

DOI: 10.12287/j.issn.2096-8965.20260310

鹅不食草醇提物通过上调 β -catenin和Gli-1促毛发生长

陈楚莹^{1,2}, 林于琳², 郭濠榜², 庞燕春^{1,2}, 刘永强^{1,2*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006;

2. 广州中医药大学, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006)

【摘要】目的 脱发严重影响患者的心理健康和生活质量。本研究旨在评价鹅不食草醇提物 (ECM) 对小鼠毛发生长的促进作用, 并初步探讨其改善毛发生长的机制。**方法** 采用超声辅助方法制备 ECM 并利用高效液相色谱法 (HPLC) 检测其主要成分。将 ECM 与乳膏基质混合, 制得 5% 和 10% 浓度的 ECM 乳膏。按如下分组给药: 乳剂对照组、5% ECM 组、10% ECM 组、米诺地尔组, 连续给药 21 天, 分别于第 1、7、14 和 21 天记录毛发生长情况。实验结束后取背部皮肤组织, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色、免疫组化 (IHC)、免疫印记 (WB) 及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析检测毛囊形态及 β -连环蛋白 (β -catenin)、神经胶质瘤相关癌基因同源物 1 (Gli-1) 的表达水平, 探究 ECM 促小鼠毛发生长效果与作用机制。**结果** ECM 主要含有短叶老鹳草素 A、芦丁、绿原酸、异绿原酸等成分。5% ECM 组与米诺地尔组均显著促进毛发生长, 效果相当; 10% ECM 组效果较弱。组织学显示, 5% ECM 组毛囊数量增多、毛球膨大, 接近米诺地尔组水平。分子检测表明, ECM 与米诺地尔组中 β -catenin与Gli-1的蛋白及mRNA表达均显著上调, 且5% ECM组优于10% ECM组。**结论** ECM可有效促进小鼠毛囊发育与毛发生长, 可能与其上调 β -catenin和Gli-1表达水平有关。因此, 本研究为鹅不食草作为潜在的促进毛发生长药物的研发提供了理论依据。

【关键词】 鹅不食草; 毛发生长; 脱发; β -连环蛋白; 神经胶质瘤相关癌基因同源物 1

中图分类号: R285.5, R758.71

文献标识码: A

文章编号: 2096-8965 (2026) 03-0083-10

Ethanol extract of *Centipeda minima* promotes hair growth by upregulating β -catenin and Gli-1

Chen Chuying^{1,2}, Lin Yulin², Guo Haobang², Pang Yanchun^{1,2}, Liu Yongqiang^{1,2*}

[1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, China]

【Abstract】Objective Alopecia significantly impacts patients' mental health and quality of life. This study aimed to evaluate the hair growth-promoting effect of the ethanol extract of *Centipeda minima* (ECM) and to preliminarily investigate its underlying mechanism. **Methods** ECM was prepared using ultrasonic-assisted extraction and its main constituents were examined by high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequently, ECM was formulated into 5% and 10% creams with a cream matrix. Mice were randomly divided into four groups: vehicle control, 5% ECM, 10% ECM, and minoxidil. Treatments were applied topically for 21 consecutive days. Hair growth was monitored and recorded on days 1, 7, 14, and 21. At the end of the experiments, dorsal skin tissues were collected for

收稿日期: 2026-02-10; 修回日期: 2026-03-04

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021B1515140052)

通信作者: 刘永强 (1984-), 男, 山东泰安人, 副研究员, 主要从事中草药治疗肿瘤分子机理与有效成分方面的研究, E-mail: liuyq@gzucm.edu.cn

hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemistry (IHC), Western blotting, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analyses. These analyses were performed to examine hair follicle morphology and the expression levels of β -catenin and glioma-associated oncogene homolog 1 (Gli-1), aiming to elucidate ECM's hair growth-promoting effects and mechanisms. **Results** Phytochemical analysis revealed that the major constituents of ECM included brevilin A, rutin, chlorogenic acid, and isochlorogenic acid. Both the 5% ECM and minoxidil groups significantly promoted hair growth, exhibiting comparable efficacy, while the 10% ECM group showed a relatively weaker effect. Histological examination revealed an increased number of hair follicles and enlarged hair bulbs in the 5% ECM group, similar to the minoxidil group. Molecular analyses demonstrated significant upregulation of both protein and mRNA expression levels of β -catenin and Gli-1 in the ECM-treated and minoxidil groups, with the 5% ECM group exhibiting superior effects compared to the 10% ECM group. **Conclusion** ECM effectively promotes hair follicle development and hair growth in mice, likely associated with its upregulation of β -catenin and Gli-1 expression. Therefore, this study provides a theoretical basis for the development of *Centipeda minima* as a potential hair growth-promoting drug.

【Keywords】 *Centipeda minima*; Hair growth; Alopecia; β -catenin; Gli-1

毛囊不仅是毛发生长的基本单位,还在皮肤屏障构建、免疫调节及组织修复中发挥多重功能,其周期性活动直接决定毛发的生长状态^[1]。近年来,受生活节奏加快、环境压力增大等因素影响,脱发问题日益普遍,已成为全球关注的公共卫生议题^[2]。研究^[3]表明,毛囊微型化及周期紊乱是多种脱发类型的核心病理特征。目前临床常用药物如米诺地尔和非那雄胺虽有一定疗效,但仍存在局限性,包括个体响应差异大、停药后易复发、长期使用可能引发头皮刺激或系统性副作用(如性功能障碍)等^[4-5]。因此,发掘安全、高效且来源天然的促毛发生长活性物质,具有重要的临床意义。

现有研究^[6-7]证实,毛囊周期的精确调控依赖于多条信号通路的协同作用,其中Wnt/ β -catenin与刺猬基因(Hedgehog, Hh)/Gli通路的交互尤为关键。 β -catenin作为Wnt通路的核心转录共激活因子,可通过核转位启动下游基因(如c-Myc、Cyclin D1)表达,驱动毛囊干细胞(Hair follicle stem cells, HF-SCs)从休止期进入生长期。神经胶质瘤相关癌基因同源物1(Glioma-associated oncogene homolog-1, Gli-1)则是Hh通路的主要效应转录因子,参与毛囊形态发生及干性维持^[8-9]。值得注意的是, β -catenin与Gli-1可形成蛋白复合物,协同增强彼此的核定位与转录活性,构成正反馈调控环路,在发育与再生过程中发挥协同作用^[10]。

天然产物因其成分多样、生物相容性好、毒副作用低等优势,成为新型促毛发生长药物研发的重要资源^[11]。鹅不食草为菊科一年生草本植物,传统

中医用于通鼻窍、散风寒、消肿止痛^[12]。现代药理研究^[13-14]表明,其富含黄酮类、萜类及酚酸等活性成分,具有抗炎、抗氧化、改善微循环及调节细胞增殖等作用,但其在毛发生长调控机制及临床应用尚未有明确研究。

报道^[15]显示,来源于鹅不食草的倍半萜化合物短叶老鹳草素A具有促毛发生长效果,但获取单一小分子效率低且获取成本较高。单一靶向药物如非那雄胺容易导致靶点适应性改变或耐药性,而多成分协同作用可能降低毛囊对单一机制的适应性,提供更持久的疗效。研究^[16]表明,植物提取物中的多种活性成分往往通过协同作用共同调节Wnt/ β -catenin、Hh/Gli、PI3K/AKT等信号通路。与单一化合物相比,鹅不食草醇提物(Ethanol extract of *Centipeda minima*, ECM)保留了植物中丰富的化学成分如黄酮类、萜类、甾体、酚酸等,且易于制备^[17]。鹅不食草作为传统中药,临床上主要采用干燥全草煎汤或研粉服用,而使用醇提物是现代中药制剂的常见形式,能在浓缩有效成分的同时保留了药物的整体性,为开展本研究提供了一定的依据。基于此,本研究拟通过小鼠脱毛模型,与临床上常用的脱发治疗药物米诺地尔进行对比,结合组织学与分子生物学手段,系统评估ECM对毛发生长的影响,并聚焦于 β -catenin和Gli-1的调控作用,为其作为新型抗脱发药物的开发及未来的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

选取24只4周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,体

重 (20±2) g, 购自诺航生物技术研究院徐州有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2021-0009; 动物质量合格证号: B202504270482]。所有动物实验经广州中医药大学中药学院伦理委员会批准 (批准号: ZYD-2025-062), 饲养于SPF级屏障环境中, 温度 20°C~26°C, 湿度 40%~70%, 12 h 明暗循环, 自由摄食饮水。

1.2 实验试剂及仪器

鹅不食草全草干燥粉末 (20211130, 北京同仁堂有限公司, 中国); 甲醇 (色谱纯) (67-56-1, Sigma-Aldrich, 美国); 异丙醇 (分析纯) (67-63-0, 天津市大茂化学试剂公司, 中国); 无水乙醇 (分析纯) (64-17-5, 大茂化学试剂厂, 中国); 绿原酸 (WKQ-0000358, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 咖啡酸 (WKQ-0001331, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 异绿原酸 A (WKQ-0030236, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 异绿原酸 B (WKQ-0000921, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 异绿原酸 C (WKQ-0000020, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 短叶老鹳草素 A (WKQ-0002569, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 芦丁 (WKQ-00348, 四川维克奇生物科技有限公司, 中国); 蛋白酶抑制剂混合液 (P001, 苏州新赛美生物科技有限公司, 中国); 磷酸酶抑制剂混合液 (P003, 苏州新赛美生物科技有限公司, 中国); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BL521A, 白鲨生物科技有限公司, 中国); RIPA 裂解液 (FD008, 杭州弗德生物科技有限公司, 中国); 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) (PB180327, 普诺赛生命科技有限公司, 中国); 硬脂酸 (S30473, 上海源叶生物科技有限公司, 中国); 单硬脂酸甘油酯 (S30304, 上海源叶生物科技有限公司, 中国); 医用凡士林 (8009-03-8, 天津市大茂化学试剂公司, 中国); 十六醇 (S24198, 上海源叶生物科技有限公司, 中国); 对羟基苯甲酸乙酯 (Q/12HB 3806-2010, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 中国); 甘油 (G8190, 索莱宝科技有限公司, 中国); 十二烷基硫酸钠 (FD2040, 杭州弗德生物科技有限公司, 中国); 多聚甲醛 (30525-89-4, 大茂化学试剂厂, 中国); TO 型生物制片透明剂 (SJ2510-1, 广西岑溪市松香场, 中国); 中性树胶 (G8590, 索莱宝科技有限公司, 中国); 苏木素伊红 (Hematoxylin and Eosin, HE) 染色试剂盒 (G1120, 索莱宝科技有限公司, 中国); 米诺地尔 (浙江万晟药业有限公司, 中国); 增强型 ECL 化学发光检测试剂盒 (E432, 诺

唯赞生物科技股份有限公司, 中国); HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (BL003A, 白鲨生物科技有限公司, 中国); Gli-1 兔单克隆抗体 (AF6990, 碧云天生物科技有限公司, 中国); β -catenin 兔单克隆抗体 (#8480, Cell Signaling Technology, 美国); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) (GTX100118, GeneTex, 美国); 柠檬酸钠抗原修复液 (50 $\times$) (C1032, 索莱宝科技有限公司, 中国); 总 RNA 提取试剂盒 (RC112-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国)。

旋转蒸发仪 (RE-85Z, 上海予正仪器设备有限公司, 中国); 恒温水浴锅 (DK-8D, 上海一恒科技有限公司, 中国); 真空冷冻干燥机 (LC-10N-50D, 力辰邦西仪器科技有限公司, 中国); 电子天平 (SQP, 赛多利斯科学仪器有限公司, 中国); 移液枪 (CC-7858-01, 德国艾本德股份公司, 德国); 高速微量冷冻离心机 (CF1524R, 赛洛捷克公司, 美国); EPOCH2 全波长酶标仪 (BioTek, 美国); eBlot™ L1 快速湿转仪 (南京金斯瑞生物科技有限公司, 中国); 化学发光成像系统 (GelView 6000Pro II, 广州博鹭腾生物科技有限公司, 中国); 石蜡组织包埋机 (E0987, 上海碧云天生物技术股份有限公司, 中国); 超低温冰箱 (DW-86L826G, 青岛海尔生物医疗股份有限公司, 中国); 实时荧光定量 PCR 仪 (C1000, BIO-RAD, 美国); 多模块逆转录 PCR 仪 (ProFlex, 赛默飞世尔科技公司, 美国); 宠物剃毛器 (CP-9600, 科德士电器有限公司, 中国)。

2 方法

2.1 鹅不食草醇提物乳膏制备

取鹅不食草干粉, 按 1 : 6 (g/mL) 比例加入 95% 乙醇, 室温浸渍过夜, 次日超声提取 1 h (每 10 min 搅拌 1 次), 滤液经旋转蒸发浓缩后冷冻干燥, 得 ECM 粉末, 4°C 保存。

乳膏基质由油相 (硬脂酸、凡士林、单硬脂酸甘油酯、十六醇、羟苯乙酯) 与水相 (甘油、十二烷基硫酸钠、纯水) 在 70°C 下乳化制得。将 ECM 溶于无水乙醇后, 按比例等质量混入基质, 分别配制成 5% 与 10% ECM 乳膏, 4°C 备用。

2.2 动物分组与给药

小鼠适应性饲养 1 周后, 背部剃毛处理。随机分为四组 ($n=6$): 乳剂对照组、5% ECM 组、10% ECM 组、5% 米诺地尔组。按照 1 mg/g 体重在小鼠背部剃毛区域每日涂抹上述乳膏制剂, 持续 21 天。于第 1、7、14、21 天拍照记录毛发生长, 利用 Image J

软件计算新生毛发覆盖率(=新生毛发面积/脱毛总面积×100%)。实验结束处死小鼠,取背部皮肤分3份:4%多聚甲醛固定(石蜡切片)、液氮速冻(-80℃保存,用于Western blotting与qRT-PCR)。在后续的实验验证中,因个体差异导致部分动物样品出现数值异常,每组去掉一个异常值,最终以每组5只纳入统计分析。

2.3 HE染色

将已经被充分固定的皮肤组织使用梯度乙醇(70%、80%、85%、90%、95%、100%、100%)去除组织内的水分,通过浸泡TO型生物制片透明剂去除残余乙醇后,将组织放在溶解石蜡中浸泡1 h。将组织样品放入包埋模具内待石蜡凝固,使用石蜡切片机将包埋组织切成薄片并放置于载玻片上。将皮肤组织石蜡切片浸入TO型生物制片透明剂中脱蜡2次,随后使用梯度乙醇(100%、95%、90%、80%、70%)各水化5 min,水化结束后用流动纯水轻轻冲洗切片5 min。染色阶段:擦去切片周围多余水分,在苏木素染液中浸染3 min,置于流动纯水下冲洗5 min;滴加1%的盐酸乙醇分化液促分化处理60 s,使用1%氨水溶液促蓝化反应10 s,置于流动纯水下冲洗5 min;滴加伊红染液复染1 min,使用流动纯水洗涤5 min。将切片置于梯度乙醇(70%、80%、90%、100%、100%)各脱水处理5 min,随后使用TO型生物制片透明剂将切片进行透明化处理2 min,重复2次。待切片自然晾干后,使用中性树胶进行封片操作,最后通过病理组织切片自动扫描仪记录图像,对各治疗组小鼠皮肤的毛囊发育情况进行观察并分析。

2.4 免疫组化(Immunohistochemistry,IHC)

将皮肤组织石蜡切片置于60℃恒温箱10 min,使用TO型生物制片透明剂对切片脱蜡2次,每次5 min。切片经过梯度乙醇(100%、95%、90%、80%、70%)各处理5 min进行水化,随后使用纯水洗涤3次各5 min。采用微波修复法将切片置于1×柠檬酸钠修复液中,在高功率下微波炉加热煮沸后调至中功率维持微沸状态15 min,待切片自然冷却至室温后置于纯水中洗涤2 min,再置于PBS中洗涤3次,各2 min。吸弃组织切片周围水分,滴加3% H₂O₂溶液并在室温环境下孵育15 min,阻断内源性过氧化氢酶,PBS洗涤2次,各5 min。往组织上滴加10%正常山羊血清封闭液,室温孵育30 min。吸弃封闭液,滴加按1:200比例稀释的一抗,于4℃冰箱孵育过夜。

第二日,使用PBS将切片洗涤4次,各5 min,按1:100的比例滴加与一抗对应种属的二抗,放置

室温下孵育30 min,再次使用PBS洗涤3次,各2 min。擦去切片周围多余水分,滴加按1:100比例稀释的SABC-POD工作液,室温孵育30 min,PBS洗涤3次各5 min。擦去多余水分后,滴加新鲜配制的比例为A液:B液:PBS=1:1:20的DAB显色液,室温显色30 s,滴加纯水进行终止。往组织上滴加苏木素染液孵育15 s进行复染,纯水洗涤5 min。依次使用梯度酒精(80%、90%、95%、100%)对切片进行脱水处理各1 min,随后使用TO型生物制片透明剂进行透明,待切片晾干后使用中性树胶进行封片,最后在光学显微镜下进行图像采集、阳性细胞计数及统计学分析。

2.5 Western blotting检测

称取适量皮肤组织放入研钵中,加入液氮并快速研磨成粉末状,将样品转移至无菌1.5 mL离心管内,加入适量含有1%蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂及苯甲磺酰氟的RIPA裂解液,于冰上裂解30 min,在4℃条件下12 000 rpm离心10 min。取上清液,使用BCA试剂盒对各样品进行总蛋白定量,剩余上清按4:1的比例加入5×上样缓冲液,在100℃条件下加热变性10 min。配制10% SDS-PAGE凝胶,量取30 μg总蛋白样品上样,经SDS-PAGE电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,1×TBST缓冲液洗涤后滴加一抗β-catenin(1:3 000)、Gli-1(1:3 000)、GAPDH(1:4 000),在4℃冰箱孵育过夜。次日用1×TBST缓冲液洗涤,滴加与一抗对应种属的二抗(兔源),室温孵育2 h。使用超敏ECL化学发光试剂盒对条带进行显影,采用Image J分析软件量化各蛋白的灰度值,并以GAPDH为标准定量分析目的蛋白表达值。

2.6 qRT-PCR检测

取20 mg皮肤组织于液氮中快速研磨成粉状,加入Buffer RL裂解液500 μL并充分涡旋至无明显颗粒后,按照总RNA提取试剂盒操作对样品进行RNA提取和纯化,经浓度和纯度测定后,对样品进行逆转录,反应体系与程序见表1、表2。以Actin为管家基因,进行qRT-PCR检测,反应体系与程序见表3~5。

表1 逆转录配置反应体系

Table 1 Reverse transcription reaction system	
组分	体积
2 × RT Mix	10 μL
HiScript® Enzyme Mix	2 μL
Oligo (dT) (50 μmol/L)	1 μL
Random hexamers (50 ng/μL)	1 μL
总 RNA	1 μg
RNase-free ddH ₂ O	补足至20 μL

表2 逆转录反应程序
Table 2 Reverse transcription program

温度(℃)	时间
25	5 min
50	15 min
85	5 s

表3 qRT-PCR 配制反应体系
Table 3 qRT-PCR reaction system

组分	体积(μL)
2×AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10
正向引物 (10 μmol/L)	0.4
反向引物 (10 μmol/L)	0.4
cDNA	1
RNase-free ddH ₂ O	up to 20

表4 引物序列
Table 4 Primer sequences

基因名称	正向引物(5'端-3'端)	反向引物(3'端-5'端)
<i>Actin</i> (Mouse)	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC
β -catenin(Mouse)	GCTGCTGTCCTATTCCGAATGTCTG	GGCACCAATGTCCAGTCCAAGATC
<i>Gli-1</i> (Mouse)	GGTGTGTAATTACGTTTCAGTCG	GGATAGGAGCCTGATTTGTGAT

表5 qRT-PCR 配制反应程序
Table 5 qRT-PCR program

程序	温度(℃)	时间
预变性	95	5 min
	95	10 s
	60	30 s
	95	15 s
循环反应(40 cycles)	60	30 s
	95	15 s
	60	60 s
溶解曲线	95	15 s

按上述条件进行反应, 得出Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的表达水平。

2.7 ECM 化学成分分析

采用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对所制备的ECM进行化学成分分析, 称取10 mg的ECM固态样品, 加入1 mL甲醇室温超声溶解30 min后过0.22 μm微孔滤膜除

菌, 避光贮存。使用7种标准品作为参照, 包括咖啡酸、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、芦丁和短叶老鹳草素A, 使用甲醇把上述标准品制备成表5中相应浓度的母液, 根据HPLC检测灵敏度, 在1 mL甲醇里面各加入1~5 μL的标准品母液, 过0.22 μm微孔滤膜除菌并避光贮存, 即得混合标准品, 用于对ECM进行质控的HPLC分析中。

选用Waters E2695 Alliance HPLC液相色谱仪配合Acclaim™ 120 (5 μm, 4.6×250 mm) 色谱柱进行表征。流动相: A为0.2%乙酸; B为乙腈(v/v)梯度洗脱。体积流量为1 mL/min; 进样量30 μL (最大进样量不超过50 μL); 检测波长为254 nm; 柱温为室温。洗脱顺序: 初始条件90% 0.2%乙酸; 0~13 min, 90%~89% 0.2%乙酸; 13~18 min, 89%~85% 0.2%乙酸; 18~40 min, 85%~74% 0.2%乙酸; 40~45 min, 74%~63% 0.2%乙酸; 45~52 min, 63%~

表6 标准品浓度
Table 6 Standard concentrations

标准品类型	咖啡酸	绿原酸	异绿原酸A	异绿原酸B	异绿原酸C	芦丁	短叶老鹳草素A
标准品母液浓度(mg·mL ⁻¹)	3.2	3	5.2	3	3	3.6	2.5
标准品工作浓度(μg·mL ⁻¹)	3.2	15	52	15	15	18	50

47% 0.2%乙酸; 52~65 min, 47% 0.2%乙酸。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.3.0软件对数据进行统计学分析和绘图。实验数据均满足正态分布, 故以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组不同时间点小鼠背部

毛发覆盖面积/脱毛区域总面积的比例变化采用重复测量设计方差分析, 其余指标均采用单因素方差分析, 多重比较采用Dunnnett-t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blotting条带灰度值使用Image J软件分析。

3 结果

3.1 ECM中主要化学成分测定

采用HPLC对ECM的主要成分进行鉴定。通过比较ECM与混合标准对照品（包括咖啡酸、短叶老鹳草素A、芦丁、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸

B、异绿原酸C）的色谱图，色谱峰保留时间对比明确样品ECM中所含的主要成分包括绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、芦丁等成分（见图1），这些成分的存在与已有研究结果相一致^[17-19]，其中含量较高的倍半萜类、酚酸类、黄酮类有可能是ECM的活性物质。

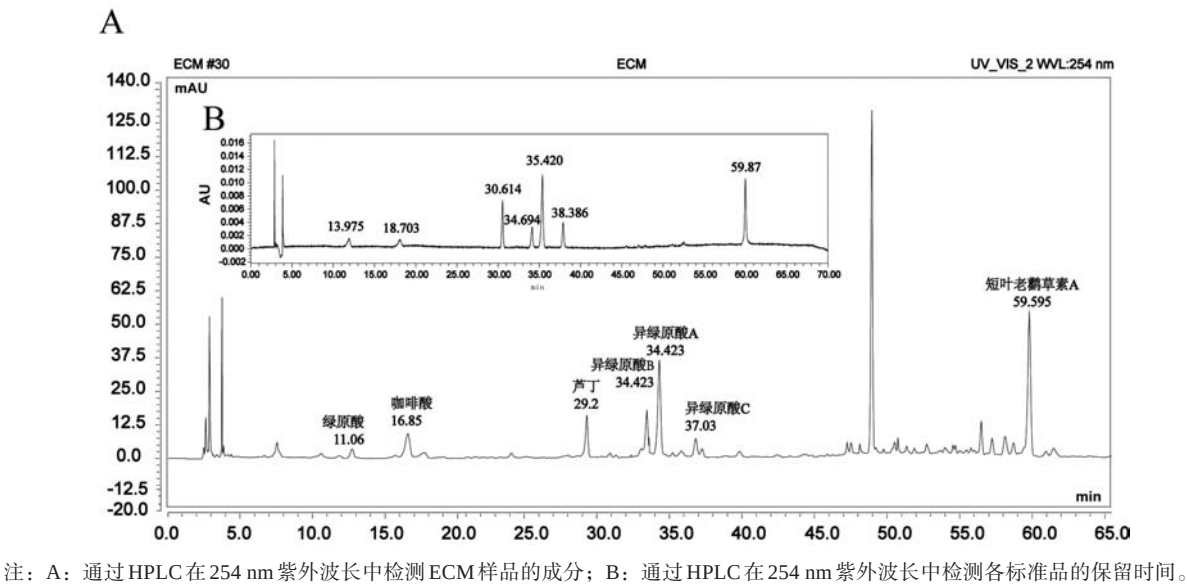
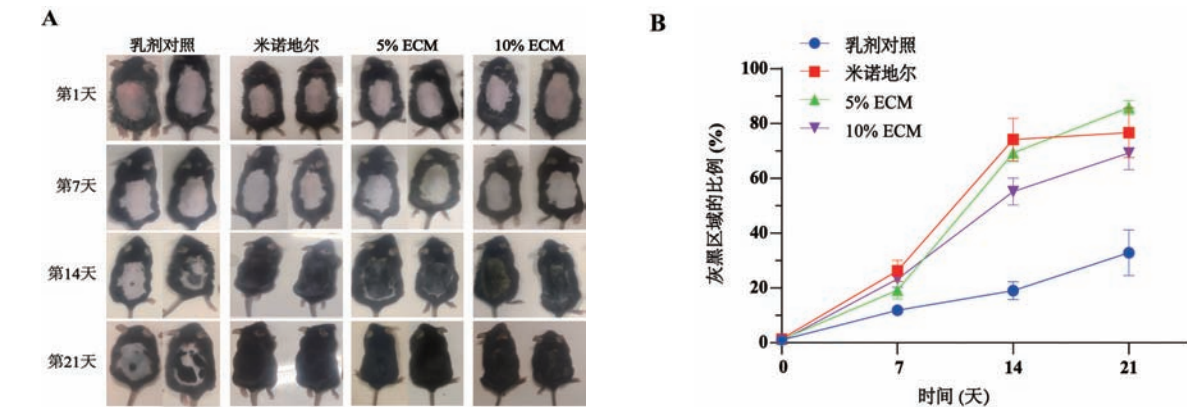


图 1 ECM的HPLC分析图
Figure 1 HPLC chromatogram of ECM

3.2 ECM对小鼠皮肤毛发生长的影响

为评估ECM对小鼠皮肤毛发生长的影响，在给药的第1、7、14、21天观察各处理组小鼠背部的药物处理区域的皮肤颜色和毛发生长变化。结果如图2显示，给药7天时，与乳剂对照组比较，5% ECM组和5%米诺地尔组的小鼠皮肤整体转成灰黑色，10% ECM组变化较缓；在第14天时，乳剂对照组小鼠背部仅出现小面积的黑色素沉着，同时毛发生长面积

相对较小，5% ECM组和5%米诺地尔组的毛发覆盖明显，而10% ECM组的毛发生长覆盖一般。至21天时，乳剂对照组的皮肤仍有较明显的粉色区域，且仅有少量毛发覆盖，其余处理组小鼠背部毛发生长茂密、颜色黑亮有光泽。但在ECM处理组内，10% ECM处理后的小鼠头背部衔接处仍有界限，且毛发生长缓慢。实验结果表明，5% ECM对小鼠皮肤毛发生长具有良好的促进作用，并且其效果与米诺地



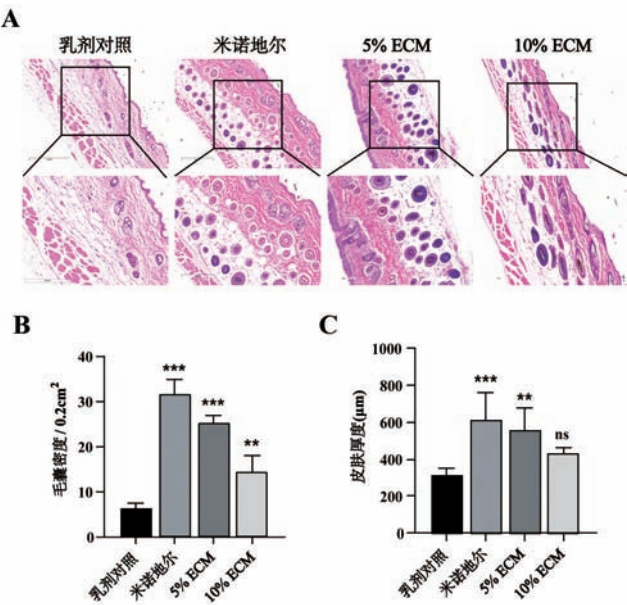
注：A：各组随机选取2个代表性样本拍照图；B：脱毛后7、14、21天，各组小鼠背部毛发覆盖面积/脱毛区域总面积的占比， $\bar{x} \pm s$, $n=5$ 。与乳剂对照组比较：*** $P < 0.001$ 。

图 2 ECM对小鼠皮肤的毛发生长情况的影响
Figure 2 Effects of ECM on hair growth in mouse skin

尔相当。

3.3 ECM对小鼠皮肤毛囊的影响

毛囊的生长发育对于毛发生长至关重要, 因此对各组小鼠的皮肤组织进行了HE染色, 以进一步探讨ECM对小鼠皮肤毛囊形态的改变的影响, 证实ECM促进毛发生长的作用。实验结果如图3所示, 与乳剂对照组比较, 5%米诺地尔组与5% ECM组显著提升了小鼠皮肤的毛囊数量 ($P < 0.001$) 和皮肤厚度 ($P < 0.01$), 同时毛囊的毛球部呈现明显的膨出, 毛干结构清晰, 且毛干远端接近毛囊口。而10% ECM组的毛囊毛球膨胀情况和皮肤厚度较5% ECM组均有所减弱。这些结果表明, ECM能够改善毛囊的发育条件, 调控毛囊生长周期, 从而促进毛发生长。



注: A: 每组挑选一个代表性HE图片 (放大倍数分别为10×和20×); B: 各组样品在20×视野下的毛囊数量统计图; C: 各组样品的皮肤厚度统计图。各组随机选取5个视野进行病理学评分并计算平均值, $\bar{x} \pm s$, $n=5$ 。与乳剂对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计学意义。

图3 ECM对小鼠皮肤毛囊生长发育的影响(HE染色, ×200)
Figure 3 Effects of ECM on growth and development of hair follicles in mouse skin (HE staining, magnification ×200)

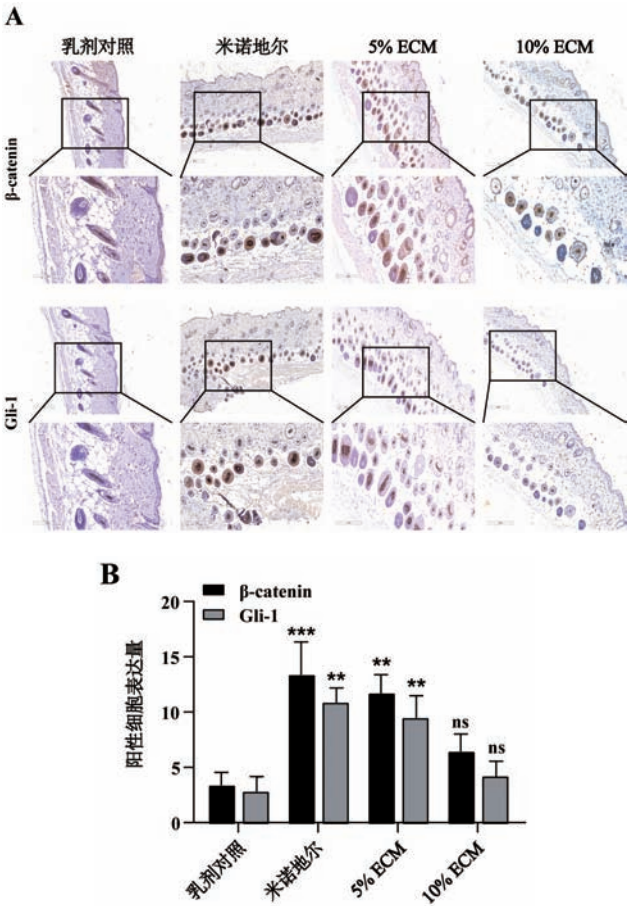
3.4 ECM对小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1阳性表达的影响

β-catenin和Gli-1均是促进毛囊发育和毛发生长的关键转录因子, 所以研究通过IHC实验检测并分析β-catenin、Gli-1在皮肤组织中的阳性表达变化。实验结果如图4, 药物治疗组的β-catenin、Gli-1阳性信号均高于乳剂对照组, 并且5% ECM组与米诺地尔组 ($P < 0.01$) 明显优于10% ECM组, 表明ECM可通过上调β-catenin和Gli-1的蛋白表达, 正向调控

小鼠皮肤组织中的毛囊发育与毛发生长。

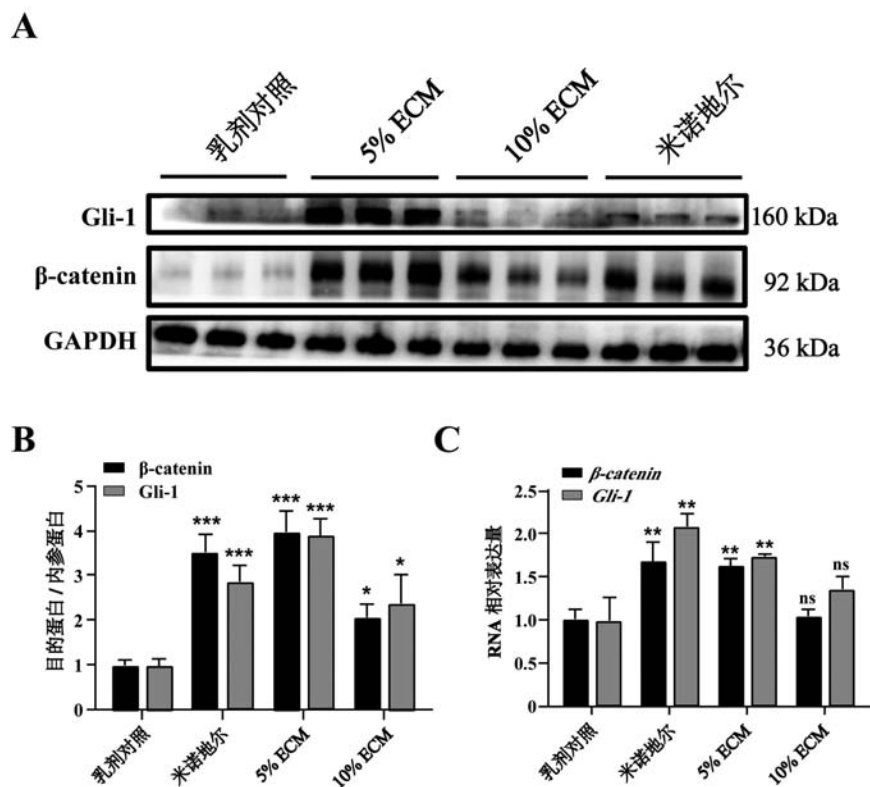
3.5 ECM对小鼠皮肤中β-catenin、Gli-1蛋白及mRNA表达的影响

为了更好地探究ECM对皮肤毛发生长的作用机制, 通过Western blotting和qPCR实验分析了促进毛发生长相关基因及蛋白β-catenin、Gli-1在皮肤组织中的表达。Western blotting结果如图5A和图5B所示, 5% ECM组与5%米诺地尔组小鼠皮肤组织的β-catenin、Gli-1蛋白表达显著高于乳剂对照组 ($P < 0.01$), 且优于10% ECM组 ($P < 0.05$)。qPCR结果与Western blotting结果相近, 5% ECM治疗组上调了皮肤组织中β-catenin和Gli-1的mRNA表达水平 ($P < 0.01$), 而10% ECM治疗组对于这两种基因的调控作用未表现出明显效果 (见图5C)。这些结果进一步表明, ECM通过作用于β-catenin和Gli-1的基因及蛋白表达, 发挥对毛囊发育的调控作用。



注: A: IHC染色观察各组小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1蛋白阳性表达 (×20); B: 各组IHC染色的β-catenin、Gli-1阳性表达统计图。 $\bar{x} \pm s$, $n=5$, 与乳剂对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计学意义。

图4 ECM对小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1蛋白表达的影响
Figure 4 Effects of ECM on protein expression of β-catenin and Gli-1 in mouse skin tissues



注：A：Western blotting 实验检测各组小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1 蛋白表达水平；B：蛋白条带灰度值统计分析结果；C：qPCR 实验检测各组小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1 的 mRNA 表达。 $\bar{x} \pm s$, $n=5$, 与乳剂对照组比较：* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns：差异无统计学意义。

图 5 ECM 对小鼠皮肤组织中β-catenin、Gli-1 表达的影响
Figure 5 Effects of ECM on expression of β-catenin and Gli-1 in mouse skin tissues

4 讨论

目前脱发的全球发病率持续攀升，已成为重要的公共卫生问题^[20]。当前主流的临床治疗药物米诺地尔与非那雄胺等，在长期应用中存在疗效波动、停药复脱及潜在不良反应等瓶颈^[21-22]。因此开发作用机制新颖、安全性更优的替代疗法是领域内亟待突破的方向。

毛囊生长周期的稳态依赖于多种信号通路的协同调控，其中 Wnt/β-catenin 与 Hedgehog/Gli 通路的交叉调控是激活毛囊干细胞、启动生长期的核心机制^[23]。β-catenin 作为 Wnt 通路的核心效应分子，其核内积累可直接启动 HFSCs 增殖与周期进程的基因如 *c-Myc*、*Cyclin D1* 的表达，推动毛囊从休止期进入生长期^[24-25]；而 Gli-1 作为 Hh 通路的关键转录因子，则对毛囊基质细胞的增殖分化和毛囊周期的持续循环至关重要^[26-28]。鹅不食草作为传统中药材，在外用治疗上，前期研究证明了来源于鹅不食草的倍半萜类化合物在临床试验中有较好的促毛发生长效果^[29]，但单一成分提取率较低，且有潜在毒副

作用。因此，本研究利用富含倍半萜和酚酸类的鹅不食草醇提物探究其治疗脱发的潜能。

本研究发现，5% ECM 组可显著上调小鼠皮肤组织中β-catenin 与 Gli-1 的蛋白及 mRNA 表达，发挥促毛发生长作用，且效果与阳性对照米诺地尔相当。值得注意的是，10% ECM 组的作用反而减弱，这提示 ECM 的效应并非简单的浓度依赖，而可能存在一个最佳的有效浓度窗口。在生物科学研究中，植物提取物普遍存在双向剂量效应。有研究^[30]表明，倍半萜类化合物在高浓度下可破坏线粒体膜电位，诱导毛囊角质形成细胞凋亡。毛囊隆起区干细胞对氧化应激敏感，过量 ROS 可激活 p53 通路，抑制β-catenin 的核转位，甚至触发毛囊提前进入退行期^[31]。其次，Wnt/β-catenin 通路的高度激活往往伴随负反馈调节。研究^[32]表明，过度的β-catenin 稳定性会触发转录反馈回路，诱导糖原合酶激酶 3β（Glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）再激活，形成对 Wnt 信号的“脱敏”状态。这提示未来制剂开发可聚焦于纳米包裹技术或缓释制剂的开发，避免持续高浓度刺激引发的负反馈反应。

本研究揭示了ECM与 β -catenin/Gli-1表达上调的相关性, 但ECM如何启动这一上调过程的上游机制尚未阐明。Wnt/ β -catenin通路的激活核心在于抑制GSK-3 β , 防止其磷酸化 β -catenin并导致其降解。在毛囊生长相关研究中, 鹅不食草乳化液提取物能够促进GSK-3 β 的磷酸化失活, 导致 β -catenin在胞质中积累并转入细胞核, 从而启动毛囊干细胞的增殖和生长期转化^[33]。有研究^[34]指出, β -catenin的激活能够诱导Gli-1的表达, 提示Wnt信号与Hh通路的效应因子Gli-1的正反馈效应。因此, 本研究推测, ECM通过启动Wnt通路可能间接导致Gli-1的上调, 从而协同促进毛囊生长, 后续将继续深入研究ECM对Wnt通路与Hh通路的具体分子机制。本研究仍存在一定局限性: 首先, 缺乏病理脱发模型如雄激素性脱发模型以验证疗效; 其次, 未通过细胞实验进一步明确药物调控该通路的直接靶点。此外, 鹅不食草虽是临床治疗过敏性鼻炎治疗的常用药物, 但长期皮肤用药的安全性及透皮吸收后的是否具有潜在毒性还需要进一步探讨。后续将针对ECM对病理模型的治疗效果、细胞实验验证通路靶向性和长期毒性实验综合评估ECM在疾病状态下的疗效。

目前已知的天然防脱发产品, 如具有抑菌促毛发生长作用的侧柏叶搭配以补益精血著称的何首乌^[35], 常用于制备治疗血热型脱发的外用制剂, 但何首乌潜在的肝毒性为长期安全应用带来一定顾虑^[36]。与这些常规中药相比, ECM作为天然植物提取物, 通过调控 β -catenin/Gli-1交叉通路发挥作用, 这种复合型提取物可能比单一成分更有疗效; 乳膏剂型制备工艺简单、成本较低, 为制备新型脱发治疗药物提供较为理想的选择。基于以上发现, ECM在抗脱发防脱发产品开发中可能具有一定的医学转化潜力, 与侧柏叶等具有协同增效作用的中药提取物配伍开发, 可能实现多通路发挥促生发疗效的复方外用制剂。

5 结论

本研究揭示了鹅不食草醇提物具有发挥促毛发生长的潜能。通过一系列实验, 确认ECM对毛发生长具有显著促进作用, 且其作用机制可能与 β -catenin和Gli-1之间的交互关联有关。本研究为鹅不食草在中药现代化促生发领域的应用提供了新的实验证据和机制视角, 推动其向临床用药或功效型化妆品转化。

参考文献

- [1] LEE J H, CHOI S. Deciphering the molecular mechanisms of stem cell dynamics in hair follicle regeneration[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2024, 56(1): 110-117.
- [2] MOSTAGHIMI A, GAO W, RAY M, et al. Trends in prevalence and incidence of alopecia areata, alopecia totalis, and alopecia universalis among adults and children in a US employer-sponsored insured population[J]. *JAMA Dermatology*, 2023, 159(4): 411-418.
- [3] SELLAMI R, MASMOUDI J, OUALI U, et al. The relationship between alopecia areata and alexithymia, anxiety and depression: A case-control study[J]. *Indian Journal of Dermatology*, 2014, 59(4): 421.
- [4] SUCHONWANIT P, THAMMARUCHA S, LEERUNYAKUL K. Minoxidil and its use in hair disorders: A review[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 2777-2786.
- [5] DEVJANI S, EZEMMA O, KELLEY J K, et al. Androgenetic alopecia: Therapy update[J]. *Drugs*, 2023, 83(8): 701-715.
- [6] ZHANG K, ZHANG L Y, QIN X, et al. Integrated multiomics analysis reveals the molecular features and crucial regulators of hair follicles in yak (*Bos grunniens*)[J]. *Communications Biology*, 2026, 9(1): 190.
- [7] CHOI B Y. Targeting Wnt/ β -catenin pathway for developing therapies for hair loss[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14): 4195.
- [8] WANG X, LIU Y, HE J, et al. Regulation of signaling pathways in hair follicle stem cells[J/OL]. *Burns Trauma*, 2022, 10: tkac022.
- [9] ZHANG X, CHEN Y, DING P, et al. The SHH-GLI1 pathway is required in skin expansion and angiogenesis[J]. *Experimental Dermatology*, 2023, 32(7): 1085-1095.
- [10] ZINKE J, SCHNEIDER F T, HARTER P N, et al. β -Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma[J]. *Molecular Cancer*, 2015, 14(1): 17.
- [11] SANTOS Z, AVCI P, HAMBLIN M R. Drug discovery for alopecia: gone today, hair tomorrow[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015, 10(3): 269-292.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [13] 王雨轩, 张嘉怡, 张奕恒, 等. 鹅不食草化学成分与药理作用研究进展[J]. *陕西中医药大学学报*, 2025, 48(4): 1-11.
- [14] LIU J, ZHENG W, HE Y, et al. A review of the research applications of centipeda minima[J]. *Molecules*, 2023, 29(1): 108.

- [15] KIM B H, LEE W Y, TRINH T A, et al. Hair growth effect of emulsion extracted brevilin a, a jak3 inhibitor, from centipeda minima[J]. Processes, 2020, 8(7): 14.
- [16] TANG X, ZHANG T, WANG B, et al. Biotransformation of cacumen platycladi extract by lactiplantibacillus plantarum CCFM1348 promotes hair growth in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(20): 11493-11502.
- [17] LI S Y, ZHOU Y L, HE D H, et al. Centipeda minima extract exerts antineuroinflammatory effects via the inhibition of NF- κ B signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2020, 67: 153164.
- [18] 宋佳玲, 张泽, 赵泽丹, 等. 鹅不食草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 516-530.
- [19] WANG Y J, WANG X Y, HAO X Y, et al. Ethanol extract of Centipeda minima exerts antioxidant and neuroprotective effects via activation of the Nrf2 signaling pathway[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 9421037.
- [20] 王志彦, 张娜, 赖燕彬. 雄激素性脱发的发病机制以及药物治疗进展[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(6): 1032-1043.
- [21] KAISER M, ABDIN R, GAUMOND S I, et al. Treatment of androgenetic alopecia: Current guidance and unmet needs[J]. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 2023, 16: 1387-1406.
- [22] DOU J, ZHANG Z, XU X, et al. Exploring the effects of Chinese herbal ingredients on the signaling pathway of alopecia and the screening of effective Chinese herbal compounds[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 294: 115320.
- [23] ROSSI A, CANTISANI C, MELIS L, et al. Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents[J]. Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery, 2012, 6(2): 130-136.
- [24] RABBANI P, TAKEO M, CHOU W, et al. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration[J]. Cell, 2011, 145(6): 941-955.
- [25] HUELSKEN J, VOGEL R, ERDMANN B, et al. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin[J]. Cell, 2001, 105(4): 533-545.
- [26] MILL P, MO R, FU H, et al. Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development[J]. Genes and Development, 2003, 17(2): 282-294.
- [27] SUN X, ARE A, ANNUSVER K, et al. Coordinated hedgehog signaling induces new hair follicles in adult skin[J]. Elife, 2020, 9: e46756.
- [28] 范娜. 侧柏叶促毛发生长的药效物质基础及其作用机制[D]. 西安: 西北大学, 2022.
- [29] 表在星, 金旻佑, 朴南圭, 等. 天然物质的选择性萃取方法: CN113226345B[P]. 2023-10-03[2026-03-04].
- [30] LIU R, QU Z, LIN Y, et al. Brevilin a induces cell cycle arrest and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 594.
- [31] CHANDAR N, SALUJA R, LAMAR P C, et al. P53 and beta-catenin activity during estrogen treatment of osteoblasts[J]. Cancer Cell International, 2005, 5: 24.
- [32] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
- [33] KIM B H, LEE M J, LEE W Y, et al. Hair growth stimulation effect of Centipeda minima extract: Identification of active compounds and anagen-activating signaling pathways[J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 976.
- [34] HAN J, CHU W, LIN K, et al. β -catenin activation in Gli-1⁺ stem cells leads to reprogramming of the hair follicle[J]. European Journal of Dermatology, 2023, 33(6): 710-712.
- [35] 黄瑛杰. 基于中医传承辅助平台挖掘中药外用制剂治疗雄激素性脱发用药规律及雄激素性脱发(肝肾不足证)的临床疗效观察[D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- [36] 胡锡琴, 嵯君, 李娅琳, 等. 何首乌中二苯乙烯苷对大鼠肝酶及蛋白的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(5): 988-990.