



보고서

"CARON solution"에 대한 *in vitro* 탈모, 발모 효능시험

시험번호: B20008

㈜바이오텍스텍

우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

보고서의 작성 및 승인

시험제목 : “CARON solution”에 대한 in vitro 탈모, 발모 효능시험

시험번호 : B20008

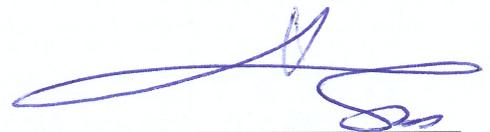
본 시험은 승인된 시험계획서에 따라서 수행되었고, 이 보고서의 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 보고서는 시험수행을 통해 얻어진 시험기초자료를 토대로 작성되었다

(주)바이오톡스텍
시험책임자 김도국



2020 년 05 월 25 일

(주)바이오톡스텍
연구소장 박철범



2020 년 05 월 25 일

목 차

	페이지
보고서의 작성 및 승인.....	2
요 약.....	5
1. 시험실시의 개요.....	6
1.1 시험목적	6
1.2 참고문헌	6
1.3 시험의뢰자.....	6
1.4 시험기관	6
1.5 시험책임자.....	6
1.6 시험일정	7
1.7 분담책임자.....	7
1.8 기록 및 자료의 보관	7
2. 시험재료 및 방법.....	8
2.1 시험물질	8
2.2 부형제	8
2.3 조제 및 조제물의 분석.....	8
2.4 시험계	9
2.5 세포배양액 및 세포주의 준비	9
2.6 군구성 및 처리농도	10
2.7 Cytotoxicity test	10
2.8 Efficacy test (RT-qPCR).....	11
2.9 자료의 통계처리	12
3. 결과.....	13
3.1 Cytotoxicity.....	13
3.2 RT-qPCR	14
4. 결론.....	19

SUMMARY TABLES	20
Table 1. Mean Data of CARON solution Cytotoxicity.....	21
Table 2. Mean Data of 5 α -reductase gene expression by CARON solution	22
Table 3. Mean Data of VEGF gene expression by CARON solution	23
Table 4. Mean Data of FGF7 gene expression by CARON solution	24
Table 5. Mean Data of FGF10 gene expression by CARON solution	25
APPENDICES	26
Appendix I. Individual Data	27
Table 6. Individual Data of Cytotoxicity by CARON solution	27
Table 7. Individual Data of 5 α -reductase gene expression by CARON solution ..	28
Table 8. Individual Data of VEGF gene expression by CARON solution	29
Table 9. Individual Data of FGF7 gene expression by CARON solution	30
Table 10. Individual Data of FGF10 gene expression by CARON solution	31
Appendix II. Experiment Protocol	32
Appendix III. Protocol Amendments.....	41
Appendix IV. Certificate of Analysis	44

요 약

본 시험은 사람 모유두세포인 HFDPC (Human Follicle Dermal Papilla Cells) 세포주를 이용하여 시험물질인 CARON solution 의 발모효과를 평가하고자 실시하였다.

탈모는 스트레스, 나이, 잘못된 식습관 등에 의해서 발생된다고 알려져 있으며, 또한 testosterone 에 5α -reductase 가 작용하여 생산된 대사 물질인 dihydrotestosterone(DHT)에 의해 발생하기도 한다. 따라서 5α -reductase 의 발현을 억제할 수 있다면 탈모를 방지하는 효과를 얻을 수 있다. 탈모 후 발모 유도를 위한 성장인자의 촉진도 탈모치료에 중요시되고 있다. 특히 세포주기를 조절하고 증식을 촉진하는 FGF group 중 FGF7 은 세포사멸로부터 모낭을 보호하여 탈모를 예방하고 모발 세포 재생을 촉진하는 성장인자로 알려져 있는 만큼 발모효과에 중요하게 여겨진다. FGF10 또한 세포의 초기형성에 기여하고 성장기를 유도하는 인자이며, 혈관내피세포성장인자인 VEGF 는 혈관확장을 통해 혈액순환을 개선하여 모발성장과 모근세포 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다. 따라서 위의 유전자 발현수준을 통해 탈모방지 및 발모촉진 효과를 확인하였다.

본 시험에 사용할 시험물질의 농도를 설정하기 위해 세포독성평가를 실시하여 세포에 독성이 없는 농도인 0.15%를 고용량으로 설정하고 0.05% 및 0.017%를 중농도 및 저농도로 설정하였다.

시험물질의 탈모방지 및 발모 효능을 분석하기 위해 HFDPC 에 시험물질을 농도별 (0.017%~0.15%)로 처리하여 5α -reductase, VEGF, FGF7 및 FGF10 의 유전자 발현량을 RT-qPCR 로 측정하였다.

그 결과 시험물질 처리군에서 FGF7 과 FGF10 의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 5α -reductase2 와 VEGF 의 발현에는 큰 영향을 끼치지 않았다.

결론적으로 시험물질인 CARON Solution 은 HFDPC FGF 발현을 촉진시키는 mechanism 은 본 실험만으로 밝힐 수 없으나, FGF7 및 FGF10 의 발현을 증가시켜 세포사멸 억제와 모발 성장 촉진에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

본 시험은 사람 모유두세포인 HFDPC (Human Follicle Dermal Papilla Cells) 세포주를 이용하여 시험물질인 CARON solution 이 발모에 효능이 있는지 평가하기 위하여 실시되었다.

1.2 참고문헌

- 1.2.1 Choi JH *et al.* Effects of Black Soybean and Fermented Black Soybean Extracts on Proliferation of Human Follicle Dermal Papilla Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017, 46(6):671~680
- 1.2.2 K. Matsushima *et al.* Primary cilia-mediated intercellular signaling in hair follicles. *Integr Mol Med.* 2016, 3(3):669-702
- 1.2.3 M. Reiter *et al.* Gene Expression in Hair Follicle Dermal Papilla Cells after Treatment with Stanazolol. *Biomarker Insights.* 2009, 4:1-8.

1.3 시험의뢰자

명칭 카론바이오㈜
주소 서울특별시 강남구 학동로 6길8 범우빌딩 1층
TEL + 82-02-547-0206 FAX + 82-02-547-0207

1.4 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍
주소 우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.5 시험책임자

성명 김도국
소속 약효약리팀

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	CARON Solution (카론솔루션)
2.1.2	Lot No.	191218AS
2.1.3	성상	아주 짙은 갈색의 현탁액
2.1.4	pH	5.2
2.1.5	안정성	차과/밀폐/상온에서 2년
2.1.6	친화성	Hydrophilic
2.1.7	제조일	2019년 12월 18일
2.1.8	유효기간	2020년 06월 17일
2.1.9	보관조건	냉장 (2~8℃, 제습)
2.1.10	취급 시 주의사항	직사광선과 직접적인 열을 피해 밀폐된 상태로 냉장에서 보관
2.1.11	제공자	
	명칭	카론바이오㈜
	주소	서울특별시 강남구 학동로 6길 8 범우빌딩 1층
2.1.12	잔여시험물질의 처리	폐기

2.2 부형제

2.2.1	물질명	HFDPC (Human Hair Follicle Dermal Papilla cell Growth)Media
2.2.2	보관조건	냉장
2.2.3	제조사	세포바이오, 한국

2.3 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 조제

시험의뢰자가 제공한 원액 (100%) 0.1 mL 에 부형제를 일부 넣어 vortex mixer 로 혼합하여 10%의 stock solution 을 조제하였다.

<세포독성시험>

조제된 Stock solution 은 부형제로 단계희석하여 총 7 용량 (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 %)으로 조제 후 사용하였다.

<본시험>

세포독성시험 결과에 따라 본 시험은 총 3 농도를 설정하여 사용시 조제하였다. 모든 조제물은 세포에 처리하기 직전에 조제하였다.

2.4 시험계

- 2.4.1 세포주명 Human Hair Follicle Dermal Papilla cells
- 2.4.2 생산자 및 구입처 세포바이오, 한국
- 2.4.3 세포주 선택이유

Human Hair Follicle Dermal Papilla cell 세포주는 *in vitro* 면역시험에 널리 사용되고 있으며 비교할 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2.5 세포배양액 및 세포주의 준비

아래의 표와 같은 조성으로 Basal medium 은 50 mL 당 Supplements 5 ml, Penicillin-Streptomycin 0.5 ml 을 혼합하여 사용하였다.

2.5.1 Basal medium

명칭	조성 (mL)
Supplements (Media kit)	5
Penicillin-Streptomycin (Media kit)	0.5
HFDPC Growth Media	50
Total volume	55.5

2.5.2 세포배양

HFDPC 세포를 Basal medium (Growth Media, CB-HDP-003, CEFO Co., Ltd, Korea) 배지에 37 °C, 5 % CO₂ incubator (MCO-20AIC, Sanyo, Japan)에서 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.6 군구성 및 처리농도

2.6.1 군구성

2.6.1.1 Cytotoxicity assay

군	1 차 시험 처리농도 (%)	처리액량 (mL/well)
시험물질	10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0	0.1

2.6.1.2 Efficacy test

군	2 차 시험 처리농도 (%)	처리액량 (mL/well)
시험물질	0.15, 0.05, 0.017%	0.1

2.6.2 처리농도설정

Cytotoxicity assay 농도는 부형제에 시료가 녹는 최고 농도를 기점으로 공비 1/2 로 설정하고 1 차 시험의 결과에 근거하여 시험물질의 농도를 설정하였다.

Efficacy test 농도는 cytotoxicity assay 에서 얻어진 결과에 따라 0.15, 0.05, 0.017%로 시험물질의 농도를 설정하였다.

2.7 Cytotoxicity test

2.7.1 96 well plate 에 6×10^3 cells/well 농도로 세포부유액을 각 well 에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양하였다.

2.7.2 세포 배양액을 제거하고 시험물질(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0 %)이 농도별로 포함된 배양배지를 100 μL 씩 처리한다. 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양하였다.

2.7.3 CCK-8 (Lot No. NQ605 Dojindo, Japan) 10 μL 를 첨가하여 37°C incubator 에서 1 시간 추가 배양하였다.

2.7.4 Microplate reader (Victor TMx3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.7.5 정상 대조군의 세포생존률 대비 각 농도별 세포생존률을 구하였다.

Survival Rate (%)

$$= (1 - \text{Absorbance of test substance group} / \text{Absorbance of normal group}) \times 100$$

2.8 Efficacy test (RT-qPCR)

- 2.8.1 6 well plate 에 1×10^5 cells/plate 농도로 세포부유액을 각 plate 에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양하였다.
- 2.8.2 세포 배양액을 제거하고 시험물질(0.15, 0.05, 0.017 %)이 농도별로 포함된 배양배지를 2 ml 씩 처리하였다. 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양하였다.
- 2.8.3 세포배양액을 제거하고, 세포는 RNeasy Mini kit (Lot No. 157031929, Qiagen, Germany)의 매뉴얼에 따라 RNA 를 추출하였다. 추출된 RNA 는 Infinite[®] 200 Pro (TECAN, Switzerland)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.
- 2.8.4 5 α -reductase II, VEGF, FGF-7 및 FGF-10 유전자를 RT-qPCR 을 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

-RT-qPCR 조성물 조건

명칭	조성 (μ L)
iTaq universal SYBR Green reaction mix(2x)	8.0
iScript reverse transcriptase	0.2
Forward primer (3 μ mole)	1.0
Reverse primer (3 μ mole)	1.0
RNA(20ng/uL)	5
3 차증류수	0.8
Total	16.0

-Primer information

Gene		Sequence for Primers (5'-3')
5 α -reductase II	Forward	TGAATACCCTGATGGGTGGT
	Reverse	GGAAATTGGCTCCAGAAACATA
VEGF	Forward	CCCACTGAGGAGTCCAACAT
	Reverse	AAATGCTTTCTCCGCTCTGA
FGF-7	Forward	CCTGAGCGACACACAAGAAG
	Reverse	GCCACTGTCGCTTCCTTATT
FGF-10	Forward	GCATGTGCGGAGCTACAATCA
	Reverse	ACGGCAACAACCTCCGATTTCTAC
GAPDH	Forward	CATCCAGCAAAGATCAGCCTC
	Reverse	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA

2.8.5 RT-qPCR 은 iTaq™ Universal SYBR® Green one-Step kit (Lot No. 64336708 BIO-RAD, CA, U.S.A.)를 사용했으며 Real time PCR machine (CFX384 Real Time System, BIO-RAD, CA, U.S.A)을 사용하여 다음 조건으로 실시되었다.

-RT-qPCR 조건

Step	Temperature (oC)	Time	Cycle
Reverse Transcription	50	10 min	1 cycle
Pre-denaturation	95	1 min	1 cycle
Denaturation	95	15sec	44 cycle
Annealing	60	30 sec	

2.8.6 결과로 얻어진 C(t) 값은 GAPDH 의 C(t) 값으로 보정하여 정상군 대비 유전자 발현량을 상대정량 하였다.

2.9 자료의 통계처리

세포독성시험은 통계분석을 실시하지 않는다. RT-qPCR 결과는 SPSS program (version 20.0, IBM Corp., U.S.A)을 이용하여 통계처리 하였다.

3. 결과

3.1 Cytotoxicity (Figure 1, Tables 1, 6)

본 시험에 사용할 시험물질의 농도를 설정하기 위해 세포독성평가를 실시하였다. 시험결과 용매대조군의 세포 생존률이 100%일 때 시험물질이 0.15% 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다. 시험결과에 따라서 본 시험의 농도는 0.15%를 최고용량으로 설정하고 그 이하 0.05%, 0.017% 를 중농도 및 저농도로 설정하였다.

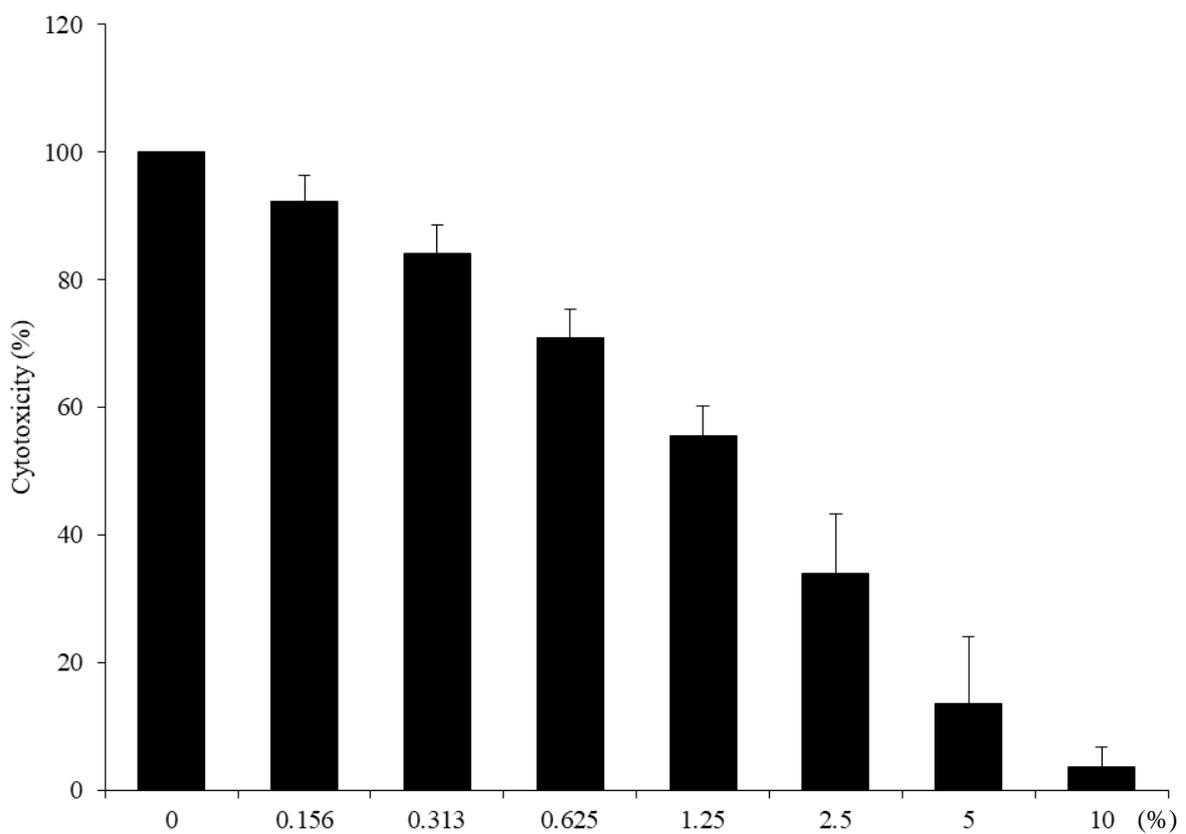


Figure 1. cytotoxicity of CARON solution

Each data expressed mean + S.D.

3.2 RT-qPCR

5 α -reductase2 는 Testosterone 을 DHT 로 전환시키는 효소로서 탈모에 관여하며, VEGF 는 혈관내피세포성장인자로 혈액순환을 개선하여 모발의 성장과 모근세포의 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다. GF7 및 FGF10 은 fibroblast 성장 인자로서 모발 성장을 자극하여 성장기를 유도한다.

시험물질의 발모 및 탈모방지 효능을 분석하기 위해 HFDPC 에 시료를 농도별 (0.017~0.15%)로 처리하여 발모 및 탈모 관련 유전자 발현량을 RT-qPCR 로 측정하였다.

시험군은 정상대조군과 시험물질(0.017%, 0.05%, 0.15%) 처리군으로 분류하였다.

<5 α -reductase2> (Figure 2, Tables 2,7)

정상대조군을 기준으로 하여 시험물질처리군의 5 α -reductase2 유전자 발현량을 계산하였다.

시험물질 0.017, 0.05 및 0.15% 처리군 모두 5 α -reductase2 의 유전자 발현에 영향을 미치지 않았으며 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.

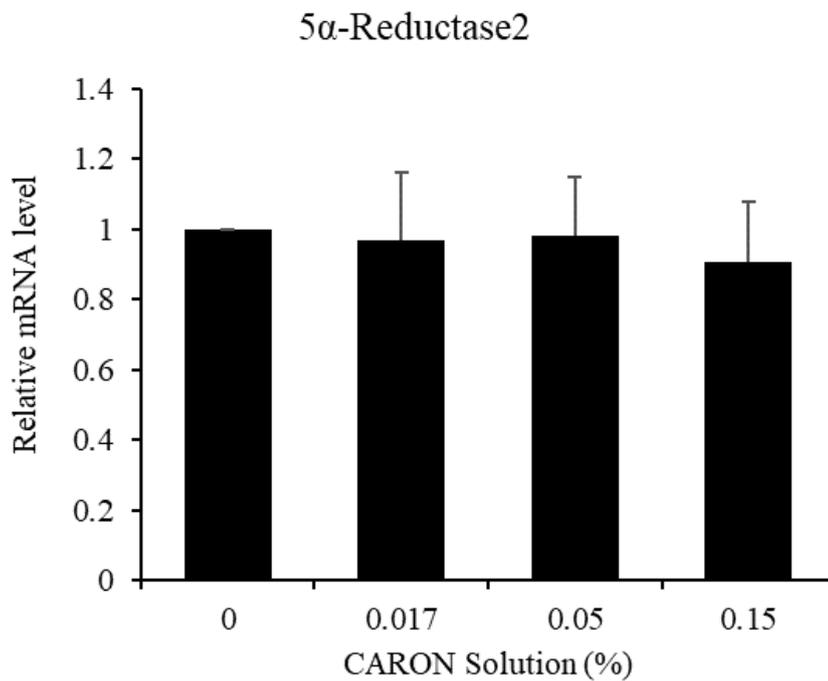


Figure 2. The 5 α -reductase2 mRNA level in HFDPC

N=3, Each data expressed mean + S.D.

No statistically significant differences were noted in the substance groups from 0% treated group (p>0.05, ANOVA)

<VEGF> (Figure 3, Tables 3,8)

정상대조군을 기준으로 하여 시험물질처리군의 VEGF 유전자 발현량을 계산하였다.

시험물질 0.017, 0.05 및 0.15% 처리군 모두 VEGF 유전자 발현에 영향을 미치지 않았으며 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.

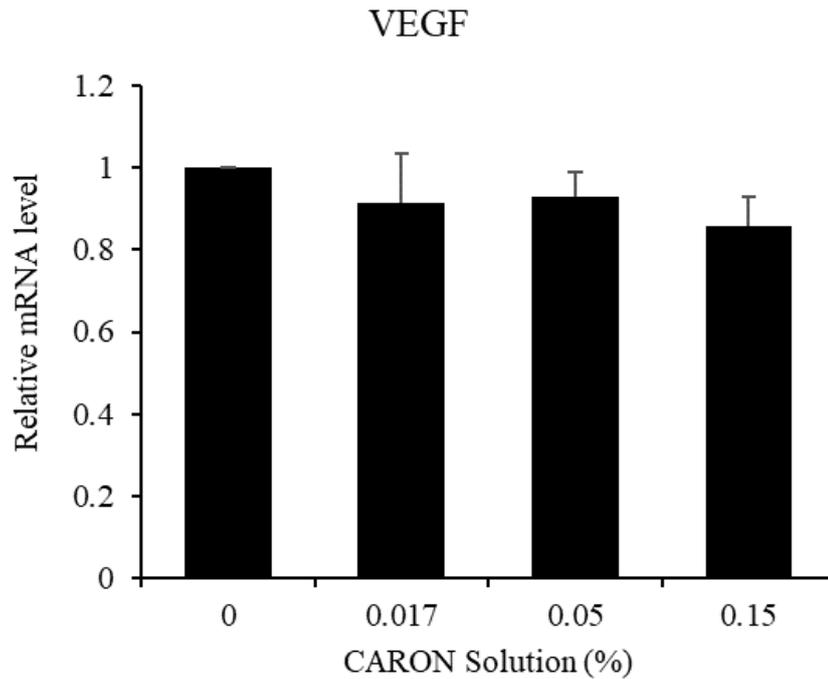


Figure 3. The VEGF mRNA level in HFDPC

N=3, Each data expressed mean + S.D.

No statistically significant differences were noted in the substance groups from 0% treated group ($p > 0.05$, ANOVA)

<FGF7> (Figure 4, Tables 4,9)

정상대조군을 기준으로 하여 시험물질처리군의 FGF7 유전자 발현량을 계산하였다.

FGF7 의 발현은 농도의존적으로 증가되는 경향을 나타내었으며 0.15% 처리군에서 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

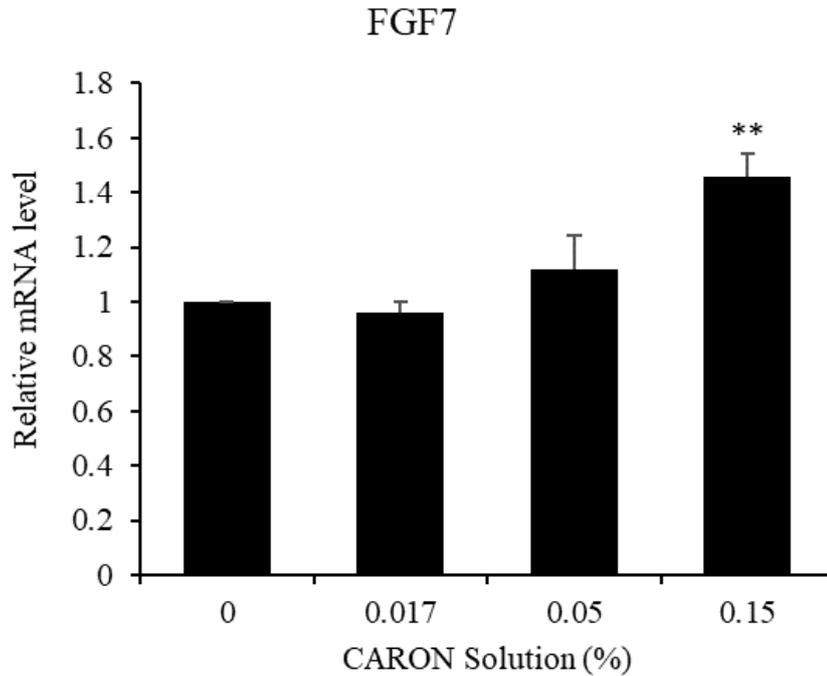


Figure 4. The FGF7 mRNA level in HFDPC

N=3, Each data expressed mean + S.D.

** p<0.01, Significant difference from the 0% treated group by Dunnett's t-test.

<FGF10> (Figure 5, Tables 5,10)

정상대조군을 기준으로 하여 시험물질처리군의 FGF10 유전자 발현량을 계산하였다.

FGF10 의 발현은 농도의존적으로 증가되는 경향을 나타내었으며 0.15% 처리군에서 무처리군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

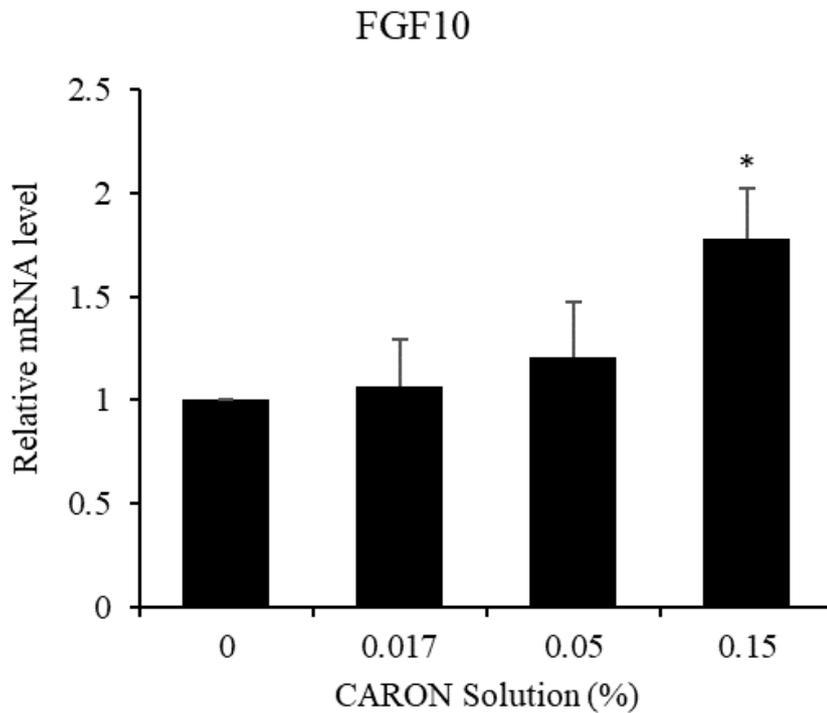


Figure 5. The FGF10 mRNA level in HFDPC

N=3, Each data expressed mean + S.D.

* p<0.05, Significant difference from the 0% treated group by Dunnett's t-test

4. 결론

본 시험은 이용하여 시험물질인 CARON solution 의 *in vitro* 발모 효능평가를 위하여 HFDPC의 세포독성시험을 통해 시험물질의 투여 용량을 설정하였다.

세포의 독성을 나타내지 않는 0.15%를 최고 농도로 설정하고, 공비 3 으로 0.05% 및 0.017%를 시험농도로 설정하였다.

그 결과 시험물질 처리군에서 FGF7 과 FGF10 의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 5 α -reductase2 와 VEGF 의 발현에는 큰 영향을 끼치지 않았다.

결론적으로 시험물질인 CARON Solution 은 HFDPC FGF 발현을 촉진시키는 mechanism 은 본 실험만으로 밝힐 수 없으나, FGF7 및 FGF10 의 발현을 증가시켜 세포사멸 억제와 모발 성장 촉진에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY TABLES

Table 1. Mean Data of CARON solution Cytotoxicity

Test No.	Cytotoxicity (%)							
	CARON sol (%)							
	0	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
1	100.0	95.4	84.8	67.2	50.9	26.5	2.2	1.1
2	100.0	87.7	79.2	69.8	55.5	31.0	15.4	2.8
3	100.0	93.6	88.3	75.8	60.3	44.5	23.0	7.1
Mean	100.0	92.2	84.1	70.9	55.6	34.0	13.5	3.7
S.D.	0.0	4.1	4.6	4.4	4.7	9.3	10.5	3.1
N	3	3	3	3	3	3	3	3

S.D.: Standard deviation

N: Number of test

Table 2. Mean Data of 5 α -reductase gene expression by CARON solution

Concentration (%)		5 α -reductase fold change
Test Substance 0	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	Mean	0.97
	S.D.	0.34
	N	3
Test Substance 0.05	Mean	0.98
	S.D.	0.29
	N	3
Test Substance 0.15	Mean	0.91
	S.D.	0.29
	N	3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Table 3. Mean Data of VEGF gene expression by CARON solution

Concentration (%)		VEGF fold change
Test Substance 0	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	Mean	0.91
	S.D.	0.21
	N	3
Test Substance 0.05	Mean	0.93
	S.D.	0.10
	N	3
Test Substance 0.15	Mean	0.86
	S.D.	0.12
	N	3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Table 4. Mean Data of FGF7 gene expression by CARON solution

Concentration (%)		FGF7 fold change
Test Substance 0	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	Mean	0.96
	S.D.	0.07
	N	3
Test Substance 0.05	Mean	1.12
	S.D.	0.22
	N	3
Test Substance 0.15	Mean	1.46
	S.D.	0.15
	N	3
		**

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

** p<0.01, Significant difference from the 0% group by Dunnett's t-test

Table 5. Mean Data of FGF10 gene expression by CARON solution

Concentration (%)		FGF10 fold change
Test Substance 0	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	Mean	0.78
	S.D.	0.44
	N	3
Test Substance 0.05	Mean	1.35
	S.D.	0.64
	N	3
Test Substance 0.15	Mean	0.39
	S.D.	0.68
	N	3
		*

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

* p<0.05, Significant difference from the 0% group by Dunnett's t-test

APPENDICES

Appendix I. Individual Data

Table 6. Individual Data of Cytotoxicity by CARON solution

Test No.	Cytotoxicity (%)							
	CARON solution (%)							
	0	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
1-1	107	91	84	72	53	38	9	1
1-2	85	99	89	72	55	39	0	1
1-3	102	98	82	68	51	29	0	1
1-4	106	95	85	57	45	0	0	2
Mean	100	95	85	67	51	27	2	1
S.D.	10	4	3	7	4	18	5	0
2-1	104	91	84	69	59	34	15	2
2-2	102	85	80	67	60	31	17	3
2-3	94	87	81	71	54	28	16	3
2-4	99	88	72	72	49	31	13	3
Mean	100	88	79	70	56	31	15	3
S.D.	4	2	5	2	5	2	2	0
3-1	109	102	89	75	54	45	22	7
3-2	87	80	87	78	61	44	22	7
3-3	96	97	89	77	64	43	24	7
3-4	108	96	88	73	63	46	24	8
Mean	100	94	88	76	60	44	23	7
S.D.	11	10	1	2	5	1	1	1

S.D. : Standard deviation

Table 7. Individual Data of 5 α -reductase gene expression by CARON solution

Concentration (%)	Number of Test	5 α -reductase fold change
Test Substance 0	1	1
	2	1
	3	1
	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
	Test Substance 0.017	1
2		0.58
3		1.21
Mean		0.97
S.D.		0.34
N		3
Test Substance 0.05		1
	2	1.26
	3	0.68
	Mean	0.98
	S.D.	0.29
	N	3
	Test Substance 0.15	1
2		0.62
3		0.90
Mean		0.91
S.D.		0.29
N		3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Table 8. Individual Data of VEGF gene expression by CARON solution

Concentration (%)	Number of Test	VEGF fold change
Test Substance 0	1	1
	2	1
	3	1
	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	1	0.67
	2	1.03
	3	1.04
	Mean	0.91
	S.D.	0.21
	N	3
Test Substance 0.05	1	0.92
	2	0.83
	3	1.04
	Mean	0.93
	S.D.	0.10
	N	3
Test Substance 0.15	1	0.98
	2	0.73
	3	0.86
	Mean	0.86
	S.D.	0.12
	N	3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Table 9. Individual Data of FGF7 gene expression by CARON solution

Concentration (%)	Number of Test	FGF7 fold change
Test Substance 0	1	1
	2	1
	3	1
	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	1	1.04
	2	0.90
	3	0.94
	Mean	0.96
	S.D.	0.07
	N	3
Test Substance 0.05	1	0.97
	2	1.37
	3	1.01
	Mean	1.12
	S.D.	0.22
	N	3
Test Substance 0.15	1	1.46
	2	1.60
	3	1.31
	Mean	1.46
	S.D.	0.15
	N	3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Table 10. Individual Data of FGF10 gene expression by CARON solution

Concentration (%)	Number of Test	FGF10 fold change
Test Substance 0	1	1
	2	1
	3	1
	Mean	1
	S.D.	0
	N	3
Test Substance 0.017	1	1.31
	2	0.62
	3	1.27
	Mean	1.07
	S.D.	0.39
	N	3
Test Substance 0.05	1	1.71
	2	0.80
	3	1.12
	Mean	1.21
	S.D.	0.46
	N	3
Test Substance 0.15	1	2.04
	2	1.31
	3	2.00
	Mean	1.78
	S.D.	0.41
	N	3

Test substance: CARON solution

S.D. : Standard deviation

N : Number of test

Appendix II. Experiment Protocol



시험계획서

"CARON solution"에 대한 *in vitro* 달모, 발모 효능시험

시험번호: B20008

㈜바이오텍스텍

우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

목 차

	페이지
시험계획서의 작성 및 승인	2
1. 시험실시의 개요	4
1.1 시험목적	4
1.2 참고문헌	4
1.3 시험의뢰자	4
1.4 시험기관	4
1.5 시험책임자	4
1.6 시험일정	5
1.7 시험계획서 및 시험계획서의 변경	5
1.8 보고서	5
1.9 기록 및 자료의 보관	5
2. 시험재료 및 방법	6
2.1 시험물질	6
2.2 부형제	6
2.3 조제 및 조제물의 분석	6
2.4 시험계	7
2.5 세포배양액 및 세포주의 준비	7
2.6 군구성 및 처리농도	8
2.7 Cytotoxicity test	8
2.8 Efficacy test (RT-qPCR)	8
2.9 자료의 통계처리	9

1. 시험실시의 개요

1.1 시험목적

본 시험은 사람 모유두세포인 HFDPC (Human Follicle Dermal Papilla Cells) 세포주를 이용하여 시험물질인 CARON solution 이 발모에 효능이 있는지 평가하기 위하여 실시하였다.

1.2 참고문헌

- 1.2.1 Choi JH et al. Effects of Black Soybean and Fermented Black Soybean Extracts on Proliferation of Human Follicle Dermal Papilla Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017, 46(6):671~680
- 1.2.2 K. Matsushima et al. Primary cilia-mediated intercellular signaling in hair follicles. *Integr Mol Med.* 2016, 3(3):669-702
- 1.2.3 M. Reiter et al. Gene Expression in Hair Follicle Dermal Papilla Cells after Treatment with Stanazolol. *Biomarker Insights.* 2009, 4:1-8.

1.3 시험의뢰자

명칭 카론바이오㈜
주소 서울특별시 강남구 학동로 6길8 범우빌딩 1층
TEL + 82-02-547-0206 FAX + 82-02-547-0207

1.4 시험기관

명칭 ㈜바이오톡스텍
주소 우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

1.5 시험책임자

성명 김도국
소속 약효약리팀

1.6 시험일정

시험개시일	2020년 2월 17일
실험개시일	2020년 2월 17일
Cytotoxicity assay	2020년 2월 17일 ~ 3월 6일
Efficacy test	2020년 3월 7일 ~ 5월 3일
실험종료일	2020년 5월 3일
보고서 (안) 제출일	2020년 5월 22일

1.7 시험계획서 및 시험계획서의 변경

시험계획서의 승인 후에 시험계획서의 내용을 변경할 경우, 변경내용, 변경사유 및 변경일자를 명시한 시험계획서 변경기록서를 작성하고 시험의뢰자에게 송부한다.

1.8 보고서

보고서는 figure, table 및 appendix를 포함하여 작성하며, 원본은 쉐바이오텍스에서 보관한다.

1.9 기록 및 자료의 보관

1.9.1 보관기간

시험종료 후 3년

이후의 보관은 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

1.9.2 보관장소

명칭 쉐바이오텍스 자료보관실

주소 우363-883 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53

1.9.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 보고서, 기초자료 및 그 외 기록문서, 통신연락문서, 참고문헌, 기타

2. 시험재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1	물질명	CARON Solution (카론솔루션)
2.1.2	Lot No.	191218AS
2.1.3	성상	아주 짙은 갈색의 현탁액
2.1.4	pH	5.2
2.1.5	안정성	차광/밀폐/상온에서 2년
2.1.6	친화성	Hydrophilic
2.1.7	제조일	2019년 12월 18일
2.1.8	유효기간	2020년 6월 17일
2.1.9	보관조건	냉장 (2~8℃, 제습)
2.1.10	취급 시 주의사항	직사광선과 직접적인 열을 피해 밀폐된 상태로 냉장에서 보관
2.1.11	제공자	
	명칭	카론바이오㈜
	주소	서울특별시 강남구 학동로 6길 8 범우빌딩 1층
2.1.12	잔여시험물질의 처리	폐기

2.2 부형제

2.2.1	물질명	HFDPG (Human Hair Follicle Dermal Papilla cell Growth) Media
2.2.2	보관조건	냉장
2.2.3	제조사	세포바이오, Republic of Korea
2.2.4	조제방법	의뢰자가 제공한 부형제를 그대로 사용한다.

2.3 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 조제

시험의뢰자가 제공한 원액 (100%) 0.1 mL 에 부형제를 일부 넣어 vortex mixer 로 혼합하여 10%의 stock solution 을 조제한다.

<세포독성시험>

조제된 Stock solution 은 부형제로 단계희석하여 총 7 용량 (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 %)으로 조제 후 사용한다.

<본시험>

세포독성시험 결과에 따라 본 시험은 총 3 농도를 설정하여 사용시 조제한다.

모든 조제물은 세포에 처리하기 직전에 조제한다.

2.4 시험계

- 2.4.1 세포주명 Human Hair Follicle Dermal Papilla cells
- 2.4.2 생산자 및 구입처 세포바이오, 한국
- 2.4.3 세포주 선택이유

Human Hair Follicle Dermal Papilla cell 세포주는 *in vitro* 면역시험에 널리 사용되고 있으며 비교할 시험기초자료가 풍부하여 선택한다.

2.5 세포배양액 및 세포주의 준비

아래의 표와 같은 조성으로 50 mL 당 Supplements, Penicillin-Streptomycin 및 HFDPC Growth Media를 혼합하여 사용한다.

2.5.1 Basal medium

명칭	조성 (mL)
Supplements (Media kit)	5
Penicillin-Streptomycin (Media kit)	0.5
HFDPC Growth Media	50
Total volume	55.5

2.5.2 세포배양

HFDPC 세포를 Basal medium (Growth Media, CB-HDP-003, CEFO Co., Ltd, Korea) 배지에 37 °C, 5 % CO₂ incubator (MCO-20AIC, Sanyo, Japan)에서 3 일에 한 번씩 계대 배양한다.

2.6 군구성 및 처리농도

2.6.1 군구성

2.6.1.1 Cytotoxicity assay

군	1 차 시험 처리농도 (%)	처리액량 (mL/well)
시험물질	10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0	0.1

2.6.1.2 Efficacy test

군	2 차 시험 처리농도 (%)	처리액량 (mL/well)
시험물질	Cytotoxicity assay 결과에 따른 3 농도 설정	0.1

2.6.2 처리농도설정

Cytotoxicity assay 농도는 부형제에 시료가 녹는 최고 농도를 기점으로 공비 1/2 로 설정하고 1 차 시험의 결과에 근거하여 시험물질의 농도를 설정한다.

Efficacy test 농도는 cytotoxicity assay 에서 얻어진 결과에 따라 시험물질의 농도를 설정한다.

2.7 Cytotoxicity test

- 2.7.1 96 well plate 에 6×10^3 cells/well 농도로 세포부유액을 각 well 에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.
- 2.7.2 세포 배양액을 제거하고 시험물질(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 및 0 %)이 농도별로 포함된 배양배지를 100 μ L 씩 처리한다. 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.
- 2.7.3 CCK-8 (Dojindo, Japan) 10 μ L 를 첨가하여 37°C incubator 에서 1 시간 추가 배양한다.
- 2.7.4 Microplate reader (Victor TMx3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정한다.
- 2.7.5 정상 대조군의 생존률 대비 각 농도별 생존률을 구한다.

Survival Rate (%)

$$= (1 - \text{Absorbance of test substance group} / \text{Absorbance of normal group}) \times 100$$

2.8 Efficacy test (RT-qPCR)

- 2.8.1 60 mm plate 에 2.5×10^5 cells/plate 농도로 세포부유액을 각 plate 에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.
- 2.8.2 세포 배양액을 제거하고 시험물질(Cytotoxicity assay 결과, 3 농도)이 농도별로 포함된 배양배지를 4 ml 씩 처리한다. 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.

- 2.8.3 세포배양액을 제거하고, 세포는 easy-Blue (Intron biotechnology, Korea)의 매뉴얼에 따라 total RNA 를 추출한다. 추출된 total RNA 는 Infinite[®] 200 Pro (TECAN, Switzerland)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 에서 흡광도를 측정하여 정량한다.
- 2.8.4 5 α -reductase II, VEGF, FGF-7 및 FGF-10 유전자를 RT-qPCR 방법으로 분석한다.
- 2.8.5 RT-qPCR 은 iTaq[™] Universal SYBR[®] Green one-Step kit (Bio-RAD, CA, U.S.A.)를 사용하여 Real time PCR machine (CFX384 Real Time System, BIO-RAD, CA, U.S.A)을 이용하여 Reverse transcription reaction: 10 min at 50 °C, polymerase activation and DNA denaturation: 1 min at 95 °C, amplification (denaturation: 15 sec at 95 °C, annealing and extension: 30 sec at 60 °C, 40 cycle) 의 조건으로 실시한다.
- 2.8.6 결과로 얻어진 C(t) 값은 GAPDH 의 C(t) 값으로 보정하여 음성대조군 대비 유전자 발현량을 상대정량 한다.

2.9 자료의 통계처리

세포독성시험은 통계분석을 실시하지 않는다. RT-qPCR결과는 SPSS program (version 20.0, IBM Corp., U.S.A)을 이용하여 통계처리 한다.

Appendix III. Protocol Amendments



시험계획서 변경기록서

Protocol Amendment

시험제목 : "CARON solution"에 대한 *in vitro* 탈모, 발모 효능시험
시험번호 : B20008
변경번호 : 1
변경일자 : 2020/3/6
시험기관 : (주)바이오텍스탁
우28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53
시험의뢰자 : 카론바이오(주)
서울특별시 강남구 학동로 6길8 범우빌딩 1층

시험책임자:	 김도국	2020.03.06 일자
연구소장:	 박철범	2020.03.06 일자
시험의뢰자: (또는 모니터)	 조진형	2020.03.06 일자

"CARON solution"에 대한 *in vitro* 탈모, 발모 효능시험

I. 변경사유 : 시험의뢰자와 협의하에 시험 결과에 따른 시험물질의 처리 농도 및 시험방법에 대해 관련 내용을 변경한다.

Page 8

2.6 군구성 및 처리농도

2.6.1. 군구성

2.6.1.1. Efficacy test

군	2 차 시험 처리농도 (%)	처리액량 (mL/well)
시험물질	Cytotoxicity assay 결과에 따른 3 농도 설정 0.15, 0.05, 0.017%	0.1

2.6.2. 처리농도 설정

Cytotoxicity assay 농도는 부형제에 시료가 녹는 최고 농도를 기점으로 공비 1/2 로 설정하고 1 차 시험의 결과에 근거하여 시험물질의 농도를 설정하였다.

Efficacy test 농도는 cytotoxicity assay 에서 얻어진 결과에 따라 0.15, 0.05, 0.017%로 시험물질의 농도를 설정하였다.

2.8 Efficacy test (RT-qPCR)

2.8.1. 60-mm 6 well plate 에 2.5×10^5 1×10^5 cells/plate 농도로 세포부유액을 각 plate 에 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.

2.8.2. 세포 배양액을 제거하고 시험물질(Cytotoxicity assay 결과, 3 농도 0.15, 0.05, 0.017 %)이 농도별로 포함된 배양배지를 4- 2 ml 씩 처리한다. 37 °C, 5 % CO₂ incubator 에서 24 시간 배양한다.

2.8.3. 세포배양액을 제거하고, 세포는 easy-Blue (Intron biotechnology, Korea)의 매뉴얼에 따라 total RNA 를 추출한다 RNeasy Mini kit (Lot No. 157031929, Qiagen, Germany)의 매뉴얼에 따라 RNA 를 추출하였다. 추출된 total RNA 는 Infinite[®] 200 Pro (TECAN, Switzerland)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 에서 흡광도를 측정하여 정량한다.

2.8.4. 5 α -reductase II, VEGF, FGF-7 및 FGF-10 유전자를 RT-qPCR 방법으로 분석한다.

-RT-qPCR 조성물 조건

명칭	조성 (μL)
iTaq universal SYBR Green reaction mix(2x)	8.0

BTT Study No.: B20008
Protocol Amendment

iScript reverse transcriptase	0.2
Forward primer (3 µmole)	1.0
Reverse primer (3 µmole)	1.0
RNA(20ng/uL)	5
3차 증류수	0.8
Total	16.0

-Primer information

Gene		Sequence for Primers (5'-3')
5α-reductase II	Forward	TGAATACCCTGATGGGTGGT
	Reverse	GGAAATTGCTCCAGAAACATA
VEGF	Forward	CCCACTGAGGAGTCCAACAT
	Reverse	AAATGCTTTCTCCGCTCTGA
FGF-7	Forward	CCTGAGCGACACACAAGAAG
	Reverse	GCCACTGTCGCTTCCTTATT
FGF-10	Forward	GCATGTGCGGAGCTACAATCA
	Reverse	ACGGCAACAACCTCCGATTCTAC
GAPDH	Forward	CATCCAGCAAAGATCAGCCTC
	Reverse	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA

2.8.5. RT-qPCR 은 iTaq™ Universal SYBR® Green one-Step kit (Bio-RAD, CA, U.S.A.)를 사용하여 Real time PCR machine (CFX384 Real Time System, BIO-RAD, CA, U.S.A)을 이용하여 Reverse transcription reaction: 10 min at 50 °C, polymerase activation and DNA denaturation: 1 min at 95 °C, amplification (denaturation: 15 sec at 95 °C, annealing and extension: 30 sec at 60 °C, 40 cycle) 의 조건으로 실시한다.

RT-qPCR 은 iTaq™ Universal SYBR® Green one-Step kit (Lot No. 64336708 BIO-RAD, CA, U.S.A.)를 사용했으며 Real time PCR machine (CFX384 Real Time System, BIO-RAD, CA, U.S.A)을 사용하여 다음 조건으로 실시되었다.

-RT-qPCR 조건

Step	Temperature (°C)	Time	Cycle
Reverse Transcription	50	10 min	1 cycle
Pre-denaturation	95	1 min	1 cycle
Denaturation	95	15sec	44 cycle
Annealing	60	30 sec	

Appendix IV. Certificate of Analysis

ITEM CODE : T7009

Certificate of Analysis

Product Name **CARON Solution**

INCI Name Morus Alba Root Extract, Ficus Carica (Fig) Fruit Extract,
Camellia Sinensis Leaf Extract

LOT 191218AS

Analytical Tests	Specifications	Results
Appearance	Liquid	Pass
Color	Brown to dark brown	Pass
Odor	Characteristics	Pass
pH (25°C)	4.00 – 7.00	5.49
Relative density at 25°C	0.990 – 1.040	1.014
Heavy Metals (as Pb)	< 20ppm	Pass
Arsenic	< 2ppm	Pass
Microbiological (cfu/ml)		
Total bacterial count	Less than 100 cfu/ml	Pass
Yeast & Molds	Less than 10 cfu/ml	Pass
Preservatives	NONE	
Storage	In original package, closed and protected from Heat and light for 2 years.	

국문명 뽕나무뿌리추출물, 무화과추출물, 녹차추출물

Issue date 2019. 12. 21

Checked by **Dae Han Kim**

Approved by **Dong Sig Choi**



T.E.N.CO.,LTD
ACE Dongbaek Tower 2-603, 16-4, Dongbaekjungang-ro, 16beon-gil,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea
Tel : +82.(0)31.8013.6882 / Fax : +82.(0)31.8060.7336

Eternal | 주티이엔
Nature