

연구결과보고서

한약주출물을 이용한

탈모방지 및 발모제 시험분석

2009. 11

(재) 대구테크노파크 한방산업지원센터

제 줄 문

(주) 젠셀에서 의뢰한 “한약추출물을 이용한 탈모방지 및 발모제 시험분석 [총 연구기간 : 2008. 10. 14 ~ 2009. 10. 13]”을 성실히 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

2009. 11

연구수행 기관 : (재) 대구테크노파크 한방산업지원센터

연구수행 기관장 : (재) 대구테크노파크 한방산업지원센터 장

연구책임자 : 대구한의대학교 교수,

(재) 구대TP 한방산업지원센터 실장

연구담당자-: (재) 대구TP 한방산업지원센터 팀장 이진상

(재) 대구TP 한방산업지원센터 팀장~ 도은주

(재) 대구TP 한방산업지원센터 연구원 최혜민

(재) 대구TP 한방산업지원센터 연구원 박현진

서 론

인간에서 모발은 머리를 보호하는 장치일 뿐만 아니라 사람의 인상 및 외모에 결정적인 요소로 작용한다. 모발의 모습이 변화되면 그 사람의 이미지도 변화되며, 특히 젊음과 아름다움, 이성적 매력도 변화된다. 그래서 발모, 양모 및 탈모 예방은 예로부터 많은 관심의 대상이 되고 있다.¹⁾

2)최근에 급격하게 탈모가 증가 하는데, 이는 과도한 정신적인 스트레스의

증가와 식생활 패턴의 서구화, 환경오염 등이 직, 간접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 전 세계적으로 모발 성장과 탈락에 대한 세포학적, 생화학적 또는 분자생물학 이용한 in vivo 평가

적 연구가 활발히 진행되고 있으며, 탈모치료 및 모발성장을 촉진시킬

에도 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 현재 모발성장을 촉진하는

and Drug Administration (FDA)에서 공인받은 것으로는 Minoxidil과

지만 있을 뿐이다.

발모, 양모 및 탈모예방 연구에 이용되는 실험법으로는 실험 동물을

와 모낭세포 및 조직배양을 이용한 in vitro 평가 등이 주로 이용되고 있다.

3)본 연구에서는

수 있는 약물의 개발

약물로서 미국 Food

Finasteride의 두 가

C57BL/6 mouse를 이용하여 실험하였는데, 이 mouse는 체모가 검정색이고, 자발적 탈모가 일어나는 특징을 지니고 있다. 또한 melanocyte 가 모낭에만 한정적으로 존재하며, melanon합성이 모발성장주기와 잘 일치하므로 피부색으로 모발의 성장주기를 판정할 수 있다는 장점을 가지므로 모발생리 연구에 널리 이용되고 있다.

4)

전통적으로 한방에서 많은 한약재 추출물들이 탈모예방 및 발모에 사용되어 왔다. 본 실험에서는 시중에서 발모제로 널리 알려져 있는 3% Minoxidil을 양성 대조군으로 사용하여 C67BL/6 마우스의 탈모 모델에서 (주) 젠셀에서 의뢰 받은 한약재 추출물을 혼합하여 만든 제품들의 발모 혹은 양모에 대한 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

6주령의 C57BL/6 male mouse를 (주) 오리엔트바이오로부터 구입하여, 온도 $23\pm3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm10\%$, 12시간 조명 주기 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 7일 간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 시료의 준비

본 실험에 사용한 시료는 2가지로, 피부에 액상 타입의 시료를 바르면서 분말타입의 시료를 식이로 사료에 혼합하여 투여하였다. 즉, 피부에 바르는 토닉형태의 제품구성 성분은 뽕잎, 측백잎, 검은깨, 다시마, 미역이며, 원료를 선별하여 이물질을 제거한 후 세척 후 건조시키고, 선별된 원료를 에탄올과 증류수를 혼합해 24시간 상온에서 2회 추출을 반복한 다음, 추출물을 진공 감압농축기에서 45°C 의 온도에서 농축시켜 생산한 녹갈색의 최종 제품을 공급받았다.

그리고 식이로 공급한 제품은 뽕잎, 검은깨, 솔잎, 측백엽, 구기자, 홍삼, 미역, 검은콩이 들어간 복합성분으로 되어 있는데, 상기 원료를 선별하여 이물질을 제거한 후 세척하여 건조시키고, 건조된 원료를 분쇄기에 넣어 200 mesh 이상으로 분쇄된 각각의 원료를 성분 배합비율로 배합기에 넣어 혼합된 원료를 (주)젠셀으로부터 공급받아, 실험을 진행하였다.

3. 시료의 도포 및 투여

50mg/kg의 sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약)과 xylazine(Sigma, USA), saline을 0.9:0.1:1 비율로 조합하여 마취(lcc/kg, IP)시킨 다음 이발기를 이용하여 피부에 손상이 가지 않게 주의하여 mouse의 등 부위 털을 1차적으로 제거한다. 피부 속에 남아있는 모낭과 미세한 털을 제거하기 위하여 2차적으로 제모제(니크린, 일동제약)를 발라 피부에 잘 흡수 되도록 5분정도 방치한 후 제모주걱을 이용하여 hair follicle이 눈에 보이지 않을 때 까지 제거한다. 이후 하루의 회복기를 거친 뒤 각 군당 6마리씩 배정하여, Normal(N) 과 Control(C), Treatment(T) 군의 3군으로 나누고, N군은 vehicle액(99.9% ethanol 60ml와 polyethylene glycol 20ml, D.W. 20ml을 혼합하여 조제)을, C군은 위에서 조제한 vehicle 액을 이용하여 조제한 3% Minoxidil (sigma) 용액을 각각 100ul씩 제모 해 놓은 등 부위에 붓으로 3주간 도포하였다. 또한 고군은 99.9% ethanol에 한약재 추출물을 용해한 시료를 제모된 등 부위에 100ul 씩 3주간 붓으로 도포하였다. 한편, 3주간의 시료 도포과정 중에 N군과 C군에는 시중에서 판매하는 동물용 정상사료(삼양사)를, 고군에는 정상사료에 분말형의 시료(바이오셀 환을 분쇄한 시료)를 혼합하여 만든 5% 함유 식이를 공급하였다.

4. 육안적 발모 관찰 및 조직 적출

시료를 도포한 등 전체부위의 변화를 육안적으로 관찰하기 위하여 디지털사진기를 이용하여 1주 간격으로 촬영을 한 후, sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약)과 xylazine (X1126, Sigma, USA), saline을 0.9:0.1:1 비율로 조합한 마취약(50 mg/kg, IP)을 이용하여 마취시킨 뒤 등 부위의 시료도포 조직을 2부위, 즉 밀도분석용 및 IGF-1 분석용으로 적출하였다.

5. 기기적 분석

적출한 조직은 whatman paper 에 말리지 않게 잘 펴서 붙인 후 Fo Hi. sc ope (ver. 2.8, Lead M, Korea) 를 이용하여 시료도포 조직을 촬영한 후 일정면적 (1mm²:0.5mm² + 0.5mm²)당 털의 밀도와 굵기를 측정하였다.

6. 분자생물학적 관찰(Western blotting)

조직 속에 함유되어 있는 Insulin-like growth factor (IGF-1)는 아래와 같이 분석하였다. 즉, deep freezer에 보관하고 있던 피부조직 lg에 lysis buffer (50mM Tris-HCl, 120mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100) 500ul> 넣어 Homogenizer(Tissue tearor, Biospec, Korea)를 이용하여 분쇄하고 원심 분리 후 Lowly법을 이용하여 단백질을 정량한다. 60ug protein을 15% SDS-PAGE gel에 전기영동하고 PVDF paper로 이동시킨 다음, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고, primary antibody(IGF-1, Upstate, USA)는 5% skim milk에 1:1000로 희석하여 4°C 에서 overnight한다. 이후 IX PBST로 세척 후 secondary antibody(Goat anti-Rabbit IgG, Stressgen, USA)를 5% skim milk에 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 세척하고, ECL solution (elpisbiotec, Korea)을 이용하여 이미지 분석기(Gel Documentation system, UVP, USA)로 분석하였다.

7. 통계방법

실험결과의 통계 처리는 SPSS package를 이용하였으며, 모든 측정값은 Mean±SEM로 표시하였고 분석에 대한 유의성은 one-way-ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 p<0.05의 수준에서 LSD 다중 검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

결 과

1. 육안적 관찰

각 군에서 7일째 까지는 뚜렷한 차이가 없었으나 10일, 11일째부터 털이 자라기 시작하여 14일째부터는 발모부위가 고군에서 N군에 비해 유의하게 커졌으며, 양성대조군인 C군의 상태와 유사하게 변화하였다. 따라서 C군과 T군 모두에서 N군보다 유의하게 제모부위에서 털의 성장이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

1. 육안적 관찰

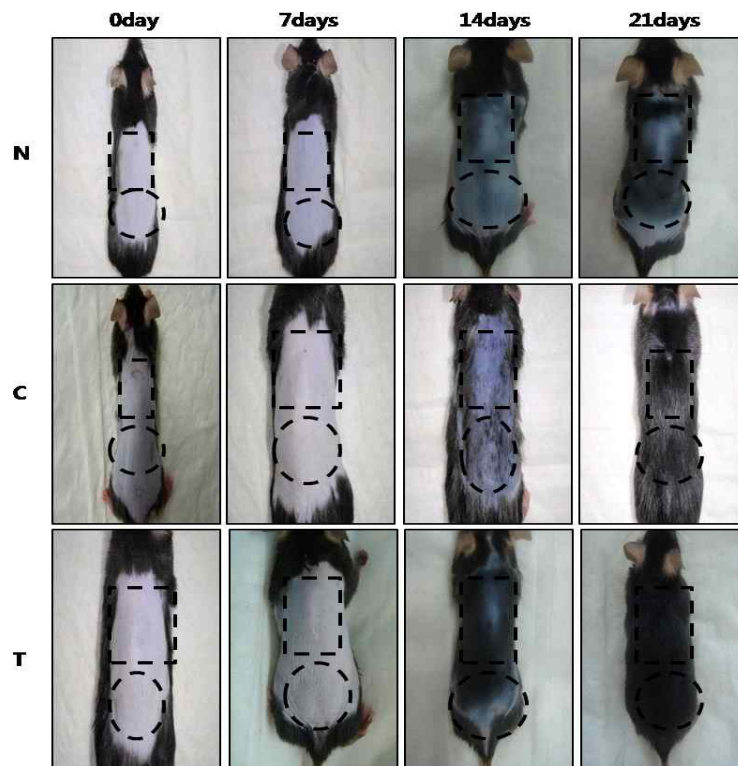
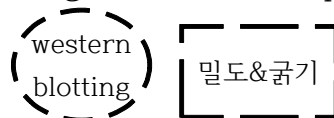


Fig. 1. Overall feature of growing hair in an alopecia model of C57BL/6 mice.



* 적출된 피부조직에서 기기적 분석 부위와 분자생물학적 분석 관찰부위를 표시함
N: normal group, C: control group, T: treatment group

Oday 7days 14days 21days

Fig. 1. Overall feature of growing hair in an alopecia model of C57BL/6 mice.
western

* 적출된 피부조직에서 기기적 분석 부위와 분자생물학적 분석 관찰부위를 표시함

2. 기기적 분석

1) 밀도 및 굵기 변화

7일째 체모의 밀도 변화를 보면 N군이 43.00 ± 4.93 개/mm²

, C군은 63.67 ± 7.2 개/mm²

, T

군은 77.33 ± 8.45 개/mm² 로 C군에서는 N군에 비해 유의성 있는 변화가 나타났으나 고군에서는 큰 변화는 없었다, 그러나 10일, 11일째부터 털이 자라기 시작하여 14일째에 N군은 62.33 ± 10.74 개/mm²

, C군은 92.00 ± 7.21 개/mm²

, T군은 99.67 ± 3.18 개/mm² 이었고, 21일

째에는 N군 , C군 , T군 각각 $84.67 \pm 5.9 \text{CPfl/mm}^2$
 $, 105.00 \pm 13.50 \text{ 개/mm}^2$
 $, 99.33 \pm 8.95 \text{개}$
 $/\text{mm}^2$ 로 체모 밀도는 가군과 C군에서 N군 보다 유의성 있는 차이를 확인 할 수 있었으며 ,
 C군과 T군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2, 3). 그리고 굵기의 변화는 7
 일에는 N군 , C군 , 고군에서 각각 5.67 ± 0.33 , 12.67 ± 0.33 ; , $11.33 \pm 1.20 // \text{m}$ 로 , 7일째부터
 C군과 T군에서 N군에 비해 유의성 있는 차이를 보였다. 14일째에는 N군 , C군 , 고군에서
 각각 13.67 ± 0.33 사m , $17.33 \pm 0.33 // \text{m}$ 1 , 7.00 ± 0.01 ; ■이었으며 , 21일째에는 각각
 18.00 ± 0.58
 ; ■ , $21.67 \pm 0.67^{\wedge} \text{m}$, 22.33 ± 0.88 ; ■로N군에 비해 C군과 고군에서 7일 , 14일에서 모두 유의
 한 변화를 보였으며 , 21일째에는 T군만 유의한 증가를 보였다. 전체적인 T군에서의 굵기
 변화는 시간이 경과함에 따라 C군과 유사한 양상을 보였다(Fig. 2, 4)

2. 기기적 분석



Fig. 2. Comparison of hair growth in an alopecia model of C57BL/6 mice by Folliscope.

N: normal grjoup, C: control group, T: treatment group

Oday
7days
14days
21days

Fig. 2. Comparison of hair growth in an alopecia model of C57BL/6 mice by Folliscope.

Fig. 3. Effect on hair density in an alopecia model of C57BL/6 mice. Results are the mean \pm SE of 6 mice per group (*; $p < 0.05$ N VS T group).

Fig. 4. Effect on hair thickness in an alopecia model of C57BL/6 mice. Results are the mean \pm SE of 6 mice per group.

(*; $p < 0.05$ N VS C group, #; $p < 0.05$ N VS T).

2. 분자생물학적 (Western blotting) 변화

IGF-1 은 대표되는 성장인자(Growth factor)중 하나로 Insulin-like growth factor로 알려져 있다. 이는 인슐린과 비슷한 작용을 하며 성장에 직접적으로 작용하므로 IGF-1 의 변화를 통하여 피부조직 속 모낭의 성장변화를 분자생물학적으로 관찰하였다. 전체적으로 IGF-1 의 발현정도는 GAPDH에 대한 상대적인 강도로 표시하였는데, 7일째에 N군에서 0.26 ± 0.082 , C군에서 0.53 ± 0.15 , 고군에서 0.85 ± 0.10 이었고 14일째에는 N, C, 가군에서 각각 0.49 ± 0.10 , 0.59 ± 0.06 , 0.90 ± 0.05 이었으며, 21 일째에는 각각 0.25 ± 0.10 , 0.46 ± 0.056 , 1.01 ± 0.12 로 각 군에서 시간이 지남에 따라 점차적으로 IGF-1 의 발현이 증가하였다. 특히, N군에서보다 C군에서 IGF-1 의 발현이 증가하였으며, 21일째에 T군에서 N, C군보다 IGF-1 의 발현이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

Fig 5. Effect on IGF-1 expression in an alopecia model of C57BL/6 mice. Results are the mean \pm SE of 6 mice per group.

고찰 및 결론

최근 탈모의 심각성은 점차 증가하고 있으므로, 탈모에 대한 유효한 약제의 개발이 매우 중요시 되고 있다. 현재 시중에서 탈모제로 잘 알려진 약물인 Minoxidil은 실험동물에서 모낭을 자극하여 모낭이 충분히 길어지고 모발 재생장에 도움을 준다고 알려졌다. 또한 Minoxidil sulfate는 모낭에 가서 활성 대사물로 전환되며⁴ 사람의 머리카락에서 혈액순환이 잘 되도록 작용한다. 근래에 많은 연구에서는 한약 등의 천연 약물 및 대체 의학에서 탈모에 효능이 약물을 개발하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 본 실험에서는 한약재의 발효추출물로 이루어진 시료를 이용하여 실험동물에서 모발 성장에 효과가 있는지를 평가하였다.

실험에 사용한 C57BL/6 마우스는 탈모실험에 적합한 특성을 가진 모델로 7수령부터 telogen이 시작되는 시기 즉, 탈모가 유발되는 시기이므로, 이 기간에 실험을 수행하였다. 또한 털의 밀도와 굵기를 기구적으로 평가하였는데, 이 때 사용한 Folliscope는 피부측정 통합장치에 연결되어 지는 디지털 프로브 특수 외부센서가 대기 상태를 감지하고, 감지된 자료는 프로그램과 연결되어 작동 시에 내부 온도 습도 상태가 자동으로 측정되어 각 결과 값들과 함께 저장되어 지는 장비이다. 따라서 환경적인 요소(특히, 온도와 습도)를 반영함으로써 살아있는 피부조직에 대한 정확한 측정을 가능하게 하여, 탈모 환자들의 정확한 탈모상태 및

치료 후 효과를 측정할 수 있는 분석 장비이다.

한편, 본 실험에서 육안적인 변화 관찰, 털의 밀도 및 굵기의 변화, IGF-1의 변화를 관찰해본 결과 모든 부분에서 고군이 양성대조군인 C군의 변화에 뒤지지 않는 효과로 발모 및 양모와 관련인자에 유의적인 변화를 나타냄을 보였다. 한편, 발모관련 단백질인 IGF-1은 in vitro에서 배양된 hair follicle 뿐만 아니라 epithelial cell의 성장을 촉진한다⁵⁾ 더구나, IGF transgenic animal에서 hair elongation에 유의성 있게 증가한다.

(6) 본 실험에서 시료

의 식이 및 도포에 따라 7일, 14일, 21일째에 IGF-1의 발현이 증가함을 보였다. 이상의 결과를 토대로 본 실험한 사용된 시료의 복용 및 도포는 발모, 양모 및 탈모예방에 효과가 있을 것으로 생각된다.