



Studies on the effect of *Betula platyphylla* extract on human dermal papilla cell proliferation and its mechanism of action

Seunghyun Ahn² · Jung Yeon Lee² · Eunbi Hong¹ · Jiyun Kim¹ · Won Seok Jeong³ · Kown Ki Moon⁴ · CheongTaek Kim³ · Jiha Sung^{1,2} · Seyeon Park^{1,2}

자작나무 추출물에서 보이는 모유두(HDP) 세포 성장 촉진 효과와 작용 메커니즘 연구

안승현² · 이정연² · 홍은비¹ · 김지윤¹ · 정원석³ · 문권기⁴ · 김청택³ · 성지하^{1,2} · 박세연^{1,2}

Received: 25 September 2022 / Accepted: 14 October 2022 / Published Online: 31 December 2022

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract *Betula platyphylla* extract includes various materials which showed biological activity such as terpenoids. For this reason, *Betula platyphylla* extract has been used to alleviate inflammation. In this study, extract of *Betula platyphylla* was obtained and purified using several solvents and evaluated whether they showed effect on prevention of hair loss. Cell cytotoxicity assay was performed to investigate the effect of extracts on cell proliferation. Western blotting was performed to observe the changes in expression of several related growth factors such as β -catenin, VEGF, IGF1, and cyclin D. Also, 5- α -reductase activity was measured. The ethyl acetate extract was divided into four partial extracts and named as H3-1, H3-2, H3-3, and H3-4. The H3-2 extract showed proliferation activity of human derma papilla cell and increased the protein expression of

several related growth factors such as β -catenin, VEGF, IGF1, and cyclin D, comparable to the effect of Ethyl 3,4,5-Trimethoxy Benzoate (ETB) and Lupeol (LPO). Moreover, we found that the fraction H3 was shown to decrease 5- α -reductase activity while ETB and LPO had no significant effect on 5- α -reductase activity.

Keywords 5- α -reductase activity · *Betula platyphylla* extract · Ethyl 3,4,5-trimethoxy benzoate · Hair growth · Human derma papilla cell · Lupeol

서 론

자작나무(*Betula platyphylla*)는 그 껍질의 대부분이 기름 성분으로 구성되어 있어 오랫동안 썩지 않아 글을 새기거나 불을 피우는 촛불의 대용으로 사용되었으며 생약명으로는 화목피로 불린다. 자작나무 추출물에 포함된 유효성분들에 의한 생리활성 효과로는 충치예방, 뇌기능 및 인지 기능개선, 자외선에 의해 감소된 유전자 발현 정상화에 의한 피부세포의 항상성 유지, 5- α -reductase 활성억제 효과, 피부 주름개선 효과, 항알레르기 효과, 항산화, 항염, 그리고 항암에 이르기까지 다양한 분야에서 효과가 보고되어 있다[1-5].

탈모는 유전에 의한 발생 뿐 아니라 자외선, 산성비와 같은 외부 자극과 약물 치료, 스트레스, 비정상적인 면역 반응과 같은 외인적, 내인적 환경 요소에 기인하여 발생하기도 한다[6-7]. 탈모가 남성들에게서만 나타나는 것이라는 선입견이 있지만 최근 발표된 통계에 따르면 미국의 경우 2000만명 이상의 여성이 탈모를 겪고 있으며 우리나라에서의 40대 이상 여성들의 30% 정

Seyeon Park (✉)
E-mail: sypark21@dongduk.ac.kr

¹Division of Applied Chemistry and Cosmetic Science, Dongduk Women's University, Seoul, Republic of Korea

²Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul, Republic of Korea

³RNS Inc. R&D Center, Daejeon, Republic of Korea

⁴VICHE Cosmetic R&D Center, Seoul, Republic of Korea

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.

도가 탈모로 인한 어려움을 겪고 있다고 알려져 있다. 단순 탈모의 경우 외관상의 변화로 인한 스트레스를 겪을 수 있지만, 지루성 피부염이 동반되는 경우 세균감염까지 증상이 확장될 위험이 있다. 이러한 연유로 탈모는 유전적 원인과 환경적 요인에 의해 발생하는 단순한 외형의 변화를 넘어 질병으로 바라보는 인식의 전환이 요구되고 있다[5]. 남성과 여성에게서 나타나는 탈모의 현상은 그 양상에서 차이를 보이며 이러한 유형은 주로 환경적 요인 보다는 유전적 요인에 기인 할 때 뚜렷하게 나타난다. 남성과 여성에게서 생물학적으로 큰 차이를 갖는 호르몬에 의한 것인데 어느 쪽이든 안드로겐(Androgen)의 과다분비에 의한 탈모증상이 나타나게 된다. 여성호르몬인 에스트로겐(Estrogen)은, 남성호르몬인 안드로겐(Androgen)의 기능을 억제하여 균형을 유지하는데 여성의 경우 2차 성징, 임신, 출산, 환경기 등에 의한 체내 여성호르몬의 변화가 비이상적으로 나타나며 균형이 깨지는 경우에 탈모증상이 나타날 수 있다. 호르몬에 의한 탈모발생을 억제 하기 위한 대표적인 표적은 테스토스테론을 5- α -dihydrotestosterone (5-DHT)로 환원시키는 효소인 5- α -reductase type1과 type2, 안드로겐 수용체(Androgen Receptor, AR)이다. 2022년 현재 FDA에 승인된 탈모치료제는 혈관확장제로 사용된 도포용 minoxidil과 5- α -reductase의 저해제인 경구용 약물 finasteride 두개의 약물만이 등록 되어있다[8]. 새로운 약물의 개발을 위해 기존 약물 대비 감소된 부작용과 동등 이상의 효과를 낼 수 있는 조혈모세포(PRP), 압타머(aptamer)를 이용한 천연추출물 등과 같은 탈모 유발 작용기전에 기반한 신호 전달 억제 약물의 평가 및 발굴이 활발하게 시도되고 있다. 또한 전문 의약품이 아닌 기능성 샴푸, 모낭주위주사, 두피 스키텀링과 같은 보조요법들까지 다양한 범위내에서 제안되고 있다[9].

본 연구에서는 betulin, lupeol, betulinic acid, betulone, oleanolic acid 등과 같은 triterpenoid 계열의 화합물과 catechin, aceroid VII/VIII, acrogenin E 및 정유를 각각 껍질과 잎에 함유하고 있는[10,11] 자작나무로부터 추출 및 분리 정제하여 얻은 분획물을 이용하여, 모유두 세포 성장 촉진 효과를 조사함으로써 탈모 치료 및 예방 물질로서의 자작나무 추출물의 가능성을 확인하고자 하였다. 또한 자작나무 추출물에 함유되어 있다고 알려진 Lupeol (LPO)과 모유두세포 성장 촉진 효과를 보인 단일 물질 Ethyl Trimethoxy Benzoate (ETB)를 함께 이용하여 세포 성장 관련 단백질인 β -catenin, IGF1, VEGF, cyclin D의 발현량에 미치는 영향을 평가하였다. 또, 부가적으로 이들 물질이 5- α -reductase activity 에 미치는 영향을 평가하여 그 결과를 보고하고 탈모예방 기능성 원료로서의 가능성을 제안하였다.

재료 및 방법

자작나무 추출 및 분리 정제

LPO는 다음의 방법으로 합성하였다. 이구 둥근 플라스크(Two-neck round bottom flask)에 3,4,5-트리메톡시 벤조산(3,4,5-trimethoxybenzoic acid, Eudesmic acid) 10 mmol (2.12 g)을 넣은 다음, 디메틸포름아이드(Dimethylformamide) 50 mL를 투입하고, 촉매로 탄산칼륨(K_2CO_3) 24 mmol (3.34 g)을 투입한 뒤 브로모 메탄(Bromo methane) 24 mmol (1.3 mL)을 서서히 첨가하였다. 첨가가 끝나면 상온에서 6시간 반응시켰다. 반응물에 정제수 500 mL를 투입하고 100 mL의 *n*-Hexane 을 이용하여

추출하였다. *n*-Hexane 층을 감압 하에 건조시킨 뒤 *n*-Hexane 과 Ethyl acetate 혼합용매를 전개용매로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 에틸 3,4,5-트리메톡시 벤조에이트를 수득하였으며, 고속원자 충격 질량분석법(FAB-MS)을 이용하여 동정하였다. 다음으로 에틸 3,4,5-트리메톡시 벤조에이트(Ethyl trimethoxy benzoate, ETB)는 다음의 방법으로 합성하였다. 이구 둥근 플라스크에 상온에서 Hexylsalicylate (Sigma, St. Louis, MO, USA W520326) 10 mmol (2.22 g)을 넣은 다음 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide) 50 mL를 투입하여 녹인 후 촉매로 탄산칼륨(K_2CO_3) 24 mmol (3.31 g)을 투입한 뒤 브로모 헥산(Bromo hexane) 24 mmol (3.96 g)을 서서히 첨가한 후 상온에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응을 완료한 후 반응물에 정제수 500 mL를 투입하고 100 mL의 *n*-Hexane을 이용하여 추출하였다. 유기층인 *n*-Hexane을 감압 하에 건조 시킨 뒤 *n*-Hexane 과 Ethyl acetate 혼합용매를 전개용매로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 ETB를 수득하였다.

자작나무 추출물은 자작나무껍질 10 kg을 분쇄한 뒤 Ethyl acetate (EA) 50 L로 24시간 동안 상온에서 교반 하여 추출액을 획득한 뒤 0.5 μ M 필터로 여과한 뒤 여과액을 농축하여 얻었다. 농축액의 무게는 461 g으로 4.61% 수율로 획득하였다. EA 층 추출물 461 g 중 75 g을 오픈 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 소분획 및 정제를 진행하였다. 사용한 컬럼의 크기는 6.5 cm 지름을 갖고 있으며 실리카겔(Silica gel)을 *n*-Hexane 내에서 현탁액 상태로 만들어 충전하였다. 자작나무 추출물을 첨가한 뒤 *n*-Hexane과 Ethyl acetate 혼합용액의 비율을 변화시켜 여러 분획을 얻고 정제 분리하였다(Fig. 1).

Column Chromatography

10:0에서 2:8 비율로 gradient를 주어 시료를 유출시켜 분획하였고 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석법을 통해 총 4개의 소분획 H3-1, H3-2, H3-3, H3-4를 얻었다. 4개의 소분획에 대해서는 추가로 오픈 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 소분획 및 정제를 실시하였고 H3-1은 동일 조건에서 3개의 소분획인 H3-1A, H3-1B, H3-1C 를 얻었다. H3-2에 대하여는 컬럼 전개용매를 *n*-Hexane 및 Ethyl acetate 9:1에서 6:4 비율로 gradient를 걸어 유출시켰고 2개의 소분획인 H3-2A와 H3-2B를 분리하였다. H3-3 소분획에 대해서는 *n*-Hexane 및 Ethyl acetate 비율을 9:1에서 6:4의 비율로 유출을 진행하였고 이로 부터 H3-3A를 획득하였다. 마지막으로 H3-4는 전개용매를 *n*-Hexane 및 Ethyl acetate 비율을 8:2에서 5:5로 변화시키며 유출시켜 소분획 H3-4A를 얻었다. H3-2 분획물 중 H3-2A에 대하여 오픈 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 또 다시 소분획 및 정제를 실시하였다. 지름 6.5 cm인 컬럼에 실리카겔(Silica gel) 현탁액을 충전시키고, *n*-Hexane를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 첨가 한 후 전개용매는 *n*-Hexane 및 Ethyl acetate 를 9:1에서부터 6:4의 비율로 유출시켜 1개의 소분획(H3-2AC)을 얻었다. 남은 분획물 H3-2B에 대하여 동일한 오픈 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 소분획 및 정제를 실시하였다. 컬럼에 실리카겔(Silica gel) 현탁액을 충전시키고, *n*-Hexane를 유출시켜 고정상을 균일한 상태로 만든 후 시료를 로딩한 후 전개용매는 *n*-Hexane 및 Ethyl acetate를 9:1에서부터 6:4의 비율로 유출시켜 1개의 소분획(H3-2 BC)을 얻었다. TLC 를 통해 분석한 결과 자작나무 추출물 중 알려진 LPO와

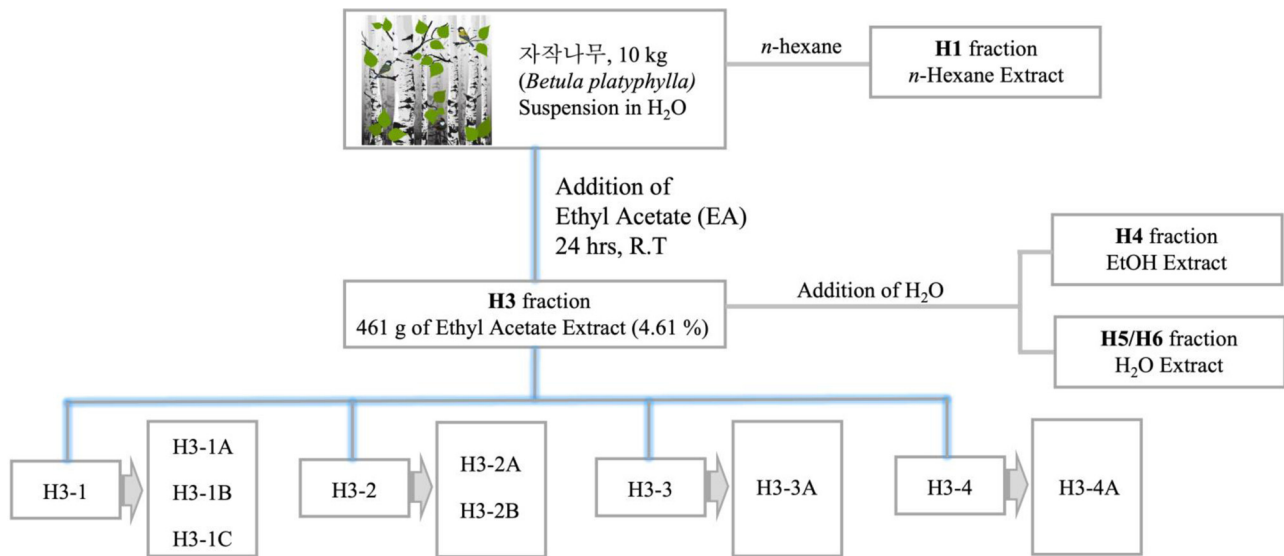


Fig. 1 Flow chart of extracting and separating *Betula platyphylla*. Initial amount of 10 kg and 461 g of ethyl acetate extraction residue. The 461 g ethyl acetate extraction was separated depending on their polarity into four group as H3-1, H3-2, H3-3, and H3-4

Betulin 이 각각 H3-AC와 H3-BC에 포함되어 있음을 확인하였고 H3-2A 분획물의 FT-NMR ¹H-스펙트럼을 통해서도 LPO 가 포함되어 있음을 확인하였다.

모유두세포 구입처, 세포배양 조건

본 연구에서 사용한 1차 배양된 사람모낭의 모유두세포(Human Hair Follicle Dermal papilla Cell, HDP)는 Cell Engineering for Origin (Seoul, Korea)에서 구입 후 37°C water bath에서 최대한 빨리 세포를 해동한 뒤, 15 mL conical tube에 PBS 4.5 mL를 넣은 뒤 해동된 세포를 조심스럽게 넣고 15,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 침전 시켰다. 상층액을 제거한 뒤 Human Hair Follicle Dermal Papilla cells growth medium (CEFOgro™ HDP, Cell engineering for origin) 10-15 mL를 이용하여 세포를 resuspension 시킨 후 T75 culture flask에 seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 배양하였다. 배지는 2일에 한번씩 교환하며 flask내 세포가 80% 정도가 되도록 유지하였다.

자작나무 추출물의 세포독성 및 세포성장 평가

사람 모유두 세포(HDP)에 대한 자작나무 추출물들과 대조군으로 사용한 minoxidil의 세포독성과 세포성장 활성을 평가하기 위하여 96-well plate에 세포를 1×10⁴ cells/well로 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 24시간 동안 배양하여 각 well의 cell confluency가 70-80% 되도록 하였다. Minoxidil 100 mM을 PBS에 녹여 제조한 뒤 serum free media를 사용하여 0.2, 1.0, 5.0, 10, 50 µM로 각각 희석하여 처리하였고 자작나무 추출물 분획들은 PBS에 녹여 10,000 ppm stock을 제조한 뒤 serum free media로 5, 10, 20 ppm으로 희석하여 사용하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) assay kit (Promega, Madison, WI, USA) 시약 10 µL씩을 첨가 한 뒤 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배

양하여 세포와 MTS 시약 간의 반응을 유도한 뒤 ELISA reader기(Bio-Teck, Winooski, VT, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 48시간 조건으로 세포독성 및 세포 성장을 평가할 때 minoxidil은 24시간 후 시료를 교체하여 배양해주었다[12].

Western blot analysis

HDP cell을 1×10⁵ 개씩 6-well plate에 seeding 하였다. 24시간 동안 배양한 후 vehicle군과 Finasteride, LPO, ETB, 그리고 H3 시료를 처리한 후 다시 24시간을 배양하였다. Protease inhibitor와 PMSF가 혼합된 lysis buffer를 적정량 처리하여 cell lysis를 진행하였다. Lysis buffer에 의해 용해된 각 Well에 해당되는 샘플을 정량한 후 10% Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide gel에 로딩하여 전기영동으로 분리 한 뒤 polyvinylidenedifluoride membrane (Millipore, Burlington, MA, USA)으로 transfer 장치를 통해 이동시켰다. 발모와 관련된 단백질들의 발현정도 변화를 확인하기 위해 5-α-reductase (sc0293232), VEGF (sc-7269), GAPDH (ab8245), cyclinD1 (sc-450), β-catenin (cell signaling #9562S)과 IGF1 (ab9572)을 각각 1차 항체로 사용하였고, 1:1000으로 희석된 1차 항체와 4°C에서 밤새(O/N) 반응시킨 후 Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 1x buffer로 충분히 씻어낸 후 1:4000으로 희석한 2차 goat anti-rabbit HRP 를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 1x buffer로 세척을 마무리한 후 ECL 반응시약(Bio-Rad USA)으로 감광을 진행하여 결과를 확인하였다.

5-α-Reductase 활성 측정

HDP cell을 60 mm dish에 1×10⁵개씩 seeding 하였다. Vehicle을 음성대조군으로 하고 양성대조군으로 Finasteride (TCI chemical, Tokyo, Japan, F0627) 를 0.1 µM로 제조하여 사용하였다. 60 mm dish에 cell 이 80% 이상 채워지면 각 해당 시료를 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서

incubation하였다. 24시간 후 dish 내 media를 제거하고 PBS 1 mL로 한 차례 세척 하였다. 1X EDTA를 500 µL씩 첨가한 뒤 3분간 incubation 하고 3분 뒤 media 1 mL를 넣고 cell을 microtube에 모아주었다. 10,000 rpm에서 5분간 e-tube를 원심분리하여 pellet을 모으고 상층액을 제거한 뒤 extraction buffer 100 µL씩 넣어 pellet을 풀어주었다. Extraction buffer는 50 mL conical tube에 sucrose 3 g, CaCl₂ 1.66 g을 10 mL PBS에 넣어 sucrose 880 mM, CaCl₂ 1.5 M이 되도록 제조하였다. 풀어준 pellet은 다시 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 e-tube에 옮긴 후 DMSO에 녹여 제조한 NADPH 1600 mM과 Testosterone (TCI chemical, Tokyo, Japan, T0027) 40 mM stock을 Tris-Cl 1 M (pH 5.7)로 1/1000씩 희석한 뒤 50 µL씩을 새로 옮겨둔 microtube에 첨가하여 총 200 µL volume을 만든 후 vertexing을 진행하였다. E-tube내에서 혼합된 용액을 96 well에 넣은 뒤 호일로 감싼 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 30분 동안 incubation 하였다. ELISA reader기 (Bio-Teck)를 사용하여 5초간 shaking하고 340 nm에서 흡광도를 확인하였다.

결과 및 고찰

자작나무 추출물의 세포독성 및 세포성장 평가

먼저 모유두세포에 대한 세포 독성 실험을 진행하여 분획물들이 갖는 세포독성 및 세포 성장 활성도를 평가하였다. 화피 전체 추출물(H1)의 물 현탁액을 *n*-Hexane 으로 추출하고(H2), 다시 Ethyl acetate로 추출하고(H3), Ethanol로 추출한(H4) 분획을

얻고, 나머지 물 분획을 H5와 H6 분획으로 나누어 모유두 세포 성장효과를 조사하였다. vehicle만 처리한 대조군과 비교 하였을 때 각 분획의 20 ppm 이상의 농도에서는 세포 독성이 보였으나 10 ppm 이하의 농도에서는 크게 세포 독성을 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). H3과 H4의 분획에서는 모유두세포 성장 촉진 효과가 보였으므로 H3 분획을 실리카겔 크로마토그래피를 이용하여 추가적인 분리를 한 후에 모유두세포 성장효과를 측정하였다. 6개의 분획으로 수득하여(H3-1, H3-2, H3-3, H3-4, H3-5, H3-6) 확인한 세포 성장 촉진 효과는 그림 2의 결과와 같다. H3-1부터 H3-3분획이 1 ppm과 4 ppm에서 모유두세포 성장 촉진 효과를 보이고 있으므로, H3-1, 2, 3 분획을 이용하여 2차적으로 컬럼 크로마토그래피로 분리하였다. 분획과 활성능의 평가 결과는 Fig. 3과 같다.

H3-1C와 H3-2B를 제외한 나머지 시료에서는 모유두세포에 대한 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). H3-1C의 경우 1 ppm 농도에서는 유의미한 세포성장을 나타낸 반면 4 ppm 농도에서는 40% 이상 세포생존을 억제하였고, H3-2B 에서도 1 ppm 농도에서는 세포성장을 나타냈지만, 4 ppm 농도에서는 20% 정도의 세포생존 억제 효과가 보였다. 이들을 제외한 나머지 시료들에 대해서는 세포독성이 없을 뿐 아니라 H3-1A, B, H3-2A, H3-4A 분획 모두 15-40% 까지의 세포 성장 촉진효과를 보였다. 또한, 유효 단일물질인 LPO 및 ETB에 대해서도 모유두세포(HDP)에 대한 cytotoxicity를 확인하여 세포 독성 및 성장 촉진 효과를 측정하였고, LPO 및 ETB, 효능물질이 포함된 것으로 보이는 분획(H3)은 모두 모유두세포(HDP)에 2 ppm 이하의 농도까지 시간별, 농도별 성장 촉진 효과를 보였다. 사용한 물질들은 24시간 또는 48시간 모두 성장

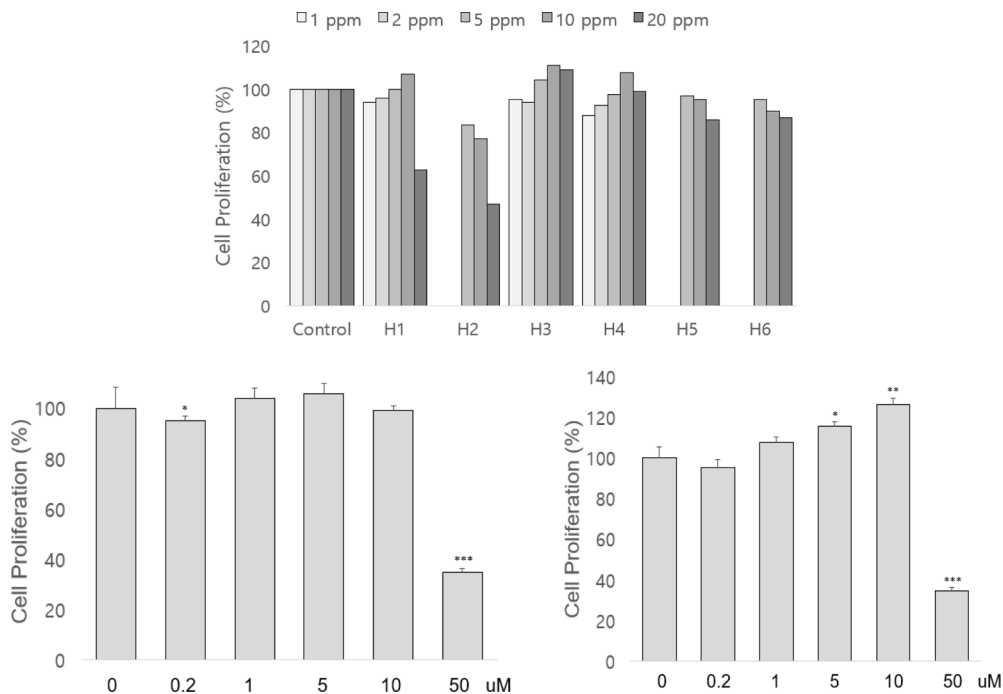


Fig. 2 (A) MTS assay on HDP cells of extracts H1-H6 at 1, 2, 5, 10, and 20 ppm during 24 h. (B) MTS assay on HDP cells of minoxidil at 0.2, 1, 5, 10, 50 µM during 24 h. (C) MTS assay on HDP cells of minoxidil at 0.2, 1, 5, 10, 50 µM during 48 h. All data were means±SD (n=3). Data were statistically different from the value of previous group (**p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001)

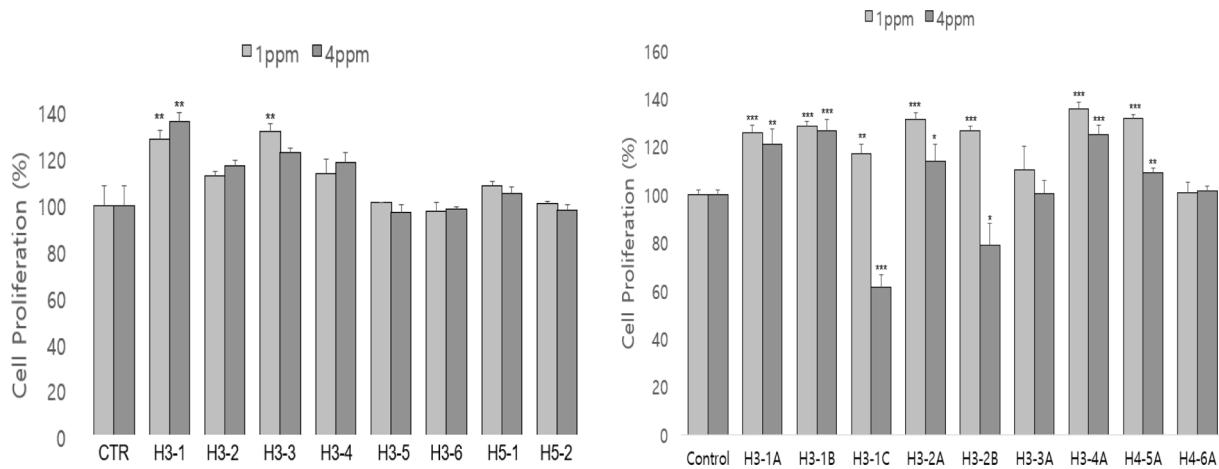


Fig. 3 (A) MTS assay on HDP cells of extracts H3-1, H3-2, H3-3, H3-4, H3-5, H3-6, H5-1, and H5-2 at 1 and 4 ppm during 24 h. (B) MTS assay on HDP cells of extracts H3-1A, H3-1B, H3-1C, H3-2A, H3-2B, H3-3A, H3-4A, H4-5A, and H4-6A at 1 and 4 ppm during 24 h. All data were means±SD (n=3). Data were statistically different from the value of previous group (**p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001)

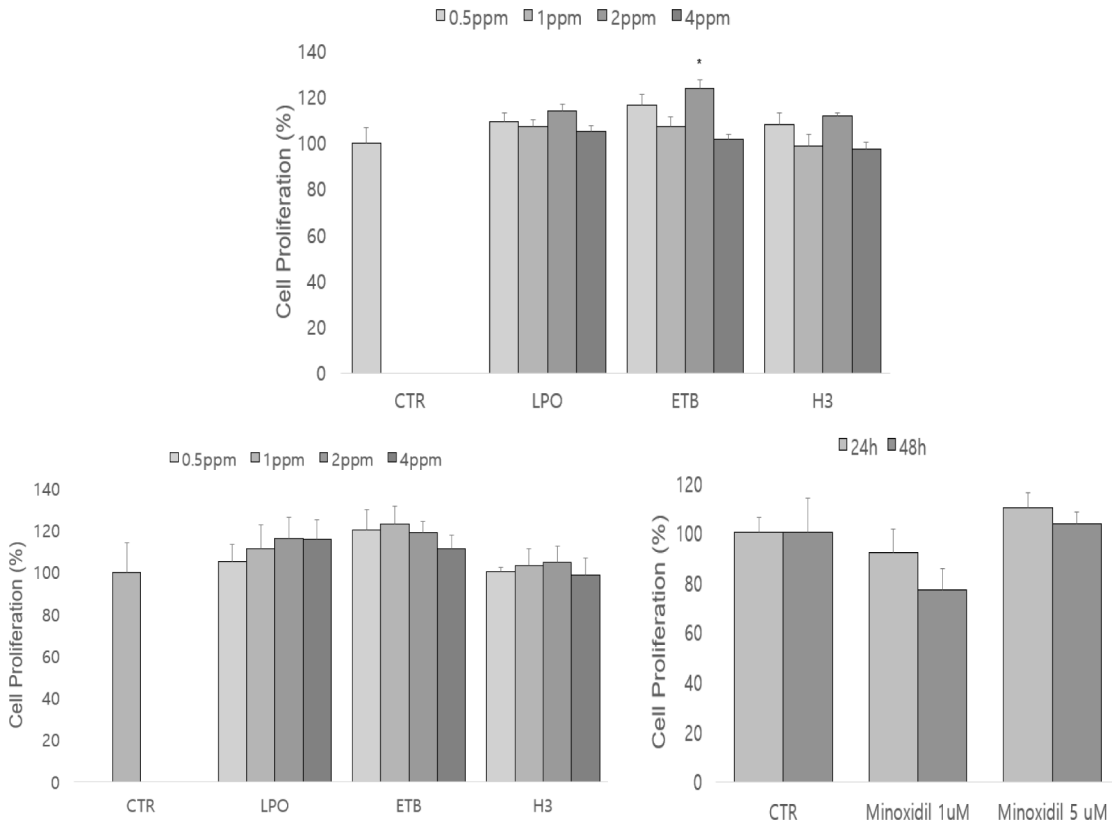


Fig. 4 (A) MTS assay on HDP cells of two extracts which separating and identifying as single compound lupeol (LPO) and ethyl trimethoxy benzoate (ETB) and final purification extract which named as H3-2 (HEE) at 0.5, 1, 2, and 4 ppm during 24 h. (B) MTS assay on HDP cells of two extracts which separating and identifying as single compound lupeol (LPO) and ethyl trimethoxy benzoate (ETB) and final purification extract which named as H3-2 (HEE) at 0.5, 1, 2, and 4 ppm during 48 h. (C) MTS assay on HDP cells of minoxidil at 1 and 5 μM during 24 and 48 h. All Data were statistically different from the value of previous group (**p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001)

효과를 보이고 대체적으로 48시간에서 더 큰 성장효과를 보였으며 minoxidil 5 μM을 처리했을 때 보다 LPO, ETB 그리고 H3 시료 모두 더 나은 성장 촉진 효과를 나타냈다(Fig. 4).

모유두세포 성장인자들의 단백질 발현량 평가

LPO 및 ETB, 유효물질 포함 분획(H3)을 이용하여 HDP 성장인자인 β-catenin, IGF1, VEGF, cyclin D와 탈모 원인 물질인

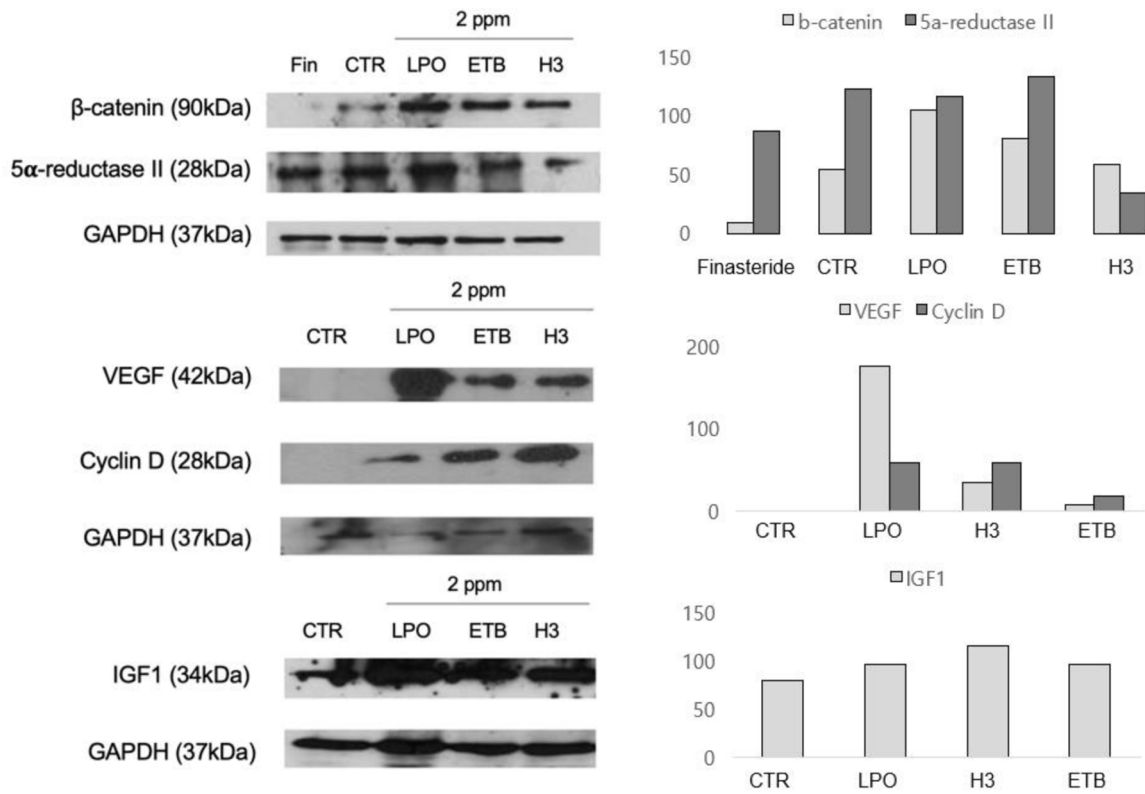


Fig. 5 Western blotting and quantification of the western blotting bands. Marker proteins were β -catenin, 5- α -reductase II, VEGF, Cyclin D, and IGF1. Normalized marker was GAPDH. Treatment materials were finasteride (Fin), LPO, ETB, and H3

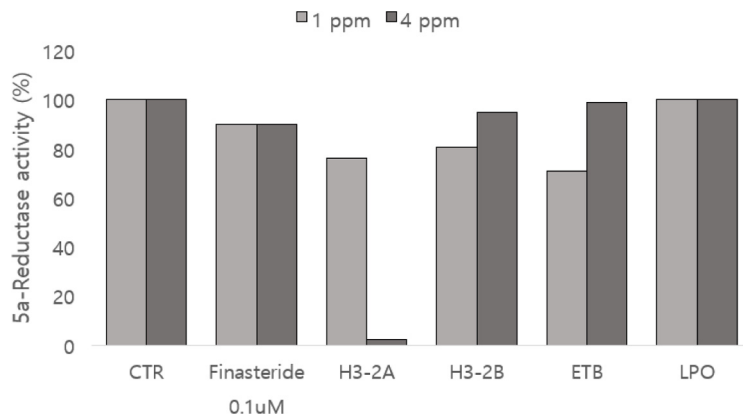


Fig. 6 Assay of 5- α -reductase activity with Finasteride (Fin), H3-2A, H3-2B, ETB, and LPO at concentration of 1 and 4 ppm

5- α -reductase II에 대하여 β -catenin 발현량을 측정된 결과 LPO와 ETB, H3분획 모두 모유두세포 성장인자들에 대한 발현량이 vehicle과 finasteride에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었다. VEGF, cyclin D, IGF1에 대해서도 LPO, ETB, H3시료 모두 vehicle 대비 확실하게 발현량이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며 LPO의 경우 VEGF에 대한 증가가 매우 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특별히 H3분획에서는 5- α -reductase II 발현정도가 상대적으로 감소되는 결과를 얻었다(Fig. 5).

5- α -reductase activity 평가

LPO 및 ETB, H3분획을 이용하여 5- α -reductase의 활성도에 미치는 영향을 측정된 결과 H3분획은 대조군과 양성 대조군 모두에 대해 탈모를 촉진하는 호르몬 합성효소인 5- α -reductase의 활성도를 억제하는 효과를 보였고 이 중에서도 H3-2A 분획의 4 ppm을 처리한 경우 활성감소효과가 뚜렷하게 나타났다. 반면 단일 성분 LPO 및 ETB는 5- α -reductase의 활성도 억제 효과를 거의 보이지 않았다(Fig. 6).

본 연구에서는 자작나무 추출물을 분리 정제하였고 이를 이

용하여 사람의 모유두(HDP) 세포 성장촉진활성 효과 및 발모 관련 지표 단백질들의 발현정도를 확인하였다. 세포독성 및 성장 활성도 평가, 성장 촉진 관련 단백질들의 양 변화 평가와 탈모 발생의 주 메커니즘 중 하나인 5- α -reductase의 활성 저해평가를 세포수준에서 확인한 결과 유효 단일 물질인 LPO 및 ETB와 활성 분획 H3은 사람의 모유두세포(HDP)에 처리시 시간별, 농도별 성장 촉진 효과를 나타냈다. 이는 유효 단일 물질인 LPO 및 ETB와 최종분획(H3)이 사람의 모유두세포(HDP) 성장 촉진 효과를 통하여 발모효과에 기여할 것으로 제안 할 수 있으며 모유두세포(HDP) 성장 촉진 효과 자체는 최대 효과대비, minoxidil과 유사한 정도였다. 모유두세포(HDP)의 성장이 확인된 LPO와 ETB, 최종분획(H3)에 대해서 모두 모유두세포 성장인자인 β -catenin, IGF1, VEGF, cyclin D 단백질의 발현수준의 변화를 확인하기 위해 western blot을 진행한 결과 역시 모유두세포 성장인자들의 증가를 관찰 할 수 있었다. 또한 탈모의 원인의 주요 요소인 5- α -reductase에 대해서 LPO와 ETB는 5- α -reductase 발현량에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났지만, 최종분획(H3)은 5- α -reductase 발현량을 감소시키는 효과를 보였다. 이를 통해 최종분획(H3)에는 LPO와 ETB를 제외하고 5- α -reductase 발현량을 감소시키는 성분이 포함되어 있는 것으로 예측할 수 있다. 자작나무 추출물로부터 얻은 일부 분획은, qRT-PCR에서 5- α -reductase의 발현량을 감소시키는 활성을 보였다. 따라서, *in vitro* 실험결과들을 바탕으로 자작나무 추출물의 발모 촉진 효과는 모유두세포 성장인자 β -catenin, IGF1, VEGF, cyclin D 발현량을 증가시켜서 HDP 성장을 가져오는 효과와 발모 촉진 호르몬 합성효소 5- α -reductase의 활성도 억제 효과의 복합 효과에 의한 것으로 작용 메커니즘을 제안 할 수 있다. 또한 탈모는 다양한 기전에 의해 조절 및 발병하는 만큼 추후 여러 작용 메커니즘을 보일 수 있는 혼합 추출물에 의한 시너지 효과와 화장품 원료로써 가능성을 mRNA level분석과 *in vivo* 실험을 통해 좀 더 구체적으로 평가하는 것이 필요하다.

초 록

자작나무(*Betula platyphylla*) 수피 추출물에는 생리활성을 보일 수 있는 다수의 terpenoids 물질이 포함되어 있고 염증반응을 완화시키는 치료제로 사용되어 왔다. 본 연구는 탈모예방 효과를 보일 수 있는 천연 물질을 확보하기 위해 자작나무를 여러 용매에서 추출 및 분리 정제하여 몇몇 분획을 획득하였다. 이를 사용하여 사람 모낭 모유두세포(HDP)에 대한 세포 독성 및 성장 촉진 효과 그리고 β -catenin, VEGF, IGF1, Cyclin D의 발현변화와 5- α -reductase activity에 미치는 영향을 평가하였다. Ethyl acetate를 이용하여 분리한 4개의 분획 중 H3-2 분획은 알려진 유효물질인 ETB, LPO와 동등수준의 모낭 모유두세포(HDP)에 대한 성장 촉진 효과를 보였고 성장에 관여하는 주요인자들의 발현을 높이는 효과를 보였다. 또한, 5- α -reductase activity에 ETB, LPO가 큰 영향을 보이지 못한 반면 최종분획물인 H3은 5- α -reductase activity 감소활성이 있음을 확인할 수 있었다.

Keywords 모발성장 촉진 · 자작나무 추출물 · 5- α -reductase activity · Ethyl 3,4,5-Trimethoxy Benzoate · Human Dermal Papilla (HDP) · Lupeol

Abbreviation

Human Dermal Papilla (HDP)
Ethyl 3,4,5-Trimethoxy Benzoate (ETB)
Lupeol (LPO)

감사의 글 본 논문은 과학기술정보통신부 개인기초연구(과기정통부)(R&D)2019R1F1A1043896 과 중소벤처기업부 지역특화산업육성+(R&D) S2913492의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Cho NK, Kim DH, Sung SH (2014) Simultaneous Determination of Platyphylloside, Aceroside VIII and Betulin in *Betula platyphylla* bark by HPLC-DAD. *Kor J Pharmacogn* 45(4): 294–299
2. Eom HJ, Kang HR, Choi SU, Kim KH (2017) Cytotoxic Triterpenoids from the Barks of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Chemistry & Biodiversity* 14(4): e1600400. doi:10.1002/cbdv.201600400
3. Lukasz Szoka, Valery Isidorov, Jolanta Nazaruk, Marcin Stocki, Leszek Siergiejczyk (2019) Cytotoxicity of Triterpene Seco-Acids from *Betula pubescens* Buds. *Molecules* 24(22): 4060–4069. doi:10.3390/molecules24224060
4. Jung JY, Jung HA (2010) Effect of *Phellinus igniarius* Quel Extract on the Anti-inflammatory, Anti allergy, Anti-oxidant, Anti-wrinkle reaction. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 23(3): 42–65
5. Ahn JW, Jang SK, Jo BR, Kim HS, Jeoung EY, Kithenya Hillary, Yoo YM, Joo SS (2022) Promotion effects of steam-dried *Betula platyphylla* extract on hair regrowth. *Korean J Food Sci Technol* 54(1): 43–51. doi: 10.9721/KJFST.2022.54.1.43
6. Anja Blumeyer, Antonella Tosti, Andrew Messenger, Pascal Reygagne, Veronique Del Marmol, Phyllis I Spuls, Myrto Trakatelli, Andreas Finner, Franklin Kiesewetter, Ralph Trüeb, Berthold Rzany, Ulrike Blume-Peytavi (2011) Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *J. Dtsch Dermatol. Ges.* 9(s6) S1–S57. doi: 10.1111/j.1610-0379.2011.07802.x
7. A Naito, T Sato, T Matsumoto, K Takeyama, T Yoshino, S Kato, M Ohdera (2008) Dihydrotestosterone inhibits murine hair growth via the androgen receptor. *British Journal of Dermatology*. 159: 300–305. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08671.x
8. Gupta AK, Foley KA (2014) 5% Minoxidil: treatment for female pattern hair loss. *Skin Therapy Lett.* 19(6): 5–7
9. Jang IW, Ko WS, Yoon HJ (2015) The Latest Trends of Treatment for Alopecia. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 28(4): 12–28. doi: 10.6114/jkood.2015.28.4.012
10. Fuchino H, Konishi S, Satoh T, Yagi A, Ssitsu K, Tatsumi T, Tanaka N (1996) Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 44(5): 1033–1038. doi: 10.1248/cpb.44.1033
11. Lee CH, Cho YM, Park ES, Shin CS, Lee JY, Jeong HS (2009) In vivo Immune Activity of Sap the White Birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Korean J Food Sci Technol* 41(4): 413–416
12. Choi SK, Cho NJ, Kim KK (2016) Development and Evaluation of the Herbal Medicine for Hair Growth-promoting Activity. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 31(4): 237–245. doi: 10.7841/ksbj.2016.31.4.237