

分类号: _____

单位代码: 85901

学 号: 17706005

中国医药工业研究总院

硕士学位论文



中文论文题目: 生发、乌发中草药复方的筛选及其药效学研究

英文论文题目: Screening and Pharmacodynamics Study of
Chinese Medicine Compound of
Stimulating Hair Growth or Blackening
Hair

研究生姓名: 刘学

指导教师: 刘英, 胡海峰

专业名称: 药理学

研究方向: 中药药理

论文提交日期: 2020 年 05 月

论文答辩日期: 2020 年 05 月 21 日

分类号: _____

单位代码: 85901

学 号: 17706005

中国医药工业研究总院

硕士学位论文



中文论文题目: 生发、乌发中草药复方的筛选及其药
效学研究

英文论文题目: Screening and Pharmacodynamics Study of
Chinese Medicine Compound of
Stimulating Hair Growth or Blackening
Hair

研究生姓名: 刘学

指导教师: 刘英, 胡海峰

专业名称: 药理学

研究方向: 中药药理

论文提交日期: _____

论文答辩日期: _____

生发、乌发中草药复方的筛选及其药效学研究



论文作者签名: _____

指导教师签名: _____

论文评阅人 1: _____

评阅人 2: _____

评阅人 3: _____

评阅人 4: _____

评阅人 5: _____

答辩委员会主席: _____

委员 1: _____

委员 2: _____

委员 3: _____

委员 4: _____

委员 5: _____

答辩日期: _____

Screening and Pharmacodynamics Study of Chinese Medicine

Compound of Stimulating Hair Growth or Blackening Hair



Author's signature:_____

Supervisor's signature:_____

Thesis reviewer 1 : _____

Thesis reviewer 2 : _____

Thesis reviewer 3 : _____

Thesis reviewer 4 : _____

Thesis reviewer 5 : _____

Chair : _____

(Committee of oral defence)

Committeeman 1 : _____

Committeeman 2 : _____

Committeeman 3 : _____

Committeeman 4 : _____

Committeeman 5 : _____

Date of oral defence : _____

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，独立进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，本学位论文不包含任何其他个人和集体已经发表和撰写过的作品成果。对本论文所涉及的研究工作做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

签 名：_____ 日 期：_____

摘要

头发不仅可以保暖，还可以使人更加美观。头发生长具有周期性，其周期可分为生长期、退行期和休止期，正常情况下三个阶段周期长度相对稳定，由于生理或药物作用导致休止期延长而出现毛发减少，表现为脱发现象；由于黑素合成减少而导致白发的产生，严重影响了毛发的外观。目前，由于工作压力和生活节奏的加快，导致许多年轻人出现脱发和白发现象。临床上脱发的治疗西药主要为米诺地尔与非那雄胺，具有一定的疗效但是副作用大且易反弹；白发一般通过染发来达到乌发的目的。文献报道，许多中草药及其复方具有生发和乌发的功效，并具有毒副作用小，使用人依从性好等优势。尽管市场上已经拥有一些产品，但还存在许多问题。本研究首先建立小鼠耳肿胀抗炎模型、咪喹莫特诱导 C57 小鼠脱发模型和氢醌诱导 C57 小鼠白发模型，对文献报道具有生发或乌发功效的中药材及其复方进行功效筛选，然后对最佳复方提取工艺和制剂工艺进行优化，最后进行药效学评价。

脱发模型的复制、复方筛选及其工艺优化。首先在实验室复制小鼠耳肿胀抗炎模型和小鼠脱发模型，应用抗炎模型对 4 个复方进行活性筛选，结果发现 4 号复方抗炎效果良好。在 4 号复方组成的基础上设计 4 个新的复方，应用抗炎和小鼠脱发模型进行筛选，发现 7 号复方效果良好。对 7 号复方进行提取工艺优化，采用单因素和正交设计的方法，获得最佳工艺为：药材溶剂比 1：10，提取次数 3 次，提取时间 2h，提取温度 80℃。在最佳的提取工艺下，浸膏得率由 19.68% 提升至 23.53%，黄酮含量由 3.51% 提高至 3.92%，姜辣素含量从 0.26% 提升至 0.40，没

食子酸含量由 0.30 提升至 0.36%。随后，对水凝胶制剂工艺进行优化，发现最佳的制剂工艺条件为：2%卡波姆 40%、甘油 10%、丙二醇 10%，三乙醇胺 0.5%，透皮剂 5%氮酮。在优化条件下所制凝胶粘度适宜，易于涂抹，透皮性好。

对生发最佳复方进行药效学研究，制备生药含量分别为 10g/100g 水凝胶、20g/100g 水凝胶、30g/100g 水凝胶三个浓度，应用脱发小鼠模型对其药效进行考察，选择米诺地尔作为阳性药，共给药 20 天。结果：当生药含量为 20g/100g 水凝胶时，生发评分达 4.33，单位面积毛密度 2.96，毛囊切片显示中剂量高于低剂量和高剂量，与阳性药米诺地尔效果相当。

白发模型的复制、复方筛选和药效学研究。首先建立体外酪氨酸酶活性测定模型、小鼠 B16 黑素瘤细胞模型和氢醌诱导 C57 小鼠白发模型，应用酪氨酸酶模型对 18 味药材进行筛选，结果发现女贞子、何首乌、紫苏叶等 9 味中药材提取物的酶促进活性较强；进而设计两种药材复合物和三种药材复合物，并进行活性的筛选，获得最佳的组合物为：女贞子何首乌丹参、女贞子何首乌紫苏叶、何首乌丹参紫苏叶共三种；其次，应用细胞模型考察三种组合对 B16 黑素瘤细胞增殖与黑素生成的影响，对细胞增殖活性最强的为“女何丹”与“女何紫”组合，促进细胞黑素生成作用最强的为“女何紫”组合。制备乌发复方水凝胶，使用氢醌诱导 C57 小鼠白发模型考察了生药含量分别为 30g/100g 水凝胶、40g/100g 水凝胶、50g/100g 水凝胶三个浓度的乌发效果，结果：给药 28 天后，乌发中剂量组皮肤色素恢复区比例高达 95%，评分 3.83 分，显微观察毛囊黑素含量最高。

本研究通过动物模型筛选获得生发与乌发功能的新中草药复方，为中草药复方在头发护理产品开发奠定了基础。

关键词 生发 乌发 黑素 酪氨酸酶

Abstract

Hair plays important roles, ranging from conserving body heat to keeping people beautiful. The growth of hair is periodic, and its cycle can be divided into anagen, catagen and telogen. Under normal conditions, the three periods are stable. The physiological effect or drug effect usually causes the telogen to be prolonged and the hair is reduced, which is called alopecia. Due to the decrease of melanin synthesis, white hair is produced, which seriously affects the appearance of human being. At present, due to the work pressure and the acceleration of the pace of life, hair loss and early white hair phenomenon appear in many young people. In clinic, the western medicine for curing hair loss are minoxidil and finasteride, which have limited curative effect with side effects; people usually deal with white hair by dyeing it. It has been reported that many Chinese herbal medicines and compounds have the effects of generating hair and blackening hair, and have the advantages of less toxic side effects and good patient compliance. Although there are some products used in the field, there are still many problems. In this study, the ear swelling and anti-inflammatory model of mice, the hair loss model of C57 mice induced by imiquimod and the white hair model of C57 mice induced by hydroquinone were established; Traditional Chinese Medicines and their compound in the literature reported were screened for hair growth or blackening hair; the extraction process and preparation process of the best compound were optimized, and their pharmacodynamics were also evaluated.

Replication of hair loss model, screening of compound prescription and optimization of preparation process were carried out. At first, the ear swelling anti-inflammatory model and alopecia model of mice were duplicated in the laboratory. The anti-inflammatory model was used to screen the activity of the four compounds. The results showed that the anti-bacterial and anti-inflammatory effect of compound No.4 was best. Then, using the ear swelling anti-inflammatory model and hair loss model of mice, a new compound No.7 was obtained and shown to be better among four new compounds designed on the basis of the composition of No. 4 compound. Later, the extraction process of compound No.7 was optimized by single factor and orthogonal design. The best processes are: solvent ratio (1:10), times of extraction (3), extraction time (2h), temperature (80°C). Under the best extraction process, the extraction rate was increased from 19.68% to 23.53%, the content of flavonoids from 3.51% to 3.92%, the content of gingerols from 0.26% to 0.40 and the content of gallic acid from 0.30 to 0.36%. Subsequently, the hydrogel processing technology was optimized, and the best preparation conditions were as follows: 2% carbomer 40%, glycerol 10%, propylene glycol 10%, triethanolamine 0.5%, transdermal agent 5% . Under the optimized conditions, the gel is suitable

for viscosity, easy to apply and transdermal.

The pharmacodynamics of best hair regeneration compound was studied. The effects of three concentrations of 10g/100g (low dose) hydrogel, 20g/100g (high dose) hydrogel and 30g/100g hydrogel were investigated by the alopecia mouse model and minoxidil used as the positive drug, and the experiment lasted for 20 days. Results showed that the 20g/100g (median dose) hydrogel was best and the its hair score was 4.33 and the gross density of the unit area was 2.96. The hair follicle sections showed that the median dose was higher than those of the low dose and high dose, and the effect was similar to that of the positive drug minoxidil.

Replication of white hair model, screening of compound prescription and pharmacodynamic study of blackening hair compound were carried out. At first, the tyrosinase activity model, B16 melanoma cell model and C57 mice white hair model induced by hydroquinone were established. Tyrosinase model was used to screen 18 kinds of Chinese herbal medicines. The results showed that 9 kinds of Chinese herbal extracts could promote the tyrosinase activity. Then, the combination of two kinds of medicine and three kinds of medicine were designed, and the activities were screened. The best three combinations were obtained as follows: compound 1 (Nv He Dan). compound 2 (Nv He Zi) and compound 3 (He Dan Zi). Secondly, the effects of three combinations on the proliferation and melanogenesis of B16 melanoma cells were studied by cell model. The results showed that the best two combinations are "Nv He Dan" and "Nv He Zi", of which "Nv He Zi" showed the strongest effect on melanogenesis. Three doses of blackening hair compound "Nv He Zi" hydrogel were prepared. Using the C57 mice white hair model the effects of three concentrations of 30g/100g hydrogel, 40g/100g hydrogel and 50g/100g hydrogel on blackening hair were investigated. Results showed that after 28 days of dose, the proportion of skin pigment recovery area in the middle dose group was 95%, with a score of 3.83, and the content of melanin in hair follicle was the highest.

In clusion, two new Chinese herbal compound with the function of stimulating hair growth or blackening hair were obtained through animal model screening, which laid a foundation for the development of hair care products of Chinese herbal compound.

Key words: hair growth; blackening hair; melanin; hydrogel

英文缩写说明

英文缩写	英文全称	中文释义
AGA	Androgenetic Alopecia	雄激素脱发
AR	Androgen Receptor	雄激素受体
AA	Alopecia Areata	斑秃
PE	Penetration Enhancer	透皮吸收促进剂
ALT	Alanine Aminotransferase	丙氨酸氨基转氨酶
AST	Aspartate Aminotransferase	天门冬氨酸氨基转移酶
ALP	Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酶
Nv	Ligustri lucidi fruit	女贞子
He	Polygonum multiflorum	何首乌
Dan	Salvia mil	丹参
Zi	Perilla leaf	紫苏叶

目 录

摘要.....I

ABSTRACT.....III

英文缩写说明.....V

目录.....VI

1 绪论.....1

1.1 脱发.....1

1.1.1 中医治疗脱发研究现状.....1

1.1.2 西医治疗脱发研究现状.....4

1.1.3 脱发动物模型.....5

1.2 白发.....6

1.2.1 中医治疗白发研究现状.....6

1.2.2 西医治疗白发研究现状.....7

1.2.3 白发动物模型.....7

1.3 中药凝胶剂研究现状.....8

1.3.1 处方组成.....8

1.3.2 凝胶基质.....8

1.3.3 溶剂及助溶剂.....8

1.3.4 保湿剂.....8

1.3.5 防腐剂.....9

1.3.6 抗氧化剂.....9

1.3.7 香精.....9

1.3.8 透皮促进剂	9
1.4 立题依据	10
1.5 研究内容	11
2 生发复方的动物造模、复方筛选、制备工艺及药效学研究	12
2.1 前言	12
2.2. 实验材料	12
2.2.1 主要实验仪器	12
2.2.2 实验试剂	13
2.2.3 实验动物	13
2.3 实验方法	14
2.3.1 动物模型的建立	14
2.3.2 生发复方的筛选	14
2.3.3 生发复方的提取及制剂工艺优化	17
2.3.4 生发复方对 C57BL/6 脱发小鼠的促生发作用研究	22
2.4 实验结果	28
2.4.1 动物模型的建立	28
2.4.2 生发复方的筛选	30
2.4.3 生发复方的提取及制剂工艺优化	33
2.4.4 生发复方对 C57BL/6 脱发小鼠的促生发作用研究	43
2.5 本章小结	48
3 乌发复方的造模、筛选及药效学研究	49
3.1 前言	49

3.2 实验材料.....49

3.2.1 主要实验仪器.....50

3.2.2 实验试剂.....50

3.2.3 实验动物.....51

3.3 实验方法.....51

3.3.1 白发动物模型的建立.....52

3.3.2 乌发复方的筛选.....52

3.3.3 乌发复方对 C57BL/6 白发小鼠的乌发作用研究.....53

3.4 实验结果.....54

3.4.1 白发动物模型的建立.....54

3.4.2 乌发复方的筛选.....58

3.4.3 乌发复方对 C57BL/6 白发小鼠的乌发作用研究.....61

3.5 本章小结.....67

4 全文总结.....68

参考文献.....69

对进一步研究工作的设想和建议.....74

攻读学位期间发表的学术论文与专利申请.....75

致谢.....76

1 绪论

当今社会，脱发(Alopecia)、须发早白(grey hair)普遍发生，发病者年龄越来越小，经济社会的发展使得大众的健康意识大大提高，对治疗脱发与须发早白的有效制剂需求随之增加^[1-3]。据调研，目前市面现有的生发、乌发中西药均较少见，且疗效不理想，远远不能满足人们的需求，因此优质生发与乌发制剂的研究具有较广阔前景，不断受到专家学者的重视^[4]。

脱发治愈困难且发病率高。据报道，我国男女的发病率分别是 21.3%和 6.0%，并且有逐年增加的迹象^[5]。该病虽不会直接危害到生命，但具有徘徊不去的特点，影响患者的外在形象，给患者带来精神压力和生活负担^[6]。西医治疗脱发往往是效果微弱的，而且副作用多，费用高昂。传统中药治疗脱发有其独特优势。它是安全的，很少出现不良反应。与西药相比，其价格相对较低，更符合中国患者的需求^[7-9]。

白发是指头发全部变白或部分异常变白的现象，随着现代人脑劳动力的负担加重，致使中年、青年、少年等各个年龄段的人白发比例显著增多，给人们的生活、工作、学习等带来非常严重的困扰^[10]。据统计，我国少白头患者约占成年人群体的 20%~30%，并呈不断增长的趋势，三十岁左右的人群中约四分之一患散在白发，四十岁的人群中之一比例上升至二分之一^[11]。人们对乌发的需求猛增，而市面上乌发产品较少，西医效果不佳，主要以染发为主，治标不治本，中草药复方较多，但是效果不太明显以及治疗时间上比较长，而多数白发者还是以染发为主，因此乌发中药制剂的开发仍有广阔前景^[12-13]。

1.1 脱发

1.1.1 中医治疗脱发研究现状

传统中药应用于脱发上有悠久的历史。中医认为“发是肾证”，“发是血证”。头发的生长靠精和血^[14]。有报道，许多中药复方、单味药材或某一成分均能不同程度的促进毛发生

长，而中药防治脱发与西药不一样在于，中药作用角度多方面，且毒副作用低等优势^[15]。

1.1.1.1 中医对脱发的病因认识

根据中医理论，脱发是人体内脏力量的外在提现。本病位于皮毛，主要由脏腑气血引起。主要是因为肾精不足，精不成血，血不养毛，毛不长点脱落。它们主要是风、湿、热和疲劳。中医临床认为脱发主要在于：一是肺气严重不足，无法保护头发；二是肺气丧失，气血津液流失，毛发功能减退，毛发萎缩^[16-18]。

1.1.1.2 中医对脱发的治疗现状

中医对脱发的治疗主要有四种思路，即辨证论治法、中药外治法、针灸疗法以及综合疗法^[19]。

辩证治疗，口服中药生发汤剂。魏跃刚^[20]将此病归因于湿热积聚、血虚、风干、肝肾不足。湿热蓄积，用龙胆丸肝汤滋补；气血不足，风燥，养血祛风，补充适量的祛风换肌丸；肝肾亏虚，补肝肾，用适量六味地黄丸等。程德华^[21]认为该病的发生与脾胃密切相关，主张先健脾祛湿，补气补血。健脾养血生发汤为主药，枸杞为辅助，每天1剂，煎煮，一天两次，30天一个疗程，对36位患者的有效率高达89%。

中药外治法，孙玉齐^[22]采取中药透骨草的作用除湿和激活血液，使用水煎液清理头皮，使用双倍的鲜透骨草加水煎，得煎液，温度降至50℃时给患者洗头发，清理头皮，效果相当好。

针灸疗法，于滨兰^[23]等使用针灸刺激头部生发四穴，同时对相关三穴辅助治疗，也取得了相当的疗效。

综合治疗：外敷可直接到达病发部位，扩张小血管，调理气血，促进脱发部位血液供应，直接作用于目标部位；而内服药从系统性治疗，因此内外治疗能有效地将局部精细补充与整体同时进行，在临床上也获得了较多的认可^[24]。

1.1.1.3 中医对脱发的研究进展

中药生发制剂经过数千年的发展，古方有"杏林生发方"，"汉龙古方"等，现代中医用于治疗脱发的产品也较多，代表性的有章光 101，日本柳屋生发液，何桑生发凝胶等。

杏林生发方，内服方剂，为生发经典方，出自《汉草坊录》，主要含有为党参，枸杞，地榆，墨旱莲，雪莲，藏红花等，具有补血养气，祛湿生发的功效。得到 100 多位中医药和生物技术领域权威人士和学者的认可。对各种情况下的脱发均有显著疗效。有“中国头发的瑰宝”之称。但其受药材品质，煎制工艺，使用者的影响较大，第药材消耗量巨大，成本昂贵，使用者较少。

章光 101，从产品出现至今已有 46 年，是国内知名度极高的生发品牌。目前最为成功的生发中药产品章光 101 是一种纯中药复方制剂,属外用酊剂，主要以人参、丹参、苦参、川芎等中草药为原料，通过低温物理萃取等方法获得提取物，可起到平衡油脂，恢复头皮活性，改善营养供给等作用，从而改善毛囊环境促进生发。但该产品有疗效不稳定，味道难闻刺鼻，作用周期长达一个月等诸多不足。

柳屋生发液，属外用生发液，在日本五十年来广受消费者好评。需每天使用保养头发。主要配方为甘草，当归，人参，当药，胡萝卜，延寿草等，其中主要药效成分有甘草酸二钾，胡萝卜素等，加入其它醇类、香料等制成酊剂。该产品功效个体差异较大，最快者 3 周可见效，但亦有患者表示使用两个月仍不见起效，每天喷三次于患处，对人体粘膜有一定的刺激，入眼需迅速清洗，因此存在较大局限性。

何桑生发凝胶，由周春英^[25]依据多年临床经验研制而成的中药复方凝胶，主要处方组成是墨旱莲、地榆、女贞子、桑白皮、桑椹子、川椒、补骨脂、丁香以及其它共十几种药材,通过中药提取，以卡波姆为基质，配以乙醇，甘油以及其他基质而成，经实验和临床验证具有良好生发作用。

常用的脱发中草药较多，统计常见的具有较好生发功效中药，具体如下：

地榆最早见《神农本草》，为蔷薇科，味微寒、微苦且酸，有凉血之作用。现代医学研究证明，地榆富含黄酮与没食子酸，具有较好的抗菌与抗炎作用。

干姜是姜科植物，华夏民族很早就将其应用于生发。根据中医观点，干姜可归脾、胃、肾、心、肺，可温、散寒。现代医学研究证明，干姜可以改善血压、抗凝等功能，干姜中姜辣素可活化透皮毛细血管，促进透皮微循环，促进毛囊营养。

侧柏是侧柏的干枝和干叶。根据中医理论，它的性质是苦、寒，有冷血止血的作用。现代医学研究证明，侧柏叶中的黄酮抗菌抗炎效果显著；

枇杷叶，属蔷薇科，为琵琶的干燥叶，在中药生发中也是较为常见的一味中药。中医理论认为枇杷叶具有清肺止咳，止呕的作用，对各种肺热咳嗽效果显著。现代研究证明，枇杷叶中有较多的三萜酸，黄酮等成分，日本研究学者还发现其中的三萜酸具有抗癌活性。

银杏叶为银杏的干燥叶子，其中的黄酮含量较多。有文献报道，银杏叶中的酯、银杏叶黄酮具有抗氧化、清除自由基、促进血管微循环等作用。

蒲公英属于菊科植物。同时兼备甜苦与冷的特点。可降热抗炎。现代分析发现，蒲公英高含量的铁、钙能更好地促进毛囊营养；

甘草，属豆科。对人体较大的补益性，能降毒化痰。在中医中使用广泛，其中的甘草酸具抗炎抗过敏的作用。

尽管中医药对脱发的研究已取得一定的成果,但仍未有疗效明显突破的产品,目前主要是对临床经验的总结，对于具体机制的研究较为不足，且存在效果不稳定，作用周期长等不足之处，外用生发酊剂、凝胶等有使用方便，患者依从性强等优点，是近年研究的热点。

1.1.2 西医治疗脱发研究现状

1.1.2.1 西医对脱发的病因认识

现代医学认为脂溢性脱发(AGA, Total Parenteral Nutrition)是由于人体雄激素过多导致的具有遗传特征的脱发,患者往往同时具有两个特点:毛乳头周围中的雄激素水平高和遗传易感性。还有文献报道人体睾酮与二氢睾酮及雄激素受体(AR, Androgen Receptor)的含量增加有密切联系。其他方面如饮食不健康,长时间的精神压力、真菌感染与炎症都会增加本病的发生率^[26-28]。

斑秃(Alopecia Areata, AA)表现为一种非恶性、区域性、无皮肤损伤的脱发,病情持续发展则可以变成全秃。到目前为止,AA的发病机理还没有完全阐明,大多认为该病主要与免疫、遗传、炎症、营养等相关。目前AA尚未得到一致的治疗方式,各有不同程度的效果^[29-30]。

1.1.2.2 西医对脱发的治疗现状

对于AGA,目前主要的治疗方法是根据其产生的直接原因,使药物抑制AR或雄激素代谢酶,从而达到阻止雄激素活性表达的目的。临床多见药物有:(1)调节雄激素代谢药物,如非那雄胺,它是经FDA批准唯一可临床使用的5- α 还原酶抑制剂,可以减少患者体内的二氢睾酮。副作用有轻度肝功能抑制、性功能抑制、偶见抑郁、情绪抑制,还可影响睡眠和饮食。停药后不良反应可迅速缓解。(2)抗雄激素类药物,有研究报道氟他胺250mg/d持续给药十二个月能有效治疗女性脱发。不良反应是轻微肝功能抑制,在停止用药后可恢复。(3)生物反应调节剂,最常见的是酞剂米诺地尔(又名敏乐定),局部涂抹,此药为FDA唯一批准上市的应用于脱发的非处方药。米诺地尔对脱发的主要机制是诱导并提高血管内皮生长因子的活性,促进造血英子以及胰岛素样生长因子1等的形成,还可以开放K⁺通道扩张毛囊的小动脉血管,通过增加供血以达到促进毛发生长的效果。不足之处在于其停药易反弹的特点^[31-32]。(4)减少皮脂分泌或抗真菌的药物,头发掉落部位常表现为多油,搔痒等,有较多马拉色菌。因此减少皮脂和抗真菌药可以起到良好的作用,如二硫

化硒洗剂希尔生^[33]。

斑秃的治疗也有较多药物,患者往往表现出差异的效果。其较常见的有米诺地尔酊剂、复方甘草酸苷以及糖皮质激素等。随着研究的不断深入,针对斑秃的治疗药物越来越多,如毛囊干细胞疗法、新型生物制剂等^[34]。

1.1.2.3 西医对脱发的研究进展

除常规治疗药物外,目前西医对于脱发的研究,强调从多个致病因素入手,如遗传、雄激素、血液流变学、头发微观结构、补肾、心理辅导结合研究等取得突破。如使用基因工程技术将编码的抗炎细胞与具有其他免疫介导的遗传物质整合进毛囊干细胞中,保护毛囊细胞被免疫破坏促进生发^[35]。此外,毛发移植术也应用较多,有研究报道对 60 例脱发移植术患者有效率达 90% 以上^[36]。

1.1.3 脱发动物模型

随着人们对脱发认识的不断深入,脱发诱导模型也越来越科学合理。

脱发体内模型的建立有多重方法,为了便于观察以及考虑到与人类脱发的相似度,目前主要以 C57BL/6 小鼠作为实验动物。脱毛方法也有较多不同,如直接松香石蜡拔毛,即利用冷却凝固私下鼠毛。市售人用脱毛膏如"薇婷"也有较好的脱毛效果,还可使用化学诱导剂 6~8% 的硫化钠涂抹,利用其碱性腐蚀小鼠毛发,从而制造脱发小鼠模型,C57 小鼠脱毛模型关键在于需严格控制其毛发生长周期^[37]。此外,也有报道使用昆明小鼠和 SFJ 小鼠。有研究报导咪喹莫特可以诱导 C3H/He J 小鼠形成类似于人类斑秃的动物模型,同时报导了咪喹莫特外用建立多品系小鼠脱毛动物模型的可行性及其初步机理,结果证实 BARB/c、129、C3H/HeJ、C57BL/64 种品系小鼠造模成功率达 100%,其机理可能与咪喹莫特诱导激活毛囊周围的 TLR7 受体有关,证实可用于人类脱毛疾病的研究^[38]。

体外模型,目前较为受认可的是毛囊体外培养模型。该模型可以研究毛囊生长周期的

调控,也可用于毛囊药物筛选与研究。但该模型受化疗药物的作用时间与浓度的影响较大,致使模型复制和药物疗效评价效果不稳定。毛囊在体外培养状态下的生存能力也比较低下,而且对实验要求条件较高,准备过程比较困难。这些因素限制了毛囊体外模型的普及[39]。

1.2 白发

1.2.1 中医治疗白发

1.2.1.1 中医对白发的病因认识

中医药应用于白发也有较长历史,当代在中医学认为头发过早变白原因有三:肾阴虚引起的白发、阴虚血热引起的白发、肝郁气滞致白发。中医虽对白发产生无统一观点,存在分歧,但主要定位在肝脏、肾脏、脾脏三个器官。"肝肾不足"、"气血亏虚""血热上行""情志郁结"都可能促进须发早白。依据大量的古医记载和方药分析,肝肾不足为产生白发的主要原因^[40-41]。

1.2.1.2 中医对白发的治疗现状

目前中医治疗白发主要有三种方法:(1)系统辨证治疗,内服汤剂。肝肾不足型主要是滋补肝肾为原则,用药的主药是六味地黄丸、二至丸为主方。气血亏虚型以益气补血为原则,用药多以四物汤、神应养真汤为主方。血热上行型以清热凉血为原则,用药多以犀角地黄汤、凉血四物汤为主方。情志郁结证多可引起气滞血瘀,因此此型多以疏肝解郁、活血化瘀为原则,用药多以柴胡疏肝散、逍遥散为主方。(2)针灸疗法,结合辨证分型,选穴论治,也可以直接在病变部位用梅花针叩刺皮肤。但这些方法只是停留在个人经验层面,缺乏足够的临床研究数据支持,确切疗效仍需进一步确定。(3)外治法,直接将药物涂抹在病变部位以改善毛发的生长。此法避免了药物通过系统代谢,作用直接,使用方便^[42-43]。潘秋华^[44]将中药乌发汤直接包裹头发按摩为主,配合口服自拟养血补肾酒为辅治疗白发

286 例,总有效率为 79.37%。

1.2.1.3 中医对白发的研究进展

中药外用剂型主要是汤剂,但汤剂有一个很显著的缺点是粘附力不足,而新型凝胶剂成为良好的替代品。目前中药乌发制剂主要有东宫生发乌发液,何桑 2 号凝胶等。

东宫生发乌发液^[45],是一种天然的育发养发产品,苏盈盈等研究证实东宫生发乌发液能够加快细胞增值以及加大酪氨酸酶活性,有利于黑发的生成。不足之处在于缺乏对触须游离毛囊的生长。通过毒理学研究未发现其显著毒性,其中药处方为墨旱莲,辣木籽,地榆,人参,丹参,何首乌等。质谱分析其含有钾、钠、钙、镁等数十种金属元素。

何桑 2 号凝胶,周春英自制何桑 2 号凝胶,应用于临床取得了良好的乌发作用。其主要由川椒、蒲公英、当归、川芎、制首乌、桑椹子、补骨脂、紫草、丁香、女贞子、桑白皮等提取而成,与卡波姆,甘油,香料等配合制成外用凝胶。研究证实何桑 2 号凝胶可以有助于鼠真皮层的毛细血管的增生,扩张局部血管,使真皮层更厚,增加营养的供应,促使毛囊增殖和黑色素的产生,也可对免疫有一定的促进作用,同时可用于白癜风,有较佳的安全性。

常见的乌发中草药较多,如:

女贞子是女贞子的果实。具有滋阴延年、补肝肾、清热明目、生发黑发的功效。在中医中,常用于治疗头晕、耳鸣、腰膝压痛、内热和头发白。

何首乌,又称紫藤。何首乌生长环境要求低且价廉易得。它的块根可以入药,镇静神经,滋养大脑。制何首乌能养精、养发、养胫、养肝、养肾。是最常见应用于白发的中药。

干姜,为姜科植物姜的干燥根茎,可以为人体增体热、增气血。又能去恶养新,有阳生阴长之意,故血虚者用之。其中姜辣素具有促进毛细血管扩张,通血活血之功效。

丹参性味苦,温寒,主要为化瘀止痛、活血通经、清心解困、气血不足、入睡障碍、

情志抑郁等。

蒲公英，菊科，属于常见的草本植物，性味较甘，微苦。归肝，胃经，有利尿，缓泻，退黄疸利胆等功效，治热毒，对感冒发热具有较好的疗效。

紫苏叶，唇形科。可去风、驱寒、降湿。适用于夏季感冒、排毒、预防和减轻海鲜的严重程度。紫苏叶总黄酮具有良好的抗菌活性。

中药乌发汤剂起效缓慢且存在肝肾损伤等副作用,而外用酊剂粘附力小，易造成药物的流失,因此外用凝胶剂成为新的研究方向^[46]。

1.2.2 西医治疗白发

1.2.2.1 西医对白发的病因认识

毛发变白主要是因为患者发根部黑素细胞产生的黑色素生成减少，导致毛发脱色，产生白色毛发。合成黑色素的限速酶是酪氨酸酶，酪氨酸酶是一种由 Cu^{2+} 与蛋白质连接在一起的金属酶，它主要聚集在黑素细胞中的黑素体内，大多数附着在黑素体膜，也有部分游离与体液中。在黑色素生物合成的过程当中，酪氨酸酶是非常重要的催化作用，他可以催化黑素生成时所需的多步反应，因此只有具备足够的酪氨酸酶活性才能保证黑素的充足供应。此外，遗传、代谢、免疫、内分泌、肿瘤、营养如矿物质与维生素的缺乏及药物等因素都会不同程度对的促进白发的产生^[47]。

1.2.2.2 西医对白发的治疗现状

目前治疗白发的西医药较少见，对于病因已知的白发，如化疗药物，缺乏维生素及矿物质，甲状腺功能减退，白癜风等因素对症治疗即可^[48]。而对于一些原因不明的白发往往较难治愈，据文献报道，腺苷环磷酸具有一定的促进蛋白质、RNA 的合成作用，可延缓白发的产生。米诺地尔对白发也有较好疗效，甲氧沙林具有促进酪氨酸酶活性的作用可一定程度上促进白发转黑发。但因缺乏稳定疗效，使用不便等原因，年轻人更趋向于选择使

用染发剂，但是染发剂含对苯二胺等致癌物，对人体健康不利^[49]。

1.2.2.3 西医对白发的研究进展

西医虽然对白发的发病机制有了一定的了解，但目前缺乏针对性的药物，最有效的途径依然是化学染色剂。病因明确的白发症状，最佳办法还是治疗原发病。新药的开发主要从保护毛囊色素干细胞，促进酪氨酸酶活性以促进黑素生成等角度寻找新药^[50]。

1.2.3 白发动物模型

目前乌发研究的主要实验动物为 C57BL/6 小鼠，因其毛发乌黑，且毛发生长活力较强，便于观察且与人类脱发的相似度较高，是白发模型的最佳使用对象。白发动物模型的建立过程主要是使用 2.5% 氢醌 CMCNa 溶液背部涂抹有道白发，也可使用 1% 氢醌生理盐水溶液背部皮下注射造模。两种发放都是以氢醌为造模剂，区别在于浓度与给与发途径的差异，背部皮下注射可以起到较快的白发模型，外部涂抹则过程更久，需要前期脱毛，使小鼠背部毛发进入生长期^[51]。

体外研究模型，目前应用最广的是蘑菇酪氨酸酶多巴速率氧化法，特点是可以对多种中药提取物进行筛选，效率高，成本较低，对化合物也有筛选作用。不足之处在于实验存在较大系统误差，且需排除溶剂对酶活性产生的影响^[52]。

1.3 中药凝胶剂研究现状

中药凝胶是近年来出现的一种新型药物制剂。它是由药物和凝胶基质形成的均匀、悬浮或乳化型的浓液或半固体制剂^[53]。随着现代药学的不断发展，以凝胶为基质的缓释、控释剂型如胃滞留控释系统、脉冲释放、凝胶骨架片等得到了充分的发展。中药凝胶剂分为水性、油性及乳剂性三类^[54]。水性凝胶剂对于生发制剂有数种优势，所含基质的吸收与溶胀特性使药物可以长时间停留在表面逐渐释放，是更适合于中药提取物的剂型。

1.3.1 处方组成

中药凝胶剂除了含中药提取物、凝胶基质、pH 调节剂外，还要加入保湿剂、抗氧化剂、调味剂、透皮促进剂、防腐剂等附加剂。各组分的最佳加入量或比例通常根据已有经验或实验优化得到。

1.3.2 凝胶基质

凝胶基质是凝胶剂中不可或缺的组成部分，凝胶剂依靠凝胶基质成形，其应有较好的粘附性及塑性流变学特质，才能保证凝胶剂产生适宜的涂布性能，卡波姆（Carbomer）、HPMC、CMC-Na 是最常见的凝胶基质。

卡波姆是丙烯酸与烯丙基蔗糖共聚物，水中分散后调节 pH 可形成透明半固体凝胶状态^[28]。卡波姆包括 934、940、941 等规格，代表其可在不同 pH 范围内达到适宜的粘度，如卡波姆 940 在 pH4.5-11.0。卡波姆基质可增加主药在作用部位的滞留时间，起到一定的缓释功能。同时具备易涂展、附着性强、无油腻感、容易洗脱、无皮肤和黏膜刺激等优点。常用剂量为 1%-3%^[55]。

CMC-Na 是纤维素类衍生物。其制备的凝胶制剂较易失水干燥，使用过程中，会引起患者使用部位明显的不适感，故需与甘油等保湿剂配合在一起使用。常用剂量为 3%-10%。

1.3.3 溶剂及助溶剂

常用溶剂包括水、乙醇、丙二醇等。通常凝胶基质材料的溶胀溶剂为水，主药的溶解溶剂根据药物性质进行选择。乙醇可作为难溶药物的溶剂，又能起到透皮、防腐、消毒等作用，但需对其用量严格控制，以免对皮肤及毛囊细胞造成损伤。对于难溶性主药，一般采用加入助溶剂来增加其溶解度，常用的助溶剂包括酰胺类、有机酸类等^[56]。

1.3.4 保湿剂

凝胶剂需保持一定的含水量以保证其粘着性，适量保湿剂可改善基质稠度，避免涂抹于皮肤后基质干燥成硬膜，加入保湿剂可防止长时间放置后凝胶失水变干。常见的保湿剂

包括甘油、丙二醇等。

1.3.5 防腐剂

为防止微生物腐蚀，凝胶剂中还需加入防腐剂。对羟基苯甲酸乙酯是常见的药用防腐剂，对个总细菌真菌均有抵抗作用。易溶于乙醇、丙二醇。安全低毒，限度规定为0.01-0.05%。

1.3.6 抗氧化剂

加入抗氧剂可维持制剂的保质期，增加凝胶剂的放置时间。抗氧剂主要有亚硫酸盐、丁基茴香醚、VE 等。VE 最为常见，可通过抑制活性成分的氧化反应达到抗氧化作用，其对热稳定，无毒性，且有改善皮肤粗糙、鳞屑的作用，适合外用凝胶剂的使用，用量为1~3%。

1.3.7 香精

为提高患者依从性，凝胶剂中常加入适量的无害香精调节气味。常见的适合于外用凝胶制剂的香精有薄荷脑香精，柠檬香精等，用量可根据使用感进行选择，一般不超过 1.5%。

1.3.8 透皮促进剂

透皮吸收促进剂 (Penetration Enhancer, PE) 能够加快药物经过患病部位。主要包括化学、天然 PE 两类。前者包括醇类、酰胺类或脂肪酸类等，如氮酮、乙醇、油酸等。后者主要是精油、萜类及内酯类等，如薄荷脑、冰片、挥发油等。在诸多常见化学 PE 中氮酮应用最为多件，其对亲水性药物的促透作用大于亲脂性药物，不需加入过多量，一般不超过 5%。天然 PE 中冰片及薄荷醇应用较广泛。冰片及薄荷醇本身就有一定的止痛消炎作用，非常适合中药外用制剂使用。且冰片可长时间维持高血药浓度，增加药物生物利用度，且经肝肾清除快，不容易蓄积。常用浓度均为 1%-5%^[57]。

1.4 立题依据

国内外许多学者也进行了大量生发、乌发的研究，但是目前还没有一种既有效又安全的治疗脱发和白发的产品。西药往往副作用较大，停药后复发显现普遍，中药在生发、乌发方面有着安全，毒副作用小且成本低廉的优势。

以往的中药汤剂使用程序繁琐，患者依从性太差，而酊剂等粘附性不足，起效不稳定，新型外用凝胶剂冷敷易于吸收，很好的弥补了汤剂和酊剂的不足。抗菌，去油，供血等是中西医理论生发乌发的共通原理，通过对中草药进行合理组方，提取出具有抗菌，抗炎，营养毛囊，改善微循环等中药有效成分，开发中草药复方生发凝胶剂和中草药复方乌发凝胶剂具有广阔的应用前景。

1.5 研究内容

- 1) 建立 C57BL/6 小鼠脱发模型；
- 2) 采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型筛选抗炎复方组合，采用在体C57小鼠脱发模型筛选生发复方中草药材，得到最终中草药复方组合；
- 3) 采用正交试验优化生发复方的提取、水凝胶的制备工艺；
- 4) 利用脱发模型对生发复方水凝胶进行药效学考察；
- 5) 利用酪氨酸酶筛选模型，黑素细胞增值，黑素合成模型初步筛选乌发中草药材；
- 6) 以氢醌为造模剂建立C57BL/6小鼠白发模型，体内筛选获得理想乌发中草药复方；
- 7) 不同剂量考察乌发复方水凝胶的药效。

2 生发复方的动物造模、复方筛选、制备工艺及药效学研究

2.1 前言

本章先建立抗炎模型和 C57 小鼠脱发动物模型 ,然后对文献报导的具有生发功效的中草药进行筛选 ,再对筛选的复方进行提取与制剂工艺的优化 ,制备稳定的水凝胶 ,最后设计含量高、中、低三种剂量水凝胶研究复方的药效。

2.2 实验材料

2.2.1 主要材料与试剂

表2-1 主要材料与试剂

Table 2-1 Principal meterals and reagents

名称	批号	规格	厂家
脱毛膏	20180822	50g	薇婷
松香石蜡 (1:1)	20180716	1:1	国药试剂
Na2S	20180716	6%	国药试剂
水合氯醛	20180120	4%	国药试剂
氢醌	20170713	98%	国药试剂
CMCNa	20170614	98%	国药试剂
地榆	20180821	饮片	兴德中药材销售有限公司
蒲公英	20180821	饮片	兴德中药材销售有限公司
侧柏叶	20180821	饮片	兴德中药材销售有限公司
银杏叶	20180821	饮片	兴德中药材销售有限公司
枇杷叶	20180821	饮片	兴德中药材销售有限公司
干姜	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司
当归	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司
党参	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司
何首乌	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司
女贞子	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司

芍药	20190608	饮片	兴德中药材销售有限公司
95%乙醇	20160716	饮片	上海振兴化工一厂
卡波姆 940	L08O6S4023	饮片	源叶生物科技有限公司

表2-1 主要材料与试剂 (续)

Table 2-1 Principal materials and reagents

名称	批号	规格	厂家
甘油	20151106	饮片	国药试剂
无水乙醇	20170615	饮片	国药试剂
氮酮	20150918	饮片	国药试剂
三乙醇胺	20150518	饮片	国药试剂
二甲苯	20170122	饮片	国药试剂
地塞米松乳膏	1611038H	饮片	三九医药
咪喹莫特	17090239	饮片	四川明欣药业有限责任公司
卤米松乳膏	6161245	饮片	澳美制药

2.2.2 实验仪器

表2-2 主要仪器与设备

Table 2-2 Principal instruments and equipments

仪器	型号	厂家
剃刀	FC5801	上海飞科电器股份有限公司
数显卡尺	I 型	上海美耐特实业有限公司
电子天平	BS110S	德国赛多利斯集团
流水式中药材粉碎机	DLF-18	顶历医疗器械有限公司
电子天平	AV2101	梅特勒-托利多仪器有限公司
电子天平	AL104	梅特勒-托利多仪器有限公司
恒温水浴锅	DK-S24	精宏实验设备有限公司
低温冷却循环泵	DLSB	予华仪器有限责任公司
循环水式多用真空泵	SHB-III A	豫康科教仪器设备有限公司
旋转蒸发仪	Heating Bath B-490	瑞士 Buchi 公司

	Rotarapor-R-200	
数显高速均质机	FJ300-s	鲁硕事业有限公司
顶置数显搅拌器	OS20-S	大龙兴创实验仪器有限公司
荧光倒置显微镜	nikonT-is	日本尼康公司
CO ₂ 细胞培养箱		Thermo

2.2.3 实验动物

C57BL/6小鼠，SPF级，雄性，体重20g左右。购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，许可证号码SCXK（沪）2013-0016；恒温恒湿，温度控制为22℃±2℃，湿度控制为45~60%，小鼠可自由饮水。

2.3 实验方法

2.3.1 抗炎和脱发动物模型的建立

2.3.1.1 二甲苯致急性小鼠耳肿胀模型的建立

2.3.1.1.1 造模剂二甲苯保留时间的优选

取 24 只 ICR 小鼠适应性饲养 3d，实验当天按体重均匀分成 4 组，每组 6 只，测量小鼠右耳厚度记为肿胀前右耳厚度，测量位置为右耳正中部位，同一位点测量 3 次，取平均值。各组小鼠右耳前，后两面均匀涂布 20μl 二甲苯，对应四组分别于涂布后 15、30、35、60min 后测量右耳厚度，测量三次，取均值。

2.3.1.1.2 模型的验证

取 ICR 小鼠 18 只，随机分为空白组，模型组，地塞米松组（阳性组），每组 6 只，空白组和模型组小鼠右耳前，后两面均匀涂布 0.1ml 生理盐水，阳性组涂抹等量地塞米松。间隔 30min 后第二次涂布，共涂布 4 次，末次涂布一小时后，洗去各组小鼠耳部残留药物，对模型组和地塞米松组小鼠涂抹二甲苯 20μl，空白组涂抹等量生理盐水。30min 后测量右耳厚度，与其 0h 右耳厚度进行比较，计算肿胀度及肿胀抑制率，计算公式如下。

$$\text{肿胀度} = \frac{\text{肿胀后右耳厚度} - \text{肿胀前右耳厚度}}{\text{肿胀后右耳厚度}} \times 100\%$$

$$\text{肿胀抑制率} = \frac{\text{模型组肿胀率} - \text{给药组肿胀率}}{\text{模型组肿胀率}} \times 100\%$$

2.3.1.2 脱毛动物模型的建立

2.3.1.2.1 小鼠的麻醉

C57BL/6 小鼠 18 只以 4% 水合氯醛 (0.18ml/20g) 经腹腔注射麻醉，待其处于麻醉状态下用剃刀剃除 2.0*2.0cm² 的背部毛发。

2.3.1.2.2 分组

分组方法 :待小鼠剃毛结束后 ,用镊子拨开残余短毛观察各小鼠背部剃毛区皮肤颜色 ,选取背部皮肤颜色为粉红色的小鼠均匀分到 3 个组中 ,分别为脱毛膏组 ,Na₂S 组 , 松香石蜡 (1:1) 组 , 每组 6 只 , 拍照并详细记录各组小鼠每只背部初始颜色。

2.3.1.2.3 脱毛剂的使用

脱毛膏组：参照脱毛膏说明书使用方法，使用 1ml 注射器吸取脱毛膏 0.2ml 均匀涂于小鼠背部，1 分钟后用温水彻底洗去脱毛膏及剩余细毛，保持干燥。

Na₂S 组：用 1ml 注射器吸取 6% 的 Na₂S 溶液 0.6ml，均匀涂抹在小鼠背部实验区，待实验区背毛变成浅黄色 (150±30s)，用温水清理干净背部，保持干燥。

松香/石蜡 (1:1) 组：将松香/石蜡 (1:1) 加热至融为液状，然后冷却至略高于鼠背皮肤温度，在实验区域均匀涂抹约 1.0ml 左右，凝结后，用镊子轻轻撕脱凝结的长毛，保持清洁干燥。

表2-3 分组与给药剂量 (n=6)
Table2-3 Grouping and dosage (n=6)

组别	N	脱毛剂	使用剂量 ml/只	作用时间 s
Na ₂ S 组	6	6% 的 Na ₂ S 溶液	0.6	150±30
薇婷组	6	“薇婷”脱毛膏	0.2	60±12
松香、石蜡组	6	松香/石蜡 (1:1)	1.0	60±12

2.3.1.2.4 检测指标与方法

脱毛完成后，饲养小鼠，并观察记录以下指标：

A. 小鼠体重变化：每三日对小鼠体重进行称量，记录各组小鼠体重变化及小鼠状态差异。

B. 脱毛效果评分^[58]：

脱毛结束后对脱毛效果进行评分，将脱毛效果分为 4 个等级，优：毛发去除干净，皮肤正常；良：偶见毛发残留，部分小区域可见皮肤发红；中：可见毛发残留或皮肤有搔抓痕迹及出血点；差：毛发残留较多或皮肤有红肿或小切口。

C. 小鼠毛发生长速度比较：定期观察小鼠毛发生长长度，生长面积，并分别于第 6, 9, 12, 15d 对小鼠毛发生长情况进行评分。评分标准为：

表2-4 评分标准
Table2-4 Standard for evaluation

毛发生长情况	积分
未生长, 脱毛区皮肤呈红色	0
脱毛区皮肤呈灰色	1
脱毛区皮肤呈黑色	2
脱毛区皮肤呈黑色并有少许毛发长出	3
新生毛发密度及长度约为未脱毛区 1/2	4
新生毛发密度及长度与周围一致	5

D. 小鼠新生毛发量差异^[59]：实验终点在脱毛区域用镊子拔取较长区域的毛发，选取最长三根测其长度，并用剪刀沿毛发根部剪下 2 cm×2 cm 面积的新生毛发，分析天平称重，计算各组小鼠毛重均值，比较各组间毛长度与重量。

2.3.1.2.5 数据统计与分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理，数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2.3.1.2.6 咪喹莫特诱导脱毛模型

脱毛后的小鼠需进一步使用咪喹莫特诱导免疫反应，破坏毛囊时期产生更佳类似于人的脱发症状，结合外观与病理切片判断造模是否成功。选取 C57 小鼠 10 只，6%Na₂S 脱去项部 1cm*1.5cm 区域毛发，硫化钠脱毛方法同前，随机选择 5 只，取脱毛区皮肤，用 10% 甲醛固定。剩余 5 只脱毛区涂 5% 的咪喹莫特软膏，0.1g/只，每周 4 次，周一、三、五、日上午 10 时涂抹，给药前用生理盐水清洁项部皮肤，以去除前次残留药物。至小鼠项部皮肤出现轻微角质，微红，停止给造模剂。

小鼠的皮肤切片：切取适当大小的实验区皮肤组织，用 10% 甲醛固定，进行常规组织脱水，石蜡包埋，HE 染色，40× 光镜镜检，观察以下指标：

①一般组织学检查：毛囊、毛根梢、毛乳头大小形态，真皮厚度。

②毛囊计数：每例数 3 个高倍视野(200 倍)的毛囊数，取其均值，并进行统计学处理。

2.3.2 生发复方的筛选

2.3.2.1 药材配伍的初步选择评价

2.3.2.1.1 处方设计依据

据《中华本草》，地榆凉血止血，清热解毒，侧柏叶清热燥湿，泻火解毒。各药都具有不同的抗菌、抗炎或活血生发的功效，其活性成分共同作用可能对脱发的治疗产生一定的协同作用，故采用二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型对处方药材配伍进行初步筛选，在此基础上进行动物实验的处方优化，选出强效组合。初步确立四个复方组合为：

方 1：地榆：蒲公英：獐牙菜：银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:1

方 2：地榆：蒲公英：辣沫籽：银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:1

方 3：地榆：甘草：獐牙菜：银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:1

方 4：地榆：干姜：獐牙菜：银杏叶：蒲公英 1:1:1:1:1

提取溶剂选择 60% 乙醇提取

2.3.2.1.2 中药材复方的提取

1) 药材预处理

将地榆，蒲公英，獐牙菜，银杏叶，枇杷叶打粉，拉沫子，甘草，干姜分别打粉过 40 目筛备用。

2) 60% 乙醇提取物的制备

方 1：称取地榆 30g，蒲公英 30g，獐牙菜 30g，银杏叶 30g，枇杷叶 30g，加入 1500ml

(10 倍量) 60% 乙醇，室温浸泡 12h，浸泡时晃动搅拌，使其充分浸润，提取完全；50℃ 加热回流 (红外辅助加热) 2h，抽滤，收集滤液；渣相再次加入 1500ml60% 乙醇，相同方法再提取一次，合并提取液，50℃ 下旋转蒸发浓缩，即得地榆：蒲公英：獐牙菜：银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:160% 乙醇提取物，50ml 离心管保存于冰箱。

方 2：称取地榆 30g，蒲公英 30g，辣木籽 30g，银杏叶 30g，枇杷叶 30g，其与方法同“方 1”

方 3：称取地榆 30g，干姜 30g，甘草 30g，银杏叶 30g，枇杷叶 30g，其与方法同“方 1”

方 4：称取地榆 30g，蒲公英 30g，獐牙菜 30g，银杏叶 30g，干姜 30g，其与方法同“方 1”

2.3.2.1.3 提取物凝胶剂的制备^[60]

卡波姆加水放置过夜充分溶胀得 2% 卡波姆基质；称取 6g 卡波姆基质，加入 2g 甘油，搅拌均匀，作为凝胶基质；称取“3.3.1.2”所得提取物于烧杯中 (生药量均为 10%)，加入 5g 乙醇，提取物完全溶解后加入 4g 氮酮，作为含药溶剂；搅拌下将含药溶剂加入凝胶基质中分散均匀，加入三乙醇胺至 pH6.0 左右，搅拌均匀即得。同法制备不含提取物空白凝胶。四种提取物相同制备方法。

2.3.2.1.4 生发组合物 60% 乙醇提取物凝胶对小鼠耳肿胀急性炎症模型作用的研究

1) 分组

小鼠适应性饲养 3d，实验当天按体重均匀分组，测量小鼠右耳厚度记为 0h 右耳厚度，测量位置为右耳正中部位，同一位点测量 3 次，取平均值。

2) 给药方式与剂量

各组小鼠右耳前，后两面均匀涂布对应药物，30min 后重复涂布，共涂布 4 次，分组与给药剂量如表 2-5。

表2-5 分组与给药剂量 (n=6)
Table2-5 Grouping and dosage (n=6)

组别	N	受试物	给药剂量
模型组	6	空白凝胶	0.1g/次
地塞米松组 (阳性组)	6	地塞米松	0.1g/次
方 1 组	6	地榆：蒲公英：獐牙菜： 银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:160% 醇提物凝胶	0.1g/次
方 2 组	6	地榆：蒲公英：辣沫籽： 银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:160% 醇提物凝胶	0.1g/次

地榆：甘草：獐牙菜：			
方 3 组	6	银杏叶：枇杷叶 1:1:1:1:1	0.1g/次
60% 醇提取物凝胶			
地榆：干姜：獐牙菜：银			
方 4 组	6	杏叶：蒲公英 1:1:1:1:160%	0.1g/次
醇提取物凝胶			

3) 二甲苯致急性炎症模型的建立

末次给药 1h 后，洗去各组小鼠耳部残留，吸取二甲苯 20 μ l 均匀涂布于小鼠右耳前、后两面。

4) 检测

致炎后 30min 使用游标卡尺分别测量各组小鼠右耳厚度并记录，并与其 0h 右耳厚度进行比较，计算肿胀率及肿胀抑制率，计算公式如下。

5) 数据统计与分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理，数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2.3.2.2 药材配伍的进一步优化与初步评价

在前面筛选基础上，进一步组合复方，利用抑菌平板、耳肿胀模型评价，同时使用脱发模型初步探讨新复方的生发功效。

2.3.2.2.1 新处方的设计

新设计四个复方，分别为：

方 5：侧柏叶、地榆、何首乌、银杏叶、女贞子、当归、甘草 2:2:2:1:1:1:1

方 6：侧柏叶、地榆、干姜、银杏叶、蒲公英、芍药、党参 2:2:2:1:1:1:1

方 7：侧柏叶、地榆、干姜、枇杷叶、银杏叶、蒲公英、甘草 2:2:2:1:1:1:1

方 8：侧柏叶、地榆、何首乌、女贞子、当归、墨旱莲、黑胡椒 2:2:2:1:1:1:1

方法同前“3.3.1.2”

2.3.2.2.2 提取物凝胶剂的制备

方法同前“2.3.1.1.4”

2.3.2.2.3 生发新组合物 60% 醇提取物凝胶对小鼠耳肿胀急性炎症模型作用的研究

方法同前“2.3.1.1.5”

2.3.2.2.4 利用 C57 小鼠脱发模型筛选不同生发新组合物

1) 脱发小鼠模型的建立

方法同“2.3.1”

2) 给药

将上述造模成功的小鼠按体重平均分为六组，即模型组，阳性组，复方 5、6、7、8 组，每组 6 只，模型组涂抹空白凝胶，阳性组涂抹米诺地尔酊剂 0.2ml/只，生发中草药四

组分别涂抹相应复方，各组涂抹相应水凝胶 0.2g/只，以注射器吸取，观察小鼠生发状况，并用记号笔标注每只小鼠脱毛区域。

给药后观察指标

A.小鼠毛发生长情况：同表 2-4”

B.小鼠新生毛长，毛重及密度记录：分别在实验第 9 天和实验终点于脱毛处理区取最长毛 3 根，使用游标卡尺测量其长度，计算平均值，比较各组间毛发长度差异及不同组起始背部颜色相同小鼠毛发长度差异；实验终点在脱毛区域用剪刀沿毛发根部剪下标记的面积的新生毛发，分析天平称重，计算各组小鼠毛重均值，比较各组间毛发生成量差异及不同组起始背部颜色相同小鼠毛发生成量差异。并计算毛发密度。

2.3.3 生发复方提取与制剂工艺的优化

2.3.3.1 含量测定方法的建立

2.3.3.1.1 指标成分的选择

从抗菌、抗炎、营养、促进循环等生发原理方面综合分析，以总黄酮、鞣质、姜辣素为主要检测指标。

2.3.3.1.2 姜辣素及没食子酸含量检测条件^[61]

姜辣素色谱条件：参照中国药典 2015 版，姜辣素色谱条件为 SymmetryC18 色谱柱（150mm*4.6mm，5 μ m），乙腈-甲醇-水（40：5：55）为流动相；流速：1.0mL/min，柱温：35℃，检测波长为 280nm。

对照品溶液的制备 取 6-姜辣素对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含 0.1mg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过三号筛）约 0.25g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 20ml，称定重量，超声处理（功率 100W，频率 40kHz）40 分钟，放冷，再称定重量，用 75% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10^{-1} ，注入液相色谱仪，测定，即得。

没食子酸检测条件：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-0.05% 磷酸溶液(5 : 95)为流动相；检测波长为 272nm。

对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量，精密称定，水制成每 1ml 含 30 μ g 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号约 0.2g)，精密称定，置具塞锥形瓶中，加 10% 盐酸溶液 10ml，加热回流 3 小时，冷，过，液置 100ml 量瓶中，用水适量分数次洗涤容器和残渣，洗液滤入同一量瓶中，加水至刻度，摇匀，过，取续滤液，即得。测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 100 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

2.3.3.1.3 总黄酮检测方法-分光光度法^[62]

5%亚硝酸钠溶液配制：称取 1g 亚硝酸钠固体，加蒸馏水至 20ml，即得。

10%硝酸铝溶液配制：称取 2g 硝酸铝固体，加蒸馏水至 20ml，即得。

氢氧化钠试液：取氢氧化钠 4.3g，加水溶解成 100ml，即得。

样品制备：取样品 1ml 于 50ml 容量瓶中，定容。然后分别取 2ml 溶液置离心管中，并加入 8ml 无水乙醇，4℃冰箱放置过夜。将其离心，即得。取上清液 6ml 于 15ml 离心管中，加入 5%亚硝酸钠 0.6ml，放置 6min；加 10%硝酸铝 0.6ml，放置 6min；加氢氧化钠溶液 6ml，将其定容到 15ml，放置 15min 后以相应的试剂为空白，用紫外分光光度仪测 509nm 波长处的吸光度 A。

2.3.3.2 生发复方提取工艺的优化

2.3.3.2.1 提取方法单因素考察

1) 常规提取

按照处方比例称地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1

(过 50 目筛) 共 20g, 加 10 倍量 60% 乙醇, 室温浸泡 12h, 于 80℃ 水浴回流提取 2h, 共提取 2 次, 抽滤, 收集所得滤液, 70℃ 下减压浓缩至 20ml, 按照上述检测条件进行含量检测。

2) 搅拌提取

按照处方比例称地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 共 20g, 加 10 倍量 60% 乙醇, 室温浸泡 12h, 于 80℃ 水浴回流提取 2h, 回流过程中间隔 20min 搅拌一次, 共提取 2 次, 抽滤, 收集所得滤液, 70℃ 下减压浓缩至 20ml, 按照上述检测条件进行含量检测。

3) 红外辅助提取

按照处方比例称地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 共 20g, 加 10 倍量 60% 乙醇, 室温浸泡 12h, 于 80℃ 水浴回流提取 2h, 回流过程中使用红外辅助加热, 共提取 2 次, 抽滤, 收集所得滤液, 70℃ 下减压浓缩至 20ml, 按照上述检测条件进行含量检测。

4) 超声辅助提取

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 共 20g, 加 10 倍量 60% 乙醇, 室温浸泡 12h, 于 80℃ 水浴回流提取 2h, 共提取 2 次, 每次回流开始前使用超声辅助提取 15min, 抽滤, 收集所得滤液, 70℃ 下减压浓缩至 20ml, 提取后混合按照上述检测条件进行含量检测。

2.3.3.2.2 提取次数单因素考察

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 共 20g, 加 10 倍量 60% 乙醇, 室温浸泡 12h, 于 80℃ 水浴回流提取 2h, 共提取 4 次, 回流过程中间隔 20min 搅拌一次, 抽滤, 所得滤液分别于 70℃ 下减压浓缩至

20ml，按照上述检测条件对 4 次所得滤液进行含量检测。

2.3.3.2.3 提取时间单因素考察

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 三份，每份 20g，加 10 倍量 60% 乙醇，室温浸泡 12h，分别于 80℃ 水浴回流提取 1h、2h、3h，回流过程中间隔 20min 搅拌一次，抽滤，收集所得滤液，70℃ 下减压浓缩至 20ml，按照上述检测条件进行含量检测。

2.3.3.2.4 提取温度单因素考察

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 三份，每份 20g，加 10 倍量 60% 乙醇，室温浸泡 12h，分别于 65℃、80℃、95℃ 水浴回流提取 2h，回流过程中间隔 20min 搅拌一次，抽滤，收集所得滤液，70℃ 下减压浓缩至 20ml，按照上述检测条件进行含量检测。

2.3.3.2.5 提取料液比单因素考察

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 三份，每份 20g，分别加 5、10、15 倍量 60% 乙醇，室温浸泡 12h，80℃ 水浴回流提取 2h，回流过程中间隔 20min 搅拌一次，抽滤，收集所得滤液，70℃ 下减压浓缩至 20ml，按照上述检测条件进行含量检测。

2.3.3.2.6 提取方法多因素考察

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1 (过 50 目筛) 三份，每份 20g，加 10 倍量 60% 乙醇，室温浸泡 12h，于 70℃ 水浴回流提取 2h，回流过程中 A. 使用红外辅助加热 B. 间隔 20min 搅拌一次 C. 使用红外辅助加热并间隔 20min 搅拌一次，抽滤，收集所得滤液，70℃ 下减压浓缩至 20ml，按照上述检测条件组合进行含量检测。

2.3.3.2.7 正交设计优化提取工艺

1) 试验因素与水平

在单因素考察基础上，采用正交设计进一步优化溶剂用量（倍，A）、提取时间（h，B）、提取次数（次，C）及提取温度（℃，D），采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验进行筛选，正交试验因素及水平见表 2-6。

表 2-6 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及水平表

Table2-6 Factors and Level Table of Orthogonal Test

水平	因素			
	溶剂用量（倍，A）	提取时间（h，B）	提取次数（次，C）	提取温度（℃，D）
1	7	1	1	65
2	10	2	2	80
3	13	3	3	95

2) 试验设计

按照处方比例称取地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草 2:2:2:1:1:1:1（过 50 目筛）共 9 份，每份 20g，加入溶剂，室温浸泡 12h，按正交试验方案进行试验，回流过程中使用红外辅助并间隔 20min 搅拌一次，抽滤，收集所得滤液，70℃下减压浓缩至 80ml，正交试验方案见表 2-7。

表 2-7 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及水平表

Table2-7 Factors and Level Table of Orthogonal Test

序号	溶剂用量（倍，A）	提取时间（h，B）	提取次数（次，	提取温度（℃，D）
			C）	
实验 1	7	1	1	65

实验 2	7	2	2	80
实验 3	7	3	3	95
实验 4	10	1	2	95
实验 5	10	2	3	65
实验 6	10	3	1	80
实验 7	13	1	3	80
实验 8	13	2	1	95
实验 9	13	3	2	65

药材预处理

将地榆、侧柏叶、干姜、蒲公英、银杏叶、枇杷叶、甘草打粉，过 40 目筛备用。

3) 有效成分提取率的测定^[64]

精密吸取一定量的提取液，加适量溶剂定容，0.45μm 有机滤膜，按相应色谱条件进行测定，记录峰面积并计算提取液中姜辣素、没食子酸含量；采用紫外分光光度法进行测定总黄酮含量，结合药材中姜辣素、没食子酸、黄酮含量，计算有效成分提取率。计算公式如下：

$$\begin{aligned} \text{姜辣素提取率} &= \frac{\text{提取液中姜辣素量}}{\text{干姜药材中姜辣素量}} \\ \text{没食子酸提取率} &= \frac{\text{提取液没食子酸量}}{\text{地榆药材中没食子酸量}} \\ \text{黄酮提取率} &= \frac{\text{提取液中黄酮量}}{\text{药材中黄酮量}} \end{aligned}$$

4) 干浸膏得率的测定^[65]

精密吸取一定量的提取液，减压回收溶剂至适量，转移至恒重并称重的蒸发皿中，于

70℃水浴锅上浓缩至适量，再转移至真空干燥箱中 70℃干燥成干浸膏，取出置干燥器冷却，冷后迅速取出称定重量，并计算干浸膏得率。计算公式如下：

$$\text{干浸膏得率} = \frac{\text{干浸膏的质量}}{\text{取用药材的质量}} \times 100\%$$

5) 提取工艺的验证

按照上述最优提取工艺条件制备生发复方提取物，对其干浸膏得率进行计算；精密称取提取物 1.0g，置 100ml 容量瓶中，60%乙醇溶解，超声 15min，冷却至室温，定容至刻度，0.45μm 滤膜过滤，取续滤液，按相应条件对提取物中主要药效成分进行含量测定，确定提取物主要药效成分含量，为生发复方提取物质量标准的建立提供依据。

6) 结果处理

试验结果以姜辣素、没食子酸、黄酮提取率及干浸膏得率为评价指标，进行综合评分，评分方法为：综合得分=0.3*总黄酮提取率+0.2*姜辣素提取率+0.2 没食子酸*+0.3*干浸膏得率，以此筛选得到最佳提取工艺。

2.3.3.3 生发复方制剂工艺的优化

凝胶剂应有良好的皮肤生物相容性及药物释放性、无明显毒性及刺激性，外观状态稳定。对凝胶剂需加入保湿剂、防腐剂和透皮吸收促进剂等必要成分，通过正交试验获得最优制剂工艺。

2.3.3.3.1 溶剂及助溶剂

1) 溶剂及助溶剂的选择

生发复方组合物提取方法为 60%乙醇提取，所得提取物浸膏可溶解于低浓度乙醇中，由于乙醇对皮肤有明显刺激性,会对皮肤及毛囊细胞造成损坏等副作用，故尽量选用低浓度乙醇作为制剂溶剂。

PEG400 可增加水溶性差物质溶解性，其作为外用制剂时，具有一定得保湿作用，满

足凝胶制剂要求，可增加提取物溶解性，减少乙醇用量，降低乙醇副作用，故选择 PEG400 作为制剂助溶剂。

2) 单因素考察溶剂最低用量

称取生发复方提取物 0.1g 三份，分别加入 0.5g20%、40%、60% 乙醇，使用超声辅助溶解，观察 3min 内提取物溶解状况。

3) 单因素考察助溶剂用量

称取 0.1g 生发复方提取物，结合上述实验结果，分别按 40 乙醇：PEG400 = 1:1、1:0.5 比例，降低醇用量，使用超声辅助溶解，观察 3min 内提取物溶解状况。

2.3.3.3.2 凝胶基质卡波姆的含量

1) 凝胶卡波姆基质的制备

分别称取卡波姆适量,一定量去离子水充分溶胀,制备 1%、2%、3% 的卡波姆基质。

2) 单因素考察卡波姆含量的影响

A.考察温度对不同卡波姆含量所制凝胶稳定性的影响

耐热实验：将各凝胶放置于敞口试管内，将其置于 55℃ 恒温干燥箱内 6h 后取出观察有无粘度明显变化及明显水分流失现象。

耐寒实验：将各凝胶放置于敞口试管内，将其置于 -15℃ 冰箱内 24h 后取出观察有无粘度明显变化。

B.考察离心对不同凝胶基质所制凝胶稳定性的影响

取凝胶各 10g，装于离心管中，在 4000r/min 条件下离心 30min 后观察是否有分层现象。

C.考察对不同含量卡波姆凝胶所制凝胶流动性差异

取各凝胶，置于清洁玻璃板一端，均匀涂布在 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 的面积内，将玻璃板置于 40℃

恒温箱中并倾斜 30°角，放置 10min 后观察凝胶流动情况，统计其移动距离。

D.考察对不同含量卡波姆凝胶所制凝胶流变性差异

使用 5mL 注射器吸取各凝胶，缓慢推出，感受推出阻力，轻微阻力说明流变性较好，无阻力感、凝胶自动流出或推出阻力较大则说明流变性差，以此评价凝胶的流变性。

E.考察对不同含量卡波姆凝胶所制凝胶基质黏度差异

使用粘度测量仪对各凝胶进行粘度测量，记录粘度仪稳定时结果。

F.对不同含量卡波姆所制凝胶进行感官指标评价

将各凝胶涂抹于手背，评价其覆盖能力、粘稠程度、涂展性等指标。

2.3.3.3.3 保湿剂

2.3.3.3.3.1 保湿剂的选择

凝胶剂含水量决定着基质的粘着性，直接影响患者使用感受，加入适量保湿剂可改善基质稠度，避免涂抹于皮肤后基质干燥而结成硬膜。且凝胶剂长时间放置容易失水,保湿剂的加入可改善此现象。常用的保湿剂有甘油、丙二醇、山梨醇等，保湿剂用量最佳范围为 10%-60%。

2.3.3.3.3.2 单因素考察保湿剂用量

以甘油、丙二醇及二者的不同比例混合物作为保湿剂，总量为 3g。加入适量凝胶基质，并加水至 10g。所得凝胶放置于 55±5℃条件下，于 0、12h 时分别称定重量，计算终点失水率和终点保湿率，以终点保湿率为指标，考察最佳保湿剂或组合。

$$\text{终点失水率} = \frac{(M_0 - M_{12})}{M_{\text{湿}}} \times 100\%$$

$$\text{终点保湿率} = 1 - \text{终点失水率}$$

其中 M_0 为 0h 凝胶重量， M_{12} 为 12h 凝胶重量， $M_{\text{湿}}$ 为凝胶加入水分和保湿剂的重量之和。

2.3.3.3.4 香精

1) 香精的选择

适量的香精能调节凝胶剂提取物中的气味，涂抹时可带来清爽、愉悦的感觉。薄荷脑具有薄荷清凉特点，可使皮肤和粘膜有清凉感觉。故选用薄荷脑作为凝胶剂所用香精。

2) 单因素考察香精用量

制备凝胶，所得凝胶按比例加入 1%、2%、3%、5%、8%香精，对其气味及使用感进行评价。

2.3.3.3.5 正交优化实验优化制剂处方

依据文献及水凝胶处方特性，各原辅料范围见表 2-8：

表 2-8 原辅料配方范围

Table2-8 Formulation Range of Raw Materials and Accessories

名称	配方范围
2% 卡波姆	30-50%
40% 乙醇	10-20%
PEG400	10-20%
甘油	10-20%
丙二醇	10-20%
香精	适量

在单因素考查的基础上，以 2%卡波姆用量、甘油用量、丙二醇、三乙醇胺用量作为考察因素,以各处方制剂的外观性状、粘度及感官指标包括光泽性、涂展性、均匀度、稳定性及保湿性作为评价标准进行综合考察及评分，粘度采用粘度测量仪进行测定，感官指标评价标准见表 2-9。

表 2-9 感官指标评分标准

Table2-9 Scoring Criteria for Sensory Indicators

指标	分值			
	优	良	中	差
光泽性(2.0 分)	表面光滑呈亮紫红色 (1.6 ~ 2.0 分)	表面平整有亮泽 (1.0 ~ 1.5)	表面呈紫红色但无光泽 (0.5 ~ 0.9)	无光泽且表面有可见颗粒 (0 ~ 0.4)
涂展性(2.0 分)	易于涂布 (1.6 ~ 2.0 分)	可涂布但细腻度较差 (1.0 ~ 1.5)	可涂开但涂布性差 (0.5 ~ 0.9)	黏性大不宜涂开 (0 ~ 0.4)
均匀度(2.0 分)	细腻 (1.6 ~ 2.0 分)	较细腻 (1.0 ~ 1.5)	较粗糙 (0.5 ~ 0.9)	粗糙 (0 ~ 0.4)
离心性(2.0 分)	均匀外观不变 (1.6 ~ 2.0 分)	无分层现象 (1.0 ~ 1.5)	表面有微小颗粒 (0.5 ~ 0.9)	分层 (0 ~ 0.4)
保湿性(2.0 分)	保湿性好，有水润感 (1.6 ~ 2.0 分)	保湿性较好，润滑 (1.0 ~ 1.5)	保湿性适中 (0.5 ~ 0.9)	厚重，油腻 (0 ~ 0.4)

每因素设置 3 个水平，进行 $L_9 (3^4)$ 的正交试验筛选得到最优制剂处方，具体正交因素及水平如表 2-10 所示。

表 2-10 $L_9 (3^4)$ 正交试验因素及水平表

Table2-10 Factors and Level Table of Orthogonal Test

水平	因素
----	----

2%卡波姆用量 (% , A)		三乙醇胺用量 (% , 甘油用量 (% ,B)丙二醇用量 (% ,C)		
1	3	1	1	0.5
2	4	1.5	1.5	1
3	5	2	2	1.5

2.3.3.3.6 透皮促进剂的选择

在处方优化的基础上，按下表 2-11 加入透皮促进剂制备凝胶：

表 2-11 透皮促进剂添加量

Table2-11 Transdermal accelerator dosage				
名称	处方 1	处方 2	处方 3	处方 4
氮酮	0%	3%	3%	0%
冰片	3%	0%	3%	0%

透析膜的处理：透析膜在 50%乙醇水浴条件下保持微沸 1h，结束后使用 10mmol/L 的碳酸氢钠、1mmol/L 的 EDTA 溶液及蒸馏水各洗涤两次，完成后在蒸馏水中加热除去残留的 EDTA，放置于 4℃的蒸馏水中备用。

释放实验条件：扩散池面积 1.5cm²，接受池体积 16ml，磁力搅拌速度 500r/min，水域温度 32℃，接受液为 30%乙醇-PBS。

释放试验方法：将处理好的透析膜固定于扩散池与接受池之间，接受液液面与透析膜下层接触，无气泡，扩散池加入生发凝胶 1.0g，均匀涂抹与透析膜接触，设定好上述条件，分别于 0.5、1、2、4、8、12、24h 定时取样 5ml，及时补充新鲜接受液。

2.3.3.3.7 凝胶制备工艺流程

工艺流程图如下图 2-1 所示。



图 2-1 凝胶制备工艺流程

Fig.2-1 Preparation process of gel

2.3.4 生发复方对 C57BL/6 脱发小鼠的促生发作用研究

分别制备生药含量为 10g、20g、30g/100g 水凝胶，研究其初步生发功效，结合脏器指数与血生化指标，结合体重变化判断其有无毒性。

2.3.4.1 脱发小鼠模型的建立

方法同“2.3.1”

2.3.4.2 分组与给药

依造模结果将造模成功的小鼠均匀分组为 5 组使各组小鼠毛发生长情况相同，即模型组，阳性组，生发水凝胶低、中、高剂量，三组含量分别为每 100g 水凝胶含生药量 10g、20g、30g，每组 6 只，模型组项部涂抹空白凝胶 0.2ml/只，阳性组项部涂抹米诺地尔酊剂

0.2ml/只，其他各组涂抹相应药物 0.2ml/只，以注射器吸取，观察小鼠生发状况。

表 2-12 小鼠分组与给药 (n=6)

Table2-12 Grouping and dosage (n=6)

组别	试剂	给药量
模型组	空白凝胶	0.2ml/只
米诺地尔组	米诺地尔酊剂	0.2ml/只
生发低剂量组	含生药量 10g/100g 水凝胶	0.2ml/只
生发中剂量组	含生药量 20g/100g 水凝胶	0.2ml/只
生发高剂量组	含生药量 30g/100g 水凝胶	0.2ml/只

2.3.4.3 检测指标

1) 实验期间对小鼠状态进行观察及拍照；

2) 评分

方法同“2.3.1.4”

3) 小鼠毛长毛重的采集

方法同“2.3.1.4”

4) 脏器指数

称量小鼠体重，处死小鼠，摘取心、肝、脾、胰、腺、肾脏 5 各器官，称量并计算相对重量；

5) 血生化指标采集

连续给水凝胶21天后，毛细血管眼部取血，低温离心后取上清液，通过全自动生化仪测定血清中AST、ALP及ALT等血生化指标。

6) 病理切片的观察

方法同“2.3.1.6”

2.4 实验结果

2.4.1 抗炎和脱发动物模型的建立

2.4.1.1 二甲苯致急性小鼠耳肿胀模型的建立

2.4.1.1.1 二甲苯保留时间的优选结果

考察二甲苯保留时间为 15、30、45、60min 的耳厚度，结果如下图 2-2

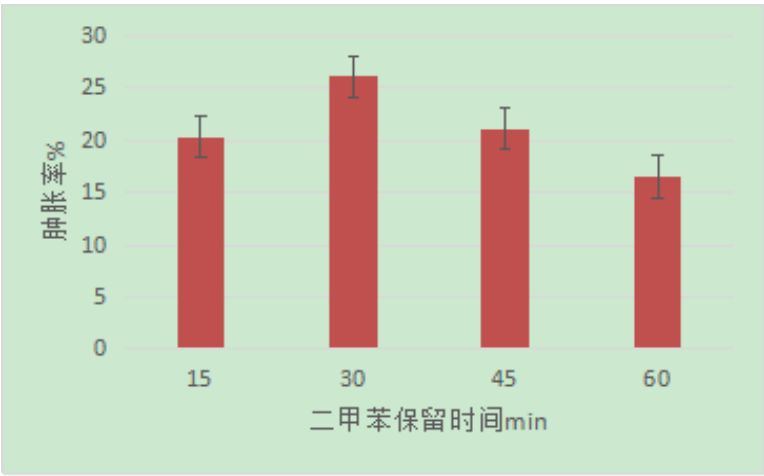


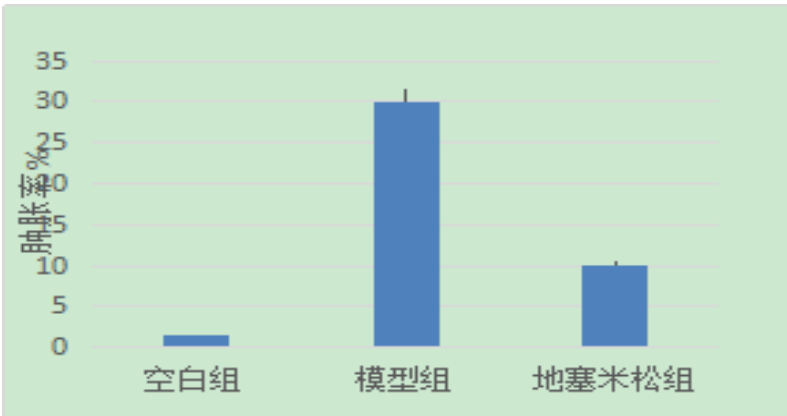
图 2-2 二甲苯作用时间肿胀率比较 (n=6 , $\bar{x}\pm SD$)

Fig.2-2 Comparison of swelling rate of xylene in action time (n=6 , $\bar{x}\pm SD$)

由图 2-2 可见，随着二甲苯保留时间的增加，各组鼠肿胀率下增加后减小，30min 左右达到最大。因此选择最佳时间为 30min。

2.4.1.1.2 模型条件的验证

比较阳性药地塞米松与空白对照和模型组耳肿胀率的差异，验证试验条件。



注：与模型组和空白组比较，地塞米松组 $p < 0.001$

图 2-3 模型条件的验证 ($n=6$, $\bar{x}\pm SD$)

Figure 2 -3 Validation of model conditions ($n=6$, $\bar{x}\pm SD$)

由图 2-3 可见，与模型组相比，地塞米松组肿胀率显著降低，说明模型构建成功。

2.4.1.2 脱毛动物模型的建立

2.4.1.2.1 体重的记录结果

每三日对小鼠体重进行称量，记录各组小鼠体重变化及小鼠状态差异。

表2-13 不同脱毛剂小鼠体重的影响 (g ; $n=6$; $\bar{x}\pm SD$)

Table 2-13 Effect of different depilatory agents on body weight of mice (g ; $n = 6$; $\bar{X} \pm SD$)

组别	小鼠体重 g		
	1d	9d	15d
“薇婷”脱毛膏组	23.30±1.37	24.86±1.12	24.97±1.33
Na ₂ S6%组	23.57±1.15	25.34±0.84	25.70±1.36
松香/石蜡组	23.22±1.20	24.88±1.31	25.23±1.09

由表可见，给药 15 天后，各组小鼠体重无显著差异，表明脱毛剂对小鼠体重无显著作用。小鼠状态良好，精神良好，未脱毛区毛发顺滑，体重略有增加，摄食饮水正常。

2.4.1.2.2 脱毛效果评分

对脱毛效果分级评定，如下表 2-14：

表2-14 脱毛效果外观分级评定 (只)

Table 2-14 Appearance grading evaluation of depilation effect

脱毛方法	优	良	中	差
脱毛膏	4	0	0	0
Na ₂ S	2	1	1	0
松香石蜡 (1:1)	2	0	1	1

脱毛膏法脱毛后皮肤干净光滑，无毛发残留；Na₂S 组脱毛后，有少量毛发残留，皮肤光滑微红；松香石蜡（1:1）组脱毛后，有少量毛发残留，部分出现红点，该组脱毛效果整体不均匀。

2.4.1.2.3 毛发生长评分

于脱毛后第6/9/12/15d评分，结果见下表2-15：

表2-15 脱毛效果外观评分 ($\bar{x}\pm SD$; n=6)

Table 2-15 Appearance score of depilation effect ($\bar{x}\pm SD$; n = 6)

脱毛方法	剂量	脱毛后毛发情况积分			
		6d	9d	12d	15d
脱毛膏	0.2ml	1.15±0.45	1.75±0.30	2.75±0.22	3.50±0.45
硫化钠	6%	1.20±0.30	2±0.45	3.25±0.30	4.10±0.31
松香石蜡	1ml	1.35±0.12	2.15±0.50	3.50±0.45	4.50±0.45

实验第 15 天时，各组小鼠背部已长出明显毛发，脱毛膏组与硫化钠组毛发生长速度一致，呈平稳生长趋势，但均匀性不及后者；松香石蜡组初期毛发生长缓慢，后期毛发生长迅速且超过前两组，均匀性更差。

2.4.1.2.4 小鼠毛发量的差异

实验终点取毛发的毛长毛重，计算毛密度如下表 2-16：

表2-16 小鼠毛发量的差异 (g ; n=6 , $\bar{x}\pm SD$)

Table 2-16 Difference of hair quantity in mice (g; n = 6, $\bar{X} \pm SD$)

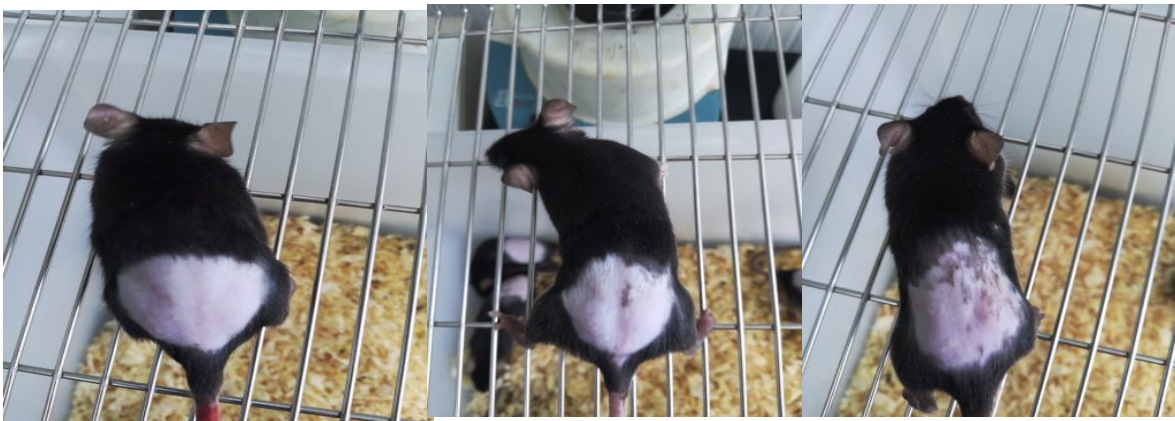
组别	毛长mm	毛重mg
脱毛膏组	6.2±0.8	6.11±0.34

硫化钠组	7.1±0.5	6.92±0.33
松香石蜡组	7.3±0.7	7.23±0.44

结果显示，松香/石蜡组再生毛重大于硫化钠组和脱毛膏组，说明其对毛囊损伤最小。

2.4.1.2.5 小鼠照片实例

脱毛后第 1d 照片：



脱毛膏组

硫化钠组

松香石蜡组

图 2-4 刚脱毛照片

Fig.2-4 Photo of initial depilation

脱毛后第 15d 照片：



脱毛膏组

硫化钠组

松香石蜡组

图 2-5 15d 小鼠照片

Fig. 2-5 Photos of 15d mice

由图 2-2, 2-3 可见，刚脱毛时，脱毛膏在效果最好，脱毛干净，无残余细毛，脱毛后 15d，脱毛膏组毛发生长不均匀，情况不如硫化钠和松香石蜡组，硫化钠组脱毛最均匀。

体现了脱毛膏对小鼠背部皮肤的破坏作用。

2.4.1.2.6 咪喹莫特诱导后毛囊观察

分别取正常小鼠，刚脱毛小鼠，涂抹咪喹莫特后的小鼠皮肤，切片观察如下图：

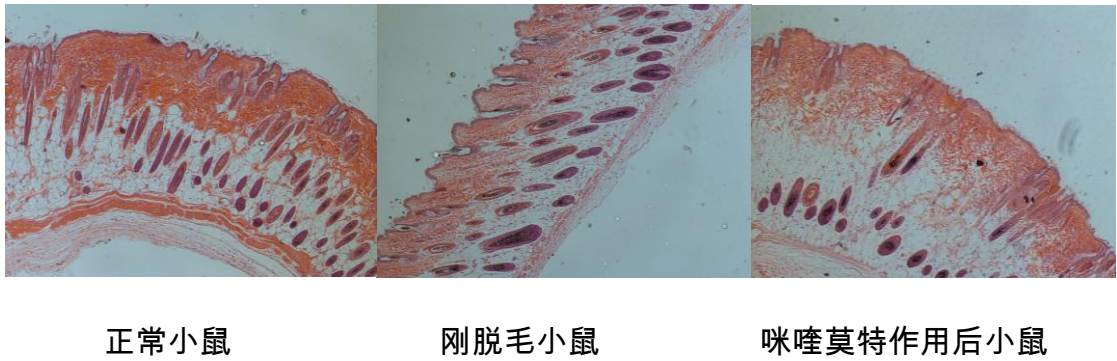


图 2-6 造模前后 HE 染色图

Fig. 2-6 HE staining before and after modeling

由图 2-6 可见，相对正常小鼠，脱毛剂刚脱毛后毛囊数量无显著差别，皮肤外层轻微损伤，涂抹咪喹莫特成功使小鼠毛囊萎缩，数量减少，造模成功。

2.4.2 生发复方的筛选结果

2.4.2.1 复方 1 到 4 药材提取结果

四种复方组合物 60% 醇提物提取收率如下表 2-17 所示。

表 2-17 中药提取物得率

Table 2-17 Yield of Chinese herbal medicine extracts

复方	得率%
方 1	21.6
方 2	22.3
方 3	20.5
方 4	19.7

由表 2-17 可见，因提取条件相同，四种复方的提取率相近，都在 20% 左右。

2.4.2.2

2.4.2.3 四种复方提取物水凝胶对小鼠耳肿胀急性炎症模型作用结果

以二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型作用结果评价四种复方组合物凝胶抗炎活性，结果如下表 2-18 所示。

表 2-18 小鼠耳肿胀急性炎症模型作用结果 (N=6； $\bar{x}\pm SD$)

Table2-18 Effects of acute inflammation model of ear swelling in mice (N=6； $\bar{x}\pm SD$)

组别	肿胀度%	肿胀抑制率%
模型组	25.63±2.34	-
地塞米松组 (阳性组)	13.37±2.90*	42.92
方 1*	19.43±5.30*	31.14
方 2	18.87±2.49*	33.6
方 3	17.62±1.67*	35.2
方 4	15.94±1.50*	37.39

与模型组比较，*p<0.05

由表 2-18 可见，模型组小鼠造模后致炎耳出现肿胀现象。药材含量相同条件下，给予方 4 提取物凝胶的小鼠耳肿胀程度最低，肿胀抑制率达到 37.39%，表明方 4 比其他方有更好的抗炎效果，但仍不及阳性药地塞米松。

2.4.2.4 复方 5 到 8 药材提取结果

四种复方组合物 60%醇提物提取收率如下表 2-19 所示。

表 2-19 中药提取物得率

Table 2-19 Yield of Chinese herbal medicine extracts

复方	得率%
方 5	22.7
方 6	23.1
方 7	20.5
方 8	21.3

由表 2-19 可见，因提取条件相同，四种复方的提取率相近，都在 20%到 24%。

2.4.2.5

2.4.2.6 四种复方提取物水凝胶对小鼠耳肿胀急性炎症模型作用结果

以二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型作用结果评价四种复方组合物凝胶抗炎活性，结果如下表 2-20 所示。

表 2-20 小鼠耳肿胀急性炎症模型作用结果 (N=6； $\bar{x}\pm SD$)

Tabl2-20 Effects of acute inflammation model of ear swelling in mice (N=6； $\bar{x}\pm SD$)

组别	肿胀度%	肿胀抑制率%
模型组	23.42±4.07	-
地塞米松组 (阳性组)	11.29±2.31*	44.19
方 5	18.36±4.11*	32.30
方 6	16.42±3.12*	38.53
方 7	14.12±2.05*	43.27
方 8	16.54±2.39*	37.21

与模型组比较，*p<0.05

由表 2-20 可见，模型组小鼠造模后致炎耳出现肿胀现象，阳性药地塞米松组肿胀度低，说明造模成功。药材含量相同条件下，给予方 7 提取物凝胶的小鼠耳肿胀程度最低，肿胀抑制率达到 37.39%，表明方 7 比其他方有更好的抗炎效果，并且接近阳性药地塞米松。

2.4.2.7 利用 C57 小鼠脱发模型筛选不同生发新组合物

2.4.2.7.1 小鼠背部毛发生长评分

在实验期间对小鼠生发状况评分，

表 2-21 小鼠生发状况评分 (n=6)

Table 2-21 Hair score of mice (n=6)

组别	评分					
天数	1d	4d	8d	12d	16d	20d

模型组	0.5	0.5	0.67	1	1.67	3
阳性组	0.5	0.83	1.5	2.5	3.67	4.33
方 5	0.5	0.83	1.16	2	3.16	4
方 6	0.5	1	1.33	2.33	3.5	4.67
方 7	0.5	0.83	1.67	2.67	3.83	4.33
方 8	0.5	0.83	1.33	2.16	3.33	4.16

实验给药共 20 天，模型组长出浅毛，阳性组和方 6 组小鼠毛发生长接近完全，证明造模成功，表观生发评价显示，中剂量+ α -KB 组的生发效果高于阳性药米诺地尔组，其次为生发中、高剂量组，而低剂量组与 α -KB 组效果相近且高于模型组。

2.4.2.7.2 小鼠体重与脏器系数

对实验终点各组小鼠体重、相对脾重进行统计，结果如下表 2-22 所示：

表 2-22 小鼠体重及脾脏指数 (N=6； $\bar{x}\pm SD$)
Table2-22 Mouse body weight and spleen index (N=6； $\bar{x}\pm SD$)

组别	体重/g	脾脏指数
正常组	20.35±1.85	0.0089±0.0008
模型组	19.77±1.41	0.0120±0.0012
方 5	19.62±0.18	0.0072±0.0011
方 6	19.41±1.81	0.0121±0.0013
方 7	19.85±0.26	0.0231±0.0013
方 8	19.88±1.43	0.0123±0.0012

与模型组比较，*p<0.05

由上表 2-22 可以看出，各实验组体重相对稳定，与对照组无显著性差异。说明生发中草药复方未对小鼠产生显著毒性。

2.4.2.7.3 小鼠毛长毛重及密度的影响

实验终点测量各组小鼠毛长毛重，记录如下表 2-23：

表 2-23 各组小鼠毛长毛重表 (n=6 , $\bar{x}\pm SD$)

Table2-23 Gross weight of mice in each group (n = 6, $\bar{x}\pm SD$)

组别	毛长 mm	毛重 mg	毛密度
模型组	2.68±0.66	6.40±1.03	2.39
阳性组	6.48±0.25	19.11±0.76	2.95
方 5	6.11±0.84	17.91±1.12	2.77
方 6	6.44±0.64	19.08±0.84	2.96
方 7	6.50±0.88	20.13±0.68	3.1
方 8	6.51±0.92	19.23±0.73	2.82

与模型组比较，*p<0.05

由表 2-23 可见，模型组较短，阳性组显著较模型组长，造模成功。密度由大到小依次为方 7>方 6>阳性组>方 8>方 5>模型组。说明复方 7 组合更有利于毛发增多。

2.4.2.7.4 各指标总结如下表

对各指标作分级评定，效果由强到弱分为优良中差四个等级，结果如下 2-24：

表 2-24 各组小鼠综合比较

Table 2-24 Comprehensive comparison of mice in each group

组别	抗炎	生长评分	毛发长度	毛发重量	毛发密度
模型组	差	差	差	差	中
阳性组	优	优	优	优	优

方 5	良	中	良	良	良
方 6	优	优	优	良	优
方 7	优	优	良	优	优
方 8	优	良	良	良	优

由表 2-24 可见，方 6 的生发评分与毛长觉最佳，但是其毛发密度不及方 7，且方 7 组毛发长度与评分与 6 相差不大，鉴于生发复方对毛发密度的重要性大于毛长，因此选择方 7 位最佳中草药复方。即方 7：侧柏叶、地榆、干姜、枇杷叶、银杏叶、蒲公英、甘草 2:2:2:1:1:1:1

2.4.3 提取与制剂工艺优化结果

2.4.3.1 生发复方提取工艺的优化

2.4.3.1.1 提取方法单因素考察

采用分光光度法对不同提取方法第一次提取滤液中总黄酮含量进行分析，结果如下表 2-25：

表 2-25 不同提取方法第一次提取滤液总黄酮含量检测结果

Table2-25 Test results of total flavonoids in the first extraction filtrate by different extraction methods

不同提取方法	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
常规提取（第 1 次滤液）	1.58	0.55	0.31
搅拌提取（第 1 次滤液）	1.96	0.68	0.42
红外辅助提取（第 1 次滤液）	1.73	0.60	0.35
超声辅助提取（第 1 次滤液）	1.76	0.63	0.32

由表 2-25 可见，对于不同提取方法，搅拌提取提取液中总黄酮、姜辣素与没食子酸含量最高，且明显高于常规提取提取液中总黄酮含量，说明最佳提取方法为搅拌提取。

2.4.3.1.2 提取次数单因素考察

采用分光光度法对不同提取次数提取液中总黄酮含量进行分析，结果如下：

表 2-26 不同提取次数滤液总黄酮含量检测结果

Table2-26 Test results of total flavonoids in filtrate with different extraction times

不同提取次数	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
1 次	2.76	0.61	0.44
2 次	1.77	0.55	0.43
3 次	0.47	0.33	0.22
4 次	0.14	0.13	0.08

由表 2-26 可见，对于不同提取次数，第一次提取时，提取物总黄酮、姜辣素与没食子酸含量最高，随着提取次数的增加，提取液总黄、姜辣素与没食子酸含量逐渐下降，提取 3 次时提取液中含量较少，因此选择最佳提取次数为 2 次；

2.4.3.1.3 提取时间单因素考察

采用分光光度法对不同提取时间提取液中总黄酮含量进行分析，结果如下：

表 2-27 不同提取时间滤液总黄酮含量检测结果

Table2-27 Test results of total flavonoids in filtrate at different extraction times

不同提取时间	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
1h	2.05	0.48	0.31
2h	3.18	0.55	0.45
3h	3.39	0.58	0.48

由表 2-27 可见，对于不同提取时间，2h 时提取液中总黄酮含量达到最高，3h 趋于稳定因此选用最佳提取时间为 2h。

2.4.3.1.4 提取温度单因素考察

采用分光光度法对不同提取温度提取液中总黄酮含量进行分析，结果如表 2-28：

表 2-28 不同提取温度滤液总黄酮含量检测结果

Table2-28 Test results of total flavonoids in filtrate at different extraction temperatures

不同提取温度℃	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
65	2.16	0.36	0.22
80	3.28	0.47	0.44
95	3.46	0.52	0.49

由表 2-28 可知，对于不同提取温度，950℃时提取液中总黄酮增加不明显，65℃时提取液中总黄酮较低，因此认为 80 摄氏度提取效果较佳。

2.4.3.1.5 提取料液比单因素考察

采用分光光度法对不同提取料液比提取液中总黄酮含量进行分析，结果如表 2-29：

表 2-29 不同提取料液比滤液总黄酮含量检测结果

Table2-29 Test results of total flavone content in filtrate with different extraction ratio

不同提取料液比	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
7 倍	3.15	0.23	0.38
10 倍	3.72	0.33	0.42
13 倍	3.98	0.35	0.46

由表 2-29 可知，对于不同倍数溶剂，15 倍时提取液中总黄酮增加不明显，5 倍时提取液中总黄酮较低，因此认为 15 倍溶剂提取效果较佳。

2.4.3.1.6 提取方法多因素考察

比较生发复方 60% 醇提物搅拌提取、红外辅助提取、搅拌+红外辅助提取提取物中总黄酮含量进行分析，结果如下表 2-30:

表 2-30 不同提取方法第一次提取滤液总黄酮含量检测结果

Table 2-30 Test results of total flavonoids in the first extraction filtrate by different extraction methods

不同提取方法	总黄酮含量%	姜辣素含量%	没食子酸含量%
搅拌提取（第 1 次滤液）	1.96	0.46	0.42

红外辅助提取 (第 1 次滤液)	1.73	0.33	0.35
搅拌+红外辅助提取 (第 1 次)	2.57	0.62	0.49

由表 2-30 可见，对于不同提取方法，搅拌+红外辅助提取提取液中总黄酮含量最高，选用最佳提取方法为搅拌+红外辅助提取。

2.4.3.1.7 正交设计优化提取工艺

在单因素考察的基础上，对溶剂料液比、提取实间、提取次数及提取温度进一步优化，评价总黄酮、姜辣素、没食子酸及干浸膏得率，共计九次实验，考察设计如表 2-31：

表 2-31 正交试验结果
Table2-31 Orthogonal test results

序号	溶剂用 量 (倍 , A)	提取时 间(h ,B) (次 , C)	提取 次数 D)	提取温 度 (°C , D)	含量 %			干浸膏 得率 %	综合得 分
					总黄酮	姜辣素	没食子 酸		
实验 1	7	1	1	65	3.54	0.81	0.22	16.88	3.932
实验 2	7	2	2	80	3.61	0.42	0.43	17.53	4.112
实验 3	7	3	3	95	4.55	0.71	0.44	17.10	4.325
实验 4	10	1	2	95	3.83	0.21	0.38	15.60	3.547
实验 5	10	2	3	65	4.27	0.17	0.4	17.56	4.263
实验 6	10	3	1	80	4.35	0.47	0.35	16.17	3.92
实验 7	13	1	3	80	4.67	0.35	0.41	19.40	4.973
实验 8	13	2	1	95	4.17	0.51	0.4	14.45	3.368

实验 9	13	3	2	65	3.93	0.37	0.45	17.02	4.049
均值 1	12.369	12.454	11.220	12.244					
均值 2	11.729	11.740	11.706	13.005					
均值 3	12.389	12.293	13.561	11.239					
极差	0.6598	0.7142	2.3411	1.7663					

综合得分=0.3*总黄酮提取率+0.2*姜辣素提取率+0.2 没食子酸*+0.3*干浸膏得率，以此筛选得到最佳提取工艺。

表 2-32 方差分析表
Table2-32 ANOVA Table

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	251.606	2	125.803	1.445	
B	96.658	2	48.329	0.555	
C	473.409	2	1236.703	12.719	P<0.05
D	347.756	2	328.8795	2.972	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.05}(2, 2) = 9.00$

由表 2-31 , 2-32 结果可见，四个因素中，对总黄酮、姜辣素、没食子酸提取率及干浸膏得率的影响大小依次为 C>D>B>A，即提取次数对总黄酮、姜辣素、没食子酸提取率及干浸膏得率的影响最大，提取温度次之，溶剂倍数影响最小，且各影响因素的水平大小依次是 A3>A1>A2，B1>B3>B2，C3>C2>C1，D2>D1>D3，其中 C 因素的影响具有显著性意义 (P<0.05)，因此 C 因素可选择 C3，而因素 A、B、D 对总黄酮、姜辣素、没食子酸提取率及干浸膏得率无显著性影响。根据实际生产成本和难易程度，优化提取方法为溶剂用量 10 倍，提取次数 3 次，提取时间 2h，提取温度 80℃。

2.4.3.1.8 提取工艺的验证

对最优提取工艺条件下制备所得生发复方提取物得率进行计算，并对其中主要药效成

分总黄酮、没食子酸、姜辣素进行含量测定，测定结果如下表：

表 2-33 提取工艺验证结果				
Table2-33 Verification results of extraction process				
	含量%			干浸膏得率%
	总黄酮	姜辣素	没食子酸	
原方法	3.51	0.26	0.30	19.68
优化后方法	3.92	0.40	0.36	23.53

由表 2-33 可以看出，最优提取工艺条件下提取物浸膏得率提升到 23.53%，各指标成分也得到显著提升。

2.4.3.2 制剂工艺的优化

2.4.3.2.1 乙醇最低浓度用量

称取生发复方提取物 0.1g 三份，分别加入 1.0g20%、40%、60% 乙醇，3min 内提取物溶解状况如下表 2-34。

表 2-34 生发提取物溶解情况	
Table2-34 Dissolution of compound extract	
乙醇浓度%	溶解情况
20	3min 未完全溶解
40	2min 内完全溶解
60	2min 内完全溶解

称取生发复方提取物 0.103g，加入 1.0g40 乙醇，使用超声辅助溶解，对结果进行验证，结果如下表 2-35:

表 2-35 生发复方提取物溶解情况

Table 2-35 Dissolution of compound extract

40% 乙醇加入量/g	溶解情况
1.0	2min 内完全溶解

由表 2-35 可得，溶解 0.1g 生发复方提取物的最低乙醇浓度为 40%。

结合表 2-34, 2-35 可得，溶解 0.1g 生发复方提取物的最低适乙醇含量为 40%。

2.4.3.2.2 添加 PEG400 后 40% 乙醇最低用量

加入增溶剂后，3min 内提取物溶解状况如下表 2-36。

表 2-36 生发提取物溶解情况

Table 2-36 Dissolution of compound extract

生发提取物称量/g	40 乙醇：PEG400	40 乙醇加入量/g	PEG400 加入量/g	溶解情况
0.102	1:1	0.75	0.75	3min 内完全溶解
0.103	1:0.5	0.75	0.38	3min 内完全溶解
0.101	1:1	0.5	0.5	3min 内完全溶解
0.11	1:0.5	0.5	0.25	3min 未完全溶解

由上表 2-36 可得，溶解 0.1g 生发提取物的最低溶剂用量为 40% 乙醇用量 0.5g，该条件下 PEG400 添加量比例为 40 乙醇：PEG400=1:1。

2.4.3.2.3 凝胶基质含量考察

A.温度对不同含量基质所制凝胶稳定性的影响

耐热实验：各凝胶均无明显水分流失现象，粘度均未见明显变化。

耐寒实验：各凝胶均无明显水分析出现象，粘度均未见明显变化。

B.离心对不同含量凝胶基质所制凝胶稳定性的影响

4000r/min 条件下离心 30min，各凝胶均无明显分层现象，粘度未见明显变化。

C.不同含量凝胶基质所制凝胶流动性、流变性、黏度及感官指标评价

不同含量凝胶基质所制凝胶流动性、流变性、黏度、感官指标评价结果见下表 2-37。

表 2-37 各含量基质流动性、流变性、黏度、感官指标评价
Table2-37 Evaluation of matrix fluidity, rheology, viscosity and sensory index

凝胶基质 类型	浓 度	感官评价	流动性 (移 动距离/cm)	流变 性	粘度 mPa s (*100)
卡波姆	1%	覆盖力较差，粘稠度低，微流动性，易有水分析出，成型性差	0.6	差	2.1
	2%	覆盖力好，粘度适宜，易覆于皮肤表面，成型性好	0.5	较好	3.5
	3%	覆盖力强，粘度大，易覆于皮肤表面，成型性良好	0.1	较好	9.0

由表 2-37 可见，1%卡波姆覆盖性、粘度不足，易有水分析出，3%卡波姆浓度过大可能会造成给药部位的厚重感加重引起不适，2%含量的凝胶基质较均匀，粘稠度适中，成型性好，容易涂展，流变性佳，粘度稳定，适合局部给药特性，故选卡波姆浓度为 2%。

2.4.3.2.4 单因素考察保湿剂用量

对不同比例的保湿剂甘油及丙二醇保湿性能进行考察，结果见下表 2-38:

表 2-38 保湿剂用量考察结果
Table2-38 Inspection results of humectant dosage

保湿剂类型	M ₀ /g	M ₁₂ /g	M _湿 /g	终点失水率%	终点保湿率%
甘油	10.62	9.09	6.43	23.81	76.19
甘油：丙二醇 2:1	10.37	8.92	6.21	23.41	76.59
甘油：丙二醇 1:1	9.98	8.04	5.93	32.74	67.26
甘油：丙二醇 1:2	10.24	8.10	6.22	34.42	65.58
丙二醇	9.88	7.84	5.67	35.94	64.06

由上表 2-38 可见，当保湿剂类型仅为丙二醇时，制得凝胶终点保湿率较低；随着甘油用量的增加，凝胶终点保湿率逐渐升高；当保湿剂类型为甘油：丙二醇 2:1 时，其终点保湿率最高，保湿性能最好。

2.4.3.2.5 单因素考察香精用量

向凝胶剂中加入不同比例香精，通过感官评价其气味及使用感，获得香精优化结果如表 2-39:

表 2-39 香精用量考察结果
Table 2-39 Investigation results of flavor dosage

香精加入剂量	1%	2%	3%	5%	8%
气味	较淡	适宜	适宜	略浓	非常浓
使用感	无	略清凉	清凉	较凉	非常凉

由上表 2-39 可见，香精加入量为 3% 时，凝胶剂气味较适宜，涂抹时使用感较好，有适宜清凉感，故选用香精加入量为 3%。

2.4.3.2.6 正交优化实验优化制剂处方结果

以 2% 卡波姆用量、甘油用量、丙二醇、三乙醇胺用量作为考察因素,对各处方制剂的

外观性状及粘度进行综合考察及评分，粘度值结果如下表 2-42:

表 2-40 生发复方水凝胶 L ₉ (3 ³) 正交试验因素及水平表						
Table 2-40 Factors and levels of orthogonal test for compound hydrogel L9 (33)						
序号	2%卡波姆	甘油用量		三乙醇胺	感官指标 评分	粘度*100
	用量 (% ,	丙二醇用		用量 (% ,		
	A)	(% , B) 量 (% , C)		C)		
实验 1	30	10	10	0.25	7.1	19
实验 2	30	15	15	0.5	8.3	37
实验 3	30	20	20	1	7.5	43
实验 4	40	10	15	1	7.6	40
实验 5	40	15	20	0.25	7.1	36
实验 6	40	20	10	0.5	8.7	49
实验 7	50	10	20	0.5	7.0	50
实验 8	50	15	10	1	6.4	54
实验 9	50	20	15	0.25	6.6	41
感官指标评分						
I	7.700	7.333	6.933	7.567		
II	7.933	7.867	7.633	7.533		
III	6.600	7.033	7.667	7.133		
R	1.333	0.834	0.734	0.434		
粘度						
I	32.000	35.333	39.667	31.333		
II	39.667	40.333	37.667	43.333		
III	46.667	42.667	41.000	43.667		
R	14.667	7.334	3.333	12.334		

表 2-41 方差分析表
Table2-41 ANOVA Table

	方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
感官指标	A	3.251	2	1.465	21.214	P<0.05
	B	0.123	2	0.068	1	
	C	0.365	2	0.216	2.234	
	D	2.103	2	1.125	15.123	P<0.1
粘度	A	311.2654	2	170.235	18.934	P<0.05
	B	90.156	2	41.325	5.652	
	C	17.149	2	9.156	1	
	D	301265	2	157.125	17.342	P<0.1

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.05}(2, 2) = 9.00$

由直观分析和方差分析结果可见，2%卡波姆用量、甘油用量、丙二醇、三乙醇胺用量四个因素中，对其外观及感官指标影响的大小依次为 A>D> B>C，即 2%卡波姆用量对凝胶剂外观及感官指标影响最大，三乙醇胺用量的影响次之，甘油、丙二醇用量的影响最小，且各影响因素的水平大小依次是 $A_2>A_1>A_3$ ， $B_2>B_1>B_3$ ， $C_3>C_2>C_1$ ， $D_1>D_2>D_3$ ，其中 A 因素的影响具有显著性意义（ $P<0.05$ ），因此 A 因素可选择 A_2 ，而因素 B、C、D 对凝胶剂外观及感官指标无显著性影响。对粘度结果发现，三乙醇胺对凝胶粘度存在较大影响。

因此，选用最佳制剂处方为 $A_2B_3C_1D_2$ ，即优化的制剂处方为：2%卡波姆 40%、甘油 10%、丙二醇 10%，三乙醇胺 0.5%。

2.4.3.2.7 采集 0.5 到 24h 的分离液，收集，以姜辣素为指标成分测定其中的含量，对结果进行线性回归分析，确认氮酮与冰片促透皮作用的强弱。

表 2-42 不同透皮剂作用比较
Table 2-42 Comparison of different transdermal agents

处方	线性方程	R	透皮速率 J/	$T_{lag}/h^{1/2}$	$Q/24h/(\mu$
----	------	---	---------	-------------------	--------------

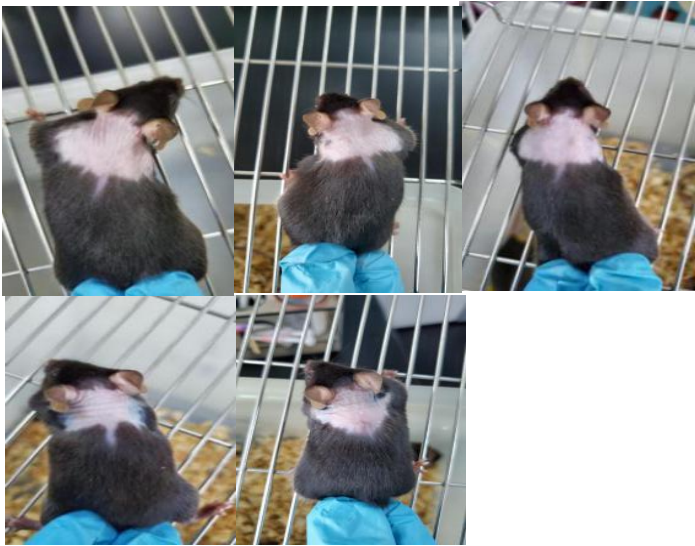
			($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)		$\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
处方 1	$Q=0.5023t^{1/2}-0.1427$	0.8657	0.6217	0.46	2.2249
处方 2	$Q=0.6859t^{1/2}-0.6013$	0.9842	0.5124	0.91	2.9046
处方 3	$Q=0.4312t^{1/2}-0.2398$	0.9337	0.7012	0.60	1.6915
处方 4	$Q=0.6519t^{1/2}-0.4156$	0.9816	0.4865	0.71	2.6287

结果可见，直观数据可以看出氮酮的透皮作用较冰片效果好，而氮酮与冰片合用并未表现出协同作用，因此选择使用 5% 的氮酮作为透皮促进剂。

2.4.4 生发复方对 C57BL/6 脱发小鼠的促生发作用研究

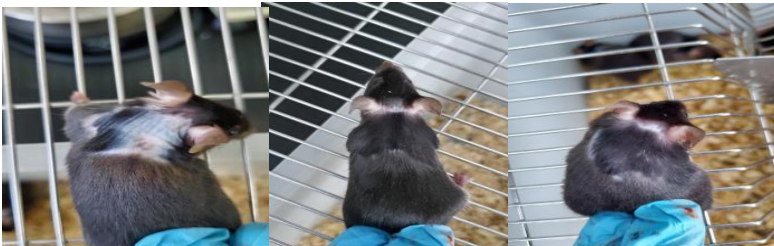
2.4.4.1 实验起点与终点小鼠照片

第 1 天 从左到右依次为模型组，米诺地尔组（阳性组），生发水凝胶低、中、高剂量组



给药第 1 天，大部分小鼠项部皮肤处于初始斑秃状态，边缘接近毛发区域皮肤有进入生长期的趋向，脱毛区皮肤均有轻微褶皱，变硬，出现轻微角质。

第 20 天 模型组，米诺地尔组，生发水凝胶低剂量组、中剂量组、高剂量组



给药第 20 天至实验终点，模型组小鼠部分脱毛区长出浅毛，米诺地尔组毛发接近生长完全，体现阳性药的生发功效显著。生发中、高剂量组相近无显著差别，低剂量组优于模型组，但不及前述两组。

2.4.4.2 毛发生长状况评分

每 4 日观察各组小鼠皮肤及被毛生长情况，对不同组起始项部颜色相同的小鼠进行比较，并对小鼠皮肤毛发生长情况进行评分，拍照并记录小鼠去毛区皮肤颜色由粉红色变成灰色的时间及由灰色至长满毛的时间：

表 2-43 各组小鼠毛发生长评分 (n=6)

Table2-43 Hair growth score of mice in each group (n = 6)

组别	评分					
	1d	4d	8d	12d	16d	20d
模型组	0.5	0.5	0.67	1.00	1.67	3.00
米诺地尔组	0.5	0.83	1.5	2.5	3.67	4.33
生发低剂量组	0.5	0.83	1.16	2.00	3.16	4.00
生发中剂量组	0.5	1.00	1.33	2.33	3.5	4.33
生发高剂量组	0.5	0.83	1.33	2.16	3.33	4.16

实验给药共 20 天，模型组长出浅毛，阳性组和中剂量+α-KB 组小鼠毛发生长接近完全，证明造模成功，表观生发评价显示，中剂量+α-KB 组的生发效果高于阳性药米诺地尔组，其次为生发中、高剂量组，而低剂量组与 α-KB 组效果相近且高于模型组。

2.4.4.3 小鼠毛长毛重的采集

实验终点测量各组小鼠毛长毛重，并以毛重/毛长为单位面积毛密度，记录如表 2-46：

表 2-44 各组小鼠毛长毛重表 (n=6 , $\bar{x}\pm SD$)

Table 2-44 Hair length and weight of mice in each group (n = 6, $\bar{x}\pm SD$)

组别	毛长 mm	毛重 mg	毛密度
模型组	2.68±0.66	6.4±1.03	2.39
阳性组	6.48±0.25*	19.1±0.76*	2.95*
生发低剂量组	6.11±0.84*	17.91±1.12*	2.93*
生发中剂量组	6.51±0.92*	19.23±0.73*	2.96*
生发高剂量组	6.44±0.64*	19.08±0.84*	2.94*

与模型组比较，*p<0.05

以毛重除以毛长作为毛密度衡量指标，结果过可见，毛密度由大到小依次为：生发中剂量组 > 米诺地尔组=生发高剂量组 > 生发低剂量组 > 模型组，

2.4.4.4 对小鼠体重、相对脏器的影响

对实验终点各组小鼠体重、相对脏器进行统计，结果如下表 2-45 所示：

表 2-45 小鼠体重及内脏指数 (N=6 ; $\bar{x}\pm SD$)

Table2-45 Body weight and visceral index of mice (n = 6; $\bar{X} \pm SD$)

组别	体重	肝脏	肾脏	脾脏	胰腺	胸腺
模型组	24.45±0.98	4.38%	1.17%	0.65%	0.88%	0.11%
米诺地尔组	24.47±1.28	4.99%	1.22%	0.58%	1.38%	0.15%

生发低剂量组	24.13±0.87	5.52%	1.26%	0.88%	0.75%	0.16%
生发中剂量组	24.52±1.15	5.23%	1.32%	0.83%	1.37%	0.13%
生发高剂量组	25.14±0.80	5.19%	1.41%	0.72%	1.21%	0.17%

与模型组比较，*p<0.05

各组小鼠体重无显著差别，米诺地尔组的脾脏比模型组略低，可能是化学药米诺地尔对小鼠造成了免疫抑制，给药组间无显著差别。

2.4.4.5 小鼠血生化指标的采集 0

每组取五只小鼠，对小鼠眼部取血 0.8ml，离心取上清液，稀释后于全自动生化仪测定 AST、ALT、ALP 三个水平指标。

表 2-46 各小鼠指标水平

Table2-46 Index levels of each mouse

组别	ALT	AST	ALP
模型组	22	30.25	869
米诺地尔组	20.25	23.25	843
生发低剂量组	21.75	26.25	703.5
生发中剂量组	24.75	36	709.5
生发高剂量组	24	32.75	976.5

由表 2-46 可见，后四组小鼠 ALT 水平较模型组轻微高，但属于正常范围，若过高则可能药物引起轻微的肝脏炎症；AST 无显著差异；各组 ALP 中无显著差别

2.4.4.6 小鼠皮肤切片观察

制备实验区皮肤切片，40×物镜下拍摄照片：

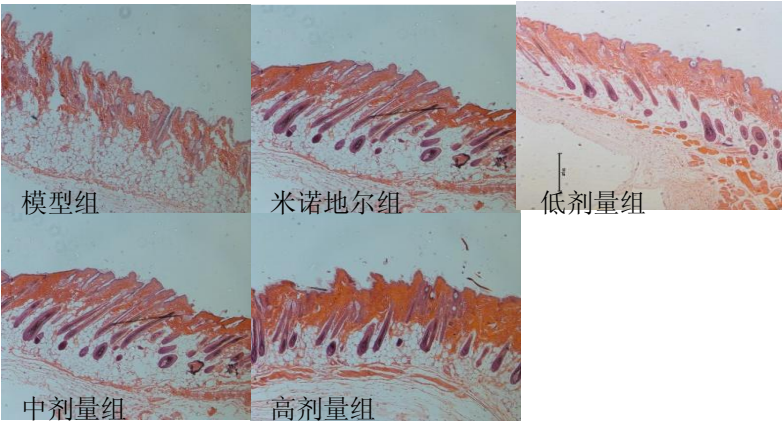


图 2-7 各组切片实例

Fig.2-7 Slice examples of each group

①一般组织学检查：毛囊大小与形态的观察

③毛囊计数：每例数 3 个高倍视野(200 倍)的毛囊数，取其均值，并进行统计学处理。

2.4.4.6.1 毛囊大小与形态的观察

由图 2-7 可见，模型组出现炎细胞聚集，米诺地尔组未见炎细胞浸润，生发复方低剂量组有轻微炎细胞浸润，中、高剂量组无炎细胞浸润。模型组无成型毛囊，除低剂量组偏小，其他各组毛囊清晰完整。说明米诺地尔及生发复方可不同程度促进小鼠毛囊的生长。

2.4.4.6.2 毛囊计数

小鼠毛囊计数如表 2-47:

表 2-47 各组小鼠毛囊计数 (N=3； $\bar{x}\pm SD$)

Table2-47 Hair follicle count of mice in each group (n = 3; $\bar{x}\pm SD$)

组别	单位视野毛囊个数
模型组	0.3±0.57
米诺地尔组	6.3±1.8*

生发低剂量组	3.2±1.4*
生发中剂量组	6.2±1.9*
生发高剂量组	6.1±1.2*

与模型组比较，*p<0.05

由表 2-47 可见，模型组毛囊数极少，其他各组毛囊数均显著多余模型组，米诺地尔组与生发中、高剂量组无显著差异，表明生发高中剂量组对小鼠毛囊的促进作用。生发低剂量组相对于生发中、高剂量组毛囊数更少，表明低剂量药效不如中高剂量组。

2.4.4.6.3 各组生发作用比较

对各指标作分级评定，效果由强到弱分为优良中差四个等级，结果如下：

表 2-48 各组小鼠综合比较

Table 2-48 Comprehensive comparison of mice in each group

组别	生长评分	毛发长度	毛发重量	毛发密度	血生化指标	毛囊状态	毛囊数目
模型组	差	差	差	差	优	差	差
米诺地尔组	优	优	优	优	优	优	优
生发低剂量组	中	中	良	中	优	良	良
生发中剂量组	优	良	优	优	优	优	优
生发高剂量组	优	优	优	良	优	优	优

综合各项指标可见，阳性组在各项指标中优于模型组，说明造模成功。与阳性组相比，生发低剂量组效果相对较差。各组脏器无明显差别，说明水凝胶无显著毒性。高剂量组对小鼠的毛长作用更为强烈，而中剂量组对小鼠的毛发生长密度促进作用更佳，考虑到实际应用，毛密度的增加更符合病人的需求，因此认为中剂量为最适剂量。

2.5 本章小结

1) 通过对不同的脱毛剂研究对比,发现脱毛膏脱毛后小鼠毛发生长缓慢,且生长不均匀,对毛囊造成一定程度损伤,会导致一定比例的小鼠毛发无法生长,因此不是生发筛选的最佳脱毛剂。松香/石蜡脱毛后小鼠毛发生长先慢后快,毛发生长良好,但是其操作繁琐,且脱毛时小鼠会遭受较大痛苦,脱毛不够干净,也是造成小鼠脱毛后毛发生长更快的原因之一,松香/石蜡完全冷却变硬更有利于脱毛,但小鼠皮肤可能因此受损。硫化钠脱毛与脱毛膏一样操作方便,小鼠不会遭受痛苦,且脱毛干净,不会对小鼠毛囊产生较大损伤,因此 Na_2S 更适合作为生发模型的脱毛剂。

2) 通过第一批抗炎中草药复方的筛选,得到效果较好的复方 4:地榆:干姜:獐牙菜:银杏叶:蒲公英 1:1:1:1:1,分析四种复方,有干姜与银杏叶、枇杷叶等药材抗炎效果更佳显著。

3) 在第一批筛选的基础上保留干姜地榆等药材,添加何首乌,女贞子,甘草等药材进一步优化,发现抗炎效果有所提升,结合动物模型的筛选,分析毛长与毛密度等各指标,得到方 7:侧柏叶、地榆、干姜、枇杷叶、银杏叶、蒲公英、甘草 2:2:2:1:1:1:1 为最佳组合。

4) 确定提取物指标成分为姜辣素、没食子酸以及总黄酮,建立指标成分的 HPLC 及紫外-可见光分光光度法含量测定方法;根据指标成分含量检测结果,对生发复方常规提取,搅拌提取,红外辅助提取,超声辅助提取等不同提取方法进行优化,选取提取方法为红外辅助加热并间隔 20min 搅拌一次,该条件下所得提取液中指标成分含量最高;根据指标成分转移率、干浸膏得率结果,对复方提取条件进行正交设计优化实验,选取最优提取条件为 60%乙醇溶剂用量为药材 10 倍,提取次数 3 次,提取时间 2h,提取温度 80℃。

5) 考察不同含量的卡波姆,结果 2%卡波姆粘度最佳。通过对提取物在不同浓度乙醇

中溶解性的考察，乙醇浓度为 40% 时提取物溶解性最佳。通过水凝胶的耐热耐寒实验证明凝胶稳定性良好。

6) 根据感官指标、粘度要求，对方剂组成进行正交设计优化实验，选取光泽性佳，涂展性好，粘度适宜的优化处方为 2% 卡波姆 40%、甘油 10%、丙二醇 10%、三乙醇胺 0.5%；根据 24h 内姜辣素累计透过量结果，选取 5% 氮酮为处方中透皮扩散剂。

7) 通过分别考察了生药含量为 10g/100g 水凝胶、20g/100g 水凝胶、30g/100g 水凝胶三个浓度的生发效果，结果证明随着生药含量的增加，生发活性增加，达到一定程度不再增加且略有降低，中剂量 20g/100g 水凝胶为最适生药浓度。

3 乌发复方的造模、筛选、制备工艺及药效学研究

3.1 前言

白发动物模型的建立是以C57小鼠为实验动物，本章先比较皮下注射1.5%氢醌与外涂2.5%氢醌的造模效果，选择合适的造模方法；对乌发复方的筛选，主要方法为体内与体外两个方面。体外主要是通过酪氨酸酶活性筛选和细胞实验检测，体内则使用C57小鼠白发动物模型筛选，最后设计高中低三种剂量水凝胶初步研究其药效。

3.2 实验材料

3.2.1 主要材料与试剂

表3-1 主要材料与试剂

Table 3-1 Principal meterals and reagents

名称	批号	规格	厂家
脱毛膏	20180822	50g	薇婷
松香石蜡 (1:1)	20180716	1:1	国药试剂
Na2S	20180716	6%	国药试剂
水合氯醛	20180120	4%	国药试剂
氢醌	20170713	98%	国药试剂
CMCNa	20170614	98%	国药试剂

3.2.2 实验仪器

表3-2 主要仪器与设备

Table 3-2 Principal instruments and equipments

仪器	型号	厂家
剃刀	FC5801	上海飞科电器股份有限公司

数显卡尺	I 型	上海美耐特实业有限公司
电子天平	BS110S	德国赛多利斯集团

3.2.3 实验动物

C57BL/6 小鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号码 SCXK(沪)2013-0016;SPF级,雄性35只,体重20g左右。恒温恒湿,温度控制为22℃±2℃,湿度控制为45~60%，小鼠可自由饮水。

3.3 实验方法

3.3.1 白发动物模型的建立

3.3.1.1 氢醌的制备

1.5%氢醌的制备：称取氢醌粉末 1.5g 溶解于 100ml 的生理盐水中，充分溶解后避光保存备用。

2.5%氢醌的制备：称取氢醌粉末 2.5g 溶解于 100ml 的 CMCNa 溶液中，充分溶解后避光保存备用。

3.3.1.2 小鼠的麻醉同“2.3.1.1”

3.3.1.3 分组

分组方法：待小鼠剃毛结束后，按体重蛇形分组，分别为对照 1 组，对照 2 组，1.5% 氢醌组，2.5%氢醌组。

3.3.1.4 造模剂的使用

脱毛七天后，开始造模，外涂需全部浸湿，保持 2min 再放回鼠笼。每日两次，分别于每日 9 时与 16 时涂抹。各组所给试剂及方式、剂量如下：

表3-3 分组与给药剂量

Table3-3 Grouping and dosage

组别	N	造模方式	试剂剂使用量 ml/只	频率
对照 1 组	5	生理盐水皮下注射	0.2	2 天 1 次
对照 2 组	5	生理盐水外涂	1.0	2 次 1 天
1.5%氢醌组*	5	氢醌皮下注射	0.2	2 天 1 次
2.5%氢醌组*	5	氢醌外涂	1.0	2 次 1 天

*氢醌性质不稳定，见光易分解，因此每 3 天制备新的氢醌。

3.3.1.5 检测指标与方法

- 1) 实验期间对小鼠体重，精神状态观察并拍照
- 2) 待小鼠长出毛发对小鼠背部白毛情况进行评分，标准如下：

表 3-4 白发造模评分标准

Table3-4 Scoring standard of white hair modeling	
分值	毛发状态
0	无变白毛发
1	变白毛发占实验区 0~25%
2	变白毛发占实验区 25%~50%

表 3-4 白发造模评分标准（续）

Table3-4 Scoring standard of white hair modeling	
分值	毛发状态
3	变白毛发占实验区 50%~75%
4	变白毛发占实验区 75%~100%

3.3.1.6 数据统计与分析

采用 SPASS20.0 软件进行数据处理，以 $X\pm SD$ 表示。

3.3.2 乌发复方的筛选

3.3.2.1 单味药材酪氨酸酶活性筛选^[66]

分别考察 18 味中药材 95% 乙醇提，60% 乙醇提及水提物对酪氨酸酶活性的影响。酪氨酸酶 1.0mg (1380U) 用 50mlPBS (0.05mol/L，pH6.8) 缓冲液溶解，配制成 25U/ml 浓度。反应体系共 250 微升，按下表加入个试剂：

表 3-5 各试剂加入体积（单位：微升）

Table 3-5 Volume of each reagent (unit: microliter)

	待测药	酶	pbs	L-Dopa
A	0	50	140	60
B	0	0	190	60
C	50	50	90	60
D	50	0	140	60

实验在 96 孔板中进行，在 37℃ 反应 10min 后加入 Dopa，2min 后立即与波长 490nm 测定吸光度，每组设 3 个平行孔。按以下公式计算酶激活率，酪氨酸酶激活率(%)=
$$\frac{[(C-D) - (A-B)]}{(A-B)} \times 100$$

其中，A：未加中药样品的加酶混合液所测得吸收度；B：未加中药样品也未加酶的混合液所测得吸收度；C:加中药样品和酶的混合液所测得吸收度；D：加中药样品未加酶混合液所测得吸收度；A,B 为各组对照

3.3.2.2 两味药材组合酪氨酸酶活性筛选

对单味药材效果良好的中药进行两两组合，其与实验方法同“3.2.2.1”

3.3.2.3 三味药材组合酪氨酸酶活性筛选

在两两组合的基础上进行三味药材的组合，实验方法同“3.2.2.1”

3.3.2.4 细胞实验的筛选^[67]

小鼠 B16 黑素瘤细胞的培养:配制 10% 小牛血清的 DMEM 培养基，(10U/m L 青霉素、100ug/m L 链霉素),孵箱设置 37℃、5%CO₂,培养细胞，待细胞生长至近融合状态,使用 200ul0.25%胰蛋白酶进行消化,分装，更新培养基，三天传代一次。

采用 MTT 法测定 B16 黑色素瘤细胞的增殖活性。对数生长期细胞消化调整至 5 * 10⁴ 个/ ml，取 100ul 接种于 96 孔板，设置培养条件 37℃、5% CO₂ 孵育 24 小时。每孔加入 100ul 稀释的中药，设置 3 个平行孔，以培养基+细胞为空白对照，在培养箱中培养 48h 后，

倒置显微镜下观察细胞形态。添加 20 ul 5 毫克/毫升 MTT,在孵箱培养 4 h 后，取出 96 孔板并吸出培养基，添加 100μl 裂解液振摇半小时，以充分溶解生成的晶体，并测量 490nm 光吸收值。利用 graphpad prism 软件计算 IC50，并对实验结果进行记录和分析。

黑素含量测定：NaOH 裂解法:采用相同方法对细胞接种，设立对照同上。药物作用 48 h 后,去掉上清,以 PBS 冲洗干净,再加入 100uL 1mol/L NaOH,37℃ 水浴 1 h 后，酶标仪于 490nm 处检测吸光度值,用吸光度值表示黑素含量。

3.3.3 乌发复方对 C57BL/6 白发小鼠的乌发作用研究

分别制备生药含量为 30g、40g、50g/100g 水凝胶，研究其初步乌发功效，结合脏器指数与血生化指标，结合体重变化判断其有无毒性。

3.3.3.1 白发小鼠模型的建立

方法同“3.3.1”

3.3.3.2 分组与给药

将制备成功的白发小鼠分为模型组，阳性组，乌发低剂量组、乌发中剂量组，乌发高剂量组，每组 6 只，使用剃刀剃去新生毛发，每四日剃一次。模型组涂抹空白凝胶，阳性组涂抹甲氧沙林溶液 0.3ml/只，乌发配方三组涂抹相应配方水凝胶，0.3ml/只，每日两次，上午 9 时与下午 4 时各一次。

表 3-6 分组与给药

Table 3-6 Grouping and dosage

组别	受试药	给药量 ml/只
模型组	空白凝胶	0.3

表 3-6 分组与给药 9 (续)

Table 3-6 Grouping and dosage

组别	受试药	给药量 ml/只
阳性组	甲氧沙林	0.3
乌发低剂量组	30g/100g 水凝胶	0.3
乌发中剂量组	40g/100g 水凝胶	0.3
乌发高剂量组	50g/100g 水凝胶	0.3

3.3.3.3 实验观察：

- A.小鼠体重变化：每三日对小鼠体重进行称量，记录各组小鼠体重变化及小鼠状态。
- B.小鼠实验区拍照，四天一次
- C.小鼠毛发恢复情况观察 观察区皮肤色素恢复面积所占比例
- D.实验结束后，对各组的改善效果评分。剃刀剃去新生毛发后评分，其标准如下：“4 分”为观察区新生毛乌黑无白毛参杂；“3 分”为观察区新毛乌黑，参杂灰色毛发；“2 分”为观察区新生毛发灰色参杂白毛；“1 分”为观察区毛发大部分为白色，夹杂少许灰色；“0 分”全白色无黑毛。

3.3.3.4 小鼠血液肝功能生化指标采集

实验结束，眼部取血收集各小鼠血液，分别检测 ALT、AST、ALP 三项指标

3.3.3.5 脏器指数采集与皮肤切片

麻醉 使用 4% 水合氯醛对小鼠进行腹腔注射进行麻醉，称重，按 0.1ml/10g 体重注射。

脱毛 待小鼠麻醉后，电动剃刀剔去背部长毛，过程中轻微，避免损伤皮肤。再用 1ml 注射器吸取 1ml6% 硫化钠均匀涂于小鼠背部，2.5min 后温水冲去，此时小鼠背部毛发完全脱落，皮肤完整。

取皮切片 将脱毛后的小鼠颈椎脱臼处死，使用剪刀剪下背部大于 1cm*1cm 的皮肤，过程勿触碰中间待收集皮肤，然后皮肤放于报纸上，用锋利刀片切取中间 1cm*1cm 的皮肤，边缘整齐，不可有分叉，取下的皮肤放于 50ml 离心管中，加入 10%福尔马林 40ml 固定，石蜡包埋，HE 染色，40×物镜下拍摄照片，观察毛囊形态大小及黑素生成量。

取脏器 剪开小鼠腹部皮肤，取小鼠肝脏，肾脏，脾脏，胰腺、胸腺五个脏器，编号，分别称重，计算各脏器系数。

3.4 实验结果

3.4.1 白发动物模型的建立

3.4.1.1 体重的记录结果

每三日对小鼠体重进行称量，记录各组小鼠体重变化及小鼠状态差异。

表3-7 不同脱毛剂小鼠体重的影响 (g ; n=5 ; $\bar{x}\pm SD$)
Table 3-7 Effect of different depilatory agents on body weight of mice (g; n = 5; $\bar{x}\pm SD$)

组别	小鼠体重 g		
	1d	9d	15d
对照 1 组	18.30±1.23	21.86±1.13	22.97±1.19
对照 2 组	18.57±1.43	21.34±0.14	22.70±1.27
1.5%氢醌组	18.22±1.29	20.88±1.29	23.23±1.12
2.5%氢醌组	18.37±1.33	20.97±1.50	22.91±1.22

与模型组比较，*p<0.05

小鼠状态良好，精神良好，未脱毛区毛发顺滑，体重略有增加，摄食饮水正常。

3.4.1.2 按上述标准对小鼠评分，分别于第 17d、21d、25d、30d 评分，结果如表 3-8:

表 3-8 小鼠实验区白发评分 (n=5 , $\bar{x}\pm SD$)
Table 3-8 Hair score in experimental area of mice (n = 5, $\bar{x}\pm SD$)

组别	评分			
	17d	21d	25d	30d

对照 1 组	0	0	0	0
对照 2 组	0	0	0	0
1.5%氢醌组	1.2±0.32	2.0±0.35	2.5±0.17	3.5±0.32
2.5%氢醌组	0.8±0.21	1.2±0.22	2.3±0.38	3.2±0.24

与模型组比较，*p<0.05

17d 氢醌组开始生白毛。至 30d，皮下注射氢醌组达到 3.5 分，而外涂氢醌组为 3.2 分。

3.4.1.3 小鼠照片实例

脱毛后第 1d 照片：



造模第一天各组无差异。

第 30d 照片：

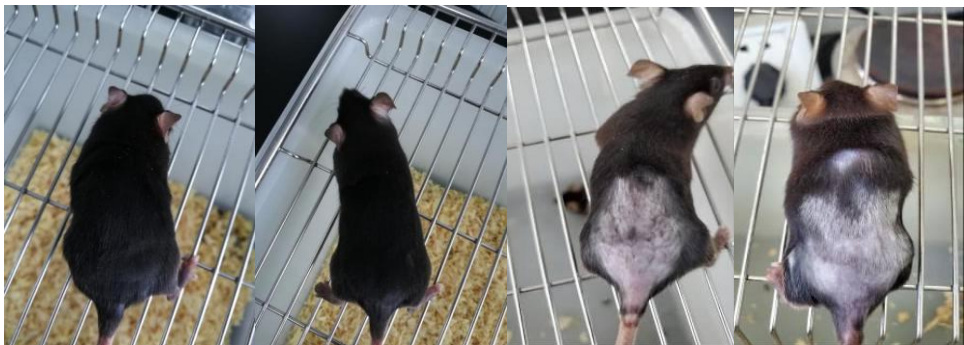


图 3-1 白发模型诱导照片

Fig. 3-1 Induced picture of white hair model

从左到右依次为对照 1，2 组，外用氢醌组，皮下氢醌组。由图 3-1 可见，刚脱毛时，各组无差别，实验起点相同，至第 30 天时，对照组毛发正常恢复，而皮下氢醌组比外涂氢醌组更白，说明皮下效果更佳，但恢复困难，会导致阳性药也无法起效，影响受试药的筛选。

3.4.2 乌发复方的筛选

3.4.2.1 单味中药提取物酪氨酸酶活性的筛选

分别考察 18 味中药材 95% 乙醇提，60% 乙醇提及水提物对酪氨酸酶活性的影响，结果如下：

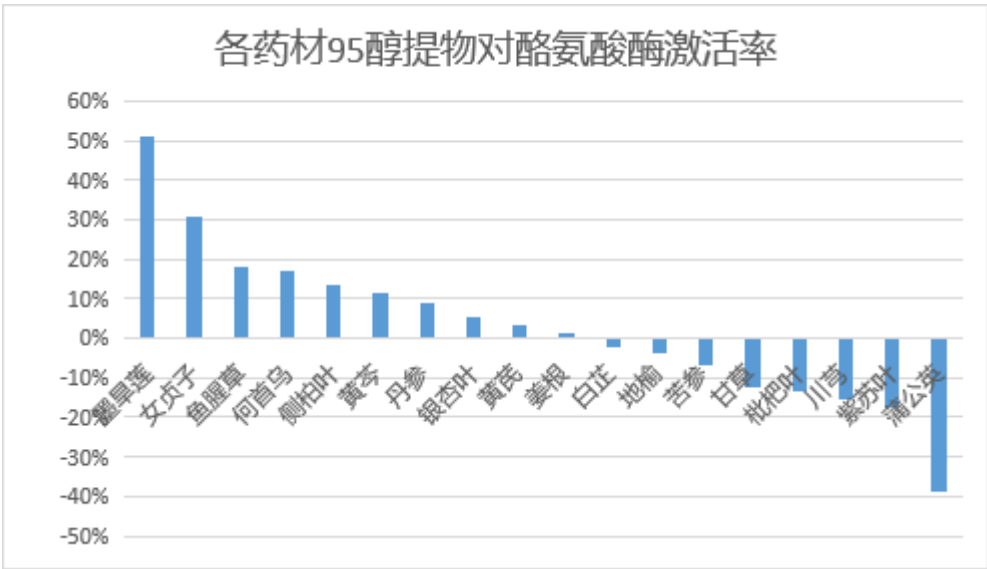


图 3-2 各药材 95% 乙醇提物对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-2 Effect of 95% ethanol extract of each medicinal material on tyrosinase activity

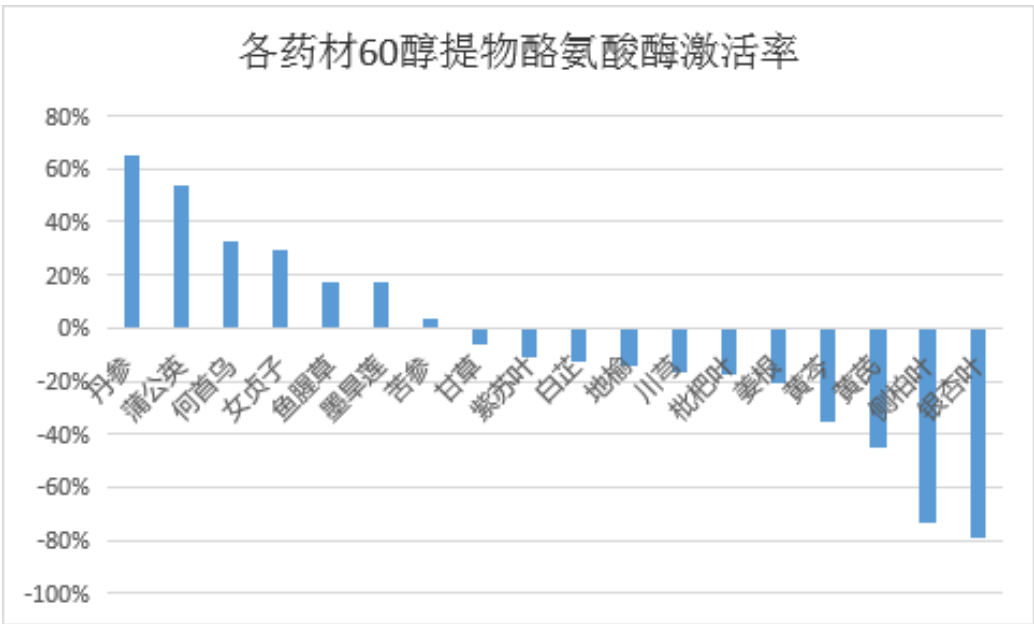


图 3-3 各药材 60% 乙醇提物对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-3 Effect of 60% ethanol extract of each medicinal material on tyrosinase activity

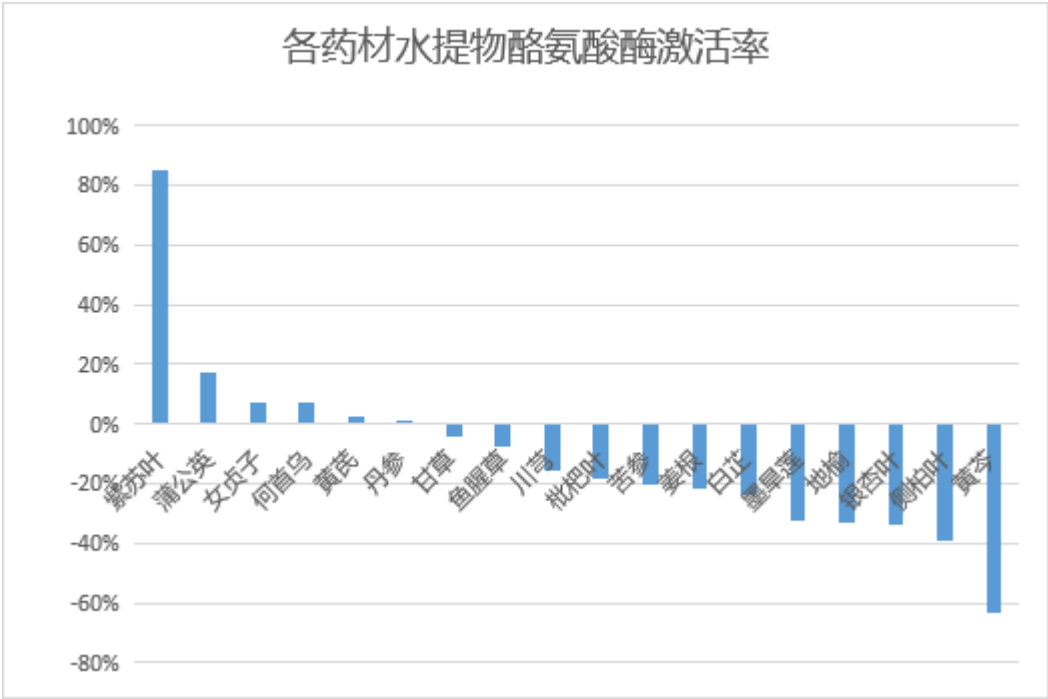


图 3-4 各药材水提物对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-4 Effect of water extracts of various herbs on tyrosinase activity

由图 3-2, 3-3, 3-4 可见，95%乙醇提物对酪氨酸酶激活作用较强的女贞子，何首乌，墨旱莲，鱼腥草，丹参，银杏叶等药材，考察 150mg/ml,100mg/ml,75mg/ml，50mg/ml，25mg/ml，10mg/ml 四个浓度对酪氨酸酶的影响，实验方法同上：

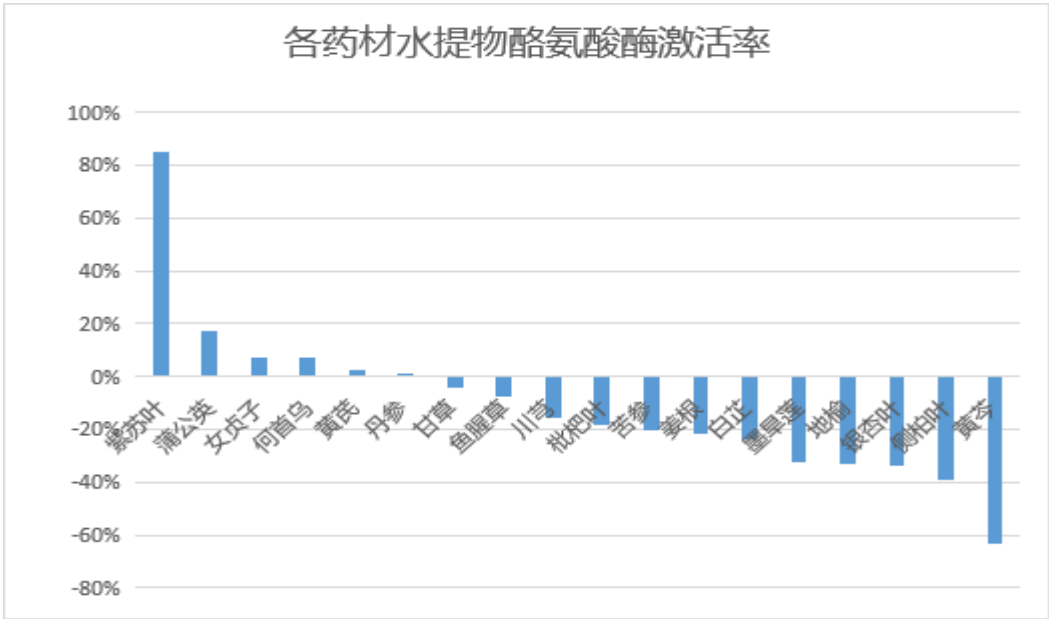


图 3-5 各药材 95%乙醇提物不同浓度对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-5 effect of different concentrations of 95% ethanol extracts of different herbs on tyrosinase activity

根据上述 60% 乙醇提物实验结果，选择对酪氨酸酶激活作用较强的女贞子，何首乌，墨旱莲，鱼腥草，丹参，侧柏叶，姜根，紫苏叶等药材进一步研究 75mg/ml，50mg/ml，25mg/ml，10mg/ml 四个浓度对酪氨酸酶的影响，实验方法同上：

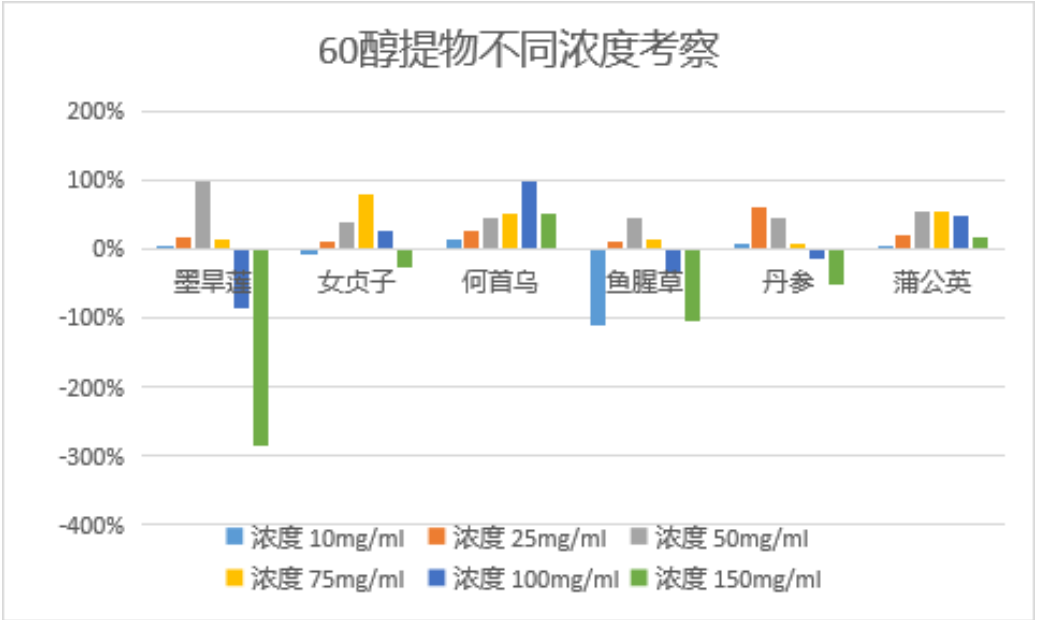


图 3-6 各药材 60% 乙醇提物不同浓度对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-6 Effect of different concentrations of 60% ethanol extracts of different medicinal materials on tyrosinase activity

根据上述水提物实验结果，选择对酪氨酸酶激活作用较强的女贞子，何首乌，墨旱莲，鱼腥草，丹参，侧柏叶，姜根，紫苏叶等药材进一步研究 75mg/ml，50mg/ml，25mg/ml，10mg/ml 四个浓度对酪氨酸酶的影响，实验方法同上：

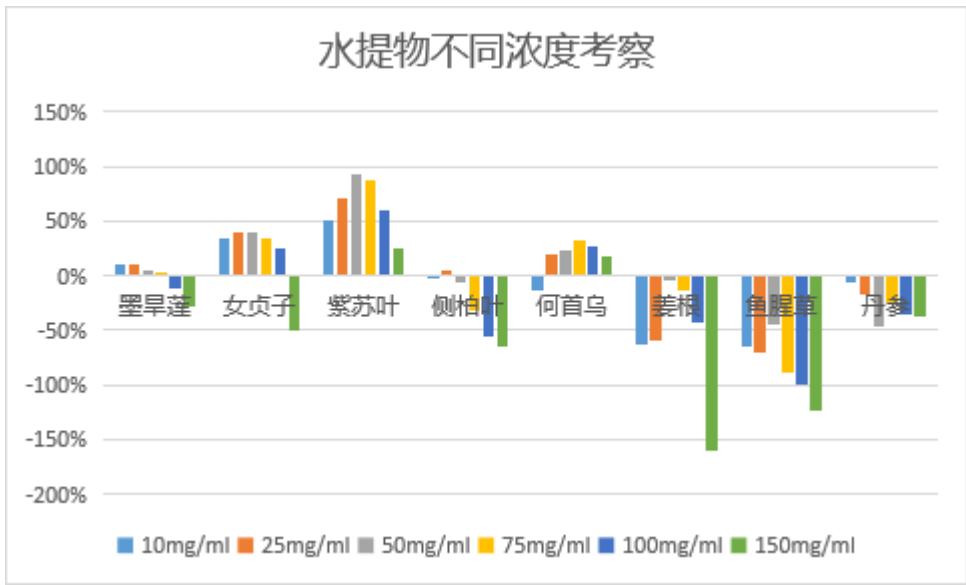


图 3-7 各药材水提物不同浓度对酪氨酸酶活性影响

Fig. 3-7 Effect of different concentrations of water extracts of different medicinal materials on tyrosinase activity

由图 3-5, 3-6, 3-7 可见，随着浓度的升高，各提取物对酪氨酸酶的作用表现出先促进后抑制的特点，最佳激活浓度多在 25~75mg/ml 之间，对酪氨酸酶具有激活作用的药物主要有墨旱莲、女贞子 95% 乙醇提取物，女贞子、何首乌、蒲公英、丹参、墨旱莲、鱼腥草 60% 乙醇提取物以及紫苏叶水提取物，最佳激活浓度及激活率总结如下表 3-9:

表 3-9 对酪氨酸酶激活作用较强的单味药材

Table 3-9 Single herbs with strong tyrosinase activation

药材	活性部位	浓度 mg/ml	酪氨酸酶激活率
墨旱莲	95% 乙醇提	50	40%
女贞子	95% 乙醇提	25	47%
墨旱莲	60% 乙醇提	50	98%
女贞子	60% 乙醇提	75	78%
何首乌	60% 乙醇提	100	99%
鱼腥草	60% 乙醇提	50	45%

丹参	60% 乙醇提	25	61%
蒲公英	60% 乙醇提	50	53%
紫苏叶	水提	50	93%

3.4.2.2 两两组合酪氨酸酶活性的筛选

在单方筛选的基础上进行适当组方，研究其酪氨酸酶激活率。根据前期实验结果，墨旱莲、女贞子 95% 乙醇提物，女贞子、何首乌、蒲公英、丹参、墨旱莲、鱼腥草 60% 乙醇提物，紫苏叶水提物对酪氨酸酶具有较强的激活作用，对各组合物及相同条件下单体药物进行酶活性测试，结果见表 3-10:

表 3-10 各组合及单味提取物酶激活率*

Table 3-10 Enzyme activation rate of each combination and single extract

药物组合	激活率	单体药物	25mg/ml 酶激活率	50mg/ml 酶激活率
女 60+紫水	86%	女 60	36%	42%
何 60+紫水	126%	何 60	26%	67%
蒲 60+紫水	56%	蒲 60	7%	41%
丹 60+紫水	82%	丹 60	23%	58%
墨 60+紫水	57%	墨 60	6%	22%
鱼 60+紫水	65%	鱼 60	12%	35%
女 60+蒲 60	-33%	紫水	66%	81%
女 60+丹 60	10%	墨 95	24%	44%
女 60+墨 60	7%	女 95	37%	51%
女 60+鱼 60	10%			

何 60+蒲 60	58%
何 60+丹 60	97%
何 60+鱼 60	37%
墨 95+女 60	45%
墨 95+何 60	67%
墨 95+蒲 60	55%
墨 95+紫水	89%
墨 95+丹 60	47%
女 60+何 60	233%

表 3-10 各组合及单味提取物酶激活率 (续)

Table 3-10 Enzyme activation rate of each combination and single extract

药物组合	激活率	单体药物	25mg/ml 酶激活率	50mg/ml 酶激活率
丹 60+蒲 60	146%			
女 95+紫水	-12%			

*注：各药材以名称首字代替，如“女”即女贞子，“60”为 60% 乙醇，下同

由表 3-10 可见，两次组合物酶激活率有一定差别，但总体趋势相同，强弱依次为女何 (138%)，丹蒲 (126%)，何紫 (116%)、何丹 (97%)，何蒲 (60%)。

3.4.2.3 三种药材组合酪氨酸酶活性的筛选

在两两组方筛选的基础上进行三味药组方，研究其酪氨酸酶激活率。女 60+何 60、丹参 60+蒲 60、何 60+紫、何 60+蒲 60、何 60+丹 60 五种组合表现出较强的协同作用，在此基础上进一步研究三味药对组合的活性。结果见下表 3-11:

表 3-11 各组合及单味提取物酶激活率

Table 3-11 Enzyme activation rate of each combination and single extract

药材组合	激活率	单药材	激活率
女+何+丹	158%	女贞子	43%
女+何+蒲	37%	何首乌	72%
女+何+紫	135%	丹参	62%
女+丹+蒲	47%	蒲公英	38%
何+丹+蒲	53%	紫苏叶（水）	81%
何+丹+紫	139%	丹+蒲+紫	39%
何+蒲+紫	45%	甲氧沙林	61%

由表 3-9 可见，对酪氨酸酶激活作用较强的组合为女+何+丹、女+何+紫、何+丹+紫三种药材的组合物，激活率均显著高于其中的各单体物酶激活率，也高于其中两种组合后的酶激活率，显示出较强的协同作用。且高于阳性药甲氧沙林，证明该组合酶激活作用较强。

3.4.2.4 研究前期所得组合女何丹、女何紫对细胞增殖与黑素生成的影响，结果如下：

空白对照组存活率 100，高于 100 表示促进，结果见表 3-12:

表 3-12 两种种组合物对细胞增殖的影响

Table 3-12 Effects of two kinds of compositions on cell proliferation

组别	细胞增值率%		
	低浓度	中浓度	高浓度
女何紫	159	137	129

女何丹	125	189	162
空白组		100	

对细胞增殖活性最强的为女何丹中浓度，其次为女何紫低浓度。

3.4.2.5 对两种中药材组合进行黑素生成实验，根据前期实验，此次浓度设置为 0.05、0.1 和 0.2μg/ml 三个梯度，以空白对照组为 100，高于 100 表示促进，结果见下表 3-13:

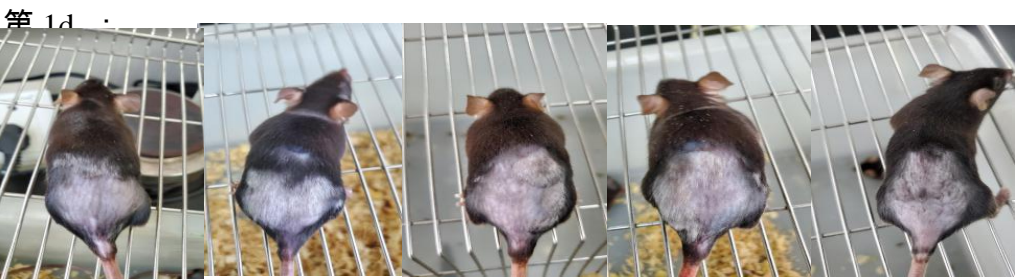
表 3-13 中药提取物对细胞黑素生成影响
Table 3-13 Effect of extract of traditional Chinese medicine on melanogenesis

组别	黑素生成%		
	低浓度	中浓度	高浓度
女何紫	155	187	162
女何丹	131	174	163
空白组		100	

促进细胞黑素生成作用最强的为女何紫中浓度，其次为女何丹中浓度。

3.4.3 乌发复方对 C57BL/6 白发小鼠的乌发作用研究

3.4.3.1 实验起点与终点小鼠比较



模型组 甲氧沙林组（阳性组） 低剂量组 中剂量组 高剂量

给药第 1 天，大部分小鼠背部毛发均处于初始白发状态，实验区白发比例达 90%

第 28d :



模型组 甲氧沙林组（阳性组） 低剂量组 中剂量组 高剂量

经过 28 天的给药，模型组颜色无显著恢复，阳性组小鼠基本完全变黑，表现出色素恢复作用。乌发复方中剂量组恢复优于高剂量组，乌发低剂量组效果最差。

3.4.3.2 小鼠新生毛发变黑效果评价

每四日观察小鼠实验区域皮肤色素恢复所占面积比，记录恢复区比例，结果见下：

表 3-14 小鼠新生毛发黑色比例变化

Table 3-14 Echanges of black proportion of new born hair in mice

组别	色素恢复区评分							
	1d	5d	9d	13d	17d	21d	25d	28d
模型组	10	10	10	15	15	25	30	40
阳性组	10	15	25	30	40	45	70	90
乌发低剂量组	10	15	20	25	30	40	50	65
乌发中剂量组	10	15	25	35	40	50	65	95
乌发高剂量组	10	15	20	30	35	45	55	85

给药共 28 天，皮肤色素恢复区比例最高为乌发中剂量组，其次为阳性组，高剂量组，乌发低剂量组效果最差，但乌发仍优于模型组，表现出促进乌发作用。

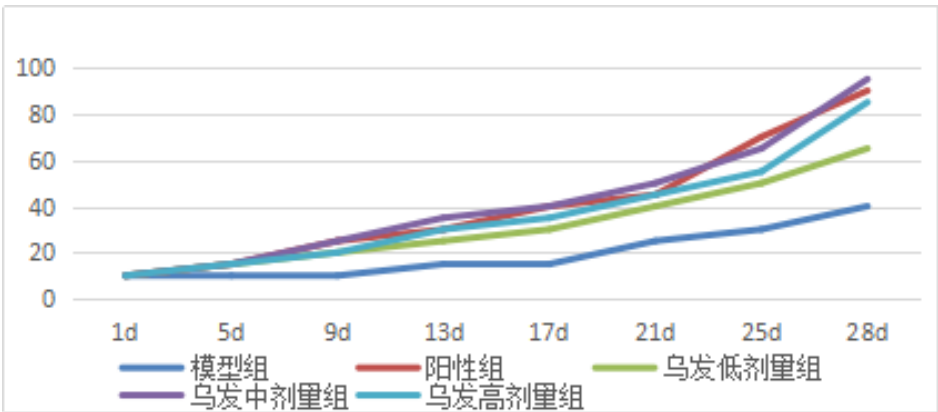


图 3-8 小鼠新生毛发黑色比例变化

Fig. 3-8 Change of black proportion of newborn hair in mice

3.4.3.3 小鼠皮肤变黑情况评价

实验终点剃去新生毛发观察评分如表 3-15:

表 3-15 小鼠皮肤变黑评分

Table 3-15 Skin darkening score of mice

组别	评分
模型组	1.1
阳性组	3.67
乌发低剂量组	2.83
乌发中剂量组	3.83
乌发高剂量组	3.50

对各组小鼠评分可见，中剂量组评分最高，高于阳性组。高剂量组略低于阳性组，高于低剂量组。

3.4.3.4 小鼠血生化指标比较

每组取 4 只小鼠，对小鼠眼部取血 0.5ml，离心取上清液，稀释后于全自动生化仪测定 AST (谷草转氨酶)、ALT (谷丙转氨酶)、ALP (碱性磷酸酶) 三个水平指标。

表 3-16 各小鼠指标水平

Table 3-16 Index levels of each mouse

组别	ALT	AST	ALP
模型组	41	53	1835
阳性组	39	58	1559
乌发低剂量组	46	68	1559
乌发中剂量组	48	55	1894
乌发高剂量组	43	44	2300



图 3-9 各组小鼠血液 ALT、AST、ALP 水平

Fig.3-9 Blood alt, AST and ALP levels of mice in each group

AST 无显著差异；各组 ALP 中，乌发高剂量组偏高，高于模型组，可能存在胆汁淤积性肝炎。低剂量组的 AST 偏高，可能有轻微肝脏损伤。总体上各组无血生化异常。

3.4.3.5 小鼠脏器指数比较

各组采集六只小鼠取其脏器，计算脏器指数，结果见表 3-17:

表 3-17 小鼠脏器指数

Table 3-17 Organ index of mice

组别	脏器指数				
	肝脏	肾脏	脾脏	胰腺	胸腺
模型组	4.46	0.25	0.68	1.25	0.16
阳性组	4.38	0.25	0.65	1.22	0.12
乌发低剂量组	4.53	0.3	0.68	1.28	0.14
乌发中剂量组	4.77	0.29	0.72	1.23	0.14
乌发高剂量组	4.22	0.32	0.63	1.19	0.14

由肝脏器系数可见乌发中剂量组略高，可能轻微增加了肝脏的负担。由肾脏器系数可见各组无显著差异，说明各组药物没有对肾脏造成负担。脾脏中剂量组偏高，高剂量组偏低，但无显著影响。胸腺整体上各组无显著差别。

3.4.3.6 小鼠毛囊数量与形态比较：

切取适当大小的实验区皮肤组织，用 10% 甲醛固定，进行常规组织脱水，石蜡包埋，HE 染色，光镜镜检，观察豚鼠皮肤组织与毛囊黑素生长相关的指标.皮肤保存于 10% 福尔马林中，制取切片观察。

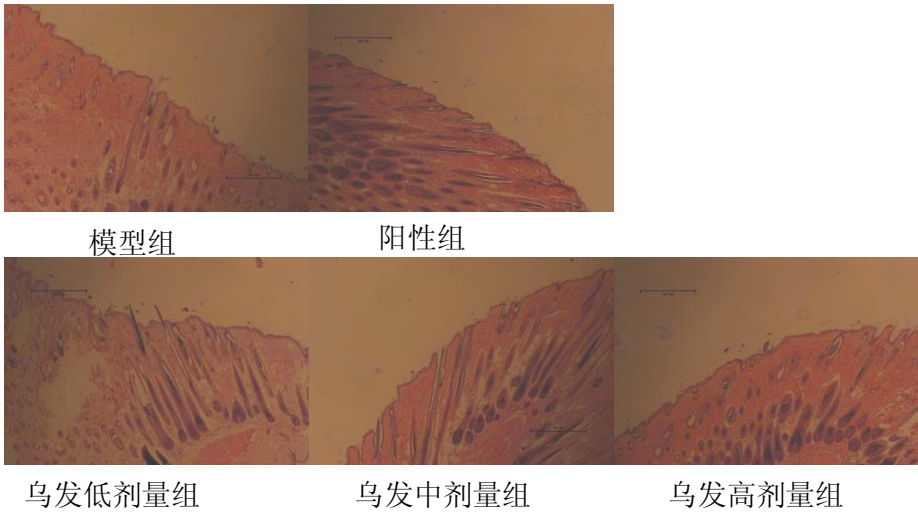


图 3-10 HE 染色图

Fig.3-10 HE staining

3.4.3.7 各指标总结如下表

对各指标作分级评定，效果由强到弱分为优、良、中、差四个等级，结果如表 3-18:

表 3-18 各小鼠乌发功效综合评价

Table 3-18 Comprehensive evaluation of germinal efficacy of each mouse

组别	恢复比例	评分	血生化指标	毛囊黑素量
模型组	差	差	正常	差
阳性组	优	良	正常	优
乌发低剂量组	中	中	正常	中
乌发中剂量组	优	优	正常	优
乌发高剂量组	良	良	正常	良

综合各项指标可见，阳性组在各项指标中优于模型组，说明造模成功。乌发中剂量在恢复比例与评分上都优于阳性组，表现出最好的活性。其次是阳性组，乌发高剂量组其次，而乌发低剂量组效果最弱。

本次对分别考察了生药含量为 30g/100g 水凝胶、40g/100g 水凝胶、50g/100g 水凝胶三个浓度的乌发效果，综合色素恢复比例与毛发变黑度如下：

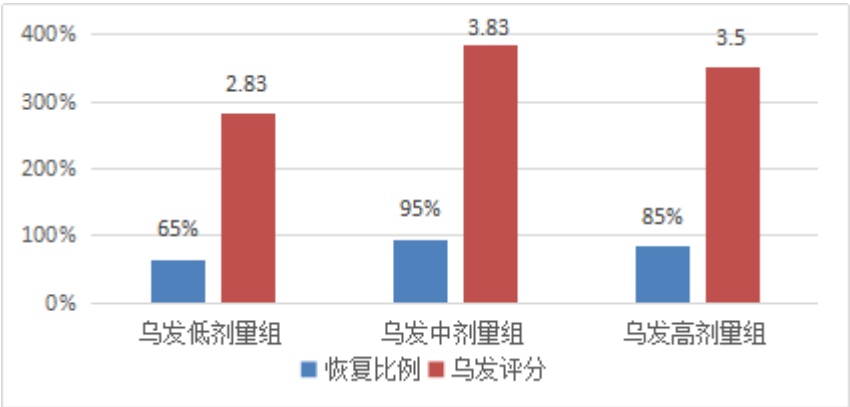


图 3-11 不同生药含量乌发复作用比较

Fig. 3-11 Comparison of UFR effect of different crude drug content

中剂量的毛发恢复比例与乌发评分均最高，高剂量的乌发评分略低于中剂量，但乌发回复比例显著低于中剂量组，低剂量组在乌发恢复比例与评分上都显著低于上述两组。结果证明随着生药含量的增加，复方的乌发作用先增加，在 50g、100g 时开始下降，说明生药浓度太高产生了轻微抑制作用。

3.5 本章小结

1) 对白发模型的筛选，因皮下注射后脱色过度，经观察无法恢复黑色，因此外涂氢醌为最佳白发动物模型。

2) 通过体外酪氨酸酶活性筛选，分别考察 95% 乙醇提取，60% 乙醇提取，水提取 18 位中草药材，并在此基础上进一步浓度考察，得到墨旱莲、女贞子 95% 乙醇提物，女贞子、何首乌、蒲公英、丹参、墨旱莲、鱼腥草 60% 乙醇提物以及紫苏叶水提物具有最佳的促酪氨酸酶活性。

3) 在得到 8 味药材活性较强后，进一步两两组合，三三组合，最终得到具有显著协同作用的促进酪氨酸酶活性组合物女+何+丹、女+何+紫、何+丹+紫三种。

4) 通过体外细胞实验 MTT 检测对黑素瘤细胞的增值活性以及对黑素细胞黑素生成量的研究，发现这些组合中，促进细胞黑素生成与细胞增殖作用最强的为女何紫 0.1 μ g/m 浓度。

5) 使用氢醌诱导 C57 小鼠白发模型考察乌发复方水凝胶的药效，分别考察了生药含量为 30g/100g 水凝胶、40g/100g 水凝胶、50g/100g 水凝胶三个浓度的乌发效果，综合色素恢复比例与毛发变黑情况，以及毛囊黑素生成量，发现 40g/100g 时可以获得良好乌发效果，浓度过高会抑制黑发生成。

4 全文总结

1) 筛选确定小鼠耳肿胀急性炎症模型的造模剂为二甲苯，作用时间为 30min，并成功复制了抗炎模型；比较市售脱毛膏、 Na_2S 、松香/石蜡不同的脱毛方法，发现 Na_2S 脱毛效果良好且不会过度损伤小鼠皮肤，为最佳脱毛剂；通过对 C57 小鼠项部涂抹 5% 咪喹莫特，一周四次，成功诱导毛囊损伤的脱发模型。

2) 通过文献调研，选取地榆、蒲公英、侧柏叶等 10 味药材，设计四个复方，利用抗炎模型进行筛选，在此基础上设计四个新的复方，使用抗炎模型和 C57 小鼠脱发模型进行筛选，发现最佳生发复 7，侧柏叶：地榆：干姜：枇杷叶：银杏叶：蒲公英：甘草（2:2:2:1:1:1:1）。

3) 对最佳生发复方 7 的提取工艺优化，采用单因素与多因素实验方法，以指标成分提取率和干浸膏得率为指标进行优化，得到最佳提取方法：搅拌+红外辅助提取；采用正交实验设计方法，进一步优化提取条件，获得最佳提取工艺：溶剂（60% 乙醇）用量 10 倍、温度 80℃、提取次数 3 次和时间 2h；对水凝胶制剂工艺进行优化，最佳的工艺条件为：2% 卡波姆 40%、甘油 10%、丙二醇 10%、三乙醇胺 0.5% 和透皮剂氮酮 5%。在优化条件下所制凝胶粘度适中，易于涂抹，透皮性好。

4) 制备每 100g 水凝胶含生药量 10、20、30g 三个浓度的水凝胶，以 C57 小鼠脱发动物模型考察其药效，给药 20 天，发现当生药含量为 20g/100g 水凝胶（中剂量）时，生发效果评分和单位面积毛密度最高，毛囊切片显示中剂量毛囊数也高于低剂量和高剂量，与阳性药米诺地尔效果相当。

5) 以体外多巴速率氧化法筛选 18 种单味药材的促进酪氨酸酶活性，发现墨旱莲、女贞子 95% 乙醇提物，女贞子、何首乌、蒲公英、丹参、墨旱莲、鱼腥草 60% 乙醇提物以及紫苏叶水提物等有较好的促进酪氨酸酶活性的作用。在此基础上设计两元和三元组合并筛

选，发现有较好协同作用的药材组合为：“女+何+丹”、“女+何+紫”、“何+丹+紫”三种。通过细胞增殖与黑素生成实验考察，发现女贞子+何首乌+紫苏叶对黑素瘤细胞增殖及黑素合促进作用优于其他两组。

6) 制备每100g水凝胶含生药量30、40、50g三个浓度的乌发水凝胶，以氢醌诱导C57小鼠白发动物模型考察其药效，给药28天，结果当生药含量为40g/100g水凝胶时，小鼠色素恢复比例、乌发评分和显微观察毛囊黑色素含量最高。

7) 本研究通过动物模型筛选获得生发复方(侧柏叶：地榆：干姜：枇杷叶：银杏叶：蒲公英：甘草=2:2:2:1:1:1:1)与乌发复方(女贞子：何首乌：丹参：紫苏叶：干姜：蒲公英)为文献没有报道的新中草药复方，为中草药复方在头发护理产品开发奠定了基础。

参考文献

- [1] 吴承燕, 孙世发, 周雯, 等. 脱发治疗研究进展[J]. 中药药理与临床, 2015,31(2):238-239.
- [2] 司富春, 孟宪佩. 脱发与白发的中医证候和方药规律分析[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报). 2016 年 9 月第 31 卷第 9 期 3785-3788
- [3] 尉雁, 韩静如, 董琛, 等. 斑秃患者外周血淋巴细胞凋亡的研究[J]. 临床医药实践杂志. 2005; 14(11) : 820-822.
- [4] 周雯, 近 50 年中医治疗脱发的文献研究[D]. 南京中医药大学.2016
- [5] 吴大兴, 杨松标, 钮正祥, 等. 斑秃患者与雄激素性脱发患者心理状况比较 [J] . 预防医学.2017 , 5 , 29(5):511-513.
- [6] Cecchin E ,De Mattia E ,Mazzon G ,et al. A pharmacogenetic survey of androgen receptor (CAG) n and (GGN) n polymorphisms in patients experiencing long term side effects after finasteride discontinuation [J] . Int J Biol Markers, 2014,29 (4) :310-316.
- [7] Jain R , De-Eknamkul W. Potential targets in the discovery of new hair growth promoters for androgenic alopecia [J] .Expert Opin Ther Tar, 2014,18(7)787-806.
- [8] 张建中. 中国雄激素性秃发诊疗指南 [J] . 临床皮肤科杂志 , 2014 , 43 (3) : 182-186.
- [9] 马淑然, 张宝春, 刘晓燕. 刘燕池教授治疗脂溢性脱发经验 [J] . 安徽中医学院学报 , 2006 , 25(6) : 8
- [10] 刘林兴. 3396 名中小學生白发情况的调查分析[J]. 中国校医, 1993, 7(1) : 21- 23.
- [11] 潘子奇. 山西省中学生少白头形成的影响因素研究[J]. 中国初级卫生保健 2013 年 2 月第 27 卷第 2 期 (总第 326 期) 69-71.
- [12] Mallick S , Singh SK , Sarkar C , et al. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro[J]. Pigm Cell Res , 2005 ,

18 : 25- 33.

[13] Vance KW ,Goding CR. The transcription net work regulating melanocyte development and melanoma[J]. Pigm Cell Res , 2004 , 17 (4) : 318-325.

[14] 宋志华 , 魏跃钢. 辨证治疗雄激素性脱发举要 [N] . 成都中医药大学学报 , 2012 , 35(3) : 89.

[15]赵艳霞 , 陈学荣. 陈学荣教授中医治疗脱发的临床经验 [J] . 中国中西医结合皮肤性病杂志 , 2006 , 5(2) :103.

[16] 李灿 , 高晓芬. 唐定书治疗脂溢性脱发的临床经验 [J] . 四川中医 , 2006,24(1) : 6.

[17] 刘维. 陈达灿教授论治脂溢性脱发经验撷萃 [J] . 中医药学刊 , 2004, 22 (1) : 10.

[18] MORENO-ARIAS G , CASTELO-BRANCO C , FERRANDO J.Paradoxical effect after IPL photoepilation [J] .Dermatol , Surg , 2002 , 28: 1013-1016.

[19] 高建英 , 刘海金 , 谢亚彬 , 等. 埋线结合艾灸辨证治疗雄激素源性脱 发的疗效观察 [J] . 现代中西医结合杂志 , 2013 , 22(1):8-9 , 15.

[20] 魏跃钢 ,孙丽蕴. 中药联合米诺地尔酊治疗肝肾亏虚证雄激素性脱发临床研究[J] . 中国中西医结合皮肤性病杂志 , 2017 , 16(5):431-433.

[21] 程德华 ,刘训荃 ,许爱娥 ,等. 米诺地尔酊治疗斑秃和男性型脱发的临床观察[J] . 中华皮肤科杂志 , 2003 , 36 (4) :230-231.

[22]孙玉齐 , 肖瑞江 , 郭芙蓉 , 等 . 楂曲首乌方治疗脂溢性脱发临床观察 [J] . 现代中西医结合杂志 , 2011, 20(27) : 3418-3419.

[23]于滨兰,王伦 , 丁小珍 , 等 . 肤康合剂治疗脂溢性脱发 8 3 例 [J] . 中国中医药信息杂志 , 2010,17(9):66.

[24]董佳辉 , 张国平 , 黄小雄 . 除脂生发片联合甘草锌颗粒治疗男性早期雄激素性秃发

- [J] . 中国美容医学 , 2014,23(10):846-848.
- [25] 赵明川, 何桑 2 号凝胶的乌发作用实验研究[D]. 山东中医药大学.2009
- [26]李勇,刘靖,李东海,等. 补肾生发方联合非那雄胺治疗 脂 溢 性 脱发临床疗效分析 [J] . 世界中西医结合杂志 , (2013-7-1), 2013, 2013(7):980419.
- [27]梁幼雅,姜倩娥,李耿. 中药育发液治疗脂溢性脱发临床观察 [J] . 河北中医 2006, 13(11):39-40.
- [28]何斌,黄丹燕. 养发生发剂的制备与临床应用[J] . 医药导报 , 2007, 25 (4) :695 - 702.
- [29]Ellis CN , Brown MF , Voorhees JJ . Sulfasalazine for alopecia areata [J] . J Am Acad Dermatol , 2002 , 46: 541
- [30]GEORGALA S , KATOULIS AC , BEFON A , et al . Inosiplex for treat- ment of alopecia areata: a randomized placebocontrolled study [J] . Acta Derm Venereol , 2006 , 86(5) : 422
- [31]Rusli J K, Sanguansri L , Augustin MA. Stabilization of Oils by Microencapsulation with Heated Protein-Glucose Syrup Mixtures [J] . Journal of the American Oil Chemist s' Society , 2006, 83 (11) : 965 - 972.
- [32] Hu M, McClement s J, Decker EA. Lipid oxidation incorn oil2in2water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate and soy protein isolate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemist ry, 2003, 51 (6) :1 696- 1 700.
- [33] 阚伟娟, 喻婉莹, 于鹏霞, 等. 芹菜素的抗炎作用及其机制 [J] . 亚太传统医药 , 2008, 33(12):42-46.
- [34] Skurkovich S , Korotky NG , Sharova NM , et al . Treatment of alopecia areata with anti - interferon - γ antibodies [J] , Investig Dermatol Symp Proc , 2005 , 10(3) : 283
- [35]姜泽群, 吴琼, 徐继敏, 等. 中药何首乌促进黑色素生成的作用机理研究 [J] . 南京中医药大学学报 , 2015, 35(8):861-864.
- [36]何红梅, 朱红霞, 刘强, 等. 何首乌提取物对 C57BL /6J 小鼠毛囊生长和毛发生长

周 期 的 影 响 [J] . 中 国 实 验 方 剂 学 杂 志 , 2012 , 18 (23):216 - 219 .

[37] 赵恒光 , 李惠 . 咪喹莫特诱导 C3H/HeJ 小鼠脱毛实 验动物模型的建立 [J] . 中 华 皮 肤 科 杂 志 , 2008 , 41 (1) : 25-28 .

[38] 杜佳 , 赵恒光 , 李惠 , 等 . 咪喹莫特诱导多品系小鼠 脱毛动 物 模 型 的 建 立 [J] . 重 庆 医 科 大 学 学 报 , 2009 , 34(3) : 307-309 .

[39] Gilhar A , Kam Y , Assy B , et al . Alopecia areata induced in C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege[J] . J Invest Dermatol ,2005 ,124(1) : 288-289 .

[40]赵永光 , 赵莹 , 张建平 , 等 . 侧柏叶总黄酮在功能性洗发香波中的应 用研究[J] . 安 徽 农 业 科 学 , 2008 , 36(24):10295 - 10296 .

[41]魏春晓 , 金波 . 生姜治疗脱发 [J] . 中 国 民 间 疗 法 , 2013 , 21(8):24 .

[42]张瑞晨 , 刘斌 , 孙震晓 , 等 . 何首乌提取物对人正常肝细胞 L02 周期阻滞及凋亡的 影响 [J] . 中 西 医 结 合 学 报 , 2010 , 8(6):554 - 561 .

[43]刘莉 , 朱红霞 , 陈育尧 , 等 . 生姜对 C57 小鼠毛发生长影响的研究 [J] . 辽 宁 中 医 药 大 学 学 报 , 2013 , 07:42 - 44 .

[44] 梁培干 , 肖琴芳 , 曾峰 , 等 . 治疗白发中药内服方剂的组方原则及用药分析[J] . 中 国 美 容 医 学 , 2010 , 19(5):746 - 748 .

[45] 苏盈盈.东宫生发乌发液的药理活性研究[D].吉林大学白求恩医学院.2009

[46] Norris A , Todd C , Graham A , el al . The expression of the c-kit receptor by epidermal melanocytes may be reduced in vitiligo [J] . Br J Derma- tol , 1996 , 134:299 - 306 .

[47]罗梅梅 . 朱其杰教授治疗雄激素性脱发中医用药规律研究 [D] . 广 州 中 医 药 大 学 硕 士 论 文 , 2012 .

- [48]张兴洪,刘彦群,魏志平等. 齐墩果酸对阿霉素抑制离体猪毛囊生长的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2011, 27(6):384 - 386.
- [49]N.M.Matkar.Natural and Synthetic Hair:Dyesa Solution for Graying Hair[J].Cosmetics&toilettries magazine,2000,115(4):77-81.
- [50]Rafl Paus.Principles of hair cycle control.The Journal of Dermatology.1998;25: 793-802.
- [51] Kivity S , Agmon-Levin N , Blank M , et al . Infections and autoimmunity -friends or foes [J] Trends Immunol , 2009 , 30(8) : 409 - 414 .
- [52] Amor KT , Rashid RM , Mirnirani P . Does D matter? The role of vitamin D in hair disorders and hair follicle cyc- ling [J] . Dermatol Online J , 2010 , 16(1) : 3 .
- [53] Majella E Lane. Skin penetration enhancers[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 447(2) : 12-21.
- [54] 金建初, 易美彤, 古碧秀. 中医内病外治法的新剂型--中药凝胶剂[J]. 中国药业, 2005, 14(10):76-77.
- [55] Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides[J]. Biopolymers 2000, 55: 4-30.
- [56] 朱如彩, 周作的. 不同氮酮用量对复方苦参凝胶中苦参碱体外经皮渗透的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11):39-40.
- [57] 赵桂福, 李雁. 中药透皮吸收促进剂的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2009(9):82-84.
- [58] 冯放. 中药生发凝胶对雄激素性秃发的临床和实验研究[D]. 北京中医药大学.2019.
- [59] 蒋薇, 杨键, 裴志胜, 等. 中药制剂促毛发再生作用观察 [J] . 中国临床康复 , 2005 , 9(30) : 158 .
- [60] 吴俊洪. 痛经舒凝胶膏剂的研制[D]. 广州中医药大学, 2014.
- [61] 国家药典委员会. 中华人民共和国药[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社. 2015:附录 IQ
- [62] 张玉梅, 孙学斌, 高旭年, et al. 紫外分光光度法测定大豆总异黄酮的含量[J]. 中国食

品卫生杂志, 2000(04):7-9.

[63] 张为亮. 浅谈中药提取的出膏率控制[J]. 中国中药杂志, 2008(7):849-850.

[64] 杨基森, 张永萍. 近年来中药提取工艺研究概论[J]. 贵阳中医学院学报, 1999, 021(001):48-49.

[65] 殷明阳. 复方中药提取工艺研究概况[J]. 中草药, 2015, 46(21):3279-3283.

[66] 刘之力, 徐跃飞, 涂彩霞, et al. 56 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性影响的研究[J]. 大连医科大学学报, 2000(01):7-10.

[67] 程东庆, 尉晓冬, 王遂泉, et al. 复方中药对小鼠 B-16 黑素瘤细胞株黑素合成和酪氨酸酶的激活作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(3):173-174.

对进一步研究工作的设想和建议

1) 本研究发现生发水凝胶对二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型、咪喹莫特诱导小鼠脱发模型均有良好的治疗作用,后期实验可进一步研究生发水凝胶对其他脱发动物模型的药效学研究。

2) 生发、乌发复方中药提取物对动物模型具有较好的作用,后续可对该中药提取物进行适当分离以进一步研究其产生作用的具体成分,进一步研究其作用机制。

3) 中药复方毒副作用虽小,但后期仍需进一步考察其在更广剂量范围内对动物皮肤的刺激性,过敏性以及对小鼠内脏器官的毒性等。

攻读学位期间发表的学术论文与专利申请 4

1. 胡海峰, 刘学, 郝塞恒, 李彻. 一种中药生发发组合物及其制剂. 中国专利, 申请号 CN201911057473.4
2. 胡海峰, 刘学, 郝塞恒. 一种中药乌发组合物及其制剂. 中国专利, 申请号 CN201911058031.1
3. 胡海峰, 郝塞恒, 刘学, 李彻, 乔晓丽. 一种中药组合物及其制剂. 中国专利, 申请号 CN2020100349573
4. 郝塞恒, 刘学, 凌旺, 胡海峰. 青风藤复方颗粒药效学及急性毒性研究[J]. 发酵科技通讯. 稿号: 202003-03.

致谢

时光匆匆，硕士生活转眼间来到了尾声，回味三年的硕士生活，感触良多，有苦有甜，能一路走下来，收获颇丰，也很不易，其间得到了许多人的帮助，在此对所有帮助我的人，鼓励我的人表示衷心的感谢。

首先感谢恩师胡海峰研究员，刘英研究员，能成为老师的学生我感到非常荣幸，感谢胡老师三年来对我学习上与生活上无微不至的关怀，胡老师虽工作繁忙，但从不忘在百忙之中对我们研究生孜孜不倦的教导，从课题的选择，指导我们的科研工作，到毕业论文的撰写，都包含着胡老师辛勤的耐心指导。胡老师认真踏实，精益求精的精神深深地影响着我們，为我们树立了积极地学习榜样，人生榜样。

感谢国药集团健康产业研究院的职工徐文君老师、朱薇老师，在实验室给予我诸多帮助，使我受益良多，向他们表示诚挚的谢意。感谢师兄田勋，师姐姜锦锦、胡梦、李彻、程玉冰，同学郝赛恒、张培燕，师妹乔晓利、丁子惠、马宁、王志娟，师弟凌旺等在实验过程中、论文写作中以及日常生活中给予我的帮助和建议，实验室的时光因为你们的陪伴与鼓励而变得更加美好。

感谢我的家人对我无私的付出与支持，在我遇到挫折时鼓励我，帮助我；感谢朋友对我的帮助和关怀，在我失落时的不离不弃。你们是我坚强的后盾，在你们的帮助下，我更有勇气面对困难。

最后特别感谢各位专家学者，感谢您们在百忙之中抽出宝贵的时间审阅论文并出席论文答辩会。

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解上海医药工业研究院有关保留、使用学位论文的规定，同意上海医药工业研究院保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许该论文被查阅和借阅。本人授权上海医药工业研究院可以将本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和汇编该学位论文。

本学位论文属于（请在以上方框内打“√”）

不公开□；

公开☒。

研究生姓名： 刘宇

日期： _____

导师姓名： 胡海峰

日期： _____