

# 阿魏酸钠对增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原合成的影响

王 畅<sup>1\*</sup>,陈 炜<sup>2</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学; <sup>2</sup>西南交通大学,成都 610000

**摘要:**探讨阿魏酸钠(SF)对增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)增殖及胶原合成的影响。体外培养 HSFb, MTT 法计算 SF 的 LC<sub>50</sub> 及最佳药物时间后, 分为空白对照组、SF 干预组(高、中、低浓度分别为 0.3、0.03、0.003 mg/mL), 培养 72 h 后, 在倒置显微镜和透射电镜下观察 HSFb 微观形态学变化; MTT 法、Western blot 法检测 SF 对 HSFb 细胞增殖和 I、Ⅲ 胶原蛋白表达的影响。结果显示, 与空白对照组相比, 倒置显微镜下 HSFb 细胞明显减少, 电镜下见核固缩, 线粒体轻度肿胀, 粗面内质网扩张呈囊泡状, 有较多空泡、自噬的产生; MTT 法显示各浓度 SF 干预组对 HSFb 增殖均有明显抑制作用( $P < 0.01$ ); Western blot 法检测显示低浓度 SF 对 I 胶原蛋白表达有一定的抑制作用( $P < 0.05$ ), 高、中浓度 SF 能明显抑制 HSFb 的 I、Ⅲ 胶原蛋白的表达( $P < 0.01$ )。本研究结果表明, SF 能改变 HSFb 的微观形态, 抑制 HSFb 的细胞增殖及 I、Ⅲ型胶原蛋白的表达。

**关键词:**阿魏酸钠;增生性瘢痕成纤维细胞;增殖;胶原

**中图分类号:**R287

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-6880(2021)1-0097-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.013

## Effects of sodium ferulate on proliferation and collagen synthesis of human hypertrophic scar fibroblasts

WANG Chang<sup>1\*</sup>, CHEN Wei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chengdu University of TCM, <sup>2</sup>Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China

**Abstract:** The study attempts to investigate the effects of sodium ferulate (SF) on the proliferation and collagen synthesis of the cultured human hypertrophic scar fibroblast (HSFb). After HSFb cells were cultured *in vitro* and SF LC<sub>50</sub> and optimal drug time were calculated with MTT method, the cells were divided into blank control group and SF intervention groups (high, medium and low concentration rates were 0.3, 0.03, 0.003 mg/mL, respectively). After HSFbs were cultured for 72 hours, they were observed under inverted microscope and transmission electron microscope to detect their morphological changes. The MTT test and Western blot method were used to detect the effects of SF on the cell proliferation of HSFb and the expression of collagen cells I and III. The results showed that, compared with the blank control group, the HSFb cells were significantly reduced under inverted microscope. Under the electron microscope, the results showed that the nuclei were contracted, that the mitochondria were slightly swollen, that the rough endoplasmic reticulum was expanded into vesicles, and that there were more vacuoles and autophagy. With MTT test, the results showed that SF in each concentration group can significantly inhibit the proliferation of HSFb ( $P < 0.01$ ); With Western blot method, the results showed that SF in high and medium concentration groups can significantly inhibit the expression collagen cells I and III ( $P < 0.01$ ) of HSFb and SF in low concentration group could inhibit the expression of collagen cells I to some extent ( $P < 0.05$ ). The results of this study indicate that SF can transform the micro morphology of HSFb and inhibit the cell proliferation of HSFb and the expression of collagen cells of I and III.

**Key words:**sodium ferulate;hypertrophic scar fibroblast;proliferation;collagen

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤深度

烧伤、严重创伤后致局部组织的异常修复, 是创伤最常见的并发症<sup>[1]</sup>。HS 发病机制十分复杂, 治疗方面尚无突破性进展<sup>[2]</sup>。中医药在防治瘢痕方面历史久远, 治疗以活血化瘀、软坚散结为主, 研究发现

收稿日期:2020-02-16 接受日期:2020-10-23

基金项目:四川省教育厅自然科学重点项目(18ZA0184);成都中医药大学科技发展基金(ZRQN1760)

\*通信作者 Tel:86-28-61466659;E-mail:wangchang@cdutcm.edu.cn

中药川芎、当归治疗 HS 疗效较好<sup>[3-5]</sup>。

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是阿魏酸(ferulic acid, FA)的钠盐,易从传统活血化瘀类中药——川芎、当归中提取,具有抗炎镇痛、调节免疫、抗纤维化等作用,不良反应少、安全性高,是我国完全自主研发的药物,临幊上主要用于动脉粥样硬化、冠心病、脑血管病等心脑血管疾病<sup>[6]</sup>。瘢痕组织是肉芽组织经改建成熟形成的成纤维结缔组织<sup>[7]</sup>,近年发现 SF 对肝、肾、肺组织具有抗纤维化的作用<sup>[8,9]</sup>,由于 HS 的病理生理机制与纤维化存在相似性,因此两者的研究往往可以相互借鉴<sup>[10]</sup>。课题组前期实验也发现,将含有 SF 的复合物外涂于兔耳,能有效抑制家兔瘢痕增生<sup>[11]</sup>。在此基础上,本研究采用体外实验,探讨 SF 对增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原表达的影响,为 SF 用于 HS 提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

阿魏酸钠(批号:160201,成都亨达药业有限公司);胎牛血清(批号:20150514,杭州四季青生物制品研究所);0.25% 胰蛋白酶(批号:J150031)、高糖 DMEM 培养液(批号:AAK208933, Hyclone 公司);四甲基偶氮唑盐(批号:298-93-1,美国 Amresco 公司);二甲基亚砜(批号:D-5879, Biosharp 公司);I 型胶原单克隆抗体(批号:SC59772,美国 SANTA 公司);III 型胶原多克隆抗体(批号:SC8780-R,美国 SANTA 公司)。

### 1.2 实验细胞

人增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)购于上海素尔生物科技有限公司,系3~4代传代细胞。

### 1.3 主要仪器

MCO-15AC 恒温培育箱(三洋电机国际贸易有限公司);SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);AE31 倒置显微镜(麦克奥迪实业集团中国有限公司);Image Lab 全自动凝胶分析系统(Bio-RAD 公司,美国);ChemiDoc XRS + 多功能凝胶成像系统(Bio-RAD 公司,美国)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 细胞培养、鉴定

将复苏细胞按规定进行消化传代,HE、免疫组化细胞<sup>[12]</sup>鉴定本实验所用细胞为 HSFb。

#### 1.4.2 SF 的 LC<sub>50</sub>、实验分组及最佳有效时间测定

MTT 法测定 SF 在 1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> mg/mL 浓度下的细胞抑制率,设计量效关系曲

线并计算 SF 的 LC<sub>50</sub>。测定 SF 在不同时间对细胞增殖抑制的影响,确定 SF 的高、中、低浓度及最佳有效时间。

#### 1.4.3 形态学观察

以 2.14 × 10<sup>5</sup>/mL 细胞密度接种于 24 孔板,加入高、中、低浓度的 SF 经 72 h 后置于倒置显微镜下、电镜下行细胞形态学观察。

#### 1.4.4 MTT 法测定不同浓度的 SF 对细胞增殖的影响

细胞接种于 96 孔板,置入 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,吸去孔内培养上清液。加入不同浓度 SF,空白对照组加入等量的 DMEM 培养液后,置入培养箱中继续培养 72 h,再在每孔添加 180 μL 不含血清的培养液和 20 μL/孔的 MTT,震蕩 10 min。自动酶标仪上测定每孔在 490 nm 处的光密度,即 OD 值。每组设 5 个复孔,实验重复 3 遍。

#### 1.4.5 Western blot 法检测 SF 对 HSFb 的 I 型、III 型胶原蛋白表达的影响

细胞接种于 24 孔板,每组设 4 个复孔,加入不同浓度的 SF(空白对照组加入等量的 DMEM 培养液)72 h 后,离心并收集细胞。加入细胞裂解液 80 μL,离心收集上清液即总蛋白。测定蛋白浓度,制作浓缩胶及分离胶,水封静置 30 min,凝胶电泳 2 h 后,转膜 30~50 min,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,分别加入 1:200 稀释的一抗在印迹膜室温孵育 2 h、洗膜后,加入二抗室温孵育 2 h,洗膜发光,凝胶成像系统中曝光成像并统计分析。

### 1.5 统计学分析

用 SPSS21.0 软件进行统计分析,实验资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组均数之间比较采用 One-Way ANOVA 检验,方差齐则采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验,检验结果以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义, $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义, $P > 0.05$  为差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 细胞鉴定

HE 染色后,在光镜下可见细胞呈长梭形或三角形,细胞核着蓝色,细胞浆嗜酸性着色,胞浆两级突起、长短不一,部分核仁为双核仁,细胞数量较多,提示分裂旺盛(图 1A)。波形蛋白免疫组化染色后,在镜下可见细胞质呈棕褐色,细胞核呈蓝紫色(图 1B),为阳性表达。

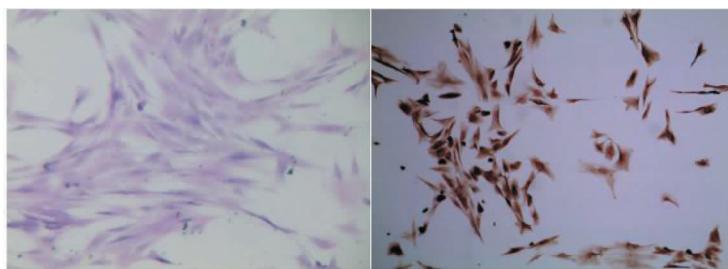


图 1 细胞鉴定

Fig. 1 Cell identification

注:A:细胞(HE  $\times 200$ ) ;B:细胞(IHC  $\times 400$ ) Note: A; Cell (HE  $\times 200$ ) ;B; Cell (IHC  $\times 400$ ) .

## 2.2 SF 的 $LC_{50}$ 及实验分组及最佳有效时间测定

MTT 法测定 SF 在  $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$  mg/mL 浓度下的细胞抑制率(表 1), 在 SPSS 行“线性回归分析”计算 SF 的  $LC_{50} = 0.3075$  mg/mL, 绘制量效关系曲线(图 2)。SF 在  $1 \sim 0.001$  mg/mL 浓度对细胞抑制明显, 结合药物  $LC_{50}$  和参考文献中 SF<sup>[13,14]</sup> 对细胞有效浓度的设定, 设定本实验的 SF 高、中、低浓度组分别为: 0.3、0.03、0.003 mg/mL。

MTT 法测定不同浓度 SF 在  $0 \sim 72$  h 对 HSFb 的细胞增殖的影响(表 2, 图 3), 结果显示 SF 在  $0 \sim 72$  h 对细胞抑制呈上升趋势并在 72 h 抑制率最强。本实验将 72 h 设定为 SF 最佳有效时间。

表 1 SF 对 HSFb 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 1 Effect of SF on HSFb cell proliferation( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别 Group (mg/mL)	OD 值 OD value	抑制率 Inhibition rate (%)
1	$0.179 \pm 0.013$	74.18
$10^{-1}$	$0.212 \pm 0.025$	64.13
$10^{-2}$	$0.340 \pm 0.028$	25.46
$10^{-3}$	$0.372 \pm 0.022$	15.31
$10^{-4}$	$0.406 \pm 0.028$	4.95
$10^{-5}$	$0.404 \pm 0.024$	5.51
$10^{-6}$	$0.405 \pm 0.024$	5.10

表 2 SF 在不同时间对 HSFb 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 2 Effect of SF on HSFb cell proliferation at different time( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别 Group (mg/mL)	OD 值 OD value			
	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组 Control	$0.14 \pm 0.013$	$0.366 \pm 0.035$	$0.581 \pm 0.015$	$0.769 \pm 0.020$
0.1	$0.147 \pm 0.005$	$0.346 \pm 0.020$	$0.447 \pm 0.018$	$0.683 \pm 0.043$
0.2	$0.141 \pm 0.015$	$0.307 \pm 0.240$	$0.430 \pm 0.005$	$0.559 \pm 0.030$
0.3	$0.148 \pm 0.013$	$0.273 \pm 0.355$	$0.400 \pm 0.030$	$0.440 \pm 0.023$
0.4	$0.140 \pm 0.018$	$0.249 \pm 0.022$	$0.353 \pm 0.024$	$0.420 \pm 0.029$

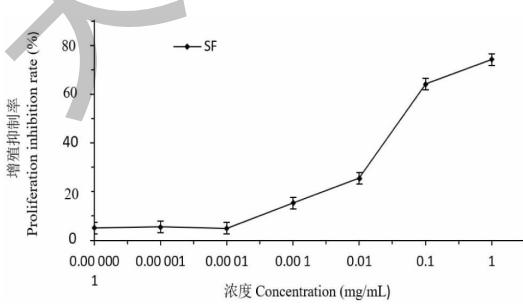


图 2 SF 量效关系曲线

Fig. 2 Dose-effect curve of SF

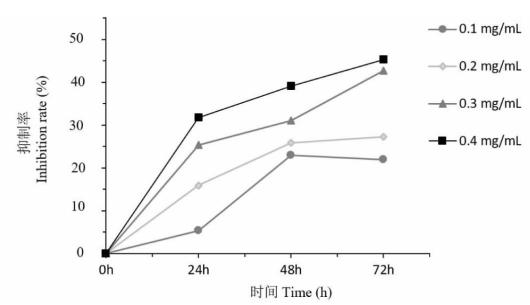


图 3 SF 对 HSFb 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of SF on HSFb cell proliferation

## 2.3 SF 对 HSFb 细胞形态的影响

### 2.3.1 倒置显微镜观察

对照组的细胞形态规则,平行排列,多呈长梭形,走向基本趋于一致。SF 各组细胞变短、细胞梭形,走向基本趋于一致。SF 各组细胞变短、细胞梭

状突起回缩,形态逐渐变圆、脱壁,与邻近细胞接触减少,细胞间隙变大,贴壁细胞减少。随着 SF 浓度的增加,细胞变得更加稀松,棱形更加不明显,SF-H 组已见大量细胞脱落漂浮于培养液中(图 4)。

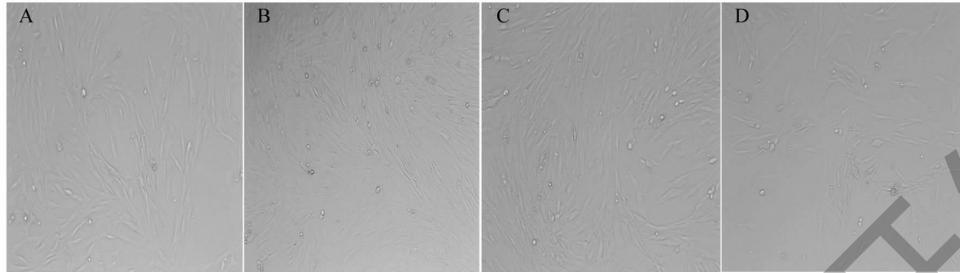


图 4 倒置显微镜观察 SF 对 HSFb 细胞形态的影响( $\times 100$ )

Fig. 4 Effect of SF on HSFb cells by inverted microscope ( $\times 100$ )

注:A:空白组;B:SF 低剂量组;C:SF 中剂量组;D:SF 高剂量组。Note: A: Control; B: SF-L; C: SF-M; D: SF-H.

### 2.3.2 透射电镜观察

对照组的细胞核较大,核膜清晰完整,染色质分布较均匀,胞浆中有较丰富的线粒体、粗面内质网和

核糖体等细胞器,结构完整清晰。SF 组的细胞核固缩,染色质丢失,胞浆中可见线粒体轻度肿胀,粗面内质网出现扩张呈囊泡状,有较多的空泡、自噬(图 5)。

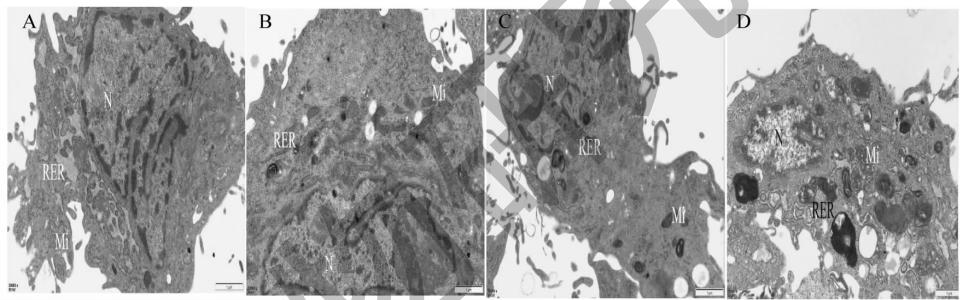


图 5 SF 对 HSFb 细胞形态的影响( $\times 20000, 1 \mu\text{m}$ )

Fig. 5 Effect of SF on HSFb cells by electron microscope ( $\times 20000, 1 \mu\text{m}$ )

注:A:空白组;B:SF 低剂量组;C:SF 中剂量组;D:SF 高剂量组。细胞核(N)、线粒体(Mi)、粗面内质网(RER)。Note: A: Control; B: SF-L; C: SF-M; D: SF-H. Nuclear nucleus (N), itochondria (Mi), rough endoplasmic reticulum (RER).

## 2.4 SF 对 HSFb 增殖活力的影响

MTT 法检测结果见表 3, SF 作用于 HSFb 72 h 后,细胞增殖活力降低且有一定的浓度依赖性。与空白对照组比较,均有显著性统计学差异( $**P < 0.01$ )。

表 3 SF 对 HSFb 增殖活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of SF on HSFb proliferation( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别 Group	OD 值 OD value
空白对照组 Control	$0.694 \pm 0.060$
SF 低剂量组 SF-L	$0.571 \pm 0.058^{**}$
SF 中剂量组 SF-M	$0.534 \pm 0.039^{**}$
SF 高剂量组 SF-H	$0.454 \pm 0.054^{**}$

注:与空白对照组相比, $^*P < 0.05$ , $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compared with control,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ .

## 2.5 SF 对 HSFb 的 I、III型胶原蛋白表达的影响

Western blot 结果见表 4、图 6:与空白对照组相比,低浓度 SF 组的 I 型胶原蛋白表达降低,差异有统计学意义( $^*P < 0.05$ ),中、高浓度 SF 组的 I、III 型胶原蛋白表达显著性降低,差异具有显著统计学意义( $^{**}P < 0.01$ )。

## 3 讨论

HS 是创伤后皮肤结缔组织异常修复愈合的结果<sup>[7]</sup>,现代医学治疗 HS 尚无突破性进展<sup>[2]</sup>。中医药防治瘢痕历史久远<sup>[15]</sup>,活血化瘀类中药川芎、当归有较好疗效。有文献统计,在防治病理性瘢痕中,川芎使用 9 次,当归使用 8 次<sup>[5]</sup>。SF 作为传统中药材——川芎、当归的主要活性成分,取材方面、价格低廉、药效稳定,目前已广泛用于治疗心血管、肾脏

表 4 HSFb 的 I、III 型胶原蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )  
Table 4 The expression of collagen I and III of HSFb ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别 Group	I型 Collagen I	III型 Collagen III
空白对照组 Control	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0
SF 低剂量组 SF-L	0.927 0 ± 0.047 0 *	0.948 2 ± 0.034 8
SF 中剂量组 SF-M	0.903 3 ± 0.031 9 **	0.885 2 ± 0.060 0 **
SF 高剂量组 SF-H	0.863 2 ± 0.032 8 **	0.841 5 ± 0.097 7 **

注:与空白对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

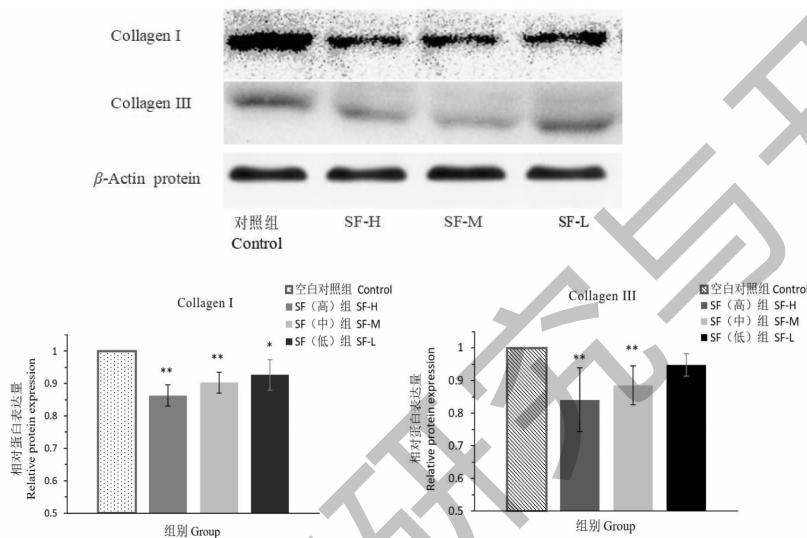


图 6 Western blot 分析 SF 对 HSFb 的 I、III 型胶原蛋白表达的影响

Fig. 6 Western blot results of collagen I and III protein expression of HSFb induced by SF

疾病<sup>[16]</sup>。近年发现 SF 还具有抑制肝、肺、肾组织纤维化的作用<sup>[8-10]</sup>。由于 HS 的病理生理机制与纤维化存在相似性,因此两者的研究往往可以相互借鉴<sup>[10]</sup>。课题组前期实验也发现,含有 SF 的复合物能有效抑制兔耳瘢痕增生<sup>[11]</sup>。

成纤维细胞过度增殖是 HS 形成的细胞学基础。SF 对 HS 中的成纤维细胞是否有抑制作用,目前尚未见文献报道。MTT 法是目前常用的检测细胞增殖的方法,本实验 MTT 结果提示,不同浓度的 SF 均可明显地抑制 HSFb 增殖( $P < 0.01$ )。

成纤维细胞可诱导分泌大量的胶原蛋白<sup>[17]</sup>,而过量的胶原合成是 HS 发生的病理基础。在 HS 中,主要胶原成分是 I 型和 III 型胶原,这些胶原在 HS 形成过程不断合成并沉积加剧病情。因此,测定 I、III 型胶原含量是衡量瘢痕增生程度的客观指标,也是研究防治 HS 的一个重要方向。本实验用 Western blot 法表明,SF 可抑制 I、III 型胶原蛋白的表达。

研究发现,成纤维细胞的微观形态正常是分泌、

储存大量胶原蛋白的形态学基础<sup>[18]</sup>。在倒置显微镜下,我们发现,加入 SF 后的 HSFb 形态变得不规则,部分细胞脱落悬浮在培养液中。透射电镜则发现,加入 SF 后的 HSFb 微观形态出现异常,如出现核固缩,染色质丢失,线粒体轻度肿胀,粗面内质网出现扩张呈囊泡状,有较多的空泡、自噬等,这些从另一个方面说明,SF 可致 HSFb 分泌胶原蛋白的功能衰退,甚至出现凋亡的趋势。

本实验初步说明 SF 在体外可抑制 HSFb 增殖和 I、III 型胶原蛋白表达,其在体内是否仍然具有抗瘢痕增生作用,则需要我们进一步开展体内实验以探讨研究。

## 参考文献

- 1 Hu DH, Liu JQ. A long way to go in scar research further enhancement of basic and clinical research of the scar [J]. Chin J Burns (中华烧伤杂志), 2011, 27: 407-417.
- 2 Zhang J, Xu D, Li N, et al. Downregulation of micro RNA-31 inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting-

- HIF1AN in human keloid [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 74623-74634.
- 3 Ran X. The therapeutic effect of Essential oil of *Ligusticum chuanxiong* Hort. on human hypertrophic scar and its safety evaluation [D]. Shanghai: East China Normal University (华东师范大学), 2012.
- 4 Liu K, Zhang XF, Zhang J, et al. Effect of angelicanaphtha on proliferation, apoptosis, collagen synthesis of human hypertrophic scar fibroblast [J]. *Chin J Aesth Med* (中国美容医学), 2012, 21: 1536-1538.
- 5 Guan ZQ, Chen GS, Feng LC, et al. Analysis of traditional Chinese medicine treatment of pathological scar based on literature research [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2018, 36: 1803-1805.
- 6 Wang LX, Wang F, Chen X, et al. Pharmacological research progress of sodium ferulate in cardio-cerebral vascular disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50: 772-777.
- 7 Li MY, Liu DW. The research of abnormal scar and the present situation in its prevention and treatment [J]. *J Pract Dermatol* (实用皮肤病学杂志), 2017, 10: 161-165.
- 8 Yang Y, Jiang J. Effect of sodium ferulate combined with atorvastatin on the clinical efficacy and renal interstitial fibrosis in patients with diabetic nephropathy [J]. *Sichuan Med J* (四川医学), 2018, 39: 888-891.
- 9 Zhang ZB, Cai T, Miao ZE, et al. Effect of sodium ferulate on proliferation, activation and, collagen synthesis of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24 (12) : 123-128.
- 10 Kuang J, Wei XL, Xie M. The effect of sodium ferulate in experimental pulmonary fibrosis via NALP3 inflammasome [J]. *J Sichuan Univ: Med Sci* (四川大学学报: 医学版), 2017, 48: 503-508.
- 11 Jin XR, Gao YX, Zhu MM, et al. Effects and mechanism of Chuanqing ointment treatment with rabbit ear hypertrophic scars [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2018, 45: 617-620.
- 12 Shang Y, Zhao LL, Xi W, et al. Primary culture and identification of adult dermal fibroblasts [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2018, 34: 824-828.
- 13 Liang JY, You GQ, Liu F, et al. Effects of sodium ferulate on  $\alpha$ -SMA, CTGF and ECM in renal fibroblasts stimulated by  $TGF\beta_1$  [J]. *Med J West China* (西部医学), 2009, 21: 361-365.
- 14 Huang YT, Zheng SF, Zhang XQ, et al. Effect of sodium ferulate on epidermal growth factor in human dermal fibroblasts *in vitro* [J]. *Chin J Dermatovenereol* (中国皮肤性病学杂志), 2011, 25: 590-593.
- 15 Cai JL, Zhang ZX. *Modern Scar Therapy* (现代瘢痕学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998: 220-223.
- 16 Wang LX, Wang F, Chen X, et al. Pharmacological research progress of sodium ferulate in cardio-cerebral vascular disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50: 772-777.
- 17 Li XS, Yue YG, Zhang KQ, et al. Therapeutic effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on hypertrophic scar [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1014-1020.
- 18 Yang Y, Guo GZ, Wang WT, et al. Effect of asiaticoside ointment on fibroblast and collagen expression in the keloid model of nude mice [J]. *Chin J Lepr Skin Dis* (中国麻风皮肤病杂志), 2019, 35: 398-401.