

인체 두피 모낭의 장기간 배양을 위한 기관 배양 배지의 개발

유보영 · 윤희훈 · 신연호 · 서영권 · 이두훈 · 송계용* · 황성주** · 박정극†

동국대학교 공과대학 생명화학공학과
100-715 서울시 중구 필동 3가 26
*중앙대학교 의과대학 병리학교실
140-757 서울시 동작구 흑석동 221
**황성주 털털피부과

135-887 서울시 강남구 신사동 513-1 동원빌딩 4층
(2005년 12월 10일 접수, 2006년 1월 20일 채택)

Development of Organ Culture Medium for Long Term Culture of Human Hair Follicle

Bo-Young Yoo, Hee-Hoon Yoon, Yeon-Ho Shin, Young-Kwon Seo, Doo-Hoon Lee, Kye-Yong Song*,
Sung-Joo Hwang** and Jung-Keug Park†

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 3-26, Pil-dong, Chung-gu, Seoul 100-715, Korea

*Department of Pathology, Chung-Ang University, 221, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 140-757, Korea

**SJ Hair Hair Clinic, Dongwon Bld, 513-1, Sinsa-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-887, Korea

(Received 1 December 2005; accepted 20 January 2006)

요 약

본 연구에서는 인체 두피조직에서 미세수술법을 이용하여 모낭을 성공적으로 분리하였으며 다양한 조건으로 액침 기관배양을 수행하였다. 우태아 혈청첨가시 모낭의 길이 성장이 저해되는 것으로 확인되어 무혈청 배지 조성을 시도하였다. 무혈청 배지로는 모낭 기관배양에 널리 이용되는 Williams'E medium을 기본으로 하는 Philpott medium과 자체 개발한 고농도 아미노산과 비타민(B군) 조성의 DHGM(Dongguk hair growth medium)을 이용하였다. 그리고 IMDM은 DHGM의 비교 대조군으로 이용하였다. 연구 결과 Philpott medium과 IMDM으로 배양한 모낭은 구조상으로는 길이 성장이 각각 9일과 12일 정도에 멈추며, 낮은 알카라인 포스파테이즈 발현, CK19 발현이 거의 없는 것으로 보아 세포사멸에 의한 퇴화(regression)가 빠르게 일어나는 것으로 판단되었다. 반면, DHGM으로 배양한 모낭은 상대적으로 긴 기간 동안 성장기의 구조를 보이며 25일까지 지속적인 길이 증가 및 3배 높은 알카라인 포스파테이즈 발현, 전반적인 CK19 발현을 나타내었다. 따라서 고농도의 아미노산 및 비타민 배지 조성이 생체 외에서 모낭을 장기간 배양하는데 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 이러한 배양 방법은 장기간 검사를 필요로 하는 모낭에 대한 기초 생물학적 연구뿐만 아니라 새로운 탈모치료제의 효능 평가 분야에 이용될 수 있을 것이다.

Abstract – We successfully isolated human anagen hair follicles from human scalp skin by microdissection and tried to culture them under various conditions. First we confirmed negative effect of serum on human hair follicle organ culture. As a next step serum-free medium compositions, Philpott medium, IMDM, and DHGM (Dongguk hair growth medium) were tried. Philpott medium is a general medium for hair organ culture based on Williams' E medium and DHGM is a special self-developed medium containing high amino acids and vitamins (B group) composition. As results, hair follicle in Philpott medium and IMDM showed anagen phase morphological structure, but rapid loss of hair elongation, low alkaline phosphatase expression, and very low expression of CK19. It is thought these hair follicles rapidly regressed from apoptosis. However, hair follicles in DHGM showed long term anagen phase morphological structure, continuous hair elongation, high alkaline phosphatase, and CK19 expression. These results demonstrate that high amino acids and vitamins (B group) composition are essential to *in vitro* long term human hair follicle organ culture and this culture medium will be useful in basic study of hair biology or application study to the development of alopecia treatment drugs.

Key words: Hair, Organ Culture, Medium, Hair Length, CK19, Alkaline Phosphatase

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jkpark@dongguk.edu

1. 서 론

모낭은 비록 작지만 외배엽(ectoderm)과 중배엽(mesoderm) 유래의 다양한 세포가 층상 구조를 이루는 복잡한 하나의 기관(organ)이다. 또한, 모낭은 풍부한 피부 줄기세포의 저장고로서 이 세포들이 증식, 이동, 분화되어 재생이나 상처의 치유에 관여한다[1]. 특히 모유두(dermal papilla)와 모기질(matrix) 사이의 상피-진피 간 상호작용(epidermal-dermal interaction)에 의해 성장기(anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기(telogen)로 이루어지는 세 단계의 주기(life cycle)를 거치면서 모발의 교체가 일어나게 된다. 이와 같이 모낭의 성장과 유지를 조절하는 모유두는 태생기에 형성되어 15~20회의 주기를 거치며 점차 퇴화되는 기관으로 알려졌다[2].

그러나 이러한 성장기, 퇴행기, 휴지기 주기에 관련된 정확한 분자생물학적 기작은 아직 알려져 있지 않다. 특히 탈모와 관련된 기작은 남성형 탈모에 한정되어 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)이 5 α -환원효소(5 α -reductase)에 의해 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)으로 전환되고, 이것이 안드로젠 수용체(androgen receptor)와 결합하면 모유두가 퇴화되고 모발이 탈락하게 되는 것만이 밝혀져 있다[3].

따라서 발모 및 육모제 등과 같은 탈모치료제의 효능을 평가하는데 있어 상당한 제약이 따르게 되며, 분자생물학적인 분석보다는 동물을 이용한 생체 내 실험이 주를 이룬다. 그러나 털이 많이 존재하는 동물들(설치류 등)을 이용할 경우 종(species) 차이가 심하게 발생하며[5, 20], 인간과 유사한 자연적인 대머리 동물(stumptailed macaque)의 경우에는 비용이 상당히 많이 들어 사실상 평가하기가 쉽지 않다[19]. 그뿐만 아니라 최근 동물 보호차원에서 동물시험이 사회적으로 비판을 받고 있는 실정이다.

따라서 이러한 평가를 위하여 인체 모낭을 생체 외에서 기관배양(organ culture)하려는 많은 노력이 시도돼 왔다. 특히 최적의 환경을 제공하기 위하여 다양한 배지 조성들을 연구하였는데, 혈청(serum)은 부정적인 효과를 유발하는 것으로 알려져 대부분의 연구자가 무혈청 배지 조성으로 실험을 진행하고 있다.

혈청에는 모낭 세포의 성장을 저해하는 transforming growth factor- β (TGF- β)가 포함되어 있어 생체 외에서 모낭의 조기 퇴화를 유발하는 것으로 알려졌다. 1~20% 송아지혈청을 첨가 후 배양한 경우보다 무혈청 배지로 배양한 경우 길이성장 기간이 눈에 띄게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 혈청 농도가 높은 경우에는 혈청 내 세포부착인자로 인해 기관배양시 모낭이 배양 용기 바닥에 부착되어 외측모근초에서 세포가 분리되면서 모낭 구조의 변형을 가져오기 때문에 모낭 기관배양에 무혈청 배지가 필수적이다[5, 6, 7].

1992년 이후로 보편적으로 사용되는 배지는 Philpott 등[6]이 개발한 것으로 기본배지인 Williams'E medium에 10 ug/ml insulin, 10 ug/ml transferrin, 10 ng/ml sodium selenite 그리고 10 ng/ml hydrocortisone을 첨가한 조성이다. 이밖에 Kealey 등[5]은 Philpott medium에 글루타민(L-glutamine)을 2 mM보다 높은 4 mM로 첨가하여 배양했을 때 모낭 내 세포들의 ATP 합성량이 증가하는 것을 보고하였다.

그러나 이와 같은 노력에도 현재의 배양 기술로는 장기간 배양이 어려워, 오랫동안의 효능 평가가 있어야 하는 경우에 있어 상당한 제약이 된다.

이러한 문제를 해결하기 위해 우리는 몇 가지 가정을 하였는데 특히 영양분 공급의 제한이라는 것에 초점을 맞추었다. 모낭은 작

지만 하나의 복잡한 기관으로서 그 내부에는 외배엽 유래의 외측모근초(outer root sheath), 내측모근초(inner root sheath), 모기질(matrix), 멜라닌세포(melanocyte)들이, 그리고 중배엽 유래의 모유두(dermal papilla), 결직초(dermal sheath) 세포들이 존재한다. 따라서 사이토카인(cytokine)이나 성장인자(growth factor)를 통한 근접 신호 전달(paracrine signaling)뿐만 아니라 직접적인 세포-세포 간 상호작용(direct cell-cell interaction)은 생체 외에서도 어느 정도 유지될 것으로 가정하였고 다만 생체 외로 옮겨지면서 혈관으로부터의 능동적인 영양 공급이 차단되고 단지 확산에 의한 약하고 미흡한 수동적인 영양 공급으로 인하여 장기간 배양이 어려울 것이라 가정하였다. 즉, 기존의 연구들은 대개 이미 조성이 알려진 배지에 여러 성장인자 등을 첨가하여 모낭의 생존기간을 연장하려는 연구였으나 본 연구에서는 모낭의 장기간 배양용 배지 자체의 조성을 개발하려고 하였다. 이러한 가정을 뒷받침해주는 하나의 근거로서 미 식품의약품안전청(USA FDA)의 허가를 받은 혈관 확장제인 미녹시딜(Minoxidil)의 효과로서, 모낭에 충분한 혈류를 흐르게 함으로써 모발을 유지시키는 것으로 알려졌다[8]. 그리고 미녹시딜은 생체 외에서 모유두 세포의 배양시 모낭 성장을 촉진하는 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 생산을 자극하여 모낭세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려졌다[4]. 그리고 다른 조직에서 보고된 몇 가지 예로서, 장간막 허혈(mesenteric ischemia)인 경우에 비필수아미노산의 하나인 글라이신(glycine)을 첨가하면 pro-apoptotic gene product인 bax와 caspase-3 발현을 낮추주며 anti-apoptotic gene product인 bcl2 발현을 높인다는 것이 보고되었다[18]. Tanaka 등[24]은 L-세린(L-serine)이 신경세포의 생존을 유지시키며, L-세린과 글라이신이 anti-apoptotic gene product인 Bcl-w를 증가시켜 apoptosis를 저해시킨다는 것을 확인했다. 이 밖에도 하이브리도마 세포 배양시 다양한 비타민이 bcl-2 발현을 증가시켜 apoptosis를 저해한다는 보고가 있다[23].

그리고 대외적으로 그 조성이 공개되고 있지는 않지만, 첨가되는 혈청의 양을 줄이거나 또는 특정 세포(조혈모세포 등)를 무혈청 조건에서 배양하기 위한 목적으로 개발된 다양한 상업적 배지들도 고농도의 아미노산 및 비타민을 함유하는 것으로 여겨지고 있다.

이러한 근거를 바탕으로 우선 필수아미노산과 비 필수아미노산이 모두 포함되어 있는 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's medium) 기본 배지 조성을 바탕으로 아미노산과 비타민(B군)을 2배로 함유하는 고농도 배지인 DHGM (Dongguk hair growth medium)을 개발하였다. 일반적으로 생체 외에서 세포들이 에너지원으로 포도당(glucose)보다는 글루타민(L-glutamine)을 이용하므로 포도당의 농도는 2,000 mg/L로 낮추고 글루타민의 농도를 4 mM로 증가시켰다[11].

생체 내 모낭의 모유두 주변조직에서 축적된 Cu²⁺와 결합하는 구리 결합 펩타이드에 의해 모발의 길이 성장을 확인할 수 있는데, 생체 외에서는 주변조직의 부재로 인한 Cu 결핍을 보완하기 위해 10⁴ μ g/ml의 농도로 첨가하였다[10, 11, 12]. 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)은 Cu와 결합하여 peroxy radical trap 작용을 하는 것으로 알려져 있어 peroxide에 의한 apoptosis를 저해시킬 것으로 판단된다[11].

모발을 형성하는 모기질 세포는 가장 빠르게 증식하는 세포 중 하나이며 포유동물 중 손상에 가장 민감한 조직이므로 DNA 안정성과 치유에 중요한 작용을 하는 Zn이 필수적이며[13, 14, 15], endonucleases의 저해제로 모낭 퇴행기에 일어나는 각질형성세포

(keratinocyte)의 apoptosis 작용을 억제하는 작용을 통해 퇴행기로의 진행을 더디게 만들 수 있을 것으로 판단되어 배지에 첨가하였다 [13, 16].

그리고 기본적인 세포 배양에 이용되는 insulin, transferrin, sodium selenite 그리고 hydrocortisone 등은 Philpott medium과 함께 첨가하였다. 이렇게 개발된 배지를 이용하여 모낭 기관 배양을 하였으며, 모낭의 형태, 길이 성장, 알카리인 포스파테이즈 정량, 조직학적 분석을 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 모낭의 분리

인체 두피 모낭은 모발 이식술시 노출된 모발의 길이가 짧아 식 모기 장착이 어려운 후두부 모낭이나 외과 시술시 제거되는 두피조직에서 시술환자의 동의를 얻어 사용하였다.

분리된 두피 조직을 기관 배양용 배지에 담아 실험실로 이송 후 Philpott 등 [5]의 방법을 응용하여 모낭을 분리하였다. Scalpel blade No. 10을 이용하여 표피(epidermis)와 유두층(papillary dermis)을 제거 후 육안을 통해 망상진피(reticular dermis)와 피하지방층(hypodermis)에서 모낭을 분리하였다. 모낭을 두피조직으로부터 분리한 후 입체 현미경을 통해 남아있는 주위조직을 세밀하게 제거하였다. 기관 배양에는 현미경상으로 관찰하였을 때 모유두와 진피초의 손상이 없는 성장기 모낭만을 사용하였으며 모발의 성장이 미비한 경우는 결과에서 제외하였다.

2-2. 액침배양법을 이용한 인체 두피 모낭의 기관배양

24-well plate(SPL, Korea)에 모낭 1개씩을 넣고 배지 500 μ l를 첨가하여 액침배양을 실시하였으며 2일 간격으로 배지를 교환하였다. 이때 사용한 배지는 Philpott medium, IMDM, DHGM이며 첨가물은 별도의 표기가 없을 경우 Sigma 제품을 사용하였다. Philpott medium은 Williams'E medium(Gibco BRL, USA)에 10 μ g/ml insulin, 10 ng/ml hydrocortisone, 10 μ g/ml transferrin, 10 ng/ml sodium selenite 그리고 50 U/ml gentamicin(Welgene, Korea)을 넣어 제조하였다. 먼저 혈청의 효과를 확인하기 위하여 Philpott medium에 5% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)를 첨가하여 배양하였다. 그리고 IMDM(Welgene, Korea)과 DHGM에는 앞의 첨가물 외에 4 mM(최종농도) L-glutamine, trace elements(10^{-4} μ g/ml cupric sulfate, 10^{-4} μ g/ml zinc sulfate, 10^{-4} μ g/ml manganese sulfate, 2×10^{-4} μ g/ml iron sulfate, 20 mg/l bovine serum albumin)를 추가로 넣어 주었다. 이 세 가지 배지의 기본 조성은 Table 1과 같다. 세 가지 조건 모두 사진촬영은 배지 교체 시에 수행하였으며 이때 모구 형태와 모낭 길이 증가 변화량 그리고 외측모근초 세포 성장에 대해서 관찰하였다.

2-3. 실제 현미경을 통한 모낭의 구조적 변화와 길이 성장 측정

모낭의 길이 성장은 입체현미경을 통해 다음과 같이 관찰하였다. 2배의 접안렌즈와 10배의 대물렌즈를 사용한 입체현미경(stereoscope, KSZ, Korea)를 이용하여 위상차를 없애기 위해 배지 제거 후 관찰하였으며 실험 시작일을 0일로 하여 25일까지 사진을 찍어 비교하였다. 모낭의 길이는 모구 끝에서 모간 절단부까지 총 길이를 측정하였으며 모낭의 건조를 막기 위해 배지 제거 후 신속하게 디지털

Table 1. Composition of Philpott medium, IMDM, and DHGM

	Philpott medium	IMDM	DHGM
INORGANIC SALTS			
CaCl ₂	200	165	165
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0001	-	-
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001	-	-
KCl	-	330	330
KNO ₃	-	0.076	0.076
MgSO ₄	97.67	98	98
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0001	-	-
NaCl	6800	4800	4800
NaHCO ₃	2200	3024	3024
Na ₂ HPO ₄	140	111	111
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0002	-	-
OTHER COMPONENTS			
D-Glucose	2000	4500	2000
Glutathione	0.05	-	-
Methyl Linoleate	0.03	-	-
Sodium Pyruvate	25	110	110
HEPES	2383	5958	2383
Phenol Red	10	15	15
AMINO ACIDS			
L-Alanine	90	25	50
L-Arginine·HCl	50	50	100
L-Asparagine(anhydrous)	18.86	25	50
L-Aspartic acid	30	30	60
L-Cystine	40	-	-
L-Cystine·2HCl	26.10	91.2	182.4
L-Glutamic acid	50	75	150
L-Glutamine	292	584	584
L-Glycine	30	30	60
L-Histidine·HCl·2H ₂ O	15	31.05	62.1
L-Isoleucine	50	105	210
L-Leucine	75	105	210
L-Lysine·HCl	87.5	146	292
L-Methionine	15	30	60
L-Phenylalanine	25	66	132
L-Proline	30	40	80
L-Serine	10	42	84
L-Threonine	40	95	190
L-Tryptophane	10	16	32
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	50.70	-	-
L-Tyrosine	-	104	208
L-Valine	50	94	188
VITAMINS			
Ascorbic acid	2	-	-
Biotin	0.5	0.013	0.026
D-Ca Pantothenate	10	4	8
Choline Chloride	1.5	4	8
Ergocalciferol	0.1	-	-
Folic acid	1	4	8
i-Inositol	2	7.2	14.40
Menadione Sodium Bisulfate	0.01	-	-
Niacinamide	1	4	8
Pyridoxal·HCl	1	4	8
Riboflavin	0.1	0.4	0.8
α -Tocopherol Phosphate, Disodium	0.01	-	-
Thiamine·HCl	1	4	8
Vitamin A Acetate	0.1	-	-
Vitamin B ₁₂	0.2	0.013	0.026

카메라로 사진 촬영 후 일정한 배율로 확대하여 오차범위가 작은 지를 이용하여 길이를 측정하였다(오차범위±5 μm).

배지 조성에 따른 모낭의 퇴화 정도를 확인하기 위해 배지교체 시기에 디지털 카메라로 촬영한 모낭의 모구 상태를 육안으로 관찰하였다. 지속적인 모발성장이 관찰되고, 모유두와 매트릭스 조직이 잘 연결되어 있는 성장기 모낭과 모유두와 매트릭스 조직 간의 결합이 분리되기 시작하며 모유두와 매트릭스 조직을 연결해주는 epithelial strand가 형성되는 퇴행기 모낭, 모유두와 매트릭스 간의 연결이 관찰되지 않는 휴지기 모낭으로 분류하여 초기 배양군 대비 측정일의 각 주기의 비율을 백분율로 나타내었다.

2-4. 모낭의 알칼리인 포스파테이즈 양 측정

모발 유도 능력이 있는 모유두에만 선택적으로 발현되는 알칼리인 포스파테이즈(alkaline phosphatase) 양을 분석하기 위해 기관 배양을 마친 모낭에서 미세수술법(microdissection)을 이용하여 모유두만을 분리하였다. 분리해낸 모유두를 단백질 추출용액인 PRO-PREP(Intron, Korea) 100 μl에 모유두 10개를 넣은 뒤 조직분쇄기를 이용하여 모유두를 분쇄하였다. 그리고 -20 °C 에서 20분간 반응시켜 모유두 내에 존재하는 알칼리인 포스파테이즈를 추출하였다. 추출된 알칼리인 포스파테이즈는 96-well plate(bottom black, SPL, Korea)에 well 당 20 μl의 추출된 알칼리인 포스파테이즈 용액을 첨가 후 20 μl의 MgCl₂와 160 μl의 fluorescence assay buffer를 첨가하였다. 미리 일정한 농도로 희석해 두었던 4-methylumbelliferyl phosphate 기질을 well 당 1 μl 첨가 후 잘 섞이도록 흔들어 준 뒤 fluorometer(Victor 3, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 excitation 파장은 340 nm로, emission 파장은 440 nm로 측정하여 효소의 활성을 측정하였다[17].

2-5. 조직면역학적 분석

액침배양을 실시한 모낭을 10% 포르말린에 고정한 후 파라핀블럭을 제조하고 조직학적 염색이 가능하도록 초박절편으로 박절하여 슬라이드에 부착시켜서 H/E 염색(hematoxylin/eosin staining)을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

활발한 증식능을 가지고 있으며 모낭 내 존재하는 표피 줄기 또는 전구세포로 추정되는 세포에 염색되는 특이 단백질인 CK19의 발현을 관찰하였다[21, 22]. 고정된 조직절편 슬라이드를 0.3% H₂O₂ 용액에 넣어 endogenous peroxidase 활성을 억제하고, 2% 양혈청과 0.5% 말혈청을 사용하여 비특이성 항체들을 막아주었다. 이렇게 준비된 조직절편 슬라이드를 1차 항체인 RCK108(DAKO, USA)로 상온에서 2시간 동안 반응시키고, 2차 항체로는 biotinylated horse anti-mouse IgG(1:200 dilution, Vector, USA)를 사용하여 약 30분간 반응시켰다. 이들 단계마다 Tris 완충용액으로 5분간 3번 세척하였다. 그리고 avidin-biotin(Zymed Lab, USA)를 결합시키고 diaminobenzidine(DAB)으로 발색하였다. Hematoxylin으로 대조염색을 하고, 3% glutaraldehyde 용액으로 고정하여 gel-mount(Biomedica, USA)로 봉입하고 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 모낭의 분리

병원으로부터 이송된 두피조직을 분리 직전까지 기관배양용 배지

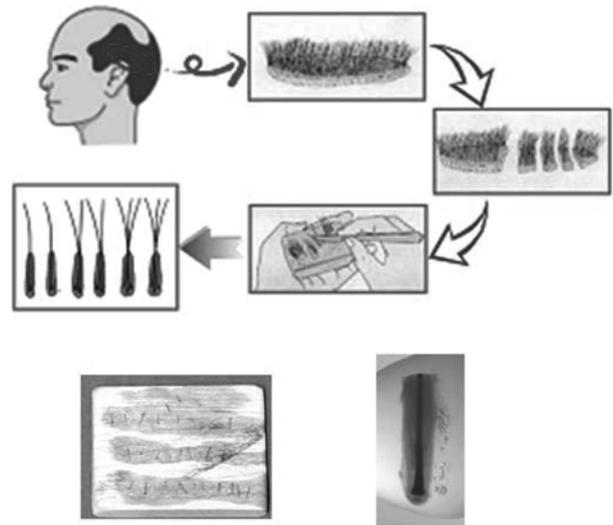


Fig. 1. Schematic diagram of procedure to isolate hair follicle from scalp dermis.

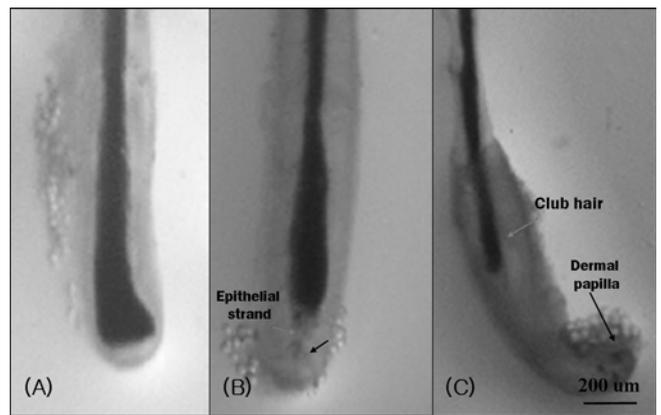


Fig. 2. Microscopy of isolated human hair follicle (a: anagen phase, b: catagen phase, c: telogen phase).

에 담아 냉장 보관하였으며 4시간 이내에 모낭을 분리하였다(Fig. 1). 그 결과 성장기 모낭을 80% 이상의 수율로 분리할 수 있었으며 입체현미경으로 확인한 결과 모낭 구조의 파괴나 손상이 없음을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 운반 및 분리 조건이 모낭 분리에 적합함을 알 수 있었다. 그리고 분리된 모낭을 입체현미경으로 검사하여 모유두와 모기질 세포 세포가 연속적으로 연결되어 있는 구조를 지니는 모구의 손상이 없는 모낭을 성장기 모낭으로(80% 이상, Fig. 2(a)), 그리고 비연속적으로 되어 있거나 모유두와 모기질 세포가 탈락되어 있는 모낭을 퇴행기 및 휴지기 모낭으로 분류할 수 있었다(Fig. 2(b), (c)).

3-2. 장기간 배양용 배지를 이용한 인체 두피 모낭의 기관배양

우선 5% 혈청의 효과를 확인한 결과, 선연구자들의 연구결과와 마찬가지로 모유두를 감싸고 있던 매트릭스 조직의 과증식이 관찰되었으며 배양 4일째에는 매트릭스와 모유두가 분리되면서 퇴행기에서 관찰되는 양상인 매트릭스 부위가 곤봉모 형태로 바뀌면서 모유두가 분리되는 구조상의 변형이 관찰되었다(Fig. 3).

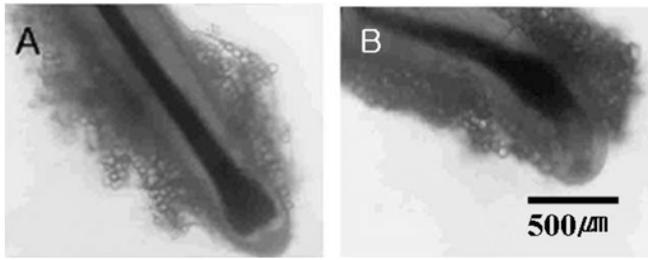


Fig. 3. Regression of hair bulb structure caused by fetal bovine serum after 4 days of organ culture (a: Philpott medium only b: Philpott medium with 5% FBS).

이러한 구조적 변형은 저농도(1%)의 혈청에서도 배양 4일에서 7일째 사이에 동일하게 나타나는 것으로 보아 혈청 농도에 비례하여 모낭의 퇴화가 진행되는 것으로 판단되었다. 따라서 혈청은 모낭의 장기간 배양에 부적합한 것으로 판단되어 이후 실험에는 배제하였다.

장기간 배양용 배지 조성이 인체 두피 모낭의 성장에 미치는 효과를 확인하기 위해 기존 여러 연구자가 사용했던 Philpott medium을 대조군으로 사용하였다. 배양 동안의 상태를 확인하기 위해 입체현미경(X30)에 연결된 디지털 카메라로 사진 촬영을 하였는데, 입체현미경으로부터 발산되는 빛으로 인하여 촬영 소요시간이 5분 정도 경과하면 상당히 건조되어 심각한 모낭 손상을 유발하였다. 따라서 이를 보완하기 위해 배지를 첨가하여 촬영을 하였으나, 배지의 양이 많게 되면 모구 부분이 아래쪽으로 향하고 모발 부분이 위쪽으로 향하게 되어 위상차가 발생하게 되고 길이 측정에 오류가 발생하게 되었다. 따라서 기존의 배지를 제거한 후 새로운 배지를 배양용기의 바닥에 적셔지는 정도의 양(10 μl/cm²)만을 첨가하여 촬영함으로써 문제를 해결하였다. 배양 2일째부터 두 가지 배지에서 모두 외측모근초와 모발의 성장을 동시에 확인할 수 있었으며 배양전

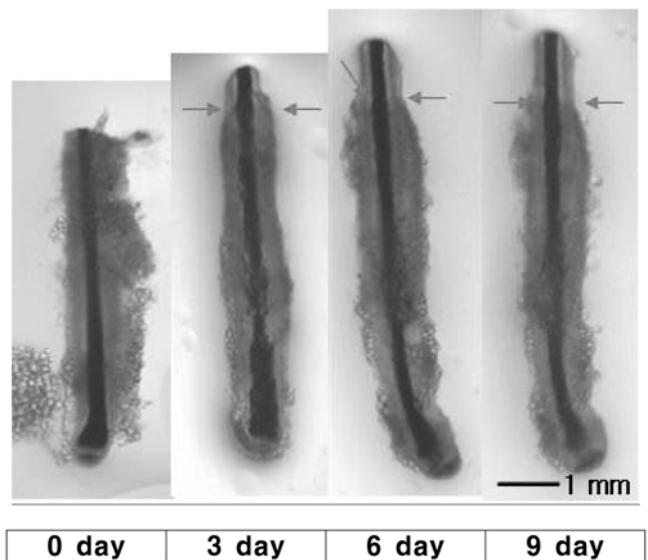


Fig. 4. Morphology of organ cultured hair follicles in Philpott medium, which is Williams'E medium supplemented with 10 ng/ml hydrocortisone, 10 μg/ml insulin, 10 μg/ml transferrin, 10 ng/ml sodium selenite, and 0.2% BSA (Arrows indicate starting points).

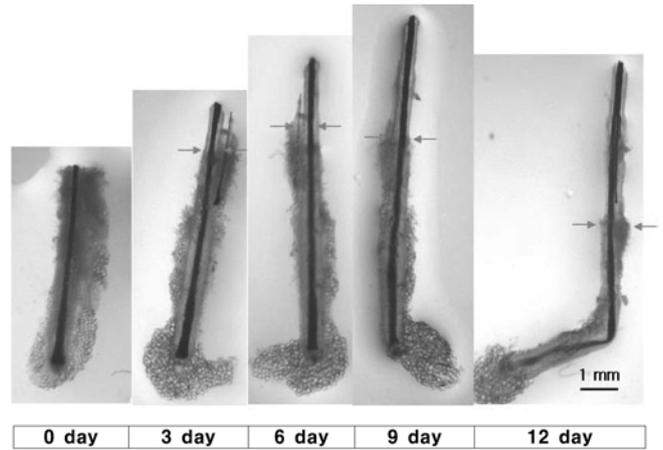


Fig. 5. Morphology of organ cultured hair follicle in IMDM supplemented with 10 ng/ml hydrocortisone, 10 μg/ml insulin, 10 μg/ml transferrin, and 10 ng/ml sodium selenite, 0.2% BSA, and trace elements (Arrows indicate starting points).

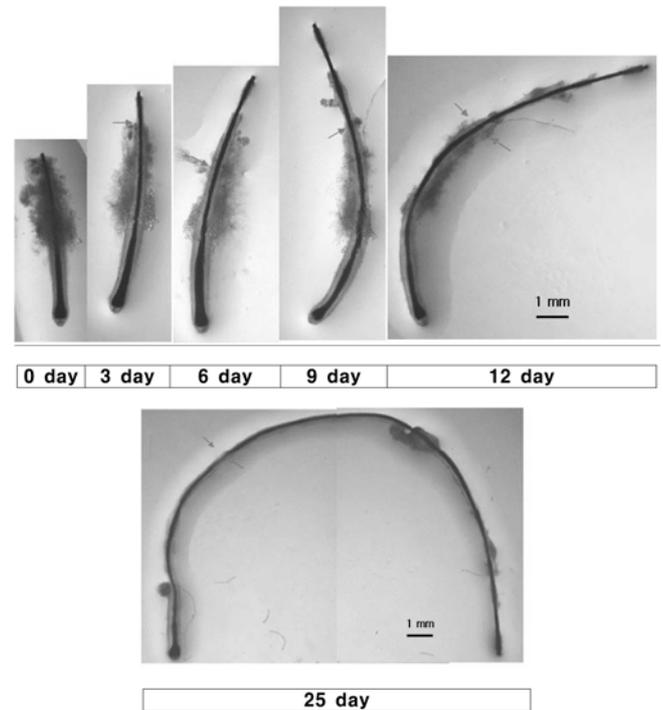


Fig. 6. Morphology of organ cultured hair follicles in DHGM supplemented with 10 ng/ml hydrocortisone, 10 μg/ml insulin, 10 μg/ml transferrin, and 10 ng/ml sodium selenite, 0.2% BSA, and trace elements (Arrows indicate starting points).

보다 일시적으로 모구가 팽윤되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5, 6). 생체 내에서의 달리 액침배양에서는 주위 조직의 부재로 인한 공간적인 한계가 없기 때문에 일시적으로 미각질화된 모피질과 모수질이 길이 성장이 아닌 모구의 부피 증가 양상으로 나타났으며 앞으로 콜라겐 젤 등에 삽입되어 있는 형태의 3차원 조직 모델을 이용하여 주위 조직의 치밀성으로 공간적인 한계를 부여한다면 해결될 것으로 판단된다.

모발 길이 증가 경향을 보면 Philpott medium의 경우 배양 9일째

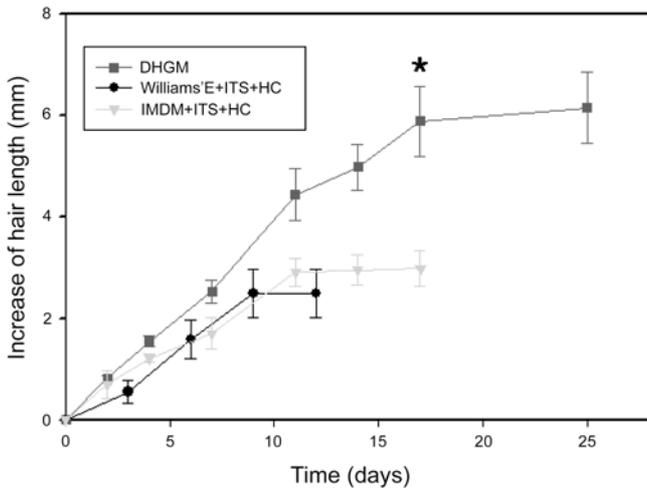


Fig. 7. Increase of hair length of organ cultured hair follicles in Philpott medium, IMDM and DHGM (*p<0.01).

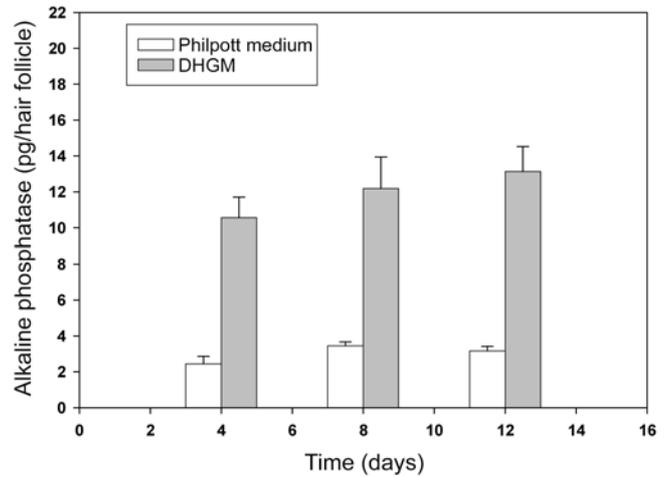


Fig. 8. Alkaline phosphatase expression of organ cultured hair follicles in different medium (*p<0.01).

부터는 길이 증가가 전혀 나타나지 않았다. 배양기간(9일) 동안의 평균 길이 증가율은 0.273 mm/day로 확인되었다. 그리고 IMDM의 경우 배양 12일째까지만 지속적으로 증가하였으며(Fig. 7), 12일 동안의 평균 길이 증가율은 0.312 mm/day로 측정되었다. 반면 DHGM의 경우 비록 배양 20일째부터 모발의 길이 증가가 둔화하지만 배양 10일째까지의 길이 증가율은 0.372 mm/day로 생체 내 길이 증가 속도인 0.4 mm/day와 큰 차이를 보이지 않았으며 25일째까지 길이 증가를 관찰할 수 있었다. Philpott medium으로 배양한 모낭과 비교하여 최종적으로는 약 2배 이상의 모발 길이 증가를 나타내었다(Fig. 7). 실험에 사용한 각 군의 모낭은 같은 기증자로부터 채취된 모낭을 사용하였으므로 개체 차이에 따른 변수는 없었을 것으로 판단된다.

배양 중간에 모낭이 퇴화하는 경우가 있으므로 모발 길이 증가가 나타나는 시기인 성장기의 비율을 Table 2에 나타냈다. 모든 조건에서 배양기간이 길어짐에 따라 성장기 모낭의 비율이 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으며 IMDM과 DHGM의 경우 성장기 모낭의 감소 경향이 Philpott medium에 비해 더디게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Philpott medium의 경우 배양 2일째부터 성장기 모낭의 비율이 감소하며 배양 12일째는 29.2%로 IMDM의 경우 54.2%, DHGM의 경우 66.7%인 것에 비해 크게 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

새로운 모낭을 유도할 수 있는 모유두에만 발현되는 것으로 알려진 알카라인 포스파테이즈의 정량분석을 수행한 결과 배양 4일째부터 Philpott medium에 비해 DHGM의 경우 발현량이 3배 이상 증가한 양상을 나타냈으며 이러한 경향은 배양 12일째까지 유지되었다(Fig. 8).

액침배양한 모낭의 내부 구조 변화를 확인하기 위해 H/E 염색과 모낭 줄기세포에 특이적으로 나타나는 CK19에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다[11, 12]. 일반적으로 모낭에 존재하는 상피 전구 세포 또는 줄기세포가 CK19를 발현하며, 성장기 초기에는 협부, 팽윤부, 모구 부근에서 발현된다고 알려졌고, 퇴행기로 진행됨에 따라 팽윤부의 외측모근초의 전구세포들이 모구쪽으로 이동하게 되고 외측모근초의 최외각에 전체적으로 분산되어 나타나는 것으로 알려졌다. Philpott medium으로 10일 배양한 모낭에서는 거의 발현되지 않았던 CK19가 DHGM으로 배양한 모낭에서는 외측모근초의 최외각에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9(b), (d)). 이러한 전반적인 CK19 발현으로 보아 모낭이 초기 퇴행기(early catagen phase)에 있는 것으로 판단되어 상대적으로 퇴화가 덜 일어나는 것을 확인하였다.

4. 결 론

종합적으로 살펴보면 일반 배지 조성을 기본으로 하는 Philpott medium이나 IMDM으로 배양한 모낭은 구조상으로는 초기 성장기 처럼 보이지만 길이 성장이 없으며, 낮은 알카라인 포스파테이즈 발현, CK19 발현이 거의 없는 것으로 보아 모낭 내 세포의 세포사멸에 의한 퇴화(regression)가 빠르게 일어나는 것으로 판단되는 반면 DHGM으로 배양한 모낭은 상대적으로 긴 기간 동안 성장기의 구조, 지속적인 길이 증가 및 높은 알카라인 포스파테이즈 발현 그리고 전반적인 CK19 발현을 나타내었다. 따라서 고농도의 아미노산 및 비타민 배지 조성이 생체 외에서 모낭을 장기간 배양하는데 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며, 이러한 배양 방법은 장기간 검

Table 2. Number of hair follicles at growth phase

Media		Day of culture			
		3	6	9	12
Media	Philpott medium	19/24(79.2%)	14/24(58.3%)	12/24(50.0%)	7/24(29.2%)
	IMDM	20/24(83.3%)	18/24(75.0%)	13/24(54.2%)	13/24(54.2%)
	DHGM	24/24(100%)	20/24(83.3%)	19/24(79.2%)	16/24(66.7%)

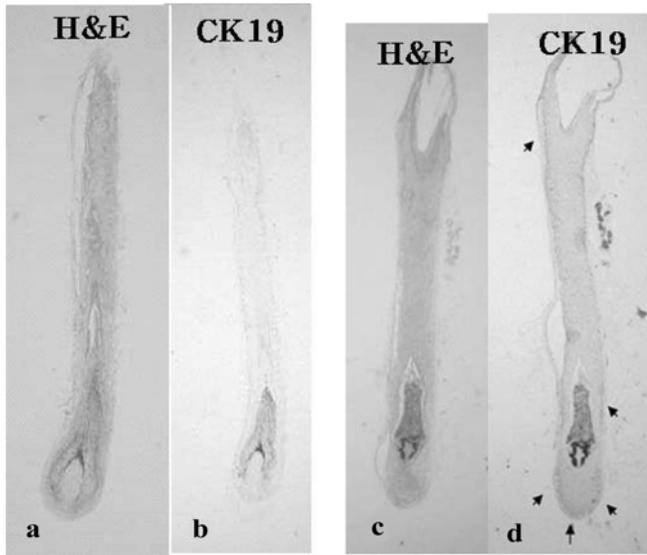


Fig. 9. Histological analysis of organ cultured hair follicles at 10th day (a, b: in Philpott medium; c, d: in DHGM) (Brown color indicates CK19-positive cells).

사를 필요로 하는 모낭에 대한 기초 연구뿐만 아니라 새로운 탈모 치료제의 효능 평가 분야에 이용될 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 산업자원부 산업기초기술연구개발사업(과제번호 10000030)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Maria, I. M. and Marjana, T. C., "Epidermal Stem Cells: the Cradle of Epidermal Determination, Differentiation and Wound Healing," *Biol. Cell.*, **97**(3), 173-183(2005).
2. Jahoda, C. A. and Reynolds, A. J., "Dermal-Epidermal Interactions: Adult Follicle-derived Cell Populations and Hair Growth," *Dermatol. Clin.*, **14**(4), 573-583(1996).
3. Eicheler, W., Happle, R. and Hoffmann, R., "5 α -Reductase Activity in the Human Hair Follicle Concentrates in Dermal Papilla," *Arch. Dermatol. Res.*, **290**, 126-132(1998).
4. Messenger, A. G. and Rundegren, J., "Minoxidil: Mechanism of Action on Hair Follicle," *Br. J. Dermatol.*, **150**, 186-194(2004).
5. Philpott, M. P., Green, M. R. and Kealey, T., "Human Hair Growth *in vitro*," *J. Cell. Sci.*, **97**, 463-471(1990).
6. Westgate, G. E., Gibson, W. T., Kealey, T. and Philpott, M. P., "Prolonged Maintenance of Human Hair Follicles *in vitro* in a Serum-free Medium," *Br. J. Dermatol.*, **129**, 372-379(1993).
7. Childs, C. B., Proper, J. A., Tucker, R. F. and Moses, H. L., "Serum Contains a Platelet-derived Transforming Growth Factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 5312-5316(1982).

8. Sica, D. A., "Minoxidil: an Underused Vasodilator for Resistant or Severe Hypertension," *J. Clin. Hypertens.*, **6**(5), 283-287(2004).
9. Vjayalakshmi, B., Sesikeran, B., Udaykumar, P., Kalyanasundaram, S. and Raghunath, M., "Effects of Vitamin Restriction and Supplementation on Rat Intestinal Epithelial Cell Apoptosis," *Free. Radic. Biol. Med.*, **38**(12), 1614-1624(2005).
10. Uno, H. and Kurata, S., "Chemical Agents and Peptides Affect Hair Growth," *J. Invest. Dermatol.*, **101**(1 Suppl), 143-147(1993).
11. Thomas, C. E., "The Influence of Medium Components on Cu(2+)-Dependent Oxidation of Low-density Lipoproteins and its Sensitivity to Superoxide Dismutase," *Biochim. Biophys. Acta.*, **1128**(1), 50-57(1992).
12. Trachy, R. E., Fors, T. D., Pickart, L. and Uno, H., "The Hair Follicle-stimulating Properties of Peptide Copper Complexes. Results in C₃H Mice," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **26**(642), 468-469(1991).
13. Lewin, B. and Genes, V., Oxford University Press Inc., New York(1994).
14. Paus, R. and Pecker, S., "Biology of Hair and Nail," In Bologna, J. L., Jorizzo, J. L., Rapini, R. P., eds *Dermatology*. Mosby-Wolfe, London, 1007-1032(2003).
15. Sheng, Y., Pero, R. W., Olsson, A. R., Bryngelsson, C. and Hua, J., "DNA Repair Enhancement by a Combined Supplement of Carotenoids, Nicotinamide, and Zinc," *Cancer. Detect. Prev.*, **22**, 284-292(1998).
16. Marini, M. and Musiani, D., "Micromolar Zinc Affects Endonucleolytic Activity in Hydrogen Peroxide-mediated Apoptosis," *Exp. Cell. Res.*, **239**(2), 393-398(1998).
17. Handjiski, B. K., Eichmuller, S., Hofmann, U., Czarnetzki, B. M. and Paus, R., "Alkaline Phosphatase Activity and Localization During the Murine Hair Cycle," *Br. J. Dermatol.*, **131**(3), 303-310(1994).
18. Theresa, J., Enrico, A., Anil, H. and Sreedhar, K., "Glycine Prevents the Induction of Apoptosis Attributed to Mesenteric Ischemia/reperfusion Injury in a Rat Model," *Surgery*, **134**, 457-466(2003).
19. Uno, H., Cappas, A. and Schlager, C., "Cyclic Dynamics of Hair Follicles and the Effect of Minoxidil on the Bald Scalps of Stumptailed Macaques," *Am. J. Dermatopathol.*, **7**(3), 283-297(1985).
20. Philpott, M. P., Green, M. R. and Kealey, T., "Rat Hair Follicle Growth *in vitro*," *Br. J. Dermatol.*, **127**(6), 600-607(1992).
21. Commo, S., Gaillard, O. and Bernard, B. A., "The Human Hair Follicle Contains two Distinct K19 Positive Compartments in the Outer Root Sheath: a Unifying Hypothesis for Stem Cell Reservoir?," *Differentiation*, **66**(4-5), 157-164(2000).
22. Michel, M., Torok, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A. and Germain, L., "Keratin 19 as a Biochemical Marker of Skin Stem Cells *in vivo* and *in vitro*: Keratin 19 Expressing Cells are Differentially Localized in Function of Anatomic Sites, and Their Number Varies with Donor Age and Culture Stage," *J. Cell. Sci.*, **109**, 1017-1028(1996).
23. Yang, L., Zhang, B., Toki, K., Maeda, N., Sakanaka, M. and Tanaka, J., "Improvement of the Viability of Cultured Rat Neurons by the Non-essential Amino Acids L-serine and Glycine that Upregulates Expression of the Anti-apoptotic Gene Product Bcl-w," *Neurosci. Lett.*, **295**(3), 97-100(2000).