

分类号密级_____Q96_____

UDC _____

公开_____

学位论文

白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢模型小鼠脱发的作用研究

Hair Growth Promoting Effect of White wax and
Policosanol on the Mouse Model of Testosterone Induced
Hair Loss

王占娣

指导教师姓名	陈晓鸣研究员
申请学位级别	博士
专业名称	森林保护学
研究方向	资源昆虫
论文提交日期	2017 年 4 月
论文答辩日期	2017 年 6 月
学位授予日期	2017 年 7 月

答辩委员会主席
评阅人

中国林业科学研究院

学位论文

白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢模型小鼠脱发的作用研究

学位论文作者	王占娣
指导教师姓名	陈晓鸣研究员
指导小组成员	冯颖研究员
申请学位级别	博 士
专 业 名 称	森林保护学
研 究 方 向	资源昆虫
论文答辩日期	2017 年 6 月



中国 · 北京

Dissertation for the Degree

Hair Growth Promoting Effect of White wax and Policosanol on the Mouse Model of Testosterone Induced Hair Loss

Candidate:	WangZhan Di
Supervisor:	Prof. Chen Xiao Ming
Associate Supervisor:	Prof. Feng Ying
Academic Degree Applied for:	Doctor Degree
Speciality:	Forest Protection
Date of Defence:	June, 2017
Degree-conferring-institution:	Chinese Academy of Forestry

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得本研究生培养单位或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：王占娣

日期：2017年6月10日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解中国林业科学研究院有关保留、使用学位论文的规定，中国林业科学研究院有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权中国林业科学研究院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：王占娣

导师签名：王占娣

2017年6月10日

2017年6月10日

学位论文作者毕业联系方式

工作单位：

联系电话：

电子邮件：

通讯地址、邮编：

摘要

脂溢性脱发是当今三大脱发之一，多发生于男性，且随着压力和饮食结构的改变，脂溢性脱发越来越偏向于年轻化，给年轻人的自尊带来了很大的伤害。目前国际上公认的用于治疗雄激素性脱发的药物主要为米诺地尔和非那雄胺。但是这两种药物具有明显的副作用。寻找安全性好、对脱发生物活性高的药物成为当今研究的热点。白蜡是半翅目 Hemiptera 蝽总科 Coccoidea 白蜡蚧属 *Ericerus* 的白蜡虫雄性幼虫分泌的次生代谢物质。在中国民间白蜡常用作生发剂。但是对于白蜡治疗脱发的类型及其作用机理还未见报道。白蜡高级烷醇是采用氢化铝锂或还原法从白蜡中提取得到的一元饱和醇的混合物。研究表明高级烷醇具有广泛的药理活性，但是其对脱发治疗效果方面的研究鲜有报道。为了明确白蜡及白蜡高级烷醇治疗脱发的类型和作用机理，本论文从动物和细胞两个层面研究白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发的作用效果及机理。动物方面以 KM 小鼠为研究对象探讨白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠毛发外观、毛囊形态、小鼠血液中激素水平、小鼠皮肤内生长因子表达量的影响；细胞方面以人真皮乳头细胞为研究对象探讨白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的增殖作用以及对蛋白表达量的调节作用。主要的研究结果显示：

（1）白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠毛发外观和毛囊形态变化的影响。

模式组和溶剂对照组小鼠背部毛发脱落明显并散布有斑秃块，毛色发暗，毛囊长度缩短，毛囊微型化。而在模式小鼠背部涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后小鼠背毛顺滑有光泽，背部脱毛不明显，相同面积范围内小鼠毛发重量明显高于模式组和溶液组。此外白蜡及白蜡高级烷醇能明显促进毛囊长度、毛球直径、生长期（A）/休止期（T）比值以及毛囊密度的增加。其中 10%白蜡和 1%白蜡高级烷醇促进毛囊生长的活性高于非那雄胺。

（2）白蜡及白蜡高级烷醇对激素的调节作用

给药期间，白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠体内雌二醇的含量没有调节作用。而对睾酮含量和睾酮与雌二醇（TE/E2）比例的调节作用随着给药时间的延长而发生变化。其中给药第 28d，白蜡及白蜡高级烷醇能明显降低小鼠血液中睾酮的含量和 TE/E2 比例，调整紊乱的激素水平。给药第 60d，给药组和模式组小鼠血液中 TE/E2 比值与 CK 组之间差异

不显著，小鼠激素水平趋于正常。然而 2%白蜡高级烷醇组小鼠血液中睾酮的含量明显低于模式组。体外研究发现白蜡及白蜡高级烷醇能够降低睾酮转换为二氢睾酮的量，抑制 5 α -还原酶的活性，其对 5 α -还原酶的抑制中浓度高于 2%非那雄胺。

（3）白蜡及白蜡高级烷醇对生长因子表达量的调节作用

与模式组相比，白蜡及白蜡高级烷醇能明显提高小鼠皮肤内血管内皮生长因子（VEGF）、表皮生长因子（EGF）和碱性磷酸酶的表达量。其中，白蜡及白蜡高级烷醇促进小鼠皮肤内 VEGF 和 EGF 表达量的作用与剂量无关。其中白蜡及白蜡高级烷醇对 VEGF 的作用效果与 5%米诺地尔差异不显著，白蜡与白蜡高级烷醇之间小鼠皮肤内的 VEGF 的表达量差异不显著。虽然不同浓度白蜡之间或者不同浓度白蜡高级烷醇之间 EGF 的表达量差异不显著。但是，在白蜡组中 10%白蜡组小鼠皮肤内 EGF 的表达量最低，在白蜡高级烷醇组中 1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内的 EGF 表达量最高。其中 1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内 EGF 的表达量明显高于 10%白蜡组和 5%米诺地尔组，而 10%白蜡组小鼠皮肤内 EGF 的表达量与 5%米诺地尔组差异不显著。小鼠皮肤内碱性磷酸酶的活性随着给药时间发生改变。其中 10%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内碱性磷酸酶的含量变化趋势与 5%米诺地尔组相似。5%白蜡组和 2%白蜡高级烷醇小鼠皮肤内碱性磷酸酶的含量在试验第 28d 到 45d 出现平台期，随后小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量降低。

（4）白蜡及白蜡高级烷醇对细胞生长的影响

吐温 80 能够增加白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶解度，其最佳制备条件为吐温 80：白蜡=50:1 或吐温 80：白蜡高级烷醇=5:1，溶液 pH3~4，加热温度为 91℃，搅拌时间 30min。吐温 80 用量在 1.25~6.25 μ g/mL 范围内对人真皮乳头细胞没有伤害，细胞能够安全生长。在吐温 80 安全用量范围内白蜡及白蜡高级烷醇能促进健康细胞和模式细胞的增殖，并且能抑制 TGF- β 、caspase3、caspase8 和 caspase9 蛋白的表达。其中，白蜡用量为 1.25 μ g/mL，白蜡高级烷醇用量为 12.5 μ g/mL 时人真皮乳头细胞的增值率最高。白蜡及白蜡高级烷醇对 TGF- β 2 蛋白的调节作用差异不明显，但是这两个物质对 caspase 蛋白的调节作用差异比较明显。白蜡对 caspase9 的调节作用较强，白蜡高级烷醇对 caspase3 和 caspase8 的调节作用较强。

综上所述，白蜡及白蜡高级烷醇能促进脂溢性脱发模式小鼠毛发的生长。其作用的靶标位点为毛球、5- α 还原酶、二氢睾酮与受体的结合三个部位。白蜡及白蜡高级烷醇促

进毛囊生长的作用机理为延长毛囊的生长期和阻止激素对毛囊的伤害两个方面。其中延长毛囊的生长期主要与促进血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达以及促进真皮乳头细胞的增殖有关。阻止激素对毛囊伤害方面的机理主要表现为降低小鼠体内睾酮的含量，抑制 5α -还原酶的活性，阻止二氢睾酮与雄激素受体的结合，并且能抑制 caspase 细胞凋亡信号通路。其中白蜡抑制内源性细胞凋亡信号通路，白蜡高级烷醇抑制外源性新版信号通路

关键词：白蜡，白蜡高级烷醇，脂溢性脱发，促进毛发生长，作用机理

Abstract

Androgenetic alopecia (AGA) is more than seen in men compare to women. It is one of three common forms of hair loss. It can begin at a younger age with mental stress and dietary change, and it injures younger people's self-respect. At present, finasteride and minoxidil are widely used to treat AGA. However, the two drugs have some adverse effects. Recently, natural products, which are safe and promote hair growth, have become widespread in the hair care industry. White wax (WW) is a secondary metabolite of the male larva of the white wax scale *Ericerus pela* Chavannes (Hemiptera: Coccoidea). In China, WW is used to treat hair loss. WW has been traditionally used to treat hair loss in China. However, there has been no report of WW responsible for hair growth-promoting effect. Policosanol of white wax (WWP) is a mixture of saturated monohydric alcohols, which can be prepared from WW with LiAlH_4 and saponification. There was no report of hair-promoting effect of WWP. It has been reported that WWP possesses extensive pharmacological activities. But there has been no report of WWP responsible for hair growth-promoting effect. The present study was carried out to evaluate the effects of WW and WWP on testosterone-induced hair loss and the action mechanism in vivo and cell proliferation. In vivo, we employed visual inspection, morphology of hair follicle, level of hormone and growth factor to explore the change of follicle morphogenesis. In cell test, we employed human follicle dermal papilla cells (HFDPCs) as research object to evaluate cell proliferation in cultured HFDPCs and employed western blot to evaluate protein expression in each group. The main results showed that:

(1) The effect of WW and WWP on appearance of mice and morphology of hair follicle

Darker hair and diffuse hair loss were visible in testosterone propionate only and testosterone propionate plus vehicle-treated groups. Follicles were shortened and miniaturized. However, in WW-treated groups and WWP-treated groups, smooth and lustrous hair was seen. WW and WWP showed an outstanding hair growth-promoting activity as reflected by the follicular length, follicular density, A/T ratio, and hair bulb diameter. The optimal treatment effect was observed at 10% WW and 1% WWP, which were better than 2% finasteride treatment.

(2) The adjustment of WW and WWP on hormone

There were no effect of WW and WWP on estradiol level during test. But the level of testosterone and the ratio of testosterone and estradiol were change with the time. After 28 d, the levels of testosterone in mice treated with WW and WWP were decreased compare to model group, and the hormone levels was adjusted back to normal. But after 60d, the ratio of testosterone and estradio was no difference between treatment group and CK groups, and the levels of testosterone in mice treated with 2%WWP was significantly lower than model group. Inhibitor assay of 5 α - reductase showed that WW and WWP inhibited significantly the conversion of testosterone to dihydrotestosterone, and the IC₅₀ values of WW and WWP were higher than that of finasteride.

(3) The effect of WW and WWP on growth factors

The expression of VEGF and EGF, and the activity of ALP in mice treated with WW and WWP were significantly higher compare to model group. The level of VEGF and EGF was not relation to amouts. There were no differect between WW group or WWP group and 5% minoxidil for VEGF, in which there was no difference between WW group and WWP groups. Although there were no difference between in three concentration WW and WWP. the minimum level of EGF was 10% WW in WW group and the maximum level of EGF was 1% WWP in WWP group, and the expression of EGF in mice treated with 1%WWP was significantly higher than 10%WW group and 5% minoxidil, and there were no difference between 10%WW and 5% minoxidil. The activity of ALP was change with time. In which the tendency of ALP in 10%WW group and 1%WWP group were similar to 5% minoxidile. And the activity of ALP in 5%WW group and 20%WW group was difference between 28d and 45d, and then they decrease gradually.

(4)The effect of WW and WWP on Human dermal papilla cells

Twain 80 have the properties to increase the solubility of WW and WWP. The optimistic solution conditions was : the ratio of twain80 and WW =50:1 or twain80 and WWP=5:1,pH 3 ~ 4, heating temperature is 91 °C, stirring time is 30min. Human dermal papilla cells could grow well when the concentration of tween 80 was 1.56 ~ 6.25ug/mL. In the safe concentration range of tween80, white wax and policosanol from white wax had the cell proliferation effect for

human dermal papilla cells and model cells. Western blot result showed that WW and WWP hold the capacity to inhibit the expression of TGF- β , caspase3, caspase8 and caspase9. There were not difference between white wax and policosanol for TGF- β . But the adjustment effect of caspase protein was obvious, in which white wax hold the higher property for caspase9 , and policosanol hold the higher property for caspase3.

In Conclusion, WW and WWP could act against testosterone-induced alopecia in mice, and they promoted hair growth. The action sites included hair bulb, 5 α -reductase and the complexes of dihydrotestosterone and the androgen receptor. The action mechanism included prolong the anagenic phase of follicle and blocking the hormone to damage hair follicles. The property of prolong the anagenic phase of follicle for WW and WWP was related to promoting the expression of VEGF and EGF and DPCs proliferation. WW and WWP blocked the hormone to damage hair follicles by decreasing the level of testosterone and inhibiting 5 α -reductase activity and inhibiting the complexes of dihydrotestosterone and the androgen receptor, and then inhibiting the caspase apoptosis signaling pathways, and in which white wax could inhibited the endogenous apoptosis signaling pathways, and policosanol could inhibited the exogenous signaling pathways.

Keywords:white wax, policosanol from white wax,Testosterone-induced Hair Loss, promoting hair growth, action mechanism

目录

摘要	I
Abstract	V
第一章绪论	1
1.1 引言	1
1.1.1 研究背景	1
1.1.2 脂溢性脱发的研究进展	2
1.1.3 白蜡及高级烷醇国内外研究现状及评述	12
1.2 研究的目标和主要研究内容	16
1.2.1 关键的科学问题与研究目标	16
1.2.2 主要研究内容	16
1.3 研究技术路线	18
第二章白蜡及白蜡高级烷醇毛囊组织学调查	19
2.1 材料与方法	19
2.1.1 供试药剂	19
2.1.2 试验仪器	20
2.1.3 试验动物	20
2.1.4 药剂配置	21
2.1.5 溶剂致敏性试验	21
2.1.6 模式动物的建立及实验处理	21
2.1.7 外观调查	22
2.1.8 组织学调查	22
2.1.9 数据处理	23
2.2 结果与分析	24
2.2.1 有机溶剂致敏性	24
2.2.2 外观调查和毛发重量	24

2.2.3 毛囊形态变化.....	27
2.2.4 毛囊组织学调查.....	28
2.3 讨论.....	33
2.4 小结.....	35
第三章白蜡及白蜡高级烷醇对激素的调节作用.....	37
3.1 材料与方法.....	38
3.1.1 供试药剂和仪器设备.....	38
3.1.2 试验动物.....	38
3.1.3 药剂配置.....	38
3.1.4 动物分组、模型的建立及组织样品的制备.....	38
3.1.5 血液中睾酮的含量测定.....	39
3.1.6 血液中雌二醇的含量测定.....	40
3.1.7 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用.....	41
3.1.8 数据处理.....	43
3.2 结果与分析.....	44
3.2.1 睾酮的含量.....	44
3.2.2 雌二醇的含量.....	44
3.2.3 睾酮与雌二醇的比值 (TE/E2).....	44
3.2.4 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用.....	45
3.3 讨论.....	49
3.4 小结.....	50
第四章白蜡及白蜡高级烷醇对生长因子的表达量.....	51
4.1 材料与方法.....	52
4.1.1 供试药剂及仪器设备.....	52
4.1.2 试验动物.....	52
4.1.3 药剂配置.....	52
4.1.4 动物分组及模型的建立.....	52
4.1.5 生长因子含量测定.....	53

4.1.6 碱性磷酸酶含量测定	54
4.1.7 数据处理	55
4.2 结果与分析	55
4.2.1 生长因子表达量	55
4.2.2 碱性磷酸酶活性	56
4.3 讨论	59
4.4 小结	60
第五章白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用	62
5.1 材料与方法	63
5.1.1 供试药剂	63
5.1.2 试验仪器	64
5.1.3 试验细胞	65
5.1.4 药剂配置	65
5.1.5 白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备	65
5.1.6 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性评价	66
5.1.7 白蜡及白蜡高级烷醇促进细胞增殖的作用	66
5.1.8 蛋白印记	67
5.1.9 统计分析	69
5.2 结果与分析	69
5.2.1 不同 pH 值对水溶液稳定性的影响	69
5.2.2 搅拌时间对水溶液稳定性的影响	70
5.2.3 吐温 80 用量对水溶液稳定性的影响	70
5.2.4 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性评价	71
5.2.5 白蜡及白蜡高级烷醇促进人真皮乳头细胞的增殖	71
5.2.6 白蜡及白蜡高级烷醇对凋亡信号通路的调节	76
5.3 讨论	81
5.3.1 白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备	81
5.3.2 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性	82

5.3.3 白蜡及白蜡高级烷醇促进健康人真皮乳头细胞的增殖 83

5.4 小结 85

第六章 结论与展望 86

6.1 结论 86

6.1.1 白蜡及白蜡高级烷醇对毛囊形态的影响 86

6.1.2 白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠激素水平的调节作用 86

6.1.3 白蜡及白蜡高级烷醇对生长因子的作用 87

6.1.4 白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用 87

6.2 创新点 88

6.3 讨论 88

6.3.1 白蜡及白蜡高级烷醇促进毛囊生长的作用 88

6.3.2 白蜡及白蜡高级烷醇延长毛囊的生长期 88

6.3.3 白蜡及白蜡高级烷醇阻止激素对毛囊的伤害 89

6.4 展望 91

6.5 存在的问题 91

参考文献 93

在读期间的学术研究 107

致谢 108

图目录

图 1-1 毛囊的结构及循环生长	5
图 1-2 技术路线.....	18
图 2-1 有机溶剂对小鼠皮肤的致敏性	24
图 2-2 试验第 28d 不同处理组小鼠背毛生长情况比较	26
图 2-3 试验第 28d 不同处理组小鼠毛发重量比较	27
图 2-4 不同时间不同处理组之间毛囊形态变化	28
图 2-5 生长期毛囊和退行期毛囊形态结构	29
图 2-6 不同时间不同处理组之间毛球直径	31
图 2-7 不同时间不同处理组之间毛囊长度比较	33
图 3-1 小鼠血液中激素含量变化	47
图 3-2 反应体系中 5 α -还原酶添加量对睾酮含量的影响	47
图 4-1 不同处理小鼠皮肤内碱性磷酸酶表达量的变化	58
图 5-1 不同处理吐温-80 对人真皮乳头细胞增殖的影响	73
图 5-2 白蜡对人真皮乳头细胞的增殖作用	74
图 5-3 白蜡高级烷醇对真皮乳头细胞的增殖作用	75
图 5-4 白蜡及白蜡高级烷醇对模式细胞的增殖作用	76
图 5-5 白蜡及白蜡高级烷醇对 TGF- β 2 蛋白表达量的影响.....	78
图 5-6 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase8 蛋白表达量的影响	80
图 5-7 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase9 蛋白表达量的影响	81
图 5-8 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase3 蛋白表达量的影响	79

表目录

表 1-1 与毛囊生长相关的信号通路	6
表 1-2 与毛囊生长相关的生长因子	6
表 1-3 脂溢性脱发药物及其作用位点	7
表 2-1 试验分组与处理方法	22
表 2-2 不同处理组之间小鼠毛囊 A/T 比值	30
表 2-3 不同处理组毛囊密度变化	32
表 3-1 实验分组信息和药剂处理	39
表 3-2 白蜡对 5α -还原酶的抑制作用	48
表 3-3 高级烷醇对 5α -还原酶的抑制作用	48
表 3-4 非那雄胺对 5α -还原酶的抑制作用	48
表 4-1 实验分组信息和药剂处理	53
表 4-2 不同处理小鼠皮肤内生长因子的表达量	57
表 5-1 不同 pH 条件下吐温-80 对白蜡水溶液的稳定性	70
表 5-2 不同搅拌时间对水溶液稳定性的影响	70
表 5-3 吐温-80 不同用量对水溶液稳定性的	71
表 5-4 吐温-80 不同用量对白蜡高级烷醇的增溶效果	71

第一章绪论

1.1 引言

1.1.1 研究背景

脱发是由机体自身免疫性缺陷引起的头部毛发脱落。脂溢脱发、斑秃、雄激素性脱发是目前公认的发病率最高的三种脱发类型^[1]。由于精神压力和饮食习惯的改变,脂溢性脱发成为当今最主要的脱发类型,而且偏于年轻化,给年轻人的自尊带来了很大的伤害。米诺地尔和非那雄胺^[2]是目前公认的用于治疗脂溢性脱发的药物。研究表明米诺地尔能够明显延长毛囊的生长期,促进细胞生长因子的表达和真皮乳头细胞的增殖^[3]。非那雄胺能降低毛囊内二氢睾酮对毛囊的伤害^[4]。但在服用这两种药物期间,人体会出现明显的副作用,如在服用非那雄胺期间会出现性功能障碍^[5],局部应用米诺地尔产生过敏性皮炎^[6]、心肌梗塞^[7]和厌食^[8]等不良反应。因此,寻找安全性好,对脱发生物活性高的药物成为当今研究的热点^[9,10]。白蜡是白蜡虫雄性幼虫分泌的次生代谢物质。因其无毒副作用、理化性质稳定,被广泛应用于各行各业。白蜡已经成为我们比较重要的林副产品。近年来,科技人员在白蜡产品的开发利用方面做了很多研究。从白蜡虫的蜜蜡机理到白蜡虫高效增产的人工养殖技术再到白蜡成分的鉴定和分离均做了很多的研究并取得了很大的成绩。但对其生理活性方面的研究非常少。虽然白蜡在民间常被用作生发剂,但是关于白蜡治疗脱发方面的研究文献鲜有报道。采用氢化铝锂和氧化还原法能从白蜡中分离得到白蜡高级烷醇。研究证明来源于植物的高级烷醇具有多方面的生物活性,其研究多集中于二十六烷醇、二十八烷醇和三十烷醇。其中二十六烷醇和二十八烷醇生理活性研究最多且集中在医药领域,特别是其在降低胆固醇方面的研究比较全面而且深入。三十烷醇生理活性的研究集中在农业领域,其具有促进植物根、芽分化的作用。这些研究表明高级烷醇生理活性好,安全性高。虽然目前关于高级烷醇生理活性研究比较广泛而且深入,但是其在治疗脱发方面的研究鲜有报道。对白蜡及白蜡高级烷醇防脱发效果和作用机理的研究,可科学的评价其用于防脱发的可行性,为其开发利用奠定科学基础。

1.1.2 脂溢性脱发的研究进展

1.1.2.1 脂溢性脱发的症状与原因

脂溢性脱发是目前脱发领域发病率最高的一种类型，主要以男性为主，尤其是中青年男性，且随着年龄的增加脱发数量增加。据报道年龄在 30 岁的男性脱发人数超过 30%，年龄在 50 岁的人群，脱发数量上升到 50%^[11]。脂溢性脱发的特症主要表现为头部脱发区域覆盖一层油性分泌物，头皮发红，严重的甚至伴有皮炎^[12-15]。头发枯黄、细而短，在头发根部常伴有白色头屑，毛囊微型化^[15]。脱发从头顶或前额开始，逐步向周围扩散最终整个头部毛发全部掉光^[12-14]。

国内和国外对脂溢性脱发发病原因均有研究。据记载我国早在秦朝就对脱发有研究。经过千年的研究和临床实践，中医认为脱发主要与人体内的气血有关^[16, 17]。现代医学研究发现脱发产生的原因主要包括下面几个方面：

（1）雄激素：

雄激素是指由腺分泌、对机体生长有调节作用的类固醇物质。雄激素分泌后由血液运输到全身各个器官，之后与靶细胞内的雄激素受体结合发挥生理活性。大部分雄激素在体内被转化为无活性的物质排出体外，只有少部分雄激素在 5 α -还原酶或芳香酶的作用下不可逆的生成高活性的二氢睾酮和 17 β -雌二醇^[16]。正常情况下，二氢睾酮与雌二醇共同维护正常的生理功能。当血液中睾酮的含量打破平衡时会引起一系列病症^[16]。如血液中雄激素过低会引起骨质疏松、过高会引起多囊卵巢综合征^[17]。

作用于皮肤的睾酮来源于皮脂腺细胞自身合成，性腺和肾上腺素分泌的雄激素前体或游离的雄激素以及外源性的雄激素。皮肤内的睾酮含量过多时，在 5- α 还原酶的催化下，睾酮能够生成二氢睾酮，二氢睾酮与睾酮竞争毛囊靶细胞内的雄激素受体。由于二氢睾酮的活性明显高于睾酮，因此，二氢睾酮结合雄激素受体的能力强于睾酮。一旦二氢睾酮进入细胞核内，就能抑制毛囊细胞的生长，促使毛囊提前进入休止期，导致毛发的脱落^[18]。雄激素还能作用于皮脂腺，激活皮脂腺细胞中的 SREBP 通路，促进皮脂腺细胞外层的幼稚细胞发育分化为成熟的分泌细胞，使皮脂腺腺体肥大，分泌功能增强，产生过多的皮脂^[19]。

（2）皮脂的过度分泌

皮脂由皮脂腺分泌，主要成分为脂肪酸，脂肪醇，甘油二酯和甘油三酯，蜡酯，胆固醇，维生素 E，胆固醇酯和角鲨烯^[19,20]。这些皮脂对皮肤和毛发具有两重影响，在皮脂腺正常分泌情况下，皮脂对皮肤和毛发具有润滑作用、抑菌作用和抗氧化作用^[19]。皮脂成分中对皮肤和毛发生长具有抑菌活性的成分为十二烷酸、十六烷酸，油酸，这些成分为皮脂内游离的脂肪酸，这些脂肪酸能够使皮肤表面表现酸性，从而达到抑菌的目的^[19]。皮脂的抗氧化作用与皮脂分泌的维生素 E 关系密切，维生素 E 能够保护角鲨烯，避免其在光照情况下产生过氧化物和丙二醛，降低过氧化物和丙二醛对细胞的毒害作用^[22]。另一方面，当皮脂腺分泌亢进时，过多的皮脂会堵塞或者压迫毛孔，阻碍毛发的正常生长。皮脂分泌过多还会使头皮滋生细菌、真菌或酵母，这些微生物能够使皮肤诱发炎症，甚至滋生在皮肤表面的微生物其菌丝通过毛囊孔到达毛囊的内部，影响毛囊的生长^[21]。此外，皮脂分泌物中的油酸、亚油酸等过量时对毛囊有毒性作用，导致毛发中毒、枯萎、脱落^[12-14]。

（3）饮食

糖和盐是我们日常生活中常用的调味品。随着食品行业的发展，相比之前，我们有更多的机会摄入过量的糖和盐。然而过量的糖和盐会促使皮脂腺分泌过多的皮脂，诱发脂溢性皮炎，头部皮脂分泌过量会导致脱发。此外人体微量元素缺乏会导致人体分泌失调，诱发某些免疫性疾病，如斑秃^[12-14]。

（4）精神压力

随着社会竞争越来越大，人长期处于精神紧张状态，一方面导致机体激素水平分泌失调，特别是雄激素分泌过多^[23]。另一方面，血管收缩，造成头部血液供应不足，头发营养不良^[24]。

（5）菌类感染

由于皮脂腺的过量分泌导致体表一些正常的菌群失衡。特别是马拉色菌和金葡萄球菌等在头皮的皮脂腺分泌处诱发机体的变态反应，产生致敏原，引起皮肤炎症^[25, 26]。此外侵染表皮的细菌、真菌或酵母菌不仅能诱发皮肤炎症而且其菌丝还会伸入到毛囊的内部，依附毛干而生长，影响毛发的生长^[21, 27]。

（6）遗传因素

研究表明脂溢性脱发与遗传有关，具有家族病史的人群更容易发生脂溢性头发，且其发病时间早^[18]。

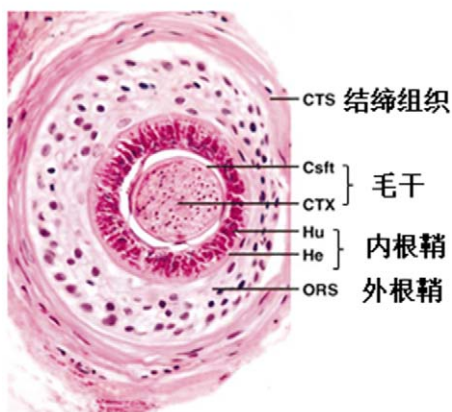
1.1.2.2 毛囊的结构和生长

(1) 毛囊的结构

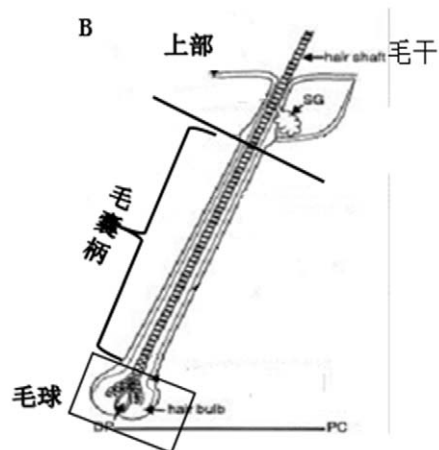
毛囊是体内一个比较小而复杂的附属器官，其着生于皮肤的表皮层和真皮层。毛囊将毛发包裹在其中，指导毛发的形成，并为毛发的生长提供营养^[28]。毛囊的结构比较简单，从内到外依次为毛干、内根鞘、外根鞘和芥蒂组织（图 1-1A）。从皮肤的表皮层到真皮层以立毛肌为界限毛囊分为上部（皮脂腺、毛囊隆突部位、毛囊孔）和下部（毛囊柄和毛球）（图 1-1B）。毛囊的结构随着毛囊的生长而发生变化。毛囊的生长分三个阶段，即毛囊的生长期、退行期和休止期。在毛囊的生长期，毛囊逐渐由表皮层延伸到真皮层，毛囊柄最长，毛球膨大呈圆形，毛囊结构完整（即在毛囊横切面能明显看到毛干、内根鞘、外根鞘和芥蒂组织）。在毛囊的退行期，毛囊从真皮层逐渐萎缩上升到表皮层，毛囊柄萎缩变短，毛球呈钉型，毛囊的内根鞘结构紊乱。在休止期，毛囊柄最短，位于皮肤的表皮层，毛囊内根鞘消失（图 1-1C）。

(2) 毛囊的生长

毛囊形成于人的胚胎时期，毛发着生长于毛囊内。一般一根毛囊生长一根毛发。人出生后毛囊的数量基本不变，但是毛发生长 4~6 年就会脱离，随后毛囊长出新的毛发。毛囊生长的动力源泉来源于毛球。毛球位于毛囊的基底部，内含真皮乳头细胞和毛基质细胞。其中，真皮乳头细胞对毛囊的生长具有至关重要的作用。具体表现为：a、指导毛基质细胞分化形成毛干和内根鞘，调控毛囊的循环再生；b、真皮乳头细胞能激活毛囊内的信号通路（表 1-1），如 Wnt、BMP、Shh、Notch 信号通路指导毛囊形态结构的形成以及毛囊的循环，其中 BMP、Shh、FGF 和 TGF- β 信号通路决定毛囊生长期的持续时间。在这些信号通路中，Wnt 信号通路的作用最重要，它不仅能指导毛囊形成和循环，而且能够重塑受伤的表皮^[28]；c、真皮乳头细胞能够分泌一些毛囊生长所必需的生长因子（表 1-2）。这些生长因子在毛囊结构的形成过程中以及在毛囊的循环过程中决定毛干直径和毛囊生长期的长短。d、真皮乳头细胞自身的增殖能力也能调节毛囊的生长^[29]。由此可知，真皮乳头细胞是研究药物促进毛发生长的优选细胞。



参照K. S. Stenn报道



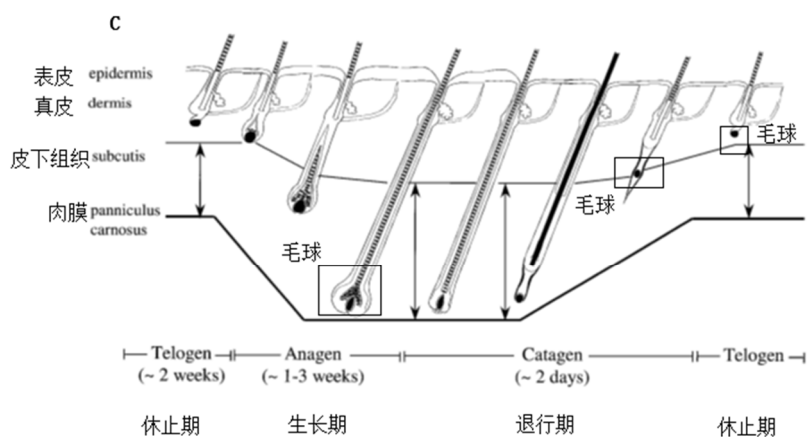
参照Sven Muller- Rover报道

分图 A：毛囊横切面

A: hair follicle structure of from transverse section

分图 B：毛囊结构示意图

B: Morphology of hair follicle



参照Sven Muller- Rover报道

分图 C：毛囊循环示意图

c: hair cycle stages

图 1-1 毛囊的结构及循环生长

Fig.1-1 Morphology of hair follicle and hair cycle stages

表 1-1 与毛囊生长相关的信号通路

Table 1-2 Signal pathway of follicle

信号通路 Signal channel	相关蛋白 Related protein	下游蛋白 Downstream proteins	在毛囊形成中的作用 The role of proteins in hair follicle	参考文献 References
WNT	B-action、Wnt3、Wnt4、Wnt5、Wnt11、Wnt10、Wnt10b、Dvl2、DKK、TCF3/4	Axin/GSK-3 β /APC、serine/threonine、DLX3、Lef1	毛囊形成、分化	[30-32]
BMP	BMP2/4/6/7、Gli1、Patched1、smad1、Noggin、Bmpr1a	P-Smad1/5/8、pSMAD1	毛囊细胞增殖、分化、凋亡、诱导毛囊进入退行期和休止期	[33, 34]
Shh	Noggin	HEY1、kras、fgfr2	促进毛囊由休止期进入生长期	[35-37]
Notch	Notch1/2/3、Jagged	TGF- β	决定毛囊结构	
FGF	FGF1/2/5/7/10/18		决定毛囊的长度、诱导毛囊进入退行期和休止期	[38-40]
TGF- β	P-Smad2/3、TGF- β 1/2	Tmeff1、Bmp6、Fgf18	延长毛囊退行期	[41]

表 1-2 与毛囊生长相关的生长因子

Table 1-2 Kinds of growth factors for follicle

生长因子 Growth factor	存在部位 Present site	作用 Effect	代表药物 Representative drugs	参考文献 References
肝细胞生长因子 (HGF)	间充质细胞	刺激细胞 DNA 合成 ,引起表皮细胞中 β -连环蛋白的表达量增加,延长毛干;与尿激酶结合引起细胞外溶蛋白性裂解控制血管形成。	橄榄苦苷	[42, 43]
血管内皮细胞生长因子 (VEGF)	真皮乳头细胞	促进毛乳头细胞增殖和迁移以及诱导毛囊周围血管的形成,为毛囊提供营养	米诺地尔	[44, 45]
表皮生长因子 (EGF)	外根鞘、内根鞘	低剂量促进毛囊生长,高剂量抑制毛囊生长。通过 Notch 信号通路调控毛囊生长期的开闭。通过 Wnt/ β -catentin 信号通路调控毛囊外根鞘的生长	日本扁柏提取物	[49-51]

续表 1-2

生长因子 Growth factor	存在部位 Present site	作用 Effect	代表药物 Representative drugs	参考文献 References
转化生长因子 β (TGF- β)	真皮鞘、外 根鞘	激活 caspase 死亡信号通路中 caspase3 或 caspase8 诱导毛囊由长期 进入退行期	连翘素-A	[52, 53]
胰岛素样生长因 子 (IGF-1,IGF- 2)	真皮乳头、 毛囊	提高细胞活力，促进毛干的分化，维 持毛囊的生长期	韭菜	[46-48]
成纤维细胞生长 因子-5 (FGF- 5)	染色体 4q21.21	诱导毛囊进入退行期，决定毛发的长 度，抑制毛发的生长	--	[54, 55]

1.1.2.3 药物促进毛发生长的作用机理

目前临床上用于治疗脂溢性脱发的药物有米诺地尔、非那雄胺、螺内酯，酮康唑等，这些药物从不同方面抑制毛发的脱落（见表 1-3）。

表 1-3 脂溢性脱发药物及其作用位点

Table 1-3 Drug for seborrheic alopecia and the site of action

药物 Drugs	作用位点 Acting site
米诺地尔	延长毛囊生长期
氟罗地尔	雄激素受体
非那雄胺	抑制 5 α -还原酶
螺内酯	抑制二氢睾酮
酮康唑	细胞色素 p450 酶（糠秕孢子菌）
硫化硒	抑制皮脂形成和较强的杀灭真菌、杀灭寄生虫及抑制细菌的能力
异维甲酸	抑制皮脂腺分泌，使皮脂腺萎缩

从表 1-1 中可以看出，促进毛发生长的药物主要从三方面改善毛囊的生长。

（1）作用于激素

作用于激素抑制脱发的药物包括雄激素受体抑制剂、促性腺激素释放激素受体拮抗剂和 5 α - 还原酶抑制剂。这些药物的作用机理主要是作用于受体或酶，抑制睾酮所致皮脂腺及附属器增生。如雄激素受体抑制剂降低雄激素与其受体的结合能力，降低 mRNA 的表达量^[56, 57]；促性腺激素释放激素受体拮抗剂，抑制 GnRH 与 GnRH 受体的结合，并

且还抑制 NFAT 受体的活性^[58]；5 α -还原酶抑制剂作用于 NADPH 辅酶，降低 5 α -还原酶活性抑制毛囊中睾酮转变为二氢睾酮^[59]。

（2）改变毛囊的生长周期

毛囊的生长周期分为三个阶段，即毛囊的生长期、退行期和休止期。其中毛囊的生长期决定这毛干的直径和毛发的长度，而在退行期和休止期毛发生长停止、萎缩，最终脱落。药物可通过调节毛囊内生长因子、细胞因子和信号通路的调节（表 1-2，1-3）延长毛囊的生长期、缩短毛囊的休止期促进毛发的生长。如雌激素受体蛋白抑制毛囊由静止期到生长期的转变^[60]。环孢素 A 和豆类提取物能够促进毛囊从静止期向生长期转化^[61]。其中环孢素 A 通过抑制磷酸酯酶 3，ppp3CA（钙依赖磷酸激酶）抑制 T 细胞活性，刺激毛囊由静止期进入生长期。豆类提取物激活毛乳头细胞增殖及通过扩张毛细血管促进血液循环为毛球供给营养，促使毛囊进入生长期^[62]。Lachgar^[63]和 Li^[2]等人研究发现米诺地尔与外部上皮鞘中的磺基转移酶作用转化为米诺地尔硫酸盐。米诺地尔硫酸盐一方面，能刺激腺苷受体，激活 DP 细胞中磺酰脲类受体导致腺苷 5'-三磷酸分泌。腺苷受体 Ador A2b 上调 FGF-7，从而延长毛发生长初期。另一方面，米诺地尔硫酸盐能松弛血管平滑肌，使血管平滑肌钾离子通道打开，上调血管内皮生长因子表达量、促进前列腺素的合成和 17 β -羟类固醇脱氢酶的活性，缩短毛囊的静止期，延长毛囊的生长期，刺激毛囊的生长。同时米诺地尔还可以刺激真皮乳头细胞中的 ERK 和 AKT 活性的增加以及增加 Bcl-2/Bax 的比例延长毛囊的生长期。多肽类药物能阻断 EGF/FGF/VEGF/IGF 等生长因子信号通路，抑制炎症的发生、皮脂的分泌^[64]以及促进细胞分裂^[65]。蛋白激酶抑制剂抑制 JNK 靶向转录因子 C-Jun、ATF2, E1K1 的活化，抑制细胞的生长和分化^[66]。Blebbistatin 促进毛囊干细胞存活和干性的维持^[64]，Wnt 衍生肽促进 β 连环蛋白信号传导，促纤连蛋白的表达，而纤连蛋白是 wnt 的靶蛋白，诱导毛囊干细胞的增殖和分化生成新的毛囊治疗雄激素性脱发^[67]。

（3）作用于皮脂腺

在皮脂腺内，雄激素可以激活皮脂腺细胞的 LXR-SREBP-1c 通路，上调 FAS, HMGCR，SCD 和 ACS 基因的转录，促使脂质合成与分泌增多^[19]。作用于皮脂的药物具有两方面的作用。一方面，降低体内雄激素的含量、抑制皮脂腺细胞的增殖和分泌，另一方面，杀死

抑制寄生在皮脂内的真菌、细菌或寄生虫，抑制炎症的发生^[68]。如卵圆形糠秕孢子菌和金黄色葡萄球菌^[69]。

1.1.2.4 国内外用于治疗脂溢性脱发的方法和药物

(1) 中医

中医认为脱发是由于精血不足，肝肾阴虚，气滞血瘀引起的，因此，中医对脱发的治疗多以活血化瘀，补血补气、通经活络为主要治疗方案。其对脱发治疗的方法主要有内治、外治、内外兼治三种。

A 内治

中药治疗脱发的药材主要为补血补气，温经通络的植物。中药治疗脱发的药物首先何首乌。《本草纲目》记载何首乌具有益血气，黑须发的功效，现代医学证明何首乌^[70, 71]具有促进血液循环、加快人体新陈代谢，增加免疫功能，抑制细胞破坏和抗氧化，防止色素细胞的生长，预防头屑，头皮痒。用于治疗脱发的补血药物有包括三七花、白术、地黄，补气的药物有黄芪、丹参、人参、枸杞、和女贞子等^[25, 72, 73]。此外从植物中提取得到的活性成分对脱发也具有治疗效果，如侧柏提取物、大戟科^[74]、豆科、旋花科、葫芦科、蕨科和菊科等植物的提取物均能促进毛发的生长。这些植物分属于草本、木本、藤本或蕨类植物。这些提取物或通过抑制 5 α -还原酶活性，或通过促进细胞的增殖，或通过抑制真菌的滋生等方式促进毛发的生长^[74-80]。中药常被加工的剂型主要包括汤剂、丸剂、片剂和胶囊剂型，如六味地黄丸^[81]、四君子汤、养血生发胶囊^[82]，滋补生发片等。

B 外治

外治是以通络生发和活血化瘀为主，治疗方法包括药物外用，头部按摩、针灸三种，药剂外用主要是将药物加工成外用制剂如酊剂、洗发液等通过透皮吸收的方式将药物直接作用于患处，促进发病部位血液循环和药物吸收^[83]。如中药育发液^[84]。也可直接将药物涂抹在头部。如白蜡，本草纲目中记载“白蜡频涂，勿令日晒，久则生发”。头部按摩主要是通过物理的方式刺激头部毛细血管促进血液循环^[85]。针灸主要是通过银针刺激毛囊周围的神经和毛囊周围的血液循环促进毛发的生长^[86]。

C 内外兼治

内外兼治就是口服药物与外用药物相结合的方式，内部调理体内酸碱平衡和气血，外部舒张血管促进血液循环。

(2) 西医

A 药物治疗

目前临床上用于治疗脱发的药物多为化学合成的药物，这些药物根据毛发脱落因素有针对性的治疗不同原因引起的脱发。根据药物作用的位点和作用机理可将药物分为以下几种：

1) 米诺地尔

1986 美国首次批准米诺地尔用于脱发的治疗，当时米诺地尔的规格只有 2%和 5%两种，目前市场上销售的米诺地尔规格除了 5%、2%外还有 3%个规格，加工的剂型也由传统的酊剂和水剂扩展为油乳、醇脂质体和纳米脂质体等缓、控释式制剂^[87-89]。

米诺地尔促进毛囊生长的作用机理主要表现为延长毛囊的生长期和抑制雄激素受体与睾酮的结合。米诺地尔通过作用于毛囊的信号通路和生长因子两方面延长毛囊的生长期。米诺地尔能够上调细胞存活信号通路上细胞外调解蛋白激酶（ERK）和丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶（AKT）蛋白的表达，下调凋亡信号通路中 P53 和 P21 蛋白的表达，从而提高毛囊细胞活力^[90]。米诺地尔对生长因子的作用主要表现为在磺基转移酶的作用下米诺地尔被转化为米诺地尔硫酸盐，米诺地尔硫酸盐刺激腺苷受体，上调血管内皮生长因子、成纤维生长因子-7 的表达量，松弛血管平滑肌，打开钠离子通道，延长毛囊的生长期^[91-93]。此外米诺地尔还能促进真皮乳头细胞的增殖^[94]。米诺地尔能够降低雄激素受体的稳定性，抑制雄激素受体的转录活性^[90, 95]。

2) 还原酶抑制剂

还原酶抑制剂包括 Ⅰ型 5- α 还原酶抑制剂、Ⅱ型 5- α 还原酶抑制剂和混合型 5- α 还原酶抑制剂，非那雄胺为 Ⅰ型 5- α 还原酶抑制剂，其在 1992 年研发。依立雄胺为 Ⅱ型 5- α 还原酶抑制剂。度他雄胺对 Ⅰ、Ⅱ型 5- α 还原酶均具有较强的抑制作用。这类药物能够抑制 5- α 还原酶活性，降低毛囊内二氢睾酮的转化量^[4]，维持毛囊的生长期，促进毛发的生长。还原酶抑制剂对真皮乳头细胞的生长没有调节作用。

3) 多肽类药物

多肽类药物抑制生长因子的表达，如表皮生长因子（EGF）、血管内皮生长因子（VEGF）、成纤维生长因子（FGF）和胰岛素样生长因子（IGF）等，阻断信号通路，抑制

炎症的发生和皮脂的分泌以及促进细胞分裂^[64, 65]。蛋白激酶抑制剂抑制 JNK 靶向转录因子 C-Jun、ATF2、E1K1 的活化抑制细胞的生长和分化^[66]。

4) 改善毛囊微环境

洛沙坦、坎地沙坦、或替米沙坦刺激缓激肽 B2 受体引起内源性的前列腺素 F-2a 的释放，通过前列腺素的受体途径改善局部微环境促进毛发生长；同时血管紧张素 II 的 I 型受体拮抗剂还能有效的阻断血管紧张素 II 的作用，促进局部血液的供给，从而达到促进毛发生长的效果^[96]。

5) 雌激素类药物

雌激素类药物能阻止二氢睾酮的生成，减少皮脂分泌，增强芳香酶的活性，增加睾酮转换为 17 β -雌二醇的量，延长毛发生长期，缩短休止期^[97]。

6) 作用于淋巴细胞

主要是作用于 CD4⁺和/或 CD8⁺细胞，改变毛囊周围免疫细胞的浸润。如局部涂抹方酸二丁酯^[98]改变毛囊中下部 CD4⁺/CD8⁺的比例由 2 : 1 到 1 : 1。他克莫司不仅能改变毛囊周围的 CD4⁺和 CD8⁺而且能降低毛囊上皮细胞中 MHC 、 和 ICAM1 的表达^[99]。白介素 4 抑制毛囊周围的 CD8 T 细胞的浸润和干扰素 γ mRNA 的表达 ,恢复毛发的生长^[100]。抗体 CD44V10 降低毛囊周围 CD8⁺淋巴细胞和 MHC1 的表达^[101]，对 CD4⁺的作用程度比较小。局部免疫疗法为一个给定的抗原抑制另外一个抗原的免疫反应。如二苯莎莫酮刺激转录因子 β 1mRNA 过量表达，抑制 TH1 免疫反应，诱导毛发再生^[102]。

7) 抑菌

抑制酵母菌和金黄色葡萄球菌的生长。如酮康唑通过抑制细胞色素 p450 酶的活性从而抑制菌的生长。

B 手术治疗

手术治疗脱发的方法主要为植发和激光治疗两种。植发就是通过手术的方式将人体内的头发进行重新分布的一种方法^[103]。激光治疗主要是采用低功率激光促进毛发的生长^[104]。

C 基因工程

毛发的生长与毛囊的循环再生密切相关。在循环中毛囊干细胞分化形成毛囊母细胞，毛母细胞分裂生成次生毛芽，次生毛芽向下生长形成新的毛囊。一旦毛囊干细胞不能分

化形成毛囊母细胞进而不能生长新的毛囊和毛发。因此，激活毛囊干细胞可以重新生成新的毛囊^[105]。

D 中西医结合

目前国内认可的用于治疗脂溢性或/和雄激素脱发的药物有米诺地尔、非那雄胺、螺内酯，酮康唑等，但这些药物只能阻止毛发的脱落，而不能诱导毛囊的再生。因此，利用中药具有活血的功效，研发了将米诺地尔与养血生发胶囊联合用于治疗脂溢性脱发^[106]。将非那雄胺与含有黄嘌呤及生长激素的药物配合使用，降低二氢睾酮对细胞代谢抑制作用，同时利用生长激素具有促进生长作用防止毛发脱落。酮康唑与中药合用^[107]实现促进毛囊生长的同时抑制真菌的生长。

综上所述，雄激素分泌异常是诱发脂溢性脱发最重要的原因，延长毛囊的生长期是治疗脂溢性头发的目标。虽然目前用于治疗脂溢性脱发的方法很多，但是药物治疗依然占主导地位。且临床上用于治疗脂溢性脱发的药物多是化学合成药物，化学合成药物治疗脱发的根本是抑制或延缓诱导毛发脱落的因素，阻止毛囊的衰退和凋亡，而不能生成新的毛囊。中药从气血两方面调节毛囊的生长，能从根本上改变毛囊自身的生长，但是中药治疗脱发的作用机理研究的比较少而且不够深入。

1.1.3 白蜡及高级烷醇国内外研究现状及评述

1.1.3.1 白蜡国内外研究进展

白蜡是半翅目 Hemiptera 蚧总科 Coccoidea 白蜡蚧属 *Ericerus* 的白蜡虫雄性幼虫在寄主植物枝条上分泌的次生代谢物质经过一系列的漂洗加工而成的物质^[108]。随着白蜡虫人工放养技术的不断成熟，白蜡已经成为我国一种重要的林副产品。主要成分为一元饱和脂肪酸和一元饱和脂肪醇形成的蜡酯，其含量占总量的 93%~95%。在蜡酯中含量最高的为二十六烷酸二十六烷酯，二十八烷酸二十八烷酯，除此之外还含有少量的蜂蜡醇、色素、磷脂、树脂，烃、游离的脂肪酸，其中不饱和脂肪酸主要为油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸，这些脂肪酸的含量在 3%左右^[109]。白蜡质地坚硬，不溶于水，微溶于乙醇和乙醚等有机溶剂中，但能溶解在苯、甲苯，二甲苯和氯仿等。因其具有物理性质稳定、润滑、防潮的特点。被广泛应用于工业、农业、化妆品、食品和医药行业^[110]。在医药领域白蜡除了做赋形剂外，还是外科要药，用于治疗痈疽、疮疖、烫火伤。中医记载：虫白

蜡具有止血，生肌，定痛，补虚，续筋接骨，杀瘰虫，止咳止泻，润肺后肠胃，补肺敛气的功效。在中国民间白蜡常被用于治疗脱发。中药典籍也记载：“白蜡甘，温，无毒，蜡烛频涂，勿令日晒，久则自然生发”，表明白蜡具有一定的生发效果。

白蜡高级烷醇为采用氢化铝锂还原法和皂化法从白蜡中纯化分离得到的直链一元饱和醇的混合物^[111, 112]，主要成分为二十六烷醇、二十八烷醇，含量分别为 45%~56%和 34~38%。除此之外还含有少量的二十四烷醇、三十烷醇、二十五烷醇和二十七烷醇^[15]。

1.1.3.2 高级烷醇国内外研究进展

高级烷醇是一种天然的直链一元饱和脂肪醇，碳原子数在 24~34 之间，主要存在于植物表皮^[6-8]、蜂蜡^[9]或白蜡虫^[10]，在这些物质中二十八烷醇、二十六烷醇和三十烷醇的含量最高。研究表明，高级烷醇具有多种生理活性，具体表现为下列几方面：

(1) 调节激素水平

睾酮是人体一个重要的促合成激素，它能促进蛋白质的合成。睾酮的高低反映内分泌（下丘脑-垂体-性腺轴）功能状态。男子睾酮由睾丸间质细胞合成，女子睾酮由卵巢与肾上腺皮质合成。皮质醇是促分解激素，由肾上腺皮质分泌的一种固醇类糖皮质激素，可促进脂肪分解，促进肝组织利用脂肪酸进行糖原合成能减少蛋白质的合成。睾酮与皮质醇的比值可以衡量合成代谢与分解代谢的平衡指标，反映运动能力和疲劳程度^[113]。二十八烷醇能提高血清中睾酮的含量，降低皮质醇的含量，提高运动疲劳大鼠睾酮与皮质醇的比值^[114]，有利于机体蛋白的合成，为运动提供能量。此外皮质醇降低能促进淋巴细胞的增生，增强 NK 细胞的自然杀伤能力，增加 IL-2 的释放，增加循环中淋巴细胞的数量，增强机体的免疫功能。同时皮质醇还具有促进蛋白质合成和脂肪分解的作用，为机体提供能量。因此具有抗疲劳的作用。

肌糖原是人体运动时能量供应的主要物质，葡萄糖是肌肉组织提供和储存能量的基础物质，糖原的合成和分解是葡萄糖最主要的代谢形式；肝糖原主要用于维持机体血糖浓度和大脑能量供应。在糖原的代谢过程中涉及到的激素有肾上腺素和胰高血糖素。胰高血糖素能促进糖原分解和糖异生作用以及脂肪分解，增加脂肪酸氧化，产生酮体；肾上腺素增强机体的应激反应。二十八烷醇能促进大鼠机体胰高血糖素分泌和糖原合成酶的表达量，增强大鼠血液中血糖的供应能力，增加大鼠机体的应激反应能力^[115]。糖原合

成过程中重要的酶是糖原合成酶，它是一个限速酶。二十八烷醇能增加糖原合成酶的表达量，促进机体糖原的合成。

(2) 抑制胆固醇的合成

在胆固醇的合成过程中 HMG-CoA 还原酶是一个关键酶，受上游 AMP 激酶(AMPK)的调控。AMPK 是 ATP 消耗/生产通路的开关，AMPK 磷酸化后能使 HMG-CoA 磷酸化失去活性，抑制胆固醇的合成。AMPK 在机体处于运动状态或出现不正常状态时，如缺氧，缺血及葡萄糖缺乏等状态时被激活。AMPK 酶活性的高低与机体内 ATP 数量多少有关。AMPK 激活后不仅能增加脂肪酸的氧化，而且能抑制脂肪酸的合成。AMPK 不仅能促使葡萄糖摄取还抑制糖原的合成。从而促进葡萄糖向糖酵解方向转化。在胆固醇的合成过程中 HMG-CoA 还原酶是一个关键酶，受上游 AMP 激酶(AMPK)的调控，AMPK 是 ATP 消耗/生产通路的开关，AMPK 磷酸化后能使 HMG-CoA 磷酸化失去活性，抑制胆固醇的合成。甘蔗醇能增加 AMPK 的磷酸化和调节下游转录因子 SREBP-1，间接的增加 HMGR 的磷酸化，降低甲羟戊酸衍生物的生长，抑制胆固醇的合成^[116]。此外，前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 具有调节低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 降解代谢，参与细胞的凋亡，促进肝脏发育和再生，影响神经系统发育和分化，以及参与调节异生代谢、细胞周期，炎症和应激反应^[117]。郭元林等人报道甘蔗醇能降低阿活他汀引起的前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 上升。但对血浆中胆固醇水平没有影响^[118]。

(3) 神经细胞的作用

细胞的生长发育过程中受到细胞的存活和凋亡信号通路的调节，神经细胞凋亡的主要信号通路为 JNK-P53-Bax，在此通路中 ProNGF 与其受体 P75NTR 结合激活 JNK-P53-Bax 通路导致细胞死亡^[119]。神经细胞存活的信号通路包括 PI3-k/Akt 和存在细胞外的激酶 1/2 (Erk1/2) 和磷脂酰肌醇 3/Akt 信号通路，在 PI3-k/Akt 通路中 NGF 与受体 TrkA 受体结合抑制 JNK-P53-Bax 通路使细胞存活，二十八烷醇通过调节 ProNGF 和 NGF 的比值抑制 6-羟多巴胺介导的帕金森病^[120]。在细胞外的细胞存活通路中，二十八烷醇能抑制因 6-羟多巴胺介导而导致的 p-Akt 活性的下降，提高细胞的存活^[120]。同时，二十八烷醇能直接调节上述两个受体的活性，主要表现为：二十八烷醇抑制 P75NTR 受体活性，增加受体 TrkA 的活性，从而调节神经细胞的死亡和存活。二十八烷醇还能抑制细胞凋亡通路中 JNK 的活性以及 P53 的磷酸化，从而抑制细胞死亡。在神经细胞凋亡信号通路 JNK-

P53-Bax 中，Bax 能促进细胞凋亡，而 Bcl-2 能阻止细胞凋亡。二十八烷醇能够抑制 Ser128Bad 的活性，阻断 JNK-P53-Bax 信号通路[120]，同时二十八烷醇还能调节 Bax 和 Bcl-2 的比值，保护神经细胞的活性。二十六烷醇能提高谷氨酰胺酶和神经元特异性烯醇酶磷酸化，延缓胆碱能神经元的衰退，降低兴奋性神经毒的产生^[121, 122]。从而促进中枢神经元的成熟。

(4) 对心肌细胞的作用

在运动的最初机体主要消耗磷酸肌酸，ATP、糖原和血糖，并产生大量的乳酸，乳酸对脑神经细胞有毒害作用，对心肌细胞影响不明显。随着时间的延长，机体开始分解脂肪或蛋白质，为机体提供能量，蛋白质分解产生尿素氮^[123]，力竭运动后会使体内氧化代谢，自由基信号^[124]和脂质过氧化反应增强，体内不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用生产丙二酸，对心肌细胞产生毒性^[125]，造成心肌缺血缺氧，同时 ET 的水平显著增加，CGRP 的含量增加，ANP 水平降低，ET、ANP、CGRP 反应心肌内分泌功能，ET 可以引起心肌缺血，ANP 可以改善力竭运动时心肌血液供应，CGRP 具有保护心肌细胞的功能，灌饲二十八烷醇后的 SD 大鼠明显提高 CGRP 和 ANP 的含量，降低 EF 的水平。调节运动性疲劳大鼠心肌分泌功能的稳定^[126]，改善能量代谢，抑制蛋白质的分解降低机体尿素氮的含量，抑制脂质过氧化作用，保护心肌细胞^[126]。

(5) 抑制自由基的产生

糖尿病并发症与一氧化氮合成酶 NOS 成员（主要有内皮型一氧化氮合成酶、诱发性一氧化氮合成酶 iNOS、神经性一氧化氮合成酶 nNOS）表达量改变有关^[127-131]。NOS 成员之间的平衡有助于 NO 的产生。在近端肾小管和集合管处 NO 可以抑制 Na⁺/H⁺ 的交换，Na⁺-K⁺-ATP 酶和阿米洛利敏感型钠通道，抑制 Na 的重吸收^[129]。NO 还可以控制髓质血流量和肾间质流体静压力调节尿钠排泄^[132]。而 NAD(P)H 氧化酶具有分解 NOS 的作用但是在分解 NOS 的同时产生活性氧^[133]。在糖尿病亚慢性阶段 eNOS 的活性可以诱发糖尿病并发肾病。而肾脏中活性氧的产生可以诱发糖尿病血管并发症。同 NO₂-NO₃ 在肾脏中含量增加时还会导致肾小球硬化症的产生^[132]。在肾脏中蛋白激酶 C (PKC) 特别是 PKC-β 能阻止内皮细胞和微脉管中 eNOS 的活性^[130]，抑制 NO 的合成，当 NO 的合成被抑制时可降低肾血流量 (RPF) 和肾小球过滤率(GFR)的表达^[127]。Shinich 研究发现二十六烷醇能明显的抑制 iNOS 的表达，而降低 eNOS 和 nNOS 和 NO₂-NO₃ 在肝脏中的含

量,改善尿微量白蛋白排泄量、血肌酐水平并能减轻肝脏重量^[132]。Saito[134]指出二十六烷醇通过抑制丙二醛、TGF- β 1 和 PKC 在肝脏中的含量治疗糖尿病诱发血管并发症和膀胱缺血再灌注性损伤^[135]。

综上所述,高级烷醇具有多方面的生物活性,特别是在细胞和抑制胆固醇合成方面的研究比较深入,但是对毛囊方面的研究鲜有报道。此外,上述具有明显药理活性的高级烷醇多来自于植物,而对来自于昆虫方面的高级烷醇,特别是从白蜡虫分泌的白蜡中提取的高级烷醇生物活性研究的比较少。

1.2 研究的目标和主要研究内容

1.2.1 关键的科学问题与研究目标

目前临床上用于治疗脂溢性脱发的药物在安全上存在很大的隐患。寻找对毛发生长活性高,生物安全性好的药物成为当今研究的热点。在民间白蜡常被用于治疗脱发,但是对于白蜡治疗脱发的类型及其作用机理还未见报道。白蜡高级烷醇是采用氢化铝锂或还原法从白蜡中提取得到的一元饱和醇的混合物。研究表明高级烷醇具有广泛的药理活性,但是其对脂溢性脱发治疗效果方面的研究鲜有报道。本文以雄性 KM 小鼠和人真皮乳头细胞为研究对象,目的在于明确白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式小鼠是否具有明显作用效果以及其治疗脂溢性脱发作用机理。为白蜡及白蜡高级烷醇产品的开发奠定理论基础。

1.2.2 主要研究内容

本研究的主要内容为四方面:

(1) 白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式小鼠毛囊形态的影响

从外观调查和毛囊形态研究两方面评价白蜡及白蜡高级烷醇促进毛发生长的作用效果。外观调查方面观察毛发颜色、毛发脱落情况和毛发重量三个方面指标;毛囊形态研究方面调查毛囊的长度、毛囊密度、毛球直径、毛囊生长期/休止期比值四个指标。

(2) 白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式小鼠体内激素水平的调节作用

根据睾酮含量、雌二醇含量、睾酮与雌二醇含量比值和 5 α -还原酶活性抑制率四个指标评价白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式小鼠激素水平的调节作用。

(3) 白蜡及白蜡高级烷醇对模式小鼠皮肤内生长因子和碱性磷酸酶的调节作用

以模式动物为研究对象，测定不同给药时间各组小鼠皮肤内碱性磷酸酶的活性和给药 28d 时各组小鼠皮肤内血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达量，明确白蜡及白蜡高级烷醇对毛囊生长期的调节作用。

(4) 白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的增殖作用

1) 白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备及吐温 80 对人真皮乳头细胞安全性评价

探讨吐温 80、pH 值和搅拌时间三个因素对白蜡及白蜡高级烷醇水溶液稳定性的影响。并采用 MTS 法，明确人真皮乳头细胞安全生长时吐温 80 的用量范围，为研究白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞增殖作用和细胞内蛋白表达的影响奠定基础。

2) 白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞增殖作用的影响

采用 MTS 法研究白蜡及白蜡高级烷醇对健康的人真皮乳头细胞和二氢睾酮诱导的人真皮乳头细胞增殖作用的影响。目的在于明确白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用效果以及这两个化合物抑制二氢睾酮与雄激素受体结合的能力。

3) 白蜡及白蜡高级烷醇对蛋白表达的调节作用

采用 western blot 探讨白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase3、caspase8、caspase9 和 tgf- β 2 四个蛋白表达量的调节作用。目的在于明确白蜡及白蜡高级烷醇对细胞凋亡信号通路的调节作用。

1.3 研究技术路线

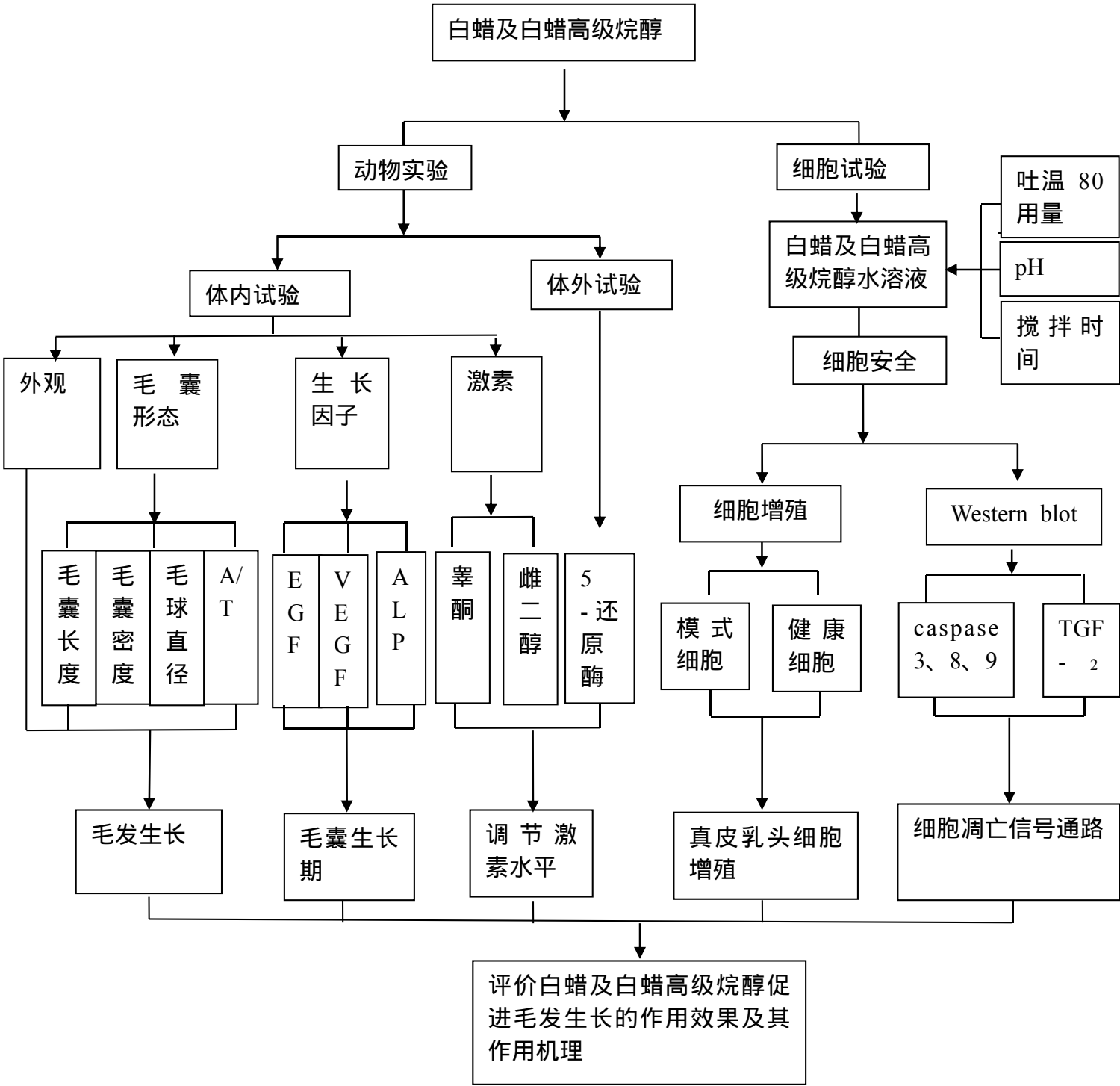


图 1-2 技术路线图

Fig 1-2 The map of technique route

第二章白蜡及白蜡高级烷醇毛囊组织学调查

毛发依附毛囊而生长,毛囊形成于人的胚胎时期,其数量在毛囊形成时就已经确定,并伴随人的一生。在毛囊的一个生长周期内,一般一个毛囊只能长出1~2根毛发,毛发生长4~6年后就会脱落,随后会有新的毛干透过表皮暴露在皮肤外面形成新的毛发。而毛发的直径、长度和脱落与毛囊的循环再生关系密切。毛囊的循环再生分为三个阶段,即毛囊的生长期、退行期、休止期^{[97][28]}。也有文献将毛囊的休止期分为休止期和脱落期两个阶段^[136,137]。在毛囊的生长期,毛囊从毛芽形成开始逐渐向真皮层延伸形成一个完整的毛囊,此时的毛囊长度最长、毛囊直径较粗,毛球直径最大,生成的毛干直径较粗,毛发有光泽且长。到退行期,毛囊上皮细胞开始程序化死^[138]。毛囊萎缩变短,毛球直径缩小,毛发停止生长。随着毛囊向上移动,毛根通过细胞索与毛球相连,当毛囊到达真皮层与皮下组织交界处时,毛球内的细胞处于休眠状态^[28],毛囊停止生长,毛囊长度最短、毛囊直径变细,毛球直径最小,毛干直径缩小,毛发失去光泽,最终脱落^[139]。由此可知,毛囊的长度和毛球直径能够反映毛发的健康状态。毛囊的密度以及生长期毛囊数量和休止期毛囊数量的比值能够反映毛发的脱落情况。因此,我们采用毛囊长度、毛球直径、毛囊密度和生长期毛囊数量与休止期毛囊数量比值四个指标探讨白蜡及白蜡高级烷醇促进脂溢性脱发模式小鼠毛发生长的效果。

2.1 材料与方法

2.1.1.供试药剂

白蜡购自于四川峨眉白蜡研究所。

白蜡高级烷醇由本课题组提供。采用还原法^[111]从白蜡中提取白蜡高级烷醇。在白蜡高级烷醇中含量最高的成分为二十四烷醇、二十六烷醇、二十八烷醇和三十烷醇,其含量分别为11.49%、54.15%、27.64%和3.18%。

丙酸睾酮注射液,规格25mg/ml,购自杭州动物药品厂,生产批号:150813;

非那雄胺购原料药 (99%), 购自大连美仑生物, 批号: M1122A。

灭菌大豆油: 食品级大豆油, 150 °C 干热灭菌 4h;

无水乙醇: 分析级, 天津化学药品三厂

多聚甲醇: 分析级, 天津市瑞金特化学品有限公司

二甲苯: 分析级, 四川西陇化工有限公司

1,2-丙二醇: 分析级, 山东飞扬化工有限公司

高效切片石蜡: 熔点 50 ~ 52 °C 和 54 ~ 56 °C, 上海华灵康复器械厂

氯化钠: 天津市风船化学试剂科技有限公司

氢氧化钠: 天津市风船化学试剂科技有限公司

磷酸氢二钾: 天津市风船化学试剂科技有限公司

磷酸二氢钾: 天津市风船化学试剂科技有限公司

Mayer 苏木素: 北京索莱宝科技有限公司

伊红: 上海联硕生物科技有限公司

中性树胶: 北京索莱宝科技有限公司

硫酸铝钾: 天津市风船化学试剂科技有限公司

碘酸钠: 济宁泰诺化工有限公司

水合氯醛: 上海展云化工有限公司

枸橼酸: 陕西盛瑞医药科技有限公司

柠檬酸: 天津市风船化学试剂科技有限公司

2.1.2 试验仪器

倒置显微镜: 型号 VHX-1000, 基恩, 日本;

石蜡切片机: 型号 RM2126RT, 上海徕卡仪器有限公司;

电热恒温水浴锅: 型号 XMTD-7000, 北京市永光明医疗仪器有限公司;

数显鼓风干燥箱: 型号 GZX-9140 MBE, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

普通光学显微镜: 型号 E800, Nikon, 日本;

超声波清洗机: 型号 SB25-12D, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

2.1.3 试验动物

KM 小鼠 (5 周龄雄鼠) (证书号: 3cdk(川)2013-24), 购自于四川达硕科技, 在室内适应性饲养 1 周, 饲养温度为室温, 光照 L:D=12h:12h, 饲喂人工饲料, 食物和水不限量供应;

2.1.4 药剂配置

(1) 5mg/mL 丙酸睾酮溶液: 1mL 25mg/mL 丙酸睾酮注射液溶解到 4 mL 灭菌大豆油中超声时 10min。

(2) 2%非那雄胺溶液: 精密称取 2.02g 非那雄胺原料 (99%) 用有机溶剂 (乙醇: 丙二醇=80:20) 定容到 100mL。

(3) 白蜡混悬液: 白蜡原料粉碎后过 200 目筛用有机溶液 (乙醇: 丙二醇=80:20) 配置成浓度为 1%、10%、20%的药液, 超声 30min。

(4) 白蜡高级烷醇混悬液: 白蜡高级烷醇用有机溶液 (乙醇: 丙二醇=80:20) 配置成浓度为 0.5%、1%、2%的药液, 超声 30min。

(5) 4%多聚甲醛: 称取 40g 多聚甲醛, 8.5g NaCl, 19.6gK₂HPO₄ 和 2.49g KH₂PO₄, 加水 800mL, 60℃ 水浴锅中加热, 并不断搅拌, 待多聚甲醛软化或溶液成为乳白色溶液时, 滴加 0.1M NaOH 水溶液, 边加边搅拌, 待多聚甲醛溶解后, 补足水到 1L。

Mayer 苏木素溶液: 称取 1g 苏木素, 加蒸馏水 1L 煮沸, 加入 50g 硫酸铝钾 0.2g 碘酸钠, 搅拌溶解后加入 50g 水合氯醛和 1g 枸橼酸, 继续煮沸 5min, 冷却, 过滤。

(6) 伊红 (醇型): 10g 伊红溶解到 1L95%的乙醇中, 滴加 10 滴冰醋酸。

2.1.5 溶剂致敏性试验

选取 20 只 5 周龄 雄性 KM 小鼠 随机分成两组, 每组 10 只, 剪除小鼠背部 (2x3cm) 毛发, 暴露小鼠背部皮肤以脊背为界, 组: 左边涂抹有机溶剂 (乙醇: 丙二醇=80:20), 右边涂抹去离子水, 组: 右边涂抹有机溶剂 (乙醇: 丙二醇=80:20), 左边涂抹去离子水, 连续给药 14d, 每天给药 1h 后观察小鼠背部给药区域皮肤有无红斑、结痂和水肿现象, 并拍照。

2.1.6 模式动物的建立及实验处理

动物模型的建立参照 Renuka^[141]等人的报道。将 275 只 KM 小鼠随机分成 11 组，每组 25 只试验动物（见表 2-1）。除健康小鼠组外，其他处理每天在小鼠背部皮肤皮下注射 0.1mL 5mg/mL 丙酸睾酮，连续注射 28d。皮下给药的同时，除空白组和模式组外，其他处理组按照表 2-1 的试验设计每天在小鼠背部局部（2cmx3cm）涂抹 0.5ml 相应的药液。

表 2-1 试验分组与处理方法

Table 2-1 Treatments for each group

编号 Number	分组 Groups	处理方法 Treatment
A	健康小鼠	不做任何处理
B	模式	皮下注射丙酸睾酮
C	溶剂对照	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹有机溶剂
D	阳性对照 1	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 2%非那雄胺
E	1%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 1%白蜡溶液
F	10%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 10%白蜡溶液
G	20%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 20%白蜡溶液
H	0.5%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 0.5%高级烷醇溶液
I	1%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 1%高级烷醇溶液
J	2%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 2%高级烷醇溶液

2.1.7 外观调查

给药第 28d ,观察各组动物背毛颜色、毛发脱落情况 ,并拍照。同时每组随机取 5 只 ,剪取小鼠给药区域（2cm x 3cm）背部全部毛发，并称重。

2.1.8 组织学调查

采用石蜡切片法调查不同给药时间各组小鼠毛囊形态变化。其操作步骤为

（1）组织块的收集和固定：分别在给药期间的第 14d、21d、28d 取样三次。每次随机选取 1 只小鼠，剪去小鼠背部给药区域毛发，用乙醚迷晕后，脱颈处死。剪下小鼠背部给药部位皮肤，剪下的皮肤面积为 2cm*3cm。剪下的皮肤在 4%多聚甲醛中固定 12h，流水冲洗 4h。

（2）脱水 :根据乙醇浓度梯度从低浓度到高浓度逐渐脱水。即组织片分别依次在 30%、50%乙醇浸泡 1h，70%乙醇过夜，80%、90%、95%（ ）和 95%（ ）乙醇浸泡 1h，无水乙醇（ ）和无水乙醇（ ）各 30min。

(3) 透明：脱水后的组织块依次放在无水乙醇：二甲苯（1：1）混合液中 30min，二甲苯（ ）和二甲苯（ ）溶液中各 30min。

(4) 浸蜡包埋：浸蜡和包埋过程在水浴锅中进行，水浴锅的温度为 58℃~64℃。浸蜡过程为：石蜡：二甲苯（1:1）和石蜡：二甲苯（3:1）各 1h，石蜡（熔点为 50-52℃）和石蜡（熔点为 54-56℃）中各 1h。装盒（蜡块熔点为 54-56℃）。

(5) 切片与贴片：切片的厚度为 6~8μm，连续切片。切片方向为纵切和横向两种方式。蜡块纵切方向为顺着毛囊生长的方向，用于调查毛囊的长度、毛球直径和毛囊密度。蜡块横切方向为垂直毛囊生长的方向。用于调查毛囊生长期（A）和休止期（T）数量，统计 A/T 比值。

(6) 贴片与烤片：将连续的切片取适当长度，切片光滑的一面紧贴含有粘合剂（鸡蛋清与甘油按 3:1 混合均匀）的载玻片上。50℃ 烘箱内过夜。

(7) 脱蜡与水合：烘干后的切片在二甲苯和不同浓度乙醇中进行脱落和水合。其过程为：将切片浸泡在二甲苯中两次，每次 10min、二甲苯与无水乙醇（1：1）混合液 2min，无水乙醇、95%、90%、80%、70%酒精 4min，蒸馏水 2min。

(8) H&E 染色：其操作过程为：氏苏木素 2min，水洗 2min，1%的盐酸酒精分化 5s，自来水洗 3min，0.2%氨水返蓝 25s，自来水洗 2min，蒸馏水洗 1min，70%、80%、90%乙醇 1min，伊红染液 1min，95%乙醇 I、II 各 2min，无水乙醇 I、II 各 4min，二甲苯：无水乙醇=1:1 2min，二甲苯 I、II 各 4min

(9) 封片：切片风干后中性树胶封片

(10) 毛囊形态调查：在倒置显微镜 100x 条件下每个处理组调查 80 根毛囊的长度和毛球的直径，1mm 皮肤长度范围内毛囊的密度，在 100x 条件下调查 1mm 皮肤长度范围内生长期毛囊的数量和休止期毛囊的数量，并统计生长期毛囊数量与休止期毛囊数量比值（A/T）。

2.1.9 数据处理

采用 SAS9.1 统计软件中的 ANOVA 分析不同处理组小鼠的毛发重量、毛囊密度、毛囊生长期和休止期的比例、毛囊长度以及毛囊的毛球直径的平均值±标准误， $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

2.2 结果与分析

2.2.1 有机溶剂致敏性

连续涂抹有机溶剂 14d ,在小鼠背部给药区域皮肤上未见红斑和水肿现象(图 2-1)。表明有机溶剂(乙醇:丙二醇=80:20)对小鼠皮肤没有致敏性,可以用于后续试验。

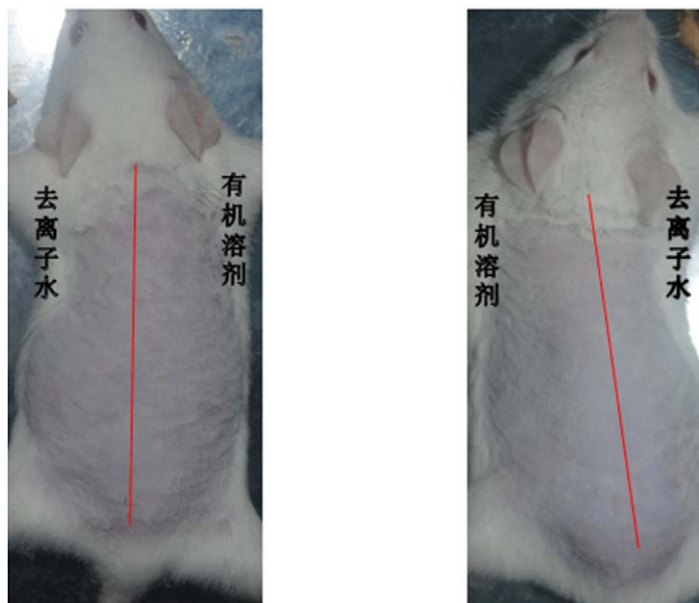


图 2-1 有机溶剂对小鼠皮肤的致敏性

Fig 2-1 The sensitization of organic solvent in skin of mice

2.2.2 外观调查和毛发重量

试验第 28d ,对各组小鼠背部毛发生长状况、颜色、脱落情况等进行观察和比较,发现白蜡组及白蜡高级烷醇组小鼠被毛总体生长情况明显好于模式组和溶剂对照组。其中,给药 28d ,模式组和溶剂组 KM 小鼠毛色发暗,背部毛发脱落明显并散布有斑秃块;2%非那雄组小鼠颈部和背部毛发厚度变薄;白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠仅颈部脱毛。其中,10%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组小鼠背毛顺滑有光泽,背毛生长情况优于 2%非那雄胺(图 2-2)。给药 28d 称取给药区域小鼠背毛重量,结果显示:白蜡及白蜡高级烷醇组和阳性对照组小鼠背毛重量明显高于模式组和溶剂组。10%白蜡和 1%白蜡高级烷醇组小鼠背毛重量明显高于阳性对照,5%、20%白蜡及 0.5%白蜡高级烷醇毛发重量与阳性对照组差异不显著(图 2-3)。



分图 A : CK 组
A: CK group



分图 B:模式组
B:model group



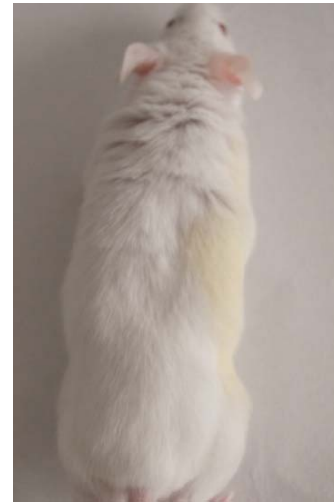
分图 C:溶剂组
C: vehicle group



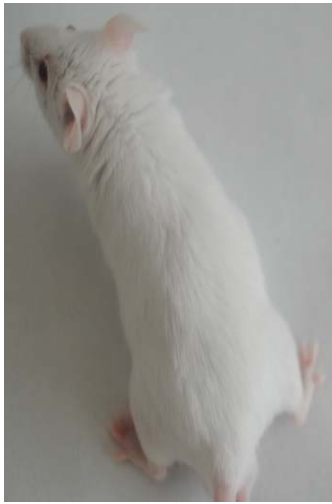
分图 D: 非那雄胺组
D: 2% finasteride group



分图 E:1%白蜡组
E:1% WW group



分图 F: 10%白蜡组
F: 10% WW group



分图 G: 10%白蜡组
G: 20% WW group



分图 H: 0.5%白蜡高级烷醇组
H: 0.5% WWP group



分图 I : 1%高级烷醇
I: 1%WWP group



分图 J : 2%高级烷醇
J: 2% WWP group

图 2-2 试验第 28d 不同处理组小鼠背毛生长情况比较

Fig. 2-2 Comparison of hair growth patterns in various groups at 28 days

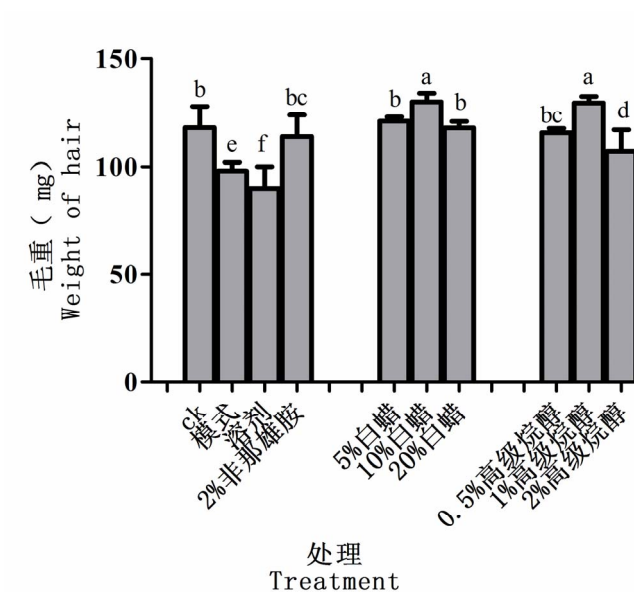
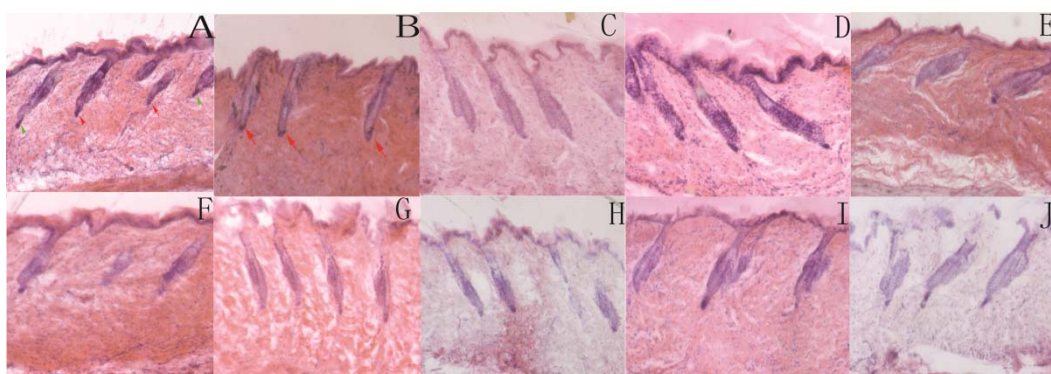


图 2-3 试验第 28d 不同处理组小鼠毛发重量比较

Fig. 2-3 Comparison of hair weights in various groups at 28 days

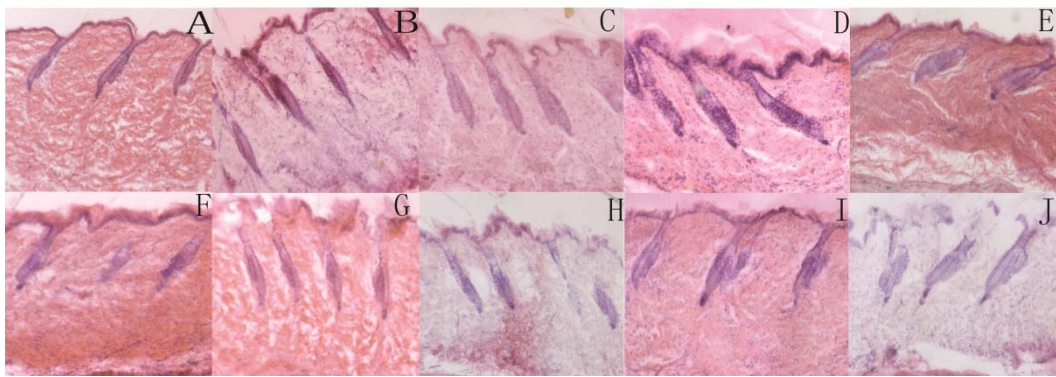
2.2.3 毛囊形态变化

皮下注射丙酸睾酮后，模式组和溶剂组小鼠皮肤内的毛囊微型化。皮下注射丙酸睾酮同时局部涂抹白蜡、白蜡高级烷醇和非那雄胺的小鼠背部皮肤内的毛囊直径和毛囊长度明显大于模式组和溶剂组(图 2-4)。这表明：皮下注射丙酸睾酮能够抑制毛囊的生长，而白蜡、白蜡高级烷醇和非那雄胺能够阻止丙酸睾酮对毛囊的伤害。



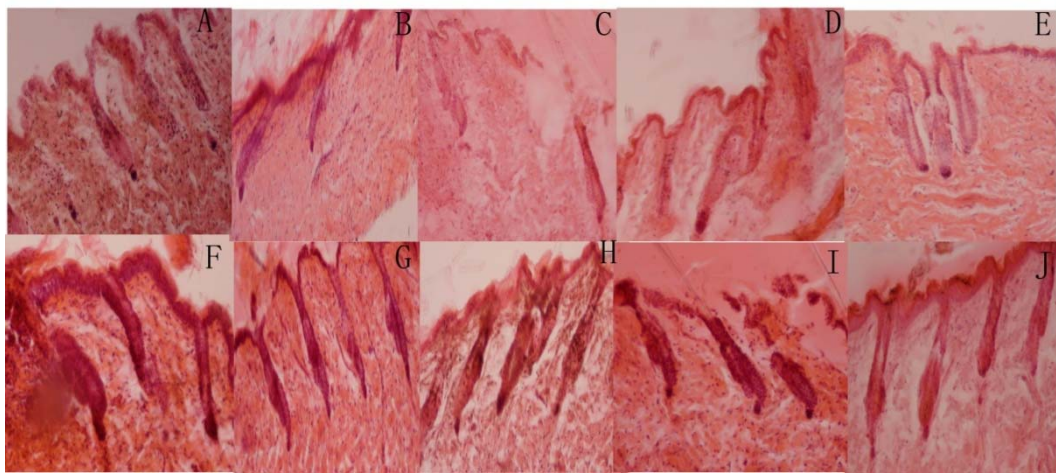
分图 A：14d 各组毛囊形态

A: morphology of hair follicles in different groups at 14d



分图 B : 21d 各组毛囊形态

B:morphology of hair follicles in different groups at 21d



Scale bar: 150um

分图 C : 28d 各组毛囊形态

C:morphology of hair follicles in different groups at 28d

图 2-4 不同时间不同处理组之间毛囊形态变化

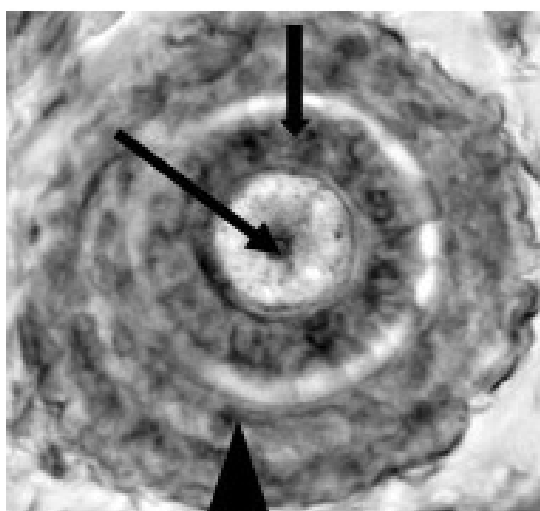
Fig.2-4 Histology of skin sections in different time for vary groups.

注：A：CK 组，B：模式组，C：溶剂组，D：2%非那雄胺组，E：1%白蜡组，F：10%白蜡组，G：20%白蜡组，H：0.5%白蜡高级烷醇组，I：1%白蜡高级烷醇组，J：2%白蜡高级烷醇组。A: CK group, B: model group, C: vehicle group, D: 2% finasteride group, E: 1% WW group, F: 10% WW group, G: 20% WW group, H: 0.5% WWP group, I: 1%WWP group, J: 2% WWP group

2.2.4 毛囊组织学调查

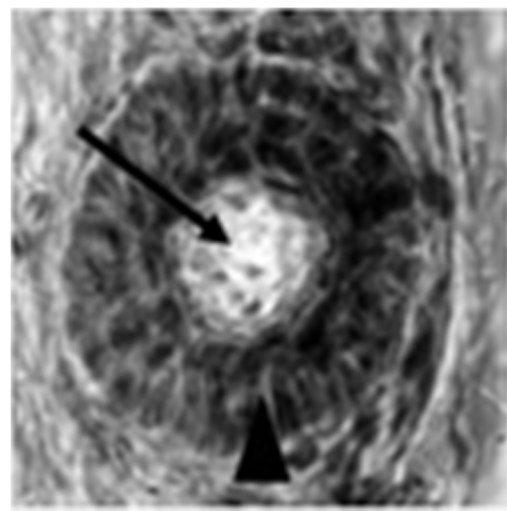
(1) 毛囊生长期 (A) 与休止期 (T) 比值

组织片横向切片用于调查生长期毛囊数量和休止期毛囊数量，其判断标准为生长期毛囊其横断面可以明显看到四个圆环，从内到外依次为毛干、毛囊内根鞘、毛囊外根鞘和结缔组织，且毛囊外根鞘结构清晰 (图 2-5A)。退行期毛囊的评价指标为其毛囊横断面内只能看到三个圆环，从内到外依次为毛干、毛囊外根鞘和结缔组织，且毛囊外根鞘结构比较紊乱 (图 2-5B)。



分图 A：生长期毛囊

A: Hair follicle structures of terminal anagen



分图 B：退行期毛囊

B: Hair follicle structures of terminal telogen

图 2-5 生长期毛囊和退行期毛囊形态结构

Fig.2-5 Hair follicle structures of terminal anagen and terminal telogen.

注：长箭头指示的位置为毛干，短剑头指示的位置为毛囊的内根鞘，三角形指示的位置为毛囊的结缔组织。Triangle indicated outer root sheath, thick arrow indicated inner root sheath, long arrow indicated hair shaft.

在三次调查中，白蜡、白蜡高级烷醇和 2%非那雄胺组小鼠毛囊 A/T 比值明显高于模式组和溶剂组。且白蜡、白蜡高级烷醇和 2%非那雄胺组小鼠生长期毛囊数量随着调查时间的增加而增加。在白蜡组中 10%白蜡组小鼠 A/T 比值高于 1%和 20%白蜡组小鼠 A/T 比值，在白蜡高级烷醇组中 1%白蜡高级烷醇组小鼠 A/T 比值最高。试验第 14d，10%、和 1%白蜡高级烷醇组小鼠 A/T 比值与 2%非那雄胺组小鼠 A/T 比值差异不显著。试验第 21d，10%白蜡组小鼠 A/T 比值明显高于 2%非那雄胺组和 1%白蜡高级烷醇组，而 1%白

蜡高级烷醇组小鼠 A/T 比值与 2%非那雄胺组小鼠 A/T 差异不显著。试验第 28d , 1%白蜡高级烷醇组小鼠 A/T 比值明显高于 2%非那雄胺组小鼠 A/T 比值 , 而低于 10%白蜡组小鼠 A/T 比值 (表 2-2)。

表 2-2 不同处理组之间小鼠毛囊 A/T 比值

Table 2-2 Follicular A/T ratios in skin sections from various groups

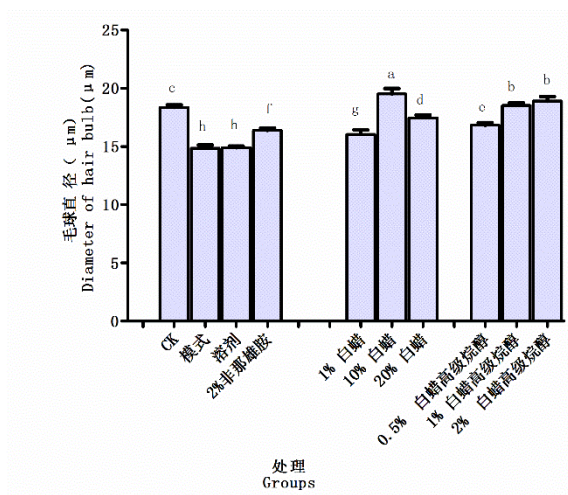
分组	处理	14 天	21 天	28 天
Groups	Treatment	14 days	21 days	28 days
对照组	CK	0.69±0.06c	0.87±0.08d	1.07±0.09e
	模式	0.32±0.06e	0.25±0.06e	0.37±0.04f
	溶剂	0.50±0.08d	0.24±0.02e	0.52±0.11f
	2%非那雄胺	0.87±0.12ab	0.96±0.11b	1.47±0.31d
	1% 白蜡	0.82±0.10bc	1.02±0.17b	1.84±0.29bc
	10% 白蜡	0.95±0.22ab	1.46±0.03a	2.23±0.27a
	20% 白蜡	0.90±0.17ab	1.01±0.10b	1.37±0.10dc
处理组	0.5% 白蜡高级烷醇	0.71±0.14c	0.80±0.09c	1.69±0.25c
	1% 白蜡高级烷醇	0.82±0.15a	1.00±0.10b	1.96±0.23b
	2% 白蜡高级烷醇	0.73±0.13c	0.98±0.12b	1.85±0.18bc

注：A/T 比值表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，N=20，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异（ $P<0.05$ ）。

Values were expressed as the $\bar{x} \pm S.E.M$, N = 20, with different lowercase letters (a–f) indicate significant differences according to one-way analysis of variance (ANOVA) ($P<0.05$).

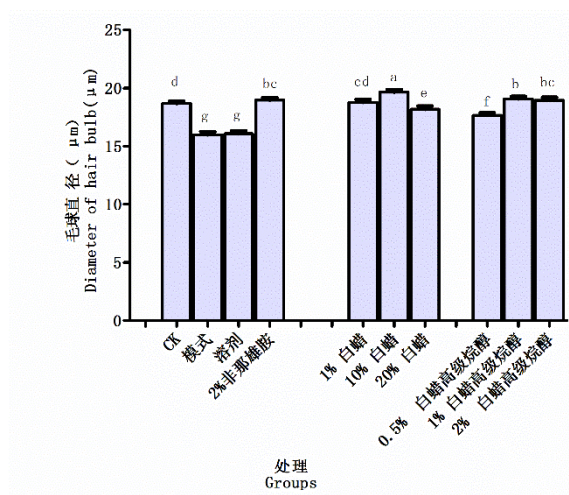
（2）毛球直径

随着调查时间的延长，各组小鼠毛球直径增加。在三次调查中，白蜡组及白蜡高级烷醇组小鼠毛球直径明显高于模式组和溶剂组，其中 10%白蜡组毛球直径最大，其值明显高于阳性对照组和健康组。试验第 14d，随着白蜡高级烷醇浓度的增加毛球直径增加，其毛球直径明显大于 2%非那雄胺组，而低于 10%白蜡组毛球直径。在白蜡组中，10%白蜡组毛囊直径明显高于 5%和 20%白蜡组毛球直径。试验第 21d，各组毛球直径增加，其中，1%、20%白蜡组、1%、2%白蜡高级烷醇组毛球直径与阳性对照组差异不显著。试验第 28d，1%白蜡高级烷醇组毛球直径增加明显，其毛球直径仅次于 10%白蜡组，与 1%白蜡组毛球直径差异不显著，而明显高于其他处理组毛球直径 (图 2-6)。



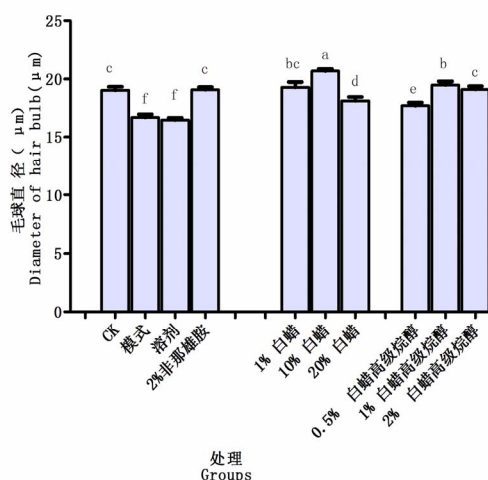
分图 A：14d 各处理组毛球直径

A: Diameter of hair bulbs in skin sections from difference groups at 14d



分图 B：21d 各处理组毛球直径

B: Diameter of hair bulbs in skin sections from difference groups at 21d



分图 C：28d 各处理组毛球直径

C: Diameter of hair bulbs in skin sections from difference groups at 28d

图 2-6 不同时间不同处理组之间毛球直径

Fig.2-6 Diameter of hair bulbs in skin sections from difference groups.

(3) 毛囊密度

试验期间白蜡及高级烷醇组毛囊密度显著大于模式组和溶剂组。白蜡组小鼠毛囊密度随着试验时间增加而增加，其中 10%白蜡组毛囊密度明显高于 1%和 20%白蜡组毛囊密度；白蜡高级烷醇组小鼠在试验第 21d 毛囊密度达到峰值。在三次调查中 1%白蜡高级烷醇毛囊密度明显高于 0.5%和 2%白蜡高级烷醇组毛囊密度。相同用量的白蜡及白蜡高

级烷醇在试验第 14d ~ 21d , 1%白蜡高级烷醇组毛囊密度明显高于 1%白蜡毛囊密度 , 而在试验第 28d , 1%白蜡高级烷醇组毛囊密度与 1%白蜡组之间差异不显著 (表 2-3)。

表 2-3 不同处理组毛囊密度变化

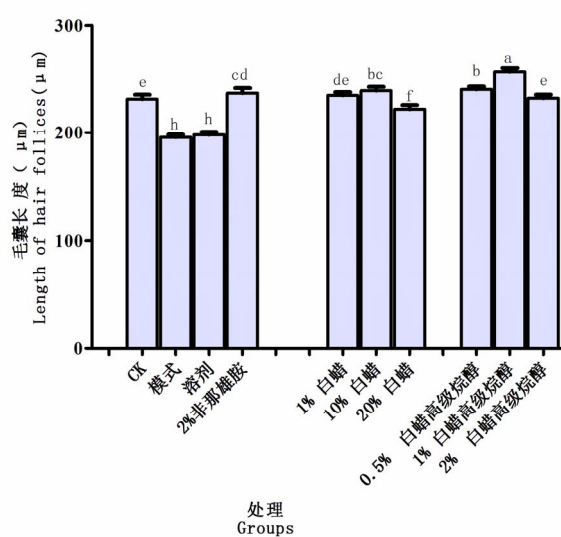
Table 2-3 Follicular density in skin sections from various groups

处理 Treatment	14 天 14 days	21 天 21 days	28 天 28 days
Ck	6.15±0.15d	8.90±0.19a	9.00±0.18a
模式组	5.40±0.11g	6.70±0.28e	6.05±0.17g
溶剂组	5.50±0.14fg	6.60±0.13e	6.10±0.16g
2%非那雄胺	7.00±0.19a	7.35±0.11bc	7.80±0.17b
1%白蜡	6.15±0.22d	6.60±0.18e	6.80±0.19d
10%白蜡	6.55±0.14c	7.20±0.14cd	7.40±0.22c
20%白蜡	5.60±0.11f	6.40±0.11f	6.50±0.14de
0.5%白蜡高级烷醇	6.65±0.11c	7.45±0.11b	6.50±0.11ef
1%白蜡高级烷醇	6.80±0.20b	7.10±0.16d	6.65±0.17de
2%白蜡高级烷醇	5.75±0.10e	7.45±0.11b	6.45±0.14f

注：毛囊密度表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。Values were expressed as the $\bar{x} \pm S.E.M$, N = 20, with different lowercase letters (a–f) indicate significant differences according to one-way analysis of variance (ANOVA) ($P<0.05$).

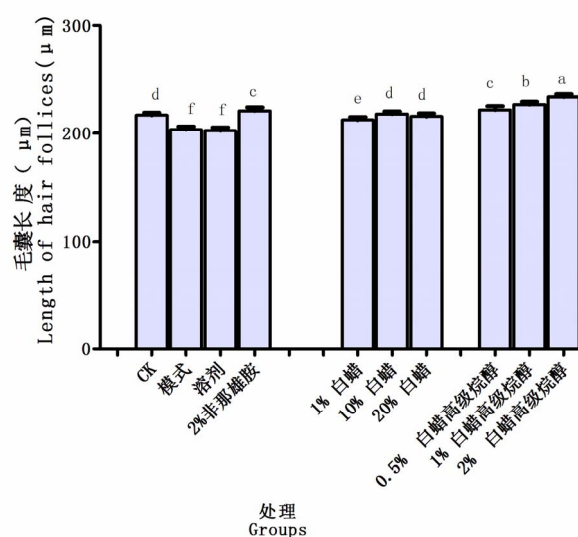
(4) 毛囊长度

试验期间 ,白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠毛囊长明显高于模式组和溶剂组。试验第 14d , 1%白蜡高级烷醇组毛囊长度为 $256.96 \pm 3.63\mu\text{m}$,明显大于阳性对照组($236.95 \pm 4.73\mu\text{m}$) , 健康小鼠组 ($231.52 \pm 4.03\mu\text{m}$) 和白蜡组；在白蜡组中，10%白蜡组小鼠毛囊长度明显高于 1%和 20%白蜡组，而与阳性对照组差异不显著。试验第 21d , 各组毛囊长度缩短，其中白蜡组毛囊长度明显低于白蜡高级烷醇组。在白蜡组中，10% , 20%白蜡组之间毛囊长度明显低于 2%非那雄胺组，而与 CK 组差异不显著。在白蜡高级烷醇组中，随着白蜡高级烷醇浓度的增加毛囊长度增加，其中 1%、2%白蜡高级烷醇组毛囊长度明显高于 2%非那雄胺组。试验第 28d , 白蜡和白蜡高级烷醇组毛囊长度增加，而 2%非那雄胺组毛囊长度降低。在白蜡组中，随着白蜡浓度的增加毛囊长度增加，而在白蜡高级烷醇组中，1%白蜡高级烷醇组毛囊长度明显高于 0.5%和 1%白蜡高级烷醇组毛囊长度 (图 2-7)。



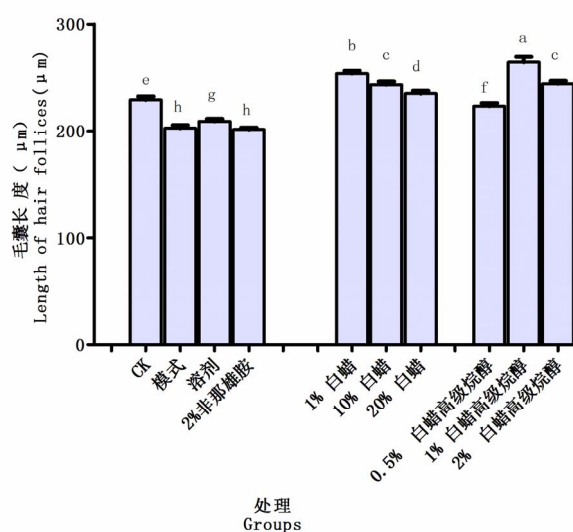
分图 A：14d 各处理组毛囊长度

A: Length of hair bulbs in skin sections from difference groups at 14d



分图 B：21d 各处理组毛囊长度

B: Length of hair bulbs in skin sections from difference groups at 21d



分图 C：28d 各处理组毛囊长度

C: Length of hair bulbs in skin sections from difference groups at 28d

图 2-7 不同时间不同处理组之间毛囊长度比较

Fig.2-7 Length of HF's in skin sections from difference groups.

2.3 讨论

模式组和溶剂组小鼠背部出现明显的雄激素脱发症状，而健康组小鼠背毛顺滑，有光泽，没有明显的脱毛区域。组织学结果显示，模式组和溶剂组小鼠毛囊直径变细，毛囊

密度降低。表明雄激素性脱发小鼠建立成功，溶剂组对本实验没有干扰。试验中发现在阳性对照组和药剂处理组中小鼠颈部有毛发脱落的现象，而小鼠背部毛发顺滑有光泽，且无明显的斑秃块。出现这种现象的原因可能是建模时人为或针孔扎伤造成。因为小鼠建模采用的是皮下注射丙酸睾酮，其给药部位为小鼠颈部皮肤，在入针给药时需要用手指捏住此处皮肤并向上提拉。选择此部位是由于此处皮肤比较松弛，相对于其他部位而言，此部位不易对小鼠皮下组织造成伤害。

毛囊生长经历了三个阶段，生长期、退行期和休止期，在生长期内毛囊的长度增加，毛发生长旺盛，生成的毛干较粗。在退行期和休止期，毛囊的长度逐渐缩短，毛发停止生长，毛干萎缩变短，毛发脱落^[139]。所以，毛囊长度、毛囊密度和毛囊生长期与休止期的比值（A/T）常被用于评价药物促进毛囊生长的指标。例如 Noubarani^[76]等人采用毛囊密度和 A/T 两个指标评价铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris* Linn)对毛囊生长的促进作用。Dhanotia^[141]等人采用毛囊密度、A/T 和毛囊长度三个指标评价药西瓜 (*Citrullus colocynthis* Schrad) 对毛囊生长的促进作用。但是，在生长期内毛囊由表皮部逐渐延伸到真皮部，毛囊长度逐渐增加，在退行期内毛囊由真皮部收缩到表皮部，毛囊长度逐渐降低，而相同长度时，生长期和退行期的毛球直径存在显著性差异。单从长度上而言，不能完全区分毛囊所处的发育阶段。毛球直径也是评价毛囊生长的关键指标。因此，我们选用毛囊长度、密度、毛球直径、A/T 比值四个指标评价白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式小鼠的作用效果。结果显示：白蜡及白蜡高级烷醇能明显促进毛囊长度、密度、毛球直径和 A/T 比值的增加，其值高于阳性对照。表明白蜡及白蜡高级烷醇能促进脂溢性脱发小鼠毛发的生长，可以用于脂溢性脱发的治疗。

外用药物作用于毛囊发挥药效时受到药物粒径大小，皮脂腺分泌的皮脂和毛囊循环期的影响^[142]，一般分子量小于 300 道尔顿，带正电，具有脂溶性或一定水溶性的物质易穿过毛囊内的细胞及细胞间隙达到作用位点^[142-144]。白蜡及白蜡高级烷醇均为大分子化合物，但其化学成分存在着差异。白蜡的化学成分主要为碳原子数为 24~30 的一元直链饱和醇和酸形成的蜡酯，其分子重在 700~875 道尔顿之间。白蜡高级烷醇的化学成分主要为碳原子数为 24~30 的一元直链饱和醇^[112]，其分子量在 354~438 道尔顿之间。相对于白蜡而言，白蜡高级烷醇分子量小，含有羟基具有一定的亲水性。因此我们推测白蜡高级烷醇较白蜡更易透过毛囊内的细胞间隙或穿过表皮最外层的角质层细胞和细胞间隙作

用于靶标位点,其促进毛发生长的作用效果优于白蜡。预实验结果显示白蜡用量高于 20% 时在小鼠背部形成一层蜡膜,阻止毛发的生长,使毛发成片脱落。所以

然而,试验结果显示,相同用量时,给药第 21d,白蜡高级烷醇处理组小鼠的毛囊密度和毛球直径高于白蜡,然而在给药第 28d 时,白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠毛囊毛球直径差异不显著,而白蜡高级烷醇组小鼠毛囊长度明显高于白蜡组。出现这种现象的原因可能是在白蜡中除了蜡酯外还含有少量的蜂蜡醇、色素、磷脂、树脂,烃、游离的不饱和脂肪酸,其中不饱和脂肪酸主要为油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸^[109],这些物质分子量小于或等于 300 道尔顿易透过毛囊进入靶标位点。此外,亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸是人体必需脂肪酸,亚油酸和亚麻酸在体内可以合成花生四烯酸。花生四烯酸具有第二信使的作用,同时具有能促进或放大其他第二信使的作用^[145]。毛囊可能是花生四烯酸合成和代谢的场所,在毛囊内花生四烯酸诱导并激活毛球内的信号通路,刺激毛球内的细胞增殖,增加毛球直径,毛球内信号通路被激活后还能刺激毛囊隆突部位的干细胞向下分化形成新的毛芽,促进次生毛囊的生长。而磷脂是构成生物膜的主要成分,对细胞具有活化再生能力^[146],在体内磷脂还具有很强的表面活性,能够调节细胞代谢和细胞膜的渗透性^[147]。磷脂也有可能是作为表面活性剂,促进亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸与毛囊内的细胞结合。关于白蜡中其他微量成分对毛囊生长的调节作用还需进一步研究。

毛囊的长度与毛囊的循环关系密切。毛囊由退行期进入休止期的转变过程中,毛囊的长度逐渐缩短,毛囊由休止期进入生长期的过程中毛囊的长度逐渐增加。试验中发现:试验第 21d,各组毛囊长度降低,试验第 28d,白蜡及白蜡高级烷醇组和 CK 组小鼠毛囊长度上升,而阳性对照组毛囊长度依然降低。从毛囊形态结构图中我们了解到出现这种现象的原因是,试验第 14d,模式组、溶剂组处于退行期,2%非那雄胺组毛囊还有一部分处于休止期,而白蜡和白蜡高级烷醇组毛囊处于退行期和休止期。试验第 21d,除模式组、溶剂组和 2%非那雄胺组外,其他处理组毛囊基本上完成一次循环进入下一个毛囊循环阶段。由于 2%非那雄胺延长了毛囊的退行期,导致毛囊的长度随时间的增加而缩短,而白蜡和白蜡高级烷醇能够缩短毛囊的休止期,促进毛囊进入生长期,使毛囊试验第 21d 时长度降低,而后毛囊长度有增加的现象。

2.4 小结

(1) 皮下连续注射 5%丙酸睾酮 28d ,能成功建立脂溢性脱发毛色小鼠。有机溶剂(乙醇:丙二醇=80:20)对小鼠皮肤没有致敏性并且对试验结果没有影响,可以用于后续试验。

(2) 在模式小鼠背部局部涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后小鼠背毛有光泽,未见明显的脱毛区域。组织学结果显示:白蜡及白蜡高级烷醇具有促进毛囊长度、毛囊密度、毛球直径和生长期毛囊数量与休止期毛囊数量比值(A/T)的增加。10%白蜡和 1%白蜡高级烷醇促进小鼠毛发生长的效果优于 2%非那雄。其中 10%白蜡对毛囊 A/T 比值和毛球直径的作用效果优于 1%白蜡高级烷醇。1%白蜡高级烷醇对毛囊长度的作用效果优于 10%白蜡。相同用量时,白蜡高级烷醇对毛囊长度、毛囊密度、毛球直径和 A/T 的作用效果优于白蜡。

第三章白蜡及白蜡高级烷醇对激素的调节作用

脂溢性脱发与激素的调节有关^[18]。体内直接分泌的激素有睾酮和雌二醇两种，其中作用于皮肤的睾酮主要来源于性腺和皮脂腺。由性腺分泌的睾酮被分泌后由血液运输到全身各个器官。雌二醇的来源因性别不同而存在差异。对于男性而言，雌二醇不能由腺体直接产生，而是睾酮在芳香酶的催化下生成。对女性而言雌二醇由卵巢分泌，随血液运输到全身各个器官。睾酮进入血液后大部分被转化为无活性的物质排出体外，只有少部分睾酮在 5α -还原酶和芳香酶的作用下不可逆的生成高活性的二氢睾酮和 17β -雌二醇。因此雄激素的活性形式为睾酮、二氢睾酮和 17β -雌二醇三种形式^[1]。具有活性的雄激素与靶标细胞内的雄激素受体结合后发挥生理活性。在正常情况下，雄激素的活性产物共同维护正常的生理功能，当血液中雄激素的含量打破平衡时会引起一系列病症^[1]。如血液中雄激素降低时会导致骨质疏松、过高会引起女性多囊卵巢综合征^[2]。在头部睾酮与型 5α -还原酶共同作用生成二氢睾酮，在芳香酶的催化下生成 17β -雌二醇。二氢睾酮与受体的亲和力强于睾酮，在毛囊内二氢睾酮与毛囊靶标细胞内的雄激素受体结合，抑制真皮乳头细胞的生长，并干扰毛囊细胞的生长代谢，使毛囊提前进入休止期，导致新毛发还未形成，旧毛发已脱离^[18]。由此可知，抑制 5α -还原酶的活性可以有效的阻止睾酮对毛囊的伤害。存在于头部催化睾酮生成二氢睾酮的 5α 还原酶为 型 5α 还原酶^[148]。目前开发的作用于 5α 还原酶的药剂有非那雄胺和度他雄胺，其中非那雄胺为 型 5α 还原酶抑制剂，度他雄胺对 型和 型 5α 还原酶均具有较好的抑制活性。无论是 型还是 型 5α -还原酶抑制剂其作用机理都是作用于 NADPH 辅酶，降低 5α -还原酶活性，抑制毛囊中睾酮转变为二氢睾酮^[59]。有文献报道，调节体内激素水平也可以有效的阻止毛发的脱落。如中药育发液，齐墩果酸均能通过调节小鼠体内激素水平达到治疗脱发的目的。甚至临床上应用 17α 雌二醇或 17β -雌二醇治疗脱发^[149]。为了明确白蜡及白蜡高级烷醇治疗脱发的作用机理，我们研究这两个物质对睾酮和雌二醇的调节作用以及对 5α -还原酶活性的抑制作用。为白蜡产品的开发奠定理论基础。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试药剂和仪器设备

小鼠睾酮 (T) 酶联免疫分析试剂盒：上海酶联生物科技有限公司，批号：201604

小鼠雌二醇 (E2) 酶联免疫分析试剂盒：上海酶联生物科技有限公司，批号：201604

考马斯亮蓝试剂盒：生工生物工程有限公司批号：C804DB0002

酶标仪：赛默飞世尔科技，型号 3001-1592

振荡培养箱：伊孚森生物技术有限公司，型号：ecotron

高效液相色谱仪：安捷伦科技有限公司，型号 1200

3.1.2 试验动物

KM 小鼠 (5 周龄雄鼠) (证书号：SCXK (京) 2014-004)，购自于北京华阜康生物科技股份有限公司，批号：11401300042992，在室内适应性饲养 1 周，饲养温度为室温，光照 L:D=12h:12h，饲喂人工饲料，食物和水不限量供应；

3.1.3 药剂配置

(1) 1mM/L 睾酮溶液：精密称取 29mg 睾酮，用 95%乙醇定容至 100 mL。

(2) 0 μ g/mL 非那雄胺溶液：精密称取 10mg 睾酮，用 95%乙醇定容至 100 mL，吸取 1mL 母液用 95%乙醇定容到 10mL 容量瓶中。

(3) 20mM 磷酸钠溶液：精密称取 760mg 磷酸钠，蒸馏水定容到 100ml。

(4) 酶提取液：精密称取 760mg 磷酸钠，1090mg 蔗糖和 37mgEDTA 用蒸馏水定容 100mL，备用。

(4) 白蜡溶液和高级烷醇溶液：称取一定重量的白蜡及白蜡高级烷醇添加 5%吐温水溶液混合均匀，用 5%柠檬酸调节溶液 pH3~4，91℃水浴加热搅拌 30min，取出室内静置放冷。用 0.1M NaOH 溶液调节溶液 pH7.2。

3.1.4 动物分组、模型的建立及组织样品的制备

将 90 只 KM 小鼠随机分成 9 组，每组 10 只试验动物，分组情况如下（见表 3-1）。动物模型的建立参照 2.1.2.1 实验操作。给药第 28d、60d 时，各组随机选取 5 只小鼠，取小鼠心脏血。室温静置 30min，3500rpm，离心 10min，用一次性注射器抽取上层血清，保存在-80℃冰箱内，备用。

表 3-1 实验分组信息和药剂处理

Table 3-1 Information of animals and drug in each group

编号 Number	分组 Groups	处理方法 Treatment
A	CK	不做任何处理
B	模式	皮下注射丙酸睾酮
C	阳性对照	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 2%非那雄胺
D	0.5%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 0.5%高级烷醇
E	1%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 1%高级烷醇
F	2%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 2%高级烷醇
G	5%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 5%白蜡
H	10%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 10%白蜡
I	20%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 20%白蜡

3.1.5 血液中睾酮的含量测定

采用睾酮酶联免疫试剂盒测定小鼠血液中睾酮的含量。测定方法按照说明书的操作用进行。具体步骤为：

（1）标准曲线的测定

A、将睾酮标准品（480nmol/L）按照等比关系用标准品稀释液稀释，分别配置成浓度为 0、15、30、60、50、120、240nmol/L 6 个浓度。

B、加样孵育

在酶标包被板中加入不同浓度的标准品，每个浓度 3 个复孔，每孔 50μL，37℃孵育 30min。

C、洗涤

弃去液体，甩干，每孔加 250μL 洗液，放置 30s，弃去，重新加入洗液，如此反复洗涤 5 次，拍干。

D、加酶孵育、洗涤

除 0 浓度外，每孔加酶标试剂 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。洗涤 5 次。

E、显示

每孔加入 50 μ L 显色剂 A 和 50 μ L 显色剂 B，混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显示 10min

F、终止反应、测定 OD 值

每孔加终止液 50 μ L，在 450nm 波长测定各个孔的 OD 值。

(2) 样品的测定

将样品从冰箱内取出，放在室温待温度冷却到室温，在酶包被板中每孔加入 10 μ L 待测样品和 40 μ L 样品稀释液。随后操作步骤参照标准曲线测定步骤 B~F 进行测定样品中睾酮的 OD 值

(3) 睾酮含量计算

在 excel 表中，根据睾酮标准品浓度与 OD 值绘制标准曲线，计算标准曲线回归方程，标准曲线回归方程的 R² 大于 0.95 可以用于样品睾酮的计算。将样品中测定的 OD 值代入标准曲线回归方程计算测试样品中睾酮的含量(CT 测试)。样品中睾酮的含量计算公式如下：

$$CT = CT_{\text{测试}} \times 5$$

式中：

CT：样品中睾酮的含量

CT_{测试}：测试样品时睾酮的含量

3.1.6 血液中雌二醇的含量测定

采用雌二醇酶联免疫试剂盒测定小鼠血液中雌二醇的含量。测定方法按照说明书的操作进行。具体步骤为：

(1) 标准曲线的测定

A、将雌二醇标准品（400pmol/L）按照等比关系用标准品稀释液稀释，分别配置成浓度为 0、12.5、25、50、100、200nmol/L 6 个浓度。B~F 操作步骤同 3.1.2.1

(2) 样品的测定

将样品从冰箱内取出，放在室温待温度冷却到室温，在酶包被板中，每孔加入 10 μ L 待测样品和 40 μ L 样品稀释液。随后操作步骤参照标准曲线测定步骤 B ~ F 进行测定样品中雌二醇的 OD 值

(3) 雌二醇含量计算

在 excel 表中，根据睾酮标准品浓度与 OD 值绘制标准曲线，计算标准曲线回归方程，标准曲线回归方程的 R² 大于 0.99 可以用于雌二醇的计算将样品中测定的 OD 值代入标准曲线回归方程计算出样品中雌二醇的含量(CE 测试)。样品中雌二醇的含量计算公式如下：

$$CE = CE_{\text{测试}} \times 5$$

式中：

CE：样品中雌二醇睾酮的含量

CE_{测试}：测试样品时雌二醇的含量

3.1.7 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用

(1) 5 α -还原酶的提取

KM 小鼠体重为 18-22g，禁食不禁水过夜脱颈处死，在冰上提取小鼠附睾，剪碎，称重，加入 3 倍量预冷酶提取液在玻璃匀浆器中匀浆，匀浆液于 4℃，10000g 离心 50min 取上清液，分装，-80℃ 保存。

(2) 蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝试剂盒测定提取液中总蛋白的含量。操作步骤为：

A、牛血清白蛋白标准曲线的制备

将牛血清白蛋白标准品用标准品稀释液稀释成浓度为 0、0.025、0.05、0.1、0.3、0.4、0.5mg/mL 八个浓度，每个浓度取 20 μ L 加入 96 孔板中，每个浓度 3 个复孔，随后加入 200 μ L 显色剂，轻轻混匀，室温显色 5min，使用酶标仪在波长为 595nm 时测定牛血清白蛋白的 OD 值，根据标准品浓度与 OD 值在 excel 中绘制标准曲线，计算标准曲线回归方程

B、样品中蛋白的测定

将样品用酶提取液稀释 10 倍 ,加入到 96 孔板中 ,每个浓度 3 个复孔 ,每个复孔 20 μ L ,随后加入 200 μ L 显色剂 ,轻轻混匀 ,室温显色 5min , 595nm 波长测定样品的 OD 值

C、样品中蛋白含量的计算

标准曲线回归方程的 R^2 大于 0.995 可以用于样品蛋白浓度的计算。将样品测定的 OD 值代入牛血清白蛋白标准回归方程中计算样品中蛋白的含量(CP 测试)。样品中蛋白的含量计算公式如下：

$$CP = CP_{\text{测试}} \times 10$$

式中：

CP：样品中蛋白的含量

$CP_{\text{测试}}$ ：测试样品时蛋白的含量

(3) 最适 5 α -还原酶添加量的选择

参照 Shweta^[150]报道的方法 ,在 5mL 离心管中添加 0.1mL 1mM/L 睾酮溶液 ,0.1 ~ 0.9mL 的 5 α -还原酶提取液 ,用 20mM 磷酸钠溶液补足到 1ml ,混合均匀 ,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 60min ,加入 2ml 乙酸乙酯终止反应 ,漩涡震荡 1min ,3500rpm 离心 10min ,取有机层 ,蒸干 ,添加 2ml 甲醇溶解 ,0.22 μ m 过滤膜过滤。滤液采用高效液相(HPLC)测定睾酮的含量。HPLC 条件：流动相：甲醇-水 80:20 ,柱温：室温 ,流速：0.6ml/min ,进样量 20 μ l ,检测波长 242nm。

(4) 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用

在 5mL 离心管中添加 0.1mL 1mM/L 睾酮溶液 ,0.1mL EDTA 水溶液 ,0.3mL 的 5 α -还原酶和 0.3mL 不同浓度白蜡(0.5、1、2、4 mg/mL)和白蜡高级烷醇(1、2、4、8mg/mL)和非那雄胺(0.0125、0.0625、0.125 、 0.25mg/mL) ,添加相同用量的 5%吐温 80 作为空白对照 (CK) 混合均匀 ,用 20mM 磷酸钠溶液补足到 1.5mL。在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 60min ,加入 3mL 乙酸乙酯终止反应 ,漩涡震荡 1min ,3500rpm 离心 10min ,取有机层 ,蒸干 ,添加 2mL 甲醇溶解 ,0.22 μ m 过滤膜过滤。滤液采用高效液相(HPLC)测定睾酮的含量。根据睾酮标准曲线 ,计算样品反应后溶液中残留的睾酮量 (C)。按照下列公式计算睾酮的反应量 (R) 5 α -还原酶的抑制率和睾酮转化率。

$$R = C_{60\text{min}} - C_{0\text{min}}$$

式中：

R: 辜酮的反应量；

C_{60min}：反应 60min 后反应体系中辜酮的量；

C_{0min}：反应 60min 后反应体系中辜酮的量

$$I\% = \frac{R_{\text{空白}} - R_{\text{样品}}}{R_{\text{空白}}} \times 100$$

式中：

I%：5 α -还原酶的抑制率；

R_{空白}：空白对照组反应体系中辜酮的反应量；

R_{样品}：样品组反应体系中辜酮的反应量

$$T = \frac{R_{CK} - R_{\text{样品}}}{R_{CK}}$$

式中：

T：辜酮转化率；

R_{CK}：空白对照组反应体系中辜酮的转化率；

R_{样品}：样品组反应体系中辜酮的转化率

(5) 辜酮标准曲线

精密称取 28.84mg 辜酮标准品，用 95%的甲醇（色谱级）配置成浓度为 10mmol/L 母液，按等比关系将母液稀释成浓度为 0.5、1、2、4、8、10mmol/L 的供试药液。HPLC 条件：流动相：甲醇-水 80:20，柱温：室温，流速：0.6mL/min，进样量 20ul，检测波长 242nm 测量不同浓度辜酮溶液的 OD 值。根据浓度和 OD 值绘制辜酮标准曲线，标准曲线回归方程的 R² 大于 0.999 可以用于反应体系中辜酮浓度的计算。

3.1.8 数据处理

采用 SAS9.1 统计软件中的 ANOVA 分析不同处理组小鼠辜酮和雌二醇含量殖的平均值 \pm SE，不同字母表示有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

3.2 结果与分析

3.2.1 睾酮的含量

给药第 28d ,白蜡组、白蜡高级烷醇组和非那雄胺组小鼠体内睾酮含量明显低于模式组。在白蜡组中,随着白蜡浓度的增加,睾酮的含量增加。其中 5%白蜡组小鼠体内睾酮的含量明显低于非那雄组,10%、20%白蜡组睾酮的含量与非那雄胺组之间差异不显著。在白蜡高级烷醇组中,不同浓度白蜡高级烷醇组之间睾酮的含量差异不显著,而且三个浓度白蜡高级烷醇组睾酮含量与非那雄组差异不显著。不同浓度白蜡高级烷醇组睾酮含量与不同浓度白蜡组之间差异不显著(图 3-1A)。

给药第 60d ,在白蜡组中,随着白蜡浓度的增加,小鼠血液中睾酮的含量增加,其中,不同浓度白蜡组之间小鼠血液中睾酮的含量差异不显著,其值明显高于非那雄胺组,而与模式组差异不显著。在白蜡高级烷醇组中,随着白蜡高级烷醇浓度的增加小鼠血液中睾酮的含量降低。其中 2%白蜡高级烷醇组小鼠血液中睾酮的含量明显低于模式组,其值与非那雄胺组之间差异不显著(图 3-1D)。

3.2.2 雌二醇的含量

给药第 28d 模式组小鼠体内雌二醇含量与 CK 组和 2%非那雄胺组之间差异不显著。在白蜡组中,5%、20%白蜡组小鼠体内雌二醇含量与模式组之间差异不显著,10%白蜡组小鼠体内雌二醇含量明显低于模式组,而与 CK 组和 2%非那雄组之间差异不显著。在白蜡高级烷醇组中,不同浓度白蜡高级烷醇组之间雌二醇含量差异不显著,且白蜡高级烷醇组雌二醇含量明显高于非那雄组,而与模式组之间差异不显著(图 3-1B)。

给药第 60d ,白蜡不同浓度之间以及白蜡高级烷醇不同浓度之间小鼠体内血液雌二醇的含量与模式组和 2%非那雄胺组之间差异不显著(图 3-1E)。

3.2.3 睾酮与雌二醇的比值 (TE/E2)

给药第 28d , 10%白蜡组小鼠体内 TE/E2 比值明显高于 5%、20%白蜡组及白蜡高级烷醇组小鼠体内 TE/E2 , 而与模式组小鼠体内 TE/E2 比值差异不显著。其中 5%白蜡组和 0.5%白蜡高级烷醇组小鼠体内 TE/E2 明显低于阳性对照组 (图 3-1C)。

给药第 60d , 白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠血液激素水平没有调节作用 , 而阳性药能明显降低小鼠血液中激素水平 (图 3-1F)。

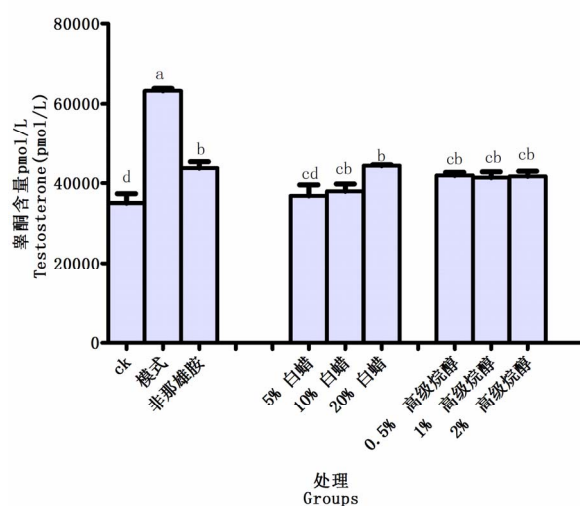
3.2.4 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用

(1) 最适 5 α -还原酶的选择

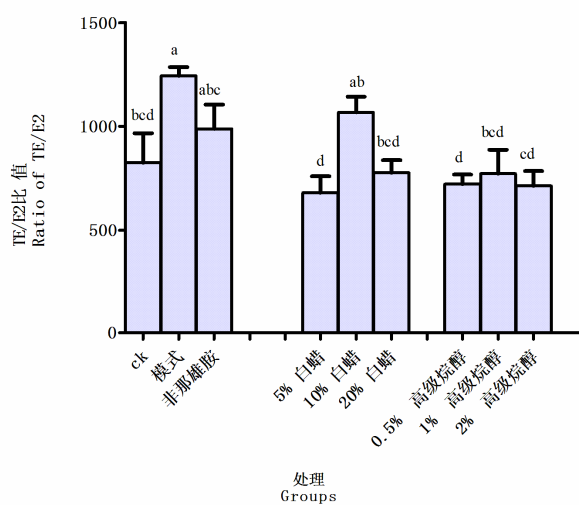
随着 5 α -还原酶提取液添加量的增加 , 反应体系中睾酮含量先降低后升高。酶提取液添加量为 300uL (3.74mg) 时睾酮的含量最低。这表明 5 α -还原酶提取液添加量为 3.74mg 时催化睾酮转化为二氢睾酮的能力最强 (图 3-2)。

(2) 白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用

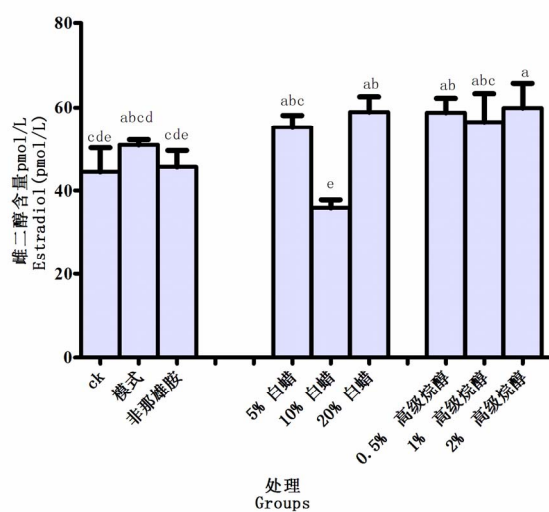
在反应体系中添加白蜡及白蜡高级烷醇可以明显降低睾酮向二氢睾酮的转化 , 抑制 5 α -还原酶的活性。且随着白蜡及白蜡高级烷醇浓度的增加睾酮的转化率降低 , 5 α -还原酶的抑制率增加。其中白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制中浓度分别为 1.66ug/mL、3.42 ug/mL , 明显高于非那雄胺对 5 α -还原酶的抑制中浓度 (0.07 ug/mL) (表 3-3 , 3-4 , 3-5)。



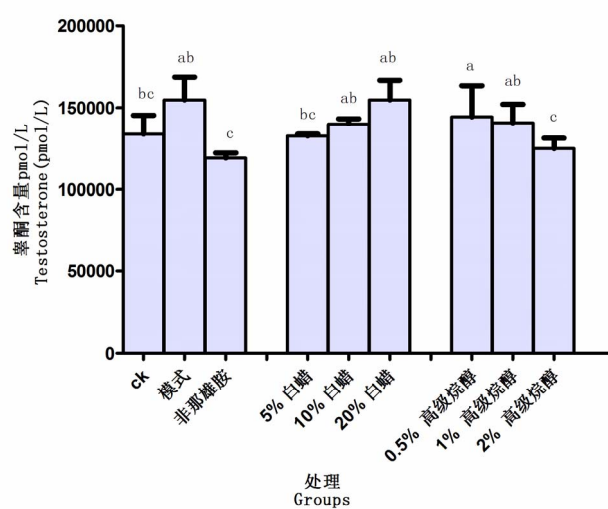
分图 A : 28d 各处理组睾酮含量
A: testosterone levels of mice blood in each group at 28d



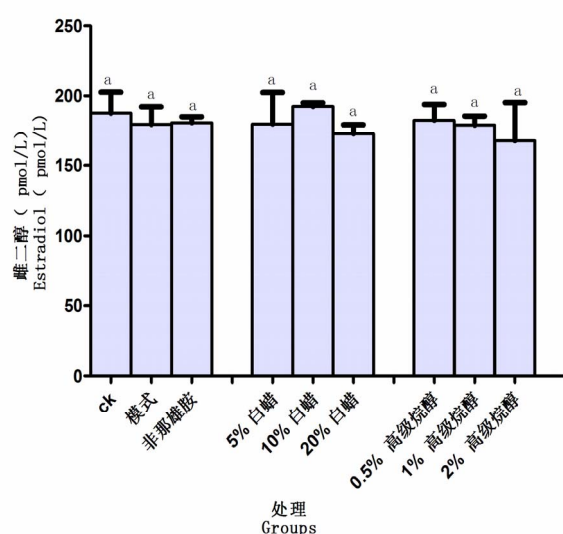
分图 C : 28d 各处理组睾酮含量 TE/E2
C: ratio of TE/E2 of mice blood in each group at 28d



分图 B : 28d 各处理组雌二醇含量
B: estradiol levels of mice blood in each group at 28d

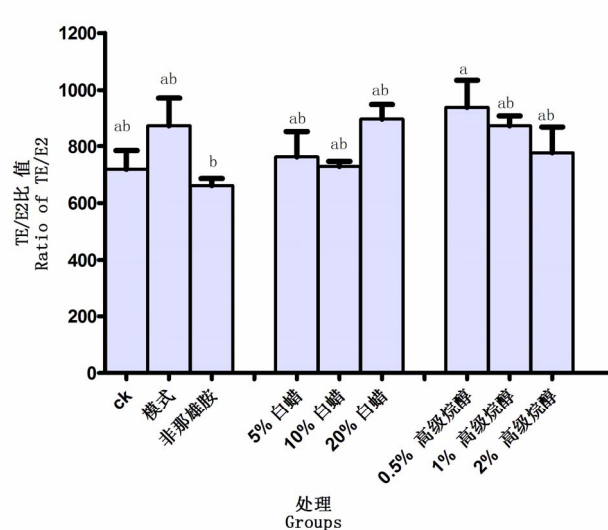


分图 D : 60d 各处理组睾酮含量
D: testosterone levels of mice blood in each group at 60d



分图 E：60d 各处理组雌二醇含量

E: estradiol levels of mice blood in each group at 60d



分图 F：60d 各处理组睾酮含量 TE/E2

F: ratio of TE/E2 of mice blood in each group at 60d

图 3-1 小鼠血液中激素含量变化

Fig.3-1 Hormone levels of mice blood in each group

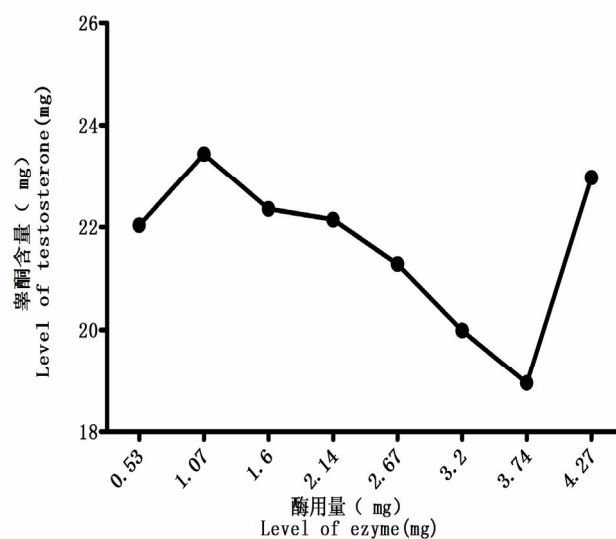


图 3-2 反应体系中 5 α -还原酶添加量对睾酮含量的影响

Fig.3-1 Levels of testosterone in the reaction of 5 α -reductase

表 3-2 白蜡对 5 α -还原酶的抑制作用

Table 3-2 Inhibitory effect of white wax to 5 α -reductase

处理组 Grops	CK	白蜡用量(mg/mL)			
		Dosage of white wax (mg/mL)			
		0.50	1.00	2.00	4.00
睾酮反应量 (μ g/mL)	25.73	14.23	13.50	9.58	4.35
睾酮转化率 (%)	41.01	24.04	21.41	10.87	10.03
酶抑制率 (%)	-	32.07	47.80	52.45	77.53
抑制曲线	-	直线方程：Y=11.939X+30.128，相关系数： R ² =0.9521			
IC ₅₀ (μ g/mL)	-	1.66			

表 3-3 高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用

Table 3-3 Inhibitory effect of policosanols from white wax to 5 α -reductase

处理组 Grops	CK	白蜡高级烷醇用量(mg/mL)			
		Dosage of policosanols of white wax (mg/mL)			
		1.00	2.00	4.00	8.00
睾酮反应量 (μ g/mL)	25.73	20.55	14.62	12.02	3.33
睾酮转化率 (%)	41.01	29.72	23.14	17.84	7.84
酶抑制率 (%)	-	20.13	43.17	53.27	87.07
抑制曲线	-	直线方程：Y=8.7811X+17.98， 相关系数：R ² =9554			
IC ₅₀ (μ g/mL)	-	3.42			

表 3-4 非那雄胺对 5 α -还原酶的抑制作用

Table 3-4 Inhibitory effect of finasteride to 5 α -reductase

处理组 Grops	CK	白蜡高级烷醇用量(mg/mL)			
		Dosage of finasteride (mg/mL)			
		0.0125	0.0625	0.125	0.25
睾酮反应量 (μ g/mL)	25.68	16.80	13.16	7.79	3.17
睾酮转化率 (%)	34.64	21.12	17.82	10.62	4.97
酶抑制率 (%)	-	34.58	48.43	69.44	87.65
抑制曲线	-	直线方程：Y=222.6X+35.119， 相关系数：R ² = R ² =9597			
IC ₅₀ (μ g/mL)	-	0.07			

3.3 讨论

给药第 28d, 模式组能明显提高小鼠血液睾酮的含量, 扰乱小鼠血液中激素水平。我们推测给药 60d 模式组小鼠血液中睾酮的含量与健康组小鼠血液中的睾酮含量差异会更明显。然而事实上是给药第 60d 模式组小鼠血液中睾酮的含量与 CK 组之间差异不显著, 小鼠血液中的激素水平也趋于正常。出现这种现象的原因可能是建立脂溢性脱发模式小鼠时, 在给药的最初阶段由于小鼠体内被动的接受了高剂量的丙酸睾酮使小鼠血液中激素水平紊乱导致毛发脱落, 而随着给药时间的延长机体会做出应激反应, 重新调整体内激素的分配。因此会出现给药第 28d 模式小鼠体内睾酮的含量明显高于健康小鼠, 给药第 60d, 模式小鼠体内睾酮的含量与健康小鼠差异不显著。雄激素与毛囊相互作用, 对毛囊的生长造成病理上伤害, 虽然机体自身重新调整了激素分配, 但是毛囊自身已经发生病变。即使体内激素水平恢复正常给药 60d 小鼠毛发依然会脱落。因此, 评价白蜡及白蜡高级烷醇对激素的调节作用应该以给药第 28d 的试验数据为依据。

在毛囊内存在有睾酮、二氢睾酮和雌二醇三种激素, 其中二氢睾酮是性腺分泌的睾酮被运输到头部, 与头部毛囊内的 5α -还原酶发生化学反应生成的。在头部二氢睾酮与雄激素受体结合后进入毛囊细胞, 调控毛囊内的凋亡信号通路诱导毛囊脱发^[151]。而雌二醇也来源于性腺分泌的睾酮, 由芳香酶催化睾酮而生成。雌二醇具有促进毛囊生长的作用。在正常情况下, 睾酮与雌二醇维持在相对平衡的状态。但是当机体内的 5α -还原酶的活性被激活时, 睾酮能够转化为二氢睾酮。因二氢睾酮的活性是睾酮活性的 40 倍, 因此, 二氢睾酮与雄激素结合的能力强于睾酮。当毛囊内雄激素与雌二醇的平衡比例被打破时会导致毛发脱落。一些中药配方通过调节动物体内激素的水平达到治疗头发的目的, 如止脱灵^[152]、章光 101^[153]等能明显降低模式小鼠体内睾酮的含量, 提高雌二醇的含量, 调节小鼠体内激素的水平。我们研究发现, 给药 28d 白蜡和白蜡高级烷醇能明显降低小鼠血液中睾酮含量, 而不能提高小鼠血液中雌二醇的含量。但是能够将小鼠体内紊乱的激素水平调节正常。这表明白蜡及白蜡白蜡高级烷醇对激素均有调节作用。有研究报道白蜡高级烷醇能降低胆固醇合成^[154-156], 而胆固醇是合成睾酮的原料。因此推测白蜡高级烷醇能够破坏睾酮的合成过程, 关于这一点还需验证。

5 α -还原酶在二氢睾酮的生成过程中具有决定性的作用。降低 5 α -还原酶的活性能够抑制毛发的脱落。目前国际上公认的对脱发具有明显治疗效果的药物非那雄胺和度他雄胺均能够抑制 5 α -还原酶的活性。此外人参皂苷^[157]治疗脱发的作用效果也与其抑制 5 α -还原酶的活性有关。我们的试验结果显示：白蜡及白蜡高级烷醇能够降低睾酮转化二氢睾酮的量，抑制 5 α -还原酶的活性。但其对 5 α -还原酶的抑制中浓度明显高于非那雄胺。这表明：白蜡及白蜡高级烷醇能抑制 5 α -还原酶的活性，但其对 5 α -还原酶的抑制能力低于非那雄胺。

白蜡、白蜡高级烷醇和非那雄胺虽然均能抑制 5 α -还原酶的活性，但是这三个物质在化学结构上存在着很大的差异。非那雄胺为 4-氮杂甾体化合物，化学名为：N-叔丁基-3-氧代-4-氮杂-5 α -雄甾-1-烯-17 β -甲酰胺，其母体为含有 N 原子的杂环化合物，在母环上含有甲酰胺基。白蜡的化学成分为碳原子数在 48 ~ 684 范围内的蜡酯，蜡酯在体内羧酯酶的作用下发生水解反应生成高级脂肪醇和高级脂肪酸^[158]。白蜡高级烷醇为碳原子数在 24 ~ 34 范围内的高级烷醇混合物。高级烷醇在体内可进一步被分解为小分子量的脂肪酸和脂肪醇。Richard^[159]研究显示碳原子数为 14 ~ 18 范围内的脂肪酸是抑制 5 α -还原酶活性的活性基团。因此，我们推出白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制作用是在体内羧酯酶的参与下完成。

3.4 小结

(1) 白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠体内雌二醇的含量没有调节作用。而对睾酮的含量和睾酮与雌二醇(TE/E2)比例的调节作用随着给药时间的延长而发生变化。给药第 28d，白蜡及白蜡高级烷醇能明显降低小鼠血液中睾酮的含量和 TE/E2 比例，调整紊乱的激素水平。给药第 60d，白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠血液中 TE/E2 比值没有调节作用。除了 2%白蜡高级烷醇组小鼠血液中睾酮的含量明显低于模式组外，其它处理组小鼠体内睾酮的含量与模式组差异不显著。

(2) 白蜡及白蜡高级烷醇能明显降低睾酮的转化率，抑制 5 α -还原酶的活性。其对 5 α -还原酶的抑制中浓度分别为 1.66 μ g/mL 和 3.42 μ g/mL。非那雄胺对 5 α -还原酶的抑制中浓度为 0.07 μ g/mL。

第四章白蜡及白蜡高级烷醇对生长因子的表达量

毛发依附于毛囊而生长，毛囊是毛发生长的物质基础。毛囊基地部位的毛球是毛发生长的动力来源。毛球的基底部位与毛细血管相连，毛细血管为毛发的生长提供营养。而毛球内的真皮乳头细胞分泌血管内皮生长因子能促进毛细血管的形成，调控与毛球相连的毛细血管的数量^[29, 160]。血管内皮生长因子的表达量和毛细血管的数量与真皮乳头细胞的增殖状态有关。真皮乳头细胞增殖旺盛时，血管内皮生长因子基因表达较高，毛球周围的毛细血管网比较发达，毛囊营养供应充分，形成的毛干较粗。真皮乳头细胞增殖降低时血管内皮生长因子基因表达降低，毛囊上皮细胞的凋亡，毛球在皮肤内的位置上移，导致毛细血管与毛球的连接数量降低，毛囊营养供应不足，毛干萎缩变细，最后脱落^[45, 161]。而一般在毛囊的生长期，真皮乳头细胞增殖旺盛，在毛囊的退行期和休止期真皮乳头细胞增殖降低或休眠。因此，血管内皮生长因子的表达量决定着毛发的生长以及毛囊生长期的活力。此外，文献报道存在于毛囊外根鞘内的表皮生长因子也能调控毛发的脱落。研究报道表皮生长因子具有调节角质细胞的增殖和分化，促进外根鞘细胞的生长，控制毛囊生长期的长短的作用^[161, 162]。Kingston^[50]报道表皮生长因子的持续表达能阻止毛囊由生长期进入退行期。由此可知，血管内皮生长因子和表皮生长因子表达量的提高可以促使毛囊有休止期进入生长期，延长毛囊的生长期，阻止毛发脱落。

碱性磷酸酶是存在于毛囊内的有一种锌指酶，它表达量的高低反应了毛囊所处的生长阶段。在毛囊生长期的初级阶段碱性磷酸酶表达活性最高，随后逐渐降低，在毛囊的退行期其表达量最低^[163]。因此，毛囊内碱性磷酸酶的含量变化可以反应毛囊不同生长阶段持续的时间。因此，为了明确白蜡及白蜡高级烷醇对毛囊生长期的调节作用，我们需要研究小鼠皮肤内碱性磷酸酶的含量变化以及血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达量。

4.1 材料与方法

4.1.1 供试药剂及仪器设备

小鼠 VEGF 酶联免疫试剂盒：上海依科赛生物制品有限公司，批号 EM009

小鼠 EGF 酶联免疫试剂盒：上海依科赛生物制品有限公司，批号 EM014

碱性磷酸酶试剂盒：南京建成生物工程研究所，批号：20160618；

一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒：生工生物工程股份有限公司，批号：C325DA0008。

磷酸氢二钠：天津市瑞金特化学品有限公司

磷酸二氢钠：天津市瑞金特化学品有限公司

考马斯亮蓝试剂盒：生工生物工程股份有限公司，批号：C804DB0002

多功能酶标仪：赛默飞世尔科技，型号 3001-159

4.1.2 试验动物

KM 小鼠（5 周龄雄鼠）（证书号：SCXK（京）2014-004），购自于北京华阜康生物科技股份有限公司，批号：11401300047739，在室内适应性饲养 1 周，饲养温度为室温，光照 L:D=12h:12h，饲喂人工饲料，食物和水不限量供应；

4.1.3 药剂配置

0.1M 的磷酸缓冲盐(pH 值为 7.4) 精密称取 2.4g NaH_2PO_4 加入蒸馏水定容到 100mL 作为 A 液，备用。精密称取 2.84g Na_2HPO_4 加入蒸馏水定容到 100mL 作为 B 液，备用。精密称取 1.7g NaCl 加入蒸馏水定容到 100mL 作为 C 液，备用。分别量取 19mL A 液和 81mL B 液混合均匀后加入 100mL 的 C 液即可。

4.1.4 动物分组及模型的建立

将 200 只 KM 小鼠随机分成 8 组，每组 25 只试验动物，分组情况如下（见表 4-1）。动物模型的建立参照 2.1.2.1 实验操作。

表 4-1 实验分组信息和药剂处理

Table 4-1 Information of animals and drug in each group

编号 Number	分组 Groups	处理 Treatment
A	CK	不做任何处理
B	模式	皮下注射丙酸睾酮
C	阳性对照	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 5%米诺地尔溶液
D	0.5%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 0.5%高级烷醇
E	1%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 1%高级烷醇
F	2%高级烷醇	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 2%高级烷醇
G	5%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 5%白蜡
H	10%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 10%白蜡
I	20%白蜡	皮下注射丙酸睾酮+局部涂抹 20%白蜡

4.1.5 生长因子含量测定

(1) 样品的制备：试验第 28d，每组随机选取 5 只小鼠，取小鼠背部皮肤，剪碎，称重，按一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒操作说明进行。加入 9 倍量的组织提取液，在冰上孵育 20min，4℃离心，取上清液。

(2) 血管内皮生长因子和表皮生长因子表达量的测定

采用小鼠 VEGF ELISA 试剂盒和小鼠 EGF ELISA 试剂盒测定小鼠皮肤内血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达量，具体操作步骤为：

1) 标准曲线的测定

A、标准品浓度的配置

将血管内皮生长因子和表皮生长因子标准品按照等比关系用试剂稀释液配置浓度为 0、31.25、62.5、125、250、500、1000pg/mL 7 个浓度。

B、加样孵育

在酶标包被板中加入不同浓度的标准品，每个浓度 3 个复孔，每孔 100μL，在震荡箱内 100rpm 室温孵育 2h。

C、洗涤

弃去液体，甩干，每孔加 3050μL 洗液，放置 30s，弃去，重新加入洗液，如此反复洗涤 5 次，拍干。

D、加酶结合物工作液孵育、洗涤

除 0 浓度外，每孔加酶结合物工作液 100 μ L，100rpm 室温孵育 15min。洗涤 5 次。

E、显示

每孔加入 100 μ L 显色剂底物,混匀，避光显示 15min。

F、终止反应、测定 OD 值

每孔加终止液 100 μ L，在 450nm 波长测定各个孔的 OD 值。

2) 样品的测定

将样品从冰箱内取出，放在室温待温度冷却到室温，在酶包被板中，每孔加入 50 μ L 待测样品和 50 μ L 试剂稀释液。随后操作步骤参照标准曲线测定步骤 B ~ F 进行测定样品中血管内皮生长因子的 OD 值

3) 血管内皮生长因子和表皮生长因子表达量计算

在 excel 表中，根据血管内皮生长因子和表皮生长因子标准品浓度与 OD 值绘制标准曲线，计算标准曲线回归方程，标准曲线回归方程的 R² 大于 0.99 可以用于计算每毫升样品中血管内皮生长因子和表皮生长因子表达量(W_g 测试)。样品中蛋白的含量计算公式如下：

$$W_g = W_{g\text{测试}} \times 10$$

式中：

W_g：样品中生长因子的表达量

W_{g 测试}：样品中生长因子的表达量

4.1.6 碱性磷酸酶含量测定

(1) 样品的制备

给药第 14d、21d、28d、45d、60d 各组随机选取 5 只将小鼠背部毛发剪短，取背部皮肤，剪碎，称重，加入 4 倍量 0.1M 的磷酸缓冲盐(pH 值为 7.4)，在玻璃均浆器中匀浆，12,000rpm，4℃ 离心 20min，取上清液，分装放在-70℃ 条件下保存，备用。

(2) 蛋白浓度测定

将样品用组织提取液稀释 20 倍蛋白浓度测定步骤参照 3.1.2.4。标准曲线回归方程的 R² 大于 0.995 可以用于样品蛋白浓度的计算。样品中蛋白含量根据标准曲线计算。

(3) 碱性磷酸酶含量测定

采用碱性磷酸酶试剂盒测定皮肤内碱性磷酸酶的含量，操作步骤按照试剂盒说明进行。即在 96 孔板内添加适量的样品和试剂，37℃ 孵育 15min，加入显色剂，摇匀，用酶标仪在 520nm 波长时测定每孔的吸光度值，每个样品 3 次重复。

(4) 每克蛋白中碱性磷酸酶含量计算

按照下列公式计算样品中碱性磷酸酶的活性：

$$ALP = \frac{(OD_{测定} - OD_{空白}) \times CF}{(OD_{标准} - OD_{空白}) \times CP}$$

式中：

ALP：碱性磷酸酶活性；

OD_{测定}：样品处理组 OD 值；

OD_{空白}：空白溶剂 OD 值；

CF：酚标准品浓度；

CP：待测样品蛋白浓度

4.1.7 数据处理

采用 SAS9.1 统计软件中的 ANOVA 分析不同处理组小鼠的碱性磷酸酶活性、血管内皮生长因子和表皮生长因子的 $\bar{x} \pm S.E.M$ ， $P < 0.05$ 表明处理组与模式组之间存在有显著性差异， $P < 0.01$ 表明处理组与模式组之间存在极显著性差异。

4.2 结果与分析

4.2.1 生长因子表达量

(1) 血管内皮生长因子表达量

给药第 28d，白蜡、白蜡高级烷醇组和阳性对照组小鼠皮肤内血管内皮生长因子的表达量明显高于模式组。在白蜡处理组中，随着白蜡浓度的增加小鼠皮肤内血管内皮生长因子的表达量增加，其中 10%、20%白蜡组小鼠皮肤内的血管内皮生长因子的表达量与 5%米诺地尔组之间差异不显著。白蜡浓度为 20%时小鼠皮肤内的血管内皮生长因子的表达量与模式组之间存在极显著性差异。在白蜡高级烷醇组中，不同浓度白蜡高级烷醇组

之间小鼠皮肤内血管内皮生长因子的表达量差异不显著。其中 1%、2%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内的血管内皮生长因子表达量明显高于模式组,而与 5%米诺地尔组之间差异不显著(表 4-2)。

(2) 表皮生长因子表达量

给药第 28d,白蜡组、白蜡高级烷醇组和 5%米诺地尔组小鼠皮肤内的表皮生长因子明显高于模式组。其中,5%米诺地尔组、5%、20%白蜡组和三个不同浓度白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内表皮生长因子的表达量与模式组存在极显著性差异,10%白蜡组小鼠皮肤内表皮生长因子的表达量与模式组存在显著性差异。在白蜡组中 20%白蜡组小鼠皮肤内表皮生长因子表达量最高,但与 5%、10%白蜡组以及 5%米诺地尔组之间差异不显著。在白蜡高级烷醇组中,1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内表皮生长因子最高,其值与 0.5%、2%白蜡高级烷醇组和 20%白蜡组之间差异不显著,但其值明显高于 5%米诺地尔组小鼠皮肤内表皮生长因子的表达量(表 4-2)。

4.2.2 碱性磷酸酶活性

皮下连续注射丙酸睾酮 60d,小鼠皮肤内的碱性磷酸酶活性随着给药时间发生改变。给药第 14d~28d,各组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量均呈上升趋势,而在给药第 28d~60d,各组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量变化存在着显著性差异。在模式组中,给药第 28d~60d,小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量呈明显的下降趋势。在阳性对照组中,给药第 28d~45d 小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量下降,给药 45d~60d 小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量上升。在白蜡组中,小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量出现两种变化趋势。其中 5%白蜡组小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量在给药第 28d~45d 出现平台期,给药第 45d 后碱性磷酸酶含量呈下降趋势。10%、20%白蜡组小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量变化趋势与 5%米诺地尔组中碱性磷酸酶含量变化趋势相似。但给药 60d 时,10%白蜡组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量明显高于 5%米诺地尔组(图 4-1A)。在白蜡高级烷醇组中,给药第 28d~60d,不同浓度白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内的碱性磷酸酶呈下降趋势,且随着白蜡高级烷醇浓度的增加,小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量降低的幅度变小。其中给药第 45d,2%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内的碱性磷酸酶明显高于 5%米诺地尔(图 4-1B)。

表 4-2 不同处理小鼠皮肤内生长因子的表达量

Table 4-2 expression of growth factors in each group

处理 Treatment	血管内皮生长因子 (pg/mL) Vascular endothelial growth factor (pg/mL)	表皮生长因子 (pg/mL) Epidermal growth factor (pg/mL)
模式组	36.77±2.82	769.82±74.57
5%米诺地尔	66.53±10.77**ab	2526.01±261.59**b
5%白蜡	39.32±4.13b	1966.01±127.47**b
10%白蜡	55.94±7.54ab	1488.44±125.78*b
20%白蜡	63.64±4.40**ab	2550.06±130.20**ab
0.5%白蜡高级烷醇	57.29±22.40ab	2435.51±310.37**ab
1%白蜡高级烷醇	79.81±9.22**a	3307.10±476.07**a
2%白蜡高级烷醇	60.50±5.13**ab	2355.04±510.18**ab

注：生长因子表示为 $\bar{x} \pm S.E.M$ ， $n=5$ * $P < 0.05$ 表明处理组与模式组之间存在有显著性差异，**

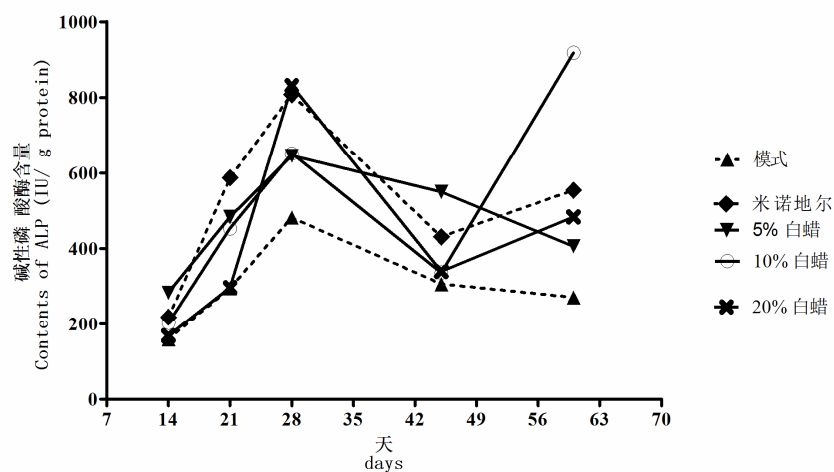
$P < 0.01$ 表明处理组与模式组之间存在极显著性差异，相同字母表示不同处理之间没有显著性差异

($P < 0.05$) Values were expressed as the mean \pm SEM, $N = 5$, * $P < 0.05$ indicate significant

differences between treatment groups and model group * $P < 0.01$ indicate extremely significant

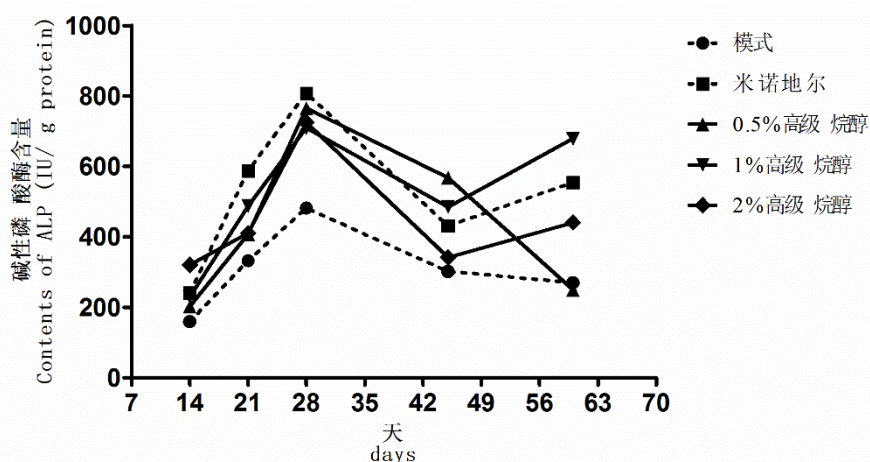
differences between treatment groups and model group according to one-way analysis of variance

(ANOVA). Different lowercase letters (a–f) indicate significant differences according to one-way analysis of variance (ANOVA) ($P < 0.05$).



分图 A：不同浓度白蜡组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量

A: contents of alkaline phosphatase activity in the skin of mice of different concentration WW



分图 B：不同浓度白蜡组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量

B: contents of alkaline phosphatase activity in the skin of mice of different concentration WW

图 4-1 不同处理小鼠皮肤内碱性磷酸酶表达量的变化

Fig.4-1 changes of alkaline phosphatase activity in the skin of mice

4.3 讨论

碱性磷酸酶的表达量能够反映毛囊的生长阶段。碱性磷酸酶的含量在毛囊生长的初期最高,随后碱性磷酸酶含量降低,在休止期毛囊内碱性磷酸酶含量最低^[163]。因此,我们可以根据碱性磷酸酶的含量变化判断毛囊的生长阶段。试验结果显示,在试验第 14d ~ 第 28d 内,各处理小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量变化与模式组小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量变化趋势一致。由此可知:各组小鼠毛囊处于同一生长阶段。根据 Machiko 的报道可知,在试验第 14d ~ 28d 各组毛囊处于生长期的早期阶段。试验第 28d ~ 45d 各组毛囊所处的阶段存在差异。对模式组而言,试验第 28d ~ 45d 小鼠毛囊处于生长期中期,试验第 45d ~ 60d 小鼠毛囊处于退行期。对于阳性对照组而言,试验第 28d ~ 45d 小鼠毛囊处于生长期中后期,试验第 45d ~ 60d 小鼠毛囊处于下一循环的生长初期。对于 5%白蜡和 2%白蜡高级烷醇组而言,从试验第 28d 一直持续到 60d 毛囊均处于生长期的中期阶段。10%、20%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内碱性磷酸酶含量变化趋势与米诺地尔组相似。这表明,5%白蜡和 2%白蜡高级烷醇能延长毛囊的生长期,10%、20%白蜡组、1%白蜡高级烷醇组能促进毛囊由休止期进入生长期。由此可知,白蜡及白蜡高级烷醇既能促进毛囊由休止期进入生长期又能延长毛囊的生长期。其对毛囊生长期的调节作用与剂量有关,其中白蜡在低浓度时延长毛囊的生长期,高浓度时促进毛囊由休止期进入生长期。白蜡高级烷醇在低浓度时促进毛囊由休止期进入生长期,高浓度时延长毛囊的生长期。

血管内皮生长因子的表达量反映了毛囊的营养状态。血管内皮生长因子表达量高,毛囊营养丰富,毛发生长旺盛。血管内皮生长因子表达量低,毛囊营养不足,毛发失去光泽甚至脱落。研究表明,提高血管内皮生长因子的表达量能阻止毛发的脱落,如米诺地尔在磺基转移酶的作用生成米诺地尔硫酸盐促进血管内皮生长因子的表达^[76,164],对毛发具有治疗效果的日本扁柏油提取物也能促进血管内皮生长因子的表达^[51]。我们的研究结果显示:白蜡及白蜡高级烷醇能促进血管内皮生长因子的表达,其中白蜡对血管内皮生长因子作用效果与白蜡高级烷醇之间差异不显著。表明白蜡及白蜡高级烷醇均能提高毛囊的营养供应。

表皮生长因子主要存在于毛囊的外根鞘,调节毛囊由休止期进入生长期。有研究表明,表皮生长因子表达量提高能够促进休止期毛囊进入生长期^[50]。但是表皮生长因子促

进毛发生长的作用与其剂量关系密切，表皮生长因子的表达量在 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4 \text{ pg/mL}$ 范围内才能促进毛发的生长，当表皮生长因子的表达量为 $2 \times 10^5 \text{ pg/mL}$ 抑制毛发的生长^[49]。我们的研究表明：局部涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后，除 5%、10%白蜡组外，其他处理组小鼠皮肤内的表皮生长因子的表达量在 $2355 \sim 3307 \text{ pg/mL}$ 范围内。这一范围恰恰是表皮生长因子促进毛发生长的有效剂量范围。表明除了 5%、10%白蜡外其他处理均能促进毛囊由休止期进入生长期。但奇怪的是，根据碱性磷酸酶含量变化趋势表明，10%白蜡也能促进毛囊由休止期进入生长期。而 5%白蜡能延长毛囊的生长期。

动物实验中由于个体差异的影响经常会导致实验结果的假阳性，因此，保证实验动物的一致性对正确评价药物作用效果是至关重要的。对于毛发而言，毛囊所处的生长阶段决定了毛发的健康状态，因此在评价药物对毛发的作用效果时希望各处理组小鼠毛囊处于同一生长阶段。为了保证毛囊处于同一生长阶段人们常采用的方法主要有用松香、石蜡或脱毛液、剪短小鼠背部毛发等方法，诱导毛发处于生长阶段，但是由于石蜡或松香需要加热后直接敷在小鼠皮肤上待冷却后撕掉蜡层，易导致毛囊的损伤和小鼠表皮的伤害。脱发液多为亚硫酸钠，易引起小鼠皮肤的过敏。剪短毛发只是将暴露在表皮外的毛发剪短并不能改变毛囊的生长状态。而且上述方法只是采用物理的方法改变毛囊的生长阶段，并没有让毛囊发生病变。而脱发多是由于毛囊发生病变而引起的。如脂溢性脱发是由于毛囊内二氢睾酮含量的提高导致毛囊细胞凋亡，毛囊萎缩，变短。因此，上述三种方法虽然能使新生长出来的毛囊处于同一生长阶段但是与脂溢性脱发产生的毛囊存在根本性的差异。

4.4 小结

(1) 白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达量明显高于模式组，而与 5%米诺地尔差异不显著。白蜡组及白蜡高级烷醇对小鼠皮肤内血管表皮生长因子和表皮生长因子的表达与剂量无关。白蜡对血管内皮生长因子的作用效果与白蜡高级烷醇差异不显著。虽然不同浓度白蜡组之间或不同浓度白蜡高级烷醇组之间小鼠皮肤内表皮生长因子的表达量没有差异。在白蜡组中，10%白蜡促进表皮生长因子

的表达量最低,在白蜡高级烷醇组中,1%白蜡高级烷醇促进表皮生长因子的表达量最高。10%白蜡促进表皮生长因子的表达量明显高于10%白蜡。

(2) 给药第45d,10%、20%白蜡组、1%白蜡高级烷醇组和阳性对照组小鼠毛囊处于退行期,5%白蜡和2%白蜡高级烷醇组小鼠毛囊处于生长期,模式组处于退行期。给药第60d,10%、20%白蜡组、1%白蜡高级烷醇组和阳性对照组小鼠毛囊进入下一个毛囊循环中的生长初期,5%白蜡和2%白蜡高级烷醇组小鼠毛囊处于生长期,模式组处于休止期。

第五章白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用

在药物研究方面，人们越来越重视从细胞水平上阐明药物的作用机理。通过对细胞的培养、细胞融合等技术，能快速筛选出药物的作用位点。但是细胞大都是培养在液体中，药物需要制备成液体才能与细胞充分的接触。液体药物与细胞充分接触后，在试验过程中可以真实的评价药物对细胞的作用效果，减少因给药不均匀造成的试验误差。然而白蜡及白蜡高级烷醇既不溶于水，也不能溶于乙醇、甲醇、丙二醇、DMSO 等这些对细胞毒性小的有机溶液。而且白蜡及白蜡高级烷醇均为混合物。白蜡主要成分为碳原子数为 48-~68 的蜡酯，其中含量最高的为二十六烷酸二十六烷酯和二十八烷酸二十八烷酯^[140, 112]，此外还含有少量的二十七烷酸二十七烷酯、二十四烷酸二十四烷酯、蜂蜡醇、三十烷醇、游离脂肪酸、色素和磷脂等。其中游离脂肪醇含量为 1.0%—1.5%，烃含量为 2%—3%，树脂含量为 1.0%—1.5%。白蜡高级烷醇是白蜡采用氢化铝锂还原法或皂化法提炼后能够得到碳原子数在 24~34 之间的长链脂肪醇的混合物^[110]，其主要成分为二十六烷醇、二十八烷醇，含量分别为 45%-56%和 34-38%。除此之外还含有少量的二十四烷醇、三十烷醇、二十五烷醇和二十七烷醇^[140]。从白蜡及白蜡高级烷醇的理化性质和化学结构上而言，这两种物质均不溶于水。因此，在研究白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用之前，必需解决白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶解问题。

表面活性剂是一种对难溶性物质增溶效果比较好的试剂，其中吐温 80 是一种应用广泛，对难溶性物质增溶能力较强的非离子表面活性剂。但是吐温 80 中含有的杂质或降解产物，这些物质对细胞容易产生毒害作用^[177]。因此，以吐温 80 作为增溶剂解决白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶剂性问题，需要考察吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全用量范围。

人真皮乳头细胞存在于毛囊的基底部位，调控毛囊的生长、循环，指导毛基质细胞分化形成毛干，决定毛发的直径。此外真皮乳头细胞释放的血管内皮生长因子调控调控与毛球相连的毛细血管的数量，为毛囊提供营养^[145]。而且真皮乳头细胞自身的增殖状态和细胞内存在的信号通路也能调控毛囊的生长和毛干的直径。真皮乳头细胞增殖旺盛时释放的血管内皮生长因子较多，为毛囊提供的营养充足，毛囊生长旺盛，形成的毛干较粗。真皮乳头细胞增殖衰减或休眠时，血管内皮生长因子分泌较少，毛囊营养供应不足，

毛囊萎缩变短,毛干直径变细。此外在毛囊的真皮乳头细胞存在很多信号通路。如 Wnt , Bmp、Shh 这些信号通路调节毛囊的生长和循环^[30-37]。因此,真皮乳头细胞是毛囊生长的重要细胞,促进其增殖能防止毛发的脱落。

雄激素与真皮乳头细胞内的雄激素受体结合后能刺激 caspase 信号通路上游转化生长因子 $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) 的合成,从而启动 caspase 信号通路。caspase 信号通路能促进毛囊表皮细胞的凋亡,使毛囊微型化最终导致毛发脱落。在 caspase 信号通路中有三个关键的蛋白分子分别为 caspase8、caspase3 和 caspase9。Caspase8 被激活后能直接激活 caspase3 诱导外源性的细胞凋亡,也可以先激活 caspase9 再激活 caspase3 诱导内源性的细胞凋亡。治疗因雄激素诱导而产生脱发的药物能够抑制 caspase 信号通路中的上游蛋白和 caspase 信号通路的蛋白^[166]。如 Heon-sub 报道 caspase 信号通路中的 TGF- $\beta 2$ 、caspase3、Smad、sp1 蛋白是人参皂苷抑制毛发脱落靶标蛋白^[167]。我们研究发现白蜡及白蜡高级烷醇能够促进脂溢性脱毛模式小鼠毛发的生长,其作用机理是否也与 caspase 信号通路有关需要进行验证。

为了明确白蜡及白蜡高级烷醇促进毛发生长的作用机理,我们采用 MTS 法和 Western blot 方法测定白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞增殖作用的影响以及 TGF- $\beta 2$ 、caspase8、caspase3 和 caspase9 蛋白表达量的调节作用。

5.1 材料与方法

5.1.1 供试药剂

吐温 80 : 天津市风船化学试剂科技有限公司

柠檬酸 : 天津市风船化学试剂科技有限公司

氢氧化钠 : 广东光华科技股份有限公司

化学发光试剂盒 : 赛默飞世尔科技, 批号 : QF217717

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 : 上海碧云天生物技术有限公司, 编号 : P0012S

人真皮乳头细胞生长培养基 (批号 184) 包被液 (批号 361) 消化液 (批号 322)

购自美国 Cell Application。

非那雄胺 (M1122A) 购自大连美仑生物科技有限公司。

吐温 80 (分析纯) 购自天津市风船化学试剂科技有限公司。

DMSO (批号: 302A0328) 购自北京索莱宝科技有限公司。

疏水性 PVDF 转印膜: millipore, 规格 0.22 μ m

兔抗人 TGF- β 2 特异性抗体: proteintech 批号: 19999-1-AP

多克隆鼠抗人 caspase8: proteintech 批号: 66093-1-Ig

多克隆兔抗人 caspase9: proteintech 批号: 10380-1-AP

多克隆兔抗人 caspase3: proteintech 批号: 19677-1-AP

过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (H+L): proteintech, 批号 SA00001-2

过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG (H+L): proteintech, 批号 SA00001-2

Western 及 IP 细胞裂解液: proteintech, 编号: P0013

PEMF: 联科生物, 目录号: WB018

12%凝胶 (预染胶): 美国 Bio-Rad, 货号: 161-0185

Tris: 上海生工生物工程有限公司, 甘氨酸: 上海生工生物工程有限公司, 批号: C707BA0001

SDS: 上海生工生物工程有限公司, 批号: 0620S05

吐温 20: 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 6271041

5.1.2 试验仪器

精密增力电动搅拌器: 型号 JJ-1 常州澳华仪器有限公司

电热恒温水浴锅: 型号 D2KW-D-4 北京市永光明医疗仪器厂

电子天平: 型号 LT1002 常熟市天量仪器有限责任公司

分析天平: 型号 AB204-S 瑞士梅特勒有限公司

电热恒温真空干燥箱: 型号 DZF-1B 上海跃进医疗器械厂

立式压力蒸汽灭菌器: 型号 LDZX-50KBS 上海申安医疗器械厂

酶联免疫仪: 型号 3001-1592, 赛默飞世尔科技

电泳仪和电泳槽: 美国 Bio-Rad, 型号: mini-protean tetra system

转膜仪: 美国 Bio-Rad, 型号: trans-blot.turbo system

凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad, 型号: Biorad GelDoc XR

5.1.3 试验细胞

人真皮乳头细胞购自美国 Cell Application，批号 2365。

5.1.4 药剂配置

(1) 5%柠檬酸：精密称取 5g 柠檬酸，加入去离子水定容至 100 mL

(2) 0.1M 氢氧化钠：精密称取 0.4g 氢氧化钠，加入去离子水定容至 100 mL

(3) 二氢睾酮 (1×10^{-2} mol/L)：精密称取 29mg 二氢睾酮溶解到 1ml 无水乙醇中，取 100 μ L 加去离子水补足到 1ml，作为母液。

(4) 非那雄胺 (0.1mmol/mL) 精密称取 0.372g 非那雄胺溶解到 1ml DMSO 中 (1mmol/L)，取 10 μ L 用去离子水稀释到 1ml (10mmol/L)，再取 10 μ L 用去离子水稀释到 1ml 作为母液。

(5) 5x 电泳液：称取 Tris 15.1g，Glycine 94g 加入去离子水 1L 溶解，加入 5g SDS，搅拌溶解。

(6) 转膜电泳液：称取 Tris 0.582g，Glycine 0.293g SDS 0.0375g 加 80ml 去离子水混匀，再添加 20ml 甲醇，4 $^{\circ}$ C 保存。

(7) 洗膜缓冲液 (TBST)：Tris-base 2.422g、NaCl 8.775g 加 1L 去离子水溶解后加 Tween 80 0.5ml

(8) 细胞裂解液：细胞裂解液与 PMF 按 100:1 混匀，现配现用。

5.1.5 白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备

(1) 样品的准备

将白蜡及白蜡高级烷醇粉碎过 200 目筛。精密称取 100mg 白蜡或白蜡高级烷醇，备用

(2) 吐温 80 用量

按照吐温 80 与白蜡或白蜡高级烷醇不同比例 (10:1、30:1、50:1、100:1) 称取的吐温 80 的用量。将白蜡或白蜡高级烷醇与吐温-80 混匀，加入 60mL 水温在 85 $^{\circ}$ C ~ 90 $^{\circ}$ C 左右的去离子水搅拌均匀。

(3) 溶液 pH 值

在上述溶液中滴加 5%柠檬酸或 0.1M 氢氧化钠调节溶液的 pH 为：3~4、5~6 或 8~9

(4) 搅拌时间

将调节好 pH 值的溶液在 85 ~ 91 °C 水浴锅中加热搅拌不同的时间(10、30、60min)后取出静置，自然放冷，滴加 0.1M 氢氧化钠或 5%柠檬酸调节溶液的 pH 6~7，补足水到 100ml。

(5) 调查指标

观察溶液的透明程度以及在室温条件下溶液析出沉淀的时间。

5.1.6 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性评价

(1) 细胞培养

人真皮乳头细胞(hFDPCs)保存在液氮中，临用前从液氮中取出，在 37°C 水浴中融化后，转移到用包被液处理过的 T-75 培养瓶中，37°C，5% CO₂ 培养箱内培养过夜，第二天更换完全培养基，继续培养，待细胞融合度达到 90%，用消化液消化，采用台盼蓝法测定细胞的活力，备用。

(2) MTS 法

人真皮乳头细胞(2.5X10³ 个/孔)接种到 96 孔板中，过夜，更换含有不同浓度的吐温 80 培养基(终浓度为 25.00 ug.mL⁻¹、12.50 ug.mL⁻¹、6.25 ug.mL⁻¹、3.12 ug.mL⁻¹、1.56ug.mL⁻¹)，同时设阴性对照(90ul 细胞悬液+10ul 培养基)、空白对 1(100uL 培养基)，每个处理 4 个平行孔，继续在 37 °C，5% CO₂ 培养箱内培养 48h 后，每孔加 20ul MTS 试剂，继续培养 4h，用酶标仪 490nm 测定各孔光密度(OD)，计算细胞增殖率，吐温 80 对细胞作用效果计算公式为：细胞增殖率%=(实验组 OD-空白对照组 OD)/(阴性对照组 OD-空白对照组 OD)%^[10]。同时采用倒置显微镜观察细胞生长情况。

5.1.7 白蜡及白蜡高级烷醇促进细胞增殖的作用

(1) 促进健康细胞的增殖

A 细胞接种：人真皮乳头细胞接种密度为 2.5X10³ 个/孔，接种到 96 孔板。

B 加药 :接种第二天 ,更换含有不同浓度的白蜡培养基(终浓度为 0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 $\mu\text{g/mL}$)和白蜡高级烷醇培养基(终浓度为 3.12、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{g/mL}$) ,同时设阴性对照 (90ul 细胞悬液+10ul 培养基) 空白对照 1 (100uL 培养基) 和空白对照 2 (90uL 培养基+10uL 相应浓度的吐温 80 水溶液) , 阳性对照 (0.074 $\mu\text{g/mL}$ 非那雄胺) , 每个处理 4 个平行孔 , 在 37 , 5% CO₂ 培养箱内继续培养 48h。

C MTS 检测 : 每孔加 20ul MTS 试剂 , 继续培养 4h , 用酶标仪 490nm 测定各孔光密度 (OD)。

D 细胞增殖率计算 : 计算公式为 :

$$A\% = \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白对照2}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白对照1}}} \times 100$$

式中 :

A% : 细胞增殖率

(2) 促进模式细胞的增殖

试验方法参照 shanghum[135, 167]报道的方法进行 , 并稍做修改。

A 细胞接种 : 人真皮乳头细胞接种密度为 2.5×10^3 个/孔 , 接种到 96 孔板。

B 加药 : 接种第二天更换含有 1×10^{-5} 的二氢睾酮的培养基 , 同时添加终浓度为 5、2.5、1.26、0.625 $\mu\text{g/mL}$ 的白蜡和终浓度为 50、25、12.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 白蜡高级烷醇。终浓度为 0.2 μM 非那雄胺溶液为阳性对照 , 只添加睾酮溶液的细胞作为空白对照 , 每个处理四个复孔 , 继续在 37 条件下培养 48h。

C MTS 检测 : 每孔加 20ul MTS 试剂 , 继续培养 4h , 用酶标仪 490nm 测定各孔吸光度值 (OD)。

D 细胞增殖率计算 : 计算公式为 :

$$A\% = \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白对照}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白对照}}} \times 100$$

式中 :

A% : 细胞增殖率

5.1.8 蛋白印记

A 细胞的培养

将 hFDPCs 细胞接种到 T-25 培养瓶中 (接种密度为 2×10^5), 待细胞融合度达到 70-80% 后, 除 CK 组, 其他处理组中添加终浓度为 $0.1 \mu\text{m}$ 的二氢睾酮, 同时分别添加终浓度为 1.25、2.5、 $5 \mu\text{g/mL}$ 的白蜡和终浓度为 12.5、25、 $50 \mu\text{g/mL}$ 白蜡高级烷醇, 终浓度为 $0.2 \mu\text{m}$ 的非那雄胺作为阳性对照, 继续培养 48h。

B 细胞裂解

加药培养后的细胞去除培养基, 用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 向培养瓶中加入 $300 \mu\text{L}$ 的细胞裂解液, 同时用细胞刷将细胞刮下, 于冰上裂解 30min, 收集细胞于 1.5mL 离心管中, 14000rpm , 4°C , 离心 15min。

C 蛋白浓度测定

采用 BCA 法测定细胞裂解后溶液中蛋白浓度。外加细胞裂解液同一各处理组蛋白浓度。

D 蛋白变性

将蛋白样品与 loading buffer 按照 4:1 的比例混匀, 100°C , 5min, 室温冷却

E western blot

凝胶和电泳液的配置

A 液配置: 2.5mL Resolver A、 2.5mL Resolver B、 $2.5 \mu\text{L}$ TEMED 和 $25 \mu\text{L}$ 10% APS, 混匀

B 液配置: 1mL I Stacker A、 1mL Stacker B、 $2 \mu\text{L}$ TEMED 和 $10 \mu\text{L}$ 10% APS, 混匀

先将 A 液添加到玻璃板中, 再加入 B 液, 插上梳子, 放置 30min。

上样

将变性后的样品混匀后添加相同体积 (样品蛋白含量为: $20 \mu\text{g}$)

电泳条件

150V , 60min

转膜

PVEF 膜的准备: PVEF 膜裁剪成 $5 \text{cm} \times 8 \text{cm}$ 的规格, 在甲醇中浸泡 2h

滤纸与 PVEF 膜放置顺序 (从下到上): 9 张滤纸、PVEF 膜、胶、9 张滤纸

转膜条件: 25V , 1A , 转膜 30min

洗膜

洗膜在震荡培养箱内进行，震荡频率为 50rpm，TBST 洗液洗膜 5 次，每次 5min

封闭

取封闭液 20mL，室温条件下，50rpm 震荡封闭 1h

加入一抗

在封闭液中加入一抗，一抗与封闭液的加入比例为、BCl2(500 :1)、TGF- β 2(1000 : 1)、AKT(2000 : 1)、caspase3 (500:1)。37℃，50rpm，2h。之后用 TBST 洗膜 5 次，每次 5min。

加入二抗

更换 TBST，加入二抗，二抗与 TBST 加入比例为 5000:1，37℃，50rpm，1h。之后用 TBST 洗膜 5 次，5X5min，37℃，50rpm。

化学发光

ECLA 液与 B 液按 1:1 混匀后，滴加到 PVEF 膜中，静置 1min。

拍照

采用伯乐凝胶成像仪 5.2 拍照，选择全蛋白定量法，分析不同抗体的灰度值，根据灰度值反应蛋白的表达量。

5.1.9 统计分析

采用 SAS9.1 统计软件中的 ANOVA 分析不同处理组人真皮乳头细胞增殖的 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

5.2 结果与分析

5.2.1 不同 pH 值对水溶液稳定性的影响

白蜡及白蜡高级烷醇在溶解过程中溶液中 pH 值对白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的稳定性影响比较大，其中溶液的 pH 在 3 ~ 4 时可制备得到澄清透明溶液，溶液稳定性相对较好。在自然条件下，白蜡水溶液放置 24h 后有沉淀析出，而白蜡高级烷醇水溶液放置

4d 才有细小的晶体析出。相对于白蜡而言，白蜡高级烷醇在 pH 值为 3 ~ 4 水溶液环境中稳定性更高（表 5-1）。

表 5-1 不同 pH 条件下吐温-80 对白蜡水溶液的稳定性

Table 5-1 Effect of tween-80 to Stability of white wax solution in vary pH

pH 值 Value of pH	溶液 Solution	沉淀析出时间 Precipitation out of time	
		白蜡	白蜡高级烷醇
3 ~ 4	淡黄色，透明	室温放置 24h 析出	室温放置 4d 析出
5 ~ 6	淡黄色，透明	室温放置 25min 析出	室温放置 1h 析出
9 ~ 10	淡黄色，浑浊	室温放置 10min 析出	室温放置立马析出

5.2.2 搅拌时间对水溶液稳定性的影响

溶液 pH 值为 3 ~ 4 的条件时加热搅拌不同是时间考察搅拌时间对溶液稳定性的影响。结果显示：随着搅拌时间的延长，白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的稳定性增加，其中搅拌时间大约 30min 时，无论是白蜡还是白蜡高级烷醇水溶液在室温放置 2 个月均未析出(表 5-2)。

表 5-2 不同搅拌时间对水溶液稳定性的影响

Table 5-2 Effect of stirring time for Stability of water solution

搅拌时间 (min) Stirring time	溶液 Solution	沉淀析出时间 Precipitation out of time	
		白蜡	白蜡高级烷醇
10	淡黄色，透明	室温放置 24h 后析出	室温放置 4d 后析出
30	淡黄色，透明	室温放置 2 个月未见析出	室温放置 2 个月未见析出
60	淡黄色，透明	室温放置 2 个月未见析出	室温放置 2 个月未见析出

5.2.3 吐温 80 用量对水溶液稳定性的影响

为了确定吐温 80 与白蜡及白蜡高级烷醇最佳用量比，在溶液 pH 值为 3 ~ 4，搅拌时间为 30min 的条件下研究吐温 80 与白蜡及白蜡高级烷醇不同比例时溶液的稳定性。结果显示白蜡与吐温 80 的比例为 1:50、白蜡高级烷醇与吐温 80 的比例 1:5 时溶液室温放置

半年未见析出（表 5-3，表 5-4）。由此可知：吐温 80 对白蜡及白蜡高级烷醇均有明显的增溶效果，其中吐温 80 对白蜡高级烷醇的增溶效果明显高于白蜡。

5.2.4 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性评价

吐温 80 对人真皮乳头细胞生长的影响与其剂量存在着明显量效关系。吐温 80 用量在 1.56 ~ 6.25μg/mL 范围时，人真皮乳头细胞为梭形，生长良好，其生长状态与阴性细胞差异不明显，细胞融合度达到 70% ~ 80%。细胞增值率明显高于阴性对照，且随着吐温 80 用量的增加细胞增殖率降低。吐温 80 用量在 12.50 ~ 25.00μg/mL 范围内人真皮乳头细胞溶胀、变圆、破裂，有明显的细胞碎片，细胞融合度只有 5% ~ 20%，吐温 80 对细胞具有明显的抑制作用，其抑制作用随着吐温 80 用量的增加而增加（图 5-1）。这表明，吐温 80 用量在 1.25 ~ 6.25μg/mL 范围内人真皮乳头细胞能安全生长。

表 5-3 吐温-80 不同用量对水溶液稳定性的

Table 5-3 Effect of tween-80 for the stability of white wax solution

吐温 80：白蜡(w:w)	溶液	沉淀析出时间（室温放置）
Tween80:white wax (w:w)	Solution	Precipitation out of time (at room temperature)
5:1	浑浊	析出时间小于 1min
12.5：1	乳浊液	1 周析出
25：1	蜡白色，半透明	1 周析出
50：1	淡黄色，透明	半年未见析出

表 5-4 吐温-80 不同用量对白蜡高级烷醇的增溶效果

Table 5-3 Effect of tween-80 for the stability of policosanol of white wax solution

吐温 80：白蜡(w:w)	溶液	沉淀析出时间（室温放置）
Tween80:white wax (w:w)	Solution	Precipitation out of time (at room temperature)
5:1	乳白色，半透明	半年未见析出
12.5：1	蜡白色，透明	半年未见析出
25：1	透明溶液	半年未见析出
50:1	透明溶液	半年未见析出

5.2.5 白蜡及白蜡高级烷醇促进人真皮乳头细胞的增殖

（1）促进健康人真皮乳头细胞的增殖

吐温 80 安全用量范围为 1.56、3.12、6.25 $\mu\text{g/mL}$ ，白蜡在水中相应的溶解度分别为 0.31、0.63 和 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 。白蜡高级烷醇在水中相应的溶解度分别为 3.12、6.25 和 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 。在此范围内，人真皮乳头细胞生长良好，细胞成梭形，生长状态与阴性细胞相似，细胞融合度达到 80%~95%。白蜡和白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞具有明显的增殖效果。其中白蜡对人真皮乳头细胞的增殖率随着剂量的增加而增加。白蜡的用量为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 时对人真皮乳头细胞的增殖效果最明显，其增殖率明显高于阴性对照和阳性对照。白蜡用量为 0.62 $\mu\text{g/mL}$ 时对人真皮乳头细胞的增殖率与非那雄胺差异不明显，白蜡用量为 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 时对人真皮乳头细胞的增殖作用明显低于阳性对照，而高于阴性对照。在白蜡高级烷醇组中，白蜡高级烷醇用量为 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 时人真皮乳头细胞的增殖率最高，其增殖率为 161.99%，明显高于阳性对照。白蜡用量为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 或白蜡高级烷醇用量为 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ ，人真皮乳头细胞溶胀、变圆、破裂，有明显的细胞碎片，细胞的融合度只有 5%~20%。人真皮乳头细胞的增值率明显降低，且随着白蜡和吐温 80 用量的增加，细胞的增殖率降低。白蜡高级烷醇用量为 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 时，人真皮乳头细胞生长良好，其对细胞增殖作用仅次于 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 白蜡高级烷醇。白蜡高级烷醇用量达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 才明显抑制人真皮乳头细胞的生长（图 5-2，图 5-3）。这表明：在吐温 80 安全用量范围内，白蜡和白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞有明显的增殖作用。12.5 $\mu\text{g/mL}$ 吐温和 25 $\mu\text{g/mL}$ 白蜡高级醇共同作用于人真皮乳头细胞时，白蜡高级烷醇能抑制吐温 80 对人真皮乳头细胞的伤害。

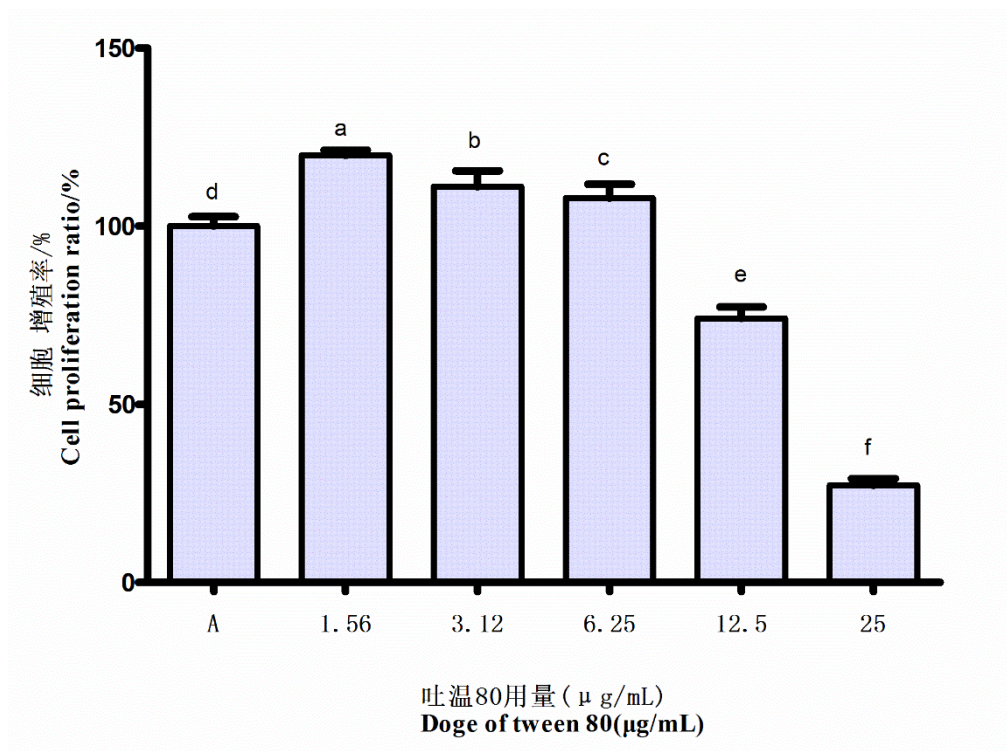


图 5-1 不同处理吐温-80 对人真皮乳头细胞增殖的影响

Fig.5-1 The proliferation of human dermal papilla cells in difference tween 80

注：细胞增殖率表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Values expressed as $\bar{x} \pm S.E.M$, means with the different lowercase (a-f) were significantly different according to One-way analysis of variance ($P < 0.05$).

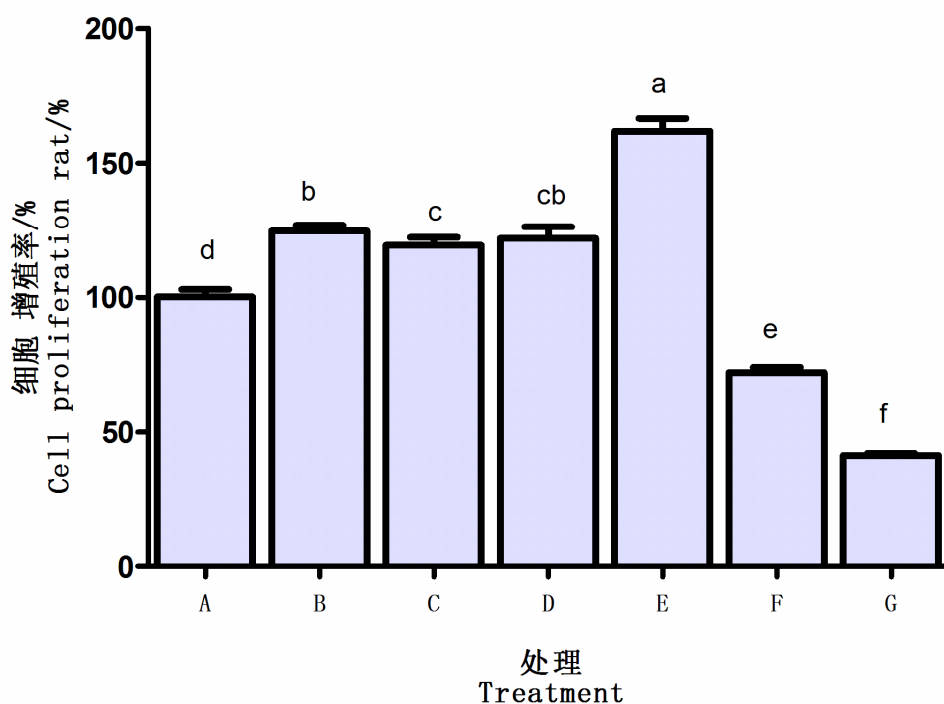


图 5-2 白蜡对人真皮乳头细胞的增殖作用

Fig.5-2 The proliferation of human dermal papilla cells in difference concentrate of white wax

注：细胞增殖率表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。A: 阴性对照; B: 非那雄胺; C: 处理药剂中吐温 80 和白蜡的浓度分别 $1.56 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.31 \mu\text{g/mL}$; D: 处理药剂中吐温 80 和白蜡的浓度分别 $3.15 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.62 \mu\text{g/mL}$; E: 处理药剂中吐温 80 和白蜡的浓度分别 $6.25 \mu\text{g/mL}$ 和 $1.25 \mu\text{g/mL}$; F: 处理药剂中吐温 80 和白蜡的浓度分别 $12.5 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.50 \mu\text{g/mL}$; G: 处理药剂中吐温 80 和白蜡的浓度分别为 $25.00 \mu\text{g/mL}$ 和 $5.00 \mu\text{g/mL}$ 。Values expressed as $\bar{x} \pm S.E.M$, means with the different lowercase (a-f) were significantly different according to One-way analysis of variance, A: Negative control; B: Finasteride; C: treatment agent including $1.56 \mu\text{g/mL}$ white wax; E: treatment agent including $6.25 \mu\text{g/mL}$ tween 80 and $1.25 \mu\text{g/mL}$ white wax; F: treatment agent including $12.5 \mu\text{g/mL}$ tween 80 and $2.50 \mu\text{g/mL}$ white wax; G: treatment agent including $25 \mu\text{g/mL}$ tween 80 and $5.00 \mu\text{g/mL}$ white wax.

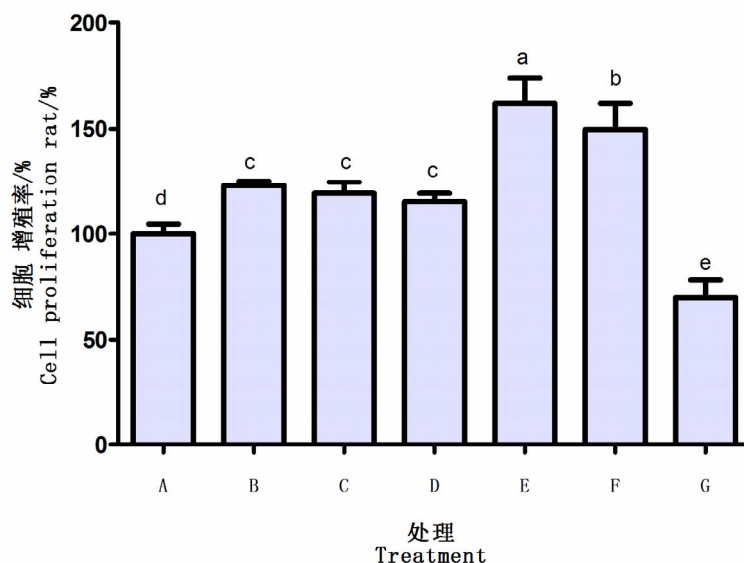


图 5-3 白蜡高级烷醇对真皮乳头细胞的增殖作用

Fig.5-3 The proliferation of human dermal papilla cells in difference concentrate of policosanol from white wax

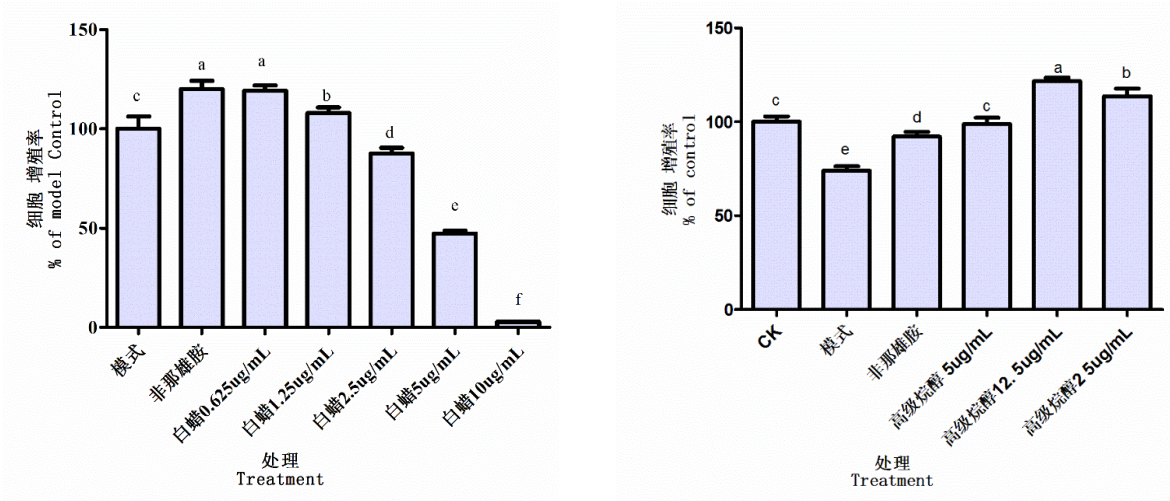
注：细胞增殖率表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。A:阴性对照; B:非那雄胺;C:吐温 80 和白蜡高级烷醇的浓度分别为 $1.56\mu\text{g/mL}$ 和 $3.12\mu\text{g/mL}$;D:处理药剂中吐温 80 和白蜡高级烷醇的浓度分别为 $3.15\mu\text{g/mL}$ 和 $6.25\mu\text{g/mL}$;E:处理药剂中吐温 80 和白蜡高级烷醇的浓度分别为 $6.25\mu\text{g/mL}$ 和 $12.5\mu\text{g/mL}$;F:处理药剂中吐温 80 和白蜡高级烷醇的浓度分别为 $12.50\mu\text{g/mL}$ 和 $25.00\mu\text{g/mL}$;G:处理药剂中吐温 80 和白蜡高级烷醇的浓度分别 $25.00\mu\text{g/mL}$ 和 $50.00\mu\text{g/mL}$ 。

Values expressed as $\bar{x} \pm S.E.M$, means with the different lowercase (a-e) were significantly different according to One-way analysis of variance, A: Negative control; B: Finasteride; C: treatment agent including $1.56\mu\text{g/mL}$ tween 80 and $3.12\mu\text{g/mL}$ white wax; D: treatment agent including $3.15\mu\text{g/mL}$ tween 80 and $6.25\mu\text{g/mL}$ white wax; E: treatment agent including $6.25\mu\text{g/mL}$ tween 80 and $12.5\mu\text{g/mL}$ white wax; F: treatment agent including $12.5\mu\text{g/mL}$ tween 80 and $25.00\mu\text{g/mL}$ white wax; G: treatment agent including $25.00\mu\text{g/mL}$ tween 80 and $50.00\mu\text{g/mL}$ white wax.

（2）促进模式细胞的增殖

二氢睾酮与真皮乳头细胞共同作用 48h 后能明显抑制人真皮乳头细胞的增殖，而添加白蜡及白蜡高级烷醇后能阻断二氢睾酮对真皮乳头细胞的伤害。在白蜡组中，随着白

蜡用量的增加人真皮乳头细胞的增殖率降低。白蜡用量为 0.0625ug/mL 时，对真皮乳头细胞的增殖作用与非那雄胺差异不显著。白蜡用量高于 1.25ug/mL 时细胞的增殖率明显低于阳性对照，而高于模式组（图 5-4A）。在白蜡高级烷醇组中，随着白蜡高级烷醇浓度的增加，人真皮乳头细胞的增殖率增加。高级烷醇溶解度为 5ug/mL ~ 25ug/mL 时，人真皮乳头细胞的增殖率明显高于阳性对照。其中，高级烷醇用量为 12.5ppm 时对模式细胞的增殖效果最为明显，其增殖率为 121.60%（图 5-4B）。这表明白蜡及白蜡高级烷醇能明显阻断二氢睾酮与受体的结合。其中白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的增殖活性高于白蜡。



分图 A：白蜡对模式细胞的增殖作用
A: the proliferation of model cells in difference
concentrate of white wax

分图 B：白蜡高级烷醇对模式细胞的增殖作用
B: the proliferation of model cells in difference
concentrate of policosanols from white wax

图 5-4 白蜡及白蜡高级烷醇对模式细胞的增殖作用

Fig.5-4 The proliferation of model cells in difference concentrate of white wax and policosanols from white wax

注：细胞增殖率表示 $\bar{x} \pm S.E.M$ ，不同字母表示不同处理组之间存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。Values expressed as $\bar{x} \pm S.E.M$, means with the different lowercase (a-e) were significantly different according to One-way analysis of variance,

5.2.6 白蜡及白蜡高级烷醇对凋亡信号通路的调节

（1） TGF-β2 蛋白

随着白蜡浓度的增加细胞内的 TGF- β 2 蛋白降低，其中白蜡浓度为 5 μ g/mL 时，细胞内的 TGF- β 2D 蛋白的表达量低于模式细胞，而与阳性药剂处理的细胞差异不明显。5 μ g/mL 白蜡组蛋白表达量与模式组蛋白表达量比值为 0.82。白蜡高级烷醇处理后的细胞内 TGF- β 2 蛋白表达量与白高级烷醇的剂量无关，其中白蜡高级烷醇用量为 25 μ g/mL 时 TGF- β 2 蛋白表达量低于模式组和阳性对照组，其与模式组蛋白表达量比值为 0.76，而非那雄胺组 TGF- β 2 蛋白的表达量与模式组的比值为 0.81（图 5-5）。这表明，白蜡及白蜡高级烷醇能够降低 TGF- β 2 蛋白表达，这两种物质对 TGF- β 2 蛋白的作用活性差异不明显。

（2）caspase8

白蜡及白蜡高级烷醇处理人真皮乳头细胞后 caspase8 蛋白的表达量低于模式组。在白蜡组中，不同浓度白蜡组细胞中 caspase8 蛋白的表达量低于模式组细胞，而高于非那雄胺组细胞中 caspase8 的表达量。其中白蜡浓度为 2.5 μ g/mL 时 caspase8 蛋白的表达量最低，其蛋白表达量与模式组的比值为 0.70。在白蜡高级烷醇组中，随着白蜡高级烷醇浓度的增加 caspase8 蛋白表达量增加。其中白蜡高级烷醇用量为 6.25 μ g/mL 时 caspase8 蛋白的表达量低于非那雄胺组，其表达量与模式组的比值为 0.45（图 5-6）。这表明，白蜡及白蜡高级烷醇均能下调 caspase8 蛋白的表达，其中白蜡高级烷醇对 caspase8 蛋白的活性高于白蜡。

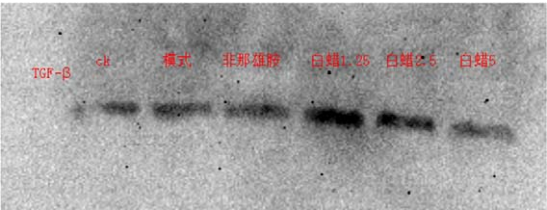
（3）caspase9

人真皮乳头细胞与白蜡及白蜡高级烷醇共同培养 48h，在白蜡组中，2.5 μ g/mL 白蜡处理后的细胞 caspase9 蛋白表达量低于模式组和非那雄胺组，其蛋白表达量与模式组的比值为 0.40。1.25 μ g/mL 和 5 μ g/mL 白蜡组处理后细胞 caspase9 蛋白表达量高于模式组和非那雄胺组。在白蜡高级烷醇组中，不同浓度白蜡高级烷醇处理后的细胞 caspase9 蛋白表达量低于模式组和非那雄胺组。其中白蜡高级烷醇用量为 6.25 μ g/mL 时 caspase9 蛋白的表达量最低，其蛋白表达量与模式组的比值为 0.52（图 5-7）。这表明，白蜡及白蜡高级烷醇均能降低 caspase9 蛋白的表达，其中白蜡对 caspase9 蛋白作用的活性高于白蜡高级烷醇。

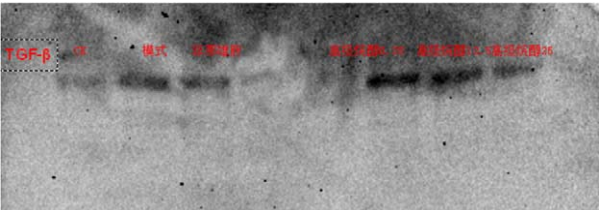
（4）caspase3

白蜡及白蜡高级烷醇处理人真皮乳头细胞后。在白蜡组中，随着白蜡浓度的增加 caspase3 蛋白表达量降低，但不同浓度白蜡组中 caspase3 的表达与模式组和非那雄胺组

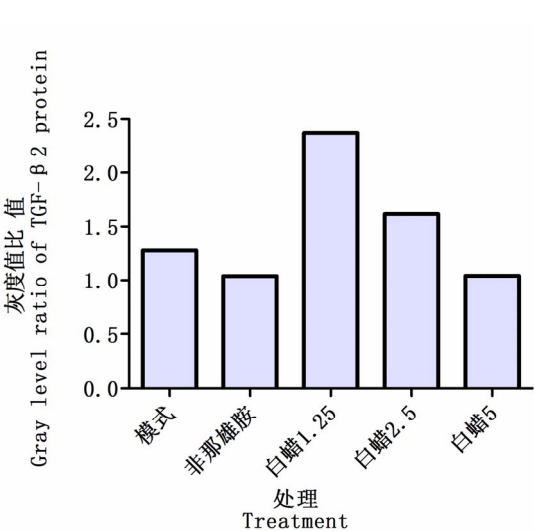
差异不显著 ,其中 5 μ g/mL 白蜡组 caspase3 蛋白的表达量与模式组的比值为 0.97。在白蜡高级烷醇组中 ,随着白蜡高级烷醇浓度的增加 caspase3 蛋白表达量降低 ,且不同浓度白蜡高级烷醇组 caspase3 蛋白的表达量明显低于模式组和非那雄胺组 ,其蛋白表达量与模式组的比值分别为 0.52、0.36、0.39 (图 5-8)。这表明 ,白蜡不能调节 caspase3 蛋白的表达 ,而白蜡高级烷醇对 caspase3 具有明显的调节作用。



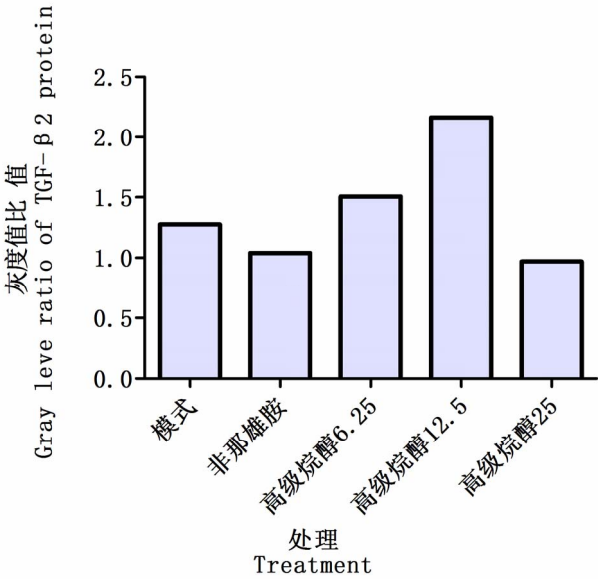
分图 A：白蜡组 TGF-β2 蛋白条带
A: The protein band of TGF-β2 in difference concentrate of white wax



分图 B：白蜡高级烷醇组 TGF-β2 蛋白条带
B: The protein band of TGF-β2 in difference concentrate of policosanols from white wax



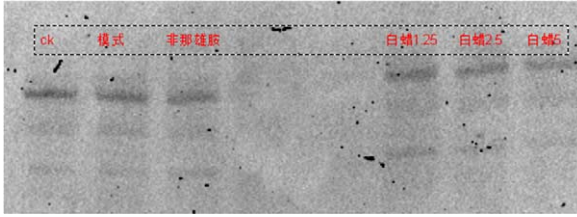
分图 C：白蜡组 TGF-β2 灰度值
C: The gray level ratio of TGF-β2 in difference concentrate of white wax



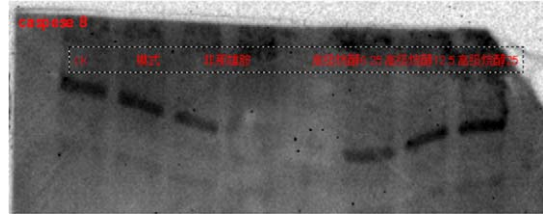
分图 D：白蜡高级烷醇组 TGF-β2 灰度值
D: The gray level ratio of TGF-β2 in difference concentrate of policosanols from white wax

图 5-5 白蜡及白蜡高级烷醇对 TGF-β2 蛋白表达量的影响

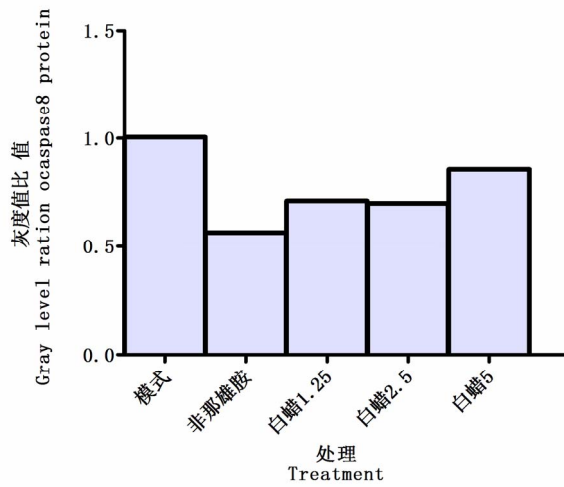
Fig.5-5 The level of TGF-β2 in difference concentrate of white wax and policosanols from white wax



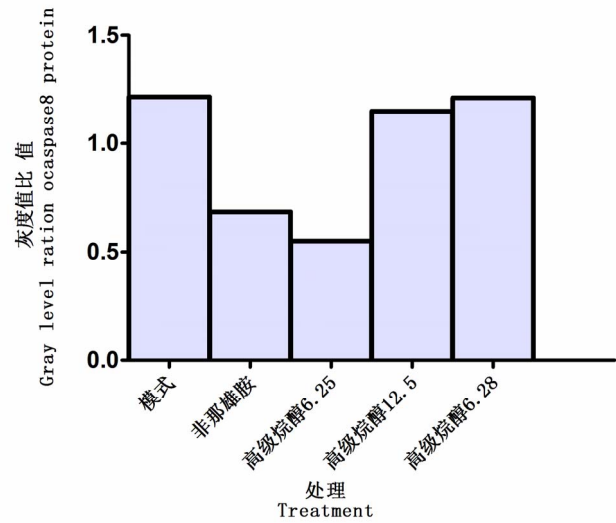
分图 A：白蜡组 caspase8 蛋白条带
A: The protein band of caspase in difference concentrate of white wax



分图 B：白蜡高级烷醇组 caspase8 蛋白条带
B: The protein band of caspas8 in difference concentrate of policosanols from white wax



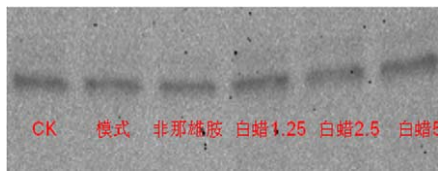
分图 C：白蜡组 caspase8 灰度值
C: The gray level ratio of caspase8 in difference concentrate of white wax



分图 D：白蜡高级烷醇组 caspase8 灰度值
D: The gray level ratio of caspase8 in difference concentrate of policosanols from white wax

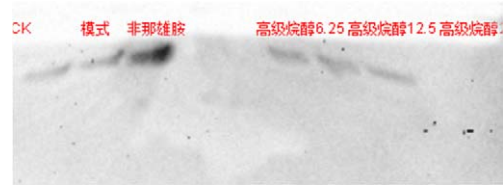
图 5-6 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase8 蛋白表达量的影响

Fig.5-6 The level of caspase9 in difference concentrate of white wax and policosanols from white wax



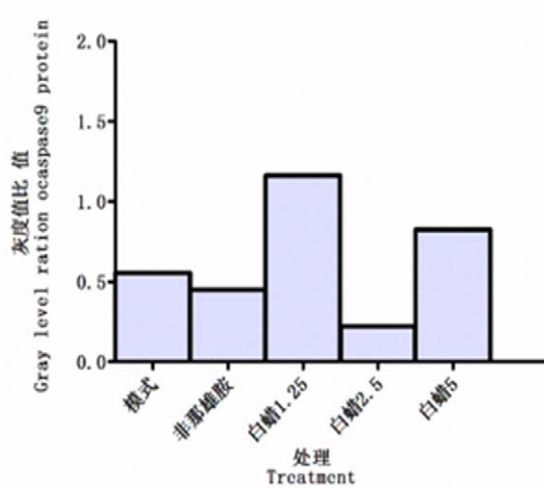
分图 A：白蜡组 caspase9 蛋白条带

A: The protein band of caspase9 in difference concentrate of white wax



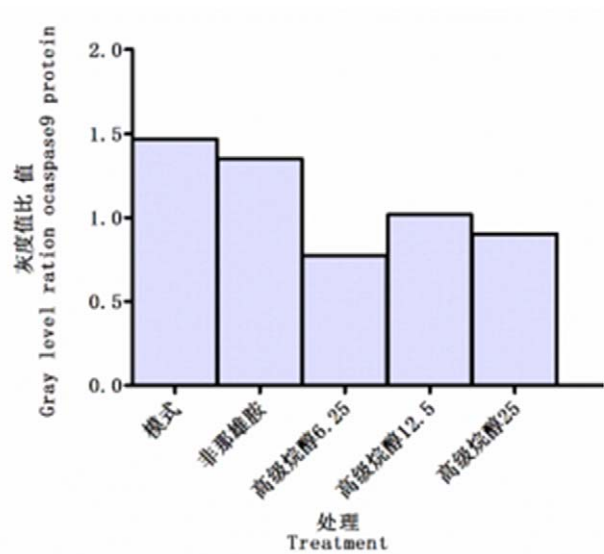
分图 B：白蜡高级烷醇组 caspase9 蛋白条带

B: The protein band of caspase9 in difference concentrate of policosanols from white wax



分图 C：白蜡组 caspase9 灰度值

C: The gray level ratio of caspase9 in difference concentrate of white wax

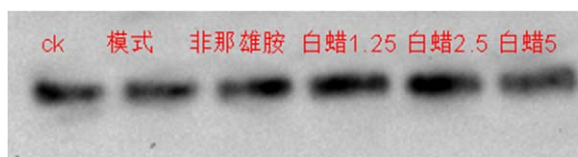


分图 D：白蜡高级烷醇组 caspase9 灰度值

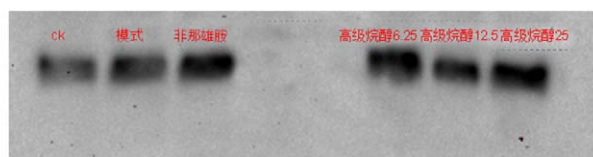
D: The gray level ratio of caspase9 in difference concentrate of policosanols from white wax

图 5-7 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase9 蛋白表达量的影响

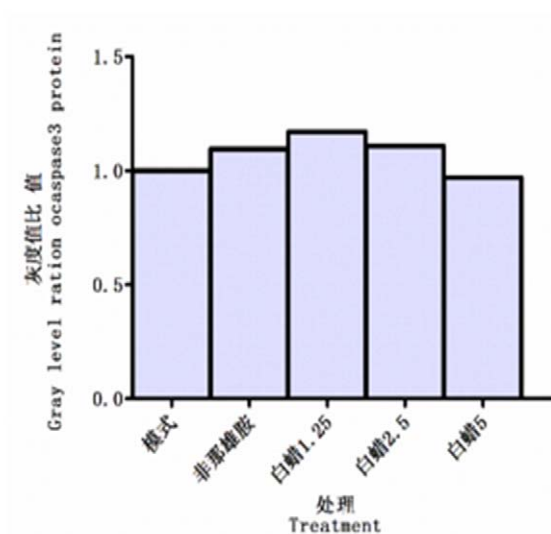
Fig.5-7 The level of caspase9 in difference concentrate of white wax and policosanols from white wax



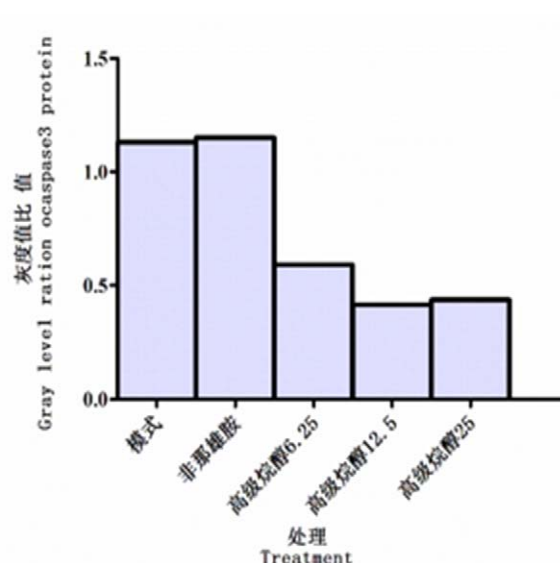
分图 A：白蜡组 caspase3 蛋白条带
A: The protein band of caspase3 in difference concentrate of white wax



分图 B：白蜡高级烷醇组 caspase3 蛋白条带
B: The protein band of caspase3 in difference concentrate of policosanols from white wax



分图 C：白蜡组 caspase3 灰度值
C: The gray level ratio of caspase3 in difference concentrate of white wax



分图 D：白蜡高级烷醇组 caspase3 灰度值
D: The gray level ratio of caspase3 in difference concentrate of policosanols from white wax

图 5-8 白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase3 蛋白表达量的影响

Fig.5-8 The level of caspase3 in difference concentrate of white wax and policosanols from white wax

5.3 讨论

5.3.1 白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备

增加难溶性物质溶解度常用的方法包括调节溶液的 pH 值、添加增溶剂和助溶剂、制备包合物等三种。其中调节溶液 pH 值主要是增加(弱)酸性或 (弱)碱性药物的解离度，从而增加其在水中的溶解度^[168]。常用于调节溶液 pH 值的试剂包括：氢氧化钠、三乙醇胺、

氨水、洒石酸、枸橼酸、抗坏血酸等^[169]。增溶剂主要指的是一些表面活性剂，利用表面活性的两亲性增加难溶性药物在水中的溶解度。应用最多的表面活性剂为阴离子表面活性剂，如吐温 80、泊罗萨姆，司盘-80 等。其增溶机理是在适当的条件下表面活性剂易在药物表面形成亲水基向外，疏水基向的胶束或离子架桥将难溶性药物包裹在里面，增加药物的溶解性^[170]。助溶剂主要指的是通过与难溶性药物形成水溶性络合物增加药物的溶解度。常用的助溶剂包括有机酸及其钠盐、酰胺类或胺类化合物。包合物指将难溶性物质包裹在具有空穴结构的物质，具有空穴结构的物质必需是亲水基团分布在外部，疏水基团分布在内的物质，如环糊精^[171]。对于上述三种增加难溶性物质溶解度的方法中，调节溶液 pH 值和添加增溶剂是比较常用的方法。但是在解决难溶性药物溶解性问题时，需结合药物本身的物理化学性质可以选择一种方法也可以将几种不同的方法综合考虑。我们在研究白蜡及白蜡高级烷在水中溶解性时发现除了吐温 80 的用量外，溶液的 pH 值也是一个必不可缺的影响因素。

研究中我们发现制备过程中溶液的 pH 值和吐温 80 的用量对白蜡及白蜡高级烷醇水溶液的制备影响较大。吐温 80 为聚氧乙烯型阴离子型表面活性剂。这类阴离子表面活性剂含有能吸附液体中悬浮颗粒的极性基团，形成粒子架桥从而加快溶液的澄清。白蜡为蜡酯类化合物，而酯类化合物在强酸性条件下发生水解生成脂肪酸和脂肪醇。脂肪酸和脂肪醇中的羧基和羟基均为极性基团。白蜡及白蜡高级烷醇被加热到 85 及其以上呈液体状态，高速搅拌能加速分子的布朗运动，有利于吐温 80 与脂肪酸和脂肪醇形成粒子桥，从而促进白蜡在水中的溶解性。白蜡高级烷醇虽然不需要经过水解过程，但是溶液中的 pH 值对促进白蜡高级烷醇在水中的溶解度也是至关重要的，可能的原因是溶液的 pH 值增加了高级烷醇的解离度，当溶液的温度达到吐温 80 的临界温度，被解离的高级烷醇与吐温 80 形成胶束，将高级烷醇包裹在胶束中从而增加高级烷醇在水中的溶解度。因此，在酸性条件下，吐温 80 能增加白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶解度。其中制备白蜡水溶液的最佳条件为：pH 值为 3~4，搅拌时间大于 30min，白蜡：吐温 80 为 1:50。制备白蜡高级烷醇水溶液最佳条件为：pH 值为 3~4，搅拌时间大于 30min，白蜡：吐温 80 为 1:5。在最佳溶解条件下，白蜡溶解度为 1mg/mL，白蜡高级烷醇溶解度为 2mg/mL 时，溶液澄清透明且溶液稳定性好。

5.3.2 吐温 80 对人真皮乳头细胞的安全性

考察药物对细胞生长的影响通常采用的方法有 MTT 法和 MTS 法，这两种方法均是采用比色法检测细胞的生长，其原理是 MTT 和 MTS 试剂被活细胞内的脱氢酶产生的 NADPH 或 NADH 还原为有色的甲臜，而死细胞不能产生脱氢酶，因此死细胞不能产生延伸。活细胞代谢越活越，产生的甲臜越多，培养基的颜色越深^[172]，表明细胞增殖越旺盛。但是相对于 MTT 法，MTS 法检测时间短，安全性高，重复性好^[173]。

吐温 80 能够很好的增加白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶解度，但是吐温 80 中含有的杂质或降解产物，这些物质对细胞容易产生毒害作用^[174]。而且不同细胞对吐温 80 的敏感程度不同。如吐温 80 用量在 0.1%~2% 时对红细胞有溶血作用^[175]；用量为 1% 时对卵巢癌 SKOV3 有明显的抑制作用^[176]；而吐温 80 用量为 0.05%~0.10% 时对 Caco-2 细胞没有明显的毒害^[177]。虽然吐温 80 对细胞的生长有一定的毒害作用。但是某些中药以吐温 80 作为增溶剂后，其水溶液对红细胞的毒害作用小于吐温 80 本身对红细胞的作用，如含有吐温 80 的细辛脑注射液对红细胞的溶血作用小于吐温 80 本身^[178]。由此可见，针对不同的细胞类型筛选合适的吐温剂量非常必要。我们试验结果显示吐温 80 用量在 $1.56 \sim 6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ （百分含量为 0.003%~0.006%）对人真皮乳头细胞没有明显的毒害，可用于试验。

5.3.3 白蜡及白蜡高级烷醇促进健康人真皮乳头细胞的增殖

《本草纲目》中记载白蜡能够促进毛发的生长^[179]，但是鲜有文献在细胞水平上证明白蜡对毛发生长有促进作用。高级烷醇自 1949 年被发现后，其生物活性被大量而深入的研究和开发^[121, 180, 181]，而高级烷醇对毛发生长作用方面的研究鲜见报道。此外对高级烷醇活性的研究多取材于植物，如小麦^[182]、甘蔗^[183]的高级烷醇，而对于昆虫的高级烷醇生物活性的研究鲜有报道。本研究以人真皮乳头细胞作为模式细胞，研究白蜡及从白蜡中提取得到的白蜡高级烷醇对毛发生长的促进作用。结果表明，在吐温作为增溶剂条件下，白蜡用量为 $0.31 \sim 1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，高级烷醇用量为 $3.12 \sim 12.50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时能促进体外人真皮乳头细胞的增殖。

5.3.4 白蜡及白蜡高级烷醇促进模式细胞的增殖

对毛囊具有伤害作用雄激素主要是二氢睾酮，二氢睾酮穿过真皮乳头细胞的细胞膜进入细胞内，与真皮乳头细胞内的雄激素受体结合，调控相关基因的表达，引发激素效

应,调节细胞的生长和分化^[151],诱导毛囊脱发。由此可以,抑制二氢睾酮与受体的结合可以阻止毛发的脱落。因此,我们将人真皮乳头细胞培养中含有二氢睾酮的培养基中建立雄激素性模式细胞,再将模式细胞培养在含有白蜡及白蜡高级烷醇的培养基中研究白蜡及白蜡高级烷醇能否阻止人真皮乳头细胞内二氢睾酮与雄激素受体的结合。试验结果显示:细胞培养在含有二氢睾酮培养基中 48h,细胞增殖率明显低于健康细胞。这表明模式细胞建立成功。在模式细胞中添加白蜡及白蜡高级烷醇后,人真皮乳头细胞的增殖率明显高于模式细胞。这表明,白蜡及白蜡高级烷醇能阻止二氢睾酮与人真皮乳头细胞内雄激素受体的结合。

5.3.5 白蜡及白蜡高级烷醇对凋亡信号通路的调节

雄激素通过毛细血管进入真皮乳头细胞中与其雄激素受体结合进入细胞核^[184]。在细胞核内雄激素与其受体的结合物能激活转化生长因子 $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) 的合成,合成的 TGF- $\beta 2$ 可以激活 caspases 信号通路^[185]。在 caspase 信号通路中,首先被激活的蛋白为 caspase8。caspase8 能够直接激活 caspase3,也能通过诱导细胞色素 c 的释放激活 caspase9,再激活 caspase3^[186-188],其中 caspase8 直接激活 caspase3 的信号途径能启动外源性细胞凋亡的信号通路,其信号通路与 TNF- α 和 Fas 两个受体相关。通过 caspase9 激活 caspase3 的信号途径启动内源性途径的细胞凋亡^[187]。这两个信号通路都能激活 caspase3 蛋白,使毛囊内的表皮细胞开始凋亡,毛囊微型化最终导致脱发。因此,降低细胞凋亡信号通路中的关键蛋白,如 TGF- $\beta 2$ 、caspase8、caspase3 和 caspase9 能够抑制细胞的凋亡。如 Kim, M. H. 根据 caspase3 蛋白和 caspase9 蛋白的表达评价黄芪甲苷抑制 Fas/Fas-L 介导的细胞凋亡信号通路的作用^[166]。在蛋白印记试验中我们根据 TGF- $\beta 2$ 、caspase3、caspase8 和 caspase9 蛋白条带的灰度值评价白蜡及白蜡高级烷醇对 caspase 凋亡信号通路的调节作用。结果显示,白蜡及白蜡高级烷醇能够抑制 TGF- $\beta 2$ 、caspase8、caspase3 和 caspase9 蛋白的表达。其中白蜡及白蜡高级烷醇对 TGF- $\beta 2$ 蛋白的调节作用差异不明显,但是这两个物质对 caspase 蛋白的调节作用差异比较明显。白蜡对 caspase9 的调节作用较强,白蜡高级烷醇对 caspase3 和 caspase8 的调节作用较强。这表明白蜡及白蜡高级烷醇能够调节细胞凋亡信号通路,其中白蜡主要调节内源性细胞凋亡,白蜡高级烷醇主要调节外源性细胞凋亡。

5.4 小结

(1) 吐温 80 作为增溶剂能够解决白蜡及白蜡高级烷醇在水中溶解性的问题，其中制备白蜡水溶液的最佳条件为：pH 值为 3~4，搅拌时间大于 30min，白蜡：吐温 80 为 1:50，制备白蜡高级烷醇水溶液的最佳条件为：pH 值为 3~4，搅拌时间大于 30min，白蜡：吐温 80 为 1:5。吐温 80 作为增溶剂，用量在 1.56~6.25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内人真皮乳头细胞能安全生长。

(2) 白蜡及白蜡高级烷醇均能促进健康细胞和模式细胞的增殖。白蜡水溶液的浓度为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、白蜡高级烷醇水溶液浓度为 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 能明显促进人真皮乳头细胞和二氢睾酮诱导的模式细胞的增殖，其对细胞的增殖率明显高于阳性对照。

(3) 白蜡及白蜡高级烷醇能降低 TGF- β 2、caspase8、caspase3 和 caspase9 蛋白的表达。白蜡及白蜡高级烷醇对 TGF- β 2 蛋白的调节作用差异不明显。但是白蜡对 caspase9 的调节作用较强，白蜡高级烷醇对 caspase3 和 caspase8 的调节作用较强。

第六章结论与展望

6.1 结论

本文从动物实验、体外实验、细胞试验和蛋白检测四个方面研究了白蜡及白蜡高级烷醇促进脂溢性脱发小鼠毛发生长的作用及机理。结果显示白蜡及白蜡高级烷醇能促进雄激素性脱发模式小鼠毛发的生长。其作用的靶标位点有毛球, 5α -还原酶、二氢睾酮与雄激素受体的复合物三个。白蜡及白蜡高级烷醇促进毛囊生长的作用机理表现为延长毛囊的生长期和阻止激素对毛囊的伤害两个方面。延长毛囊的生长期主要与促进血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达以及促进真皮乳头细胞的增殖有关。阻止激素对毛囊的伤害方面的机理主要表现为降低小鼠体内睾酮的含量, 抑制 5α -还原酶的活性, 阻止二氢睾酮与雄激素受体的结合, 并且能抑制 caspase 细胞凋亡信号通路, 其中白蜡调节内源性细胞凋亡信号通路, 白蜡高级烷醇调节外源性细胞凋亡信号通路。具体结果显示:

6.1.1 白蜡及白蜡高级烷醇对毛囊形态的影响

给药 28d, 模式组小鼠背毛色泽发暗并伴有明显脱毛区域, 毛囊直径变细、微型化。局部涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后小鼠背毛顺滑有光泽, 毛囊直径较粗。此外白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠背毛重量、毛囊长度、毛球直径、毛囊密度、生长期毛囊数量与休止期毛囊数量比值 (A/T) 明显高于模式组。随着调查时间的延长白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠毛球直径和 A/T 比值增加。其中 10%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组小鼠、毛球直径和 A/T 比值明显高于阳性对照组。表明白蜡及白蜡高级烷醇能促进脂溢性脱发模式小鼠毛发的生长, 相同用量时, 白蜡高级烷醇促进毛囊生长的效果高于白蜡。

6.1.2 白蜡及白蜡高级烷醇对小鼠激素水平的调节作用

给药第 28d, 涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后小鼠体内睾酮含量明显低于模式组, 对雌二醇的作用效果不明显, 但能使紊乱的激素水平回复正常。给药第 60d, 各组小鼠体内激素整体水平与 CK 组差异不显著。但是 2%白蜡高级烷醇能明显降低小鼠体内睾酮含量, 其

值与阳性对照差异不显著。5 α -还原酶抑制试验结果显示，白蜡及白蜡高级烷醇能够降低制睾酮的转化率，抑制 5 α -还原酶的活性。但是白蜡及白蜡高级烷醇对 5 α -还原酶的抑制中浓度高于非那雄胺。表明白蜡及白蜡高级烷醇能够降低小鼠血液内睾酮的含量，阻抑制 5 α -还原酶催化睾酮生成二氢睾酮。其中，白蜡高级烷醇对睾酮的作用效果高于白蜡，而白蜡抑制 5 α -还原酶活性的能力强于白蜡高级烷醇。

6.1.3 白蜡及白蜡高级烷醇对生长因子的作用

涂抹白蜡及白蜡高级烷醇后小鼠皮肤内的碱性磷酸酶含量明显高于模式组。其中 10%、20%白蜡组及 1%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内碱性磷酸酶的含量变化与 5%米诺地尔组变化趋势相同。5%白蜡和 0.5%白蜡高级烷醇组小鼠皮肤内碱性磷酸酶表达量最低点出现的时间晚于模式组，表明白蜡及白蜡高级烷醇能延长毛囊的生长期。

给药 28d，白蜡及白蜡高级烷醇能明显促进血管内皮生长因子和表皮生长因子的表达量，其表达量明显高于模式组，而与阳性对照组差异不显著。表明白蜡及白蜡高级烷醇通过促进毛囊营养成分的供应促进毛囊由休止期进入生长期。

6.1.4 白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮乳头细胞的作用

吐温 80 能够增加白蜡及白蜡高级烷醇在水中的溶解度，其对人真皮乳头细胞的安全用量范围为 1.56 ~ 6.25 ug/mL。在吐温 80 安全用量范围内，白蜡及白蜡高级烷醇能促进人真皮乳头细胞和二氢睾酮诱导的模式细胞的增殖。并且能抑制 caspase 细胞凋亡信号通路中 caspase9、caspase8、caspase3 和 TGF- β 2 蛋白的表达。其中，白蜡对 caspase3 蛋白没有调节作用，而其对 caspase9 作用的活性高于白蜡高级烷醇，而白蜡高级烷醇对 caspase8 和 caspase3 的作用活性高于白蜡。同时这两个物质对 TGF- β 2 的活性差异不显著。这表明白蜡及白蜡高级烷醇能促进人真皮乳头细胞的增殖，抑制二氢睾酮与受体的结合，并且能调节 caspase 细胞凋亡信号通路，其中白蜡调节内源性细胞凋亡，白蜡高级烷醇主要调节外源性细胞凋亡。

6.2 创新点

1、以脂溢性脱发模式小鼠为研究对象，本文对毛发的外观和毛囊组织学进行调查发现白蜡及白蜡高级促进毛发生长的作用效果。

2、用昆明小鼠做模式小鼠研究发现白蜡及白蜡高级促进毛发生长的作用机理主要是延长毛囊的生长期和阻止激素对毛囊的伤害。

6.3 讨论

6.3.1 白蜡及白蜡高级烷醇促进毛囊生长的作用

毛发的直径和脱落与毛囊的形态关系比较密切，因此，毛囊形态的变化常被用于评价药物对毛发生长的作用效果。其中毛囊长度、毛囊密度、生长期毛囊数量和休止期毛囊数量的比值是常用的调查指标^[76,139,141]。但是，毛囊的长度随着毛囊生长期的改变发生周而复始的变化。毛囊着生在皮肤的表皮层并向真皮层延伸，毛囊由表皮层向真皮层延伸是，毛囊长度的增加，毛发的直径和长度增加。毛囊由真皮层向表皮层萎缩时，毛囊长度减少，毛发直径萎缩变细脱落。而在于毛囊基地部位的毛球决定着毛囊长度。毛球直径增加，毛囊长度增加，毛球直径萎缩变小毛囊长度降低。因此除了毛囊长度、毛囊密度、生长期毛囊数量和休止期毛囊数量的比值外，毛球直径也是毛囊形态变化中重要的指标。我们的研究发现白蜡及白蜡高级烷醇能明显促进毛囊长度、毛囊密度、毛球直径和 A/T 比值的增加，其值高于阳性对照。其中白蜡给药浓度为 10%和白蜡高级烷醇给药浓度为 1%时促进小鼠毛囊生长的效果最为明显。这表明：白蜡及白蜡高级烷醇能促进毛发的生长。

6.3.2 白蜡及白蜡高级烷醇延长毛囊的生长期

毛发的生长与毛囊的循环再生关系非常密切。毛囊的循环再生包括三个阶段，生长期、退行期和休止期。在生长期，毛囊隆突部位形成的毛芽向下生长，激活处于休眠状态的真皮乳头细胞，并刺激其增殖。真皮乳头细胞增殖旺盛其分泌的生长因子表达量较高。毛囊营养供应充足，毛囊生长旺盛，形成的毛干较粗，毛发长度较大。在退行期，真皮乳

头细胞增殖降低，生长因子基因表达降低，毛囊上皮细胞的凋亡，毛球在皮肤内的位置上移，导致毛细血管与毛球的连接数量降低，毛囊营养供应不足，毛干萎缩变细，毛发失去光泽。在休止期，真皮乳头细胞处于休眠状态，毛发开始脱落^[30-37]。由此可以，在毛囊生长的三个阶段中，延长毛囊的生长期可以有效的防止毛发的脱落，其中促进真皮乳头细胞的增殖能延长毛囊的生长期。毛囊生长期的启动和持续时间的长度与毛囊内的生长因子有关。如血管内皮生长因子（VEGF）^[45,161]、表皮生长因子（EGF）^[161,162]、胰岛素样生长因子-1（IGF-1）、成纤维细胞生长因子（FGF）^[165]。其中，VEGF 由毛球内的真皮乳头细胞分泌，其具有血管生成素的作用，能促使毛球周围的毛细血管网形成，为毛囊的生长提供必需的营养物质，延长毛囊的生长期^[160]。EGF 其存在于毛囊的外根鞘，通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进毛囊由休止期进入生长期^[49]。但是 EGF 对毛囊的调节作用与剂量有关，EGF 表达量在 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ pg/mL 范围内能促进毛发的生长，其表达量高于 2×10^5 pg/mL 抑制毛发的生长^[49]。我们的试验结果显示：白蜡及白蜡高级烷醇能够促进真皮乳头细胞的增殖，提高 VEGF 和 EGF 的表达量，而且 EGF 表达量在 $1.4 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^3$ pg/mL。除了 5%、10%白蜡组外，其他处理组 EGF 的表达量均处于促进毛发生长的有效量范围内，由此可知，白蜡及白蜡高级烷醇能够延长毛囊的生长期，又能够促进毛囊由休止期进入生长期。

碱性磷酸酶是毛囊生长的指标性酶，其表达量的高低反应毛囊所处的阶段。在毛囊生长期的初级阶段碱性磷酸酶的活性最高，随后其表达量降低，到休止期毛囊内碱性磷酸酶的活性最低^[163]。因此，可以根据碱性磷酸酶活性的变化判断毛囊所处的生长阶段。我们的研究结果显示，给药第 45d，模式组小鼠毛囊进入退行期，5%白蜡组及 2%白蜡高级烷醇组毛囊处于生长中期，10%、20%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组小鼠毛囊进行下一个循环期的生长期。相对于模式组而言，5%白蜡和 2%白蜡高级烷醇延长了毛囊的生长期，10%、20%白蜡组和 1%白蜡高级烷醇组促进了毛囊由休止期向退行期的转化。这也表明白蜡及白蜡高级烷醇既能延长毛囊的生长期又能缩短毛囊的休止期。

6.3.3 白蜡及白蜡高级烷醇阻止激素对毛囊的伤害

脂溢性脱发是一种与激素调节有关的疾病，其主要因素是由于雄激素在头皮内聚集，导致睾酮在 $5-\alpha$ 还原酶的作用下产生二氢睾酮，二氢睾酮与毛囊的靶标细胞内的雄激素

受体结合进入真皮乳头细胞的细胞核内，抑制真皮乳头的生长，干扰毛囊细胞的生长代谢，使毛囊提前进入休止期^[8]，从而延长毛囊的休止期，导致新毛发还未形成，旧毛已经脱落。而在体内直接由腺体分泌的激素为睾酮和雌二醇两种，其中雌二醇只存在于女性的卵巢内。男性体内的雌二醇主要来源于睾酮。睾酮随着血液循环运输到全身各个部位。在头皮内，睾酮除了被 5 α -还原酶催化生成二氢睾酮外还能在芳香酶的作用下生成雌二醇。雌二醇能够拮抗二氢睾酮对毛囊的伤害^[60]。由此可知，调节激素水平，抑制 5- α 还原酶的活性，阻止二氢睾酮与雄激素受体结合能够促进毛发的生长。

目前作用于激素、促进毛发生长的药物包括雄激素受体抑制剂、促性腺激素释放激素受体拮抗剂和 5 α -还原酶抑制剂三大类。其中雄激素受体抑制剂通过降低雄激素与其受体结合的能力，降低 mRNA 的表达量^[71,72]；促性腺激素释放激素受体的拮抗剂能够抑制 GnRH 与 GnRH 受体的结合以及 NFAT 受体的活性^[73]；5 α -还原酶抑制剂作用于 NADPH 辅酶，降低 5 α -还原酶活性抑制毛囊中睾酮转变为二氢睾酮^[74]。我们的试验结果显示白蜡及白蜡高级烷醇能够降低小鼠体内睾酮的含量，抑制 5 α -还原酶的活性并且能阻止二氢睾酮与雄激素受体的结合。表明白蜡及白蜡高级烷醇能够阻止二氢睾酮对毛囊的伤害。

二氢睾酮与毛囊内雄激素受体结合能激活毛囊内的凋亡信号通路。在细胞凋亡信号通路中，诱导细胞内的转化生长因子 $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) 的合成，合成的 TGF- $\beta 2$ 激活 caspase 细胞凋亡信号通路，在此通路中，关键的蛋白为 caspase8，其不仅能直接激活 caspase3 启动外源性细胞凋亡信号脱落，而且还能通过激活 caspase9 再激活 caspase3 刺激内源性的细胞凋亡信号通路，提高 Bax 蛋白的表达，促使表皮细胞凋亡^[166]。因此，药物阻止二氢睾酮对毛囊伤害的作用机理涉及药物对 caspase 蛋白及其上游蛋白(TGF- $\beta 2$)表达量的调节作用。如人参皂苷和黄芪甲苷^[192]促进毛发生长的靶标位点为 TGF- $\beta 2$ 和 caspase 蛋白^[167]。我们的试验结果显示，白蜡及白蜡高级烷醇均能降 TGF- $\beta 2$ 蛋白的表达，且这两个化合物对 TGF- $\beta 2$ 蛋白表达的活性差异不明显。而这两个化合物对细胞信号通路的调节存在差异。其中白蜡对 caspase9 具有较高的活性，而白蜡高级烷醇对 caspase3 和 caspase8 具有较高的活性。表明白蜡能够阻断内源性细胞凋亡信号通路，白蜡高级烷主要是阻断外源性细胞信号通路。

6.4 展望

目前临床用于治疗脱发的药物多为化学合成的药物，这些药物从不同方面作用于毛囊阻止毛发的脱落。但是，这些药物对人体产生的毒副作用比较明显。而白蜡属于天然产物，药物活性好，无毒、无副作用，可以用于工业、农业、食品行业、医药行业。在医药领域白蜡不仅可以作为赋形剂用于药物剂型的加工，其本身也具有很好的药理活性。白蜡高级烷醇是从白蜡中提取得到的一元饱和醇的混合物，前人研究发现，高级烷醇具有多方面的药理活性，但是高级烷酯对治疗脱发方面的研鲜有报道。我们研究发现白蜡及白蜡高级烷醇对脂溢性脱发模式具有明确的作用效果。如果深入研究其作用机理，有望开发为安全性高，生物活性好的治疗脱发的药物。

6.5 存在的问题

1、虽然在研究中发现白蜡及白蜡高级烷醇促进毛发生长具有两方面的作用机理，但是对白蜡及白蜡高级烷醇作用机理研究不够深入。对激素方面的研究只是考察了白蜡及白蜡高级烷醇对睾酮、雌二醇和 5α -还原酶的调节作用以及对其信号蛋白 TGF- β 表达量的影响，但是对其上游蛋白的作用情况还不清楚，需进一步研究。对于促进毛囊生长期方面只考察生长因子对毛囊生长期的调节作用，未对其信号通路进行研究。而且对生长因子的考察也只研究了血管内皮生长因子和表皮生长因子对于其他生长因子如 IGF,FGF 等未做研究。

2、组织切片结果显示，白蜡和白蜡高级烷醇用量相同时，给药第 21d，白蜡高级烷醇处理组小鼠的毛囊密度和毛球直径高于白蜡，然而在给药第 28d 时，白蜡及白蜡高级烷醇组小鼠毛囊毛球直径差异不显著，而白蜡高级烷醇组小鼠毛囊长度明显高于白蜡组。出现这种现象的原因可能是由于白蜡中除了蜡酯外还含有少量的蜂蜡醇、色素、磷脂、树脂，烃、游离的不饱和脂肪酸对毛发生长也有促进毛发生长的作用，关于这一点还需进一步证实。

3、文献报道 表皮生长因子表达量在 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ pg/mL 范围内能促进毛发的生长，高于或低于此剂量均不能促进毛发的生长，而当表皮生长因子的表达量为 2×10^5 pg/mL 却

抑制毛发的生长。我们研究发现，10%白蜡处理后的小鼠其表皮生长因子的表达量低于 $2 \times 10^3 \text{ pg/mL}$ ，但是碱性磷酸酶活性结果显示10%白蜡能促进毛囊由休止期进入生长期，这与前人的研究结果存在差异。关于这一点还需寻找更多的指标或考察因素证明。

4、我们从动物和细胞两个方面评价了白蜡及白蜡高级烷对毛囊形态、激素水平、生长因子的表达量、细胞的增殖和蛋白的表达量的调节作用，证明了白蜡及白蜡高级烷醇对毛发生长有促进作用。但是引起脱发的原因比较多而且复杂，我们还需考虑其他因素，如皮脂腺对毛发生长的作用。

参考文献

- [1] Li M, Marubayashi A, Nakaya Y, et al. Minoxidil-induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: Possible Involvement of Sulfonylurea Receptor 2B as a Target of Minoxidil. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, 117(6):1594-1600.
- [2] Libecco J F, Bergfeld W F. Finasteride in the treatment of alopecia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2004, 5(4):933.
- [3] Han J H, Kwon O S, Chung J H, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 34(2):91-98..
- [4] Xu J, Xu Z, Jiang Y, et al. Cryptorchidism induces mouse testicular germ cell apoptosis and changes in bcl-2 and bax protein expression. *Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology & Cancer*, 2000, 19(1-2):25.
- [5] Mysore V, Shashikumar B M. Guidelines on the use of finasteride in androgenetic alopecia. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, 2016, 82(2):128.
- [6] Rossi A, Cantisani C, Melis L, et al. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2012, 6(2):130.
- [7] Satoh H, Morikaw S, Fujiwara C, et al. A case of acute myocardial infarction associated with topical use of minoxidil (RiUP) for treatment of baldness. *Japanese Heart Journal*, 2000, 41(4):519-23.
- [8] Vesoulis Z A, Attarian S J, Zeller B, et al. Minoxidil associated anorexia in an infant with refractory hypertension. *Pharmacotherapy the Journal of Human Pharmacology & Drug Therapy*, 2014, 34(12):341-4.
- [9] Han M N, Li Y F, Lu J M, et al. Advances in study on regulation of hair pigment expression by natural products. *Chinese Traditional & Herbal Drugs*, 2015, 46(9):1393-1398.
- [10] Li Y F, Lin P, He Y R, et al. Research progress in regulation of natural medicine on influence factor for hair growth cycle[J]. *Chinese Traditional & Herbal Drugs*, 2014, 45(11):1655-1662.
- [11] Roy RK, Thakur M, Dixit VK. Hair growth promoting activity of *Eclipta alba* in male albino rats. *Archives of Dermatological Research*, 2008, 300(7):357-364.

- [12] Marechal R E. New treatment for seborrheic alopecia: the ligation of the arteries of the scalp. *Journal of the National Medical Association*, 1977, 69(10):709.
- [13] Werner B, Mulinari-Brenner F. Clinical and histological challenge in the differential diagnosis of diffuse alopecia-female androgenetic alopecia, telogen effluvium and alopecia areata-Part II. *An Bras Dermatol*, 2012, 87(6):884-890
- [14] Lai C H, Chu N F, Chang C W, et al. Androgenic alopecia is associated with less dietary soy, higher blood vanadium and rs1160312 1 polymorphism in Taiwanese communities. *Plos One*, 2013, 8(12):e79789.
- [15] Messenger A G, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Br J Dermatol*, 2004, 150(2):186-94.
- [16] 代洪宾, 张伟滨. 雄激素、雌激素与男性骨质疏松症. *国际骨科学杂志*, 2009, 30(2):121-123.
- [17] 高玲玲. SET 在多囊卵巢综合征高雄激素血症中的作用机制研究. 南京医科大学, 2013.
- [18] Urysiakczubotka I, Kmiec M L, Broniarczykdyła G. Assessment of the usefulness of dihydrotestosterone in the diagnostics of patients with androgenetic alopecia. *Advances in Dermatology & Allergology*, 2014, 31(4):207-215.
- [19] 黄秋红. 丹参酮 A 抗金黄地鼠皮脂腺增生及其抑制 HaCaT 细胞脂质合成通路的研究. 南京医科大学, 2012.
- [20] Nakatsuji T, Kao M C, Zhang L, et al. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating β -Defensin-2 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010, 130(4):985-994.
- [21] Joshi R. Adamson's fringe, horatio george adamson, and kligman's experiments and observations on tinea capitis. *International Journal of Trichology*, 2011, 3(1):14.
- [22] Thiele J J, Weber S U, Packer L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 1999, 113(6):1006-10.
- [23] 颜凡辉. 心理压力对中青年高血压患者血压和血液生化指标浓度影响的临床观察. 新疆医科大学, 2015.
- [24] Mcelwee K J, Gilhar A, Tobin D J, et al. What causes alopecia areata?. *Experimental Dermatology*, 2013, 22(9):609-26.
- [25] 罗永城, 梁剑. 中药三七花的新用途:, CN103877135A. 2014.

- [26] Tsai Y J, Chung W C, Wang L C, et al. The dog mite, *Demodex canis*: prevalence, fungal co-infection, reactions to light, and hair follicle apoptosis. *Journal of Insect Science*, 2011, 11(1):317-328.
- [27] Rudnicka L, Lukomska M. *Alternaria* scalp infection in a patient with alopecia areata. Coexistence or causative relationship?. *Journal of Dermatological Case Reports*, 2012, 6(4):120.
- [28] Lee J, Tumber T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012, 23(8):906-916.
- [29] Yamao M, Inamatsu M, Ogawa Y, et al. Contact between dermal papilla cells and dermal sheath cells enhances the ability of DPCs to induce hair growth. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010, 130(12):2707-2718.
- [30] Andl T, Reddy S T, Gaddapara T, et al. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Developmental Cell*, 2002, 2(5):643-653.
- [31] Su-Yi T, Rachel S, Amélie R, et al. Wnt/ β -catenin signaling in dermal condensates is required for hair follicle formation. *Developmental Biology*, 2014, 385(2):179-88.
- [32] Hwang J, Mehrani T, Millar S E, et al. DLX3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling. *Development*, 2008, 135(18):3149-59.
- [33] Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes & Development*, 2008, 22(4):543-557.
- [34] Plikus M V, Mayer J A, Cruz D D L, et al. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature*, 2008, 451(7176):340.
- [35] Cui C Y, Kunisada M, Childress V, et al. Shh is required for Tabby hair follicle development. *Cell Cycle*, 2011, 10(19):3379-86.
- [36] Woo W M, Zhen H H, Oro A E. Shh maintains dermal papilla identity and hair morphogenesis via a Noggin-Shh regulatory loop. *Genes Dev.* 2012, 26(11):1235-1246.
- [37] Pisal R, Kapil D, Daniel D, et al. Signaling involved in hair follicle morphogenesis, and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(1):1647.
- [38] Lin W H, Xiang L J, Shi H X, et al. Fibroblast growth factors stimulate hair growth through β -Catenin and Shh expression in C57BL/6 Mice. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:730139.
- [39] Hébert J M, Rosenquist T, Götz J, et al. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from

targeted and spontaneous mutations. *Cell*, 1994, 78(6):1017.

- [40] Higgins C A, Petukhova L, Harel S, et al. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(29):10648.
- [41] Foitzik K, Lindner G, Muellerroever S, et al. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2000, 14(5):752.
- [42] Qi Y, Miao L, Lian X, et al. Therapeutic role of human hepatocyte growth factor (HGF) in treating hair loss. *Peerj*, 2016, 4(11).
- [43] Tong T, Kim N, Park T. Topical application of oleuropein induces anagen hair growth in telogen Mmouse skin. *Plos One*, 2015, 10(6):e0129578.
- [44] Rossi A, Cantisani C, Melis L, et al. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2012, 6(2):130.
- [45] Angelo G L, Ferreira C R, Ajaime A L, et al. Hematological and hepatic effects of vascular epidermal growth factor (VEGF) used to stimulate hair growth in an animal model. *BMC Dermatology*, 2013, 13(1):1-5.
- [46] Ahn S Y, Pi L Q, Hwang S T, et al. Effect of IGF-I on hair growth Is related to the anti-apoptotic effect of IGF-I and up-regulation of PDGF-A and PDGF-B. *Annals of Dermatology*, 2012, 24(1):26.
- [47] Lee G S, Hong E J, Gwak K S, et al. The essential oils of *chamaecyparis obtusa* promote hair growth through the induction of vascular endothelial growth factor gene. *Fitoterapia*, 2010, 81(1):17.
- [48] Ben A D, Lurie R, Laron Z. I-GF-1 signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 125(5):873-882.
- [49] Zhang H, Nan W, Wang S, et al. Epidermal growth factor promotes proliferation and migration of follicular outer root sheath cells via Wnt/ β -catenin signaling. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2016, 39(1):360.
- [50] Mak K K, Chan S Y. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(28):26120-6.
- [51] Park Y O, Kim S E, Kim Y C. Action mechanism of *chamaecyparis obtusa* oil on hair growth.

- Toxicological Research, 2011, 29(4):241-247.
- [52] Shin H S, Park S Y, Song H G, et al. The androgenic alopecia protective effects of forsythiaside-A and the molecular regulation in a mouse model. *Phytotherapy Research*, 2015, 29(6):870-876.
- [53] Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118(6):993.
- [54] Higgins C A, Petukhova L, Harel S, et al. FGF5 is a crucial regulator of hair length in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(29):10648.
- [55] Legrand R, Tired L, Abitbol M. Two recessive mutations in FGF5 are associated with the long-hair phenotype in donkeys. *Genetics Selection Evolution*, 2014, 46(1):1-7.
- [56] C·波斯塔德. N-(吡啶-4-基)酰胺和N-(嘧啶-4-基)酰胺及其药物和化妆品用途: CN104039767A. 2014.
- [57] 陈元伟. 咪唑二酮类化合物及其用途: CN 104024228 A. 2014.
- [58]张瑀, 尚艳杰, 蔡玉颖,等. 针灸治疗脱发的研究进展. *黑龙江中医药*, 2008(2):63-64.
- [59] 吴培诚, 欧春凤, 梁高卫,等. 抑制 5 α -还原酶活性的防脱发中草药复方及其制备方法:, CN103446563A. 2013.
- [60] Chanda S, Robinette C L, Couse J F, et al. 17 β -estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor-alpha pathway. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism*, 2000, 278(2):E202.
- [61] 叶希韵, 任小林, 张叶, 刘连喜. 氮-(4-氯-2,5-二甲氧基苯基)-5-异丙基-2-甲氧基苯磺酰胺在促进毛发生长的应用: CN104306168A. 2015.
- [62] 田熙英, 金升堦, 金秀耿等. 用于预防脱发或促进毛发修复的含有豆提取物的组合物: CN103702660A, 2014.
- [63] Lachgar S, Charveron M, Gall Y, et al. Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells.. *British Journal of Dermatology*, 1998, 138(3):407-411.
- [64] 陈晔光, 赵冰. Blebbistatin 在促进干细胞存活和维持干细胞干性中的应用: CN 102940631 A. 2013.
- [65] 谭剑平, 蒋立新, 周志文. 一种神经生长因子组合物, Neural growth factor composition:, CN 102512664 B. 2015.
- [66] C·邦尼. Jnk 信号转导通路的细胞可渗透性肽抑制剂用于治疗各种疾病的应用: CN 102112149 A.

2011.

- [67] 郑熔池, 金银美. Wnt 系列衍生肽及其用途, Wnt series derived peptides and their uses: CN 103781799 A. 2014.
- [68] 吴培诚. 一种适用于雄激素性脂溢性脱发的植物提取组合物、制备方法及其应用:, CN104224631A. 2014.
- [69] 金泽明. 鱼腥草的新用途及其药物组合物:, CN104069237A. 2014.
- [70] 南钟铉. 毛发生长促进剂及其制备方法: CN 2007.
- [71] Li Y, Han M, Lin P, et al. Hair growth promotion activity and its mechanism of polygonum multiflorum. evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2014, 2015(1):517901.
- [72] 朱海琴. 黄芩苷、齐墩果酸及甘草提取物等中药成分对人毛囊和毛乳头细胞生物学特性的影响. 南京医科大学, 2007.
- [73] Zhang Y, Han L, Chen S S, et al. Hair growth promoting activity of cedrol isolated from the leaves of Platycladus orientalis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83:641-647.
- [74] Patel S, Sharma V, Chauhan N S, et al. Evaluation of hair growth promoting activity of Phyllanthus niruri. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2015, 5(6):512-519.
- [75] 吴成胜. 何首乌临床研究进展与安全应用思考. 中国中药杂志, 2017, 42(2).
- [76] Noubarani M, Rostamkhani H, Erfan M, et al. Effect of adiantum capillus veneris linn on an animal model of testosterone-induced hair loss. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 13(Suppl):113-118.
- [77] Shin H S, Park S Y, Hwang E S, et al. Ginsenoside F2 reduces hair loss by controlling apoptosis through the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein and transforming growth factor- β pathways in a dihydrotestosterone-induced mouse model. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2014, 37(5):755-63.
- [78] Nandecha C, Nahata A, Dixit V K. Effect of benincasa hispida fruits on testosterone-induced prostatic hypertrophy in albino rats. Current Therapeutic Research Clinical & Experimental, 2010, 71(5):331.
- [79] Cho Y H, Lee S Y, Jeong D W, et al. Effect of pumpkin seed oil on hair growth in men with androgenetic alopecia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2013, 2014(1):549721.
- [80] Patel S, Sharma V, Chauhan N S, et al. A study on the extracts of Cuscuta reflexa Roxb. in treatment of

- cyclophosphamide induced alopecia. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 22(1):1-7.
- [81] 王纪云. 六味地黄丸治愈脱发 1 例. *山西中医*, 1999, 15(1):24.
- [82] 巫燕莉, 崔琦珍, 杜群, 等. 养血生发胶囊生发作用实验研究. *中药药理与临床*, 2004, 20(4):33-35.
- [83] 沈璐, 陈科力. 中医药治疗脱发的研究与分析. *中南民族大学学报自然科学版*, 2011, 30(1):42-45.
- [84] 张玲玲. 中药育发液治疗脂溢性脱发药效评价及其作用机理研究. 广州中医药大学, 2013.
- [85] 蔡琼, 丁益. 脂溢性脱发的中医治疗与护理. *湖北中医杂志*, 2015(6):54-54.
- [86] 王珏云, 冯蕙裳, 侠晨辉. 针灸治疗斑秃的临床研究进展. *中国民族民间医药*, 2015(16):37-39.
- [87] Shatalebi M A, Rafiei Y. Preparation and evaluation of minoxidil foamable emu oil emulsion. 2014, 9(2):123-133.
- [88] 汤杰, 肖丽娟, 罗琼, 等. 米诺地尔醇脂质体的制备. *中南药学*, 2009, 7(7):510-513.
- [89] 刘维. 米诺地尔纳米脂质载体的制备及其体外经皮吸收研究. 南方医科大学, 2011.
- [90] Sang K O, Keol P H, Jin O Y, et al. Promotive effect of minoxidil combined with all-trans retinoic acid (tretinoin) on human hair growth in vitro. *Journal of Korean Medical Science*, 2007, 22(2):283.
- [91] Randall V A, Sundberg J P, Philpott M P. Animal and in vitro models for the study of hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2003, 8(1):39-45.
- [92] Han J H, Kwon O S, Chung J H, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 34(2):91-98.
- [93] Philpott M P, Green M R, Kealey T. Human hair growth in vitro. *Journal of Cell Science*, 1990, 97 (Pt 3):463.
- [94] Han J H, Kwon O S, Chung J H, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *Journal of Dermatological Science*, 2004, 34(2):91-98.
- [95] Hsu C L, Liu J S, Lin A C, et al. Minoxidil may suppress androgen receptor-related functions. *Oncotarget*, 2014, 5(8):2187.
- [96] 朱蓓莉, 高清秀, 李琳亚, 等. 一种血管紧张素 ii 的 i 型受体拮抗剂在促进毛发生长方面的应用: CN 103479627 A. 2014.
- [97] 汪长寿. 绵羊毛囊培养方法的建立及雌二醇对毛囊 Bcl-2、Bax 表达的影响. 内蒙古农业大学, 2008.
- [98] Freyschmidt-paul P, Sundberg J P, Happle R, et al. Successful treatment of alopecia areata-like hair loss with the contact sensitizer squaric acid dibutylester (SADBE) in C3H/HeJ mice. *Journal of Investigative*

Dermatology, 1999, 113(1):61-8.

- [99] Freyschmidtpaul P, Ziegler A, Mcelwee K J, et al. Treatment of alopecia areata in C3H/HeJ mice with the topical immunosuppressant FK506 (Tacrolimus). *European Journal of Dermatology Ejd*, 2001, 11(5):405.
- [100] Nakamura M, Jo J, Tabata Y, et al. Controlled delivery of T-box21 small interfering RNA ameliorates autoimmune alopecia (Alopecia Areata) in a C3H/HeJ mouse model. *American Journal of Pathology*, 2008, 172(3):650-8.
- [101] Sun J, Silva K A, Mcelwee K J, et al. The C3H/HeJ mouse and DEBR rat models for alopecia areata: review of preclinical drug screening approaches and results. *Experimental Dermatology*, 2008, 17(10):793–805.
- [102] Hoffmann R, Wenzel E, Huth A, et al. Cytokine mRNA levels in alopecia areata before and after treatment with the contact allergen diphenylcyclopropanone. *Journal of Investigative Dermatology*, 1994, 103(4):530-533.
- [103] 吴可佳, 吴文育. 毛发移植研究进展. *中国医学文摘:皮肤科学*, 2016(4):508-514.
- [104] 李盛, 黄茜, 陈敏. 雄激素性脱发的发病机制与激光治疗. *激光生物学报*, 2016, 25(2):107-111.
- [105] 刘学武. 干细胞与脱发治疗. *生命世界*, 2013(3):44-47.
- [106] 吴仁根. 米诺地尔酊联合养血生发胶囊治疗男性型脱发临床观察. *海峡药学*, 2013, 25(1):205-206.
- [107] 黄欣. 酮康唑、特比萘芬联合中药单体抗马拉色菌的实验研究. 第二军医大学, 2005.
- [108] 陈晓鸣, 王自力, 陈勇,等. 影响白蜡虫泌蜡主要气候因子及白蜡虫生态适应性分析. *昆虫学报*, 2007, 50(2):136-143.
- [109] Hou X Y. Overview of pharmacological research of insect wax. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 05:2817-2818.
- [110] 陈晓鸣. 白蜡虫自然种群生态学. 科学出版社, 2009:1.
- [111] 马李一, 王有琼, 张重权,等. 虫白蜡制备高级烷醇工艺研究. *食品工业科技*, 2008(2):179-181.
- [112] 马李一, 王有琼, 张重权,等. 虫白蜡还原法制备高级烷醇混合物研究. *林产化学与工业*, 2009, 29(5):6-10.
- [113] 周海涛, 曹建民, 林强,等. 红景天对运动训练大鼠睾酮含量、物质代谢及抗运动疲劳能力的影响. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(12):1808-1812.

- [114] 向洋, 杨浩, 李利龙,等. 二十八烷醇调控大鼠机体 GS 基因表达量研究. 新乡学院学报, 2012, 29(1):47-51.
- [115] 向洋, 杨浩, 李利龙, 吴信. 二十八烷醇调控大鼠机体 GS 基因表达量研究. 新乡学院学报(自然科学版),2012, 01):47-51.
- [116] Oliarobosso S, Gaudino E C, Mantegna S, et al. Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids*, 2009, 44(10):907-16.
- [117] 江璐, 龚慧琴, 刘录山. 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 的生物学功能. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(12):1085-1089.
- [118] Guo Y L, Xu R X, Zhu C G, et al. Policosanol attenuates statin-induced increases in serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 when combined with atorvastatin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014(3):926087.
- [119] Raquel S. Aloyz, Shernaz X, et al. P53 Is essential for developmental neuron death as regulated by the trkA and p75 neurotrophin receptors. *Journal of Cell Biology*, 1998, 143(6):1691.
- [120] Wang T, Liu YY, Wang X *et al.* Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31(7):765-774.
- [121] Borg J, Kesslak P J, Cotman C W. Peripheral administration of a long-chain fatty alcohol promotes septal cholinergic neurons survival after fimbria-fornix transection. *Brain Research*, 1990, 518(1-2):295.
- [122] Borg J. The neurotrophic factor, n-hexacosanol, reduces the neuronal damage induced by the neurotoxin, kainic acid. *Journal of neuroscience research*, 1991, 29(1):62-67.
- [123] 杨文领, 薛文通, 程永强,等. 复合中药制剂对小鼠抗运动疲劳能力影响的实验研究. 食品科学, 2005, 26(z1):77-79.
- [124] Benderitter M, Hadj-Saad F, Lhuissier M, et al. Effects of exhaustive exercise and vitamin B6 deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, 21(4):541.
- [125] 于长青, 张国海. 二十八烷醇抗大鼠心肌线粒体损伤的研究. 中国食品添加剂, 2003(2):35-37.
- [126] 杨小英, 刘华钢, 林敬松,等. 二十八烷醇制剂对运动性疲劳大鼠自由基代谢和心脏内分泌功能的影响. 南方医科大学学报, 2008, 28(4):652-653.
- [127] Choi K C, Kim N H, An M R, et al. Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems

in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney International Supplement*, 1997, 60(60):S23.

- [128] Fenoy F J, Ferrer P, Carbonell L, et al. Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension*, 1995, 25(3):408-414.
- [129] Khamaisi M, Keynan S, Bursztyn M, et al. Role of renal nitric oxide synthase in diabetic kidney disease during the chronic phase of diabetes. *Nephron Physiology*, 2006, 102(3-4):p72.
- [130] Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*, 2000, 101(6):676-681.
- [131] Hanada T, Saito M, Kanzaki S. Treatment with cyclohexenonic long-chain fatty alcohol reverses diabetes-induced tracheal dysfunction in the rat. *Pharmacology*, 2006, 78(2):51-60.
- [132] Okada S, Saito M, Kazuyama E, et al. Effects of N-hexacosanol on nitric oxide synthase system in diabetic rat nephropathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2008, 315(1):169-177.
- [133] Schwartz D, Schwartz I F, Blantz R C. An analysis of renal nitric oxide contribution to hyperfiltration in diabetic rats. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 2001, 137(2):107-114.
- [134] Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, et al. N-hexacosanol ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat nephropathy. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 544(1-3):132-137.
- [135] Saito M, Suzuki H, Yamada M, et al. Preventive effect of long-chain fatty alcohol on ischemia-reperfusion injury in the rat bladder. *European Journal of Pharmacology*, 2002, 454(1):81-84.
- [136] Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(119):391-393.
- [137] Herman A, Herman A P. Mechanism of action of herbs and their active constituents used in hair loss treatment. *Fitoterapia*, 2016, 114:18-25.
- [138] Driskell R R, Clavel C, Rendl M, et al. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 8):1179.
- [139] Müller-Röver S, Foitzik K, Paus R, et al. A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, 117(1):3-15.
- [140] 马李一, 王有琼, 张重权, 等. 虫白蜡还原法制备高级烷醇混合物研究. *林产化学与工业*, 2009, 29(5):6-10.

- [141] Dhanotia R, Chauhan N S, Saraf D K, et al. Effect of *Citrullus colocynthis* Schrad fruits on testosterone-induced alopecia. *Natural Product Research*, 2011, 25(15):1432-43.
- [142] Meidan V M, Bonner M C, Michniak B B. Transfollicular drug delivery--is it a reality?. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 306(2):1-14.
- [143] 马庆晏, 秦洁. 皮肤的生理特点与透皮吸收. *生物学通报*, 1997(10):24-26.
- [144] Lademann J, Otberg N, Richter H, et al. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology*, 2001, 14 Suppl 1(Suppl. 1):17-22.
- [145] Nadler A, Yushchenko D A, Müller R, et al. Exclusive photorelease of signalling lipids at the plasma membrane. *Nature Communications*, 2015, 6:10056.
- [146] Jiang X, Zhang Y P, Liu Y, et al. Advances in Studies on Phosphatide's Function and Purifying Method. *Food Research and Development*, 2007, 28(04):166-170.
- [147] Wen-Juan Q I, Yue H W, Wang W. Physicochemical properties, development and application of soybean phospholipid. *China Oils & Fats*, 2005.
- [148] 巫珊, 张海州. 脂溢性脱发的发生机制及治疗研究进展. *日用化学品科学*, 2012, 35(2):29-33.
- [149] 李晓凤. 苯甲酸雌二醇对体外培养的毛囊生长和对人皮肤成纤维细胞胶原合成的影响. *南京医科大学*, 2006.
- [150] Pandit S, Chauhan N S, Dixit V K. Effect of *cuscuta reflexa* roxb on androgen-induced alopecia. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2008, 7(3):199-204.
- [151] 朱孔明. 4-氮杂甾体酰胺的合成及其 5 α -还原酶抑制活性研究. *天津大学*, 2005.
- [152] 赵党生, 李淑霞, 赵春霖, 等. "止脱灵"对实验性大鼠雄激素的调节及对毛发脱落的影响. *甘肃中医学院学报*, 2005, 22(1):12-15.
- [153] 李耿, 赵冉, 张榕文, 等. 中药育发液对脂溢性脱发大鼠性激素、肝细胞生长因子水平的影响. *中药材*, 2011, 34(6):958-961.
- [154] Castaño G, Más R, Fernández J C, et al. Effects of policosanol on older patients with hypertension and type II hypercholesterolaemia. *Drugs in R&D*, 2002, 3(3):159-172.
- [155] Menéndez R, Más R, Amor A M, et al. Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2000, 50(3):255-262.

- [156] Singh D K, Li L, Porter T D. Policosanol inhibits cholesterol synthesis in hepatoma cells by activation of AMP-kinase. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 2006, 318(3):1020-6.
- [157] Murata K, Takeshita F, Samukawa K, et al. Effects of ginseng rhizome and ginsenoside ro on testosterone 5 α -reductase and hair re-growth in testosterone-treated Mice. *Phytotherapy Research*, 2012, 26(1):48-53.
- [158] Hargrove J L, Greenspan P, Hartle D K. Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(3):215.
- [159] Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W *et al.* Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(6):1165-1176.
- [160] Yano K, Lawrence F. Brown, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107(4):409-17.
- [161] Ozeki M, Tabata Y. In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials*, 2003, 24(13):2387-2394.
- [162] Zhang L, Bhattacharya S, Leid M *et al.* Ctip2 is a dynamic regulator of epidermal proliferation and differentiation by integrating EGFR and Notch signaling. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(23):5733-5744.
- [163] Iida M, Ihara S, Matsuzaki T. Hair cycle-dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Development Growth & Differentiation*, 2007, 49(3):185–195.
- [164] Dastan M, Najafzadeh N, Abedelahi A, et al. Human platelet lysate versus minoxidil stimulates hair growth by activating anagen promoting signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84:979-986.
- [165] 程毅. IGF-1、FGF7 与毛乳头细胞生物学特性的相关性及其复方甘草酸苷、地塞米松对毛乳头细胞活性影响的研究. 河北医科大学, 2010.
- [166] Kim M H, Kim S H, Yang W M. Beneficial effects of Astragaloside IV for hair loss via inhibition of Fas/Fas L-mediated apoptotic signaling. *Plos One*, 2014, 9(3):e92984.
- [167] Shin H S, Park S Y, Hwang E S, et al. Ginsenoside F2 reduces hair loss by controlling apoptosis through the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein and transforming growth factor- β pathways in a dihydrotestosterone-induced mouse model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014,

37(5):755-63.

- [168] 杨璇. 甘草对葛根、黄芩增溶作用和机理的研究. 北京中医药大学, 2013.
- [169] 林瑞来. 难溶性药物溶解度的提高方法. 中国医药指南, 2010, 8(3):32-33.
- [170] 李华龙, 尹东东, 王杏林. 难溶性药物的制剂增溶技术及应用. 天津药学, 2010, 22(1):60-67..
- [171] 钟慧, 朱源, 余江南, 等. 难溶性天然药物增溶方法的研究进展. 中国中药杂志, 2014, 39(17):3226-3231.
- [172] 张嘉, 李澎, 李贻奎, 等. 吐温 80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用研究. 现代免疫学, 2009(3):240-245.
- [173] 李红艳, 夏启胜, 徐梅, 等. MTT、MTS、WST-1 在细胞增殖检测中最佳实验条件的研究. 中国康复医学杂志, 2005, 20(11):824-826.
- [174] 程欧, 高鹏, 涂家生, 等. 吐温 80 质量与致敏性关系的研究. 中国药科大学学报, 2010, 41(3):244-247.
- [175] 贺煜星, 丁选胜. 吐温 80 体外溶血研究. 安徽医药, 2014, 18(3):444-446.
- [176] 陈艳华, 黎丹戎, 侯华新, 等. 不同溶剂和受试物颜色对 MTT 实验的影响. 广西医科大学学报, 2007, 24(1):17-19.
- [177] 吴懿, 朱容慧, 赵军宁, 等. 3 种表面活性剂对 Caco-2 细胞的细胞毒性研究. 中药药理与临床, 2010(5):157-158.
- [178] 牛慧玲, 李庆忠, 陈志勇, 等. 含吐温 80 的不同注射剂溶血试验研究. 中国药品标准, 2012, 13(2):108-111.
- [179] 李时珍. 本草纲目. 北京: 华夏出版社, 2006:345.
- [180] Menendez R, Amor AM, Rodeiro I *et al*. Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblasts. Arch Med Res, 2001, 32(1):8-12.
- [181] Banerjee S, Ghoshal S, Porter TD. Activation of AMP-kinase by policosanol requires peroxisomal metabolism. Lipids, 2011, 46(4):311-321.
- [182] 陈宏艳. 从米糠蜡提取分离高级脂肪醇的研究. 浙江大学, 2003.
- [183] 陈赶林, 游建华, 林波, 等. 甘蔗天然活性高级醇的柱层析纯化制备与分析. 食品工业科技, 2010, 31(10):82-84.
- [184] 鞠强, 沈丹蓓, 夏隆庆. 人皮脂腺细胞与雄激素关系的研究进展. 国际皮肤性病杂志, 2002,

28(6):372-374.

- [185] Song K, Wang H, Krebs TL *et al.* Androgenic control of transforming growth factor-beta signaling in prostate epithelial cells through transcriptional suppression of transforming growth factor-beta receptor II. *Cancer research*, 2008, 68(19):8173-8182.
- [186] Moya A, Sakamaki K, Mason B M, et al. Functional conservation of the apoptotic machinery from coral to man: the diverse and complex Bcl-2 and caspase repertoires of *Acropora millepora*. *BMC Genomics*, 2016, 17(1):62.
- [187] Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. Apoptosis in the Hair Follicle. *Journal of Investigative Dermatology*, 2006, 126(2):258-264.
- [188] Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 13(6):343-348.

在读期间的学术研究

1、攻读博士期间参与的科研项目：

国家 863 项目 (2014AA021800), 白蜡紫胶高效生产技术及相关产品开发。

2、攻读博士期间发表论文情况：

(1) Zhan-di WANG, Ying FENG, Li-yi MA, Xian LI, Wei-feng DING, Xiao-ming CHEN.
Hair Growth-promoting Effect of White Wax and Policosanol from White Wax on the Mouse
Model of Testosterone-induced Hair Loss. Biomedicine &Phamacocherapy. 2017, 89(2017):
438-445.

(2) 王占娣, 冯颖, 李嫻, 丁伟峰, 马李一, 陈晓鸣.白蜡及白蜡高级烷醇对人真皮
乳头细胞生长的影响.林业科学研究, 2017,30 (1): 1-45

(3) 一种制备虫白蜡水溶液的方法, 发明专利, 实审阶段

(4) 一种制备高级烷醇水溶液的方法, 发明专利, 实审阶段。

致谢

师风垂范，惠泽终生！本论文是在导师陈晓鸣研究员和冯颖研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题、实施到论文的撰写和修改，无不凝聚着导师的心血与汗水。导师求实严谨的科研精神，勤奋认真的工作态度，精深渊博的知识修养，使我受益匪浅。值此论文完成之际，谨向导师表示诚挚的谢意和深深的敬意！

感谢马李一老师对实验每一个环节开展的支持与帮助！谢谢您三年来对我的关心与照顾。

感谢丁伟峰师兄、孙龙师兄、何钊师兄和李娴在我实验中的帮助与疑难解答。

感谢何锐老师、马艳老师和赵虹老师对我工作的支持和配合。

感谢王超老师和任维斌师弟的鼓励和关心。

最后，我要感谢我的爱人才玉峰以及我的父母，是你们给予我精神上的支持与生活上的关心使我无后顾之忧，安心完成学业！

致谢人：

2017 年 5 月