

# 白藜芦醇纳米颗粒结合可溶性微针 用于瘢痕疙瘩治疗

付焱盈<sup>1,2</sup>, 许文哲<sup>2</sup>, 荣莉<sup>1</sup>, 刘树威<sup>3</sup>

(1. 吉林大学第一医院整形外科, 长春 130021; 2. 吉林大学化学学院, 长春 130012;  
3. 吉林大学第一医院转化医学研究院, 长春 130021)

**摘要** 以白藜芦醇(RES)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为原料, 通过纳米沉淀法制备了尺寸均一的RES-PVP球形纳米颗粒(RES-PVP NPs); 将其作为纳米药物负载在以透明质酸为基质的可溶性微针(MNs)中, 制备了载药微针(MN-NPs)。微针载药后仍然保持了较高的机械强度, 能够满足穿透人瘢痕组织皮肤的需要。MN-NPs中的RES-PVP NPs能够诱发人瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡并抑制其迁移。体内实验结果表明, MN-NPs能够有效抑制瘢痕疙瘩的生长, 展现出治疗瘢痕疙瘩的能力。本文提出的以载药微针实现白藜芦醇纳米药物的透皮给药并治疗瘢痕疙瘩的方法是可行的, 具有良好的应用前景。

**关键词** 白藜芦醇; 纳米药物; 微针; 瘢痕疙瘩

中图分类号 O631

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240268

## Resveratrol Nanoparticles Combined with Dissolving Microneedles for Keloid Treatment

FU Yiyi<sup>1,2</sup>, XU Wenzhe<sup>2</sup>, RONG Li<sup>1\*</sup>, LIU Shuwei<sup>3\*</sup>

(1. Department of Plastic Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China;

2. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;

3. Institute of Translational Medicine, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** By using resveratrol (RES) and polyethylpyrrolidone (PVP) as raw materials, RES-PVP spherical nanoparticles (RES-PVP NPs) with uniform size were prepared by nano-precipitation method. Then the RES-PVP NPs were loaded into soluble microneedles (MNs) based on hyaluronic acid to prepare the nanodrug-loaded microneedles MN-NPs. The microneedles still maintain high mechanical strength after drug loading, which can meet the needs of penetrating the skin of human scar tissue. The RES-PVP NPs in MN-NPs can induce the apoptosis of human keloid fibroblasts and inhibit their migration. In experiments *in vivo*, MN-NPs can effectively inhibit the growth of keloid, showing the ability in keloid treatment. The method proposed in this work of transdermal delivery of resveratrol nanodrug using drug-loaded microneedles to treat keloid is feasible, and has good application prospect.

**Keywords** Resveratrol; Nanodrug; Microneedle; Keloid

瘢痕疙瘩是病理性瘢痕的一种, 是皮肤在外界刺激下不正常愈合引起的皮肤纤维增生性疾病, 以伤口愈合过程中成纤维细胞的增殖和胶原的过量沉积为显著特征。瘢痕疙瘩的生长会超出原始的伤口边界, 不会自发变小<sup>[1]</sup>。在瘢痕疙瘩的形成过程中, 成纤维细胞起到十分重要的作用。成纤维细胞是细

收稿日期: 2024-06-03. 网络首发日期: 2024-08-30.

联系人简介: 刘树威, 男, 博士, 研究员, 主要从事功能纳米复合材料的制备和生物医学应用方面的研究. E-mail: liushuwei@jlu.edu.cn

荣莉, 女, 博士, 主任医师, 主要从事瘢痕疙瘩治疗的基础研究和临床方面的研究. E-mail: rong\_li@jlu.edu.cn

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(批准号: 20230204091YY)资助.

Supported by the Science and Technology Development Program of Jilin Province, China(Nos.20230204091YY).

胞外基质的主要生产者,转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )能够通过TGF- $\beta 1$ /Smad信号通路刺激成纤维细胞的增殖和分化,减少成纤维细胞的凋亡,同时影响细胞外基质的降解,诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化<sup>[2]</sup>.因此,瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长能力较强,临床治疗存在困难.目前常见的瘢痕疙瘩治疗方法主要包括皮质类固醇注射疗法、手术疗法、冷冻疗法及激光疗法等<sup>[3]</sup>,但是它们均面临着疼痛、患者依从性差以及复发率高的缺点,而且必须依赖专业技术人员的操作.此外,皮质类固醇等激素类药物的注射还可能引发皮肤萎缩及色素沉积等,甚至给机体的其它组织器官带来毒副作用.因此,寻找能够用于瘢痕疙瘩治疗的药物并选择与之适配的给药方法具有重要的研究意义.

多酚是指分子结构中有若干个酚羟基的化合物的总称,广泛存在于天然植物中,具有抗氧化<sup>[4,5]</sup>、抗炎<sup>[6]</sup>、抗菌<sup>[7]</sup>及抗肿瘤<sup>[8]</sup>等广泛的生物学功能,可预防、治疗多种疾病.其中,白藜芦醇(RES)是一种具有代表性的多酚化合物,广泛存在于葡萄、虎杖及花生等植物中,是一种天然的植物抗毒素<sup>[9]</sup>.除了多酚普遍具备的生物学功能外<sup>[10-12]</sup>,白藜芦醇还有保护皮肤以及治疗皮肤病的功能,例如治疗银屑病和其它皮肤炎症性疾病、促进伤口愈合及抗衰老等<sup>[13]</sup>.特别要指出的是,白藜芦醇还能对抗纤维化,对心脏纤维化<sup>[14]</sup>、肺纤维化<sup>[15]</sup>及皮肤纤维化<sup>[16]</sup>等疾病均有一定的治疗效果,有望应用于病理性瘢痕的治疗,是潜在的瘢痕疙瘩治疗药物.但光稳定性差、水溶性差及生物利用率低等问题极大限制了白藜芦醇的应用<sup>[17]</sup>.现有研究表明,将白藜芦醇单体构筑成为纳米药物的方法不仅能够提升白藜芦醇的稳定性、水溶性和生物利用率,还能够保留白藜芦醇的药物活性,甚至一些白藜芦醇纳米药物的作用效果与白藜芦醇单体相比还有一定的提升<sup>[18]</sup>.

对于瘢痕疙瘩等皮肤疾病,透皮给药是一种理想的给药方式.透皮给药是指药物经由皮肤吸收进入人体血液循环并达到有效血药浓度,进而实现疾病预防或治疗的一种给药途径,能够避免口服给药可能发生的肝脏首过效应和胃肠道灭活,有助于维持血药浓度、降低副作用和提升治疗效果<sup>[19]</sup>.皮肤从外到内可分为表皮层、真皮层和皮下组织,其中,表皮层最外层的厚度为10~20  $\mu\text{m}$ 的致密角质层是限制皮肤对药物吸收效果的主要原因<sup>[20]</sup>.因此,研究者针对性地开发出载药微针来增强皮肤对药物的吸收.微针是微米级大小的针头阵列,能够破坏皮肤角质层,在皮肤上形成临时的微米大小的通路,为药物直接进入表皮层或真皮层提供保障<sup>[21]</sup>.其中,可溶性微针完全由生物相容性材料制成,可降解且降解产物安全,无尖锐医疗废物的产生,具有高效、便捷、安全等优点,受到了广泛的关注<sup>[22]</sup>.

本文通过纳米沉淀法,以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为稳定剂制备了白藜芦醇球形纳米颗粒(RES-PVP NPs),其中白藜芦醇的质量分数最高可达49.3%.将RES-PVP NPs作为纳米药物负载在以透明质酸为基质的可溶性微针(MNs)中,制得负载了RES-PVP NPs的载药微针(MN-NPs).微针载药后仍然保持了较高的机械强度,能够满足穿透人瘢痕组织皮肤的需要.MN-NPs中的RES-PVP NPs能够诱发人瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡并抑制其迁移.在体内实验中,MN-NPs能够有效抑制瘢痕疙瘩的生长,对瘢痕疙瘩的治疗取得了较好的效果.本文提出的以载药微针实现白藜芦醇纳米药物的透皮给药并治疗瘢痕疙瘩的方法是可行的,具有良好的应用前景.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

白藜芦醇(纯度98%),美国Sigma-Aldrich公司;聚乙烯吡咯烷酮(分子量8000),阿法埃莎(中国)化学有限公司;无水乙醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris,纯度99.9%),阿拉丁试剂(上海)有限公司;透明质酸(分子量10000),大连美伦生物技术有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC)、Annexin V-FITC型细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒和TUNEL细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;T11023型碳支持膜铜网(300目),北京新兴百瑞技术有限公司;DMEM培养基(高糖)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH值为7.2~7.4),美国Gibco公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)、胰蛋白酶消化液(质量分数为0.25%)和Ki-67蛋白抗体,北京索莱宝科技有限公司;人瘢痕疙瘩成纤维细胞(HKFs),上海信裕生物科技有限公

司; Balb/c 裸鼠, 北京维通利华实验动物技术有限公司。

H-800 型透射电子显微镜(TEM), 日本 Hitachi 公司; Zetasizer NanoZS 型纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; UV-2600 型紫外-可见-近红外(UV-Vis-NIR)分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; Bruker VERTEX 80V 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 德国布鲁克公司; FluoView FV1000 型激光共聚焦显微镜(CLSM), 日本奥林巴斯公司; Ts2-FL 型荧光倒置显微镜, 日本尼康公司; PYXE-80IR 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; RT-6000 型酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

## 1.2 实验过程

1.2.1 RES-PVP NPs 溶液的制备 在室温条件下, 将 1 mL 浓度为 7 mg/mL 的白藜芦醇乙醇溶液注入 4 mL 溶解有 3 mg 聚乙烯吡咯烷酮的 Tris 缓冲溶液(pH=8.5)中, 在 550 r/min 的转速下磁力搅拌 1.5 h. 反应结束后, 收集溶液并在 9200g 的离心力下离心 10 min. 除去上清液后, 将沉淀重新分散于去离子水中, 得到浓度为 8 mg/mL 的 RES-PVP NPs 溶液。

1.2.2 MN-NPs 的制备及皮肤插入性能测试 将透明质酸溶解在去离子水中, 配制成浓度为 300 mg/mL 的透明质酸水溶液. 将 250  $\mu$ L 透明质酸水溶液填充于微针模具中, 进行真空处理, 使透明质酸水溶液填满模具的微孔, 随后将模具放入干燥器内, 待其干燥固化后脱模即得到未载药的空白可溶性微针(MNs)。

将 50  $\mu$ L 浓度为 300 mg/mL 的透明质酸水溶液与 5  $\mu$ L 浓度为 8 mg/mL 的 RES-PVP NPs 溶液混合均匀后注入微针模具中, 进行真空处理并干燥, 随后再注入 200  $\mu$ L 300 mg/mL 的透明质酸水溶液, 再次真空处理干燥后脱模即得到 MN-NPs. 将 MN-NPs 的针尖部分做超薄切片并通过 SEM 观察形貌。

为测试纳米药物在针尖中的分布情况及载药微针的皮肤插入性能, 以 FITC 标记透明质酸、以罗丹明 B(RhB) 标记 RES-PVP NPs 制备荧光标记的可溶性载药微针(F-MN-NPs), 通过激光共聚焦显微镜观察 F-MN-NPs 的形貌和纳米颗粒在针尖中的分布情况. 按压 2 min 使 F-MN-NPs 插入猪皮肤后, 将猪皮肤表皮侧置于激光共聚焦显微镜镜头上方, 以 25  $\mu$ m 为步长扫描猪皮不同深度的荧光信号, 判断 F-MN-NPs 插入猪皮的深度。

1.2.3 RES-PVP NPs 和 MN-NPs 的体外瘢痕疙瘩治疗活性 将 HKFs 以  $8 \times 10^3$  Cell/Pore 的密度接种在 96 孔板中, 并置于 CO<sub>2</sub> 培养箱[37  $^{\circ}$ C, 5%(质量分数)CO<sub>2</sub>]中孵育. 待细胞贴壁后, 分别加入 10  $\mu$ L 相应药物的溶液, 使得培养基中 RES 和 PVP 单体的终浓度分别为 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30 和 40  $\mu$ g/mL, RES-PVP NPs 和 MN-NPs 的终浓度分别为 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 和 100  $\mu$ g/mL. 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 48 和 72 h 后, 在避光条件下, 向每孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 继续孵育 1 h. 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度值, 计算 HKFs 的存活率。

将 HKFs 以  $1 \times 10^6$  Cell/Pore 的密度接种在 6 孔板中, 并置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育. 待细胞贴壁后弃除培养基, 分别用完全培养基稀释样品至 RES 和 PVP 单体终浓度为 10  $\mu$ g/mL, MNs、RES-PVP NPs 和 MN-NPs 终浓度为 20  $\mu$ g/mL, 对细胞进行给药处理 24 h; 除更换新的完全培养基外, 对照组未做任何其它处理. 药物处理结束后, 收集各组中的细胞, 通过流式细胞术分别测定各组细胞的凋亡情况和周期分布情况。

将 HKFs 以  $1 \times 10^6$  Cell/Pore 的密度接种在激光共聚焦专用 6 孔板中, 并置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育. 待细胞贴壁后弃除培养基, 使用 10  $\mu$ L 移液器吸头在孔板底部进行划痕, 并使用 PBS 冲洗掉划痕处掉落的细胞. 分别用低血清浓度完全培养基稀释样品至 RES 和 PVP 单体终浓度为 10  $\mu$ g/mL, RES-PVP NPs 和 MN-NPs 终浓度为 20  $\mu$ g/mL, 对细胞进行给药处理, 对照组同时更换为新的低血清浓度完全培养基. 在药物处理后的 0, 24 和 48 h 分别对孔板的细胞划痕处进行拍照。

1.2.4 MN-NPs 的体内瘢痕疙瘩治疗活性 本文所涉及动物实验方案通过了吉林大学第一医院动物伦理委员会的审查, 所有实验均严格按照操作规范进行. 选择处于对数生长期的 HKFs, 消化离心后用 PBS 洗涤并计数, 将 PBS 与 Matrigel 基质胶等体积混合后重悬细胞, 细胞浓度调整为  $5 \times 10^7$  Cell/mL. 将

0.1 mL 细胞悬液接种于 Balb/c 裸鼠右侧腋下皮下, 待小鼠皮下瘢痕疙瘩体积达到 100 mm<sup>3</sup> 后, 将小鼠随机分为 3 组 (Control 组、空白微针组和 MN-NPs 组). 在第 0 天、第 6 天和第 12 天进行空白微针给药和载药微针给药, 期间每隔 24 h 用游标卡尺测量一次瘢痕疙瘩体积和小鼠体重. 16 d 后, 对小鼠进行安乐死, 解剖取出主要器官进行 H&E 染色; 解剖取出瘢痕疙瘩进行拍照、称重、H&E 染色、免疫组化染色, 并利用 Image J 软件对免疫组化结果进行定量分析. H&E 染色中, 主要实验步骤包括器官和组织的脱水、石蜡包埋、切片、石蜡切片脱蜡、H&E 染色、石蜡切片脱水和封片等 7 个步骤. 免疫组化染色的前 4 个步骤与 H&E 染色相同, 石蜡切片脱蜡后的主要实验步骤包括抗原修复、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色、复染、切片脱水和封片等步骤.

## 2 结果与讨论

### 2.1 RES-PVP NPs 与 MN-NPs 的表征

图 1(A) 为 RES-PVP NPs 的 TEM 照片. 可见, RES-PVP NPs 具有尺寸均一的球形形貌, 平均直径为 70 nm. 图 1(B) 为 RES-PVP NPs 的水合粒径分布图. 可见, 其平均水合粒径 (*Z*-average) 为 117.5 nm. 这是因为溶液中的纳米颗粒会吸水产生一定的体积溶胀. 图 1(C) 和 (D) 分别为 RES-PVP NPs 的紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱和 FTIR 谱图, 证明 RES-PVP NPs 中存在 RES 和 PVP 两种组分. 其中, 在 FTIR 谱图中, 1606~1514 cm<sup>-1</sup> 处为 RES 中苯环的振动吸收峰, 1290 cm<sup>-1</sup> 处为 PVP 中 C—N 的振动吸收峰, C=O 的振动吸收峰从 PVP 的 1680 cm<sup>-1</sup> 红移至 RES-PVP NPs 的 1660 cm<sup>-1</sup> 可能是因为 RES 和 PVP 之间存在氢键. 此外, 通过标准曲线法测得 RES-PVP NPs 中白藜芦醇的质量分数为 49.3%.

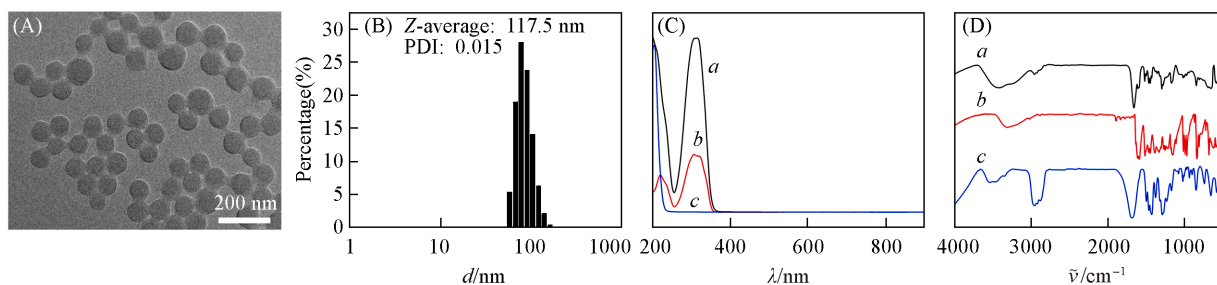


Fig. 1 TEM image(A), hydrated particle size(B), UV-Vis absorption spectra(C) and FTIR spectra(D) of RES-PVP NPs (C, D) a. RES-PVP NPs; b. RES; c. PVP.

图 2(A) 为 MNs 的光学照片, 从图中可以看到清晰的微针结构. 图 2(B) 为 RES-PVP NPs 的 TEM 照

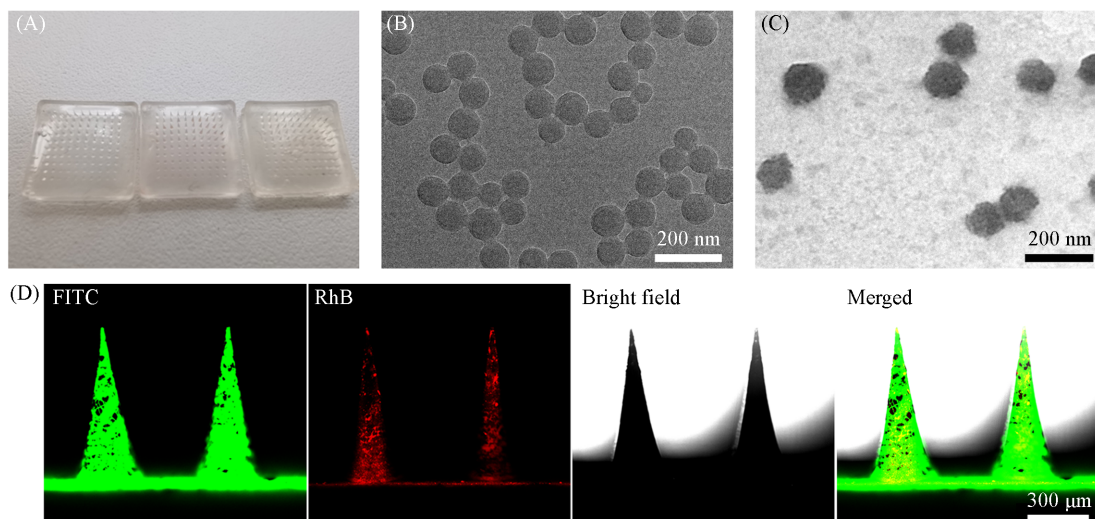


Fig. 2 Optical photo of MNs(A), TEM images of RES-PVP NPs before(B) and after(C) loaded in MNs and CLSM images of F-MN-NPs(D)

片,可见其为均匀的球形.图2(C)为MN-NPs针尖冷冻切片的TEM照片,可见RES-PVP NPs被负载于微针针尖后仍保持了原有的均一球形形貌.图2(D)为F-MN-NPs的CLSM图像,可见RhB标记的RES-PVP NPs所呈现的红色荧光均匀分布于FITC标记的透明质酸所呈现的绿色荧光中,说明将RES-PVP NPs负载于透明质酸为基质的可溶性微针后,纳米药物能够均匀分布在微针的整个针尖中.

将F-MN-NPs插入猪皮肤后扫描猪皮肤不同深度的荧光信号.由图3可见,F-MN-NPs插入猪皮肤的深度最大可达175  $\mu\text{m}$ ,可以穿透角质层达到表皮和上真皮层,实现对纳米药物的透皮递送.

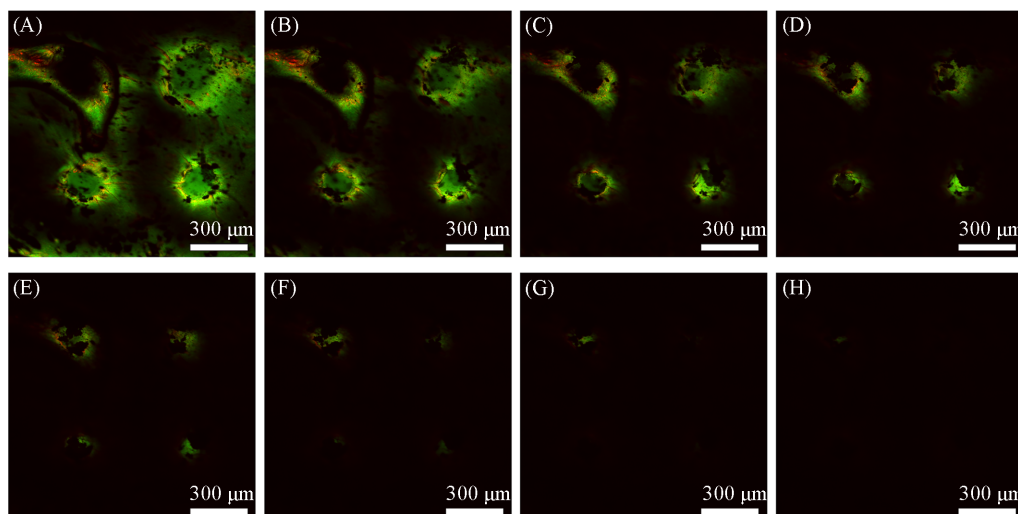


Fig. 3 CLSM images of porcine skin treated with F-MN-NPs at varied depths after insertion for 5 min  
Depth/ $\mu\text{m}$ : (A) 0; (B) 25; (C) 50; (D) 75; (E) 100; (F) 125; (G) 150; (H) 175.

## 2.2 RES-PVP NPs及MN-NPs的体外瘢痕疙瘩治疗活性

图4为利用CCK-8法测定的RES, PVP, RES-PVP NPs和MN-NPs对HKFs的细胞毒性结果.由图4(A)可见,随着RES浓度的增大,HKFs的存活率逐渐下降,并且处理72 h后的细胞存活率显著低于处理48 h后的.由图4(B)可见,随着PVP浓度的增大和处理时间的延长,HKFs的存活率几乎没有变化,表明PVP对HKFs几乎没有毒性.因此,RES-PVP NPs对HKFs的毒性来源于其中的RES.由

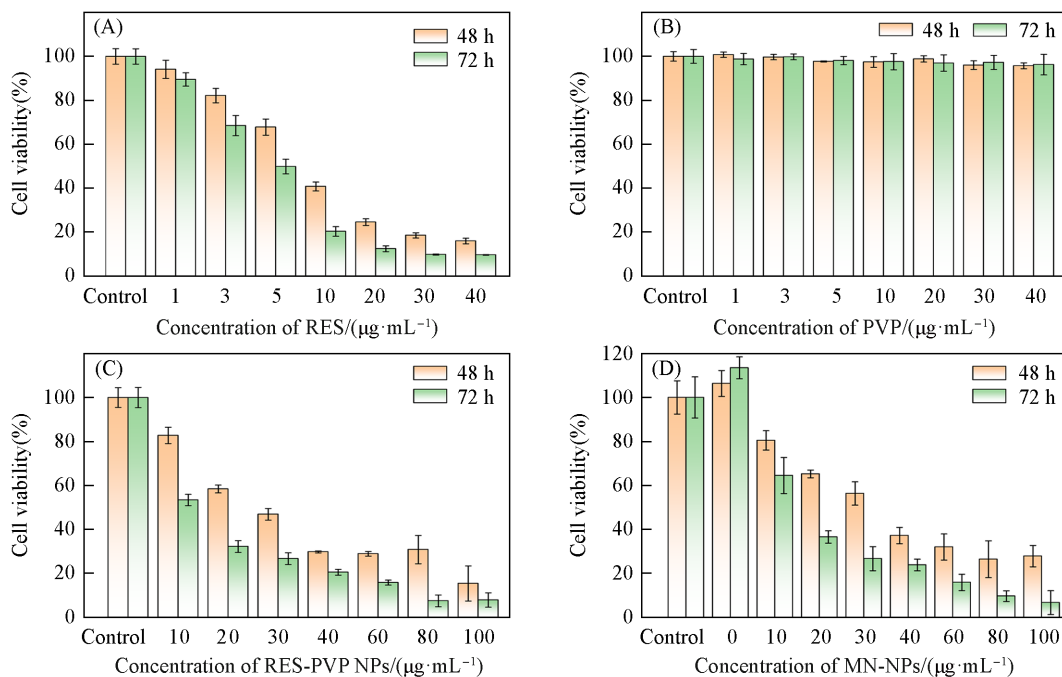


Fig. 4 Cell viability of HKFs after treated with RES(A), PVP(B), RES-PVP NPs(C) and MN-NPs(D)

图4(C)可见, HKFs的存活率同样随着RES-PVP NPs浓度的增大而降低, 随着处理时间的延长而降低. 基于RES-PVP NPs构筑的MN-NPs展现了相似的结果, 由图4(D)可见, MN-NPs对HKFs同样具有明显的杀伤效果.

图5示出了利用流式细胞术测定的细胞凋亡情况, 图6示出了利用流式细胞术测定的细胞周期分布情况. 由图5可见, 对照组的总细胞凋亡率为13.84%, 空白微针组的总细胞凋亡率为20.18%, PVP组的总细胞凋亡率为19.18%, RES组的总细胞凋亡率为41.70%, RES-PVP NPs组的总细胞凋亡率为

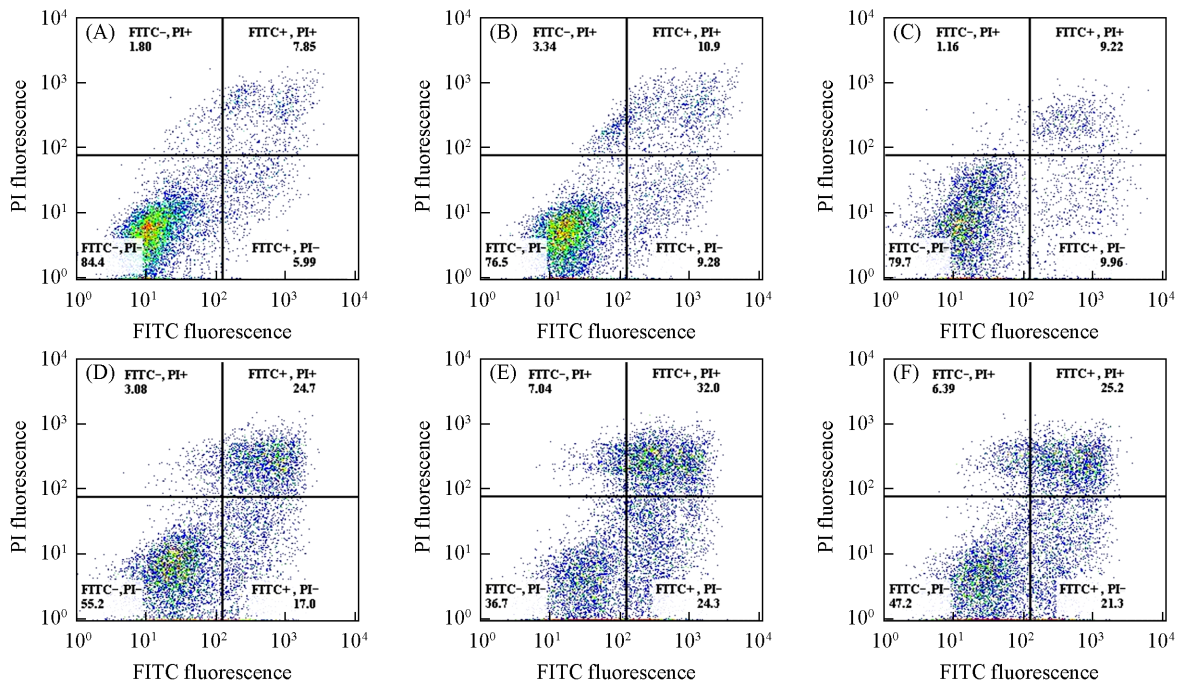


Fig. 5 Annexin V-FITC/PI assay of HKFs treated with different samples

(A) Control; (B) MNs; (C) PVP; (D) RES; (E) RES-PVP NPs; (F) MN-NPs.

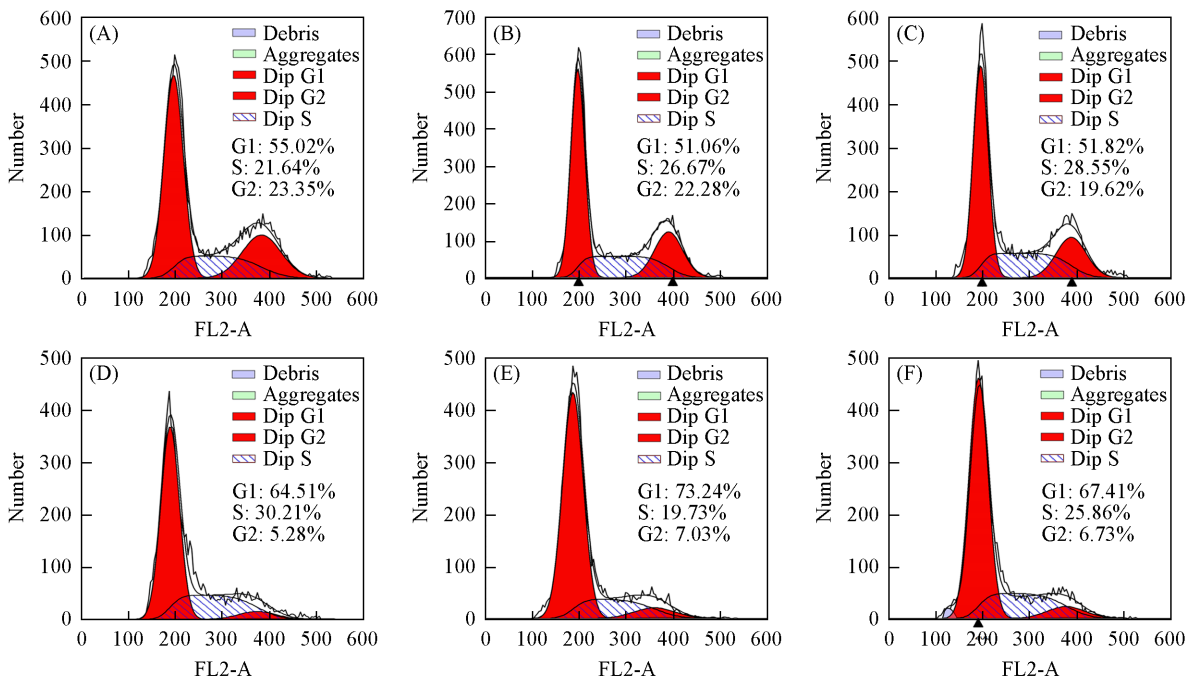


Fig. 6 Cell cycle assay of HKFs treated with different samples

(A) Control; (B) MNs; (C) PVP; (D) RES; (E) RES-PVP NPs; (F) MN-NPs.

56.30%, MN-NPs组的总细胞凋亡率为46.50%。可以看出,空白微针组和PVP组的总细胞凋亡率与Control组接近,对HKFs的杀伤作用十分有限。而RES组、RES-PVP NPs组和MN-NPs组的总细胞凋亡率显著高于Control组,有效诱发了HKFs的凋亡。说明RES-PVP NPs和MN-NPs中的RES具备抗瘢痕能力,有望应用于对瘢痕的治疗。由图6可见,与Control组相比,空白微针组和PVP组对HKFs的细胞周期几乎没有影响,而RES组、RES-PVP NPs组和MN-NPs组处于G1期的细胞比例明显增多。说明RES-PVP NPs和MN-NPs中的RES能够通过抑制HKFs细胞周期的阻滞抑制其增殖,有望应用于对瘢痕的治疗。

瘢痕疙瘩的生长会超出原始伤口边界,迁移扩散的能力较强。因此,对不同处理后HKFs的细胞迁移能力进行了考察。由图7可见,Control组、空白微针组、PVP组的划痕在48 h内可完全愈合,即划痕愈合率为100%。而RES单体组、RES-PVP NPs组、MN-NPs组在24 h内只有轻微的划痕愈合,即便在48 h后,划痕愈合率也分别只有29.39%, 12.23%和19.20%。实验结果说明RES、RES-PVP NPs和MN-NPs均能够抑制HKFs的细胞迁移。

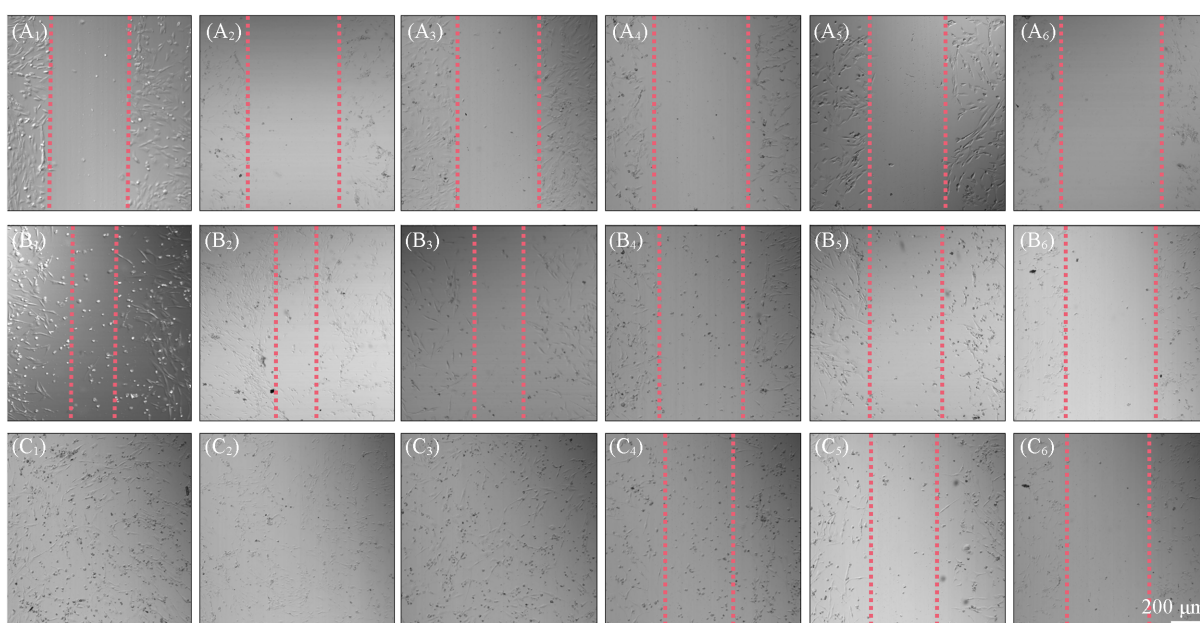


Fig. 7 CLSM images of scratches treated with different samples at 0 h(A<sub>1</sub>—A<sub>6</sub>), 24 h(B<sub>1</sub>—B<sub>6</sub>) and 48 h(C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>)

The distance between the red dashed lines is the remaining width of the scratch.

(A<sub>1</sub>—C<sub>1</sub>) Control; (A<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>) MNs; (A<sub>3</sub>—C<sub>3</sub>) PVP; (A<sub>4</sub>—C<sub>4</sub>) RES; (A<sub>5</sub>—C<sub>5</sub>) RES-PVP NPs; (A<sub>6</sub>—C<sub>6</sub>) MN-NPs.

### 2.3 MN-NPs的体内瘢痕疙瘩治疗活性

图8(A)为由不同时间点下各组小鼠瘢痕疙瘩的平均体积绘制的瘢痕疙瘩生长曲线。空白微针组中瘢痕疙瘩的生长速率与Control组基本一致,表明空白微针对瘢痕疙瘩的生长几乎没有抑制作用。而

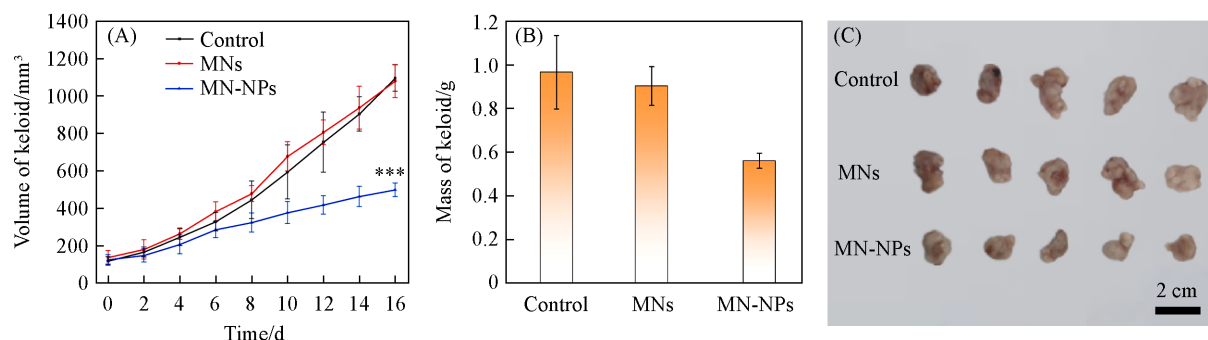
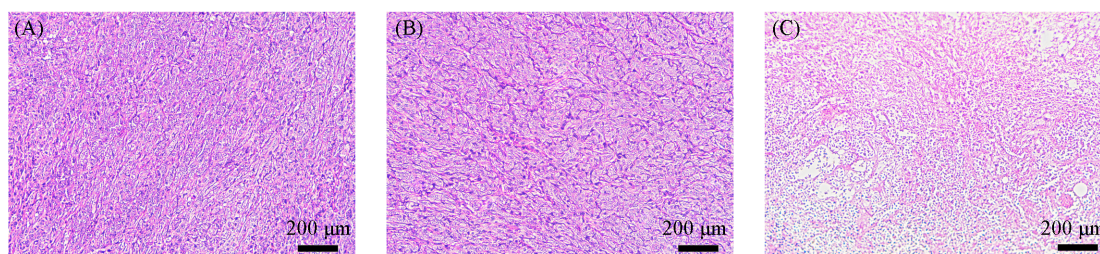


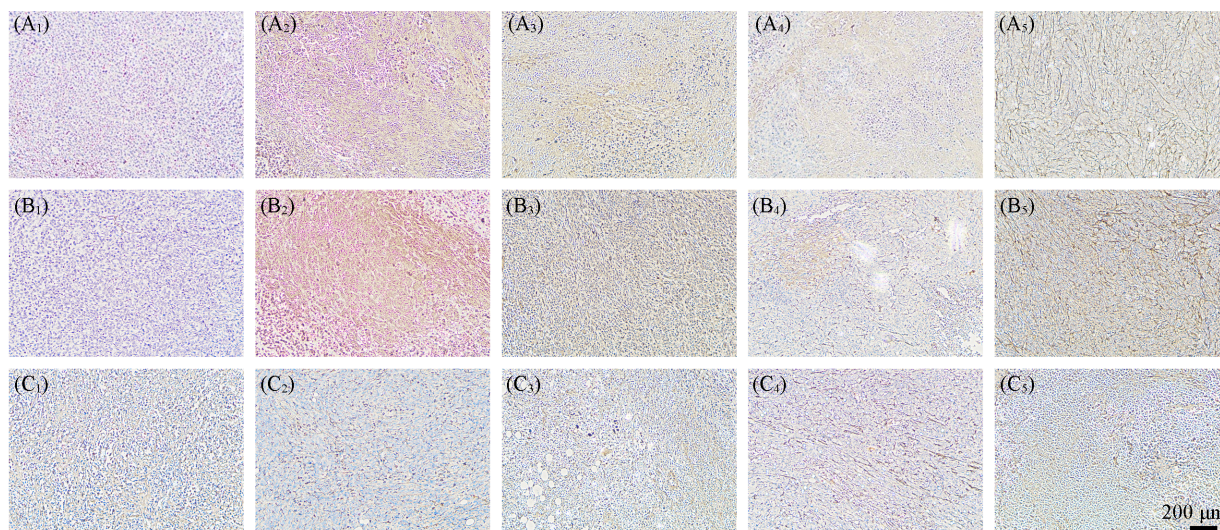
Fig. 8 Keloid volume growing trend curves of nude mice in each group (A), average mass(B) and photographs(C) of keloid in each group after different treatments for 16 d

MN-NPs组中瘢痕疙瘩的生长被显著抑制,在第16 d时的平均体积不足Control组的一半. 16 d的治疗结束后,对各组小鼠实施安乐死,解剖取出瘢痕疙瘩. 图8(B)为瘢痕疙瘩的质量测定结果,图8(C)为瘢痕疙瘩的照片. 实验结果显示,Control组和空白微针组中瘢痕疙瘩的质量没有显著性差异,而MN-NPs组中瘢痕疙瘩的质量明显降低,表明MN-NPs对瘢痕疙瘩的生长有抑制作用. 图9(A)~(C)为各组中瘢痕疙瘩的H&E染色图像,可以看出MN-NPs组中细胞的密度与Control组相比有明显的减小,表明瘢痕疙瘩的生长受到了抑制.



**Fig. 9** Micrographs of H&E-stained keloid slices collected from nude mice at 16 d treated with different samples  
(A) Control; (B) MNs; (C) MN-NPs.

进一步探究了MN-NPs对瘢痕疙瘩的治疗机制. 首先,利用TUNEL细胞凋亡检测试剂盒测试了瘢痕疙瘩组织中的细胞凋亡情况. TUNEL阳性的细胞为瘢痕疙瘩组织中的凋亡细胞,呈棕褐色. 由图10可见,Control组和空白微针组中未见明显的阳性细胞,而MN-NPs组可见较多的棕褐色阳性细胞. 实验结果表明,MN-NPs能够诱发瘢痕疙瘩组织中细胞的大量凋亡,抑制瘢痕疙瘩的生长. 通过免疫组化染色实验测定了瘢痕疙瘩组织中Ki-67蛋白的表达情况. 结果表明,Control组和空白微针组中可见较多的Ki-67阳性细胞,即存在较多处于增殖状态的细胞,而MN-NPs组中阳性细胞明显减少,说明MN-NPs可抑制瘢痕疙瘩组织中的细胞增殖. 转化生长因子 $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和I型胶原蛋白(Col-I)在瘢痕疙瘩组织中均高表达,可作为纤维化标志性蛋白来衡量药物对瘢痕疙瘩的治疗效果. 因此,采用免疫组化染色法进一步测定了瘢痕疙瘩组织中上述3种纤维化标志性蛋白的表达水平. 结果表明,经过MN-NPs治疗后,棕褐色阳性细胞的比例均有一定的减少,即3种纤维化标志蛋白的表达均下调,说明MN-NPs可通过抑制TGF- $\beta 1$ ,  $\alpha$ -SMA及Col-I 3种蛋白的表达来抑制

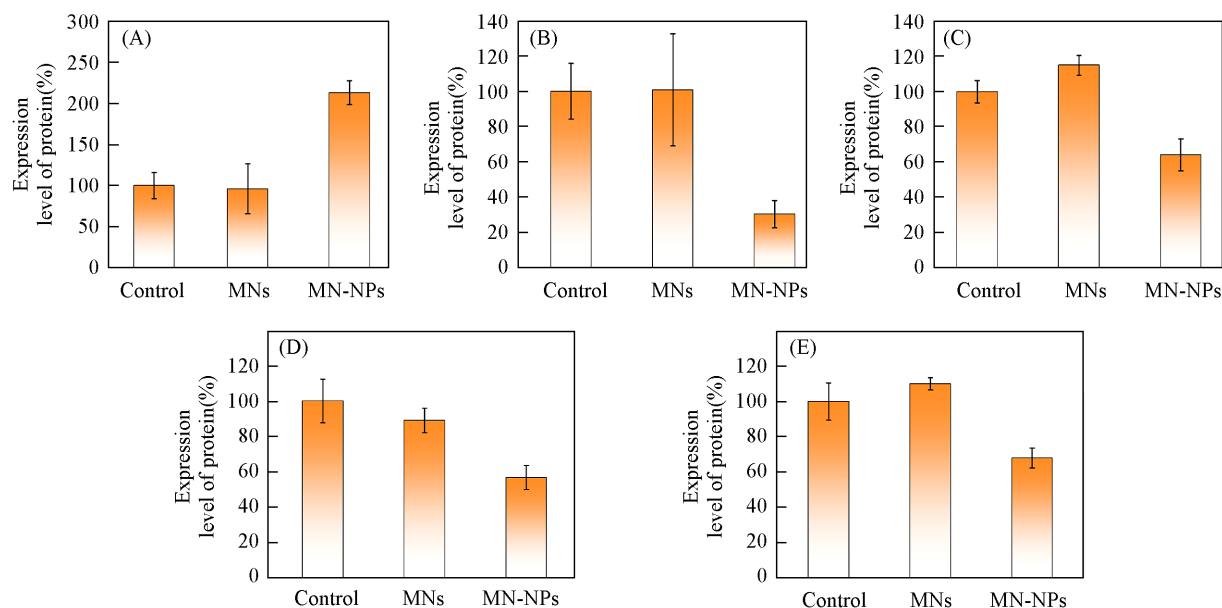


**Fig. 10** Micrographs of immunohistochemical staining of keloid slices collected from nude mice at 16 d after different treatments

(A<sub>1</sub>—A<sub>5</sub>) Control; (B<sub>1</sub>—B<sub>5</sub>) MNs; (C<sub>1</sub>—C<sub>5</sub>) MN-NPs. (A<sub>1</sub>—C<sub>1</sub>) tunel; (A<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>) Ki-67;  
(A<sub>3</sub>—C<sub>3</sub>) TGF- $\beta 1$ ; (A<sub>4</sub>—C<sub>4</sub>)  $\alpha$ -SMA; (A<sub>5</sub>—C<sub>5</sub>) Col-I.

瘢痕疙瘩的生长,从而发挥治疗效果.

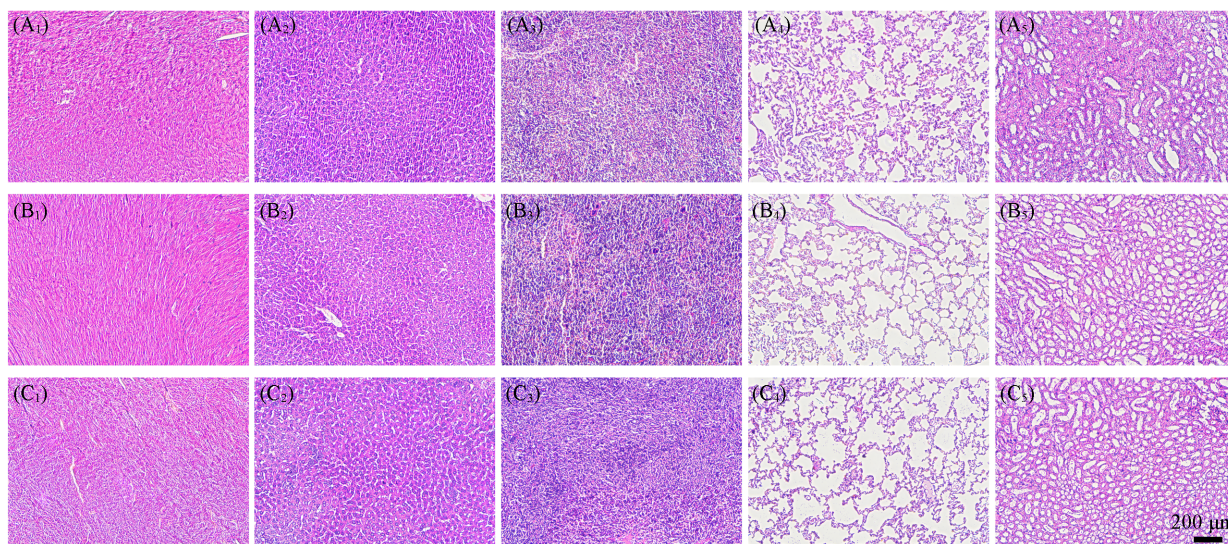
图 11 示出了免疫组化染色实验的定量分析结果,其所显示的治疗效果与瘢痕疙瘩生长曲线及 H&E 染色显示的结果一致,表明 MN-NPs 对瘢痕疙瘩确实具有良好的治疗效果.



**Fig. 11 Results of quantitative analysis of immunohistochemical staining**

(A) TUNEL; (B) Ki-67; (C) TGF- $\beta$ 1; (D)  $\alpha$ -SMA; (E) Col-I.

最后,解剖小鼠取出的主要器官(心、肝、脾、肺、肾)经固定、脱水、包埋、切片后,被用于H&E染色.由图12可见,微针给药并未对小鼠的主要器官造成损伤.因此,本文提出的以可溶性微针负载RES-PVP NPs进行透皮给药的治疗方式具有良好的生物安全性.



**Fig. 12 H&E-stained splanchnic slices of heart(A<sub>1</sub>—C<sub>1</sub>), liver(A<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>), spleen(A<sub>3</sub>—C<sub>3</sub>), lungs(A<sub>4</sub>—C<sub>4</sub>) and kidneys(A<sub>5</sub>—C<sub>5</sub>) of nude mice after different treatments**

(A<sub>1</sub>—A<sub>5</sub>) Control; (B<sub>1</sub>—B<sub>5</sub>) MNs; (C<sub>1</sub>—C<sub>5</sub>) MN-NPs.

### 3 结 论

通过纳米沉淀法制备了RES-PVP NPs,并将其负载于透明质酸为基质的可溶性微针中制备得到载

药微针 MN-NPs. MN-NPs 中的 RES-PVP NPs 仍能保持其原本的尺寸和形貌, 在微针的透皮作用下, MN-NPs 能够实现 RES-PVP NPs 向皮内的递送和 RES 的释放. 在体外实验中, RES-PVP NPs 和 MN-NPs 均保留了白藜芦醇的抗纤维化作用, 可促进 HKFs 的凋亡, 将 HKFs 的细胞周期阻滞于 G1 期, 抑制其增殖, 并抑制 HKFs 的迁移, 且作用效果优于 RES. 在体内实验中, MN-NPs 显著降低了瘢痕疙瘩的生长速率, 抑制了瘢痕疙瘩组织中的细胞增殖, 促进了瘢痕疙瘩组织中的细胞凋亡, 展示出了良好的瘢痕疙瘩治疗潜力, 并且生物安全性良好.

感谢吉林大学第一医院实验动物中心在动物实验中提供的帮助.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Trace A. P., Enos C. W., Mantel A., Harvey V. M., *Am. J. Clin. Dermatol.*, **2016**, *17*, 201—223
- [ 2 ] Limandjaja G. C., Belien J. M., Scheper R. J., Niessen F. B., Gibbs S., *Brit. J. Dermatol.*, **2020**, *182*(4), 974—986
- [ 3 ] Andrews J. P., Marttala J., Macarak E., Rosenbloom J., Uittoet J., *Matrix Biol.*, **2016**, *51*, 37—46
- [ 4 ] Bešlo D., Golubić N., Rastija V., Agić D., Karnaš M., Šubarić D., Lučić B., *Antioxidants*, **2023**, *12*(6), 1141
- [ 5 ] Zhou Y., Zhang S. S., Fan X., *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2021**, *2021*, 5471347
- [ 6 ] Chen X., Song X., Zhao X., Zhang Y., Wang Y. M., Jia R. Y., Zou Y. F., Li L. X., Yin Z. Q., *Mediators Inflamm.*, **2022**, *2022*, 7138756
- [ 7 ] Daglia M., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2012**, *23*(2), 174—181
- [ 8 ] Ghafouri-Fard S., Shabestari F. A., Vaezi S., Abak A., Shoorei H., Karimi A., Taheri M., Basiri A., *Biomed. Pharmacother.*, **2021**, *138*, 111548
- [ 9 ] Lin M. H., Hung C. F., Sung H. C., Yang S. C., Yu H. P., Fang J. Y., *J. Food Drug Anal.*, **2021**, *29*(1), 15—38
- [ 10 ] Meng X., Zhou J., Zhao C. N., Gan R. Y., Li H. B., *Foods*, **2020**, *9*(3), 340
- [ 11 ] Filardo S., Pietro M. D., Mastro-marino P., Sessa R., *Pharmacol. Ther.*, **2020**, *214*, 107613
- [ 12 ] Ko J. H., Sethi G., Um J. Y., Shanmugam M. K., Arfuso F., Kumar A. P., Bishayee A., Ahn K. S., *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*(12), 2589
- [ 13 ] Hecker A., Schellnegger M., Hofmann E., Luze H., Nischwitz S. P., Kamolz L. P., Kotzbeck P., *Int. Wound J.*, **2022**, *19*(1), 9—28
- [ 14 ] Arafa M. H., Mohammad N. S., Atteia H. H., Abd-Elaziz H. R., *J. Physiol. Biochem.*, **2014**, *70*(3), 701—711
- [ 15 ] Wang J., He F., Chen L., Li Q., Jin S., Zheng H. M., Lin J., Zhang H., Ma S., Mei J., Yu J., *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *105*, 37—44
- [ 16 ] Ikeda K., Torigoe T., Matsumoto Y., Fujita T., Sato N., Yotsuyanagi T., *Wound Repair Regen.*, **2013**, *21*(4), 616—623
- [ 17 ] Ha E. S., Sim W. Y., Lee S. K., Jeong J. S., Kim J. S., Baek I., Choi D. H., Park H., Hwang S. J., Kimet M. S., *Antioxidants*, **2019**, *8*(11), 554
- [ 18 ] Santos A. C., Pereira I., Pereira-Silva M., Ferreira L., Caldas M., Collado-González M., Magalhães M., Figueiras A., Ribeiro A. J., Veiga F., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **2019**, *180*, 127—140
- [ 19 ] Wang H., Fu Y., Mao J., Jiang H., Du S., Liu P., Tao J., Zhang L., Zhu J., *Adv. Mater.*, **2022**, *34*, 2207832
- [ 20 ] Ramadon D., McCrudden M. T. C., Courtenay A. J., Donnellyet R. F., *Drug Deliv. Transl. Res.*, **2022**, *12*(4), 758—791
- [ 21 ] Dragicevic N., Maibach H., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2018**, *127*, 58—84
- [ 22 ] Qi S., Lin M., Qi P., Shi J., Song G., Fan W., Sui K., Gao C., *Chem. Eng. J.*, **2022**, *444*, 136541

(Ed.: W, K, M)