Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Effects of *Aucklandia lappa* Decne. Extract on Hair Growth in Depilated CL57BL/6 MiceJoung-Hee Kim¹, Syng-Ook Lee², Gyoung Yeun Beik³, Keuk-Jun Kim¹¹Department of Biomedical Laboratory Science, Daekyeung University, Gyeongsan, Korea²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu, Korea³Okchundang Research institute, Daegu, Korea

CL57BL/6 마우스의 발모에 미치는 목향 추출물의 영향

김정희¹, 이승욱², 백경연³, 김극준¹¹대경대학교 임상병리과, ²계명대학교 식품가공학과, ³(주) 옥천당

ARTICLE INFO

Received February 4, 2021

Revised February 17, 2021

Accepted February 22, 2021

Key words

Aucklandia lappa Decne.

CL57BL/6 mouse

Collagen

Hair growth

Oral administration

ABSTRACT

Aucklandia lappa Decne., a traditional herbal medicine, has been used to treat various diseases, including asthma, coughs, rheumatism, and diarrhea. In the present study, the effects of the oral administration of *Aucklandia lappa* Decne. extract on hair growth was investigated in hair-removed mice. A 70% ethanol extract of *Aucklandia lappa* Decne. (ALD) was prepared, and the extraction yield and total polyphenol content of ALD were measured as 27.30 ± 0.01 and 28.39 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, respectively. The oral administration of ALD to hair-removed CL57BL/6 mice for six weeks had no significant effects on food intake and body weight changes. Biochemical and histological examinations also showed that the oral administration of ALD for six weeks had no significant effect on the liver and kidney functions. On the other hand, hair growth was significantly higher in the ALD group than the control group and the Pancidil group (positive control). In addition, the number of hair follicles and the degree of collagen production in the dermis were significantly higher in the ALD group than in the control and pancidil groups. These results suggest that ALD is a potential source of nutricosmetics with hair growth-promoting effects.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서 론

모발은 머리보호, 외향에 대한 영향, 머리의 온도유지 등 인체에서 다양한 역할을 담당하고 있으며, 생명유지에 중요한 기관은 아니지만, 건강상태의 척도이자 외모를 결정짓는 신체의 중요한 일부분이기도 하다. 탈모는 지금까지 다른 질병에 비해 상대적으로 가볍게 취급되어져 오고 있지만, 외모를 중시하는 현대 사회의 가치관으로 인해 이차적으로 정신적 스트레스를 발생

시키고 삶의 질을 저하시키며 대인관계나 사회생활에 많은 지장을 주면서 최근 새로운 사회적 문제로 떠오르고 있다[1]. 탈모 장애는 생명을 위협하지는 않지만, 스트레스와 삶의 질을 저하시킨다[2]. 모낭에서 모발 생성은 정상모발의 90%를 차지하는 성장기(anagen, growing phase), 성장정지와 모근이 위축되는 퇴행기(catagen, transitional phase), 및 모구가 건조되고 곧 봉모가 되는 휴지기(telogen, resting phase)의 반복되는 주기를 가지며, 성장기가 단축되거나 퇴행기와 휴지기가 길어짐에 의해 탈모증이 발생한다[3, 4]. 탈모의 원인으로 노화와 유전적 요인 등이 알려져 있지만 최근에는 스트레스, 과도한 다이어트와 잘못된 식습관에 의한 영양 불균형과 질병들 그리고 출산 등 다양한 원인에 의해 발생되고 있으며 특히 젊은 층과 여성들의

Corresponding author: Keuk-Jun Kim

Department of Biomedical Laboratory Science, Daekyeung University, 65 Danbuk

1-gil, Jain-myeon, Gyeongsan 38547, Korea

E-mail: biomed@tk.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5190-0904>

pISSN 1738-3544 eISSN 2288-1662

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

탈모가 증가하고 있는 추세이다[5]. 한편, 탈모증이 증가하면서 이를 해결하기 위한 방법도 다양해지는 추세이다. 탈모를 방지하고 발모를 촉진하기 위해서 혈관을 확장시켜 모근에 영양 공급이 잘 이루어지도록 하거나, 모발의 구성 성분과 유사한 성분을 직접 모근에 공급하는 외용제나 건강보조식품, 의약품, 화장품 등이 앞다투어 출시되고 있다[6-9]. 그러므로 탈모를 예방하고 피모의 재생장 및 모발성장을 촉진할 수 있는 안전하고 간편한 소재의 탐색에 많은 관심이 집중되고 있어 큰 산업적 가치를 지니고 있다. 최근 탈모방지와 발모촉진에 대한 실험적인 연구가 활발히 진행되고 있으며[10-13], 미녹시딜은 안드로겐성 탈모증 환자에서 휴지기 단계에서 모낭을 유도하여 성장기 단계로의 전환하는데 널리 사용되는 모발 성장 촉진제로 알려져 있다[14]. 이에 천연물질이나 약용물질로부터 항산화 물질을 분리하여 항산화능이 우수한 천연탈방지제 개발 연구가 더욱 활발하게 진행되고 있다[15].

목향은 국화과에 속한 다년생 식물인 *Aucklandia lappa* Decne.의 뿌리로서 한의학에서는 비, 위, 대장, 및 담경에 작용하며 행기止痛, 건비소식, 식체사리, 후증, 간실소설, 비위기허불운 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있고, 특히 비위의 기체를 통행시켜 행기止痛하는 요약이며, 건비소식 작용을 겸하는 약재로 알려져 있다[16]. 목향의 주요 생리활성 물질로는 sesquiterpene 및 sesquiterpene lactone계 화합물이 알려져 있으며, 특히 목향 추출물과 목향의 주요 지표물질로 알려진 sesquiterpene lactone계 화합물인 costunolide와 dehydrocostus lactone은 항균, 항염증, 항암, 항피부염, 항바이러스 등의 다양한 약리작용을 보이는 것으로 보고되고 있다[17, 18]. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, FGF-7, FGF-10, insulin like growth factor-1 (IGF-1), IGF-2 및 epidermal growth factor (EGF)와 같은 여러 성장 인자들은 세포주기를 촉진, 증식하고 탈모를 개선하며 체내 및 체외에서 모세포 재생을 촉진한다. EGF 및 TGF- α 는 조류의 모낭세포 증식 및 재생에 관여한다고 보고되었다[19]. 따라서 모발 성장을 촉진하는 신약 개발이 시급하다[20]. IGF-1, FGF-2로 처리한 후 무린 등 피부의 손실된 모세포가 재생된 것을 발견하였으며, keratinocyte growth factor (KGF)는 자외선 조사, 화학 요법 또는 세포 독성 제유도 된 세포 사멸로부터 모낭을 보호한다고 보고되었다[21]. EGF, FGF-1 및 FGF-2는 인간 모낭 유래 중간엽 줄기세포에서 높은 증식율을 유지한다는 잠재력을 보고하였다[22].

최근 본 연구실에서는 노화 마우스 모델을 대상으로 이루어진 한 실험에서 목향 추출물의 식이가 노화 마우스의 발모와 모

질 개선에 좋은 영향을 주는 것을 우연히 관찰할 수 있었으며, 따라서 목향 추출물이 발모에 미치는 영향에 대해 자세히 알아보기 위해 이번 연구에서는 C57BL/6 마우스를 이용하여 제모 모델을 제작한 후 목향 추출물이 발모에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

RAW264.7 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose, antibiotics (penicillin/streptomycin), fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 세포 생존율 측정에 사용된 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)—2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시약은 Amresco (Solon, OH, USA)로부터 구입하였으며, 특별한 언급이 없는 한 그 밖의 분석용 시약 및 유기용매는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 추출물 제조

본 연구에 사용된 목향은 영천에 소재하고 있는 (주)옥천당 영천지점에서 구입하여 사용하였으며, 70% prethanol 추출은 목향 100 g당 10배량(w/v)의 prethanol로 환류냉각추출장치를 사용하여 추출하였다. 추출 후 여과지(Whatman NO.2)로 여과한 다음 55°C에서 감압농축기(Rotary vacuum evaporator, Büchi rotavapor R-100, Germany)로 농축한 후 동결건조(TFD5505, Ilshin BioBase, Korea)하였으며 추출물은 분말 상태로 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

3. 총 polyphenol 함량 측정

총 polyphenol의 함량은 널리 사용되고 있는 Folin-Denis 법을 응용하여 측정하였다. 96-well plate에 시료 60 μ L을 분주한 후 2배 희석한 Folin-Ciocalteu phenol reagent 60 μ L를 첨가하고 3 min 간 방치하였다. 10% sodium carbonate (Na_2CO_3) 60 μ L를 첨가하여 1시간 반응시키고, microplate spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 10, 25, 50, 75, 100 μ g/mL 농도로 표준 검량 곡선을 작성한 후 총 polyphenol 함량을 gallic acid equivalent (μ g GAE/mg)으로 나타내었다.

4. 세포 배양

실험에 사용한 마우스 유래의 대식세포인 RAW264.7 세포

는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW264.7 세포 배양은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)와 penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL, respectively)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 세포가 70~80% 정도 자랐을 때 cell lifter로 세포를 떼어내고 원심분리기로 원심분리(1,000 rpm, 2분)하여 세포를 회수한 후 2일에 1회씩 계대 배양하였다.

5. 세포 생존율 측정

RAW264.7 세포에 대한 추출물의 독성을 측정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 세포 3×10^5 cells/well을 48-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였으며, 그 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 추출물을 농도별로 1시간 처리한 다음 LPS (100 ng/mL)를 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다. 24시간 배양이 끝난 후 2.5 mg/mL의 MTT 용액 20 µL를 각 well에 처리하고 incubator에서 4시간 동안 배양하였으며, 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 250 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate spectrophotometer로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 처리하지 않고 세포만 배양한 무처리 군의 100% 생존율을 기준으로 상대적인 세포 생존율(cell viability: %)로 계산되었다.

6. Nitric oxide (NO) 생성 억제활성 측정

NO 생성량 측정은 Griess 분석방법으로 측정하였다. RAW264.7 세포를 3×10^5 cells/well로 48-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 LPS (100 ng/mL)와 농도별 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상층액 50 µL를 96-well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도(µM)는 sodium nitrite (NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

7. 실험동물 및 군 분류

동물실험은 영남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 동물실험 가이드라인(승인번호: YUMC-AE2019-018)에 따라 진행되었으며, 자발적으로 탈모가 진행되는 특징을 가지면서 모발 성장주기 판정이 용이하여 모발연구에 널리 사용되는 CL57BL/6 마우스(6주령)를 하나상사(부산, 한국)에서 구매하

여 사용하였다. 사육실에서 1주일 순화기간을 거친 후 일반증상을 관찰하고, 체중을 측정하여 건강한 개체만을 선별하여 사용하였다. Pentobarbital (50 mg/kg, 엔토발, 한림제약)로 마취 후 피부에 손상이 가지 않게 주의하며 마우스 등 부위의 털을 1차적으로 제모한 후 실험을 진행하였다. 실험기간 중의 실험동물은 격리동 마우스 케이지 당 5마리씩 수용하고, 사육실 환경 조건은 실내온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 40~60%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 조도는 150~200 lux로 조정하였으며, 멸균 정제수와 실험동물용 사료를 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험군은 정상군(Normal saline, NS), 양성대조군(Pan-sidil, P) 목향추출물 투여군(ALD)로 분류하여, 1일 2회, 400 mg/kg body weight (BW) 농도로 경구 투여하였다. 6주간 경구투여 후 임상병리학적 검사를 위해 마취제 Avertin-PBS를 1:9 150 µL씩 복강투여 후 심장채혈과 생검을 실시하였다.

8. 실험동물의 체중변화 및 발모정도의 육안적 관찰

제거한 날을 실험 1일째로 정하여 피부에서 일어나는 발모와 체중변화 정도를 보기 위해 42일째까지 관찰, 육안적 발모정도를 관찰을 위하여 Cannon DP70 카메라를 이용하여 42일째 발모부위를 촬영하였다.

9. Hematoxylin & Eosin 염색

발모 정도 확인과 경구투여 독성을 보기 위해 실험동물 조직을 채취하여 10% 포르말린에 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직을 절취하여 자동침투기에서 파라핀을 침투시킨 후 포매하여 4 µm 두께로 절편을 제작하고 60°C에서 건조한 후 탈파라핀, 함수과정을 거쳐 핵을 염색하기 위해 Harris hematoxylin 용액에 7분 염색 후 수세, 감별, 청색화 과정을 거친 후 eosin 용액에 3분간 염색 후 탈수, 투명, 임포하였다. DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan) 현미경 디지털 카메라로 이미지를 획득하였다.

10. Masson's trichrome 염색

콜라겐 생성능을 확인하기 위해 창상 부위와 정상피부가 포함된 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 고정하였다. 조직을 육안검사 후, 자동침투기에서 파라핀을 침투시킨 후 포매, 4 µm 두께로 절편제작하고 60°C에서 건조한 후 탈파라핀, 함수과정을 거쳤다. Collagen fiber의 정량적인 평가를 위해 Weigert iron hematoxylin 용액에 10분 염색 후 수세, bieberich scarlet red 용액에 15분간 염색, phosphomolybdic acid/phosphotungstic acid 용액에 15분간 감별,

aniline blue 용액에 15분간 염색 후 1% acetic acid 용액에 3분간 탈색하고 탈수, 투명 및 봉입하였다. DP71 현미경 디지털 카메라(Olympus, Japan)로 이미지를 획득한 후 Leopard (zotos, korea) 프로그램을 사용하여 collagen fiber를 정량적으로 측정하였다.

11. 통계처리

실험 결과는 SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 유의적 차이가 있는 항목에 대해서 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

1. 목향 추출물의 제조 수율, 총 polyphenol 함량 및 *in vitro* 항염증 활성

목향 추출물의 70% prethanol로 추출한 목향의 추출 수율은 $27.30 \pm 0.01\%$ 로 측정되었으며, 총 폴리페놀 함량을 gallic acid로 환산한 결과 28.39 ± 1.50 mg GAE/g으로 나타났다 (Table 1). RAW264.7 세포를 대상으로 한 nitric oxide (NO) 생성 억제활성 측정한 결과를 Figure 1A에 나타내었다. RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리한 결과, NO 생성량이 30.65 ± 0.42 μ M로 LPS 무처리군에 비해 약 12배가량 증가하

Table 1. Extraction yield and total polyphenol content of ALD

	Extraction yield (%)	Total polyphenols (mg GAE ¹⁾ /g extract)
ALD	$27.30 \pm 0.01^{(2)}$	28.39 ± 1.50

¹⁾Gallic acid equivalent.

²⁾Each value is mean $\pm$ SEM (N $\geq$ 3).

Abbreviation: ALD, *Aucklandia lappa* Decne.

Figure 1. Effects of ALD on NO production and cell viability in LPS-treated RAW264.7 cells. Cells were pre-treated with different concentrations of ALD for 1 h and then treated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. NO production (A) and cell viability (B) were then measured. Results are presented as mean $\pm$ SEM (N $\geq$ 3). *** $P < 0.01$ and [#] $P < 0.001$ vs. LPS control.

였으나 ALD 처리농도에 의존적으로 NO 생성량이 감소하여 20 μ g/mL에서는 NO 생성량이 11.31 ± 0.58 μ M로 유의적인 감소를 보였다. 또한 ALD가 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과, 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며 (Figure 1B), 이로부터 ALD의 NO 생성 억제활성이 세포 독성과는 연관성이 없음을 확인할 수 있었다.

2. 식이량 및 체중변화

ALD를 400 mg/kg BW 용량으로 1일 2회, 6주간 경구투여한 후 체중변화를 관찰한 결과, ALD 그룹의 평균 체중 증가량은 24.24 g으로 대조군(20.64 g) 대비 4.4 g 높게 나타났으며, 양성대조군인 판시딜(20.49 g) 처리군에 비해서도 3.75 g 높은 것으로 확인되었으나 통계학적 유의성은 확인되지 않았다 (Table 2).

3. 모발성장의 육안적 관찰

제모 후 판시딜과 ALD를 6주간 경구투여 후 그룹간 발모정도를 육안적 관찰 결과 ALD 투여군은 5마리 중 4마리에서 발모(화살표)를 관찰할 수 있었고, 판시딜 투여군은 4마리 중 1마리만 발모를 관찰할 수 있었다. Control 군은 4마리 모두 발모를 관찰할 수 없었다 (Figure 2).

4. 조직학적 일반독성 평가

간 및 콩팥을 대상으로 조직병리학적 독성 여부를 관찰하기 위해 각 조직에 대한 H&E 염색을 실시한 결과는 Figure 3과 같다. 간 조직을 관찰한 결과 정상군, 판시딜 투여군 및 ALD 투여군 모두 간소엽, sinusoid 구조의 변성이나 중심정맥 주위변화, 담관 및 문맥 주위의 특이적인 변화는 관찰되지 않았으며, 콩팥의 사구체, 근위곡세뇨관 그리고 원위곡세뇨관 또한 세 그룹에서 모두 정상적인 소견으로 보였다.

Table 2. Effects of ALD on food intake and body weight in C57BL/6 mice

	Food intake (g/day)	Body weight (g)		Body weight change (g)
		Initial	Final	
Control	2.86±0.91	22.00±0.70	28.00±1.82	5.87±1.79
Pansidil	2.57±0.36	21.90±0.41	26.87±2.59	4.87±2.92
ALD	3.36±0.83	21.60±0.89	28.80±3.43	7.20±3.30

Results are presented as mean±SD (N≥5).

Figure 2. Photograph of hair regrowth in C57BL/6 mice. The animals were shaved with electric clipper and each sample was given orally for 6 weeks. The photographs were taken at the end of the experiment.

Figure 3. Histological changes of the liver and the kidney tissues in C57BL/6 mice. Histological sections were prepared from the liver and the kidney and stained with hematoxylin and eosin. Representative images were collected at low (×100) magnification for observation under a microscope.

5. 모발 성장의 조직학적 분석

그룹별 모발 성장을 비교하기 위해 조직학적 분석을 통해 모낭수를 측정한 후 그룹별로 비교하였다. 모낭의 수는 각 마우스의 피부조직을 H&E 염색을 실시한 후 배율 100배에서 배면의 5개 필드에서 현미경으로 분석한 결과, control군 4개, 양성대조군인 판시딜 8.6개 대비 목향투여군의 모낭 수가 11.5개로 유의적($P<0.05$)으로 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 4).

6. Masson's trichrome 염색 결과

ALD의 투여가 마우스 피부조직 내 콜라겐 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Masson's trichrome 염색을 실시한 결과를 보면 Pansidil 투여군(36.10%)보다 ALD 투여군(45.27%) 콜라겐 생성률이 높게 나타났다(Figure 5).

고 찰

최근 본 연구실에서는 노화 마우스 모델을 대상으로 이루어진 한 실험에서 목향 추출물의 식이가 노화 마우스의 발모와 모질 개선에 좋은 영향을 주는 것이 관찰되었다. 본 목향 추출물이 발모에 미치는 영향에 대해 자세히 알아보기 위해 이번 연구에서는 C57BL/6 마우스를 이용하여 제모 모델을 제작한 후 목향 추출물이 발모에 미치는 영향을 조사하였다. 동물모델을 이용한 발모 실험에 앞서, 우선 제조한 목향 추출물에 대한 품질특성 평가를 실시하였다. 추출물의 특성은 추출수율 및 총 폴리페놀 함량과 함께 선행 연구[23, 24]에서 확인된 바 있는 RAW264.7 세포를 대상으로 한 nitric oxide (NO) 생성 억제활성을 측정함으로써 평가되었다. 70% prethanol로 추출한 목향의 추출수율은 27.30 ± 0.01 로 측정되었으며, 추출물의 총 폴리페놀 함량

Figure 4. Histological change of hair follicles in the dorsal skin of C57BL/6 mice. Histological sections were prepared from the dorsal skin and stained with hematoxylin and eosin. Representative images were collected at high ($\times 200$) magnification for observation under a microscope. Image of H&E stain for hair follicle (A) and number of hair follicle (B) were then measured. Results are presented as mean $\pm$ SEM ($N \geq 3$), and different letter indicates a significant difference among group, according to one-way ANOVA with Duncan's multiple reange test ($P < 0.05$).

Figure 5. Collagenesis of dermis in the dorsal skin of C57BL/6 mice. Histological sections were prepared from the dorsal skin and stained with Masson's trichrome. Representative images were collected at high ($\times 200$) magnification for observation under a microscope. Image of Masson's trichrome stain for collagen fibers (A) and relative intensity (B) were then measured. Results are presented as mean $\pm$ SEM ($N \geq 3$), and different letter indicates a significant difference among group, according to one-way ANOVA with Duncan's multiple reange test ($P < 0.05$).

을 gallic acid로 환산한 결과 28.39 ± 1.50 mg GAE/g으로 나타났다(Table 1). 목향 추출물(ALD)의 총 폴리페놀 함량의 경우 선행연구[25]에서 60% 알코올 추출물이 2.6 mg/g을 나타낸 것과 비교하여 유의적인 함량 차이를 보이지 않았다. 대식세포는 활성화와 염증성 사이토카인의 조절을 통해 다양한 염증매개물질을 생성하게 되며, 특히 과도하게 생성된 NO는 혈관 투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[26, 27]. 따라서 ALD의 *in vitro* 항염증활성은 RAW264.7 대식세포를 대상으로 수행되었으며, 그람음성균의 내독소인 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의해 과도하게 생성되는 NO에 대한 생성억제 활성을 확인함으로써 ALD의 항염증활성을 평가하였다. NO 생성억제 활성을 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 ALD를 선행연구들과 유사한 농도 범위인 2.5~20

$\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간 전처리한 후 LPS (100 ng/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 NO 생성량을 측정하였으며, 그 결과는 Figure 1A와 같다. RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리한 결과, NO 생성량이 30.65 ± 0.42 μM 로 LPS 무처리군에 비해 약 12배가량 증가하였으나 ALD 처리농도에 의존적으로 NO 생성량이 감소하여 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 NO 생성량이 11.31 ± 0.58 μM 로 유의하게 감소하였으며 이는 앞서 언급한 선행연구들[28, 29]의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 또한 ALD가 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 확인한 결과, 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며(Figure 1B), 이로부터 ALD의 NO 생성 억제활성이 세포 독성과는 연관성이 없음을 확인할 수 있었다. 위 결과들을 종합해 볼 때, 본 연구실에서 제조한 목향 추출물이 선행연구들에서 사

용된 추출물들과 비교하여 큰 차이가 없음이 확인되었으며, 따라서 이 추출물을 이후 수행된 동물실험에 사용하였다.

C57BL/6 마우스는 모발 선별에 유용한 모델이다. 성장 촉진제, 그들의 줄기 색소 침착은 모낭 멜라닌 세포에 의존하여 성장기 동안에만 색소를 생성한다[26]. 목향추출물이 섬유모세포 활성을 유도하여 콜라겐 합성에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하여 정량 분석한 결과를 Figure 5에 나타낸 바와 같이 양성대조군인 판시딜보다 ALD 투여군이 9.17% 콜라겐 생성률이 높게 나타나 콜라겐 양이 증가할수록 발모증가를 유도한다는 것을 확인하였으나, 추가적인 기전규명이 요구된다. EGF, FGF, TGF- β , IGF, HGF/SF, PDGF가 모발 성장에 관여하는 성장인자로 알려져 있다[19]. 그러나 섬유모세포 성장인자(FGF)가 C57BL/6 Mice에서 beta-catenin과 Shh의 발현을 통하여 모발성장을 유도한다는 [20] 결과와 섬유모세포가 교원섬유, 탄력섬유, 세망섬유를 생성한다는 잘 알려진 이론과 본 연구에서 Masson's trichrome 염색결과 판시딜 대비 ALD 투여군이 콜라겐 생성이 증가함과 유사한 결과를 증명한다.

제모 후 판시딜과 ALD를 6주간 경구투여 후 그룹간 발모정도를 육안적으로 관찰한 결과 ALD 투여군에서 판시딜 투여군 보다 현저하게 발모 및 모낭수가 증가함을 확인하였다(Figure 4) [23, 24]. 따라서 본 연구결과는 목향추출물이 발모성장에 기여한다는 것을 최초로 시사하나, 추가적인 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 제모된 마우스 모델을 대상으로 목향 추출물의 경구 투여가 발모에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 목향 70% prethanol 추출물(ALD)을 제조하여 추출수율과 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정하고 각각 27.30 $\pm$ 0.01과 28.39 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract로 측정되었다. ALD를 제모된 C57BL/6 마우스에 6주간 경구 투여하며 관찰한 결과, 식이량과 체중 변화에 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 혈액 생화학적 검사 및 조직학적 검사를 통해 ALD의 6주간 반복 투여가 주요 장기인 간과 신장의 기능에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군에 비해 간기능과 콩팥기능 모두 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 이와 더불어 ALD 투여에 따른 모발 성장 정도를 육안적으로 관찰한 결과, ALD 투여군에서 대조군 및 판시딜 투여군(양성 대조군)보다 현저하게 발모가 증가함을 확인하였다. 또한 모낭수와 진피의 콜라겐 생성 정도를 비

교한 결과, 대조군 및 판시딜 투여군 대비 ALD 투여군에서 두 항목 모두 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 본 연구로부터 ALD의 경구 투여는 제모된 마우스 모델에서 모발 성장을 촉진하며 진피내 콜라겐 합성 증가와 모낭수 증가를 유도한다는 결론을 도출할 수 있었으며, 이는 ALD를 함유하는 경구용 발모 촉진제 개발을 위한 기초자료로써 그 가치가 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kim JH¹, Professor; Lee SO², Professor; Beik GY³, Researcher; Kim KJ¹, Professor.

REFERENCES

1. Lee SH, Lee JR. Association of diffuse hair loss of adult male on stress, self-confidence, and depression. J Kor Soc Cosm. 2010;16: 1171-1179.
2. Patel M, Harrison S, Sinclair R. Drugs and hair loss. Dermatologic Clinics. 2013;31:67-73. <https://doi.org/10.1016/j.det.2012.08.002>
3. Oh JW, Kloepper J, Langan EA, Kim YS, Yeo JY, Kim MJ, et al. A guide to studying human hair follicle cycling *in vivo*. J Invest Dermatol. 2016;136:34-44. <https://doi.org/10.1038/JID>.
4. Buhl AE, Waldon DJ, Miller BF, Brunden MN. Differences in activity of minoxidil and cyclosporin A on hair growth in nude and normal mice. Lab Invest. 1990;62:104-107.
5. Hattori M, Oqawa H. Biochemical analysis of hair growth from the aspects of aging and enzyme activities. J Dermatol. 1983; 10:45-54. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1983.tb01103.x>
6. Inaoka Y, Shakuya A, Fukazawa H, Ishida H, Nukaya H, Tsuji K, et al. Studies on active substances in herbs used for hair treatment. I. Effects of herb extracts on hair growth and isolation of an active substance from Polyporus umbellatus F. Chem Pharm Bull. 1994;42:530-534. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.530>
7. Kim SH, Kim YH, Han SS, Roh JK. Teratogenicity study of scutellariae radix in rats. Reprod Toxicol. 1993;7:73-79. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(93\)90012-v](https://doi.org/10.1016/0890-6238(93)90012-v)
8. Kessels AG, Cardynaals RL, Borge RL, Go MJ, Lambers JC, Knottnerus JA, et al. The effectiveness of the hair-restorer "Dabao" in males with alopecia androgenetica. A clinical experiment. J Clin Epidemiol. 1991;44:439-447. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(91\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0895-4356(91)90083-1)
9. Ishimatsu TY, Soma T, Kishimoto J. Identification of novel hair-growth inducers by means of connectivity mapping. FASEB J. 2010;24:1489-1496. <https://doi.org/10.1096/fj.09-145292>
10. Wosicka H, Cal K. Targeting to the hair follicles: current status and potential. J Dermatol Sci. 2010;57:83-89. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.12.005>
11. Ali A, Martin JM. Hair growth in patients alopecia areata totalis after treatment with simvastatin and ezetimibe. J Drugs Dermatol. 2010;9:62-64.

12. Yoon JI, Al-Reza SM, Kang SC. Hair growth promoting effect of *Zizyphus jujuba* essential oil. Food Chem Toxicol. 2010;48:1350-1354. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.036>
13. Dufton N, Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. Pharmacol Ther. 2010;127:175-188. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.010>
14. Gregoriou S, Papafragkaki D, Kontochristopoulos G, Rallis E, Kalogeromitros D, Rigopoulos D. Cytokines and other mediators in alopecia areata. Mediators of Inflammation. 2010;2010:928030. <https://doi.org/10.1155/2010/928030>
15. Kim SY, Kim JH, Kim SK, Oh MJ. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. J Am Oil Chemists' Soc. 1994;71:633-640.
16. Wedge DE, Galindo JC, Macías FA. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. Phytochemistry. 2020;53:747-757. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00008-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00008-x)
17. Lee MS, Ryu DG, Kwon KB. Anti-inflammatory effects of *Saussurea Lappa* extracts in murine macrophages. J Oriental Physiology & Pathology. 2011;25:275-279.
18. Jeong SJ, Itokawa T, Shibuya M, Kuwano M, Ono M, Higuchi R, et al. Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway. Cancer Lett. 2002;187:129-133. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00361-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00361-0)
19. Zine A, Ribaupierre F. Replacement of mammalian auditory hair cells. Neuro Report. 1998;9:263-268. <https://doi.org/10.1097/00001756-199801260-00016>
20. Lin WH, Xing LJ, Shi HX, Zhang J, Jiang L, Cai PT, et al. Fibroblast growth factors stimulate hair growth through β -Catenin and shh expression in C57BL/6 mice. Biomed Res Int. 2015;2015:730139. <https://doi.org/10.1155/2015/730139>
21. Braun S, Krampert M, Bodo E, Kumin A, Christiane BB, Paus R, et al. Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents. J Cell Science. 2006;119:4841-4849. <https://doi.org/10.1242/jcs.03259>
22. Zhang X, Wang Y, Gao Y, Liu X, Bai T, Li M, et al. Maintenance of high proliferation and multipotent potential of human hair follicle-derived mesenchymal stem cells by growth factors. Int J Mol Medicine. 2013;31:913-921. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1272>
23. Kim MS, Kim NS, Kwon J, Kim HR, Lee DY, Oh MJ, et al. Anti-inflammatory and immune regulatory effects of *Aucklandia lappa* decne 70% ethanol extract. J Medicinal Crop Science. 2018;26:8-18. <https://doi.org/10.7783/KJMCS.2018.26.1.8>
24. Lim JS, Lee SH, Lee SR, Lim HJ, Roh YS, Won EJ, et al. Inhibitory effects of *Aucklandia lappa* decne. Extract on inflammatory and oxidative responses in LPS-treated macrophages. Molecules. 2020;25:1336. <https://doi.org/10.3390/molecules25061336>
25. Park KT, Oh SL, Cho YJ. Hyaluronidase inhibitory activity of extracted phenolic compounds from ultrafine grind *Saururus chinensis*. J Food Preservation. 2016;23:20-26. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2016.23.1.20>
26. Plonka PM, Michalczyk D, Popik M, Handjiski B, Slominski A, Paus R. Splenic eumelanin differs from hair eumelanin in C57BL/6 mice. Acta Biochimica Polonica. 2005;52:433-441.
27. Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. Dermatologic Clinics. 1996;14:559-572. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70384-3](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70384-3)
28. Hue1 JJ, Jo BK, Kang BS, Kim Jh, Nam SY, Yun YW, et al. Effect of Sodium Silicate on hair growth in C57BL/6 mice. Lab Anim Res. 2010;26:55-62.
29. Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. Biol Trace Elem Res. 2002;89:251-261. <https://doi.org/10.1385/bter:89:3:251>