

· 研究报告 ·

河豚毒素缓释微球含量测定方法的建立

王 琦, 卢光照, 李 园, 樊 莉, 张 翮, 鲁 莹 (海军军医大学药理学系药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立测定河豚毒素(TTX)缓释微球中的含量检测方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为 5% 乙腈-95% 8 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液(0.005% TFA, pH4.0); 流速 1.0 ml/min; 紫外检测波长 200 nm; 柱温 30 ℃。结果 该方法专属性好, TTX 在 1~20 μg/ml 浓度范围内线性良好, 该方法日内精密度、日间精密度、稳定性、重复性均符合要求, 加样回收率范围为 98.0%~102.0%。结论 本研究建立了适用于缓释微球中河豚毒素含量测定的 HPLC 方法, 该方法准确可靠, 专属性强, 可以实现定量检测。

[关键词] 河豚毒素; 高效液相色谱; 缓释微球; 庚烷磺酸钠

[文章编号] 2097-2024(2023)03-0182-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202208060

Establishment of determination of tetrodotoxin sustained-release microspheres

WANG Qi, LU Guangzhao, LI Yuan, FAN Li, ZHANG He, LU Ying (Department of pharmaceutics, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish a detection method for the determination of tetrodotoxin (TTX) in sustained-release microspheres. **Methods** The HPLC separation of tetrodotoxin was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6mm×150mm, 5 μm) with acetonitrile, 8mmol/L sodium heptane sulfonate containing 0.005% TFA (5:95) (pH 4.0) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min. The UV detection wavelength was 200 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** The method had good specificity and linearity of TTX in the concentration range of 1–20 μg/ml. The intra-day precision, inter-day precision, stability and repeatability of the method were good, and the average recoveries were found between 98.0% and 102.0%. **Conclusion** This study established an HPLC method which was suitable for the determination of tetrodotoxin sustained-release microspheres. The method is accurate and reliable within the applicable range, with strong specificity, which could lead to quantitative detection.

[Key words] Tetrodotoxin; HPLC; sustained-release microspheres; sodium heptane sulfonate

河豚毒素(TTX)是一种强效生物毒素,是目前已知毒性最强的生物毒素之一,主要存在于河豚鱼和部分海洋生物中。据报道,河豚毒素能与电压门控钠离子通道 1:1 结合,阻断钠离子内流,从而发挥抑制兴奋的作用^[1]。基于其对钠离子通道不同亚型的阻断,河豚毒素在一定剂量范围可以起到镇痛、局麻等多种药用效果^[2-6]。其中镇痛效用为当前主要研究领域,相较于临床常用的阿片类药物,河豚毒素发挥镇痛作用无成瘾性,副作用小,肝肾功能损害小,但其治疗剂量极低,且治疗窗口狭窄,低剂量往往带来频繁的给药次数,要想良好的发挥镇痛作用,就需要选取合适的剂型来更好的发挥其

作用。微球作为长缓释制剂的优良载体,经常包载治疗窗狭窄、半衰期较短的药物以发挥长周期药效的作用,为测定微球中 TTX 含量等数据,需要一套适用的检测方法。

目前针对河豚毒素定量检测的方法多为生物样本检测,应用于动物体内河豚毒素检测和人河豚毒素中毒血液检测,针对河豚毒素的体外测定方法较少,药用制剂的检测方法更是稀少。本方法的建立适用于河豚毒素药用制剂中的含量检测,为河豚毒素药用开发的含量测定提供了新选择。主流的河豚毒素含量测定方法包括小鼠生物法^[7-8]、免疫测定法^[9-11]、高效液相色谱法(HPLC)^[12-13]、液相色谱-质谱联用法^[14-16]、气相色谱-质谱联用法^[17]等。高效液相色谱法因其适用性广、稳定性好及灵敏度良好而备受欢迎。但由于河豚毒素不溶于任何有机溶剂,仅溶于弱酸水溶液,常见的方法难以较好地保留河豚毒素。本研究使用庚烷磺酸钠作为离

[基金项目] 军队“双重”项目:生物毒素战剂控释研究与应用

[作者简介] 王 琦, 硕士研究生, Email: wq15254138792@163.com

[通信作者] 鲁 莹, 教授, 研究方向: 纳微米制剂, Tel: 021-81871290, Email: acuace@163.com

子对试剂,通过河豚毒素与离子对试剂结合形成复合分子,提高其在色谱柱上的保留能力,从而更好地分离河豚毒素与其他物质^[18-19]。

根据河豚毒素的作用功效和缓释长效镇痛目标,本研究制备了河豚毒素缓释微球。为考察微球中河豚毒素的含量,需要建立相应的含量测定方法。因此,本研究采用 HPLC 方法建立针对河豚毒素缓释微球的含量分析方法,以期河豚毒素微球中的含量测定提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津制作所);电子天平(METTLER TOLEDO,瑞士);数显 pH 计(sartorius,德国),紫外可见分光光度计[安捷伦科技(中国)有限公司];循环水式真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司);SECURA125-1CN 型十万分之一电子天平(赛多利斯,德国);Arium@ mini 超纯水机(赛多利斯,德国)。

1.2 药品与试剂

河豚毒素标准品(98%,中洋生物科技股份有限公司);PBS 缓冲液(武汉普诺赛生物科技股份有限公司);聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA, RG 503H, sigma-Aldrich Company);甲酸(色谱纯,国药集团);三氟乙酸(色谱纯, sigma-Aldrich Company);氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);泊洛沙姆-188(sigma-Aldrich Company);叠氮钠(Sigma-Aldrich Company);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);乙腈(色谱纯, sigma-Aldrich Company);二氯甲烷(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);河豚毒素-PLGA 微球、空白 PLGA 微球(海军军医大学药理学教研室提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相: 8 mmol/L 庚烷磺酸钠(0.005%TFA, 1 mol/L NaOH 调节 pH4.0)水溶液: 乙腈=95:5;检测波长: 200 nm;流速: 1.0 ml/min;柱温: 30 °C;分析时间: 12 min;进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取叠氮钠、泊洛沙姆-188 适量,加入磷酸盐缓冲液配制成含 0.02%NaN₃、0.02%F-68 的释放介质,取 10 mg 河豚毒素标准品,用 6 ml 0.1% 甲

酸溶液溶解,以 PBS 介质(0.02%NaN₃、0.02%F-68)定容得 100 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

精密称取 20.00 mg 河豚毒素冻干微球,加入 1 ml 二氯甲烷(DCM)超声使完全溶解,加入经甲酸调节 pH 至 4.0 的释放介质,超声后充分振摇,取上层水相溶液过 0.22 μm 水系滤膜作为供试品溶液。

2.3 色谱系统适应性考察

配制以下样品,考察方法专属性:① 1ml PBS 释放介质加入 50 μl 1% 甲酸,为空白释放介质;② 甲酸调节 pH 的 PBS 介质稀释得的 10 μg/ml TTX 标准品溶液;③ 精密称取 10 mg 空白微球于 5 ml EP 管,加入 1 ml 二氯甲烷超声 2 min 使完全溶解,加入 1 ml PBS 介质及 50 μl 1% 甲酸,充分振摇后超声 10 min,取上层水相过 0.22 μm 水系膜,为空白微球样品;④ 精密称取 10 mg 空白微球于 5 ml EP 管,准确加入 10 μg/ml TTX 标准液 1ml,加入 1 ml 二氯甲烷超声 2 min 使完全溶解,甲酸调节 pH 的 PBS 溶液提取,过膜处理后为河豚毒素微球样品。按照“2.1”项下方法进样检测,图谱如图 1。实验结果表明,该方法专属性良好,河豚毒素得到了较好的分离。

2.4 标准曲线的绘制

精密量取对照品溶液于 10 ml 量瓶,加入 PBS 介质,分别稀释得 20、15、12、10、5、2、1 μg/ml 的系列浓度标准液。按照“2.1”项下方法进样检测,记录 TTX 峰面积。以峰面积(A)为纵坐标,河豚毒素的浓度(X_r μg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 Y=22 216X+591.8, r=0.999 9,证明本方法在 1~20 μg/ml 浓度范围内线性良好。

2.5 精密度试验

由对照品溶液配制低、中、高三个浓度的河豚毒素标准液,分别为 2、10、20 μg/ml,进行日内精密度及日间精密度测定。日内精密度测定方法为样品测定 5 次,计算日内相对偏差;日间精密度测定法为 3 个浓度样品连续测定 5 d,计算日间相对偏差。3 个浓度由低到高的日内精密度 RSD 值分别为 0.81%、0.43%、0.58%,日间精密度 RSD 值分别为 1.32%、1.10%、0.68%,均小于 2.0%,符合精密度要求。

2.6 重复性试验

按照“2.2.2”项下方法,平行制备 5 份河豚毒素供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定。结果显示,RSD 值为 1.49%,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

选取低、中、高 3 个浓度标准溶液,分别为 2、

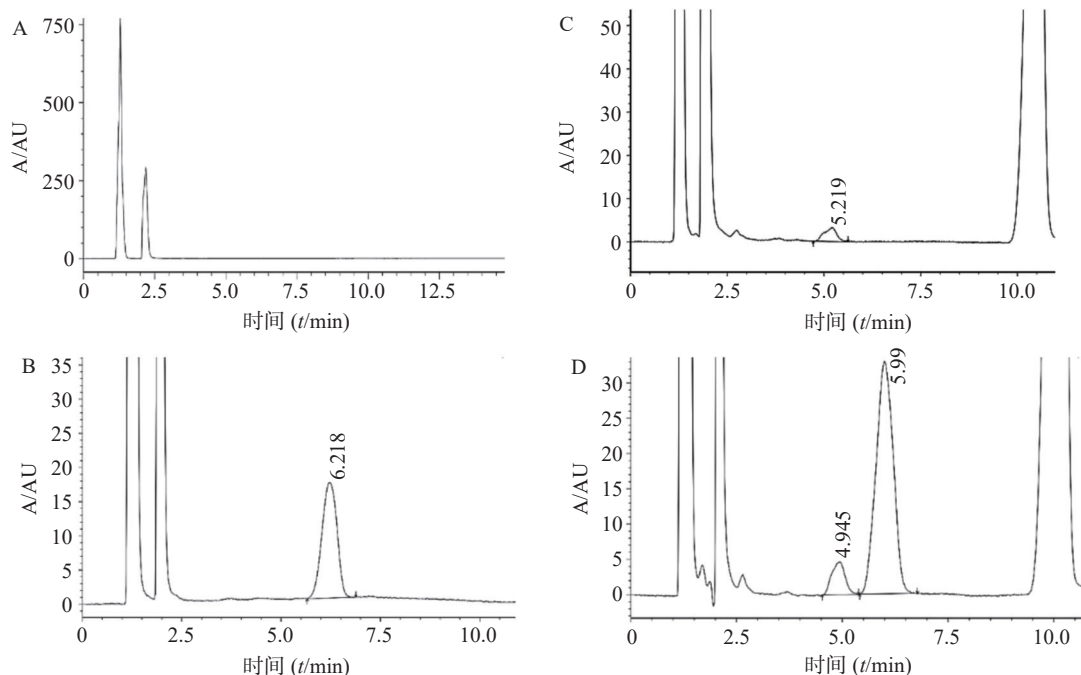


图 1 色谱系统适应性考察色谱图

A. PBS; B. TTX+PBS; C. DCM+空白微球+PBS; D. TTX+DCM+空白微球+PBS

10、20 $\mu\text{g/ml}$, 称取 10 mg 空白微球于 5 ml EP 管, 加入 1 ml 二氯甲烷超声溶解和 1 ml 标准溶液及 50 μl 1% 甲酸, 充分振摇后超声 10 min, 超声后取上层水相过膜进样检测, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 河豚毒素加样回收率试验结果 ($n=3$)

加入量($\mu\text{g/ml}$)	测得量($\mu\text{g/ml}$)			回收率(%)	RSD(%)
2	1.96	1.98	1.99	98.88 $\pm$ 0.82	0.83
10	10.04	9.96	10.00	100.00 $\pm$ 0.43	0.43
20	20.04	20.18	20.08	100.49 $\pm$ 0.37	0.37

试验结果表明, 低、中、高 3 个浓度的回收率均在 98.0%~102.0% 之间, 3 组不同浓度的 RSD 均小于 2%, 符合方法学要求。

2.8 微球中药物含量测定

为了考察该方法能否测定微球中还未释放的河豚毒素含量, 本实验进行微球中药物含量测定。精密称取河豚毒素-PLGA 微球 20 mg, 加入 0.5 ml DCM 超声溶解, 再加入 1% 甲酸调节 pH 至 4 的 PBS 溶液 2.5 ml, 充分振摇后超声 10 min, 取上清液过膜后进样检测。测定河豚毒素浓度为 2.52 $\mu\text{g/ml}$, 换算后计算微球包封率(EE)及载药量(DL), 计算方法如下:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{微球内药物量}}{\text{投入总药物量}} \times 100$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{微球中包含药物量}}{\text{微球总重量}} \times 100$$

换算可得微球包封率为 60.77%, 载药量为 0.024%。因此, 通过此方法可以计算微球的载药量和包封率, 为下一步微球释放情况考察时通过测定微球中未释放含量从而间接测定微球的释放量提供依据。

2.9 TTX 在释放介质 (pH=7.4) 中的稳定性

由于河豚毒素溶液受温度影响较大, 温度越高, 河豚毒素降解越快, 在微球长期释放过程中, 已释放的河豚毒素发生降解会影响体外释放的测定, 故对河豚毒素标准品溶液进行 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下释放介质中的稳定性考察, 样品 pH 均为 7.4。4 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 样品分别在第 1、3、5、7、14、21、28 天取样检测; 37 $^{\circ}\text{C}$ 样品在第 1 周每天取样, 其后隔天取样。取 12 $\mu\text{g/ml}$ TTX 标准品溶液分别置于 4、25、37 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min 条件下考察, 用于测定 TTX 在体外释放条件下稳定性, 结果见图 2。

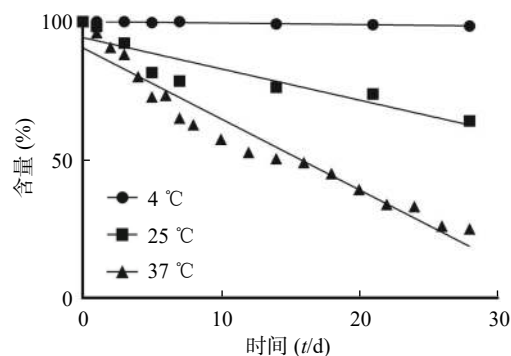


图 2 河豚毒素温度稳定性降解曲线

结果表明,河豚毒素在水溶液中稳定性受温度影响比较大。28 d 考察中,河豚毒素在 4 ℃ 放置降解约 1.53%, 25 ℃ 放置降解约 32.67%, 37 ℃ 放置降解约 74.96%。所以,在河豚毒素微球释放测定时不能直接测定释放介质中的河豚毒素含量,而应测定微球中还未释放的河豚毒素含量,从而间接测定微球的释放。

3 讨论

目前针对河豚毒素定量检测的方法多为生物样本检测,应用于动物体内河豚毒素检测和人河豚毒素中毒血液检测,针对河豚毒素的体外测定方法较少,药用制剂的检测方法更是稀少。本方法的建立适用于河豚毒素药用制剂中的含量检测,为河豚毒素药用开发的含量测定提供了借鉴。

针对河豚毒素微球的含量测定,我们尝试了许多方法,发现常规的反相色谱法对这类物质分离度不高,而反相离子对色谱法分离效果好。为了取得更佳的分离效果,分别考察了 Agilent Zorbax SB-C₈ 柱(4.6mm×150mm, 5μm)、shim-pack GIST C₁₈-AQ(4.6mm×250mm, 5μm)、Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(4.6mm×150mm, 5μm)等不同色谱柱对河豚毒素的分离效能及峰型的影响。结果显示,当色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱时,河豚毒素的分离效果及峰形最佳。

在离子对色谱法中,河豚毒素的分离及峰型等受到多种因素影响,在该方法建立过程中,我们考察了流动相 pH、流动相比比例等条件对河豚毒素分离效果的影响。流动相 pH: 我们考察了流动相中 pH3.0、4.0、4.5 和 5.0,不同 pH 对其峰型有一定的影响,对比筛选后,我们确定了 pH4.0 时为最佳峰型。流动相比比例: 流动相比比例对 TTX 出峰时间存在较大的影响,我们考察了 90 : 10、92 : 8、94 : 6、95 : 5、98 : 2 等比例,保留时间在 4 ~ 25 min 不等,在保证出峰完整的情况下,调整进样时间至适宜,最终确定比例为 95 : 5。

微球中的河豚毒素提取我们尝试了不同的有机溶剂破乳,其中包括二氯甲烷、三氯甲烷、乙腈等有机溶剂,最终选用速度最快、溶解最完全的二氯甲烷溶剂破乳提取。

结果证明选用本方法测定缓释微球中的河豚毒素在一定浓度范围内线性良好,专属性强,精密度和回收率均符合方法学要求,可以作为 TTX 微球含量、释放量的测定方法。

【参考文献】

- [1] LEE C H, RUBEN P C. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin[J]. *Channels*, 2008, 2(6): 407-412.
- [2] GONZÁLEZ-CANO R, RUIZ-CANTERO M C, SANTOS-CABALLERO M, et al. Tetrodotoxin, a potential drug for neuropathic and cancer pain relief? *Toxins*, 2021, 13(7): 483.
- [3] HAGEN N A, CANTIN L, CONSTANT J, et al. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer-related pain: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design trial[J]. *Pain Res Manag*, 2017, 2017: 7212713.
- [4] 陈学军, 王陈, 石童, 等. TTX和吗啡对醋酸扭体小鼠联合镇痛效应的研究[C]//中国毒理学会第九次全国毒理学大会论文集. 太原, 2019: 13.
- [5] 邓兴朝, 陈欢, 陈静, 等. 河豚毒素对敏感性钠离子通道的作用及其与疼痛的关系[J]. *生物化工*, 2019, 5(1): 127-131.
- [6] MARGAUX M, Salas. Tetrodotoxin suppresses thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat full thickness thermal injury pain model[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 607: 108-113.
- [7] 纪元, 刘岩, 宫庆礼. 小鼠生物法和酶联免疫法(ELISA)定量监测沿海5省养殖河豚鱼中的河豚毒素(TTX)[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 589-597.
- [8] HONG H J, LY S Y. Voltammetric detection of tetrodotoxin real-time in vivo of mouse organs using DNA-immobilized carbon nanotube sensors[J]. *Curr Anal Chem*, 2019, 15(5): 567-574.
- [9] A E, Vlasenko. Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for the determination of tetrodotoxins in marine ribbon worms (NEMERTEA) and its comparison with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Toxicon*, 2020, 176: 30-33.
- [10] THUY L V, YAMAMOTO S, KAWAURA R, et al. Tissue distribution of tetrodotoxin and its analogs in Lagocephalus pufferfish collected in Vietnam[J]. *Fish Sci*, 2020, 86(6): 1101-1110.
- [11] REVERTÉ L, DE LA IGLESIA P, DEL RÍO V, et al. Detection of tetrodotoxins in puffer fish by a self-assembled monolayer-based immunoassay and comparison with surface plasmon resonance, LC-MS/MS, and mouse bioassay[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(21): 10839-10847.
- [12] YU C H, YU C F, TAM S, et al. Rapid screening of tetrodotoxin in urine and plasma of patients with puffer fish poisoning by HPLC with creatinine correction[J]. *Food Addit Contam A*, 2010, 27(1): 89-96.
- [13] LIN S J, LIAO C J, CHEN S K, et al. Survey on toxicity and label of dried dressed fish fillet in 1998[J]. *J Food Drug Anal*, 2020, 10(1): 48-51.
- [14] 杨邦忠, 廖建萌, 章超桦, 等. 液相色谱-串联质谱法测定河豚毒素方法建立[J]. *科技展望*, 2015, 25(15): 102-104.
- [15] BANE V, HUTCHINSON S, SHEEHAN A, et al. LC-MS/MS method for the determination of tetrodotoxin (TTX) on a triple quadrupole mass spectrometer[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2016, 33(11): 1728-

- 1740.
- [16] PATRIA F P, PEKAR H, ZUBEROVIC-MURATOVIC A. Multi-toxin quantitative analysis of paralytic shellfish toxins and tetrodotoxins in bivalve mollusks with ultra-performance hydrophilic interaction LC-MS/MS-an In-house validation study[J]. *Toxins*, 2020, 12(7): 452.
- [17] INDUMATHI S M, KHORA S S. Toxicity assessment and screening of tetrodotoxin in the oblong blowfish (*Takifugu oblongus*) from the Tamil Nadu Coast of Bay of Bengal, India[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(3): 278-284.
- [18] 龚玺. 养殖河豚鱼肉营养品质研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- [19] 陈唯真, 朱维华, 俞如英. HPLC法测定河豚毒素的含量及稳定性[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(1): 41-43.
- [收稿日期] 2022-08-13 [修回日期] 2023-02-02
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 148 页)

- [7] WANG W, ZHOU P H, HU W, et al. Cryptotanshinone hinders renal fibrosis and epithelial transdifferentiation in obstructive nephropathy by inhibiting TGF- β 1/Smad3/integrin β 1 signal[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(42): 26625-26637.
- [8] MA Y Z, LI H, YUE Z B, et al. Cryptotanshinone attenuates cardiac fibrosis via downregulation of COX-2, NOX-2, and NOX-4[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64(1): 28-37.
- [9] ZHANG Y T, LU W T, ZHANG X L, et al. Cryptotanshinone protects against pulmonary fibrosis through inhibiting Smad and STAT3 signaling pathways[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104307.
- [10] WANG W, WANG X, ZHANG X S, et al. Cryptotanshinone attenuates oxidative stress and inflammation through the regulation of nrf-2 and NF- κ B in mice with unilateral ureteral obstruction[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 123(6): 714-720.
- [11] LIU M R, LÓPEZ DE JUAN ABAD B, CHENG K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 173: 504-519.
- [12] VERMOT A, PETIT-HÄRTLEIN I, SMITH S M E, et al. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 890.
- [13] CHANDRA S, EHRLICH K C, LACEY M, et al. Epigenetics and expression of key genes associated with cardiac fibrosis: NLRP3, MMP2, MMP9, CCN2/CTGF and AGT[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(3): 219-234.
- [14] DONG F, ABHIJIT T, JIWON L, et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 15(5(1)).
- [15] MA S T, YANG D C, WANG K Y, et al. Cryptotanshinone attenuates isoprenaline-induced cardiac fibrosis in mice associated with upregulation and activation of matrix metalloproteinase-2[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 145-150.
- [16] LO S H, HSU C T, NIU H S, et al. Cryptotanshinone inhibits STAT3 signaling to alleviate cardiac fibrosis in type 1-like diabetic rats[J]. *Phytother Res*, 2017, 31(4): 638-646.
- [17] FAN D, TAKAWALE A, LEE J, et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(1): 15.
- [18] MARCONI G D, FONTICOLI L, RAJAN T S, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1587.
- [19] KALLURI R, NEILSON E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1776-1784.
- [20] JIANG Y F, YOU F M, ZHU J, et al. Cryptotanshinone ameliorates radiation-induced lung injury in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1908416.
- [21] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [22] ALTAMIRANO-BARRERA A, BARRANCO-FRAGOSO B, MÉNDEZ-SÁNCHEZ N. Management strategies for liver fibrosis[J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(1): 48-56.
- [23] NAGAPPAN A, KIM J H, JUNG D Y, et al. Cryptotanshinone from the *Salvia miltiorrhiza* bunge attenuates ethanol-induced liver injury by activation of AMPK/SIRT1 and Nrf2 signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 265.
- [24] LAN H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [25] 段红梅, 吴志远, 江黎明. 隐丹参酮对人皮肤瘢痕胶原基因表达的影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2009, 30(3): 267.
- [26] 杨莉, 李雪莉, 宋静卉, 等. 隐丹参酮抑制模型兔耳增生性瘢痕的作用及机制[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(20): 3150-3155.
- [27] LI Y, SHI S, GAO J X, 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: 80-86.
- [收稿日期] 2022-08-14 [修回日期] 2022-11-18
[本文编辑] 李睿旻