

## Effect of *Allium cepa* (red) and *Angelica gigas* Nakai on Hair-growth Promotion in C57BL/6 Mice

Jin Young Lee<sup>1</sup>, Jae Kyung Dong<sup>2</sup> and Jae Seon Kang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Korea

Received September 8, 2020 / Revised September 17, 2020 / Accepted October 12, 2020

This study was conducted to evaluate the hair-growth promotion effect in C57BL/6 mice of a new substance mixed with *Allium cepa* (red)-bioconversion extract and *Angelica gigas* Nakai. The ethanol extract of *Allium cepa* (red) was bioconverted through the use of the *Bacillus subtilis* KJ-3 (BS3) strain, which was named Red-BCQ. The quercetin content of Red-BCQ increased by about 7.4-fold after bioconversion. *Angelica gigas* Nakai extract (Agnex) contains a large amount of coumarins such as decursin (D) and decursinol angelate (DA). A 1 mg portion of Agnex contained 0.4146 mg of D and 0.3659 mg of DA. Minoxidil has been known to promote hair growth. In this study, the hair-growth promotion effects of Red-BCQ, Agnex, and a mixture of both Red-BCQ and Agnex were compared with 5% minoxidil. Twenty-five mice were divided into five experimental groups including saline (CON), 5% minoxidil (PCON), Red-BCQ (RA), Agnex (AG), and a Red-BCQ-Agnex mixture (RAG)-treated group. Samples were administered orally once a day at a fixed time for 4 weeks. Hair growth was monitored by photograph at 7, 14, 21, and 28 days. We also observed 5 $\alpha$ -reductase, alkaline phosphatase (ALP),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), insulin-like growth factor (IGF)-1, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, antioxidant enzyme, and the hair follicles of the skin tissue. In all the results, the RAG-administered group showed greater antioxidative and hair-growth promotion effects than the other groups. These data suggest that RAG has potent stimulating activity on hair growth in C57BL/6 mice.

**Key words** : *Allium cepa* (red), *angelica gigas* Nakai, decursin, hair growth, quercetin

### 서 론

탈모는 계속해서 증가하는 추세로, 남성과 여성 모두의 신체적, 정신적 건강에 영향을 미친다[28]. 또한, 그 메커니즘이 명확히 밝혀지지 않아서 질병으로 단정짓기 보다는 유전적 장애, 국소 혈류장애, 영양과 호르몬의 불균형, 자가면역 장애, 노화, 스트레스, 다른 질병에 의한 부작용 등 다양한 원인에 의해 발생한다[18]. 현재 모발성장을 촉진하는 약물로 미국 FDA (Food and Drug Administration)에서 승인을 받은 성분은 미녹시딜(minoxidil)과 피나스테라이드(finasteride)가 있다[36]. 미녹시딜의 발모효과에 대한 작용기전은 명확하지는 않으나 혈행개선에 의한 영양공급의 증가를 주요 기전으로 여기고 있으며, 최초 고혈압치료를 위한 혈관확장제로 사용된 만큼 혈액순환 개선을 통한 모낭상피세포의 성장을 촉진시키는 것이 발모에 도움을 주는 것으로 생각되고 있다[37]. 피나스

테라이드는 5 $\alpha$ -Reductase 저해제로 혈중 dihydrotestosterone (DHT) 농도를 낮추어 발모효과를 나타낸다고 알려져 있으며 이 약물은 전립선비대증 치료제로도 사용되고 있다[2]. 하지만 이 약물들은 장기간 동안 복용해야 효과가 나타나고 대표적인 부작용으로 홍반, 가려움증 등 피부관련 질환을 동반할 뿐만 아니라 약물복용 중단 시 원래대로 되돌아가서 발모효능이 사라지는 등의 단점들이 보고된 바 있다[27]. 이러한 문제점들이 대두되면서 최근 탈모 예방 및 발모관련 천연물 소재에 대한 관심이 증가되고 있다. 천연물 소재들의 발모효과를 확인하기 위해 모발 생성과정에 관여하는 성장인자들의 발현양상[21], 모발성장에 관련된 효소활성[24], 항혈전 및 혈행개선 효과[6], 항산화 효과[9] 등을 발모지표인자로 확인한다. 적양과(*Allium cepa* (red))는 백색이나 황색 양파에 비해 quercetin 함량이 높고, 안토시아닌 성분과 같은 유용성분들이 다량 함유되어 있다[22]. 특히, 적양파에 함유된 quercetin은 혈중 지질농도를 낮추어 혈류개선 효과뿐만 아니라 항산화 효과도 가지고 있다[20]. 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 한국산 당귀로 coumarin계열의 다양한 물질 중 decursin (D)과 decursinol angelate (DA)가 다량 함유되어 있다[30]. 대표적인 약리작용으로는 당뇨성 고혈압, 빈혈, 폐경기 증후군, 월경통, 복통, 편두통 등에 치료효과가 있는 것으로 밝혀졌다[14, 15]. 본 연구에서는 *Bacillus subtilis* KJ-3 (BS3)로 발효전환한 적양과

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4882, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : [jskang28@hanmail.net](mailto:jskang28@hanmail.net)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

추출물과 참당귀 추출물 혼합물의 발모효과를 C57BL/6 마우스에서 확인하여 발모효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 적양과 생물전환 추출물(Red-BCQ)의 제조 및 지표성분 분석

적양과는 경상남도 농업기술원 양과연구소(경상남도 창녕)로부터 공급받았다. 적양과 건조분말 16 kg을 알코올 80 l에 넣어 40°C에서 3시간 동안 추출했다. 그런 다음 이 추출물을 하우스징 필터(pore size: 25 µm)로 여과하고 여액을 원심분리(14,981 xg, 15분)하여 상등액을 얻었다. 상등액을 농축한 것을 Red-Q라고 명명하였고, 이를 생물전환하기 위한 재료로 사용하였다. 생물전환은 *Bacillus subtilis* KJ-3 (KCCM 11523P: BS3) 균주를 사용하여 퀘르세틴 전환율을 높였다. BS3 균주를 Tryptic soy broth (TSB) 5 ml에 접종한 후 42°C, 150 rpm의 속도로 16시간 배양하여 종균으로 사용하였다. 종균을 미네랄 배지(옥수수 전분 1.5 g, 효모 추출물 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, KCl 0.05 g, NaCl 0.03 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, MnSO<sub>4</sub> 0.003 g, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g 함유)에 5% 비율로 접종하였다. Red-Q와 배양 배지는 1:4 비율로 혼합하여 55°C, 150 rpm에서 4시간 동안 배양한 후 실온에서 2시간 동안 보관하였다. 14,981 xg에서 15분간 원심분리 후 침전물을 70% 에탄올에 용해시킨 다음 원심분리(14,981 xg, 15분)하여 얻은 상등액을 농축하여 Red-BCQ를 제조하였다. 균주 배양에 사용된 Bacto™ Soy Broth와 Bacto™ agar는 Becton Dickinson (Franklin Lake, NJ, Franklin Lakes, USA)에서 구입하여 사용하였다. 발효 배양기는 Ecell3000s (Ecell, 서울, 한국), 진탕배양기는 세영 SH-803R (서울, 한국), 원심분리기는 LABOENGIN 원심분리기 (Scanspaped 1735R, 대전, 한국)를 사용하였다. HPLC (Waters 2690, San Diego, California, USA)를 사용하여 Red-Q, Red-BCQ의 퀘르세틴 함량을 분석하였다. 검정곡선은 퀘르세틴 표준품을 이용하여 작성하였으며 시료는 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 500 µg/ml 농도로 여과하여 분석하였다. 분석 조건은 다음과 같다. Column은 Zorbax Eclipse XDB-C18 칼럼(4.6 mm × 250 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)을 사용하였고, column 온도는 35°C였다. 이동상은 2% 아세트산(A)과 아세토니트릴(B)을 60:40(v/v)으로 혼합한 용액을 사용하였다. 유량은 1.3 ml/min, 주입량은 20 µl, 사용된 검출기는 광다이오드 검출기(Photo Diode Array Ditector), 370 nm의 파장에서 분석하였다.

### 참당귀 추출물(Agnex)의 제조 및 지표성분 분석

참당귀는 심마니 산삼농협(경상남도 함양군)에서 구입하였다. 총 15 kg의 건조 참당귀 분말에 75 l의 알코올에 첨가하여 40°C에서 3시간 동안 보관한 후, 하우스징 필터(포어 크기: 25

µm)로 여과하였다. 여과물에 2배 부피의 물을 넣어 pH를 5로 조정된 뒤 6시간 후 원심분리(14,981 xg, 15분)하여 침전물을 얻었다. 침전물에 70% (v/v) 에탄올을 5배 부피로 첨가하여 녹인 후 여과액을 농축하여 함량을 분석하였다. D와 DA의 검출에 대한 최적 조건은 HPLC (Agilent Technologies, 1100 series, USA), column (Agilent Zorbax SB-C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm), UV 검출기(Photo-Diode Array UV/Vis detector, Agilent Technologies, 1100 series, USA)를 이용하여 329 nm의 파장에서 분석하였다. Column의 온도는 상온으로 유지하였고, 이동상은 아세트산과 아세토니트릴을 70:30(v/v)으로 혼합한 용액에 포말산을 0.1% (v/v)가 되도록 첨가하여 사용하였다.

### 실험동물 및 시료 처리

6주령 15 g 내외의 음성 마우스 C57BL/6는 ㈜샘타코 바이오 코리아(서울, 한국)에서 분양 받아 동물 사육실 내 실험동물용 케이지에서 1주일의 적응기간을 거친 후 4주간의 실험에 투입하였다. 동물사육실은 무균실로 실내온도 22±1°C, 습도 55±5%를 자동으로 유지하고 12시간 단위로 점등점멸이 되는 환경으로 조성되었다. Ethyl ether로 가볍게 마취시킨 다음 동물용 제모기를 이용하여 마우스의 등 부위의 털을 제거하였고, 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 제모제(Niclean, Ildong Pharmaceutical, Co., LTD, Seoul, Korea)를 피부에 도포하여 3분간 방치 후 제모를 완료하였다. 24시간 후부터 saline을 경구투여한 음성대조군(CON), 5% minoxidil이 함유된 경구용 제제인 pancidil을 투여한 양성대조군(PCON), Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)를 경구투여한 실험군(RA), Agnex (25 mg/kg body weight)를 경구투여한 실험군(AG), Red-BCQ와 Agnex 혼합물을 경구투여한 실험군(RAG)으로 분리하여 각각의 약물을 매일 1회 4주간 경구투여 하였다. 각 그룹당 개체수는 5마리로 실험하였으며 총 25마리의 실험동물을 사용하였다. 실험 종료 16시간 전에는 사료의 공급을 중단하여 이 후 대사에 영향을 미치지 않도록 하였다. 실험종료 시 복대정맥에서 혈액시료를 채취하고 혈청을 분리하여 이 후 생체지표 측정에 사용하였다. 또한, 조직분석과 면역화학적 분석을 위해 간 조직과 등 피부를 적출 후 전처리하여 바로 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 SUACUC (Silla University, Animal Care and Use Committee)의 승인(SUACUC-2018-012)을 받아 진행하였다.

### 육안적 평가에 의한 발모효과의 분석

실험 시작 후 1, 2, 3, 4주차에 털이 자라는 상태를 확인하기 위하여 가볍게 ethyl ether로 마취시킨 후 사진촬영을 하였다. 털이 자란 상태를 육안적으로 판단하여 점수화하기 위해 각 군별로 비교하였다. 육안으로 관찰한 결과를 다음과 같은 기준으로 점수화하였다(2주, 4주차). 80-100%(5점), 60-70%(4점),

40-59%(3점), 20-39% (2점), 0-19%(1점)[29]. 10명의 평가자에 의해 평가하여 기록하였으며, 각 평가자들의 점수를 합산하여 각 군별로 평균치를 산정하였다.

### 조직검사

실험종료 시점에 perfusion에 의하여 혈액을 제거하고 mouse의 등 피부조직을 적출하였다. 적출한 조직 중 일부분을 취하여 10% formaldehyde (pH 7.4 인산완충용액으로 용해) 용액에 48시간 고정시킨 후, 70%, 80%, 90%, 100% (v/v) ethanol에서 순차적으로 각각 탈수시켰다. 탈수시킨 조직을 xylylene으로 투명화 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 microtome을 이용하여 5  $\mu$ m의 조직절편을 제작하였다. Hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색한 후에 봉입하여 광학현미경으로 조직을 관찰하였다.

### 조직 중 항산화효소 측정

동물실험 종료 후 간을 적출하여 간 무게의 5배에 해당하는 PBS (phosphate buffer solution 0.05 M pH 7.4)를 넣고 간을 균질화한 후 실험재료로 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry법 [19]으로 740 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준단백질시료로 bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다.

Malonaldehyde (MDA)를 정량하기 위하여 간균질액을 시험관에 각각 0.5 ml씩 triplicate로 분취한 뒤 thiobarbituric acid (TBA)변법으로 7% SDS (sodium dodecyl sulfate)로 용해시켜 여기에 0.67% acetic acid 혼합시약을 2 ml를 첨가하여 95°C water bath에서 50분간 가온시킨 후 즉시 급냉시키고 butanol 5 ml를 넣고 원심분리 (150 × g, 10분)한 뒤 상등액을 채취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,4,4-tetra-ethoxypropane를 사용하여 표준검량선을 작성한 후 MDA 값을 정량하였다.

SOD 활성 측정은 Fridovich법을 변형하여 측정하였다[3]. Potassium phosphate buffer 용액(100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7.4)과 1 mM xanthine, 1% deoxycholate (DOC), 1.5 mM potassium cyanate (KCN), 0.2 mM cytochrome C를 혼합한 후에 간균질액을 첨가하였다. 마지막으로 xanthine oxidase (XOD)를 첨가하여 550 nm의 파장에서 2분간 효소활성을 측정하였다.

CAT 활성 측정은 Aebi법으로 측정하였다[1]. 0.05 M PBS (pH 7.0) 완충액 1.9 ml에 간균질화 시료 0.1 ml를 혼합하였다. 여기에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 1 ml를 첨가한 뒤 240 nm에서 1분 30초간 효소 활성을 측정하였다.

### 5- $\alpha$ Reductase의 정량

실험종료 후 EDTA tube에 모은 혈액을 원심분리(1,348 xg, 4°C, 10분)하여 plasma를 분리한 후 분석을 위한 시료로 사용하였다. 5- $\alpha$  reductase의 측정은 steroid 5- $\alpha$  reductase를 정량

하기 위한 Enzyme Linked Immunosorbent Assay Kit (Mybiosource, San Diego, USA, cat. no. MBS2021309)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 측정하였다.

### Alkaline phosphatase (ALP)와 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) 활성 측정

실험종료 후 적출한 피부조직에 그 무게의 4배에 해당하는 PBS를 첨가하여 조직균질기로 파쇄하였다. 그 후 원심분리 (1,348 xg, 4°C, 10분)하여 상등액을 채취해 실험에 사용하였다. Alkaline phosphatase colorimetric assay kit (Genetex: GTX85593)를 이용하여 ALP 활성을 측정하였고, gamma glutamyl transferase activity colorimetric assay kit (biovision: K784-100)를 이용하여  $\gamma$ -GT 활성을 측정하였다. 모두 제조사의 매뉴얼에 따라 측정하였다.

### 모발성장인자, 탈모유발인자의 발현 측정

Mouse 피부 조직에서 단백질을 추출하기 위해 털을 제거하고 피부 조직을 차가운 PBS로 세척한 뒤, PI cocktail (Cat No. P8340, Lot No. 037M4055V, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)이 함유된 RIPA buffer (Cat No. R2002, Lot No. R0219R29S, 바이오세상, 서울, 한국) 300  $\mu$ l/100 mg tissue를 첨가하여 균질화하였다. 이후 BCA protein assay kit (Cat No. 23227, Lot No. RG235629, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 각 샘플의 단백질을 정량하였다. Western blot을 수행하기 위해, 추출한 단백질과 loading buffer를 첨가하여 동일 농도의 단백질을 함유하는 시료를 준비하여 Western blot을 실시하였다. 15%(w/v) SDS-PAGE gel을 만든 후, well 당 동량의 sample을 로딩 후 nitrocellulose membrane에 blotting 하였다. 이후 skim-milk와 BSA를 사용하여 membrane을 blocking한 후, TBS-T를 이용하여 membrane을 세척하였다. 세척 후 1차 항체는 TGF- $\beta$ 1 (Cat No. ab92486, Lot No. GR3237963-7, Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:500, IGF-1 (Cat No. ab9572, Lot No. GR21525-66, Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:1,000,  $\beta$ -actin (Cat No. #8457s, Lot No. 6, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 1:1,000의 농도로 처리하여 4°C에서 15시간 동안 반응하였다. 다음 날 TBS-T를 이용하여 membrane을 세척한 후 2차 항체(#7074, Lot No. 28, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 TGF- $\beta$ 1 membrane, IGF-1 membrane 및  $\beta$ -actin membrane에 각각 1:6,000, 1:4,000 및 1:20,000의 농도로 90분 동안 반응시켰다. TBS-T를 이용하여 각각의 membrane을 세척한 후 Super Signal West Pico (Cat No. 34577, Lot No. TA262523, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Super Signal West Femto (Cat No. 34095, Lot No. QL227785B, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질 band를 확인하였다. 산출된 band의 intensity는 Alpha Ease FC soft-

ware (Alpha Innotech, San Leandro, CA)를 이용하여 정량화 하였다[23].

**통계적 분석**

본 연구의 모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, 통계 프로그램을 이용하여 분산 분석(ANOVA)을 실시하였다. 각 그룹간의 차이를 검정하기 위하여 Duncan의 사후 테스트(Duncan's post hoc test)를 실시하였다. 통계 분석은 SPSS 버전 13.0 통계 소프트웨어(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$  및  $p < 0.005$ 로 표현하였다.

**결과 및 고찰**

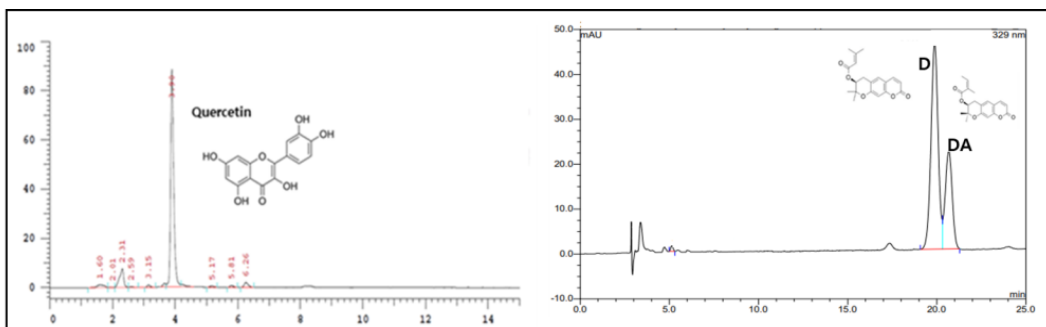
**Red-BCQ와 Agnex의 지표성분 함량 분석**

적양파는 오래 전부터 우리 식단에 광범위하게 사용되어 왔으며, 트리글리세리드 감소, 항산화 활성, 항혈전 효과 등의 다양한 생리학적 효능을 발휘하는 것으로 알려져 있다[32]. 양파에 많이 함유되어 있는 플라보노이드에는 퀘르세틴 4'-글루코사이드, 퀘르세틴 3,7-디글리코사이드, 퀘르세틴 4',7-글리코사이드, 3,4'-디글리코사이드, 퀘르세틴, 퀘르세틴 아글리콘, 캠페롤 모노글리코사이드 등이 있으며, 이 중 약 80%가 퀘르세틴 디글리코사이드, 모노글리코사이드, 퀘르세틴 아글리콘으로 존재한다[20]. 양파는 외피와 내피 중 외피에 그 중에서도 외피의 색깔이 짙을수록 퀘르세틴 함량이 높은 것으로 보고되었다[13]. 혈행개선 효과가 알려져 있는 퀘르세틴이 상대적으

로 적양파에 조금 더 많이 함유되어 있지만, 이것의 함량증가를 위한 연구는 부족하고 그 함량이 적어 산업적으로 이용하기에는 한계가 있다. 본 연구에서는 적양파의 퀘르세틴 추출 효율을 높이기 위해 우선 적양파 건조물을 에탄올로 추출농축하여 Red-Q를 얻었다. 그 후 미생물을 이용하여 생물전환한 뒤 Red-BCQ를 획득하였다. Quercetin 함량을 증가시키기 위해 사용된 BS3 균주는 산삼의 뿌리 내에서 분리동정한 그람양성 균주로 호기성, 미호기성, 혐기성 모든 상태에서 배양이 가능하다. 성장가능 온도범위가 넓고 45°C에서 가장 잘 자라므로 산업적으로 사용하기에 용이한 균주이다[10]. Red-Q의 퀘르세틴 피크는 3.9분에서 관찰되었고 추출물 1 g 당 약 2.91 mg의 퀘르세틴을 함유하고 있었다. Red-Q를 BS3로 생물전환시킨 후에 획득한 Red-BCQ의 퀘르세틴 함량은 추출물 1 g 당 21.62 mg으로 약 7.4배 증가했다(Table 1). 이는 BS3균주를 이용한 생물전환 시 균주가 분비하는 효소에 의해 루틴, 퀴시메리트린, 퀴시트린 등 O-link 된 당성분이 제거되어 상대적인 퀘르세틴 순도가 높아진 결과이다. 참당귀는 다양한 약리학적 효과가 입증된 한약재로 자주색 꽃을 피우는 것이 특징이다. 특히 이 약초는 혈액순환에 효과가 있으며 조혈기능과 관련된 활력 및 항암 활성도 가지고 있다. 참당귀의 대표 물질인 D와 DA는 치매 예방을 위해 제안된 물질이기도 하다[17]. D와 DA 성분은 중국산이나 일본당귀에 비해 참당귀에 많이 함유되어 있으며, 참당귀에서 그 성분비율이 약 6:4로 알려져 있다[12]. 본 연구에서는 참당귀로부터 D와 DA를 얻기 위해 Kim et al. [12]의 방법을 응용하여 추출하였으며, HPLC를 이용하여 D와 DA를 정량하였다. 결과에 따르면 1 g의 Agnex는 0.4146

Table 1. Quercetin content of Red-Q, Red-BCQ and decursin/ decursinol angelate (D and DA) content in Agnex

Extract	mg of quercetin <sup>a</sup> ±SD
Red-Q	2.91±0.02 / g-extract
Red-BCQ	21.62±0.03 / g-extract
Extract	mg of (D + DA) <sup>a</sup> ±SD
Agnex	780.5±0.02 / g-extract



<sup>a</sup>n=3, triplicate injection

Red-Q: Crude ethanol extract obtained from *red Allium cepa*. Red-BCQ: Extract obtained by bioconversion of Red-Q using BS3 strains. Agnex: Extract obtained from *Angelica gigas* Nakai.

Table 2. Comparison of hair re-growth after topical application of Red-BCQ, Agnex, and a mixture of these compounds for a period of 2 weeks and 4 weeks

	Hair re-growth score	
	2 weeks	4 weeks
CON	1.32±0.47***	4.04±0.64***
PCON	2.48±1.09	4.44±0.95
RA	1.98±0.87***	4.30±0.81*
AG	2.02±0.74***	4.66±0.56
RAG	3.68±0.89***	4.88±0.33***

Hair re-growth scoring index: 0-19% (1), 20-39% (2), 40-59% (3), 60-79% (4), 80-100% (5). Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG -administered group. All values were expressed as means ± SD. Significance differences from positive control value are indicated by \**p*<0.5 and \*\*\**p*<0.005.

g의 D, 0.3659 g의 DA를 포함하고 있으며, 이러한 화합물의 순도는 약 78%로 확인되었다. 결과는 Table 1에 나타내었다.

**육안적 발모효과 평가**

모발연구에 주로 사용하는 C57BL/6 수컷 마우스는 검은색의 털을 가지고 있으며 모발 성장을 육안으로 관찰하기 쉽다는 장점을 가지고 있어서 모발연구에 주로 사용되고 있는 모델이다. 모발은 생장기(anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기(telogen)를 거치면서 탈모와 발모가 반복 되는 것으로 알려져 있다[25]. C57BL/6종은 약 6주령부터 모발주기가 휴지기로 들어가는 유전적 특징[34]이 있으므로 이를 이용하여 연구를 시작하였다. 제 2 발모주기의 휴지기 상태인 7주령에 등 부위를 제모하여 모든 실험동물이 동일한 발모주기를 가질 수 있도록 유도한 뒤 saline (CON), 5% 미녹시딜(PCON), RA, AG, RAG 각각

의 경구투여 시에 나타나는 변화를 제모 후 2주 및 4주째에 사진촬영한 뒤 관찰하여 기록하였다(Fig. 1, Table 2). 시료 투여 후 1주차에 PCON그룹 중에 3개체, RA, AG, RAG그룹 중에서는 각각 1개체에서 발모가 시작되었으며, 2주차에 본격적으로 발모가 시작되는 개체와 그렇지 않은 개체가 육안으로도 뚜렷하게 관찰되었다. 3주차부터는 그룹간 편차를 조금 더 확실하게 관찰할 수 있었고 PCON과 RAG그룹에서 발모가 많이 진행된 개체를 관찰할 수 있었다. 털이 자란 상태를 육안으로 관찰하여 점수화한 다음 비교한 결과 2주차부터 PCON그룹(2.48점)과 RAG그룹(3.68점)은 다른 군에 비해 상대적으로 높은 점수를 나타내었다. 시간이 경과함에 따라 PCON그룹과 RAG그룹에서 hair re-growth가 급격하게 일어났고 4주차에는 CON그룹(4.04점)과 비슷한 양상으로 hair re-growth가 일어났지만 모발의 건강상태와 윤기는 RAG그룹(4.88점, *p*<0.005)이 가장 뛰어났다. 피부 조직사진 분석결과 RAG그룹에서 모낭의 수가 많아졌고, 모낭의 크기가 크며, 모근의 길이가 길어진 것을 보면 발모효과가 있다고 판단할 수 있다. 조직절편상에서 모낭의 크기와 수는 모발 성장주기에서 모낭의 상태를 결정하는 중요한 척도로 다른 그룹들에 비해서 RAG그룹은 생장기로의 전이가 빠르게 진행됨을 알 수 있다(Fig. 1). 이는 적양파의 혈행개선 작용, 참당귀의 혈행촉진 및 보혈작용, 그리고 이들 추출혼합물의 항산화 작용까지 더하여 모발에 충분한 영양분이 공급된 결과라 사료된다.

**In Vivo 항산화 활성평가**

산화제와 항산화제 사이의 평형을 의미하는 산화적 밸런스(Oxidative balance)는 체내에서 매우 중요하며, 노화나 질병 등의 비정상적인 신체 상태일 때 이러한 균형은 깨어지고 이로 인해 많은 문제점들이 야기된다[28]. Malonaldehyde (MDA)는 산화스트레스 마커로서 유용하며, superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT)는 대표적인 항산화 효소이다.

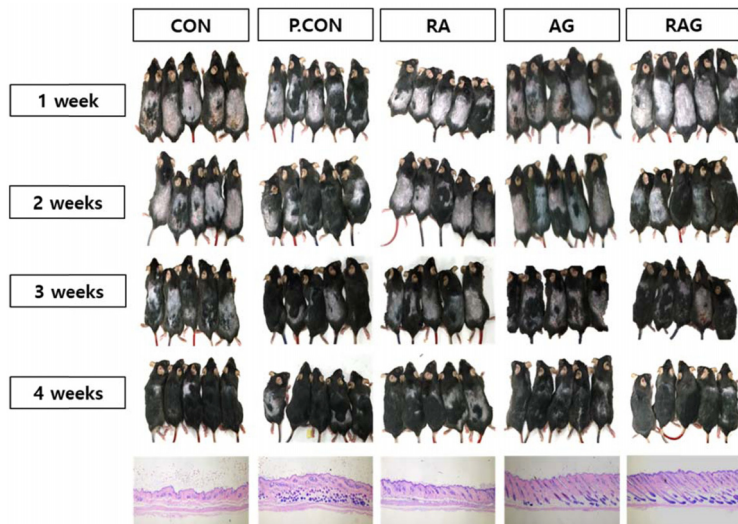


Fig. 1. Time dependent changes of hair re-growth in C57BL/6 treated with RA, AG, and a mixture of these compounds for a period of 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG -administered group.

MDA는 지질과산화물의 최종산물로 과잉의 활성산소는 DNA, 지질, 단백질 등의 변형 및 손상을 유발하고 결국 혈관을 오염시키고[31], 모근세포를 파괴하기 때문에 두피를 얇게 만들고 모발성장인자인 IGF-1을 저해하여 탈모를 가속화시킨다. 또한 활성산소종으로 인한 산화적 스트레스는 결국 세포막의 지방산을 산화시켜 지질과산화물인 MDA의 함량을 증가시키게 된다[4]. 따라서 항산화 활성이 있는 물질을 섭취하거나,

체내 항산화 효소의 활성을 증가시키면 모세혈관 확장에 도움이 되고 모발의 성장을 촉진할 수 있다. 본 연구에서는 동물실험 후 간 조직을 채취하여 MDA와 항산화 효소의 변화를 확인해 보았다.

MDA 측정결과 PCON그룹(20.7 nmol/mg protein)은 CON그룹(72.8 nmol/mg protein)에 비해 약 71.2%만큼 현저히 저하되었다. RA그룹과 AG그룹은 CON그룹에 비해 큰 차이는 없었으나, RAG그룹(61.90 nmol/mg protein)은 CON그룹에 비해 약 15%만큼 저하되었다(Fig. 2A). SOD는 PCON 그룹

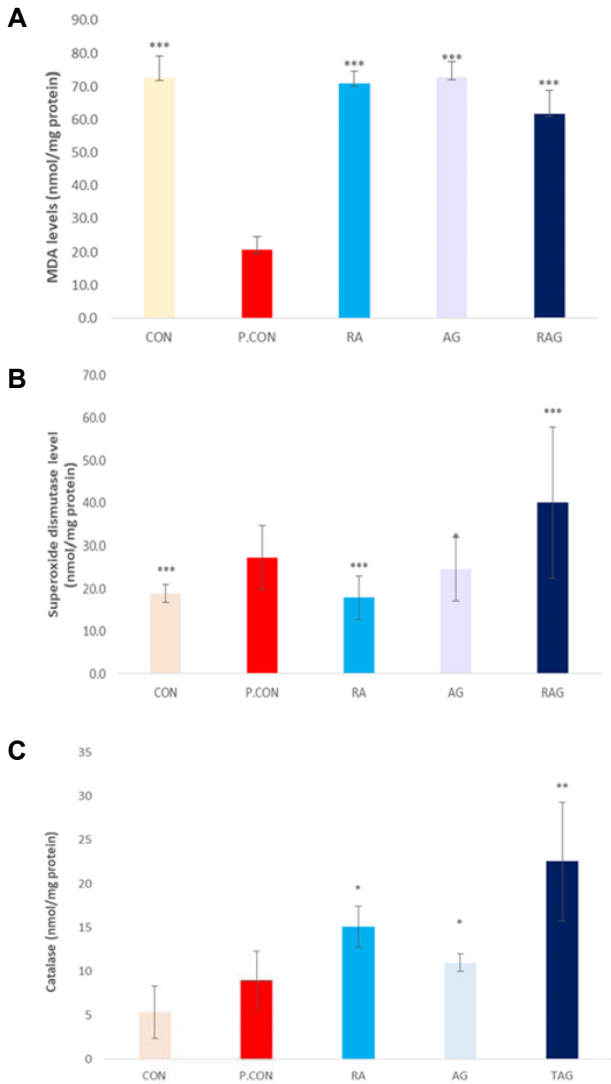


Fig. 2. Changes of malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in C57BL/6 treated with RA, AG, and a mixture of these compounds for a period of 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group. All values were expressed as means  $\pm$  SD. Significance differences from positive control value are indicated by \* $p$ <0.5, \*\* $p$ <0.05, and \*\*\* $p$ <0.005.

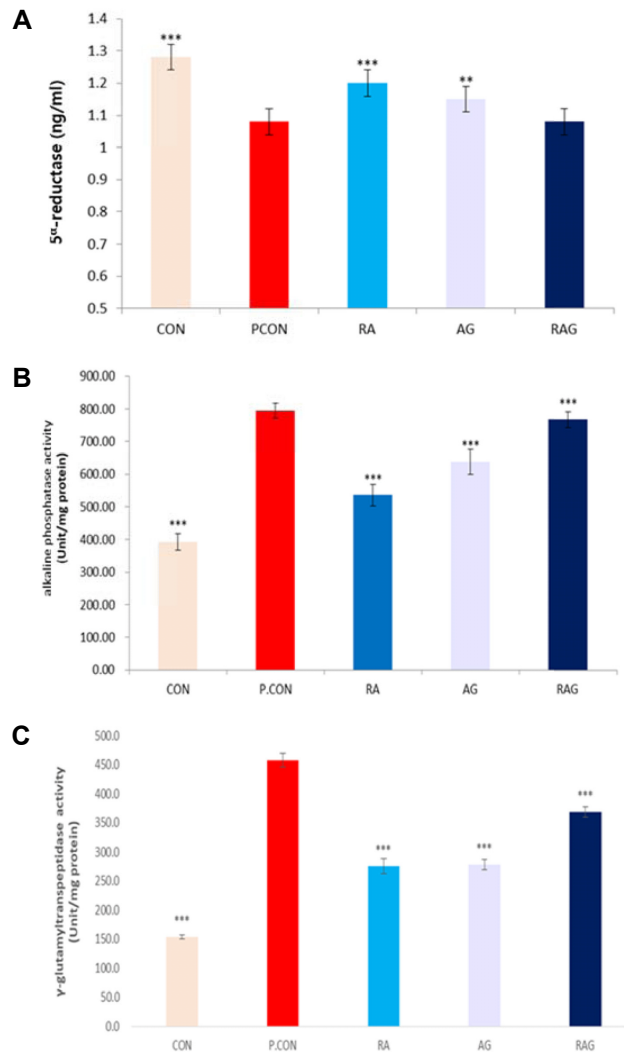


Fig. 3. Changes of 5a-reductase in the serum, ALP and  $\gamma$ -GT activity in the skin of mice. Test compounds were administered for 4 weeks. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group. All values were expressed as means  $\pm$  SD. Significance differences from positive control value are indicated by \*\* $p$ <0.05, and \*\*\* $p$ <0.005.

(27.3 nmol/mg protein)이 CON그룹(18.8 nmol/mg protein)에 비해 약 50.5% 증가했고, AG그룹(24.5 nmol/mg protein)과 RAG그룹(40.1 nmol/mg protein)은 CON에 비해 각각 30.3%, 113.3% 증가했다(Fig. 2B). CAT는 PCON 그룹(8.96 nmol/mg protein)이 CON그룹(5.34 nmol/mg protein)에 비해 약 67.8% 증가했고, RA그룹(15.11 nmol/mg protein)과 RAG그룹(22.52 nmol/mg protein)은 CON그룹에 비해 각각 183%, 321.7%만큼 증가했다(Fig. 2C). 따라서 복합물 투여는 세포내 환원력을 유지하고 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효능을 증가시켜 활성산소에 의한 세포 손상을 막아서 탈모방지 또는 발모에 효과가 있을 것으로 생각된다.

**혈액 및 피부조직의 효소활성도 변화**

피나스테라이드와 미녹시딜은 미국 FDA에서 공인받은 약물이지만, 중단 시 6개월 이내에 다시 숄털로 바뀌게 되며, 장기간 사용시 가려움증, 피부염 등을 일으킬 수 있다고 보고되어 있다[11]. 5 $\alpha$ -Reductase는 활성 남성호르몬인 dihydroxytestosterone (DHT)을 생성하는데 이러한 5 $\alpha$ -Reductase는 두 가지 형태로 알려져 있다. Type I은 모낭, 피부, 뇌, 간 등에 연관되어 작용하고, Type II는 전립선, 음낭 등에 존재하여 전립선비대증과 관련이 있다[2]. 경구용 제제인 피나스테라이드는 5 $\alpha$ -Reductase Type II를 저해하여 전립선 비대증 치료제로 작용하기도 하지만, Type I을 저해하여 탈모치료제로 승인을 받은 약물이다[2]. 따라서, 본 연구에서는 발모실험을 진행한 개체에서 혈액을 채취하여 serum 5 $\alpha$ -Reductase의 양을 측정하여 보았다. 5% 미녹시딜을 4주간 투여한 PCON그룹과 RAG 그룹은 5 $\alpha$ -Reductase 양이 모두 1.08 ng/ml이었고, 이는 대조군(1.28 ng/ml)에 비해 약 16% 감소한 결과이다. RA와 AG 단독 투여시 5 $\alpha$ -Reductase 양은 각각 1.2 ng/ml, 1.15 ng/ml로

복합투여함으로써 약 7-10% 감소한 결과를 보였다(Fig. 3A). 5 $\alpha$ -Reductase 양이 절대적인 발모 및 탈방지의 지표가 될 수는 없지만, RA와 AG 복합 투여시 5 $\alpha$ -Reductase양이 줄어든 것은 결국 DHT level을 저하시켜 발모 및 탈방지의 가능성을 시사하고 심각한 부작용을 가진 화학탈방지제인 피나스테라이드를 대체할 수 있는 후보물질이 될 것이라 생각한다.

Iida 등[8]에 따르면 피부 조직 내에서의 ALP는 모세혈관에 영양을 공급하고 혈관 신생작용에 관여하여 발모작용을 원활하게 해 준다고 하였다. 특히 ALP는 털이 다시 자라나기 시작하는 부위에서 활성이 증가하는 경향이 있다고 보고하였다[7]. 본 연구에서 피부조직 내 ALP의 활성을 측정 한 결과를 살펴 보면 복합물을 투여한 RAG그룹(766.90 U/mg protein)은 PCON그룹(794.45 U/mg protein)과 유의한 수준으로 증가하였고, 이는 CON그룹(393.74 U/mg protein)에 비해 약 195~200% 증가한 값이다(Fig. 3B). RA와 AG의 복합물에 의한 ALP의 현저한 증가는 발모에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

발모와 관련된 생화학적 효소로 모발 성장기 때 활성이 증가한다고 알려진 또 다른 발모지표로  $\gamma$ -GT가 있다. 이는 세포막을 통한 아미노산과 펩타이드의 흡수 및 분비에 관여하는 효소로[26], glutathione의 체내 대사에 관여하여 cysteine을 공급함으로써 모발의 케라틴화에 도움을 준다[5]. 본 연구에서는 CON그룹(153.4 U/mg protein)에 비해 PCON그룹(457.2 U/mg protein)과 RAG그룹(368.3 U/mg protein)은 각각 298%, 240% 증가하여 발모효과에 영향을 주었을 것으로 생각된다. RA그룹(275.5 U/mg protein)은 약 180%, AG그룹(278.5 U/mg protein)은 약 182% 증가하여 단독 투여 또한 발모효과에 긍정적인 영향을 주었을 것이라 생각된다(Fig. 3C).

**모발성장인자의 발현에 미치는 영향**

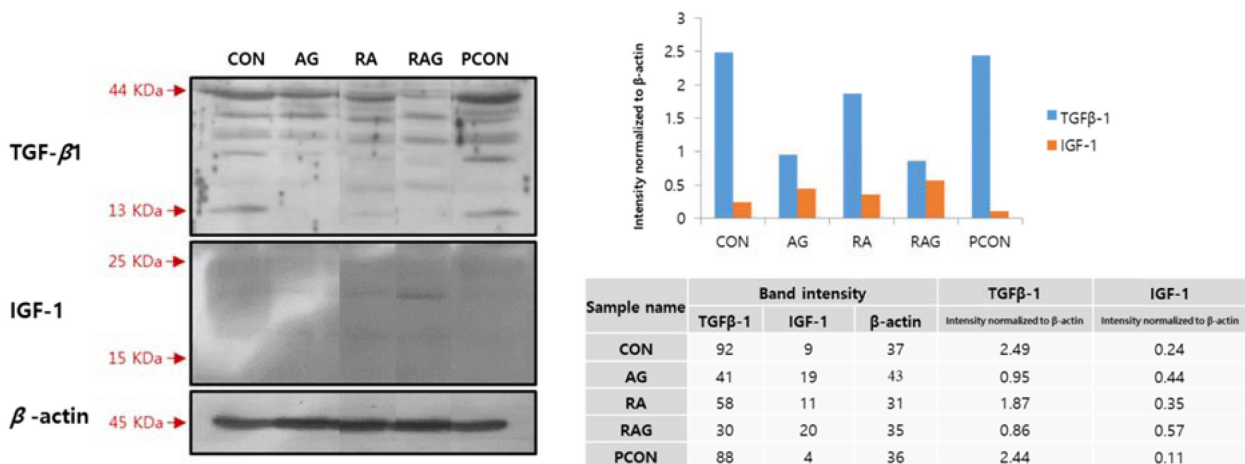


Fig. 4. Effects of RA, AG and a mixture of these compounds on expression of IGF-1 and TGF-β1 by western blot. β-actin was used as a comparative control. Con: Saline-administered group, PCON: 5% minoxidil-administered group as positive control, RA: Red-BCQ (1.7 mg/kg body weight)-administered group, AG: Agnex (25 mg/kg body weight)-administered group, RAG: Mixture of RA and AG-administered group.

본 연구에서는 육안적인 발모효과를 관찰하였을 뿐만 아니라, 모발성장인자인 IGF-1의 발현을 증가시키는지 확인하기 위해 동물실험 종료 시 채취한 조직을 이용하여 IGF-1의 발현을 확인하였다. IGF-1은 남성호르몬에 의해 생성이 촉진되고 모발성장을 조절하는 가장 중요한 성장인자 중 하나로 모낭세포의 세포사멸을 억제하고 모발성장을 촉진한다고 알려져 있다[33]. IGF-1의 발현 양상을 관찰해 본 결과 RAG그룹에서 CON그룹에 비해 증가하였다. 5% 미녹시딜을 투여한 PCON그룹에서는 오히려 감소하였으나 유의적인 차이는 판단하기 어렵다(Fig. 4). 또한 모발성장에 영향을 미치는 내분비계 물질인 TGF- $\beta$ 1의 발현량을 측정해 보았다. TGF- $\beta$ 1은 모발의 상피세포 증식을 억제하여 성장을 저해하고 퇴행기로 진입하게 함으로써 탈모를 유발하는 인자로 알려져 있다[35]. 따라서 TGF- $\beta$ 1의 발현량이 증가하면 털의 기질세포와 모근세포들의 세포사멸이 일어나 휴지기 모낭이 증가하게 되고 가늘고 짧은 모발로 전환된다[16]. 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현이 AG그룹과 RAG그룹에서 비투여군에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 4). 본 연구진의 다른 연구(현재 논문 투고중)에서 적양과와 참당귀 추출복합물의 항혈전 및 혈소판 응집억제 효과가 관찰되었는데 이러한 혈행개선 효과와 항산화 효과 등의 복합적인 메커니즘에 의해 모발성장인자인 IGF-1의 발현은 증가하고, 모발성장억제인자인 TGF- $\beta$ 1은 감소시켜 모낭의 성장을 촉진시키고 발모에 도움을 주는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 농림기술기획평가원의 고부가가치 식품개발사업(과제번호 317067-3, 2017.11.1~2020.10.31)연구비 지원으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro* methods. *Enzymology* **105**, 121-126.
- Dallob, A. L., Sadick, N. S., Unger, W., Lipert, S., Geissler, L. A., Gregoire, S. L., Nguyen, H. H., Moore, E. C. and Tanaka, W. K. 1994. The effect of finasteride, a 5 $\alpha$ -reductase, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 703-706.
- Fridovich, I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-15.
- Gloire, G., Legrand-Poles, S. and Piette, J. 2006. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493-1505.
- Hamada, K. and Suzuki, K. 1996. Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Exp. Anim.* **45**, 251-256.
- Hamamoto, T. and Mori, Y. 1989. Sulfation of minoxidil in keratinocytes and hair follicles. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **66**, 33-44.
- Handjiski, B. K., Eichmüller, S., Hofmann, U., Czarnetzki, B. M. and Paus, R. 1994. Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle. *By. J. Dermatol.* **131**, 303-310.
- Iida, M., Ihara, S. and Matsuzaki, T. 2007. Hair cycle dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Dev. Growth Differ.* **49**, 185-195.
- Jung, J. E. and Cho, E. J. 2014. Protective effects of *Zizyphus jujuba* and fermented *Zizyphus jujuba* from free radicals and hair loss. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1174-1180.
- Kang, J. H. 2018. Characterization of *Bacillus subtilis* KJ-3 and bioconversion of ginseng saponin. Master's thesis, Kyungsoong University, Busan, Korea.
- Kaufman, K. D., Olsen, E. A., Whiting, D., Savin, R., DeVillez, R., Bergfeld, W., Prove, V. H., Neste, D. V., Robert, J. L., Hordinsky, M., Shapiro, J., Biokowitz, B. and Gormley, G. J. 1998. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* **39**, 578-589.
- Kim, K. M., Jung, J. Y., Hwang, S. W., Kim, M. J. and Kang, J. S. 2009. Isolation and purification of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* Nakai. *J. Kor. Sci. Nutr.* **38**, 653-656.
- Kim, S. K. and Kim, M. K. 2004. Effect of dried powders or ethanol extracts of onion flesh and peel on lipid metabolism, antioxidative and antithrombogenic capacities in 16-month-old rats. *Kor. J. Nutr.* **37**, 623-632.
- Lee, S. H., Lee, Y. S., Jung, S. H., Shin, K. H., Kim, B. K. and Kang, S. S. 2003. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 727-730.
- Lee, S. H., Shin, D. S., Kim, J. S., Oh, K. B. and Kang, S. S. 2003. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 449-452.
- Lee, Y. J. and Lee, J. Y. 2007. Clinical analysis and treatments for androgenetic alopecia of men. *J. Kor. Soc. Cosmet.* **13**, 799-810.
- Li, L., Li, W., Jung, S. W., Lee, Y. W. and Kim, Y. H. 2011. Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid  $\beta$ -protein-induced oxidative stress in the PC12 cell line: The role of Nrf2 and antioxidant enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 434-442.
- Liu, J., Kurashiki, K., Shimizu, K. and Kondo, R. 2006. 5 $\alpha$ -reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 392-395.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. S. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-261.
- Lu, X. L., Zhao, C. H., Yao, X. L. and Zhang, H. 2017. Quer-



- cetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* **85**, 658-671.
21. Mitsui, S., Ohuchi, A., Hotta, M., Tsuboi, R. and Ogawa, H. 1997. Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles. *British J. Dermatol.* **137**, 693-698.
  22. Moon, J. S., Kim, H. D., Ha, I. J., Lee, S. Y., Lee, J. T. and Lee, S. D. 2010. Chemical component of red onion (*Allium cepa* L.) according to cultivars and growing areas. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28**, 921-927.
  23. Moore, T., Carbajal, S. and Beltran, L., Perkins, S. N., Yakar, S., Leroith, D., Hursting, S. D. and Digiovanni, J. 2008. Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with low circulating insulin-like growth factor I levels. *Cancer Res.* **68**, 3680-3688.
  24. Nam, S. Y., Moon, J. H., Yun, Y. W., Baek, I. J., Yon, J. M., Ryu, K. C. and Lee, B. J. 2004. Effect of NDM hair tonic on hair growth promotion in C57BL/6 mice. *Yakhak Hoeji* **48**, 122-129.
  25. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158-169.
  26. Paus, R. and Cotsarelis, G. 1999. The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* **341**, 491-497.
  27. Peters, K., Syuss, D. and Waddell, N. 1996. *Hair loss prevention*, pp. 1-3, 1st ed., Apple Tree Publishing Co. Ltd., Vancouver, Canada.
  28. Perry, J. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D. and Tainer, J. A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 245-262.
  29. Ryu, E. M. and Shin, H. J. 2011. Hair growth effect of ethyl acetate and water fractions of *Sparassis crispa* extracts on hair-removed C57BL/6 mice. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **9**, 295-304.
  30. Ryu, K. S. and Yook, C. S. 1967. Studies on the coumarins of the root of *angelica gigas* Nakai. *Yakhakhoeji* **11**, 22-26.
  31. Segara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. and Mahher, P. 1998. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1375-1389.
  32. Shon, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. and Sung, N. J. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 659-666.
  33. Tang, L., Bernado, O., Bolduc, C., Lui, H. and Shapiro, J. 2003. The expression of insulin-like growth factor 1 in follicular dermal papillae correlates with therapeutic efficacy of finasteride in androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 229-233.
  34. Tobin, D. J., Hagen, E., Botchkarev, V. A. and Paus, R. 1998. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.* **111**, 941-947.
  35. Tsuji, Y., Denda, S., Soma, T., Raftery, L., Momoi, T. and Hibino, T. 2003. A potential suppressor of TGF-beta delays catagen progression in hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **8**, 65-68.
  36. Tried, R. M. 2001. The value of hair cosmetics and pharmaceuticals. *Dermatology* **202**, 38-45.
  37. Zappacosta, A. R. 1980. Reversal of boldness in patient receiving minoxidil for hypertension. *N. Eng. J. Med.* **303**, 1480-1481.

## 초록 : C57BL/6 마우스에서 모발성장 촉진에 대한 *Allium cepa* (red)와 *Angelica gigas* Nakai의 효과

이진영<sup>1</sup> · 동재경<sup>2</sup> · 강재선<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경성대학교 약학대학 약학과, <sup>2</sup>신라대학교 제약공학과)

본 연구는 C57BL/6 마우스에서 *Allium cepa* (red) 생물전환 추출물과 *Angelica gigas* Nakai 추출물이 혼합된 새로운 물질의 모발 성장 촉진 효과를 평가하기 위해 수행되었다. 적양과의 에탄올 추출물을 *Bacillus subtilis* KJ-3 (BS3) 균주의 사용을 통해 생물전환하였고 이것을 Red-BCQ라고 명명하였다. Red-BCQ의 퀘르세틴 함량은 생물전환 후 약 7.4배 증가 되었다. 참당귀 추출물(Agnex)에는 decursin (D), decursinol angelate (DA) 등 쿠마린이다량 함유되어 있다. Agnex 1 mg 중에는 D 0.4146 mg, DA 0.3659 mg이 포함되어 있었다. 미녹시딜(minoxidil)은 모발 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 Red-BCQ, Agnex 및 이들 혼합물의 모발 성장 촉진 효과를 5% 미녹시딜과 비교하였다. 25마리의 마우스는 생리식염수(CON), 5% 미녹시딜(PCON), Red-BCQ (RA), Agnex (AG), 이들 혼합물 (RAG) 처리군 등 5개의 실험군으로 나누었다. 시료는 하루에 한 번 4주 동안 정해진 시간에 경구로 투여되었다. 모발 증식은 7, 14, 21, 28일에 사진으로 관찰하였다. 또한 5 $\alpha$ -reductase, alkaline phosphatase (ALP),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), insulin-like growth factor (IGF)-1, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, 항산화효소활성, 피부조직의 모낭도 관찰했다. 모든 결과에서 혼합물 투여 그룹은 다른 그룹보다 항산화 효과와 모발 성장 촉진 효과가 더 컸다. 이러한 데이터는 RAG가 C57BL/6 종의 모발 성장에 대해 강력한 자극 활동을 가지고 있음을 시사한다.