

인체 모낭기관배양에서 substance P와
calcitonin gene-related peptide의
병용투여가 모발성장에 미치는 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 훈

인체 모낭기관배양에서 substance P와
calcitonin gene-related peptide의
병용투여가 모발성장에 미치는 효과

지도 이 원 수 부교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 훈

이상훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성할 수 있도록 도와주신 모든 분들께 감사드립니다. 연구 시작부터 논문을 마칠 때까지 항상 세심하고 자상한 조언으로 이끌어 주시면서 이 논문이 완성될 수 있게 지도하여 주신 이 원수 지도 교수님께 특별한 감사를 드리며 좋은 논문이 될 수 있도록 충고와 격려를 아끼지 않으셨던 이 광길 교수님, 최 응호 교수님께도 감사드립니다. 그리고 항상 저에게 많은 가르침을 주시는 안 성구 교수님과 논문이 완성되기까지 저의 빈자리를 채워준 김영희 연구원, 피부과 의국원들께도 감사를 드립니다.

또한 저를 항상 사랑하시는 부모님을 비롯한 가족들과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저 자 씬

차 례

그림 차례	iii
표 차례	v
국문 요약	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
가. 연구대상	4
나. 배지성분	4
2. 방법	4
가. 인체모양의 분리	4
나. 배양	5
다. 배양조건	5
라. 결과관정	5
(1) 모양의 형태와 조직소견	5
(2) 모양의 길이성장 및 형태 측정	6
(3) 모양의 방사성 동위원소 흡수량 측정	6
마. 통계처리	6
III. 결과	7
1. 분리된 모양의 시험관 내 성장 형태	7
가. 입체현미경 소견	7

나. 광학현미경 소견	7
2. 배양된 모낭의 길이 성장	8
3. 전체 모낭에서 길이 증가를 보이는 모낭의 비율 측정	8
4. 방사성 동위원소 흡수량	9
IV. 고찰	10
V. 결론	13
참고문헌	14
부록	18
영문요약	29

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; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15). 18
- 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; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15). 19
- Fig. 3.** Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-7} M CGRP (CGRP 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, x15). 20
- Fig. 4.** Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-6} M SP and 10^{-7} M CGRP (combined 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, x15). 21
- Fig. 5.** Histology of cultured human hair follicles maintained in control group for 12 days; A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days, and D) 12 days (H&E, x40). At day 12, hair follicle still keeps normal anagen morphology. 22
- Fig. 6.** Histology of cultured human hair follicles maintained in SP group for 12 days; A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days and D) 12 days (H&E, x40). At day 12, the growth of hair follicle is stopped and the follicle entered catagen stage. 23

Fig. 7. Histology of cultured human hair follicles maintained in combined group for 12 days; A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days and D) 12 days (H&E, x40). At day 8, the growth of hair follicle is stopped and the follicle entered the catagen stage earlier than other groups. 24

Fig. 8. Cumulative human follicle elongation for 14 days. Combined group showed statistically significant inhibitory effect on the rate of linear hair growth from day 6 25

Fig. 9. Effect of each medium on daily human hair follicle elongation measured every other day for 14 days. 26

Fig. 10. Percentage of anagen follicles according to duration. Combined group showed statistically significant inhibitory effect on the anagen stage of hair cycle from day 6. 27

표 차 례

Table 1. ^3H -thymidine incorporation of cultured hair follicle according to culture media and duration.	28
---	----

국 문 요 약

인체 모낭기관배양에서 substance P와 calcitonin-gene related peptide의 병용투여가 모발성장에 미치는 효과

말초신경계가 모발 성장과 모발 주기에 중요한 역할을 한다는 사실이 최근의 임상적 및 실험적인 관찰로부터 제시되어 왔다. 이러한 말초 신경계의 원심성 기능에 관여하는 물질이 신경펩타이드이다. 피부에는 수많은 신경펩타이드가 존재하며 이러한 신경펩타이드는 신경전달물질로서의 기능 이외에 면역 조절, 화학 주성, 성장 조절 등의 인자로도 작용한다. Substance P(SP)는 모발주기에 영향을 미치는 것으로 알려진 대표적인 신경펩타이드로 마우스에서 성장기의 기간을 증가시킴으로써 모발성장을 촉진한다고 알려져 있다. 반면에 또 다른 대표적인 신경펩타이드인 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 모발과의 관계는 거의 알려져 있지 않았다.

이 연구에서는 인체 모낭기관배양을 통하여 첫째, CGRP가 인체 모발성장에 미치는 영향을 알아보고 둘째, 모발 성장과 관계가 잘 알려져 있는 SP와 CGRP를 병용 투여하여 모발성장에 대한 두 물질의 상호 영향을 규명하고자 하였다.

안드로겐 호르몬의 영향을 받지 않는 정상 성인 후두부의 두피조직을 얻어 성장기 모낭을 분리하여 배양하였다. 대조군(SP와 CGRP를 첨가하지 않고 기본배지에 배양), SP군(기본배지 + 10^{-6} M SP), CGRP군(기본배지 + 10^{-7} M CGRP), 병용투여군(기본배지 + 10^{-6} M SP + 10^{-7} M CGRP)의 4개의 군으로 분류한 후 각각의 군 당 18개씩의 모낭을 배양하였으며 이를 통해 모낭의 형태, 조직소견, 모낭의 길이성장, 모낭의 방사성 동위원소 흡수량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 14일간의 인체 모낭기관배양에서 CGRP는 통계학적인 의미는 없었으나 배양 6일 이후부터 모낭의 성장속도가 대조군에 비해 뚜렷이 감소하였고, 배양 10일째부터 퇴행기 모낭이 급격히 증가해 대조군보다 이틀 일찍 모든 모낭이 퇴행기로 변하였다.
2. 14일간의 인체 모낭기관배양에서 CGRP와 SP의 공동투여는 배양 6일 이후부터 통계적으로 의미 있게 대조군에 비해 모낭의 성장속도가 감소하였고 퇴행기 모낭의 수가 급격히 증가하였으며 CGRP 단독 투여시보다 모발 성장과 성장기 억제효과가 증가되었다.

이상의 결과로 CGRP가 인체 모낭기관배양에서 모발의 성장억제와 성장기 기간의 억제에 관여하며, SP와 CGRP의 공동 투여는 모낭에 대한 CGRP의 효과를 증대시키는 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 인체 모낭기관배양, 신경펩타이드, 모발성장, substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP)

인체 모낭기관배양에서 substance P와 calcitonin-gene related peptide의 병용투여가 모발성장에 미치는 효과

<지도 이 원 수 부교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 상 훈

I. 서론

피부에 분포하는 말초신경섬유는 신경계의 고유기능인 구심성의 감각전달기능 외에도 각종 염증반응 및 증식성 피부반응을 조절하는 매우 중요한 원심성 기능을 갖고 있다¹. 피부내 구조물 중에서 신경섬유가 가장 높은 밀도로 분포되어 있는 곳은 바로 모낭이며 모낭주위 신경분포에 관해서는 비교적 많은 연구결과가 보고되어 있다²⁻⁵. 모낭은 외배엽, 중배엽 그리고 신경외배엽에서 유래하는 세포들의 유기적인 상호작용에 의해 모발을 생성하는 기관으로서, 모낭의 발생과 성장 및 모발주기(hair cycle)의 변화에 말초신경계가 중요한 역할을 한다는 사실이 최근의 임상적 및 실험적인 관찰로부터 제시되어 왔다^{4,6}. 이러한 말초신경계의 모낭에 대한 원심성 기능은 감각신경 섬유와 말단부로부터 유리되는 많은 물질과 그 물질에 특이한 수용체의 매개에 의한 것으로 생각되고 있으며 여기에 속하는 대표적인 물질이 substance P(SP)나 calcitonin gene-related peptide(CGRP)와 같은 신경펩타이드이다⁶.

신경펩타이드는 신경조직에서 생성되어 표적세포의 수용체에 결합하여 다양한 작용을 하는 물질로서 그 주요한 기능으로는 자율신경계의 구성원으로서의 국소적인 작용과 중추신경계의 뇌펩타이드(brain peptide)로서의 작용을 들 수 있다. 또한 시상하부-뇌하수체 순환계나 전신순환에 의해 표적세포에 대한 신경호르몬

으로서의 작용 등 신경세포와 면역계 사이에서 신호를 전달하여 서로를 조절하는 기능을 하고, 각종 세포에 대한 성장 조절인자로도 작용을 한다^{7,8}. 피부에는 SP와 CGRP 외에도 neurokinin A, somatostatin, vasoactive intestinal peptide(VIP), neuropeptide Y(NPY), γ -melanocyte stimulating hormone 등 많은 신경펩타이드가 존재한다^{1,7,9}.

대표적 신경펩타이드의 하나인 SP는 11개의 아미노산으로 구성되어 있으며 통각 전달에 관여하고 강력한 혈관확장 효과를 나타낸다^{1,7}. 또한 비만세포의 탈과립화와 단핵구의 화학주성을 자극하고⁹, 마우스의 표피세포와 인간의 섬유아세포 증식을 유도한다^{8,10}. SP와 모낭성장과의 관련성에 대해서는 비교적 많은 연구가 보고되어 있는데 SP는 C57BL/6마우스의 모발성장을 유도하며, SP의 양은 모낭주기에 따라 차이를 보여서 초기 성장기(anagen stage)때 최대치를, 퇴행기(catagen stage)때 최소치를 나타낸다¹¹. 또한 SP를 지속적으로 유리하는 특수장치를 마우스의 피하층에 삽입한 뒤 모낭성장이 촉진된 연구관찰도 발표된 바 있다¹¹. 사람의 모낭기관배양에서도 SP는 모발성장에 영향을 미치는데 특히 성장기의 기간을 연장하는 효과를 보인다¹². 이와는 대조적으로 지나치게 고농도의 SP를 투여하면 정반대의 결과를 보일 수 있어서 SP를 마우스에 피내주사한 뒤 모낭이 퇴행기로 이행되어 주사부위의 모낭위축과 탈모증이 유발된 결과도 보고된 바 있다¹³. 이러한 신경펩타이드의 모낭에 대한 영향은 각종 신경펩타이드의 특이 수용체를 다량 함유하고 있는 모낭세포를 신경펩타이드가 직접적으로 자극하기 때문인 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁸.

또 다른 대표적 신경펩타이드인 CGRP는 37개의 아미노산으로 이루어져 있으며, calcitonin과 같은 유전자에 의해 기호화되어 있는 물질이다^{1,7}. CGRP는 표피하방의 유두진피(dermal papilla)와 자유 신경종말(free nerve ending), 그리고 땀샘에서 SP와 공동으로 위치하고 있으며 SP와 마찬가지로 많은 기능을 갖고 있다^{7,9}. CGRP는 매우 강력한 혈관확장효과를 갖고 있으며 혈관내피세포의 증식을 초래한다^{19,20}. 또한 다양한 면역조절기능을 갖고 있어서 랑게르한스 세포의 항원전달

능과 T 림프구 증식을 억제하고, 화학주성(chemotaxis) 물질의 유리를 증가시키며 일부 염증매개물질의 작용을 억제한다^{7,9}.

CGRP가 모발분화, 모발주기 및 모발질환에서 갖는 구체적인 역할에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 모발성장에 가장 중요한 구조물들인 모유두와 bulge 부위의 말초신경섬유의 CGRP 표현은 정상모낭에 비해 원형 탈모증 병변에서 감소되어 있다⁴. 또한 원형 탈모증 병변내의 CGRP의 양 자체도 감소되어 있다는 보고가 있으며 이는 병변의 국소적인 혈액공급 감소와 동반되어 나타나서, 국소적인 피부 CGRP 수치 감소가 염증반응과 혈관수축을 초래하여 모발성장의 감소와 모발탈락을 초래할 가능성을 제시해주고 있다²¹. 반면에 이와는 대조적으로 최근 보고에 의하면 마우스의 모낭조직배양에서 CGRP는 모낭의 성장기를 억제하는 것으로 되어 있다. 또한 이러한 모낭 성장 억제 작용은 SP에 의해 상쇄되어 SP와 CGRP가 서로 기능적인 길항작용이 있다고 하였다²². 하지만 아직까지 CGRP가 인체 모발에 미치는 영향에 대한 보고는 발표된 바 없다.

따라서 이 연구에서는 인체 모낭기관배양을 통하여 첫째, CGRP가 인체 모발성장에 미치는 영향을 알아보고 둘째, SP와 CGRP를 병용 투여하여 모발성장에 대한 두 물질의 상호 영향을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 연구대상

안드르겐 호르몬의 영향을 받지 않는 정상 성인의 후두부의 두피조직을 얻어 모낭을 분리하였다.

나. 배지 구성

기본배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 근간으로 하여, penicillin(50IU/ml), streptomycin(50g/ml), amphotericin B(125ng/ml)가 든 antibiotic-antimycotic solution, hydrocortisone(10ng/ml), insulin(5 μ l/ml), human transferin(5 μ g/ml), sodium selenite(5ng/ml) (이상 Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 것을 사용하였다.

2. 방법

가. 인체 모낭의 분리

Philpott등²³의 방법을 변형하여 모낭을 분리하였다. 먼저 진피-피하지방층의 경계부에서 메스를 이용하여 수평으로 두피조직을 양분하여 윗부분을 버리고 아랫부분은 배양액이 담긴 배양용기에 담는다. 수술용 입체박리현미경 하에서 미세수술용 포셉(watch marker's forcep)으로 모낭을 진피 쪽에서 부드럽게 잡아당겨서 뽑아낸다. 이때 모구(hair bulb)가 손상되지 않고 부착된 진피성분(모유두진피, 결체조직초)이 건재한 생장기 모낭만을 따로 추려내어 실험에 사용하였다.

나. 배양

분리된 생장기 모낭은 24 well plate(Corning NY, U.S.A)의 각 well 당 1개씩 넣고 배지 500 μ l를 넣은 뒤 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂/95% 공기 하에서 배양기에 넣어 배양하였다. 배지는 3일마다 교환하며 모낭은 배지 안에서 자유롭게 부유하면서 배양하였다.

다. 배양조건

(1) 대조군 : SP와 CGRP를 첨가하지 않은 기본배지에서 모낭을 배양하였다

(2) SP군 : 기본배지에 SP를 10⁻⁶M의 농도가 되게 첨가하였다.

(3) CGRP군 : 기본배지에 CGRP를 10⁻⁷M의 농도가 되게 첨가하였다.

(4) 병용투여군 : 기본배지에 10⁻⁶M SP와 10⁻⁷M CGRP를 첨가하였다

이렇게 4개의 군으로 분류한 후 각각의 군 당 18개씩의 모낭을 배양하였으며, 이때 사용된 SP와 CGRP의 농도는 각각 두 물질의 별도 예비실험을 통해 가장 적절하다고 판단된 농도를 선택한 것이며 같은 실험을 2회 반복하였다.

라. 결과판정

(1) 모낭의 형태와 조직소견

모낭의 형태(생장기, 퇴행기, 휴지기 모낭)는 x1.5 대물렌즈를 부착시킨 입체현미경(Olympus, SZ-40, Japan)을 이용하여 측정하였으며 배양 당일 및 2일 간격으로 관찰하고 사진을 찍어서 비교하였다. 또한, 배양된 모낭을 10% 포르말린에 고정하고 통상적 방법에 따라 파라핀에 포매한 뒤 헤마톡시린-에오진 염색하여 조직소견을 관찰하였다.

(2) 모낭의 길이성장 및 형태 측정

모낭의 길이는 모구의 끝에서 모간(hair shaft)의 절단부까지의 전길이를 현미경의 대안렌즈에 부착된 측정눈금을 이용하여 2일 간격으로 배양 14일까지 측정하여 통계 처리하였다. 동시에 모낭의 형태(생장기, 퇴행기, 휴지기 모낭)를 관찰하여 개개 모낭의 성장기 유지 기간을 조사하였다.

(3) 모낭의 방사성 동위원소 흡수량 측정

모낭의 DNA 합성을 보기 위하여 각 실험군의 방사성 동위원소의 흡수량을 배양 0, 8, 12일째에 측정하였는데 Harmon등²⁴의 방법을 이용하여 모낭의 alkali-soluble protein(ASP)의 방사성 흡수량을 측정하였다. 우선 4 μ Ci/ml의 ³H-thymidine을 배지에 첨가한 뒤 37°C에서 4시간 배양하였다. 그리고 나서 모낭을 1ml의 phosphate-buffered saline(PBS)에서 10분간 2회 수세하고, 얼음 위에서 5%의 trichloroacetic acid(TCA) 1ml에 10분간 넣는 것을 2회 반복한 후, 1ml의 물에 약 10분간 담가놓았다. 이렇게 처리한 모낭을 한 용기당 한 개씩 담고 0.3M NaOH 300 μ l을 첨가하여 37°C에서 18시간동안 배양한 후 11,200rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 추출액을 방사성 측정장치(liquid scintillation counter)를 이용하여 흡수량을 측정하였다.

마. 통계처리

모낭의 길이 성장, 모낭의 성장기 유지 기간을 각 집단 별로 비교하기 위하여 모낭의 길이 성장 항목을 repeated measure ANOVA 검정하였으며, 생존분석을 위하여 Kaplan-Meier survival analysis를 시행하여 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

가. 입체현미경 소견

대조군의 모낭들은 배양 4일까지는 활발히 자라는 모습이 관찰되었으며 형태학적으로도 성장기의 모습을 유지하였다(Fig. 1). SP군은 전체 배양기간 동안 그 길이성장과 성장기 유지 비율이 대조군과 비슷한 양상으로 나타났다(Fig. 2). 이에 비해 CGRP군은 배양 6일 이후부터 대조군에 비해 그 성장속도가 줄어들었으며, 성장기의 비율은 배양 10일째부터 대조군에 비하여 퇴행기로 진행된 모낭의 비율이 증가하였다(Fig. 3). CGRP와 SP의 병용투여군은 배양 4일째부터는 그 성장이 대조군에 비하여 현저히 저하된 양상이 나타났으며 CGRP 단독투여군과 비교했을 때에도 훨씬 성장이 억제된 양상으로 나타났다. 또한, 성장기 모낭의 비율에서도 배양 4일째 이후부터 퇴행기 모낭의 수가 증가하기 시작하여 대조군에 비해 조기에 퇴행기로 진행되는 모습이 관찰되었다(Fig. 4).

나. 광학 현미경 소견

대조군에서 모낭은 시간이 지남에 따라 길이성장을 하였으며 배양 6일 이후부터는 퇴행기 모낭의 수가 급격히 증가하였으며 배양 14일째는 모두 퇴행기 모낭으로 변화하였다(Fig. 5). SP군은 대조군에 비해 배양 8일까지는 성장기가 더 잘 유지된 양상을 보였으며 배양 14일째는 대조군과 같이 모든 모낭이 퇴행기로 변화하였다(Fig. 6). CGRP군은 성장기 모낭의 비율이 배양 8일까지는 비교적 잘 유지되었으나 배양 10일째는 퇴행기 모낭이 급격히 증가하였고 대조군보다 빠른 배양 12일째 모든 모낭이 퇴행기로 변화하였다. SP와 CGRP의 병용투여군은 배양 2일 이후부터 퇴행기로 변하는 모낭이 증가하여 대조군에 비하여 일찍 퇴행기로 진행하였으며 배양 10일째에 모든 모낭이 퇴행기로 변화하였다(Fig. 7).

2. 배양된 모낭의 길이성장

대조군에서 14일간 배양된 모낭 18개의 하루 평균 성장길이는 $0.08 \pm 0.042\text{mm}$ 이었다. 배양 6일째까지는 활발하게 길이 성장을 하였으나 그 이후는 성장 속도가 감소하였다. SP군의 하루 평균 성장길이는 $0.08 \pm 0.028\text{mm}$ 로 대조군과 유사하였으며, 배양 2일째에 다른 군과 비교해 가장 높은 성장률을 보였다. CGRP군의 하루 평균 성장길이는 $0.06 \pm 0.029\text{mm}$ 이었으며 배양 4일째까지는 SP군과 유사하게 활발히 자랐으나 그 이후 성장속도가 줄어들었다. SP와 CGRP의 병용투여군은 하루 평균 성장길이가 $0.02 \pm 0.017\text{mm}$ 이었으며, 배양 4일째부터 그 성장률이 다른 군에 비교하여 현저히 낮았다. 병용투여군은 대조군 및 다른 군과 비교시 통계적으로 의미있는 길이 성장의 차이를 보였으나, SP군과 CGRP군은 대조군과 비교시 통계적으로 의미 있는 성장길이의 차이를 보이지는 않았다(Fig. 8, 9).

3. 전체 모낭에서 길이증가를 보이는 모낭의 비율 측정

생장기 모발의 비율에서도 대조군과 비교할 때 배양 6일째까지는 대조군과 SP군, CGRP군은 생장기 모낭의 비율이 각각 93%, 94%, 93%로 유사하였으나 SP와 CGRP의 병용투여군은 56%로 감소하였다. 배양 8일째에는 대조군이 64%, SP군이 81%, CGRP군이 87%로 CGRP군에서 생장기가 대조군 보다 잘 유지되었으나 그 이후 급속히 퇴행기로 변화하는 모낭이 증가해 배양 12일째에 CGRP군은 퇴행기로 진행하였다. 반면 대조군은 21%, SP군은 25%의 모낭이 생장기를 유지하였다. SP와 CGRP의 병용투여군은 배양 4일째부터 모낭이 퇴행기로 변화하기 시작하여 배양 10일째는 모든 모낭이 퇴행기로 변화하였다(Fig. 10).

4. 방사성 동위원소 흡수량

³H-thymidine 흡수량은 8일째에는 길이성장과 유사하게 대조군과 SP군에서 증가된 소견이 관찰되었다. CGRP군도 증가된 양상이지만 대조군과 SP군에 비교하여 흡수 정도가 낮았으며, SP와 CGRP의 병용투여군은 다른 군에 비해 가장 흡수 정도가 낮았다. 배양 12일째는 모든 군에서 흡수가 감소하였다(Table 1).

IV. 고찰

모낭은 신경섬유가 가장 풍부하게 분포되어 있는 기관으로, 이러한 신경섬유의 분포는 모낭 주기에 따라 변화한다. 이러한 신경섬유의 변화가 모낭 발달에 영향을 줄 수 있으며 이에 관여하는 물질이 신경펩타이드이다^{22,23}.

피부에는 수많은 신경펩타이드가 존재하며 여러 실험에서 피부 질환과 신경펩타이드와의 연관성이 알려져 있으며 대표적인 신경펩타이드가 tachykinin인 SP이다. 이는 건선, 아토피 피부염과도 관련이 있으며²⁵⁻²⁷, 시험관내에서 SP는 마우스나 인간의 표피세포 증식과 인간의 섬유모세포의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다^{28,29}. SP는 마우스의 모발주기에서 성장기를 유도하는 기능이 있으며¹¹, 인체 모낭의 배양에서 성장기의 기간을 연장시키는 효과가 있다는 보고가 있다¹². CGRP 또한 혈관 확장 효과와 랑게르한스 세포의 항원전달 능력 억제, 면역 조절 기능 등 다양한 기능이 알려져 있으나^{7,9}, 아직까지 모낭의 성장에 대한 연구는 거의 없는 상태이다. 최근 보고에 의하면 마우스의 모낭조직배양에서 CGRP에 의해 모낭의 성장기 진행이 억제되었다는 보고가 있었으며 또한 이러한 모낭 성장 억제 작용은 SP에 의해 상쇄되어 SP와 CGRP가 서로 기능적인 길항작용이 있다고 하였다²². 하지만 아직까지 인체 모낭에 대한 연구는 없는 상태이다.

이 연구에서는 입체 현미경을 통한 시간에 따른 모낭의 형태 및 길이관찰에서 대조군과 SP군에서 큰 차이가 관찰되지 않았으나 배양 10일째를 제외하고 SP군은 대조군 보다 그 길이 성장이 촉진된 양상이 관찰되었으며, 성장기 모발의 배양 10일째를 제외하고는 SP군에서 성장기가 대조군 보다 잘 유지되었다. 그러나 대조군과 비교시 통계적인 유의성을 나타내지는 않았다. SP가 모발성장에 미치는 영향에 대하여는 다양한 결과가 보고되어 있는데 마우스의 피부에서 인위적으로 유도된 모발주기 중에 SP는 초기 성장기에 최고의 농도를 보였고, 퇴행기에 최소치를 나타내었으며, SP를 외부에서 공급하였을 때 모발주기를 성장기로 유도할 수 있다고 하였다¹¹. 또한, 인체 모낭기관배양에서 SP는 모발의 성장기 기간을 연장한다는 보고가 있으며¹², SP의 분비를 촉진시키는 작용이 있는 capsaicin에 의해

마우스에서 모낭의 성장기를 조기에 유도하며, 성장기 기간을 연장한다는 보고가 있다³⁰. 이와는 대조적으로 지나치게 고농도의 SP를 투여하면 정반대의 결과를 보일 수 있어서 SP를 마우스에 피내주사한 뒤 모낭이 퇴행기로 이행되었으며, SP 또는 capsaicin의 주사 부위는 국소적인 탈모증과 모낭의 위축이 유도된다고 하였다¹³. 따라서 인체모낭에서 SP는 모발 성장의 유도 또는 억제 기능 모두에 관여할 것으로 생각되며 그것은 SP의 농도와 관계가 있을 것으로 생각된다.

CGRP단독 투여군은 대조군에 비해 성장속도가 감소되었고 전체 모낭의 퇴행기 진행도 대조군에 비해 이틀 정도 빠르게 나타났다. 이러한 결과는 Peter등²²이 발표한 CGRP에 의해 마우스 모낭의 성장기 진행이 억제되는 결과와 유사하다고 할 수 있겠다. 연구자는 수 차례의 예비실험에서 다양한 CGRP의 농도를 사용하여 모낭성장과의 관계를 보았는데, 10^{-6} M CGRP와 10^{-7} M CGRP는 농도간에 큰 차이를 보이지는 않았고 모두 유사한 결과가 나타났으며 10^{-8} M CGRP는 대조군과 유사한 결과가 나타났기 때문에 본 실험에서는 10^{-7} M CGRP를 이용하였다. CGRP와 SP의 공동투여군은 배양 4일째부터 그 성장이 대조군에 비하여 현저히 저하된 양상이 나타났으며 CGRP 단독투여군과의 비교에서도 훨씬 성장이 억제된 양상으로 나타났다. 또한 성장기 모낭의 비율에서도 배양 4일째에 대조군은 모든 모낭이 성장기의 모습을 유지하였지만 SP와 CGRP 공동투여군은 성장기 모낭의 비율이 67%로 퇴행기 모낭의 수가 증가하기 시작하여 전체 배양 기간 동안 퇴행기로의 이행이 대조군에 비해 조기에 진행되는 모습이 관찰되었으며 배양 10일째에 모든 모낭이 퇴행기로 진행하였다. 이것은 Peter등²²의 마우스 실험과 비교하여 볼 때 SP에 의해 CGRP의 작용이 길항된다는 것과는 반대의 결과로 SP와 CGRP를 공동 투여할 때 모낭의 길이성장과 성장기 비율 감소가 CGRP단독 투여군보다 훨씬 증대되어 관찰되었다. 이러한 마우스와 인체 모낭의 배양간 차이의 정확한 기전은 알 수 없으나 유추해 볼 수 있는 것으로 첫째, 인체 모낭과 마우스에서 신경섬유 분포의 차이점으로 인체 모낭 주변에는 주로 SP 양성의 신경섬유가 보이는데 비하여 C57BL/6 마우스의 경우에는 단지 소수의 SP 양성 신경섬유가 보이며 대부분의 신경섬유가 CGRP 양성을 보인다^{4,31,32}. 또한, CGRP 신경섬유의 분포는 초기 성장기에 최대치를 보이고, 퇴행기 또는 휴지기에서 최소치를 보여 이러한 신

경섬유 분포의 차이가 관계될 것으로 생각된다³³. 둘째로, 본 실험에서는 실험실내에서는 SP와 CGRP가 인체 모낭에 미치는 직접적인 영향을 알아보았으나 마우스 등의 생체실험에서 SP와 CGRP는 강력한 혈관확장 효과, 혈장의 혈관외유출, 비만세포의 탈과립화, 백혈구의 화학주성효과 등 여러 가지 인자가 복합적으로 작용하므로 그 차이점이 있을 수 있겠다³⁴⁻⁴⁰. 셋째로는 마우스와 인간의 종간의 특성에 따른 차이를 들 수 있겠다. 넷째로는 모낭주기의 차이를 들 수 있는데 마우스의 모발은 휴지기 상태에서 오랫동안 존재하며 한 개체의 모낭이 거의 동일한 단계의 모발주기(모발주기의 일치성)에 있기 때문에 모발의 길이가 일정하지만, 인간의 모발은 계속 자라며 개개 모발의 모낭주기가 비일치성을 보이며 반복하는 특성 등 이러한 차이점들이 관계될 것으로 생각된다.

방사성 동위원소를 이용한 실험에서는 길이의 증가와 함께 DNA의 합성이 증가하는 것을 관찰하였다. 배양 8일째 방사성 동위원소의 흡수량은 모낭의 성장속도와 유사한 결과를 나타내어 대조군과 SP군에서 가장 많이 증가하였으며, 이에 비해 CGRP군은 감소한 양상이 관찰되었고, SP와 CGRP 병용투여군은 훨씬 더 감소된 양상을 보였다. 이는 인체 모낭기관배양에서 CGRP에 의해 모발성장 억제와 성장기가 억제되는 효과, SP와 CGRP를 공동투여 시 CGRP의 효과가 길항되기보다는 모낭성장을 억제하는 효과가 증대되는 것과 일치되는 결과이다.

연구자는 분리된 모낭 중 성장기 모낭만을 선택하여 사용하려 하였으나 평균 5개중 하나의 모낭은 잘 자라지 않았다. 이러한 것들은 중기 성장기 모낭(metanagen follicle)으로 생각되며 같은 성장기의 모낭이지만 서로 다른 성장속도와 방사선 흡수를 나타낸 것으로 생각된다¹². 좀 더 신뢰성 있는 결과를 얻기 위해서 같은 단계의 모낭을 얻어내는 것이 필요하며, 실험에서 모낭의 개수를 증가시키는 것이 필요하지만 인체실험의 과정에서 현실적으로 많은 모낭을 얻기에는 어려움이 있었다.

이 실험에서는 CGRP가 인체 모낭기관배양에서 성장기를 억제하는데 관여하는 것을 처음으로 관찰하였고 또한 SP와 CGRP의 병용투여가 CGRP 단독 투여시보다 모발성장 억제가 증가됨을 보고하는 첫 실험으로 그 의의가 있다고 생각되며, 향후 인체 모발질환의 이해와 그 기전을 밝히는데 도움이 될 것으로 생각된다.

V. 결론

이 연구에서는 인체 모낭기관배양을 통하여 CGRP가 인체 모발 성장에 미치는 영향과 SP와 CGRP를 병용투여 할 때 모발 성장에 대한 두 물질의 상호 영향을 규명하고자 하였으며 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 14일간의 인체 모낭기관배양에서 CGRP는 통계학적인 의미는 없었으나 배양 6일 이후부터 모낭의 성장속도가 대조군에 비해 뚜렷이 감소하였고, 배양 10일째 부터 퇴행기 모낭이 급격히 증가해 대조군보다 이틀 일찍 모든 모낭이 퇴행기로 변화였다.
2. 14일간의 인체 모낭기관배양에서 CGRP와 SP의 공동투여는 배양 6일 이후부터 통계적으로 의미 있게 대조군에 비해 모낭의 성장속도가 감소하였고 퇴행기 모낭의 수가 급격히 증가하였으며 CGRP 단독 투여시보다 모발 성장과 생장기 억제효과가 증가되었다.

이상의 결과로 CGRP가 인체 모낭기관배양에서 모발의 성장억제와 생장기 억제에 관여하며 SP와 CGRP의 공동 투여는 CGRP의 효과를 증대시키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ansel JC, Kaynard AH, Armstrong CA, Olerud J, Bunnett N, Payan D. Skin-nervous system interactions. *J Invest Dermatol* 1996;106:198-204
2. Halata Z. Sensory innervation of the hairy skin(light and electron microscopic study). *J Invest Dermatol* 1993;101:75s-81s
3. 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
4. Hordinsky MK, Ericson ME. Relationship between follicular nerve supply and alopecia. *Dermatol Clin* 1996;14:651-659
5. 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
6. Paus R. Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Curr Opin Dermatol* 1996;3:248-258
7. Lotti T, Hautman G, Panconesi E. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:482-496
8. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985;315:61-63
9. Wallengren J, Ekman R, Sundler F. Occurrence and distribution of neuropeptides in the human skin. *Acta Derm Venereol*(Stockh) 1987;67:185-92
10. 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
11. Paus R, Heinzelmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzki BM.

- Hair growth induction by substance P. *Lab Invest* 1994;71:134-140
12. 손인범, 이원수. 인체 모낭기관배양에서 substance P가 모발성장에 미치는 영향. *대피지*. 2001;39:190-198
 13. 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
 14. Ansel J, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Caughman SW, Bunnett NW. Interactions of the skin and nervous system. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1997;2:23-6
 15. Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl MV. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 1993;101:32-36
 16. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1997;2:41-8
 17. Pincelli C, Yaar M. Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1997;2:31-6
 18. 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;285:216-20
 19. Brian SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985;313:54-6
 20. Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzone B. Calcitonin gene related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3299-303
 21. Rossi R, Del Bianco E, Isolani D, Baccari MC, Cappugi P. Possible involvement of neuropeptidergic sensory nerves in alopecia areata. *Neuroreport* 1997;8:1135-8
 22. 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;116:236-45
23. Philpott MP, Green MR, Kealey T. Human hair growth in vitro. *J Cell Sci* 1990;97:463-71
 24. Harmon CS, Nevins TD. Hair fibre production by human hair follicles in whole-organ culture. *Br J Dermatol* 1994;130:415-23
 25. Eedy DJ, Johnston CF, Shaw C, Buchanan KD. Neuropeptides in psoriasis : an immunocytochemical and radioimmunoassay study. *J Invest Dermatol* 1991;96:434-8
 26. Farber EM, Nickoloff BJ, Recht B, Fraki JE. Stress, symmetry and psoriasis : possible role of neuropeptides. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:305-11
 27. Pincelli C, Fantini F, Massimi P. Neuropeptides in skin from patients with atopic dermatitis : an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 1990;122:745-50
 28. Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S. Effect of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;90:399-401
 29. 서호석, 장성은, 백은미, 최지호, 성경제. Substance P가 배양한 인체 각질형성 세포의 증식능에 미치는 영향. *대피지*. 1998;36:595-601
 30. 안형진. Capsaicin과 monoxidil의 병용투여가 모발성장에 미치는 영향[학위 논문]. 서울: 연세대학교 대학원;2000.
 31. Bjorklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hermansson A. Sensory and autonomic innervation of non-hairy human skin: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 1986;243:51-7
 32. Hordinsky MK, Kennedy W, Wendelschafer-Crabb G, Lewis S. Structure and function of cutaneous nerves in alopecia areata. *J invest Dermatol*

- 1995;104:28-9
33. Botchkarev VA, Eichmuller S, Peters EMJ, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, Paus R. A simple immunofluorescence technique for simultaneous co-visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle-dependent changes in mast cell-nerve fiber contacts in murine skin. *Arch Dermatol Res* 1997;289:292-302
 34. Maggi CA, Borsini F, Santicoli P, Geppetti P, Abelli L, Evangelista S, Manzini S, Theodorsson Norheim E, Somma V, Amenta F. Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats: a trophic role of capsaicin-sensitive afferents? *Arch Pharmacol* 1987;336:538-45
 35. Matis WL, Lavker RM, Murphy GF. Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. *J invest Dermatol* 1990;94:492-5
 36. Xu XJ, Dalsgaard CJ, Maggi CA, Wisenfeld-Hallin Z. NK-1, but not NK-2, tachykinin receptors mediate plasma extravasion induced by antidromic C-fiber stimulation in rat hindpaw: demonstrated with the NK-1 antagonist CP-96,345 and the NK-2 antagonist Men 10207. *Neurosci Lett* 1992;139:249-52
 37. Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide(CGRP) as co-transmitter released from peripheral endings of sensory nerve. *Prog Neurobiol* 1995;15:1-98
 38. Morris JL. Peptides as neurotransmitters in vascular autonomic neurons. *Clin Exp Phamacol Physiol* 1995;22:792-802
 39. Crawley JN, McLean S. Neuropeptides-basic and clinical advances. *Ann NY Acad Sci* 1996;780:1-225
 40. Baraniuk JN. Neuropeptides in the skin. In: Bos JD(ed.) *The Skin Immune System*. CRC, Boca Raton, FL, 1997:311-26

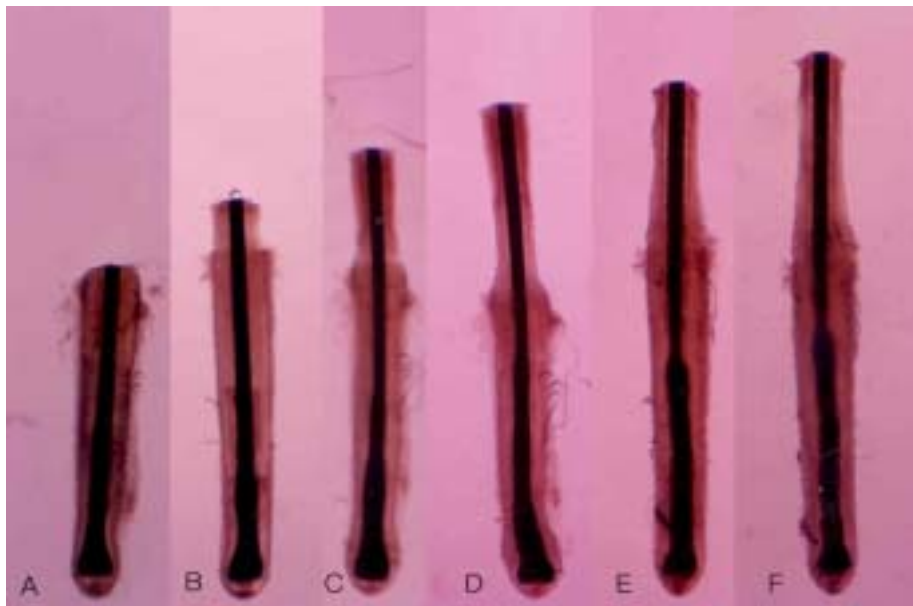


Fig. 1. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in DMEM(control group) for 10 days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15).

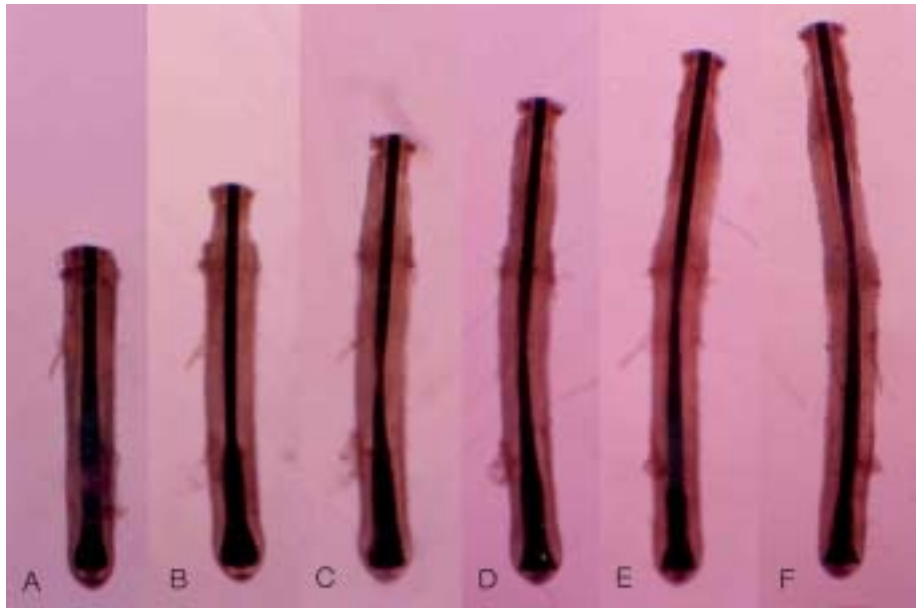


Fig. 2. Photograph showing sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-6} M SP(SP group) for 10 days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15).

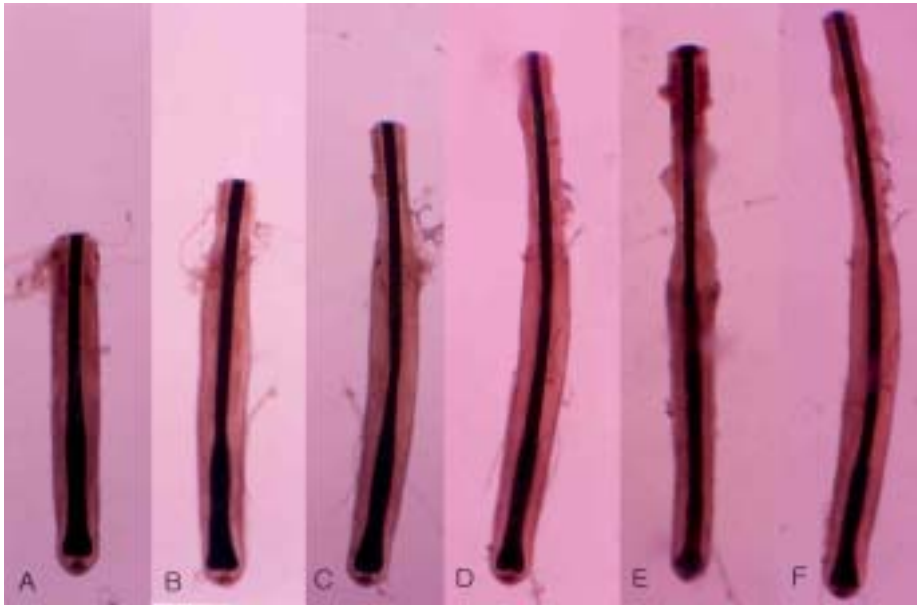


Fig. 3. Photograph showing sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-7} M CGRP (CGRP group) for 10 days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15).

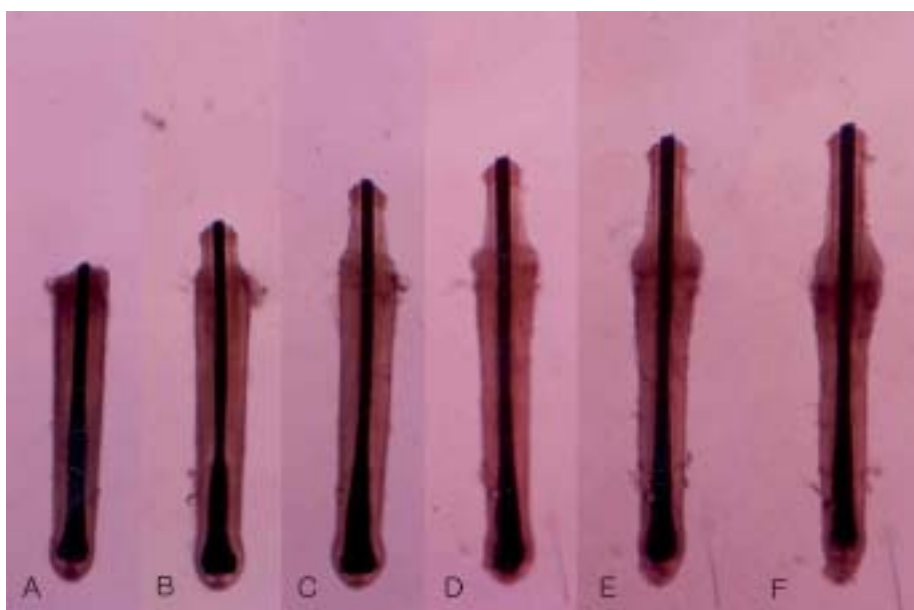


Fig. 4. Photograph showing the sequential increase in length of the same hair follicle in culture in media with 10^{-6} M SP and 10^{-7} M CGRP(combined group) for 10 days; A) 0 day, B) 2 days, C) 4 days, D) 6 days, E) 8 days and F) 10 days (no stain, x15).

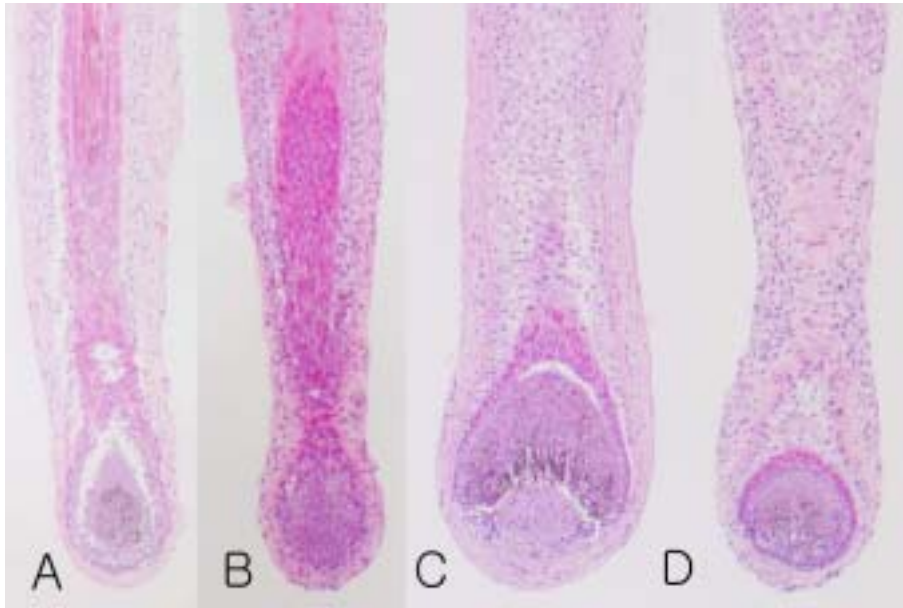


Fig. 5. Histology of cultured human hair follicles maintained in control group for 12 days A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days and D) 12 days (H&E, x40). At day 12, hair follicle still keeps normal anagen morphology.

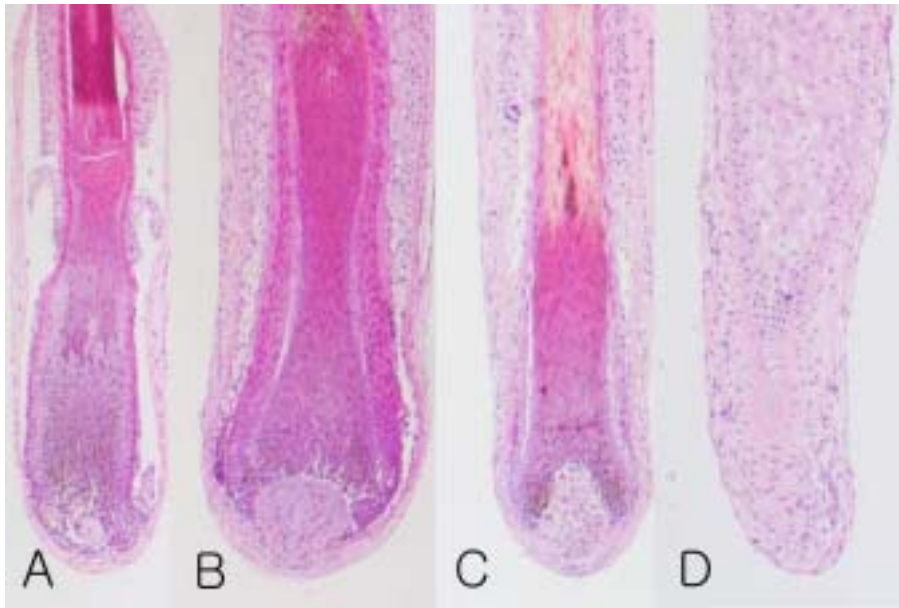


Fig. 6. Histology of cultured human hair follicles maintained in SP group for 12 days; A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days and D) 12 days (H&E, x40). At day 12, the growth of hair follicle is stopped and the follicle entered catagen stage.

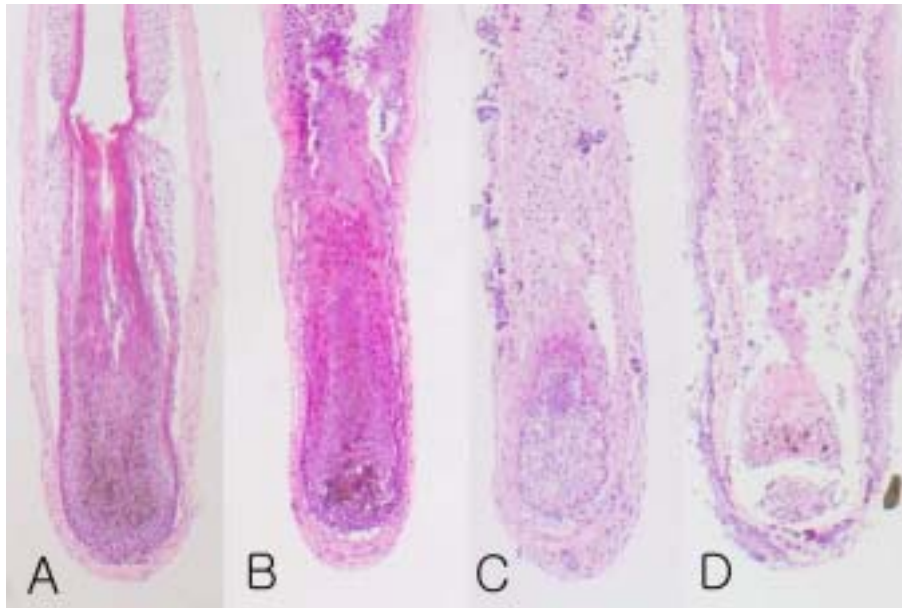


Fig. 7. Histology of cultured human hair follicles maintained in combined group for 12 days; A) 0 day, B) 4 days, C) 8 days and D) 12 days (H&E, x40). At day 8, the growth of hair follicle is stopped and the follicle entered the catagen stage earlier than other groups.

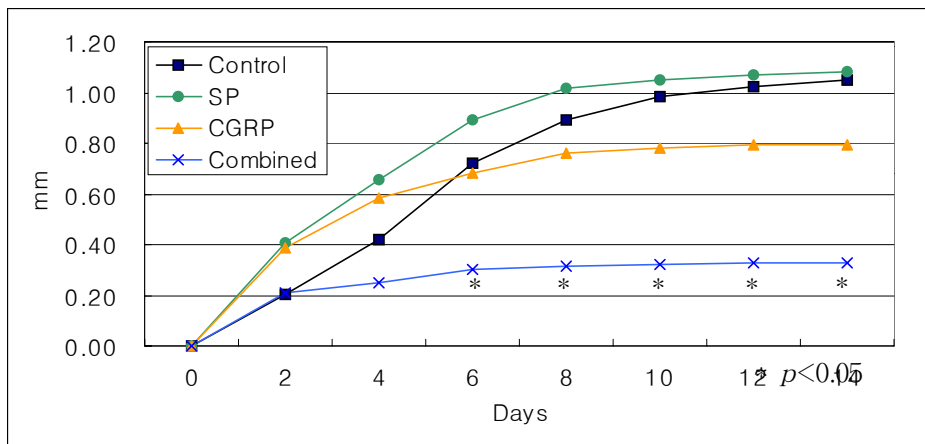


Fig. 8. Cumulative human follicle elongation for 14 days. Combined group showed statistically significant inhibitory effect on the rate of linear hair growth from day 6.

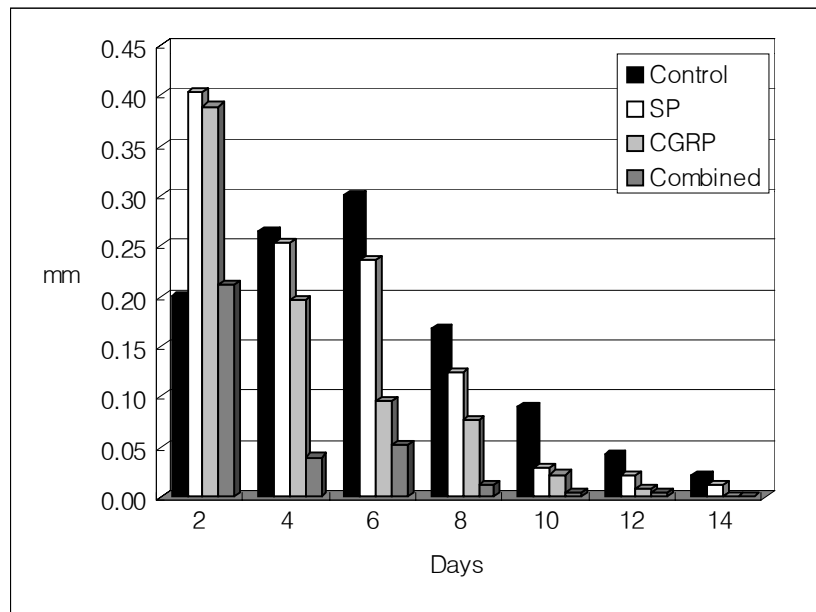


Fig. 9. Effect of each medium on daily human hair follicle elongation measured every other day for 14 days.

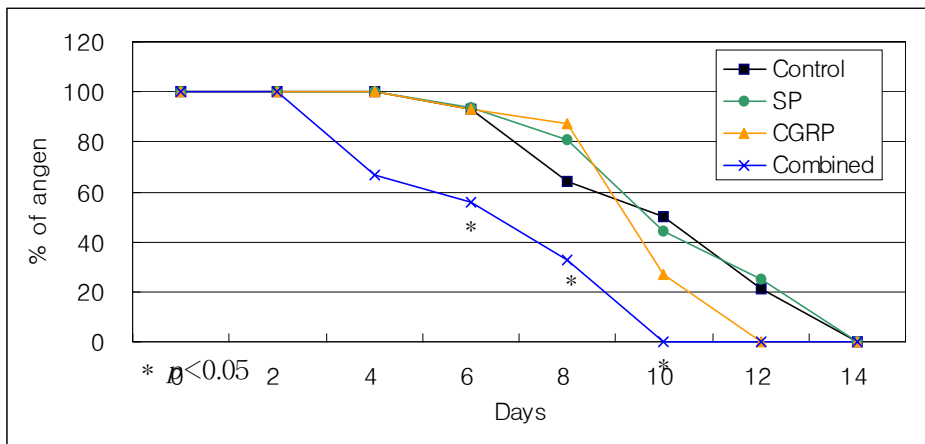


Fig. 10. Percentage of anagen follicles according to duration. Combined group showed statistically significant inhibitory effect on the anagen stage of hair cycle from day 6.

Table 1. ^3H -thymidine incorporation of cultured hair follicle according to culture media and duration(c.p.m./follicle).

	0 day	8 days	12 days
Control	95.5 \pm 7.8	2730.0 \pm 3851.3	114.0 \pm 76.1
SP	143.0 \pm 0	2658.3 \pm 3391.9	516.0 \pm 483.6
CGRP	188.0 \pm 0	914.3 \pm 1365.2	705.7 \pm 156.5
Combined	92.5 \pm 16.3	597.7 \pm 212.6	222.3 \pm 210.7

Values are mean \pm standard deviations

Abstract

The Effects of Coapplication of Substance P and Calcitonin
Gene-Related Peptide on the Hair Growth
in Human Hair Follicle Organ Culture

Sanghoon Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Won-Soo Lee)

Peripheral nervous system has important roles in the hair follicle growth and hair cycle change, which are mediated by neuropeptides. Selected neuropeptides act not only as neurotransmitters, immunomodulators, and chemotactic factors but also act as growth modulators. Substance P (SP), one of the most important neuropeptides, stimulates mouse hair growth by increasing anagen stage of hair cycle. Calcitonin gene-related peptide(CGRP) is also the most important neuropeptide, but the effect of CGRP on hair growth has rarely reported. We studied the effect of CGRP on human hair growth using organ culture model in which isolated hair follicles were grown in vitro and also studied the effect of that of combined use of SP and CGRP. Normal human scalp samples were obtained and anagen hair follicles were isolated and they were cultured in Dulbeco's Modified Eagle's Medium(DMEM) with

several combination of supplements at an atmosphere of 5% CO₂/95% air incubator. We divided the culture plates into four groups, i.e. control group(DMEM only), SP group (10⁻⁶M SP dissolved in DMEM), CGRP group(10⁻⁷M CGRP dissolved in DMEM), and combined group(10⁻⁶M SP and 10⁻⁷M CGRP dissolved in DMEM). The results were evaluated by measuring linear hair growth and hair follicle morphology on light microscopy and by measuring radioisotope uptake of ³H thymidine in alkali-soluble protein(ASP) fraction obtained by extraction of hair follicle.

1. During 14 days' culture, CGRP showed inhibitory effect on the rate of linear hair growth since 6th days of culture compared with control group and abrupt increase of catagen follicle since 10 days of culture resulted in 2 days of earlier modification of all hair follicle into catagen stage compared with control group although it was not statistically significant
2. During 14 days' culture, combined use of CGRP and SP decreased the rate of linear hair growth since 6th days of culture compared with control group and abruptly increased number of catagen hair follicle was also noticed both which was statistically significant. The inhibitory effect of CGRP on the hair growth and the anagen stage of human hair follicle was enhanced when it combined with SP.

From the results, we concluded that CGRP would be related with inhibition on the rate of linear hair growth and the anagen stage of hair cycle in cultured human hair follicle and combined use of SP and

CGRP enhances the inhibitory effect of CGRP on the hair growth and the anagen stage of hair cycle.

Key words : human hair organ culture, neuropeptide, hair growth, substance P, calcitonin gene-related peptide(CGRP)