

灭癍膏减少癍痕形成的作用及其机制研究

王浩南¹, 吴雨蒙¹, 张 喆¹, 梁梦梦¹, 刘 谦^{1,2*}, 张永清^{1*}
(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东沃华医药科技股份有限公司博士后流动站, 山东 潍坊 261000)

摘要: **目的** 探讨灭癍膏减少癍痕形成的作用及其机制。**方法** HPLC 法分析灭癍膏所含成分。建立小鼠创伤模型, 给予灭癍膏干预后观察创面愈合率, Masson、天狼猩红染色分析胶原纤维、I 型胶原蛋白 (Col1) 在愈伤组织中的表达; MTT 法检测隐丹参酮、丹参酮 II_A 对人成纤维细胞 (HFF-1)、人脐静脉内皮细胞 (EA. hy926)、角质形成细胞 (HaCaT) 增殖活性的影响, 划痕实验检测隐丹参酮、丹参酮 II_A 对 HaCaT 细胞迁移率的影响; ELISA 法检测愈伤组织和 HFF-1、EA. hy926、HaCaT 细胞表皮生长因子 (EGF)、血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 水平, Western blot 法检测愈伤组织和 HFF-1 细胞 TGF-β₁、TGF-β₃、Col1 表达。**结果** 灭癍膏中主要成分是丹参酮 II_A 与隐丹参酮。灭癍膏作用第 3、7 天时能促进大鼠创面愈合 ($P<0.05$, $P<0.01$), 作用第 15 天时能减少大鼠愈伤组织胶原纤维 ($P<0.01$), 升高 VEGF-A 和 EGF 水平 ($P<0.05$); 灭癍膏作用第 7、15 天时均能抑制 TGF-β₁、TGF-β₃ 蛋白表达 ($P<0.01$)。灭癍膏能抑制 HFF-1、EA. hy926、HaCaT 细胞增殖活性及 HaCaT 细胞迁移率 ($P<0.05$, $P<0.01$), 升高 3 种细胞 VEGF-A 水平 ($P<0.01$), 抑制 Col1 蛋白表达 ($P<0.01$)。**结论** 灭癍膏中丹参酮类成分在伤口愈合过程中调节愈伤组织中 TGF-β、EGF 以及 VEGF-A 等相关生长因子的分泌, 减少胶原纤维的沉积, 从而减少癍痕形成。
关键词: 灭癍膏; 丹参; 创伤; 癍痕形成; HPLC; 生长因子; 胶原纤维
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)02-0620-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.050

丹参属于大宗常用中药材, 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根与根茎^[1], 首载于《神农本草经》。现代研究发现, 丹参含有丹参酮类、丹酚酸类等活性成分, 具有抑菌^[2]、抗炎^[3]、抑制新生血管^[4-5]、抗血栓、抗心肌缺血再灌注损伤、抗癌等药理作用^[6-9]。皮肤创伤在临床上极为常见, 后期愈合过程中极易形成癍痕, 影响美观, 导致患者产生“挥之不去的阴影, 难以言表的忧伤”, 关节处癍痕组织甚至会丧失部分功能, 严重影响生活质量。皮肤创伤愈合分为止血、炎症、愈合、重塑 4 个时期^[10-11]。研究显示, 丹参及其制剂具有加快创面愈合、降低感染率、减轻水肿、减少癍痕形成等作用^[12-13]。课题组发掘了一个以丹参为主要原料用于消除皮肤创伤癍痕的民间验方, 并在工艺研究的基础上研制成灭癍膏。本研究对灭癍膏的活性成分进行了检测, 并通过动物与细胞实验对其减少癍痕残留的作用及机制进行研究, 旨在为新产品研制和丹参资源充分利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱 (美国 Waters 公司); Spectra Max M2 酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限

公司]; Scientz-24 高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); IX71 生物倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。
1.2 试剂与药物 丹参饮片原植物由山东中医药大学药用植物园种植, 2019 年 11 月采收后去除泥土, 切片, 晒干, 经山东中医药大学张永清教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.。蒸馏水、超纯水 (实验室自制); 0.9% 生理盐水 (辰欣药业股份有限公司); 甲醇、乙醇 (天津富宇精细化工有限公司)。羊脂 (泰安明睿建设工程有限公司); 白凡士林 (南昌白云药业有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 国药集团化学试剂有限公司); 丹参素、二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 II_A 对照品 (上海源叶生物科技有限公司); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、I 型胶原蛋白 (Col1)、转化生长因子 β₁ (TGF-β₁) 抗体 (英国 Abcam 公司); TGF-β₃ 抗体 (美国 ImmunoWay 公司); 总蛋白 (BCA 法) 测定试剂盒、VEGF-A、EGF ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 人源 VEGF、EGF ELISA 试剂盒 (杭州联科生物科技股份有限公司)。

收稿日期: 2021-10-05
基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1702704, 2017YFC1702705)
作者简介: 王浩南 (1995—), 男, 硕士生, 从事中药质量控制及产品开发。Tel: 17616527885, E-mail: 17616527885@163.com
* 通信作者: 刘 谦 (1982—), 女, 博士, 副教授, 从事中药资源开发。Tel: 13290326687, E-mail: cleanlq@163.com
张永清 (1962—), 男, 博士, 教授, 从事中药质量控制级天然药物化学研究。Tel: 13969053200, E-mail: zyzq62203@126.com

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 羊脂 取纯净羊脂置于锅中, 2 000 W 加热 23 min, 放凉后 4 ℃ 保存备用。

2.1.2 灭癍膏 取羊脂 400 g 置于锅中, 2 000 W 加热 20 min, 丹参饮片 160 g 用蒸馏水湿润搅拌均匀后加入进行煎炸 (1 600 W, 3 min), 炸至丹参饮片外圈发黑、体积缩小, 中心发黄后停止加热, 过滤, 去渣, 羊脂部分放冷 4 ℃ 保存备用。

2.1.3 丹参酮软膏 按照 110 mg 隐丹参酮、105 mg 丹参酮Ⅱ_A 与 50 g 白凡士林 60 ℃ 混匀, 冷却, 4 ℃ 冷藏备用。

2.2 灭癍膏活性成分提取与含量测定 取 1 g 灭癍膏分别用 20 倍量蒸馏水、80% 乙醇, 40 ℃ 超声提取 2 h, 放冷, 溶剂与油层分离后收集溶剂层, 通风橱放置挥干, 加 20 mL 甲醇溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, -20 ℃ 冷藏备用供 HPLC 分析。

色谱条件为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 nm×250 nm, 5 μm); 流动相 0.01% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 丹酚酸类检测波长 286 nm, 丹参酮类检测波长 270 nm。

2.3 动物实验

2.3.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 4 周龄, 体质量 (180±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008, SPF 环境单只单笼饲养, 适应性饲养 7 d 后开始实验。

2.3.2 分组、造模及给药 60 只大鼠随机分为对照组、丹参酮软膏组、灭癍膏组、羊脂组, 每组 15 只, 用乙醚麻醉, 剃净背部毛发, 手术剪裁去背部脊椎两侧对称的 2 个 1.0 cm×1.0 cm 面积皮肤, 深入皮下, 消毒, 即造模完成, 造模与取材位置见图 1 缺口部分。对照组只用绷带包扎; 羊脂组、灭癍膏组、丹参酮软膏组涂抹相应药物后绷带包扎, 造模第 1 天开始给药, 每天 1 次, 每次 1 g。



图 1 大鼠造模及取材位置示意图

2.3.3 创伤愈合率测定 采用透明膜描记称重法测定伤口面积, 给药第 0、3、7、11、15 天, 用透明膜描记创面大小, 以此为模板, 将质地均匀的硬纸片剪成同样大小, 称定硬纸片质量, 硬纸片质量表示创面面积大小, 计算创伤愈合率, 公式为创伤愈合率= (第 0 天创伤面积-第 N 天创伤面积) / 第 0 天创伤面积×100%。

2.3.4 样品处理与总蛋白、生长因子测定 给药 7 d 后选取 7 只大鼠, 处死取左右两侧愈伤组织 (均为大鼠背部两

侧造模位置的愈伤组织) 标记为 A 组, 经液氮速冻后于 -80 ℃ 保存; 给药 15 天后处死剩余 8 只大鼠, 取左右两侧愈伤组织标记为 B 组, 经液氮速冻后于 -80 ℃ 保存。B 组左侧愈伤组织进行 Masson、天狼猩红染色, 使用 Image J 软件 (IHC Tool Box 插件) 计算胶原纤维染色面积比例; 取 A、B 两组右侧愈伤组织 (0.1±0.01) g, 加生理盐水制成 10% 组织匀浆液, 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用蛋白定量测定试剂盒、VEGF-A 及 EGF ELISA 试剂盒测定总蛋白及 EGF、VEGF-A 水平, 其中各生长因子水平=各生长因子含量/各样品总蛋白水平。

2.4 细胞实验

2.4.1 细胞来源及培养 人皮肤成纤维细胞 (HFF-1)、人脐静脉内皮细胞 (EA. hy926) 购自中国科学院细胞库; 人永生角质形成细胞 (HaCaT) 购自北京北纳创联生物技术研究院。EA. hy926、HaCaT 细胞使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 双抗的 DMEM 培养基; HFF-1 细胞使用 HFF-1 完全培养液, 于 5% CO₂、37 ℃、相对饱和湿度 95% 条件下松盖培养, 每天换液 1 次, 细胞长至 80% 时消化传代, 取第 3~8 代后对数期细胞用于实验。

2.4.2 MTT 法检测细胞增殖活性 EA. hy926、HaCaT、HFF-1 细胞调整密度至 4×10⁴/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 孵育过夜。细胞分为对照组 (0 μmol/L) 和给药组 (1、2、4、8、16、32 μmol/L, 1 μmol/L 药物为 1 μmol 隐丹参酮+1 μmol 丹参酮Ⅱ_A 混合溶于 1 L 的 DMSO), 另设空白组 (无细胞), 给药培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT, 继续孵育 5 h, 于酶标仪 595 nm 波长处测定吸光度值, 计算细胞增殖抑制率。

2.4.3 划痕实验 HaCaT 细胞以无血清培养基培养, 给药浓度为 0 μmol/L (0% 抑制浓度, 丹参酮Ⅱ_A+隐丹参酮混合物)、1 μmol/L (20% 抑制浓度)、3 μmol/L (50% 抑制浓度), 12 h 后用 10 μL 枪头在细胞板上划痕, 0、16、32、48 h 于倒置显微镜下观察各给药浓度 HaCaT 细胞迁移率。

2.4.4 细胞生长因子检测 取 HFF-1、HaCaT、EA. hy926 细胞混悬液, 用 0%、20%、50% 抑制率浓度给药处理 48 h, 收集细胞, 按照 EGF、VEGF-A ELISA 试剂盒说明书检测 EGF、VEGF 水平。

2.4.5 Western blot 法检测愈伤组织和细胞 TGF-β₁、TGF-β₃、Col1 蛋白表达 分别取愈伤组织样本和细胞样本, 加 150 μL 裂解液超声 1 min 后于 0 ℃ 裂解 45、30 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 在 10% SDS-PAGE 凝胶电泳中分离蛋白质, 转到 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h, 加一抗 TGF-β₁ (1 : 500)、TGF-β₃ (1 : 500)、Col1 (1 : 500)、GAPDH (1 : 5 000) 4 ℃ 孵育过夜, 洗膜 3 次后加过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 二抗, 室温孵育 40 min, 洗膜 3 次后加免疫增强化学发光剂 (ECL), 显影, 曝光, 保存条带图进行分析, GAPDH 为内参蛋白。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理, 计量资

料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

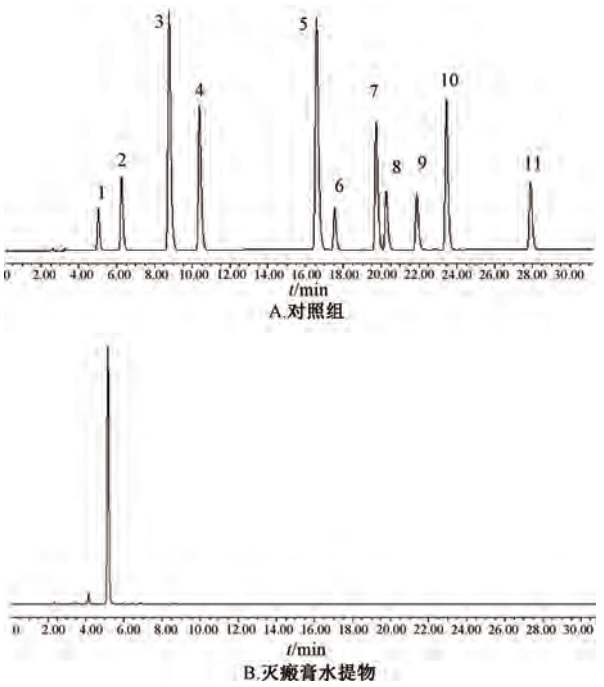
3.1 灭癍膏中活性成分 灭癍膏水、醇提取物经 HPLC 分析, 结果见图 2~3, 灭癍膏水提取物只含丹参素, 含量为 0.565 9 mg/g; 乙醇提取物中主要含有隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A、二氢丹参酮, 含量分别为 2.196、2.111、0.346 mg/g, 隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 是灭癍膏中的主要成分。

3.2 灭癍膏对大鼠愈合组织切片 Masson、天狼猩红染色的影响 如图 4、表 1 所示, 与对照组、羊脂组比较, 灭癍膏组和丹参酮软膏组大鼠愈合组织肌红纤维水平增加, 胶原纤维水平降低 ($P<0.01$), 说明灭癍膏组和丹参酮软膏组均具有降低癍痕形成的作用, 灭癍膏中有效成分为丹参酮类成分。如图 5、表 1 所示, 灭癍膏和丹参酮软膏能增加 I 型胶原水平 ($P<0.01$), 说明隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 具有分解胶原纤维或抑制 I 型胶原合成胶原纤维的作用。

表 1 各组 Masson、天狼猩红染色结果比较 (% , $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	Masson	天狼猩红
对照组	76.55±4.45	32.49±3.33
丹参酮软膏组	47.73±12.65** #	45.63±3.78** #
灭癍膏组	31.04±12.98** #	78.73±5.22** #
羊脂组	78.09±8.22	31.80±2.95

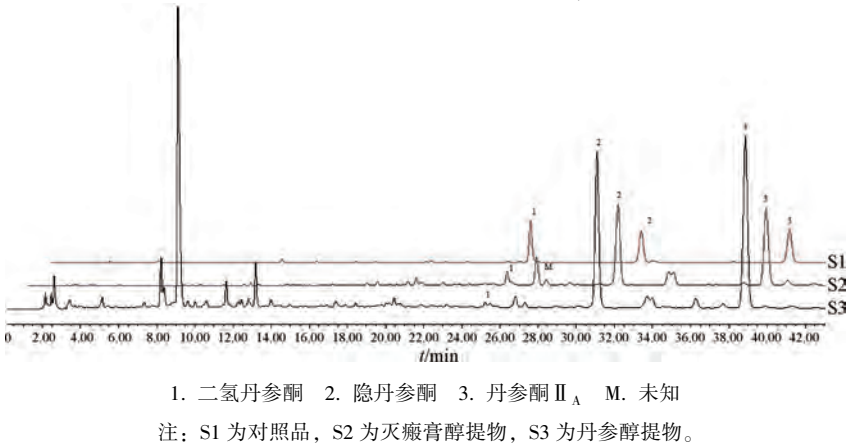
注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与羊脂组比较, # $P<0.01$ 。



1. 丹参素钠 2. 原儿茶酸 3. 原儿茶醛 4. 咖啡酸 5. 异阿魏酸 6. 丹酚酸 D 7. 迷迭香酸 8. 紫草酸 9. 丹酚酸 B 10. 丹酚酸 A 11. 丹酚酸 C

图 2 灭癍膏水提取物 HPLC 色谱图

3.3 灭癍膏对大鼠伤口愈合率的影响 第 3、7 天时, 与对照组比较, 灭癍膏组和丹参酮软膏组创面愈合率均增加



1. 二氢丹参酮 2. 隐丹参酮 3. 丹参酮Ⅱ_A M. 未知

注: S1 为对照品, S2 为灭癍膏醇提取物, S3 为丹参醇提取物。

图 3 各成分 HPLC 色谱图

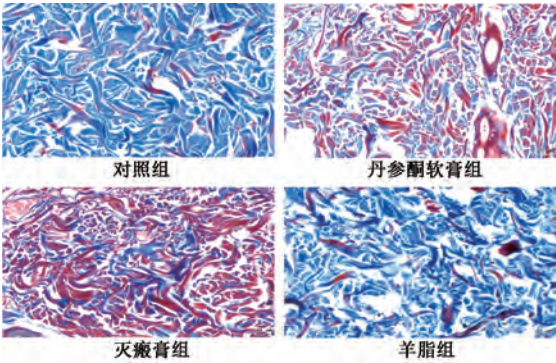


图 4 各组 Masson 染色 (×400)

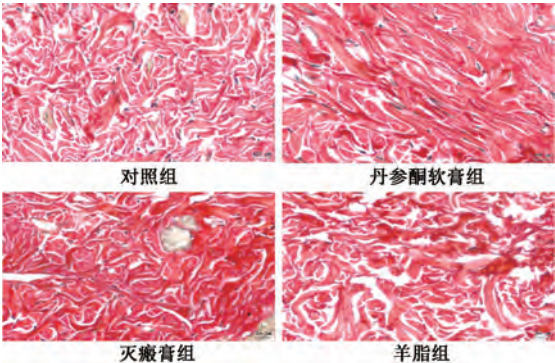


图 5 各组天狼猩红染色 (×400)

($P<0.01$)；第 15 天时，所有大鼠伤口均愈合，接近闭合，愈合速率，同时在第 3、7 天，丹参酮具有促进创面愈合的作用，见表 2。

表 2 各组大鼠创面愈合率比较（%， $\bar{x}\pm s$ ， $n=8$ ）

组别	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 15 天
对照组	10.39±2.48	35.19±22.81	75.61±14.62	85.55±3.18
丹参酮软膏组	34.03±12.47**##	52.85±16.79**	83.10±3.68##	84.45±5.20
灭癍膏组	18.14±17.83**	53.94±17.50**	78.01±5.63##	84.35±4.17
羊脂组	13.05±4.54*	50.64±18.12**	64.40±22.79**	80.13±5.16*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与羊脂组比较，## $P<0.01$ 。

3.4 灭癍膏对大鼠愈伤组织 VEGF-A、EGF 水平的影响

表 3 显示，第 7 天，与对照组比较，灭癍膏组和丹参酮软膏组大鼠愈伤组织 VEGF-A 水平降低（ $P<0.05$ ），EGF 水平无明显变化（ $P>0.05$ ）；第 15 天，与对照组比较，灭癍

膏组和丹参酮软膏组大鼠愈伤组织 VEGF-A、EGF 水平均升高（ $P<0.05$ ），前期抑制血管生成与促进表皮细胞的增殖，说明丹参酮能够促进愈伤组织正常的增殖发育，同时抑制毛细血管的过度增殖，减少癍痕相关蛋白的沉积。

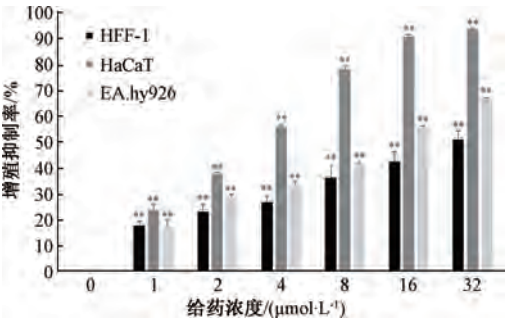
表 3 各组大鼠愈伤组织 VEGF-A、EGF 水平比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=7$ ）

组别	VEGF-A		EGF	
	第 7 天	第 15 天	第 7 天	第 15 天
对照组	0.751±0.136	1.221±0.128	0.477±0.159	0.714±0.082
丹参酮软膏组	0.528±0.173*#	1.456±0.070*#	0.426±0.101#	0.853±0.068*
灭癍膏组	0.490±0.112*#	1.549±0.276**	0.501±0.090	0.968±0.102**
羊脂组	0.728±0.107	1.305±0.248	0.612±0.118	0.822±0.063

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与羊脂组比较，# $P<0.05$ 。

3.5 隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物对 HFF-1、HaCaT、EA.hy926 细胞增殖活性的影响 隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物对 HFF-1、HaCaT、EA.hy926 细胞活性均具有抑制作用（ $P<0.01$ ），可避免愈伤组织的过度增殖导致顽固性癍痕形成，见图 6。隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物 48 h 的 IC₅₀ 为 HFF-1 细胞 29.705 μmol/L，HaCaT 细胞 2.904 μmol/L，EA.hy926 细胞 11.171 μmol/L。

3.6 隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物对 HaCaT 细胞迁移率的影响 与 0 μmol/L 组比较，隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物 1、3 μmol/L 组 16、32 h 空白面积增大（ $P<0.01$ ），即细胞迁移率降低；48 h 各组细胞均填满原先划痕位置，划痕面积为 0，见图 7、表 4。说明隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物处理后再上皮化速率的降低，HaCaT 细胞上皮-间充质化（EMT）水平下调，避免角质层过早形成、增厚、堆叠，减少角蛋白、胶原纤维过度积累，在不影响创面愈合的前提，抑制肥厚性癍痕组织的形成。



注：与 0 μmol/L 组比较，** $P<0.01$ 。

图 6 各组 HFF-1、HaCaT、EA.hy926 细胞增殖抑制率（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

3.7 隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物对 3 种细胞生长因子分泌的影响 3 种细胞经 0、20%、50% 抑制浓度的隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 化合物处理后。隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A 混合物各浓度组剂量依赖性地升高 HFF-1 细胞中 VEGF-A、EGF

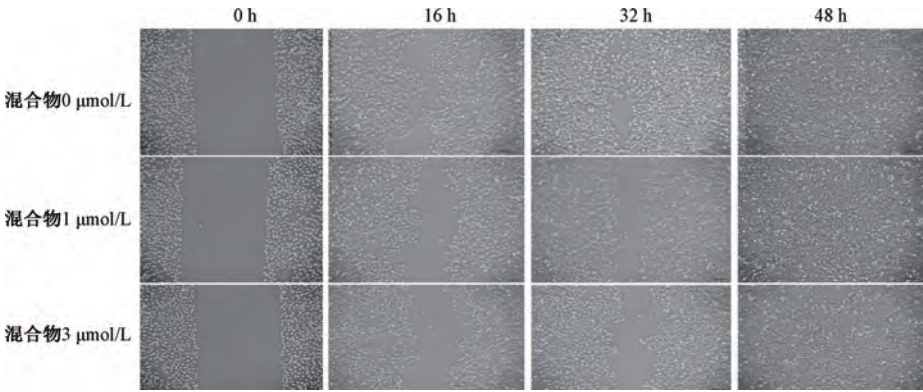


图 7 细胞划痕实验结果

表 4 各组 HaCaT 细胞划痕实验空白面积比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

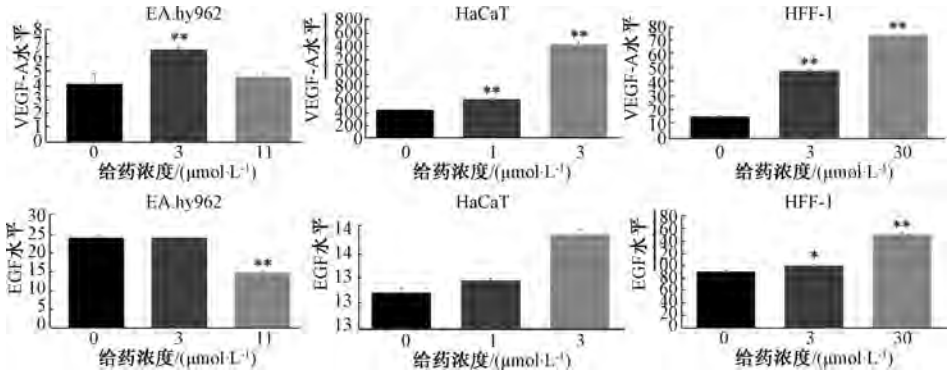
组别	0 h	16 h	32 h	48 h
隐丹参酮和丹参酮Ⅱ _A 混合物 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	158 607.28±2 421.77	53 261.70±2 767.00	20 668.09±6 161.85	0
隐丹参酮和丹参酮Ⅱ _A 混合物 1 $\mu\text{mol/L}$ 组	163 578.76±11 233.49	73 307.63±6 846.71 *	41 552.47±7 599.59 *	0
隐丹参酮和丹参酮Ⅱ _A 混合物 3 $\mu\text{mol/L}$ 组	167 941.02±5 416.47	90 975.00±8 710.95 *	61 608.81±5 337.54 *	0

注：与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较，* $P<0.05$ 。

水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)，HaCaT 细胞中 VEGF-A 水平 ($P<0.01$)，及 EA.hy926 细胞 VEGF-A 水平 ($P<0.01$)，并降低 EA.hy926 细胞 EGF 水平 ($P<0.01$)，见图 8。

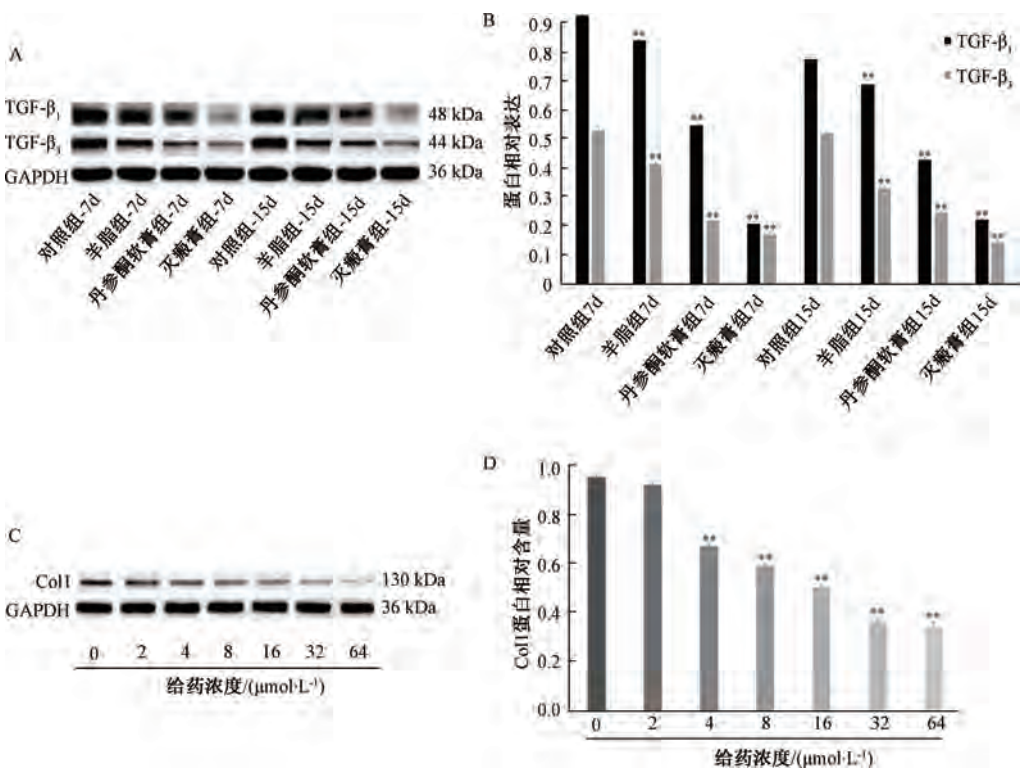
3.8 各组愈伤组织、细胞中 TGF- β_1 、TGF- β_3 、Col1 蛋白表达比较 如图 9A~9B 所示，与对照组比较，羊脂组、丹参酮软膏组、灭瘢膏组 TGF- β_1 、TGF- β_3 蛋白表达均降低

($P<0.01$)，说明以羊脂为基质能够促进隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A混合物的释放吸收，促进混合物对 TGF- β_1 、TGF- β_3 表达的抑制作用。如图 9C~9D 所示，与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较，隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A混合物各浓度组 HFF-1 细胞 Col1 蛋白表达均降低 ($P<0.01$)，说明其具有抑制人皮肤成纤维细胞 Col1 的活性。



注：与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 8 3 种细胞 VEGF-A、EGF 水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)



注：A 为大鼠愈伤组织中 TGF- β_1 、TGF- β_3 蛋白条带图，B 为 TGF- β_1 、TGF- β_3 蛋白相对表达量，C 为 HFF-1 细胞 Col1 蛋白条带图，D 为 Col1 蛋白相对表达量。与对照组或 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较，** $P<0.01$ 。

图 9 各组愈伤组织、细胞中 TGF- β_1 、TGF- β_3 、Col1 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

4 讨论

灭癍膏是一种效果显著且使用历史悠久的民间验方，HPLC 分析发现其中含有的主要活性成分为隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A。前期实验结果证明，丹参酮Ⅱ_A与隐丹参酮对 HFF-1 细胞活性具有抑制作用，且以丹参酮Ⅱ_A的 IC₅₀最低，但两者 IC₅₀均高于丹参酮混合物，故使用隐丹参酮与丹参酮Ⅱ_A设计药理实验，结果证明隐丹参酮与丹参酮Ⅱ_A混合物为灭癍膏中发挥药理作用的主要活性成分。

癍痕组织形成是愈伤组织过度增殖、胶原纤维和细胞外基质（ECM）过度积累导致的。胶原纤维由胶原蛋白及甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸等构成。胶原蛋白肽链中关键前肽缺失、Col1 无法重新螺旋生成胶原都会影响胶原纤维合成^[14-15]。通过病理染色和蛋白印迹实验发现，丹参酮混合物可抑制 Col1、胶原纤维的合成，并分解胶原纤维生成胶原蛋白以减少胶原纤维在愈伤组织中的沉积。

系统性皮肤硬化病、癍痕组织增生过程中 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、5 激活 $\text{TGF-}\beta$ mRNA 使 TGF- β 表达增加^[16]，TGF- β_1 mRNA 及其蛋白表达异常增高是正常皮肤向癍痕组织转化的标志^[17]；丹参酮混合物可抑制愈伤组织中 TGF- β 的分泌，进而降低 TGF- β /Smad 通路中 p-Smad2、p-Smad3 水平^[18]，从而降低 TGF- β_1 对成纤维细胞的增殖促进作用。

药物载体将创面密封降低氧量，愈伤组织受缺氧诱导因子（HIF-1 α ）的分泌提升促进 VEGF-A 编码基因的表达从而促进创面中 VEGF-A 水平的提升^[19-20]。灭癍膏、丹参酮软膏处理后生长因子 VEGF-A 水平在前期显著降低并在给药后期显著提升，可能在前 7 d 时，丹参酮通过影响 HIF-1 α 亚基与其辅助活化因子 CBP/p300 的活化，HIF-1 α 、HIF-1 β 的异源二聚后与缺氧反应原（HRE）、VEGF-AR₂ 受体结合水平降低有关^[21]，前期较低的 VEGF-A 水平能够抑制愈伤组织中毛细血管的生成，从而避免愈伤组织的过度增殖而形成癍痕组织。

本实验明确了灭癍膏的主要活性成分为隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A，通过动物和细胞实验证实了隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A减少癍痕组织形成的药理作用，初步阐明了灭癍膏在伤口愈合时期抑制愈伤组织过度增殖，减少因胶原纤维过度沉积引起的癍痕形成的机制，为新产品研制和丹参植物资源的开发利用提供了参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：78-80.

[2] 王政军，库里满·哈里甫，苗德艳，等. 丹参提取物抑菌活性的初步评价 [J]. 食品工业科技，2011，32（7）：65-66；70.

[3] 项 婷. 丹参酮Ⅱ A 磺酸钠对肝癌术后患者抗炎作用的临床研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2017.

[4] 周利红，李 雁，隋 华，等. 丹参酮Ⅱ A 调节缺氧诱导因子 1 α 对人结肠癌细胞血管新生的抑制作用 [J]. 中华中

医药杂志，2019，34（3）：947-951.

[5] 王乐琪，张云帆，李莎莎，等. 丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究 [J]. 中草药，2020，51（2）：439-450.

[6] 贾壮壮，赵 磊，陈红阳，等. 注射用丹参多酚酸配伍注射用血栓通（冻干）通过抑制 MMPs 对脑缺血再灌注损伤大鼠鼠脑屏障通透性的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（19）：135-145.

[7] 王 松，汪茂胜，周定荣，等. 丹参酮Ⅱ_A 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药，2020，51（8）：2141-2150.

[8] 朱方涛，余海彬，黄伟华，等. 丹参川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志，2019，36（11）：2068-2070.

[9] Tao L, Xu M, Dai X J, *et al.* Polypharmacological profiles underlying the antitumor property of *Salvia miltiorrhiza* Root (Danshen) interfering with NOX-dependent neutrophil extracellular traps [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 4908328.

[10] Boyko T V, Longaker M T, Yang G P. Laboratory models for the study of normal and pathologic wound healing [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2017, 139（3）：654-662.

[11] Kasuya A, Tokura Y. Attempts to accelerate wound healing [J]. *J Dermatol Sci*, 2014，76（3）：169-172.

[12] 黄方涛，童仁联. 手术加丹参和癍痕敷贴治疗疤痕疙瘩疗效观察 [J]. 中国误诊学杂志，2004，4（2）：201-203.

[13] 刘嘉楠，何 放，钱明元，等. 丹参酮Ⅱ A 磺酸钠对烧伤植皮创面愈合及癍痕形成的影响 [J]. 现代生物医学进展，2016，16（7）：1306-1308.

[14] Holmes D F, Lu Y, Starborg T, *et al.* Collagen fibril assembly and function [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2018，130：107-142.

[15] Varma S, Orgel J P, Schieber J D. Nanomechanics of type I collagen [J]. *Biophys J*, 2016，111（1）：50-56.

[16] Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing [J]. *EMBO Rep*, 2010，11（2）：97-105.

[17] Wang R, Ghahary A, Shen Q, *et al.* Hypertrophic scar tissues and fibro-blasts produce more transforming growth factor-beta 1 mRNA and protein than normal skin and cells [J]. *Wound Repair Regen*, 2000，8（2）：128-137.

[18] 许小琪，韩 兵，赖建辉，等. 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 [J]. 中草药，2020，51（18）：4685-4690.

[19] Saravani M, Rokni M, Mehrbani M, *et al.* The evaluation of VEGF and HIF-1 α gene polymorphisms and multiple sclerosis susceptibility [J]. *J Gene Med*, 2019，21（12）：e3132.

[20] 雷 睿. 缺氧诱导因子-1 α 及其相关信号通路促进癍痕疙瘩形成的作用机制研究 [D]. 杭州：浙江大学，2017.

[21] Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies [J]. *Biomed Res Int*, 2015，2015：549412.