

In vivo와 In vitro 실험에서 加味雙和湯 및 구성한약재가 마우스의 모발 성장에 미치는 실험적 연구

윤정훈 · 김남권 · 임규상 · 노석선¹ · 황충연*

원광대학교 한의과대학 안이비인후과교실, 1:대전대학교 한의과대학 안이비인후과교실

Study on the Effect of Gamissanghwa-tang and each Medicinal Plant Extract for the Hair Growth of the Mice using In vivo and In vitro Test

Jeong Hun Yun, Nam Kwen Kim, Kyu Sang Lim, Seok Seon Roh¹, Chung Yeon Hwang*

Deptpartment of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Deptpartment of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

To screen the effective materials for hair loss treatment, the Gamissanghwa-tang extracts were tested. As a result we found that the Gamissanghwa-tang extracts have the hair growth promoting effect. After topical application of each test materials to the back of C57BL/6 mice, the earlier conversion of telogen-to-anagen phase was induced. In the experiments of 5 α -reductase type II inhibition assay, Radix Paeoniae Alba, Semen Cuscutae showed effective potential to inhibit the activity of 5 α -reductase type II. And hair growth index of the Gamissanghwa-tang extracts ranked as 1.2, especially the hair growth index of Fructus Rubi is highest as 1.8. But there were no plant extracts which have effect on the DNA proliferation of hair dermal papilla cell measured by [³H]thymidine incorporation, the expression of growth factors such as IGF-I, KGF, HGF estimated by RT-PCR and protein synthesis of vibrissae hair follicle measured by [³⁵S] cysteine incorporation. Cortex Cinnamomi showed anti-bacterial effect on P. ovale, Radix Paeoniae Alba has the highest radical scavenging activity and Radix Glycyrrhizae has the highest effects of NO synthesis. These results suggest that Gamissanghwa-tang can be used as a potent treatment agent for helping hair growth stimulation

Key words : Gamissanghwa-tang(加味雙和湯), hair loss, hair growth stimulation

서 론

모발은 태양광선과 추위, 외부 충격 흡수작용 등으로부터 머리를 보호하는 것이 일차적인 역할이지만, 최근에는 이러한 일차적 기능 이외에 미용적인 측면의 중요도가 더욱 크게 부각되고 있다¹⁾.

탈모를 유발하는 원인으로는 현재까지 모유두와 모낭을 둘러싸고 있는 혈관의 순환장애로 인한 영양공급 장애, 그리고 남성호르몬 등이 주 요인으로 생각되고 있다. 이중 남성호르몬에 의한 영향은 Hamilton이 남성호르몬과 성인형 탈모의 관련성을 밝히면서 수많은 연구가 진행되어 왔다¹⁾. 혈중내의 주요 남성호르몬인 testosterone은 표적기관에서 5 α -reductase라는 효소의 작용을 받

아 더욱 강력한 형태의 남성호르몬인 dihydrotestosterone(DHT)으로 전환된다. 5 α -reductase는 두가지 type의 isoform이 존재하며, 이중 type II가 남성형 탈모에 직접적으로 관여하는 것으로 생각되고 있다²⁾. 이러한 관점에서, 5 α -reductase type II의 저해제인 finasteride(Merck)가 FDA로부터 minoxidil에 이어 두번째 발모성분으로 인정받은 것은 매우 유의할 만한 사실이라 할 수 있다.

韓醫學에서 탈모는 《黃帝內經》에 ‘髮墮³³⁾, ‘髮落³⁴⁾, ‘毛拔³⁴⁾, ‘毛折³⁵⁾, ‘髮去³³⁾ 등으로 수록되어 있으며 脫毛의 發生原因으로 外因은 風, 熱, 火^{40,43-46)}, 內因은 血燥^{39,41,47)}, 血氣衰弱³⁹⁾, 腎虛^{43,44)}, 肺虛⁴³⁻⁴⁶⁾, 濕痰^{40,43,44,46)}, 精血不足⁴⁸⁾, 不內外因은 怒^{45,46)}, 精神의 刺戟⁴¹⁾, 多食甘味^{34,38)} 등으로 분류하고 있다.

지금까지 한약재를 이용한 모발성장에 미치는 영향들에 관해 많은 연구들이 진행되어 왔으며, 김⁵²⁾의 ‘In vivo와 In vitro 평가모델을 이용한 한약재추출물의 모발성장 및 촉진에 미치는 실험적 연구’, 윤 등⁵³⁾의 ‘탈모증에 대한 상백피 복합물의 모발성

* 교신저자 : 황충연, 광주시 주월동 543-8, 원광대학교 광주한방병원 외과과
· E-mail : hwangida@wonkwang.ac.kr, Tel : 062-670-6432
· 접수 : 2004/02/07 · 수정 : 2004/03/11 · 채택 : 2004/04/03

장 촉진효과, 노 등⁵⁴⁾의 '고삼추출물이 모발성장 촉진 및 면포 억제에 미치는 영향, 신⁵⁵⁾의 '5종의 한약재추출물이 탈모방지 및 모발성장촉진에 미치는 실험적 연구' 등에 의하면 烏梅, 黑大豆, 黑芝麻, 覆盆子, 桑白皮, 苦參, 細辛등이 黑鼠의 모발 성장에 유의한 영향을 미치는 것으로 보고가 되고 있다. 또한 탈모 방지 및 모발성장 촉진을 위해 많이 사용되고 있는 Finasteride제제가 남성의 성기능 감퇴를 유발하는 것⁵⁰⁾으로 보고되어 그 문제점이 지적되고 있다. 이에 저자는 남성의 성기능 감퇴를 유발하지 않으면서 모발 성장에 유의한 영향을 미칠 수 있는 韓藥材로 예로부터 氣血虛弱과 房事過度로 인한 虛勞에 다용하여 온 雙和湯과 五子가 유의할 것으로 사료되어 加味雙和湯 및 구성 韓藥材가 黑鼠의 모발 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 실험 관찰해 보고자 하였다. 雙和湯은 白芍藥, 熟地黃, 黃芪, 當歸, 川芎, 桂皮, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되어 氣血虛, 房事過多, 勞役太甚, 大病후 虛勞, 氣乏自汗을 치료하는 데 응용되어온 處方이며⁴⁹⁾, 枸杞子, 兔絲子, 覆盆子, 蛇床子, 五味子是 오래전부터 남성의 精氣衰弱에 다용하여왔다⁵¹⁾.

이에 본 연구에서는 加味雙和湯 추출물과 그 구성 韓藥材 12종의 추출물이 모발 성장과 탈모에 미치는 영향을 평가하고자 C57BL/6 마우스를 동물 실험, 5 α -reductase type II 활성 억제 평가, 모유두세포 증식에 미치는 영향, 모낭조직배양에 미치는 영향, 모발 성장 관련 growth factor의 유전자 발현에 미치는 영향, 항산화력, nitric oxide 생성억제에 미치는 영향과 세포독성을 종합적으로 평가해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 加味雙和湯의 처방 내용

실험에 사용된 加味雙和湯의 처방내용은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 모든 약재는 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Gamissanghwa-tang

한약명	학 명	1점분량(g)
당 귀	<i>Angelica gigas Nakai</i>	4
숙지황	<i>Rehmannia glutinosa Liboschitz</i>	4
백작약	<i>Paeonia lactiflora Pallas</i>	4
천 궁	<i>Cnidium officinale Makino</i>	4
구기자	<i>Lycium chinense Miller</i>	4
토사자	<i>Cuscuta chinensis Lamark</i>	4
복분자	<i>Rubus coreanus Miquel</i>	4
오미자	<i>Schizandra chinensis Baillon</i>	4
사상자	<i>Torilis japonica D.C.</i>	4
황 기	<i>Astragalus membranaceus Bung</i>	4
감 초	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	4
계 피	<i>Cinnamomum cassia Blume</i>	4

2) 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 체중이 16-20g인 5주령 C57BL/6 마우스(충북 음성 바이오 링크)를 구입해 사용하였다.

3) 미생물 균주

비듬균에 대한 항균력 평가를 위해 사용한 표준 균주로는 *Pityrosporum ovale* (ATCC 14521)를 사용하였다.

4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 세포배양 및 [³H]thymidine incorporation, 조직배양 및 [³⁵S]cysteine incorporation 실험, 항산화실험, nitric oxide 생성억제 및 세포독성을 위한 시약으로는 William's medium E, Dulbecco's modified Eagle medium, fetal bovine serum, antibiotic-antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate, amphotericin B), trypsin-EDTA (이상 Gibco BRL, USA) 등을 사용하였으며, 역전사 중합효소 반응 (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) 시약으로는 M-MLV reverse transcriptase, recombinant RNasin ribonuclease inhibitor, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), Taq polymerase, random hexamer (이상 Promega, USA) 등을 사용하였다. testosterone 5 α -reductase 실험에는 [1,2,6,7-³H] testosterone, 5 α -dihydro-[1,2,4,5,6,7-³H] testosterone, hyperfilm MP (이상 Amersham Bioscience, U.K.), testosterone, dihydrotestosterone (이상 TCI, Japan), toluene, acetone (이상 대정화학, 한국) 등을 사용하였다. 본 실험에 사용한 초차로는 세포배양실험 및 조직배양 실험에는 tissue culture dish (60mm, 100mm), tissue culture plate (6well), tissue culture flask (이상 Falcon, USA) 등을 사용하였다.

기기로는 GeneAmp PCR system (PERKIN ELMER, USA), spectrophotometer, refrigerated high speed centrifuge, scintillation counter, Ph meter (Beckman, USA) 등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 한약재 추출물의 제조

한약재 100g을 취하여 한약분쇄기를 이용 100~200메쉬 크기로 분쇄시킨 후 methanol 500ml (1:5 weight/volume) 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman Filter Paper No. 4를 사용해 여과하여 고형분을 제거한 후, rotary evaporator system을 이용해 감압 농축시켰다.

2) 5 α -reductase type II의 활성 억제 평가

5 α -reductase II의 source로는 SD rat 수컷의 전립선을 이용하였다. 9주령된 SD rat 수컷을 ethyl ether로 마취시킨 후 경추 도살 하여 전립선을 적출하고, 이를 4°C homogenizing buffer를 넣은 glass homogenizer에 넣고 20-30회 stroke하여 잘게 분쇄시킨 후 거즈를 통과시켜 고형분을 제거하였다. 원심분리(1500g, 15분, 4°C) 후 상층액을 제거하고, 침전물을 dissolving buffer를 가하여 잘 섞은 후 이를 crude enzyme으로 사용하였다²⁴⁾. 5 α -reductase type II 활성평가는 eppendorf tube에 crude enzyme 과 천연 추출물 및 reaction buffer를 가하여 최종 반응액을 100 μ l로 맞춘 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 70% cyclohexane, 30% ethyl acetate 용액을 tube당 250 μ l씩 가하여 효소반응을 종료시키고, 원심분리(14,000rpm, 상온)시켜 물과 유기용매 층을 분리시킨 후 steroid가 포함되어 있는 유기용매층을 취해 새로운 eppendorf tube로 옮긴 후, hood 내에서 완전히 건조시켰다. 건

조시킨 steroid는 chloroform 20 μ l을 가하여 녹인 후, TLC plate에 spotting하고 전개용매 (80% toluene, 20% acetone)하에서 전개시켰다. 전개된 TLC plate는 상온에서 말린 후 cassette에서 hyperfilm으로 상온에서 3일간 감광시켜 autoradiogram을 얻었다. 효소반응의 결과는 film상에 감광된 면적을 densitometer로 측정해 계산하였다. 효소 활성 억제물은 천연물을 넣지 않고 반응시켰을 때의 효소반응을 100% 효소활성으로 하여 계산하였다.

3) C57BL/6 mouse를 이용한 모발 성장 촉진 효과 평가

구입한 5주령 암컷 C57BL/6 mouse를 온도 24 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 10%, 조명 12시간 cycle(07:00~19:00), 조도 200~250Lux의 조건에서 固形 飼料과 물을 자유 섭취토록 하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 체중의 변화등 이상 증상이 없는 동물만을 골라 체중 등이 균일하게 群분리 (5-7마리/1군)한 후 본 실험을 실시하였다. 실험 개시 하루 전에 animal clipper를 이용해 털을 제거하고, 실험 개시일(day 0)부터 실험동물의 제모부위에 천연추출물 1% 용액을 매일 1회 약 0.2ml씩, 30일간 그림 붓을 이용해 도포하였다¹³⁾. 대조군으로는 70% ethanol을 동일하게 도포하였다. 모발성장촉진 효과는 제모부위에서 모발이 자란 면적을 관찰하여 점수를 부여하였으며, 이때 모발성장 부위가 제모부위에 대비하여 70% 이상일 때는 3점, 70% 미만 30% 이상일 경우 2점, 30% 이하는 1점 그리고 모발이 자라지 않았을 경우는 0점을 부여하였다. 또한 실험개시 30일 후 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후, 경추 도살하여 사진 촬영하였다.

4) 모유두 세포 배양 및 [³H]thymidine incorporation 평가

모유두 세포는 충남대학교 의과대학에서 모발이식수술을 받은 환자의 scalp hair skin을 기증 받았으며, Messenger의 방법¹⁴⁾에 준하여 모유두세포의 초대배양을 실시하였다. 먼저 scalp skin을 70% ethanol에 약 1분간 넣어 살균하고 dermo-subcutaneous fat interface를 15번 scalpel로 절개 하였다. 분리된 피하지방층을 stereomicroscope 하에서 microforceps과 scalpel blade를 이용하여 모낭을 분리하였다. 분리된 모유두를 배양배지 5ml가 들어있는 60mm cell culture dish에 옮기고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이때 사용한 세포 성장배지로는 DMEM에 fetal bovine serum (10%), penicillin (100 μ g/ml), streptomycin (100I.U./ml), amphotericin B (0.25 μ g/ml), 20mM HEPES, 10mM sodium bicarbonate를 첨가하고 pH를 7.3으로 조정한 것을 사용하였다. 한약재 추출물의 효과를 판정하기 위하여 monolayer가 형성된 flask를 trypsin 처리 후 2 \times 10⁴ cells/ml로 희석하여, 6 well plate에 well당 2ml씩 분주하여 하루동안 배양하여 70~80% 성장된 세포를 실험에 사용하였다. 배양된 모유두 세포를 인산완충용액 (phosphate buffered saline)으로 2회 세척한 후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 단계 희석한 천연 추출물을 3개의 well에 가하고, 나머지 3개의 well에는 FBS가 첨가되지 않은 DMEM을 가해 대조군으로 이용하였다.

5) 모유두 세포에서의 역전사 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

Monolayer를 형성한 모유두 세포를 trypsin 처리 후 100mm tissue culture dish에 2 \times 10⁴ cells/ml의 농도로 가하여 70-80%정도 성장할 때까지 배양하고, 천연추출물을 처리하기 하루 전에

혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 배양액을 교체하였다. 70% ethanol로 단계 희석한 한약재추출물을 tissue culture dish당 10 μ l씩 가하고 18시간동안 배양하였다. 이때 control로는 천연 추출물을 단계 희석하는데 사용한 70% ethanol을 사용하였다.

(1) Total RNA 분리

모유두 세포로부터 total RNA를 분리하는 과정은 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform법에 준하여 실시하였다¹⁶⁾. 즉 시료를 처리한 배지를 완전히 제거한 후 RNA solubilizing solution 1ml을 가하여 녹인 후 micropipet으로 잘 섞어 eppendorf tube로 옮겼다. Chloroform을 200 μ l 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하고 원심분리 (14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 취하고, 이를 새 eppendorf tube에 옮긴 후 isopropanol을 700 μ l 가하고 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치시켰다. 원심분리(14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하여 상층액을 버리고 침전물을 75% ethanol로 1회 washing한 후 DEPC처리된 이온교환수 20 μ l을 가하여 녹인 후, 이중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

(2) 역전사 증합효소 반응

(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

분리한 total RNA 4 μ g를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 μ l)를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차 구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1 \times buffer, 100uM dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 반응을 역전사 반응을 종료시켰다. 증합효소 연쇄반응은 PCR tube에 상기 역전사반응액과 PCR반응액을 가하여 PCR machine에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 실시하였다. 이때 역전사증합반응에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2에 정리하였다. RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에 올려 놓고 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 그 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

Table 2. Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products.

	Primer	Sequence	Size
IGF-1	Sense	5'-TCAACAAGCCACAGGGTAT-3'	307
	Anti-sense	5'-ACTCGTGCAGAGCAAAGGAT-3'	
HGF	Sense	5'-CGAGGCCATGGTGCTATACT-3'	296
	Anti-sense	5'-ACACCAGGGTGATTGAGACC-3'	
KGF	Sense	5'-GACATGGATCCTGCCAACTT-3'	304
	Anti-sense	5'-AATTCCAAGTGCACACTGTCC-3'	

6) 쥐의 축모조직 배양과 [³⁵S]cysteine incorporatoion 평가

쥐의 축모 조직배양은 Willams 등의 방법에 준하여 실시하였다. 한약재 추출물이 쥐 축모조직의 keratin 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 분리한 축모조직 15개씩을 William's E medium으로 단계 희석한 한약추출물 5ml에 넣고 [³⁵S]cysteine을 1uCi/well의 농도로 첨가한 후 4일간 배양하였다. 배양이 종료된 후 배지

를 제거하고 촉모조직을 인산완충용액으로 3회 washing한 후 촉 모조직을 scintillation vial 하나에 한 개씩 넣고 tissue solubilizer(Soluene-350)를 0.8ml 가해 50℃에서 2시간 동안 완전히 녹인 후, scintillation cocktail 5ml을 가하고, scintillation counter로 촉모조직으로 incorporation된 [³⁵S]cysteine의 양을 측정하였다.

7) *Pityrosporum ovale* 에 대한 항균력 평가

(1) Paper disk법에 의한 한약재추출물의 항균력 평가

-70℃에서 냉동보관중인 *P. ovale* 균주를 실험개시 3일 전 액상배지에 접종한 후 37℃ incubator에서 전 배양하였다. 전 배양한 균액은 각 균주마다 동일한 액상배지를 이용해 1/100로 희석한 후, 0.5ml을 취해 agar가 포함된 고체 성장배지에 각각 도포 하였다. 한약재추출물의 항균력 평가는 paper disk 주변에 생긴 균의 성장억제 영역의 지름을 측정하여¹⁸⁾ 평가하였다.

(2) Minimum Inhibition Concentration (MIC) 측정

Paper disc법에서 clear zone이 13mm 이상으로 우수한 항균력을 보인 계지추출물의 정확한 항균력 평가를 위해 MIC를 측정하였다. MIC 측정에는 성장배지를 이용해 5-0.005% 까지 2-fold dilution한 한약재추출물에 전 배양한 *P. ovale*을 10⁵-10⁶ colony forming units/ml의 농도로 희석해 첨가한 후 3일간 배양하며, 균의 성장을 억제한 희석액의 최저 농도를 측정해 MIC로 결정하였다¹⁷⁾.

8) 항산화력 평가

항산화력은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl)법을 이용해 평가하였다. 무수에탄올로 0.01%와 0.001%로 희석한 한약재 추출액 1ml에 0.1mM DPPH용액 1ml을 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 반응물의 흡광도를 spectrophotometer로 516nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을, 음성대조군으로는 무수에탄올을 사용하였다¹⁸⁾.

9) Nitric oxide (NO) 형성 억제력 평가

RAW264.7세포 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다. Lipopolysaccharide를 1μg/ml의 농도로 가하여 48시간 배양한 후, 상층액을 100μl씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100μl씩 가해 상온에서 5분간 반응시키고, ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다^{19,20)}.

10) 세포독성 평가

V79-4 cell line(ATCC number:CCL-93)을 이용해 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. ELISA reader로 560nm와 640nm에서의 흡광도를 측정해 세포독성의 정도를 측정하였다²¹⁾.

실험결과

1. 5α-Reductase type II 활성 억제 평가

加味雙和湯에 처방된 모든 한약재 추출물이 5α-reductase type II의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 1차로 0.01% 농도의 한약재 추출물을 대상으로 실험을 실시한 결과 백작약과 토사자 추출물이 5α-reductase type II의 활성을 억제시키는 것으로 조사되었다(Fig. 1). 1차실험에서 백작약과 토사자 추출물을 대상으로 실시한 2차 실험에서는 0.01%와 0.001%의 농도에서 5α-

-reductase type II의 활성이 각각 92.1%와 48.9%, 89.8%와 36.3% 억제시키는 것으로 조사되었다(Fig. 2).

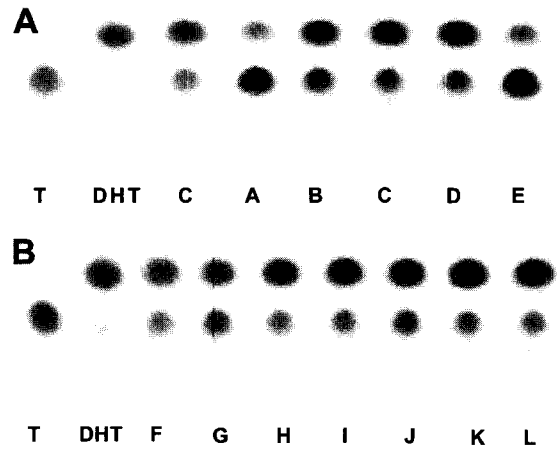


Fig. 1. Effects of medicinal plant extracts on the activities of 5α-reductase II. T: Testosterone, DHT: Dihydrotestosterone, C: control, A: 백작약(Paeonia lactiflora), B: 천궁(Cnidium officinale), C: 당귀(Angelica gigas), D: 구기자(Lycium chinense), E: 토사자(Cuscuta chinensis), F: 복분자(Rubus coreanus), G: 속지황(Rehmannia glutinosa), H: 오미자(Schizandra chinensis), I: 사삼자(Torilis japonica), J: 황기(Astragalus membranaceus), K: 계지(Glycyrrhiza glabra), L: 감초(Glycyrrhiza glabra)

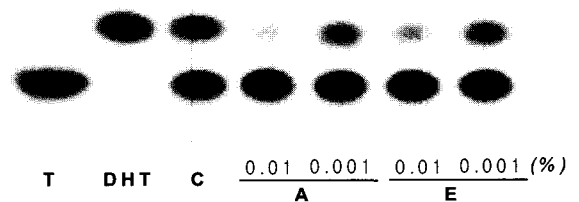


Fig. 2. Effects of medicinal plant extracts on the activities of 5α-reductase II. T: Testosterone, DHT: Dihydrotestosterone, C: control, A: 백작약(Paeonia lactiflora), E: 토사자 (Cuscuta chinensis)

2. C57BL/6 mouse를 이용한 모발 성장 촉진 효과 평가

加味雙和湯이 모발성장에 미치는 영향을 평가하기 위해, 모발이 휴지기 상태에 있는 7주령 C57BL/6 mouse 암컷의 등판 털을 animal clipper를 이용해 제거하고 加味雙和湯 추출물 1% 용액을 30일간 경피 도포하며 모발성장 촉진 효과가 있는지를 육안 평가한 결과, 加味雙和湯 추출물의 hair growth index는 약 1.2 (대조군 0)로 약간의 모발성장 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig.3).

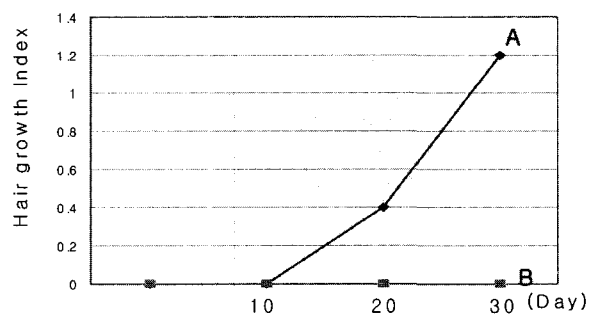


Fig. 3. Scoring of hair growth promoting effect of GMSHT extract on C57BL/6 mice. A: GMSHT extract, B: Control

加味雙和湯에 처방된 모든 원료 추출물을 대상으로 실시한 평가에서는 복분자 추출물의 hair growth index가 약 1.8(대조군 0.4)로 실험을 실시한 한약재중 가장 우수한 모발성장 촉진 효과를 보였으며, 백작약과 토사자도 약간의 발모촉진효과를 보였다(Fig 4).

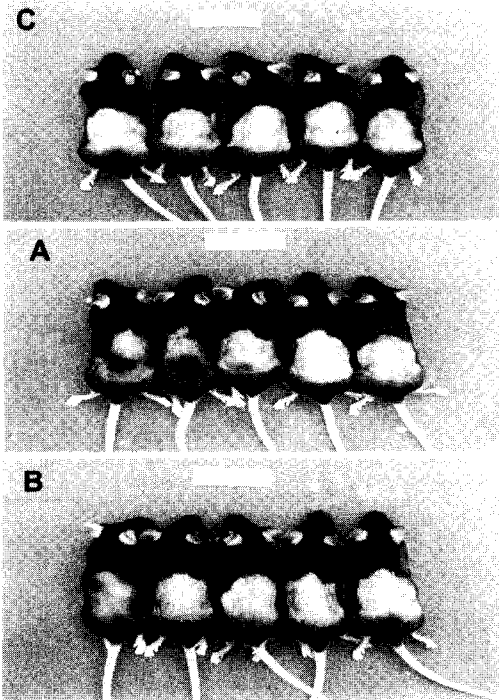


Fig. 4. Effects of medicinal plant extracts on hair growth of C57BL/6mice C: control, A: 토사자(Cuscuta chinensis), B:선궁(Cnidium officinale)

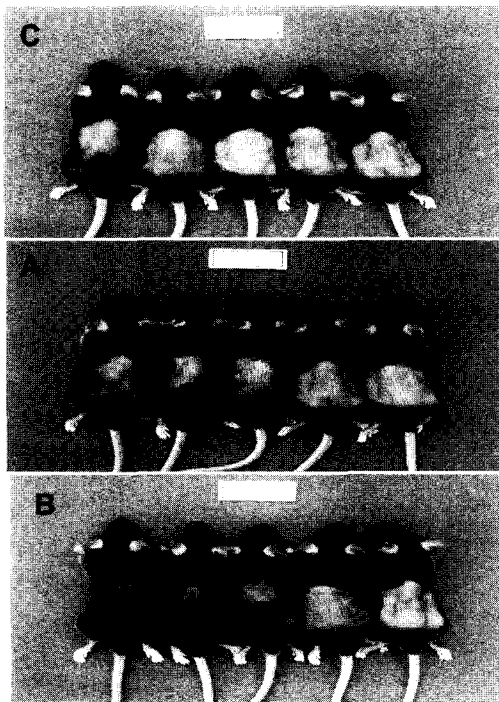


Fig. 4 - Continued. C: Control, A:계지(Cinnamomum cassia), B:복분자(Rubus coreanus)

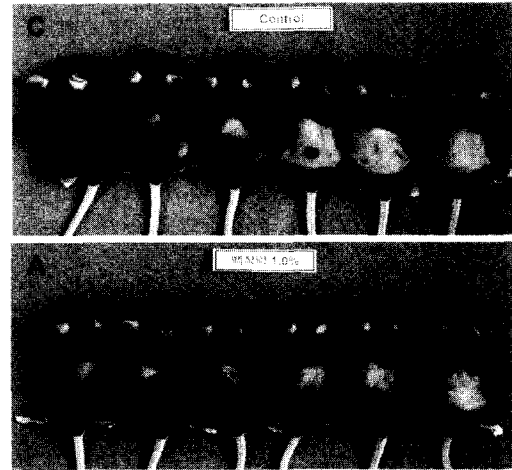


Fig. 4 - Continued. C: control, A:백작약(Paeonia lactiflora)

6. 비듬균에 대한 抗菌力 평가

Paper disc 法으로 韓藥材抽出物 12種이 비듬의 原因菌으로 알려진 P.ovale에 대한 抗菌力을 가지고 있는 지의 與否를 評價한 결과, 계지추출물이 18mm의 clear zone을 형성했을 뿐 다른 韓藥材추출물들은 모두 P. ovale균의 증식을 억제시키지 못했다 (Table 3). MIC 측정 결과 계지 추출물의 MIC는 0.05% 이하였다.

Table 3. Anti-bacterial activities of medicinal plant extracts on Pityrosporum ovale.

Medicinal Plant Extract	Incorporation Rate(%)	
당 귀(Angelica gigas)	0.0001%	101%
숙지황(Rehmannia glutinosa)	0.0001%	73%
백작약(Paeonia lactiflora)	0.0001%	94%
천 궁(Cnidium officinale)	0.0001%	93%
구기자(Lycium chinense)	0.0001%	103%
토사자(Cuscuta chinensis)	0.0001%	81%
복분자(Rubus coreanus)	0.0001%	89%
오미자(Schizandra chinensis Baillon)	0.0001%	104%
사상자(Torilis japonica)	0.0001%	98%
황 기(Astragalus membranaceus)	0.0001%	79%
감 초(Glycyrrhiza glabra)	0.0001%	88%
계 지(Cinnamomum cassia)	0.0001%	86%

* '-' means it has no antibacterial activity

Table 4. Radical scavenging activities of medicinal plant extracts.

Medicinal Plant Extracts	Concentration	Radical Scavenging Activity
숙지황 (Rehmannia glutinosa)	0.01%	34.0%
백작약 (Paeonia lactiflora)	0.001%	4.0%
당 귀 (Angelica gigas)	0.01%	95.9%
천 궁 (Cnidium officinale)	0.001%	23.1%
구기자 (Lycium chinense)	0.01%	23.8%
토사자 (Cuscuta chinensis)	0.001%	2.1%
복분자 (Rubus coreanus)	0.01%	34.1%
오미자 (Schizandra chinensis)	0.001%	3.3%
계지 (Cinnamomum cassia)	0.01%	8.4%
사상자 (Torilis japonica)	0.001%	3.0%
황기 (Astragalus membranaceus)	0.01%	32.1%
감초 (Glycyrrhiza glabra)	0.001%	3.5%
백작약 (Paeonia lactiflora)	0.01%	94.3%
오미자 (Schizandra chinensis)	0.001%	52.5%
계지 (Cinnamomum cassia)	0.01%	28.9%
복분자 (Rubus coreanus)	0.001%	4.1%

7. 항산화력 평가

DPPH 법으로 한약재 추출물 12종의 radical scavenging activity를 평가한 결과 백작약, 복분자, 계지 및 감초 추출물이 0.01%와 0.001%의 농도에서 각각 95.9%와 23.1%, 94.3%와 52.5%, 90.6%와 25.1%, 85.7%와 15.8%의 우수한 항산화력을 보였다 (Table 4, Fig. 5).

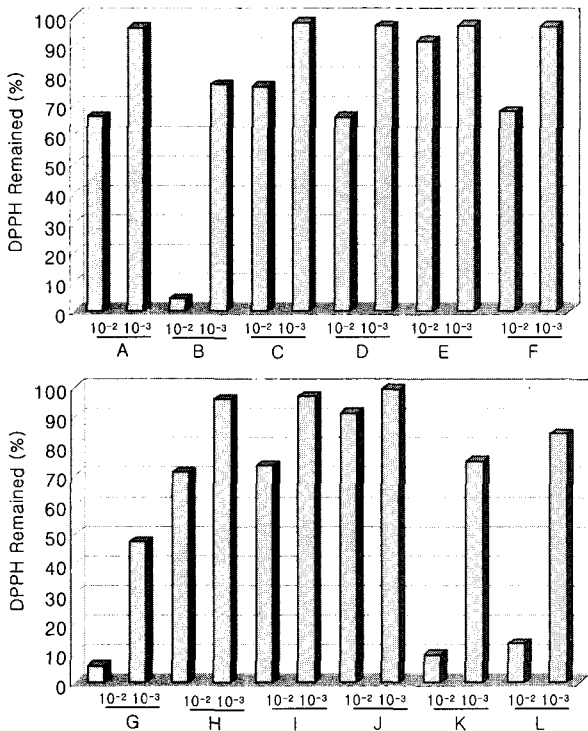


Fig. 5. Radical scavenging activities of herbal extracts. A:속지황 (Rehmannia glutinosa), B:백작약(Paeonia lactiflora), C:당귀(Angelica gigas), D:천궁 (Cnidium officinale), E:구기자(Lycium chinense), F:토사자(Cuscuta chinensis), G:복분자 (Rubus coreanus), H:오미자(Schizandra chinensis), I:사상자(Tonlis japonica), J:황기 (Astragalus membranaceus), K:계지(Cinnamomum cassia), L:감초(Glycyrrhiza glabra)

8. Nitric oxide (NO) 생성 억제력 평가

RAW264.7세포를 이용해 GRIESS법으로 加味雙和湯에 처방된 한약재 12종의 NO생성 억제력을 평가한 결과, 감초 추출물이 50µg/ml과 5µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 55.8%와 21.7% 억제시켜 NO형성 억제효과가 가장 우수하였고, 사상자 추출물은 50µg/ml의 농도에서 41.3%억제시켰다 (Fig.6).

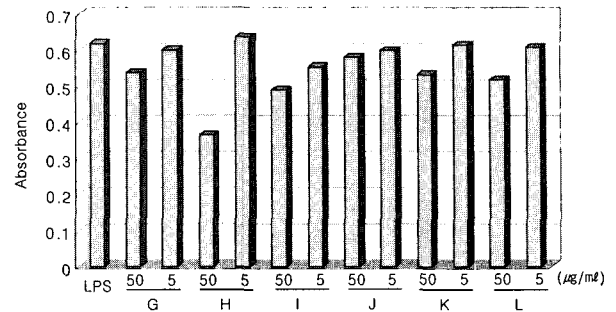
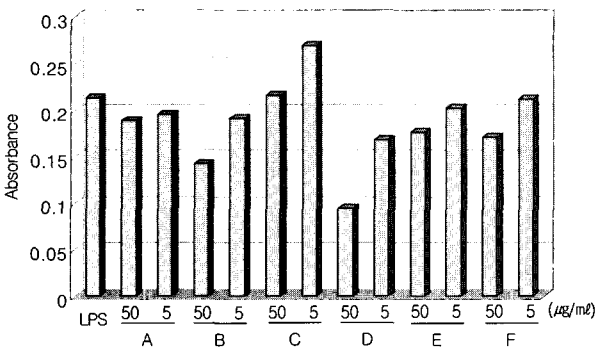


Fig. 6. Inhibitory effects of NO synthesis by medicinal plant extracts. A:속지황(Rehmannia glutinosa), B:당귀 (Angelica gigas), C:계지 (Cinnamomum cassia), D:감초(Glycyrrhiza glabra), E:오미자 (Schizandra chinensis), F:황기 (Astragalus membranaceus), G:복분자(Rubus coreanus), G:사상자 (Tonlis japonica), H:천궁 (Cnidium officinale), I:백작약 (Paeonia lactiflora), J:토사자(Cuscuta chinensis), K:구기자 (Lycium chinense)

9. 세포독성 평가

V79-4세포를 이용해 MTT법으로 加味雙和湯에 처방된 모든 한약재추출물의 세포독성을 평가한 결과 속지황, 백작약, 구기자, 복분자, 황기의 MTT50(MTT법으로 측정된 반수치사농도)이 500µg/ml 이상으로 세포독성이 가장 적었으며, 당귀, 토사자, 오미자, 계지의 경우 300µg/ml 이상, 사상자와 감초는 100µg/ml 이상인 반면 천궁의 경우 60µg/ml로 실험을 실시한 한약재중 세포독성이 가장 강한 것으로 조사되었다(Table 5).

Table 5. Cytotoxicities of medicinal plant extracts.

한약명	학 명	MTT50 (µg/ml)
당 귀	<i>Angelica gigas Nakai</i>	340
속지황	<i>Rehmannia glutinosa Liboschitz</i>	> 500
백작약	<i>Paeonia lactiflora Pallas</i>	> 500
천 궁	<i>Cnidium officinale Makino</i>	60
구기자	<i>Lycium chinense Miller</i>	> 500
토사자	<i>Cuscuta chinensis Lamark</i>	360
복분자	<i>Rubus coreanus Miquel</i>	> 500
오미자	<i>Schizandra chinensis Baillon</i>	320
사상자	<i>Tonlis japonica D.C.</i>	120
황 기	<i>Astragalus membranaceus Bung</i>	> 500
감 초	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	100
계 지	<i>Cinnamomum cassia Blume</i>	320

고 찰

모발은 태양광선과 추위, 외부 충격 흡수작용 등으로부터 머리를 보호하는 것이 일차적인 역할이지만, 최근에는 이러한 일차적 기능 이외에 미용적인 측면의 중요도가 더욱 크게 부각되고 있다¹⁾. 또 최근 식생활의 변화와 스트레스의 증가 등으로 인해 탈모와 박모를 고민하는 사람의 수가 늘어나고, 연령층도 점차 낮아지고 있는 추세를 보이고 있다.

모발은 모낭(hair follicle)內的 여러 세포간 상호작용에 의해 형성되며, 특히 상피계 세포인 기질세포(matrix cell), 외모근초세포(outer root sheath cell)와 간엽계인 모유두세포(dermal papilla cells)간의 상호작용이 중요한 것으로 알려져 있다²⁾. 모발성장과 탈모에 대한 정확한 기전은 아직까지 밝혀져 있지 않지만, 최근 세포생물학, 분자생물학등 기초의학의 발달과 더불어 모발성장 기전에 대한 연구 결과가 비약적인 발전을 이루고 있으며, 이를

이용한 탈모억제 및 발모촉진 소재의 탐색연구도 활발히 진행되고 있다. 즉 Jahoda와 Oliver에 의해 쥐의 촉모에서 분리한 모유두세포의 배양법³⁾, Messenger등에 의해 사람의 모낭에서 분리한 모유두세포 배양법이 정립되었으며⁴⁾, Philpott 등에 의해 사람의 모낭조직 배양법이 정립되면서⁵⁾ 모낭세포와 조직을 이용한 많은 기초연구가 진행되었고, 이에 따라 모발성장 조절에 직간접적으로 관여하는 많은 인자들에 대한 정보들도 하나씩 밝혀지고 있다⁶⁻¹⁰⁾. 그러나 모발성장 조절 및 특히 탈모에 대하여는 아직까지 정확한 기전이 밝혀져 있지 않은 실정이다.

韓醫學에서 脫毛는 《黃帝內經》에 ‘髮墮³³⁾, ‘髮落³⁴⁾, ‘毛拔³⁴⁾, ‘毛折³⁵⁾, ‘髮去³³⁾ 등으로 수록되어 있으며 脫毛의 發生原因으로 外因은 風, 熱, 火^{40,43-46)}, 內因은 血燥^{39,41,47)}, 血氣衰弱³⁹⁾, 腎虛^{43,44)}, 肺虛^{43,46)}, 濕痰^{40,43,44,46)}, 精血不足⁴⁸⁾, 不內外因은 怒^{45,46)}, 精神的 刺戟⁴¹⁾, 多食甘味^{34,38)}등으로 분류하고 있다.

남성형 탈모의 발증 기전은 아직까지 정확히 밝혀지지는 않았지만 남성호르몬 의존적이고, 휴지기 모낭이 증가되고 모낭 왜소화된다는 두 가지 명확한 현상을 보인다²³⁾. 따라서 발모나 탈모 방지를 위한 약재의 효과를 과학적 평가를 위해서는 남성호르몬의 작용을 억제시키는 약재를 찾거나 휴지기 모낭의 증가와 모낭의 왜소화 현상을 억제시키는 효과를 평가하는 것이 바람직하다.

본 실험에서 휴지기 상태에 있는 7주령 C57BL/6 암컷의 등관 털을 animal clipper를 이용해 제거하고 쌍화탕가오자 및 원료 한약재 추출물 12종의 1% 용액을 30일간 경피 도포한 결과, 실험개시 약 3주경부터 쌍화탕가오자 추출물과 복분자 추출물 처리군에서 대조군과 비교해 뚜렷한 모발성장 촉진 효과를 보이기 시작하였으며, 30일 후에는 통계적으로 유의한 수준의 육묘효과를 보이는 것이 확인되었고, 백작약과 토사자 추출물은 경우 미약한 효과를 보여 쌍화탕가오자 추출물과 복분자 추출물의 경우 휴지기 상태의 모낭을 성장기로 유도하는 기능을 가지고 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 복분자 추출물의 어떤 성분이 C57BL/6 마우스의 모발성장과 관련된 어떤 기능을 자극해 발모촉진효과를 보이는 지에 대한 추가적인 연구는 수행하지 못하였다.

雙和湯은 白芍藥, 熟地黃, 黃芪, 當歸, 川芎, 桂皮, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되어 氣血虛, 房事過多, 勞役太甚, 大病后 虛勞, 氣乏自汗을 치료하는 데 응용되어온 處方이며⁴⁹⁾, 枸杞子, 菟絲子, 覆盆子, 蛇床子, 五味子是 남성의 精氣衰弱에 다용하여왔다⁵¹⁾.

남성형 탈모증이 남성호르몬 의존적이라는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 남성호르몬의 작용기전은 혈중 testosterone이 표적세포에 들어가 5 α -reductase에 의해 보다 강력한 형태의 남성호르몬인 dihydrotestosterone (DHT)으로 전환되고, 남성호르몬 수용체와 결합해 특정 유전자 발현을 촉진 또는 억제시키는 것으로 알려지고 있다¹²⁾. 따라서 남성형 탈모의 예방과 치료를 위해 천연물질을 이용해 testosterone 5 α -reductase의 활성을 억제시키고자 하는 노력이 활발히 이루어지고 있다. 5 α -Reductase는 type I과 type II의 두 종류가 있는 것으로 알려져 있다. 5 α -reductase I형은 optimum pH가 6.0-8.5의 넓은 alkaline range를 가지며 non-genital skin과 간 등의 일반 조직에 널리 분포하는 특징을 가지며, 여드름 생성과 관련된 피지의 생합성 기전에 중

요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 반면 5 α -reductase II형은 optimum pH가 5.0근처의 acidic range를 가지며, prostate, epididymis, genital skin등 생식관련 조직에 주로 분포한다²⁴⁾. 사람의 모낭에는 5 α -reductase type I과 II가 모두 존재하지만 5 α -reductase II형 결손증인 pseudohermaphroditism 환자에서는 남성형 탈모가 발생하지 않는 점 등으로부터 5 α -reductase type II가 남성형 탈모에 직접적으로 관여하는 것으로 생각되고 있다. 또 최근에는 5 α -reductase type II를 억제시키는 약물인 finasteride(Merck)가 개발되어 FDA로부터 경구용 발모제로 인정받아 시장에서 판매되는 등 5 α -reductase type II가 남성형탈모에 직접적인 관련이 있음이 밝혀져 있다²⁵⁾.

이에 본 연구에서는 加味雙和湯에 처방된 모든 한약재 추출물이 남성형 탈모를 유발하는 원인의 하나로 주목받고 있는 5 α -reductase II형의 활성을 억제시키는 지의 여부를 확인하기 위해 SD rat의 전립선을 효소원으로 testosterone 5 α -reductase type II 활성에 영향을 미치는 지의 여부를 평가하였으며, 그 결과 백작약과 토사자 추출물이 0.01%의 농도에서 5 α -reductase type II효소의 활성을 각각 92.1%와 89.8% 억제시키는 것으로 조사되어 이들 한약재 추출물들은 탈모방지를 위한 처방에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되었다(Fig. 2).

한약추출물이 모발의 성장에 미치는 영향에 대한 연구도 최근 진행되어 고삼추출물, 은행잎추출물, 하수오, 죽절인삼, 당약 등 많은 천연약재가 동물실험이나 모낭조직과 세포를 이용한 실험에서 모발성장에도 효과가 있다고 보고되는 등²⁶⁻²⁸⁾ 일본과 한국에서 많은 연구가 수행되고 있다. 본 연구에서는 DPPH법으로 한약재 추출물 12종의 항산화력을 평가한 결과 백작약, 복분자, 계지 및 감초추출물이 0.01%의 농도에서 모두 85% 이상의 radical scavenging activity를 보여, 우수한 항산화력을 지닌 것으로 평가되었다. 이 결과는 이들 한약재들은 탈모의 한 원인으로 작용하는 염증억제의 치료 및 발생억제를 위한 처방에 항산화물질로 사용될 수 있음을 의미한다고 생각된다.

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O₂⁻)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 iNOS의 활성을 억제시켜 NO의 생성을 억제시키는 것이 중요하다²⁹⁻³²⁾. 이에 본 연구에서는 加味雙和湯이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는 지의 여부를 평가하기 위해 염증실험에 널리 활용되고 있는 macrophage 세포주인 RAW264.7세포를 이용해 실험을 실시한 결과, 감초 및 사상자 추출물이 50 μ g/ml의 농도에서 NO의 생성을 각각 55.8%와 41.3%억제시키는 것으로 확인되어, 이들 약재는 향후 염증 치료 및 억제를 위한 처방에 NO 형성억제 물질로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

加味雙和湯에 사용된 한약재 추출물들이 비듬의 원인균으로 알려진 *P. ovale* 균에 미치는 영향을 paper disk법으로 평가한 결과 한약추출물 12종 중 계지추출물이 *P. ovale*균주에 대한 우수한 항균력을 보이는 것으로 평가되어, 계지추출물은 비듬의 억제에도 효용이 있을 것으로 사료되었다. 雙和湯加五子에 사용된 원료 한약재 추출물들의 세포독성을 MTT법을 이용한 평가한 결과 숙지황, 백작약, 구기자, 복분자, 황기의 MTT50(MTT법으로 측정된 반수치사농도)이 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 세포독성이 가장 적었으며, 당귀, 토사자, 오미자, 계지의 경우 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이었으며, 사상자와 감초는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 반면 천궁의 경우 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 실험을 실시한 한약재중 세포독성이 가장 강한 것으로 조사되었다

이상의 실험결과를 종합하면, 加味雙和湯은 C57BL/6를 이용한 실험에서 발모촉진효과를 지니는 것으로 확인되었으며, 그 효과는 원료 한약재중 복분자 추출물의 양호한 발모촉진효과와 백작약 및 토사자의 약한 효과가 함께 작용한 결과인 것으로 생각된다. 그러나 雙和湯加五子에 처방된 모든 한약재 추출물들은 모유두세포의 DNA합성과 축모조직배양에서의 케라틴 단백질합성, 그리고 모유두세포에서 발현되는 IGF-I, KGF, HGF, VEGF 등의 모발관련 성장인자의 발현에는 직접적인 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되어, 加味雙和湯 추출물의 모발성장 촉진 효과는 모발로 직접 분화되는 모낭세포인 hair matrix나 또는 모낭의 줄기세포 (stem cell)가 위치해 있는 것으로 알려진 외모근초 (outer root sheath) 등의 세포에 작용하여, 이러한 세포의 성장 및 분화 또는 아직까지 정확히 밝혀지지 않은 모발성장 관련유전자나 조절인자의 발현을 조절함으로써 발모촉진효과를 보이는 것이 아닌가 생각되었다. 또 加味雙和湯에 처방된 일부 한약재들은 비듬의 원인균으로 알려진 *P. ovale*에 대한 항균력과 탈모와 관련이 있는 염증반응을 억제시키는 작용을 하는 것으로도 밝혀져 加味雙和湯은 모발의 성장촉진과 탈모방지에 유용하게 활용될 수 있는 처방임을 확인하였다.

지금까지 한약재를 이용한 모발성장에 미치는 영향들에 관해 많은 연구들이 진행되어 왔으며, 강⁵²⁾의 'In vivo와 In vitro 평가모델을 이용한 한약재추출물의 모발성장 및 촉진에 미치는 실험적 연구', 윤 등⁵³⁾의 '탈모증에 대한 상백피 복합물의 모발성장 촉진효과', 노 등⁵⁴⁾의 '고삼추출물이 모발성장 촉진 및 면포 억제에 미치는 영향', 신⁵⁵⁾의 '5종의 한약재추출물이 탈모방지와 모발성장촉진에 미치는 실험적 연구' 등에 의하면 烏梅, 黑大豆, 黑芝麻, 覆盆子, 桑白皮, 苦蔘, 細辛등이 黑鼠의 모발 성장에 유의한 영향을 미치는 것으로 보고가 되고 있다. 또한 탈모 방지 및 모발성장 촉진을 위해 많이 사용되고 있는 Finasteride제제가 남성의 성기능 감퇴를 유발하는 것⁵⁰⁾으로 보고되어 그 문제점이 지적되고 있다. 이에 저자는 남성의 성기능 감퇴를 유발하지 않으면서 모발성장에 유의한 영향을 미칠 수 있는 한약재로 예로부터 氣血虛弱과 房事過度로 인한 虛勞에 대응하여 온 雙和湯과 五子が 유의할 것으로 사료되었다. 또한 한약의 복용법보다는 모발 및 두피에 직접 자극을 주는 피부도포법이 모발성장에 더 유효할 것으로 생각되어 加味雙和湯 및 그 각각의 구성 韓藥材를

이용한 피부 도포법이 黑鼠의 모발성장에 어떠한 영향을 미치는지를 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었다. 따라서 탈모질환에 加味雙和湯을 응용할 가치가 있다고 사료되며 앞으로 실험적, 임상적 연구가 더 필요하다고 생각된다.

결 론

加味雙和湯 추출물과 그 원료로 사용된 12종의 한약재의 에탄올추출물이 발모촉진과 및 탈모방지에 효과가 있는지의 여부를 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味雙和湯에 처방된 모든 한약재 추출물이 남성형 탈모를 유발하는 원인의 하나로 주목받고 있는 5 α -reductase type II의 활성에 미치는 영향을 평가한 결과, 백작약과 토사자 추출물이 0.01%와 0.001%의 농도에서 5 α -reductase type II의 활성을 각각 92.1%와 48.9%, 89.8%와 36.3% 억제시켰다. 加味雙和湯이 모발 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해, 모낭이 휴지기 상태에 있는 7주령 C57BL/6 mouse 암컷의 등판 털을 animal clipper를 이용해 제거하고 加味雙和湯 및 원료 한약재 추출물 1% 용액을 30일간 경피 도포하며 평가한 결과, 加味雙和湯 추출물의 hair growth index는 약 1.2 (대조군 0)로 약간의 모발성장 촉진 효과가 있었으며, 원료 한약재중에서는 복분자 추출물의 hair growth index가 약 1.8(대조군 0.4)로 실험을 실시한 한약재중 모발성장 촉진 효과가 가장 우수하였다. 加味雙和湯에 처방된 모든 한약재 추출물들은 [³H]thymidine incorporation법으로 측정된 모유두세포의 DNA 증식, RT-PCR로 평가한 IGF-I, KGF, HGF 유전자의 발현, [³⁵S] cysteine incorporation 측정된 축모 모낭조직의 단백질합성에 영향을 미치지 못했다. 加味雙和湯에 처방된 한약재중 계지추출물은 Paper disc법으로 측정된 *P. ovale*에 대한 抗菌力 평가에서 18mm의 clear zone을 형성했으며, MIC는 0.05% 이하이었다. DPPH 법으로 加味雙和湯에 처방된 한약재추출물 12종의 항산화력을 평가한 결과 백작약, 복분자, 계지 및 감초추출물은 0.01%의 농도에서 각각 95.9%, 94.3%, 90.6%, 85.7%의 radical scavenging activity를 보였다. RAW264.7세포를 이용해 GRIESS법으로 측정된 NO생성 억제실험에서 쌍화탕가오자에 처방된 한약재중 감초와 사상자 추출물이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 55.8%와 41.3%억제시켰다.

이상의 실험 결과를 살펴보면 加味雙和湯이 모발의 성장 촉진과 탈모방지에 유용할 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 실험적, 임상적 연구가 더 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Randall, V. A.: Androgen and human hair growth. Clin. Endocrinol. 40, 439, 1994.
2. Hardy, M. H.: The secret life of the hair follicle. Trends Genet. 8, 55, 1992.
3. Jahoda, C. and Oliver, R. F.: The growth of vibrissae dermal papilla cells in vitro. Br. J. Dermatol. 105, 623, 1981.

4. Messenger, A. G., Jennifer H. and Bleehen, S. S.: The in vitro properties of dermal papilla cell lines established from human hair follicles. *Br. J. Dermatol.* 114, 425, 1986.
5. Philpott, M. P., Green, M. R. and Kealey, T.: human hair growth in vitro. *J. Cell Sci.* 97, 463, 1990.
6. Hebert, J.M., Rosenquist, T., Gotz, J. and Martin, G.R.: FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78, 1017, 1994.
7. Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. and Fuchs, E.: De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95, 605, 1998.
8. Chiang, C., Swan, R.Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E.K., Cooper, M.K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P. A. and Dlugosz, A. A.: Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* 205, 1, 1999.
9. Reddy, S., Andl, T., Bagasra, A., Lu, M. M., Epstein, D. J., Morrisey, E. E. and Millar, S. E.: Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech. Dev.* 107, 69, 2001.
10. Stenn, K. S. and Paus, R.: Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 81, 449, 2001.
11. Hamilton, J.B.: Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am J Anat.* 71:451, 1942.
12. Randall, V. A.: Androgen and human hair growth. *Clin.Endocrinol.* 40, 439, 1994.
13. Ogawa H. and Hattori M. : Regulation mechanisms of hair growth. *Current Problems in Dermatology* 11:159-170, 1983.
14. Messenger, A. G.: The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br. J. Dermatol.* 110, 685, 1984.
15. Jahoda, C.A.B. and Oliver R. : Vibrissae dermal papilla cell aggregative behavior in vivo and in vitro. *J.Embryol.Exp.Morph.* 79 : 211-224, 1984.
16. Chomczynski P., Sacchi N. : Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1988.
17. 이건걸, 김승곤, 김신무, 김영권, 오흥백, 정경석, 정태화, 진 단미생물학(3판), pp. 322-323, 359-374, 고려의학, 1999.
18. 문숙임, 류홍수, 이희령, 최재수, 식품식물의 항산화효과 검색 과 산초의 항산화성분. *한국영양식량학회지* 23:466-471, 1994.
19. Wadsworth TL, Koop DR., Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* 137:43-58, 2001.
20. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A., Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Pharm.Res.* 18:151-6, 2001.
21. Denizot F, Lang R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol.Methods* 89:271-7, 1986.
22. Harris, G., Azzolina, B., Baginsky, W., Cimis, G., Rasmusson G. H., Tolman, R. L., Raetz, C. R. H. and Ellsworth, K.: Identification and selective inhibition of an isozyme of steroid 5 α -reductase in human scalp. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 10787, 1992.
23. Otomo S. : New hair growth drugs and their nonclinical evaluation methods. *香粧會誌* 21:228-230, 1997.
24. Russel D.W., Wilson, J.D. Steroid 5 α -reductase : two genes /two enzymes. *Annu.Rev..Biochem.* 63:25-61.
25. Nishizawa, H.: Researches on new growth promoters. *香粧會誌* 21, 228, 1997.
26. Takahashi, T., Hamada C., Ishino A., Kobayashi, K., Kimura, T. and Tajima M.: The effect of Sophora root extract on the anagen elongation and isolation of active compound. Third International Meeting of Hair Research Society, Jun.13-15, Japan, 71, 2001.
27. Kobayashi N., Suzuki R, Koide C., Suzuki T., Matsuda H and Kubo M. : Effect of leaves of Ginkgo biloba on hair regrowth in C3H strain mouse. *藥學雜誌* 113:718-724, 1993.
28. Kubo M., Matsuda H., Fukui M. and Nakai Y. : Development studies of cuticle drugs from natural resources. I. Effects of crude drug extracts on hair growth in mice. *藥學雜誌* 108:971-978, 1988.
29. 김룡규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태: 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과 약화회지, p.3439.
30. 서영준, 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자세포생물학뉴스* 13:8-17, 2001:3-347, 2002.
31. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han J.W. and Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophage by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European J. Pharmacol.* 406 : 301-309, 2000.
32. Kim, E.J., Jin, H.K., Kim .K., Lee H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.R., Zee O.P., Han, J.W. and Lee H.W. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation *Biochem.Pharmacol.* 61 903-910, 2001.
33. 素問: 上古天真論, 북경, 人民衛生出版社, pp.405-415, 2002.
34. 素問: 五臟生成篇, 북경, 人民衛生出版社, pp.488-492, 2002.
35. 靈樞經橋樑釋, 경매편, 하북의학원 교석, p.219, 1982.
36. 葛洪: 肘後備急方, 북경, 人民衛生出版社, pp.165-166, 1996.
37. 巢元方: 諸病源候論校釋 上冊, 人民衛生出版社, pp761-769, 1983.
38. 孫思邈: 備急千金要方, 大星文化社, pp.434-435, 1984.

39. 吳謙: 醫宗金鑑, 북경, 人民衛生出版社, pp.745-746, 1998.
40. 祁坤: 外科大成,台北, 文光圖書有限公司, pp.211-212, 1980.
41. 上海中醫學院: 中醫外科學, 항포, 商務印書館, pp.137-138, 1985.
42. 朱橚: 普濟方 卷四十七: 中國醫學大系16권, 도서출판정담, pp.366-372.
43. 黃度淵: 醫宗損益, 서울, 醫學社, p.308, 1973.
44. 劉河間: 劉河間傷寒六書, 이리, 古今醫學研究會, p.103, 1975.
45. 許浚: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.308-309, 1983.
46. 孟華燮: 方藥指針, 서울, 南山堂, p.535, 1983.
47. 徐春甫: 古今醫統大全(八),台北, 新文豐出版公司, pp.4349, 1979.
48. 裴元植: 最新漢方臨床學, 서울, 南山堂, pp.656,657,659, 1986.
49. 許俊: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.670, 1992.
50. McClellan KJ, Markham A: Finasteride: a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs*, 57(1):111-26, 1999.
51. 신민교: 臨床本草學, 서울, 永林社, pp.79, 172, 173, 194, 195, 212-214, 226, 236, 237, 240, 248, 249, 260, 280, 308, 501, 531, 1997.
52. 강학천: In vivo와 In vitro 평가 모델을 이용한 한약재추출물의 모발성장 및 촉진에 미치는 실험적 연구, 원광대학교 박사학위논문, 2002.
53. 윤성중 외3인: 탈모증에 대한 삼백피 복합물의 모발성장 촉진 효과, 한국잠사학회지, 2000.
54. 노현찬, 노석선: 고삼추출물이 모발성장촉진 및 면포 억제에 미치는 영향, 대한피부과학회지, 15권 1호, 2001.
55. 신연상: 5종의 한약재추출물이 탈모방지과 모발성장촉진에 미치는 실험적 연구, 대전대학교 박사학위논문, 2003.