

참도박의 Wnt 경로 활성화를 통한 모발성장 효과

강정일¹ · 김상철¹ · 전유진² · 고영상³ · 유은숙¹ · 강희경^{1*}

¹제주대학교 의학전문대학원 약리학교실, ²제주대학교 해양과학대학 해양의생명과학부,
³제주대학교 의학전문대학원 미생물학교실

Hair-growth Promoting Effect of *Grateloupia elliptica* Via the Activation of Wnt Pathway

Jung-Il Kang¹, Sang-Cheol Kim¹, You-Jin Jeon², Young-Sang Koh³,
Eun-Sook Yoo¹ and Hee-Kyoung Kang^{1*}

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

²Faculty of marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

³Department of Microbiology, School of Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

Abstract – *Grateloupia elliptica* has been reported to have the proliferation effect of dermal papilla cells (DPCs), which play important roles in the regulation of hair cycle. In the present study, we examined *in vitro* and *in vivo* hair growth-promoting effect of *Grateloupia elliptica*. When isolated rat vibrissa follicles were treated with extract of *G. elliptica*, the hair-fiber lengths of the vibrissa follicles significantly increased. Furthermore, the *G. elliptica* extract accelerated the telogen-angen transition in C57BL/6 mice. To investigate the molecular mechanisms of the *G. elliptica* extract on the proliferation of DPCs, we examined the activation of wnt/ β -catenin signaling which is known to regulate hair follicle development, differentiation and hair growth. The *G. elliptica* extract activated wnt/ β -catenin signaling via the increase of β -catenin and phospho-GSK3 β . In addition, the *G. elliptica* extract increased the level of cyclin E and CDK2, while the level of p27^{kip1} was decreased. These results suggest that the the *G. elliptica* extract may induce hair growth by proliferation of DPCs via cell-cycle progression and the activation of Wnt/ β -catenin signaling.

Key words – Hair growth, *Grateloupia elliptica*, C57BL/6 mice, Rat vibrissa follicles, Dermal papilla cells, Wnt/ β -catenin

인체의 모발은 약 10만 내지 15만개 정도이며, 각각의 모발은 서로 다른 모발주기를 가진다. 성장기, 퇴행기, 휴지기를 거치면서 모발은 성장하고 탈락한다. 그 결과 일일 평균 60개~100개의 모발이 정상적으로 탈락하게 된다. 일반적으로 탈모증이라 함은 이러한 주기 중에서 성장기의 모발비율이 적어지고 퇴행기 또는 휴지기의 모발이 많아져 비정상적으로 모발이 탈락하는 숫자가 많아지는 것을 의미한다.^{1,2)} 탈모는 과거에는 중, 장년층에서 주로 발생하였지만, 현재는 산업의 고도화에 따른 환경오염과 스트레스 등에 의한 탈모인구가 급증하고 있다. 탈모는 남성과 여성 모두에서 발생하며 미적 관심의 증대 및 탈모 인구의 증가로 치료제의 개발 및 그 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만,

탈모의 원인이 무엇인지는 정확히 알려져 있지 않다.¹⁻³⁾ 현재 탈모방지 및 모발성장을 촉진하는 약물로 미국식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)의 승인을 받은 것으로서 finasteride와 minoxidil이 있다. Finasteride는 type II 5 α -reductase의 활성을 억제시키는 물질로서 전립선 비대증 치료제로 개발되었으며, minoxidil은 고혈압 치료를 위한 혈관확장제로 개발되었으나, 두 약물 모두 모발성장을 촉진함이 알려져 발모제로 이용되고 있다.^{4,5)} Minoxidil의 작용기전은 명확히 밝혀지지 않았으나, Wnt/ β -catenin 경로의 활성화⁶⁾ 및 K_{ATP} 채널 개방효과^{7,8)}등이 발모효과를 유도하는 것으로 생각되고 있다. Minoxidil은 또한 모낭의 기저에 위치한 증배엽 유래의 모유두 세포의 apoptosis를 저해하여 모유두 세포를 증식함이 알려져 있다.⁹⁾

모발성장과 모발재생에 필수적인 모낭 줄기세포의 활성화 및 hair germ cell의 증식 등의 과정에 Wnt/ β -catenin 신

*교신저자(E-mail): pharmkhk@jejunu.ac.kr
(Tel): +82-64-754-3846

호전달이 중요한 역할을 함이 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ Wnt 리간드가 수용체에 결합하면 세포질 내의 β -catenin 분해가 방지되고 세포핵으로 β -catenin의 이동이 증가하여 타겟 유전자의 발현을 조절하게 된다. 특히, protein kinase A(PKA), AKT 및 glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 등의 활성화는 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로를 활성화시킴이 보고되어 있다.¹³⁻¹⁵⁾

모유두 세포는 모낭내의 여러 종류의 상피세포들과 상호작용을 하며 모낭의 형성, 모발의 재생 및 모발의 성장에 중요한 역할을 함이 알려져 있다.¹⁶⁾ 특히 모유두세포의 성장 증식 및 apoptosis 억제제는 모발의 성장을 유지하는데 필요함이 보고되어 있다.^{6,7,9)} 세포의 증식은 세포주기의 진행과 밀접하게 관련되며, 이러한 세포주기에 관련된 단백질에는 cyclins, cyclin-dependent kinases(CDKs) 및 CDK 억제자 같은 단백질들이 있다.¹⁷⁾ 이러한 세포주기 단백질 중 cyclin D1은 세포주기 중 G0/G1에서 S phase로 진행될 때에 증가함이 알려져 있고, Wnt/ β -catenin 신호전달 경로의 target gene의 하나로 밝혀져 있다.¹⁸⁾

참도박(*Grateloupia elliptica*)은 홍조류 지누아릿과의 해조로서, 잎 모양으로 여러 갈래로 갈라지며 자란다. 해안의 바위틈에 뭉쳐나며, 한국과 일본 등지에 분포한다. 참도박의 효능으로 α -glucosidase를 억제하는 항 당뇨 효능,¹⁹⁾ pro-inflammatory 매개인자를 억제하는 항염증 효능,²⁰⁾ 탈모방지 효능,²¹⁾ 및 항암 효능²²⁾ 등이 보고되어 있다. 특히, 본 저자들은 5 α -reductase 억제, PGE₂생성증가, 비듬 균의 증식 억제 및 모유두 세포 증식의 효능을 나타내는 참도박의 탈모방지 효능에 대한 가능성을 보고하였다.²¹⁾ 그러나, 모낭 배양을 이용한 *in vitro* 모델 및 C57BL/6 마우스를 이용한 *in vivo* 모델에서의 육모 효능을 직접적으로 조사한 것은 아니므로, 본 연구에서는 참도박의 배양 모낭의 hair-fiber 길이 성장 효능 및 *in vivo*에서의 육모 효능을 조사하고, 그 작용기전을 규명하여 참도박을 탈모방지제 및 탈모 치료제로 이용할 수 있는 근거를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 참도박은 제주도 동부 지역의 성산포 해안에서 채집하였으며, 제주대학교 해양과학대학의 이기완 교수가 감별하였다. 채집한 참도박은 이물질을 제거하기 위하여 수세하였으며, 동결건조를 거친 후 분쇄기를 이용하여 분쇄하고, 20 mesh 필터를 이용하여 균질화 하였다. 동결건조한 참도박 500 g을 70% 주정 5 L에 넣고 교반하여 24시간 추출하였으며, 차후 2~3회 반복하여 추출하였다. 이렇게 추출된 해조류 추출물을 감압필터를 이용하여 여과하고, 감압건조하여 참도박 추출물을 제조하였다. 시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹여 실험에 사용하였으며, DMSO의

최종 농도는 0.2%를 초과하지 않도록 하였다.

Rat Vibrissa Follicles의 분리 및 배양 - 생후 3주령인 Wistar rat 수컷(Japan SLC, Japan)을 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 ethyl ether로 마취 후 경추도살 하였다. Rat 왼쪽과 오른쪽 mystacial pads를 분리하여 100 units/mL penicillin-100 μ g/mL streptomycin(Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 E/P buffer[Earle's balanced salts solution(EBSS, Sigma, MO, USA) + phosphate-buffered saline(PBS, Sigma MO, USA)]에 넣었다. 해부 현미경으로 관찰하며 vibrissa follicles을 조심스럽게 분리하였다. 모낭이 모두 분리될 때까지 E/P buffer를 넣은 Petri dish에 분리된 모낭을 넣고 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 1시간 정도 배양하였다. 24 well plate의 각 well에 2 mM L-glutamine(Gibco Inc, NY, USA), 10 μ g/mL insulin(Sigma, MO, USA), 50 nM hydrocortisone(Sigma, MO, USA)과 100 units/mL penicillin-100 μ g/mL streptomycin을 포함하는 500 μ L의 William E medium(Gibco Inc, NY, USA)을 넣고, 하나의 well에 하나씩의 모낭을 넣어서 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 한 실험군에 8-10개의 모낭을 이용하였으며, 배양 중에 배지는 3 일마다 교환하였다. 시료들을 다양한 농도로 처리하였으며, 양성 대조물질인 minoxidil(Sigma, MO, USA)는 10 μ M의 농도가 되게 처리하였다.²³⁾

Hair-fiber 길이 성장 효능 - 배양중인 vibrissa follicle 형태는 현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 촬영하였다. 모낭 길이는 image analyzer(DP controller; Olympus, Japan)를 사용하여 0, 7, 14 및 21일에 측정하였다. 모낭 길이 변화의 평균값을 구하고 대조군의 평균길이와 비교하여 성장 정도를 측정하였다.

In Vivo 육모 효능 평가 - 생후 6주된 암컷 C57BL/6 마우스를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 1주간 동물 사육실 환경에 적응과 모발주기를 맞춘 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 23 \pm 3°C, 12 시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험동물은 격리용 마우스 케이지에서 사육하였고, 실험용 사료를 자유로이 급여하였다. 마우스 등 부위를 실험개시 전에 소동물용 clipper로 제모 하였다. 실험군은 5개의 군으로 설정하여 대조군, 양성대조군(MYNOXYLTM, 현대약품) 및 참도박(0.1, 1 및 10 μ g/mL) 도포군으로 하였다. 한 실험군에 각 8 마리의 마우스를 실험에 사용하였다. 각각의 시료들은 200 μ L씩 제모부위에 매일 한번 도포하였고, 실험 시작 후 1, 12, 19, 26 및 34 일에 hair 성장 상태를 육안으로 확인하기 위하여 마취한 후 사진촬영을 실시하였다. 성장기로의 유도는 도트매트릭스 면적측정(dotmatrix planimetry)을 이용하여²⁴⁾ 34일째 black skin/total skin(%)의 평균을 구하고 대조군의 평균과 비교하여 성장기로의 유도를 측정하였다.

모유두 세포의 배양 - 흰쥐 수염에서 분리된 모유두 세포를 불멸화한 세포(Rat vibrissa immortalized dermal papilla

cell)²⁵⁾는 (주)아모레퍼시픽 피부과학연구소로부터 제공받았다. 모유두 세포를 100 units/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin(Gibco Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 DMEM (Hyclone Inc, UT, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대배양 하였다.

Western Blot Analysis – 모유두 세포는 1% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 24 시간 동안 배양한 후에 참도박 추출물(10 및 100 µg/ml) 및 10 µM minoxidil을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포는 PBS로 2회 세척한 후 200 µl의 lysis buffer[50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), 25 µg/mL aprotinin, 25 µg/mL leupeptin and 1% NP-40]를 첨가한 다음, 4°C에서 30분 동안 lysis 시켰다. Cell lysate를 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었고 실험에 사용전까지 -20°C에 보관하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준물질로 사용하여 Bradford method에 의하여 정량하였다.²⁶⁾ 20-30 µg의 lysate를 8-12% mini gel SDS-PAGE 로 변성분리하여 polyvinylidene fluoride(PVDF) membranes(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 200 mA에서 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% nonfat dried milk가 함유된 Tween-20-TBS(T-TBS)(50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 용액에서 2시간 동안 실시하였다. Membrane은 여러 단백질의 발현을 조사하기 위해 CDK2(1:2000), Cyclin E(1:2000), p27^{kip1}(1:1000), β-catenin(1:2000), phospho-GSK3β(1:1000), GSK3β(1:1000) and β-actin(1:5000)에 대한 primary antibody로 4°C에서 overnight 실시하였다. Secondary antibody는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG 를 1:5000으로 희석하여 1시간 동안 상온에서 진행하였다. 그 다음 T-TBS로 membrane을 3회 세척한 후, ECL 기질(Intron, Seoul, Korea)로 1분 동안 반응시킨 다음 X-ray film(AGFA, Mortsel, Belgium)에 감광하였다.

통계분석 – 모든 측정결과는 평균 ± 표준편차 또는 표준 오차로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검정은 student's t-test으로 검정하였으며, p-value가 0.05 이하일 경우 유의성을 인정하였다. 통계처리는 SPSS 12.0K for Windows (Release 12.0.1. SPSS Inc. USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Rat vibrissa follicle culture model을 이용하여 참도박의 *in vitro* 육모 효능을 조사하였다. Rat vibrissa follicles은 주령에 따라 모발주기가 동일하며, 분리된 vibrissa follicles은

*in vitro*에서 23일 정도까지 배양이 가능하다.^{27,28)} 생후 3주령 rat의 성장기 vibrissa follicles을 분리하여 3주간 배양하면서 모낭 길이를 측정하여 참도박 추출물이 육모 효능 있는지 조사하였다. 21일째 참도박 추출물 처리군과 대조군과의 모낭의 길이 차이(%)를 비교한 결과, 1, 10 및 100 µg/ml을 각각 처리하였을 때 대조군(100.0%)보다 hair fiber의 성장이 168.1%(*P*<0.05), 95.3% 및 27.4%로 관찰되었다. 양성대조군인 10 µM minoxidil은 153.5%(*P*<0.05) 성장을 나타내었다(Fig. 1). 참도박 추출물 1 µg/ml 처리하였을 때의 hair-fiber 길이 성장 효능은 양성대조군인 minoxidil의 hair-fiber 길이 성장 효능보다 더 큰 것이다. 반면에 참도박 추출물 10 및 100 µg/ml 처리하였을 때의 hair-fiber 길이 성장이 대조군보다 감소하였는데, 그 이유로 다음의 가능성을 생각할 수 있다. 처리한 시료가 단일 물질이 아닌 추출물이어서 많은 성분이 작용한다는 점과, 모낭에는 모낭줄기세포, 외근모초, 내근모초, 각질세포, 메라닌세포 및 모유두세포 등 다양한 종류의 세포가 있어 세포에 따라 다른 작용이 나타날 수 있다는 점이다. 또한, rat vibrissa follicle culture model을 이용한 실험에서 3일마다 배지를 교환할 때마다 시

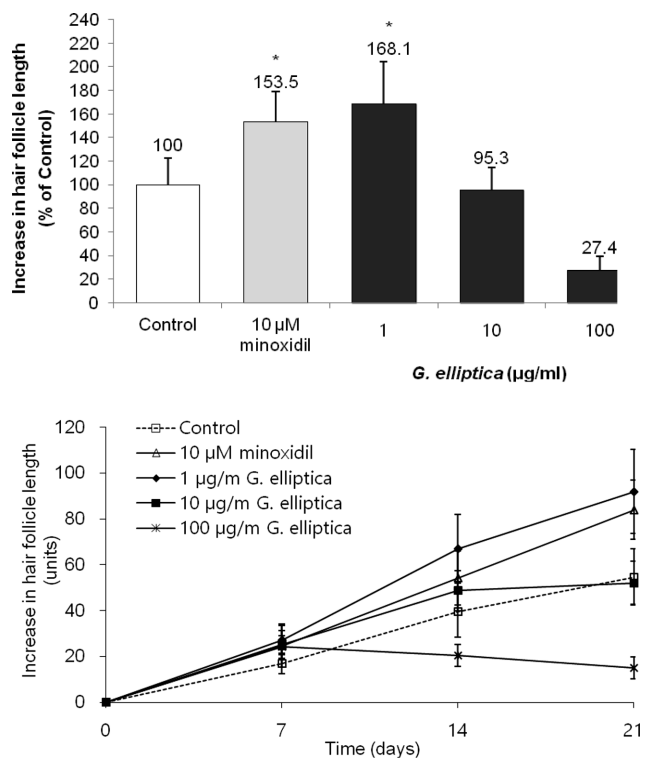


Fig. 1. The effect of the *G. elliptica* extract on the increase of hair-fiber length. Vibrissa follicles were treated with the *G. elliptica* extract (1, 10 and 100 µg/ml) for 21 days. Stimulation with minoxidil served as a positive control. The difference in the length of vibrissa follicles of the control group on day 21 was considered to be 100%. Data are expressed as the mean ± SE. **p*<0.05 vs. control.

료를 처리하였다. 이로 인한 시료 및 시료의 대사물이 모낭에 축적될 수 있으며, 축적된 성분에 의하여 세포마다 다양한 효과가 나타날 수 있다고 사료된다.

참도박 추출물에 의한 *in vitro* 육모 효과가 실제 *in vivo* 동물모델에서도 나타나는지 C57BL/6 마우스를 사용하여 평가하였다. C57BL/6 마우스는 피부의 melanocyte가 모낭에만 존재하며, 모발 주기가 휴지기(telogen)에서 성장기(anagen)로 진행이 되면 피부색깔이 핑크색에서 검은색으로 변하는 것을 확인할 수 있다.²⁹⁾ Fig. 2-A에서 보이는 것처럼 참도박 추출물 도포군에서 제모 후 19일부터 피부색의 변화가 관찰되었고, 제모 후 26 일 및 34일째에 참도박 추출물 도포군에서 대조군에 비하여 현저한 모발의 성장을 확인할 수 있었다. 참도박 추출물 도포군의 모발의 성장기 유도 효능을 dotmatrix 면적측정법²⁴⁾을 이용하여 정량적으로 분석하였다. 34 일째 black skin/total skin(%)를 비교한 결과, 0.1, 1 및 10 µg/ml 참도박 도포군은 대조군(29.7±7.2)에 비하여 각각 49.8±10.4%, 57.5±11.9% 및 69.8±8.9%로 대조군에 비하여 높은 성장기 유도 효능을 나타내었다(Fig. 2-B). 양성 대조군으로 사용한 MINOXYL™ 도포군은 제모 후 15일 이후부터 피부색상의 변화 및 뚜렷한 모발 성장 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 참도박 추출물이 *in vivo*에서 모발의 성장기 유도를 촉진할 수 있음을 시사한다.

모유두 세포는 모낭의 기저에 위치하는 중배엽 유래 세포로써, 상피세포로 이루어진 모기질 세포(matrix cells)와의 상호작용을 통해 모발의 형성 및 성장에 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있다.^{30,31)} 이미 본 저자들은 참도박 추출물을 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml 처리하였을 때, 모유두 세포의 증식이 농도의존적으로 증가하므로 탈모방지 효능을 가질 수 있다고 보고하였다.²¹⁾ 그래서 본 연구에서는 참도박 추출물이 모유두 세포의 성장증식을 증가시키는 분자적 기전을 규명하기 위하여 세포주기 조절 단백질의 발현을 조사하였다. 포유류 세포는 세포증식의 주요 과정인 세포주기 진행을 위해 cyclin E/CDK2 complex의 활성화, cyclin D1 증가 및 pRB의 인산화 증가 등을 필요로 함이 알려져 있다.³²⁻³⁴⁾ Minoxidil은 모유두 세포에서 cyclin E 및 CDK2의 level 증가, p27^{kip1} level 감소를 통해 세포주기 진행을 촉진하여 모유두 세포의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 참도박 추출물의 모유두 세포증식 증가 효과가 세포주기 조절 단백질에 의하여 조절되는지 확인하기 위하여, 모유두 세포의 증식 효과가 현저한 농도인 10 및 100 µg/ml로 참도박 추출물을 처리하여 cyclin E, CDK2, 및 p27^{kip1}의 발현을 조사하였다. 그 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이, 참도박 추출물을 모유두 세포에 24시간 동안 10 및 100 µg/ml 농도로 처리하였을 때, Cyclin E 및 CDK2의 발현 증가 양상을 확인할 수 있었고, 세포주기 억제자인 p27^{kip1}의 발현

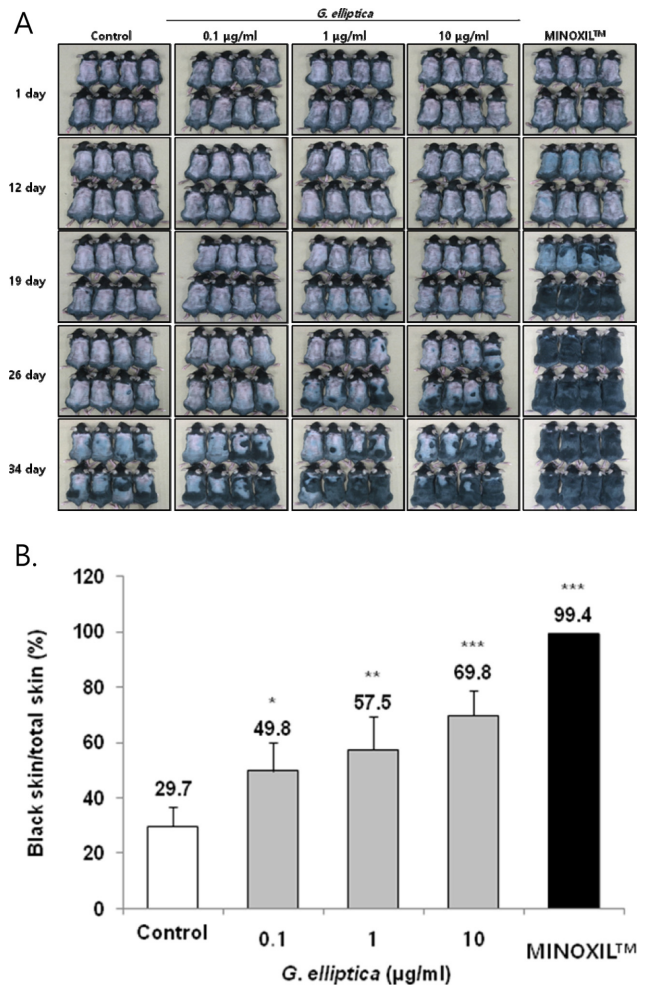


Fig. 2. The effect of the *G. elliptica* extract on the anagen induction in C57BL/6 mice. After shaving, the back skins were treated with the *G. elliptica* extract, vehicle and MINOXYL™ every day for 34 days. (A) The back skins were photographed at 1, 12, 19, 25 and 34 days after depilation. (B) On day 34, to analyze the quantitative assessment of anagen induction, dotmatrix planimetry was performed. The transparency was put on a photo of a mouse to mark the areas that were in different stages (pink = telogen, anagen = black). Afterward a dotmatrix (sheet with a uniform defined dot pattern) was placed under the marked foil to calculate the percentages of the regions of interest by counting the dots. The percentage of anagen induction was calculated by the equation [(black skin/total skin)×100]. Data are presented as the mean±S.E. (n=8). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. vehicle treated control.

은 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 양성대조물질로 사용한 minoxidil의 처리 역시 참도박 추출물과 비슷한 결과를 보임을 확인하였다(Fig. 3). 한편, Wnt/β-catenin 신호전달 경로는 모발성장, 세포증식 조절에서 중요한 역할을 한다.^{6,36)} Wnt/β-catenin 신호전달 경로는 다양한 인자에 의해

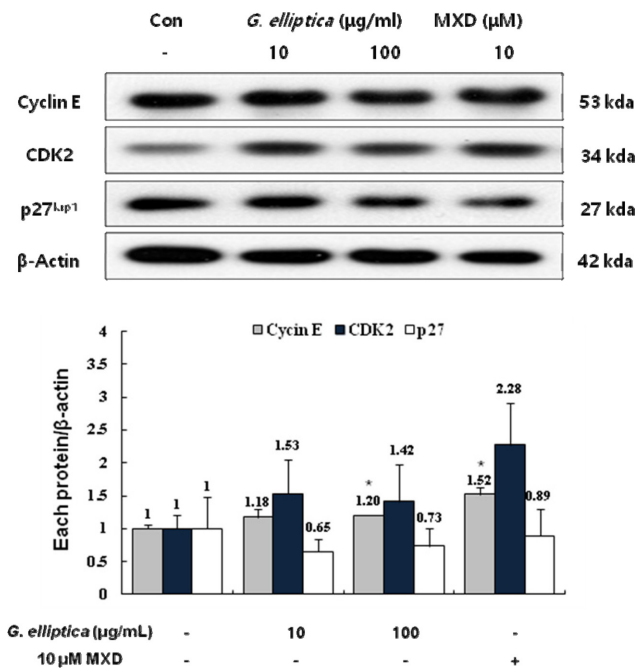


Fig. 3. The effects of the *G. elliptica* extract on the levels of cell cycle associated proteins in cultured dermal papilla cells. Immortalized DPCs (1.0×10^5 cells/mL in 100 mm dishes) were pre-incubated for 24 h under 1% serum conditions, the cells were treated with the *G. elliptica* extract (10 and 100 μg/mL) and minoxidil (MXD, 10 μM) for 24 h. Whole cell lysates from DPCs were analyzed for the levels of cyclin E, CDK2 and p27^{kip1} by western blot.

조절되며 특히, Akt의 활성화는 β-catenin의 인산화(ser552) 및 GSK3β의 인산화(ser9)를 유도하며, PKA는 β-catenin의 인산화(ser552 및 ser675)를 유도하여 결국 Wnt/β-catenin 신호전달 경로를 활성화 하게 된다.^{13-15,37} 그 이후에 β-catenin의 안정화 및 세포핵으로의 이동 촉진 등의 과정이 일어나 target gene의 발현을 조절하게 된다.^{13,15} Immortalized dermal papilla cells에 모유두 세포의 증식 효과가 현저한 농도인 10 및 100 μg/ml로 참도박 추출물을 24 시간 처리하였을 때, 10 μg/ml의 농도에서 β-catenin의 발현은 의미있게 증가하였고 상위 조절자인 GSK-3β의 인산화를 확인할 수 있었다. 양성대조물질로 사용한 minoxidil에 의한 β-catenin의 발현증가 및 GSK-3β의 인산화도 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과들은 참도박 추출물이 Wnt/β-catenin 신호전달 경로의 활성화하고, 세포주기 조절 단백질들의 발현을 조절하여 모유두 세포의 증식 효능을 나타냄을 시사한다. Kwack 등은 minoxidil이 human DPCs에서 PKA, Akt 및 GSK3β의 활성화를 경유한 β-catenin 신호전달 경로의 조절을 통해 육모 효능을 나타냄을 보고하고 있다.⁶ 간질 치료에 사용하는 약물인 valproic acid 및 섬오가피의 성분인 acankoreoside J도 모유두 세포에서 Wnt/β-catenin 신호전달

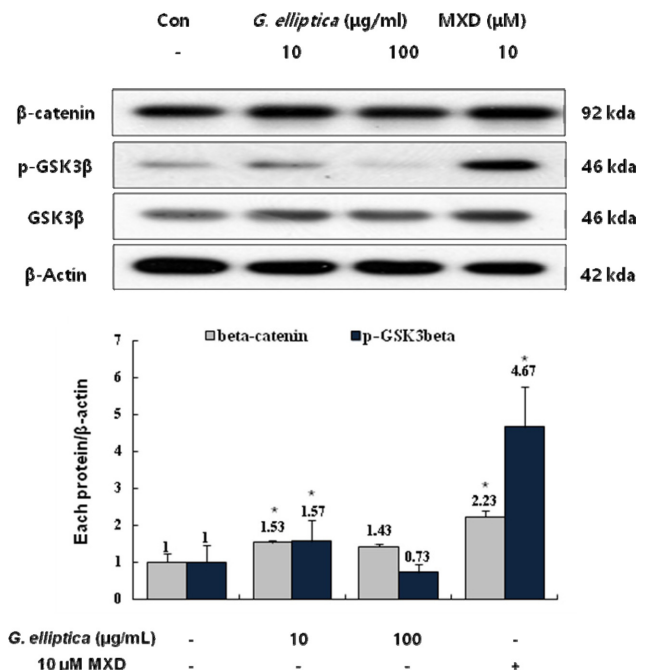


Fig. 4. The effects of the *G. elliptica* extract on the levels of Wnt/β-catenin signaling proteins in cultured dermal papilla cells. Immortalized DPCs (1.0×10^5 cells/mL in 100 mm dishes) were pre-incubated for 24 h under 1% serum conditions, the cells were treated with *G. elliptica* extract (10 and 100 μg/mL) and minoxidil (MXD, 10 μM) for 24 h. Whole cell lysates from DPCs were analyzed for the levels of β-catenin, phospho-GSK3β and GSK3β by western blot.

경로의 활성화하여 육모효능을 나타낸다고 알려져 있다.^{38,39} 한편, 안드로젠성 탈모의 주요 원인으로 알려져 있는 dihydrotestosterone(DHT)은 모유두 세포에서 β-catenin level을 감소시키는 것으로 확인되고 있다.⁴⁰ 그런데, 참도박 추출물은 testosterone이 DHT로 전환되는데 관여하는 효소인 5α-reductase를 억제하는 효능이 있으므로,²¹ *in vivo*에서 DHT level을 감소시킬 수 있을 것이다. 이는 DHT의 모유두 세포에의 작용을 저하시켜 DHT에 의한 β-catenin level 감소를 억제하므로 또한 육모 효능을 나타낼 수 있을 것으로도 생각된다.

참도박의 활성 성분에 대한 연구는 거의 없으나, 같은 지누아릿과 해조에서는 다당류가 항바이러스 작용, 혈관생성 억제작용, 항산화 및 항암 작용 등 다양한 생리활성을 나타냄이 보고되고 있다.⁴¹⁻⁴³ 또한, 석곡의 다당류 성분이 육모 작용을 나타낸다는 보고도 있으므로,⁴⁴ 참도박의 다당류 성분이 육모효능을 나타내는지 조사할 필요가 있을 것이다.

결론

본 연구에서는 *in vitro* 및 *in vivo* 모델을 이용하여 참도

박 추출물의 육모 효능을 확인하였다. 또한, 참도박 추출물이 모발의 성장에서 중요한 역할을 하는 모유두 세포에서 cell cycle proteins, Wnt/ β -catenin 신호전달 경로의 활성화에 의한 세포의 성장증식을 촉진 효과를 통해 모낭의 성장기를 유도하거나 성장기를 유지시킴을 밝혔다. 이와 같은 연구결과는 참도박 추출물이 탈모치료 및 예방제로 이용될 수 있는 가능성을 가지고 있다는 근거를 제시하는 것이다.

사 사

이 논문은 2015학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원 사업에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Price, V. H. (1999) Treatment of hair loss. *N. Engl. J. Med.* **341**: 964-973.
- Ellis, J. A., Sinclair, R. and Harrap, S. B. (2002) Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* **4**: 1-11.
- Cotsarelis, G. and Millar, S. E. (2001) Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol. Med.* **7**: 293-301.
- Kaufman, K. D. and Dawber, R. P. (1999) Finasteride, a Type 2 5 α -reductase inhibitor, in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **8**: 403-415.
- Kaufman, K. D. (2002) Androgens and alopecia. *Mol. Cell Endocrinol.* **198**: 89-95.
- Kwack, M. H., Kang, B. M., Kim, M. K., Kim, J. C. and Sung, Y. K. (2011) Minoxidil activates beta-catenin pathway in human dermal papilla cells: A possible explanation for its anagen prolongation effect. *J. Dermatol. Sci.* **62**: 154-159.
- Hamaoka, H., Minakuchi, K., Miyoshi, H., Arase, S., Chen, C. H. and Nakaya, Y. (1997) Effect of K⁺ channel openers on K⁺ channel in cultured human dermal papilla cells. *J. Med. Invest.* **44**: 73-77.
- Shorter, K., Farjo, N. P., Picksley, S. M. and Randall, V. A. (2008) Human hair follicles contain two forms of ATP-sensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil. *FASEB J.* **22**: 1725-1736.
- Han, J. H., Kwon, O. S., Chung, J. H., Cho, K. H., Eun, H. C. and Kim, K. H. (2004) Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *J. Dermatol. Sci.* **34**: 91-98.
- Ouji, Y., Yoshikawa, M., Moriya, K. and Ishizaka, S. (2007) Effects of Wnt-10b on hair shaft growth in hair follicle cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**: 516-522.
- Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S. E. and Cotsarelis, G. (2007) Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**: 316-320.
- Greco, V., Chen, T., Rendl, M., Schober, M., Pasolli, H. A., Stokes, N., Dela Cruz-Racelis, J. and Fuchs, E. (2009) A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* **4**: 155-169.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M. and Klein, P. S. (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev. Biol.* **185**: 82-91.
- Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I., and Kikuchi, A. (2005) Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 9063-9072.
- Monick, M. M., Carter, A. B., Robeff, P. K., Flaherty, D. M., Peterson, M. W., and Hunninghake, G. W. (2001) Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *J. Immunol.* **166**: 4713-4720.
- Stenn, K. S. and Paus, R. (2001) Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* **81**: 449-494.
- Johnson, D. G. and Walker, C. L. (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 295-312.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-426.
- Kim, K. Y., Nam, K. A., Kurihara, H. and Kim, S. M. (2008). Potent alpha-glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* **69**: 2820-2825.
- Yang, E. J., Moon, J. Y., Kim, M. J., Kim, D. S., Kim, C. S., Lee, W. J., Lee, N. H. and Hyun, C. G. (2010). Inhibitory effect of Jeju endemic seaweeds on the production of pro-inflammatory mediators in mouse macrophage cell line RAW 264.7. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **11**: 315-322.
- Kang, J. I., Kim, S. C., Han, S. C., Hong, H. J., Jeon, Y. J., Kim, B., Koh, Y. S., Yoo, E. S. and Kang, H. K. (2012) Hair-loss preventing effect of *Grateloupia elliptica*. *Biomol. Ther.* **20**: 118-124.
- Cho, M., Park, G. M., Kim, S. N., Amna, T., Lee, S. and Shin, W. S. (2014) Glioblastoma-specific anticancer activity of pheophorbide a from the edible red seaweed *Grateloupia elliptica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 346-353.
- Matsuda, H., Yamazaki, M., Asanuma, Y., and Kubo, M. (2003) Promotion of hair growth by ginseng radix on cultured mouse vibrissa hair follicles. *Phytother. Res.* **17**: 797-800.
- Ohnemus, U., Uenalan, M., Conrad, F., Handjiski, B., Mecklenburg, L., Nakamura, M., Inzunza, J., Gustafsson, J.A. and Paus, R. (2005) Hair cycle control by estrogens: Catagen induction via estrogen receptor (ER)-alpha is checked by ER beta signaling. *Endocrinology* **146**: 1214-1225.

25. Filsell, W., Little, J. C., Stones, A. J., Granger, S. P. and Bayley, S. A. (1994) Transfection of rat dermal papilla cells with a gene encoding a temperature-sensitive polyomavirus large T antigen generates cell lines a differentiated phenotype. *J. Cell Sci.* **107**: 1761-1772.
26. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
27. Philpott, M.P., Green, M.R. and Kealy, T. (1992) Rat hair follicle growth in vitro. *Br. J. Dermatol.* **127**: 600-607.
28. Philpott, M.P. and Kealey, T. (2000) Cyclical changes in rat vibrissa follicles maintained *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 1152-1155.
29. Müller-Röver, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S. and Paus, R. (2001) A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 3-15.
30. Jahoda, C. A., Horne, K. A. and Oliver, R. F. (1984) Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* **311**: 560-562.
31. Horne, K. A., Jahoda, C. A. and Oliver, R. F. (1986) Whisker growth induced by implantation of cultured vibrissa dermal papilla cells in the adult rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97**: 111-124.
32. Sherr, C. J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677.
33. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**: 1501-1512.
34. Prall, O. W., Sarcevic, B., Musgrove, E. A., Watts, C. K. and Sutherland, R. L. (1997) Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J. Biol. Chem.* **272**: 10882-10894.
35. Kang, J. I., Kim, E. J., Kim, M. K., Jeon, Y. J., Kang, S. M., Koh, Y. S., Yoo, E. S. and Kang, H.K. (2013) The promoting effect of *Ishige sinicola* on hair growth. *Mar. Drugs* **11**: 1783-1799.
36. Wangefjord, S., Brändstedt, J., Ericson Lindquist, K., Nodin, B., Jirström, K. and Eberhard, J. (2013) Associations of beta-catenin alterations and MSI screening status with expression of key cell cycle regulating proteins and survival from colorectal cancer. *Diagn. Pathol.* **8**: 10.
37. Brudvik, K. W., Paulsen, J. E., Aandahl, E. M., Roald, B. and Taskén, K. (2011) Protein kinase A antagonist inhibits β -catenin nuclear translocation, c-Myc and COX-2 expression and tumor promotion in Apc(Min/+) mice. *Mol. Cancer* **10**: 149.
38. Jo, S. J., Choi, S. J., Yoon, S. Y., Lee, J. Y., Park, W. S., Park, P. J., Kim, K. H., Eun, H. C. and Kwon, O. (2013) Valproic acid promotes human hair growth in *in vitro* culture model. *J. Dermatol. Sci.* **72**: 16-24.
39. Kim, S. C., Kang, J. I., Park, D. B., Lee, Y. K., Hyun, J. W., Koh, Y. S., Yoo, E. S., Kim, J. A., Kim, Y. H. and Kang, H. K. (2012) Promotion effect of acankoreoside J, a lupane-triterpene in *Acanthopanax koreanum*, on hair growth. *Arch. Pharm. Res.* **35**: 1495-1503.
40. Kang, J. I., Kim, S. C., Kim, M. K., Boo, H. J., Kim, E. J., Im, G. J., Kim, Y. H., Hyun, J. W., Kang, J. H., Koh, Y. S., Park, D. B., Yoo, E. S. and Kang, H. K. (2015) Effects of dihydrotestosterone on rat dermal papilla cells *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* **757**: 74-83.
41. Wang, S. C., Bligh, S. W., Shi, S. S., Wang, Z. T., Hu, Z. B., Crowder, J., Branford-White, C. and Vella, C. (2007) Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**: 369-375.
42. Yu, Q., Yan, J., Wang, S., Ji, L., Ding, K., Vella, C., Wang, Z. and Hu, Z. (2012) Antiangiogenic effects of GFP08, an agar-type polysaccharide isolated from *Grateloupia filicina*. *Glycobiology* **22**: 1343-1352.
43. Ye, D., Jiang, Z., Zheng, F., Wang, H., Zhang, Y., Gao, F., Chen, P., Chen, Y. and Shi, G. (2015) Optimized extraction of polysaccharides from *Grateloupia livida* (Harv.) Yamada and biological activities. *Molecules* **20**: 16817-16832.
44. Chen, J., Qi, H., Li, J. B., Yi, Y. Q., Chen, D., Hu, X. H., Wang, M. L., Sun, X. L. and Wei, X. Y. (2014) Experimental study on *Dendrobium candidum* polysaccharides on promotion of hair growth. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **39**: 291-295.

(2016. 3. 4 접수; 2016. 3. 31 심사; 2016. 5. 13 게재확정)