

丹酚酸 B-TAT 脂质体对 HSF 细胞增殖、侵袭和细胞周期的影响

时军^{*}, 吴艳婷, 郭思旖, 陈桂添, 赖建辉, 许小琪

(广东药科大学 中药学院 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

[摘要] 制备载丹酚酸 B 的穿膜肽 TAT 修饰脂质体 (SAB-TAT-LIP), 研究其对人皮肤成纤维细胞 (HSF) 生长增殖、迁移、侵袭和细胞周期的影响, 初步评价其用于防治增生性瘢痕的效果。以体外培养的 HSF 细胞为研究对象, 采用四甲基偶氮唑盐 MTT 法检测 SAB-TAT-LIP 对细胞生长增殖的抑制作用; 采用 Transwell 小室法和划痕法检测 SAB-TAT-LIP 对细胞侵袭和迁移能力的影响; 采用流式细胞术检测细胞周期变化。空白脂质体对 HSF 细胞基本无毒副作用, 不同浓度的 SAB-TAT-LIP 干预 HSF 细胞不同时间后, 均具有一定的增殖抑制作用, 且呈现剂量和时间依赖性, 同时细胞迁移和侵袭能力明显降低; SAB-TAT-LIP 干预 HSF 细胞 48 h 后, 可使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 与空白对照组相比 $P < 0.01$ 。SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞的增殖、侵袭和迁移有显著的抑制作用, 对细胞周期 G_0/G_1 期有阻滞作用。

[关键词] 丹酚酸 B; 穿膜肽 TAT; 脂质体; 人皮肤成纤维细胞; 增殖; 迁移; 细胞周期

DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20181108.003

Effect of cell penetrating peptide TAT-modified liposomes loaded with salvianolic acid B on proliferation, migration and cell cycle of human skin fibroblasts

SHI Jun^{*}, WU Yan-ting, GUO Si-yi, CHEN Gui-tian, LAI Jian-hui, XU Xiao-qi

(Guangdong Engineering & Technology Research Center of Precise Drug Delivery System, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Hypertrophic scar (HS) is a very common skin fibrosis disorder after human skin injury and wound healing. The objective of this study was to investigate the efficacy of cell penetrating peptide TAT-modified liposomes loaded with salvianolic acid B (SAB-TAT-LIP) on proliferation, migration and cell cycle of human skin fibroblasts (HSF), and preliminarily evaluate its effect on prevention and treatment of HS. HSF were cultured *in vitro*, and MTT assay was used to detect the inhibitory effect of SAB-TAT-LIP on cell proliferation. Cell migration was assessed by Transwell chamber method and scratch method; and cell cycle change was detected by flow cytometry. *In vitro* cell studies showed that blank liposome basically had no toxic effect on HSF. Different concentrations of SAB-TAT-LIP inhibited proliferation on HSF in varying degrees after intervention for different periods in a dose and time dependent manner; meanwhile, SAB-TAT-LIP significantly inhibited the migration and invasion of HSF. At the same time, SAB-TAT-LIP could block the cell cycle at G_0/G_1 phase after intervention for 48 h, $P < 0.01$ as compared with the blank control group. Conclusively, our experimental data quantitatively demonstrate that SAB-TAT-LIP has significant inhibitory effect on cells proliferation, invasion and migration, with blocking effect on G_0/G_1 phase. This may offer a promising therapeutic strategy for transdermal delivery in prevention and treatment of HS.

[Key words] salvianolic acid B; cell penetrating peptide TAT; liposomes; human skin fibroblasts; proliferation; migration; cell cycle

[收稿日期] 2018-09-15

[基金项目] 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目 (YQ2015099); 广东省自然科学基金项目 (2018A0303130234)

[通信作者] ^{*} 时军 博士, 副教授, 主要从事中药新药及制剂新技术研究, Tel: (020) 39352169, Email: shijun8008@163.com

丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 是活血化瘀中药丹参中含量最高的水溶性成分,或是抗纤维化疾病的主要药效成分^[1]。现代研究表明,SAB 抗纤维化的作用机制可能与其抗自由基过氧化损伤,抑制成纤维细胞增殖,作用于 TGF/Smads 等多个信号转导通路,下调细胞Ⅲ型胶原蛋白 COL-Ⅲ等细胞因子的表达有关^[2-5]。

增生性瘢痕 (hypertrophic scars, HS) 是一种临床常见但治愈率较低的皮肤纤维化疾病^[6]。目前认为 HS 可能和皮肤炎症过度反应有关,表皮再生延迟、新生血管形成增强,引起成纤维细胞过度增殖和迁移,导致典型细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 合成、沉淀和重塑^[7-9]。许多细胞参与了 HS 的形成,以皮肤成纤维细胞为关键效应细胞^[10]。

脂质体的结构类似生物膜,又被称为“人工生物膜”,是一种新型的给药载体。细胞穿膜肽 TAT 是一种具有高度细胞穿透能力的小分子多肽,聚乙二醇 [poly(ethylene glycol), PEG] 和 TAT 共同修饰的脂质体透皮给药体系,能高效地透过皮肤角质层屏障,增强真皮层的药物递送和细胞摄取,从而更好地发挥药效^[11-13]。本课题组将实验制备的载丹酚酸 B 的穿膜肽 TAT 修饰的脂质体 (SAB-TAT-LIP) 作用于体外培养的人皮肤成纤维细胞 (HSF),观察其对 HSF 增殖、侵袭、迁移和细胞周期的影响,为 SAB-TAT-LIP 防治 HS 的开发及临床应用奠定理论基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹酚酸 B 原料药 (南京泽朗生物科技有限公司,质量分数>99%);大豆卵磷脂 (S100,德国 Lipoid 公司,批号 57-1140045-10); DSPE-PEG₁₀₀₀, DSPE-PEG₂₀₀₀ (美国 NANOCS 公司,批号分别为 115CCG0212 和 115CCG0442); DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT (TAT, Cys-AYGRKKRRQRRR, 美国 NANOCS 公司,批号为 115CCG0451); 胆固醇 (Chol, 上海艾韦特医药科技有限公司,批号 B01221); 载丹酚酸 B 的穿膜肽 TAT 修饰脂质体 (SAB-TAT-LIP, 实验室自制,批号 20180520); 24 孔 PLOY 小室 (美国 Costar 公司,批号 3422); 四甲基偶氮唑盐细胞活性检测试剂盒 (MTT, 美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青); 高糖 DMEM (美国 Gibco 公司,批号 C11995500BT); 胰酶 TrypLE Express Enzyme (美国

Gibco 公司,批号 12605-028); PBS (美国 HyClone 公司,批号 SH30 256.01); 0.5% 结晶紫染液 (matrigel, 美国 BD 公司); 牛血清白蛋白 (BSA, 澳大利亚); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGA108); 水为屈臣氏超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

BP211D 型 1/10 万电子天平 (德国 Sartorius 公司); JY-96IIN 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); LF-50 型脂质体挤出仪 (加拿大 Avestin 公司); ELX800 全自动酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司 (BioTek)); PHS-25 型电子数显 pH 计 (上海雷磁仪器电科学仪器有限公司); MCO-18AIC CO₂ 恒温培养箱 (日本三洋电机株式会社); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 超净工作台 HF safe-1500 (香港 Heal force 公司); HNY-211C 欧诺恒温摇床 (天津市欧诺仪器仪表有限公司); OLYMPUS CKX41 倒置式生物显微镜 (北京中仪光科科技发展有限公司)。

1.3 细胞株

HSF 人皮肤成纤维细胞株,购买自中国科学院上海生命科学研究院 (中国上海)。

2 方法与结果

2.1 SAB-TAT-LIP 的制备

采用 pH 梯度-逆向蒸发法制备^[14-15]: 精密称取处方量的 S100, Chol, DSPE-PEG₁₀₀₀, DSPE-PEG₂₀₀₀, DSPE-PEG₁₀₀₀-TAT (100: 33.33: 2: 1: 1) 溶于有机溶剂 (氯仿-甲醇 2:1), SAB 溶于 1% 甘氨酸-盐酸缓冲盐溶液 (pH 3.20), 将两相体系转移入 250 mL 茄形瓶中,置于旋转蒸发仪中旋干有机溶剂,在氮气氛围下放置过夜吹干残留的有机溶剂,加入适量的 PBS 缓冲盐溶液调至 pH 6.0,继续孵育 30 min 形成脂质体乳液,探头超声 180 次 (功率 300 W, 超 1 s 间隔 1 s), 过 0.8 μm 的微孔滤膜,然后用 400 nm 脂质体挤出仪来回挤出 15 次整粒,即得 SAB-TAT-LIP。同法制备不含 SAB 的空白脂质体 (Blank-LIP), SAB 常规脂质体 (SAB-LIP)。

2.2 SAB-TAT-LIP 的质量评价

采用超滤法测定 SAB-TAT-LIP 的包封率。同时将 SAB-TAT-LIP 稀释至适宜浓度,滴至铜筛网上,用 4% 磷钨酸负染,自然干燥后,置于电镜下观察形态并拍照。将 SAB-TAT-LIP 稀释至适宜浓度,

置于激光散射粒度分布分析仪中,测定其平均粒径、PDI 和 Zeta 电位。采用改良 Franz 扩散池,以大鼠皮肤为透皮屏障,考察脂质体的体外透皮性质。经检测得平均粒径为 (183.2 ± 4.09) nm, PDI 为 0.190, Zeta 电位为 (-9.25 ± 0.92) mV, 包封率为 $(86.70 \pm 0.85)\%$, 载药量为 (6.3 ± 0.34) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SAB-TAT-LIP 置于 4°C 冰箱保存 10 d, 包封率大于 80%, 粒径大小没有明显变化, 稳定性良好。SAB-TAT-LIP 体外 32 h 经皮渗透动力学符合零级方程模型 $Q = 28.33X + 22.61$ ($R^2 = 0.9957$), 皮肤累积透过率为 17.21%, 稳态透皮速率 J 为 (28.33 ± 4.9) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 表观透皮系数 P_{app} 为 $3.19 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 真皮层滞留量为 (44.39 ± 6.87) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 显著高于 SAB 溶液和 SAB-LIP, 透皮行为满足局部透皮给药制剂的透皮规律。

2.3 细胞培养

将人皮肤成纤维 HSF 细胞接种于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 双抗 ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素) 的高糖培养基 (DMEM) 中, 置于 37°C $5\% \text{CO}_2$ 及饱和湿度条件下培养, 取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化传代, 取 3~8 代细胞用于实验。

2.4 MTT 法检测 HSF 增殖

收集生长状态良好的 HSF, 经 0.25% 胰酶消化离心后, 按每孔 1×10^4 个 ($200 \mu\text{L}$) 将 HSF 接种于 96 孔板, 边缘孔用无菌 PBS 填充, 于 37°C $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱培养 24 h, 用 DMEM 稀释 SAB-TAT-LIP 和 SAB 原料药 ($0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞, 每组设 5 个复孔, 平行 3 份, 分别干预 24, 48, 72 h 后, 在显微镜下观察细胞形态并拍照, 采用 MTT 法检测各组 490 nm 处

吸光度 (A), 计算细胞存活率, 细胞存活率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。给药干预 72 h 后各给药组的细胞形态见图 1, 不同浓度的 SAB-TAT-LIP 干预 72 h 后, 贴壁的 HSF 细胞出现脱黏附过程, 细胞变圆, 体积变小, 折光性增强, 随着 SAB-TAT-LIP 给药浓度的增加, 死亡数量增多, 细胞核分裂破碎明显, 完整的细胞形态消失; 与空白对照组 (Control 组) 相比, Blank LIP 组的细胞形态没有发生明显变化, 对 HSF 增殖没有影响。SAB-TAT-LIP 对 HSF 增殖有明显的抑制作用, 见图 2, 且相比于 Free SAB, 体现一定的缓释效果。在一定给药浓度范围内, SAB-TAT-LIP 对 HSF 增殖抑制作用呈现剂量依赖关系。

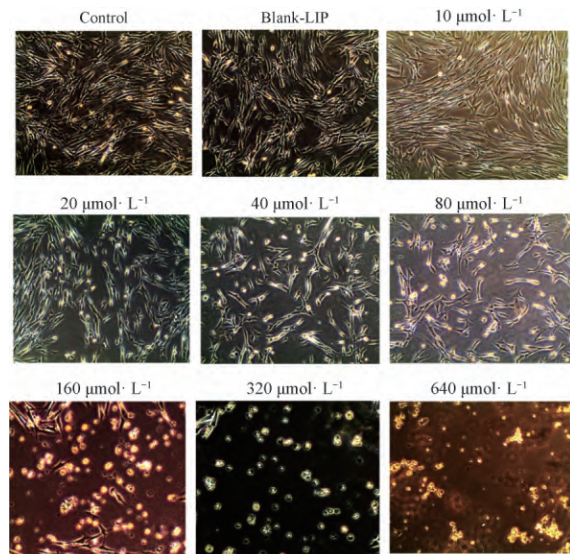


图 1 SAB-TAT-LIP 干预 72 h 后 HSF 在显微镜下的形态 ($\times 100$)

Fig.1 Effect of SAB-TAT-LIP on HSF morphological changes after intervention of 72 h ($\times 100$)

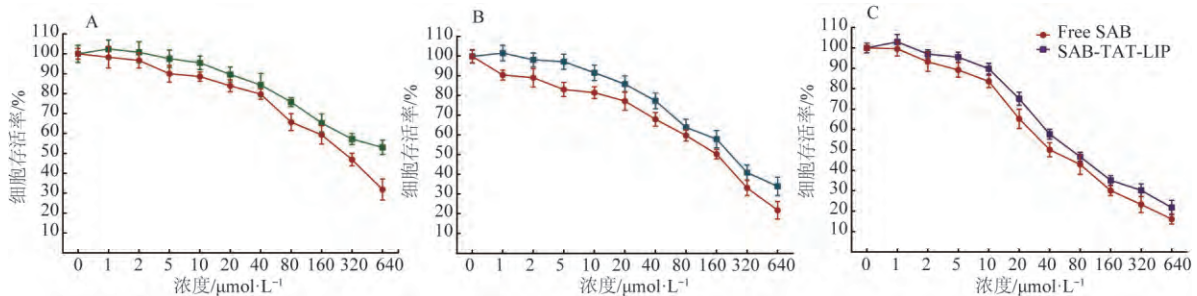


图 2 SAB-TAT-LIP 分别干预 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) 后对 HSF 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 Inhibition of SAB-TAT-LIP on HSF proliferation after intervention of 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 检测 HSF 侵袭和迁移能力

2.5.1 Transwell 小室法 收集生长状态良好的 HSF, 胰酶消化离心后, 按每孔 3.5×10^5 个接种于 6 孔板, 于 37°C $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱培养 24 h, 分别设置空白对照组 (Control 组)、Blank-LIP 组、Free SAB 组 (含 SAB $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SAB-LIP 组 (含 SAB $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SAB-TAT-LIP L 组 (含 SAB $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SAB-TAT-LIP M 组 (含 SAB $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、SAB-TAT-LIP H 组 (含 SAB $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。平行 3 份, 加药培养 48 h, PBS 清洗细胞 3 次, 用无血清 DMEM 调整细胞密度至 6×10^5 个/mL, 将 100 μL 单细胞悬液加入基底膜已包被、水化的 Transwell 小室的上室, 下室用 500 μL 含 15% FBS 的 DMEM 培养

24 h, 弃去培养基, 湿棉棒擦去 Transwell 上层小室基质胶及未穿膜的细胞, 0.1% 结晶紫染液固定染色 30 min, 流水冲洗, 晾干, 在显微镜下随机选取 5 个视野细胞计数, 以穿透 Transwell 小室基底膜的细胞数代表 HSF 细胞的侵袭能力, 见图 3 A。与 Control 组相比, Blank-LIP 组的侵袭细胞个数没有明显变化, 即 Blank-LIP 对 HSF 的侵袭能力没有影响。与 Control 组相比, 含等剂量 SAB 的各给药组均表现明显地抑制 HSF 侵袭的作用, $P < 0.01$, 且 SAB-TAT-LIP 组的抑制效果弱于 Free SAB 组, 优于 SAB LIP 组。以上结果表明 SAB-TAT-LIP 可以显著抑制 HSF 在三维水平上的迁移, 且与 SAB 的质量浓度成正相关。

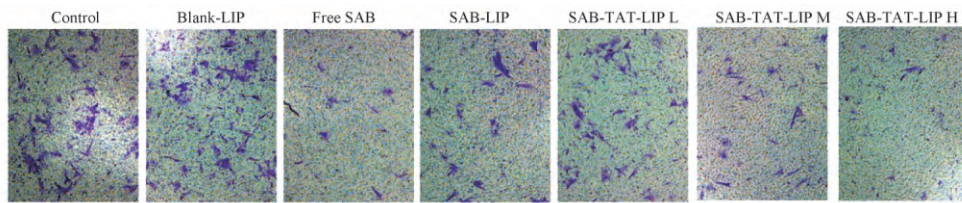
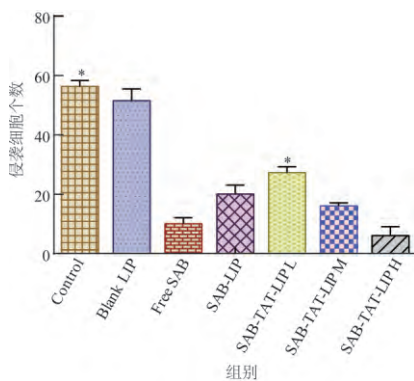


图3 SAB-TAT-LIP 对 HSF 侵袭的抑制作用

Fig.3 Inhibition effect of SAB-TAT-LIP on invasion of HSF



与空白对照组相比, $* P < 0.01$ (图 7 同)。

图4 SAB-TAT-LIP 对 HSF 侵袭的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Quantification of indicated invading cells analyzed of SAB-TAT-LIP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 划痕法 收集生长状态良好的 HSF, 胰酶消化离心后, 按每孔 5×10^5 个 (2 mL) 接种于 6 孔板, 培养至细胞密度达到 80%~90%, 用 200 μL 无菌加样枪头在每孔单细胞层中呈“井”字状迅速划线, 用 PBS 细洗 3 次, 洗去细胞残片, 降低培养基中血清浓度至

3% 给药及分组同 2.5.1 项, 平行 3 份, 加药后分别于 0, 12, 24, 48 h 对同一视野拍照, 每组细胞选择 4 个不同视野, 观察细胞的恢复情况, 见图 5。给药干预 48 h 后, Control 组和 Blank-LIP 组已经恢复划痕的宽度并长满细胞, 即 Blank-LIP 组对 HSF 的迁移能力没有影响。SAB 各给药组均没有恢复划痕的宽度, HSF 的迁移能力减弱甚至丧失, 目测可粗略观察到 SAB-TAT-LIP M 组抑制 HSF 迁移的效果优于 SAB-LIP 组。SAB-TAT-LIP H 组可观察到细胞形态发生变化, 细胞核破碎的现象, 即较高剂量的 SAB-TAT-LIP 能促使 HSF 凋亡而丧失迁移的能力。结果表明 SAB-TAT-LIP 能够显著地抑制 HSF 的迁移。

2.6 流式细胞仪检测 HSF 的细胞周期

细胞接种、分组及加药同 2.5.1 项, 平行 3 份, 给药培养 48 h 后, 用 PBS 清洗细胞沉淀 3 次, 70% 冷乙醇固定 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, 离心后用 PBS 重悬细胞, 加入 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RNA 酶 (RNase A) 和 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化丙啶 (PI), 室温避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 见图 6, 7。其中图 6 中第 1 个高峰

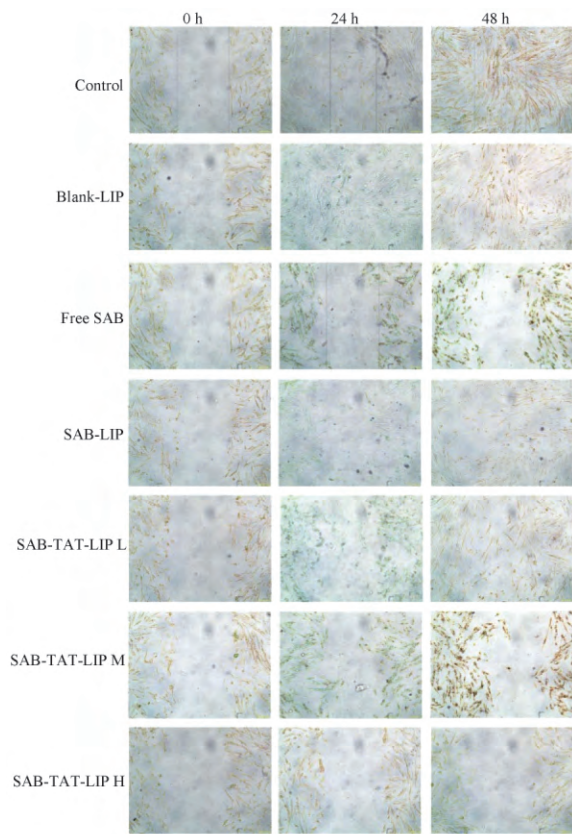


图5 SAB-TAT-LIP 对 HSF 迁移的抑制作用
Fig.5 Effect of SAB-TAT-LIP on migration of HSF

为 G_0/G_1 期、中间凹谷为 S 期、第 2 峰为 G_2/M 期。给药干预 48 h 后, Blank-LIP 组与 Control 组相比, G_0/G_1 S G_2/M 期细胞比例差异均无统计学意义, 对细胞周期的变化无影响。与 Control 组相比, 含 SAB 实验组增殖期(包括 S 期及 G_2/M 期)细胞比例减少; G_0/G_1 期细胞比例明显增加且与 SAB 含量呈正相关 $P < 0.01$ 。结果表明 SAB-TAT-LIP 能将 HSF 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 不能进入 S 期, 最终诱导细胞凋亡。

3 讨论

HS 常继发于手术外伤、烧烫伤等严重创伤之后, 是皮肤创伤愈合过程中结缔组织持续性炎症和过度纤维化愈合的结果^[16]。成纤维细胞 (fibroblasts) 是 HS 形成的细胞学基础, 出现在炎症期结束时的损伤位置以及伤口愈合增生期的开始阶段^[17]。研究认为皮肤成纤维细胞 (HSF) 活化和分化成肌成纤维细胞是 HS 病理生理学的中心过程^[18-19]。因此, 抑制 HSF 生长增殖是治疗 HS 的重要方法之一。

中医学认为, HS 等纤维化疾病属于癥瘕积聚范畴, 其发病机制主要为气虚血瘀^[20]。在纤维化的发病过程中, 气虚与血瘀相互伴生并互为因果。瘀

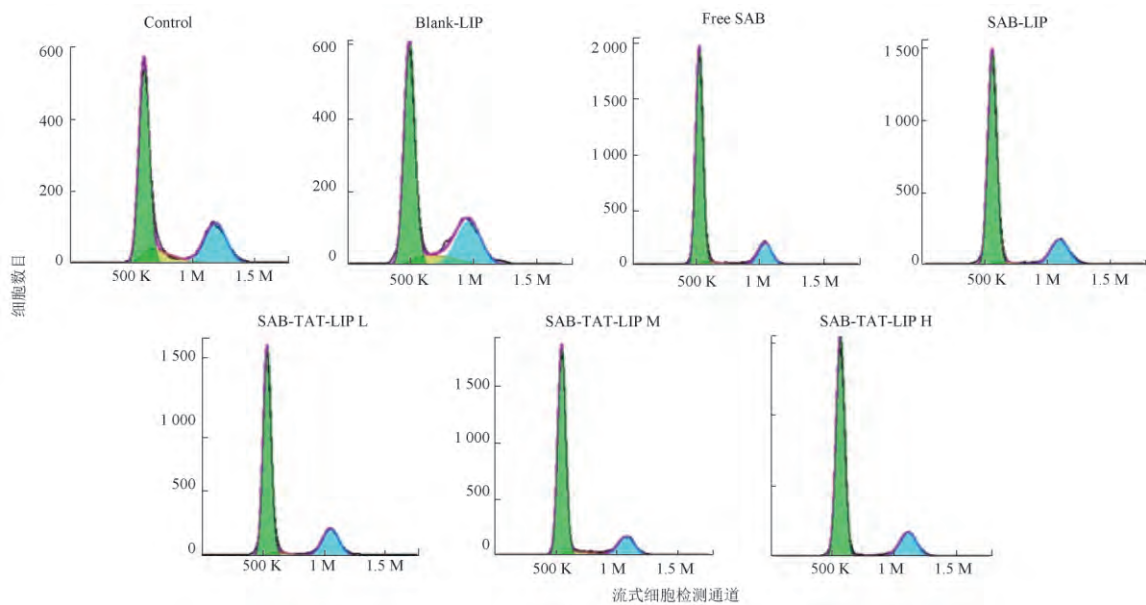


图6 SAB-TAT-LIP 对 HSF 细胞周期的影响
Fig.6 Cell cycle distribution of HSF treated with SAB-TAT-LIP

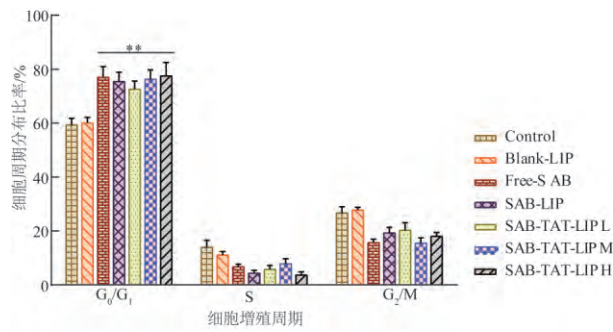


图7 SAB-TAT-LIP 处理 HSF 细胞后细胞周期的分布图 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.7 Cell cycle distribution of HSF treated with SAB-TAT-LIP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

血阻络,必会阻碍气机,血为气之母,气为血之帅,气机阻滞,血行不畅,导致瘀阻经络,而形成气血不畅的恶性循环。正气虚弱是纤维化的内因和转归,血瘀阻滞是纤维化的病理基础^[15]。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 的干燥根及根茎,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效。临床上主要用于胸痹心痛、腕腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、疮疡肿痛、月经不调、痛经经闭、心烦不眠等病症^[1]。作为治疗纤维化最常用的中药之一,近年来,丹参、丹参复方制剂及丹参有效成分在抗纤维化疾病中得到广泛应用,其中丹参有效成分研究进展迅速^[21-23]。SAB 化学式为 $C_{36}H_{30}O_{16}$,由 3 个分子丹参素与 1 个分子咖啡酸缩合而成,是丹参中含量最高的活性成分,也是水溶性成分中研究最多的成分之一,含量约占总丹酚酸的 70%^[24]。体内外实验表明,SAB 具有抗肝、肾、心肌纤维化、抗氧化、抗炎、清除自由基、抗肿瘤等多方面的药理作用,能够抑制成纤维细胞增殖及胶原合成,其抗纤维化作用主要与 TGF- β /Smad 信号转导通路密切相关^[25-27]。SAB 的结构较不稳定,因此制备成脂质体能够提高其生物利用度,从而更好地发挥疗效。

HS 的成纤维细胞主要来源和聚集于伤口部位周围的局部真皮和皮下组织,基于这一病理学特征,本课题组在前期实验中已成功构建了载丹酚酸 B 的穿膜肽 TAT 修饰脂质体(SAB-TAT-LIP)局部透皮给药体系。本研究结果表明,SAB-TAT-LIP 能够体外抑制 HSF 的增殖活性,抑制 HSF 的侵袭和迁移能力,并可能通过将细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,进

而诱导细胞凋亡,为 SAB-TAT-LIP 在 HS 治疗中靶点的选择以及其与 G₀/G₁ 期抑癌药物的联用提供了一定的指导意义。但 HS 的致病机制和因素极为复杂,关于 SAB-TAT-LIP 对 HS 的作用机制研究需大量的基础实验和临床研究进行深入的探讨。目前 HS 主要依靠手术治疗和药物治疗,但手术治疗复发率较高,会给患者带来痛苦;激素类药物治疗副作用较大且费用相对昂贵^[28]。TAT-LIP 因其毒副作用较小等优势,有望作为丹酚酸 B 防治 HS 的经皮给药优良载体。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2015: 76.
- [2] Liu Q, Chu H, Ma Y, et al. Salvianolic acid B attenuates experimental pulmonary fibrosis through inhibition of the TGF- β signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(9): 27610.
- [3] Hou J, Tian J, Jiang W, et al. Therapeutic effects of SMND-309, a new metabolite of salvianolic acid B, on experimental liver fibrosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 390.
- [4] Liu M, Xu H, Zhang L, et al. Salvianolic acid B inhibits myofibroblast transdifferentiation in experimental pulmonary fibrosis via the up-regulation of Nrf2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 325.
- [5] 罗红,王春花,赵玲璐,等.丹酚酸 B 抗心肌纤维化的机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(28): 3900.
- [6] Finnerty C C, Jeschke M G, Branski L K, et al. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge following burn injury[J]. *Lancet*, 2016, 388(10052): 1427.
- [7] Chawla S, Ghosh S. Regulation of fibrotic changes by the synergistic effects of cytokines, dimensionality and matrix: towards the development of an *in vitro* human dermal hypertrophic scar model[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 69(15): 131.
- [8] Curran T A, Ghahary A. Evidence of a role for fibrocyte and keratinocyte-like cells in the formation of hypertrophic scars[J]. *J Burn Care Res*, 2013, 34(2): 227.
- [9] Li G, Zhou R, Zhang Q, et al. Fibroproliferative effect of microRNA-21 in hypertrophic scar derived fibroblasts[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(1): 93.
- [10] Chun Q, Zhiyong W, Fei S, et al. Dynamic biological changes in fibroblasts during hypertrophic scar formation and regression[J]. *Int Wound J*, 2016, 13(2): 257.
- [11] Kwon S S, Kim S Y, Kong B J, et al. Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of *Polygonum aviculare* L. extract[J]. *Int J Pharm*, 2015, 483(1/2): 26.
- [12] Fu H, Hu G L, He Q. Preparation of cell penetrating peptide TAT and cleavable PEG-co-modified liposomes loaded with paclitaxel and its *in vitro* apoptosis assay[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 49(7): 1054.

- [13] Patlolla R R , Desai P R , Belay K , et al. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers [J]. *Biomaterials* , 2010 , 31(21) : 5598.
- [14] Zhang L , Han L , Sun X , et al. The use of PEGylated liposomes to prolong the circulation lifetime of salvianolic acid B [J]. *Fitoterapia* , 2012 , 83(4) : 678.
- [15] 林珈好. 丹参酮 II_A、丹酚酸 B 与甘草次酸复方脂质体构建及体内外评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [16] Gong Y F , Zhang X M , Yu J , et al. Effect of recombinant human endostatin on hypertrophic scar fibroblast apoptosis in a rabbit ear model [J]. *Biomed Pharmacother* , 2017 , 91(7) : 680.
- [17] Wang J , Dodd C , Shankowsky H A , et al. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring [J]. *Lab Invest* , 2008 , 88(12) : 1278.
- [18] Bai X , He T , Liu J , et al. Loureirin B inhibits fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition in hypertrophic scar via TGF- β /Smad pathway [J]. *Exp Dermatol* , 2015 , 24(5) : 355.
- [19] 罗宏宾. 紫草素对皮肤成纤维细胞增殖、凋亡的调控及抑制增生性瘢痕形成的机制研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2017.
- [20] 时军, 张小灵, 郭波红 等. 双丹脂质体凝胶抑制兔耳瘢痕增生的作用及机制研究 [J]. *广东药科大学学报* , 2017 , 33(1) : 84.
- [21] 袁媛, 吴芹, 石京山 等. 丹参及其主要成分保肝作用的研究进展 [J]. *中国中药杂志* , 2015 , 40(4) : 588.
- [22] Li Y , Shi S , Gao J , et al. Cryptotanshinone downregulates the profibrotic activities of hypertrophic scar fibroblasts and accelerates wound healing: a potential therapy for the reduction of skin scarring [J]. *Biomed Pharmacother* , 2016 , 80(5) : 80.
- [23] Xu L , Shen P , Bi Y , et al. Danshen injection ameliorates STZ-induced diabetic nephropathy in association with suppression of oxidative stress , pro-inflammatory factors and fibrosis [J]. *Int Immunopharmacol* , 2016 , 38(90) : 385.
- [24] 王丽娜, 陶艳艳, 李书 等. 丹酚酸 B 盐对大鼠纤维化肝组织脂质过氧化及其 MMP-2 活性的影响 [J]. *中国中药杂志* , 2010 , 35(1) : 71.
- [25] 梁文仪, 陈文静, 杨光辉 等. 丹参酚酸类成分研究进展 [J]. *中国中药杂志* , 2016 , 41(5) : 806.
- [26] Wang Y , Xu F , Chen J , et al. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration , collagen and cytokine secretion: Inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytomedicine* , 2012 , 19(1) : 13.
- [27] Wang Q L , Tao Y Y , Yuan J L , et al. Salvianolic acid B prevents epithelial-to-mesenchymal transition through the TGF- β 1 signal transduction pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *BMC Cell Biol* , 2010 , 11(1) : 1.
- [28] Ledon J A , Savas J , Franca K , et al. Intralesional treatment for keloids and hypertrophic scars: a review [J]. *Dermatol Surg* , 2013 , 39(12) : 1745.

[责任编辑 曹阳阳]