

## C57BL6 생쥐에서 NDM 헤어토닉의 모발성장 촉진 효과

남상윤 · 문준환 · 윤영원 · 백인정 · 연정민 · 류광철\* · 이범준<sup>#</sup>

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소, \*(주)다모코스메틱

(Received February 11, 2004; Revised April 16, 2004)

### Effect of NDM Hair Tonic on Hair Growth Promotion in C57BL6 Mice

Sang-Yoon Nam, Jun-Hwan Mun, Young Won Yun, In-Jeoung Baek, Jung-Min Yon, Kwang-Chuel Ryu\* and Beom Jun Lee<sup>#</sup>

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763 and

\*Damocosmetics, Inc., Seoul 110-460, Korea

**Abstract** — NDM hair tonic is composed of several plant extracts which are known to be used in oriental medicine. This study was carried out to investigate the effect of NDM hair tonic on hair regrowth in an alopecia model of C57BL6 mice. Hair of six-weeks old mice were trimmed by electric clippers and electric shavers, so as not to damage the skin. The next day, mice without visible scratches were selected, randomized and separated in groups of 6 mice. There were four experimental groups including saline (negative control), 50% ethanol (vehicle control), 3% minoxidil (MXD), and NDM tonic. The test compounds were topically treated with 0.15 ml per mouse per day for 2 weeks. The hair regrowth was determined photographically and histologically and the quantity of endocrine factors, IGF-1 and TGF- $\beta$ , in the skin of mice was measured by PCR. No clinical signs were found in all animals. The topical treatment of NDM tonic for 2 weeks to dorsal skin accelerated hair regrowth faster than either the controls or MXD treatment. The NDM tonic treatment also promoted hair follicle development and elongation as compared with the controls or MXD treatment. Both NDM tonic and MXD treatment significantly increased the expression of IGF-1 and TGF- $\beta$  in the skin of C57BL6 mice as compared with the controls ( $p < 0.05$ ). These results suggest that NDM tonic has a hair growth activity and be useful for the treatment of baldness or alopecia.

**Keywords** □ alopecia, hair growth, IGF-1, NDM hair tonic, TGF- $\beta$

사람의 모발은 뇌와 그것을 둘러싸고 있는 두개골 보호와 같은 본래의 기능 이외에도 미용적인 면에서 큰 기능을 하고 있어 탈모, 양모 및 탈모 예방은 예로부터 많은 관심의 대상이 되고 있다.<sup>1)</sup> 최근에는 기존의 중년 남성뿐 아니라 젊은 층과 여성층에서도 탈모예방과 양모 등에 대한 관심이 증가하고 있다. 이는 남성에서 발생하는 유전적인 요인 이외에 현대사회로 들어서면서 여성들의 사회활동 증가, 입시나 직장에서의 스트레스 증가 및 서구화된 식사습관에서 오는 영양 불균형 등 탈모에 직, 간접적으로 영향을 미칠 수 있는 많은 사회 문화적인 요인들의 변화에서 기인하는 것으로 생각되고 있다.

모발성장주기(hair growth cycle)는 3단계로 구성되는 데, 모발이 가장 활발하게 성장하는 anagen기, 모발의 퇴화가 시작되는 catagen기 및 모발의 성장이 멈추거나 휴지기에 접어드는 telogen

기로 분류하게 된다.<sup>2)</sup> 모발의 각 성장주기에 대하여 다양한 인자(endocrine or paracrine factors)들이 작용함으로써 양모 또는 탈모를 유발하게 된다. 지금까지 밝혀진 탈모기전에 대한 연구내용들을 살펴보면, 피부에 존재하는 cytokines중 IL-1과 TNF는 모발세포의 세포사를 유발함으로써 탈모를 일으키게 된다. 또한, TGF- $\beta$ 는 모발의 anagen 성장을 방해하고, 남성호르몬 androgen은 모발의 anagen기를 짧게함으로써 정상보다 빨리 catagen기로 접어들게 한다.<sup>3)</sup> 한편, IGF-1, EGF, FGF 등과 같은 성장인자는 모발의 성장을 촉진하고 모발세포의 세포사를 방지 하는 것으로 알려져 왔다.<sup>3)</sup>

최근 전세계적으로 많은 대학 및 기업 연구소 등에서 모발 성장과 탈락에 대한 세포학적, 생화학적 또는 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있으며, 탈모치료 및 모발성장을 촉진시킬 수 있는 약물의 개발에도 많은 노력을 기울이고 있다. 현재 모발 성장을 촉진하는 약물로 미국 Food and Drug Administration (FDA) 에서 공인받은 것으로는 minoxidil(MXD)과 finasteride 두가지만 있을 뿐이다. Pharmacia & Upjohn의 MXD는 최초에는 고혈압 치료를 위한 혈관확장제로 개발되었으나 부작용으로

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-3357 (팩스) 043-267-3150  
(E-mail) beomjun@cbu.ac.kr

다모증이 보고 되면서 발모제로 개발되었다. MXD의 발모효과에 대한 작용기전은 현재까지 명확히 밝혀지지 않았지만 혈관확장을 통한 영양공급 증가 및 potassium channel opening 효과가 모발성장을 유도하는 것으로 생각되고 있다.<sup>4,6)</sup> 또한 최근 Merck에서 개발한 finasteride는 남성호르몬 대사에 작용하는 효소인 5 $\alpha$ -reductase의 활성을 억제시키는 물질이다.<sup>7)</sup>

발모, 양모 및 탈모예방 연구에 이용되는 실험법으로는 실험동물을 이용한 *in vivo* 평가와 모낭세포 및 조직배양을 이용한 *in vitro* 평가 등이 주로 이용되고 있다.<sup>8)</sup> 1980년대에 들어 모낭을 구성하고 있는 모유두세포(dermal papilla cell)와 외모근초세포(outer root sheath cell)의 배양법이 개발되면서 모낭에서의 분화기전에 대한 연구가 활기를 띠게 되었고, 이후 모낭조직 배양법이 개발되면서 발모, 양모 및 탈모방지 등의 연구에 유용한 평가모델로 활용될 수 있는 가능성을 보여주었다.<sup>9-12)</sup> 그러나 이러한 *in vitro* 배양기법을 이용한 평가는 모낭조직내에서의 세포간의 상호작용과 모낭조직과 주위를 둘러싼 진피조직과의 상호작용, 그리고 혈액순환이 배제되는 등 모발 성장에 직, 간접적으로 영향을 미칠 수 있는 많은 요소들이 배제되어 있어 한계성을 지니고 있다.<sup>13,14)</sup> 따라서 각종 생화학적 평가를 통해 탐색되는 많은 약물들의 실제 효과를 검증하기 위해서는 아직까지 실험동물을 이용한 효능평가 및 임상실험 등이 주로 이용되고 있는 실정이다. 또한, 최근에는 생화학적, 분자생물학적 실험 방법을 이용하여 모발 성장과 관련된 각종 성장인자나 유전자의 동정, 작용기전 연구 및 약물탐색연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>15-18)</sup>

발모, 양모 및 탈모방지 등의 효과를 평가하기 위하여 이용되는 실험동물모델로는 붉은꼬리원숭이(stumptailed macaque), 토끼(rabbit), 햄스터(hamster), 생쥐(mouse) 등이 있다. 본 연구에 사용된 C57BL6 mouse는 체모가 검정색이고, 자발적 탈모(spontaneous alopecia)가 일어나는 특징을 지니고 있으며, 또한 melanocyte가 모낭에만 한정적으로 존재하고 melanin합성이 모발성장주기(hair growth cycle)와 잘 일치되어 피부색으로 모발의 성장주기를 판정할 수 있는 장점을 가져 모발생리 연구에 널리 이용되고 있다.<sup>19)</sup>

전통적으로 한방에서 많은 식물 추출물들이 발모 및 탈모예방을 위해 사용되어 왔다. NDM hair tonic(NDM)은 이러한 식물들 즉, 치자, 창포, 상백피, 알로에, 박하 등의 추출물을 혼합하여 만든 제품으로 본 연구에서는 C57BL6 마우스의 발모 모델을 사용하여 발모 혹은 양모의 효능을 평가하고, 기존 3% MXD 제품과의 효능을 비교 분석하였다.

**재료 및 방법**

**시료의 준비**

시험물질로서 NDM의 헤어토닉(제조 No : 0021217)을 다모

**Table I** – Major components of NDM tonic

	Components	(Kg/100 Kg)
Major components	Salicylic acid	0.500
	Nicotinic acid amide	0.300
Emollients	Gardenia seeds extract	0.500
	Sweet flag extract	0.300
	Moriradicis cortex extract	2.000
	Aloe extract	3.000
	Propylene glycol	2.000
Flavoring agents	Rosemary extract	0.500
	Lavender extract	0.200
Moisturizer	Collagen	2.000
Preservatives	Methylparaoxy benzoate	0.100
Solvents	Ethanol	48.000
	Deionized water	40.600

코스메틱(주)으로부터 공급받았고, 그 구성성분의 함량은 Table I에서와 같다. 비교대상의 발모제로서 3% MXD(현대약품)을 구입하여 사용하였다.

**실험동물**

생후 5주된 수컷 C57BL6 마우스를 (주)대한바이오링크로부터 구입하여 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 23±3°C, 상대 습도 50±10%, 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험동물은 격리용 마우스 사육상(삼광, 금산)에서 사육하였고 실험동물용 사료(삼양사료, 대전)를 자유로이 급여하였다. 군은 총 4개로 군당 6마리씩 총 24마리를 실험하였다.

**발모제의 도포 및 육안적 관찰**

양모 효과를 살펴보기 위해, 등쪽 피부의 색이 pink color를 보이는 휴지기 체모의 6주령을 사용하였다. 체모는 Electric animal clipper를 이용하여 조심스럽게 마우스의 등편의 털을 깎아내고 제거한 후, 그 부위에 붓을 사용하여 150 $\mu$ 의 시료를 각 군별로 도포하였다. 시료 처리는 매일 오전 10시에 1회씩 2주간 실시하였다.

시료로서 NDM의 헤어토닉(NDM)과 3% MXD를 실험시작 후 피부(제모부위)에 매일 도포하였고, 음성대조군으로서 saline과 용매대조군으로서 50% 에탄올(50% EtOH)을 도포하였다. 실험시작 후 1일, 4일, 7일, 10일, 및 14일에 털이 자라는 상태를 육안적으로 확인하기 위하여 에테르로 가볍게 마취한 후 사진촬영을 실시하였다. 털이 자란 상태 정도는 육안적 판단하여 0~20% (-), 20~40%(±), 40~60%(+), 60~80%(++), 80~100%(+++ )로 정하였다.

**체중측정 및 장기무게의 측정**

체중은 발모제 도포직전부터 측정하여 실험 종료 시까지 일정

한 시간(오전 10시)에 매일 측정하였다. 발모제 도포가 종료된 후 각 동물들을 부검하여 각종 장기의 무게를 측정하였다.

### 조직학적 분석

시료도포부위를 해부기를 이용하여 적출한 후 formalin으로 고정하였다. 단계별로 alcohol과 xylene으로 탈수처리한 후 파라핀으로 포매한 후, 마이크로톰을 이용하여 5  $\mu$ m의 절편을 만들어 다시 alcohol과 xylene으로 파라핀을 제거하였다. hematoxylin & eosin 염색하여 광학현미경으로 모낭조직의 조직학적 변화를 관찰하였다.

### 분자생물학적 분석

**RNA 추출** - 마우스를 부검하여 적출한 피부를 잘게 잘라 Deep freezer(-70°C)에 보관해 두었다가 피부조직 50~100 mg에 Trizol 1 ml을 넣어 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 실온에서 5분간 incubation시킨 후 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 섞어 2~3분간 실온에서 다시 incubation시킨 다음 4°C에서 12,000~15,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 넣고 vortex한 후 실온에서 10분간 incubation하고 4°C에서 12,000×g로 10분 동안 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 이 RNA pellet을 70% EtOH로 washing한 뒤 건조시켰다. 그 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 수용액 50  $\mu$ l에 pellet을 다시 용해시켰다. 그 용액을 DEPC 수용액에 1/100로 희석한 후 260 nm에서 OD값을 측정하여 RNA를 정량하였다. 280 nm에서도 OD값을 측정하고 Absorbance ratio(A260/A280)가 1.8~2.0 사이인지 확인하였다.

**cDNA 합성** - iNtRON사의 power cDNA kit에서 제공하는 protocol에 따라 total RNA가 5  $\mu$ g이 되도록 RNA sample을 넣고 DEPC water를 9.5  $\mu$ l까지 채운 후 oligo(dT) primer 1  $\mu$ l을 넣어 65°C에서 10분간 가열하였다. RNase inhibitor 1.0  $\mu$ l, 5× RT buffer 4.0  $\mu$ l, dNTP 2.0  $\mu$ l, DTT 2.0  $\mu$ l, AMV RT buffer 0.5  $\mu$ l을 넣고 혼합하여 42°C에서 60분간 incubation하였다. 그

후 70°C에서 5분간 가열하여 반응을 종결하였다.

**PCR과 전기영동** - iNtRON사의 i-taq DNA Polymerase를 구입하여 사용하였다. 10× PCR buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2.0  $\mu$ l, template 1.25  $\mu$ l, forward primer와 reverse primer(10 pmole/l, Promega, USA) 각각 1.25  $\mu$ l, iTaq 0.31  $\mu$ l, autoclaved deionized water 16.44  $\mu$ l를 섞고 PCR을 실시하였다. Primer는 대조군으로 GAPDH(58°C, 30 cycles), 실험군으로 IGF-1(60°C, 35 cycles), TGF- $\beta$ (58°C, 35 cycles)를 사용하였다. 그리고 TBE buifer를 이용하여 1.5% agarose gel에 전기영동시켜 Ethidium bromide에 염색한 후 수세하였다. UV를 조사하여 DNA band를 확인하였고 그 확인된 band는 AlphaEasy v5.5 analyzer system을 이용하여 발현량을 수치화하였다.

### 통계학적 분석

체중 및 장기무게 측정치의 통계적 분석은 SAS program을 사용하여 one-way ANOVA에서 유의한 F값의 항목을 Dunnett's test를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다. 또한 처치군에서 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 발현에 대한 유의성은 Student's test를 사용하여 p<0.05 수준에서 대조군에 대해 검정하였다.

## 결 과

### 일반증상 및 체중과 장기무게의 변화

각 시료를 투여한 마우스에 있어서 대조군에 비교하여 특별한 증상은 관찰할 수 없었다. 체중과 장기무게에서는 체중의 유의적 차이는 없고 절대 장기무게에서는 NDM군에서 오른쪽 신장 무게가 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다(Table II). 상대 장기무게에서는 3% MXD군에서는 뇌와 오른쪽 신장이 유의성(p<0.05) 있게 감소하였으며, NDM군에서 간과 오른쪽 신장에서 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Table III).

**Table II** - Absolute organ weights (g) of mice in an alopecia model by shaving after topical treatment of test compounds for 2 weeks

	Saline	50% EtOH	3% MXD	NDM
Body weight	22.5±1.58356	21.714±1.00776	23.984±0.43299	21.7167±1.30216
Testis (left)	0.09512±0.00551	0.0887±0.00957	0.09074±0.00456	0.09167±0.00252
Testis (right)	0.09262±0.00347	0.0874±0.00492	0.09012±0.007	0.07467±0.0215
Epididymis (left)	0.04316±0.013	0.0304±0.00275	0.03694±0.0063	0.03167±0.01762
Epididymis (right)	0.03465±0.00295	0.0371±0.01215	0.03554±0.01369	0.03233±0.01365
Prostate	0.04096±0.01174	0.0408±0.00849	0.03684±0.01305	0.03833±0.01872
Brain	0.42556±0.01943	0.41238±0.01844	0.42006±0.0171	0.43133±0.00602
Liver	1.38564±0.10491	1.29072±0.07537	1.4625±0.06337	1.17067±0.10372
Spleen	0.06744±0.01075	0.05946±0.00548	0.07924±0.00662	0.094±0.01819
Kidney (left)	0.16816±0.0504	0.14176±0.00531	0.15212±0.01397	0.135±0.01735
Kidney (right)	0.16292±0.01878	0.14722±0.01062	0.154±0.01079	0.124±0.01778*

\*Significantly different from control, p<0.05.

**Table III** – Relative organ weights (g) of mice in an alopecia model by shaving after topical treatment of test compounds for 2 weeks

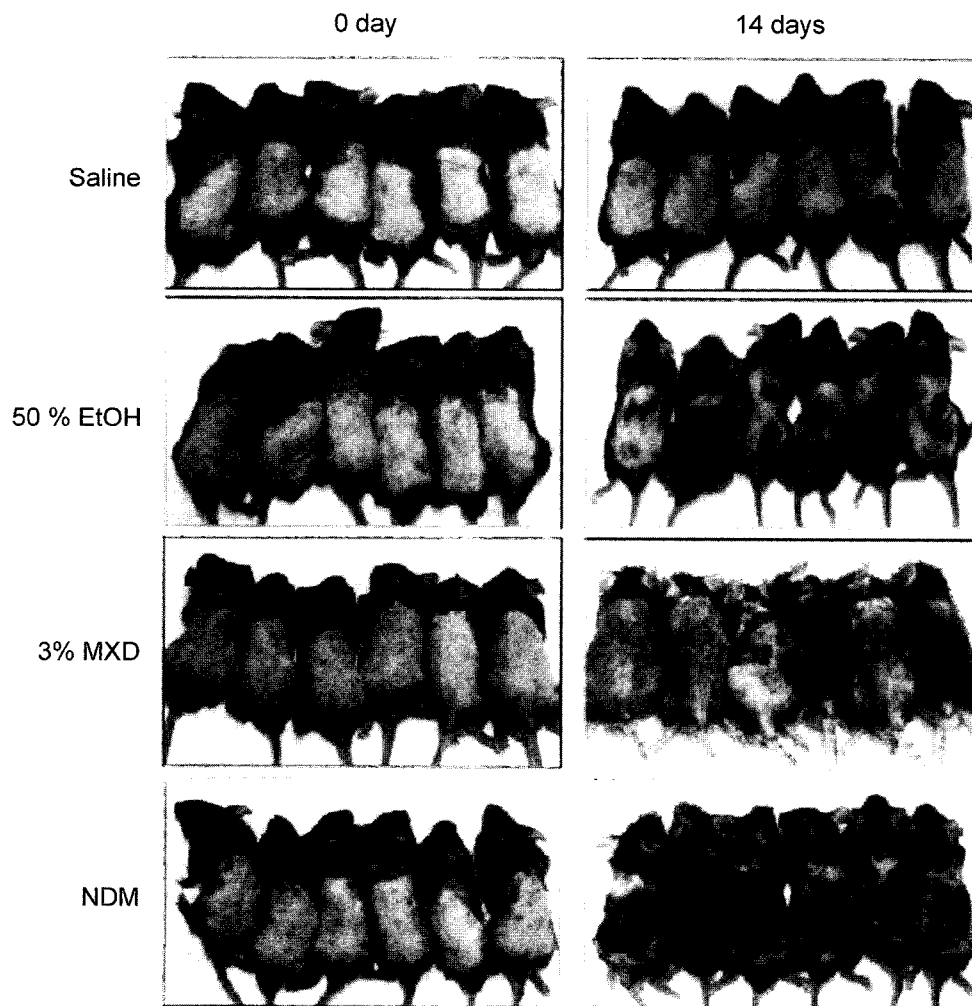
	Saline	50% EtOH	3% MXD	NDM
Testis (left)	0.42276±0.04688	0.40849±0.0315	0.37834±0.01563	0.4221±0.02074
Testis (right)	0.41164±0.0297	0.40251±0.00778	0.37575±0.02661	0.34382±0.11748
Epididymis (left)	0.19182±0.0693	0.14±0.01338	0.15402±0.02631	0.14582±0.08983
Epididymis (right)	0.154±0.01476	0.17086±0.05059	0.14818±0.05703	0.14889±0.05468
Prostate	0.18204±0.0408	0.1879±0.04197	0.1536±0.05538	0.17652±0.07954
Brain	1.89138±0.0814	1.89914±0.06277	1.75142±0.08663*	1.98619±0.19825
Liver	6.1584±0.34234	5.94418±0.24378	6.09782±0.34388	5.39064±0.28633*
Spleen	0.29973±0.03482	0.27383±0.01855	0.33039±0.03219	0.43285±0.09215
Kidney (left)	0.74738±0.16754	0.65285±0.03457	0.63426±0.04973	0.62164±0.08466
Kidney (right)	0.72409±0.06072	0.678±0.03645	0.64209±0.04373*	0.57099±0.05343*

\*Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

**양모의 육안적 특징**

각 마우스에 제모 1일 후에 각각의 시료를 제모된 부위에 도포하였다. 음성대조군으로서 saline을 도포한 마우스에서는 2주 후에도 거의 털이 자라지 않았으나, 50% 에탄올을 도포한 마우스에서는 일부분 털이 자라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 3%

MXD군에서는 미약한 양모효과를 보였으나, NDM군은 가장 고르고 왕성하게 털이 자라는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 각 군의 발모효과를 scoring system에 의해 높은 순서대로 분류하면 NDM hair tonic>3% MXD>50% EtOH>saline 순이다 (Table IV).



**Fig. 1** – Comparison of hair regrowth in an alopecia model of C57BL6 mice by shaving after topical application of test compounds for 2 weeks.

**Table IV** – Comparison of hair regrowth in an alopecia model of C57BL6 mice induced by shaving after topical application of test compounds for 2 weeks

Treatment	Score
Saline	-
50% EtOH	±
3% MXD	++
NDM tonic	+++

**발모제 NDM의 경시적 발모양상**

제모한 후 NDM을 매일 도포하면서 털이 자라는 양상을 육안적으로 관찰하였다. Saline을 투여한 음성대조군은 14일 후에도 거의 털이 자라지 않는 상태였고, 50% EtOH를 투여한 군에서는 14일 후에 미미한 정도의 털이 자랐다(Fig. 2). NDM을 도포한 4일 후에는 제모된 부위가 휴지기의 상태로서 다소 선홍색의 피부색을 띠었다. 도포 7일에는 피부색이 옅은 흑색을 띠기 시

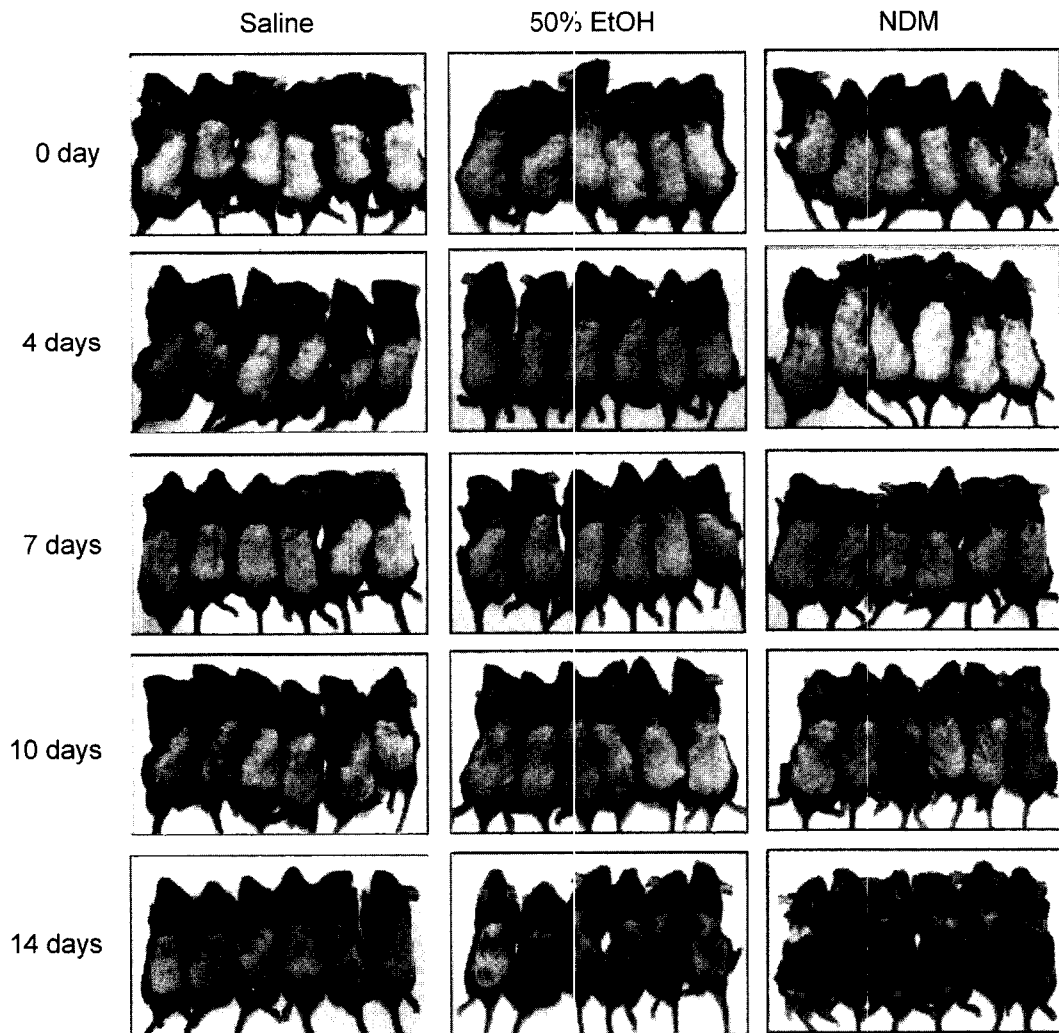
작하였고, 도포 10일에는 제모된 전체피부가 검게 변화했다. 도포 14일에는 제모된 부위가 완전한 털로 전체적으로 덮이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

**발모효과와 조직학적 특징**

14일 후에 피부조직을 현미경으로 관찰하였을 때, 음성대조군으로서 saline은 hair follicle 휴지기 상태로 존재하였으나, 50% EtOH 도포군의 경우는 모낭내의 모근이 원형으로 관찰되었다(Fig. 3). 3% MXD 및 NDM군에서는 모낭의 수가 증가하였을 뿐 아니라 모낭내의 모근이 길게 성장하여 피부의 표면으로 분출하는 양상을 보였다(Fig. 3).

**발모효과와 분자생물학적 특징**

14일 투여 후 피부에서 IGF-1 및 TGF-β의 발현을 조사하였는데, IGF-1의 경우 saline과 50% EtOH에서 거의 유사한 발현량



**Fig. 2** – Hair growth changes of C57BL6 mice in a time-dependent manner in an alopecia model by shaving after topical application of NDM for 2 weeks.

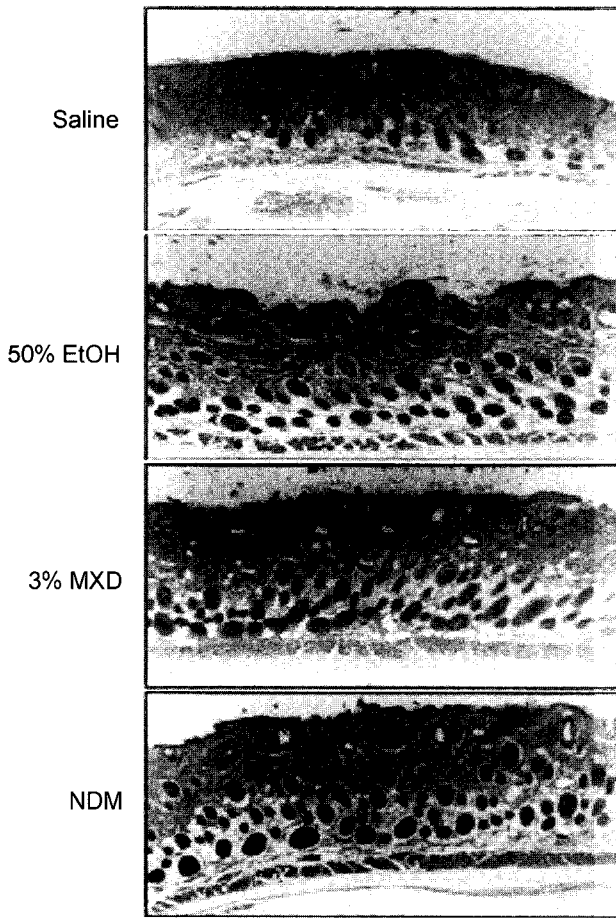


Fig. 3 – Histological observation of hair growth in an alopecia model of C57BL6 mice by shaving after topical application of test compounds for 2 weeks. NDM and 3% MXD promote hair follicle elongation compared to the controls. H&E,  $\times 40$ .

을 나타냈었다(Fig. 4). 3% MXD군과 NDM군에서 IGF-1의 발현량이 saline군보다 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하여, 3% MXD군은 약 1.5배, NDM군은 약 2배 정도 많이 발현되었다(Fig. 4). TGF- $\beta$  발현은 대조군으로 쓰인 saline군에서 발현량의 수치가 매우 낮았으며 50% EtOH군에서 2배, 3% MXD군에서 14배, NDM군에서는 13배 정도 saline보다 많은 양의 TGF- $\beta$ 가 발현되었다(Fig. 5).

### 고찰

최근 탈모 및 세모로 심리적 고통을 받는 남성 및 여성이 증가하고 있다. 그래서 탈모방지 혹은 양모에 대해 효능이 있는 약제의 개발이 매우 중요하다. 이러한 점에서 현재 Minoxidil은 잘 알려진 발모제이나 한약 혹은 약용식물을 사용하는 대체의학이 점차 주목을 받고 있다. 본 실험은 전통적으로 머리를 감을 때 사용해왔던 창포 및 알로에 등의 혼합물로 만들어진 NDM Hair

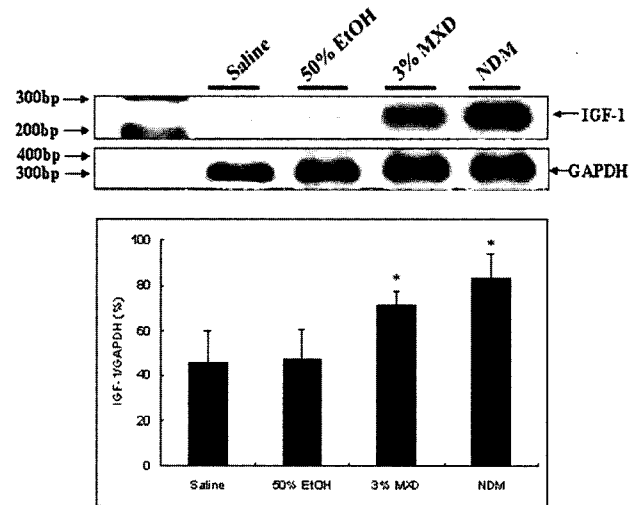


Fig. 4 – Comparison of IGF-1 expression in an alopecia model of C57BL6 mice by shaving after topical application of test compounds for 2 weeks. \*Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

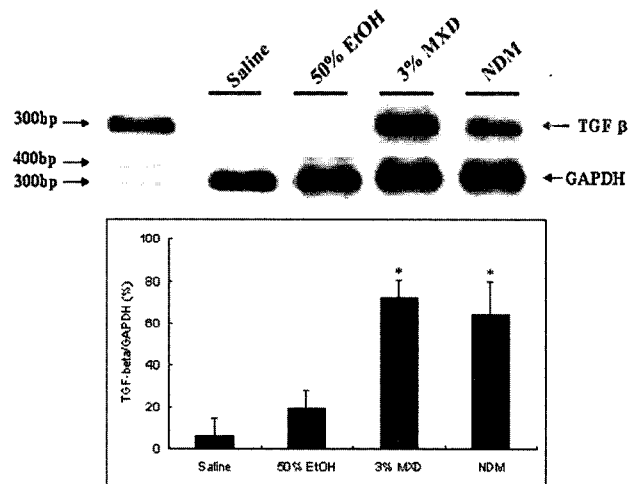


Fig. 5 – Comparison of TGF- $\beta$  expression in an alopecia model of C57BL6 mice by shaving after topical application of test compounds for 2 weeks. \*Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

tonic을 사용하여 실험동물(C57BL6 마우스)에서 모발 성장에 효과가 있는가를 평가하였다.

수컷의 탈모 패턴의 형태학적, 조직학적, 생화학적 측면은 짧은 꼬리 원숭이를 가지고 연구한 끝에 알려졌다. 대표적인 수컷의 탈모패턴은 telogen 기가 길어지고 anagen 기가 짧아진다. 탈모의 한 가지 조직학적 특징은 anagen 모낭이 충분히 길어지지 않는다는 것이다. 자라나는 모발의 두터움은 모낭의 크기로 결정된다. 그러므로, 초기 anagen에서 중기 anagen에서 자라나는 모낭의 길이가 정상 모발 주기에서 매우 중요하다.<sup>20-25)</sup> 본 실험에서 C57BL6 마우스를 실험동물 모델로 사용하였는데, C57BL6

마우스는 6주령부터 모발 주기가 telogen 기로 들어간다고 알려졌다. 우리는 5주령 된 실험동물을 구입하여 1주일간 순화기간을 거친 후 6주령 된 마우스를 가지고 실험을 시작하였다. telogen 기에 들어간 마우스는 털을 깎았을 때 체표면의 색이 분홍색을 띄었고 시험을 진행함에 따라 체표면 색은 검정색으로 변해갔다. 이는 모발 주기가 telogen기에서 anagen기로 돌아감을 뜻한다.<sup>19,26)</sup>

본 실험에서 NDM hair tonic은 모발의 성장을 촉진하였으며 이러한 효과는 이미 발모제로서 잘 알려진 MXD보다 모발이 매우 빠르게 성장하는 것으로 나타났다. MXD 및 NDM이 남성 생식에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 실험동물을 부검을 하여 체중 및 상대 장기 무게를 측정하였다. 절대장기 및 상대장기 무게에 있어서 3% MXD 및 NDM군은 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 그러나 이러한 결과를 통해 MXD 혹은 NDM이 생식독성에 영향을 미치는지 않는다고 정확히 말할 수는 없으며, 안전성 평가를 통해 확인 될 수 있으리라 사료된다. 더불어 남성 호르몬의 분비에 대한 영향도 추후 측정되어야 한다고 생각된다. 본 실험에서는 좀 더 자세하고 객관적인 자료를 얻기 위하여 조직학적 검사를 실시하였다. 실험을 실시한지 2주일 후 실험동물을 부검을 하여 검사 시약을 투여한 등쪽 피부를 채취하여 조직 절편을 제작한 후, H&E 염색으로 현미경 검사를 실시하였다. 조직 검사시 NDM이 대조군보다 모낭의 길이와 크기에서 특징적인 차이를 보였다. 대조군인 saline 군에서는 모낭속의 모근의 수가 적었고 또한 모낭의 크기가 작았으며, NDM군과 3% MXD 군에서는 모낭의 수가 많고 길이가 길어져 피부로 표출되어 있는 현상을 나타냈으며, 이러한 현상은 두 물질의 발모효과와 연관되어지는 것으로 사료된다.<sup>27)</sup>

NDM의 기전을 알아보기 위하여 NDM을 피부에 도포하여 모발 성장에 영향을 미치는 내분비계 인자를 조사하였다. 먼저 피부에 존재하는 내분비계인자들 중에 시료를 피부에 도포할 시에 평소 피부에 존재하는 내분비계인자들의 양에 변화가 생긴다는 추측하에 실험을 하였다. 실험은 각 군당 시료도포부위인 등쪽 피부를 채취하여 진행하였고 내분비계인자들의 양을 측정하기 위해 PCR를 이용하였고 반복실험하여 통계처리 하였다. 결과는 IGF-1 발현량이 대조군인 saline 군보다 3% MXD군과 NDM군에서 각각 1.5배, 2배 정도 많게 측정되었다. 이는 3% MXD 혹은 NDM을 피부에 도포함으로써 피부에 IGF-1의 양을 증가시킴으로서 모발의 성장을 촉진하였다고 추정할 수 있다. IGF-1은 *in vitro*에서 배양된 hair follicle 뿐아니라 상피세포의 성장을 촉진한다고 알려져 있으며 IGF-1 transgenic animal에서 hair follicle의 elongation이 촉진된다.<sup>28)</sup> TGF- $\beta$ 의 경우는 대조군인 saline 군에서 매우 낮은 수치를 나타냈으며 MXD 및 NDM군에서 각각 15 및 13배 정도로 대조군보다 유의성 있게 증가하였다. TGF- $\beta$ 1은 hair follicle의 anagen-catagen transition을 촉진하는 것으

로 알려졌다.<sup>29,30)</sup> 그러나 이러한 변화는 매우 복잡하며, 더우기 3개의 isoforms( $\beta$ 1-3)의 역할이 매우 다양하다.<sup>29,31)</sup> 이들 중 TGF- $\beta$ 2 효과는 모발주기 중 생리적으로 모발의 성장을 촉진하며 anagen phase를 증가시키는 것으로 알려졌다.<sup>29,30)</sup> 본 실험에서 MXD 및 NDM의 14일 투여 후에 TGF- $\beta$ 의 발현이 증가하였는데, 이에 대한 해석은 좀더 많은 실험이 필요하다.

MXD는 예전 연구에서 이 실험동물에서 모낭을 자극하여 모낭이 충분히 길어지고 모발 재생장에 도움을 준다고 알려졌다. 사실은 MXD sulfate가 모낭에 가서 활성 대사물로 전환된다.<sup>32)</sup> 그리고 사람의 머리피부에서 혈액순환이 잘 되도록 작용한다. NDM도 MXD와 마찬가지로 C57BL6 마우스에서 모발 재생장에 도움이 된다. 하지만 NDM은 아직 기전이 확실히 알려져 있지 않으며, 이번 연구결과로는 NDM이 모낭의 길이성장 가속화가 모낭이 anagen기로 돌아가도록 활성화시킨다고 할 수 있다. 그 결과, 충분한 모발 재생장에 필요한 시간이 짧아진다. 뿐만 아니라 모발 성장을 촉진하는 인자인 IGF-1 혹은 TGF- $\beta$ 2의 양을 증가시켜 모발 재생장을 촉진시킨다.

위에 결과를 토대로 NDM은 사람에서도 모낭 길이성장을 자극하여 모발 재생장을 촉진하며 모발 성장 촉진인자의 발현량을 증가시키므로 NDM 약물이 탈모환자에 유용하게 사용될 것이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 (주)다모코스메틱에서 의뢰한 용역사업(No. 104188)으로 수행한 결과의 일부분입니다.

## 참고문헌

- 1) Stenn, K. S. : The molecular and structural biology of hair: introduction. *Ann. NY Acad. Sci.* **642**, xi (1991).
- 2) Buhl, A. E., Waldon, D. J., Miller, B. F. and Brunden, M. N. : Differences in activity of minoxidil and cyclosporin A on hair growth in nude and normal mice. *Lab. Invest.* **62**, 104 (1990).
- 3) Jiang, H., Yamamoto, S. and Kato, R. : Induction of anagen in telogen mouse skin by topical application of FK506, a potent immunosuppressant. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 523 (1995).
- 4) Burton, J. L. and Marshall, A. : Hypertrichosis due to minoxidil. *Br. J. Dermatol.* **101**, 593 (1979).
- 5) Meisheri, K. D., Cipkus, L. A. and Taylor, C. J. : Mechanism of action of minoxidil sulfate-induced vasodilation: a role for increased K<sup>+</sup> permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 751 (1988).
- 6) Buhl, A. E., Waldon, D. J., Baker, C. A. and Johnson, G. A. : Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 553 (1990).
- 7) Kaufman, K. D. : Clinical studies on the effects of oral

- finasteride, a type II 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, on scalp hair in men with male pattern baldness. In : *Hair Research for the Next Millenium* (D. Neste and V. A. Randall. eds.), Elsevier Science, Amsterdam, p.363 (1996).
- 8) Uno, H. : Quantitative models for the study of hair growth *in vivo*. *Ann. NY Acad. Sci.* **642**, 107 (1991).
  - 9) Limat, A., Breitkreutz, D., Stark, H. J., Hunziker, T., Thikoetter, G., Noser, F and Fusenig, N. : Experimental modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes from epidermis and hair follicle outer root sheath and matrix cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **642**, 125 (1991).
  - 10) Buhl, A. E., Waldon, D. J., Kawabe, T. T. and Holland, J. M. : Minoxidil stimulates mouse vibrissae follicles in organ culture. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 315 (1989).
  - 11) Jahoda, C. and Oliver, R. F. : The growth of vibrissae dermal papilla cells *in vitro*. *Br. J. Dermatol.* **105**, 623 (1981).
  - 12) Messenger, A. G., Jennifer, H. and Bleehen, S. S. : The *in vitro* properties of dermal papilla cell lines established from human hair follicles. *Br. J. Dermatol.* **114**, 425 (1986).
  - 13) Yang, J. S., Lavker, R. M. and Sun, T. T. : Upper hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior *in vitro* proliferative potential. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 652 (1993).
  - 14) Philpott, M. P., Green, M. R. and Kealey, T. : Human hair growth *in vitro*. *J. Cell Sci.* **97**, 463 (1991).
  - 15) Yamamoto, S., Jiang, H. and Kato, R. : Stimulation of hair growth by topical application of FK506, a potent immunosuppressive agent. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 160 (1994).
  - 16) Paus, R., Stenn, K. S. and Link, R. E. : The induction of anagen hair growth in telogen mouse skin by cyclosporin A administration. *Lab. Invest.* **60**, 365 (1989).
  - 17) Kawabe, T. K., Kubicek, M. F., Johnson, G. A. and Buhl, A. E. : Use of  $\beta$ -glutamyltransferase activity as a marker of hair cycle and androgen induction in mouse hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 122 (1994).
  - 18) Paus, R., Stenn, K. S. and Link, R. E. : Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br. J. Dermatol.* **122**, 777 (1990).
  - 19) Messenger, A. G.: The control of hair growth and pigmentation. In : *Disorders of Hair Growth* (Elise A Olsen., et al. eds.), McGraw-Hill, New York, p. 39 (1994).
  - 20) Uno, H., Allegra, F., Adachi, K. and Montagna, W. : Studies of common baldness of the stump-tailed macaque. I. Distribution of the hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **49**, 288 (1967).
  - 21) Uno, H., Adachi, K., Allegra, F. and Montagna, W. : Studies of common baldness of the stump-tailed macaque. II. Enzyme activities of carbohydrate metabolism in the hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **51**, 11 (1968).
  - 22) Allegra, F., Giacometti, L., Uno, H. and Adachi, K. : Studies of common baldness in the stump-tailed macaque. III. DNA synthesis in regrowing hair. *Acta Derm-Venereol.* **50**, 169 (1970).
  - 23) Takashima, I., Adachi, K. and Montagna, W. : Studies of common baldness in the stump-tailed macaque. IV. *In vitro* metabolism of testosterone in the hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **55**, 329 (1970).
  - 24) Takashima, I. and Montagna, W. : Studies of common baldness of the stump-tailed macaque (*Macacaspeciosa*). VI. The effect of testosterone on common baldness. *Arch. Dermatol.* **103**, 527 (1971).
  - 25) Takashima, I. : Studies of common baldness in the stump-tailed macaque. V. Regional difference of testosterone metabolites in the hair follicles. *J. Dermatol.* **1**, 14 (1974).
  - 26) Tobin, D. J., Hagen, E., Botchkarev, V. A. and Paus, R. : Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.* **111**, 941 (1998).
  - 27) Kamiya, T., Shirai, A., Kawashima, S., Sato, S. and Tamaoki, T. : Hair follicle elongation in organ culture of skin from newborn and adult mice. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 54 (1998).
  - 28) Tang, L., Bernardo, O., Bolduc, C., Lui, H. and Shapiro, J. : The expression of insulin-like growth factor 1 in follicular dermal papillae correlates with therapeutic efficacy of finasteride in androgenetic alopecia. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 229 (2003).
  - 29) Inui, S., Fukuzato, Y., Nakajima, T., Yoshikawa, K. and Itami, S. : Androgen-inducible TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. *FASEB J.* **16**, 1967 (2002).
  - 30) Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roever, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., Dotto, G. P. and Paus, R. : Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 *in vivo*. *FASEB J.* **14**, 752 (2000).
  - 31) Soma, T., Tsuji, Y. and Hibino, T. : Involvement of transforming growth factor- $\beta$ 2 in catagen induction during the human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 993 (2002).
  - 32) Buhl, A. E., Waldon, D. J., Baker, C. A. and Johnson, G. A. : Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 553 (1990).