

丹参酮 II_A 对 TGF- β ₁ 诱导的人皮肤成纤维细胞增殖的影响及作用机制

许小琪¹, 韩 兵², 赖建辉¹, 林宇建¹, 时 军^{1,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中山大学附属第一医院整形外科, 广东 广州 510080

3. 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: 目的 研究丹参酮 II_A (TSA) 对 TGF- β ₁ 诱导的人皮肤成纤维细胞 (HSF) 的影响及作用机制。方法 采用 CCK-8 法测定不同浓度 TSA (2.5、5、10、20 μ mol/L) 干预 TGF- β ₁ 诱导 HSF 细胞增殖的影响; 采用平板克隆形成实验分别分析不同浓度 TSA 处理 48 h 后 HSF 细胞的克隆形成能力的变化; Western blotting 检测 HSF 细胞中 TGF- β ₁/Smad 通路蛋白及 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白的表达水平。结果 CCK-8 和平板克隆形成实验结果表明, TSA 显著抑制了 HSF 细胞的增殖和克隆形成能力 ($P < 0.01$); Western blotting 结果显示, TSA 各浓度组能够显著抑制 p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白水平, 下调 p-Smad2/Smad2 的比值 ($P < 0.01$)。5、10、20 μ mol/L TSA 组明显下调 p-Smad3/Smad3 的比值; 另外, HSF 细胞中 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达水平随着 TSA 浓度的升高而显著降低 ($P < 0.01$)。结论 TSA 具有抑制 HSF 细胞增殖的能力, 其作用机制可能与 TGF- β ₁/Smad 通路有关。

关键词: 丹参酮 II_A; 人皮肤成纤维细胞; 增生性瘢痕; 增殖抑制; TGF- β ₁/Smad 通路; CCK-8 法; Western blotting; α -SMA; VEGFA; COL I; p-Smad2; p-Smad3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4685-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.011

Effect and mechanism of tanshinone II_A on TGF- β ₁ induced human skin fibroblast proliferation

XU Xiao-qi¹, HAN Bing², LAI Jian-hui¹, LIN Yu-jian¹, SHI Jun^{1,3}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Plastic and Reconstructive Surgery, First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

3. Guangdong Engineering & Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To study the effect and mechanism of tanshinone II_A on human skin fibroblasts cell (HSF). **Methods** CCK-8 method was used to determine the effect of different concentrations of TSA on the proliferation of HSF induced by TGF- β ₁. The plate cloning ability of HSF treated with different concentrations of TSA (2.5, 5, 10 and 20 μ mol/L) for 48 h were analyzed by plate clonogenesis assay. The protein expression of TGF- β ₁/Smad signaling pathway proteins and α -SMA, VEGFA and COL I were further measured by Western blotting. **Results** CCK-8 and plate clonogenesis assay results showed that TSA significantly inhibited the proliferation and colony forming efficiency of HSF ($P < 0.01$). Western blotting results revealed that each concentration group of TSA significantly inhibited the protein levels of p-Smad2 and p-Smad3, and down-regulated the ratio of p-Smad2/Smad2 ($P < 0.01$). The ratio of p-Smad3/Smad3 was significantly decreased in 5, 10 and 20 μ mol/L TSA groups. Additionally, the expression levels of α -SMA, VEGFA and COL I in HSF decreased significantly with the increase of TSA concentration ($P < 0.01$). **Conclusion** TSA exhibits the inhibitory effect on proliferation of HSF, and its mechanism may be related to TGF- β ₁/Smads signaling pathway.

Key words: tanshinone II_A; human skin fibroblasts; hypertrophic scar; proliferation inhibition; TGF- β ₁/Smad pathway; CCK-8 method; Western blotting; α -SMA; VEGFA; COL I; p-Smad2; p-Smad3

收稿日期: 2020-06-15

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

作者简介: 许小琪 (1995—), 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 18826108607 E-mail: 871424840@qq.com

*通信作者 时 军 (1980—), 副教授, 研究方向为中药经皮给药技术研究。Tel: 13580334598 E-mail: shijun8008@163.com

当皮肤深度创伤如手术、烧烫伤时,伤口常出现过愈合反应,释放出大量的炎症因子和促纤维化因子,导致人皮肤成纤维细胞(HSF)过度增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积,从而诱发增生性瘢痕(hypertrophic scar)。目前,临床上的治疗手段主要包括手术或激光切除的侵入性治疗以及以局部注射糖皮质激素为代表的非侵入性治疗,但这些治疗方法复发率较高,不能达到理想的根治效果^[1]。

丹参酮 II_A (tanshinone II_A, TSA) 是传统活血化瘀中药丹参的主要活性成分之一,具有醌式结构,易被氧化,可消除创伤皮肤中过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)簇,抑制纤维化进程^[2-3]。现代研究发现 TSA 具有显著抗纤维化的作用,同时能够抑制炎症细胞浸润和炎症细胞因子的表达,抗氧化,改善微循环等^[4-6]。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta, TGF- β_1) 是一种多功能的生长因子,广泛存在于正常细胞中,参与生物体内细胞各种生理过程以及各器官、组织的纤维化进程,是目前已知的强促纤维化因子之一,在增生性瘢痕的发病机制中占有重要地位^[7]。研究表明, TGF- β_1 在伤口瘢痕增生期呈高表达,可从多方面促进瘢痕的形成^[8-9]。如促进 HSF 的增殖及分化,引起肉芽组织收缩;促使大量以 I、III 型胶原蛋白为主等 ECM 的合成和分泌,使胶原纤维发生纤维化等。因此,可通过 TGF- β_1 刺激 HSF 建立增生性瘢痕体外细胞模型,筛选出抑制 TGF- β_1 的活性药物。

目前 TSA 抗纤维化研究多集中在肝、心脏、肾等器官及组织,对 HSF 增殖的影响及其调控 HSF 生物学行为的机制尚不清楚。本研究以 TGF- β_1 刺激 HSF 细胞作为研究对象,探索 TSA 对 HSF 细胞的增殖和 TGF- β_1 /Smad 信号通路相关分子表达影响,为 TSA 抗增生性瘢痕方面药物研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 细胞类型

HSF 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院,取第 3~8 代细胞用于实验。

1.2 药品与试剂

丹参酮 II_A (TSA), 质量分数 $\geq 95\%$, 批号 568-72-9, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; DMEM-高糖培养基购自美国 Hyclone 公司; 青霉素链霉素、磷酸盐缓冲液、胰酶购自美国 Genview 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学

公司; Edu 检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 抗体、Smad2 抗体、p-Smad2 抗体、Smad3 抗体、p-Smad3 抗体、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 抗体、I 型胶原蛋白 (COL I) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Memmer INC108 CO₂ 细胞培养箱, 德国 Memmer 公司; MOTIC AE200 倒置生物显微镜, 中国麦克奥迪实业集团有限公司; Leica DMI6000B 倒置荧光显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; Thermo Fisher Multiscan MK3 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司; SDS-PAGE 垂直电泳槽, 北京凯元伯乐生物科技有限公司; AX-II X 射线摄影暗匣, 广东粤华医疗器械有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养及分组

HSF 使用含 10% 胎牛血清以及 1% 青霉素/链霉素的高糖培养基 DMEM, 置于 37 °C、5% CO₂、相对饱和度 95% 的培养箱中静置培养。当细胞融合度达到 80%~90% 时进行传代培养, 取生长状态良好并处于对数生长期的细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法测定 HSF 增殖抑制率

以每孔 $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 的密度接种到 96 孔细胞培养板中, 孵育过夜后, 将细胞分为对照组、TGF- β_1 刺激组、给药组 (TSA 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。除对照组外, 其余各组细胞分别用 TGF- β_1 5 ng/mL 处理 2 h, 然后给药组再分别加入不同浓度的 TSA 处理细胞, 分别孵育 24 h 和 48 h。取出培养板, 将稀释在 100 μL DMEM 中的 10% CCK-8 溶液加入细胞中, 将培养板放入培养箱中继续孵育 4 h 后, 移至酶标板中检测各组 450 nm 处吸光度 (A) 值。

2.3 平板克隆形成实验测定 HSF 细胞克隆形成能力

将处于对数生长期的 HSF 细胞以每孔 $1 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 密度接种到 35 mm 培养皿中。接种完毕后, 用不同浓度的 TSA 处理 48 h 并补加培养基至 300 μL , 均匀晃动培养板, 使孔内细胞分布均匀, 置于培养箱中培养 2~3 周, 期间时时观察。当培养皿中出现肉眼可见的克隆斑时, 终止培养。弃去培养液, 用 PBS 浸洗 2 次后加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定细胞, 固定时间为 20 min。弃去固定液后加入适量结晶紫染料染色 10 min 后用流动水清洗残留的

结晶紫溶液, 晾干, 观察并拍照, 计算克隆形成率。

2.4 Western blotting 法检测 TGF- β_1 /Smad 通路蛋白及 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达水平

取 6 孔板 HSF 细胞加适量的预冷的蛋白裂解液 (RIP), 将所得裂解液在 4 °C 下 14 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液。采用 BCA 试剂盒测定各蛋白浓度。以 GAPDH 作为内参蛋白, 在 10% SDS-PAGE 凝胶电泳中进行蛋白质分离后, 转移到 PVDF 膜上, 室温封闭孵育 1 h。然后在 4 °C 下与下列抗体孵育过夜: Smad2 (1:2 000)、p-Smad2 (1:1 000)、Smad3 (1:10 000)、p-Smad3 (1:2 000)、 α -SMA (1:10 000)、VEGFA (1:10 000)、Collagen I (1:10 000)。使用 TBST 溶液洗膜 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗, 室温下孵育 40 min。再次用 TBST 洗膜 3 次后, 室温下加入免疫增强化学发光 (ECL) 试剂盒后在 Chemi DocTM XRS 系统上进行可视化处理。

2.5 数据处理及分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验分析。 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TSA 对 HSF 细胞增殖的影响

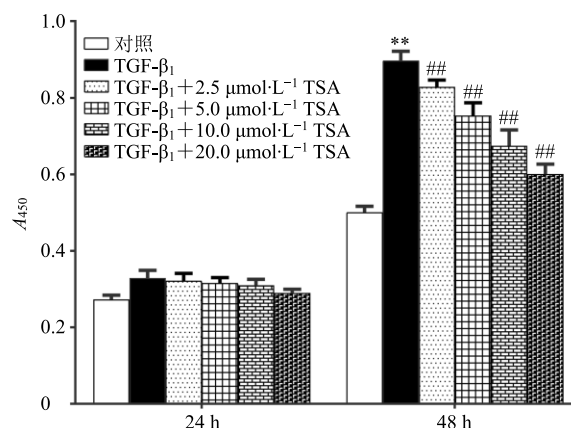
CCK-8 结果显示, 初始 24 h 内, 各组细胞之间的增殖活性没有显著性差异。干预细胞 48 h, 与对照组相比, TGF- β_1 刺激对 HSF 细胞具有明显促增殖作用 ($P < 0.01$); 与 TGF- β_1 组比较, HSF 细胞给予不同浓度的 TSA 48 h 后, 可显著抑制 TGF- β_1 刺激引起的促增殖作用 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性关系。各 TSA 浓度组的 A 值和抑制率结果分别见图 1 和表 1。

3.2 TSA 对 HSF 细胞克隆形成能力的影响

平板克隆形成实验结果显示, 与对照组相比, TGF- β_1 刺激对 HSF 细胞具有明显促克隆形成作用 ($P < 0.01$); 与 TGF- β_1 组比较, HSF 细胞给予不同浓度的 TSA 后可显著抑制 TGF- β_1 刺激引起的促克隆形成作用 ($P < 0.01$), 结果见图 2。

3.3 TSA 对 HSF 细胞中 TGF- β_1 /Smad 通路蛋白及 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, TGF- β_1 刺激处理显著升高了 HSF 细胞中 Smad2 和 Smad3 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 上调 p-Smad2/



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组比较: ## $P < 0.01$; 下同
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs TGF- β_1 stimulation group;
same as below

图 1 TSA 对 TGF- β_1 诱导的 HSF 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of TSA on proliferation of TGF- β_1 -stimulated HSF ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 TSA 对 HSF 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Inhibition of TSA on proliferation of HSF ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

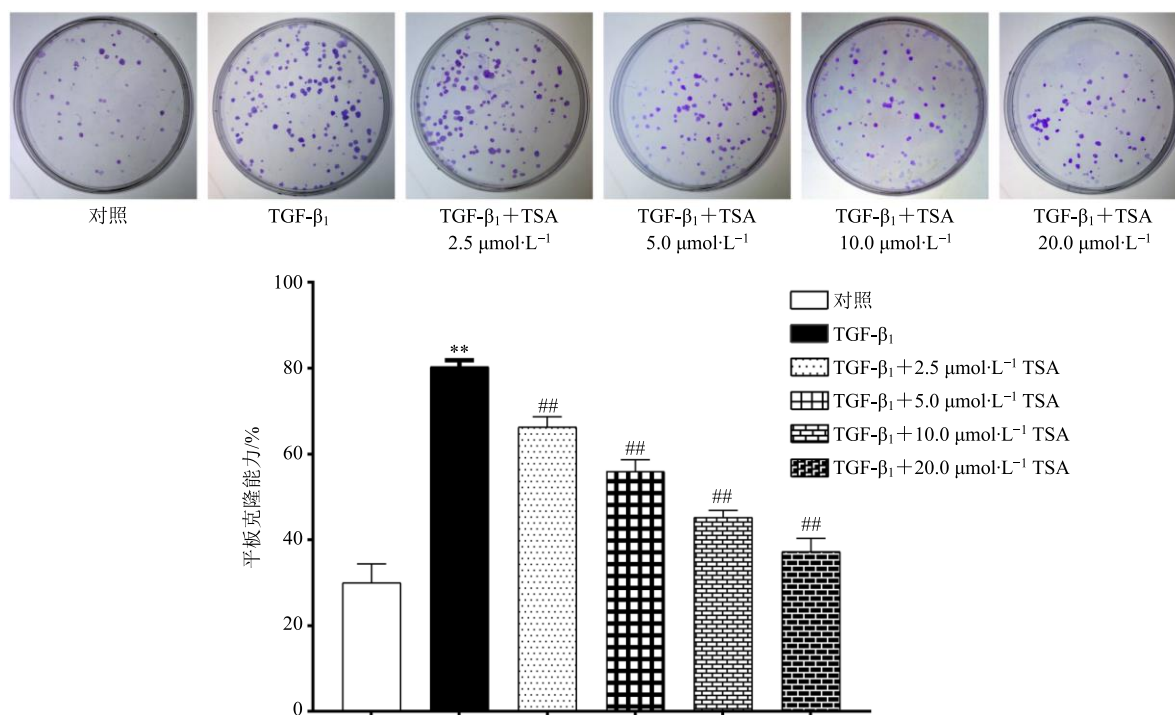
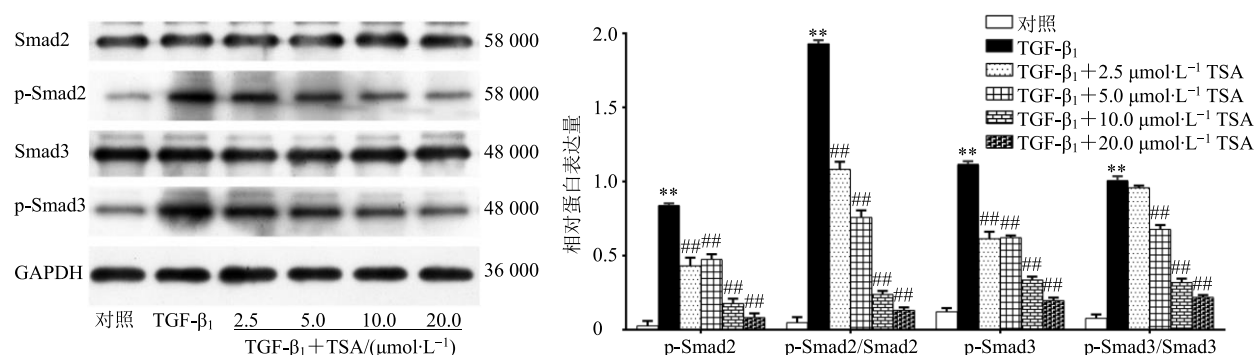
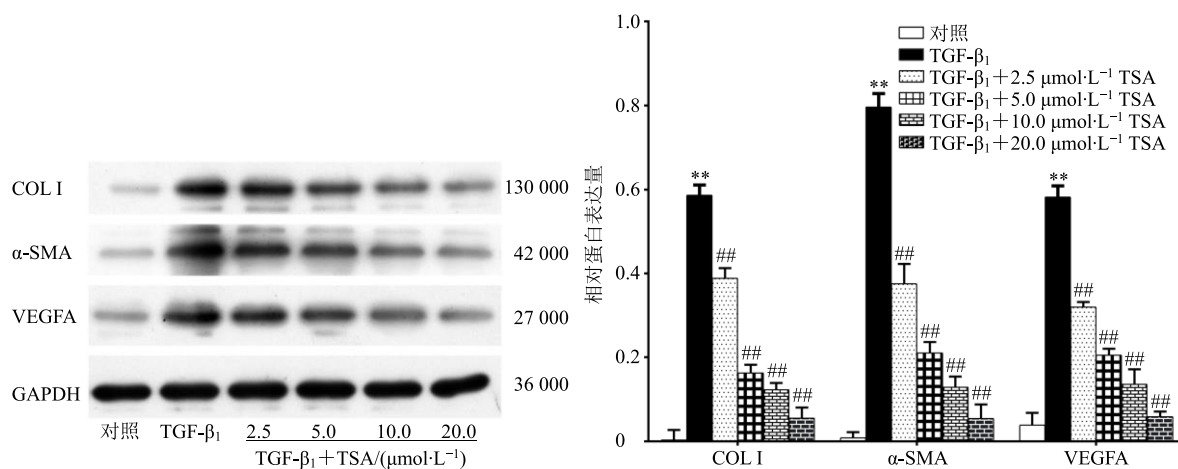
TSA/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率/%	
	24 h	48 h
2.5	1.70	7.64
5.0	3.96	16.05
10.0	5.70	24.72
20.0	11.75	33.01

Smad2 和 p-Smad3/Smad3 的比值。与 TGF- β_1 组相比, TSA 各浓度处理组显著抑制了 Smad2、Smad3 的磷酸化水平, 下调 p-Smad2/Smad2 的比值 ($P < 0.01$)。除 2.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 浓度组外, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ TSA 组明显下调 p-Smad3/Smad3 的比值, 表明 TSA 可能通过介导 TGF- β_1 /Smad 信号通路发挥药效作用, 结果见图 3。

与对照组相比, TGF- β_1 组 HSF 细胞中 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.01$); 与 TGF- β_1 组相比, 不同浓度 TSA 处理组 HSF 细胞中 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达水平随着 TSA 浓度的升高而显著降低 ($P < 0.01$), 表明 TSA 对受到 TGF- β_1 刺激的 HSF 细胞中 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达起抑制作用, 结果见图 4。

4 讨论

增生性瘢痕由皮肤深度受创后纤维化组织过度生长而形成, 是一种病理性伤口过度愈合反应。由

图 2 TSA 对 TGF- β_1 刺激的 HSF 细胞平板克隆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effect of TSA on plate cloning ability of TGF- β_1 -stimulated HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 3 TSA 对 TGF- β_1 刺激的 HSF 细胞中 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of TSA on TGF- β_1 /Smad signaling pathway in HSF stimulated by TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 TSA 对 TGF- β_1 刺激的 HSF 细胞中 α -SMA、VEGFA 和 COL I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of TSA on protein expression of α -SMA, VEGFA and COL I in HSF stimulated by TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

于涉及多种细胞、细胞因子和细胞外基质之间的相互调控作用,相关的发病机制目前尚不完全明确。目前,成纤维细胞过度增殖分化和细胞外基质过度沉积被认为是瘢痕增生的主要原因,而 TGF- β_1 是关键细胞因子之一,可通过调节 HSF 的增殖和迁移、分化、胶原的产生和沉积以及 ECM 的重塑来调控伤口愈合的生理过程^[7]。

研究表明, TGF- β_1 在瘢痕组织和 HSF 中的 mRNA 和蛋白质分泌水平均显著高于正常皮肤或正常皮肤衍生纤维细胞,提示针对 TGF- β_1 靶向治疗增生性瘢痕的潜在应用价值^[10]。作为触发 Smad 依赖性细胞通路的重要信号转导因子, TGF- β_1 活化后可诱导下游信号分子 Smad2 和 Smad3 磷酸化,进而与 Smad4 相结合形成异构复合物。该复合物通过直接或间接与其他 DNA 结合蛋白的相互作用后,触发炎症因子以及参与纤维化的关键基因的转录,这种转录活性能够刺激 HSF 增殖以及以胶原蛋白为主的 ECM 过度沉积^[11]。

TSA 是丹参标志性成分之一,近年来大量的临床和实验研究证明 TSA 具有显著的抗肺、心肌、肾纤维化等药理作用。Tang 等^[12]证实 TSA 可减轻博来霉素诱导的大鼠肺胶原沉积和巨噬细胞浸润,抑制 TGF- β_1 触发的肺泡上皮细胞上皮间充质转化,改善肺纤维化。Zhan 等^[13]研究发现 TSA 通过抑制 TGF- β_1 诱导的大鼠心脏成纤维细胞中 p-Smad2 和 p-Smad3,阻断了 TGF- β_1 /Smad 通路,从而对心肌纤维化起到抑制作用。Wang 等^[14]通过切除大鼠 5/6 肾研究 TSA 诱导肾脏纤维化发现, TSA 可能通过介导 TGF- β_1 /Smad 信号通路下调肾脏组织中 III、IV 型胶原蛋白、纤维连接蛋白和 TGF- β_1 ,改善肾脏纤维化。有报道指出, TSA 可通过抑制 HSF 细胞的异常增殖治疗瘢痕疙瘩和系统性硬化症等皮肤纤维化疾病^[15-16]。张楠楠等^[17]比较丹参不同提取部位抗 HSF 增殖的作用后发现丹参石油醚提取部位中的丹参酮类化合物为主要活性成分。由于 TSA 水溶性较差,目前多以经过化学结构修饰后转化为水溶性成分的丹参酮 II_A 磺酸钠(STS)为研究对象,用于皮肤纤维化疾病如增生性瘢痕、瘢痕疙瘩等的注射给药^[18-19]。但研究发现, TSA 与 STS 之间的药动学行为、组织分布和部分药理作用具有显著差异^[20-21]。目前亦有直接应用 TSA 注射给药抑制兔耳瘢痕组织增生、抑制 HSF 增殖和促 HSF 凋亡的少量报道^[22-23]。增生性瘢痕为结缔组织增生疾病,病变源于真皮部

位, TSA 在防治皮肤纤维化方面的机制值得进一步深入研究,为后续抑制瘢痕增生的经皮制剂提供理论基础。本实验以 HSF 作为研究对象,发现 TSA 对 TGF- β_1 诱导的 HSF 增殖和克隆形成具有抑制作用,同时作用于 TGF- β_1 /Smad 信号通路,显著下调 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平,提示 TSA 对于 HSF 细胞的生理机能具有显著的影响,提示具有治疗增生性瘢痕的广阔前景。

成纤维细胞的分化作用是生理性伤口愈合和病理性伤口修复的关键环节之一, TGF- β_1 是诱导分化的重要细胞因子^[24]。正常情况下, HSF 向肌成纤维细胞分化后,通过分泌胶原和重塑(收缩)ECM 促进伤口的愈合。然而,在过量的炎症因子和大量促纤维化因子作用下,在创伤区域大量持续存在的肌成纤维细胞将诱导 ECM 不断收缩,最终导致瘢痕的增生^[25]。

α -SMA 是一种参与细胞收缩和应力纤维形成的可收缩的细胞骨架丝状蛋白,其表达是 HSF 向肌成纤维细胞分化的独特分子标记。 α -SMA 在应力纤维中的定位增强了肌成纤维细胞的收缩活性^[26]。另外,血管内皮生长因子(VEGF)是主要的促血管生成因子之一,可通过作用于炎性细胞和内皮细胞间接,或作用于成 HSF 直接促进瘢痕生成^[27]。COL I 是 ECM 的主要成分,与正常皮肤相比,增生性瘢痕中 I 型胶原蛋白的合成和分泌明显增加,提示 ECM 中胶原过度沉积与增生性瘢痕的发病机制密切相关^[28]。有研究发现,瘢痕增生期组织与正常组织、早期、退化期和成熟期瘢痕组织相比, HSF 和微血管数量明显增多, TGF- β_1 和 VEGF 蛋白表达水平明显上升, TGF- β_1 和 VEGF mRNA 和蛋白表达水平以及 COL I mRNA 表达水平明显增高并达到峰值。其中, VEGF 主要分布于 HSF 中,少量分布于微血管内,微血管周围伴随有大量胶原沉积^[29]。本实验中, TGF- β_1 刺激 HSF 后,细胞内 α -SMA、VEGF、COL I 表达水平升高,提示 HSF 向肌成纤维细胞的转变以及瘢痕增生相关因子分泌水平的增高。TSA 呈浓度依赖性降低了 α -SMA、VEGF、COL I 的表达水平,提示 TSA 可能通过抑制 HSF 的分化,减少微血管的过度生成以及胶原的过度沉积,从而抑制瘢痕增生。

综上所述, TSA 能够在体外发挥抑制 HSF 增殖和分化的作用,同时抑制 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,下调 p-Smad2/Smad2 和 p-Smad3/Smad3 的比值,

减少 VEGF 和 COL I 胶原的分泌, 该作用机制可能与抑制 TGF- β_1 /Smad 信号通路有关。今后将进一步结合体内实验深入研究 TSA 的作用机制, 为 TSA 治疗增生性瘢痕的药物研究开发提供科学依据。

参考文献

- [1] Coentro J Q, Eugenia P, Geoffrey H, *et al.* Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 34(146): 37-59.
- [2] Xu J, Wei K, Zhang G, *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 42(225): 18-30
- [3] Shroff A, Mamalis A, Jagdeo J, Oxidative stress and skin fibrosis [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2014, 8(2): 257-267.
- [4] Shi M J, Dong B S, Yang W N, *et al.* Preventive and therapeutic role of tanshinone II_A in hepatology [J]. *Biomed Pharmacother*, 39(112): 108676-108686.
- [5] Ren J, Fu L, Nile S H, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* in treating cardiovascular diseases: A review on its pharmacological and clinical applications [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 53(10): 753-760.
- [6] Cai Y, Zhang W, Chen Z, *et al.* Recent insights into the biological activities and drug delivery systems of tanshinones [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 15(11): 121-130.
- [7] Penn J W, Grobbelaar A O, Rolfe K J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: A review [J]. *Int J Burns Traum*, 2012, 2(1): 18-28.
- [8] Nourian D A, Mirahmadi B F, C M, *et al.* Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 111.
- [9] Borena B M, Martens A, Broeckx S Y, *et al.* Regenerative skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 1-23.
- [10] Gilbert R, Vickaryous M K, Vilorio-Petit A M. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration [J]. *J Dev Biol*, 2016, 4(2): 1-21.
- [11] Lichtman M K, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2): 215-222.
- [12] Tang H Y, He H Y, Ji H, *et al.* Tanshinone II_A ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inhibits transforming growth factor-beta- β -dependent epithelial to mesenchymal transition [J]. *J Surg Res*, 2015, 197(1): 167-175.
- [13] Zhan C Y, Tang J H, Zhou D X, *et al.* Effects of tanshinone II_A on the transforming growth factor β_1 /Smad signaling pathway in rat cardiac fibroblasts [J]. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(6): 633-638.
- [14] Wang D T, Huang R H, Cheng X, *et al.* Tanshinone II_A attenuates renal fibrosis and inflammation via altering expression of TGF- β /Smad and NF- κ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(1): 4-12.
- [15] 吕小岩, 李明, 翁孟武. 丹参成分抑制系统性硬皮病成纤维细胞增殖及胶原表达的研究 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(34): 2426-2428.
- [16] Chen G, Liang Y, Liang X, *et al.* Tanshinone II_A inhibits proliferation and induces apoptosis through the down regulation of survivin in keloid fibroblasts [J]. *Ann Plast Surg*, 2016, 76(2): 180-186.
- [17] 张楠楠, 王倩, 高洁, 等. 丹参抗成纤维细胞增殖作用的分子机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2440-2447.
- [18] 张建华, 欧斌贤, 蒙诚跃. 早期注射丹参酮 II_A 磺酸钠可抑制兔耳增生性瘢痕 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9457-9461.
- [19] 康春福, 陈斌, 秦泽莲, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠在低氧下对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和促纤维化因子表达的影响 [J]. 中国微创外科杂志, 2015, 15(7): 649-654.
- [20] 曹运朝, 廖正根, 梁新丽, 等. 丹参酮 II_A 脂微球与丹参酮 II_A 磺酸钠注射液的药动学与组织分布比较研究 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2105-2111.
- [21] Zhou Z Y, Zhao W R, Zhang J, *et al.* Sodium tanshinone II_A sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 39(118): 109362-109373.
- [22] 肖小娜, 张培华, 罗少军, 等. 丹参酮 II_A 对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的作用 [J]. 广东医学院学报, 2005, 22(4): 359-360.
- [23] 吴志远, 罗少军, 汤少明, 等. 丹参酮 II_A 对兔耳增生性瘢痕组织形成的影响 [J]. 广东医学院学报, 2002, 19(4): 255-259.
- [24] 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 Biomater*, 2018, 69(15): 131-145.
- [25] Shin D, Minn K W. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 113(2): 633-640.
- [26] Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell [J]. *J Biomech*, 2010, 43(1): 146-155.
- [27] Wilgus T A. Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2019, 8(12): 671-678.
- [28] Tejiram S, Zhang J, Travis T E, *et al.* Compression therapy affects collagen type balance in hypertrophic scar [J]. *J Surg Res*, 2016, 201(2): 299-305.
- [29] Qing C, Wang Z Y, Song F, *et al.* Dynamic biological changes in fibroblasts during hypertrophic scar formation and regression [J]. *Int Wound J*, 2016, 13(2): 257-262.