

镉通过铁自噬途径诱导成骨细胞铁死亡

楼凯^{1#} 沈方敏^{1#} 张彤彤² 张智铭¹ 陈易杭¹ 吴欣然¹ 张云^{1*}

(¹绍兴文理学院医学院生理学教研室, 绍兴 312000; ²南京中医药大学翰林学院, 泰州 225300)

摘要 该文探讨了镉(Cadmium, Cd)诱导大鼠原代成骨细胞铁死亡作用及潜在分子机制。采用Cd(0.25~10 μmol/L)处理大鼠原代成骨细胞48 h, MTT和化学比色法检测细胞活力和细胞毒性, 筛选Cd的适宜处理浓度。依据IC₅₀值, 将成骨细胞随机分为6组, 分别是正常培养液(Control)组、低剂量Cd(L-Cd, 0.5 μmol/L)组、中剂量Cd(M-Cd, 1.0 μmol/L)组、高剂量Cd(H-Cd, 2.0 μmol/L)组、铁死亡抑制剂Fer-1+H-Cd(Fer-1+H-Cd)组及自噬抑制剂BafA1+H-Cd(BafA1+H-Cd)组。通过Fer-1和BafA1分别干预H-Cd组成骨细胞, 明确二者对Cd诱导成骨细胞铁自噬活化及铁死亡的调控作用。FeRhoNox-1荧光探针染色检测细胞内游离Fe²⁺水平; C11-BODIPY 581/591荧光探针染色检测细胞内脂质活性氧(Lip ROS)水平; 化学比色法测定细胞内丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量; RT-qPCR技术检测溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)的mRNA水平; Western blot检测SLC7A11、GPX4、ACSL4、微管相关蛋白轻链-3(LC-3)、核受体共激活因子4(NCOA4)、溶酶体相关膜蛋白(LAMP2)和铁蛋白重链1(FTH1)蛋白表达变化; 免疫荧光染色观察LC-3B聚集及FTH1与溶酶体的共定位情况。结果显示, 与Control组相比, 中、高剂量Cd(M-Cd、H-Cd)处理组成骨细胞存活率、GSH含量、SLC7A11与GPX4的mRNA水平, 以及SLC7A11、GPX4、FTH1和溶酶体相关膜蛋白2(LAMP2)蛋白表达量均显著降低(P<0.01), 而细胞内游离Fe²⁺、Lip ROS及MDA水平, ACSL4的mRNA水平, ACSL4、NCOA4蛋白表达量与LC-3II/LC-3I值均显著升高(P<0.01), 同时细胞自噬泡数量、LC-3B蛋白表达量及FTH1在溶酶体中的聚集程度显著升高。与H-Cd组相比, Fer-1和BafA1干预可显著降低细胞内Fe²⁺、Lip ROS水平及LC-3II/LC-3I值, 并明显恢复NCOA4、FTH1、GPX4蛋白表达水平与细胞活力(P<0.01)。以上结果表明, Cd可诱导成骨细胞铁死亡, 其作用机制可能与铁自噬的激活密切相关。

关键词 镉; 成骨细胞; 铁死亡; 铁自噬

Cadmium Promotes Ferroptosis in Osteoblasts by Activating the Ferritinophagy

LOU Kai^{1#}, SHEN Fangmin^{1#}, ZHANG Tongtong², ZHANG Zhiming¹, CHEN Yihang¹, WU Xinran¹, ZHANG Yun^{1*}

(¹Department of Physiology, College of Medicine, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China; ²Hanlin College, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, China)

Abstract This study aimed to investigate whether Cd (cadmium) induced ferroptosis of rat primary osteoblasts and to explain the underlying molecular mechanisms. Rat primary osteoblasts isolated *in vitro* were treated with Cd (0.25-10 μmol/L). Cell viability and cytotoxicity were evaluated by MTT and colorimetric assays to determine the optimal concentrations of Cd. Based on the IC₅₀ value, osteoblasts were randomly assigned to six groups:

收稿日期: 2025-12-30 接受日期: 2026-02-09

浙江省自然科学基金(批准号: LY21H060001)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 13957580685, E-mail: bme_yz@usx.edu.cn

Received: December 30, 2025 Accepted: February 9, 2026

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY21H060001)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13957580685, E-mail: bme_yz@usx.edu.cn

Control (normal) group, L-Cd (low-dose Cd, 0.5 $\mu\text{mol/L}$) group, M-Cd (medium-dose Cd, 1.0 $\mu\text{mol/L}$) group, H-Cd (high-dose Cd, 2.0 $\mu\text{mol/L}$) group, Fer-1+H-Cd (the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1+H-Cd) group, and BafA1+H-Cd (the autophagy inhibitor bafilomycin A1+H-Cd) group. To elucidate the regulatory effects of Fer-1 or BafA1 on Cd-induced ferritinophagy and ferroptosis in osteoblasts, cells in the H-Cd group were pretreated with the two inhibitors, respectively. Intracellular levels of free Fe^{2+} and Lip ROS (lipid reactive oxygen species) were determined by FerRhoNox-1 and C11-BODIPY 581/591 staining, respectively. Intracellular contents of MDA (malondialdehyde) and GSH (glutathione) were detected by colorimetric assays. The mRNA expression levels of *SLC7A11* (solute carrier family 7 member 11), *GPX4* (glutathione peroxidase 4), and *ACSL4* (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4) were measured via RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction). Protein expression of SLC7A11, GPX4, ACSL4, LC-3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), NCOA4 (nuclear receptor coactivator 4), LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2) and FTH1 (ferritin heavy chain 1) were examined by Western blot. The punctate accumulation of LC-3B and the colocalization of FTH1 with lysosomes were observed by immunofluorescence staining. Results showed that compared with the control group, the osteoblasts viability, GSH content, mRNA levels of *SLC7A11* and *GPX4*, as well as protein expression levels of SLC7A11, GPX4, LAMP2 and FTH1 were significantly decreased in the M-Cd and H-Cd-treated groups ($P<0.01$); whereas, the intracellular levels of free Fe^{2+} , Lip ROS and MDA, mRNA level of *ACSL4*, protein expression levels of ACSL4 and NCOA4, as well as the LC-3II/LC-3I value were significantly increased ($P<0.01$); meanwhile, the number of autophagic vacuoles, LC-3B protein expression, and the accumulation of FTH1 in lysosomes were remarkably enhanced in the Cd-treated cells. Compared with the H-Cd group, the intracellular levels of free Fe^{2+} and Lip ROS, as well as the LC-3II/LC-3I value, were significantly reduced in the Fer-1 or BafA1-treated groups; protein expression of NCOA4, FTH1, and GPX4, along with osteoblasts viability, was markedly restored ($P<0.01$). Collectively, these results suggest that Cd induces ferroptosis in osteoblasts, which is closely associated with the activation of the ferritinophagy.

Keywords cadmium; osteoblasts; ferroptosis; ferritinophagy

镉(cadmium, Cd)是一种典型的重金属污染物^[1], 在我国的污染问题尤为突出。我国Cd年产量约占全球总产量的35%, 且储量居世界首位, 这使得Cd污染防治面临更大挑战。流行病学研究证实, Cd可通过饮食、呼吸等途径进入人体, 主要蓄积于肝、肾和骨骼中, 体内生物半衰期高达10~30年^[2]。Cd长期暴露对肝、肾、肺和神经系统及生殖系统等多个器官和系统造成损伤^[3-5]。此外, 骨骼也是Cd毒性作用的主要靶器官。有研究表明, Cd可直接作用于骨组织, 破坏骨微观结构、降低骨密度, 最终诱发骨质疏松症, 同时显著增加骨折发生风险^[6-9]。有报道, Cd能显著抑制成骨细胞活力, 阻碍成骨细胞增殖与分化, 减少骨矿化及骨形成^[6-7]; 此外, Cd还可通过促进caspase-3活化和DNA片段化, 诱导成骨细胞凋亡^[8-10]。上述研究明确了Cd可诱导成骨细胞死亡并引发骨代谢紊乱, 但其具体作用机制, 目前尚未被完全阐明。

铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖、脂质过氧

化介导的新型细胞死亡方式, 以谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活、铁代谢紊乱及脂质过氧化物蓄积为核心特征^[11]。已有研究证实, 铁死亡与肿瘤、心功能不全及生殖系统疾病等多种病症的发生发展密切相关^[12-14]; 有证据表明, 铁死亡在骨质疏松症的病理进程中发挥关键调控作用^[15-18]。例如, JING等^[16]研究发现, 铁超载可通过Fenton反应促进脂质活性氧(lipid reactive oxygen species, Lip ROS)及脂质过氧化物生成, 进而诱导成骨细胞铁死亡, 最终导致小鼠胫骨骨质疏松。另有报道显示, 地塞米松(10 $\mu\text{mol/L}$)可显著下调成骨细胞株MC3T3-E1中GPX4的表达水平, 升高细胞内游离 Fe^{2+} 水平^[17]。高糖或糖皮质激素刺激也会诱导成骨细胞发生铁死亡, 具体表现为细胞内GSH含量、GPX4活性均显著下降、Lip ROS水平明显升高, 同时伴随矿化结节形成减少及骨质疏松症状加剧^[18-19]。然而, 铁

死亡在Cd诱导的成骨细胞损伤过程中的作用及相关调控机制,目前仍有待深入阐明。基于此,本研究以大鼠原代成骨细胞为实验对象,构建Cd诱导细胞损伤模型,探讨Cd对成骨细胞铁死亡及铁自噬的影响,并阐明其潜在分子机制,以期为Cd致骨质疏松症的发病机制及防治策略制定提供实验数据支撑与理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和主要仪器

氯化镉(CdCl₂, 货号: C116344)购自上海阿拉丁试剂有限公司; DMEM培养基(货号: 12491015)和胎牛血清(货号: 10099141)购自美国Gibco公司; II型胶原酶(货号: Y296937)、MTT(货号: C0009M)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(货号: P0393S)、GSH检测试剂盒(货号: S0056)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号: S0131M)、溶酶体荧光探针 LysoTracker(货号: S28588)及RIPA裂解液(货号: P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司; Fe²⁺荧光探针 FeRhoNox-1(货号: GRX-0003)购自日本Goryo Chemical公司; 兔抗SLC7A11单克隆抗体(货号: A25302)、兔抗GPX4单克隆抗体(货号: A11243)、兔抗长链酰基辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)单克隆抗体(货号: A20414)和兔抗溶酶体相关膜蛋白 2(lysosome-associated membrane protein 2, LAMP2)单克隆抗体(货号: A0593)购自爱博泰克武汉生物科技有限公司; 兔抗微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC-3)多克隆抗体(货号: AF5402)、兔抗核受体共激活因子4(nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)多克隆抗体(货号: DF4255)、兔抗铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)多克隆抗体(货号: DF6278)和兔抗β-actin单克隆抗体(货号: T0022)购自美国Affinity Biosciences公司; Lip ROS荧光探针C11-BODIPY 581/591(货号: HY-D1301)、凋亡抑制剂Z-VAD-FMK(VAD, 货号: T7020)、坏死性凋亡抑制剂Nec-1(necrostatin-1, 货号: T1847)、铁死亡抑制剂Fer-1(ferrostatin 1, 货号: T6500)和自噬抑制剂BafA1(bafilomycin A1, 货号: T6740)购自美国MCE公司; 超敏ECL化学发光液(货号: 32209)购自美国ThermoFisher Scientific公司。

AB104S型电子分析天平购自德国Sartorius公司; 细胞培养箱、Applied Biosystems PCR仪购自美国ThermoFisher Scientific公司; VersaMax全波长酶标仪购自美国MD公司; CytoFLEXS型流式细胞仪购自美国Beckman公司; DMIL型荧光显微镜购自德国Leica公司; LSM900型激光共聚焦显微镜购自德国Carl Zeiss公司; 小型蛋白垂直电泳转印系统购自美国Bio-Rad公司; 凝胶成像分析系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代成骨细胞的分离、培养与鉴定
SPF级1日龄SD大鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号为SCXK(浙)2022-0004。本研究动物实验经绍兴市人民医院实验动物伦理委员会审核并批准(批准号: 2025Z069)。成骨细胞采用酶消化法进行分离与培养, 具体操作步骤如下: SD乳鼠先经4 °C冰浴5 min, 行低温麻醉, 待其深度镇静后, 采用颈椎脱臼改良法处死——以轻柔、精准的力度快速实施颈椎分离, 避免骨骼及软组织机械性损伤; 处死完成后, 迅速剥离颅盖骨, 将其置于无菌PBS液中暂存。去除颅盖骨表面附着的结缔组织及血管等杂质, 用无菌PBS清洗2次, 随后将颅盖骨剪碎至约1 mm×1 mm×1 mm的细小组织块。向组织块中加入0.25%胰蛋白酶, 置于37 °C条件下消化15 min, 消化结束后弃去胰蛋白酶消化液; 随后加入1 mg/mL II型胶原酶, 继续于37 °C消化90 min, 消化完成后, 收集消化液与剩余组织到离心管中。将离心管置于离心机中, 于4 °C、1 000 ×g条件下离心10 min, 离心结束后倾去上清液; 取下层细胞沉淀, 用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素的高糖DMEM培养液充分重悬, 吹打均匀制成单细胞悬液。将制备好的细胞悬液接种于培养瓶中, 置于5% CO₂、37 °C培养箱中进行常规培养; 采用差异贴壁法对分离的细胞进行纯化, 纯化后的细胞通过ALP染色鉴定其成骨细胞特性^[20]。

1.2.2 MTT法检测细胞活力
取3~5代成骨细胞接种于96孔培养板, 培养24 h后分别加入Cd(0、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μmol/L)处理48 h, 每个浓度设置6个复孔。处理结束后, 每孔加入20 μL MTT(5 g/L), 置于37 °C、5% CO₂培养箱中继续孵育4 h。孵育结束后弃上清液, 每孔加入200 μL DMSO, 避光振荡6 min; 采用酶标仪检测各孔在490 nm波长

下的吸光度(D_{490})值。根据MTT结果计算各组细胞活力,并筛选出Cd的适宜处理浓度。

1.2.3 细胞分组与处理 将细胞随机分为正常培养液(Control)组、低剂量Cd(L-Cd, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)组、中剂量Cd(M-Cd, 1.0 $\mu\text{mol/L}$)组、高剂量Cd(H-Cd, 2.0 $\mu\text{mol/L}$)组、铁死亡抑制剂Fer-1+H-Cd(Fer-1+H-Cd)组及自噬抑制剂BafA1+H-Cd(BafA1+H-Cd)组。

1.2.4 LDH检测试剂盒检测细胞毒性 收集各组细胞上清液。严格参照LDH检测试剂盒说明书进行检测:取120 μL 上清液加入96孔培养板对应孔中,每孔补加60 μL LDH检测工作液,充分混匀后于室温避光条件下孵育30 min,采用酶标仪在490 nm波长处测定各孔吸光度(D_{490})值。按照公式 $R_{\text{死亡率}} = [(D_{\text{Cd处理组}} - D_{\text{对照组}}) / (D_{\text{最大释放量}} - D_{\text{对照组}})] \times 100\%$ 计算成骨细胞的死亡率。

1.2.5 细胞MDA与GSH的含量的测定 收集各组细胞,加入RIPA裂解液并将其置于冰上裂解30 min。裂解结束后,将细胞裂解液转移至EP管中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 条件下离心10 min,收集上清液,采用BCA法测定各组细胞蛋白浓度。

MDA含量检测。参照MDA试剂盒说明书操作,分别取MDA标准品、待测样品与MDA检测工作液充分混匀,置于100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热15 min;待水浴体系自然冷却至室温后,将混合液于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 条件下离心10 min;取200 μL 上清液加入96孔培养板,采用酶标仪在532 nm波长处测定各孔吸光度(D_{532})值,依据标准曲线计算各组样品的MDA含量,实验结果以 nmol/mg prot 表示。

GSH含量测定。参照GSH试剂盒说明书操作:于96孔板中分别加入待测样品或GSH标准品,每孔补加150 μL GSH检测工作液,充分混匀后室温孵育5 min;

随后每孔补加50 μL NADPH(0.5 mg/mL)溶液,混匀后继续室温孵育25 min,立即在采用酶标仪412 nm波长处测定各孔吸光度(D_{412})值。依据标准曲线计算各组样品的GSH含量,实验结果以 nmol/mg prot 表示。

1.2.6 FeRhoNox-1染色观察细胞内 Fe^{2+} 水平 各组细胞处理完毕后,弃上清液并用PBS洗涤2次;加入5 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} 荧光探针FeRhoNox-1,室温避光孵育30 min。再次用PBS洗涤后,通过LSM900激光共聚焦显微镜及流式细胞仪分别检测细胞内游离 Fe^{2+} 水平变化。

1.2.7 C11-BODIPY 581/591染色观察细胞内Lip ROS水平 各组细胞处理完毕后,弃去上清液并用PBS洗涤2次;加入2 $\mu\text{mol/L}$ Lip ROS荧光探针C11-BODIPY 581/591,室温避光孵育30 min,再次用PBS洗涤后通过LSM900激光共聚焦显微镜及流式细胞仪分别检测细胞内Lip ROS水平。

1.2.8 RT-qPCR测定mRNA水平 收集各组细胞。采用Trizol法提取细胞总RNA, RNA经反转录后,使用SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒进行实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算SLC7A11、GPX4和ACSL4基因的mRNA相对表达量,引物序列见表1。

1.2.9 Western blot检测蛋白表达情况 收集各组细胞,每孔加100 μL RIPA裂解液,冰上裂解30 min;于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 离心15 min,收集上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经煮沸变性后,每孔上样20 μg ,行12% SDS-PAGE凝胶电泳分离。随后将蛋白样品转移至PVDF膜,用10%脱脂牛奶室温封闭2 h;将膜与一抗(SLC7A11、GPX4、ACSL4、LC-3、NCOA4、LAMP2、FTH1稀释比例均为1:1 000,内参 β -actin稀释比例为1:2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用

表1 PCR引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

基因名字 Gene name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
SLC7A11	GTC CCG GCG TAT TAC CTC TT (F) GCA GAT GGC CAA GGA TTT GAT (R)
GPX4	AAG TAC AGG GGT TGC GTG TG (F) TAT CGG GCA TGC AGA TCG AC (R)
ACSL4	GCT CCT CTT ATT TGC TGT (F) CCT TTG TCC ATT TTC ATC (R)
GADPH	GGC TCT CTG CTC CTC CCT GT (F) CGT TCA CAC CGA CCT TCA CC (R)

TBST洗膜3次,加入HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h;再次用TBST洗膜3次后,滴加ECL显色液,经凝胶成像系统显色成像,采用Quantity One软件分析蛋白表达水平。

1.2.10 免疫荧光染色检测LC-3B蛋白的表达与分布情况 各组细胞处理完毕后,弃去上清液,PBS清洗2次,4%多聚甲醛室温固定30 min;0.1% Triton X-100室温破膜5 min,5% BSA室温封闭2 h。加入LC-3B抗体(1:200),于4 °C孵育过夜。次日用PBS清洗后,加入FITC标记的二抗(1:500),室温避光孵育2 h;再次PBS清洗后,置于LSM900激光共焦显微镜观察并记录细胞内LC-3B蛋白的表达与分布情况。

1.2.11 免疫荧光染色观察FTH1蛋白在溶酶体中的表达及其定位情况 各组细胞处理完毕后,弃去上清液,PBS清洗2次,加入50 nmol/L溶酶体荧光探针Lyso-Tracker Red,室温避光孵育30 min。PBS清洗后,依次进行4%多聚甲醛室温固定细胞30 min、0.1% Triton X-100室温透膜5 min;再经5% BSA室温封闭2 h。随后加入FTH1抗体(1:300)4 °C孵育过夜;次日PBS清洗后加入FITC标记的二抗(1:500),室温避光孵育2 h;再次PBS清洗后置于LSM900激光共焦显微镜下观察并记录FTH1蛋白在溶酶体中的表达及二者共定位情况。

1.3 统计与分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 17.0软件分析处理,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*t*检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Cd抑制成骨细胞活力并诱导细胞死亡

与Control组相比,Cd处理组成骨细胞数量显著减少、细胞体积缩小,且出现明显的萎缩及空泡变性现象;同时细胞活力显著降低($P<0.01$),细胞上清液中LDH释放量显著升高,细胞死亡率显著增加($P<0.01$)。上述结果表明,Cd可诱导成骨细胞死亡(图1)。基于MTT检测结果,经GraphPad Prism软件计算得出,Cd作用于成骨细胞48 h的 IC_{50} 值为2.26 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究据此选取0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的Cd作为干预浓度用于后续实验。

为明确Cd诱导成骨细胞死亡的主要方式,本研

究采用不同细胞死亡类型的特异性抑制剂对成骨细胞进行预处理。结果(图1D)显示,凋亡抑制剂VAD、铁死亡抑制剂Fer-1及坏死性凋亡抑制剂Nec-1预处理均能显著逆转Cd诱导的成骨细胞活力下降,且以Fer-1的逆转效果最为显著。由此可推断,凋亡、铁死亡与坏死性凋亡均参与Cd诱导的成骨细胞损伤过程,其中铁死亡为Cd诱导成骨细胞死亡的主要方式。

2.2 Cd增加成骨细胞内游离 Fe^{2+} 水平

与Control组相比,Cd(0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$)处理组成骨细胞的FeRhoNox-1红色荧光强度(即 Fe^{2+} 水平)显著升高,其均值由Control组的 49.13 ± 3.76 分别升至 57.12 ± 3.22 (L-Cd, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、 72.00 ± 3.73 (M-Cd, 1.0 $\mu\text{mol/L}$)和 86.02 ± 4.25 (H-Cd, 2.0 $\mu\text{mol/L}$),见图2。

2.3 Cd促进成骨细胞内脂质过氧化物的产生

与Control组相比,Cd(0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$)处理组成骨细胞中C11-BODIPY 581/591探针的红色荧光强度呈梯度减弱,绿色荧光强度则逐步增强,提示细胞内Lip ROS水平呈剂量依赖性升高,且各处理组细胞中Lip ROS水平分别为Control组的1.40倍、1.91倍和3.77倍($P<0.01$);同时,Cd处理组成骨细胞内MDA含量明显升高,而GSH含量显著降低($P<0.01$),见图3。

2.4 Cd对成骨细胞中铁死亡相关因子基因和蛋白表达的影响

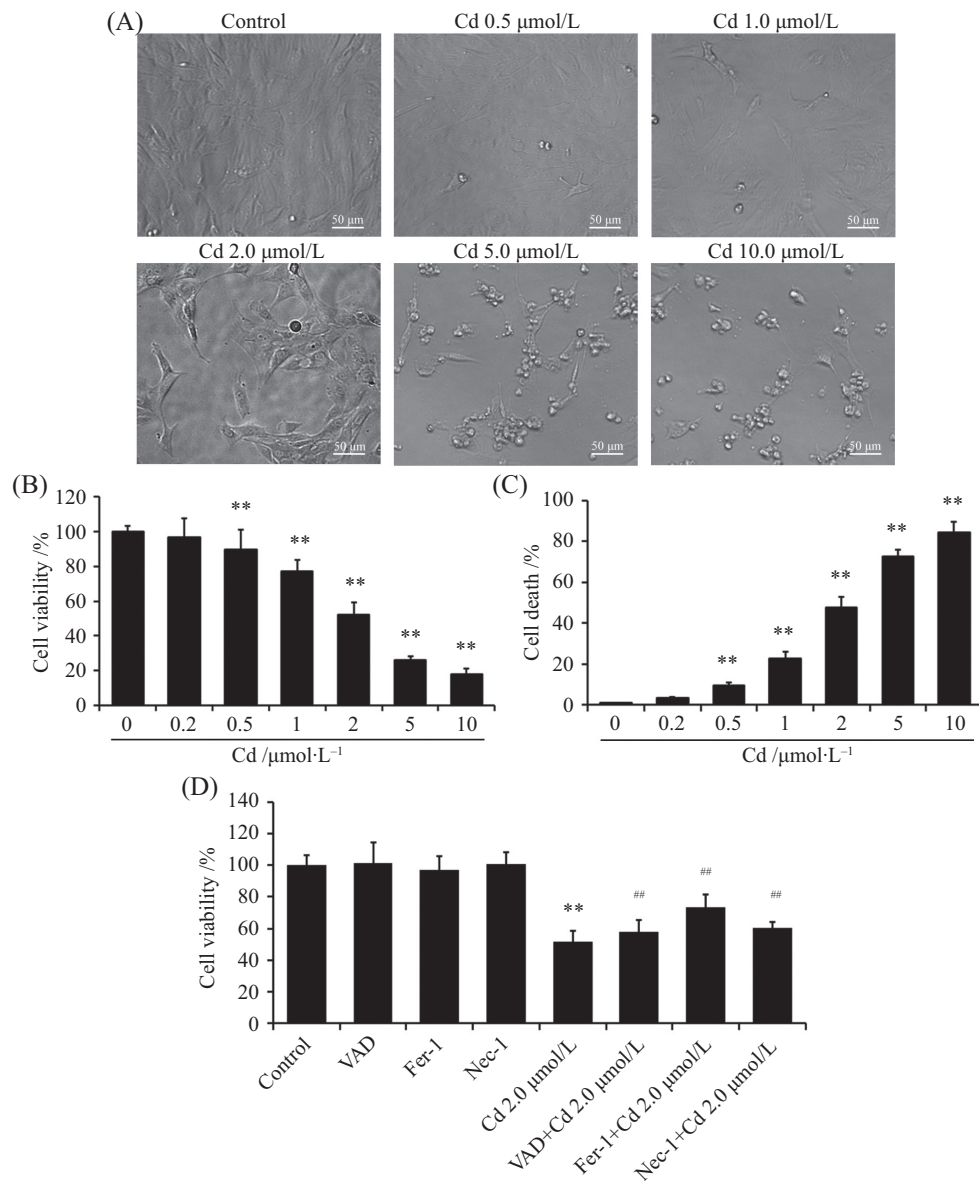
RT-qPCR和Western blot结果(图4)显示,与细胞对照组相比,Cd(1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$)处理组成骨细胞中铁死亡因子SLC7A11和GPX4的mRNA水平及其蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),而ACSL4的mRNA水平和蛋白表达水平明显增加,见图4。

2.5 铁死亡抑制剂Fer-1可缓解Cd诱导的成骨细胞铁死亡

与H-Cd组(2.0 $\mu\text{mol/L}$)相比,Fer-1干预组成骨细胞内游离 Fe^{2+} 水平及Lip ROS水平均显著降低($P<0.01$);铁死亡关键蛋白SLC7A11和GPX4的表达水平明显上调($P<0.01$),细胞活力亦得到显著恢复($P<0.01$);见图5。

2.6 Cd促进成骨细胞发生铁自噬

与Control组相比,Cd(0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$)组成骨细胞中自噬标志物LC-3I向LC-3II的转换效率显著提升,LC-3II/LC-3I值呈明显上升趋势;同时铁自噬关键蛋白NCOA4的表达水平显著上调,而LAMP2和FTH1的表达水平则明显降低($P<0.01$)。



A: 细胞形态观察; B: 细胞活力检测; C: 细胞毒性检测; D: 细胞活力测定。 $\bar{x}\pm s$, $n=5$; ** $P<0.01$, 与Control组相比; ## $P<0.01$, 与Cd 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比。
A: cell morphology observation; B: cell viability assays; C: cytotoxicity assay; D: cell viability assays. $\bar{x}\pm s$, $n=5$; ** $P<0.01$ compared with the Control group; ## $P<0.01$ compared with the Cd 2.0 $\mu\text{mol/L}$ -treated group.

图1 Cd抑制成骨细胞活力并诱导细胞死亡

Fig.1 Cd inhibited osteoblasts viability and induced cell death

此外, Cd处理组细胞的溶酶体荧光强度(可反映自噬泡的形成水平)显著增强, 细胞内LC-3B蛋白呈明显点状聚集分布, 且溶酶体内FTH1蛋白的聚集程度亦显著升高。见图6。

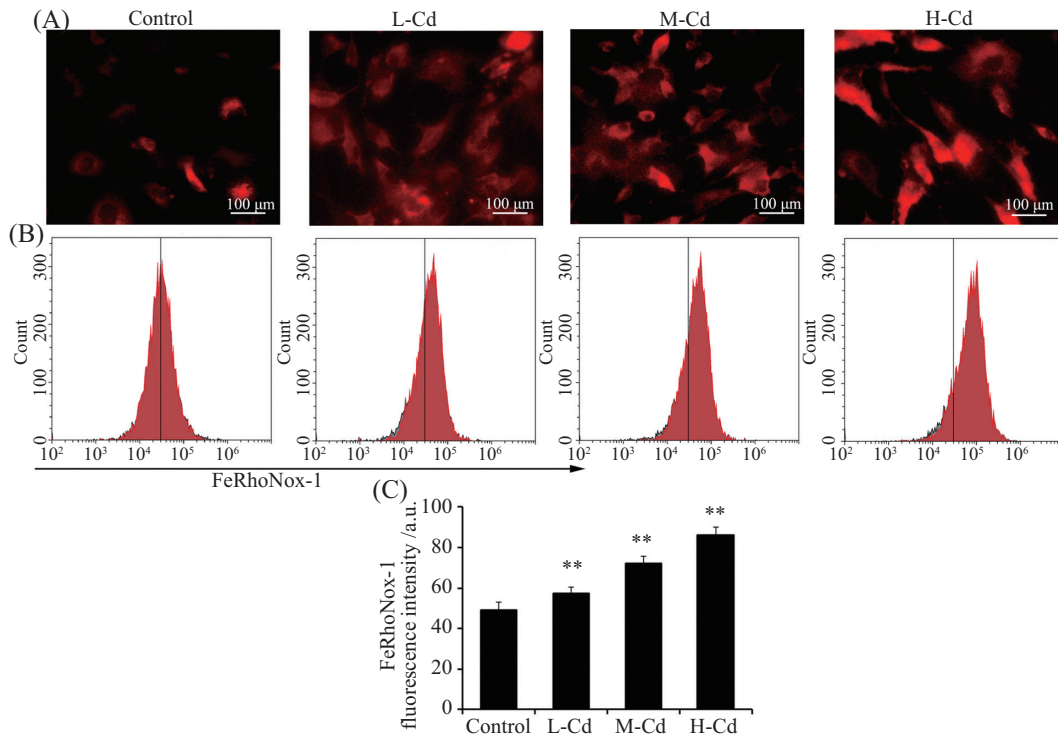
2.7 自噬的抑制剂BafA1对Cd诱导的成骨细胞铁死亡和铁自噬的影响

与H-Cd组(2.0 $\mu\text{mol/L}$)相比, BafA1干预组成骨细胞内游离 Fe^{2+} 水平、Lip ROS水平及NCOA4蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$), LC-3II/LC-3I值以及GPX4和FTH1表达水平显著升高($P<0.01$), 细胞活力

亦明显恢复($P<0.01$), 见图7。

3 讨论

Cd作为典型的重金属污染物, 长期暴露后可在骨骼组织中沉积, 是诱发骨代谢紊乱及骨骼系统疾病的重要环境危险因素。已有研究证实, Cd可通过干扰成骨细胞、破骨细胞及骨细胞的正常生理功能, 打破骨形成与骨吸收的动态平衡, 进而破坏骨代谢稳态, 最终诱导骨质疏松症等疾病的发生发展。其中, 成骨细胞作为骨形成过程中的核心功能细胞,



A: 激光共聚焦显微镜观察细胞内游离Fe²⁺水平; B: 流式细胞仪检测细胞内游离Fe²⁺水平; C: 游离Fe²⁺水平的定量分析。x̄±s, n=3; **P<0.01, 与Control组相比。

A: intracellular free Fe²⁺ levels observed by laser confocal microscopy; B: intracellular free Fe²⁺ levels detected by flow cytometry; C: quantitative analysis of free Fe²⁺ levels. x̄±s, n=3; **P<0.01 compared with the Control group.

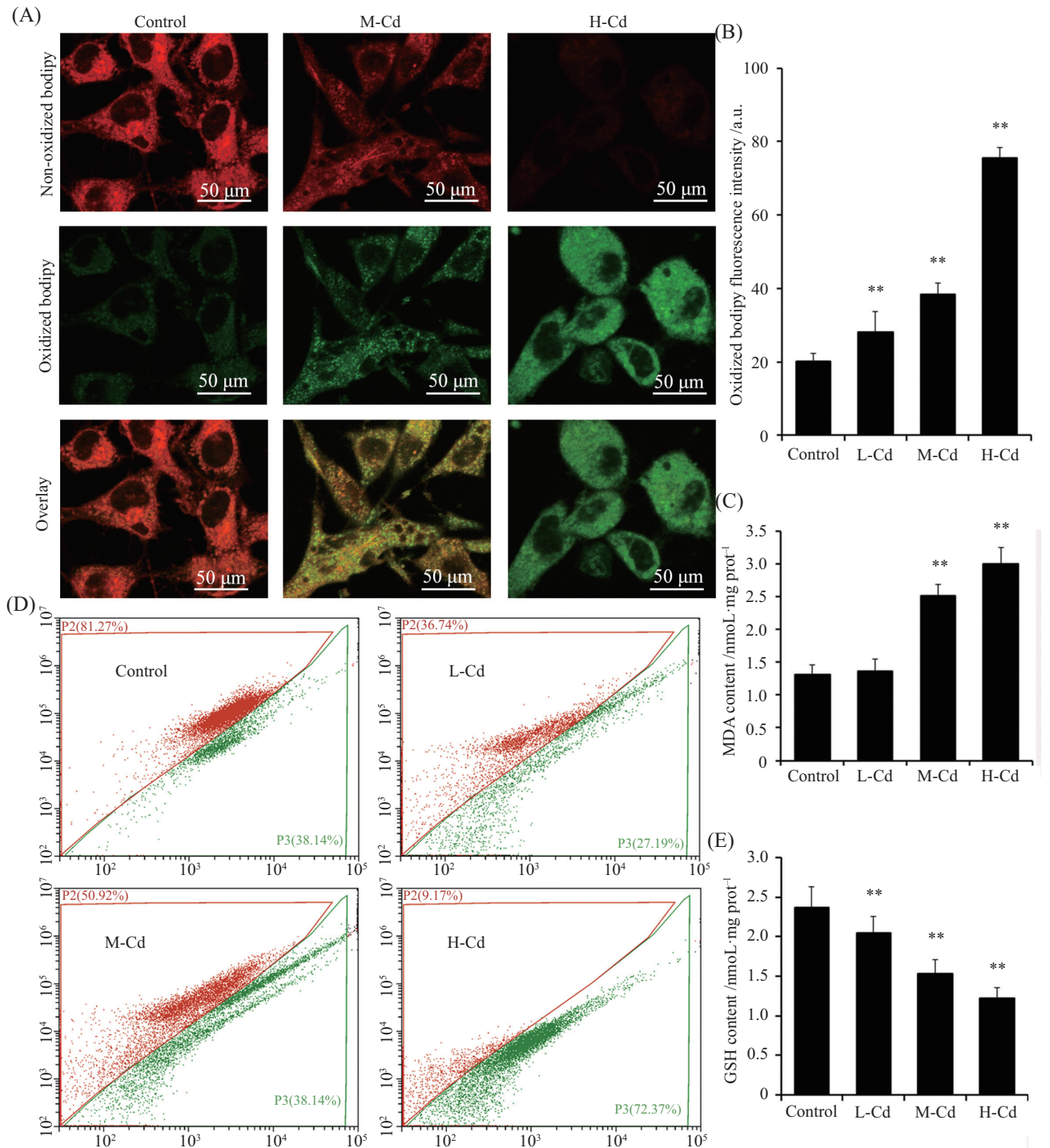
图2 Cd对成骨细胞内游离Fe²⁺水平的影响

Fig.2 Effect of Cd on the intracellular level of free Fe²⁺ in osteoblasts

其活性与功能的正常与否直接决定骨形成效率,亦是Cd介导骨毒性作用的关键靶细胞。本研究结果表明,Cd可显著抑制成骨细胞增殖,并诱导其发生死亡。该实验结果与JIA等^[21]、ZHOU等^[22]研究者报道的Cd对成骨细胞株MC3T3-E1和hFOB 1.19的作用趋势基本一致;更为重要的是,本研究采用的Cd处理浓度,显著低于以往研究中Cd对MC3T3-E1细胞产生生物学效应的实验剂量^[7-9,21-22]。这一差异提示,原代培养的成骨细胞对Cd的耐受能力更弱,对Cd诱导的损伤应答更为敏感。为明确Cd诱导成骨细胞死亡的主要方式,本研究通过特异性死亡抑制剂预处理实验开展了进一步验证,结果显示,VAD、Fer-1及Nec-1预处理均能显著逆转Cd诱导的成骨细胞活力降低,且以Fer-1的逆转效果最为显著。据此可推断,凋亡、铁死亡与坏死性凋亡均参与Cd诱导的成骨细胞损伤过程,其中铁死亡为主要的细胞死亡方式。

已有研究证实,铁死亡在骨质疏松症的发生、发展过程中扮演着关键角色^[15-19]。例如,铁超载或

地塞米松处理可显著升高成骨细胞株MC3T3-E1内Lip ROS和MDA水平,同时降低SLC7A11和GPX4的表达水平及活性,进而促进MC3T3-E1细胞发生铁死亡、抑制新骨形成,最终诱发骨质疏松症^[16-17]。此外,高糖亦可通过降低成骨细胞内GSH含量与GPX4活性、升高Lip ROS水平,阻碍成骨细胞矿化进程,进而诱发2型糖尿病性骨质疏松症^[18-19]。与之类似,本研究发现,成骨细胞经Cd处理48 h后,细胞内游离Fe²⁺与Lip ROS水平显著升高,铁死亡核心抑制因子SLC7A11与GPX4的mRNA转录及蛋白表达水平GSH含量均显著降低,而铁死亡正向调控因子ACSL4的mRNA转录及蛋白表达水平,MDA含量则明显升高。铁死亡抑制剂Fer-1干预后,Cd诱导的成骨细胞铁死亡效应被显著逆转。上述结果表明,Cd可通过诱导成骨细胞铁超载与脂质过氧化物堆积,调控铁死亡关键蛋白的表达及活性,最终触发铁死亡。本研究结果与既往关于Cd诱导肝细胞、肾小管上皮细胞铁死亡报道高度一致^[23-24],这进一步证实了诱导铁死亡是Cd发挥毒性作用的重要共性机



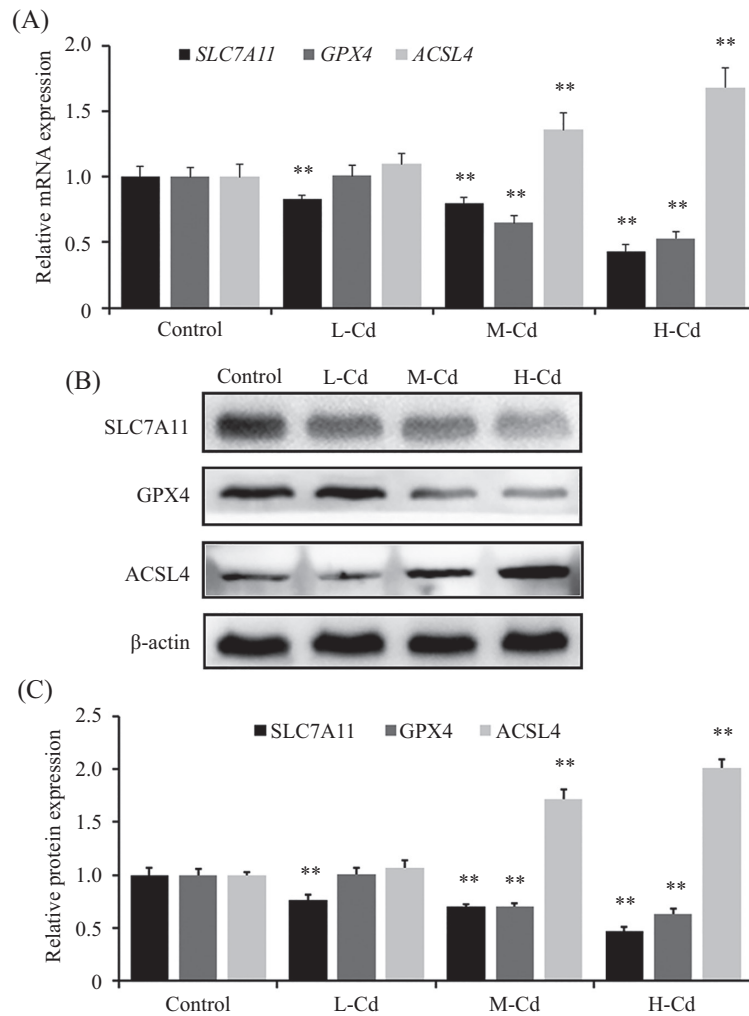
A: 激光共聚焦显微镜观察细胞内Lip ROS水平; B: 流式细胞仪检测Lip ROS水平; C: Lip ROS水平的定量分析; D: MDA含量; E: GSH含量。x̄±s, n=3; **P<0.01, 与Control组相比。

A: representative confocal microscopy images of intracellular Lip ROS levels; B: flow cytometric analysis of Lip ROS levels; C: quantitative analysis of Lip ROS levels; D: MDA content; E: GSH content. x̄±s, n=3; **P<0.01 compared with the Control group.

图3 Cd对成骨细胞内脂质过氧化物产生的影响
Fig.3 Effect of Cd on lipid peroxide production in osteoblasts

制之一。由此我们推测, 铁死亡参与介导Cd诱导的成骨细胞死亡过程, 但是具体调控通路仍有待明确。最新研究证实, 铁死亡具有自噬依赖性特征,

其可通过铁自噬(ferritinophagy)途径释放过量Fe²⁺而诱发, 这一过程是铁死亡发生的核心环节^[25-26]。LOKE等^[25]运用自噬体分离技术与定量蛋白质组学



A: RT-qPCR检测 $SLC7A11$ 、 $GPX4$ 和 $ACSL4$ 的mRNA水平; B: Western blot检测 $SLC7A11$ 、 $GPX4$ 和 $ACSL4$ 的蛋白表达情况; C: $SLC7A11$ 、 $GPX4$ 和 $ACSL4$ 的蛋白相对表达量。 $\bar{x}\pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与Control组相比。

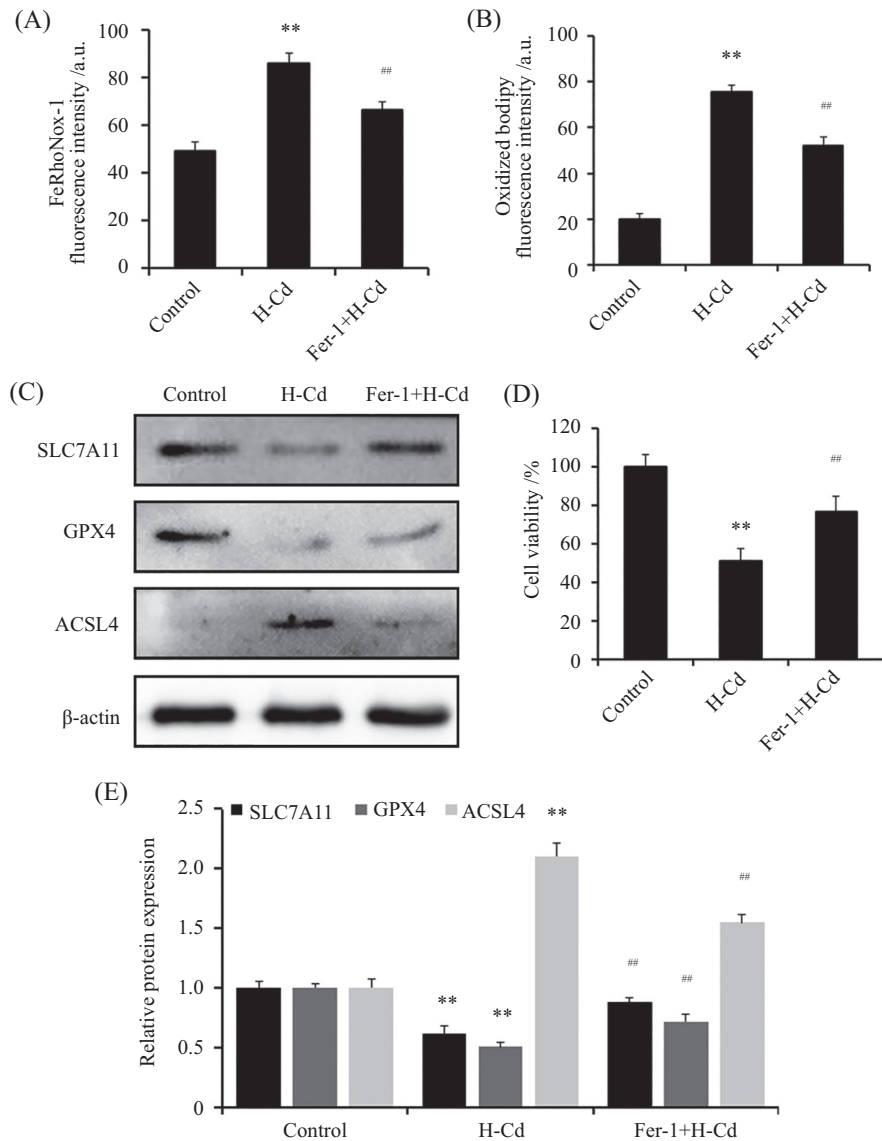
A: RT-qPCR for mRNA levels of $SLC7A11$, $GPX4$ and $ACSL4$; B: Western blot analysis of the protein expression levels of $SLC7A11$, $GPX4$ and $ACSL4$; C: relative protein expression of $SLC7A11$, $GPX4$ and $ACSL4$. $\bar{x}\pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with the Control group.

图4 Cd对成骨细胞中铁死亡相关因子基因和蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of Cd on expression levels of ferroptosis-related genes and proteins in osteoblasts

研究手段证实, NCOA4是介导自噬依赖性FTH1降解的特异性分子载体蛋白。该蛋白可将FTH1靶向转运至自噬小体, 促进其在自噬小体内降解, 进而释放与FTH1结合的 Fe^{2+} , 从而实现对细胞内游离 Fe^{2+} 稳态的精准调控。当铁自噬通路过度激活时, NCOA4表达水平显著升高, 同时伴随GSH耗竭、GPX4及FTH1表达下调, 大量游离 Fe^{2+} 在细胞内累积可引发细胞破裂, 最终导致铁死亡。2025年, LIN等^[27]研究表明, 铁自噬过度激活可诱导神经细胞释放大量 Fe^{2+} , 造成溶酶体铁超载与脂质过氧化累积, 加速神经细胞铁死亡, 最终诱发阿尔茨海默病等神经退行性疾病。另有证据显示, 铁自噬也能调控成骨细胞铁死亡, 是骨质疏松症发生的重要诱因之一^[28]。糖皮质激素可通

过上调NCOA4蛋白表达水平, 下调FTH1蛋白水平, 诱导成骨细胞发生铁自噬; 而靶向抑制铁自噬通路能有效阻断糖皮质激素介导的成骨细胞铁死亡, 并延缓骨质疏松性骨吸收进程^[28]。本研究结果显示, Cd处理成骨细胞48 h后, NCOA4蛋白表达水平显著升高, FTH1蛋白水平则明显降低; 与此同时, 自噬标志物LC-3I向LC-3II转换显著提升, LC-3II/LC-3I值呈明显升高趋势。免疫荧光染色结果进一步证实, Cd可显著诱导成骨细胞自噬泡生成, 促使细胞内LC-3B呈现典型的点状聚集特征, 同时增强FTH1蛋白在溶酶体中的靶向聚集效应。由此我们推测, Cd可能通过诱导FTH1降解, 促进细胞内游离 Fe^{2+} 蓄积, 进而引发铁代谢稳态失衡, 激活铁自噬相关信号通



A: 细胞内游离 Fe^{2+} 水平; B: 细胞内 Lip ROS 水平; C: Western blot 检测 SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 表达情况; D: 细胞活力检测; E: SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 的蛋白相对表达量。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$, 与 Control 组相比; ## $P<0.01$, 与 H-Cd 组相比。

A: intracellular free Fe^{2+} levels; B: intracellular lipid ROS (Lip ROS) levels; C: Western blot analysis of the expression levels of SLC7A11, GPX4 and ACSL4; D: cell viability assay; E: relative protein expression of SLC7A11, GPX4 and ACSL4; $\bar{x} \pm s$, $n=3$; ** $P<0.01$ compared with the Control group; ## $P<0.01$ compared with the H-Cd group.

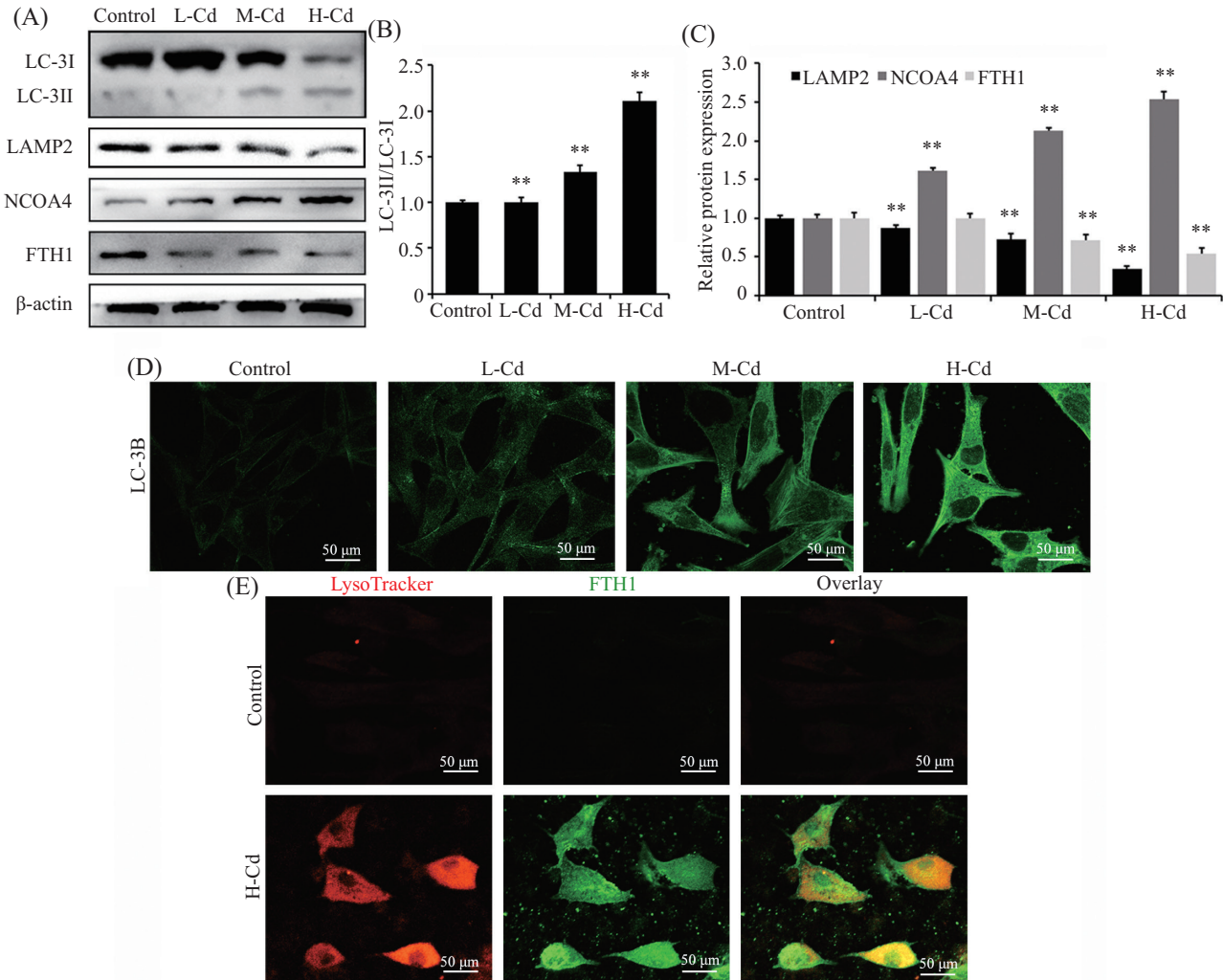
图5 铁死亡抑制剂Fer-1对Cd诱导的成骨细胞铁死亡的影响

Fig.5 Effect of the ferroptosis inhibitor Fer-1 on ferroptotic death induced by Cd in osteoblasts

路,最终触发成骨细胞铁自噬。于此同时Cd对溶酶体功能的破坏、对铁自噬关键蛋白表达的直接调控,也可能是其诱导铁自噬及铁死亡发生的重要原因及铁死亡发生的重要原因。

为进一步明确铁自噬在Cd诱导成骨细胞铁死亡过程中的调控作用,本研究采用自噬抑制BafA1开展干预实验,结果表明,抑制自噬通路可显著阻断Cd诱导的成骨细胞溶酶体中FTH1降解,有效降低细胞内游离 Fe^{2+} 及Lip ROS水平,同时显著上调铁

死亡关键调控蛋白GPX4的表达水平,最终使成骨细胞活力得以恢复。结合前述铁死亡相关实验数据,本研究提出如下分子机制: Cd可通过上调NCOA4的表达和活性,经铁自噬途径促进FTH1降解并释放大量的游离 Fe^{2+} ;过量的 Fe^{2+} 会触发Fenton反应,导致成骨细胞内脂质过氧化物大量堆积,最终引发铁死亡。此外,本研究中Cd对FTH1蛋白表达的调控趋势,与丙戊酸刺激成骨细胞MC3T3-E1后FTH1的表达变化规律基本一致^[29],这一结果进一步佐证了铁自



A: Western blot检测LC-3、NCOA4、LAMP2和FTH1表达情况; B: LC-3II/LC-3I值; C: NCOA4、LAMP2和FTH1相对表达量; D: 免疫荧光染色观察LC-3B在细胞中表达; E:免疫荧光染色分析 FTH1在溶酶体中的聚集情况。 $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P < 0.01$, 与Control组相比。

A: Western blot analysis of the expression levels of LC-3, NCOA4, LAMP2 and FTH1; B: the ratio of LC-3II to LC-3I; C: relative protein expression of NCOA4, LAMP2 and FTH1; D: immunofluorescence staining for the cellular localization of LC-3B; E: immunofluorescence analysis of FTH1 accumulation in lysosomes. $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P < 0.01$ compared with the Control group.

图6 Cd对成骨细胞中铁自噬相关指标的影响

Fig.6 Effect of Cd on ferritinophagy-associated factors in osteoblasts

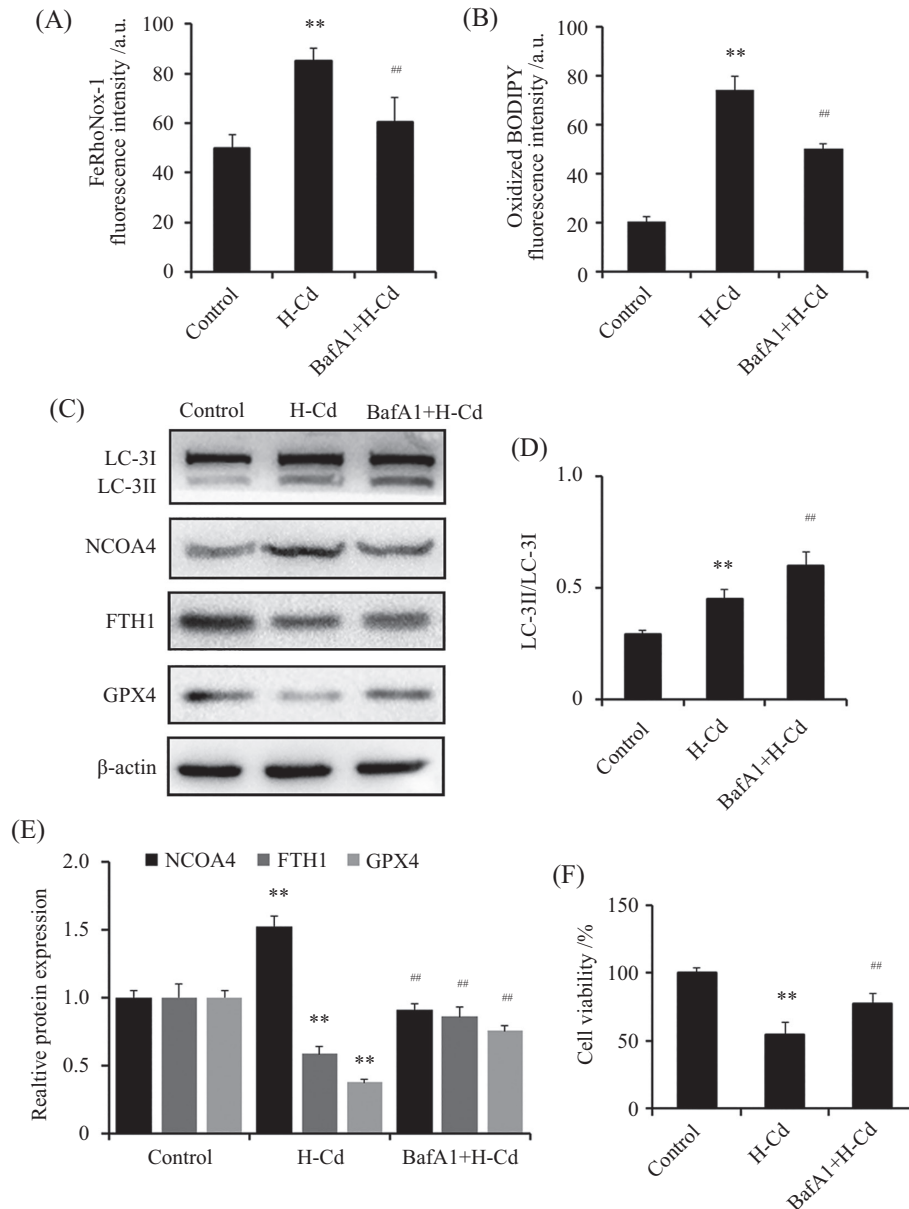
噬在成骨细胞铁死亡中发挥的关键调控作用。然而,本研究尚未探讨铁死亡相关Nrf2/ARE信号通路及氧化应激对铁死亡核心基因 *SLC7A11*、*GPX4*及 *ACSL4*转录及其蛋白表达的调控作用,亦未明确其对成骨细胞铁死亡的影响,后续我们将进一步开展体外细胞与分子机制实验,深入解析Cd调控铁死亡关键基因表达的核心通路,完善Cd诱导成骨细胞铁死亡的分子调控网络。同时将构建Cd诱导骨组织损伤动物模型,阐明Cd在体内对成骨细胞生物学行为的调控效应;系统解析铁死亡介导Cd致成骨细胞损伤的上下游分子通路,挖掘该通路中可调控的关键靶点;并整合体内外实验结果,完善从Cd诱导成

骨细胞铁死亡,最终引发骨组织损伤的完整分子机制链,为揭示Cd致骨毒性的分子机制、寻找防治骨组织损伤防控的潜在干预靶点提供更充分的实验依据。

综上,Cd可通过激活铁自噬途径诱导成骨细胞发生铁死亡,为解析Cd致骨损伤的分子机制提供了新的实验依据。

参考文献 (References)

- [1] JOMOVA K, ALOMAR S Y, NEPOVIMOVA E, et al. Heavy metals: toxicity and human health effects [J]. Arch Toxicol, 2025, 99(1): 153-209.
- [2] SATARUG S, MOORE M R. Adverse health effects of chronic



A: 细胞内游离Fe²⁺水平; B: 细胞内Lip ROS水平; C: Western blot检测LC-3、NCOA4、FTH1和GPX4表达情况; D: LC-3II/LC-3I值; E: NCOA4、FTH1和GPX4相对表达量; F: 细胞活力检测。x̄±s, n=3; **P<0.01, 与Control组相比; ##P<0.01, 与H-Cd组相比。

A: intracellular free Fe²⁺ levels; B: intracellular Lip ROS levels; C: Western blot analysis of the expression levels of LC-3, NCOA4, FTH1 and GPX4; D: the ratio of LC-3II to LC-3I; E: relative protein expression of NCOA4, FTH1 and GPX4; F: cell viability assay. x̄±s, n=3; **P<0.01 compared with the Control group; ##P<0.01 compared with the H-Cd group.

图7 自噬抑制剂BafA1对Cd诱导的铁自噬和铁死亡的影响

Fig.7 Effect of BafA1 on Cd-induced ferritinophagy and ferroptosis in osteoblasts

exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke [J]. Environ Health Perspect, 2004, 112: 1099-103.

[3] BAUTISTA C J, ARANGO N, PLATA C, et al. Mechanism of cadmium-induced nephrotoxicity [J]. Toxicology, 2024, 502: 153726.

[4] LI B M, XIA M S, ZOREC R, et al. Astrocytes in heavy metal neurotoxicity and neurodegeneration [J]. Brain Res, 2021, 1752: 147234.

[5] MEN H, YOUNG J L, ZHOU W, et al. Early-life exposure to low-dose cadmium accelerates diethylnitrosamine and diet-induced liver cancer [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 1427787.

[6] YU F, LIU L P, ALI W, et al. P62 acts as an intermedator in cadmium-induced osteocyte apoptosis and osteoporosis in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2025, 240: 117104.

[7] MA Y G, RAN D, SHI X N, et al. Cadmium toxicity: a role in bone cell function and teeth development [J]. Sci Total Environ, 2021, 769: 144646.

[8] MA Y G, RAN D, ZHAO H Y, et al. Cadmium exposure triggers osteoporosis in duck via P2X7/PI3K/AKT-mediated osteoblast

- and osteoclast differentiation [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 750: 141638.
- [9] ELMORSY E M, AL-GHAFARI A B, AL DOGHAITHER H A, et al. Vitamin D alleviates heavy metal-induced cytotoxic effects on human bone osteoblasts via the induction of bioenergetic disruption, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2025, 203(4): 2420-34.
- [10] MA Y G, RAN D, CAO Y, et al. The effect of P2X7 on cadmium-induced osteoporosis in mice [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 405: 124251.
- [11] HUANG B, WANG H, LIU S, et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 867.
- [12] 孙承阳, 袁诗博, 王运良, 等. 锦灯笼醇提取物调控SLC7A11/ALOX12通路对乳腺癌细胞铁死亡的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(SUN C Y, YUAN S B, WANG Y L, et al. Effect of physalis calyx seu fructus alcoholic extract on ferroptosis of breast cancer cells by regulating SLC7A11/ALOX12 pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2025, 47(4): 841-50.
- [13] 张宗丽, 席世兵, 李涛, 等. 肿瘤坏死因子 α 通过抑制Nrf2/GPX4信号通路促进H9c2心肌细胞铁死亡的作用机制研究[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHANG Z L, XI S B, LI T, et al. Study on the mechanism of tumor necrosis factor α promoting ferroptosis of H9c2 cardiomyocytes through inhibiting the Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2025, 47(10): 2495-503.
- [14] YANG G C, YANG Y H, SONG Z H, et al. Spliceosomal GT-Pase Eftud2 deficiency-triggered ferroptosis leads to Purkinje cell degeneration [J]. *Neuron*, 2024, 112(20): 3452-69.
- [15] LIU P, WANG W Z, LI Z, et al. Ferroptosis: a new regulatory mechanism in osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2634431.
- [16] JIANG Z X, WANG H, QI G B, et al. Iron overload-induced ferroptosis of osteoblasts inhibits osteogenesis and promotes osteoporosis: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *IUBMB Life*, 2022, 74(11): 1052-69.
- [17] SUN F, ZHOU J L, LIU Z L, et al. Dexamethasone induces ferroptosis via P53/SLC7A11/GPX4 pathway in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 602: 149-55.
- [18] LIN Y F, SHEN X M, KE Y Z, et al. Activation of osteoblast ferroptosis via the METTL3/ASK1-p38 signaling pathway in high glucose and high fat (HGHF)-induced diabetic bone loss [J]. *FASEB J*, 2022, 36(3): e22147.
- [19] LIN Y Z, CHEN Z H, YANG J F, et al. Astaxanthin prevents glucocorticoid-induced femoral head osteonecrosis by targeting ferroptosis through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(7): 4270-87.
- [20] 董凡赫, 寿今豪, 张云, 等. 重楼皂苷I通过抑制自噬减轻TCP磨损颗粒诱导成骨细胞损伤的体外实验研究[J]. *中草药*(DONG F H, SHOU J H, ZHANG Y, et al. Polyphyllin I alleviates osteoblasts injuries induced by TCP wear particles *in vitro* via inhibition of autophagy [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2020, 51(9): 2501-8.
- [21] JIA L, MA T W, LÜ L Y, et al. Endoplasmic reticulum stress mediated by ROS participates in cadmium exposure-induced MC3T3-E1 cell apoptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 251: 114517.
- [22] ZHOU D H, RAN Y W, YU R, et al. SIRT1 regulates osteoblast senescence through SOD2 acetylation and mitochondrial dysfunction in the progression of osteoporosis caused by cadmium exposure [J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110632.
- [23] HE Z Q, SHEN P, FENG L J, et al. Cadmium induces liver dysfunction and ferroptosis through the endoplasmic stress-ferritinophagy axis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 45: 114123.
- [24] GUO Y Y, LIANG N N, ZHANG X Y, et al. Mitochondrial GPX4 acetylation is involved in cadmium-induced renal cell ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2024, 73: 103179.
- [25] LOKE J, KIM P G, NGUYEN T T P, et al. An *in vivo* barcoded CRISPR-Cas9 screen identifies Ncoa4-mediated ferritinophagy as a dependence in Tet2-deficient hematopoiesis [J]. *Blood*, 2025, 146(10): 1174-86.
- [26] LIU B X, TIAN X Y, LI L R, et al. SFTSV induces liver ferroptosis through m6A-related ferritinophagy [J]. *Autophagy*, 2025, 21(11): 2353-66.
- [27] LIN J X, HONG H H, LIU S C, et al. Aflatoxin B1 exposure induces Alzheimer's disease like pathology by disrupting redox homeostasis and activating ferroptotic signals in C57BL/6 J mice [J]. *Sci Total Environ*, 2025, 970: 179049.
- [28] YANG R Z, XU W N, ZHENG H L, et al. Exosomes derived from vascular endothelial cells antagonize glucocorticoid-induced osteoporosis by inhibiting ferritinophagy with resultant limited ferroptosis of osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(9): 6691-705.
- [29] GU Y F, WANG Z R, WANG K, et al. Low-dose valproic acid ameliorates osteoporosis by restoring redox homeostasis and suppressing ferritinophagy-dependent ferroptosis via EZH2/H3K27me3 signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 241: 76-89.