

本文引用:谭素芳,程晓,徐翠萍,钟昕,周琦,刘朝圣.防脱育发精华液对雄激素性脱毛大鼠局部皮肤睾酮、双氢睾酮、肝细胞生长因子水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2023,43(1):9-13.

防脱育发精华液对雄激素性脱毛大鼠局部皮肤睾酮、双氢睾酮、肝细胞生长因子水平的影响

谭素芳¹,程晓²,徐翠萍²,钟昕³,周琦²,刘朝圣^{2*}

1.湖南中医药高等专科学校,湖南 株洲 412012;2.湖南中医药大学第一附属医院皮肤科,湖南 长沙 410007;

3.湖南中医药高等专科学校附属第一医院,湖南 株洲 412000

〔摘要〕目的 探讨防脱育发精华液对雄激素性脱毛大鼠局部皮肤组织睾酮(testosterone, T)、双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)水平的影响。**方法** 将45只大鼠随机分为空白组、对照组、模型组、米诺地尔酊组、防脱育发精华液组,每组9只。模型组、米诺地尔酊组、防脱育发精华液组连续6周皮下注射丙酸睾酮注射液(5 mg/kg)建立雄激素性脱毛大鼠模型,对照组皮下注射生理盐水,造模同时给药,实验过程中定期观察大鼠一般状态,运用免疫组化、Western blot、ELISA等技术手段,检测大鼠局部皮肤T、DHT、HGF表达的变化。**结果** 与空白组比较,模型组T、DHT含量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),HGF蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,米诺地尔酊组和防脱育发精华液组T、DHT含量均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),防脱育发精华液组HGF蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与米诺地尔酊组比较,防脱育发精华液组DHT含量明显降低($P<0.05$)。**结论** 防脱育发精华液可减轻雄激素性脱毛大鼠脱毛程度,通过降低局部皮肤组织T、DHT含量,促进HGF表达是其主要作用机制之一。

〔关键词〕 雄激素性脱发;防脱育发精华液;睾酮;双氢睾酮;肝细胞生长因子

〔中图分类号〕R269

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.002

Effects of Fangtuo Yufa Essence on the T, DHT and HGF levels in the local skin of androgenic alopecia rats

TAN Sufang¹, CHENG Xiao², XU Cuiping², ZHONG Xin³, ZHOU Qi², LIU Chaosheng^{2*}

1. Hunan Chinese Medical College, Zhuzhou, Hunan 412012, China; 2. The First Hospital of Hunan University of

Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. The First Hospital of Hunan College of Chinese Medicine,

Zhuzhou, Hunan 412000, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the effects of Fangtuo Yufa Essence on the levels of testosterone (T), di-hydrotestosterone (DHT), hepatocyte growth factor (HGF) in the local skin tissue of SD androgenic alopecia rats. **Methods** A total of 45 rats were randomly divided into blank group, control group, model group, minoxidil group, and Fangtuo Yufa Essence group, with 9 in each group. For six weeks, the rat models of androgenic alopecia were established by subcutaneous testosterone propionate injection (5 mg/kg) for 6 consecutive weeks in model group, minoxidil group, and Fangtuo Yufa Essence group. While the control group was subcutaneously injected with an equal volume of normal saline. Meanwhile, the drug was evenly applied during modeling. During

〔收稿日期〕2022-04-16

〔基金项目〕湖南中医药大学第一附属医院国医大师熊继柏传承工作室基金项目(XJB202208);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH06)。

〔第一作者〕谭素芳,女,硕士,研究方向:中医外科皮肤病与性病学。

〔通信作者〕*刘朝圣,男,博士,副主任医师,E-mail:57846224@qq.com。

the experiment, the general conditions, the expression levels of T, DHT and HGF of each group were detected utilizing immunohistochemistry, Western blot, ELISA, and others. **Results** The content of T and DHT was significantly higher ($P<0.05$, $P<0.01$) and the HGF protein expression levels were significantly lower ($P<0.05$) in model group versus blank group. Compared with the model group, the minoxidil group and Fangtuo Yufa Essence group showed lower T and DHT content ($P<0.05$, $P<0.01$), while Fangtuo Yufa Essence group showed higher HGF protein expression levels ($P<0.05$). The DHT content in Fangtuo Yufa Essence group decreased apparently in comparison to the minoxidil group ($P<0.05$). **Conclusion** Fangtuo Yufa Essence can alleviate the hair removal in androgenic alopecia rats. One of the main mechanisms may be decreasing T and DHT content and increasing HGF expression in local skin tissues.

[**Keywords**] androgenic alopecia; Fangtuo Yufa Essence; testosterone; di-hydrotestosterone; hepatocyte growth factor

脱发是皮肤科中的常见病、多发病。其中,雄激素性脱发,又名男性型脱发,发病率占脱发的 90%,是目前导致脱发的第一大原因,具有反复发作、缠绵难愈的特点。临床主要表现为前额及两侧鬓角发际线上行及头顶毛发稀疏,常伴油腻、脱屑、瘙痒等症^[1-3],具有反复发作、缠绵难愈的特点^[4]。

中医学认为精血为头发化生之源,精血不足、肝肾亏虚则无以濡养肌肤毛发,或长期精神压力过大,肝郁气滞,气行不畅,进而气滞血瘀,发失所养。中药复方具有疗效确切、不良反应少的优点。从中药中筛选防治雄激素性脱发的处方,是防治雄激素性脱发药物开发的一种新尝试。防脱育发精华液是广东芙妍化妆品公司历时 20 余年研发的一款用于治疗雄激素性脱发的外用洗剂,由《本草纲目》七宝美髯丹加减化裁研制而成,主要由女贞子、何首乌、菟丝子、侧柏叶、苦参、艾叶、川芎、花椒等中药组成,具有固发防脱、祛风止痒的功能。本课题组前期研究显示,防脱育发液在控制头痒和头油症状、减少脱发数量及促进新发生长方面临床疗效确切,且在研究过程中未发生不良反应^[5]。

本研究以雄激素性脱毛大鼠模型为实验载体,观察大鼠毛发生长及睾酮(testosterone, T)、双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)表达的变化,探讨其作用机制,为临床应用提供客观依据。

1 材料

1.1 实验动物

6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 45 只,体质量 180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,生产许可证号:SYXK(湘)2020-0010。饲养于湖南中医药大学东塘校区 SPF 级动物实验中心,严格按照动物伦理学要求善待动物(动物实验伦理审批号:ZYFY20220513-40)。

1.2 主要药物与试剂

防脱育发精华液(广东芙妍化妆品有限公司,批号:20210221);米诺地尔酊(浙江万晟药业有限公司,批号:20210927);丙酸睾酮(上海凛恩科技发展有限公司,批号:R002673);大鼠 T 试剂盒(批号:MM-0577R1)、大鼠 DHT 试剂盒(批号:MM-0532R1)均购自江苏酶免实业有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-BC-K318-M);HGF(北京安诺伦生物科技有限公司,批号:26881-1-ap)。

1.3 主要仪器

低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5424R);电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司,型号:PX224ZH);超高灵敏度化学发光成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司,型号:Chemi Doc™ XRS+);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200)。

2 方法

2.1 动物分组

适应性喂养 3 d,用 Excel 软件随机分为空白组、对照组、模型组、米诺地尔酊组、防脱育发液精华组,每组各 9 只。

2.2 动物造模及给药

将丙酸睾酮用花生油进行稀释,待混匀后配成浓度为 5 mg/mL 的溶液。参照文献[6-8]构建动物模型,空白组无干预措施,对照组皮下注射生理盐水外,其他组皮下多点注射 5 mg/kg 的丙酸睾酮,每天上午注射 1 次,连续 35 d。大鼠颈背部观察区毛发出现脱落、稀疏现象,提示造模成功。由于本实验周期较长,动物局部雄激素受体具有可逆性^[8],因此,造模成功后需持续皮下注射丙酸睾酮,此后丙酸睾酮的注射剂量减半^[9-10]。

造模的同时进行药物干预,皮下注射造模 30 min

后,将药物涂于脱毛实验观察区内。给药剂量参照《实验动物学基础与技术》^[1],通过人与大鼠体表面积比换算出大鼠的用量。空白组和模型组涂赋型剂(生理盐水),其余组予相应的治疗药物,每天给药1次,连续35 d。

2.3 观察指标

2.3.1 一般状态观察 每天观察大鼠的精神状态、毛色、脱毛、体质量、饮食量、二便等情况。

2.3.2 ELISA法测定大鼠局部皮肤组织中T、DHT含量 实验第36天后,将大鼠麻醉,75%乙醇局部消毒,镊子捏起大鼠背部皮肤,取1 g新鲜皮肤组织,加入9 g PBS缓冲液,匀浆离心,收集上清液,按照相应试剂盒说明,用ELISA法测定皮肤中的T、DHT含量。

2.3.3 免疫组化及Western blot检测局部皮肤组织中HGF蛋白表达 实验第36天后,将大鼠麻醉后取新鲜皮肤组织固定,按照免疫组化流程,经石蜡切片、抗原修复、淋洗、封闭、敷一抗、敷二抗、显色复染等操作,对HGF的蛋白表达水平进行测定。另一部分新鲜皮肤组织采用BCA测定法,提取蛋白并检测浓度、制胶、上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、曝光等流程,检测局部皮肤组织中HGF蛋白相对表达量。

2.4 统计学方法

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,当资料满足正态分布和方差齐性时,

采用完全随机设计多组ANOVA分析,并采用LSD-t法进行多重比较,否则采用Kruskal-wallis H检验;体质量变化情况采用重复测量方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般状态

SD大鼠毛发丰富,喜舔舐毛发,实验过程中空白组观察区毛发呈现出浓密、洁白、柔顺,未见明显脱落;对照组基本不见裸露皮肤;模型组、米诺地尔酞组、防脱育发精华液组在连续皮下注射丙酸睾酮3周后,毛发失去光泽,颜色变灰暗,于4周后逐渐出现毛发稀疏、脱落现象,存留的毛发变得易油腻、纤细、质脆,偶见小块裸露皮肤,毛发脱落于第5周尤为明显。实验过程中各组间体质量变化比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见图1、表1。

3.2 各组大鼠局部皮肤组织中T、DHT含量

与空白组比较,模型组T、DHT含量均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。对照组与空白组间T、DHT含量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,米诺地尔酞组、防脱育发精华液组T、DHT含量均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与米诺地尔酞组比较,防脱育发精华液组DHT含量明显降低($P < 0.05$)。米诺地尔酞组与防脱育发精华液组间T含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表2。

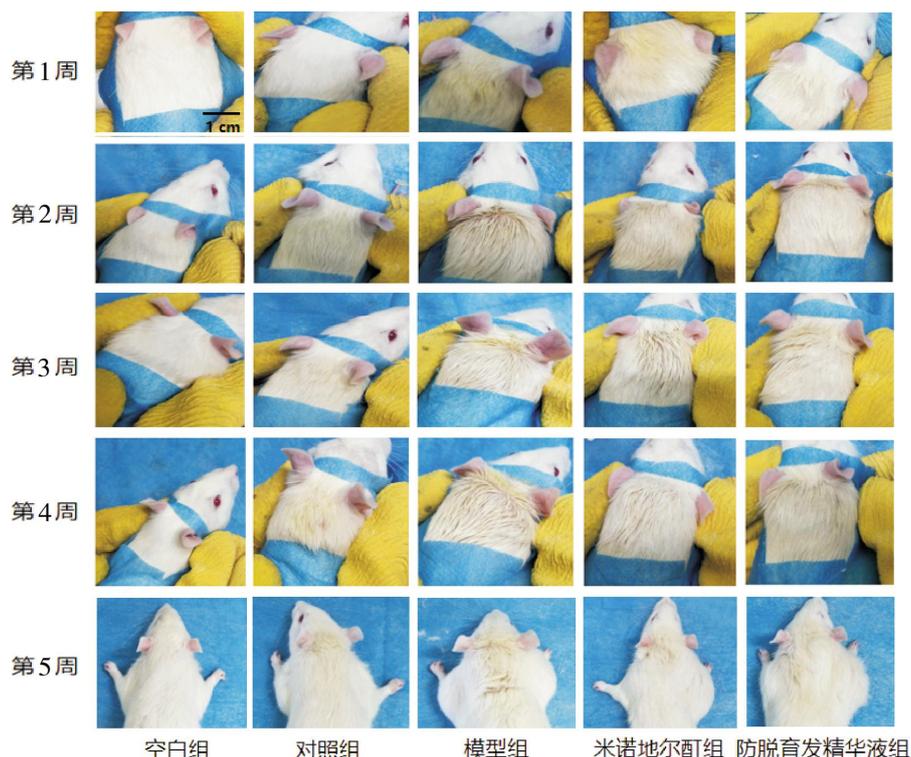


图1 各组大鼠局部毛发状态比较

表1 各组大鼠体质量变化比较($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
空白组	248.88±6.75	310.98±6.78	324.05±11.29	353.44±20.88	383.56±29.90
对照组	245.88±6.62	306.81±11.47	324.61±10.59	349.56±18.37	380.78±33.72
模型组	258.27±7.79	318.56±14.51	339.18±19.57	356.89±19.37	382.78±27.19
米诺地尔酞组	255.46±12.41	312.32±19.19	339.67±18.61	355.44±21.70	390.67±27.16
防脱护发精华液组	246.15±13.04	308.73±18.95	339.67±18.61	346.56±24.99	361.67±50.78

表2 各组大鼠局部皮肤组织中 T、DHT 含量比较($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	T/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DHT/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白组	154.784±4.276	5.802±0.277
对照组	160.132±16.403	5.909±0.272
模型组	203.012±15.851**	6.592±0.524*
米诺地尔酞组	167.487±10.173 [#]	6.170±0.670 [#]
防脱护发精华液组	159.842±10.685 [#]	5.635±0.322 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与米诺地尔酞组比较,^Δ $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠局部皮肤组织中 HGF 蛋白表达情况

免疫组化结果显示:与空白组及对照组比较,模型组 HGF 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。空白组与对照组的 HGF 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,防脱护发精华液组 HGF 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。米诺地尔酞组与防脱护发精华液组间 HGF 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 2、表 3。

表3 各组大鼠皮肤组织 HGF 蛋白表达水平比较(免疫组化, $\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	HGF
空白组	5.086±2.026
对照组	6.633±1.691
模型组	2.599±0.326* ^{&}
米诺地尔酞组	3.583±0.446
防脱护发精华液组	5.343±1.155 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与对照组的比较,[&] $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

Western blot 结果显示:与空白组比较,对照组 HGF 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$),模型组 HGF 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 HGF 蛋白相对表达量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,米诺地尔酞组、防脱护发精华液组 HGF 蛋白相对表达量均明显升高($P<0.05$)。米诺地尔酞组与防脱护发精华液组间 HGF 蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 3、表 4。

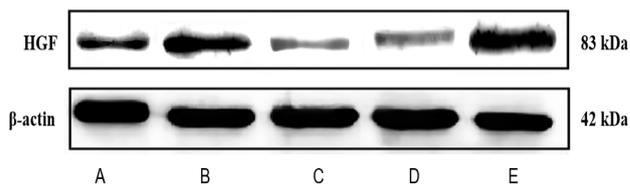


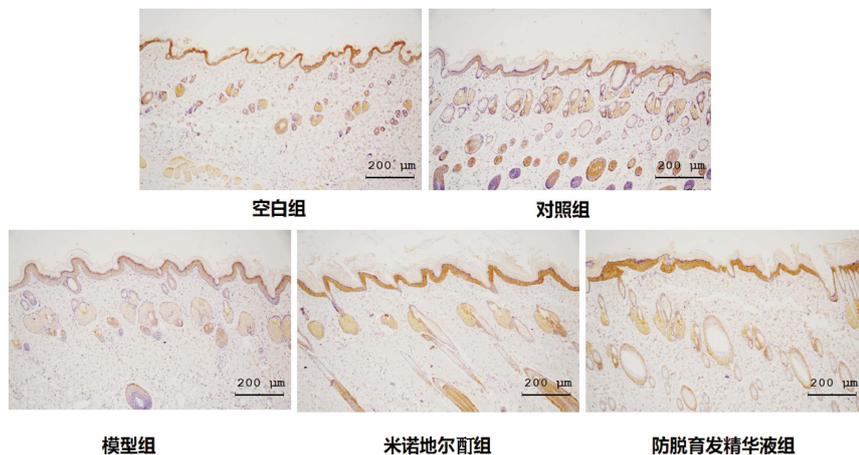
图3 各组大鼠 HGF 蛋白表达电泳图

注:A.空白组;B.对照组;C.模型组;D.米诺地尔酞组;E.防脱护发液组。

表4 各组大鼠皮肤组织 HGF 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	HGF
空白组	0.150±0.027
对照组	0.229±0.053*
模型组	0.079±0.013* ^{&}
米诺地尔酞组	0.163±0.047 [#]
防脱护发精华液组	0.191±0.029 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与对照组的比较,[&] $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠皮肤组织 HGF 蛋白表达免疫组化图($\times 10$)

4 讨论

雄激素性脱发是一种以进行性的毛囊微小化为主要病理表现的毛发进行性减少的疾病,其发病机制主要与遗传、性激素、皮脂腺分泌、局部微环境、精神压力、饮食等因素有关^[11-12]。皮下注射丙酸睾酮注射液是通过局部皮肤区域注射游离T,经5 α -还原酶作用转化为活性更高的DHT,DHT随即与其受体结合形成雄激素-受体复合物,逐渐使毛囊微小化^[13],最终导致脱发。现代医学治疗脱发的常用方法有激素调节剂、生物反应学调节剂、光化学疗法、手术移植等,有一定的治疗效果,但有不同程度的不良反应^[14-15]。

防脱育发精华液由女贞子、何首乌、菟丝子、侧柏叶、苦参、艾叶、川芎、花椒等中药组成。方中制何首乌性微温、味甘涩,归肝、肾经,发挥补益肝肾精血,固肾涩精乌须之功,为君药。菟丝子、女贞子、灵芝共为臣药,菟丝子归肝、脾、肾经,补肾填精;女贞子归肝、肺、肾三经,补肝肾、明目乌发;灵芝归心、肺、肝、肾经,补气安神、扶正固本。侧柏叶凉血、生发黑发,归肺、肝、大肠经;苦参归心、肝、胃、大肠、膀胱经,清热燥湿杀虫、凉血、生发黑发;血中之气药川芎归肝、胆经,行气活血止痛,艾叶归肝、脾、肾经,温经通络、散寒止痛,共为佐药。花椒归脾、胃、肾经,辛香走窜,温中散寒除湿,载药达毛窍,为使药。以上诸药相辅相成,共奏固发防脱、祛风止痒之功。

本研究实验结果表明防脱育发精华液对雄激素性脱发大鼠毛发脱落具有改善作用,主要表现在较模型组大鼠而言,防脱育发精华液组大鼠毛发油腻程度减轻,毛干差异小,毛发不易梳落、打结。本次实验结果提示,防脱育发精华液能提升HGF表达水平,在实验过程中两种方法检测HGF蛋白表达,均显示对照组HGF蛋白表达最高。HGF是一种多功能生长因子^[16],它在肝细胞中发挥作用并刺激再生^[17-18]的同时,对肝外组织和细胞的有丝分裂或营养也有促进作用。本次实验过程中相较于空白组无干涉措施,对照组伴随皮下注射这种微小的创伤性刺激,能使局部区域血管内皮生长因子分泌增多,进而刺激上皮细胞^[19]、黑素细胞和内皮细胞的生长和功能发挥。中医外治法中常用梅花针叩刺^[20]局部皮肤治疗脱发,发挥调和营卫气血、通经活络的作用,殊途同归。

本次实验中局部皮肤组织的DHT降低明显,由此推测防脱育发精华液可通过改善局部毛囊雄激素受体水平,改善毛发脱落等现象,但雄激素性脱发病因病机复杂,亦可进一步研究本品是否具有抑制局部皮肤5 α -还原酶作用。

综上所述,本研究提示防脱育发精华液对促进雄激素性脱发大鼠毛发生长,其机制可能是改善局部毛囊雄激素受体水平,降低DHT含量,促进HGF表达,其他方面的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 赵 辨.中国临床皮肤病学[M].2版.南京:江苏凤凰科学技术出版社,2017:1314.
- [2] 肖 杰,田优德.清热利湿祛脂汤联合米诺地尔治疗湿热蕴结型脂溢性脱发的临床观察[J].世界中西医结合杂志,2021,16(12):2275-2279.
- [3] 陈亚洲,匡 琳,黄恩惠.祛脂生发液联合米诺地尔治疗脂溢性脱发的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1285-1287.
- [4] 何增华,卢传坚,禩国维.国医大师禩国维基于“瘀血理论”针药相须辨治脂溢性脱发经验[J].中华中医药杂志,2021,36(7):4015-4018.
- [5] 谭素芳,钟 昕,周 琦,等.防脱育发液联合祛脂生发汤治疗女性型脱发临床观察[J].亚太传统医药,2022,18(2):125-128.
- [6] 陶春旭,李欢欢,徐滢滢,等.中药治疗动物脂溢性脱毛的研究进展[J].中兽医学杂志,2019(6):95-97.
- [7] 黄 丹,冷 静,殷国前,等.雄激素源性脱发的动物模型研究进展[J].中华实验外科杂志,2020,37(11):2163-2167.
- [8] 孙位军,甘大莉,王 张,等.脱毛动物模型造模要素和药物防治的数据挖掘研究[J].中药与临床,2017,8(6):57-61.
- [9] 景 林,余志杰,胡婷婷,等.补气活血生发酊治疗硫化钠脱毛小鼠模型的药效学研究[J].成都中医药大学学报,2020,43(2):31-36.
- [10] 徐玲玲,玄 敏,李 挺,等.中药治疗脂溢性脱发的药理及实验模型研究概述[J].中国药师,2022,25(2):330-335.
- [11] 杨 斐,胡 樱.实验动物学基础与技术[M].2版.上海:复旦大学出版社,2019:320-335.
- [12] 王 洁,何振兴,赵菊花,等.小剂量肉毒毒素注射联合光子治疗在雄激素源性脱发中的应用[J].中国美容医学,2022,31(6):5-8.
- [13] 方卫婷,谢红炬,廖俊琳,等. SVF-gel 和 CGF 在治疗雄激素源性秃发中的应用进展[J].中南医学科学杂志,2020,48(1):105-108.
- [14] 倪锦涛,杨旅军.雄性激素源性脱发治疗方式的研究进展[J].中国美容医学,2022,31(5):185-189.
- [15] 吴 巍,张 颖,张 美,等.雄激素性脱发的药物研究进展[J].中国美容整形外科杂志,2022,33(5):308-311.
- [16] 张 月,韩 飞,何 亭,等.肝细胞生长因子修饰人脂肪间充质干细胞对糖尿病大鼠全层皮肤缺损创面愈合的影响及其机制[J].中华烧伤杂志,2021,37(9):860-868.
- [17] 黄文俊,周亚飞,王 洁,等.建立并鉴定一种基于人诱导多能干细胞的肝脏细胞定向分化实验方案[J].中国组织工程研究,2023,27(1):28-33.
- [18] 侯瑞霞,刘燕敏,赵新程,等.微RNA-155对脂肪间充质干细胞肝细胞生长因子及前列腺素E2基因表达影响的研究[J].山西医药杂志,2020,49(6):651-653.
- [19] 李 秀,杨 颖,管 乐,等.肝细胞生长因子促进人毛囊生长的作用研究[J].中华整形外科杂志,2021,37(8):922-929.
- [20] 邱学军,龙俊茹,韩 亮,等.斑秃非手术治疗法的研究现状与展望[J].激光生物学报,2022,31(3):208-214.