

· 论著 ·

肝星状细胞核糖体蛋白 S5 (RPS5) 特异性敲减对肝纤维化的影响

汤玉珍, 张俊平 (福建中医药大学药学院 福建 福州 350108)

[摘要] **目的** 观察特异性敲减肝星状细胞(HSC)内核糖体蛋白 S5(RPS5)对大鼠肝纤维化的影响。**方法** 构建胶质纤维酸性蛋白(GFAP)启动子驱动的 RPS5 shRNA 腺病毒, 分别用 AdGFa2-shRPS5 及其对照 AdGFa2 shNC 转染大鼠原代 HSC 和肝细胞, 通过蛋白印迹法和实时 PCR 测定 RPS5、 α -SMA 和 I 型胶原表达情况; 采用二甲基亚硝胺(DMN)和胆管结扎术(BDL)的方法建立大鼠肝纤维化模型, 尾静脉注射腺病毒特异性敲减肝内 HSC 的 RPS5 水平。肝组织切片 HE 染色分析病理改变情况; 羟脯氨酸含量测定、切片天狼星红和 Masson 染色评价胶原沉积情况; 免疫组织化学染色检测 α -SMA 和 RPS5 的表达情况。**结果** AdGFa2-shRPS5 能够特异性敲减 HSC 中的 RPS5 表达水平, 增加 α -SMA 和 I 型胶原在体表达。体内研究结果表明, 在两种慢性肝损伤动物模型中, 特异性敲减 HSC 中 RPS5 表达水平能够促进 HSC 活化, 增加细胞外基质的沉积, 促进肝纤维化。**结论** RPS5 对 HSC 激活和肝纤维化发生至关重要, 可能是治疗肝纤维化的潜在靶点。

[关键词] 核糖体蛋白 S5; 肝星状细胞; 胶质纤维酸性蛋白; 肝星状细胞活化; 肝纤维化

[文章编号] 2097-2024(2023)04-0227-07

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202209007

Effects of specific knockdown of ribosomal protein S5 in hepatic stellate cells on liver fibrosis

TANG Yuzhen, ZHANG Junping (School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of specific knockdown of hepatic stellate cells (HSC) ribosomal protein S5 (RPS5) on liver fibrosis in rats. **Methods** The glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter-driven RPS5 shRNA adenovirus was established, and AdGFa2-shRPS5 and its control AdGFa2 shNC were used to transfect primary rat HSCs and hepatocytes, respectively. RPS5 was determined by Western-blot and Real Time PCR, α -SMA and type I collagen expression; the rat liver fibrosis model was established by dimethyl nitrosamine (DMN) and bile duct ligation (BDL), and intrahepatic HSC was specifically knocked down by tail vein injection of adenovirus of RPS5 levels. The pathological changes of liver tissue sections were analyzed by HE staining; the content of hydroxyproline, sections of Sirius red and Masson staining were used to evaluate collagen deposition; immunohistochemical staining was used to detect the expression of α -SMA and RPS5. **Results** AdGFa2-shRPS5 specifically knocked down the expression level of RPS5 in HSC and increased the expression of α -SMA and type I collagen in vitro. The in vivo results showed that in two animal models of chronic liver injury, specific knockdown of RPS5 expression in HSCs promoted HSC activation, increased the deposition of extracellular matrix, and promoted liver fibrosis. **Conclusion** RPS5 is essential for HSC activation and liver fibrosis, which could be a potential target for the treatment of liver fibrosis.

[Key words] ribosomal protein S5; hepatic stellate cells; glial fibrillary acidic protein; HSC activation; hepatic fibrosis

肝纤维化(HF)是一种创伤愈合反应,其特征是细胞外基质(ECM)在肝内的过度沉积,导致肝功能丧失和肝脏结构破坏^[1]。在正常肝脏中,肝星状细胞(HSC)是位于肝脏窦状隙的 DISE 腔内,负责储存维生素 A。当肝脏受到损伤刺激时,HSC 从静止状态转化为具有增殖、类维生素 A 消失、趋化

性、收缩性、纤维生成等特性的肌成纤维细胞(MFs),参与肝纤维化进程^[2-4]。

核糖体蛋白 S5(RPS5)是核糖体 40S 小亚基的组成成分,是核糖体生物发生所必需的。越来越多的证据表明,一些核糖体蛋白除了参与蛋白质加工合成之外,还具有许多核糖体外功能^[5-6]。例如,RPS5 基因对于胚胎干细胞的分化和类胚体的形成至关重要^[7];RPS5 的 β -发夹结构能够与 HCV IRES 相互作用,并介导 HCV 的翻译过程^[8];RPS5 在结肠癌中异常表达,并可能在癌变过程中作为检查点发挥重要作用^[9]。此外,RPS5 还参与小鼠红白血病细胞分化,其表达下调会影响细胞周期蛋白依赖激

[基金项目] 福建中医药大学高层次人才科研启动资金项目 (X2019005)

[作者简介] 汤玉珍, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理, Email:wynljf@163.com

[通信作者] 张俊平, 博士生导师, 研究方向: 中药药理与毒理, Email:jpzhang08@163.com

酶-2、-4 和-6 的蛋白水平,并延迟体外红细胞成熟,引起 G1/G0 细胞周期停滞^[10-11]。

本课题组前期研究发现,在肝纤维化过程中,RPS5 在静息和激活的 HSC 内存在差异表达^[12-13]。体外实验证实 RPS5 参与 HSC 活化,体内研究表明,RPS5 基因敲减可加重肝纤维化,RPS5 过表达则减轻肝纤维化^[13]。但是,我们并没有研究特异性敲减 HSC 内 RPS5 的表达对肝纤维化的影响^[14-17]。为此,我们构建了 GFa2(GFAP 启动子)-驱动 shRPS5 腺病毒,并研究其靶向敲减 HSC 的 RPS5 表达对肝纤维化进展的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

高糖 DMEM 培养基(Gibco); Western 及 IP 细胞裂解液液(Beyotime); BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific); RPS5 抗体(Santa Cruz)、ALB、GAPDH 抗体(Cell Signaling Technology)、GFAP、 α -SMA、胶原蛋白 I 抗体(Abcam); 山羊(多克隆)抗兔 IgG(H+L)、山羊(多克隆)抗小鼠 IgG(H+L)(LI-COR Biosciences); Odyssey 成像系统(LI-COR Biotechnology); SYBR Premix Ex TaqTM PCR 试剂盒(Takara)。

1.1.2 实验动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,重约 200 g,购于上海 SLAC 实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原代 HSC 和肝细胞提取

原代 HSC 和肝细胞从雄性 SD 大鼠分离,通过蛋白酶-胶原酶消化,单步 Nycodenz 梯度纯化^[13]。分离的 HSC 和肝细胞在含有 10% 胎牛血清(FBS) DMEM 培养基,5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。每隔 1 天更换 1 次培养基。通过 GFAP 免疫染色评估,HSC 的纯度为 90%~95%。本实验于分离后第 3 天在转分化的 HSC 上进行。HSC 以感染复数(MOI)50 感染腺病毒 48 h。

1.2.2 构建重组腺病毒

根据 AdEasyTM Adenoviral Vector System(Agilent Stratagene, USA) 的说明制备质粒 pShuttle-GFa2-

shRPS5。将 GFAP 基因启动子(GFa2)、shRPS5 序列和必需元件克隆到无启动子穿梭载体 pShuttle 中,穿梭载体 pShuttle-GFa2 驱动 shRPS5 的表达。重组 AdGFa2-shRPS5 和 AdGFa2-shNC 腺病毒在 293 细胞中扩增,通过氯化铯梯度超速离心纯化。使 293 细胞通过噬斑测定病毒原液的滴度。shRPS5 和 shNC 序列见表 1。

1.2.3 蛋白印迹法(Western-blot)

将 HSC 细胞中的培养基吸弃,用 PBS 洗涤 1 次,加入 Western 及 IP 细胞裂解液冰上裂解 20 min。通过 BCA 法测量蛋白浓度后将蛋白样品在 95 °C 下加热 5 min。制胶上样,将 20 μ g 样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,结束后将蛋白质转移到 NC 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入 RPS5、ALB、GAPDH、GFAP、 α -SMA 和 I 型胶原的单克隆抗体 4 °C 孵育过夜,用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。山羊(多克隆)抗兔 IgG(H+L)或山羊(多克隆)抗小鼠 IgG(H+L)室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。Odyssey 红外扫描成像系统对 NC 膜扫描,观察相关蛋白的表达情况。

1.2.4 实时 PCR

用 Trizol 试剂盒提取总 RNA。用 SYBR Premix Ex TaqTM PCR 试剂盒,合成 cDNA,定量 PCR 检测基因 mRNA 表达。以管家基因 β -肌动蛋白(β -actin)作为内部对照,并将基因特异性 mRNA 表达与 β -actin 表达进行归一化。引物序列见表 2。

1.2.5 动物肝纤维化模型

用二甲基亚硝胺(DMN)和胆管结扎术(BDL)的方法建立大鼠肝纤维化模型^[13],尾静脉注射腺病毒(4×10^9 pfu)特异性敲减肝内 HSC 的 RPS5 水平。

1.2.6 组织标本采集及指标的检测

肝组织切片 HE 染色分析病理改变情况;羟脯氨酸(羟脯氨酸检测试剂盒)含量测定、切片天狼星红和 Masson 染色评价胶原沉积情况;免疫组织化学染色检测 α -SMA 和 RPS5 的表达情况。

1.2.7 统计分析

数据分析通过 SPSS 21 统计软件进行,采用 *t* 检验分析,实验结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。与对照组比较, $P < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

表 1 shRPS5 和 shNC 序列

名称	序列
shRPS5	5'-GCTCATGACTGTACGAATTCTCGAGAATTCGTACAGTCAT GAGC-3'
shNC	5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCGCTCGAGCGAATCCTACAAA GCGCGC-3'

2 结果

2.1 AdGFa2-shRPS5 对 RPS5 表达的抑制作用

为了确定 AdGFa2-shRPS5 对 RPS5 表达的影响及对 HSC 的特异性,我们分别用 AdGFa2-shRPS5 和 AdGFa2 shNC 转染大鼠的原代 HSC 和肝细胞 48 h,蛋白印迹法和实时 PCR 测定 RPS5 的表达情况。结果显示,RPS5 mRNA 和蛋白质水平仅在原代 HSC 中降低(图 1A、1B),在肝细胞中没有明显变化(图 1C、1D)。

2.2 AdGFa2-shRPS5 对 HSC 活化的影响

AdGFa2-shRPS5 转染原代培养的 HSC,蛋白印迹法和实时 PCR 分析 α -SMA 和 I 型胶原表达变化。结果表明,AdGFa2-shRPS5 感染 HSC 后, α -SMA 和 I 型胶原 mRNA 和蛋白质的表达显著增加(图 2A、2B)。免疫荧光结果显示,转染 AdGFa2-

shRPS5 的 HSC 形态明显改变,细胞更加扁平而延展(图 2C)。以上结果表明 RPS5 敲减促进了 HSC 的活化。

2.3 AdGFa2-shRPS5 对 BDL 诱导的肝纤维化的影响

为了考察 AdGFa2-shRPS5 体内对肝纤维化的影响,我们构建了 BDL 肝纤维化模型。BDL 手术前 2 d 和手术后 5 d 由尾静脉注射 AdGFa2-shRPS5,2 周后处死所有大鼠(图 3A),评价肝纤维化情况。免疫组织化学染色结果所示,与 AdGFa2-shNC 组相比,AdGFa2-shRPS5 降低了小鼠体内 RPS5 的表达,促进 HSC 的活化, α -SMA 表达相应增加,表明肝纤维化程度加重。HE 染色结果表明,在 AdGFa2-shRPS5 组中,反应性胆管周围有更广泛的胆管增生和有害的肝实质塌陷, α -SMA 阳性表达增加。此外,天狼星红和 Masson 染色结果显示 AdGFa2-

表 2 实时 qPCR 引物序列

名称	正向引物序列	反向引物序列
β -actin	5'-CCAT TGAACACGGCATTGTC-3'	5'-TCATAGATGGGCACAC AGTG-3'
RPS5	5'-AAATGTGCAGGTGTTGACCA-3'	5'-CACGCTCCTCCTGAAGAATC-3'
α -SMA	5'-CCGAGATCTCACCGACTACC-3'	5'-TCCA GAGCGACATAGCACAG-3'
collagen I	5'-CCGTGACCTCAAGATG TGCC-3'	5'-GCTCATACCTTCGCTT CCAA-3'

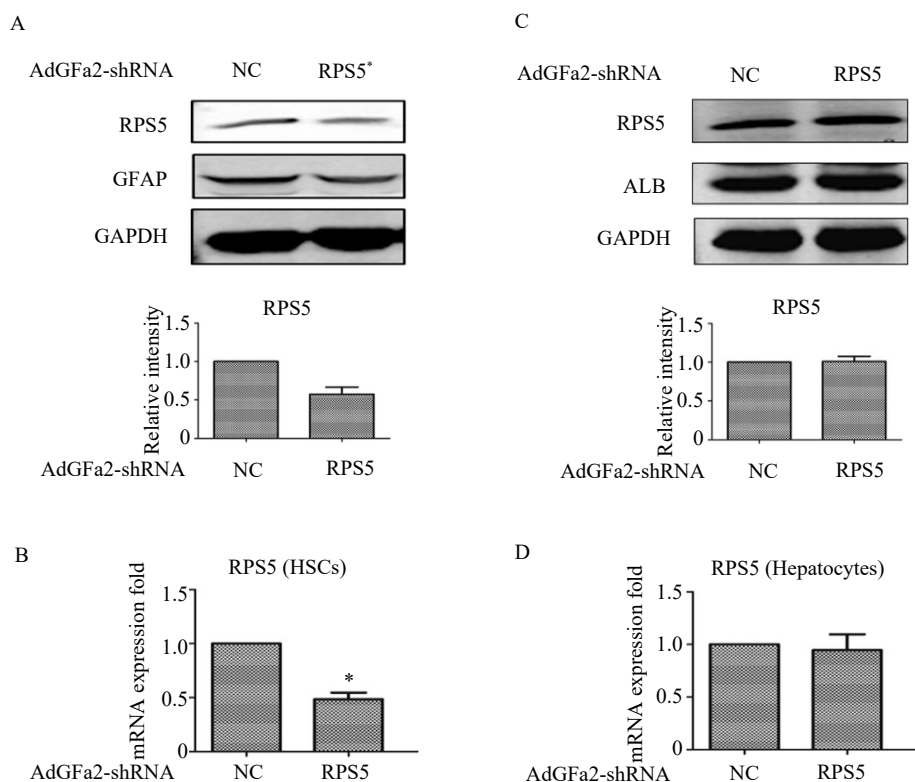


图 1 AdGFa2-shRPS5 对 HSC 和肝细胞中 RPS5 表达的影响 (n=3)

A、B. AdGFa2-shRPS5 特异性敲减原代 HSC 中 RPS5 的表达; C、D. AdGFa2-shRPS5 对原代肝细胞中 RPS5 的表达;

* $P < 0.05$, 与 AdGFa2 shNC 比较

shRPS5 增加了胶原沉积(图 3B)。天狼星染色半定量分析表明, AdGFa2-shRPS5 处理的 BDL 大鼠纤维化面积增加了 161%($P<0.05$, 图 3C)。羟脯氨酸含量 AdGFa2-shRPS5 组明显高于 AdGFa2 shNC 组($P<0.05$, 图 3D)。并且 α -SMA 和 I 型胶原 mRNA 的表达也与其蛋白质水平结果表达相一致(图 3E)。

2.4 AdGFa2-shRPS5 对 DMN 诱导的肝纤维化的影响

为了进一步证实 AdGFa2-shRPS5 对肝纤维化的作用, 腹腔注射 DMN 制备纤维化模型。分别在第一次 DMN 注射前 2 天和后 2 周通过尾静脉向大鼠注射 AdGFa2-shRPS5, 在 4 周后处死所有大鼠(图 4A)。AdGFa2-shRPS5 抑制大鼠体内 RPS5 的表达, α -SMA 在肝脏中的表达增加(图 4B)。与 BDL 模型一致, HE、天狼星红、Masson、 α -SMA 染色及 α -SMA RT-PCR 分析证实(图 4B, 4E), AdGFa2-shRPS5 也促进了 DMN 诱导的肝纤维化的发展。在 DMN 模型中, AdGFa2-shRPS5 组的羟脯氨酸含量高于 AdGFa2 shNC 组($P<0.05$, 图 4C)。天狼星红染色的半定量分析结果显示, AdGFa2-shRPS5 使纤维化面积显著增加约 157%($P<0.05$, 图 4D)。综上所述结果证实特异性敲减 HSC 内的 RPS5 加剧了纤

维化的进展。

3 讨论

肝纤维化是一个动态过程, 其特征是慢性肝损伤导致 ECM 的过度沉积, 当肝损伤发生时, HSC 活化以获得成纤维能力, 因此 HSC 是肝纤维化的主要生成细胞。文献表明, 在转分化的 HSC 和人类肝硬化肝脏中 RPS5 显著降低^[13]。RPS5 的过表达使得体内肝纤维化得到改善, 而 RPS5 的敲减促进了肝纤维化^[13]。但究竟是哪一种细胞在这一过程中起主要作用仍值得进一步研究。因此, 有必要仅针对肝脏中一个或有限细胞群进行研究。胶质纤维酸性蛋白 GFAP 是成熟星形胶质细胞中的主要中间丝状蛋白, 但也在肝脏的 HSCs 中表达。因此, 使用 GFAP 启动子 GFa2 来驱动 RPS5 敲减可能是靶向 HSC 的方法。在此研究中, 我们使用 GFAP 启动子驱动 shRNA 系统来研究 RPS5 靶向 HSCs 对大鼠肝纤维化进展的影响。

本研究构建重组腺病毒 AdGFa2-shRPS5, 并证实 AdGFa2-shRPS5 可以特异性地将 HSCs 中 RPS5 的表达降低约 50%, 对肝细胞没有明显作用。研究

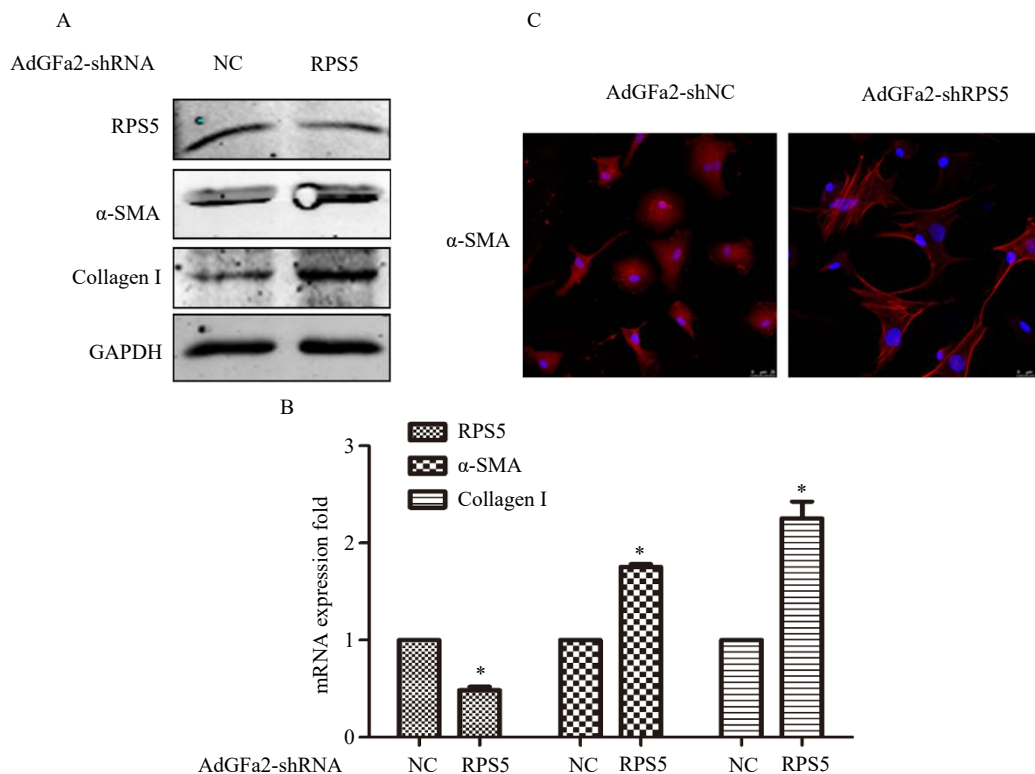


图 2 AdGFa2-shRPS5 对 HSC 活化的影响

A、B. AdGFa2-shRPS5 感染 HSC 后显著增加 α -SMA 和 I 型胶原的表达;
C. 用 AdGFa2-shRPS5 和 AdGFa2-shNC 感染 HSC 3 d, 免疫荧光染色检测 α -SMA 的表达 (比例尺: 25 μ m);
* $P<0.05$, 与 AdGFa2 shNC 比较

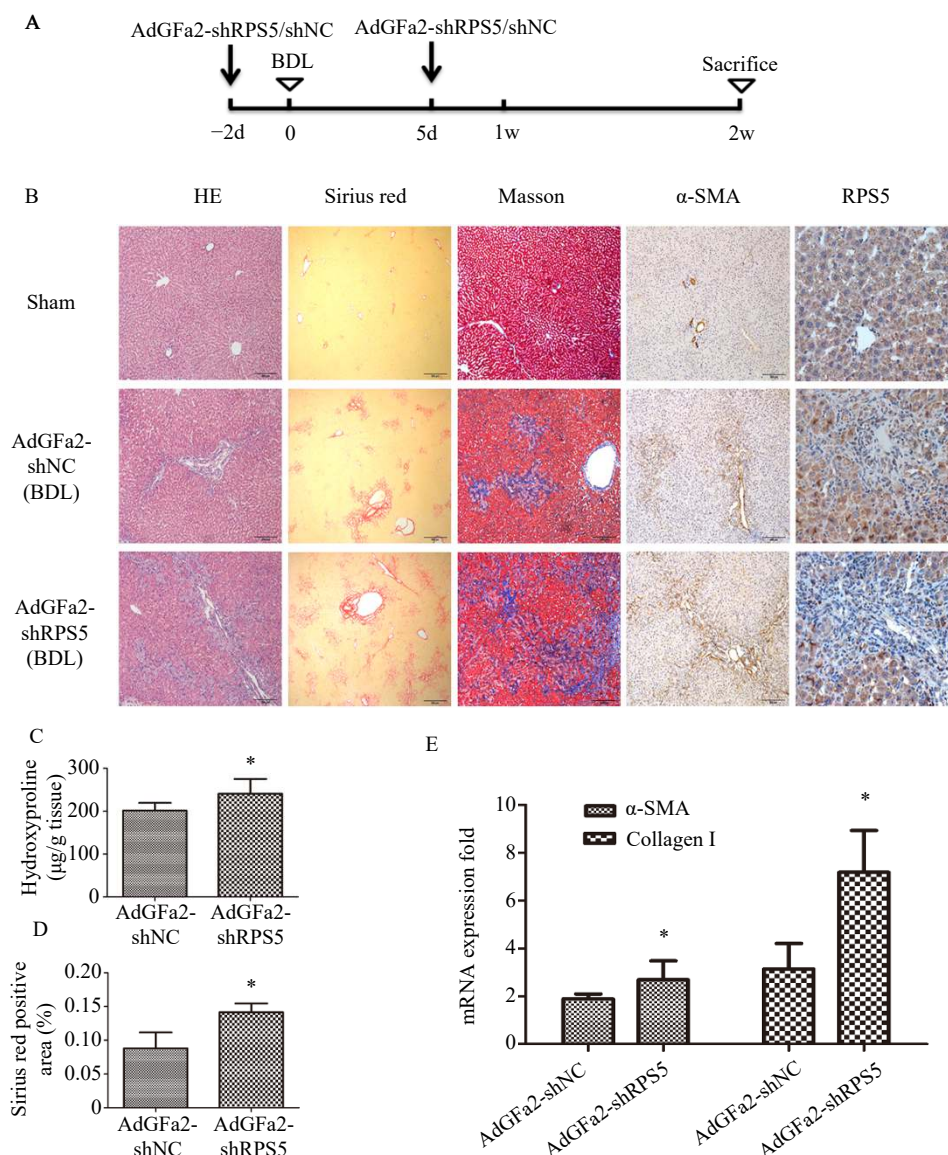


图3 AdGFa2-shRPS5对BDL诱导的肝纤维化的影响($n > 6$)

A. BDL 诱导大鼠肝纤维化的示意图; B. 各组代表性肝切片 H&E (100×)、天狼星红 (Sirius red) 染色 (40×)、Masson 染色 (100×)、 α -SMA (100×) 和 RPS5 (400×); C. 羟脯氨酸测定胶原蛋白含量; D. 半定量分析计算 Sirius red 染色胶原含量; E. α -SMA 和 I 型胶原 mRNA 水平; * $P < 0.05$, 与 AdGFa2-shNC 对照组比较

证明 RPS5 的敲减促进 HSCs 的活化。体内研究结果表明, 两种慢性肝损伤动物模型中纤维化的发展随着 RPS5 的特异性敲减而加重, 并伴有显著的细胞外基质沉积。综上结果表明, RPS5 的下调有助于 HSC 的激活, 从而促进体内肝纤维化, 表明 RPS5 可能是 HSC 激活的分子开关。

RPS5 是核糖体 40S 小亚基的组成成分, 是核糖体生物发生所必需的, 并且具有许多核糖体外功能, 如促进细胞的凋亡、DNA 修复、细胞增殖和分化^[5-6,10-11]。文献证实 RPS5 可抑制 LPS 诱导的巨噬细胞中的 IL-6 和 NO 释放, 表明 RPS5 也参与炎症过程^[18]。本研究结果表明, RPS5 在调节 HSC 活化中起着重要作用, 揭示了 RPS5 的新功能。由于

GFa2 启动子的活性较弱, 我们没有研究过表达 HSC 中的 RPS5 对体内肝纤维化的影响。

本研究为敲减 HSC 中的 RPS5 对肝纤维化有促进作用提供了证据。使用 AdGFa2-shRPS5 的一个关键优势是靶向 HSC, 并且对正常肝细胞没有影响。结果表明, RPS5 对肝纤维化的发生发展至关重要, 可能是治疗肝纤维化的一个有前景的靶点。

【参考文献】

- [1] BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [2] FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. *Physiol Rev*, 2008,

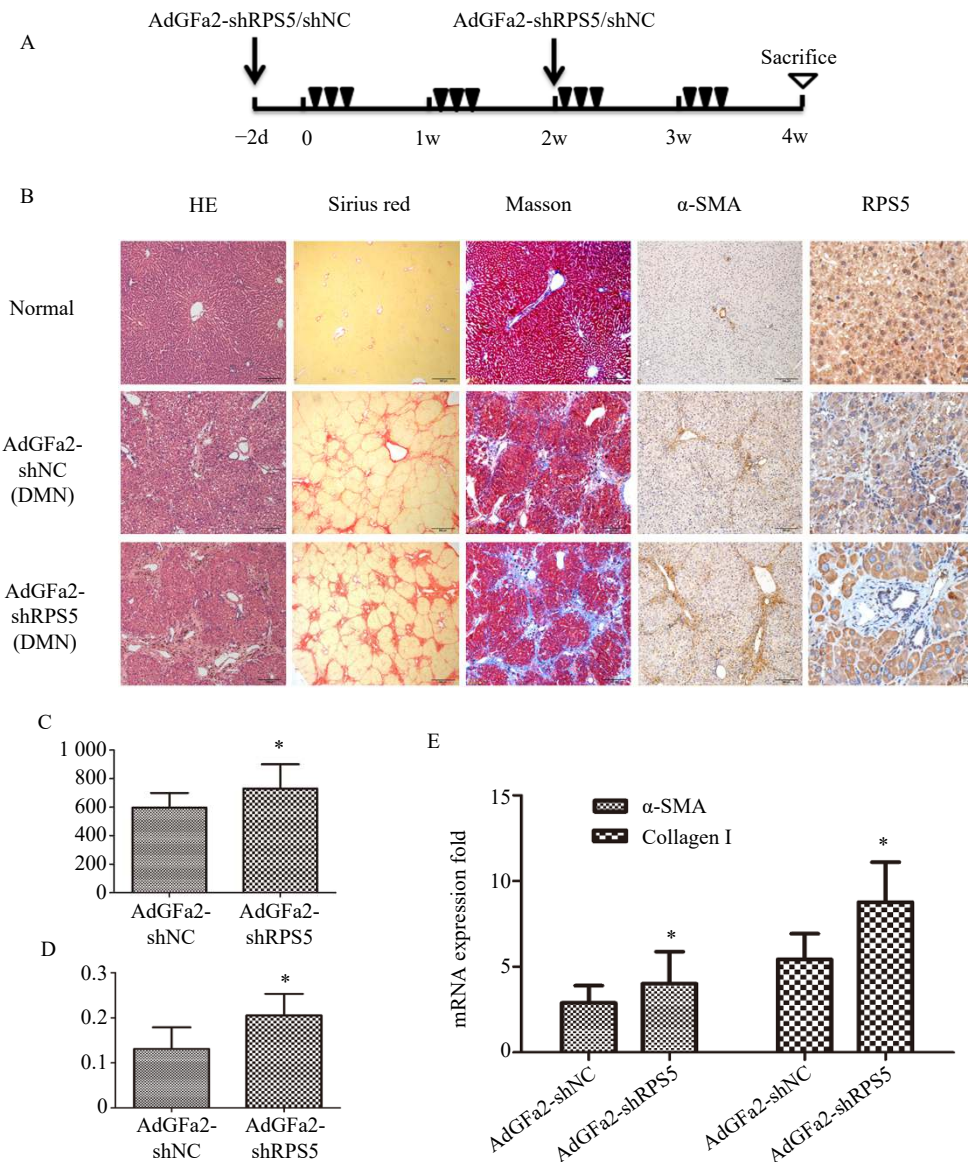


图 4 AdGFa2-shRPS5 对 DMN 诱导的肝纤维化影响 ($n > 6$)

A. DMN 诱导大鼠肝纤维化的示意图; B. 各组肝切片 H&E (100 $\times$)、天狼星红染色 (40 $\times$)、Masson 染色 (100 $\times$)、 α -SMA (100 $\times$) 和 RPS5 (400 $\times$); C. 羟脯氨酸测定胶原蛋白含量; D. 半定量分析计算 Sirius red 染色胶原含量; E. α -SMA 和 I 型胶原 mRNA 水平;

* $P < 0.05$, 与 AdGFa2-shNC 对照组比较

- 88(1): 125-172.
- [3] BATALLER R, BRENNER D A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis[J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 437-451.
 - [4] KINOSHITA K, IIMURO Y, FUJIMOTO J, et al. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis[J]. *Gut*, 2007, 56(3): 396-404.
 - [5] WARNER J R, MCINTOSH K B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. *Mol Cell*, 2009, 34(1): 3-11.
 - [6] LINDSTRÖM M S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2): 167-170.
 - [7] FORTIER S, MACRAE T, BILODEAU M, et al. Haploinsufficiency screen highlights two distinct groups of ribosomal protein genes essential for embryonic stem cell fate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(7): 2127-2132.
 - [8] BHAT P, SHWETHA S, SHARMA D K, et al. The beta hairpin structure within ribosomal protein S5 mediates interplay between domains II and IV and regulates HCV IRES function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(5): 2888-2901.
 - [9] BANDRÉS E, MALUMBRES R, CUBEDO E, et al. A gene signature of 8 genes could identify the risk of recurrence and progression in Dukes' B colon cancer patients[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(5): 1089-1094.
 - [10] VIZIRIANAKIS I S, PAPPAS I S, GOUGOUMAS D, et al. Expression of ribosomal protein S5 cloned gene during differentiation and apoptosis in murine erythroleukemia (MEL) cells[J].

- Oncol Res, 1999, 11(9): 409-419.
- [11] MATRAGKOU C N, PAPACHRISTOU E T, TEZIAS S S, et al. The potential role of ribosomal protein S5 on cell cycle arrest and initiation of murine erythroleukemia cell differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(4): 1477-1490.
- [12] LIU X J, YANG L, LUO F M, et al. Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(11): 1600-1607.
- [13] XU W H, HU H G, TIAN Y, et al. Bioactive compound reveals a novel function for ribosomal protein S5 in hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 648-660.
- [14] BACHEM M G, MEYER D, SCHÄFER W, et al. The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture[J]. *J Hepatol*, 1993, 18(1): 40-52.
- [15] WEINER J A, CHEN A, DAVIS B H. Platelet-derived growth factor is a principal inductive factor modulating mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor gene expression via a distal E-box in activated hepatic stellate cells[J]. *Biochem J*, 2000, 345(Pt 2): 225-231.
- [16] YANG N N, MAHATO R I. GFAP promoter-driven RNA interference on TGF- β 1 to treat liver fibrosis[J]. *Pharm Res*, 2011, 28(4): 752-761.
- [17] MAUBACH G, LIM M C C, ZHANG C Y, et al. GFAP promoter directs lacZ expression specifically in a rat hepatic stellate cell line[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(5): 723-730.
- [18] XU J, WANG K Q, XU W H, et al. The matrine derivative MASM prolongs survival, attenuates inflammation, and reduces organ injury in murine established lethal Sepsis[J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(11): 1762-1772.
- [收稿日期] 2022-09-04 [修回日期] 2023-01-30
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 217 页)

- [51] DHAL S, PAL K, GIRI S. Transdermal delivery of gold nanoparticles by a soybean oil-based oleogel under iontophoresis[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(10): 7029-7039.
- [52] LABALA S, JOSE A, CHAWLA S R, et al. Effective melanoma cancer suppression by iontophoretic co-delivery of STAT3 siRNA and imatinib using gold nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2017, 525(2): 407-417.
- [53] TAVEIRA S F, DE SANTANA D C A S, ARAÚJO L M P C, et al. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(7): 1382-1390.
- [54] PEDROZA R B, Moura, Ms, et al. Combination of lipid nanoparticles and iontophoresis for enhanced lopinavir skin permeation: impact of electric current on lipid dynamics[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 168: 106048.
- [55] NGUYEN H X, BANGA A K. Electrically and ultrasonically enhanced transdermal delivery of methotrexate[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3): 117.
- [56] VAIDYA J, SHENDE P. Potential of sonophoresis as a skin penetration technique in the treatment of rheumatoid arthritis with transdermal patch[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21(5): 180.
- [57] PARK J, LEE H, LIM G S, et al. Enhanced transdermal drug delivery by sonophoresis and simultaneous application of sonophoresis and iontophoresis[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20(3): 96.
- [58] 杜丽娜, 金义光. 经皮给药系统研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2013, 40(4): 379-385.
- [59] TEAIMA M H, MOHAMED M A A, ABD EL REHEM R T, et al. Enhanced transdermal delivery of bisoprolol hemifumarate via combined effect of iontophoresis and chemical enhancers: ex vivo permeation/in vivo pharmacokinetic studies[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(5): 682.
- [收稿日期] 2022-08-02 [修回日期] 2023-03-15
[本文编辑] 费永和