

C57BL/6N 생쥐에서 천남성 추출물과 분획물의 발모효과에 대한 실험적 연구

권경숙¹ · 이문원 · 정일국 · 정한솔² · 송범용³ · 송정모¹ · 이창현*

우석대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 사상체질의학교실, 2: 병리학교실, 3: 침구학교실

Experimental Studies on the Hair Growth Activity of Fractions and Extract of *Arisaematis Rhizoma* in C57BL/6N Mice

Kyung Suk Kwon¹, Moon Won Lee, Il Kook Jeong, Han Sol Jeong², Beom Yong Song³, Jeong Mo Song¹, Chang Hyun Lee*

Department of Anatomy, 1: Department of Sasang Constitutional Medicine, 2: Department of Pathology, 3: Department of Acupuncture & Moxibution, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the hair growth activity of fractions and extract of *Arisaematis Rhizoma* in the hair removed skin of normal and spontaneous alopecia areata model in C57BL/6N mice. These experiments were performed with the macroscopic, microscopic, immunohistochemical(VEGF, c-kit, PKC- α , TGF and FGF) and RT-PCR(TGF- β , IGF, prolactin and placenta lactogen) methods. The results were as follows: Macroscopic observation after topical application of vehicle, 50% EtOH as control and extract of *Arisaematis Rhizoma* to the hair removed skin of C57BL/6N mice on the 9th, 11th and 15th day. Extensive hair growth activity was observed in treated group with extract of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th, 11th and 15th day. In *Arisaematis Rhizoma* extracts treated group, hair follicles of middle stage of anagen was observed and it were grown down to subcutaneous tissue of skin in all the normal mice on 15th day. But in control group, most of hair follicles of telogen phase was observed in skin. The treatment of extract of *Arisaematis Rhizoma* increased expression of IGF(145%) and placenta lactogen(108%) in the skin of normal C57BL/6N mice on the 11th day compared to control group(100%). But expression of TGF- β (90%) and prolactin(91%) decreased in the skin of normal C57BL/6N mice on the 11th day compared to control group(100%). After application of fractions(chloroform, ethyl acetate and water fractions) of *Arisaematis Rhizoma* extract for 9th day, hair growth effect was observed in whole skin area in 50% of normal mice. But in control group, hair growth effect was not observed in whole skin area of normal mice. Immunoreactive density of VEGF, c-kit, PKC- α and FGF in skin of fractions of *Arisaematis Rhizoma* extracts was strongly stained in epidermis, bulge, secondary hair germ cells, cutaneous trunci m., subcutaneous tissue, root sheath compare to control group on the 9th day. In spontaneous alopecia areata model, The hair growth activity of *Arisaematis Rhizoma* extrat treated group(75%) was observed to be strong compared to control group(0%) on 7th day. These experiments suggest that fractions and extracts of *Arisaematis Rhizoma* may stimulate the topical hair growth activity. Thus it can be useful for treatment of alopecia areata.

Key words : *Arisaematis Rhizoma*, hair growth, immunohistochemistry, VEGF, c-kit, PKC- α , TGF, FGF, RT-PCR, TGF- β , prolactin, IGF, placenta lactogen

서 론

모발은 피부 표면에서 생산된 가늘고 각질화 된 구조로서¹⁾,

* 교신저자 : 이창현, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학

· E-mail : chlee@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1559

· 접수 : 2009/04/27 · 수정 : 2009/05/20 · 채택 : 2009/06/08

외부충격에 대한 쿠션 역할과 더불어 직사광선, 한랭, 마찰, 위험 등 외부 자극으로부터 인체를 보호하고, 신체에 유해한 비소, 수은, 아연 등의 중금속을 체외로 배출하는 기능을 하며, 현대에 와서는 미용 측면도 강조되고 있다²⁾. 그러나 식생활의 변화나 내외적 스트레스 증가 및 여러가지 원인에 의해 탈모를 호소하는 사

털들이 늘어나고 있다.

탈모에 대한 한의학적 기록으로는 《黃帝內經》에서 髮墮, 髮落, 毛拔, 髮始墮, 髮去³⁾ 등으로 언급된 것을 비롯하여 毛落, 毛折⁴⁾, 鬚鬢禿落⁵⁾, 鬚髮禿落候, 白禿候, 赤禿候, 鬼舐頭候⁶⁾ 등의 다양한 용어로 많은 의서에 언급되어 왔다. 탈모에 대한 원인으로 한의학에서는 血熱^{7,8)}, 血瘀^{7,8)}, 氣血虛^{7,8)}, 肝腎不足⁷⁾, 脾胃氣虛⁹⁾, 肝鬱腎虛⁹⁾ 등으로 분류하였고, 서양의학에서는 국소감염¹⁰⁾, 내분비장애¹¹⁾, 유전인자¹²⁾, 자가면역^{13,14)} 등과 더불어 정신적인 외상 또는 정서적 압박도 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다¹⁵⁾.

털의 성장조절에는 protein kinase c- α ¹⁶⁾, stem cell factor¹⁷⁾ 등의 cytokine과 감각신경이 관여한다. 감각신경세포에서 분비되는 substance P는 신경세포체에서 합성되어 소포형태로 말초신경종말에 전달되며 혈액순환 조절, 샘분비 활동 및 피부염증 반응에 관여한다는 연구도 발표되고 있다^{18,19)}.

국내에서 한의학 관련 탈모에 대한 연구로는 문헌고찰^{20,21)} 및 다양한 약재를 사용하여 피부에 도포하는 방법으로 발모 효과에 관한 실험²²⁻²⁴⁾을 진행하여 왔다. 이처럼 모발 성장과 탈모에 대한 정확한 기전은 최근 세포생물학, 분자생물학 등 기초의학의 발달과 모발성장에 대한 연구 성과로 비약적인 발전을 이루고 있으며 이를 이용한 탈모억제 또는 발모촉진 소재의 탐색연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 실험에 사용되는 약물들의 특징은 피부자극을 유도하는 방법을 통해 치료를 시도하게 되는데, 한의학에서는 뜸 요법의 일종인 天灸와 같은 非火熱 灸法을 이용하여 좋은 효과를 보고 있다.

천구요법은 혈위나 환부 국소에 약물을 붙이거나 발라서 發泡를 일으켜 치료하는 것으로 발포약물로는 자극이 있는 모낭, 위령선, 반모, 한련초 등을 사용하며 드물게는 생반하와 생남성도 사용되었다²⁵⁻²⁸⁾. 특히 반하와 남성은 모두 같은 천남성과의 약물로 천남성은 피부에 소양감을 일으키는 약물²⁹⁾로 알려져 있다.

천남성은性は溫하고味는苦辛하며有毒³⁰⁾한 것이 특징인데, 主治로는化痰止咳, 化痰定癍, 消腫散結 등의 효능이 있는 약물로 특히 생남성의 외용치료는消腫散結, 解毒止痛의 효과³¹⁾가 있다. 천남성은 외과치료에 대하여發癰瘡, 惡瘡, 頭上生痛, 癩癧初起, 纏腰火丹, 陰癬, 贅疣, 身面疣子 등에 응용³²⁾하였다. 이러한 작용은 생남성의 분말이 피부에 대하여 경도의 자극성이 있고 점막에 대하여 경도의 미란을 일으키는 것을 활용한 것이다³¹⁾. 또한 천남성의 生品에 대한 독성 연구에서 치명적으로 강하지 않음을 확인³³⁾한 바, 탈모와 관련하여 두피에 적절한 자극을 주면서消腫散結 등의 효능이 모발 성장에 기여하는지를 알아보기 위하여 C57BL/6N 정상 생쥐와 이들의 성장과정에서 자발적으로 발생된 원형탈모 생쥐를 이용하여 천남성 추출물과 분획물을 피부에 도포하는 실험을 시도 한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 체중 25 g 내외의 수컷 7주령 C57BL/6N 정상

생쥐와 21주령 이상의 자발적으로 형성된 원형탈모 생쥐를 이용하였다. 천남성 추출물을 도포할 정상 생쥐를 이용한 실험군은 실험의 정확성을 위하여 모두 출생날짜가 유사한 생쥐를 대조군과 실험군 각각 5마리씩 배정하였다. 천남성 분획물을 도포할 정상 생쥐를 이용한 실험군은 실험의 정확성을 위하여 모두 출생날짜가 유사한 생쥐를 대조군 5마리, chloroform 층 4마리, ethyl acetate 층 4마리, 물 층 4마리로 배정하였다. 21주령 이상의 원형탈모 생쥐는 실험실에서 사육한 암컷 생쥐 중 원형탈모가 발생한 생쥐만을 선발하여 대조군과 실험군을 각각 5마리씩 배정하였다.

2) 도포약물의 조제

천남성 추출물은 시중에서 구입한 천남성(*Arisaematis Rhizoma*, 중국) 600 g을 분쇄하여 80% ethanol(EtOH) 용액 1000 ml를 넣고 3주간 침지시킨 후 여과하여 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 시료를 동결건조기를 이용하여 건조한 후 35 g(수득율은 5.83%)의 시료를 회수하였다. 천남성 분획물은 시중에서 구입한 천남성 1 kg을 분쇄하여 80% ethanol (EtOH)용액 1400 ml를 넣고 3주간 침지시킨 후 여과하여 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 시료를 동결건조기를 이용하여 건조한 후 56 g(수득율은 5.6%)의 시료를 회수하였다. 농축된 시료에 250 ml의 물을 넣은 후 동량의 chloroform 을 넣고 분획 깔대기에서 chloroform 층을 2회 분획하여 회수하였다. 회수된 chloroform 층을 감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결 건조하여 8 g의 분획물을 회수하였다. Chloroform으로 분획하고 남은 물층을 다시 ethyl acetate(EtOAc) 를 넣고 분획 깔대기에서 EtOAc 층을 3회 분획하여 회수하였다. 회수된 EtOAc층을 감압농축기를 이용하여 농축한 뒤 동결 건조하여 EtOAc 분획물 2 g을 회수하였다. 그 후 EtOAc로 분획하고 남은 물층을 감압농축기를 이용하여 농축한 뒤 동결 건조하여 물 층 분획물 46g을 회수하여 실험에 사용하였다. 천남성 추출물 도포액은 추출물 각각 3 g을 50% EtOH 용액 30 ml에 희석하여 피부에 도포하였으며, 천남성 분획물은 각각 2 g을 50% EtOH 용액 30 ml에 희석하여 실험에 사용하였다. 자발적인 원형탈모 생쥐에서의 천남성추출물의 발모현상을 관찰하기 위하여 정상 생쥐에서 사용하였던 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 도포방법

정상 생쥐를 이용한 실험에서는 animal clipper를 이용하여 털을 깎은 후에 정상적인 휴지기상태에 있는 생쥐만을 선발하여 실험군을 배정하였다. 또한 원형탈모 군에서는 탈모가 일어난 부위와 그 주위에 도포하였다. 모든 실험군에서 도포는 하루 2회씩 오전과 오후에 각각 1회씩 스프레이를 이용하여 뿌린 후에 면봉을 사용하여 3-4회 문질러 흡수를 촉진시켰다. 정상 생쥐를 이용한 실험에서 대조군에는 50% EtOH을 피부에 도포한 군을 대조군으로 하였으며, 각각의 실험군에는 천남성 추출물 또는 천남성 분획물을 피부에 도포하였다.

2) 관찰방법

(1) 정상생쥐에서 천남성 추출물 발모효과 관찰방법

피부의 육안 관찰방법은 정상적인 생쥐의 피부에서 일어나는 鬚毛와 관련된 특징들을 animal clipper로 털을 깎은 후 추출물을 도포하면서 9일, 11일 및 15일째 육안으로 관찰하면서 디지털 카메라를 이용하여 발모부위를 촬영하였다. 정상적인 생쥐의 피부조직 내 모낭의 변화를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 천남성 추출물을 도포한 후 11일째 1마리씩 희생시켜 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정하였다. 고정 후 일반적인 방법에 의하여 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매 하였으며, 포매 후 7 μ m의 절편을 제작하여 H&E 염색을 시행하였다. RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)은 역전사중합효소반응을 말한다. 정상적인 생쥐에 천남성추출물을 도포한 후 11일째에 피부를 적출하여 Deep freezer(-70°C)에 보관해 두었다가 피부조직 100 mg에 Trizol 1 ml을 넣어 homogenizer로 분쇄하였으며, 제조회사의 방법에 준하여 RNA를 추출하였다. 이 후 spectrophotometer를 이용하여 260, 280 nm에서 OD값을 측정하여 RNA를 정량화 했다. Total RNA 1 μ g으로 ImProm-II reverse transcriptase(Promegar M314A)를 이용하여 제조회사의 방법에 준하여 cDNA를 합성하였고, GoTaq(Promegar M712B)을 이용하여 thermal cycler (Perkin Elmer 2400, USA)에서 30 cycle 동안 증폭하였다. 각각의 cycle은 94°C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, primer에 따라 48-56°C에서 30 초간 annealing 시키고, 72°C에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기 영동하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다³⁴⁾. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. PCR primers

Target gene	Sequence	Amplicon size(bp)
GAPDH	forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'	177
	reverse 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'	
TGF- β	forward 5'-CCACAACGAAATCTATGACA-3'	245
	reverse 5'-ACTCCGCTGACATCAAAAGA-3'	
IGF-1	forward 5'-ACATCTCCCATCTCTCTGGA-3'	283
	reverse 5'-AAAGAGAGCACACCAGTCCA-3'	
PRL	forward 5'-CTCTCAGGCCATCTTGGAGAA-3'	68
	reverse 5'-GGCTGACCCCTGGCTGTT-3'	
PL	forward 5'-CTTGAGGTGCCGAGTTGTCTT-3'	99
	reverse 5'-GGAAAGCATTACAAGTCTGGTTCA-3'	

(2) 정상생쥐에서 천남성 분획물의 발모효과 관찰방법

피부의 육안적인 관찰은 정상적인 생쥐의 피부에서 일어나는 발모와 관련된 특징들을 animal clipper로 털을 깎은 후 분획물을 도포하면서 9일째 육안적으로 관찰하면서 디지털 카메라를 이용하여 발모부위를 촬영하였다. 정상적인 생쥐의 피부조직 내 모낭의 변화를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 천남성 분획물을 도포한 후 9일째에 2마리씩 희생시켜 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정하였다. 고정 후 일반적인 방법에 의하여 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매 하였으며, 포매 후 7 μ m의 절편을 제작하여 H&E 염색을 시행하였다. 피부조직 내 cytokine에 대한

면역조직화학적 관찰은 정상 생쥐에 천남성 분획물을 도포한 후 9일째에 희생시켜 피부조직 내 털의 성장과 관련된 여러가지 cytokine을 관찰하기 위하여 rabbit polyclonal antibody(Santa cruz)인 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), c-kit, PKC- α (Protein Kinase C- α), TGF(Transform Growth Factor) 및 FGF(Fibroblast Growth Factor) 등을 각각 1;100, 1;50, 1;50, 1;50, 1;50으로 희석한 1차 항체를 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편들은 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하며 Hsu 등³⁵⁾의 방법에 따라 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc.)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 15분간 2회 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3'-diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 hematoxylin으로 20초간 대조염색한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 자발적인 원형탈모 생쥐에서 천남성 추출물의 발모효과 관찰방법

자발적인 원형탈모 생쥐의 피부에서 일어나는 발모상황을 살펴보기 위하여 천남성 추출물을 도포하면서 7일째까지 대조군과 비교 관찰하며 육안으로 확인하고 디지털 카메라를 이용하여 발모부위를 촬영하였다.

결 과

1. 정상 생쥐에서 천남성 추출물의 발모현상

1) 천남성 추출물의 발모현상에 대한 육안 관찰

정상 생쥐에서 천남성 추출물을 이용하여 발모효과를 관찰하기 위하여 정상 생쥐 등쪽 부위의 털을 animal clipper로 짧게 깎은 후에 50% EtOH 을 도포한 대조군과 천남성 추출물을 도포한 실험군으로 나누어 15일 동안 도포한 결과, 털을 깎은 후 50% EtOH 을 9일째 도포한 대조군에서는 5마리 모두 육안으로 발모 현상은 전혀 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 도포한 군에서는 피부가 희색으로 변하는 발모현상을 5마리 가운데 2마리에서는 전체적으로 관찰되었고, 3마리에서는 부분적인 발모현상이 관찰되었다. 털을 깎은 후 50% EtOH 을 11일째 도포한 대조군에서는 5마리 모두 육안으로 발모 현상은 관찰할 수 없었고, 천남성 추출물을 도포한 군에서는 5마리 모두 털을 깎은 부위 전체 또는 일부에서 발모현상이 관찰되었다. 털을 깎은 후 50% EtOH 을 15일째 도포한 대조군에서는 4마리 모두 육안으로 발모 현상은 관찰할 수 없었고(Fig. 1a), 천남성 추출물을 도포한 군에서는 4마리 모두 털을 깎은 부위 전체 또는 일부에서 발모현상이 관찰

되었다(Fig. 1b).

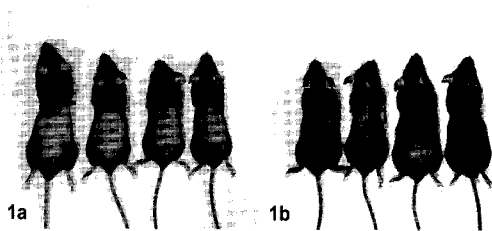


Fig. 1. Macroscopic observation after topical application of vehicle, 50% EtOH as control(1a), extracts of *Arisaematis Rhizoma* (1b) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on the 15th day. Extensive hair growth activity was observed in treated group with extracts of *Arisaematis Rhizoma*.

2) 전남성 추출물의 발모현상에 대한 광학현미경적 관찰

정상 생쥐의 털을 깎고 실험 11일째까지 대조군과 실험군에 각각 50% EtOH과 전남성 추출물 도포군으로 나누어 도포한 후 희생시켜 조직절편을 제작하여 H&E염색을 시행하여 모낭의 변화를 관찰하였다. 50% EtOH을 도포한 대조군에서는 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다(Fig. 2a). 그러나 전남성 추출물을 도포한 군에서는 전체적으로 성장기 중기나 후기의 모낭으로서 모낭들은 피하층까지 성장하였다(Fig. 2b).

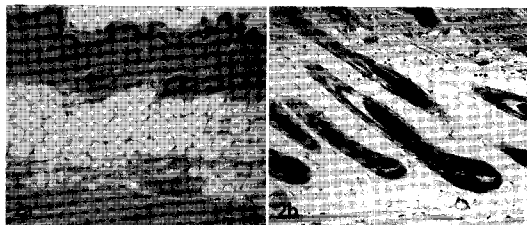


Fig. 2. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(2a) and extracts of *Arisaematis Rhizoma*(2b) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on the 11th day(H&E, X100).

3) 전남성 추출물의 피부조직 내 TGF-β, IGF, prolactin 및 placenta lactogen에 대한 RT-PCR 관찰

발모효과를 관찰하기 위하여 전남성 추출물을 도포한 후 털의 성장과 관련된 cytokine과 호르몬들의 발현량을 관찰한 바 TGF-β의 발현은 대조군에 비하여 전남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 90%정도였고(Fig. 3a), IGF의 발현은 대조군에 비하여 전남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 145%정도였다(Fig. 3b). Prolactin(PRL)의 발현은 대조군에 비하여 전남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 약 91%정도였고(Fig. 3c) placenta lactogen(PL)의 발현은 대조군에 비해 전남성 추출물을 11간 도포한 군에서 약 108%정도로 나타났다(Fig. 3d).

2. 정상 생쥐에서 전남성 분획물의 발모현상

1) 전남성 분획물의 발모현상에 대한 육안 관찰

정상 생쥐의 털을 깎고 9일간 전남성 분획물을 도포한 결과 대조군에서는 어떠한 발모현상도 관찰할 수 없었다. 그러나

Chloroform 분획층에서는 4마리 가운데 2마리에서만 전체적으로 발모현상을 관찰하였다. Ethyl acetate 분획층에서는 4마리 가운데 2마리는 전체적인 발모현상이 관찰되었고, 1마리는 부분적인 발모현상이 관찰되었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서는 4마리 모두 발모현상을 관찰하였으나 2마리는 전체적으로 나머지 2마리는 부분적인 발모현상이 관찰되었다.

2) 전남성 분획물의 일반 광학현미경적 관찰

정상 생쥐에 전남성 분획물을 9일간 도포한 후 희생시켜 조직 절편을 제작하여 H&E 염색을 시행하여 모낭의 변화를 관찰하였다. 50% EtOH을 도포한 대조군에서는 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다(Fig. 4a). Chloroform 분획층에서는 휴지기에서 성장기 중기로 성장하여 피부의 피하층까지 성장 한 후 모간이 다시 진피층까지 성장하고 있는 단계였다(Fig. 4b). Ethyl acetate 분획층에서는 휴지기에서 성장기 중기로 분화하는 단계로서 모낭이 성장하여 진피층에서 모간이 관찰되었다(Fig. 4c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서는 발생중인 성장기 중기의 모낭들이 성장하여 모간이 진피층에서 주로 관찰되었고, 일부 모낭의 모간이 진피층에서도 관찰되었다(Fig. 4d).

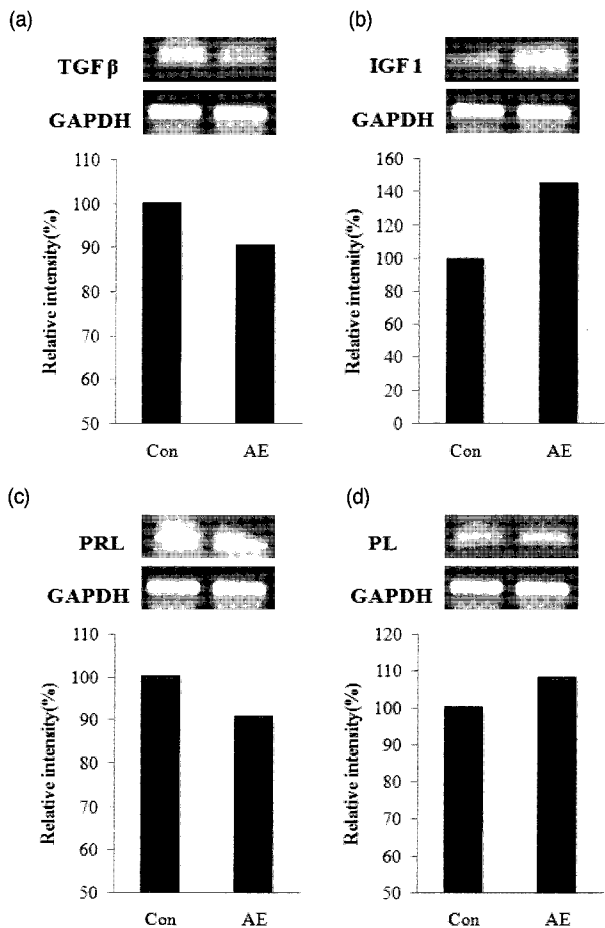


Fig. 3. Comparison of TGF-β(a), IGF(b), PRL(prolactin, c) and PL(placenta lactogen, d) expression after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(Con) and extracts of *Arisaematis Rhizoma*(AE) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on the 11th day.

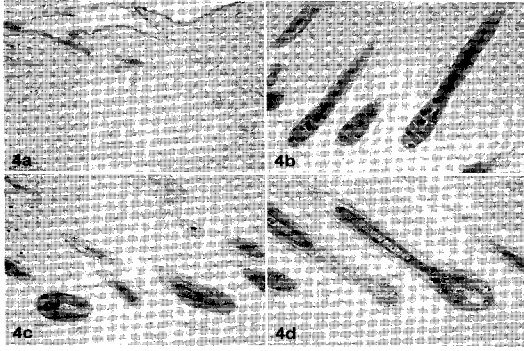


Fig. 4. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(4a), chloroform fraction(4b), ethyl acetate fraction(4c) and water fraction(4d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(H&E, X100).

3) 천남성 분획물의 피부조직 내 cytokine에 대한 면역조직화학 염색 관찰

정상 생쥐에 천남성 분획물을 9일간 도포한 후 희생시켜 조직절편을 제작하여 면역조직화학 염색법에 의하여 피부에서의 여러가지 사이토카인의 변화를 관찰하였다.

(1) VEGF 면역조직화학적 염색에 대한 관찰

대조군에서의 VEGF에 표지된 분화세포들은 표피, bulge, secondary hair germ cell의 상피세포 및 동피근에서 미약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 5a). Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 VEGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장중에 있는 모낭의 내외모근초에 강한 면역 반응을 나타내었다(Fig. 5b). Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 VEGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 강하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 5c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 불층에서의 VEGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강하게 표지되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 5d).

(2) c-kit 면역조직화학적 염색에 대한 관찰

대조군에서의 c-kit에 표지된 분화세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포 및 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에서 미약하게 표지되었다(Fig. 6a). Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 c-kit에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서는 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장중에 있는 모구와 내,외모근초 및 모구에서도 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 6b). Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 c-kit에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 중등도의 염색성을 나타내었으며,

진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 6c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 불층에서의 c-kit에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 중등도의 염색성이 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서 미약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 6d).

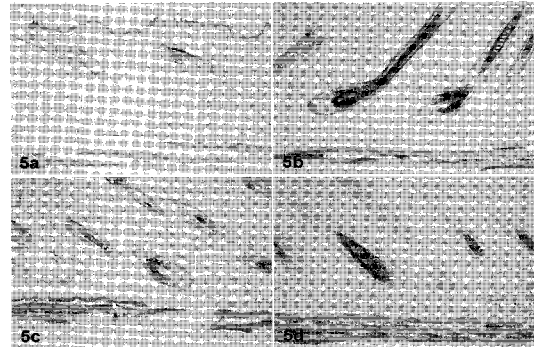


Fig. 5. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(5a), chloroform fraction(5b), ethyl acetate fraction(5c) and water fraction(5d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(VEGF immunoreaction, X100).

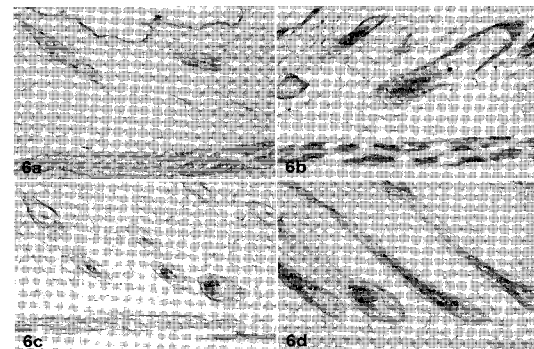


Fig. 6. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(6a), chloroform fraction(6b), ethyl acetate fraction(6c) and water fraction(6d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(c-kit immunoreaction, X100).

(3) PKC-α 면역조직화학적 염색에 대한 관찰

대조군에서의 PKC-α에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포, 진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에는 미약하게 표지되었다(Fig. 7a). Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 PKC-α에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 7b). Ethyl

acetate 분획물을 도포한 군에서의 PKC- α 에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포들은 미약하게 관찰되었으나 피하층 아래에 위치한 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 7c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 PKC- α 에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 7d).

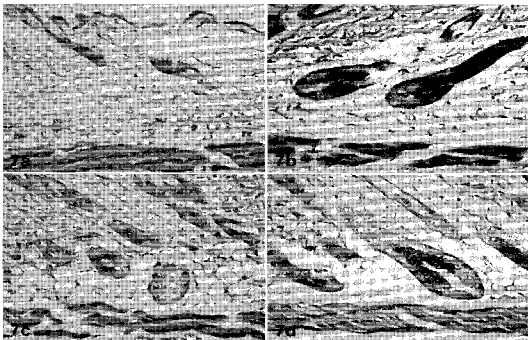


Fig. 7. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(7a), chloroform fraction(7b), ethyl acetate fraction(7c) and water fraction(7d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(PKC- α immunoreaction, X100).

(4) TGF 면역조직화학적 염색에 대한 관찰

대조군에서의 TGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포, 진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에는 미약하게 표지되었다(Fig. 8a). Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 TGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 미약한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포에서도 미약하게 관찰되었다. 그러나 피하층 아래에 위치한 동피근과 성장중에 있는 모간의 외모근초에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 8b). Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 TGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었다(Fig. 8c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 TGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 미약한 면역반응을 나타내었다. 그러나 성장중에 있는 모낭의 외모근초에서는 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 8d).

(5) FGF 면역조직화학적 염색에 대한 관찰

대조군에서의 FGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포에서 강하게 염색되었으나,

진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에서는 중등도로 표지되었다(Fig. 9a). Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 FGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 중등도의 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서는 미약한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장중에 있는 모구와 내,외모근초에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다(Fig. 9b). Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 FGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 강하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서는 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 강한 면역반응을 나타내었다(Fig. 9c). Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 FGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 미약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 미약한 면역반응을 나타내었다(Fig. 9d).

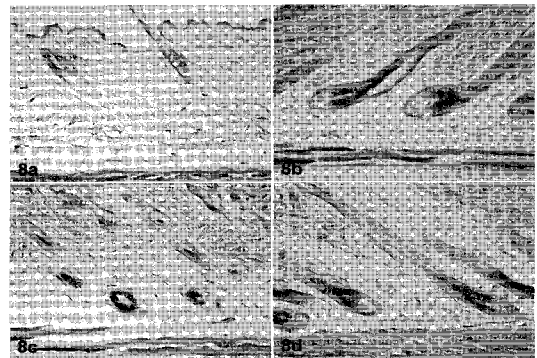


Fig. 8. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(8a), chloroform fraction(8b), ethyl acetate fraction(8c) and water fraction(8d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(TGF immunoreaction, X100).

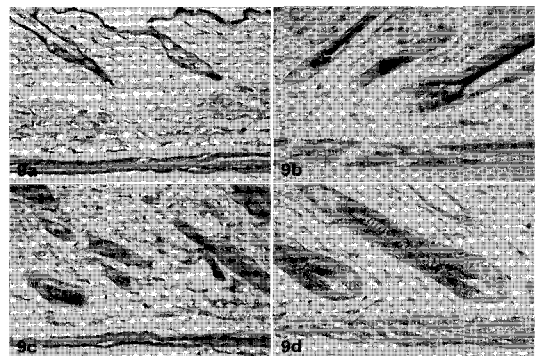


Fig. 9. Longitudinal section of C57BL/6N mice after topical application of vehicle, 50% EtOH as a control(9a), chloroform fraction(9b), ethyl acetate fraction(9c) and water fraction(9d) of extracts of *Arisaematis Rhizoma* on the 9th day(FGF immunoreaction, X100).

3. 자발적인 원형탈모 생쥐에서 천남성 추출물의 발모효과의 육안적인 관찰

자발적인 원형탈모 생쥐에서 50% EtOH을 도포한 대조군과 천남성 추출물을 7일간 도포한 실험군에서의 발모효과를 육안적으로 관찰한 결과 실험 개시 전 대조군과 천남성 추출물 도포군을 7일 동안 피부에 도포하면서 육안으로 발모현상을 관찰한 결과, 대조군에서는 5마리 모두 발모현상을 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 7일간 도포한 실험군에서는 5마리 가운데 3마리에서 발모현상이 관찰되었다.

고 찰

식생활의 변화나 내외적 스트레스 증가를 비롯한 여러가지 원인에 의해 탈모와 박모를 호소하는 사람들이 늘어나고 있다. 탈모는 한방에서 원형탈모와 지루성탈모로 크게 나누어지는데, 원형탈모증은 모발이 갑자기 얼룩 모양으로 빠지는 것이며 심하면 머리 전체가 빠지는 '禿禿'이나 전신의 모발이 모두 빠지는 '普禿' 등도 있다. 또한 지루성탈모는 '禿髮'이라 불리는데, 청년기에 시작하여 앞머리, 앞머리, 뒷머리 순으로 진행 된다³⁶⁾.

모발 성장과 탈모에 대한 정확한 기전은 최근 세포생물학, 분자생물학 등 기초의학의 발달과 모발성장에 대한 연구 성과로 비약적인 발전을 이루고 있으며, 이를 이용한 탈모억제 또는 발모촉진 소재의 탐색연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 실험에 사용되는 약물들의 특징은 피부자극을 유도하는 방법을 통해 치료를 시도하게 되는데, 한의학에서는 뜸 요법의 일종인 천구요법은 혈위나 환부 국소에 약물을 붙이거나 발라서 發泡를 일으켜 치료하는데, 특히 생남성의 분말은 피부에 대하여 경도의 자극성이 있고 점막에 대하여 경도의 미란을 일으키고³¹⁾, 또한 천남성의 生品에 대한 독성 연구에서 치명적으로 강하지 않음을 확인³³⁾한 바, 탈모와 관련하여 두피에 적절한 자극을 주면서 消腫散結 등의 효능이 모발 성장에 기여하는지를 알아보기 위하여 C57BL/6N 정상 생쥐와 이들의 성장과정에서 자발적으로 발생된 원형탈모 생쥐를 이용하여 천남성 추출물과 분획을 피부에 도포하는 실험을 시도 한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

본 실험에서는 체중 25 g 내외의 수컷 7주령 C57BL/6N 정상 생쥐와 21주령 이상의 자발적으로 형성된 원형탈모 암컷 생쥐를 이용하였다. C57BL/6N 정상 생쥐의 경우 태어나서 털이 나기 시작하여 생후 4주 전후가 되면 털갈이를 하게 되는데, 4주 전후에 털갈이가 이루어지고 나서 이후 털을 깎게 되면 더 이상 특별한 자극이 없는 한 휴지기(telogen)를 유지하는데, 털은 자발적 또는 인위적인 자극에 의하여 휴지기에서 성장기(anagen)로 유발되므로, 특히 인위적인 자극에 의하여 털을 성장기로 유발시킬 때에는 피부에 상처를 내게 한다^{37,38)}. 피부에 외상과 상처를 일으키는 방법에는 털을 뽑거나, 면도를 심하게 하거나 화학물질(부식시키는 물질이나 제모제) 등에 노출시켜 유발시키므로³⁹⁾ 본 연구에서도 이러한 방법으로 털을 제거하였다.

정상 생쥐에서 천남성 추출물의 육안적인 발모효과를 관찰

한 바 animal clipper로 털을 깎은 후 50% EtOH을 9일째, 11일째, 15일째까지 도포한 대조군 모두에서는 육안으로 발모현상을 전혀 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 도포한 군에서는 9일째 피부가 회색으로 변하는 발모현상을 5마리 가운데 2마리에서는 전체적으로 관찰되었고, 3마리에서는 부분적인 발모현상이 관찰되었으며, 11일째에는 5마리 모두 털을 깎은 부위 전체 또는 일부에서 발모현상이 관찰되었고, 15일째에는 4마리 모두 털을 깎은 부위 전체 또는 일부에서 발모현상이 관찰되었다. 대조군의 경우 휴지기로 접어들어 인위적인 자극이 없는 한 발모가 일어나지 않아 50% EtOH의 도포에는 특별한 반응이 없었던 것으로 이해된다. 그러나 천남성 추출물을 도포한 정상 생쥐에서 뚜렷한 발모현상이 관찰됨으로써 천남성 추출물에는 발모를 촉진하거나 유도하는 물질이 함유되어 있음을 추측할 수 있었다.

정상 생쥐에서 천남성 추출물의 발모현상에 대한 피부조직 내 모낭의 광학현미경적으로 관찰한 바 50% EtOH을 도포한 대조군에서는 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 도포한 군에서는 전체적으로 성장기 중기나 후기의 모낭으로서 모낭들은 피하층까지 성장하였다. 모낭은 모낭주기에 따라 증식과 구조적 변화를 겪고 있는데, 성장기에는 모간으로 발생하기 위하여 모구의 각질세포의 많은 증식이 일어나고 퇴행기에는 하부 모낭세포가 apoptosis를 일으켜 모낭의 수축을 야기 시켜 휴지기 상태가 되는데⁴⁰⁾, 휴지기 이후에는 모낭의 재생을 위하여 새로운 모낭세포들은 모낭 내에 항상 존재하는 세포로서 휴지기에는 bulge에 있는 세포에서 secondary hair germ cell을 발생 시킨다⁴¹⁾. 본 실험에서 대조군은 휴지기 모낭이 확인되었으며 천남성 추출물을 도포한 실험군에서는 성장기 모낭으로 성장하고 있음을 알 수 있었다.

정상 생쥐에서 천남성 추출물 도포 후 피부조직 내 TGF- β , IGF, prolactin 및 placenta lactogen에 대한 RT-PCR 관찰을 위해 추출물을 도포한 후 11일째에 피부를 적출하여 RNA를 추출과 정량화를 한 후 cDNA 합성과 증폭을 거친 후 전기영동 및 염색을 한 후 관찰한 바 TGF- β 의 발현은 대조군에 비하여 천남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 90%정도였고, IGF의 발현은 대조군에 비하여 천남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 145%정도였다. Prolactin(PRL)의 발현은 대조군에 비하여 천남성 추출물 도포군이 약 91%정도였고, placenta lactogen(PL)의 발현은 대조군에 비해 천남성 추출물 도포군이 약 108%정도로 나타났다. 모낭의 성장에는 TGF- β , IGF, prolactin 및 placenta lactogen 등이 중요한 역할을 하는데, 우선 TGF- β 는 모낭주기 중 퇴행기의 유도에 중요한 역할을 한다⁴²⁾. 모낭의 기질 내에 유도되어 기질세포의 apoptosis를 일으켜 성장기의 모낭을 퇴행기로 유발한다. 즉 TGF- β 의 양이 증가하면 털의 기질세포와 외모근초 세포들이 apoptosis를 유도하며 이는 휴지기 모낭이 증가하며 성장기 모낭이 퇴행기 모낭으로 바뀌게 되고 모낭 재생이 불완전하여 재생된 모낭의 크기가 축소하여 쉽게 빠지며 가늘고 짧은 모발이 생성 된다⁴³⁾. 따라서 TGF- β 는 모낭의 성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다. 최근 procyanidin은 와인에 많이 함유되어 있는 것으로 발모에 효과를 보이고 이런 효과가 성장기 모발이 휴지기

상태의 모발로 이행될 때 모발 세포에서 일어나는 TGF- β 신호를 차단함으로써 휴지기 모발로 이행되지 않고 성장기 모발로 남아 있게 하여 결과적으로 모발이 계속 성장할 수 있게 해준다는 결과도 보고되고 있다^{44,45}. 본 연구에서는 TGF- β 는 대조군에 비해 약간 적게 발현되었는데, 이것은 휴지기 모발로 이행되지 않고 성장기 모발이 유지되게끔 탈모를 억제하는 효과가 천남성에 있을 것으로 추측된다. IGF는 인슐린양 성장인자로 털의 성장과 피부의 탄력을 증가시키는 효과가 있는 것으로 최근 연구에서 탈모가 진행 중인 모발에서는 남성호르몬이 DDK-1 (Dickkopf-1)의 생성을 유도하며 모발세포의 사멸을 야기하지만, 수염에서는 남성호르몬이 DDK-1을 유도하지 않았으며 오히려 세포성장에 관여하는 IGF의 발현을 증가 시켰다고 보고하였다^{46,47}. 이렇듯 IGF는 털의 성장에 도움이 되는 것으로 본 연구에서도 IGF의 발현은 대조군에 비하여 천남성 추출물을 11일간 도포한 군에서 무려 145%정도 강하게 발현되었음을 알 수 있었다. 이것은 천남성이 발모를 유도하고 있음을 추측할 수 있다. Prolactin 역시 털의 성장조절에 관여하는데, prolactin은 뇌하수체 이외의 태반, 유선, 뇌 및 림프구에서 많이 발견되는 것으로 모낭의 성장과 발생을 조절한다. 모낭주기의 휴지기에서는 약한 면역반응을 나타내며, 성장기 초기와 말기에는 내,외모근초에서 강한 면역반응을 나타낸다고 하였다⁴⁸. 본 연구에서 prolactin의 발현이 대조군에 비해 천남성추출물 도포군에서 적게 발현되고 있었다. 이것은 아마도 대조군은 이미 휴지기과정에 있었고 천남성추출물 도포군은 초기를 지나 중기에 접어들고 있어 발현이 적었을 것으로 추측되며, 다만 prolactin의 경우는 그 양이 증가가 되면 털같이 내지는 탈모로 전환될 가능성이 있기에 prolactin의 양이 많아지지 않는 것이 탈모억제에는 더욱 효과적일 것이라 생각된다. 또한 placenta lactogen의 발현에 대해서도 털을 뽑은 후 3일째에 20배 정도 증가한 후 빠르게 감소하여 퇴행기에는 다시 급격히 감소한다고 보고한 결과⁴⁹와 비교하면 본 실험의 발현량의 증가와 관계있는 것으로 생각된다. PCR을 통해 본 연구에서는 IGF와 placenta lactogen는 강하게 발현되었는데, 발모 현상은 육안으로 확인하였으나 TGF- β 와 prolactin은 기존의 반묘와 골쇄보 추출물⁵⁰에 비해서는 발현이 적었던 것을 확인하였고, IGF와 placenta lactogen에는 강하게 발현되어 적절하게 발모에 영향을 주고 있는 것을 알 수 있었다.

천남성 분획물의 발모효과 실험에서 피부의 육안적인 관찰은 정상적인 생쥐의 피부에 천남성 분획물을 도포한 후 9일째에 육안적으로 관찰한 결과 대조군에서는 어떠한 발모현상도 관찰할 수 없었다. 그러나 chloroform 분획층에서는 4마리 가운데 2마리에서만 전체적으로 발모현상을 관찰하였고, ethyl acetate 분획층에서는 4마리 가운데 2마리는 전체적인 발모현상이 관찰되었고, 1마리는 부분적인 발모현상이 관찰되었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서는 4마리 모두 발모현상을 관찰하였으나 2마리는 전체적으로 나머지 2마리는 부분적인 발모현상이 관찰되었다. 정상 생쥐에서 천남성 분획물의 광학현미경적 관찰은 50% EtOH을 도포한 대조군에서는 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으나. Chloroform 분획층

에서는 휴지기에서 성장기 중기로 성장하여 피부의 피하층까지 성장 한 후 모간이 다시 진피층까지 성장하고 있는 단계였다. Ethyl acetate 분획층에서는 휴지기에서 성장기 중기로 분화하는 단계로서 모낭이 성장하여 진피층에서 모간이 관찰되었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서는 발생중인 성장기 중기의 모낭들이 성장하여 모간이 진피층에서 주로 관찰되었고, 일부 모낭의 모간이 진피층에서도 관찰되었다. 일반 광학현미경상에서도 천남성 추출물과 유사하게 발모가 진행되는 것을 확인 할 수 있었으며 특히, chloroform 분획층, ethyl acetate 분획층 및 물층 전반에 걸쳐서 발모가 진행되고 있는 것을 알 수 있었다. 피부조직 내 cytokine에 대한 면역조직화학염색 관찰을 위해 정상 생쥐에 천남성 분획물을 도포한 후 9일째에 희생시켜 피부조직 내 털의 성장과 관련된 rabbit polyclonal antibody(Santa cruz)인 vascular endothelial growth factor(VEGF), c-kit, protein kinase C- α (PKC- α), TGF 및 FGF를 이용하였다. Cytokine은 세포의 성장과 분화에 필수적인 요소가 되는데, 털의 성장에서도 중요한 역할을 한다. Stem cell factor(SCF)를 포함한 cytokine들은 여러 가지가 존재하는데, 본 연구에서는 VEGF, c-kit, PKC- α , TGF, FGF 등에 대하여 면역조직화학염색을 통해 관찰하였다. 모낭과 모구의 진피유두에는 모낭줄기세포들이 존재하여 많은 혈관과 신경들이 분포하고 최적의 성장환경을 만들어 주기 위하여 다양한 cytokine을 분비한다. 털을 지배하는 혈관들은 털의 성장주기에 따라 변화하는데 성장기에 최대로 분포하며 퇴화기에는 대부분의 모세혈관이 붕괴되거나 사라진다. 털의 성장주기별 혈관분포의 변화는 혈관재생에 관여하는 VEGF에 의하여 내피세포의 활성을 유도하거나 증식 및 이주에 관여하며 혈관재생에 필요한 기질의 단백질용해와 관련된 단백질분해효소(protease)생산을 자극하고 혈관 투관성을 향진시킨다⁴⁹. 본 실험에서 VEGF 면역조직화학적 염색에 대한 관찰에서는 대조군에서 VEGF에 표지된 분화세포들은 표피, bulge, secondary hair germ cell의 상피세포 및 동피근에서에서 미약한 면역반응을 나타내었다. Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 VEGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모낭의 내,외모근초에 강한 면역 반응을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 VEGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 강하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 VEGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강하게 표지되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서 강한 면역반응을 나타내었다.

c-kit는 kit-tyrosine kinase receptor를 가진 피부의 비만세포와 melanocyte의 성숙과 증식을 조절하는 물질로 상피 혹은 간엽에서 유래한 stem cell factor에 반응한다. 이러한 인자들은 생

장기 모낭에서 강한 면역반응을 나타내며, 주로 색소침착부위나 진피유두에 강한 양성반응을 나타낸다고 하였고 털의 성장주기에 의존적으로 강하게 반응을 한다고 하였다⁵⁹⁾. 본 연구의 대조군에서 c-kit에 표지된 분화세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포 및 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에서 미약하게 표지되었다. Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 c-kit에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서는 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초 및 모구에서도 강한 면역반응을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 c-kit에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 중등도의 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 c-kit에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 중등도의 염색성이 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서 미약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 중등도의 면역반응을 나타내었다.

PKC- α 는 protein kinase C- α 로 털의 성장에 중요한 역할을 하는데, 피부를 자극하면 털의 성장을 촉진하고 털의 생장기 중기와 말기에 피부 내 농도가 증가하며 퇴행기로 이행하면 감소하게 된다. PKC- α 의 증가는 주로 털의 외모근초의 각질세포에서 과발현 된다고 하였다⁶⁾. 즉, 발현이 강하면 발모상태와 연관이 깊은 것으로 인식할 수 있는 것이다. 본 연구에서도 대조군에서의 PKC- α 에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포, 진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에는 미약하게 표지되었다. Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 PKC- α 에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 강한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 강한 면역반응을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 PKC- α 에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포들은 미약하게 관찰되었으나 피하층 아래에 위치한 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 PKC- α 에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 약한 면역반응을 나타내었다.

TGF는 면역조직화학적 염색에 대한 관찰에 있어서는 대조

군에서의 TGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포, 진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에는 미약하게 표지되었다. Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 TGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 미약한 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포에서도 미약하게 관찰되었다. 그러나 피하층 아래에 위치한 동피근과 성장 중에 있는 모간의 외모근초에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 TGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물 층에서의 TGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 미약한 면역반응을 나타내었다. 그러나 성장 중에 있는 모낭의 외모근초에서는 강한 면역반응을 나타내었다. 앞서 언급한대로 TGF- β 는 모낭주기 중 퇴행기의 유도에 중요한 역할을 하는데⁴²⁾, 모낭의 기질 내에 유도되어 기질세포의 apoptosis를 일으켜 성장기의 모낭을 퇴행기로 유발한다. 본 실험에서는 천남성을 분획하여 Chloroform과 ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서는 대조군과 유사하게 반응되어 강한 발현은 물 층 외에 없는 것으로 관찰되었다. 이에 대한 부분은 조금 더 확실한 데이터를 얻기 위하여 반복 실험과 도포과정의 기간에 따른 실험을 통하여 기전을 확인하는 것이 중요할 것으로 보인다. 다만, 현 실험 결과로 천남성이 적절하게 TGF를 저해하는 것으로 추측되어 진다.

FGF는 섬유아세포 증식인자로 혈관내피세포의 증식을 유도하는데, 발현이 많이 될수록 발모 혹은 양모에 도움이 되는 것을 알 수 있는 바, 면역조직화학적 염색에 대한 관찰에서 대조군은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell의 상피세포에서 강하게 염색되었으나, 진피층, 진피층과 피하층의 경계에 있는 세포에서는 중등도로 표지되었다. Chloroform 분획물을 도포한 군에서의 FGF에 표지된 세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에 중등도의 염색성을 나타내었으며, 진피층과 피하층에 있는 세포와 피하층 아래에 위치한 동피근에서는 미약한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장 중에 있는 모구와 내, 외모근초에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물을 도포한 군에서의 FGF에 표지된 세포들은 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 강하게 관찰되었으며, 진피층과 피하층의 경계와 피하층 아래에 위치한 동피근 및 성장 중에 있는 모구와 내,외모근초에서도 강한 면역반응을 나타내었다. Chloroform과 ethyl acetate로 분획하고 남은 물층에서의 FGF에 표지된 분화세포들은 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge 및 secondary hair germ cell에서 미약하게 관찰되었으며, 진피층의 일부 세포, 진피층과 피하층의 경계 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서도 미약한 면역반응을 나타내었다. 또한 성장 중에 있는 모구와 내, 외모근초에서도 미약한 면역반응을 나타내었다. 즉, Chloroform

과 ethyl acetate에서 분획된 물질이 물 층에 비해 발모에 영향을 주는 것으로 보이며 적절한 분획을 통해서 발모와 관련된 물질을 찾는데 초보적인 연구로써 의미를 생각해 볼 수 있다.

자발적인 원형탈모 생쥐에서 천남성 추출물의 발모효과에 대한 육안적인 관찰을 위해 털을 깎은 후 50% EtOH을 도포한 대조군과 천남성 추출물을 7일간 도포한 실험군을 관찰한 결과, 실험 개시 전 대조군과 천남성 추출물 도포군을 7일 동안 피부에 도포하면서 육안으로 발모현상을 관찰한 결과, 대조군에서는 5마리 모두 발모현상을 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 7일간 도포한 실험군에서는 5마리 가운데 3마리에서 발모현상이 관찰되었다. 즉 자발적으로 발생한 원형탈모 생쥐에서도 천남성 추출물은 발모가 비교적 양호하게 되는 것을 보여주고 있다.

이상의 결과로 볼 때, 정상생쥐에서 천남성 추출물과 분획물, 자발적 원형탈모 생쥐에서 천남성 추출물은 각각 대조군에 비해 육안으로 확인 가능한 정도의 충분한 발모가 이루어진 것으로 보이며, 도포과정에서 대조군에 비하여 천남성을 사용한 군에서 경도의 피부자극과 상처를 유발한 것이, 외상과 상처에 의하여 세포의 괴사와 염증을 유발하여 직접 털의 성장기를 유발시키는 proinflammatory cytokine을 방출하여 발모를 유발시킬 수 있다는 것과 연관성이 있을 것으로 생각 된다^{52,53}. 또한 천남성 추출물이 발모에 영향을 주는 과정에서 외용 도포에 의한 발포를 유발하거나 자극을 주는 것이 기존에 밝혀진 바와 같이 반하, 천남성, 백부자 등의 천남성과의 약재 분말의 독특한 결정체에 기인한 것으로 유추되기도 하며⁵⁴⁻⁵⁷, 한편으로는 단순히 자극만으로 발모가 이루어진다면 과거의 다양한 자극방법을 통해서도 그 성과가 있어야 했으나 좋은 결과를 얻지 못하였던 것을 살펴볼 때 천남성 내에 특별한 성분이 발모에 작용했음을 유추할 수 있다. 그리고 천남성이 탈모를 줄이는 작용도 있지만 發毛나 養毛의 유도 역할이 강한 것으로 생각되며 발포 작용을 통해 적절한 농도를 유지한다면 적당한 자극과 혈관을 확장시켜 혈액공급을 늘려 줌으로써 活血과 行血의 기능을 양호하게 만들 수 있음^{54,57,58}을 생각할 수 있었다. 이에 본 연구에서 천남성에 대한 발모연구를 통해 천남성이 일정한 효과가 있음을 확인한 것을 바탕으로 추후에는 정확한 성분은 무엇이며 어떤 제형으로 외용할 수 있는지에 대하여 보다 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

C57BL/6N 생쥐에서 천남성 추출물과 분획물을 이용하여 발모에 미치는 영향을 실험적 연구를 통하여 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

정상 생쥐에서 천남성 추출물의 발모현상에 대한 육안적 관찰에서 대조군에 비해 천남성 추출물을 도포한 군에서 뚜렷한 발모현상이 관찰되었다. 정상 생쥐에서 천남성 추출물의 발모현상에 대한 일반적인 광학현미경 관찰에서 대조군은 휴지기 모낭으로 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으나, 천남성 추출물을 도포한 군에서는 전체적으로 성장기 중기나 후기의 모낭으로서 모낭들은 피하층까지 성장한 것을 확인할 수 있었다. 정상 생쥐에서

천남성 추출물 도포 후 피부조직 내 TGF-β, IGF, prolactin 및 placenta lactogen에 대한 RT-PCR 관찰에서 TGF-β의 발현은 대조군에 비하여 천남성 추출물 도포군에서 90%, IGF는 145%, Prolactin은 91%, placenta lactogen은 108%정도였다. 정상 생쥐에서 천남성 분획물의 발모현상에 대한 육안 관찰에서 대조군에서는 어떠한 발모현상도 관찰할 수 없었으나 chloroform, ethyl acetate 분획층과 물층에서 발모현상이 관찰되었다. 정상 생쥐에 천남성 분획물의 일반 광학현미경적 관찰에서 대조군은 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으나 chloroform, ethyl acetate 분획층과 물층에서 휴지기에서 성장기로 분화하는 모낭이 관찰되었다. 정상 생쥐에서 천남성 분획물의 피부조직 내 cytokine에 대한 면역조직화학 염색을 관찰한 결과 chloroform 층 및 ethyl acetate 분획층 및 물층에서 대조군에 비해 VEGF, c-kit, PKC-α, FGF 등은 강하게 발현되었고, TGF는 물층을 제외하고 미약하게 발현되었다. 자발적 원형탈모 생쥐에서 천남성 추출물의 발모효과의 육안적 관찰에서 대조군에 비해 천남성 추출물을 도포한 군에서 발모현상을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 천남성은 발모를 촉진하거나 유도하는 물질이 함유되어 있음을 추측할 수 있다. 향후에는 탈모억제 또는 발모와 관련된 정확한 천남성의 성분은 무엇이며, 어떤 제형으로 외용에 응용할 수 있는지에 대하여 보다 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 학술진흥재단의 지원(KRF-2007-E00170)과 2009년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 연구되었습니다.

참고문헌

- Gartner, L.P., Hiatt, J.L. Color textbook of histology(3rd), Elsevier, pp 339-340, 2007.
- 최근희 외 11인. 모발과학. 서울, 수문사, pp 8-14, 2001.
- 楊維傑 編. 黃帝內經素問譯解. 台聯國風出版社, 일중사(영인본), pp 6-7, 94, 1991.
- 최승훈 譯. 難經入門. 서울, 법인문화사, p 93, 147, 1998.
- 葛洪. 肘後備急方. 北京, 人民衛生出版社, p 121, 1982.
- 巢元方. 諸病源候論校釋. 北京, 人民衛生出版社, pp 761-767, 1983.
- 朱仁康. 脫髮証治. 中醫雜誌 2(12): 46, 1986.
- 李林. 實用中醫皮膚病學. 北京, 中醫古籍出版社, pp 60-61, 1998.
- 裴正學, 侯瑞云, 傅秀琴. 辨証治療斑禿和早禿73例初步報告. 中醫雜誌 28: 43-44, 1987.
- Muller, H.K., Rook, A.J., Kubba, R. Immunohistology and autoantibody studies in alopecia areata, Br J Dermatol 102: 609-610, 1980.
- Bergfeld, W. Diffuse hair loss in women. Cutis 22: 190-195,

- 1978.
12. Selmanowilz, V., Victor, S., Warburton, D., Orentreich, N. Fingerprints arches in alopecia areata. *Arch Dermatol* 110: 570-571, 1974.
 13. Friedman, P.S. Alopecia areata and auto-immunity. *Br J Dermatol* 105: 153-157, 1981.
 14. Rashtak, S., Pittelkow, M.R. Skin involvement in systemic autoimmune diseases. *Curr Dir Autoimmun* 10: 344-358, 2008.
 15. Toback, C., Ajkunar, S. The emotional disturbances underlying alopecia areata, alopecia totalis and trichotillomania. *Child Psychiatry Hum Dev* 10: 114-117, 1979.
 16. Li, L.F., Guo, J., Gao, Z.F. Overexpression of skin protein kinase c-alpha in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. *Clin Exp Dermatol* 28: 429-433, 2003.
 17. Botchkareva, N.V., Khlgtian, M., Longley, B.J., Botchkareva, V., Gilchrist, B.A. SCF/c-kit signaling is required for cycling regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J* 15: 645-658, 2001.
 18. Tausk, F., Christian, E., Johansson, O., Milgram, S. Neurobiology of the skin. In Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M., Austen, K.F.(eds) *Dermatology in General Medicine*(4th ed), New York, McGraw-Hill, pp 396-463, 1993.
 19. 김용익, 이문원, 권진, 송창호, 이창현. 자발적으로 탈모된 생쥐 모델을 이용한 탈모관련 인자에 관한 연구. *대한해부학회지* 38(2):133-143, 2005.
 20. 홍석훈, 노석선. 모발탈락의 병인 및 치료법에 대한 문헌적 고찰. *외관과학회지* 9(1):43-65, 1996.
 21. 임사비나, 최규동, 김수경. 탈모에 대한 동서의학적 고찰. *경산대학교 제한동의학술원 논문집*, 4(1):699-710, 1994.
 22. 정석영, 정일국, 김대근, 조한영, 정한술, 이창현. C57BL/6N 생쥐에서 골쇄보 추출물을 이용한 발모효과에 대한 실험적 연구. *동의생리병리학회지* 21(2):453-461, 2007.
 23. 조한영. C57BL/6N 생쥐에서 반모추출물과 분획물을 이용한 발모효과에 대한 실험적 연구. *우석대학교대학원(석사)*. 2007.
 24. 탁민진, 정일국, 김대근, 정한술, 이창현. 측백엽 추출물의 발모효과에 관한 실험적 연구. *동의생리병리학회지* 21(1):136-144, 2007.
 25. 婁國菁, 滕穎. 發泡療法及其臨床應用. *時珍國醫國藥*, 12(12): 1126-1128, 2001.
 26. 姜義娜. 斑禿藥物治療的新進展. *中國皮膚性病學雜誌*, 17(3): 203-204, 2003.
 27. 許浚. *東醫寶鑑*, 서울, 법인문화사, pp 793-797, 1999.
 28. 全國韓醫科大學鍼灸經穴學教室. *鍼灸學(下)*, 집문당, 서울, pp 1059-1060, 1991.
 29. 趙成林. 中藥引赤發泡藥簡介. *江蘇中醫*, 17(5):37-38, 1996.
 30. 한의과대학본초학관집위원회. *본초학*, 서울, 영림사, pp 486-487, 2007.
 31. 陳存仁. *漢方醫藥大事典*, 圖書出版 松嶽, pp 296-297, 1998.
 32. 吳自強, 尤菊松. 天南星在外治法中的應用. *中醫外治雜誌* 4期: 36-37, 1997.
 33. 楊中林, 韋英杰, 杜慧, 宣圓圓. 東北南星不同炮制品的毒性及刺激性研究. *中成藥*, 23(2):101-103, 2001.
 34. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A. Simplified Hot-Start PCR. *Nature* 381: 445-446, 1996.
 35. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
 36. 李元文, 張韋川. *名醫臨床証經驗叢書 皮膚病*, 北京, 人民衛生出版社, pp 572-622, 2001.
 37. Argyris, T.S. The effects of wounds on adjacent growing or resting hair follicles in mice. *Arch Dermatol Symp* 61: 31-36, 1956.
 38. Argyris, T. Kinetics of epidermal production during epidermal regeneration following abrasion in mice. *Am J Pathol* 83: 329-340, 1956.
 39. Lynfield, Y.L., MacWilliams, P. Shaving and hair growth. *J Invest Dermatol* 55: 170-172, 1970.
 40. Ito, M., Kizawa, K., Hamada, K., Cotsarelis, G. Hair follicle stem cells in the lower bulge from the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation* 72: 548-557, 2004.
 41. Cotsarelis, G., Sun, T.T., Lavker, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit : implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-1337, 1990.
 42. Tsuji, Y., Denda, S., Soma, T., Raftery, L., Momoi, T., Hibino, T. A potential suppressor of TGF-beta delays catagen progression in hair follicles. *J Invest Dermatol Symp Proc* 8(1):65-68, 2003.
 43. 이영주, 이주영. 남성의 안드로겐성 탈모자의 임상적 진단과 관리. *한국미용학회지* 13(2):799-810, 2007.
 44. Kamimura, A., Takahashi, T., Morohashi, M., Takano, Y. Procyanidin oligomers counteract TGF-beta1- and TGF-beta2-induced apoptosis in hair epithelial cells: an insight into their mechanisms. *Skin Pharmacol Physiol* 19(5):259-265, 2006.
 45. Otomo, S. Hair growth effect of minoxidil. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 119(3):167-174, 2002.
 46. Kwack, M.H., Sung, Y.K., Chung, E.J., Im, S.U., Ahn, J.S., Kim, M.K., Kim, J.C. Dihydrotestosterone-inducible dickkopf 1 from balding dermal papilla cells causes

- apoptosis in follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128(2):262-269, 2008.
47. Harada, N., Okajima, K., Narimatsu, N., Kurihara, H., Nakagata, N. Effect of topical application of raspberry ketone on dermal production of insulin-like growth factor-1 in mice and on hair growth and skin elasticity in humans. *Growth Horm IGF Res.* 18(4):335-344, 2008.
48. Foitzik, K., Krause, K., Nixon, A.J., Ford, C.A., Ohnemus, U., Pearson, A.J., Paus, R. Prolactin and its receptor are expressed in murine hair follicle epithelium, show hair cycle-dependent expression and induce catagen. *Am J Pathol* 62: 1611-1621, 2003.
49. Detmar, M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *J Invest Dermatol* 106: 207-208, 1996.
50. Peters, E.M., Maurer, M., Botchkarev, V.A., Jensen, K., Welkr, P., Scott, G.A., Paus, P. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J Invest Dermatol* 121: 976-984, 2003.
51. 이문원. 자발적 원형탈모 생쥐(C57BL/6N)와 정상 생쥐에서 반모와 골쇄보 추출 혼합물의 발모에 대한 실험적 연구, 우석대학교대학원(박사), 2008.
52. Silver, A.F., Chase, H.B., Arsenault, C.T. Early anagen initiated by plucking compared with early spontaneous anagen. *Adv Biol Skin* 9: 265-286, 1969.
53. Stenn, K.S., Paus, R. Controls of hair follicle. *Physiological Reviews* 81: 449-494, 2001.
54. 吳皓, 鐘凌云. 天南星科有毒中藥刺激性作用比較研究. *中國中藥雜誌*, 33(4):380-384, 2008.
55. 肖培根. 新編中藥誌, 北京, 化學工業出版社, pp 165-175, 2002.
56. 樓之岑, 秦波. 常用中藥材品種整理和質量研究, 北京大學醫學出版社, pp 975-1022, 1995.
57. 鐘凌云, 吳皓. 天南星科植物中黏膜刺激性成分的研究現狀與分析. *中國中藥雜誌*, 31(18):1561-1563, 2006.
58. 汪蕾, 張繼振. 天南星屬植物研究進展. *延邊大學學報*, 30(1):66-72, 2004.
59. 韋英杰, 楊中林. 天南星研究進展. *時珍國醫國藥*, 12(3):264-267, 2001.