

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.002

A 型肉毒毒素对增生性瘢痕成纤维细胞的抑制作用及机制*

张雪¹, 兰东¹, 宁淑华¹, 冉立伟¹, 贾红侠¹, 于思思¹, 王晓军²

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院皮肤与医疗美容科, 北京 100043; 2. 中国医学科学院北京协和医院美容外科, 北京 100730)

[摘要] **目的** 探讨 A 型肉毒毒素(BTXA)对增生性瘢痕成纤维细胞的抑制作用及机制。**方法** 0(对照组)、0.2、0.4、0.8 U/mL 的 BTXA 作用于增生性瘢痕成纤维细胞 48 h, 噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力, Hoechst 染色检测细胞凋亡, 流式细胞术检测细胞周期, 免疫印迹法分析细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路的激活状况。**结果** 与对照组(0.75±0.07)比较, 0.2、0.4、0.8 U/mL 的 BTXA(0.59±0.06、0.43±0.04、0.34±0.03)可明显降低增生性成纤维细胞活力; 与对照组[(2.38±0.24)%]比较, 可显著提高细胞凋亡率[(15.79±1.54)%、(27.32±2.69)%、(38.46±3.90)%]; 下调 Cyclin D1 及 PCNA 表达, 降低 PI3K 表达及 AKT 磷酸化水平, 并使细胞周期阻滞在 G₁ 期, 差异均具有统计学意义(P<0.05)。**结论** BTXA 可通过阻断 PI3K/AKT 信号通路及细胞周期蛋白表达, 进而抑制增生性细胞增殖。

[关键词] 肉毒毒素类; 成纤维细胞; 细胞周期; 增生性瘢痕; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路**[中图分类号]** R619+6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)05-0580-03**Study of mechanism and inhibition of botulinum toxin type A on hypertrophic scar fibroblasts***Zhang Xue¹, Lan Dong¹, Ning Shuhua¹, Ran Liwei¹, Jia Hongxia¹, Yu Sisi¹, Wang Xiaojun²

(1. Department of Dermatology and Plastic Surgery, the Affiliated Chaoyang Hospital of Capital Medical University, Beijing 100043, China; 2. Department of Cosmetic Surgery, the Affiliated Beijing Union Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism and inhibition of botulinum toxin type A (BTXA) on hypertrophic scar fibroblasts. **Methods** The cells were treated by 0 (control), 0.2, 0.4, 0.8 U/ml BTXA for 48 h. Cell viability was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by Hoechst staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. The level of cell cycle related protein D1 (Cyclin D1), proliferation nuclear antigen (PCNA) and activation of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/ protein kinase B (AKT) signaling pathway were assayed by western blot. **Results** Compared with control group(0.75±0.07), 0.2, 0.4, 0.8 U/mL BTXA(0.59±0.06, 0.43±0.04, 0.34±0.03)inhibited hypertrophic scar fibroblasts cell viability, increased cell apoptotic rate[control group(2.38±0.24)%; BTXA(15.79±1.54)%、(27.32±2.69)%、(38.46±3.90)%], down-regulated the expression of Cyclin D1(control group 1.57±0.18; BTXA 0.93±0.07, 0.42±0.04, 0.35±0.03) and PCNA(control group 1.46±0.16; BTXA 0.50±0.05, 0.59±0.05, 0.37±0.03), inhibited the expression of PI3K(control group 0.98±0.06; BTXA 0.49±0.04, 0.50±0.04, 0.39±0.03) and the phosphorylation of AKT(control group 1.38±0.08; BTXA 0.97±0.06, 0.60±0.04, 0.29±0.02), made cell cycle arrested in G₁ phase. The difference was statistically significant (P<0.05). **Conclusion** These results suggested BTXA inhibit proliferation via blocking the activation of PI3K/AKT signal pathway and down-stream related cell cycle related protein.

[Key words] botulinum toxins; fibroblasts; cell cycle; hypertrophic scar; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B signal pathway

创面愈合的同时会导致瘢痕的产生,使患者在烧伤或者创面愈合时产生高低不平,形状不规则,局部潮红并伴有灼痛感及瘙痒感的增生性瘢痕。而且当增生性瘢痕发生在面部、关节、手时,会导致挛缩的产生,产生严重的功能障碍,影响美观,给患者带来巨大的生理心理负担,是整形科及烧伤科亟待解决的难题之一^[1-2]。研究已显示,成纤维细胞在瘢痕形成过程中起重要作用,细胞数目的增加,凋亡的不足,进而大量分泌胶原,导致细胞外基质过度沉积,是增生性瘢痕形成的机制之一^[3-4]。A 型肉毒毒素(BTXA)是 20 世纪 90 年代初开始用于美容整形外科的一种生物制剂,临床上主要用于去除鱼尾纹、眉间纹、抬头纹等,或者用于面部轮廓的重塑,安全有效^[5]。近些年临床及动物实验研究发现,BTAX 对增生性瘢痕具有显著

疗效^[6-8]。此外国内外学者也发现,BTXA 不仅能抑制胶原蛋白生成,还能显著抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖,但是具体作用机制未知。所以本研究将探讨 BTXA 对于增生性瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用及具体机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 BTXA 购于兰州生物制品研究所。兔细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)抗体购自美国 Epitomics 公司;兔磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、p-AKT 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;DMEM 培养基、噻唑蓝(MTT)购自美国 Gibco 公司;Hoechst 染色试剂盒,细胞周期检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器 ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;FACSAria Fusion 型流式细胞仪购自美国 BD 公司;电泳仪、转印电泳仪均购自北京六一仪器厂,TS100 倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.3 瘢痕组织标本来源 10 份标本取自首都医科大学附属北京朝阳医院同期住院并进行手术的临床烧伤患者所切除的瘢痕组织,患者男 7 例,女 3 例,年龄 11~47 岁,平均年龄 29 岁,病程 3 个月至 2 年。患者瘢痕组织红、痒、痛症状明显,说明瘢痕处于增生期,另外取材前所有患者皆无用药史,且知情并签署了同意书。

1.4 方法

1.4.1 增生性瘢痕成纤维细胞的制备^[9] 在手术过程中获得的增生性瘢痕组织,置于无菌操作台中,用手术剪将皮下组织彻底去除,保留带表皮的瘢痕组织,并将瘢痕组织切成 1 mm×1 mm 的小组织块,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净后,加入 0.25 g/L II 型中性酶,4 ℃ 过夜后,再加入 3 倍体积的 2% 的 I 型胶原酶,37 ℃ 培养 2 h,即可获得单细胞悬液,1 500 r/min 离心 10 min,并将细胞溶解于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。7 d 后首次换液,往后每隔 3 d 换液 1 次,大约 15 d 细胞基本融合成片,以 1:2 的比例进行传代,实验取 2~4 代。

1.4.2 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调整为 1×10⁵/mL,接种于 96 孔板,培养 24 h,去除培养基后。加入浓度为 0、0.2、0.4、0.8 U/mL 的 BTXA,继续培养 48 h,加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h 后,将上清液弃去,并加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL,振荡摇匀,在酶标仪 570 nm 处测定吸光度(A)值。

1.4.3 Hoechst 染色检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调整为 1×10⁵/mL,接种于 96 孔板,培养 24 h,去

除培养基后。加入浓度为 0、0.2、0.4、0.8 U/mL 的 BTXA,继续培养 48 h 后按照 Hoechst 染色试剂盒说明书进行操作,染色、固定并于显微镜下进行观察、拍照。

1.4.4 细胞周期检测 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调整为 1×10⁵/mL,接种于 6 孔板,培养 24 h,去除培养基后。加入浓度为 0、0.2、0.4、0.8 U/mL 的 BTXA,继续培养 48 h,收集细胞。按细胞周期检测试剂盒说明书进行检测。

1.4.5 Western blot 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调整为 1×10⁵/mL,接种于 6 孔板,培养 24 h,去除培养基后。加入浓度为(0、0.2、0.4、0.8 U/mL)的 BTXA,继续培养 48 h,收集细胞,并用细胞裂解液裂解细胞,于 4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,获得蛋白样品。二喹啉甲酸(BCA)检测试剂盒检测蛋白浓度,蛋白煮沸变性,并上样,进行十二烷基磺酸钠凝胶电泳 1~2 h 后,湿法转膜 30~50 min,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,于一抗溶液 4 ℃ 过夜孵育,次日二抗溶液室温孵育 1 h,最后于凝胶成像系统中曝光。并用 Quantity one 软件分析各蛋白灰度值。

1.5 统计学处理 用 SPSS17.0 进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞活力的影响 与对照组(0.75±0.07)比较,0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA(0.59±0.06、0.43±0.04、0.34±0.03)可明显抑制增生性瘢痕成纤维细胞活力,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡情况的影响 与对照组[(2.38±0.24)%]比较,0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 可明显提高增生性瘢痕成纤维细胞活力,其凋亡率分别为 [(15.79±1.54)%、(27.32±2.69)%、(38.46±3.90)%],差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见图 1。

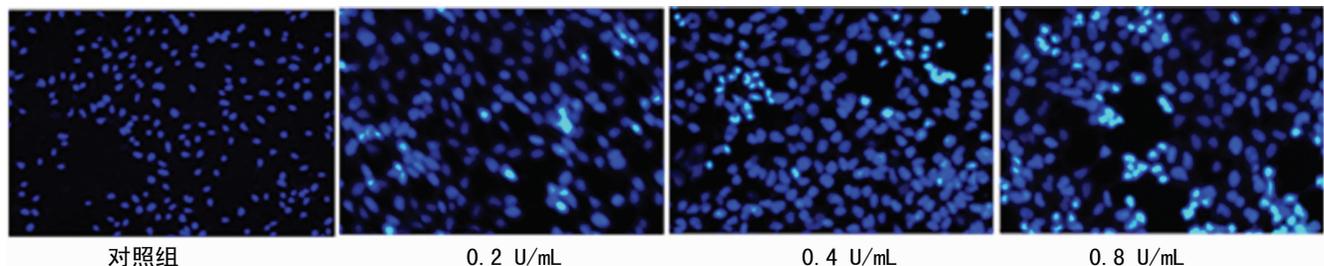


图 1 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡情况的影响(×200)

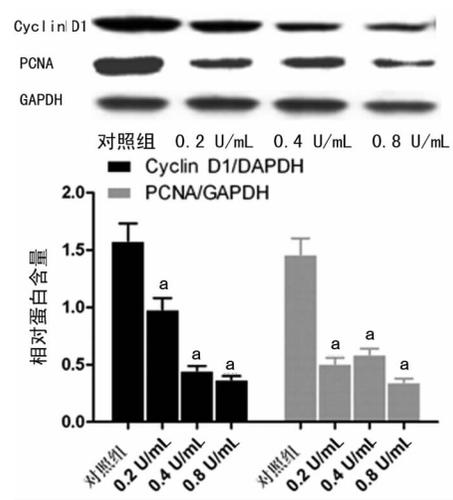
表 1 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期影响($\bar{x} \pm s$)

组别	G ₁ (%)	S(%)	G ₂ (%)
对照组	48.36±4.84	32.87±3.29	20.16±2.07
0.2 U/mL	55.28±5.53 ^a	24.56±2.46 ^a	18.77±1.88 ^a
0.4 U/mL	63.49±6.50 ^a	21.59±2.16 ^a	14.92±1.49 ^a
0.8 U/mL	72.29±7.30 ^a	19.01±2.00 ^a	8.70±0.82 ^a

^a: *P*<0.05,与对照组比较。

2.3 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期的影响 与对照组比较,0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 能使 G₁ 期细胞数目明显增多,S 期细胞数目明显减少,G₂ 期细胞数目也明显减少,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。从而说明 BTXA 可使增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期停滞在 G₁ 期。见表 1。

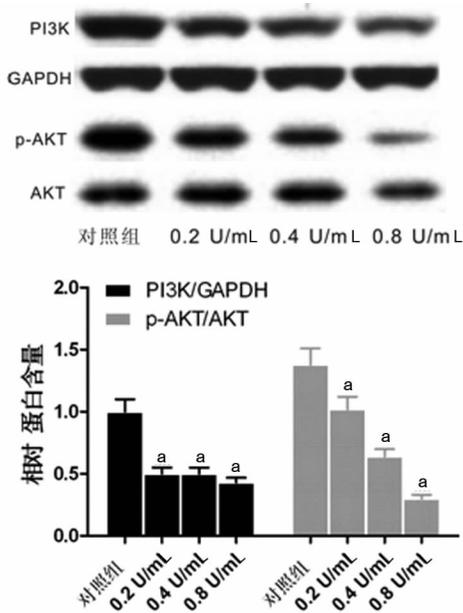
2.4 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期蛋白的影响 与对照组比较,0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 皆能明显下调 Cyclin D1 及 PCNA 表达,差异均具有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2。



^a: *P*<0.01,与对照组比较。

图 2 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期蛋白的影响

2.5 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响 与对照组比较,0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 可明显抑制 PI3K 表达,并降低 AKT 磷酸化水平,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



^a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响

3 讨论

BTXA 是目前用于神经毒理作用并且研究较为透彻的生物制剂,近年来发现其在整形美容中也具有一定的治疗作用,其应用领域也不断拓宽,成为许多临床手术的辅助手段或者一线治疗方法。临床研究表明,BTXA 能减轻早期增生性瘢痕所引起的痛痒,能够促进瘢痕软化及萎缩,减轻挛缩,并使瘢痕颜色变淡,变平整,弹性更好^[7-8]。而且国内学者的研究不仅证实了不同浓度的 BTXA 不仅能够抑制胶原蛋白的表达,还能显著地抑制人增生性瘢痕成纤维增殖,并诱导其凋亡^[10-11]。Jeong 等^[12]研究表明 BTXA 能显著抑制增生性瘢痕成纤维细胞的分化及肿瘤坏死因子- β 1 (TGF- β 1) 的表达。Xiao 等^[13]研究也表明 BTXA 通过降低结缔组织生长因子(CTGF)表达,从而抑制增生性瘢痕成纤维细胞的生长及增殖。从而说明 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞增殖具有显著的抑制作用,所以本研究将在此基础上探讨 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞增殖抑制作用、凋亡诱导作用的具体机制。

本研究首先结合已报道文献^[10]及 MTT 预试验获得 0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 对增生性成纤维细胞活力具有显著的抑制作用,接着采用 Hoechst 染色法证实此剂量 BTXA 还能显著地诱导细胞凋亡。而细胞的增殖受细胞周期调控,细胞周期的紊乱可能是成纤维细胞过度增殖的原因之一^[14]。所以本研究继续通过流式细胞术检测 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞周期的影响,结果表明 0.2、0.4、0.8 U/mL BTXA 能显著地延长 G_1 期,而缩短 S 期及 G_2 期,说明 BTXA 使细胞周期阻滞在 G_1 期,导致细胞 DNA 复制和有丝分裂产生障碍,进而诱导细胞凋亡。细胞周期的调控由细胞周期蛋白调控,其中 Cyclin D1 与 G_1 期密切相关,其表达量的增加说明了细胞加快进入了 S 期。另外 PCNA 是细胞核内 DNA 聚合酶辅助蛋白,其表达量与 S 期密切相关,并在 S 期表达量达到顶峰,是反映

细胞增殖状态的有效指标。本研究显示,BTXA 能显著下调 Cyclin D1 及 PCNA 表达,从而说明 BTXA 通过抑制 G_1 期及 S 期相关蛋白表达,使细胞周期阻滞在 G_1 期,并最终抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。

细胞的增殖与凋亡受多种信号通路调控,其中 PI3K/AKT 信号通路最为常见,并具有抗凋亡通路之称,此通路与细胞的生长、增殖、凋亡、分化周期密切相关。具体表现为 PI3K 接受到上游刺激信号后,被激活,从而促使 4-二磷酸脂酰肌醇转化为 3,4,5-三磷酸脂酰肌醇,并磷酸化 AKT,AKT 转入细胞核内,诱导下游基因(Cyclin D1 及 PCNA)的表达,从而调控细胞的生物学行为。研究显示增生性瘢痕中 PI3K/AKT 信号通路被激活^[15]。所以本研究继续探讨 BTXA 对增生性瘢痕成纤维细胞中 PI3K/AKT 激活情况的影响。Western blot 结果表明,BTXA 能显著抑制 PI3K 表达,并降低 AKT 磷酸化水平,从而说明 BTXA 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,下调 Cyclin D1 及 PCNA 表达,并使细胞周期阻滞在 G_1 期,最终抑制细胞增殖,并诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] Rha EY, Kim YH, Kim TJ, et al. Topical Application of a Silicone Gel Sheet with Verapamil Microparticles in a Rabbit Model of Hypertrophic Scar[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2016, 137(1): 144-151.
- [2] Zhang YF, Zhou SZ, Cheng XY, et al. Baicalein attenuates hypertrophic scar formation via inhibition of the transforming growth factor-beta/Smad2/3 signalling pathway[J]. *Br J Dermatol*, 2016, 174(1): 120-130.
- [3] Zhu Z, Ding J, Shankowsky HA, et al. The molecular mechanism of hypertrophic scar[J]. *J Cell Commun Signal*, 2013, 7(4): 239-252.
- [4] 孙奎, 吴晓明, 张鸿霞, 等. 丝裂霉素 C 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖与 Smad2/3 蛋白表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(23): 5215-5217.
- [5] 刘睿, 李钦涛, 齐平建. A 型肉毒毒素对比面神经显微血管减压术治疗面肌痉挛的疗效观察研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(3): 417-419.
- [6] Caliskan E, Gamsizkan M, Acikgoz G, et al. Intralesional treatments for hypertrophic scars: comparison among corticosteroid, 5-fluorouracil and botulinum toxin in rabbit ear hypertrophic scar model[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(8): 1603-1608.
- [7] 王小玉, 王小琴, 刘琰, 等. 面部小面积瘢痕手术切口早期应用 A 型肉毒毒素注射联合强脉冲光照射的临床效果[J]. *实用皮肤病学杂志*, 2013, 6(5): 271-273.
- [8] 王育红, 涂惠芳, 杜芳, 等. A 型肉毒毒素抑制内眦赘皮术后瘢痕的观察[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(6): 1103-1106.
- [9] 杜启翠, 肖文林, 孙桂兰, 等. 原代培养人增生性瘢痕成纤维细胞的生物学行为[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(7): 1174-1179.
- [10] 李卫华, 高玉伟, 李德水, 等. A 型肉毒毒素引起人增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(24): 4429-4435.
- [11] 李卫华, 李德水, 高玉伟, 等. A 型肉毒毒素可抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原蛋白的合成[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(20): 3667-3670. (下转第 585 页)

后,再与 DNA 的 N-盒结合,从而改变了染色体的结构,使 DNA 的转录停止^[10-11]。研究表明 Hes1 在心血管系统发挥重要作用,并发现 Hes1 在心脏前体细胞中表达,为心室流出道发育所必需^[12];笔者前期研究也表明心肌缺血后适应可激活 Hes1,从而提高细胞存活率,减少活性氧(ROS)形成,稳定线粒体膜电位,抑制线粒体通透性转换孔开放,最终抑制心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[13]。为深入研究 Hes1 在心肌保护中的分子机制,利用基因异位表达技术,针对 Hes1 构建病毒表达载体,可望在心肌细胞中特异性激活 Hes1,从中观察 Hes1 的心肌保护效应。

目前,用于目的基因转移的病毒载体主要包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和慢病毒载体^[14]。重组腺病毒载体系统是研究基因转染最理想的载体系统,介导的基因转染效率高,适合用于绝大多数细胞和组织的转基因表达研究;同时可以产生高滴度病毒,也可用于基因治疗。重组腺病毒系统是 E1 和 E3 区缺陷的腺病毒载体系统,可重组高达 10 000 bp 的外源基因片段,免疫原性低,不引起宿主基因突变;并在同一载体上可克隆多个基因片段且能长效表达,产生的高滴度病毒既能感染分裂相细胞,又能感染未分裂相细胞,因此宿主范围广,应用广泛^[15]。居于以上特点,考虑到由于 Hes1 片段较大,涉及细胞及动物实验,对病毒感染效率要求高,因此采用腺病毒载体系统构建 Hes1 过表达载体。

本研究应用腺病毒载体系统先构建 pShuttle-CMV-Hes1 重组穿梭质粒,再以 pShuttle-CMV-Hes1 为骨架,构建 pAdeno-Hes1 病毒质粒,然后感染至 293 细胞中进行病毒包装,细胞出毒后收集第一代(P1)毒液,并以此为毒种进行第二代(P2)出毒及大量病毒扩增。病毒滴度测定后,再感染 H9c2 心肌细胞,以确定 Ad-Hes1 构建成功,并可在心肌细胞里正常表达。笔者前期研究发现 Notch1 信号通路有明显的心肌保护效应^[8],Hes1 作为 Notch1 信号的靶基因,是否在其中发挥重要作用需要进一步研究论证,而 Ad-Hes1 的成功构建,正为进一步研究 Hes1 的心肌保护作用奠定实验基础。

参考文献

- [1] Feder JN, Jan LY, Jan YN. A rat gene with sequence homology to the Drosophila gene hairy is rapidly induced by growth factors known to influence neuronal differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(1):105-113.
- [2] Grbavec D, Stifani S. Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223(3):701-705.
- [3] Zhang K, Zhang YQ, Ai WB, et al. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by notch1 and tgf-beta/bmp signaling [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3):878-887.
- [4] Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, et al. The notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6/7):572-581.
- [5] Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: A key role in stemness, metastasis and multidrug resistance [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3):353-359.
- [6] Bhoopathi P, Chetty C, Dontula R, et al. Sparc stimulates neuronal differentiation of medulloblastoma cells via the notch1/stat3 pathway [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14):4908-4919.
- [7] Qiang L, Wu T, Zhang HW, et al. Hif-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating notch signaling pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(2):284-294.
- [8] Zhou XL, Wan L, Xu QR, et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning [J]. *J Transl Med*, 2013(11):251.
- [9] Rani A, Greenlaw R, Smith RA, et al. Hes1 in immunity and cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016(30):113-117.
- [10] Schnell SA, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, et al. Therapeutic targeting of hes1 transcriptional programs in t-all [J]. *Blood*, 2015, 125(18):2806-2814.
- [11] Tian C, Tang Y, Wang T, et al. Hes1 is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia [J]. *Oncotargets Ther*, 2015(8):899-904.
- [12] Rochais F, Dandonneau M, Mesbah K, et al. Hes1 is expressed in the second heart field and is required for outflow tract development [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7):e6267.
- [13] Zhou XL, Zhao Y, Fang YH, et al. Hes1 is upregulated by ischemic postconditioning and contributes to cardioprotection [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8):730-736.
- [14] Liu YP, Berkhout B. Mirna cassettes in viral vectors: Problems and solutions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):732-745.
- [15] Janssen JM, Liu J, Skokan J, et al. Development of an adeno-based system to produce first- and second-generation adenoviral vectors with tropism for car- or cd46-positive cells [J]. *J Gene Medz*, 2013, 15(1):1-11.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-16)

(上接第 582 页)

- [12] Jeong HS, Lee BH, Sung HM, et al. Effect of botulinum toxin type a on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 136(2):171e-178e.
- [13] Xiao Z, Zhang M, Liu Y, et al. Botulinum toxin type a inhibits connective tissue growth factor expression in fibroblasts derived from hypertrophic scar [J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2011, 35(5):802-807.

- [14] 吴晓明, 孙奎, 张宏霞, 等. 丝裂霉素 C 影响增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(2):235-238.
- [15] Zhu HY, Li C, Bai WD, et al. MicroRNA-21 regulates hTERT via PTEN in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e97114.

(收稿日期:2016-06-19 修回日期:2016-08-17)