

# HX109 Herbal Extract Promotes Hair Growth by Regulating Cell Cycle in Hair Follicle Dermal Papilla Cells

Sooyeon Choi, Jisun Song, Suhyun Han, Jungkyu Lee, Wonwoo Lee\*  
R&D Center for Innovative Medicines, Helixmith Co., Ltd., Seoul, Korea

\*Corresponding author: Wonwoo Lee, R&D Center for Innovative Medicines, Helixmith Co., Ltd., 21, Magokjungang 8-ro 7-gil, Gangseo-gu, Seoul 07794, Korea  
Tel.: +82 2 2102 7291  
Fax: +82 2 887 0023  
Email: wwlee@helixmith.com

Received December 22, 2022  
Revised February 13, 2023  
Accepted March 06, 2023  
Published March 30, 2023



## Abstract

**Purpose:** This study aimed to determine the promoting effects of HX109 on hair growth. **Methods:** We prepared HX109 by extracting *Taraxacum officinale*, *Cuscuta australis*, and *Nelumbo nucifera* with 25% ethanol. The hair growth-promoting effects were measured in C57BL/6J mice which were orally administered HX109 (30, 100, and 300 mg/kg) with dorsal hair depilation. Western blotting was used to examine the protein expression in skin tissues (cyclin family, bax, and bcl-2). Moreover, the WST-1 assay was used to assess the cell viability of human hair dermal papilla cells (HFDPC). Flow cytometry was used to examine the change in the HFDPC cell cycle proportion. **Results:** In HX109-treated C57BL/6J mice, hair growth was increased in a dose-dependent manner compared with the vehicle-treated group. Specifically, 300 mg/kg of HX109 treated group showed significantly enhanced hair regrowth ( $p < 0.01$ ). Furthermore, HX109 significantly increased cyclin B1 expression and decreased the bax/bcl-2 ratio in the back skin of mice. HX109 also increased cell viability in HFDPCs in a dose-dependent manner by stimulating the S-G2/M phase transition. **Conclusion:** The mixed herbal extract HX109 has a hair growth-promoting effect by increasing HFDPC viability through regulation of the S-G2/M phase transition.

**Keywords:** Herbal extract, Hair growth, HFDPC, Cell viability, Cell cycle

## Introduction

사람의 모발 성장주기는 크게 성장기, 퇴행기, 휴지기의 3단계로 나누어진다(Alonso & Fuchs, 2006). 이 주기를 일생 동안 평균적으로 10-20회 정도 반복하며 모발이 성장한다고 알려져 있다. 일반적으로 성장기, 퇴행기, 휴지기의 모발은 각각 80-90%, 5%, 10% 정도의 비율로 분포하며, 정상인은 평균적으로 하루에 50-100개 정도의 모발 탈락을 겪는다(Eckert *et al.*, 1968; Van Scott & Eugene, 1958; Zhao *et al.*, 2008). 탈모는 앞서 언급한 모발 성장주기 중 휴지기가 길어지거나, 휴지기 모발의 개체수가 증가하여 모발의 탈락이 정상보다 과도하게 많아지는 현상을 말한다(Stenn *et al.*, 1996). 탈모의 원인과 기전은 명확히 밝혀지지 않았지만, 스트레스, 영양결핍, 두피 감염, 남성호르몬에 의한 모낭 기능 저하, 식생활의 변화 등 복합적인 요인이 원인이 되는 것으로 연구되고 있다(Stenn & Paus, 2001). 남성형 탈모(*Androgenic alopecia*)는 대표적인 탈모 질환으로, 남성호르몬 testosterone의 활성형인 dihydrotestosterone (DHT)

의 증가에 의해 발생하는 증상이며, 전세계 50% 이상의 성인남성에 걸쳐 발견되며, 여성에게도 나타나는 것으로 알려져 있다(Kabir & Goh, 2013). 따라서 모발 건강 소스에 대한 필요 및 관련 시장은 지속적으로 증가하고 있으며, 글로벌 시장 규모는 2027년까지 53억달러 규모에 이를 것으로 전망된다(Ring *et al.*, 2022).

현재까지 모발 성장을 촉진하는 약물로 미국 FDA의 승인을 받은 제품으로는 finasteride와 minoxidil이 있다. Finasteride는 본래 전립선비대증 치료제로 개발된 약물로, testosterone을 활성형인 DHT로 전환하는 환원효소인 type II 5 $\alpha$ -reductase의 억제제이다. 이러한 기전으로 통하여 DHT에 의한 모낭 세포의 사멸을 방지하는 효과를 가져, 대표적인 남성형 탈모증을 예방하는 약물로 사용되고 있다(Dallob *et al.*, 1994). 하지만 finasteride는 복용 시 성기능 감퇴, 여성형 유방 등의 부작용이 발생할 수 있다고 보고되어지고 있으며, 복용 중단 시 약효가 떨어지는 단점이 있다(Upadhyay *et al.*, 2019). Minoxidil은 본래 고혈압 치료를 위한 혈관 확장제로서, 모낭에 직접 작용하여 두피의 혈관을 확장시킨다. 이를 통해 두피의 혈류량을 증

가시키고 양모를 촉진하는 효과를 나타낸다. 하지만 두피건조/자극 증상 및 알레르기성 접촉 피부염 등이 발생할 수 있어 사용에 주의가 필요하며, 역시 사용 중단 시 약효가 떨어지는 단점이 있다(Olsen *et al.*, 2002).

따라서, 이러한 기존 치료제보다 부작용이 적은 안전한 소재를 발굴하기 위하여 한약재 및 식물추출물 등 천연물 기반의 양모 촉진 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cho *et al.*, 2021; Kim & You, 2022; Park & Lee, 2021). 본 연구에 사용한 HX109는 포공영, 토사자, 연자육의 혼합추출물이다. 포공영은 항염 및 항암 효과와 이노 작용을 하는 것으로 알려져 비노기 및 신장 질환 치료에 사용되어 왔다(Sigstedt *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2008). 토사자 또한 비노기 질환에 강장제로 처방되어온 소재로, 배뇨 및 사정장애 치료에 효능을 갖는 것으로 보고되어진다(Chye, 2006). 연자육 추출물은 항스테로이드 및 항산화 효능, 안드로겐 신호전달 조절 효능을 갖는다고 알려져 있다(Gupta *et al.*, 1996; Rai *et al.*, 2006; Wethangkaboworn & Munglue, 2014). 이와 같이 각 생약은 안드로겐 호르몬 기능과 연관이 있는 비노기계 질환에 긍정적인 효능을 보이며, 이 생약들의 혼합추출물인 HX109는 특히 남성호르몬에 직접적으로 작용하는 기존의 탈모치료제와는 다르게 간접적으로 호르몬 신호전달경로를 조절하는 효능이 있는 것으로 밝혀진 바 있다(Lim *et al.*, 2018). 이는 HX109가 기존의 치료제 대비 부작용은 적으면서 유사한 수준의 효능을 나타낼 가능성을 시사한다(Lim *et al.*, 2018). 따라서, HX109는 구성 생약의 효능 및 기존 연구결과에 의거하여 양모 개선 효능을 나타낼 것으로 예상되며, 본 연구에서는 이와 같은 가능성을 양모 평가 동물모델 및 모유두세포 증식 모델을 사용하여 검증하였다.

## Methods

### 1. HX109 생약제재 제조 및 성분 분석

HX109 시료 생산을 위해, 포공영(*Taraxacum officinale*), 토사자(*Cuscuta australis*), 연자육(*Nelumbo nucifera*)을 잘게 분쇄한 뒤 중량 기준 2:1:1 비율로 혼합하여 25% 에탄올로 20°C에서 8 h 동안 추출하였으며, 추출물을 여과 후 회전증발기(N-1000; Eyela, Japan)에서 농축하여 동결건조 하였다. 해당 과정을 통하여 건조 생약 원물 약 60 g으로부터 약 14%의 수율로 8.5 g의 HX109 분말시료를 생산하였으며, 연구에 사용한 모든 생약은 한국 경산에 위치한 휴먼허브에서 구입하였다. 각 생약은 한국 식물 DNA 은행(PDBK, Korea)에서 유전자 염기서열을 통해 종동정하였다. 생산한 시료는 (주)헬릭스미스(Korea)의 지하실에 보관하였다. HX109의 전성분 함량 분석은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석법을 이용하여 수행되었다. 상세한 분석 방법 및 성분 분석 결과는 본 연구진이 수행한 선행연구에서 확인할 수 있다(Lim *et al.*, 2018).

### 2. 실험동물 및 시료 처리

1주간 순화를 거친 8주령 수컷 C57BL/6J (Janvier Labs, France)을 17마리씩 5개 그룹으로 분류하였다. 음성대조군(Control: Con)과 양성대조군인 미녹시딜 처리군(Minoxidil: MXD)은 HX109 시료의 용매인 2% HPMC를, HX109 처리군(30, 100, 300 mg/kg)은 각 농도에 맞는 HX109를 200 µL/day씩 매일 경구투여 하였다. 시료 경구투여 1주일 째에, 마우스 등 부위의 털을 clipper로 면도한 후, 면도한 부위에 niclean 제모제(일동제약, Korea)를 사용하여 털을 완전히 제거하였다. 제모한 부위의 피부가 완전히 선홍색으로 확인되는 개체를 실험에 사용하였으며, 푸른색 혹은 검은색 피부가 관찰되는 개체는 제외되었다. 양성대조군에는 제모 다음 날부터 제모한 부위에 매일 5% Minoxidil (현대약품, Korea) 200 µL/day를 매일 도포하였다. HX109 투여와 minoxidil 도포를 지속하면서, 제모한 부위의 모발 성장 추이를 관찰하였다. 실험동물은 항온 항습 및 12 h light/dark cycle을 유지하며 사육하였으며, 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 모든 동물 실험은 (주)헬릭스미스의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)가 정한 지침에 따라 진행되었다(승인번호: VIC-20-04-006).

### 3. 양모 촉진 효능 평가

제모 후 15일째 되는 날, CO<sub>2</sub>로 마우스를 안락사 하여 실험을 종료하였다. 동일한 위치와 조명 조건 하에서 등 부위를 사진촬영 하였다. Adobe photoshop을 이용하여 제모 부위의 모발 성장 정도를 정량화 하였다. 모발이 전혀 자라지 않고 피부가 분홍색인 영역(0점), 모발이 자라지 않고 피부가 푸른색 혹은 검은색으로 변한 영역(1점), 모발이 자라났으며 푸른색 혹은 검은색으로 변한 피부가 보이는 영역(2점), 그리고 모발이 깨끗히 자라나 피부가 보이지 않는 영역(3점)을 각각 측정하였고, 각 영역값과 해당하는 점수를 곱하여 합한 값이 전체 면적에서 차지하는 비율을 계산하여 양모 촉진 효능을 평가하였다.

### 4. 피부조직 단백질 분석

실험동물을 안락사하고 제모한 영역 중앙 부위의 피부조직을 적출하였다. 적출한 피부는 phosphatase inhibitors, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Swiss) and DL-Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA)가 포함된 T-PER tissue extraction reagent buffer (Thermo Fisher, USA)를 사용하여 피부조직의 단백질을 추출한 후, 12,000 g에서 10 min 원심분리 하여 얻은 상등액으로 Bradford assay를 이용해 단백질 농도를 정량 하였다. 정량한 단백질을 15 µg씩 Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels (Invitrogen, USA)에 loading하여 전기영동 하였으며, polyvinylidene fluoride (PVDF; Cytiva, Korea) membrane에 transfer하였다. 1X TBS Blocking buffer (Thermo Fisher, USA)에 1 h 동안 incubation하여 단백질 간의 비특이적 결합을 차단하였다. 그 후 β-actin (Cell signaling, USA, 1:5000), bcl-2, bax, cyclin B1, cyclin E1 (Cell signaling,

USA, 1:1000), cyclin D1 (Abcam, England, 1:10000) 1차항체를 4°C에서 overnight 하였다. 이후 membrane을 10 min씩 3회 wash 후, anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody and anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell signaling, USA, 1:10000) 2차항체 희석액에 1 h incubation하였다. 반응 후 membrane을 10 min씩 3회 wash하고, ECL 용액(Thermo Fisher, USA)으로 membrane의 단백질 band를 감광시켜 검출하였다.

### 5. 모유두세포 배양

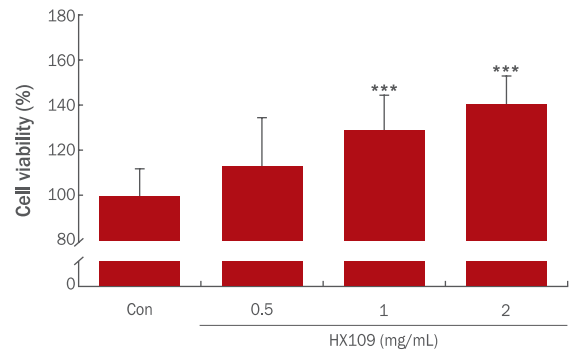
인간유래 모유두세포(Hair follicle dermal papilla cell, HFDPC)와 배양 배지는 Promocell (Germany)사에서 구매하여 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 공급사 매뉴얼에 따라 배양하였으며, 이틀마다 배지를 교체하여 7-80% confluency가 되었을 때에 계대배양 하였다. 본 연구에서는 passage 3 이하의 세포를 실험에 사용하였다.

### 6. 세포증식능 평가

세포증식능 평가는 CellVia Cell viability assay kit (Abfrontier, Korea)을 사용하였다(Choi, 2022). 96-well plate에 HFDPC를 2.5 × 10<sup>3</sup> cells/well 만큼 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양 후, 기존 배지를 제거하고 실험군에는 HX109 희석 배지로 (HX109 0.5, 1, 2 mg/mL), 대조군에는 새 배양배지로 교체하였다. 이후 48 h 동안 추가 배양하여 제조사의 protocol에 따라 WST-1 assay를 진행하였다. 간략히, 기존 배지를 제거하고, FBS가 포함되지 않은 배지에 10%로 희석한 WST-1 solution을 100 µL/well HFDPC에 처리하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30 min간 배양 후, microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군과 비교하여 세포증식능을 평가하였다.

### 7. 세포주기 분석

HFDPC의 세포주기 분석은 Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (Abcam, England)을 사용하였다. 6-well plate에 HFDPC를 1 × 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양 후 기존 배지를 제거하고 HX109를 2 mg/mL 농도로 처리하였다. 그 후 동일한 조건에서 48 h 동안 추가로 배양한 후, DPBS로 세포를 세척 후 harvest하여 66% ice cold 에탄올로 4°C에서 2 h 동안 고정하였다. 고정된 cell을 상온에서 10 min간 둔 후, RNase (550 U/mL)+Propidium iodide (50 µg/mL)를 PBS에 희석한 용액으로 37°C에서 30 min간 빛을 차단하여 반응시켜 DNA를 염색하였다. 반응 후 각 세포는 flow cytometer (FACS Lyric<sup>TM</sup>; BD biosciences, USA)를 이용하여 G1기, S기, G2/M기의 population을 측정한 후, FlowJo 프로그램을 이용하여 사후 분석하였다(BD biosciences).



**Figure 1. HX109 promotes the proliferation of HFDPCs.**

2.5 × 10<sup>3</sup> cells/well of HFDPCs were cultured with HX109 for 48 h. The viability of HFDPCs was measured by WST-1 assay. Data show mean ± SEM for three independent experiments. \*\*\*p < 0.001 vs control group.

### 8. 통계분석

모든 실험은 동일한 조건에서 3회 반복하였으며, 결과값의 평균 ± 표준오차로 표기되었다. 통계 분석에는 GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA)이 사용되었으며, 그룹 간 비교는 student t-test 및 one-way ANOVA 분석을 통해 p-value < 0.05 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## Results and Discussion

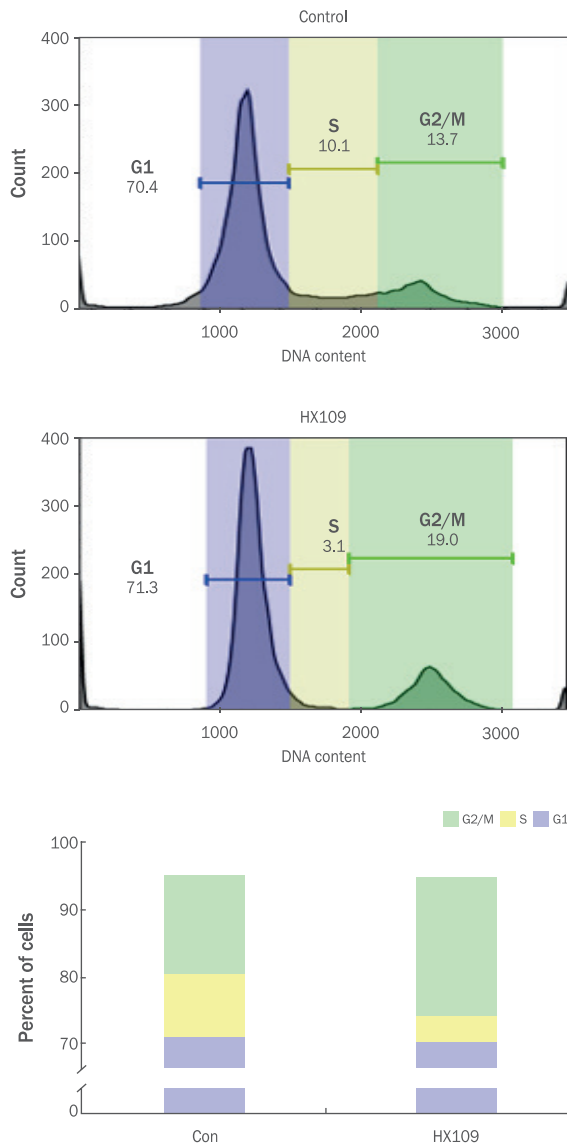
### 1. HFDPC에서 HX109의 세포증식 촉진 효과

Human follicle dermal papilla cells (HFDPC)는 사람의 모근에서 유래한 primary cell로서 모발의 성장주기 유지에 핵심역할을 하기 때문에 양모 촉진 효능 기전연구 모델로 활용되어진다(Driskell et al., 2011; Zhao et al., 2008). HFDPC의 세포 증식에 HX109가 미치는 영향을 확인하기 위해, HX109를 각각 0.5, 1, 2 mg/mL 농도로 처리하여 48 h 동안 배양한 후 WST-1 assay로 세포증식의 변화를 확인하였다. 그 결과, 음성대조군 대비하여 HX109 처리 시 농도 의존적으로 세포 증식이 증가하는 경향을 확인하였다(Figure 1). 특히 HX109를 1, 2 mg/mL 농도 조건으로 처리하였을 경우, 음성대조군 대비 유의적인 생육촉진 효과를 보였다(p < 0.001). 이를 통해 HX109는 HFDPC의 성장 촉진을 통해 hair growth 효능을 나타낼 수 있다는 가능성을 확인하였다.

### 2. HX109의 세포 주기 분포 조절 효능

세포의 분열과정은 단계별 특징에 따라 G1기(제1 휴지기), S기(DNA 합성기), M기(분열기), G2기(제2 휴지기)로 분리하며, 세포의 성장과 분열이 지속되는 동안 계속 이 주기를 순환한다(Purba et

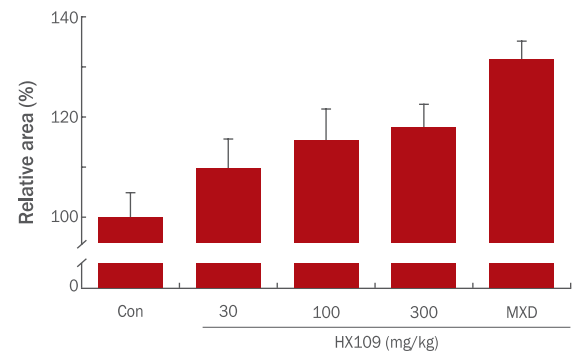
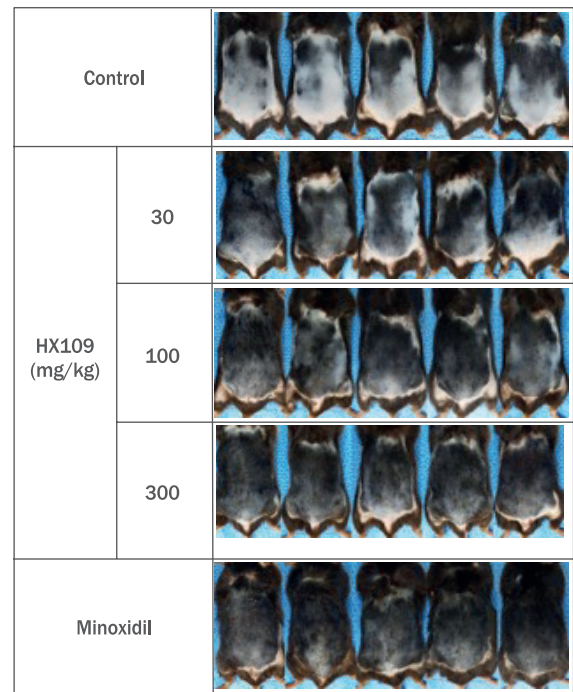
## HX109 Promotes Hair Growth Through Regulation of Cell Cycle



**Figure 2. HX109 induces the S to G2/M phase transition of HFDPs.**

HFDPs were treated with HX109 (2 mg/mL) for 48 h. The flow cytometry analysis was conducted after the staining of DNA by propidium iodide. The proportion of G1, S, and G2/M phases was presented.

al., 2016). 따라서, 앞선 Figure 1에서 확인한 HX109에 의한 세포 증식 촉진 효과에 대한 작용 기전을 규명하기 위하여, HX109가 세포 분열 과정에 미치는 영향을 조사하였다. HX109를 HFDP에 2 mg/mL 농도로 처리하여 48 h 동안 배양한 후, flow cytometry를 이용하여 세포주기의 변화를 분석하였다. 그 결과, 음성대조군과 HX109 처리군에서의 G1기 population은 각각 70.4%, 71.3%로 비슷한 분포를 나타내어 유의미한 변화가 관찰되지 않은 반면, 음성대조군과 HX109 처리군의 S기 population은 각각 10.1%, 3.1%로서, HX109



**Figure 3. HX109 improves hair growth in C57BL/6J mice.**

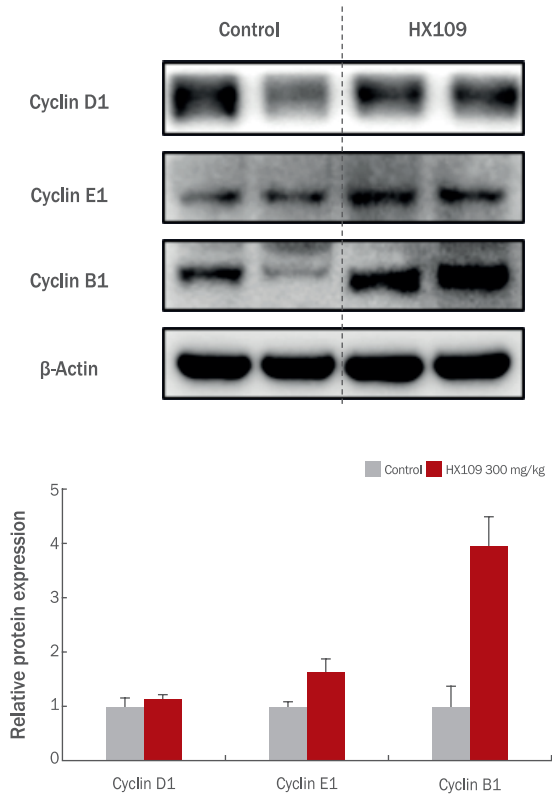
Photograph of mouse dorsal skin at 15 days after depilation. The hair growth efficacy was analyzed by Adobe Photoshop. Minoxidil (MXD) was used as a positive control.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.0001$  vs control group.

에 의해 S기의 분포도가 큰 폭으로 감소함을 확인하였다. 또한, G2/M기 population은 13.7%, 19.0%로서, HX109를 처리하였을 때 G2/M기의 분포도가 증가함을 확인하였다(Figure 2). 이는 HX109에 의해 S기에서 G2/M기로의 transition이 촉진되었음을 의미한다.

### 3. C57BL/6J 마우스를 통한 HX109의 모발 성장 효과

HFDP에서 HX109의 세포증식 촉진 효과를 본 Figure 1, Figure 2의 결과를 토대로, 양모촉진 동물모델에서 HX109 추출물을 이용한 양모효과를 관찰하고자 동물 실험을 진행하였다. C57BL/6J 마우스는 사람과 유사한 검은색 체모를 가져 모발의 성장주기를 색으로 쉽





**Figure 4. HX109 stimulates the protein expression of cyclin B1 which is associated G2/M phase *in vivo*.**

Protein was obtained from mouse dorsal skin tissues. The expression of cyclin family proteins (cyclin D1, E1, and B1) was analyzed by western blotting.

게 판정할 수 있는 장점을 가지고 있고, 휴지기에서 성장기로의 모발 주기 유도를 측정하는 모델로서 많이 사용되고 있다(Müller-Röver *et al.*, 2001). 1 주일간 순응이 완료된 마우스에 HX109를 일주일 간 경구투여한 후, 마우스 등쪽 부위의 털을 제모 하였다. 그 후, 14 일간 HX109를 매일 경구투여 실시한 후에, 15일 시점에 육안적 관찰 및 양모면적 비율 분석을 실시하였다. MXD군에는 제모 다음날부터 제모된 부위에 minoxidil을 200 µL씩 매일 도포하였다. 15일 후 사진 촬영하여 제모 면적 대비 양모면적의 비율을 양모 정도에 따라 가중치를 부여하여 계산하였고, 음성대조군의 양모 정도를 100% 기준으로 두고 상대적인 양모 면적 증가량을 분석하였다. 제모한 등 부위의 양모상태를 육안적으로 관찰 한 결과는 Figure 3과 같다. 아무 것도 처리하지 않은 음성대조군에 비교하였을 때, HX109 투여군에서는 성장기로 진입하는 모발이 증가하여 피부색이 회색에서 검푸른색으로 변하면서 모발이 자라는 것이 관찰되었다. 특히, HX109를 300 mg/kg 투여한 마우스의 전체 등 면적은 아주 진한 검푸른색을 띠는 것을 확인할 수 있었다. 양모 면적 분석을 실시한 결과, 육안적 평가 결과와 동일하게 HX109 투여 시 농도 의존적으로 양모 면적이

증가하였으며, 특히 HX109 300 mg/kg 투여군( $p < 0.01$ )과 MXD군 ( $p < 0.001$ )에서는 음성대조군에 대비하여 통계적으로 유의미하게 양모 면적이 증가하였다.

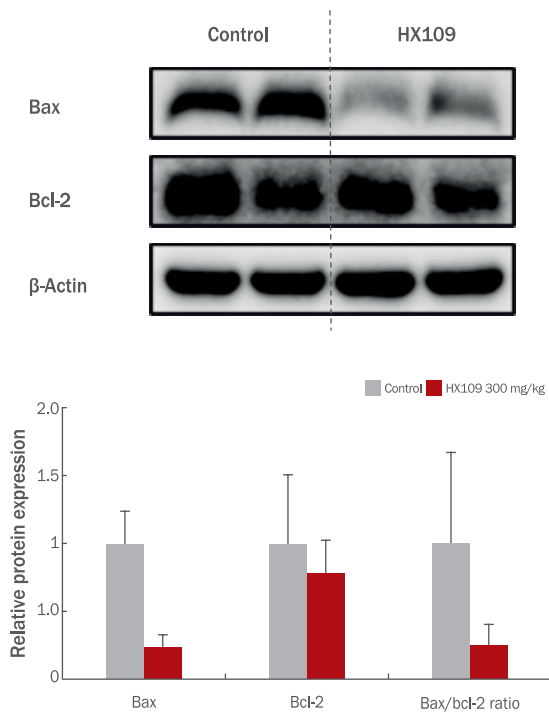
**4. C57BL/6J 마우스의 피부에서 HX109의 cyclin B1 단백질 발현 촉진 효과**

Cyclin B1은 cell cycle phase 중 G2/M phase에서 증가하는 단백질인 것으로 알려져 있으며, cyclin B1이 분해될 때 세포 분극이 저해되며 따라서 세포 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Yuan *et al.*, 2004). HX109는 HFDPC에서 세포증식의 촉진과 세포 분열과정 중 S기에서 G2/M기로의 transition을 유도하였기 때문에, HX109가 C57BL/6J 마우스 동물모델에서 세포분열의 각 단계를 조절하는 cyclin family protein을 조절하는지 확인하고자 하였다. 음성대조군 대비 뚜렷하게 효과가 나타났던 HX109 300 mg/kg 투여군의 마우스 등 조직에서 얻은 단백질로 western blot을 진행하였다. 그 결과, 음성대조군에 대비하여 HX109 300 mg/kg 투여군에서는 G1기로 진행시켜 세포 분열 유무를 결정하는 cyclin D1과 S기 진입에 도움을 주는 cyclin E1의 단백질 발현이 크게 증가하지 않은 반면, cyclin B1의 단백질 발현은 음성대조군과 비교하여 HX109 300 mg/kg 투여군에서 약 3.9배 증가하였다(Figure 4). 이는, HX109가 cyclin B1의 단백질 발현을 자극하여 세포주기 G2/M기 변화를 유발할 가능성을 암시한다.

**5. C57BL/6J 마우스에서 HX109의 pro-apoptotic 단백질 발현 억제 효과**

세포 주기 조절과 더불어, 세포 사멸의 조절 역시 세포 증식에 중요한 영향을 미친다. 세포 사멸은 pro-apoptotic gene product인 bax와 anti-apoptotic gene product인 bcl-2의 비율에 의하여 결정되며(bax/bcl-2 ratio), bax의 발현이 감소할 경우 세포 사멸이 억제되어 세포의 생존률이 증가함이 보고되어 있다(Thomas *et al.*, 1996). HX109가 bax와 bcl-2의 발현을 조절하는지 확인하기 위하여 C57BL/6J 마우스 피부 조직을 이용하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 HX109 300 mg/kg 투여군은 음성대조군에 비해 bcl-2의 단백질 발현은 큰 변화가 없었던 반면, bax의 단백질 발현은 크게 감소하였으며, 그 결과 bax/bcl-2 ratio가 크게 감소하였다(Figure 5). 즉, HX109는 마우스 피부의 세포 사멸을 저해하는 효능을 지닐 수 있다는 가능성을 시사한다.

이 연구에서 HX109는 음성대조군 대비 HFDPC의 세포 증식을 유의미하게 증가시켰으며, 또한 C57BL/6J 마우스에서는 음성대조군 대비 양모 면적을 유의미하게 증가시켰다. 모발의 성장은 세포 주기 및 세포 사멸과 밀접하게 관련되어 있어 HFDPC에서 세포 주기에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Purba *et al.*, 2016). 기본적으로 세포 증식은 세포 주기 순환을 통해 발생하는데, HX109는 HFDPC에서 S기를 G2/M기로 transition 시키는 것을 확인했고, HX109를



**Figure 5. HX109 suppresses the pro-apoptotic protein expression *in vivo*.**

Protein was obtained from mouse dorsal skin tissues. The expression of bax and bcl-2 protein was analyzed by western blotting.

투여한 C57BL/6 마우스의 피부조직에서 cyclin B1의 단백질 발현이 증가하였다. Cyclin B1은 S기 후반부터 G2에 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다(Kakino *et al.*, 1996). 그러므로 HX109는 세포 주기 중 S기에서 G2/M기로의 transition을 통해 HFDP 세포의 성장을 촉진시켜 모발 성장을 촉진시킨다고 볼 수 있다. 추가적으로 세포 증식은 세포 사멸과도 밀접한 연관이 있는데, HX109를 투여한 마우스의 피부조직에서 bcl-2는 발현에 변화가 없었으나 bax의 단백질 수준이 크게 감소하면서 세포 사멸을 나타내는 bax/bcl-2 ratio가 음성대조군 대비 크게 감소하였다. 이는 HX109에 의해 세포 사멸이 저해될 수 있다는 가능성을 보여줌으로써 HX109는 세포 주기 조절뿐만 아니라 세포 사멸을 저해함으로써 모발 성장을 촉진시킨다고 볼 수 있다. 다만 본 연구에서는, 기술적 한계로 인해 실제 동물의 follicular dermal papilla cell에서 직접 HX109에 의한 S기에서 G2/M기로의 transition 변화를 확인하지는 못하였으며, 대신 간접적으로 cyclin B1의 발현 변화를 확인하였다. 추후 quantitative intravital microscopy 기법을 활용하여 *in vivo* cell cycle profiling을 실시한다면, HX109의 작용 기전에 대해 더욱 엄밀한 검증이 가능할 것으로 기대된다.

현재 탈모 치료제로 사용중인 finasteride는 5 $\alpha$ -reductase의 활

성을 억제하여 DHT 생성을 억제하는 것과 같이 직접적인 호르몬 억제를 통해 탈모 억제 작용을 한다(Dallob *et al.*, 1994; Libecco & Bergfeld, 2004). 하지만 이러한 finasteride는 호르몬 조절에 대한 다양한 부작용을 갖고 있는데, 발기부전 및 성욕 감소, 여성형 유방 등이 대표적이다(Libecco & Bergfeld, 2004; Upadhyay *et al.*, 2019; Wilton *et al.*, 1996). 반면 HX109는 직접적으로 DHT농도에 영향을 주지 않고, 간접적으로 activating transcriptional factor 3 (ATF3) 및 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ )의 활성화를 증가시켜 이로 인해 androgen receptor가 타겟 프로모터에 결합하는 활성을 억제함이 밝혀졌다(Lim *et al.*, 2018). 이는 HX109가 기존 치료제와는 달리, 직접적인 호르몬 조절에 의한 부작용 없이 간접적인 작용을 통하여 보다 안전한 소재로서 개발될 가능성이 있음을 시사한다. 또한 후속 연구에서 진행한 결과에 따르면, HX109를 직접 피부에 도포하여도 유사한 기능을 나타내는 것으로 생각된다(unpublished data). 이에 본 연구진은 HX109를 모발 건강 개선 및 모발 탈락 완화를 목적으로 하는 화장품 및 건강기능식품 소재로 개발하기 위하여, 현재 식약처에서 배포한 모발건강기능성 평가 가이드라인에 의거하여 임상시험의 프로토콜 수립 및 개시를 계획하고 있다.

## Conclusion

본 연구는 포공영, 토사자, 연자육의 복합추출물인 HX109가 HFDP 세포의 세포 증식 및 세포주기를 조절함을 확인하였고, 또한 동물 모델에서 양모 촉진 효과를 검증하여 모발성장 촉진 기능성 소재로의 개발 가능성을 조사하였다.

HX109는 HFDP 세포 증식을 유의미하게 증가시켰고, 세포 주기 중 S기 population을 감소시킨 반면(10.1%에서 3.1%), G2/M기 population은 증가시켰다(13.7%에서 19.0%). 이러한 결과는 HX109가 세포 증식 및 세포주기 조절능을 지니고 있음을 나타낸다. 또한 제모된 C57BL/6J 마우스에서 HX109 투여에 의해 모발이 자라는 현상을 확인하였고, 특히 HX109 300 mg/kg 투여군에서는 음성 대조군에 대비하여 양모 면적이 유의미하게 증가된 것을 확인하였다. 마우스의 피부 조직에서 얻은 단백질을 이용하여 세포 주기에 관여하는 cyclin family 중 cyclin B1의 단백질 발현이 HX109 투여군에서 음성 대조군 대비 약 4배 증가하였고, 세포 사멸에 관여하는 bax의 단백질 발현 또한 HX109 투여군에서 현저히 감소하여 bax/bcl-2 ratio가 음성대조군 대비 약 70% 감소하였다. 이러한 결과는 HX109가 세포 주기 조절능과 더불어 세포 사멸 억제능 또한 지니고 있음을 시사한다.

종합적으로 HX109는 S기에서 G2/M기로의 세포주기 transition을 촉진하고, 세포 사멸 억제능을 통해 HFDP 세포 증식을 유도하

여 모발 성장 촉진 효과를 지닐 가능성이 있다. 그러므로 HX109는 모발의 성장을 촉진하는 화장품 및 건강기능식품 소재로 활용할 수 있는 잠재력을 지니고 있다고 사료된다.

### Author's contribution

W. Lee designed the project. S. Choi, J. Song, S. Han, J. Lee and W. Lee conducted the in vivo experiments. S. Choi and J. Song conducted the in vitro experiments. S. Choi, J. Song, S. Han and W. Lee analyzed the data and made interpretations. S. Choi, J. Song, S. Han, J. Lee and W. Lee drafted and finalized the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Author details

Sooyeon Choi (Researcher)/Jisun Song (Researcher)/Suhyun Han (Researcher)/Jungkyu Lee (Researcher)/Wonwoo Lee (Researcher), Helixmith Co., Ltd., 21, Magokjungang 8-ro 7-gil, Gangseo-gu, Seoul 07794, Korea.

## References

- Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *Journal of Cell Science*, 119: 391-393, 2006.
- Cho YJ, Choi YH, Kim BL, Han MH, Lee HS, Jeong YG. Effect of optimal mixing ratio of dendropanax, sea salt, and other extracts on the alleviation of hair loss symptoms. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 19: 533-542. 2021.
- Choi IJ. The antioxidant and anti-inflammatory activities of *Echinacea angustifolia* hot water extract. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 20: 373-381. 2022.
- Chye PLH. Traditional Asian folklore medicines in sexual health. *Indian Journal of Urology*, 22: 241-245, 2006.
- Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79: 703-706, 1994.
- Driskell RR, Clavel C, Rendl M, Watt FM. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *Journal of Cell Science*, 124: 1179-1182, 2011.
- Eckert J, Church RE, Ebling FJ. The pathogenesis of alopecia areata. *British Journal of Dermatology*, 80: 203-210, 1968.
- Gupta M, Mazumder UK, Mukhopadhyay RK, Sarkar S. Antisteroidogenic effect of the seed extract of *Nelumbo nucifera* in the testis and the ovary of the rat. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58: 236, 1996.
- Jeon HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kang YS, Lim CJ, Kim YM, Park EH. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 82-88, 2008.
- Kabir Y, Goh C. Androgenetic alopecia: update on epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society*, 10: 107-116, 2013.
- Kakino S, Sasaki K, Kurose A, Ito H. Intracellular localization of cyclin B1 during the cell cycle in glioma cells. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 24: 49-54, 1996.
- Kim JS, You SE. Effects of propolis extracts on damaged hair. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 20: 407-415. 2022.
- Libecco JF, Bergfeld WF. Finasteride in the treatment of alopecia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5: 933-940, 2004.
- Lim SN, Lee WW, Lee DS, Nam IJ, Yun N, Jeong YS, Rho TW, Kim SY. Botanical formulation HX109 ameliorates TP-induced benign prostate hyperplasia in rat model and inhibits androgen receptor signaling by upregulating Ca<sup>2+</sup>/CaMKK $\beta$  and ATF3 in LNCaP cells. *Nutrients*, 10: 1946, 2018.
- Müller-Röver S, Foitzik K, Paus R, Handjiski B, Van der Veen C, Eichmüller S, McKay IA, Stenn KS. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *Journal of Investigative Dermatology*, 117: 3-15, 2001.
- Olsen EA, Dunlap FE, Funicella T, Koperski JA, Swinehart JM, Tschen EH, Trancik RJ. A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47: 377-385, 2002.
- Park SY, Lee JM. Modulation of hair growth promoting effect by natural products. *Pharmaceutics*, 13: 2163, 2021.
- Purba TS, Brunken L, Hawkshaw NJ, Peake M, Hardman J, Paus R. A primer for studying cell cycle dynamics of the human hair follicle. *Experimental Dermatology*, 25: 663-

## HX109 Promotes Hair Growth Through Regulation of Cell Cycle

- 668, 2016.
- Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 322-327, 2006.
- Ring C, Heitmiller K, Correia E, Gabriel Z, Saedi N. Nutraceuticals for androgenetic alopecia. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 15: 26-29, 2022.
- Sigstedt SC, Hooten CJ, Callewaert MC, Jenkins AR, Romero AE, Pullin MJ, Kornienko A, Lowrey TK, Slambrouck SV, Steelant WF. Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 32: 1085-1090, 2008.
- Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinias JR, Parimoo S, Prouty SM. Hair follicle growth controls. *Dermatologic Clinics*, 14: 543-558, 1996.
- Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*, 81: 449-494, 2001.
- Thomas A, El Rouby S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, Potmesil M, Newcomb EW. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*, 12: 1055-1062, 1996.
- Upadhyay DK, Sharma A, Sarma GS, Gupta GD, Rai VK. Mechanism of androgenic alopecia: addressing speculations through empirical evidences. *Dermatologic Therapy*, 32: e13120, 2019.
- Van Scott, Eugene J. Morphologic changes in pilosebaceous units and anagen hairs in alopecia areata. *Journal of Investigative Dermatology*, 31: 35-43, 1958.
- Wethangkaboworn Y, Munglue P. Effect of ethanolic seed extract of *Nelumbo nucifera* on male rat sexual behavior. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19: 156-161, 2014.
- Wilton L, Pearce G, Edet E, Freemantle S, Stephens MDB, Mann RD. The safety of finasteride used in benign prostatic hypertrophy: a non-interventional observational cohort study in 14 772 patients. *British Journal of Urology*, 78: 379-384, 1996.
- Yuan J, Yan R, Krämer A, Eckerdt F, Roller M, Kaufmann M, Strebhardt K. Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*, 23: 5843-5852, 2004.
- Zhao J, Liu LQ, Wang YJ, Yang W, Geng WX, Wei J, Li LW, Chen FL. Treatment of alopecia by transplantation of hair follicle stem cells and dermal papilla cells encapsulated in alginate gels. *Medical Hypotheses*, 70: 1014-1016, 2008.



## 국문초록

## 복합생약추출물 HX109의 모근세포 세포주기 조절을 통한 모발성장 촉진 효과

최수연, 송지선, 한수현, 이정규, 이원우\*

(주)헬릭스미스 연구본부센터, 서울, 한국

**목적:** 본 연구는 포공영, 토사자, 연자육 복합추출물인 HX109 생약제제의 모발성장 촉진 기능성 소재로서의 활용 가능성을 탐색하기 위하여 수행되었다. **방법:** 포공영, 토사자, 연자육 생약을 혼합한 뒤 25% 에탄올 추출하여 HX109 생약제제를 제조하였다. 등 부위의 털을 제거한 C57BL/6J 마우스에 HX109를 농도별로 투여하며(30, 100, 300 mg/kg) 모발 성장 촉진 효능을 측정하였다. Western blot을 통하여 마우스 피부조직의 단백질 발현을 분석하였다(Cyclin family, bcl-2 및 bax). 또한, HX109를 처리한 HFDPC에서의 WST-1 assay로 세포증식능을 측정하였으며, FACS 분석을 통해 cell cycle proportion 변화를 확인하였다. **결과:** C57BL/6J 마우스에서 HX109 투여에 의해 농도 의존적으로 모발 성장이 증가하였으며, 300 mg/kg를 투여군에서 모발 성장이 음성대조군 대비 유의적인 차이를 보였다( $p < 0.01$ ). 해당 마우스의 피부 조직의 단백질 분석 결과, HX109 처리 시 cyclin B1의 발현이 증가하였으며, bax/bcl-2 ratio는 감소하였다. 또한 HFDPC에서 HX109 처리에 의해 농도 의존적으로 세포증식이 증가하였으며, 특히 세포주기 중 S-G2/M phase transition이 촉진되었다. **결론:** 복합생약추출물 HX109는 세포주기 조절을 통하여 모근의 세포증식을 유도해 모발 성장 촉진 효능을 지닐 가능성을 가진다.

**핵심어:** 식물추출물, 모발성장, 모유두세포, 세포증식, 세포주기

## 참고문헌

- 김주섭, 유세은. 프로폴리스 추출물의 손상모발 개선효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 20: 407-415, 2022.
- 조연제, 최윤희, 김병록, 한민희, 이학성, 정용기. 황칠과 천일염 등의 최적 배합비율에 따른 탈모증상 완화 효과. *아시아 뷰티화장품학술지*, 19: 533-542, 2021.
- 최인정. *Echinacea angustifolia* 열수 추출물의 항산화, 항염 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 20: 373-381, 2022.

## 中文摘要

### 复方中草药提取物HX109通过调节毛囊细胞周期促进生发

崔修娟, 宋志仙, 韩秀贤, 李正圭, 李元宇<sup>\*</sup>

(株)Helixmith研究中心, 首尔, 韩国

**目的:** 确定蒲公英、菟丝子和莲子来制备的复合提取物HX109对毛发生长的促进作用。**方法:** 将蒲公英、菟丝子和 莲子混合, 然后用25%乙醇提取, 制备HX109 草药制剂。将HX109以不同浓度(30、100、300mg/kg)给药于去除背毛的C57BL/6J小鼠, 并测定其促进毛发生长的效果。通过蛋白质印迹分析小鼠皮肤组织中的蛋白质表达(细胞周期蛋白家族、bcl-2和bax)。此外, 在用HX109处理的HFDPC中, 通过WST-1测定法测量细胞增殖, 并通过FACS分析确认细胞周期比例变化。**结果:** 在C57BL/6J小鼠中, HX109给药以浓度依赖性方式促进毛发生长, 300 mg/kg给药组的毛发生长与阴性对照组有显著差异( $p < 0.01$ )。小鼠皮肤组织的蛋白质分析结果表明, HX109治疗增加了细胞周期蛋白B1的表达并降低了bax/bcl-2比率。此外, HFDPC中的HX109处理以浓度依赖性方式增加细胞增殖, 尤其是促进细胞周期中的S-G2/M相转变。**结论:** 复方中草药提取物HX109 通过调节S-G2/M相变来增加HFDPC的活力, 从而具有促进毛发生长的作用。

**关键词:** 植物提取物, 毛发生长, 真皮乳头细胞, 细胞增殖, 细胞周期