何首乌提取物对 C57BL/6J 小鼠毛囊生长和毛发生长周期的影响

何红梅[1],朱红霞[2],刘强[2],张璐[2],刘莉[2*]
(1. 中国医药科技出版社,北京 100082; 2. 南方医科大学中医药学院,广州 510515)

[摘要] **目的:**观察何首乌提取物对 C57BL/6J 小鼠毛囊体外培养和在体毛发生长周期的影响。**方法:**对小鼠毛囊生长的影响采用 C57BL/6J 小鼠触须毛囊体外培养模型,实验分为 9 组,空白对照组(蒸馏水)、阳性对照组(章光 101)、何首乌提取物 75,150,300,600,1 200,2 500,5 000 $\mu g \cdot L^{-1}$组,24 孔板,每孔 2 枚毛囊,培养 12 d,通过观察毛发生长时间和生长速度,评价何首乌提取物对毛囊生长的影响;对小鼠毛发生长周期的影响采用 C57BL/6J 小鼠背部脱毛,分为 5 组,阳性对照组(章光 101)、空白对照组、何首乌提取物高、中、低(2,1,0.5 $g \cdot mL^{-1}$)剂量组,涂抹不同浓度的何首乌提取物,观察其对小鼠毛发生长周期的影响。**结果:**体外毛囊培养实验表明,何首乌提取物在 300,600,1 200 $\mu g \cdot L^{-1}$浓度时对毛囊生长早、中、晚期都有加速生长的作用,并可延长毛发的生长时间,且在早、中期呈现一定的剂量依赖性,与空白对照组比较均有显著性差异。其中 300 $\mu g \cdot L^{-1}$时,第 2,6,12 天毛发生长速度分别为(0.236 ± 0.061),(0.427 ± 0.078),(0.325 ± 0.054) $mm \cdot d^{-1}$,毛发生长时间为(9.60 ± 1.43) d,与空白对照组比较 $P < 0.01$,与阳性对照组比较 $P < 0.01$;600 $\mu g \cdot L^{-1}$时,第 2,6 天,毛发生长速度分别为(0.313 ± 0.044),(0.522 ± 0.084) $mm \cdot d^{-1}$,与空白对照组比较 $P < 0.01$,与阳性对照组比较 $P < 0.05$,第 12 天为(0.439 ± 0.064) $mm \cdot d^{-1}$,毛发生长时间为(11.00 ± 1.15) d,与空白对照组比较 $P < 0.01$;1 200 $\mu g \cdot L^{-1}$时,第 2,6,12 天毛发生长速度分别为(0.406 ± 0.053),(0.642 ± 0.067),(0.475 ± 0.036) $mm \cdot d^{-1}$;毛发生长时间为(12.40 ± 1.43) d,与空白对照组比较 $P < 0.01$。体内药效学实验表明,何首乌提取物较空白对照组可以使毛发从休止期进入生长期,加速毛发的生长,具有显著性差异。高剂量组时皮肤粉红到变灰的时间为(9.06 ± 0.43) d,灰色皮肤长出毛的时间为(14.68 ± 1.19) d,皮肤长满毛的时间为(26.86 ± 2.02) d,与空白对照组比较 $P < 0.01$,较中、低剂量可以加速皮肤黑色素的形成; 毛发生长后期,剂量依赖关系不明显。**结论:**何首乌提取物能诱导 C57BL/6J 小鼠毛发生长,使其从休止期进入生长期,从而加速毛发生长,体内、外实验结果一致。

[关键词] 何首乌; C57BL/6J 小鼠; 毛发生长周期; 毛囊生长
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0216-04

Influence of the Extract of Polygoni Multiflori Radix on Follicle Growth and Hair Growth of C57BL/6J

HE Hong-mei[1], *ZHU Hong-xia*[2], *LIU Qiang*[2], *ZHANG Lu*[2], *LIU Li*[2*]
(1. *China Medicament Technology Publishing Company*, *Beijing* 100082, *China*;
2. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Southern Medical University*, *Guangzhou* 510515, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the influence of the extract of Polygoni Multiflori Radix on follicle growth and hair growth of C57BL/6J. **Method**: The model of organ culture of mouse vibrissa follicle *in vitro* was used and the time and velocity of hair growth were recorded to investigate the influence of follicle growth. The experiment had 9 groups: blank control group, positive control group (Zhangguang 101), different content of the extent for 75,

---

[收稿日期] 20120929(001)
[基金项目] 广州市白云区科技计划重点项目(2011-KQ-23);广东省高校中药化妆品工程中心建设项目(GCZX-A1007)
[第一作者] 何红梅,硕士,从事药物制剂研究,Tel:13701291309,E-mail:hhm7840@ yahoo. com. cn
[通讯作者] * 刘莉,博士,副教授,从事中药制剂新技术与新剂型研究,Tel:13430359298,E-mail:shyshLL@ 163. com

150, 300, 600, 1200, 2 500, 5 000 μg·L^{-1}, 24 shadow mask, 2 folliculus pili per hole and cultivating 12 d. Treated *in vitro* on hairless mice skin was used to investigate the effects of promoting hair growth with different dose of Polygoni Multiflori Radix. This experiment had 5 groups: positive control group (Zhangguang 101), blank control group, the extract of Polygoni Multiflori Radix high dose group (2 g·mL^{-1}), medium dose group (1 g·mL^{-1}), low dose group (0.5 g·mL^{-1}). **Result**: The experiment of organ culture of mouse vibrissa follicle *in vitro* showed that the extract of Polygoni Multiflori Radix could accelerate follicle growth in the early, intermediate and terminal phases and prolong the hair growth time with the dose of 300, 600, 1 200 μg·L^{-1} in a dose-dependent manner and there were significant differences in comparison with normal group. When the content was 300 μg·L^{-1}, the velocity of hair growth were (0.236 ±0.061), (0.427 ±0.078), (0.325 ±0.054) mm·d^{-1} on the second, sixth and twelve day, the time of hair growth was (9.60 ±1.43) d, the differences were significant between the test groups with the blank control and positive control group ($P<0.01$). When the content was 600 μg·L^{-1}, the velocity of hair growth were (0.313 ±0.044), (0.522 ±0.084) mm·d^{-1} on the second and sixth day, the differences were significant between the test groups with the blank control group ($P<0.01$) and between the test groups with the positive control group ($P<0.05$), the velocity of hair growth was (0.439 ±0.064) mm·d^{-1} on the twelve day, the time of hair growth was (11.00 ±1.15) d, the differences were significant between the test groups with the blank control group ($P<0.01$). When the content was 1 200 μg·L^{-1}, the velocity of hair growth were (0.406 ±0.053), (0.642 ±0.067), (0.475 ±0.036) mm·d^{-1} on the second, sixth and twelve day, the time of hair growth was (12.40 ±1.43) d, the differences were significant between the test groups with the blank control group ($P<0.01$). The experiment of pharmacodynamics *in vivo* showed the extract of Polygoni Multiflori Radix can make hair grow from anestrum to growing period with significant difference. High dose group can accelerate the production of melanin in skin than middle and low dose group. The time of high dose group were (9.06 ±0.43) d when the skin became pale from pink, (14.68 ±1.19) d when hair came out and (26.86 ±2.02) d when hair was overgrown, the differences were significant between the test groups with the blank control group ($P<0.01$). In the later period of hair growth, the dependence on its concentration is not significant. **Conclusion**: The extract of Polygoni Multiflori Radix can lead hair growth of C57BL/6J mice from anestrum to growing period, the result of experimental *in vivo* and *in vitro* is coincident.

[**Key words**] Polygoni Multiflori Radix; C57BL/6J mice; growing phase of hair cycle; follicle growth

何首乌味苦、甘、涩,性微温,归肝、肾经,具有补肝肾、益精血的作用,不仅具有补益作用,还是一味常用的具有乌发、生发作用的传统中药,中医学认为毛发的生长与肝、肾的关系最密切,毛发的荣养根源于血,“发为血之余”,而肝主藏血,肝脏通过血液影响毛发的生长;而肾“其华在发”,调理好了肝肾,可以达到生发、乌发的效果[1]。现代许多生发、乌发类产品中均添加了何首乌提取物,但对其生发作用的药理基础研究甚少,文章对何首乌的体外毛囊培养和在体毛发生长周期进行了研究,为深入研究其生发机制提供了基础。

1 材料

1.1 动物 7~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠(SPF 级),体重 18~22 g 中山大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2011-0029。

1.2 试药 何首乌提取物(何首乌饮片购自广州广弘药材有限公司,经南方医科大学中医药学院药用植物与鉴定教研室陈兴兴副教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根,含 2,3,5,4′-四羟基二苯乙烯-2-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷不少于 1.0%。何首乌提取物由南方医科大学中药制剂学教研室提供,采用 75% 乙醇提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩至每 1 mL 相当于原药材 2 g,用时双蒸水稀释,过 0.22 μm 微孔滤膜,);章光 101B 防脱育发剂(北京章光 101 集团公司);William E 无血清培养基(Sigma 公司);水为双蒸水,试剂为分析纯。

1.3 仪器 ECLIPSE Ti-S 双端口倒置显微镜(日本尼康)。

2 方法

2.1 对 C57 小鼠触须毛囊生长的影响

2.1.1 毛囊的分离[2-3] C57BL/6J 鼠处死,剪去双

侧胡须,75% 乙醇消毒上唇部,无菌生理盐水冲洗,无菌条件下剪取双侧胡须垫,置于 Hank's 液中,分离并轻取胡须垫眼侧毛囊,每个胡须垫可取 7~9 只毛囊,选完整生长期毛囊(毛乳头大、光滑圆润、真皮组织鞘完整且与外皮根鞘无分离者)用于培养。

2.1.2 分组 实验分为 9 组,空白对照组(涂抹蒸馏水)、阳性对照组(章光 101)、何首乌提取物质量浓度 75,150,300,600,1200,2 500,5 000 $\mu g \cdot L^{-1}$组。

2.1.3 毛囊的培养 毛囊培养均在 24 孔板中进行,加入 William E 无血清培养基,37℃,5% CO_2 条件下孵育 12 h,选取形态完好,生长速度相似的毛囊,每组 5 孔,每孔加 2 枚毛囊,加入待测液,继续培养 12 d。

2.1.4 检测指标

2.1.4.1 长度测定 每日于倒置显微镜下测量毛发长度(毛囊底部至毛发顶部的距离)。

2.1.4.2 生长速度的测定 相邻 2 次测量的毛发长度差与天数的比值($mm \cdot d^{-1}$)。

2.1.4.3 生长时间的测定 毛发与前 1 d 的长度相比不再变长时的天数(d)。

2.2 对 C57 小鼠毛发生长周期的影响

2.2.1 分组及给药 动物饲养 1 周后,分为 5 组,阳性对照组(涂抹章光 101)、空白对照组(涂抹蒸馏水),何首乌提取物高剂量组($2\ g \cdot mL^{-1}$)、中剂量组($1\ g \cdot mL^{-1}$)、低剂量组($0.5\ g \cdot mL^{-1}$),每组 10 只。给药前 24 h 将小鼠背部用温和脱毛剂[4]脱毛,去毛面积 4 cm^2,每日涂一次药液($7.5\ mL \cdot kg^{-1}$),连续涂至背部去毛区毛发全部长出。

2.2.2 毛发生长周期情况 每天观察小鼠皮肤及被毛生长情况,记录每只小鼠去毛区皮肤颜色由粉红色变成灰色的时间和由灰色至长满毛发的时间。

3 结果

3.1 对毛发生长速度和毛发生长时间的影响 何首乌提取物 75, 150 $\mu g \cdot L^{-1}$在毛发生长早期和中期有加速毛发生长速度的作用,并延长毛发的生长时间,与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。300, 600, 1 200 $\mu g\ L^{-1}$在毛发生长早、中、晚期都有加速毛发生长速度的作用,在早、中期呈现一定的剂量依赖性,与空白对照组均有显著性差异,并可显著延长毛发的生长时间。高剂量组5 000,2 500 $\mu g\ L^{-1}$可抑制毛发生长,缩短毛发生长的时间,可能与浓度过高,产生细胞毒性有关。见表 1。

3.2 对 C57 小鼠毛发生长周期的影响 小鼠脱毛后,皮肤呈现粉红色,毛发进入休止期,涂药 7~10 d 后,阳性对照药组和何首乌高剂量组小鼠皮肤开始发黑,12~15 d 后中、低剂量组开始变黑,14~16 d 后,空白组开始变黑,空白对照组与阳性对照组和高、中剂量组之间均有显著性差异,阳性对照组与中、低剂量组之间存在显著性差异。涂药 13~17 d 后,阳性对照药组和何首乌高、中剂量组黑色皮肤开始长出毛发,17~19 d 后,低剂量组开始长出毛发,19~21 d 后,空白组开始长出毛发。各给药组与空白对照组均有显著性差异。阳性对照组与高、中剂量组之间无显著性差异,与低剂量组之间有显著性差异。高、中剂量组之间无显著性差异,与低剂量组则有显著性差异。其剂量依赖性不明显。涂药26~29 d 各给药组均长满毛发,各组间时间无显著性差异。提示在生长后期,生发作用已无明显的剂量依赖关系。空白与各组有显著性差异。见表 2 和图 1。

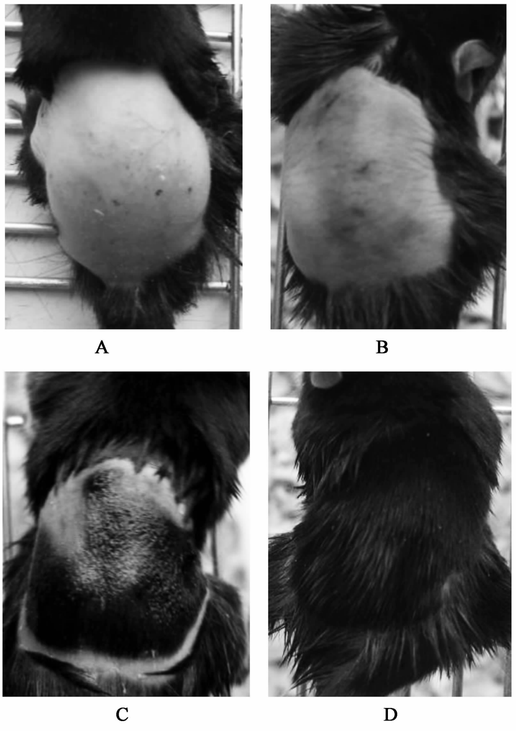
表 1 何首乌提取物对毛发生长速度和毛发生长时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度 /$\mu g \cdot L^{-1}$	毛发生长速度/$mm \cdot d^{-1}$ 2 d	6 d	12 d	毛发生长时间 /d
空白对照组	-	0.089 ± 0.017	0.228 ± 0.025	0.142 ± 0.045	7.00 ± 1.70
何首乌提取物	75	0.148 ± 0.067$^{1)}$	0.331 ± 0.058$^{1)}$	0.143 ± 0.046	8.30 ± 1.42$^{2,3)}$
	150	0.153 ± 0.063$^{1)}$	0.340 ± 0.048$^{1)}$	0.155 ± 0.047	8.50 ± 0.85$^{2,3)}$
	300	0.236 ± 0.061$^{1,3)}$	0.427 ± 0.078$^{1,3)}$	0.325 ± 0.054$^{1,3)}$	9.60 ± 1.43$^{1,3)}$
	600	0.313 ± 0.044$^{1,4)}$	0.522 ± 0.084$^{1,4)}$	0.439 ± 0.064$^{1)}$	11.00 ± 1.15$^{1)}$
	1 200	0.406 ± 0.053$^{1)}$	0.642 ± 0.067$^{1)}$	0.475 ± 0.036$^{1)}$	12.40 ± 1.43$^{1)}$
	2 500	0.057 ± 0.012	0.141 ± 0.084$^{1)}$	0	5.60 ± 1.26$^{2,3)}$
	5 000	0.038 ± 0.022$^{2)}$	0	0	5.30 ± 0.82$^{2,3)}$
章光 101	600	0.372 ± 0.079$^{1)}$	0.576 ± 0.064$^{1)}$	0.471 ± 0.067$^{1)}$	11.30 ± 1.64$^{1)}$

注:与空白对照组比较$^{1)}$ $P < 0.01$,$^{2)}$ $P < 0.05$,与阳性对照组比较$^{3)}$ $P < 0.01$,$^{4)}$ $P < 0.05$(表 2 同)。

表 2 何首乌提取物对 C57 小鼠毛发生长周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /g·kg⁻¹	皮肤粉红到变灰的时间 /d	灰色皮肤长出毛的时间 /d	皮肤长满毛的时间 /d
空白对照组	-	15.04 ± 1.05	20.42 ± 1.31	45.02 ± 2.12
何首乌提取物	15	9.06 ± 0.43 1)	14.68 ± 1.19 1)	26.86 ± 2.02 1)
	7.5	13.88 ± 0.98 2)3)	15.46 ± 1.71 1)	27.21 ± 1.87 1)
	3.75	14.13 ± 1.81 3)	17.94 ± 1.68 1,3)	28.27 ± 2.13 1)
章光 101	7.5	8.59 ± 0.87 1)	14.94 ± 0.98 1)	27.39 ± 1.23 1)



A. 进入休止期的皮肤(粉红色);B. 皮肤开始变灰;
C. 皮肤开始长毛;D. 背部全部长满毛

图 1 小鼠涂药后无毛区皮肤变化情况

4 讨论

何首乌含有二苯乙烯苷类、蒽醌类、卵磷脂类、糖类等多种物质,可以促进黑色素的合成,调节神经,滋养发根,改善头皮内血液循环和毛囊的环境,因此在民间常用于固发和乌须发。

毛囊的体外培养模型主要有两大类:一是人头皮毛囊,二是小鼠触须的毛囊。小鼠繁殖快,鼠龄易控制,而且小鼠触须毛囊体积大,分离较易,因此我们选用小鼠触须毛囊作为体外培养的模型[5]。研究表明 C57BL/6J 小鼠触须毛囊在体外培养中比 BALB/c 乳鼠毛囊存活时间长,而且出生 35 ~65 d 的 C57BL/6J 小鼠触须毛囊体外培养生长优于出生 7 d 的乳鼠,存活率也较乳鼠高[6]。因此我们选用出生 7 ~ 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠生长期毛囊进行体外培养。由于血清中可能存在某些抑制毛囊生长的因子,故选用 Willams E 无血清培养液。

C57BL/6 小鼠是用来观察毛发生长周期常用的动物模型,其躯干皮肤的黑色素细胞只存在于毛囊中,且仅于生长期时合成黑色素并传递给角质细胞,使皮肤变为黑色,至退行期,黑色素合成减少,皮肤呈灰色,至休止期黑色素合成完全停止,使皮肤恢复至粉红色[7],C57BL/6J 黑毛小鼠出生 7 周后,毛发生长即进入休止期[8]。脱毛后,局部可被诱导出高度同步的新毛发周期,皮肤颜色变化与毛发周期变化一致,故可从皮肤颜色变化来推断毛发周期变化。实验结果显示何首乌可以使小黑鼠 C57BL/6J 黑毛小鼠的毛发由休止期进入生长期,从而促进毛发的生长。

[参考文献]

[1] 杨丽娟. 从古方看何首乌"乌发、生发"的应用[J]. 中医药通报, 2008,7(3):39.

[2] 傅琳玲,朱文元. 单味中药对体外培养毛囊生长影响的研究[J]. 中国皮肤性病学杂志,2000,14(2):92.

[3] 薛芬,赵章光,赵胜霞. 章光 101 生发系列产品对 C57BL/6J 小鼠触须毛囊体外培养的研究[J]. 延安大学学报:医学科学版,2009,7(3):7.

[4] 余建强,闫琳,郑萍,等. 实验动物脱毛剂的改良与应用[J]. 宁夏医学院学报, 2001,23(4):296.

[5] 王继文,郝飞. 毛囊实验研究的模型[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,2004,30(5):314.

[6] 范卫新,朱文元,雷铁池. 小鼠触须毛囊体外培养的研究[J]. 中华皮肤科杂志,1992,2(32):28.

[7] 杨亚军,王冬春, 周秋贵,等. 水溶性米诺地尔对 C57BL/6 小鼠毛发生长影响的研究[J]. 海峡药学, 2007,(7): 34.

[8] 李卫江. 银杏叶萃取物的生发效果和改善毛细血管血液循环效果[J]. 日用化学工业译丛,1994,4:36.

[责任编辑 聂淑琴]