

당목향 뿌리 추출물의 인체 모유두세포 증식 및 모발 성장 관련 신호전달에 미치는 영향

최형철^{*,**} · 정노희^{*,†}

*충북대학교 공과대학 공업화학과, **(주)에이치피앤씨
(2021년 10월 13일 접수, 2021년 11월 5일 채택)

Effect of *Saussurea Lappa* Root Extract on Proliferation and Hair Growth-related Signal Pathway in Human Hair Follicle Dermal Papilla Cells

Hyoung-Chul Chio^{*,**} and Noh-Hee Jeong^{*,†}

^{*}Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

^{**}HP&C Ltd., Cheongju 28158, Korea

(Received October 13, 2021; Accepted November 5, 2021)

초 록

본 연구에서는 에탄올과 노말헥산을 이용하여 당목향 뿌리 추출물을 제조하고, 인체 모유두세포의 세포증식 및 모발 성장 관련 신호전달에 미치는 영향을 평가하였다. 당목향 뿌리 추출물의 세포증식 효과는 MTT assay를 실시하였으며, ERK, Akt, Wnt/ β -catenin 신호 경로, 5 α -reductase의 발현을 western blot 분석을 통해 측정하였다. 당목향 뿌리 추출물은 인체 모유두세포의 증식을 유의하게 증가시켰고, 세포증식에 관여하는 ERK와 Akt의 인산화를 촉진하였으며, 당목향 뿌리 추출물에 의해 증가된 ERK, Akt 인산화 촉진과 세포증식은 MEK/ERK 억제제 PD98059와 PI3K/Akt 억제제 LY294002에 의해 유의하게 감소되었다. 또한 당목향 뿌리 추출물은 GSK-3 β (Ser9)의 인산화를 통한 β -catenin (Ser552, 675)의 인산화를 촉진함으로써 핵 내의 β -catenin 축적을 유도하였고, 5 α -reductase type I, II의 활성을 억제하였다. 종합적으로 당목향 뿌리 추출물은 모유두세포의 ERK, Akt 경로의 활성화를 통해 세포의 증식을 유도하며, β -catenin 신호 경로 활성화 및 5 α -reductase 활성 억제를 통해 탈모 예방 및 모발 성장 효과를 나타냄으로써 헤어케어 제품의 소재로 응용가능성이 있음을 시사한다.

Abstract

In this study, *Saussurea Lappa* roots were extracted using ethanol and n-hexane, and also the effects on proliferation of human hair dermal papilla cells and fibroblast and related signaling pathway were evaluated. 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was conducted for cell proliferation effect of *Saussurea Lappa* root extract, and extracellular signal-related kinase (ERK), serine/threonine protein kinase (Akt), wingless-related integration site (Wnt)/ β -catenin signaling pathway, and 5 α -reductase expression through western blot analysis were measured. *Saussurea Lappa* root extract significantly increased human hair dermal papilla cells and propagation of fibroblast, promoted phosphorylation of ERK and Akt that get involved in cell proliferation. Additionally, *Saussurea Lappa* root extract significantly decreased promotion of Akt phosphorylation and cell proliferation by MEK/ERK inhibitor PD98059 and PI3K/Akt inhibitor LY294002. Also, *Saussurea Lappa* root extract induced intranuclear β -catenin accumulation by promoting phosphorylation of β -catenin (Ser552, 675) through phosphorylation of GSK-3 β (Ser9), and suppressed activation of 5 α -reductase type I and II. Overall, *Saussurea Lappa* root induces cell proliferation through vitalization of ERK and Akt route of human hair dermal papilla cells and fibroblast and apoptosis defense mechanism, and can be helpful in hair loss prevention and hair growth by vitalizing the β -catenin signaling pathway and inhibiting activation of 5 α -reductase, which can be used as a potential hair care products.

Keywords: *Saussurea Lappa* root extract, Human hair dermal papilla cells, Cell proliferation, Signaling pathway, Hair care

1. 서 론

모발은 외부자극으로부터 피부를 보호하고, 추위와 더위, 물리적 충

격, 자외선으로부터 머리를 보호하는 기능을 가지고 있으며, 사회적 동물인 인간이 자신의 개성과 아름다운 매력을 발산하기 위한 헤어스타일의 표현에 대한 욕구 등 현대 사회에서 모발이 갖는 의미는 중요하다. 탈모는 지금까지 다른 질병에 비해 상대적으로 가볍게 취급되어져 오고 있지만, 외모를 중시하는 현대 사회의 가치관으로 인해 정신적 스트레스를 발생시키고 삶의 질을 저하시키며 대인관계나 사회 생활에 많은 지장을 주면서 최근 새로운 사회적 문제로 떠오르고 있다[1,2]. 모발은 피부 부속기관인 모낭에서 성장하며, 두발과 체모를

† Corresponding Author: Chungbuk National University
Department of Engineering Chemistry, Cheongju 28644, Korea
Tel: +82-43-261-2440 e-mail: nhjeong@cbnu.ac.kr

포함한 모낭이 전신에 분포되어 있다. 모낭은 모구를 감싸는 주머니로 모구, 모유두, 모기질, 멜라닌형성세포, 피지선, 기모근 등이 존재한다[3]. 각각의 모낭은 독립된 성장 주기를 가지며, 성장기, 퇴화기, 휴지기로 구분되는 3단계의 반복을 통해 성장하고 탈락한다[4]. 이러한 모발의 성장주기는 환경오염, 스트레스, 호르몬 등의 내적, 외적 요인에 의해 변형되고 단축되어 모발의 비정상적 탈모를 유도하고 탈모 환자의 수는 매년 증가하고 있으며, 인간의 평균 수명이 높아짐에 따라 탈모증은 불가항력이 아닌 질환으로 여겨져 탈모 예방 및 발모는 많은 사람들의 관심을 받고 있다[5].

안드로겐성 탈모(androgenic alopecia, AGA)는 가장 흔한 유형의 탈모 증상으로 남성형 탈모로 알려져 있으며, 모낭주기의 성장단계가 반복적으로 조기 종료되어 발생한다[6]. 현재 미국 FDA (food and drug administration)로부터 승인받은 탈모치료제는 finasteride와 minoxidil이 있으며, finasteride의 성기능 저하 및 기형아 출산 부작용, minoxidil의 알레르기성 피부염, 가려움증 및 사용 중단 시 탈모가 재발하는 등의 부작용이 발생하는 것으로 알려져 있어 탈모 치료제로서의 단점이 있다[7,8]. 따라서 이러한 단점을 보완하여 보다 안전하고 모발 손실 예방 및 모발 성장 강화 효과를 가진 새로운 소재 개발이 필요한 실정이다[9].

최근 들어 중년 뿐 아니라 청년기에도 탈모가 증가하여 사회활동에 지장을 초래하는 경우가 크게 늘고 있으며, 탈모를 예방하고 모발 성장을 촉진할 수 있는 소재의 탐색 및 실험적인 연구가 활발히 진행되고 있다[10-13]. 모발이 성장하기 위해서는 모낭인자들의 작용과 모낭 내에 있는 표피세포와 모유두세포와의 상호작용이 매우 중요하다[14, 15]. 모발의 성장과 재생에 필수적인 모낭 줄기세포의 활성화 및 모발 배종(hair germ)의 세포 증식 과정에 Wnt/ β -catenin 신호전달이 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 보고되었고[16,17], Wnt ligand가 수용체에 결합하면 세포질 내의 β -catenin 분해가 방지되고 세포핵으로 β -catenin의 이동이 증가하여 target 유전자의 발현을 조절하게 된다. 특히, protein kinase A (PKA), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 등의 활성화는 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로를 활성화 한다[18]. 또한, 모유두세포에는 모세 혈관이 분포하고 있어 기관에 영양소를 공급하며 성장인자인 insulin like growth factor 1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), fibroblast growth factor 1 (FGF-1)을 분비하여 모낭주위에 혈관을 형성시키고 혈액순환을 촉진함으로써 상피세포의 성장을 조절한다[19,20].

당목향은 국화과에 속한 다년생 식물인 *Saussurea Lappa*의 뿌리로서 한의학에서는 구토, 설사 및 염증치료 등에 사용되는 약재로 알려져 있다[21]. 당목향의 주요 생리활성 물질로는 sesquiterpene 및 sesquiterpene lactone계 화합물이 알려져 있으며, 특히 당목향 추출물과 당목향의 주요 지표물질로 알려진 costunolide와 dehydrocostuslactone은 항균, 항염증, 항암, 항피부염, 항바이러스 등의 다양한 약리작용을 보이는 것으로 보고되었다[22, 23].

본 연구에서는 에탄올과 노말헥산을 이용하여 당목향 뿌리 추출물을 제조하고, 인체 모유두세포(human hair follicle dermal papilla cells, HFDPC)의 세포증식 및 모발 성장 관련 신호전달에 미치는 영향을 조사하여 탈모 관련 기능성 화장품 소재로서 활용 방안을 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험재료 및 시약

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 및 fetal bovine serum

(FBS)는 invitrogen (Carlsbad, CA, USA)사 제품을, dimethylsulf-oxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 5 α -reductase I, II, β -actin, lanmin B는 Santa Cruz (CA, USA)사 제품을, phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204), p44/42, phospho-Akt (S473), Akt, β -catenin (Amino-terminal Antigen), phospho- β -catenin (Ser675), phospho- β -catenin (Ser552), phospho-GSK-3 β (Ser9), GSK-3 β antibody는 cell signaling (Beverly, MA, USA)사 제품을, Anti-Goat, Anti-Rabbit, Anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody, Hybond-ECL nitrocellulose membrane, western blotting detection reagent는 amersham biosciences (Buckinghamshire, England)사 제품을, Non-fat skim milk는 Becton (Le Pont de Clanx, France)사 제품을, leupeptin, aprotonin, sodium fluoride (NaF), minoxidil, finasteride, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), sodium orthovanadate (Na₃VO₄), N,N,N',N'-tetrametylet-hylendiamine (TEMED)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을, 단백질 정량 시약은 Bio-Rad (CA, USA)사 제품을 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 다른 모든 실험재료는 분자생물학적 등급이다.

2.2. 추출물 제조

본 연구에 사용된 당목향 뿌리는 ㈜산들초계약에서 구입하여 사용하였으며, 당목향 뿌리 6 kg에 에탄올 40 L을 넣어 상온에서 3일간 추출한 후 펠트프레스로 여과하였다. 이 액을 60 °C 이하에서 감압농축기(Rotary vacuum evaporator, Büchi rotavapor R-100, Germany)로 농축하여 얻어진 0.72 kg을 증류수 10 L에 현탁시키고, 노말헥산 30 L을 넣어 분획하여 노말헥산층을 취하였다. 노말헥산층을 60 °C 이하에서 감압 농축하여 추출물 약 60 g을 제조하였으며, 냉장보관하면서 사용하였다.

2.3. 세포 배양

인체 모유두세포(HFDPC)는 Abm Inc (Richmond, British Columbia, Canada)에서 구입하여 사용했고, 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL)이 포함된 DMEM를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4. 세포생존율 측정

MTT assay를 통해 성장률을 분석하였으며, HFDPC를 24 well plate에 4×10^3 개씩 분주하여 24시간 배양한 뒤 당목향 뿌리 추출물 5, 10, 20, 30 μ g/mL과 minoxidil 10 μ M을 처리한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 0.05% W/V MTT 용액을 넣어 37°C에서 3시간 반응시킨 뒤 상층액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 1 mL로 녹여 ELISA plate reader (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 ERK와 Akt경유를 통한 측정은 24 well plate에 HFDPC를 4×10^3 개씩 분주하여 24시간 배양한 뒤 ERK 억제제 PD98059 (20 μ M)와 Akt 억제제 LY294002 (20 μ M)를 1시간 전처리하고 당목향 뿌리 추출물 10, 20 μ g/mL과 minoxidil 10 μ M 처리하였으며, 72시간 뒤 측정하였다.

2.5. Western blot

10 cm 배양용기에 HFDPC를 3×10^5 개씩 분주하고 24시간 배양한 뒤 당목향 뿌리 추출물(10, 20 μ g/mL)과 minoxidil 1 (10 μ M)을 처리한 후 3일간 배양하여 측정에 사용하였다. ERK와 Akt 인산화 측정은 10

cm 배양용기에 HFDPC를 5×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양한 뒤 당목향 뿌리 추출물과 minoxidil을 처리한 후 30분 뒤 sampling하였다. ERK와 Akt 억제 측정은 ERK inhibitor (PD98059, 20 μ M)와 Akt inhibitor (LY294002, 20 μ M)를 1시간 전처리 하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척 후 수거하여 lysis buffer [1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15% NaCl, 0.01 M sodium phosphate (pH 7.2), 2 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 0.2 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin]로 30분간 용해시키고 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다. 단백질은 Bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 동량의 $2 \times$ sample buffer (1 mL glycerol, 0.5 mL β -mercaptoethanol, 3 mL 10% SDS, 1.25 mL 1 M Tris-HCl, 1~2 μ g bromophenol blue)를 혼합한 후 10~12% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. PVDF membrane로 전이시키고, 5% non-fat skim milk가 첨가된 $1 \times$ TBST (Tween-20, pH 7.6)로 blocking 시킨 후 1차 β -actin (1:5000), 5 α -reductase I, II, phospho p44/42, p44/42, p-Akt, Akt, β -catenin, phospho- β -catenin, phospho- β -catenin, phospho-GSK-3 β , GSK-3 β , lamin B (1:1000)의 antibody를 $1 \times$ TBST 또는 3% BSA에 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였다. 2차 antibody는 anti-rabbit IgG, anti-mouse, anti-goat를 1:5000의 비율로 희석하여 반응시킨 다음 TBST로 세척하고 ECL 용액으로 발색 후 ChemiDoc을 이용해 각 band의 사진을 촬영하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포의 증식에 미치는 영향

당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포(HFDPC)의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 당목향 뿌리 추출물 5, 10, 20, 30 μ g/mL과 양성대조군 미녹시딜(MXD) 10 μ M을 농도별 처리한 후 48시간, 72시간 배양하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 대조군($100 \pm 0.8\%$)에 비해 48시간 배양 후 당목향 뿌리 추출물은 각각의 농도에서 $99.5 \pm 1.3\%$, $109.9 \pm 2.4\%$, $107.4 \pm 2.7\%$, $97.8 \pm 2.1\%$ 로 나타났으며, 72시간 배양에서는 $105.3 \pm 1.7\%$, $116.5 \pm 3.5\%$, $112.1 \pm 3.1\%$, $105.2 \pm 2.6\%$ 로 세포생존율이 나타났다(Figure 1). 양성대조군 미녹시딜의 경우 48시간에서 $104.5 \pm 1.9\%$, 72시간에서 $108.1 \pm 2.8\%$ 로 나타났다.

이러한 결과를 통해 모유두세포에 대한 당목향 뿌리 추출물의 효과는 48시간 배양보다 72시간 배양에서 세포증식이 증가된 것으로 나타났으며, 10, 20 μ g/mL 농도처리 군에서 양성대조군인 미녹시딜보다 높은 효과를 보였다. 따라서 이후의 실험은 10, 20 μ g/mL 농도의 당목향 뿌리 추출물을 72시간 배양하여 실시하였다.

3.2. 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포의 ERK 인산화에 미치는 영향

Extracellular signal-related kinase (ERK)는 세포의 성장과 호르몬 및 사이토카인 등의 반응을 조절하는 신호전달기전인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 중 하나로 ERK의 활성화는 세포증식에 영향을 미치며, ERK의 활성화가 모유두세포의 증식을 촉진하는 것으로 보고되었다[24].

당목향 뿌리 추출물이 모유두세포의 증식과 관련된 신호전달 경로를 조사하기 위해 ERK 인산화에 미치는 영향을 western blot을 통해 조사하였다. 실험 결과, 대조군에 비해 당목향 뿌리 추출물 10, 20 μ g/mL 농도에서 각각 약 2.7배, 3.2배로 인산화가 증가되었으며, 양성

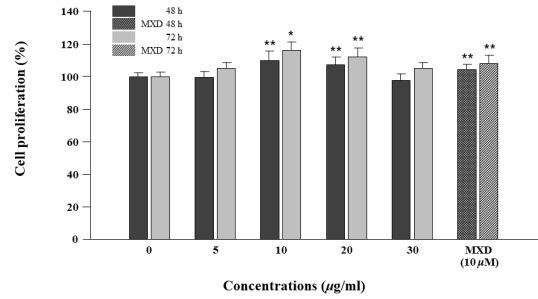


Figure 1. Effect of *Saussurea Lappa* Root Extract (SLR) on the cell proliferation in HFDPC.

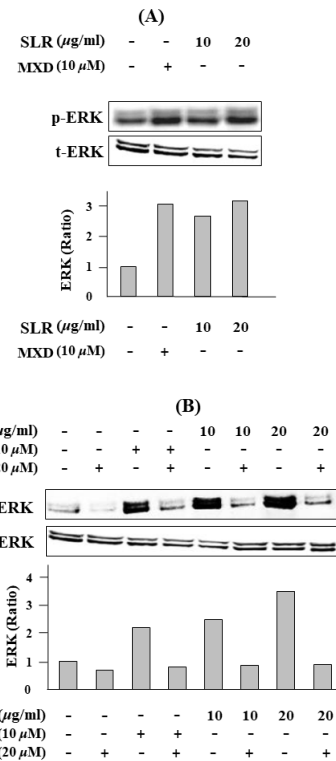


Figure 2. SLR induced phosphorylation of ERK in cultured HFDPC.

대조군인 미녹시딜은 약 3.1배 증가되었다(Figure 2(A)).

PD98059는 MEK의 억제제로 ERK의 활성을 억제한다. 따라서 당목향 뿌리 추출물의 ERK 인산화 촉진 효과를 확인하기 위해 20 μ M PD98059를 처리하여 조사한 결과, 당목향 뿌리 추출물의(10, 20 μ g/mL)의 처리로 인해 증가된 인산화가 PD98059에 의해 억제되는 것을 확인하였다(Figure 2(B)).

3.3. 당목향 뿌리 추출물이 ERK 인산화 경로를 통한 인체 모유두 세포의 증식 촉진 효과

ERK 경로를 통한 당목향 뿌리 추출물의 세포증식 효과를 확인하기 위해 PD98059를 1시간 전 처리한 후 당목향 뿌리 추출물을 처리하여 72시간 배양한 뒤 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과, PD98059 단독 처리군은 대조군(100%)에 비해 $93 \pm 6.2\%$ 로 세포증식이 감소되었고, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 μ g/mL 처리군과 PD98059 병용처리군의 경우 각각 $110.3 \pm 11.2\%$, $68.6 \pm 4.1\%$ 와 $128.7 \pm 7.6\%$, $84.9 \pm$

4.7%로 세포증식이 억제되었다(Figure 3). 한편 양성 대조군인 미녹시딜의 경우 $114.2 \pm 7.4\%$ 에서 PD98059 병용처리 시 $82.6 \pm 5.2\%$ 로 감소되었다. 이러한 결과는 당목향 뿌리 추출물이 모유두세포의 ERK의 인산화 경로를 통해 세포의 증식을 촉진시켰음을 보여준다.

3.4. 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포의 Akt 인산화에 미치는 영향

Akt는 모낭형성에 중요한 역할을 하는 Wnt/ β -catenin pathway에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, Akt의 인산화는 GSK-3 β (Ser9)를 인산화하여 β -catenin의 안정화를 유도해 모유두세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[25].

당목향 뿌리 추출물이 Akt 인산화에 미치는 영향을 조사한 결과, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군에 비해 각각 약 2.5배, 3.2배 인산화가 촉진되었으며, 양성 대조군 미녹시딜은 1.2배 증가되었다[Figure 4(A)]. 따라서 이러한 인산화가 Akt 경로를 통한 것인지 확인하기 위해 PI3K/Akt 억제제인 LY294002를 전 처리하여 확인하였다. 실험 결과, 당목향 뿌리 추출물에 의해 증가된 Akt의 인산화는 LY294002 병용처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다[Figure 4(B)].

3.5. 당목향 뿌리 추출물이 Akt 인산화 경로를 통한 인체 모유두세포의 증식 촉진 효과

Akt의 경유를 통한 모유두세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위해 LY294002 (20 μM)를 1시간 전 처리한 후 당목향 뿌리 추출물을 농도별 처리하고 72시간 배양한 뒤 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

실험 결과, 대조군(100%)에 비해 LY294002 단독처리군은 $73.2 \pm 3.5\%$ 로 세포생존율이 감소되었고, 당목향 뿌리 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도처리군은 $119.1 \pm 8.7\%$ 에서 $63.8 \pm 3.7\%$ 로 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도처리군은 $116.2 \pm 3.4\%$ 에서 $72.5 \pm 8.0\%$ 로 세포의 생존율이 감소되었다(Figure 5). 또한 양성대조군으로 사용한 미녹시딜(10 μM)의 경우 $116.3 \pm 3.4\%$ 에서 $70.5 \pm 5.4\%$ 로 세포생존율이 감소되었다. 이러한 결과를 통하여 당목향 뿌리 추출물이 Akt 인산화 촉진을 통해 모유두세포의 증식을 촉진함을 확인하였다.

3.6. 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포의 Wnt/ β -catenin 신호 경로에 미치는 영향

Wnt/ β -catenin 신호 경로는 모낭의 발달과 모발의 형태 형성 개시에 필수적이며, Wnt 수용체가 없을 경우 GSK-3 β 는 APC와 axin, β -catenin을 인산화하여 세포질의 β -catenin을 분해 및 유비퀴틴화를 유도한다[25]. 또한 Akt의 인산화를 통한 GSK-3 β (Ser9)의 인산화는 β -catenin (Ser552)의 인산화를 유도하며, PKA의 인산화는 β -catenin (Ser675)의 인산화를 유도해 핵 내로 이동되어 target gene의 발현을 조절한다[26].

본 연구에서 당목향 뿌리 추출물(10, 20 $\mu\text{g/mL}$)은 ERK와 Akt의 인산화 촉진과 세포증식 효과를 확인하였다. 따라서 모낭 형성 및 모발 성장에 밀접한 관계가 있는 Wnt/ β -catenin pathway를 western blot 분석을 통해 관찰하였다. 실험 결과, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 세포 내 β -catenin과 GSK-3 β 의 발현 수준은 동일하였으며, GSK-3 β (Ser9)의 인산화 촉진으로 인한 β -catenin (Ser552, 675)의 인산화 촉진을 확인하였다[Figure 6(A)]. 이에 세포질과 핵 내의 발현 수준을 알아보기 위해 모유두세포의 세포질과 핵을 분리 용해하여 실험을 진행한 결과, 세포질 내 β -catenin (Ser552, 675)의 인산화는 감

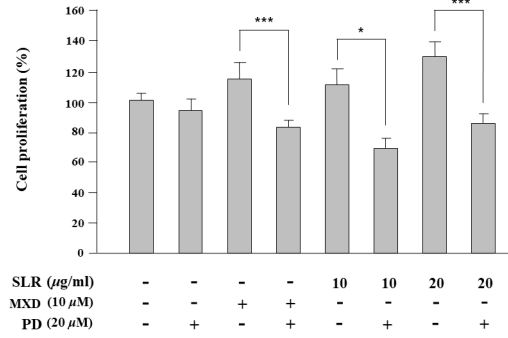


Figure 3. SLR increased cell proliferation via ERK activation in HFDPC.

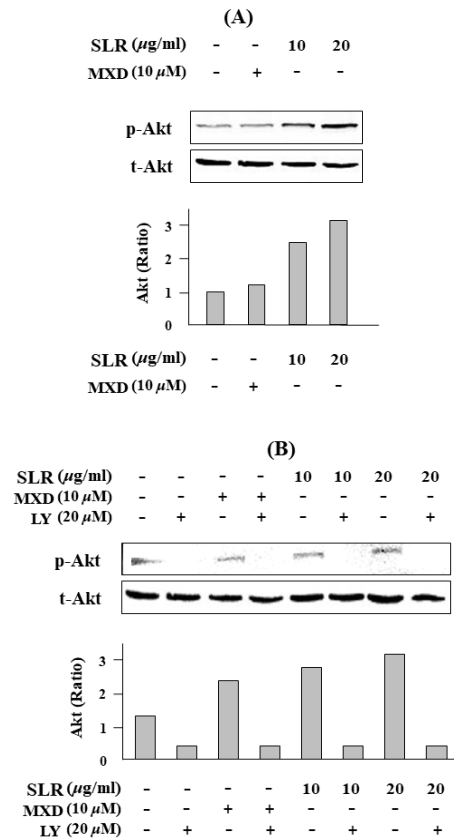


Figure 4. SLR induced phosphorylation of Akt in cultured HFDPC.

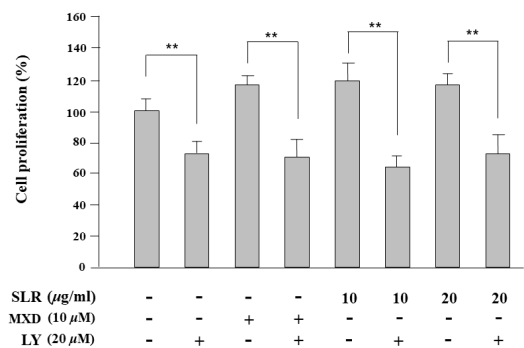


Figure 5. SLR increased cell proliferation via Akt activation in HFDPC.

소되었지만 핵 내 인산화가 촉진되었다[Figure 6(B)]. 이러한 결과는 당목향 뿌리 추출물(10, 20 $\mu\text{g/mL}$)이 GSK-3 β (Ser9)을 인산화하여 β -catenin을 축적하고 핵으로의 전위를 유도함을 나타낸다.

3.7. 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포의 5 α -reductase의 발현에 미치는 영향

남성호르몬은 모낭 주기의 성장기를 단축시키며, 모발의 성장을 억제한다. 모유두세포는 남성호르몬 target 세포로 안드로겐 수용체를 가지며, *in vitro*에서 디하이드로테스토스테론(DHT) 테스토스테론(T)에 비해 안드로겐 수용체 친화력이 약 5배 정도 높은 것으로 보고되었다[27]. 따라서 남성호르몬대사(T \rightarrow DHT)에 관여하는 5 α -reductase의 활성 억제는 탈모 치료에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 5 α -reductase 활성화에 미치는 당목향 뿌리 추출물의 효과를 알아보기와 5 α -reductase type I 과 II의 발현을 측정하였으며, 미녹시딜과 함께 5 α -reductase type II 억제제인 피나스테라이드를 처리하여 비교하였다. 실험 결과, 당목향 뿌리 추출물(10, 20 $\mu\text{g/mL}$)은 농도 의존적으로 5 α -reductase type I의 발현을 억제하였다(Figure 7). 한편 양성대조군으로 사용된 미녹시딜은 대조군에 비해 큰 차이가 나타나지 않았으나 피나스테라이드 처리로 인해 5 α -reductase type I, II가 크게 감소된 것으로 나타났다.

4. 결 론

본 연구는 당목향 뿌리 추출물이 인체 모유두세포 증식 및 모발 성장 관련 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포생존율, 세포 성장 관련 MAPK의 인산화, ERK와 Akt의 인산화 경로를 통한 세포 증식 효과, Wnt/ β -catenin 신호경로, 5 α -reductase 발현 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 당목향 뿌리 추출물이 모유두세포 대증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 진행한 결과, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 모유두세포의 생존율이 증가되었으며, 48시간보다 72시간 배양에서 높게 증식이 유도되는 것으로 나타났다. 또한 양성 대조군으로 사용한 미녹시딜(10 μM)보다 당목향 뿌리 추출물의 생존율이 더 높은 것으로 나타났다.
2. 모유두세포의 증식을 증가시킨 당목향 뿌리 추출물이 ERK와 Akt의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 ERK와 Akt의 인산화를 촉진하였으며, ERK 억제제(PD98059)와 Akt 억제제(LY294002)를 처리하여 확인한 결과, 증가된 인산화가 PD98059와 LY294002의 전 처리로 인해 억제되었음을 확인하였다. 또한 ERK와 Akt 경로를 통한 당목향 뿌리 추출물의 세포 증식 효과를 알아보기 위해 PD98059와 LY294002를 처리한 후 MTT assay를 진행한 결과, ERK와 Akt 억제제로 인해 모유두세포의 증식이 억제된 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 ERK와 Akt의 인산화는 모유두세포의 증식에 관여한다고 판단할 수 있다.
3. 당목향 뿌리 추출물이 모유두세포의 Wnt/ β -catenin 경로에 미치는 영향을 평가하기 위해 western blot 분석을 실시하였다. 실험 결과, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 모유두세포의 β -catenin 안정화 경로인 GSK-3 β (Ser9)의 인산화를 증가시켰

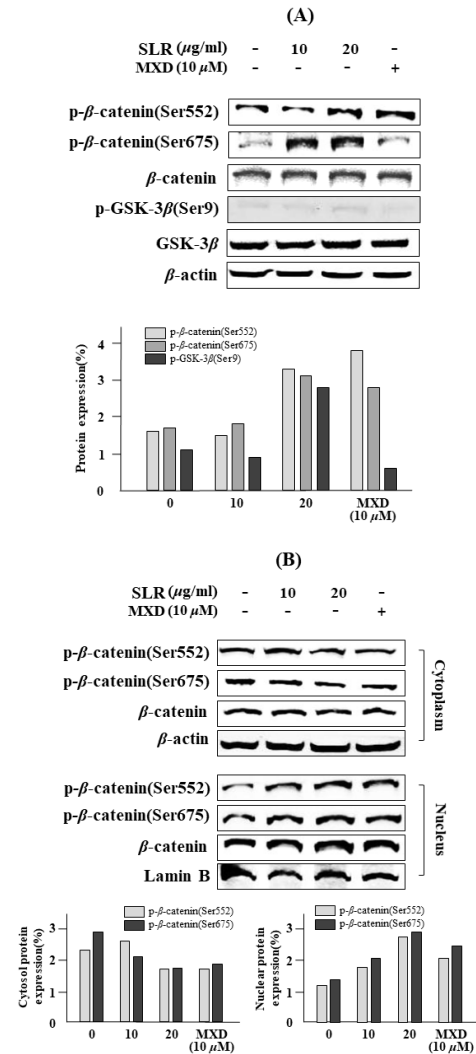


Figure 6. SLR increased the phosphorylated β -catenin in HFDPC.

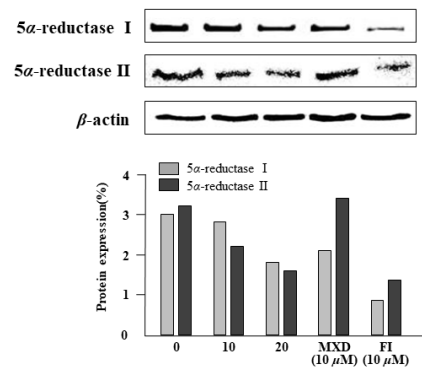


Figure 7. SLR repression the 5 α -reductase expression in HFDPC.

으며, β -catenin (Ser552, 675)의 인산화를 촉진하였다. 또한 각각의 세포의 세포질과 핵을 분리 용해하여 분석한 결과, 두 세포 모두 핵 내의 β -catenin의 수준이 증가된 것을 확인하였다. 이러한 결과는 모유두세포의 증식에 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로가 영향을 미치며, ERK, Akt 신호전달 경로와도 밀접한 관계가 있

음을 알 수 있다.

- 탈모의 원인으로 가장 많이 알려진 남성호르몬 대사(T → DHT)는 5 α -reductase에 의해 조절된다. 당목향 뿌리 추출물이 5 α -reductase의 작용에 미치는 영향을 평가한 결과, 당목향 뿌리 추출물 10, 20 μ g/mL 농도에서 모유두세포의 5 α -reductase type I 과 II의 활성을 억제하였음을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면 당목향 뿌리 추출물은 모유두세포의 증식을 촉진하고, 이러한 증식은 ERK, Akt 인산화 경유 관련 인자의 억제를 통한 결과이며, β -catenin 활성화 및 5 α -reductase 작용을 억제하는 효과를 가지는 것으로 판단된다. 따라서 당목향 뿌리 추출물이 탈모 예방 및 모발 성장 효과를 나타내는 헤어케어 제품의 소재로 응용가능성이 있음을 시사한다.

References

- S. H. Lee and J. R. Lee, Association of diffuse hair loss of adult male on stress, self-confidence, and depression, *J. Korean Soc. Cosmetol.*, **16**, 1171-1179 (2010).
- D. B. Kim, E. Y. Ahn, and E. J. Kim, Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice, *JCCT*, **4**, 315-323 (2018).
- M. H. Kwack, J. S. Ahn, M. K. Kim, J. C. Kim, and Y. K. Sung, Preventable effect of L-threonate, an ascorbate metabolite, on androgen-driven balding via repression of dihydrotestosterone-induced dickkopf-1 expression in human hair dermal papilla cells, *BMB reports*, **43**, 688-692 (2010).
- V. A. Botchkarev and J. Kishimoto, Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling, *J. Invest. Dermatol.*, **8**, 46-55 (2003).
- K. S. Stenn, The molecular and structural biology of hair: introduction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **26**, 11-13 (1991).
- M. B. Morgan, and P. Rose, An investigation of apoptosis in androgenetic alopecia, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **33**, 107-112 (2003).
- K. J. McClellan and A. Markham, Finasteride: A review of its use in male pattern baldness, *Drugs*, **57**, 111-126 (1999).
- T. Hagemann, B. Schlütter-Böhmer, J. P. Allam, T. Bieber, and N. Novak, Positive lymphocyte transformation test in a patient with allergic contact dermatitis of the scalp after short-term use of topical minoxidil solution, *Contact Derm.*, **53**, 53-55 (2005).
- H. Rastegar, H. Ahmadi Ashtiani, M. Aghaei, A. Ehsani, and B. Barikbin, Combination of herbal extracts and platelet-rich plasma induced dermal papilla cell proliferation: involvement of ERK and Akt pathways, *J. Cosmet. Dermatol.*, **12**, 116-122 (2013).
- H. Wosicka, and K. Cal, Targeting to the hair follicles: current status and potential, *J. Dermatol. Sci.*, **57**, 83-89 (2010).
- A. Ali, and J. M. Martin, Hair growth in patients alopecia areata totalis after treatment with simvastatin and ezetimibe, *J. Drugs Dermatol.*, **9**, 62-64 (2010).
- J. I. Yoon, S. M. Al-Reza, and S. C. Kang, Hair growth promoting effect of Zizyphus jujuba essential oil, *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1350-1354 (2010).
- N. Dufton, and M. Perretti, Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists, *Pharmacol. Ther.*, **127**, 175-188 (2010).
- S. Inui, Y. Fukuzato, T. Nakajima, K. Yoshikawa, and S. Itami, Androgen-inducible TGF β 1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to understanding paradoxical effects of androgen on human hair growth, *FASEB J.*, **16**, 1967-1969 (2002).
- S. Mitsui, A. Ohuchi, M. Hotta, R. Tsuboi, and H. Ogawa, Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles, *Brit. J. Dermatol.*, **137**, 693-698 (1997).
- T. Andl, S. T. Reddy, T. Gaddapara, and S. E. Millar, WNT signals are required for the initiation of hair follicle development, *Dev. Cell*, **2**, 643-653 (2002).
- J. Kishimoto, R. E. Burgeson, and B. A. Morgan, Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla, *Genes Dev.*, **14**, 1181-1185 (2000).
- N. Le Floch, C. Rivat, O. De Wever, E. Bruyneel, M. Mareel, T. Dale, and C. Gespach, The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3 β and c-Jun/AP-1 signaling, *FASEB J.*, **19**, 144-146 (2005).
- H. S. Hwang, T. H. Hwang, A. J. Pyo, and E. H. Ju, Anti-oxidant efficacy and effects on expression of growth factors in human hair follicle dermal papilla cells of Rosa multiflora root extracts, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **15**, 146-158 (2017).
- Y. M. Park, J. S. Han, Y. M. Park, and J. S. Han, A study on the utilization of Dendropanax morbifera Lev. leaf extract for material of functional cosmetics and hair growth products, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **14**, 277-288 (2016).
- Y. J. Jeon, H. S. Lee, J. H. Ko, K. M. An, S. W. Yu, J. H. Kang, B. Y. Hwang, and T. Y. Kim, Inhibitory effects of dehydrocostuslactone isolated from Saussurea radix on CDK2 activity, *Korean J. Pharmacogn.*, **36**, 97-101 (2005).
- M. S. Lee, D. G. Ryu, and K. B. Kwon, Anti-inflammatory effects of Saussurea lappa extracts in murine macrophages, *J. Physiol. Pathol. Korean Med.*, **25**, 275-279 (2011).
- S. J. Jeong, T. Itokawa, M. Shibuya, M. Kuwano, M. Ono, R. Higuchi, and T. Miyamoto, Costunolide, a sesquiterpene lactone from Saussurea lappa, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway, *Cancer Lett.*, **187**, 129-133 (2002).
- P. D. Ray, B. W. Huang, and Y. Tsuji, Reactive oxygen species(ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell. Signal.*, **24**, 981-990 (2012).
- T. R. Kwon, C. T. Oh, E. J. Choi, H. M. Park, H. J. Han, H. J. Ji, and B. J. Kim, Human placental extract exerts hair growth-promoting effects through the GSK-3 β signaling pathway in human dermal papilla cells, *Int. J. Mol. Med.*, **36**, 1088-1096 (2015).
- J. I. Kang, J. S. Moon, E. J. Kim, Y. S. Koh, E. S. Yoo, and H. K. Kang, The Hair Growth Effects of Wheat Bran, *Korean J. Pharmacogn.*, **44**, 384-390 (2013).
- H. Rastegar, H. A. Ashtiani, M. Aghaei, B. Barikbin, and A. Ehsani, Herbal extracts induce dermal papilla cell proliferation of human hair follicles, *Ann. Dermatol.*, **27**, 667-675 (2015).

Authors

Hyoung-Chul Chio; Ph.D., Researcher, Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea; hcchoi@hpnc.co.kr

Noh-Hee Jeong; Ph.D., Professor, Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea; nhjeong@cbnu.ac.kr