

益氣補血湯이 C57BL/6 마우스의 育毛촉진 및 Cytokine 변화에 미치는 영향

홍정애¹, 송미연¹, 최인화², 손락원³, 정석희¹

¹경희대학교 한의과대학 한방재활의학교실

²경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

³경희대학교 동서의학대학원 신경과학 및 뇌질환 전공

Effect of *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) on Hair Regrowth and Cytokine Changes on Hair-Removed C57BL/6 Mice

Jung-Ae Hong¹, Mi-Yeon Song¹, In-Hwa Choi², Nak-Won Sohn³, Seok-Hee Chung¹

¹Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

²Dept. of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & dermatology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

³Dept. of Neuroscience and Brain Disease, Graduate School of East-West Medicine, Kyung-Hee University

Objective: *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) is one of the representative prescriptions for invigoration of vitality and nourishing of the blood. This study was carried out to investigate the effects of *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) on hair regrowth and cytokine changes in a shaving model of C57BL6 mice.

Method: Five-week-old mice were acclimated for 1 week at a temperature between 21-23°C, 40-60% relative humidity, and 12h of a light/dark cycle before beginning of the experiment. There were two groups including normal saline (control) and a positive control of oral intake of *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) extract (sample) in 18 female mice. The test compounds were topically treated once a day over 14 days. The hair regrowth was photographically and histologically determined during the experimental period of 14 days. Revelation of TGF-β1 and EGF were also determined using immunohistochemistry. In addition to that, IFN-γ, IL-4 and IL-10 were determined in serum.

Results: Hair regrowth in the sample group was promoted earlier and faster than the control group, as shown by concentrations of hairs and thick-hair ratio in the sample group. TGF-β1 was not revealed in either control or sample group. EGF was strongly positive in out root sheath of some thick hair of the sample group. Serum IFN-γ was significantly decreased in the sample group compared with the control group at 7 experimental days. However, it was not significantly decreased at 14 experimental days. Serum IL-4 was significantly increased in the sample group compared with the control group at 7 experimental days. However, it was not significantly decreased at 14 experimental days. Serum IL-10 was decreased in the sample group compared with the control group, but with no real statistical significance.

Conclusion: These results suggest that *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) has hair growth promoting activity and it can be used for treatment of alopecia. Also, these effects relate to EGF revelation of hair roots, a decrease in serum IFN-γ, and an increase of serum IL-4.

Key Words : Alopecia, C57BL/6 mice, *Yikgeobohyul-tang*, hair regrowth.

• Received : 27 August 2009 • Revised : 16 October 2009 • Accepted : 28 October 2009

• Correspondence to : 정석희(Seok-Hee Chung)

서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 부속한방병원 한방재활의학교실

Tel : +82-2-958-9226, Fax : +82-2-963-4983, E-mail : omdchung@yahoo.com

서론

사람의 모발은 생명현상에는 영향을 주지는 않지만 미용적 기능을 담당하고 있는 피부의 부속 기관으로 최근 들어 외모에 대한 관심이 증가하면서 모발 질환에 대한 관심도 증가하여 모발 질환의 원인과 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 모발은 피부와 함께 발생하며 모낭은 표피에 있는 종자층의 증식으로 시작되어 아래에 있는 진피로 확대되고 모낭이나 毛芽의 심층은 클럼모양의 毛球를 형성하며 毛球 상피세포가 종자기질을 이룬 후 털로 자라게 된다. 毛球는 중간엽 세포인 모유두에 의해 곧 함입되어 毛球의 주위 세포는 뿌리상피집을 형성하며 그 주위를 둘러싸고 있는 중간엽세포는 뿌리진피집으로 분화한다¹⁾. 모유두는 모발의 성장에 중요한 역할을 하며 3-5년의 성장기, 1-2개월의 퇴화기, 3-5개월의 휴지기 및 발생기의 모발 성장주기가 있으며²⁾ 모낭은 모유두의 성장 주기별로 뚜렷한 형태학적 특징을 가지고 세포의 증식과 분화를 보인다^{2,3)}. 모낭의 성장주기별 변화는 모낭의 면역특권에 의해 가능한 것으로 모낭에서의 면역특권은 자가면역 반응을 피하는데 필수적인 것으로 알려져 있으며, 모낭의 면역특권은 T세포간의 면역평형에 의해 유지된다⁴⁾.

모낭은 다양한 종류의 cytokine과 성장인자가 모낭의 형태와 모발의 성장에 영향을 주는 중요한 기능적 단위이다. 모발의 성장에 영향을 주는 주요 cytokine과 성장인자로는 EGF(Epidermal Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor- α), TGF- β (Transforming Growth Factor- β), KGF(Keratinocyte Growth Factor), IGF-1(Insulin-like Growth Factor-1), bFGF(basic Fibroblast Growth Factor), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), HGF(Hepatocyte Growth Factor), IL-1(Interleukin-1), IFN- γ (Interferon-gamma), IL-4, IL-10, IL-16 등이 있다⁵⁻⁷⁾. 그 중에서 EGF는 모유두 세포에서 생성되는 cytokine으로 모낭의 혈관생성에 도움을 주며 모발의 성장을 촉진시키고 세포소멸을 억제시키고 세포의 분열과 이동을 촉진시킨다⁸⁾. 또 인체 모낭에서 TGF- β 1은 퇴행기 전환시

증가되는 인자로 모낭 상피세포의 증식을 억제하고 세포고사를 유도하여 일반적으로 모발의 성장을 억제하는 쪽으로 작용한다^{9,10)}.

지금까지 탈모에 대한 한약의 실험적 연구를 살펴보면 외용제로 何首烏^{11,12)}, 桑白皮^{11,12)}, 細辛¹³⁾, 甘草¹⁴⁾, 當歸¹²⁾, 白芷¹²⁾, 苦蔘¹⁵⁾ 등에 대한 연구가 있고, 내복약으로 加味四物湯¹⁶⁾과 當歸補血湯加味方¹⁷⁾에 관한 연구가 있으나 연구방법적으로 모낭의 면역특권과 관련한 연구는 없는 실정이다.

益氣補血湯은 김¹⁸⁾의 《東洋醫學 診療要鑑》에 수록되어 氣血不足으로 인한 困倦無力 頭重眩暈 精神不清 등에 사용된 처방으로 補中益氣湯, 滋陰健脾湯, 四物湯이 포함된 처방이다. 이들 처방에 관한 연구 및 문헌에 따르면 益氣補血湯은 補氣, 補血의 효과가 있어¹⁹⁻²⁵⁾ 면역력 개선의 효과가 있을 것으로 사료되며 이러한 효과는 모발탈락의 原因으로 알려진 모낭의 면역특권 소실을 개선하여 육모를 촉진하는 효과가 있으리라 추정된다. 그러나 지금까지 益氣補血湯의 탈모 방지 및 육모 촉진 효과에 관련된 실험적 연구가 진행되지 않았다. 이에 저자는 본 처방의 효능이 모낭에 분포하는 모발 성장인자에 미치는 영향 및 모낭에 미치는 면역계의 작용을 알아보기 위해 C57BL/6 마우스의 털을 제모하고 益氣補血湯을 투여한 후 육모지수와, 모낭의 조직학적 변화를 살펴보았으며, 모낭에 분포하는 모발 성장인자중 TGF- β 1, EGF의 발현양상을 측정하고, 탈모 관련 cytokine중 혈중 IFN- γ , IL-4와 IL-10의 발현양을 측정된 결과 다음과 같은 유의한 결과를 얻은 바 이에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 실험동물

생후 5주된 암컷 C57BL/6 마우스(샘타코, Korea) 36마리를 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도(21~23℃), 습도(40~60%), 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유

지되는 사육실에서 무균음수와 사료(삼양사, Korea)를 자유롭게 공급받았으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨후 사용하였다.

2) 실험약물의 제조

益氣補血湯(*Yikgeebohyul-tang*(*Yiqibuxue-tang*), YBT)의 처방 내용은 Table 1과 같으며, 10첩 분량인 804g을 3,000ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축후 동결건조하여 156.7g의 분말 건조된 엑기스를 얻었다. 실험동물의 투여량은 체중비례 계산량의 10배인 26.1mg/10g body weight를 1회 투여량으로 하였다. 약물의 투여는 각각의 1

회 투여량을 0.2ml의 음용수에 녹여 1일 1회, 2주간 경구투여 하였다.

2. 방법

1) 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. 제모된 C57BL/6 마우스에 식염수를 경구투여한 군을 대조군(Control)으로, 益氣補血湯을 경구투여한 군을 실험군(Sample)으로 나누었다. 각 군은 18마리씩으로 하였으며, 식염수와 약물의 경구

Table 1. Herbal Constitution of *Yikgeebohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*)

Herbs	Dosage(g)
黃耆(密炙)	<i>Astragali Radix</i> (stir-bake with honey) 6.0
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i> 6.0
山查肉	<i>Crataegi Fructus</i> 4.0
香附子	<i>Cyperii Rhizoma</i> 4.0
半夏	<i>Pinelliae Tuber</i> 4.0
陳皮	<i>Citri Percarpium</i> 4.0
白茯苓	<i>Hoelen</i> 4.0
神麩(炒)	<i>Massa Medicata Fermentata</i> (stir-bake) 4.0
麥芽(炒)	<i>Hordei Germinatus Fructus</i> (stir-bake) 4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i> 4.0
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i> 3.2
砂仁	<i>Amomi Xanthioides Fructus</i> 3.2
當歸身	<i>Angelicae Gigantis Radix</i> 2.8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i> 2.8
乾地黄	<i>Rehmanniae Recens Radix</i> 2.8
人蔘	<i>Ginseng Radix</i> 2.4
白茯苓	<i>Poria</i> 2.4
麥門冬	<i>Ophiopogonis Radix</i> 2.4
遠志	<i>Polygalae Radix</i> 2.4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i> 2.0
木香	<i>Saussureae Radix</i> 2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i> 4.0
大棗	<i>Zippyphi Fructus</i> 4.0
Total	80.4

투여는 제모한 다음 날부터 매일 오전 10시에 1회씩 2주간 실시하였다.

2) 육모 상태의 관찰

육모 상태를 확인하기 위하여 실험개시 1일, 4일, 7일, 10일 및 14일에 생쥐를 2% isoflurane으로 가볍게 흡입마취한 후 배부를 디지털카메라(EOS-10D, Canon, Japan)로 사진 촬영하여 관찰하였다. 동일한 mouse를 구분하기 위해서는 유성필기구를 사용하여 꼬리에 각기 다른 색깔을 표시하여 구분하였다.

3) 육모지수의 측정

육모 상태를 수치화하여 비교검증하기 위해서, 디지털카메라로 촬영된 영상을 컴퓨터에 입력한 다음 NIH의 "Image J" software(ver. 1.36)를 사용하여 육모지수를 측정하였다. 육모지수(Hair Regrowth index, HRG index)는 다음과 같이 계산하였다. 첫째, fig. 1-A에서와 같이 털의 재생장에 의한 배부의 피부색깔 차이에 따라 4등급으로 구분하고 각각 0점부터 3점까지의 점수를 배정하였다. 제모된 분홍색 피부상태는 4등급으로 0점, 모낭으로부터 털이 자라기 시

작하여 피부가 회색을 띠면 3등급으로 1점, 피부 바깥쪽으로 털이 다시 자라 나온 것을 육안으로 확인할 수 있는 상태는 2등급으로 2점, 털이 완전히 자란 것은 1등급으로 3점을 부여하였다. 다음으로 배부 전체 제모된 면적에 대하여 각각 등급별로 털이 자란 면적비율을 측정하고, 각각의 면적비율에 점수를 곱한 총합을 육모지수로 하였다(Fig. 1). 이에 따른 육모지수는 최소값 0%에서 최대값 300%를 나타내게 된다.

4) 피부조직의 처리

실험 14일째에 실험동물을 과용량의 sodium pentobarbital로 희생시킨 다음 배부의 피부조직을 채취하여 일부는 dry ice-isophentane으로 동결시켜 면역조직화학염색용으로 사용하였으며, 일부는 10% neutral formalin 용액으로 고정하고 수세한 다음 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 파라핀 포매한 피부조직은 8 μ m의 두께로 절편하여 털의 상태와 모양을 관찰하기 위하여 Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

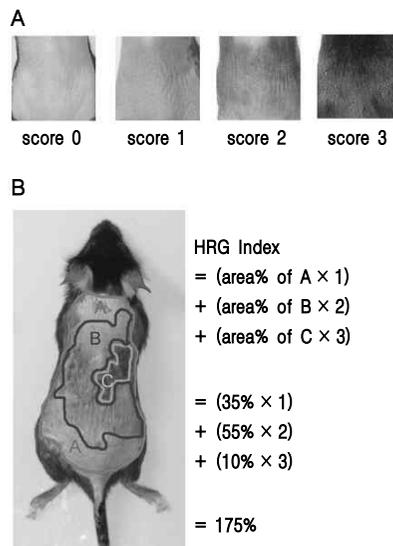


Fig. 1. (A) Representative sections of scores and (B) sample of Hair Regrowth index (HRG index) calculated with area percentages and scores.

5) 면역조직화학염색

동결 피부조직 절편을 0.05M Phosphate-Buffered Saline(PBS)로 5분간 3회 씻어내고, 1% H2O2에서 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 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody의 처리는 anti-TGF-β1(sc-146, Santa Cruz, USA)와 anti-EGF(MAB236, R&D Systems, USA)를 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase(ABC Vectastain Kit, USA)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl2·H2O(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 조직 표본을 제작하였다.

6) 혈청 cytokine의 측정

실험 1일, 7일 및 14일 째에 무작위로 실험 동물 6마리씩을 선택하여 sodium pentobarbital로 가볍게 마취한 다음 심장으로부터 혈액을 채취하고 1,000g으로 15분간 원심분리한 후 혈청을 분리하여 동결 보관 하였다. 혈청에서 IFN-γ, IL-4와 IL-10의 정량

은 각각의 전용 colorimetric Sandwich ELISA kit (Quantikine, R&D Systems, USA)를 사용하여 측정 하였다. 96 well plate의 각 well에 standard와 혈청을 100μl씩 분주하여 2시간 동안 실온에서 반응시킨 후 wash buffer 400μl로 4회 세척하고, 각각의 conjugate을 200μl씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 wash butter 400μl로 4회 세척하였다. 각 well에 substrate을 200μl씩 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 다음 stop solution 50μl를 넣어 반응을 종결시켰다. 30분 후에 ELISA reader(BIO-TEK Instruments, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계분석

실험자료의 통계분석은 대조군에 대한 실험군의 유의성을 p<0.05 수준에서 Mann-Whitney U test 방법을 사용하여 검정하였다. 모든 결과는 Mean ± Standard error로 표시하였다. 통계분석에 사용된 실험동물의 수는 각각 실험에 사용된 수에 따라 18마리, 12마리 그리고 6마리가 사용되었다(n=18, 12, 6).

성적

1. 발모상태의 육안적 변화

대조군은 체모 이후 4일까지는 배부 전체가 체모 된 상태의 분홍색 피부로 관찰되었고, 7일째에 피부

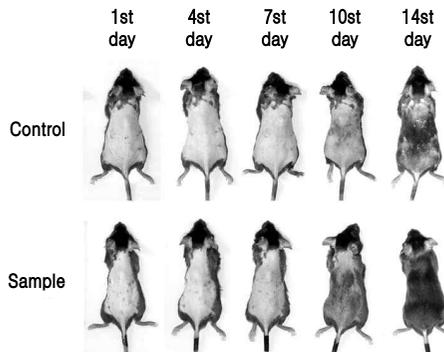


Fig. 2. Representative animals of hair regrowth of C57BL/6 mouse. *Yikgeebohyul-tang*(*Yiqibūxué-tāng*) administration(sample) promoted hair regrowth of C57BL/6 mouse.

Table 2. Changes of Hair Regrowth Index Following YBT Treatment on Hair Removal C57BL/6 Mice (%)

Groups	Day after hair removal				
	1st (n=18)	4th (n=12)	7th (n=12)	10th (n=6)	14th (n=6)
Control	0	4.8±0.6	27.6±4.9	130.8±11.1	208.9±15.2
Sample	0	4.2±0.5	69.2±5.6***	168.2±12.5*	253.5±10.8*

Data present Mean ± Standard error.

YBT; Yikgeebohyul-tang(Yiqibüxuè-tāng).

Control; group treated without any treatment after the hair removal.

Sample; group treated with Yikgeebohyul-tang(Yiqibüxuè-tāng) water-extract administration after the hair removal.

Statistical significance was verified with Mann-Whitney U test between the control and sample group(*, P<0.05; ***, P<0.001).

가 부분적으로 회색 피부로 변하여 모낭으로부터 새로운 털이 자라나는 것을 관찰할 수 있었으나 매우 제한된 국소적인 변화였으며, 10일째에는 일부분에서 피부 바깥쪽으로부터 털이 자라난 것을 관찰할 수 있었고, 14일째는 부분적이기는 하지만 검정색 털이 완전히 자라났다. 이에 비하여 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 7일째까지는 변화가 대조군과 비슷하였으나 7일째에 회색으로 변한 피부 부위가 더 넓었으며, 10일째에도 피부 바깥쪽까지 털이 자라난 부위 면적이 더 넓었고, 14일째에는 배부 전체적으로 털이 완전히 다시 자라났다(Fig. 2). 육모지수를 통해 각 군 간의 정량적 비교를 실시하였다.

2. 육모지수의 변화

육모상태를 털이 자란 피부상태와 면적에 근거하

여 육모지수로 측정된 결과, 대조군은 1일째에 0%, 4일째에 4.8±0.6%, 7일째에 27.6±4.9%, 10일째에 130.8±11.1%, 14일째에 208.9±15.2%를 나타내어 1일부터 7일까지 보다는 7일부터 14일까지에서 큰 변화를 나타내었다. 이에 비하여 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 1일째에 0%, 4일째에 4.2±0.5%, 7일째에 69.2±5.6%, 10일째에 167.2±12.5%, 14일째에 243.5±10.8%를 나타내어 대조군에 비하여 7일째에는 P<0.001, 10일째와 14일째에는 P<0.05의 유의성 있는 육모지수의 증가를 나타내었다(Table 2, Fig. 2,3).

3. 발모상태의 조직학적 변화

제모 이후 14일째에 H&E 염색한 피부조직에서 모낭 및 발모상태를 광학현미경으로 관찰한 바, 제모 이후 생리식염수를 경구투여한 대조군은 부분적

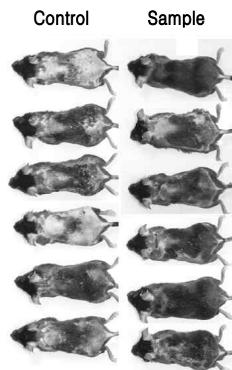


Fig. 3. Representative animals hair regrowth of C57BL/6 mouse at 14th day. Yikgeebohyul-tang(Yiqibüxuè-tāng) administration group(sample) promoted the effect of hair regrowth compared to the control group.

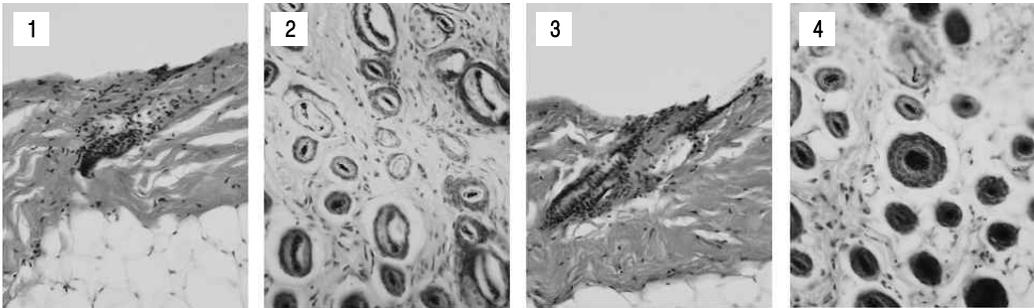


Fig. 4. Representative sections of H&E stained skin tissues of C57BL/6 mouse at 14th day. *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) administration group(section 3 and 4, sample) promoted healthy development of hair follicles and inner root sheaths compared to the control group(section 1 and 2).

으로 모낭의 발달이 미약하거나 (Fig. 4-1), 털이 자라더라도 털의 형태가 둥글지 않고 반달형으로 변형되어 있거나, 내모근초의 발달이 충분하지 못한 것이 부분적으로 관찰되었다(Fig. 4-2). 이에 비하여 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 전체적으로 모낭이 잘 발달되어 있으며(Fig. 4-3), 내모근초도 잘 발달되어 털이 둥근 형태로 자라난 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-4).

4. TGF-β1 발현의 변화

제모 이후 14일째에, 각각 실험동물의 피부조직을 TGF-β1에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 관찰한 결과, 생리식염수를 경구투여한 대조군은 모발의 굵기가 일정 수준 이상인 성모와 굵기가 가는 솜털 모두에서, 또한 모근의 외모근초와 내모근초 모두에서 TGF-β1의 발현을 관찰하기 어려웠다(Fig. 5-1). 益氣補血湯을 경구투여한 실험군에서도 TGF-β1의 발현을 관찰하기 어려웠다(Fig. 5-2).

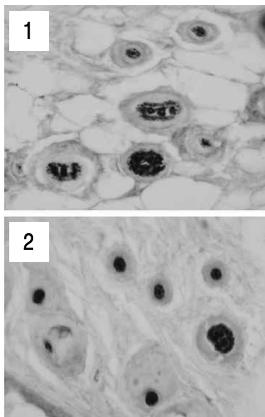


Fig. 5. Representative sections of immunohistochemistry against TGF-β1 on skin tissues of C57BL/6 mouse at 14th day. *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) administration group(section 2) promoted similar TGF-β1 expression compared to the control group(section 1).

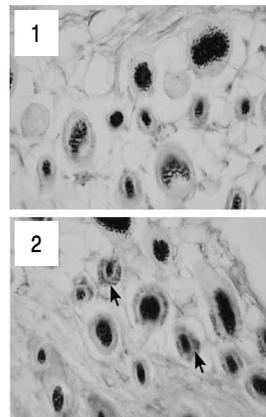


Fig. 6. Representative sections of immunohistochemistry against EGF on skin tissues of C57BL/6 mouse at 14th day. *Yikgeobohyul-tang* (*Yiqibuxue-tang*) administration group (section 2, arrows) promoted increase of EGF expression on inner root sheath compared to the control group(section 1).

5. EGF 발현의 변화

제모 이후 14일째에, 각각 실험동물의 피부조직을 EGF에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 관찰한 결과, 생리식염수를 경구투여한 대조군은 모발의 굵기가 일정 수준 이상인 성모와 굵기가 가는 솜털의 모근 외모근초에서 미약한(± 또는 +) 양성반응을 나타내었으며, 내모근초에서는 음성반응(-)을 나타내었다(Fig. 6-1). 이에 비하여 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 전체적으로 굵기가 일정 수준 이상인 성모의 외모근초에서는 EGF에 대하여 미약한(+) 또는 중등도(++)의 양성반응을 나타내었으며, 특히 굵기가 가는 새롭게 자라나는 털의 외모근초에서는 매우 강현(+++) EGF 양성반응을 나타내었다(Fig. 6-2).

6. 혈청 IFN-γ의 변화

제모 이후 실험동물의 혈청으로부터 측정된 IFN-γ는 대조군은 1일째에 8.3±1.5pg/ml, 7일째에 218.3±43.9pg/ml으로 현저하게 증가하였다가 14일째에 53.2±12.1pg/ml으로 감소하였다. 益氣補血湯을 경구

투여한 실험군은 1일째에 5.8±1.2pg/ml, 7일째에 105.6±25.3pg/ml, 14일째에 48.5±10.3pg/ml으로 대조군에 비하여 7일째에 P<0.05의 유의한 혈청 IFN-γ의 감소를 나타내었다(Table 3).

7. 혈청 IL-4의 변화

제모 이후 실험동물의 혈청으로부터 측정된 IL-4는 대조군은 1일째에 18.3±1.2pg/ml, 7일째에 10.3±1.5pg/ml으로 감소하고, 14일째에 13.5±1.2pg/ml으로 증가하였다. 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 1일째에 17.5±1.4pg/ml, 7일째에 15.2±1.6pg/ml, 14일째에 14.8±1.3pg/ml으로 대조군에 비하여 7일째에 P<0.05의 유의한 혈청 IL-4의 증가를 나타내었다 (Table 4).

8. 혈청 IL-10의 변화

제모 이후 실험동물의 혈청으로부터 측정된 IL-10은 대조군은 1일째에 53.5±5.3pg/ml, 7일째에 43.7±4.6pg/ml으로 감소하고, 14일째에 46.2±4.2pg/ml을

Table 3. Changes of Serum IFN-γ Level Following YBT Treatment on Hair Removal C57BL/6 Mice (pg/ml)

Groups	Days after hair removal		
	1st (n=6)	7th (n=6)	14th (n=6)
Control	8.3±1.5	218.3±43.9	53.2±12.1
Sample	5.8±1.2	105.6±25.3*	48.5±10.3

Data present Mean ± Standard error.
 YBT; Yikgeebohyul-tang(Yiqibūxué-tāng).
 Control; group treated without any treatment after the hair removal.
 Sample; group treated with Yikgeebohyul-tang(Yiqibūxué-tāng) water-extract administration after the hair removal.
 Statistical significance was verified with Mann-Whitney U test between the control and sample group(*, P<0.05).

Table 4. Changes of Serum IL-4 Level Following YBT Treatment on Hair Removal C57BL/6 Mice (pg/ml)

Groups	Days after hair removal		
	1st (n=6)	7th (n=6)	14th (n=6)
Control	18.3±1.2	10.3±1.5	13.5±1.2
Sample	17.5±1.4	15.2±1.6*	14.8±1.3

Data present Mean ± Standard error.
 YBT; Yikgeebohyul-tang(Yiqibūxué-tāng).
 Control; group treated without any treatment after the hair removal.
 Sample; group treated with Yikgeebohyul-tang(Yiqibūxué-tāng) water-extract administration after the hair removal.
 Statistical significance was verified with Mann-Whitney U test between the control and sample group(*, P<0.05).

Table 5. Changes of Serum IL-10 Level Following YBT Treatment on Hair Removal C57BL/6 Mice

(pg/ml)

Groups	Days after hair removal		
	1st (n=6)	7th (n=6)	14th (n=6)
Control	53.5±5.3	43.7±4.6	46.2±4.2
Sample	45.7±4.1	40.3±3.6	41.2±4.4

Data present Mean ± Standard error.

YBT; Yikgeebohyul-tang(Yiqibūxué-tāng).

Control; group treated without any treatment after the hair removal.

Sample; group treated with *Yikgeebohyul-tang*(Yiqibūxué-tāng) water-extract administration after the hair removal.

Statistical significance was verified with Mann-Whitney U test between the control and sample group.

나타내었다. 益氣補血湯을 경구투여한 실험군은 1일째에 45.7±4.1pg/ml, 7일째에 40.3±3.6pg/ml, 14일째에 41.2±4.4pg/ml로 대조군에 비하여 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 5).

고 찰

모낭은 포유동물만이 가지고 있는 피부의 부속기관으로 생명유지의 기능보다는 감각 기능 및 미용적 기능을 주로 담당한다²⁶⁾. 성숙 모낭의 구조를 관찰하면, 하부의 모유두를 성장부의 상피세포가 덮고 있으며 그 위로 모발이 형성되어 있고 그 밖으로 내측모근초와 외측모근초 그리고 결직초가 감싸고 있다²⁷⁻²⁹⁾. 모발의 생성은 모유두와 모기질 세포 사이의 상호작용에서 시작되는데, 모기질 세포와 모유두가 모낭의 기저막인 유리양막에서 분리되면서 세포질의 keratin 합성이 증가하고 세포소기관은 점점 퇴화되며 무정형의 세포외기질 사이에 keratin fibril이 팽 차있는 모습으로 변하면서 지속적인 모발성장이 이루어진다²⁹⁾. 또한 이 상호 작용은 모낭의 주기를 발생시키며 기관을 유지하고 모발의 굵기 및 형태 등의 생물학적 특징을 결정한다^{1,2,30)}. 그리고 모낭에는 피부와는 구별되는 멜라닌 세포가 존재하며 모발의 색을 결정하게 된다³¹⁾.

모낭의 형태와 모발성장에 영향을 주는 신호전달 물질에는 외적인 요인과 내적인 요인이 존재하며 내적인 요인으로는 성장인자와 cytokine을 들 수 있는데 모낭의 각 부위와 주기에 따라 다른 성장인자와

수용체가 존재한다⁵⁾. 성장기 모낭의 협부 주변 내측 모근초에서는 TGF- α , TGF- β , aFGF (acidic FGF), FGF5, HER-3 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-3)이 존재하고, 모낭하단부의 내측모근초에서는 TGF- β , EGFR (EGF Receptor), FGFR2 (Fibroblast GFR2), KGFR (Keratinocyte GFR) 등이 존재하며 모유두에는 TGF- β , KGF, HGF (Hepatocyte Growth Factor), VEGF (Vascular EGF), FGFR1 (Fibroblast GFR1)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 이에 반해 휴지기의 모유두에서는 VEGF가 분비되고 그 결과로 모세혈관의 신생 혈관 생성을 촉진시켜 새로운 성장기로 진입시키는 것으로 알려져 있다. 이밖에도 휴지기의 모유두에서는 KGF, HGF가 분비되어 EGF, TGF- α , EGFR, KGFR 등이 존재하는 팽윤부를 활성화시킨다^{6,8,9,32,33)}. 그 중에서 EGF는 모유두 세포에서 생성되는 cytokine으로 모낭의 혈관 생성에 도움을 주며 모발의 성장을 촉진시키고 세포 소멸을 억제시키고 세포의 분열과 이동을 촉진시킨다⁸⁾ 또, 인체 모낭에서 TGF- β 1는 퇴행기 전환시 증가되는 인자로 모낭 상피세포의 증식을 억제하고 세포고사를 유도하여 일반적으로 모발의 성장을 억제하는 쪽으로 작용한다^{9,10)}.

모낭은 성장 주기별로 뚜렷한 형태학적 특징을 가지고 세포의 증식과 분화, 모발의 성장과 탈락을 보인다는 점에서 세포고사 과정이 잘 통제되는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 이러한 모낭의 세포고사 과정은 모낭의 성장 주기별 면역학적 특성 즉 면역특권에 근거하는데, 인체 모낭은 성장기에 MHC I 항원이

근위부 모낭에서는 발현되지 않고 면역관련 세포들도 모낭에서 드물게 분포하는데 이런 소견들은 모낭이 면역특권을 지니고 있는 증거라고 여겨진다^{35,36}. 또한 쥐에서 모낭주기가 퇴행기로 진행함에 따라 MHC I 발현이 증가됨은 잘 알려져있다^{35,37}. 모낭의 기관배양시 IFN- γ 를 투여하면 MHC I 발현이 증가하며 퇴행기로의 이행이 촉진되고 반면 다른 면역억제 물질 처리시에는 MHC I 발현 증가가 억제되며 퇴행기로의 이행 또한 늦춰진다고 보고되었다³⁸. 이상을 토대로 국소적인 MHC I의 상대적인 발현증가와 모낭의 퇴행기로의 진행이 서로 관련되어 있다는 주장이 제시된 바 있다^{36,38,39}. MHC II 발현양상은 성장기와 비교할 때 퇴행기로 진행할수록 근위부 모낭, 특히 모구 주변으로 강하게 발현되는데 이는 퇴행기의 진행에 따라 면역특권이 깨지면서 면역관련 세포들이 모구 주변에 모여들기 때문이다⁴⁰. 이런점에서 모낭에서의 면역특권은 특히 성장기 모낭에 있어 자가면역 반응을 피하는데 필수적인 것으로 생각할 수 있다⁴¹.

탈모와 관련하여 혈청 cytokine에 관한 연구를 살펴보면 IFN- γ 는 원형 탈모증을 일으키는 CD4+ T 세포중 Th1 세포가 생산하는 Th1 cytokine으로 원형 탈모증의 병변의 진행과 연관성이 있고 치료에 좋은 반응을 보인 경우 IFN- γ 가 의미있게 감소하는 것으로 알려져있다^{38,40,41}. 또 IL-4는 CD4+ T 세포중 Th2 세포가 생산하는 Th2 cytokine으로 Th1 반응을 억제하여 IFN- γ 를 길항한다⁴¹. 그리고 IL-10은 다른 전염증성 cytokine의 생산을 억제하고 항원 전달 세포를 억제하며 면역억제 효과가 있는 것으로 밝혀져있고⁴² 원형 탈모증에 있어서 병변 부위의 염증반응을 억제하는 것으로 알려져으며^{39,43} T 세포의 항상성과 자가 관용을 유지하는데 필요하여 병변이 급격하게 확산되는 활성기의 급성 염증을 억제하는데 조절 역할을 한다⁴¹. IL-16은 급성기의 원형 탈모증 환자의 말초 혈액에서 증가되어 있고 이런 IL-16의 증가가 여러 전염증성 cytokines 분비를 자극해서 염증 반응을 확대시키는 영향을 한다고 알려져있다⁴⁴.

益氣補血湯은 김¹⁸의 《東洋醫學 診療要鑑》에 수록되어 있는 處方으로 補中益氣湯과 滋陰健脾湯의 合方에 木香, 厚朴, 山查, 麥芽, 神麩를 加한 處方으로 氣血不足으로 인한 困倦無力 頭重眩暈 精神不清 등에 대응되어왔다. 그 구성을 살펴보면 黃芪 蜜炙, 白朮, 山楂肉, 香附子, 半夏, 陳皮, 白茯苓, 神麩炒, 麥芽炒, 甘草, 厚朴, 砂仁, 當歸身, 白芍藥, 乾地黃, 人蔘, 白茯苓, 麥門冬, 遠志, 川芎, 木香, 生薑, 大棗로 補中益氣湯, 滋陰健脾湯, 四物湯의 의미를 가진다. 益氣補血湯에 관한 연구로는 절혈결성 빈혈에 관한 임상 시험례¹⁹를 제외하고는 보고된 바 없으나 益氣補血湯에 포함된 補中益氣湯, 滋陰健脾湯, 四物湯의 연구를 통하여 益氣補血湯의 方義를 이해할 수 있으리라 사료된다.

補中益氣湯은 李²⁰의 《東垣十種醫書》에 처음으로 수록된 처방으로 飲食失節이나 寒溫不適으로脾胃가 傷한 경우나 勞役過度로 耗損元氣한 證에 사용되었고 氣虛로 인한 諸 疾患에 通用되는 대표적인 方劑이다²¹. 補中益氣湯에 관한 실험적 연구로는 항스트레스, 항알레르기, 근육의 피로회복에 대한 영향 및 항산화 효과 등이 보고되었며⁴⁵⁻⁴⁸ 혈중 cytokine 연구에서 IFN- γ 의 유의한 변화를 보고하였으나^{49,50} 모발 및 탈모관련 연구는 보고되지 않았다.

滋陰健脾湯은 龔⁵¹의 《萬病回春》에 처음으로 수록되어 있지만 許⁵²는 《萬病回春》의 原方에 半夏를 增量하고 白芍藥을 가미하여 心脾虛怯, 氣血不足 및 痰飲으로 인한 眩暈에 사용할 수 있다고 하였다. 滋陰健脾湯에 관한 실험적 연구로는 위장점막 보호기능, 뇌혈류 및 뇌세포에 관한 영향, 항스트레스, 鎮靜·補血효과등이 보고되었지만²²⁻²⁵ 모발 및 탈모관련 연구는 보고되지 않았다.

四物湯은 宋代 陳⁵³의 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 이래 血病의 대표적 治方으로 血과 관련된 일체의 질병을 치료하나 임상에서 原方으로만 사용되는 경우는 드물고 病證에 따라 다양하게 加減 활용되고 있으며 특히 血虛, 血熱, 血燥 등의 血病證과 婦人科 疾患의 기본방으로 광범위하게 응용되고 있다²¹. 四物湯의 모발 및 탈모관련 연구로

는 권¹⁶⁾의 四物湯加味方의 원형탈모 생쥐의 發毛효과 및 모발성장인자에 대한 영향에 관한 연구가 보고되었다.

한의학에서 모발은 인체의 臟腑, 經絡과 밀접한 관계가 있는데 《素問·五臟生成論》⁵⁴⁾에는 “肺之合皮也 其榮毛也, 其主心也……腎之合骨也 其榮髮也 其主脾也.”라 하여 心, 脾, 肺, 腎과 밀접한 관계가 있음을 언급하였고, 《靈樞·陰陽二十五人》⁵⁵⁾에서는 인체를 循行하는 각 經絡의 氣血多少가 순행하는 각 부위의 毛髮盛衰를 결정하는데 특히 手足三陽經과 밀접한 관련이 있다고 하였다.

또 탈모의 원인에 대하여 《黃帝內經》⁵⁴⁾에서는 “多食甘味”라 하였고 素⁵⁶⁾는 黃帝內經의 이론을 바탕으로 病症과 證候를 결합하여 설명하였다. 이후 모발탈락에 대한 辨證施治가 더욱 발전되어 血燥, 血氣衰弱, 腎虛, 風, 熱, 怒, 濕痰, 多食甘味, 肺虛 등을 그 원인으로 언급하였다⁵⁷⁾.

이상의 연구와 문헌에 따르면 益氣補血湯은 補氣, 補血효과가 있으며¹⁹⁻²⁵⁾, 면역력 개선의 효과가 있을 것으로 사료되며 이러한 효과는 모발탈락의 원인으로 알려진 모낭의 면역특권 소실을 개선하여 육모를 촉진하는 효과가 있으리라 추정된다.

이에 저자는 지금까지 본 처방에 대해 실험적 연구가 진행되지 않았고 특히, 본 처방이 모낭에서 분비되는 모발 성장인자에 미치는 영향 및 모낭에 미치는 면역계의 작용을 알아보기 위해 본 실험을 하였다.

본 연구에 사용된 C57BL/6 mouse는 생후부터 모든 모낭이 모발 성장주기의 성장기로 들어가 털이 자라기 시작하였다가 생후 약 3주경 휴지기로 전이된 다음 바로 2차 성장기로 접어들어 6주경 모든 모낭이 휴지기로 전이되어 약 4주 이상 지속되므로 실험동물의 효과를 평가하기 위한 시간적 여유가 있다는 장점을 지녔다. 또한, melanocyte가 모낭에만 한정적으로 존재하고 melanin 합성이 모발 성장주기와 잘 일치되어 피부색으로 모발의 성장주기를 판정할 수 있는 장점을 지녀 모발 생리 연구에 널리 이용되고 있다^{58,59)}. 본 연구에서는 androgen의 작용이

배제된 상태에서 육모 효과를 관찰하기 위하여 5주령된 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 1주일간 순화기간을 거쳐서 6주령 된 마우스를 가지고 실험을 시작하였다.

본 연구에서는 육안적 발모상태의 변화, 발모면적, 모낭 및 모발의 조직학적 변화, 모낭에 분포하는 모발 성장인자 중 TGF- β 1, EGF와 탈모와 관련된 혈청 cytokine중 IFN- γ , IL-4, IL-10의 발현양을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

육안적 발모상태는 대조군의 경우 4일까지는 별다른 변화가 나타나지 않았다가 7일째 제한된 국소 부위의 모낭에서 새로운 털이 자라나기 시작하였고 10일째부터 일부 피부밖으로 자라난 털이 관찰되었고 14일째 부분적으로 검정색 털이 완전히 자라났다. 益氣補血湯 투여군은 7일째까지는 대조군과 비슷한 변화였으나 7일째, 10일째, 14일째 모두 대조군에 비해 털이 자라난 상태와 부위가 더 넓어 대조군에 비하여 뚜렷한 발모 촉진 효과를 나타내었다.

발모면적을 측정한 결과, 대조군은 1일부터 7일까지 보다는 7일부터 14일까지에서 뚜렷한 발모상태를 보였으나 益氣補血湯 투여군은 대조군에 비하여 7일째에는 $P < 0.001$, 10일째와 14일째에는 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 육모지수의 증가를 나타내었다. 이는 대조군에 비하여 益氣補血湯 투여군이 육모를 앞당기고 그 효과 또한 지속되는 것을 의미한다.

모낭 및 모발의 조직학적 변화를 살펴보면 대조군은 부분적으로 모낭의 발달이 미약하거나 털이 자라더라도 털의 형태가 등글지 않고 반달형으로 변형되어 있거나, 내모근초의 발달이 충분하지 못한 것이 부분적으로 관찰되었다. 이에 비해 益氣補血湯을 투여한 군은 전체적으로 모낭이 잘 발달되어 있으며, 내모근초도 잘 발달되어 털이 등근 형태로 자라난 것을 관찰할 수 있어 육안적 관찰 뿐만 아니라 조직학적으로도 대조군에 비해 양호한 육모상태를 나타내어 육모의 양적, 질적 우위를 확인할 수 있었다.

모낭에 분포하는 모발 성장인자의 발현 변화를 알아보기 위해 피부조직에 면역조직화학염색을 시행하여 TGF- β 1 발현을 관찰한 결과 대조군과 益氣

補血湯 투여군 모두에서 TGF-β1의 발현을 관찰하기 어려웠다. 이는 益氣補血湯이 TGF-β1 발현에 영향을 미치지 못하였거나 또는 발현을 억제한 결과로 추측되며, 이는 益氣補血湯이 모낭의 주기를 퇴행기로 전이시키거나 세포를 고사시키는 작용은 없는 것을 의미할 것으로 생각된다. EGF 발현을 관찰한 결과, 대조군은 모발의 굵기가 일정 수준 이상인 성모와 굵기가 가는 새롭게 자라나는 털의 외모근초에서 미약한 양성 반응을 나타내었으며, 내모근초에는 음성반응을 나타내었으나 益氣補血湯 투여군은 전체적으로 굵기가 일정 수준 이상인 성모의 외모근초에서는 EGF에 대하여 미약한 또는 중등도의 양성반응을 나타내었으며, 특히 굵기가 가는 새롭게 자라나는 털의 외모근초에서는 매우 강한 EGF 양성 반응을 나타내어 益氣補血湯이 모근의 EGF 발현에 영향을 미쳐 모발의 성장을 촉진하고 세포분열을 자극하여 육모를 촉진하는 작용이 있음을 추측할 수 있다.

혈청 cytokine중 IFN-γ의 변화를 관찰한 결과, 대조군은 7일째에 현저하게 증가하였다가 14일째에는 감소하였고, 益氣補血湯 투여군은 대조군에 비하여 7일째에 P<0.05의 유의한 혈청 IFN-γ의 감소를 나타내다가 14일째에는 감소하였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. 이는 益氣補血湯이 Th1 반응을 감소시켜 탈모증의 병변의 진행을 막고 육모를 촉진하는 작용이 있음을 추측할 수 있다. 혈청 IL-4는 대조군은 7일째에 감소하였고, 14일째에 증가하였고, 益氣補血湯 투여군은 대조군에 비하여 7일째에 P<0.05의 유의한 혈청 IL-4의 증가를 나타내다가 14일째는 증가하였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. 이는 益氣補血湯이 Th2 반응을 증가시키고 Th1 반응을 억제하여 IFN-γ를 길항함으로써 육모를 촉진하는 작용이 있음을 추측할 수 있다. 혈청 IL-10은 대조군과 益氣補血湯 투여군 모두에서 7일째에 감소하고, 14일째에 증가하는 결과를 보였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었다.

이러한 결과를 종합해 검토한 결과 益氣補血湯은 대조군에 비하여 우수한 육모촉진 효과가 있으며 그

기전은 모낭에서 EGF의 발현을 증가시키며 혈청 IFN-γ의 감소 및 혈청 IL-4의 증가를 통한 작용에 의한 것으로 추측된다.

그러나 본 실험은 병리적 탈모현상을 가진 실험 동물을 이용한 실험이 아니라 제모를 실시한 이후에 수행되어진 실험이라는 점에서 한계를 가지고 있다. 특히 본 연구에서 혈청 IFN-γ과 혈청 IL-4의 변화를 살펴보면, 실험 7일째까지 혈청 IFN-γ가 증가하다가 실험 14일째는 실험 7일째에 비해 감소되었고, 혈청 IL-4는 실험 7일째까지 혈청 IL-4이 감소하다가 실험 14일째는 실험 7일째에 비해 증가되었다. 이러한 경향성은 대조군과 실험군에서 동일하게 나타나며, 실험 14일째는 대조군과의 비교에서 실험군의 유의성 있는 효과를 관찰할 수 없다. 이러한 변화의 경향성은 실험 동물의 제모로 유발되는 모낭의 cytokine의 변화에 대한 연구를 통해 보완될 수 있으리라 생각되어 진다.

결론

益氣補血湯의 육모촉진 효과를 관찰하기 위하여 제모된 C57BL/6 마우스에 益氣補血湯을 14일간 경구투여한 다음 육안적 발모상태 및 발모면적, 모발 및 모낭의 조직학적 변화, 모낭에서의 TGF-β1 및 EGF 발현을 면역조직화학염색을 통해 관찰하였다. 또한 혈청에서의 IFN-γ, IL-4, IL-10의 변화에 대해서 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 발모면적비율에서 유의성 있는 증가를 나타내었다.
2. 모발의 밀도, 성모의 수 및 성모 비율에서 유의성 있는 증가를 나타내었다.
3. 대조군과 益氣補血湯 투여군 모두에서 모낭의 TGF-β1은 관찰되지 않았다.
4. 모낭에서 EGF의 발현을 증가시켰다.
5. 혈청 IFN-γ는 실험 7일째 유의하게 감소되었으며 실험 14일째는 감소되었으나 유의성은 없었다.
6. 혈청 IL-4는 실험 7일째는 유의하게 증가되었

으며 실험 14일째는 증가되었으나 유의성은 없었다.

7. 혈청 IL-10은 감소되었으나 유의성은 없었다.

참고문헌

1. Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2003;8(1):46-55.
2. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001;81(1):449-494.
3. Soma T, Ogo M, Suzuki J, Takahasi T, Hibino T. Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles. *J Invest Dermatol* 1998;11:948-954.
4. Kalish RS, Gilhar A. Alopecia areata: autoimmunity-the evidence is compelling. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2003;8:164-167.
5. Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clin.* 1996;14(4):559-72.
6. Jindo T, Tsuboi R, Imai R, Takamori K, Rubin JS, Ogawa H. The effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on human hair follicle growth. *J Dermatol Sci.* 1995;10(3):229-32.
7. Mitsui S, Ohuchi A, Hotta M, Tsuboi R, Ogawa H. Gene for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicle. *Br. J Dermatol.* 1997;137:693.
8. Mak KK, Chan SY. Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle. *J Biol Chem.* 2003;278(28):26120-6.
9. Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, Yoshikawa K, Itami S. Androgen-inducible TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. *FASEB J.* 2002;16(14):1967-9.
10. Soma T, Dohrmann CE, Hibino T, Raftery LA. Profile of transforming growth factor-beta responses during the murine hair cycle. *J Invest Dermatol.* 2003;121(5):969-75.
11. Lee hs, Song JY, Yun Km, Jae YM. Hair growth effect of Mori Cortex Mixture on the hair of rat. *Korean J. Seric. Sci.* 2000;42(2):83-5.
12. Choi W, Choi JH, Kim JH. Effect on Hair Growth by various herb medicine. *The Journal of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & dermatology.* 2002;15(2):80-103.
13. Shin YS. Studies on the effect of five herbal extracts on hair growth activity. Dept. of Oriental Medicine Graduate School Daejeon University. 2003.
14. Kim MY, An BJ. A Study of Hair Loss Prevention and Hair Growth Promotion by Korean Traditional Fomular. *Korean journal of herbology.* 2004;19(2):9-20.
15. Park WS, Sung DS, Kim DK, Cho WH, Lee HK, Lee CH, et al. The Effect of Hair Essence (HHRHG0202-80) Containing Five Herbal Extracts on Hair Growth and the Prevention of Alopecia in vitro & vivo. *J Korean Oriental Med.* 2004;25(1):152-60.
16. Kwon GJ. Experimental Studies on Hair Growth Effect of Samultang-gamibang in Spontaneous Alopecia Areata Mice. Professional Graduate School of Oriental Medicine Wonkwang University. 2004.
17. KIm PS, Kim HT, Roh SS, Whang CY. Effect of DanGuiBoHyulTangGami-Bang on the Alopecia and Hair Growth Stimulation. *The Journal of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & dermatology.* 2004;17(3):38-60.
18. Kim JJ. Dongyangeuihak Jinryoyogam. Seoul: The Institute of Oriental medicine. 2007;176.
19. Hwang HJ, Kim JD. A Case Study on the Iron Deficiency Anemia. *Korean J. Orient. Int. Med.* 2000;21(4):655-60.

20. Lee G. Dongyuashizhongyishu. Seoul:Daeseong medicine publishing company. 1983;35-7,86-7.
21. Youn GY. Dongeuiyimsangbangjehak. Seoul: Myungbo publishing company. 1987;254-63,303-8.
22. Lee HY, Baek TH. Effect of Jaeumgeonbi-tang Extract on Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Lesions. *J Korean Oriental Med.* 2004;25(3):111-22.
23. Lim KM, Jeong HW. Mechanism of Jaeumgeonbi-tang adding Aurantii Fructus · Gastrogae Rhizoma on the Improvement and Changes of Cerebral Hemodynamics. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology.* 2003;17(1):64-70.
24. Hong DS. The Effect of Jaeumgunbitang on The Brain Catecholamine Contents and Body Weight of Rats in Immobilization Stress. Graduate School Kyung Hee University. 1992.
25. Kim JH, Lee KS. Experimental Study on the Effects of Jaeumgeonbi-tang on Sedative Action and Hematosis. *J Korean Oriental Med.* 1988;9(1):35-41.
26. Randall VA, Sundberg JP, Philpott MP. Animal and in vitro models for the study of hair follicles. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2003;8(1):39-45.
27. Powell B, Crocker L, Rogers G. Hair follicle differentiation: expression, structure and evolutionary conservation of the hair type II keratin intermediate filament gene family. *Development.* 1992;114(2):417-33.
28. Rogers GE. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol.* 2004;48(2-3):163-70.
29. Kreplak L, Mérigoux C, Briki F, Flot D, Doucet J. Investigation of human hair cuticle structure by microdiffraction: direct observation of cell membrane complex swelling. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1547(2):268-74.
30. Hirobe T. Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol Histopathol.* 1995;10(1):223-37.
31. Li J, Tzu J, Chen Y, Zhang YP, Nguyen NT, Gao J, et al. Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J.* 2003;22(10):2400-10.
32. Peters EM, Hansen MG, Overall RW, Nakamura M, Pertile P, Klapp BF, et al. Control of human hair growth by neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor inhibits hair shaft elongation, induces catagen, and stimulates follicular transforming growth factor beta2 expression. *J Invest Dermatol.* 2005;124(4):675-85.
33. Danilenko DM, Ring BD, Yanagihara D, Benson W, Wiemann B, Starnes CO, et al. Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia *Am J Pathol.* 1995;147(1):145-54.
34. Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol.* 1997;151(6):1601-17.
35. Paus R, Christoph T, Muller-Rover S. Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999;4(3):226-34.
36. Christoph T, Muller-Rover S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol.* 2000;142(5):862-73.
37. Paus R, Hofmann U, Eichmuller S, Czarnetzki BM. Distribution and changing density of gamma-delta T cells in murine skin during the induced hair cycle. *Br J Dermatol.* 1994;130(3):281-9.
38. Ito T, Ito N, Saathoff M, Bettermann A, Takigawa M, Paus R. Interferon-gamma is a potent inducer of catagen-like changes in cultured human anagen hair follicles. *Br J Dermatol.* 2005;152(4):623-31.

39. Bodemer C, Peuchmaur M, Fraitag S, Chatenoud L, Brousse N, De Prost Y. Role of cytotoxic T cells in chronic alopecia areata. *J Invest Dermatol.* 2000;114(1):112-6.
40. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(3):207-19.
41. Miceli MC, Parnes JR. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol.* 1993;53:59-122.
42. Meng X, Sawamura D, Tamai K, Hanada K, Ishida H, Hashimoto I. Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin-10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin. *J Clin Invest.* 1998; 101(6):1462-7.
43. Gilhar A, Landau M, Assy B, Ullmann Y, Shalaginov R, Serafimovich S, et al. Transfer of alopecia areata in the human scalp graft/Prkdc(scid) (SCID) mouse system is characterized by a TH1 response. *Clin Immunol.* 2003;106(3): 181-7.
44. Tanyasiri K, Hira K, Mitsuishi K, Ueki R, Sekigawa I, Ogawa H. Interleukin-16 in patients with alopecia areata. *J Dermatol Sci.* 2005;37 (1):55-7.
45. Kim JH, Lee TH. Effects of Bojungikgitang on Starvation stress in Mice. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription.* 2006;14(1):133-40.
46. Kim SM, Sim SY, Byun HS, Kim KJ. The Effect of Bojungikgi-tang in mouse model of Allergic rhinitis. *The Journal of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & dermatology.* 2005;18(3): 26-36.
47. Baek TH, Jee HC. Study on effect of Bojungikgi-tang affecting lactate tolerance and recovery rate. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine.* 1998;8(1):171-86.
48. Park SD, Seo GS, Park WH. Effects of Bojungikgitang, Soeumin Bojungikgi-tang and its component groups on Antioxidant Activities in alloxan-induced diadetic rats. *Kor. J. Herbology.* 2001;16 (2):113-26.
49. Kim JS, Sim SW, U YS, Nam HJ, Kim KJ. The Effect of Bojungikgi-tang on the Nasal tissue in allergic rhinitis of ovalbimin-inhalation Rats. *Journal of the oriental medical surgery, ophthalmology & otolaryngology.* 2004;17(1):66-74.
50. Eun JS, Choi H, Song JM. Effect of Bojungikgitang on the Specific immune Response in BALB/c Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2002;16(5):943-7.
51. Gong TX. Wanbinghuichun. Seoul:Haenglim publishing company. 1972;220-2.
52. Heo J. Dongeuibogam. Seoul:Namsandang. 1983 ;202-3,359.
53. Chen SW. Taipinghuiminhejjufang. Beijing:People's Medical Publishing House. 1985;179-80, 310-1.
54. Yang YG. Huangdineijingsuwenyijie. Seoul:Seongbosa 1980;5-10,93-4,337,340.
55. Yang YG. Huangdineijinglingshuyikjie. Seoul: Seongbosa. 1980;104,452-6.
56. Chao YF. Zhubingyuanhoulun. Beijing:People's Medical Publishing House. 1983;761-7.
57. Lim SBN, Choi KD, Kim SK. The Oriental and Western Medical Study of Alopecia. *The Journal of Jeahan Oruental Medical Academy.* 1999;4 (1):699-710.
58. Otomo S. new hair growth drugs and their nonclinical evaluation methods. *Hyangjanghwoggi.* 1997;21:228.
59. Kagoura M, Morohashi M, Ogita Z. Animal models for the study of alopecia. *Hyangjanghwoggi.* 1997;21:207.