菝葜皂苷元通过激活 PI3K/Akt 通路抑制成骨细胞铁死亡减轻糖皮质激素性骨质疏松症

姜幸福，党　琦，王勤俭，徐冬康，王阳明，董良杰*

河南省中医院（河南中医药大学第二附属医院）脊柱病三区，河南 郑州　450003

摘　要：目的　探讨菝葜皂苷元（sarsasapogenin，SAR）对糖皮质激素性骨质疏松症（glucocorticoid-induced osteoporosis，GIOP）成骨细胞铁死亡的影响及作用机制。**方法**　地塞米松处理小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞建立 GIOP 细胞模型，设置对照组、模型组及 SAR（1、2、4 μmol/L）组和 SAR（4 μmol/L）＋铁死亡激活剂 erastin（10 μmol/L）组、SAR（4 μmol/L）＋磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）抑制剂 LY294002（10 μmol/L）组。CCK-8 法检测细胞活力；采用 C11 BODIPY 581/591、二氢乙锭（dihydroethidium，DHE）和 Ferro Orange 染色检测脂质过氧化、活性氧（reactive oxygen species，ROS）和亚铁离子水平；试剂盒检测丙二醛（malondialdehyde，MDA）和谷胱甘肽（glutathione，GSH）含量；碱性磷酸酯酶（alkaline phosphatase，ALP）和茜素红 S 染色检测成骨分化；Western blotting 检测乙酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4（acetyl coenzyme A synthetase long-chain family member 4，ACSL4）、谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）、PI3K/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路及骨形成相关蛋白［ALP、I 型胶原 A1（collagen type I α1，COL1A1）、骨形态发生蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）、Runt 相关转录因子 2（Runt-related transcription factor 2，RUNX2）］表达。ip 地塞米松建立小鼠 GIOP 模型，随机分为对照组、模型组、SAR（10 mg/kg）组和 SAR（10 mg/kg）＋LY294002（10 mg/kg）组。采用 Micro-CT 对小鼠股骨远端进行骨形态分析；苏木素-伊红（hematoxylin eosin，HE）和 Masson 染色评价股骨组织形态学改变；钙黄绿素-茜素红双标记实验测定矿化沉积率（mineral apposition rate，MAR）；Western blotting 检测 ACSL4、GPX4、PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达。**结果**　与对照组比较，模型组细胞活力显著降低（$P<0.001$），脂质过氧化、ROS、亚铁离子、MDA 水平及 ACSL4 蛋白表达显著升高（$P<0.001$），GSH 水平和 GPX4 蛋白表达显著降低（$P<0.001$），ALP 含量及活性、钙结节形成、骨形成相关蛋白表达及 PI3K、Akt 的磷酸化水平显著降低（$P<0.001$）；与模型组比较，SAR 处理可呈剂量相关性地增加细胞活力，抑制铁死亡，促进骨形成，并上调 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋erastin 组骨形成能力显著降低（$P<0.05$），SAR＋LY294002 组铁死亡明显增多（$P<0.05$）。动物实验结果表明，与对照组比较，模型组小鼠股骨远端骨小梁出现严重的骨丢失，骨形态严重损坏，p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达显著降低（$P<0.001$），ACSL4 蛋白表达显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，SAR 组骨形态明显改善，p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达显著升高（$P<0.01$），ACSL4 蛋白表达显著降低（$P<0.001$）；与 SAR 组比较，SAR＋LY294002 组骨形态损坏，p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达显著降低（$P<0.05$），ACSL4 蛋白表达显著升高（$P<0.05$）。**结论**　SAR 可有效减轻 GIOP，其机制可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制成骨细胞铁死亡，进而促进骨形成。

关键词：菝葜皂苷元；PI3K/Akt 通路；成骨细胞；铁死亡；糖皮质激素性骨质疏松症

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)13 - 4678 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.012

Sarsasapogenin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by inhibiting ferroptosis of osteoblasts by activating PI3K/Akt pathway

JIANG Xingfu, DANG Qi, WANG Qinjian, XU Dongkang, WANG Yangming, DONG Liangjie

Spinal Disease District 3, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450003, China

收稿日期：2025-02-24

基金项目：河南省中医药科学研究专项课题（2021ZY2120，2024ZY2050）；河南省卫生健康委国家中医药传承创新中心科研专项（2023ZXZX1172）

作者简介：姜幸福，硕士，主治医师，从事中医脊柱伤研究。E-mail: 18939505355@163.com

***通信作者：**董良杰，硕士，主任医师，从事中草药治疗关节骨病相关研究。E-mail: shaolinyanyi@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of sarsasapogenin (SAR) on ferroptosis of osteoblasts in glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP). **Methods** GIOP cell model was established by treating mouse osteoblasts (MC3T3-E1) with dexamethasone (Dex), control group, model group, SAR (1, 2, 4 μmol/L) group, SAR (4 μmol/L) + ferroptosis activator erastin (10 μmol/L) group, SAR (4 μmol/L) + phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (10 μmol/L) group were set up. Cell viability was measured by CCK-8 assay; Levels of lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS) and ferrous ions were detected by C11 BODIPY 581/591, DHE and Ferro Orange staining; The contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were detected by kits; Osteogenic differentiation was detected by alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red S staining; The expressions of acetyl coenzyme A synthetase long-chain family member (ACSL4), glutathione peroxidase 4 (GPX4), PI3K/protein kinase B (Akt) signaling pathway, and bone formation related proteins (ALP, collagen type I alpha 1 (COL1A1), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) were detected by Western blotting. Mouse GIOP model was established by intraperitoneal injection of Dex. The mice were randomly divided into control group, model group, SAR (10 mg/kg) group and SAR (10 mg/kg) + LY294002 (10 mg/kg) group. The bone morphology of distal femurs of mice was analyzed by Micro-CT; The morphologic changes of femur were evaluated by hematoxylin eosin (HE) and Masson staining; The mineral apposition rate (MAR) was determined by calcein-alizarin red double labeling experiment; The expressions of ACSL4, GPX4 and PI3K/Akt signaling pathway related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, cell viability in model group was significantly decreased ($P < 0.001$), the levels of lipid peroxidation, ROS, ferrous ion, MDA and ACSL4 protein expression were significantly increased ($P < 0.001$), while GSH content and GPX4 protein expression were significantly decreased ($P < 0.001$), the content and activity of ALP, calcium nodules, bone formation related protein expressions and phosphorylation levels of PI3K and Akt were significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with model group, SAR dose-dependently increased cell viability, reduced ferroptosis, promoted bone formation, and increased the phosphorylation levels of PI3K and Akt ($P < 0.01$). Compared with SAR group, bone formation ability was significantly decreased in SAR + erastin group ($P < 0.05$), while ferroptosis in SAR + LY294002 group was significantly enhanced ($P < 0.05$). The results of animal experiments showed that compared with control group, there was serious bone loss in distal bone trabecula of femur, bone morphology was severely damaged, p-PI3K, p-Akt and GPX4 protein expressions were significantly decreased, while ACSL4 protein expression was significantly increased in model group ($P < 0.001$). Compared with model group, bone morphology was significantly improved, p-PI3K, p-Akt and GPX4 protein expressions were significantly increased ($P < 0.01$), while ACSL4 protein expression was significantly decreased in SAR group ($P < 0.01$). Compared with SAR group, bone morphology was damaged, p-PI3K, p-Akt and GPX4 protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05$), while ACSL4 protein expression was significantly increased in SAR + LY294002 group ($P < 0.05$). **Conclusion** SAR could effectively alleviate GIOP, and its mechanism might be involved in the activation of PI3K/Akt signaling pathway to inhibit ferroptosis of osteoblasts and thus promote bone formation.

Key words: sarsasapogenin; PI3K/Akt pathway; osteoblast; ferroptosis; glucocorticoid-induced osteoporosis

骨质疏松症（osteoporosis，OP）是一种常见的代谢性疾病，其特点为骨组织破坏、总骨量减少，导致骨骼脆弱，易发生骨折。OP 可分为原发性 OP 和继发性 OP[1]。糖皮质激素性骨质疏松症（glucocorticoid-induced osteoporosis，GIOP）是最常见的继发性 OP。地塞米松是一种广泛使用的糖皮质激素，常用于治疗炎症和自身免疫性疾病。然而，长期或高剂量使用地塞米松会对骨骼系统产生不良后果，导致骨退化加速、骨密度降低和骨微结构损伤，并可引起继发性 OP 和骨坏死[2]。研究表明，成骨细胞功能障碍是导致 GIOP 的主要原因[3]。因此，增加成骨细胞的数量和功能可能是治疗 GIOP 的有效策略。

铁死亡是一种铁依赖性细胞死亡形式，其特征是脂质过氧化和活性氧（reactive oxygen species，ROS）的积累。铁死亡与 OP 的发生和进展关系密切[4]。谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）是一种分解脂质过氧化物的酶，以谷胱甘肽（glutathione，GSH）作为底物，将有害的脂质过氧化物转化为无毒的醇[5]。研究发现，地塞米松诱导的 GIOP 小鼠铁代谢紊乱，氧化应激和脂质过氧化水平升高，表明铁死亡在 GIOP 中起重要作用[6]。铁过载可诱导成骨细胞铁死亡进而抑制骨形成并促进骨质疏松[7]。因此，靶向抑制成骨细胞铁死亡可能是减缓 GIOP 进展的潜在治疗方法。

菝葜皂苷元（sarsasapogenin，SAR）是一种从知母根茎中分离得到的天然甾体皂苷元，具有抗衰老、抗氧化和抗炎等多种药理特性[8]。SAR 已被证明能在体外抑制核因子-κB 受体激活因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，

RANKL）诱导的破骨细胞生成，并防止脂多糖诱导的小鼠骨溶解模型中骨质流失[9]。SAR 可抑制 YAP1 依赖性软骨细胞铁死亡，从而减轻骨关节炎的进展[10]。此外，SAR 通过激活 GPX4/裂隙导向配体 3（slit guidance ligand 3，SLIT3）/圆轴蛋白同源物 1（roundabout human homolog 1，ROBO1）信号通路诱导血管生成和骨形成，改善雌激素缺乏诱导的 OP[11]。然而，SAR 是否能通过调控成骨细胞铁死亡而延缓 GIOP 尚未可知。本研究通过地塞米松诱导建立体内外 GIOP 模型，探讨 SAR 对 GIOP 中成骨细胞铁死亡的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞购自合肥万物生物科技有限公司。

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 40 只，10 周龄，体质量（27±2）g，购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，生产许可证号 SCXK（豫）2019-0002。小鼠饲养于相对湿度为 50%～60%、温度为（22±2）℃的 SPF 环境中，自由进食饮水。动物实验经河南省中医院伦理委员会批准（批准号 HNSZYYWZ-2024008）。

1.2 药品与试剂

MC3T3-E1 细胞专用完全培养基［含 α 最低必需培养基（α minimum essential medium，MEMα）、10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和 1%青霉素/链霉素］购自武汉普诺赛生命科技有限公司；SAR（批号 HY-N0073，质量分数为 99.91%）、铁死亡激活剂 erastin（批号 HY-15763，质量分数为 99.62%）、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）抑制剂 LY294002（批号 HY-10108，质量分数为 99.86%）购自美国 MedChemExpress 公司；地塞米松（批号 265005）、β-甘油磷酸酯（批号 G6626）、抗坏血酸（批号 A4544）、钙黄绿素（批号 C0875）、茜素红 S（alizarin red S，ARS，批号 A5533）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；CCK-8 试剂盒（批号 abs50003）购自爱必信（上海）生物科技有限公司；C11 BODIPY 581/591 脂质过氧化荧光探针（批号 MX5211-1MG）、Ferro Orange 亚铁离子荧光探针（批号 MX4559-48UG）购自上海懋康生物科技有限公司；二氢乙锭（dihydroethidium，DHE）-ROS 检测试剂盒（批号 HR8685）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 WE0276）购自北京百奥莱博科技有限公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA）测定试剂盒（批号 A003-1-2）、GSH 测定试剂盒（批号 A006-2-1）购自南京建成生物工程研究所有限公司；BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶（alkaline phosphatase，ALP）显色试剂盒（批号 C3206）、RIPA 裂解缓冲液（批号 P0013B）、PVDF 膜（批号 FFP22）、超敏 ECL 化学发光试剂盒（批号 P0018M）购自碧云天生物技术有限公司；ARS 染色定量试剂盒（批号 8678）购自美国 ScienCell Research Laboratories 公司；GPX4 抗体（批号 ab125066）、乙酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4（acetyl coenzyme A synthetase long-chain family member 4，ACSL4）抗体（批号 ab155282）、ALP 抗体（批号 ab229126）、I 型胶原 A1（collagen type I α1，COL1A1）抗体（批号 ab316222）、骨形态发生蛋白 2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）抗体（批号 ab284387）、Runt 相关转录因子 2（Runt-related transcription factor 2，RUNX2）抗体（批号 ab236639）购自英国 Abcam 公司；PI3K 抗体（批号 4292）、p-PI3K 抗体（批号 17366）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）抗体（批号 9272）、p-Akt 抗体（批号 4060）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 2118）、HRP 标记的 IgG 二抗（批号 7074）购自美国 CST 公司；苏木素-伊红（hematoxylin eosin，HE）染色试剂盒（批号 G1120）、Masson 三色染色试剂盒（批号 G1340）购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 仪器

Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Zeiss LSM 880 型激光共聚焦显微镜（德国 Zeiss 公司）；BX53 型荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；μCT 100 micro-CT 仪（瑞士 Scanco Medical 公司）。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 细胞培养 MC3T3-E1 细胞用专用完全培养基，于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养，隔天更换 1 次培养基，用第 3～10 代细胞进行实验。在专用完全培养基中加入 10 mmol/L β-甘油磷酸酯和 50 mg/mL 抗坏血酸制成成骨诱导培养基，用于诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化。

2.1.2 CCK-8 法检测细胞活力 MC3T3-E1 细胞以

5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，分别加入 1、2、4、8 μmol/L SAR[9]培养 24、48 h，另设置对照组（加入不含药物的培养基）。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，于 37 ℃孵育 2 h，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度（*A*）值，考察 SAR 对 MC3T3-E1 细胞的毒性。

设置对照组、模型组和 SAR（1、2、4 μmol/L）组，模型组和给药组给予 10 μmol/L 地塞米松处理 1 h 后，给药组加入药物处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，于 37 ℃孵育 2 h，用酶标仪测定 450 nm 处的 *A* 值，考察 SAR 对地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞活力的影响。

2.1.3 细胞处理 设置对照组、模型组及 SAR（1、2、4 μmol/L）组和 SAR（4 μmol/L）＋erastin（10 μmol/L）、SAR（4 μmol/L）＋LY294002（10 μmol/L）组，对照组加入不含药物的培养基；模型组给予 10 μmol/L 地塞米松处理 1 h；SAR（1、2、4 μmol/L）组给予 10 μmol/L 地塞米松处理 1 h 后，加入不同浓度的药物处理 24 h；SAR＋erastin 组和 SAR＋LY294002 组先用 erastin（10 μmol/L）或 LY294002（10 μmol/L）预处理 30 min，更换为新鲜培养基，加入 10 μmol/L 地塞米松处理 1 h 后，加入 4 μmol/L SAR 处理 24 h。

2.1.4 脂质过氧化水平的检测 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，加入 10 μmol/L C11 BODIPY 581/591 荧光探针孵育 1 h。未氧化的 C11 BODIPY 581/591 荧光探针呈红色，氧化的荧光探针呈绿色。利用激光共聚焦显微镜分别用 488 nm 和 565 nm 激光器激发，采集荧光信号图像，根据荧光信号强度量化分析脂质过氧化水平。

2.1.5 ROS 水平的检测 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，加入 DHE 荧光探针，在 37 ℃避光条件下孵育 30 min。用荧光显微镜进行观察并采集图像，使用 Image Proplus 6.0 软件进行荧光强度定量分析。

2.1.6 亚铁离子含量的测定 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，加入 1 μmol/L Ferro Orange 荧光探针，在 37 ℃避光条件下孵育 30 min。激光共聚焦显微镜观察细胞并采集图像，根据荧光信号强度定量分析亚铁离子含量。

2.1.7 MDA 和 GSH 含量的测定 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，按照试剂盒说明书测定 MDA 和 GSH 含量。

2.1.8 成骨分化实验 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中，采用成骨诱导培养基培养，隔天更换 1 次培养基。在培养第 7 天采用 BCIP/NBT ALP 显色试剂盒进行染色，显微镜下观察染色结果，并用酶标仪检测 405 nm 处的 *A* 值，评估 ALP 活性。在培养第 21 天，采用 ARS 染色试剂盒进行染色，显微镜下观察染色结果，并用酶标仪检测 570 nm 处的 *A* 值，定量分析钙结节形成。

2.1.9 Western blotting 检测 GPX4、ACSL4、ALP、COL1A1、BMP2、RUNX2、p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达 MC3T3-E1 细胞经不同处理后，采用 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白，并采用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h 后，分别加入相应抗体，4 ℃孵育过夜；加入二抗，室温孵育 1.5 h；采用超敏 ECL 化学发光试剂盒显影，并采用 Image Proplus 6.0 软件对条带进行定量分析。

2.2 体内实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 小鼠适应性饲养 1 周后，采用随机分配法分为对照组、模型组、SAR（10 mg/kg）组和 SAR（10 mg/kg）＋LY294002（10 mg/kg）组，每组 10 只。除对照组外，其余小鼠 im 地塞米松（5 mg/kg），对照组 im 等体积的生理盐水，每周 2 次，连续注射 8 周。从第 9 周开始，各给药组 ig SAR 或同时 ip LY294002，对照组和模型组给予等体积的生理盐水，1 次/d，连续给药 8 周。

2.2.2 骨形态分析 实验结束后，小鼠 ip 戊巴比妥钠（100 mg/kg）安乐死，取股骨用 4%多聚甲醛固定 24 h。采用 Micro-CT 扫描小鼠股骨远端，参数设置为电压 70 kV、电流 200 μA、分辨率 14.8 mm，对图像进行三维重建。采用 Skyscan 软件量化骨形态参数，包括骨体积（bone volume，BV）/组织体积（tissue volume，TV）、骨小梁数（trabecular number，Tb.N）、骨小梁厚度（trabecular thickness，Tb.Th）和骨小梁分离度（trabecular separation，Tb.Sp）。

2.2.3 股骨的 HE 和 Masson 染色 Micro-CT 扫描完成后，股骨在 10% EDTA 中浸泡 3 周，对股骨进行脱钙处理。然后用乙醇脱水，在石蜡中包埋，制作 5 μm 厚的纵向切片。分别进行 HE 和 Masson 三色染色，显微镜下观察骨组织形态变化。

2.2.4 钙黄绿素-茜素红双标记实验 在实验第 12

周和第 16 周的第 1 天，小鼠分别 ip 钙黄绿素和 ARS，剂量均为 30 mg/ kg。实验结束后，麻醉处死小鼠，取股骨用多聚甲醛固定、乙醇脱水后，用 Embed-812 包埋，制作 5 μm 厚的纵向切片。荧光显微镜下观察，并计算矿化沉积率（mineral apposition rate，MAR）。

2.2.5　Western blotting 检测 GPX4、ACSL4、p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达　取各组小鼠股骨，采用 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白，按“2.1.9”项下方法检测相关蛋白表达。

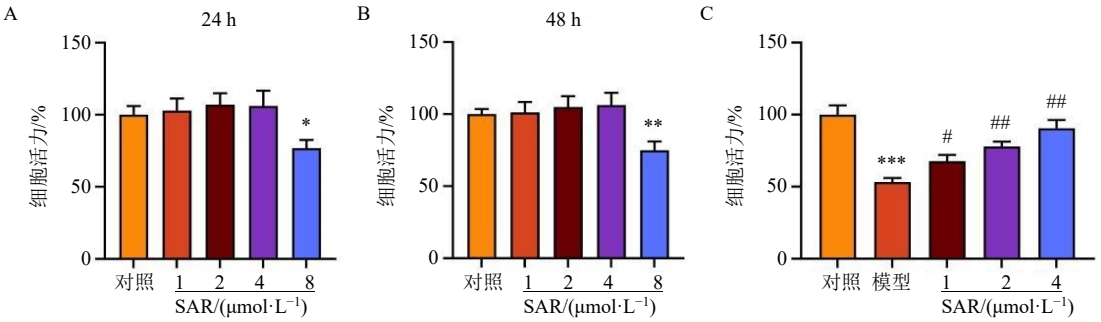
2.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，单因素方差分析进行多组间差异比较，并进行 Tukey’s 事后检验。

3　结果

3.1　SAR 对成骨细胞活力的影响

如图 1-A、B 所示，8 μmol/L SAR 处理 MC3T3-E1 细胞 24、48 h，细胞活力显著降低（P＜0.05、0.01）；1、2、4 μmol/L SAR 处理 MC3T3-E1 细胞 24、48 h，细胞活力无明显变化。因此，选取 1、2、4 μmol/L SAR 用于后续实验。如图 1-C 所示，与对照组比较，模型组细胞活力显著降低（P＜0.001）；与模型组比较，SAR（1、2、4 μmol/L）组细胞活力显著升高（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。



A、B-CCK-8 法检测不同浓度的 SAR 处理 MC3T3-E1 细胞 24、48 h 的细胞活力；C-SAR 对地塞米松处理的 MC3T3-E1 细胞活力的影响；与对照组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001，下图同。

A, B-viability of MC3T3-E1 cells treated with SAR at different concentrations for 24 and 48 h detected by CCK-8; C-effect of SAR on viability of MC3T3-E1 cells treated by dexamethasone; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$　$^{\#\#}P < 0.01$　$^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group, same as below figures.

图 1　SAR 对成骨细胞活力的影响（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Fig. 1　Effect of SAR on viability of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

3.2　SAR 抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡

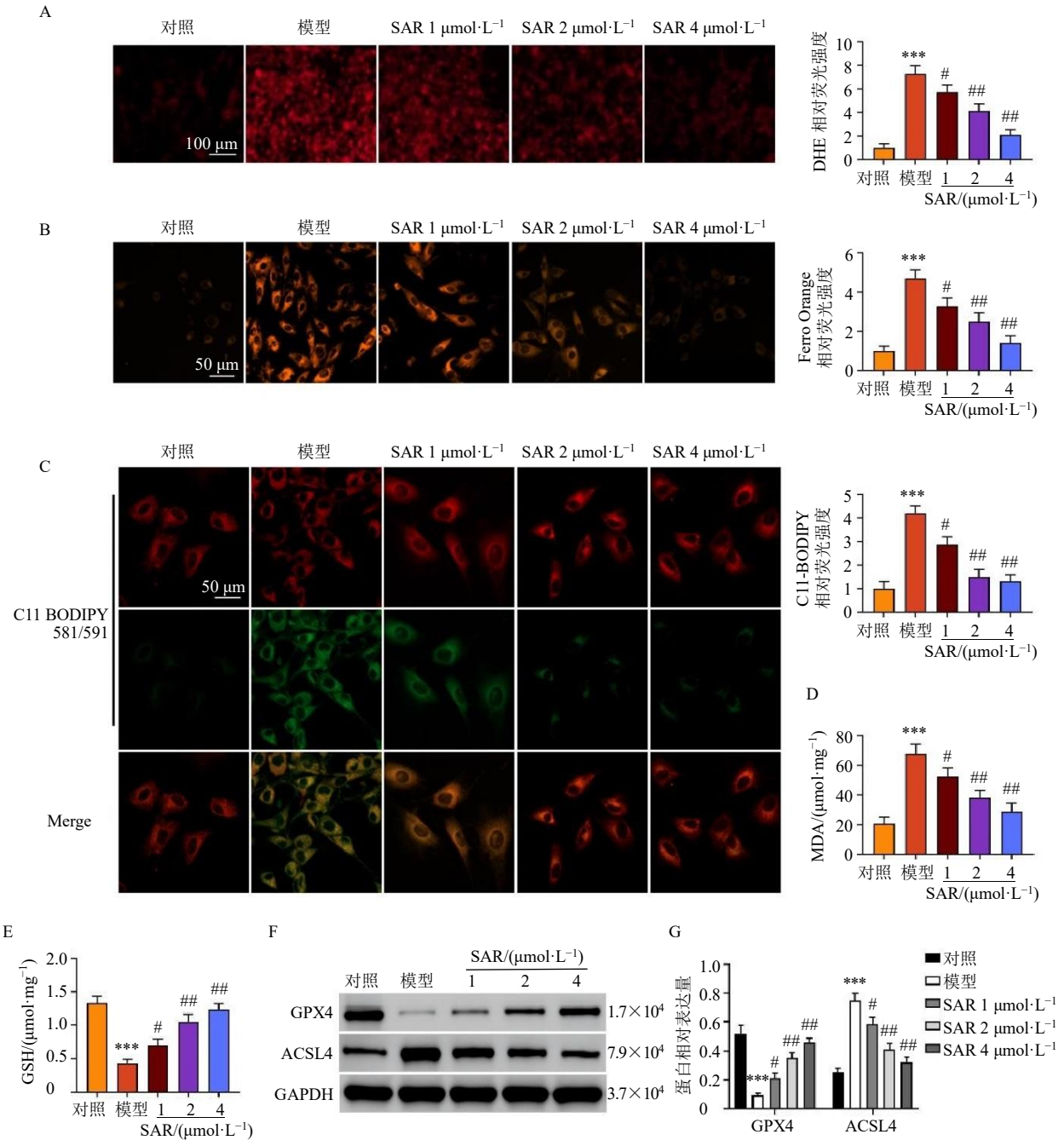
DHE、Ferro Orange 和 C11-BODIPY 染色结果（图 2-A～C）显示，与对照组比较，模型组 ROS、亚铁离子及脂质过氧化水平显著升高（P＜0.001）；与模型组比较，SAR 各剂量组 ROS、亚铁离子及脂质过氧化水平均显著降低（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。如图 2-D、E 所示，与对照组比较，模型组 MDA 含量显著升高（P＜0.001），GSH 含量显著降低（P＜0.001）；与模型组比较，SAR 各剂量组 MDA 含量显著升高（P＜0.05、0.01），GSH 含量显著降低（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。Western blotting 结果（图 2-F、G）显示，与对照组比较，模型组 GPX4 蛋白表达水平显著降低（P＜0.001），ACSL4 蛋白表达水平显著升高（P＜0.001）；与模型组比较，SAR 各剂量组 GPX4 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01），ACSL4 蛋白表达水平显著降低（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。

3.3　SAR 促进地塞米松处理的成骨细胞骨形成

与对照组比较，模型组 ALP 含量（图 3-A）及活性（图 3-B）、钙结节形成（图 3-C）及骨形成相关蛋白（ALP、COL1A1、BMP2、RUNX2）表达（图 3-D、E）显著降低（P＜0.001）；与模型组比较，SAR 各剂量组 ALP 含量及活性、钙结节形成及骨形成相关蛋白表达均显著升高（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。

3.4　SAR 活化地塞米松处理的成骨细胞中 PI3K/Akt 信号通路

如图 4 所示，与对照组比较，模型组 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平显著降低（P＜0.001）；与模型组比较，SAR 各剂量组 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平显著升高（P＜0.05、0.01），且呈剂量相关性。



A-DHE 染色检测 ROS 水平（×100）；B-Ferro Orange 染色检测亚铁离子含量（×200）；C-C11-BODIPY 染色检测脂质过氧化水平（×200）；D、E-MDA 和 GSH 含量；F、G-Western blotting 检测 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达。

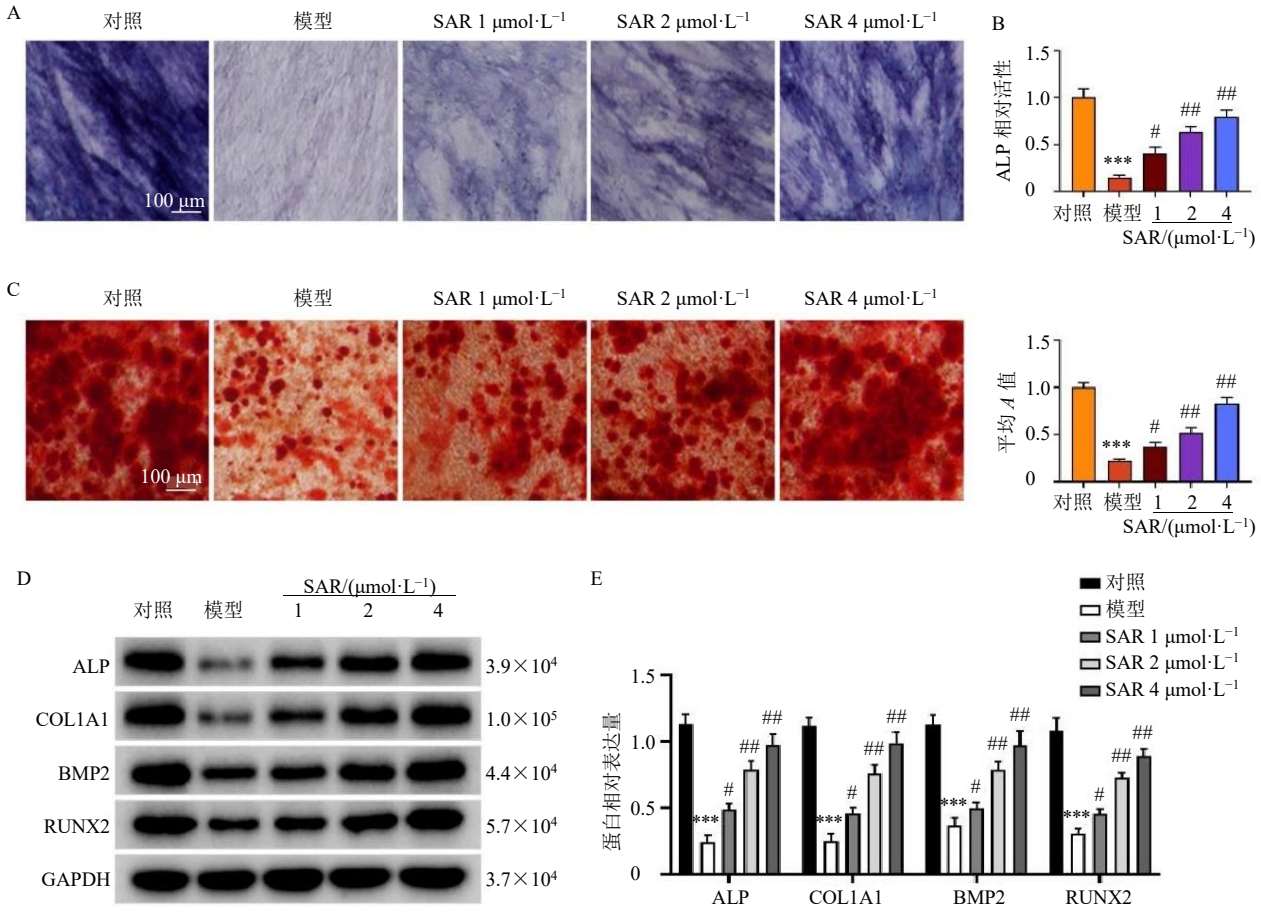
A-ROS level detected by DHE staining (× 100); B-ferrous ion content detected by Ferro Orange staining (× 200); C-lipid peroxidation level detected by C11-BODIPY staining (× 200); D, E-contents of MDA and GSH; F, G-expressions of GPX4 and ACSL4 proteins detected by Western blotting.

图 2　SAR 抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 2　SAR inhibited dexamethasone-induced ferroptosis in osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5　SAR 通过抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡提高成骨能力

与对照组比较，模型组 ALP 含量（图 5-A）及活性（图 5-B）、钙结节形成（图 5-C）及骨形成相关蛋白（ALP、COL1A1、BMP2、RUNX2）表达（图 5-D、E）显著降低（$P<0.001$）；与地塞米松组比较，SAR 组 ALP 含量及活性、钙结节形成及骨形成相关蛋白表达显著升高（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋erastin 组 ALP 含量及活性、钙结节形成及骨形成相关蛋白表达显著降低（$P<0.05$）。



A、B-试剂盒检测成骨诱导第 7 天时 ALP 含量和活性（×100）；C-ARS 染色检测成骨诱导第 21 天时钙结节形成（×100）；D、E-Western blotting 检测成骨诱导第 7 天时 ALP、COL1A1、BMP2 和 RUNX2 蛋白表达。

A, B-content and activity of ALP detected by kits on day 7 of osteogenesis induction (× 100); C-formation of calcium nodules on day 21 of osteogenesis induction detected by ARS staining (× 100); D, E-expressions of ALP, COL1A1, BMP2 and RUNX2 on day 7 of osteogenic induction detected by Western blotting.

图 3　SAR 促进地塞米松处理的成骨细胞骨形成（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Fig. 3　SAR promoted bone formation in dexamethasone-treated osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

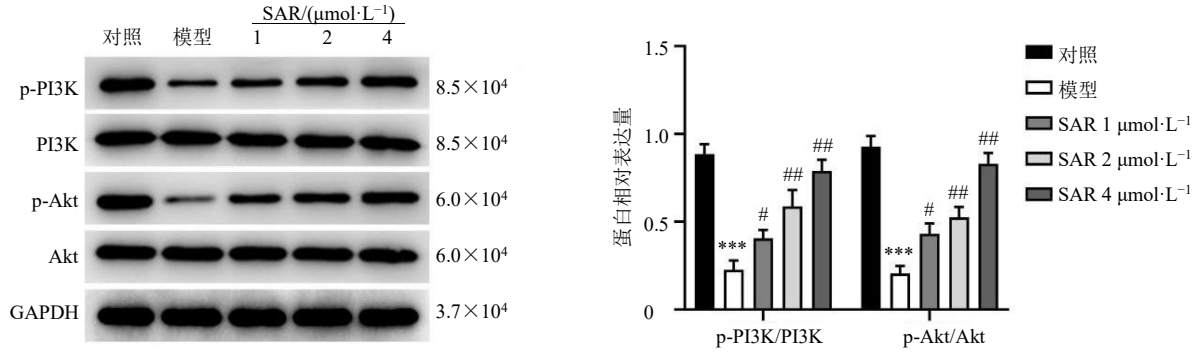
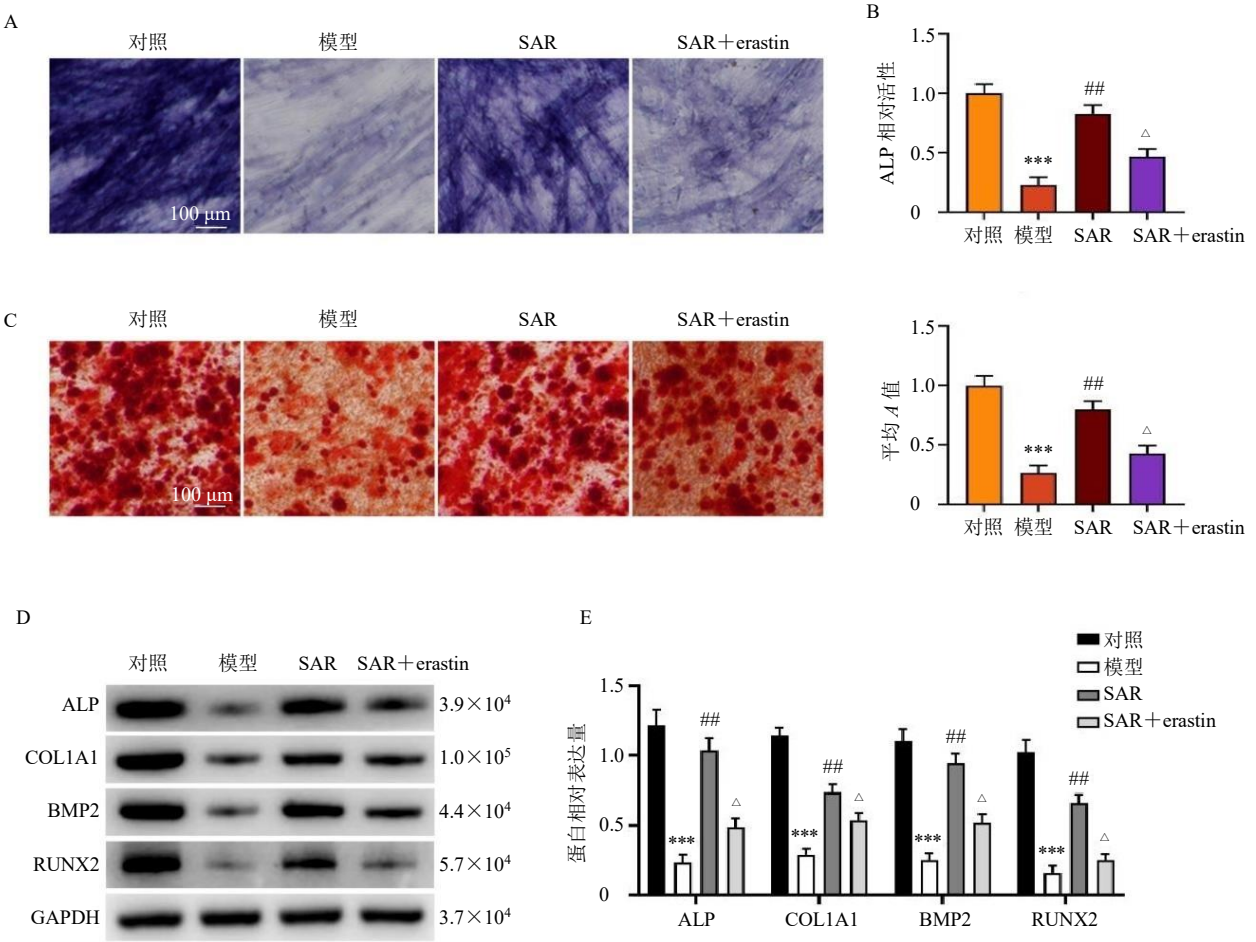


图 4　SAR 活化地塞米松处理的成骨细胞中 PI3K/Akt 信号通路（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Fig. 4　SAR activated PI3K/Akt signaling pathway in dexamethasone-treated osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A、B-试剂盒检测成骨诱导第 7 天时 ALP 含量和活性（×100）；C-ARS 染色检测成骨诱导第 21 天时钙结节形成（×100）；D、E-Western blotting 检测成骨诱导第 7 天时 ALP、COL1A1、BMP2 和 RUNX2 蛋白表达；与 SAR 组比较：$^{\triangle}P<0.05$，下图同。

A, B-content and activity of ALP detected by kits on day 7 of osteogenesis induction (× 100); C-formation of calcium nodules on day 21 of osteogenesis induction detected by ARS staining (× 100); D, E-expressions of ALP, COL1A1, BMP2 and RUNX2 on day 7 of osteogenic induction detected by Western blotting; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* SAR group, same as below figures.

图 5 SAR 通过抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡提高成骨能力（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

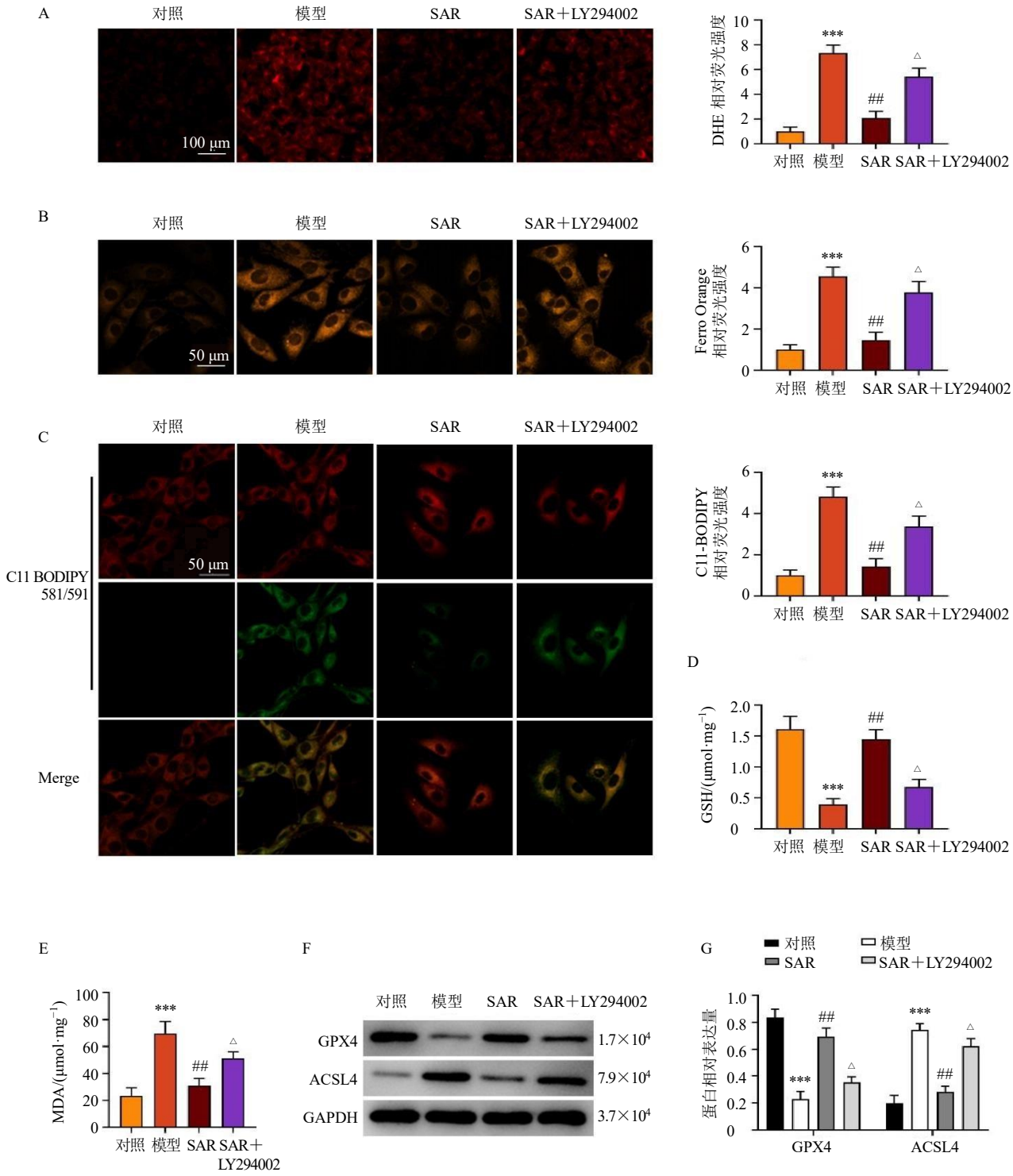
Fig. 5 SAR enhanced osteogenic ability by inhibiting dexamethasone-induced ferroptosis of osteoblasts ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6 SAR 通过活化 PI3K/Akt 信号通路抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡

与对照组比较，模型组 ROS（图 6-A）、亚铁离子（图 6-B）、脂质过氧化（图 6-C）、MDA（图 6-D）水平及 ACSL4 蛋白表达（图 6-F、G）显著升高（$P<0.001$），GSH 水平（图 6-E）及 GPX4 蛋白表达（图 6-F、G）明显降低（$P<0.001$）；与模型组比较，SAR 组 ROS、亚铁离子、脂质过氧化、MDA 水平及 ACSL4 蛋白表达显著降低（$P<0.01$），GSH 水平及 GPX4 蛋白表达显著升高（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋LY294002 组 ROS、亚铁离子、脂质过氧化、MDA 水平及 ACSL4 蛋白表达显著升高（$P<0.05$），GSH 水平及 GPX4 蛋白表达明显降低（$P<0.05$）。

3.7 SAR 在体内通过活化 PI3K/Akt 信号通路抑制铁死亡而促进骨形成

Micro-CT 结果（图 7-A）显示，与对照组比较，模型组小鼠股骨远端骨小梁出现严重的骨丢失，BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 显著降低（$P<0.001$，图 7-B～D），Tb.Sp 明显升高（$P<0.001$，图 7-E）；与模型组比较，SAR 治疗 8 周后，骨小梁结构明显改善，BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 显著升高（$P<0.01$），Tb.Sp 显著降低（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋LY294002 组骨小梁结构损坏，BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 显著降低（$P<0.05$），Tb.Sp 显著升高（$P<0.05$）。股骨的 HE 和 Masson 染色结果与 Micro-CT

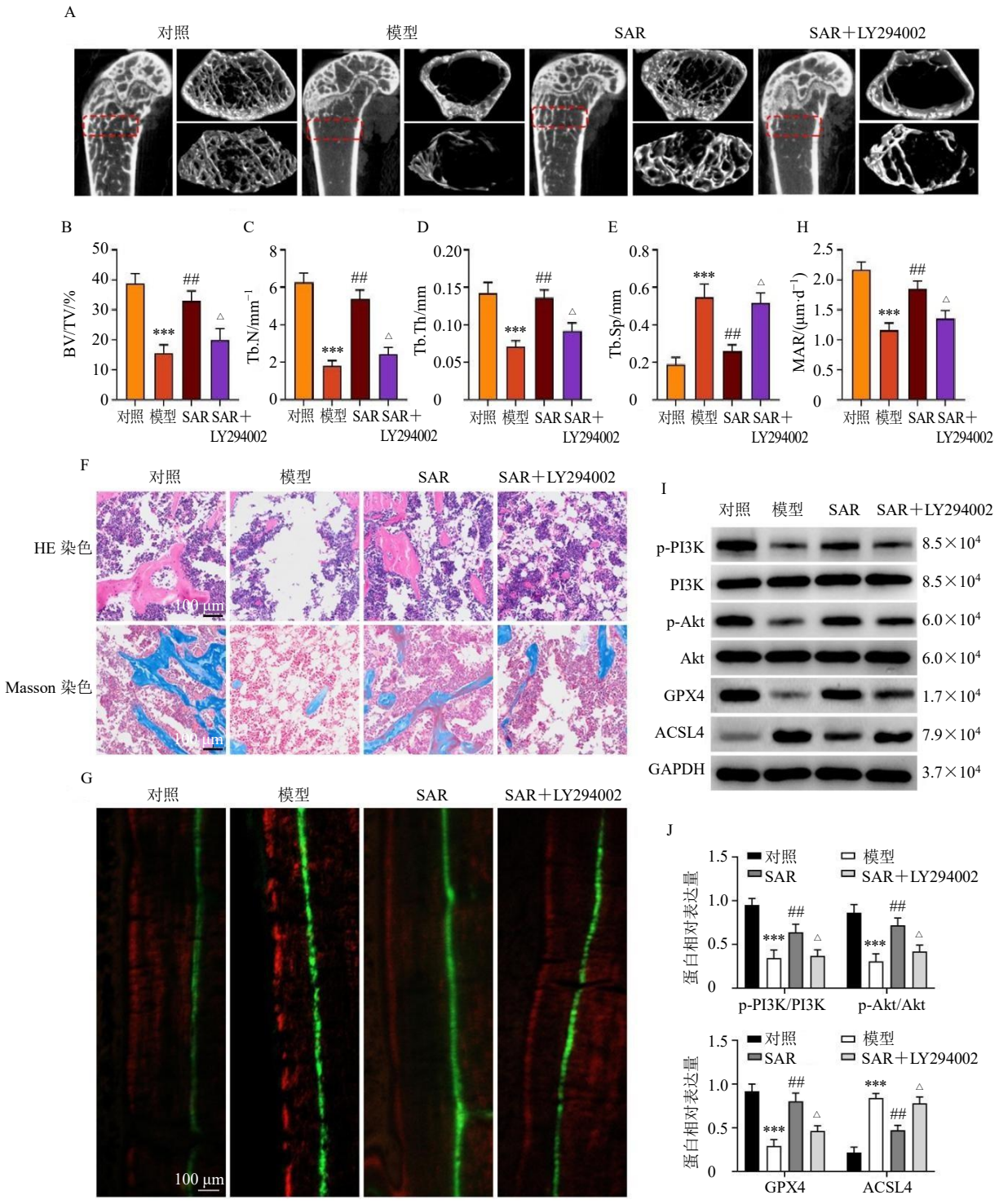


A-DHE 染色检测 ROS 水平（×100）；B-Ferro Orange 染色检测亚铁离子含量（×200）；C-C11-BODIPY 染色检测脂质过氧化水平（×200）；D、E-GSH 和 MDA 含量；F、G-Western blotting 检测 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达。

A-ROS level detected by DHE staining (× 100); B-ferrous ion content detected by Ferro Orange staining (× 200), C-lipid peroxidation level detected by C11-BODIPY staining (× 200); D, E-contents of GSH and MDA; F, G-expressions of GPX4 and ACSL4 detected by Western blotting.

图 6　SAR 通过活化 PI3K/Akt 信号通路抑制地塞米松诱导的成骨细胞铁死亡（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 6　SAR inhibited dexamethasone-induced ferroptosis of osteoblasts by activating PI3K/Akt signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-股骨远端纵、横切面的代表性 Micro-CT 图像；B～E-BV/TV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 定量分析；F-HE 染色和 Masson 染色的代表性图像（×100）；G-股骨远端钙黄绿素-茜素红双标记代表性图像（×40）；H-MAR 定量分析；I、J-Western blotting 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、GPX4 和 ACSL4 蛋白表达。

A-representative micro-CT images of longitudinal and transverse sections of distal femur; B—E-BV/TV, Tb.N, Tb.Th and Tb.Sp were quantitatively analyzed; F-representative images of HE and Masson staining (× 100); G-representative images of calcein and alizarin red double-labeled staining of distal femur (× 40); H-quantitative analysis of MAR; I, J-expressions of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, GPX4 and ACSL4 proteins detected by Western blotting.

图 7　SAR 在体内通过活化 PI3K/Akt 信号通路抑制铁死亡而促进骨形成（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Fig. 7　SAR inhibited ferroptosis to promote bone formation by activating PI3K/Akt signaling pathway *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

结果一致（图 7-F）。钙黄绿素-茜素红双标记实验结果（图 7-G、H）显示，与对照组比较，模型组双标记间距离和 MAR 显著减少（$P<0.001$）；与模型组比较，SAR 组双标记间距离和 MAR 显著增加（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋LY294002 组双标记间距离和 MAR 显著减少（$P<0.05$）。Western blotting 结果（图 7-I、J）显示，与对照组比较，模型组 p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达水平显著降低（$P<0.001$），ACSL4 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，SAR 组 p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$），ACSL4 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）；与 SAR 组比较，SAR＋LY294002 组 p-PI3K、p-Akt 和 GPX4 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），ACSL4 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。

4 讨论

糖皮质激素通常用于治疗哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿关节炎、类风湿息肉病和炎症性肠病等疾病。然而，长期或过量使用可导致 OP，即为 GIOP。目前，GIOP 的治疗主要以化学药促进骨形成、抑制骨破坏为主。地诺单抗（denosumab）是一种抑制破骨细胞成熟、寿命和活性的 RANKL 抗体，已被批准用于治疗 GIOP，但其弊端逐渐被人们所认识[12]。因此，从天然草药中提取的活性产物越来越受到关注。SAR 是一种生物活性皂苷，研究证实，SAR 可防止脂多糖诱导小鼠的骨质流失[9]，减轻骨关节炎小鼠的软骨细胞铁死亡[10]，并通过抑制铁死亡促进间充质干细胞成骨分化和促进血管生成而治疗绝经后 OP[11]。与此结果一致，本研究显示，在地塞米松处理的成骨细胞中，SAR 可促进成骨分化；在地塞米松诱导的小鼠 GIOP 模型中，SAR 可明显改善股骨骨小梁骨丢失和骨微结构损坏。表明 SAR 可能通过促进骨形成而减轻 GIOP。

铁死亡是一种新的细胞死亡类型，其特征是铁依赖的 ROS 积累和脂质过氧化过程[13]。铁死亡的发生发展受复杂的信号和机制调节，含多不饱和脂肪酸的磷脂是铁死亡中脂质过氧化的主要底物，这一过程受 ACSL4、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3（lysophosphatidylcholine acyltransferase 3，LPCAT3）、花生四烯酸脂氧合酶（arachidonate lipoxygenases，ALOXs）或 P450 还原酶（P450 oxidoreductase，POR）等酶的正向调节，而 xc-系统-GSH-GPX4 轴在抑制脂质过氧化中起关键作用[14-15]。越来越多的研究证明了铁死亡与 OP 之间的相关性[16-18]。多种天然产物可通过促进破骨细胞铁死亡和抑制成骨细胞铁死亡预防和治疗 OP[19]。芒果苷通过调控 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1（Kelch-like ECH-associated protein 1，Keap1）/核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）/SLC7A11/GPX4 途径抑制成骨细胞铁死亡而减轻 OP[20]。褪黑素通过活化 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路抑制骨髓间充质干细胞铁死亡改善类固醇诱导的 OP[21]。金石蚕苷通过激活 Nrf2/GPX4 通路抑制铁死亡而保护 2 型糖尿病性 OP[22]。在卵巢切除术大鼠绝经后 OP 模型中，女贞子通过调控 Nrf2/血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）通路抑制铁死亡[23]。秦皮苷通过 Nrf2/GPX4 通路抑制成骨细胞铁死亡而延缓 GIOP 进展[24]。在铁葡聚糖和 erastin 处理的骨髓间充质干细胞中，SAR 可促进骨分化并抑制铁死亡，具体表现为增加 ALP 活性，降低 4-羟基壬烯醛（4-hydroxynonenal，4-HNE）表达和脂质过氧化水平，并减轻线粒体损伤[11]。本研究中，SAR 显著降低地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞中脂质过氧化、ROS、亚铁离子和 MDA 含量及 ACSL4 蛋白表达，增加 GSH 含量和 GPX4 表达，而铁死亡诱导剂 erastin 可减弱 SAR 对 MC3T3-E1 成骨分化的促进作用，表明 SAR 可能通过抑制成骨细胞铁死亡促进骨生成而减轻 GIOP。

PI3K/Akt 通路是一种细胞内信号转导通路，通过响应细胞外信号，促进细胞增殖、代谢和生长。PI3K/Akt 信号通路与多种骨科疾病密切相关[25-27]。Abdurahman 等[28]在绝经后 OP 小鼠模型中证明，激活 PI3K/Akt 通路通过增加血管生成而促进骨形成。此外，木樨草素通过激活 PI3K/Akt 通路减轻成骨细胞焦亡而改善绝经后 OP[29]。在铁过载诱导的 OP 模型中，牛蒡子苷激活 PI3K/Akt 途径，从而促进骨形成[30]。体内外实验证实，毛蕊花糖苷通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路发挥骨保护作用，减轻地塞米松诱导的 OP[31]。此外，PI3K/Akt 信号通路可调控铁死亡[32]。夏玉双等[33]通过生物信息学分析发现，骨质疏松铁死亡相关基因参与 PI3K/Akt 信号通路。生育酚通过 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制铁凋亡，保护骨髓间充质干细胞免受氧化应激损伤[34]。益骨汤介导的 P13K/Akt/GSK-3β 信号通路可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化而治疗 OP[35]。在地塞

米松处理的骨髓间充质干细胞中，褪黑素可激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制其铁死亡而减轻类固醇性 OP[21]。网络药理学和实验证实，在原发性 OP 中，青娥丸通过 PI3K/Akt 途径抑制成骨细胞铁死亡[36]。本研究发现，在地塞米松处理的成骨细胞和小鼠中，SAR 可提高 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平，PI3K 抑制剂 LY294002 预处理则可抑制成骨细胞铁死亡，并抑制 GIOP 小鼠骨形成，表明在 GIOP 中，SAR 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路减少成骨细胞铁死亡而发挥骨保护作用。

综上，本研究通过体内外实验证实，SAR 可通过抑制成骨细胞铁死亡而促进骨生成而延缓 GIOP 的进展，其作用机制可能与 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Amarnath S S, Kumar V, Lakshmana Das S. Classification of osteoporosis [J]. *Indian J Orthop*, 2023, 57(Suppl 1): 49-54.

[2] Anastasilaki E, Paccou J, Gkastaris K, *et al*. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An overview with focus on its prevention and management [J]. *Hormones*, 2023, 22(4): 611-622.

[3] Chen M, Fu W Y, Xu H Y, *et al*. Pathogenic mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2023, 70: 54-66.

[4] Wu X H, Fang X X, Lu F, *et al*. An update on the role of ferroptosis in the pathogenesis of osteoporosis [J]. *EFORT Open Rev*, 2024, 9(8): 712-722.

[5] Xue Q, Yan D, Chen X, *et al*. Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 1982-1996.

[6] Jeney V. Clinical impact and cellular mechanisms of iron overload-associated bone loss [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 77.

[7] 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): 1052-1069.

[8] Mustafa N H, Sekar M, Fuloria S, *et al*. Chemistry, biosynthesis and pharmacology of sarsasapogenin: A potential natural steroid molecule for new drug design, development and therapy [J]. *Molecules*, 2022, 27(6): 2032.

[9] Peng J X, Zhao K X, Zhu J L, *et al*. Sarsasapogenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro* and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss *in vivo* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3435-3447.

[10] Chen R H, Ying C T, Zou Y X, *et al*. Sarsasapogenin inhibits YAP1-dependent chondrocyte ferroptosis to alleviate osteoarthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115772.

[11] Wang F, Zhang F X, Lin B F, *et al*. Sarsasapogenin stimulates angiogenesis and osteogenesis coupling to treat estrogen deficiency-induced osteoporosis by activating the GPX4/SLIT3/ROBO1 axis [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156297.

[12] Zeytinoglu M, Naaman S C, Dickens L T. Denosumab discontinuation in patients treated for low bone density and osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2021, 50(2): 205-222.

[13] Li J, Cao F, Yin H L, *et al*. Ferroptosis: Past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.

[14] Liu J, Kang R, Tang D L. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7038-7050.

[15] 王丽娟, 孟美辰, 王志远, 等. 基于网络药理学探讨金藤清痹颗粒对大鼠膝骨关节炎的影响及与促进线粒体自噬改善铁死亡的相关性 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1244-1253.

[16] Liu P, Wang W Z, Li Z, *et al*. Ferroptosis: A new regulatory mechanism in osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2634431.

[17] Gao Z H, Chen Z Y, Xiong Z F, *et al*. Ferroptosis-A new target of osteoporosis [J]. *Exp Gerontol*, 2022, 165: 111836.

[18] Maheshwari S, Singh A, Verma A. Ferroptosis: A frontier in osteoporosis [J]. *Horm Metab Res*, 2024, 56(9): 625-632.

[19] Yang Y S, Jiang Y F, Qian D Y, *et al*. Prevention and treatment of osteoporosis with natural products: Regulatory mechanism based on cell ferroptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 951.

[20] Deng X H, Lin B F, Wang F, *et al*. Mangiferin attenuates osteoporosis by inhibiting osteoblastic ferroptosis through Keap1/Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155282.

[21] Li M, Yang N, Hao L, *et al*. Melatonin inhibits the ferroptosis pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling axis to attenuate steroid-induced osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8223737.

[22] Xu C Y, Xu C, Xu Y N, *et al*. Poliumoside protects against type 2 diabetes-related osteoporosis by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 pathway [J].

Phytomedicine, 2024, 125: 155342.

[23] Li P, Wang Y H, Yan Q Q, *et al*. *Fructus Ligustri Lucidi* inhibits ferroptosis in ovariectomy-induced osteoporosis in rats via the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biomed Rep*, 2023, 20(2): 27.

[24] Zheng X, Ye F C, Sun T, *et al*. Delay the progression of glucocorticoid-induced osteoporosis: Fraxin targets ferroptosis via the Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(11): 5203-5224.

[25] Sun K, Luo J, Guo J, *et al*. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: A narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4): 400-409.

[26] Sadrkhanloo M, Paskeh M D A, Hashemi M, *et al*. New emerging targets in osteosarcoma therapy: PTEN and PI3K/Akt crosstalk in carcinogenesis [J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 251: 154902.

[27] Wu Z X, Li X D, Chen X H, *et al*. Phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)-inhibitor CDZ173 protects against LPS-induced osteolysis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 13: 1021714.

[28] Abdurahman A, Li X L, Li J, *et al*. Loading-driven PI3K/Akt signaling and erythropoiesis enhanced angiogenesis and osteogenesis in a postmenopausal osteoporosis mouse model [J]. *Bone*, 2022, 157: 116346.

[29] Chai S, Yang Y B, Wei L W, *et al*. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155516.

[30] Li M, Pan Z F, He Q, *et al*. Arctiin attenuates iron overload-induced osteoporosis by regulating the PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(5): 108.

[31] Li S M, Cui Y J, Li M, *et al*. Acteoside derived from *Cistanche* improves glucocorticoid-induced osteoporosis by activating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1): 2154578.

[32] Xu J W, Li Y, Kang M L, *et al*. Multiple forms of cell death: A focus on the PI3K/AKT pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(9): 2026-2038.

[33] 夏玉双, 王博, 潘鹏飞, 等. 骨质疏松铁死亡相关基因的生物信息学分析及实验验证 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2024, 53(6): 680-690.

[34] Lan D M, Yao C, Li X, *et al*. Tocopherol attenuates the oxidative stress of BMSCs by inhibiting ferroptosis through the PI$_3$k/AKT/mTOR pathway [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 938520.

[35] Li N, Gong Y C. The mechanism of the Yigutang-mediated P13K/AKT/GSK-3β signal pathway to regulate osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells to treat osteoporosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6699781.

[36] Hao J, Bei J X, Li Z H, *et al*. Qing`e Pill inhibits osteoblast ferroptosis via ATM serine/threonine kinase (ATM) and the PI3K/AKT pathway in primary osteoporosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 902102.

[责任编辑　李亚楠]