

원저

5종의 한약 추출물이 함유된 헤어 에센스제품(HHRHG0202-80)이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 육모 및 탈모 방지에 미치는 효과

박원석, 성대석, 김대권, 조원희, 이해광, 이창훈, 박성규¹⁾, 심영철

태평양기술연구원, 경희대학교 한의과대학 방제학교실¹⁾

The Effect of Hair Essence (HHRHG0202-80) Containing Five Herbal Extracts on Hair Growth and the Prevention of Alopecia *in vitro* & *vivo*

Won-seok Park, Dae-Seok Sung, Dae-kwon Kim, Won-Hee Cho, Hae-Kwang Lee,
Chang-Hoon Lee, Seong Kyu Park¹⁾, Young-Chul Sim

AmorePacific R&D Center, Yongin-si, Kyunggi-do, Korea

¹⁾Dept of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Backgrounds : Androgenetic alopecia is a relatively common disorder, but its precise mechanism is not elucidated. There are two commercial drugs approved by FDA. One(finasteride) has an inhibition activity of 5 α -reductase(type 2) and the other(minoxidil) has a vasodilation activity.

Objectives : A verified herbal remedy for baldness is needed for medicinal treatment or preventing alopecia, which could be demonstrated by alopecia-related *in vitro* & *in vivo* tests

Methods : On the basis of oriental pharmacognosy, we classified many herbal medicines into four groups (malnutrition, aging, alopecia and gray hair) according to its effect. The mitosis induction of hairy dermal papillae cell and the metabolic inhibition for type 2 5 α -reductase were tested with five herbal extracts. Also, five herbal extracts were added to the normal essence formulation (HHRHG0202-80) in ranges of 0.1~0.3%, which was applied two-mouse models to validate each hair growing activity *in vivo*.

Results : Stimulation of follicular papillae cell proliferation was observed in treatment of three herbal extracts (*Glycyrrhizae radix*: 159.7%, *Corni fructus*: 144.7%, and *Coicis semen*: 136.6%) at a dose of 10 μ g/ml. Three herbal extracts (*Biotae semen*, *Glycyrrhizae radix* and *Coicis semen*) showed inhibitory activity for 5 α -reductase(type 2) at 93.18%, 73.36% and 47.6%, respectively at the same dose. We observed the enhancement of hair growth activity in C57bl/6 mouse and the inhibition of alopecia in AGA mouse after topical administration of the hair essence.

Conclusions : Hair essence product, which contains five medicinal plants, would be used for the remedy for male pattern baldness (MPB) and the other alopecia diseases.

Key Words: Androgenetic alopecia, Hair growth, 5 α -Reductase, Herbal extract

· 접수 : 2003년 11월 17일 · 논문심사 : 2003년 12월 18일

· 채택 : 2004년 1월 2일

· 교신저자 : 박원석. 경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 태평양기술연구원 의학건강연구소 피부의약연구팀
(Tel: 031-280-5821, Fax: 031-282-6063, E-mail: wspark@amorepacific.com)

서 론

현대사회로 가면서 탈모환자가 급격히 증가하고 있으며, 그에 대한 관심과 고민도 점점 더 심화되고 있다. 정상적인 두피에서 성모(terminal hair)와 연모(vellus hair)의 비율은 약 2:1 정도로 알려져 있으며, 남성형 탈모증이 관찰되는 두피에서는 연모의 비율이 증가되는 것을 확인할 수 있다¹⁾. 또한, 성모 중에서도 성장기(anagen phase) 모발과 휴지기(telogen phase) 모발을 비교하면 성장기 모발은 감소되고, 휴지기 모발의 수는 증가되는 것을 관찰할 수 있는데 이는 성장기가 짧아지고 휴지기가 길어지는 것에 기인한다²⁾.

남성형 탈모증의 정확한 기전은 아직까지도 확실하게 규명되지 못하고 있으며, 다만 활성 남성호르몬이 중요한 원인으로 생각되고 있다. 혈장과 소변 내의 안드로젠의 농도는 정상인과 남성형 탈모증 환자간에 차이가 없으며, 안드로젠은 음모, 액모, 턱수염 등 다른 부분의 모발의 성장을 조절한다. 여성의 음모 양상과 액모는 여성의 안드로젠 농도에 의해서 성장하지만 남성의 음모 양상 및 턱수염, 팔, 다리의 모발은 더 높은 농도의 안드로젠을 필요로 한다³⁾.

모발의 성장과 퇴화에 많이 관여하는 남성호르몬으로 testosterone과 DHT(dihydroxytestosterone)가 존재하며, 핵내 안드로젠 수용체와 결합하는 DHT가 testosterone이 결합하여 생성된 결합체보다 더 강력하게 염색체와 결합한다⁴⁾. 음모와 액모는 testosterone에 의해 영향을 받고, 턱수염의 성장과 남성형 탈모증의 발생은 DHT에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

최근 탈모방지제 및 발모제에 대한 연구가 심화되어 여러 가지 제품이 개발되고 있으나 효능이 우수하고 안전한 탈모방지제는 미진한 실정이다. 현재 개발된 관련제품으로는 서구 중심의 미녹시딜과 프로페시아 발모의약품과 일본을 중심으로 한 한약추출물이 함유된 욱모제로 개발되고 있으나 그 효능 면

에서 욱모 및 발모를 해결하기에는 아직 이른 실정이다.

본 연구에서 우선 한의학적인 이론에 근거하여 동의보감⁶⁾ 및 기난잡증 효험단방전서⁷⁾, 신선기방 999⁸⁾, 피부병 중약 외용제제⁹⁾, 중의 피부 미용 방제대전¹⁰⁾에 수록되어 있는 모발 질환에 관계된 288종의 처방을 중심으로 모발의 영양불량, 노화, 탈모 및 백발 등의 증상에 따라 한약을 분류하여 각 단처방 및 처방한약의 에탄올 추출물을 제조하여 욱모 효능을 검증하였다. 모낭세포(모유두세포)의 성장 촉진과 항남성호르몬 작용 및 모발주기의 정상화 기능을 가지고 미리 선정한 68종 한약추출물 중에서 栝子仁¹¹⁾, 山茱萸, 薏苡仁, 枸杞子和 甘草 등 5가지 한약재에 대한 1) 모발주기에 관여하는 모유두세포의 증식 촉진능과 2) type 2 5 α -reductase 효소 저해력 평가 결과를 본 논문에서 제시하고, 상기 5종의 한약재를 최종합량 0.1~0.3%의 농도로 저알콜 헤어에센스 제형을 제조한 다음, 두 가지의 마우스 동물 모델을 대상으로 생장기 모낭 유도 및 안드로젠에 의한 탈모를 방지하는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

5종의 한약 추출물을 경기도 수원 소재 건화약품에서 구입하여 95% 에탄올 용매로 48시간 동안 냉침한 후, 환류 감압농축기를 이용하여 용매를 제거한 후 여과하여 조추출물을 얻었다. 이와 같이 얻은 한약 추출물을 대상으로 모낭 기저부에 존재하며 모발주기 조절에 중요한 역할을 하는 PVGDPLTsa 6 모유두 세포주를 이용하여 증식 촉진능을 확인하였다. 또한, 탈모를 직접적으로 유발한다고 알려진 활성 남성호르몬(DHT; dihydrotestosterone)의 생성에 관계된 5 α -reductase(type 2) 효소의 저해 평가를 수행하였다.

이후 상기 한약 추출물이 각각 0.1~0.3% 함유된 헤어에센스 제품을 증류수 82%와 에탄올 10%에 계면활성제(Emalex HC 60)를 이용하여 가용화하여 제조하여 암컷 C57bl/6 마우스와 androchronogenetic

alopecia (B6CBAF1/j)마우스로 구성된 2가지의 마우스 모델에 적용하여 각각의 성장기 모낭으로의 유도 평가 및 남성호르몬에 의한 탈모 방지 효과를 관찰하였다.

1. 모유두 세포의 증식 활성

Temperature sensitive T antigen을 암호화한 polyomavirus large T 유전자를 PVG 랫트의 vibrissal dermal papilla cell에 transfection하여 만든 PVGDPLTsa 6 세포주를 이용하였다¹²⁾. 암 억제물질의 선별 검사법으로 널리 사용되고 있는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide test(MTT) 방법으로 기능이 살아 있는 미토콘드리아에 의하여 formazan이라는 색소가 형성되는 것을 정량하여 증식 평가를 실시하였다. 96공 평판배양기를 이용하여 상기 모유두세포를 well 당 약 104 cells/well 정도로 초기 cell 농도를 맞추었다. 시료의 처리는 용매로서 DMSO(Dimethyl sulfoxide)나 EtOH에 용해시킨 후, 5% 농도로 혈청 함량을 갖춘 DMEM 배지로 순차적 희석(serial dilution)한다. Well 당 200 μ l 정도의 양으로 배지를 조절하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 약 3일간 배양을 한다. 2mg/ml의 농도로 조제된 MTT 용액을 각 well 당 50 μ l 씩 첨가한 후, 동일한 배양기에서 4시간 동안 방치한다. MTT 시약이 세포내 mitochondria에 흡수되었다고 판단되면 상등액을 제거하고 DMSO를 150 μ l 첨가한 후, 10분간 교반하여 균일하게 formazan 염색(dye)을 녹여낸다. 그런 다음 ELISA reader를 이용하여 515nm 파장에서 흡광도 값을 측정하고, 미리 만들어 둔 표준 검체 곡선에 맞추어 세포수를 측정한다.

2. 5 α -reductase (type 2) 효소의 저해 평가

pCMV7-5 α R plasmids를 David W. Russel로부터 공급받았으며, 각 두개의 plasmide에는 각 두가지 type의 5 α -reductase isozymes에 대한 full length human cDNAs가 함유되어 있었다¹³⁾. 일단 type 2에 대한 pCMV7-5 α R2 plasmid를 template로 다음과 같은 두가지 primer(LCHP-4; 5' -CTA 91CCA GTA TCG

AAT TCG ATG CAG GTT CAG TGC CAG CAG AGC3', LCHP-6; 5' CTA CCA GTA GCT CTA GAT TAA AAG ATG AAT GGA ATA AGG GC3')를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 여기서 5말단의 EcoRI site와 3말단의 XbaI site를 5 α -reductase type 2를 coding하는 배열로 하여 insertion하고자 하였다. PCR 반응물은 0.82kb크기의 단일 band를 수득하였고, eucaryotic expression vector인 p3xFLAG-CMV-10 (Sigma Chemical, U.S.A.)에 ligation시켜 recombinant plasmid를 제조하였다(p3xFLAG-CMV-5 α R2; 7.2kb). 제조된 plasmid를 Human Embryo Kidney 293 cell line에 lipofectamine plus (Life Technologies, U.S.A.)를 이용하여 transfection을 시키고, untransfected cells은 항생물질인 G418 sulfate (400 μ g/ml)로 제거하였다.

5 α -reductase 활성은 HEK293-5 α R2 cells을 이용하여 기질로 첨가한 [¹⁴C]testosterone이 [¹⁴C]dihydrotestosterone로 전환되는 양을 가지고 평가하였다. p3 \times FLAG-CMV-5 α R2 plasmid를 transfection 시킨 HEK293 세포주를 24 well culture plate에 2.5 \times 10⁵ cells/well의 농도로 전날 seeding하였다. 배양액을 감압으로 제거하고, 0.5ml의 기질과 저해평가 물질이 첨가된 배지로 교체하였다. 이 배지는 무혈청 DMEM 배지에 0.05 μ Ci [¹⁴C]testosterone(Amersham Pharmacia biotech, U.K.)를 첨가하고 나서, 시료의 저해평가를 위해서 일정 농도(0.1%)로 DMSO에 용해시켜 전체 배지에 1%가 되도록 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 후에, 각기 well의 배양액을 채취하여 상기 스테로이드를 800 μ l ethyl acetate로 추출하였다. 상층 유기용액 부분을 따로 분리한 후 진공오븐에서 완전히 건조시켰다. 잔류 스테로이드를 20 μ l ethyl acetate로 현탁한 후 박층크로마토그래피(Silica gel 60F254, Merck, Germany)에 점적하였다. 서로 다른 분자 구조를 가진 남성호르몬은 박층크로마토그래피 상에서 ethylacetate/hexane (1:1)의 전개 조건에서 분리하고, phoshoimaging (FLA-3000, Fuji Film, Japan)의 원리로 MacBas software를 이용하여 정량

하였다. 5 α -reductase의 전환율은 DHT/(T+DHT)의 비로 표현하였다.

3. C57bl/6 마우스의 성장기 모낭 유도 평가

생후 50 \pm 3일된 암컷 C57bl/6 마우스(Taconic, USA)의 등 부위 털을 제거하고, 등 부위 피부가 깨끗한 것을 골라 실험군마다 9 마리씩을 선정하여 매일 시험물질을 개체당 150 μ 씩 하루 2회 20일간 도포하였다. 시간 경과에 따른 모발의 길이 및 모발 성장 정도를 모 제거 후 복원 정도에 따라 점수를 0에서 3까지 부여하여 각각 비교하였다. 음성대조군(vehicle)에는 64% EtOH, 20% propylene glycol와 16% water 로 구성된 제제를 사용하고¹⁴⁾, 양성대조군은 5%의 농도로 미녹시딜(Laboratory MAG, Italy)을 vehicle 용액에 첨가하여 사용하였다. 각 시료를 이렇게 제조된 용액에 적절한 농도로 희석하여 개체에 도포한 후 모발의 성장 상태를 관찰하였다. 모발의 길이 및 모발 성장 정도는 복원 정도에 따라 점수를 0~3까지 부가하여 육안평가하였다.

4. Androchronogenetic alopecia (B6CBAF1/j) 마우스를 이용한 안드로젠에 의해 유도된 탈모 방지 효과

테스토스테론을 피하주사로 주입하면 12주 후에 탈모 현상이 일어나는 androchronogenic alopecia 마우스 (B6CBAF1/j)(Jackson Lab, USA)는 C57bl/6(female)와 CBA(male)의 변이종(hybrid)이며, 남성형 호르몬인 testosterone과 dihydrotestosterone에 의해서 탈모 현상이 유도되는 유일한 모델이다. 기존의 연구에 의하면, 모발주기 중에서 남성호르몬에 의해서 생기기(anagen)가 짧아지고, 휴지기(telogen)의 기간이 연장되어 탈모 현상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한, 안드로젠 수용체의 길항체인 cyproterone acetate와 혈관확장제인 minoxidil의 탈모 방지 효과를 확인하였으며, 이러한 비슷한 기능을 가진 약물의 검증하는 모델로 이용되었다¹⁵⁾. 또한, 남성 호르몬 중에서도 testosterone보다 DHT가 더욱 탈모가 빠르게 일어나는 결과를 이용하여, DHT로 전환

되는 5 α -Reductase를 저해하는 약물에 대한 탈모 방지 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 인용한 논문과 같이 12주간 7주령이 된 female androchronogenic alopecia 마우스를 대상으로 계속 마리당 2mg의 testosterone(Fluka chemical, Germany)을 0.5%의 carboxymethylcellulose에 현탁하여 피하주사하고, 6주 후 음성대조군(testosterone only, 3마리), 양성대조군(미녹시딜 처리군, 4마리)과 실험군(한약함유 헤어에센스 처리군, 4마리)로 분류하여 양성대조군에는 5.0%의 미녹시딜 용액을 100 μ 씩 도포하고, 한약추출물이 함유된 헤어에센스는 실험군에 동량으로 도포하였다. 탈모증의 육안평가는 아래 Table 1과 같이 5단계(0~4)의 등급에 맞추어 실시하였다.

Table 1. Alopecia Grades of Androchronogenetic Alopecia Mouse(B6CBAF1/j)

Index of Alopecia	Description
0	No hair loss
1	Diffuse thinning along the intrascapular area
2	Well-defined Alopecia measuring approximately 1cm ²
3	Alopecia progresses posteriorly and covers an area app. 2cm ²
4	Alopecia greater than 4cm ²

결 과

1. 모유두 세포의 증식 활성화

한의학 문헌에서 분류한 288종의 처방으로부터 모발의 영양불량, 노화, 탈모 및 백발 등의 증상에 효과가 있는 백자인, 산수유, 의이인, 구기자, 감초 5가지의 에탄올 추출물로부터 쥐의 수염에서 분리하여 immortalization시킨 모유두 세포주의 증식 촉진능을 살펴 보았다. 5가지 한약추출물을 DMSO에 여러 농도로 용해시킨 후 우선 각 농도에서 추출물의 세포 사멸능을 살펴 본 후(data omitted), 일정 10ppm의 농도에서 대조군과의 상대적 증식 촉진능을 그림 1에 나타내었다. 5가지의 한약제 중에서 감초(159.7%), 산수유(144.7%), 의이인(136.6%)의 순으로 모유두 세포 증식 촉진 활성을 나타내었고, 백자인과 구기자

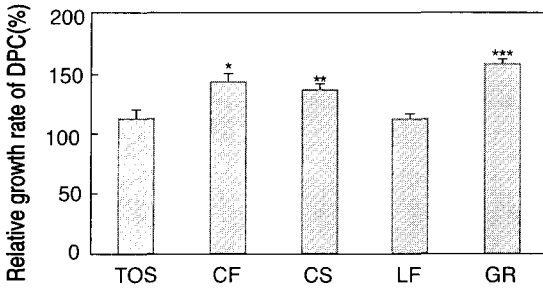


Fig. 1. Relative growth stimulations of rat vibrissa dermal papillar cell(DPC; PVGDPLTtsa 6) by five herbal extract at a dose of 10 μ g/ml. Abbreviations: TOS; *Biotae semen*, CF; *Corni fructus*, CS; *Coicis semen*, LF; *Lycii fructus*, GR; *Glycyrrhizae radix*. * $p < 0.001$, ** $p < 0.004$ and *** $p < 0.0007$ compared with DMSO treated control using paired *t*-test.

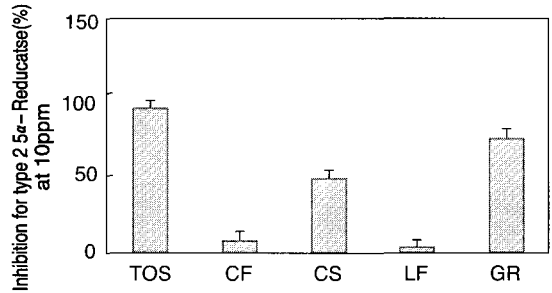


Fig. 2. *In situ* inhibitory effects of five herbal extract for human 5 α -reductase type 2 with using newly constructed HEK293-5 α R2 cell line in cell-based metabolic assay. Abbreviations: TOS; *Biotae semen*, CF; *Corni fructus*, CS; *Coicis semen*, LF; *Lycii fructus*, GR; *Glycyrrhizae radix*

추출물의 경우는 10% 정도의 증식 촉진능을 보였으나 DMSO만을 첨가한 음성대조군과 유의적 차이는 보이지 않았다.(Fig. 1)

2. 5 α -reductase type 2 효소의 저해 평가

5 α -reductase 활성은 앞서 서술한 HEK293-5 α R2 세포주를 이용하여 cell-based metabolic assay 방법을 이용하여 기질로 첨가한 [¹⁴C]testosterone이 [¹⁴C]dihydrotestosterone으로 전환되는 양을 평가하였다. 위의 5가지 한약 추출물을 대상으로 일정 농도(0.1%)로 DMSO에 용해시켜 전체 배지에 1%가 되도록 첨가하여, 2시간 동안 배양하여 대조군의 전환율을 기준으로 저해 활성을 측정된 결과를 그림 2에 나타내었다. 5가지 한약 추출물 중에서 백자인(93.18%), 감초(73.36%), 의이인(47.6%) 추출물이 비교적 높은 저해 활성을 나타내었으며, 산수유 및 구기자 추출물의 경우 낮은 저해 활성을 나타내었다. 상기 3가지 저해 활성을 가진 한약은 농도 의존적으로 저해양상을 나타내었으며, 각각의 IC₅₀ 값은 백자인(2.6 μ g/ml), 감초(6.4 μ g/ml), 의이인(11.8 μ g/ml)의 순서대로 높은 활성값을 나타내었으며, 양성대조군으로 사용한 Finasteride의 IC₅₀의 값은 0.34 μ M 농도로 측정되었다¹¹⁾. (Fig. 2)

3. C57BL/6 마우스의 성장기 모낭 유도 평가

생후 45일 정도 지나면 마우스의 모낭은 2번째 휴지기를 거치게 되며, 이 기간에는 마우스 개체별로 동일한 모낭 주기를 가지고 있기 때문에 모낭주기를 조절하는 즉, 휴지기(telogen)에서 생성기(anagen)로의 이행을 유도하는 약물의 효과를 측정할 수 있다. 위의 두 가지 *in vitro* 시험 결과를 토대로 마우스에서의 *in vivo* 실험을 통해 시험물질 도포에 따른 모발의 길이 및 모발 성장 정도를 복원 정도에 따라 육안평가하였다. 음성대조군으로는 Vehicle(64% EtOH, 20% propylene glycol와 16% water)로 구성된 제제를 사용하고, 양성 대조군은 혈관확장제이며, potassium channel opener로 널리 알려진 미녹시딜을 5% 농도로 음성대조군에 용해하여 제조하였다. 5종의 한약이 함유된 헤어에센스 제품을 두개의 대조시료와 함께 매일 2회 150 μ l씩 도포하여 10, 20일 후에 모발성장 형태를 관찰하였다. 도포 7일 후부터 미녹시딜 양성 대조군에서 빠른 모발 성장을 관찰할 수 있었으며, 헤어에센스는 초기의 성장기 모낭 유도력은 미녹시딜에 비해서 떨어지는 것으로 판단되었다. 그러나, 20일까지 관찰한 결과 초기의 성장기 모낭 유도력이 시간 경과에 따라 헤어에센스 처리군에서 회복되어 미녹시딜 처리군과 비교하여 유의성있는 동등한 효과를 확인할 수 있었다.(Fig. 3)

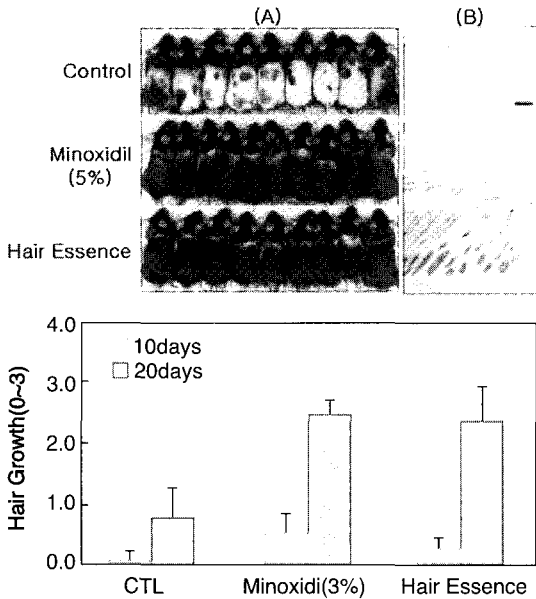


Fig. 3. Comparative anagen induction and hair restoration of female C57BL/6 mice by topical application of hair essence (HHRHG0202-80) containing five herbal extract with 5% minoxidil solution (scale bar = 200µm)

4. Androchronogenetic alopecia 마우스 (B6CBAF1/j)를 이용한 안드로젠에 의해 유도된 탈모 방지 효과

이전의 연구보다¹⁵⁾ 높은 농도(2mg)로 testosterone을 주입하였을 때 동일한 탈모 현상을 8주 이후부터 관찰할 수 있었다. 선행 연구에서는 testosterone으로 유발되는 androchronogenetic alopecia 현상을 안드로젠 호르몬 수용체의 길항제인 cyproterone acetate와 상용 발모물질인 미녹시딜을 도포하여 저해한 결과가 보고된 바 있다. 본 실험에서는 음성대조군은 단지 테스토스테론만을 처리하고, 양성대조군은 테스토스테론과 혈관확장제인 미녹시딜용액(5%)을 사용하였으며, 실험군은 테스토스테론과 한약추출물이 함유된 헤어에센스를 함께 도포하여 관찰하였다. 테스토스테론을 처리한 후 6주까지는 별다른 탈모 현상을 관찰할 수 없었으며, 9주부터 음성대조군에서 탈모 현상을 관찰할 수 있었다. 그림 4에서와 같이 등부위의 모발 상태에 따라서 0~4까지 등급(표 1)을 정하여 육안 평가한 결과 단순히 테스토스테론만을

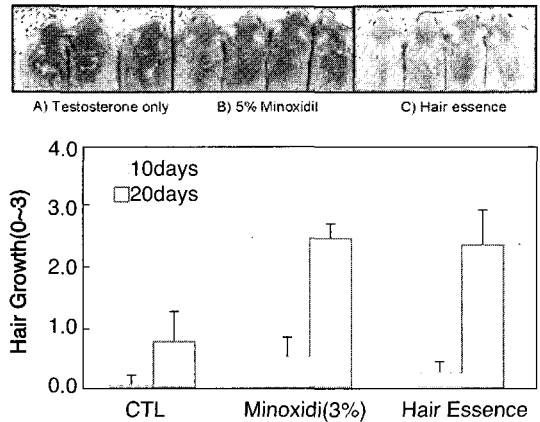


Fig. 4. Baldness of androchronogenetic alopecia mouse, which induced by testosterone (2mg) injection, was interfered by topical application of minoxidil (5%) and hair essence (HHRHG0202-80) containing five herbal extract. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.013$ compared with only testosterone-treated group using paired *t*-test.

주사한 군에서 확인한 탈모 양상을 관찰할 수 있었다. 미녹시딜과 헤어에센스를 테스토스테론을 주사한 후 도포한 군에서는 0 등급 수준의 모발형태가 관찰되지는 않았지만, 유의적으로 탈모현상을 저해한 것으로 평가되었다. 미녹시딜 처리군과 헤어에센스 처리군간의 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.(Fig. 4)

고찰

여러 한의학 문헌을 토대로 분류한 288종의 한약들 중에서 양모, 생발(발모) 및 탈모방지와 관련된 처방에서 분류한 백자인, 산수유, 의이인, 구기자 및 감초에 대한 모발 성장 및 탈락 방지 효과를 모두 두 세포 증식 촉진과 5α-reductase 억제 실험을 수행하고, 2가지의 동물시험을 통해서 그 효과를 확인하였다.

실제로 사람을 대상으로 육포 및 탈모방지 효과를 6개월 이상 장기간 관찰해야 효과적으로 약물의 효능을 평가할 수 있으나, 본 연구에서는 모낭세포(모유두세포)의 증식 촉진 활성화와 5α-reductase 저해 활성이라는 시험관 수준의 대체 실험을 수행하고, 또한 2가지 육포 모델의 마우스를 대상으로 각각 휴지기

에서 성장기 모낭으로의 유도 효과 및 안드로젠에 의한 탈모 방지 효과를 관찰하였다.

栝子仁(Biotae semen)은 측백나무의 종자로서 양심안신(養心安神)과 윤장통변(潤腸通便)의 효능으로 心悸怔忡 陰虛盜汗 및 腸燥便秘 증상의 치료에 사용되었으며, 주성분으로는 정유성분과 사포닌 성분이 알려져 있다⁶⁾. 본 실험에서는 5종 한약추출물 중에서 가장 높은 type 2 5 α -reductase 저해효과(IC₅₀= 2.6 μ g/ml)를 나타내었고 유의적 세포증식 촉진 활성은 관찰되지 않았다.

山茱萸(Corni fructus)는 산수유나무의 과육(果肉)을 약용으로 사용하며, 보익간신(補益肝腎), 삼정고탈(澁精固脫)의 효능이 있다고 알려져 있으며, 陽萎遺精, 遺尿, 尿意頻數 등의 증상 치료에 사용되었다. 과육에는 보통 코르닌(cornin), 모로니사이드(Morroneiside), 로가닌(Loganin), 탄닌(tannin), 사포닌(Saponin) 등의 배당체와 포도주산·사과산·주석산 등의 유기산이 함유되어 있고, 그밖에 비타민 A와 다량의 당(糖)도 포함되어 있다. 종자에는 팔미틴산, 올레인산, 리놀산 등이 함유되어 있다고 전해지며, 본 연구에서는 단지 모유두세포 증식만을 촉진하는 활성(144.7%)을 관찰할 수 있었다

薏苡仁(Coicis semen)은 건비삼습(健脾滲濕), 제비지사(除痺止瀉) 및 청열배농(淸熱排膿)의 효능으로 肺癰과 腸癰 및 脾虛泄瀉 등 증상에 치료 효과가 있으며, 주로 전분(Starch), 지질(Fatty oil), Coixol, Sterol, Amino acid, Vitamin B1, Coixenolide가 함유되어 있다. 결과에서 보듯이 높지는 않지만 모유두세포 증식 촉진(136.6%)과 함께 type 2 5 α -reductase를 동시에 저해하는 활성(IC₅₀= 11.8 μ g/ml)을 나타내었다.

枸杞子(Lycii fructus)는 항노화 효능을 가진 한약으로 분류되어¹⁷⁾ Vitamin B1, Betaine, Physalien, Zeaxanthine 등의 성분이 있는 것으로 알려져 있으며, 그 중 Zeaxanthin dipalmitate이라는 성분의 간 보호 작용이 보고되어 있다^{18), 19)}. 본 실험에서 모유두세포 증식 촉진 활성과 5 α -reductase 저해 활성은 높게 관찰되지 않았다.

甘草(Glycyrrhizae radix)에는 주로 glycyrrhizin,

liquiritigenin, liquiritin 등 다수의 flavonoid 성분이 함유되어 있고, 해독, 진정, 항염증 및 항알러지의 효능으로 예전부터 많은 처방에서 이용되었다. 결과에서와 같이 5종의 한약추출물 중에서 가장 높은 모유두세포 증식 촉진(159.7%)을 나타내고, 5 α -reductase 저해 활성도 백자인추출물 다음으로 높은 저해활성(IC₅₀= 6.4 μ g/ml)을 나타냈다.

모낭의 상피세포의 증식은 모낭의 주기에 따라 다른 양상으로 나타나며, 특히 성장기에서 퇴행기로 진행되는 과정에 현저한 모낭주위의 상피세포(외모근 초세포와 모모세포)의 세포사(apoptosis)가 관찰되고 있으며²⁰⁾, 최근 연구에 따르면 포도씨에서 추출한 proanthocyanidin이 상피세포의 증식을 촉진하여 휴지기 모낭에서 성장기 모낭으로 유도된다는 것이 보고되었다²¹⁾. 또한, 모유두세포는 모낭 주기의 조절에 여러 신호를 모기질에 분비하면서 중요한 역할을 하고 있으며, 직접적으로 남성호르몬이 모유두에 작용하여 모유두로 하여금 모발의 성장을 유발하는 성장인자를 분비하지 못하도록 하거나, 모유두의 성장을 억제하는 물질을 분비하므로 탈모가 일어나게 된다²²⁾. 따라서 앞서 언급한 것과 같이 감초, 산수유, 의이인 등의 한약추출물은 모유두세포의 증식에 관여하여 직접적인 모유두세포 증식을 촉진하는 것이 실험을 통하여 확인되었고, 이들 한약추출물은 전체 모낭세포의 증식에도 기여할 것으로 예측되었다.

성장기 모낭에서 퇴행기로 유도하는 남성호르몬 중 5 α -DHT라는 환원된 테스토스테론이 직접적으로 모낭 세포의 세포사를 유발하여 최종적으로는 모낭의 축소와 함께 탈모증이 되는 것이 남성형 탈모증의 전형적인 기전으로 널리 알려져 있다. 따라서, 많은 연구자들이 testosterone에서 dihydrotestosterone으로 전환시키는 환원효소 5 α -reductase 저해제를 연구하고 있으며, 현재 FDA 승인을 받은 프로페시아(finasteride)라는 type 2에 대한 특이적 저해제가 발모제로 판매되고 있다²³⁾.

본 실험에서도 한약 추출물을 대상으로 HEK293 세포주에 특이적으로 type 2 5 α -reductase를 발현시켜 활성을 측정하는 방법을 마련하여^{11), 24)}, 배지상에 한약

추출물을 10 μ g/ml의 농도로 첨가하여 각 한약의 저해효과를 비교하였으며, 백자인, 감초, 의이인 순서대로 3가지 한약추출물에서 저해활성을 나타내었다. 지금까지 5 α -reductase를 저해한다고 알려진 식물추출물에는 saw palmetto(*Serenoa repens*)²⁵⁾, Cactus flower extracts²⁶⁾, Strogon forte extract²⁷⁾ 등이 알려져 있다. 본 실험에서 저해 활성을 나타낸 한약에서의 유효성분은 함유된 지질(fatty oil)에 기인한 것으로 추측된다²⁸⁾.

많은 동물욕모 평가법 중에서 C57bl/6 마우스 모델의 휴지기에서 성장기로의 모발주기 유도를 측정하는 방법이 널리 이용되고 있으며²⁹⁾, 이외에도 직접적으로 남성형탈모증과 유사하게 남성호르몬(testosterone)을 주입하여 자연적 탈모를 촉진시켜 유도되는 퇴행기 탈모 진행을 평가하는 AGA 마우스((B6CBAF1/j) 모델도 최근 들어 각광 받는 실험법이 되었다. 각 두 가지 동물 실험모델을 대상으로 양성대조군으로 FDA 공인 혈관확장제로 알려진 5% 미녹시딜 용액을 설정하였다.

상기 모낭세포 증식 촉진 및 5 α -reductase 저해 효과를 지닌 5가지의 한약 추출물을 0.1~0.3%의 농도로 첨가하여 제조된 헤어에센스(HHRHG0202-80)를 처리한 결과 휴지기 모발주기에서 성장기 모발주기로의 이행을 촉진하는 효과는 도포후 10일째는 5% 미녹시딜 용액보다 유의적으로 낮았으나, 20일후에는 유의적 차이가 없게 나타나 휴지기에서 성장기로의 모발주기를 유도할 수 있으리라 생각되었다.(그림 3)

Testosterone을 마리당 2mg씩 12주간 투여하고, 각각의 음성대조군(Testosterone only), 양성대조군(5% 미녹시딜 용액)과 함께 앞서 제조한 헤어에센스를 6주간 도포하여 각 그룹의 testosterone에 의한 탈모양상을 관찰한 결과 욱안상으로도 양성대조군과 함께 헤어에센스를 도포한 군에서 탈모현상이 저해되는 것을 확인할 수 있었다.(그림 4) 조직학적인 관찰에서도 단지 testosterone만을 처리한 군에 비해서 미녹시딜 용액과 헤어에센스를 처리한 군에서의 피부

가 두껍게 나타나고 성장기 모낭(Anagen VI)을 많이 관찰할 수 있었다.(Data omitted) 따라서 상기 헤어에센스가 testosterone에 의해 유도된 모발의 퇴행기 이행을 효과적으로 저해하여 탈모를 저해하는 것으로 추측할 수 있었다.

결론

위의 결과로부터 모유두세포 증식 촉진 활성을 나타내는 산수유, 구기자, 감초 추출물 및 5 α -reductase 효소 저해 활성을 가진 백자인, 의이인, 감초 추출물을 0.1~0.3%의 농도로 첨가한 헤어에센스(HHRHG0202-80) 제품은 효과적으로 남성형 탈모증을 포함한 기타 탈모증에 대한 유용한 치료제로써 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Whiting DA. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. J Am Acad Dermatol. 1993; 128: 755-763.
2. Bergfeld WF. Androgenetic alopecia: an autosomal dominant disorder. Am J Med. 1995; 98:95-98.
3. Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, Hamada K, Merrick AE, Kato S, Jenner TJ, De Oliveira I, Messenger AG. The hair follicle: a paradoxical androgen target organ. Horm Res. 2000; 54(5-6): 243-50.
4. McPhaul MJ, Young M. Complexities of androgen action. J Am Acad Dermatol. 2001; 45(3 Suppl): 87-94.
5. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, et al. Steroid 5 alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. Science. 1974; 186: 1213-15.
6. 허준. 동의보감. 서울: 대성문화사. 1992:307-310.
7. 장준정. 기난잡증 효험단방전서. 북경: 중국중의약출판사. 1994:199-201.
8. 장연순, 이서. 신선기방 999. 북경: 중국중의약출판사. 1999:268-687.
9. 송조우. 피부병 중약 외용제제. 북경: 인민위생출판사. 2000:163-266.

10. 장민경. 중의 피부 미용 방제대전. 북경: 중국중의약출판사. 2001:116-183.
11. Wonseok Park *et al.*: The extract of *Thuja occidentalis* semen inhibited 5 α -reductase and androchronogenetic alopecia of B6CBAF1/j hybrid mouse. *J Dermatol Sci*. 2003; 31:91-98.
12. Filsell W, Little JC, Stones AJ, Granger SP, Bayley SA. Transfection of rat dermal papilla cells with a gene encoding a temperature-sensitive polyomavirus large T antigen generates cell lines retaining a differentiated phenotype. *J Cell Sci*. 1994; 107: 1761-72.
13. Andersson S, Russell DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 3640-4.
14. Akio Shirai, Jun-ichi Ikeda, Sagano Kawashima, Tatsuya Tamaoki, Toshikazu Kamiya: KF19418, a new compound for hair growth promotion in vitro and in vivo mouse models. *J Dermatol Sci*. 2001; 25: 213-8.
15. Matias JR, Orentreich N: The effect of testosterone, cyproterone acetate, and minoxidil on hair loss in the androchronogenetic alopecia mouse. *Clin Dermatol*. 1988; 6(4): 169-76.
16. Ikeda I, Oka T, Koba K, Sugano M, Lie Ken Jie MS. 5c,11c,14c-eicosatrienoic acid and 5c,11c,14c,17c-eicosatetraenoic acid of *Biota orientalis* seed oil affect lipid metabolism in the rat. *Lipids*. 1992; 27(7): 500-4.
17. Xiao PG, Xing ST, Wang LW. Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiageing drugs. *J Ethnopharmacol*. 1993; 38(2-3): 167-75.
18. Kim HP, Kim SY, Lee EJ, Kim YC, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997; 97(3): 301-14
19. Kim HP, Lee EJ, Kim YC, Kim J, Kim HK, Park JH, Kim SY, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25(3): 390-2.
20. Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol*. 1997; 151(6): 1601-17.
21. Takahashi, T, Kamiya, T, Yokoo, Y. Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells in vitro and convert hair cycle *In vivo*. *Acta Derm Venereol*. 1998; 78: 428-432.
22. Randall VA, Hibberts NA, Hamada K. A comparison of the culture and growth of dermal papilla cells from hair follicles from non-balding and balding (androgenetic alopecia) scalp. *Br J Dermatol*. 1996; 134(3): 437-44.
23. Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79(3): 703-6.
24. Reichert W, Hartmann RW, Jose J. Stable expression of the human 5alpha-reductase isoenzymes type I and type II in HEK293 cells to identify dual and selective inhibitors. *J Enzyme Inhib*. 2001; 16: 47-53.
25. Raynaud JP, Cousse H, Martin PM. Inhibition of type 1 and type 2 5alpha-reductase activity by free fatty acids, active ingredients of Permixon. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; 82(2-3): 233-9.
26. Jonas A, Rosenblat G, Krapf D, Bitterman W, Neeman I. Cactus flower extracts may prove beneficial in benign prostatic hyperplasia due to inhibition of 5alpha reductase activity, aromatase activity and lipid peroxidation. *Urol Res*. 1998; 26(4): 265-70.
27. Toth I, Szecsi M, Julesz J, Faredin I, Behnke B. In vitro inhibition of testicular delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and prostatic 5 alpha-reductase activities in rats and humans by strogen forte extract. *Int Urol Nephrol*. 1996; 28(3): 337-48.
28. Liang T, Liao S. Inhibition of steroid 5 alpha-reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids. *Biochem J*. 1992 15; 285(Pt 2): 557-62.
29. Makoto Ozeki, Yasuhiko Tabata. Promoted growth of murine hair follicles through controlled release of vascular endothelial growth factor. *Biomaterials* 2002; 23: 2367-2373.