

作阳性对照,病人瘤块标本除部分保存外,未分细胞株系。

以上结果表明,苦草提取物 Pft-d 具有强的抗肿瘤作用,此部分是苦草抗癌的有效部位,值得进一步进行单体成分的分离与精制实验,且有待进一步深入进行端粒酶活性研究。

参考文献

[1]黄壁才.常用中草药识别与应用[M].第二版.北京:化学工业出版社,2005,366.

[2]成桂仁,金静兰,文永新,等.自苦玄参分得五种新三萜成分[J].药学通报,1981,16(2):50.

[3]徐任生,叶阳,赵维民,等.天然产物化学[M].第二版.北京:科学出版社,2004,418.

[4]李忌,陈俊杰,巨勇,等.天然甾体皂甙化合物的抗肿瘤活性[J].天然产物研究与开发,1989,11(1):14-17.

[5]单磊,张卫东,张川,等.皂苷类成分抗肿瘤活性的研究进展[J].中草药,2005,36(2):295-298.

(收稿日期 2009-11-25)

养血生发胶囊对 C57BL/6 小鼠毛发生长的影响及机制

陈芙蓉,岳南,只德广,赵益桂

(天津药物研究院 新药评价中心,天津 300193)

摘要:目的 观察养血生发胶囊对 C57BL/6 小鼠毛发生长的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 采用 C57BL/6 小鼠脱发实验模型,观察毛发生长情况,并于脱毛后第 9、19 天,做脱毛区皮肤毛囊数、毛细血管数及毛囊血管内皮生长因子(VEGF)检测。结果 养血生发胶囊明显缩短小鼠皮肤变黑时间;明显增加皮肤毛囊数、毛囊毛细血管数及毛囊组织中 VEGF 表达积分吸光度(A)值。结论 养血生发胶囊通过增加毛囊组织中 VEGF 表达、毛细血管数及毛囊数,促进毛发生长。

关键词:养血生发胶囊;毛发生长;血管内皮生长因子;毛囊

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2010)02-0137-04

The effect and mechanism of Yangxue Shengfa Capsules on hair growth in mice

CHEN Fu-rong, YUE Nan, ZHI De-guang, ZHAO Yi-gui

(Center for Drug Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Yangxue Shengfa Capsules on hair growth of mice, and to detect the possible mechanism of hair growth promotion by using vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** C57BL/6 mice were chosen as experimental animals. Hair re-growth was observed, and the number of hair follicles, capillary and VEGF in hairless zone were determined on 9 and 19 day after the depilation. **Results** Yangxue Shengfa Capsules shortened significantly the time of skin darkening. Compared with model group, there was significant increase in hair follicle number and skin blood vessels as well as the integrated optical density (A) of VEGF in Yangxue Shengfa group. **Conclusion** Yangxue Shengfa Capsules can promote hair growth by increasing A of VEGF, hair follicle number and skin blood vessels.

Key words: Yangxue Shengfa Capsules; hair growth; vascular endothelial growth factor; hair follicle

脱发是临床常见疾病,可分为斑秃、脂溢性脱发、药源性脱发、产后脱发等类型,其中以斑秃和脂溢性脱发发病率最高。无论斑秃还是脂溢性脱发的发病,都是多因素综合作用的结果,既包括遗传、免疫调节等的影响,也涉及到体内激素、细胞因子和生

长因子、神经肽和神经营养因子等多方面的变化。临床上常采用口服和外用中药复方,利用其补肝益肾、活血养血、清热祛湿、祛风止痒的功效治疗该病。中药复方具有疗效确切、副作用小等优点,在中医理论的指导下,从整体出发,调节机体的阴阳平衡,标

本兼治,已取得较好的临床效果^[1]。养血生发胶囊主要组成为熟地黄、制何首乌、当归、川芎、天麻等,具有养血补肾、祛风生发的功效。笔者采用C57BL/6小鼠脱发模型,考察养血生发胶囊对毛发生长的作用并进行初步的作用机制探讨。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

养血生发胶囊:1.74 g(生药,下同)/g药粉,天津宏仁堂药业有限公司,批号HO1058;滋补生发片:每片0.38 g,陕西君寿堂制药有限公司,批号080301;冰醋酸:天津市化学试剂二厂,批号070112;甲醛溶液:天津市风船化学试剂科技有限公司,批号070919。

1.2 动物

近交系C57BL/6小鼠,SPF级,6~8周龄,雌性,体质量17~20 g,中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号SCXK(京)2005-0013。

1.3 仪器

IMPS-SOP-YQ-85-1-12型显微镜:Olympus;Fisher Model 266 MP自动石蜡包埋机,远东电子仪器有限公司;Leica RM2135切片机,德国莱卡公司。

2 方法

2.1 养血生发胶囊对小鼠脱毛区皮肤颜色的影响

将C57BL/6小鼠150只随机分为5组,每组30只。设模型对照组、滋补生发片3.42 g/kg组,养血生发胶囊0.44、0.87、1.74 g/kg 3个剂量组,共5组。实验第1天,采用松香-石蜡(体积比为9:1)为各组小鼠进行背部脱毛,面积约为2 cm×2 cm,诱导毛发进入生长期;实验第2天,各给药组小鼠分别ig给药,模型对照组ig 0.5% CMC-Na,每天1次,给药容积均为20 mL/kg。给药后第9天,每组随机选择10只小鼠,处死,取相同脱毛区皮肤,分成两份,一份用包因氏液(含苦味酸饱和水溶液750 mL,冰醋酸50 mL,福尔马林250 mL,混合而成)固定,观察真皮毛囊数(个)及真皮毛细管数(条);另一份用10%福尔马林固定,观察皮肤毛囊血管内皮生长因子。剩余动物继续给药,至给药第19天,每组选择10只,取相同脱毛区皮肤,再次进行上述各项指标的检测;余下动物继续观察皮肤颜色变化^[2-3]。

2.2 养血生发胶囊对小鼠脱毛区真皮毛囊数与毛细血管数的影响

常规石蜡切片,苏木素伊红(HE)染色。光学显微镜下进行组织形态学观察,并于200倍镜下计数3~5个视野内皮肤毛囊平均数,100倍镜下计数5个视野内真皮层小血管的总数。用IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统采集图像。

2.3 养血生发胶囊对小鼠皮肤毛囊血管内皮生长因子的影响

常规石蜡切片,切片脱蜡至水,3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶;胃蛋白酶消化修复抗原,山羊血清封闭,滴加血管内皮生长因子(VEGF)抗体,4℃过夜;加入生物素化二抗、辣根酶标记的链酶卵白素工作液,增敏二氨基联苯胺(DAB)显色,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以北京中山生物技术有限公司提供阳性切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。用光学显微镜观察,IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统对皮肤毛囊组织中阳性物质积分A值(阳性表达面积×阳性平均A值)进行测定。

2.4 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用Excel进行t检验统计。皮肤毛囊组织中阳性物质积分吸光度A值采用IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统SPSS11.0统计软件进行统计,以 $\bar{x} \pm s$ 对资料进行描述,采用方差分析。

3 结果

3.1 养血生发胶囊对小鼠脱毛区皮肤颜色的影响

与模型对照组比较,养血生发胶囊0.44、0.87、1.74 g/kg均明显缩短小鼠皮肤变黑时间。对小鼠皮肤变灰时间,各组间无显著差异。结果见表1。

表1 养血生发胶囊对正常C57BL/6小鼠脱毛区皮肤颜色(毛发生长周期)的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	变黑时间/d	变灰时间/d
模型对照	—	10.4±0.7	16.0±1.4
养血生发胶囊	1.74	9.4±0.5*	15.8±1.5
	0.87	9.3±0.7*	15.9±1.4
	0.44	9.5±0.8*	15.8±1.5
滋补生发片	3.42	9.5±0.8*	15.3±0.9

与模型对照组比较: * P<0.05 ** P<0.01

3.2 养血生发胶囊对小鼠脱毛区真皮毛囊数与毛细血管数的影响

给药第9天,模型对照组小鼠脱毛区毛囊较小,多数分布在真皮浅层,数量较少,同时真皮层小血管数量亦较少;养血生发胶囊1.74 g/kg组小鼠脱毛区毛囊较大,多数分布在真皮深层,数量较多,同时

真皮层小血管数量明显增多。给药第19天,模型对照组小鼠脱毛区毛囊缩短、扭曲,数量较少,同时真皮层小血管数量亦较少;养血生发胶囊0.87、1.74

g/kg组小鼠脱毛区毛囊数量明显增多,毛囊、毛乳头较大,生长旺盛,同时真皮层小血管数量亦明显增多。结果见表2。

表2 养血生发胶囊对正常C57BL/6小鼠脱毛区皮肤毛囊数和小血管数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	毛囊数		小血管数	
		第9天	第19天	第9天	第19天
模型对照	—	14.5±3.3	12.1±4.7	11.7±3.0	10.0±2.0
养血生发胶囊	1.74	16.6±3.5	16.1±3.1*	14.6±2.8*	14.2±2.3***
	0.87	16.0±3.2	17.5±3.6**	11.9±2.0	10.6±2.3
	0.44	16.8±3.0	14.8±2.5	9.9±1.6	10.3±2.2
滋补生发片	3.42	16.3±5.3	16.3±5.1	16.4±3.7**	12.3±1.5**

与模型对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

3.3 养血生发胶囊对小鼠皮肤毛囊 VEGF 的影响

给药第9天,养血生发胶囊0.87、1.74 g/kg 2个剂量组小鼠皮肤毛囊组织中 VEGF 表达 A 值

明显高于模型对照组。给药第19天,养血生发胶囊1.74 g/kg组小鼠皮肤毛囊组织中 VEGF 表达 A 值明显高于模型对照组。结果见表3。

表3 养血生发胶囊对正常C57BL/6小鼠脱毛区皮肤毛囊 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	第9天		第19天	
		切片数	A 值	切片数	A 值
模型对照	—	8	0.99±0.39	8	0.78±0.40
养血生发胶囊	1.74	7	4.58±1.31*	7	1.78±0.68*
	0.87	9	1.79±0.39*	9	0.63±0.19
	0.44	9	1.23±0.43	10	0.57±0.09
滋补生发片	3.42	7	4.53±1.08*	10	1.96±0.64*

与模型对照组比较: * $P<0.05$

4 讨论

本实验所选的6~8周C57BL/6小鼠所有毛囊均由生长期进入静止期,且生理状态下不再自发进入生长期。经人工脱毛或拔毛等创伤刺激后可诱导其毛发进入生长期,并可自发经过退行期再进入休止期。这个周期活动与自然周期无明显差异^[4]。该小鼠躯干皮肤的黑素细胞只存在于毛囊中,而且仅在生长期时合成黑色素并传递给角质形成细胞,使皮肤变成黑色,而退行期皮肤变成灰色,休止期皮肤变为粉红色,因此可根据皮肤颜色大致判断毛发生长周期情况^[5]。实验结果表明,养血生发胶囊能明显缩短小鼠皮肤变黑时间,表明能促进皮肤毛囊黑色素的合成,加快毛发的生长;对毛发周期无明显差异。

Lachgar等^[6]从毛乳头条件培养基中分离出 VEGF 样蛋白,并首先证实了毛乳头细胞分泌 VEGF。Kozłowska等^[7]发现 VEGF 能促使体外培养的人毛乳头细胞分裂增殖,而且 VEGF 及其受体仅在生长期毛囊(主要存在外毛根鞘、毛母质和毛乳头)表达,进入退行期后逐渐降低,在休止期则基本消失。范卫新等^[8]也进一步证实 VEGF 对毛囊生长周期和毛发生长具有正相调节的重要作用。VEGF 一方面通过自分泌方式作用于毛乳头本身,

另一方面通过旁分泌机制影响毛囊其他细胞和血管形成而参与毛囊生长周期的调控。VEGF 对毛囊生长亦有重要作用,对血管内皮细胞(EC)和角朊蛋白等具有很强的促分裂作用,能诱导 EC 增殖,促进毛囊周围血管生成,增加毛细血管通透性,使毛囊得到充足的营养并维持正常生理功能^[9]。本实验结果表明,养血生发胶囊能明显增加皮肤毛囊数、毛囊毛细血管数及毛囊组织中 VEGF 表达 A 值,增加毛囊的 VEGF 表达,从而起到营养毛囊,使毛囊变粗、变多,达到加快毛发生长的作用。

参考文献

- [1] 韩向晖,李经才. 脱发发病机理与防治药物新进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(3): 223-227.
- [2] 高尚璞,黄 岚,杨新伟,等. 活血补肾合剂对 C57BL/6 小鼠皮肤血管新生及毛囊中血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(2): 170-173.
- [3] Müller-Röver S, Handjiski B, Van der Veen C, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages [J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(1): 3-15.
- [4] Paus R, Handjiski B, Czarnetzki B M, et al. A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen): effects of dexamethasone and cyclosporin A [J]. J Invest Dermatol, 1994, 103(2): 143-147.
- [5] Slominski A, Paus R. Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and

- the regulation of melano-genesis in hair growth [J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 101(1 Suppl): 90S-97S.
- [6] Lachgar S, Moukadiri H, Jonca F, *et al.* Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal pailla cells [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(1): 17-23.
- [7] Kozłowska U, Bhune-Peytavi U, Kodelja V, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in various compartments of the human hair follicle [J]. *Arch Dermatol*

Res, 1998, 290(12): 661-668.

- [8] 范卫新, 朱文元. 环孢素 A 促毛发生长机理的研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2000, 29(5): 255-257.
- [9] 宋志强, 郝 飞, 杨希川, 等. 毛乳头细胞凝集性生长差异表达基因的筛选及分析 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36(9): 513-515.

(收稿日期 2009-12-03)

反相高效液相色谱法测定小儿百部止咳糖浆中的苦杏仁苷

李洪刚, 李洪斌, 熊胜元, 苏 丹

(重庆市涪陵药品检验所, 重庆 408000)

摘要:目的 建立小儿百部止咳糖浆中苦杏仁苷的测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Hypersil ODS, 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(19:81), 检测波长 210 nm。结果 苦杏仁苷在 0.081 6~1.020 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.63%, RSD=1.15%。结论 本方法简便、准确, 重现性好。可作为小儿百部止咳糖浆的质量控制标准。

关键词:反相高效液相色谱法; 小儿百部止咳糖浆; 苦杏仁苷

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)02-0140-03

Determination of amygdaloside in Child Baibu Zhike Syrup by RP-HPLC

LI Hong-gang, LI Hong-bin, XIONG Sheng-yuan, SU Dan

(Chongqing Fuling Institute for Drug Control, Chongqing 408000, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for determination of amygdaloside in Child Baibu Zhike Syrup. **Methods** RP-HPLC was used with Agilent Hypersil ODS as analytical column. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution (19:81). The detective wavelength was set at 210 nm. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.081 6—1.020 μg for amygdaloside ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 98.63% (RSD=1.15%). **Conclusion** The method is convenient, accurate and reproducible. It can be applied to quality control of amygdaloside in Child Baibu Zhike Syrup.

Key words: RP-HPLC; Child Baibu Zhike Syrup; amygdaloside

小儿百部止咳糖浆是由百部、苦杏仁、桔梗、桑白皮、麦冬等 11 味中药制成, 具有清肺、止咳、化痰之功效。用于小儿痰热蕴肺所致的咳嗽、顿咳, 症见咳嗽、痰多、痰黄黏稠、咯吐不爽, 或痰咳不已、痰稠难出; 百日咳见上述证候者。百部、苦杏仁为方中主药, 目前文献报道该制剂的质量控制仅有橙皮苷和黄芩苷的测定方法。苦杏仁中苦杏仁苷的测定方法有银量法(药典法)、薄层色谱扫描法、气相色谱和高效液相色谱(HPLC)法等^[1-5], 其中 HPLC 法是测定苦杏仁苷的常用方法^[6], 较其他方法灵敏度更高、重

现性好。为了提高该制剂质量标准, 本实验建立了小儿百部止咳糖浆中苦杏仁苷的测定方法。该法简便快速, 结果准确可靠, 专属性强, 重现性好, 可用于小儿百部止咳糖浆的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 包括 G1322A 在线真空脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315A 二极管阵列检测器, 安捷伦化学色谱工作站(美国安捷伦科技有限公