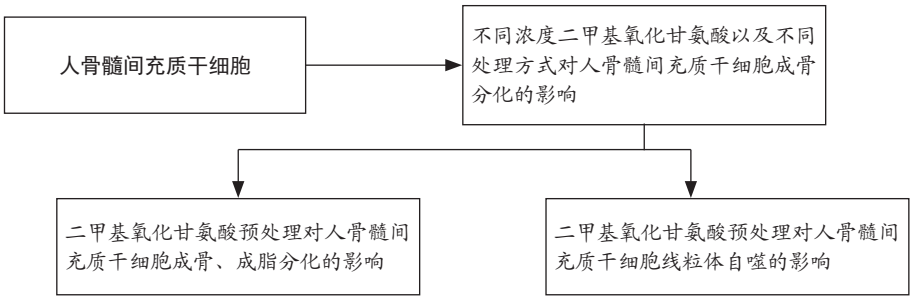
二甲基氧化甘氨酸对人骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化及线粒体自噬的影响

陈启衡[1, 2]，翁土军[1]，彭 江[1]

https://doi.org/10.12307/2025.578
采用日期：2024-12-23
修回日期：2025-03-08
在线日期：2025-04-03
中图分类号：
R459.9；R318；R681.8
文章编号：
2095-4344(2026)01-00050-08
文献标识码：A

文章快速阅读： 二甲基氧化甘氨酸预处理促进骨髓间充质干细胞成骨分化、线粒体自噬并抑制成脂分化



文题释义：

二甲基氧化甘氨酸： 一种α-酮戊二酸模拟物，能够抑制脯氨酰羟化酶的活性，进而稳定和激活缺氧诱导因子1α，所以也称为低氧模拟剂。缺氧诱导因子1α是细胞在低氧状态下发挥功能的关键转录因子，参与调节多种基因的表达，影响细胞代谢、增殖和分化。

线粒体自噬： 细胞通过自噬机制选择性地清除受损、失去功能或多余的线粒体的过程。作为一种细胞自噬形式，线粒体自噬对于维持线粒体功能的稳定、细胞内环境的平衡以及预防线粒体相关疾病至关重要。

摘要

背景： 骨髓间充质干细胞在股骨头坏死等疾病的治疗中发挥重要作用，其治疗效果与细胞质量息息相关，如何为细胞赋能成为如今研究的热点。

目的： 探究低氧模拟剂二甲基氧化甘氨酸预处理对人骨髓间充质干细胞线粒体自噬、分化能力的影响。

方法： 从患者髂骨的骨髓血中提取骨髓间充质干细胞，体外培养至第3代，用0，10，50，100 μmol/L 二甲基氧化甘氨酸处理24 h，然后更换成骨诱导分化培养基，此为预处理组；而在细胞贴壁后直接用含有0，10，50，100 μmol/L二甲基氧化甘氨酸的成骨诱导培养基培养，此为持续处理组。诱导7 d后进行碱性磷酸酶染色，选出最利于成骨分化的条件为实验组，正常培养的骨髓间充质干细胞为对照组。采用碱性磷酸酶染色、碱性磷酸酶活性、油红O染色及RT-qPCR评估两组骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化差异；采用MitoSox染色检测线粒体活性氧水平；采用Mito-tracker和Lyso-tracker染色检测线粒体和溶酶体的共定位情况；使用荧光探针JC-1检测线粒体膜电位。

结果与结论： 碱性磷酸酶染色显示，对骨髓间充质干细胞成骨最有利的处理方式为10 μmol/L二甲基氧化甘氨酸预处理24 h。与对照组相比，实验组骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶染色表达增强，碱性磷酸酶活性和成骨相关基因表达升高，油红O染色显示脂滴生成减少以及成脂相关基因表达下降，线粒体活性氧生成减少，线粒体和溶酶体的共定位增多，线粒体膜电位升高。结果表明，10 μmol/L二甲基氧化甘氨酸预处理可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化，抑制成脂分化，并增强线粒体自噬。

关键词： 骨髓间充质干细胞；二甲基氧化甘氨酸；预处理；成骨分化；成脂分化；线粒体；线粒体自噬；线粒体膜电位；线粒体活性氧；溶酶体

Effect of dimethylglyoxal glycine on osteogenic, adipogenesis differentiation, and mitophagy of human bone marrow mesenchymal stem cells

Chen Qiheng[1, 2], Weng Tujun[1], Peng Jiang[1]

[1]Institute of Orthopedics, Fourth Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China; [2]Chinese People's Liberation Army Medical School, Beijing 100853, China

Chen Qiheng, Master candidate, Institute of Orthopedics, Fourth Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China; Chinese People's Liberation Army Medical School, Beijing 100853, China

Corresponding author: Peng Jiang, Chief physician, Researcher, Institute of Orthopedics, Fourth Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

Co-corresponding author: Weng Tujun, Associate researcher, Institute of Orthopedics, Fourth Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

[1] 解放军总医院第四医学中心骨科医学部研究所，北京市 100853；[2] 解放军医学院，北京市 100853

第一作者： 陈启衡，男，1997 年生，北京市人，汉族，解放军医学院在读硕士，主要从事股骨头坏死组织工程修复研究。

通讯作者： 彭江，主任医师，研究员，解放军总医院第四医学中心骨科医学部研究所，北京市 100853

共同通讯作者： 翁土军，副研究员，解放军总医院第四医学中心骨科医学部研究所，北京市 100853

https://orcid.org/0009-0007-7265-335X (陈启衡)

基金资助： 国家重点研发计划课题 (2022YFB3804303)，项目分课题负责人：翁土军；解放军总医院青年自主创新科学基金项目 (22QNCZ032)，项目负责人：翁土军

引用本文： 陈启衡，翁土军，彭江 . 二甲基氧化甘氨酸对人骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化及线粒体自噬的影响 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):50-57.

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells play a crucial role in treatment of diseases, such as femoral head necrosis, and the therapeutic efficacy is closely related to the quality of the cells. The empowerment of cells has become a research focus.

OBJECTIVE: To investigate the effects of hypoxia mimetic dimethylglyoxal glycine pretreatment on mitophagy and differentiation capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from the bone marrow of patients' iliac crest and cultured *in vitro* to the third passage. The cells were treated with dimethylglyoxal glycine at 0, 10, 50, and 100 μmol/L for 24 hours, followed by the replacement with an osteogenic induction differentiation medium, which constituted the pretreatment group. The continuous treatment group was cultured directly in osteogenic induction medium containing 0, 10, 50, and 100 μmol/L dimethylglyoxal glycine after cell adhesion. After 7 days of induction, alkaline phosphatase staining was performed to select the most favorable conditions for osteogenic differentiation for subsequent experiments, with normally cultured bone marrow mesenchymal stem cells serving as the control group. Alkaline phosphatase staining, alkaline phosphatase activity, oil red O staining, and related RT-qPCR were used to evaluate the osteogenic and adipogenic differentiation differences of bone marrow mesenchymal stem cells between the two groups. MitoSox staining was used to detect mitochondrial reactive oxygen species levels. Mito-tracker and Lyso-tracker staining were used to detect the co-localization of mitochondria and lysosomes. The fluorescent probe JC-1 was used to measure mitochondrial membrane potential.

RESULTS AND CONCLUSION: Alkaline phosphatase staining indicated that the most beneficial treatment for bone marrow mesenchymal stem cell osteogenesis was pretreatment with 10 μmol/L dimethylglyoxal glycine for 24 hours. Compared with the control group, the experimental group showed enhanced alkaline phosphatase staining expression, increased alkaline phosphatase activity and osteogenic gene expression, reduced lipid droplet formation and adipogenic gene expression as indicated by oil red O staining, decreased mitochondrial reactive oxygen species production, increased co-localization of mitochondria and lysosomes, and elevated mitochondrial membrane potential. The results suggest that 10 μmol/L dimethylglyoxal glycine pretreatment can promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, inhibit adipogenic differentiation, and enhance mitophagy.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; dimethylglyoxal glycine; pretreatment; osteogenic differentiation; adipogenic differentiation; mitochondria; mitophagy; mitochondrial membrane potential; mitochondrial reactive oxygen species; lysosome

Funding: *National Key Research and Development Plan Project, No. 2022YFB3804303 (to WTJ); Youth Independent Innovation Science Fund Project of Chinese People's Liberation Army General Hospital, No. 22QNCZ032 (to WTJ)*

How to cite this article: *CHEN QH, WENG TJ, PENG J. Effect of dimethylglyoxal glycine on osteogenic, adipogenesis differentiation, and mitophagy of human bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):50-57.*

0 引言 Introduction

股骨头坏死是一种进行性疾病，主要影响 30–50 岁的人群，如果不及时干预，超过 80% 的未治疗患者在 4 年内会出现股骨头塌陷，通常需要进行全髋关节置换 [1]。基于自体干细胞的组织工程已成为治疗早期股骨头坏死的有前景的疗法，特别是应用骨髓间充质干细胞 [2]。由于骨髓间充质干细胞具有固有的成骨潜能，因此备受关注，然而临床结果往往不一致，这归因于来自患者的骨髓间充质干细胞可能存在功能障碍，因此如何为干细胞进行赋能成为如今提高组织工程治疗效果的关键。

近年来，研究者日益关注线粒体功能作为干细胞分化的关键调节因素 [3-4]。线粒体自噬，即对受损线粒体的选择性自噬降解，在促进干细胞成骨分化中起着至关重要的作用 [5-8]。尽管有这些发现，线粒体自噬解决股骨头坏死患者骨髓间充质干细胞分化失衡的具体机制仍然知之甚少。

研究发现缺氧诱导因子 1α 在调控骨髓间充质干细胞分化中具有重要作用，同时发现低氧模拟剂二甲基氧化甘氨酸 (dimethyloxalylglycine，DMOG) 能够稳定缺氧诱导因子 1α 的表达，可通过促进线粒体自噬改善骨髓间充质干细胞的功能 [5]。此外，线粒体功能在骨代谢中的关键调节作用日益显现，尤其是在骨坏死和骨损伤修复方面。

DMOG 是一种 α– 酮戊二酸模拟物，能够抑制脯氨酰羟化酶的活性，进而稳定和激活缺氧诱导因子 1α[9-10]。课题组前期实验表明：缺氧诱导因子 1α 靶向药物可促进老年大鼠衰老骨髓间充质干细胞成骨分化、抑制成脂分化 [11]。然而，对于 DMOG 在间充质干细胞成骨分化中的作用，目前结论并不一致。部分研究表明，DMOG 在成骨分化中起到促进作用 [12-14]，而另一些研究则显示 DMOG 可能抑制成骨分化 [15-16]。另外，DMOG 对骨髓间充质干细胞分化和线粒体自噬的影响，以及最佳处理方式及加药浓度，现在还有待研究。

该研究观察 DMOG 对骨髓间充质干细胞线粒体自噬及成骨、成脂分化的影响，为提高自体骨髓间充质干细胞在股骨头坏死修复中的治疗效果提供可能的理论基础，并为了“干细胞赋能”提出可能的策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞及分子生物学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2024 年 6–10 月在解放军总医院第四医学中心骨科医学部骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验试剂 人外周血淋巴细胞分离液、PBS(索莱宝，中国)；MSCM 培养基 (ScienCell，美国)；α-MEM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco，美国)；低氧模拟剂 DMOG、L– 抗坏血酸、地塞米松、β– 甘油磷酸钠、JC-1、cccp(MedChemExpress，中国)；成人骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基 (海星生物，中国)；BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒 (荧光法)、Mito-Tracker Green(线粒体绿色荧光探针)、Lyso-Tracker Red(溶酶体红色荧光探针)、Hoechst 33258(碧云天，中国)；MitoSox Red 线粒体超氧化物指示剂 (Invitrogen，美国)；RT-qPCR 试剂盒 (Toroivd，中国)。

1.3.2 实验器材 倒置显微镜 (奥林巴斯，日本)；高内涵细

胞成像分析系统 (PerkinElmer，美国)；实时荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystems，美国)；多功能酶标仪 (Tecan，瑞士)。

1.3.3 骨髓样本 选取 2024 年 6–8 月在解放军总医院第四医学中心就诊并确诊为股骨头坏死的患者 3 例，在股骨头坏死组织工程修复术中抽取右侧髂前上棘处的骨髓作为试验样本。

纳入标准：①年龄在 20–65 岁之间的男性或女性患者；②体质量在正常范围，定义为体质量指数在 18.5–23.9 kg/m^2 范围内；③类固醇或乙醇引起的股骨头骨坏死；④符合髋关节置换术适应证以及股骨头坏死组织工程修复术适应证。

排除标准：①创伤引起的股骨头骨坏死；②术前有 HIV、丙型肝炎病毒或乙型肝炎病毒感染。

所有受试者均已签署知情同意书，由中国人民解放军总医院医学伦理委员会审查和批准，批件编号：2024KY089-KS0001。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离和培养 取骨髓血样本，用等体积 PBS 稀释，在离心管中加入与稀释骨髓血等体积的人单个核淋巴细胞分离液，然后将稀释后的骨髓血平铺到人单个核淋巴细胞分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰，室温下水平转子 1 000×*g* 离心 30 min，小心吸取白膜层细胞到 15 mL 洁净的离心管中，用 10 mL PBS 或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞，水平转子 250×*g* 离心 10 min，弃上清，用 5 mL PBS 或细胞清洗液重悬细胞，水平转子 250×*g* 离心 10 min，重复 2 遍，弃上清，用 MSCM 培养基重悬细胞，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中，培养 3 d 后换液，弃去悬浮细胞，然后每隔 2 d 换液 1 次，当细胞达到 90% 融合后，以 0.25% 胰蛋白酶消化传代，传至第 3 代进行实验。倒置显微镜下观察细胞形态，然后成骨诱导分化 7 d 以及成脂诱导分化 14 d，分别进行碱性磷酸酶染色以及油红 O 染色，在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.4.2 确定 DMOG 的最佳浓度以及最佳处理方式

碱性磷酸酶染色：取第 3 代骨髓间充质干细胞以 8×10^4 个 / 孔密度接种于 24 孔板中，分别在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中加入 0，10，50，100 μmol/L DMOG 配置实验用培养基，待细胞贴壁后更换上述实验用培养基预处理 24 h，然后更换成骨诱导分化培养基 (含 10 mmol/L β– 甘油磷酸钠、50 μmol/L L– 抗坏血酸、0.1 μmol/L 地塞米松、体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基)，此为预处理组。而在细胞贴壁后直接更换为含有 0，10，50，100 μmol/L DMOG 的成骨诱导培养基，此为持续处理组。诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶染色，具体步骤：吸除培养基，PBS 清洗 2 次，40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，弃去固定液再用 1×PBS 清洗 2 次，根据 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明书配置 BCIP/NBT 染色工作液，最后一次洗涤完毕后，去除洗涤液，向清洗干净的诱导孔内加入适量 BCIP/NBT 染色工作液，确保能充分覆盖细胞，室温避光孵育 30 min 后吸出工作液，用蒸馏水洗涤 2 次终止显色反应，显微镜下观察碱性磷酸酶染色效果。

CCK-8 实验：第 3 代骨髓间充质干细胞以 1×10^3 个 / 孔密度接种于 96 孔板中，分别在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中加入 0，10，50，100 μmol/L DMOG 配置实验用培养基，预处理组待细胞贴壁后更换上述实验用培养基预处理 24 h，然后更换含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养，持续处理组待细胞贴壁后更换含有 10，50，100 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。分别于培养 6 h 和 1，2，3 d 4 个时间点，每孔加入 CCK-8 溶液在培养箱内继续孵育 1 h，酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值。

根据细胞增殖情况和促成骨分化效果，在后续实验中以 10 μmol/L DMOG 预处理的骨髓间充质干细胞为实验组，以未经药物处理的骨髓间充质干细胞为对照组。

1.4.3 碱性磷酸酶活性测定 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 5×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中，待细胞达到 90% 融合时，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后更换成骨诱导分化培养基诱导 7 d，用 PBS 洗涤 1 次洗净残留液体，每孔加入 200 μL BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay，适当吹打，冰浴 10 min 充分裂解细胞，4 ℃、12 000×*g* 离心 5 min，取上清，按照试剂盒要求检测碱性磷酸酶活性 (μmol/μL)。

1.4.4 油红 O 染色 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 8×10^4 个 / 孔密度接种于 24 孔板中，待细胞贴壁后，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后更换为成脂诱导培养基，诱导 14 d 后进行油红 O 染色，具体步骤：吸去培养基，使用适量 1×PBS 清洗 1 次，40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，弃去固定液再使用 1×PBS 清洗 2 次，根据油红 O 染色试剂盒说明书配置油红 O 染色工作液，向清洗干净的诱导孔内加入适量油红 O 工作液，静置染色 30 min，吸走油红 O 工作液，用 1×PBS 清洗 2 次，显微镜下观察成脂染色效果，并用 Image J 软件进行量化。

1.4.5 Mito-Tracker Green、Lyso-Tracker Red 以及 Hoechst 共定位 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 7×10^3 个 / 孔密度接种于康宁高内涵筛选 96 孔板中，待细胞贴壁后，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后根据试剂说明书配置 Mito-Tracker

Green、Lyso-Tracker Red 以及 Hoechst 工作液，分别进行荧光染色，运用高内涵细胞成像分析系统进行拍照及分析。

1.4.6 MitoSOX Red 以及 Hoechst 染色 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 7×10^3 个 / 孔密度接种于康宁高内涵筛选 96 孔板中，待细胞贴壁后，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后根据试剂说明书配置 MitoSOX Red 以及 Hoechst 工作液，分别进行荧光染色，运用高内涵细胞成像分析系统进行拍照及分析。

1.4.7 JC-1 染色 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 5×10^4 个 / 孔密度接种于 24 孔板中，待细胞贴壁后，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后根据试剂说明书配置 JC-1 工作液，并设置阳性对照组，阳性对照组培养基中加入 10 μmol/L cccp(质子梯度的解偶联剂，诱导线粒体膜电位下降) 试剂提前处理 20 min，进行荧光染色，运用高内涵细胞成像分析系统进行拍照及分析。

1.4.8 RT-qPCR 检测 将第 3 代骨髓间充质干细胞以 5×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中，待细胞达到 90% 融合时，实验组更换为含有 10 μmol/L DMOG 和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h，然后更换成骨诱导分化培养基或成脂诱导分化培养基，成骨诱导后第 7 天检测成骨标志基因碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2 及Ⅰ型胶原 a 的表达量，成脂诱导后第 14 天检测成脂标志基因脂联素、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 及扭曲螺旋转录因子 1 的表达量。以 h-GAPDH 为内参基因。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。引物序列见**表 1**。

表 1 | 引物序列
Table 1 | **Primer sequences**

基因	引物序列 (5'–3')	片段长度 (bp)
Runx2	F：TGC TTC ATT CGC CTC ACA	18
	R：CGG TGG CTG GTA GTG ACC	18
COL1a	F：CAG GAG GCA CGC GGA GTG TG	20
	R：GGC AGG GCT CGG GTT TCC AC	20
ALP	F：CTA TCC TGG CTC CGT GCT CC	20
	R：TTA ACT GAT GTT CCA ATC CTG CG	23
ADIPO	F：GTG AGA AAG GAG ATC CAG GTC TT	23
	R：GGC ACC TTC TCC AGG TTC TC	20
PPARγ	F：GGA TCC CTC CTC GGA AAT GG	20
	R：TGG CTT CTT TCA AAT CTG GTG T	22
TWIST1	F：CGG CCA GGT ACA TCG ACT TC	20
	R：TCT CTG GAA ACA ATG ACA TCT AGG	24
GAPDH	F：TGG CTA CAG CAA CAG GGT G	19
	R：ATG GCA ACT GTG AGG AGG G	19

表注：F 为上游引物，R 为下游引物，Runx2 为 Runt 相关转录因子 2，COL1a 为Ⅰ型胶原 a，ALP 为碱性磷酸酶，ADIPO 为脂联素，PPARγ 为过氧化物酶体增殖物活化受体 γ，TWIST1 为扭曲螺旋转录因子 1。

1.5 主要观察指标 ①两组骨髓间充质干细胞在碱性磷酸酶染色、碱性磷酸酶活性，以及成骨相关基因表达上的差异；②两组骨髓间充质干细胞在油红 O 染色以及成脂相关基因表达上的差异；③两组骨髓间充质干细胞 MitoSox、Mito-tracker 和 Lyso-tracker 共定位染色以及 JC-1 染色，从而展现出线粒体自噬功能的差异。

1.6 统计学分析 利用 GraphPad Prism 9.3.0 软件进行数据分析及作图，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA)，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该研究统计学方法已经通过解放军总医院院内生物统计学专家审核。

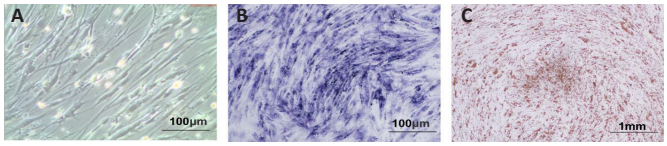
2 结果 Results

2.1 人骨髓间充质干细胞的形态及鉴定结果 倒置显微镜下观察，第 3 代人骨髓间充质干细胞贴壁生长，部分呈漩涡状生长，排列紧密，细胞形态为梭形，见**图 1A**。第 3 代人骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶染色，倒置显微镜下观察细胞胞膜及胞浆蓝染，染色呈阳性反应，见**图 1B**。第 3 代人骨髓间充质干细胞成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色，倒置显微镜下观察可见大量红染脂滴形成，见**图 1C**。

2.2 不同浓度 DMOG 以及不同处理方式对人骨髓间充质干细胞成骨分化及增殖的影响 碱性磷酸酶染色显示，持续处理组随着 DMOG 浓度上升，其对人骨髓间充质干细胞成骨分化抑制越明显。在预处理组中，10 μmol/L DMOG 具有明显的成骨促进作用，而 50，100 μmol/L DMOG 并没有促进成骨的效果，100 μmol/L 组甚至表现为轻微抑制作用，见**图 2A**。CCK-8 实验显示 10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 对人骨髓间充质干细胞无细胞毒性且促进增殖最明显，见**图 2B**。在后续实验中将 10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 设置为实验组，未经 DMOG 处理设置为对照组。

2.3 DMOG 预处理对人骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化的影响 碱性磷酸酶染色显示，与对照组相比，10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 促进了人骨髓间充质干细胞的成骨分化，见**图 3A**。碱性磷酸酶活性显示，与对照组相比，实验组碱性磷酸酶活性更强，见**图 3B**。RT-qPCR 结果显示，在成骨诱导 7 d 后，与对照组相比，实验组成骨相关基因表达更高，见**图 3C**。与成骨分化相反，油红 O 染色显示实验组脂滴形成明显弱于对照组，见**图 3D**，**E**。RT-qPCR 结果与油红 O 染色结果相同，实验组成脂相关基因表达明显弱于对照组，见**图 3F**。上述这些结果表明，10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 可以改变人骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化平衡，使其更加偏向成骨分化，从而在理论上能够增强骨髓间充质干细胞在股骨头坏死治疗中的疗效。

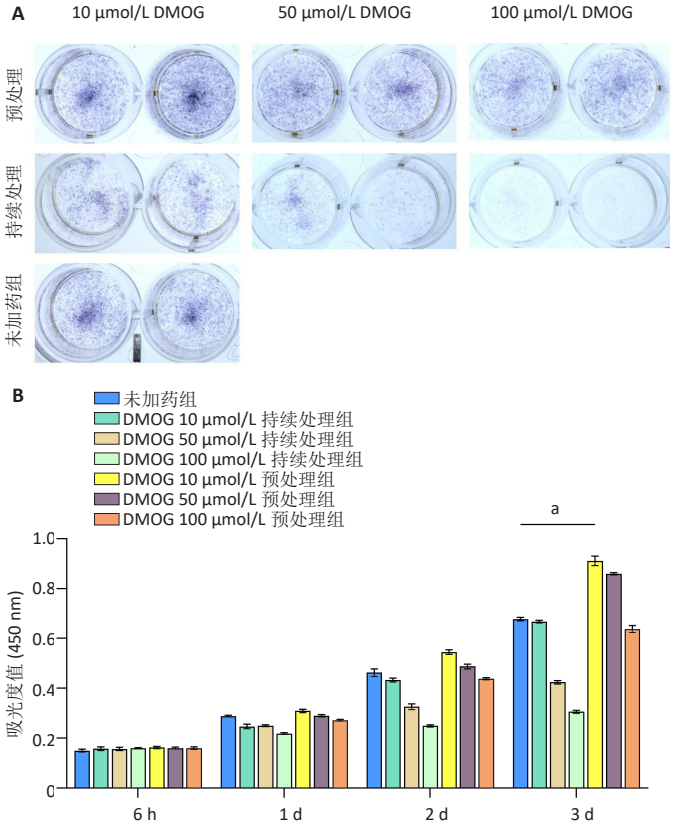
2.4 DMOG 预处理对人骨髓间充质干细胞线粒体自噬的影响 Mito-Tracker Green、Lyso-Tracker Red 以及 Hoechst 共定位实验，



图注：图 A 为第 3 代人骨髓间充质干细胞 (×100)；B 为人骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶染色 (×100)；C 为人骨髓间充质干细胞成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色 (×10)。

图 1 | 人骨髓间充质干细胞的形态及鉴定结果

Figure 1 | Morphology and identification results of human bone marrow mesenchymal stem cells

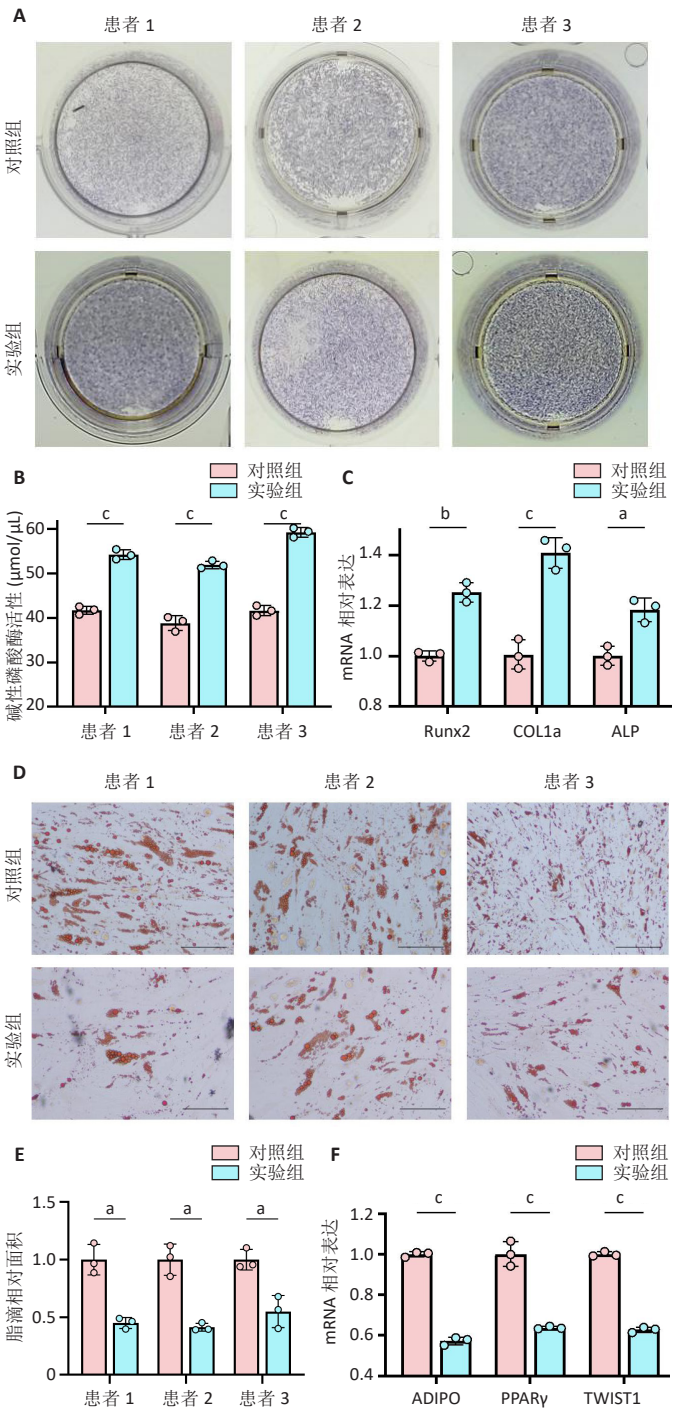


图注：图 A 为不同浓度 DMOG 持续处理以及预处理 24 h，成骨诱导 7 d 后碱性磷酸酶染色大体图；B 为不同浓度 DMOG 持续处理以及预处理 24 h CCK-8 实验结果。$^{a}P < 0.001$。

图 2 | 不同浓度二甲基氧化甘氨酸 (DMOG) 以及不同处理方式对人骨髓间充质干细胞成骨分化和增殖的影响

Figure 2 | Effects of different concentrations of dimethylglyoxal glycine and different treatment methods on osteogenic differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells

见**图 4A**。与对照组相比，实验组虽然在线粒体数量上与对照组没有统计学差异，但是实验组线粒体长宽比更大，提示实验组细胞中的线粒体形态更加细长，更加健康，见**图 4B，C**。实验组 Lyso-Tracker Red 荧光强度以及线粒体和溶酶体共定位的数量明显优于对照组，见**图 4D，E**。MitoSOX Red 染色显示实验组线粒体活性氧水平稍低于对照组，见**图 4F，G**。JC-1 染色显示，实验组绿色荧光的不健康线粒体明显少于对照组，而健康的红色荧光线粒体两组大致相同，实验组红色



图注：图 A 为两组人骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 d 后碱性磷酸酶染色；B 为两组人骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶活性检测；C 为两组人骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 d 后 RT-qPCR 检测 Runx2、COL1a、ALP 的 mRNA 表达水平；D 为两组人骨髓间充质干细胞成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色 (×20)；E 为油红 O 染色脂滴相对面积 Image J 量化数据；F 为两组人骨髓间充质干细胞成脂诱导 14 d 后 RT-qPCR 检测 ADIPO、PPARγ、TWIST1 的 mRNA 表达水平。n=3，$^{a}P < 0.01$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$。Runx2：Runt 相关转录因子 2；COL1a：Ⅰ型胶原 a；ALP：碱性磷酸酶；ADIPO：脂联素；PPARγ：过氧化物酶体增殖物活化受体 γ；TWIST1：扭曲螺旋转录因子 1。

图 3 | 二甲基氧化甘氨酸 (DMOG) 预处理对人骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化的影响

Figure 3 | Effect of dimethylglyoxal glycine pretreatment on osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells

荧光与绿色荧光的比值更大，见**图 4H，I**。上述这些结果表明，10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 增强了人骨髓间充质干细胞的线粒体自噬。

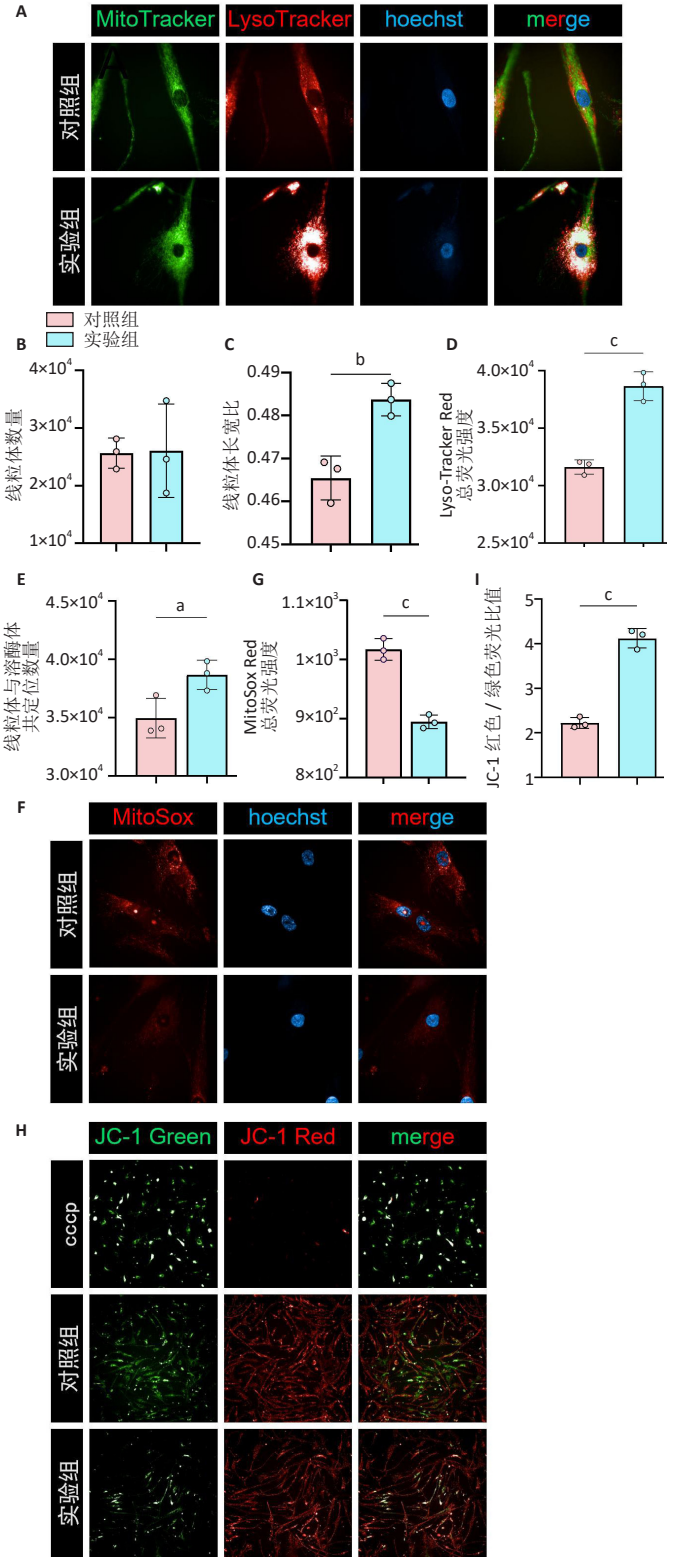
3 讨论 Discussion

间充质干细胞凭借多向分化潜力和自我更新能力，已被广泛应用于组织工程和再生医学，尤其是治疗股骨头坏死具有重要意义[2, 17-19]。然而，间充质干细胞的治疗效果高度依赖细胞质量和功能，因此，如何优化间充质干细胞的质量和功能已成为当前研究的焦点[20]。间充质干细胞的异质性显著影响了在临床应用中的一致性和可重复性，来自不同个体和组织的间充质干细胞在增殖能力和分化潜能上存在显著差异[21-22]。早期研究通过骨形态发生蛋白和机械力等外源性因素，探讨间充质干细胞成骨和成脂分化的机制，为股骨头坏死的治疗提供了理论支持[23]。

低氧环境被认为是促进间充质干细胞增殖和分化的重要外源性因素之一[24-25]。研究表明，低氧条件可以通过激活缺氧诱导因子 1α 通路，显著增强间充质干细胞的增殖及自我更新能力，有助于骨组织的修复[26-27]。然而，对于低氧模拟剂 DMOG 在间充质干细胞成骨分化中的作用，目前尚无一致结论。部分研究表明，DMOG 在成骨分化中起到促进作用，而另一些研究则显示 DMOG 可能抑制成骨分化[11, 13, 15-16, 28-31]。这种差异可能与不同实验条件和细胞来源有关，因此有必要进一步探索 DMOG 对间充质干细胞的作用机制[30-31]。研究发现 VEGF/AKT/mTOR 信号通路偶联血管生成和成骨，从而增加人间充质干细胞的成骨能力[32]。

间充质干细胞的功能在很大程度上依赖于线粒体状态[3]。线粒体自噬是一种重要的细胞自我保护机制，通过清除受损的线粒体，维持线粒体的健康状态，从而提高细胞的代谢活性和分化潜能[29, 33-34]。尽管已有研究表明线粒体功能对骨髓间充质干细胞的分化起关键作用，但线粒体自噬在这一过程中的具体作用机制尚不明确。近年来，越来越多的证据表明，线粒体自噬在调节间充质干细胞成骨分化过程中发挥了关键作用[35-37]。在最近的一些研究中，激活缺氧诱导因子 1α 通路可通过上调 BNIP3 来促进细胞中的线粒体自噬[38-40]。而激活缺氧诱导因子 1α 通路是否能够通过某种信号通路促进人间充质干细胞的线粒体自噬从而影响成骨成脂分化能力还尚未可知。

该研究结果显示，10 μmol/L DMOG 预处理 24 h 是促进骨髓间充质干细胞成骨分化的最优条件。实验组骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶表达和活性明显高于对照组，成骨相关基因表达显著增加，成脂相关基因表达则被抑制。此



图注：图 A 为 Mito-Tracker Green、Lyso-Tracker Red 以及 Hoechst 荧光探针共定位情况 (×63)；B 为两组人骨髓间充质干细胞线粒体数量；C 为两组人骨髓间充质干细胞线粒体长宽比；D 为两组人骨髓间充质干细胞 Lyso-Tracker Red 荧光强度；E 为两组人骨髓间充质干细胞线粒体与溶酶体共定位数量；F 为两组人骨髓间充质干细胞 MitoSOX Red 染色 (×63)；G 为两组人骨髓间充质干细胞 MitoSOX Red 荧光强度；H 为两组人骨髓间充质干细胞 JC-1 染色 (×20)；I 为两组人骨髓间充质干细胞 JC-1 红色 / 绿色荧光比值。n=3，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$。

图 4 | 二甲基氧化甘氨酸 (DMOG) 预处理对人骨髓间充质干细胞线粒体自噬的影响

Figure 4 | Effect of dimethylglyoxal glycine pretreatment on mitophagy of human bone marrow mesenchymal stem cells

外，实验组骨髓间充质干细胞线粒体中的活性氧水平较低，Mito-tracker 和 Lyso-tracker 染色表明线粒体自噬显著增强。这些结果表明 DMOG 不仅可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化抑制成脂分化，还可以调控线粒体自噬，影响细胞代谢，这为未来的临床治疗提供了新思路。

尽管该研究提供了重要的实验数据，但局限性也不可忽视。首先，该研究主要基于体外实验，虽然验证了 DMOG 对骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用，但在体内复杂微环境下，DMOG 是否能够展现出相同的效果仍需进一步验证；其次，尽管该研究使用了线粒体功能相关标志物进行分析，但尚未进行氧消耗率和糖酵解率等更为全面的代谢功能检测；此外，骨髓间充质干细胞的异质性问题仍未完全解决。该研究未深入探讨不同来源骨髓间充质干细胞在成骨和成脂分化潜能上的差异，这在未来的研究中需加以关注。特别是在股骨头坏死患者中，骨髓间充质干细胞的分化功能可能存在异常，DMOG 是否能够有效纠正这一异常需要进一步研究。

综上所述，该研究通过系统分析 DMOG 对线粒体自噬及在骨髓间充质干细胞分化过程中的作用，提供了有关线粒体自噬调控机制的新见解，这些发现不仅揭示了 DMOG 在促进骨髓间充质干细胞成骨分化和抑制成脂分化中的双重作用，还为未来骨组织工程中实现细胞分化平衡提供了理论依据。未来的研究应聚焦于 DMOG 在体内微环境中的表现，进一步揭示 DMOG 通过线粒体自噬影响骨髓间充质干细胞分化平衡的具体机制。

作者贡献：实验设计为彭江、翁土军、陈启衡，实验实施、数据整理为陈启衡，实验评估为陈启衡，收集资料为陈启衡。陈启衡成文，彭江、翁土军审校。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] ZHAO D, ZHANG F, WANG B, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version). J Orthop Translat. 2020;21:100-110.

[2] XU Y, JIANG Y, XIA C, et al. Stem cell therapy for osteonecrosis of femoral head: Opportunities and challenges. Regen Ther. 2020;15: 295-304.

[3] LI Y, FU G, GONG Y, et al. BMP-2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing mitochondrial activity. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2022;22(1):123-131.

[4] YAN C, SHI Y, YUAN L, et al. Mitochondrial quality control and its role in osteoporosis. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1077058.

[5] WU J, NIU J, LI X, et al. Hypoxia induces autophagy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via activation of ERK1/2. Cell Physiol Biochem. 2014;33(5):1467-1474.

[6] WANG K, PENG X, ZHANG R, et al. COL6A3 enhances the osteogenic differentiation potential of BMSCs by promoting mitophagy in the osteoporotic microenvironment. Mol Biol Rep. 2024;51(1):206.

[7] MA S, LI S, ZHANG Y, et al. BMSC-Derived Exosomal CircHIPK3 Promotes Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells via Mitophagy. Int J Mol Sci. 2023;24(3):2785.

[8] LIU F, YUAN Y, BAI L, et al. LRRc17 controls BMSC senescence via mitophagy and inhibits the therapeutic effect of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss. Redox Biol. 2021;43:101963.

[9] BAI H, WANG Y, ZHAO Y, et al. HIF signaling: A new propellant in bone regeneration. Biomater Adv. 2022;138:212874.

[10] NOWAK-STĘPNIOWSKA A, OSUCHOWSKA PN, FIEDOROWICZ H, et al. Insight in Hypoxia-Mimetic Agents as Potential Tools for Mesenchymal Stem Cell Priming in Regenerative Medicine. Stem Cells Int. 2022;2022: 8775591.

[11] YI L, JU Y, HE Y, et al. Intraperitoneal injection of Desferal® alleviated the age-related bone loss and senescence of bone marrow stromal cells in rats. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):45.

[12] SONG S, ZHANG G, CHEN X, et al. HIF-1α increases the osteogenic capacity of ADSCs by coupling angiogenesis and osteogenesis via the HIF-1α/VEGF/AKT/mTOR signaling pathway. J Nanobiotechnology. 2023;21(1):257.

[13] SHAO W, LI Z, WANG B, et al. Dimethyloxalylglycine Attenuates Steroid-Associated Endothelial Progenitor Cell Impairment and Osteonecrosis of the Femoral Head by Regulating the HIF-1α Signaling Pathway. Biomedicines. 2023;11(4):992.

[14] ZHANG F, PENG W, WANG T, et al. Lnc Tmem235 promotes repair of early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by inhibiting hypoxia-induced apoptosis of BMSCs. Exp Mol Med. 2022;54(11): 1991-2006.

[15] ABU-SHAHBA AG, GEBRAAD A, KAUR S, et al. Proangiogenic Hypoxia-Mimicking Agents Attenuate Osteogenic Potential of Adipose Stem/Stromal Cells. Tissue Eng Regen Med. 2020;17(4):477-493.

[16] ZHANG P, HA N, DAI Q, et al. Hypoxia suppresses osteogenesis of bone mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated 1/2 and p38-mitogen activated protein kinase signaling pathways. Mol Med Rep. 2017;16(4):5515-5522.

[17] JIANG Y, FAN X, YU Y, et al. USP13 Overexpression in BMSCs Enhances Anti-Apoptotic Ability and Guards Against Methylprednisolone-Induced Osteonecrosis in Rats. Stem Cells. 2024;43(1):sxae069.

[18] ZHENG C, WU Y, XU J, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head by transferring microRNA-210 into bone microvascular endothelial cells. J Orthop Surg Res. 2023;18(1):939.

[19] YANG N, LI M, LI X, et al. MAGL blockade alleviates steroid-induced femoral head osteonecrosis by reprogramming BMSC fate in rat. Cell Mol Life Sci. 2024;81(1):418.
[20] LIAO Z, JIN Y, CHU Y, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals aberrant stromal cells and heterogeneous endothelial cells in alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head. Commun Biol. 2022;5(1):324.
[21] LEE JS, LEE JS, ROH HL, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor. J Orthop Res. 2006;24(4):604-609.
[22] HOUDEK MT, WYLES CC, PACKARD BD, et al. Decreased Osteogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Corticosteroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. J Arthroplasty. 2016; 31(4):893-898.
[23] FENG X, XIANG Q, JIA J, et al. CircHGF suppressed cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs in ONFH via inhibiting miR-25-3p binding to SMAD7. Mol Ther Nucleic Acids. 2022;28:99-113.
[24] MAS-BARGUES C, SANZ-ROS J, ROMÁN-DOMÍNGUEZ A, et al. Relevance of Oxygen Concentration in Stem Cell Culture for Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2019;20(5):1195.
[25] HU Y, LOU B, WU X, et al. Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. 2018; 2018:6704583.
[26] ZHAO F, VELDHUIS JJ, DUAN Y, et al. Low oxygen tension and synthetic nanogratings improve the uniformity and stemness of human mesenchymal stem cell layer. Mol Ther. 2010;18(5):1010-1018.
[27] ZHAO D, LIU L, CHEN Q, et al. Hypoxia with Wharton's jelly mesenchymal stem cell coculture maintains stemness of umbilical cord blood-derived CD34+ cells. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):158.
[28] DONG Q, FEI X, ZHANG H, et al. Effect of Dimethyloxalylglycine on Stem Cells Osteogenic Differentiation and Bone Tissue Regeneration-A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2024;25(7):3879.
[29] LU Y, LI Z, ZHANG S, et al. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation. Theranostics. 2023;13(2):736-766.
[30] SAMAL JRK, RANGASAMI VK, SAMANTA S, et al. Discrepancies on the Role of Oxygen Gradient and Culture Condition on Mesenchymal Stem Cell Fate. Adv Healthc Mater. 2021;10(6):e2002058.
[31] CHEN W, WU P, YU F, et al. HIF-1α Regulates Bone Homeostasis and Angiogenesis, Participating in the Occurrence of Bone Metabolic Diseases. Cells. 2022;11(22):3552.
[32] WU D, LIU L, FU S, et al. Osteostatin improves the Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and enhances angiogenesis through HIF-1α under hypoxia conditions in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2022;606:100-107.
[33] SUN K, JING X, GUO J, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases. Autophagy. 2021;17(9):2082-2092.
[34] XIANG K, REN M, LIU F, et al. Tobacco toxins trigger bone marrow mesenchymal stem cells aging by inhibiting mitophagy. Ecotoxicol Environ Saf. 2024;277:116392.
[35] YANG Q, ZOU Y, WEI X, et al. PTP1B knockdown alleviates BMSCs senescence via activating AMPK-mediated mitophagy and promotes osteogenesis in senile osteoporosis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2023;1869(7):166795.
[36] LI G, JIAN Z, WANG H, et al. Irisin Promotes Osteogenesis by Modulating Oxidative Stress and Mitophagy through SIRT3 Signaling under Diabetic Conditions. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:3319056.
[37] LU Z, JIANG L, LESANI P, et al. Nicotinamide Mononucleotide Alleviates Osteoblast Senescence Induction and Promotes Bone Healing in Osteoporotic Mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2023; 78(2):186-194.
[38] LIN Q, LI S, JIANG N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy. Autophagy. 2021;17(10):2975-2990.
[39] LI J, LIN Q, SHAO X, et al. HIF1α-BNIP3-mediated mitophagy protects against renal fibrosis by decreasing ROS and inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome. Cell Death Dis. 2023;14(3):200.
[40] FU ZJ, WANG ZY, XU L, et al. HIF-1α-BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury. Redox Biol. 2020;36:101671.

（责任编辑：马征华，邱杨，张楠）