

한방복합처방단의 발모효과 및 멜라닌 생성 촉진효과

임 경 란 · 김 미 진 · 윤 경 섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소
(2011년 5월 11일 접수, 2011년 5월 27일 수정, 2011년 6월 10일 채택)

Hair Growth Activity and Melanogenic Activity of Oriental Medical Prescription

Kyung Ran Im, Mi Jin Kim, and Kyung Sup Yoon[†]

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 493-1, Daeheung-dong, Jung-gu, Daejeon 301-803, Korea
(Received May 11, 2011; Revised May 27, 2011; Accepted June 10, 2011)

요약: 본 연구에서는 발모 소재 개발을 위하여 한방복합처방단의 효소처리에 의한 발모 및 흑모 관련 생리활성을 알아 보았다. 효소 처리된 한방 복합 처방단의 자유라디칼 소거활성과 superoxide dismutase 유사활성을 알아보았으며, lip-oxygenase 활성 저해효과, 5 α -reductase 활성 저해효과 및 멜라닌 생성 촉진효과를 확인하였다. 또한, 인체 피부 일차 자극시험 결과 자극이 없는 저자극으로 나타났다. 이로써, 효소 처리된 한방 복합 처방단은 피부자극 없이 모발제품의 기능성 원료로서 큰 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

Abstract: To develop a new natural cosmetic hair care product for scalp treatment, we investigated the effect of enzyme modified (Viscozyme, Pectinex) oriental medical prescriptions on hair growth and melanogenesis. Enzyme modified oriental medical prescriptions showed the antioxidative effect, inhibitory effects on lipoxygenase activity and 5 α -reductase activity and melanogenic activity. In human irritation test, they did not show any adverse effect. Based on these results, we suggest that enzyme modified oriental medical prescriptions may potentially be used in a cosmetic hair care product for scalp treatment.

Keywords: oriental medical prescription, hair growth, melanogenesis, 5 α -reductase

1. 서 론

모발은 신체의 다른 세포나 조직과는 달리, 모낭주기 또는 모발주기(hair cycle)라는 독특한 생체리듬을 갖고 있다. 즉, 일정하게 계속 자라다가 쇠퇴하여 결국 사멸하는 과정을 거치는 것이 아니고, 2 ~ 6년 정도의 성장기(anagen stage) 동안 지속적으로 성장하다가 2 ~ 3주 정도의 퇴행기(catagen stage)를 거쳐서 2 ~ 3개월 정도의 휴지기(telogen) 동안 성장을 멈추었다가 다시 성장기로 들어가는 순환주기를 그리게 된다. 일반적으로 탈모증이라 함은 이러한 주기 중에서 성장기의 모발 비율이 짧아지고 퇴행기 또는 휴지기가 길어져 비정상적으로

모발이 탈락하는 숫자가 많아지는 것을 일컫는다[1-3].

발모 및 탈모의 정확한 기전은 현재까지 완전하게 밝혀져 있지 않으나, 탈모유발 원인으로 남성호르몬 관여에 의한 모포 기능의 저하, 모포 및 모구부의 신진대사 기능의 저하, 두피 긴장에 의한 국소 혈류 장애, 영양 불량, 스트레스, 약물에 의한 부작용, 유전적 요인, 자가 면역, 국소감염, 화학물질, 백혈병, 결핵 등의 질병과 모발제품의 남용 등 매우 다양하다. 탈모의 가장 전형적인 형태인 남성형 탈모증(androgen alopecia)의 경우 유전적으로 안드로겐(androgen) 호르몬에 의존적으로 발생하는데 포유류의 대표적인 안드로겐 호르몬에는 testosterone과 dihydrotestosterone이 있는데 탈모가 일어나는 환자들에게서 dihydrotestosterone이 더 많이 나타난다. 여기서 testosterone은 5 α -reductase에 의해서 dihydrotes-

[†] 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@hanmail.net)

tosterone으로 전환되는데, 특히 5 α -reductase로 존재하는 두 형태 중 제 2형 5 α -reductase에 의해 testosterone에서 전환된 dihydrotestosterone이 진피유두 및 모낭에서 점진적으로 감소된다[4-6].

한편, 모발은 크게 모표피, 모피질, 모수질의 3개 부분으로 구성되어 있다. 모수질을 감싸고 있는 모피질은 모발에서 가장 두터운 부분(80 ~ 90 %)으로서 멜라노솨이라는 멜라닌색소 및 지질막과 TRP-1 (Tyrosinase Related Protein-1), TRP-2 (Tyrosinase Related Protein-2) 및 기타 단백질로 구성된 과립을 포함하고 있다. 모발에 있어서의 멜라닌은 모발의 색조를 결정하는 중요한 인자로서, 모발상부에 존재하는 멜라노사이트 내에서 생성되어 모발피질세포인 케라티노사이트에 전달된 후, 모발의 성장과 함께 위쪽으로 이동한다. 생리적 노화의 한 현상으로서 인식되는 백발은 모발 멜라노사이트의 수적 감소 및 멜라노사이트의 기능저하에 의한 멜라닌 생성의 감소에 의해 유발된다[7-9].

백발은 일반적으로 연령이 높아지면 발생하는 것으로, 노령이라는 느낌을 인상 깊게 하고, 특히 젊은 나이에 있어서 백발은 불청객이다. 그 때문에 백발을 감추기 위하여 백발의 염색 등에 의해 모발을 검게 염색하는 염색제가 많이 연구되고, 또한 널리 시판되고 있다. 그러나 흑발염색은 일시적인 방법으로 백발의 성장에 의해 다시 염색하지 않으면 안 되고, 또한 현재 널리 사용되고 있는 산화형 흑발염색은 산화제 등의 사용에 의해 두피에 손상을 준다. 따라서 백발의 발생을 방지하는 백발방지제에 대해서도 각종 연구가 행해지고 있다[10-12].

또한, 인체는 생물학적 원리에서 이탈해 산화과정을 거치면서 노화가 진행되는데 탈모는 노화의 진행이므로 항산화에 대한 치료가 이루어져야 하며, 여러 요인에 의한 생체 내에서의 스트레스와 염증이 모발의 성장에 어려움을 주는 것으로 알려져 있어 항염증에 관한 연구도 이루어지고 있다[13,14].

본 연구에서는 발모 및 탈모방지의 효과를 갖는 약재(당귀, 보골지, 측백엽, 한련초), 흰머리 방지의 효과를 갖는 약재(구기자, 복분자, 상백피, 숙지황, 여정실, 적하수오, 흑지마), 항균효과를 갖는 약재(고삼, 백지, 익모초), 혈액순환을 개선해주는 약재(단삼, 도인, 몰약, 감국, 유향, 인삼, 천궁, 합환피, 현호색)를 포함하는 23종 한방복합처방단(EEX라 칭함)을 발효 및 정제하여 그들의 항산화 효과, lipoxygenase 활성 저해효과, 5 α -reductase 활성 저해효과 및 B16 melanoma cell 내에서의 멜라닌 생성효과를 기존의 잘 알려진 성분들과의 비교로

Table 1. Composition of Oriental Medical Prescription

Herbal name	Amount (g)
<i>Angelica gigas</i> Nakai	1.75
<i>Psoralea corylifolia</i> Linne	2.75
<i>Biota orientalis</i> Endlicher	2.75
<i>Eclipta prostrata</i> Linne	2.75
<i>Lycium chinense</i> Miller	4.00
<i>Rubus coreanus</i> Miquel	6.00
<i>Morus alba</i> Linne	6.00
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino	4.00
<i>Ligustrum lucidum</i> Aiton	3.00
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg	4.00
<i>Sesamum indicum</i> Linne	3.00
<i>Sophora angustifolia</i> Siebold et Zuccarini	16.00
<i>Angelica dahurica</i> Benthham et Hooker	12.00
<i>Leonurus sibiricus</i> Linne	12.00
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	3.00
<i>Prunus persica</i> Batsch	3.00
<i>Commiphora molmol</i> Engler	2.00
<i>Chrysanthemum indicum</i> Linne	2.00
<i>Boswellia carterii</i> Birdwood	2.00
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	2.00
<i>Cnidium officinale</i> Makino	2.00
<i>Albizia julibrissin</i> Durazzini	2.00
<i>Corylais ternata</i> Nakai	2.00

효능을 평가하여 발모 및 탈모방지 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 약재는 (주)지유본초에서 구입하여 사용하였으며, 추출과정 및 분획에 사용된 용매들은 시약급을 구입하여 그대로 사용하였다. 실험에 사용한 시약으로는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, L-tyrosine, tyrosinase (from mushroom)은 Fluka (USA)에서 구입하였으며, xanthine, xanthine oxidase, lipoxygenase, linolenic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 또한, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA), fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), trypsin-EDTA solution (GIBCO, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA), α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH, Sigma, USA) 등을 사용하였다. 마우스 흑색종 세포주인 B16F1은 ATCC (American Type

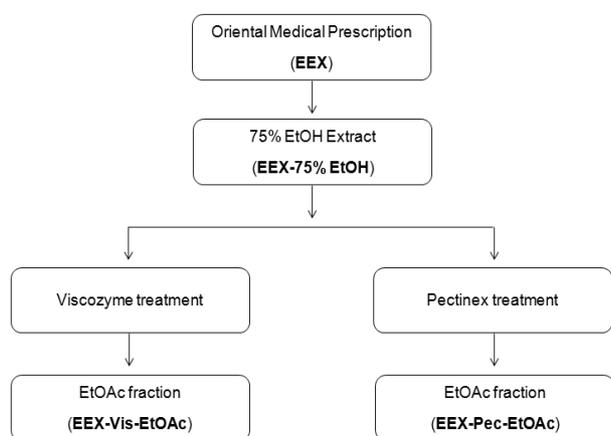


Figure 1. Scheme for preparation of samples from oriental medical prescriptions.

Culture Collection, USA)에서 분양받아 사용하였다. 기기로는 UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan), ELISA reader (EL800, BIO-TEK Instrument, USA) 등을 사용하였다.

2.2. 한방복합처방단의 추출 및 정제

Table 1에 기재된 23종의 약재 비율로 100 g를 정량하여 분쇄하고 추출기에 넣은 후, 75 % 에탄올(EtOH) 수용액 1 L을 넣고 환류 냉각 추출한 후 와트만 2번 여과지로 여과하고, 추출여액을 회전식 증발 건조기(rotary evaporator)에서 60 °C로 감압 농축하여 한방 복합 처방단 조추출물(EEX-75 % EtOH)을 3.27 g를 얻었다. 조추출물을 10 % EtOH수용액 1 L로 용해시킨 후, 상업적으로 판매되어 사용하고 있는 viscozyme L (100 FBG/g, Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex (5,000 FDU/mL, Novo Nordisk Co., Denmark)를 이용하여 효소처리를 실시하였다. Viscozyme은 arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase 등을 포함한 탄수화물분해 효소이며, pectinex은 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase를 주성분으로 하는 펙틴분해효소이다. 이 효소를 1 % 농도로 처리한 후 50 ~ 60 °C에서 10 h 동안 교반하면서 가수분해처리한 후, 동량의 hexane으로 탈지하고 ethyl acetate (EtOAc)로 분획 농축하여 시료 2종(EEX-Vis-EtOAc, EEX-Pec-EtOAc)을 제조하였다. 이들의 정제 모식도를 Figure 1에 나타내었고, 수율 및 물리적 특성을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Physical Properties of Oriental Medical Prescription

Material	Yield (%)	Appearance	pH
EEX-75 % EtOH	3.27	Paste	4.58
EEX-Vis-EtOAc	0.90	Powder	4.26
EEX-Pec-EtOAc	1.06	Paste	4.45

2.3. 한방복합처방단의 항산화효과 평가

2.3.1. 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 시험은 안정적인 자유라디칼 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical을 사용하는 방법으로 [15] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL에 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 2 mL로 하여 혼합하고, 실온에서 10 min동안 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 하기의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.3.2. 활성산소 소거효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거활성 평가는 Noro 등의 방법[16] 활용하여 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (Sigma), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, BSA (bovine serum albumin, Sigma), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 10 min동안 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25 °C에서 20 min 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂ (Sigma)를 넣어 반응을 정지시키고 UV-Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣고, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 소거율은 자유라디칼 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였다.

2.4. 한방복합처방단의 Lipoxygenase 활성 저해효과 평가

항염 활성효과를 확인하기 위해 lipoxygenase에 대한 활성저해를 측정하였다[17]. 1 mM linolenic acid 1 mL에 시료 0.1 mL (1 mg/mL), 0.1 M sodium phosphate

buffer (pH 7.0)에 용해시킨 lipoxygenase 0.9 mL을 넣은 후, 25 °C의 수욕조에서 10 min 동안 반응시켰다. 20 % (w/v) trichloroacetic acid 0.5 mL를 넣어 반응을 종결시키고, 0.6 % (w/v) thiobarbituric acid를 1 mL 넣은 후 끓는 물에서 10 min 동안 발색시켰다. 그 후 얼음물에 2 min 냉침시키고, n-butanol 2 mL를 넣고 진탕혼합한 후, 3,500 rpm에서 5 min 동안 원심분리하였다. 상층 (n-butanol)을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lipoxygenase 활성 저해율은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{활성 저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.5. 한방복합처방단의 5 α -Reductase 활성 저해효과 평가

5 α -reductase 활성 저해효과는 rat prostate 5 α -reductase를 이용하여 첨가한 [^{3H}]testosterone이 [^{3H}]dihydrotestosterone으로 전환되는 양으로 평가하였다[18]. 7 ~ 8주령된 SD 수컷을 ethyl ether로 마취시킨 후 경추 도살 하여 전립선을 적출하고, 곧바로 액체질소에 넣어서 보관하였고, 실험마다 필요한 양의 전립선을 꺼내어 사용하였다. 전립선을 4 °C의 homogenizer buffer (20 mM potassium phosphate (pH 6.6), 0.32 M sucrose, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))를 넣은 glass homogenizer에 넣고 뿌렇게 될 때까지 분쇄하였다. 원심분리(1,500 rpm, 20 min, 4 °C) 후 pellet을 얻은 후에 두 번 세척하고, pellet에 homogenizer buffer를 넣어 suspension하여 crude enzyme으로 사용하였다. Microtube에 crude enzyme과 시료 및 reaction buffer (40 mM potassium phosphate (pH 6.6), 200 μ M NADPH, 1 mM DTT, 120 nCi [1,2,6,7-^{3H}]T)를 넣어 최종 반응액을 500 μ L로 맞춘 후, 37 °C에서 1 h 동안 반응시켰다. 1 mL의 ethyl acetate를 넣고 vortex 후, 원심분리(1,000 rpm, 5 min)하여 상층액을 취해서 새로운 microtube로 옮긴 후, heating plate (60 °C)를 이용하여 완전히 건조하였다. Microtube에 50 μ L의 ethyl acetate를 넣고, TLC plate에 spotting하고 전개용매(50 % cyclohexane, 50 % ethyl acetate)하에서 3회 전개하였다. UV spectrometer로 254 nm에서 testosterone을 확인하고 10 % 황산을 뿌려서 dihydrotestosterone를 확인하였다. Testosterone과 dihydrotestosterone 부위를 가위로 오려내서 각각의 scintillation vial에 넣고 cocktail 10 mL을 넣어 β -counter로 측정하

여 전환율을 계산하고, 그 결과를 대조군(추출물을 첨가하지 않았을 때의 전환율)과 비교하여 다음 식으로 5 α -reductase 활성 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A = testosterone에서 dihydrotestosterone으로의 전환율(시료 미첨가 시)

B = testosterone에서 dihydrotestosterone으로의 전환율(시료 첨가 시)

2.6. 한방복합처방단의 흑모효과 평가

2.6.1. 세포 생존력 시험

본 실험에서 B16 세포주에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] assay를 Mosmann의 방법[19]을 변형하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

B16 Melanoma cell을 1×10^4 cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 4 h 정도 배양한 후, 각 well에 적당한 농도로 시료를 처리하여 CO₂ 배양기에서 72 h 더 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 μ L을 첨가하고 4 h 후 상등액을 제거하고, 150 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가한 후 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6.2. Melanin 생성량 측정

흑모 생성 촉진 효과를 검증하는 방법으로써, B16F1 멜라노마에 대한 멜라닌 생성율을 측정하여 흑모 생성 촉진 효과를 판단하였다. 세포주는 B16 melanoma cell사 용하였으며, 멜라닌 함량 측정은 Meyskens의 방법[20]

을 변형하여 사용하였다. B16F1 흑색종 세포를 10 % FBS가 함유된 DMEM 배지로 6 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 5 % CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 시료를 농도별로 배지에 희석하여 교체한 후, 최종 200 μ M α -MSH이 되도록 첨가하여 48 h 동안 더 배양하였다. 대조군은 시료를 첨가하지 않고 α -MSH만 첨가한 것으로 하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 10 % DMSO가 함유된 1 N NaOH를 첨가한 후 50 °C 항온조에서 세포내 멜라닌을 용해시켰다. 이 액을 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준 정량 곡선을 이용하여 멜라닌 양을 구하였으며, 총 단백질로 보정하였다.

2.7. 피부안전성 시험

한방 복합 처방단에 대한 피부안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 인체 첩포 시험을 실시하였다.

임상시험 시험기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 18세 이상의 여성 30명을 피험자로 선정하였다. 우선, 첩포 부위인 등을 70 % EtOH로 세척한 후, 준비된 시험물질을 IQ Ultra™ chamber 내에 20 μ L을 적하시켰다. 48 h가 지난 후 첩포를 제거하고 약 1 h간 안정을 취하도록 한 후 첫 판독을 시행하였고, 첩포 부착 후 96 h가 경과한 후 2차 판독을 시행하였다. 평가기준은 Forsch & Kligman [21]과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) guideline[22]을 반영한 판정기준에 따랐으며, 피부반응도의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{피부반응도}(\%) = \Sigma \frac{\text{가중치} \times \text{반응인원수}}{4(\text{최대가중치}) \times n(\text{전체인원수})} \times 100$$

2.8. 통계처리

모든 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었고 통계적 유의성은 SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Sciences, USA) software를 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

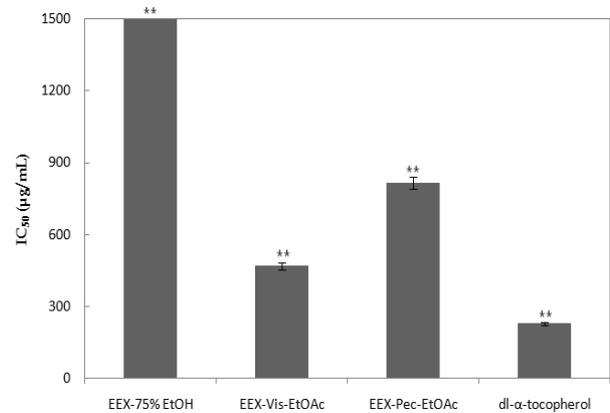


Figure 2. Effect of oriental medical prescriptions on DPPH free radical scavenging activity. Values represented in the figure are mean \pm SD of three replicates (** $p < 0.01$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 한방복합처방단의 항산화효과

3.1.1. 자유라디칼 소거효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다.

한방 복합 처방단의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였으며 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 dl- α -tocopherol (1,000 IU/g, Sigma)을 이용하여 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 free radical을 50 % 소거할 수 있는 농도 (IC₅₀)가 한방 복합 처방단의 75 % EtOH 추출물보다 viscozyme 또는 Pectinex로 효소처리한 분획물의 항산화 효과가 월등히 증가함을 확인하였다. Pectinex보다는 viscozyme 효소처리한 분획물에서 상대적으로 좋은 활성이 나타났으며, viscozyme으로 처리한 분획물은 dl- α -tocopherol과 유사한 항산화 활성을 나타내었다.

3.1.2. 활성산소 소거효과

Superoxide radical 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였으며 양성 대조군으로 dl- α -tocopherol을 이용하였다. 그 결과 superoxide radical을 50 % 소거할 수

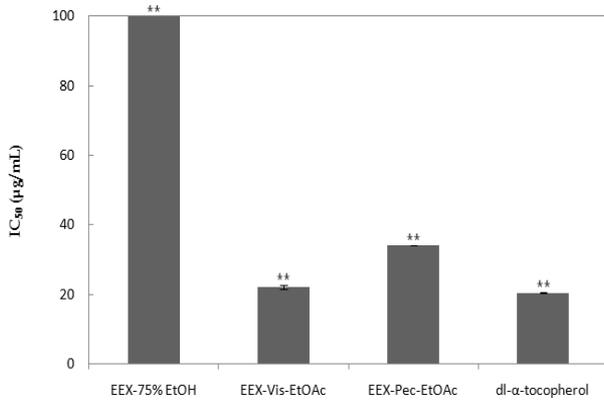


Figure 3. Effect of oriental medical prescriptions on superoxide anion scavenging activity. Values represented in the Figure are mean \pm SD of three replicates (** $p < 0.01$).

있는 농도(IC₅₀)로 한방복합처방단의 75 % EtOH 추출물 보다 viscozyme 또는 pectinex로 효소처리한 분획물의 항산화 효과가 월등히 증가함을 확인하였다. Pectinex 보다는 viscozyme 효소처리한 분획물에서 상대적으로 좋은 활성을 나타내었다. DPPH radical 소거활성과 같이 종합해 볼 때, viscozyme 및 pectinex로 처리한 한방 복합 처방단은 지질 radical과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

3.2. 한방복합처방단의 Lipoxygenase 활성 저해효과

Lipoxygenase는 linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid와 같이 분자 내에 1,4-cis,cis-pentadiene 구조를 갖는 불포화 지방산에 분자상 산소를 첨가하여 1,3-cis, transdiene 5-hydroperoxide를 생성하는 산화효소로 아라키돈산으로부터 각종 염증 및 알레르기성 질환에 관여하는 leucotriene 생합성의 첫 번째 반응에 관여하는 효소이다. 따라서 구조적, 메커니즘적으로 lipoxygenase와 유사한 soybean lipoxygenase를 이용하여 lipoxygenase의 저해 활성을 측정하여 항염 활성 효과를 평가할 수 있다. 그 결과, 한방복합처방단의 75 % EtOH 추출물에서는 1 mg/mL에서 lipoxygenase 활성 저해효과가 나타나지 않았으나, viscozyme 또는 pectinex로 효소처리한 분획물에서 항염효과가 증가함을 알 수 있었다. 특히, pectinex로 효소처리한 분획물에서는 1 mg/mL에서 24.053 ± 2.265 %로 상대적으로 좋은 lipoxygenase 활성 저해효과를 나타내었다.

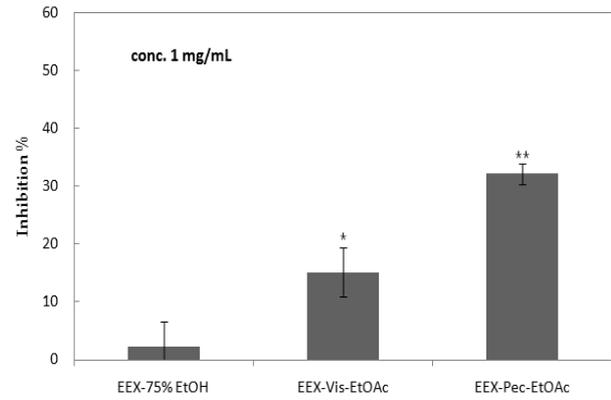


Figure 4. Effect of oriental medical prescriptions on lipoxygenase inhibition. Values represented in the figure are mean \pm SD of three replicates (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

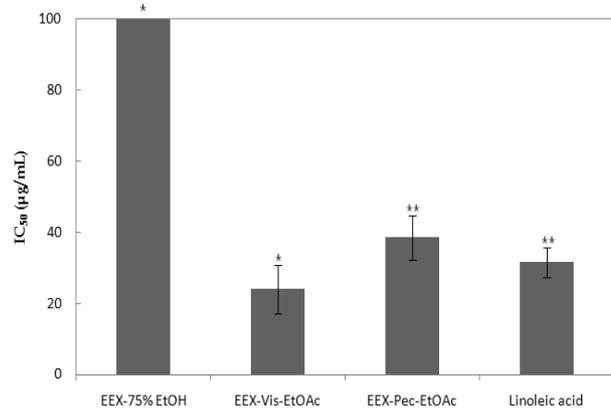


Figure 5. Effect of oriental medical prescriptions on 5 α -reductase inhibition. Values represented in the figure are mean \pm SD of three replicates (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3. 한방복합처방단의 5 α -Reductase 활성 저해효과

탈모를 유발하는 활성 남성호르몬인 dihydrotestosterone의 생성을 촉진하는 5 α -reductase 활성 억제력을 측정하였으며 양성 대조군으로는 linolenic acid를 사용하여 5 α -reductase 활성 억제력을 비교하였다. 그 결과 5 α -reductase 활성을 50 % 저해할 수 있는 농도(IC₅₀)가 한방복합처방단의 75 % EtOH 추출물보다 viscozyme 또는 pectinex로 효소처리한 분획물에서 월등히 증가함을 확인하였다. pectinex보다는 viscozyme 효소처리한 분획물에서 상대적으로 좋은 활성이 나타났으며, viscozyme으로 처리한 분획물은 linolenic acid보다도 좋은 저해효과를 나타내었다.

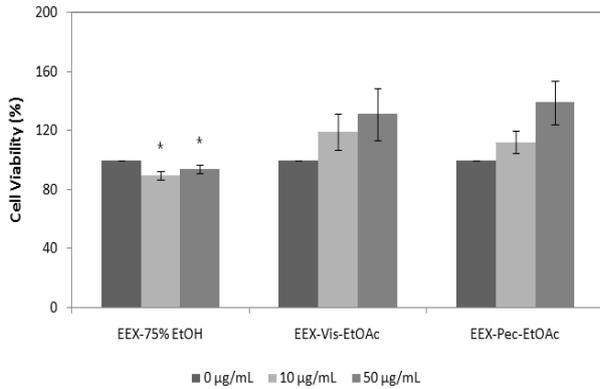


Figure 6. Effect of oriental medical prescriptions on the viability of B16 melanoma cells. Values represented in the figure are mean \pm SD of three replicates ($^*p < 0.05$).

3.4. 한방복합처방단의 흑모효과

3.4.1. Melanoma Cell의 생존율

한방 복합 처방단이 B16 melanoma cell의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 시료를 농도별로 처리하고, 48 h 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 75 % EtOH 추출물 의한 세포의 생존율은 50 μ g/mL에서도 90 % 이상의 생존력을 보였으며, viscozyme 또는 pectinex로 효소 처리한 분획물에서는 세포 증식 효과를 보임을 확인하였다. 따라서 50 μ g/mL 이하의 농도 범위에서 한방복합처방단의 B16 melanoma cell에 대한 독성이 미미한 것으로 판단하고 50 μ g/mL 이하의 농도로 실험을 진행하였다.

3.4.2. Melanin 생성 촉진 효과

B16 세포주는 마우스에서 유래한 멜라닌이라는 흑색 색소를 분비하는 세포로서 멜라닌을 생합성한다. 한방 복합 처방단이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 함량을 측정된 결과를 Figure 7에 나타내었다. 한방복합처방단의 75 % EtOH 추출물보다 viscozyme 또는 pectinex로 효소 처리한 분획물에서 멜라닌 생성량이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 이 결과는 모근 주위의 멜라노사이트를 활성화시켜 멜라닌의 생산을 증가시킴으로써 흑모 생성을 촉진하는 것으로 판단되어진다.

3.5. 피부자극 평가

피험자 30명에 대하여 실시한 인체 첩포 시험의 검사 결과에 근거하여 48 h 및 72 h의 평균 반응도를 비교하

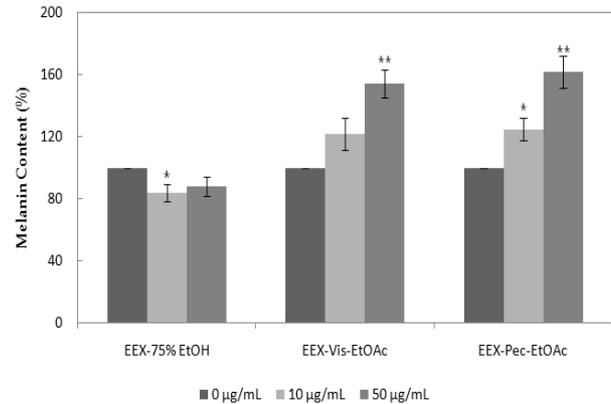


Figure 7. Stimulatory effect of oriental medical prescriptions concentration on melanin content of B16 melanoma cells. Values represented in the figure are mean \pm SD of three replicates ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

였으며, 이를 기준으로 하여 그 결과를 판정한 결과, 한방복합처방단의 viscozyme 및 pectinex로 각각 효소 처리한 분획물 1 %에 대한 피부반응도(means)는 0으로 대조군과 마찬가지로 자극이 없는 저자극으로 판정되어 독성이 거의 존재하지 않는 안전한 소재임을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 한방 복합 처방단을 이용하여 효소 처리한 후 탈모 방지 및 발모 효능에 대한 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다.

한방복합처방단을 viscozyme 및 pectinex로 효소처리한 분획물이 75 % EtOH 추출물과 비교하여 항산화 효과, 항염 효과, 발모 효과 및 흑모생성 효과가 월등히 증가함을 알 수 있었다. 이는 한방 복합 처방단 배당체형태의 화합물이 발효에 의해 aglycone 형태의 화합물로 전환함으로써 생리활성 효과가 증진된 것으로 여겨지며, 변환된 aglycone 형태의 화합물의 구조분석을 LC-MSMS로 진행 중이다.

DPPH radical 소거효과에서 viscozyme과 pectinex로 효소 처리한 분획물은 각각 IC_{50} 값이 $22.219 \pm 0.622 \mu$ g/mL, $34.155 \pm 0.095 \mu$ g/mL를 나타내었으며, superoxide radical 소거효과에서는 각각 $470.056 \pm 15.023 \mu$ g/mL, $816.135 \pm 24.012 \mu$ g/mL로 우수한 항산화 효과를 보였다.

Lipoxygenase 활성 저해 효과는 1 mg/mL에서 viscozyme과 pectinex로 효소 처리한 분획물에서 각각 $15.180 \pm 4.269 \%$, $32.169 \pm 1.767 \%$ 의 저해 효과를 나타내었

며, 5 α -reductase 활성 저해 효과는 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 저해 효과를 나타내었으며 각각 IC₅₀ 값이 29,983 \pm 6,832 μ g/mL, 38,535 \pm 6,319 μ g/mL로 탈모 방지 효과를 나타내었다. B16 melanoma cell 에서는 농도 의존적으로 멜라닌 생합성이 증가함을 확인함으로써 흑모 생성을 촉진하는 것을 확인하였다. 한방 복합 처방단의 효소 처리 분획물은 피부 자극없이 모발 제품의 기능성 원료로서 큰 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 중소기업기술혁신개발사업(과제번호 S1074059)의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- R. Paus and K. Foitzik, In search of the "hair cycle clock": a guided tour, *Differentiation*, **72**(9-10), 489 (2004).
- E. Fuchs, B. J. Merrill, C. Jamora, and R. DasGupta, At the roots of a never-ending cycle, *Dev Cell*, **1**(1), 13 (2001).
- S. Hendrix, B. Handjiski, E. M. Peters, and R. Paus, A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice, *J. Invest. Dermatol.*, **125**(1), 42 (2005).
- W. S. Park, C. H. Lee, B. G. Lee, and I. S. Chang, The extract of *Thuja occidentalis* semen inhibited 5 α -reductase and androchronogenetic alopecia of B6CBAF1/j hybrid mouse, *J. Dermatol. Sci.*, **31**(2), 91 (2003).
- J. S. Park, M. H. Yeom, W. S. Park, K. M. Joo, H. S. Rho, D. H. Kim, and I. S. Chang, Enzymatic hydrolysis of green tea seed extract and its activity on 5 α -reductase inhibition, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(2), 387 (2006).
- J. Liu, K. Kurashiki, K. Shimizu, and R. Kondo, 5 α -reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(2), 392 (2006).
- S. Tanimura, Y. Tadokoro, K. Inomata, N. T. Binh, W. Nishie, S. Yamazaki, H. Nakauchi, Y. Tanaka, J. R. McMillan, D. Sawamura, K. Yancey, H. Shimizu, and E. K. Nishimura, Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells, *Cell Stem Cell*, **8**(2), 177 (2011).
- R. Cui, H. R. Widlund, E. Feige, J. Y. Lin, D. L. Wilensky, V. E. Igras, J. D'Orazio, C. Y. Fung, C. F. Schanbacher, S. R. Granter, and D. E. Fisher, Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation, *Cell*, **128**(5), 853 (2007).
- E. K. Nishimura, S. R. Granter, and D. E. Fisher, Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche, *Science*, **307**(5710), 720 (2004).
- E. J. Lee, S. Y. Bae, and Y. H. Lee, The stimulatory effects of *Epimedium koreanum* Nakai extract on melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(4), 265 (2009).
- S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
- K. Y. Sarin and S. E. Artandi, Aging, graying and loss of melanocyte stem cells, *Stem Cell Rev.*, **3**(3), 212 (2007).
- M. A. Jones, M. J. Raymond, Z. Yang, and N. Smirnov, NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase, *J. Exp. Bot.*, **58**(6), 1261 (2007).
- K. Sayama, K. Kajiya, K. Sugawara, S. Sato, S. Hirakawa, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, D. Metzger, P. Chambon, S. Akira, R. Paus, J. Kishimoto, and K. Hashimoto, Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice, *PLoS One.*, **5**(6), e11275 (2010).
- M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
- T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of daphne genkwa, *Chem. Pharm.*

- Bull.*, **31**, 3984 (1983).
17. T. J. Ha, K. Shimizu, T. Ogura, and I. Kubo, Inhibition mode of soybean lipoxygenase-1 by quercetin, *Chem. Biodivers*, **7**(8), 1893 (2010).
 18. O. I. Salem, M. Frotscher, C. Scherer, A. Neugebauer, K. Biemel, M. Streiber, R. Maas, and R. W. Hartmann, Novel 5α -reductase inhibitors: synthesis, structure-activity studies, and pharmacokinetic profile of phenoxybenzoylphenyl acetic acids, *J. Med. Chem.*, **49**(2), 748 (2006).
 19. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
 20. P. R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, **92**(4), 565 (1989).
 21. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test : a new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**(1), 35 (1979).
 22. CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, 20036, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., U.S., (1991).