

# 오리나무 가지 유래 Oregonin의 인체 모유두 세포 Apoptosis 조절 효능

이경화<sup>1</sup>, 박광현<sup>2</sup>, 최선은<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>남부대학교 향장미용학과, <sup>2</sup>남부대학교 한방 제약개발학과

## Modulative Effect of Human Hair Dermal Papilla Cell Apoptosis by Oregonin from the Branches of *Alnus japonica*

Gyeong Hwa Lee<sup>1</sup>, Kwang Hyun Park<sup>2</sup> and Sun Eun Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetology Science, Nambu University, Gwangju 62271, Korea

<sup>2</sup>Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 62271, Korea

**Abstract** - A diarylheptanoid, (5S)-1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxyheptane-3-one-5-O-β-D-xylopyranoside, named oregonin (1), was isolated from the of *Alnus japonica* (*A. japonica*), which is a species of the genus Betulaceae, growing throughout Korea, Japan and China. The structure was elucidated by various spectroscopic methods including negative and positive LC/MS, 1H-NMR, and 13C-NMR techniques or by comparison with authentic samples. In order to evaluate the anti-oxidative activities of oregonin (1) isolated from *A. japonica*, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS) radical scavenging activity were measured *in vitro*. Oregonin from *A. japonica* exhibited potent DPPH and ABTS radical scavenging activities. *A. japonica* shows not only 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity, but also apoptosis modulative effects. The present results indicate that *A. japonica* could be a hair-growth-promoting agent for cosmetic products.

**Key words** - *Alnus japonica*, Anti-oxidant, Hair growth, Oregonin

## 서 언

국내 자생하는 오리나무 (*Alnus japonica*)의 가치를 한방에서는 적양(赤楊)이라 부르며 청열(淸熱), 강화(降火) 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 민간에서는 고열, 육혈(衄血), 설사, 치통, 숙취해소, 암 등에 쓰여 온 것으로 알려져 있다(Lee, 1966). *Alnus*속 식물들은 동양과 서양에서 예로부터 다양한 질환 중 특히 피부질환들에 대해서 공통적으로 사용되어 왔으며, red alder라고 불리는 같은 속 식물인 *Alnus rubra*는 북아메리카에서는 만성 헤르페스질환, 습진, 소양증 등 다양한 만성 난치성 피부질환에 사용되어 왔다(Boericke, 1927).

최근까지 *Alnus*속 식물로부터 diarylheptanoid 계열의 화합물을 분리하고, 항산화활성, 항염증활성, 항아토피활성 등에 대한 *Alnus* 속 식물의 자원의 활용성에 대한 연구가 다수 발표되고 있다(Choi *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012). 이렇게 강력하고 효과적인 생리활성의 주요 효능 물질로서는 *Alnus* 속 식물에서 높은 함량으로 존재하는 주된 diarylheptanoid 계열 화합물로 알려진 oregonin이 핵심적인 역할을 하는 것으로 판단된다. 이는 *Alnus* 속 식물의 화학적 계통 분류 연구에 있어서 지표 물질로서 oregonin을 중점적으로 연구하는 국내외 연구동향을 살펴보면 알 수 있다(Choi, 2013; Lim *et al.*, 2004).

다양한 생리활성 연구가 활발히 보고된 oregonin을 포함한 *Alnus*속 식물들이지만 최근 대두되고 있는 탈모 질환과 관련된 생리활성 연구는 아직 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구자들

\*교신저자: E-mail sechoi@nambu.ac.kr

Tel. +82-62-970-0210

은 *Alnus*속 식물로부터 분리한 oregonin을 대상으로 탈모질환과의 연관성을 밝혀내기 위하여 인체 모유두 세포로부터 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸(apoptosis)을 유도한 후 oregonin이 세포사멸과 관련된 바이오 마커들을 효율적으로 조절하는지에 대한 활성 연구를 수행하고자 하였다.

또한, 본 연구에서 주로 수행한 연구내용인 세포사멸과 웨스턴 블랏팅 실험에서 측정된 바이오 마커는 Bcl-2, Bax, caspase-3, PARP 등이며, 이들에 대한 과학적 근거는 다음과 같다. 세포가 내외부의 요인으로 인해 죽음에 이르는 것을 크게 세포사멸(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)로 구분할 수 있다. 이 가운데 세포사멸은 세포 내부의 신호에 따른 여러 단백질 활성의 조절과 유전자의 발현을 통하여 프로그래밍된 세포 사멸의 과정으로 일어나는 능동적으로 진행되는 세포의 죽음으로 알려져 있다(Clark et al., 1995). 외부 요소로서 대표적인 것은 방사선, 고열 충격, 독소, 박테리아나 바이러스에 의한 감염 등에 의한 세포의 손상이나 심한 스트레스로 세포사멸 반응이 나타나며, 그 이상은 다양한 질병을 초래하는데 정상적인 세포의 사멸을 유도하는 것은 장기의 손상과 연관될 수 있다. 세포사멸과 관련된 유전자중 대표적인 것은 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-2와 이를 유도하는 유전자인 Bax가 존재하여 길항적으로 조절되는 것으로 보고되고 있다(Alnermri et al., 1997). 또한 세포사멸을 유도하는 경로에서 활성화되는 단백질 분해효소 중, caspase들은 세포가 사멸하는 과정에서 각 소기관별로 다양하게 활성화되는 가장 중요한 실행자로 알려져 있으며, 이 효소의 활성을 통하여 세포사멸의 정도 및 경로를 파악할 수 있다(Zhap et al., 2001). Caspase 계열의 효소가 활성화되면 다양한 표적 단백질들을 분해하여 세포사멸을 비가역적으로 진행시키게 되는데, 특히 caspase-3 단백질은 DNA repair, DNA stability 및 전사조절에 관여하는 PARP 단백질 등의 발현을 증대시키고, PARP 단백질의 절단을 유도하고(Muller et al., 1994) 최종적인 세포 사멸 단계로 접어들게 된다.

따라서 정상세포에서 세포사멸을 유도하는 외부 자극, 예를 들면 약물 또는 산화적 스트레스 등으로 인해 세포 사멸에 이르게 되는 것을 차단하기 위해서 상기에 기술된 요소 등의 발현을 조절하는 것은 매우 중요하다. 따라서 본 연구자들은 국내 자생 식물인 오리나무(*A. japonica*)로부터 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 oregonin을 단일하게 분리한 후 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR)과 액체크로마토그래피/질량분석(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS) 데이

터를 확보하여 기존 선행 문헌과 비교하여 최종 oregonin으로 구조동정 후 DPPH·ABTS 라디칼 소거능과 인체 모유두 세포를 대상으로 세포사멸 조절 효능에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

오리나무(*A. japonica*)는 2017년 9월 경기도 포천시에 위치한 국립수목원에서 진혜영 연구관(국립수목원)으로부터 식물학적 감정한 후 제공받아 실험에 사용하였으며, 표준품은 남부대학교 천연 기능성 소재 연구실에 보관하고 있다(AJ2017-09).

### 기기 및 시약

<sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR 분석은 JEOL-JNM-AL300(300MHz, 75MHz)로 실시하였다. High performance liquid chromatography (HPLC)는 Waters 2695 system (USA)과 2487 Dual rhamda Absorbance Detector, Guard column : Phenomenex KJ0-4282 Guard column, Column : Sky Pak C18 column (120 Å, 4.6\*250 mm, 5 μm), Column oven temperature : 25°C, Mobile phase : Water (A), Acetonitrile (B), Data system : Empower 2 Software (Waters Co., USA)의 조합을 통해 구성하였다.

LC/MS는 Shimadzu prominence UFLC-MS system, Pump A: LC-30AD, Pump B: LC-30AD, Detector: SPD-20A, Auto sampler: SIL-20A XR, Column Oven: CTO-20A, Communications Bus Module: CBM-20A, MS: ESI-IT-TOF MS를 이용하였으며, 사용조건은 Column: Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 2.1 x 150 mm, 1.7 μm, Column Oven Temperature: 35°C, UV detector: 280 nm, injection volume: 1 μl, flow: 0.21 ml/min, Solvent A: Water in 0.1% formic acid, Solvent B: Acetonitrile, solvent condition이며, MS condition은 Nebulizing gas flow: 1.5 L/min, Curved desolvation line (CDL) Temperature : 200°C, Heat Block Temperature : 200°C를 각각 설정하여 실험에 활용하였다.

박막크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) plate는 pre-coated silica gel 60 F<sub>254</sub> plate (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 항산화활성 측정용 시약인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), L-ascorbic acid, potassium persulfate, 무수에탄올은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 흡광도는 ELISA reader (TECAN,

Salzburg, Austria)를 사용하여 측정하였다.

### 추출 및 분리

오리나무 가지 200 g을 절단한 후 70% 에탄올로 실온에서 1 회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압 농축과 동결건조를 통해 최종 23.01 g을 확보 하였고, HPLC 분석용으로 정량하여

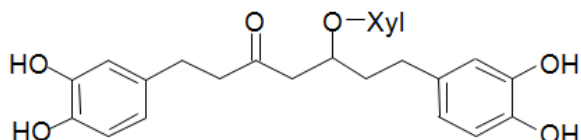


Fig. 1. The structure of oregonin.

Table 1. Retention time of oregonin and *A. japonica* extracts

Samples	Retention Time (min)
Oregonin	15.561 ± 0.019 <sup>z</sup>
<i>A. japonica</i> extract	15.107 ± 0.021

<sup>z</sup>The results are expressed as means ± S.D (n=3).

실험에 사용하였다.

기존에 실험실에서 보유중인 오리나무 가지로부터 분리, 정제한 표품인 oregonin (1) (Fig. 1) 1 mg을 정확히 취해 80% MeOH를 가하여 전체량이 1 ml가 되도록 하여 고농도원액(1,000 ppm)을 조제하였다. 이 고농도 원액을 희석하여 125, 250, 500, 1,000 ppm 농도의 표준용액을 조제하였다. 표준용액을 20 µl 씩 취하여 HPLC 분석을 실시하여 대표적인 분석곡선을 획득하였다(Fig. 2, 3). 또한 실험의 재현성을 위해 반복실험을 통해서 표준용액과 신나무 가지 추출물 미지검역의 체류시간(retention time, RT)의 평균과 표준오차를 구하였다(Table 1).

표품의 분석조건을 아래와 같이 설정한 다음, 반복정제를 통해서 oregonin 표품과 동일한 RT값을 나타내는 분석곡선의 분획을 획득하여 구조 및 구성을 동정하기 위해 NMR과 LC/MS 분석을 시행하였다.

### HPLC 분석

이동상의 조건은 Table 2와 같이 구성을 하였으며, 유량은 1 ml/min, wavelength는 280 nm, inject volumn은 20 µl, total

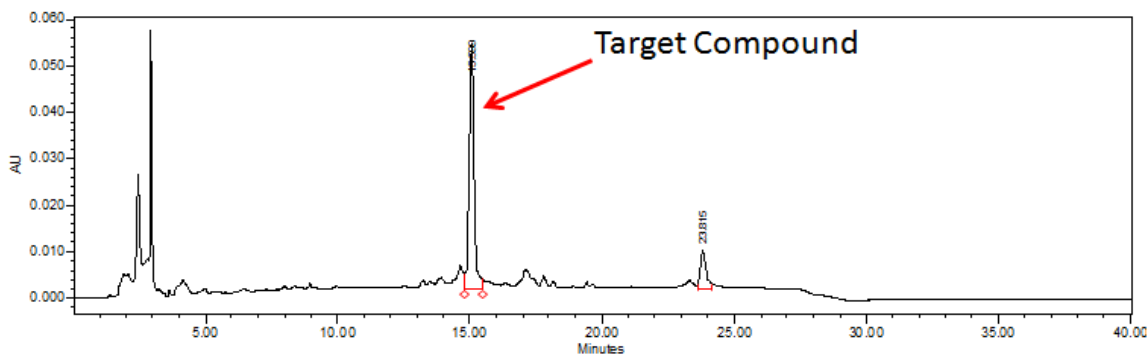


Fig. 2. Chromatogram of *A. japonica* by HPLC.

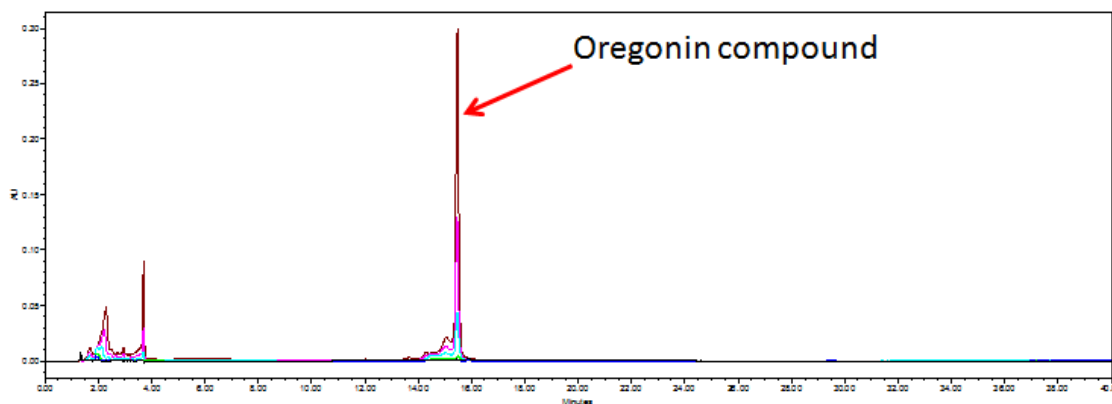


Fig. 3. Chromatogram of oregonin by HPLC.

Table 2. HPLC method of solvent system

	0 min	12 min	24 min	25 min
Solvent A (H <sub>2</sub> O)	100	90	75	60
Solvent B (CH <sub>3</sub> CN)	0	10	25	40

Table 3. LC/MS method of solvent system

	0 min	20 min	24 min	25 min	30 min
Solvent A (0.1% Acetic acid-H <sub>2</sub> O)	95	40	40	95	95
Solvent B Acetonitrile	5	60	60	5	5

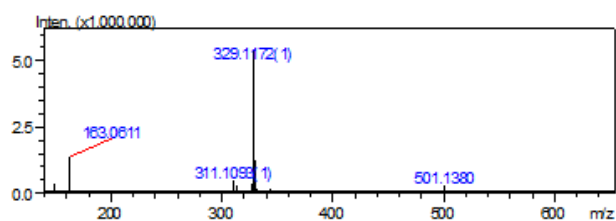


Fig. 4. Positive mode LC/MS spectrum of oregonin.

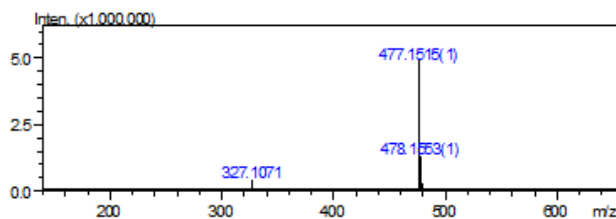


Fig. 5. Negative mode LC/MS spectrum of oregonin.

run time은 40 min, column oven 온도는 25°C로 분석조건을 적용하였으며, Phenomenex KJ0-4282 Guard 칼럼, VDSpher 100 C18-E 칼럼(5  $\mu$ m, 250 X 4.6 mm)의 조합을 사용하여 분석을 실시하였다.

### LC/MS 분석

LC 조건은 각각 다음과 같이 설정하여 수행하였다. 즉, 칼럼은 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 2.1 x 150 mm, 1.7  $\mu$ m, column oven의 온도는 35°C, UV detector는 254 nm, injection volume은 1  $\mu$ l, 유량은 0.21 ml/min으로 각각 설정하여 분석을 시행하였으며, 이동상의 조건은 Table 3과 같이 설정하였다.

질량 분석 시험 조건에서 nebulize gas flow는 1.5 L/min, CDL 온도는 200°C, heat block 온도는 200°C로 각각 설정하여 분석에 적용하였다.

Table 4. <sup>13</sup>C-NMR spectra of oregonin

Carbon No.	Oregonin
C-1	28.4
C-2	44.9
C-3	209.0
C-4	47.2
C-5	76.6
C-6	39.7
C-7	30.3
C-1'	132.9
C-1''	133.0
C-2'	115.4
C-2''	115.4
C-3'	145.9
C-3''	145.8
C-4'	143.1
C-4''	143.1
C-5'	115.6
C-5''	115.7
C-6'	118.8
C-6''	118.8
Xyl-1	102.6
Xyl-2	74.3
Xyl-3	76.6
Xyl-4	69.5
Xyl-5	65.8

\*75 MHz (DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O).

### Oregonin

무정형 갈색 분말

파지티브 LC/MS  $m/z$  : 501 [M+Na]<sup>+</sup>(Fig. 4), 네거티브 LC/MS  $m/z$ : 477 [M-H]<sup>-</sup>(Fig. 5).

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O):  $\delta$  6.61-6.53(4H in total, H-2', 2'', 5', 5''), 6.42-6.37 (2H in total, H-6'', 6'), 4.25 (1H, brd,  $J=7.8$ Hz, xyl-1), 4.13 (1H, m, H-5), 3.72 (1H, dd,  $J=11.4, 6$ Hz xyl-5e), 3.27 (1H, m, xyl-4), 3.07-2.50 (8H in total, H-1,2,4,7), 1.66-1.59 (2H in total, m, H-6) (Fig. 1).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O): Table 4 (Fig. 1).

### DPPH 프리 래디칼 소거작용의 측정

DPPH 프리 래디칼 소거작용의 측정은 Hatano *et al.* (1989)

의 방법에 의하여 실시하였다. 즉 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100  $\mu$ l (control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH 용액 (99.5% ethanol) 1.9 ml를 가한다. 각 시료는 5가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 반응시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid (vitamin C) (Xie *et al.*, 2018)를 5가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 IC<sub>50</sub>치 (DPPH 래디칼 형성을 50%로 억제하는 데 필요한 농도)로 나타내었다.

### ABTS 프리 래디칼 소거작용의 측정

ABTS 래디칼 소거 활성은 Re *et al.* (1999)의 방법을 수정하여 측정하였다. ABTS (Sigma-Aldrich, USA) 시약을 증류수에 용해하여 7.0 mM의 농도로 준비하고, potassium persulfate (Sigma-Aldrich, USA)를 증류수에 용해하여 2.45 mM 농도로 준비하여 두 용액을 1:1 비율로 섞어서 12~16시간 동안 암실상태로 방치하여 시험을 위한 래디칼 고농도원액(radical stock solution)을 제조하였다. 이를 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4)으로 희석하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 0.7~1.0 사이의 흡광값이 나오도록 희석하여 준비하였다. 흡광도는 농도별로 시료를 준비하여 96 well plate (NUNC, USA)에 시료와 ABTS 반응 비율을 1:9 (v/v)로 맞춰서 실온에서 30분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응을 시키고, 반응이 끝난 후 750 nm 파장에서 측정하였다.

### HFDPC 세포배양

인모유두세포주(human fibroblastic dermal papilla cells, HFDPC)는 PromoCell (Heidelberg, Germany)로부터 구입하여 사용하였고, 배지의 선택 및 배양은 공급자의 지침에 준하여 실시하였다. 온도 37°C와 5%의 CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기를 사용하였다. 배지는 매 2일마다 교환하였으며, 세포의 밀도가 80~90%에 도달하기 이전에 계대 배양하였다. 냉동보관 한 세포를 해동한 후 내지 2~3 세대까지만 사용하였으며, 사용 후 세포는 고압멸균 후 폐기하였다(Boivin *et al.*, 2006).

### Western blotting

세포를 인산완충용액(phosphate-buffered saline, pH 7.4) (PBS)로 두 번 세척하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM

NaF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin)를 넣고 약 5분간 얼음에 정치시킨 후 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상등액을 취해서 electrosample buffer (Bio-Rad, USA)를 넣은 후 100°C에서 5분 동안 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. 그 후 10% SDS PAGE를 이용하여 단백질을 분리한 후 Polyvinylidene fluoride (PVDF) 막에 옮긴 후 웨스턴 블롯팅 분석을 각각의 항체를 이용하여 실시하였다. 사용된 항체는 공급처에서 제시하는 희석비율을 사용하였고, SantaCruz (UT, USA) 및 Sigma-Aldrich Korea를 통해 구입하여 사용하였다(Burnette *et al.*, 1981).

## 결과 및 고찰

### Oregonin의 구조 동정

TLC plate상에서 10%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 FeCl<sub>3</sub> 용액에 의한 발색과 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, MS spectrum data를 기존 문헌(Kim *et al.*, 2005)과 비교하여 각각 일치함을 확인하여 oregonin으로 최종 동정하였다(Fig. 1).

### DPPH, ABTS 프리래디칼 소거능 활성

오리나무 가지 추출물과 이로부터 분리한 oregonin의 항산화 활성을 검정하기 위해서 두 가지 실험 방법인 DPPH 래디칼 소거능과 ABTS 래디칼 소거능 측정법을 통해서 항산화 활성을 양성대조군으로 잘 알려진 강력한 항산화제인 Vitamin C (Xie *et al.*, 2018)와 비교하여 실험을 수행한 결과 IC<sub>50</sub>를 각각 비교하였을 때, 오리나무 가지 주정 추출물은 DPPH 래디칼 소거능은 57.64±0.62  $\mu$ g/ml, ABTS 소거능은 13.18±0.11  $\mu$ g/ml로 각각 측정되었으며, oregonin은 DPPH 래디칼 소거능은 14.46±0.08  $\mu$ g/ml, ABTS 소거능은 4.05±0.04  $\mu$ g/ml로 각각 측정되었고, 양성대조군인 Vitamin C의 DPPH 래디칼 소거능은 18.18±0.10  $\mu$ g/ml, ABTS 소거능은 14.96±0.29  $\mu$ g/ml로 각각 측정된 결과값이 나옴에 따라서 오리나무 가지 추출물과 그로부터 분리한 oregonin은 양성대조군과 비교하였을 때 두 가지 실험에서 모두 매우 강력한 항산화 활성을 나타내었음을 알 수 있었다(Fig. 6, Fig. 7).

### Oregonin의 처리에 의한 oxidative stress-induced apoptosis 유발 분자의 감소효능

HDFDC의 세포독성을 유발하기 위해 처리한 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포사멸을 측정하기 위하여 600  $\mu$ M

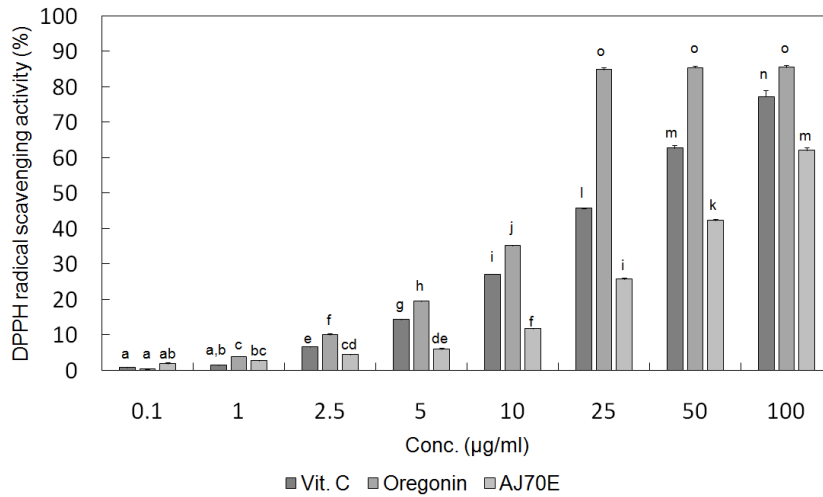


Fig. 6. DPPH radical scavenging activities of oregonin and extract of *A. japonica*. Values were expressed as mean±S.D. of three determinations. Values were expressed as mean ± S.D. of at least three determinations. Values bearing different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

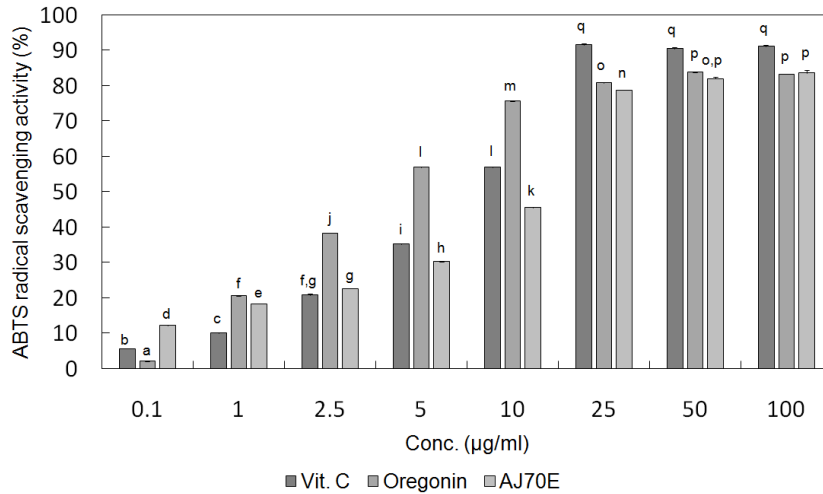


Fig. 7. ABTS radical scavenging activities of oregonin and extract of *A. japonica*. Values were expressed as mean±S.D. of three determinations. Values were expressed as mean ± S.D. of at least three determinations. Values bearing different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

의  $H_2O_2$ 를 세포에 처리하였다. Bax (Bcl-2-associated X protein)는 대표적인 세포사멸 유발단백질 분자로서(Oltvai *et al.*, 1993; Sedlak *et al.*, 1995),  $H_2O_2$ 의 처리는 Bax 분자의 발현을 유의하게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 농도별로 처리한 oregonin은 농도의존적으로 Bax의 발현을 유의하게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 oregonin은 세포 내 활성산소에 의한 스트레스 (oxidative stress) 및 세포사멸을 효과적으로 억제함을 증명하고 있다(Fig. 8).

### Oregonin의 처리에 의한 oxidative stress-induced apoptosis에 대한 억제분자의 증가효능

상기와 동일한 방법으로 HDFDC의 세포독성을 유발하기 위해 처리한 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포사멸을 측정하기 위하여  $600 \mu M$ 의  $H_2O_2$ 를 세포에 처리하였다. Bcl-2는 대표적인 세포사멸 억제에 관여하는 단백질 분자로서(Tsujimoto *et al.*, 1984; Cleary *et al.*, 1986),  $H_2O_2$ 의 처리는 Bcl-2 분자의 발현을 유의하게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 농도별로 처리한 oregonin은 농도의존적으로 Bcl-2의 발현을 유의

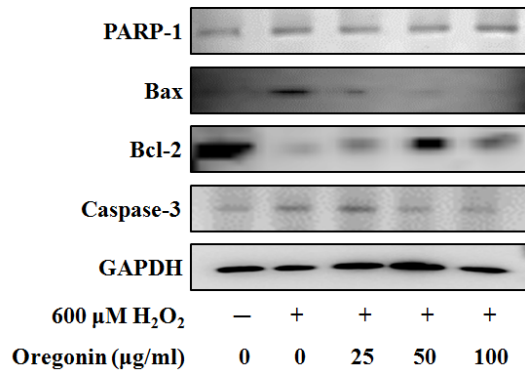


Fig. 8. Inhibitory effects of oregonin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PARP-1, Bax, Bcl-2, and caspase-3 protein expression in HDFDC. Cells (1× 10<sup>5</sup> cells) were pre-incubated with oregonin in various dosage or control medium for 10 min at 37°C, in CO<sub>2</sub> incubator. Then, cells were treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration 600 µ M) and further incubated for 12 hrs. Harvested cells were solubilized with protease inhibitors-contained RIPA buffer and analyzed by western blotting by using PARP-1, Bax, Bcl-2, and caspase-3 specific antibody.

하게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 oregonin은 세포내 활성산소에 의한 스트레스(oxidative stress) 및 세포사멸을 효과적으로 억제함을 증명하고 있다(Fig. 8).

**Oregonin의 처리에 의한 oxidative stress-induced apoptosis에 의해 유도된 PARP-1 단백질의 발현 억제효과**

PARP-1은 세포의 핵에 존재하여 대량의 NAD를 사용하여 표적단백질을 poly-ADP ribosylation을 유도하고 이를 통해 하위 세포사멸에 관여하는 신호전달을 활성화시킨다. 이로 인해 PARP-1의 활성화는 세포사멸의 진행에 대한 지표로 사용되고 있다(Godon *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2003). HDFDC에 처리된 600 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 유의하게 세포내 PARP-1의 발현을 증가시켰고, 이러한 결과는 세포의 세포사멸이 진행되고 있음을 증명하고 있다. 이에 반해 oregonin의 처리는 농도의존적으로 PARP-1의 단백질발현을 유의하게 억제시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 oregonin은 세포내 활성산소에 의한 스트레스(oxidative stress) 및 세포사멸을 효과적으로 억제함을 증명하고 있다(Fig. 8).

**Oregonin의 처리에 의한 oxidative stress-induced apoptosis에 의해 유도된 caspase-3 단백질의 발현억제효과**

Caspase-3는 세포의 세포사멸의 최종단계를 담당하는 분자로서 상기의 다양한 분자들의 발현과 세포신호전달기전을 통해

비가역적인 세포 사멸을 담당하는 단백질이다. 따라서 caspase-3의 활성화 또는 단백질 발현량 증가의 확인은 세포사멸의 진행에 대한 중요한 최종지표로 사용되고 있다(Alnemri *et al.*, 1996; Harrington *et al.*, 2008). HDFDC에 처리된 600 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 유의하게 세포내 caspase-3의 단백질 발현을 증가시켰고, 이러한 결과는 세포의 세포사멸이 최종적으로 진행되고 있음을 증명하고 있다. 이에 반해 oregonin의 처리는 농도의존적으로 caspase-3 단백질 발현을 유의하게 억제시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 oregonin은 세포내 활성산소에 의한 스트레스(oxidative stress) 및 세포사멸을 효과적으로 억제함을 증명하고 있다(Fig. 8).

**적 요**

최근 식품의약품안전처에서 그동안 의약외품으로 분류되었던 '탈모 증상 완화' 관련 제품이 기능성 화장품의 범주에 포함됨에 따라서 관련 산업계에 큰 관심 중 하나라고 할 수 있다. 본 연구에서는 기존 의약품들의 한계점인 부작용의 위험률이 적으면서 탈모를 과학적으로 조절시켜 줄 수 있는 객관적인 근거를 제시할 수 있는 천연물 유래 신소재를 발굴하고자, 오리나무 가지로부터 분리한 oregonin은 강력한 활성산소중 소거능을 가지며 탈모와 연관성이 높은 모유두 세포의 사멸을 명확하게 조절함을 확인하였다. 결론적으로 oregonin을 포함한 오리나무 추출물은 두피에서 발생한 활성산소를 강력하게 제거하는 효능을 기반으로 하여, 산화적 스트레스에 의한 모유두세포의 사멸 억제 및 조절을 통하여 탈모방지 효과를 기대할 수 있는 천연 탈모 방지 및 양모 신소재로서의 개발가능성이 있는 것으로 확인하였다.

**사 사**

이 논문 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2017R1C1 B5016051).

**References**

Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.  
 Alnemri, E.S. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cystein proteases. *J.*

- Cell. Biochem. 64:32-42.
- Boericke, W. 1927. Pocket Manual of Homeopathic Materia Medica with Repertory (Ninth Edition). Boericke & Tafel, INC. Santa Rosa, CA (USA). p. 24.
- Boivin, W.A., H. Jiang, O.B. Utting and D.W.C. Hunt. 2006. Influence of interleukin-1 $\alpha$  on androgen receptor expression and cytokine secretion by cultured human dermal papilla cells. *Exp. Dermatol.* 15:784-793.
- Burnette, W.N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- Choi, S.E. 2013. Chemotaxonomic significance of oregonin in *Alnus* species. *Asian J. Chem.* 25:6989.
- \_\_\_\_\_, K.H. Park, M.H. Kim, J.H. Song, H.Y. Jin and M.W. Lee. 2012. Diarylheptanoids from the Bark of *Alnus pendula* Matsumura. *Nat. Prod. Sci.* 18:106.
- \_\_\_\_\_, M.S. Jeong, M.J. Kang, D.I. Lee, S.S. Joo, C.S. Lee, H. Bang, M.K. Lee, S.C. Myung, Y.W. Choi, K. Lee, S.J. Seo and M.W. Lee. 2010. Effect of topical application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* 19:37-43.
- Clarke, P.G. and S. Clarke. 1995. Historic apoptosis. *Nature* 378:230.
- Cleary, M. L., S.D. Smith and J. Sklar. 1986 Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47:19-28.
- Godon, C., F.P. Cordelieres, D. Biard, N. Giocanti, F. Megnin-Chanet, J. Hall and V. Favaudon. 2008. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.* 36:4454-4464.
- Harrington, H.A., L.K. Ho, S. Ghosh and K.C. Tung. 2008. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor. Biol. Med. Model.* 5:1-15.
- Hatano, T., R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Mori, Y. Fujita, T. Yasuhara, T. Yoshida and T. Okuda. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37:2016-2021.
- Kim, H.J., K.H. Kim, S.H. Yeom, M.K. Kim, J.G. Shim, H.W. Lim and M.W. Lee. 2005. New diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel, *Chin. Chem. Lett.* 16:1337-1340.
- Lee, S.J. 1966. Korea Folk Medicine. Seoul National University Publishing Center Press, Seoul, Korea. p. 40.
- Lim, H.W., M.K. Kim, H.J. Kim, J.G. Shim, G.H. Kim, H.K. Choi and M.W. Lee. 2004. Quantitative determination of diarylheptanoid compounds from Korean *Alnus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 35:384-387.
- Muller, S., J.P. Briand, S. Barakat, J. Lagueux, G.G. Poirier, G. De Murcia and D.A. Isenberg. 1994. Autoantibodies reacting with poly(ADP-ribose) and with a zinc-finger functional domain of poly(ADP-ribose) polymerase involved in the recognition of damaged DNA. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73:187-196.
- Oltvai, Z.N., C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Schultz, N., E. Lopez, N. Saleh-Gohari and T. Helleday. 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 31:4959-4964.
- Sedlak, T.W., Z.N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L.H. Boise, C.B. Thompson and S.J. Korsmeyer. 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *PNASU.* 92:7834-7838.
- Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell and C.M. Croce. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099.
- Xie, G.H., S.E. Choi, M.J. Mun, J.H. Jeong and K.H. Park. 2018. Ameliorative effects of combinative injection of *Ginko biloba* leaves extract and vitamin C on ischemia/reperfusion liver damages model. *Korean J. Plant Res.* 31:268-273.
- Zhap, Z.Q., J.M. Budde, C. Morris, N.P. Wang, D.A. Velez, S. Murak, R.A. Guyton and J.J. Vinten. 2001. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:57-68.

(Received 8 February 2018 ; Revised 16 April 2018 ; Accepted 18 May 2018)