, OVX干预提升了骨组织中细胞的铁死亡水平, 而DFO干预减缓了OVX干预引起的铁死亡进程, 从而发挥了抗骨质疏松症的作用。

3 讨论

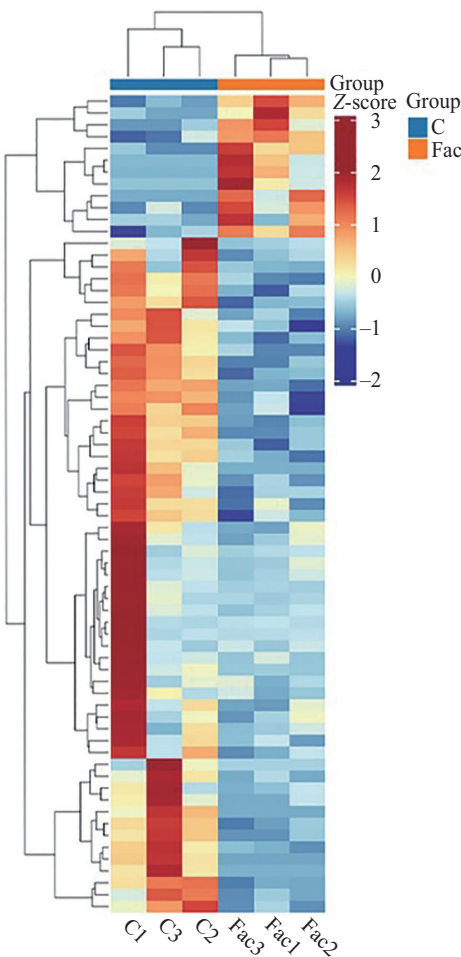
越来越多的研究表明铁死亡与骨质疏松症的发生发展具有密切关系^[14-18]。骨组织中的成骨细胞、破骨细胞及骨细胞均可发生铁死亡。目前的研究绝大多数侧重于成骨细胞及破骨细胞铁死亡与骨质疏松症的关系, 而关于骨细胞铁死亡与骨质疏松症的研究较少。骨细胞是骨骼中数量最多的细胞, 占细胞总数的90%, 人体内大约有420亿个骨细胞, 平均半衰期为25年^[19]。既往的经验认为骨细胞是休眠细胞, 不参与或调节骨形成和骨吸收代谢。近些年的研究发现, 骨细胞通过延伸到骨表面的树突形成复杂的网络, 使骨细胞与其他细胞联系起来。而且骨细胞被发现是一种多功能的内分泌细胞, 可以分泌众多的细胞因子包括炎症因子、RANKL、M-CSF、OPG等^[20-21], 来调节骨代谢。骨细胞通过不同的信号轴与破骨和成骨细胞沟通, 包括RANKL/OPG轴和SOST/Dkk1/Wnt轴等^[22]。

为了探究骨细胞铁超载在骨质疏松中症的作用, 我们使用FAC干预MLO-Y4细胞来体外模拟铁超载环境, 并通过各种实验来验证MLO-Y4细胞发生铁死亡。铁死亡在生物学特性方面变现为胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白(System Xc⁻)活性降低以及Fe²⁺和活性氧的异常积累。在细胞形态学上, 铁死亡主要表现为细胞变小、变圆, 线粒体皱缩、线粒体嵴减少或消失、线粒体膜密度增加等^[23-24]。我们通过电镜观察到了FAC干预后骨细胞发生典型的铁死亡细胞形态变化, 流式细胞术也检测到了骨细胞中ROS的异常积累。我们的Western blot结果显示SLC7A11、HO-1、GPX4蛋白表达水平下降, 而Ferritin蛋白的表达量增加。SLC7a11是一种多通道跨膜蛋白, 介导系统System Xc⁻中的胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白活性, 在抑制铁死亡方面发挥着重大重要^[25]。GPX4通过催化GSH依赖的高反应性脂质氢过氧化物还原为非反应性脂质醇, 限制脂质过氧化的能力,

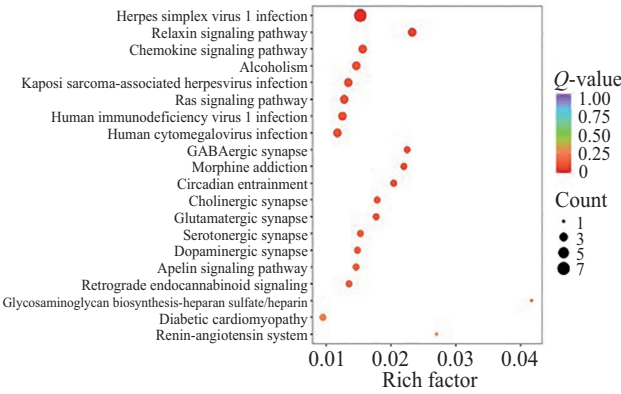
(A)



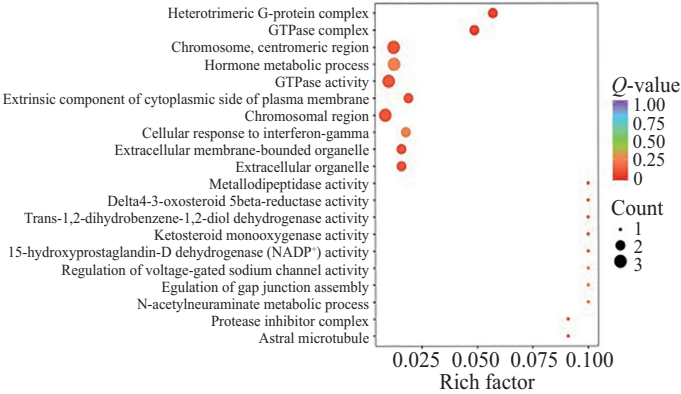
(B)



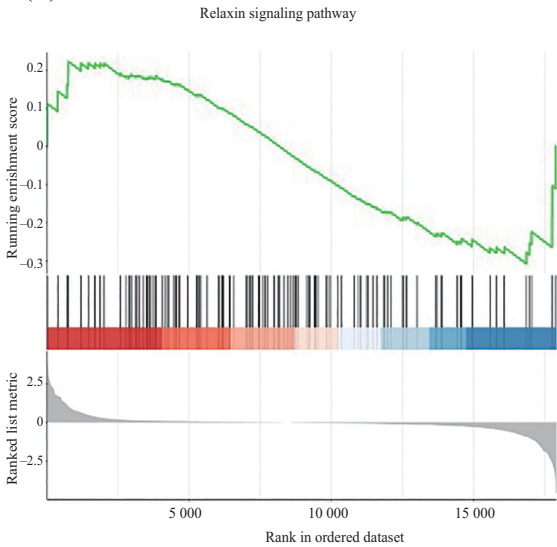
(C)



(D)

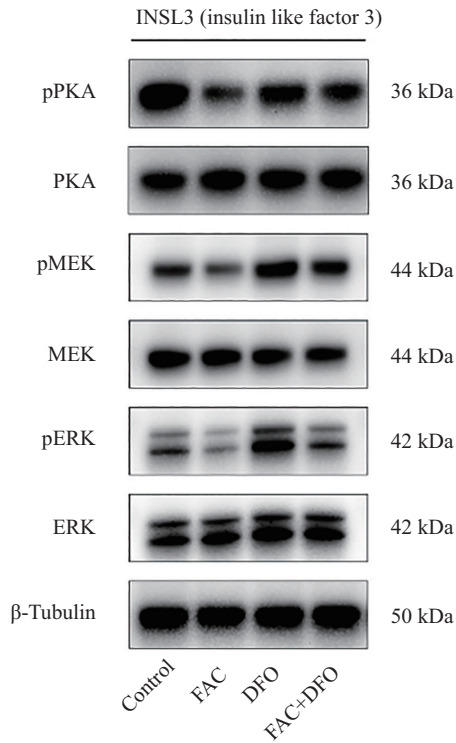


(E)

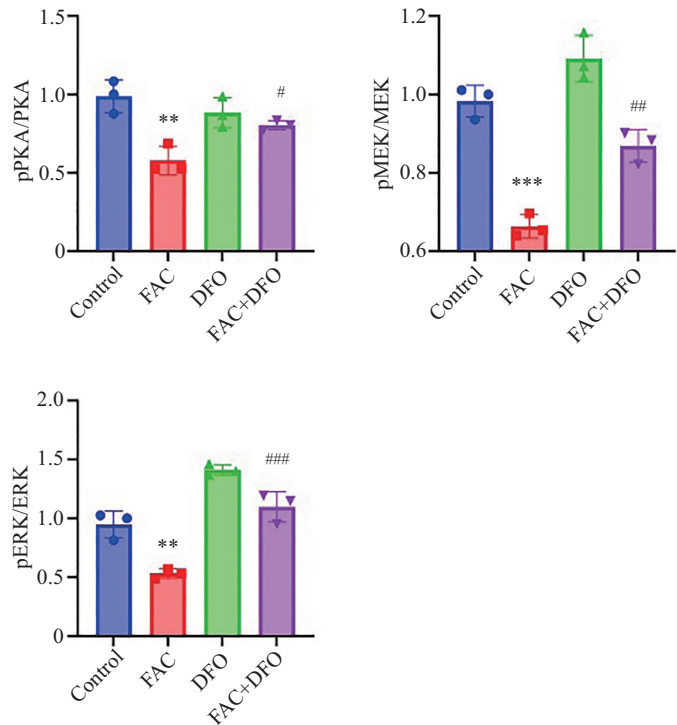


续图3

(F)



(G)



A: 差异基因火山图; B: 差异基因聚类热图; C: KEGG富集气泡图; D: GO富集气泡图; E: Relaxin通路的GSEA富集通路图; F: MC3T3-E1细胞中PKA、MEK和ERK的总蛋白和磷酸化蛋白的代表性蛋白质印迹图像; G: MC3T3-E1细胞中PKA、pPKA、MEK、pMEK、ERK、pERK蛋白表达水平的定量分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与control组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与FAC组比较。

A: volcano plot of differentially expressed genes; B: heatmap of differentially expressed genes; C: KEGG enrichment bubble plot; D: GO enrichment bubble plot; E: GSEA enrichment plot of Relaxin signaling pathway; F: representative Western blot images of total and phosphorylated proteins of PKA, MEK, and ERK in MC3T3-E1 cells; G: quantitative analysis of the phosphorylation levels of PKA, MEK, and ERK in MC3T3-E1 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs FAC group.

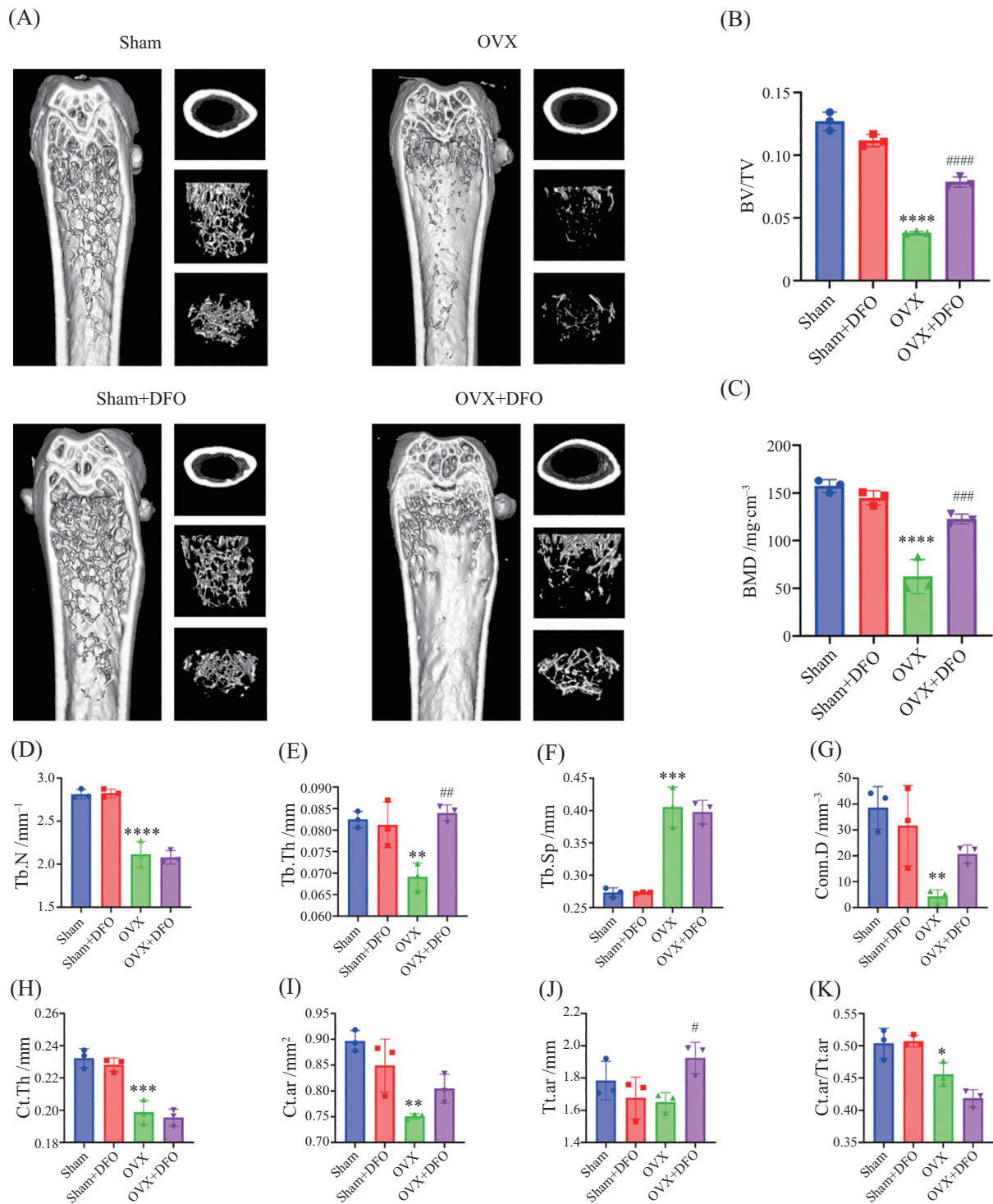
图3 MLO-Y4细胞铁超载可能通过INSL3通路抑制MC3T3-E1细胞成骨分化

Fig.3 Iron overload treated MLO-Y4 cells may inhibit the osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells through INSL3 pathway

以保护细胞免受膜脂质过氧化作用, 目前GPX4已成为铁死亡的主要内源性抑制剂^[26]。缺氧也与铁死亡密切相关, 缺氧可通过Nrf2/HO-1信号通路促进铁浓缩^[27]。铁蛋白Ferritin作为参与调节体内铁稳态的重要蛋白之一, 当细胞体内发生铁超载时, 其往往会代偿性增加, 因为它是体内存储铁的主要形式。近来已有研究表明核受体共激活因子4(nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)可介导细胞铁蛋白的自噬降解, 二者结合会释放出游离铁, 大量的铁离子通过芬顿反应促进脂质过氧化反应, 最终引发铁死亡^[28]。

后续为了研究骨细胞铁超载是否可以影响成骨细胞的成骨分化能力, 我们使用间接共培养技术证实了MLO-Y4骨细胞铁超载的条件培养基可以抑制MC3T3-E1细胞的成骨分化。为了进一步明确骨

细胞铁超载通过何种机制或信号通路影响成骨细胞的成骨能力, 我们进行了ELISA实验和转录组测序。ELISA检测铁超载环境下骨细胞MLO-Y4分泌的细胞因子, 结果发现炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高, 而Sclerostin、IGF-1水平在各组间未见明显差异, 表明其可能是通过炎症因子来作用于成骨细胞的。通过转录组测序和Western blot验证, 我们发现了INSL3信号通路是其关键作用通路。INSL3通路在2008年被报道与人成骨细胞的成骨分化相关^[12]。FERLIN等^[12]发现INSL3受体RXFP2基因突变的年轻男性尽管他们的睾酮血浆水平在正常范围内, 但有骨量减少和骨质疏松的风险。与人类表型一致, RXFP2^{-/-}的小鼠腰部和股骨部位的骨组织形态计量学和micro-CT分析显示骨量减少, 骨小梁改变, 矿化

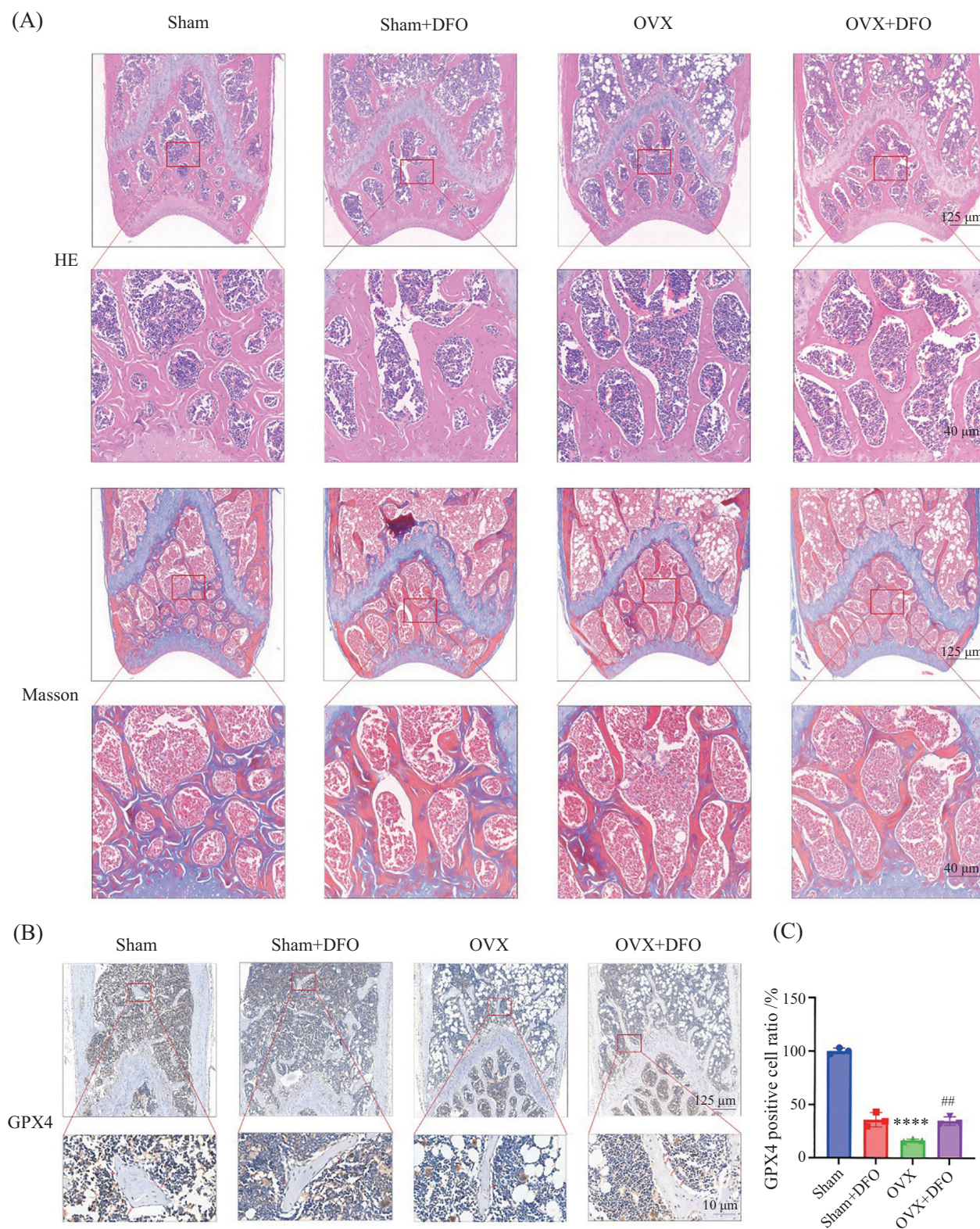


A: 皮质骨、松质骨和股骨远端的代表性3D重建图像; B-K: 股骨远端的骨小梁和骨皮质相关参数的定量分析包括骨体积分数(BV/TV)、骨矿物质密度(BMD)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)、骨小梁连接密度(Conn.D)、皮质骨厚度(Ct.Th)、皮质骨面积(Ct.ar)、皮质骨总面积(Tt.ar)、皮质骨面积与总面积比值(Ct.ar/Tt.ar)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与Sham组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$, 与OVX组比较。

A: representative 3D reconstructed images of cortical bone, trabecular bone, and distal femur region; B-K: quantitative analysis of cortical and trabecular bone parameters in the distal femur region, including bone volume fraction (BV/TV), bone mineral density (BMD), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), connectivity density (Conn.D), cortical layer thickness (Ct.Th), cortical area (Ct.ar), total cross-sectional area (Tt.ar), cortical bone area fraction (Ct.ar/Tt.ar). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs OVX group.

图4 通过影像学方法对铁超载干预的小鼠的骨质疏松程度进行评估

Fig.4 Radiological analysis of the degree of osteoporosis in iron overload-treated mice



A: HE和Masson染色的代表性图像; B: GPX4的免疫组织化学染色的代表性图像; C: GPX4阳性的细胞定量分析。**** $P < 0.0001$, 与Sham组比较; ## $P < 0.01$, 与OVX组比较。

A: representative HE and Masson staining images; B: representative IHC staining images for GPX4; C: quantitative analysis of GPX4-positive cells. **** $P < 0.0001$ vs Sham group; ## $P < 0.01$ vs OVX group.

图5 通过组织学方法对铁超载干预的小鼠的骨质疏松及铁死亡程度进行评估

Fig.5 Histological analysis of the degree of osteoporosis and ferroptosis in iron overload-treated mice

表面面积减少,并且有功能性成骨细胞损伤。FERLIN等^[13]在后续研究中,进一步证明了INSL3/RXFP2系统不仅通过cAMP而且可以通过激活MAPK途径对人成骨细胞发挥作用。本研究证明了骨细胞铁超载能通过分泌作用抑制成骨细胞INSL3信号通路从而促进骨质疏松症的发生。

目前绝经后骨质疏松症在动物上采用去卵巢小鼠模型来模拟,OVX小鼠可发生明显的骨质疏松症与铁死亡^[29-30]。与上述结果相似,我们发现OVX组的小鼠发生了骨质疏松症,同时通过免疫组化检测股骨远端骨组织中GPX4的水平,发现OVX组小鼠体内铁死亡水平升高。绝经后骨质疏松症患者的骨组织中往往伴随着铁超载^[31],堆积在骨组织中的铁能够影响骨形成和骨吸收之间的平衡,从而引起骨质疏松症。XUE等^[32]则发现去卵巢小鼠中破骨细胞发生铁死亡且破骨活性增强,而乌头碱可以通过抑制NF- κ B通路减轻铁浓缩和抑制破骨细胞介导的骨吸收,从而改善骨质疏松症。除此之外,众多研究利用测序分析发现了许多调控铁代谢的基因可能与绝经后骨质疏松症的发生发展有关^[33-35]。

目前已有少量研究探讨了骨细胞铁超载的条件培养基对破骨细胞与成骨细胞的影响。YANG等^[36]通过体外实验证明了铁超载诱导的骨细胞凋亡通过增加骨细胞RANKL的产生刺激破骨细胞分化。MA等^[37]发现FAC增强MLO-Y4细胞SOST和RANKL/OPG的表达能力,同时骨细胞铁死亡的条件培养基抑制成骨细胞的成骨能力,并刺激破骨细胞分化。此外,JIANG等^[9]发现Nrf2信号通路是骨细胞铁浓缩的核心调节因子。抑制Nrf2在高铁环境中导致骨细胞铁浓缩。Nrf2的抑制直接导致骨细胞中RANKL的高表达,这是骨细胞介导的破骨细胞过度活化的关键原因。研究已经证实RANKL主要由骨细胞分泌,其对于破骨细胞形成和骨重塑至关重要^[38-39]。本实验只研究了骨细胞铁超载对成骨细胞的影响,而未对破骨细胞的影响进行进一步研究,我们后续将进一步对此进行探索。综上,和传统的观点认为骨细胞是休眠细胞不同,骨细胞也是预防和治疗铁超载引起的骨质疏松症的重要靶点。

本研究也存在局限性。首先本研究没有使用激动剂/抑制剂对INSL3对骨质疏松的影响进一步进行探究,同时在体内试验没有对此通路进一步研究。其次在动物实验中,我们只明确了骨组织铁死亡的

发生,并没有进一步明确发生铁死亡的细胞组成及铁死亡的程度。这些不足拟在后续的研究中进一步通过实验明确。

4 结论

研究表明骨细胞铁超载可以引起骨细胞铁死亡,同时通过分泌作用抑制成骨细胞的成骨分化能力,从而导致骨质疏松症,而这一效应很可能是通过增加炎症因子的分泌从而抑制INSL3信号通路实现的。DFO干预可预防骨细胞铁超载引起的骨质疏松症。

参考文献 (References)

- [1] WALKER M D, SHANE E. Postmenopausal osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(21): 1979-91.
- [2] ZHANG Y, HUANG X, SUN K, et al. The potential role of serum IGF-1 and leptin as biomarkers: towards screening for and diagnosing postmenopausal osteoporosis [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 533-43.
- [3] CRANDALL C J, LARSON J C, LACROIX A Z, et al. Risk of subsequent fractures in postmenopausal women after nontraumatic vs traumatic fractures [J]. *JAMA Intern Med*, 2021, 181(8): 1055-63.
- [4] DOLMA S, LESSNICK S L, HAHN W C, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285-96.
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-72.
- [6] NI S, YUAN Y, KUANG Y, et al. Iron metabolism and immune regulation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 816282.
- [7] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-82.
- [8] WANG D, SHEN J, WANG Y, et al. Mechanisms of ferroptosis in bone disease: a new target for osteoporosis treatment [J]. *Cell Signal*, 2025, 127: 111598.
- [9] JIANG Z, QI G, HE X, et al. Ferroptosis in osteocytes as a target for protection against postmenopausal osteoporosis [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(12): e2307388.
- [10] WU M. G protein and its signaling pathway in bone development and disease [J]. *Front Biosci*, 2010, 15(1): 957.
- [11] FERLIN A, PEPE A, FACCIOLLI A, et al. Relaxin stimulates osteoclast differentiation and activation [J]. *Bone*, 2010, 46(2): 504-13.
- [12] FERLIN A, PEPE A, GIANESELLO L, et al. Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(5): 683-93.
- [13] FERLIN A, PERILLI L, GIANESELLO L, et al. Profiling insulin like factor 3 (INSL3) signaling in human osteoblasts [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29733.

- [14] XIAO W, YIKE W, GONGWEN L, et al. Ferroptosis-mediated immune responses in osteoporosis [J]. *J Orthop Translat*, 2025, 52: 116-25.
- [15] RU Q, LI Y S, XIE W Q, et al. Fighting age-related orthopedic diseases: focusing on ferroptosis [J]. *Bone Res*, 2023, 11(1): 12.
- [16] CHEN Y, ZHAO W, HU A, et al. Type 2 diabetic mellitus related osteoporosis: focusing on ferroptosis [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 409.
- [17] WANG J, CHEN T, GAO F. Mechanism and application prospect of ferroptosis inhibitors in improving osteoporosis [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1492610.
- [18] WU X, FANG X, LU F, et al. An update on the role of ferroptosis in the pathogenesis of osteoporosis [J]. *EFORT Open Rev*, 2024, 9(8): 712-22.
- [19] BUENZLI P R, SIMS N A. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton [J]. *Bone*, 2015, 75: 144-50.
- [20] TRESGUERRES F G F, TORRES J, LÓPEZ-QUILES J, et al. The osteocyte: a multifunctional cell within the bone [J]. *Ann Anat*, 2020, 227: 151422.
- [21] KITAURA H, MARAHLEH A, OHORI F, et al. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 5169.
- [22] ROBLING A G, BONEWALD L F. The osteocyte: new insights [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 485-506.
- [23] KAZAN K, KALAIPANDIAN S. Ferroptosis: yet another way to die [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(6): 479-81.
- [24] LI C, GONG H, ZHANG Y, et al. Ferroptosis as an emerging target in diabetic osteoporosis [J]. *FASEB J*, 2025, 39(12): e70769.
- [25] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [26] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [27] GAO X, HU W, QIAN D, et al. The mechanisms of ferroptosis under hypoxia [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(7): 3329-41.
- [28] GALY B, CONRAD M, MUCKENTHALER M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(2): 133-55.
- [29] RUAN B, DONG J, WEI F, et al. DNMT aberration-incurred GPX4 suppression prompts osteoblast ferroptosis and osteoporosis [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 68.
- [30] DENG X, LIN B, WANG F, et al. Mangiferin attenuates osteoporosis by inhibiting osteoblastic ferroptosis through Keap1/Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155282.
- [31] CHEN B, LI G F, SHEN Y, et al. Reducing iron accumulation: a potential approach for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 7-11.
- [32] XUE C, LUO H, WANG L, et al. Aconine attenuates osteoclast-mediated bone resorption and ferroptosis to improve osteoporosis via inhibiting NF-κB signaling [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1234563.
- [33] HU Y, HAN J, DING S, et al. Identification of ferroptosis-associated biomarkers for the potential diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 986384.
- [34] HUANG C, LI Y, LI B, et al. Identifying potential ferroptosis key genes for diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis through competitive endogenous RNA network analysis [J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e23672.
- [35] YANG Y, ZHANG X, YANG Y, et al. A two-pronged approach to inhibit ferroptosis of MSCs caused by the iron overload in postmenopausal osteoporosis and promote osseointegration of titanium implant [J]. *Bioact Mater*, 2024, 41: 336-54.
- [36] YANG J, DONG D, LUO X, et al. Iron overload-induced osteocyte apoptosis stimulates osteoclast differentiation through increasing osteocytic RANKL production *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 107(5): 499-509.
- [37] MA J, WANG A, ZHANG H, et al. Iron overload induced osteocytes apoptosis and led to bone loss in Hephidin^{+/−} mice through increasing sclerostin and RANKL/OPG [J]. *Bone*, 2022, 164: 116511.
- [38] XIONG J, PIEMONTESE M, ONAL M, et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138189.
- [39] NAKASHIMA T, HAYASHI M, FUKUNAGA T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression [J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1231-4.