

• 药剂与工艺 •

丹参酮 II_A-丹酚酸 B 共载脂质体制备、表征及对人成纤维细胞生物学特性的影响

刘锐萍¹, 詹燕珊¹, 许小琪², 罗玺¹, 王纠³, 韩兵⁴, 时军^{1,5*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006
2. 汕头市科技馆, 广东 汕头 515000
3. 广东省药物新剂型重点实验室, 广东 广州 510006
4. 中国医学科学院北京协和医学院整形外科医院, 北京 100144
5. 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 制备丹参酮 II_A (tanshinone II_A, TSA) 和丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 共载脂质体 (TSA-SAB 脂质体), 并考察其对皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblasts, HSF) 增殖的抑制作用。方法 薄膜分散-pH 梯度法制备出 TSA-SAB 脂质体, 对其形态、粒径分布、ζ 电位、包封率、初步稳定性、体外释药行为和透皮性能等进行表征; CCK-8 法、细胞划痕法和 Transwell 小室法分别考察 TSA-SAB 脂质体对 HSF 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响; Western blotting 法考察其对基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 和 I 型胶原 (type I collagen, COL-I) 蛋白表达水平的影响。结果 TSA-SAB 脂质体粒径为 (189.50±1.57) nm, ζ 电位为 (-18.73±1.41) mV, 粒子分散系数为 0.246±0.030, TSA 和 SAB 包封率分别为 (87.93±0.97)% 和 (91.20±0.47)%, 稳定性良好, 表现出持续缓慢的释药行为和良好的透皮性能, 且能抑制 HSF 细胞的增殖、迁移和侵袭 ($P<0.01$), 同时显著增加 MMP2 的合成, 降低 COL-I 的表达 ($P<0.01$)。结论 所制备的 TSA-SAB 脂质体粒径分布均匀, 稳定性良好, 包封率高, 可延缓释放速率, 提高药物的透皮性, 对 HSF 细胞的增殖、迁移和侵袭均有较好的抑制作用, 同时能提高 MMP2 的表达, 抑制 COL-I 的过度生成, 表明 TSA-SAB 脂质体可能对增生性瘢痕有防治作用。

关键词: 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 脂质体; 人皮肤成纤维细胞; 增生性瘢痕

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2633-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.005

Preparation and characterization of tanshinone II_A-salvianolic acid B co-loaded liposomes and their effects on biological properties of human skin fibroblasts

LIU Rui-ping¹, ZHAN Yan-shan¹, XU Xiao-qi², LUO Xi¹, WANG Jiu³, HAN Bing⁴, SHI Jun^{1,5}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. Shantou Science and Technology Museum, Shantou 515000, China
3. Guangdong Key Laboratory of New Drug Formulations, Guangzhou 510006, China
4. Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100144, China
5. Guangdong Engineering & Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective Tanshinone II_A (TSA) and salvianolic acid B (SAB) co-loaded liposomes (TSA-SAB liposomes) were prepared and their inhibitory effects on the proliferation of human skin fibroblasts (HSF) were investigated. **Methods** TSA-SAB liposomes were prepared by the thin film dispersion method combined with the pH gradient active drug loading method, and characterized by

收稿日期: 2021-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173982); 广东省自然科学基金 (2022A1515011382)

作者简介: 刘锐萍 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 15913426034 E-mail: 1171737196@qq.com

*通信作者: 时军 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为纳米经皮给药系统及瘢痕的中医药防治研究。E-mail: shijun8008@163.com

morphology, particle size distribution, ζ potential, encapsulation rate, preliminary stability, release regularity and transdermal *in vitro*; The effects of TSA-SAB liposomes on the proliferation, migration and invasion of HSF cells were investigated by CCK-8, cell scratching and Transwell, respectively. And the Effect of TSA-SAB liposomes on the protein expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and type I collagen (COL-I) was investigated by Western blotting. **Results** The TSA-SAB liposomes had a particle size of (189.50 ± 1.57) nm, a ζ potential of (-18.73 ± 1.41) mV, a particle dispersion coefficient (PDI) of 0.246 ± 0.030 , and TSA and SAB encapsulation rates of $(87.93 \pm 0.97)\%$ and $(91.20 \pm 0.47)\%$, respectively. The stability of liposomes was high, and it had sustained drug release and good transdermal property *in vitro*, which were able to inhibit the proliferation, migration and invasion of HSF cells ($P < 0.01$), and significantly increased the protein synthesis of MMP2 and decreased the protein expression of COL-I ($P < 0.01$). **Conclusion** The TSA-SAB liposomes with uniform particle size distribution, good stability, high encapsulation rate, good transdermal absorption, which inhibited the proliferation, migration and invasion of HSF cells, and also increased the activity of MMP2 collagen degrading enzyme and inhibited the excessive production of COL-I, indicating that TSA-SAB liposomes may have a preventive effect on the generation of hypertrophic scar.

Key words: tanshinone II_A; salvianolic acid B; liposomes; human skin fibroblasts; hypertrophic scar

增生性瘢痕 (hypertrophic scar, HS) 常发生于皮肤深度创伤后, 临床表现为病变处隆起, 明显高于周围正常皮肤, 局部增厚变硬, 常伴有灼热、瘙痒、疼痛等症状, 严重影响了患者的正常生活^[1-2]。目前 HS 的发病机制尚未完全阐明, 现代医学研究认为, HS 的发生主要与人皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblasts, HSF) 过度增殖及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积有关。中医将 HS 归于癭瘕积聚范畴, 认为气虚血瘀是主要的病机^[3-4]。基于文献研究分析中医药治疗 HS 的用药规律, 发现多为活血化瘀药, 其中丹参的用药频次最高, 表明其在防治 HS 方面具有很大的潜力^[5]。

丹参酮 II_A (tanshinone II_A, TSA) 是丹参中脂溶性成分之一, 具有显著的抗肺、心肌、肾纤维化等药理作用^[6-8]。研究发现, 当皮肤处于创面修复期时, HSF 会受到转化生长因子- β 1 (transforming factor- β 1, TGF- β 1) 的调控大量地增殖和转化, 诱导 I 型胶原纤维 (collagen type I, COL-I) 等关键蛋白在真皮层堆积, 同时, 还抑制了降解胶原的关键酶——基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 的表达。课题组前期实验发现, TSA 能够抑制 TGF- β 1 诱导的 HSF 细胞增殖和分化^[9], 降低 COL-I 的产生。丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 是丹参中含量最高的水溶性成分, 研究表明其对心、肺等器官纤维化疾病具有显著的治疗作用。本课题组前期研究发现, 穿膜肽 TAT 修饰的载 SAB 脂质体在体外能显著抑制 HSF 的增殖、迁移及侵袭, 且呈剂量相关性^[10-12]。

脂质体 (liposomes) 是生物亲和的纳米递药载体, 能够同时携带不同极性的药物, 其类脂双分子层结构具有良好的生物相容性以及药物包载能力,

可增强药物真皮滞留性。本研究采用薄膜分散-pH 梯度法制备 TSA-SAB 脂质体, 并通过体外实验考察其对 HSF 增殖的抑制作用, 以期对丹参透皮制剂防治 HS 提供新的思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ulti Mate 3000 高效液相色谱仪系统, 311 型 CO₂ 恒温细胞培养箱, 赛默飞世尔科技公司; ELX800 型全自动酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; TGL-16 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; RE-2000A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; JY96-II N 型超声波细胞破碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; MX-S 漩涡混匀器, 大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司; LF-50 型脂质体挤出仪, 加拿大 Avestin 公司; 3-30K 型低温离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; -80 °C 超低温冰箱, 青岛海尔股份有限公司; IX73 型荧光倒置显微镜, 日本奥林巴斯株式会社; TP-6 型透皮扩散仪, 天津市精拓仪器科技有限公司。

1.2 试剂

大豆卵磷脂, 德国 Lipoid 公司; 胆固醇, 上海艾伟特医药科技有限公司; TSA 对照品 (批号 Y27M19C37812, 质量分数 $\geq 98\%$)、TSA 原料药 (批号 Y14M10C82864, 质量分数 $\geq 95\%$)、SAB 原料药 (批号 H16O10Y100218, 质量分数 $\geq 98\%$)、上海源叶生物科技有限公司; SAB 对照品 (批号 111562-202010, 质量分数 $\geq 99\%$)、中国食品药品检定研究院; TSA-SAB 脂质体 (批号 20201205、20201220、20210105), 实验室自制; 澳洲胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 46G5163K)、DMEM-高糖培养基 (批号 8120501)、链霉素/青霉素 (P/B) 双抗、

磷酸盐缓冲液 (PBS), 美国 Gibco 公司; 细胞级二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 美国 Sigma 公司; CCK-8 细胞增殖检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 抗体、COL-I 抗体, 英国 Abcam 公司; 其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞与动物

HSF 细胞株, 购自中国科学院细胞库, 取第 3~8 代细胞用于实验。SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 体质量 200~250 g, 由南方医科大学提供, 合格证号 SCXK (粤) 2019-0041。动物饲养于广东药科大学动物实验中心, 该中心提供 SPF 级实验环境及设备。所有动物实验遵循《实验动物管理条例》有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.4 主要溶液的配制

1.4.1 完全培养基 用 FBS、双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素) 和基础培养基 DMEM 配制得含 10% FBS 的完全培养基。

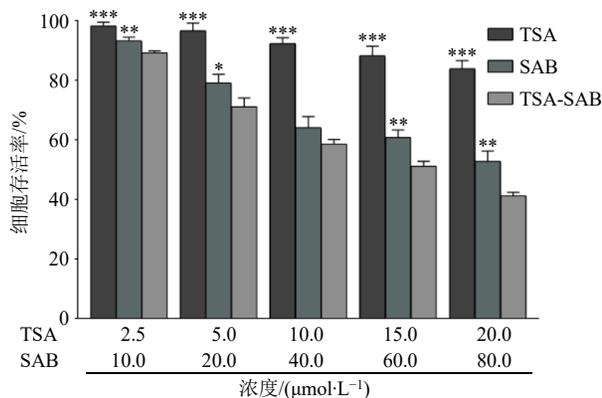
1.4.2 含药储备液 用完全培养基将适量 TSA/SAB 溶液和 TSA-SAB 脂质体溶液梯度稀释得到不同浓度含药储备液。

2 方法与结果

2.1 联合用药对 HSF 增殖的作用

前期预实验发现 TSA 和 SAB 摩尔质量配比为 1:4 时, 抑制 HSF 细胞增殖的效果较好, 因此选择该比例进行后续操作。取对数生长期的 HSF 细胞消化, 离心, 以 1×10^5 /孔接种到 96 孔细胞培养板中, 孵育过夜。细胞分为 4 组, 分别是空白对照组、游离 TSA 组 (2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、游离 SAB 组 (10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、TSA 和 SAB 联合用药组 (TSA-SAB 1:4, 以 TSA 的浓度计 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 每组设 5 个复孔, 并各设置 1 组空白孔, 平行 3 份。各组分别给药干预 48 h 后, 采用 CCK8 法检测各组 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。依据 Chou-Talalay 方法计算联合作用指数 (combined index, CI), 结果显示 5 种浓度配比的 CI 值分别为 0.94 ± 0.12 、 0.87 ± 0.18 、 0.90 ± 0.13 、 0.93 ± 0.04 、 0.89 ± 0.10 (CI=1, 表示有加和作用, CI<1 表示有协同作用, CI>1 表示拮抗作用)。

结果如图 1 所示, TSA 和 SAB 两药单用时, 随着浓度的提高, 抑制 HSF 细胞增殖的作用变强。与单独给药组相比, 不同浓度的 TSA-SAB 联合用



与 TSA-SAB 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs TSA-SAB group

图 1 TSA-SAB 联用对 HSF 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of TSA and SAB on proliferation of HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药组均增强了对 HSF 细胞的抗增殖活性, 其结果具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 CI 值均小于 1, 表明两者联用具有协同作用, 可为下一步制剂的制备提供初步药效依据。

2.2 TSA-SAB 脂质体制备与表征

2.2.1 TSA-SAB 脂质体制备 精密称取处方量的大豆卵磷脂、胆固醇和 TSA 溶于氯仿中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 真空旋转蒸发, 除去有机溶剂得均匀薄膜。加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的去离子水并在该温度下水浴水化, 超声波细胞破碎机超声 5 min, 即得 TSA-脂质体。SAB 溶于 1% 甘氨酸-HCl 缓冲溶液 (pH 3.32), 按药脂质量比 0.12, 将其逐滴滴加至 TSA-脂质体中, 后加入 PBS 缓冲溶液调节外水相 pH 值至 6.0, 继续孵育 30 min, 得脂质体混悬液。将脂质体混悬液过 0.8 μm 的微孔滤膜, 再用 400 nm 脂质体挤出仪来回挤出 20 次整粒, 即得 TSA-SAB 脂质体。

2.2.2 TSA-SAB 脂质体性状考察 取脂质体适量, 用蒸馏水稀释至一定倍数, 观察其整体外观形态。然后将脂质体稀释样品滴至铜网上, 滴加 2% 磷酸溶液进行负染, 在透射电镜下观察其形貌特征。另取脂质体稀释样品适量, 利用动态光散射激光粒径仪测定其平均粒径、粒径分散指数和 ζ 电位, 结果见图 2。所制备的脂质体外观呈浅肉橘色, 将其稀释后可观察到明显淡蓝色乳光现象, 无絮凝分层, 无药物沉淀, 可观察到丁达尔效应。电镜下脂质体呈球状或类球状, 粒子间无聚集现象, 分散均匀。测得的脂质体粒径为 (189.50 ± 1.57) nm, 粒径分散指数 (PDI) 为 0.246 ± 0.030 , ζ 电位为 (-18.73 ± 1.41) mV, 表明脂质体粒径较小且分布均匀, ζ 电

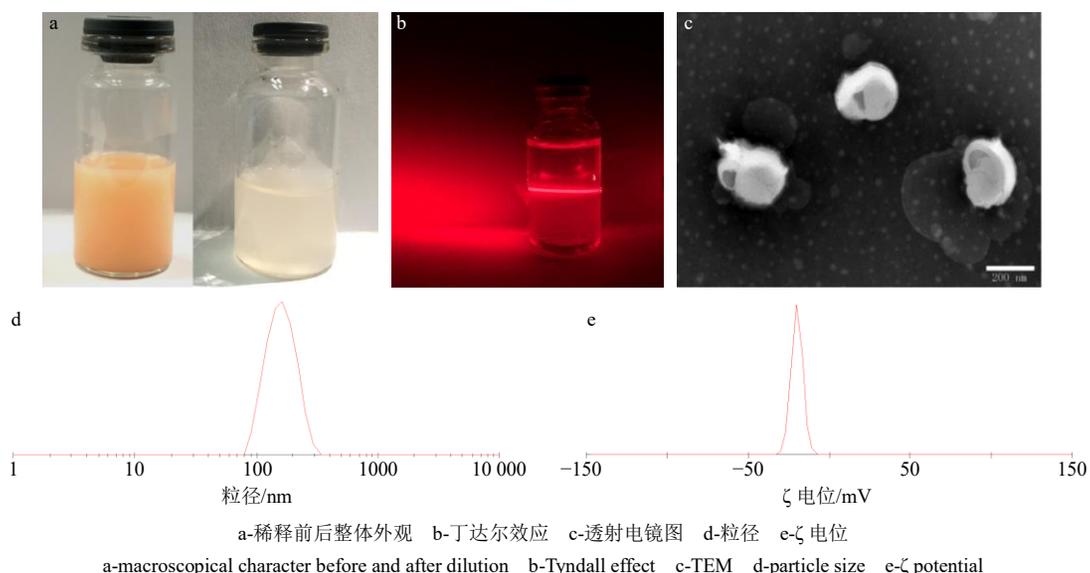


图2 TSA-SAB 脂质体性状表征

Fig. 2 Characterization of TSA-SAB liposomes

位稳定，不易发生絮凝。

2.2.3 TSA-SAB 脂质体包封率和载药量测定 精密量取脂质体 3 mL，2000 r/min 离心（离心半径为 6.30 cm）5 min，取上清 0.1 mL 置 1 mL 量瓶中，加入适量的甲醇稀释至刻度并超声破乳，用 HPLC 法测定 TSA 的质量浓度。取脂质体 3 mL，15 000 r/min 离心（离心半径为 9.98 cm）30 min，取上清液 0.4 mL 置于截留相对分子质量 100 000 超滤管中，10 000 r/min 离心（离心半径为 9.98 cm）15 min，收集滤过液并用 HPLC 法测定游离 SAB 的质量浓度。另精密吸取未离心的脂质体 0.1 mL 于 1 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度并超声破乳，分别测定 TSA 和 SAB 含量。按包封率=脂质体中药物的质量/药物的加入质量，载药量=脂质体中药物的质量/(载体质量+脂质体中药物的质量)，分别计算 TSA 和 SAB 的包封率和载药量。结果测得所制备的 3 批 TSA-SAB 脂质体中 TSA 包封率为 (87.93±0.97) %，载药量为 (0.78±0.52) %；SAB 包封率为 (91.20±0.47) %，载药量为 (8.03±0.61) %。

2.2.4 TSA-SAB 脂质体初步稳定性考察 将制备好的 TSA-SAB 脂质体贮存于西林瓶内，分别置于室温和 4 ℃ 避光处储存 10 d，于第 0、1、3、5、7、10 天时取出，观察其包封率及粒径变化。如图 3 所示，随着贮存时间的增加，粒径略有增大，包封率有所下降；相比于室温避光储存，4 ℃ 避光其粒径和包封率总体变化小，稳定性良好。

2.2.5 TSA-SAB 脂质体体外释药性能考察 以含

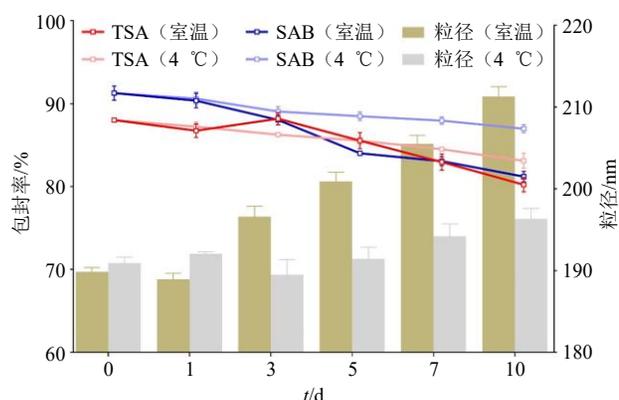


图3 不同条件下脂质体包封率和粒径的变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Changes of liposome encapsulation and particle size under different conditions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1% SDS 的生理盐水作为 TSA-SAB 脂质体的释放介质，即可保证药物释放在漏槽状态下进行。精密吸取 TSA-SAB 脂质体溶液 1 mL 装入预处理好的透析袋（截留相对分子质量 14 000）内，悬于 50 mL 的释放介质中，于 37 ℃ 水浴以 100 r/min 振摇，分别在 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24 h 吸取 1 mL 释放介质，同时补加等温等量的释放介质，HPLC 法测定 TSA 和 SAB 的质量浓度，计算二者的累积释放率。另取相等质量浓度的 TSA 和 SAB，按上述实验步骤进行测定。

各时间点药物累积释放情况见图 4。游离 TSA 脂溶性强，几乎不溶于水，在 6 h 时累积释放率为 17.13%，6 h 之后再无释放药物；而 TSA-SAB 脂质

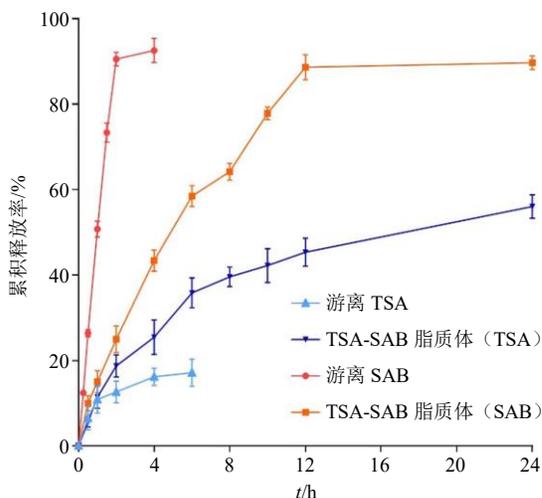


图 4 TSA-SAB 脂质体中 TSA 和 SAB 的体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Accumulative release of TSA and SAB in TSA-SAB liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

体在 24 h 内能够持续缓慢地释放 TSA, 累积释放率为 56.01%, 二者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。游离 SAB 水溶性较强, 4 h 时累积释放率就达到 94.72%; 而脂质体中的 SAB 24 h 时累积释放率为 89.46%, 相比于游离 SAB 的快速释放, 表现出一定缓释能力。采用零级、一级和 Higuchi 方程对 TSA-SAB 脂质体中 TSA 和 SAB 释药数据进行拟合, 发现 2 种药物的一级方程拟合结果最高。TSA 的一级方程: $Q = 54.560(1 - e^{-0.168t})$, $r = 0.9863$; SAB 的一级方程: $Q = 99.833(1 - e^{-0.835t})$, $r = 0.9692$, 以上结果表明 TSA-SAB 脂质体具有良好的缓释作用。

2.2.6 TSA-SAB 脂质体体外透皮性能考察 将油相白凡士林置于 70 °C 水浴锅上加热溶解, 将称量处方量的 TSA 溶于油相中, 另精密称取 SAB 溶于同等温度的水相蒸馏水中, 将水相缓缓倒入油相中, 并不断搅拌至冷凝, 制得与 TSA-SAB 脂质体药物质量分数相等的 TSA-SAB 乳膏。

取 SD 大鼠, 进行脱毛处理, 处死后剥取腹部皮肤并去除皮下脂肪组织及筋膜, 用生理盐水漂洗干净后观察, 选用无破损的鼠皮。将皮肤固定于 Franz 扩散池 (有效释药面积为 1.766 cm², 接收池体积为 15 mL), 角质层面向供给池, 真皮层面向接收液。分别取 TSA-SAB 脂质体和 TSA-SAB 乳膏加入供给池。以无水乙醇-PEG₄₀₀-生理盐水 (5 : 2 : 3) 作为接收液, 37 °C 水浴保温, 并以 350 r/min 转速搅拌, 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 定时取样 1 mL, 同时补充等温等量的接收液。氮气吹

干接收液样品, 残渣用甲醇复溶, 采用 HPLC 法测定 TSA 和 SAB 的含量, 计算 2 组制剂 TSA 和 SAB 的累积渗透量。透皮实验结束后, 取出离体皮肤, 洗去皮肤表面的残留药物, 照皮肤样品处理方法用 HPLC 测定 2 组制剂皮肤内 TSA 和 SAB 的含量, 计算真皮滞留量。

采用零级、一级和 Higuchi 方程对 2 组制剂的 TSA 和 SAB 释药数据进行拟合, 结果见图 5 和表 1。TSA-SAB 脂质体中 TSA 和 SAB 的透皮释药均符合一级动力学方程, 与体外释药的结果一致。TSA-SAB 脂质体中 TSA 和 SAB 的 24 h 累积释放量和真皮滞留量均高于 TSA-SAB 乳膏组, 表明 TSA-SAB 脂质体能提高药物的透皮能力。

2.3 对 HSF 生物学特性的影响

2.3.1 对 HSF 增殖活性的影响 在前面 TSA 和 SAB 联合用药对 HSF 增殖影响的考察中, 含 15 μmol/L TSA 和 60 μmol/L SAB 的联合给药组对 HSF 的抑制率接近 50%, 因此, 将该剂量组视为联合用药组的半数细胞抑制浓度 (half maximal inhibitory

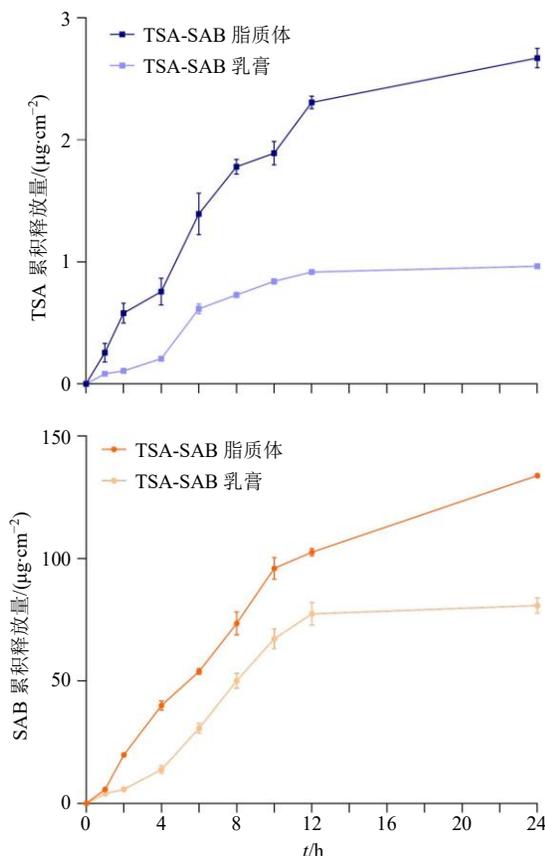


图 5 TSA-SAB 脂质体与乳膏的透皮吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Accumulative transdermal of TSA-SAB liposomes and TSA-SAB cream ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 TSA-SAB 脂质体与乳膏的透皮动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Percutaneous permeation kinetic parameters of TSA-SAB liposomes and TSA-SAB cream ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制剂	成分	Q_n-t 方程	r	模型	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	真皮滞留量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
脂质体	TSA	$Q=3.000(1-e^{-0.103t})$	0.981 5	一级方程	2.67 ± 0.08	3.54 ± 0.28
	SAB	$Q=9.075(1-e^{-0.105t})$	0.981 6	一级方程	133.87 ± 0.86	30.06 ± 2.66
乳膏	TSA	$Q=1.118(1-e^{-0.114t})$	0.922 5	一级方程	3.04 ± 0.16	0.97 ± 0.02
	SAB	$Q=20.943t^{1/2}-12.728$	0.842 3	Higuchi	80.80 ± 3.09	17.65 ± 2.85

concentration, IC_{50})。取处于对数生长期的细胞消化,离心,计数后,按 1×10^5 /孔接种到 96 孔板中,于培养箱中孵育 24 h 后,用 PBS 洗涤细胞。将细胞分为对照组、空白脂质体组、TSA-SAB 游离药物组(含 $15 \mu\text{mol/L}$ TSA 和 $60 \mu\text{mol/L}$ SAB)、TSA-SAB 脂质体低剂量组(含 $10 \mu\text{mol/L}$ TSA 和 $40 \mu\text{mol/L}$ SAB)、TSA-SAB 脂质体中剂量组(含 $15 \mu\text{mol/L}$ TSA 和 $60 \mu\text{mol/L}$ SAB)、TSA-SAB 脂质体高剂量组(含 $20 \mu\text{mol/L}$ TSA 和 $80 \mu\text{mol/L}$ SAB)。对照组加入完全培养基 $100 \mu\text{L}$,空白脂质体用等量完全培养基稀释后加入空白脂质体组,其余各组分别加入含相应浓度的等量含药储备液。干预 48 h 后,然后采用 CCK8 法检测各组 450 nm 处 A 值,计算细胞存活率。结果见表 2,与对照组相比,空白脂质体组对 HSF 增殖活性无显著影响,表明该膜材生物相容性好,无毒副作用。相较于对照组和空白脂质体组,含 TSA-SAB 联合给药组干预 HSF 48 h 后,细胞存活率均有所下降,表明均具有一定的抗 HSF 增殖活性 ($P < 0.01$)。与游离药物组相比,含同等药物量的脂质体对细胞增殖的抑制作用明显增强,呈剂量相关性。

表 2 TSA-SAB 脂质体对 HSF 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of TSA-SAB liposomes on proliferation of HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	-	100.00 ± 2.06
空白脂质体	-	100.00 ± 3.03
TSA 和 SAB 联合游离药物	15+60	$52.36 \pm 4.47^{***}$
TSA-SAB 脂质体	10+40	$54.66 \pm 2.78^{***}$
	15+60	$41.39 \pm 1.90^{***}$
	20+80	$29.95 \pm 3.30^{***}$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空白脂质体组比较: *** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs blank liposomes group

2.3.2 对 HSF 细胞迁移能力的影响 取处于对数生长期的细胞消化,离心,计数后,按 1.5×10^6 /孔接种到 6 孔板中。静置孵育,观察细胞融合状态,用 $10 \mu\text{L}$ 微量移液器的枪头垂直于定位横线垂直方向均匀划线,PBS 洗涤细胞 2~3 次,除去细胞碎片。在显微镜下观察并记录划痕宽度,记录该时间点为 0 h。细胞分组同“2.3.1”项,采用换液的方式,对照组加入完全培养基 $100 \mu\text{L}$,空白脂质体用等量完全培养基稀释后加入空白脂质体组,其余各组分别加入含相应浓度的等量含药储备液。给药干预后,分别在 24、48 h 用倒置显微镜进行拍照并记录,使用 Image J 1.52 软件对图像进行分析。结果见图 6 和表 3,随着培养时间的增加,对照组和空白脂质体组左、右两侧的 HSF 逐渐向中间划痕区域迁移,划痕间距逐渐变小。在 48 h 时可明显观察到 HSF 长满整个划痕区域,提示脂质体膜材对 HSF 的迁移能力无影响。相较于对照组,含 TSA-SAB 联合给药组划痕区域均保持一定的划痕宽度,且在培养过程中可明显观察到细胞胞体缩小,胞质皱缩,部分细胞皱折离壁漂起的现象,表明 TSA 和 SAB 联合游离药物组和脂质体组均能显著抑制 HSF 迁移 ($P < 0.01$),且 TSA-SAB 脂质体对 HSF 迁移的抑制作用呈现剂量相关性关系。

2.3.3 对 HSF 细胞侵袭能力的影响 将融解的 Matrigel 基质胶与培养基按 1:8 的比例进行稀释,以 $100 \mu\text{L}$ /孔加到 Transwell 上室中,置于培养箱中恒温孵育 30 min。取处于对数生长期的细胞消化,离心,计数后,用基础培养基调整细胞密度为 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$,分组同“2.3.1”项。

取 $100 \mu\text{L}$ 单细胞悬液接种于 Transwell 上室中,空白对照组下室加入 $500 \mu\text{L}$ 的完全培养基,空白脂质体组加入稀释了空白脂质体的等量完全培养基,其余各组下室分别加入含相应浓度的等量含药储备液。给药 48 h 后,弃去 Transwell 上室的培养基,用 0.1% 结晶紫固定染色 30 min。染色结束后,用

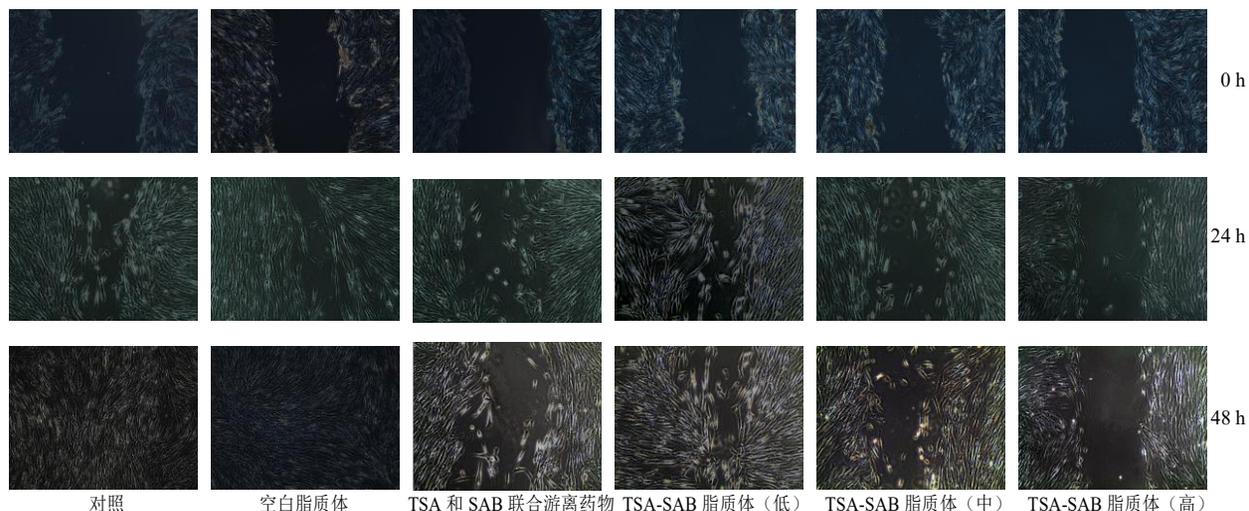


图6 TSA-SAB脂质体对HSF迁移能力的影响(×40)

Fig. 6 Effect of TSA-SAB liposomes on migratin ability of HSF (× 40)

表3 TSA-SAB脂质体对HSF迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effect of TSA-SAB liposomes on migratin ability of HSF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	划痕面积恢复率/%	
		24 h	48 h
对照	-	67.12±1.44	99.97±0.64
空白脂质体	-	62.31±2.58	96.44±1.50
TSA和SAB联合游离药物	15+60	31.27±0.84 ^{**##}	49.89±2.46 ^{**##}
TSA-SAB脂质体	10+40	53.45±1.27 ^{**#}	71.29±5.72 ^{**##}
	15+60	20.22±1.43 ^{**##}	37.51±4.61 ^{**##}
	20+80	9.86±2.25 ^{**##}	17.12±0.28 ^{**##}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与空白脂质体组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs blank liposomes group

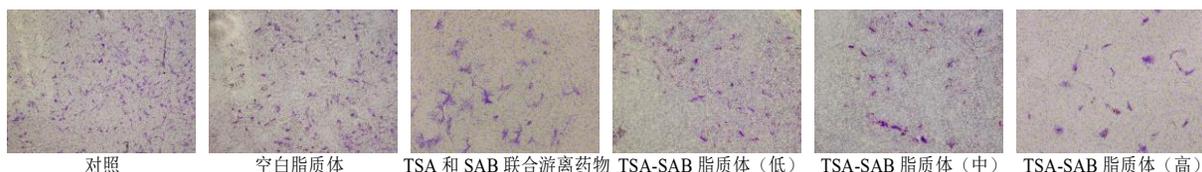


图7 TSA-SAB脂质体对HSF侵袭的影响(×40)

Fig. 7 Effect of TSA-SAB liposomes on invasion ability of HSF (× 40)

胞分组和给药同“2.3.1”项, 给药干预72h后, 加100 μL 预冷的蛋白裂解液(RIPA), 将所得裂解液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下14 000 r/min离心(离心半径为9.98 cm)10 min后吸取上清液。

采用BCA法测出细胞上清液中各蛋白浓度, 以GAPDH作为内参蛋白, 配制10% SDS-PAGE凝胶进行电泳, 将其转移到PVDF膜上。将膜置于5%脱脂奶粉配制的封闭液中, 于摇床室温孵育1h。回收封闭液, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与MMP2(1:2000)和COL-

PBS漂洗3次, 自然晾干, 于显微镜下选取随机视野, 观察并记录穿过小室基底膜的细胞, 比较各组间HSF侵袭率的差异。结果见图7和表4, 与对照组相比, 空白脂质体组小室内细胞数量不具有显著差异性, 提示脂质体膜材对HSF的侵袭能力无影响。含TSA-SAB联合给药干预组中穿过Transwell小室聚碳酸酯膜的细胞数量与对照组相比明显减少, 说明TSA-SAB联合给药均能抑制HSF的侵袭能力($P < 0.01$), 且TSA-SAB脂质体各剂量组抑制效果与剂量呈正相关。

2.3.4 Western blotting测定HSF中MMP2、COL-I蛋白表达水平 HSF以 1.5×10^6 /孔接种到6孔板中, 于培养箱中孵育24h后, 用PBS洗涤细胞。细

I(1:1000)抗体孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG作为二抗孵育40 min后, 用TBST洗膜3次, 于室温下加入免疫增强化学发光试剂盒, 在Chemi DocTM XRS系统上进行可视化处理。用Image J 1.52软件对蛋白条带进行灰度值分析, 比较各组间蛋白表达的差异。

Western blotting检测结果见图8和表5, 空白脂质体组MMP2、COL-I蛋白表达水平与空白对照组之间没有显著性差异, 提示脂质体膜材对2种蛋

表 4 TSA-SAB 脂质体对 HSF 侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of TSA-SAB liposomes on invasion ability of HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	-	100.00 ± 4.50
空白脂质体	-	93.04 ± 5.35
TSA 和 SAB 联合游离药物	15+60	28.48 ± 4.65 ^{**##}
TSA-SAB 脂质体	10+40	41.77 ± 3.42 ^{**##}
	15+60	24.68 ± 4.65 ^{**##}
	20+80	13.29 ± 5.23 ^{**##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空白脂质体组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs blank liposomes group

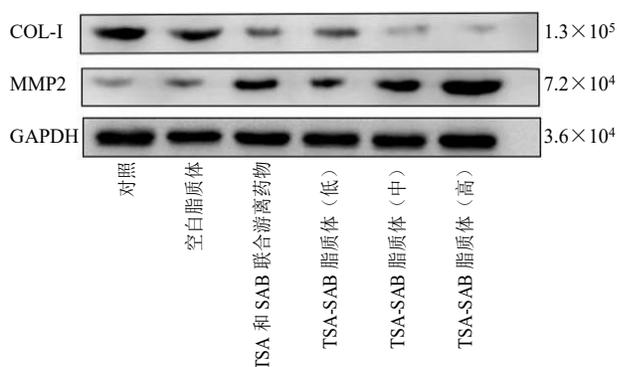


图 8 TSA-SAB 脂质体对 HSF 中 COL-I 和 MMP2 蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of TSA-SAB liposomes on protein expression of COL-I and MMP2 in HSF

表 5 TSA-SAB 脂质体对 HSF 中 COL-I 和 MMP2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of TSA-SAB liposomes on protein expression of COL-I and MMP2 in HSF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	相对蛋白表达量	
		COL-I	MMP2
对照	-	0.74 ± 0.05	0.11 ± 0.08
空白脂质体	-	0.84 ± 0.03	0.20 ± 0.02
TSA 和 SAB 联合游离药物	15+60	0.36 ± 0.02 ^{**##}	0.56 ± 0.06 ^{**##}
TSA-SAB 脂质体	10+40	0.48 ± 0.12 ^{**##}	0.35 ± 0.11 ^{**}
	15+60	0.18 ± 0.02 ^{**##}	0.64 ± 0.03 ^{**##}
	20+80	0.07 ± 0.03 ^{**##}	1.03 ± 0.03 ^{**##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空白脂质体组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs blank liposomes group

白的表达没有影响。与对照组相比, 给药干预后, TSA-SAB 联合用药组均明显抑制了 COL-I 的表达, 上调了 MMP2 的表达 ($P < 0.01$), 且含同等药物量

的脂质体与游离药物组相比, 该作用更明显, 与剂量呈正相关。

3 讨论

CCK-8 法实验结果发现, TSA 和 SAB 联用可协同抑制 HSF 细胞的增殖, 为 TSA-SAB 共载脂质体的构建奠定初步药效基础。TSA 为脂溶性成分, 与磷脂具有高亲和力, 可采用薄膜分散法制备含药脂质体; SAB 为水溶性弱酸性成分, pH 值对其表观油水分配系数影响较大, 可使脂质体内外两侧形成 pH 梯度后, 药物顺梯度跨膜进入脂质体内相中进行载药。采用薄膜分散法结合 pH 梯度主动载药法制备出的 TSA-SAB 脂质体, 粒径分布均匀, 稳定性良好, 包封率高, 表现出持续缓慢的释药行为和良好的透皮性能^[14-15]。

HSF 过度增殖是 HS 的主要生物学表现。为考察 TSA-SAB 脂质给药浓度范围内呈剂量相关性的作用特点, 而且中、高剂量组 HSF 抑制率高于游离药物组。其机制可能是由于药物载入脂质体后, 脂质体能够通过胞吞或融合的途径进入细胞, 从而增加 HSF 对体是否有防治 HS 的潜力, 以 HSF 作为体外药效细胞模型初步评价 TSA-SAB 脂质体抗 HS 作用, 发现游离 TSA-SAB 和 TSA-SAB 脂质体均能有效抑制 HSF 的增殖, 其中 TSA-SAB 脂质体在一定药物的摄取。细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验可分别用于量化细胞迁移能力和细胞自主侵袭能力, 结合该 2 个实验的结果看出, TSA-SAB 脂质体对 HSF 迁移和侵袭能力均表现出显著的抑制作用。

过度增殖活化的 HSF 会在真皮组织会大量分泌 COL-I、COL-III, 降低降解胶原的关键成分 MMPs 的分泌, 使 ECM 重塑和代谢发生异常, 造成 ECM 沉积, 进一步导致 HS 的形成^[16-18]。Western blotting 结果表明, TSA-SAB 脂质体各剂量组可显著增加 MMP2 的合成量, 降低 COL-I 的蛋白表达水平, 提示 TSA-SAB 脂质体可能通过提高 MMP2 胶原降解酶的活性, 抑制 COL-I 的过度生成, 维持 ECM 代谢平衡, 从而抑制瘢痕增生, 为 TSA-SAB 脂质体用于防治 HS 提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shu B, Xie J L, Xu Y B, *et al.* Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1478-1486.
- [2] Coentro J Q, Pugliese E, Hanley G, *et al.* Current and

- upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146(C): 37-59.
- [3] 张小灵. 双丹脂质体凝胶剂的制备及抗增生性瘢痕研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [4] 廖红华, 段砚方, 李厚东. 试论活血化瘀药在病理性瘢痕中的应用进展 [J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2020, 32(3): 207-210.
- [5] 管志强, 陈桂升, 封乐驰, 等. 基于文献研究分析中医药治疗病理性瘢痕的用药规律 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(8): 1803-1805.
- [6] Meng Z J, Meng L T, Wang K K, *et al*. Enhanced hepatic targeting, biodistribution and antifibrotic efficacy of tanshinone II_A loaded globin nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 73: 35-43.
- [7] Cao L Y, Huang B Y, Fu X G, *et al*. Effects of tanshinone II_A on the regulation of renal proximal tubular fibrosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4247-4252.
- [8] Wu H J, Li Y, Wang Y X, *et al*. Tanshinone II_A attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via modulating angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7) axis in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(6): 578-586.
- [9] 许小琪, 韩兵, 赖建辉, 等. 丹参酮 II_A 对 TGF-β1 诱导的人皮肤成纤维细胞增殖的影响及作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4685-4690.
- [10] Shi J, Guo S Y, Wu Y T, *et al*. Behaviour of cell penetrating peptide TAT-modified liposomes loaded with salvianolic acid B on the migration, proliferation, and survival of human skin fibroblasts [J]. *J Liposome Res*, 2020, 30(1): 93-106.
- [11] Xiao Z, Liu W, Mu Y P, *et al*. Pharmacological effects of salvianolic acid B against oxidative damage [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 572373.
- [12] Shi M, Huang F F, Deng C P, *et al*. Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(6): 953-964.
- [13] Ashton J C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method: Letter [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2400.
- [14] Wang J W, Cai J, Wang X Y, *et al*. An injectable liposome for sustained release of tanshinone II_A to the treatment of acute blunt muscle injury by augmenting autophagy and alleviating oxidative stress [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4189-4203.
- [15] Lin J H, Wang X L, Wu Q, *et al*. Development of salvianolic acid B-tanshinone II_A-glycyrrhetic acid compound liposomes: Formulation optimization and its effects on proliferation of hepatic stellate cells [J]. *Int J Pharm*, 2014, 462(1/2): 11-18.
- [16] Xue M L, Jackson C J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring [J]. *Adv Wound Care*, 2015, 4(3): 119-136.
- [17] Geervliet E, Bansal R. Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1212.
- [18] Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68(69): 452-462.

[责任编辑 郑礼胜]