



梅花鹿鹿茸干细胞共培养对人皮肤成纤维细胞 抗衰老影响及其蛋白组学研究

李雄智, 刘 振, 胡 肖, 张 迪, 黄 聪, 周李生, 孙伟丽, 刘可园, 赵海平*

(青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109)

摘 要: 旨在探索梅花鹿鹿茸干细胞(reserve mesenchyme cells, RMCs)对过氧化氢诱导衰老的人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDFs)的抗衰老作用及分子机制。本研究采用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理构建HDFs衰老模型, 并通过SA- β -gal染色验证模型成功建立, 通过与RMCs共培养后, 检测衰老HDFs的细胞增殖与迁移能力、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量; 进一步利用4D-DIA蛋白质组学技术, 鉴定共培养条件培养基与衰老HDFs条件培养基中的差异蛋白, 并进行生物信息学富集分析。细胞功能检测表明, 与模型组相比, RMCs共培养组HDFs的增殖与迁移能力显著提高($P < 0.01$), 同时SOD活性显著提高($P < 0.05$), MDA含量降低($P < 0.05$)。在共培养条件培养基中鉴定289种差异蛋白, 其中ATP1A1、COL7A1、IGF2R及MMP3等关键分子的表达发生显著改变。KEGG富集分析揭示蛋白酶体、PPAR信号通路、细胞外基质-受体相互作用及粘着斑通路为主要调控轴。本研究结果提示, 梅花鹿RMCs可通过减轻氧化应激改善衰老细胞功能, 推测RMCs可能通过增强蛋白酶体介导的损伤蛋白清除、激活PPAR γ 抑制炎症与氧化应激, 促进COL7A1-依赖的真皮-表皮连接重建与抑制MMP3介导的ECM降解, 共同维护HDFs的稳态与功能。本研究为鹿茸干细胞分泌产物的皮肤抗衰老策略提供了理论基础。

关键词: 鹿茸干细胞; 人皮肤成纤维细胞; 细胞共培养; 抗衰老; 条件培养基; 蛋白质组学

中图分类号: S825.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0769-11

Effects of Sika Deer Velvet Antler Stem Cell Co-culture on Anti-aging in Human Dermal Fibroblasts and a Proteomic Study

LI Xiongzhì, LIU Zhen, HU Xiao, ZHANG Di, HUANG Cong, ZHOU Lisheng, SUN Weili,
LIU Keyuan, ZHAO Haiping*

(College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: This study aimed to investigate the anti-aging effects and underlying molecular mechanisms of reserve mesenchyme cells (RMCs) derived from the velvet antler of the sika deer on hydrogen peroxide-induced senescent human dermal fibroblasts (HDFs). An HDF senescence model was established by treatment with $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ and confirmed via SA- β -galactosidase staining. Senescent HDFs were then co-cultured with RMCs, and subsequent assays evaluated cell proliferation, migration, superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content. The 4D-DIA proteomics technology was used to identify differential proteins between co-

收稿日期: 2025-07-18

基金项目: 青岛农业大学高层次人才引进项目(1121009); 山东省现代农业产业技术体系特种经济动物产业技术体系项目(SDAIT-21-23); 青岛市关键技术攻关及产业化示范类项目(23-1-4-xxgg-21-nsh)

作者简介: 李雄智, 硕士生, 主要从事特种经济动物研究, E-mail: xiongzhì8670@163.com

* 通信作者: 赵海平, 主要从事特种动物干细胞研究, E-mail: zhperic@163.com

culture medium and senescent HDF medium, and bioinformatics enrichment analysis was performed. Functional analyses revealed that, compared with the model group, RMCs co-culture significantly enhanced HDFs proliferation and migration ($P < 0.01$), increased SOD activity ($P < 0.05$), and decreased MDA levels ($P < 0.05$). Using 4D-DIA proteomics, 289 differentially expressed proteins were identified in the conditioned media of the co-culture versus senescent HDF alone, with key molecules such as ATP1A1, COL7A1, IGF2R, and MMP3 showing significant expression changes. KEGG enrichment analysis highlighted the proteasome, PPAR signaling pathway, extracellular matrix-receptor interaction, and focal adhesion pathways as principal regulatory axes. These findings suggest that velvet-antler-derived RMCs from the sika deer alleviate oxidative stress-induced dysfunction in senescent HDFs. It was speculated that RMCs may exert their effects by enhancing proteasome-mediated clearance of damaged proteins, activating PPAR γ to suppress inflammation and oxidative stress, promoting COL7A1-dependent dermal-epidermal junction reconstruction, and inhibiting MMP3-mediated extracellular matrix degradation, thus maintaining HDF homeostasis and function. This work provides experimental evidence and a theoretical foundation for developing deer antler-derived secretome-based strategies for skin anti-aging.

Keywords: antler stem cells; human dermal fibroblasts; cell co-culture; anti-aging; conditioned medium; proteomics

* **Corresponding author:** ZHAO Haiping, E-mail: zhperic@163.com

鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官,鹿茸形成区干细胞的增殖驱动了该过程的发生,鹿茸干细胞具有极强的再生潜能^[1-3],近年来成为组织工程与抗衰老研究的热点。鹿茸是鹿类动物的一种快速生长的动物组织^[4-5],驱动鹿茸快速生长的储备间充质细胞(reserve mesenchyme cells, RMCs)是鹿茸干细胞(antler stem cells, ASCs)的一种^[6-7]。ASCs能分泌丰富的生长因子和细胞因子,参与组织修复与抗衰老过程。多项研究表明,ASCs条件培养(conditioned medium, CM)上清中含有VEGF、EGF、TGF- β 等活性分子,可促进伤口愈合与骨组织再生,并通过旁分泌小泡调节受体细胞的再生程序^[8]。SFRP4、LUM等再生调控蛋白在ASC条件培养液中高丰度表达,提示其分泌产物可通过Wnt和TGF- β 信号通路促进组织再生^[9]。这些研究提示ASCs分泌丰富的细胞因子,可通过调节旁分泌发挥再生、抗氧化和抗衰老作用。

皮肤衰老是内源性因素与紫外线、污染等引起的外源性因素共同作用的结果,主要表现为真皮厚度减少、皱纹增多、弹性下降与屏障功能受损^[10]。人类真皮层中的成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDFs)是合成胶原蛋白、弹性蛋白及其他细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要细胞^[11]。随着年龄增长或氧化应激增高, HDFs的增

殖能力下降、细胞骨架重组出现障碍,并分泌促炎因子和降解酶(如MMPs),形成衰老相关分泌表型(SASP),从而加速ECM降解并导致皮肤松弛^[11]。因此,成纤维细胞衰老导致的功能失调是皮肤衰老的关键驱动因素之一。

为探究鹿茸干细胞对皮肤衰老的影响,本研究构建了HDFs衰老模型,并将RMCs与衰老HDFs进行共培养,以模拟细胞间的旁分泌和接触依赖性信号传递,揭示RMCs对衰老HDFs的功能调控。同时,结合4D-DIA蛋白质组学技术,检测共培养组与仅衰老HDFs组条件培养基中蛋白表达的差异,并进一步分析相关的信号通路及生物学过程,旨在系统阐明鹿茸干细胞对衰老的人类皮肤成纤维细胞的抗衰老作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

HDFs细胞系来源于中国科学院动物研究所国家干细胞资源库;采集4岁雄性梅花鹿(*Cervus nippon*)15~20 d二杠茸,按照孙红梅等^[12]的方法培养RMCs细胞系用于后续试验。均于完全培养基(DMEM+10%胎牛血清+1%双抗)中,37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂

胎牛血清(FBS)、二甲基亚砷(DMSO)和过氧化氢(H_2O_2)均购于默克生命科学公司;DMEM基础培养基、青霉素-链霉素溶液($100\times$,双抗)均购于赛默飞世尔科技公司;胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)和维生素C(Vc)均购于北京索莱宝科技有限公司;细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、细胞计数试剂盒-8(CCK-8, WST-8法)、Western及IP细胞裂解液、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(TBA法)均购自上海碧云天生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(WST-8法)购自苏州格锐锐思生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 HDFs衰老模型建立 按照潘长伟等^[13]的方法建立HDFs细胞衰老模型。具体操作为:P3代HDFs细胞按每孔 1×10^5 个细胞的细胞密度接种于12孔板中,放置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养24 h。弃去培养基后,空白组每孔加入1 mL无血清培养基,模型组每孔加入1 mL含 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 的无血清培养基处理1 h,处理结束后用无血清培养基洗2次去除 H_2O_2 并加入DMEM完全培养基持续培养。处理后在48、96 h进行衰老表型鉴定,每组3个平行样,进行 β -半乳糖苷酶染色法检测HDFs衰老模型是否成功建立。

1.3.2 β -半乳糖苷酶染色法检测HDFs细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试验分组同“1.3.1”分组一样。吸弃培养基经PBS洗两次,加入 $500\ \mu\text{L}$ β -半乳糖苷酶染色固定液室温固定15 min,吸弃染色固定液后用PBS洗3次,然后用 $500\ \mu\text{L}$ 染色工作液 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵育过夜,PBS洗涤后,倒置显微镜下对HDF细胞拍照计数,衰老细胞比例=(染色阳性细胞数/所计总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.3.3 试验分组 将试验细胞分为4组,每组3个重复:①空白组(无血清DMEM培养的HDFs);②模型组($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 处理1 h后的HDFs用无血清DMEM培养);③Vc处理组($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 处理1 h后的HDFs+维生素C溶于无血清DMEM,终浓度 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);④共培养组($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 处理1 h后的HDFs+RMCs用无血清DMEM共培养)。共培养采用 $0.4\ \mu\text{m}$ 孔径Transwell小室间接共培养,HDFs于Transwell小室的下室经 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 1 h处理后,将RMCs加入Transwell小室的上室中,共培养比例为

HDF:RM=3:1。

1.3.4 Transwell共培养形态学观察 采用 $0.4\ \mu\text{m}$ 孔径的Transwell小室在12孔板中建立间接共培养体系,下室接种HDFs,上室接种RMCs。共培养48 h后进行形态学记录:先弃去培养基并以PBS清洗2次;下室细胞用 4% 多聚甲醛室温固定10 min,取出上室(insert上膜面)细胞用 4% 多聚甲醛固定30 min;固定后用PBS洗涤2次并分别用结晶紫进行染色(下室、上室染色时间均为10 min),随后用蒸馏水洗去多余染液并自然晾干,显微观察。

1.3.5 CCK-8检测HDFs细胞增殖 HDFs接种于12孔板(每孔 1×10^4 个细胞),孵育24 h后按“1.3.3”试验分组各自处理方案培养,使用CCK-8试剂盒检测细胞活力。分组处理后,分别于0、24、48、72和96 h向相应的孔中加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8试剂,孵育1 h后于450 nm波长下测定吸光度(OD值)。以第0 h吸光度为基准,计算相对增殖情况。

1.3.6 细胞划痕试验 HDFs接种于12孔板(每孔 1×10^5 个细胞)培养至90%融合,用无菌移液器尖端在细胞单层上垂直画直线划痕,PBS洗2次去除细胞碎片后,按“1.3.3”试验分组各自处理方案培养。分组处理后,记录划痕0、72 h的显微镜图像,使用ImageJ软件测量划痕宽度,计算愈合率。

1.3.7 氧化应激指标检测 超氧化物歧化酶(SOD):HDFs接种于12孔板(每孔 5×10^4 个细胞),孵育24 h后按“1.3.3”试验分组处理48 h后,收集各试验分组中的HDFs到离心管内进行细胞SOD的指标检测, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心弃上清,加入1 mL提取液在 4°C 超声破碎, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\ 4^\circ\text{C}$ 离心10 min,取上清于冰上待测。严格按照SOD活性检测试剂盒说明书操作后,用酶标仪于450 nm处测定各管吸光值。丙二醛(MDA):HDFs接种于12孔板(每孔 5×10^4 个细胞),孵育24 h后按“1.3.3”试验分组处理48 h后,收集各试验分组中的HDFs到离心管内进行细胞的MDA的指标检测, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心弃上清,加入1 mL提取液, $150\ \mu\text{L}$ 细胞裂解液裂解细胞, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\ 4^\circ\text{C}$ 离心10 min,取上清待测。严格按照MDA含量检测试剂盒说明书操作后,用酶标仪于532 nm处测定各管吸光值。

1.3.8 统计学处理 利用GraphPad Prism软件分析数据。结果以“平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)”表示,组间差异采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA)进行比较,两组间差异采用独立样本 t 检

验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

1.4 蛋白质组学分析

1.4.1 蛋白质提取与质量控制 将“1.3.3”试验分组中的模型组和共培养组培养 48 h 的条件培养基上清液体收集, 4°C 、 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, -20°C 保存。培养基上清中蛋白首先用 SDT 裂解液 (4% SDS, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.6) 提取, BCA 法 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 定量后取 $20\text{ }\mu\text{g}$ 上样, 4%~20% 梯度 SDS-PAGE (180 V, 45 min) 并以考马斯亮蓝 R-250 染色, 确认蛋白条带完整。随后在 56°C 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 还原 1.5 h, 加入 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 在室温避光中烷基化 30 min; 用胰蛋白酶 (酶:底物=1:50) 37°C 消化 15~18 h。消化产物经 MCX 脱盐 (OmniSolution, OS-MCX-1ML)、真空浓缩后重悬于 0.1% 甲酸水中, 掺入 iRT 肽进行保留时间校正; 所有样品上机前均做小型 LC-MS/MS 检测, 确保肽段丰度与消化效率一致, 剔除潜在离群点。

1.4.2 数据处理 消化肽在 Evosep One 系统上进行纳升流速色谱分离, Bruker timsTOF 质谱仪以 DIA 模式 ($100\sim 1\,700\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$, 4 个 TIMS 窗口均 100 ms, PASEF 碎裂能 20~59 eV) 采集原始数据。DIA 数据用 Spectronaut 19 (Biognosys, Zürich, Switzerland) 处理, 参数: dynamic iRT、MS2 干扰校正、cross-run normalization 开启; 允许 2 个 missed cleavages; 固定修饰 Carbamidomethyl (C), 可变修饰 Oxidation (M)、Acetyl (Protein N-term); Q Value cutoff = 0.01 (FDR < 1%)。对蛋白定量强度值加 1 后取 $\log_2$ 并进行 Z-score 标准化, 随后使用 Python 3.9 (scikit-learn 1.2) 对两组共 6 个样本进行主成分分析 (PCA), 随后以 $\text{FC} > 1.5$ 或 < 0.67 且 $P < 0.05$ 为阈值筛选差异蛋白。

1.4.3 差异表达蛋白的功能分析 为了解这些差异表达蛋白在生物学过程中的富集情况, 对筛得的差异蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 采用 Fisher 精确检验 ($P < 0.05$) 筛选 BP、MF、CC 三大分类下显著条目; KEGG 通过对差异蛋白在 7 大通路类别 (细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、代谢、有机系统、药物开发) 中的富集程度绘制气泡图。

2 结果

2.1 成功构建 HDFs 衰老模型

为建立氧化应激诱导的衰老模型, 在 H_2O_2 处理后的 48 与 96 h 进行了 β -半乳糖苷酶染色, 染色结果显示, H_2O_2 促进 HDFs 衰老, 与各自空白组相比, 在 48 与 96 h 的模型组阳性着色细胞数均极显著增加 ($P < 0.01$), 表明 HDFs 经 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理 1 h 后可形成稳定的衰老表型, 见图 1。

2.2 Transwell 共培养细胞形态观察

为说明采用的间接共培养体系, 图 2 给出 12 孔板 Transwell 小室的上下室细胞的结晶紫染色显微照片。示意图显示下室种植 HDFs、上室 (insert) 种植 RMCs, 膜孔径为 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 。图 2A、B 分别为下室 HDF 与上室 RMCs (取出 insert 后在膜面拍摄) 的代表视野。共培养为间接、经膜分泌物交流的体系, 后续功能学变化均基于此体系下的间接交互。

2.3 RMCs 共培养对衰老 HDFs 细胞增殖与迁移功能的影响

CCK-8 结果显示, 处理 72 h 以前, 除空白组外, 各组无显著差异。处理 96 h, 相对空白组, 模型组衰老 HDFs 增殖能力极显著减弱 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Vc 组和共培养组均极显著促进衰老 HDFs 增殖 ($P < 0.01$), 见图 3A。

划痕试验结果表明, 划痕 72 h 后, 相比空白组, 模型组衰老 HDFs 迁移能力极显著减弱 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Vc 组和共培养组均极显著促进衰老 HDFs 划痕愈合 ($P < 0.01$), 见图 3B。

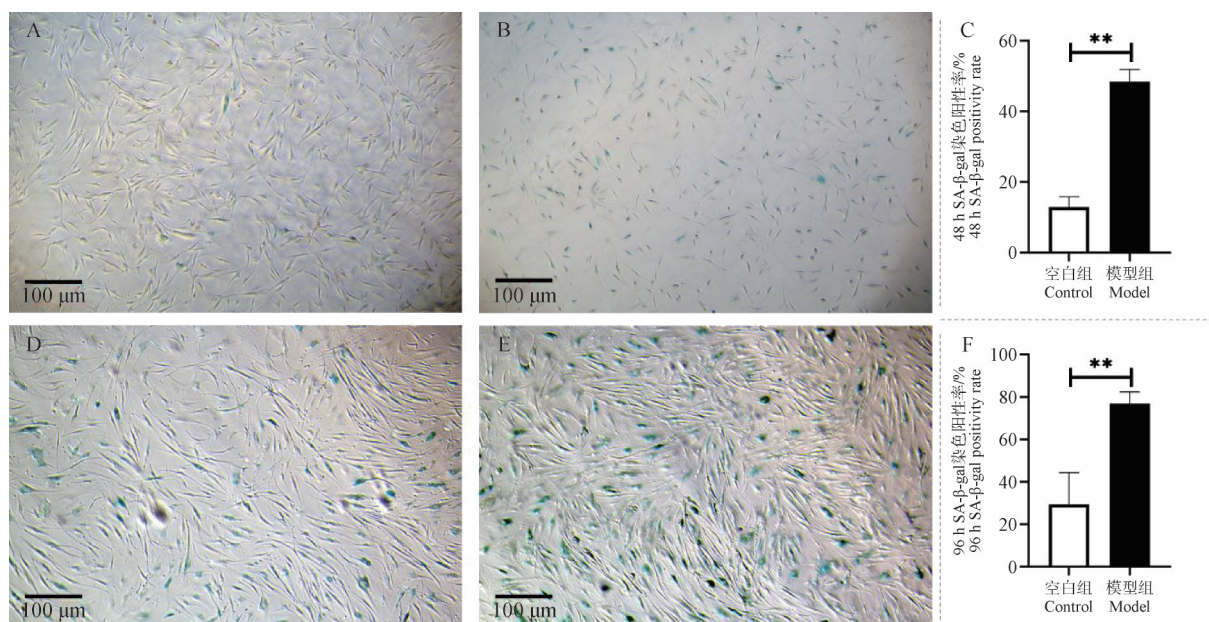
2.4 RMCs 共培养对衰老 HDFs 细胞内氧化应激指标的影响

SOD 检测结果显示, 相比模型组, 空白组与 Vc 组 SOD 活力极显著升高 ($P < 0.01$); 相比模型组, 共培养组 SOD 活力显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4A。

MDA 检测结果显示: 相比模型组, 空白组与 Vc 组 MDA 含量极显著降低 ($P < 0.01$); 相比模型组, 共培养组 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 4B。

2.5 差异表达蛋白定量分析

对处理后 48 h 的条件培养基上清进行 4D-DIA 蛋白组学分析, 共鉴定并定量蛋白 2 037 个, 前两主成分清晰区分两组且组内聚合, 支持数据质量与组间差异 (图 5A); 在两组不同处理的条件培养基蛋白组中, 共筛选出 289 个差异表达蛋白, 其中 78 个上调表达、211 个下调表达 (图 5B); 绘制了火山图来展示

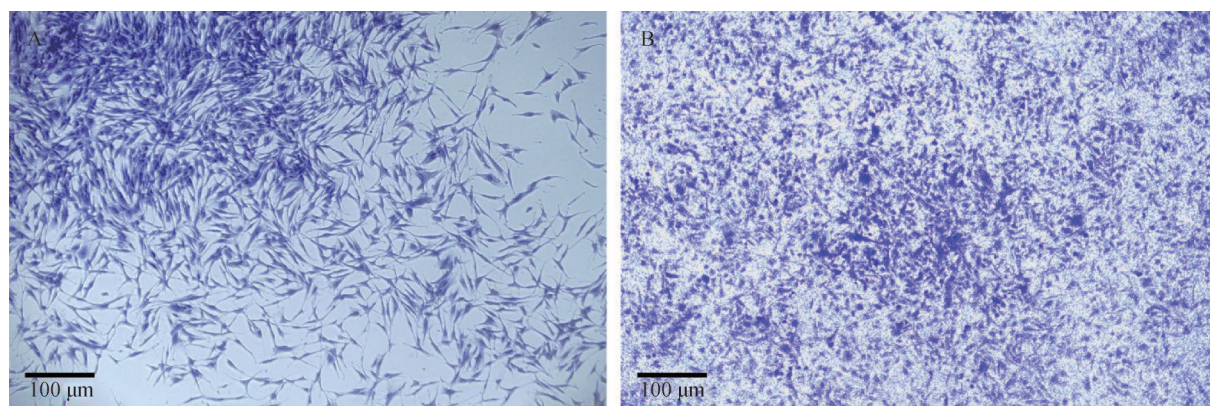


A. 48 h空白组HDF细胞;B. 48 h模型组HDFs细胞;C. 48 h β -半乳糖苷酶染色阳性率;D. 96 h空白组HDF细胞;E. 96 h模型组HDFs细胞;F. 96 h β -半乳糖苷酶染色阳性率。**. $P < 0.01$,下同

A. Blank group HDF cells for 48 h; B. Model group HDF cells for 48 h; C. SA- β -gal staining positivity rate for 48 h; D. Blank group HDF cells for 96 h; E. Model group HDF cells for 96 h; F. SA- β -gal staining positivity rate for 96 h. **. $P < 0.01$, the same as below

图1 β -半乳糖苷酶染色

Fig. 1 β -galactosidase staining



A. 下室HDFs培养图;B. 上室RMCs培养图

A. HDFs in the lower chamber; B. RMCs on the upper chamber

图2 共培养细胞图

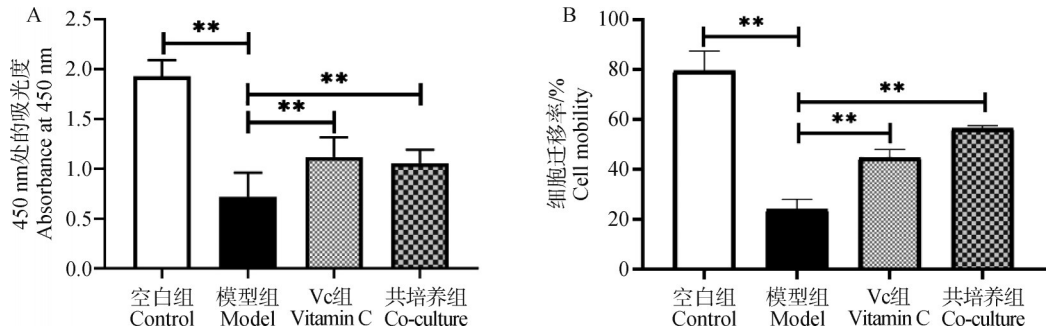
Fig. 2 Co-culture cell images

详细情况(图5C);与抗衰老相关具有代表性的蛋白有ATP1A1、COL7A1、IGF2R、IGFBP3、MMP3(蛋白缩写对应的描述详见表1)。

2.6 差异表达蛋白的GO功能注释

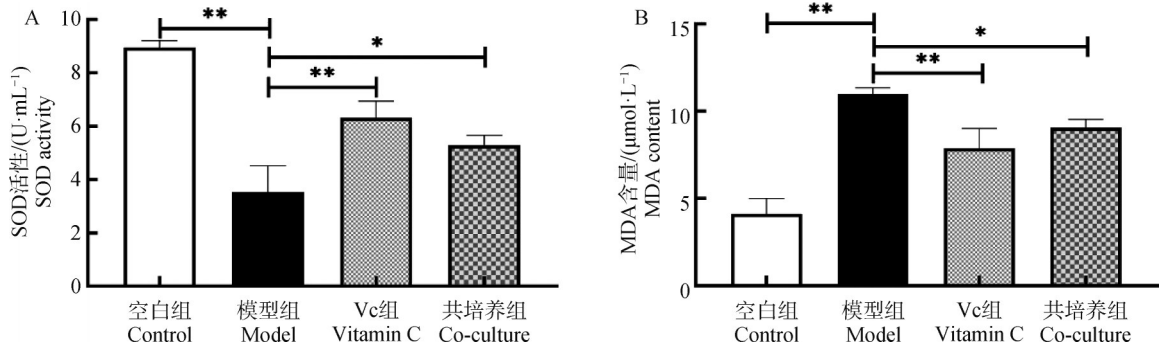
对两组比对发现的289个差异蛋白进行GO分析,结果涉及10种分子功能(molecular function, MF)、2种细胞组分(cellular component, CC)、10种

生物学过程(biological process, BP)(图5D)。在分子功能(MF)分类中,结合过程涉及蛋白164个、分子功能调节因子活性(45个)、结构分子活性(22个)、分子传感器活性(14个)和转运体活性(11个)等;在细胞组成(CC)分类中,细胞解剖结构实体涉及蛋白249个,蛋白质复合物(60个),提示差异蛋白广泛分布于多种细胞结构与复合体中;在生物过程(BP)分类



A. 增殖能力;B. 迁移能力
A. Proliferative capacity; B. Migratory capacity
图3 不同组处理对人皮肤成纤维细胞的增殖与迁移功能的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on the proliferation and migration of human dermal fibroblasts



A. SOD活力;B. MDA含量。与模型组相比,*表示 $P<0.05$
A. SOD activity; B. MDA content. Compared with model group, * indicate $P<0.05$
图4 不同组处理对人皮肤成纤维细胞内SOD活力和MDA含量的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on intracellular SOD activity and MDA content in human dermal fibroblasts

表1 与抗衰老相关的差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins associated with anti-aging

名称缩写 Abbreviation	名称或注释 Name or annotation	变化倍数 Fold Change	P值 P value
ATP1A1	钠/钾转运ATP酶亚基α-1	3.593 4	0.038 1
COL7A1	Ⅶ型胶原蛋白α-1链	2.549 4	0.039 8
IGF2R	胰岛素样生长因子2受体	0.586 0	0.000 8
IGFBP3	胰岛素样生长因子结合蛋白3	0.349 3	0.020 1
MMP3	基质金属蛋白酶3	0.268 0	0.028 7

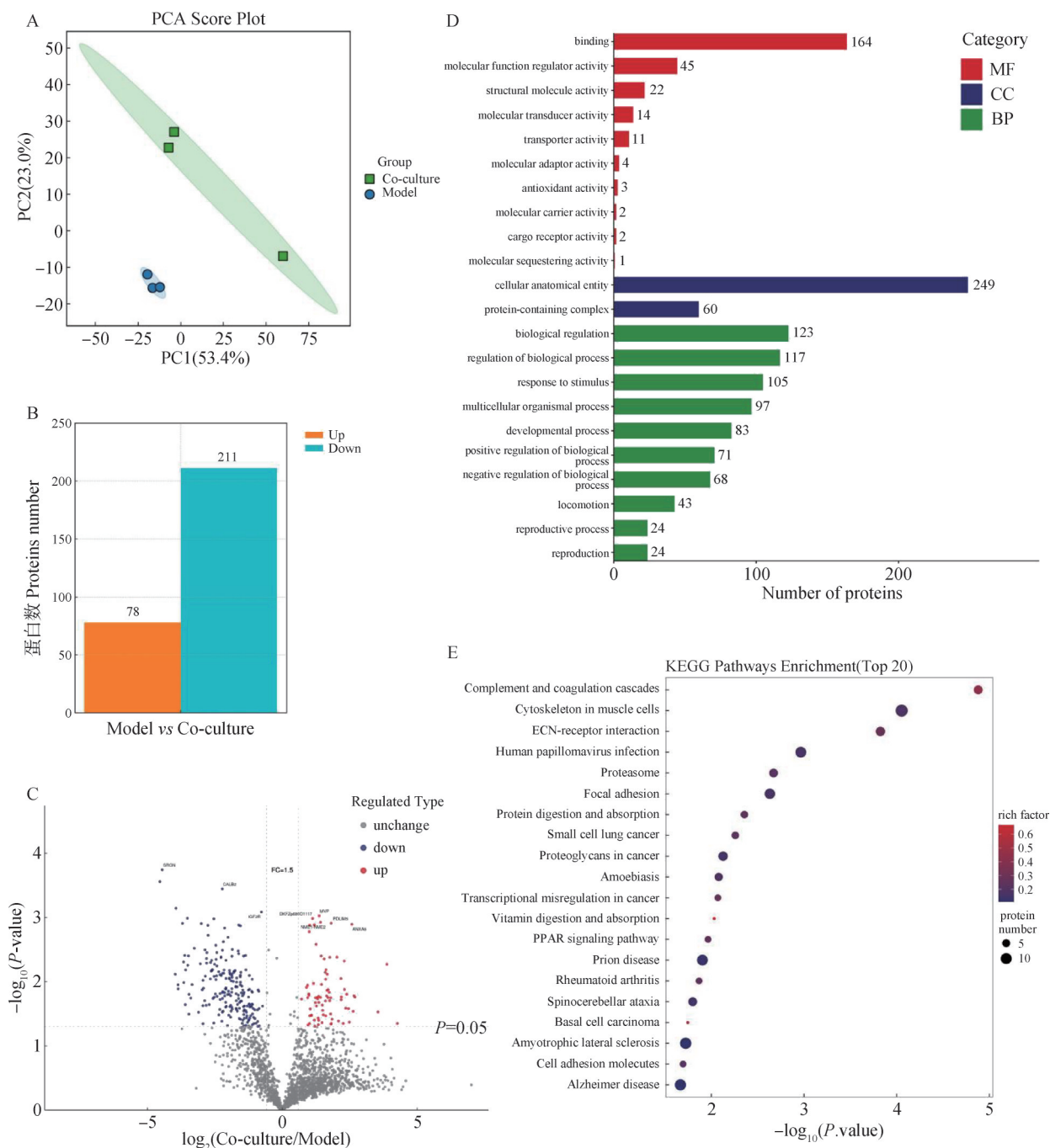
中,生物调节涉及蛋白123个、生物过程调节(117个)、响应刺激(105个)、多细胞有机体过程(97个)、发育过程(83个)等。

2.7 差异表达蛋白的KEGG通路注释与富集分析

对两组比对发现的差异表达蛋白进行KEGG通路分析,其中显著富集排名前20位的有补体和凝血级联、肌肉细胞骨架、ECM-受体相互作用、人乳头瘤病毒感染和蛋白酶体等通路(图5E),与抗衰老相关的信号通路有4条(表2)。

3 讨论

本研究通过过氧化氢构建人皮肤成纤维细胞(HDFs)的衰老模型,探究鹿茸干细胞(RMCs)与衰老HDFs共培养对衰老HDFs的抗衰老作用。结果显示,与衰老HDFs模型组相比,RMCs与衰老HDFs共培养后,HDFs的增殖能力和迁移能力显著增强,表明RMCs促进了HDFs的细胞活性。推测可能是RMCs通过分泌生长因子、细胞因子或外泌



A. 主成分分析; B. 上、下调差异表达蛋白质统计; C. 差异表达蛋白质火山图; D. 差异表达蛋白 GO 功能注释; E. 差异表达蛋白 KEGG 富集分析(前 20 名)

A. PCA; B. Statistics of up-regulated and down-regulated differentially expressed proteins; C. Volcano plot of differentially expressed proteins; D. GO functional annotation of differentially expressed proteins; E. KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins (top 20)

图 5 蛋白组差异表达分析

Fig. 5 Differential expression analysis of proteins

体等旁分泌产物来调节 HDFs 的功能。已有研究表明,鹿茸干细胞及其分泌的外泌体可以被成纤维细胞摄取,进而促进其迁移、增殖和胶原合成^[14-15]。同

时,与模型组相比,共培养组 HDFs 的超氧化物歧化酶(SOD)活力显著升高,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量显著降低,表明 RMCs 提高了 HDFs 的

表2 抗衰老相关差异表达蛋白的信号通路分析

Table 2 Signaling pathway analysis of anti-aging associated differentially expressed proteins

通路ID Pathway ID	通路名称 Pathway name	与该通路相关的差异蛋白的数目 Number of differential proteins associated with the pathway	P 值 P value	代表性蛋白质 Typical protein
hsa03050	蛋白酶体 Proteasome	7	0.002 1	PSMB2、PSMA3
hsa03320	PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	4	0.010 8	APOA1、ME1
hsa04512	细胞外基质受体相互作用 ECM-receptor interaction	8	0.000 1	COL1A1、COL6A1
hsa04510	粘着斑 Focal adhesion	10	0.002 3	ACTN4、FLNA

抗氧化能力。这与鹿茸干细胞来源的分泌物具有清除自由基的效应一致,鹿茸干细胞的条件培养基富含细胞因子、微小核糖核酸等,能够有效清除 DPPH 自由基,并促进人角质形成细胞和真皮成纤维细胞增殖^[15-17]。此外,间充质干细胞来源的细胞培养基能够降低活性氧(ROS)的生成和基质金属蛋白酶(MMP)水平,并上调HDFs中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的表达,在氧化应激条件下保护I型胶原蛋白合成,从而起到延缓皮肤老化的目的^[18-19],这与本研究结果RMCs与衰老HDFs共培养组抗氧化能力增强相符。因此,RMCs可能通过分泌细胞因子或外泌体等,激活HDFs的信号通路,不仅促进细胞增殖和迁移,而且增强其抵抗氧化和修复损伤的能力,从而起到抗衰老作用。

本研究收集了衰老HDFs的培养基上清及RMCs与衰老HDFs共培养组的培养基上清,进行蛋白质组学分析,共鉴定出289个差异蛋白(涉及ATP1A1、COL7A1、IGF2R、MMP3等关键分子)。ATP1A1编码钠/钾泵(Na^+/K^+ -ATP酶)的 $\alpha 1$ 亚基,该蛋白对维持细胞离子平衡和能量代谢至关重要^[20]。在衰老的人源成纤维细胞和神经细胞中, Na^+/K^+ -ATP酶活性显著降低,导致离子稳态紊乱和膜电位部分去极化,进而触发DNA损伤反应并引起细胞周期停滞,促进细胞衰老^[21]。共培养组ATP1A1上调可能是RMCs增强了衰老的HDFs的 Na^+/K^+ -ATP酶活性,进而抑制细胞衰老;COL7A1编码Ⅶ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链,是真皮—表皮结合部位锚定纤维的关键成分,有利于重建真皮—表皮连接并改善皮肤结构^[22]。在人皮肤成纤维细胞中,过表达COL7A1可上调真皮—表皮连接区相关基因及抗氧化应答因子,改善衰老成纤维细胞的

形态和迁移能力,并抑制SA- β -gal染色,且COL7A1表达增强还能改善皮肤屏障功能、降低氧化应激标志物,并通过多条衰老相关信号通路(如TGF- β 、Wnt)协同作用,从而显著延缓组织衰老^[23-24]。共培养组中COL7A1上调,推测RMCs增加了衰老HDFs中该锚定纤维蛋白的表达量,进而增强细胞外基质(ECM)的合成、改善细胞形态,降低氧化应激并延缓细胞衰老;IGF2R是胰岛素生长因子2受体,在人源成纤维细胞的多代连续传代中,IGF2R表达水平与细胞倍增数呈正相关,并伴随衰老标志物(SA- β -gal、p21/p53)升高,表明IGF2R随复制性衰老上调^[25]。共培养组IGF2R下调可能反映RMCs延缓了衰老HDFs的衰老表型;MMP3为一种基质金属蛋白酶,在人和小鼠成纤维细胞的衰老模型中显著上调,促进ECM的降解与重塑,形成促炎和促纤维化的衰老相关分泌表型(SASP),加剧组织老化^[26-27]。共培养组中MMP3下调,提示RMCs可能减少了衰老HDFs的胶原降解,有助于维持ECM稳态并发挥一定的抗炎作用。上述蛋白变化表明,RMCs共培养可能调控衰老HDFs的细胞能量代谢和生长信号,平衡ECM的合成与降解,并发挥抗炎和抗氧化作用,从而抑制细胞老化表型。

本研究对差异蛋白进行了KEGG富集分析,在显著富集且排名前20位的信号通路中,与抗衰老相关的包括Proteasome(蛋白酶体)、PPAR signaling pathway(PPAR信号通路)、ECM-receptor interaction(细胞外基质-受体相互作用)和Focal adhesion(粘着斑)等4条通路。在人胚肺成纤维细胞(WI38)中,部分抑制蛋白酶体活性即可触发衰老样表型,表现为永久性增殖停滞和SA- β -gal阳性染色增加,提示蛋白酶体对维持细胞稳态并延缓衰老具有重

要作用^[28]。此外,蛋白酶体活性增强可更有效清除氧化损伤蛋白,从而对氧化和化学应激表现出更强的抵抗能力,并延缓衰老进程^[29-30]。因此推测,RMCs共培养可能通过影响蛋白酶体通路促进HDFs的蛋白质稳态调节,清除错误折叠与受损蛋白,从而延缓细胞衰老。激活PPAR γ 可下调NF- κ B信号通路,减轻与年龄相关的慢性炎症和活性氧(ROS)积累,从而在多种组织中发挥抗衰老作用并延缓组织功能衰退^[31-33]。上调PPAR γ 表达可显著降低人皮肤成纤维细胞早期衰老模型的SA- β -gal活性并恢复抗氧化平衡,表明激活该通路可延缓细胞衰老^[34]。推测RMCs共培养可能通过影响PPAR信号通路来调节抗炎反应、减少活性氧积累,从而提高HDFs的抗衰老能力。衰老细胞分泌高水平的基质金属蛋白酶(MMPs),导致胶原蛋白等ECM成分过度降解,进而通过整合素介导的信号转导加强细胞的衰老表型^[35-37]。补充或改善ECM中的胶原蛋白或纤连蛋白含量,可激活整合素-FAK等细胞存活信号,显著降低成纤维细胞的SA- β -gal染色率并延缓衰老进程^[38]。相反,抑制FAK活性会诱导DNA损伤反应,上调p53/EZH2通路并触发细胞衰老^[39]。生物信息学分析将“细胞-基质粘附”列为最显著的衰老相关富集类别,衰老成纤维细胞中可观察到黏着斑增大、FAK激活和细胞迁移能力下降,说明调控焦点粘着斑的动力学会影响衰老进程^[40-41]。细胞外基质-受体相互作用和黏着斑相关蛋白的改变提示,RMCs的分泌物可能影响细胞-基质相互作用与迁移能力,这与本研究在划痕试验中观察到的迁移能力恢复一致。推测RMCs共培养可能影响细胞外基质-受体相互作用与粘着斑这两条通路,减缓ECM成分的降解、调节整合素及粘着斑信号,从而延缓HDFs的衰老进程。本研究提示,鹿茸干细胞共培养可能通过增强蛋白酶体介导的蛋白质清除、激活PPAR γ 以降低炎症和氧化应激,同时通过修复ECM结构并调节整合素-FAK信号以维持细胞-基质的黏附稳定,从而多个层面协同延缓人皮肤成纤维细胞的衰老进程。

4 结 论

本研究结果表明,梅花鹿来源的鹿茸干细胞(RMCs)通过共培养显著改善H₂O₂诱导衰老的人皮肤成纤维细胞(HDFs)的功能状态:RMCs共培养能恢复衰老HDFs的增殖与迁移能力,并改善细胞氧

化应激指标(提高SOD活性、降低MDA含量)。基于条件培养上清的4D-DIA蛋白质组学分析,鉴定出若干与蛋白酶体功能、PPAR信号通路和细胞外基质-受体相互作用相关的差异蛋白,提示RMCs可能通过调节细胞蛋白稳态与细胞外基质环境来发挥其抗衰老作用。综上所述,本研究为鹿茸干细胞的抗衰老潜能提供了功能学与分子学的初步证据,并为后续基于RMCs分泌产物的抗衰老皮肤修复策略提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] LI C, SUTTIE J M. Tissue collection methods for antler research[J]. *Eur J Morphol*, 2003, 41(1): 23.
- [2] LI C, ZHAO H, LIU Z, et al. Deer antler—a novel model for studying organ regeneration in mammals[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 56: 111.
- [3] 张然然, 荣 敏, 董依萌, 等. 不同生长时期梅花鹿鹿茸代谢组分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(12): 4518-4526.
ZHANG R R, RONG M, DONG Y M, et al. Metabolomic analysis of sika deer antler in different growth stages [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(12): 4518-4526. (in Chinese)
- [4] LI C, LI Y, WANG W, et al. Deer antlers: the fastest growing tissue with least cancer occurrence [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(12): 2452-2461.
- [5] 邢宝瑞, 刘 振, 赵海平, 等. 鹿茸逆向成骨的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(6): 2231-2240.
XING B R, LIU Z, ZHAO H P, et al. Research progress in reverse osteogenesis of deer antler [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(6): 2231-2240. (in Chinese)
- [6] ZHANG W, KE C H, GUO H H, et al. Antler stem cells and their potential in wound healing and bone regeneration [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(8): 1049-1057.
- [7] 刘 振, 孙红梅, 李春义. 抑制PI3K/AKT信号通路对鹿茸干细胞的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(11): 2189-2197.
LIU Z, SUN H M, LI C Y. Differential effects of inhibition of the PI3K/AKT pathway on antler stem cells' parameters [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(11): 2189-2197. (in Chinese)
- [8] LIU Q, LI J, CHANG J, et al. The characteristics and medical applications of antler stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 225.

- [9] SEO M, KIM J C, KIM H K, et al. A novel secretory vesicle from deer antlerogenic mesenchymal stem cell-conditioned media (DaMSC-CM) promotes tissue regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:3891404.
- [10] SHIN S H, LEE Y H, RHO N K, et al. Skin aging from mechanisms to interventions: focusing on dermal aging[J]. *Front Physiol*, 2023, 14:1195272.
- [11] ZHANG J, YU H, MAN M Q, et al. Aging in the dermis: Fibroblast senescence and its significance[J]. *Aging Cell*, 2024, 23(2):e14054.
- [12] 孙红梅, 邢秀梅, 丛波, 等. 鹿茸干细胞体外培养技术的研究[J]. *经济动物学报*, 2007, (1):7-9, 14.
- SUN H M, XING X M, CONG B, et al. Cultural technique of deer antler stem cell *in vitro*[J]. *Journal of Economic Animal*, 2007, (1):7-9, 14. (in Chinese)
- [13] 潘长伟, 赵峰, 郎宏鑫, 等. 过氧化氢诱导人皮肤成纤维细胞衰老模型的建立[J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(2):193-195, 199.
- PAN C W, ZHAO F, LANG H X, et al. Establishment of human dermal fibroblast senescence model induced by hydrogen peroxide[J]. *Progress of Anatomical Sciences*, 2019, 25(2):193-195, 199. (in Chinese)
- [14] ZHANG G, WANG D, REN J, et al. Antler stem cell-derived exosomes promote regenerative wound healing via fibroblast-to-myofibroblast transition inhibition[J]. *J Biol Eng*, 2023, 17(1):67.
- [15] HUYNH P D, CAO A L T, LE T M, et al. A mixture of secretions and extractions derived from antler stem cells heal open wounds in rats with a tendency to leave no scar[J]. *Biomed Res Ther*, 2024, 11(1):6125-6134.
- [16] SUI Z, SUN H, WENG Y, et al. Quantitative proteomics analysis of deer antlerogenic periosteal cells reveals potential bioactive factors in velvet antlers[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1609:460496.
- [17] LI C. Antler stem cells sustain regenerative wound healing in deer and in rats[J]. *J Regen Biol Med*, 2020, 2(1):1-8.
- [18] GUI Q, DING N, YAO Z, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells: the wine in Hebe's hands to treat skin aging[J]. *Precis Clin Med*, 2024, 7(1):pbae004.
- [19] WONG S Y, NG C S, BRIANNA B, et al. Role of mesenchymal stem cells in skin aging and damage: insights from recent preclinical and clinical studies[J]. *Current Stem Cell Reports*, 2025, 11(1):1-14.
- [20] CAI L, PESSOA M T, GAO Y, et al. The Na/K-ATPase $\alpha 1$ /Src signaling axis regulates mitochondrial metabolic function and redox signaling in human iPSC-Derived cardiomyocytes[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12):3207.
- [21] DE LORES ARNAIZ G R, ORDIERES M G. Brain Na(+), K(+)-ATPase activity in aging and disease[J]. *Int J Biomed Sci*, 2014, 10(2):85-102.
- [22] REMINGTON J, WANG X, HOU Y, et al. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(1):26-33.
- [23] KIM J, KIM H, SEO W Y, et al. Collagen type VII (COL7A1) as a longevity mediator in *Caenorhabditis elegans*: anti-aging effects on healthspan extension and skin collagen synthesis[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2024, 32(6):801-811.
- [24] JOVER I, RAMOS M C, ESCÁMEZ M J, et al. Identification of novel small molecule-based strategies of COL7A1 upregulation and readthrough activity for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):18969.
- [25] XU W, ZHUANG Z X, YANG J P, et al. The profile of IGF2R gene expression and H3 histone modifications in replicative cell senescence[J]. *J Sichuan Univ Med Sci*, 2014, 45(1):6-9.
- [26] BYUN H O, LEE Y K, KIM J M, et al. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes[J]. *BMB Rep*, 2015, 48(10):549-558.
- [27] ESCRICHE-NAVARRO B, GARRIDO E, SANCENÓN F, et al. A navitoclax-loaded nanodevice targeting matrix metalloproteinase-3 for the selective elimination of senescent cells[J]. *Acta Biomater*, 2024, 176:405-416.
- [28] CHONDROGIANNI N, GONOS E. Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures[J]. *Biogerontology*, 2004, 5(1):55-61.
- [29] CHONDROGIANNI N, STRATFORD F, TROUGAKOS I, et al. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(30):28026-28037.

- [30] SALCEDO-TACUMA D, ASAD N, ISLAM MQ, et al. Hyperactive 20S proteasome enhances proteostasis and ERAD in *C. elegans* via degradation of intrinsically disordered proteins[J]. *Sci Adv*, 2025, 11(41):eadx3014.
- [31] EROL A. The functions of PPARs in aging and longevity[J]. *PPAR Res*, 2007, 2007:39654.
- [32] LAN T, BI F, XU Y, et al. PPAR- γ activation promotes xenogenic bioroot regeneration by attenuating the xenograft induced-oxidative stress[J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1):10.
- [33] LEE I T, YANG C C, YANG C M. Harnessing peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists to induce Heme Oxygenase-1: a promising approach for pulmonary inflammatory disorders [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):125.
- [34] BRIGANTI S, FLORI E, BELLEI B, et al. Modulation of PPAR γ provides new insights in a stress induced premature senescence model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104045.
- [35] SHIN E, PARK J, YOU S, et al. Integrin-mediated adhesions in regulation of cellular senescence [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(19):eaay3909.
- [36] MAVROGONATOU E, PAPADOPOULOU A, PRATSINIS H, et al. Senescence-associated alterations in the extracellular matrix:deciphering their role in the regulation of cellular function [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 325(3):C633-C647.
- [37] FISHER GJ, WANG B, CUI Y, et al. Skin aging from the perspective of dermal fibroblasts: the interplay between the adaptation to the extracellular matrix microenvironment and cell autonomous processes[J]. *J Cell Commun Signal*, 2023 17(3):523-529.
- [38] TRAGOONLUGKANA P, PRUKSAPONG C, ONTONG P, et al. Fibronectin and vitronectin alleviate adipose-derived stem cells senescence during long-term culture through the AKT/MDM2/P53 pathway[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):14242.
- [39] PIFER P M, YANG L, KUMAR M, et al. FAK drives resistance to therapy in HPV-negative head and neck cancer in a p53-dependent manner [J]. *Clin Cancer Res*, 2024, 30(1):187-197.
- [40] BLOKLAND K E C, POUWELS S D, SCHULIGA M, et al. Regulation of cellular senescence by extracellular matrix during chronic fibrotic diseases[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(20):2681-2706.
- [41] HOWES A M, DEAN C, GHOSH D, et al. Fibroblast senescence-associated extracellular matrix promotes heterogeneous lung niche [J]. *APL Bioeng*, 2024, 8(2):026119.

(编辑 郭云雁)