

引用:杨晓彤,亓智玮,李明秀,刘聪毅,李雯婧,吴丽丽,刘铜华,秦灵灵,李青松.归乌生发颗粒对雄激素性脱发小鼠毛发再生的作用与机制研究[J].中医导报,2025,31(12):41-47.

## 归乌生发颗粒对雄激素性脱发小鼠 毛发再生的作用与机制研究\*

杨晓彤<sup>1</sup>, 亓智玮<sup>1</sup>, 李明秀<sup>1</sup>, 刘聪毅<sup>1</sup>, 李雯婧<sup>1</sup>, 吴丽丽<sup>1,2</sup>, 刘铜华<sup>1,2</sup>, 秦灵灵<sup>1,3,4</sup>, 李青松<sup>5</sup>

(1.北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室,北京 100029;

2.北京中医药大学中医养生研究所,北京 100029;

3.北京中医药大学科研处,北京 100029;

4.教育部高等学校学科创新引智基地,北京 100029;

5.陕西中医药大学第一临床学院,陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的:探讨归乌生发颗粒对雄激素性脱发(AGA)模型小鼠毛发再生的效果及其机制。方法:选取60只雄性SPF级C57BL/6N小鼠,采用随机数字表法按体质量分组,分为正常组、模型组、非那雄胺组(0.13 mg/kg)、归乌生发颗粒低剂量组(0.06 g/kg)、归乌生发颗粒中剂量组(0.12 g/kg)及归乌生发颗粒高剂量组(0.24 g/kg)。通过皮下多点注射二氢睾酮构建雄激素性脱发(AGA)模型,造模的同时给药,实验周期为21 d。以脱毛区域的新生毛发面积、毛发长度、毛发质量和毛囊数量为评价指标,观察归乌生发颗粒对小鼠的治疗效果;利用HE染色法观察皮肤病理变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测皮肤中睾酮(T)、双氢睾酮(DHT)和5 $\alpha$ -还原酶(5-AR)水平;通过免疫组化检测Wnt/ $\beta$ -catenin通路中Wnt10b、 $\beta$ -catenin蛋白及细胞凋亡相关Bcl-2、Bax蛋白的表达;使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析Wnt/ $\beta$ -catenin通路中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及细胞凋亡相关Bcl-2、Bax基因的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠新生毛发面积、毛发长度、质量和毛囊数量均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组上述指标均改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。ELISA结果显示,与正常组比较,模型组小鼠T、DHT和5-AR含量升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,归乌生发颗粒低、中剂量组T、DHT水平均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),高剂量组无显著变化( $P>0.05$ )。与模型组比较,各给药组5-AR含量均降低( $P<0.01$ )。免疫组化结果表明,与正常组比较,模型组Bax蛋白表达增加,Wnt10b、 $\beta$ -catenin和Bcl-2蛋白表达减少( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组Bax表达显著降低,Wnt10b、 $\beta$ -catenin和Bcl-2表达显著增加( $P<0.01$ )。qRT-PCR结果与免疫组化结果一致,各给药组Bax基因表达显著降低,Wnt10b、 $\beta$ -catenin和Bcl-2基因表达显著增加( $P<0.01$ )。结论:归乌生发颗粒可显著改善小鼠雄激素性脱发,其可能通过降低雄激素水平、抑制5-AR、促进Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路活性及抑制细胞凋亡发挥作用。

[关键词] 雄激素性脱发;归乌生发颗粒;Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路;Bcl-2;Bax;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)12-0041-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.007

### Study on the Effect and Mechanism of Guiwu Shengfa Granules (归乌生发颗粒) on Hair Regrowth in Mice with Androgenetic Alopecia

YANG Xiaotong<sup>1</sup>, QI Zhiwei<sup>1</sup>, LI Mingxiu<sup>1</sup>, LIU Congyi<sup>1</sup>, LI Wenjing<sup>1</sup>,

WU Lili<sup>1,2</sup>, LIU Tonghua<sup>1,2</sup>, QIN Lingling<sup>1,3,4</sup>, LI Qingsong<sup>5</sup>

(1.Beijing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Health Preservation of the Ministry of Education, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Health Care, Beijing 100029, China; 2.Institute of Traditional Chinese Medicine Health Care, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3.Department of Science and Technology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4.Discipline Innovation and Intelligence Introduction Base for Colleges and Universities,

\*基金项目:教育部-科技部中医药防治糖尿病及其并发症学科创新引智基地(B20055)

通信作者:刘铜华,男,研究员,研究方向为中医养生研究与保健食品研发

Ministry of Education, Beijing 100029, China; 5.The First Clinical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712000, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the impact of Guiwu Shengfa granules on hair regeneration in mice exhibiting androgenetic alopecia (AGA) and to elucidate the associated underlying mechanisms. Methods: A total of 60 SPF male C57BL/6N mice were selected and categorized into different groups according to body weight, utilizing a random number table for allocation. The groups included normal group, model group, finasteride treatment group (0.13 mg/kg), Guiwu Shengfa granules low-dose group (0.06 g/kg), Guiwu Shengfa granules medium-dose group (0.12 g/kg), and Guiwu Shengfa granules high-dose group (0.24 g/kg). The AGA model was induced through multiple subcutaneous injections of dihydrotestosterone. The therapeutic effects of Guiwu Shengfa granules were evaluated by assessing the area, length, and weight of newly grown hair, as well as the number of hair follicles in the depilated regions. Histopathological examinations were conducted using hematoxylin and eosin (HE) staining. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), and 5 $\alpha$ -reductase (5-AR) in skin samples. Additionally, immunohistochemistry was employed to detect the expression of Wnt10b and  $\beta$ -catenin proteins in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the apoptosis-related Bcl-2 and Bax proteins. Additionally, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was utilized to analyze the expression of Wnt10b,  $\beta$ -catenin, and the apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Results: The area, length, weight of new hair, and the number of hair follicles in the model group were significantly diminished compared to the normal group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). All treatment groups exhibited considerable improvement in these parameters compared to the model group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). ELISA data revealed that the concentrations of T, DHT and 5-AR in the model group were significantly increased compared to the normal group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared to the model group, Guiwu Shengfa granules low-dose group and Guiwu Shengfa granules medium-dose group showed decreased levels of T and DHT ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the Guiwu Shengfa granules high-dose group showed no significant changes ( $P>0.05$ ). The level of 5-AR substantially decreased in all treatment groups compared to the model group ( $P<0.01$ ). Immunohistochemical results showed that compared with the normal group, the model group exhibited increased Bax protein expression and decreased expression of Wnt10b,  $\beta$ -catenin, and Bcl-2 proteins ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, all treatment groups showed significantly reduced Bax expression and significantly increased expression of Wnt10b,  $\beta$ -catenin, and Bcl-2 ( $P<0.01$ ). The qRT-PCR results were consistent with the immunohistochemical findings, showing that the expression of the Bax gene was significantly decreased, while the expressions of the Wnt10b,  $\beta$ -catenin, and Bcl-2 genes were significantly increased in all treatment groups ( $P<0.01$ ). Conclusion: Guiwu Shengfa granules can significantly ameliorate androgenetic alopecia in mice, potentially through mechanisms involving the reduction of androgen levels, inhibition of 5-AR activity, activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and the suppression of apoptosis.

[Keywords] androgenetic alopecia; Guiwu hair growth granules; Wnt/ $\beta$ -catenin ( $\beta$ -catenin) signaling pathway; Bcl-2; Bax; mice

雄激素性脱发(androgenetic alopecia,AGA)是一种青春后期后逐渐发展的终末型脱发,分为男性型脱发(MPHL)和女性型脱发(FPHL)<sup>[1-2]</sup>。中医学中,AGA常被称为“发蛀脱发”“蛀发癣”“白屑风”等,其特征为毛发减少及毛囊微小化<sup>[3]</sup>。该病多见于青春后期后,发病率随年龄增长而增加,全球约一半人口受影响<sup>[4]</sup>。80%的男性和50%的70岁女性受累,发病率在白种人中最,亚洲人次之,国内患病率超过20%<sup>[5]</sup>。目前,临床上常用的AGA治疗药物包括局部使用米诺地尔和口服非那雄胺,但其副作用,特别是对男性功能的影响,已被广泛报道<sup>[6-8]</sup>。相比之下,中医药治疗AGA经验丰富,疗效显著,副作用小,且经济实用。

中医学认为AGA多与肝、脾、肾等脏腑有关,病机多为本虚标实,前期以湿热、肝郁等实证为主,后期以肝肾亏虚、气血不足等虚证为主<sup>[9]</sup>。归乌生发颗粒是刘铜华教授多年临床

经验的总结,可通过滋补肝肾、补气活血来治疗脱发,其主要由制何首乌、酒黄精、当归等中药组成。研究<sup>[10-13]</sup>表明,归乌生发颗粒能够增加Wnt信号通路中关键蛋白的表达水平,降低雄激素含量,抑制雄激素与雄激素受体(androgen receptor, AR)结合,从而减少 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)的降解,进而调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路。此外,其还能够抑制细胞凋亡,延长毛发生长周期,并促进毛发生长。本研究采用二氢睾酮稀释液构建小鼠AGA模型,评估归乌生发颗粒对小鼠AGA的治疗效果。本研究通过免疫组化和实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)定量分析Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2、Bax等关键蛋白和基因的表达,探讨归乌生发颗粒促进毛发再生的作用机制,旨在为临床治疗AGA提供参考。

## 1 材 料

1.1 实验动物 6周龄SPF级C57BL/6N雄性小鼠60只,体质

量20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠生产许可证号: SYXK(京)2023—0011, 质量合格证号: 110011241104321631。小鼠饲养在北京中医药大学良乡校区动物房, 伦理审查机构为北京中医药大学(伦理证号为BUCM-2024051303-2110)。饲养于无特定病原体的SPF级环境, 湿度(50±10)%, 温度(22±2)℃, 光照12 h/12 h明暗交替, 饮食饮水自由, 适应性喂养7 d, 小鼠无特殊情况后正式开始实验。

1.2 药品与试剂 归乌生发颗粒(15 g/包, 西安六君子中医医院有限责任公司, 批号: 22021371); 双氢睾酮注射液(批号: ID0310)、4%组织细胞固定液(批号: 2306001)、二甲基亚砜(批号: D8370)均购自北京索莱宝科技有限公司; 非那雄胺(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: H200701112); 薇婷脱毛膏(利洁时家化中国有限公司, 批号: G20150999); 异氟烷(山东安特牧业科技有限公司, 批号: 2023090502); HRP山羊抗兔二抗(批号: GB23303)和Wnt10b单克隆重组抗体(批号: HL2370)均购自赛默飞世尔科技公司; Bcl-2单克隆重组抗体(12789-1-AP)、Bax单克隆重组抗体(50599-2-Ig)、β-连环蛋白单克隆重组抗体(批号: 80488-1-RR)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 小鼠双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号: 081688803C626M)、小鼠5α-还原酶(5α-reductase, 5-AR)ELISA试剂盒(批号: 090488802D4176)、小鼠睾酮(testosterone, T)(批号: 081688803C530M)均购自上海酶科生物科技有限公司; SteadyPure通用型RNA提取试剂盒(艾克瑞生物科技有限公司, 批号: A6A4238)。

1.3 主要仪器 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 型号R5201P); 奥克斯电动剃毛器(奥克斯公司); 188105型载玻片、10212432C型盖玻片均购自江苏世泰实验器材有限公司; 微波炉(广东格兰仕电器制造有限公司, 型号: P70D20N1P-G5W0); 显微镜(Nikon/OLYMPUS公司, 型号: E100/CX23); T100TMTermal Cycler(BIORAD公司, 型号: 621BR45665); CFX Duet Real-Time PCR System(BIORAD公司, 型号: 782B20794)。

## 2 方法

2.1 动物分组 小鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、非那雄胺组、归乌生发颗粒低剂量组、归乌生发颗粒中剂量组及归乌生发颗粒高剂量组, 每组10只。根据《中华人民共和国药典》中人用剂量与小鼠体质量换算系数为0.000 26, 归乌生发颗粒正常成人每日用量为95 g/d, 所以实验中归乌生发颗粒中剂量组为临床使用的正常剂量, 高剂量为临床剂量的2倍, 低剂量为临床剂量的0.5倍。因此得到归乌生发颗粒低、中、高剂量组用药浓度分别为0.06 g/kg、0.12 g/kg和0.24 g/kg。阳性对照药物非那雄胺的给药剂量为0.13 mg/kg。

2.2 造模与给药 适应性喂养7 d后, 使用小动物麻醉机(4 L/min)麻醉小鼠。采用电动剃毛器和自制塑料框板, 在小鼠背部中心剃除2 cm×3 cm的脱毛区域。涂抹脱毛膏于剩余毛发部位, 静置30 s后, 用脱脂棉球清除残留毛发和脱毛膏。脱毛区域皮肤呈粉红色且无明显破损时, 判定毛囊处于休止期。剔除破损结痂严重的小鼠。随后, 使用双氢睾酮稀释液(5 mg/kg)进行皮下注射。由于双氢睾酮不溶于生理盐水, 先将其溶解于

二甲基亚砜中, 配制成50 mg/mL溶液, 再以生理盐水稀释至0.5 mg/mL进行皮下多点注射(1次/d)。同时, 进行灌胃给药。正常组和模型组给予等体积生理盐水, 非那雄胺组给予非那雄胺(0.13 mg/kg)灌胃, 归乌生发颗粒低、中、高剂量组分别给予相应剂量的稀释药液。实验过程中, 每周称量并记录小鼠体质量。使用异氟烷(4 L/min浓度)麻醉小鼠, 并于第0、7、11、14、18、21天拍照记录。

### 2.3 检测指标

2.3.1 新生毛发面积 分别在第0、7、11、14、18、21天拍照并记录小鼠脱毛区域毛发生长情况, 利用Image J软件统计并计算在实验第21天时各组小鼠背部脱毛区域新生毛发的面积。

2.3.2 新生毛发长度、新生毛发质量 在造模并给药第21天, 采用4 L/min浓度的异氟烷麻醉小鼠, 摘取其眼球并采集眼部血样。选取小鼠背部新生毛发区域内最长的6根毛发, 测量其长度并计算平均值。剃除所有新生毛发, 使用脱毛膏去除剩余毛发, 称量脱毛前后小鼠体质量, 计算差值作为新生毛发质量。取脱毛区域皮肤组织, 裁取1 cm×1 cm样本固定于组织固定液中, 以供后续实验。

2.3.3 苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色观察脱毛区域毛囊数量及形态 新鲜组织在固定液中固定24 h以上后, 进行平整处理并置于脱水盒中。组织通过梯度酒精和二甲苯连续处理, 在脱水机中进行脱水和透明化。随后, 将组织浸入石蜡中, 置于包埋机中进行包埋。蜡质凝固后, 取出并修整为适合切片的蜡块。利用切片机切割成4 μm厚切片, 于40℃温水中展平, 于60℃烘箱中干燥。石蜡切片经过脱蜡和复水处理, 使用二甲苯和梯度乙醇。切片浸入苏木素染色液中进行染色, 使用返蓝液调整颜色后流水冲洗。进一步染色时, 切片通过梯度酒精脱水后, 浸入伊红染色液中。最终, 切片在梯度无水乙醇和二甲苯中透明化处理, 并用中性树胶封片。HE切片在显微镜下观察, 统计分析毛囊数量及形态。

2.3.4 免疫组化实验检测小鼠皮肤组织中蛋白的含量 首先, 切片依次放入二甲苯和梯度无水乙醇中进行脱蜡处理。然后, 切片浸泡在PBS缓冲液(pH值为7.4)内, 脱色摇床清洗3次, 3 min/次, 滴加3% BSA溶液进行封闭, 室温封闭20 min。去除封闭液后, 滴加预制的一抗溶液, 稀释倍数分别为Wnt10b 1:3 000、β-catenin 1:500、Bcl-2 1:400、Bax 1:4 000, 并在4℃下孵育过夜。次日, 用PBS清洗切片3次, 去除一抗后, 加入二抗溶液, 室温孵育50 min。显色时, 使用DAB显色剂观察目标区域显色至棕黄色, 完成后用纯净水来冲洗切片。将切片浸入到苏木素溶液中, 复染3 min, 水洗后用分化液调整染色深度, 分化后再次冲洗并进行返蓝处理以增强对比度。最后, 通过梯度无水乙醇和二甲苯处理完成脱水和透明化, 晾干后使用中性树胶封片, 进行显微镜观察和长期保存。

2.3.5 ELISA法检测小鼠脱毛区域皮肤组织中T、DHT及5-AR的表达水平 根据试剂盒的说明书, 分别配置标准品孔和样本孔。标准品孔中内加入不同浓度梯度的标准品溶液50 μL, 建立标准曲线; 样本孔先加入10 μL待测样品再加入40 μL稀释液。除空白孔外, 每孔加入100 μL辣根过氧化物酶(HRP)。封板后, 孔板在37℃水浴中孵育60 min, 允许抗体与抗原结合。孵育后, 倒掉反应液, 孔板需用吸水纸拍干, 每孔加入洗涤液

同时静置1 min,甩去液体,重复5次洗涤以去除未结合物。清洗后,加入50 μL底物A和50 μL底物B,在37℃避光孵育15 min以触发酶反应。最后,加入50 μL终止液,停止反应,在反应终止后15 min内,使用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度(OD)值,以计算样本中待测物的浓度。

2.3.6 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测小鼠皮肤组织mRNA表达 qRT-PCR RNA提取与逆转录使用AG Steady-pure通用型RNA试剂盒从皮肤组织中提取总RNA。按照试剂盒说明书操作,提取RNA并测定浓度后,配置逆转录反应体系:5X Evo M-MLV RT Master Mix 4 μL,RNA样品2 μL(1 000 ng),用无酶水补足至20 μL。逆转录反应在37℃下进行15 min,随后升温至85℃反应5 s,最后在4℃下保存3 min,完成cDNA合成。qPCR扩增:反应体系中加入10 μL 2X SYBR Green,正向与反向引物各0.4 μL,2 μL cDNA样品,7.2 μL无酶水。PCR扩增程序设置为:95℃预变性3 min,随后进行39个循环,每循环包括95℃变性10 s、60℃退火30 s、延伸30 s。结果分析:根据qPCR的CT值进行定量分析,并计算相对表达量。引物信息由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成。(见表1)

表 1 引物序列表

引物名称	序列(5-3')	长度/bp
GAPDH	上游:TGTGTCCTCGTGGATCTGA	150
	下游:TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	150
Bcl-2	上游:CCAGCTAATGAAAGGGGAACC	92
	下游:CAGGGTGTGATAATGCCCAA	92
Bax	上游:CAGGATGCGTCCACCAAGAA	102
	下游:CGTGTCACGTCAGCAATCA	102
Wnt10b	上游:TTCACGAGTGTGACACCAG	136
	下游:GCCAGCATGGAGAAGGAGAA	136
β-catenin	上游:TGGTGAACAGCAACTATTATGCC	180
	下游:TTGAACATCCTCTCCATCTGGTA	180

2.4 统计学方法 本研究采用Image J和SPSS 27.0软件对实验数据进行统计分析。计量资料以“均数±标准差”(x±s)表示,以确保数据准确性。在多组数据比较中,首先是方差齐性检验,若满足,则进行单因素方差分析(ANOVA)。ANOVA结果

显著时,两两相比较,采用最小显著性差异法(LSD)。对于方差不齐的数据,使用Dunnett T检验进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 小鼠体质量 随着实验时间的增加,各组小鼠体质量均缓慢增加,证明在实验过程中小鼠生长状态良好。(见图1)

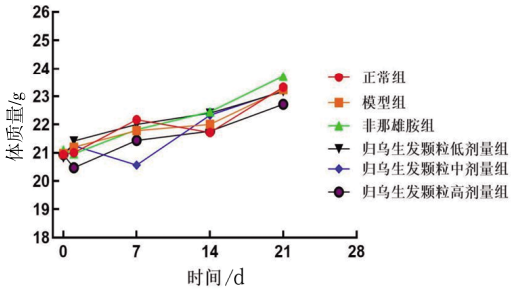


图 1 不同组内小鼠体质量变化折线图 (n=6)

3.2 小鼠脱毛区域内的新生毛发面积 与正常组比较,模型组小鼠脱毛区域的新生毛发面积减少( $P<0.01$ ),表明皮下注射双氢睾酮能够成功诱导AGA模型;与模型组比较,归乌生发颗粒低、中、高剂量组小鼠脱毛区域的新生毛发面积均增加( $P<0.01$ )。尽管非那雄胺组和归乌生发颗粒高剂量组小鼠的新生毛发面积呈上升趋势,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。上述结果表明,归乌生发颗粒可有效缓解雄激素引起的毛发减少现象。(见表2、图2)

表 2 各组小鼠脱毛区域内新生毛发面积比较 (x±s)

组别	n	给药剂量/(g/kg)	新生毛发面积/mm <sup>2</sup>
正常组	6		220.98 ± 54.79
模型组	6		51.61 ± 44.17 <sup>a</sup>
非那雄胺组	6	0.000 13	101.20 ± 35.29
归乌生发颗粒低剂量组	6	0.060 00	204.28 ± 85.11 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒中剂量组	6	0.120 00	180.77 ± 69.03 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒高剂量组	6	0.240 00	119.35 ± 43.87

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.3 各组小鼠脱毛区域内新生毛发的质量、毛发的长度及毛囊的数量变化 与正常组比较,模型组小鼠脱毛区域内新生

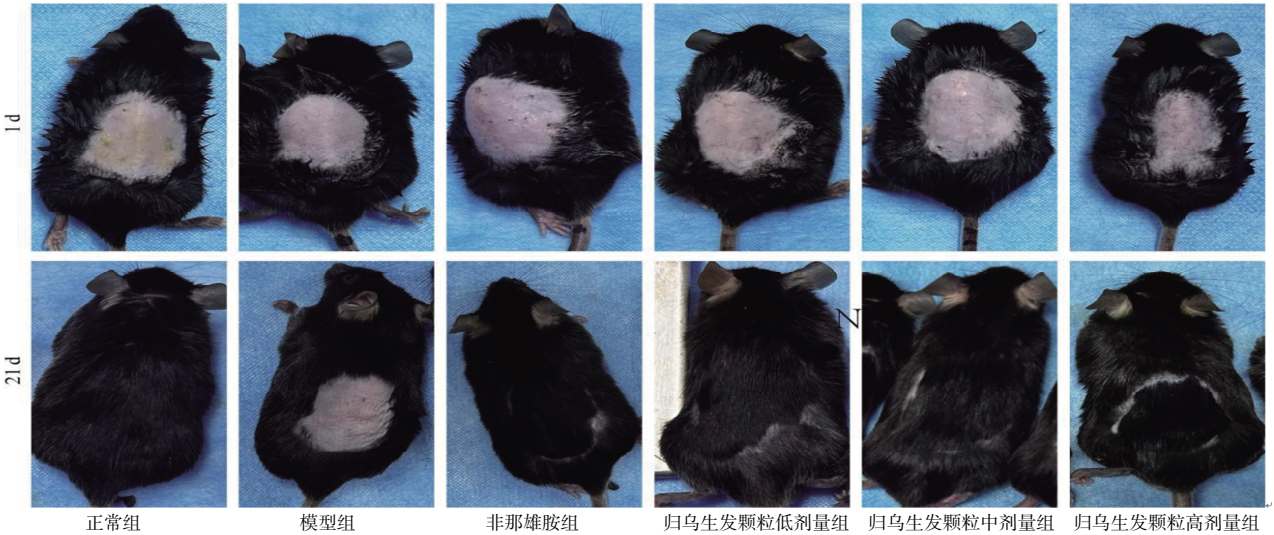


图 2 各组小鼠脱毛区域的新生毛发面积



毛发的长度、质量及单位面积均下降( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,归乌生发颗粒低、中、高剂量组及非那雄胺组小鼠新生毛发长度均增加( $P<0.01$ )。归乌生发颗粒低、中剂量组小鼠毛发质量增加( $P<0.05$ );归乌生发颗粒高剂量组小鼠毛发质量有升高趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。HE结果显示,与正常组比较,模型组小鼠毛囊数量减少( $P<0.01$ ),且排列杂乱无序,毛形态不规则发育较差;与模型组比较,各给药组小鼠毛囊数量显著增加( $P<0.01$ ),且排列整齐,形态规则,发育良好。(见表3、图3)

表3 各组小鼠脱毛区域内新生毛发质量、长度及毛囊数量比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	给药剂量(g/kg)	毛发长度/mm	毛发质量/g	毛囊数量/个
正常组	6		7.50±0.60	0.19±0.07	39.50±22.47
模型组	6		4.50±0.31 <sup>a</sup>	0.04±0.03 <sup>b</sup>	6.50±5.05 <sup>a</sup>
非那雄胺组	6	0.000 13	7.58±0.70 <sup>d</sup>	0.15±0.08	48.00±8.29 <sup>d</sup>
归乌生发颗粒低剂量组	6	0.060 00	7.70±0.75 <sup>d</sup>	0.26±0.16 <sup>c</sup>	46.83±11.87 <sup>d</sup>
归乌生发颗粒中剂量组	6	0.120 00	8.21±0.53 <sup>d</sup>	0.28±0.17 <sup>c</sup>	58.00±7.20 <sup>d</sup>
归乌生发颗粒高剂量组	6	0.240 00	6.95±0.55 <sup>d</sup>	0.19±0.13 <sup>c</sup>	44.83±9.52 <sup>d</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

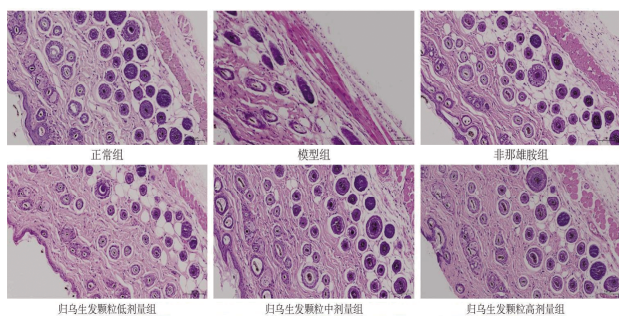


图3 各组小鼠脱毛区域内皮肤组织病理学变化(HE染色,×20)

3.4 各组小鼠脱毛区域内皮肤组织中T、DHT及5-AR表达水平 与正常组比较,模型组小鼠脱毛区域皮肤中T、DHT水平均升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,归乌生发颗粒低、中剂量组小鼠脱毛区域皮肤中T、DHT水平均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),归乌生发颗粒高剂量组虽有下降趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组5-AR与正常组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,归乌生发颗粒低、中、高剂量组小鼠皮肤中5-AR水平降低( $P<0.01$ )。(见表4)

表4 不同组内小鼠脱毛区域内皮肤组织中的T、DHT及5-AR含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量(g/kg)	DHT/(nmol/L)	T/(nmol/L)	5-AR/(pg/mL)
正常组	6		5.16±1.30	30.34±1.64	3.97±0.42
模型组	6		7.96±0.95 <sup>a</sup>	36.99±4.86 <sup>a</sup>	4.13±0.68
归乌生发颗粒低剂量组	6	0.06	6.10±0.92 <sup>b</sup>	30.09±3.23 <sup>b</sup>	2.60±0.11 <sup>c</sup>
归乌生发颗粒中剂量组	6	0.12	7.20±0.46 <sup>c</sup>	29.83±2.39 <sup>b</sup>	3.14±0.21 <sup>c</sup>
归乌生发颗粒高剂量组	6	0.24	6.61±1.28	35.73±2.26	3.26±0.84 <sup>c</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

3.5 各组小鼠Wnt10b、 $\beta$ -catenin、Bax、Bcl-2蛋白表达水平 免疫组化分析结果显示,与正常组比较,模型组小鼠脱毛区域

皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2蛋白表达均下降( $P<0.01$ ),而Bax蛋白表达均上升( $P<0.01$ )。与模型组比较,归乌生发颗粒各剂量组小鼠皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2蛋白表达均上升( $P<0.01$ ),Bax蛋白表达均下降( $P<0.01$ )。(见表5、图4)

表5 各组小鼠脱毛区域内皮肤组织中Wnt10b、 $\beta$ -catenin、Bcl-2和Bax蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Wnt10b	$\beta$ -catenin	Bcl-2	Bax
正常组	3	30.99±3.51	28.10±1.34	32.06±2.16	1.51±0.31
模型组	3	10.65±2.15 <sup>a</sup>	9.43±0.64 <sup>a</sup>	6.01±1.05 <sup>a</sup>	5.81±0.95 <sup>a</sup>
归乌生发颗粒低剂量组	3	41.24±0.75 <sup>b</sup>	26.55±1.72 <sup>b</sup>	29.57±2.09 <sup>b</sup>	1.69±0.35 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒中剂量组	3	28.55±0.69 <sup>b</sup>	22.91±0.90 <sup>b</sup>	28.03±0.08 <sup>b</sup>	1.58±0.15 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒高剂量组	3	24.14±2.15 <sup>b</sup>	24.40±0.51 <sup>b</sup>	22.85±1.68 <sup>b</sup>	1.61±0.48 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

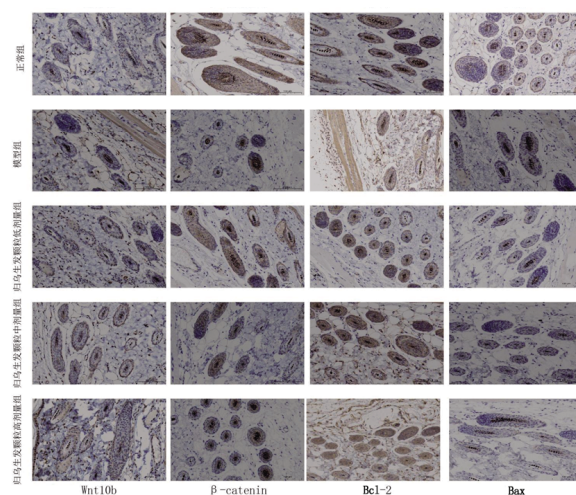


图4 各组小鼠皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin、Bcl-2和Bax蛋白定量表达(×40)

3.6 各组小鼠Wnt10b mRNA、 $\beta$ -catenin mRNA、Bax mRNA及Bcl-2 mRNA表达水平 qRT-PCR结果:与正常组比较,模型组小鼠皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2基因表达均降低( $P<0.01$ ),Bax基因表达显著升高( $P<0.01$ )。归乌生发颗粒各剂量组小鼠脱毛区域皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2基因表达均上调( $P<0.01$ ),Bax基因表达均下调( $P<0.01$ )。(见表6)

表6 各组小鼠皮肤组织中Wnt10b、 $\beta$ -catenin、Bcl-2和Bax基因含量比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Wnt10b	$\beta$ -catenin	Bcl-2	Bax
正常组	3	1.3±0.05	1.45±0.14	1.14±0.04	0.28±0.01
模型组	3	0.75±0.16 <sup>a</sup>	0.61±0.11 <sup>a</sup>	0.83±0.06 <sup>a</sup>	1.48±0.21 <sup>a</sup>
归乌生发颗粒低剂量组	3	1.71±0.14 <sup>b</sup>	1.52±0.22 <sup>b</sup>	1.26±0.10 <sup>b</sup>	0.71±0.14 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒中剂量组	3	1.22±0.25 <sup>b</sup>	1.04±0.03 <sup>b</sup>	1.18±0.14 <sup>b</sup>	0.53±0.02 <sup>b</sup>
归乌生发颗粒高剂量组	3	1.12±0.13 <sup>b</sup>	1.06±0.06 <sup>b</sup>	1.09±0.06 <sup>b</sup>	0.87±0.11 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

#### 4 讨论

AGA的发生与雄激素水平、遗传因素、血液流变学、生活习惯等有关<sup>[14]</sup>。T通过调控毛囊上皮细胞,进而对毛发的生长速率、真皮乳头尺寸、真皮乳头细胞活性、角质形成细胞活性以及黑素细胞活性产生影响<sup>[15]</sup>。AGA的发病机制主要与AR和

DHT的作用相关。Ⅱ型5 $\alpha$ -还原酶在血液循环中将T转化为DHT,而DHT与AR的结合亲和力是睾酮的5倍。这些激素异构体在雄激素代谢中发挥着关键作用<sup>[16]</sup>。虽然男性患者雄激素水平正常,然而,当5-AR的活性增强时,会导致DHT的水平上升,进而引发脱发问题。本研究结果表明,与模型组比较,归乌生发颗粒能显著降低小鼠脱毛区域内皮肤中的DHT和5-AR的水平( $P<0.01$ )。

Wnt信号通路主要包括经典的Wnt/ $\beta$ -catenin途径和非经典的Wnt/polarity途径<sup>[17]</sup>。其中,Wnt/ $\beta$ -catenin通路在毛囊发育基质细胞(DPCs)诱导毛发生长及毛囊由休止期向生长期的过渡过程中发挥关键作用<sup>[18]</sup>。DHT通过与AR竞争性结合,形成复合物,进而激活经典Wnt/ $\beta$ -catenin通路中的糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )。GSK-3 $\beta$ 的激活促进 $\beta$ -catenin磷酸化,导致其被泛素化并通过蛋白酶体途径降解。这一过程抑制了AGA患者毛囊干细胞的分化。DHT刺激能够抑制Wnt激动剂Wnt10b的表达,同时促进Wnt拮抗剂DKK1的水平升高。DKK1作为退行期诱导因子,通过与卷曲蛋白结合,阻断经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的激活,进而诱导促凋亡蛋白Bax的表达。该过程最终导致外根鞘角质形成细胞的凋亡,干扰毛囊干细胞的分化与增生<sup>[19]</sup>。Wnt10b是Wnt信号通路中的独特配体,其通过经典的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路能够促进毛囊再生及毛发生长,延长毛囊的生长期<sup>[20]</sup>。当 $\beta$ -catenin水平升高时,能够有效激活干细胞增殖,并促进毛囊再生。该过程加速了毛囊干细胞向毛囊的分化,进而激活毛发生长周期,缩短毛发的休止期,并促进毛发快速进入生长期,最终使毛发保持在持续生长状态,从而导致毛发长度与质量的增加<sup>[21]</sup>。在皮肤毛囊的相关研究中,Bcl-2蛋白家族成员Bcl-2和Bax在毛囊细胞凋亡过程中起着重要作用<sup>[22]</sup>。Bcl-2作为细胞凋亡抑制因子,而Bax作为促凋亡因子,其相对表达量的变化与绒毛羊毛囊周期性再生的时间规律密切相关<sup>[23-24]</sup>。在毛囊生长期,Bcl-2/Bax比值较低,而在退行期和休止期,该比值则显著升高。已有研究表明,植物通过增加Bcl-2与Bax的抗凋亡与促凋亡比例,能够有效抑制HDPC细胞的凋亡<sup>[25]</sup>。此外,Bax与Bcl-2可在体内独立调节细胞凋亡<sup>[26]</sup>。米诺地尔溶液的局部应用及非那雄胺的口服给药虽已广泛用于脱发治疗,但由于其显著的不良反应,亟需开发更安全且高效的治疗方法。本研究结果表明,归乌生发颗粒组小鼠脱毛区域皮肤中Wnt10b与 $\beta$ -catenin蛋白及其基因表达水平均显著高于模型组( $P<0.01$ )。此外,细胞凋亡抑制因子Bcl-2的蛋白和基因表达水平亦显著增加,而细胞凋亡启动因子Bax的蛋白和基因表达水平则显著降低( $P<0.01$ )。

AGA与人体气、血、精的状态,以及肝、脾、肾等脏腑功能密切相关,其主要病机包括肝肾亏损、肝郁血瘀、虚湿热内蕴及血热化燥等<sup>[27]</sup>。归乌生发颗粒可滋补肝肾,补气活血。中药治疗AGA副作用小、患者依从性较高、且活性谱广泛,可通过多途径、多靶点调节Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,从而有效抑制AGA的发生,进而实现治疗效果<sup>[28]</sup>。本研究结果表明,归乌生发颗粒能够显著提升小鼠皮肤中Wnt10b、 $\beta$ -catenin及Bcl-2

的表达水平,并明显降低Bax的表达。这些结果提示,归乌生发颗粒通过促进Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的传导,发挥生发作用,并通过抑制细胞凋亡,减缓毛发脱落。

综上所述,本研究采用双氢睾酮稀释液建立小鼠雄激素性脱发模型,通过评估小鼠新生毛发面积、毛发长度、毛发质量以及局部皮肤组织中毛囊数量,验证归乌生发颗粒对AGA小鼠毛发再生的促进作用。实验结果显示,给药组小鼠毛囊数量显著高于模型组,毛囊排列整齐,大小均匀,且发育状态良好;而模型组小鼠毛囊数量减少,排列不规则,毛囊逐渐萎缩并缩小。此外,进一步检测小鼠皮肤中T、DHT及5-AR含量,结果表明,归乌生发颗粒能够显著降低雄激素水平及局部皮肤中5-AR的含量,从而减少毛发脱落。通过免疫组化和QRT-PCR分析,验证了Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中关键蛋白及Bcl-2与Bax的表达水平,结果表明,归乌生发颗粒可能通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路并抑制细胞凋亡,从而对雄激素性脱发小鼠具有显著的治疗作用。该颗粒不仅体现了中医的整体观念和辨证施治原则,还通过现代药理学研究验证了其科学性和有效性,为AGA患者提供了新的治疗选择。不足之处在于应增加临床试验,增大临床样本量,进一步证实归乌生发颗粒对AGA患者毛发生长的作用效果与机制。

## 参考文献

- [1] PRICE V H. Androgenetic alopecia in women[J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 2003, 8(1): 24-27.
- [2] RATHNAYAKE D, SINCLAIR R. Male androgenetic alopecia[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(8): 1295-1304.
- [3] 胡志奇, 苗勇. 中国人雄激素性脱发诊疗指南[J]. 中国美容整形外科杂志, 2019, 30(1): 8-12.
- [4] KELLY Y, BLANCO A, TOSTI A. Androgenetic alopecia: An update of treatment options[J]. Drugs, 2016, 76(14): 1349-1364.
- [5] WANG T L, ZHOU C, SHEN Y W, et al. Prevalence of androgenetic alopecia in China: A community-based study in six cities: Prevalence of androgenetic alopecia in China[J]. Br J Dermatol, 2010, 162(4): 843-847.
- [6] SHIVALI D, OGECHI E, J. STRATTON EMMASENNA MARYANNE K K, et al. Drugs: International journal of current therapeutics and applied pharmacology reviews, featuring evaluations on new drugs, review articles on drugs and drug therapy, and drug literature abstracts[J]. Androgenetic Alopecia: Therapy Update, 2023, (8): 701-715.
- [7] RYU Y C, LEE D H, SHIM J, et al. KY19382, a novel activator of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling, promotes hair regrowth and hair follicle Neogenesis[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(12): 2533-2546.

- [8] NESTOR M S, ABLON G, GADEA, et al. Treatment options for androgenetic alopecia: Efficacy, side effects, compliance, financial considerations, and ethics[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2021, 20(12): 3759–3781.
- [9] 曲梦柔, 高冬梅, 牟翔宇, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗雄激素性脱发用药规律研究[J]. *世界中医药*, 2024, 19(6): 856–863, 870.
- [10] MA Q M, YU J L, ZHANG X, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway—a versatile player in apoptosis and autophagy[J]. *Biochimie*, 2023, 211: 57–67.
- [11] FU D L, HUANG J F, LI K T, et al. Dihydrotestosterone-induced hair regrowth inhibition by activating androgen receptor in C57BL6 mice simulates androgenetic alopecia[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111247.
- [12] WEN L H, FAN Z X, HUANG W C, et al. Retinoic acid drives hair follicle stem cell activation via Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in androgenetic alopecia[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2025, 39(1): 189–201.
- [13] KRISHNAMURTHY N, KURZROCK R. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 50–60.
- [14] SHEN Q, YU W R, FANG Y, et al. Beta-catenin can induce hair follicle stem cell differentiation into transit-amplifying cells through c-myc activation [J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(1): 28–34.
- [15] 顾嘉伟, 牛耿明, 柯重伟. 经典Wnt信号通路中 $\beta$ -catenin在细胞核内外分布的调控机制及潜在治疗靶点的研究进展[J]. *复旦学报(医学版)*, 2022, 49(2): 300–308.
- [16] GAO R Y, YU Z L, LV C, et al. Medicinal and edible plant *Allium macrostemon* Bunge for the treatment of testosterone-induced androgenetic alopecia in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315: 116657.
- [17] 王雪, 梁粟, 赵月铮, 等. 雄激素性脱发的病因及发病机制研究进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2024, 31(6): 440–444.
- [18] RANDALL V A. Androgens and hair growth[J]. *Dermatol Ther*, 2008, 21(5): 314–328.
- [19] 孙建林, 吕新翔. 雄激素性脱发的发病机制与治疗进展[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2020, 42(1): 106–108, 112.
- [20] 钟淑贤. 龟板酊调控Wnt/ $\beta$ -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.
- [21] 潘福竺, 陈明霞, 易斌, 等. 纹何首乌通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路治疗小鼠雄激素性脱发[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(23): 246–253.
- [22] CERUTI J M, LEIRÓS G J, BALAÑA M E. Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 465: 122–133.
- [23] HE M L, LV X Y, CAO X K, et al. CRABP2 promotes the proliferation of dermal papilla cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Animals*, 2023, 13(12): 2033.
- [24] HAN J H, KWON O S, CHUNG J H, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle [J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 34(2): 91–98.
- [25] KLESZCZ R. The canonical Wnt pathway[J]. *Postepy biochemii*, 2019, 65(3): 183–192.
- [26] 刘慧, 张燕军, 李金泉, 等. 褪黑激素对Bcl-2和Bax基因在绒山羊皮肤中表达的影响[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(12): 2462–2467.
- [27] 徐玲玲, 玄敏, 李挺, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在脂溢性脱发中的作用及中药干预的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(4): 254–261.
- [28] 于晓飞, 王科军, 刘莹, 等. 雄激素性脱发中医病因病机浅析[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2021, 19(5): 129–131.

(收稿日期: 2025-03-12 编辑: 罗英姣)