

分 类 号: R378

单位代码: 10183

研究生学号: 2007712058



吉 林 大 学

硕士学位论文

东宫生发乌发液的药理活性研究

Study on Pharmacodynamics of DongGong

Hair Growth and Blacking Lotion

作者姓名: 苏盈盈

专 业: 微生物学

研究方向: 分子病毒

指导教师: 李 凡 教 授

培养单位: 吉林大学白求恩医学院

2009 年 4 月

东宫生发乌发液的药理活性研究

Study on Pharmacodynamics of DongGong

Hair Growth and Blacking Lotion

作者姓名：苏盈盈

专业名称：微生物学

指导教师：李 凡 教 授


学位类别：理学硕士

答辩日期：2009 年 6 月 6 日

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

吉林大学博士(或硕士)学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究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。

学位论文作者签名： 

日期： 2009 年 6 月 3 日

内 容 提 要

脱发及早发性白发病是临床常见的毛发病，对人们的精神、心理产生较大的影响。随着生活水平的提高，人们对美容美发要求日益迫切，现代医学和传统医学也越来越重视对脱发和乌发的研究。目前应用于临床治疗脱发及早发性白发病的化学药物均存在着不同程度的副作用及停药易复发的缺点，因此继续寻找更安全更有效的治疗脱发、白发的新型药物将成为该领域的研究趋势。东宫生发乌发液是由延吉市达元有限公司开发出的新产品，该品种为一种天然护发养发产品，经临床上 30 余例脱发、白发患者应用，均获得了良好治疗效果。

本论文是通过实验方法研究东宫生发乌发液的药理作用，为其进一步的临床应用提供药效学的理论依据。

研究内容包括以下四个方面：

1、体外培养小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞，应用 7 个不同浓度的药物与细胞共同孵育，采用四甲基偶氮唑盐(MTT)、多巴速率氧化法分别测定药物对 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖的影响及酪氨酸酶的活性。

结果表明：东宫生发乌发液能明显促进小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的增殖，能明显激活黑素瘤细胞酪氨酸酶活性。并呈高浓度抑制，中低浓度激活的趋势。

说明东宫生发乌发液可深入毛囊以激活酪氨酸酶的活性，即可促进毛发黑色素的生成，从而达到乌发的目的。

2、体外进行小鼠毛囊分离培养，测定东宫生发乌发液对小鼠触

须游离毛囊生长的影响。

结果表明：东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长无明显作用。

3、进行小鼠局部涂抹东宫生发乌发液的吸收毒性实验，以测定东宫生发乌发液的毒性反应。

结果表明：未见小鼠局部皮肤红斑、水肿及其它明显刺激反应，也未见其它异常体征，无全身毒性反应。说明东宫生发乌发液毒性很低。

4、选用 C57 小鼠，用硫化钠脱毛，建立脱发模型进行实验。研究东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响。对 C57 小鼠脱毛区体毛生长进行“评分”，测量给药前后小鼠脱毛区体毛长度及重量。

实验结果表明，东宫生发乌发液中、低剂量组的毛发增长长度与阴性对照组比较差异有显著性($P<0.01$, $P<0.05$)。表明东宫生发乌发液可使化学性脱毛小鼠体毛生长速度加快，单位面积的新生毛长和毛重增加，具有明显促进毛发生长的作用。

在组织学的观察中反映出药物能促进给药皮肤的毛囊数增长。说明东宫生发乌发液能改善毛囊营养，刺激毛囊再生，促进毛发生长和再生。

综上所述，东宫生发乌发液能促进 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖；对酪氨酸酶有明显的激活作用；对小鼠触须游离毛囊生长无明显作用；对小鼠背毛的生长有一定的促进作用。

创新点：国内外首次对东宫生发乌发液进行体内、体外的药理活性研究。

关键词：东宫生发乌发液/生发/乌发/药理活性

目 录

第 1 章 绪论

第 2 章 东宫生发乌发液对小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的作用

2.1 实验材料

2.2 实验方法

2.3 统计学分析

2.4 实验结果

第 3 章 东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长的影响

3.1 实验材料

3.2 实验方法

3.3 统计学分析

3.4 实验结果

第 4 章 东宫生发乌发液对小鼠的吸收毒性研究.....

4.1 实验材料

4.2 实验方法

4.3 统计学分析

4.4 实验结果

第 5 章 东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响

5.1 实验材料

5.2 实验方法

5.3 统计学分析

5.4 实验结果

第 6 章 讨论

第 7 章 结论

参考文献

导师及作者简介

致谢

中文摘要

英文摘要

符号说明

英文缩写	中文名称
DMSO	二甲基亚砷
MTT	噻唑兰
PBS	磷酸盐缓冲液
NaCl	氯化钠
KCl	氯化钾
NaH ₂ P0 ₄	磷酸二氢钠
KH ₂ PO ₄	磷酸二氢钾
Williams E	威廉姆斯培养液
Na ₂ S	硫化钠

第1章 绪论

爱美乃人之天性，每个人都希望自己有一个美丽、健康、精神抖擞的外表，头发自然是整体形象中不可忽视的一部分^[1]。头发是皮肤附属器官，是人体的一部分^[2]。

1.1 毛发的结构及生长特点

头发的构造分为毛干和毛根两部分。毛干是露出皮肤之外的部分，由角化细胞构成。胞质内含有黑色素颗粒，其含量的多少与毛发的色泽有关。毛根是埋在皮肤内的部分，并且被毛囊包围。毛囊是上皮组织和结缔组织构成的鞘状囊。毛根和毛囊的末端膨大，称毛球。毛球的细胞分裂活跃，是毛发的生长点。毛球的底部凹陷，结缔组织突入其中，形成毛乳头。毛乳头内含有毛细血管及神经末梢，能营养毛球，并有感觉功能。如果毛乳头萎缩或受到破坏，头发就会停止生长并逐渐脱落。

头发的基本化学成分是角蛋白（内含丰富的二硫键）、黑色素和痕量的金属元素。它由圆柱状毛干及毛囊两部分构成。髓质位于毛干的中心，是毛发变化最大的部分，由2-3层部分角化的立方形和多角形细胞构成，细胞基质为 β -角蛋白。毛囊依功能分为三带：内带是头发细胞生物合成部位；中间带是角质形成部位；终末带是稳定期头发。毛囊和皮脂腺及顶泌腺紧密相连，两种腺体导管直接开口于毛囊内。毛泌汗腺导管位于毛囊附近，未开口进入毛囊，上述三种腺体分泌物滋养毛干，很可能是微量元素和药物等进入毛发的载体^[3]。

毛囊是控制毛发周期性生长的主要因素，由上皮和真皮成分组成。上皮成分包括内毛根鞘和外毛根鞘，真皮成分包括毛乳头和真皮结缔组织鞘，上皮成分和真皮成分之间的相互作用决定毛发的生长。此外，也受生长因子、细胞因子、皮质激素和药物等影响。毛囊形成之后，所有成熟毛囊进入毛囊周期的休止期。根据组织李特征等^[4]，将毛囊周期分为长达数年的生长期、在凋亡机制促发下形成短暂(数周)的退行期和为期数月的休止期。

毛发的周期性生长一般分为三期：

(1) 毛发生长初期(anagen)：也称活动期，此期可持续 2-5 年，甚至更长。毛发呈活跃增生状态，毛球下部细胞分裂加快，毛球上部细胞分化出皮质，毛小皮；毛乳头增大，细胞分裂加快，数目增多。原不活跃的黑色素细胞长出树枝状突，开始形成黑色素。生长初期毛囊底部基质细胞增生活跃，代谢活性明显增加。有学者认为，微量元素在代谢活性较强的初期进入头发，但也有学者提出外源性物质进入头发有部位特异性，与代谢活性程度无关^[5]。

(2) 毛发生长中期(catagen)：为细胞增生停止、毛球开始萎缩的时期，内毛根鞘消失，外毛根鞘逐渐角化，毛球变平，不成凹陷，毛乳头逐渐缩小，细胞数目减少。黑色素细胞失去树枝状突，呈圆形而无活性。

(3) 静止期(telogen)：为头发停止生长，毛根部停留于真皮浅层的时期。

1.2 头发的作用

头发在人体中的功能虽然没有心脏、肾脏等生命中枢器官显得重要，但它同样具有不可或缺的人体生理功能^[6]：① 头发能够保护大脑，减少和避免外来的机械性和化学性损伤，缓冲对头部的伤害。② 阻止或减轻紫外线对头皮和颅内组织器官的损伤。③ 冬季保暖、夏季散热。④ 代谢体内汞、砷、铅重金属等有害物质。⑤ 为皮脂腺和汗腺的分泌物提供出路。⑥ 促进细胞新陈代谢，改善促进血液循环，增强免疫力等生理作用。⑦ 直接决定人的外观，有重要的美容学价值。

我国的传统医学理论对头发也是极为重视的，认为它是“窥测脏腑的一个窗口”。《东医宝鉴》中就论述“血衰则发衰，血热则发黄，血败则发白”。毋庸置疑，一头乌黑浓密的头发总能给人以活力四射的健康印象。但随着人们生活节奏的加快，白发、脱发症状正日趋严重。早老性白发病（俗称少白头）及脱发是临床常见的毛发病，对人们的精神、心理会产生较大的负面影响，不仅严重影响了生活质量，而且对健康和工作也带来了很大的危害。近年来，随着社会竞争日益加剧，人们在工作、学习、生活等各方面的压力逐渐加大，使脱发及早老性白发病的发病率在逐年增高，发病年龄也日趋年轻化。根据城市抽样调查统计，我国中年人(35-59岁) 白发、脱发的发病率高达45.7%^[3]。

在现代社会中，由于多种原因，很多人过早的出现了白发脱发的现象，不仅严重影响了生活质量，而且对健康及工作也带来了很大的危害。脱发、白发尽管表现形式不一样，但引起病变的原因却有相同之处，既有先天性遗传因素，也有后天因素；既有生理性的原因，也有病理性的原因。

1.3 黑色素的形成与作用

黑色素(Melanin)是由黑素细胞产生的一种高分子生物色素,广泛存在于人和高等动物的皮肤、眼睛和毛发中,能起到保护皮肤和眼睛,抵御紫外线辐射的作用^[7]。在人体内,黑色素除决定皮肤、毛发颜色外,还主要具有防晒、防老化、防癌变三大生理功能,同时它也是一种稳定的自由基,可参与体内的一些氧化还原反应,它可以和某些毒性物质如金属离子、氧自由基结合,消除这些物质的破坏作用从而维护人体的健康^[8]。黑色素也能提供机械力来维持蛋白质的交联,保护蛋白质不被降解。黑色素可分为两种,一种是真黑色素(Enmelanin),它不含硫原子,呈暗棕色或黑色;另一种是脱黑色素(Pheomelanin),含硫原子,为黄色或微红棕色。在不同人种和个体中黑色素的种类和含量有所不同,则头发、皮肤以及眼睛的颜色就有差异^[9]。

人毛发的颜色取决于毛囊的黑素细胞合成黑色素的质和量,黑素合成是一多步骤、多因素参与的复杂过程,同时受多种细胞因子、激素和各种酶的调控,若其中任何一个环节发生障碍,均可影响黑素的形成。

许多科学家的实验已证实黑色素的形成与酪氨酸酶(Ty-rosinase)的作用密切相关^[10]。酪氨酸酶是一种含铜的氧化还原酶,广泛存在于生物体中,是生物体合成黑色素的关键酶,该酶活性大小决定着黑色素形成的数量^[11],故通过调控其活性可以调控黑色素的生成量^[12]。孙靖^[13]等报道,酪氨酸含量的降低对头发发质和颜色有较大的负面影

响。因为酪氨酸酶是由 Cu^{2+} 与酶蛋白结合的金属酶，故其活性依赖于微量的铜离子 (Cu^{2+}) 以及其他多价离子，如钴离子 (Co^{3+})、镍离子 (Ni^{2+}) 和钒离子 (V^{2+})，如果人体缺铜,将使酪氨酸酶含量减少或活性降低，会出现局部的色素脱失症，从而导致白发的发生^[14]。

1.4 早老性白发病及其病因

白发病指头发部分或全部变白。随着年龄的增加，人的头发由黑变白是一种必然的生理趋势。老年头发灰白或变白是一种正常生理现象。灰发中黑素细胞数目正常，但黑素减少，而白发中黑素细胞也减少。青少年白发即头发过早变白，俗称“少白头”，属于皮肤附属器官疾病之一。由于青少年白发的病因比较复杂，对青少年患者的心理影响较大，并且是冠心病的一个危险因素^[15]，发病率较高(15-32%)^[16]。

中医学认为，下列因素与白发有关：一是精虚血弱：肾精不足，不能化生阴血，阴血亏虚，导致毛发失其濡养，故而花白。二是血热偏盛：情绪激动，致使水不涵木，肝旺血燥，血热偏盛，毛根失养，故发早白。三是肝郁脾湿：肝气郁滞、损及心脾，脾伤运化失职，气血生化无源，故而白发。

现代医学认为，引起白发的主要原因是由黑素细胞形成黑色素的功能减弱，毛发黑色素形成减少，酪氨酸酶的活性降低而使毛干中色素消失所致。白发形成的机制包括：(1)毛母黑素细胞数量减少或消失。(2)黑素生长障碍。也有学者利用以 Lacz 为报告基因的转基因毛发变白小鼠的实验发现，黑色素细胞在黑色素合成过程中产生的大量氧自由基导致毛囊黑色素细胞干细胞库功能发生缺陷，因此造成白发的最

主要原因很可能是黑色素细胞出现异常^[17]。(3)酪氨酸酶生成减少或消失。(4)体内存有酪氨酸酶抑制物质。现已知黑色素的产生与酪氨酸酶密切相关，酪氨酸酶普遍存在于人和动植物体内，它是由二价 Cu 离子与酶蛋白结合的金属酶，该酶催化酪氨酸形成黑色素。如果人体 Cu 的含量减少或活性降低，会出现局部的色素脱失症，从而导致白发的发生^[16]。(5)黑素由毛母黑素细胞向毛皮质细胞移行障碍。(6)黑发铜、铁、钴等微量元素缺乏或不能正常地运到头发的根部^[17]。

青少年生白发，是由于头发髓质和皮质里黑色素颗粒减少或被空气填充的缘故。正常情况下，毛乳头内有丰富的血管，为毛乳头、毛球部提供充足的营养，黑色素颗粒便顺利合成。当黑色素颗粒在毛乳头、毛球部的形成发生障碍，或虽然形成但因某种因素不能运送到毛发中去，从而使毛发髓质、皮质部分的黑色素颗粒减少、消失时，就会出现白发。少年白发的原因，一般认为与下列几种因素有关：

(1) 精神因素。精神紧张、忧愁伤感、焦虑不安、恐慌惊吓等都是造成少白头的原因。现代医学认为，不良的精神因素，会造成供应毛发营养的血管发生痉挛，使毛乳头、毛球部的色素细胞分泌黑色素的功能发生障碍，影响黑色素颗粒的形成和运送^[18]。

(2) 营养失调。实验证明，黑鼠如果一直进食缺乏叶酸、泛酸、维生素等的食物，鼠毛便会变成灰白色。另外，头发色素颗粒的颜色，往往和它含的金属有关。黑头发中的色素颗粒含有铜、钴、铁等元素，假如缺少这些元素，往往出现白发^[19,20]。此外。缺少蛋白质、严重营养不良等，也可长白发。

(3) 患慢性疾病。一些人患有植物神经功能失调、甲状腺功能亢

进、肺结核、伤寒、内分泌障碍等，也会出现白发。这是因为疾病破坏或干扰了毛乳头、毛球色素细胞的生长发育，使它失去分泌黑色素的能力，阻碍黑色素颗粒的形成。

(4) 遗传因素。少年白发也有一定的先天因素，在父母或家族血统中有类似的情况发生。

头发过早变白可以用中药内服、中药外用、食膳疗法、推拿按摩等方法进行治疗。治疗以活血化瘀、舒通经脉、滋养毛根、促进毛囊黑色素的再生和利用，及滋补肝肾以增强毛发的生长功能为原则^[21]。

1.5 早老性脱发及其病因

脱发是指头发脱落的现象，分为生理性脱发及病理性脱发。

生理性脱发是指头发正常的脱落。每个正常成年人大约有 10 万根头发，每天要正常脱落 50 根~75 根。这是因为毛发的生长有周期性，包括生长期、退行期及休止期。正常脱落的头发是处于退行期及休止期的毛发。能维持正常数量的头发是由于进入退行期与新进入生长期的毛发处于动态平衡中^[8]。如果各种体内外因素打乱了头发正常的周期或平衡，破坏了毛囊的结构，则会造成毛发脱落过多或长期不能再生新发而引起脱发病症^[16]。

病理性脱发是指头发异常或过度的脱落。与种族、性别、年龄和遗传等因素有关。有些脱发原因明确，统称症状性脱发，如服用细胞毒性药物后脱发、重症全身性疾病后脱发、皮肤病引起的脱发等。有些脱发原因尚不完全明了，包括雄激素性脱发及斑秃。雄激素性脱发(男性型秃发)患者多数在青春期后于鬓角两侧及前额出现脱发，随年龄的增长，脱发区向上扩大，头顶的头发也开始脱落，并发展为大片

脱发。女性也见此类脱发，但少见，表现为头顶部稀疏脱发，前额和鬓角少脱发。斑秃则指头皮突然发生的圆形秃发（俗称鬼剃头）。一般认为与精神刺激、情绪紧张等有关。

中医认为肝藏血，发为血之余，肾主骨生髓，其荣在发，血气盛则肾气强，肾气强骨髓充满，毛发黑而有光泽，血气虚则肾气弱，血气不能行，发则枯黄无泽而脱落，故认为脱发的形成与肝肾不足，血气虚弱有关。同时，人受七情内伤、情志抑郁、劳心伤脾、影响血气运行不畅而导致气滞血瘀，毛发失去营养而脱落，这与现代医学研究的机体内分泌与免疫紊乱失调、精神创伤与过度紧张、血管及血液循环障碍等因素，导致毛发营养障碍而脱发的观点一致。近年来临床检测表明，脱发患者血清中内皮素(ET)含量明显高于正常人。这种能够引起局部血管强烈发缩痉挛而致首部供血减少的物质，可导致毛发枯竭脱落或变白^[5]。

目前有相关学者实验证实微量元素的缺乏是造成脱发的主要原因之一，许蕴等^[19]采用原子吸收光谱法，对57名不明原因脱发患者和48名体检正常的健康成人的头发进行微量元素含量的测定，测定结果认证铜、铁营养不良是其脱发发生的重要原因。马琳等^[17]对52名脱发患儿头发中微量元素铜、铁、锌、钙、镁、铅含量进行测定，研究分析结果显示脱发患儿头发中铜、锌的含量低于正常对照组，提示微量元素铜、锌的缺乏是造成儿童脱发的重要因素。

1.6 治疗脱发的研究进展

近年来脱发的治疗方法较多。脱发的治疗首先要去除可能的诱因，特别是精神因素，要保证睡眠充足，心情舒畅，注意休息，劳逸结合。其次可口服镇静药、维生素 B 族、胱氨酸等。局部可外用斑蝥辣椒酊、皮质类固醇激素制剂、蒽林软膏、樟脑油或鲜姜摩擦，用以刺激头皮，增加皮肤的血流量，促进毛发生长。物理疗法包括紫外线照射、梅花针等疗法。

局部用药是将药物直接作用于头部皮肤，营养头部肌肤，促进局部血循环，促使脱落的毛发再生。这类治疗方法的典型药物的药物治疗如 101 毛发再生精。但该方法只局限于治标，而不能通过调理脏腑气血功能而达到治本的目的，所以对肝肾亏虚，阴血不足所致的严重脱发很难起到满意的治疗效果。

治疗脱发的药物目前主要有以下几类^[29]：①生物应答调节剂：包括维 A 酸类、成纤维细胞生长因子、胎盘素及胚胎素等；②免疫调节剂：包括他克莫司、肾上腺皮质激素、环孢素、地蒽酚等；③血管扩张剂：如毛果芸香碱、氯化卡波洛宁、环腺苷酸、卵磷脂等；④局部刺激性生发药：如芦荟宁、姜汁、辣椒油树脂、蒜汁、斑蝥酊等；⑤抗雄激素药：如非那雄胺、依立雄胺、螺内酯、雌性激素等；⑥钾离子通道开放药：如米诺地尔、二氮嗪等；⑦中医药类及其他。目前应用于临床治疗脱发的化学药物存在着不同程度的副作用及停药易复发的缺点。

王艳荣经研究“脱发再生灵”纯中药制剂后指出：方中运用何首乌、枸杞子、菟丝子、熟地以补益肝肾；当归、人参、红花、川芎以活血化瘀、养气补血、温精通络；白芍、天麻以益肾祛风、除湿止痒。全方配伍具有乌发功能，可扩张豚鼠真皮浅层毛细血管，增加局部供血量，改善局部微循环，加强毛囊营养，促进毛发生长和再生^[30]。可见对于头发的治疗，若对症下药，皆可取得较为良好的效果。

1.7 治疗老年性白发病的研究进展

近年来，通过激活酪氨酸酶的活性来促进毛发黑色素的生成而使头发变黑是一重要的研究方向。通过各种方式将药剂深入毛囊以激活酪氨酸酶的活性，即可促进毛发黑色素的生成，从而达到乌发的目的。

这方面的研究引起了化妆品、美容和医药界的兴趣，并且已有研究报道了部分中药和一些无机离子等因素对酪氨酸酶有或多或少的激活作用，分述如下：

(1) 使用补骨脂可以增强紫外线的作用，使酪氨酸酶的活性增加，从而增加黑素的合成。徐氏等^[10]实验也证实，补骨脂对酪氨酸酶有明显的激活作用^[36]。

(2) 酪氨酸酶的活性会依赖于微量的铜，它以一价铜或二价铜的形式存在，相似的络合物也包含其他的多价离子，比如钴、镍和钒，它们也影响酪氨酸酶的活性。泛酸已经被报道用以改变由于缺少铜引起的白发，它通过一些方式能把铜粘合到酪氨酸酶上，Hundley 和 ING

研究发现，铜能积聚在泛酸缺乏的老鼠皮肤上，而使酪氨酸酶活性增加^[2]。

(3) 另外，有资料表明，薄荷水提物对酪氨酸酶具有较强的激活作用。在一定浓度范围内，随着剂量的增加，激活作用增强^[33]。

1.8 生发、乌发药物的研究趋势

很多患有脱发、早老性白发的人选择使用防脱、乌发产品染发而使其变黑。一般的染发剂会使头发发生氧化-还原反应而使头发的某些角质蛋白和色素成分发生明显的氧化，现在流行的漂染剂更是一种化学性脱色剂，在脱色的同时改变头发的颜色，这种成分对头发的毛鳞片有伤害，受损的毛鳞片会变得脆弱易断；同时经脱色剂处理后的头发各氨基酸含量可发生显著变化，如胱氨酸、蛋氨酸、酪氨酸含量会明显降低，对头发的质量和颜色有很大的负面影响，并且随着人的新陈代谢不断进行，新生成的头发仍然为白色，并未从根本上解决使头发变黑的问题^[13]。

综上所述，中医和西医针对脱发、早老性白发有具有一定疗效作用，但都存在不足之处。临床治疗脱发及早老性白发病的化学药物存在着不同程度的副作用。如西药治疗的杀伤白细胞作用、抑制雄激素作用等，同时具有停药易复发的缺点，而现有中药因其作用特点不能够快速、准确地达到期待的疗效，所以它们都不足以对脱发、早老性白发病进行完善的治疗。因此继续寻找更安全更有效的治疗脱发、白发的新型药物成为该领域的研究趋势。

1.9 东宫生发乌发液简介

东宫生发乌发液由延吉市达元有限公司提供，批号：2008413。

该品种为一天然护发养发产品。经临床上 30 余例脱发、白发患者应用，均获得了良好治疗效果。

采用电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）测定东宫生发乌发液中无机成分的含量测定，结果如表 1.1 所示：

表 1.1 东宫生发乌发液无机成分的含量

元素	$\rho(B)/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					$\rho(B)/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
	K	Na	Ca	Mg	Fe	Li	B	Al	V	Cr	Mn
含量	125	475	47.21	12.11	1.29	106.1	187.1	87.48	72.37	2.21	15.12
元素	$\rho(B)/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$										
	Co	Ni	Cu	Zn	Sr	As	Se	Mo	Cd	Ba	Hg
含量	0.268	4.722	21.43	2.360	324.1	10.92	5.816	195.6	0.025	125.2	0.174
元素	$\rho(B)/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$										
	Pb	Th	U	Ge	La	Ce	Pr	Nb	Sm	Eu	Gd
含量	0.244	0.529	0.454	--	0.389	0.330	0.096	0.433	0.079	0.009	0.081
元素	$\rho(B)/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$										
	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	Y			
含量	0.004	0.092	0.024	0.062	0.001	0.042	0.010	0.440			

东宫生发乌发液中有机成分的分析正在进行中。

根据白发、脱发是由黑素细胞形成黑色素的功能减弱，酪氨酸酶的活性降低等引起的，故本论文拟进行体内、体外实验对东宫生发乌发液的对黑素细胞、酪氨酸酶等影响方面进行研究，以明确其生发、乌发作用。研究方案：

1、培养小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞，应用不同剂量组的药物与细胞共同孵育，采用四甲基偶氮唑盐、多巴速率氧化法分别测定药物对 B₁₆ 黑素瘤细胞的形态、增殖的影响及对酪氨酸酶活性的影响。

小鼠黑色瘤细胞作为肿瘤细胞，对环境要求不高，不需要添加特殊的促分裂成分，而且繁殖迅速，生长稳定，当体外条件满足生长所需时，能够无限制生长下去，这些特点使之成为研究黑素细胞的理想材料。在鼠黑素瘤细胞系中较为典型的是 B₁₆ 细胞，该细胞系是一种形态均一、生长增殖稳定、生物学性状比较清楚的细胞群，其应用十分广泛^[40]。

2、测定药物对小鼠触须游离毛囊生长的影响。

3、进行小鼠局部涂抹东宫生发乌发液的吸收毒性实验，以测定东宫生发乌发液的毒性反应。

4、小鼠背毛实验，测定药物对小鼠背毛生长的影响。

第 2 章 东宫生发乌发液对小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的作用

2.1 实验材料

2.1.1 细胞

小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞株（吉林大学白求恩医学院病原生物学教研室）

2.1.2 主要试剂及其配制

DMEM 培养液 (GIBCO 公司)

胎牛血清 (杭州四季青公司)

25%胰蛋白酶溶液：胰蛋白酶 0.25g，PBS 缓冲液 100ml，10 磅 15 分钟高压灭菌，分装，4℃ 贮存备用。

PBS 缓冲液：NaCl 8.0g，KCl 0.2g，NaH₂PO₄ 1.15g，KH₂PO₄ 0.2g，蒸馏水 1000ml 溶解，校正 pH7.0~7.2，121℃ 灭菌 20 分钟，4℃ 贮存备用。

MTT (德国 SIGMA 公司)溶液：MTT 50mg，D-Hank's 10ml，充分溶解，滤膜 (0.22 μ m) 过滤除菌，分装：1ml / 支，4℃ 贮存备用，两日内有效。

5% Triton-100 溶液：Triton-100 0.5g，蒸馏水 100ml，充分溶解。

1% DL-多巴溶液：DL-多巴 0.1g，蒸馏水 100ml，充分溶解，滤膜 (0.22 μ m) 过滤除菌，4℃ 贮存备用。

DMSO (德国 SIGMA 公司)

各种离心管、细胞培养瓶、培养板（北京鼎国生物技术有限责任公司）

2.1.3 主要仪器

SW-CJ-IF 超净工作台（苏州安泰技术有限公司）

BHC-1300IIA/B₃ 生物安全柜（净集团安泰公司）

TGL-16 高速台式离心机（上海医疗器械六厂）

TDL80-2B 低速离心机（上海安婷科学仪器厂）

CKX41 倒置显微镜（日本 Olympus Instrument）

YS-2H 解剖显微镜（上海千欣仪器有限公司）

YJ-876 净化工作台（苏州安泰空气技术有限公司）

HG303-5CO₂ 孵育箱（南京实验仪器厂）

SHH-W21Y420 三用恒温水浴箱（北京长安科学仪器厂）

10 μl、100 μl、200 μl、1000 μl 微量加样器（荷兰）

A5028 酶标仪（UNIC 公司）

ES-60J 电子分析天平（沈阳龙腾电子称有限公司）

U802 数码相机（日本 Olympus）

2.2 实验方法

2.2.1 B₁₆ 黑素瘤细胞的复苏与培养

将冻存的黑素瘤细胞从液氮容器中取出，迅速置 37℃ 水浴箱中融化，然后放入装有 DMEM 培养液的离心管中，2000r/min，离心 5 分钟，吸取上清液，加入含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液，吹打细胞使混合均匀，放入培养瓶中，37℃、5%CO₂ 孵箱中，饱和湿度条件下培养，次日更换培养液。待细胞生长至近融合状态，用 25%胰蛋白酶约 1ml 消化细胞 1~2 分钟，倒置显微镜下观察，待细胞变圆时，加 DMEM 1ml 终止消化，再加适量的 PBS 液吹打细胞至混悬状，收集细胞至离心管中，2000r/min 离心 5 分钟，吸取上清液，沉淀的细胞用适量培养液稀释，计数板上计数细胞，以浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 接种细胞于培养瓶中，2~3 周后传代备用。每次实验均取自同一传代细胞。

2.2.2 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖的测定

采用甲基偶氮唑蓝比色法（MTT法）^[34]测定B₁₆黑素瘤细胞的增殖。具体步骤如下：

传代后的细胞生长至近融合状态时，用胰蛋白酶消化，收集并调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ ，接种于96孔细胞培养板中，每孔加细胞悬液 100 μl ，在加入不同浓度的东宫生发乌发液（分别进行0、2、4、8、16、32、64倍稀释）100 μl ，每一浓度设3个平行孔，以单纯细胞孔作为对照孔。将培养板置于37℃，5%CO₂孵箱中培养 24~48h，于结束前加入

MTT (5mg/ml) 10 μ l/孔, 继续培养4h, 小心吸去上清, 加入 DMSO 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ 孵育2h, 待颗粒完全溶解后吹打均匀, 立即于酶标仪490nm处测定光吸光度, 并绘制生长曲线。

2.2.3 B₁₆ 黑素瘤细胞酪氨酸酶活性的测定^[35]

选择对数生长期细胞, 将细胞浓度调整为 4×10^4 m/l, 加入96孔细胞培养板上, 每孔100 μ l, 待细胞贴壁生长后在加入不同浓度的东宫生发乌发液(分别0、2、4、8、16、32、64倍稀释) 100 μ l, 以不加东宫生发乌发液的细胞孔作为对照, 对照组加100 μ l培养液, 每一浓度设立3个平行孔, 取平均值。同上条件培养48h后弃培养液, 用PBS洗涤2次, 每孔5% Triton-100溶液50 μ l, 迅速置-80 $^{\circ}$ C冻存30分钟, 随后室温融化使细胞完全破裂, 37 $^{\circ}$ C预温5分钟后加入1%DL-多巴溶液20 μ l, 37 $^{\circ}$ C反应2h, 立即于酶标仪490nm处测定吸光度, 并绘制生长曲线。

按下列公式计算酶激活率:

$$\text{酶激活率} = (\text{药物组OD值} - \text{对照组OD值}) / (\text{对照组OD值} - \text{空白})$$

2.3 统计学分析

各项指标数据以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理方法采用组间实测值 t -检验分析。

2.4 实验结果

2.4.1 对 B₁₆ 黑素瘤细胞形态的影响

倒置显微镜下可见, 与 B₁₆ 黑素瘤对照组细胞(图 2.1)相比较, 用

东宫生发乌发液处理 48h 后细胞形态生长(图 2.6)最为旺盛，密度增加，树突增多。



图 2.1 对照组黑素瘤细胞形态



图 2.2 原液组黑素瘤细胞形态



图 2.3 稀释 2 倍组黑素瘤细胞形态



图 2.4 稀释 4 倍组黑素瘤细胞形态

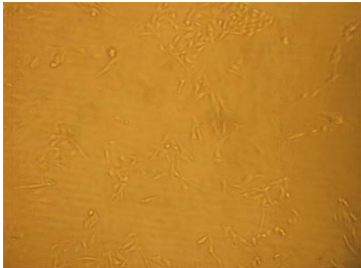


图 2.5 稀释 8 倍组黑素瘤细胞形态

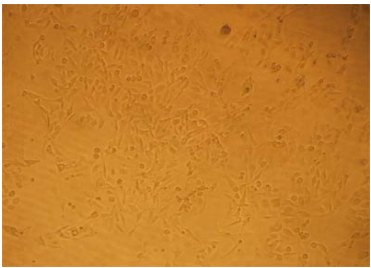


图 2.6 稀释 16 倍组黑素瘤细胞形态



图 2.7 稀释 32 倍组黑素瘤细胞形态



图 2.8 稀释 64 倍组黑素瘤细胞形态

2.4.2 对 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖的结果

MTT 法测定结果显示，东宫生发乌发液在稀释倍数大于 8 倍时对黑素细胞增殖有明显促进作用 ($P<0.05$)。东宫生发乌发液原液及稀释 2、4 倍对细胞增殖有明显的抑制作用(见表 2.1)。不同倍比稀释的东宫生发乌发液作用细胞后对细胞增长活性的影响见图 2.9。

表 2.1 东宫生发乌发液对 B16 黑素瘤细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	OD 值
对照组	0.646±0.037
原液组	0.164±0.016 [#]
稀释 2 倍组	0.167±0.021 [#]
稀释 4 倍组	0.356±0.093 [#]
稀释 8 倍组	0.771±0.053*
稀释 16 倍组	0.751±0.046*
稀释 32 倍组	0.732±0.035*
稀释 64 倍组	0.655±0.046

*与对照组相比， $P<0.05$ ，有明显的促进作用；[#]与对照组相比， $P<0.05$ ，有明显的抑制作用

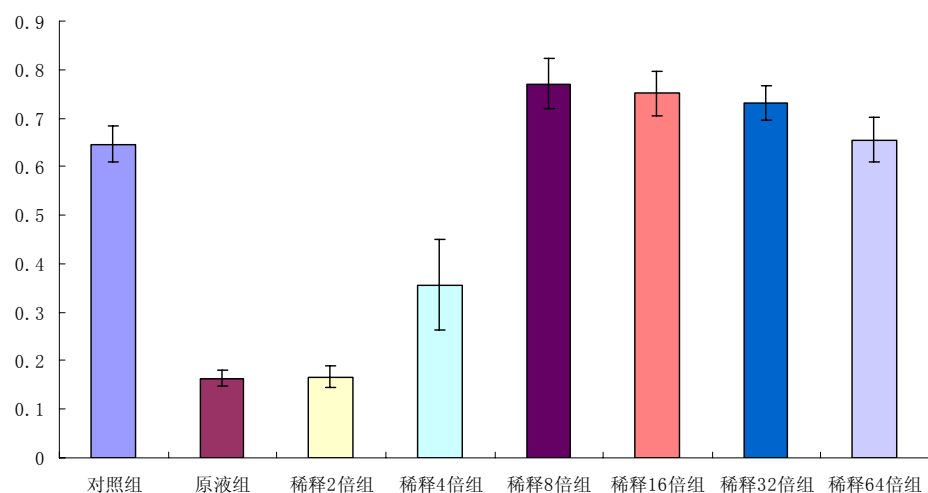


图 9 东宫生发乌发液对 B₁₆ 黑素瘤细胞活性的影响

2.4.3 对 B₁₆ 黑素瘤细胞酪氨酸酶活性的影响

多巴速率氧化法测定结果显示,东宫生发乌发液在稀释倍数大于 16 倍时对酪氨酸酶的活性均有明显增强作用 ($P<0.05$),其中稀释倍数为 8、16 倍时对酪氨酸酶的活性有非常显著的增强作用 ($P<0.01$)。东宫生发乌发液原液及稀释倍数 2、4 倍时对酪氨酸酶的活性有明显的抑制作用(见表 2.2)。不同倍比稀释的东宫生发乌发液对酪氨酸酶活性的影响见图 2.10。

表 2.2 东宫生发乌发液对酪氨酸酶活性激活率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	OD 值
对照组	0.153±0.012
原液组	0.075±0.009 ^{##}
稀释 2 倍组	0.093±0.004 ^{##}
稀释 4 倍组	0.133±0.008 [#]
稀释 8 倍组	0.198±0.005 ^{**}
稀释 16 倍组	0.206±0.005 ^{**}
稀释 32 倍组	0.174±0.009 [*]
稀释 64 倍组	0.166±0.005

*与对照组相比, $P<0.05$, 有明显促进作用, **与对照组相比, $P<0.01$, 有非常显著促进作用;
[#]与对照组相比, $P<0.05$, 有明显抑制作用, ^{##}与对照组相比, $P<0.01$, 有非常明显抑制作用。

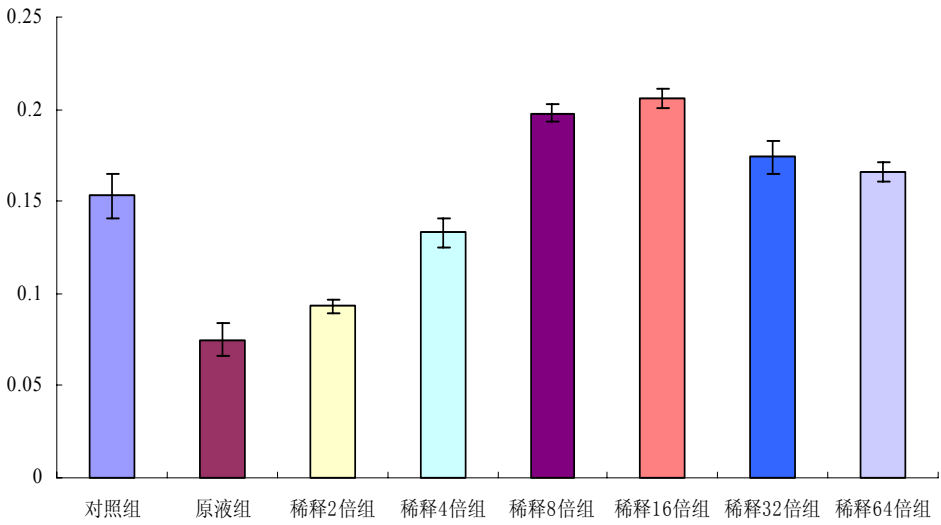


图 2.10 东宫生发乌发液对 B₁₆ 黑素瘤细胞酪氨酸酶活性的影响

第3章 东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长的影响

3.1 实验材料

3.1.1 动物

C57 小鼠，雌雄各半，体重 18~22g，购自吉林大学基础医学院动物实验中心，动物合格证号：SCXK-(吉)-2003-0001。

3.1.2 主要试剂及其配制

Hank's 液： NaCl 8g, KCl 0.4g, $12\cdot\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.121g, KH_2PO_4 0.06g, NaHCO_3 0.35g, 先加 70ml 水溶于 100ml, 用 7.6% 的 NaHCO_3 调节 PH 制 7.0-7.2, 高压灭菌, 4° 保存。

PBS 缓冲液： Nacl 8g, KCl 0.2g, NaH_2P_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g, 蒸馏水 1000ml 溶解, 校正 pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 20 分钟, 4℃ 贮存备用。

细胞生长液： DMEM 91ml, 3%谷氨酰胺 1ml, 青链霉素 1ml, 7.5% 碳酸氢钠 2ml, 胎牛血清 5ml。

无血清毛囊生长液： Williams E 培养液中加入过滤除菌的胰岛素(终浓度 $5\mu\text{g/ml}$), 转铁蛋白(终浓度 $5\mu\text{g/ml}$), 氢化可的松(终浓度 $0.4\mu\text{g/ml}$), 两性霉素 B (终浓度 $2.5\mu\text{g/ml}$), 青-链霉素 (终浓度 $100\mu - 100\mu\text{g/ml}$)

各种离心管、细胞培养瓶、培养板(北京鼎国生物技术有限责任公司)

3.1.3 主要仪器

SW-CJ-IF 超净工作台（苏州安泰技术有限公司）

BHC-1300IIA/B₃ 生物安全柜（净集团安泰公司）

CKX41 倒置显微镜（日本 Olympus Instrument）

YS-2H 解剖显微镜（上海千欣仪器有限公司）

YJ-876 净化工作台（苏州安泰空气技术有限公司）

HG303-5CO₂ 孵育箱（南京实验仪器厂）

U802 数码相机（日本 Olympus）

3.2 实验方法

3.2.1 对小鼠触须游离毛囊生长的测定

3.2.1.1 取毛囊 生下1周的C57小鼠10只，剪去双侧胡须，并用75%乙醇消毒上唇，无菌条件下进行如下操作：剪下双侧胡须垫，置于D-Hank's液中，取C57 小鼠触须区皮肤1-2cm×1cm，解剖显微镜下从真皮侧显微镊轻轻拔取完整毛囊，去除皮下组织，用含抗生素的PBS液冲洗，选取无损伤的生长早期毛囊，将毛干连同外根鞘自真皮鞘中拔出，用无血清毛囊生长培养液冲洗3遍，将C57小鼠毛囊分别置于含无血清毛囊生长培养液的培养皿中备用。

3.2.2.2 毛囊培养 实验在24孔板中进行，每组12孔，每孔5枚毛囊，

每孔含无血清毛囊生长培养液1ml, 在加入不同浓度的东宫生发乌发液（分别0、2、4、8、16、32、64倍稀释），以单纯无血清毛囊生长培养液作为对照孔。置37℃，5%CO₂培养箱中培养，每3-4天更换一次培养液，实验重复3次。倒置显微镜中装入目镜测微仪，选取第1天即有明显生长的（长度≥0.1mm）的毛囊进行统计，每天观察毛囊的形态和测量生长长度，共测量7天。

3.3 统计学分析

各项指标数据以均数加减标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，统计学处理方法采用组间实测值 t -检验分析。

3.4 实验结果

选取第1天即有明显生长的（长度≥0.1mm）毛囊进行统计，每组取5根，每天观察毛囊的形态和测量生长长度，共测量7天。对照组毛囊最终生长长度为0.632mm，东宫生发乌发液组无明显生长变化。

第 4 章 东宫生发乌发液对小鼠的吸收毒性实验

4.1 实验材料

4.1.1 实验动物

C57 小鼠 20 只，雌雄各半，体重 18~22g，购自吉林大学基础医学院动物实验中心，动物合格证号：SCXK-(吉)-2003-0001。

4.1.2 主要试剂

脱毛剂（广州有春化妆品有限公司）

4.1.3 主要仪器

TCS-B 型计价电子天平

4.2 实验方法^[36]

取 C57 健康小鼠 20 只，背部毛剪短，将脱毛剂 (10%Na₂S) 涂于小鼠背部约 2~3 分钟后，用温水洗净，以小鼠背部光滑，无伤无残毛为净，脱毛面积约 3×4cm。次日取健康小鼠 10 只涂以东宫生发乌发液(原液)，每小时 1 次，每次 0.1ml，共 10 次。剩余健康小鼠 10 只涂以蒸馏水，每小时 1 次，每次 0.1ml，共 10 次，作为对照组。

此后连续观察 14 天，每天上下午各观察一次，观察小鼠毛色、精神状态、自主活动、呼吸、口鼻分泌物、饮食、尿便及有无全身和局部毒性反应症状。

体重测定：给药前 0 周、1 周、2 周各测定一次，每次均在给食前测定。

4.3 统计学分析

指标数据以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理方法采用组间实测值 t -检验分析。

4.4 实验结果

4.4.1 给药局部刺激反应

涂抹给药供试品组未见局部皮肤红斑、水肿及其它明显刺激反应。

4.4.2 一般症状观察

药前全部小鼠发育及活动正常, 行为活泼, 被毛理顺光滑, 呼吸平稳, 饮食正常, 排便情况正常, 每只动物未见其它异常体征, 表明实验所选用的小鼠符合吸收毒性实验要求。

给药期间, 全部动物未见明显异常表现。

经连续 14 天观察, 所有小鼠均未见明显异常表现, 活动正常, 行为活泼, 被毛理顺光滑, 呼吸平稳, 饮食正常, 排便情况正常, 每只动物未见其它异常体征。

4.4.3 体重变化

给药供试品组与对照组动物体重无明显差异, 见表 4. 1。

表 4.1 小鼠急性毒性试验中体重 (g) 变化表 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时 间			
	0 周	1 周	2 周	

对照组	19.15±0.95	20.29±0.84	20.94±0.68
供试品组	18.67±0.71	19.56±0.54	20.6±0.58

采用重复测量的方差分析：总体 P=0.118 (P>0.05)

第5章 东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响

5.1 实验材料

5.1.1 实验动物

C57 小鼠 120 只，雌雄各半，体重 18~22g，购自吉林大学基础医学院动物实验中心，动物合格证号：SCXK-(吉)-2003-0001。

5.1.2 主要试剂

甲醛（北京化工厂）

脱毛剂（广州有春化妆品有限公司）

5.1.3 主要仪器

SW-CJ-IF 超净工作台（苏州安泰技术有限公司）

BHC-1300IIA/B₃ 生物安全柜（净集团安泰公司）

CKX41 倒置显微镜（日本 Olympus Instrument）

YS-2H 解剖显微镜（上海千欣仪器有限公司）

YJ-876 净化工作台（苏州安泰空气技术有限公司）

U802 数码相机（日本 Olympus）

ES-60J 电子分析天平（沈阳龙腾电子称有限公司）

10 μ l、100 μ l、200 μ l 、1000 μ l 微量加样器（荷兰）

5.2 实验方法^[36]

5.2.1 对小鼠脱毛区体毛生长的影响

取C57小鼠40只，每组10只，背部毛剪短，将脱毛剂(10%Na₂S)涂于小鼠背部约2~3分钟后，用温水洗净，以小鼠背部光滑，无伤无残毛为净，脱毛面积约3×4cm²。东宫生发乌发液设高、中、低三个剂量组，分别为4、16、64倍稀释三个浓度。对照组为空白水。分别涂抹于脱毛区，每日两次，每次0.2ml/只，连续19日。每2日对小鼠脱毛区新毛生长状况评分一次，评分标准为：无毛生长为0分；浅毛长满脱毛区为1分；新生毛长度及密度约为未脱毛区的一半为2分；新生毛长与未脱毛区无差别为3分；出现不规则毛生长的小鼠按面积比率计算，计算每组平均分并作曲线。

5.2.2 对小鼠脱毛区体毛长度及重量的影响^[32]

取 C57 小鼠 40 只，每组 10 只，背部毛剪短，将脱毛剂(10%Na₂S)涂于小鼠背部约 2~3 分钟后，用温水洗净，以小鼠背部光滑，无伤无残毛为净，脱毛面积约 3×4cm²。东宫生发乌发液设高、中、低三个剂量组，分别为 4、16、64 倍稀释三个浓度，对照组为蒸馏水，分别涂抹于脱毛区，每日两次，每次 0.2ml/只，连续 19 日，于第 20 日脱颈处死小鼠，将背部脱毛区毛皮剪下，用 14mm 打孔器于每鼠脱毛区相同位置取一圆形皮片，用手术刀刮下皮片上所有体毛，分析天平称重，求出各组小鼠毛重的均值。在每鼠脱毛区相同位置取最长毛 10 根，显微镜下用显微测微器测量其长度，以 10 根毛均长代表每只

鼠的毛长，求出各组小鼠毛长的均值。

5.2.3 对小鼠皮肤组织学的影响

取 C57 小鼠 40 只，脱毛、分组及涂药情况同 5.2.2，于实验第 16 日脱颈处死小鼠，切取约 $1.0 \times 0.7 \text{cm}^2$ 脱毛区皮肤组织块，10% 的福尔马林固定。常规石蜡包埋切片，苏木素—伊红染色，每例切片连续 2 张，光镜观察，最后对皮肤组织切片显微照相。

5.3 统计学分析

指标数据以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，统计学处理方法采用组间实测值 t -检验、 χ^2 -检验分析。

5.4 实验结果

5.4.1 对小鼠脱毛区体毛生长的影响

东宫生发乌发液高、中、低三剂量组连续给药 19 日，一日 2 次，与对照组相比，育毛效果评分有显著性差异。东宫生发乌发液中、低剂量组自给药第 10 日起与对照组比较育毛效果评分有显著性差异，其中高剂量的东宫生发乌发液在评分无显著差异，中剂量的东宫生发乌发液在给药第 10、12、14、16 日评分有明显差异，第 16 日评分有非常显著性差异，低剂量的东宫生发乌发液自给药第 16 日评分有明显差异。提示东宫生发乌发液中剂量组在给药中、后期可使化学性脱毛小鼠的体毛生长速度加快，且作用逐渐增强。结果见表 5.1。

表 5.1 东宫生发乌发液对小鼠脱毛区体毛生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	2 天	4 天	6 天	8 天	10 天	12 天	14 天	16 天
对照组	0	0.1±0.31	0.3±0.48	1±0.47	1.3±0.48	2±0.47	2.3±0.48	2.5±0.52
高剂量组	0	0	0.2±0.42	1.1±0.56	1.2±0.42	2.1±0.73	2.2±0.63	2.5±0.52
中剂量组	0	0.2±0.42	0.6±0.69	1.4±0.51	1.9±0.73*	2.6±0.51*	2.8±0.42*	3**
低剂量组	0	0.2±0.42	0.4±0.51	1.2±0.63	1.6±0.51	2.3±0.67	2.5±0.52	2.9±0.31*

**与对照组相比, $P<0.01$; *与对照组相比, $P<0.05$

5.4.2 对小鼠脱毛区体毛长度及重量的影响

实验结果表明:东宫生发乌发液高、中、低三剂量组和对照组连续给药 19 日,一日 2 次,与对照组相比,毛长均值和体表面积毛重均有显著性差异,东宫生发乌发液中剂量组小鼠明显比对照组毛长、毛密。表明东宫生发乌发液可明显促进化学性脱毛小鼠的毛发再生。结果见表 5.2。

表 5.2 东宫生发乌发液对小鼠脱毛区体毛长度及重量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	毛发长度 (mm)	毛发重量 (mg /cm ²)
对 照 组	4.89±0.42	5.95±0.63
高剂量组	4.91±0.52	5.30±0.92
中剂量组	6.37±0.75**	7.59±0.8**
低剂量组	5.73±0.76*	6.54±0.71*

**与对照组相比, $P<0.01$; *与对照组相比, $P<0.05$

5.4.3 对小鼠皮肤组织学的影响

结果显示第 19 天时，中剂量组毛乳头较大，被毛球完全包绕，毛囊的毛球部伸入到皮下组织深层，可以见到新生毛发，大部分毛发已长出或长到毛囊口，黑素形成明显。空白对照组毛囊较小，分布比较稀疏，位于皮下组织与真皮交界附近。新生毛发少见，黑素形成不明显。用药组皮肤毛囊发育较完整，数量较多见，黑素较对照组明显。

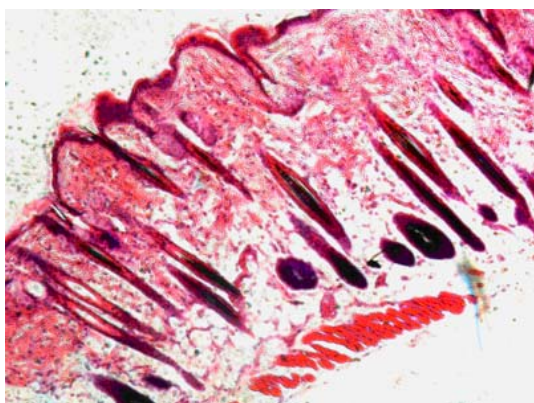


图 5.1 对照组

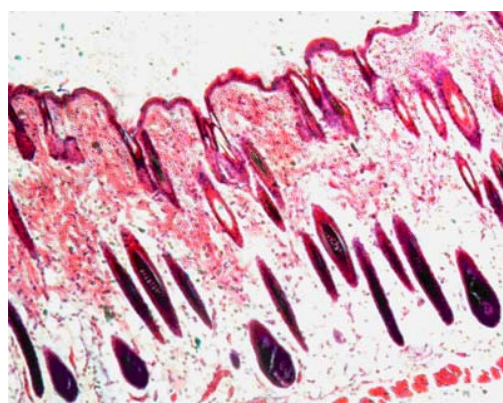


图 5.2 高剂量组

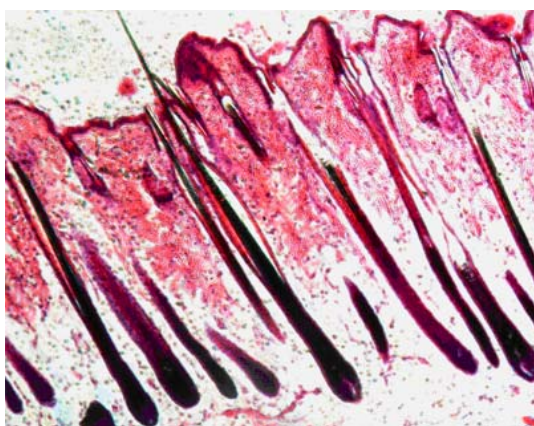


图 5.3 中剂量组

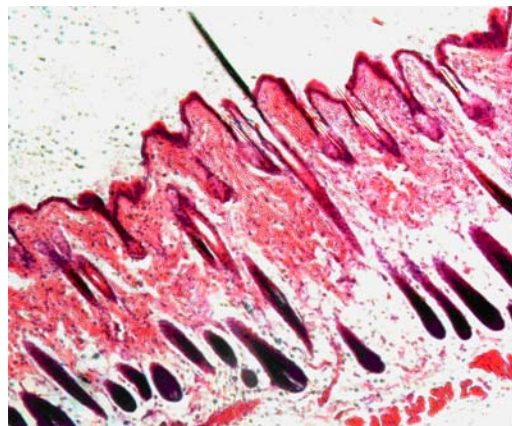


图 5.4 低剂量组

第6章 讨论

头发比身体其他部位的毛发更具有重要性和象征性意义,它赋予人体某些个性特征。正常头发呈周期性生长,可分为生长期、退行期和休止期。若各种体内外因素破坏了这种正常的周期或平衡,甚至破坏了毛囊的结构等,则会使毛发脱落过多,或长期不能再生新发而引起脱发病症。随着生活水平的提高,人们对美容美发的要求日益迫切,现代医学和传统医学也越来越重视对脱发和乌发的研究。生发药可减轻毛发脱落或促进毛发生长^[37]。

中医认为脱发的发病原因是情志所伤,肝肾亏损,气血不足,血热或血瘀所致;西医认为脱发与遗传,内分泌失调,精神创伤,神经营养障碍,免疫功能异常等因素有关。

但目前尚无由于“肝肾亏损、气滞血瘀”所导致脱发的动物模型。目前国内、外学者对毛发用药的药效学研究,常采用体内和体外实验两种方法。体内实验多用兔、大鼠、豚鼠、小鼠等建立实验模型的,常采用脱毛剂如硫化钠、硫化钡对动物进行化学性脱毛,局部破坏毛囊;也有通过给动物灌服碳酸铊造成脱毛模型;国外学者则采用SCID小鼠、Dundee实验秃毛大鼠或裸鼠模型进行实验。本研究所用的脱发动物模型,仅是将正常小鼠的背毛剃光后用于实验,即选用C57小鼠,用硫化钠脱毛,建立脱发模型进行实验。

东宫生发乌发液的作用是药物疗效直接作用于患处,头皮表面也是最容易直接被吸收滋养的部位。药物作用循环,激活毛母细胞,提

高体内新陈代谢，通经活络，活血收敛，起到更好的治疗作用。

体内实验选取了小鼠脱毛区新生毛长度、重量和毛囊数目作为指标，进行了测定。结果表明，中、低剂量组的毛发增长长度与阴性对照组比较差异有显著性($P<0.01$ ， $P<0.05$)。提示东宫生发乌发液具有明显促进毛发生长的作用。在组织学的观察中反映出药物能促进给药皮肤的毛囊数增长。提示，东宫生发乌发液能改善毛囊营养，刺激毛囊再生，促进毛发生长和再生。

很多人过早的出现白发，主要原因是由于黑素细胞、黑素体较少，或酪氨酸酶活性降低，导致黑色素生成不足所致。黑色素是人体合成的影响肤色和头发颜色的天然色素，其生物合成的关键酶——酪氨酸酶广泛存在于人体、动物和植物体内。其活性程度关系到黑素合成的质和量，决定黑素在皮肤和毛发中的沉积^[38]，是迄今已知唯一参与黑色素生物合成的酶^[39]。酪氨酸酶缺乏势必影响黑色素的形成，从而导致白发出现。

近年来，通过激活酪氨酸酶的活性来促进毛发黑色素的生成而使头发变黑是一重要的研究方向。通过各种方式将药剂深入毛囊以激活酪氨酸酶的活性，即可促进毛发黑色素的生成，从而达到乌发的目的。

故本研究在体外实验中对 B16 黑素瘤细胞增殖和酪氨酸酶的活性进行了测定，实验结果显示东宫生发乌发液可促进 B₁₆ 黑素瘤细胞的增殖，对酪氨酸酶也有一定的激活作用。提示东宫生发乌发液可增强酪氨酸酶的活性，促进黑色素的形成，对白发有一定的治疗作用。

综上所述，东宫生发乌发液促进毛发生长的原因可能是影响毛发生长周期中生长期毛囊，改善包围毛囊周围的网状毛细血管的血液循环，从而促进毛发生长。

本次实验还对东宫生发乌发液作了局部涂抹的吸收毒性实验。结果表明，涂抹给预东宫生发乌发液未见局部皮肤红斑、水肿及其它明显刺激反应。也未见其它异常体征，无全身毒性反应。说明东宫生发乌发液毒性很低。

本次实验仅对东宫生发乌发液的促进毛发生长的药理作用进行了部分药效学研究，关于呈高浓度抑制，中低浓度激活的趋势、其他药理作用和其促进毛发生长的作用机制等方面还有待于进一步深入研究。

第7章 结 论

本论文进行了如下4个方面的工作：

（一）东宫生发乌发液对小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的作用。

体外培养小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞，应用不同浓度的药物与细胞共同孵育，采用四甲基偶氮唑盐(MTT)、多巴速率氧化法分别测定药物对 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖的影响及酪氨酸酶的活性。

结果表明：东宫生发乌发液能明显促进小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的增殖，能明显激活黑素瘤细胞酪氨酸酶活性。并呈高浓度抑制，中低浓度激活的趋势。由此可见，东宫生发乌发液可深入毛囊以激活酪氨酸酶的活性，即可促进毛发黑色素的生成，从而达到乌发的目的。

（二）东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长的影响

体外进行小鼠毛囊分离培养，测定东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长的影响。

结果表明：东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长无明显作用。

（三）东宫生发乌发液对小鼠的吸收毒性实验

进行小鼠局部涂抹东宫生发乌发液的吸收毒性实验，以测定东宫生发乌发液的毒性反应。

结果表明：未见小鼠局部皮肤红斑、水肿及其它明显刺激反应。也未见其它异常体征，无全身毒性反应。东宫生发乌发液对机体无毒性作用。

（四）东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响。

选用 C57 小鼠，Na₂S 脱毛，建立脱发模型进行实验。研究东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响。对 C57 小鼠脱毛区体毛生长进行“评分”，测量给药前后小鼠脱毛区体毛长度及重量。

结果表明：东宫生发乌发液中、低剂量组的毛发增长长度与阴性对照组比较差异有显著性($P<0.01$ ， $P<0.05$)。表明东宫生发乌发液可使化学性脱毛小鼠体毛生长速度加快，单位面积的新生毛长和毛重增加，具有明显促进毛发生长的作用。

在组织学的观察中反映出药物能促进给药皮肤的毛囊数增长。说明东宫生发乌发液能改善毛囊营养，刺激毛囊再生，促进毛发生长和再生。

综上所述，东宫生发乌发液能促进 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖；对酪氨酸酶有明显的激活作用；对小鼠触须游离毛囊生长无明显作用；对小鼠背毛的生长有一定的促进作用。

参考文献

- [1] 宋爱玲. 话说头发[J]. 家庭医学, 1995,(04).
- [2] N.M.Matkar.Natural and Synthetic Hair:Dyesa Solution for Graying Hair[J].Cosmetics&toiletries magazine,2000,115(4):77-81.
- [3] 孙婧; 王建新 白发成因及其防治研究进展, 香料香精化妆品, 2003.6
- [4] Rafl Paus.Principles of hair cycle control.The Journal of Dermatology.1998;25: 793-802.
- [5] 雷铁池.酪氨酸酶基因家族与皮肤黑素生成,国外医学皮肤性病学分册,1998,Vol.24(2):81-8.
- [6] 王维, 脱发因素知多少,家庭医学,1994.3.
- [7] 范广伦, 脱发白发的预防与治疗, 安徽科技, 2007.9.
- [8] 人老化进程中头发生长的变化, 尹兴平 2006.10.
- [9] 张焕春, 秦前红, 高旭. 青少年白发的病因[J]. 中国校医, 1996, 10(5): 396-399.
- [10] 刘林兴, 吕淑琴, 梁艳凤, 等. 3396 名中小學生白发情况的调查分析[J]. 1993, 7(1): 21-23.
- [11] 田宏现,彭司英. 385 名大学生白发情况调查现状及白发原因分析 [J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2004,25(4):91-93.
- [12] 姜英勤, 刘艳, 吴巨, 等. 白发与钙、镁及遗传关系探讨[J]. 微量元素与健康研究, 1995, 12(1): 43-44.

- [13] 姜秀梅, 王琳琳. 青少年白发与发中微量元素关系研究[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(6): 13-14.
- [14] 苟勇, 陈子金, 向静, 等. 青少年与中老年白发微量元素含量调查[J]. 实用预防医学, 1999, 6(5):39.
- [15] 王富宽, 王金川. 按摩头皮加中药酒剂外擦治疗青少年白发[J]. Journal of External Theranv of TCM Jun 2005.14(3):26.
- [16] 陈浩宏, 吴海英, 生发药物研究, 现代中西医结合杂志, 2004.6.
- [17] 马琳,邢环,张霞,等. 儿童脱发患者头发中6种元素含量分析研究, 微量元素与健康研究, 2001.3
- [18] 蔡海仙,姜 华.大连市朝鲜学生白发现状及原因分析[J].中国学校卫生,2002,23(2):178.
- [19]张焕春,秦前红,林 杰,等.中专生 722 名白发现况调查分析[J].中国学校卫生,1997,18(2):134-135.
- [20]尹兴平, 人老化过程中头发生长的变化, 中国协和医科大学博士学位论文, 2005.5
- [21]杨海平,孙建方.人类毛囊黑素细胞的研究现况.国外医学皮肤性病学分册,1998 年第 24 卷第 5 期.
- [22] Halaban Ruth,Tyrrell Lyn da,Longley Jack,et al.Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-timulating hormone and Mltraviolet Blight[J].Ann-N-Y-Acad-Sci,993,680:290—3012.
- [23] 何学民; 秦德安. 黑色素与酪氨酸酶, 中国化妆品, 1994.3

- [24] 姚文杰 滨海白首乌影响黑素合成功效组分的筛选, 江南大学硕士论文, 2009.2
- [25] 许爱娥,王遂泉,周渭珩.常用中药对酪氨酸酶的激活作用, 中华皮肤科杂志,1998,31(1):48.
- [26] 宋康康 抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究. 厦门大学博士论文, 2008.6
- [27] 《朝日新闻》2004年12月24日.
- [28] 张焕春,秦前红,高 旭.青少年白发的病因[J]中国校医, 1996, 10 (5): 396-399.
- [29] 中药“脱发再生灵”促毛发生长的实验研究, 中国实验动物学会第六届学术年会论文集, 2004
- [30] 徐建国, 尚靖. 补骨脂对酪氨酸酶的激活作用. 中草药,1991,22(4):168
- [31] 刘志军,欧阳恒.中药调控酪氨酸酶活性的现状分析.中国中医药信息杂志,2001 年 10 月第 8 卷第 10 期
- [32] 吴可克,王航,刘建峰,王晓华,单新强.乌发组方要素对酪氨酸酶活性的影响研究.日用化学工业,第三期 2001 年 6 月
- [33] Kubo, Yokokawa, Y, Kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. J NatProd, 1995, 58(5):739 — 43
- [34] Bo-SK, Nma HS, Seung HL. Inhibitory effects of aviniferin and resvetrol on the L-dopa tyrosinase. Med SciRes, 1998, 26(4):235—7

- [35]曾昭贤, 陈嘉任, 刘光谱等.云宝生发灵的生发作用研究.中药材, 1995, 18(2):91—93
- [36]朱铁君陈书元.色素性皮肤病[M].北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版,1996,12.
- [37] 陈浩宏, 吴海英. 生发药物研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(10):1261-1262.
- [38] 雷铁池.酪氨酸酶基因家族与皮肤黑素生成[J].国外医学-皮肤性病学分册,1998,24(2):81
- [39] 刘辅仁.实用皮肤科学[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1996.517
- [40] Martinez-Liarte, JH, Solano F, et al.Alpha-MSH and other Melanogenic activators mediate opposite effects on tyrosinase and Ropachrome tautomerase in B16 mouse melanoma cells.J Invest Dermatol 1992 Oct;99(4):435-9.

导师及作者简介

导师简介:

李凡，女，吉林大学白求恩医学院教授，博士生导师。1982 年在白求恩医科大学获医学学士学位，1987 年在白求恩医科大学获医学硕士学位，1998 年在白求恩医科大学获医学博士学位，1995-1997 年作为欧共体博士后留学于西班牙马德里自治大学分子生物中心，2001 年在美国纽约大学西奈山医学院留学，2002 年回国工作至今。现为吉林大学病原生物学学科带头人，新疆医科大学副校长，中国微生物学会感染与免疫学专业委员会副主任委员，中国微生物学会吉林省分会副理事长。李凡教授围绕病原生物的诊断技术、细菌耐药性发生和传播机制以及 T 淋巴细胞表面分化抗原筛选和鉴定、与信号传导有关蛋白的 cDNA 克隆等方面开展许多富有成效的研究工作，先后主持和完成国家“十五”攻关项目、国家自然科学基金项目和高等学校博士学科点专项科研基金项目等科研课题 10 余项，发表专业论文百余篇，主编教育部规划教程<<医学微生物>>和<<基础医学实验教程>>等，获吉林省科技进步二等奖和三等奖各一项。

联系方式: E-mail:lifan@jlu.edu.cn Tel:0431-85619574

作者简介:

苏盈盈，女，1983 年 12 月生于辽宁省海城市，汉族，毕业于辽宁医学院临床医学专业，2007 年考入吉林大学白求恩医学院微生物专业攻读硕士学位。联系方式: 13644410804

致 谢

感谢我的导师李凡教授,感谢她在多年的学习和工作中对我的悉心指导和关怀。她渊博的知识、严谨的治学态度、诲人不倦、勇于探索的精神、以及对学生无微不至的关怀,无不体现出她高尚的人格魅力,导师将成为我终身学习的楷模!

感谢病原生物学教研室赵春燕老师、黄红兰老师、王放老师、易世红老师和倪朝晖老师对我的关心和帮助、感谢孙丽媛、王海河、王国庆、胡玉、杨颖、时景伟博士在实验上给予的耐心指导和热情帮助,及对实验中各种问题的有益探讨;感谢张国梁、尚占斌、陈玉、高洋、丛珊、魏成国、盛忠志、曹娜娜硕士对我实验上的支持和鼓励,令我心存感激,铭记于心。

最后要特别感谢我的亲人,我的朋友,感谢我的父母多年来一如既往给我的教诲、理解、支持和鼓励,他们的支持是我前进的动力。

谨以此文献给所有关心和帮助我的老师、同学、朋友和亲人,是您们使我能够顺利完成学业。谢谢!



中 文 摘 要

脱发及早发性白发病是临床常见的毛发病，对人们的精神、心理产生较大的影响。随着生活水平的提高，人们对美容美发要求日益迫切，现代医学和传统医学也越来越重视对脱发和乌发的研究。目前应用于临床治疗脱发及早发性白发病的化学药物均存在着不同程度的副作用及停药易复发的缺点，因此继续寻找更安全更有效的治疗脱发、白发的新型药物是该领域的研究趋势。东宫生发乌发液是由长春市达元有限公司开发出的新产品，该品种为一天然护发养发产品，经临床上 30 余例脱发、白发患者应用，均获得了良好治疗效果。

本论文是通过实验方法研究东宫生发乌发液治疗脱发及早发性白发病的药理作用，为其进一步的临床应用提供药效学的理论依据。

采用的实验方法如下：

1、体外培养小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞，应用 7 个不同浓度的药物与细胞共同孵育，采用四甲基偶氮唑盐(MTT)、多巴速率氧化法分别测定药物对 B₁₆ 黑素瘤细胞增殖的影响及酪氨酸酶的活性。

2、体外进行小鼠毛囊分离培养，测定东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长的影响。

3、进行小鼠局部涂抹东宫生发乌发液的急性毒性实验，以测定

东宫生发乌发液的毒性反应。

4、体内试验：选用 C57 小鼠，用 Na₂S 脱毛，建立脱发模型进行实验。研究东宫生发乌发液对小鼠背毛生长的影响。对 C57 小鼠小鼠脱毛区体毛生长进行“评分”，测量给药前后小鼠脱毛区体毛长度及重量。

实验结果表明：

1、东宫生发乌发液能明显促进小鼠 B₁₆ 黑素瘤细胞的增殖，能明显激活黑素瘤细胞酪氨酸酶活性。并呈高浓度抑制，中低浓度激活的趋势。

2、东宫生发乌发液对小鼠触须游离毛囊生长无明显作用。

3、进行小鼠局部涂抹东宫生发乌发液的吸收毒性实验，结果表明：未见小鼠局部皮肤红斑、水肿及其它明显刺激反应。也未见其它异常体征，无全身毒性反应。说明东宫生发乌发液毒性很低。

4、体内实验结果表明，东宫生发乌发液中、低剂量组的毛发增长长度与阴性对照组比较差异有显著性($P<0.01$, $P<0.05$)。表明东宫生发乌发液可使化学性脱毛小鼠体毛生长速度加快，单位面积的新生毛长和毛重增加，具有明显促进毛发生长的作用。

在组织学的观察中反映出药物能促进给药皮肤的毛囊数增长。说明东宫生发乌发液能改善毛囊营养，刺激毛囊再生，促进毛发生长和再生。

综上，可得出如下结论：东宫生发乌发液能明显促进小鼠 B₁₆ 黑

素瘤细胞的增殖，能明显激活黑素瘤细胞酪氨酸酶活性。并呈高浓度抑制，中低浓度激活的趋势。说明东宫生发乌发液可深入毛囊以激活酪氨酸酶的活性，即可促进毛发黑色素的生成，从而达到乌发的目的。

东宫生发乌发液可使化学性脱毛小鼠体毛生长速度加快，单位面积的新生毛长和毛重增加，具有明显促进毛发生长的作用。

关键词：

东宫生发乌发液/生发/乌发/药理活性

Abstract

Study on Pharmacodynamics of DongGong

Hair Growth and Blacking Lotion

Alopecia and Presenile Poliosis are common clinical diseases of hair which produced great influence on people's spirit and mentality. Along with the increase of living standard, people's requirement of hairdressing become increasingly urgent, Modern medicine and traditional Chinese medicine also pay more attention to the research of alopecia and blue rinse.

Almost all the chemicals that used for clinical treatment of alopecia and presenile poliosis have varying degrees of faults as side-effect、relapse after drug withdrawal etc, therefore continue to seek for a safe and more effective new drug in the treatment of alopecia and presenile poliosis will become the research trend. Donggong pilatory is new natural hair curing product which developed by Dayuan Limited Company of Changchun , after more than 30 clinical cases of hair loss、white hair patients' using , the good treatment have been proved .

This thesis studied Donggong pilatory's pharmacological action in the treatment of alopecia and presenile poliosis through

the experiment method, then it can provide theoretical basis of pharmacodynamic for its further clinical application. The experiment method is as follows:

1、Cultivating B16 melanoma cells of mice in vitro, hatch cells by using 7 different dose group of drugs, use MTT method、Dopamine oxidation rate method to mensurate the medicine's influence over B16 melanoma cell's proliferation and tyrosinase's activity.

2、Mensurate drug's effect on growth of mice tentacles'free follicle through in vitro follicle cultivation.

3、Experiment by smearing Donggong pilatory on mice's local skin in order to mensurate toxicity reaction of Donggong pilatory.

4、In vivo tests: Select C57 mice and depilate them by Sodium Sulphide to establish alopecia matrix for the experiment so as to research Donggong pilatory's influence on posterodorsad hair growth of mice. "grade" the hair growth condition of mice's depilate area, detect hair's length and weight in depilate area before administration as well as after .

Test results show that:

1、Donggong pilatory can promote B16 melanoma cell's proliferation obviously, and it registers as have apparent activation of tyrosinase in melanoma . It showed the trend of

inhibit the activation in high concentration while activate it in low or medium ones.

2、Donggong pilatory have no significant effect on free hair follicles' growth .

3、Experiment by smearing Donggong pilatory on mice's local skin in order to mensurate toxicity reaction of Donggong pilatory, the result shows that no erythema、dropsy or stimulating response have been found in local skin . Other abnormal clinical sign and systemic toxicity reaction also not found, this illustrated that Donggong pilatory possess hypotoxicity.

4、The vivo tests' results showed that compare with the negative group , the length of hair growth in low and middle dose of Donggong pilatory group has significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). This indicate that Donggong pilatory can quicken the speed of hair growth、enhance the length and weight of new hair in given area of chemical depilated mice. have visible auxo-action on hair growth.

Histological observation reflects the drug can promote follicles' increase ,which explains that Donggong pilatory may improve follicles' nutrition、activate the growth and regeneration process.

To sum up, we came to the conclusion that Donggong pilatory can promote B16 melanoma cell's proliferation obviously, and it registers as have apparent activation of tyrosinase in melanoma. And it showed the trend of inhibit the activation in high concentration while activate it in low or medium ones. This illustrate that Donggong pilatory could activate the activity of tyrosinase by embed into follicles, then advance melanin's formation, so as to achieve the goal of blue rinsing.

Donggong pilatory can quicken the speed of hair growth, enhance the length and weight of new hair in given area of chemical depilated mice. have visible auxo-action on hair growth.

Keywords: Donggong pilatory /hair growth / blue rinse/
pharmacological activity