



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](#)

2021년 2월

박사학위 논문

찐레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물 및
혼합물의 C57BL/6 마우스 모델에서의
발모촉진 효과

조선대학교 대학원

보완대체의학과

황 태 현

질레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물 및 혼합물의 C57BL/6 마우스 모델에서의 발모촉진 효과

Effect of *Rosa multiflora* Root and *Perilla frutescens*
Ethanol Extracts and Mixture on Hair Growth Promotion
in C57BL/6 Mouse Model

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

보완대체의학과

황 태 현

필레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물 및 혼합물의 C57BL/6 마우스 모델에서의 발모촉진 효과

지도교수 소 금 영

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청 논문으로

제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

황태현

황태현의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	<u>이미자 (인)</u>
위 원	원광디지털대학교	교수	<u>유지호 (인)</u>
위 원	조선대학교	교수	<u>홍 란 (인)</u>
위 원	조선대학교	교수	<u>김상훈 (인)</u>
위 원	조선대학교	교수	<u>소금영 (인)</u>

2020년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표 목차	iii
그림 목차	iv
ABSTRACT	v
I . 서론.....	1
II . 연구방법.....	3
1. 실험대상 및 재료와 시약.....	3
2. 추출물의 제조.....	3
3. 항산화 활성(Antioxidant activity) 실험.....	4
1) DPPH 라디컬 소거능 측정.....	4
2) ABTS 라디컬 소거능 측정.....	4
3) SOD 유사활성 측정.....	5
4. 아질산염 소거능 측정.....	5
5. 모유두세포에 대한 독성 및 생육도 평가(in vitro).....	6
1) 추출물처리.....	6
2) 세포배양.....	6
3) MTT - assay.....	6
6. 마우스를 사용한 육모효능 평가.....	7
1) 실험동물의 입수 및 관리.....	7
2) 제모 및 실험 시료 도포	7
3) 육모효능 평가(In vivo).....	8
4) Image J를 사용한 육모효능 분석.....	9

7. Antibody array를 이용한 발모관련 단백질 증감 분석.....	9
1) 단백질 추출.....	9
2) 단백질 라벨링(protein labeling).....	10
3) 결합(coupling).....	10
4) 탐색(detection).....	11
5) 분석(analysis).....	11
8. 통계처리.....	12
III. 연구결과.....	13
1. 항산화 활성.....	13
1) DPPH 라디컬 소거능	13
2) ABTS 라디컬 소거능	14
3) SOD 유사활성	15
2. 아질산염 소거능.....	16
3. 인간 모유두세포에 대한 독성 및 생육도(in vitro).....	17
4. 마우스를 사용한 육모효능.....	18
1) 육안적 육모효능(in vivo).....	18
2) Image J를 사용한 육모효능 분석	18
5. Antibody array를 이용한 발모관련 단백질 증감.....	20
1) 모발 성장기를 촉진하는 단백질의 발현도.....	21
2) 모발 퇴행기를 촉진하는 단백질의 발현도.....	22
IV. 고찰	23
V. 결론.....	27
참고문헌.....	28

표 목차

Table 1. Sample Concentration.....	10
Table 2. Image test results for hair growth efficacy for 20 days using Image J.....	19
Table 3. Expression of proteins that promote growth.....	21
Table 4. Expression of protein that promotes degenerative phase.....	22

그림 목차

Figure 1. The process of removal of mouse hair.	8
Figure 2. Extraction of depilation area and Brightness analysis using Image J.	9
Figure 3. Antibody-array chip scan images.	11
Figure 4. DPPH radical scavenging activity of <i>Rosa multiflora</i> root ethanol extracts and <i>Perilla frutescens</i> ethanol extracts.	13
Figure 5. ABTS radical scavenging activity of <i>Rosa multiflora</i> root ethanol extracts and <i>Perilla frutescens</i> ethanol extracts.	14
Figure 6. Superoxide anion radical scavenging ability of <i>Rosa multiflora</i> Root ethanol extracts and <i>Perilla frutescens</i> ethanol extracts.	15
Figure 7. The nitrite-scavenging activity of <i>Rosa</i> root <i>multiflora</i> extracts and <i>Perilla frutescens</i> extracts.	16
Figure 8. Effect of cytotoxicity from ethanol extracts from <i>Rosa multiflora</i> root extracts and <i>Perilla frutescens</i> extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells.	17
Figure 9. Visual test results for the effect of promoting hair growth in C57BL/6 mouse.	18
Figure 10. Results of visual analysis of hexafecimal effect using Image J.	19
Figure 11. Analysis results of hair growth efficacy for 20 days using Image J.	20

ABSTRACT

Effect of *Rosa multiflora* Root and *Perilla frutescens* Ethanol Extracts and Mixture on Hair Growth Promotion in C57BL/6 Mouse Model

Hwang, Taehyun

Advisor : Prof. So, Keumyoung, M.D., Ph. D

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

This study researched the possibility of using natural products for hair growth agents and hair loss prevention materials based on the test for the antioxidant and anti-inflammatory activity of *rosa multiflora* root, and *perilla frutescens* extract and toxicity and growth rate assessment to human follicular dermal papilla cells (HFDPC), hair growth efficacy evaluation using a mouse model and analysis of the increase or decrease of hair growth-related proteins to check the possibility of using these natural products as the hair growth agents and hair loss prevention materials to develop a hair growth agent made of safe and natural products with excellent hair growth effects and fewer side effects. Regarding the experimental method, DPPH scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and SOD-like activity were measured to measure the antioxidant capacity. The measurement of scavenging activity for nitrite tested the anti-inflammatory activity, and the MTT assay tested the toxicity and cell proliferation effect on human follicular dermal papilla cells. The hair growth effect was observed and researched in the C57BL/6 mouse, and the increase and decrease of hair growth-related proteins were analyzed using an antibody array.

As a result of the study, at the concentration of 1,000 μ g/ml of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens* extract, DPPH scavenging activity was measured at 87.64% for *rosa multiflora* root extract and 78.0% for *perilla frutescens* extract.

ABTS radical scavenging activity was measured at 80.12% in *rosa multiflora* root and 72.24% in *perilla frutescens*, and SOD-like activity was 65.22% in *rosa multiflora* root and 57.53% in *perilla frutescens*, and nitrite scavenging activity was 42.64% in *rosa multiflora* root extract and 40.38% *perilla frutescens* extract, which showed a high level of antioxidant capacity and anti-inflammatory function. sing MTT assay, no cytotoxicity was observed for human follicular dermal papilla cells of *rosa multiflora* root extract, *perilla frutescens*, *rosa multiflora* root, and *perilla frutescens* (1:1) mixture, and cell growth rate was found to be 121.3% of *rosa multiflora* root extract, 116.3% of *perilla frutescens* and 130.2% of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens* mixture at the concentration of 1,000 μ g/ml. For the hair growth efficacy assessment using C57BL/6 in vivo for 20 days after application, Image J analysis showed significant hair growth efficacy with 86% in minoxidil, which is the positive control group, 84% in the *rosa multiflora* root, 80% in the *perilla frutescens*, and 90% ($p < 0.005$) in the mixture of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens*. As a result of observing protein expression using the antibody array, the expression of proteins that promote hair growth was synergistic in the mixture of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens* (1:1) compared to the control group. The expression of proteins that promote the degenerative phase of hair was also significantly reduced in the mixture of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens* (1:1) compared to the control group.

This study shows that the *rosa multiflora* root extract and the *perilla frutescens* extract have high antioxidant and anti-inflammatory functions. The *rosa multiflora* root extract, *perilla frutescens* extract, and a mixture of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens* (1:1) were not toxic to human follicular dermal papilla cells and showed high cell proliferation effects. For the hair growth efficacy assessment using C57BL/6 in vivo, significant hair growth effects were observed in the group of administering the mixture of *rosa multiflora* root and *perilla frutescens*. In this assessment, it was analyzed that the expression of the protein that promotes the growth phase of hair increased while the expression of the protein that promotes the degenerative phase was reduced, confirming the possibility of developing a hair growth agent using a mixture of *rosa multiflora* roots and *perilla frutescens*.

Keyword: Hair loss, *Rosa multiflora*, *Perilla frutescens*, Antioxidant capacity, Antibody array, C57BL/6

I. 서론

모발은 외부 자극으로부터 두피를 보호하고, 체온을 유지시키며 자외선으로부터 머리를 보호하는 기능 외에도 중금속 배출 등 인체의 많은 의학적인 기능을 수행하고 있다. 최근의 연구에서는 탈모증의 원인으로 식습관 변화와 다양한 외부 환경의 요인이 탈모에 영향을 미치는 것으로 보고되었고, 혈액 내에서 활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 산화적 스트레스를 주요 발병기전으로 제시하였다[1, 2]. 탈모는 비록 생명에 영향을 미치는 것은 아니지만 자신감 감소 등 개인의 정신적 스트레스로 대인관계에 기피현상이 나타나는 심각한 사회적 문제로 작용한다[3]. 이로 인하여 탈모 예방과 발모 및 두피건강관련 시장의 규모는 매년 성장세에 있다[4].

현재까지 알려진 탈모 치료제로는 미국식품의약국(FDA)의 공인을 받은 경구용 피나스테라이드(finasteride)와 경피용 미녹시딜(minoxidil) 등이 의약품으로 사용되고 있다. 피나스테라이드는 초기에 전립선 비대증 치료를 목적으로 개발되었으나 남성형 대머리(androgenic alopecia)에 모발 재생효과를 보여 남성형 탈모 치료제로 사용되고 있다. 이 약물은 단기간에 효과가 나타나는 장점이 있으나, 사용을 중지하면 치료 이전의 상태로 돌아가며 장기간 복용하게 되면 기형아 출산과 남성 성기능 장애 등의 부작용 때문에 사용이 제한적이다[5]. 미녹시딜은 고혈압 치료제로 개발되었으나 다모증의 부작용이 나타나 이를 연구한 결과 현재의 바르는 발모제로 사용되고 있다. 하지만 피부염 및 소양증, 체중 증가, 협심증, 부종 등의 부작용이 나타나는 것으로 보고되어 사용을 기피하고 있다[6, 7].

이 밖에도 다양한 발모 관련 제품들은 많으나, 대부분 발모관련 효과 및 효능과 안전성에 대한 근거 자료가 미흡하다. 따라서, 객관적으로 검증되고 부작용이 적은 약물 개발이 절실하게 요구되고 있는 실정이다[8]. 이러한 문제들을 보완하기 위해 최근 모발성장과 관련하여 대체의학(요법)적 접근법의 하나로 약용식물 등 천연물을 이용한 치료제에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 발모효과가 우수한 천연물의 제제 개발 가능성을 시사하고 있다[9, 10].

쥘레나무의 생리활성에 관한 연구로 쥘레뿌리 추출물이 항산화활성에 대해

DPPH, ABTS소거능 및 SOD라디칼 소거능이 우수하고 항염증 작용이 우수한 것으로 보고하였다[11-13]. 쥘레나무의 주요 성분으로 플라보노이드 계열과 탄닌 계열의 페놀 화합물들은 라디칼 소거능이 높은 것으로 알려져 있다[14]. 특히 최근 항산화활성이 높은 축합형 탄닌화합물인 프로시아니딘 B3와 카테킨이 포함된 것으로 분석되어 개발 가치가 높은 것으로 평가된다고 하였다[15].

자소엽(*Perilla frutescens*)은 차조기(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo) 또는 주름소엽(*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decaisne)의 잎과 끝가지를 말하며, 향균, 항산화, 항염증 효과 등 생리활성에 대한 연구가 보고 되었고 [16-19], 특히 항산화활성이 우수한 것으로 보고 하였다[20]. 이러한 약리활성은 자소엽이 가지고 있는 페놀화합물, 로스마린산, 안토시아닌, 카페인산, 루테올린 등 때문으로 보고되었다[21].

본 연구는 발모 효과가 우수하면서도 부작용이 적은 안전한 천연물을 소재로 한 발모제의 개발을 목적으로 첫째, 쥘레뿌리와 자소엽 추출물의 항산화, 항염 활성 실험을 통하여 발모제 소재로의 활용 가능성을 연구하였다. 둘째, 쥘레뿌리 및 자소엽 추출물과 혼합물의 인간 모유두세포에 대한 독성 및 생육도 평가와 마우스모델을 이용한 육모효능평가를 통해 모발의 성장을 촉진하는 소재로서의 적용 가능성을 평가하였다. 셋째, Antibody array를 이용한 발모관련 단백질의 증감 분석을 통해 발모촉진 및 탈모 예방제품의 소재로 사용 가능성을 검토 하였다.

II. 연구방법

1. 실험대상 및 재료와 시약

C57BL/6 마우스 동물 실험의 모든 과정은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 승인(Approval No. 2020-0006)받은 후 2020년 1월부터 2020년 3월까지 시행하였다. 본 실험에 시료로 사용한 짙레뿌리(*Rosa multiflora* Root)와 자소엽(*Perilla frutescens*)은 시중 약재상에서 건조된 상태로 구입 하였다.

항산화 효능 분석에 사용된 시약인 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), BHT (butylated hydroxytoluene), Griess reagent, diethylene glycol, sodium nitrite, gallic acid, vitamin-C, narginin, H₂O₂는 Sigma-Aldrich (USA) 제품을, MTT-assay에 사용한 FBS (Fetal Bovine Serum), antibiotics-antimycotic, Trypsin-EDTA는 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)제품을, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetazolium bromide), Yeast Extract, Tryptic Soy Broth, Malt Extract, Bacto agar, Peptone, Tryptone, Dextrose는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였다.

2. 추출물의 제조

건조된 짙레뿌리와 자소엽을 절단 후 각각 추출용매인 70% 주정 에탄올에 침지하여 60°C 에서 24시간 추출하였으며, 추출액을 여과(Whatman filter paper No.1, GE Healthcare, Leuven, Belgium)한 후에 회전식 감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 동결건조기(PVTFA 10AT, ILSIN, Korea)에 72시간 동안 동결 건조하여 보관 후 실험을 진행하였다.

3. 항산화 활성(Antioxidant activity) 실험

모든 항산화 활성 실험의 양성대조군으로 항산화 물질로 잘 알려진 비타민 씨와 BHT (butylated hydroxytoluene)를 사용하였다.

1) DPPH 라디칼 소거능 측정

DDPH는 안정한 자유라디칼(stable free radical)인 상태에서 보라색이지만, 항산화 물질과 만나면 담황색으로 변한다. 이때 감소하는 흡광도를 비교하는 실험으로, 항산화활성은 Blois의 방법으로 측정하였다[22]. 1mM DPPH 용액 100 μ l와 농도별로 희석된 추출물을 100 μ l씩 취하여 혼합한 후 30분간 암 상태를 유지한 후 잔존 라디칼 농도를 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517nm에서 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 추출물의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율을 토대로, 시료를 첨가하지 않은 대조군과 흡광도를 비교하여 자유라디칼의 제거 활성도를 백분율로 나타내었다.

2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거활성은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 이 방법은 ABTS와 항산화 물질을 혼합했을 때 무색으로 환원되는 원리를 이용하여 색 변화를 관찰하는 것이다[23]. 시험 용액은 증류수에 7mM ABTS와 2.45mM 과황산칼륨을 1:1의 비율로 혼합하여 상온에서 16시간 배양하여 ABTS 양이온을 생성시킨 후 734nm에서 흡광도의 값이 0.7 ± 0.02 이하가 되도록 증류수로 희석하여 시험용액을 제조하였다. 그 다음 ABTS 용액 100 μ l에 찔레뿌리와 자소엽 추출물 100 μ l을 가한 후 6분간 반응 후에 흡광도를 측정하였다. 음성대조군(2.45mM potassium persulfate buffer)의 흡광도와 비교하여 감소 정도를 백분율로 나타내었다.

3) SOD 유사활성 측정

SOD (Superoxide Dismutase) 유사활성은 과산화물(Superoxide)에 의해 산화되는 피로갈롤(pyrogallol)의 산화속도를 억제시키는 원리로, Marklund & Marklund의 방법에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 피로갈롤의 생성량을 측정하였다[24]. 찔레뿌리와 자소엽 추출물 0.2ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl 버퍼(buffer) 3ml와 7.2mM 피로갈롤 0.2ml를 첨가하였다. 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.1ml로 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율(%)로 나타내었다.

4. 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능(nitrite-scavenging ability)은 Gray & Dugan의 방법으로 측정하였다[25]. 1mM NaNO₂용액 50μl에 1mg/ml 농도의 시료 50μl를 첨가 후 0.1N HCl용액(pH 1.2)을 300μl를 가하여 반응용액의 최종 부피를 0.4ml로 하여 37° C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리스 시약(Griess reagent) (1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine=1:1)은 2% 초산용액 5ml, 30% 아세트산으로 조제하였다. 조제된 그리스 시약을 반응시킨 각 반응액에 시약 0.2ml를 가하여 잘 혼합한 다음 이 혼합액을 실온에서 15분간 반응시키고 마이크로플레이트 리더(Microplate reader) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 520nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 양을 측정하였다. 음성대조군으로 증류수를 사용하였고, 양성대조군으로는 비타민 C 1mg/ml를 가하여 동일한 조건으로 실험을 수행하였고, 다음과 같은 식을 이용하여 억제율을 산출하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{시료 무처리군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

5. 모유두세포에 대한 독성 및 생육도 평가(in vitro)

1) 추출물처리

쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물을 PBS (Phosphate buffered saline)에 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1,000 μ g/ml농도별로 용해하였다. 추출물의 용해를 위해 강하게 30분 보텍싱(vortexing) 한 후 30분간 초음파처리 하여, 8,000rpm으로 10동안 원심분리 후 불용성 성분을 제거하고 상등액을 세포 처리용 샘플로 사용하였다.

2) 세포배양

실험에 사용한 인간모유두세포(human follicle dermal papilla cell, HFDPC)는 Promocell GmbH (Germany, Heidelberg)사에서 구매 사용하였다. 세포의 배양과 실험에는 세포배양 전용배지인 Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium (Ready-to-use) (Cat. No. C-26501)을 사용하였다. HFDPC 배양은 SANYO CO₂ 배양기(incubator)를 사용하여 5% CO₂를 37 $^{\circ}$ C에서 배양 하였다. 세포의 특성상 실험은 passage 4-6 사이의 세포를 사용하여 배양용기에 HFDPC를 세포배양 정도가 80~85%가 될 때까지 배양을 하였다.

3) MTT - assay

각각의 시료에 대한 HFDPC의 생존율을 측정하기 위하여 Mosmann의 방법을 이용 하였다[26]. 모유두세포가 적정 수준까지 자라면 세포를 배양 용기에서 분리(trypsin 처리법)하고, 24 웰플레이트(well plate)에 초기 세포배양 정도가 20~25%가 되게 세포를 접종한 후 세포배양 정도가 70~80% 되게 추가 배양하였다. 배양액을 석션(suction)으로 제거하고 37 $^{\circ}$ C로 워밍(warming) 된 모유두세포 배지(Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium) 1.0ml 씩으로 배지를 교환하였다.

시험 추출물인 쥘레뿌리 추출물, 자소엽 추출물 및 쥘레뿌리와 자소엽 혼합물을 대조군과 함께 처리하였다. 대조군으로 샘플의 용해에 사용된 PBS는 동량으

로 처리하고, 시험추출물을 배양 배지 1ml에 대하여 0.05ml 처리 한 후 농도가 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1,000 μ g/ml 되게 하여 48시간 추가 배양 하였다. 쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물을 혼합 처리 시는 1:1의 비율로 처리하였다. 배양 완료 후 100 μ l의 MTT 용액을 각 웰(well)에 첨가하고 잘 섞어서 3시간 동안 추가로 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양액을 석션으로 완전히 제거한 후 각 웰에 생성된 포마잔(formazan) 결정을 DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Amresco, 0231-500ML) 200 μ l로 녹여서 잘 섞어준 다음 100 μ l씩 골고루 96 웰플레이트로 옮겨 ELISA reader를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 마우스를 사용한 육모효능 평가

1) 실험동물의 입수 및 관리

C57BL/6 마우스는 5주령 된 암컷을 (주)오리엔탈바이오로부터 구입(N = 30, Orient Co., LTD, Korea)하여 실험동물은 2주간 새로운 사육환경에서 제주대학교 수의학과 실험동물센터에서 식이적응을 한 후 open-lid cage내에 깔짚(JRS3-4) (Lignocel, JRS CO., Ltd, Korea)을 깔아 사육하였다. 사육 중 식이는 실험동물 사료(Purina, Switzerland)와 수돗물을 급수병으로 자동급여 하였으며, 사육환경 조건은 Clean Animal Lack (Jeongdo Industry Co., Ltd, Korea)내에서 평균온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 \pm 5% 및 명암주기는 12시간 밤 낮 주기로 조절되는 표준사육 환경에서 사육되었다. 평가에 사용되는 실험군은 ① 음성대조군, ② 양성대조군(3% 미녹시달), ③ 쥘레뿌리군, ④ 자소엽군, ⑤ 쥘레뿌리와 자소엽 혼합(1:1)군의 5군으로 각각 6마리씩 총 30마리를 사용하였다.

2) 제모 및 실험 시료 도포

7주령 C57BL/6 마우스를 실험실에서 1.9% 농도의 에테르로 마취를 실시하였다. 에테르 80 μ l 용액을 솜뭉치와 거즈패드를 이용 5~10분간 1.9% 농도 마취를 유도하였다. 마취된 마우스는 전자가위를 이용하여 1차 제모 한 후 80% 치오글리콜산(Thioglycolic acid)가 주성분인 제모크림(Niclean, Ildong Co., Ltd, Korea)을

도포한 후 5분간 방치하여 털을 완전히 제거하였다(Figure 1). 제모 1일 후 실험 동물의 피부가 털이 완전히 제거되어 선홍색으로 된 것을 확인 후 각각의 실험 시료를 도포하였다. 시료는 양성대조군으로 의약외품으로 판매되는 3% 미녹시딜(Hyundai Pharm. Co., Ltd, Korea), 농도 1,000 μ g/ml의 쥘레뿌리와 자소엽 추출물, 쥘레뿌리와 자소엽 혼합물을 매일 도포하면서 육모의 효능을 비교 측정 하였다.



Figure 1. The process of removal of mouse hair

3) 육모효능 평가(in vivo)

육모 효능 평가는 육안적 검사와 Image J를 사용한 육모효능 분석 방법을 사용하여 분석 하였다. 음성대조군을 제외한 각 군의 마우스에게 3% 쥘레 뿌리추출물, 3% 자소엽 추출물, 3% 쥘레뿌리 + 3% 자소엽 혼합물과 3% 미녹시딜을 매일 도포하고 4일, 8일, 12일, 16일, 20일 간 육모의 효능을 관찰 비교 하였다.

발모효과를 확인하기 위해 클로로포름 흡입 마취를 한 후 육안적 발모 효능 평가는 사진촬영을 실시하여 발모상태 정도와 피부 색상을 비교하였다.

4) Image J를 사용한 육모효능 분석

분석방법은 실험부위(등) 사진을 포토샵을 이용하여 직사각형 모양으로 제모부위를 추출한 후 추출한 직사각형의 제모부위 사진을 Image J를 이용하여 명도를 분석하였다(Figure 2).



Figure 2. Extraction of depilation area and Brightness analysis using Image J.

7. Antibody array를 이용한 발모관련 단백질 증감 분석

시료를 도포한 C57BL/6 마우스의 등 피부 내의 발모관련 단백질의 발현을 관찰하기 위하여 군별로 나뉘어진 마우스를 순서대로 에테르를 사용하여 마취하고 사목하였다. 그 후 안락사 시킨 다음 등 피부를 채취하여 antibody array 분석을 ebiden (Seoul, Korea)에 의뢰 하였다.

1) 단백질 추출

차가운 얼음물 1X PBS로 세포를 씻은 후 여기에 용해비드(lysis beads) 와 추출 완충제(Extraction Buffer)를 첨가하고 30초 동안 보텍싱하여 혼합하고 얼음 위에서 10분 동안 배양하였다. 배양된 혼합물을 1시간 동안 10분 간격으로 30초 동안 보텍싱을 반복하였으며, 배양된 혼합물은 10,000 x g에서 20분 동안 4 °C에서 원심 분리하여 상등액을 깨끗한 튜브로 옮기고 상등액의 버퍼를 라벨링 버퍼로 교환하고 단백질 농도를 측정하였다(Table 1).

Table 1. Sample Concentration

sample	OD	AVR.	Average Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	dilution factor	Stock conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	vol (μl)	total (μg)
NC	0.1926 0.1960 0.1998	0.196	56.2	10	0.562	100	56.2
MNXD	0.1686 0.1729 0.1749	0.172	34.4	10	0.344	100	34.4
RMEE	0.2018 0.2012 0.2120	0.205	64.3	10	0.643	100	64.3
PFEE	0.2061 0.2081 0.2116	0.209	67.5	10	0.675	100	67.5
RMEE + PFEE	0.1544 0.1591 0.1576	0.157	20.7	10	0.207	100	20.7

NC; negative control, MNXD; minoxidil, RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

2) 단백질 라벨링(protein labeling)

DMF (N, N-dimethylmethanamide) 100mg에 1mg의 비오틴시약(biotin reagent)을 첨가하여 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 최종 농도를 만들고 여기에 라벨링 완충제(labeling buffer)를 첨가하여 부피를 $75\mu\text{l}$ 로 만든 후 라벨링 완충제를 사용하여 비오틴 / DMF $3\mu\text{l}$ 를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 혼합하면서 배양한 후, 다시 정지 시약(stop reagent) $35\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합하면서 실온에서 30분 동안 배양하였다 .

3) 결합(coupling)

차단 완충액(blocking buffer)에 항체 마이크로 어레이(antibody microarray)를 담그고 실온에서 40분 동안 흔들면서 차단하고 슬라이드를 Milli-Q 등급의 물로 헹구어준 다음 6ml 커플링 용액과 90ug의 라벨된 단백질 샘플과 함께 진탕기(coupling chamber)에 실온에서 2시간 동안 슬라이드를 배양한 후 커플링 챔버에서 슬라이드를 제거하고, 새로운 세척 버퍼(wash buffer)로 슬라이드를 3회 세척 후 탈 이온수로 헹구어 주었다.

4) 탐색(detection)

탐색완충제(detection Buffer)가 들어있는 60ml 병에 30 μ l의 스트렙타비딘(streptavidin)-Cy3 (1mg/mL)를 넣고, 스트렙타비딘-Cy3 용액 30ml에 슬라이드를 담근 후 실온의 암실에서 45분 동안 퀘도 진탕기에서 배양하였다. 그 후 슬라이드를 세척 버퍼로 3번 세척한 후 탈 이온수로 행구고 압축 질소로 슬라이드를 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 GenePix 4000B (Agilent) Array Scanner로 스캔하였으며(Figure 3), 이미지 분석은 GenePix Pro 6.0 (Agilent)으로 수행하였다.

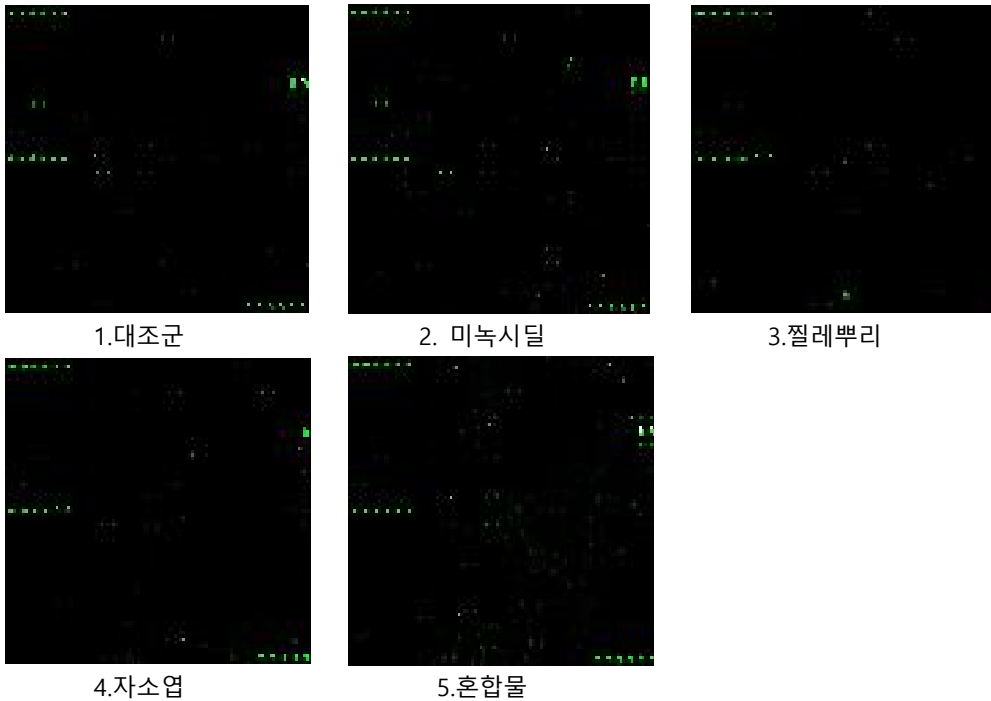


Figure 3. Antibody-array chip scan images.

5) 분석(analysis)

데이터의 노이즈와 편차를 줄이고 여러 장의 슬라이드를 사용할 경우 슬라이드간의 편차를 줄이고 분포를 맞추어 각 배열 내에서 모든 항체에 대한 평균 신호 강도의 중간 값을 슬라이드 배열로 정규화 한다. 정규화된 데이터를 사용하여 대조군과 처리 샘플 사이의 배수 변화를 결정한다.

8. 통계처리

모든 실험과 평가의 분석은 3번 반복 수행하였고, 실험 결과는 SPSS package program (Statistical Package for the Social Sciences, V.21, SPSS Inc., Chicago, USA) 통계 프로그램으로 분석하였다. 분석 값은 평균±표준편차로 표시하였고 통계 분석은 Student' s t-test를 실시하여 각 군의 유의수준을 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 항산화 활성

1) DPPH 라디칼 소거능

찔레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물에 대한 DPPH 소거능을 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml의 농도에서 측정한 결과 찔레뿌리 추출물은 각각 24.43 \pm 0.4%, 47.07 \pm 0.4%, 54.39 \pm 0.81%, 71.57 \pm 0.23%, 81.19 \pm 1.64%, 87.64 \pm 0.38%의 소거능을 나타냈다. 자소엽 추출물은 각각 15.43 \pm 1.16%, 20.07 \pm 1.21%, 38.39 \pm 0.98%, 54.57 \pm 1.24%, 62.16 \pm 1.5%, 78.0 \pm 1.35%의 소거능을 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 비타민 C는 78.81 \pm 1.2%, 89.84 \pm 0.16%, 91.81 \pm 0.1%, 92.29 \pm 0.11%, 92.3 \pm 0.15%, 92.5 \pm 0.5%로 나타났으며, BHT는 각각 2.08 \pm 0.99%, 6.32 \pm 2.65%, 28.36 \pm 2.96%, 50.49 \pm 1.1%, 68.31 \pm 0.75%, 84.38 \pm 0.54%로 나타났다(Figure 4).

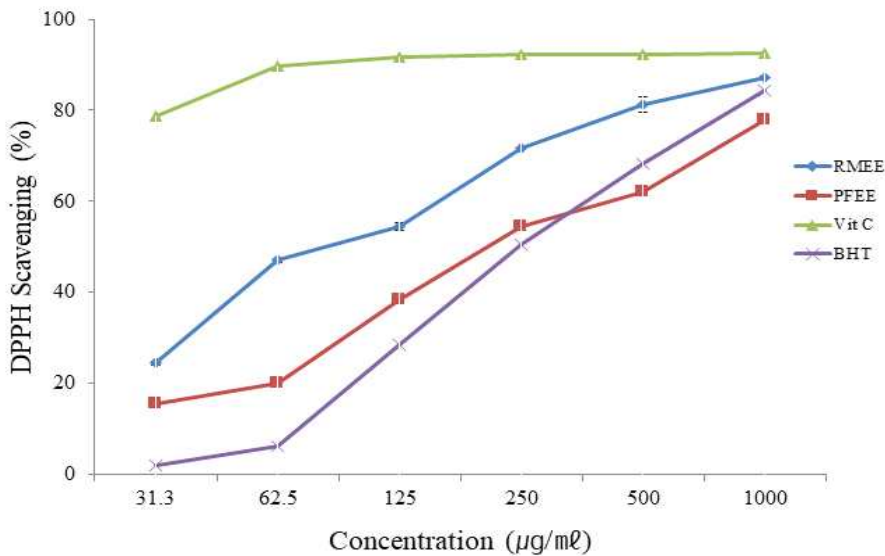


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of *Rosa multiflora* root ethanol extracts and *Perilla frutescens* ethanol extracts. RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

2) ABTS 라디칼 소거능

쥘레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 쥘레뿌리는 각각 $28.16 \pm 1.12\%$, $31.42 \pm 1.23\%$, $54.15 \pm 1.04\%$, $69.27 \pm 1.14\%$, $75.21 \pm 0.81\%$, $80.12 \pm 1.63\%$ 의 소거능을 나타냈다. 자소엽은 각각 $10.35 \pm 1.82\%$, $22.21 \pm 1.63\%$, $42.34 \pm 0.83\%$, $50.12 \pm 1.22\%$, $64.53 \pm 1.91\%$, $72.24 \pm 0.56\%$ 의 소거능을 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 비타민 C는 $60.07 \pm 1.2\%$, $71.21 \pm 0.16\%$, $79.43 \pm 0.1\%$, $89.32 \pm 0.11\%$, $93.21 \pm 0.15\%$, $94.24 \pm 0.5\%$ 로 나타났으며, BHT는 $20.71 \pm 0.99\%$, $32.31 \pm 2.65\%$, $52.52 \pm 2.96\%$, $65.49 \pm 1.1\%$, $70.13 \pm 0.75\%$, $74.15 \pm 0.54\%$ 로 각각 나타났다(Figure 5).

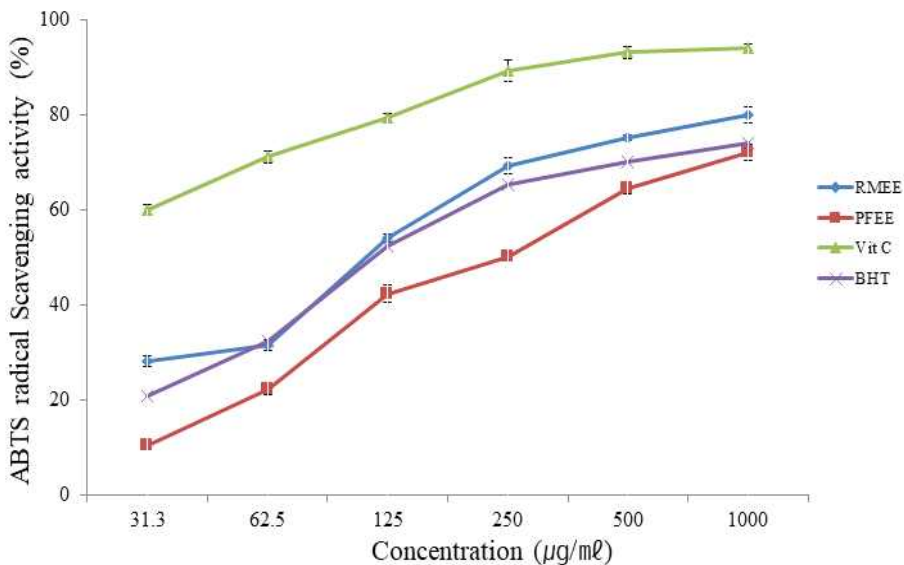


Figure 5. ABTS radical scavenging activity of *Rosa multiflora* root ethanol extracts and *Perilla frutescens* ethanol extracts. RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

3) SOD 유사활성

찔레뿌리와 자소엽 에탄올 추출물에 대한 SOD 유사활성을 측정한 결과는 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 찔레뿌리는 각각 $12.17 \pm 1.34\%$, $20.21 \pm 1.12\%$, $35.02 \pm 1.18\%$, $46.76 \pm 0.92\%$, $58.38 \pm 1.51\%$, $65.22 \pm 1.27\%$ 의 소거능이 확인되었다. 자소엽은 각각 $10.14 \pm 1.87\%$, $17.23 \pm 1.29\%$, $28.72 \pm 1.22\%$, $41.08 \pm 1.14\%$, $51.21 \pm 2.16\%$, $57.53 \pm 0.82\%$ 의 소거능을 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 비타민 C는 $62.81 \pm 1.44\%$, $65.54 \pm 1.42\%$, $68.21 \pm 0.16\%$, $72.29 \pm 0.81\%$, $82.13 \pm 0.71\%$, $87.15 \pm 0.15\%$ 로 나타났으며, BHT는 $9.04 \pm 2.08\%$, $15.27 \pm 1.19\%$, $28.72 \pm 1.45\%$, $43.28 \pm 1.14\%$, $62.21 \pm 2.52\%$, $70.29 \pm 0.72\%$ 로 각각 나타났다(Figure 6).

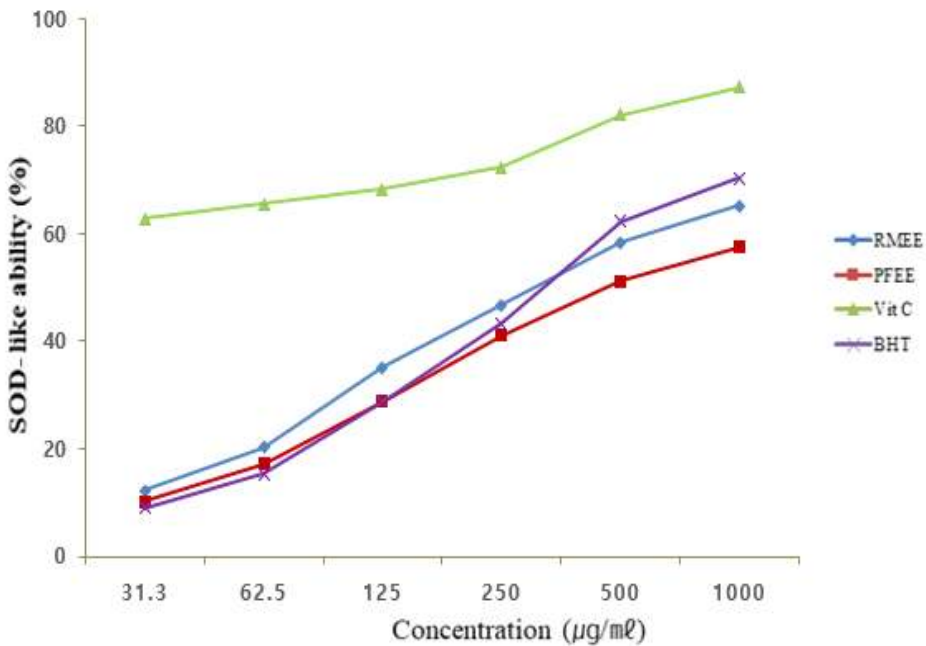


Figure 6. Superoxide anion radical scavenging ability of *Rosa multiflora* Root ethanol extracts and *Perilla frutescens* ethanol extracts. RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* etanolic extracts.

2. 아질산염 소거능

아질산염 소거능을 분석한 결과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 쯔레뿌리 추출물은 42.6 \pm 3.85%, 자소엽 추출물은 40.3 \pm 2.24%로 각각 나타났다. 양성대조군으로 사용한 비타민 씨는 90~93%로 나타났다(Figure 7).

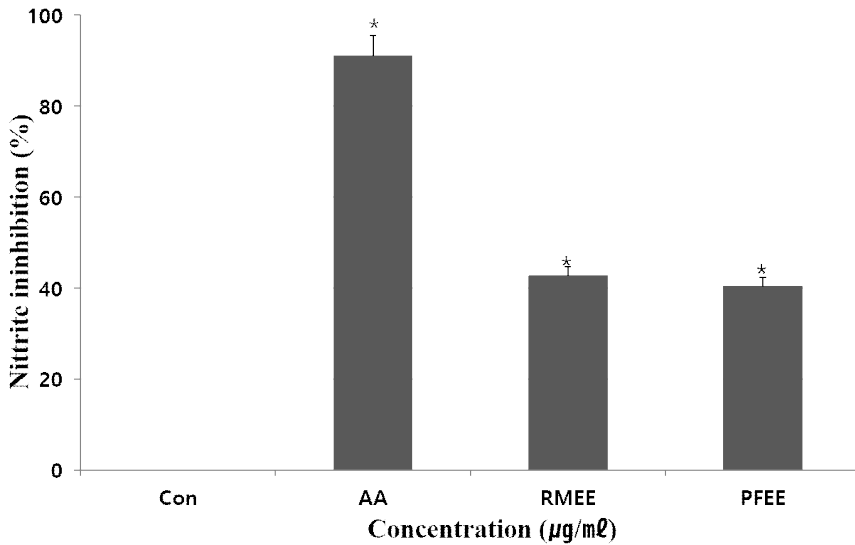


Figure 7. The nitrite-scavenging activity of *Rosa* root *multiflora* extracts and *Perilla frutescens* extracts. Con; negative control group, AA; positive control group, RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

3. 인간 모유두세포에 대한 독성 및 생육도(in vitro)

인간 모유두세포에 쨌레뿌리 추출물, 자소엽 추출물과 혼합물을 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1,000 μ g/ml의 농도별로 MTT assay를 통해 세포독성을 확인하였다. 쨌레뿌리, 자소엽 추출물, 쨌레뿌리와 자소엽 1:1 혼합물의 모든 처리 농도 범위에서 유의적인 독성은 관찰되지 않았다. 세포 생육도는 쨌레뿌리 추출물은 PBS를 처리한 대조군과 비교하여 10 μ g/ml 처리군에서 93.8 \pm 2.15%, 100 μ g/ml 처리군은 95.2 \pm 2.85%, 500 μ g/ml 처리군은 105.2 \pm 2.27%, 1,000 μ g/ml 처리군은 111.3 \pm 4.82%의 세포 생육도를 보였다. 자소엽 추출물은 10 μ g/ml 처리군에서 89.2 \pm 3.32%, 100 μ g/ml 처리군은 92.1 \pm 2.35%, 500 μ g/ml 처리군은 98.2 \pm 2.95%, 1,000 μ g/ml 처리군은 100.3 \pm 2.15%의 세포 생육도를 보였다. 혼합물 처리 시에는 대조군과 비교하여 10 μ g/ml 처리군에서 96.2 \pm 2.65%, 100 μ g/ml 처리군은 98.3 \pm 1.85%, 500 μ g/ml 처리군은 112.6 \pm 5.43%, 1,000 μ g/ml 처리군은 126.2 \pm 3.45%의 세포 생육도를 보였다(Figure 8).

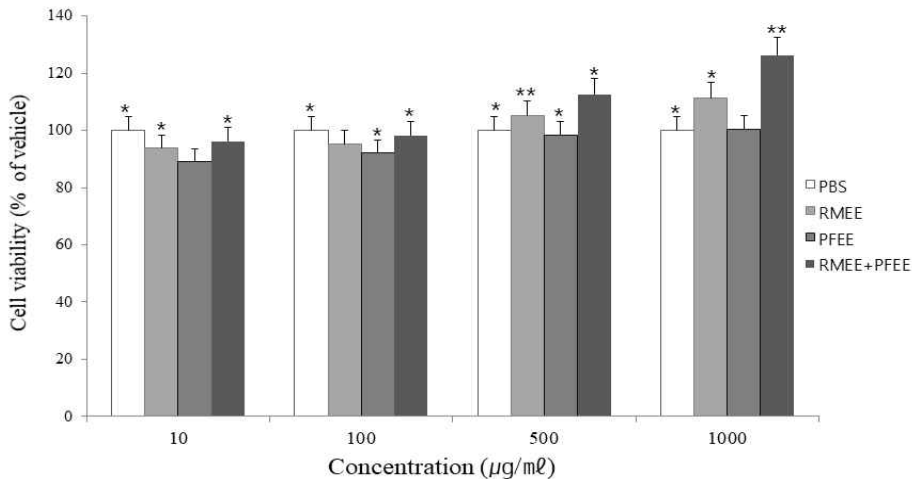


Figure 8. Effect of cytotoxicity from ethanol extracts from *Rosa multiflora* root extracts and *Perilla frutescens* extracts on the cell viability of Human follicle dermal papilla cells. Confluent cells (70-80%) were incubated with the extract for 48h and measured cell viability by MTT assay. RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

4. 마우스를 사용한 육모효능

1) 육안적 육모효능(in vivo)

쥘레뿌리, 자소엽 추출물과 혼합물, 그리고 양성대조군 미녹시딜을 20일 동안 C57BL/6 마우스 등 쪽에 도포한 후 피부 상태와 발모 상태의 육안적 관찰을 통한 육모 및 발모 효과를 이미지로 나타내었다(Figure 9). 육안적 관찰을 통한 결과는 혼합물 > 미녹시딜 > 쥘레뿌리 > 자소엽의 순서로 나타났다.

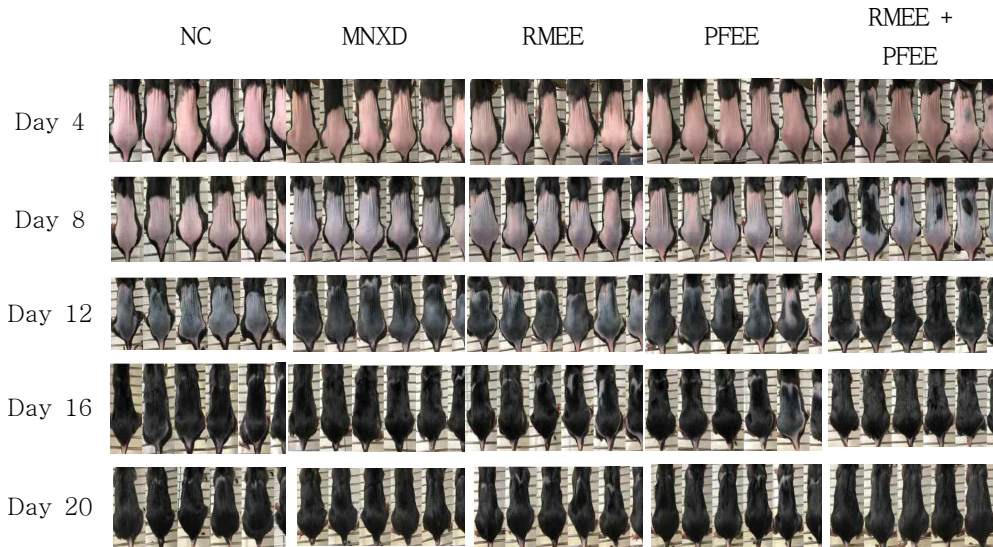


Figure 9. Visual test results for the effect of promoting hair growth in C57BL/6 mouse. Removed hair from a 7-week-old C57BL/6 mouse, and applied 3% of minoxidil (MNXD) and 3% of *Rosa multiflora* root ethanol extracts (RMEE), *Perilla frutescens* ethanol extracts (PFEE) and *Rosa multiflora* root ethanol extracts + *Perilla frutescens* ethanol extracts mixture (RMEE + PFEE) to dorsal skin for 4, 8, 12, 16, 20 days to conduct a visual examination on the hair growth efficacy.

2) Image J를 사용한 육모효능 분석

쥘레뿌리, 자소엽 추출물과 혼합물, 그리고 양성대조군 미녹시딜을 20일 동안 C57BL/6 마우스 등 쪽에 도포한 후 각 시료의 육모 및 발모 효과를 관찰한 마우

스의 등 쪽 피부 촬영 사진을 mage J를 사용하여 육모효능을 화상검사 하였다. 선홍색이던 마우스의 등 쪽 피부 촬영 사진이 시일이 경과 할수록 발모로 인해 흑색으로 변화면서 점점 짙어지는 것을 확인할 수 있다(Figure 10).

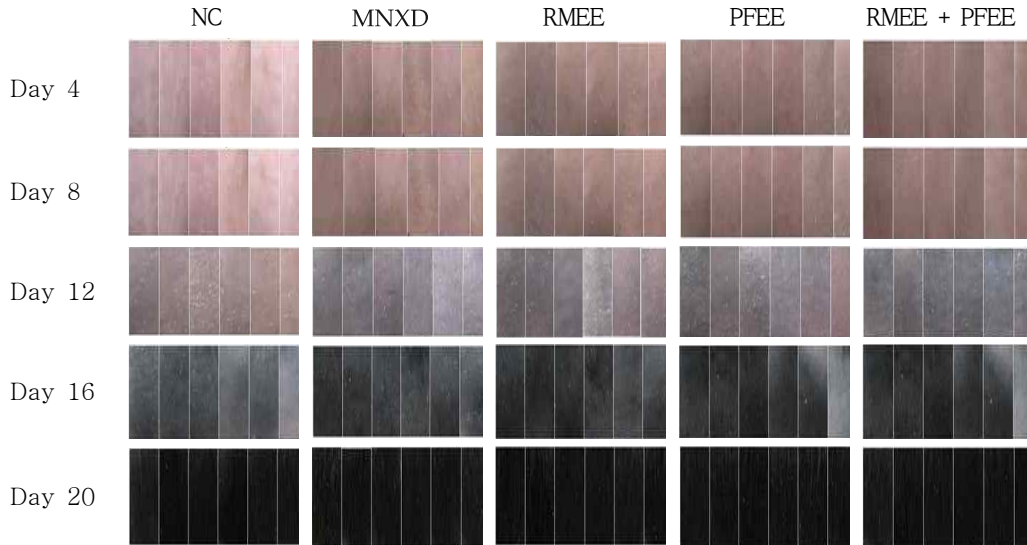


Figure 10. Results of visual analysis of hexafecimal effect using Image J
Results of image analysis of mouse' dorsal skin photographs after applying to the back of C57BL/6 mouse and observing the hair growth and hair growth effects of each sample using Image. NC; negative control, MNXD; 3% minoxidil, RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

명도분석 프로그램을 통해 화상분석 결과는 아래와 같다(Table 2).

Table 2. Image test results for hair growth efficacy for 20 days using Image J

그룹	Day 4	Day 8	Day 12	Day 16	Day 20
NC	16.07±1.7	28.73±1.6	45.12±5.3	74.06±3.8	82.21±1.8
MNXD	22.39±1.4*	36.03±0.8**	60.26±3.4*	84.51±1.7*	86.43±1.6*
RMEE	24.29±1.2**	35.12±2.3*	58.86±3.6	84.71±1.8*	84.22±1.2
PFEE	26.16±1.4**	32.44±2.9	55.63±7.2	79.84±2.5	79.94±2.2
RMEE + PFEE	23.68±1.4*	41.81±2.9**	62.21±1.7*	86.01±1.2*	89.98±1.1**

NC; negative control, MNXD; 3% minoxidil, RMEE; *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; *Perilla frutescens* ethanol extracts.

육모 효능을 분석한 결과 시료 도포 4일째에 모든 시료 처리군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가된 육모효능을 나타내었으며, 도포 20일째에는 혼합물군에서 $89.98 \pm 1.1\%$ ($p < 0.005$)으로 대조군 대비 유의성 있게 증가된 육모효능을 나타내었다. 양성대조군인 미녹시딜 $86.43 \pm 1.6\%$, 쥘레뿌리 추출물 $84.22 \pm 1.2\%$, 자소엽 추출물 $79.94 \pm 2.2\%$ 의 순서로 육모효능이 높게 나타났다(Figure 11).

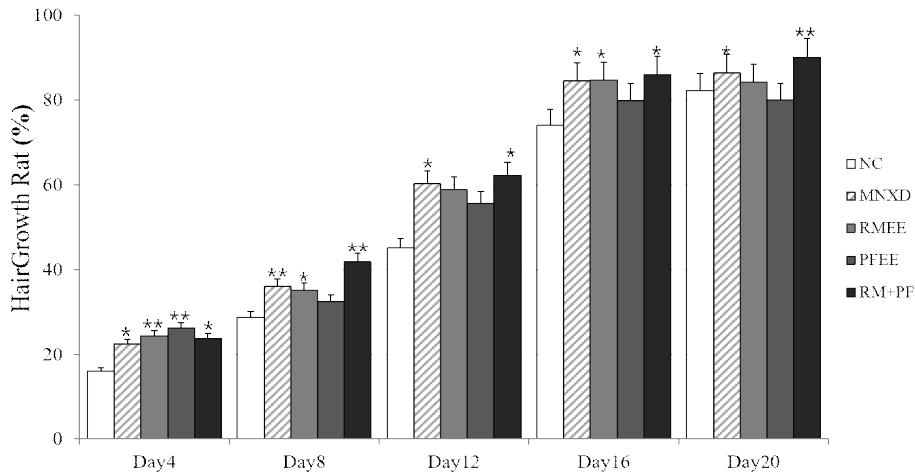


Figure 11. Analysis results of hair growth efficacy for 20 days using Image J. NC; negative control, MNXD; 3% minoxidil, RMEE; 3% *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; 3% *Perilla frutescens* ethanol extracts.

5. Antibody array를 이용한 발모관련 단백질 증감

단백질의 발현이 증감된 단백질을 중심으로 변화를 관찰한 결과에서 쥘레뿌리는 모발의 성장을 촉진하는 단백질의 발현도가 증가되었으며, 퇴행기를 촉진하는 단백질의 발현도는 감소하였다. 자소엽은 모발의 성장을 촉진하는 단백질의 발현도는 쥘레뿌리에 비교하여 낮게 나타났으나, 퇴행기를 촉진하는 단백질의 발현도는 쥘레뿌리 보다 많은 감소가 나타났다. 혼합물의 경우는 모발의 성장을 촉진하는 단백질의 발현도 증가와 퇴행기를 촉진하는 단백질의 발현도 감소가 높게 나타났고, 양성대조군인 미녹시딜 보다 높게 나타났다.

1) 모발 성장기를 촉진하는 단백질의 발현도

모발의 성장기를 촉진하는 β -Catenin, FGF, HGF, IGF, PDGF, Shh-N, VEGF 관련 단백질들에 대하여 분석을 실시한 결과 쥘레뿌리 추출물은 양성대조군인 미녹시딜과 비슷한 수준의 발현 효과가 나타났으나, 자소엽 추출물에서는 양성대조미녹시딜 보다 낮게 나타났다. 혼합물 투여군에서는 양성대조군보다 높은 단백질 발현 증가 효과가 나타났다(Table 3).

Table 3. Expression of proteins that promote growth

Probe name	MNXD/C	RMEE/C	PFEE/C	RMEE+PFEE/C
β -Catenin	1.021	0.928	0.947	1.214
FGF R3	1.237	1.044	0.977	1.230
FGF R4	1.087	0.978	0.945	0.957
FGF R5 β	1.112	1.051	1.001	1.291
FGF-21	1.132	0.963	0.954	0.973
HGF R	1.059	0.949	1.020	1.214
HGF	1.225	0.970	0.968	1.252
IGF-I	1.095	1.037	0.930	1.301
IGF-II	1.166	1.060	0.849	1.207
PDGF-C	1.029	1.107	0.985	1.169
PDGF R α	0.996	1.138	0.998	1.435
PDGF R β	1.034	1.138	1.173	1.320
Shh-N	0.957	1.154	0.920	1.248
VEGF	1.099	1.267	1.010	1.232
VEGF R1	1.083	1.006	0.935	1.284
VEGF R2	1.041	1.083	0.969	1.305
VEGF R3	1.001	1.059	1.014	1.313
VEGF-B	0.961	1.002	0.883	1.370
VEGFC	1.124	0.947	0.792	1.236
VEGF-D	1.056	1.182	1.348	1.460

RMEE; 3% *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; 3% *Perilla frutescens* ethanol extracts, MNXD; 3% minoxidil.

2) 모발 퇴행기를 촉진하는 단백질의 발현도

모발의 퇴행기를 촉진하는 EGF, IL-1, IL-6, TACI, TGF 관련 단백질들에 대하여 분석을 실시한 결과, 쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물 모두에서 양성대조군인 미녹시딜과 비교하여 발현이 감소되었음을 알 수 있었다.

또한 혼합물 투여군에서는 대조군인 미녹시딜 보다 높은 단백질 발현 감소 효과가 나타났다(Table 4).

Table 4. Expression of protein that promotes degenerative phase

Probe name	MNXD/C	RMEE/C	PFEE/C	RMEE+ PFEE/C
EGF R	1.051	0.940	0.903	0.824
IL-1 R α	1.341	0.939	0.838	0.924
IL-1 R β	1.186	1.086	1.000	0.824
IL-1 RI	1.324	0.999	0.969	0.916
IL-1 RII	1.227	1.041	1.044	0.984
IL-6	1.187	1.062	0.930	1.011
IL-6 R	1.257	1.107	1.019	1.039
TACI	1.196	1.140	0.973	0.986
TGF- β 1	1.094	1.112	1.030	0.956
TGF- β 2	1.007	1.152	1.543	0.924
TGF- β 3	1.123	1.265	1.087	0.933
TGF- β RI	1.053	1.138	1.029	0.824
TGF- β RII	1.153	0.903	0.818	0.887

RMEE; 3% *Rosa multiflora* root ethanol extracts, PFEE; 3% *Perilla frutescens* ethanol extracts, MNXD; 3% minoxidil.

IV. 고찰

활성 산소는 외부환경 및 대사과정에서 끊임없이 생성되며 강한 반응성을 가지고 있어 DNA, 단백질, 지질과 반응하여 변성을 야기하게 된다. 노화의 진행에 의해 활성 산소의 생성량은 늘어나고, 활성 산소 제거 효소의 기능은 저하가 되는 불균형으로 발생하는 세포의 산화적 스트레스가 각종 질환의 원인으로 알려져 있다[27]. 특히 산화적 스트레스에 의해 지질이 산화되어 모낭의 혈류를 감소시켜 모낭세포의 사멸을 유도하여 탈모 발생의 원인으로 작용한다[28]. 안정한 상태의 산소는 공해물질, 화학약품, 광화학 반응, 환원대사 등 환경과 생화학적인 요인에 의해 과산화수소와 하이드록시 라디칼 같은 활성산소로 전환되어 세포의 사멸 유도한다[29]. 이들은 과산화물과 지질의 생산을 도와 세포막을 손상시키고 세포의 항산화 능력을 감소시켜 인체에 나쁜 영향을 미친다[30]. 이러한 활성 산소의 생성을 억제하는 항산화 활성은 탈모 예방과 모발의 성장에 매우 중요하게 작용한다. 본 연구에서는 쥘레뿌리 에탄올 추출물과 자소엽 에탄올 추출물이 활성 산소에 미치는 영향을 DPPH 라디칼 소거능 측정과 ABTS 라디칼 소거능 측정, SOD 유사활성 측정을 통하여 확인 하였다. DPPH를 이용하여 각 추출물의 라디칼 소거활성을 측정한 결과 1,000 μ g/ml 농도에서 쥘레뿌리 추출물은 87.64%, 자소엽 추출물은 78.0%의 라디칼 소거능을 나타내었다. 이는 비타민 씨의 92.5%와 BHT의 84.38%와 비슷 하거나 다소 낮은 수준이지만 매우 높은 소거능을 보였다. 보다 자세한 항산화 활성을 확인을 위하여 ABTS를 이용한 라디칼 소거활성을 측정한 결과 쥘레뿌리와 자소엽 추출물의 1,000 μ g/ml 농도에서 각각 80.12%, 72.24%로 나타났다. 이는 비타민 씨의 94.24%와 BHT의 74.15%와 비교하였을 때 높은 수준으로 나타났다. SOD 유사활성을 측정한 결과 쥘레뿌리와 자소엽 추출물의 1,000 μ g/ml 농도에서 각각 65.22%, 57.53%로 나타났다. 이는 비타민 씨의 87.15%와 BHT의 70.29% 보다는 낮은 수준이지만 SOD 유사활성이 우수한 것으로 나타났다. 이는 쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물에 대해 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거활성능 측정, SOD 유사활성 측정 등을 이용하여 항산화능에 관한 선행연구 등과 유사한 결과이다[12, 31-34].

아질산염(nitrite)은 생체 내에서 산화질소합성효소(NO synthase)의 촉매작용을

통해 엘-아르기닌(L-arginine)에 의해 변환된 반응성이 강한 자유라디칼로, 아질산염은 2차 아민과 반응하여 발암성물질로 알려진 니트로사민(nitrosamines)을 생성한다[35]. 정상적인 농도의 산화질소(NO)는 면역계와 신경계 및 심혈관계의 전달물질로서 감염성 병원체에 대한 억제와 종양을 억제하는 등 다양한 기능을 한다[36]. 그러나 과도한 산화질소는 독성을 가지는 라디칼로 작용하여 세포 손상과 염증반응 및 퇴행성 질환에 주요한 요인으로 작용한다고 보고되고 있다[37]. 따라서 인체에 유해한 물질인 아질산염을 제거하여 니트로사민의 생성 억제에 관여하는 항염증 소거활성을 가지는 소재의 검토는 필수적으로 수행되어진다[38]. 본 연구에서 아질산염 소거능을 분석한 결과 1,000 μ g/ml의 농도에서 쥘레뿌리 추출물은 42.6, 자소엽 추출물은 40.3%의 아질산염 소거능이 각각 나타났다. 이는 쥘레뿌리와 자소엽 추출물의 아질산염 소거능을 분석한 선행연구에서도 항염증 활성이 있음을 알 수 있었다[31, 33, 39].

사람의 모낭의 가장 하단부에 위치하는 모유두는 여러 조절 인자의 도움을 받아 모발의 발생과 모발의 생성주기를 조절함으로써 발모와 탈모에 관여 하는 것으로 알려져 있다[40]. 본 연구에서 인간 모유두세포에 쥘레뿌리 추출물, 자소엽 추출물과 혼합물의 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 그리고 1,000 μ g/ml의 농도에서 MTT assay를 통해 세포에 대한 독성을 확인한 결과 독성은 세포의 생존율이 80% 이하이면 독성이 있다고 보는데, 모든 군에서 처리 농도 범위에서 독성이 관찰되지 않았으며, 세포생존율이 농도 의존적으로 농도가 증가하는 것으로 확인하였으며, 1,000 μ g/ml에서 쥘레뿌리 추출물은 대조군 대비 111.3%, 자소엽 추출물 100.3%, 쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물을 1:1 혼합물은 126.2%의 세포 생육도를 보였다. 이는 선행연구에서도 유사한 결과를 보였다[31-33, 41].

육모 효능을 평가하기 위한 방법으로는 일반적으로 C57BL/6 마우스 모델을 이용하여 측정하는 방법이 널리 이용되고 있다[42]. C57BL/6 마우스의 특징으로 생후 45-49일이 지나면 마우스의 모낭이 2번째 휴지기를 거치는데 이 기간에는 마우스 개체별로 동일한 모낭 주기를 가지고 있어 모낭 주기를 조절하는 물질의 효과를 측정할 수 있다[43]. 또한, 성장기에 진피유두세포의 증식 이외에도, 진피유두상부에 존재하는 멜라닌 색소의 활성화가 동시에 일어나는 까닭에 등 피부색이 검으나, 휴지기로 진입하면 분홍색을 띠는 특성이 있어 육안적으로 성장

기와 퇴화기를 쉽게 구분할 수 있는 장점이 있다. 암컷은 수컷보다 휴지기가 긴 특성을 갖고 있으며 일반적인 표준화 모델의 C57BL/6 마우스의 발모 효능이 나타나는 색소침착과 털의 성장 변화를 가장 잘 관찰할 수 있는 발모주기가 휴지기인 7주령의 마우스를 실험동물로 많이 사용한다. 본 연구에서 제모한 C57BL/6 마우스의 등에 양성 대조군인 미녹시딜과 쥘레뿌리 추출물, 자소엽 추출물, 혼합물을 각각 20일간 도포하고 육모도를 Image J를 이용하여 화상 분석한 결과 쥘레나무 추출물 $84.22 \pm 1.2\%$, 자소엽 추출물 $79.94 \pm 2.2\%$ 로 나타나 양성대조군인 미녹시딜 $86.43 \pm 1.6\%$ 보다는 낮은 수준이지만 육모 효능이 우수한 것으로 나타났다. 혼합물의 경우 $89.98 \pm 1.1\%$ ($p < 0.005$)로 양성대조군인 미녹시딜보다 높은 육모 효과를 나타내었다. 이는 김중학 등의 연구에서 쥘레뿌리 추출물의 발모효과 실험에서도 쥘레뿌리 추출물의 발모 효과를 확인할 수 있었다[11].

모유두(papilla) 세포는 간엽계에서 유래된 세포로 주위의 상피세포의 분열을 조절하는 능력이 있는데, 이는 성장인자에 의해 조절된다고 보고되었다. 모발성장인자로는 간세포성장인자(HGF), 인슐린유사성장인자 1(IGF1), 섬유아세포성장인자 1(FGF1), 혈관내피성장인자(VEGF), 각질형성세포성장인자(KGF) 등이 알려져 있다[44]. Yano K 등은 모낭의 성장과정에서 혈관생성에 관여하는 중요한 인자로 VEGF가 대두되었고, VEGF가 여러 동물실험에서 모낭주위의 미세혈관을 생성시켜 탈모 후 자라나는 모발의 성장속도를 촉진시키고 크기를 증가시킨다는 것을 보고 하였다[45]. 또한 KGF / FGF7는 섬유아세포 성장인자로서 모발 성장을 자극하여 성장기를 유도하고 상처 회복하는 과정에서 피부조직의 분열과 표피화를 촉진시키는 각질세포 형성인자로 알려져 있으며[46], 전환성장인자-베타 1(TGF- β 1)과 안드로젠 수용체(androgen receptor)는 모발 성장에 있어 모낭의 수와 크기를 감소시키는 네거티브 조절자로 모발이 퇴행기로 전환할 때 그 분비가 촉진되어 상피세포의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도, 정상보다 빠른 퇴행기를 유도하여 탈모를 촉진하는 것으로 알려져 있다[47]. 본 연구에서 모발의 성장기를 촉진하는 β -Catenin, FGF, HGF, IGF, PDGF, Shh-N, VEGF 관련 단백질과 퇴행기를 촉진하는 EGF, IL-1, ILL-6, TACI, TGF 관련 단백질들의 발현에 관해서 Antibody array를 통하여 분석을 실시한 결과 쥘레뿌리 추출물은 성장기를 촉진하는 단백질의 발현도가 대조군 대비 증가되었음이 관찰 되었는데 이는

양성대조군인 3% 미녹시딜과 비슷한 수준으로 쥘레뿌리의 육모 효과가 높다는 것을 나타내는 것이다. 자소엽의 경우에도 단백질의 발현도가 대조군 대비 증가되었음이 관찰 되었으나 양성대조군인 3% 미녹시딜과 비교하여 낮은 수준이었다. 반면 혼합물의 경우 성장기를 촉진하는 단백질 발현도가 많은 증가가 관찰되었는데 양성대조군인 3% 미녹시딜과 비교하여 매우 높은 수준으로 우수한 육모 효능이 관찰되었다. 퇴행기를 촉진하는 EGF, IL-1, IL-6, TACI, TGF 관련 단백질들의 발현에 대하여 분석을 실시한 결과 쥘레뿌리와 자소엽 모두에서 대조군 대비 발현이 감소되었는데 3% 미녹시딜 양성대조군인 미녹시딜과 비교하였을 때 발현이 현저히 감소되었음을 알 수 있었다. 자소엽의 경우 쥘레뿌리보다 감소 효과가 높게 나타났으며, 특히 혼합물 투여군에서는 대조군과 양성대조군인 3% 미녹시딜 보다 매우 높은 단백질 발현 감소 효과가 나타나 탈모 방지 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. Hwang 등은 연구에서 HFDPC에 쥘레뿌리 추출물을 100 μ g/mL의 농도에서 모발성장인자 단백질인 EGF, HGF, IGF1, PDGFB, VEGF, KGF의 발현 정도에 미치는 영향을 측정된 결과 쥘레뿌리 추출물 에서 발현촉진 효과가 있음을 확인하였다[31]. Su HY 등은 마우스를 이용한 실험을 통해 피부에 IGF-1을 과 발현시킨 실험군에서 모낭의 발달이 빨라졌고, IGF-1은 생존인자(survival factor)로써 세포사멸을 방지하는 효과가 있다는 것을 확인하였다[48].

본 연구에서 쥘레뿌리 추출물과 자소엽 추출물은 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능과 SOD 유사활성능이 우수하며 아질산염 소거능이 높은 것으로 나타나 항산화 활성과 항염증 활성이 우수함을 입증 하였다. 또한 쥘레뿌리 추출물, 자소엽 추출물과 혼합물의 모유두세포에 대한 독성이 나타나지 않고 세포 증식 효과가 높았다. 마우스를 사용한 육안적 육모효능 평가와 mage J를 사용한 육모효능 평가에서 쥘레뿌리, 자소엽 추출물 모두에서 우수한 육모효과가 관찰되었으며, 특히 혼합물은 대조군 대비하여 유의성 있게 증가된 높은 육모효능을 나타내었다. Antibody array를 이용한 발모를 촉진하는 단백질 발현효과 분석에서 쥘레뿌리 추출물과 혼합물에서 우수한 발현효과가 나타났으며, 발모를 억제시키는 단백질의 발현 감소 효과는 자소엽 추출물과 혼합물에서 높게 나타나 쥘레뿌리와 자소엽, 혼합추출물을 활용한 육모제 개발 가능성을 확인 하였다.

V. 결론

본 연구는 찹쌀떡과 자소엽 추출물의 항산화, 항염 활성 실험을 통하여 발모제 소재로의 활용 가능성을 연구하였고, 찹쌀떡과 자소엽 추출물 및 혼합물(찹쌀떡+자소엽)의 독성 및 생육도 평가와 육모효능평가와 발모관련 단백질의 증감 분석을 통해 발모촉진 및 탈모 예방제품의 소재로의 활용 가능성을 검토 하였다.

연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 찹쌀떡과 자소엽 추출물은 항산화 효과와 항염효과가 높게 나타났다.
2. 모든 추출물에서 인간모유두 세포에 대한 독성은 관찰되지 않았고, 혼합물에서 세포 증식효과가 높았다.
3. 육모 효능은 혼합물 > 미녹시딜 > 찹쌀떡 > 자소엽의 순서로 나타났다.
4. 찹쌀떡 추출물은 발모 촉진 단백질의 발현 효과가 높았고, 자소엽 추출물은 발모를 억제하는 단백질의 억제 효과가 높았다. 특히, 찹쌀떡 추출물의 발모촉진 효과와 자소엽 추출물의 탈모억제 효과가 혼합물에서 상호작용을 통해 각각의 효과보다 그 이상의 상승작용으로 효과가 매우 높았다.

연구결과 찹쌀떡과 자소엽 추출물은 천연 항산화 활성 소재로 충분한 효과를 보였다. 특히 혼합물에서 가장 높은 육모 효과 및 탈모억제 효과를 확인하였다.

참고문헌

- [1] Koca R, Armutcu F, Altinyazar H, Gurel A. Evaluation of lipid peroxidation, oxidant/antioxidant status and serum nitric oxide levels in alopecia areata. *Medical Science Monitor*. 11: 296-299, 2005.
- [2] Akar A, Arca E, Erbil H, Akay C, Sayal A, Gur AR. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the scalp of patients with alopecia areata. *Journal of Dermatological Science*. 29: 85-90, 2002.
- [3] Rushton DH, Norris MJ, Dover R, Busuttill N. Causes of hair loss and the developments in hair rejuvenation. *International Journal of Cosmetic Science*. 24: 17-23, 2002.
- [4] Choi GS. Hair characteristics and androgenetic alopecia in Koreans. *Journal of the Korean Medical Association*. 56: 45-54, 2013.
- [5] Min MJ, Choi MH, Shin HJ. Hair-growth Effect of ZnSO₄ and ZnCl₂ Solution in C57BL/6 Mice Model. *Korean journal of aesthetics and cosmetics society*. 13(4): 551-557, 2015.
- [6] Avram MR, Cole JP, Chase C, Gandelman M, Haber R, Knudsen R, Leavitt ML, Leonard RT, Puig CJ, Rose PT, Vogel JE, Zieringl CL, Fitzpatrick RE. The Potential role of Minoxidil in the Hair Transplantation Setting. *Dermatol, Surg*. 28: 894-900. 2002
- [7] Hagemann T, Schlütter-Böhmer B, Allam JP, Bieber T, Novak N. Positive lymphocyte transformation test in a patient with allergic contact dermatitis of the scalp after shortterm use of topical minoxidil solution. *Contact Dermatitis*. 53: 53-55, 2005.
- [8] Lee JH. Alternative Therapy of Scalp and Hair loss Care. *Journal of Cosmetics and Public Health*, 5(1): 19-23, 2009.
- [9] Shin ES. A Study on the Effect Five Herbal Extracts on the Hair Growth. *J. Beauty & Trichol.*, 2: 91-100, 2006.
- [10] Kim YJ, Chung HC, Chung HT, Choi KY, Yun YG, Jang SI. Hair growth promoting effect of *Thuja orientalis* ethanol extracts on hair loss-induced DBA1J mice. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, 18:

1471-1475, 2004

- [11] Kim JH, Hong SK, Hwang SJ, Son SW, Choi YS. The preclinical and clinical effects of herbal product containing *Rosa multiflora* roots extracts as a main component on the hair growth promotion. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 20: 108-116, 2012.
- [12] Park GH, Lee, JY, Kim DH, Cho YJ, An BJ. Anti-oxidant and antiinflammatory effects *Rosa multiflora* root. *J. of Life Sci.* 21: 1120-1126, 2011.
- [13] Park KH, Choi SE, Choi YW, Lee DI, Joo SS, Jeong MS, Bang H, Lee CS, Lee MK, Seo SJ, Lee MW. Topical application of two condensed tannins from the root of *Rosa multiflora* Thunberg for the treatment of atopic dermatitis (AD) in NC/Nga mice. *Phytotherapy Research.* 25: 1564-1569. 2011.
- [14] Cho, YJ. Antioxidant and antimicrobial activity of *Rosa multiflora* Thunberg fruits extracts. *Current Research on Agriculture and Life Sciences* 31: 170-176, 2013.
- [15] Han JT. Development of functional material using the root of *Rosa multiflora*. *Food Industry and Nutrition.* 11: 59-65, 2006.
- [16] Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kwoen DJ, Choi UK. Antioxidant Activities fo Extract with Water and Ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo Leaf. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 50(4): 327-333, 2007.
- [17] Son HU, Heo JC, Seo MS, Lee SH. Effects of *Perilla frutescens* L. on anti-oxidant and anti-inflammation activity. *Korean J. Food Preserv.*, 17(5): 757-761, 2010.
- [18] Seo IY, Kim HS, Jang KS, Yeo MH, Kim HR, Jang BK, Chang KS. Comparison of anti-oxidative activities of *Perilla frutescens* extracts by extraction methods. *Journal of Oil & Applied Science.* 35: 12-19, 2018.
- [19] Gok SY, Yu SA, Lee SY. Effect of *Perillae Folium* Extract on regulation of Type 1 allergic response in RBL-2H3 Cells. *J. Korean Oriental Pediatrics.* 26: 36-45, 2012.
- [20] You JS, Kim SY, Kim SH. Antiallergic and Anti-inflammatory Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Kor. J. Pharmacogn.* 43(2): 163-166, 2012.
- [21] Kim BY, Jeong JS, Kwon HJ, Lee JH, Hong SP. Determination of Rosmarinic

Acid and Caffeic Acid from *Perilla frutescens* var. japonica and var. acuta by Reversed-Phase HPLC. *Kor. J. Herbology*. 23(3), pp. 67-72, 2008

- [22] Kim HS, Hong MJ, Kang IY, Jung JY, Kim HK, Shin YS, Jun H J, Suh JK, kang YH. Radical Scavenging Activities and Antioxidant Constituents of Oriental Melon Extract. *Journal of Bio-Environment Control*. 18: 442-447, 2009.
- [23] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol, Med*, 26: 1231, 1999.
- [24] Marklund, S, G. Marklund. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*. 47: 468-474, 1975.
- [25] Gray J.I, Dugan L.R., Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.*, 40(5): 981-984, 1975.
- [26] Mosmann T. Rapid colormetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods*, 65: 55-63, 1983.
- [27] Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med*. 227(9): 671-82. 2002.
- [28] Trüeb RM. The impact of oxidative stress on hair. *Int J Cosmet Sci*. 37, 2: 25-30. 2015.
- [29] Pratt DE, Huang MT, Ho ST, Lee CY. In Phenolic compound in food and their effects on health(II). *Antioxidants and Cancer Prevention*: 54-71, Washington DC. 1992.
- [30] S. Tobwala, W. Fan, C. J. Hines, W. R. Folk, N. Ercal. Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures. *BMC Complement Altern Med*. 14; 1-10, 2012.
- [31] Hwang HS, Hwang, TH. Pyo AJ, Ju E H. Anti-oxidant efficacy and effects on expression of growth factors in human hair follicle dermal papilla cells of *Rosa multiflora* root extracts. *Asian J. Beauty Cosmetol*. 15: 146-158, 2017.

- [32] Lee KE, Lee ES, Kang SG. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of the Extract Mixtures of *Perilla frutescens*, *Houttuynia cordata* and *Camellia sinensis*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 41(2): 173-18, 2015.
- [33] Park DY, Lee KY. Evaluation of the cosmeceutical activity of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, 18(3): 513-517, 2017.
- [34] An BJ, Lee JT. Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*. *Korean J. Herbology* 17: 29-38, 2002.
- [35] Park YB, Lee TG, Kim OK, Do JR, Yeo SG, Park YH, Kim SB. Characteristics of nitrite scavenger derived from seeds of *Cassia tora* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 124-128. 1995.
- [36] Im DY, Lee KI. Nitric Oxide Production Inhibitory Effect and Antibacterial Activity of the Extract and Fractions from *Paeoniae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* 43(2): 173-178, 2012.
- [37] Chung HT, Pae HO, Choi BM, T. R. Billiar, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(5): 1075-1079, 2001.
- [38] Kang TB, Yoon TJ. Effect of herbal composition on alcohol degradation and anti-inflammatory activity in mice. *Korean J. Food & Nutr.* 24(4): 489-495, 2011.
- [39] Yu SY, Lee YJ, Song HS, Hong HD, Lim JH, Choi HS, Lee BY, Kang SN, Lee OH. Antioxidant Effects and Nitrite Scavenging Ability of Extract from *Acanthopanax cortex* Shoot. *Korean J. Food & Nutr.*, 25(4): 793-799, 2012.
- [40] Oh TH, Lee EY, Lee WS. Effects of substance P on the expression of various factors to control hair growth in human hair follicle culture. *Korean Journal of Dermatology.* 42: 1543-1551, 2004.
- [41] Kim HJ, Kang L, Ahm JY, Han JS, Kim SU, Lee KW, Kim MH. The red-ginseng extract alters the cell cycle and viability in the human neuronal stem cells. *Journal of Ginseng Research.* 28: 39-44. 2004.
- [42] Hue JJ, Li L, Lyu SH, Baek IJ, Yon JM, Nam SY. Effect of Hwangggungung, a natural product, on hair growth promotion in C57BL6 mice. *Yakhak Hoeji* 49:

518-526, 2005.

- [43] Park WS, Sung DS, Kim DK, Cho WH, Lee HK, Lee CH, Park SK, Sim YC. The effect of hair essence containing five herval extracts on hair growth and the prevention of alopecia in vitro and in vivo. *J. Korean Oriental Med.* 25: 152-160, 2004.
- [44] Kim KJ, Park KH, Lee IC, Kim BH. Antioxidant Ability and Hair Growth Efectof Samhwang-Sasimtang in C57BL/6 Model. *koreann J. Oriental Physiology & Pathology.* 28(2): 154~161, 2014.
- [45] Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest,* 107: 409-417, 2001.
- [46] Tsuboi R, Sato C, Kurita Y, Ron D, Rubin JS, Ogawa H. Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 101: 49-53, 1993.
- [47] Hsu CL, Liu JS, Lin AC, Yang CH, Chung WH, Wu WG. Minoxidil may suppress androgen receptor-related functions. *Oncotarget,* 5: 2187-2197. 2014.
- [48] Su HY, Hickford GH, Bickerstaffe R, Palmer BR. Insulin-like growth factor1 and hair growth, *Dermatol Online J.,* 5(2): 1, 1999.