

白首烏의 항산화 효능 및 모유두 세포의 5 α -reductase mRNA 발현 억제 효능

조남준 · 최영호 · 전해리 · 이용희^{1,2} · 김기광* · 한효상^{3*}

충남대학교 생화학과, 1 : 충남대학교 생물공학연구소, 2 : (주)모든바이오, 3 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation of Antioxidant Activity of Cynanchi Wilfordii Radix and Inhibitory Effect of 5 α -reductase mRNA in Human Dermal Papilla Cells

Nam Joon Cho, Young Ho Choi, Hai Li Jeon, Woong Hee Lee^{1,2}, Kee Kwang Kim*, Hyo Sang Han^{3*}

Department of Biochemistry, 1 : Institute of Biotechnology, Chungnam National University, 2 : MODN BIO Inc.,
3 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University

Hair loss affects interpersonal relationships and causes psychological stress. In this study, we investigated the antioxidant activity of Cynanchi Wilfordii Radix (CWR) and its effects on dermal papilla (DP) cells. Antioxidant efficacy was examined by ABTS assay. To confirm the effect on cell activity, MTS assay was performed and cell count was directly measured by hemocytometer. The mRNA expression of genes involved in hair formation and hair loss formation was confirmed by quantitative RT-PCR. CWR has a strong antioxidant activity. Cell viability of DP cells was increased to 118.5% by treatment of 0.5 mg/ml CWR for 24 hours, but the effect on the cell number was insignificant. These results suggest that CWR increases mitochondrial activity without promoting cell proliferation. Treatment of DP cells with 0.5 mg/ml CWR resulted in 48.5% reduction of mRNA expression of type 2 5 α -reductase, a major cause of male hair loss. In addition, mRNA expression of bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF)7, and FGF10, which are closely related to hair growth, was also decreased. Reactive oxygen species (ROS) acts as a cause of hair loss. The excellent antioxidant efficacy of CWR is thought to be able to effectively remove ROS. The dihydrotestosterone produced by type 2 5 α -reductase in DP cells is a potent inducer of male pattern hair loss. The inhibitory effect of type 2 5 α -reductase mRNA on DP cells induced by CWR may induce a positive therapeutic effect of male pattern hair loss.

keywords : Cynanchi Wilfordii Radix, Antioxidant effect, Dermal papilla cell, Cytotoxicity, Type 2 5 α -reductase

서 론

白首烏 또는 白何首烏는 宋代의 《開寶本草》와 《圖經本草》에 何首烏는 赤何首烏, 白何首烏가 있다는 기록 이후로 何首烏의 일종으로 사용되었던 약물이다. 사용 연원이 비교적 오래되었음에도 불구하고 明代의 《本草綱目》에 이르러서도 《圖經本草》의 내용을 인용하여 언급하였을 뿐 두 약물간의 정확한 감별요점이 제시되어 있지 않다¹⁾. 白首烏는 《山東中藥》에 최초로 수재되었으며 임상에서 補肝腎, 強筋骨, 健脾胃, 解毒의 효능이 있어 肝腎兩虛, 頭昏眼花,

失眠健忘, 須髮早白, 陽痿, 遺精, 腰膝酸軟, 脾虛不運, 腕腹脹滿, 食欲不振, 泄瀉, 產後乳少, 魚口瘡毒 등의 증상을 치료하는데 사용되고 있다²⁾.

白首烏는 대한약전의한약(생약)규격집³⁾에 박주가리와 은조롱(隔山消, Cynanchum wilfordii Hemsley)의 덩이뿌리인데 반해 何首烏는 마디풀과 하수오(何首烏, Polygonum multiflorum Thunberg)의 덩이뿌리⁴⁾로 기원식물이 다르고 유기성분도 다르다.

白首烏의 성분으로 Steroidal alkaloid로서 gagaminine 및 이의 배당체와 wilfoside KIN, wilfoside CIN 및 cynauricuoside

* Corresponding author

Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, Republic of Korea

·E-mail : kimkk@cnu.ac.kr ·Tel : +82-42-821-5485

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, 201, Daehak-ro, Majeon-ri, Chubu-myeon, Geumsan-gun, Chungcheongnam-do, Republic of Korea

·E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr ·Tel : +82-41-750-6292

·Received : 2017/09/13 ·Revised : 2017/11/10 ·Accepted : 2017/12/05

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.374>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

A 등이 함유되어 있다. 이 외에도 acetophenone 화합물로서 cynamandione A 및 cynanchone A 등이 함유되어 있다⁵⁾.

白首烏의 알칼로이드 성분인 gagaminine이 심혈관 질환 증 말초저항의 증가가 원인이 되는 질환에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다⁶⁾. 白首烏의 약리작용으로는 白首烏가 간장조직 내 지방변성의 억제효과 및 간장기능 회복을 촉진하는 효소활성이 증가된다는 보고⁷⁾가 있고, 白首烏 추출물이 혈압을 낮추고 지질 대사 개선에 영향을 준다는 보고⁸⁾, 白首烏 추출물을 이용한 실험을 통해 p38과 NF- κ B의 활성 억제하여 파골세포 분화에 핵심적인 유전자인 c-fos, NFATc1의 발현을 조절함으로써 파골세포 분화를 억제에 대한 보고⁹⁾가 있으며, 白首烏 추출액이 고지혈증 및 Streptozotocin 유발 당뇨병 흰쥐의 혈청 지질 개선 효과가 보고¹⁰⁾ 되었다.

모유두 세포 (dermal papilla)는 모낭 주기의 조절을 매개하는 여러 신호를 분비하는 중요한 역할을 하고 있다. 남성호르몬은 모유두에 직접적으로 작용하여 성장을 억제하는 물질의 분비를 촉진하고, 모발의 성장을 유발하는 성장인자를 분비하지 못하도록 유도하여 탈모를 유발한다¹²⁾.

한의학에서 말하는 “脫髮”, “鬼舐頭”, “油風”, “斑禿”, “白禿”, “赤禿” 등은 탈모증의 범주에 속한다. 탈모의 원인으로는 腎虛, 肺氣虛, 氣血虛, 血虛, 血熱, 瘀血, 七情 등의 內因과 風邪, 風熱, 濕熱, 五味傷, 蟲, 火 등의 外因을 들고 있으며¹³⁾ 최근의 문헌에서는 이를 血熱生風, 肝腎不足, 瘀血阻絡, 血熱風燥, 濕熱上蒸, 血虛風燥¹⁴⁻¹⁸⁾ 등으로 분류하고 있다.

白首烏는 모발 성장 강화를 위한 화장품으로 많이 이용되고 있으며, 마우스의 모발 성장을 촉진하는 연구결과가 보고되어있다¹⁹⁾. 하지만 白首烏가 모발 성장을 조절하는 모유두 세포에 미치는 영향은 잘 알려지지 않았다. 이에 저자는 白首烏를 열수추출하여 얻은 시료로 항산화 효능, 모유두 세포의 세포활성도에 미치는 영향, 그리고 제1형, 제2형 5 α -reductase, bone morphogenetic protein (BMP)6, fibroblast growth factor (FGF)7, FGF10, β -catenin의 mRNA 발현량에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 白首烏는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2017년 1월에 구입 (NO: 2017-0105)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과 대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 DMEM media (WELGENE, Korea), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (WELGENE, Korea), FBS (WELGENE, Korea), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), MTS solution (Promega, USA), Qubit RNA

Assay Kit (Molecular probes, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENETBIO, Korea), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), 그리고 Filter paper (Advantec No.2, Japan) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Thermo, USA), microplate reader (Molecular Devices EMx Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), Ultrasonic cleaner (Branson, USA) 등이다.

2. 방법

1) 白首烏 열수추출물 제조

白首烏 중량 50 g을 정확하게 측정된 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 白首烏 16.2 g, 수율 32.4%였다.

2) 세포 배양

실험에 사용된 모유두 세포는 충남대학교 의과대학 피부과로부터 분양받아 연구를 진행하였다²⁰⁾. 실험에 사용한 모유두 세포는 10% FBS와 1% antibiotic이 첨가되어있는 DMEM 배양액을 이용하여, 세포표준배양법인 5% CO₂, 37°C 조건을 유지시켜주었다.

3) 항산화 효능 평가

白首烏 농도 (0.125, 0.25, 0.5, 1.2 mg/ml)와 resveratrol의 항산화 효능을 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 통해 측정하였다. ABTS 7 mM, potassium persulfate 2.4 mM 용액을 동일한 부피로 혼합해준 뒤 24 시간 동안 차광시킨 상태로 반응시켜 ABTS free radical로 만들었다. 이후 96 well plate의 well에 ABTS free radical 80 μ l 용액을 넣고 microplate reader로 650 nm 흡광도를 측정하였을 때 측정값이 0.7 부근이 되도록 ABTS free radical을 D.W로 희석 해주어 ABTS working solution을 만들었다. ABTS working solution 80 μ l 와 sample 20 μ l를 96 well plate의 각 well에 혼합한 뒤 5 분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능의 결과는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

4) 세포활성도 평가

96 well plate의 각 well에 모유두 세포를 1 X 10⁴ cells/well로 분주한 뒤 24 시간 동안 배양 후, 白首烏를 0.13, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 처리해주고 24 시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 용액을 20 μ l 첨가해주고 microplate reader를 이용하여 490 nm 흡광도를 측정하였다. 白

首烏 처리에 의한 상대적인 세포활성도 변화를 계산하기 위하여 다음 식을 이용하였다.

세포활성도(%) =

(시료첨가군의 흡광도-시료자체의 흡광도/대조군의 흡광도) × 100
5) 세포 수 측정

모유두 세포를 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 뒤 24 시간 동안 배양하였다. 이후 白首烏를 0.5 mg/ml 농도로 처리한 뒤 24 시간 동안 다시 배양하였다. 배양액을 다 제거해주고 DPBS로 세척 후 trypsin-EDTA를 처리하여 single cell을 얻은 뒤 hemocytometer로 세포 수를 측정하였다.

6) qRT-PCR

6 well plate에 모유두 세포를 2×10^5 cells/well로 분주 후 24 시간 배양하였다. 이 후 白首烏 0.5 mg/ml를 처리한 뒤 36 시간 다시 배양하였다. 배양액을 제거해준 뒤 DPBS로 세척 후 eCube Tissue RNA Mini Kit로 RNA를 추출하였다. The Qubit 2.0 Fluorometer를 이용하여 추출한 RNA를 정량한 뒤 RNA 1 µg에 DEPC-treated water로 총 부피를 8 µl로 만들어준 뒤 Random hexamer (100 pmol/µl) 1 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl를 각각 넣어주었다. Water bath를 이용하여 65°C에서 5 분간 반응시킨 뒤, 바로 얼음에 냉각시켜 주었다. 각 sample에 RNase inhibitor 1 µl, M-MLV RT reaction buffer 4 µl, M-MLV reverse transcriptase 1 µl, DEPC-treated water 4 µl를 추가로 첨가하였다. 10 분간 실온에서 반응시킨 후 50°C에서 1 시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고, D.W를 이용하여 1/5로 희석하였다. cDNA 5 µl와 2X Prime Q-mater Mix 10 µl, D.W 2 µl, forward, reverse primer (10 pmol/µl) 각각 1.5 µl를 섞고, AriaMx를 통해 qRT-PCR을 수행하여 SRD5A1, SRD5A2, BMP6, FGF7, FGF10, CTNNB1의 mRNA 발현 변화를 확인하였다. β-actin mRNA 발현량을 이용하여 결과값을 보정하였다.

Table 1. Primer sequences

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
SRD5A1	F CTA CCA GTA CGC CAG CGA GT	143	58
	R CCA ACA GTG GCA TAG GCT TT		
SRD5A2	F ACG GTA CTT CTG GGC CTC TT	135	58
	R AAG GAC TCC ATT TCC AGT GC		
BMP6	F CAT GAG CTT TGT GAA CCT GG	141	58
	R CAG TCC TTG TAG ATG CGG AA		
FGF7	F TGA TTA CAT GGA AGG AGG GG	146	58
	R CTG CCA CTG TCC TGA TTT CC		
FGF10	F TGA GAA GAA CGG GAA GGT CA	139	58
	R CCC CTT CTT GTT CAT GGC TA		
CTNNB1	F AGG TCT GAG GAG CAG CTT CA	142	58
	R ATT GTC CAC GCT GGA TTT TC		
β-actin	F TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

결 과

1. 항산화 효능 확인

활성산소는 생리적 작용에 의해 끊임없이 생성되고, 이로 인해 발생하는 산화적 스트레스는 노화 진행에 중요한 원인이 되며, 남성

형 탈모의 발병 원인으로 작용하기도 하다²¹⁾. 이러한 이유로 白首烏가 활성산소에 미치는 작용을 ABTS assay를 통해 확인하였다. 항산화 효능이 잘 알려진 resveratrol을 이용하여 ABTS assay를 진행한 결과 농도의존적으로 ABTS 라디칼 소거능을 보였으며, 이를 통해 실험 시스템을 검증할 수 있었다. 白首烏의 ABTS 라디칼 소거 효능 또한 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 통해 白首烏의 항산화 효능을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

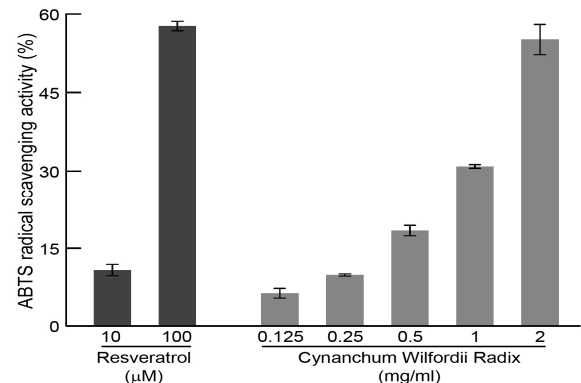


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity of resveratrol and Cynanchum Wilfordii Radix.

2. 모유두 세포의 세포활성도 및 세포증식에 미치는 영향

白首烏가 모유두 세포의 세포활성도에 미치는 효과를 확인하기 위하여 미토콘드리아의 NADH, NADPH 생성량을 측정하는 MTS assay를 실시하였다. 모유두 세포에 白首烏를 24 시간 처리한 결과 0.25 mg/ml, 1 mg/ml의 白首烏는 모유두 세포의 세포활성도를 103.6%, 107.6%로 증가시켰으며, 0.5 mg/ml 농도의 白首烏는 특히 가장 높은 수치인 118.5%로 세포활성도를 증가시켰다. 반면 2 mg/ml 농도의 白首烏는 82.0%로 세포활성도를 감소시켰다. 모유두 세포에 0.5 mg/ml 농도의 白首烏를 24 시간을 처리한 뒤 hemocytometer로 직접적인 세포 수를 측정한 결과 유의미한 세포 수의 변화를 확인할 수 없었다. 즉 0.5 mg/ml 白首烏에 의한 모유두 세포의 세포활성도 증가는 세포 증식의 촉진에 의해 나타나는 것이 아니라 세포 내 미토콘드리아 활성의 증가로 인해 나타난 것으로 생각된다(Fig. 2).

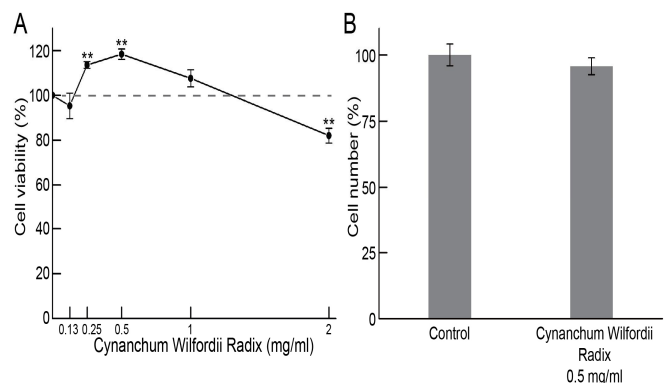


Fig. 2. Effect of DP cells viability by Cynanchi Wilfordii Radix. DP cells were treated with indicated concentration of Cynanchi Wilfordii Radix for 24 h. (A) Cell viability was measured by MTS assay. (B) Cell numbers were determined by counting in hemocytometer. **p < 0.01 versus control.

3. 모발 생성 및 성장과 관련된 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향

5 α -reductase의 작용으로 testosterone으로부터 생성되는 dihydrotestosterone (DHT)은 모낭을 축소시키고, 모발의 성장기간을 감축시켜 남성형 탈모의 주원인으로 작용한다²²⁾. 白首烏가 남성형 탈모에 미치는 영향을 확인하기 위하여 모유두 세포에 0.5 mg/ml 白首烏를 36 시간 처리한 후 제1형과 제2형 5 α -reductase 유전자인 SRD5A1, SRD5A2의 mRNA 발현량을 qRT-PCR로 확인하였다. 그 결과 제1형 5 α -reductase mRNA 발현에는 큰 영향을 나타내지 않았으나, 놀랍게도 제2형 5 α -reductase mRNA 발현은 48.5%로 감소하였다. 또한 白首烏의 처리 농도를 증가시킨 경우 모유두 세포의 제2형 5 α -reductase mRNA 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 모유두 세포에서 발현되는 BMP는 모발 생성 주기의 성장기를 억제하고, 휴지기를 유도한다. 이 후 모유두 세포는 BMP inhibitor와 FGF7, FGF10과 같은 인자의 발현을 증가시켜 모발의 생성을 다시 촉진시키며, 결국 모발 생성 주기를 성장기 단계로 다시 유도한다²³⁾. β -catenin 신호는 모낭의 생성 및 형성에 중요한 역할을 하며, BMP 신호의 억제와 Wnt 신호의 조절을 통해 모발의 성장을 촉진한다^{24,25)}. 0.5 mg/ml 白首烏에 의한 BMP6, FGF7, FGF10 그리고 β -catenin 유전자인 CTNNB1의 발현 변화를 qRT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 BMP6의 mRNA 발현이 60.7%로 감소하였으며, FGF7과 FGF10은 각각 77.9%, 52.0%로 mRNA 발현이 감소하였다. 하지만 β -catenin mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 3).

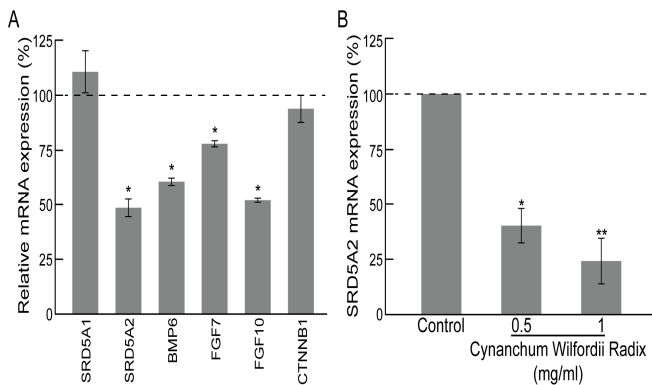


Fig. 3. (A) Regulation of hair growth related gene expression by *Cynanchi Wilfordii Radix*. DP cells were treated with 0.5 mg/ml *Cynanchi Wilfordii Radix* for 36 h. (B) Effect of type 2 5 α -reductase mRNA expression level by *Cynanchi Wilfordii Radix* treatment in concentration-dependent manner. DP cells were treated with indicated concentration of *Cynanchi Wilfordii Radix* for 36 h. mRNA expression level was measured by qRT-PCR. Data was normalized by β -actin mRNA expression. *p < 0.05, **p < 0.01 versus control.

고찰

《東醫寶鑑》²⁶⁾에서 하수오의 향약명으로 "온조롱"과 새박불휘"라고 기술하고 있다. 白首烏는 양치바른 山麓 풀밭 또는 바닷가 경사지에서 자라는 덩굴성 多年草로서 뿌리가 깊이 들어가며 굵고 원줄기는 왼쪽으로 감아 올라가며 길이 1~3 m 이고 자르면 백색 乳液이 나온다²⁷⁾.

白首烏의 성분은 인지질성분으로 phosphatidyl choline, phosphatidylethanol amide, phosphatidyl inositol 등과 steroid al glycoside로서 wilfosiide 등과 이들의 aglycone으로 sarcostin, kidjoranin, deacylcynanchogenin, deacylmetaplexigenin, caudatin, penupogenin, wilforine 등이 있으며 이들의 sugar로서 wilforbiose, d - and l - cymarose, l - diginose 등이 포함되어있으며, 이들의 steroidal glycosede를 cynanchotoxin이라고도 한다²⁸⁾.

탈모를 유발하는 원인으로서는 현재까지 모유두와 모낭을 둘러싸고 있는 혈관의 순환장애로 인한 영양공급 장애, 그리고 남성호르몬 등이 주요인으로 생각되고 있다. 이중 남성호르몬에 의한 영향은 Hamilton이 남성호르몬과 성인형 탈모의 관련성을 밝히면서 연구가 진행되어 왔다²⁹⁾.

활성산소는 매우 반응성이 강하기 때문에 DNA, protein, lipid 등 유기물질의 변성을 유도하게 되어 다양한 질병의 원인이 되며, 현재 이 활성산소는 노화의 매우 중요한 원인으로 생각되어지고 있다. 특히 산화적 스트레스에 의해 나타나는 지질의 산화는 마우스 모발 성장주기에서 퇴화기를 유도하고, 모낭세포의 세포사멸을 촉진시킨다는 연구결과가 보고되었다³⁰⁾. 즉 활성산소는 모발 생성의 역제를 유도하며, 탈모 발병의 원인으로 작용할 수 있다. 항산화제인 tempol은 마우스에서 지질의 산화를 막아주어 모발 생성 주기를 회복하는 작용을 가진다는 연구결과가 보고되었다³¹⁾. 항산화 효능은 모발 성장 촉진 및 탈모 억제에 중요하게 작용할 수 있으므로 白首烏의 항산화 효능을 ABTS assay를 통해 확인하였다. 그 결과 白首烏는 농도 의존적인 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었다. 白首烏의 항산화 효능이 세포 및 실제 사람의 발모에 작용하여 미치는 영향은 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

BMP6, FGF7, FGF10, β -catenin과 같은 모유두 세포가 발현하는 다양한 세포 신호 분자들은 모낭의 형성에 필수적인 요인일 뿐 아니라 모발 생성 주기를 조절하여 성장기를 유도하는 중요한 기능을 가진다³²⁾. 높은 농도 白首烏 처리에 의하여 모유두 세포에 독성을 나타낼 경우 모발 형성에 부정적인 영향을 미칠 수 있으므로, 白首烏가 모유두 세포의 세포활성도에 미치는 영향 그리고 모유두 세포에 가지는 白首烏의 세포독성을 확인하기 위하여 MTS assay를 실시하였다. 그 결과 0.5 mg/ml 농도 白首烏는 모유두 세포의 세포활성도를 증가시켰으며, 2 mg/ml 농도에서는 세포독성이 확인되었다. MTS assay는 tetrazolim salt가 미토콘드리아에서 생성되는 NADH, NADPH에 의해 formazan으로 바뀌며, 이 formazan을 490 nm 흡광도로 측정하여 세포활성도를 확인하는 방법으로 0.5 mg/ml 白首烏에 의한 세포활성도의 증가는 세포 수 증가를 통해 나타나거나, 세포 내 NADH, NADPH 생성량 증가를 통해 나타난다³³⁾. 0.5 mg/ml 白首烏는 모유두 세포의 증식에는 영향을 미치지 않는 것을 직접적인 세포 수 측정을 통해 확인하였다. 따라서 0.5 mg/ml 白首烏에 의한 모유두 세포의 세포활성도 증가는 세포 내 미토콘드리아 활성에 의해 나타난 것으로 생각된다. 다음과 같은 작용이 나타나게 된 메커니즘과 모발의 생성 및 성장에 미치는 영향은 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

세포활성도를 가장 높은 수치로 증가시킨 0.5 mg/ml 농도 白

首烏를 모유두 세포에 처리한 뒤 모발의 생성 및 성장과 관련된 다양한 유전자 발현에 미치는 영향을 확인해보았다. 제1형 5 α -reductase는 피부의 피지 및 땀샘에 많이 분포하고 있으며 제2형 5 α -reductase는 수염, 전립선 그리고 두피 모낭에 주로 분포하고 있다³⁴). 그 중 제2형이 탈모의 주된 원인으로 작용한다. FDA에 탈모 치료제로 승인받은 물질은 minoxidil과 finasteride가 유일하며, 그 중 finasteride는 제2형 5 α -reductase를 억제함으로써 DHT의 생성을 감소시켜 남성형 탈모의 치료 효과를 나타낸다³⁵). 따라서 제2형 5 α -reductase의 억제는 남성형 탈모 치료에 매우 중요하다. 白首烏는 제1형 5 α -reductase의 mRNA 발현에 큰 영향을 미치지 않았으나 놀랍게도 제2형 5 α -reductase의 mRNA 발현을 절반 이상 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. 추가로 白首烏가 모발 성장에 중요하게 작용하는 BMP6, FGF7, FGF10 β -catenin 유전자 발현에 미치는 영향을 확인해보았다. 0.5 mg/ml 농도의 白首烏를 모유두 세포에 처리한 경우 모발 생성을 억제하는 BMP6의 mRNA 발현이 감소하였지만, 모발 생성을 유도하는 FGF7, FGF10의 mRNA 발현도 같이 감소하였다. β -catenin의 mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않았다. 탈모의 대부분은 남성형 탈모에 의해 나타나며, 이 남성형 탈모의 주요 원인인 DHT는 모유두와 모낭의 수축을 유도하여 모발성장 주기를 성장기에서 휴지기로 유도하며, 탈모를 유도하는 transforming growth factor- β 1과 β 2의 발현을 촉진한다³⁶). 白首烏의 처리에 의하여 모유두 세포의 제 2형 5 α -reductase mRNA 발현량이 감소되는 효과는 白首烏가 남성형 탈모의 뛰어난 치료 효과를 나타낼 수 있는 가능성을 제시해준다. 하지만 白首烏는 모발 생성을 촉진시키는 FGF7, FGF10의 mRNA 발현 또한 억제하였다. 이러한 이유로 白首烏의 작용이 최종적으로 모발 성장 주기에 미치게 될 영향은 추가적인 연구가 필요하다.

白首烏는 활성산소를 제거할 수 있는 항산화 효능을 보유하고 있으며, 모유두 세포에 작용하여 남성형 탈모의 가장 큰 원인으로 작용하는 5 α -reductase의 mRNA 발현을 48.5% 까지 감소시켰다. 5 α -reductase 활성을 억제하여 남성형 탈모를 치료하는 약물인 finasteride는 치료에 장기간 적용할 경우 성욕 감퇴, 발기력 저하, 남성의 여성형 유방, 사정량 감소 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다³⁷). 본 연구 결과들을 통해, 저자는 白首烏는 기존의 만성형 탈모 치료제인 finasteride처럼 적용할 수 있는 것으로 사료된다. 추후 白首烏를 in vivo에 적용하여 모발의 형성 및 탈모의 치료 효과를 검증할 필요가 있으며, 본 연구 결과에서 白首烏 처리에 의해 나타난 모유두 세포의 미토콘드리아 활성도 증가 및 BMP6, FGF7, FGF10 mRNA 발현량의 변화가 발모 및 탈모 치유 작용에 미치게 되는 영향 또한 검증할 필요가 있을 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 白首烏를 열수추출하여 얻은 시료의 항산화 효능을 확인하였으며, 모유두 세포에 白首烏를 처리한 뒤 나타나는 세포 활성도의 변화, 모발의 성장 및 탈모의 유발과 관련된 유전자의 mRNA 발현량에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

白首烏의 항산화 효능을 ABTS assay를 통해 확인하였다. 白

首烏를 다양한 농도로 모유두 세포에 24 시간 처리한 후 MTS assay를 실시한 결과 0.5 mg/ml 농도에서 세포활성도를 118.5% 까지 증가시켰다. 0.5 mg/ml 농도의 白首烏를 모유두 세포에 36 시간 처리한 경우 제2형 5 α -reductase의 mRNA 발현을 48.5%까지 감소시켰다.

본 연구 결과를 통해 白首烏는 항산화 효능 및 제2형 5 α -reductase 발현 억제를 바탕으로 남성형 탈모를 효율적으로 치료할 수 있는 새로운 치료제로 개발될 수 있는 가능성 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Doh EJ, Kim JH, Choi GY, Lee SH, Song HJ, Ju YS, Lee GS. Microscopic Identification-keys for *Cynanchi Wilfordii Radix* and *Cynanchi Auriculati Radix*. Kor. J. Herbol. 2015;30(4):65-9.
2. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. *Zhonghuabencao*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999:355.
3. Korea Food and Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia. Seoul: Korea Food and Drug Administration. 2017:275-7.
4. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH. *Hanbangyakrihak*. Seoul:Shinilbukseu. 2007:709-11.
5. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. *Boncho-Hak*. Seoul:Young-Lim Press. 2007:635-7.
6. Chang KC, Lee DU. Vasodilatory Effect of the Alkaloid Component from the Roots of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. Korean Journal of Life Science. 2000;10(6):584-90.
7. Shin MK. A Comparative Study on the Effects of *Polygoni Radix* and *Cynanchi Radix* on Rat Livers Intoxicated with Carbon Tetrachloride. Kor J Pharmacogn. 1985; 16(2):81-92.
8. Choi JH, Lee Hs, Kim YE, Kim BM, Kim IH, Lee CH. Effect of *Cynanchi wilfordii Radix* Extracts on Lipid Compositions and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. J Korean Soc Food Sci Nut. 2012;41(3):345-50.
9. Ahn YH, Oh JM, Lee MS, Jung JH, Chae SU, Moon SY, Jeon BH, Choi MK. Effect of Water Extract of *Cynanchi*

- Wilfordii Radix in RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2012;26(2):160-5.
10. Kim HS. Effects of *Cynanchum wilfordii* Extract on Serum Lipid Components and Enzyme Activities in Hyperlipidemic and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean J Human Ecology*. 2004;7(2):1-11.
 11. Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression(catagen). *Am J Pathol*. 1997;151(6):1601-7.
 12. Takahashi T, Kamiya T, Yokoo Y. Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells in vitro and convert hair cycle in vivo. *Acta Derm Venereol*. 1998;78(6):428-32.
 13. Jang HY, Choi KH, Kim SH, Kwon KR, Kim BW. Bibliographic Studies of Depilation. *J Pharmacopuncture*. 2002;5(2):92-108.
 14. Zhongyiyuan. *Zhongyizhengzhuangjianbiezhenduanxue*. Beijing:Renminweisheng chubanshe. 1987:495-6.
 15. Yang SS. *Zhongyilinchuangdaquan*. Beijing: Beijingkexue jishuchubanshe. 1965:911-2.
 16. Chen GY, Yang SS. *Shiyongzhongxiyijiehezhenduanzhiliaoxue*. Beijing:Zhongguoyiyaokejichubanshe. 1991:1508,1510.
 17. Gu BK. *Zhongyiwaikexue*. Beijing:Renminweisheng chubanshe. 1987:309-12.
 18. Lee BG. *Jeungsanggambyeolchilyo*. seoul:Seongbosa. 1991: 773-4.
 19. Park JS, LeeJS. The Promoting Effect of *Pleuropterus cilinervis* Extracts Fermented with *Lactobacillus rhamnosus* on Hair Growth. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2011;39(4):345-9.
 20. Kim CD, Lee MH, Roh SS. Identification of androgen-regulated genes in SV40-transformed human hair dermal papilla cells. *J. Dermatol. Sci*. 2003;32(2):143-9.
 21. Ralph M Trüeb. Oxidative Stress in Ageing of Hair. *Int J Trichology*. 2009;1(1):6-14.
 22. Randall VA. Androgen and hair growth. *Dermatol Ther*. 2008;21(5):314-28.
 23. Solanas G, Benitah SA. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(11):737-48.
 24. Enshell-Seijffers D, Lindon C, Kashiwagi M, Morgan BA. beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. *Dev Cell*. 2010;18(4):633-42.
 25. Lei MX, Chuong CM, Widelitz RB. Tuning Wnt Signals for More or Fewer Hairs. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):7-9.
 26. Heo J. Donguibogam. Namsandang;Seoul. 1989:735.
 27. Lee CB. Daehansigmuldogam. Hyangmunsa. 1982:630.
 28. Korea Food & Drug Administration. Search for a publication data base. from, <https://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=8&page=2&page=2&mode=view&boardSeq=71515>.
 29. Hamilton JB. Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am J Anat*. 1942;71:451.
 30. Naito A, Midorikawa T, Yoshino T, Ohdera M. Lipid peroxides induce early onset of catagen phase in murine hair cycles. *Int J Mol Med*. 2008;22(6):725-9.
 31. Liu N, Wang LH, Guo LL, Wang GQ, Zhou XP, Jiang Y, Shang J, Murao K, Chen JW, Fu WQ, Zhang GX. Chronic Restraint Stress Inhibits Hair Growth via Substance P Mediated by Reactive Oxygen Species in Mice. *PLoS One*. 2013;8(4):e61574.
 32. Rahmani W, Abbasi S, Hagner A, Raharjo E, Kumar R, Hotta A, Magness S, Metzger D, Biernaskie J. Hair Follicle Dermal Stem Cells Regenerate the Dermal Sheath, Repopulate the Dermal Papilla, and Modulate Hair Type. *Dev Cell*. 2014;31(5):543-58.
 33. Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity. *Biotechniques*. 1995;19(4):640-9.
 34. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Adv Urol*. 2012;2012:530121.
 35. Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, DeVillez R, Bergfeld W, Price VH, Nete DV, Roberts JL, Hordinsky M, Shapiro J, Binkowitz B, Gormley GJ, the Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998;39(4):578-89.
 36. Kang JI, Kim SC, Kim MK, Boo HJ, Kim EJ, Im GJ, Kim YH, Hyun JW, Kang JH, Koh YS, Park DB, Yoo ES, Kang HK. beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *Molecular and cellular pharmacology*. 2015;757:74-83.
 37. Ferrando J, Grimalt R, Alsina M, Bulla F, Manasievskia E. Unilateral gynecomastia induced by treatment with 1 mg of oral finasteride. *Arch Dermatol*. 2002;138(4):543-4.