Original Article

黃芪 추출물의 외용 도포가 자발성 원형탈모 생쥐에 미치는 영향

권혁제, 김미혜, 양웅모

경희대학교 한의과대학

Effects of Topical application of *Astragalus membranaceus* in Spontaneous Alopecia Mice Model

Hyeok Je Kwon, Mi Hye Kim, Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine,
Kyung Hee University

Objectives: *Astragalus membranaceus* has been reported to inhibit immune responses, but its effect on hair loss is not clear. In this study, the effect of *A. membranaceus* extract (AM) on hair regrowth in C57BL/6 mice with natural hair loss in the telogen phase was investigated.

Methods: Mice with natural hair loss were topically treated with 1% AM on the dorsal skin for 2 weeks. Dorsal skin samples were stained with hematoxylin and eosin and probed with an anti-mouse CD8a IgG. The mRNA expression levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-4 were measured by reverse transcription polymerase chain reaction and quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results: AM treatment induced hair regrowth in hair loss mice, while control mice suffered continued hair loss. Tapering hair shafts and broken hair follicles were decreased as well as CD8+ T lymphocyte infiltration. In addition, the expressions of TNF- α , IFN- γ and IL-4 were reduced by AM treatment. Also, AM treatment significantly increased the KGF expressions in Hs68 fibroblast cells.

Conclusion: These results suggest that topical application of *A. membranaceus* may be an alternative therapy for hair loss.

Key Words : *Astragalus membranaceus*, hair loss, hair follicle, T lymphocyte, cytokine

서론

모발은 물리적 충격, 자외선, 한랭자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 담당하는 피부의 부속기관으로, 1~6년의 성장기(anagen), 1~3주의 퇴행기(catagen), 2~3개월의 휴지기(telogen) 등 3 단계의 모주기를 통하여 성장과 탈락을 반복한다¹⁾. 탈모는 모낭의 소형화, 휴지기 모낭의 증가, 모발의 길이와

밀도의 감소로 인하여 두피, 액와, 음부 등에 존재하는 모발이 탈락하는 질환이다^{2,3)}.

탈모는 흔히 반흔성탈모증과 비반흔성탈모증으로 구분되는데⁴⁾, 이 중 반흔성탈모증은 홍반성루푸스, 박리모낭염, 여드름, 켈로이드 등의 원인으로 인하여 모낭이 파괴되며, 모낭의 섬유화로 모구가 폐색되어 발생한다⁵⁾. 반면, 비반흔성탈모증은 남성형탈모증, 원형탈모증, 휴지기탈모증, 생장기탈모증 등으로 구

• Received : 21 November 2017 • Revised : 14 December 2017 • Accepted : 17 January 2018

• Correspondence to : 양웅모(Woong Mo Yang)

서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학

Tel : +82-2-961-2209, E-mail : wmyang@khu.ac.kr

분할 수 있다. 남성형탈모증은 연령 증가로 인한 dihydrotestosterone (DHT)의 영향으로 두피의 전두부와 두정부의 모낭의 크기가 축소되고, 성장기가 단축되어 발생하는 질환이다^{6,7)}. 원형탈모증은 갑상선 질환, 당뇨, 외상, 백신, 유전적, 정신적, 환경적 요인 등의 원인이 복합적으로 작용하여 성장기 모낭에 T 림프구를 매개한 자가면역 반응이 유도되어 발생한다^{8,9)}.

현재 FDA의 승인을 받은 탈모 치료제로는 Finasteride와 Minoxidil 등이 임상에서 사용되고 있다^{10,11)}. 남성형탈모증 치료제인 Finasteride는 testosterone에서 DHT로의 전환을 매개하는 5 α -reductase를 억제시키는 약물로서 그 중 전피 유두부와 전립샘 및 모낭에 존재하는 type 2 5 α -reductase를 선택적으로 억제한다^{12,13)}. 또한 두피 내에 존재하는 DHT를 41% 정도 감소시키는 것으로 알려졌다¹⁴⁾, 성욕 감소, 무기력, 사정 장애, 우울 등의 부작용이 나타나는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. Dutasteride는 Finasteride보다 type 2 5 α -reductase는 3배, type 1 5 α -reductase는 100배 더 강하게 억제하며¹⁶⁾, 두피 내 DHT를 51% 가량 감소시키는 것으로 나타났으나¹⁴⁾ 사정 장애, 성기능 이상, 무기력, 발기 장애, 여성형 유방 등의 부작용이 확인되어 탈모 치료에 한계가 있다¹⁷⁾. Minoxidil은 piperidinopyrimidine 계열로 본래 고혈압 치료제였으나 약물 효과 외의 발모 효과가 관찰된 이후, 치료 용도를 탈모치료제로 변경하여 현재까지 사용되고 있다^{18,19)}. Minoxidil의 정확한 발모 기전은 아직까지 밝혀진 바 없으나 두피 혈류의 순환 개선을 통해 모발 성장을 촉진한다는 가설이 가장 유력하다^{20,21)}. 그러나 건조감, 소양감, 알러지성 접촉성 피부염 등의 다양한 부작용이 발생할 우려가 있어 안전한 탈모 치료제 개발이 필요한 실정이다²²⁾. 그 외에도 원형탈모증 등에는 스테로이드²³⁾, Cyclosporine²⁴⁾, Diphenylcyclopropenone²⁵⁾를 이용한 약물 치료, Excimer lamp²⁶⁾, 저강도광선요법(Low-level light therapy)²⁷⁾, 줄기세포 치료²⁸⁾, 표재성 냉동치료²⁹⁾, 자가혈소판농축혈장치료술(Platelet-rich plasma)³⁰⁾ 등 다양한 치료가 시도되고 있으나 효과가 미미하고 치

료마다 뚜렷한 근거가 부족한 실정이다.

한의학 문헌에서 탈모는 《黃帝內經》에서 髮墮, 髮去, 毛拔, 髮落, 毛折으로 기록되어 있다^{31,32)}. 晉代 葛洪은 《肘後備急方》³³⁾에서 鬚鬢髮禿으로 언급하였으며, 隋代 巢元方은 《諸病源候論》³⁴⁾에서 탈모의 원인에 따라 鬚髮禿落候, 鬼舐頭候, 毛髮不生候, 白禿候, 赤禿候, 火燒處, 髮不生候로 구분하였다. 唐代 孫思邈의 《千金方》³⁵⁾에서는 白禿, 赤禿, 髮落不生, 頭風白屑으로, 明代 陳實功의 《外科正宗》³⁶⁾에서는 油風으로, 清代 《醫宗金鑑》³⁷⁾에는 鬼剃頭으로 기재되었다. 이 중 현대의 남성형탈모증과 연관된 병증은 鬚髮禿落候이며 변증으로는 氣血兩虛, 肝脾濕熱, 肝腎陰虛³⁸⁾, 脾胃濕熱³⁹⁾ 등이 있다. 鬼舐頭候, 油風, 鬼剃頭는 원형탈모증과 유사하며, 변증으로 血熱生風⁴⁰⁾, 瘀血阻絡, 肝腎不足⁴¹⁾, 血瘀風燥, 氣滯血瘀⁴²⁾ 및 氣血虛弱³⁴⁾이 있다.

황기는 콩과 다년생 본초인 *Astragalus membranaceus* Bunge의 周皮를 벗긴 根으로 性味가 甘溫하며, 生用하면 益衛固表, 利水消腫, 托毒生肌하며 炙用하면 補中益氣하고 內傷勞倦을 치료하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 황기의 성분은 isoflavonoid, saponin, polysaccharide가 포함되어 있고, 그 중 saponin인 astragaloside⁴⁴⁾와 isoflavonoid인 formononetin, calycosin⁴⁵⁾이 황기의 중요한 생리활성 작용과 연관되어 있다. 현재까지 황기의 약리 작용으로는 항산화⁴⁶⁾, 간기능 보호⁴⁷⁾, 혈압강하⁴⁸⁾, 항염증⁴⁹⁾, 아토피 증상 완화⁵⁰⁾ 등이 보고되었다. 특히, 황기의 주성분인 astragaloside IV와 formononetin의 외용 도포가 탈모 생쥐에서 모낭 내 세포자멸사를 억제하여 발모 효과를 나타내는 것으로 보고되었다⁵¹⁾. 그러나 황기 추출물을 이용한 탈모 생쥐에 대한 효능은 아직까지 연구되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 자연 탈모가 유발된 C57BL/6J mice에서 황기 추출물 외용 도포의 발모 효과를 확인하고, 작용 기전을 확인하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 약물의 제조 및 분석

본 실험에 사용된 황기는 정도 생약국(Seoul, Korea)에서 건조된 뿌리 형태로 구입한 후 경희대학교 한의과대학 융합한의과학교실에서 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 황기(150 g)에 30% 에탄올(1.5 L)을 가하여 상온에서 24시간 추출 한 후 여과하였다. 여과액은 $55 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 회전 감압농축기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축 후, 동결 건조하여 24.3g 파우더 상태의 황기 에탄올 추출물을 얻었다(수율: 16.2%). 최종적으로 얻어진 황기 30% 에탄올 추출물 표본(Voucher specimen: #AME030)은 본 실험실에 보관되었다.

황기 추출물의 성분 분석은 High-performance liquid chromatography (HPLC)를 통하여 확인하였다. HPLC system은 chromatographic pump (G1311A Quat pump; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), automated sample injector (ALS G1329A; Agilent Technologies)와 thermostatted column compartment equipped with an evaporative light-scattering detector (1200 series; Agilent Technologies)로 이루어져 있으며, output signal은 G1315D Diode Array Detector (DAD; Agilent Technologies)로 측정하였다. 분석 column은 Gemini RP C₁₈ column (5 μm , 4.6 I.D. $\times$ 250 mm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며 이동상 용매는 증류수(A)와 acetonitrile (B)를 이용하였다. 유속은 0.5mL/min으로 유지하였고 UV 277 nm에서 검출하였다.

2. 실험동물

실험동물은 체중 20g 내외의 암컷 7주령의 C57BL/ 6J 정상 생쥐와 자발적인 원형탈모 생쥐를 이용하였다. 모든 생쥐는 (주)라온바이오(Yongin, Korea)로부터 구매하여 일주일 동안의 적응기를 통해 본 실험에 사용되었다. 각 군의 생쥐(n = 7)는 정상적인 모발 주기를 가진 정상대조군(Normal, normal control group), 자발적으로 원형탈모가 유발된 음성대조군(Control, negative control group), 자발적으로

원형탈모가 유발된 생쥐에 황기 추출물을 처리한 실험군(AM, sample group)으로 나뉘어졌다. 정상대조군과 음성대조군에는 vehicle(증류수)를 처리하였으며, 실험군은 황기 추출물을 1% w/v 농도로 100 μL 씩 원형탈모가 일어난 등 부위에 동일하게 처리하였다. 매일 1회씩 총 14일간 반복하였으며, 15일 째 되는 날 실험 목적에 따라 생쥐를 희생하였다. 탈모 부위의 조직학적 분석 및 각종 분자학적 지표 분석을 위하여 병변 부위의 피부 조직을 적출하였다. 전 실험 기간 동안 모든 생쥐들은 표준화된 고형사료와 물을 공급받았으며, 사육실의 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 광주기와 암주기(light-dark cycle)는 12시간-12시간으로 유지되었다. 모든 동물실험 과정은 National Institutes of Health의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)에 근거하여 이루어졌으며, 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인(Permit Number: KHUASP(SE)-13-046)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 수행되었다.

3. 육안적 발모 소견

자발적으로 원형탈모가 유발된 생쥐에서 황기 추출물의 발모 효능을 관찰하기 위하여 실험 시작 15일 째 되는 날 생쥐를 희생하기 전 졸레틸과 림폰이 1:1로 혼합된 마취제를 희석하여 복강 투여하였다. 마취된 생쥐의 등 부위를 카메라(Sony, Tokyo, Japan)로 촬영한 후 정상대조군 및 음성대조군과 비교 관찰하였다.

4. 조직학적 평가

적출한 등 피부 조직을 24시간 동안 4% 포르말린에 고정한 후, 조직의 탈수를 위해 순서대로 저농도의 70% 에탄올부터 80% 에탄올, 90% 에탄올, 95% 에탄올 및 고농도 100% 알코올까지 탈수하고, 자일렌에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 4 μm 두께로 박절하여 탈파라핀 및 100% 에탄올에서 70% 에탄올을 거쳐 함수시켰다. 증류수에 수세시킨 조직 슬라이드를 hematoxylin & eosin (H&E)로 각각 염색하여 permount로 봉입하

였고. 염색된 조직은 광학현미경(Leica Microsystems Inc., IL, USA)에서 $\times 200$ 및 $\times 400$ 배율로 관찰하였다.

5. 면역조직화학적 염색

파라핀 슬라이드의 탈파라핀 및 수세 과정은 조직학적 평가에 사용했던 방법과 동일하게 진행되었다. 3% 과산화수소 처리로 인하여 endogenous peroxidase 활성이 억제된 조직 슬라이드에 normal goat serum이 포함된 1차 항체 goat anti-mouse CD8a (1:200)을 처리하여 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 2차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 1:400으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 Avidin/ Biotinylated enzyme Complex kit (Vector Laboratories) 용액에 담가 실온에서 1시간가량 반응시킨 후 3-3' diaminobenzidine으로 발색시켜 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거쳐 permount로 봉입하였다. 염색된 조직은 광학현미경(Leica Microsystems Inc., IL, USA)에서 $\times 400$ 배율로 관찰하였다.

6. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 Real-time PCR (qPCR)

적출한 등 피부 조직에서 mRNA를 추출하기 위하여 Trizol 방법을 사용하였다. 100 mg의 피부 조직에 Trizol 1 mL을 섞어 상온에서 30분 정도 반응시킨 후 homogenizer로 분쇄하였다. 클로로포름과 이소부탄올을 이용하여 추출된 1 μ g RNA를 cDNA synthesis kits (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 45°C에서 60분, 95°C에서 5분 동안 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA 증폭은 GoTaq (Promega M712B)을 이용하였고 TNF- α , IL-4와 IFN- γ primer와 함께 thermal cycler (Perkin Elmer 2400, USA)에서 45 cycles 증폭되었다. 사용된 primer는 RT-PCR과 qPCR 모두 사용 가능한 제품으로 주문하였다. 각 cycle은 94°C에서 20초 denaturation, 60°C에서 30초 annealing 및 72°C에서 2분 extension시켰다. PCR에 사용된 TNF- α sequence

는 5'-GGT GCA ATG CAG AGC CTT CC-3' (forward) and 5'-CAG TGA TGT AGC GAC AGC CTG G-3' (reverse), IL-4 sequence는 5'-ATG GGT CTC AAC CCC CAG C-3' (forward) and 5'-GCT CTT TAC GCT TTC CAG GAA GTC-3' (reverse), IFN- γ sequence는 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' (forward) and 5'-GCT CTT TAC GCT TTC CAG GAA GTC-3' (reverse)이며, GAPDH sequence는 5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG -3' (forward) and 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3' (reverse)였다. 증폭된 생성물은 1% agarose gel에 전기영동 후 Gel Doc (Bio-Rad, USA)에서 관찰하였다.

7. 면역 형광 검사

Hs68 섬유아세포의 배양을 위하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 혼합하여 사용하였다. 6 well chamber에서 세포가 confluent한 상태가 될 때까지 배양한 후 황기 추출물을 농도별로 1, 10, 100 μ g/mL 처리한 후 24시간째에 배지를 제거하고 4% 포르말린 용액을 처리하여 세포를 고정시켰다. 1차 항체로 goat anti-rabbit keratinocyte growth factor (KGF)를 이용하여 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 2차 항체로 Alexa fluor 488 rabbit anti-goat를 반응시키고, 핵은 DAPI로 염색하였다. 염색된 세포는 형광 현미경으로 관찰하였다.

8. Western blotting

상기 기재된 동일한 방법으로 황기 추출물을 섬유아세포에 처리 후, 배지를 제거하고 trypsin-EDTA 시약을 첨가하여 세포를 걷어내었다. Protease inhibitors cocktail이 포함된 protein extraction buffer (0 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA)를 pipetting을 통하여 분쇄하였다. 정량된 단백질을 30 μ g을 SDS 12% polyacrylamide gel에 전기영동하여 분리한 후 PVDF membrane으로 이동시켰다. 1차 항

체로 goat anti-rabbit KGF를 반응시킨 후, HRP goat anti-rabbit을 처리하였다. 발현된 단백질 밴드는 enhanced chemiluminescence assay kit를 이용하여 LAS Image Gauge 프로그램에서 측정하였다.

9. 통계처리

실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ S.E.M) 값으로 표시하였으며, 집단 간 평균치 차이는 각 실험 결과를 통하여 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

1. HPLC를 이용한 황기 추출물의 품질 분석

황기 추출물 내 formononetin 함량을 확인하기 위

하여 HPLC를 이용하여 formononetin 표준물질(Fig. 1A)과 황기 추출물(Fig. 1B)을 비교 분석하였다. formononetin 표준물질과 황기 추출물의 peak는 31.7 min으로 동일한 것을 확인하였다.

2. 황기 추출물의 육안적인 발모 효능

자발적으로 원형탈모가 유발된 대조군 생쥐의 경우, 모발 주기가 정상인 정상군 생쥐에 비하여 등 부위에 부분적으로 원형탈모가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 자발적 원형탈모 유발 생쥐의 병변 부위 피부는 C57BL/6J 생쥐의 모발 생성 주기 중 퇴행기를 나타내는 회색으로 변한 상태였다. 황기 추출물을 원형탈모 부위에 14일 동안 외용 도포한 결과 병변 부위 전체에서 육안적인 발모 현상과 육모 현상이 관찰되었다(Fig. 2). 뿐만 아니라, 황기 추출물로 인하여 모발의 밀도가 대조군에 비하여 증가된 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 1. Quality evaluation of *Astragalus membranaceus*, HPLC chromatograms of standard formononetin (A) and *A. membranaceus* extract (B). It takes 31.7 min for the retention times of formononetin itself and formononetin in *A. membranaceus* extract.

Fig. 2. *A. membranaceus* induces hair regrowth in hair loss mice. Morphological findings on the back of the C57BL/6J mice. The mice of *A. membranaceus* group were treated with 100 μ L of 1% (w/v) *A. membranaceus* for 14 days. Following challenge for 15 days, photographs were taken and mice were sacrificed. Normal, non-treated normal control mice; Control, vehicle-treated alopecia mice; AM, AM-treated alopecia mice.

3. 황기 추출물의 모낭 성장 효능

H&E 염색으로 병변 부위 조직을 확인한 결과, 정상 생쥐의 모낭은 손상 없이 털이 표피 밖으로 빠져 나와 있는 반면, 자발적 원형탈모를 유발한 대조군 생쥐의 병변 부위 조직의 모낭은 이어져 있지 않고 불규칙하게 끊어져 있었다. 그리고 모낭의 크기가 축소되어 모낭 안쪽의 모발 섬유가 없이 비어있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 모낭 주위에 염증세포가 무리를 지어 군집을 형성한 ‘swarm of bees’ 현상을 나타내었다. 황기 추출물을 외용 도포한 생쥐의 경우 손상되었던 모낭이 회복되어 진피층 뿐만 아니라 피하층까지 성장한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 일부 모낭들에서는 황기 추출물 처리로 인하여 모낭 안쪽의 모발 섬유가 자라났으며 대조군 생쥐에 비하여 황기 추출물을 외용 도포한 생쥐에서는 모낭의 수가 증가되는 현상을 나타내었다.

4. 황기 추출물의 모낭 내 CD8⁺ T 림프구 저해 효능

자발적으로 원형탈모가 유발된 대조군에서는 CD8⁺ T 림프구가 침윤되어 모낭 주위에서 강하게 면역반응을 나타내었다. 반면 황기 추출물 처리군의 피부

Fig. 3. *A. membranaceus* recovers the dystrophy of hair follicles. Histological findings by hematoxylin and eosin (H&E) staining of dorsal skin sections (n = 7). The magnifications were $\times 100$ (upper panel) and $\times 200$ (lower panel). Arrow indicates ‘swarm of bees’. Arrowhead indicates tapering hair shaft. Normal, non-treated normal control mice; Control, vehicle-treated alopecia mice; AM, AM-treated alopecia mice.

Fig. 4. *A. membranaceus* reduces the infiltration of CD8⁺ cells in skin tissues. Immunohistochemical CD8⁺ cell staining. Arrow indicates brown-stained CD8⁺ cells. Normal, non-treated normal control mice; Control, vehicle-treated alopecia mice; AM, AM-treated alopecia mice.

조직에서는 표지된 CD8⁺ T 림프구를 거의 관찰할 수 없어 황기 추출물이 모낭 내 CD8⁺ T 림프구의 침윤을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

5. 황기 추출물의 피부 조직 내 사이토카인 mRNA 발현 조절 효능

탈모 병변 부위의 피부 조직에서 탈모에 관련된 사이토카인 (TNF- α , IL-4와 IFN- γ) mRNA 발현량을 RT-PCR과 qPCR 모두에서 측정한 결과, 대조군 생

Fig. 5. *A. membranaceus* decreases the mRNA expressions of cytokines in skin tissues. Expression of TNF- α , IL-4 and IFN- γ mRNA levels by RT-PCR (A) and qPCR (B). Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. ## and ### indicates the mean differs significantly between Normal group and Control group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). *** indicates that the mean differs significantly between Control and AM group ($p < 0.001$).

귀의 피부 조직에서 TNF- α , IL-4와 IFN- γ mRNA 발현량이 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다. TNF- α 발현은 정상군에 비하여 대조군의 피부 조직에서 약 22배 증가하였고, IL-4 발현은 약 59배 증가, IFN- γ 발현은 약 25배 증가하였다. 반면 탈모된 병변 부위에 황기 추출물을 외용 도포한 피부 조직에서 TNF- α , IL-4와 IFN- γ mRNA 발현량이 모두 정상군의 발현량과 비슷한 수준으로 감소되었다(Fig. 5, $p < 0.001$).

6. 황기 추출물의 피부 모유두 세포 내 KGF 발현 증가 효능

피부 모유두 세포인 Hs68 세포에서 황기 추출물을 농도별로 처리하여 KGF 발현량을 확인하였다.

Fig. 6. *A. membranaceus* increases the KGF expression in Hs68 fibroblast cells. Expression of KGF fluorescence by immunofluorescence staining (A) and protein level by Western blotting (B) in Hs68 fibroblast cells. Green, KGF. Blue, DAPI. Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. *** indicates that the mean differs significantly between non-treated cells and AM-treated cells ($p < 0.001$).

KGF를 녹색 형광으로 염색한 결과 피부 모유두 세포에서 황기 추출물은 농도 의존적으로 KGF 발현을 증가시켰다 (Fig. 6A). 황기를 처리했을 때 DAPI로 염색된 세포의 핵의 수는 그대로 유지되었기 때문에 황기가 피부 모유두 세포에서 KGF의 발현을 증가시키는 효능을 확인하였다. 뿐만 아니라 Western blotting으로 확인한 KGF 단백질 발현량 또한 황기 추출물에 의하여 농도 의존적으로 유의성 있게 늘어난 것을 확인하였다 (Fig. 6B).

고 찰

탈모로 인하여 손상된 모낭은 크기가 축소되어 있거나 심한 경우 모구가 폐색되어 모낭이 파괴되어

있다. 특히, 손상된 모낭 주위에 림프구가 침윤되는 ‘swarm of bees’ 현상이 일어나 모낭에 염증을 일으킨다⁹⁾. 침윤된 림프구는 $CD4^+$ T 림프구와 $CD8^+$ T 림프구로 구성되어 있는데, $CD8^+$ T 림프구와, $CD4^+$ T 림프구를 매개한 자가면역 반응으로 모낭이 훼손되면 모발이 정상적으로 기능을 수행할 수 없다. 본 연구에서는 자발적 원형탈모가 유발된 동물 모델을 통해 황기 추출물의 탈모 개선 효과를 실험하였다. 배측 병변 부위에 황기 추출물을 도포한 생쥐의 병변 부위 모발은 육안상으로 대조군에 비하여 비병변 부위의 모발의 길이가 회복되었으며, 모발의 밀도도 높아지는 등의 경향성이 관찰되었다. 조직학적 평가에서 대조군에 비해 황기 추출물 처리군에서는 염증세포의 침윤이 감소하였으며, 면적 당 모낭 수가 증가했고 모낭 내 모발의 정상 성장을 확인하였다. 면역조직화학적 염색으로 $CD8^+$ T 림프구의 발현을 확인한 결과, 황기 추출물의 외용 도포로 인하여 $CD8^+$ T 림프구가 감소하였다.

스트레스, 피부 미세 손상, 감염 인자 외 설명할 수 없는 여러 발병 원인들로 인하여 모낭 및 모낭 주위 세포들이 interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 등의 사이토카인을 분비한다⁵²⁾. TNF- α 는 여러 감염과 염증에 연관되어 있으며 IFN- γ 와 같은 Th1 계통의 사이토카인이다. 염증 매개 작용과 함께 세포 성장과 분화 등 비면역 반응에도 영향을 미치는 TNF- α 는^{53),54)} 최근 연구에 따르면 in vitro에서 IL-1 α , IL-1 β 와 함께 모구(hair bulb)에 있는 기질의 공포화, 크기 감소, 모낭 내 melanocyte의 붕괴, precortical cell과 내모근초(inner root sheath)의 비정상적 분화와 각화를 일으키는 작용을 하는 것으로 보고되었다⁵⁵⁾. 뿐만 아니라 TNF- α 는 모발을 퇴행기의 모발과 유사한 형태인 곤봉 형태로 변화시킨다고 알려져 있다⁵⁶⁾. 본 연구에서는 정상 생쥐에 비하여 탈모가 유발된 병변 부위에서 TNF- α mRNA 레벨이 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 탈모 병변 부위의 증가된 TNF- α 발현은 황기 추출물 외용 도포로 인하여 유의성 있게 감소되었다.

IFN- γ 은 모낭 내 MHC class I, II의 발현을 유도하여 성장기 모낭의 면역 특권을 소실하는 것으로 보고되어 있다^{57),58)}. IFN- γ 가 결핍된 생쥐는 모낭 주위의 MHC I, II의 이상 발현이 정상대조군에 비해서 적어 원형탈모증을 유발하지 않았다⁵⁹⁾. 이는 원형탈모증에서 모낭 내 MHC class I, II의 발현에 대한 IFN- γ 의 역할을 나타낸다. 본 실험에서 황기 추출물 도포군은 탈모가 유발된 생쥐에서 IFN- γ 의 발현을 유의하게 감소시켰다. 따라서 황기는 IFN- γ 의 발현을 억제하여 모낭 내 MHC class I, II의 발현을 낮추어 $CD8^+$ T 림프구의 모낭 파괴를 감소시킨 것으로 유추할 수 있다. 또한 IL-4는 Th2 계열의 싸이토카인 중 하나로, 원형탈모증에 이환된 환자에서 높게 나타나는 것으로 밝혀져 있다^{60),61)}. 본 연구에서는 황기 추출물을 처리한 생쥐에서 Th2 싸이토카인인 IL-4가 대조군에 비해 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면, 황기 추출물 외용 도포는 TNF- α , IFN- γ 및 IL-4 등의 염증성 싸이토카인의 발현 감소를 통해 기질, melanocyte, 근초 등 모낭의 기능 정상화에 기여하였을 것으로 사료된다.

염증성 싸이토카인 외에도 IGF-1, KGF, fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, FGF-5, hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor 등 모발 성장을 유도하는 여러 가지 인자가 있다. 그 중 KGF는 섬유모세포 성장인자의 하나인 FGF family에 속하는 인자이다⁶²⁾. KGF는 모낭의 성장에 필수적인 인자이며, 표피의 기저층과 외모근초(outer root sheath)에 존재하는 KGF 수용체를 억제할 경우, 모낭의 형태가 비정상적으로 변화되고 모낭 개수가 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 그 외에도 피부, 위 장관, 유선 등의 상피세포의 분열과 분화가 KGF에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있다^{62),63)}. KGF는 피부 내 기저층과 모낭 및 피지선 안의 keratinocyte를 자극하여 성장을 촉진시키고 모발의 성장을 유도한다⁶⁴⁾. 황기 추출물의 처리는 Hs68 섬유아세포의 KGF의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다. 이러한 KGF의 발현 증가를 통해 황기 추출물이 모발 성장을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

이상과 같이 황기 추출물 처리는 자발적 원형탈모가 유발된 C57BL/6J mice의 병변부위에서의 모발의 성장을 유도하고, 염증성 사이토카인을 감소시켰다. 또한 섬유아세포에서 KGF 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 황기의 외용도포제로써 탈모 치료에 응용할 가치가 있다고 사료된다. 추후 황기의 탈모 효과 개선에 대한 기전 규명을 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

결론

본 연구는 황기 추출물의 자발적 원형탈모에 대한 개선효과를 객관적으로 검증하기 위하여 황기의 외용 도포가 염증세포의 침윤, CD8⁺ T 림프구 침윤, IL-4, IFN- γ , TNF- α 의 발현 감소 및 KGF의 발현 증가를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 황기 외용 도포는 자발적 원형탈모 병변부위에 모발 성장을 보였으며, 향후 자발적 원형탈모에 대한 치료 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiological Reviews*. 2001;81(1): 449-94.
2. Min BG. Diagnosis and treatment of hair & scalp disorders. Hanmi Book. 2005:21-30.
3. Zoe DD. Cosmetics in dermatology. 2nd. London: Churchill Livingstone. 1995:179-91.
4. Ahn SG, Ji HG, Hwang SM, Jung J, Jang KH. Common Skin Disease. Pacific publisher. 2003. 437.
5. Korean Dermatology Association. Textbook of Dermatology. 6Th. Seoul:Med book. 2014:551-7.
6. Lee SH, Lee JR. Association of Diffuse Hair loss of Adult Male on Stress, Self-confidence, and Depression. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2010;16(4):1171-9.
7. Fitzpatrick TB, Wolff K. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7Th. NewYork:McGraw-Hill. 2008:766-9.
8. Moustafa AET, Hassan I, Essam AN, Mai SAD. Platelets rich plasma versus minoxidil 5% in treatment of alopecia areata: A trichoscopic evaluation. *Dermatologic Therapy*. 2017;30(1): e12437.
9. Amin SS, Sachdeva S. Alopecia areata: A review, Saudi Society of Dermatology and Dermatologic Surgery. 2013;17:37-45.
10. Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, Reygagne P, Del Marmol V, Spuls PI, et al. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2011;9(6):51-7.
11. Varothai S, Bergfeld WF. Androgenetic Alopecia: An Evidence-Based Treatment Update. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2014;15(3): 217-30.
12. Levy LL, Emer JJ. Female pattern alopecia: current perspectives. *International Journal of Women's Health*. 2013;5:541-56.
13. Yamana K, Labrie F, Luu-The V. Human type 3 5 α -reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and Dutasteride. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2010;2:293-9.
14. Lee SY, Chun SW, Kim JB, No BI. A Case of Combination Therapy with Finasteride and Low Dose Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Korean Journal of Dermatology*. 2017;55(2):147-8.
15. Mounsey AL, Reed SW. Diagnosing and treating hair loss. *American Family Physician*. 2009;80(4):356-62.

16. Eun HC, Kwon OS, Yeon JH, Skin HS, Kim BY, Ro BI, et al. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;63:252-8.
17. Choi GS, Kim JH. Safety and Tolerability of the Dual 5-Alpha Reductase Inhibitor Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Annals of Dermatology*. 2016;28(4):444-50.
18. Lee WS, Ahn HJ, Kim YH. The Effect of Coapplication of Capsaicin and Minoxidil on the Murine Hair growth. *Korean Journal of Dermatology*. 2003;41(4):451-60.
19. Zappacosta AR. Reversal of baldness in patient receiving minoxidil for hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 1980;303:1480-1.
20. Fiedler-Weiss VC. Potential mechanisms of minoxidil-induced hair growth in alopecia areata. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1987;16:653-6.
21. Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *British Journal of Dermatology*. 2004;150:186-94.
22. Evelyn YC. Androgenetic alopecia (male pattern hair loss) in the United States: What treatments should primary care providers recommend?. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*. 2013;25(8):395-401.
23. Alkhalifah A, Alsantali A, Wang E, McElwee KJ, Shapiro J. Alopecia areata update. Part II: treatment, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;62:191-202.
24. Olsen EA, Carson SC, Turney EA. Systemic steroids with or without 2% topical minoxidil in the tretment of alopecia areata. *Archives of Dermatology*. 1992;128:1467-73.
25. Chiang KS, Mesinkovska NA, Piliang MP, Bergfeld WF. Clinical efficacy of diphenylcyclopropenone in alopecia areata: retrospective data analysis of 50 patients. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2015;17:50-5.
26. Ohtsuki A, Hasegawa T, Komiyama E, Takagi A, Kawasaki J, Ikeda S. 308-nm Excimer Lamp for the Treatment of Alopecia Areata: Clinical Trial on 16 Cases. *Indian Journal of Dermatology*. 2013;58(4):326.
27. Munck A, Gavazzoni MF, Trüeb RM. Use of low-level laser therapy as monotherapy or concomitant therapy for male and female androgenetic alopecia. *Canadian Medical Association Journal*. 2013;185(18):1579-85.
28. Fukuoka H, Suga H. Hair Regeneration Treatment Using Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Medium: Follow-up With Trichograms. *Eplasty*. 2015;15:e10.
29. Zawar VP, Karad GM. Liquid nitrogen cryotherapy in recalcitrant alopecia areata: a study of 11 patients. *International Journal of Trichology*. 2016;8:15-20.
30. Khatu SS, More YE, Gokhale NR, Chavhan DC, Bendsure N. Platelet-rich plasma in androgenic alopecia: myth or an effective tool. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014;7(2):107-10.
31. Lee WG. *Sinpyeonsomunjipju*. Seoul: Daeseongmunhwasa. 1994:894.
32. Kwak AC. *Hwangjenaegyeong yeongchugyojueoseok*. Busan:Iljungsang. 1993:123, 213.
33. Gal H. *Gallhongjuhubigeupbang*. Beijing:Inminwisaengchulpansa. 1996:196.
34. So WB. *Sossijebyeongwonhuchongnon*. Shanghai: Soinchulpansa. 1980:695-6.
35. Son SM. *Bigeupcheongeumyobang*. Seoul: Deseongmunhwasa. 1984:434-5.

36. Jin SG. Oegwajeongjong. Beijing:Inninwisaengchulpansa. 1983:256.
37. Oh G. Uijonggeumgam. Seoul:Daeseongmunhwasa. 1983:97.
38. Gao J, Liu H, Xie Y, Zhao H, Xie Z, Zhong Z. Clinical observation of the therapy of catgut embedding and moxibustion on androgenetic alopecia. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. 2013;22(1):8-15.
39. Lin KR, Jiang YF, Yu AS. Clinical observation of Chinese comprehensive therapy on androgenetic alopecia of damp and heat in the spleen and the stomach pattern. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine. 2014;48(8):53-6.
40. Yang SS. Junguiimsangdaeyeon. Seoul: Daeseongchulpansa. 1988:912.
41. Chen GT. Siryongjungseouigyeolhapjindanchiryohak. Busan:Iljunga. 1992:1508.
42. Gu BK. Junguioegwahak. Shanghai:Sanghaegwahakgisulchulpansa. 1985:309-12.
43. All oriental medicine university bonchohak teacher. Bonchohak. Seoul:Yunglimsa. 2007:576-8.
44. Kim SH, Jun YM, Lim JJ, Kim SH, Chung IM, Kim EH. Variation of Astragalosides Contents in Cultivated Astragalus membranaceus. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2012;20(5): 372-80.
45. Bai F, Makino T, Kono K, Nagatsu A, Ono T, Mizukami H. Calycosin and formononetin from astragalus root enhance dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 and nitric oxide synthase expressions in Madin Darby Canine Kidney II cells. Journal of Natural Medicines. 2013;67(4):782-9.
46. Park CI. Study on Effects of Anti-oxidant and Viscoelastic on Emulsion by the Extract of Astragalus membranaceus. The Korea Journal of Herbology. 2012;27(2):93-7.
47. Baek NI, Kim YS, Kyung JS, Park KH. Isolation of anti-hepatotoxic agent from the root of Astragalus membranaceus. Korean Journal of Pharmacognosy. 1996;27:111-6.
48. Hikino H, Funayama S, Endo K. Hypotensive principles of Astragalus and Hedysarum roots, Planta Medica. 1976;30:297-302.
49. Zang YD, Wang YL, Shen JP, Li DX. Hypotensive and anti-inflammatory effects of Astragalus saponin 1. Acta Pharmacologica Sinica. 1984;19:333-7.
50. Kim JH, Kim MH, Yang GS, Huh YB, Kim SH, Yang WM. Effects of topical application of Astragalus membranaceus on allergic dermatitis, Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2012;35(1):151-6.
51. Kim MH, Kim SH, Yang WM. Beneficial Effects of Astragaloside IV for Hair Loss via Inhibition of Fas/Fas L-Mediated Apoptotic Signaling. PLoS One. 2014;9(3):e92984.
52. Paus R, Ito N, Takigawa M, Ito T. The hair follicle and immune privilege. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 2003;8(2):188-94.
53. Ansel J, Perry P, Brown J. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. Journal of Investigative Dermatology. 1990;94(6):1015-75.
54. Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. Clinical Chemistry. 1990;36:1269-81.
55. Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor- α in alopecia areata. British Journal of Dermatology. 1996;135(6):942-8.

56. Hoffmann R, Eicheler W, Huth A, Wenzel E, Happle R. Cytokines and growth factors influence hair growth in vitro: Possible implications for the pathogenesis and treatment of alopecia areata. *Archives of Dermatological Research*. 1996;288:153-6.
57. Gilhar A, Etzioni A, Assy A, Eidelman S. Response of grafts from patients with alopecia areata transplanted onto nude mice, to administration of interferon-gamma. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1993;66:120-6.
58. Sato-Kawamura M, Aiba S, Tagami H. Strong expression of CD40, CD54 and HLA-DR antigen and lack of evidence for direct cellular cytotoxicity are unique immunohistopathological features in alopecia areata. *Archives of Dermatological Research*. 2003;294(12):536-43.
59. Freyschmidt-Paul P, McElwee KJ, Hoffmann R, Sundberg JP, Vitacolonna M, Kissling S, et al. Interferon-gamma-deficient mice are resistant to the development of alopecia areata. *British Journal of Dermatology*. 2006;155(3):515-21.
60. Teraki Y, Imanishi K, Shiohara T. Cytokines in alopecia areata: contrasting cytokine profiles in localized form and extensive form (alopecia universalis). *Acta Dermato-Venereologica*. 1996;76(6):421-3.
61. Attia EA, El Shennawy D, Sefin A. Serum Interleukin-4 and Total Immunoglobulin E in Nonatopic Alopecia Areata Patients and HLA-DRB1 Typing. *Dermatology Research and Practice*. 2010;2010:1-6.
62. Hom DB. Growth factors in wound healing, *Otolaryngologic Clinics of North America*. 1995;28(5):933-53.
63. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 1994;266:819.
64. Pierce GF, Yanagihara D, Klopchin K, Danilenko DM, Hsu E, Kenney WC, et al. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994;179:831-40.

ORCID

Hyeok Je Kwon <https://orcid.org/0000-0003-4773-7301>
Mi Hye Kim <http://orcid.org/0000-0001-6455-5441>
Woong Mo Yang <http://orcid.org/0000-0001-5308-2386>