

基于经皮吸收成分探究中药育发凝胶对雄激素性脱发小鼠的药效物质基础及作用机制

张秀君¹, 张明欣², 王 艳^{2,3,4*}, 王柯淳², 师浩然², 郭 浩⁵, 王旭楠⁵, 李肖夏^{2,3}

1. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 天津市中药智能制药与绿色制药重点实验室, 天津 301617

4. 现代中医药海河实验室, 天津 301617

5. 天津尚美化妆品有限公司, 天津 300380

摘要: **目的** 基于经皮吸收成分探究中药育发凝胶对雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 小鼠的药效物质基础及作用机制。**方法** 采用涂抹丙酸睾酮建立 AGA 小鼠模型, 涂抹中药育发凝胶进行治疗, 观察小鼠毛发的生长情况; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察毛囊状态和真皮厚度; ELISA 检测小鼠皮肤组织中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的含量。UPLC-QTOF-MS 定性分析中药育发凝胶提取液化学成分、经皮入血成分和皮肤滞留成分。采用网络药理学和分子对接预测中药育发凝胶治疗 AGA 小鼠的潜在作用机制; 采用 Western blotting 检测小鼠皮肤组织中雄激素受体 (androgen receptor, AR)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 的表达, 验证网络药理学预测的关键靶点。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠毛囊数减少且毛发生长缓慢, 说明模型建立成功; 与模型组比较, 中药育发凝胶高剂量组小鼠新生毛发区毛囊和真皮厚度增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 皮肤组织中 TGF- β 1、TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。共鉴定出中药育发凝胶提取液中 76 种成分, 皮肤滞留成分 30 种, 经皮入血成分 7 种; 基于经皮吸收成分共得到成分靶点 481 个、疾病靶点 236 个、共同靶点 41 个, 核心靶点包括蛋白激酶 B (protein kinase B1, AKT1)、连环蛋白 1 (catenin beta 1, CTNNB1)、TNF 等, 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析共 375 个条目, 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集通路共 117 条。与模型组比较, 中药育发凝胶组小鼠皮肤组织中 AR、Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), Bax/Bcl-2 值显著降低 ($P < 0.001$)。**结论** 初步揭示了中药育发凝胶对 AGA 小鼠的经皮吸收成分和作用机制, 为其临床应用提供了理论参考。

关键词: 中药育发凝胶; 雄激素性脱发; 经皮吸收; 网络药理学; 光甘草定; α -香附酮; 山柰酚; 芹菜素; 柳杉酚; 雄激素受体; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4782-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.015

Pharmacodynamic material basis and mechanism of Yufa Gel on androgenic alopecia mice based on ingredients absorbed through skin

ZHANG Xiujun¹, ZHANG Mingxin², WANG Yan^{2,3,4}, WANG Kechun², SHI Haoran², GUO Hao⁵, WANG Xunan⁵, LI Xiaoxia^{2,3}

1. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Tianjin Key Laboratory of Intelligent and Green Pharmaceuticals for Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

5. Tianjin Shang Mei Cosmetics Co., Ltd., Tianjin 300380, China

收稿日期: 2024-01-29

基金项目: 天津市技术创新引导专项——企业科技特派员项目 (23YDTPJC00590)

作者简介: 张秀君, 硕士, 副主任医师, 研究方向为皮肤科相关疾病。E-mail: 43100821@qq.com

*通信作者: 王 艳, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础和中药新药、化妆品、新产品研究与开发。E-mail: paozhijiaoxue@126.com

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic material basis and mechanism of Yufa Gel (中药育发凝胶) on androgenic alopecia (AGA) mice based on percutaneous absorption of ingredients. **Methods** The AGA mouse model was established by smearing testosterone propionate, and the growth of mouse hair was observed after smearing Yufa Gel; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the status of hair follicles and the thickness of dermis; ELISA was used to detect the contents of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in skin tissue of mice. UPLC-QTOF-MS was used to qualitatively analyze the chemical components of Yufa Gel extract, transdermal components and skin retention components. Network pharmacology and molecular docking were used to predict the potential mechanism of Yufa Gel in treating AGA mice; Western blotting was used to detect the expressions of androgen receptor (AR), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in skin tissue of mice to validate key targets predicted by network pharmacology. **Results** Compared with control group, mice in model group showed a decrease in the number of hair follicles and slow hair growth, indicating the successful establishment of model; Compared with model group, the thickness of hair follicle and dermis in new hair area of mice in Yufa Gel high-dose group was increased ($P < 0.01, 0.001$), and the levels of TGF- β 1, TNF- α and IL-6 in skin tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.001$). A total of 76 chemical components were identified in Yufa Gel extract, 30 skin retention components and seven transdermal blood components were analyzed; Based on percutaneous absorption of components, a total of 481 component targets, 236 disease targets, and 41 common targets were obtained. The core targets included protein kinase B1 (AKT1), catenin beta 1 (CTNNB1), TNF, etc. Gene ontology (GO) function enrichment analysis included 375 entries, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enriched pathway included 117 entries. Compared with model group, the expression levels of AR, Caspase-3 and Bax protein in skin tissue of mice in Yufa Gel group were significantly down-regulated ($P < 0.05, 0.001$), and Bax/Bcl-2 value was significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** The composition and mechanism of Yufa Gel on percutaneous absorption of AGA mice are preliminarily revealed, which provides a theoretical reference for its clinical application.

Key words: Yufa Gel; androgenic alopecia; transdermal absorption; network pharmacology; glabridin; α -cyperone; kaempferol; apigenin; sugiol; androgen receptor; apoptosis

随着现代人们的生活节奏不断加快,精神压力大,作息饮食不规律,导致我国脱发人群呈逐年上升趋势。根据 2021 年国家卫健委数据显示,我国脱发人群约达 2.5 亿。雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 是现阶段临床中最常见的脱发类型,临床表现为脱发、头皮油腻和脱屑,额部发际线逐渐后退^[1]。AGA 的发病机制极其复杂,目前其主要治疗手段为药物治疗和手术治疗^[2-3]。美国食品和药品管理局批准治疗 AGA 的药物为非那雄胺和米诺地尔,但药物治疗周期长、不良反应大^[4-5]。中药育发凝胶是在中医药理论指导下,由临床经验方改良而得的中药复方制剂,包括丹参、苦参、侧柏叶、香附和人参 5 味中药。

中药育发凝胶作为经皮给药制剂,其经皮给药成分尚不明确,基于广义的经皮给药系统定义,包括皮肤局部药物递送系统 (dermal drug delivery systems, DDDS) 和透皮药物递送系统 (transdermal drug delivery systems, TDDS),前者作用于皮肤或皮下组织,后者是药物通过皮肤吸收进入循环系统发挥全身治疗作用^[6]。本研究选择经皮入血成分和皮肤滞留成分作为中药育发凝胶的经皮吸收成分。由于中药复方的成分复杂,治疗 AGA 的药效和机

制不清楚,网络药理学与分子对接的研究方式符合中医整体观念的理论体系,因此,本研究以中药育发凝胶的经皮吸收成分作为活性成分,通过网络药理学和分子对接技术探究中药育发凝胶治疗 AGA 的潜在作用机制,并通过实验验证其药效和关键作用靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 (20 ± 2) g,购自天津中医药大学动物实验中心,许可证号 SCXK (京) 2019-0008。实验开始前,大鼠在实验动物中心适应性饲养 1 周。饲养期间正常喂养,室内温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 (60 ± 5) %。动物实验经天津中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 TCM-LAEC2021073)。

1.2 药材

丹参、苦参、侧柏叶、香附和人参药材购自天津鹏海医院,经天津中医药大学马琳教授鉴定分别为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根、柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶、莎草科植物莎草 *Cyperus*

rotundus L. 的干燥根茎、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

无水乙醇(批号 20220127)购自朝阳赫成化学试剂有限公司; PBS 缓冲液(pH 6.8, 批号 20221121)购自北京索莱宝科技有限公司; 生理盐水(批号 20220324)购自石家庄四药有限公司; 甘油(批号 20210714)购自天津市凯通化学试剂有限公司; 氮酮、苯氧乙醇(批号 30212360、10023418)购自国药集团化学试剂有限公司; 丙二醇(批号 108208)购自上海阿拉丁生化科技公司; 卡波姆 940(批号 20231224)购自艾勒科技; 透明质酸(批号 20200904)购自华熙福瑞达生物医药有限公司; 三乙醇胺(批号 20220324)购自天津大茂化学试剂厂; 5%米诺地尔酊(批号 H20010714)购自浙江万晟药业有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号 CW0014S)购自康为世纪生物科技有限公司; 小鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) ELISA 试剂盒(批号 MM-0135M2)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 MM-0132M1)、小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 MM-46428M2)购自武汉酶免生物科技有限公司; 雄激素受体(androgen receptor, AR)抗体(批号 AB108341)、 β -actin 抗体(批号 AB119716)购自英国 Abcam 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 9662)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 3498)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 2772)购自美国 CST 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 BA1054)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器

AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; VX-200 型涡旋混匀器(美国 Labnet 公司); Scientz-48L 型冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); ACQUITY 超高效液相色谱系统、Q-TOF 质谱仪(美国 Waters 公司); TECAN 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司); H1650 型台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); ChemiDoc MP 型多功能凝胶成像系统、PowerPac™ 基础电源(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 中药育发凝胶的制备

取丹参、苦参、侧柏叶、香附、人参各 200 g, 粉碎, 加入 8 倍量的水, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 趁热滤过, 合并 2 次水提液, 旋蒸浓缩至 1 g/mL 和 2 g/mL。1%卡波姆 940 加适量水, 放置 24 h, 使其充分溶胀, 随后加入 10%甘油、20%丙二醇、1%氮酮、0.2%透明质酸、44%中药提取液和 0.5%苯氧乙醇, 搅拌均匀。使用适量三乙醇胺调节 pH 至 6.5, 即得中药育发凝胶。

2.2 中药育发凝胶对 AGA 小鼠的药效评价

2.2.1 动物分组、造模及给药 45 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组及中药育发凝胶高、低剂量组和米诺地尔组, 每组 9 只。用电推剪除去小鼠背部毛发, 脱毛膏除去小鼠背部绒毛, 脱毛面积约为 4 cm² (2 cm×2 cm)。除对照组外, 其余各组小鼠涂抹 0.1 mL 8%丙酸睾酮诱导建立 AGA 小鼠模型^[7], 同时中药育发凝胶高剂量组涂抹 2 g/mL 中药育发凝胶, 中药育发凝胶低剂量组涂抹 1 g/mL 中药育发凝胶, 米诺地尔组涂抹 5%米诺地尔溶液, 1 次/d, 每次 0.1 mL, 连续涂抹 14 d。

2.2.2 小鼠毛发生长状态记录 每天观察并记录小鼠的毛发生长状态和皮肤颜色变化, 于第 7、14 天对小鼠脱毛区毛发生长的覆盖率进行评分, 评分标准^[8]: 脱毛区皮肤呈粉红色, 计 0 分; 脱毛区皮肤呈灰色, 计 1 分; 脱毛区皮肤呈黑色并有少许毛发生长出, 计 2 分; 脱毛区皮肤呈黑色并有大量毛发生长出, 计 3 分。在实验第 0、14 天, 对小鼠背部进行拍照记录。

2.2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察毛囊和表皮厚度 给药结束后, 使用异氟烷麻醉后颈椎脱臼处死, 剥离皮肤后, 刮净毛发及皮下脂肪, 将小鼠背部皮肤放入 10 倍量 4%组织/细胞固定液中固定 48 h, 乙醇逐级脱水, 石蜡包埋, 将小鼠皮肤组织纵向平整切开, 切片(5 μ m), 进行 HE 染色, 于显微镜下观察皮肤表皮层和真皮层形态。

2.2.4 小鼠皮肤组织中 TGF- β 1、IL-6、TNF- α 水平的测定 按照试剂盒说明书检测小鼠皮肤组织 TGF- β 1、IL-6、TNF- α 的水平。

2.3 UPLC-Q-TOF-MS 检测中药育发凝胶的经皮吸收成分

2.3.1 动物分组及给药 12 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为空白基质组和中药育发凝胶组, 每组 6 只。

脱去小鼠毛发,脱毛面积约为 4 cm^2 ($2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$)。空白基质组涂抹空白基质凝胶 1 mL 于脱毛区,给药组涂抹 2 g/mL 中药育发凝胶 1 mL 于脱毛区。所有小鼠在涂抹完凝胶后,用纱布和医用胶带将给药部位包裹住,观察 2 h ,防止小鼠之间相互舔舐。每天早、中、晚涂抹,连续涂抹 7 d ,末次涂抹给药后 1 h 后取小鼠皮肤和血浆。

2.3.2 生物样品前处理 剥离小鼠背部脱毛区皮肤,用生理盐水洗净表皮残留的药膏,取 500 mg 皮肤,加入 5 倍量乙腈,涡旋 2 min 后,冷冻型高通量组织研磨器中匀浆 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 12 000 r/min 离心 10 min ,取上清液于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。

小鼠摘眼球取血,肝素管抗凝, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 4 000 r/min 离心 10 min ,取上层淡黄色液体,即为血浆。分别精密吸取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 空白血浆和含药血浆于 5 mL 离心管内,加入 3 倍量的甲醇,涡旋 2 min ,静置 10 min 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 12 000 r/min 离心 10 min ,取上清液于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。

小鼠皮肤和血浆残渣用 80% 甲醇 $100\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,涡旋 2 min ,超声 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 12 000 r/min 离心 10 min ,取上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液备用,供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.3.3 UPLC-Q-TOF-MS 分析条件

(1) 色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$),流动相为水 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱: $0\sim 8\text{ min}$, $5\%\sim 30\%\text{ B}$; $8\sim 30\text{ min}$, $30\%\sim 65\%\text{ B}$; $30\sim 50\text{ min}$, $65\%\sim 81\%\text{ B}$ 。体积流量 0.2 mL/min ;柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量 $3\text{ }\mu\text{L}$ 。

(2) 质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI),正、负离子模式下采集数据。正离子毛细管电压为 3 kV ,负离子毛细管电压为 2 kV ,锥孔气体积流量为 50 L/h ,脱溶剂气体积流量为 800 L/h ,源温度为 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度为 $450\text{ }^{\circ}\text{C}$,扫描范围 $m/z\ 50\sim 1\text{ 700}$ 。

2.3.4 数据分析 根据文献对中药育发凝胶中涉及药材化合物进行系统检索,汇总化合物名称、分子式、特征碎片等数据,自建中药育发凝胶质谱数据库。通过 Masslynx 4.2 对图谱数据进行解析,以质量相对误差在 $\pm 1\times 10^{-5}$ 内为目标候选物,根据获得多级质谱提供的分子离子峰、计算元素组成以及裂解碎片信息,通过 MS、MS/MS 信息及自建中药育发凝胶质谱数据库、PubChem 数据库等数据库比对推测化合物结构。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 中药育发凝胶潜在作用靶点 以 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析得到的经皮入血成分和皮肤滞留成分为主要的药效成分,从 PubChem 数据库下载成分的 Canonical SMILES 结构式,上传到 SwissTargetPrediction 数据库预测作用靶点,以 $\text{probability}>0$ 作为靶点筛选标准。

2.4.2 AGA 疾病靶点的获取 利用 GeneCards、OMIM、Disgent 数据库,以“androgenic alopecia”作为检索词分别检索,其中 GeneCards 数据库中选取“relevance score” ≥ 10 的靶点。将 3 个数据库靶点合并后去除重复靶点,并利用 UniProt 蛋白质数据库标准化和规范化靶点信息。

2.4.3 中药育发凝胶治疗 AGA 潜在靶点的筛选及核心靶点的筛选 将中药育发凝胶主要药效成分作用靶点和 AGA 疾病靶点分别输入 Venny 数据库,取二者交集靶点,得到中药育发凝胶治疗 AGA 潜在靶点并绘制韦恩图。

2.4.4 “成分-靶点”网络的构建 构建“成分-靶点”网络,使用 Cytoscape 3.7.1 软件中 Network Analysis 进行可视化处理分析,筛选活性成分节点的度值前 10 名为主要活性成分。

2.4.5 关键靶点功能注释 将“2.4.3”项下得到的中药育发凝胶治疗 AGA 的关键靶点作为输入文件,通过 DAVID 数据库进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析,分别选取 GO 分析中生物进程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 3 个方面分别进行阐释,并进一步进行 KEGG 通路分析。

2.4.6 分子对接 PubChem 数据库下载光甘草定、槲皮素等 10 种主要活性成分 3D 结构 sdf 文件,导入 Openable 软件中将其导出为 pdbqt 格式文件。从蛋白数据库 PDB 获取蛋白激酶 B (protein kinase B1, AKT1)、AR、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-asparate protease-3, CASP3)、连环蛋白 1 (catenin beta 1, CTNNB1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、酪氨酸激酶受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, ERBB2)、雌激素受体 α (estrogen receptor 1, ESR1)、非受体酪氨酸激酶 SRC、TNF、血管内皮细胞生长因子受体 α (vascular endothelial growth

factor α , VEGFA) 蛋白的 pdb 格式文件, 导入 AutoDockTools 软件, 去除水分子、添加全氢, 导出 pdbqt 格式文件。分别将上述 10 个受体蛋白与 10 个活性成分的 pdbqt 格式文件导入 Autotool 软件, 采用盲对接方法, 通过 Grid Box 设定搜索范围使 Box 包裹蛋白的所有活性位点, 导出 Grid Box 参数 gp 格式文件。通过设置 config 文件, 文件包含 Grid Box 参数和需要对接的受体和配体名称。通过 Autodock vina 软件进行 config 文件的对接, 导出对接结果 pdb 格式文件。将对接结果 pdb 格式文件导入 Pymol 软件, 将分子对接结果构象图可视化并分析结果。

2.5 Western blotting 检测小鼠皮肤组织中 AR 及凋亡相关蛋白的表达

取小鼠背部皮肤, 剪碎, 加入 9 倍量的 RIPA 裂解液, 于冰上用组织细胞超声破碎仪提取蛋白。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 2 h; 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 显影并采集图像, 分析条带灰度值。

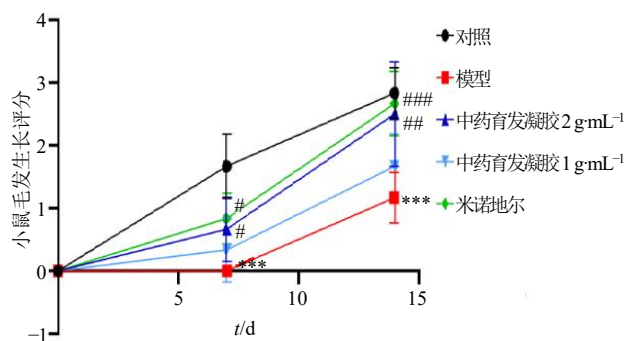
2.6 统计学分析

数据处理采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如果资料符合正态分布且方差齐性, 多组数据比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。符合方差齐性, 采用 LSD-*t* 法进行; 不符合方差齐性, 但数据满足正态分布, 采用 Tamhane's *T2* 法检验。使用 GraphPad Prism 5 软件绘图。

3 结果

3.1 中药育发凝胶对 AGA 小鼠的药效评价

3.1.1 中药育发凝胶对 AGA 小鼠毛发生长的影响 如图 1 所示, 各组小鼠在第 0 天时, 背部皮肤呈粉红色, 表示小鼠毛发处于休止期状态。在第 14 天时,



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组小鼠毛发生长情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 1 Growth of hair in mice of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

对照组小鼠脱毛区皮肤呈黑色并有大量毛发长出, 模型组小鼠脱毛区皮肤呈灰色, 2 组小鼠间出现明显毛发生长周期差异, 表明 AGA 模型复制成功。中药育发凝胶高剂量组和米诺地尔组小鼠皮肤呈黑色并有大量毛发长出, 中药育发凝胶低剂量组小鼠皮肤呈黑色并有少许毛发长出。毛发生长情况评分结果显示, 自给药第 7 天, 与模型组比较, 中药育发凝胶高剂量组和米诺地尔组小鼠毛发生长评分显著升高 ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), 表明毛发生长周期缩短。

3.1.2 中药育发凝胶对 AGA 小鼠毛囊形态的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠毛囊分布稀少, 毛囊萎缩; 各给药组毛囊分布广, 毛囊较大, 且黑色素形成明显。

3.1.3 中药育发凝胶对 AGA 小鼠真皮厚度的影响 如表 1 所示, 造模第 7、14 天, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤真皮厚度显著下降 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠真皮厚度均显著增加 ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001)。

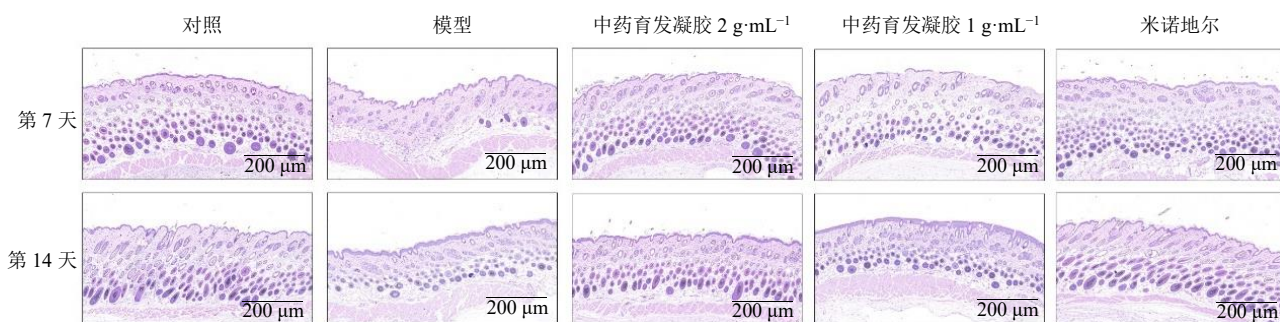


图 2 各组小鼠皮肤组织毛囊形态 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Morphology of hair follicles in skin tissue of mice in each group (HE, $\times 100$)

表 1 各组小鼠真皮厚度 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Dermal thickness of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	真皮厚度/ μm	
		第 7 天	第 14 天
对照	—	824.83 $\pm$ 17.76	840.03 $\pm$ 15.27
模型	—	637.83 $\pm$ 18.33***	682.21 $\pm$ 26.28***
中药育发凝胶	2 g·mL ⁻¹	825.45 $\pm$ 10.45###	788.37 $\pm$ 52.64##
	1 g·mL ⁻¹	714.08 $\pm$ 41.31##	728.09 $\pm$ 25.71#
米诺地尔	5%	821.45 $\pm$ 13.41###	823.20 $\pm$ 11.62###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

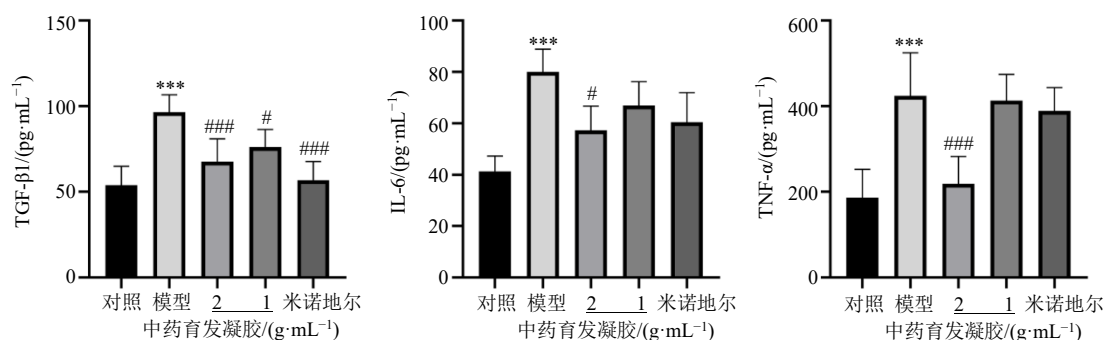


图 3 各组小鼠皮肤组织中 TGF- β 1、IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Levels of TGF- β 1, IL-6 and TNF- α in skin tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 负离子模式下中药育发凝胶提取液成分鉴定

Table 2 Identification of chemical components of Yufa Gel extract in negative ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	[M-H] ⁻ (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	蔗糖 ^[9]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1.10	387.113 9	387.113 4	-1.3	341.107 0
2	香草酸 4- β -D-葡萄糖苷 ^[10]	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	3.78	329.086 7	329.087 0	0.9	167.268 5, 108.344 0, 152.275 2, 153.277 8
3	原儿茶酸 ^[11-12]	C ₇ H ₆ O ₄	3.93	153.018 2	153.018 9	4.6	109.350 0
4	丹参素 ^[13]	C ₉ H ₁₀ O ₅	4.22	197.044 4	197.045 1	3.6	179.034 8, 151.039 8, 123.350 2, 135.334 5
5	(2Z)-2-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-phenylacrylic acid ^[10]	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	4.66	325.091 8	325.092 4	1.8	119.360 5, 163.287 5
6	香橙素 ^[14]	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	4.68	287.055 0	287.056 1	3.8	149.296 3, 121.337 8
7	棘皮苷 D ^[15]	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	5.06	787.268 1	787.271 9	4.8	—
8	芦丁 ^[16]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.15	609.145 0	609.143 9	-1.8	463.578 7, 179.035 1
9	丁香酸 ^[10]	C ₉ H ₁₀ O ₅	5.38	197.044 4	197.044 8	2.0	167.242 3, 138.319 8, 123.314 2
10	hovetrichoside C ^[10]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	5.76	449.107 8	449.107 4	-0.9	259.117 2, 287.148 9, 269.102 9
11	杨梅苷 ^[14]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6.70	463.087 1	463.086 0	-2.4	316.929 0, 271.043 1, 179.216 6, 151.269 4
12	3-苯基乳酸 ^[10]	C ₉ H ₁₀ O ₃	6.81	165.054 6	165.055 1	3.0	—
13	异槲皮苷 ^[17]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	7.16	463.087 1	463.086 5	-1.3	299.148 2
14	槲皮苷 ^[17]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.46	447.092 2	447.090 0	-4.9	300.978 1, 299.972 5, 271.042 1, 255.085 6, 179.215 6, 151.268 9
15	人参皂苷 Rd ^[15]	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	7.58	945.541 7	945.544 3	2.7	459.231 3
16	人参皂苷 Rf ^[15]	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	7.62	799.483 8	799.485 4	2.0	475.160 2

3.1.4 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织中 TGF- β 1、IL-6 和 TNF- α 水平的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 TGF- β 1、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组皮肤组织中 TGF- β 1 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 中药育发凝胶高剂量组皮肤组织中 IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$)。

3.2 中药育发凝胶提取液、经皮入血成分和皮肤滞留成分分析

共推测出中药育发凝胶提取液中 76 个化合物 (表 2、3), 中药育发凝胶经皮入血 7 个化合物 (表 4、5), 皮肤滞留 30 个化合物 (表 6、7)。

表 2 (续)

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[\text{M}-\text{H}]^- (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
17	南烛木糖苷 ^[17]	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$	7.90	551.212 3	551.210 4	-3.4	505.205 7, 341.137 6, 329.136 8
18	山柰酚-3- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[17]	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	8.13	431.097 3	431.096 4	-2.1	286.025 1, 285.038 8, 283.154 3
19	香叶木素-7- <i>O</i> -葡萄糖 ^[10]	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	8.29	461.107 8	461.106 6	-2.6	315.926 9
20	异迷迭香酸苷 ^[18]	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	8.33	521.129 0	521.128 0	-1.9	499.252 1, 359.205 2
21	3-对豆酰基奎宁酸 ^[10]	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8$	8.64	337.091 8	337.091 4	-1.2	173.273 3, 191.250 4, 111.331 4
22	咖啡酸 ^[12]	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	9.08	179.033 9	179.034 8	5.0	134.327 5
23	槲皮素 ^[9]	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	9.29	301.034 3	301.034 4	0.3	151.269 1, 137.383 3, 121.334 2
24	丹酚酸 F ^[11]	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	9.32	313.070 7	313.070 3	-1.3	109.347 8, 269.138 5
25	原紫草酸 ^[19]	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_8$	9.33	357.060 5	357.059 1	-3.9	—
26	迷迭香酸 ^[10]	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	9.35	359.076 1	359.075 9	-0.6	179.252 5, 161.273 8, 135.334 4, 133.321 4
27	高丽槐素/毛蕊异黄酮 ^[17]	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	9.39	283.060 1	283.059 8	-1.1	153.150 6, 137.183 6, 121.215 5
28	三叶豆紫檀苷 ^[20]	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	9.44	491.118 4	491.116 1	-4.7	287.055 2, 153.150 3, 121.214 3
29	山柰酚 ^[17]	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	9.53	285.039 4	285.039 4	0.0	239.126 2
30	人参皂苷 Rg ₁ ^[21]	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	9.85	845.491 4	845.495 4	4.7	637.295 2, 475.143 0, 391.206 4
31	人参皂苷 Rb ₁ ^[21]	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	10.06	1107.594 6	1107.600 6	5.4	621.317 6, 459.178 6, 375.105 7
32	芹菜素 ^[22]	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	10.29	269.044 4	269.044 7	1.1	151.2683, 117.345 8
33	人参皂苷 Ro ^[21]	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	10.73	955.498 8	955.498 8	0.0	793.903 0, 613.261 8, 455.300 4, 221.107 4
34	丹酚酸 C ^[23]	$\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	11.14	491.097 3	491.096 1	-2.4	197.230 0, 135.334 7, 185.230 4, 295.019 8
35	黄细辛酮 B ^[24]	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$	11.15	331.055 0	331.054 9	-0.3	250.129 6
36	丹酚酸 A ^[25]	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	11.37	493.112 9	493.111 3	-3.2	295.019 8, 185.230 7, 179.252 2, 135.334 4, 159.298 1, 109.350 1
37	紫草酸甲酯 ^[26]	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	11.70	551.118 4	551.116 5	-3.4	339.895 9, 321.934 6, 293.008 0
38	芒柄花素 ^[27]	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	12.22	267.065 2	267.065 5	1.1	252.105 3, 223.162 8, 132.020 3
39	壬二酸 ^[10]	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	13.08	187.096 5	187.096 9	2.1	—
40	人参皂苷 Re ^[21]	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	13.23	945.541 7	945.539 3	-2.5	637.249 3
41	穗花杉双黄酮/罗波斯塔双黄酮/ 扁柏双黄酮 ^[22]	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	14.99	537.081 6	537.080 2	-2.6	331.189 4
42	苦参酮 ^[27]	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$	16.39	437.195 9	437.195 0	-2.1	275.171 6, 191.267 0, 161.273 3, 151.304 4
43	新隐丹参酮 ^[18]	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$	17.29	313.143 4	313.142 2	-3.8	267.158 7, 251.163 1, 197.807 2
44	降苦参酮 ^[28]	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$	19.46	423.180 2	423.178 2	-4.7	—
45	人参皂苷 F ₂ ^[21]	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	19.65	783.488 9	783.495 7	8.7	—
46	光甘草定 ^[29]	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$	20.06	323.127 8	323.127 6	-0.6	201.266 6, 135.332 8
47	3-羟基山达海松酸 ^[14]	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$	24.53	317.211 1	317.210 2	-2.8	255.049 9, 197.045 0
48	去氧鼠尾草酚 ^[18]	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$	27.96	315.195 5	315.194 8	-2.2	134.339 8
49	棕榈酸 ^[18]	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	37.13	255.231 9	255.231 3	-2.4	—

“—”表示与自建数据库无匹配，下表同。

“—” indicates no match with self-built database, same as below tables.

表 3 正离子模式下中药药发凝胶提取液成分鉴定

Table 3 Identification of chemical components of Yufa Gel extract in positive ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[\text{M}+\text{H}]^+ (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	金雀花碱 ^[20]	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$	2.13	191.117 9	191.118 2	1.6	148.216 8, 120.269 1
2	氧化苦参碱 ^[20]	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$	2.23	265.191 1	265.191 4	1.1	247.181 0
3	苦参碱 ^[20]	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$	2.50	249.196 1	249.195 6	-2.0	247.106 0, 176.194 2, 150.265 5, 148.253 1, 112.276 2
4	胰靛叶碱 ^[30]	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	2.71	261.159 8	261.159 7	-0.4	114.289 0, 164.218 5
5	<i>N</i> -甲基金雀花碱 ^[30]	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$	2.74	205.133 5	205.132 9	-2.9	146.206 7, 108.286 5
6	氧化槐定碱 ^[20]	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$	2.80	263.175 4	263.175 6	0.8	150.264 5, 122.245 5
7	槐果碱 ^[30]	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$	3.14	247.180 5	247.180 7	0.8	179.235 0, 150.265 6, 136.274 5
8	异槐果碱/5,6-去氢羽扇豆碱 ^[30]	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$	4.68	247.180 5	247.180 7	0.8	179.235 4, 150.265 7, 136.275 0
9	异阿魏酸 ^[10]	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	5.90	195.063 0	195.063 8	4.1	—
10	菜蓟苦素 ^[31]	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$	5.97	347.148 9	347.149 0	0.3	247.180 9

表 3 (续)

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M+H]^+ (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
11	葡萄糖基芥菜素 ^[31]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	6.61	565.155 1	565.155 8	1.2	270.926 5, 271.924 9
12	杨梅苷 ^[14]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6.95	465.102 8	465.103 0	0.4	319.045 3
13	杨梅素 ^[31]	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	7.35	319.044 8	319.045 2	1.3	317.138 7
14	山柰酚-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[24]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.41	449.107 8	449.107 9	0.2	287.055 8
15	槲皮苷 ^[31]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.50	449.107 8	449.108 2	0.9	153.151 3, 109.233 7
16	丹参酮 II _B ^[25]	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	7.86	313.143 4	313.143 2	-0.6	303.050 0
17	香叶木素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[10]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	7.89	463.123 5	463.122 8	-1.5	293.172 2, 267.158 4, 235.169 1
18	山柰酚-3- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[31]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	8.18	433.112 9	433.114 2	3.0	315.926 9
19	小红参醌 C ^[18]	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	10.65	341.138 4	341.138 2	-0.6	268.064 6, 239.264 2, 211.092 0
20	柳杉酚 ^[26]	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	11.18	301.216 2	301.216 2	0.0	447.182 8
21	苦醇 N ^[30]	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	15.13	453.190 8	453.190 0	-1.8	137.219 7, 153.223 8
22	香附烯酮 ^[32]	C ₁₅ H ₂₂ O	16.03	219.174 3	219.174 3	0.0	171.180 1
23	亚甲基丹参醌/二氢丹参醌 ^[26]	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	18.98	279.101 6	279.101 2	-1.4	177.239 2, 149.293 1, 121.336 6
24	丹参酮 I ^[25]	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	18.98	279.101 6	279.101 2	-1.4	205.084 2
25	afromosin ^[29]	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	21.06	299.091 4	299.091 4	0.0	251.200 2, 233.153 7
26	诺卡酮 ^[32]	C ₁₅ H ₂₂ O	21.70	219.174 3	219.174 0	-1.4	190.134 8, 233.053 7, 205.125 1, 260.982 3, 149.163 0
27	亚油酸 ^[18]	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	22.86	281.247 5	281.246 8	-2.5	279.218 3, 281.247 4, 251.200 5
28	隐丹参酮 ^[20]	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	23.22	297.148 5	297.148 2	-1.0	205.085 7
29	α -香附酮 ^[32]	C ₁₅ H ₂₂ O	24.65	219.174 3	219.174 3	0.0	263.236 3
30	丹参酮 II _A ^[20]	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	27.78	295.132 9	295.132 7	-0.7	281.962 1, 251.058 8, 278.983 0
31	亚麻酸 ^[18]	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	29.35	279.231 9	279.231 6	-1.1	205.086 4

表 4 负离子模式下中药育发凝胶入血化学成分鉴定

Table 4 Identification of chemical components in blood of Yufa Gel in negative ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M-H]^- (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	香草酸 4- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	3.90	329.086 7	329.087 1	-1.2	153.870 4
2	光甘草定	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	18.49	323.127 8	323.126 5	-4.0	201.022 5
3	去氧鼠尾草酚	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	26.32	315.195 8	315.196 0	-0.6	134.869 1

表 5 正离子模式下中药育发凝胶入血化学成分鉴定

Table 5 Identification of chemical components in blood of Yufa Gel in positive ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M+H]^+ (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	2.12	249.196 2	249.196 7	2.0	150.110 8, 112.897 2
2	槐果碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	2.23	247.181 0	247.180 7	-1.2	175.119 4
3	异阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	5.75	195.066 2	195.064 8	-7.2	135.045 5
4	柳杉酚	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	9.79	301.216 2	301.216 0	-0.7	171.142 9

表 6 负离子模式下中药育发凝胶皮肤滞留成分鉴定

Table 6 Identification of chemical components of skin retention of Yufa Gel in negative ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M-H]^- (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	2.87	153.018 2	153.018 2	0.0	108.956 6
2	香草酸 4- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	3.91	329.086 7	329.087 6	2.7	167.025 4
3	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	4.98	609.145 0	609.148 6	5.9	463.087 4, 179.035 7
4	杨梅苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	5.03	463.087 1	463.088 0	1.9	316.132 9, 179.025 2
5	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	5.45	463.087 1	463.086 4	-1.5	299.133 3
6	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6.30	447.092 2	447.092 8	1.3	271.077 4, 179.040 6
7	南烛木糖苷	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	6.75	551.212 3	551.213 9	2.9	329.120 8, 341.104 2
8	山柰酚-3- <i>O</i> -鼠李糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6.89	431.097 3	431.096 0	-3.0	285.047 4
9	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7.33	285.039 4	285.040 3	3.2	239.078 1
10	人参皂苷 Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	7.58	945.541 7	945.542 5	0.8	459.181 8

表 6 (续)

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M-H]^- (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
11	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	8.14	301.034 3	301.037 0	9.0	151.036 1
12	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	9.19	269.044 4	269.045 0	2.2	116.930 4
13	人参皂苷 Rg_1	$C_{42}H_{72}O_{14}$	9.87	845.489 9	845.493 1	5.1	799.198 8, 637.281 7, 475.157 4
14	人参皂苷 Rb_1	$C_{54}H_{92}O_{23}$	10.06	1 107.594 6	1 107.597 5	2.6	621.320 9
15	芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_4$	10.91	267.065 2	267.065 2	0.0	252.074 1
16	人参皂苷 Re	$C_{48}H_{82}O_{18}$	12.09	945.541 7	945.547 8	6.5	475.247 4, 391.205 1
17	苦参酮	$C_{26}H_{30}O_6$	14.97	437.195 9	437.195 0	-2.1	161.028 1
18	降苦参酮	$C_{25}H_{28}O_6$	17.96	423.180 2	423.180 8	1.4	—
19	光甘草定	$C_{20}H_{20}O_4$	18.46	323.127 8	323.128 5	2.2	201.011 5
20	人参皂苷 F_2	$C_{42}H_{72}O_{13}$	18.75	783.488 9	783.489 1	0.3	—
21	去氧鼠尾草酚	$C_{20}H_{28}O_3$	26.28	315.195 5	315.195 2	-1.0	134.888 7

表 7 正离子模式下中药育发凝胶皮肤滞留成分鉴定

Table 7 Identification of chemical components of skin retention of Yufa Gel in positive ion mode

编号	化合物	分子式	t_R/min	$[M+H]^+ (m/z)$		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)
				理论	实测		
1	氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	1.19	265.191 1	265.191 0	-0.4	247.180 7
2	苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O$	2.10	249.196 1	249.197 0	3.6	120.081 0
3	槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	2.20	247.180 5	247.181 0	2.0	176.066 7
4	杨梅苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	5.45	465.102 8	465.102 0	-1.7	319.046 2
5	异阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	5.76	195.065 7	195.066 8	5.6	—
6	槲皮苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	6.30	449.107 8	449.108 0	0.4	303.050 7
7	山柰酚-3- <i>O</i> -鼠李糖苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	7.02	433.112 9	433.114 0	2.5	—
8	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	8.16	303.050 0	303.050 0	0.0	—
9	柳杉酚	$C_{20}H_{28}O_2$	9.80	301.216 2	301.218 3	0.0	171.106 0
10	afromosin	$C_{17}H_{14}O_5$	19.35	299.091 4	299.092 0	2.0	279.125 6, 281.293 1
11	隐丹参酮	$C_{19}H_{20}O_3$	21.50	297.148 5	297.150 0	5.0	251.200 2
12	α -香附酮	$C_{15}H_{22}O$	22.85	219.175 0	219.175 0	0.0	205.121 7
13	丹参酮 II_A	$C_{19}H_{18}O_3$	25.98	295.132 9	295.133 0	0.3	206.199 6, 249.181 1

3.3 网络药理学分析

3.3.1 中药育发凝胶治疗 AGA 核心靶点和蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 构建 对 SWISS 靶点预测数据库预测所得靶点基

因合集进行去重, 共获得 481 个药物靶点基因。运用 DisGeNET、OMIM、Genecards 数据库, 获得疾病潜在靶点 236 个。药物靶点和疾病靶点取交集, 共获得 41 个交集靶点 (图 4-A)。交集靶点即为核

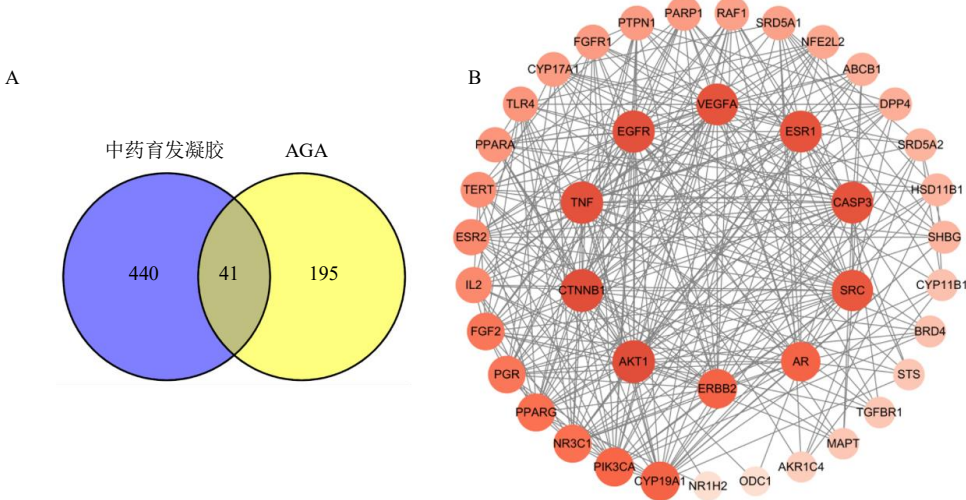


图 4 中药育发凝胶治疗 AGA 靶点的 Venn 图 (A) 和核心靶点 PPI 网络 (B)

Fig. 4 Venn diagram (A) of targets of Yufa Gel in treatment of AGA and PPI network (B) of core targets

心靶点，核心靶点的 PPI 网络的构建及分析其潜在靶点为 AKT1、CTNNB1、TNF、EGFR、VEGFA、ESR1、CASP3、SRC、AR 等（图 4-B）。

3.3.2 “化合物-靶点”网络构建 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“化合物-靶点”网络（图 5），根据度值筛选中药育发凝胶治疗 AGA 贡献较大的活性成分为光甘草定(glabridin)、 α -香附酮(α -cyperone)、山柰酚(kaempferol)、芹菜素(apigenin)、柳杉酚(sugiol)等。

3.3.3 靶点功能富集分析 运用 DAVID 数据库进

行 GO 功能和 KEGG 通路分析，发现潜在作用靶点 BP 集中在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、RNA 聚合酶 II 启动子 pri-miRNA 转录的正调控、基因表达的负调节等，CC 涉及膜筏、染色质、高分子复合物等，MF 涉及酶结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、类固醇结合等（图 6）。KEGG 通路富集分析主要集中在丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）-Akt 信号通路、类固醇激素生物合成等（图 7）。

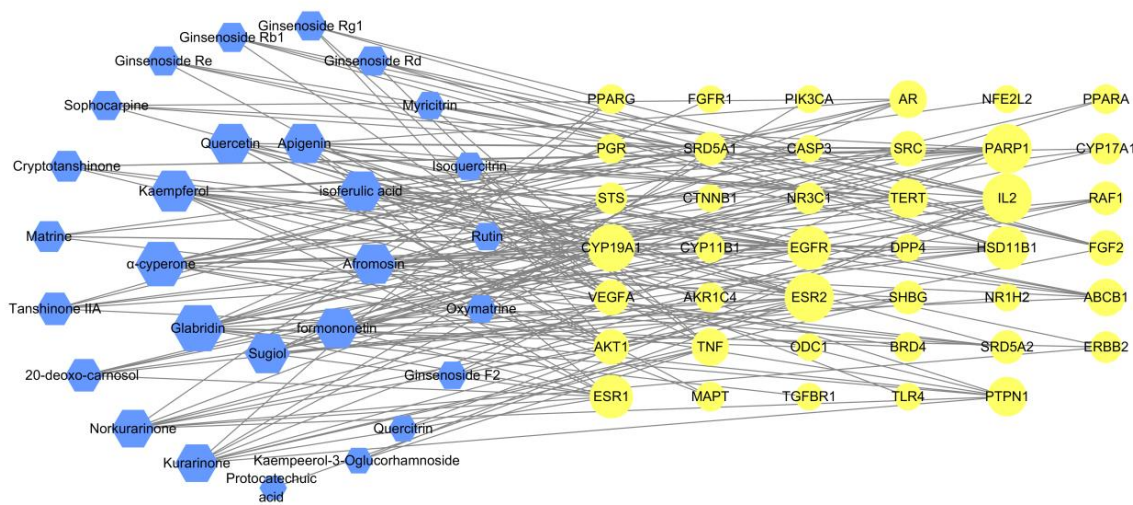


图 5 “化合物-靶点”网络

Fig. 5 “Compound-target” network

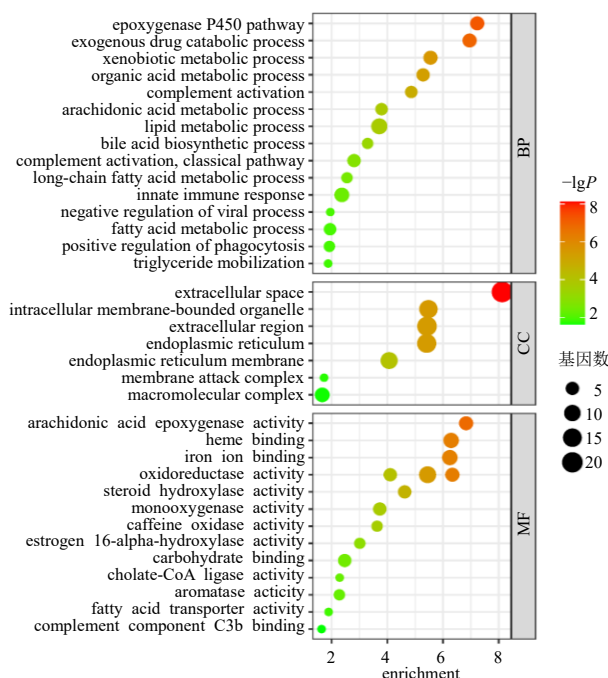


图 6 核心靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO function enrichment analysis of core targets

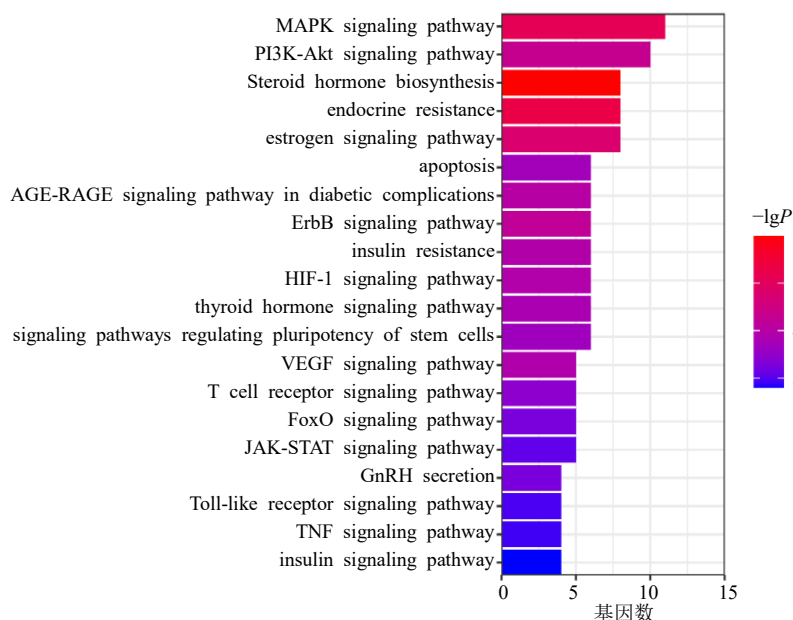


图 7 核心靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of core targets

3.4 分子对接分析

选取 PPI 网络排名前 10 的核心靶点和 10 个关键活性成分进行分子对接 (图 8-A), 通过结合能来判断配体和受体结合的稳定性, 结合能均小于

-20.92 kJ/mol, 表明主要活性成分与核心靶点均具有较强的结合力。其中光甘草定与 AR 和 CASP3 的结合能分别为-36.82、-38.49 kJ/mol, 结合能较低, pymol 将结果二维可视化, 见图 8-B。

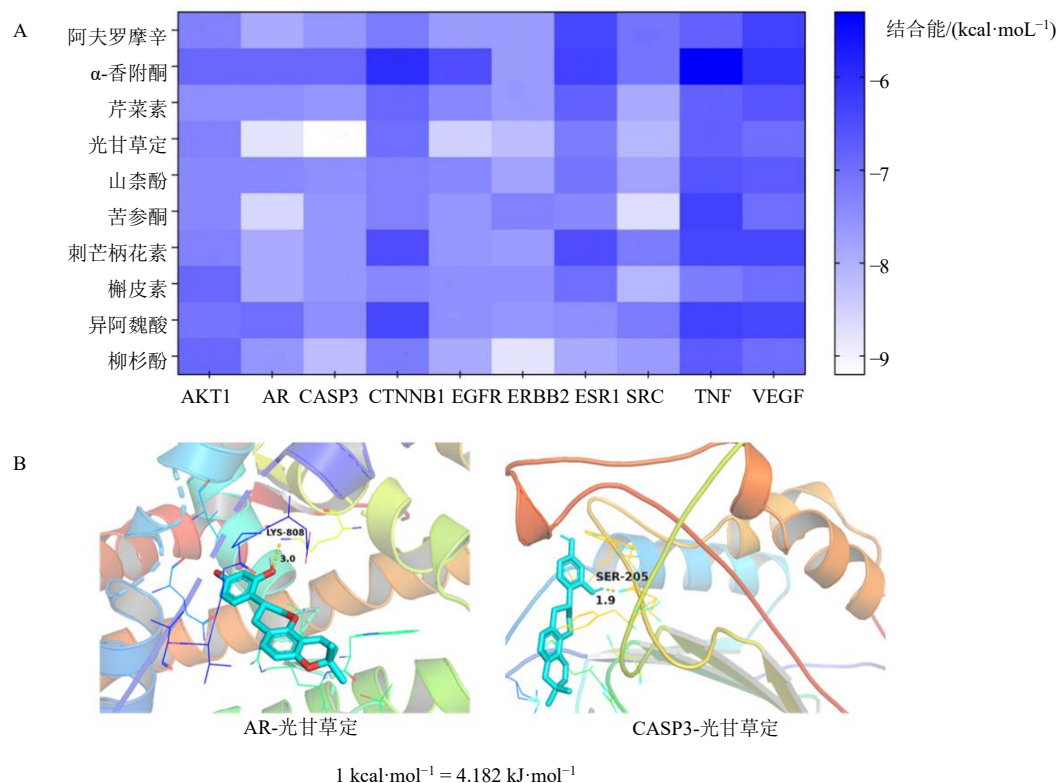


图 8 分子对接结合能热图 (A) 及光甘草定与 AR、CASP3 的对接示意图 (B)

Fig. 8 Heat map of molecular docking binding energy (A) and schematic diagram of docking between glabridin and AR, CASP3 (B)

3.5 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织中 AR 及凋亡相关蛋白表达的影响

3.5.1 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织中 AR 蛋白表达的影响 如图 9 所示,与对照组比较,模型组小鼠皮肤组织中 AR 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,各给药组 AR 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.001$),表明中药育发凝胶可以降低 AGA 小鼠背部组织中的 AR 蛋白表达,从而发挥药效。

3.5.2 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织中凋亡相关蛋白表达的影响 如图 10 所示,与对照组比较,模型组小鼠皮肤组织中 Caspase-3、Bax 蛋白表

达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平无明显变化, Bax/Bcl-2 值显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,各给药组 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平无明显变化, Bax/Bcl-2 值显著降低 ($P<0.001$)。表明中药育发凝胶可以通过调节皮肤组织中凋亡相关蛋白表达发挥药效。

4 讨论

中医认为,湿热蕴结是 AGA 的首要病机,肝肾亏虚是 AGA 的本质所在,AGA 多与血热风盛、血虚风燥、肝郁血瘀有关,应从清热凉血、活血化瘀、补肾益肝方面进行治疗^[33-34]。中药育发凝胶是

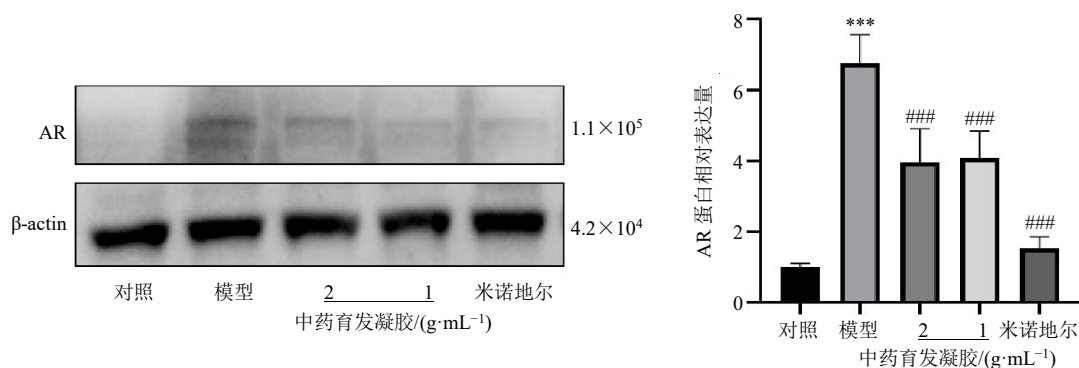


图 9 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织 AR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of Yufa Gel on AR protein expression in skin tissue of AGA mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

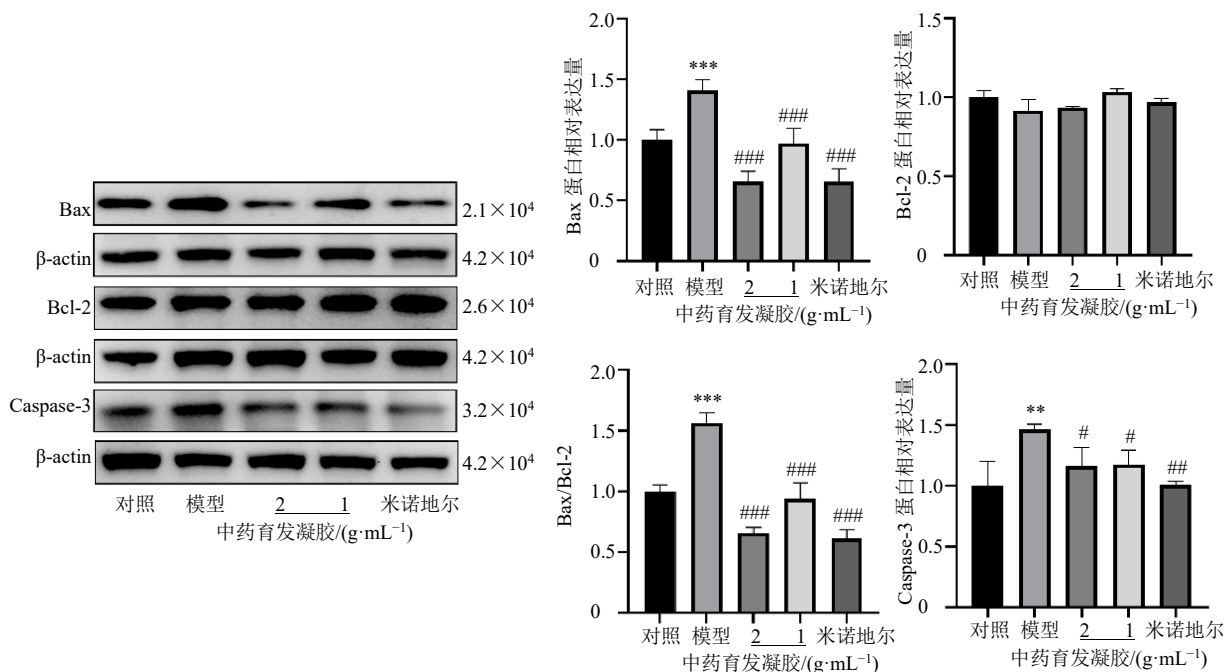


图 10 中药育发凝胶对 AGA 小鼠皮肤组织 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of Yufa gel on expressions of Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein in skin tissue of AGA mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

在中医药理论指导下由临床经验而得的中药复方制剂,包括侧柏叶、丹参等 5 味中药,诸药合用,共行益气摄血、活血祛瘀、乌发生发之效^[35]。本研究通过涂抹丙酸睾酮建立 AGA 小鼠模型,模型组小鼠毛发生长缓慢,毛囊微小,真皮厚度减少,与文献报道一致^[36],表明小鼠 AGA 模型造模成功。AGA 发病机制复杂,与免疫调节和炎症呈正相关,雄激素诱导人毛乳头细胞释放 TGF- β 1 抑制角质形成细胞的生长从而抑制毛发的生长^[37],且 TGF- β 1 促进组织纤维化,可能与 AGA 的毛囊周围纤维化相关,二氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)可以诱导 AGA 患者的毛囊毛乳头细胞释放 IL-6^[38],TNF- α 能够在微血管内皮水平诱导促炎细胞活化负性调节毛发生长^[39]。本研究结果显示,中药育发凝胶可以降低 AGA 小鼠皮肤组织中 TGF- β 1、IL-6 和 TNF- α 的含量,减少炎症反应从而促进毛发的生长。

AGA 是一种皮肤疾病,通过经皮给药方式,药物可以直接到达靶部位,也可以通过皮肤吸收进入循环系统发挥治疗作用。基于上述思考,本研究分析了给药部位皮肤中的滞留成分与血浆中的入血成分,以期科学且全面地探究中药育发凝胶治疗 AGA 的有效成分。UPLC-QTOF-MS 共鉴定出中药育发凝胶提取液中 76 种成分,皮肤滞留成分 30 种,经皮入血成分 7 种。利用网络药理学^[40]预测结合实验验证,初步探究中药育发凝胶治疗 AGA 的主要活性成分和分子机制。网络药理学结果表明,光甘草定、 α -香附酮、山柰酚等可能为关键成分;分子对接结果显示光甘草定与 AR 和 Caspase-3 可以很好的结合;KEGG 富集通路分析显示,类固醇激素生物合成信号通路和凋亡通路同 AGA 有密切的联系,因此选取类固醇激素生物合成通路中与 AGA 关联最为密切之一的 AR 蛋白进行验证^[41]。细胞凋亡与毛发生长和循环周期密切相关^[42],细胞凋亡是机体在生长、发育及维持内部平衡过程中发生的受基因调控的有序的细胞死亡,Bcl-2 蛋白家族由促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白组成,二者的协调平衡维持着细胞凋亡正常进行,Bcl-2 阻断程序化细胞死亡的功能,抑制细胞凋亡;Bax 是 Bcl-2 家族的成员之一,是一种细胞损伤和刺激的传感器,促进细胞凋亡^[43]。线粒体介导的内在通路是重要的凋亡通路,Bax 易位到线粒体膜,触发细胞色素 C 的释放并阻止 Bcl-2 的释放,释放的细胞色素 C 与活化的 Caspase-9 和其他复合物结合形成细胞凋亡体,这些细胞凋亡体激

活 Caspase-3 信号级联反应,诱导细胞死亡^[44]。本研究结果显示,中药育发凝胶可以下调皮肤组织中 Bax/Bcl-2 值和 Caspase-3 的蛋白表达,抑制毛囊细胞凋亡从而促进头发生长。

中药复方治疗 AGA 具有患者依从性高、不良反应小且多靶点、多通路发挥药效等优势,本研究从中药育发凝胶经皮给药可能的活性成分及机制进行初步探究,发现中药育发凝胶对 AGA 具有良好的治疗作用,能够通过抑制炎症反应和细胞凋亡促进毛发生长。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lizneva D, Gavrilova-Jordan L, Walker W, *et al.* Androgen excess: Investigations and management [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 37: 98-118.
- [2] Ceruti J M, Leirós G J, Balañá M E. Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 465: 122-133.
- [3] 邱月荣, 付思祺, 李亚萍. 雄激素性秃发的非手术治疗进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2022, 36(11): 1327-1333.
- [4] Sha K, Chen M T, Liu F F, *et al.* Platelet factor 4 inhibits human hair follicle growth and promotes androgen receptor expression in human dermal papilla cells [J]. *Peer J*, 2020, 8: e9867.
- [5] 钟淑贤. 龟板酊调控 Wnt/ β -catenin 信号诱导毛囊干细胞防治雄激素性脱发 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [6] 杜丽娜, 金义光. 经皮给药系统研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(4): 379-385.
- [7] Murata K, Noguchi K, Kondo M, *et al.* Inhibitory activities of *Puerariae Flos* against testosterone 5 α -reductase and its hair growth promotion activities [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(1): 158-165.
- [8] 刘学. 生发、乌发中草药复方的筛选及其药效学研究 [D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2020.
- [9] 逢世峰, 李亚丽, 许世泉, 等. UPLC-ELSD 法测定人参中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量 [J]. 特产研究, 2017, 39(1): 22-25.
- [10] 黄雅兰, 张艳玲, 向琴, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱快速鉴定左归降糖舒心方化学成分 [J]. 分析测试学报, 2022, 41(7): 963-977.
- [11] 任妍, 陈嘉慧, 张雅心, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析定心方 IV 号化学成分 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(5): 643-650.
- [12] 张敏敏, 程素盼, 赵志国, 等. UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS 在线联用技术快速筛选丹参中的抗氧化成分

- [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2908-2913.
- [13] 屠燕, 孙连娜, 董志颖, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析不同产地丹参药材化学成分的差异 [J]. 中药材, 2021, 44(6): 1337-1342.
- [14] 周丽娜. 侧柏炭对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及细胞代谢组学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [15] 曾琪. 黑参的指纹图谱、人参皂苷类成分含量测定以及药代动力学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [16] 冯阳, 陈玉梅, 辛华. 金樱子黄酮类成分的 UPLC-QTOF-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 71-76.
- [17] 陈叶青. 凉血止血药炒炭时黄酮类成分的变化规律与止血作用的相关性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [18] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5496-5513.
- [19] 董庆海. 丹参川芎嗪注射液化学成分及其抗血瘀作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [20] 黄广伟, 孙仁弟, 杨素德, 等. 基于高分辨质谱大数据的芩苏胶囊化学成分分析及指纹图谱研究 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(10): 58-65.
- [21] 林瑞梅. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 和 GC-MS 的开心散物质基础及质量控制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [22] 单鸣秋, 钱雯, 高静, 等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1626-1629.
- [23] 杨琳, 刘剑刚, 董国菊, 等. 基于 LC-MSⁿ 法的复方芪丹颗粒主要化学成分研究 [J]. 北京中医药, 2022, 41(3): 264-269.
- [24] 石典花, 戴衍朋, 王丽凤, 等. 基于 UHPLC-QTOF-MS/MS 辨识的侧柏叶炒炭前后化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 107-116.
- [25] 刘灿黄, 章泽恒, 汪辉, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析丹膝颗粒的化学成分 [J]. 药品评价, 2022, 19(4): 201-209.
- [26] 杨琳, 刘剑刚, 董国菊, 等. 基于 LC-MSⁿ 法的复方芪丹颗粒主要化学成分研究 [J]. 北京中医药, 2022, 41(3): 264-269.
- [27] 王允吉, 王海丹, 刘璐, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的苦黄注射液化学成分分析 [J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2295-2304.
- [28] 张逢雨, 彭静, 王雨馨, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析椿乳凝胶中的化学成分 [J]. 中南药学, 2022, 20(11): 2580-2586.
- [29] 林泽华. 侧柏叶黄酮和多糖分离纯化、结构表征及活性评价 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [30] 熊乐乐, 张静, 邓维. 苦参的主要成分及质谱裂解规律研究进展 [J]. 药品评价, 2022, 19(13): 823-829.
- [31] 郑亚美. 侧柏叶多酚的分离纯化、结构鉴定及相关活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [32] 刘聪. 四制香附和蒸陈皮的质量评价研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [33] 李思远, 武忠. 中医药治疗脂溢性脱发的临床研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2022, 29(6): 1135-1138.
- [34] 赵玉玲, 霍青云, 周芳, 等. 邱明义教授治疗脂溢性脱发的经验 [J]. 环球中医药, 2017, 10(8): 991-993.
- [35] 刘芳, 杜郁华, 陈雁. 脂溢性脱发的中医药特色治疗研究进展 [J]. 健康教育与健康促进, 2020, 15(6): 645-647.
- [36] McDonough P H, Schwartz R A. Adolescent androgenic alopecia [J]. *Cutis*, 2011, 88(4): 165-168.
- [37] Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, *et al.* Androgen-inducible TGF- β 1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: A clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth [J]. *FASEB J*, 2002, 16(14): 1967-1969.
- [38] Kwack M H, Ahn J S, Kim M K, *et al.* Dihydrotestosterone-inducible IL-6 inhibits elongation of human hair shafts by suppressing matrix cell proliferation and promotes regression of hair follicles in mice [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(1): 43-49.
- [39] 李琳琳. 雄激素脱发模型小鼠的建立及其初步探讨 [D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- [40] 田海涛, 蔡春颖, 赵东升, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术与网络药理学研究赶黄草保肝潜在药效物质基础和作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1477-1492.
- [41] Kwack M H, Ben Hamida O, Kim M K, *et al.* Dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, induces the activity of androgen receptor in human dermal papilla cells [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2022, 35(5): 299-304.
- [42] Ma L, Shen H C, Fang C G, *et al.* *Camellia* seed cake extract supports hair growth by abrogating the effect of dihydrotestosterone in cultured human dermal papilla cells [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6443.
- [43] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.
- [44] Fang T, Xu R, Sun S, *et al.* Caizhixuan hair tonic regulates both apoptosis and the PI3K/Akt pathway to treat androgenetic alopecia [J]. *PLoS One*, 2023, 18(2): e0282427.