

참가죽그물바탕말 1,9-Dihydroxycrenulide 및 Epiloliolide의 양모 효능

강정일¹ · 오태현^{2,3} · 김지오⁴ · 노해민⁴ · 이남호² · 유은숙^{1,4} · 강희경^{1,4*}

¹제주대학교 제주천연물의약연구센터, ²제주대학교 자연과학대학 화학·코스메틱스학과

³대봉엘에스(주) 제주천연물소재응용연구소, ⁴제주대학교 의학전문대학원 의학과

The Effect of 1,9-Dihydroxycrenulide and Epiloliolide from *Dictyota coriacea* on the Hair Growth

Jung-Il Kang¹, Tae Heon Oh^{2,3}, Jioh Kim⁴, Haemin No⁴, Nam Ho Lee²,
Eun-Sook Yoo^{1,4}, and Hee-Kyoung Kang^{1,4*}

¹Jeju Research Center for Natural Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

²Department of Chemistry & Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

³Smart Building Suite 212, Advanced Science and Technology Complex,

213-3 Chumdang-ro (Yeongpyeong-dong), Jeju 63309, Korea

⁴Department of Medicine, School of Medicine, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju 63243, Korea

Abstract – This study was conducted to evaluate the effects of *Dictyota coriacea* extract and its active components such as 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide on the hair growth. Treatment with *D. coriacea* extract and the hexane and EtOAc fractions of *D. coriacea* extract significantly increased the proliferation of dermal papilla cells (DPCs), a central regulator of the hair cycle. Especially, 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide from *D. coriacea* extract, caused an increase in the DPC proliferation. When isolated rat vibrissa follicles were treated with 1,9-dihydroxycrenulide or epiloliolide for 21 d, the hair-fiber lengths for the vibrissa follicles increased. When examined the activity of 5 α -reductase, which converts testosterone to dihydrotestosterone (DHT), a main cause of androgenetic alopecia, the several solvent fractions of *D. coriacea* extract significantly decreased the 5 α -reductase activity while 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide scarcely inhibited 5 α -reductase activity. In addition, we found that the *D. coriacea* extract and several solvent fractions of *D. coriacea* extract could not act as a K_{ATP} channel opener, which could be a contributory factor in the effect on hair growth. These results suggest that *D. coriacea* extract and 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide, principals of *D. coriacea*, have the potential to treat alopecia via the proliferation of DPCs.

Keywords – *Dictyota coriacea*, 1,9-Dihydroxycrenulide, Epiloliolide, Hair growth, Dermal papilla cells

탈모는 신체 또는 머리부위의 모발이 가늘어지며 감소하는 증상으로, 남성과 여성 모두에서 발생하며, 모낭의 축소화 및 성장기 모낭의 감소 등의 특징을 수반한다.^{1,2} 지금까지 밝혀진 탈모 요인으로는 모발 주기 조절과 관련된 모유두 세포의 증식억제 또는 기능저하,³ dihydrotestosterone(DHT) 남성호르몬의 작용에 의한 모발주기의 비정상화,⁴ 두피로의 혈류량 저하로 인한 모발주기의 비정상적 변화,⁵ 항암제,^{6,7} 정신적 스트레스, 물리적 자극, 및 환경오염 등이 다양하게 거론되고 있다.^{7,8}

탈모 치료제로는 현재까지 finasteride 및 minoxidil 두 약물만이 미국식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)의 승인을 받아 사용되고 있다. Finasteride(Propecia[®])와 minoxidil(Rogain[®])은 각각 전립선 비대증 및 고혈압 치료를 위해 개발되었으나, 두 약물 모두 모발성장을 촉진하는 효능을 밝혀져 탈모방지제로 이용되고 있다.^{9,10} Finasteride는 type II 5 α -reductase의 활성을 억제하여 테스토스테론(testosterone; T)의 DHT로의 전환을 저해함으로써 안드로겐성 탈모를 개선함이 알려져 있다.⁹ 최근에는 type I 및 type II 5 α -reductase의 활성을 동시에 저해하는 dutasteride가 한국 식약처의 허가를 받아 사용되고 있다.¹¹

Minoxidil은 모낭 내의 중배엽유래 세포인 모유두세포의

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

apoptosis를 억제하여 모유두세포의 증식을 촉진하며,¹²⁾ ATP-sensitive potassium channels(K_{ATP} 채널) 개방효과^{13,14)} 등이 탈모방지 효과를 유도하는 것으로 여겨지고 있다.

탈모 기전에 관여하는 많은 조절 인자들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 성장기, 퇴행기, 휴지기의 모발주기 조절에 관련된 인자들(fibroblast growth factor-7, Sonic hedgehog 및 transforming growth factor β)과 그들의 수용체에 의한 신호전달에 의하여 육모효과가 조절됨이 계속적으로 보고되고 있다.¹⁵⁾

참가죽그물바탕말(*Dictyota coriacea*)은 제주 연안에 서식하는 갈조류로, 알갈로이드 성분인 dictyospiromide의 항산화작용이 보고되었다.¹⁶⁾ 또한, 항멜라닌작용을 나타내는 1,9-dihydroxycrenulide와 epiloliolide 성분이 분리되었다.¹⁷⁾ FDA의 승인을 받은 fnasteride와 minoxidil의 일시적인 효능 및 다양한 부작용으로 장기적으로 사용할 수 있는 천연물 유래 탈모개선제 개발연구가 활발히 진행 중이다. 본 연구에서는 탈모개선 효능에 대한 연구보고가 없는 해조류인 참가죽그물바탕말 및 활성성분인 1,9-dihydroxycrenulide와 epiloliolide의 탈모개선 효능을 조사하여 이들을 탈모방지제 및 탈모치료제로 이용할 수 있는 근거를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

참가죽그물바탕말 추출물의 제조 - 본 실험에 사용한 참가죽그물바탕말(*Dictyota coriacea*)은 2005년 1월 제주도의 사수동 해안에서 채집하였으며, 제주테크노파크 생물중대양성연구소의 이옥재박사가 감별하였다. 채집한 시료는 염, 착생 식물과 모래를 제거하기 위하여 물로 3회 세척한 후 행구어 냈다. 60°C oven에서 24시간 동안 건조시킨 후 분쇄하였다. 건조된 참가죽그물바탕말 400 g을 실온에서 70% 에탄올 수용액에 침지하여 이틀간 교반 후 여과하였다. 여과액은 감압 건조와 동결 건조를 거쳐 분말형태의 추출물 65.4 g을 얻었으며, -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

참가죽그물바탕말 추출물로부터 화합물의 분리정제 - 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물을 1L의 증류수에 분산시킨 후 n-hexane 분획(14.1 g), dichloromethane 분획(0.9 g), ethyl acetate(EtOAc) 분획(0.1 g), n-butanol(BuOH) 분획(2.2 g)과 물 분획(43.5 g)으로 나누었다.

Dichloromethane 분획 870 mg을 실리카겔을 이용한 VLC(vacuum liquid chromatography)를 시행하였으며, 용매 조성은 n-Hex/EtOAc 혼합용매로 0~100% 용리한 후 MeOH/EtOAc 혼합 용매로서 0~100%까지 단계적으로 용매의 극성을 증가시켰다.

이 용리액들은 7개의 분획(DM-I ~ DM-VII)으로 나누었으며 DM-II 분획을 n-Hex/EtOAc(2/1)의 용매 조성으로

silica gel chromatography를 수행하여 23개의 분획으로 나누고 DM-II-2 분획으로부터 화합물 **1**(6.1 mg)을 분리하였다. DM-V 분획을 CH₂Cl₂/Me₂CO(9/2)을 용매로 하여 silica gel chromatography를 수행한 결과 3개의 분획으로 나누고 이 중 DM-V-2 분획으로부터 화합물 **2**(9.1 mg)을 얻었다. 분리한 2개의 화합물의 구조를 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR로 분석하였다. 화합물 **1**의 구조는 1,9-dihydroxycrenulide, 화합물 **2**의 구조는 epiloliolide로 유추하였으며, 문헌^{18,19)}과 비교하여 1,9-dihydroxycrenulide(Fig. 1-A)와 epiloliolide(Fig. 1-B)로 동정하였다.

화합물 1 - 1,9-dihydroxycrenulide¹⁸⁾; colorless oil; C₂₀H₃₀O₄; 334.44. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.95 (1H, *m*, H-18), 5.12 (1H, *m*, H-13), 4.32 (1H, *m*, H-4), 3.19 (1H, *d*, *J*=9.5 Hz, H-3), 2.03 (1H, *m*, H-10), 2.02 (2H, *m*, H-12a, 12b), 1.93 (1H, *m*, H-5b), 1.81 (1H, *m*, H-5a), 1.69 (3H, *s*, H-15), 1.61 (3H, *m*, H-16), 1.45 (1H, *m*, H-9), 1.28 (2H, *m*, H-11b, 6), 1.07 (1H, *m*, H-8b), 1.07 (3H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-17), 1.01 (3H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-20), 0.92 (1H, *m*, H-7), 0.28 (1H, *m*, H-8a). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 173.6 (C-19), 167.4 (C-2), 134.3 (C-1), 133.2 (C-14), 125.1 (C-13), 98.3 (C-18), 70.9 (C-4), 50.8 (C-3), 49.7 (C-5), 37.4 (C-11), 33.6 (C-10), 29.7 (C-9), 27.3 (C-6), 26.5 (C-16), 26.0 (C-12), 24.1 (C-20), 17.8 (C-15), 17.5 (C-17), 11.2 (C-7), 9.34 (C-8)

화합물 2 - epiloliolide¹⁹⁾; colorless gum; C₁₁H₁₆O₃; 196.24. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 5.78 (1H, *s*, H-3), 4.10 (1H, *q*, *J*=8.5, 4.0 Hz, H-6), 2.47 (1H, *ddd*, *J*=11.5, 3.5, 2.0 Hz, H-7α), 2.00 (1H, *ddd*, *J*=12.5, 3.2, 2.0 Hz, H-5α), 1.59 (3H, *s*, 7α-Me), 1.42 (1H, *t*, *J*=11.5 Hz, H-5β), 1.31, 1.28 (each 3H, *s*, 4-Me), 1.26 (1H, *m*, H-7β). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 184.1 (C-3α), 174.2 (C-2), 113.9 (C-3), 88.7 (C-7α), 65.4 (C-6), 50.8 (C-5), 48.6 (C-7), 36.3 (C-4), 30.5, 25.4 (4-Me), 25.9 (7α-Me).

세포 배양 - 흰쥐 수염에서 분리된 모낭 유두 세포를 불멸화한 모유두세포(Rat vibrissa immortalized dermal papilla cell)를²⁰⁾ 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, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양 하였다. Mouse embryonic NIH3T3 fibroblasts는 ATCC(Rockville, MD, USA)에서 구매하였으며, 세포는 100 units/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin(Gibco Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated bovine calf serum(BCS; Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 DMEM(ATCC, MD, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양 하였다.

MTT assay – 모유두세포 및 NIH3T3 fibroblasts의 증식은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 측정하였다.²¹⁾ 모유두세포의 증식 측정을 위한 시료는 다음과 같이 처리하였다. 모유두세포(1.0×10^4 cells/mL)를 1% FBS를 포함한 DMEM 배지에 혼탁하여 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료를 처리하였다. 양성 대조군인 minoxidil(Sigma, MO, USA)는 10 μ M의 농도로 처리하였다. NIH3T3 fibroblasts의 증식 측정을 위한 시료는 다음과 같이 처리하였다. NIH3T3 fibroblasts(1.0×10^4 cells/mL)를 10% 또는 2% BCS를 포함한 DMEM 배지에 혼탁하여 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후에 시료를 처리하였다. 양성 대조군으로 minoxidil을 75 μ M의 농도로 처리하였다. 4일 동안 배양한 후 50 μ L의 MTT(Sigma, MO, USA)을 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. 상층액은 제거하고 DMSO 200 μ L을 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식정도를 조사하였다.

5 α -Reductase assay – 5 α -Reductase 활성은 rat prostate 5 α -reductase를 이용하여 [3 H]testosterone(T)이 [3 H]dihydrotestosterone(DHT)로 전환되는 양으로 평가하였다.²²⁾ 7~8주령 된 Wistar rat 수컷을 이산화탄소 가스를 사용하여 희생시킨 후에 바로 전립선을 적출하고, 곧바로 액체질소에 넣어서 보관하였다. 전립선을 4°C의 homogenizer buffer[20 mM potassium phosphate(pH6.5), 0.32 M sucrose, 1 mM dithiothreitol(DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 25 μ g/mL aprotinin, 25 μ g/mL leupeptin]를 넣은 glass homogenizer에 넣고 뿌영게 될 때까지 분쇄하였다. 원심분리(100,000 g, 60분, 4°C) 후 pellet(nuclear, mitochondria, microsomes)을 얻은 후에 pellet에 homogenizer buffer를 넣어서 현탁하여 crude enzyme으로 사용하였다. 5 α -Reductase assay는 다음과 같이 수행하였다. Microtube에 crude enzyme과 시료 및 reaction buffer[40 mM potassium phosphate (pH6.6), 200 μ M NADPH, 1 mM DTT, 120 nCi[1,2,6,7- 3 H]T]를 넣어 최종 반응액을 500 μ L로 맞춘 후, 37°C에서 60분간 반응시켰다. 1 mL의 ethyl acetate로 추출하고 완전히 건조한 다음, 50 μ L의 ethyl acetate를 넣고, TLC plate에 spotting하고 전개용매(50% cyclohexane, 50% ethyl acetate)하에서 전개하였다. UV spectrometer로 254 nm에서 T를 확인하고 10% 황산을 뿌려서 DHT를 확인하였다. T와 DHT 부위를 가위로 내려서 각각의 scintillation vial에 넣고 cocktail 10 mL을 넣어 β -counter로 측정하였다. 5 α -Reductase 활성에 의한 testosterone의 전환율을 DHT/(T+DHT)의 비로 계산하였다.

Rat Vibrissa Follicles의 분리 및 배양²³⁾ – 생후 3주령

인 Wistar rat 수컷(Japan SLC, Hamamatsu, Japan)을 (주) 중앙 실험동물로부터 구입하여 ethyl ether로 마취 후 경추 도살 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 8-12개의 모낭을 이용하였으며, 배양 중에 배지는 3일마다 교환하였다. 1,9-Dihydroxycyrenulide또는 epiloliolide를 0.01, 0.1 및 1 μ M으로 처리하였으며, 양성 대조물질인 minoxidil은 10 μ M의 농도로 처리하였다.

모낭 길이 측정 – 배양중인 vibrissa follicle 형태는 현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 촬영하였다. 모낭 길이는 image analyzer(DP controller; Olympus, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모낭 길이 변화의 평균값을 구하고 대조군의 평균길기와 비교하여 성장 정도를 측정하였다.

통계분석 – 모든 측정결과는 평균 \pm 표준편차 또는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검정은 unpaired student's t-test로 검정하였으며, *p*-value가 0.05이하일 경우 유의성을 인정하였다. 통계처리는 Sigma Stat software(Jandel Scientific Software, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 참가죽그물바탕말 및 그 성분인 1,9-dihydroxycyrenulide(Fig. 1-A)와 epiloliolide(Fig. 1-B)의 양모 효능을 조사하였다.

모유두세포는 모낭의 기저에 위치하는 증배업 유래 세포로써, 상피세포로 이루어진 모기질 세포(matrix cells) 등과의 상호작용을 통해 모발의 형성 및 성장에 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있다.^{24,25)} 참가죽그물바탕말 추출물 및 용매 분획물이 모낭주기 조절에 중요한 세포로 인식되고 있는 모유두세포의 증식 효과가 있는지 조사하였다. 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 용매 분획물을 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 μ g/mL 농도로 처리하여 모유두세포의 증식을 조사하였다. 대조군(100%)에 비하여 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물은 0.1 및 1 μ g/mL 농도에서 각각

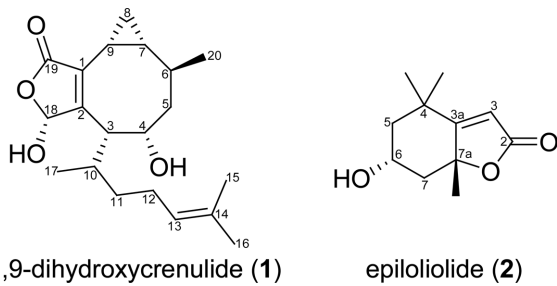


Fig. 1. Structures of 1,9-dihydroxycrenulide (A) and epiloliolide (B) from *Dictyota coriacea*.

114.9±12.4% ($P<0.01$) 및 110.3±7.6% ($P<0.01$); Hexane 분획물은 10 µg/mL 농도에서 145.8±14.1% ($P<0.001$); EtOAc 분획물은 10 µg/mL 농도에서 136.0±12.5% ($P<0.001$)의 증식을 나타내었다(Fig. 2). 양성대조군인 minoxidil(10 µM)은 108.0±6.3% ($P<0.05$)의 증식 효과를 나타내어, 참가죽그물바탕말 에탄올추출물 및 용매분획물이 양성대조군인 minoxidil보다 더 높은 모유두세포의 증식 효능을 나타내었다(Fig. 2). 또한, 참가죽그물바탕말에서 분리한 1,9-dihydroxycrenulide와 epiloliolide를 0.01, 0.1, 1 및 10 µM의 농도로 처리하였을 때, 각각의 농도에서 1,9-dihydroxycrenulide는 123.0±12.4% ($P<0.001$), 126.6±9.1% ($P<0.001$), 121.7±9.2% ($P<0.01$) 및 108.0±9.1; epiloliolide는 116.4±15.5%, 124.5±13.6% ($P<0.001$), 128.8±16.1% ($P<0.01$) 및 116.1±15.2%의 증식

를 나타내었다(Table I). 참가죽그물바탕말의 성분인 1,9-dihydroxycrenulide와 epiloliolide는 대조군에 비하여 모낭 유두세포의 성장을 유의성 있게 증가시켰으며, 양성대조군인 minoxidil(10 µM)의 125.8±13.1% ($P<0.01$)과 비슷한 증식 효과를 나타낸 것이다(Table I).

5 α -Reductase는 테스토스테론을 안드로겐 수용체에 결합력이 강한 DHT로의 전환에 관여하며, 이러한 DHT는 남성에서 가장 일반적인 발생하는 탈모의 유형인 안드로겐성 탈모의 주요 원인이다.^{26,27} 특히, type II 5 α -reductase를 억제하는 것으로 알려진 finasteride는 안드로겐성 탈모 환자의 증상 개선에 기여한다.²⁶ 또한, 안드로겐성 탈모 환자에게 type I과 II 양쪽 모두를 억제하는 dutasteride를 처리한 경우 두피 및 혈장 내 DHT가 감소되며 모발수가 증가됨이 알려져 있으며, 비교 연구 결과 dutasteride는 finasteride 보다 개선된 효능을 나타낸다고 보고하였다.¹¹ 실제로 5 α -reductase 억제 효능은 탈모방지 효능을 지닌 소재 연구에 있어서 주요한 타겟으로 알려져 있다.^{28,29} 생후 7~8 주령의 SD rat 전립선 추출물을 사용하여 참가죽그물바탕말 추출물, 용매 분획물 및 그 성분인 1,9-dihydroxycrenulide와 epiloliolide의 5 α -reductase 활성 억제 효과를 조사하였다. 참가죽그물바탕말 추출물은 0.1, 1 및 10 µg/mL 농도에서 5 α -reductase 활성을 각각 18.4±14.6%, 15.5±12.4% 및 12.4±1.7% ($P<0.05$) 정도로 억제하였다(Fig. 3). Hexane분획물은 1 및 10 µg/mL 농도에서 각각 19.0±8.6% ($P<0.05$)

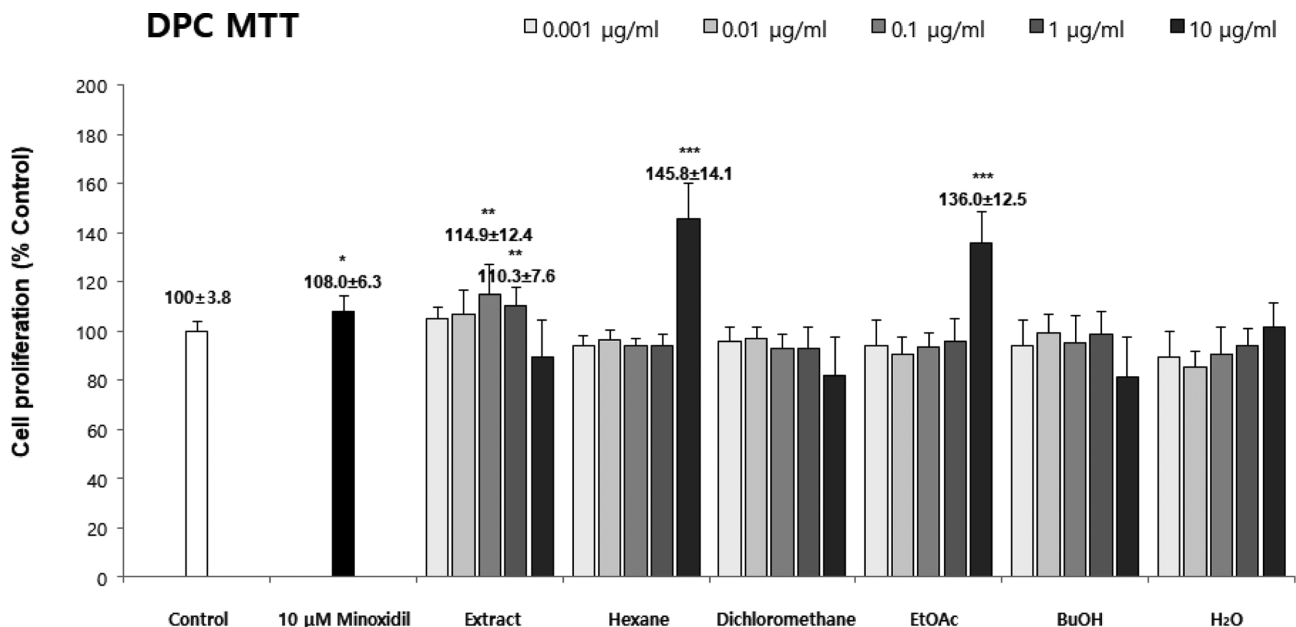


Fig. 2. The effects of *D. coriacea* extract and its solvent fractions on the proliferation of dermal papilla cells. Rat dermal papilla cells (1.0×10^4 cells/mL) were plated in 96 well plates. Dermal papilla cells were stimulated with various concentrations of *D. coriacea* extract or its solvent fractions, as indicated. Stimulation with minoxidil served as a positive control. Cell proliferation was measured using a MTT assay for 4 days. All experiments were performed in triplicate. Data are presented as the mean ± the S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared with the control.

Table I. The effects of 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide on the proliferation of dermal papilla cells (DPC)

Compound	Concentration (μM)	DPC proliferation (control %)
1,9-dihydroxycrenulide	0.01	123.0 \pm 12.4***
	0.1	126.6 \pm 9.1***
	1	121.7 \pm 9.2***
	10	108.0 \pm 9.1
epiloriolide	0.01	116.4 \pm 15.5
	0.1	124.5 \pm 13.6***
	1	128.8 \pm 16.1**
	10	116.1 \pm 15.2
Minoxidil	10	125.8 \pm 13.1**

DPC proliferation was measured using a MTT assay for 4 days. All experiments were performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm the S.D. ** p <0.01, *** p <0.001 compared with the control.

및 67.4 \pm 8.0%(P <0.001); EtOAc 분획물은 0.1 및 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 50.2 \pm 18.4%(P <0.05) 및 23.5 \pm 3.1%(P <0.01); BuOH 분획물은 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 56.2 \pm 6.1%(P <0.01) 및 27.6 \pm 13.6%(P <0.05); 물 분획물은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 28.6 \pm 14.4%(P <0.05)의 5 α -reductase 억제 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 5 α -reductase 활성 억제 효과는 양성대조 물질로 사용한 finasteride의 억제 효과(94.5 \pm 21.8%;

Table II. The effects of 1,9-dihydroxycrenulide and epiloliolide on the inhibition of 5 α -reductase activity (%)

Compound	Concentration	5 α -Reductase inhibition rate (%)
1,9-dihydroxycrenulide	0.01 μM	0 \pm 0
	0.1 μM	0 \pm 0
	1 μM	0 \pm 0
epiloriolide	0.01 μM	1.2 \pm 5.1
	0.1 μM	6.3 \pm 10.8
	1 μM	16.9 \pm 10.3
Finasteride	2 nM	87.5 \pm 3.4***

The inhibition rate of the control group was considered 0% (not shown). Data are presented as the mean \pm SD. Finasteride was used as reference material to evaluate the inhibition of 5 α -reductase activity.

P <0.001)보다는 다소 낮은 것이다. 그러나, 5 α -reductase 억제 활성이 유의성 있게 관찰되지 않은 dichloromethane 분획물에서 분리된 1,9-dihydroxycrenulide 또는 epiloliolide 처리군에서는 유의성 있는 5 α -reductase 억제 활성이 관찰되지 않았다(Table II). 참가죽그물바탕말 추출물 및 용매(Hexane, EtOAc 및 BUOH) 분획물은 finasteride와 같은 5 α -reductase 활성을 억제하므로 안드로젠성 탈모에 활용될

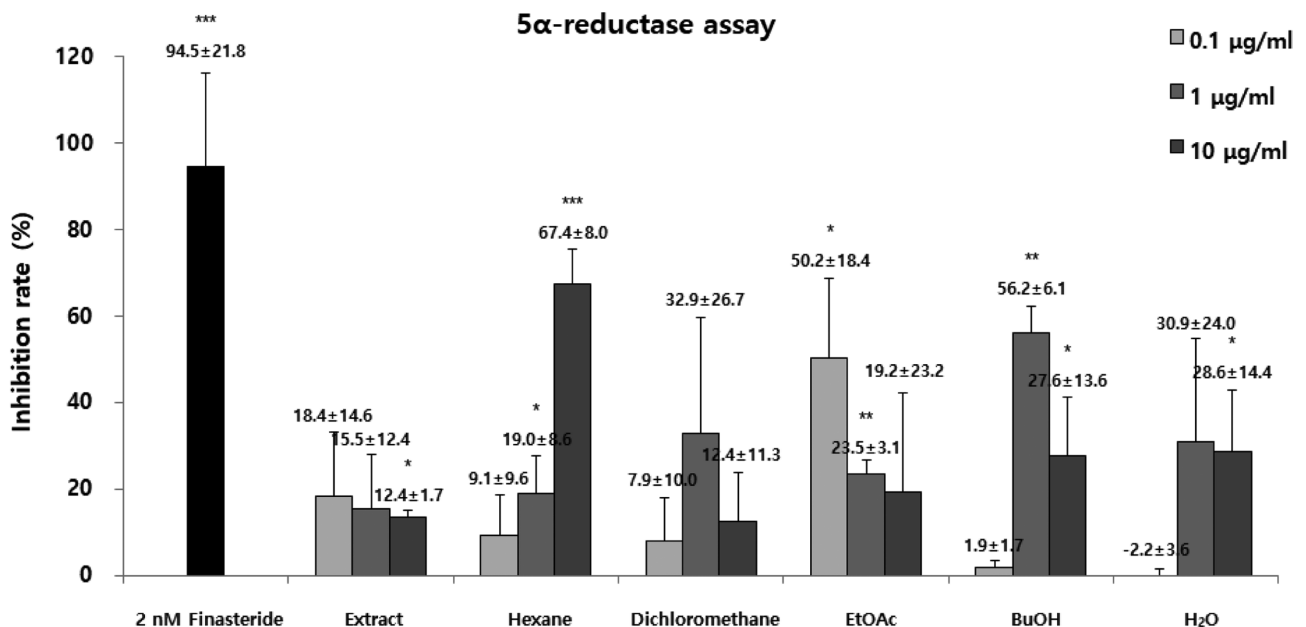


Fig. 3. The effects of *D. coriacea* extract and its solvent fractions on the inhibition of 5 α -reductase. The conversion rate of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT) was calculated by the equation: $[\text{DHT}/(\text{T} + \text{DHT})] \times 100$. The inhibition rate of 5-reductase activity (%) was estimated as a percentage of the reduction in conversion rate compared with the control. The inhibition rate of the control group was considered 0% (not shown). Data are presented as the mean \pm SD. Finasteride was used as reference material to evaluate the inhibition of 5 α -reductase activity. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with the control.

수 있으며, 후속 연구에서 5 α -reductase 억제 효능 물질을 규명할 필요가 있다.

Minoxidil의 육모효능이 모유두세포에 있는 ATP-sensitive potassium channels(K_{ATP} 채널)의 opening에 기인한다고 알려져 있다.¹³⁾ K_{ATP} 채널의 opener로 작용하는 물질은 NIH3T3 fibroblast cells에서 mitogenic 효능을 나타내어 fibroblast의 성장증식이 촉진됨이 알려져 있으며, 이와 같은 효능은 K_{ATP} 채널 차단제인 tolbutamide 및 glibenclamide 등에 의하여 차단된다.³⁰⁾ 참가죽그물바탕말 추출물 및 용매 분획물이 minoxidil처럼 K_{ATP} 채널 개방효과를 나타내는지 NIH3T3 fibroblast 증식 효능을 조사하였다. 참가죽그물바탕말 추출물 및 용매 분획물을 0.01, 0.1, 1 및 10 μ g/mL 농도로 처리하였을 때, 82.9 \pm 7.1% ~ 108.3 \pm 9.3%의 증식률을 나타내었다

Table III. The effects of *D. coriacea* extract and its solvent fractions on the proliferation of NIH3T3 fibroblast

<i>D. coriacea</i> extract and its solvent fractions	Concentration (μ g/mL)	Proliferation (control %)
EtOH extract	0.1	92.7 \pm 5.4
	1	91.4 \pm 5.4
	10	92.1 \pm 6.1
Hexane fraction	0.01	92.8 \pm 8.5
	0.1	92.6 \pm 4.9
	1	93.3 \pm 5.2
	10	108.3 \pm 9.7
Dichloromethane fraction	0.01	93.9 \pm 10.7
	0.1	92.8 \pm 7.3
	1	92.4 \pm 4.8
	10	82.9 \pm 7.1
EtOAc fraction	0.01	95.4 \pm 6.3
	0.1	95.6 \pm 9.8
	1	95.0 \pm 10.8
	10	102.7 \pm 9.5
BuOH fraction	0.01	97.5 \pm 12.7
	0.1	95.5 \pm 6.3
	1	93.9 \pm 8.2
	10	84.4 \pm 4.6
H ₂ O fraction	0.01	104.3 \pm 6.3
	0.1	104.3 \pm 4.9
	1	105.8 \pm 7.3
	10	101.5 \pm 7.4
Minoxidil	75	135.9 \pm 17.8***

Mouse embryonic NIH3T3 fibroblasts (1.0×10^4 cells/mL) were plated in 96 well plates. Cell proliferation was measured using a MTT assay for 4 days. All experiments were performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm the S.D. *** $P < 0.001$ compared with the control.

(Table III). 이런 결과는 참가죽그물바탕말 추출물 및 용매 분획물이 K_{ATP} 채널 개방효과를 나타내지 않음을 시사하는 것이다. 양성대조 물질로 사용한 75 μ M minoxidil은 135.9 \pm 17.8%($P < 0.001$)의 증식률을 나타내었다(Table III).

모유두세포의 증식효능을 나타내는 참가죽그물바탕말의 활성성분인 1,9-dihydroxycrenulide 및 epiloliolide가 hair-fiber 길이 성장 효능이 있는지 조사하기 위하여 rat vibrissa follicle culture model을 이용하였다. Rat vibrissa follicles은 나이에 따라 모발주기가 동일하며, 분리된 vibrissa follicles은 23일 정도까지 배양이 가능하다.^{31,32)} 생후 3 주령 rat의 성장기 vibrissa follicles을 분리하여 3주간 배양하면서 모낭 길이를 측정하여 1,9-dihydroxycrenulide 또는 epiloliolide를 모유두세포의 증식효능을 나타내는 농도로 처리하여 육모 효능 있는지 조사하였다. 21일째 1,9-dihydroxycrenulide(0.01, 0.1 및 1 μ M)과 대조군과의 모낭의 길이 차이(%)를 비교한 결과, 0.01 및 0.1 μ M의 농도에서 대조군(100.0 \pm 26.5%)보다 hair fiber의 성장이 117.6 \pm 28.7% 및 106.2 \pm 29.6%로 증가하는 경향이 관찰되었다(Fig. 4-A). 그러나, 1,9-dihydroxycrenulide 1 μ M에서는 hair fiber의 성장이 94.5 \pm 28.7%로 관찰되었다(Fig. 4-A). 21일째 epiloliolide처리군(0.01, 0.1 및 1 μ M)과 대조군과의 모낭의 길이 차이(%)를 비교한 결과, 1 μ M의 농도에서 대조군(100.0 \pm 26.5%)보다 hair fiber의 성장이 117.4 \pm 34.7%로 증가하였다(Fig. 4-B). 반면에 epiloliolide처리군 0.01 및 0.1 μ M에서는 hair fiber의 성장이 97.4 \pm 22.8% 및 97.7 \pm 24.5%로 관찰되었다(Fig. 4-B). 양성대조군인 10 μ M minoxidil은 136.8 \pm 24.0%의 hair fiber 성장을 나타내었다(Fig. 4). Fig. 4의 결과로 참가죽그물바탕말의 활성성분인 1,9-dihydroxycrenulide 및 epiloliolide는 follicle culture model에서 양모효능을 나타내며, 1,9-dihydroxycrenulide(0.01 μ M)의 hair-fiber 길이 성장 효능이 epiloliolide(10 μ M)의 hair-fiber 길이 성장 효능보다 우세함을 예측할 수 있다. 그러나, Fig. 4의 rat vibrissa follicle culture에서의 1,9-dihydroxycrenulide 및 epiloliolide의 농도의 증가에 따른 hair fiber의 성장이 다르게 나타나는 양상은 기존에 보고된 Acancoreoside J³³⁾ 및 HNG(an analogue of humanin)³⁴⁾ 등의 다른 양모효능 물질에서도 관찰된다. 이와 같이 양모효능 물질의 농도에 따른 hair fiber의 성장이 다른 양상으로 나타나는 이유로 다음의 가능성을 생각할 수 있다. 모낭에는 모낭줄기세포, 외근모초, 내근모초, 각질세포, 멜라닌세포 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 시료를 처리하였다. 이로 인한 시료 및 시료의 대사물이 모낭에 축적될 수 있으며, 축적된 성분에 의하여 모낭을 구성하는 세포마다 다양한 효과가 나타날 수 있다고 사료된다.

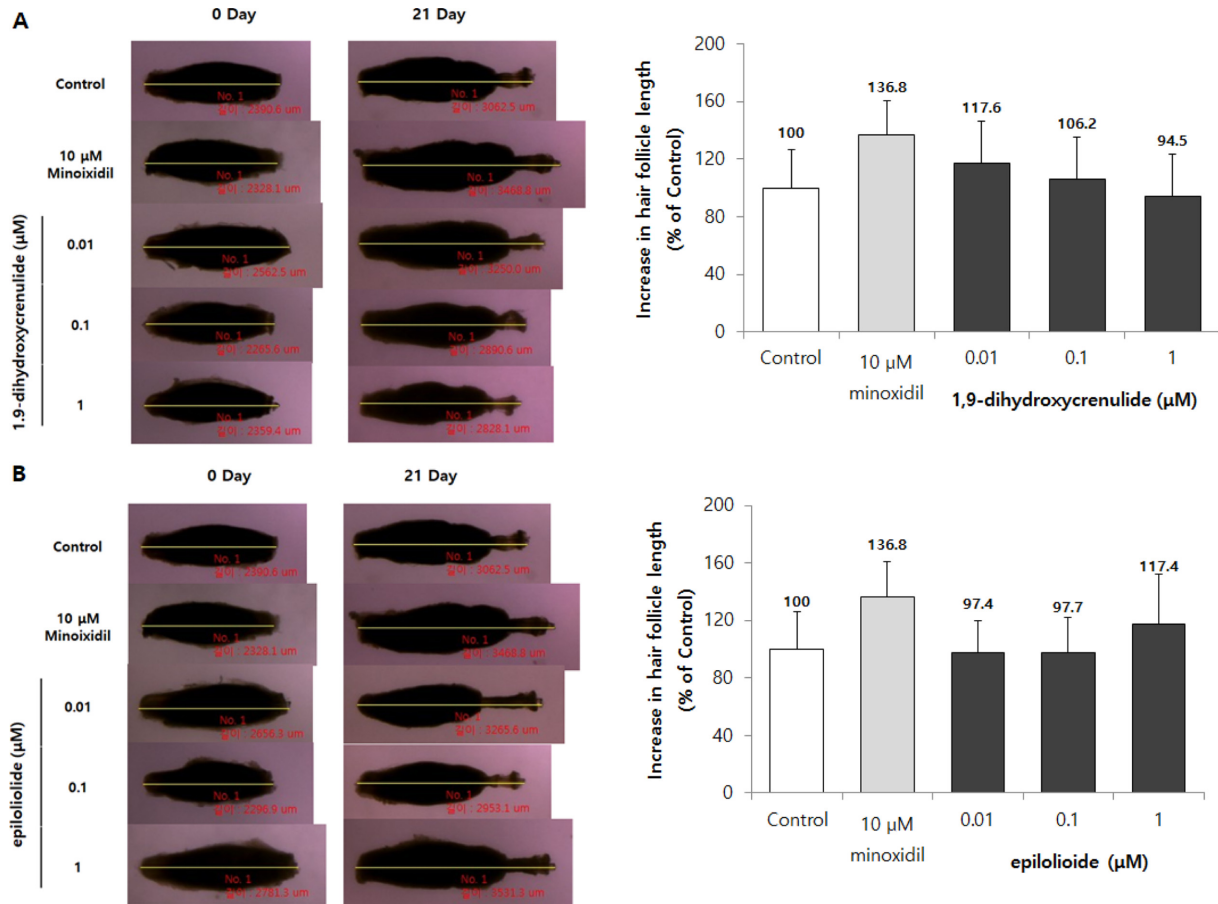


Fig. 4. The elongation effects of 1,9-dihydroxycrenulide (A) and epiloliolide (B) on the hair-fiber length of rat vibrissa follicle. Individual vibrissa follicles from Wistar rats were microdissected and then cultured in William's E medium at 37°C under 5% CO₂. Vibrissa follicles were then treated with 1,9-dihydroxycrenulide (A) or epiloliolide (B) (0.01, 0.1 and 1 μM) for 21 days. Stimulation with minoxidil served as a positive control. All experiments were performed in triplicate. The difference in the length of vibrissa follicles of the vehicle-treated control group on day 21 was taken to be 100%. Data are presented as the percentage of the length of the treated follicles based on the mean length of the control follicles ± the S.E.

결 론

본 연구에서는 참가죽그물바탕말 추출물 및 참가죽그물바탕말의 활성성분인 1,9-dihydroxycrenulide 및 epiloliolide가 모발의 성장기 조절에 중요한 모낭 유두세포의 성장증식을 증가시켜, 탈모개선 및 예방제로 이용될 수 있는 근거를 제시하였다. 한편, 참가죽그물바탕말 추출물은 안드로젠성 탈모를 예방할 수 있는 5α-reductase 억제 활성이 있으나, 1,9-dihydroxycrenulide 및 epiloliolide은 5α-reductase 활성을 억제하지 않으므로 후속 연구에서 5α-reductase 억제 효능 물질을 규명할 필요가 있다.

사 사

이 논문은 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2016R1D1A1B01010337).

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.

Elliott, K., Stephenson, T. J. and Messenger, A. G. (1999) Differences in hair follicle dermal papilla volume are due to extracellular matrix volume and cell number: implications for the control of hair follicle size and androgen responses. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 873-877.

Kaufman, K. D. (2002) Androgens and alopecia. *Mol. Cell Endocrinol.* **198**: 89-95.

Mecklenburg, L., Tobin, D. J., Müller-Röver, S., Handjiski, B., Wendt, G, Peters, E. M., Pohl, S., Moll, I. and Paus, R. (2000) Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **114**: 909-916.

- Botchkarev, V. A. (2003) Molecular mechanisms of chemotherapy-induced hair loss. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **8**: 72-75.
- Batchelor, D. (2001) Hair and cancer chemotherapy: consequences and nursing care-a literature study. *Eur. J. Cancer. Care (Engl).* **10**: 147-163.
- Aoki, E., Shibasaki, T. and Kawana, S. (2003) Intermittent foot shock stress prolongs the telogen stage in the hair cycle of mice. *Exp. Dermatol.* **12**: 371-377.
- 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.
- Messenger, A. G. and Rundegren, J. (2004) Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Br. J. Dermatol.* **150**: 186-194.
- Olsen, E. A., Hordinsky, M., Whiting, D., Stough, D., Hobbs, S., Ellis, M. L., Wilson, T. and Rittmaster, R. S. (2006) The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. *J. Am Acad. Dermatol.* **55**: 1014-1023.
- 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.
- 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.
- Cotsarelis, G. and Millar, S. E. (2001) Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends. Mol. Med.* **7**: 293-301.
- Yan, P., Li, G., Wang, C., Wu, J., Sun, Z., Martin, G. E., Wang, X., Reibarkh, M., Saurí, J. and Gustafson, K. R. (2019) Characterization by empirical and computational methods of dictyospiromide, an intriguing antioxidant alkaloid from the marine alga *Dictyota coriacea*. *Org. Lett.* **21**: 7577-7581.
- Ko, R. K., Kang, M. C., Kim, S. S., Oh, T. H., Kim, G. O., Hyun, C. G., Hyun, J. W. and Lee, N. H. (2013) Anti-melanogenesis constituents from the seaweed *Dictyota coriacea*. *Nat. Prod. Commun.* **8**: 427-428.
- Midland, S. L., Wing, R. M. and Sims, J. J. (1983) New crenulides from the sea hare *Aplysia vaccaria*. *J. Org. Chem.* **48**: 1907-1908.
- Park, K. E., Kim, Y. A., Jung, H. Y., Lee, H. J., Ahn, J. W., Lee, B. J. and Seo, T. W. (2004) Three norisoprenoids from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *J. Kor. Chem. Soc.* **48**: 394-398.
- 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 retaining a differentiated phenotype. *J. Cell. Sci.* **107**: 1761-1772.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Picard, F., Schulz, T. and Hartmann, R. W. (2002) 5-phenyl substituted 1-methyl-2-pyridones and 40-substituted biphenyl-4-carboxylic acids. Synthesis and evaluation as inhibitors of steroid-5 α -reductase type 1 and 2. *Biorg. Med. Chem.* **10**: 437-448.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kaufman, K. D., Olsen, E. A., Whiting, D., Savin, R., DeVillez, R., Bergfeld, W., Price, V. H., Van Neste, D., Roberts, J. L., Hordinsky, M., Shapiro, J., Binkowitz, B. and Gormley, G. J. (1998) Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride male pattern hair loss study group. *J. Am. Acad. Dermatol.* **39**: 578-589.
- Sinclair, R. (1998) Male pattern androgenetic alopecia. *BMJ.* **317**: 865-869.
- Kumar, N., Rungseewijitprapa, W., Narkkhong, N. A., Suttajit, M. and Chaiyasut, C. (2012) 5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. *J. Ethnopharmacol.* **139**: 765-771.
- Murata, K., Noguchi, K., Kondo, M., Onishi, M., Watanabe, N., Okamura, K. and Matsuda, H. (2013) Promotion of hair growth by *Rosmarinus officinalis* leaf extract. *Phytother. Res.* **27**: 212-217.
- Sanders, D. A., Fiddes, I., Thompson, D. M., Philpott, M. P., Westgate, G. E. and Kealey, T. (1996) In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet-derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K⁺ channel-dependent fashion. *J. Invest. Dermatol.* **107**: 229-234.
- Philpott, M. P., Green, M. R. and Kealy, T. (1992) Rat hair follicle growth in vitro. *Br. J. Dermatol.* **127**: 600-607.
- Philpott, M. P. and Kealey, T. (2000) Cyclical changes in rat vibrissa follicles maintained in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 1152-1155.
- 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.

Kim, S. M., Kang, J. I., Yoon, H. S., Choi, Y. K., Go, J. S., Oh,

S. K., Ahn, M., Kim, J., Koh, Y. S., Hyun, J. W., Yoo, E. S. and Kang, H. K. (2020) HNG, a humanin analogue, promotes hair growth by inhibiting anagen-to-catagen transition. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 4553.

(2021. 7. 26 접수; 2021. 8. 17 심사; 2021. 9. 6 게재확정)