

延年益壽固本丹의 育毛效能에 대한 면역조직화학적 연구

정춘근¹, 심은섭¹, 이창열¹, 김범희², 김성준¹, 강희¹, 손낙원¹

¹경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

²동의대학교 한의과대학 해부학교실

Immunohistochemical Study on Hair Growth Promoting Effect of *Yonnyuniksoogobon-dan*

Chun-Geun Jeong¹, Eun-Sheb Shim¹, Chang-Yeol Lee¹, Bum-Hoi Kim²,
Seong-Joon Kim¹, Hee Kang¹, Nak-Won Sohn¹

¹Division of Oriental Medical Science,

Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

²Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Objectives: *Yonnyuniksoogobon-dan* (Yan Nian Yi Shou Gu Ben Dan 延年益壽固本丹) is composed of 11 herbs (Polygoni Multiflori Radix, Lycii Radicis Cortex, Polia, Rehmanniae Radix, Rehmanniae Radix Preparat, Asparagi Radix, Lirioepis Tuber, Lycii Fructus, Acori Graminei Rhizoma, Angelicae Acutiloba Radix, and Pini Folium) based on Yonryungobon-dan (Yan Ling Gu Ben Dan 延齡固本丹) and Yonnyuniksoobulrho-dan (Yan Nian Yi Shou Bu Lao Dan 延年益壽不老丹). This study evaluated hair growth promoting effect of *Yonnyuniksoogobon-dan* on the shaved C57BL/6 mice.

Methods: *Yonnyuniksoogobon-dan* was treated by oral administration (Sample I) and oral administration plus skin application (Sample II) once a day for 12 days. Hair regrowth was photographically and histologically determined during the experimental period. Hair growth cycle related factors (EGF, TGF- β 1) and vascular factors (VEGF, iNOS) were also determined with immunohistochemistry.

Results:

1. On gross observation of hair regrowth, Sample I and Sample II groups demonstrated acceleration of hair regrowth.
2. The hair regrowth index of the Sample I group increased significantly from 7 days ($P < 0.05$) to 12 days ($P < 0.01$) after the shave while that of the Sample II group significantly increased at 12 days ($P < 0.05$).
3. On histological observation, both Sample I and Sample II groups demonstrated histological improvement and increases of number and diameter of the hair follicles.
4. EGF expressions on the root sheath of hair follicles were up-regulated in both Sample I and Sample II groups.
5. TGF- β 1 expressions on the root sheath of hair follicles were not regulated in Sample I or Sample II groups.
6. VEGF expressions in the surrounding tissues of hair follicles were up-regulated in both Sample I and Sample II groups.
7. iNOS expressions in the surrounding tissues of hair follicles were down-regulated in both Sample I and Sample II groups.

Conclusions: These results suggest that *Yonnyuniksoogobon-dan* has hair growth-promoting activity and these effects relate to up-regulations of EGF and VEGF expressions and down-regulations of TGF- β 1 and iNOS expressions on hair roots.

Key Words : *Yonnyuniksoogobon-dan*, hair growth, EGF, VEGF, TGF- β 1, iNOS

· Received : 3 December 2009

· Revised : 11 January 2010

· Accepted : 11 January 2010

· Correspondence to : 손낙원(Nak-Won Sohn)

경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 전자정보관 444호

Tel : +82-31-201-2747, Fax : +82-31-204-6832, E-mail : sohnnw@khu.ac.kr

서론

모발은 외부로부터의 물리적인 충격, 태양광선, 한랭 등에 대한 완충과 보호의 일차적인 방어 기능과 증금속을 흡수하여 체외로 배출하는 기능 등을 가지고 있다¹⁾. 산업화와 더불어, 유전적 요인, 내분비 요인 (특히 남성호르몬의 과다), 심리적 스트레스, 두피 긴장에 의한 혈행장애, 영양불균형, 환경오염 (대기오염, 두피모발용 화학제품 과다사용 등), 자가면역질환을 포함한 여러 질환 및 약물 등의 다양한 원인으로 탈모가 급속히 증가하여 신체적, 정신적 및 사회적 문제를 수반할 수 있는 독립적인 질환으로 여겨지고 있다²⁻⁴⁾.

한의학에서 모발의 성장은腎이 주관한다고 하였으며, 血이 왕성하면 모발이 윤택해지고 血이 쇠퇴하면 모발도 쇠퇴한다고 하여, 모발이 腎, 血과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 또한 탈모의 원인은, 內因으로 氣血衰弱, 精血不足, 血燥, 腎虛, 肺虛, 濕痰, 七情傷, 外因으로 風, 熱, 火, 不內外因으로 多食甘味 등으로 나눌 수 있다⁵⁻⁹⁾. 이와 같은 한의학적인 탈모의 원인에 따라 한약물, 침구, 약침 등의 임상치료가 실시되고 있으며¹⁰⁾, 최근 한의학계에서도 한약재를 이용한 발모제 개발에 많은 연구를 하고 있다¹⁵⁾. 단미제로는 桑白皮, 槐角, 何首烏, 訶子, 木瓜, 木香, 當歸, 白芷, 苦參, 細辛, 黑豆, 五倍子 등¹⁰⁻¹⁶⁾, 복합처방으로는 神應養眞丹¹⁷⁾, 當歸補血湯加味方¹⁸⁾, 生髮飲¹⁹⁾ 등이 모두두세포 증식, 모두두세포에서 성장인자 촉진, 5 α -reductase type-I과 type-II 활성의 억제, 모낭 조직의 단백질합성 촉진 등의 작용을 통하여 유의한 발모방지 및 육모촉진 효과가 있다고 하였다.

본 연구에서는 탈모의 한의학적 원인 중 氣血衰弱, 精血不足, 腎虛 등을 개선하여 탈모 방지 및 육모 촉진의 효능을 갖는 처방을 개발하고자 하는 취지에서, 補精益血의 효능이 있는 延齡固本丹^{20,21)}과 生精補腎의 효능이 있어 腎虛하고 精華가 상승하지 못하는 경우에 사용하는 延年益壽不老丹²¹⁾에 수록된 한약재 중 赤何首烏, 地骨皮, 白茯苓, 生地黃, 熟地黃, 天門冬, 麥門冬, 枸杞子 및 石菖蒲와, 탈모에

관련된 효능이 기록된 當歸²¹⁾와 松葉²¹⁾ 등 총 11종으로 처방을 새롭게 구성하여 ‘延年益壽固本丹’이라 명명하고, 육모 촉진에 대한 효능을 실험하였다.

연년익수고본단의 육모효능을 실험적으로 관찰하기 위해서 제모된 C57BL/6 마우스의 모발성장 상태를 조직학적으로 관찰하고, 모낭과 모발의 성장에 관련된 인자인 epidermal growth factor (EGF)와 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), 모낭 주위 조직의 혈액공급에 관련된 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 5주된 암컷 C57BL/6 마우스 (샘타코, Korea) 36마리를 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 (21~23°C), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료 (삼양사, Korea)를 자유롭게 공급받았으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 한약물의 제조

연년익수고본단 (Yonnyuniksoogobon-dan)의 처방 내용은 Table 1과 같으며, 10첩 분량 760 g을 4,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음, 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 94.8 g의 건조된 분말 엑기스를 얻었다. 실험동물의 투여량은 체중비례 계산량의 10배인 15.8 mg/10g body weight를 1회 투여량으로 하였으며, 약물 투여는 각각의 1회 투여량을 0.2 ml의 음용수에 녹여 1일 1회, 12일간 경구투여하였다. 피부도포액은 건조엑기스 30%의 연년익수고본단-생리식염수 용액을 만들어 사용하였다.

Table 1. Herbal Constitution of *Yonnyuniksoogobon-dan*

	Herbs	Weight(g)
赤何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	16.0
地骨皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	10.0
白茯苓	<i>Polia</i>	10.0
生地黄	<i>Rehmanniae Radix</i>	6.0
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	6.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	6.0
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	6.0
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	4.0
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	4.0
當歸	<i>Angelicae Acutiloba Radix</i>	4.0
松葉	<i>Pini Folium</i>	4.0
	Total	잘못된 계산식

3. 제모 및 실험군의 구분

육모 촉진효과를 관찰하기 위해 6주령의 C57BL/6 마우스 배부의 검정색 털을 일차적으로 animal hair clipper로 제거한 다음, 니크린 제모약 (일동제약, Korea)을 사용하여 나머지 털을 완전히 제거하고 깨끗이 닦아주었다. 실험군은 제모된 C57BL/6 마우스에 생리식염수를 경구투여한 대조군 (Control), 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군 및 연년익수고본단의 경구투여와 함께 피부도포를 병행한 Sample II군으로 나누었다. 각 군은 12마리씩으로 하였으며, 약물의 경구투여와 피부도포는 제모한 다음 날부터 매일 오전 10시에 1회씩 12일간 실시하였다.

4. 육모상태의 관찰

육모상태를 확인하기 위하여 실험개시 1일, 5일, 7일, 9일 및 12일에 생쥐를 2% isoflurane으로 가볍게 흡입마취한 후 배부를 디지털카메라 (EOS-10D, Canon, Japan)로 사진 촬영하여 관찰하였다. 동일한 생쥐를 구분하기 위해서는 유성필기구를 사용하여 꼬리에 각기 다른 색깔을 표시하여 구분하였다.

5. 육모지수의 측정

육모 상태를 정량적으로 비교검증하기 위해서, 디지털카메라로 배부를 촬영한 다음 영상을 컴퓨터에 입력하고 NIH의 “ImageJ” software (ver. 1.36)를 사용하여 측정하였다. 육모지수 (hair regrowth index, HRG index)는 C57BL/6 마우스는 털이 검정색이고 melanin 생성이 모발 성장주기와 일치하므로 털이 자라남에 따라 육안적으로 피부의 색이 분홍색으로부터 회색, 짙은 회색 및 검정색으로 변화가는 단계를 이용하여 다음과 같이 계산하였다²²⁾. 제모된 분홍색 피부상태는 4등급으로 0점, 모낭으로부터 털이 자라기 시작하여 피부가 회색을 띠면 3등급으로 1점, 피부 바깥쪽으로 털이 다시 자라 나온 것을 육안으로 확인할 수 있는 상태는 2등급으로 2점, 털이 완전히 자라 검정색이 된 것은 1등급으로 3점을 부여하였다 (Fig. 1-A). 다음으로 배부의 제모된 전체 면적에 대하여 각각 등급 별로 털이 자란 면적비율을 측정하고, 각각의 면적비율에 점수를 곱한 총합을 육모지수로 하였다. 그러므로 육모지수는 최소값 0%에서 최대값 300%를 나타내게 된다 (Fig. 1-B).

6. 피부조직의 처리

실험 7일째와 12일째에 실험동물은 과용량의 sodium pentobarbital로 희생시킨 다음, 배부의 피부

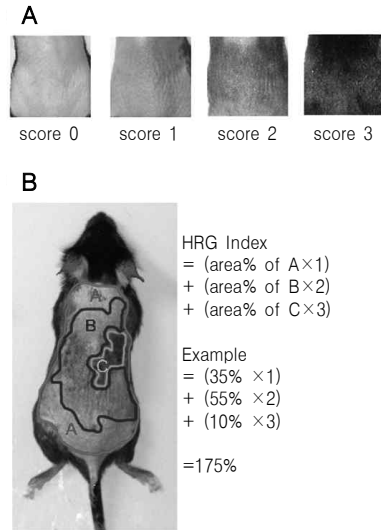


Fig. 1. Representative sections of scores (A) and example of hair regrowth index (HRG index) calculated with area percentages and scores (B).

조직을 채취하여 일부는 dry ice-isophentane으로 동결시키고, 20 μm 두께의 절편을 만들어 면역조직화학염색용으로 사용하였으며, 일부는 10% neutral formalin 용액으로 고정하고 수세한 후 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 파라핀 포매한 피부조직은 8 μm 두께의 조직 절편을 만들어 Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

7. 면역조직화학염색

동결 피부 조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고 1% H_2O_2 에서 10~15분 정도 반응시킨 다음, 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 후 primary antibody를 처리하였다. Primary antibody의 처리는 anti-EGF (1:200, sc-1342, Santacruz, USA), anti-TGF- β 1 (1:100, sc-146, Santacruz, USA), anti-iNOS (1:200, 610329, R&D Bioscience, USA) 및 anti-VEGF (1:100, sc-152, Santacruz, USA)를 사용하였

으며, 각각 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액에 희석한 후 4 $^\circ\text{C}$ 에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase 의 방법 (ABC Vectastain Kit, USA)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. EGF와 iNOS는 diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, USA)에서, TGF- β 1과 VEGF 는 NiCl_2 (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, USA)에서 5~10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. 면역조직화학염색의 결과는 광학현미경으로 조직 전체를 관찰하여, 염색강도가 불분명하거나 미약한 경우 \pm , 미약한 양성반응은 +, 중등도의 양성반응은 ++, 강하게 발현된 정도는 +++로 구분하였다.

8. 통계분석

실험자료의 통계분석은 대조군에 대한 Sample I 군과 Sample II군 각각의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Student's t-test 방법을 사용하여 검정하였다.

결 과

1. 발모상태의 육안적 변화

대조군은 제모 5일째까지는 제모된 배부가 털이 자라지 않은 상태의 분홍색 피부로 관찰되었고 (Fig. 2, Control, 1 day), 7일째에는 모낭으로부터 새로운 털이 자라나기 시작하여 피부가 부분적으로 회색으로 변화하였으며, 부분적으로는 여전히 털이 자라지 않는 분홍색 피부를 나타내었다 (Fig. 2, Control, 7 days). 9일째에는 제모된 배부가 모낭에서 전체적으로 새로운 털이 많이 자라나 피부색이 짙은 회색으로 변화하였으나, 일부분에서는 피부 바깥쪽까지 털이 자라난 것을 관찰할 수 있었으며, 또 일부분에서는 여전히 털이 자라지 않는 분홍색 피부를 나타내었다 (Fig. 2, Control, 9 days). 12일째에는 부분적이기는 하지만 검정색 털이 완전히 자라난 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, Control, 12 days). 이에 비하여 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군은 7일과 9일째까지는 대조군과 유사한 변화를 나타내었

으나, 회색으로 변한 피부 부위가 더 넓었으며 (Fig. 2, Sample I, 7 days, 9 days), 12일째에는 피부 바깥쪽까지 털이 자라난 부위 면적이 대조군에 비하여 더 넓어진 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, Sample I, 12 days). 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군 역시 Sample I군과 유사한 양상으로 대조군에 비해서는 발모가 더 촉진된 상태를 관찰할 수 있었으나 Sample I군과 비교하여 큰 차이가 없었다 (Fig. 2, Sample II).

2. 육모지수의 변화

털이 다시 자라난 상태와 그 면적 비율로부터 육모지수를 측정된 결과, 대조군은 1일에 0%, 7일에 61.1±3.3%, 9일에 122.5±13.0%, 12일에 219.2±15.0%를 나타내었다. 이에 비하여 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군은 1일에 0%, 7일에 75.4±5.5%, 9일에 180.0±10.6%, 12일에 268.3±10.2%를 나타내어, 대조군에 비하여 7일부터 12일까지 지속적인 육모지수의 유의한 (P<0.05, P<0.01) 증가를 나

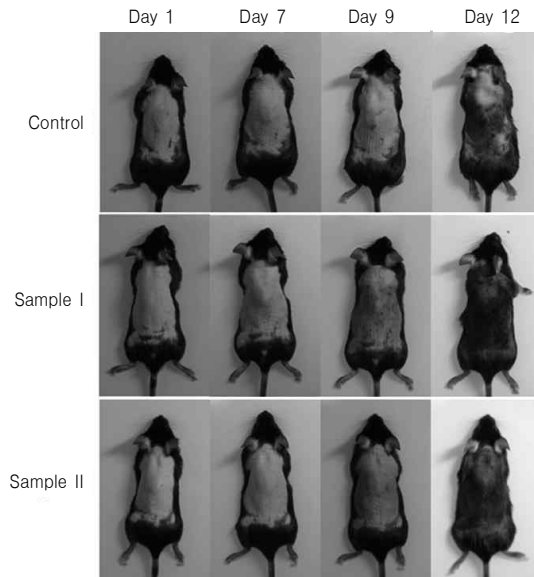


Fig. 2. Representative sections of the hair-shaved C57BL/6 mice for 12 days. *Yonnyuniksoogobon-dan* administration (Sample I) and *Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application (Sample II) accelerated hair regrowth of the hair-shaved C57BL/6 mice.

Table 2. Effect of *Yonnyuniksoogobon-dan* on Hair Regrowth Index of the Hair-Shaved C57BL/6 Mice (%)

Groups	Day after hair shave			
	1 (n=12)	7 (n=12)	9 (n=6)	12 (n=6)
Control	0	61.1±3.3	122.5±13.0	219.2±15.0
Sample I	0	75.4±5.5*	180.0±10.6†	268.3±10.2*
Sample II	0	69.6±6.6	158.3±18.7	259.2±8.3*

Data present Mean ± Standard error.

Control: group treated with saline after the hair shave

Sample-I: group treated with *Yonnyuniksoogobon-dan* administration after the hair shave

Sample-II: group treated with *Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application after the hair shave

Statistical significance was verified with Student's T-test between the control group and each sample groups (*, P<0.05; †, P<0.01).

타내었다. 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군은 1일에 0%, 7일에 69.6±6.6%, 9일에 158.3±18.7%, 12일에 259.2±8.3%를 나타내어 대조군에 비하여 12일에만 P<0.05의 유의성 있는 육모지수의 증가를 나타내었다 (Table 2, Fig. 2, 3).

3. 발모상태의 조직학적 변화

제모 이후 7일과 12일에 H&E 염색한 피부조직에서 모낭 및 발모상태를 광학현미경으로 관찰하였다. 제모 7일째에 대조군은 부분적으로 모근의 발달

이 미약하거나, inner root sheath의 발달이 충분하지 못한 것이 부분적으로 관찰되었다 (Fig. 4-1). 이에 비하여 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군과 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군은 전체적으로 모낭과 inner root sheath가 잘 발달되었고 (Fig. 4-3, 5), 또한 대조군에 비하여 자라나는 털의 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5-1, 3, 5). 제모 12일째에는 모든 군에서 완전히 성장한 모근들이 다수 관찰되었고, Sample I군과 Sample II군은 털의 단면적이 굵고, inner root

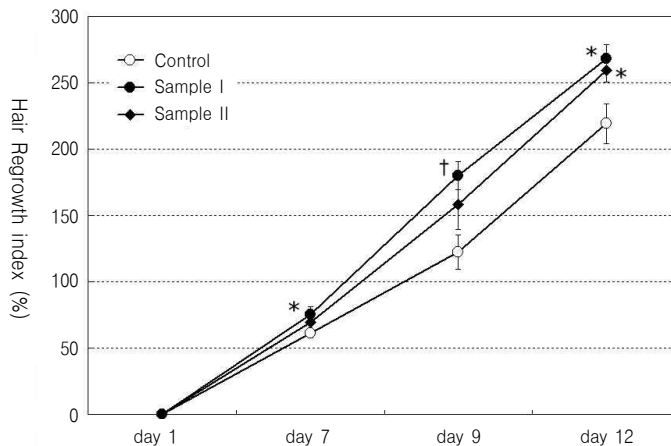


Fig. 3. Changes of the hair regrowth index of the hair-shaved C57BL/6 mice. *Yonnyuniksoogobon-dan* administration (Sample I) demonstrated significant increase of the hair regrowth index as compared to the Control group (*, P<0.05; †, P<0.01). *Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application (Sample II) demonstrated significant increase of the hair regrowth index only at 12 days after the hair shave as compared to the Control group (*, P<0.05).

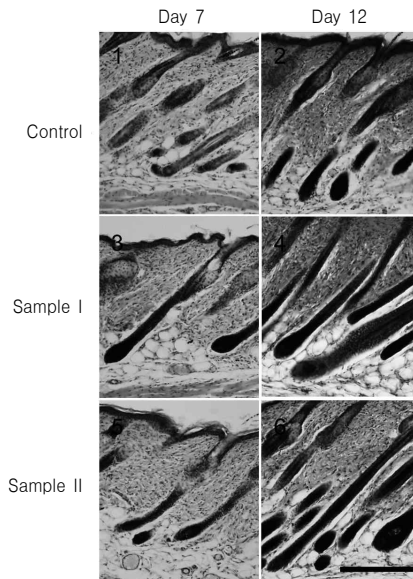


Fig. 4. Representative skin sections of the hair-shaved C57BL/6 mice (longitudinal section of hair follicles). Sample I (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration) and Sample II (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application) groups demonstrated histological improvement of the hair follicles. Sections are stained with H&E. Scale bar in section 6 is 200 μ m.

sheath와 outer root sheath의 발달이 풍부한 모낭들과 단면적이 넓은 털의 수가 대조군에 비해서 증가

하여, 더 잘 발달된 육모상태를 나타내었다 (Fig. 4-2, 4, 6; Fig. 5-2, 4, 6).

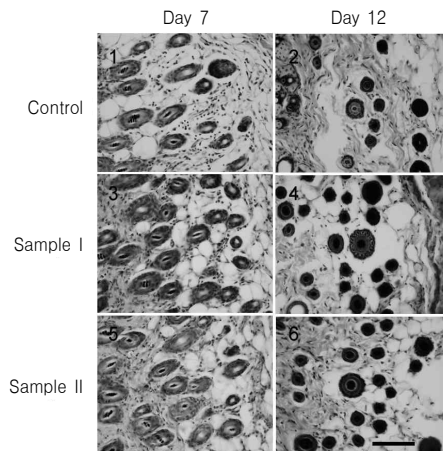


Fig. 5. Representative skin sections of the hair-shaved C57BL/6 mice (horizontal section of hair follicles). Sample I (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration) and Sample II (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application) groups demonstrated increases of number and diameter of the hair follicles. Sections are stained with H&E. Scale bar in section 6 is 100 μ m.

4. EGF 발현의 변화

제모 12일째에 피부 조직을 EGF에 대한 면역조직화화학염색하여 관찰한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군은 모발의 굵기가 일정 수준 이상인 성모와 굵기가 가는 솜털의 모근 outer root sheath에서 미약한 (± 또는 +) 양성반응을 나타내었으며, inner root sheath에는 음성반응 (-)을 나타내었다 (Fig. 6-1, 2, Table 3). 연년익수고본단을 투여한 Sample I군은 전체적으로 굵기가 일정 수준 이상인 성모의 outer root sheath에서는 EGF에 대하여 중등도 (++)의 양성반응을 나타내었으며, 특히 새롭게 자라나는 굵기가 가는 털의 outer root sheath에서는 매우 강한 (+++) EGF 양성반응을 나타내었다 (Fig. 6-3, 4). 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군은 Sample I군과 비슷한 EGF 발현 양상을 나타내었다 (Fig. 6-5, 6, Table 3).

5. TGF-β1 발현의 변화

제모 12일째에 피부 조직을 TGF-β1에 대한 면역조직화화학염색하여 관찰한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군은 모발의 굵기가 일정 수준 이상인 성모

에서는 inner root sheath에서 미약한 (+) 양성반응이 관찰되었으며, 일부에서는 강한 (+++) 양성반응을 나타내는 모근도 관찰되었고, 굵기가 가는 솜털의 모근에서는 inner root sheath와 outer root sheath 모두에서 미약한 (± 또는 +) 양성반응을 나타내었다 (Fig. 7-1, 2, Table 3). 연년익수고본단을 투여한 Sample I군과 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군에서도 전체적으로는 TGF-β1 발현이 큰 차이가 없었으나, 일부 종단면의 모근에서는 TGF-β1 발현이 대조군에 비하여 감소된 것도 관찰되었다 (Fig. 7-3, 4, 5, 6, Table 3).

6. VEGF 발현의 변화

제모 12일째에 피부 조직을 VEGF에 대한 면역조직화화학염색하여 관찰한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군은 모낭과 모근 주위조직에서 VEGF가 발현된 세포들이 400배율 영상에서 약 3~7개가 관찰되었다 (Fig. 8-1, 2, Table 3). 이에 비하여 연년익수고본단을 투여한 sample-I군은 모낭과 모근 주위조직에서 VEGF가 발현된 세포들이 약 10~15개가 관찰되어 대조군에 비하여 증가된 것으로 관찰되었으

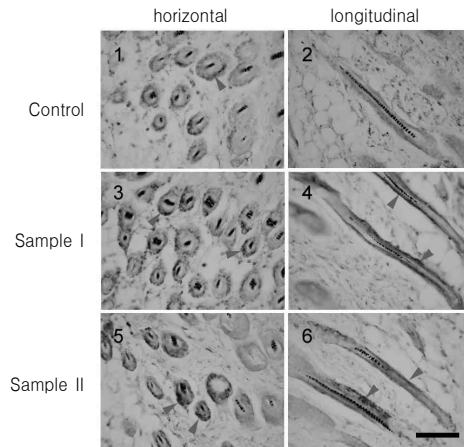


Fig. 6. Representative sections of EGF immuno-reacted skin tissues of the hair-shaved C57BL/6 mice at day 12. Sample I (Yonnyuniksoogobon-dan administration) and Sample II (Yonnyun iksoogobon-dan administration plus skin application) groups demonstrated up-regulation of EGF expression on the root sheath of hair follicles. Red arrowheads indicate EGF expressions. Scale bar in section 6 is 100 μm.

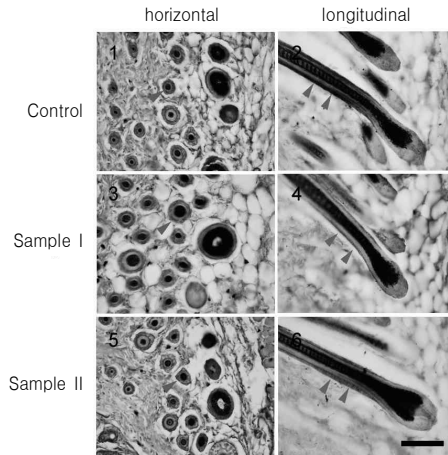


Fig. 7. Representative sections of TGF- β 1 immuno-reacted skin tissues of the hair-shaved C57BL/6 mice at day 12. Sample I is *Yonnyuniksoogobon-dan* administration group and Sample II is *Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application group. TGF- β 1 expressions on the root sheath of hair follicles were not different between groups. Red arrowheads indicate TGF- β 1 expressions. Scale bar in section 6 is 100 μ m.

며 (Fig. 8-3, 4, Table 3), 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 sample-II군 또한 약 10개 이상이 관찰되어 대조군에 비하여 증가된 것으로 관찰되었다 (Fig. 8-5, 6, Table 3).

7. iNOS 발현의 변화

제모 12일째에 피부 조직을 iNOS에 대한 면역조직화학염색하여 관찰한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군은 모낭과 모근 주위 조직에서 강한 (+++) iNOS 발현이 관찰되었다 (Fig. 9-1, 2, Table 3). 이

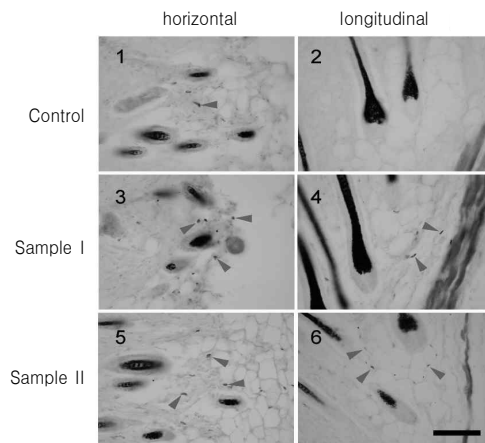


Fig. 8. Representative sections of VEGF immuno-reacted skin tissues of the hair-shaved C57BL/6 mice at day 12. Sample I (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration) and Sample II (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application) groups demonstrated up-regulation of VEGF expressions in the surrounding tissues of hair follicles. Red arrowheads indicate VEGF immuno-positive cells. Scale bar in section 6 is 100 μ m.

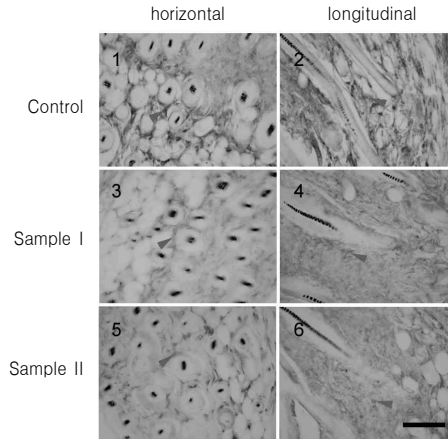


Fig. 9. Representative sections of iNOS immuno-reacted skin tissues of the hair-shaved C57BL/6 mice at day 12. Sample I (*Yonnyuniksoogobon-dan* administration) and Sample II (*Yonnyun iksoogobon-dan* administration plus skin application) groups demonstrated down-regulation of iNOS expressions in the surrounding tissues of hair follicles. Red arrowheads indicate iNOS expressions. Scale bar in section 6 is 100 μ m.

에 비하여 연년익수고본단을 투여한 Sample I군은 모낭과 모근 주위 조직에서 iNOS의 발현이 미약하거나 중등도 (+ 또는 ++)로 나타나 대조군에 비하여 감소된 것으로 관찰되었으며 (Fig. 9-3, 4, Table 3), 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군 또한 Sample I군과 비슷한 iNOS 발현 양상을 나타내었다 (Fig. 9-5, 6, Table 3).

고 찰

사람의 모발은 수개월, 길게는 약 2-4년의 주기로 성장과 탈락을 반복하는 성장주기를 가지고 있으

며, 일반적으로 모발이 가장 활발하게 성장하는 anagen기, 모발의 퇴화가 시작되는 catagen기 및 모발의 성장이 멈추거나 휴지기에 접어드는 telogen기로 분류하게 된다²³⁾. 이러한 모발 성장주기의 이상으로 정상적인 모발탈락에 비하여 과도한 모발탈락이 일어나는 것을 탈모라고 정의하고 있으며, 유전적 요인과 남성 호르몬의 과다, 정신적 스트레스, 혈액순환장애, 기타 영양장애, 내분비 장애, 노화, 환경오염, 염색 등이 원인으로 알려져 있고^{1,2)}, 일종의 자가면역질환으로 분류하기도 한다³⁾. 매우 다양하고 복합적인 원인에 의하여 탈모가 일어나므로 범용적이고 효과적인 치료방법을 제시하기가 매우 어렵다.

Table 3. Effect of *Yonnyuniksoogobon-dan* on EGF, TGF- β 1, VEGF, and iNOS Expressions of the Hair-Shaved C57BL/6 Mice

Groups	Immuno-reactivity			
	EGF	TGF- β 1	VEGF	iNOS
Control	+	+	+(-5)	+++
Sample I	++/+++	+/ \pm	++(10~)	+
Sample II	++/+++	+/ \pm	++(10~)	+

Control: group treated with saline after the hair shave

Sample I: group treated with *Yonnyuniksoogobon-dan* administration after the hair shave

Sample II: group treated with *Yonnyuniksoogobon-dan* administration plus skin application after the hair shave

Immuno-densities are demonstrated with \pm , weak; +, mild; ++, moderate; and +++, strong.

지금까지 개발된 발모제나 양모제들은 대부분 혈액순환 부진이나 영양장애, 지루성 피부염, 스트레스 등 탈모를 유발하는 간접적 원인들을 개선함으로써 탈모방지 및 발모를 유도하는 것들로 그 효과가 완벽하지 못하였다. 모발성장을 촉진하는 약물로 잘 알려진 minoxidil은 고혈압 치료를 위한 혈관확장제로 개발되었으나 부작용으로 다모증이 보고되면서 발모제로 개발되었고, 그 발모효과에 대한 작용기전은 혈관확장을 통한 영양공급 증가 및 K⁺ channel opening 효과 등이 모발성장을 유도하는 것으로 생각되고 있다^{24,25}). 또한 finasteride는 남성호르몬 대사에 작용하는 효소인 5 α -reductase의 활성을 억제시키는 물질로서 발모촉진제로 사용되고 있다²⁶). 그러나 사용을 중단할 경우 다시 모발이 빠지기 시작하여 원래의 탈모된 상태로 되돌아가므로 효과가 지속적이지 못한 단점이 있다²⁷). 최근에는 모유두세포의 활성 촉진, 모유두세포 주위의 혈액순환 개선, 피지분비의 억제, 남성호르몬 전환의 억제, 모발성장주기 중 성장기에서 퇴행기·휴지기로의 이행을 촉진시키는 물질인 TGF- β 의 활성 억제 등을 목표로 한 약물개발 연구가 진행되고 있다^{28,29}).

한의학적으로 모발은腎이 주관하며, 血이 왕성하면 모발도 윤택해지고 반대로 血이 쇠퇴하면 모발도 쇠퇴한다고 하여, 정상적인 모발 성장이腎, 血과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다²¹). 한편 탈모의 原因으로는 血熱, 氣血衰弱, 腎虛, 肺虛, 七情傷 등을 제시하고 있다⁵⁻⁹).

탈모방지나 육모촉진에 대한 한약물의 연구를 살펴보면, 桑白皮, 槐角, 何首烏, 訶子 등의 메탄올 추출물이 모발 성장 촉진 효과가 있고, 桑白皮, 木瓜, 木香, 當歸, 何首烏, 白芷 등은 5 α -reductase type II의 활성을 억제시키는 효능이 있다고 보고되었다^{10,11}). 또한 苦蔘 추출물이 5 α -reductase type I, type II의 활성을 억제시키는 작용에 의하여 육모효과를 나타낸다고 하였으며¹²), 何首烏, 當歸 및 枸杞子 혼합물은 DHT 농도를 증가시켜 발모효과를 나타낸다고 하였다³³).

복합처방으로는 神應養眞丹¹⁷), 當歸補血湯加味方

¹⁸), 生髮飲¹⁹) 등이 유의한 탈모방지 및 육모촉진 효과가 있다고 하였으며, 한약재를 포함한 헤어스프레이¹³), 헤어에센스¹⁵), 비누¹⁶) 등이 모발의 상태를 개선하고 모발의 단위 면적당 밀도를 증가시키거나 모발 탈락율의 감소로 탈모 억제 효과가 보고된 바도 있다.

본 연구에 사용된 연년익수고본단은 연년익수불노단과 연령고본단에 포함된 한약재인 赤何首烏, 地骨皮, 白茯苓, 生地黃, 熟地黃, 天門冬, 麥門冬, 枸杞子 및 石菖蒲에 當歸와 松葉를 가미한 처방이다. 연년익수불로단은 生精補腎의 효능으로 腎虛하고 精華가 상승하지 못하는 경우에 사용되는 처방으로²¹), 길 등³²)은 노화유발 흰쥐에서 혈장과 간의 thiobarbituric acid reactive substance 함량을 유의하게 감소시키는 항산화효능이 있다고 보고하였다. 연령고본단은 養生延年益壽의 방제로 補肝腎 補精 益血氣하는 한약물로 구성되어, 諸般虛損과 중년의 陽事不舉를 治하고, 未至五十의 鬚髮先白을 治한다고 하였다^{20,21}). 허 등³⁰)은 연령고본단이 노화생쥐의 생식능력에 미치는 영향을 연구하여 난자 수, 정상난자의 비율 및 수정율을 증가시키고, 생식소의 NOS 유전자 발현을 감소시켜 노화로 인한 생식능력 저하에 효과가 있다고 하였으며, 박 등³¹)은 피부섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포에 대한 연구에서 세포배가 횡수를 증가시키고 세포배가 시간을 감소시키므로 세포노화를 지연시키는 효과가 있다고 하였다.

C57BL/6 마우스를 인위적으로 제모한 다음, 延齡固本丹의 효능에 대한 기존 연구^{30,31})에서 유효투여량이 1,000~3,100 mg/kg인 것을 감안하여 延年益壽固本丹 추출물을 1,580 mg/kg (체중비례 계산량의 10배)을 12일간 경구투여 하였다. 그 결과, 대조군은 제모 4일째까지는 제모된 배부가 털이 자라지 않은 상태의 분홍색 피부로 관찰되었고, 7일째부터는 모낭으로부터 새로운 털이 자라나기 시작하여 피부가 부분적으로 회색으로 변하였지만, 아직 부분적으로는 여전히 털이 자라지 않는 분홍색 피부가 남아있기도 하였다. 9일째에는 제모된 배부가 전체적으

로 모낭으로부터 새로운 털이 많이 자라나 피부색이 짙은 회색으로 변화하였고, 일부에서는 피부 바깥 쪽으로까지 털이 자라난 것을 관찰할 수 있었으나, 아직 일부에서는 여전히 털이 자라지 않는 분홍색 피부를 나타내었다. 12일째부터는 부분적이기는 하지만 검정색 털이 완전히 자라난 것을 관찰할 수 있었다. 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군은 7일과 9일째까지는 대조군과 유사한 변화를 나타내었으나 회색으로 변한 피부 부위가 더 넓었으며, 12일째에는 피부 바깥쪽까지 털이 자라난 부위 면적이 대조군에 비하여 더 넓어진 것을 관찰할 수 있었다. 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군 역시 Sample I군과 유사한 양상으로 대조군에 비해서는 발모가 더 촉진된 상태를 관찰할 수 있었으나 Sample I군에 비해서는 큰 차이가 없었다. 제모 이후 7일과 12일에 H&E 염색한 피부조직에서 모낭 및 발모상태를 조직학적으로 관찰한 결과에서도 Sample I군과 Sample II군은 털의 단면적이 굵고 inner root sheath와 outer root sheath의 발달이 풍부한 모낭들과 단면적이 굵은 털의 수가 대조군에 비해서 유의하게 증가하여, 더 잘 발달된 육모상태의 나타내었다.

발모 상태와 면적 비율로부터 육모지수를 측정한 결과, 대조군에 비하여 연년익수고본단을 경구투여한 Sample I군은 7일부터 12일까지 지속적인 육모지수의 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군은 대조군에 비하여 12일에만 유의성 있는 육모지수의 증가를 나타내었다. 상대적으로 Sample II군의 결과가 Sample I군에 비하여 우수하지 못한 것은 아마도 한약재추출물 용액의 직접적인 피부도포에 따른 침전물의 피부침착 및 잔류 등의 부차적인 문제점들로 인한 것으로 생각된다. 한약재 추출물의 피부도포에 따른 이러한 문제점은 기술적으로 개발된 피부도포제 시제품에 의한 추가적인 실험이 요구되는 것으로 판단한다.

모낭은 매우 복잡한 구성을 갖는 하나의 기관으로, 모유두 (dermal papilla)라고 부르는 간엽세포들

과 상피세포들로 구성되어 있으며, 성장기인 anagen, 퇴화기인 catagen, 휴지기인 telogen의 3단계 성장주기를 가지고 있다²³⁾. 이러한 성장주기는 fibroblast growth factors, Sonic hedgehog, TGF- β , insulin-like growth factors, EGF, hepatocyte growth factors, platelet-derived growth factors, interferon과 interleukins, thyroid hormone과 Vitamin D, glial cell line-derived neurotrophic factor, neurotrophins 등 매우 다양한 인자들에 의하여 조절되는 것으로 보고되어 있다^{23,24,28)}. 이들 중에서 EGF는 모낭의 outer root sheath에 발현하여 세포증식과 모낭의 형성을 자극하는 인자로 알려져 있으며^{39,40)}, TGF- β 1은 성숙한 모낭의 inner root sheath와 outer root sheath 모두에서 발현하여 anagen 유도를 억제하여 catagen의 유도를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{41,42)}. 그러므로 본 실험에서는 EGF와 TGF- β 1의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다.

제모 12일째 대조군은 미약한 (\pm 또는 +) EGF 양성반응이나 음성반응(-)을 나타내었다. 연년익수고본단을 투여한 Sample I군은 EGF에 대하여 중등도 (++) 양성반응과 일부에서는 매우 강한 (+++) EGF 양성반응을 나타내었다. 그리고 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군도 Sample I군과 비슷한 EGF 발현 양상을 나타내었다. TGF- β 1 발현은 대조군은 미약한(+) 양성반응이 관찰되었으며, 일부에서는 강한 (+++) 양성반응을 나타내는 모근도 관찰되었다. 연년익수고본단을 투여한 Sample I군과 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군에서도 전체적으로는 TGF- β 1 발현이 대조군과 큰 차이가 없었으나, 일부 종단면의 모근에서는 TGF- β 1 발현이 대조군에 비하여 감소된 것도 관찰되었다. 이러한 결과는 연년익수고본단의 육모효과가 모낭에서 EGF 발현을 촉진하고 TGF- β 1 발현을 억제하는 기전에 의한 것을 추측하게 한다.

한편 모낭 자체와 모근 주위의 표피조직에는 혈관분포가 없으므로, 성장기 모낭의 매우 빠른 세포분열은 산소와 영양분 공급 수요의 증가로 인하여

하부 진피로부터 혈관신생 (angiogenesis)을 유도하게 되며, 이때 VEGF의 발현이 중심적인 역할을 하므로 VEGF 발현의 증가는 모낭의 성장을 촉진하여 모낭의 크기와 털의 굵기를 증가시킨다고 하였다^{43,44)}. 또한 피부조직에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되는 nitric oxide는 melanogenesis, 상처치유, 혈관확장 등의 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{45,46)}. 특히 endothelial NOS (eNOS)는 모낭유두세포에서 발현되므로 모낭의 성장과 모발 성장주기에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, inducible NOS (iNOS)는 cytokine과 같은 염증성 자극과 자외선 등에 의하여 모낭 주위 조직에서 발현이 증가하는 것으로 보고되어 있다^{47,48)}. 그러므로 본 실험에서 모낭 주위 조직에서 VEGF와 iNOS의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다.

제모 12일째 대조군은 모낭과 모근 주위 조직에서 VEGF가 발현된 세포들이 400배율 영상에서 약 3~7개가 관찰되었으나 연년익수고본단을 투여한 Sample I군은 모낭과 모근 주위 조직에서 VEGF가 발현된 세포들이 약 10~15개가 관찰되어 대조군에 비하여 증가되었다. 또한 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군도 약 10개 이상이 관찰되어 대조군에 비하여 증가되었다. 한편 iNOS 발현에 있어서는 대조군은 모낭과 모근 주위 조직에서 강한 (+++) iNOS 발현이 관찰되었으며, 연년익수고본단을 투여한 Sample I군과 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 Sample II군은 모낭과 모근 주위 조직에서 iNOS의 발현이 미약하거나 중등도 (+ 또는 ++)로 나타나 대조군에 비하여 감소되었다. 이러한 결과로 보아 연년익수고본단이 모낭 주위 조직의 혈류환경을 개선하고 염증성 반응을 감소시키는 효능을 발휘하여 육모를 촉진시키는 것으로 추측된다.

본 실험의 결과들을 총괄하면, 연년익수고본단은 모낭에서 EGF 발현을 촉진하고 TGF-β1 발현을 억제하며, 모낭 주위조직에서 VEGF 발현을 촉진하고 iNOS 발현을 억제하는 효능에 의하여 육모를 촉진하는 것으로 생각된다. 한편으로 연년익수고본단-생

리식염수 용액의 피부도포는 효과적이지 못하였으며, 피부도포의 부차적인 문제점들을 해소한 시제품 개발을 통한 추가적인 효능 평가가 필요한 것으로 판단된다.

결론

氣血衰弱, 精血不足, 腎虛 등을 개선하여 탈모 방지 및 육모 촉진의 효능을 갖는 처방을 개발하고자 하는 취지에서 연령고본단과 연년익수불로단으로부터 연년익수고본단의 처방을 구성하고, 이에 대한 육모 촉진효능을 관찰하였다. C57BL/6 마우스를 사용하여, 제모 이후 육모상태에 미치는 영향과 모발의 성장에 관여하는 EGF, TGF-β1, iNOS 및 VEGF 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 육모상태를 육안적으로 관찰한 결과, 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와 피부도포를 병행한 경우 모두 유의한 육모 촉진효능을 관찰할 수 있었다.
2. 육모지수를 측정된 결과, 연년익수고본단의 경구투여는 7일부터 12일까지 지속적인 육모지수의 유의한 증가를 나타내었으며 ($P<0.05$, $P<0.01$), 연년익수고본단의 경구투여와 피부도포를 병행한 경우는 12일에만 유의성 있는 육모지수의 증가를 나타내었다 ($P<0.05$).
3. 발모상태의 조직학적 변화에서는 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와 피부도포를 병행한 경우 모두 발달이 풍부한 모낭들과 단면적이 좁은 털의 수가 증가하여, 더 잘 발달된 육모상태를 나타내었다.
4. 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와 피부도포를 병행한 경우 모두 모근의 EGF 발현을 증가시켰다.
5. 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와 피부도포를 병행한 경우 모두 모근의 TGF-β1 발현을 변화시키지는 못하였다.
6. 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와

피부도포를 병행한 경우 모두 모낭과 모근 주위조직에서 VEGF 발현 세포를 증가시켰다.

7. 연년익수고본단의 경구투여 또는 경구투여와 피부도포를 병행한 경우 모두 모낭과 모근 주위조직의 iNOS 발현 강도를 감소시켰다.

이상의 결과로 보아, 연년익수고본단은 육모 촉진 효능이 있으며, 이는 모낭과 모낭 주위 조직에서 EGF와 VEGF 발현을 증가시키고 TGF-β1과 iNOS 발현을 억제하는 기전에 의한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bressler RS, Bressler CH. Functional anatomy of the skin. Clin Podiatr Med Surg. 1989;6(2):229-46.
2. Hadshiew IM, Foitzik K, Arck PC, Paus R. Burden of hair loss: stress and the underestimated psychosocial impact of telogen effluvium and androgenetic alopecia. J Invest Dermatol. 2004; 123(3):455-7.
3. Jaworsky C, Gilliam AC. Immunopathology of the human hair follicle. Dermatol Clin. 1999; 17(3):561-8.
4. Spencer LV, Callen JP. Hair loss in systemic disease. Dermatol Clin. 1987;5(3):565-70.
5. 蔡炳允. 韓方外科. 서울:고문사. 1971:285-6.
6. 巢元方. 諸病源候論. 서울:대성문화사. 1992:197-200.
7. 李庭. 醫學入門. 台北:台聯國民出版社. 1982:442.
8. Jang HY, Choi KH, Kim SH, Kwon KR, Kim BW. Bibliographic studies of depilation. J Kor pharmacoapuncture. 2002;5(2):92-108.
9. 임사비나, 최규동, 김수경. 탈모에 대한 동서의학적 고찰. 제한동의학술논문제집. 1999;4(1):699-710.
10. Lee HS, Yun SJ, Moon YK, Moon JY. Hair growth effects of Mori Cortex Radicis Mixture on the hair of rat. J Kor sericultural science. 2000;42(2):83-5.
11. Choi W, Choi JH, Kim JH. Studies on the effects of medicinal plant extracts on the hair growth stimulation. J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology. 2002;15(2): 80-103.
12. Rho HC, Rho SS. Studies on the effects of Sophora flavescens extract on the hair growth stimulation and acne inhibition. J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology. 2002;15(1):96-126.
13. Kim MY, An BJ. A study of hair loss prevention and hair growth promotion by korean traditional fomula. Kor J Herbol. 2004;19(2):9-20.
14. Chiang HC, Lee SH, Kim NK, Lim HJ, Hwang CY. Extracts for the hair growth stimulation using in vivo and in vitro test models. J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology. 2002;15(2):53-79.
15. Park WS, Sung DS, Kim DK, Cho WH, Lee HK, Lee CH, et al. The effect of hair essence(HHRHG 0202-80) containing five herbal extracts on hair growth and the prevention of alopecia in vitro & vivo. J Kor oriental medicine. 2004;25(1): 152-60.
16. Kim NK, Du IS, Mun YJ, Woo WH. Clinical study on the effect of Sangmogen on the alopecia. Kor J oriental physiology & pathology. 2005;19(1):270-8.
17. Kim SY, Kim JH, Chae BY. An experimental study on the effects of Sineungyangjin-dan applied to the treatment of alopecia. J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology. 1991;4(1):43-58.
18. Kim PS, Kim HT, Rho SS, Hwang CY. Effect of Danguibohyultangami-bang on the alopecia and hair growth stimulation. J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology. 2004;17(3):38-60.
19. Lee SH, Chung SH, Song MY, Shin HD. Hair growth promoting effect of Saengbal-eum application on hair-removed C57BL/6 mouse. J

- Oriental Rehab Med. 2007;17(2):101-21.
20. 龔延賢. 增補 萬病回春. 서울:일증사. 1994:193-4.
 21. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1987:78, 85, 307-9, 449, 738.
 22. Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, Jensen K, Welker P, Scott GA, Paus R. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003;121(5):976-84.
 23. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001;81(1):449-94.
 24. Price VH. Treatment of hair loss. *N Engl J Med.* 1999;341(13):964-73.
 25. Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Br J Dermatol.* 2004;150(2):186-94.
 26. McClellan KJ, Markham A. Finasteride: a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs.* 1999;57(1):111-26.
 27. Trüeb RM. The value of hair cosmetics and pharmaceuticals. *Dermatology.* 2001;202(4):275-82.
 28. Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med.* 2001;7(7):293-301.
 29. Meidan VM, Touitou E. Treatments for androgenetic alopecia and alopecia areata: current options and future prospects. *Drugs.* 2001;61(1):53-69.
 30. Heo SJ, Jo JH, Jang JB, Lee GS. Effects of Yeonbyeongobondan on the reproductive competence of aged mice. *J oriental obstetrics and gynecology.* 2004;17(1):72-87.
 31. Park YJ, Ahn YM, Ahn SY, Doo HK. Effects of Yeonbyeongobondan and Palmijihwangtang on the population doubling number and the population time in rat fibroblast, heart-endothelial cells, mesagial cells. *J Kor oriental medicine.* 2004;25(1):49-59.
 32. Kil HS, Lee SS, Lee SJ, Kim KH. Effect of Younnyeniksoobulrodan on antioxidant capacity in d-galactose induced aging rats. *Kor J oriental preventive med.* 2002;6(2):112-27.
 33. Lee YG, Kim JK. The study of the oriental medicine extract on the hair growth effect. *Kor J Herbol.* 2004;19(2):83-90.
 34. Lee YS, Kim HS, Son YW, Yoo KS, Lee JH, Lee KC, et al. Effect of Radix Polygoni Multiflori on cultured vascular endothelial cells damaged by xanthine oxidase and hypoxanthine. *J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology.* 2002;16(4):720-3.
 35. Kim SB, Kim KJ. The effects of Rehmannia glutinosa on the protein expression related to the angiogenesis, cell survival and inflammation. *J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology.* 2006;19(3):22-33.
 36. O YS, Oh MS, Roh SS. The experimental study on the effect of herbal extracts on hair growth and acnes. *J Kor oriental medical ophthalmology & otolaryngology & dermatology.* 2006;19(3):34-54.
 37. Ahn BY, Gwak JS, Ryu SH, Moon GS, Choi DS, Park SH, et al. Protective effect of water extract of Lycii Cordex Radicis on lipid peroxidation of rat skin exposed to ultraviolet B radiation. *J. Kor Soc. Appl. Biol. Chem.* 2002;45(4):218-22.
 38. Jiang C, Lee HJ, Li GX, Guo J, Malewicz B, Zhao Y, et al. Potent antiandrogen and androgen receptor activities of an Angelica gigas-containing herbal formulation: identification of decursin as a novel and active compound with implications for prevention and treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(1):453-63.
 39. Hansen LA, Alexander N, Hogan ME, Sundberg JP, Dlugosz A, Threadgill DW, et al. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *Am J Pathol.* 1997;150:1959-75.
 40. Moore GPM, Panaretto BA, Robertson D. Effects of epidermal growth factor on hair growth in the

- mouse. *J Endocrinol.* 1981;88:293-9.
41. Mori O, Hachisuka H, Sasaki Y. Effects of transforming growth factor β 1 in the hair cycle. *J Dermatol.* 1996;23:89-94.
42. Wollina U, Lange D, Funa K, Paus R. Expression of transforming growth factor β isoforms and their receptors during hair growth phases in mice. *Histol Histopathol.* 1996;11:431-36.
43. Lachgar S, Moukadiri H, Jonca F, Charveron M, Bouhaddioui N, Gall Y, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal papilla cells. *J Invest Dermatol.* 1996;106(1):17-23.
44. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* 2001;107(4):409-17.
45. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:635-42.
46. Cobbold CA. The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions. *Med Hypotheses.* 2001;57:497-502.
47. Wolf R, Schönfelder G, Paul M, Blume-Peytavi U. Nitric oxide in the human hair follicle: constitutive and dihydrotestosterone- induced nitric oxide synthase expression and NO production in dermal papilla cells. *J Mol Med.* 2003;81(2):110-7.
48. Sowden HM, Naseem KM, Tobin DJ. Differential expression of nitric oxide synthases in human scalp epidermal and hair follicle pigmentary units: implications for regulation of melanogenesis. *Br J Dermatol.* 2005;153(2):301-9.