四物湯加味方이 원형탈모 생쥐의 발모효과에 관한 형태학적 연구

권강주 · 이창현[1] · 이문원[1] · 문연자 · 최두호 · 이학재[2] · 김호민 · 우원홍*

원광대학교 한의학전문대학원, 1 : 우석대학교 한의과대학 해부학교실,
2 : 상지대학교 한의과대학 방제학교실

Morphological Studies on Hair Growth Effect of *Samultang-gamibang* in Alopecia Areata Mice

Gang Joo Kwon, Chang Hyun Lee[1], Moon Won Lee[1], Yeun Ja Mun, Doo Ho Choi, Hak Jae Lee[2], Ho Min Kim, Won Hong Woo*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1 : Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University,
2 : Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Sangji University

This experiment examined the effect of *Samultang-gamibang* (SGB) on hair growth in spontaneous alopecia areata C57BL/6N mice. We first investigated hair growth effect of SGB compare to control groups after apply to oral administration for 10 weeks and regional treatment in skin for last 4 weeks. We second investigated the number of hair follicle and mast cells after treatment of SGB in spontaneous alopecia areata C57BL/6N mice for 10 weeks. We third investigated immunoreactive density of neuropeptides in skin of spontaneous alopecia areata C57BL/6N mice by immunohistochemical methods. The results were as follows : Hair growing effect of experimental group was observed from 7 weeks after administration of SGB (87.5%). In experimental group, the number of mast cells and eosinophils was significantly decreased compare to control group. Immunoreactive density of substance P and corticotropin releasing factor (CRF) in skin of experimental group was weakly stained in epidermis and subcutaneous tissue compare to control group. Immunoreactive density of CRF-receptor (CRF-R), CRF-binding protein (CRF-BP) in skin of experimental group was increased in epidermis, sebaceous gland, inner root sheath, outer root sheath and secondary hair germ epithelium compare to control group. These results suggest that SGB may be used in treatment of alopecia areata.

Key words : *Samultang-gamibang*(SGB), alopecia areata, hair, neuropeptides

서 론

圓形脫毛症은 자각증세와 염증증상 없이 국소적으로 한개 혹은 다수의 圓形 脫毛瘢을 형성하는 질환으로서, 증상은 탈모의 정도에 따라 두부전체에 발생되는 全頭部脫毛症(alopecia areata totalis), 두부, 눈썹, 액와 및 치부 등 신체 전반에 걸쳐 탈모현상이 나타나는 全身脫毛症(alopecia areata universalis) 그리고 두부의 일부에 원형의 탈모반이 형성되는 일반적인 경우를 patch 형 원형탈모증(alopecia areata patch type)이라한다[1,2].

圓形脫毛症의 발병기전은 명확하게 밝혀지지 않았지만 유전적인 요인, 內分泌的인 요인, 精神的인 스트레스, 免疫學的인 요인, 국소적인 感染 및 血管障碍 등 여러 가지 복합적인 요인에 의하여 발병한다[3-5].

圓形脫毛시 일어나는 조직학적 변화는 털의 生長期(anagen) 중 毛球주위에 활성화된 $CD4^+$와 $CD8^+$ T세포의 침윤, $CD4^+/CD8^+$세포 비율의 증가[6,7], 털의 生長期(anagen), 退化期(catagen) 및 休止期(telogen)사이에서 주기적으로 스위치 역할을

* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학
· E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6845
· 접수 : 2005/03/15 · 수정 : 2005/04/18 · 채택 : 2005/05/17

하면서 털의 성장을 조절하는데 관여하는 탈모부위의 비만세포 수의 증가 등이 보고되어 있다[8].

또한 털의 성장조절은 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)[9], protein kinase C-α(PKC-α)[10], stem cell factor(SCF)[11] 등의 cytokine과 감각신경이 관여하며, 감각신경세포에서 분비되는 substance P 물질은 신경세포체에서 합성되어 소포형태로 말초신경종말에 전달됨으로써 혈액순환 조절, 腺分泌 활동 및 피부염증 반응에 관여한다고 알려져 있다[12].

한의학적으로 원형탈모는 '油風'의 범주에 속하는 것으로, 血熱生風, 血瘀毛竅, 氣血兩虛, 肝腎不足에 의하여 발생하며 凉血熄風, 佐以養陰, 通竅活血散瘀, 氣血雙補, 滋補肝腎 등의 治法이 응용되어 주로 四物湯, 六味地黃湯, 逍遙散, 桃紅四物湯, 八珍湯 등이 활용된다[13,14]. 이 중 四物湯은 養血疎肝과 補血調血의 效能을 가지는 대표적인 方劑로 잘 알려져 있으며, 桂枝는 發汗解肌, 溫通經脈, 通陽化氣의 效能을, 紅花는 活血通經과 祛瘀止痛의 效能을 가지므로 活血散瘀의 작용을 기대할 수 있다. 또한 補血藥材에 속하는 何首烏는 補肝腎과 益精血의 效能을 가지므로 滋補肝腎의 작용이 예상되어 油風의 범주에 속하는 圓形脫毛症에 四物湯加味方이 유효할 것으로 예상된다.

최근 脫毛에 대한 실험적 연구로 金 등[15]은 神應養眞丹의 에탄올 추출물이 외피 내 콜레스테롤과 중성지질을 억제함으로써 육모효과를 관찰하였다고 보고하였으며, 이 등[16,17]은 桑白皮抽出物과 桑白皮複合物의 育毛促進 효과를, 노 등[18]은 毛髮成長 촉진에 관한 苦蔘추출물 효과를 보고하는 등 다양한 연구 보고와 문헌적인 보고들을 접할 수 있었다.

그러나 상기한 실험논문들은 주로 외용제로서 피부에 도포하여 관찰하였거나, 실험적으로 탈모모델 동물을 이용하였지만 항암제 투여나 털을 제거하는 방법 즉 animal clipper로 털을 깎은 후 발모효과를 관찰하는 등 인위적인 방법을 활용하여 사람에게 발생하는 원형탈모증과는 연관성이 적은 모델들이었다.

이에 저자는 한의학적으로 원형탈모증에 해당하는 油風의 치료원칙에 입각하여 四物湯加味方을 입방하고 원형탈모에 대한 치료효과를 조사하고자, 자연적으로 圓形脫毛가 발생된 생쥐를 이용하여 四物湯加味方 추출물을 10주 동안 구강투여 하였고 마지막 4 주는 피부도포를 병행하여 육안적인 發毛效果를 확인한 후, 비만세포와 피부 neuropeptide, cytokine에 대한 형태학적 연구를 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험에 사용된 생쥐는 C57BL/6N 雌性(♀) 생쥐로, 체중 25 g 내외의 8주령 정상생쥐 8마리와 1년 이상 사육하여 자연적으로 원형탈모증이 유발된 생쥐 16마리를 사용하였다. 원형탈모증이 유발된 생쥐는 각 군에 8마리씩 배정하여 대조군과 실험군으로 나누어 사용하였으며 실험 6 주째에 대조군과 실험군에서 3마리씩 희생시켜 조직절편을 제작하였고 7 주째부터는 5마리를 이용하여 구강투여와 피부도포를 병행하여 실험하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 四物湯加味方 1첩의 처방내용은 아래와 같으며, 약재는 시중에서 구입하여 정선된 약재를 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Samultang-gamibang* (四物湯加味方, SGB)

韓 藥 名	生 藥 名	重 量(g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	6g
當歸	*Angelicae Gigantis Radix*	6g
川芎	*Cnidii Rhizoma*	6g
白芍藥	*Paeoniae Radix Alba*	6g
桂枝	*Cinnamomi Ramulus*	2g
紅花	*Carthami Flos*	2g
何首烏	*Polygoni Multiflori Radix*	20g
	Total Amount	48g

2. 방법

1) 시료의 조제

상기 四物湯加味方 6첩 분량인 288g을 細切하여 3시간 가열추출하고 여과한 濾液을 감압농축기를 이용하여 1ℓ로 농축한 후 시료로 사용하였다. 四物湯加味方 농축액인 시료를 일정시간을 택하여 하루에 2 ㎖씩 위관을 이용하여 실험군은 6 주 동안 구강투여만을 실시하고 실험 7 주부터 10 주까지의 4 주간은 구강투여와 피부도포를 병행하였다. 대조군의 경우 생리식염수를 동일한 방법과 동량으로 실시하였다.

2) 피부의 광학현미경적 소견

피부의 조직학적 소견을 검사하기 위하여 약물 투여 후 6 주째에 마취 하에서 등쪽 피부의 脫毛된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액과 carnoy 용액으로 고정한 후 일반적인 방법에 의하여 水洗, 脫水過程을 거쳐 paraffin으로 포매하고, 7 ㎛의 절편을 제작하여 형태학적 변화를 관찰하였다. 일반적인 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 H&E 염색을 시행하였으며, 炎症反應과 관련된 호산구의 변화를 관찰하기 위하여 congo red 염색을 실시하였다. 또한 피부조직 내 고정액의 차이에 따라 염색된 비만세포 수의 변화를 관찰하기 위하여 toluidine blue와 alcian blue 염색을 시행하였다.

3) 피부 neuropeptide에 대한 면역조직화학염색 관찰

피부 조직 내 neuropeptide를 관찰하기 위하여 substance-P와 스트레스 관련 neuropeptide의 염색을 위하여 1차 항체는 rabbit polyclonal antibody인 corticotropin releasing factor (CRF), CRF-receptor(CRF-R), CRF-binding protein(CRF-BP) (Santa cruz) 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역조직화학 염색을 위해 박절한 조직을 0.1M phosphate buffer(PB)로 세척한 후 조직 절편 내에 내재되어 있을 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% H_2O_2로 처리하고 1% normal goat serum과 0.3% triton X-100으로 1시간 처리하여 비특이성 항원의 반응을 제거하였다. Substance P 염색은 1 : 3000으로 희석한 1차 항체(rabbit anti-substance P)를, CRF, CRF-R, CRF-BP의 염색은

각각의 항체를 1 : 100으로 희석한 1차 항체를 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하며 Hsu 등[19]의 방법에 따라 2차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc.)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 1 시간 반응시켰다. 다시 15 분간 2 회 0.1 M PB로 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1 시간 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15 분간 2 회 수세하고 30㎎의 3-3′ diaminobenzidine를 150 ㎖의 0.1 M PB에 녹인 용액에 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 hematoxylin으로 20초간 대조염색한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4) 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 Student,s t test에 의하여 검정하였으며, P값이 $P < 0.05$인 것만 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

실험결과

1. 육안적인 관찰 소견

자연적으로 발생한 원형탈모 생쥐에서 四物湯加味方의 발모효과를 알아보고자 10주 동안(6 주간의 구강투여 후 4 주간 구강투여와 피부도포 병행) 육안적인 관찰을 시행한 결과 생리식염수를 활용한 대조군의 경우 2 주 까지는 등이 검어지기 시작하는 발모현상이 나타나는 예가 관찰되지 않았다(Fig. 1a & 1b). 실험 6 주째에 이르러 8 마리 중 3 마리(37.5%)에서 탈모된 등쪽 피부 일부분에서 검어지기 시작하는 발모현상을 관찰하였다(Fig. 1c & 3a). 또한 피부도포 방법을 동시에 실시한 실험 7 - 10 주의 대조군은 일부분의 탈모된 피부에서 발모현상이 약간씩 일어났으나 탈모된 부위 전체에 발모가 일어난 예는 관찰 할 수 없었다(Fig. 1d & 1e & 1f).

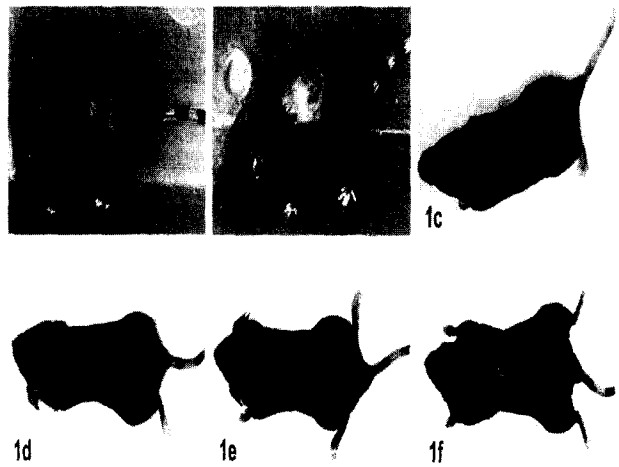

Fig. 1. Delayed hair regrowth of control group in spontaneous alopecia areata of C57BL/6N mice (1a; 0 week, 1b; 2 weeks, 1c; 6 weeks, 1d; 7 weeks, 1e; 8 weeks, 1f; 9 weeks).

四物湯加味方을 투여한 실험군의 경우 약물투여 0-2 주부터 탈모된 피부아래에서 발모현상(등쪽 피부가 약간 검어지기 시작함)이 8마리 중 7마리(87.5%)에서 일어나기 시작하였다(Fig. 2a & 2b). 실험 6주에는 8마리 중 5마리(62.5%)에서 등쪽 피부가 점점 검어지면서 털이 나오기 시작하였다(Fig. 2c & 3b). 실험 7 주부터는 四物湯加味方의 구강투여와 피부도포를 병행으로 실시한바 실험 8-9 주에 5 마리 중 4 마리(6주째 발모가 일어나서 희생시킨 3마리 포함하면 8 마리 중 7마리, 87.5%)에서 발모현상이 구강투여를 시행했을 때보다 빨리 진행되어 탈모된 부위 전체에서 발모가 일어났다(Fig. 2d & 2e & 2f). 그러나 발모현상이 관찰되지 않은 1 마리의 경우 10주째에도 탈모된 부위 전체에 발모 현상이 일어나지 않았고 탈모부위 주변에서만 일부 발모현상이 관찰되었다.

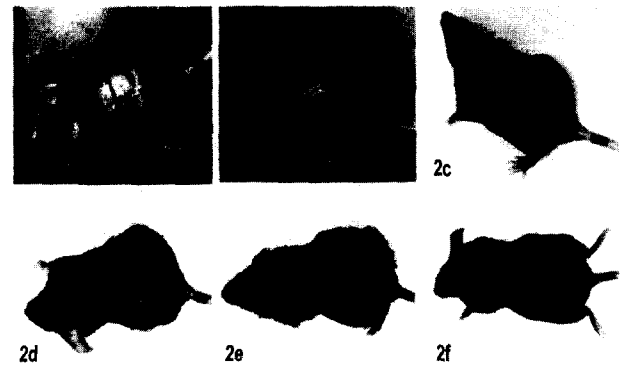

Fig. 2. Accelerated hair regrowth of experimental group in spontaneous alopecia areata of C57BL/6N mice (2a; 0 week, 2b; 2 weeks, 2c; 6 weeks, 2d; 7 weeks, 2e; 8 weeks, 2f; 9 weeks).

Fig. 3. Stereomicroscopic observation of dorsal skin in control group (3a) and experimental group (3b) at 10 weeks.

2. 광학현미경적 관찰 결과

형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 실험 6 주 후에 각 군에서 3 마리씩 희생시켜 형태학적 관찰을 시도하였다. 먼저 일반적인 H&E 염색을 시행한 결과 대조군의 경우 발생중인 모낭의 수가 실험군에 비하여 현저하게 감소하였으나 피지샘은 실험군에 비하여 매우 발달하였다. 또한 표피의 두께는 대조군의 경우 실험군에 비하여 매우 얇았다(Fig. 4a). 그러나 四物湯加味方을 투여한 실험군의 경우 발생중인 모낭의 수는 대조군에 비하여 증가하였으며 피지샘은 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4b). 또한 염증반응과 관련된 호산구(eosinophils)의 변화를 보기 위한 congo red 염색을 시행한 결과, 四物湯加味方을 투여한 실험군의 경우 대조군에 비하여 호산구의 수가 현저하게 감소되었다(Fig. 5a & 5b).

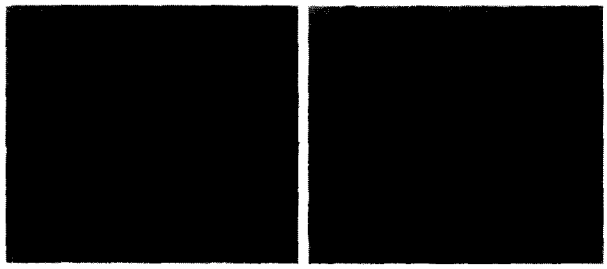

Fig. 4. Histological observation of H&E stained paraffin sections demonstrates shedding hair and developed sebaceous gland in control group (4a) and different developing stages of hair follicle in experimental group (4b) at 6 weeks.

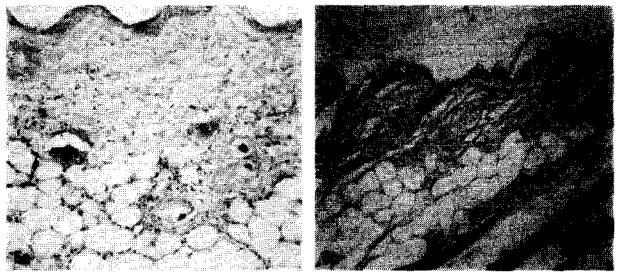

Fig. 5. Histological observation of congo red stained paraffin sections demonstrates infiltration of eosinophils of perifollicular region in control group (5a) and no infiltration of eosinophils of perifollicular region in experimental group (5b) at 6 weeks.

피부조직 내 비만세포 수의 변화를 알아보기 위하여 실험 6주와 10 주에 toluidin blue 염색과 alcian blue 염색을 시행하였고 8 주령 정상 생쥐를 정상군으로 하였다. 실험 6 주 후의 비만세포 수의 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 정상군에서 10.5 ± 3.8개로 나타났으나 원형탈모 생쥐의 대조군에서는 48.3 ± 3.4개로 증가되었다. 그러나 원형탈모 생쥐에 四物湯加味方을 투여한 실험군에서는 22.7 ± 2.9개로 대조군에 비하여 비만세포가 유의하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6a & 6b). 또한 alcian blue 염색으로 비만세포 수의 변화를 관찰한 바 정상군에서 2.9 ± 1.04개 이었으나 대조군에서는 31.2 ± 2.8개로 정상군에 비하여 증가하였다(Fig. 7a). 그러나 四物湯加味方을 투여한 실험군에서는 17.4 ± 3.8개로 대조군에 비하여 유의성있게 감소하는 경향을 보였으며(Table 2), 대조군에서의 alcian blue에 염색된 비만세포들은 실험군에 비하여 탈과립된 상태로 흩어져 관찰되었다(Fig. 7b).

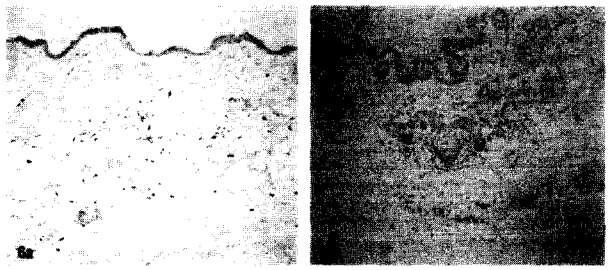

Fig. 6. Histological observation of toluidine blue stained paraffin sections demonstrates many infiltration of mast cells of dermis and subcutaneous tissue in control group (6a) and a few infiltration of mast cells of dermis and subcutaneous tissue in experimental group (6b) at 6 weeks.

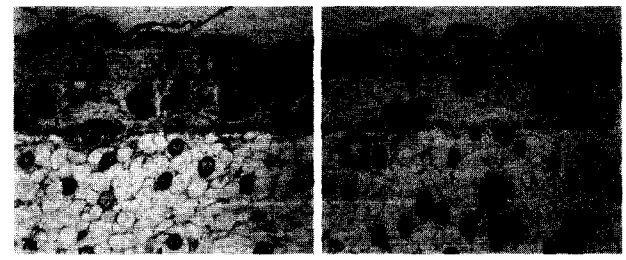

Fig. 7. Histological observation of alcian blue blue stained paraffin sections demonstrates many infiltration of mast cells of dermis and subcutaneous tissue in control group (7a) and a few infiltration of mast cells of dermis and subcutaneous tissue in experimental group (7b) at 6 weeks.

Table 2. Numerical changes of mast cells stained by toluidine blue and alcian blue after administration of SGB for 6 weeks in alopecia areata of C57BL/6N mice

	Toluidine blue stain	Alcian blue stain
Normal group[1]	10.5 ± 3.8	2.9 ± 1.04
Control group[2]	48.3 ± 3.4	31.2 ± 2.8
Experimental group[3]	22.7 ± 2.9*	17.4 ± 3.8*

Values are Mean±SD. [1]Normal group : Normal C57BL/6N mice [2]Control group : Saline administration for 6 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice [3]Experimental group : SGB administration for 6 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice Significant differences as compared with control group : *, P<0.05.

실험 1-6 주간은 四物湯加味方을 구강투여하고, 7-10 주의 4주 동안 구강 투여와 피부도포를 병행한 후 실험 10 주째에 조직절편 내 비만세포의 수를 Toluidin blue 염색으로 관찰한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 정상군에서는 14.5 ± 3.4개 이었으며, 대조군에서 54.2 ± 3.9개로 증가하였으나, 四物湯加味方을 투여한 실험군에서는 17.5 ± 4.3개로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한 alcian blue에 염색된 비만세포의 수는 정상군에서 5.8 ± 1.8이었으며, 대조군에서는 35.1 ± 2.5개로 증가하였으나, 실험군에서는 12.5 ± 2.5개로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 3).

Table 3. Numerical changes of mast cells stained by toluidine blue and alcian blue after administration of SGB for 10 weeks and together with spread for 4 weeks in alopecia areata of C57BL/6N mice

	Toluidine blue stain	Alcian blue stain
Normal group[1]	14.5±3.4	5.8±1.8
Control group[2]	54.2±3.9	35.1±2.5
Experimental group[3]	17.5±4.3*	12.5±2.5*

Values are Mean±SD. [1]Normal group : Normal C57BL/6N mice [2]Control group : Saline administration for 6 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice [3]Experimental group : SGB administration for 6 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice Significant differences as compared with control group:*, P<0.05.

또한 실험 10 주에 toluidin blue 염색에 의한 비만세포의 수를 진피층과 피하층으로 나누어 관찰한 결과 정상군에서 각각 5.0 ± 2.0개와 2.6 ± 1.5개 이었으며, 대조군에서는 28.8 ± 3.9개와 22.3 ± 3.0개로 증가되어 나타났다. 특히 실험군의 경우 10.4 ± 2.6개와 6.7 ± 2.6개로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한 alcian blue에 염색된 비만세포의 수를 진피층과 피하층으로 나누어 관찰한 결과 정상군에서 5.0 ± 2.3개와 1.7 ± 2.0개로 나타

났으며, 대조군에서는 16.4 ± 2.1개와 18.8 ± 3.2개로 증가하였으나, 실험군에서는 9.5 ± 1.9개와 12.5 ± 3.7개로 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(Table 4).

Table 4. The immunohistochemical stain density on the neuropeptides of skin after administration of SGB for 10 weeks and together with apply to skin for 4 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice

	Subatance P		CRF	
	dermis	subcutaneous tissue	dermis	subcutaneous tissue
Normal group	+*	+ +	+	+
Control group	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Experimental group	+	+	+ +	+

* Immunohistochemical staining density: +: weak stain, + +: mild stain, + + +: strong stain

3. Neuropeptide에 대한 면역조직화학적 관찰

1) Substance P

Substance P에 대한 면역반응은 정상군에서 표피와 진피에 미약하게 나타났고 진피와 피하층 사이에서 강하게 나타났다. 대조군에서는 표피, 진피 및 진피와 피하층의 경계에서 강하게 나타났으며, 실험군에서는 표피와 진피사이에서만 강하게 나타났고 다른 부위에서는 미약하게 나타났다(Fig. 8a & 8b, Table 5).

Fig. 8. Immunolocalization of substance-P antigens was observed heavy stained density in back skin of control group (8a) and weak stained density in back skin of experimental group (8b) at 6 weeks.

2) Corticotropin releasing factor(CRF)

CRF에 대한 면역반응은 정상군의 경우 표피와 생장기의 외모근초에서 중등도로 나타났고 대조군에서는 표피와 피지샘에서 미약하게 나타났다. 실험군에서는 표피와 피지샘에서 중등도로 나타났고, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서 강하게 나타났다(Fig. 9a & 9b, Table 5).

Fig. 9. Immunolocalization of CRF antigens was observed was observed weak stained density in back skin of control group (9a) and mild stained density in back skin of experimental group (9b) at 6 weeks.

Table 5. The immunohistochemical stain density on the neuropeptides of skin after administration of SGB for 10 weeks and together with apply to skin for 4 weeks in alopecia areata model of C57BL/6N mice

	Subatance P		CRF	
	dermis	subcutaneous tissue	dermis	subcutaneous tissue
Normal group	+*	+ +	+	+
Control group	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Experimental group	+	+	+ +	+

* Immunohistochemical staining density: +: weak stain, + +: mild stain, + + +: strong stain

3) CRF-receptor(CRF-R)

CRF-R에 대한 면역반응은 정상군의 경우 표피에서 강하게 나타났고 생장기의 내, 외모근초에서 중등도로 나타났으며 대조군에서는 표피와 휴지기 모낭주위에 미약하게 나타났다. 실험군에서는 표피, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서 강한 면역반응이 나타났고, 피지샘과 2차 모배아상피세포에서 중등도로 나타났다(Fig. 10a & 10b).

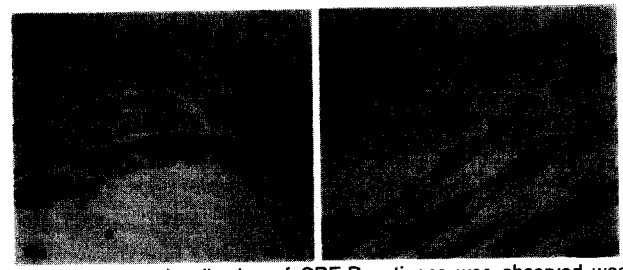

Fig. 10. Immunolocalization of CRF-R antigens was observed was observed weak stained density in back skin of control group (10a) and heavy stained density in back skin of experimental group (10b) at 6 weeks.

4) CRF-binding protein(CRF-BP)

CRF-BP에 대한 면역반응은 정상군의 경우 표피, 생장기의 내, 외모근초 및 2차 모배아상피(secondary hair germ epithelium)에서 중등도로 나타났고 대조군에서는 표피에서만 미약하게 나타났다. 실험군에서는 표피, 피지샘, 2차 모배아상피, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서 중등도로 나타났다(Fig. 11a & 11b).

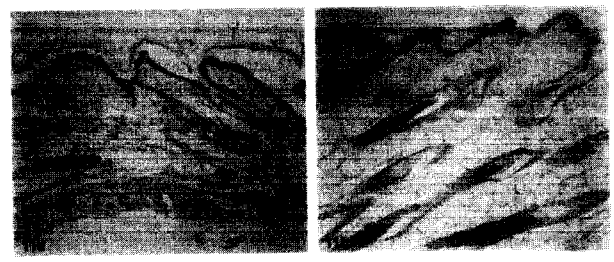

Fig. 11. Immunolocalization of CRF-BP antigens was observed was observed weak stained density in back skin of control group (11a) and heavy stained density in back skin of experimental group (11b) at 6 weeks.

고 찰

毛髮은 물리적 충격으로부터 머리를 보호하고, 직사일광, 한냉, 위험 등의 외부자극으로부터 頭皮를 보호하는 기능 및 美容學的으로도 중요한 기능을 하고 있다.

毛髮은 皮膚와 함께 발생하며 毛囊(hair follicle)은 表皮에 있는 種子層의 증식으로 시작되어 아래에 있는 眞皮로 확대되고 毛囊이나 毛芽(hair bud)의 심층은 클럽모양의 毛球(hair bulb)를 형성하며 毛球上皮細胞가 種子基質을 이룬 후 털로 자라게 된다. 毛球는 작은 中間葉 털유두(mesenchymal hair papilla)에 의해 곧 陷入되어 毛球의 주위세포는 뿌리상피집(epithelial root sheath)을 형성하며, 그 주위를 둘러싸고 있는 중간엽세포는 뿌리진피집(dermal root sheath)으로 분화된다. 種子基質 내의 세포가 증식하고 角質化되어 毛幹(hair shaft)이 된다[20]. 毛乳頭는 毛髮의 成長에 중요한 역할을 하며 3-5년의 成長期(anagen), 1-2개월의 退化期(catagen), 3-5개월의 休止期(telogen) 및 發生期(new anagen stage)의 毛髮成長週期가 있다.

모발의 成長週期別로 일어나는 脫毛의 원인을 분류하면 休止期性 脫毛는 남성형 탈모, 산후 탈모, 지루성 탈모 및 내분비질환에 의한 탈모를 말하며 成長期性 脫毛는 圓形脫毛, 瘢痕性脫毛 및 頭部白癬에 의한 脫毛를 말한다[21].

脫髮과 관련된 기록은 <黃帝內徑>[22]에는 '髮墮' ,'髮落', '毛拔', '髮去' 등이라 하였으며, <肘後備急方>[23]에서는 '鬚髮髮禿'라 하였다. <諸病源候論>[24]에서는 '鬚髮禿落候', '鬼舐頭候', '毛髮不生候', '白禿候' 등의 症候名이 나오며 이 중 '鬼舐頭候' 의 증상은 '風邪가 머리에 있어 偏虛한 곳에 禿落을 發하고 肌肉이 枯死한다. 동전이나 손가락 크기로 머리가 不生하며 가렵지않다'라 하였는데 오늘날의 원형탈모증과 흡사하며 '鬚髮禿落候' 의 증상은 오늘날의 남성형 탈모와 흡사하다.

원형탈모인 '油風' 은 <外科正宗>[25]에서 '血이 虛하여 肌肉과 皮膚가 영화롭게 번성하지 못하는 것이다' 라 하였고, 또한 <醫宗金監'>[26]에는 '白禿', <備急千金要方>[27]에는 '鬼舐頭' 등이라 하였다.

毛髮은 인체의 기본 물질인 氣, 血, 精이 모발성장의 물질적 기초가 되며 氣에는 4종류의 元氣, 宗氣, 營氣, 衛氣가 있다. 元氣는 腎의 정기가 化生되어 인체 생명활동의 원동력이 되어 모발의 발생과 생장을 촉진하며, 宗氣는 肺의 호흡과 心血의 運行을 조화롭게 하며, 營氣는 血液과 함께 脈中으로 행하게 하면서 모발에 영양을 공급하여 혈액으로 화생이 가능하게 한다고 하였다. 衛氣는 皮膚와 分肉之間을 행하며, 모발에 영양공급을 하고 외부의 邪氣가 침입하여 毛根 아래에 머물러 두발손상을 방어하거나 땀을 排泄하여 체온을 조절하여 모발의 성장환경을 조절한다 하였다. 血은 모발발생에 있어서의 영양작용. 즉 모발은 血의 나머지라 혈기가 왕성하면 모발의 생장발육도 왕성하고 血氣가 虛하고 줄어들면 모발도 마르고 위축되어 희소해지거나 혹은 탈락된다고 하였다. 精은 精氣라고도하며 넓은 의미의 精은 氣, 血, 津液 등의 水穀의 精氣를, 협의의 精은 腎의 精氣만을 의미한다. 이 가운데 협의의 精이 毛髮에 중요하다고 하였다[14].

탈모 및 발모와 관련된 여러 가지 요인들은 매우 복잡 다양하기 때문에 정확한 기전을 밝히기가 어렵고 탈모관련 실험동물 모델을 만들기 어려워 탈모기전 규명과 탈모치료제를 개발하는데 어려움이 있었다.

본 실험에서는 1년 이상 사육하여 자연적으로 발생한 C57BL/6N 원형탈모 생쥐 모델을 이용하여 원형탈모의 증상 개선을 위한 치료제의 개발에 목적을 두고 실험을 행하였다.

원형탈모는 '油風'의 범주에 속하는 것으로, 血熱生風, 血瘀毛竅, 氣血兩虛, 肝腎不足에 의하여 발생하며 凉血熄風, 佐以養陰, 通竅活血散瘀, 氣血雙補, 滋補肝腎 등의 治法이 응용되어 주로 四物湯, 六味地黃湯, 逍遙散, 桃紅四物湯, 八珍湯 등이 활용된다[13,14]. 이 중 四物湯은 養血疎肝과 補血調血의 效能을 가지는 대표적인 方劑로 잘 알려져 있으며, 桂枝는 發汗解肌, 溫通經脈, 通陽化氣의 效能을, 紅花 는 活血通經과 祛瘀止痛의 效能을 가지므로 活血散瘀의 작용을 기대할 수 있다. 또한 補血藥材에 속하는 何首烏는 補肝腎과 益精血의 效能을 가지므로 滋補肝腎의 작용이 예상되어 油風의 범주에 속하는 圓形脫毛症에 四物湯加味方이 유효할 것으로 예상되는 처방이다.

이에 四物湯加味方의 효과를 규명하고자 1년 이상 사육하여 자연적으로 발생한 C57BL/6N 원형탈모 생쥐 모델을 이용하여 약물의 구강투여와 피부도포를 병행한 후 발모효과를 육안적으로 관찰하고 원형탈모를 일으킨 대조군과 약물로 처치하여 발모된 실험군의 피부조직 내 여러 가지 인자들을 비교하고자 하였으며, 또한 대조군과 실험군의 면역조절 세포들의 변화를 관찰하였다.

모발의 주기적인 성장활동은 상피-간엽[28], 상피-간엽-신경외배엽의[29] 상호관계를 연구하는데 훌륭한 모델이 되며, 털의 성장에 있어 비만세포의 기능을 이해함으로서 비만세포와 조직과의 상호작용에 의한 다기능세포들의 생리학적 기능을 이해하는데 도움이 된다. 정상적인 피부에서 비만세포의 기능은 아직은 확실하지 않으나, 알러지 반응, 염증질환 그리고 침입하는 미생물에 대한 방어기능을 밝혀야 하며, 비만세포의 탈과립은 그 부위에서의 국소적인 세포변환을 유발하는(mitogenic) 효과가 있어 흰쥐 비만세포내 heparin과 serotonin성분 등 털의 성장과 관련된 여러 가지 변화가 있을 것으로 생각한다[30]. 또한 비만세포는 사이토카인, proteases, 염증매개물질, glycosaminoglycans과 같은 성장조절인자들을 만들어 방출함으로써 조직의 재구성(remodelling)과 털의 성장조절에 관여하는 것으로 생각한다[31].

원형탈모시 비만세포는 숫적으로 증가하여 털의 생장기, 퇴화기, 휴지기사이에서 주기적으로 스위치 역할을 하면서 털의 성장을 조절하는데 관여한다[7]. 털의 성장주기는 비만세포의 숫적 변화, 진피 내 histamine, serotonin, glycosaminoglycans과 같은 비만세포 분비물의 농도와도 관계가 있으며[32], histamine 방출물을 연속적으로 투여하면 설치류에서 털의 성장을 지연시킨다고 하였다[33]. 또한 스트레스 하에서 시상하부에서 방출되는 주요 인자인 corticotropin releasing hormone(CRH)은 뇌하수체에서 주로 발견되는데[34], 이는 proinflammatory action을 가지고 있으며[35], 원형탈모증 모델 설치류 피부에서 비만세포 탈과립과 혈관투

과성을 증가시켜 모낭주위에 스트레스에 의하여 유발된 염증세포의 침윤을 일으킨다고 하였다[36].

본 실험에서는 四物湯加味方을 처음 6주간은 구강투여만을 실시하고, 7-10주에는 四物湯加味方을 구강투여와 함께 4주 동안 피부도포를 병행실시한 후 10주째에 희생시킨 생쥐의 피부조직 절편 내 비만세포 수를 관찰한 바 toluidin blue에 염색된 비만세포는 대조군에서 정상군에 비하여 증가하였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한 alcian blue에 염색된 비만세포의 수에서도 대조군은 정상군 보다 증가하였으나, 실험군에서는 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. 또한 피부조직 절편 내 비만세포 수를 진피층과 피하층으로 나누어 관찰한 결과 대조군에서 증가하였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 감소하였다. Alcian blue에 염색된 비만세포 수의 경우 진피층과 피하층으로 나누어 관찰한바 대조군에서 증가하였고 실험군에서는 대조군에 비하여 현저히 감소하여 四物湯加味方의 발모효과는 비만세포의 숫적 감소와 관련이 있을 것으로 사료된다.

털의 성장조절은 감각신경이 관여하며, 감각신경세포에서 분비되는 substance P는 신경세포체에서 합성된 neuropeptide를 소포형태로 말초신경종말에 전달하여, 혈액순환을 조절하고, 선분비 활동 및 피부염증 반응과 같은 많은 운동기능을 하며, 최근에는 피부신경지배의 중요한 기능, 상처치유, 표피와 같은 여러 가지 상피세포의 유지에 관여한다고 하였다[10].

본 실험에서의 substance P에 대한 면역반응은 정상군에서는 표피와 진피에서 미약하게 나타났고 진피와 피하층 사이에서만 강하게 나타났다. 대조군에서는 표피, 진피 및 진피와 피하층의 경계에서 강하게 나타났으며, 실험군에서는 표피와 진피사이에서만 강하게 나타났고 다른 부위에서는 미약하게 나타내어 대조군에 비하여 미약한 면역반응을 나타내었다.

스트레스와 같은 정신적인 요인은 병적인 아토피성 피부염과 원형탈모증을 유발하며, lymphokines 그리고 다른 화학적 매개물질을 통하여 염증반응에 관여한다[37]. 스트레스는 시상하부에서 방출되는 주요 인자인 CRH에 대한 2개의 수용체(CRH-1, CRH-2α or CRH-2β)를 가지고 있으며, 이들은 뇌하수체 뿐 만아니라 말초조직에서도 발견 된다[38]. CRH 투여하거나 급성으로 스트레스를 가하면[39] 원형탈모증 모델 설치류 피부에서 비만세포 탈과립과 혈관투과성을 증가시켜 모낭주위에 염증세포의 침윤을 일으킨다고 하였다[40]. 시험관내 실험에서 CRH는 특이적으로 CRH 수용체 기전에 의하여 내피세포 chemotaxis를 자극한다고 하였고, 생체실험에서는 혈관신생(angiogenesis)을 촉진한다고 하여 신경계 밖의 말초조직 내 CRH는 국소적인 혈관재생에 관여한다고 하였으며, 국소적으로 분비된 CRH는 피부의 생리와 병리에 중요한 역할을 하며 중추신경계 내 신경내분비적 또는 신경전달물질 역할을 하는 것 이외에도 면역조절자, 심혈관, 생식기계 및 성장인자로서 중요한 역할을 한다고 하였다[40].

CRH와 CRH 수용체는 부신, 성선, 태반, 위장관계의 말초조직에서 발현되며[38] paracrine 형태로 작용하나 피하의 CRH는 국소적으로 피부의 구성성분인 면역, 혈관, 상피 및 멜라닌 세포계 등을 조절한다고 하였다. 이러한 반응은 직접 특이수용체와의 상호작용에 의하여 일어나며 간접적으로는 국소적으로 분비된 ACTH, MSH 그리고 β-endorphin의 자극에 의하여 일어난다고 하였다. 이러한 국소적인 CRH 신호전달체계는 국소적인 스트레스에 대하여 피부 조절에 관여한다고 하였다[41].

본 실험에서 CRF에 대한 면역반응은 대조군에서 표피와 피지샘에서 미약하게 나타났으나, 실험군에서는 표피와 피지샘에서 중등도로, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서는 강하게 나타났다. CRF-R에 대한 면역반응은 대조군에서 표피와 휴지기 모낭주위에서 미약하게 나타났으나. 실험군에서는 표피, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서 강하게 나타났고, 피지샘과 2차 모배아상피에 중등도로 나타났다. CRF-BP에 대한 면역반응은 대조군에서 표피에서만 미약하게 나타났으나. 실험군에서는 표피, 피지샘, 2차 모배아상피, 여러 단계의 생장기에 있는 내, 외모근초에서 중등도로 나타났다.

이러한 면역반응은 대조군의 모낭은 생장기 초기인데 반하여 실험군에서는 모낭의 성장이 빨라 생장기 중기로서 내, 외모근초에서 중등도 및 강도의 면역반응을 보인 것으로 생각되며, 이러한 면역반응은 四物湯加味方에 의한 모낭의 생장 촉진에 기인한 생장단계별 면역반응의 차이라고 생각된다.

이상의 실험결과를 종합하면 四物湯加味方의 구강투여와 피부도포에 의한 발모효과를 육안적으로 확인할 수 있었으며, 四物湯加味方은 털의 성장과 관련된 비만세포와 호산구의 수를 감소시켰다. 또한 피부에 존재하는 여러 가지 neuropeptide들의 면역조직학적 반응 검사에서 대조군에 비하여 면역반응이 증가한 것으로 나타나 四物湯加味方은 원형탈모의 생쥐에서 발모를 촉진하는 것으로 나타나 향후 인체에 직접적인 응용을 위한 면역학적인 연구 등 지속적인 연구가 요구되어진다.

결 론

四物湯加味方의 원형탈모증에 대한 치료효과를 알아보고자 자발적인 원형탈모 모델 C57BL/6N 생쥐에 四物湯加味方 추출물을 10주 동안 경구투여하고, 4주 동안 피부도포를 시행하여 육안적으로 發毛效果를 확인하고 형태학적인 연구와 더불어 면역조절세포와 neuropeptide의 변화를 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

四物湯加味方 은 실험 7주째부터 현저한 발모효과(87.5 %)가 인정되었다. 四物湯加味方을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 비만세포 및 호산구의 수가 감소하였다. 四物湯加味方을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 진피와 피하층의 substance P와 CRF에 대한 면역반응이 감소하였다. 四物湯加味方을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 표피, 피지샘, 내외모근초 및 2차모배아상피에서 CRF, CRF-R, CRF-BP에 대한 면역반응이 증가하였다.

이상의 실험결과 四物湯加味方은 털의 성장과 관련된 비만세포와 호산구의 숫적 감소와, 피부에 존재하는 substance P와 CRF를 감소시켰으며, CRF-R, CRF-BP 에 대한 반응을 강하게 나타내어 四物湯加味方이 원형탈모증 치료에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Domonkos, A.N., Arnold, H.L., Odom, R.B. Andrews diseases of the skin. 7th ed. WB Saunders Co, Philadelphia, USA, pp 936-939, 1982.
2. Maquire, H.C., Hanno, R. Diseases of the hair. In Dermatology. Moschella SL, Hurley HJ:(eds) 2nd eds. , WB Saunders Co. Philadelphia, USA, pp 1374-1379, 1985.
3. Bergfeld, W., Diffuse hair loss in women. Cutis 22, 190-195, 1987.
4. Beard, H.O. Social and psycological implications of alopecia areata. J. Am. Acad. Dermatol. 14, 697-700, 1986.
5. Muller, H.K., Rook, A.J., Kubba, R. Immunohistology and autoantibody studies in alopecia areata. Br. J. Dermatol. 102, 609-610, 1980.
6. Carroll, J., McElwee, K.J., King, L.E., Byrne, M., Sundberg, J.P., Gene array profiling and immunomodulation studies define a cell mediated immune response underlying the pathogenesis of alopecia areata in a mouse model and humans. J. Invest. Dermatol. 119, 392-402, 2002.
7. Paus, R., Link, R.E., The psoriatic epidermal lesion and anagen hair growth may share the same "switch-on" mechanism. Yale J. Biol. Med. 61, 467-476, 1989.
8. Kozlowska, U., Blume-Peytavi, U., Kodelja, V., Sommer, C., Goerdt, S., Majewski, S., Jablonska, S., Orfanos, C.E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in various compartments of the human follicle. Arch. Dermatol. Res. 290, 661-668, 1998.
9. Li, L.F., Guo, J., Gao, Z.F. Overexpression of skin protein kinase C-alpha in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. Clin. Exp. Dermatol. 2894, 429-433, 2003.
10. Botchkareva, N.V., Khlgatian, M., Longley, B.J., Botchkarev, V., Gilchrest, B.A. SCF/c-kit signaling is required for cycling regeneration of the hair pigmentation unit. FASEB J. 15, 645-658, 2001.
11. Tausk, F., Christian, E., Johansson, O., Milgram, S. Neurobiology of the skin. In Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Freedberg, I.M., Austen, K.F. eds. Dermatology in General Medicine, New York: McGraw-Hill, 1993.
12. De Waard-Van der Spek, F.B., Orange, A.P., De Raeymaecker, D.M., Peereboom-Wynia, J.D. Juvenile versus maturity-onset alopecia areata- A comparative retrospective clinical study. Clin. Exp. Dermatol. 14, 429-433, 1989.
13. 한방피부미용학회, 한방피부미용학개론, 한방피부미용학회, 서울, p 266-269, 2004.
14. 黃霏莉, 余靖, 中醫美容學, 제2판, 人民衛生出版社, pp 185-186, 2004.
15. 김소영, 김중호, 채병윤. 탈모에 응용되는 신응양진단의 효능에 관한 실험적 연구. 외관과학회지 4(1):43-58, 1991.
16. 이희삼, 문재유. Cytarabine으로 유도된 탈모증에 대한 상백피 추출물의 육모촉진 효과. 약학회지 44(1):66-70, 2000.
17. 이희삼, 윤성중, 문윤기, 문재유. 탈모증에 대한 상백피 복합물의 모발성장 효과. 한국잠사학회지 42(2):83-85, 2000.
18. 노현찬, 노석선. 고삼추출물이 모발성장 촉진 및 면포억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지 15(1):96-126, 2002.
19. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580, 1981.
20. 고재승 외 19인. 인체발생학, 5판, 정문각, 서울, p 483, 1996.
21. 최근희 외 11인, 모발과학, 수문사, 서울, p 36-38, 138-140, 2001.
22. 김달호, 黃帝內經注解補注素問, 醫聖堂, p 14, 18, 236, 1980,
23. 葛洪. 肘後備急方, 人民衛生出版社, 북경, p 165-166, 1996.
24. 巢元方. 諸病源候論 校釋, 人民衛生出版社,pp 761-769, 1983.
25. 陳實功. 外科正宗. (中華經典醫書 第六集)., 中國醫藥科學技術出版社. p 987, 2002.
26. 吳謙. 醫宗金監(下卷). 第2版, 人民衛生出版社, p 1660, 1982.
27. 孫思邈. 備急千金要方. 人民衛生出版社, p 297, 1982.
28. Link, R.E., Paus, R., Stenn, K.S., Kuklinska, E., Moellmann, G. Epithelial growth by rat vibrissae follicles in vitro requires mesenchymal contact via native extracellular matrix. J. Innvest. Dermatol. 94, 202-207, 1990.
29. Slominski, A., Paus, R., Constantino, R. Differential expression and acticity of melanogenesis-related proteins during induced hair growth in mice. J. Invest. Dermatol. 96, 172-179, 1991.
30. Enerback, L., Mellblom, L. Growth related changes in the content of heparin and 5-hydroxytryptamine of mast cells. Cell Tissue Res. 187, 367-378, 1978.
31. Paul, W.E., Seder, R.A., Plaut, M. Lymphokine and cytokine production by Fc-epsilon RI^{+} cells. Adv. Immunol. 53, 1-29, 1993.
32. Moretti, G., Ranabou, E.M., Rebora, A. The hair cycle re-evaluated. Int. J. Dermatol. 15, 277-281, 1976.
33. Stern, P., Misirlija, A. Die Bedeutung des Hauthistamins fur den Haarwuchs bei Ratten und Meerschweinchen. Int. Arch. Allergy 12, 334-339, 1958.
34. Lovenberg, T.W., Chalmers, D.T., Liu, C., DeSouza, E.B. CRF2α and CRF2β receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. Endocrinology 136, 4139-4142, 1995.
35. Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Listwak, S., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin releasing hormone in vivo. Science 254, 421-423, 1991.

36. Jaworsky, C., Kligman, A.M., Murphy, G.F. Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implication for pathogenesis. Br. J. Dermatol. 127, 239-246, 1992.
37. Van Moffaert, M. Psychodermatology : An overview: Psychother. Psychosom. 58, 125-136, 1992.
38. Chrousos, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. N. Engl. J. Med. 332, 1351-1362, 1995.
39. Singh, L.K., Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R., Theoharides, T.C. Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticontropin releasing hormone, neurotensin and substance P: A link to neurogenic skin disorders. Brain Behav. Immun. 13, 225-239, 1992.
40. Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Mazurkiewicz, J.E., Corliss, D., Eastman, A. The expression of proopiomelanocortin (POMC), of corticotropin releasing hormone receptor (CRH-R) genes in mouse skin. Biochim. Biophys. Acta. 1289, 247-251, 1996.
41. Detmar, M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin. J. Invest. Dermatol. 106, 207-208, 1996.