



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 2월

박사학위 논문

녹나무와 동백 씨 추출물 유래 기능성화장품 소재 개발

조선대학교 대학원

보완대체의학과

전 경 미

녹나무와 동백 씨 추출물 유래 기능성화장품 소재 개발

Development of Materials for Functional Cosmetics Using
Extracts of cinnamomum Camphora and Camellia seeds

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

전 경 미

녹나무와 동백 씨 추출물 유래 기능성화장품 소재 개발

지도교수 문 경 래

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

전 경 미

전경미의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	박상학	(인)
위 원	남부대학교	교수	한진섭	(인)
위 원	조선대학교	교수	문경래	(인)
위 원	조선대학교	교수	이미자	(인)
위 원	조선대학교	교수	김진호	(인)

2015년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표 목차	iii
그림 목차	iv
ABSTRACT	vii
I. 서론.....	1
II. 연구방법.....	3
1. 재료 및 시약.....	3
2. 추출물의 제조.....	4
1) 유기용매 추출.....	4
2) 초임계 추출.....	5
3. 항산화 효과 분석.....	7
1) 총 폴리페놀 함량 측정.....	7
2) 총 플라보노이드 함량 측정.....	7
3) DPPH 라디칼 소거능 측정.....	7
4) 아질산염 소거능 측정 소거능 측정.....	8
4. 모유두세포에 대한 in vitro 세포 독성 평가.....	9
1) 천연추출물 처리.....	9
2) 세포배양.....	9
3) MTTassay.....	9
5. Western blotting을 통한 성장인자 발현에 미치는 영향.....	11
6. 통계처리.....	12
III. 연구결과.....	13

1. 생약제재 추출물의 수율.....	13
2. 항산화 효과.....	14
1) 총 폴리페놀 함량.....	14
2) 총 플라보노이드 함량.....	16
3) DPPH 라디칼 소거능.....	18
4) 아질산염 소거능.....	20
3. 모유두세포에 대한 invitro 세포 독성 평가 및 세포증식효과.....	23
1) 녹나무.....	23
2) 동백 씨.....	24
3) 녹나무 추출물과 동백 씨 추출물의 1:1 혼합물.....	25
4) 동백 씨 추출물의 추가 희석.....	26
5) 녹나무 추출물과 추가 희석된 동백 씨 추출물의 1:1 혼합.....	27
4. 성장인자 발현 촉진 효과.....	28
1) PDGF-B 발현 촉진 효과.....	28
2) IGF 발현 촉진 효과.....	29
3) VEGF 발현 촉진 효과.....	30
4) KGF의 발현 촉진 효과.....	31
5) hGH 발현 촉진 효과.....	32
6) EGF 발현 촉진 효과.....	33
IV. 고찰.....	34
V. 결론.....	40
참고문헌.....	42

표 목차

Table 1. Extraction condition of superficial extraction group.....	5
Table 2. Extracted yield in the water, Ethanolic, Methanolic, Ethanol-Sonication Methanol-Sonication, and super critical extracts from <i>Cinnamomum Camphora</i> and <i>Camellia Japonica</i>	13
Table 3. Total polyphenols content of <i>Cinnamomum camphora</i> extracts.....	14
Table 4. Total polyphenols content of <i>Camellia japonica</i> seed extracts.....	15
Table 5. Total flavonoids content of <i>Cinnamomum camphora</i> extracts.....	16
Table 6. Total flavonoids content of <i>Camellia japonica</i> seede extracts.....	17

그림 목차

Figure 1. Superficial extraction process.....7

Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *Cinnamomum camphora* extracts.
 Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1mg/ml) as positive control group; CCWE, *Cinnamomum camphora* water extracts; CCEE, *Cinnamomum camphora* ethanolic extracts; CCME, *Cinnamomum camphora* methanolic extracts; CCESE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCMSE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCSE, *Cinnamomum camphora* super critical extracts.18

Figure 3. DPPH radical scavenging activity of *Camellia japonica* seed extracts.
 Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; CJWE, *Camellia japonica* water extracts; CJEE, *Camellia japonica* ethanolic extracts; CJME, *Camellia japonica* methanolic extracts; CJESE, *Camellia japonica* ethanolic sonication extracts; CJMSE, *Camellia japonica* methanolic sonication extracts; CJSE, *Camellia japonica* super critical extracts.....19

Figure 4. The nitrite-scavenging activity of *Cinnamomum camphora* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1mg/ml) as positive control group; CCWE, *Cinnamomum camphora* water extracts; CCEE, *Cinnamomum camphora* ethanolic extracts; CCME, *Cinnamomum camphora* methanolic extracts; CCESE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCMSE, *Cinnamomum camphora* methanolic sonication extracts; CCSE, *Cinnamomum camphora* supercritical extracts.21

Figure 5. The nitrite-scavenging activity of *Camellia japonica* seed extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; CJWE, *Camellia japonica* water extracts; CJEE, *Camellia japonica* ethanolic extracts; CJME, *Camellia japonica* methanolic extracts; CJESE, *Camellia japonica* ethanolic sonication extracts; CJMSE, *Camellia japonica* methanolic sonication extracts; CJSE, *Camellia japonica* super critical extracts.·····22

Figure 6. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.·····23

Figure 7. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.·····24

Figure 8. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* from Methanol-Sonication extracts *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.·····25

Figure 9. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.·····26

Figure 10. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* from Methanol-Sonication extracts *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.·····27

Figure 11. Effect of promote revelation from PDGF-B from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.28

Figure 12. Effect of promote revelation from IGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.29

Figure 13. Effect of promote revelation from VEGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.30

Figure 14. Effect of promote revelation from KGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.31

Figure 15. Effect of promote revelation from hGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.32

Figure 16. Effect of promote revelation from EGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.33

ABSTRACT

Development of Materials for Functional Cosmetics Using Extracts of *Cinnamomum camphora* and *Camellia* Seeds

Jeon kyung-mi

Advisor : Prof. Moon kyung-rye,

Dept. of Complementary & alternative Medicine,
Graduate School of Chosun University

This study has been conducted with the aim of providing practical materials for development of an anti-hair loss agent and hair growth promotor that utilizes natural ingredients replacing medications through experimental methods testing growth factor protein expression promotion effect, based on MTT assay and Western blotting on human hair papilla cells and antioxidative capacity by extracting active ingredients in 6 methods such as hot water extraction, ethanol extraction, methanol extraction, ethanol-ultrasonic wave extraction, methanol-ultrasonic wave extraction and superficial extraction from the seeds of *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.

The results show that total polyphenol content was the highest on the ethanol-ultrasonic wave extracts of *Cinnamomum camphora* and methanol extracts of *Camellia japonica* at 50.248 mg/g and 99.263 mg/g respectively, while total flavonoid content was the highest on *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica* at 5.907 mg/g and 11.811 mg/g respectively.

DPPH elimination performance analysis results were that *Cinnamomum camphora* had the highest performance of 96.34% on methanol-ultrasonic wave extracts while *Camellia japonica* had the highest performance of 49.33% on superficial extracts. Nitrite elimination performances of both *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica* turned out as 37.59% and 37.76% respectively, which were lower than the nitrite elimination performance 90~93% of ascorbic acid (1 mg/mL), the positive control group.

There was no cell toxicity of *Cinnamomum camphora* observed on human hair papilla

cells at treatment concentrations of 10 ug/mL, 100 ug/mL and 500 ug/mL, while cell growth degree was 112.7% at 500 ug/mL. *Camellia japonica* seed extracts turned out to have cell toxicity at all three treatment concentrations of 10 ug/mL, 100 ug/mL and 500 ug/mL. Cell toxicity analysis of *Camellia japonica* seed extracts after additional dilution and treatment at concentrations of 0.1 ug/mL, 0.5 ug/mL and 1 ug/mL showed that there was no toxicity at the concentration of 0.1 ug/mL.

Growth factor expression promotion effect analysis through Western blotting showed that, after processing *Cinnamomum camphora* at the concentration of 100 ug/mL and processing *Camellia japonica* seed extracts at the concentration of 0.1 ug/mL, the former had PDGF-B had 142% and the latter had 99%, 164% and 105% for IGF, 99% and 78% for VEGF respectively, 106% and 99% for KGF, 101% and 108% for hGH respectively and 97% and 99% for EGF respectively compared to the control group (PBS).

This study resulted in that, *Cinnamomum camphora* extracts had high DPPH elimination performance, with no toxicity on human hair papilla cells and great human hair papilla cell growth promotion effect, as well as favorable PDGF-B and IGF expression effects, all of which represent high potential to be utilized for functional cosmetics and hair growth promotor with natural antioxidative effect, while *Camellia japonica* seed extracts had poor DPPH elimination performance and some cell toxicity, thus it has been figured that further studies regarding utilization for functional cosmetics and hair growth promotor would be required.

Keyword: Hair loss, *Cinnamomum camphora*, *Camellia japonica*, antioxidative effect, western blotting, growth factor

I. 서론

의학의 발달로 평균 수명이 증대되고 고령화 사회에서 삶의 질 (quality of life)에 대한 관심이 집중됨에 따라 아름답고 건강하게 늙어갈 수 있는 안티에이징 (antiaging)제품이 각광을 받으면서 효과 및 효능이 뛰어난 기능성화장품이 요구되고 있으며, 인간의 아름다움에 대한 무한한 욕구로 인하여 모발은 해부학적으로 보호역할 뿐만 아니라 장식적인 면에서 개인의 개성을 나타내는 중요한 역할인자가 되었다. 21세기 들어 외모에 대한 관심의 증가와 함께 모발의 중요성이 더욱 커지고 있으며, 최근 들어 여성뿐만이 아니라 남성에 있어서 사회적, 성적 매력을 표현하는 중요한 신체의 일부분으로 인식되고 있다.

Ralph[1]에 의하면 탈모는 노화가 진행됨에 따라 나타나는 자연스러운 현상이지만. 현대인의 삶의 질이 개선되고 미적 욕구가 증대됨에 따라 하나의 질병으로 인식되고 있으며 탈모의 원인은 아토피, 비 특이적 면역, 자가면역 반응, 스트레스, 유전적 요인 등으로 추측할 수 있다고 하였다.

건강보험 심사평가원에 의하면 우리나라에서 최근 5년간(2009~2013년)의 탈모증에 의한 진료인원은 15% 증가하여 연평균 3.6%의 증가율을 나타내었으며, 성별 연평균 증가율은 남성 4.8%, 여성 2.3% 증가하였으며, 2013년 성별 진료인원은 남성이 21.1%, 여성 48.9% 로 나타나[2], 탈모증은 더 이상 남성만의 전유물이 아니라 여성에게도 심각한 문제가 되었다.

현재 탈모증의 치료제로 미국 Food and Drug Administration (FDA)에서 지금까지 공인 받은 것으로는 피나스테리드 (finasteride)와 미녹시딜 (minoxidile) 2종 뿐이다. 피나스테리드는 전립선 비대증 치료제로 개발되었다가 부작용으로 발모작용이 나타나 먹는 발모제로 사용되고 있으며, 바르는 약 미녹시딜은 주성분이 두타스텔리드로 원래 혈관 이완 작용을 하는 고혈압 치료제로 쓰였던 약인데 부작용으로 머리털을 나게 하는 작용이 관찰되어 1988년 FDA에서 대머리의 치료제로 인정받게 되었는데 발모작용 기전은 명확히 밝혀지지 않았지만 혈관 확장을 통한 영양공급 증가 및 칼륨 통로를 여는 효과 등이 모발 성장을 유도하는 것으로 생각 되고 있다[3]. 그러나 미녹시딜은 효과 유지를 위하여 지속적인 사용

이 요구되어지며[4], 부작용으로 급격한 몸무게 증가, 부종, 심장박동 증가, 협심증 등[5]과 홍반, 가려움증, 표피박리, 건성화를 동반한 피부염 및 과잉 도포 시 급격한 혈압강하 등[6]이 보고되었으며, Mapar & Omidian(2007)은 1497명의 20~40세 남성 탈모 환자들을 대상으로 한 연구에서 미녹시딜 사용을 시작한 환자 중 대부분이 얼마 지나지 않아 많은 환자들이 약의 효과가 별로 없다는 이유로 사용을 중단하였다고 보고하였다[7].

경구 복용제인 피나스테리드의 경우 5 α -reductase의 활성을 억제시킴으로써 탈모의 진행지연 및 발모효과를 지니지만 효과유지를 위한 장기복용은 남성 성기능 장애, 여성 기형아 출산과 같은 부작용을 초래하기도 한다[8]는 보고와 이밖에도 치료 약물로 수반되는 부작용으로 심혈관계 장애, 피부 자극, 성기능 감소 및 심각한 기형유발 등을 경고하였다[9].

이러한 부작용은 탈모에 대한 적극적 치료에 상당한 제한성이 있으며, 이에 따르는 고통 뿐 만 아니라 의료 부담이 많이 차지하고 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하고 지속적 사용에도 안전한 다양한 천연 추출물 및 한약소재를 사용하는 대체의학이 주목을 받고 있으며 임상 분야에 전반적으로 활용할 수 있는 신물질의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 실험적 방법을 통하여 녹나무와 동백 씨에서 다양한 방법으로 유효물질을 추출하여 항산화능과 인간 모두유 세포의 증식 효과와 Western blotting을 통하여 기능성 화장품 소재로 활용에 필요한 실용적 자료를 제공하고자 하는 목적으로 연구를 하였다.

Ⅲ. 연구방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 녹나무는 제주도 군락지역에서 채취한 가지와 잎을 건조하여 사용하였으며, 동백 씨는 경동시장에서 국내산을 구입하여 사용하였다.

추출에 사용된 유기용매는 일급시약을 구입하여 사용하였다. 항산화 효능 분석에 사용된 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), L-ascorbic acid (vitamin-C), gallic acid, narginin, sodium nitrite, diethylene glycol, Griess reagent 은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였고, MTT-assay에 사용한 Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics- antimycotic, Trypsin - EDTA는 Gibco BRLCo.(GrandIsland,USA)에서 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Tryptic Soy Broth, Yeast Extract, Malt Extract, Peptone, Dextrose, Tryptone, Bacto agar는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다. 배양 dish 등 소모품은 Falcon제품을 사용하였다.

Western blotting에 사용된 모발 성장인자 1차 항체 PDGF- β 와 hGH는 Santa Cruz Biotechnology, INC (Texas, USA)에서 KGF, IGF-1, VEGF, EGF는 Pepro Tech (New Jersey, USA)사에서 구입하여 사용하였으며, 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology, INC (Texas, USA)에서 구입 사용하였다.

2. 추출물의 제조

1) 유기용매 추출

생약제제의 잎과 줄기를 잘게 분쇄한 후 시료 10~20 g을 각각 70% ethanol, 70% methanol, 증류수를 가하여 총량을 0.2~0.5 L가 되도록 조절하고, 72시간 동안 암 상태로 실온에 보관하여 추출하였다. 각 시료의 초음파 추출을 위해 권(2008) 등의 방법[10]을 수정하여 위와 같은 조건의 ethanol와 methanol 용매로 추출물을 준비하고 30분간 60 kHz의 초음파를 발생시킨 후 72시간 동안 암 상태로 실온에 보관하여 추출하였다. 각 시료 추출물은 5장을 겹친 거즈로 1차 여과한 후 2차로 추출용 여과지(Whatman filter paper No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Japan)에 통과 시킨 후 시료 추출물을 rotary vacuum evaporation (Eyela, N-1000, Tokyo, Japan)으로 감압 증류하여 용매를 완전하게 휘발시킨 후 -80℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조된 각 분말 시료는 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

2) 초임계 추출

녹나무와 동백 씨는 믹서를 이용하여 0.5mm 이하로 분쇄를 한 후 열풍건조기로 50℃에서 6시간 건조 진행하여 수분함량을 5%이하로 건조하였다.

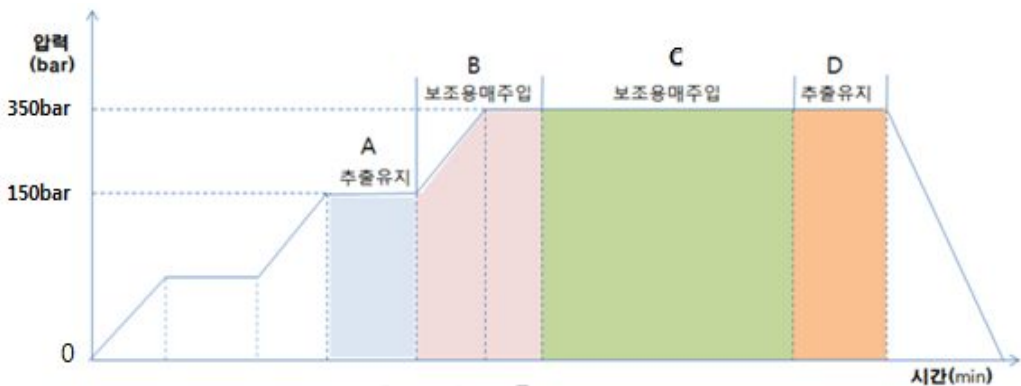
건조한 시료를 추출조에서 압력 350 bar, 온도 50℃, 보조용매 주입 유량은 6 ml/min으로 70분 주입 추출하였다.

Table 1. Extraction condition of superficial extraction group

추출조(Extractor)		보조용매유량 (ml/min)	분리조(Separator)		CO2 유량 (ml/min)	냉각기 (℃)	Run-time (min)
압력 (bar)	온도 (℃)		압력 (bar)	온도 (℃)			
350	50	6 ml/min 70min 주입	40	40	60	-2	120

추출과정(Figure 2)은 등압, 퍼칭, 가압 후 압력 150 bar에서 20분 동안 CO₂유체를 이용하여 추출하여 추출하였다(A), 압력을 350 bar까지 올리면서 보조용매로 에탄올을 주입하고 10분 동안 추출 한 추출물(B), 이후 60분 동안 추출한 추출물(C), 10분 간 추출한 추출물(D)을 구분하여 추출하였다.

추출된 추출물(A, B, C, D)은 단계별 추출량을 계량 후 전량을 합쳐 rotary vacuum evaporation (Eyela, N-1000, Tokyo, Japan)으로 감압 증류하여 용매를 완전하게 휘발시킨 후 -80℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조된 각 분말 시료는 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.



추출 공정 (분)	등압	퍼칭	가압	추출 유지 (A)	보조용매 주입/가압 (B)	보조용매 주입 (C)	추출 유지 (D)	감압	총 추출 시간
		10	10	10	20	10	60	30	10

Figure 1. Superficial extraction process

3. 항산화 효과 분석

1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 수정하여 측정하였다. Methanol로 용해하여 1 mg/mL 농도로 준비한 시료 100 μ L에 Folin-Denis reagent (Fluka, Buchs, Switzerland)를 100 μ L을 가하여 혼합한 후 3분간 실온에 반응시켰다. 3분 후 10% sodium carbonate solution 100 μ L을 가하여 혼합하고 1시간 반응시킨 후 상층액을 취하여 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Methanol에 녹인 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 40 μ g/mL, 50 μ g/mL 의 gallic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 김 등의 방법[11]으로 측정하였으며, methanol로 용해하여 1 mg/mL 농도로 준비한 시료 100 μ L에 diethylene glycol을 1 mL씩 가하여 혼합하였다. 혼합 후 1 N NaOH를 100 μ L 가하여 잘 혼합하고 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 naringin을 사용하였으며 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 40 μ g/mL, 50 μ g/mL 농도의 표준검량곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산하였다.

3) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 김 등의 방법[11]으로 측정하였으며, 각 시료는 methanol을 이용하여 1 mg/mL 농도로 준비하였다. DPPH 시약은 빛을 차단한 상태에서 0.1 mM 농도가 되도록 methanol에 녹여 준비하였다. 시료 100 μ L과 DPPH 시약 0.5 mL을 넣고 20분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517

nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 시료 대신 methanol을 사용하였고, 양성대조군으로는 시료 대신 ascorbic acid (1 mg/mL)를 가하여 동일한 조건으로 실험을 수행하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 DPPH 억제율 (Inhibitory activity, %)을 산출하였다.

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{시료 무 처리군의 흡광도})] \times 100$$

4) 아질산염 소거능 측정

각 시료의 아질산염 소거능(nitrite-scavenging ability, NSA)은 Gray & Dugan의 방법[12]으로 측정하였다. 1 mM NaNO₂용액 50 μL에 1 mg/mL 농도의 시료 50 μL를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 용액(pH 1.2)을 300 μL 가하여 반응 용액의 최종부피를 0.4 mL로 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 2% acetic acid 용액 2 mL, Griess reagent 0.2 mL를 가하여 잘 혼합한 다음, 실온에서 15분간 반응시키고 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 산출하였다. 대조군으로 시료 대신 증류수를 사용하였고, 음성대조군으로 Griess reagent 대신 증류수를 사용하였고, 양성대조군으로는 시료 대신 ascorbic acid (1 mg/mL)를 가하여 동일한 조건으로 실험을 수행하였다. 아질산염 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 억제율(Nitrite inhibition, %)을 산출하였다.

$$\text{Nitrite inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{시료 무 처리군의 흡광도})] \times 100$$

4. 모유두 세포에 대한 invitro 세포 독성 평가

1) 천연추출물 처리

녹나무 추출물(메탄올 초음파 추출)과 동백 씨 추출물(메탄올 초음파 추출)은 PBS (Phosphate buffered saline)에 10 mg/mL 농도로 용해하였다. 추출물의 용해를 돕기 위해 30분간 강하게 vortexing 한 후 30분간 sonication 하였으며, 8,000rpm으로 10분간 원심 분리한 후 불용성 성분을 제거하고 상등 액을 세포처리용 샘플로 사용하였다.

2) 세포배양

인간 모유두 세포 (Human follicle dermal papilla cell, HFDPC)는 Promocell사에서 구매한 것을 사용 하였으며, 세포의 배양과 실험에는 Promocell사의 HFDPC 세포 배양 전용 배지인 Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium (Ready-to-use) (Cat. No. C-26501)을 사용하였으며, 배양과 계대배양 및 실험용 세포의 준비는 Promocell에서 제공하는 실험법에 준하여 수행하였다.

HFDPC 세포 배양은 SANYO CO₂ incubator 사용하여 5% CO₂, 37도에서 배양 하였다. 배양용기에 시험에 사용할 HFDPC 세포를 세포배양정도(confluency)가 80 ~ 85% 합류할 때까지 전 배양을 하였다.

3) MTT Assay

각 시료의 모유두 세포(HFDPC, promo CELL)에 미치는 생존율 측정은 Mosmann의 방법을 응용 실시하였다[13].

전 배양 세포가 적정 수준까지 자라면 세포를 배양용기에서 분리(trypsin 처리법)하고, 24 well plate에 초기 confluency가 20 ~ 25%가 되게 세포를 접종한 후 confluency가 70 ~ 80% 되게 추가 배양하였다. 배양액을 suction으로 제거하고 37도로 warming 된 Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium (Ready-to-use) (Cat. No. C-26501) 1.0 mL 씩으로 배지를 교환하였다.

시험 천연 추출물인 녹나무 메탄올 초음파 추출물, 동백 씨 메탄올 초음파 추출물 2종을 대조군과 함께 처리하였으며, 대조군으로 샘플을 용해하는데 사용된 PBS를 처리하였다. 천연추출물 2종은 배양 배지 1 mL에 대하여 0.05 mL (50 uL) 처리 후 최종 농도가 500 ug/mL, 100 ug/mL, 10 ug/mL이 되게 3가지 농도가 되게 처리하였다. 녹나무 추출물(메탄올 초음파 추출), 동백 씨 추출물(메탄올 초음파 추출)을 혼합 처리 시는 1 : 1의 비율로 처리하여, 처리의 합이 최종 농도가 500 ug/mL, 100 ug/mL, 10 ug/mL이 되게 한 후 48시간 추가 배양을 하였다.

배양 완료 후 100 uL의 MTT solution을 각 well에 첨가하고 잘 섞어 3시간 동안 추가로 세포 배양기에서 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다.

배양액을 suction으로 완전히 제거한 후 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO (Amresco, 0231-500ML) 200 uL로 녹여서 잘 섞어준 다음 100 uL 씩을 골고루 96 well로 옮겨 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다

5. Western blotting을 통한 성장인자 발현에 미치는 영향

인간 모유두 세포주를 계대 배양한 후, 녹나무 추출물, 동백 씨 추출물을 100 ug/mL의 농도로 처리 후 48시간 뒤에 세포에서 발현되는 6가지의 성장인자 PDGF-B, KGF, IGF, VEGF, hGH, EGF 단백질들의 발현을 SDS 폴리아크릴아마이드 전기영동 (SDS PAGE)겔에서 전기영동으로 분리하고 Western blot방법을 이용하여 측정하였다.

추출물을 2일 동안 처리한 인간 모유두 세포를 배양한 후 PBS (phosphate Buffered Saline) 2회 세척하고, 2% NET buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 7.4)를 이용하여 세포를 용해하고 sonication을 통해 세포추출물을 제조하였다

세포추출물을 단백질 정량하여 20 µg의 단백질을 SDS PAGE에서 150 V로 1시간동안 전기영동하고 electro - blotter를 사용하여 70 V 30분간 Nylon membrane filter에 옮기고 밀크 용액(5% skim milk solution)에 filter를 담그고 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 TBS 세척액으로 10분간 3회 세척하고 1차 항체를 이용하여 1시간 30분 동안 반응시켰으며 세척액으로 3회 세척한 후 2차 항체로 1시간 동안 반응시키고 세척액으로 3회 세척한 후 ECL 키트를 이용하여 필름에 감광시키는 방법을 이용하여 단백질의 발현을 조사하였다.

사용된 성장인자는 PDGF-B, KGF, IGF-1, VEGF, hGH, EGF, 로 Pepro Tech (US)사에서 제품을, 이차항체는 goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, INC.)를 구입하여 사용하였다.

6. 통계처리

모든 시료의 분석은 3번 반복 수행되었고, 모든 실험결과는 SPSS package program (Statistical Package for the Social Sciences, V.21, SPSS Inc., Chicago)을 사용하여 통계 분석하였다. 분석 값은 Mean \pm SD로 표시하였고 통계분석은 Student's t-test로 분석하였으며 $p < 0.05$ 값을 유의성 있는 것으로 해석하였다.

III. 연구결과

1. 생약제재 추출물의 수율

생약제재는 용매와 추출방법에 따라 성분들이 달라지기 때문에 추출수율에 있어서도 차이를 보인다. 본 실험에서 추출된 녹나무와 동백 씨의 각 용매 및 추출법에 따른 수율을 제시하였다(Table 2).

녹나무와 동백 씨 모두 메탄올-초음파 추출에서 가장 높았다.

Table 2. Extracted yield in the water, ethanolic, methanolic, ethanol-sonication, methanol-sonication, and super critical extracts from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*.

Extracts	Extracted yield (%)	
	CC	CJ
Water	1.007	0.7062
ethanol	1.3809	1.7619
Methanol	1.6191	1.3962
Ethanol-Sonication	1.9623	1.6019
Methanol-Sonication	2.0378	1.8095

DM: *Dendropanax morbifera*

RM: *Rosa multiflora*

2. 항산화 효과

1) 총 폴리페놀 함량

(1) 녹나무

녹나무 추출물 6종의 총 폴리페놀 함량(mg/g)을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 76.079 ± 3.805 (mg/g)로 가장 높게 나타났으며, 에탄올-초음파 추출물에서 50.248 ± 4.020 (mg/g), 메탄올 추출물에서 30.871 ± 1.544 (mg/g), 증류수 추출물에서 28.950 ± 1.158 (mg/g), 초임계 추출물에서 10.356 ± 0.932 (mg/g), 에탄올 추출물에서 9.991 ± 0.450 (mg/g) 순서로 총 폴리페놀 함량이 나타났다(Table 3)

Table 3. Total polyphenols content of *Cinnamomum Camphora* extracts.

<i>Cinnamomum camphora</i> extracts	Water	Ethanol	Methanol	Ethanol-Sonication	Methanol-Sonication	Super critical
Polyphenol contents (mg/g)	$28.950 \pm 1.158^*$	9.991 ± 0.450	30.871 ± 1.544	50.248 ± 4.020	76.097 ± 3.805	10.356 ± 0.932

*Values are expressed as Mean \pm SD; n=3.

(2) 동백 씨

동백 씨 추출물 6종의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 메탄올 추출물에서 99.263 ± 3.276 (mg/g)로 가장 높았으며, 초임계 추출물에서 33.262 ± 1.297 (mg/g), 증류수 추출물에서 14.261 ± 0.271 (mg/g), 메탄올-초음파 추출물에서 11.860 ± 0.605 (mg/g), 에탄올-초음파 추출물에서 2.411 ± 0.159 (mg/g), 에탄올 추출물에서 0.323 ± 0.013 (mg/g) 순서로 총 폴리페놀 함량이 나타났다(Table 4).

Table 4. Total polyphenols content of *Camellia Japonica* seed extracts.

<i>Camellia japonica</i> seed extracts	Water	Ethanol	Methanol	Ethanol Sonication	Methanol Sonication	Super critical
Polyphenol contents (mg/g)	$14.261 \pm 0.271^*$	0.323 ± 0.013	99.263 ± 3.276	2.411 ± 0.159	11.860 ± 0.605	33.262 ± 1.297

*Values are expressed as Mean \pm SD; n=3.

2) 총 플라보노이드 함량

(1) 녹나무 추출물

녹나무 추출물 6종의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 5.907 ± 0.266 (mg/g)로 가장 높았으며, 에탄올-초음파 추출물에서 5.067 ± 0.431 (mg/g), 초임계 추출물에서 1.328 ± 0.060 (mg/g), 증류수 추출물에서 0.516 ± 0.034 (mg/g) 순서로 총 플라보노이드 함량이 나타났으며(Table 5), 메탄올 추출물과 에탄올 추출물에서는 총 플라보노이드가 검출되지 않은 것으로 분석되었다.

Table 5. Total flavonoids content of *Cinnamomum Camphora* extracts.

<i>Cinnamomum camphora</i> extracts	Water	Ethanol	Methanol	Ethanol Sonication	Methanol Sonication	Super critical
Flavonoid contents (mg/g)	$0.516 \pm 0.034^*$	0 ± 0	0 ± 0	5.067 ± 0.431	5.907 ± 0.266	1.328 ± 0.060

*Values are expressed as Mean \pm SD; n=3.

(2) 동백 씨 추출물

동백 씨 추출물 6종의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 11.811 ± 0.886 (mg/g)로 가장 높았으며, 에탄올-초음파 추출물에서 5.818 ± 0.378 (mg/g), 초임계 추출물에서 3.776 ± 0.359 (mg/g), 증류수 추출물에서 2.469 ± 0.086 (mg/g), 메탄올 추출물에서 0.802 ± 0.036 (mg/g) 순서로 총 플라보노이드 함량이 나타났으며, 에탄올 추출물에서는 플라보노이드가 검출되지 않은 것으로 분석되었다(Table 6).

Table 6. Total flavonoids content of *Camellia Japonica* seede extracts.

<i>Camellia japonica</i> seeds extracts	Water	Ethanol	Methanol	Ethanol Sonication	Methanol Sonication	Super critical
Flavonoid contents (mg/g)	$2.469 \pm 0.086^*$	0 ± 0	0.802 ± 0.036	5.818 ± 0.378	11.811 ± 0.886	3.776 ± 0.359

*Values are expressed as Mean \pm SD; n=3.

3) DPPH 라디칼 소거능

항산화 효능 분석을 위해 각 시료로부터 얻은 6종 추출물(각 추출물 농도 1 mg/mL)의 DPPH 소거능을 분석하였다. 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid (1 mg/mL)의 DPPH 소거능은 98~100 %로 나타났다.

(1) 녹나무 추출물

녹나무 추출물 6종의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 96.34%로 가장 높은 효과를 보였으며, 그 다음으로 에탄올-초음파 추출물 (91.95%), 증류수 추출물(54.63%), 메탄올 추출물(41.86%), 에탄올 추출물(39.96%), 초임계 추출물(33.93%) 순서로 DPPH 소거능이 나타났다(Figure 2).

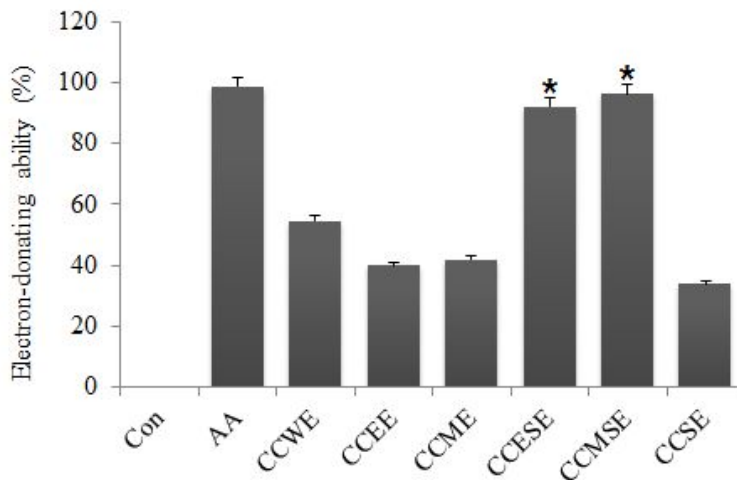


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *Cinnamomum camphora* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1mg/ml) as positive control group; CCWE, *Cinnamomum camphora* water extracts; CCEE, *Cinnamomum camphora* ethanolic extracts; CCME, *Cinnamomum camphora* methanolic extracts; CCESE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCMSE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCSE, *Cinnamomum camphora* super critical extracts. All data are mean \pm SD of triplicates determinations. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

(2) 동백 씨 추출물

동백 씨 추출물 6종의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 초임계 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 49.33%의 DPPH 소거능을 보였다. 그 다음으로 메탄올-초음파 추출물(34.10%), 에탄올-초음파 추출물(30.36%), 증류수 추출물(20.98%), 에탄올 추출물(15.44%), 메탄올 추출물(15.14%) 순서로 DPPH 소거능이 나타났다 (Figure 3).

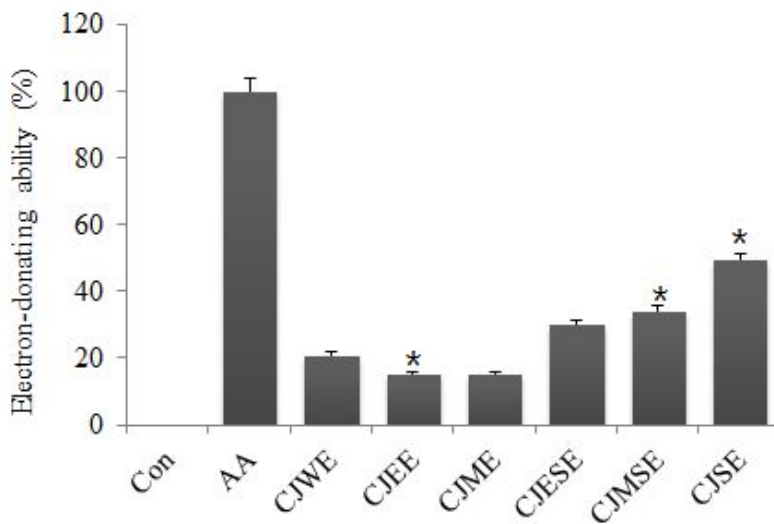


Figure 3. DPPH radical scavenging activity of *Camellia japonica* seed extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; CJWE, *Camellia japonica* water extracts; CJEE, *Camellia japonica* ethanolic extracts; CJME, *Camellia japonica* methanolic extracts; CJESE, *Camellia japonica* ethanolic sonication extracts; CJMSE, *Camellia japonica* methanolic sonication extracts; CJSE, *Camellia japonica* super critical extracts. All data are mean \pm SD of triplicates determinations. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

4) 아질산염 소거능

항산화 효능 분석을 위해 각 시료로부터 얻은 총 12종 추출물(각 추출물 농도 1 mg/mL)의 아질산염 소거능을 분석한 결과는 양성대조군으로 사용한 Acorbic Acid (1 mg/ml)의 아질산염 소거능은 90~93%로 나타났다.

(1) 녹나무 추출물

녹나무 추출물 6종의 아질산염 소거능을 분석한 결과, 초임계 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 37.59%의 아질산염 소거능을 보였다. 그 다음으로 에탄올-초음파 추출물(32.24%), 메탄올-초음파 추출물(27.93%), 에탄올 추출물(27.24%), 메탄올 추출물(25.86%), 증류수 추출물(19.31%) 순서로 아질산염 소거능이 나타났다 (Figure 4).

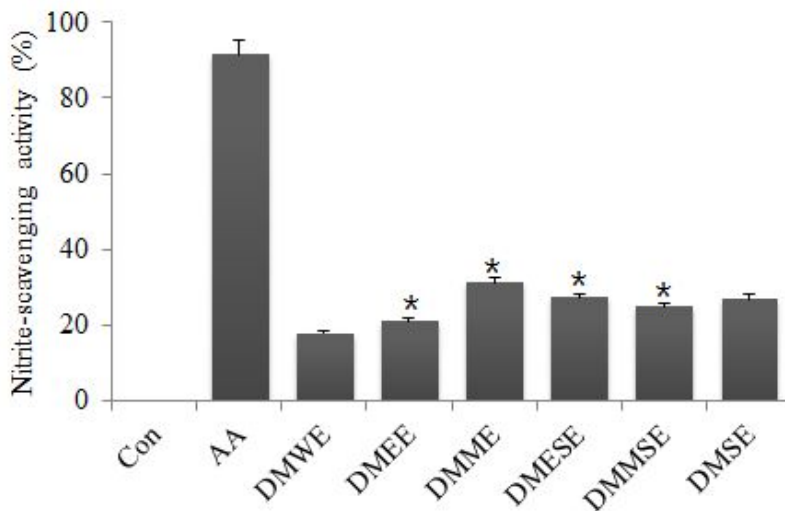


Figure 4. The nitrite-scavenging activity of *Cinnamomum camphora* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1mg/ml) as positive control group; CCWE, *Cinnamomum camphora* water extracts; CCEE, *Cinnamomum camphora* ethanolic extracts; CCME, *Cinnamomum camphora* methanolic extracts; CCESE, *Cinnamomum camphora* ethanolic sonication extracts; CCMSE, *Cinnamomum camphora* methanolic sonication extracts; CCSE, *Cinnamomum camphora* supercritical extracts. All data are mean \pm SD of triplicates determinations. All data are mean \pm SD of triplicates determinations. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

(2) 동백 씨 추출물

동백 씨 추출물 6종의 아질산염 소거능을 분석한 결과, 초임계 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 37.76%의 아질산염 소거능을 보였다. 그 다음으로 메탄올-초음파 추출물(29.14%), 메탄올 추출물(27.59%), 에탄올-초음파 추출물(26.90%), 에탄올 추출물(24.66%), 증류수 추출물(19.83%) 순서로 아질산염 소거능이 나타났다(Figure 5).

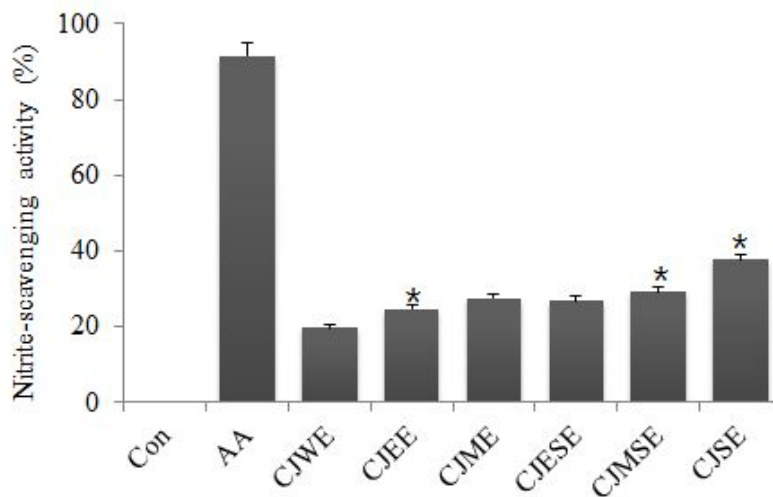


Figure 5. The nitrite-scavenging activity of *Camellia japonica* seed extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; CJWE, *Camellia japonica* water extracts; CJEE, *Camellia japonica* ethanolic extracts; CJME, *Camellia japonica* methanolic extracts; CJESE, *Camellia japonica* ethanolic sonication extracts; CJMSE, *Camellia japonica* methanolic sonication extracts; CJSE, *Camellia japonica* super critical extracts. All data are mean \pm SD of triplicates determinations. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

3. 모유두 세포에 대한 invitro 세포 독성 평가

1) 녹나무

녹나무 추출물(메탄올 초음파 추출)을 인간 모유두 세포에 10ug/ml, 100 ug/ml, 500 ug/ml의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. 500 ug/mL 농도 처리 시 PBS를 처리한 대조군 대비 11%의 유의적 생육촉진 효과를 보였다. 대조군 대비 10 ug/mL 처리는 $101.4 \pm 1\%$, 100 ug/mL 처리는 $106.4 \pm 3\%$, 그리고 500 ug/mL 처리는 $112.7 \pm 6\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 6).

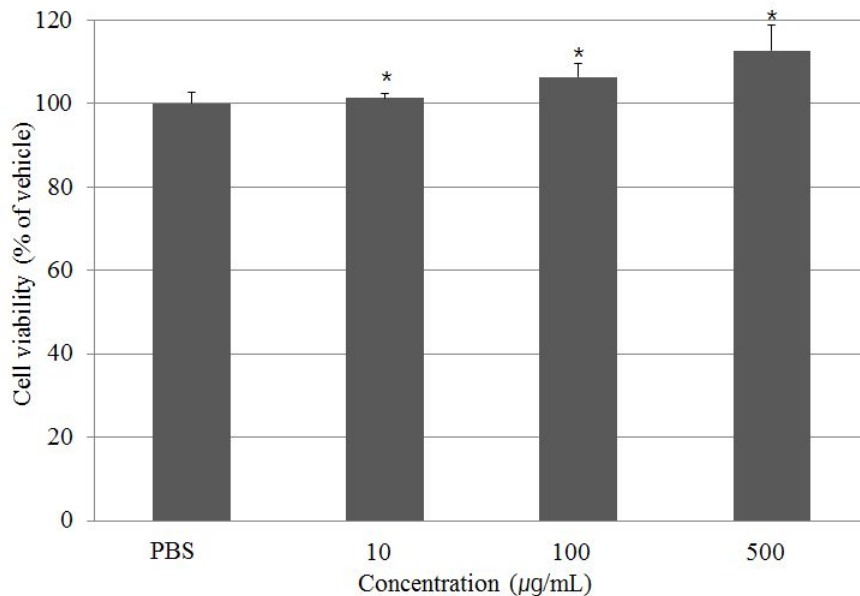


Figure 6. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from Cinnamomum camphora extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Significantly different from the control value : *p<0.05

2) 동백씨

동백씨 추출물(초임계 추출)을 인간 모유두세포에 10 ug/mL, 100 ug/mL, 500 ug/mL의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성이 관찰되었다. PBS를 처리한 대조군 대비, 10 ug/ mL, 처리는 $24.7 \pm 1\%$, 100 ug/mL, 처리는 $23.5 \pm 0.3\%$, 그리고 500 ug/ mL, 처리는 $23.0 \pm 0.2\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 7).

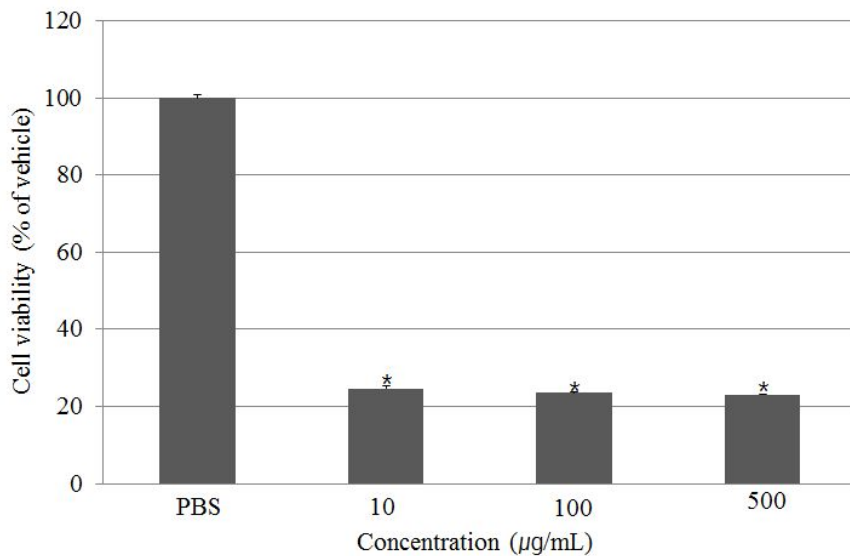


Figure 7. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

3) 녹나무 추출물과 동백씨 추출물의 1:1 혼합

녹나무 추출물(메탄올 초음파 추출)과 동백씨 추출물(초임계 추출)을 동일한 비율 (1:1)로 합하여 인간 모유두세포에 10 ug/mL, 100 ug/mL, 그리고 500 ug/mL의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성이 관찰되었다. PBS를 처리한 대조군 대비, 10 ug/mL 처리는 $31.8 \pm 4\%$, 100 ug/mL 처리는 $27.8 \pm 10\%$, 그리고 500 ug/mL 처리는 $23.5 \pm 10\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 8).

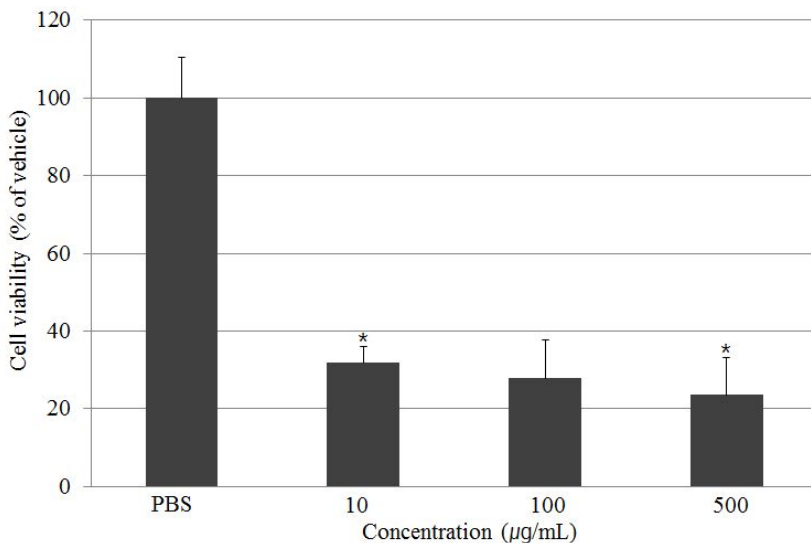


Figure 8. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* from Super critical extracts *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

4) 동백 씨 추출물의 추가 희석

동백 씨 추출물(초임계 추출)을 추가적으로 희석하여 인간 모유두 세포에 0.1 ug/mL, 0.5 ug/mL, 그리고 1 ug/mL의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도가 감소함에 따라 세포 독성이 감소하는 경향을 보였으며, 0.1 ug/mL 처리군에서는 PBS 대조군에 비해 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다. PBS를 처리한 대조군 대비, 0.1 ug/ml 처리는 $85.8 \pm 9\%$, 0.5 ug/mL, 처리는 $79.4 \pm 4\%$, 그리고 1 ug/mL, 처리는 $61.4 \pm 14\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 9).

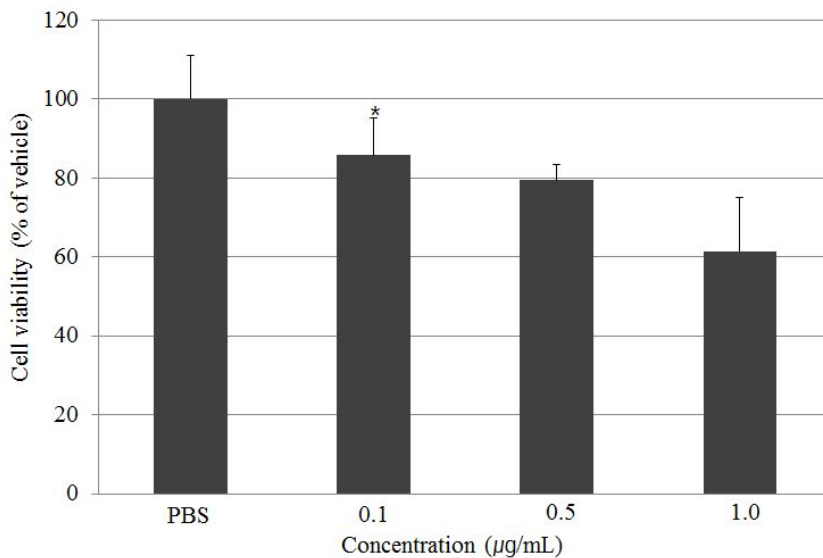


Figure 9. Effect of cytotoxicity from Super critical extracts from *Cinnamomum camphora* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Significantly different from the control value : *p < 0.05

5) 녹나무 추출물과 추가 희석된 동백 씨 추출물의 1:1 혼합

녹나무 추출물 (메탄올 초음파 추출)과 추가로 희석된 동백씨 추출물 (초임계 추출)을 동일한 비율 (1:1)로 합하여 인간 모유두 세포에 녹나무 추출물 10ug/ml + 동백씨 추출물 0.1 ug/ml, 녹나무 추출물 100 ug/mL + 동백씨 추출물 0.1 ug/mL, 그리고 녹나무 추출물 500 ug/mL + 동백씨 추출물 0.1 ug/mL의 혼합 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 10ug/mL + 동백씨 추출물 0.1 ug/mL 처리는 $84.9 \pm 12\%$, 녹나무 추출물 100 ug/mL + 동백씨 추출물 0.1 ug/mL 처리는 $92.2 \pm 11\%$, 그리고 녹나무 추출물 500 ug/mL + 동백씨 추출물 0.11 ug/mL 처리는 $93.9 \pm 19\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 10).

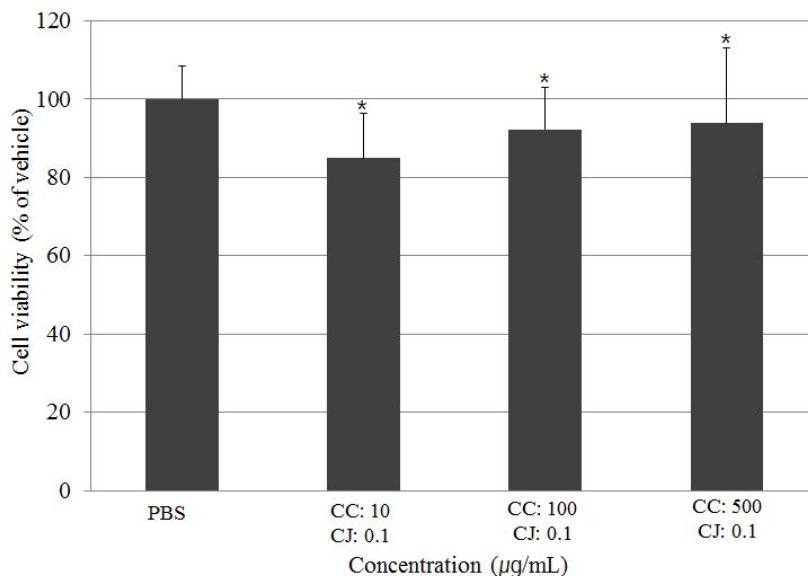


Figure 10. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Cinnamomum camphora* from Super critical extracts *Camellia japonica* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

4. Western blot

1) PDGF-B 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 PDGF-B의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $142 \pm 16\%$ 로 PDGF-B 발현 촉진효과가 나타났으나, 동백 씨 추출물 처리 시 $99 \pm 3\%$ 로 차이가 나타나지 않았다. 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $119 \pm 10\%$ 로 PDGF-B 발현 촉진효과가 나타났다(Figure 11).

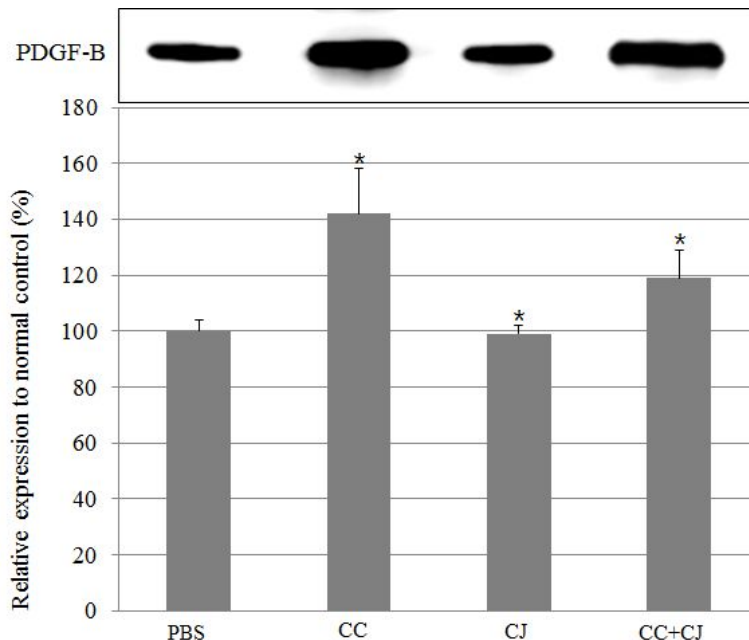


Figure 11. Effect of promote revelation from PDGF-B from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

2) IGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 IGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $164 \pm 21\%$, 동백 씨 추출물 처리 시 $105 \pm 7\%$ 로, 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $130 \pm 11\%$ 로 IGF 발현 촉진 효과가 나타났다(Figure 12).

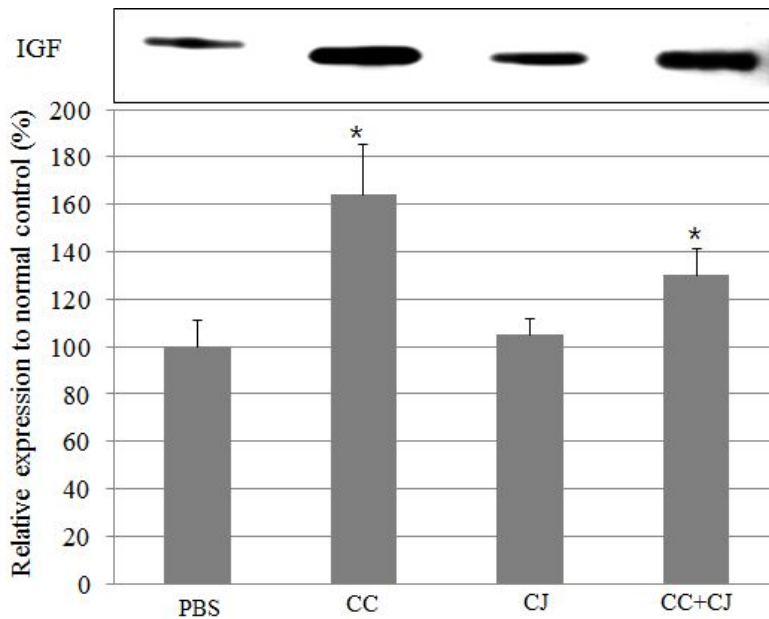


Figure 12. Effect of promote revelation from IGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

3) VEGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 VEGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $99 \pm 6\%$ 로 차이가 나타나지 않았으나, 동백 씨 추출물 처리 시 $78 \pm 10\%$ 로 VEGF 발현이 감소되는 효과가 관찰되었다. 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $96 \pm 8\%$ 로 차이가 나타나지 않았다(Figure 13).

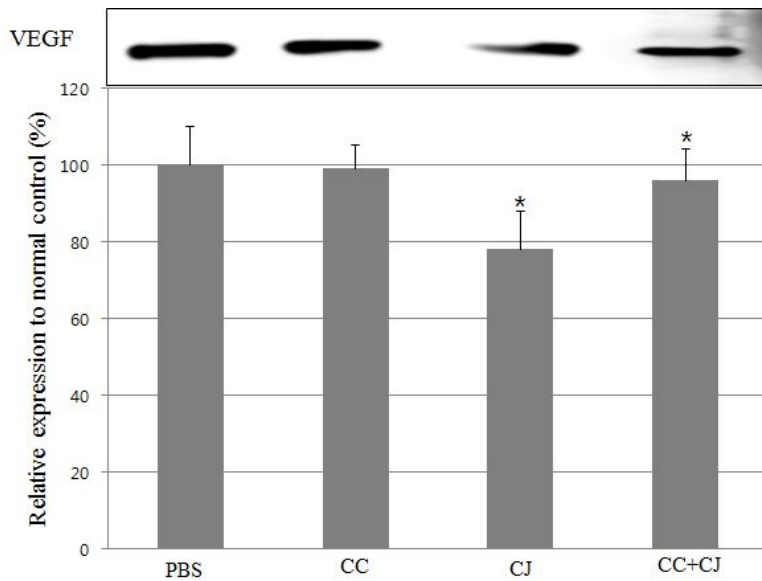


Figure 13. Effect of promote revelation from VEGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

4) KGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 KGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $106 \pm 6\%$, 동백 씨 추출물 처리 시 $99 \pm 1\%$ 로 KGF 발현 효과의 차이가 나타나지 않았다. 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $103 \pm 8\%$ 로 KGF 발현 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 14).

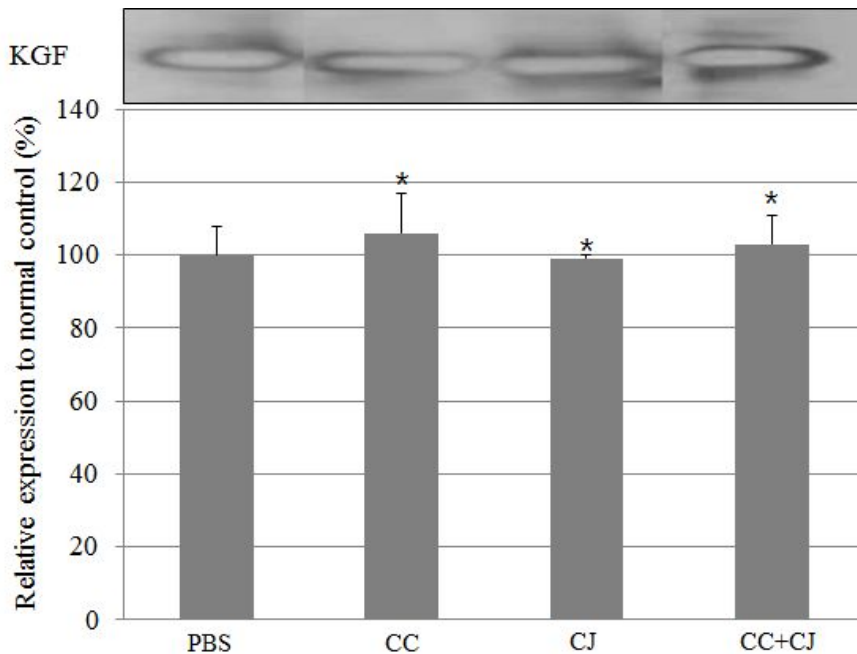


Figure 14. Effect of promote revelation from KGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

5) hGH 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 hGH의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $100 \pm 13\%$, 동백 씨 추출물 처리 시 $108 \pm 10\%$ 로 hGH 발현 효과의 차이가 나타나지 않았다. 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $102 \pm 15\%$ 로 hGH 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 15).

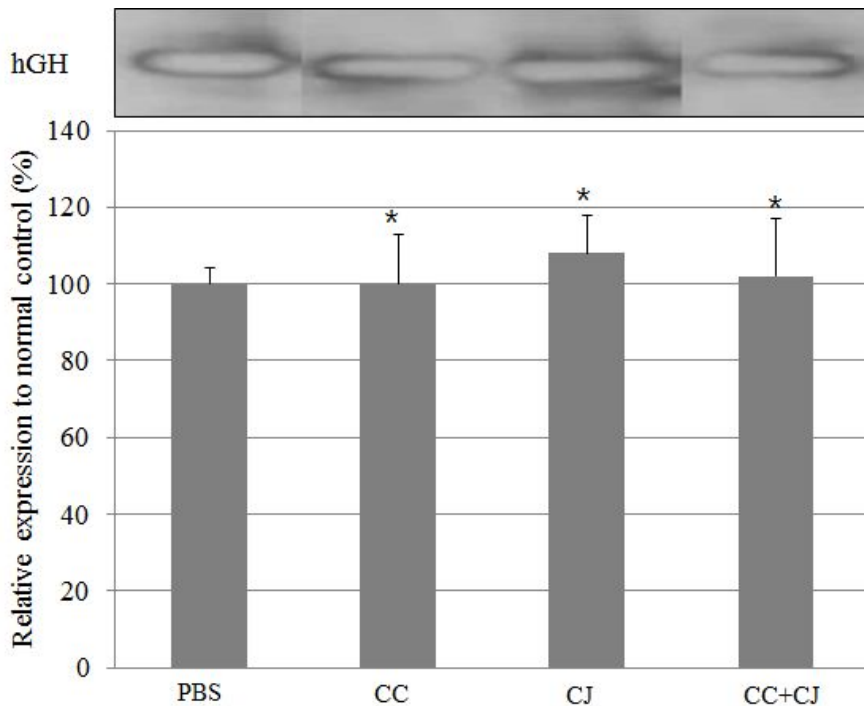


Figure 15. Effect of promote revelation from hGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : * $p < 0.05$

6) EGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 녹나무 추출물과, 동백 씨 추출물 2종에 대하여 녹나무 추출물은 100 ug/mL의 농도로, 동백 씨 추출물은 0.1 ug/mL의 농도로 48시간 처리한 후 EGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 녹나무 추출물 처리 시 $97 \pm 9\%$, 동백 씨 추출물 처리 시 $99 \pm 9\%$ 로 EGF 발현 효과의 차이가 나타나지 않았다. 녹나무와 동백 씨 혼합 처리 시 $101 \pm 11\%$ 로 EGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다 (Figure 16).

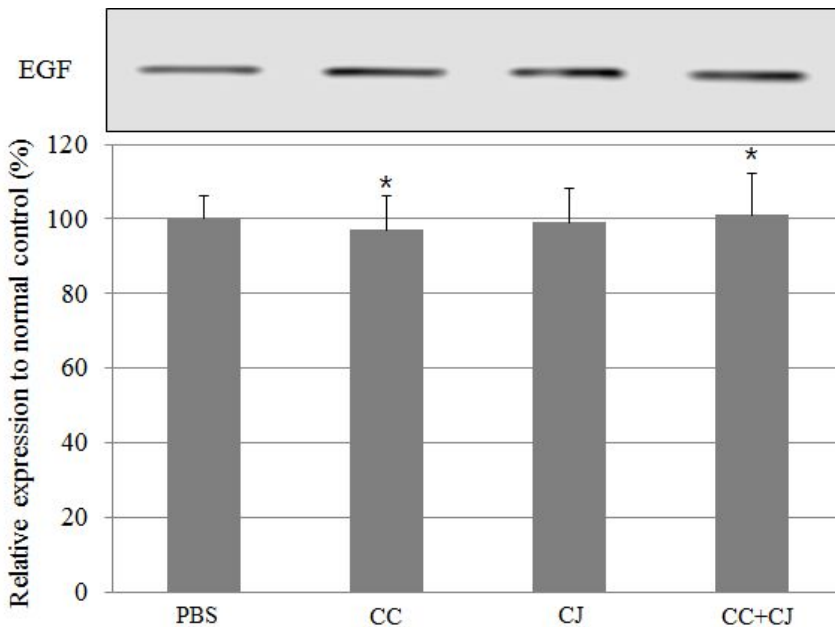


Figure 16. Effect of promote revelation from EGF from *Cinnamomum camphora* and *Camellia japonica*. Significantly different from the control value : *p<0.05

IV. 고찰

녹나무(*Cinnamomum camphora*)는 Lauraceae과로 난대성 기후에서만 자라는 나무로 겨울에도 잎이 떨어지지 않는 상록 활엽수이다. 녹나무의 재목, 가지, 잎, 뿌리를 말려 수증기로 증류시켜 얻은 기름을 장뇌라고 하며, 장뇌에는 정유성분인 camphor가 주성분이고 cineol, α -pinene, l-camphene, d-limonene, safrol, α -camphorene 등이 함유되어 있다[14]. 가지와 뿌리는 강심제를 만드는 약의 원료가 되고, 잎은 서양요리의 소스를 만들 때 사용하기도 하며 민간에서는 방해충, 신경쇠약, 간질, 방광염, 신우신염, 강심제로도 알려져 있고, 제주도에서는 당뇨, 암 치료 약으로 사용되어 왔다[15].

동백나무(*Camellia japonica*)는 동백나무과(*Theaceae*) 동백속(*Camellia*)에 속하는 상록교목이다. 동백종실은 포화지방산이 9.1~11.5%, 올레인산 85.6~89.4%, 리놀산 1.3~2.9%로서 올레인산 함유량이 많은 불건성유로 예로부터 머릿기름, 정밀기계유 및 식용유로 사용되었고 꽃은 본초강목에 가루를 내어 화상부위의 치료에 쓰인다고 하였다[16]. 동백나무 추출물의 피부 미백 작용 등의 생리 활성이 보고되었고, 국내에서는 일부 학자들이 동백유의 일반 성분 분석과 유박의 아미노산 함량을 연구하여 동백종실의 지방산이 stearic, palmitic, linoleic 및 oleic acid 등으로 구성되어 있음을 밝혔다[17]. 동백 씨는 식용유와 화장유의 자원으로 사용되었고 포화산 9.1~11.5%, 올레인산 85.6~89.4% 리놀산 1.3~2.9%로서, 올레인산 함유량이 많은 불건성유로 머릿기름, 정밀기계유 및 식용유로서 맛이 고소하다고 알려졌다[18].

페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, 1,000여 종류 이상이 밝혀져 있다. 대부분 식물들의 항산화능 화합물은 주로 폴리페놀 물질들이며 천연 항산화제로서의 기능이 잘 알려져 있다[19].

한정훈[20]은 연구에서 녹나무의 폴리페놀 함량을 분석한 결과 40.845 mg/g으로 나타났다고 하였으며, 김은진 등[21]은 송화와 참나무 겨우살이 폴리페놀 함량은 각각 44.01 mg/g, 46.76 mg/g으로 나타났다고 하였다.

본 연구에서 녹나무의 총 폴리페놀 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 76.079 mg/g로 가장 높게 나타났는데, 이는 한정훈[20]의 연구보다 높은 결과이며, 송화와 참나무 겨우살이 추출물의 폴리페놀 함량 보다 상대적으로 높게 나타났다 .

김영례 및 한진섭[22]은 동백 잎 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 23.4mg/g 이라고 보고하였다. 황은수[23]는 동백 씨 총 페놀 함량이 28.37mg/g 으로 나타났다고 하였다.

본 연구에서 동백 씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 메탄올 추출물에서 99.263 mg/g로 폴리페놀 함량이 높게 나타났다. 이는 김영례 및 한진섭[22]의 연구와 황은수[23]의 연구 보다 높은 결과이며 녹나무, 송화와 참나무 겨우살이 추출물의 폴리페놀 함량 보다 상대적으로 높은 결과이다.

플라보노이드(flavonoids)는 폴리페놀에 속하는 성분으로 플라보노이드의 C6-C3-C6를 기본 골격으로 하며 노란색 내지는 담황색을 나타내는 페놀계 화합물의 총칭으로 자연계에 널리 분포하고 있으며 폴리페놀과 같이 채소류와 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위에 함유되어 있을 뿐 아니라 곡물, 과실류 등에도 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며[24], 활성 산소종을 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며, 폴리페놀과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다[25].

한정훈[20]은 연구에서 녹나무의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 2.86 mg/g로 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서 녹나무의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 5.907 mg/g로 한정훈[20]의 연구결과 보다 높게 나타났다.

김영례 및 한진섭[22]은 동백 잎 70% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 87.6 mg/g 으로 보고하였다.

본 연구에서는 동백 씨 추출물의 총 플라보노이드 함량이 메탄올-초음파 추출물에서 11.811 mg/g로 나타나 김영례 및 한진섭[22]의 연구보다 낮게 나타났다. 이는 황은수[23]의 연구에서 동백나무의 종자보다 어린잎에 30배 정도의 많은 양의 페놀 화합물을 함유하고 있다는 연구결과와 유사한 결과이다.

범희주 등[26]은 인체에 손상을 입히는 활성산소는 반응성이 높기 때문에 과산화 지질을 생성하고 세포와 조직에 손상을 가해 노화를 촉진시킨다고 하였으며,

산소와 자외선에 노출되어 있는 피부의 경우 활성 산소 종으로 유도된 피부의 광학적 손상 위험이 증가된다고 하였다. 차재영 등[27]을 활성산소의 억제 효과가 있는 항산화제는 대부분 식물 기원의 항산화성 화합물로서 나무, 수피, 줄기, 잎, 과일, 뿌리, 꽃, 열매, 씨앗 등의 모든 부위에 존재하며, 주로 페놀 화합물 구조를 가지면서 지질의 자동산화 조건에 의해 생성된 유리라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해하는 역할을 한다고 하였다.

이혜자 및 황석연[28]의 연구에서 녹나무의 80% MeOH 추출물을 기존에 잘 알려져 있는 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA)의 RC_{50} 값과 비교하였을 때 $16.9 \mu\text{g/mL}$, $11.9 \mu\text{g/mL}$ 로 비슷한 항산화 활성을 보였다고 보고하였고, Lee *et al.*[29]의 연구에서 녹나무의 SC_{50} 값이 $33 \mu\text{g/mL}$ 로 나타나 대조군 BHT (SC_{50} : $50 \mu\text{g/mL}$) ascorbic acid (SC_{50} : $22 \mu\text{g/mL}$)와 유사한 항산화 활성을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서 녹나무의 DPPH 소거능을 분석한 결과 메탄올-초음파 추출물에서 96.34%로 높은 DPPH 소거능을 나타내고 있어 이혜자 및 황석연[28]의 연구와 Lee *et al.*[29]의 연구 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

Kim *et al.*[30]은 연구에서 동백의 부위별 메탄올 추출물의 free radical에 대한 소거작용을 검색한 결과, 신엽 ($RC_{50}=30.37 \mu\text{g/mL}$), 꽃봉오리 ($RC_{50}=52.97 \mu\text{g/mL}$)와 꽃 ($RC_{50}=59.48 \mu\text{g/mL}$)이 높은 활성을 보여 합성 산화제인 Vit C ($RC_{50}=6.68 \mu\text{g/mL}$)보다는 활성이 낮았지만 BHT의 RC_{50} 값이 584.04임을 고려할 때 활성이 강한 것으로 판단된다고 하였다.

Choi *et al.*[31]의 연구에서 95% EtOH에 용해시킨 동백 씨 추출물의 DPPH에 대한 소거능 (EC_{50})은 500 mg/mL 로 농도에 비례해서 약간의 항산화능은 있으나 대조군에 비해 상대적으로 낮은 항산화 활성을 보였다고 하였다.

김영례 및 한진섭[22]은 동백 잎 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능 활성을 측정 한 결과 $500 \mu\text{g/mL}$ 에서 61.02%를 보였으며, 이숙영 등[32]은 동백 나무 종자의 DPPH free radical 소거능은 76.26%로 나타났다고 하였다.

본 연구에서 동백 씨 추출물의 DPPH 소거능은 초임계 추출물에서 49.33% 가장 높게 나타났는데, 이는 김영례 및 한진섭[22]은 동백 잎 추출물의 DPPH 소거능 보다 낮은 결과이며, 이숙영 등[32]의 연구보다 낮은 결과이다.

아질산염은 2급 및 3급 amine류와 반응하여 nitrosoamine을 생성하는 것으로 알려져 있다[33]. Nitrosoamine은 체내에서 diazoalkane($C_nH_{2n}N_2$)으로 변환하여 핵산이나 단백질 또는 세포내의 성분을 alkyl화 함으로써 암을 유발하고[34], 아질산염은 그 자신이 독성을 갖고 있기 때문에 일정한 농도 이상 계속 섭취 시 혈액중의 헤모글로빈을 산화 시켜 메트헤모글로빈증 (methemoglobinemia)를 유발한다[35]. Mirvish[36]은 ascorbic acid에 의한 nitrosoamine 생성 억제 기능을 보고하였고, phenolic guaiacol, resorcinol 등의 phenol계 물질들이 nitro화 반응을 강력하게 억제한다는 사실이 보고되고 있다[37].

본 연구에서 녹나무의 아질산염 소거능을 분석한 결과는 초임계 추출물에서 37.59%로 가장 높은 아질산염 소거능을 보였으며, 동백 씨 추출물의 아질산염 소거능을 분석한 결과는 초임계 추출물에서 37.76%로 가장 높은 아질산염 소거능을 보여, 2종의 천연물 모두에서 초임계 추출물의 아질산염 소거능이 높게 나타났다.

연구결과 녹나무는 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높게 나타났으며, 높은 항산화 활성과 아질산염 소거능을 보여 천연 항산화제로 활용 가능성과 기능성 화장품의 소재로 활용 가능성을 확인 하였다. 동백 씨의 경우 폴리페놀 함량은 높게 나타났으나, 플라보노이드 함량은 낮았고, 항산화 활성은 녹나무 추출물보다 낮았지만 아질산염 소거능이 높게 나타났다.

본 연구에서 녹나무 추출물(메탄올 초음파 추출)의 인간 모유두 세포에 대한 독성은 500 ug/ml 이내의 처리 농도에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않으며, PBS를 처리한 대조군 대비 11%의 유의적 생육촉진 효과를 보였다.

성장 인자는 세포의 성장, 증식 및 분화에 관여하는 단백질로써[38] 현재까지 다양한 성장 인자들이 발견되었다. 이들 성장 인자들은 종류에 따라, 특정 수용체와 결합해서 각각의 기능을 나타내고, 세포의 신호 전달 물질로 작용한다. 성장인자들이 발견되고, 보고된 초반에는, 분리 및 정제에 어려움이 있었다. 그러나, 1973년 유전자 재조합 기술의 발달로 성장인자들의 대량 분리와 정제가 가능해진 이후, 다양한 연구에서 이용되고 있다[38,39].

성장인자를 활용한 모발성장 효과에 관한 연구도 활발하게 진행되면서, 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 인슐린 유사 성장인자(insulin-like

growth factor, IGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 등의 성장인자들은 여러 실험을 통하여 모낭의 특정 장소에 작용하여 모발 성장에 관여한다고 이미 밝혀진바 있다[40].

최근에는 몇몇 성장인자가 모발의 외형형성과 성장주기에 관여한다는 보고가 있었으며 이를 이용한 많은 연구가 이루어지고 있다[41].

모낭주기의 조절에 있어 다양한 성장인자 및 cytokine이 관여하는데 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), keratinocyte growth factor (KGF), insulin like growth factor (IGF), interleukin-1, basic fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (bHGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이 이에 포함된다 [42]. 이 성장인자들은 모낭에 공급되는 호르몬 작용에 의해 그 발현량이 증가 또는 감소할 수 있으며, 모유두 세포에서 분비되어 자가 분비적(autocrine), 측분비적(paracrine) 방식으로 작용 한다 모유두 세포는 모낭주기의 조절에 있어 주요한 역할을 하며, 이는 여러 성장인자들에 의해 매개된다. 남성호르몬은 모유두 세포를 자극하여 bFGF, HGF, IGF-1, KGF, VEGF, TGF- β 1, 2와 같은 성장인자를 생산하게 하며, 이는 모유두 세포 뿐 만 아니라 주변의 다른 모낭 상피 세포들에게도 작용한다[43].

VEGF는 성체에서의 혈관생성 뿐만 아니라, 배아발생에서의 혈관 발달을 조절하는 중요한 인자이다. 이는 또한, 모낭 주위의 혈관생성에 중요한 역할을 한다. 즉, 외모근초의 모낭 각질형성세포에 의한 VEGF 발현량 증가에 따라 모낭의 크기 및 혈관 형성이 증가하며, VEGF 중화항체 처리에 따라 모낭의 크기가 감소하고 모발의 성장이 지연되었음을 보고한 연구가 있다[44,45]. 모낭 각질형성세포는 모유두 세포와 상호작용하며 모낭의 형성과 모낭주기의 조절에 있어 중요한 역할을 한다. KGF-2는 모유두에 존재하며, 이의 수용체는 이웃하고 있는 외모근초의 각질형성세포에 존재한다. 이와 관련하여, 재조합 KGF-2를 주입하였을 때 모낭 내 세포들이 증식한다는 연구결과가 있다[46].

EGF는 세포핵에 작용하여 표피 세포의 분열과 증식속도를 촉진시켜, 피부 재생 과정에 관여한다[47]. 이러한 기능으로 EGF는 화장품 분야에서 폭넓게 이용되

고 있다[48].

IGF-1이 세포들의 신호 전달과정을 통해 세포 표면의 receptor와 결합하게 되고, 모낭의 발달 단계에서 세포들의 성장과 이동에 상당한 역할을 한다고 보고되었다[49][50]. 또한, survival factor로써 세포사멸을 방지하는 anti-apoptotic 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이런 효과는 모낭세포가 성장주기(catagen phase)를 지남에 따라 퇴화되는 것을 방지시켜주는 역할을 하게 된다[51].

서금화[52]은 연구에서 세신과 고삼 추출물은 VEGF의 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었으며, KGF는 백자인과 고삼 추출물에 의해 발현이 증가되었다고 하였다

본 연구에서 나타난 PDGF-B 발현촉진 효과는 녹나무 추출물에서 대조군 대비 142%로 높게 나타났으나, 동백 씨 추출물에서는 99%로 나타나 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

IGF의 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물에서 164%로 높게 나타났으나, 동백 씨 추출물 105%로 나타나 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

VEGF 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물 99% 대조군 대비 차이가 없었으나, 동백 씨 추출물 78%로 나타나 VEGF 발현이 감소되는 것으로 관찰 되었다.

KGF 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물에서 106%, 동백 씨 추출에서는 99%, hGH의 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물에서 100%, 동백 씨 추출물에서 108%, EGF 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물에서는 97%, 동백 씨 추출물 처리 시 99%로 각각 나타나 대조군과 차이를 보이지 않았다.

연구결과 녹나무 추출물은 폴리페놀 함량이 높게 나타났으며, 높은 DPPH 소거능을 보여 항산화 기능성 화장품의 소재로 활용가치가 크다고 생각 되었다. 또한 모두유 세포에 대한 세포독성이 없으며, 세포 증식효과와 함께 PDGF-B, IGF 발현 촉진 효과가 높게 관찰되어 육모제 소재로 활용가치가 높다는 것을 알 수 있었다. 동백 씨 추출물의 폴리페놀 함량은 높게 나타났으나, 온화한 수준의 DPPH 소거능을 보였으며, 처리농도에서 세포독성이 관찰되어 기능성 화장품의 소재로 사용을 위한 추가적 연구가 필요한 것으로 생각되며 향후 후속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

VI. 결론

본 연구는 실험적 방법을 통하여 녹나무와 동백 씨에서 다양한 추출방법으로 유효물질을 추출하여, 항산화능과 세포 독성실험을 통한 기능성 화장품의 원료로의 사용 가능성을 알아보고자 하였다. 또한 모유두 세포의 증식효과와 western blotting을 통한 성장인자 발현 촉진효과를 통해 육모제 소재 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 녹나무와 동백 씨에서 추출방법을 달리하여 추출한 각 6종의 추출물에 대한 추출물의 수율은 녹나무와 동백 씨 모두에서 메탄올-초음파 추출물이 각각 2.037%, 1,809%로 가장 높게 나타났다.

2. 녹나무와 동백 씨에서 추출방법을 달리하여 추출한 각 6종의 추출물에 대하여 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과 녹나무는 에탄올-초음파 추출물에서 50.248 mg/g로 가장 높게 나타났으며, 동백 씨에서는 메탄올 추출물에서 99.263 mg/g으로 가장 높게 나타나 동백 씨의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났다.

3. 녹나무 추출물의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 5.907 mg/g로 가장 높았으며, 동백 씨 추출물의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 11.811 mg/g로 가장 높게 검출 되었다.

4. 녹나무 추출물의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 96.34%로 가장 높은 DPPH 소거능을 보였으며, 동백 씨는 초임계 추출물에서 49.33%로 가장 높은 효과를 나타내었다.

5. 아질산염 소거능 분석 결과는 녹나무 추출물과 동백 씨 추출물 모두 초임계 추출물에서 각각 37.59%, 37.76%로 가장 높은 효과를 보여, 양성대조군으로 사용

한 ascorbic acid (1 mg/ml)의 아질산염 소거능 90~93% 보다 낮게 나타났다.

6. 녹나무 추출물과 동백 씨 추출물의 인간 모유두 세포에 10 ug/ml, 100 ug/ml, 500 ug/ml의 농도에서 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 녹나무 추출물에서는 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았으나, 동백씨 추출물은 처리 농도 범위 내에서 유의적인 독성이 관찰되었다.

7. 녹나무 추출물과 동백 씨 추출물의 인간 모유두 세포 생육촉진 효과는 녹나무 추출물 500 ug/mL 농도 처리 시 대조군 대비 11%의 유의적 생육촉진 효과를 보였다. 10 ug/mL 처리는 101.4%, 100 ug/mL 처리는 106.4%, 500 ug/mL 처리는 112.7%로 나타나 농도가 증가할수록 세포 생육 도가 높게 나타났다. 동백 씨 추출물에서는 10 ug/mL 처리는 24.7%, 100 ug/mL 처리는 23.5%, 500 ug/mL 처리는 23.0%로 나타나 농도가 증가할수록 세포 생육도가 낮게 나타나 세포 독성이 관찰되었다.

동백 씨의 세포 독성 확인되어 처리 농도를 추가 희석하여 0.1 ug/mL, 0.5 ug/mL, 그리고 1 ug/mL의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과 처리 농도가 감소함에 따라 세포 독성이 감소하는 것으로 나타났으며, 0.1 ug/mL 처리군에서 PBS대조군에 비해 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다.

8. 녹나무추출물과 동백 씨 추출물에 대하여 western blotting을 통한 성장인자 발현 촉진 효과 측정 결과는 PBS를 처리한 대조군 대비 PDGF-B 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물의 경우 142%로 높게 나타났으나, 동백 씨에서는 99%로 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

IGF 발현 촉진 효과는 녹나무 추출물 164%로 높게 나타났으며, 동백 씨 추출물은 105%로 대조군과 차이가 나타나지 않았다. VEGF 발현 촉진효과는 녹나무 추출물 99%로 대조군과 차이가 나타나지 않았으나, 동백 씨 추출물은 78%로 나타나 VEGF 발현이 감소되는 효과가 관찰되었다. KGF의 경우는 녹나무 추출물 106%, 동백 씨 추출에서는 99%로 나타나 대조군과 차이가 나타나지 않았다. 또

한 hGH 에서도 녹나무 추출물에서 101%, 동백 씨 추출물에서 108%로 나타났으며, EGF에서도 녹나무 추출물 97%, 동백 씨 추출물 99%로 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

참고문헌

- [1] Ralph MT. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Experimental Gerontology*. 37: 981-990, 2002.
- [2] 건강보험심사평가원. '남성 탈모증'환자 년 4.8%씩 꾸준히 증가. 2014
- [3] Shapiro J, Price V. H. Hair regrowth therapeutic agents. *Dermatol. Clin.*, 16: 341-356, 1998.
- [4] Stough D, Stenn K, Haber R, Parsley WM, Vogel JE, Whiting DA, Washenik K, Psychological Effect, Pathophysiology, and Management of Androgenetic Alopecia in Men, *Mayo Clin Proc*, 80(10), pp.1316-1322, 2005.
- [5] Mackay A, Isles C, Henderson I, Fife R, Kennedy AC. Minoxidil in the management of intractable hypertension. *Quart J Med*, 52, pp.175-190, 1981.
- [6] Hagemann T, Schlüter-Bömer B, Allam JP, Bieber T, Novak N. Positive lymphocyte transformation test in a patient with allergic contact dermatitis of the scalp after short-term use of topical minoxidil solution, *Contact Dermatitis*, 53(1), pp.53-55, 2005.
- [7] Mapar MA, Omidian M. Is topical minoxidil solution effective on androgenetic alopecia in routine daily practice?. *J. Dermatol. Treat.*, 18: 268-270, 2007.
- [8] McClellan KJ, Markham A, Finasteride : a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs*, 7(1), pp.111-126, 1999.
- [9] Olsen EA, Hordinsky M, Whiting D, Stough D, Hobbs S, Ellis ML, Wilson T, Rittmaster RS. The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: Results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. *J Am Acad Dermatol*. 55: 1014-1023 (2006)5. Sinclair R, Wewerinke M, Jolley D. Treatment of female pattern hair loss with oral antinadrogens. *Br J Dermatol*. 152: 466-473. 2005.

- [10] 권민철, 한재건, 하지혜, 오성호, 김영, 정향숙, 최근표, 황백, 이현용. 병풀의 초음파 추출 시 용매에 따른 면역활성 증진 효과. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 16(5): 294-300. 2008.
- [11] 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 44(3): 337-342. 2012.
- [12] Gray J.I. and Dugan L.R. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.*, 40(5): 981-984. 1975.
- [13] Mosmann T. Rapid colormetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods*, 65: 55-63. 1983.
- [14] Han JH. Studies on the effect of antimicrobial and antiinsecticidal activity from warm temperate zone species of tree. MS Thesis, Jeonbuk National Univ Korea. 2011.
- [15] Lee, HJ Inhibitory effect of Cinnamomum camphora, Jeju native plant, on the Inflammatory biomarkers in RAW264.7 cells. MS Thesis, Jeju National Univ. Korea. 2003.
- [16] 이향희. 동백꽃에 함유된 항산화 활성 물질의 구명 및 응용제품. 전남대학교 석사학위논문, 2011.
- [17] 한영숙. 동백나무잎 추출물이 식품 유해 미생물에 미치는 항균효과. *한국식품과학회지*, 37: 113-121. 2005.
- [18] Itokawa, H., H. Nakajima, A. Ikuta, and Y. Iitaka. Two teiterpenes from the flowers of *Camellia japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 20: 2539-2542. 1981.
- [19] Pratt, D. E., M. T. Huang, S. T. Ho, and C. Y. Lee. In Phenolic compound in food and their effects on health(II). *Antioxidants and Cancer Prevention*. pp. 54-71, Washington DC. 1992.
- [20] 한정훈. 주요 난대수종 천연물의 항균·항충 효과. 전북대학교 대학원 석사학위논문. p.26. 2010.
- [21] 김은진, 최주연, 유미리, 김미영, 이상현, 이복희. 자생식물과 생약자원 추출물의 폴리페놀플라보노이드 함량 및 항산화 활성 탐색 *한국식품과학회지* 44(3): 337-342. 2012.

- [22] 김영례, 한진섭. 동백나무 잎 추출물의 피부질환균에 대한 항균효과 및 항산화 활성. *Journal of Investigative Cosmetology* 10(1): 13~19. 2014.
- [23] 황은수. 국내자생 동백나무(*Camellia japonica* L.)의 생리활성. 동신대학교 대학원, 석사학위 논문, pp. 2005.
- [24] Hetog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *J. Agr. Food Chem.* 41: 1242-1246. 1993.
- [25] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246. 2010.
- [26] 범희주, 김란, 김한식. 수창포의 이화학적 특성과 에탄올 추출물이 UVB로부터 피부 보호에 미치는 효과. *대한피부미용학회지*, 8: 181-194. 2010.
- [27] 차재영, 김현정, 정정환, 조영수. 꾸지뽕나무의 폴리페놀 화합물 함량과 항산화 활성. *한국식품영양과학회지*, 28: 181-194. 1999.
- [28] 이해자. RAW264.7 세포에서 제주자생식물녹나무(*Cinnamomum camphora*)의 염증성 생체지표 억제효과에 관한 연구. 제주대학교 대학원. PP.20-21. 2003.
- [29] Lee NH, Lee SJ, J DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ. Screening of the Tyrosinase Inhibition and Radical Scavenging Effects Using Plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3): 175~180, 2001.
- [30] Kim. MS, Hwang EJ, Pyo BS, Lee SY. Antioxidant and Antimicrobial Activities of The Extracts from Native *Camellia japonica* L. in Korea. *Korean J. Plant. Res.* 17(3): 318. 2004.
- [31] Choi M H, Min M J, Oh D S and Shin H J. Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Camellia japonica* Extracts for Cosmetic Applications. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 28(2): 99-105. 2013.
- [32] 이숙영, 황은주, 김지혜, 최영복, 임채영, 김선미. 동백나무 잎과 종자 추출물의 항 미생물 활성 및 항산화 효과. *Korean J. Medicinal Crop Sci*, 13(3): 93-100. 2005.
- [33] Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ. Encyclopedia of food science food technology and nutrition. Academic Press, New York, NY, USA. 3240-3249. 1993.
- [34] Bartsh H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibition of endogenous nitrosation:

- Mechanism and implications in human cancer prevention. *Nut. Res.* 202: 307-324. 1998.
- [35] Jin Q, Park JR, Kim JB, Cha MH. Physiological activity of zizyphus jujaba leaf extracts. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 593-598. 1999.
- [36] Mirvish SS. Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. natl. Cancer Inst.* 44: 633-639. 1970.
- [37] Cooney & Ross. N-Nitrosation and N- nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution: Effectsof vanillin and related phenols. *J. Agric. Food Chem.* 35: 789-796. 1987.
- [38] Y. R. Yun, J. H. Jang, E. Jeon, W. Kang, S. Lee, J. E. Won, H. W. Kim and I. Wall, *Regenerative Medicine*, 7: 369-385, 2012.
- [39] J. Tan, Y. Wang, X. Yip, F. Glynn, R. K. Shepherd and F. Caruso, *Advance Materials*, 24: 3362-3366. 2012.
- [40] Tsuboi R. Growth Factors and Hair Growth. *Korean Journal of Investigative Dermatology.* 4(2): 103-108. 1997.
- [41] Messenger AG. Overview of hair follicle growth and development. The control of hair growth: an overview. *J Invest Dermatol.* 101: 4-9, 1993.
- [42] Zagana P, Haikou M, Klepetsanis P, Giannopoulou E, Ioannou PV, Sophia GA. In vivo distribution of arsonoliposomes: Effect of vesicle lipid composition. *Journal of Pharmaceutics.* 347: 86-92. 2008.
- [43] Ahmet A, Ercan A, Hakan E. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the scalp of patients with alopecia areata. *Journal of Dermatological Science.* 29: 85-90. 2002.
- [44] Toshihiko H, Toshio N. Role of TGF- β 2 in the human hair cycle. *Journal of Dermatological Science.* 35: 9-18. 2004.
- [45] 박원석, 성대석, 김대권. 5종의 한약 추출물이 함유된 헤어 에센스제품이 in vitro 및 in vivo에서 육모 및 탈모 방지에 미치는 효과. *대한한의학회지*,
- [46] Yano K, Brown LF, Michael D. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 107: 152-160, 2004.
- [47] R. C. Harris, E. Chung and R. J. Coffey, *Experimental Cell Research.* 284:

- 2-13, 2003.
- [48] Choi JH, Jang JH, Jang WH, Kim J, Bae IH, Bae J, Park YH, Kim BJ, Lim KM and Park JW. *Biomaterials*, 33: 8579-8590, 2012.
- [49] PeusD, Pittelkow MR. Growth factorsin hairorgan development and the hair growth cycle. *Dermatol Clin*, 14: 559-72, 1996.
- [50] Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinas JR, Parimoo S, Prouty SM, Hair follicle growth controls. *Dermatol Clin*, 14: 543-58,1999.
- [51] Su HY, Hickford GH, Bickerstaffe R, Palmer BR. Insulin-like growth factor1 and hair growth; *Dermatol Online J*, 5(2): 1, 1999.
- [52] 서금화. 리포솜제형을 이용한 네 가지 약재추출물의 남성형 탈모방지 효능 평가. 건국대학교 대학원 석사학위논문. p.25. 2008.