

葛根의 착즙 및 열수 추출에 따른 모유두 세포의 모발 성장 관련 mRNA 발현에 미치는 영향

전해리^{1#}, 조남준¹, 김기광^{1*}, 한효상^{2*}

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the differential effect of juice or water extract from Puerariae Radix on hair growth related-genes in dermal papilla cells

Haili Jeon^{1#}, Namjoon Cho¹, Keekwang Kim^{1*}, Hyosang Han^{2*}

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : Puerariae Radix extracts are a rich source of isoflavones that affect the activity of hepatic antioxidant enzymes. However, the effect of these extracts on hair growth in human dermal papilla (DP) cells is unknown. The purpose of this study is to compare the effects between juice and water extracts of Puerariae Radix on the mRNA expression levels of hair growth-related genes in dermal papilla (DP) cells.

Methods : The antioxidant activity of juice and water extracts of Puerariae Radix was analyzed using an ABTS assay. The cytotoxicity was analyzed using the MTS assay in DP cells. mRNA expression levels of hair growth-related genes in dermal papilla (DP) cells were analyzed using quantitative RT-PCR analysis.

Results : Juice and water extracts of Puerariae Radix showed strong antioxidant activity. The cytotoxicity was confirmed to be higher in the juice extract than the water extract, using the MTS assay on DP cells. The mRNA expression levels of CTNNA1, FGF7, and BMP6 were significantly increased after treatment with water extract, whereas the juice extract did not affect the expression of hair growth-related genes.

Conclusions : Our study provides evidence that water extract of Puerariae Radix is effective at inducing hair growth, by promoting the mRNA expression levels of hair growth-related genes. Also in the future, studies should be conducted to investigate the effects of Puerariae radix extracts on the various hair growth mechanisms of dermal papilla cells.

Key words : Puerariae radix, Extraction, Dermal papilla cell, Antioxidant effect, Hair growth

I. 서 론

葛根은 神農本草經에 처음 收載되었으며, 임상에서 解肌退熱, 生津, 透疹, 升陽止瀉의 효능이 있어 外感發熱두통, 項背強痛, 口渴, 消渴, 麻疹不透, 熱痢, 泄瀉, 高血壓頸項強痛의 증상을 치료하는 데 사용되고 있다¹⁾. 葛根은 대한민국약전²⁾에 葛根

Pueraria lobata Ohwi (콩과 Leguminosae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것이라고 收載되어 있다.

葛根에는 다른 콩과식물처럼 isoflavone이 많이 함유되어 있다. 특히 O-glucoside 계열의 화합물인 daidzin과 C-glucoside 계열의 화합물인 puerarin (daidzein-8-C-glucoside)이 그것이다. Daidzein은 장벽에서 β -glucosidase에 의해

*Corresponding author : Keekwang Kim, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.
· Tel : +82-42-821-5485 · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr

Hyo-Sang Han, Department of Health Administration, College of Tourism Health, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea.
· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

#First author : Haili Jeon, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.
· Tel : +82-42-821-5481 · Fax : +82-42-822-7548 · E-mail : qlsnqlsn7@naver.com

· Received : 6 November 2017 · Revised : 18 November 2017 · Accepted : 15 January 2018

daidzein으로 변환된다. 이 외에도 oleanene-type의 triterpene glucoside로서, kudzuaponins A1, A2 및 A3가 분리 보고 되어 있으며, soyasaponin 등도 함유되어 있다고 보고되어 있다³⁾. 葛根의 약리작용으로는 항염증 작용^{4,5)}, 국소뇌혈관에 대한 뇌신경보호효과⁶⁾, 간섬유화 예방 및 간보호효과⁷⁻⁹⁾, 당뇨병 개선효과¹⁰⁾ 등 여러 연구들이 보고되었다. 또한 최근 연구 결과에 따르면 葛根 에탄올추출물에서 모유두세포의 증식을 유도하는 것으로 밝혀졌다¹¹⁾.

한의학에서는 탈모는 髮墮, 髮去, 髮落, 毛拔, 油風, 禿瘡, 鬼舐頭라 불리며, 그 원인은 內因과 外因으로 나누어 內因으로는 腎虛, 肺氣虛, 血熱, 氣血虛, 血虛, 瘀血, 七情 등을, 外因으로는 風邪, 風熱, 濕熱, 五味傷, 風, 火 등을 원인으로 보고 있으며¹²⁾, 치료는 辨證施治를 통한 한약 치료와 體鍼療法, 藥鍼療法, 光學療法 등 外治法을 다양하게 적용하고 있다¹³⁾.

모유두 (dermal papilla) 세포는 모발의 성장과 유지에 있어서 중요한 역할을 한다. 모발의 주기는 성장기 단계 (anagen stage), 성장을 멈추고 모구 (bulb)가 축소하는 시기인 퇴행기 단계 (catagen stage), 오래된 모발을 탈모시키는 시기인 휴지기 (telogen stage)로 나눌 수 있다. 성장기 단계에서 모유두에 있는 모모 세포는 신속하게 유사분열을 진행하며 모낭 안에 같이 존재하게 되는 각화 세포 (keratinocyte)의 증식을 자극한다. 퇴행기 단계는 모발의 형태를 유지하면서 천천히 성장한다. 휴지기 단계는 모유두가 위축되고 모낭은 수축 되어 모낭의 깊이가 줄어들어서 모근이 위쪽으로 밀려 올라가 빠지는 단계이다. 이때 휴지기 단계에서 모유두의 모모 세포가 활성화되면 모낭이 점차 내려와 진피 내 모유두가 있는 곳까지 다 다르다면 새로운 모발을 형성하여 기존의 모발을 대신하게 된다^{14,15)}. 모유두 세포를 중심으로 나타나는 Wnt 신호, BMP 신호 등과 같은 신호 전달이 모발의 주기 변화에 영향을 줌으로써 발모 또는 탈모로 이어지게 된다^{16,17)}.

葛根 추출물이 모낭의 재생 및 성장을 촉진하여 발모와 탈모 예방 효과가 보고되었다. 백모 현상을 가속화시킨 백반증 마우스 모델에서 葛根 추출물은 cAMP/ MITF-M 신호전달 경로를 활성화하여 가장 대표적인 모발 노화 증상인 백모 현상을 저해하는 것으로 보고되었으며¹⁸⁾, 葛根 추출물이 ERK, Akt 인산화 경유를 통해 모유두 세포의 증식을 촉진하여 모발의 성장과 관련이 있을 것이라는 보고가 있다¹¹⁾.

그러나 葛根 추출물이 모발의 주기에 중요한 역할을 하는 모유두 세포에서 모발 성장과 관련된 mRNA 발현에 미치는 영향은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 모발 성장 촉진의 측면에서 葛根의 착즙 추출 및 열수 추출에 따른 항산화 효과 및 모유두 세포에 작용하여 모발 성장과 관련된 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 生葛根과 葛根은 각각 한국 서울의 천지가

약초와 동양허브 주식회사로부터 2017년 7월에 구매 (NO: 2017-0721, 0722)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천 대학교 한의과 대학 본초학교실에서 감정하였고, 약제는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Potassium persulfate (sigma, #216224, USA), ABTS (sigma, #A1888, USA), Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), Antibiotic antimycotic (WELGENE, Korea), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), DPBS (Corning, USA), MTS solution (Promega, USA), Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, USA), Qubit RNA Assay Kit (Molecular probes, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzymomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENETBIO, Korea), juice extractor (Hurom, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 juice extractor (Hurom, Korea), CO₂ incubator (Thermo, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA) 등이다.

2. 방법

1) 葛根 착즙 제조

生葛根 약재를 100 g으로 중량을 측정 후, 착즙기로 착즙 후 시료를 filter paper에서 감압하여 여과액을 제작한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 제작하였다. 동결건조 추출물은 9.25 g으로 측정되었으며, 수율은 18.5%였다.

2) 葛根 열수추출물 제조

葛根 약재를 50 g으로 중량을 측정 후, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣어주었다. 탕액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열한 뒤, 추출액을 filter paper에서 감압하여 여과액을 제작한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 제작하였다. 동결건조 추출물은 5.4 g으로 측정되었으며, 수율은 10.8%였다.

3) 세포 배양

모유두 세포주를 실험에 사용하였으며¹⁹⁾, Dulbecco's modified Eagle medium에 10% (v/v) fetal bovine serum과 1% antibiotic antimycotic을 첨가하여 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고 계대배양은 2~3일에 한 번씩 수행하였다.

4) ABTS 라디칼 소거능 측정

2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay를 이용하여 항산화 효능을 측정하였다. 실온에서 차광된 상태로 potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 1:1로 혼합한 후 24 시간 반응시켜 free radical 상태의 ABTS를 만들었다. Free radical 상태의 ABTS를 증류수로 희석하여 650 nm의 흡광도가 0.7 부근이

되도록 하였다. ABTS working solution 80 μ l와 sample 20 μ l를 96 well plate의 각 well에 넣어준 뒤, 4 분간 암실에서 반응시키고 microplate reader로 650 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정값을 이용하여 시료의 항산화 효능을 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 백분율로 다음의 식에 따라 항산화 효능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sample blank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

5) 세포 독성 평가

葛根 추출물을 모유두 세포에 처리했을 때 세포 독성을 알아보기 위해 MTS assay를 진행하였다. 모유두 세포를 96 well plate에 10,000 cells/well 씩 분주하고 24 시간 배양하였다. 각 well에 시료를 농도별로 처리 후 36 시간 동안 배양한 뒤, MTS 시약을

넣어 492 nm의 흡광도를 microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA)를 이용하여 측정하였다. 흡광도 측정값을 이용하여 시료를 처리한 세포의 생존율을 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 계산하여 세포 독성 정도를 알아보았다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{(\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

6) quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

6 well culture dish에 모유두 세포를 3×10^5 cells/well 씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 후 葛根 추출물을 0.25 mg/ml 농도로 처리하고 36 시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 Direct-zolTM RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, USA)를 이용하여 RNA를 추출한 후 The Qubit 2.0 Fluorometer를 이용하여 정량하였다. RNA 1 μ g에 DEPC-treated water를 이용하여 총 부피를 8 μ l로 조정하고 Random Hexamer (100 pmol/ μ l) 1 μ l, dNTP mix (10 mM) 1 μ l를

첨가하여 5 분간 65 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 그 후 얼음에 냉각시킨 다음에 5X M-MLV RT reaction buffer 4 μ l, DEPC-treated water 4 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, M-MLV reverse transcriptase 1 μ l를 넣고 10 분간 실온에 뒀다가 50 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하고 증류수로 1/5로 희석시켜 실험에 사용하였다. 그 다음 AriaMx를 이용해서 qRT-PCR을 통해 모유두 세포의 모발 성장 촉진 관련 유전자인 FGF7, FGF10, CTNNB1, BMP6, FasR의 mRNA 발현 변화를 알아 보았고, β -actin으로 결과 값을 보정하였다.

Table 1. Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. ($^{\circ}$ C)
FGF7	F	CTG CCA CTG TCC TGA TTT CC	146	58
	R	TGA TTA CAT GGA AGG AGG GG		
FGF10	F	CCC CTT CTT GTT CAT GGC TA	139	58
	R	TGA GAA GAA CGG GAA GGT CA		
CTNNB1	F	ATT GTC CAC GCT GGA TTT TC	142	58
	R	AGG TCT GAG GAG CAG CTT CA		
BMP6	F	CAG TCC TTG TAG ATG CGG AA	141	58
	R	CAT GAG CTT TGT GAA CCT GG		
FasR	F	TTC TGC CAT AAG CCC TGT CC	175	58
	R	CCA CTT CTA AGC CAT GTC CTT C		
β -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

Ⅲ. 결 과

1. 葛根 추출물의 항산화 효능 측정

ABTS assay를 통해 葛根 추출물의 항산화 효능을 확인하였다. 착즙 추출물의 경우 0.25 mg/ml에서 $26.71 \pm 0.14\%$, 1 mg/ml에서 $77.37 \pm 0.33\%$ 로 농도 증가에 따른 라디칼 소거능이 증가하였다. 열수 추출물은 0.25 mg/ml에서 $22.21 \pm 0.19\%$, 1 mg/ml에서 $70.38 \pm 0.19\%$ 로 농도 증가에 따른 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다. 실험 결과 착즙 추출물 및 열수 추출물 모두 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

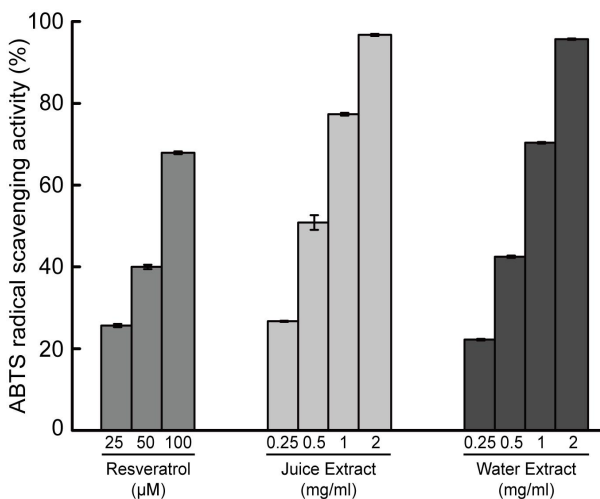


Fig 1. Anti-oxidant activities of the Puerariae Radix extracts. ABTS radical scavenging activity of resveratrol and pueraria radix extracts. n=3 (biological replicates). Average \pm S.E.M.

2. 葛根 추출물의 모유두 세포 독성 평가

모유두 세포에 葛根 추출물을 처리했을 때 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해 MTS assay를 진행했다. 葛根 추출물을 농도별 (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml)로 모유두 세포에 36 시간 처리하였다. 착즙 추출물은 1 mg/ml에서 $85.74 \pm 1.88\%$, 열수 추출물은 1 mg/ml에서 $94.95 \pm 0.52\%$ 로 약 10%의 세포 생존율 차이를 보였다. 실험 결과 모유두 세포에 열수 추출물보다 착즙 추출물을 처리했을 때 미세하게 좀 더 강한 세포 독성이 나타나는 것을 확인하였다.

3. 모유두 세포의 모발 성장 관련 유전자의 mRNA 발현량 확인

葛根의 착즙 추출물 및 열수 추출물을 모유두 세포에 처리했을 때 모발 성장과 관련된 유전자의 mRNA 발현 변화를 알아보기 위해 qRT-PCR을 실시하였다. 앞선 MTS assay 실험

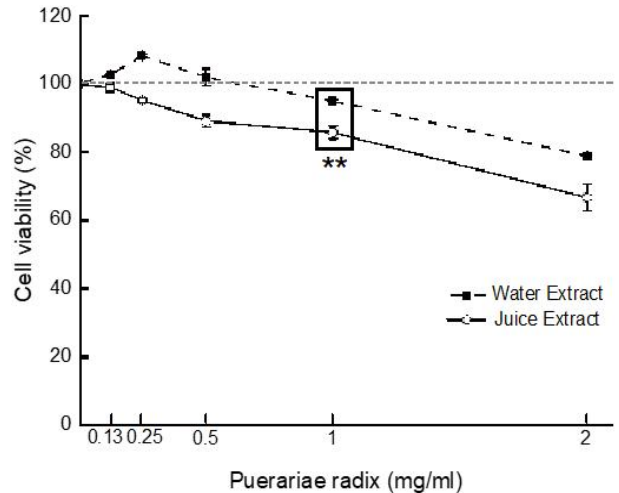


Fig 2. The Cytotoxicity of the Puerariae Radix extracts on DP cells. DP cells were treated with juice or water extract of Puerariae Radix for 36 h. Cell viability was measured by MTS assay and expressed in percentage. n=3 (biological replicates and cell cultures), Average \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ versus Puerariae Radix extracts group.

결과를 근거로 설정한 시료 농도인 0.25 mg/ml로 葛根 추출물을 모유두 세포에 36시간 처리 후 실험을 진행했다(Fig 3.(A)). 실험 결과 착즙 추출물 처리 시 FGF7의 발현은 1.02 ± 0.12 배, β -catenin의 유전자인 CTNNB1은 1.28 ± 0.01 배, BMP6는 1.31 ± 0.11 배로 葛根 추출물을 처리하지 않은 control과 비슷하게 나타났으나, 열수 추출물의 경우 FGF7는 2.80 ± 0.32 배, CTNNB1의 발현은 2.05 ± 0.17 배로 나타났다. 특히 모유두 세포에서 발현되었을 때 모낭 형성을 촉진하는 BMP6 mRNA가 5.48 ± 0.35 배로 발현이 매우 증가한 것을 확인하였다. FGF10과 FasR mRNA 발현의 경우 착즙 추출물은 0.69 ± 0.03 배, 0.62 ± 0.01 배로 약간 감소시켰고, 열수 추출물은 FGF10을 1.46 ± 0.10 배로 약간 증가시켰으며, FasR은 1.07 ± 0.17 배로 control과 비슷하였다.

葛根 추출물 0.25 mg/ml보다 더 높은 농도인 1 mg/ml을 모유두 세포에 처리했을 때 FGF7, CTNNB1, BMP6의 mRNA 발현 변화를 알아보았다(Fig 3.(B)). 착즙 추출물의 경우 FGF7 발현은 1.92 ± 0.01 배, CTNNB1의 발현은 1.90 ± 0.35 , BMP6는 5.68 ± 0.18 배로 나타났고, 열수 추출물은 FGF7이 2.19 ± 0.15 배, CTNNB1의 발현이 1.64 ± 0.06 배, BMP6의 경우 4.37 ± 0.21 배로 나타났다. 특히 두 葛根 추출물을 처리했을 때 BMP6 mRNA 발현이 4~5배 이상 증가한 것을 확인하였다.

0.25 mg/ml 농도의 착즙 추출물을 처리했을 때 모발 성장을 촉진하는 유전자의 mRNA 발현을 크게 변화시키지 못했으나 같은 농도의 열수 추출물을 모유두 세포에 처리했을 때 모발 성장 촉진 관련 유전자들의 mRNA 발현이 매우 증가한 것을 알 수 있었다. 1 mg/ml 농도로 더 높은 농도에서 같은 실험을 실시하였고 두 葛根 추출물 모두 모유두 세포 모발 성장 촉진 관련 유전자의 mRNA 발현 증가시키는 것을 확인하였다.

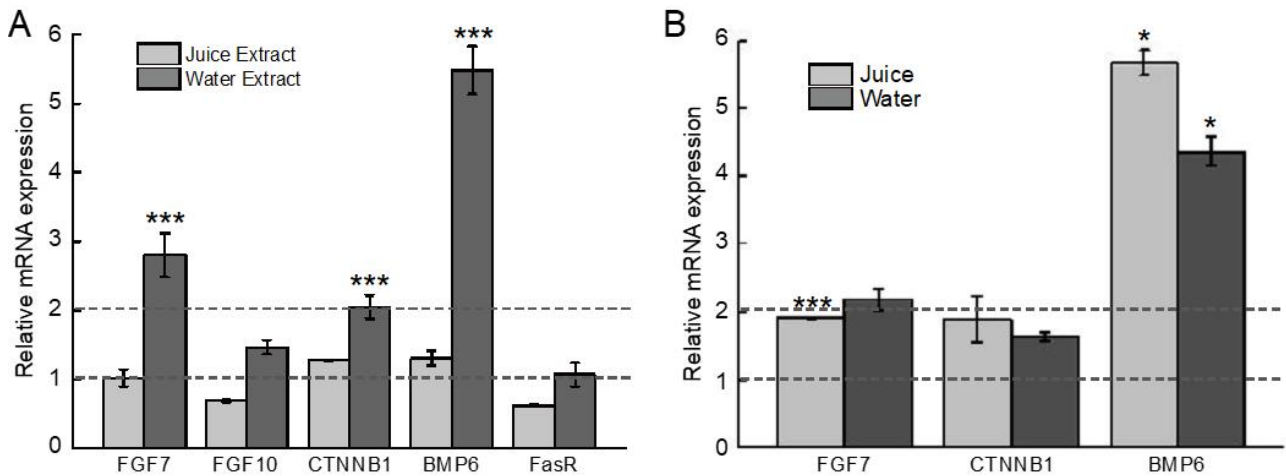


Fig 3. Regulation of FGF7, FGF10, β -catenin, BMP6, and FasR mRNA expression by treatment of Puerariae Radix extracts. (A) DP cells were treated with 0.25 mg/ml Puerariae Radix extracts for 36 h. (B) DP cells were treated with 1 mg/ml Puerariae Radix extracts for 36 h. The mRNA expression levels were measured by qRT-PCR. Data was normalized by β -actin mRNA expression level. n=4 (biological replicates and cell cultures), Average \pm S.E.M. * p < 0.01, *** p < 0.005 versus control.

IV. 고찰

葛根은 뿌리로 직사각형의 두꺼운 조각 또는 세로로 자른 작은 덩어리이다. 앞의 것은 길이 20 ~ 30 cm, 두께 약 1 cm 이며, 뒤의 것은 크기가 일정하지 않은 육면체에 가깝다. 바깥면은 회백색 ~ 연한 갈색이고 세로주름이 있으며 꺼질꺼질하다. 세로로 꺾기 쉽다²⁾.

갈근의 주요 성분은 flavonoids로 daidzin, daiszein, puerarin, daidzein-4', 7-diglycoside, pueranin-7-xyloside, 4', 6"-o-diacetyl puerarin, 4'-methoxypuerarin 등이 있다. Triterpenoidalsapogenol도 sophoradiol, soyasapogenol A, B 등이 있고, 그 외 allantoin, β -sitosterol, starch 등이 함유되어 있다²⁰⁾.

모발의 성장 촉진은 성숙모낭에서 모낭 모기질 세포와 모유두 세포가 모낭의 기저막을 통해 일어나는 상호작용에 의해 모기질 세포의 특화된 분화가 일어나게 되며, 이 결과 모발이 생성되고 성장하게 된다^{21,22)}. 이런 모유두 세포는 모낭내의 여러 종류의 상피세포들과 상호작용을 하며 모낭의 형성, 모발의 재생 및 성장에 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 있다²³⁾.

탈모증은 혈액순환장애와 신경계통의 이상으로 두피와 모발을 손상시켜 탈모가 발생하는데 탈모 요인의 하나로 산화적 스트레스에 의한 염증을 들 수 있으며, 산화적 스트레스는 멜라닌 합성 시에 멜라닌세포의 핵과 미토콘드리아 DNA에 mutation을 초래하여 백모와 탈모가 나타난다고 보고되었다^{24,25)}.

여러 요인에 의해 생성되는 활성산소는 매우 강한 반응성을 가지고 있기 때문에 DNA, protein, lipid 등과 반응하여 변성을 일으킨다. 활성산소의 축적으로 생성되는 산화적 스트레스에 의한 지질의 산화는 모발을 휴지기로 유도하고 모낭 세포의 사멸을 촉진한다고 알려져 있다^{26,27)}. 이러한 활성산소의 활성을 억제하는 것은 탈모 예방 및 모발 생성과 관련되어 있기 때문에 葛根 추출물의 항산화 효과를 ABTS assay를 실시하여 알아 보았다. 착즙 추출물 1 mg/ml에서는 77.37 \pm 0.33%, 열수 추출물 1 mg/ml의 항산화 효능은 70.38 \pm 0.19%로 두 갈근 추

출물 모두 항산화 효능이 확인되었다. 따라서 葛根의 착즙 추출물 및 열수 추출물을 사람의 모발에 적용할 경우 모두 우수한 항산화 효과를 나타낼 것으로 보인다.

다음은 葛根 추출물 처리에 의한 모유두 세포의 세포 독성 정도를 알아보기 위해 MTS assay를 실시하였다. 실험 결과 1 mg/ml에서 약 10%의 세포 생존율 차이를 보였고 모유두 세포에서 열수 추출물보다 착즙 추출물이 강한 독성을 띠는 것을 확인하였다.

모낭의 가장 하단부에 위치하는 모유두는 여러 조절 인자의 도움을 받아 모낭의 발생과 모발의 생성 주기를 조절하기 때문에 모발 성장에서 중요한 역할을 한다. 여러 조절 인자 중에서 Wnt 신호를 통한 β -catenin의 증가는 모유두 세포에서 모낭 형성을 촉진해 모낭 형태 형성 및 재생에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 각화 세포의 증식을 촉진하여 모발 생성 주기의 초기 단계를 활성화하는 역할을 하는 FGF7, FGF10의 발현은 모낭 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 모유두 세포에서 BMP6의 발현은 모낭 형성을 위한 모유두 세포의 특징을 유지시키기 때문에 모낭 형성 및 모발 생성 유도에 필요하다¹⁷⁾. 세포 사멸 조절 인자 중 하나로 알려진 FasR의 발현이 증가한 경우 모유두 세포의 사멸을 유도하여 모낭 생성을 저해하여 모발 성장이 저해된다²⁹⁾. 葛根 추출물 처리에 따른 모유두 세포의 모발 성장 관련 유전자 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 qRT-PCR을 실시하였다. 모유두 세포에 큰 독성을 나타내지 않으면서 두 가지 葛根 추출물의 영향을 극대화하기 위해 0.25 mg/ml 농도로 시료를 처리한 후 실험을 진행하였다. 그 결과 착즙 추출물을 모유두 세포에 처리한 경우 β -catenin, FGF7, FGF10, BMP6의 mRNA 발현을 크게 변화시키지 못한 것에 비해 열수 추출물을 모유두 세포에 처리한 경우 FGF7, CTNNB1, BMP6 mRNA 발현 정도가 두드러지게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히 열수 추출물을 모유두 세포에 처리했을 때 BMP6의 mRNA 발현량이 5.48배로 매우 높게 증가한 것을 확인하였다. 0.25 mg/ml 농도의 열수 추출물 처리에 따른 mRNA 발현 변화가 나타난 유전자인 FGF7, CTNNB1,

BMP6의 mRNA 발현 변화를 더 높은 농도인 1 mg/ml 葛根 추출물을 모유두 세포에 처리하여 알아본 결과, 두 葛根 추출물 모두 모유두 세포 모발 성장 촉진 관련 유전자 mRNA 발현을 증가시키는 효과를 확인하였다. 그러나 MTS assay 결과로 1 mg/ml 농도에서 열수 추출물보다 착즙 추출물이 세포 생존율을 더 감소시켰기 때문에 착즙 추출물이 열수 추출물보다 모유두 세포 모발 성장 촉진 관련 유전자 mRNA 발현 증가에 더 유리하다고 보기 어려울 것으로 사료된다. qRT-PCR 실험 결과를 통해 葛根 열수 추출물은 모유두 세포에 작용하여 모발 성장을 촉진시키는 유전자인 FGF7, CTNNB1, BMP6의 mRNA 발현을 강하게 촉진하는 효과를 지니고 있으며, 이 효과는 葛根 착즙 추출물을 처리했을 때보다 더욱 효과적인 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 통해 葛根 착즙 추출물 및 열수 추출물 모두 항산화 효과를 가지고 있어서 활성산소를 제거하여 활성산소 축적을 막을 수 있을 것으로 보인다. 葛根 착즙 추출물보다 葛根 열수 추출물이 모유두 세포에서 모발 성장 관련 유전자인 FGF7, CTNNB1, BMP6 mRNA 발현의 증가를 통해 세포를 자극하여 모발 성장 및 탈모 예방 효과가 있을 것으로 추측된다. 추가적인 in vivo test를 실시하여 葛根 추출물의 처리에 따른 모유두 세포 유전자 발현 변화가 모낭 형성과 모발 성장을 유도할 수 있는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 葛根을 추출 방법을 달리하여 추출한 시료를 대상으로 항산화 효능, 모유두 세포에 처리했을 때 나타나는 세포 독성 정도 및 모발 성장 관련 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ABTS assay를 통해 착즙 방법과 열수 추출 방법을 통한 두 가지 葛根 추출물의 항산화 효과를 확인하였다.
2. 추출 방법별 두 가지 葛根 추출물을 여러 농도로 모유두 세포에 36 시간 처리한 후 MTS assay 실험 결과 0.25 mg/ml 에서 큰 세포 독성이 확인되지 않았고 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 葛根 열수 추출물보다 葛根 착즙 추출물이 더 큰 세포 독성을 나타내었다.
3. 0.25 mg/ml 농도의 두 가지 葛根 추출물을 모유두 세포에 36 시간 처리했을 때 葛根 착즙 추출물은 모발 성장 관련 유전자 mRNA 발현 정도에 큰 영향을 주지 못하였으나 葛根 열수 추출물은 FGF7, CTNNB mRNA 발현을 2배 이상, BMP6 mRNA 발현의 경우 5배 이상 증가시켰다.

이상의 실험결과를 통해 葛根 열수 추출물이 항산화 효과를 통해 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있으며, 모발 성장을 촉진시키는 유전자인 FGF7, CTNNB, BMP6 mRNA 발현을 촉진시켜 탈모 치료의 효과를 보일 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY., Boncho-Hak, Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 184-5.
2. Korea Food and Drug Administration. The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2015 : 4-5.
3. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH. Hanbangyakrihak. Seoul : Shinilbukseu, 2007 : 395-404.
4. Kim HB, Kang KH, Hwang WD, Lyu SA, Lee SY. The Effects of Puerariae Radix on Allergic Inflammation. J Korean Oriental Pediatrics, 2009 ; 23(3) : 217-31.
5. Kim SN, Kim HS, Nam GS, Hwang SW, Hwang SY. Inhibition of Inflammatory cytokines Production and Prostaglandin E2 Activity by Puerariae Radix Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 2006 ; 35(1) : 28-34.
6. Song JB, Choi JG, Lee DH, Gaire BP, Lee CW, Bu YM, Choi HY, Kim HC. Neuroprotective effect of Puerariae Radix extract on focal cerebral ischemia in mice. Kor J Herbology. 2012 ; 27(6) : 71-6.
7. Wang S, Shi XL, Feng M, Wang X, Zhang ZH, Zhao X, Han B, Ma HC, Dai B, Ding YT. Puerarin protects against CCl4-induced liver fibrosis in mice: possible role of PARP-1 inhibition. Int Immunopharmacol. 2016 ; 38 : 238-45.
8. Li R, Liang T, He Q, Guo C, Xu L, Zhang K, Duan X. Puerarin, isolated from Kudzu root (Willd.), attenuates hepatocellular cytotoxicity and regulates the GSK-3 β /NF- κ B pathway for exerting the hepatoprotection against chronic alcohol-induced liver injury in rats. Int Immunopharmacol. 2013 ; 1(1) : 71-8.
9. Chen X, Li R, Liang T, Zhang K, Gao Y, Xu L. Puerarin improves metabolic function leading to hepatoprotective effects in chronic alcohol-induced liver injury in rats. Phytomedicine. 2013 ; 20(10) : 849-52.
10. Oh TW, Park YK. Effect of the root extract of Pueraria thunbergiana Benthham on high fat/high sucrose diet and single low-dose streptozotocin-induced diabetic mice. Kor J Herbology. 2014 ; 29(5) : 75-81.
11. Park SA, Ko KS, In MH, Mun YJ, Woo WH. Effect of Puerariae Radix Ethanol Extract on the Proliferation of Human Dermal Papilla Cells. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2017 ; 31(3) :

- 167-72.
12. Jang HY, Choi KH, Kim SH, Kwon KR, Kim BW. Bibliographic Studies of Depilation, *J Pharmacoacupuncture*. 2002 ; 5(2) : 92-108.
 13. Yim SBN, Choi GD, Kim SK. A literature study about the comparison of Oriental-Occidental medicine on the alopecia. *The Journal of Jehan oriental medical academy*. 1999 ; 4(1) : 699-710.
 14. Kwak IS, Kim YB, Ri SH, Shim SN, Lee JH, Cho JH, Joo ER. *NEW Dupimobal gwanli-Hak*. Gun-Ja Press, 2011 : 21-22.
 15. Oh JW, Kloepper J, Langan EA, Kim Y, Yeo J, Kim MJ, Hsi TC, Rose C, Yoon GS, Lee SJ, Seykora J, Kim JC, Sung YK, Kim M, Paus R, Plikus MV. A Guide to Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo. *J Invest Dermatol*. 2016 ; 136(1) : 34-44.
 16. Jiro K, Robert EB, Bruce AM. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev*. 2000 ; 14(10) : 1181-5.
 17. Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. *Genes Dev*. 2008 ; 22(4) : 543-57.
 18. Park. W. Anti-graying effect of the extract of *Pueraria thunbergiana* via potentiating the cAMP/MITF-M pathway. National University. 2014.
 19. Kim CD, Lee MH, Roh SS. Identification of androgen-regulated genes in SV40-transformed human hair dermal papilla cells. *J. Dermatol. Sci*. 2003 ; 32(2) : 143-9.
 20. Kim HC. *Hanbangyagli-Hak*. Seoul:Jibmundang. 2001 : 165-6.
 21. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001 ; 104(2) : 233-45.
 22. Fraser RD, Parry DA. Macrofibril assembly in trichocyte (hard alpha-) keratins. *The Journal of Structural Biology*. 2003 ; 142(2) : 319-25.
 23. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*. 2001 ; 81(1) : 449-94.
 24. Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol* 2001 ; 36(1) : 29-54.
 25. Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression(catagen). *J Invest Dermatol* 1998; 111(6) : 941-7.
 26. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med*. 2002 ; 227(9) : 671-82.
 27. Naito A, Midorikawa T, Yoshino T, Ohdera M. Lipid peroxides induce early onset of catagen phase in murine hair cycles. *Int J Mol Med*. 2008 ; 22(6) : 725-9.
 28. Enshell-Seijffers D, Lindon C, Kashiwagi M, Morgan BA. Beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. *Dev Cell*. 2010 ; 18(4) : 633-42.
 29. Reiter M, Pfaffl MW, Schönfelder, M, Meyer HHD. Gene expression in hair follicle dermal papilla cells after treatment with stanzolol. *Biomark Insights*. 2009 ; 4 : 1-8.