



膳食补充磷脂型 EPA/DHA 结合蓝光照射对小鼠毛发再生的影响

李晓月¹, 王成成¹, 段学锋¹, 史豪豪¹,
王玉明^{1,2}, 薛长湖^{1,2}, 张恬恬^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为探究膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠毛发再生的影响, 实验以膳食补充结合蓝光照射方法, 以人工脱毛小鼠为实验对象, 建立毛发再生模型。雄性昆明小鼠背部脱毛后, 随机分为白光照射组、蓝光照射组、蓝光照射喂食 DHA-PLs 或 EPA-PLs 组, 每组 8 只。测量新生毛发的长度及覆盖率, 苏木精-伊红 (H.E) 染色观察毛囊形态及数量, 分析毛发再生相关因子的 mRNA 及蛋白表达水平, 初步探究作用机制。结果显示, 蓝光照射条件下, 膳食补充 EPA/DHA-PLs 可显著增加毛发长度及覆盖率, 毛发再生初期 DHA-PLs 的效果较优, 毛发再生后期显示 EPA-PLs 的效果最佳, 其作用机制可能与对毛囊周期的调节、血管内皮生长因子 VEGF 的表达升高及对成纤维细胞生长因子 18 (Fgf18) 的调控有关。本研究提示, 膳食补充 EPA/DHA-PLs 可增效蓝光照射对小鼠毛发再生的促进作用, 为水产品功能性脂质用于维护毛发健康提供科学依据。

关键词: 磷脂型 DHA/EPA; 毛发再生; 蓝光; 毛囊周期; 血管内皮生长因子 (VEGF); 成纤维细胞生长因子 18 (Fgf18)

中图分类号: TS 201.4

文献标志码: A

改革开放以来, 我国水产品加工产业取得了长足发展, 水产品加工生产量已成为世界第一, 然而在精深加工领域还有很大的提升空间, 围绕功效成分进一步挖掘成为水产品精深加工的重要方向^[1-2]。海洋食品的一大典型特征是富含甘油三酯型与磷脂型的二十碳五烯酸 (EPA, C20:5n-3) 和二十二碳六烯酸 (DHA, C22:6n-3), 并已形成了大规模的全球产业^[3]。

脱发严重影响个人形象外观, 进而影响心理健康^[4]。研究显示, 膳食因素是造成脱发的主要原因之一, 包括食品污染物、膳食营养素不

足等方面^[5]。维生素、矿物质等微量元素的补充, 蛋白质的足量摄入及某些氨基酸的补充均可促进毛发再生并改善毛发质量^[6]。必需脂肪酸亚油酸和 α -亚麻酸, 是角质层细胞膜和环层小体的重要组成部分^[7], 对毛发生长有着重要的作用。

多数脱发是由于新毛干生成与旧毛发脱落的失衡所造成的, 新毛干的生成依赖于毛囊干细胞的激活^[8-9]。研究发现, 喂食或局部涂抹甘油三酯型 EPA/DHA (EPA/DHA -TG) 可以提升毛发质量并促进毛发再生^[10-11]。而磷脂型 EPA/DHA (EPA/DHA-PLs) 对毛发再生的作用尚未报道。多

收稿日期: 2021-05-14 修回日期: 2021-06-18

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901103)

第一作者: 李晓月 (照片), 从事食品营养学和分子营养学研究, E-mail: 531847045@qq.com

通信作者: 张恬恬, E-mail: zhangtiantian@ouc.edu.cn



项研究表明,膳食摄入磷脂型 EPA/DHA 相较于甘油三酯型在改善脑功能、抗肿瘤及调节糖脂代谢等方面具有更好的作用效果^[3,12],因而有必要探究 EPA/DHA-PLs 在促进毛发生长方面的功效。此外,细胞实验显示,蓝光可激活细胞代谢活性、增加胶原蛋白表达量、延长体外毛囊生长期,提示蓝光照射可能具有促进毛发再生的作用^[13-14]。而二者的相互作用效果还未有探究。将富含 EPA/DHA-PLs 的海洋食品作为蓝光照射的增效剂广泛应用于促进毛发再生,对维护毛发健康及辅助脱发治疗具有重要意义,同时也拓宽了水产品精深加工产品的应用市场。

综上,本研究以膳食补充结合蓝光照射方法,以人工脱毛小鼠(*Mus musculus*)为实验对象,建立毛发再生模型,探究膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠毛发再生的影响,以开发一种维护毛发健康的新途径,为水产品的高值利用提供研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

雄性昆明小鼠,SPF 级,6 周龄,体质量 20~25 g,许可证号 SCXK(鲁)20190003,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。

DHA-PLs 与 EPA-PLs 参照文献报道的方法^[15-16],分别从鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)卵和冰岛刺参(*Cucumaria frondosa*)体壁中提取得到富含 DHA 或 EPA 的磷脂;MMLV 逆转录酶购自美国 Promega 公司;SYBR Green PCR Master Mix 购自爱必梦生物科技有限公司;TRIzol,购自美国 Invitrogen 公司;RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;Fgf18、VEGF 抗体购自成都正能生物技术有限责任公司;HRP 标记山羊抗小鼠/兔 IgG、Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒,购自上海雅酶生物科技有限公司。其他的生化试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

CG-05 型 Realtime PCR 仪(力康生物医疗科技控股有限公司);Tanon-5200 型凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);KZ-III-F 型低温高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);Nikon/Ni-E 型电子显微镜(尼康株式会社)。

1.3 实验方法

动物实验 适应性喂养 1 周后,将 32 只雄性昆明小鼠背部毛发脱除,并随机分成 4 组,每组 8 只,分别为白光照射组、蓝光照射组、蓝光照射喂食 DHA-PLs 或 EPA-PLs 组。饲料组成如表 1 所示。白光由普通照明白炽灯产生,蓝光由 450~455 nm 的发光二极管 LEDs 产生,12 h : 12 h 明暗交替。小鼠在恒温(23±2)℃、相对湿度 65%±15% 的条件下自由饮水与进食 6 周,待毛发再生结束,采用眼球取血法处死小鼠,取背部 1 cm×1 cm 皮肤于-80℃冻存用于后续分析。同时取背部同一部位皮肤于 10% 中性甲醛溶液中固定,用于切片观察。

表 1 小鼠饲料的组成成分

原料 ingredients	普通饲料含量 normal diet content	EPA-PLs/DHA-PLs 饲料含量 EPA-PLs/DHA-PLs added diet content
玉米淀粉 corn starch	272.7	272.7
干酪素 casein	181.8	181.8
果糖 fructose	227.3	227.3
纤维素 cellulose	45.5	45.5
矿物质混合物 mineral mixture	31.8	31.8
维生素混合物 vitamin mixture	9.1	9.1
DL-半胱氨酸 DL-cysteine	2.7	2.7
重酒石酸胆碱 choline heavy tartrate	1.8	1.8
玉米油 corn oil	45.5	45.5
食用猪油 edible lard	181.8	172.7
EPA-PLs/DHA-PLs		9.1

毛发脱除与生长监测 采用化学法脱毛^[17],脱脂棉蘸取 6% 的硫化钠酒精溶液涂抹在小鼠背部,脱毛区域为前腿连线至后腿连线处的矩形区域,作用 2 min 后,用温水冲洗干净,为保证所有小鼠毛发脱除程度一致,3 d 后进行第 2 次脱毛处理。

在裸露区域观察到新生毛发时,将其作为毛发生长的第 0 天,测量新生毛发的长度、覆盖率,根据 Kwon 等^[18]的方法,对小鼠皮肤裸露区域的新生毛发覆盖率进行评分:0% 为 0 分,

0%~20% 为 1 分, 20%~40% 为 2 分, 40%~60% 为 3 分, 60%~80% 为 4 分, 80%~100% 为 5 分。

皮肤切片分析 皮肤组织的横切与纵切切片经苏木精-伊红 (H.E) 染色后, 分别用于观测毛囊形态与毛囊数量。切片与染色由武汉赛维尔生物科技有限公司完成, 通过电子显微镜进行观测。毛囊细胞计数将 100×视野下 5 个不同视野的均值作为各组的统计结果。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 采用 TRIzol 法提取皮肤总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳与 Nanodrop 验证 RNA 纯度与含量, 将其与 MMLV 逆转录酶、RNAase inhibitor、无酶无菌水、dNTP 及 Random Primer 混合, 经 PCR 程序逆转录得到 cDNA。参考 SYBR Green PCR Master Mix 试剂说明, 进行 qRT-PCR, cDNA 经变性处理后, 采用三步法进行扩增, 分别在 95、60 和 72 °C 下反应 15~30 s, 共 45 个循环, 各基因的 mRNA 表达量相对于内参基因 *GAPDH* 的表达进行计算。引物经 NCBI BLAST 验证, 序列信息如表 2 所示。

表 2 qRT-PCR 引物序列

Tab. 2 Primer sequences for qRT-PCR

基因 gene	上下游引物 (5' to 3') forward/reverse primer (5' to 3')
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCCGAGAATGGGAA CTCGTGGTTCACACCCATCA
<i>Adrb2</i>	GAAGGAAGATTCCACGCCCA AAGCAGAGTTGACGTAGCC
<i>Shh</i>	TGGCCAGATGTTTTCTGGTGA CTTCTCGGCTACGTTGGGAA
<i>IL1-α</i>	GAAGCTCGTCAGGCAGAAGT TGGCAACTCCTTCAGCAACA
<i>Fgf18</i>	AAGTCCGGATCAAGGGCAAG CCCTTGGGGTAACGCTTCAT
<i>IGF</i>	GCTGGTGGATGCTCTTCAGT TAGGGACGGGACTTCTGAG

免疫印迹分析 根据 RIPA 裂解缓冲液的说明, 从皮肤中提取总蛋白, 采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 半干法转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用 5% BSA 溶液进行膜封闭 2 h, 用 TBST (0.1% Tween-20, 20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, pH 值 7.6) 洗涤, 在 4 °C 与特异性一抗 Fgf18、VEGF、β-Actin 孵育过夜, 经 TBST 洗涤后, 在室温下使用 HRP 标记山羊抗小鼠/兔 IgG 二抗孵育 2 h, 再次用 TBST 洗涤, 最后根据 Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒说明, 对抗原-抗体复合物进行显色, 利用凝

胶成像仪采集图像, 并进行量化分析。

数据分析 实验结果以 mean±SE 表示, 各组之间采用 One-Way ANOVA (Tukey's test) 进行两两比较分析, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义上的显著差异。

2 结果

2.1 毛发长度与覆盖率

毛发脱除 3 周后, 在小鼠背部皮肤观察到新生毛发, 以此为起点, 进行了为期 21 d 的毛发生长监测 (图 1)。结果显示, 第 1 周为毛发再生的起始阶段, 第 2 周为毛发快速生长期, 第 3 周毛发生长基本完成。在起始阶段 2 d 时, 蓝光照射小鼠的毛发长度与覆盖率分别是白光照射小鼠的 5.3 和 2.6 倍, 但未见统计学显著性差异, 而结合膳食补充 DHA-PLs 后, 其毛发长度与覆盖率分别是白光照射小鼠的 9.9 和 12.3 倍 ($P < 0.05$)。蓝光照射喂食 EPA-PLs 的小鼠, 起始阶段的毛发长度与覆盖率均小于喂食 DHA-PLs 的小鼠。

第 2 周内, 蓝光照射喂食 EPA-PLs 小鼠的毛发生长速率反超喂食 DHA-PLs 的小鼠, 14 d 时二者的毛发长度分别是 7 d 时的 3.4 倍和 2.3 倍。覆盖率方面, 蓝光照射喂食 EPA-PLs 小鼠在 12 d 时就实现了毛发全覆盖, 明显优于 DHA-PLs 的补充效果。同时, 相比于单独接受蓝光照射的小鼠, 其覆盖率至少高出 25%, 而蓝光照射与白光照射的小鼠无明显差别。

到第 3 周, 小鼠毛发生长基本结束, 21 d 时的最终结果显示, 蓝光照射可使小鼠毛发长度、覆盖率分别增加 3.5% 和 6.9%, 膳食补充 DHA-PLs 和 EPA-PLs 小鼠的毛发长度分别在蓝光照射的基础上增加 7.8% 和 8.7%, 覆盖率则分别增加 10.1% 和 12.9%。

2.2 毛囊数量与形态

小鼠出生后毛囊开始经历生长期、退化期、静止期及重新启动生长期的循环过程^[19], 毛囊形态的变化情况是判断毛囊发育周期的重要依据。截止到 21 d 时毛囊的细胞形态如图版 I 所示, 经过相同的生长周期后, 白光照射的小鼠仍处于生长期, 而蓝光照射下的小鼠则出现了毛囊退化, 处于退化早期, 蓝光照射喂食 DHA-PLs 和 EPA-PLs 的小鼠毛囊, 表现为毛囊内根鞘萎缩, 乳头空泡化等退化中晚期和晚期特征。此外,

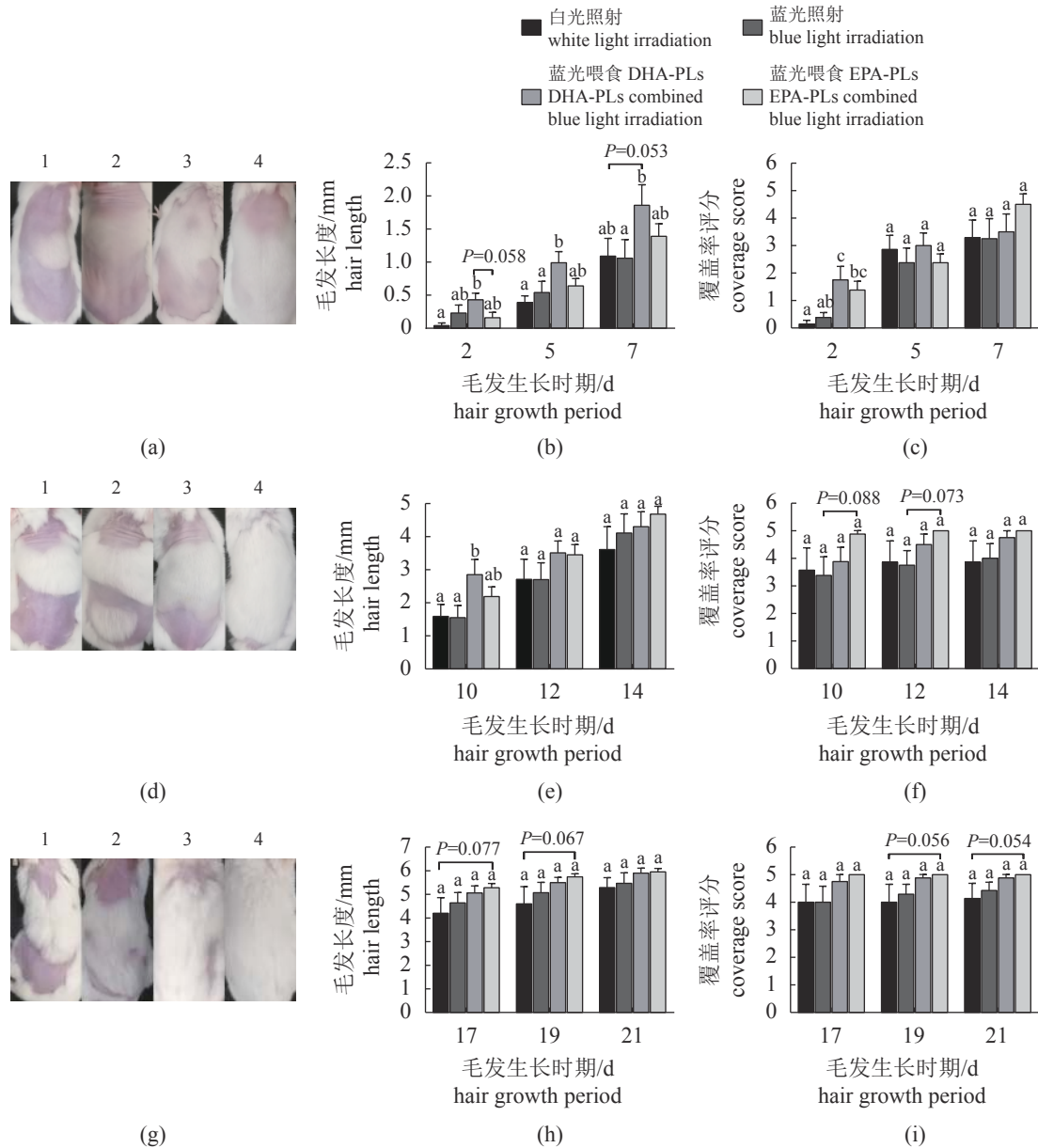


图 1 膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠毛发长度及覆盖率的影响

(a)(d)(g). 毛发生长 1, 2, 3 周的背部图片, (b)(e)(h). 毛发生长 1, 2, 3 周的毛发长度, (e)(f)(i). 毛发生长 1, 2, 3 周的背部覆盖率; 1. 白光照射, 2. 蓝光照射, 3. 蓝光喂食 DHA-PLs, 4. 蓝光喂食 EPA-PLs; 下同; 不同字母标识表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Effects of dietary supplementation with EPA/DHA-PLs combined with blue light irradiation on hair length and coverage

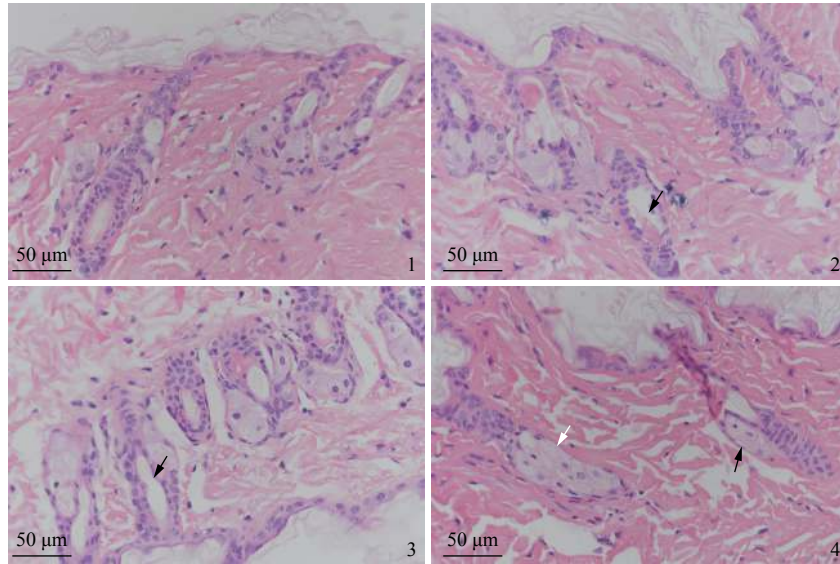
(a)(d)(g). back pictures of newborn hair after 1, 2, 3 weeks, (b)(e)(h). length of newborn hair after 1, 2, 3 weeks, (e)(f)(i). coverage rate of newborn hair after 1, 2, 3 weeks; 1. white light irradiation, 2. blue light irradiation, 3. DHA-PLs combined blue light irradiation, 4. EPA-PLs combined blue light irradiation; the same below; different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

EPA-PLs 小鼠还出现了毛发的二次生长^[20]。蓝光照射与膳食补充均不会对毛囊数量产生显著影响(图版 II)。

2.3 毛发生长相关基因的 mRNA 表达水平

Shwartz 等^[21]报道, 立毛肌-交感神经-毛囊

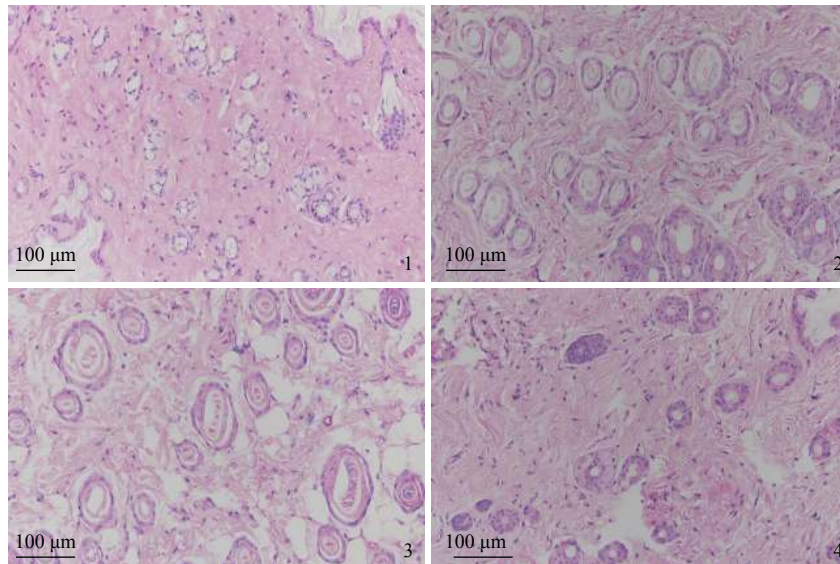
干细胞通路具有调节毛囊干细胞生态位并促进毛发生长的作用。音猬因子 (SHH) 与 β 2-肾上腺素能受体 (Adrb2) 是该通路的核心调控因子。Shh 在毛囊发育期间可调节立毛肌的形成及毛囊干细胞的交感神经支配, 对立毛肌-交感神经-毛囊干细胞调节通路的形成有重要作用, 其表达量



图版 I 21 d 时膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠背部皮肤毛囊形态的影响 (400×)
 黑色箭头指示毛囊细胞的退化, 白色箭头指示毛发的二次生长

Plate I Effects of dietary supplementation with EPA-PLs and DHA-PLs combined with blue light irradiation on follicle morphology of back skin at 21d (400×)

Black arrows indicate the degeneration of hair follicles and the white arrows indicate the secondary growth of hair



图版 II 膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠背部皮肤毛囊数量的影响 (100×)

Plate II Effects of dietary supplementation with EPA-PLs and DHA-PLs combined with blue light irradiation on follicle count of back skin (100×)

与毛发状态呈正相关。*Adrb2* 位于毛囊干细胞, 是接受交感神经分泌的去肾上腺素的直接作用靶点, 其表达量同样与毛发状态呈正相关。*Shh* 与 *Adrb2* 的 mRNA 表达水平结果显示, 与蓝光照射相比, 额外膳食补充 EPA-PLs、DHA-PLs 均未上调 *Shh* 和 *Adrb2* 的 mRNA 表达量 (图 2)。

成纤维细胞生长因子 18 (Fgf18) 是一种静止

调节因子, 当 Fgf18 表达水平降低时, 即启动毛囊干细胞的激活^[22]。蓝光照射喂食 DHA-PLs 的小鼠, *Fgf18* 的 mRNA 表达量在蓝光照射的基础上显著提高了 4 倍, 喂食 EPA-PLs 的小鼠则提高了 2.6 倍, 但无显著性差异, 与 21 d 时各组的毛囊周期状态相一致。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是胰岛素样生长因子家族细胞信号因子的配体

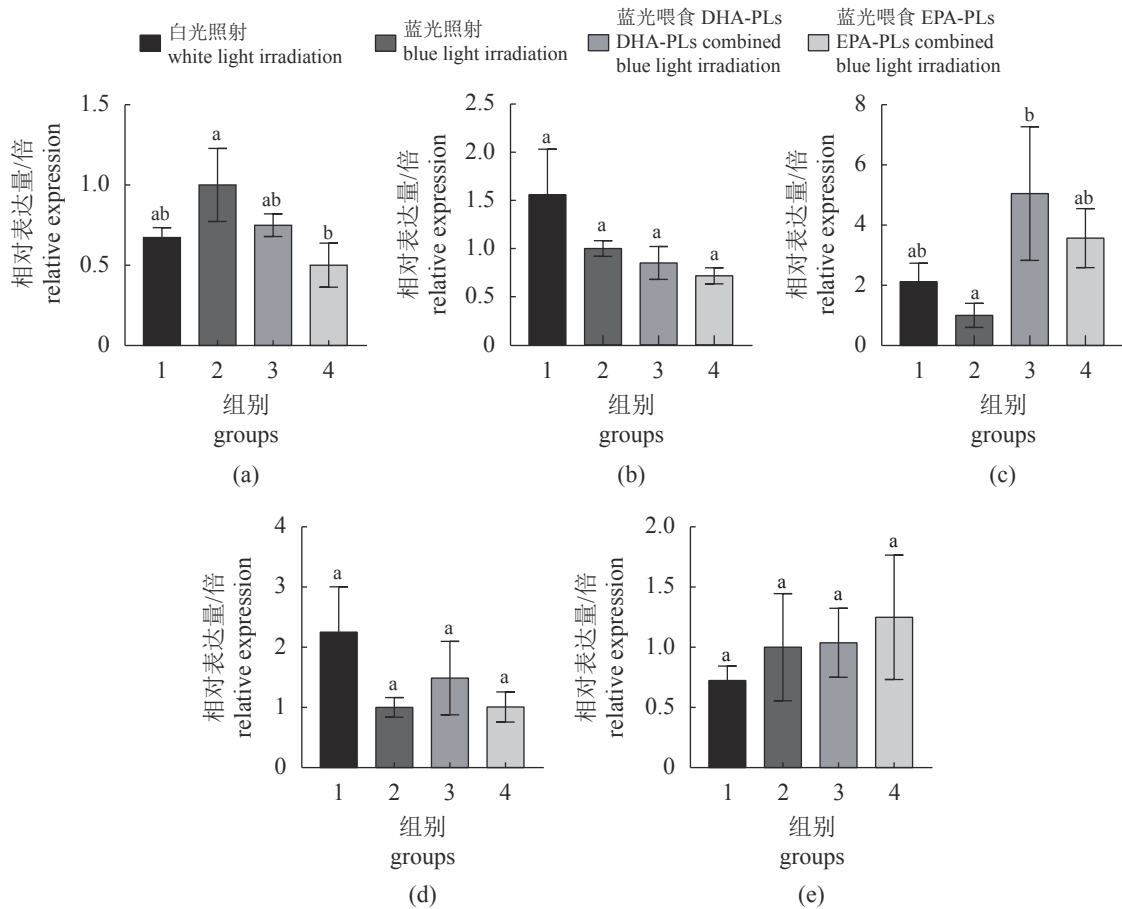


图2 膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对毛发生长相关基因 mRNA 表达水平的影响

(a) *Shh* 的相对 mRNA 表达量, (b) *Adrb2* 的相对 mRNA 表达量, (c) *Fgf18* 的相对 mRNA 表达量, (d) *IGF-1* 的相对 mRNA 表达量, (e) *IL-1α* 的相对 mRNA 表达量

Fig. 2 Effects of dietary supplementation of EPA-PLs and DHA-PLs combined with blue light irradiation on hair growth-related genes' mRNA expression

(a) relative mRNA expression of *Shh*, (b) relative mRNA expression of *Adrb2*, (c) relative mRNA expression of *Fgf18*, (d) relative mRNA expression of *IGF-1*, (e) relative mRNA expression of *IL-1α*

之一, 是后期生长发育过程中 IGF 家族的主要形式, 有调节毛囊细胞由静止期向生长期的转化, 延长生长期等促进作用^[23]。但是, 本实验结果显示, *IGF-1* 的 mRNA 在各组间的表达量无显著差异。与炎症性脱发有关的细胞因子中, 白细胞介素-1α (*IL-1α*) 已被证实是毛囊生长的直接抑制因子, 其表达的上调会造成毛囊的减少和萎缩^[24]。结果显示, *IL-1α* 的 mRNA 表达在各组间无显著性差异。

2.4 关键蛋白的表达

通过测定蓝光照射喂食 EPA/DHA-PLs 对毛发生长相关基因的 mRNA 表达水平的影响, 发现 *Fgf18* 可能是较为重要的关键因子, 其在皮肤中的蛋白表达量结果显示, 与白光照射小鼠相

比, 蓝光照射小鼠的表达量提高了 2.7 倍, 在蓝光照射的基础上, 膳食补充了 DHA-PLs 和 EPA-PLs 的小鼠, *Fgf18* 蛋白表达量分别提高了 59.0% 和 53.9% (图 3-a)。

血管内皮生长因子 (VEGF) 在介导血管生成和增强微血管通透性方面有重要作用, 已有不少研究证实 VEGF 可以通过增强血管支持以满足毛发在生长期的高营养需求, 从而促进毛发生长^[25-26]。皮肤中 VEGF 蛋白的表达量结果显示, 接受蓝光照射的小鼠, VEGF 蛋白表达量相比白光小鼠显著提高了 60.5%; 在蓝光基础上额外补充了 DHA-PLs 或 EPA-PLs 的小鼠, 其表达量相比蓝光小鼠分别提高了 43.5% ($P < 0.05$) 和 53.8% ($P < 0.01$), 具有极显著差异 (图 3-b)。

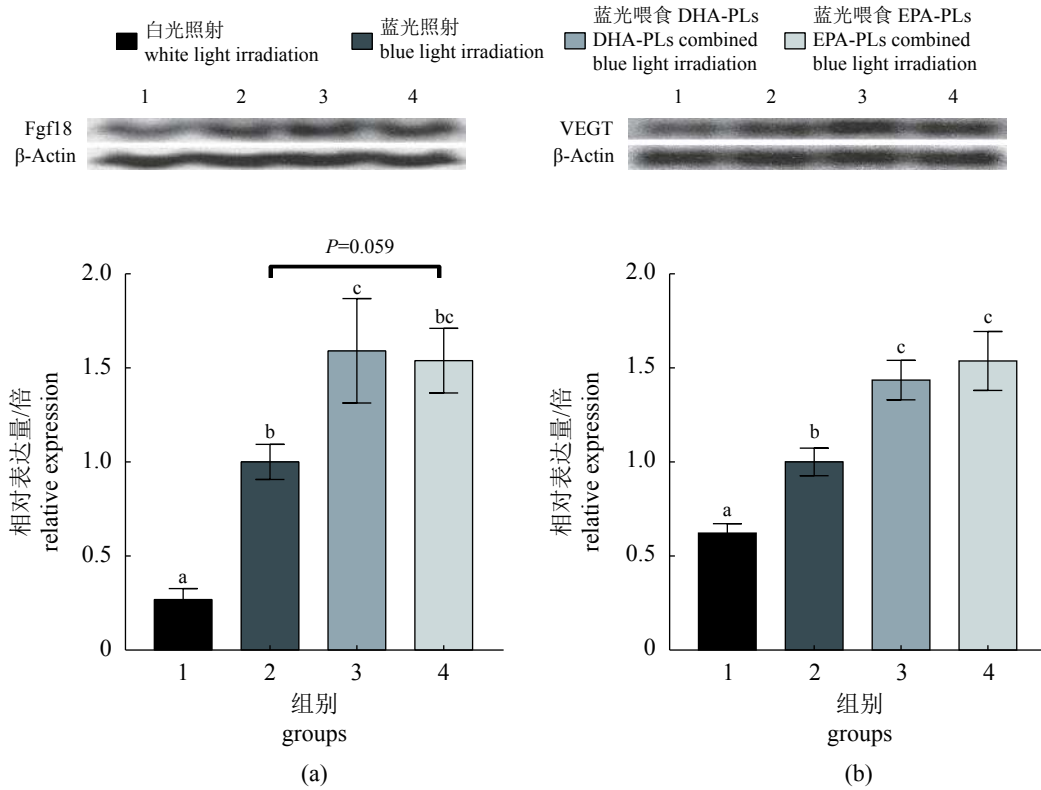


图 3 膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对 Fgf18 及 VEGF 在皮肤中蛋白表达水平的影响 (a) Fgf18 的相对蛋白表达量, (b) VEGF 的相对蛋白表达量; 蛋白免疫印迹结果从左到右依次为 1-4 组别

Fig. 3 Effects of dietary supplementation with EPA-PLs and DHA-PLs combined with blue light irradiation on the protein expression of Fgf18 and VEGF in skin

(a) relative protein expression of FGF18, (b) relative protein expression of VEGF; Western blot strips are groups 1-4 from left to right

3 讨论

膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射对小鼠毛发长度及覆盖率的影响结果表明, 在毛发再生起始阶段, 蓝光照射可以在一定程度上促进毛囊周期的活跃, 而膳食补充 DHA-PLs 或 EPA-PLs 对此具有显著的促进作用, 其中 DHA-PLs 组效果最为显著。该结果与 Kang 等^[11]所述的皮肤涂抹甘油三酯型 DHA 结果一致。毛发快速生长期, 喂食 DHA-PLs 或 EPA-PLs 均可提高毛发生长速率, 而 EPA-PLs 效果优于 DHA-PLs。21 d 时, 毛发长度和覆盖率均呈现出蓝光照射优于白光照射, 膳食补充 EPA-PLs 或 DHA-PLs 结合蓝光照射优于单独蓝光照射, 其中 EPA-PLs 的增效作用最为显著。

Combarros 等^[10]将富含 EPA/DHA-TG 的鱼油胶囊 (EPA : DHA=1.6) 以膳食补充形式持续 3 个月喂食给发质差的狗, 与安慰剂组相比, 鱼油胶囊可显著改善狗的毛发和皮肤质量。本实验对比了膳食补充 EPA-PLs 与 DHA-PLs 在蓝光照射

下对毛发再生的影响, 结果显示, EPA-PLs 在增效蓝光照射对小鼠毛发再生的促进作用更为显著。Kang 等^[11]将 DHA-TG 为主的鲭 (*Scomber sp.*) 发酵鱼油提取物以局部涂抹形式对 C57BL/6 小鼠进行了毛发再生实验, 结果表明, 甘油三酯型 DHA 可通过调节细胞周期相关蛋白水平来促进真皮乳头细胞的增殖, 从而促进毛发生长。多项研究显示, EPA/DHA-PLs 在调节糖脂代谢、改善脑功能等方面比 EPA/DHA-TG 具有更好的作用效果^[3, 12], 猜测 EPA/DHA-PLs 对毛发再生的促进作用比 EPA/DHA-TG 更为显著, 但需要进一步实验验证。

Mignon 等^[13]以人类真皮成纤维细胞为模型, 探究了不同光参数对人类真皮成纤维细胞代谢活性、胶原生成和细胞迁移的影响, 结果表明, 453 nm 蓝光具有激活细胞代谢、增加胶原蛋白表达量的作用, 可促进皮肤的年轻化。Buscone 等^[27]以人毛囊细胞为模型, 发现低辐照强度的 453 nm 蓝光通过与脑视蛋白的相互作用, 能够

显著延长体外毛囊的生长期。Fan等^[14]研究发现,蓝光通过刺激动物眼睛的感光性视网膜神经节细胞向视交叉上核发出信号,再由交感神经调控毛囊细胞的激活。结合本实验观测结果,蓝光照射可促进体内的毛发再生,而膳食补充EPA/DHA-PLs可作为蓝光照射的增效剂,显著增强其对毛发再生的促进作用。

毛囊形态与毛囊数量的结果表明,蓝光照射可在一定程度上促进毛发再生,膳食EPA-PLs、DHA-PLs的补充能够显著增强蓝光照射的毛发再生促进作用,其中EPA-PLs效果更为显著。毛囊细胞的数量在胚胎发育时期就已确定,且不会随着后期生长发育及毛囊周期更迭发生改变^[21]。在各组小鼠毛囊数量无显著差异的前提下,毛发再生状况呈现出蓝光照射较优,膳食补充EPA/DHA-PLs结合蓝光效果最佳的结果,说明蓝光照射与膳食EPA/DHA-PLs是通过对面毛囊生长周期的调节来促进毛发再生。

毛发生长相关基因的mRNA表达水平显示,*Fgf18*的mRNA表达水平变化趋势与毛发生长状态一致,Shwartz等^[21]报道称,*Fgf18*受立毛肌-交感神经-毛囊干细胞通路的调节,但*Shh*和*Adrb2*的mRNA表达水平显示该通路未被激活,因此推测,蓝光和EPA/DHA-PLs可能是通过激活其他通路来调控*Fgf18*的表达,从而调节毛发生长。*Fgf18*在静止期高表达,生长期的表达显著降低^[21],*Fgf18*的蛋白表达水平符合这一趋势,蓝光照射喂食EPA-PLs补充小鼠由于开始了毛发的二次生长,*Fgf18*的蛋白表达量相较于DHA-PLs补充小鼠有所降低,蛋白免疫印迹结果验证了膳食补充EPA/DHA-PLs结合蓝光照射通过调控*Fgf18*的表达促进毛发再生。VEGF的蛋白表达水平在白光照射、蓝光照射、蓝光喂食DHA-PLs或EPA-PLs小鼠中呈现依次升高的趋势,与毛发生长的观察结果一致,这表明VEGF的高表达可能是蓝光照射及膳食补充DHA-PLs、EPA-PLs促进毛发再生的一个重要机制。

除以上所表述的膳食补充DHA-PLs或EPA-PLs结合蓝光照射对毛发再生的促进作用及可能机制外,结合Kawano等^[28]的研究结果,即*Fgf18*信号介导静止期毛发的抗辐射能力,推测膳食补充EPA-PLs或DHA-PLs结合蓝光照射对毛发生长的促进作用不仅仅是促进毛囊周期的活跃,

静止期*Fgf18*的表达也有助于毛发的辐射防护,二者形成了一个良性循环。但因本实验设计的缺陷,白光照射下的膳食补充EPA-PLs或DHA-PLs对毛发再生的效果尚不明确,有待进一步的实验验证。此外,甘油三酯型EPA/DHA与磷脂型之间的效果比较也值得进一步的研究。

综上,膳食补充DHA-PLs或EPA-PLs可以增效蓝光对毛发再生的促进作用,具体通过调节毛囊周期,促进VEGF及调控*Fgf18*的表达来实现,在维护毛发健康方面具有一定的应用价值。

参考文献 (References):

- [1] 黄利华,贾强,郑玉玺,等.水产品加工现状及发展对策[J].现代食品,2019(24):5-7.
Huang L H, Jia Q, Zheng Y X, et al. Current situation and development strategy of aquatic products processing[J]. Modern Food, 2019(24): 5-7(in Chinese).
- [2] 刘子飞,孙慧武,蒋宏斌,等.我国水产加工业发展现状、问题与对策[J].中国水产,2017(12):36-39.
Liu Z F, Sun H W, Jiang H B, et al. Current situation, problems and countermeasures of aquaculture processing industry in China[J]. China Fisheries, 2017(12): 36-39(in Chinese).
- [3] Zhang T T, Xu J, Wang Y M, et al. Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 75: 100997.
- [4] Rose P T. Advances in hair restoration[J]. *Dermatologic Clinics*, 2018, 36(1): 57-62.
- [5] Lin R L, Garibyan L, Kimball A B, et al. Systemic causes of hair loss[J]. *Annals of Medicine*, 2016, 48(6): 393-402.
- [6] Almohanna H M, Ahmed A A, Tsatalis J P, et al. The role of vitamins and minerals in hair loss: a review[J]. *Dermatology and Therapy*, 2019, 9(1): 51-70.
- [7] Rawlings A V, Scott I R, Harding C R, et al. Stratum corneum moisturization at the molecular level[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1994, 103(5): 731-740.
- [8] Grothe T, Wandrey F, Schuerch C. Short communication: clinical evaluation of pea sprout extract in the treatment of hair loss[J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(2): 428-431.
- [9] Schneider M R, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan[J]. *Current Biology*, 2009, 19(3): R132-R142.
- [10] Combarros D, Castilla-Castaño E, Lecru L A, et al. A

- prospective, randomized, double blind, placebo-controlled evaluation of the effects of an n-3 essential fatty acids supplement (Agepi[®] ω3) on clinical signs, and fatty acid concentrations in the erythrocyte membrane, hair shafts and skin surface of dogs with poor quality coats[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2020, 159: 102140.
- [11] Kang J I, Yoon H S, Kim S M, *et al.* Mackerel-derived fermented fish oil promotes hair growth by anagen-stimulating pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2770.
- [12] Wang T, Cong P X, Cui J, *et al.* Digestion, absorption, and metabolism characteristics of EPA-enriched phosphoethanolamine plasmalogens based on gastrointestinal functions in healthy mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(46): 12786-12795.
- [13] Mignon C, Uzunbajakava N E, Raafs B, *et al.* Photobiomodulation of distinct lineages of human dermal fibroblasts: a rational approach towards the selection of effective light parameters for skin rejuvenation and wound healing[C]//Proceedings of SPIE 9695, Mechanisms of Photobiomodulation Therapy XI. San Francisco: SPIE, 2016: 969508.
- [14] Fan S M Y, Chang Y T, Chen C L, *et al.* External light activates hair follicle stem cells through eyes via an ipRGC-SCN-sympathetic neural pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(29): E6880-E6889.
- [15] Zhang L Y, Ding L, Shi H H, *et al.* Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids suppressed lipid accumulation by specific inhibition of lipid droplet-associated protein FSP27 in mice[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(5): 2244-2251.
- [16] Wang C C, Shi H H, Zhang L Y, *et al.* The rapid effects of eicosapentaenoic acid (EPA) enriched phospholipids on alleviating exercise fatigue in mice[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(58): 33863-22871.
- [17] 景林, 侯丽, 彭春桥, 等. 生发小鼠模型建立常用脱毛方法的系统比较[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4): 205-209.
- Jing L, Hou L, Peng C Q, *et al.* Systematically comparison of common hair removal methods in the mouse hair growth model[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2017, 33(4): 205-209(in Chinese).
- [18] Kwon T R, Oh C T, Park H M, *et al.* Potential synergistic effects of human placental extract and minoxidil on hair growth-promoting activity in C57BL/6J mice[J]. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2015, 40(6): 672-681.
- [19] Alonso L, Fuchs E. The hair cycle[J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(3): 391-393.
- [20] Amberg N, Holcman M, Stulnig G, *et al.* Effects of imiquimod on hair follicle stem cells and hair cycle progression[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(11): 2140-2149.
- [21] Shwartz Y, Gonzalez-Celeiro M, Chen C L, *et al.* Cell types promoting goosebumps form a niche to regulate hair follicle stem cells[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 578-593.e19.
- [22] Vogt A, Mcelwee K J, Blume-Peytavi U. Biology of the hair follicle[M]//Blume-Peytavi U, Tosti A, Trüeb R M. Hair Growth and disorders. Berlin: Springer, 2008: 1-22.
- [23] Li J J, Yang Z H, Li Z, *et al.* Exogenous IGF-1 promotes hair growth by stimulating cell proliferation and down regulating TGF-β1 in C57BL/6 mice *in vivo*[J]. *Growth Hormone & IGF Research*, 2014, 24(2-3): 89-94.
- [24] Stenn K S, Paus R. Controls of hair follicle cycling[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 449-494.
- [25] Woo Y M, Kim O J, Jo E S, *et al.* The effect of *Lactobacillus plantarum* hydrolysates promoting VEGF production on vascular growth and hair growth of C₅₇BL/6 mice[J]. *Journal of Analytical Science and Technology*, 2019, 10(1): 18.
- [26] Choi M, Choi S J, Jang S, *et al.* Shikimic acid, a manose bioisostere, promotes hair growth with the induction of anagen hair cycle[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 17008.
- [27] Buscone S, Mardaryev A N, Raafs B, *et al.* A new path in defining light parameters for hair growth: discovery and modulation of photoreceptors in human hair follicle[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2017, 49(7): 705-718.
- [28] Kawano M, Umeda S, Yasuda T, *et al.* FGF18 signaling in the hair cycle resting phase determines radioresistance of hair follicles by arresting hair cycling[J]. *Advances in Radiation Oncology*, 2016, 1(3): 170-181.

Effects of dietary supplementation with EPA/DHA-enriched phospholipids combined with blue light irradiation on hair regeneration in mice

LI Xiaoyue¹, WANG Chengcheng¹, DUAN Xuefeng¹, SHI Haohao¹,
WANG Yuming^{1,2}, XUE Changhu^{1,2}, ZHANG Tiantian^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Abstract: Aquatic product processing industry has a large scale in China, but the field of deep processing is weak. The functional lipids of aquatic products represented by EPA and DHA are important targets for deep processing of aquatic products. Hair loss originates from the imbalance between hair shaft regeneration and shedding. EPA/DHA-enriched triglyceride (EPA/DHA-TG) and blue light irradiation can both promote hair regeneration, however the effect of EPA/DHA-enriched phospholipids (EPA/DHA-PLs) on hair regeneration and its interaction with blue light irradiation are still unclear. In the present study, artificial hair removal mice were used to establish a hair regeneration model and to explore the effects of dietary supplementation with EPA/DHA-PLs combined with blue light irradiation on hair regeneration. After the back hair removal, male Kunming mice were randomly divided into four groups ($n=8$), including white light irradiation group, blue light irradiation group, and blue light irradiation combined with dietary supplementation with DHA-PLs or EPA-PLs group. The length and coverage of regenerating hair were measured, and HE staining was applied to observe the morphology and number of hair follicles. The mRNA and protein expression levels of genes related to hair regeneration were analyzed to preliminarily explore the possible underlying mechanism. The results showed that with the blue light irradiation, dietary supplementation with EPA/DHA-PLs could significantly increase hair length and coverage. Specially, the effect of DHA-PLs was better than EPA-PLs in the early stage of hair regeneration, and the effect of EPA-PLs is more prominent compared with DHA-PLs in the later stage, which might be related to the regulation of hair follicle cycle, the increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the regulation of fibroblast growth factor 18 (Fgf18). This study suggested that dietary supplementation with EPA/DHA-PLs could enhance the promotion effect of blue light irradiation on mouse hair regeneration, which may provide a scientific basis for the use of aquatic functional lipids in the health maintenance of hair.

Key words: DHA/EPA-enriched phospholipids; hair regeneration; blue light; hair follicle cycle; vascular endothelial growth factor (VEGF); fibroblast growth factor 18 (Fgf18)

Corresponding author: ZHANG Tiantian. E-mail: zhangtiantian@ouc.edu.cn

Funding project: National Key R & D Program of China (2018YFD0901103)