

任文佳, 赵鹏飞, 李畅, 等. 盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖分化的影响及机制解析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 182–189. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040062

REN Wenjia, ZHAO Pengfei, LI Chang, et al. Effect of Berberine Hydrochloride on the Proliferation and Differentiation of Chicken Myoblasts and the Mechanism Analysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 182–189. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040062

· 生物工程 ·

盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖分化的影响及机制解析

任文佳^{1,2}, 赵鹏飞^{1,2}, 李畅^{1,2}, 李莹莹^{1,2}, 唐铎^{1,2}, 刘屹森^{1,2}, 王守伟^{1,2,*}

(1. 中国肉类食品综合研究中心, 北京食品科学研究院, 北京 100068;
2. 国家市场监督管理总局技术创新中心(动物替代蛋白), 北京 100076)

摘要: 为探究盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖分化的影响。本研究通过 CCK-8 法、EdU 染色法以及肌间线蛋白 (Desmin) 免疫荧光染色检测盐酸小檗碱对细胞增殖和分化的影响, 通过实时荧光定量 PCR 实验 (RT-qPCR) 对生肌因子 5 (Myogenic Factor 5, *MYF5*) 和生肌分化因子 (Myogenic Differentiation 1, *MYOD*) 基因表达水平进行测定, 同时通过转录组测序技术探究盐酸小檗碱对鸡成肌细胞基因表达谱的影响。结果表明, 盐酸小檗碱处理显著促进了鸡成肌细胞增殖, 同时抑制 *MYOD* ($P < 0.01$) 和 *MYF5* ($P < 0.05$) 表达, Desmin 染色在实验组胞质内荧光信号略弱于对照组, 表明盐酸小檗碱在一定程度上抑制鸡成肌细胞的分化。此外, 基因本体论富集分析 (Gene Ontology, GO) 表明, 盐酸小檗碱处理后差异基因主要富集在细胞外空间与基质、细胞粘附、细胞迁移调节等方面; 京都基因与基因组百科全书富集分析 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 表明, 差异基因主要富集在酪氨酸代谢、转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路、促分裂素原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) 信号通路以及细胞粘附分子相关信号通路; RT-qPCR 结果显示在 TGF- β 通路中 DNA 结合抑制因子 1 (Inhibitor of DNA Binding 1, *ID1*) 和垂体同源盒转录因子 2 (Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2, *PITX2*) 表达上调, 而卵泡抑素 (Follistatin, *FST*) 表达下调, 在 MAPK 通路中, 促增殖基因胰岛素样生长因子 2 (Insulin-like Growth Factor 2, *IGF2*)、成纤维细胞生长因子 7 (Fibroblast Growth Factor 7, *FGF7*)、FBJ 骨肉瘤基因转录因子 (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog, *FOS*)、血管内皮生长因子受体 1 (Fms-related Tyrosine Kinase 1, *FLT1*) 和 MAPK 活化蛋白激酶 3 (MAPK-activated Protein Kinase 3, *MAPKAPK3*) 表达均上调, 而钙通道基因电压门控钙通道 $\alpha 1E$ 亚基 (Calcium Voltage-gated Channel Subunit Alpha 1E, *CACNA1E*) 下调, 表明盐酸小檗碱可能通过 TGF- β /MAPK 通路的交互作用, 协同调控成肌细胞的增殖-分化平衡。本研究发现盐酸小檗碱促进鸡成肌细胞增殖并对其中的分子机制进行了解析和验证, 同时为体外高效培养鸡成肌细胞提供了理论支持。

关键词: 盐酸小檗碱, 鸡成肌细胞, 细胞增殖, 细胞分化, 转录组学

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0182-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040062



本文网刊:

Effect of Berberine Hydrochloride on the Proliferation and Differentiation of Chicken Myoblasts and the Mechanism Analysis

REN Wenjia^{1,2}, ZHAO Pengfei^{1,2}, LI Chang^{1,2}, LI Yingying^{1,2}, TANG Duo^{1,2}, LIU Yisen^{1,2}, WANG Shouwei^{1,2,*}

(1. China Meat Research Center, Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068, China;

2. Technology Innovation Center of Animal-derived Protein Alternatives, State Administration for Market Regulation, Beijing 100076, China)

收稿日期: 2025-04-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2024YFA0918300)。

作者简介: 任文佳 (1998-), 女, 硕士, 初级工程师, 研究方向: 无血清培养基研发, E-mail: Renwenjia2021@163.com。

* 通信作者: 王守伟 (1961-), 男, 硕士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品安全与食品加工, E-mail: cmrcsw@126.com。

Abstract: To explore the effect of berberine hydrochloride on the proliferation and differentiation of chicken myoblasts. In this study, the effects of berberine hydrochloride on cell proliferation and differentiation were detected by CCK-8 assay, EdU staining and Desmin immunofluorescence staining. The gene expression levels of myogenic factor 5 (*MYF5*) and myogenic differentiation 1 (*MYOD*) were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The effects of berberine hydrochloride on the gene expression profiles of chicken myoblasts were also investigated by RNA sequencing analysis. The results showed that berberine hydrochloride treatment significantly promoted the proliferation of chicken myoblasts while inhibiting the expression of *MYOD* ($P < 0.01$) and *MYF5* ($P < 0.05$). Desmin staining showed slightly weaker fluorescence signals in the cytoplasm of the experimental group than that of the control group, indicating that berberine hydrochloride inhibited the differentiation of chicken myoblasts to a certain extent. In addition, Gene Ontology enrichment analysis (GO) showed that the differential genes were mainly enriched in extracellular space and matrix, cell adhesion, and cell migration regulation after berberine hydrochloride treatment; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis (KEGG) showed that the differential genes were mainly enriched in tyrosine metabolism, TGF- β signaling pathway, MAPK signaling pathway and cell adhesion molecule-related signaling pathway. The RT-qPCR results showed that in the TGF- β pathway, the expression of Inhibitor of DNA Binding 1 (*ID1*) and Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2 (*PITX2*) was upregulated, while Follistatin (*FST*) was downregulated. In the MAPK pathway, the pro-proliferative genes Insulin-like Growth Factor 2 (*IGF2*), Fibroblast Growth Factor 7 (*FGF7*), FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (*FOS*), Fms-related Tyrosine Kinase 1 (*FLT1*), and MAPK-activated Protein Kinase 3 (*MAPKAPK3*) were all upregulated, whereas the calcium channel gene Calcium Voltage-gated Channel Subunit Alpha1 E (*CACNA1E*) was downregulated. These findings suggested that berberine hydrochloride might synergistically regulate the proliferation-differentiation balance of myoblasts through the interaction between the TGF- β and MAPK signaling pathways. In this study, we found that berberine hydrochloride promoted the proliferation of chicken myoblasts and analyzed the molecular mechanism and provided theoretical support for the efficient culture of chicken myoblasts *in vitro*.

Key words: berberine hydrochloride; chicken myoblasts; cell proliferation; cell differentiation; transcriptomics

随着全球人口的增长以及对安全、稳定和可持续食品供应需求的增加,开发新型食品生产技术正逐渐成为研究热点^[1-3]。细胞培育肉(Cultured Meat)是通过体外培养动物肌肉细胞来生产可食用肌肉组织的技术,这一过程不仅有助于减少对传统畜牧业的依赖,还能对环境产生较小的负面影响^[4-5]。在这一食品生物制造过程中,成肌细胞需通过增殖和分化形成肌管进而促进肌纤维的形成,因此,成肌细胞的增殖、分化是肌肉发育的关键步骤,也是当今细胞培育肉研发的重点^[6-7]。

肌肉的发育具有高度的可塑性,通过多种信号分子和转录因子的精细调控可以促进肌肉的发育^[8]。探索能够安全、有效调控此过程的生物活性物质对优化细胞培养肉的效率和质量至关重要。盐酸小檗碱(Berberine Hydrochloride, BBR)也称为黄连素,是从中药黄连中提取的一种异喹啉类生物碱^[9-10]。现代研究揭示了盐酸小檗碱广泛的生物学活性,其显著的抗菌和抗炎特性已被证实^[11-13],并在治疗肿瘤、糖尿病和心血管疾病方面显示出较高的临床应用价值^[14-15]。还有证据表明,盐酸小檗碱具有抗氧化作用^[16],可用于高脂血症、阿尔兹海默病、糖尿病的研究^[17-19]。例如,盐酸小檗碱能够通过稳定低密度脂蛋白受体的 mRNA 来降低血中胆固醇和甘油三酯^[20]。另一方面,盐酸小檗碱还被发现能够通过激活 AMP 活化蛋白激酶来改善葡萄糖耐量,减少体重,对肥胖和糖尿病具有潜在的治疗作用^[21]。在细胞水平上,盐酸小檗碱对 HL-60 细胞的增殖和分化具有显著影

响。研究表明,盐酸小檗碱能够抑制 HL-60 细胞的增殖,并诱导这些细胞向成熟细胞分化,同时细胞周期分析显示,小檗碱处理后细胞阻滞于 G0/G1 期, S 期细胞明显减少^[22]。在食品领域,黄连(含盐酸小檗碱)除药用外,可被用作食品中的天然苦味剂和抑菌防腐剂^[23]。研究表明,盐酸小檗碱在体外对食源性致病菌(如大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)具有抑制作用,可作为天然抗菌剂用于食品保鲜^[24]。此外,也有研究表明小檗碱可作为天然食品补充剂供消费者使用^[25]。然而,目前未有研究将盐酸小檗碱应用于鸡成肌细胞培养体系,其对鸡成肌细胞的增殖和分化作用尚不明确。

本研究从食品生物技术应用的角度出发,旨在探讨盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖和分化的影响,并解析其潜在的作用机制,为细胞培育肉的生产提供重要的细胞生物学见解。此外,通过分子生物学技术探究盐酸小檗碱的作用机制,期望能揭示其对细胞增殖和分化相关关键细胞信号通路的调控作用,从而为优化细胞培育肉的生产流程和提高肌肉组织的产量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡成肌细胞 分离自鸡胚胎期第 10 d 腿肌组织;盐酸小檗碱 纯度 99.02%,上海 MedChemExpress 公司;基础培养基 DMEM F-12、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、马血清 美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素(Penicillin-Streptomycin Solution)、

0.25% 胰酶、CCK-8 试剂、DAPI 染料(1:500)、抗荧光淬灭封片剂、5% BSA 封闭液 北京索莱宝科技有限公司; PBS 武汉普诺赛公司; Trizol 美国 Ambion 公司; 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂(KR118) 北京天根生化科技有限公司; Triton X-100、Edu 检测试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司; PAX7 一抗(1:200)、Desmin 一抗(1:200) Abclonal 公司; ABflo®594-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)二抗(1:500) 美国 CST 公司。

HR40-IIB2 生物安全柜、HCP-80/168/258 CO₂ 培养箱 中国海尔集团公司; YB8 恒温水浴锅 上海普锐马电子有限公司; 低速离心机、EVOS™ XL Core 配置细胞成像仪、A37834 MiniAmp 热循环 PCR 仪、NanoDrop One 微量 UV-Vis 分光光度计、QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 系统 美国赛默飞世尔科技公司; ECLIPSE Ti2-U 倒置荧光显微镜 日本尼康公司; Halo-Lite 细胞计数仪 北京高分生物科技有限公司; Synergy H4 多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡成肌细胞分离和培养 参照杨朝永等^[26]的研究,将胚胎期第 10 d 鸡种蛋经 75% 酒精消毒后,用无菌镊子取出鸡胚,手术剪剥去腿部肌肉皮肤小心分离肌肉放置于含 DMEM F-12 完全培养基的培养皿中,将皿中肌肉剪碎后 1000 r/min 离心 5 min,保留沉淀加入适量胰酶于 37 °C 培养箱中消化至肌肉呈肉糜状,经 200 目细胞筛过滤后 1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入完全培养基吹打混匀,接种至 10 mm 培养皿中,每隔 1 h 更换培养基纯化鸡成肌细胞,共纯化 3 次。

鸡成肌细胞使用添加 1% 青霉素-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM F-12 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。待细胞汇合度达 90% 时进行传代,细胞汇合度达 60%~70% 时添加盐酸小檗碱处理。

1.2.2 免疫荧光 以 1×10^5 个/孔的密度将细胞接种至 24 孔板中,细胞贴壁后实验组替换为含盐酸小檗碱的完全培养基,对照组替换为含等量 DMSO 的完全培养基。培养 48 h 后用 PBS 清洗细胞,并用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 通透完成后 5% BSA 封闭 1 h,根据不同检测目的使用 PAX7 (1:200)或 Desmin(1:200)一抗 4 °C 孵育过夜,用 PBS 清洗细胞 3 次后二抗避光孵育 1 h,DAPI 染色 10 min 后使用抗荧光淬灭封片剂封片后在倒置荧光显微镜下成像。鸡成肌细胞的鉴定通过直接对孔板内的细胞进行染色实现。

1.2.3 药物浓度筛选 收集对数生长期的鸡成肌细胞,按照每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔板。待细胞贴壁后弃去原培养基,用新鲜培养基将盐酸小檗碱按照 0、15、30、45、60、75、90、105、120 $\mu\text{mol/L}$

的浓度进行稀释,每个浓度设置 3 个复孔,各加入 200 μL 稀释液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,以 0 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱为对照组,空白组无细胞(仅添加等量完全培养基)。24 h 后换成含有 10% CCK-8 溶液的无血清培养基继续孵育 3 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值(OD 值)。

1.2.4 细胞增殖实验 收集对数生长期的鸡成肌细胞,按照每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔板,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。待细胞贴壁后弃去原培养基,更换含有 45 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱的完全培养基继续培养细胞,对照组含与盐酸小檗碱等量的 DMSO,空白组无细胞,每组设置 5 个复孔。分别在换液后的第 0、1、2、3、4 d 通过 CCK-8 法检测 450 nm 波长处的吸光度值,检测方法参考 1.2.3 药物浓度筛选部分。将第 4 d 和第 0 d 测得的 OD 值作差得到 OD(450 nm)变化值。同时以第 0 d 为对照,计算各组细胞相较于第 0 d 的相对增殖倍数,相对增殖倍数=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)。

1.2.5 EdU 染色 参照 EdU 检测试剂盒说明书,使用 EdU 处理细胞后,弃去培养液,加入 4% 多聚甲醛固定细胞,漂洗后用 0.5% Triton X-100 通透,加入 Click 反应液均匀覆盖样品,室温避光孵育 30 min。然后加入 DAPI 对细胞核进行复染,使用荧光显微镜拍照。蓝色荧光代表检测到的细胞总数,绿色荧光代表增殖细胞。Edu 阳性细胞百分比(%)=绿色荧光细胞数/蓝色荧光细胞数 $\times 100$ 。

1.2.6 鸡成肌细胞分化诱导 接种鸡成肌细胞,使用含有 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM-F12 培养基并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞贴壁后更换为含 45 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱的完全培养基继续培养,在细胞汇合度达 90% 时换成无血清培养基继续培养 24 h,然后使用含有 2% 马血清的 DMEM F-12 培养基诱导细胞分化约 48 h。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 盐酸小檗碱处理细胞 48 h 后,使用 Trizol 试剂裂解盐酸小檗碱组和对照组细胞,加入氯仿混匀 4 °C 下 12000 r/min 离心 10 min,吸去最上层上清液至新 EP 管中,添加异丙醇混匀后 4 °C 下 12000 r/min 离心 10 min,弃去上清,并添加 70% 无水乙醇清洗沉淀后 4 °C 下 12000 r/min 离心 5 min,根据沉淀量添加适量无菌无酶水溶解沉淀获得总 RNA。使用天根一步法 cDNA 第一链合成预混试剂按照说明书将总 RNA 反转录成 cDNA。反应条件设置为:42 °C 孵育 15 min,95 °C 孵育 3 min。使用 QuantStudio3 实时荧光定量 PCR 系统检测实验组及对照组目的基因的相对表达量。反应条件设置为:预变性 95 °C 5 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,变性和退火共进行 40 个循环。基因相对表达倍数采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算。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')
<i>GAPDH</i>	F: GTCGGAGTCAACGGATTTGG R: TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC
<i>MYF5</i>	F: CTCCGATGTGATGGCGGAC R: CGATGCTGGAGAGGCAGTC
<i>MYOD</i>	F: GGGAAACCACACGAGGAGGAG R: CGGTCAGCGTTGGTGGTCTTC
<i>ID1</i>	F: CCGGAGGGTCTCTAAAGTGG R: GGCACAGTATGCGGTCGG
<i>BMP4</i>	F: GGGCTTCCACCGGATAAACA R: ACATCAAAGGTCTCCAGCG
<i>PITX2</i>	F: GAAGGACCCGTTAAGCCTGG R: CGCTTCTTCTGGAGGGGTC
<i>FST</i>	F: CAGCCATTGGGCACGAAATC R: CACTGCTCTCCCGTAACGA
<i>IGF2</i>	F: TCAGTAGACCAGTGGGACGA R: CGGACTTGGCACAGTAGGTT
<i>FGF7</i>	F: GGATCTGCAATTTTGCTCT R: TTCTGGTATGTCGCTCAGGG
<i>FOS</i>	F: ATGATGTACCAGGGCTTCGC R: CCCATGCTGGAGAAGGAGTC
<i>FLT1</i>	F: ACAGCGCATTGACCAGAAGA R: GGTCCTACTTTCACATGGCA
<i>MAPKAPK3</i>	F: ATTCTGAATGGGGCAGTATGGG R: CCTATGGTTGCACTTTGCAGG
<i>CACNA1E</i>	F: TACCTTCCCGTGGACACTCA R: GAGGTGTGGTGCCTTTGTC

1.2.8 转录组测序 盐酸小檗碱处理鸡成肌细胞 48 h 后使用 Trizol 法(同 1.2.7)提取盐酸小檗碱组和对照组细胞总 RNA, 每组样品设置 3 个重复。使用 KC-Digital™ 链特异性 mRNA 文库制备试剂盒构建测序文库, 对文库产物中长度在 200~500 bp 的片段进行富集、定量, 通过 Illumina NovaSeq 6000 测序仪使用 PE150 模式进行测序。通过 Trimmomatic (版本 0.36)进行过滤, 去除低质量序列, 并剪切被接头污染的序列。序列通过 STAR 软件比对到参考基因组, 组之间差异表达基因通过 edgeR 鉴定, 使用的统计显著性判断标准为 $P < 0.05$ 和表达倍数变化 (Fold-change) ≥ 2 。GO 分析和 KEGG 富集分析通过 KOBAS 软件(版本 2.1.1)完成。

1.3 数据处理

所有实验均重复操作三次。采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件对数据进行 t 检验分析, 所有数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 鸡成肌细胞的鉴定

PAX7 是鸡骨骼肌卫星细胞的标志基因, 通过 *PAX7* 染色可以准确鉴定鸡成肌细胞^[27]。在细胞培养过程中, *PAX7* 的表达有助于维持肌肉干细胞的干细胞特性, 当细胞开始分化时, *PAX7* 的表达下调, 促使细胞向成熟肌细胞分化。通过免疫荧光实验对细胞内 *PAX7* 蛋白进行染色。结果如图 1 所示, *PAX7* 在细胞核周围有明显的荧光信号且主要集中在细胞核区域, 表明鸡成肌细胞在培养过程中生长状态良好, 未发生细胞分化, 有较强的干细胞特性。

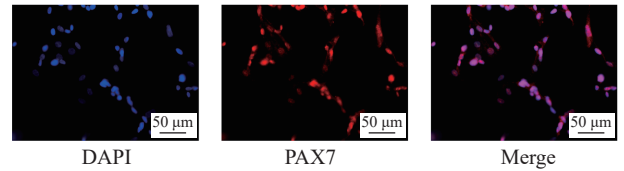


图 1 鸡成肌细胞的鉴定

Fig.1 Morphological characterization of chicken myoblasts

注: 蓝色: DAPI, 红色: PAX7。

2.2 盐酸小檗碱最适浓度筛选

不同浓度盐酸小檗碱处理鸡成肌细胞的结果如图 2 所示, 横坐标表示盐酸小檗碱的药物浓度, 纵坐标表示 450 nm 波长处 OD 值。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱组相比, 随着盐酸小檗碱浓度增加, 在药物浓度为 45 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高 OD 值, 且具有极显著差异 ($P < 0.001$)。因此, 选用 45 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱浓度用于后续实验。

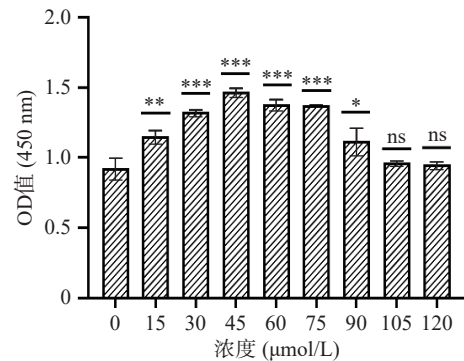


图 2 盐酸小檗碱最适浓度筛选

Fig.2 Screening of optimal concentration of BBR

注: ns 无统计学意义, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 图 3、图 4 同。

2.3 盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖的影响

通过 CCK-8 增殖实验和 EdU 染色实验探究盐酸小檗碱对鸡成肌细胞增殖的作用。CCK-8 实验结

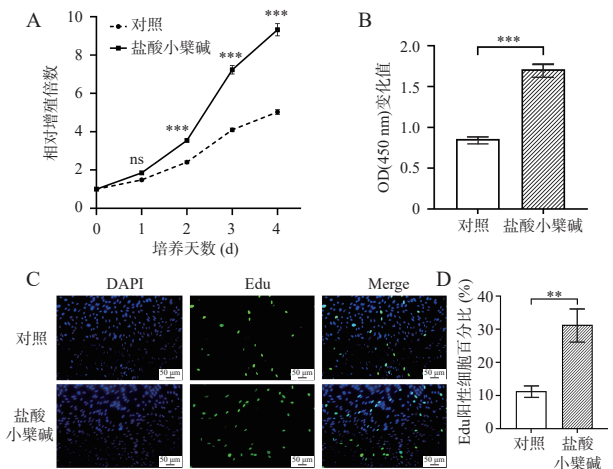


图 3 盐酸小檗碱促进鸡成肌细胞增殖

Fig.3 BBR promotes the proliferation of chicken myoblasts

注: A. 0~4 d 鸡成肌细胞相对增殖倍数; B. 第 0 d 和第 4 d OD 值差值; C. EdU 实验检测鸡成肌细胞增殖能力; D. EdU 实验组间差异统计。

果如图 3A 所示, 盐酸小檗碱组细胞的相对增殖速率明显高于对照组, 且两组间差异随培养天数增加而增大, 第 4 d 时差异极显著($P < 0.001$)。分别将第 4 d 和第 0 d 测得的吸光度作差, 结果如图 3B 所示, 盐酸小檗碱组的吸光度差值高于对照组且差异极显著($P < 0.001$), 表明盐酸小檗碱处理细胞后细胞活力和细胞增殖速率明显提高。同时 EdU 染色实验结果表明(图 3C 和 3D), 盐酸小檗碱组处于增殖状态的细胞数量显著高于对照组($P < 0.01$)。有研究表明盐酸小檗碱对胆囊癌、胃癌和非小细胞肺癌细胞的增殖有抑制作用, 并促进这些癌细胞的凋亡^[28-30]。这可能是由于盐酸小檗碱对不同细胞类型中信号通路有选择性调控^[31-33]。而在正常细胞中盐酸小檗碱可诱导血管平滑肌细胞的增殖^[34], 且对心肌细胞的增殖有促进作用^[35]。综上, 盐酸小檗碱通过调控鸡成肌细胞中的某些信号通路发挥促进鸡成肌细胞增殖的作用。

2.4 盐酸小檗碱对鸡成肌细胞分化的影响

盐酸小檗碱处理鸡成肌细胞后, 用 2% 马血清对鸡成肌细胞进行诱导分化, 通过免疫荧光实验检测细胞内 Desmin 的表达。结果如图 4A 所示, Desmin 的荧光信号在对照组和实验组细胞中均有表达, 大多集中在细胞核区域, 盐酸小檗碱组细胞质区域的 Desmin 荧光信号略弱于对照组, 表明盐酸小檗碱未改变 Desmin 在鸡成肌细胞的分布。此外, RT-qPCR 实验检测 MYF5 和 MYOD 的表达变化结果如图 4B 所示, 与对照组相比, 实验组 MYF5($P < 0.05$) 和 MYOD($P < 0.01$) 的表达均下调, 且分别具有显著和极显著差异, 表明盐酸小檗碱对这两种生肌调节因子的表达有一定抑制作用。Desmin 是一种肌源性标志中间丝蛋白, 主要存在于肌肉细胞中, 该蛋白的表达通常与细胞的分化状态密切相关^[36-37]。细胞内 Desmin 的表达和定位, 可以反映细胞分化状态^[37]。在未分化的肌卫星细胞中, Desmin 主要存在于细胞核周围; 而在分化过程中, Desmin 会重新排列形成肌细胞的骨架结构^[38]。MYF5 和 MYOD 是两种重要的生肌调节因子, MYF5 和 MYOD 通过激活肌肉特异性基因的表达, 促进细胞分化为成熟的肌细胞^[39-40]。在成肌细胞分化过程中, MYF5 的表达通常上调, 为 MYOD 发挥其功能创造条件, MYOD 在细胞分化过

程上调起到促进分化的作用, 如果 MYOD 的表达没有显著上调, 或者在分化过程中保持较低水平, 这表明细胞没有进入分化阶段^[41]。结合上述实验结果, 盐酸小檗碱处理下鸡成肌细胞经过分化诱导后并未进入分化状态, 且在一定程度上抑制鸡成肌细胞的分化。

2.5 盐酸小檗碱作用鸡成肌细胞的转录组分析

差异表达分析结果如图 5A 所示, 共检测到 292 个差异基因, 其中上调基因 96 个, 下调基因 196 个。对差异表达基因进行 GO 富集分析, 按照显著性程度选出排名前 20 的富集结果, 如图 5B 所示, 盐酸小檗碱作用细胞后, 鸡成肌细胞差异表达基因在心室心肌细胞发育、细胞的迁移调节、细胞粘附、细胞外空间和细胞外基质方面有显著富集。最后通过 KEGG 富集分析并选出排名前 4 的富集结果, 如图 5C 所示, 差异表达的基因主要富集在 TGF- β 和 MAPK 信号通路。已有研究显示 TGF- β 和 MAPK 信号通路均与细胞增殖密切相关^[42]。在细胞增殖过程中, TGF- β 信号通路具有双重作用: 一方面, 其经典 Smad 信号通路通常抑制细胞增殖, 如抑制细胞周期相关基因的表达; 另一方面, 在特定条件下, TGF- β 信号通路也可以通过非经典 Smad 信号通路或与其他信号通路协同作用, 促进细胞增殖^[43]。MAPK 信号通路在细胞增殖中发挥促进作用。研究表明, ERK1/2、JNK、p38 MAPK 等通路的激活, 能够促进细胞周期蛋白的合成和细胞周期的推进^[44]。上述结果进一步说明, 盐酸小檗碱与鸡成肌细胞的增殖过程不仅具有显著相关性, 而且盐酸小檗碱可能通过调控 TGF- β 信号通路和 MAPK 信号通路发挥其促增殖作用。

2.6 盐酸小檗碱调控 TGF- β 和 MAPK 信号通路机制解析

通过 RT-qPCR 实验检测在 TGF- β 信号通路和 MAPK 信号通路富集到的目的基因, 其中 TGF- β 信号通路相关基因表达结果如图 6 所示, 盐酸小檗碱处理细胞后, ID1 和 PITX2 基因表达上调, FST 基因表达下调, 骨形态发生蛋白 4 (Bone Morphogenetic Protein 4, BMP4) 基因无显著变化。其中, ID1 和 PITX2 基因表达上调提示盐酸小檗碱可能通过激活 BMP-Smad1/5/8 信号通路, 抑制成肌细胞过早分化, 从而支持增殖, PITX2 能正反馈调节 BMP 信号, 进一步强化 ID1 的表达, 形成促增殖环路^[45-47]。FST 是 TGF- β 超家族的重要拮抗剂, 主要抑制 Activin 和 Myostatin 的活性, FST 基因表达下调可能部分解除其对成肌细胞增殖的抑制作用^[48]。BMP4 是肌生成中的重要调控因子, 但其 mRNA 水平未发生显著变化可能是由于盐酸小檗碱作用于 BMP 信号通路下游(如 Smad1/5/8 磷酸化), 而非作用于 BMP4 的转录调控^[49]。综上, 盐酸小檗碱可能通过激活 BMP-Smad1/5/8-ID1/PITX2 轴, 同时抑制 FST 以增强 Activin 信号, 共同促进鸡成肌细胞增殖。

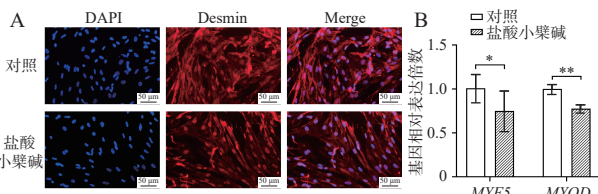


图 4 盐酸小檗碱对鸡成肌细胞分化的影响

Fig.4 Effect of BBR on the differentiation of chicken myoblasts

注: A. 免疫荧光染色 Desmin 蛋白, 蓝色: DAPI, 红色: Desmin; B. RT-qPCR 检测盐酸小檗碱处理细胞后 MYF5 和 MYOD 在 mRNA 水平表达变化。

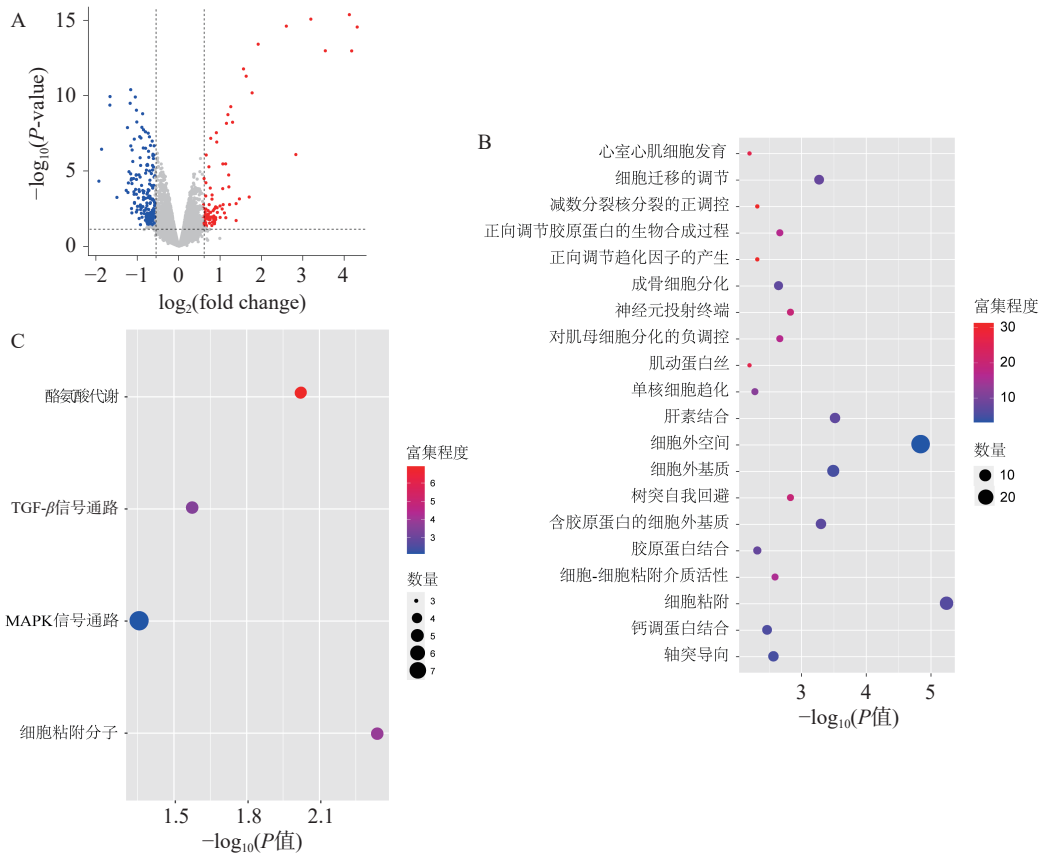


图 5 盐酸小檗碱作用下差异基因的转录组分析

Fig.5 Transcriptome analysis of differentially expressed genes under the action of BBR

注: A. 盐酸小檗碱处理后差异基因表达火山图; 蓝色点、红色点和灰色点分别代表下调表达基因、上调表达基因和无差异表达基因; fold change 表示差异表达倍数, P 值表示差异显著性; B. 盐酸小檗碱作用下差异基因的 GO 富集分析; 气泡颜色偏红表示富集程度高, 气泡颜色偏蓝则表示富集程度低, 气泡大小表示基因数量; C. 盐酸小檗碱作用下差异基因的 KEGG 富集分析; 气泡颜色偏红表示富集程度高; 气泡颜色偏蓝表示富集程度低; 气泡大小表示基因数量。

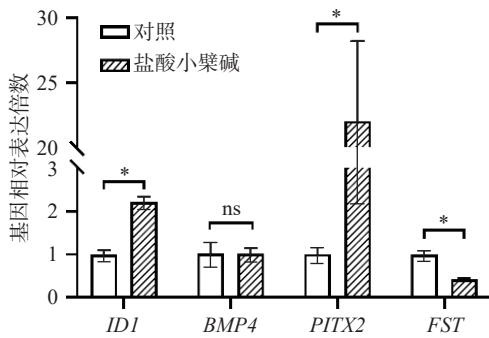


图 6 盐酸小檗碱作用下 TGF-β 信号通路基因表达情况

Fig.6 Expression of TGF-β signaling pathway genes under the effect of BBR

注: ns: 无统计学意义, $*P < 0.05$ 。

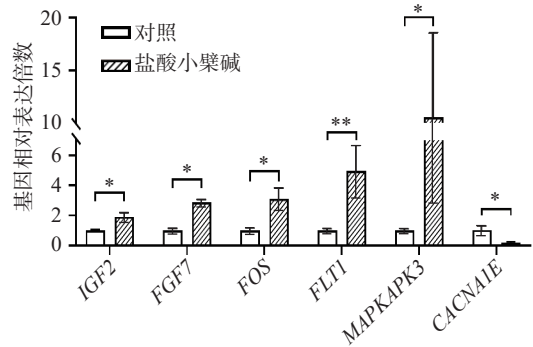


图 7 盐酸小檗碱作用下 MAPK 信号通路基因表达情况

Fig.7 Expression of MAPK signaling pathway genes under the effect of BBR

注: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

MAPK 信号通路相关基因表达结果如图 7 所示, 盐酸小檗碱处理后 *IGF2*、*FGF7*、*FOS*、*FLT1* 和 *MAPKAPK3* 基因表达上调, *CACNA1E* 基因表达下调。*IGF2* 是骨骼肌生长的关键调控因子, 通过激活 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 通路促进成肌细胞增殖和存活^[50]。*FGF7* 属于成纤维细胞生长因子家族, 研究表明, *FGF7* 在鸡肌原性前体细胞中可显著增强增殖能力^[51]。*FOS* 的表达与成肌细胞从静止期进入增殖期密切相关^[52]。MAPKAPK3 是 MAPK 下游

激酶, 可通过磷酸化 HSP27 增强细胞的应激耐受性, 支持成肌细胞在增殖过程中的存活^[53]。*CACNA1E* 下调可能减少钙依赖性凋亡, 间接支持成肌细胞增殖^[54]。以上结果表明, 盐酸小檗碱可能通过上调 *IGF2*、*FGF7* 和 *FOS* 激活 ERK/MAPK 通路, 同时抑制 *CACNA1E* 以减少凋亡信号, 协同促进鸡成肌细胞增殖。综上, 本研究揭示了盐酸小檗碱通过协同调控 TGF-β 和 MAPK 信号通路促进鸡成肌细胞增殖

的潜在机制,为理解其在禽类肌肉发育中的作用提供了新视角。

3 结论

综上所述,本研究通过表型实验和转录组学分析发现,盐酸小檗碱在促进鸡成肌细胞增殖方面具有显著作用,其最佳作用浓度为 45 $\mu\text{mol/L}$ 。同时,该浓度下的盐酸小檗碱对鸡成肌细胞分化表现出明显的抑制效应。进一步通过 GO 和 KEGG 富集分析以及 RT-qPCR 验证,结果表明盐酸小檗碱可能通过协同调控 TGF- β 和 MAPK 信号通路,促进细胞增殖。本研究不仅证实了盐酸小檗碱在鸡成肌细胞增殖中的积极作用,还初步揭示了其潜在的分子机制,为实现鸡成肌细胞的高效体外扩增及细胞培育肉的研究与应用提供了理论依据和技术支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] BRYANT C J. Culture, meat, and cultured meat[J]. Journal of Animal Science, 2020, 98(8): skaa172.
- [2] YAP W S, CHOUDHURY D, SUNTORNNOND R. Towards biomanufacturing of cultured meat[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(3): 292–294.
- [3] 刘辉,徐小霞,严建兵,等.人造肉研究开发现状分析及发展对策研究[J].中国农业科技导报,2023,25(3):9–20. [LIU Hui, XU Xiaoxia, YAN Jianbing, et al. Research and development status and development countermeasures of artificial meat[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(3): 9–20.]
- [4] TUOMISTO H L, TEIXEIRA de MATTOS M J. Environmental impacts of cultured meat production[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(14): 6117–6123.
- [5] BROUCKE K, van PAMEL E, van COILLIE E, et al. Cultured meat and challenges ahead: A review on nutritional, techno-functional and sensorial properties, safety and legislation[J]. Meat Science, 2023, 195: 109006.
- [6] SCAAL M, MARCELLE C. Chick muscle development[J]. The International Journal of Developmental Biology, 2018, 62(1–3): 127–136.
- [7] 孙孟君,熊昌武,陈颖雷,等.细胞培育肉研究现状、存在问题及发展对策浅析[J].食品与发酵工业,2025,51(4):401–408. [SUN Mengjun, XIONG Changwu, CHEN Yinglei, et al. Analysis of research status, existing problems, and development countermeasures of cell-cultured meat[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(4): 401–408.]
- [8] AHMAD S S, CHUN H J, AHMAD K, et al. The roles of growth factors and hormones in the regulation of muscle satellite cells for cultured meat production[J]. Journal of Animal Science and Technology, 2023, 65(1): 16–31.
- [9] PANG Yuesheng, WANG Sha, TAO Jiayue, et al. Mechanism of berberine hydrochloride interfering with biofilm formation of *Hafnia alvei*[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(2): 126.
- [10] LIU Qingyu, TANG Yongxue, JIANG Siyu, et al. Mechanisms of action of berberine hydrochloride in planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Pathogenesis, 2024, 193: 106774.
- [11] ZHU Lei, GU Peiqing, SHEN Hong. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats[J]. International Immunopharmacology, 2019, 68: 242–251.
- [12] TONG Jinjin, HOU Xiaolin, CUI Defeng, et al. A berberine hydrochloride-carboxymethyl chitosan hydrogel protects against *Staphylococcus aureus* infection in a rat mastitis model[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 278: 118910.
- [13] ZHAO Ruifang, TAN Pengfei, HAN Yanting, et al. Preparation and performance evaluation of antibacterial melt-spun polyurethane fiber loaded with berberine hydrochloride[J]. Polymers, 2021, 13(14): 2336.
- [14] YANG Lijun, HE Jiabei, JIANG Yu, et al. Berberine hydrochloride inhibits migration ability via increasing inducible NO synthase and peroxynitrite in HTR-8/SVneo cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 305: 116087.
- [15] CHEN Yi, LI Qi, ZHAO Shiwei, et al. Berberine protects mice against type 2 diabetes by promoting PPAR γ -FGF21-GLUT2-regulated insulin sensitivity and glucose/lipid homeostasis[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 218: 115928.
- [16] SHEN Si, QU Xiaobo, LIU Yinyin, et al. Evaluation of antioxidant activity and treatment of eczema by berberine hydrochloride-loaded liposomes-in-gel[J]. Molecules, 2024, 29(7): 1566.
- [17] REZAEIAN L, KHAKSARI M, RAFAIEE R, et al. Neuroprotective effects of berberine hydrochloride on methamphetamine-induced cognitive dysfunction: Immunohistochemical and behavioral studies in rats[J]. Basic and Clinical Neuroscience, 2022, 13(4): 443–453.
- [18] ZOU Zongyao, HU Yinran, MA Hang, et al. Epiberberine reduces serum cholesterol in diet-induced dyslipidemia Syrian golden hamsters via network pathways involving cholesterol metabolism[J]. European Journal of Pharmacology, 2016, 774: 1–9.
- [19] CHENG Zhongyao, LIU Siyu, WU Xinyi, et al. Autologous erythrocytes delivery of berberine hydrochloride with long-acting effect for hypolipidemia treatment[J]. Drug Delivery, 2020, 27(1): 283–291.
- [20] DOGGRELL S A. Berberine—a novel approach to cholesterol lowering[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2005, 14(5): 683–685.
- [21] GE Yuebin, ZHANG Yan, LI Rui, et al. Berberine regulated Gck, G6pc, Pck1 and Srebp-1c expression and activated AMP-activated protein kinase in primary rat hepatocytes[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(5): 673–684.
- [22] 王志红,林菁.盐酸小檗碱对HL-60细胞的诱导分化及其作用机制[J].中国药科大学学报,2006,37(2):165–168. [WANG Zhihong, LIN Jing. Effect of berberine hydrochloride on differentiation of HL-60 cells and study of its mechanism[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2006, 37(2): 165–168.]
- [23] WANG Jin, WANG Lin, LOU Guanhua, et al. Coptidis Rhizoma: A comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 193–225.
- [24] FU Siyuan, YI Xuan, LI Yi, et al. Berberine and chlorogenic acid-assembled nanoparticles for highly efficient inhibition of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 473: 134680.
- [25] DANOUN S, BALAYSSAC S, GILARD V, et al. Quality evaluation of berberine food supplements with high-field and compact 1H NMR spectrometers[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023, 223: 115161.
- [26] 杨朝永,陈若楠,张若彤,等. gga-miR-3594-3p 靶向 APOBEC2 调控鸡成肌细胞增殖和分化的研究[J].中国畜牧杂

- 志, 2025, 61(4): 181–191. [YANG Chaoyong, CHEN Ruonan, ZHANG Ruotong, et al. Study on gga-miR-3594-3p targeting APOBEC2 to regulate the proliferation and differentiation of chicken myoblasts[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2025, 61(4): 181–191.]
- [27] HALEVY O, PIESTUN Y, ALLOUH M Z, et al. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal[J]. Developmental Dynamics, 2004, 231(3): 489–502.
- [28] LI Jie, LIU Fang, JIANG Shulong, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways[J]. Oncology Letters, 2018, 15(5): 7409–7414.
- [29] LI Hongli, WU Hui, ZHANG Beibei, et al. MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion *in vitro* and *in vivo*[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(2): 1430–1438.
- [30] 田华, 付小卫, 王晖. 盐酸小檗碱对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡、自噬及 MAPK 通路影响的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(27): 2981–2986. [TIAN Hua, FU Xiaowei, WANG Hui. Study on the effect of berberine hydrochloride on the proliferation, apoptosis, autophagy and MAPK pathway of gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2021, 30(27): 2981–2986.]
- [31] BAUR J A, PEARSON K J, PRICE N L, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet[J]. Nature, 2006, 444(7117): 337–342.
- [32] ABADI A J, MIRZAEI S, MAHABADY M K, et al. Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects[J]. Phytotherapy Research, 2022, 36(1): 189–213.
- [33] WANG Lu, ZHENG Weiyun, MEN Qiuyue, et al. Curcumin-loaded polysaccharide microparticles alleviated DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal microecology and regulating MAPK/NF- κ B/Nrf2/NLRP3 pathways[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 136687.
- [34] 蔡晓东, 刘树迎, 林宁, 等. 盐酸小檗碱通过抑制 PKC α 磷酸化抑制机械牵张力诱导的血管平滑肌细胞增殖和凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(6): 466–472. [CAI Xiaodong, LIU Shuying, LIN Ning, et al. Berberine inhibits proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell induced by mechanical stretch stress via inhibition of PKC α phosphorylation[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2023, 31(6): 466–472.]
- [35] 陈志冬, 唐坎凯, 刘凤琪, 等. 盐酸小檗碱对心肌肥厚大鼠心肌细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. 现代实用医学, 2020, 32(9): 1044–1048, 1018. [CHEN Zhidong, TANG Kankai, LIU Fengqi, et al. Effects of berberine hydrochloride on the proliferation and apoptosis of cardiomyocytes in rats with cardiac hypertrophy and its mechanism[J]. Modern Practical Medicine, 2020, 32(9): 1044–1048, 1018.]
- [36] CAPETANAKI Y. Desmin cytoskeleton a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 2002, 12(8): 339–348.
- [37] AGNETTI G, HERRMANN H, COHEN S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis[J]. The FEBS Journal, 2022, 289(10): 2755–2770.
- [38] HNIA K, RAMSPACHER C, VERMOT J, et al. Desmin in muscle and associated diseases: Beyond the structural function[J]. Cell and Tissue Research, 2015, 360(3): 591–608.
- [39] ZAMMIT P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 72: 19–32.
- [40] POWNALL M E, GUSTAFSSON M K, EMERSON C P Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2002, 18: 747–783.
- [41] SHI Linlin, ZHU Kecheng, WANG Huanling. Characterization of myogenic regulatory factors, myod and myf5 from *Megalobrama amblycephala* and the effect of lipopolysaccharide on satellite cells in skeletal muscle[J]. Gene, 2022, 834: 146608.
- [42] WANG Honglian, WANG Li, ZHAO Changying, et al. Role of TGF- β signaling in beta cell proliferation and function in diabetes[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 373.
- [43] DENG Ziqin, FAN Tao, XIAO Chu, et al. TGF- β signaling in health, disease and therapeutics[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9: 61.
- [44] XIE Zhuo, ZHOU Gaoshi, ZHANG Mudan, et al. Recent developments on BMPs and their antagonists in inflammatory bowel diseases[J]. Cell Death Discovery, 2023, 9: 210.
- [45] UEKI Y, REH T A. Activation of BMP-Smad1/5/8 signaling promotes survival of retinal ganglion cells after damage *in vivo*[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38690.
- [46] ABU-ELMAGD M, ROBSON L, SWEETMAN D, et al. Wnt/Lef1 signaling acts via Pitx2 to regulate somite myogenesis[J]. Developmental Biology, 2010, 337(2): 211–219.
- [47] KEMP P R, METCALFE J C, GRAINGER D J. ID-A dominant negative regulator of skeletal muscle differentiation: Is not involved in maturation or differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. FEBS Letters, 1995, 368(1): 81–86.
- [48] VERNEROVÁ L, HORVÁTHOVÁ V, KROPÁČKOVÁ T, et al. Alterations in activin A-myostatin-follistatin system associate with disease activity in inflammatory myopathies[J]. Rheumatology, 2020, 59(9): 2491–2501.
- [49] TRIPATHI S, MIYAKE T, MCDERMOTT J C. Smad7: β -catenin complex regulates myogenic gene transcription[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10: 387.
- [50] LOVETT F A, COSGROVE R A, GONZALEZ I, et al. Essential role for p38 α MAPK but not p38 γ MAPK in Igf2 expression and myoblast differentiation[J]. Endocrinology, 2010, 151(9): 4368–4380.
- [51] MA Lu, MENG Yingying, AN Yalong, et al. Single-cell RNA-seq reveals novel interaction between muscle satellite cells and fibro-adipogenic progenitors mediated with FGF7 signalling[J]. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2024, 15(4): 1388–1403.
- [52] ALMADA A E, HORWITZ N, PRICE F D, et al. FOS licenses early events in stem cell activation driving skeletal muscle regeneration[J]. Cell Reports, 2021, 34(4): 108656.
- [53] RADA C C, MEJIA-PENA H, GRIMSEY N J, et al. Heat shock protein 27 activity is linked to endothelial barrier recovery after proinflammatory GPCR-induced disruption[J]. Science Signaling, 2021, 14(698): eabc1044.
- [54] KESSI M, CHEN B Y, PENG J, et al. Calcium channelopathies and intellectual disability: A systematic review[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2021, 16(1): 219.