

망고 잎 열수 추출물의 모유두 세포에서 탈모 관련 유전자 발현에 미치는 영향 연구

최영수^{1#}, 김은미^{2#}, 이성희³, 한효상^{4*}, 김기광^{1*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 안전성평가연구소 예측독성연구본부
3 : 홀루아농업, 4 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation on the effect of water extracts of *Mangifera indica* leaves on the hair loss-related genes in human dermal papilla cells

Youngsoo Choi^{1#}, Eunmi Kim^{2#}, Seong Hee Lee³, Hyosang Han^{4*}, Keekwang Kim^{1*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, South Korea
2 : Department of Predictive Toxicology, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 34114, South Korea
3 : Huluwa Agriculture & content, Geumsan 32721, South Korea
4 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, South Korea

ABSTRACT

Objectives : *Mangifera indica* leaves are well known for having a variety of benefits, including anti-inflammatory, anti-tumor, diabetic retinopathy and diabetic vasculosis. However, the effects of *Mangifera indica* leaves on hair loss inhibition have not been studied. In this study, we investigated to find out the activity of *Mangifera indica* leaves on hair loss.

Methods : 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid(ABTS) analysis was performed to confirm the antioxidant efficacy of the water extract of *Mangifera indica* leaves (WEML). To examine the effect of WEML on cell viability in dermal papillar (DP) cells, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetra Zolium (MTS) analysis was performed. The changes in the mRNA expression level of the hair loss and hair growth-related genes in dermal papilla cells by WEML treatment were confirmed by quantitative RT-PCR.

Results : In dermal papilla (DP) cells, ABTS analysis and MTS analysis of WEML showed antioxidant efficacy and low cytotoxicity. As a result of gene expression analysis through Quantitative RT-PCR, no changes in hair growth-related genes BMP6 and CTNNB1 was confirmed, but inhibitory activity of WEML on hair loss-related genes EGR1, SGK, DKK1, SRD5A1 and SRD5A2 was confirmed.

*Corresponding author : Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Health and Welfare, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.

· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5485 · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

#First author : Young-Soo Choi, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-7525 · E-mail : yeong318soo@gmail.com

Eunmi Kim, Department of Predictive Toxicology, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 34114, Korea

· Tel : +82-42-610-8263 · E-mail : eunmi.kim@kitox.re.kr

· Received : 22 March 2021 · Revised : 12 May 2021 · Accepted : 25 May 2021

Conclusion : We confirmed that WEML has excellent antioxidant efficacy and a inhibitory activity of hair loss-related genes including 5α -reductase genes. These results suggest that *Mangifera indica* leaves have a potential activity as a hair loss treatment for hair loss and hair growth. Biochemical or molecular biological research on hair loss is needed.

Key words : *Mangifera indica*, Dermal papilla cell, Hair loss, Hair growth, 5α -reductase

I. 서 론

탈모란 생리적으로 모발이 모낭에서 빠져나가는 것으로, 일반적인 모발은 3년의 생장기, 3주의 퇴행기와 3개월의 휴지기를 반복하여 발모와 탈모 주기를 거친다¹⁾. 탈모는 크게 두 종류로 구분하며 휴지기의 모발이 자연스럽게 모낭에서 탈락되는 자연탈모와 임신, 유전적 요인, 호르몬 분비 이상, 노화, 극심한 다이어트, 정신적 스트레스, 불규칙한 생활, 발열성 질병, 과도한 화학제품의 사용 등이 원인이 되는 비정상적인 탈모로 분류한다^{1,2)}. 이러한 현대인의 탈모는 선천적인 요인보다 환경 문제를 포함한 후천적인 요인이 커지면서 잠재적 탈모 인구를 포함하여 2019년도 국내 기준 탈모인 1,000만 시대를 돌파하고 있다^{2,3)}. 또한 화장품, 의약품과 의약품 등을 포함한 국내시장은 대략 4 조원에 이른다는 조사도 있다. 과거에 탈모는 중장년층만의 문제로 생각되었지만 현재에는 20, 30대 젊은 층에서 크게 증가하는 추세이며 질병으로써 치부되고 있다²⁾. 이러한 증가로 인해 탈모 억제나 치료제, 발모에 대한 연구들 또한 증가하고 있다⁴⁾.

모유두 세포는 모낭에서 성장 주기를 조절하는 여러 신호 전달 물질을 분비하는 세포로 알려져 있다^{5,6)}. 또한 신체내 androgen 그룹의 스테로이드성 성 호르몬인 testosterone은 모유두 세포내의 5α -reductase와 작용하여 남성형 탈모에 직접적인 영향을 미치는 디히드로테스토스테론 (Dihydrotestosterone; DHT)를 생성하여 모낭에서 모발의 탈락을 야기한다^{7,8)}. FDA 승인을 받아 탈모 시장내 대부분의 점유율을 보유한 finasteride와 dutasteride는 5α -reductase type 2의 활성을 억제하여 발모의 유도과 탈모 진행을 늦춘다. 하지만 이러한 치료제 역시 화학적 의약품으로 알려지성 접촉성 피부염, 성욕 감퇴, 남성의 여성형 유방, 사정량 감소, 가임기 여성에서의 치명적 위험성 등 부작용을 감수하며 사용해야 한다^{9,10)}. 이러한 이유로 부작용이 적은 천연물 유래 치료제 개발은 필수적이며 지속적인 연구가 필요한 상태이다.

애플망고는 율리안과 (Anacardiaceae)의 망고속 (*Mangifera*)에 속하는 다년생의 열대과수로 사과와 비슷한 모양의 망고 품종 중 하나이다¹¹⁾. 애플망고 (*Mangifera indica*)의 성분 중 polyphenol 화합물인 mangiferin은 소염, 항당뇨, 면역조절기능, 항종양, 항산화작용 등 다양한 효능이 알려져 있다¹²⁾. 또한 망고는 쌍떡잎 식물로 긴 창 모양의 30 cm 길이의 잎을 갖고 있으며 대표적인 망고 잎 성분으로는 mangiferin, phenolic, constituents, glucose, flavonoids, arabinose, xylose, rhamnose, galactose, leucine, trosine, valine, protocatechuic acid, catechin (VI), alanine, glycine, annins, kinic acid, α -pinene, β -pinene (VI) 등이 있다¹³⁻¹⁵⁾. 망고 잎에 포함되어 있는 anthocyanins은 잎을 가열한 차를 지속적으로 섭취하였을 때 당뇨성 망막증과 당뇨성 혈관

증에 대해 긍정적인 효능이 있다고 보고되었으며, 강력한 항산화작용으로 혈관과 장기 등에 손상을 입히는 활성산소를 제거한다고 알려져 있다¹⁶⁾. 현재까지 탈모 억제 기능에 대한 애플망고 잎의 연구는 없는 상태로 이러한 여러 생물활성과 천연물 유래 물질로써 체내에서 적은 독성과 부작용은 탈모에서 긍정적인 효과를 보일 것으로 예상된다¹⁷⁾.

본 연구에서는 위와 같은 다양한 성분을 함유한 애플망고 잎 열수 추출물 (Water extracts of *Mangifera indica* leaves, WEML)을 이용하여 모유두 세포에서 모발생성 주기와 관련된 유전자 분석 실험을 통해 탈모 억제 효능에 있어서 유의미한 결과를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 *Mangifera indica* leaves는 충청남도 금산군 소재의 망고과수원에서 2021년 1월에 획득하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 filter paper (Advantec No.2, Japan), DMEM/F12 media (Welgene, Korea), FBS (Welgene, Korea), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (Welgene, Korea), Trypsin-EDTA (Welgene, Korea), DPBS (Corning, USA), MTS solution (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), Qubit RNA Assay Kit (Molecular probes, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzymomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (Geneybio, Korea) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Thermo, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA), 동결건조기 (IlshineBioBase, Korea) 등이다.

2. 방법

1) *Mangifera indica* leaves의 열수추출물 제조

Mangifera indica leaves 100 g 중량을 측정하여 환류추출기에서 얻은 1차 증류수 2 L와 함께 넣어주었다. 탱액이 끓는 시점으로부터 6 시간 동안 가열한 뒤, 추출액을 filter

paper에서 감압 여과액을 제작하였다. 이후에 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 7일간 동결건조기를 이용하여 건조 분말을 제작하였다. 최종 동결건조 추출물은 11.254 g으로 수득율은 11.254%로 확인되었다.

2) 세포 배양

실험에 사용된 세포는 모유두 세포 (Dermal papilla cell, DP)이며 충남대학교 의과대학 피부과로부터 분양받은 세포주를 사용하여 연구를 진행하였다. 실험에 사용한 모유두 세포는 DMEM 배양액에 10% FBS와 1% antibiotic이 첨가된 배양액으로 표준세포배양법인 5% CO₂, 37°C 조건을 유지하며 배양하였다.

3) 항산화 효능 평가

항산화 효능은 *Mangifera indica* leaves 열수 추출물 (Water extraction of *Mangifera indica* leaves, WEML) 농도 25, 50, 100 µg/ml와 resveratrol 농도 25, 50 µM에서 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay를 이용해 대조군과 항산화 효능을 측정하였다. ABTS 7 mM 용액과 WEML가 모유두 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 측정하기 위해 potassium persulfate 2.4 mM 용액을 동일한 부피로 혼합하며, 24 시간 동안 실온에서 차광 상태로 반응을 유도하여 free radical 상태의 ABTS 용액을 제작하였다. 반응시킨 ABTS free radical 용액 80 µl을 96 well plate에 첨가하였고, 멸균된 증류수를 사용하여 희석시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였을 때 측정값이 0.7 부근의 수치가 되도록 ABTS working 용액을 제작하였다. Sample 20 µl와 ABTS working 용액 80 µl를 96 well plate에 첨가하여 5 분간 실온에서 반응시킨 후 734 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정하여 도출된 값을 이용해 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 비교군의 흡광도를 다음의 식에 따라 항산화 효능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

4) 세포 생존율 측정

WEML이 모유두 세포의 세포활성도에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTS(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay를 수행하였다. 모유두 세포를 1 X 10⁴cells/well로 96 well plate에 분주하였으며, 표준세포배양법 (37°C, 5% CO₂)에서 24시간 동안 배양한 후 각의 well에 WEML을 농도별로 처리하고 36시간 동안 동일하게 배양하였다. 이후에 MTS 시약 20 µl을 첨가하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \left\{ \frac{\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right\} \times 100$$

5) 유전자 발현 비교 분석

모유두 세포를 6 well plate에 2 X 10⁵cells/well로 분주 후 표준세포배양법으로 24 시간 배양하였다. 이 후 WEML을 0.1 mg/ml 농도로 처리한 뒤 36 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 모유두 세포를 DPBS로 세척 후 RNA는 eCube Tissue RNA Mini Kit로 추출하였다. Qubit 2.0 Fluorometer를 이용하여 추출한 RNA는 정량하여 RNA 1 µg에 Random hexamer (100 pmol/µl) 1 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl를 각각 첨가하였으며, DEPC-treated water로 총 부피를 8 µl로 맞춰주었다. 65°C 항온 수조에서 5 분간 반응시킨 뒤, 곧바로 얼음에 냉각시켜 주었다. 각 sample에 M-MLV RT reaction buffer 4 µl, RNase inhibitor 1 µl, M-MLV reverse transcriptase 1 µl, DEPC-treated water 4 µl를 추가하여 총 부피 10 µl를 첨가하였다. cDNA 합성은 실온에서 10 분간 반응시킨 후 50°C에서 1 시간 동안 반응시켰으며 D.W를 사용하여 1/5로 희석하였다. cDNA 5 µl와 D.W 2 µl, 2X Prime Q-mater Mix 10 µl, forward와 reverse primer (10 pmol/µl) 각각 1.5 µl를 섞어 사용하였다. qRT-PCR은 AriaMx를 이용하여 BMP6, CTNNB1, SRD5A1, SRD5A2, EGR1, SGK, DKK1의 mRNA 발현 변화를 확인하였다. 결과값의 보정은 β-actin의 mRNA 발현량을 이용하였다.

Table 1. Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
BMP6	F	CAG TCC TTG TAG ATG CGG AA	141	58
	R	CAT GAG CTT TGT GAA CCT GG		
CTNNB1	F	ATT GTC CAC GCT GGA TTT TC	142	58
	R	AGG TCT GAG GAG CAG CTT CA		
SRD5A1	F	CCA ACA GTG GCA TAG GCT TT	143	58
	R	CTA CCA GTA CGC CAG CGA GT		
EGR1	F	GGA AAA GCG GCC AGT ATA GG	131	58
	R	AGC CCT ACG AGC ACC TGA C		

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
SGK	F	ATA CAA GAC AGC TCC CAG GC	143	58
	R	TCG GAC TCT GCA AGG AGA AC		
DKK1	F	TCT GGA ATA CCC ATC CAA GG	147	58
	R	ATG CGT CAC GCT ATG TGC T		
β -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

3. 자료 분석 및 통계 처리

모든 실험의 결과는 Mean \pm Standard error로 표기하였고, 실험자료의 통계 분석은 대조군에 대한 실험군의 유의성을 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.001 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. WEML의 활성산소 소거능 평가

WEML의 활성산소 소거능 평가를 ABTS assay를 실시하여 확인하였다. Resveratrol은 기존에 활성산소 소거능이 뛰어나다고 알려져 있어 양성 대조군으로 사용하였으며, 5 μ g/ml의 농도에서 47.8%, 10 μ g/ml의 농도에서 72.9%로 농도 증가에 따른 활성산소 소거능의 증가가 확인되었으며, 이를 통해 ABTS assay에 대한 신뢰성을 확보할 수 있었다. 또한 WEML의 농도 증가에 따른 활성산소 소거능의 증가도 확인하였으며, WEML 100 μ g/ml 농도에서 ABTS radical 소거 효능은 93.4%로 대조군보다 뛰어난 활성산소 소거능을 나타내었다.

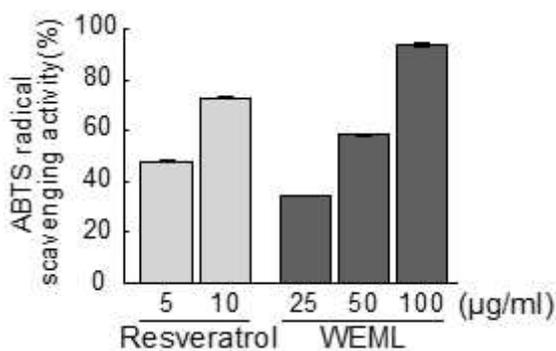


Fig 1. Free radical scavenging activities of the resveratrol and WEML by ABTS assay. n=3 (biological replicates). Average \pm S.E.M

2. WEML의 세포활성도에 미치는 영향

모유두 세포에 WEML이 미치는 세포활성도를 확인하기 위하여 36 시간 동안 다양한 농도의 WEML를 모유두 세포에 처리한 뒤 MTS assay를 실시하였다. 그 결과 WEML 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도를 처리한 경우 평균 90.0%의 세포활성도를 나타냈으며, 0.4 mg/ml 농도의 WEML는 모유두

세포의 세포활성도를 77.5%로 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 MTS assay의 결과를 토대로 세포 독성이 나타나지 않는 농도 범위 내에서 이후 실험을 수행하였다.

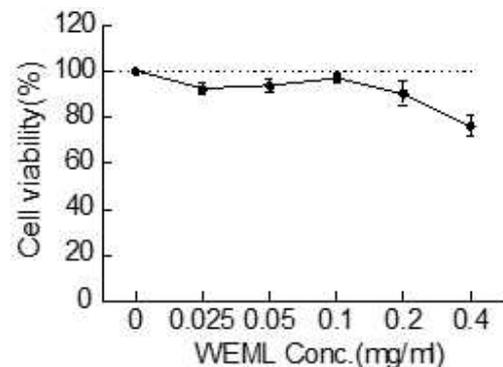


Fig 2. Cytotoxicity of WEML on Dermal papilla cell. Dermal papilla cell were treated with indicated concentrations of WEML for 36 h. Cell viability was measured by MTS assay. n=3 (Biological replicates). Average \pm S.E.M

3. 발모 관련 유전자 발현에 미치는 영향

모유두 세포에 36 시간 동안 세포독성을 크게 나타내지 않은 WEML 0.1 mg/ml 농도를 처리한 뒤, WEML를 처리하지 않은 대조군과 qRT-PCR을 이용하여 상대적인 mRNA 발현량의 차이를 확인하였다. BMP6, CTNNB1의 mRNA 발현량은 WEML 처리에 의해 통계학적으로 유의한 변화가 확인되지 않았다.

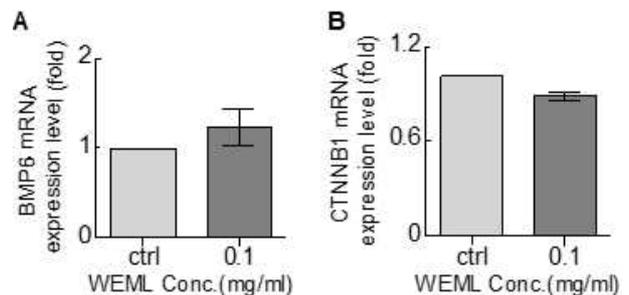


Fig 3. BMP6, CTNNB1 mRNA expression level was measured by qRT-PCR. (A) Regulation of BMP6 gene expression by WEML. Dermal papilla cells were treated with 0.1 mg/ml WEML for 36 h. (B) Dermal papilla cells were treated with indicated concentration of WEML for 36 h. Data was normalized by β -actin mRNA expression.

4. 탈모 관련 유전자 발현에 미치는 영향

MTS assay에서 크게 독성이 보이지 않은 농도인 0.1 mg/ml 에서 WEML를 36 시간 동안 모유두 세포에 처리한 뒤, WEML 를 처리하지 않은 대조군과 상대적인 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 비교하였다. 모발 성장에 부정적인 작용을 하는

유전자인 EGR1, SGK, DKK1은 WEML 처리시 각각 비교군 대비 68%, 80%, 90%로 감소하였으며, 제 1형과 제 2형 5 α -reductase의 유전자로 알려진 SRD5A1, SRD5A2 유전자의 mRNA 발현 또한 각각 비교군 대비 60%, 50% 감소시켰다. 이를 통하여 WEML는 남성형 탈모와 관련하여 긍정적인 효능이 있을 것으로 판단된다.

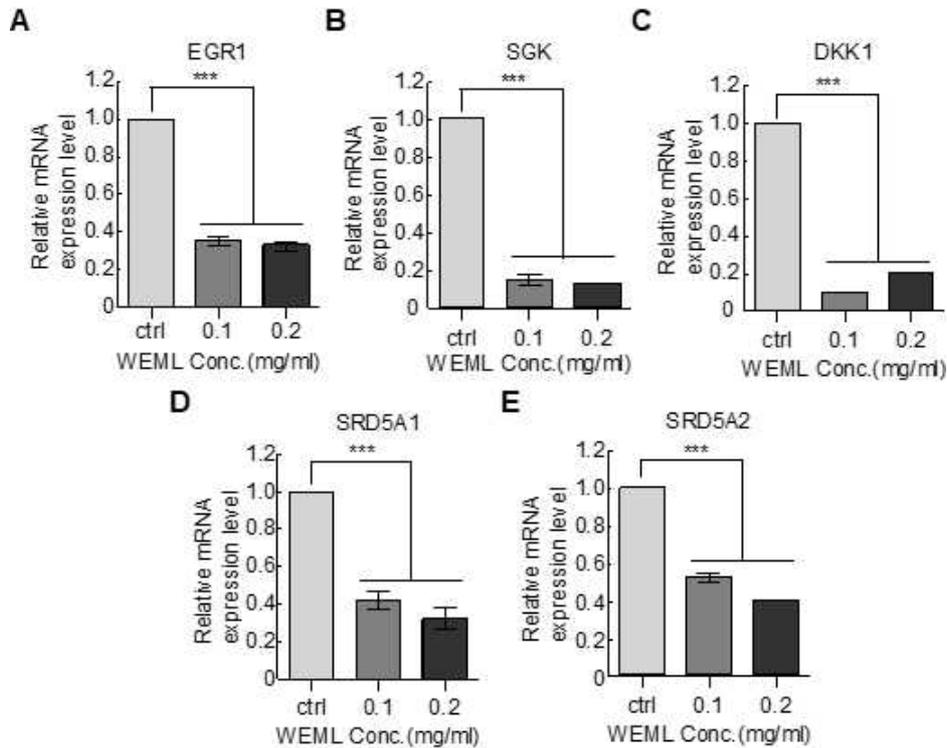


Fig 4. EGR1, SGK, DKK1, SRD5A1, SRD5A2 mRNA expression level was measured by qRT-PCR. Regulation of (A) EGR1, (B) SGK, (C) DKK1, (D) type 1 5 α -reductase, (E) type 2 5 α -reductase gene expression by WEML. Dermal papilla cells were treated with 0.1 mg/ml WEML for 36 h. Data was normalized by β -actin mRNA expression. ***p < 0.001 versus control

IV. 고 찰

최근 탈모와 관련된 의약품, 의약외품, 화장품 등 탈모 관련 국내시장은 4 조원에 이르며 탈모 억제제나 치료제, 발모에 대한 연구들이 늘어나고 있다²⁾. 대부분의 탈모 관련 의약품은 화학적 합성 의약품으로 인체내 부작용을 갖고 있으며, 이 의약품들은 탈모 치료제로써 발모 효과를 갖지만 남성의 여성형 유방, 사정량 감소, 성욕 감퇴, 다모증, 두피 건조, 알리지성 접촉성 피부염 등의 부작용을 일으킨다^{9,10,18)}. 이러한 부작용을 최소화하기 위해 독성이 적은 생약제제를 포함한 천연물 유래 의약품들의 개발도 연구되고 있다. 국내에서 개발되고 있는 발모와 탈모 관련 생약제제들은 구기자, 어성초, 백수오, 은행잎, 우엉뿌리, 당약, 감국, 측백잎, 생강, 만병초, 녹차, 백지인, 구기자, 오가피, 부자, 단삼, 한련초, 고삼, 들국화, 상백, 생솔잎, 청궁, 만형자 등 여러 종류의 천연물 소재 추출물들이 사용되고 있다^{1,19)}.

中華本草에 따르면 芒果葉은 嶺南采藥錄에 처음 收載 되었으며, 임상에서 止瀉, 化滯, 止痒의 효능이 있어 消瀉, 疳積, 濕疹瘙癢, 疣의 증상을 치료하는 데 사용되고 있다²⁰⁾. 망고는

*Mangifera indica*로 옷나무과 (Anacardiaceae) 망고 속 (Mangifera)으로 분류된다. 또한 망고는 쌍떡잎 식물로 잎의 길이는 30 cm 이내이고, 잎의 모양은 긴 창처럼 생겼으며, 망고 잎의 성분들은 flavonoids, xylose, rosine, phenolic, constituents, glucose, catechin (VI), galactose, arabinose, rhamnose, estregole, leucine, valine, protocatechuic acid, alanine, glycine, kinic acid, tannins, α -pinene, β -pinene (VI), linalool, limonene 등이 있다¹⁴⁾. 이들 성분 중 anthocyanins은 강력한 항산화 작용을 갖으며, 혈관과 장기, 노화 등 여러 작용에 관여하여 손상을 입히는 활성산소를 제거한다¹⁶⁾. 이러한 anthocyanins을 지속적으로 섭취하였을 때 당뇨병 혈관증이나 당뇨병 망막증, rhodopsin 재합성을 통한 시력 증진 등에서 긍정적인 효과를 보인다고 보고되었다¹⁷⁾. 또한 망고는 다른 과육들에 비해 다양한 종류의 antioxidants와 polyphenols, carotenoids도 다량 함유하고 있어 여러 성분 분석을 통해 항균작용, 종양 예방 및 항암작용에도 효과가 있다고 알려져 있다^{17,21,22)}. carotenoid는 식물 영양소 성분으로

알려져 있고, 항산화작용을 통해 면역력 강화와 정상 세포를 보호하여 암, 퇴행성 질환, 노화 등의 질병을 예방하고, 장 속에 존재하는 독성 물질을 흡착하여 장정작용으로 배출하는 것에도 탁월하다²²⁻²⁴. 이처럼 다양한 유효 성분을 함유하는 망고 잎 열수추출물 (Water extraction of *Mangifera indica* leaves) 이 모발의 성장주기를 조절에 영향을 미치는지 모유두 세포를 통해 탈모 억제나 치료제 분야에 대한 연구를 하고자 하였다.

인체 내 대사과정은 자유라디칼과 활성산소를 생성하게 되는데 이렇게 생성된 것들이 다량으로 존재하거나 만성적으로 생성되면 여러 생체 물질과 강하게 반응하여 유전물질인 DNA, RNA와 세포막, 단백질, 세포구조에 손상과 염증 유도, 알러지 반응 등에 부정적인 영향을 준다¹⁶. 또한 산화적 스트레스는 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있고, 세포 사멸 유도와 모낭으로 보내지는 혈류를 감소시켜 영양분과 산소가 부족하게 만들어 모발의 활력을 감소시켜 탈모를 유도하게 된다²⁵. 이러한 활성산소를 WEML가 어느 정도의 활성산소 소거능을 나타내는지 ABTS assay를 통해 확인한 결과 기존에 활성산소 소거능이 뛰어나다고 알려진 resveratrol과 비교하였을 때 WEML의 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $34.69 \pm 0.1\%$, $58.56 \pm 0.54\%$, $94.6 \pm 0.9\%$ 로 농도 증가에 따른 활성산소 소거능도 증가하여 ABTS assay에 대한 신뢰도와 대조군에 비해 WEML의 우수한 활성산소 소거능을 확인할 수 있었다. (F.2)

여러 성분을 함유하여 다양한 작용에 관여하는 WEML이 모발 성장 주기에서 신호전달 물질을 분비하는 모유두 세포에 대하여 세포활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 고농도의 WEML을 처리할 경우 모발 생성에 중요한 모유두 세포에 독성을 일으켜 모발 생성에 부정적인 영향을 유도할 수 있기에 세포 독성이 적은 농도를 확인하고자 하였다. 그 결과 농도별 0.025 ~ 0.2 mg/ml 농도까지 WEML은 모유두 세포의 세포활성도를 평균 90.01%의 세포활성도를 보였고 큰 독성을 갖지 않았다. MTS assay는 미토콘드리아에서 생성되는 NADH, NADPH에 의해 tetrazolium salt가 formazan으로 바뀌며, 이 생성물을 490 nm 흡광도에서 측정하여 세포활성도를 확인하는 방법으로 세포의 성장이나 세포내 미토콘드리아 활성도를 측정한다²⁶. 0.1 mg/ml 농도의 WEML은 $97.24 \pm 0.24\%$ 의 활성도를 나타내어 모유두 세포의 증식에는 큰 독성을 미치지 않는 것을 확인하였으며, 이 후 실험에서 처리할 적합한 농도로 사용하였다. (F.1)

세포활성도 측정에서 적은 독성을 보였던 0.1 mg/ml 농도 WEML을 모유두 세포에 처리한 뒤 모발의 생성에서 성장주기와 관련한 다양한 유전자 발현에서 미치는 영향을 quantitative RT-PCR을 통해 확인하였다. 모유두 세포 내 세포 괴사인자로 알려진 BMP라는 신호전달 물질의 자극은 모발 생성 주기에서 휴지기를 유도하며 모발 성장을 억제한다²⁷. 반대로 CTNNB1은 모낭 형성 과정에서 Wnt signaling pathway를 조절하여 BMP 신호를 억제하여 모발의 성장을 촉진시킨다²⁸. 분화와 유사분열을 조절하는 전사 조절인자로서 EGR1은 모발의 성장기를 조절하며 모낭의 항상성 정체에 관여한다²⁹. SGK는 모발 발달에서 모발 성장을 지연시키고, DKK1은 Wnt/ β -catenin 신호 전달을 차단하고 세포 사멸을 유도하여 모발 성장 억제 작용을 한다²⁹⁻³¹. 또한 탈모에 있어서 5 α -reductase는 중요한 역할을 하는데 먼저 제1형 5 α -

reductase는 피부에서 피지 분비와 땀샘에 존재하며, 제2형 5 α -reductase는 남성호르몬으로 알려진 테스토스테론과 관련하여 전립선, 수염, 그리고 두피의 모낭에 주로 분포하고 있다³². 그 중 제2형 5 α -reductase는 탈모의 주된 원인으로 작용하는데 FDA에서 승인받은 탈모 치료제는 제2형 5 α -reductase를 억제함으로써 남성형 탈모의 원인으로 알려진 DHT의 생성을 감소시켜 남성형 탈모의 치료 효과를 나타내므로 제2형 5 α -reductase의 억제는 남성형 탈모에 있어서 치료제로써 매우 중요하다⁷.

WEML은 BMP6, CTNNB1 mRNA 발현에 있어서 큰 영향을 미치지 않았으나 모발 성장을 억제하는 제1형 5 α -reductase인 SRD5A1와 제2형 5 α -reductase인 SRD5A2의 mRNA 발현을 평균 50% 이상 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. (F.3,4) 추가로 WEML가 모발 성장에 부정적인 작용을 하는 EGR1, SGK, DKK1 유전자 발현에 미치는 영향을 확인해보았다. 모유두 세포에 0.1 mg/ml 농도의 망고 잎 열수추출물을 처리한 경우 모발 생성 주기를 억제하는 EGR1, SGK, DKK1 유전자들의 발현도 같이 감소하였다. 대부분의 탈모에서 큰 비율을 차지하는 남성형 탈모의 주요 원인인 DHT는 모유두 세포와 모낭의 수축을 유도하여 모발 생성 주기를 성장기보다 휴지기로 유도한다. 이 결과를 통해 WEML의 처리시 모유두 세포의 5 α -reductase mRNA 발현량이 감소되는 효과는 WEML이 남성형 탈모에서 뛰어난 치료 효과를 나타낼 수 있는 가능성을 제시한다.

WEML의 작용이 결과적으로 모발 생성 주기에 어떠한 성분이 영향을 미치는지 추가적인 연구가 필요하다. 하지만 WEML은 산화적스트레스를 소거할 수 있는 항산화 효능을 보였으며, 모유두 세포에서 대부분의 남성형 탈모를 일으키는 5 α -reductase의 유전자 발현을 49.5% 까지 감소시켰다.

본 연구 결과들을 통해, 저자는 망고 잎 열수추출물이 기존의 화학적 합성 탈모 치료제인 dutasteride와 finasteride처럼 적용할 수 있는 것으로 기대되며, 추후 WEML을 모발의 생성 및 탈모의 억제 효과를 *in vivo*에 적용하여 검증한다면 독성이 적은 천연물 유래 탈모 치료제로 개발에 긍정적인 역할을 할 것이라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 망고 잎 열수추출물의 항산화 효능, 모유두 세포 (Dermal papilla cell, DP)의 세포활성도와 quantitative RT-PCR을 통하여 망고 잎 열수추출물의 처리에 의한 모유두 세포의 모발 생성 관련 유전자 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Resveratrol 대비 망고 잎 열수추출물의 농도 의존적 활성산소 소거능을 ABTS assay를 통해 항산화 효능을 확인하였다.
2. MTS assay를 통하여 모유두 세포에 망고 잎 열수추출물을 처리하여 수행한 결과 농도에 관계 없이 세포생존물의 변화는 없었으며, 이를 통해 망고 잎 열수추출물

이 모유두 세포의 증식과 세포활성도에 독성이 적음을 확인하였다.

3. 모유두 세포의 모발 생성 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해 quantitative RT-PCR을 실시한 결과 탈모 관련 유전자인 BMP6와 CTNNB1의 증가는 확인할 수 없었다.
4. 모유두 세포의 모발 생성 억제 유전자의 발현을 확인하기 위해 quantitative RT-PCR을 실시한 결과 탈모 관련 유전자인 SRD5A1, SRD5A2, EGR1, SGK, DKK1의 유전자 발현 억제 활성을 확인하였다.

이상의 결론을 통합하여, 향후 어떠한 망고 잎 열수 추출물의 특정 성분이 노화, 활성산소제거, 모발 생성주기와 탈모 억제 과정에서의 유의미한 영향을 주는 것인지에 대하여 깊은 연구가 필요하며, 본 실험의 결과는 망고 잎 추출물이 탈모 억제에 긍정적인 영향을 미친다는 가능성을 보여주는 바이다.

References

1. Choi SK, Cho NJ, Kim KK. Development and Evaluation of the Herbal Medicine for Hair Growth-promoting Activity. *KSBB Journal*. 2016 ; 31(4) : 237-45.
2. SO Ds, Lee BJ. Market Trends for Anti Hair Loss Cosmetics. *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*. 2019 ; 22(1) : 12-22.
3. No YH, Lee SY, Kim SG, Lee JH, Jeong SY, Choi KE. The Effect of Artemisia Absinthium Extract on Hair loss Improvement. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 2012 ; 18(2) : 429-34.
4. Alessandrini A, Bruni F, Piraccini BM, Starace M. Common causes of hair loss - clinical manifestations, trichoscopy and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021 ; 35(3) : 629-40.
5. Hibberts NA, Messenger AG, Randall VA. Dermal papilla cells derived from beard hair follicles secrete more stem cell factor (SCF) in culture than scalp cells or dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 ; 222(2) : 401-5.
6. York K, Meah N, Bhojrul B, Sinclair R. A review of the treatment of male pattern hair loss. *Expert Opin Pharmacother*. 2020 ; 21(5) : 603-12.
7. Cho YH, Lee SY, Jeong DW, Choi EJ, Kim YJ, Lee JG, Yi YH, Cha HS. Effect of Pumpkin Seed Oil on Hair Growth in Men with Androgenetic Alopecia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014 ; 2014 : 549721.
8. Hamilton JB. Male hormone stimulation is prerequisite and an incitant in common baldness. *American Journal of Anatomy*. 1942 ; 71(3) : 451-80.
9. Trueb RM. The value of hair cosmetics and pharmaceuticals. *Dermatology*. 2001; 202(4) : 275-82.
10. Rossi A, Cantisani C, Scarno M, Trucchia A, Fortuna MC, Calvieri S. Finasteride, 1 mg daily administration on male androgenetic alopecia in different age groups: 10-year follow-up. *Dermatol Ther*. 2011 ; 24(4) : 455-61.
11. Reddeman RA, Glavits R, Endres JR, Clewell AE, Hirka G, Vertesi A, Beres E, Szakonyine IP. A Toxicological Evaluation of Mango Leaf Extract (*Mangifera indica*) Containing 60% Mangiferin. *J Toxicol*. 2019 ; 2019 : 4763015.
12. Zou TB, Xia EQ, He TP, Huang MY, Jia Q, Li HW. Ultrasound-assisted extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. *Molecules*. 2014 ; 19(2) : 1411-21.
13. Gu TG, Yoo IS, Park AN. Antioxidant Effects of Bioactive Mango Leaves. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 2014 ; 20(5) : 847-51.
14. Choi YS, Kim EM, Choi SK, Lee WH, Han HS, Kim KK. Investigation of the effect of Blueberry hydrothermal extracts on myoblast differentiation. *The Korea journal of herbology*. 2020 ; 35(3) : 25-32.
15. Alanon ME, Oliver-Simancas R, Gomez-Caravaca AM, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A. Evolution of bioactive compounds of three mango cultivars (*Mangifera indica* L.) at different maturation stages analyzed by HPLC-DAD-q-TOF-MS. *Food Res Int*. 2019 ; 125 : 108526.
16. Bailey AJ, Robins SP, Balian G. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature*. 1974 ; 251(5471) : 105-9.
17. Zajac D, Stasinska A, Delgado R, Pokorski M. Mangiferin and its traversal into the brain. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;756:105-11.
18. McClellan KJ, Markham A. Finasteride: a review of its use in male pattern hair loss. *Drugs*. 1999 ; 57(1) : 111-26.
19. Cho NJ, Lee BK, Lee WH, Kim KK, Han HS. Investigation of Antioxidant Activity of *Houttuynia herba* and its Effect on 5 α -reductase Gene Expression in Dermal Papilla Cells. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*. 2017 ; 31(6) : 356-61.
20. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. *Zhonghuabencao*. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999 : (V) 80-81.
21. Han S, Cho JJ, Kang YG. Comparison of the Characteristics of Fruit Quality and Free Radical

- Scavenging Activities and Polyphenol Content by a Degree of Fruit Thinning(Leaf-Fruit Ratio) in Mango 'Irwin' Cultivated in a Plastic Heating House. *Journal of Jeju Studies*. 2020;54:219-32.
22. Choi MH, Jeon YJ, Shin HJ. Anthocyanin Analysis of Pressure-extracted Korean Blueberry Juice and in vitro Anti-inflammatory in RAW267.4 Cell line. *KSBB Journal*. 2015 ; 30(4) : 191-6.
 23. Kim MK. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Pulp and Peel Extracts of Mango. *J Invest Cosmetol*. 2017 ; 13(2) : 113-8.
 24. Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo C, Martini D, Campolo J, Vendrame S, Moller P, Loft S, Maria RD, Porrini M. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *European journal of nutrition*. 2013 ; 52(3) : 949-61.
 25. Upton JH, Hannen RF, Bahta AW, Farjo N, Farjo B, Philpott MP. Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol*. 2015 ; 135(5) : 1244-52.
 26. Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity. *BioTechniques*. 1995 ; 19(4) : 640-9.
 27. Slominski A, Paus R, Costantino R. Differential Expression and Activity of Melanogenesis-Related Proteins During Induced Hair Growth in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991 ; 96(2) : 172-9.
 28. Kharbanda M, Pilz DT, Tomkins S, Chandler K, Saggari A, Fryer A, McKay V, Louro P, Smith JC, Burn J, Kini U, Burca AD, FitzPatrick DR, Kinning E. Clinical features associated with CTNNA1 de novo loss of function mutations in ten individuals. *European Journal of Medical Genetics*. 2017 ; 60(2) : 130-5.
 29. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. *Developmental Cell*. 2002 ; 2(5) : 643-53.
 30. Cristofano AD. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2017 ; 123 : 49-71.
 31. Kwack MH, Kim MK, Kim JC, Sung YK. Dickkopf 1 Promotes Regression of Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012 ; 132(6) : 1554-60.
 32. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. *Advances in Urology*. 2012 ; 2012 : 530121.