

Original Article / 원저

## 養血飲加味方 추출물의 발모효과에 대한 실험적 연구

홍지희 · 정현아

대전대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실

### The Experimental Studies of *YangHyulEum Gami-Bang* Extracts on the Hair Growth Effect

Jee-Hee Hong · Hyun-A Jung

Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, Collegy of Oriental Medicine, Daejeon University

#### Abstract

**Objectives :** *YangHyulEum Gami-Bang*(YHEG) is a hair care extracts which is composed of fourteen plant extracts used in oriental medicine. The purpose of this study is to investigate the effect of *YangHyulEum Gami-Bang*(YHEG) on the alopecia and hair growth.

**Methods & Results :** The herbal extracts from *YangHyulEum Gami-Bang*(YHEG) was tested using in vivo and in vitro test models.

1. The YHEG extracts showed effect on the DNA proliferation of the hair dermal papilla cells measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation.
2. YHEG showed promoting on the expression of growth factors such as IGF-1, KGF-1 and inhibiting on the expression of inhibitory hair growth factor such as TGF- $\beta$ 1, BMP-2 estimated by qPCR.
3. The YHEG extracts showed effect on the activation of  $\beta$ -catenin in the dermal papilla cells.
4. YHEG showed inhibitory effects of NO synthesis at 0.2% concentrations.
5. YHEG showed effects in the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2 and iNOS gene in the LPS stimulated RAW 264.7 cells.
6. The hair growth index of the YHEG extracts ranked at over 2 when compared to control group which was ranked at 0.
7. The hair follicle number, length and size of the experimental group were remarkably higher than the control group in the histological observation.

**Conclusions :** These results suggest that *YangHyulEum Gami-Bang*(YHEG) has hair growth promoting activity and it can be used as a potent treatment agent for preventing hair loss and stimulating hair growth for treatment of alopecia.

**Key words :** *YangHyulEum Gami-Bang*(YHEG); Alopecia; Hair growth; Hair dermal papilla cell

© 2016 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서 론

모발은 일차적으로 태양광선과 한랭, 외부충격 등으로부터 머리를 보호하는 역할을 하지만, 오늘날 삶의 질이 향상되고 경제수준이 높아지면서 이러한 일차적 기능 이외에 미용적 측면의 중요도가 크게 부각되고 있다<sup>1)</sup>.

모발은 각각의 부위와 개인에 따라, 연령에 따라 서로 다른 성장기를 가지며 이에 따라 각 부위의 적당한 길이가 유지된다<sup>2)</sup>. 일반적으로 정상 頭髮의 성장기(anagen stage)는 3-5년, 퇴행기(catagen stage)는 3-4주, 휴지기(telogen stage)는 3-5개월 정도이며<sup>3)</sup>, 정상 두피 내에서 모발의 약 85-90%정도가 성장기, 1%가 퇴행기, 10%가 휴지기 상태로 분포한다.

탈모는 유전적 요인, 내분비 이상, 약물, 잘못된 생활습관, 정신적 스트레스 등으로 인해 모발 성장 주기에서 휴지기가 길어지거나 전체 모낭 중 휴지기 개체수가 증가하여 과도한 모발 탈락이 일어난 결과, 모발이 정상적으로 존재해야 할 부위에 모발이 소실되는 질환을 총칭하는 것으로<sup>4)</sup> 하루에 100개 이상 탈락하면 탈모증을 의심해 봐야 한다<sup>2)</sup>.

탈모는 현대사회에서의 불규칙한 생활습관, 과도한 업무로 인한 정신적 스트레스 등과 관련되어 유병률이 급속히 증가하고 있으며 국민 경제의 향상과 함께 사람들의 외모에 대한 관심이 높아지면서 탈모는 과거 주요 질환에 부수적으로 동반되는 증상으로만 여겨지기도는 하나의 독립된 질병으로 그 중요성이 높아지고 있다<sup>2)</sup>. 우리나라의 경우 탈모를 경험한 사람은 이미 700만명이 넘었고, 실제 탈모증 인구는 약 8만 명 이상으로 추산되고 있다<sup>5)</sup>. 또한 최근에는 심리적, 환경적 요인으로 인해 20세 이상 남성 중 약

80%에서 탈모를 고민하고 있으며 여성 및 소아에 이르는 탈모증 환자도 점차 증가하고 있는 추세로 남녀 노소를 불문하고 연령층도 점차 낮아지고 있다. 따라서 탈모증이 만성화되기 전에 탈모 초기단계부터 치료를 위해 의료기관을 방문하는 젊은 층도 점차 늘어나고 있으며 모발 성장 촉진에 효과가 있는 한약제 연구 개발과 활용에 대한 요구 또한 증대되고 있다<sup>6)</sup>.

탈모에 대한 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만, 최근 분자생물학, 세포생물학 등 기초의학의 발달과 더불어 모발성장 및 탈모의 기전에 대한 연구가 많은 발전을 이루고 있으며, 이를 이용하여 모발 성장 및 탈모억제 소재에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다<sup>6,7)</sup>.

탈모를 유발하는 원인으로 현재까지 남성 호르몬과 모낭과 모유두를 둘러싼 혈관의 순환 부전으로 인한 영양공급 장애 등이 주된 요인으로 생각되고 있으며<sup>8)</sup>, 이중 남성호르몬에 의한 영향은 Hamilton<sup>9)</sup>이 탈모와 남성 호르몬의 관련성을 밝히면서 많은 연구가 진행되어 왔다.

韓醫學에서 毛髮은 《素問·五藏生成論》<sup>10)</sup>과 《靈樞·陰陽二十五人》<sup>10)</sup>에서 인체의 臟腑, 經絡과 밀접한 관계가 있다고 하였으며, 脫毛는 《黃帝內經》<sup>10)</sup>에 髮墮, 髮去, 髮落, 毛拔, 毛折 등으로 표현되어 있으며, 역대 문헌<sup>10-13)</sup>에서 血燥, 血氣衰弱, 腎虛, 肺虛, 風, 熱, 怒, 濕痰, 多食甘味 등을 그 원인으로 언급하였다.

최근 모발과 관련한 연구로 홍 등<sup>14)</sup>은 모발탈락의 병인 및 치료에 대해 문헌고찰을 하였고, 김 등<sup>15)</sup>은 탈모에 응용되는 神應養眞丹의 효능을, 노 등<sup>16)</sup>은 苦蔘 추출물이 모발 성장에 미치는 실험적 연구를, 강 등<sup>17)</sup>은 in vivo와 in vitro 평가모형을 이용한 한약추출물의 모발 성장에 미치는 실험적 연구를 보고하였다.

養血飲加味方(YangHyulEum Gami-Bang; YHEG)은 大田大學校 韓方病院 處方集<sup>18)</sup>에 수록된 脫毛를 치료하는 經驗方으로 清胃하며 解毒升舉의 效를 지닌

Corresponding author : Hyun-A Jung, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University, Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, Daedeok-daero 176beon-gil 75, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City.

(Tel: 042-470-9133, E-mail: aqua3739@dju.kr)

• Recieved 2016/7/4 • Revised 2016/8/9 • Accepted 2016/8/16

升麻와 특히 肝腎經의 風熱을 治하는 豨薺를 君藥으로 하고, 風濕痺症을 治하는 防風과 清熱, 補血하는 四物湯을 臣藥으로 하여 血虛有風濕熱로 인한 脫毛症을 다스린다고 하였다.

본 연구에서는 養血飲加味方 추출액이 모발 성장 촉진과 탈모에 미치는 영향을 평가하고자 5 $\alpha$ -reductase type II 활성 억제 효과, 모유두세포의 DNA 증식 효과, 모발 성장에 관련된 growth factor의 유전자 발현에 미치는 영향,  $\beta$ -catenin 신호의 활성 효과, 항산화 효과, Nitricoxide(NO) 생성 억제 효과, 대식세포에서 전구 염증 매개 사이토카인과 효소 유전자 발현에 미치는 영향, C57BL/6마우스를 이용한 발모 효과 및 피부의 조직학적 변화 등을 종합적으로 평가하여 의미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 養血飲加味方(YangHyulEum Gami-Bang; YHEG)의 처방구성은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 약재는 대전대학교 부속 둔산한방병원에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 실험 동물

본 시험은 동물보호법에 의거한 충남대학교 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었으며(승인번호: CNU-00736) 5주령 암컷 C57BL/6 마우스(대한바이오링크, 충북 음성) 27마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도(24±2℃), 상대습도(50±10%), 조도(200~250Lux), 조명(12시간 명암)의 조건에서 무균음수와 고형사료(제일사료 주식회사, 한국)를 자유롭게 공급 받았으며, 실험실 환경에서 1주 이상 적응시킨 후, 체중 변화 등 특이 증상이 없는 동물만을 선별하여 群

分離(9마리/1군)한 후 본 실험을 실시하였다.

Table 1. Herbal Constitution of YangHyulEum Gami-Bang(YHEG)

Herbs	Scientific name	Dosage(g)
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	20
豨薺	<i>Siegesbeckiae Herba</i>	20
防風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	12
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	10
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	10
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	10
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	10
天花粉	<i>Trichosanthis Radix</i>	4
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
白茯苓	<i>Poria Sclerotium</i>	4
藜蘆	<i>Ligustici Rhizoma</i>	4
細辛	<i>Asiasari Radix et Rhizoma</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	2
紅花	<i>Carthami Flos</i>	1
Total		113

#### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 세포독성 및 세포배양, [3H] thymidine incorporation, 항산화 실험, nitricoxide (NO) 생성억제를 위한 시약으로는 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, antibiotic-antimycotic (amphotericin B, penicillin G sodium, streptomycin sulfate)(이상 Gibco BRL, USA), MTT[3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], sodium lauryl sulfate, sodium bicarbonate, sodium hydroxide, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl), trichloroacetic acid, butylated hydroxy-toluene(BHT), GRIESS reagent, lipopolysaccharide(LPS)(이상 Sigma, USA), lumasafe (Lumac, Netherlands), [methyl-3H] thymidine (Amersham Bioscience, UK) 등을 사용하였으며, 역

전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 시약으로는 recombinant RNasin ribonuclease inhibitor, deoxynucleotide triphosphates(dNTPs), M-MLV reverse transcriptase, random hexamer, Taq polymerase(이상 Promega, USA), sodium acetate, ethidium bromide, isopropanol, sarcosine, mercaptoethanol, guanidine thiocyanate, glacial acetic acid, phenol, chloroform(이상 Sigma, USA) 등을 사용하였다.

Testosterone 5 $\alpha$ -reductase II assay 실험에는 5 $\alpha$ -dihydro-[1,2,4,5,6,7-3H] testosterone, hyperfilm MP, [1,2,6,7-3H] testosterone(이상 Amersham Bioscience, U.K.), dihydrotestosterone, testosterone(이상 TCI, Japan), toluene, acetone(이상 대정화금, 한국), cyclohexan, HPTLC aluminium sheets silica gel 60 F254 pre-coated, ethanol, ethylacetate(이상 Merck, Germany), Bio-rad dye(Bio-Rad, USA), sodium citrate, dithiothreitol, sucrose, potassium chloride, magnesium sulfate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, phenylmethylsulfonyl fluoride(이상 Sigma, USA) 등을 사용하였다. luciferase reporter assay에는 Hematoxylin and Eosin(Thermo scientific, USA), Luciferase assay system freezer PAK(promega, USA)을 사용하였다.

본 실험에 사용한 초자로는 세포 배양 실험에는 tissue culture dish(100mm), tissue culture flask, tissue culture plate(6well)(이상 Falcon, USA)등을 사용하였으며, qPCR 및 RT-PCR에는 micro amp caps, micro amp reaction tube(Applied Biosystems, USA)를 사용하였고 microforceps (Sigma, USA), scintillation vial(Fisher, USA), surgical blade No.15(Feather, Japan), eppendorf tube(Sarstedt, Germany)을 사용하였다.

기기로는 GeneAmp PCR system(PERKIN ELMER, USA), spectrophotometer, scintillation

counter, refrigerated high speed centrifuge, Ph meter(Beckman, USA), polaroid camera(Polaroid, UK), ELISA reader(Bio-TeK, USA), refrigerated microcentrifuge, microcentrifuge(이상 한일과학, 한국), electrophoresis system(Hoefer, USA), image master(Pharmacia Biotek, USA), transilluminator (Vilber Lourmat, France), stereomicroscope, inverted microscope, camera(이상 Nikon, Japan), CO2 incubator(Forma 3546, USA), clean bench(수공양행, 한국), incubator(제이오텍, 한국), rotary evaporator system(BHI, Swetzerland), ultrasonicator (Sonics&Materials, USA), 韓藥材粉碎機(삼성제약기계, 한국), hypercassette(Amersham Bioscience, UK), animal clipper(Oster, USA), Step One Real time PCR system(Applied Biosystems, USA), micropipit(Gilson, France)을 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 한약재 추출물의 제조

養血飲加味方(*YangHyulEum Gami-Bang*; YHEG)의 처방 구성은 Table 1과 같으며, 1첩 113g의 약재를 한약분쇄기를 이용하여 100~200메쉬 크기로 분쇄한 후 methanol 565ml(1:5 weight/volume)를 가하고 5일 동안 냉침하여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman Filter Paper No.4를 사용하여 여과하고 고형분을 제거한 다음 rotary evaporator system을 이용하여 감압 농축시켰다.

### 2) 세포 독성 평가

Dermal papilla cell은 충남대 의과대학 피부과에서 모발이식 수술을 받은 환자의 scalp hair skin을 기증 받았으며, Raw 264.7 cell(Korea Cell Line Bank, KCLB number: 40071)은 한국 세포주 은행에서 구입하여 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 Dermal

papilla cell과 Raw 264.7 cell을 각각 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 seeding하고 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가하지 않은 배지에 Dermal papilla cell은 0.1%와 0.05%로, Raw 264.7 cell은 0.1%와 0.2%로 희석한 養血飲加味方 추출액을 첨가하고 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MTT 용액을 1  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 미 반응된 MTT 용액을 제거하고 ethanol 100  $\mu$ l를 가하여 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 560nm와 640nm에서의 흡광도를 각각 측정하여 세포 독성 정도를 측정하였다<sup>19)</sup>.

### 3) 5 $\alpha$ -reductase type II 활성 억제 평가

대부분의 연구에서 5 $\alpha$ -reductase의 source로 생쥐나 흰쥐의 전립선 또는 간 조직을 이용하여 스크리닝 연구를 수행하여 왔으나 5 $\alpha$ -reductase는 사람과 생쥐 사이에 약 60% 정도의 homology만을 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서 보다 효과적이고 사람의 5 $\alpha$ -reductase에 대하여 specificity가 높은 억제제를 찾기 위해 사람 5 $\alpha$ -reductase 유전자를 이용한 과발현 세포주인 HEK-293 cell을 충남대 의과대학 피부과 실험실에서 제공 받았다. 이 세포주를 5 $\alpha$ -reductase 효소원으로 사용하였다. 5 $\alpha$ -reductase type II 활성 평가는 eppendorf tube에 crude enzyme과 養血飲加味方 추출액 및 reaction buffer(pH 5.5, 40mM sodium citrate, 1mM nicotinamide adenine dinucleotidephosphate, 1mM dithiothreitol, 100nM (3H) testosterone)를 가하여 최종 반응액을 100  $\mu$ l로 맞춘 다음, 37°C에서 1시간 반응시켰다<sup>20)</sup>. 30% ethylacetate, 70% cyclohexane 용액을 250  $\mu$ l씩 tube에 가하여 효소반응을 종료시키고, 원심분리(상온, 14,000rpm)시켜 유기용매 층과 물을 분리한 후 steroid가 포함된 유기용매 층을 취하여 새로운 eppendorf tube로 옮기고 hood내에서 완전히 건조시켰다. 건조시킨 steroid는 chloroform 20

$\mu$ l를 가하여 녹인 다음, TLC plate에 spotting하고 전개용매(20% acetone, 80% toluene)하에서 전개시켰다. 전개된 TLC plate는 상온에서 말린 뒤 cassette에서 hyperfilm으로 3일 동안상온에서 감광시켜 autoradiogram을 얻었다. 효소반응의 결과는 film상에 감광된 면적을 densitometer로 측정하여 계산하였다. 효소활성 억제율은 養血飲加味方 추출물을 넣지 않고 반응시켰을 때를 100% 효소활성으로 하여 계산하였다.

### 4) 모유두세포의 DNA 증식 평가

모유두세포는 충남대 의과대학 피부과에서 모발이식 수술을 받은 환자의 scalp hair skin을 기증 받았으며, Messenger의 방법<sup>21)</sup>에 준하여 모유두세포의 초대배양을 실시하였다. 우선 scalp skin을 약 1분 동안 70% ethanol에 넣어 살균한 후 dermo-subcutaneous fat interface를 15번 scalpel로 절개하였다. 분리된 피하지방층은 stereomicroscope하에서 scalpel blade와 micro forceps을 이용하여 모낭을 분리하였다. 즉 외모근초 부위를 미세한 micro forcep으로 잡아 당겨 피하지방층으로부터 분리시키고, 분리된 모낭 하단부의 모유두세포 바로 윗부분을 scalpel blade로 가로질개 하였다. 모유두세포가 위치한 모낭 하단부의 외모근초 부위를 micro forcep으로 고정시키고 모낭 최하단부를 다른 미세 micro forcep으로 밀어 올려 모낭이 뒤집어지게 하여 모낭 내에 위치한 모유두세포를 외부로 노출시켜 scalpel blade로 잘라 내었다. 분리된 모유두세포를 5ml의 배양배지가 들어있는 60mm cell culture dish로 옮기고 5% CO<sub>2</sub> incubator, 37°C에서 배양하였다. 이때 사용한 세포 성장배지로는 DMEM에 penicillin(100  $\mu$ g/ml), fetal bovine serum (10%), amphotericin B(0.25  $\mu$ g/ml), streptomycin (100I.U./ml), 10mM sodium bicarbonate, 20mM HEPES를 첨가하고 pH 7.3으로 조정하여 사용하였다. 세포가 모유두세포로 자라기 시작하지 약 2주 후 0.25% trypsin-0.02% EDTA를 이용하여 계대배양을

실시하였으며, 배지는 3일마다 교환하였다. 모유두세포는 일반적으로 1:5의 비율로 계대배양을 실시하였으며, 본 실험에서는 4세대 이하의 모유두세포만을 사용하였다.

養血飲加味方 추출물의 효과를 판별하여 결정하기 위하여 monolayer가 형성된 flask를 trypsin처리하고  $2 \times 10^4$  cells/ml로 희석하여, 6개의 well plate에 각 well당 2ml씩 분주하여 하루 동안 배양한 뒤 70~80% 성장한 세포를 실험에 사용하였다. 배양된 모유두세포를 2회 인산완충용액(phosphate buffered saline)으로 세척한 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 단계 희석된 養血飲加味方 추출물을 3 well에 가하고, FBS가 첨가되지 않은 DMEM을 나머지 3 well에 가하여 대조군으로 이용하였다. 여기에 [3H]thymidine을  $1 \mu\text{Ci/well}$ 의 농도로 첨가해 주고 48시간 배양하였다. 실험 종료시 5% trichloroacetic acid 용액으로 1회, 차가운 PBS로 3회 세척한 후, 0.1N NaOH-1% SDS 용액을 각 well당 0.5ml씩 가하고 10분 동안 37°C에서 반응시켜 모든 세포를 용해시켰다. 이를 scintillation vial로 옮긴 후, scintillation cocktail(Lumasafe) 5ml를 가한 후 scintillation counter로 세포내로 incorporation된 [3H]thymidine의 양을 측정하였다<sup>22)</sup>.

##### 5) 모유두세포에서의 실시간 중합효소 연쇄반응 (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)

실시간 중합효소연쇄반응은 모발성장인자로 알려진 IGF-1, KGF-1과 모발성장억제 및 탈모 유발인자인 TGF- $\beta$ 1, BMP-2의 발현 정도를 알아보기 위하여 연쇄반응(PCR)을 이용해 분석하였다. Monolayer를 형성한 모유두세포를 trypsin처리하고 100mm tissue culture dish에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 가하여 70-80% 정도 성장할 때까지 배양하고, 養血飲加味方 추출물을 처리하기 하루 전에 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 배양액을 교체하였다. 70% ethanol로 단

계 희석한 養血飲加味方 추출물을 각 tissue culture dish당 10 $\mu$ l씩 가하고 18시간 동안 배양하였다. 이때 control로는 養血飲加味方 추출물을 단계 희석하는데 사용된 70% ethanol을 사용하였다.

##### ① Total RNA 분리

모유두세포로부터 total RNA를 분리하는 Trizol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 시료 처리한 배지를 완전히 제거하고 RNA solubilizing solution Trizol reagent 1ml을 가하여 녹인 후 micropipet으로 잘 섞어 eppendorf tube로 옮겼다. Chloroform을 200 $\mu$ l 가하여 1분 동안 세계 흔든 후 15분간 4°C에서 방치하고 원심분리(14,000rpm, 4°C, 15분)시켜 상층액을 취하여 새 eppendorf tube에 옮긴 후 isopropanol을 700 $\mu$ l 가하고 -20°C에서 1시간 동안 방치시켰다. 원심분리(14,000rpm, 4°C, 15분)시켜 상층액을 버리고 남은 침전물을 75% ethanol로 1회 washing하고 DEPC처리된 이온교환수 20 $\mu$ l을 가하여 녹인 후, 이중에 일부를 취해 spectrophotometer를 사용하여 260nm과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

##### ② 실시간 중합효소 연쇄반응(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)은 중합효소 연쇄 반응을 기반으로 한 실험방법으로 실시간 중합효소 연쇄반응은 목표 DNA분자의 증폭과 양의 측정을 동시에 할 수 있고 DNA 샘플에서 하나 또는 그 이상의 특정 서열을 위해 실시간 중합효소연쇄반응은 검출과 양의 측정을 할 수 있게 한다. 계량은 절대적인 복제 수 또는 상대적인 양을 셀 수 있다.

분리한 total RNA 4 $\mu$ g을 eppendorf tube에 넣고 random hexamer(10pmol/20 $\mu$ l)를 첨가하여 5분 동안 65°C에서 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA 이차 구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1 $\times$ buffer, 100 $\mu$ M dNTPs, 200unitRTase)을

가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 65°C에서 10분 동안 처리하여 역전사 반응을 종료시켰다. 합성된 cDNA는 SYBR Green Real-Time PCR Master Mix(ELPIS biotech)을 사용하여 Step One Real time PCR system(Applied Biosystems, USA)으로 측정하였다. 시료는 95°C에서 5분간 반응 후 95°C에서 15초, 65°C에서 1분씩 40회 반복시켰다. 각 유전자의 상대적 정량을 위해 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: internalcontrol)의 발현정도를 이용하여 보정하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

6) 모유두세포에서  $\beta$ -catenin 신호의 활성화 평가(Topflash luciferase reporter assay)

모유두세포를 70% confluent하게 키운 후, amplify 된 Adeno virus(Topflash) sup을 1ml 정도 넣어준 후 virus가 잘 들어갈 수 있도록 incubator에서 약 5~6시간 정도 배양한다. 이후 실험할 용도에 맞는 plate(24well)에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 가하여 24시간 배양하고 養血飲加味方 을 농도에 맞게 처리하고 다시 24시간 배양한다. Luciferase activity를 측정하기 위해 Luciferase assay system freezer PAK (promega, USA)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 실험하였다. 세포 배양액을 제거하고, phosphate

buffered saline(PBS)를 이용하여 세포를 한 번 씻어 내고, lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액에 luciferase의 기질을 넣고 Luminoskan Ascent(Thermo scientific, USA)로 측정하였다.

7) 항산화력 평가

항산화력은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. 무수에탄올로 희석한 養血飲加味方 추출액 0.1ml에 0.1mM DPPH 용액 0.1ml을 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 반응물의 흡광도를 spectrophotometer로 516nm에서 측정하였다. 음성대조군으로는 무수에탄올을, 양성대조군으로는 butylated hydroxytoluene(BHT)를 사용하였다<sup>23)</sup>.

8) Nitricoxide(NO) 생성 억제력 평가

Raw 264.7 cell(Korea Cell Line Bank, KCLB number: 40071)을 이용한 GRIESS법으로 NO 생성 억제력 실험을 실시하였다. 10%의 FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 Raw 264.7 cell을  $3 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 24 well plate에 seeding하여 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 인산염완충용액으로 2회 세척한 후, FBS를 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 養血飲加味方 추출액을 0.1%와 0.2%의 농도로 가해 1시간 동안 처리하였다. Lipopolysaccharide를 500ng/ml의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 상층액을 100 $\mu$ l씩 취해 96 well

Table 2. Nucleotide Sequence of the Primers and Expected Size qPCR Products

	Primer	Sequence	Size
IGF-1	Sense	5'-AAGGAGGCTGGAGATGTATTGC-3'	60bp
	Anti-sense	5'-CGGACAGAGCGAGCTGACTT-3'	
TGF $\beta$ -1	Sense	5'-GGGAAATTGAGGGCTTTTCG-3'	61bp
	Anti-sense	5'-AGTGTGTTATCCCTGCTGTCACA-3'	
KGF-1	Sense	5'-CTTCTGTGCAACACAGTGGTACCT-3'	68bp
	Anti-sense	5'-TCATCTCTTGGGTCCCTTTTACTT-3'	
BMP-2	Sense	5'-AAAGGGCATCCTCTCCACAA-3'	62bp
	Anti-sense	5'-AGGCGTTTCCGCTGTTTG-3'	

plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 $\mu$ l씩 가해 5분간 상온에서 반응시키고, ELISA reader(Opsys MR, DYNEX Technology, USA)로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다<sup>24)</sup>.

9) 대식세포에서의 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

대식세포 Raw 264.7 cell(Korea Cell Line Bank, KCLB number: 40071)을 60mm tissue culture dish에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 seeding하고 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 시료 처리를 하기 전 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 배양액을 교체한다. 희석한 養血飲加味方 추출액을 0.1%와 0.2%의 농도로 처리한 후, Lipopolysaccharide를 500ng/ml의 농도로 가하여 8시간 배양하였다.

RNA분리 후, RT-PCR을 하였다. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, iNOS를 PCR machine에서 30초 94 $^{\circ}$ C, 30초 58 $^{\circ}$ C, 40초 72 $^{\circ}$ C의 조건으로 24회 증폭하였다. 각 PCR products는 1.5% agarose gel에 loading 하여 전기영동으로 분석하였다. Primer 각각의 염기서열은 Table 3과 같다.

10) 대식 세포에서의 실시간 중합효소 연쇄반응 (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)

시료 처리한 세포로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA(2 $\mu$ g)와 d(T)16 primer 및 AMV 역전사효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 얻었다.

유전자들의 상대적인 양은 SYBR Green Real-Time PCR Master Mix(ELPIS biotech)을 사용한 real time PCR법(Real Time PCR System StepOne, Applied biosystems, Foster, CA)에 의해 정량하였다. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2와 iNOS 유전자 (Table 3)의 CT 값을 GAPDH 유전자의 CT 값으로 gene express 2.0 프로그램(Applied biosystems)을 이용하여 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 3과 같다.

11) C57BL/6 마우스를 이용한 발모 효과 평가

7酒齡의 C57BL/6 마우스 背部의 검정색 털을 일차적으로 동물용 털깎이(animal hair clipper)를 사용하여 제거한 다음 실험 시작일(day 0)부터 실험동물의 제모 부위에 養血飲加味方 추출물 1% 용액을 약 0.2 ml씩, 매일 1회, 30일 동안 그림붓을 이용해 피부 도포하였다<sup>25)</sup>. 대조군으로는 70% ethanol을 동일하게 피부 도포하였고 양성 대조군으로 minoxidil 3%(현

Table 3. Nucleotide Sequence of the Primers and Expected Size RT-PCR Products

Primer	Sequence	Size
IL-1 $\beta$	Sense 5'-AAGCTCTCACCTCAATGGA-3'	301
	Anti-sense 5'-TGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3'	
TNF- $\alpha$	Sense 5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	324
	Anti-sense 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'	
IL-6	Sense 5'-ATGAAGTTCTCTCTGCAAG-3'	636
	Anti-sense 5'-CACTAGGTTTGCCGAGTAGA-3'	
COX-2	Sense 5'-GGTCTGGTGCCCTGGTCTGAT-3'	724
	Anti-sense 5'-GTCCTTTCAAGGAGAATGGT-3'	
iNOS	Sense 5'-GAGGTACTCAGCGTGCTCCA-3'	472
	Anti-sense 5'-AGGGAGGAAAGGGAGAGAGG-3'	



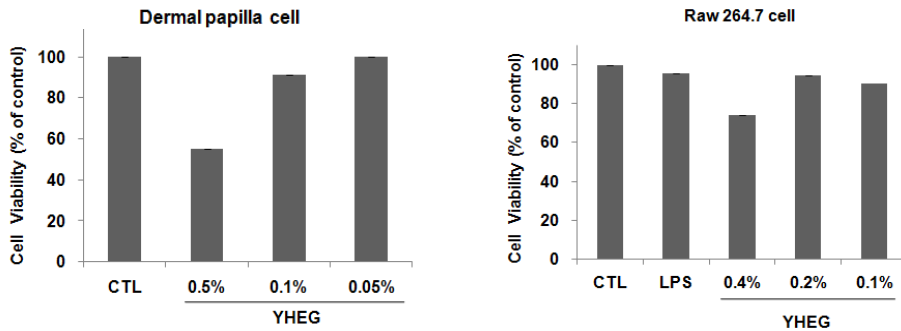


Fig. 1. The cell viability of cultured Dermal papilla cells and Raw 264.7 cells with *YangHyulEum Gami-Bang* at different concentrations.

CTL : Control, LPS : Lipopolysaccharide, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

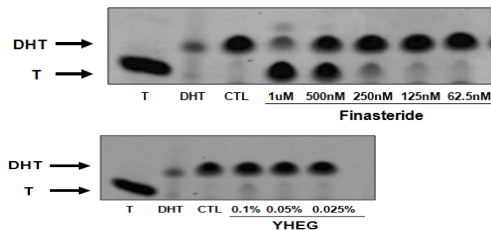


Fig. 2. Effects of Finasteride and *YangHyulEum Gami-Bang* on the activities of 5 $\alpha$ -reductase II.

T : Testosterone, DHT : Dihydrotestosterone, CTL : Control, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

대약품, 한국)을 피부 도포하였다. 모발 성장 촉진 효과는 각 군의 제모부위에서 모발이 자란 면적 비율을 육안 관찰하여 평가하였다. 모발 성장 면적이 제모부위와 비교하여 70%이상이면 3점, 70%미만 30%이상이면 2점, 30%이하는 1점, 모발이 자라지 않았을 경우에는 0점을 부여하였다. 또한 실험 시작 30일 후에는 실험 동물을 ethyl ether로 마취시킨 후, 경추 도살시켜 사진 촬영하였다.

## 12) C57BL/6 마우스 피부의 조직학적 관찰

30일 간 시료를 도포한 부위의 피부를 적출한 후 10% 중성포르말린에 고정된 다음 순차적으로 ethanol과 xylene으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 파라핀으로 고정하였다. 마이크로톰(Leica, Wetzlar,

Germany)을 이용하여 4 $\mu$ m두께의 박절편을 만들어 다시 xylene으로 파라핀을 제거하였다. Hematoxylin & Eosin(H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 모낭의 수 및 크기, 길이 등을 조직학적으로 관찰하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 세포 독성 평가

Dermal papilla cell를 이용하여 MTT법으로 세포 독성을 평가한 결과, 養血飲加味方 0.5%에서 cell viability가 55%로 세포독성을 보여, 0.1%와 0.05%로 실험을 진행하였고, Raw 264.7 cell을 이용하여 MTT법으로 세포독성을 평가한 결과, 養血飲加味方 0.4%에서 cell viability가 70%로 세포독성을 보여, 0.2%와 0.1%로 실험을 진행하였다(Fig. 1).

### 2. 5 $\alpha$ -Reductase type II 활성 억제 효과

養血飲加味方이 남성형 탈모를 유발하는 주요한 원인으로 주목받는 5 $\alpha$ -Reductase type II의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 0.1%, 0.05%, 0.025%의 농도를 대상으로 실험을 실시한 결과 5 $\alpha$ -Reductase type II의 활성을 억제시키지 못하는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

### 3. 모유두세포의 DNA 증식 효과

養血飲加味方이 모유두세포의 DNA 증식에 미치는 영향을 [3H]thymidine incorporation 실험법으로 평가한 결과, 모유두세포의 DNA 증식을 0.1%농도에서 68%, 0.05%농도에서 38% 증가시켰다(Fig. 3).

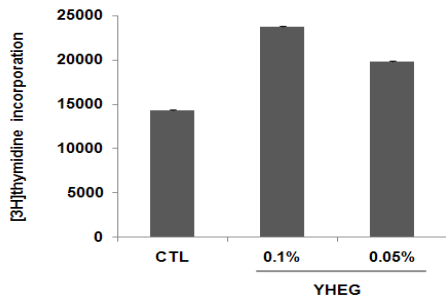


Fig. 3. Effects of *YangHyulEum Gami-Bang* on [3H]thymidine incorporation into cultured Dermal papilla cells.

CTL : Control, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

### 4. 모유두세포에서 발현되는 성장인자에 미치는 영향(qPCR)

養血飲加味方이 모유두세포에서 발현되는 세포성장 인자의 유전자에 미치는 영향을 평가하기 위해, 모발 성장과 직접적으로 연관되어 있는 IGF-1, KGF-1, TGF $\beta$ -1, BMP-2 등의 유전자 발현 변화를 실시간 중합효소연쇄반응(qPCR)법으로 평가한 결과 IGF-1 및 KGF-1의 성장인자 발현은 촉진시키고 탈모 유발 인자인 TGF $\beta$ -1, BMP-2의 발현은 억제시켜서 모발 성장 관련유전자의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 조사되었다(Fig. 4).

### 5. 모유두세포에서 $\beta$ -catenin 신호의 활성화 효과

養血飲加味方이 모유두세포에서 성장기 상태의 모낭을 유지하는데 요구되는  $\beta$ -catenin 신호를 활성화 하는지 알아보기 위해 Top flash luciferase reporter

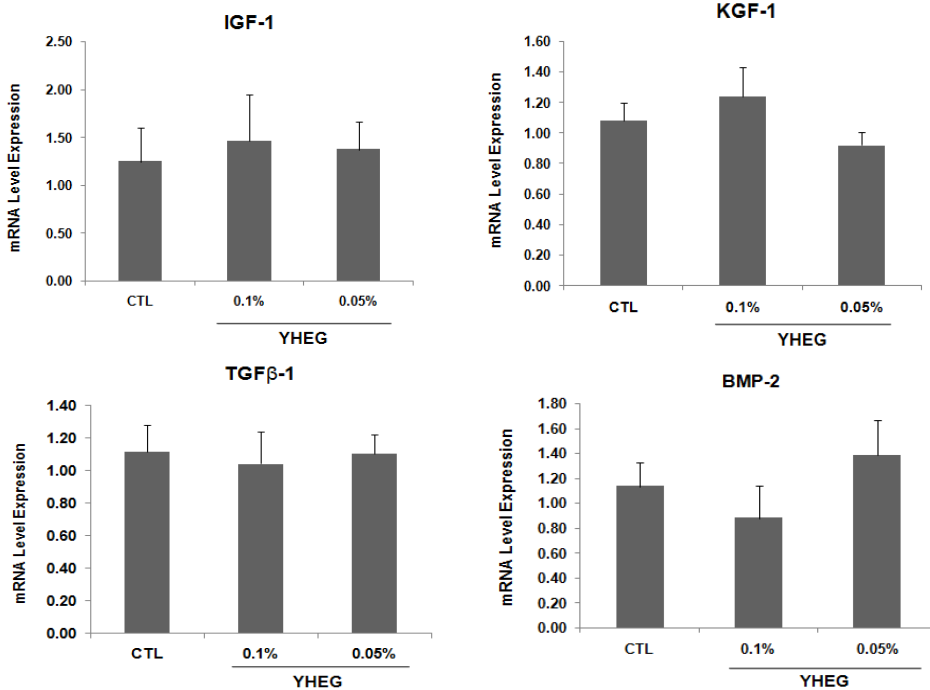


Fig. 4. Effects of *YangHyulEum Gami-Bang* on the expression of several growth factor mRNAs in cultured Dermal papilla cells.

CTL : Control, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

assay를 통하여  $\beta$ -catenin이 활성화 되는지 확인하였다. 養血飲加味方을 농도 별로 처리 후 24시간 안에 reporter 활성이 증가 되는지를 조사한 결과 0.1%, 0.05%, 0.025%의 농도에서 각각 luciferase의 활성이 78%, 53%, 25% 증가되는 결과를 보였다(Fig. 5).

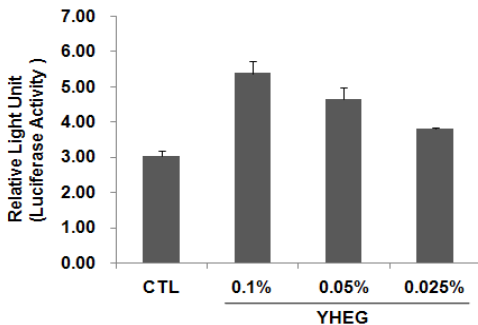


Fig. 5. Effect of *YangHyulEum Gami-Bang* on the activation of  $\beta$ -catenin in Dermal papilla cells.

CTL : Control, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

Table 4. Radical Scavenging Activities of *YangHyulEum Gami-Bang*.

	Concentration (%)	Radical Scavenging Activity(%)
<i>YangHyulEum Gami-Bang</i>	0.2	19.6
	0.1	14.5

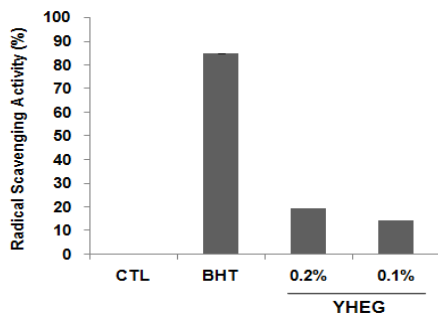


Fig. 6. Radical scavenging activities of *YangHyulEum Gami-Bang*.

CTL: Control, BHT: butylated hydroxytoluene, YHEG: *YangHyulEum Gami-Bang*

## 6. 항산화 효과

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl) 방법으로 養血飲加味方의 자유기(free radical) 소거율을 측정하였다. 養血飲加味方 0.2%, 0.1%의 농도에서 19.6%, 14.5%로 항산화 효과를 보이지 않았다(Table 4, Fig. 6).

## 7. Nitric oxide(NO) 생성 억제 효과

Raw 264.7 cell을 이용하여 GRIESS 방법으로 養血飲加味方의 NO 생성 억제력을 평가한 결과, 養血飲加味方 0.2% 농도에서 39.3% NO 생성 억제 효과를 나타냈다(Table 5, Fig. 7).

## 8. 대식세포에서 전구 염증 매개 사이토카인과 효소 유전자 발현에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 전구 염증 매개 사이토카인과 효소 유전자의 발현에 대해 RT-PCR로 조사한 결과, LPS(Lipopolysaccharide)로 자극하고 養血飲加味方 0.2%의 농도로 전처리한 세포에서 TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS 의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 qPCR법으로 조사한 결과, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 모든 사이토카인을 현저하게 감소시켰으며, iNOS와 COX-2의 전구 염증 매개 효소 유전자의 발현을 감소시켜 養血飲加味方 0.1%, 0.2% 모두 항염증 효과가 있는 것으로 조사되었다(Fig. 8, 9).

## 9. C57BL/6 마우스를 이용한 발모 효과

養血飲加味方이 모발 성장 촉진에 미치는 영향을 평가하기 위해 모낭이 휴지기 상태에 있는 7주령 암컷 C57BL/6 마우스 背部의 털을 animal hair clipper를 이용해 제거하고 養血飲加味方 추출물 1% 용액을 30일 동안 피부 도포하여 모발 성장 촉진 효과를 육안으로 평가한 결과 hair growth index가 대조군은 0인 반면 養血飲加味方은 2점 이상으로 모발 성장 촉진 효과가 있는 것으로 평가되었다(Fig. 10).

Table 5. Inhibitory Effects of NO Synthesis by *YangHyulEum Gami-Bang*.

	Concentration(%)	Absorbance (Average ±SD)	Reduction Rate(%)
Control		0.059±0.006	-
Lipopolysaccharides		0.553±0.012	-
YangHyulEum	0.2	0.359±0.038	39.3
Gami-Bang	0.1	0.559±0.006	-1.2

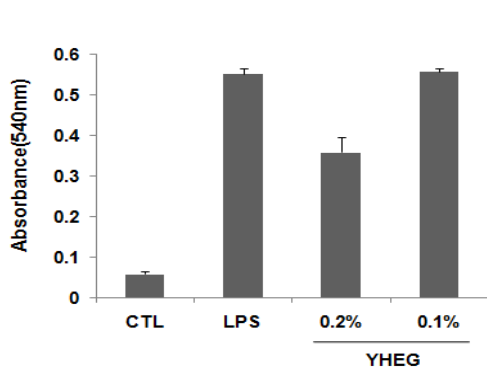


Fig. 7. Inhibitory effects of NO synthesis by *YangHyulEum Gami-Bang*.  
CTL : Control, LPS : Lipopolysaccharide, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

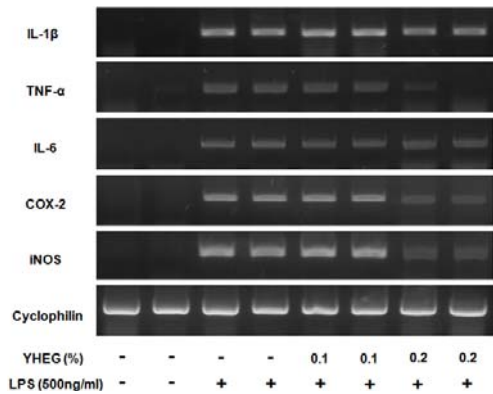


Fig. 8. Effects of *YangHyulEum Gami-Bang* in the expression of IL-1β, TNF-α, IL-6, COX-2 and iNOS gene in the LPS stimulated Raw 264.7 cells.  
LPS : Lipopolysaccharide, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

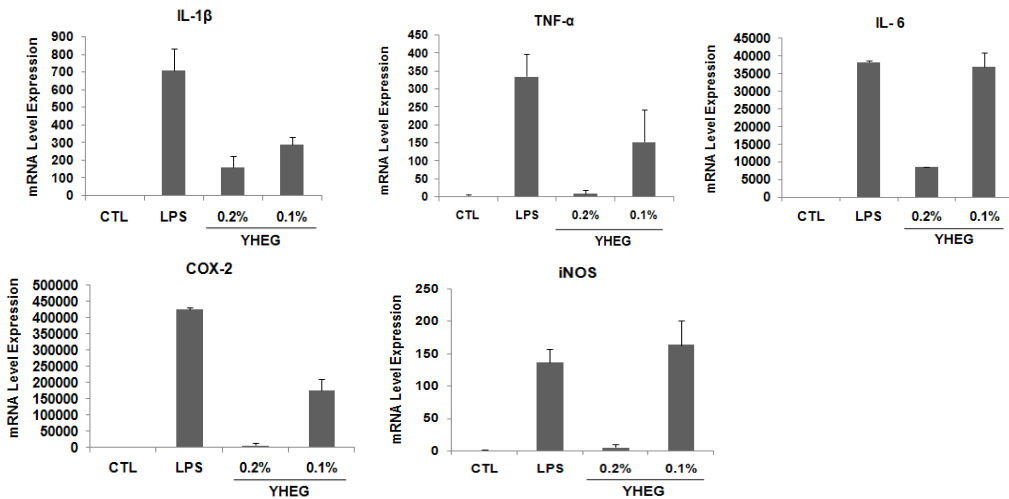


Fig. 9. Effects of *YangHyulEum Gami-Bang* in the expression of IL-1β, TNF-α, IL-6, COX-2 and iNOS gene in the LPS stimulated Raw 264.7 cells.  
LPS : Lipopolysaccharide, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

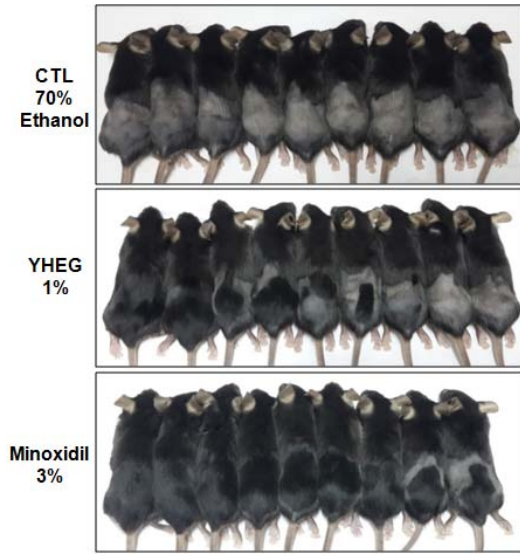


Fig. 10. Effects of *YangHyulEum Gami-Bang* on hair growth stimulation of C57BL/6 mice.

CTL : Control, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

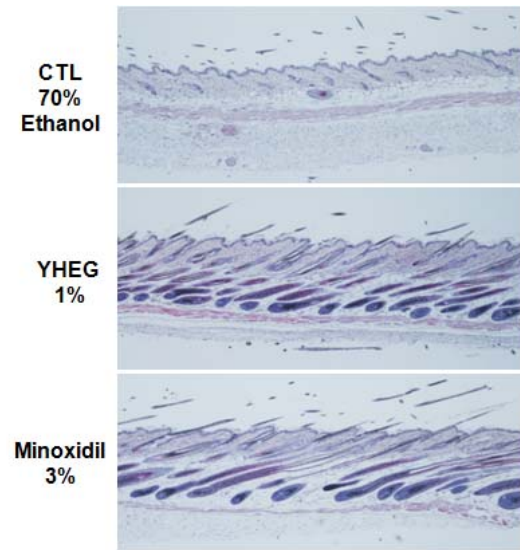


Fig. 11. Analysis of histological change in C57BL/6 mice treated with topical application of vehicle(70% Ethanol), *YangHyulEum Gami-Bang* 1%, Minoxidil 3% solution for 30 days(x40).

CTL : Control, MXD : Minoxidil, YHEG : *YangHyulEum Gami-Bang*

## 10. C57BL/6 마우스에서 養血飲加味方の 모발 성장에 대한 조직학적 평가

실험 종료 후 C57BL/6 마우스 背部 피부조직을 H&E(Hematoxylin& Eosin)염색하여 모낭의 수 및 크기, 모근의 길이를 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 마우스의 음성 대조군은 모낭의 수 및 크기가 작고 모근의 길이가 짧았고, 養血飲加味方처리군은 모낭의 수 및 크기가 증대되고 모근의 길이도 음성대조군에 비해 신장한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

## IV. 考 察

탈모는 모발이 정상적으로 존재해야 할 부위에 탈락되어 소실되는 질환을 총칭하는 것으로 주로 머리에 발생하며, 병형에 따라 남성형 탈모, 휴지기 탈모, 원형 탈모, 지루 탈모 등으로 나뉘어지고 모낭의 손상 여부에 따라 반흔성과 비반흔성으로 분류된다<sup>2)</sup>. 최근 정신적 스트레스와 식생활의 변화 등으로 인해 薄毛와 탈모로 많은 사람들이 고민하고, 연령층도 점차 낮아지는 추세를 보이고 있어 모발 성장 촉진에 효과가 있는 한약재 연구 개발과 활용에 대한 요구가 증대되고 있다.

모발은 모낭 내의 여러 세포사이에 다양한 신호를 주고받는 복잡한 과정을 거쳐 성장하는데, 특히 상피계 세포인 외모근초세포와 기질세포, 간엽계 세포인 모유두세포 간의 상호작용이 중요한 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 모낭은 포유동물만이 가지는 피부의 부속기관으로 생명유지의 기능보다는 미용적 기능 및 감각 기능을 주로 담당한다<sup>26)</sup>. 발생학적으로 외배엽 및 중배엽에서 유래하는 세포들로 이루어져 있으며, 세포의 형태와 위치에 따라 여러 구성 부위로 나뉘게 된다. 모낭의 둘러싸고 있는 최외각 부위를 외모근초(outer root sheath)라고 하는데, 이 부위는 발생 단계에서 피부의 각질층이 진피 쪽으로 함입되어 형성되며 주로 각질형성세포로 구성되어 있다. 모낭 하단부에 모

유두세포(Dermal papilla cell)가 존재하는데, 모유두 세포는 증배엽에서 유래하는 섬유아세포(fibroblast)로 구성되어 있다<sup>2)</sup>.

사람의 모발 주기(hair cycle)는 약 5-6년으로, 모낭이 활발하게 분열하여 모발이 성장하는 성장기, 모발 성장이 감퇴하는 퇴행기, 그리고 모발이 성장을 멈추는 휴지기를 거쳐 성장과 탈락을 반복한다<sup>2,5)</sup>. 모유두 세포는 모낭 형성을 촉진할 수 있는 능력을 가지며 모주기에서도 중요한 역할을 하는데, Jahoda 등<sup>27)</sup>은 implantation method를 이용하여 모구(hair bulb)가 제거된 모낭 하단부에 모유두세포를 이식할 경우 다시 모낭이 재생되는 것을 관찰하였다. 이러한 모유두 세포의 모낭 형성 촉진 기능은 모유두세포를 체외 배양한 경우에도 유지되는 것으로 보고되었다<sup>28)</sup>.

서양 의학적으로 탈모를 유발하는 원인은 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 유전적 소인, 외상, 바이러스 감염, 나병이나 독발성 모낭염 등의 세균감염, 세포 독성이 있는 화학물질이나 약제의 작용, 아토피 및 지루성 피부염, 내분비 이상, 혈관 운동 불안정성, 정신적 자극 등이 관여할 것으로 보고 있으며, 최근에는 자가 면역 질환의 하나로 간주되고 있다. 이 중 모유두와 모낭을 둘러싸는 혈관의 순환장애로 인한 영양 공급 장애와 남성 호르몬 등이 주요인으로 생각되고 있다<sup>2)</sup>.

현재까지 개발된 탈모 치료제들은 대부분 혈액순환 장애나 영양장애, 지루성 피부염, 스트레스 등 탈모를 유발하는 간접적인 원인들을 호전시킴으로써 탈모 방지 및 발모를 유도하는 것들로 그 효과는 완벽하지 못하며 사용을 중단할 경우 다시 모발이 탈락되어 원래 탈모의 상태로 되돌아가므로 효과가 지속적이지 못한 단점이 있다<sup>29)</sup>. 또한 현재 약효가 알려져 세계적으로 널리 사용되는 대표적인 발모제인 minoxidil과 finasteride도 발모 및 탈모방지 효과를 유지하기 위해서는 평생 동안 지속적으로 복용하고 사용해야 하며, 장기간 복용에 따른 부작용으로 인해 사용이 제한되는 실정<sup>30)</sup>으로 한약제를 통한 장기간 복용이 가능

하며 부작용을 최소화 한 새로운 발모제의 연구와 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다.

韓醫學에서 毛髮은 인체의 臟腑, 經絡과 밀접한 관계가 있는데 《素問·五藏生成論》<sup>10)</sup>에는“…… 其榮毛也, 其主心也. …… 腎之合骨也, 其榮髮也, 其主脾也.”라 하여 臟腑의으로는 心, 脾, 肺, 腎과 밀접한 관계가 있음을 언급하였다. 經絡과 관련하여 《靈樞·陰陽二十五人》<sup>10)</sup>에서는 인체를 순행하는 각 經絡의 氣血多少가 순행하는 각 부위 - 足陽明經은 鬚髯과 下肢의 모발을, 足少陽經은 鬚毛와 腿脛部의 모발을, 足太陽經은 眉毛, 手陽明經은 髭毛와 腋毛, 手少陽經은 眉毛, 手太陽經은 鬚髯 - 의 毛髮盛衰를 결정하여 手足三陽經과 밀접한 관련이 있다고 하였다.

脫毛는 《黃帝內經》<sup>10)</sup>에 ‘髮墮’, ‘髮落’, ‘髮去’, ‘毛折’, ‘毛拔’ 등으로 표현되어 있는데 이는 일반적인 탈모를 지칭하는 것이며 이후 葛<sup>31)</sup>은 ‘鬚鬢禿落’으로, 巢<sup>32)</sup>는 ‘鬚髮禿落候’, ‘白禿候’, ‘赤禿候’ 등의 증후명을 사용하였다. 탈모의 원인에 대하여 《黃帝內經》<sup>10)</sup>에서는 “多食甘味”라 하였고, 巢<sup>32)</sup>는 《黃帝內經》의 이론을 바탕으로 병인과 증후를 결합하여 설명하였다. 이후 모발 탈락에 대한 辨證施治가 더욱 발전되어 李<sup>33)</sup>는 《醫學入門》에서 膽과 腎의 精氣가 상승하는 것이 모발이 검고 희게 되는 중요 원인이라 하였고, 모발 탈락에 관해서는 老年에 모발이 빠지는 것은 정상적인 것이나 少壯年에 모발이 빠지는 것은 腎水枯竭로 인해 內風이 妄動하고 血燥하기 때문이라고 하였다. 또한 陳<sup>34)</sup>은 《外科正宗》에서 “油風”의 병명을 처음 사용하면서 血虛하여 肌膚를 영양하지 못하므로 毛髮根이 空虛한데 風熱이 虛함을 틈타 上攻하여 발생한다고 하였다. 이후 역대 문헌<sup>10-13)</sup>에서는 血燥, 血氣衰弱, 腎虛, 肺虛, 風, 熱, 怒, 濕痰, 多食甘味 등을 그 원인으로 언급하였다.

養血飲加味方(YangHyulEum Gami-Bang ; YHEG)은 大田大學校 韓方病院 處方集<sup>18)</sup>에 수록된 脫毛를 치료하는 經驗方으로 升麻, 豨薟, 防風, 當歸, 川芎, 白芍藥, 熟地黃, 天花粉, 黃芩, 白茯苓, 藁本, 細辛, 甘

草, 紅花 등으로 구성되어 있다. 탈모의 주된 원인을 血燥, 血氣衰弱, 腎虛, 風, 熱로 보아 본 처방은 四物湯을 기본으로 清熱解毒, 升舉陽氣의 작용이 있는 升麻와 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒의 작용이 있는 豨薟을 君藥으로 하고, 發散風寒의 작용이 있는 防風, 藁本, 細辛과 降火潤燥하는 天花粉, 清熱燥濕하는 黃芩, 利濕熱하는 白茯苓 등으로 구성되어 역대 문헌에서 언급된 탈모 원인과 부합되어 임상에서도 충분히 활용 가능한 처방이라고 생각된다<sup>35)</sup>. 또한 四物湯은 宋代 陳<sup>36)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 이래 血病을 치료하는 대표적인 治方으로 血과 관련된 일체의 질병을 치료하나 임상에서는 原方으로만 사용되는 경우는 드물고 病證에 따라 다양하게 加減하여 활용되고 있으며 특히 血熱, 血虛, 血燥 등의 血病證과 婦人科 疾患의 기본처방으로 광범위하게 응용되고 있다<sup>37)</sup>. 四物湯의 모발 및 탈모관련 연구로는 권<sup>38)</sup>의 四物湯加味方的 원형탈모 생쥐의 발모효과 및 모발성장 인자에 대한 영향에 관한 연구가 보고 되었다.

남성형 탈모는 발생 기전에서 휴지기 모낭이 많고 휴지기 모낭이 왜소화 되는 두 가지 명확한 현상을 보인다<sup>39)</sup>. 따라서 모발 성장 촉진과 탈모 방지를 위한 한약재의 효과는 휴지기에 있는 모낭을 성장기로 전이시키는 정도를 평가하는 방법이 주로 이용되고 있다. 이러한 목적으로 많이 사용되는 동물 실험법으로 C57BL/6, C3H 마우스와 토끼를 이용한 평가법이 있다<sup>23)</sup>. 이들 실험동물은 사람과 다르게 모주기가 일정하고, 휴지기가 길어 휴지기 모낭을 성장기로 이행시키는 약재의 효과를 관찰하기 적합하기 때문이다. 특히 본 연구에서 사용한 C57BL/6 마우스는 유전적인 특성이 잘 알려져 있고, 체모가 검은색으로서 melanocyte가 모낭에만 한정적으로 존재하며 melanin 합성이 모발 성장주기와 잘 일치하여 피부색만으로 모발의 성장주기를 판정할 수 있는 장점을 가져 모발 연구에서 가장 널리 사용되고 있는 모델이다<sup>39)</sup>.

MITT법은 세포독성을 평가하기 위한 실험으로

Dermal papilla cell과 Raw 264.7 cell을 이용하여 평가한 결과 각각 0.5%, 0.4%에서 cell viability가 55%, 70%로 세포독성으로 보여 Dermal papilla cell에서는 0.1%와 0.05%로 Raw 264.7 cell에서는 0.2%와 0.1%로 실험을 진행하였다(Fig. 1).

남성호르몬의 작용기전은 혈중 testosterone이 표적세포에 들어가서 5 $\alpha$ -reductase에 의해 dihydrotestosterone (DHT)이라는 보다 강력한 형태의 남성호르몬으로 전환되고, 남성호르몬 수용체와 결합해 특정 유전자 발현을 촉진 또는 억제시킨다<sup>1)</sup>. 따라서 남성형 탈모의 예방과 치료를 위해 천연물을 이용해 testosterone, 5 $\alpha$ -reductase의 활성을 억제시키고자 하는 노력이 활발히 이루어지고 있다. 5 $\alpha$ -reductase는 type I과 type II의 두 종류가 있는데, 5 $\alpha$ -reductase type I형은 optimum pH가 6.0-8.5의 넓은 alkaline range와 non-genital skin과 간 등의 일반 조직에 널리 분포하며, 여드름 생성과 관련된 피지의 생합성 기전에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 반면 5 $\alpha$ -reductase type II형은 optimum pH가 5.0 근처의 acidic range로 prostate, epididymis, genital skin 등 생식관련 조직에 주로 분포한다<sup>40)</sup>. 사람의 모낭에는 5 $\alpha$ -reductase type I 과 type II 가 모두 존재하지만 5 $\alpha$ -reductase type II 가 결손된 가성반음양증(pseudohermaphroditism) 환자에서는 남성형 탈모가 발생하지 않는 점 등으로부터 5 $\alpha$ -reductase type II 가 남성형 탈모에 직접적으로 관여하는 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 養血飲加味方이 남성형 탈모를 유발하는 주요한 원인으로 주목받고 있는 5-reductase type II의 활성 억제 여부를 평가하였으며, 그 결과 養血飲加味方이 5 $\alpha$ -reductase type II의 활성을 억제시키지 못하는 것으로 조사되었다(Fig. 2).

모유두세포는 모낭을 구성하는 핵심적인 세포로, 혈관과 연결되어 있어 혈액으로부터 영양성분, 호르몬 등 기타 생리물질들을 공급받아 모발 성장인자를 비롯한 여러 생리물질을 분비하며, 이러한 분비성 매



개체를 통해 주변 모낭 세포와 조직에 영향을 미쳐 모발의 성장과 탈락에 중요한 역할을 하는데 특히, 모유두세포의 크기가 모발성장주기에 따라 변화하며 모낭이 휴지기에서 성장기로 전이되는 시기에 모유두세포의 증식이 활발히 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

따라서 養血飲加味方이 *in vitro*에서 배양한 사람의 모유두세포 DNA 증식에 미치는 영향을 [3H]thymidine incorporation 실험법으로 평가하였다. [3H]thymidine incorporation 실험법은 세포 증식 분석에서 가장 많이 사용되는 방법 중 하나로 방사선 표지를 통해 새롭게 만들어지는 DNA를 측정하는 방식이다. 실험 결과 모유두세포의 DNA 증식을 0.1%에서 68%, 0.05%에서 38% 증가시켜 養血飲加味方 추출물은 모유두세포의 DNA 증식에 직접적인 유사분열물질(mitogen)로 작용하였음을 확인하였다(Fig. 3).

모유두세포는 발생학적으로 간엽계 유래의 세포로 주위 상피계 세포인 기질세포와 외모근초 세포의 분열을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기능은 모유두세포에서 분비되는 성장인자(growth factor)에 의해 조절된다고 알려져 있다<sup>28)</sup>. 모유두세포로부터 분비된 세포 성장인자는 상피계 세포막 표면에 존재하는 수용체와 결합하여 그 정보를 세포내로 전달하는 일종의 매개자 역할을 한다. 세포의 증식과 분화에는 peptide성 생리 활성 물질들이 많이 관여하고 있으며, 특히 직접적으로 세포 성장에 관여하는 분비성 성장인자들이 연구를 통해 밝혀지고 있다. 현재까지 모낭에서 발현되는 것으로 알려진 성장인자로는 인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor, IGF-1), 각질세포 성장인자(keratinocyte growth factor, KGF-1), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF-1, 2 & 5), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 형질전환 성장인자(transforming growth factor, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ 1) 등이 있다<sup>41)</sup>.

IGF-1은 상피계 세포에 그 수용체가 존재하며 간

엽계 세포에서만 생성되는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>. 특히 모낭에서는 모유두세포로부터 분비되는 IGF-1이 배양중인 상피계 세포의 증식을 촉진할 뿐 아니라 모낭조직의 길이 또한 현저히 증가시키는 것으로 보고되었다<sup>43)</sup>. 또한 남성호르몬이 모유두세포에서 IGF-1 분비에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 IGF-1은 모발성장을 촉진하는 가장 중요한 성장인자로 생각되고 있다<sup>44)</sup>.

KGF는 FGF family에 속하는 성장인자로서, 특히 그 수용체는 상피계 세포에서만 발현되는 특징을 가지고 있다. KGF는 상피계 세포의 분화 및 분열을 촉진하는 매개자로 잘 알려져 있으며, 또한 형질 전환 생쥐 모델을 통해 모발성장 촉진에 매우 중요한 역할을 하는 것이 밝혀져 있다<sup>45)</sup>.

養血飲加味方이 모유두세포에서 발현되는 세포 성장인자 유전자에 미치는 영향을 평가하기 위해 모발 성장에 직접적으로 관련 있는 것으로 알려진 IGF-1, KGF-1 및 TGF $\beta$ -1, BMP-2 등의 유전자 발현 변화를 qPCR를 이용하여 평가하였다. 그 결과 養血飲加味方은 모발 성장인자인 IGF-1, KGF-1의 발현은 촉진시키고 탈모 유발인자인 TGF $\beta$ -1, BMP-2의 발현은 억제시켜 결과적으로 모발성장 관련 유전자의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되어 실제 C57BL/6 마우스에서 확인된 모발성장 촉진 효과는 상기 모발 성장인자 경로를 통하여 유도되는 것으로 생각되었다(Fig. 4).

또한 養血飲加味方이 모유두세포에서 모낭을 성장기 상태로 유지하는데 요구되는  $\beta$ -catenin 신호를 활성화 하는지 알아보기 위해 Topflash luciferase reporter assay를 통하여  $\beta$ -catenin이 활성화 되는지 확인하였다. 養血飲加味方을 농도별로 처리 후 24시간 안에 reporter 활성이 증가 되는지를 조사한 결과 0.1%, 0.05%, 0.025%의 농도에서 각각 luciferase의 활성이 78%, 53%, 25% 증가되는 결과를 보였다(Fig. 5).

모발 탈락은 두피에 발생하는 접촉성 피부염, 지루



성 피부염, 모낭염 등의 염증과 관련되어 있다는 사실이 많은 학자들에 의해 보고되어 왔다<sup>46)</sup>. Nitric oxide(NO)는 중성구 및 대식세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 만들어지며 체내에서 발생하는 염증과정에서 다량으로 생성되어 각종 급성 혹은 만성 염증 질환을 매개하여 유해한 작용을 나타낸다. 또한 비특이적 면역반응에 관여하여, 조직 손상과 같은 복잡한 메커니즘에 있어서 염증 및 세포 사멸(apoptosis)의 주된 매개체로서 작용한다. 따라서 각종 염증의 발생을 억제하고 치료하기 위해서는 iNOS의 활성화와 NO의 생성을 억제시키는 것이 중요하다<sup>47)</sup>.

본 연구에서도 養血飲加味方이 염증반응의 발생 억제에 미치는 영향을 평가하기 위해 DPPH법으로 radical scavenging activity를 통해 항산화력 평가를 하고, 대식세포인 Raw 264.7 cell을 대상으로 GRIESS법으로 Nitric oxide(NO) 생성 억제력 평가를 실시하였는데 DPPH법으로 養血飲加味方の 항산화력을 평가한 결과 0.2%, 0.1%의 농도에서 19.6%, 14.5%로 항산화 효과는 없었으나(Table 4, Fig. 6), Raw 264.7 cell을 이용하여 GRIESS 방법으로 養血飲加味方の NO 생성 억제력을 평가한 결과, 養血飲加味方 0.2% 농도에서 39.3% NO 생성 억제 효과를 나타냈다(Table 5, Fig. 7).

또한 전구 염증 매개 사이토카인과 유전자의 발현에 대해 RT-PCR 로 조사한 결과, 養血飲加味方 0.2%의 농도로 전처리한 세포에서 TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, qPCR법으로 조사한 결과, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 모든 사이토카인을 현저하게 감소시켰으며, iNOS와 COX-2의 전구 염증 매개 효소 유전자의 발현을 감소시켜 養血飲加味方이 항염 효과가 있는 것으로 조사되었다(Fig. 8, 9).

실제 동물에서 養血飲加味方이 모발성장 촉진에 미치는 영향을 평가하기 위해 모낭이 휴지기 상태에 있는 7주령 C57BL/6 암컷의背部 털을 animal hair

clipper를 이용해 제거하고 養血飲加味方 추출물 1% 용액을 30일 동안 피부 도포한 결과, 실험 시작 20일 후부터 養血飲加味方처리군이 대조군과 비교해 발모 효과를 보이기 시작하였으며, 30일 후에는 눈에 띄는 발모 효과를 보이는 것으로 평가되었다(Fig. 10).

養血飲加味方の 발모 효과에 대한 조직학적 변화를 관찰하기 위해 C57BL/6 마우스背部 피부조직을 H&E 염색한 후 모낭의 수 및 크기, 모근의 길이와 진피의 두께를 관찰하였다. 모발은 성장기에 멜라닌이 합성되기 시작하여 진피층이 두꺼워지고 모낭의 크기도 커지면서 모근이 진피와 피하지방으로 깊어지는 특징이 있다. 광학 현미경으로 관찰한 결과 모낭의 수 및 크기, 모근의 길이 모두 養血飲加味方처리군이 대조군에 비해 증대되고 신장한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

상기 실험 결과를 종합해 보면 養血飲加味方은 5 $\alpha$ -reductase type II의 활성을 억제시키지는 못하였으나, 모유두세포의 DNA 합성을 증가시키고 모발 성장인자인 IGF-1, KGF-1의 발현은 촉진시키고 탈모 유발인자인 TGF $\beta$ -1, BMP-2의 발현은 억제시켜 결과적으로 모발성장 관련 유전자의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되어 C57BL/6 마우스에서 확인할 수 있었던 모발성장 촉진 효과는 모발 성장인자 경로를 통하여 유도되는 것으로 생각되었다. 또한  $\beta$ -catenin 신호를 활성화시켜 모낭 줄기세포의 성장 및 분화를 유도하고 모낭의 성장기를 유지시켜 줌으로서 모발성장 촉진 효과를 보이는 것으로 생각되었다. 비록 항산화 효과는 없었으나, NO 생성 억제 효과, 항염 효과가 뛰어나 탈모의 원인이 되는 염증의 발생을 억제시키는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다. 실제 養血飲加味方 추출물 1%용액을 30일 동안 제모된 C57BL/6 마우스에 피부 도포한 결과 눈에 띄는 발모 효과를 나타내었고, H&E 염색한 후 피부조직 관찰에서도 대조군에 비해 모낭의 수 및 크기가 증대되고, 모근의 길이가 신장하여 휴지기에서 성장기로 이행되는 모주기에서 성장기를 연장시켜 모발성장 촉진 효

과를 보이는 것으로 확인되었다.

따라서 養血飲加味方은 모유두세포의 DNA 증식과 세포 성장인자의 유전자 발현에 영향을 미쳐 발모 촉진 효과를 지니며, 또한 탈모의 원인이 되는 염증반응을 억제시키는 작용을 하여 모발성장 촉진과 탈모방지에 효과가 있음을 나타내었다.

이상의 결과를 바탕으로 본 실험에 사용된 養血飲加味方 추출물은 추후 모발 성장 촉진 기능성 원료로 활용되어 임상에서 탈모증을 개선시키는데 도움이 될 것으로 예측되며, 향후 각각의 약재 추출물에 대한 실험적, 임상적 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

養血飲加味方の 발모 효과에 대한 실험을 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 養血飲加味方은 5 $\alpha$ -Reductase type II의 활성을 억제시키지 못하였다.
2. 養血飲加味方은 모낭 모유두세포의 DNA 합성을 증가시켰다.
3. 養血飲加味方은 성장 인자인 IGF-1, KGF-1의 발현은 촉진시키고 탈모 유발인자인 TGF $\beta$ -1, BMP-2의 발현은 억제시켰다.
4. 養血飲加味方은 모낭 모유두세포에서  $\beta$ -catenin 신호의 활성을 증가시켰다.
5. 養血飲加味方은 항산화 효과를 보이지 않았다.
6. 養血飲加味方은 대식세포에서 NO 생성 억제 효과를 나타냈다.
7. 養血飲加味方은 대식세포에서 전구 염증 매개 사이토카인과 효소 유전자의 발현을 감소시켜 항염 효과를 보였다.
8. C57BL/6 마우스를 이용하여 육안으로 발모 효과를 평가한 결과 hair growth index가 대조군은 0인 반면 養血飲加味方은 2점 이상으로 모발 성장

촉진 효과가 있었다.

9. C57BL/6 마우스 피부의 조직학적 변화를 관찰한 결과 養血飲加味方 처리군은 모낭의 수, 크기 및 모근의 길이가 음성 대조군에 비해 증대 및 신장하였다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 養血飲加味方은 5 $\alpha$ -reductase type II의 활성을 억제시키지는 못하였으나, 모유두세포의 DNA 합성을 증가시키고 모발 성장인자인 IGF-1, KGF-1의 발현은 촉진시키고 탈모 유발인자인 TGF $\beta$ -1, BMP-2의 발현은 억제시켜 결과적으로 모발성장 관련 유전자의 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한  $\beta$ -catenin 신호를 활성화시켜 모낭의 성장기를 유지시켜 줌으로서 모발성장 촉진 효과를 보였다. 비록 항산화 효과는 없었으나, NO 생성 억제 효과, 항염 효과가 뛰어나 탈모의 원인이 되는 염증의 발생을 억제시키는 것으로 확인되었다. 실제 C57BL/6 마우스를 이용한 실험에서 눈에 띄는 발모 효과를 나타내었고, H&E 염색한 후 피부조직 관찰에서도 대조군에 비해 모낭의 수 및 크기가 증대되고, 모근의 길이가 신장하여 육안적 및 조직학적으로 모발성장 촉진 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 養血飲加味方은 추후 임상에서 모발 성장 촉진과 탈모 방지에 유용하게 활용될 수 있는 처방이라고 생각된다.

## References

1. Randall VA, Androgens and human hair growth. Clin Endocrinol(Oxf). 1994;40(4): 439-57.
2. Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee. Dermatology. 4th rev. ed, Seoul:RyooMungak, 2001:476.
3. Stenn KS, PAUS R, Controls of hair follicle

- cycling. *J Physiol Rev*, 2001;81(1):449-94.
4. Rho SS. Full-color Dermatology. 1st ed. Seoul:IBC Design, 2006:20-6.
  5. Lee JR, Lim EJ. Analysis and Forecast of the Domestic market for Hair loss, *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, 2009;7(1):153-61.
  6. Lee JS, Kim SN. A survey of the status of hair loss product use, hair loss treatment and satisfaction level. *J of the Korean Society of Fashion Business*, 2007;11(2):76-91.
  7. Messenger AG, Jennifer H, Bleehen SS. The in vitro properties of dermal papilla cell lines established from human hair follicles. *Br J Dermatol*, 1984;110(6):685-9.
  8. Passchier J. Quality of life issues in male pattern hair loss. *J Dermatol*, 1998;197:217-8.
  9. Hamilton JB. Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am J Anat*, 1942;71:451.
  10. Yang YG. The Interpretation of The Yellow Emperor's Interior Classics. 1st ed. Seoul:Sungbosa, 1980:5-10, 93-4, 104, 337, 340, 452-6.
  11. Liu HJ. LiuHejianSangHanYookSuh. 1st ed. IRI: All Ages Medicine Research Society, 1975:103.
  12. Huh J. DongUiBoGam. 1st ed. Seoul: Bubinbooks, 1999:793-802.
  13. Wu Q. Golden mirror of medicine. 2nd rev, ed. Beijing:People's Medical Publishing House, 1963:108-10.
  14. Hong SH, Rho SS. A Literature Review of Etiology and Treatment of Alopecia. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 1996;9(1):43-65.
  15. Kim SY, Kim JH, Chae BY. An Experimental Study on the Effects of Sineungyangjin-Dan Applied to the Treatment of Alopecia. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 1991;4(1):43-58.
  16. R HC, R SS. Studies on the effect of Sophora flavescens extract on the hair growth stimulation and acne inhibition. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2002;15(1):96-126.
  17. Chiang HC, Lee SH, Kim NK, Lim HJ. Extracts for the Hair Growth Stimulation using In vivo and In vitro Test Models. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2002;15(2):53-79.
  18. Oriental Hospital of Daejeon University. Oriental Hospital Prescription, Daejeon: Korea Publishing House, 2001:337
  19. Ogawa H, Hattori M. Regulation mechanisms of hair growth. *Current Problems in Dermatology*, 1983;11:159-70.
  20. Harris G, Azzolina B, Baginsky W, Cimis G, Rasmusson GH, Tolman RL, et al. Identification and selective inhibition of an isozyme of steroid 5 $\alpha$ -reductase in human scalp. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89:10787.
  21. Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol*, 1984;110:685.
  22. Jahoda CAB, Oliver R. Vibrissae dermal papilla cell aggregative behavior in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morph*, 1984;79: 211-24.
  23. Blos MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 1958;181:

- 1199-200.
24. Wadsworth TL, Koop DR, Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *J Chem Biol Interact*. 2001;137:43-58.
  25. Denizot F, Lang R, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89:271-7.
  26. Randall VA, Sunberg 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. Jahoda CA, Horne KA, Oliver RF, Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature*. 1984;311:560.
  28. Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, Merrick AE, Hamada K, Kato S, et al. Do androgens influence hair growth by altering the paracrine factors secreted by dermal papilla cells *Eur. J Dermatol*. 2001;11:315.
  29. Greenberg JH, Katz M, Treatment of androgenetic alopecia with a 7.5% herbal preparation. *J Dermatol Treat*. 1996;7:159-62.
  30. Sidney G, Paulo AN, Ricardo S, Nelson RN, Jonathas BS, Andrea GG. Finasteride-Associated Male Infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004;59(4):203-5.
  31. Gal H. *Zhouhoubeijifang*. Beijing:People's Medical Publishing House. 1982:121.
  32. So WB. *Jebyungwonhuron*. Beijing:People's Medical Publishing House. 1983:761-7.
  33. Lee C. *Euhakibmun*. Taipei:Taeryungukmin-chulpansa. 1982:442.
  34. Chen SG. *Orthodox manual of external medicine*. Beijing:People's Medical Publishing House. 2007:289, 301-2.
  35. College of Korean medicine Ponch'ohak Committee. *Ponch'ohak*. Seoul:Youngrimsa. 1998:131, 132, 135, 151, 165, 178, 276, 302, 409, 424, 540, 580, 581, 578.
  36. Chen SW. *Taipinghuiminhejijufang*. Beijing: People's Medical Publishing House. 1985: 179-80, 310-1.
  37. Youn GY. *Dongeuuiyimsangbangjehak*. 1st ed. Seoul: Hanseongsa. 1989:254-63, 303-8.
  38. Kwon GJ, Lee CH, Lee MW, Moon YJ, Choi DH, Lee HJ, et al. Morphological Studies on Hair Growth Effect of Samultang-gamibang. *J of physiology & pathology in Korean Medicine*. 2005;19(3):696-704.
  39. Otomo S. New hair growth drugs and their nonclinical evaluation methods. *Hyangjangji*. 1997;21:228-30.
  40. Russel DW, Wilson JD. Steroid 5  $\alpha$ -reductase: two genes / two enzymes. *J Biochem Annu Rev*. 1994;63:25-61.
  41. Mitsui S, Ohuchi A, Hotta M, Tsuboi R, Ogawa H. Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicle. *Br J Dermatol*. 1997;137(5):693-8.
  42. Su HY, Hickford JG, Bickerstaffe R, Palmer BR. Insulin-like growth factor-1 and hair growth. *Dermatol Online J*. 1999;5(2):1.
  43. Philpott MP, Sanders DA, Kealy T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J Invest Dermatol*. 1994;102(6):857-61.

44. Itami S, Kurata S, Takayasu S. Androgen induction of follicular epithelial cell growth is mediated via insulin-like growth factor-1 from dermal papilla cells, *J Biochem Biophys Res Commun*, 1995;212(3):988-94.
45. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds, *Science*, 1994;266(5186):819-22.
46. Trueb RM. Molecular mechanism of androgenetic alopecia, *J Exp Gerontol*, 2002;37:981-90.
47. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation, *J Leukoc Biol*, 2010;88(6): 1157-62.