

# 脂肪干细胞联合黄连素促进成纤维细胞增殖效果的探讨

胡啸昊 黎洪棉<sup>(通讯作者)</sup>

(广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心)

**【摘要】**目的:探究黄连素(BBR)联合脂肪干细胞(ADSC)促进成纤维细胞增殖迁移的作用。方法:选择若干只SPF级环境培养的八周龄健康雄性SD大鼠(280±20g),取从大鼠腹部两侧脂肪,用一型胶原酶进行消化分离出脂肪干细胞,随后进行一系列细胞功能实验,如细胞干性验证实验包括成骨诱导、成脂肪诱导、成软骨诱导实验。随后将成纤维细胞分成对照组、BBR干预组、ADSC干预组、BBR+ADSC联合干预组探讨不同处理对于成纤维细胞增殖迁移能力的影响。对照组细胞使用普通高糖培养基(DMEM)培养;BBR组在使用DMEM培养基情况下中添加黄连素(100μg/ml);ADSC组采用将成纤维细胞的培养基在划痕后更换为ADSC培养基上清进行干预;BBR+ADSC联合治疗组将对成纤维细胞同时添加ADSC培养基上清及黄连素。划痕处理后立即用显微镜拍照记录初始阶段划痕宽度,细胞培养一天后,在显微镜下拍照,随后使用ImageJ软件分析划痕一天后较划痕初始阶段成纤维细胞的迁移比例。结果:同对照小组对比,BBR组、ADSC组、BBR+ADSC联合干预组处理下的成纤维细胞迁移比例显著增加(P<0.05)而联合治疗组细胞迁移比例显著高于BBR组和ADSC组。结论:黄连素联合脂肪干细胞可显著促进成纤维细胞迁移能力,在皮肤创面治疗应用中有着极大潜力。

**【关键词】**黄连素;脂肪干细胞;联合治疗;细胞增殖

脂肪干细胞(Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, ADSC)作为一种多能干细胞,因其来源广泛、提取简便、增殖能力强及分化潜力大等特点,在再生医学领域受到广泛关注[1]。近年来,ADSCs在皮肤创面修复中的应用研究逐渐增多,显示出其在促进伤口愈合、改善皮肤质量等方面的显著优势[2]。ADSCs不仅可以直接参与受损组织的修复,还能通过分泌多种生长因子和细胞因子,调节局部微环境,促进血管新生和细胞迁移,从而加速伤口愈合过程。此外,ADSCs还具有免疫调节功能,能够减少炎症反应,为皮肤创面提供一个更有利于修复的环境[3]。黄连素(Berberine, BBR)是一种从中药黄连的根茎中提取的天然药物。近年来,黄连素因其广谱抗菌、抗炎、抗氧化等药理作用,在治疗各种疾病中显示出巨大应用潜力[4, 5]。尤其是在皮肤科领域,黄连素在治疗各种皮肤创面及慢性难治性皮肤疾病方面具有独特优势[6]。本研究旨在探讨脂肪ADSC及BBR促进成纤维细胞迁移增殖的效果,以此为皮肤创面的治疗,尤其是慢

性创面的愈合提供新的思路。

## 1.材料与方法

### 1.1 实验材料

黄连素,德国默克;DMEM基础培养基,美国Gibco企业;胎牛血清,杭州四季青企业;6孔细胞培养板,美国Falcon企业;大鼠脂肪间充质干细胞成骨、成脂肪、成软骨诱导分化试剂盒, OriCell®;青霉素-链霉素溶液(100×), Biosharp等。

### 1.2 细胞培养及ADSC细胞干性鉴定

脂肪干细胞细胞被安放在比例10%的胎牛血清的DMEM完全培养基培养基内,添加青霉素(100U/ml)与链霉素(100U/ml),在37摄氏度、5%二氧化碳培养设备中培养。待ADSC培养直P3代后,使用相应的诱导培养及进行细胞成骨、成脂肪、成软骨诱导数周,随后使用茜素红、油红O、阿利辛蓝进行相应染色检测分化效果,以证明ADSC多向分化能力。

### 1.3 划痕实验测试细胞迁移

将大鼠成纤维细胞接种在6孔板中,初始浓度为 $6 \times 10^4$  /ml,对照组使用常规高糖培养基培养;黄连素干预组在高糖培养基中添加黄连素(100 $\mu$ g/ml);成纤维细胞上清干预组将划痕后的成纤维细胞培养基更换为ADSC培养上清;联合干预组同时给予ADSC培养上清和黄连素(100 $\mu$ g/ml),旨在阐明黄连素和ADSC细胞在创面修复中的协同作用机制。每个小组都设立三组复孔。

### 1.4 结果统计

使用SPSS 18.0软件完成材料解读,试验成果通过 $\bar{x} \pm s$ 表达,结果使用单因素方差分析进行解读(ANOVA), $P < 0.05$ 有差别则表明具备统计学意义。

## 2.结果

### 2.1 脂肪干细胞数据结果分析

根据ADSC成骨、成脂肪、成软骨诱导实验显示,ADSC在成骨诱导21天用茜素红进行染色,观察到大量的钙结节;ADSC在成脂诱导14天后,进行油红O染色观察到明显的脂肪空泡;ADSC在成软骨诱导21天后,行阿利辛蓝染色观察到深染的软骨成分,说明提取自大鼠脂肪的细胞成分为脂肪干细胞,并具备干细胞的多向分化能力。见图1。

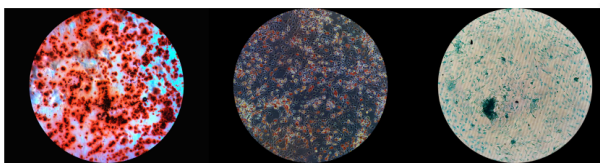


图1 干细胞多向分化功能图

### 2.2 划痕结果数据对比

划痕结果表明,相较于对照组,加入BBR或加入ADSC培养基上清进行干预都能显著促进成纤维细胞的迁移( $P < 0.05$ )。BBR组与ADSC组间的迁移效率没有显著差异,

而BBR+ADSC组的迁移率显著高于其余各小组( $P < 0.05$ )见图2。

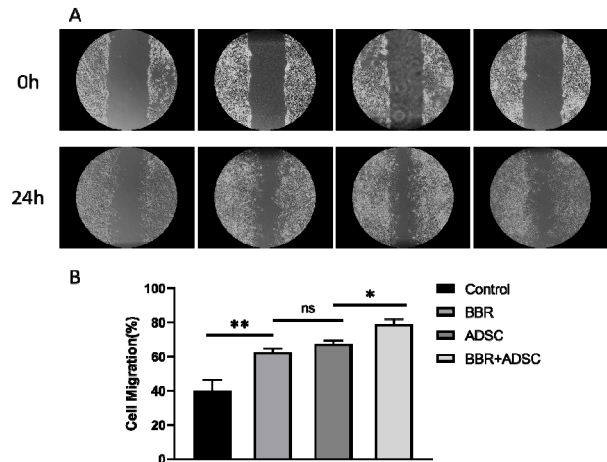


图2 划痕结果对比图

## 3.讨论

皮肤损伤后再生是一个复杂的过程,需要多种细胞协同参与,而成纤维细胞在皮肤创面再生修复过程中起着非常重要的作用[7]。虽然ADSC已经被广泛用于各种疾病的治疗当中,然而,脂肪干细胞(Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell, ADSC)联合黄连素促进成纤维细胞增殖迁移的影响的研究有待进一步探讨。黄连素(Berberine, BBR)作为一种中药单体,是一种在多种植物中发现的生物碱。近年来,黄连素因其广泛的生物活性和潜在的治疗效果而受到现代医学研究的高度关注。黄连素的作用机制相当复杂,涉及多种生物通路和分子机制。它被发现具有抗微生物、抗炎、抗氧化、降血糖、降血脂、抗肿瘤等多重生物活性。这些作用使得黄连素在治疗或辅助治疗多种疾病中显示出潜力[8, 9]。

在本研究中,通过提取大鼠腹部左右侧脂肪组织,经一型胶原酶消化获得原代ADSC,随后经过成骨、成脂肪、成软骨三向诱导后进行相应染色,证明了提取自脂肪组织的ADSC具有干细胞的多向分化能力。将验证后的ADSC与黄连素联合干预划痕实验后的大鼠成纤维细胞,记录划痕初始

阶段和划痕 24 小时后的划痕剩余面积, 随后经过计算、统计得出各个干预组相应的成纤维细胞迁移效率。结果显示, 单独加入 BBR 及单独加入 ADSC 培养基上清后的处理组的迁移效率相较于未经任何处理的 Control 空白对照组明显增加, 而联合应用 ADSC 培养基上清和 BBR 可再此基础上进一步促进成纤维细胞迁移, 其原因很可能与 ADSC 培养基上清中各种细胞因子、生长因子密切相关, 同时黄连素已有文献报道能够显著促进人来源成纤维细胞的迁移速度[10]。因

此该结果表明 ADSC 培养基上清及黄连素的联合应用很可能共同促进了成纤维细胞的迁移。然而 ADSC 细胞上清中何种成分促进了成纤维细胞的迁移, 及其联合 BBR 进一步促进迁移效率的分子机制及信号通路需进一步探讨。综上所述本研究在初步证明了脂肪干细胞联合黄连素具有促进成纤维细胞增殖的效果。然而本研究也有一定的局限性, 需要通过更多实验技术如 RT-PCR、Western blot 进一步探明其内在分子机制。这部分将有待今后更加深入的研究探讨。

### 参考文献:

- [1]Rochette L, Mazini L, Malka G, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The Crosstalk of Adipose-Derived Stem Cells (ADSC), Oxidative Stress, and Inflammation in Protective and Adaptive Responses[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23).
- [2]Yu H, Wu Y, Zhang B, Xiong M, Yi Y, Zhang Q, et al. Exosomes Derived from E2F1(-/-) Adipose-Derived Stem Cells Promote Skin Wound Healing via miR-130b-5p/TGFBR3 Axis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 6275-6292.
- [3]Sanz-Ros J, Romero-Garcia N, Mas-Bargues C, Monleon D, Gordevicius J, Brooke R T, et al. Small extracellular vesicles from young adipose-derived stem cells prevent frailty, improve health span, and decrease epigenetic age in old mice[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(42): eabq2226.
- [4]Liu Q, Tang J, Chen S, Hu S, Shen C, Xiang J, et al. Berberine for gastric cancer prevention and treatment: Multi-step actions on the Correa's cascade underlie its therapeutic effects[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106440.
- [5]Li T, Wang P, Guo W, Huang X, Tian X, Wu G, et al. Natural Berberine-Based Chinese Herb Medicine Assembled Nanostructures with Modified Antibacterial Application[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6770-6781.
- [6]Hu J J, Yu X Z, Zhang S Q, Zhang Y X, Chen X L, Long Z J, et al. Hydrogel with ROS scavenging effect encapsulates BR@Zn-BTB nanoparticles for accelerating diabetic mice wound healing via multimodal therapy[J]. *iScience*, 2023, 26(6): 106775.
- [7]Talbot H E, Mascharak S, Griffin M, Wan D C, Longaker M T. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1161-1180.
- [8]Shah D, Challagundla N, Dave V, Patidar A, Saha B, Nivsarkar M, et al. Berberine mediates tumor cell death by skewing tumor-associated immunosuppressive macrophages to inflammatory macrophages[J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 153904.
- [9]Zhang Q, Wang X, Cao S, Sun Y, He X, Jiang B, et al. Berberine represses human gastric cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing cytosolic autophagy via inhibition of MAPK/mTOR/p70S6K and Akt signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110245.
- [10]Zhang P, He L, Zhang J, Mei X, Zhang Y, Tian H, et al. Preparation of novel berberine nano-colloids for improving wound healing of diabetic rats by acting Sirt1/NF-kappaB pathway[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 187: 110647.