

## 어성초를 포함한 천연복합추출물의 C57BL/6 마우스에 대한 발모 효과

홍양희<sup>1</sup>, 배송환<sup>2</sup>, 서형주<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>수원여자대학교 미용예술과, <sup>2</sup>한경대학교 식품생물공학과, <sup>3</sup>고려대학교 바이오시스템의과학부

## Effect of Herbal Complex Extract Including *Houttuynia cordata* Thunb on Hair Growth Promotion in C57B/6 Mice

Yang Hee Hong<sup>1</sup>, Song Hwan Bae<sup>2</sup>, Hyung Joo Suh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Beauty Art, Suwon Women's University

<sup>2</sup>Department of Food and Biotechnology, Hankyong National University

<sup>3</sup>School of Biosystem and Biomedical Science, Korea University

**Abstract** Present study was carried out to investigate the effect of herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb on hair growth and gene expression in C57BL/6 mice. Twenty mice were divided into 4 experimental groups including normal (control), 50% herbal complex extract (S-1), 100% herbal complex extract (S-2) and 5% minoxidil-treated group. The test materials were daily applied with 200  $\mu$ l per mouse on shaved dorsal skin for 3 weeks. The hair growth was monitored by photograph at 7, 14 and 21 days after topical application. Then the changes of hair density and hair thickness in the hair-removed area were evaluated by phototrichogram using folliscope. Also the expression level of growth factors related to hair growth was measured by real time polymerase chain reaction. Application of S-2 or minoxidil-treated group stimulated the hair growth compared to vehicle treatment. Therefore hair density of S-2 or minoxidil-treated group application was increased about 2.5 and 3.1 fold more than in vehicle application on 21 day, respectively. And hair weight of both S-2 and minoxidil-treated group were increased about 8.3 and 10.0 fold more than in vehicle spreading on 21 day, respectively. Furthermore the gene expression of insulin-like growth factor (IGF)-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were significantly up-regulated in S-2 and minoxidil-spreaded group compared to vehicle-applied group. However the gene expression of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 was not significantly down-regulated in S-2 and minoxidil-spreaded group compared to vehicle-applied group. These data suggest that S-2 has potent stimulating activity on hair growth in C57BL/6 mice and potential usefulness as ingredients of hair tonic and hair restore.

**Keywords:** Hair re-growth, *Houttuynia cordata* Thunb, IGF-1, VEGF, TGF- $\beta$ 1

### I. 서론

모발은 피부표면에서 생산된 가늘고 각질화된 구조로서, 외부충격에 대한 쿠션 역할과 더불어 직사광선, 한냉, 마찰, 위험

등 외부 자극으로부터 인체를 보호하고, 신체에 유해한 비소, 수은, 아연 등의 중금속을 체외로 배출하는 기능 등 다양한 역할을 담당하고 있으며, 생명유지에 중요한 기관은 아니지만 건강상태의 척도이자 외모를 결정짓는 신체의 중요한 일부분이다

\*Corresponding author: Hyung Joo Suh, School of Biosystem and Biomedical Science, Korea University, 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 136-713, Republic of Korea

Tel.: +82 2 3290 5639, Fax: +82 2 940 2849, E-mail:suh1960@korea.ac.kr

Received March 22, 2015; Revised June 24, 2015; Accepted June 26, 2015; Published June 30, 2015

(Gartner & Hiatt, 2007; Stenn, 2003).

모발은 두피 기저부에 있는 기질세포의 지속적인 증식으로 피부가 함입된 구조인 모낭에서 생성되고, 다양한 성장단계를 포함한 모발주기를 가진다(Reynolds *et al.*, 1991). 모발은 정상 모발의 90%를 차지하는 성장기(anagen), 생장정지와 모근이 위축되는 퇴행기(catagen), 모구가 건조되고 곧봉모가 되는 휴지기(telogen) 그리고 탈락기(exogen)의 4단계의 모발주기에 따라 성장과 탈모를 반복한다(Saitoh *et al.*, 1970). 특히, 퇴행기동안 많은 모낭의 세포사멸(apoptosis)이 진행되어 휴지기에 들어가면서 모낭의 크기가 줄어들게 된다(Buhl *et al.*, 1990).

탈모는 일련의 노화현상으로 인식되어왔으나, 최근 여러 유전적인 요인과 함께 스트레스, 서구화된 식습관 및 영양불균형 등의 다양한 원인에 의해 탈모가 진행됨이 밝혀지고 있다(Peters *et al.*, 2006; Trüeb, 2002). 탈모의 대표적인 기전은 남성호르몬인 testosterone이 5 $\alpha$ -reductase에 의하여 dihydrotestosterone (DHT)으로 전환되어 두피의 모낭을 위축시켜 탈모를 유발하는 것이다. 나이가 들면 DHT가 증가되어 모낭세포의 단백질 합성이 지연되고 이로 인해 휴지기 모낭의 비율이 증가되면서 탈모의 진행이 빠르게 진행된다고 볼 수 있다(Adachi & Kano, 1970).

이러한 탈모증상에는 미녹시딜(minoxidil) 도포제와 경구로 복용하는 피나스테라이드(finasteride) 제제가 남성용 탈모증의 주된 치료제로 사용되고 있다. 미녹시딜은 1970년대 초에 고혈압 치료를 위한 혈관확장제로 개발되었으나, 부작용으로 다모증이 보고되면서 발모촉진제로 사용되고 있다(Zappacosta, 1980). 미녹시딜의 발모효과에 관한 작용 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않지만 혈관확장을 통한 영양공급 증가 및 potassium channel opening 효과 등이 모발성장에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 또한 1% 미녹시딜은 vascular endothelial growth factor (VEGF) 발현을 유도하고, 고혈압 치료제로 사용된 만큼 혈관내피세포 및 평활근세포를 자극하여 혈액순환을 개선하고 모낭상피세포(follicular keratinocyte)를 포함한 모발성장에 사용되는 세포들의 성장을 촉진시킴으로써(Hamamoto & Mori, 1989) 발모를 촉진하는 것으로 여겨지고 있다. 피나스테라이드는 전립선 비대증 치료제로 개발되었다가 현재는 탈모치료제로 사용되고 있으며(Shapiro & Price, 1998), 5- $\alpha$ -reductase의 저해제로 혈중 DHT 농도를 낮추어 발모효과를 나타낸다고 알려지고 있다(Dallob *et al.*, 1994; Imperato-McGinley *et al.*, 1974).

하지만 미녹시딜의 경우 체중증가, 부종, 심장박동증가, 협심증, 피부염, 가려움증, 홍반 및 피부 건조화와 같은 이상반응이 보고되고 있고(Hageman *et al.*, 2005; Mackay & Isles, 1981), 피나스테라이드의 경우 모발성장 촉진효과를 계속 유지시키기 위해서는 지속적인 약물복용이 요구되며 남성의 경

우 성기능 장애, 임신한 여성이 복용할 경우 기형아 출산과 같은 부작용이 유발됨이 보고되어 있다. 이에 최근에는 이러한 단점을 보완하여 지속적인 사용에도 안전하고 효과가 있는 제품에 대한 요구에 대응하여 전통적으로 탈모예방 및 발모에 효능이 있는 것으로 알려진 한방 처방 및 한약재를 비롯한 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Irwig, 2012; Rogers & Avram, 2008).

토코트리엔올(tocotrienol)의 섭취가 두피의 지질과산화 및 산화적 스트레스를 감소 시켜 발모를 촉진하는 것으로 보고하였으며(Beoy *et al.*, 2010), 수종의 천연물과 *Lactobacillus plantarum* 균주를 이용한 발효추출물의 도포가 모발성장에 관여하는 cytokine을 조절하여 C57BL/6 mouse의 모발성장을 촉진하는 것으로 보고하였다(Joo, 2011). Kim *et al.* (2004)은 화학요법제인 cytarabine에 의한 자발적인 탈모실험 모델에서 측백나무(*Thuja orientalis*)의 추출물의 도포가 염증성 cytokine과 염증 유발인자의 조절을 통해 DBA/1J mouse의 모발성장을 촉진한 것으로 보고하였다(Ha & Park, 2013). 이 밖에도 탈모치료에 이용되는 한방처방전 또는 민간요법에 근거한 다양한 종류의 한약재나 천연물의 추출물을 이용한 발모제의 개발에 대한 연구가 보고되어 천연물로 부터 발모효과가 우수한 제제의 개발이 가능할 것으로 시사하였다(Lee & Hwang, 2009; Ryu & Shin, 2011; Ryu *et al.*, 2013).

어성초(*Houttuynia cordata* Thunb)는 삼백초에 속하는 다년생 약초로써 비린내가 나는 식물로 알려져 있다. 어성초는 전통약용작물로 잘 알려져 있으며, 대표적인 생리활성 물질로는 정유(essential oil) (Lu *et al.*, 2006), 퀘세틴(quercetin), 하이페린(hyperin)의 flavonoids (Meng *et al.*, 2006), alkaloids (Kim *et al.*, 2001) 등이 다량 존재하는 것으로 알려져 있다. 이런 이유로 본 연구에서는 발모 및 탈모방지에 효과가 있다고 알려진 어성초, 상엽, 자초근 등을 포함하는 천연복합추출물을 제조하여 모발성장을 조절하는 성장인자인 insulin-like growth factor (IGF)-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1의 발현을 통하여 발모효과를 분석하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 준비

본 시험에 사용한 어성초, 상엽, 자초근, 상백피, 녹차, 감초, 박하잎, 질경, 자소엽, 동백씨 및 인삼씨는 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입한 후 냉장 보관하여 사용하였다. 어성초를 포함한 복합물 1.0 kg (어성초 350 g, 상엽, 자초근, 상백피, 녹차와 감초는 각각 100 g, 박하잎, 질경, 자소엽, 동백씨 및 인삼

씨는 각각 50 g씩 사용)의 10배에 해당되는 물을 첨가하여 95–100℃에서 6 h 추출 후 추출액을 여과포를 이용하여 여과하였다. 여과액을 진공회전 농축기를 사용하여 2배 농축하여 농축액을 사용하였다.

## 2. 실험동물 및 시료의 도포

6주령의 C57BL/6 수컷 마우스는 대한바이오링크(Chungcheongbuk-do, Korea)에서 구입하였으며, 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 12 h 조명주기 조건하에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취토록 하였으며 7일간의 적응기간 후 실험에 사용하였다. 추출물을 도포하는 군별로 5마리씩 4군을 실험하였으며, 총 20마리의 실험동물 사용하였다.

펜토바비탈(Entobar, Hanlim Pharm, Co., LTD, Seoul, Korea) 50 mg/kg을 복강 주사하여 마취시킨 다음 이발기를 이용하여 마우스의 등 부위의 털을 제거하였고, 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 제모제(Niclean, Ildong Pharma ceutical, Co., LTD, Seoul, Korea)를 피부에 도포하여 5 min간 방치한 후 제모주걱을 이용하였다. 제모된 C57BL/6 수컷 마우스는 미지근한 물로 피부에 남아있는 제모제를 씻어내고, 24 h 회복기를 거친 뒤 음성대조군(Control), 실험군(S-1, -2), 미녹시딜군으로 분리하여 각각의 약물을 매일 1회 제모된 마우스의 등 부위에 마리당 200 µl씩 도포하였다. 음성대조군은 생리식염수를, 실험군은 어성초 포함 복합추출물 50% 희석액(S-1)과 100% 원액(S-2)을, 양성대조군인 미녹시딜군은 5% 미녹시딜 용액을 3주간 도포하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 연구윤리지침에 따라 진행하였다(KUIACUC-2014015-2).

## 3. 육안적 평가에 의한 발모효과의 분석

실험시작 후 1, 2, 3주차에 털이 자라는 상태를 확인하기 위하여 가볍게 마취 후 디지털 카메라를 이용해 사진 촬영하였다. 털이 자란 상태를 육안적으로 판단하여 점수화하고 군별로 비교하였다; 0%–19% (1점), 20%–39% (2점), 40%–59% (3점), 60%–70% (4점), 80%–100% (5점) (Ryu & Shin, 2011). 10명의 평가원에 의해서 평가하여 기록하였으며, 각 평가원들의 점수를 합산하여 각 군별로 평균치를 산정하였다.

또한 털의 길이 및 무게 변화 관찰을 위해 실험 3주차에 마리당 10개씩 등 부위의 털을 뽑아 왓만 종이에 평평하게 잘 펴서 의료용 카메라를 이용하여 촬영한 후 2개 부위의 일정한 면적을 정하여 Folliscope (Ver. 2.8, Lead M, Seoul, Korea)로 측정하였다.

## 4. 피부조직의 효소활성도 측정

실험 3주차에 피부조직을 절취하여 빙냉하에서 미세절편

으로 만들고, 그 중 일정량을 칭량한 후, 피부조직의 4배량의 인산완충용액(phosphate buffer solution)을 가하여 마쇄기(homogenizer)를 이용하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 원심분리기를 이용하여 4℃에서 12,000 rpm으로 20 min간 원심 분리하여 그 상층액을 자동생화학 분석기(Konelab 20XT, Thermo Fisher Scientific Inc., Finland)를 이용하여 alkaline phosphatase (ALP) 및  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)를 분석하였다.

## 5. 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 이용한 분자생물학적 분석

모발성장인자로 알려진 IGF-1, VEGF와 탈모유발인자인 TGF- $\beta$ 1의 발현 정도를 알아보기 위하여 연쇄반응(real time polymerase chain reaction, PCR)을 이용해 분석하였다 (Ha & Park, 2013). 분석조직으로부터 trizol (Takara Bio., Shiga, Japan)을 이용하여 RNA를 분리하고, iNtRON사의 RT premix kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 2×SYBR Premix Ex Taq (Takara bio., Shiga, Japan)을 사용하여 MJ mini thermal cycler system (Biorad, Hercules, CA, USA)으로 측정하였다.

시료는 95℃에서 30 s간 반응 후 95℃에서 5 s, 60℃에서 30 s씩 40회 반응시켰다. 각 유전자의 상대적 정량을 위해 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현 정도를 이용하여 보정하였다.

## 6. 통계처리

SPSS 18.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 본 연구의 모든 측정항목에 대한 평균(mean)과 표준오차(standard error, SE)를 산출하였으며, 통계학적인 유의성 검증은  $p < .05$ 로 하였다.

# Ⅲ. 결과 및 고찰

## 1. 어성초 포함 복합추출물의 육안적 발모효과 평가

C57BL/6 수컷 마우스는 사람과 유사한 검은색의 체모를 가져 모발의 성장주기를 색으로 쉽게 판정할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 모발연구에서 가장 널리 사용되고 있는 모델이다. 6주령부터 모발주기가 휴지기로 들어가는 유전적인 특성이 잘 알려져 있기 때문에 이 시기에 실험을 시작하면 많은 장점이 있다(Tobin *et al.*, 1998).





**Figure 1.** Time-dependent changes of hair re-growth in C57BL/6 mice treated with herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb for a period of 3 weeks. Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

제모한 후 여성포 포함 천연복합추출물을 매일 도포하면서 털이 자라는 양상을 육안적으로 관찰하고, 디지털 카메라를 이용하여 기록하였다(Figure 1). 시료 도포 1주차에는 모든 군에서 발모현상을 관찰할 수 없었으나, 2주차에서는 양성대조군인 미녹시딜군과 여성초 포함 천연복합추출물을 100% 도포한 S-2군에서 제모되었던 등 피부의 발모가 시작되었으며, 여성초 포함 천연복합추출물을 50% 희석하여 도포한 S-1군에서는 1마리는 확연히 발모되는 현상이 나타났으나, 나머지 4마리에서는 발모현상을 확인할 수 없었다. 또한 생리식염수를 도포한 음성대조군은 1마리에서 일부 피부가 흑색을 띄었으나 나머지 4마리는 S-1군과 마찬가지로 선홍빛을 띄었다. 3주차에는 미녹시딜군과 S-2군은 전체적으로 발모가 진행되었으며, S-1군은 일부 쥐에서의 발모현상이 나타났으나 편차가 있었으며, 음

성대조군에서는 발모의 진행상황이 미미하였다.

털이 자란 상태를 육안적으로 판단하여 점수화하여 비교한 결과 S-1군(3.14 점)과 S-2군(4.69 점) 그리고 미녹시딜군(4.87 점)은 모두 대조군(2.13 점)보다 통계적으로 유의하게 높은 발모상태를 보였으며( $p < .05$ ), 그 중에서도 S-2군과 미녹시딜군은 점수가 가장 높았으며 유의적으로도 차이가 없었다(Table 1).

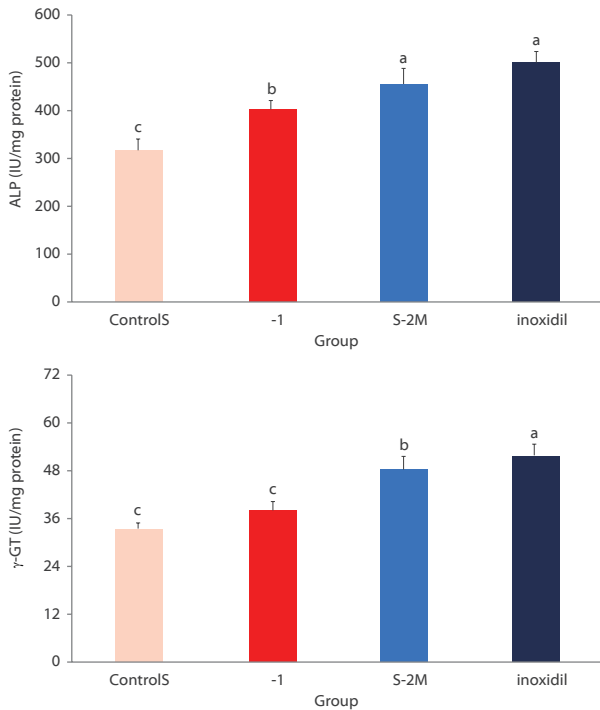
## 2. 털 길이 및 털 무게

제모한 C57BL/6 수컷 마우스 등 부위 발모상태에서 털을 뽑아 털 길이와 털 무게를 관찰한 결과(Table 2), 실험 3주차에서의 털 길이는 양성대조군인 미녹시딜군(6.56 mm) > S-2군(5.28 mm) = S-1군(3.28 mm) > 음성대조군(2.11 mm) 순으로 등 부위 털이 긴 것으로 관찰되었으며 통계적으로도 각 군간의

**Table 1.** Comparison of hair re-growth after topical application of herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb for 3 weeks

Contents	Control	S-1	S-2	Minoxidil
Hair re-growth score	2.13±0.21 <sup>c</sup>	3.14±0.72 <sup>b</sup>	4.69±0.52 <sup>a</sup>	4.87±0.13 <sup>a</sup>

Values are mean ± standard error (SE) of 5 mice. Values with different superscripts (a, b, c) in the same week are significantly different ( $p < .05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range tests. Hair regrowth scoring index: 0%–19% (1), 20%–39% (2), 40%–59% (3), 60%–79% (4), 80%–100% (5). Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

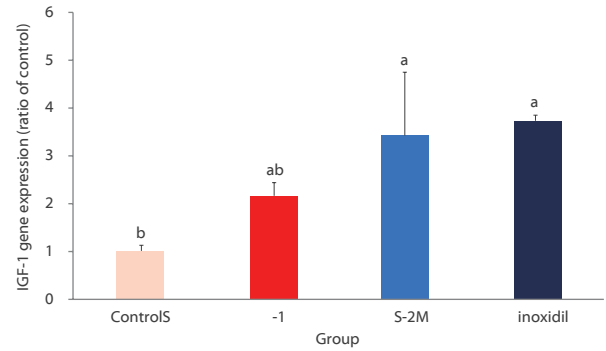


**Figure 2.** Changes of ALP and  $\gamma$ -GT activity in the skin of mice. Test compounds were topically applied to the backs of C57BL/6 mice for 3 weeks. Values are mean  $\pm$  standard error (SE) of 5 mice. Values with different superscripts (a, b, c) in the same week are significantly different ( $p < .05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range tests. ALP; Alkaline phosphatase,  $\gamma$ -GT;  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

유의적인 차이를 보였다( $p < .05$ ). 털 무게에 있어서는 미녹시딜 군(56.73 mg) > S-2군(46.84 mg) > S-1군(21.32 mg) > 대조군 (5.64 mg) 순으로 나타났으며 통계적으로도 유의적인 차이를 보였다( $p < .05$ ).

### 3. 피부조직의 효소활성도 변화

피부조직 내 ALP의 효소활성도를 측정한 결과는 Figure 2에 나타내었다. 양성대조군인 미녹시딜군이 498.70 IU/mg으로



**Figure 3.** Effects of herbal medicines on the expression of IGF-1 by real time polymerase chain reaction. GAPDH was used as a comparative control. Values are mean  $\pm$  standard error (SE) of 5 mice. Values with different superscripts (a, b) in the same week are significantly different ( $p < .05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range tests. IGF; insulin-like growth factor, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydro genase, Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

가장 높은 활성을 보였으며, S-2군은 453.50 IU/mg으로 역시 높은 활성을 보였으며 두 군 사이에 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 그러나 미녹시딜군, S-1군과 S-2군은 음성대조군에 비해 각각 55.1%, 41.1%, 24.1%로 통계적으로 유의하게 차이를 보였다( $p < .05$ ).

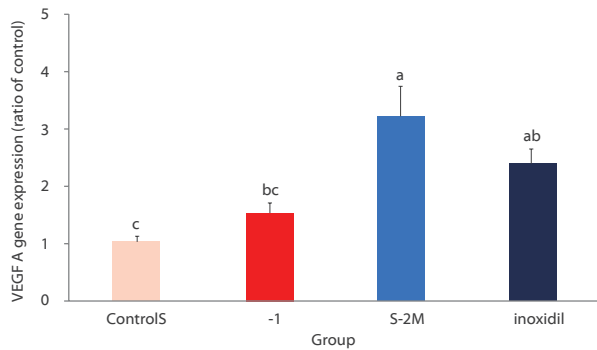
피부조직 내  $\gamma$ -GT의 효소활성도를 측정한 결과는 Figure 2에 나타내었다. 미녹시딜군(52.42 IU/mg)과 S-2 (48.30 IU/mg)군은 대조군(34.72 IU/mg)에 비해 각각 15.0%, 14.0%가 증가하여 통계적으로 유의하게 높은 활성을 나타내었으나( $p < .05$ ), S-1군(39.15 IU/mg) 군에서는 음성대조군과 통계적으로 유의성이 없었다.  $\gamma$ -GT 활성은 미녹시딜군 > S-2군 > S-1군 = 대조군 순으로 통계적으로 유의하게 높은 활성을 보였다( $p < .05$ ).

주로 혈관 신생에 관여하는 ALP는 진피 유두에 밀집된 모세혈관에 영양을 공급하여 발모작용을 원활하게 해주는 지표로서 ALP 측정으로 발모작용을 간접적으로 추측할 수 있으며, non-growth 부위에 비해 re-growth 부위에서 ALP 활성이

**Table 2.** Comparison in the hair length and hair weight after topical application of herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb for 3 weeks

Contents	Control	S-1	S-2	Minoxidil
Hair length (mm)	2.11 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	3.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	5.28 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	6.56 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Hair weight (mg)	5.64 $\pm$ 0.83 <sup>d</sup>	21.32 $\pm$ 2.21 <sup>c</sup>	46.84 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	56.73 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>

Values are mean  $\pm$  standard error (SE) of 5 mice. Values with different superscripts (a, b, c, d) in the same week are significantly different ( $p < .05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range tests. Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.



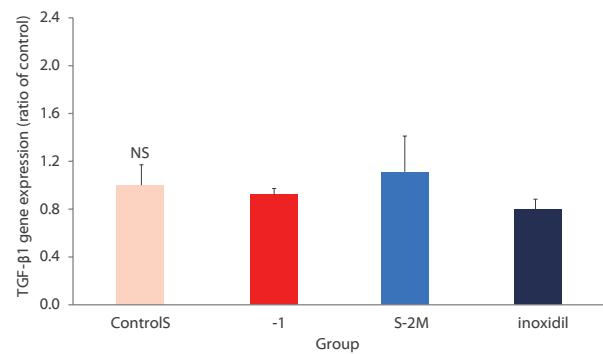
**Figure 4.** Effects of herbal medicines on the expression of VEGF by real time polymerase chain reaction. GAPDH was used as a comparative control. Values are mean±standard error (SE) of 5 mice. Values with different superscripts (a, b, c) in the same week are significantly different ( $p<.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range tests. VEGF; vascular endothelial growth factor, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

현저히 증가함이 보고되고 있다(Lida *et al.*, 2007). 본 실험의 피부조직 내 ALP의 효소활성도 측정 결과에서 S-2군의 양성 대조군인 미녹시딜군과 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않아서 여성초 포함 천연복합추출물에 의한 ALP 증가가 발모효과에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

본 실험에서 또 다른 효소인  $\gamma$ -GT는 글루타티온이나 트립토판아미노산에서 시스테인을 분리하여 케라틴 단백질을 합성하는 작용을 촉진하는 효소로서 모발성장주기에서 신생혈관형성의 지표로서 알려져 있으며 모발성장기 동안 높은 활성을 나타내고, 휴지기 동안 크게 감소한다. 성장기가 유도될 때 더 많이 발현되어 발모표지 성분 중 하나로 제시되고 있다(Hamada & Suzuki, 1996). 본 실험에서 피부조직 내  $\gamma$ -GT 활성은 S-1군은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었지만 S-2군은 대조군과 비교 시 통계적으로 유의적인 증가를 보여 용량의존적으로 발모효과에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

#### 4. 모발성장인자 관련 유전자 발현에 미치는 영향

여성초 포함 천연복합추출물에 의해 촉진된 모발의 성장이 IGF-1과 관련이 있는지 확인하기 위해 시험물질 도포 개시 후 3주차에 채취한 조직을 사용하여 IGF-1의 발현을 확인하였다(Figure 3). IGF-1의 발현의 증가가 미녹시딜군과 S-2군에서 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 나타났다( $p<.05$ ). 미녹시딜에 의한 IGF-1의 발현은 음성대조군에 비해 3.73배 증가하였고 S-2군은 3.47배 증가하여 두 군 사이에서는 유의적인 차이는 없었다.



**Figure 5.** Effects of herbal medicines on the expression of TGF-β1 by real time polymerase chain reaction. GAPDH was used as a comparative control. Values are mean±standard error (SE) of 5 mice. NS: not significant. VEGF; vascular endothelial growth factor, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Control; group of saline solution treatment, S-1; group of 50% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, S-2; group of 100% herbal complex extract including *Houttuynia cordata* Thunb treatment, Minoxidil; group of 5% minoxidil treatment.

여성초 포함 천연복합추출물의 발모촉진효과가 혈액순환과 관련이 있는지 확인하기 위해 시험물질도포 개시 후 3주차에 조직을 사용하여 VEGF의 발현을 확인하였다(Figure 4). 그 결과 S-2군에서 VEGF의 발현이 양성대조군인 미녹시딜군 보다 높은 수준의 발현량을 보였으며, 두 군간의 통계적으로도 유의적인 차이를 보였다( $p<.05$ ). 또한 TGF-β1 발현량을 측정한 결과(Figure 5), 미녹시딜군에서 낮은 수준의 발현량을 보였으나 대조군을 포함한 모든 실험군에서 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

본 실험에서 육안적인 모발의 성장, 털의 길이 및 무게의 변화 뿐만 아니라 모발성장인자인 IGF-1, VEGF와 TGF-β1의 변화를 관찰해 본 결과 모든 부분에서 실험군인 S-2군이 양성 대조군인 미녹시딜군의 변화에 뒤처지지 않는 효과를 보였다. IGF-1은 *in vitro*에서 배양된 모낭 및 상피세포의 성장을 촉진하며 모발세포의 세포사멸을 방지하며 모발성장을 촉진한다고 알려져 있다. 또한 IGF transgenic 동물에서 모발의 성장이 유의성 있게 증가한다는 보고가 있다(Tang *et al.*, 2003). 또한 VEGF는 혈관 내피를 성장시켜 혈액 순환을 개선하여 모발의 성장과 모근세포의 분화를 강화시키는 인자로 알려져 모발 관련 연구에 사용되는 지표인자 중 하나이다(Li *et al.*, 2003). IGF-1은 모발성장을 조절하는 가장 중요한 성장인자의 하나로 모유두 세포에서 IGF-1 생성에 남성호르몬이 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. IGF-1은 간접적 세포에서만 생성되고 상피계 세포에 그 수용체가 존재하기 때문에, 모낭의 경우 모유두 세포에서 분비된 IGF-1가 상피계 세포의 증식을 촉진하고 모낭 조직의 길이를 현저히 증가시키는 것으로 알



려져 있다. VEGF는 새로운 모발의 성장기로 유도하는 인자로 휴지기에 신생혈관 생성을 촉진시키는 인자로 작동한다(Ozeki & Tabata, 2003). 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 이용한 분자생물학적 분석을 통한 관찰에서 모발성장인자인 IGF-1과 VEGF의 활성도가 양성대조군인 미녹시딜군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아서 여성초 포함 천연복합추출물이 모발성장의 중요한 기전으로 작용했을 가능성을 시사하고 있다.

모발의 성장에 영향을 미치는 내분비계 물질 중 TGF- $\beta$ 1은 성장기인 모발을 퇴행기로 진입하게 하여 상피세포의 증식을 억제하는 쪽으로 작용하는 것으로 알려졌으며 성장을 저해하는 기전을 통해 탈모를 유발하며, 모발이 퇴행기로 전환될 때 증가되는 인자이다(Tsuj *et al.*, 2003). 모낭의 기질 내에 유도되어 기질세포의 세포사멸을 일으켜 성장기의 모낭을 퇴행기로 유발한다. 즉 TGF- $\beta$ 1의 양이 증가하면 털의 기질세포와 외모근초 세포들이 세포사멸을 유도하며 이는 휴지기 모낭이 증가하며 성장기 모낭이 퇴행기 모낭으로 바뀌게 되고 모낭 재생이 불완전하여 재생된 모낭의 크기가 축소하여 쉽게 빠지며 가늘고 짧은 모발이 생성된다(Lee & Lee, 2007). 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 1은 S-2군이 음성대조군에 비해 약간 높게 발현되었는데, 통계적으로는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

본 실험 결과 S-2군에서 음성대조군과 비교하여 IGF-1과 VEGF의 효소 발현의 통계적으로 유의적인 증가를 보였으며, 이와 같은 결과는 육안적, 조직학적 실험결과와 부합하는 것으로 여성초 포함 천연복합추출물이 피부세포의 IGF-1과 VEGF 발현을 증가시킴으로써 모낭의 성장을 촉진시키고 발모에 도움을 주는 것으로 생각된다

#### IV. 결론

본 연구는 천연자원으로써 여성초를 포함한 천연복합추출물을 이용하여 발모효과를 알아보고자 하였다. 생후 6주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 이용하여 3주동안 경피도포 후 육안적 관찰과 IGF-1, VEGF의 성장인자와 TGF- $\beta$ 1 분석을 통해 분자생물학적인 효과를 분석하였다. C57BL/6 수컷 마우스에 시료도포 후 1주차에서는 미녹시딜군과 여성초 포함 천연복합추출물 100%를 적용한 S-2군에서 제모되었던 등 부위 피부의 발모가 시작되었으며, 3주차에서는 미녹시딜군과 S-2군은 전체적으로 발모가 진행되었으며, S-1군은 일부 쥐에서의 발모 현상이 나타났으나 편차가 있었으며, 음성대조군에서는 발모의 진행상황이 미미하였다. 털이 자란 상태를 육안적으로 판단하여 점수화하여 비교한 결과 S-1군과 S-2군 그리고 미녹시딜군은 모두 대조군보다 통계적으로 유의하게 높은 발모상태를

보였으며, 그 중에서도 S-2군과 미녹시딜군은 점수가 가장 높았으며 유의적으로도 차이가 없었다. 제모한 C57BL/6 수컷 마우스 등 부위 발모상태에서 털을 뽑아 털 길이와 털 무게를 관찰한 결과 실험 3주차에서의 털 길이와 털 무게 모두에서 미녹시딜군>S-2군>S-1군>대조군 순으로 등 부위 털이 길고 무거운 것으로 관찰되었으며 통계적으로도 각 군간의 유의적인 차이를 보였다. 또한 IGF-1과 VEGF의 발현의 증가가 미녹시딜군과 S-2군에서 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 나타내었다.

결론적으로, 위의 결과로 보아 여성초 포함 천연복합추출물은 미녹시딜과 같이 C57BL/6 수컷 마우스에서 모발의 성장에 영향을 끼치는 물질인 ALP,  $\gamma$ -GT, IGF-1, VEGF 성장인자들을 조절하여 모낭 및 주변 조직의 성장을 촉진하고 혈액순환을 개선하므로 발모 및 탈모관련 제품에 응용하여 관련 산업분야에 적용하는데 기초적인 자료가 될 것으로 사료된다. 하지만 이번 연구는 동물실험이라는 한계가 있기 때문에 앞으로 임상적인 실험과 부작용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

#### 참고문헌

- Adachi K, Kano M. Adenyl cyclase in human hair follicles: its inhibition by dihydrotestosterone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41: 884-890, 1970.
- Beoy LA, Woei WJ, Hay YK. Effects of tocotrienol supplementation on hair growth in human volunteers. *Tro. Life Sci. Res.*, 21: 91-99, 2010.
- Buhl AE, Waldon DJ, Miller BF, Brunden MN. Differences in activity of minoxidil and cyclosporin A on hair growth in nude and normal mice. comparisons of *in vivo* and *in vitro* studies. *Lab. Invest.*, 62: 104-107, 1990.
- Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK. 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, 1994.
- Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology (3rd), Elsevier, pp339-340, 2007.
- Hageman T, Schlutter-Bhmer B, Allam JP, Bieber T, Novak N. Positive lymphocyte transformation test in a patient with allergic contact dermatitis of the scalp after short-term use of topical minoxidil solution.

- Contact Dermatitis*, 53: 85–97, 2005.
- Hamamoto T, Mori Y. Sulfation of minoxidil in keratinocytes and hair follicles. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 66: 33–44, 1989.
- Ha WH, Park DH. Effect of seaweed extract on hair growth promotion in experimental study of C57BL/6 mice. *Arch. Craniofac. Surg.*, 14: 1–10, 2013.
- Hamada K, Suzuki K. Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Exp. Anim.*, 45: 251–256, 1996.
- Iida M, Ihara S, Matsuzaki T. Hair cycle-dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissal follicles. *Dev. Growth Differ.*, 49: 185–195, 2007.
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 186: 1213–1215, 1974.
- Irwig MS. Depressive symptoms and suicidal thoughts among former users of finasteride with persistent sexual side effects. *J. Clin. Psychiatry*, 73: 1220–1223, 2012.
- Joo SS. *In vitro* and *in vivo* hair growth promotion effects of *Lactobacillus plantarum*-fermented plant extracts (MBN). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 43: 381–386, 2011.
- Kim SK, Ryu SY, No J, Choi SU, Kim YS. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, 24: 518–521, 2001.
- Kim YJ, Chung HC, Chung HT, Choi KY, Yun YG, Jang SI. Hair growth promoting effect of *Thuja orientalis* ethanol extracts on hair loss-induced DBA1J mice. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.*, 18: 1471–1475, 2004.
- Lee HS, Hwang SY. Effects of DCS® hair tonic on hair growth promotion in an alopecia model of C57BL/6 mice. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 7: 131–141, 2009.
- Lee YJ, Lee JY. Clinical analysis and treatments for androgenetic alopecia of men. *J. Kor. Soc. Cosm.*, 13: 799–810, 2007.
- Li LF, Guo J, Gao ZF. Overexpression of skin protein kinase C- $\alpha$  in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. *Clin. Exp. Dermatol.*, 28: 429–433, 2003.
- Lu H, Wu X, Liang Y, Zhang J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia Thunb.* *Chem. Pharm. Bull.*, 54: 936–940, 2006.
- Mackay A, Isles C, Henderson I, Fife R, Kennedy AC. Minoxidil in the management of intractable hypertension. *Q. J. Med.*, 50: 175–190, 1981.
- Meng J, Dong XP, Jiang ZH, Leung SY, Zhao ZZ. Study on chemical constituents of flavonoids in fresh herb of *Houttuynia cordata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 31: 1335–1337, 2006.
- Ozeki, M., Tabata, Y. *In vivo* promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials*, 24: 2387–2394, 2003.
- Peters EM, Arck PC, Paus R. Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control. *Exp. Dermatol.*, 15: 1–13, 2006.
- Reynolds AJ, Oliver R, Jahoda C. Dermal cell populations show variable competence in epidermal cell support: stimulatory effects of hair papilla cells. *J. Cell Sci.*, 98: 75–83, 1991.
- Rogers NE, Avram MR. Medical treatments for male and female pattern hair loss. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 59: 567–568, 2008.
- Ryu EM, Shin HJ. Hair growth effect of ethyl acetate and water fractions of *Sparaxis crispa* extracts on hair-removed C57BL/6 mice. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 9: 295–304, 2011.
- Ryu EM, Seo GW, Kee KH, Shin HJ. Effect of ethanolic extract from wheat sprout on hair growth of C57BL/6 mouse. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 11: 1051–1057, 2013.
- Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.*, 54: 65–81, 1970.
- Shapiro J, Price VH. Hair regrowth therapeutic agents. *Dermatol. Clin.*, 16: 341–356, 1998.
- Stenn K. Molecular insights into the hair follicle and its pathology: a review of recent developments. *Int. J. Dermatol.*, 42: 40–43, 2003.
- Tang L, Bernado O, Bolduc C, Lui H, Shapiro J. 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, 2003.
- Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.*, 111: 941–947, 1998.
- Trüeb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Experimental Gerontology*, 37: 981–990, 2002.
- Tsuji Y, Denda S, Soma T, Raftery L, Momoi T, Hibino T. A potential suppressor of TGF- $\beta$  delays catagen progression in hair follicles. *J. Invest. Dermatol.*, 8: 65–68, 2003.
- Zappacosta AR. Reversal of baldness in patient receiving minoxidil for hypertension. *N. Eng. J. Med.*, 303: 1480–1481, 1980.