

# 斑蝥, 南星, 半夏(生) 추출 혼합물의 발모효과에 대한 실험적 연구

정한솔 · 조한영<sup>1</sup> · 이창현<sup>1\*</sup>

우석대학교 한의과대학 한방병리학교실, 1: 해부학교실

## Experimental Studies on the Hair Growth Activity of Trimix Extracts of *Mylabris Phalerata* Pall., *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma Ternata* in C57BL/6N mice

Han Sol Chung, Han Young Cho<sup>1</sup>, Chang Hyun Lee<sup>1\*</sup>

Department of Oriental Pathology, 1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University

To determine whether topical application of trimix extracts of *Mylabris phalerata* Pall., *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma Ternata* lead to affects on the hair growth activity in C57BL/6N mice. To examine the hair growth activity of the extracts of *Mylabris phalerata* Pall., *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma Ternata* gross, microscopic, and immunohistochemical method were performed. In order to examine the mRNA expression of hair growth related substance, RT-PCR method was performed. Experimental group I on day 14, The most extensive hair growth activity was observed in whole skin area of all the mice whose hair had been clipped. Brdu immunoreactive cells of all the experimental groups were more heavily stained in epidermis, bulge, outer root sheath, inner root sheath, subcutaneous tissue, hair bulb and cutaneous trunci muscles than that of control group on day 12 of hair growing cycle in C57BL/6N mice. VEGF immunoreactive density of all the experimental groups was more heavily stained in epidermis, bulge and cutaneous trunci muscles than that of control group on day 12. FGF and c-kit immunoreactive cells of all the experimental groups were heavily stained in epidermis, outer root sheath, inner root sheath and cutaneous trunci muscles on day 12. PKC- $\alpha$  immunoreactive density of all the experimental groups was mildly stained in epidermis and cutaneous trunci muscles than that of control group on day 12. On day 12, the expression of bFGF (138%, 119%, 120%), VEGF (146%, 144%, 133%), IGF-1 (165%, 141%, 119%) and PL1 (121%, 116%, 123%) in each experimental groups was more increased than that of control group. On day 16, The expression of IGF-1 (126%, 149%, 151%) in all the experimental group was more increased than that of control group (100%). The expression of bFGF (92%, 94%) and VEGF (101%, 97%), PL1 (102%, 109%) in all the experimental group was more decreased than that of experimental group I, II on day 12. But the expression of bFGF (109%) and VEGF (127%), and PL1 (105%) in each experimental group III was more increased than that of control group (100%). These experiments suggest that trimix extracts of *Mylabris phalerata* Pall., *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma Ternata* may stimulate the topical hair growth activity and its experimental group I can be useful for treatment of alopecia areata.

Key words : *Mylabris phalerata* Pall., *Arisaematis Rhizoma*, *Pinelliae Rhizoma Ternata*, hair growth, immunohistochemistry, VEGF, FGF, c-kit, PKC- $\alpha$ , bFGF, IGF-1, placenta lactogen, RT-PCR

### 서 론

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

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

· 접수 : 2009/08/20 · 수정 : 2009/09/15 · 채택 : 2009/10/01

모발은 자신의 일생기간이 지나면 탈락하고, 그 자리에 새로운 모발이 자라는 모발성장 주기를 갖고 있다. 정상적인 모발의

성장주기는 3-5년간 성장을 계속하는 성장기(anagen), 성장을 하다가 1-2개월간 정지상태에 있는 퇴행기(catagen), 탈락하기 전의 3-5개월간의 휴지기(telogen), 그리고 새로운 모발이 다시 자라는 발생기(new anagen stage)로 나뉜다<sup>1)</sup>.

탈모는 중년 이후의 남성이나 갱년기 이후의 여성에서 나타나는 특정 질환으로 인식되어왔지만 그 요인도 다양하게 증가하고 있다. 강한 자외선, 바담, 습도 및 대기 환경의 변화 등에 의한 환경적인 요인과, 개인의 건강상태, 약물남용, 스트레스, 수면, 영양상태, 호르몬 불균형 등의 생체의 내부적인 요인 등에 의하여 탈모가 발생한다<sup>2)</sup>.

일반적으로 탈모는 모발의 성장주기에 따라 나누는데 휴지기성 탈모는 남성형 탈모, 산후 탈모, 지루성 탈모 및 내분비질환에 의한 탈모를, 성장기성 탈모는 원형 탈모, 반흔성 탈모 및 두부백선에 의한 탈모를 말한다<sup>1)</sup>. 탈모의 발병원인은 한의학에서는 血熱<sup>3,4)</sup>, 血瘀<sup>3,4)</sup>, 氣血虛<sup>3,4)</sup>, 肝腎不足<sup>3)</sup>, 脾胃氣虛<sup>5)</sup>, 肝鬱腎虛<sup>5)</sup> 등으로 분류하였고, 서양의학에서는 국소감염<sup>6)</sup>, 내분비장애<sup>7)</sup> 및 자가면역<sup>8)</sup> 및 정신적인 외상과 정서적 압박 등에 의하여 발생한다<sup>9)</sup>.

지금까지 서양의학적인 탈모 치료는 스테로이드<sup>10)</sup>, 국소자극제<sup>11)</sup>, Minoxidil의 국소도포<sup>12)</sup> 등 다양한 치료법이 있으나 치료에 대한 반응도 다양하며, 그 치료법 역시 확실하게 정립된 것은 없다.

최근에는 전통적인 약물내복법 외에도 약침<sup>13)</sup>과 봉침<sup>14)</sup>을 이용하여 유효한 결과를 얻기도 하였고, 사물탕가미방<sup>15)</sup>, 상백피<sup>16)</sup>, 골쇄보<sup>17)</sup> 및 반묘<sup>18)</sup> 등도 모발의 성장을 촉진한다고 하였다.

탈모 및 발모와 관련된 요인들은 매우 복잡하고 다양하기 때문에 탈모에 대한 정확한 치료기전을 밝히기 어려워 탈모기전의 규명과 탈모치료제를 개발하는 데에도 어려움이 있었다. 특히 한의학에서 한약재를 이용한 치료법들이 문헌에서 많이 언급되고 있으나 실제로 그 효과를 다 밝히지 못하고 있으므로 구체적인 연구가 필요한 실정이다.

이에 저자는 발모효과를 갖는 새로운 물질을 개발하기 위하여, 피부에 소양감을 일으키는 南星과 半夏(生) 그리고 피부에 수포를 일으키는 斑蝥를 선정하여, 한약재 추출 혼합물을 농도별로 제조, 도포하여 가장 안전하고 빠른 발모효과 즉, 탈모 개선 효과가 있는 외용 국소도포제를 개발할 목적으로 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

실험동물은 체중 25 g 내외의 숫컷 8주령 C57BL/6N 정상 생쥐를 이용하였다. 실험의 정확성을 위하여 모두 출생날짜가 유사한 생쥐를 사용하였고 각각의 케이지(cage)에 1마리씩 분리하여 실험하였다.

#### 2) 한약재, 한약재 추출물 및 도포약물 제조

##### (1) 약재

실험에 사용한 한약재는 斑蝥(*Mylabris phalerata* Pall., 중국

산), 南星(*Arisaematis Rhizoma*, 국산) 및 수치하지 않은 半夏(生)(*Pinelliae Rhizoma*, 국산)를 시중 건재약국(이케이디엠, 서울)에서 구입하여 정선하였다.

##### (2) 추출물 제조

① 斑蝥에서 칸타리딘(cantharidin) 성분 회수 : 斑蝥 全蟲體 90 g을 분쇄하여 80% 에탄올(ethanol, EtOH)용액 1,400 ml를 넣고 3주간 침지시킨 후 여과한 후 농축하였다. 농축된 시료를 동결건조기를 이용하여 건조한 후 25 g(수득물 27.7%)의 시료를 회수하였다. 농축된 시료에 300 ml의 물을 넣은 후 동량의 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc)를 넣고 EtOAc층을 3회 분획하여 회수하였다. 회수된 EtOAc층을 농축한 뒤 0℃ 이하에서 24시간 방치하여 무색 침상의 칸타리딘 결정을 얻었다(수득물 0.2%, 약 180 mg).

② 南星 추출물 제조 : 南星 600 g을 분쇄하여 80% 에탄올 용액 1,000 ml를 넣고 3주간 침지시킨 후 여과한 후 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조한 후 35 g(수득물 5.83%)의 추출물을 회수하였다.

③ 半夏(生) 추출물 제조 : 수치하지 않은 반하(生) 600 g을 분쇄하여, 80% 에탄올용액 1,000 ml를 넣고 3주간 침지시킨 후 여과한 후 농축하여 동결건조기를 이용하여 건조한 후 15 g(수득물 2.5%)의 추출물을 회수하였다.

##### (3) 도포약물의 조제

斑蝥에서 회수한 칸타리딘 결정, 南星추출물 및 반하(生)추출물을 다음과 같은 방법으로 혼합하여 세종류의 혼합물을 제조하여 도포하였다. 실험 I군은 0.5 mg cantharidin + 2 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* + 1 g extracts of *Pinelliae Rhizoma*을 50 ml의 50% 에탄올에 혼합하여 도포하였고, 실험 II군은 1.5 mg cantharidin + 1 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* + 0.5 g extracts of *Pinelliae Rhizoma*을 50 ml의 50% 에탄올에 혼합하여 도포하였으며, 실험 III군은 2.5 mg cantharidin + 0.5 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* + 0.25 g extracts of *Pinelliae Rhizoma*을 50 ml의 50% 에탄올에 혼합하여 도포하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 실험군 배정 및 도포방법

생쥐 등부위의 털을 소동물용 클리퍼(clipper)로 깎은 후에 정상적인 휴지기 상태에 있는 생쥐만을 선발하여 실험군을 배정하였다. 실험군은 3가지 추출물을 농도별로 혼합, 제조하여 실험 I, II, III군으로 나누어 시행하였다. 대조군은 50% 에탄올만을 피부에 도포하였으며, 모든 실험군에서 시료의 도포는 하루 3회씩 오전과 오후에 1회씩 스프레이를 이용하여 뿌린 후에 면봉을 사용하여 3-4회 문질러 흡수를 촉진시켰다. 각 군에서 2마리씩 선정하여 Ito 등<sup>19)</sup>의 방법과 유사하게 부로모디옥시유리딘(bromodeoxyuridine, Brdu, 50 µg/g body weight)을 털을 깎은 후 1일째부터 3일간 하루에 2번씩 복강에 주사한 후 노린 세포주기를 가진 세포들의 표지 부위를 면역조직화학 염색법으로 관찰하였다.

### 2) 육안적 관찰

생쥐에서 한약재 추출 혼합물을 도포한 후 10일, 12일, 14일 및 16일 동안 관찰한 후 카메라 또는 handscope로 촬영하여 육안적으로 비교하였다. 실험동물은 각 군에 8마리씩 배정하여 관찰하였다.

### 3) 광학현미경적 관찰

생쥐의 피부내 모낭의 변화를 관찰하기 한약재 추출 혼합물을 도포한 후 12일째 2마리를 희생시켜 등쪽 피부를 척추선에 평행하게 절개하여 포르말린 용액으로 고정한 후 일반적인 방법으로 포매한 후 7  $\mu$ m의 절편을 제작하여 H&E 염색과 Masson's trichrome 염색을 시행하였다.

### 4) 피부조직내 느린 세포주기를 가진 세포들의 표지를 위한 면역조직화학적 염색

생쥐에 3종류의 한약재 추출 혼합물을 도포한 후 12일째에 희생시켜 느린 세포주기를 가진 세포를 관찰하였다. 면역조직화학적 염색은 조직을 0.05% proteinase K로 20분간 처리한 후 인산완충식염수(PBS)로 세척하였다. Brdu에 대한 1차항체는 mouse anti-Brdu antibody(Santa cruz, USA)를 1:50으로 희석하여 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 2차항체는 biotinylated anti-mouse IgG(Vector Laboratories, Inc.)를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 페록시다아제가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 30 mg의 3-3' DAB를 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 5분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 헤마톡실린으로 20초간 대조염색한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5) 피부내 발모관련 인자에 대한 면역조직화학적 염색

생쥐에 3종류의 한약재 추출 혼합물을 도포한 후 12일째에 희생시켜 피부내 털의 성장과 관련된 여러 가지 인자를 관찰하기 위하여 rabbit polyclonal antibody(Santa cruz, USA)인 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF), c-kit, protein kinase C- $\alpha$ (PKC- $\alpha$ )를 각각 1:100, 1:50, 1:50, 1:50으로 희석한 1차항체를 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M PB에 1% normal goat serum(Vector Laboratories, Inc., USA)과 0.3% Triton X-100(Sigma)이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 Hsu 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Inc., USA)에 실온에서 1시간 반응시킨 후 페록시다아제가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 사이토키인 면역염색과 동일한 방법으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

### 6) RT-PCR

생쥐에 3종류의 한약재 추출 혼합물을 도포한 후 12일째와 16일째에 피부를 적출하여 초저온냉동고(deep freezer, -70 $^{\circ}$ C)에 보관해 두었다가 피부조직 100 mg에 Trizol 1 ml를 넣어 균질기로 분쇄하였으며, 제조회사의 방법에 준하여 RNA를 추출하였

다. 이 후 분광광도계를 이용하여 260과 280 nm에서 OD값을 측정하여 RNA를 정량화 했다. Total RNA 1  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C에서 30 초간 denaturation 시킨 후, primer에 따라 48-56 $^{\circ}$ C에서 30 초간 annealing 시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 30 초간 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다<sup>21)</sup>. PCR에 사용된 primer(bFGF, basic fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor; PL1, placenta lactogen)는 Table 1과 같다.

Table 1. PCR primers

| Target gene | Sequence                               | Amplicon size(bp) |
|-------------|--|-------------------|
| GAPDH       | forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'      | 177               |
|             | reverse 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'     |                   |
| bFGF        | forward 5'-ACCATGGCAGCCGGGAG-3'        | 471               |
|             | reverse 5'-TCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3' |                   |
| VEGF        | forward 5'-ATGAACCTTCTGCTGTCTTGGGT-3'  | 580               |
|             | reverse 5'-TCACCGCCTCGGCTTGT-3'        |                   |
| IGF-1       | forward 5'-ACATCTCCCATCTCTCTGGA-3'     | 283               |
|             | reverse 5'-AAAGAGAGACACCAGTCCA-3'      |                   |
| PL1         | forward 5'-CTTGAGGTGCCGAGITGTCTT-3'    | 99                |
|             | reverse 5'-GGAAAGCATTACAAGTCTGGTTCA-3' |                   |

## 결 과

### 1. 생쥐에서 한약재 추출 혼합물의 발모효과 관찰

#### 1) 육안적 발모효과 관찰

생쥐에서 한약재 추출 혼합물의 발모효과는 10일째 대조군에서는 5마리 모두 육안적인 발모현상은 관찰할 수 없었으나 실험 I군에서는 5마리 가운데 2마리에서 육안적으로 발모되었다. 실험 II군에서는 5마리 가운데 2마리는 전체적으로 미약하게 발모되었고, 실험 III군에서는 5마리 가운데 2마리는 부분적으로 발모되었다. 12일째 대조군에서는 5마리 모두 육안적인 발모는 관찰할 수 없었으나(Fig. 1a) 실험 I군에서는 5마리 모두 전체적으로 발모되었다(Fig. 1b). 실험 II군에서는 5마리 가운데 2마리는 전체적으로, 1마리는 부분적으로 발모되었고, 나머지 2마리는 미약하게 발모되었다(Fig. 1c). 실험 III군에서는 5마리 가운데 3마리는 부분적으로 발모되었다(Fig. 1d). 14일째 대조군에서는 5마리 모두 육안적인 발모는 일어나지 않았으나, 실험 I군에서는 5마리 전체에서 발모되었다. 실험 II군에서는 5마리 가운데 3마리는 전체적으로 발모되었고, 2마리는 부분적으로 발모되었다. 실험 III군에서는 5마리 가운데 2마리는 전체적으로 발모되었고, 나머지 3마리는 부분적으로 발모되었다. 16일째 대조군에서는 4마리 가운데 1마리는 비특이적으로 부분적인 발모가 관찰되었으나(Fig. 2a) 한약재 추출 혼합물을 농도별로 혼합, 제조하여 도포한 실험 I, II, III군에서는 4마리 전체에서 육안적으로 발모가 관찰되었고, 실험 I군(Fig. 2b), II군(Fig. 2c) 및 III군(Fig. 2d) 순서대로

뚜렷하게 발모현상을 관찰하였다.

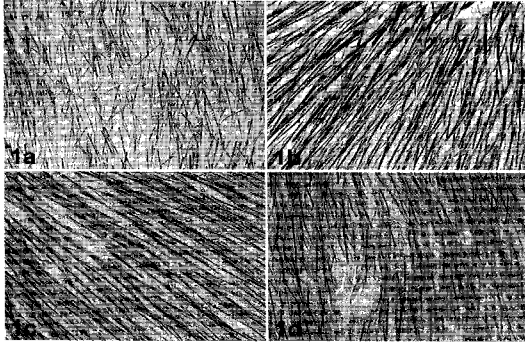


Fig. 1. Handscopic observation after topical application of 50% EtOH as control group (1a) and trimix extracts tinctures of experimental group I\* (1b), II\*\* (1c), III\*\*\* (1d) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 12. The most extensive hair growth activity was observed in experimental group I. The second extensive hair growth activity was observed in experimental group II. Main components of experimental tincture : \*trimix extracts tincture of experimental group I : 0.5 mg cantharidin + 1 g extracts of *Pinelliae Rhizoma* + 2 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* / 50 ml 50% EtOH; \*\*trimix extracts tincture of experimental group II : 1.5 mg cantharidin + 0.5 g extracts of *Pinelliae Rhizoma* + 1 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* / 50 ml 50% EtOH; \*\*\*trimix extracts tincture of experimental group III : 2.5 mg cantharidin + 0.25 g extracts of *Pinelliae Rhizoma* + 0.5 g extracts of *Arisaematis Rhizoma* / 50 ml 50% EtOH.

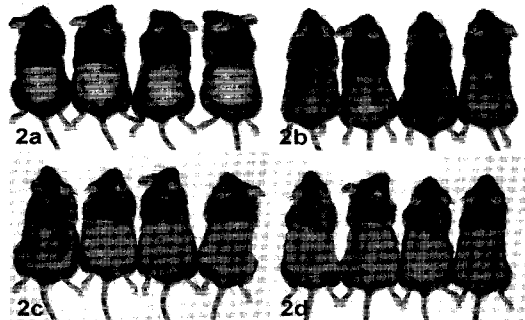


Fig. 2. Macroscopic observation after topical application of 50% EtOH as control group (2a) and trimix extracts tinctures of experimental group I\* (2b), II\*\* (2c), III\*\*\* (2d) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 16. Extensive hair growth activity was observed in all the experimental groups. The most extensive hair growth activity was observed in experimental group I(2b).

2) 광학현미경적 발모효과 관찰

C57BL/6N 생쥐의 털을 깎고 3종류의 한약재 추출 혼합물을 배합비율에 따라 실험 I, II, III군 및 대조군으로 나누어 H&E 염색과 Masson's trichrome 염색을 시행하여 모낭의 변화를 광학현미경으로 관찰하였다. 실험 12일째 대조군에서는 휴지기 모낭으로서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으나(Fig. 3a), 모든 실험군에서는 성장기 중기 또는 후기의 모낭들이 전체적으로 관찰되었고, 모낭들은 피하층까지 성장한 후 다시 표피를 향하여 성장하였다(Fig. 3b-d). 특히 실험 I군의 모낭들은 다른 실험군에 비하여 빠르게 성장하였고 모낭의 수도 많이 관찰되었다. Masson's trichrome 염색에 의하여 관찰한 결과 대조군에 비하여 모든 실험군에서 진피층의 교원섬유에 강하게 염색되었다.

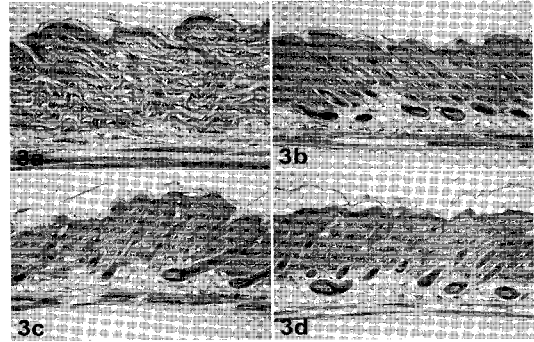


Fig. 3. Microscopic observation of C57BL/6N mice after topical application of 50% EtOH as control group (3a) and trimix extracts tinctures of experimental group I\* (3b), II\*\* (3c), III\*\*\* (3d) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 12. Follicular cycling of control group is telogen; Follicular cycling of experimental groups I, II and III is anagen IV-VI (5a, x100; 5b-d, x50, H&E).

2. 피부내 느린 세포주기를 가진 세포들의 Brdu에 대한 면역조직화학 염색법에 의한 관찰

실험개시 후 생쥐 복강내 Brdu를 3일간 주입하고 한약 추출 혼합물을 도포한 후 Brdu에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 바, 실험 12일째 대조군에서는 휴지기의 피부로서 진피내 bulge, 피지샘 및 동피근층에서 중등도로 염색되는 줄기세포가 관찰되었다(Fig. 4a). 실험 I군에서는 표피, bulge, 피지샘, 내·외모근초 및 동피근에 강하게 염색되었고, 특히 증식중인 표피에 가장 강하게 염색되었다(Fig. 4b). 실험 II군에서는 표피, bulge, 피지샘, 내·외모근초, 동피근에서는 실험 I군에 비하여 미약한 반응을 나타내었고, 표피의 증식도 실험 I군에 비하여 미약하게 관찰되었다. 또한 진피층과 피하층의 혈관주위 또는 혈관내에서 미약하게 염색되었다(Fig. 4c). 실험 III군에서는 표피, bulge, 피지샘, 내·외모근초 및 동피근에서는 실험 I군에 비하여 다소 미약하였으나 실험 II군에 비하여는 약간 강하게 염색되었고, 진피층과 피하층의 혈관주위 또는 혈관내에서 다소 미약하게 염색되었다(Fig. 4d).

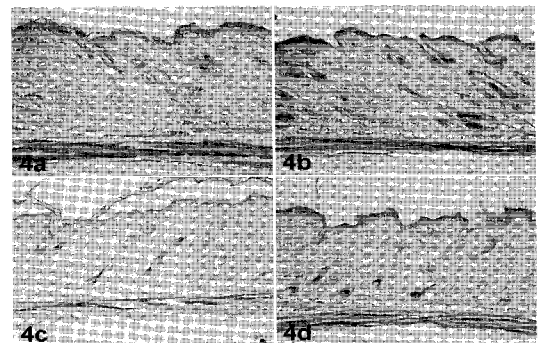


Fig. 4. Microscopic observation of C57BL/6N mice after topical application of 50% EtOH as control group (4a) and trimix extracts tinctures of experimental group I\* (4b), II\*\* (4c), III\*\*\* (4d) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 12 (4a, x100; 4b-d, x50, Brdu immunoreaction). In control group, Brdu immunoreactive cells were heavily stained in bulge, secondary hair germ cells and cutaneous trunci m. In experimental group I, II, III, Brdu immunoreactive cells were heavily stained in epidermis, bulge, outer root sheath, inner root sheath, subcutaneous tissue, hair bulb and cutaneous trunci m. on day 12 of hair growing cycle in C57BL/6N mice.

3. 피부조직내 여러 가지 사이토카인(VEGF, FGF, c-kit, PKC-α)에 대한 면역조직화학적 관찰 소견

생쥐에 한약 추출 혼합물을 배합비율에 따라 도포한 실험 I, II, III군 및 대조군으로 나누어 면역조직화학 염색을 시행한 바, 실험 12일째 대조군에서는 VEGF에 대한 면역반응은 bulge, secondary hair germ cell의 상피세포 및 동피근에서 강하였다. 모든 실험군에서는 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge, 진피층과 피하층에 있는 세포와 동피근에서 강하게 염색되었다. 섬유아세포성장인자에 대한 면역반응은 대조군에서는 bulge의 상피세포에서는 강하였으나, 표피상피에서는 미약한 반응을, 동피근에서는 중등도로 염색되었다. 모든 실험군에서는 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, bulge, 피하층 아래에 위치한 동피근 및 성장 중에 있는 모낭의 내·외모근초에 강한 염색성을 나타내었다. c-kit에 대한 면역반응은 대조군에서는 표피상피, bulge, secondary hair germ cell의 상피세포 및 피하층 아래에 위치한 동피근에서 미약하였다. 모든 실험군에서는 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피, 피지샘, bulge, 진피층과 피하층에 있는 세포, 동피근 및 성장 중에 있는 모낭의 내·외모근초에서 강하게 염색되었다. PKC-α에 대한 면역반응은 대조군의 bulge에서는 강한 염색반응을 나타내었으나 표피와 동피근에서는 미약하였다. 모든 실험군에서는 bulge에서 강한 염색성을 나타내었으나, 상피세포의 증식이 활발하게 일어나고 있는 표피와 동피근에서는 중등도로 염색되었다.

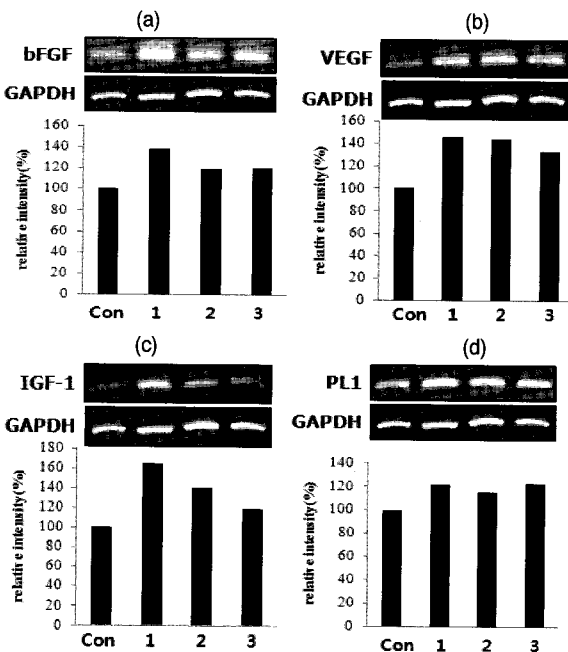


Fig. 5. Comparison of bFGF(5a), VEGF(5b), IGF-1(5c) and PL1(5d) expression after topical application of 50% EtOH as control group (Con), and trimix extracts tincture of experimental group I\* (1), II\*\* (2), III\*\*\* (3) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 12.

4. 한약재 추출 혼합물을 농도별로 도포한 후 bFGF, VEGF, IGF-1 및 PL1의 발현에 미치는 영향에 대한 RT-PCR의 결과 생쥐에서 여러 가지 발모관련 인자들의 발현량의 변화를

RT-PCR로 관찰하였다. 실험 12일째, bFGF의 발현은 대조군(100%)에 비하여 실험 I군에서는 138%, 실험 II군에서는 119%, 실험 III군에서는 120%로 발현량이 증가하였다(Fig. 5a). VEGF의 발현은 실험 I군에서는 146%, 실험 II군에서는 144%, 실험 III군에서는 133%로 현저하게 증가하였다(Fig. 5b). IGF의 발현도 실험 I군에서는 165%, 실험 II군에서는 141%, 실험 III군에서는 119%로 증가하였는데(Fig. 5c), 특히 실험 I군과 II군에서 현저히 증가하였다. PL1은 실험 I군에서는 121%, 실험 II군에서는 116%, 실험 III군에서는 123%로 증가하였다(Fig. 5d). 실험 16일째, bFGF의 발현은 실험 II군에서는 92%, 실험 III군에서는 94%로 발현량이 감소하였으나 실험 I군에서는 109%로 증가하였다(Fig. 6a). VEGF의 발현은 실험 I군과 II군은 각각 101%와 97%로 대조군(100%)과 유사하였으나 실험 III군에서는 127%로 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다(Fig. 6b). IGF-1의 발현은 실험 I군에서는 126%, 실험 II군에서는 149%, 실험 III군에서는 151%로 현저히 증가하였는데(Fig. 6c) 특히 실험 II군과 III군에서 현저히 증가하였다. PL1은 실험 I군에서는 대조군(100%)과 유사하게 103%이었으나, 실험 II군과 III군에서는 모두 114%로 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 6d).

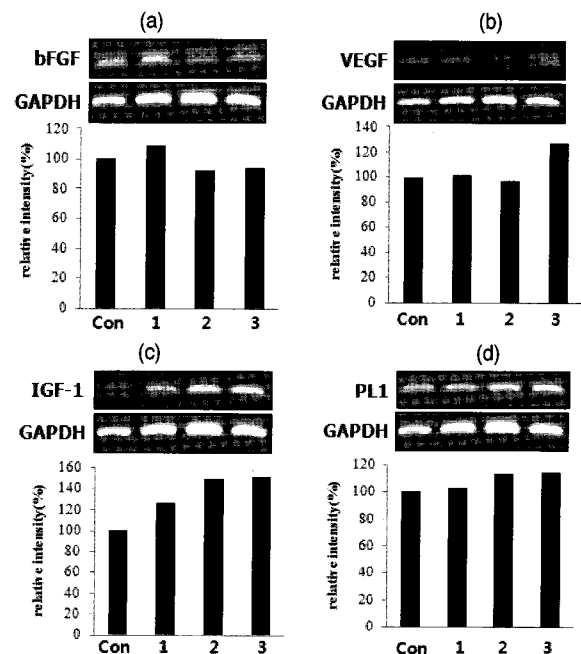


Fig. 6. Comparison of bFGF(6a), VEGF(6b), IGF-1(6c) and PL1(6d) expression after topical application of 50% EtOH as control group (Con), and trimix extracts tinctures of experimental group I\* (1), II\*\* (2), III\*\*\* (3) to the hair removed skin of C57BL/6N mice on day 16.

고찰

탈모는 지루성 탈모와 원형탈모증으로 나누며, 지루성 탈모는 “髮蛀脫髮”이라 칭하며, 청장년층 남성에서 흔히 나타나는데 두피가 가렵고 비듬도 많이 생기며, 오래되면 앞머리와 양머리의 두발이 성글고 가늘어져서 결국 대머리가 된다<sup>2)</sup>. 원형탈모증은 속칭 “鬼剃頭” 또는 “油風脫髮”이라 칭하며, 갑자기 머리에

무염증성 국한성 탈모를 일으키며, 두피는 평활하고 광택이 있으며, 원형 또는 타원형으로 일어난다<sup>22)</sup>.

탈모의 병인은 다양하여 혈허(血虛), 신허(腎虛), 기체(氣滯), 혈어(血瘀) 등이며, 치료법은 보신(補腎), 양혈(養血), 활혈(活血), 이기(理氣)를 위주로 하고, 특히 활혈법이 주목받고 있다<sup>23)</sup>.

탈모와 血虛와의 관계에 대하여 許<sup>24)</sup>는 髮者血之餘 血盛則髮潤 血衰則髮衰라 하였고, 또한 少壯有髮落 或鬚亦落者 火炎血燥故也라 하였다. 王<sup>25)</sup>은 “鬚髮脫落”의 원인이 血氣衰弱 經脈虛竭이라 하였고, 巢<sup>26)</sup>는 “鬚髮禿落”의 원인이 血盛則榮於頭髮 故鬚髮美 若血氣衰弱經脈虛竭不能榮潤이라 하여 活血化痰 치료법에 의하여 혈액순환을 증가시켜 탈모를 개선시킨다고 하였다.

탈모의 침구치료는 주로 기혈을 조화하여 活血化痰에 이르게 하기 위하여 주로 국소부위의 경혈과 매화침을 사용하며, 외용약은 혈행운행을 촉진하기 위하여 주류, 辣椒류 및 자극성 약물들을 많이 응용한다<sup>27)</sup>.

탈모 및 발모와 관련된 요인들은 매우 복잡하고 다양하기 때문에 정확한 발병원인과 치료기전이 매우 어려워 탈모치료를 개발하는 데에도 어려움이 있다.

본 실험에 사용된 斑蝥은 가뢰과 곤충으로 남방대반모(*Mylabris phalerata* Pall)나 황흑소반모(*Mylabris cichorii* L)를 건조한 약제로서<sup>28)</sup>, 斑蝥素(cantharidin), 지방, 수지 및 formic acid 등이 함유되어있다<sup>29)</sup>. 斑蝥의 활성 성분은 칸타리딘으로서 원형 탈모증의 치료에 사용하며<sup>30)</sup>, 外治에 사용하면 국소적인 혈액순환을 촉진시켜 모낭에 영양공급을 원활하게 함으로써 휴지기 모낭을 성장기모낭으로 전환하도록 자극한다<sup>31)</sup>.

南星과 半夏(生)는 모두 같은 南星科로서 南星은 피부에 소양감을 일으키며<sup>32)</sup>, 主治로는 化痰止咳, 化痰定癍, 消腫散結 등의 효능이 있다. 특히 南星의 외용치료는 消腫散結, 解毒止痛의 효과<sup>33)</sup>가 있으며, 이러한 작용은 南星의 분말이 피부에 대하여 경도의 자극성이 있고 점막에 대하여 경도의 미란을 일으키는 것을 활용한 것이다<sup>33)</sup>. 半夏(生)는 다년생 본초인 *Pinellia ternata*(THUNB.) BREIT.의 괴경을 건조한 약물로, choline, homogentisic acid, potassium oxalate 등의 유독물질을 함유하고 있어 복용 시 구강, 인후, 소화관 등의 점막을 강하게 자극하여 구토, 경련 및 마비 등의 증상을 유발시키고, 피부에 대한 부식성이 있다<sup>34)</sup>.

본 실험에서 斑蝥, 南星 및 半夏(生)의 유독성 성분에 의한 자극이 국소적인 기혈순환을 촉진시켜 모발성장을 유발할 수 있다는 가능성에 근거를 두고, 南星科의 수치많은 약재에 대한 독성 연구에서 치명적으로 강하지 않음이 확인<sup>35)</sup>된 바, 斑蝥의 독성물질인 칸타리딘을 소량 사용하면서<sup>18)</sup> 南星과 半夏(生)를 다량 사용하여 消腫散結 등의 효능이 모발성장에 기여하는지를 실험적으로 검증하고자 하였다.

본 실험의 모든 실험군에서는 육안적인 발모현상을 관찰할 수 있었으며, 그 중 실험 I군에서는 5마리 전체에서, 실험 II군에서는 5마리 가운데 3마리에서, 실험 III군에서는 5마리 가운데 2마리에서 전체적인 발모현상을 관찰하였다. 또한 광학현미경적 소견은 대조군에서는 휴지기 모낭이었으나 모든 실험군에서는

성장기 중기 또는 후기의 모낭들이 피하층까지 성장하였다. 특히, 실험 I군의 모낭들은 다른 실험군에 비하여 빠르게 성장하였고 모낭의 수도 많이 관찰되었다. Masson's trichrome 염색에 의한 결과도 대조군에 비하여 모든 실험군에서 진피층내 교원섬유에 대한 염색성이 강하였다. 이상의 결과로 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물을 농도별로 혼합하여 도포하면 실험 I군과 같이 斑蝥은 저농도로 사용하고 半夏(生)와 南星은 고농도로 사용하는 것이 가장 좋은 발모효과를 나타내었으며, 이러한 3종류의 한약재 추출 혼합물에는 발모를 촉진하는 물질이 함유되어 있을 것으로 사료되었다.

半夏(生)의 탈모치료에 이용한 기록에서, 許<sup>36)</sup>는 눈썹과 머리털이 빠져서 나오지 않는 질환에 먼저 생강으로 세 번 문지른 다음 半夏를 가루내서 참기름에 개어 바르면 치유된다고 하였고(半夏. 治尾髮落, 不生. 先用生薑擦三次後, 半夏生爲末, 麻油調塗之, 卽生), 王<sup>37)</sup>은 피부가 윤택해지고 모낭에 영양분이 공급되므로 斑蝥를 외용제로 사용한다고 하였다. 斑蝥추출물은 피부에 접촉되면 강열하게 자극하여 발적과 발포작용을 일으키고, 그 유효 성분인 칸타리딘이 과량 흡수되면 신장염과 방광염 등을 일으키기 때문에 신중하게 사용해야 하며, 斑蝥를 외치로 사용할 때는 피부에 손상을 입히지 않고 모발의 생장이 가능할 정도의 농도로 사용해야한다고 하였다<sup>38)</sup>. 털은 자발적 또는 인위적인 자극에 의하여 휴지기에서 성장기로 유발되며<sup>39,40)</sup> 이러한 자극은 세포의 괴사와 염증을 유발하여<sup>41)</sup> 염증유발 사이토카인에 의하여 발모가 유발된다고 하여<sup>42)</sup>, 본 실험의 I군에서 발모현상이 뚜렷하게 관찰된 것도 斑蝥를 소량 사용하고 다른 두 한약재의 농도를 높여 피부를 자극하여 발모를 촉진하였을 것으로 사료된다.

모낭은 여러 가지 성장인자와 사이토카인을 분비하여 털의 발생과 성장주기를 조절하여 모간의 성장을 촉진하는 기능을 한다<sup>42)</sup>. 이러한 인자들 가운데 VEGF는 모낭과 모간의 성장을 촉진하는 중요한 인자로서<sup>43)</sup> 동물모델에서 VEGF의 과발현은 털의 성장을 촉진시키며, 특히 VEGF에 의하여 유도된 혈관신생(angioogenesis)에 의하여 bulge에 위치한 세포들을 증가시켜 털의 성장을 자극한다<sup>44)</sup>. 또한 VEGF는 혈관벽의 투과성을 가속화시켜 모낭조직에 영양소와 산소를 공급하여 털을 성장시킨다<sup>45)</sup>.

본 실험의 12일째와 16일째 면역조직화학적 염색과 RT-PCR로 관찰한 결과 실험 12일째 대조군에서는 VEGF에 표지된 표피상피는 미약한 반응을 나타내었으나, 모든 실험군에서는 표피와 bulge에 강하게 염색되었다. 실험 12일째, VEGF의 발현은 실험 I, II, III군에서는 각각 146%, 144%, 133%로 대조군(100%)에 비하여 현저하게 증가하였으나, 실험 16일째 VEGF의 발현은 실험 I, II군은 각각 101%, 97%로 대조군(100%)과 유사하였으나 실험 III군에서는 127%로 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다. 이상의 실험 결과로 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물을 농도별로 도포한 실험 12일째의 실험군에서는 모발이 성장하는 단계였기 때문에 VEGF에 대한 발현량이 대조군에 비하여 증가한 것으로 사료되고, 실험 16일째에는 실험 I과 II군에 비하여 실험 III군의 모발이 늦게 성장하는 단계였기 때문에 VEGF에 대한 발현량은 대조군에 비하여 증가한 것으로 사료된다.

상피 또는 간엽(mesenchyme)에서 유래한 줄기세포성장인자(stem cell factor)에 반응하는 c-kit는 털의 성장주기에 의존적으로 성장기 모낭에 강한 염색반응을 나타내며, 주로 색소침착부위나 진피유두에 강한 양성반응을 나타낸다<sup>45)</sup>. 본 실험의 12일째 대조군에서 c-kit에 표지된 세포들은 표피상피, bulge, secondary hair germ cell의 상피세포 및 동피근에서 미약하게 염색되었으나, 모든 실험군에서는 표피, 피지샘, bulge, 진피층과 피하층에 있는 세포, 동피근 및 성장 중에 있는 모낭의 내·외모근초에서 강하게 염색되었다. 본 실험의 결과는 대조군은 휴지기인데 비하여 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물을 농도별로 도포한 모든 실험군에서는 성장기 모낭이었기 때문에 강하게 염색된 것으로 사료된다.

Protein kinase C- $\alpha$ (PKC- $\alpha$ )는 생쥐에서 털의 성장에 중요한 역할을 하며 털을 뽑거나 알러지피부염과 같은 피부자극시 털의 성장을 촉진하고, 털의 성장기 중기와 말기에 피부내 농도가 증가하며, 퇴행기로 이행하면서 감소한다고 하였다. 이러한 사이토카인의 증가는 일부 피부에서 멜라닌 합성의 조절을 통하여 모낭의 성장을 촉진시키며 털의 성장을 유지시킨다고 하였고, 주로 털의 외모근초의 각질세포에서 과발현된다고 하였다<sup>46)</sup>. 본 실험의 12일째 대조군에서 PKC- $\alpha$ 에 표지된 세포들은 표피와 동피근에서는 미약한 염색반응을 나타내었으나, 모든 실험군에서는 표피와 동피근에서 중등도로 염색되어 휴지기인 대조군에 비하여 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물을 농도별로 도포한 모든 실험군의 성장기 모낭에서 강하게 염색되었다.

피부에서는 성장호르몬과 그 수용체 및 성장호르몬 매개성 IGF-1 유전자들이 발현되어 출생 후 그리고 사춘기로의 성장에 중요한 기능을 한다<sup>47)</sup>. IGF는 모낭 발생시 세포분화와 이주를 조절하여 털성장을 촉진한다<sup>48)</sup>. IGF-I은 진피유두세포에서 만들어 지고<sup>49)</sup>, 각질세포(keratinocyte)에는 IGF 수용체가 있어<sup>50)</sup> 진피유두세포에서 만들어진 IGF는 모낭각질세포를 증식시켜 털을 성장시킨다. 한편, IGF, 표피성장인자 및 bFGF 등과 같은 성장인자는 모발의 성장을 촉진하고 모발세포의 세포사를 방지하는 것으로 알려져 왔다<sup>51,52)</sup>.

본 실험에서 bFGF의 발현은 실험 12일째 대조군(100%)에 비하여 실험 I, II, III군에서는 각각 138%, 119%, 120%로 발현량이 증가하였고, IGF의 발현도 대조군(100%)에 비하여 실험 I, II, III군에서는 각각 165%, 141%, 119%로 모든 실험군에서 증가하였다. 실험 12일째의 태반락토겐도 대조군(100%)에 비하여 실험 I, II, III군에서는 각각 121%, 116%, 123%로 증가하였다. 이상의 실험 결과로 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물을 농도별로 도포한 모든 실험군이 대조군에 비하여 모낭이 성장하는 단계였기 때문에 강하게 염색된 것으로 사료되며, 태반락토겐의 발현양도 털을 뽑은 후 3일째에 20배정도 증가한 후 빠르게 감소하여 퇴행기에는 다시 급격히 감소한다는 결과<sup>53)</sup>와 유사하였다.

본 실험의 실험 12일째 bFGF, VEGF, IGF-1의 발현양은 대조군에 비하여 모든 실험군에서 강하게 발현된 것은 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물에 의한 발모촉진과 관계가 있을 것으로 사료된다.

한의학에서 점막과 피부를 자극하는 약재를 이용한 발포요법은灸法의 일종으로, 약물의 유효성분을 직접 혈위에 작용시켜 비교적 긴 시간동안 경락을 자극하여 기혈의 운행을 촉진시키며,臟腑와 陰陽을 조정함으로써 치료효과를 일으키게 하는 방법이다. 즉, 피부가 發泡되면서 국소적인 혈관확장과 혈관 투과성을 증가시켜 혈위에 도달하는 약물자극에 의한 신경반사와 약물 자체의 약리 효과와 같은 이중적인 작용을 하게하며, 몇몇 항체형성을 촉진시켜 면역기능을 증가시킨다<sup>54)</sup>. 斑蝥, 南星 및 半夏(生) 추출 혼합물이 외용 도포에 의한 발포를 유발하거나 자극을 주는 것이 기존에 밝혀진 바와 같이 半夏(生)와 南星 등의 南星科 약재 분말의 독특한 결정체에 기인한 것으로 생각되며<sup>55,56)</sup>, 한편 단순 자극만으로 발모가 이루어진다면 과거의 다양한 자극을 통해서도 그 성과가 있어야 했으나 좋은 결과를 얻지 못하였던 것을 살펴볼 때 斑蝥, 南星 및 半夏(生)추출물 혼합물내에 특별한 성분이 발모에 작용했음을 유추할 수 있다. 그리고 이러한 혼합물의 적절한 농도로 피부를 자극하고, 혈관을 확장시켜 혈액공급을 증가시켜 活血과 行血의 기능을 양호하게 만들어 발모를 촉진시킬 수 있으리라 사료되며, 더 나아가 어떤 제형으로 외용할 수 있는지에 대하여 보다 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

생쥐에서 한약재 추출 혼합물[斑蝥, 南星 및 半夏(生)]의 농도별 발모효과를 육안, 광학현미경, 면역조직화학 및 발모관련 인자들의 발현량의 변화를 관찰한 바 실험 16일째 육안적인 소견은 모든 실험군에서는 4마리 전체에서 발모되었으나 대조군에서는 4마리 가운데 1마리는 비특이적으로 부분적인 발모가 관찰되었다. 육안적인 발모현상은 뚜렷하게 실험 I군, II군 및 III군 순서대로 발모되었다. 피부조직의 광학현미경 소견은 실험 12일째 대조군에서는 휴지기 모낭이었으나, 모든 실험군에서는 전체적으로 모낭들이 피하층까지 성장한 후 다시 표피까지 성장하는 성장기 중기 또는 후기의 모낭들이었다. 실험군간에는 실험 I군의 모낭이 다른 실험군에 비하여 빠르게 성장하였고 모낭의 수도 많이 관찰되었다. Masson's trichrome 염색시 모든 실험군에서 진피층내 교원섬유에 강하게 염색되었다. Brdu에 대한 면역염색 반응은 실험 12일째 대조군에 비하여 실험 I군에서 증식중인 표피, bulge, 피지샘, 내·외모근초 및 동피근에 가장 강하게 염색되었다. 피부조직내 VEGF, FGF, c-kit 및 PKC- $\alpha$ 에 대한 면역염색은 실험 I, II, III군에서는 표피, bulge, 진피층과 피하층 사이의 세포 및 동피근에서 강하게 염색되었다. 발모관련 인자들의 발현량은 실험 12일째 bFGF는 대조군(100%)에 비하여 실험 I, II, III군에서는 각각 138%, 119%, 120%로 증가하였고, VEGF도 각각 146%, 144%, 133%로 현저하게 증가하였다. IGF-1은 각각 165%, 141%, 119%로 증가하였으나, 특히 실험 I군과 II군에서 현저하게 증가하였다. PL1은 각각 121%, 116%, 123%로 증가하였다. 실험 16일째 IGF-1은 각각 126%, 149%, 151%로 증가하였으나 bFGF는 각각 92%와 94% 그리고 VEGF는 101%와 97%로 실험

12일째에 비하여 감소하였다. 그러나 실험 16일째 실험 III군의 bFGF(109%), VEGF(127%) 및 PL1(105%)의 발현량은 대조군에 비하여 더욱 증가하였다.

이상의 실험결과로 3종류의 한약재 추출 혼합물은 생쥐에서 모낭의 발생을 촉진시키는 발모효과가 있었으며, 특히 斑蝥를 저농도로 사용하고 南星과 半夏(生)를 고농도로 사용하는 것이 모발의 성장효과를 증대시킬 것으로 사료되었다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. 최근희 외 11인. 모발과학, 수문사, pp 36-38, 138-140, 2001.
2. 김무영, 과재훈, 박정미 이진태, 안봉전. 생약배합에 따른 탈모방지 및 발모촉진에 관한 연구. J Life Resources & Industry 6: 63-85, 2002.
3. 朱仁康. 脫髮証治, 中醫雜誌 2(12):46, 1986.
4. 李林. 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp 60-61, 1998.
5. 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.
6. Muller, H.K., Rook, A.J., Kubba, R. Immunohistology and autoantibody studies in alopecia areata. Br J Dermatol. 102: 609-610, 1980.
7. Bergfeld, W. Diffuse hair loss in women. Cutis 22: 190-195, 1987.
8. Friedman, P.S. Alopecia areata and auto-immunity. Br J Dermatol 105: 153-157, 1981.
9. Toback, C., Ajkunar, S. The emotional disturbances underlying alopecia areata, alopecia totalis and trichotillomania. Child Psychiatry Hum Dev 10: 114-117, 1979.
10. 李元文, 張韋川. 名醫臨証經驗, 人民衛生出版社, 北京, p 572, 2001.
11. Verginia, C.F.W., Buys, C.M. Evaluation of anthralin in the treatment of alopecia areata. Arch Dermatol 123: 1491-1493, 1987.
12. Price, V.H. Double-blind placebo-controlled evaluation of topical minoxidil in extensive alopecia areata. J Am Acad Dermatol 16: 730-736, 1987.
13. 윤정훈, 김경현, 장수진, 신민섭. 약침을 이용한 원형탈모증 치험 1예. 대한외과과학회지 14(1):1005-1010, 2001.
14. 김경운, 서정철, 이경민, 임성철, 정태영, 한상원. 봉약침과 홍화약침을 이용한 원형탈모증 치험 1예. 대한약침학회지 7(2): 91-96, 2004.
15. 권강주, 이창현, 이문원, 문연자, 최두호, 이학재, 김호민, 우원홍. 사물탕가미방이 원형탈모 생쥐의 발모효과에 관한 형태학적 연구. 동의생리병리학회지 19(3):696-704, 2005.
16. 이희삼, 문재유. Cytarabine으로 유도된 탈모증에 대한 상백피 추출물의 육모촉진 효과. 약학회지 44(1):66-70, 2000.
17. 정석영, 정일국, 김대근, 조한영, 정한솔, 이창현. C57BL/6N 생쥐에서 골쇄보 추출물을 이용한 발모효과에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 21(2):453-461, 2007.
18. 조한영, 김태현, 김호, 정한솔, 이광규, 이창현. C57BL/6N 생쥐에서 반묘추출물과 분획물을 이용한 발모효과에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 22(2):357-364, 2008.
19. Ito, M., Kizawa, K., Hamada, K., Cotsarelis, G. Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. Differentiation 72: 548-557, 2004.
20. 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.
21. 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.
22. 秦漢楨. 脫髮證治, 中醫雜誌 27: 46, 1986.
23. 李元文, 張韋川. 名醫臨証經驗叢書 皮膚病, 北京, 人民衛生出版社, pp 572-622, 2001.
24. 許浚. 동의보감, 서울, 법인문화사, pp 793-797, 1999.
25. 王肯堂. 證治準繩, 鴻寶齋書局, 동명사(영인본), pp 477-478, 1975.
26. 巢元方. 諸病源候論校釋, 서울, 대성출판사, pp 197-200, 1992.
27. 秦萬章. 現代中醫藥應用與研究大系, 12권, 皮膚科, 上海中醫藥大學出版社, pp 270-282, 1999.
28. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖. 中藥現代研究與應用, 學苑出版社, 제4권, pp 3328-3344, 1998.
29. 王本祥. 現代中藥藥理與臨床, 天津科技翻譯出版公司, pp 1483-1487, 2004.
30. Harry, R.G. Hair tonics. In:Harry RG, editor. Harrys cosmeticology. London: George-Godwin Ltd, pp 426-436, 1976.
31. 姜義娜. 斑禿藥物治療的新進展, 中國皮膚性病學雜誌 17: 203-204, 2003.
32. 趙成林. 中藥引赤發泡藥簡介, 江蘇中醫 17(5):37-38, 1996.
33. 陳存仁. 漢方醫藥大事典, 圖書出版 松巖, pp 296-297, 1998.
34. 박지하, 서부일. 반하의 독성에 관한 문헌적 고찰. 동서의학, 25(3):47-55, 2000.
35. 楊中林, 韋英杰, 杜慧, 宣圓圓. 東西南星不同炮制品的毒性及刺激性研究, 中成藥 23(2):101-103, 2001.



36. 許 浚. 동의보감, 서울, 법민문화사, p 800, 1999.
37. 杜錫賢. 皮膚病中醫外治療法, 北京, 中國醫藥科技出版社, p 11, 2000.
38. 吳惠時, 江小青. 斑禿搽劑的研制及臨床應用. 基層中藥雜誌 13: 57, 2000.
39. Argyris, T.S. The effects of wounds on adjacent growing or resting hair follicles in mice. Arch Dermatol Symp 61: 31-36, 1956.
40. Argyris, T.S. Kinetics of epidermal production during epidermal regeneration following abrasion in mice. Am J Pathol 83: 329-340, 1956.
41. 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.
42. Stenn, K.S., Paus, R. Controls of hair follicle. Physiological Reviews 81: 449-494, 2001.
43. Yano, K., Brown, L.F., Detmar, M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. J Clin Invest 107: 409-417, 2001.
44. Ozeki, M., Tabata, Y. Promoted growth of murine hair follicle through controlled release of vascular endothelial growth factor. Biomaterials 23: 2367-2373, 2002.
45. Peters, E.M., Maurer, M., Botchkarev, V.A., Jensen, K., Welker, P., Scott, G.A., Paus, R. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. J Invest Dermatol 121: 976-984, 2003.
46. 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.
47. Daughaday, W.H., Rotwein, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev 10: 68-91, 1989.
48. Su, H.Y., Hickford, J.G., Bickerstaffe, R., et al. Insulin-like growth factor 1 and hair growth. Dermatol Online J 5: 1, 1999.
49. Itami, S., Inui, S. Role of androgen in mesenchymal epithelial interactions in human hair follicle. J Invest Dermatol Symp Proc 10: 209-211, 2005.
50. Tavakkol, A., Elder, J.T., Griffiths, C.E., Cooper, K.D., Talwar, H., Fisher, G.J., Keane, K.M., Foltin, S.K., Voorhees, J.J. Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1(IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. J Invest Dermatol 99: 343-349, 1992.
51. Jiang, H., Yamamoto, S., Kato, R. Induction of anagen in telogen mouse skin by topical application of FK506, a potent immunosuppressant. J Invest Dermatol 104: 523-525, 1995.
52. Pearson, A.J., Ashby, M.G., Wildermoth, J.E., Craven, A.J., Nixon, A.J. Effect of exogenous prolactin on the hair growth cycle. Exp Dermatol 8: 358-360, 1999.
53. 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 162: 1611-1621, 2003.
54. 類國菁. 發泡療法及其臨床應用, 時珍國醫國藥 12(12): 1126-1128, 2001.
55. 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.
56. 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.