

中药成分联合米诺地尔抗雄激素性脱发的作用研究

刘珍达, 何泽慧, 郭腾, 冯年平* (上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: 目的 研究中药成分与米诺地尔联用抗雄激素性脱发的作用。方法 将莽草酸、黄芩苷和雪松醇 3 种中药成分分别与米诺地尔联用, 采用人毛囊乳头细胞(human dermal papilla cells, hDPC)细胞增殖试验验证中药成分协同米诺地尔提高细胞活力的作用, 并确定最佳联用比例, 利用睾酮干扰的 C57BL/6 小鼠模拟雄激素性脱发模型评价药物联用组合促进毛发再生的效果, 5 α -还原酶抑制试验探究雪松醇对抗雄激素性脱发的起效机制。结果 细胞增殖试验表明, 莽草酸、黄芩苷和雪松醇 3 种中药成分在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下均能发挥促进细胞增殖的作用, 且 3 种中药成分与米诺地尔联用都能协同提高细胞活力; 雪松醇与米诺地尔 1 : 1 摩尔比联用、黄芩苷与米诺地尔 1 : 1 摩尔比联用的细胞存活率最高。体内药效学试验表明, 雪松醇与米诺地尔联合给药组的同期毛发覆盖率、再生毛发长度药效评价指标都显著高于其他组别。5 α -还原酶抑制试验显示雪松醇对 5 α -还原酶的抑制率 >(69.60 \pm 0.89)%, 雪松醇-米诺地尔联用对 5 α -还原酶的抑制作用显著高于米诺地尔。结论 莽草酸、黄芩苷和雪松醇 3 种中药成分与米诺地尔联用均能协同促进人毛囊乳头细胞增殖。雪松醇-米诺地尔 1 : 1 联用在提高细胞活力、促进毛囊分化、诱导毛囊周期转变、促进毛发再生方面都显示出良好的协同增效作用, 可以作为抗雄激素性脱发的最佳联合给药方案。抑制 5 α -还原酶活性是雪松醇的主要起效机制之一。

关键词: 雄激素性脱发; 米诺地尔; 中药成分; 雪松醇; 联合用药; 5 α -还原酶; 人毛囊乳头细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)08-1075-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.08.011

引用本文: 刘珍达, 何泽慧, 郭腾, 等. 中药成分联合米诺地尔抗雄激素性脱发的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(8): 1075-1081.

Study on the Effect of Chinese Medicine Ingredients Combined with Minoxidil Against Androgenic Alopecia

LIU Zhenda, HE Zehui, GUO Teng, FENG Nianping* (School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Chinese medicine ingredients combined with minoxidil against androgenic alopecia. **METHODS** Shikimic acid, baicalin and cedrol were combined with minoxidil, respectively. Human dermal papilla cell(hDPC) proliferation assays were utilized to verify the effect of the Chinese medicine ingredients combined with minoxidil on improving cell viability and determine the optimized combination ratio. C57BL/6 mice model of androgenic alopecia with testosterone intervention was utilized to evaluate the hair regeneration effect of the combination of drugs. The 5 α -reductase inhibition experiment was used to explore the action mechanism of cedrol against androgenic alopecia. **RESULTS** Cell proliferation assays showed that shikimic acid, baicalin and cedrol remarkably promoted cell proliferation at the concentration of 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the combination of these Chinese medicine ingredients with minoxidil could synergically improve cell viability. Combination therapies of cedrol and minoxidil, baicalin and minoxidil at 1 : 1 molar ratio exhibited the highest cell viability. *In vivo*, the pharmacodynamic indicators of cedrol and minoxidil combination group were significantly higher than those of other administration groups, such as hair cover area, the length of regenerated hair. The 5 α -reductase inhibition experiment show that the inhibitory rate of cedrol on 5 α -reductase was higher than(69.60 \pm 0.89)%, and the inhibition of combination therapy of cedrol-minoxidil on 5 α -reductase was significantly higher than minoxidil. **CONCLUSION** Shikimic acid, baicalin and cedrol combined with minoxidil can synergically promote the proliferation of human dermal papilla cells. The combination therapy of cedrol-minoxidil(1 : 1), as the best combination of anti-androgenetic alopecia, shows synergistic effect in improving cell viability, promoting hair follicle differentiation, inducing hair follicle cycle transition and accelerating hair regeneration. Inhibition of 5 α -reductase activity is one of the main mechanisms of cedrol.

KEYWORDS: androgenic alopecia; minoxidil; ingredients of Chinese medicine; cedrol; combination therapy; 5 α -reductase; human dermal papilla cells

基金项目: 上海中医药大学研究生创新培养项目(Y2021007)

作者简介: 刘珍达, 女, 硕士 E-mail: 13122373010@163.com 共同第一作者: 何泽慧, 女, 博士 E-mail: 18817773761@163.com

*通信作者: 冯年平, 男, 博士, 教授 E-mail: npfeng@shutcm.edu.cn

雄激素性脱发是一种受基因决定的非瘢痕性脱发,是男性最常见的脱发类型。雄激素性脱发的发病特点是由于毛囊生长期缩短而导致毛囊逐渐微型化,最终头发密度逐渐降低,其发病机制与遗传、局部炎症、激素合成代谢及其受体等因素有关。目前由美国FDA批准用于雄激素性脱发治疗的2种方法是局部使用米诺地尔和口服非那雄胺。局部使用米诺地尔的临床推荐浓度主要有2%和5%,研究显示5%米诺地尔比2%米诺地尔的治疗效果更好,但使用5%米诺地尔的患者中报道发生局部刺激性反应和过敏性皮炎的案例多于使用2%米诺地尔,说明米诺地尔的不良反​​应呈剂量依赖性^[1]。因此,开发协同增效的米诺地尔联合给药方案替代高剂量米诺地尔,从而降低其不良反​​应,是非常必要的。

皮肤中循环的睾酮会被5 α -还原酶转化为双氢睾酮,它对雄激素受体的亲和力比睾酮高10倍^[2],双氢睾酮-雄激素受体复合物会抑制Wnt/ β -Catenin信号转导通路,进而干扰毛囊向生长期转变^[3]。非那雄胺是II型和III型5 α -还原酶抑制剂,能有效抑制睾酮向双氢睾酮的转化,进而减少对毛囊的破坏,延长毛发生长期,阻止毛囊微型化发展趋势^[4]。但非那雄胺具有以性功能障碍为主的严重不良反​​应,因此寻找中药成分中天然的5 α -还原酶抑制剂具有潜在的开发意义。中药成分可以通过调节细胞生长因子、调节信号通路、控制炎症等机制发挥雄激素性脱发治疗作用,如肉豆蔻酸^[5]、黄芩苷^[6]、莽草酸^[7]等能提高类胰岛素一号生长因子(insulin-like growth factors-1, IGF-1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达;侧柏提取物^[8]、黄芩苷^[9]、何首乌提取物^[10]等能够促进 β -catenin蛋白的表达;侧柏、苦参、锯叶棕、非洲臀果木、大荨麻等具有抑制5 α -还原酶的作用^[11-12];当归提取物^[13]、无花果叶提取物^[14]、姜黄素^[15-16]可以减少炎症相关细胞因子的表达。

本研究选取莽草酸、黄芩苷、雪松醇3种中药成分,以人毛囊乳头细胞(human dermal papilla cells, hDPC)、睾酮干扰的C57BL/6小鼠为模型,筛选合适的米诺地尔联合用药方案,以实现协同增效并减少不良反​​应的目的,以期雄激素性脱发的治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪、Agilent 7890A 气相色谱仪、HP-5 气相色谱柱均来自美国Agilent; Synergy HT 多功能酶标仪(美国Bio-Tek); MD200-1 氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司); Diamonsil Plus C₁₈ 色谱柱(迪马科技有限公司); CP225 D 微量电子分析天平(德国Sartorius); SB-5200 D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); SHA-C 往复式水浴恒温振荡器(金坛市科析仪器有限公司); SMZ168-TLED 体视显微镜(中国Motic); Milli-Q 纯水仪(美国Millipore)。

1.2 试剂

米诺地尔(上海源叶生物科技有限公司,批号:Q10M6Y1;纯度 \geq 99%);黄芩苷(批号:M0515A;纯度>95%;大连美仑生物技术有限公司);雪松醇(批号:K2003148;纯度>98%);莽草酸(批号:A2006161;纯度>98%)均购自上海Aladdin生化科技股份有限公司;非那雄胺(批号:H10M9Z61000;纯度>98%;上海源叶生物科技有限公司);睾酮(批号:K1904036;纯度>98%;上海Aladdin生化科技股份有限公司);雌二醇(批号:G2020207;纯度>98%;上海Aladdin生化科技股份有限公司);还原辅酶II四钠盐(批号:A0810A;大连美仑生物技术有限公司);BCA 蛋白定量分析试剂盒(批号:VK314219;美国Thermo);无水乙醇(分析纯)、二甲基亚砜(色谱级,纯度>98%)、丙酮(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均为国药集团化学试剂有限公司。

1.3 细胞株

hDPC 细胞株购于上海嗣新生物科技有限公司。

1.4 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,♂,7 周龄,购于上海灵畅生物科技有限公司,生产许可证号为 SCXK(沪)2018-0003; SPF 级 SD 大鼠,♂, 体重(180 \pm 20)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号: SCXK(沪)2017-0005。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心,饲养条件:温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为(55 \pm 10)%。使用许可证号为 SYXK(沪)2020-0009,所有动物实验均参照上海中医药大学实验动物伦理委员会的规定(审批号: PZSHUTCM200731006, PZSHUTCM200717016)。

2 方法

2.1 细胞培养

hDPC 以适量浓度接种于培养瓶,加入含 10% 胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基,置于培养箱(37 °C, 5% CO₂)中培养,细胞贴壁生长。取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 细胞增殖试验

将 hDPC 细胞以每孔 2×10^4 个细胞平行接种于 96 孔板,培养箱孵育 12 h。加入含药培养基,对照组加入含 0.3% DMSO 的培养基,继续孵育 24 h,吸弃培养基后以 PBS 洗 2 遍,加入 CCK-8 避光孵育 2.5 h,450 nm 处检测吸光值(A),照公式计算其细胞存活率[细胞存活率(%)=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%]。不同活性成分单独给药时,药物在培养基里的终浓度为 0.5, 5, 50, 100, 250 μmol·L⁻¹;将黄芩苷、雪松醇、莽草酸分别以不同摩尔比(1:1, 1:3, 3:1)与米诺地尔联合给药,药物终浓度为 5 μmol·L⁻¹;分别将黄芩苷和雪松醇以 1:1 摩尔比与米诺地尔联合给药,药物终浓度为 0.5, 5, 50, 100, 250 μmol·L⁻¹。

2.3 有效物质对雄激素性脱发小鼠的药效学考察

以 1 g·kg⁻¹ 乌来糖对 C57BL/6 小鼠进行麻醉,采用巯基乙酸对 6 cm² 面积的皮肤进行脱毛,清水洗去巯基乙酸,次日开始给药。以 50%乙醇溶液配制 0.5% 睾酮溶液,各药物以 2% 浓度配制于醇溶液中,每次给药涂抹 200 μL,连续给药 28 d。具体分组如下:正常组、模型组、米诺地尔组、黄芩苷组、雪松醇组、黄芩苷-米诺地尔组、雪松醇-米诺地尔组。正常组给予相应体积的醇溶液涂抹皮肤,其他各组在给药前 1 h 以 0.5% 睾酮涂抹皮肤造模。每日拍照,给药后第 18 天处死小鼠,取其背部皮肤做 H&E 切片进行毛囊分析,计算生长期/休止期毛囊数量比;给药结束后拔取脱毛区 3 个不同部位的毛发共 9 根,用体视显微镜测量毛发长度。

2.4 有效物质的 5α-还原酶抑制试验

采用 HPLC,参考文献^[17],通过测定底物睾酮的浓度变化以评价酶活性。该测量方法简单可行,对酶纯度要求低,减少了引起误差的影响因素。

2.4.1 溶液的配制 睾酮母液(1 mg·mL⁻¹)的配制:精密称取 10.00 mg 睾酮,用无水乙醇溶解并定容至 10 mL。

Tris 缓冲液的配制(pH 5.5):分别精密称取 1.21 g Tris、18.00 mg EDTA-Na₂、1.02 mg MgCl₂·6H₂O、2.92 g NaCl、45.00 g 蔗糖,加入 40 μL 二巯基乙醇,用 1 L 超纯水溶解后,用盐酸调节 pH 至 5.5。

还原辅酶 II 四钠盐母液(2 mg·mL⁻¹)的配制:精密称取 10.00 mg 还原辅酶 II 四钠盐,用蒸馏水溶解并定容至 5 mL。

受试药物溶液的配制:称取药物适量,分别用 75%乙醇溶解并配成浓度为 0.005, 0.050, 0.500, 2.500, 5.000 mmol·L⁻¹ 的药物溶液。

2.4.2 HPLC 测定睾酮的含量 色谱条件:检测波长为 242 nm;色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(60:40);流速为 1.0 mL·min⁻¹;进样体积为 10 μL;柱温为 30 °C;运行时间为 20 min;内标为 200 μg·mL⁻¹ 的雌二醇。

2.4.3 5α-还原酶的提取和定量 处死 SD 大鼠并尽快取肝,将预冷的缓冲液按 3 mL·g⁻¹ 加至肝脏中,组织匀浆,超高速离心(10 000×g, 30 min),收集上清继续超高速离心(100 000×g, 1 h),弃上清即得酶粗提物,用缓冲液重悬并保存在 -80 °C 下备用。采用 BCA 蛋白试剂分析盒测定酶提取液中的蛋白含量,并以此蛋白浓度代表酶含量。

2.4.4 5α-还原酶活性的测定 反应体系 1 mL 混合物中含有 350 μL Tris-HCL 缓冲液(pH 5.5), 25 μL 75%乙醇(含药或不含药), 100 μL 还原辅酶 II 四钠盐溶液(200 μg·mL⁻¹), 25 μL 睾酮溶液(25 μg·mL⁻¹), 500 μL 酶提取物(1.2 mg·mL⁻¹)。混匀后在 37 °C 下孵育 30 min,加入 2 mL 乙酸乙酯混匀终止反应,加入 100 μL 内标溶液,振荡 3 min,涡旋 30 s,离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min)。取上清液于氮气流下挥干,用 1 mL 甲醇复溶后 HPLC 进样检测。

根据公式 $C_{转化} = C_{空白} - C_{反应}$ ($C_{反应}$ 为体系反应后测得的睾酮浓度, $C_{空白}$ 为孵育前加入乙酸乙酯淬灭酶的活性测得的睾酮浓度)测定酶的活性, $C_{转化}$ 值代表酶促反应体系中 5α-还原酶活性, $C_{转化}$ 值越高说明酶活性越高。睾酮转化率 $T(\%) = C_{转化}/C_{空白} \times 100\%$, 药物对 5α-还原酶的抑制率 $I(\%) = 1 - T$ 。

3 结果

3.1 细胞增殖试验

3.1.1 不同活性成分对 hDPC 细胞增殖的影响 乳头中的 hDPC 细胞在毛发生长中起到关键调

控作用^[18]。hDPC 细胞的数量决定了毛囊中毛干的尺寸和性状,毛发进入生长期时 hDPC 细胞的数量会显著增加^[19]。hDPC 细胞中的 β -catenin 蛋白受 Wnt 信号通路调节,对于毛发再生和毛囊生长期的维持至关重要^[20-21]。筛选促进毛发生长的活性药物时,首先必须确认候选物质对 hDPC 细胞是否有毒性,后续通过评价候选物质对 hDPC 细胞活力的影响,可以确定候选物质是否能够通过改善 hDPC 细胞活力以促进毛发生长。

图 1 结果显示,黄芩苷、雪松醇、莽草酸、米诺地尔浓度在 $0.5\sim 250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,单独用药 24 h 对 hDPC 细胞不存在细胞毒性,证明药物的细胞相容性好,且在一定浓度下还能发挥促进细胞增殖的作用,可以进行后续实验以筛选最佳的米诺地尔联合用药方案。

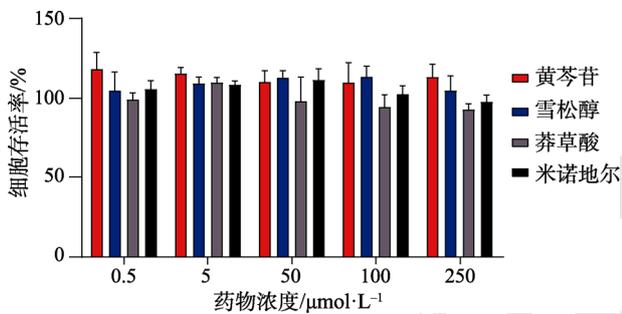


图 1 活性物质单独用药 24 h 后对 hDPC 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of active substances on the proliferation of hDPC after 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.1.2 米诺地尔与不同活性成分联用对 hDPC 细胞增殖的影响 从细胞存活率结果来看,莽草酸、黄芩苷、雪松醇 3 种中药成分与米诺地尔联合给药都具有促进 hDPC 细胞增殖的作用。

在黄芩苷-米诺地尔组和雪松醇-米诺地尔组中,相比于 1:3 和 3:1 摩尔比,1:1 摩尔比联用组的细胞存活率最高,说明黄芩苷和雪松醇与米诺地尔的最佳联用比例都是 1:1。结果见图 2。

与莽草酸-米诺地尔组相比,黄芩苷-米诺地尔 1:1 联用组($P<0.05$)和雪松醇-米诺地尔 1:1 联用组($P<0.01$)的细胞存活率显著升高。说明与莽草酸相比,黄芩苷、雪松醇与米诺地尔联用促进 hDPC 细胞增殖的作用更强。结果见图 2。

3.1.3 不同浓度的黄芩苷-米诺地尔、雪松醇-米诺地尔联合用药对 hDPC 细胞增殖的影响 与米诺地尔组相比,黄芩苷-米诺地尔(1:1)组在 0.5, 5,

$100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药浓度下,细胞存活率显著提高;与黄芩苷组相比,黄芩苷-米诺地尔(1:1)组在 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药浓度下,细胞存活率显著提高,验证了黄芩苷与米诺地尔协同促进 hDPC 细胞增殖的作用。雪松醇-米诺地尔(1:1)组在 5, 50, 100, $250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药浓度下,细胞存活率显著高于米诺地尔组;在 5, $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药浓度下细胞存活率显著高于雪松醇组,验证了雪松醇与米诺地尔可以协同提高 hDPC 细胞活力。结果见图 3。

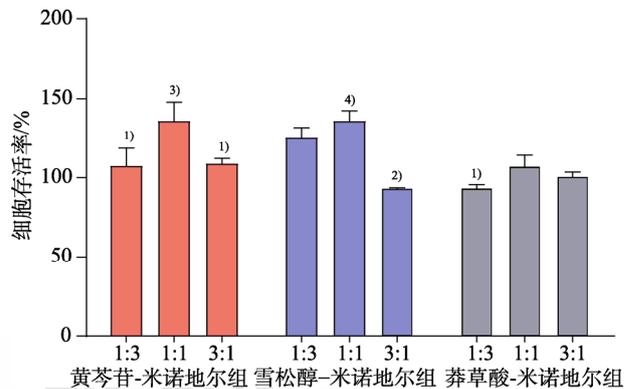


图 2 中药成分与米诺地尔联合用药 24 h 后对 hDPC 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

药物终浓度为 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与同组摩尔比 1:1 比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与莽草酸-米诺地尔组摩尔比 1:1 比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Chinese medicine ingredients combined with minoxidil on the proliferation of hDPC after 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$) The final concentration of the drug was $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; compared with the molar ratio of 1:1 in the same group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the molar ratio of shikimate-minoxidil group of 1:1, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

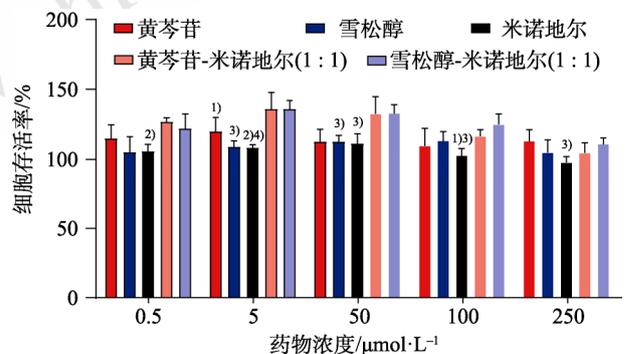


图 3 黄芩苷-米诺地尔(1:1)、雪松醇-米诺地尔(1:1)联合用药 24 h 后对 hDPC 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

与黄芩苷-米诺地尔(1:1)组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与雪松醇-米诺地尔(1:1)组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of baicalin-minoxidil(1:1) and cedrol-minoxidil(1:1) combination therapy on the proliferation of hDPC after 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Compared with the baicalin-minoxidil(1:1) group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the cedrol-minoxidil(1:1) group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.2 有效物质对雄激素性脱发小鼠的药效学考察 正常组在给药第 10 天时小鼠皮肤大部分由粉

色变为黑色，说明毛囊中的黑色素开始沉积，而给予 0.5% 睾酮处理的模型组在给药第 15 天时只有局部区域皮肤变黑；模型组的毛发再生速度、同期毛发覆盖率都明显低于正常组；通过皮肤 HE 切片可以看出，睾酮处理组毛囊数量减少，且都分布在表皮和真皮层中，大部分毛囊处于休止期。说明睾酮

处理能成功干扰毛囊由休止期向生长期转变，成功模拟了雄激素性脱发的皮肤激素环境，提示造模成功。相比于睾酮处理的造模组，不同给药组的再生毛发长度、生长期/休止期毛囊数量比都有显著性提高，说明米诺地尔与黄芩苷、雪松醇联用或单独使用都具有抗雄激素性脱发的作用。结果见图 4。

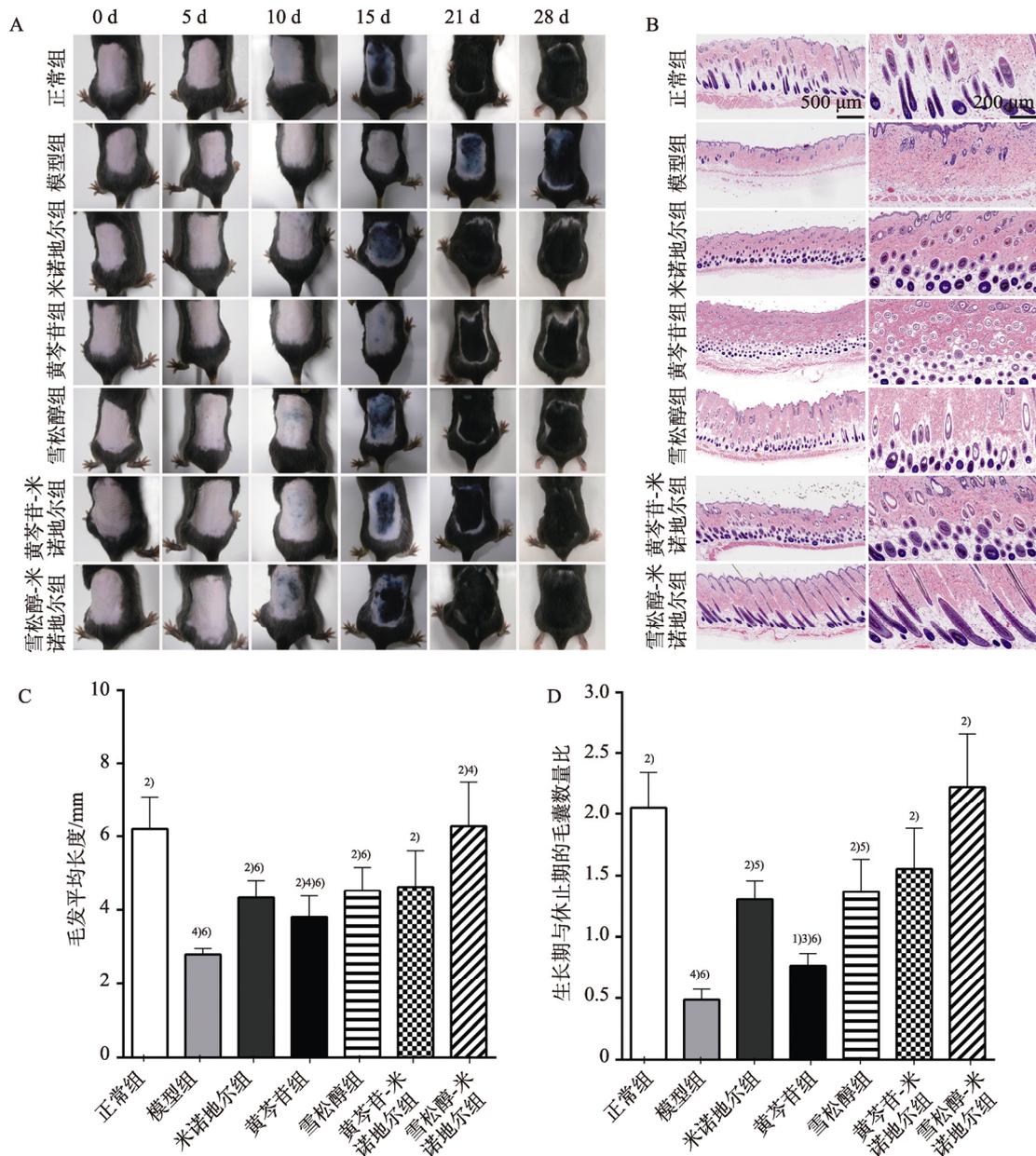


图 4 不同活性成分对睾酮诱导的雄激素脱发 C57BL/6 小鼠毛发再生作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A—于给药后 0, 5, 10, 15, 21, 28 d 拍摄的小鼠背部皮肤照片；B—于给药后第 18 天取背部皮肤组织进行 HE 染色；C—C57BL/6 小鼠再生毛发长度；D—小鼠背部皮肤生长期毛囊与休止期毛囊数量比；与模型组比较，¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ ；与黄芩苷-米诺地尔组比较，³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ ；与雪松醇-米诺地尔组比较，⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Hair regenerative effects of active substances in the testosterone-induced androgenic alopecia C57BL/6 mouse models ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A—dorsal skins were photographed at day 0, 5, 10, 15, 21 and 28; B—dorsal skin tissues of each group were collected at day 18 after treatment and subjected to HE staining; C—mean length of the hair on C57BL/6 mice; D—anagen/telogen ratio of hair follicle in C57BL/6 model mice; compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the baicalin-minoxidil group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$; compared with the cedrol-minoxidil group, ⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$.

黄芩苷-米诺地尔组的同期毛发覆盖率、再生毛发长度、生长期/休止期毛囊比例都显著优于黄芩苷组,但其相比米诺地尔组却没有显著提高,说明与黄芩苷联用无法明显地改善米诺地尔的疗效。雪松醇-米诺地尔组的同期毛发覆盖率、再生毛发长度较黄芩苷-米诺地尔组都具有显著优势。与米诺地尔组、雪松醇组相比,雪松醇-米诺地尔联用组的各药效评价指标都得到改善且存在统计学差异,说明雪松醇和米诺地尔联用,通过促进毛囊分化,诱导休止期的毛囊向生长期的转变,能对抗雄激素干扰,协同增强毛发再生的能力。结果见图4。

3.3 有效物质的 5 α -还原酶抑制试验

非那雄胺呈剂量依赖性抑制 5 α -还原酶活性,且抑制率都>(76.62 \pm 0.99)%,验证了该 5 α -还原酶活性筛选体系的可靠性。雪松醇对 5 α -还原酶的抑制率都>(69.60 \pm 0.89)%,推测雪松醇的主要起效机制之一是通过抑制 5 α -还原酶的活性来对抗雄激素性脱发。0.005~5 mmol·L⁻¹ 浓度下,雪松醇对酶活性的抑制率均高于米诺地尔组(P <0.01),说明雪松醇对 5 α -还原酶活性的抑制效果显著优于米诺地尔;雪松醇-米诺地尔组的酶抑制率与浓度呈正相关,且 2.5, 5 mmol·L⁻¹ 浓度下的酶抑制率显著高于米诺地尔组(P <0.01),说明米诺地尔与雪松醇联用可以提高对 5 α -还原酶活性的抑制作用。结果见图5。

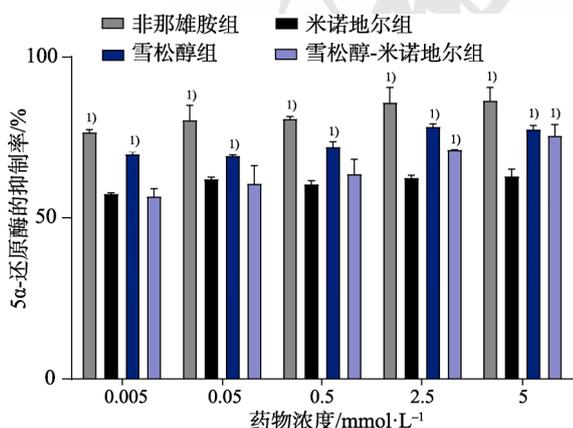


图5 不同浓度活性成分对 5 α -还原酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与米诺地尔组比较, ¹⁾ P <0.01。

Fig. 5 Inhibition effect of various concentration of active substances on the activity of 5 α -reductase ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with minoxidil group, ¹⁾ P <0.01.

4 讨论

中药成分可通过不同的起效机制发挥对抗雄激素性脱发作用。研究表明莽草酸可诱导小鼠毛

囊中 IGF-1、VEGF 的 mRNA 表达^[7]。Choi 等^[22]发现莽草酸可通过提高生长因子水平和激活 p38 MAPK-CREB 途径来促进小鼠体内毛发生长及人毛囊体外毛发生长。在体外细胞增殖试验中,莽草酸在 5 μ mol·L⁻¹ 浓度下能发挥促进 hDPC 增殖的作用;但在与米诺地尔联合给药时对于提高 hDPC 活力的协同增效作用弱于黄芩苷和雪松醇。黄芩苷可通过提高 IGF-1 和 VEGF 的表达^[6],促进 β -catenin 蛋白的表达^[9]以起到促进毛发生长的作用。此外,黄芩苷可抑制雄激素激活信号并促进 hDPC 增殖^[23]。在本研究中,黄芩苷-米诺地尔联用在体外试验中表现出良好的协同促进 hDPC 增殖的作用,但在小鼠体内药效试验中却未能显著改善米诺地尔的药效,推测原因为黄芩苷按照生物药剂学分类系统属于 IV 类化合物^[24],透皮速率和皮肤累积渗透量相对较低^[25],且研究表明醇溶液对其经皮渗透的改善效果有限^[26],由此限制了黄芩苷的药效发挥,提示或许可以借助其他促渗技术或经皮递送载体来提高黄芩苷的药效作用。

雪松醇是一种天然倍半萜醇,存在于柏科、杉科及松科等多种植物的挥发油中,目前已获 FDA 批准用于化妆品和香水中^[27]。雪松醇工艺成熟、价格低廉、皮肤相容性好,临床试验表明浓度为 8% 的雪松醇持续作用于皮肤 48 h,无明显的皮肤刺激性和皮肤过敏反应^[28]。据统计,近 50 年中医治疗雄激素性脱发涉及的外用药物中使用频次最高的中药是侧柏叶^[29-30]。现代药理研究表明侧柏叶挥发油提取物可以发挥 5 α -还原酶抑制作用以对抗雄激素性脱发^[8]。雪松醇是侧柏叶挥发油提取物中含量较高的主要成分之一。本研究表明了抑制 5 α -还原酶的活性是雪松醇发挥抗雄激素性脱发功效的重要机制;而米诺地尔对 5 α -还原酶的活性无显著抑制作用,这与文献报道一致,其起效机制包括提高皮肤血管的血流量,增加 ATP 敏感性钾离子通道的开放,刺激毛囊上皮细胞的增殖,增加 VEGF 的表达^[31-32]。本研究结果显示,能抑制 5 α -还原酶活性的雪松醇与能促进生长因子表达的米诺地尔联合用药,分别从抗雄激素性和非雄激素依赖性的 2 种不同起效机制协同促进毛发再生,能够提高 hDPC 的活力,促进毛囊分化、诱导毛囊周期转变,达到更好地对抗雄激素性脱发效果。

综上所述,中药成分与米诺地尔联合用药,协同增强了抗雄激素性脱发的作用,能够替代高剂量

米诺地尔给药方案,从而避免了其伴随的不良反
应,其中雪松醇-米诺地尔联合用药方案由于明显的
抗雄激素性脱发作用、较好的安全性和经济成本,
具有潜在的临床应用前景和商品开发价值。

REFERENCES

- [1] SUCHONWANIT P, THAMMARUCHA S, LEERUNYAKUL K. Minoxidil and its use in hair disorders: A review[J]. Drug Des Devel Ther, 2019(13): 2777-2786.
- [2] 金丽丽, 李坤, 杨义芳, 等. 抗良性前列腺增生药物作用靶点的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(3): 161-165.
- [3] CHEN X Y, LIU B, LI Y, et al. Dihydrotestosterone regulates hair growth through the Wnt/ β -catenin pathway in C57BL/6 mice and *in vitro* organ culture[J]. Front Pharmacol, 2020(10): 1528.
- [4] ZHANG J Z. Guideline for diagnosis and treatment of androgenetic alopecia[J]. J Clin Dermatol(临床皮肤科杂志), 2014(3): 182-186.
- [5] LEE E Y, CHOI E J, KIM J A, et al. *Malva verticillata* seed extracts upregulate the Wnt pathway in human dermal papilla cells[J]. Int J Cosmet Sci, 2016, 38(2): 148-154.
- [6] SHIN S H, BAK S S, KIM M K, et al. Baicalin, a flavonoid, affects the activity of human dermal papilla cells and promotes anagen induction in mice[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015, 388(5): 583-586.
- [7] SAKAGUCHI I, ISHIMOTO H, MATSUO M, et al. The water-soluble extract of *Illicium anisatum* stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture[J]. Exp Dermatol, 2004, 13(8): 499-504.
- [8] ZHANG N N, PARK D K, PARK H J. Hair growth-promoting activity of hot water extract of *Thuja orientalis*[J]. BMC Complement Altern Med, 2013(13): 1-9.
- [9] XING F, YI W J, MIAO F, et al. Baicalin increases hair follicle development by increasing canonical Wnt/ β -catenin signaling and activating dermal papillar cells in mice[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2079-2085.
- [10] LI Y F, HAN M N, LIN P, et al. Hair growth promotion activity and its mechanism of *Polygonum multiflorum*[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015(2015): 517901.
- [11] ZHANG B, ZHANG R W, YIN X Q, et al. Inhibitory activities of some traditional Chinese herbs against testosterone 5 α -reductase and effects of *Cacumen platycladi* on hair re-growth in testosterone-treated mice[J]. J Ethnopharmacol, 2016(177): 1-9.
- [12] YAO X C, GU C Z, WANG X B, et al. Review on natural plants with 5 α -reductase inhibitory effect[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26(5): 800-805.
- [13] KIM M H, CHOI Y Y, CHO I H, et al. *Angelica sinensis* induces hair regrowth via the inhibition of apoptosis signaling[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(4): 1021-1034.
- [14] TURKOGLU M, PEKMEZCI E, KILIC S, et al. Effect of *Ficus carica* leaf extract on the gene expression of selected factors in HaCaT cells[J]. J Cosmet Dermatol, 2017, 16(4): e54-e58.
- [15] FADUS M C, LAU C, BIKHCHANDANI J, et al. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent[J]. J Tradit Complement Med, 2016, 7(3): 339-346.
- [16] XU L, SHEN Y, ZHONG J H, et al. Effect of curcumin on expression of differentiation-related factors in Th17 in mice with ulcerative colitis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(1): 14-18.
- [17] LAO K J, XUN G L, GOU X C, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel androst-17 β -amide structurally related compounds as dual 5 α -reductase inhibitors and androgen receptor antagonists[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019, 34(1): 1597-1606.
- [18] ZHANG P P, KLING R E, RAVURI S K, et al. A review of adipocyte lineage cells and dermal papilla cells in hair follicle regeneration[J]. J Tissue Eng, 2014(5): 2041731414556850.
- [19] CHI W, WU E, MORGAN B A. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline[J]. Development, 2013, 140(8): 1676-1683.
- [20] ENSHELL-SEIJFFERS D, LINDON C, KASHIWAGI M, et al. Beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair[J]. Dev Cell, 2010, 18(4): 633-642.
- [21] KI G E, KIM Y M, LIM H M, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields increase the expression of anagen-related molecules in human dermal papilla cells via GSK-3 β /ERK/Akt signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 784.
- [22] CHOI M, CHOI S J, JANG S, et al. Shikimic acid, a mannose bioisostere, promotes hair growth with the induction of anagen hair cycle[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17008.
- [23] KIM A R, KIM S N, JUNG I K, et al. The inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* extract and its active compound, baicalin, on the translocation of the androgen receptor with implications for preventing androgenetic alopecia[J]. Planta Med, 2014, 80(2/3): 153-158.
- [24] WU H Y, LONG X Y, YUAN F, et al. Combined use of phospholipid complexes and self-emulsifying microemulsions for improving the oral absorption of a BCS class IV compound, baicalin[J]. Acta Pharm Sin B, 2014, 4(3): 217-226.
- [25] LI J S, LV J J, WANG X H, et al. Solubility and percutaneous penetration of total flavones from *Scutellariae Radix* and their monomer composition[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(2): 200-207.
- [26] LIU Z H, LI J S, ZHENG X, et al. Effects of penetration enhancers on *in vitro* transdermal permeation of components from total flavones in *Scutellariae Radix* Gel-unguentum[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(18): 2703-2711.
- [27] LUO F, LING Y, LI D S, et al. Characterization of a sesquiterpene cyclase from the glandular trichomes of *Leucoscepttrum canum* for sole production of cedrol in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*[J]. Phytochemistry, 2019(162): 121-128.
- [28] BHATIA S P, MCGINTY D, LETIZIA C S, et al. Fragrance material review on cedrol[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(Suppl 11): S100-S102.
- [29] WU C Y, ZHOU W, REN W M, et al. Analysis of traditional Chinese medicine in the treatment of androgenetic alopecia in the past 50 years based on data mining[J]. China Med Her(中国医药导报), 2017, 14(32): 166-169, 181.
- [30] HE X L, HUANG J H, CHEN Y G, et al. Situation analysis of traditional Chinese medicine hair care cosmetics based on social network analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(12): 1409-1416.
- [31] KELLY Y, BLANCO A, TOSTI A. Androgenetic alopecia: An update of treatment options[J]. Drugs, 2016, 76(14): 1349-1364.
- [32] WU Q F, FAN W X. Advances in the mechanisms and dosage forms of minoxidil for androgenetic alopecia[J]. Clin Dermatol J(临床皮肤科杂志), 2018, 47(2): 128-131.

收稿日期: 2021-11-09
(本文责编: 蔡珊珊)