

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.001

· 基础研究 ·

黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子混合提取物对体外培养毛囊生长的影响及药理作用研究*

徐 莲 吴 岚 王 雪 刘文娟 周立军[△]

(天津大学 天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室 天津 300072)

摘要 目的:通过体内实验探讨黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子混合中药提取物对毛囊增殖的影响作用以及其作用机理。**方法:**通过体外培养的 C57BL/6 小鼠毛囊器官模型观察不同浓度中药提取物对毛囊生长的影响;采用 MTT 法测定不同浓度中药提取物对毛乳头增殖的影响;蛋白免疫印迹法(Western Blot)和 ELISA 检测中药提取物对毛乳头细胞分泌肝细胞生长因子(HGF)的影响。**结果:**中药提取物能够刺激体外培养的小鼠毛囊的生长,800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的促进作用最强;160 $\mu\text{g/mL}$ 中药提取物对毛乳头细胞的增殖作用最强,与米诺地尔、齐墩果酸阳性对照存在显著性差异($P<0.05$)。而且,药提取物促进了毛乳头细胞分泌 HGF。**结论:**黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子混合中药提取物在促进毛发生长中起到重要作用,促进毛乳头细胞增殖和分泌 HGF 是促进毛囊生长的可能性药理机制。

关键词: 中药提取物;毛囊;毛乳头细胞;肝细胞生长因子(HGF)

中图分类号: Q285.5; R751 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)22-4201-04

Effect and Pharmacomechanisms of a Mixed Chinese Herbal Medicine Extract on Hair Follicle Growth in Vitro*

XU Lian, WU Lan, WANG Xue, LIU Wen-juan, ZHOU Li-jun[△]

(Tianjin University, Key laboratory of modern drug delivery and function efficiency, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT Objective: We have investigated here effects of a mixed Chinese herbal medicine extract, comprising of Astragalus mongholicus, Polygonum multiflorum, Ligustrum lucidum, and Semen cuscuteae, on hair follicle growth and its mechanism of action through in vitro assays. **Methods:** Organ model was carried out on cultured hair follicles of C57BL/6 mice in vitro to detect the effect of Chinese herbal medicine extract on hair follicle growth; The effect of Chinese herbal medicine extract on the proliferation of dermal papilla cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Western blot and ELISA were used to detect the level of HGF secreted by dermal papilla cells. **Results:** Chinese herbal medicine extract stimulated the growth of cultured mice hair follicle in vitro. 800 $\mu\text{g/mL}$ had the best promoting effect on the growth of hair follicles. Using follicle dermal papilla cells prepared from mice hair follicle, we showed that Chinese herbal medicine extract promoted maximum proliferation of follicle dermal papilla cells at concentration of 160 $\mu\text{g/mL}$, which is significantly different from cells treated with minoxidil or oleanolic treated cells ($P<0.05$). Moreover, Chinese herbal medicine extract enhanced secretion of HGF from dermal papilla cells. **Conclusion:** Chinese herbal medicine extract, which contains Rhizoma Chuanxiong, Radix Salviae Miltiorrhizae, Fructus Ligustri Lucidi and Semen Cuscuteae, plays a role in hair follicle growth, probably by promoting the proliferation of dermal papilla cells and enhancing secretion of HGF.

Key words: Chinese herbal medicine extract; Hair follicle; Follicle dermal papilla cells; Hepatocyte growth factor (HGF)

Chinese Library Classification (CLC): Q285.5; R751 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4201-04

前言

目前,遭受脱发困扰的人越来越多,而且越来越年轻化。中药应用于脱发治疗的历史已很悠久,在药理机制的研究上也不是很透彻。

毛囊是调控毛发周期更新的一个重要器官,毛囊内的细胞

具有生长、退行和休止三个周期,受多种信号的调控^[1],很多脱发都有毛囊内细胞的凋亡有关。毛乳头于毛囊球部基底部,是毛囊最重要的真皮成分,毛乳头细胞通过与上皮的相互作用决定着毛囊的形成、生长发育^[2-4],其功能涉及毛囊周期的正常转换和毛囊的大小等。

本实验中用 C57BL/6 小鼠动物模型、毛囊器官模型、毛乳

* 基金项目:天津市应用基础及前沿技术 Research 计划(11JCZDJ16300)

作者简介:徐莲(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤及遗传性疾病的基因治疗、再生医学的研究

[△] 通讯作者:周立军,副教授,博士, Email: ljshun@hotmail.com

(收稿日期:2014-02-23 接受日期:2014-03-20)

头细胞模型研究了黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子混合中药提取物的药理作用。

1 材料与方法

1.1 材料

生药黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子(购自天津协和药店), C57BL/6 小鼠(购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心),米诺地尔(购自常州市武进振宇化工有限公司),齐墩果酸(购自天津一方科技有限公司),甲苯胺蓝(购自上海生工生物工程有限公司),兔抗-HGF 单克隆抗体、兔抗- β -actin 单克隆抗体、羊抗兔 IgG-HRP (博士德生物工程有限公司), 小鼠 HGF ELISA 试剂盒(R&D)。

1.2 方法

1.2.1 中药混合提取物的制备 取四味生药黄芪、何首乌、女贞子和菟丝子各 10 g, 在 200 mL 水中浸泡过夜, 然后加热回流提取 2 h, 抽滤, 收集滤液, 药渣再 100 mL 水继续加热回流 1 h, 抽滤之后, 合并滤液, 旋转蒸发, 将中药混合提取液浓缩为 100 mL, 此时各味中药的浓度为 0.1 g/mL, 经过 120 °C 高压蒸汽灭菌 30 min 后, 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 毛囊试验 参照 McGee 分离毛囊的方法^[9] 在 C57BL/6 小鼠胡须处获取完整的毛囊分置于 24 孔板中, 加入 DMEM 无血清培养基(含青霉素 G 钠 100 U/mL、硫酸链霉素 100 U/mL)中, 5% CO₂, 37 °C 培养。将提取的 0.1 g/mL 中药混合提取物、米诺地尔和齐墩果酸阳分别用无血清 DMEM 稀释为所需的浓度, 经 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤后备用(下面的实验也用同样的方法进行药物稀释)。实验分为 7 组(中药提取物 32 μ g/mL、160 μ g/mL、800 μ g/mL、4000 μ g/mL, 0.5 mM 米诺地尔阳性对照^[6], 130 μ g/mL 齐墩果酸阳性对照^[7]和空白阴性对照), 每组 8 根毛囊。每天在倒置显微镜下, 通过目镜测微器测量毛囊底部到毛发顶部的长度, 计算 48h 后毛囊的增长的长度。

1.2.3 毛乳头细胞的培养和鉴定 参照林常敏改良一步酶消化法^[8]并略加改良, 简要步骤如下: C57BL/6 小鼠处死后胡须处用 75 %酒精消毒, 取下胡须处皮肤, 75 %酒精消毒 2 次, 无菌 PBS 中漂洗 6 次, 然后用手术剪将真皮-皮下组织处剪开, 轻压皮下组织显露出毛囊尖端, 用眼科镊夹持毛囊中下部将其从皮下组织中拔出, 之后加入 5 mL 的 2 mg/mL I 型胶原酶, 在 37 °C 细胞培养箱中消化 2 h 左右, 观察真皮鞘较为松散, 但仍包裹毛乳头时, 消化液中加入等体积的胎牛血清中止消化, 之后用 10 mL 注射器的针头将毛乳头从毛囊上拨下来, 用微量移液器收集无杂质黏附的毛乳头加入含有 20 %胎牛血清的 DMEM (含青霉素 G 钠 100 U/mL、硫酸链霉素 100 U/mL)于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养, 第 4~6 代细胞用于试验。利用毛乳头细胞的异染特性采用甲苯胺蓝染色的方法对毛乳头细胞进行鉴定^[9]。

1.2.4 毛乳头细胞生长的 MTT 试验 预实验发现 130 μ g/mL 的齐墩果酸对毛乳头细胞的促增殖作用最大, 我们将这个结果作为 MTT 试验的对照。将第 4 代毛乳头细胞以每孔 103 个细胞接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后将培养液吸除, 分别加入 10 组药物(中药提取物 1.28 μ g/mL、6.4 μ g/mL、32 μ g/mL、

160 μ g/mL、800 μ g/mL、0.1 μ M 米诺地尔阳性对照组^[10]、130 μ g/mL 齐墩果酸阳性对照组和空白阴性对照组)180 μ L, 每组 8 个复孔。之后分别在 24 h、48 h 和 72 h 进行呈色, 取出 96 孔板, 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 200 μ L DMSO, 振荡 30 min。选择 570 nm 波长, 用酶标仪测定各孔吸收值。

1.2.5 HGF 分析的 Western Blot 试验 取第 4 代的毛乳头细胞用 PBS 洗涤后加入无血清的药物(中药提取物 160 μ g/mL、0.1 μ M 米诺地尔阳性对照、130 μ g/mL 齐墩果酸阳性对照、阴性对照)培养 48 h, 培养液和细胞分别收集用于 Western Blot。

1.2.6 ELISA 酶联免疫试验 取第 4 代的毛乳头细胞于 96 孔板, 当细胞稳定贴壁后弃培养液用 PBS 洗涤后加入无血清的药物(1.28 μ g/mL, 6.4 μ g/mL, 32 μ g/mL, 160 μ g/mL 和 800 μ g/mL 中药提取物, 130 μ g/mL 齐墩果酸和 0.1 μ M 米诺地尔阳性对照, DMEM 作为阴性对照)培养 48 h 后, 收集其相应的上清液依照 HGF 试剂盒说明进行 ELISA, 用酶标仪测量试验结果, 进行 6 次相同实验进行数据统计。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件, 采用单因素方差分析, 当 P<0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中药提取物对小鼠毛囊生长的影响

通过对 C57BL/6 小鼠获得的毛囊的培养和观察, 如图 1 中药提取物在 32~800 μ g/mL 浓度范围内, 对含毛乳头细胞的毛囊生长的促进呈浓度依赖性增长, 800 μ g/mL 的促进作用最强。高剂量组 4000 μ g/mL 对毛发的促生长作用减弱。

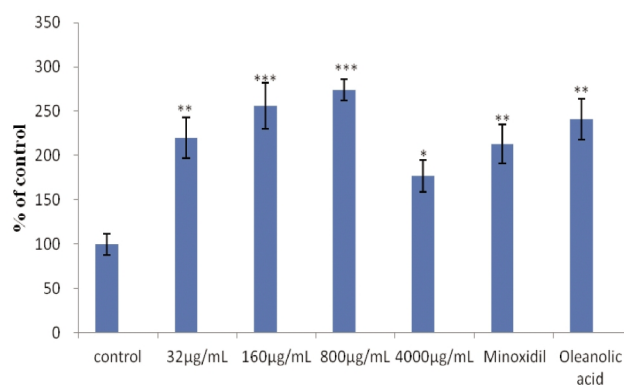


图 1 中药提取物及阳性对照对毛囊生长的影响

Fig. 1 Effects of Chinese herbal medicine extract and positive control group on growth of hair follicles

注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Notes: Compared with control, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.2 中药提取物对毛乳头细胞的增殖的影响

毛乳头细胞鉴定结果, 细胞被低 pH 值的甲苯胺蓝染成蓝色, 随 pH 值升高, 细胞逐渐被染成紫红色(图 2)。如图 3 毛乳头细胞的生长通过 MTT 实验测得, 中药提取物在 1.28~160 μ g/mL 浓度范围内, 对毛乳头细胞的增殖作用呈浓度依赖性增长, 其中 160 μ g/mL 的作用最大, 与阴性对照存在显著性差异(P<0.05), 也超过了米诺地尔和齐墩果酸阳性对照的作用。

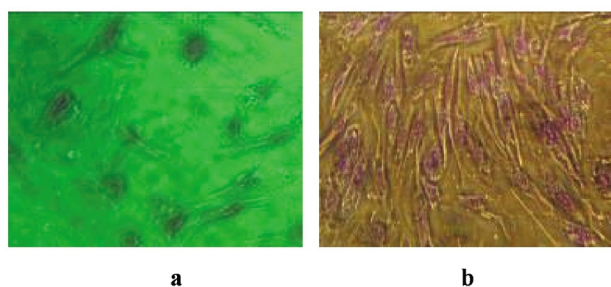


图2 甲苯胺蓝染色结果($\times 200$)a:pH0.5 时甲苯胺蓝的染色结果;b:pH6.0 时甲苯胺蓝的染色结果

Fig. 2 Staining using Toluidine Blue ($\times 200$) a: Toluidine Blue staining at pH 0.5; b: Toluidine Blue staining at pH 6.0

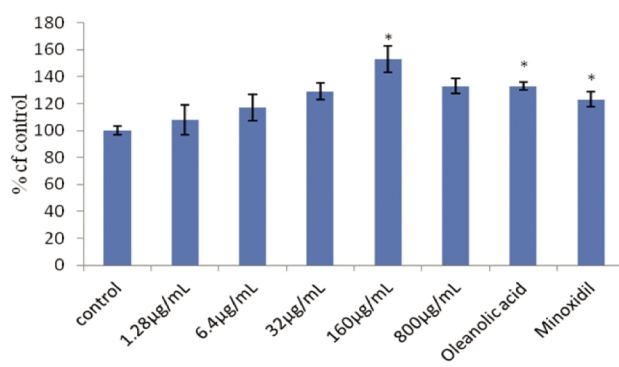


图3 各种药物对毛乳头细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of CHME on proliferation of dermal papilla cells

注:与对照组比较,* $P<0.05$

Notes:Compared with control, * $P<0.05$

2.3 中药对毛乳头细胞分泌 HGF 的影响

为进一步研究中药提取物对毛乳头细胞的作用,我们通过 Western blot 分析药物作用下毛乳头细胞 HGF 的表达,结果显示中药提取物促进了 HGF 的表达(图 4)。图 5, 中药提取物对毛乳头细胞的 HGF 分泌呈浓度依赖性增长, 其中 800 $\mu\text{g/mL}$ 的作用最大。与阴性对照相比 800 $\mu\text{g/mL}$ 中药提取物,米诺地尔,齐墩果酸存在显著性差异($P<0.05$)。

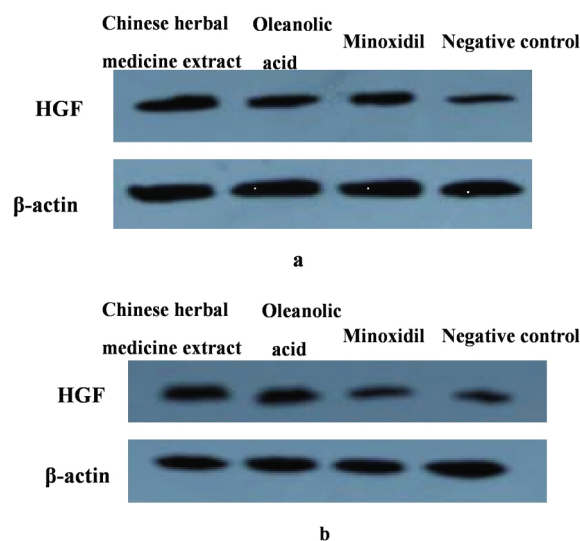


图4 Western blot 分析毛乳头细胞 HGF 的表达 a.毛乳头细胞中的 HGF; b.毛乳头细胞分泌的 HGF

Fig. 4 Analysis of HGF expression from dermal papilla cells by Western blot a. HGF exists in dermal papilla cells; b: HGF secreted from dermal papilla cells

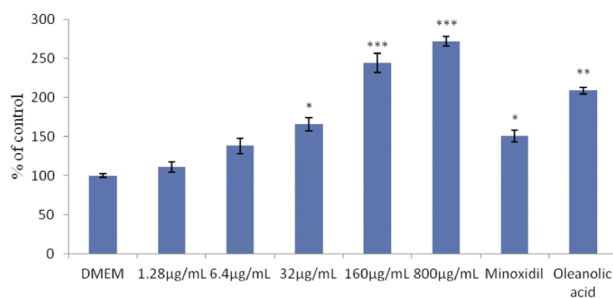


图5 不同药物对毛乳头细胞分泌 HGF 的影响

Fig. 5 The effects of different drugs on the production of HGF in the dermal papillae

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Notes:Compared with control, * $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

3 讨论

我们根据临床上用于脱发治疗的一些经验方法,在配方和制作方法上有所改进,选择了黄芪、何首乌、女贞子和菟丝子四味中药进行研究。目前已报导有这四种中药的单剂实验。

对于黄芪、何首乌、女贞子和菟丝子单剂的研究古已有之,《本草纲目》认为女贞子能“补肝肾,安五脏,强腰筋,明耳目,乌须发”;黄芪补气固表,紧束发根;菟丝子平补肝肾;何首乌补肝肾、益精血、乌须发,《本草纲目》谓之“能养血益肝,固精益肾,健筋骨,乌须发”。

通过检测 mRNA 水平的体外实验证明女贞子能够促进毛囊 HGF 和 VEGF 的表达^[1],何首乌、黄芪、女贞子中药的混合煎剂可能在一定程度上抑制培养的猪毛囊内细胞凋亡,促进毛发生长,延缓其进入退行期^[12]。菟丝子是传统的一味促毛发生长的中药,已有报道中药菟丝子水提取物能诱导毛囊黑色素细胞分化,这与它能够增强酪氨酸酶的活性有关^[13]。范卫新^[17]等研究 55 种中药对体外培养的小鼠触须毛囊的生长的影响结果发现单味中药煎剂首乌、菟丝子的单剂不能促进毛囊的生长,齐墩果酸、女贞子、黄芪对毛囊有明显促生长作用,其中齐墩果酸促毛囊生长作用最强,齐墩果酸促毛囊生长作用呈浓度依赖性,130 $\mu\text{g/mL}$ 时,促生长作用达到高峰。本实验结果发现 800 $\mu\text{g/mL}$ 中药提取物比米诺地尔和齐墩果酸更能有效的促进含毛囊的生长。说明我们黄芪、何首乌、女贞子和菟丝子四味中药的配伍加强了各成分间的协同作用,更有效的促进了毛囊的生长。高剂量组 4000 $\mu\text{g/mL}$ 对毛发的促生长作用大大减弱,可能与中药浓度过高时,产生细胞毒性作用有关。

毛乳头细胞是一群位于毛囊基底部的真皮源性细胞,毛乳头细胞可诱导和维持毛球部上皮细胞的生长和分化^[14],体外传代培养的毛乳头细胞仍保留其诱导能力^[15-17]。伍津津等人利用毛乳头细胞在体外进行三维培养一段时间后移入裸鼠体内,成功诱导出了大量的毛囊和毛发纤维,证明了是诱导毛囊形成、毛发产生的关键细胞^[18]。

为进一步了解中药提取物对毛囊的作用机理,我们分离得到毛乳头细胞并研究了中药提取物、米诺地尔、女贞子单剂、齐墩果酸对毛乳头细胞的生长和 HGF 的分泌的作用,而 160 $\mu\text{g/mL}$ 的中药提取物比齐墩果酸以及米诺地尔对毛乳头细胞

生长的促进作用强。HGF 是一种具有促分裂、促运动和促形态发生的多功能蛋白,在鼠器官培养模型中能促进毛囊生长^[9]。HGF 是由毛乳头细胞分泌产生的来促进毛乳头细胞的生长。当毛囊培养用不同的药物及不同浓度的中药提取物刺激时,800 $\mu\text{g/mL}$ 的中药提取物分泌的 HGF 的量最多,这个浓度与刺激毛囊生长的最佳浓度一致。因此,黄芪、何首乌、女贞子、菟丝子混合提取物可能通过刺激毛乳头细胞分泌 HGF 来促进毛囊的生长。

参考文献(References)

- [1] Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial—mesenchymal interactions during hair follicle cycling [J]. J Invest Dermatol Syrup Proc, 2003,8(1):46-55
- [2] Chuong CM, Cotsarelis G, Stenn K. Defining hair follicles in the age of stem cell bioengineering [J]. J Invest Dermatol, 2007,127 (9): 2098-2100
- [3] Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, et al. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(9):2106-2115
- [4] Zheng Y, Du X, Wang W, et al. Organogenesis from dissociated cells: generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells[J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(5):867-876
- [5] McGee E, Spears N, Minami S, et al. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone [J]. Endocrinology, 1997, 138(6): 2417-2424
- [6] Buhl AE, Waldon DJ, Kawabe TT, et al. Minoxidil stimulates mouse vibrissa follicles in organ culture[J]. J Invest Dermatol, 1989, 92(3): 315-320
- [7] 范卫新,朱文元.55 种中药对小鼠触须毛囊体外培养生物学特性的研究[J]. 临床皮肤科杂志,2001,30(2):81-84
Fan Wei-xin, Zhu Wen-yuan. Effect of Chinese herbal medicines on the biology of mouse vibrissa follicles in vitro [J]. Chin J Dermatol, 2001,30(2):81-84
- [8] 林常敏,李宇,蔡湘娜,等.改良一步酶消化法分离培养人头皮毛乳头细胞的实验研究 [J]. 中国实用美容整形外科杂志,2006,17(2): 135-137
Lin Chang-min, Li Yu, Cai Xiang-na, et al. Study of improved one step digestive treatment for isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells abstract [J]. Chinese J Pract Aesth Plast Surg, 2006, 7(2):135-137
- [9] 伍津津,刘荣卿,钟白玉,等.人毛乳头细胞组织化学研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1998,7(2):231-235
Wu Jin-jin, Liu Rong-qing, Zhong Bai-yu, et al. The histochemical study on human hair papilla cells [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1998, 7(2):231-235
- [10] Han JH, Kwon OS, Chung JH, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle[J]. J Dermatol Sci, 2004, 34(2):91-98
- [11] 范卫新,朱文元. 中药对小鼠毛囊生长周期中生长因子 mRNA 表达的影响[J]. 中华皮肤科杂志,2000,33(4):229-231
Fan Wei-xin, Zhu Wen-yuan. Expression of growth factor mRNA in hair follicles cultured with some Chinese herbs [J]. Chin J Dermatol, 2000, 33(4):229-231
- [12] 张兴洪,范卫新.何首乌、女贞子等中药煎剂对体外培养的猪毛囊毛发生长的影响[J]. 中华皮肤科杂志,2005,38(2):102-104
Zhang Xing-hong, Fan Wei-xin. Effect of some traditional Chinese herbs on hair growth of pig hair follicle in vitro [J]. Chin J Dermatol, 2005, 38(2):102-104
- [13] 李晓捷,尤海燕,杨晶,等. 中药菟丝子水提取物促毛囊黑色素细胞分化的实验研究[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(1):4-13
Li Xiao-jie, You Hai-yan, Yang Jing, et al. Aqueous extract of cuscutha chinensis lam induces differentiation of amelanotic melanocytes of human hair follicles.[J]. Chin J Dermatol, 2008, 22(1):4-13
- [14] Elliott K, Stephenson TJ, Messenger AG. Differences in hair follicle dermal papilla volume are due to extracellular matrix volume and cell number: implications for the control of hair follicle size and androgen responses[J]. J Invest Dermatol, 1999, 113(6):873-877
- [15] Jahoda CA, Horne KA, Oliver RF. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells [J]. Nature, 1984, 311 (5986):560-562
- [16] Matsuzaki T, Yoshizato K. Role of hair papilla cells on induction and regeneration processes of hair follicles [J]. Wound Repair Regen, 1998, 6(6):524-530
- [17] Oliver RF, Jahoda CA. Dermal-epidermal interaction [J]. Clin Dermatol, 1988, 6(4): 74-82
- [18] 伍津津,刘荣卿,麦跃,等.毛乳头细胞诱导毛囊形成的研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2003,17(2):108-112
Wu Jin-jin, Liu Rong-qing, Mai Yue, et al. Study on hair follicle formation induced by dermal papilla cell [J]. Chinese J of Reparative and reconstructive surgery, 2003, 17(2):108-112
- [19] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-159