



서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 수벌번데기 추출물의 탈모 개선 효과

김정은, 김도익, 구희연, 김현진, 김성연, 이유범, 문제학¹, 최용수^{2,*}

전남농업기술원 전남곤충잡업연구소 유용곤충연구실, ¹전남대학교 농업생명과학대학 식품공학과,
²농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과 꿀벌육종연구실

Evaluation of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Drone Pupa Extracts on the Improvement of Hair Loss

Jung-Eun Kim, Do-Ik Kim, Hui-Yeon Koo, Hyeon-Jin Kim, Seong-Yeon Kim, Yoo-Beom Lee, Jae-Hak Moon¹ and Yong-Soo Choi^{2,*}

Jeon-nam Agricultural Research & Extension Services, Insect & Sericultural Research Institute, Republic of Korea

¹Department of Food Science & Technology, Chonnam National University

²Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, R.D.A. WanJu-Gun, Iseo-myeon, 55365, Republic of Korea

Abstract

This study evaluate the effect of the *in vitro* male-type prevent hair loss, inflammatory hair loss, and hair growth by the pupal-stage drone extract of honeybee (*Apis mellifera* L.). HFDPC, HaCaT and NIH3T3 cells were excellent in cell proliferation by the drone pupa extract (DPE). As a result of analyzing the gene expression amount related to male pattern hair loss inhibition of the DPE, the cAMP gene decreased by DHT treatment during DPE showed increased activity in all test sections. The TGF-β1 gene, inhibiting cell division and differentiation, was then extremely low in expression when DPE extracted at 50% EtOH was treated, but the IGF-1 gene expression recovered. In addition, as a result of the gene expression test related to the inhibition of inflammatory hair loss of the DPE, the expression of the TNF-α gene was suppressed, and the expression of the IL-6 gene was significantly suppressed in the entire treatment zone ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). In addition, as a result of the caspase-3 gene expression suppression test, the most inhibitory effect was found at 1000 μg/mL concentration of DPE ($p < 0.05$). The collagen type 1 gene expression and inhibitory effect test, it was confirmed that expression was promoted when the DPE was treated at a concentration of 100 μg/mL ($p < 0.01$). In conclusion, DPE extracted from drone pupa at 50% EtOH have a confirmed that it suppresses the expression of genes related to hair loss and promotes the expression of genes conducive to hair growth, thereby expressing functions such as hair loss prevention and hair growth effects.

Keywords

Honeybee Drone's pupa extracts, Hair-loss

서 론

최근 탈모를 겪는 20~30대의 인구가 증가하면서 탈모 관련 전문 제품을 찾는 젊은 층의 인구가 증가함에 따라 탈모 관련 시장도 급격하게 증가되고 있다. 국내 탈모질

환 환자수가 2009년도 18만 명에서 2015년에는 23만 명을 넘었고, 탈모관리 및 치료 시장규모가 약 4조원 가량 형성된 것으로 추정된다(So and Lee, 2019). 이렇듯 현대인들에게 있어 매우 중요한 관심거리이자 고민거리 중 하나로 탈모를 들 수 있다.

모발은 모낭에서 형성되어 모유두 세포에 의해 성장하는데, 모낭이 성장하는 성장기(Anagen, 5~6년), 모낭 성장이 정지되고 모근이 위축되는 퇴화기(Catagen, 2~3주간), 모근이 각화되어 모발이 탈락하게 되는 휴지기(Telogen, 2~3개월) 등의 모발 성장주기(hair cycle)를 거치면서 성장과 자연탈모를 반복한다(Schneider *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). 비정상적인 탈모는 모발성장주기가 짧아지거나 휴지기 모낭 수 증가 및 모발탈락이 과도하게 일어날 때 발생되며, 영양상태, 스트레스, 남성호르몬의 불균형 작용 및 유전적 요인 등 다양한 이유로 나타난다고 알려져 있다. 특히 원인과 유형에 따라 남성형 탈모, 여성형 탈모, 원형탈모 및 감염성 탈모로 분류된다(Lee and Cho, 2014). 탈모에 치료 효과가 있는 약제로는 finasteride와 minoxidil 두 가지 약제만이 미국 FDA 승인을 받았으나, 약제 부작용 등의 이유로 사용이 제한되고 있어 최근 새로운 모발 촉진제의 개발이 활발히 진행되고 있다(Gupta and Foley, 2014).

인간의 발모 및 양모는 각종 세포와 성장인자들에 의하여 촉진 및 억제되는 기작을 가지고 있는 것으로 보고되어 왔으며, 이들 중 인간모유두세포(human hair follicle dermal papilla cell, HFDPC)는 발생학적으로 간엽계에서 유래된 세포로 주위의 상피계 세포의 분열을 조절하는 능력이 있고, 이러한 기능은 성장인자에 의해 조절된다고 알려져 있다(Randall *et al.*, 2001). 현재까지 모낭에서 발현되는 것으로 보고된 성장인자로는 IGF-1 (insulin-like growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), KGF (keratinocyte growth factor) 및 FGF-1 (fibroblast growth factor) 등이 있으며(Philpott *et al.*, 1994; McElwee *et al.*, 2004), 내분비계인자 중 TGF- β 1은 모발 성장기(anagen)에 영향을 미쳐 빨리 퇴행기로 접어들게 하여 탈모를 유도하고, IGF-1, TGF- β 2, EGF 및 FGF 등의 성장인자는 모발의 성장을 촉진하며, 모발세포의 퇴화를 방지하는 것으로 알려져 있다(Jiang *et al.*, 1995). 최근에는 성장인자 중 하나인 vascular endothelial growth factor (VEGF)를 이용하여 모낭 주위에 새로운 혈관을 형성시켜 혈액순환을 촉진시킴으로써 탈모를 개선한다는 보고도 있다(Kwon *et al.*, 2007). 이러한 growth factor들 이외에 cytokines인 IL-1과 TNF가 모발세포의 세포사를 유발하여 탈모를 일으킨다는 보고도 있다(Hoffmann *et al.*, 1996).

꿀벌은 전 세계적으로 분포된 곤충으로서 우리나라에

서는 동양종 꿀벌(*Apis cerana* F.)과 서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.)이 사육되고 있다. 최근 한국농촌경제연구원의 실태조사(2020)한 결과, 국내 양봉농가의 수는 24,629 농가로서 약 238만 봉군을 사육하고 있으며 연간 매출액은 5,527억원 정도이다. 그러나 기후변화 등에 의한 벌꿀 생산성이 감소하면서 농가의 소득불안정이 계속되고, 꿀벌의 수벌번데기가 식용곤충으로 이용가능성이 대두되면서 국내 연구진들에 의해 수벌번데기를 식품원료로의 이용가능성이 검토되었다(Choi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2018). 꿀벌의 수벌은 양봉산물의 생산활동에 기여하지 않고, 여왕벌과의 교미에만 이용되며 벌집 내 꿀을 소비하기 때문에 농가에서는 자연적으로 발생하는 수벌번데기를 폐기처분하고 있다(Kim *et al.*, 2018b). 경제적 가치가 전혀 없는 수벌번데기를 가공·이용할 경우 양봉농가의 신소득원으로 활용이 가능할 것이다. 곤충에는 여러 가지 유용단백질을 가지고 있어 다양한 생리활성을 기대할 수 있다. 지금까지 곤충을 소재로 한 미용제품으로 애기뿔소뿔구리의 코프린신(CopA3) (Kim *et al.*, 2014)과 왕지네의 스콜라펜드라신(Scolopendrasin) (Park *et al.*, 2019)이라는 항균펩타이드를 이용한 제품과 왕귀뚜라미의 테레오그릴루신 2(Teleogryllusine 2) (특허등록 제 1019538340000호, 2019)라는 polypeptide, 누에의 sericin (Kozo *et al.*, 2005) 단백질을 이용한 제품 및 갈색거저리(Kim *et al.*, 2018a)를 이용한 피부미백 화장품 등이 있으나, 아직까지 곤충을 소재로 한 탈모개선용 제품 개발은 이루어지지 않았다. 수벌번데기는 국내 농가로부터 대량 생산이 가능하기 때문에 단순히 1차 생산 및 판매에 의존할 것이 아니라, 수벌번데기의 기능성 구명에 대한 다양한 과학적 근거를 마련하여 고부가 농업을 위한 제품다양화로 시장을 활성화 시킬 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 수벌번데기를 대상으로 미용분야에 활용성을 창출하기 위해 그 기능성을 구명하고 탈모 개선용 미용소재로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험재료

전라남도 곤충잡업연구소에서 사육 중인 서양종꿀벌을 이용하여 16~20일령 사이의 수벌번데기를 2016년 4월부터 9월 초까지 생산하였으며, 모든 시험재료는 동결

건조하여 가정용 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 100 mesh 로 분쇄한 가루를 선별하여 시험분석하였다. 수벌번데기 동결건조 분말 100 g을 50% EtOH 2L로 실온에서 24시간 shaking 추출한 후 이를 여과한 다음 다시 동일한 과정을 2회 반복 추출하였고 총여과액을 회전감압농축기를 이용하여 농축한 다음 다시 동결건조하여 시험에 사용하였다.

2. 세포배양

HFDPC (Human follicle dermal papilla cells)는 Promo Cell (Heidelberg, Germany)에서 구입하였으며, 전용배지인 Follicle Dermal Papillar Cell Growth Medium (Ready-to-use) (Cat. No. C-26501)을 3일에 한 번씩 계대배양하였다. HaCaT (Human keratinocyte)와 NIH3T3 (Mouse fibroblast cell)는 ATCC (USA)를 통해 구입하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone) 및 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 DMEM 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Hyclone, Dallas, TX, USA)를 이용하여 3일에 한 번씩 계대배양하였다. 세포는 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 배양하여 사용하였다.

3. 세포독성 (MTS assay)

96-Well plate에 HFDPC, HaCaT 및 NIH3T3 세포를 1×10^4 cells/mL의 농도가 되도록 seeding하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 다음날 HFDPC 세포배양배지에 수벌번데기 추출물을 0, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하고, HaCaT 세포에는 0, 500, 1000, 2000 µg/mL 농도로 처리하였으며, NIH3T3 세포에는 0, 100, 200, 400 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양 후에 CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (MTS) (Promega, USA) 10 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 2시간 추가 배양하였다. Microplate reader (EPOCH2, BioTek, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 무처리군의 세포 생존율 대비 각 농도 별 세포 생존율을 구하였다.

4. 세포증식 효능 (MTS assay)

96-Well plate에 HFDPC, HaCaT 및 NIH3T3 세포를 1×10^4 cells/mL의 농도로 seeding하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 다음날 HFDPC 세포배양배지에는 수벌번데기 추출물을 0, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하고 동시

에 DHT (5 α -dihydrotestosterone)를 10 µM이 되도록 가하여 혼합배양하였다. 그리고 HaCaT 세포에는 수벌번데기 추출물을 0, 500, 1000, 2000 µg/mL 농도로 처리한 후 LPS (lipopolysaccharide)를 400 ng/mL 농도로 처리하였으며, NIH3T3 세포에는 수벌번데기 추출물을 0, 100, 200, 400 µg/mL 농도로 처리하고 TBM (tolbutamide)을 410 mM 농도로 처리하여 각각 24시간 배양 후에 CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (MTS) (Promega, USA) 10 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 2시간 추가 배양하였다. Microplate reader (EPOCH2, BioTek, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 무처리군의 세포 생존율 대비 각 처리구별 세포 생존율을 구하였다.

5. 남성형 탈모 예방 효능 평가(TGF- β 1, IGF-1, cAMP 유전자 발현)

6-Well plate에 HFDPC를 1×10^6 cells/mL의 농도로 seeding하고, well 내의 세포가 well 면적의 80~90%가 될 때까지 배양하였다. 10 µM의 DHT (5 α -dihydrotestosterone)가 포함된 배지에 시료를 농도별(0, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리하고 24시간 배양 후에 세포 및 배지를 수거하였다. 세포는 trizol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 microplate reader (EPOCH2, BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. RT-qPCR은 AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix (BioNeer)를 사용하여 Real-time PCR machine (Applied Biosystems, Thermo)을 이용하여 amplification (denaturation: 15 sec at 95°C, annealing: 15 sec at 54°C, extension: 15 sec at 72°C, 40 cycle)의 조건으로 실시하였다. 결과로 얻어진 C(t)값은 GADPH의 C(t)값으로 보정하여 음성대조군 대비 유전자 발현량을 상대 정량하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

6. 염증성 탈모 예방 효능 평가(Caspase-3, IL-6, TNF- α 유전자 발현)

6-Well plate에 HaCaT 세포를 1×10^6 cells/mL의 농도로 seeding하고, well 중의 세포가 well 면적의 80~90%가 될 때까지 배양하였다. 400 ng/mL의 LPS (lipopolysaccharide)가 포함된 배지에 DPE를 농도별(0, 50, 100, 200 µg/mL)

Table 1. Primer sequences of qPCR for detection of hair loss prevention related genes

Gene		Sequence for Primers (5'-3')
TGF-β1	Forward	GGC TAC TTT GCC AAC TAC TGC
	Reverse	CTG CTC CAC CTT GTG TTG C
IGF-1	Forward	TCG CAT CTC TTC TAT CTG GCC CTG T
	Reverse	GCA GTA CAT CTC CAG CCT CCT CAG A
cAMP	Forward	GCA CAG GAG CAC AAC ATC AG
	Reverse	CTC ATC TAC GTG CTC ATC GTG
Caspase-3	Forward	CTG CTG GGG ATG GCC ACT GTG
	Reverse	TCG CCT CGA GGA CAT CGC TCT C
IL-6	Forward	GGA GAC TTG CCT GGT GAA AA
	Reverse	GTC AGG GGT GGT TAT TGC AT
TNF-α	Forward	CGG GCA GGT CTA CTT TGG AG
	Reverse	CAG GTC ACT GTC CCA GCA TC
GADPH	Forward	CCA GGC GCC CAA TAC G
	Reverse	CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT
Collagen type I (mouse)	Forward	AGC TTT GTG GAT ACG CGG AC
	Reverse	TAG GCA CGA AGT TAC TGC AAG
β-Actin (mouse)	Forward	GAA GCT GTG CTA TGT TGC TCT A
	Reverse	ATG CCA CAG GAT TCC ATA CCC

로 처리하고 24시간 배양 후에 세포 및 배지를 수거하였다. 세포의 total RNA 추출 및 RT-qPCR 분석 등은 남성형 탈모 예방 효능 평가 항과 동일한 방법으로 수행하였다.

시험군 간의 유의성을 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하여 분석하였다(유의수준: $p < 0.05$).

7. 양모 효능 평가(collagen type I 유전자 발현)

6-Well plate에 NIH3T3를 1×10^6 cells/mL의 농도로 seeding하고 well 중의 세포가 well 면적의 80~90%가 될 때까지 배양하였다. 410 mM의 TBM을 포함한 배지에 시료를 농도별(0, 100, 200, 400 μg/mL)로 처리하고 24시간 배양 후에 세포 및 배지를 수거하였다. 세포의 total RNA 추출 및 RT-qPCR 분석 등은 남성형 탈모 예방 효능 평가 항과 동일한 방법으로 수행하였다.

8. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 모든 자료들은 평균과 표준오차로 나타내었으며 SPSS (SPSS Version 20.0 Inc. U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시(유의수준: $p < 0.05$)하여 control group에 대한 각

결과 및 고찰

1. 남성형 탈모 예방 효과

1) 세포독성 및 세포증식 효능

수벌번데기 추출물의 사람 모낭 진피 모유두 세포(HFDPC)에 대한 세포독성을 시험하였다(Fig. 1). HFDPC에 수벌번데기 추출물을 0, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 200 μg/mL 이하 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 따라서 200 μg/mL를 최고농도로 하여 수벌번데기 추출물이 HFDPC의 증식에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 2). 50% EtOH을 용매로 하여 추출한 수벌번데기 추출물을 농도별로 세포배지에 처리한 후 남성형 탈모 유도제인 DHT (5α-dihydrotestosterone)를 처리하여 세포를 배양한 결과, 수벌번데기 추출물 50~200 μg/mL 농도

에서 세포증식 효과가 양성대조구(minoxidil 처리구)와 유사하게 유의적으로 개선되었다($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$). HFDPC는 모낭 기저의 모유두에 위치하여 모발성장을 유도하고 유지해주는 세포층이며 안드로겐 수용체를 발현한다(PromoCell 매뉴얼). 안드로겐성 탈모로 알려진 남성형 탈모는 남성호르몬인 testosterone이 주된 원인으로 작용하며, 이 호르몬이 모낭에 도달시 모근 세포 내에 존재하는 5 α -reductase에 의해 더욱 강력한 대사체인 5 α -dihydrotestosterone (DHT)으로 전환된다(Lee *et al.*, 2010). 이 DHT는 모낭에서 단백질합성을 저해하여 모낭 세포의 사멸을 초래해 탈모로 이어진다고 알려져 있다

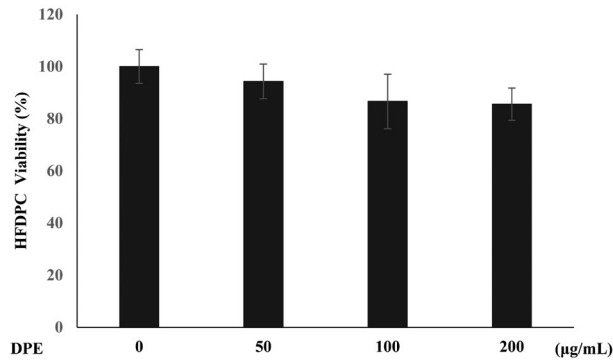


Fig. 1. Cytotoxicity of drone pupa extracts (DPE) on HFDPC (8×10^3 cells/well) cells (n = 3). Different concentration of DPE by extraction 50% EtOH (50, 100, 200 µg/mL) were treated for 24 hours in 8×10^3 cells/well HFDPC cells. Control means normal control group (extraction solvents). Data were expressed as means \pm SD.

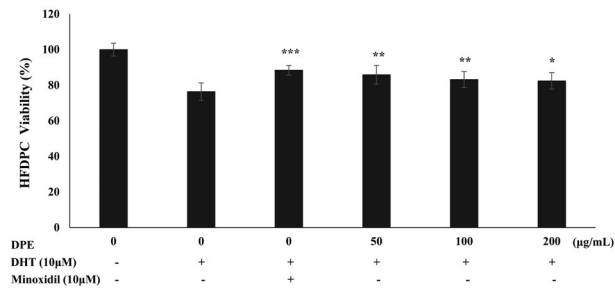


Fig. 2. Effect of mixture with 5 α -dihydrotestosterone (DHT) (10 µM) and DPE by extraction of 50% EtOH (50, 100, 200 µg/mL) on HFDPC cell viability. Extraction solvent as normal control group. DHT (10 µM) as negative control group. Minoxidil (10 µM) as positive control group. The HFDPC cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The ELISA results demonstrate that DPE decreased the number of HFDPC cells. Data were expressed as means \pm SD. Significant differences are indicated with one asterisk at $p < 0.05$, with two asterisks at $p < 0.01$ and with three asterisks at $p < 0.001$ by Dunnett's t-test.

(Lee *et al.*, 1994). 본 연구 결과, DHT에 노출된 세포는 수벌번데기 추출물 처리 시 HFDPC 세포증식이 확인되어 남성형 탈모 개선에 효과가 있음이 확인되었다.

2) HFDPC Cell을 이용한 cAMP, TGF- β 1 및 IGF-1의 발현

HFDPC에 수벌번데기 추출물과 DHT를 동시처리하여 배양한 세포에서 남성형 탈모와 관련된 모발성장 촉진 및 억제인자 등의 유전자 발현량을 상대 정량하여 비교하였다. HFDPC에 수벌번데기 추출물과 남성형 탈모를 유발하는 DHT를 동시처리하여 모발 성장기 관련 cAMP (cyclic adenosine monophosphate)의 활성 회복 정도를 분석한 결과, DHT만을 처리한 HFDPC는 대사가 감소되어 cAMP의 발현이 억제되었음이 확인되었고, DHT와 수벌번데기 추출물을 동시처리한 모든 군에서 cAMP 활성이 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이어 HFDPC에서 모낭세포과피와 관련된 TGF (transforming growth factor)- β 1의 생성량을 확인하였다(Fig. 4). 그 결과, HFDPC에 DHT만을 처리했을 때 모유두세포는 TGF- β 1을 생성하여 세포의 분열 및 분화를 억제하게 되는데, 모유두세포에서 DHT에 의해 TGF- β 1의 발현량이 증가한 것을 확인하였고, 수벌번데기 추출물과 DHT를 동시처리한 처리구 중 100~200 µg/mL 구간에서 생성억제 효능을 보였다. 또한 HFDPC에서 모발성장촉진인자인 IGF1 (insulin growth factor 1)의 생성량을 확인하였다(Fig. 5). DHT 처리에 의해 HFDPC는 IGF-1 생성량이 감소되어 분열 및 분화가 억제되는데, 수벌번데기 추출물과 DHT를 동시처리했을

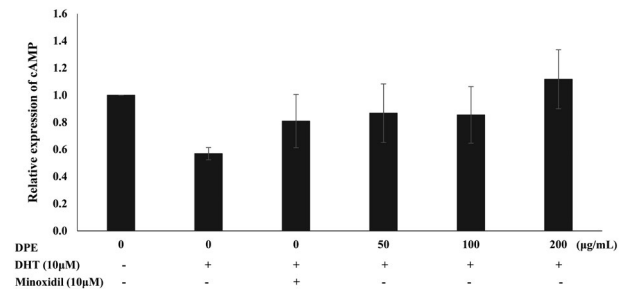


Fig. 3. Effect of mixture with DHT (10 µM) and DPE by extraction of 50% EtOH (50, 100, 200 µg/mL) on cAMP induced HFDPC. Extraction solvent as normal control group. DHT (10 µM) as negative control group. Minoxidil (10 µM) as positive control group. The HFDPC cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The qPCR results demonstrate that DPE induced the secretion of cAMP in HFDPC cells. Data were expressed as means \pm SD.

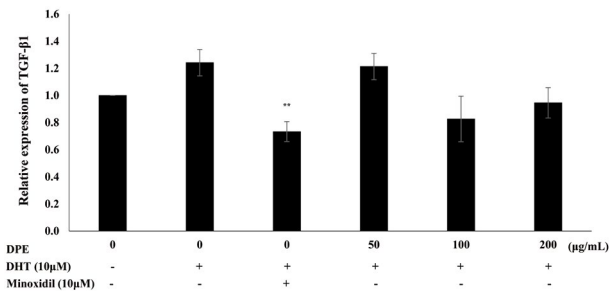


Fig. 4. Effect of mixture with DHT (10 μM) and DPE by extraction of 50% EtOH (50, 100, 200 μg/mL) on TGF-β1 induced HFDPC. Extraction solvent as normal control group. DHT (10 μM) as negative control group. Minoxidil (10 μM) as positive control group. The HFDPC cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The qPCR results demonstrate that DPE suppressed the secretion of TGF-β1 in HFDPC. Data were expressed as means ± S.D. Significant differences are indicated with two asterisks at $p < 0.01$ by Dunnett's t-test.

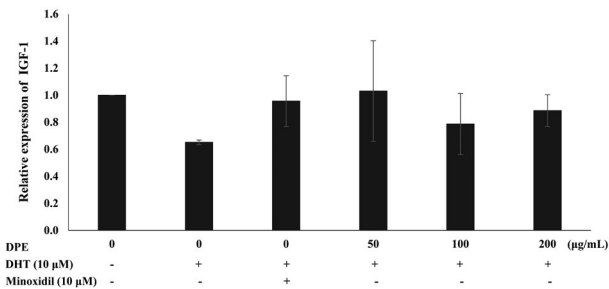


Fig. 5. Effect of mixture with DHT (10 μM) and DPE by extraction of 50% EtOH (50, 100, 200 μg/mL) on IGF-1 induced HFDPC. Extraction solvent as normal control group. DHT (10 μM) as negative control group. Minoxidil (10 μM) as positive control group. The HFDPC cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The qPCR results demonstrate that DPE induced the secretion of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in HFDPC cells. Data were expressed as means ± SD.

때 전 처리구간에서 생성능이 회복되는 것을 확인하였다. 그러나 세 가지 인자 모두 유의적인 차이를 보이지 않아 수벌번데기 추출물의 남성형 탈모 예방 효과는 약간 개선되는 경향을 나타내었다.

2. 염증성 탈모 예방 효과

1) 세포독성 및 세포증식 효능

수벌번데기 추출물의 사람 모모세포(human Keratinocyte, HaCaT cell)에 대한 세포독성을 평가하였다(Fig. 6). HaCaT 세포에 수벌번데기 추출물을 0, 500, 1000, 2000 μg/mL 농도로 처리 시 2000 μg/mL 이하 농도에서 세포 독성을 보이지 않아 이를 최고농도로 하여 수벌번데기 추

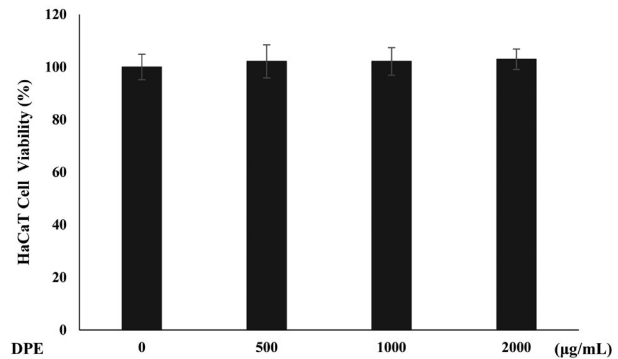


Fig. 6. Cytotoxicity of DPE on HaCaT (8×10^3 cells/well) cells ($n = 3$). Different concentration of DPE by extraction of 50% EtOH (500, 1000, 2000 μg/mL) were treated for 24 hr in 8×10^3 cells/well HaCaT cells. Control means normal control group (extraction solvents). Data were expressed as means ± SD.

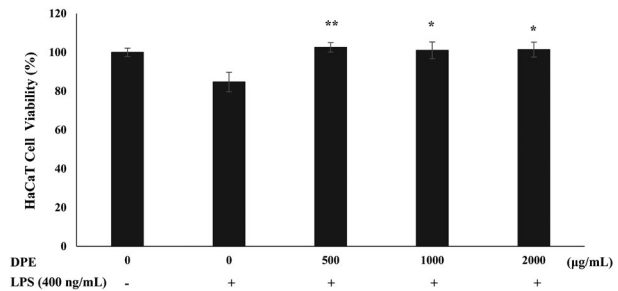


Fig. 7. Effect of mixture with lipopolysaccharide (LPS) (400 ng/mL) and DPE by extraction of 50% EtOH (500, 1000, 2000 μg/mL) on HaCaT cells viability. Extraction solvent as normal control group. LPS (400 μg/mL) as negative control group. The HaCaT cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The ELISA results demonstrate that DPE decreased the number of HaCaT cells. Data were expressed as means ± SD. Significant differences are indicated with one asterisk at $p < 0.05$ and with two asterisks at $p < 0.01$ by Dunnett's t-test.

출물이 HaCaT 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 7). 50% EtOH을 용매로 하여 추출한 수벌번데기 추출물을 농도별로 세포배지에 처리한 후 동시에 염증유도제인 LPS (lipopoly-saccharide)를 처리하여 세포를 배양한 결과, 수벌번데기 추출물을 동시처리한 모든 농도에서 세포증식이 유의적으로 개선되는 것을 확인하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$). HaCaT 세포는 피부 표피층에 존재하여 각질을 형성하며, 다양한 자극에 의해 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등 여러 cytokine을 분비함으로써 염증반응 및 면역반응에 관여하고, 이때 세포분열 억제에 의한 위축모를 만들거나 심각한 성장기성 탈모를 일으킨다(조와 최, 2006; Beissert *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2017).

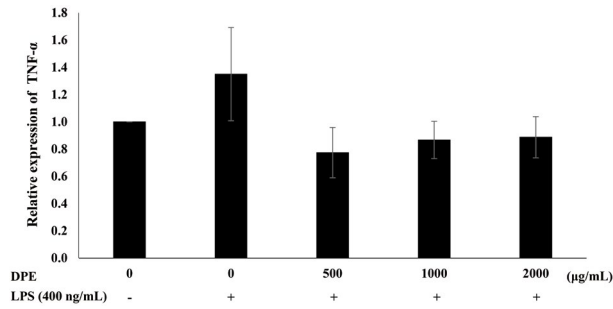


Fig. 8. Effect of mixture with LPS (400 ng/mL) and DPE by extraction of 50% EtOH (500, 1000, 2000 μg/mL) on TNF-α induced HaCaT cells. The HaCaT cells were cultured with presence or absence of DPE for 8 hr, followed by TNF-α. The qPCR results demonstrate that DPE suppressed the secretion of TNF-α in HaCaT cells. Data were expressed as means ± SD.

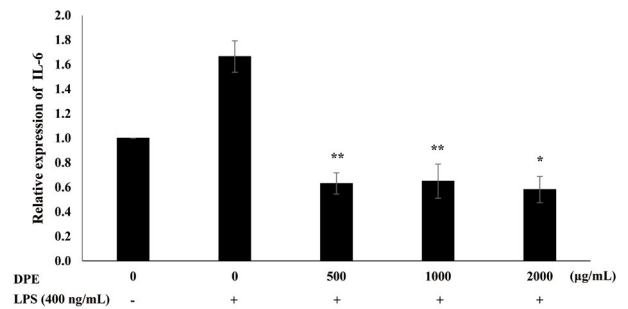


Fig. 9. Effect of mixture with LPS (400 ng/mL) and DPE by extraction of 50% EtOH (500, 1000, 2000 μg/mL) on IL-6 induced HaCaT cells. The HaCaT cells were cultured with presence or absence of DPE for 8 hr, followed by IL-6. The qPCR results demonstrate that DPE suppressed the secretion of IL-6 in HaCaT cells. Especially, almost sample of DPE were significantly suppressed IL-6 secretion. Data were expressed as means ± SD. Significant differences are indicated with one asterisk at $p < 0.05$ and with two asterisks at $p < 0.01$ by Dunnett's t-test.

2) HaCaT Cell을 이용한 TNF-α, IL-6 및 Caspase-3 발현

HaCaT 세포에 수벌번데기 추출물과 LPS를 동시처리하여 배양한 세포에서 염증성 탈모 억제 효능을 비교 분석하고자 모낭파괴 및 세포사를 유발하는 유전자 발현량을 상대 정량하여 비교하였다. 세포사 유도에 따른 염증성 탈모 시 발현되는 TNF (tumor necrosis factor)-α의 유전자 발현은 LPS만을 처리한 HaCaT 세포에서 TNF-α의 생성이 증가되었고, LPS와 수벌번데기 추출물을 동시처리한 모든 농도에서 TNF-α의 발현이 억제효능이 있음이 확인되었다(Fig. 8). 이어 HaCaT 세포에서 모낭세포 파괴와 관련된 IL (interleukin)-6의 생성량을 확인하였다(Fig. 9). LPS만을 처리한 HaCaT 세포는 IL-6의 발현이 증가하였고, 수벌번데기 추출물과 함께 첨가하여 배양한 세포에서는 수벌번데기 추출물의 모든 농도처리구간에서 유의적으로 생성억제 효능을 보였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$). 또한 세포사와 관련된 caspase-3의 생성량을 확인한 결과(Fig. 10), LPS 처리구에서는 caspase-3 생성량이 증가되었고, 수벌번데기 추출물의 500~1000 μg/mL 농도에서 유의적으로 억제($p < 0.05$)되어 수벌번데기 추출물은 염증에 의한 탈모 예방에 효과를 나타내었다.

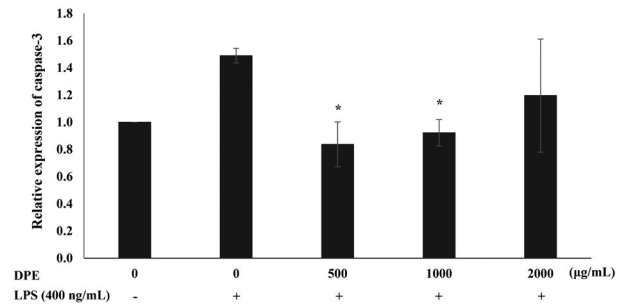


Fig. 10. Effect of mixture with LPS (400 ng/mL) and DPE by extraction of 50% EtOH (500, 1000, 2000 μg/mL) on caspase-3 induced HaCaT cells. The HaCaT cells were cultured with presence or absence of DPE for 8 hr, followed by caspase-3 treatment. The qPCR results demonstrate that DPE suppressed the secretion of caspase-3 in HaCaT cells. Especially, 500 μg/mL DPEs were significantly suppressed caspase-3 secretion. Data were expressed as means ± SD. Significant differences are indicated with one asterisk at $p < 0.05$ by Dunnett's t-test.

3. 양모 효능

1) 세포독성 및 세포증식 효능

수벌번데기 추출물의 쥐 섬유아세포(mouse fibroblast cell, NIH3T3 cell)에 대한 세포독성을 시험하였다(Fig. 11). NIH3T3 세포에 수벌번데기 추출물을 0, 100, 200,

400 μg/mL 농도로 처리 시 100 μg/mL 이하 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 또한 수벌번데기 추출물이 NIH3T3 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 12), 유사분열억제제인 TBM (tolbutamide)을 세포에 처리하였을 때 NIH3T3 세포의 증식은 감소되었으나, 수벌번데기 추출물을 함께 처리하였을 때는 특히 수벌번데기 추출물의 100 μg/mL 농도 처리구에서 세포증식이 촉진되는 것을 확인하였다. 일반적으로 모발생장은 두피 모세혈관의 혈액순환에 의해 모근 상피세포에 영양이 공급되어 육모가 촉진되고, 굵고 건강한 모발로 성장을 유도한다(Choi *et al.*, 1999; Hue *et al.*, 2005). 또한 탈모치료제인

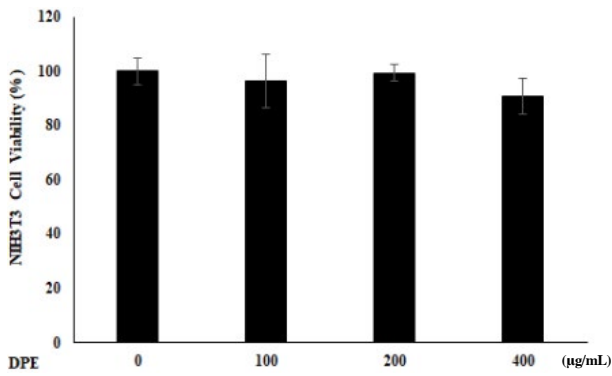


Fig. 11. Effect of DPE by extraction of 50% EtOH (100, 200, 400 µg/mL) on NIH3T3 cells viability. The NIH3T3 cells were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The ELISA results demonstrate that DPE decreased the number of NIH3T3 cells. Data were expressed as means ± SD.

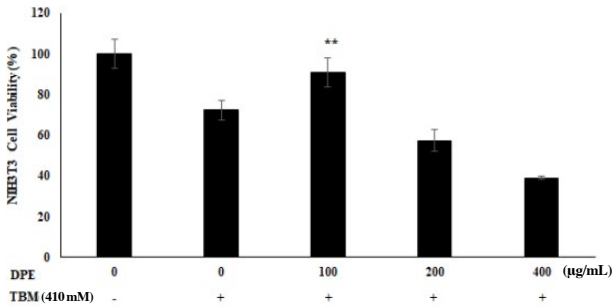


Fig. 12. Effect of mixture with tolbutamide (TBM) (410 mM) and DPE by extraction of 50% EtOH (100, 200, 400 µg/mL) on induced NIH3T3 fibroblasts viability. The NIH3T3 fibroblasts were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The ELISA results demonstrate that DPE decreased the number of NIH3T3 fibroblasts. Especially, 100 µg/mL DPEs were similarly induced comparison with control NIH3T3 fibroblasts. Data were expressed as means ± SD. Significant differences are indicated with two asterisk at $p < 0.01$ by Dunnett's t-test.

minoxidil은 K^+ channel에 작용하여 혈관을 팽창시키고 모발성장 효과를 나타내며, K^+ channel이 막히면 NIH3T3 세포의 증식이 저해된다고 알려져 있다(Sanders *et al.*, 1996). 따라서 수벌번데기 추출물에 의한 NIH3T3 세포의 증식은 K^+ channel open과 혈관 확장 촉진 효과를 추정해 볼 수 있으나, 이는 추가적으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

2) NIH3T3 Cell을 이용한 Collagen Type 1 발현

섬유아세포는 피부의 진피층에 존재하여 콜라겐을 생성하고 엘라스틴, glycosaminoglycan 및 당단백 등과 함께 extracellular matrix를 구성하며, 자외선, 스트레스 등

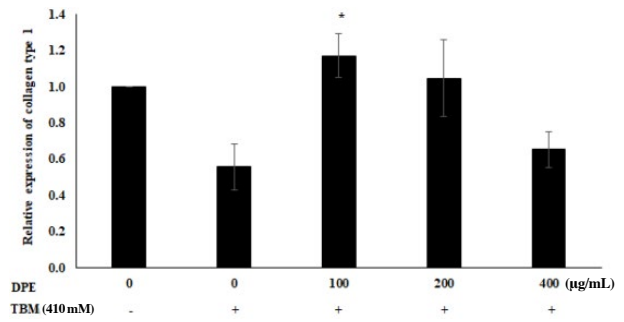


Fig. 13. Effect of mixture with tolbutamide (TBM) (410 mM) and DPE by extraction of 50% EtOH (100, 200, 400 µg/mL) on induced NIH3T3 fibroblasts viability. The NIH3T3 fibroblasts were cultured with presence or absence of DPE for 24 hr. The ELISA results demonstrate that DPE decreased the number of NIH3T3 fibroblasts. Especially, 100 µg/mL DPEs were similarly induced comparison with control NIH3T3 fibroblasts. Data were expressed as means ± SD. Significant differences are indicated with two asterisk at $p < 0.01$ by Dunnett's t-test.

내외부 작용에 의한 피부노화와 연관되어진다(Shin *et al.*, 2013). 두피의 노화는 모발 두께 감소, 모발 탄력저하, 모발 푸석거림, 백모 및 탈모 등을 야기시킨다(Peters *et al.*, 2006). Collagen type 1은 척추동물에서 가장 풍부한 단백질로 뼈, 힘줄 및 인대 등 약 90%를 차지한다고 알려져 있다(Amiel *et al.*, 1984; Fawcett and Raviola, 1994). NIH3T3 세포에 수벌번데기 추출물과 TBM을 함께 처리하여 배양한 세포에서 양모 효능을 확인하고자 collagen type 1 유전자 발현량을 상대 정량하여 비교하였다(Fig. 13). NIH3T3 세포에서 collagen type 1의 유전자 발현량은 TBM만을 처리한 세포에서 그 발현이 감소되나, TBM과 수벌번데기 추출물을 함께 첨가하여 배양된 처리구 중 수벌번데기 추출물의 100 µg/mL 농도에서 collagen type 1의 발현이 증가되는 것이 확인되었다. 이와 같은 결과로부터 수벌번데기 추출물이 탈모 예방 외 양모효능이 있어 모발이 잘 자라는 데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 수벌번데기 추출물의 탈모개선 효능을 검증하기 위해 HFDPC, HaCaT 및 NIH3T3 세포를 이용한 *in vitro* 시험을 수행하였다. 수벌번데기 추출물의 남성형 탈모억제 관련 유전자 발현량 분석결과, 수벌번데기추출물의 처리시 DHT처리에 의해 감소되었던 cAMP 및 IGF-1 유전자가 모든 시험구간에서 증가되어 활성 회복능을

보였고, 세포의 분열 및 분화를 억제시키는 TGF- β 1 유전자의 발현은 감소되는 경향이였다. 염증성 탈모 억제관련 유전자 발현 시험 결과, 수벌번데기 추출물에 의해 세포의 TNF- α 유전자의 발현이 억제되었고, IL-6 유전자의 발현은 모든 처리구에서 유의적으로 억제되었으며 ($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$), caspase-3 유전자는 500~1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 가장 억제 효과가 높았다 ($p < 0.05$). 또한, 양모 효과와 관련된 collagen type 1 유전자 발현 시험 결과, 수벌번데기 추출물을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 경우 가장 효과적인 양모 효과가 있는 것으로 확인되었다 ($p < 0.01$). 이상과 같이 수벌번데기를 50% EtOH로 추출한 수벌번데기 추출물은 탈모개선 및 양모 효과 등의 기능성을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 결론적으로 수벌번데기 추출물이 탈모개선과 같은 기능성 화장품의 원료로서 활용 가능성이 있음이 시사되었다. 이와 관련하여 이러한 기능성을 나타내는 지표성분에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 보다 더 과학적인 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 수벌번데기는 식품원료뿐만 아니라 미용소재로의 이용 등 다양한 목적으로 활용이 가능한 우수한 양봉산물로 기대되고, 생산, 유통 및 가공 등을 통해 이용성이 제고된다면 양봉농가 소득향상에 기여할 수 있는 새로운 중요한 양봉산물로 자리매김할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- 조성일, 최주미, 2006. 두피 & 탈모관리학 p. 224.
- Amiel, D., C. Frank, F. Harwood, J. Fronck and W. Akeson. 1984. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J. Orthop. Res.* 1: 257-265.
- Beissert, S., I. Cavazzana, F. Mascia, P. Meroni, S. Pastore, G. Tessari and G. Girolomoni. 2006. Mechanisms of immune-mediated skin diseases: An overview. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24: S1.
- Choi, S. M., D. Y. Kim, Y. A. Park, M. K. Lee, H. S. Song, O. S. Kwun, S. Y. Lim, H. J. Pae, D. H. Shin, J. Y. Kim, H. S. Kim, S. J. Kwack, M. Y. Ahn, Y. S. Choi and B. M. Lee. 1999. Hair growth effects of Sangmosu in mice. *Yakhak Hoeji.* 43: 351-357.
- Choi, Y. S., M. L. Lee, M. Y. Lee, H. K. Kim, K. G. Lee, J. H. Yeo and S. O. Woo. 2009. Management for high quality drone products. *Conf. Apic. Soci. Kor. Program and abstract book.* p. 23.
- Fawcett, D. W. and E. Raviola. 1994. 12th ed. Chapman and Hall; New York. Bloom and Fawcett, a textbook of histology.
- Gupta, A. K. and K. A. Foley. 2014. 5% Minoxidil: treatment for female pattern hair loss. *Skin Ther. Newslett* 19(6): 5-7.
- Hoffmann, R., W. Eicheler, A. Huth, E. Wenzel and R. Happle. 1996. Cytokines and growth factors influence hair growth in vitro. Possible implications for the pathogenesis and treatment of alopecia areata. *Arch. Dermatol. Res.* 288(3): 153-156.
- Hue, J. J., L. Li, S. H. Lyu, I. J. Baek, J. M. Yon and S. Y. Nam. 2005. Effect of Hwanggungung, a natural product, on hair growth promotion in C57BL6 mice. *Yakhak Hoeji* 49: 518-526.
- Jiang, H., S. Yamamoto and R. Kato. 1995. Induction of anagen in telogen mouse skin by topical application of FK506, a potent immunosuppressant. *J. Investig. Dermatol.* 104(4): 523-525.
- Kim, D. H., H. H. Kim, H. J. Kim, H. G. Jung, J. M. Yu, E. S. Lee and B. J. An. 2014. CopA3 peptide prevents ultraviolet-induced inhibition of type-I procollagen and induction of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Molecules* 19(5): 6407-6414.
- Kim, J. J., K. S. Kim and B. J. Yu. 2018a. Optimization of antioxidant and skin-whitening compounds extraction condition from *Tenebrio molitor* Larvae (Mealworm). *Molecules* 23(9): 2340.
- Kim, S. G., S. O. Woo, K. W. Bang, H. R. Jang and S. M. Han. 2018b. Chemical composition of drone pupa of *Apis mellifera* and its nutritional evaluation. *J. Apic.* 33(1): 17-23.
- Kozo, T., I. Yumiko, T. Yoko and Y. Hiromi. 2005. Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(2): 403-405.
- Kwon, O. S., J. H. Han, H. G. Yoo, J. H. Chung, K. H. Cho, H. C. Eun and K. H. Kim. 2007. Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine* 14(7): 551-555.
- Lim, E. G., G. T. Kim, B. M. Kim, E. J. Kim, S. Y. Kim, N. K. Han, J. S. Ha and Y. M. Kim. 2017. Study of antimicrobial activities and anti-inflammatory effects of chamomile (*Matricaria chamomilla*) extracts in HaCaT cells. *KSBB J.* 32: 9-15.
- Lee, W. R., K. H. Kim, H. J. An, J. Y. Kim, S. M. Han, K. G. Lee and K. K. Park. 2014. The effects of bee venom on tumor necrosis factor (TNF)- α induced inflammatory human HaCaT keratinocytes. *Korean J. Pharmacognosy* 45: 256-261.
- Lee, W. S., J. Chung, S. H. Lee and S. K. Ahn. 1994. Immunohistochemical comparison of androgen receptor expression from lesional and non-lesional scalp of androgenetic alopecia. *Korean J. Dermatology* 32(5): 848-852.
- Lee, C. S., Y. E. Kim and A. S. Lee. 2010. A study on the soybean effects for hair loss treatment. *J. Beauty Industry* 1(1): 1-18.

- Lee, N. J. and H. B. Cho. 2014. The latest patent trends in Korea with related to the health of hair. *Asian J. Beauty Cosmetol.* 12(1): 133-138.
- McElwee, K. J., A. Huth, S. Kissling and R. Hoffmann. 2004. Macrophage-stimulating protein promotes hair growth ex vivo and induces anagen from telogen stage hair follicles in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 123(1): 34-40.
- Park, H. S., T. J. Kim, S. Y. Park and H. T. Kim. 2019. A clinical study for the efficacy and safety of functional cosmetics containing peptide scolopendrasin-I isolated from the scolopendra subspinipes mutilansin patients with dry skin due to mild atopic dermatitis. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* 32(3): 23-36.
- Peters, E. M., M. G. Stieglitz, C. Liezman, R. W. Overall, M. Nakamura, E. Hagen, B. F. Klapp, P. Arck and R. Paus. 2006. Neurotrophin receptor-mediated signaling promotes human hair follicle regression (Catagen). *Am. J. Pathol.* 168(1): 221-34.
- Philpott, M. P., D. A. Sanders and T. Kealey. 1994. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 102(6): 857-861.
- Randall, V. A., N. A. Hibberts, M. J. Thornton, A. E. Merrick, K. Hamada, S. Kato and A. G. Messenger. 2001. Do androgens influence hair growth by altering the paracrine factors secreted by dermal papilla cells? *Eur. J. Dermatol.* 11(4): 315-320.
- Sanders, D. A., I. Fiddes, D. M. Thompson, M. P. Philpott, G. E. Westgate and T. Kealey. 1996. In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet-derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K⁺ channel-dependent fashion. *J. Invest. Dermatol.* 107: 229-234.
- Schneider, M. R., R. Schmidt-Ullrich and R. Paus. 2009. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol.* 19(3): R132-R142.
- Shin, D. C., G. C. Kim, S. Y. Song, H. J. Kim, J. C. Yang and B. A. Kim. 2013. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from *Dendropanax morbifera*, *Corni fructus* and *lycii fructus*. *Kor. J. Herbolology* 28(6): 95-100.
- So, D. S. and B. Lee. 2019. Market trends for anti hair loss cosmetics. *Korean Ind. Chem.* 22(1): 12-22.