

인체 모낭배양에서 모낭성장과
관련된 인자의 발현에 대한
substance P 의 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
오 탁 현

인체 모낭배양에서 모낭성장과
관련된 인자의 발현에 대한
substance P 의 영향

지도 이 원 수 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

오 탁 현

오탁현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

심사위원 _____ (인)

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성할 수 있도록 도와주신 모든 분들에게 감사드립니다. 연구를 시작하기부터 논문을 마칠 때까지 항상 세심하고 자상한 조언으로 이끌어 주시면서 이 논문을 완성할 수 있도록 지도하여 주신 이 원수 지도 교수님께 깊은 감사를 드리며, 연구와 강의로 바쁘신 가운데도 좋은 논문이 될 수 있도록 많은 충고와 격려를 주셨던 안 성구 교수님과 박 주영 교수님께도 감사를 드립니다.

항상 저의 부족한 부분을 채울 수 있게 많은 가르침을 주시는 최응호 교수님과 논문이 완성되기까지 저의 빈자리를 채워준 이 은영 연구원, 피부과 의국원들께도 감사 드립니다.

그리고 저를 항상 걱정해주시고 사랑하시는 부모님을 비롯한 가족분들과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저 자 씬

차 례

그림차례	iii
표차례	iv
국문요약	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
가. 연구대상	4
나. 연구재료	4
다. 배지구성	4
(1) 모낭기관 배양배지	4
(2) 모유두세포 배양배지	5
2. 방법	5
가. 인체모낭의 분리	5
나. 모유두세포의 분리	5
다. 배양	6
라. 배양조건	6
마. 결과판정	6
(1) 모낭의 형태 및 길이성장 측정	6
(2) 모낭 및 모유두세포로부터 total RNA 분리	7
(3) RT-PCR 시행	7
바. 통계처리	7

III. 결과	8
1. 분리된 모낭의 시험관 내 성장 형태	8
2. Substance P가 모낭의 길이성장에 미치는 효과	8
3. 전체 모낭에서 길이 증가를 보이는 모낭의 비율 측정	9
4. SP 처리에 의한 모낭의 성장인자 및 세포고사 관련 분자의 발현	9
5. 모유두세포의 배양 및 SP 처리에 의한 효과	9
IV. 고찰	11
V. 결론	15
참고문헌	17
부록	23
영문요약	33

그림 차례

Fig. 1. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in DMEM(control group) for 10 days.	23
Fig. 2. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-6} M SP (SP group) for 10 days.	24
Fig. 3. Effect of SP on human follicle elongation cumulated for 14 days.	25
Fig. 4. Effects of different media on daily human hair follicle elongation measured every other day for 14 days.	26
Fig. 5. Elongation of hair follicles.	27
Fig. 6. RT-PCR analysis I : cultured for 4 days in control and SP treated medium.	28
Fig. 7. RT-PCR analysis II : cultured for 8 days in control and SP treated medium.	29
Fig. 8. Effects of SP on the cultured human dermal papilla cells.	30
Fig. 9. Effect of SP on the mRNA level of growth factors in cultured dermal papilla cells.	31

표 차 례

Table 1. Primer sequences	32
---------------------------------	----

국 문 요 약

인체 모낭배양에서 모낭성장과 관련된 인자의 발현에 대한 substance P 의 영향

모낭은 피부 내 구조물 중에서 신경섬유의 밀도가 가장 높게 분포되어 있는 기관이며, 이러한 신경섬유로부터 유리되는 신경펩타이드는 모발성장과 모발주기에 중요한 역할을 한다. 또한 모발성장과 주기에 있어 다양한 성장인자와 세포고사 관련 분자들의 발현이 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서 모낭에 대한 신경펩타이드의 영향과 다양한 성장인자들의 발현에 대한 상관관계를 모낭과 모낭을 구성하는 세포수준에서 분석하는 일이 중요하리라 생각된다.

본 연구는 인체 모낭기관배양을 이용하여 substance P(SP)가 인체 모발의 길이성장에 미치는 영향 및 인체 모낭기관배양과 모유두세포 배양을 이용하여 대표적인 신경펩타이드인 SP 를 처리한 후 분자적 수준에서 모낭성장과 관련된 인자의 발현에 대한 SP 의 영향을 규명하고자 하였다.

안드로겐 호르몬의 영향을 받지 않는 정상 성인의 후두부 두피조직에서 생장기 모낭과 모유두세포를 분리하여 배양하였다. 대조군(SP 를 첨가하지 않고 기본배지에 배양), SP 군(기본배지에 $10^{-6}M$ SP 를 첨가)으로 분류하여 입체현미경으로 각각 모낭의 배양소견과 길이성장을 측정하였다. 또한 SP 를 처리한 후, 모낭의 길이성장과

모발성장에 영향을 미치는 인자들 중 모발성장 촉진인자인 fibroblast growth factor(FGF)-7, insulin-like growth factor(IGF)-1, vascular endothelial growth factor(VEGF) 및 모발성장 억제인자인 interleukin(IL)-1 α , IL-1 β 의 발현과 세포고사 관련 분자인 p53, caspase-3의 발현 변화를 살펴보고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SP는 모발의 길이성장에는 통계적으로 유의한 영향이 없었으나 대조군보다 더 오랫동안 성장하게 함으로써 성장기의 기간을 연장시키는 효과가 있었다.
2. Reverse transcription - polymerase chain reaction(RT-PCR)을 시행한 결과, 인체 모낭에서 SP 처리군은 대조군에 비해 FGF-7의 발현은 증가되었고, caspase-3의 발현은 감소되었다. 또한 모유두 세포에서 SP를 처리했을 때 뚜렷한 형태학적 변화는 관찰되지 않았으며, 모발 성장인자나 세포고사 관련 분자의 발현은 크게 변화되지 않았다. 그러나 모발 성장을 저해하는 인자인 IL-1 β 의 발현은 대조군보다 감소되었다.

이상의 결과로 인체모낭과 모유두세포에 SP를 처리하게 되면 모발의 길이 성장에는 영향을 미치지 않으나, 성장기 기간의 연장과 함께 모발의 성장을 촉진하는 효과를 나타내었다. 또한 SP에 의한 모발의 성장 촉진 효과를 분자적 수준에서 확인할 수 있었다.

핵심 되는 말 : substance P, 모낭기관배양, 모유두세포배양, 모발성장 관련인자

인체 모낭배양에서 모낭성장과 관련된 인자의 발현에 대한 substance P 의 영향

<지도 이 원 수 교수>

연세대학교 대학원 의학과

오 탁 헌

I. 서론

오래 전부터 여러 연구를 통해 신경섬유가 모낭의 성장과 발달, 그리고 모낭주기의 변화에 중요한 기능을 한다는 것은 비교적 잘 알려져 있는 사실이다. 하지만 이는 주로 모낭발달에 작용하는 조직의 상호작용 등에 관한 것으로, 정확히 어떠한 분자단위의 기전에 의해 이러한 기능을 수행하는지에 대해서는 아직도 밝혀지지 않은 부분이 많은 상태이다. 모낭은 대표적인 상피-신경-간엽-외배엽 구조 단위로서, 색조를 띠는 모간은 상피세포(모낭 각질형성세포), 섬유모세포(모유두세포), 신경 외배엽세포(모멜라닌세포)가 협동작용을 통해 만들어 내는 구조물이다¹. 또한 모낭은 포유동물의 피부내 구조물 중에서 신경섬유가 가장 밀도 높게 분포되어 있는 기관이며², 모낭주위 신경분포에 관해서는 비교적 많은 연구 결과들이 보고되고 있다³⁻⁶. 이러한 말초신경계 및 신경섬유로부터 유리되는 신경펩타이

드(neuropeptide)가 모발성장과 주기에 중요한 역할을 한다는 사실이 최근의 임상 및 실험적인 관찰로부터 제시되어 왔다^{1,5,6}. 이러한 모낭에 대한 말초신경계의 기능은 감각신경 말단으로부터 유리되는 다양한 물질과 그 물질에 대한 특이한 수용체의 매개로 인해 일어나는 것으로 추정되고 있으며, 이에 속하는 대표적인 것이 substance P(SP)나 calcitonin gene-related peptide 와 같은 신경펩타이드이다¹.

대표적인 신경펩타이드에 해당하는 SP 는 11 개의 아미노산으로 구성되며, 후근 신경절에서 생합성되는 신경펩타이드이다. 이는 주로 중추 및 말초신경계에 분포하며, 부분적으로 신경릉 기원세포에도 분포한다. SP 는 합성된 후 대부분 척수의 후각부위로 이동하지만 신경말단부로 이동하여 역으로 분비되기도 한다. SP 는 주로 통각을 전달하는데 관여하고 강력한 혈관확장 효과를 나타낸다^{7,8}. 또한 비만세포의 탈과립화와 단핵구의 화학주성을 자극하고⁹, 마우스의 표피세포와 사람의 섬유모세포 증식을 유도한다^{10,11}. 이러한 SP 와 모낭의 성장과의 연관성에 대하여 많은 연구결과들이 보고되고 있다. SP 는 C57BL/6 마우스의 모발성장을 유도하며, SP 의 양은 모낭주기에 따라 변화를 보여서 초기 성장기에는 최대치를, 퇴행기에는 최소치를 나타내는 것으로 알려져 있다¹². 말단의 모낭은 상대적으로 신경의 분포가 풍부하며³, 퇴행기에는 모발의 성장을 억제하는 신경펩타이드와 이들의 수용체가 발견된다¹³. 각질형성세포는 여러 신경전달물질에 대해 강력한 친화력을 갖는 수용체를 표현하므로 신경펩타이드는 모낭의 각질형성세포에 있는 수용체를 직접적으로 자극하는 것으로 생각된다¹⁴. 저자들은

선행연구에서 인체 모낭기관배양을 통하여 SP 가 인체모발의 길이성장에는 통계적으로 유의한 영향이 없었으나, 대조군 보다 더 오랫동안 성장하게 함으로써 성장기의 기간을 연장시키는 효과를 보고하였다^{15,16}. 이러한 결과로 볼 때 SP 처리시 모낭내의 특정한 성장인자나 세포고사 관련 분자들의 발현 변화가 유발될 가능성이 있을 것으로 사료된다. 즉 모발성장과 주기에 있어 다양한 성장인자들과 세포고사 관련 분자들의 발현이 매우 중요하며, 따라서 신경펩타이드에 의한 영향과 다양한 성장인자들의 발현과의 상관관계를 모낭과 모낭을 구성하는 세포수준에서 분석하는 일이 중요할 것으로 생각된다. 이에 저자는 인체 모낭기관배양과 모유두세포배양을 통하여 대표적인 신경펩타이드인 SP 를 처리한 후, 모낭의 길이성장과 함께 모발성장에 영향을 미치는 인자들 중¹⁷⁻²⁴ 모발성장 촉진인자인 FGF-7, IGF-1, VEGF 및 모발성장 억제인자인 IL-1 α , IL-1 β 발현과 세포고사 관련 분자인 p53, caspase-3 의 발현 변화를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 연구대상

안드로겐 호르몬의 영향을 받지않는 정상 성인의 후두부 두피조직에서 모낭을 분리하였고, 이중 성장기 모낭과 모유두세포를 선별하였다.

나. 연구재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicillin(50IU/ml), streptomycin(50 μ g/ml), amphotericin B(125ng/ml)가 함유된 antibiotic-antimycotic solution 과 Trizol 은 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, U.S.A)에서 구입하였다. Insulin(5ng/ml), hydrocortisone(10ng/ml), human transferin (5 μ g/ml), sodium selenite(5ng/ml)와 SP 는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Reverse transcription kit 는 Promega(Madison, WI, U.S.A)에서 구입하였으며, Taq polymerase 는 Takara Shuzo 사(Otsu, Shiga, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

다. 배지 구성

(1) 모낭기관 배양배지

DMEM 을 근간으로 하는 기본 배지에 penicillin(50IU/ml), streptomycin (50 μ g/ml), amphotericin B(125ng/ml)가 함유된 antibiotic-antimycotic solution, insulin(5ng/ml), hydrocortisone(10ng/ml), human transferin(5 μ g/ml),

sodium selenite(5ng/ml)를 첨가하여 CO₂ incubator 에서 배양하였다.

(2) 모유두세포 배양배지

DMEM 을 근간으로 하는 기본 배지에 penicillin(50IU/ml), streptomycin (50 µg/ml), amphotericin B(125ng/ml)가 함유된 antibiotic-antimycotic solution 과 10% fetal bovine serum 을 첨가하여 CO₂ incubator 에서 배양 하였다.

2. 방법

가. 인체모양의 분리

Philpott 등²⁵의 방법을 변형하여 모양을 분리하였다. 먼저 진피-피하지 방층의 경계부를 15 번 메스로 두피 조직을 반으로 나누어 윗부분은 버리고 아랫부분은 배양액이 있는 배양용기에 담는다. 수술용 입체박리현미경 하에서 미세수술용 포셉(watch maker's forcep)으로 모양을 진피 쪽에서 부드럽게 잡아당겨서 뽑아내는데, 이때 모구(hair bulb)가 손상되지 않고 부착된 진피성분 (모유두진피, 결체조직초)이 건재한 생장기 모양만을 선택하여 실험에 사용하였다.

나. 모유두세포의 분리

조직으로부터 분리한 생장기 모양에서 Magerl 등²⁶의 방법을 변형하여 모유두세포를 분리하여 실험에 사용하였다. 먼저 수술용 입체박리 현미경 하에서 미세수술용 포셉으로 모구의 바로 윗부분을 부드럽게 잡고 서서히

압력을 가하면서, 모구의 아랫부분에 있는 결체조직초낭(connective tissue sheath capsule)을 비스듬히 절개하여 모유두세포를 분리하였다.

다. 배양

분리한 생장기 모낭을 24 well plate(Corning NY, U.S.A)의 각 well 당 1 개씩 넣고 배지 500 μ l 를 넣은 뒤 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator 에 넣어 배양하였다. 배지는 3 일마다 교환하였으며 모낭은 배지안에서 자유롭게 부유하면서 배양하였다.

분리한 모유두 세포는 10⁻⁶M 의 SP 를 처리한 후 18 시간 동안 CO₂ incubator 에서 배양하였다.

라. 배양조건

- (1) 대조군 : SP를 첨가하지 않은 기본배지에서 모낭을 배양하였다.
- (2) SP군 : 기본배지에 SP를 10⁻⁶M의 농도가 되게 첨가하였다.

대조군과 SP군은 각각 18개씩의 모낭을 배양하였으며, 이때 사용된 SP의 농도는 예비실험을 통해 가장 적절하다고 판단된 농도를 선택하였으며 동일한 실험을 2회 반복하였다.

마. 결과판정

(1) 모낭의 형태 및 길이성장 측정

모낭의 형태(생장기, 퇴행기, 휴지기 모낭)는 x1.5 대물렌즈를 부착시킨 입체현미경(Olympus, SZ-40, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 배양 당일 및 2일 간격으로 관찰하고 사진을 찍어서 비교하였으며 개개 모낭의 성장

기 유지 기간을 조사하였다. 모낭의 길이는 모구의 끝에서 모간(hair shaft)의 절단부까지로 정하였으며, 현미경의 대안렌즈에 부착된 측정눈금을 이용하여 2일 간격으로 배양 14일까지 측정한 후에 통계 처리하였다.

(2) 모낭 및 모유두 세포로부터 total RNA 분리

분리한 모낭에 SP 를 10^{-6} M 로 처리하여 배양한 후, 처리하지 않은 대조군과 함께 배양 4 일과 8 일째에 total RNA 를 분리하였다. 또한 모유두세포에 10^{-6} M 의 SP 를 처리한 후 18 시간 동안 CO₂ incubator 에서 배양한 후, 모유두 세포로부터 total RNA 를 분리하였다.

(3) RT-PCR 시행

(2)에서 분리한 total RNA로부터 Oligo dT를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 Table 1에 명시된 각각의 primer를 이용하여 PCR 을 시행하였다.

바. 통계처리

모낭의 길이 성장, 모낭의 생장기 유지 기간을 비교하기 위하여 모낭의 길이 성장 항목을 repeated measure ANOVA 검정하였으며, 생존분석을 위하여 Kaplan-Meier survival analysis를 이용하여 Log-rank test로 생존곡선을 비교하였다. 통계 프로그램(SPSS, Win 10.0)을 이용하였으며 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 하였다.

Ⅲ. 결과

1. 분리된 모낭의 시험관내 성장 형태

대조군의 모낭은 배양 4일까지는 활발히 성장하였으며 형태학적으로 초기 성장기의 모습을 유지하였다(Fig. 1). 그 이후에는 조금씩 형태가 변하여 퇴행기로 변하는 모낭이 증가하였다. 배양 8일 이후부터는 대부분의 모낭이 성장을 멈추었으며 대부분 퇴행기의 형태변화를 나타내었다.

SP군은 시간에 따라 길이가 성장하는 경향이 있었으나 성장의 양상은 전체 배양기간 동안 길이성장과 생장기 유지 비율이 대조군과 비슷하였다(Fig. 2).

배양 8일 이후에도 성장속도는 감소하였으나 조금씩 길이가 증가하였다. 10일 이후에는 대부분 퇴행기로 이행되었다.

2. Substance P가 모낭의 길이성장에 미치는 효과

대조군에서 14 일 동안 배양된 모낭 18 개의 일일 평균 성장길이는 $0.08 \pm 0.042\text{mm}$ 이었다. 배양 6 일째까지는 활발하게 길이 성장을 하였으나 그 이후는 성장 속도가 현저하게 감소하였다(Fig. 3, 4).

SP 군의 하루 평균 성장길이는 $0.08 \pm 0.028\text{mm}$ 로 대조군과 유사하였다. 배양 2 일째에는 SP 군이 대조군에 비해 현저한 길이 성장률을 보였다. 그러나 SP 군은 대조군에 비하여 통계적으로 의미 있는 길이 성장의 차이는 없었다(Fig. 3, 4).

3. 전체 모낭에서 길이 증가를 보이는 모낭의 비율 측정

생장기 모발의 비율에서도 대조군과 비교할 때 배양 6일째까지는 대조군과 SP군에서 생장기 모낭의 비율이 각각 93%, 94%로 유사하였다. 배양 8일째에는 대조군이 64%, SP군이 81%로 SP군에서 생장기가 대조군 보다 잘 유지되었다. 그 이후 급속히 퇴행기로 변화하는 모낭이 증가하여 배양 12일째에는 대조군이 21%, SP군은 모낭의 25%에서 생장기를 유지하였다 (Fig. 5).

4. SP 처리에 의한 모낭의 성장인자 및 세포고사 관련 분자의 발현

10^{-6} M의 SP를 처리하여 생장기 모낭을 배양한 다음, 배양 4일과 8일째 모낭에서 total RNA를 분리하여 Table 1에 명시된 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 SP를 처리했을 때 FGF-7의 발현이 대조군 보다 증가되었고, caspase-3의 발현은 대조군 보다 감소되었다 (Fig. 6, 7). 이러한 현상은 배양 4일째에 더욱 현저하였다.

5. 모유두세포의 배양 및 SP 처리에 의한 효과

모유두세포에 10^{-6} M의 SP를 처리한 후 18시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 모유두세포에 SP를 처리했을 때 뚜렷한 형태의 변화는 없었다(Fig. 8). 18시간 동안 10^{-6} M의 SP를 처리한 모유두세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행한 결과, 모유두세포에서는 SP 처리에 의한 모발성장 촉진인자나 세포고사 관련 분자의 발현은 크게 변화되지 않았으

나, 모발성장을 저해하는 인자 중 IL-1 β 의 발현은 대조군 보다 낮은 결과를 보였다(Fig. 9).

IV. 고찰

인체 모낭에서는 세포의 성장, 상피조직과 간엽조직의 상호작용, 표피의 분화와 호르몬의 작용 등의 다양한 과정으로 모발의 주기를 이루게 되는데, 각각의 모낭은 생장기, 퇴행기, 휴지기로 이루어진 3 단계의 모발주기를 갖는다²⁷. 모발주기의 역동은 종간에 차이가 있으며, 동종에서는 부위간, 같은 부위에서는 모낭의 형태에 따라 다르다²⁸. 모발은 성장과 탈락을 주기적으로 반복하는 모발주기를 일생동안 계속하게 된다. 이러한 과정에 있어 수많은 성장인자와 이에 대한 수용체들이 모낭의 발달과 주기에 다양한 영향을 미치고 있으며, 모낭은 전신적 요인에 의해 조절될 수 있는 내적리듬을 갖고 있다고 생각된다. 모낭주기의 생태는 종간마다 큰 차이를 보이는데 이는 모낭의 신경섬유 분포의 차이, 모낭주기의 차이, 종간의 특성의 차이에 기인하는 것으로 추측된다. 모낭은 구조적으로 3 부분으로 나눌 수 있는데 모낭의 기저부에서 기모근이 있는 부위까지를 하부, 기모근이 부착되어 있는 부위에서 피지선관의 입구까지를 협부, 피지선관의 입구부터 모발이 피부의 표면으로 나오는 부위를 모누두부라고 한다. 모낭의 하부는 5 개 부분, 모유두, 모기질, 모간, 내측모근초, 외측모근초로 구성된다. 모발의 성장은 다양한 외적 조절요인들이 관여하지만, 궁극적으로는 모낭을 구성하는 부분 중에서 상피세포로 구성된 외측모근초와 간엽세포로 구성된 모유두세포 사이의 상호작용에 의해 조절된다^{29,30}. 모낭의 bulge 부분은 모낭에 대한 기모근의 부착 부위에 있을 것으로 생각되는 구조로서 상피줄

기세포(epithelial stem cell)로 이루어져 있다. 특히 신경말단, 머켈세포(Merkel cell)와 신경성장인자, 또는 다른 신경펩타이드를 생산하는 신경분비세포가 풍부한데 이러한 물질들은 모낭의 증식을 조절한다³¹. 또한 모발의 성장은 다양한 외적, 내적 인자들의 영향을 받으며 이것이 모발의 성장과 관련된 질환의 병태생리에 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. Lee³²는 정상두피의 모낭으로부터 얻은 모낭외근초 및 모유두 진피세포를 배양하여 원형탈모증 환자의 혈청을 첨가한 후 성장효과를 관찰하여 원형탈모증 환자의 혈청에는 모발의 성장을 억제하는 어떤 물질이 있다고 보고하였다. 이는 모발의 성장에 있어 다양한 인자들이 관여한다는 사실을 의미한다. 즉 인체 모발이 성장하기 위해서는 모낭 주위의 여러 가지 인자들의 작용과 모낭 내에 있는 표피세포와 모유두세포의 상호작용이 매우 중요하며, 이러한 상호작용에 의해 모발의 성장 및 주기가 조절된다. 그러므로 모낭성장을 촉진시키는 물질을 처리한 후 다양한 분자들의 발현을 분석함으로써 모발의 성장과 모발주기의 분자적 기작을 밝히는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

모낭은 피부내 구조물 중에서 신경섬유가 가장 밀도 높게 분포되어 있는 기관으로서², 모낭 주기를 통해 이러한 신경섬유의 분포에 다양한 변화가 나타난다. 이러한 신경섬유의 변화가 모낭 발달 및 주기에 영향을 줄 수 있으며 이에 관여하는 물질이 신경펩타이드이다^{25,33}. 신경펩타이드는 신경조직에서 생성되어 표적세포의 수용체와 결합하여 다양한 작용을 하는 물

질이다. 주요한 기능은 자율신경계 구성원으로서의 국소적인 작용과 중추 신경계의 뇌 펩타이드로서의 작용이다. 또한 시상하부-뇌하수체 순환계나 전신순환에 의해 표적세포에 대한 신경호르몬으로서의 작용 등 신경세포와 면역계 사이에서 신호를 전달하며 서로를 조절하는 기능 및 각종 세포에 대한 성장 조절인자로도 작용을 한다^{8,10}. 피부에는 SP, calcitonin gene-related peptide, protein gene product 9.5, neurokinin A, vasoactive intestinal peptide, somatostatin, neuropeptide Y, γ -melanocyte stimulating hormone, opioid 등 수많은 신경펩타이드가 존재한다⁷⁻⁹. 여러 실험에서 피부과 질환에 신경펩타이드가 연관되어 있음이 알려져 있는데, 그 중 대표적인 신경펩타이드가 tachykinin 인 SP로서 이는 건선, 아토피 피부염과 관련이 있다³⁴⁻³⁶. 신경펩타이드의 모낭에 대한 영향은 각종 신경펩타이드의 특이 수용체를 다량 함유하고 있는 모낭세포를 신경펩타이드가 직접적으로 자극하기 때문인 것으로 알려져 있다^{14,37-40}. SP는 마우스의 모발주기에서 성장기를 유도하는 기능이 있으며¹², 인체 모낭의 배양에서 성장기의 기간을 연장시키는 효과가 있다^{15,16}. 또한 SP의 분비를 촉진시키는 작용이 있는 capsaicin은 마우스에서 모낭의 성장기를 조기에 유도하고, 성장기 기간을 연장한다는 보고가 있었으며⁴¹, SP를 지속적으로 유리하는 특수장치를 마우스의 피하층에 삽입한 뒤 모낭성장이 촉진된다는 보고도 있다¹². 이와는 대조적으로 지나치게 고농도의 SP를 투여하면 정반대의 결과를 나타낼 수 있는데, SP를 마우스에 피내주사 하게 되면 모낭이 퇴행기로 이행되며, SP 또는 capsaicin의 주사 부위에 국소적인 탈

모증과 모낭 위축이 유도된다⁴². 따라서 인체모낭에서 SP 는 모발 성장의 유도 또는 억제 기능 모두에 관여할 것으로 생각되며 그것은 SP 의 농도와 관계가 있을 것으로 생각된다.

저자들은 인체모낭의 기관배양과 모유두세포배양을 통해 모발성장에 영향을 미치는 것으로 알려진 SP 를 처리한 후, 그에 따른 영향을 분석하였다. 입체 현미경을 통한 시간에 따른 모낭의 형태 및 길이 관찰에서 대조군과 SP 군에서 큰 차이가 관찰되지 않았으나, 통계적으로 배양 10 일째를 제외한 SP 군은 대조군 보다 길이 성장이 촉진된 양상이 관찰되었고, 성장기가 잘 유지되었다. 이러한 효과는 분자적 수준에서도 증명되었는데 즉, 모발성장을 촉진시키는 인자 중에 FGF-7 의 발현은 배양 4 일째에 대조군에 비해 뚜렷하게 증가되었고, 세포고사 관련 인자인 caspase-3 의 발현은 배양 초기(4 일)와 후기(8 일)에 모두 대조군 보다 낮았다. 모유두세포배양에서 SP 에 의한 효과를 분석한 결과는 모발성장을 촉진시키는 인자나 세포고사 관련 분자들의 발현에는 변화가 없었으나, 모발성장을 저해하는 인자 중 IL-1 β 의 발현이 대조군 보다 낮은 결과를 나타내었다. 본 연구는 SP 에 의한 모발 성장기 기간의 연장, 모발성장 촉진인자의 발현 증가, 세포고사 관련인자 및 모발성장 억제인자의 발현 감소를 분자적 수준에서 규명하는데에 그 의의가 있다고 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 인체 모낭기관배양을 이용하여 SP 가 인체 모발성장에 미치는 영향 및 인체 모낭기관배양과 모유두세포배양을 이용하여 대표적인 신경펩타이드인 SP 를 처리한 후 분자적 수준에서 모낭성장과 관련된 인자의 발현에 대한 SP 의 영향을 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SP 는 모발의 길이성장에 있어서 통계적으로 유의한 영향이 없었으나, 대조군보다 더 오랫동안 성장하게 함으로써 성장기의 기간을 연장시키는 효과가 있었다.
2. RT-PCR 을 시행한 결과, 인체 모낭에서 SP 처리에 의해 FGF-7 의 발현이 증가되었으며, caspase-3 의 발현 감소로 모낭 표피세포의 세포고사가 지연되는 것으로 추측된다. 또한, 모유두세포에서 IL-1 β 의 발현 감소로 표피세포에 어떤 신호를 전달함으로써 모낭의 성장기를 더 오래 유지시키는 것으로 추정된다.

이상의 결과로 인체모낭과 모유두세포에 SP 를 처리하면 모발의 성장기 기간이 연장되는 것을 확인할 수 있었고, FGF-7 의 표현 증가와 caspase-7 및 IL-1 β 의 표현감소를 관찰할 수 있었다. 이를 통해 인체모낭과 모유두세포에 SP 를 처리하였을 때 모발의 성장기 기간이 연장되는 효과와 함께 모발의 성장 촉진 효과를 분자적 수준에서도 어느 정도 증명

되었다 할 수 있겠다. 앞으로 모낭의 표피세포 배양을 확립하여 모유두세포와의 상호작용을 더 분석해야 할 것이며, 이러한 연구가 모발성장의 분자적 기작을 밝히는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Paus R. Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Curr Opin Dermatol* 1996;3:248-258
2. Winkelmann RK. Cutaneous sensory nerves. *Semin Dermatopathol* 1988;236-268.
3. Halata Z: Sensory innervation of the hairy skin(light and electronmicroscopic study). *J Invest Dermatol* 1993;101:75s-81s
4. Hashimoto K, Ito M, Suzuki Y. Innervation and vasculature of the hair follicle. In: Orfanos CE, Happle R(eds), *Hair and Hair Diseases*, Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp 117-147
5. Hordinsky MK, Ericson ME. Relationship between follicular nerve supply and alopecia. *Dermatol Clin* 1996;14:651-659
6. Rice FL, Kinnman E, Aldskogius H, Johansson O, Arvidsson J. The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP 9.5 immunofluorescence. *J Comp Neurol* 1993;337:366-385
7. Ansel JC, Kaynard AH, Armstrong CA, Olerud J, Bunnett N, Payan D. Skin-nervous system interactions. *J Invest Dermatol* 1996;106:198-204
8. Lotti T, Hautman G, Panconesi E. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:482-496

9. Wallengren J, Ekman R, Sundler F. Occurrence and distribution of neuropeptides in the human skin. *Acta Derm Venereol*(Stockh) 1987;67:185-192
10. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985;315:61-63
11. Tanaka T, Canno K, Ikai K, Imamura S. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988;90:399-401
12. Paus R, Heinzelmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzki BM. Hair growth induction by substance P. *Lab Invest* 1994;71:134-140
13. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Welker P. A new role for neurotrophins. involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 in hair cycle control. *FASEB J* 1999;13:395-410
14. Ansel JC, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Caughman SW, Bunnett NW. Interactions of the skin and nervous system. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997;2:23-26
15. 손인범, 이원수. 인체모낭기관배양에서 substance P 가 모발성장에 미치는 영향. *대한피부과학회지* 2001;39:190-198

16. Lee WS, Sohn IB. Substance P prolongs human hair growth in vitro. *J Dermatol Sci* 2003;33:137-138
17. Mitsui S, Ohuchi A, Hotta M, Tsuboi R, Ogawa H. Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles. *Br J Dermatol* 1997;137:693-698
18. Soma T, Ogo M, Suzuki J, Takahashi T, Hibino T. Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol* 1998;111:948-954
19. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 1994;266:819-822
20. Itami S, Kurata S, Takayasu S. Androgen induction of follicular epithelial cell growth is mediated via insulin-like growth factor-I from dermal papilla cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:988-994
21. Lachgar S, Charveron M, Sarraute J, Gall Y, Bonafe JL. Anti-androgens and estrogens: modulators of VEGF expression in cultured hair dermal papilla cells. *Exp Dermatol* 1999;8:336-338

22. Hoffmann R, Happle R. Does interleukin-1 induce hair loss? *Dermatology* 1995;191:273-275
23. Hamada K, Hirotsu S, Uchiwa H, Yamazaki S, Suzuki K. Pro-inflammatory cytokine interleukin-1 α is downregulated during anagen phase of hair cycle in vivo. *J Dermatol Sci* 2003;33:195-198
24. Hoffmann R, Eicheler W, Wenzel E, Happle R. Interleukin-1 β -induced inhibition of hair growth in vitro is mediated by cyclic AMP. *J Invest Dermatol* 1997;108:40-42
25. Philpott MP, Green MR, Kealey T. Human hair growth in vitro. *J Cell Sci* 1990;97:463-471
26. Magerl M, Kauser S, Paus R, Tobin DJ. Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles. *Exp Dermatol* 2002;11:381-385
27. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1998;341:491-497
28. Messenger AG. The control of hair growth: an overview. *J Invest Dermatol* 1993;101:4s-9s
29. Kim CD, Choe Y, Shim C, Kim K. Interferon β secreted from human hair dermal papilla cells inhibits the growth of outer root sheath

- cells cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1133-1138
30. Fujie T, Katoh S, Oura H, Urano Y, Arase S. The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells. *J Dermatol Sci* 2001;25:206-212
31. Botchkarev VA, Eichmuller S, Johansson O, Paus R. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol* 1997;386:379-395
32. Lee WS. Cytotoxic effect of alopecia areata serum on the cultured follicular outer root sheath cells and dermal papilla cells. *J Wonju Coll Med* 1998;11:116-125
33. Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ, Paus R. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J Invest Dermatol* 2001;116:236-245
34. Eedy DJ, Johnston CF, Shaw C, Buchanan KD. Neuropeptides in psoriasis : an immunocytochemical and radioimmunoassay study. *J Invest Dermatol* 1991;96:434-438
35. Farbeer EM, Nickoloff BJ, Recht B, Fraki JE. Stress, symmetry and psoriasis : possible role of neuropeptides. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:305-311

36. Pincelli C, Fantini F, Massimi P. Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis : an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 1990;122:745-750
37. Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 1993;101:32-36
38. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1997;2:41-48
39. Pincelli C, Yaar M. Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1997;2:31-36
40. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Swanson NN, Steinkraus V. Increased in vitro expression of beta 2-adrenoreceptors in differentiating lesional keratinocytes of vitiligo patients. *Arch Dermatol Res* 1993;285:216-220
41. 이원수, 안형진, 김영희. 마우스 모발성장에 대한 capsaicin 과 minoxidil 의 병용투여 효과. *대한피부과학회지* 2003;41:451-460
42. Maurer M, Peters EMJ, Fischer E, Botchkarev VA, Eichmuller S, Paus R. The role of neuropeptides in murine hair cycle modulation : induction of hair follicle regression by capsaicin and substance P. *J Invest Dermatol* 1996;107:489



Fig. 1. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in DMEM(control group) for 10 days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x 15).

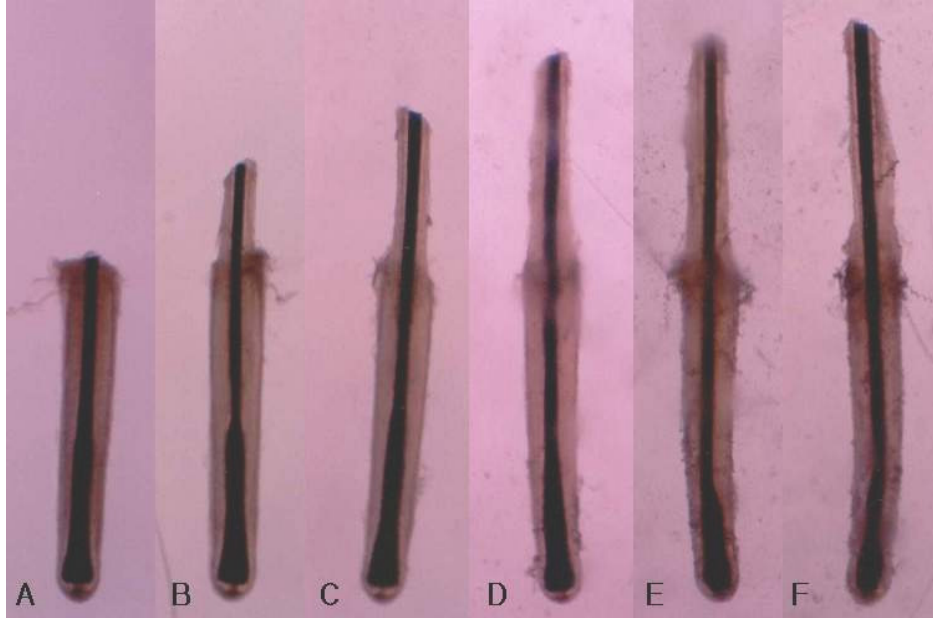


Fig. 2. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-6} M SP(SP group) for 10days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x 15).

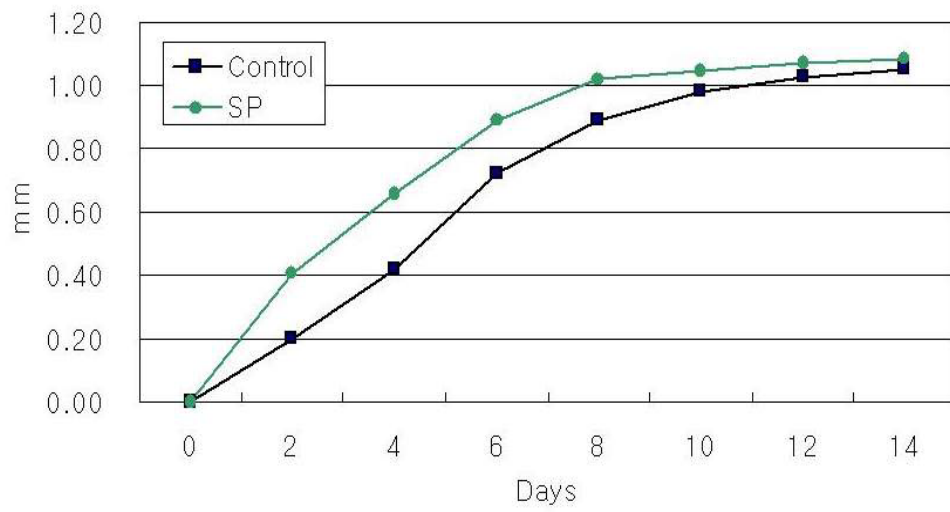


Fig. 3. Effect of SP on human follicle elongation cumulated for 14 days.

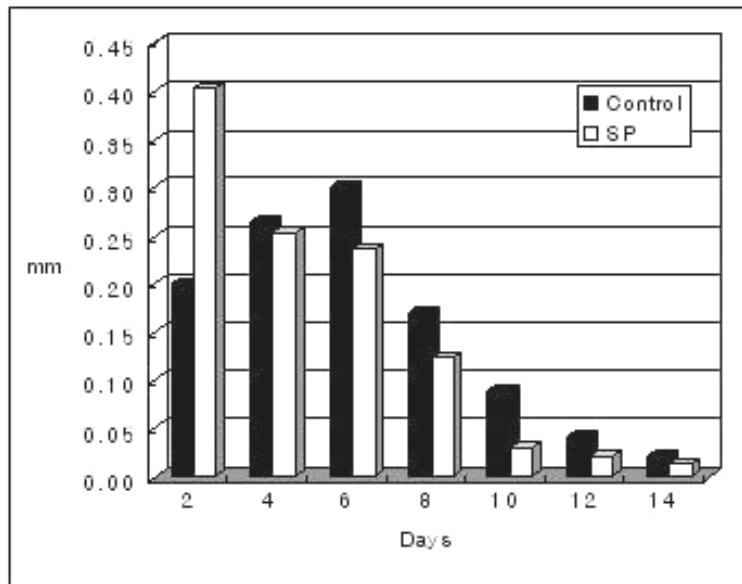


Fig. 4. Effects of different media on human hair follicle elongation measured every other day for 14 days.

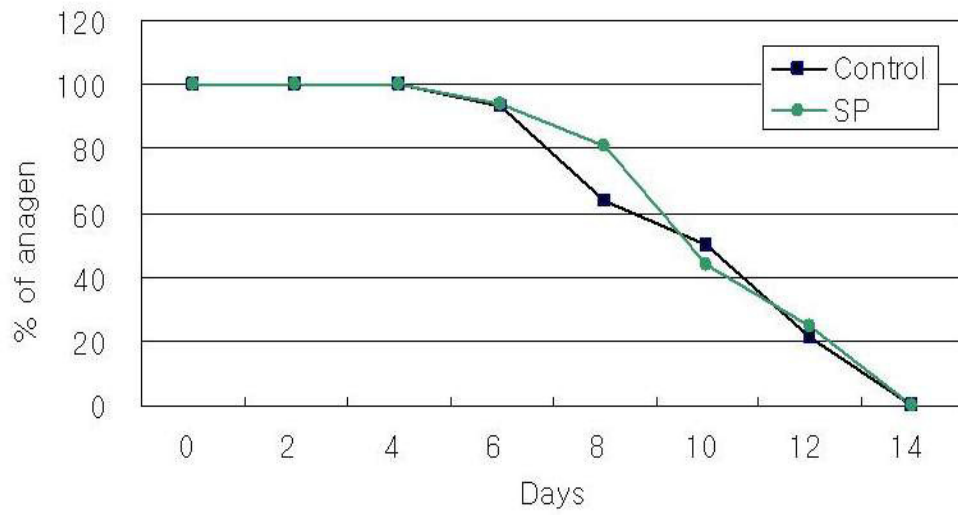


Fig. 5. Elongation of hair follicles.

In follicles incubated with SP, follicle elongation was maintained longer than in controls.

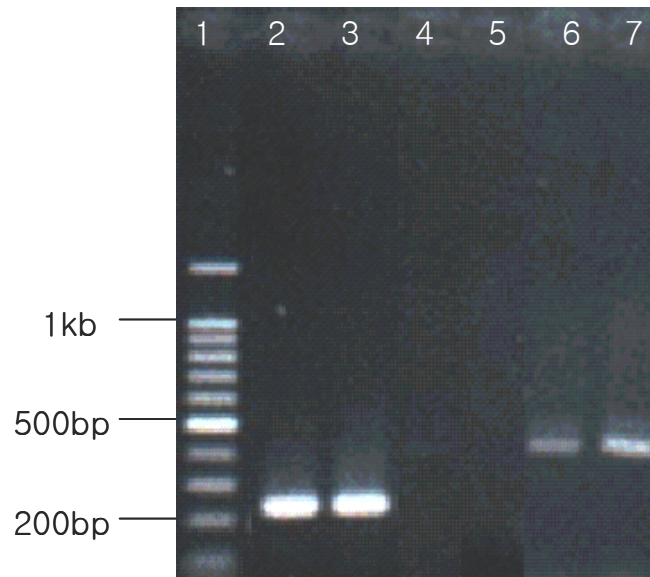


Fig. 6. RT-PCR analysis I : cultured for 4 days in control and SP treated medium.

lane 1 ; 100bp marker, lane 2,4,6 ; control, lane 3,5,7 ; SP treated,
lane 2,3 ; GAPDH, lane 4,5 ; Caspase-3, lane 6,7 ; FGF-7

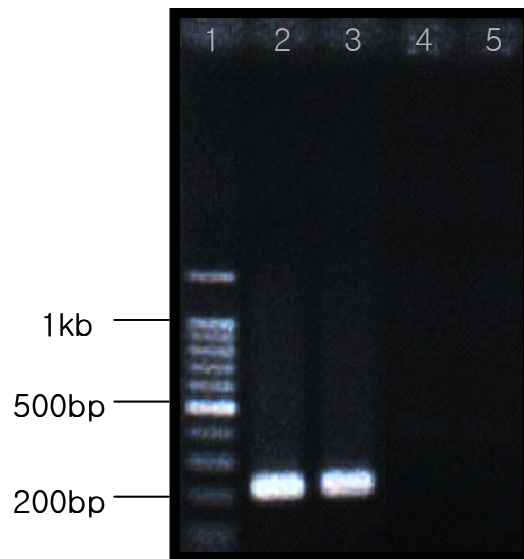


Fig. 7. RT-PCR analysis II : cultured for 8 days in control and SP treated medium.
lane 1 ; 100bp marker, lane 2,4 ; control, lane 3,5 ; SP treated,
lane 2,3 ; GAPDH, lane 4,5 ; Caspase-3

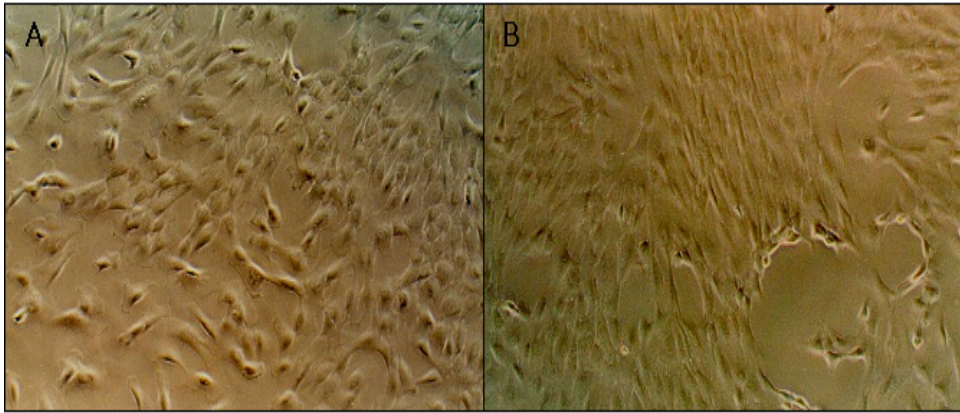


Fig. 8. Effects of SP on the cultured human dermal papilla cells.

Dermal papilla cells were cultured for 18h in the absence(A) and presence(B) of 10^{-6} M SP.

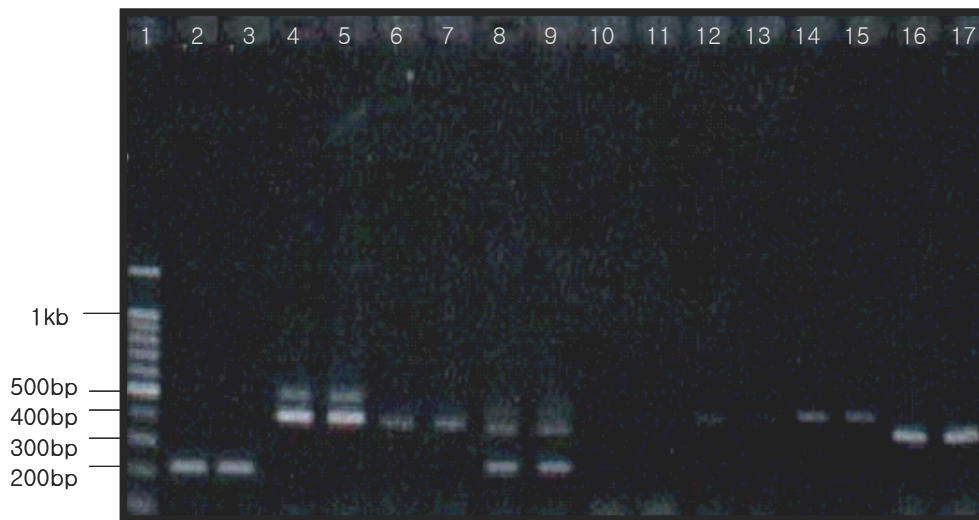


Fig. 9. Effect of SP on the mRNA level of growth factors in cultured dermal papilla cells.

lane 1 ; 100bp marker, lane 2,4,6,8,10,12,14,16 ; Control,

lane 3,5,7,9,11,13,15,17 ; SP treated DPCs, lane 2,3 ; GAPDH,

lane 4,5 ; FGF-7, lane 6,7 ; IGF-1, lane 8,9 ; VEGF,

lane 10,11 ; IL-1 α , lane 12,13 ; IL-1 β , lane 14,15 ; Caspase-3,

lane 16,17 ; p53

Primer		Sequence
GAPDH	forward	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3'
	reverse	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
FGF-7	forward	5'-TCT GTC TAG TGG GTA CTA TAT-3'
	reverse	5'-GTT GTG TGT CCA TTT AGC TG-3'
IGF-1	forward	5'-ATG CAC ACC ATG TCC TCC TC-3'
	reverse	5'-GGT CTT CCT ACA TCC TGT AG-3'
VEGF	forward	5'-CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT-3'
	reverse	5'-ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3'
IL-1 α	forward	5'-GTC TCT GAA TCA GAA ATC CTT CTA TC-3'
	reverse	5'-CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC C-3'
IL-1 β	forward	5'-CAG CCA TGC CAG AAG TAC CT-3'
	reverse	5'-GAC ATC ACC AAG CTT TTT TGC-3'
Caspase-3	forward	5'-ATA CTC CTT CCA TCA AAT AG-3'
	reverse	5'-AAC ATC ACA AAA CCA TAA TC-3'
P53	forward	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TC-3'
	reverse	5'-TTC AGC TCT CGG AAC ATC TCG-3'

Table 1. Primer sequences

Abstract

Effect of Substance P on the Expression of Factors Related to the Hair Growth in the Human Hair Follicle Culture

Tak Heon Oh

*Department of Medicine,
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Won-Soo Lee)

Among constituents of the skin, the hair follicle is the organ in which nerve fibers are distributed with the highest density. Recently, it has been reported that neuropeptides, which are secreted by nerve fibers, have important roles in hair growth and hair cycle change. Also, in the hair growth and hair cycle change, the expression of various growth factors and apoptosis-related molecules are important. Therefore, it is important to identify the relationship between influences by neuropeptides and expression of various molecular factors at the level of hair follicles and hair follicle cells.

The purpose of this study was to identify the effect of substance P on hair growth in human hair follicle organ culture and to identify the relationship between influences by neuropeptides and expression of

various hair growth-related factors at the molecular level of hair follicles after pretreatment with SP used by hair follicle organ culture and dermal papilla cell culture.

Normal human scalp samples were obtained from occipital scalp not affected by androgen, and anagen hair follicles and dermal papilla cells were isolated and cultured. We divided the culture plates into two groups, i.e. control group(DMEM only), SP group(10^{-6} M SP dissolved in DMEM). The results were evaluated by measuring linear hair growth and hair follicle morphology with light microscopy. Also, after pretreatment with SP of cultured hair follicles and dermal papilla cells, we examined the change of expression of hair growth factors(FGF-7, IGF-1, VEGF) and hair growth-inhibitory factors(IL-1 α , IL-1 β) and apoptosis-related molecules (p53, caspase-3).

The following results were obtained from this study.

1. SP did not have a statistically significant effect on the rate of linear hair growth in cultured hair follicles. However, it prolonged the anagen stage of the hair cycle.
2. By RT-PCR, in hair follicles, the expression of FGF-7 is increased over the controls, while the expression of caspase-3 decreased compared to the controls. Also, in the dermal papilla cells no morphological changes were found after pretreatment with SP, and

there was no change in expression of hair growth factors and apoptosis-related molecules. However the expression of IL-1 β , a hair growth-inhibitory factor, decreased compared to controls.

These results showed that SP has growth-stimulatory effect and especially prolongs the duration of the anagen phase without affecting linear hair growth after pretreatment with SP of cultured hair follicles and dermal papilla cells. Also we found that SP shows hair growth-stimulatory effect at the molecular level.

Key Words : Substance P, Hair follicle organ culture, Dermal papilla cell culture, Hair growth-related factors