

## 黑参提取物防脱发作用研究\*

杨 亭<sup>1</sup> 周明娟<sup>2</sup> 刘瀚麟<sup>1</sup> 徐梦迪<sup>1</sup> 慕占文<sup>3</sup> 慕 特<sup>3</sup> 刘金平<sup>1</sup> 王翠竹<sup>1</sup> 耿晓宇<sup>4\*\*</sup>

<sup>1</sup>吉林大学药学院, 长春 130021; <sup>2</sup>吉林大学化学学院, 长春 130000; <sup>3</sup>延边韩工坊健康制品有限公司, 延吉 133000; <sup>4</sup>通化师范学院医药学院, 通化 134002

**[摘要]** 目的 建立雄激素源性 C57BL/6 小鼠脱发模型, 观察黑参提取物对小鼠脱发的改善作用, 并基于网络药理学和分子对接方法探究其作用机制。方法 通过皮下注射丙酸睾酮建立小鼠脱发模型, 设立不同剂量的黑参提取物组, 并与米诺地尔进行对照。通过毛发生长情况、真皮厚度、毛囊形态与计数、血清激素水平及皮肤组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 和转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 含量等指标, 评价黑参提取物对脱发的改善作用。基于前期研究得到黑参提取物的化学成分, 利用 Swiss Target Prediction 和 Symmap 数据库获取黑参化学成分的靶点, 结合 Malacard、DisGeNET 及 Genecards 数据库中脱发相关靶点构建“黑参-化学成分-交集靶点-脱发”互作网络, 筛选关键化学成分和靶点, 进行分子对接分析。结果 黑参提取物组小鼠毛发生长优于模型组, 真皮厚度增加, 血清睾酮及二氢睾酮含量降低, 雌二醇含量升高, 皮肤 VEGF 表达增加, TGF- $\beta$  表达下降, 均存在剂量依赖性。筛选出关键化学成分去氧齐墩果酸、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、人参皂苷 Rh<sub>4</sub> 和菜油甾醇, 及关键靶点 INS、AR、VEGFA、PPARG、LEP 和 CASP3。分子对接结果表明关键成分与靶点间结合稳定。结论 黑参提取物对雄激素引起的脱发具有改善作用, 可能通过调控 AR 等靶点及 MAPK 等信号通路发挥作用, 提供了进一步研究与开发的科学依据。

**[关键词]** 黑参; 脱发; 雄激素性脱发; 网络药理学; 分子对接

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2025.02.009

### Study on the anti-hair loss effect of Black Ginseng

Yang Ting<sup>1</sup>, Zhou Mingjuan<sup>2</sup>, Liu Hanlin<sup>1</sup>, Xu Mengdi<sup>1</sup>, Qi Zhanwen<sup>3</sup>,

Qi Te<sup>3</sup>, Liu Jinping<sup>1</sup>, Wang Cuizhu<sup>1</sup>, Geng Xiaoyu<sup>4\*\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021; <sup>2</sup>College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130000; <sup>3</sup>Yanbian Hangongfang Health Products Co. Ltd., Yanji 133000; <sup>4</sup>College of Pharmacy, Tonghua Normal University, Tonghua 134002

\*\* Corresponding author: Geng Xiaoyu, email: gengxy22@mails.jlu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To establish an androgenic alopecia model in C57BL/6 mice, observe the improvement effect of Black Ginseng extract on alopecia, and explore its mechanism using network pharmacology and molecular docking methods. **Methods** An androgenic alopecia model was established by subcutaneous injection of testosterone propionate in mice. Different doses of Black Ginseng extract groups were set up and compared with Minoxidil. The improvement effect of Black Ginseng extract on androgenic alopecia was evaluated based on hair growth, dermal thickness, hair follicle morphology and count, serum hormone levels, and skin tissue VEGF and TGF- $\beta$  content. Based on previous studies, the chemical constituents of Black Ginseng extract were identified. Swiss Target Prediction and Symmap databases were used to obtain targets of Black Ginseng's chemical constituents, combined with alopecia-related targets from Malacard, DisGeNET, and Genecards databases to construct a "Black Ginseng-chemical composition-intersection target-alopecia" interaction network, screening key chemical components and targets, followed by molecular docking analysis. **Results** Mice in the Black Ginseng extract groups showed better hair growth than the model group, with increased dermal thickness, decreased serum testosterone and dihydrotestosterone levels, increased estradiol levels, increased VEGF expression, and decreased TGF- $\beta$  expression in skin, all in a dose-dependent manner. Key chemical components Deoxyoleanolic acid, Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Ginsenoside Rh<sub>4</sub>, and Campesterol, as well as key targets INS, AR, VEGFA, PPARG, LEP, and CASP3, were identified. Molecular docking results showed stable binding between key components and targets. **Conclusion** Black Ginseng extract improves androgen-induced alopecia in mice, likely by regulating targets such as AR and pathways like MAPK. This provides a scientific basis for further research and development of Black Ginseng.

收稿日期: 2024-03-18 修回日期: 2024-04-16 录用日期: 2024-04-30

\* 吉林省科技发展计划项目 (20210502005ZP); 吉林省产业自主创新能力专项 (2020C038-3)

\*\* 通信作者: 耿晓宇, 电子邮箱 gengxy22@mails.jlu.edu.cn

[Key words] Black Ginseng; Hair loss; Androgenetic alopecia; Network pharmacology; Molecular docking

脱发指头发脱落的现象, 而病理性脱发是指头发异常或过度地脱落, 其原因主要有雄激素源性、先天性因素、精神因素、药物因素、物理化学因素、内分泌和免疫系统反应紊乱等, 但脱发的机制较为复杂, 目前尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。目前, 临床上治疗脱发的主要方法包括手术治疗、药物治疗、激光治疗以及遮盖秃发区的各种美容技术, 但仅通过外科手术方法, 毛发的外观密度仍不能达到理想的预期效果, 不能完全逆转或阻止脱发的进行性过程, 远期术后的发展情况也无法预测及控制<sup>[2-5]</sup>。雄激素性脱发临床治疗药物有限, 常使用5 $\alpha$ -还原酶抑制剂(非那雄胺)、米诺地尔和雄激素拮抗剂(醋酸环丙孕酮)<sup>[6-10]</sup>。虽然在短时间内能快速控制或改善脱发症状, 但具有复发率高、副作用大等缺点, 如非那雄胺会出现阳痿、性功能异常和女性乳房发育等不良症状<sup>[11-12]</sup>。而中药具有多成分、多靶点、高活性、低副作用等特点, 因此探究低毒性、功能性天然产物防治雄激素性脱发逐渐成为研究热点。

黑参作为近年来新的人参炮制品种, 其应用日益广泛<sup>[13]</sup>。在过去的十年中, 人们针对黑参中主要成分的药理作用进行了研究, 发现黑参在抗癌、抗心力衰竭、保肝、抗糖尿病、抗氧化活性和对中枢神经系统的作用等方面具有良好的活性<sup>[14]</sup>。黑参具有较大的研究与开发价值。

本研究通过建立C57BL/6小鼠雄激素性脱发模型, 通过毛发生长情况、真皮厚度、毛囊形态与计数、血清激素水平及皮肤组织中血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和转化生长因子- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )含量等指标, 观察黑参提取物对小鼠脱发的改善作用, 并借助网络药理学构建生物分子网络, 建立黑参药效成分与疾病的关联机制, 从而初步阐明黑参防脱发的药理作用机制, 为黑参更好地服务于人类大健康提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** VORTEX-5 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), FA1104N 型电子天平(上海民侨精密科学仪器有限公司), TGL-16aR 型超速离心机(上海安亭科学仪器厂), EPOCH 型酶标仪(美国Bio Tek公司)。

**1.1.2 试剂** 高脂鼠粮(鼠繁殖生长饲料 64.52%、氯化钠 0.97%、蔗糖 0.32%、牛油 12.90%、豆油 2.58%、花生仁 12.90%、鸡蛋 5.81%) 购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司; 米诺地尔酊购自浙江万晟药业有限公司; 丙酸睾酮注射液购自杭州动物药品厂; 水合氯醛购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大宝SOD蜜购自北京大宝

化妆品有限公司; 豆油购自嘉里粮油(营口)有限公司; 苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 小鼠睾酮酶联免疫检测试剂盒、小鼠二氢睾酮酶联免疫检测试剂盒、小鼠雌二醇酶联免疫检测试剂盒及小鼠TGF- $\beta$ 、VEGF酶联免疫检测试剂盒均购自江苏菲亚生物科技有限公司。

**1.1.3 数据库及软件** Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>), Symmap (<http://www.symmap.org>), Malacard (<https://www.malacards.org>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org>), GeneCards (<https://www.genecards.org>), String (<https://cn.string-db.org>), Metascape (<https://metascape.org>), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), PDB (<https://www.rcsb.org>) 等数据库; Cytoscape 3.9.1、ChemBio 3D Ultra 17.0、AutoDockTools 1.5.7、AutoDock vina 1.1.2 及 Pymol 2.3.5 软件。

**1.1.4 实验动物** C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[许可证号 SCXK(吉)2020-0002]。饲养温度 21~23  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 45%~55%, 保证自由饮水、进食及活动。

### 1.2 实验研究

**1.2.1 样品的制备** 黑参水提取物样品: 取黑参适量, 粉碎, 过 20 目筛, 称取粉末 80 g, 加 800 mL 蒸馏水浸泡过夜, 煎煮 2 h, 过滤, 收集滤液; 滤渣重复再煎煮 2 次, 合并滤液, 减压浓缩至 100 mL, 得黑参浓缩液, 其生药浓度为 800 mg/mL。分别取 5、10、20 mL 黑参浓缩液, 用大宝 SOD 蜜做基质(主要成分包括水、甘油、矿油、聚二甲基硅氧烷、超氧化物歧化酶、人参根提取物、膜荚黄芪根提取物), 稀释至 40 mL, 充分混匀后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱储存备用。

**1.2.2 适应性饲养与动物分组** 在实验开始前, 对所有小鼠进行为期 7 d 的适应性饲养, 以确保小鼠适应实验环境并保持健康状态。适应性饲养后, 将 C57BL/6 小鼠随机分为 7 组(每组 8 只): 空白组、模型组、基质组(大宝 SOD 蜜对照组)、低剂量组(黑参生药浓度为 100 mg/mL)、中剂量组(黑参生药浓度为 200 mg/mL)、高剂量组(黑参生药浓度为 400 mg/mL) 和阳性药组(米诺地尔酊, 50 mg/mL)。

**1.2.3 雄激素性脱发小鼠模型的构建及给药** 在适应性饲养后, 开始进行模型构建和给药。造模前 1 天, 各组小鼠通过腹腔注射 4% 水合氯醛进行麻醉。麻醉后, 在距离尾巴根部近心端 0.5~1.0 cm 处选取一个大小为 2.0 cm  $\times$  3.0 cm 的脱毛区域。

首先用剃毛器将小鼠背部中央至尾部的毛发剃短, 然后使用脱毛膏按照说明书要求进行脱毛, 去除残留的毛发。使用湿润的棉球擦除残余的脱毛膏和毛发。脱毛 24 h 后, 除空白组外, 其余 6 组小鼠均在背部皮下注射丙酸睾酮 (5 mg/kg), 1 次/d, 持续 28 d。在皮下注射给药期间, 需密切观察小鼠背部皮肤, 注意是否出现破损、出血、红肿等现象。每次注射丙酸睾酮 1 h 后, 黑参低、中、高剂量组分别于小鼠背部脱毛区域涂抹 0.2 mL 混合促渗基质的各剂量黑参提取物; 阳性药组涂抹 0.2 mL 米诺地尔酊; 基质组涂抹 0.2 mL 大宝 SOD 蜜。为保证药物的吸收效果, 各给药组每天分上、下午两次给药, 每次涂抹 0.1 mL, 连续注射和给药 28 d<sup>[15-16]</sup>。

#### 1.2.4 防脱发作用研究

**1.2.4.1 小鼠背部毛发生长情况** 观察各组小鼠在各个时段的状态和活动度, 每周拍照记录背部毛发生长情况, 重点观察皮肤颜色、毛发密度和长度。在给药的第 14、21 和 28 天, 通过 Adobe photoshop 2023 软件计算小鼠背部新生毛发覆盖面积, 按以下公式计算毛发覆盖率和促进效果:

$$\text{毛发覆盖率}(\%) = \frac{\text{毛发面积}}{\text{背部脱毛面积}} \quad (\text{公式 a})$$

$$\text{促进效果}(\text{毛发覆盖率}) = \frac{\text{毛发覆盖率}(\text{给药组})}{\text{毛发覆盖率}(\text{模型组})} \quad (\text{公式 b})$$

公式 a 中毛发面积是小鼠背部新生毛发覆盖的面积, 背部脱毛面积是小鼠背部全部剃毛区域的面积; 公式 b 中“毛发覆盖率(给药组)”是各给药组新生毛发覆盖百分率平均值 ( $n=8$ ), 毛发覆盖率(对照组)是对照(模型组)新生毛发百分率平均值 ( $n=8$ )。

**1.2.4.2 小鼠毛囊组织病理学观察** 末次给药后, 小鼠禁食但不禁水 12 h, 腹腔注射 4% 水合氯醛进行麻醉。剔除脱毛区域毛发, 完全暴露小鼠背部皮肤, 通过颈椎脱臼法处死小鼠, 取 1.5 cm × 1.5 cm 皮肤组织, 用 10% 中性福尔马林缓冲液固定 24 h, 经梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色及组织封片处理, 用于皮肤组织病理观察。观察皮肤组织病理切片, 测量真皮层厚度, 重点观察毛囊形态变化, 选择毛囊数目最多的视野进行统计。

**1.2.4.3 小鼠皮肤组织 VEGF 及 TGF-β 含量测定** 颈椎脱臼法处死小鼠后取 1.5 cm × 1.5 cm 脱毛区域皮肤组织。用预冷磷酸盐缓冲液冲洗后滤纸吸干, 称重并放入匀浆容器中, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入预冷磷酸盐缓冲液匀浆, 13 000 r/min 低温离心 15 min, 取上清液, 依据酶联免疫吸附试剂盒说明书, 测定皮肤组织样本中的 VEGF 及 TGF-β 含量。

**1.2.4.4 小鼠血清睾酮、二氢睾酮及雌二醇含量**

测定 通过眼眶静脉丛采血, 室温静置 30 min, 4 000 r/min 低温离心 15 min, 取上清液, 依据酶联免疫吸附试剂盒说明书, 测定血清样本中的睾酮、二氢睾酮及雌二醇含量。

**1.2.5 统计学方法** 实验数据使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行数据分析。正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, Tukey 检验对不同组别之间进行两组间分析, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

#### 1.3 网络药理学研究

**1.3.1 化学成分筛选** 本课题组前期通过 UPLC-Q/TOF-MS 技术检测黑参水提物的主要成分, 使用 UNIFI 软件对质谱数据进行处理, 鉴定出 39 个化合物<sup>[17]</sup>。

**1.3.2 化学成分作用靶点的筛选** 通过 Pubchem 数据库搜集黑参提取物化学成分 SMILES 号, 上传至 Swiss Target Prediction 和 Symmap 数据库预测靶点, 整合去重后, 筛选出化学成分作用靶点。

**1.3.3 疾病相关靶点的筛选** 以“Alopecia, Androgenetic”“Androgenic Alopecia”为关键词, 在 Malacard、DisGeNET 和 Genecards 数据库检索, 整合去重后筛选出雄激素性脱发相关靶点。

**1.3.4 交集靶点的获取** 将黑参提取物化学成分靶点与雄激素性脱发靶点映射, 获得交集靶点, 并绘制 Venn 图。

**1.3.5 蛋白质-蛋白质相互作用网络 (Protein-protein interaction networks, PPI) 的构建及关键靶点的预测** 将交集靶点导入 String 数据库, 获得 PPI 网络并导出数据文件。将该数据文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建 PPI 网络图并进行拓扑学分析, 根据度值 (Degree) 预测关键靶点。

**1.3.6 “化学成分-交集靶点-疾病”网络的构建及关键化学成分的预测** 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“化学成分-交集靶点-脱发”网络, 分析网络拓扑特性, 通过度值筛选关键化学成分。

**1.3.7 基因本体论富集分析 (GO 富集分析) 和京都基因与基因组百科全书通路富集分析 (KEGG 通路分析)** ①GO 富集分析, 将交集靶点导入 Metascape 数据库, 进行 GO 富集分析, 并通过微生物信云平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>), 得到 GO 分析直方图; ②KEGG 信号通路分析, 将交集靶点导入 Metascape 数据库, 进行 KEGG 富集分析, 通过微生物信云平台, 获取 KEGG 气泡图。

**1.3.8 分子对接** ①分子对接配体准备: 选取网络药理学筛选出的关键化学成分作为配体。将其 SMILES 号导入 PubChem 数据库, 获取配体的三维结构, 并通过 ChemBio 3D Ultra 17.0 软件进行能量最小化处理, 得到 mol2 格式文件。随后, 将此文件导入 AutoDockTools 1.5.7 软件, 计算并重新分配电荷, 设置柔性键, 保存为 pdbqt 格式, 完成配体的优化和准备。②受体准备: 选取网络药理

学筛选出的关键靶点作为受体。从 PDB 数据库下载相应的共晶配体受体结构, 保存为 pdb. 格式文件。利用 Pymol 2. 3. 5 软件和 AutoDockTools 1. 5. 7 软件完成受体前处理, 并保存为 pdbqt. 格式文件。③分子对接: 使用 AutoDock Vina 1. 1. 2 软件进行分子对接, 选取最优势构象, 并通过 Pymol 2. 3. 5 软件对对接结果进行可视化处理。

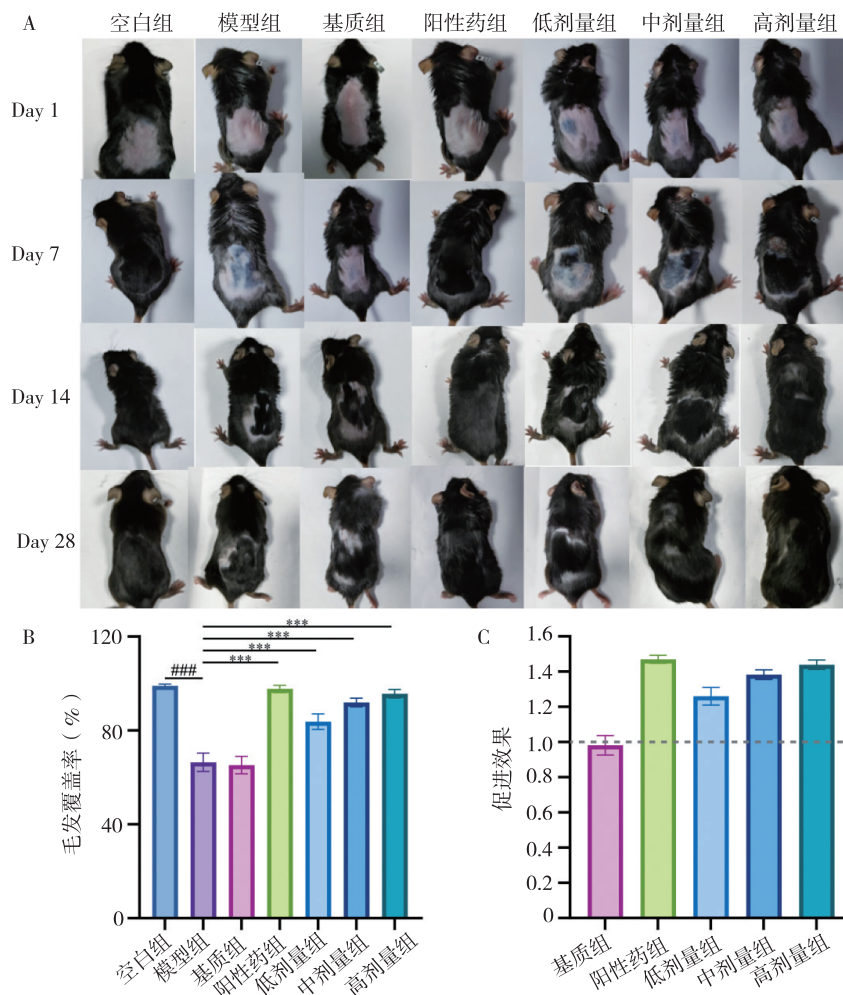
## 2 结果

### 2.1 实验结果

**2.1.1 小鼠毛发生长状况** 毛发生长周期包括生长期、退行期和休止期。C57BL/6 小鼠毛囊中含有黑色素细胞, 处于生长期时可大量合成黑色素, 皮肤呈黑色; 退行期黑色素合成减少, 皮肤呈灰色; 休止期不合成黑色素, 皮肤呈粉红色。实验使用 5~7 周龄的小鼠, 其毛囊正处于休止期。脱毛后, 随着毛囊由休止期向生长期转变, 小鼠背部皮肤逐渐由粉红色转变为黑色。

如图 1A 所示, Day1 为造模给药第 1 天拍摄的背部皮肤照片, 各组小鼠背部皮肤均呈粉红色, 表

明毛囊处于休止期。给药第 14 天时, 空白组小鼠背部毛发已有明显生长, 毛发短小且密集; 阳性对照组毛发生长情况与空白组相近, 高剂量组亦可观察到毛发生长, 但覆盖面积不如前两者; 模型组和基质组背部皮肤颜色加深, 但未见明显毛发生长; 低、中剂量组背部皮肤颜色加深, 部分区域有短小毛发生长出。给药 28 d 后, 空白组、中高剂量组和阳性药组毛发生长明显, 接近剃毛前长度; 而模型组、基质组与低剂量组仍有部分区域皮肤裸露。第 28 天的毛发覆盖率结果见图 1B, 与空白组比较, 模型组和基质组毛发覆盖率显著降低 ( $P<0.001$ ), 而阳性对照组、中高剂量组毛发覆盖率与模型组比较均显著升高 ( $P<0.001$ )。且黑参各剂量组对毛发生长均体现出一定的促生发效果, 且呈现一定的剂量相关性, 其中高剂量组与阳性药组的结果类似, 结果见图 1C。综上所述, 本实验采用皮下注射丙酸睾酮构建雄激素源性小鼠脱发模型成功, 黑参提取物对雄激素性脱发具有一定缓解作用, 能促进毛发生长, 且呈剂量依赖性。



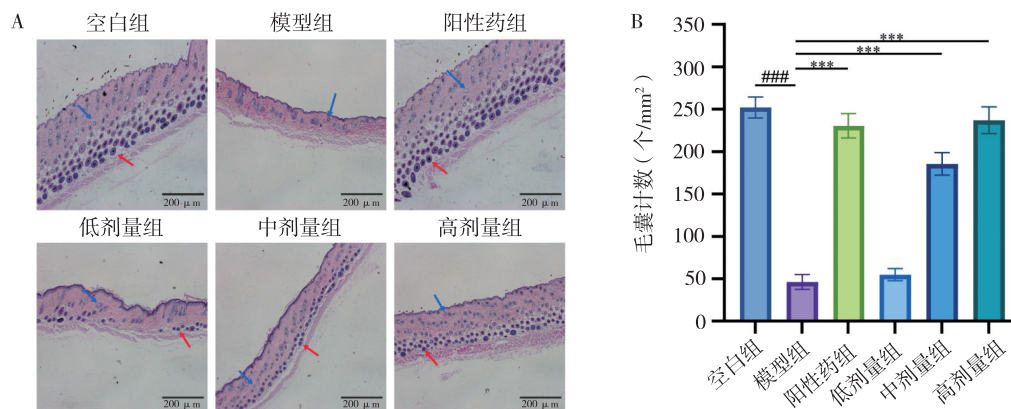
注: 模型组与空白组比较### $P<0.001$ ; 与模型组比较\*\*\* $P<0.001$

图 1 小鼠背部毛发生长情况

Fig. 1 Hair growth on the back of mice

**2.1.2** 小鼠背部皮肤真皮厚度及毛囊形态与计数病理组织学检查结果显示, 空白组皮肤毛囊较大且分布紧密; 模型组毛囊分布稀疏, 真皮厚度减少, 提示造模成功, 见图 2A。第 28 天, 与空白组比较, 模型组毛囊数目显著降低 ( $P < 0.001$ ), 与

模型组比较, 黑参低、中、高剂量组及阳性药组的真皮厚度与毛囊数目均显著增加 ( $P < 0.001$ ), 其中阳性药组和高剂量组毛囊数目最多, 分布最密, 真皮厚度接近空白组, 对小鼠脱发改善效果最好, 见图 2B。



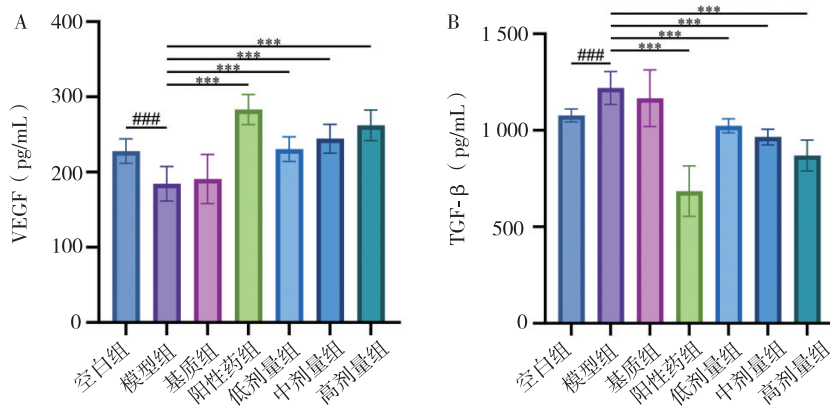
注: 模型组与空白组比较<sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 图中红色箭头为终毛, 蓝色箭头为囊毛

**图 2** 小鼠背部皮肤组织病理切片及毛囊计数统计图

**Fig. 2** Histopathologic section of the back skin of mice and statistical chart of hair follicle count

**2.1.3** 小鼠皮肤组织 VEGF 及 TGF- $\beta$  含量测定与空白组比较, 模型组 VEGF 表达量显著降低 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 各组皮肤 VEGF 表达量均有所升高, 其中阳性药组 VEGF 表达量增加最为明显, 与其局部应用具有扩张血管、增加血液供应的特点相一致, 低、中、高剂量黑参提取物 VEGF 表达量均显著增加 ( $P < 0.001$ ), 且呈剂量依赖性, 表明黑参提取物中可能通过促进局部皮

肤组织 VEGF 表达, 增加血流供应和改善微循环, 从而促进毛发生长, 见图 3A。与空白组比较, 模型组的 TGF- $\beta$  表达量显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 阳性药组以及低、中、高剂量黑参组的 TGF- $\beta$  表达量均有所下降, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 其中高剂量组和阳性药组效果尤为显著, 见图 3B。



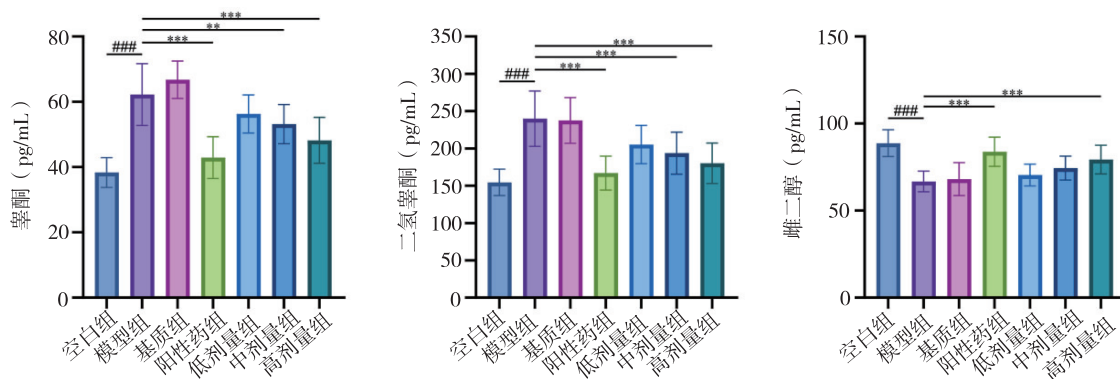
注: 模型组与空白组比较<sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

**图 3** 小鼠皮肤组织 VEGF 及 TGF- $\beta$  含量

**Fig. 3** VEGF and TGF- $\beta$  content of mouse skin tissue

**2.1.4** 小鼠血清睾酮、二氢睾酮及雌二醇含量测定与空白组比较, 模型组的血清睾酮和二氢睾酮含量明显升高 ( $P < 0.001$ ), 主要是由于皮下注射丙酸睾酮的造模方法引起的, 表明模型建立成功。与模型组比较, 各给药组血清雄激素水平有所降低, 尤以高剂量

组和阳性药组最为显著 ( $P < 0.001$ ), 表明黑参有可能通过降低雄激素水平发挥防脱发作用。与空白组比较, 模型组和基质组雌二醇的含量显著降低 ( $P < 0.001$ ), 而高剂量黑参组和阳性药组能显著升高雌二醇的水平 ( $P < 0.001$ ), 见图 4。



注：模型组与空白组比较### $P < 0.001$ ；与模型组比较\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$

图 4 小鼠血清睾酮、二氢睾酮及雌二醇含量

Fig. 4 Serum testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol levels in mice

## 2.2 网络药理学研究结果

2.2.1 交集靶点分析 将 377 个化学成分作用靶点与 444 个疾病靶点相映射，得到 26 个“成分-雄激素性脱发”交集靶点，Venn 图见图 5。

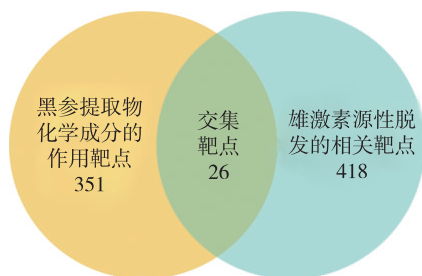


图 5 化学成分和疾病靶点的交集 Venn 图

Fig. 5 Venn diagram of the intersection of chemical composition and disease targets

通过构建 PPI 网络，进一步确定黑参防脱发作用的关键靶点，基于 String 数据库的 PPI 网络图见图 6。使用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络进行拓

扑分析，选取度值前 6 的节点作为黑参防脱发作用的关键靶点，各关键靶点的相关信息见表 1。

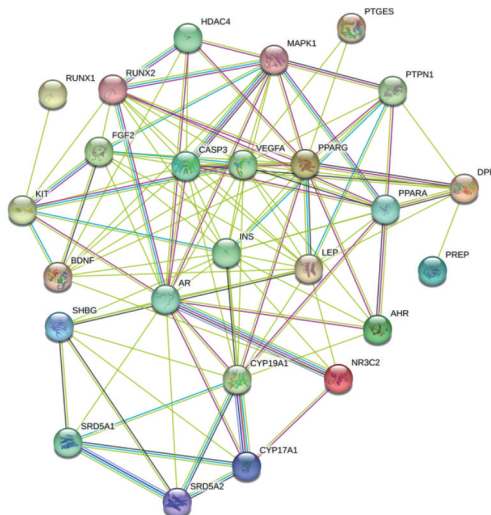


图 6 基于 String 数据库的 PPI 网络图

Fig. 6 PPI network based on the String database

表 1 度值前 6 位的关键靶点信息

Tab. 1 Information of the top 6 key targets

序号	基因	蛋白英文名	蛋白中文名	度值
1	INS	Insulin	胰岛素	18
2	AR	Androgen receptor	雄激素受体	16
3	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	血管内皮生长因子 A	16
4	PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	过氧化物酶体增殖物激活受体	14
5	LEP	Leptin	瘦素	14
6	CASP3	Caspase 3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3	14

2.2.2 “化学成分-交集靶点-疾病”网络构建及关键化学成分预测结果 “化学成分-交集靶点-雄激素性脱发”网络如图 7 所示。根据拓扑分析结果可知，度值越大表明该化学成分与黑参防脱发作用的

相关性越大，选取度值前 5 的化学成分作为黑参防脱发的关键化学成分，分别为 Deoxyoleanolic acid、Ginsenoside Rb<sub>1</sub>、Ginsenoside Rg<sub>3</sub>、Ginsenoside Rh<sub>4</sub> 和 Campesterol，其相关信息见表 2。

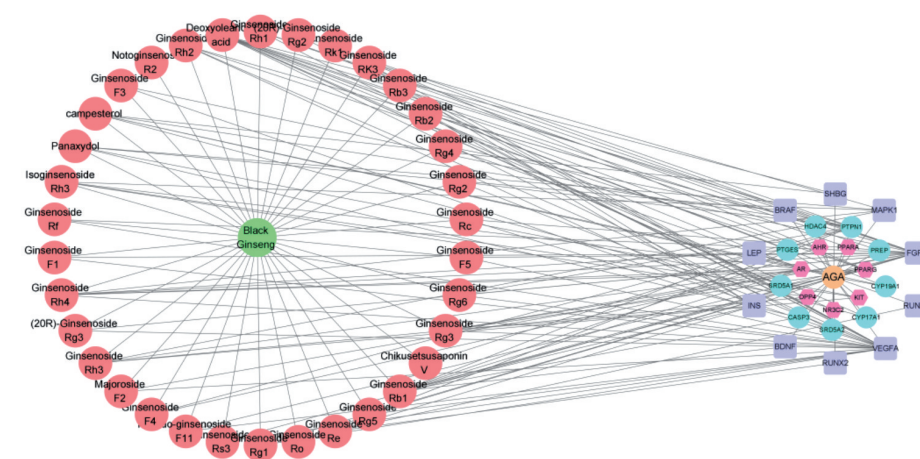


图 7 化学成分-交集靶点-雄激素性脱发的网络图

Fig. 7 The network of chemical components-intersection targets-alopecia

表 2 度值前 5 的关键化学成分信息

Tab. 2 Information of the top 5 key chemical components

序号	化合物英文名	化合物中文名	度值
1	Deoxyoleanolic acid	去氧齐墩果酸	13
2	Ginsenoside Rb <sub>1</sub>	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	9
3	Ginsenoside Rg <sub>3</sub>	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	7
4	Ginsenoside Rh <sub>4</sub>	人参皂苷 Rh <sub>4</sub>	6
5	Campesterol	菜油甾醇	6

GO 富集分析共获得 33 个具有代表性的富集分析结果, 见图 8。直方图越长, 表示富集程度越显著。结果显示, 生物过程 (Biological process, BP) 富集程度最高, 交集靶点主要富集于细胞过程、代谢过程等生物过程, 显示黑参通过以上生物学功能在防脱发过程发挥作用。

KEGG 富集分析共获得 6 条显著性通路, 见图 9。KEGG 富集通路气泡图中可以看出, 富集通路最先显著的通路为 MAPK 信号通路, 它调控多种细胞生物学过程, 例如增殖、分化、细胞凋亡以及正常条件和病理条件下应激反应的关键信号通路。

富集在 MAPK 通路上的靶点有 8 个, 分别为 BDNF、BRAF、CASP3、FGF2、INS、KIT、MAPK1、VEGFA, 其他通路具体靶点见表 3。

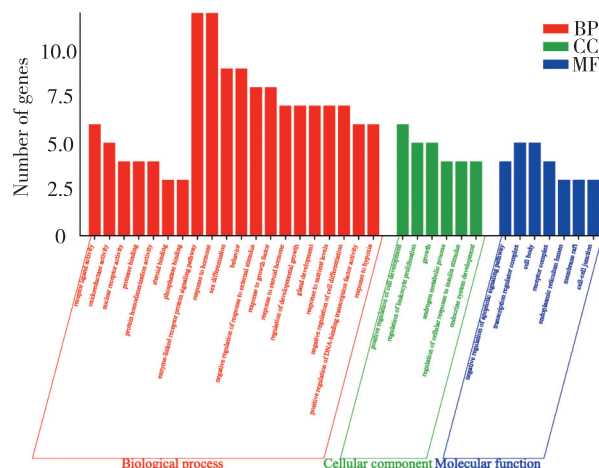


图 8 GO 富集分析直方图

Fig. 8 Histogram of GO enrichment analysis

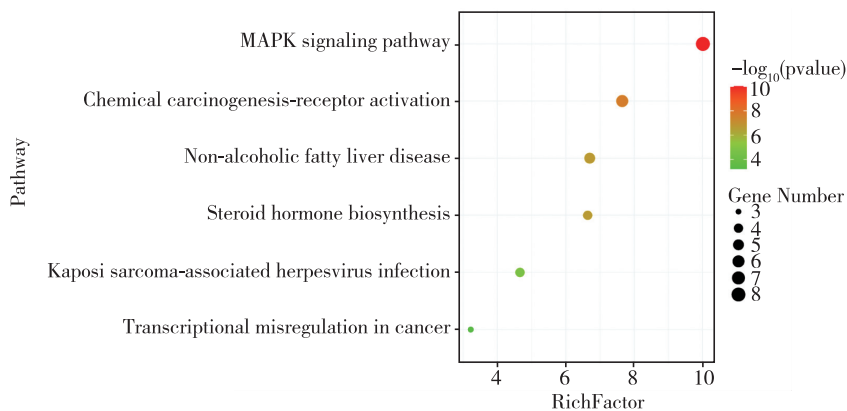


图 9 KEGG 富集通路气泡图

Fig. 9 Bubble diagram of KEGG enrichment pathways



### 3 讨论

脱发是一种全球流行的疾病,其中雄激素性脱发是最常见的脱发类型,患者群体庞大,治疗周期长,且无根治药物,因此,对于雄激素性脱发的防治具有巨大的市场需求<sup>[18]</sup>。雄激素性脱发的发病机制复杂,与基因、毛囊周围微环境紊乱、激素代谢失调等因素有关,主要特点为毛囊生长期缩短,休止期延长<sup>[19]</sup>。VEGF和TGF- $\beta$ 是被已经证实的与雄激素性脱发有密切关系的细胞因子<sup>[20]</sup>。毛发生长的营养需要毛囊周围毛细血管的供给,而VEGF在毛囊周围毛细血管的形成中发挥重要作用。VEGF在毛囊外根鞘角质形成细胞中过表达,可以诱导毛囊周围血管形成,导致脱毛后毛发加速再生、毛囊和毛干尺寸增加、毛发密度增加,其中VEGFA是一种主要的亚型<sup>[21-22]</sup>。TGF- $\beta$ 是一种受二氢睾酮诱导的毛发生长抑制因子,会诱导雄激素性脱发患者头皮毛囊微血管内皮细胞的凋亡,导致血管退化,诱导毛囊纤维化反应,抑制毛发从休止期进入生长期,它是雄激素性脱发发病机制中的关键细胞因子之一<sup>[23-24]</sup>。故本文将VEGF和TGF- $\beta$ 作为检测脱发治疗的重要指标。

黑参是人参的炮制产品,具有改善血液流变学、抑制血栓形成、改善微循环、抗凝血等多种作用<sup>[25]</sup>。脱发患者头皮血流阻力高、血流总量减少,提示黑参可能通过改善血液循环防脱发。Huo等<sup>[26]</sup>研究表明黑参具有抗炎活性,这进一步支持其防脱发功效。雄激素和雄激素的代谢与雄激素性脱发的发病有着密切关系。雄激素在调节毛发生长过程中具有重要作用,在正常情况下,能够促进毛发由毳毛向终毛转化,但随着雄激素的异常增多,可使此过程发生逆转进而发生雄激素性脱发<sup>[27]</sup>。睾酮是人体最主要的雄激素,而二氢睾酮也是一种重要的雄激素。二氢睾酮会对毛囊产生毒性作用,导致毛囊逐渐萎缩并缩短毛发生长周期,也是导致脱发的主要因素之一<sup>[28]</sup>。雌二醇是一种雌激素,具有促进毛发生长的作用<sup>[29]</sup>。本实验通过皮下注射丙酸睾酮成功建立雄激素性脱发模型,发现黑参提取物能够显著地提高毛发生长速度,增加毛发覆盖率及毛囊密度,增强VEGF在雄激素性脱发模型小鼠皮肤中的表达,显著降低雄激素性脱发模型小鼠皮肤中TGF- $\beta$ 的表达,降低血清睾酮、二氢睾酮含量,升高雌二醇含量,且存在一定的剂量依赖性,提示黑参提取物对雄激素引起的脱发具有一定的改善作用。进一步通过网络药理学分析筛选出39个黑参化学成分377个靶点和444个脱发相关靶点,获得26个交集靶点。通过PPI网络及拓扑分析,得到5个关键靶点:AR、VEGFA、PPARG、LEP和CASP3。AR为雄激素受体,AR和雄激素的结合在雄激素性脱发的发生和发展中起着至关重要的作用,只有AR存在的靶组织细胞才能特异性结合雄激素并发挥

其生物功能<sup>[30-31]</sup>;生长因子VEGF在毛囊周围毛细血管的形成中发挥重要作用,其中VEGFA是一种主要的亚型;PPARG主要参与脂质代谢的调控,PPARG可能通过参与调节脂质代谢途径来改善雄激素性脱发,LEP对雄激素性脱发有着良好的治疗作用,CASP3可调控毛发生长,下调皮肤组织Caspase-3的蛋白表达,可抑制毛囊细胞凋亡从而促进头发生长<sup>[32-34]</sup>。构建“化学成分-交集靶点-雄激素性脱发”网络,得到5个关键化学成分:Deoxyoleanolic acid、Ginsenoside Rb<sub>1</sub>、Ginsenoside Rg<sub>3</sub>、Ginsenoside Rh<sub>4</sub>和Campesterol。人参皂苷已在防脱发应用上有多项研究<sup>[35-38]</sup>。Deoxyoleanolic acid和Campesterol在雄激素性脱发上的研究较少,网络药理学分析为进一步研究提供指导。GO富集分析和KEGG通路分析发现MAPK信号通路、化学致癌-受体活化信号通路和类固醇激素生物合成信号通路是关键通路<sup>[39-40]</sup>。这些通路主要通过调控脂质代谢发挥作用。本研究中5种关键化学成分与5种关键靶点的结合能均小于-5 kcal/mol,表明具有良好的结合活性。Ginsenoside Rb<sub>1</sub>、Ginsenoside Rg<sub>3</sub>及Ginsenoside Rh<sub>4</sub>与关键靶点的结合能均小于-7 kcal/mol,表明这些成分与靶点之间具有较强的结合能力。但黑参提取物是否通过这些靶点发挥防脱发作用,仍需进一步实验验证。

黑参具有较好的防脱发作用,且存在毒性和副作用小等优势,具有良好的开发前景,但将其开发为防脱发药物,仍面临很多挑战。如黑参提取物化学成分复杂,物质组成尚不十分明确,缺乏有效的质量控制方法;缺少有效的毒理学安全性评价方法;其防脱发机制尚不明确,具体的分子调控机制仍需进一步探讨等。而且植物类提取物的单用效果可能有限,已有研究表明植物提取物与药物联用效果可能更佳,预示复配应用前景广阔,这也为黑参提取物防脱发产品开发提供了一种新思路。

### 参考文献

- [1] Alessandrini A, Bruni F, Piraccini B M, et al. Common causes of hair loss - clinical manifestations, trichoscopy and therapy[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2021, 35(3):629-640.
- [2] York K, Meah N, Bhojru B, et al. A review of the treatment of male pattern hair loss[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(5):603-612.
- [3] 赵云杰,梁皓,金磊,等. 显微毛囊移植术治疗雄激素源性脱发30例临床观察[J]. *九江学院学报(自然科学版)*, 2015, 30(4):101-103.  
Zhao Y J, Liang H, Jin L, et al. Clinical observation on 30 cases of androgenic alopecia treated by microfollicular transplantation[J]. *J Jiujiang Univ (Natural Science)*, 2015, 30(4):101-103.
- [4] 柴小伟,陆正梅. 激光治疗脱发的研究进展[J]. *中国*

- 麻风皮肤病杂志, 2022, 38(2):128-131.
- Chai X W, Lu Z M. Research progress of laser treatment for alopecia[J]. *Chin J Lep Skin Dis*, 2022, 38(2):128-131.
- [5] 张少伟, 罗银利. 脱发治疗的给药方式研究进展[J]. *中国医疗美容*, 2022, 12(3):83-86.
- Zhang S W, Luo Y L. Research progress of drug administration in the treatment of alopecia[J]. *Chin Med Cosmetol*, 2022, 12(3):83-86.
- [6] Fabbrocini G, Cantelli M, Masarà A, et al. Female pattern hair loss: a clinical, pathophysiologic, and therapeutic review[J]. *Int J Womens Dermatol*, 2018, 4(4):203-211.
- [7] Freire P, Riera R, Martimbianco A, et al. Minoxidil for patchy alopecia areata: systematic review and meta-analysis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2019, 33(9):1792-1799.
- [8] Kaliyadan F, Namblar A, et al. Androgenetic alopecia: an update[J]. *Dermatol Venereol Leprol*, 2013, 79(5):613-625.
- [9] Sitruk-Ware R, Husmann F, Thijssen J H, et al. Role of progestins with partial antiandrogenic effects[J]. *Climacteric*, 2004, 7(3):238-254.
- [10] Sinclair R D, Dawber R P. Androgenetic alopecia in men and women[J]. *Clin Dermatol*, 2001, 19(2):167-178.
- [11] Irwig M S, Kolukula S. Persistent sexual side effects of finasteride for male pattern hair loss [J]. *J Sex Med*, 2011, 8(6):1747-1753.
- [12] Iamsurang W, Leerunyakul K, Suchonwanit P. Finasteride and its potential for the treatment of female pattern hair loss: evidence to date [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:951-959.
- [13] Zhu L, Luan X, Dou D, et al. Comparative analysis of ginsenosides and oligosaccharides in White Ginseng (WG), Red Ginseng (RG) and Black Ginseng (BG) [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(5):403-410.
- [14] 赵天琦, 赵岩, 郜玉钢, 等. 黑参的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(1):123-125.
- Zhao T Q, Zhao Y, Gao Y G, et al. Research progress of Black Ginseng[J]. *Mod Chin Med*, 2016, 18(1):123-125.
- [15] Ji C, Ma J, Feng C, et al. Promotion of hair regrowth in androgenetic alopecia with supplemented erzhi wan: exploring its mechanism using network pharmacology and molecular docking [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2023, 16:2995-3022.
- [16] Truong V L, Bak M J, Lee C, et al. Hair regenerative mechanisms of red ginseng oil and its major components in the testosterone-induced delay of anagen entry in C57BL/6 Mice[J]. *Molecules*, 2017, 22(9):1505.
- [17] 綦占文, 綦特, 李卓俏, 等. 黑参水提物化学成分分析及其调节血脂作用研究 [J]. *特产研究*, 2023, 45(4):18-26, 31.
- Qi Z W, Qi T, Li Z Q, et al. Study on the chemical composition and blood lipid-regulation effect of Black Ginseng aqueous extract[J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2023, 45(4):18-26, 31.
- [18] 吴瑞英, 王磊, 杨知山, 等. 雄激素性秃发的治疗进展[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2023, 44(1):29-35.
- Wu R Y, Wang L, Yang Z S, et al. Progress in the treatment of androgenetic alopecia [J]. *J Wuhan Univ (Medical Edition)*, 2023, 44(1):29-35.
- [19] Liu X, Kong X, Xu L, et al. Synergistic therapeutic effect of ginsenoside Rg3 modified minoxidil transfersomes (MXD-Rg3@TFs) on androgenic alopecia in C57BL/6 mice[J]. *Int J Pharm*, 2024, 654:123963.
- [20] 巫珊, 张海州. 脂溢性脱发的发生机制及治疗研究进展[J]. *日用化学品科学*, 2012, 35(2):29-33.
- Wu S, Zhang H Z. Progress on the pathologic mechanism and potential therapy of androgenic alopecia [J]. *Deterg Cosmet*, 2012, 35(2):29-33.
- [21] Gnann L A, Castro R F, Azzalis L A, et al. Hematological and hepatic effects of vascular epidermal growth factor (VEGF) used to stimulate hair growth in an animal model[J]. *BMC Dermatol*, 2013, 13:15.
- [22] 俞佳玉, 朱凤, 庞锦萍, 等. 银杏黄酮通过调节 VEGF 和 TGF- $\beta$  改善小鼠雄激素性脱发的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(5):425-432.
- Yu J Y, Zhu F, Pang J P, et al. Ginkgo flavone treats androgenic alopecia in mice by regulating the expression of VEGF and TGF- $\beta$  [J]. *Chin Pharmaceut J*, 2024, 59(5):425-432.
- [23] Deng Z, Chen M, Liu F, et al. Androgen receptor-mediated paracrine signaling induces regression of blood vessels in the dermal papilla in androgenetic alopecia [J]. *J Invest Dermatol*, 2022, 142(8):2088-2099. e9.
- [24] 张博文, 杨胜男, 田甜, 等. TGF- $\beta$ /BMP/Smad 信号通路及其参与毛囊发育及周期调控的研究进展 [J]. *解剖科学进展*, 2023, 29(6):667-670.
- Zhang B W, Yang S N, Tian T, et al. Research progress of TGF- $\beta$ /BMP/Smad signaling pathway and its involvement in hair follicle development and cycle regulation [J]. *Prog Anatom Sci*, 2023, 29(6):667-670.
- [25] 李世征, 李大勇, 袁媛, 等. 人参新炮制品黑参抗血栓药理实验研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(9):45-46.
- Li S Z, Li D Y, Yuan Y, et al. Experimental study on anti-thrombotic effect of Black Ginseng developed from panax ginseng [J]. *J Liaoning Univ TCM*, 2014, 16(9):45-46.
- [26] Huo R, Wang M, Wei X, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanisms of Black Ginseng [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(3):e202200846.
- [27] 张力. 乌斯玛草对雄激素动物脱发模型治疗作用的研究 [D]. 兰州:兰州大学, 2016.
- Zhang L. Study of the therapeutic effect of Usma herb in an androgenic animal model of alopecia [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016
- [28] 林蕾, 杨梦洁, 吴晓, 等. 二氢睾酮诱导小鼠雄激素性脱发的机制研究 [J]. *浙江医学*, 2017, 39(18):1527-1531, 1535.
- Lin L, Yang M J, Wu X, et al. Mechanism of androge-

- netic alopecia in mouse model [J]. *Zhejiang Med J*, 2017, 39(18):1527-1531, 1535.
- [29] 李晓凤, 范卫新. 雌激素对皮肤和毛发生物学作用的研究进展[J]. *国外医学(皮肤性病学分册)*, 2005, 31(3):180-182.
- Li X F, Fan W X. Progress in the study of the biological effects of estrogen on skin and hair [J]. *Ine J Dermatol Venereol*, 2005, 31(3):180-182.
- [30] Ismail F F, Meah N, Trindade de Carvalho L, et al. Safety of oral bicalutamide in female pattern hair loss: a retrospective review of 316 patients [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2020, 83(5):1478-1479.
- [31] 廖金凤, 段西凌. 雄激素性脱发的病因病机[J]. *临床合理用药杂志*, 2013, 6(14):174-176.
- Liao J F, Duan X L. Pathogenesis of androgenetic alopecia [J]. *J Clin Ration Drug Use*, 2013, 6(14):174-176.
- [32] 彭涛, 李艳伟, 李东娜, 等. 二至丸治疗脂溢性脱发的生物信息学研究[J]. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2024, 33(3):335-344.
- Peng T, Li Y W, Li D N, et al. Investigating the mechanism of Erzhi pill for the treatment of seborrheic alopecia based on network pharmacology and molecular docking [J]. *J Yunnan Univ National (Natural Sciences Edition)*, 2024, 33(3):335-344.
- [33] 温旭红, 张高峰, 潘伦, 等. 瘦素对雄激素性脱发小鼠模型毛囊的影响[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2020, 36(8):461-466.
- Wen X H, Zhang G F, Pan L, et al. Effect of leptin on androgenetic alopecia mouse model [J]. *Chin J Lepr Skin Dis*, 2020, 36(8):461-466.
- [34] 张秀君, 张明欣, 王艳, 等. 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[J]. *中草药*, 2024, 55(14):4782-4795.
- Zhang X J, Zhang M X, Wang Y, et al. Pharmacodynamic material basis and mechanism of Yufa Gel on androgenetic alopecia mice based on ingredients absorbed through skin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(14):4782-4795.
- [35] 彭丽媛. 脱发的古代文献研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- Peng L Y. Ancient literature study on hair loss [D]. Beijing: China Academy of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [36] 孔艳丽, 金哲虎, 李初颖, 等. 人参皂昔 Rb1 对环磷酸腺苷衍生物 4-HC 所致化疗脱发推演模型的保护作用初探[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2023, 37(4):377-384.
- Kong Y L, Jin Z H, Li C Y, et al. Protective effect of Ginsenoside Rb1 on the deduced model of chemotherapy-induced alopecia by cyclophosphamide derivative 4-HC: a preliminary study [J]. *Chin J Dermatovenereol*, 2023, 37(4):377-384.
- [37] Murata K, Takeshita F, Samukawa K, et al. Effects of ginseng rhizome and ginsenoside Ro on testosterone 5 $\alpha$ -reductase and hair re-growth in testosterone-treated mice [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(1):48-53.
- [38] Shin H S, Park S Y, Hwang E S, et al. Ginsenoside F2 reduces hair loss by controlling apoptosis through the steroid regulatory element-binding protein cleavage activating protein and transforming growth factor- $\beta$  pathways in a dihydrotestosterone-induced mouse model [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(5):755-763.
- [39] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展[J]. *中国医药科学*, 2011, 1(8):32-34.
- Chen J Y, Wang C, Wang J, et al. Progress of MAPK signaling pathway [J]. *Chin Med Pharm*, 2011, 1(8):32-34.
- [40] 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.
- Sun J L, Lv X X. Pathogenesis and treatment progress of androgenetic alopecia [J]. *J Inner Mongolia Med Univ*, 2020, 42(1):106-108, 112.