



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

삼백초와 죽엽 추출물의 항산화 및 모유두세포 증식효과

조선대학교 대학원

보완대체의학과

박 금 단

삼백초와 죽엽 추출물의 항산화 및 모유두세포 증식효과

**Antioxidative and Proliferative Effects of Follicle Dermal Papilla
Cell of Extracts from Saururus chinensis and Phyllostachys
Folium**

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완대체학과

박 금 단

삼백초와 죽엽 추출물의 항산화 및 모유두세포 증식효과

지도교수 소 금 영

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

박 금 단

박금단의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	이	미	자	(인)
위 원	조선대학교	교수	문	경	래	(인)
위 원	남부대학교	교수	한	진	섭	(인)
위 원	조선대학교	교수	홍		란	(인)
위 원	조선대학교	교수	소	금	영	(인)

2015년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표 목차	iii
그림 목차	ix
ABSTRACT	viii
 I. 서론.....	1
1. 연구의 배경 및 필요성	1
2. 연구의 목적.....	5
 II. 연구방법.....	6
1. 재료 및 시약.....	6
2. 추출물의 제조.....	6
1) 유기용매 추출.....	6
2) 증류수 추출.....	7
3) 초임계 추출.....	8
3. 항산화 효과 분석.....	10
1) 총 폴리페놀 함량 측정.....	10
2) 총 플라보노이드 함량 측정.....	10
3) DPPH 라디칼 소거능 측정.....	10
4) 아질산염 소거능 측정 소거능 측정.....	11
4. 인간 모유두세포에 대한 in vitro 세포 독성 평가.....	12
1) 천연추출물 처리.....	12
2) 세포배양.....	12
3) MTT assay.....	12

5. Western blotting을 통한 성장인자 발현에 미치는 영향.....	14
6. 통계처리.....	15

III. 연구결과.....16

1. 생약제재 추출물의 수율.....	16
2. 항산화 효과.....	17
1) 총 폴리페놀 함량.....	17
2) 총 플라보노이드 함량.....	19
3) DPPH 라디칼 소거능.....	21
4) 아질산염 소거능.....	23
3. 인간 모유두세포에 대한 invitro 세포 독성 평가.....	25
1) 삼백초.....	25
2) 죽엽.....	26
3) 삼백초 추출물과 죽엽 추출물의 1:1 혼합물.....	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 conditions for supercritical extraction group·····	8
Table 2. Extracted yield in the water, ethanolic, methanolic, ethanol-sonication, methanol-sonication, and super critical extracts from <i>Saururus chinensis</i> and <i>Phyllostachys Folium</i> ·····	16
Table 3. Total polyphenols content of <i>Saururus chinensis</i> extracts ·····	17
Table 4. Total polyphenols content of <i>Phyllostachys Folium</i> extracts·····	18
Table 5. Total flavonoids content of <i>Saururus chinensis</i> extracts·····	19
Table 6. Total flavonoids content of <i>Phyllostachys Folium</i> extracts·····	20

그림 목차

- Figure 1. Schematics of hair morphogenesis and molecules secreted in each of cells during hair morphogenesis. The dotted circle indicate hair bulb region which made hair morphogenesis.....1
- Figure 2. Photograph of *Saururus chinensis*.....7
- Figure 3. Supercritical Extraction Process9
- Figure 4. DPPH radical scavenging activity of *Saururus chinensis* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; SCWE, *Saururus chinensis* water extracts; SCEE, *Saururus chinensis* ethanolic extracts; SCME, *Saururus chinensis* methanolic extracts; SCESE, *Saururus chinensis* ethanolic sonication extracts; SCMSE, *Saururus chinensis* methanolic sonication extracts; SCSE, *Saururus chinensis* super critical extracts..21
- Figure 5. DPPH radical scavenging activity of *Phyllostachys Folium* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; PFWE, *Phyllostachys Folium* water extracts; PFEE, *Phyllostachys Folium* ethanolic extracts; PFME, *Phyllostachys Folium* methanolic extracts; PFESE, *Phyllostachys Folium* ethanolic sonication extracts; PFMSE, *Phyllostachys Folium* methanolic sonication extracts; PFSE, *Phyllostachys Folium* super critical extracts.22
- Figure 6. The nitrite-scavenging activity of *Saururus chinensis* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; SCWE, *Saururus chinensis* water extracts; SCEE, *Saururus chinensis* ethanolic extracts; SCME, *Saururus chinensis* methanolic extracts; SCESE, *Saururus chinensis*

ethanolic sonication extracts; SCMSE, *Saururus chinensis* methanolic sonication extracts; SCSE, *Saururus chinensis* super critical extracts.
.....23

Figure 7. The nitrite-scavenging activity of *Phyllostachys Folium* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; PFWE, *Phyllostachys Folium* water extracts; PFEE, *Phyllostachys Folium* ethanolic extracts; PFME, *Phyllostachys Folium* methanolic extracts; PFESE, *Phyllostachys Folium* ethanolic sonication extracts; PFMSE, *Phyllostachys Folium* methanolic sonication extracts; PFSE, *Phyllostachys Folium* super critical extracts.
.....24

Figure 8. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Saururus chinensis* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.25

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

Figure 10. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Saururus chinensis* from Methanol-Sonication extracts *Phyllostachys Folium* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.27

Figure 11. Effect of promote revelation from PDGF-B from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*.28

Figure 12. Effect of promote revelation from IGF from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*.29

Figure 13. Effect of promote revelation from VEGF from *Saururus chinensis*

and <i>Phyllostachys Folium</i>	30
Figure 14. Effect of promote revelation from KGF from <i>Saururus chinensis</i> and <i>Phyllostachys Folium</i>	31
Figure 15. Effect of promote revelation from hGH from <i>Saururus chinensis</i> and <i>Phyllostachys Folium</i>	32
Figure 16. Effect of promote revelation from EGF from <i>Saururus chinensis</i> and <i>Phyllostachys Folium</i>	33

ABSTRACT

Antioxidative and Proliferative Effects of Follicle Dermal Papilla Cell of Extracts from *Saururus Chinensis* and *Phyllostachys Folium*

Park gum-dan

Advisor : Prof. So keum-young

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

With different methods to extract active ingredients from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium* in order to measure antioxidative effect, this study confirms cellulotoxic property and cell proliferation of human hair papilla with MIT assay by selecting extracts with the best method of top DPPH elimination effect, while aiming to provide practical materials for development of functional cosmetics as well as identifying potential of hair growth and prevention of hair loss with natural substances that replace current pharmacotherapy through the study on protein manifestation facilitation effect with western blotting.

Total polyphenol content of *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium* turned out to be the highest at 76.588 mg/g from methanol-ultrasonic wave extracts of *Saururus chinensis* and 70.616 mg/g from methanol extracts of *Phyllostachys Folium*. Total flavonoid content turned out to be the highest at 19.321 mg/g from methanol-ultrasonic wave extracts of *Saururus chinensis* while methanol-ultrasonic wave extracts of *Phyllostachys Folium* had 9.153 mg/g.

The highest DPPH elimination effect turned out to be 92.81% (methanol-ultrasonic wave extracts of *Saururus chinensis*) and 49.90%

(methanol-ultrasonic wave extracts of *Phyllostachys Folium*), with *Saururus chinensis* having stronger effect than *Phyllostachys Folium*. Also highest nitrite elimination effects were 36.90% from methanol-ultrasonic wave extracts of *Saururus chinensis* and 31.55% from methanol-ultrasonic wave extracts of *Phyllostachys Folium*, which were lower than 90 ~ 93% of ascorbic acid (1 mg/ml) used as positive control group.

Upon checking cellotoxic property on human hair papilla with MTT assay by applying methanol-ultrasonic wave extracts of each substance with content of 10 µg/ml, 100 µg/ml, and 500 µg/ml, both turned out not to have meaningful cellotoxic property within treatment concentration. Regarding hair papilla growth, treatment with *Saururus chinensis* extracts of 10 µg/ml showed 93.9%, while 96.2% at 100 µg/ml and 121.6% at 500 µg/ml were the results. Treatment with *Phyllostachys Folium* extracts of 10 µg/ml showed 93.6%, while 99.1% at 100 µg/ml and 90.8% at 500 µg/ml were the results, which represented higher degree of growth along with stronger concentration.

Measurement of PDGF-B growth factor manifestation facilitation effect through western blotting resulted in 98% for *Saururus chinensis* extracts against the control group with PBS treatment and 96% for *Phyllostachys Folium* extracts, while IGF growth factor manifestation effects were 106% for *Saururus chinensis* extracts and 98% for *Phyllostachys Folium* extracts, meaning higher effects for *Saururus chinensis* extracts. VEGF manifestation facilitation effects were 97% for *Saururus chinensis* extracts and 95% for *Phyllostachys Folium* extracts, with no difference than the control group. In case of KGF, *Saururus chinensis* extracts showed 97% and *Phyllostachys Folium* extracts showed 102% with no difference than the control group. Also, in case of hGH, *Saururus chinensis* extracts indicated 96% and *Phyllostachys Folium* extracts showed 103%, in EGF, *Saururus chinensis* extracts indicated 96% and *Phyllostachys Folium* extracts indicated 103%. So, there is no difference from the control group,

This study has found that *Saururus chinensis* extracts have values as the

ingredient for treatment to facilitate hair growth and development of a hair growth promoter as it had better performance of DPPH elimination effect.

Keyword: Hair loss, *Saururus Chinensis*, Bamboo leaf, Antioxidative property, Western blott, Growth factor

I. 서론

1. 연구배경 및 필요성

모발은 자외선차단, 완충작용등과 같이 두피를 보호하는 본래의 기능 이외에 최근 미적 측면의 기능이 중시됨에 따라 외모의 한 부분으로서 외향적 이미지를 결정하는 데 중요한 역할을 한다[1]. 또한 모발의 변화에 따라 자신감, 대인관계 등에 큰 영향을 미친다.

모발은 피부와 함께 발생하며 모낭(hair follicle)은 표피에 있는 종자층의 증식으로 시작되어 아래에 있는 진피로 확대된다. 모낭이나 모아(hair bub)의 심층은 클립 모양의 모구(hair blub)를 형성하며 모구상피세포가 종자기질을 이룬 후 털로 자라게 된다[2,3](Figure 1).

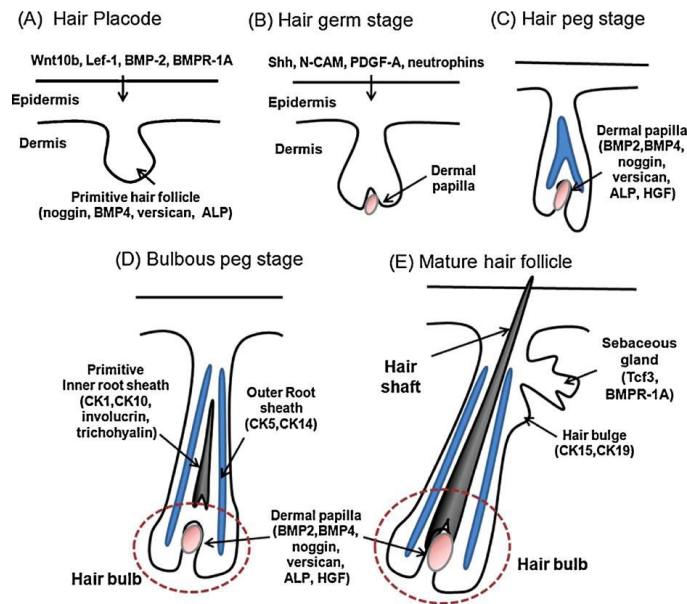


Figure 1. Schematics of hair morphogenesis and molecules secreted in each of cells during hair morphogenesis. The dotted circle indicate hair bulb region which made hair morphogenesis[3]

모발을 잘 자라게 하기 위해서는 모유두(papilla)의 역할이 중요하다. 그러나 모유두는 일생 동안 활동하고 모발을 계속 만들지는 않는다. 어느 정도 활동을 계속하면 일시 활동을 멈춘다. 모발은 성장기(anagen), 퇴행기(catagen) 및 휴지기(telogen)의 성장주기를 반복하는데, 정상적인 두피에서 90 ~ 95%는 성장기에 있고 1% 미만은 퇴화기에 있으며 5 ~ 10%는 휴지기에 있으며, 매일 60 ~ 80개 이상의 모발이 휴지기에 접어들고 같은 수의 모낭은 다시 성장기로 들어간다. 따라서 매일 60 ~ 80개 이상의 모발이 탈락되고 새로 생성되는데, 모발이 비정상적으로 이보다 많이 탈락되거나 재생되지 않는 증상을 탈모증(alopecia)이라 한다 [4].

탈모의 치료방법으로는 경피 도포제로서 미녹시딜(Minoxidil)과 경구 복용제로서 프로페시아(Propecia)가 FDA의 승인을 받은 유일한 의약품으로 많이 사용되고 있다[6]. Minoxidil의 경우 모발의 성장기(anagen phase)를 지연시킴으로서 모발성장을 촉진시키며[6], 혈관확장으로 인한 영양공급 증가 및 potassium channel opening 효과 등에 의해 모발성장을 유도하는 것으로 보고되었으나[7], 아직까지도 그 기전은 정확하게 규명되어져 있지 않다. Minoxidil은 효과 유지를 위하여 지속적인 사용이 요구되어지며[8], 임상사례로부터 미녹시딜에서 체중 증가, 부종, 협심증, 피부염 및 소양증 등이 보고[9]되어져 있으며, 홍반, 가려움증, 표피박리, 건성화를 동반한 피부염 및 과잉 도포 시 급격한 혈압강하를 초래하는 등 여러 가지 부작용을 초래하기도 한다[10].

경구복용제인 프로페시아의 경우 5 α -reductase의 활성을 억제시킴으로써 탈모의 진행지연 및 발모효과를 지니지만, 효과유지를 위한 장기복용은 남성 성기능장애, 여성 기형아 출산과 같은 심각한 부작용을 초래하기도 한다[11].

이러한 부작용은 탈모에 대한 적극적 치료에 상당한 제한성을 가지고 있다고 볼 수 있다. 따라서 최근에는 이러한 단점을 보완하고 지속적 사용에도 안전한 다양한 천연추출물 및 한약소재를 사용하는 대체의학이 주목을 받고 있다[12]. 특히 천연재료인 식물에는 다양한 생리활성 성분들이 포함되어 있으며 대부분은 페놀성 화합물이고 flavonoid류로, 이들은 alkylradical이나 alkylperoxy radical에 수소를 공여하여 radical을 제거함으로써 산화를 억제하는 활성을 가진 항산화제

로 알려져 이들 식물추출물은 한방생약·제약·건강식품 분야 등에서 응용되고 있다[13].

천연물로부터 유효성분을 좀 더 효율적이고 간편한 방법으로 추출하기 위한 다양한 방법에 대한 연구가 수행되고 있다. 열수추출법, soxhlet법, 고온 용매 추출법 및 기계적 압착법 등의 방법은 수율이 낮고, 열에 의해 변성될 수 있으며, 추출용매의 소모량이 많아 비용이 높아진다는 단점이 있다[14,15].

이러한 단점을 극복하기 위하여 초음파추출의 사용이 증가되고 있다. 초음파를 이용하였을 때 적은 용매를 사용하여 단시간에 원하는 물질을 추출할 수 있고, 추출효율이 높은 장점을 가지고 있다[16]. 특히, iridoid계 화합물이 환류냉각 추출법보다는 초음파 추출에서 추출 시간을 단축하면서 수득량을 증가시킨다는 연구가 있다[17].

모발의 성장은 어떤 요소가 모발성장의 핵심부인 모낭의 진피유두(dermal papilla, DP)에 영향을 주고, 영향을 받은 모낭의 진피유두세포들은 다시 그것을 둘러싸고 있는 모낭의 상피세포에게 성장인자 혹은 저해인자를 방출하여 성장 혹은 퇴화상태로 순환한다. 알려진 성장인자로는 basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) fibroblast growth factor (FGF)-1,2 & 5, keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), stem cell factor (SCF), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- α 와 β 1 등이 있고[18,19], 저해인자로는 epidermal growth factor (EGF)와 transforming growth factor- β (TGF- β)등이 있다[20]. 피부에 존재하는 cytokine 중 EGF, TGF- β 는 모발의 anagen기를 짧게 하고 catagen기를 빨리 접어들게 하여 상피세포의 증식을 억제하고 세포사를 유도하여 일반적으로 모발 성장 억제 효과를 나타낸다. VEGF는 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자로 작동하여 새로운 모발의 성장기로 유도하는 인자이며, KGF는 섬유아세포 성장인자 군으로써 모발 성장을 자극하는 인자로 보고되고 있다[21,22].

모유두 세포로부터 분비되는 IGF-1은 배양 중인 상피계 세포의 증식을 촉진할 뿐만 아니라, 모낭조직의 길이를 현저히 증가시킴으로써 모발성장을 조절하는 중요한 성장인자 중 하나로[23], 분자생물학과 유전학의 발달로 모발 사이클을 조절하는 메커니즘이 많이 밝혀졌지만[24,25], 최근에는 IGF-1이 세포들의 신호전

달과정을 통해 세포 표면의 수용체와 결합하게 되고, 모낭의 발달 단계에서 세포들의 성장과 이동에 상당한 역할을 한다고 보고되었다[26,27].

이러한 성장인자 단백질의 작용에 관한 메카니즘은 어떤 요소들이 어떻게 특이한 역할을 하는지에 대해선 밝혀지지 않고 있어 이에 대한 많은 연구가 필요하다.

2. 연구의 목적

화장품소재의 개발을 위해 약용식물로 대변되는 다양한 천연물을 그 대상으로 삼는 이유는 기존의 기능성 소재들이 세포 독성이나 낮은 활성 등으로 시장에서 사라지거나 기능성에 의심을 받고 있기 때문이다. 특히 한방, 민간요법, 식품에서 사용되고 있는 여러 가지 천연 물질들의 항균, 항산화, 미백, 보습 및 피부노화 억제 효과 등이 과학적으로 입증되면서 천연물의 생리활성 성분에 대한 연구가 확대되고 있다[28,29].

탈모치료에서 약물요법의 여러 가지 부작용은 탈모에 대한 적극적 치료에 상당한 제한성이 있다. 이러한 단점을 보완하고 지속적 사용에도 안전한 모발성장과 관련한 치료제 및 치료법에 대하여 많은 요구가 있어, 한방에서는 많은 식물 추출물들을 탈모예방 및 발모에 사용되어 왔으며, 안정성에 있어서 우수한 것으로 알려졌다[30,31].

본 연구에서는 실험적 방법을 통하여 부작용 없는 안전한 천연물질로 알려진 삼백초와 죽엽에서 열수추출법, 에탄올 추출법, 메탄올 추출법, 에탄올 초음파 추출법, 메탄올 초음파 추출법, 초임계 추출법 등 다양한 방법으로 유효물질을 추출하여 항산화능과 세포 독성실험을 통한 기능성 화장품의 원료로의 사용 가능성을 알아보고자 하였다. 또한 모유두세포의 증식효과와 western blotting을 통한 성장인자 발현 촉진효과를 알아보고자 하였다.

II. 연구방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 삼백초와 죽엽은 국내산을 구입하여 사용하였고, 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 reagent는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다.

Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics-antimycotic, trypsin-EDTA는 Gibco BRL Co. (Grand Island, 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.

2. 추출물의 제조

1) 유기용매 추출

천연물을 잘게 분쇄한 후 시료 10-20g을 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 등의 방법[32]을 수정하여, 위와 같은 조건의 ethanol과 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) 증류수 추출

분쇄한 시료에 대하여 각각 100g을 반응조 하부에 넣고 10배(w/v)의 증류수를 부어서 Impellar, 반응조 하부, 반응조 상부, 냉각관(직류, 환류)및 분액여두를 설치하고 약 60분 동안 약재를 불린 후 105℃로 120분간 전탕하여 찌꺼기를 따로 분리하였다. 전탕액을 무균실에 있는 증류추출기에 넣고 107℃로 추출 후 약침액은 무기염류를 침강시키기 위해서 하루 동안 냉장 보관 하였다. 무기염류를 침강시킨 약침액은 무기염류를 제외한 상층액을 분리하였다. 상층액을 20 μ m filter로 3차 여과 후 원심분리한 상등액을 -80℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조된 각 분말 시료는 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.[33](Figure 2).

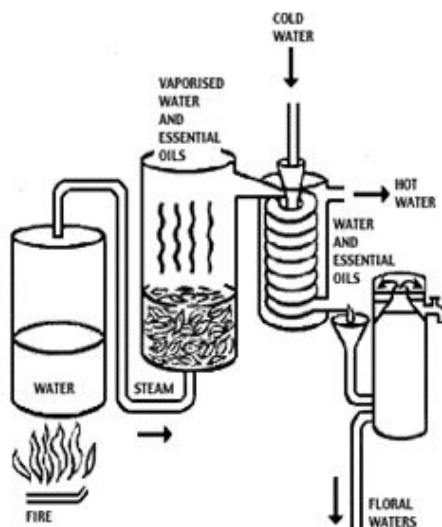


Figure 2. Diagram of steam distillation process [32]

3) 초임계 추출

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

건조한 시료를 추출조에서 압력 350bar, 온도 50℃, 보조용매주입 유량은 6ml/min으로 70분 주입 추출하였다(Tabel 1).

Table 1. Extraction conditions for supercritical 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	6ml/min 70min 주입	40	40	60	-2	120

추출공정은 등압, 펌핑, 가압 후 압력 150bar에서 20분 동안 CO₂유체를 이용하여 추출하여 추출하였다(A), 압력을 350bar까지 올리면서 보조용매로 에탄올을 주입하고 10분 동안 추출 한 추출물(B), 이후 60분 동안 추출한 추출물(C), 10분 간 추출한 추출물(D)을 구분하여 추출하였다(Figure 3).

추출한 추출물 A, B, C, D를 합한 후 감압 증류하여 용매를 완전하게 휘발시킨 후 -80℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조된 각 분말 시료는 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

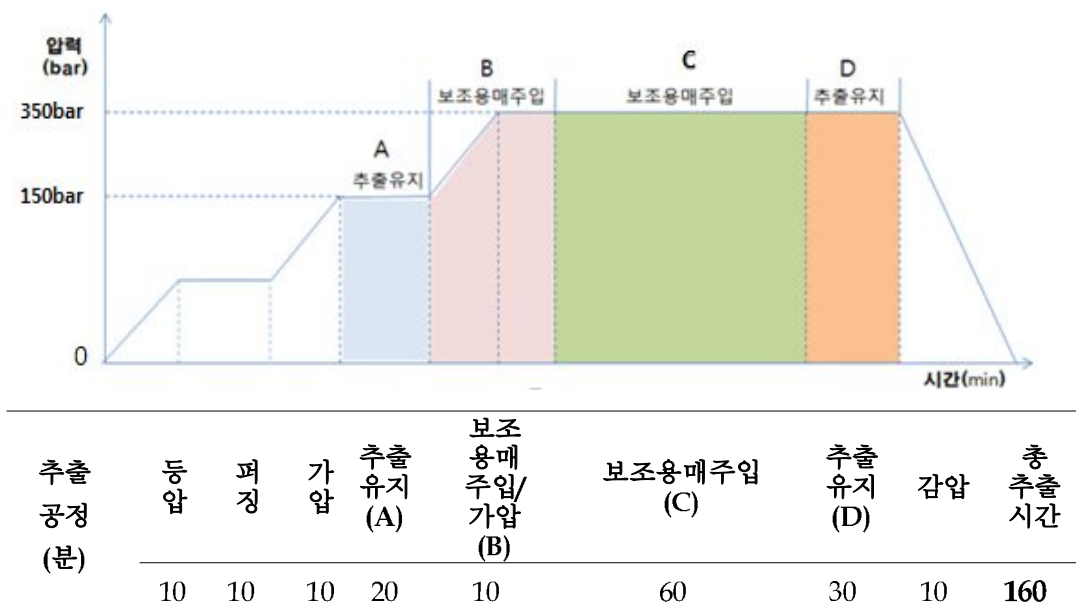


Figure 3. Supercritical extraction process

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 L를 가하여 혼합한 후 3분간 실온에 반응시켰다. 3분 후 10% sodium carbonate solution 100 μ L를 가하여 혼합하고 1시간 반응시킨 후 상층 액을 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/mL의 gallic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 김 등의 방법[34]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[34]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.

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

4) 아질산염 소거능 측정

각 시료의 아질산염 소거능(nitrite-scavenging ability, NSA)은 Gray & Dugan의 방법[35]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 최종 부피를 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.

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

4. 인간 모유두세포에 대한 in vitro 세포 독성 평가

1) 천연추출물 처리

삼백초와 죽엽의 추출방법을 달리한 추출물에 대한 DPPH 실험 결과에서 가장 우수한 추출방법을 선택하였는데, 삼백초와 죽엽 모두에서 메탄올 초음파 추출물이 가장 우수하였다.

본 실험은 삼백초와 죽엽의 메탄올 초음파 추출물을 PBS (Phosphate buffered saline)에 10 mg/ml 농도로 용해하였다. 추출물의 용해를 돕기 위해 30분간 강하게 vortexing 한 후 30 분간 sonication 하였으며, 8,000 rpm으로 10분 간 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, 37℃에서 배양 하였다. 배양용기에 시험에 사용할 HFDPC 세포를 세포배양정도(confluency)가 80 ~ 85% confluent할 때까지 전 배양을 하였다.

3) MTT assay

각 시료의 모유두세포에 미치는 생존율 측정은 Mosmann의 방법[36]을 응용 실시하였다.

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 37℃로 warming 된 Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium 1.0 mL 씩으

로 배지를 교환하였다.

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

배양 완료 후 100 μ L의 MTT 용액을 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 μ L로 녹여서 잘 섞어준 다음 100 μ L 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 모유두세포(HFDPC)주를 계대 배양한 후, 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물을 100 µg/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 blot 방법을 이용하여 측정하였다.

추출물을 2일 동안 처리한 인간 모유두세포를 배양한 후 (175T 플라스크) PBS (phosphate Buffered Saline)로 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.

세포추출물의 단백질 정량은 BSA (Bovine Serum Albumin)을 표준물질로 Bradford법으로 수행하였다. 간략하게 Quick Start Bradford Protein Assay Kit (500-0201, Bio-Rad Co.)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 정량한 시료는 well 당 20 µg의 단백질량을 로딩하여 10% SDS PAGE에서 150 V로 1시간 동안 전기영동하고 electro-blotter를 사용하여 70 V 30분간 Nylon membrane filter에 옮기고 밀크 용액(5% skim milk solution)에 filter를 담그고 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 TBST 완충액(20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 10분간 3회 세척하고 2,500배 희석된 1차 항체를 이용하여 1시간 30분 동안 반응시켰으며 세척액으로 3회 세척한 후 2,500배 희석된 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, EGF로 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. 생약제제 추출물의 수율

생약 제제는 용매와 추출방법에 따라 성분들이 달라지기 때문에 추출수율에 있어서도 차이를 보인다. 본 실험에서 추출된 삼백초와 죽엽을 각 용매 및 추출법에 따른 수율을 (Table 2)에 제시하였다.

삼백초는 에탄올-초음파 추출에서 죽엽은 메탄올-초음파 추출에서 가장 높았다.

Table 2. Extracted yield in the water, ethanolic, methanolic, ethanol-sonication, methanol-sonication, and super critical extracts from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*

Extracts	Extracted yield (%)	
	SC	PF
Water Distillation	2.9524	14.9271
Ethanol	4.1262	16.1323
Methanol	3.8113	15.0532
Ethanol-Sonication	4.3791	17.0721
Methanol-Sonication	4.2381	17.2143

SC: *Saururus chinensis*

PF: *Phyllostachys Folium*

2. 항산화 효과

1) 총 폴리페놀 함량

(1) 삼백초 추출물

삼백초 추출물 6종의 총 폴리페놀 함량(mg/g)을 분석한 결과, 메탄올 추출물에서 76.588 ± 6.893 (mg/g)로 가장 높았으며, 메탄올-초음파 추출물에서 54.215 ± 1.626 (mg/g), 증류수 추출물에서 36.310 ± 1.452 (mg/g), 에탄올-초음파 추출물에서 32.416 ± 3.274 (mg/g), 에탄올 추출물에서 22.540 ± 1.352 (mg/g), 초임계 추출물에서 10.147 ± 0.913 (mg/g) 순서로 총 폴리페놀 함량이 나타났다 (Table 3).

Table 3. Total polyphenols content of *Saururus chinensis* extracts

<i>Saururus chinensis</i> extracts	Water Distillation	Ethanol	Methanol	Ethanol- Sonication	Methanol- Sonication	Super critical
Polyphenol contents (mg/g)	36.310 $\pm 1.452^*$	22.540 ± 1.352	76.588 ± 6.893	32.416 ± 3.274	54.215 ± 1.626	10.147 ± 0.913

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

(2) 죽엽 추출물

죽엽 추출물 6종의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 메탄올 추출물에서 70.616 ± 2.824 (mg/g)로 가장 높았으며, 메탄올-초음파 추출물에서 23.824 ± 2.144 (mg/g), 증류수 추출물에서 15.983 ± 1.119 (mg/g), 에탄올-초음파 추출물에서 14.929 ± 0.448 (mg/g), 에탄올 추출물에서 10.314 ± 0.825 (mg/g), 초임계 추출물에서 10.053 ± 0.503 (mg/g) 순서로 총 폴리페놀 함량이 나타났다(Table 4).

Table 4. Total polyphenols content of *Phyllostachys Folium* extracts

<i>Phyllostachys Folium</i> extracts	Water Distillation	Ethanol	Methanol	Ethanol- Sonication	Methanol- Sonication	Super critical
Polyphenol contents (mg/g)	$15.983 \pm 1.119^*$	10.314 ± 0.825	70.616 ± 2.824	14.929 ± 0.448	23.824 ± 2.144	10.053 ± 0.503

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

2) 총 플라보노이드 함량

(1) 삼백초

삼백초 추출물 6종의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 19.321 ± 1.063 (mg/g)로 가장 높았으며, 에탄올-초음파 추출물에서 14.800 ± 1.643 (mg/g), 에탄올 추출물에서 5.593 ± 0.196 (mg/g), 증류수 추출물에서 2.769 ± 0.338 (mg/g), 메탄올 추출물에서 1.252 ± 0.106 (mg/g), 초임계 추출물에서 0.742 ± 0.056 (mg/g) 순서로 총 플라보노이드 함량이 나타났다(Table 5).

Table 5. Total flavonoids content of *Saururus chinensis* extracts

<i>Saururus chinensis</i> extracts	Water Distillation	Ethanol	Methanol	Ethanol- Sonication	Methanol- Sonication	Super critical
Flavonoid contents (mg/g)	$2.769 \pm 0.338^*$	5.593 ± 0.196	1.252 ± 0.106	14.800 ± 1.643	19.321 ± 1.063	0.742 ± 0.056

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

(2) 죽엽

죽엽 추출물 6종의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 9.153 ± 0.686 (mg/g)로 가장 높았으며, 에탄올-초음파 추출물에서 5.894 ± 0.884 (mg/g), 증류수 추출물에서 0.081 ± 0.008 (mg/g), 메탄올 추출물에서 0.051 ± 0.043 (mg/g) 순서로 총 플라보노이드 함량이 나타났으며, 에탄올 추출물과 초임계 추출물에서는 총 플라보노이드가 검출되지 않은 것으로 분석되었다 (Table 6).

Table 6. Total flavonoids content of *Phyllostachys Folium* extracts

<i>Phyllostachys Folium</i> extracts	Water Distillation	Ethanol	Methanol	Ethanol- Sonication	Methanol- Sonication	Super critical
Flavonoid contents (mg/g)	$0.081 \pm 0.008^*$	0 ± 0	0.051 ± 0.043	5.894 ± 0.884	9.153 ± 0.686	0 ± 0

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

3) DPPH 라디칼 소거능

(1) 삼백초

삼백초 추출물 6종의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 92.81%의 DPPH 소거능을 보였다. 그 다음으로 에탄올-초음파 추출물(78.50%), 에탄올 추출물(63.18%), 증류수 추출물(60.15%), 메탄올 추출물(40.29%), 초임계 추출물(27.25%) 순서로 DPPH 소거능이 나타났다(Figure 4).

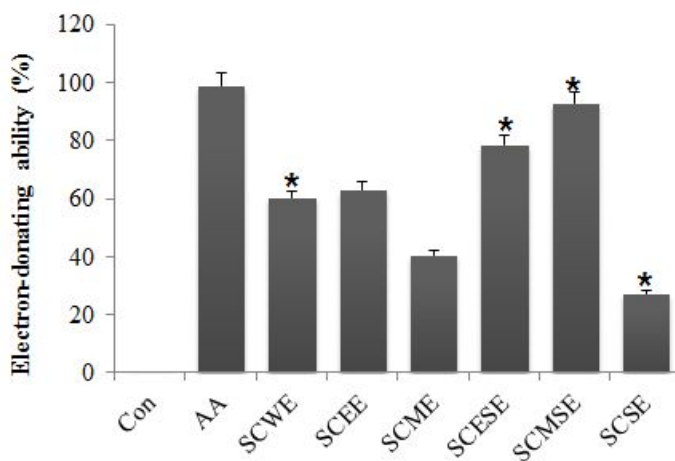


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of *Saururus chinensis* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; SCWE, *Saururus chinensis* water extracts; SCEE, *Saururus chinensis* ethanolic extracts; SCME, *Saururus chinensis* methanolic extracts; SCESE, *Saururus chinensis* ethanolic sonication extracts; SCMSE, *Saururus chinensis* methanolic sonication extracts; SCSE, *Saururus chinensis* supercritical extracts. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

(2) 죽엽

죽엽 추출물 6종의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 49.90%의 DPPH 소거능을 보였다. 그 다음으로 에탄올-초음파 추출물(39.50%), 증류수 추출물(34.57%), 에탄올 추출물(23.32%), 초임계 추출물(18.44%), 메탄올 추출물(17.57%) 순서로 DPPH 소거능이 나타났다(Figure 5).

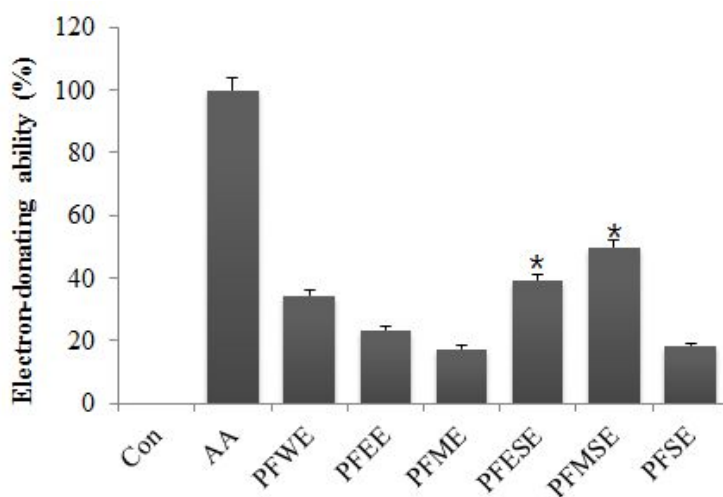


Figure 5. DPPH radical scavenging activity of *Phyllostachys Folium* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; PFWE, *Phyllostachys Folium* water extracts; PFEE, *Phyllostachys Folium* ethanolic extracts; PFME, *Phyllostachys Folium* methanolic extracts; PFESE, *Phyllostachys Folium* ethanolic sonication extracts; PFMSE, *Phyllostachys Folium* methanolic sonication extracts; PFSE, *Phyllostachys Folium* super critical extracts. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. *p < 0.05 vs control group

4) 아질산염 소거능

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

(1) 삼백초

삼백초 추출물 6종의 아질산염 소거능을 분석한 결과, 초임계 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 36.90%의 아질산염 소거능을 보였다. 그 다음으로 에탄올-초음파 추출물(35.17%), 메탄올-초음파 추출물(33.79%), 메탄올 추출물(27.76%), 에탄올 추출물(25.17%), 증류수 추출물(22.93%) 순서로 아질산염 소거능이 나타났다 (Figure 6).

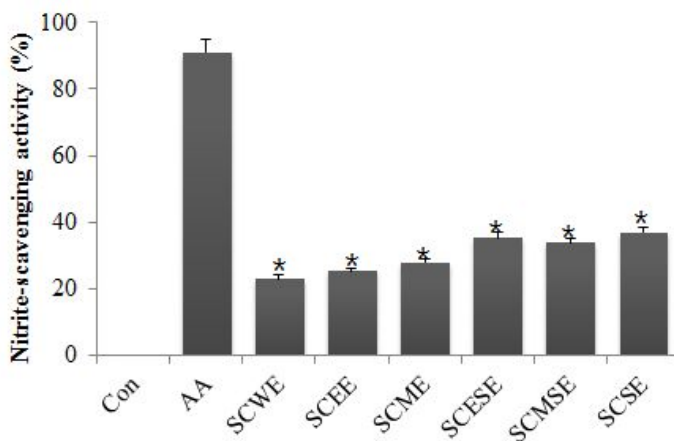


Figure 6. The nitrite-scavenging activity of *Saururus chinensis* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; SCWE, *Saururus chinensis* water extracts; SCEE, *Saururus chinensis* ethanolic extracts; SCME, *Saururus chinensis* methanolic extracts; SCESE, *Saururus chinensis* ethanolic sonication extracts; SCMSE, *Saururus chinensis* methanolic sonication extracts; SCSE, *Saururus chinensis* super critical extracts. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

(2) 죽엽

죽엽 추출물 6종의 아질산염 소거능을 분석한 결과, 에탄올-초음파 추출물 (31.55%)이 가장 높은 효과를 보였으며, 그 다음으로 초임계 추출물(31.03%), 메탄올-초음파 추출물(28.10%), 에탄올 추출물(26.21%), 메탄올 추출물(25.69%), 증류수 추출물(21.72%) 순서로 아질산염 소거능이 나타났다(Figure 7).

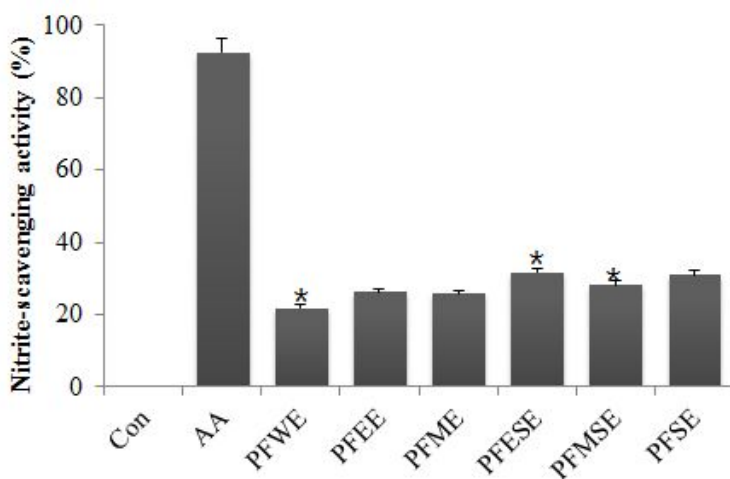


Figure 7. The nitrite-scavenging activity of *Phyllostachys Folium* extracts. Con, control (vehicle) as negative control group; AA, ascorbic acid (1 mg/ml) as positive control group; PFWE, *Phyllostachys Folium* water extracts; PFEE, *Phyllostachys Folium* ethanolic extracts; PFME, *Phyllostachys Folium* methanolic extracts; PFEESE, *Phyllostachys Folium* ethanolic sonication extracts; PFMSE, *Phyllostachys Folium* methanolic sonication extracts; PFSE, *Phyllostachys Folium* super critical extracts. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

3. 인간 모유두세포에 대한 in vitro 세포 독성 평가

1) 삼백초

삼백초 추출물(메탄올 초음파 추출)을 인간 모유두세포에 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. PBS를 처리한 대조군 대비 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $93.9 \pm 4\%$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $96.2 \pm 11\%$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $121.6 \pm 11\%$ 의 세포 생육도를 보였다(Figure 8).

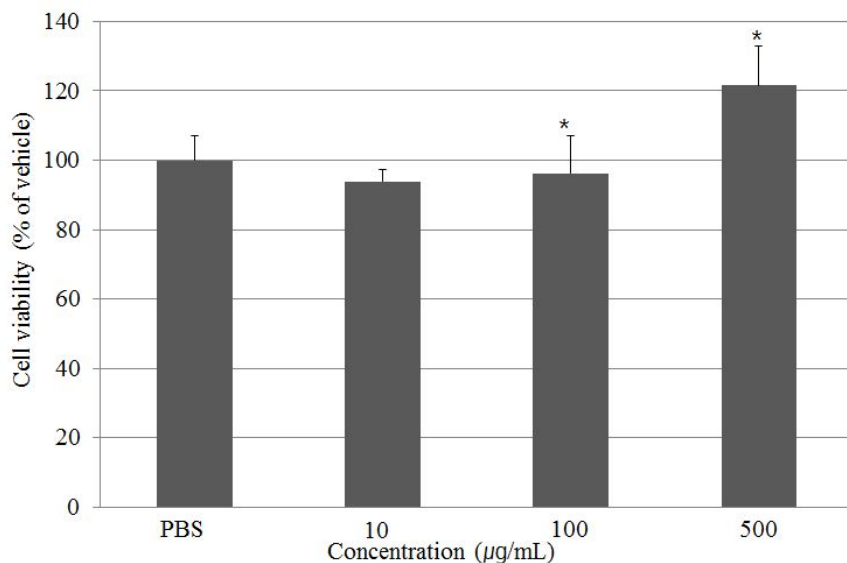


Figure 8. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Saururus chinensis* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

2) 죽엽

죽엽 추출물(메탄올 초음파 추출)을 인간 모유두세포에 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. PBS를 처리한 대조군 대비, 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $93.6 \pm 2\%$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $99.1 \pm 10\%$, 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $90.8 \pm 14\%$ 의 세포 생존도를 보였다(Figure 9).

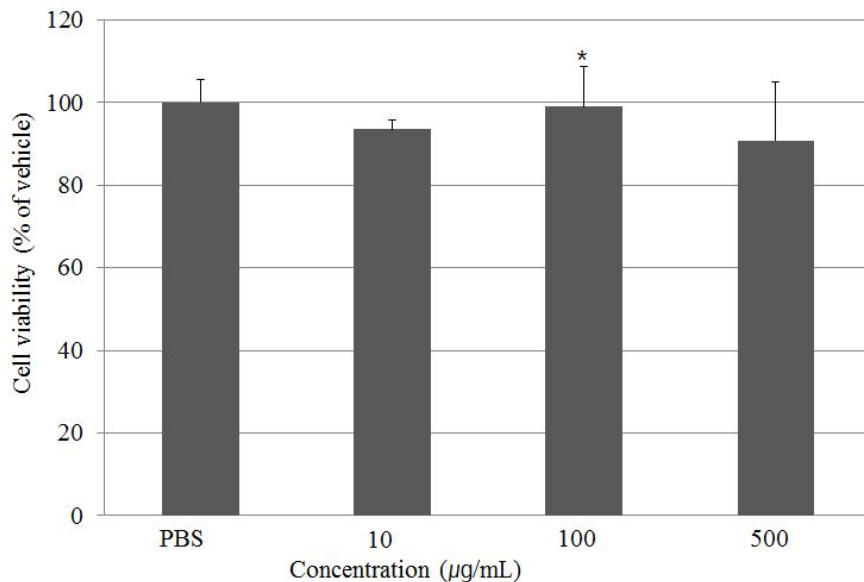


Figure 9. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Phyllostachys Folium* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

3) 삼백초 추출물과 죽엽 추출물의 1:1 혼합물

삼백초 추출물(메탄올 초음파 추출)과 죽엽 추출물(메탄올 초음파 추출)을 동일한 비율 (1:1)로 합하여 인간 모유두세포에 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. PBS를 처리한 대조군 대비, 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $99.2 \pm 4\%$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $94.5 \pm 5\%$, 그리고 500 $\mu\text{g/mL}$ 처리는 $95 \pm 5\%$ 의 세포 생존도를 보였다(Figure 10).

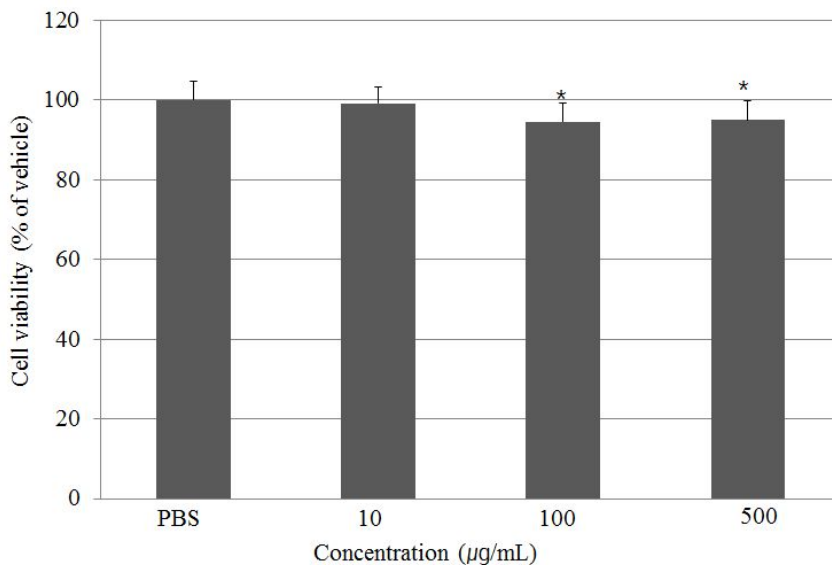


Figure 10. Effect of cytotoxicity from Methanol-Sonication extracts from *Saururus chinensis* from Methanol-Sonication extracts *Phyllostachys Folium* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Values represent the mean $\pm$ SD of triplicates determinations. * $p < 0.05$ vs control group

4. 성장인자 발현 촉진 효과

1) PDGF-B 발현 촉진 효과

인간 모유두세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로, 48시간 처리한 후 PDGF-B의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $98 \pm 5\%$ 로 PDGF-B 발현 나타났으며, 죽엽 추출물 처리 시 $96 \pm 8\%$ 로 나타나 PDGF-B 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $99 \pm 7\%$ 로 EGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 11).

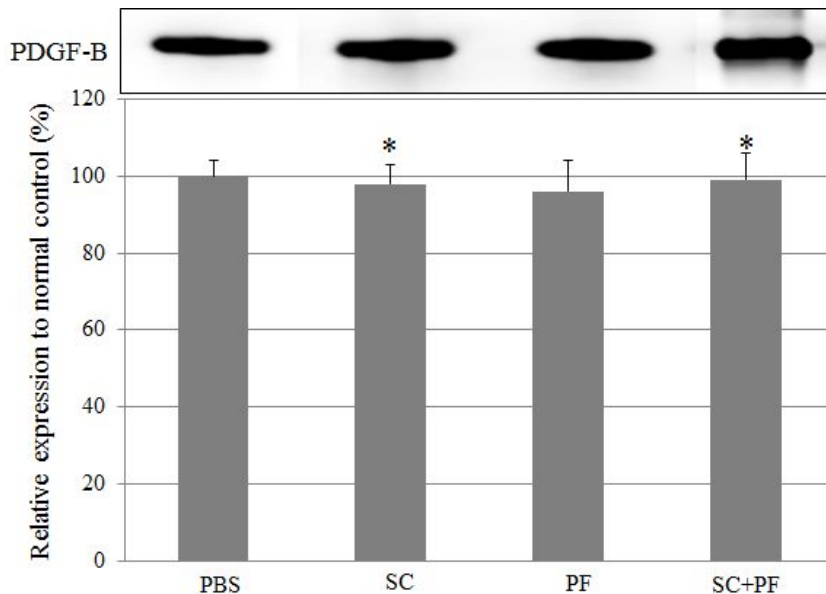


Figure 11. Effect of promote revelation from PDGF-B from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

2) IGF 발현 촉진 효과

인간 모유두세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 대하여 100 µg/mL의 농도로 48시간 처리한 후 IGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $106 \pm 11\%$, 죽엽 추출물 처리 시 $98 \pm 7\%$ 로 IGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $103 \pm 18\%$ 로 IGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 12).

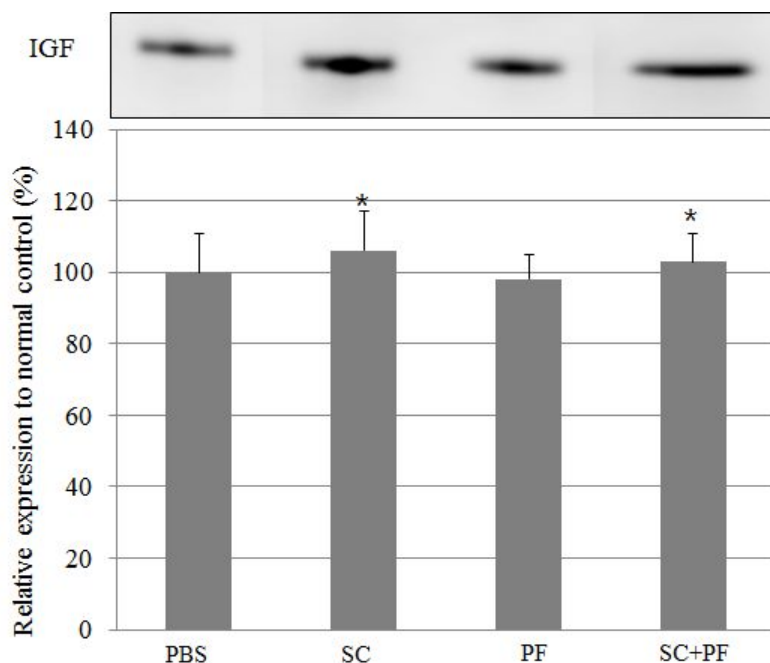


Figure 12 Effect of promote revelation from IGF from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

3) VEGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 대하여 100 µg/mL 의 농도로 48시간 처리한 후 VEGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $97 \pm 13\%$, 죽엽 추출물 처리 시 $95 \pm 7\%$ 로 VEGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $104 \pm 9\%$ 로 VEGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 13).

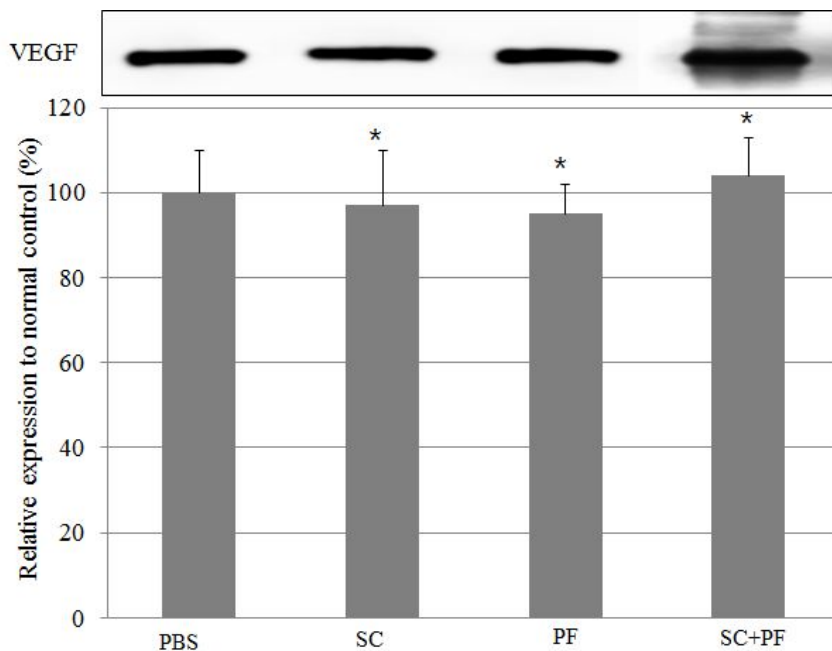


Figure 13. Effect of promote revelation from VEGF from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

4) KGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 대하여 100 µg/mL 의 농도로 48시간 처리한 후 KGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $97 \pm 10\%$, 죽엽 추출물 처리 시 $102 \pm 11\%$ 로 KGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $104 \pm 8\%$ 로 KGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 14).

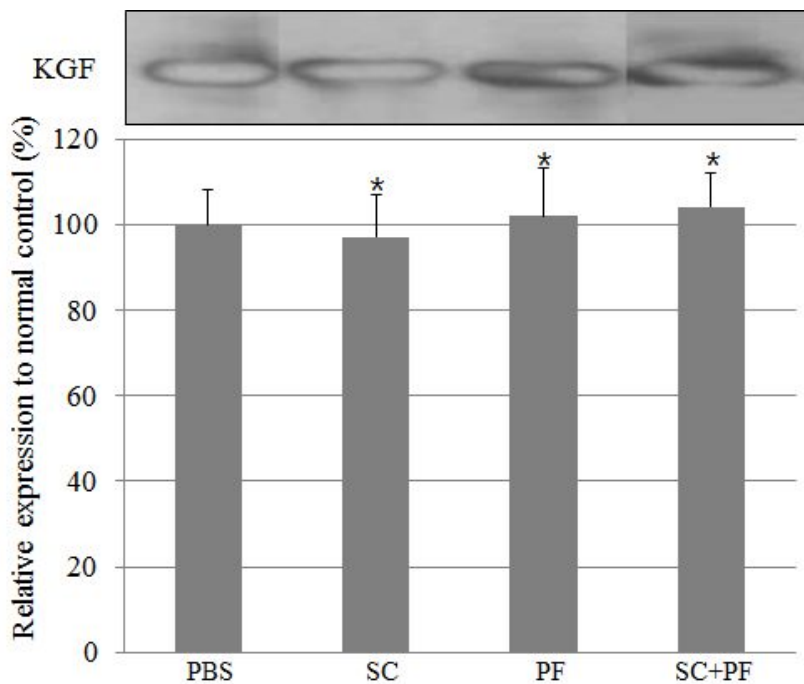


Figure 14. Effect of promote revelation from KGF from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

5) hGH 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 대하여 100 µg/mL 의 농도로 48시간 처리한 후 hGH의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $96 \pm 8\%$, 죽엽 추출물 처리 시 $103 \pm 8\%$ 로 hGH 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $102 \pm 10\%$ 로 hGH 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 15).

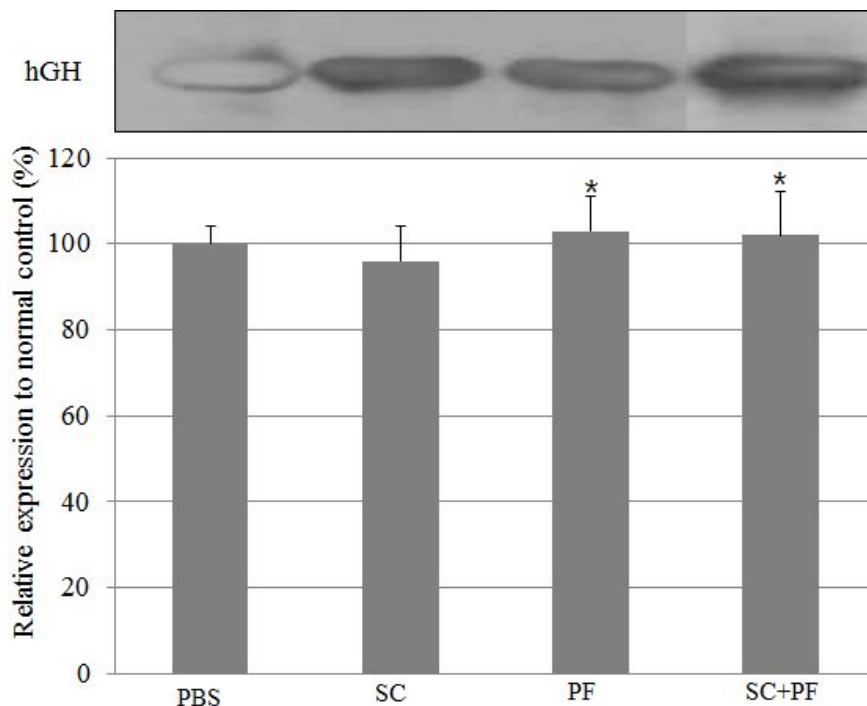


Figure 15. Effect of promote revelation from hGH from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

6) EGF 발현 촉진 효과

인간 모유두 세포에 삼백초 추출물과, 죽엽 추출물 2종에 대하여 100 µg/mL 의 농도로 48시간 처리한 후 EGF의 발현 정도에 미치는 영향을 Western blotting으로 시험하였다.

PBS를 처리한 대조군 대비, 삼백초 추출물 처리 시 $96 \pm 11\%$, 죽엽 추출물 처리 시 $103 \pm 6\%$ 로 EGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 1 : 1로 혼합하여 처리 시 $101 \pm 11\%$ 로 EGF 발현 촉진 효과의 차이가 나타나지 않았다(Figure 16).

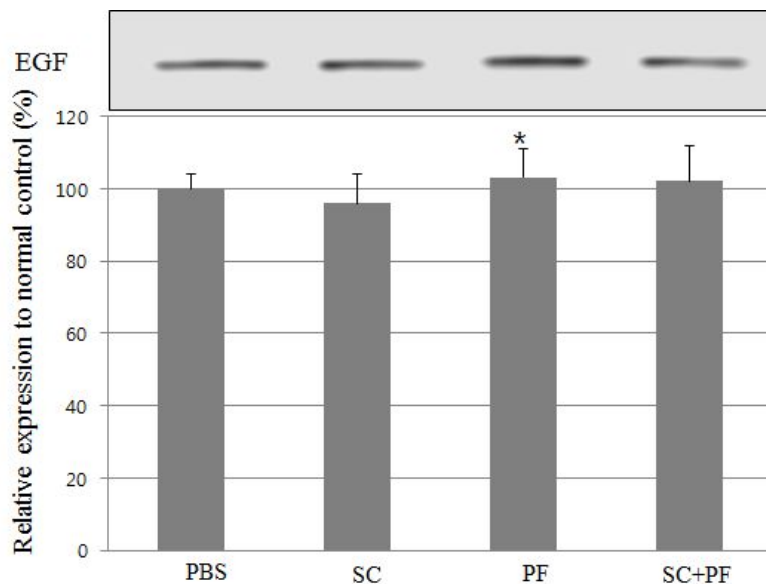


Figure 16. Effect of promote revelation from EGF from *Saururus chinensis* and *Phyllostachys Folium*. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs normal control group.

IV. 고찰

삼백초(*Saururus chinensis* Bail.)는 한의학을 비롯한 민간요법에서 전초는 습열, 정리, 소독, 해독의 효능이 있어 부종, 각기, 황달, 대하, 응중, 정독의 치료로 쓰이며, 뿌리는 이수, 제습, 청열, 해독의 효능이 있어 각기, 경중, 임탁, 대하, 응중 개선의 치료에 사용되고 있다. 삼백초는 삼백초과(*Saurceraceae*)에 속하는 여러해살이풀로 건조한 것이 약용으로 사용되며[37][38], flavonoid의 일종인 tannin 및 quercetin, quercetrin 등의 성분을 포함하고 있는데 부위별 유효 성분은 줄기나 뿌리보다 잎에서 tannin 및 quercetin, quercetrin의 함유량이 높다[36]. quercetin은 항균 및 항산화 효과를 나타내며, 혈압강하 및 모세혈관 강화작용 등의 효과들이 알려져 있으며[39], 항암 및 항산화 효과, 황색포도상구균 및 장티푸스균의 성장을 억제한다고 보고가 있다[41]. 삼백초의 효능에 관한 연구로 항산화 활성[41], 항균성[42] 및 진통성분[43] 등에 관한 연구가 보고되어 있다.

죽엽의 생약명은 *Folium Phyllostachydis*이며, 대과(*Bambusaceae*) 참대속, *Phyllostachys*에 속하는 왕대(*Phyllostachys bambusoides* S. st), 솜대(*Phyllostachys bambusoides nigra* var. *benonis* Stapf), 맹종죽(*Phyllostachys pubescence* Mael)이 우리나라에서 자생하고 특히 맹종죽은 죽재와 죽순을 모두 이용가능 하기 때문에 약용 및 식용에 이용가치가 높다[44].

대나무 잎은 죽엽이라 하여 열 내림, 지혈, 중풍, 고혈압 등 민간요법으로 사용되어 왔고 살균 및 항진균 작용과 항암 효과도 있는 것으로 알려져 있다[45].

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 물질로 항산화, 항암 및 항균 등의 생리기능을 가지며[46], Jang & Yoon[47]은 천연항산화제로의 작용이 우수하여 각종 질병의 치료 및 예방에 효과가 있다고 하였다.

Singleton 등[48]은 식물 폴리페놀이 만성질환에 강력하게 저항하는 기능성을 지닌 2차 대사산물이고, 식물유래 식품에서 활성산소를 수용하는 역할을 하여 항산화 효과를 나타낸다고 보고하고 있다.

Yu 등[49]의 연구에 의하면 오가피순 추출물의 총 페놀함량은 116.33 mg GAE/g으로 높게 나타났다고 하였으며, 김숙경 등[50]은 연구에서 삼백초의 40%

에탄올을 사용하여 추출할 때 총 페놀 함량은 2.83 mg/ml 으로 나타났다고 하였으며, Seo HS. 등[51]은 삼백초 뿌리와 잎의 물과 에탄올 추출물의 총 폴리페놀함량은 물 추출물은 뿌리와 잎에서 각각 21.0 mg/100mL, 56.3 mg/100mL로 나타났으며, 에탄올 추출물은 뿌리와 잎에서 각각 5.6 mg/100mL, 12.0 mg/100mL로 나타나 전체적으로 낮은 함량을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서 삼백초 추출물의 총 폴리페놀 함량은 메탄올 추출물에서 76.588 mg/g로 김숙경 등[50]과 Seo HS. 등[51]의 연구보다 높게 나타났다.

플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화 및 항균성 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다[52]. 천연물의 플라보노이드는 페놀성 물질의 함량에 비례하여 전자공여능 등의 항산화 활성이 증가한다는 많은 연구보고에 따르면 페놀성 물질은 천연물의 항산화작용 효과 검증의 지표라고 할 수 있다[53].

김숙경 등[50]은 연구에서 삼백초의 40% 에탄올을 사용하여 추출할 때, 총 플라보노이드 함량은 2.16 mg/m으로 나타났다고 하였다.

본 연구에서 삼백초 추출물의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 19.321 mg/g로 가장 높게 나타났다. 이는 김숙경 등[46]의 연구보다 높은 결과로 추출 용매의 차이로 사료된다.

DPPH assay는 수소 공여체를 측정할 수 있는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 방법으로 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되며 비교적 간단하고 짧은 시간 내에 항산화 활성을 측정할 수 있어 널리 사용되고 있다(Park HS, Shin HC, Kim BS, Lee KY, Choi WS, Shin JA, Nam YD, Bae SP, Que F, Mao L, Zhu C, Xie G(2006) Antioxidant properties of Chineses yellow wine, its concentrate, and volatiles. LWT-Food Sci Technol, 39, 111-117)

김숙경 등[50]은 연구에서 삼백초의 40% 에탄올을 사용하여 추출할 때 전자공여능은 71.13%로 나타났다고 하였으며, Seo HS. 등[51]은 삼백초 뿌리와 잎의 물과 에탄올 추출물의 전자공여능 효과는 물 추출물의 경우 뿌리와 잎에서 각각 5.7%, 24.3%, 에탄올 추출물은 뿌리와 잎에서 각각 24.0%, 56.1%로 나타났다고

보고하였고, 박대중 등[4]은 삼백초 에탄올 추출물의 항산화 활성 측정결과 에탄올 추출물에서 처리 농도에 따라 50 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 $59 \pm 1.0\%$ 와 $42 \pm 1.0\%$ 의 라디칼 소거활성을 나타내 농도 의존적으로 DPPH라디칼 소거능 활성이 증가함을 보였다고 하였다.

한상엽 등[55]은 연구에서 삼백초 메탄올 추출물은 농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하였고, 처리 농도가 고농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 28.48%와 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 22.78%로 가장 우수한 항산화 활성이 나타났다고 하였으며, 강성례[56]는 연구에서 삼백초 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 농도 의존성 반응을 보였으며 1000ppm에서 21.3%로 나타나 높은 항산화능을 나타냈다고 하였다.

본 연구에서 나타난 삼백초 에탄올-초음파 추출물의 DPPH 소거능은 양성대조군 ascorbic acid (AA) 대비 92.81%로 높은 항산화능을 나타내었다. 김숙경 등[50], Seo HS. 등[51], 박대중 등[54], 한상엽 등[55], 강성례[56]의 연구보다 높은 결과로 삼백초 에탄올-초음파 추출물은 항산화제로서 기능성 소재 개발에 의의를 가지고 있다고 할 수 있다고 사료된다.

아질산염 소거작용은 체내외에서 효소작용에 의해 환원된 nitrite가 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하여 각종 중독을 유발하는 것으로 알려진 nitrite를 제거하여 발암을 억제하는 작용이다[57].

본 연구에서는 삼백초 추출물의 아질산염 소거능을 분석한 결과, 초임계 추출물에서 가장 높은 효과를 보였으며 36.90%의 아질산염 소거능을 보였다.

강성례[56]는 삼백초 추출물에 대한 MTT assay In vitro에 대한 연구로 삼백초 열수추출물에 대한 인체 피부섬유 아세포의 성장률을 측정한 결과 측정 농도별 모두에서 세포 성장률이 100% 이상으로 나타나 삼백초 열수추출물의 인체피부 섬유아세포에 대한 최대허용 농도는 200ppm 이상인 것으로 확인되었다고 하였다.

Seo 등[51]은 삼백초의 ethanol 추출에 의한 용매별 분획물이 정상세포인 DC2.4 인간의 면역 세포의 생육에 영향을 미치지 않았다고 하였으며, Kang 등(2012)은 삼백초 추출 분획물을 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 HDP 세포(1×10^5 cell/mL)에 48시간 처리하여 배양한 결과, 농도가 증가하여도 독성은 나타나지 않았으며 세포의 성장에도 어떠한 영향을 미치지 않았다고 보

고하였다.

본 연구에서 삼백초 메탄올 초음파 추출을 인간 모유두세포에 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 500 μ g/mL의 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과 처리 농도 범위 내에서는 세포 독성은 관찰되지 않았으며, PBS를 처리한 대조군 대비 10 μ g/mL 처리는 93.9%, 100 μ g/mL 처리는 96.2 %, 500 μ g/mL 처리는 121.6%의 세포 생육도를 보였다. 이는 강성례[56], Seo 등[51]의 연구결과와 일치하는 결과이다.

이는 삼백초 메탄올 초음파 추출물의 육모제 소재로 개발 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

Yano 등[58]은 VEGF는 모낭의 성장과정에서 혈관생성에 관여하는 중요한 인자로 대두되었고, 여러 동물실험에서 VEGF가 모낭주위의 미세혈관을 생성시키는 것 뿐 만 아니라 탈모 후, 자라나는 모발의 크기를 증가시키고 성장속도를 촉진시킨다는 것을 알게 되었다고 하였다. 모낭 각질형성세포는 모유두세포와 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 연구결과도 있다.

Su 등[59]은 쥐를 이용한 여러 가지 실험을 통해 피부에 IGF-1을 과 발현시킨 실험군에서 모낭의 발달이 빨라졌고, IGF-1은 survival factor로써 세포사멸을 방지하는 anti-apoptotic 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이런 효과는 모낭세포가 성장주기(catagen phase)를 지남에 따라 퇴화되는 것을 방지시켜주는 역할을 하게 된다고 하였다.

본 연구에서 나타난 삼백초 메탄올 초음파 추출물의 인간 모유두세포에 대한 성장인자 발현 촉진 효과는 PDGF-B 98%, IGF 106%, VEGF 97%, KGF 97%, hGH 96 %, EGF 96%로 각각 나타나 PBS를 처리한 대조군 대비 발현 촉진 효과의 차이는 나타나지 않았다

Song 등[60]은 대나무 80% 에탄올 추출물의 총 페놀 및 유효성분을 분석한 결과는 추출물의 유효성분으로 총 페놀 함량은 171 mg/g로 보고하였다.

본 연구에서는 죽엽 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 54.215 mg/g로 나타나, Song 등[60]의 연구보다 낮게 나타났으며, Yu 등[49]의 오가피순 추출물의 총 페놀함량은 116.33 mg GAE/g으로 나타났다는 연구결과와 비교하면 죽엽의 총 폴리페놀 함량은 오가피순 추출물 보다는 낮다는 것을 알 수 있다.

Song 등[60]은 대나무 80% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량은 127 mg/g이라 보고하였는데, 본 연구에서는 죽엽 메탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량이 9.153 mg/g 으로 나타나 Song 등[60]의 연구보다 낮았다. 이는 대나무 줄기와 잎의 차이로 생각되어 진다.

Song 등[60]은 대나무 80% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 17.3% 이었다고 하였으며, Cho 등[54]은 대나무 수액의 DPPH 라디칼 소거활성은 대조 항산화제인 ascorbic acid에 비해 10 mg/ml에서는 21.67%, 50 mg/ml에서는 42.0%, 100 mg/ml에서는 50.00%의 활성을 보였지만 200 mg/ml에서는 790.83%로 농도별 의존적으로 free radical 소거작용이 나타나 DPPH 활성이 뛰어남을 알 수 있다고 하였다.

김낙구 등[61]은 대나무 추출물의 전자공여능(EDA)은 대조군인 BHA, BHT에 대비하여 죽력은 95.0%, 93.2%, 86.0%로 높게 나타나 비교적 높은 항산화작용이 기대되었으나 대나무 잎 열수 추출물은 죽 종에 따라 그 작용이 매우 미약하거나 나타나지 않았다고 하였다.

본 연구에서 죽엽의 DPPH 소거능은 대조군 AA 대비 에탄올-초음파 추출물에서 가장 높은 39.50%의 활성을 보였다.

김낙구 등[61]의 연구에서 대나무의 열수추출물 아질산염 소거능력은 잎 추출물이 줄기추출물에 비하여 높게 나타났으며, 대나무 의 잎 추출물의 경우 맹종죽 60%, 왕대 57%, 솜대 55%의 순으로 높은 소거능을 보였으나 줄기 추출물은 솜대 및 왕대가 10% 정도로 약한 소거능을 보였고, 맹종죽에서는 나타나지 않았다고 하였다.

본 연구에서는 죽엽 추출물 에탄올-초음파 추출물의 아질산염 소거능 31.55%로, 김낙구 등[61]의 연구 보다 낮게 나타났다.

Cho 등[62]은 대나무 수액을 대식세포에 대하여 농도로 첨가하여 24시간 후 세포의 형태 변화를 MTT assay로 실시한 결과 세포손상이 농도가 높아질수록

감소하는 것을 확인하였으며, 세포독성 억제효과는 H_2O_2 대비 AA는 10%로 우수하게 나타났고, 대나무 수액은 고농도에서 27%로 세포손상 방지효과가 우수하게 나타나 안전하고 독성이 전혀 없는 천연 항산화제로 가능성을 보였다고 하였다.

본 연구결과에서도 죽엽 추출물(메탄올 초음파 추출)은 처리 농도 범위 내에서 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았으며, PBS를 처리한 대조군 대비 10 $\mu g/ml$ 처리는 93.6%, 100 $\mu g/ml$ 처리는 99.1%, 500 $\mu g/ml$ 처리는 90.8%의 세포 생육도를 보였다.

또한, 본 연구에서 나타난 죽엽 메탄올 초음파 추출물의 인간 모유두세포에 대한 성장인자 발현 촉진 효과는 PDGF-B 96%, IGF 97%, VEGF 95%, KGF 102%, hGH 103%, EGF 103%로 각각 나타나 PBS를 처리한 대조군 대비 발현 촉진 효과의 차이는 나타나지 않았다.

이러한 실험결과에서 삼백초는 총 폴리페놀 함량이 높고, 높은 항산화능을 나타내었으며, 아질산염 소거능이 높아 천연 항산화제로서 기능성 소재 개발 가능성을 보였으며, 인간 모유두세포에 세포 독성이 없고, 세포 생육도가 높아 육모제 소재로서 활용 가능성이 높다고 사료된다.

죽엽 추출물은 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량과 DPPH 소거능은 온화한 수준으로 나타났으며, 아질산염 소거능이 높고, 인간 모유두세포에 세포 독성이 없어 화장품 및 피부보호 소재로써 충분한 활용가치가 있을 것으로 생각되었으나 삼백초와 비교하면 낮은 수준으로 생각 되어진다.

본 연구자는 이에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료되어 향후 연구과제로 삼고자 한다.

V. 결론

본 연구에서는 실험적 방법을 통하여 삼백초와 죽엽 추출물에서 탈모치료에서 나타나는 약물요법의 제한성을 보완하고, 기능성 화장품 소재로 활용 가능성을 알아보았다.

연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 삼백초와 죽엽에서 추출방법을 달리하여 추출한 각 6종의 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량은 삼백초 메탄올-초음파 추출물에서 76.588 mg/g로 가장 높게 나타났으며, 죽엽은 메탄올 추출물에서 70.616 mg/g로 가장 높게 나타났다.
2. 삼백초 추출물의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 19.321 mg/g로 가장 높았으며, 죽엽의 총 플라보노이드 함량은 메탄올-초음파 추출물에서 9.153 mg/g로 가장 높았다.
3. 삼백초 추출물의 DPPH 소거능을 분석한 결과, 메탄올-초음파 추출물에서 92.81%로 가장 높은 효과를 보였으며, 죽엽 추출물은 메탄올-초음파 추출물에서 49.90%로 가장 높은 효과를 나타내어 삼백초가 죽엽보다 DPPH 소거능이 높게 나타났다.
4. 아질산염 소거능 분석결과는 삼백초 추출물은 초임계 추출물에서 36.90%로 가장 높은 효과를 보였으며, 죽엽 추출물은 메탄올-초음파 추출물에서 31.55%로 가장 높은 효과를 보여, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid (1 mg/ml)의 아질산염 소거능 90~93 % 보다 낮게 나타났다.
5. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물을 인간 모유두세포에 10 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml의 농도에서 MTT assay로 세포 독성을 확인한 결과, 2종의 추출물 모두 처리 농도 범위 내에서는 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다.
6. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물의 인간 모유두세포 생육도는 삼백초 추출물에서는 10 µg/ml 처리 시 93.9%, 100 µg/ml 처리 시 96.2%, 500 µg/ml 처리 시는 121.6%의 세포 생육도가 나타나 농도가 증가할수록 세포 생육도가 높게 나타났다.

으며, 죽엽 추출물에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리는 93.6%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리는 99.1%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리는 90.8%로 농도가 증가할수록 세포 생육도가 높게 나타났다. 또한 삼백초 추출물은 죽엽 추출물보다 세포 생육도가 높게 나타났다.

7. 삼백초 추출물과 죽엽 추출물에 대하여 western blotting을 통한 성장인자 발현 촉진 효과 측정 결과는 PBS를 처리한 대조군 대비 PDGF-B 발현 촉진 효과는 삼백초 추출물은 98%, 죽엽 추출물 96%로 나타났다. IGF 발현 촉진 효과는 삼백초 추출물 106%, 죽엽 추출물 98%로 삼백초가 죽엽보다 높게 나타났으며, VEGF 발현 촉진 효과는 삼백초 추출물 97%, 죽엽 추출물 95%로 나타나 대조군과의 차이를 나타내지 않았다. KGF의 경우는 삼백초 추출물 97%, 죽엽 추출에서는 102%, hGH 에서도 삼백초 추출물에서 96%, 죽엽에서 103%로 나타나 대조군과 차이가 나타나지 않았다. EGF에서는 삼백초 추출물은 96%로 나타나 대조군과 차이가 나타나지 않았으나, 죽엽 추출물 103%로 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

연구결과 삼백초 추출물은 높은 폴리페놀 함량과 온화한 수준의 플라보노이드 함량이 검출되었으며, DPPH 소거능 또한 높은 수준의 효과를 보였으나, 죽엽 추출물은 폴리페놀 함량과 온화한 수준의 플라보노이드 함량이 아주 낮거나 검출되지 않아 삼백초는 기능성 화장품 소재로 활용 가능성이 높다는 것을 알 수 있었으나, 죽엽은 기능성화장품의 소재로 활용가치가 낮다고 사료 되었다.

모유두 세포에 대한 독성 평가 및 세포 증식효과 연구결과 세포독성은 삼백초와 죽엽 모두에서 처리 농도 범위 내 독성을 관찰되지 않았으나, 삼백초 추출물의 모유두세포 증식효과가 매우 높게 나타나 육모제의 개발 소재로 활용가치가 높다고 생각되어 삼백초를 활용한 기능성 화장품과 육모제 연구 개발을 향후 연구과제로 삼고자 한다.

참고문헌

- [1] 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) : 1316 – 1322, 2005.
- [2] 김용익, 이문원, 권진, 송창오, 이창현. 자발적으로 탈모된 생쥐 모델을 이용한 탈모 관련 인자에 관한 연구. *대한해부학회지*, 38 : 133, 2005.
- [3] Staiger Harald, Löffler Georg. The role of PDGF-dependent suppression of apoptosis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *European Journal of Cell Biology*. 77(3) : 220-227, 1999.
- [4] 박인실, 김영배, 리순화, 심선녀, 이진희. 조지훈, 주은령. *NEW두피모발관리학*. 군자출판사, 서울, pp21-22, 2011.
- [5] Price VH. Treatment of hair loss. *The New England Journal of Medicine*. 341 : 964-973, 1999.
- [6] Trüb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Exp Gerontol*, 37(8) : 981 – 990, 2002.
- [7] Buhl AE, Conrad SG, Waldon DJ, Brunden MN,. Potassium Channel Conductance as a Control Mechanism in Hair Follicles. *J Investig Dermatol*, 101 : 148 – 152, 1993.
- [8] 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) : 1316 – 1322, 2005.
- [9] Mackay A, Isles C, Henderson I, Fife R, Kennedy AC, Minoxidil in the management of intractable hypertension. *Quart J Med*, 52 : 175-190, 1981.
- [10] 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) : 53 – 55, 2005.
- [11] McClellan KJ, Markham A,. Finasteride: a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs*, 7(1) : 111-126, 1999.
- [12] 김규리, 이경란, 이제민, 류재환, 인창식. 탈모 유효 약침액 한약 소재에 대한 동

- 물모델을 이용한 국내 연구보고 고찰. 대한침구의학회지, 31(1) : 139-148, 2014.
- [13] Ann GW, Kang TW, Jeong JH, Jo BK. Clinical studies on the irritation effects of Mung Bean (*Phaseolus aureus*) extract in cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* 30 : 23-28, 2004.
- [14] Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J Antimicrob Agents*, 26(5) : 343-56, 2005.
- [15] Yu SH, Chong MS, Kim HJ, Lee KN. Studies on the extraction method and polysaccharide of *Tricholoma matsutake* using the supersonic wave and microwave. *Korean J Orient Physiol Pathol*, 21(6) : 1431-6, 2007.
- [16] Wang XS, Wu YF, Dai SL, Chen R, Shao Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrason Sonochem*, 19(6) : 1155-9, 2012.
- [17] Duan B, Hu J, Huang L, Yang X, Chen F. Chemical fingerprint analysis of *Gentianae Radix et Rhizoma* by high-performance liquid chromatography. *Acta Pharm Sin B*, 2(1) : 46-52, 2012.
- [18] Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin like growth factors on cultured human hair follicles: IGFI at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J Invest Dermatol*, 102(8) : 57-61, 1994.
- [19] McElwee KJ, Huth A, Kissling S, Hoffmann R. Macrophage stimulating protein promotes hair growth ex vivo and induces anagen from telogen stage hair follicles in vivo. *J Invest Dermatol*, 123 : 34-40, 2004.
- [20] Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends in Molecular Medicine*, 7(7) : 293-301, 2001.
- [21] Ozeki M, Tabata Y. In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials*, 24(13) : 2387 - 94, 2003.
- [22] Dulak J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *J Physiol Pharmacol*, 56(1) : 51-69, 2005.
- [23] Itami S, Kurata S, Takayasu S. Androgen induction of follicular epithelial cell growth is mediated via insulin-like growth factor-I from dermal papilla

- cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212(3) : 988 – 994, 1995.
- [24] Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med Jul*, 7(7): 293-301, 2001.
- [25] Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol Feb*, 118(2) : 216-225, 2002.
- [26] Peus D, Pittelkow MR, Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermato Clin*, 14 : 559-72, 1996.
- [27] Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinas JR, Parimoo S, Prouty SM. Hair follicle growth controls, *Dermatol Clin*, 14 : 543-58, 1996.
- [28] Yang SJ, Youn KS, No HK, Lee SH, Hong JH. Optimization of extraction conditions for mate (*Ilex paraguarensis*) ethanolic extracts, *Korean J. Food*, 18 : 319, 2011.
- [29] Lee SJ, Kim JH, Kim MJ, Yoon SM, Jeong JC, Sung NJ. Effect of garlic and medicinal plants composites on antioxidant activity and lipid levels of liver in hypercholesterolemic rats. *J. Life Sci.*, 19 : 1769, 2009.
- [30] Shin ES. A Study on the Effect Five Herbal Extracts on the Hair Growth. *J. Beauty & Trichol*, 2 : 91-100, 2006
- [31] 형순희, 강성례, 김영철. C57BL/6 마우스 모델에서 복합 한의추출물의 모발성장 효과. *한국미용학회지*, 13 : 1367-1372, 2007.
- [32] 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.
- [33] Hwang HS, Park GD. Research Paper : A Comparative Study of Anti-oxidant Effect and Cell Proliferation Effect based on Extraction Method of Natural Substances. *J. Kor. Soc. Cosm.* 21(4), 2015.
- [34] 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.
- [35] Gray J.I. and Dugan L.R. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.*, 40(5) : 981-4. 1975.

- [36] Mosmann T. Rapid colormetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods*, 65 : 55-63, 1983.
- [37] Lee ST, Park JM, Lee HK, Kim MB, Cho JS, and Heo JS. Component comparison in different growth stages and organs of *Saururus chinensis* Baill. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 8(4)4 : 312-318, 2000.
- [38] Kim SK, Kim YH, Kang DK, Chung SH, Lee SP, Lee SC. Essential oil content and composition of aromatic constituents on leaf of *Saururus chinensis*, *Angelica dahurica* and *Cnidium officinale*. *Korea J Med Crop Sci*, 6 : 299-304, 1998.
- [39] Leighton, T., C. Ginther, L. Fluss, W. K. Harter, J. Cansado, and V. Notario. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetable: their effects on malignant cell transformation. *Chemical Society* 507 : 220-238, 1992.
- [40] Lee IS. Effect of water extract from *Saururus chinensis* (Lour.) Bail water extracts on the cancer cells and antioxidative activity in cytotoxicity. *Korean J Postharvest Sci Technol*, 8 : 213-216, 2001.
- [41] Cho HY, Cho CW, Song YS. Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of *Saururus Methan* Extract in RAW 264.7 Macrophages. *J Med Food*. 8(2) : 190-7, 2005.
- [42] Kwak LW, Kwon CH. Pharmacological Studies on *Saururus Chimensis* Baill. *Bull KH Pharma Sci*, 16 : 137-54, 1988.
- [43] 박시경 외, 삼백초의 진통성분. 약학회지. 42(3) : 238-42, 1988.
- [44] In MJ, Park MK, Kim SY, Chae HJ, Chae MW, Sone J, Ji HS, Han KS, Kim DC. Composition analysis and antioxidative activity of maengjong-juk (*Phyllostachys pubescence*) leaves tea. *J Appl Biol Chem*, 53(2) : 116-9, 2010.
- [44] In MJ, Park MK, Kim SY, Chae HJ, Chae MW, Sone J, Ji HS, Han KS, Kim DC. Composition analysis and antioxidative activity of maengjong-juk (*Phyllostachys pubescence*) leaves tea. *J Appl Biol Chem*, 53(2) : 116-9, 2010.

- [45] Jang IK, Hong ND, Korean Soci. Orien. Inter. Med. 21 : 83, 1985.
- [46] Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32 : 723-727, 2003.
- [47] Jang HL, Yoon KY. Biological activities and total phenolic content of ethanol extracts of white and flesh-colored *Solanum tuberosum* L. potatoes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41 : 1035-1040, 2012.
- [48] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM.. Methods in Enzymology. pp.152-177. Academic Press, 1999.
- [49] Yu SY, Lee YJ, Song HS, Hong HD, Lim JH. Antioxidant effects and nitrite scavenging ability of extract from *Acanthopanax cortex* shoot. *Korean J Food & Nutr* 25 : 793-799, 2012.
- [50] Kim SK, Ban Sy, Kim JS, Chung SK. Change of Antioxidant Activity and Antioxidant Compounds in *Saururus chinensis* by Extraction Conditions. *J. korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48(1) : 91, 2005.
- [51] Seo HS, Chung BH, Cho YG. Antioxidant and Anticancer Effect of Agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese Lizardtail (*Saururus chinensis* Baill). *korean J Medicinal Crop Sci.*, 16(3) : 141, 2008.
- [52] Middleton E, Kandaswami C. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol* 48 : 115-119, 1994.
- [53] Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol*, 28 : 232-239, 1996
- [54] 박대중, 이장천. 삼백초 에탄올 추출물의 항산화는 및 피부 미백작용 연구. 대한 본초학회지 23(2) : 196, 2008.
- [55] 한상엽, 이정호, 백승화, 이택준, 송용선, 이기남. 삼백초와 어성초의 암세포에 대한 독성억제 효과. 대한예방의학회지 7(2) : 97-106. 2003.
- [56] 강성례. 삼백초 열수추출물의 피부노화억제 효과. 계명대학교 대학원, 박사학위 논문 : 32-48, 2008.
- [57] Peter FS. The toxicology of nitrate and N-nitroso compounds. *J Sci Food Agric*, 26: 1761-1770, 1975.
- [58] Yano K, Brown LF, Detmar M, Control of hair growth and follicle size by

- VEGF-mediated angiogenesis, *J Clin Invest*, 107 : 409-17, 2001.
- [59] Su HY, Hickford GH, Bickerstaffe R, Palmer BR, Insulin-like growth factor1 and hair growth. *Dermatol Online J*, 5(2) : 1, 1999.
- [60] Song YH, Chu GM, Jang SH, Goo AJ, Ko YG, Ha JH, Lee JY, Kang SN, Song YM, Cho JH. Antioxidant activity of Bamboo powder and its immunoreactivity in the pig. *Korean J Vet Serv*, 37(2) : 115-116, 2014.
- [61] 김낙구, 조숙현, 이상대, 류재산, 심기환. 대나무 추출물의 기능성 및 항균활성. *농산물저장유통학회지*. 8(4) : 477, 2001.
- [62] Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH. Reacyive Oxygen Species and Cytotoxicity of Bamboo (*Phyllostachys pubescens*) Sap. *korean J. Food preserv*. 15(1) : 107-108, 2008.