

The Immunohistochemical Changes of Skin during Hair Follicle Cycle after Depilation in Mice

Dae-Keun Kim and Chang-Hyun Lee[†]

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

We have examined the histological changes of skin during hair follicle growth after depilation in C57BL/6N mice. We first studied on histological changes of number of mast cells and thickness of skin during hair follicle growth periods (telogen, 1 day, 3 day, 5 day, 10 day, 14 day, 17 day and 21 day after depilation) by toluidine blue, Giemsa and H&E staining methods. We second studied immunoreactive density of cytokines and Brdu labeled cells in skin during hair follicle growth periods after depilation in C57BL/6N mice by immunohistochemical methods. The histological changes on skin thickness was increased from telogen to 14 day. The number of mast cells was decreased in 3, 5 and 10 day and increased in 14, 17 and 20 day after depilation. Immunoreactive density of cytokines [protein kinase C- α (PKC- α), c-kit, and vascular endothelial growth factor (VEGF)] in 1, 3, 5, 10, and 14 day after depilation was mildly stained in bulge and cutaneous trunci m., but immunoreactive density of cytokines in 17 and 21 day was heavily stained in epidermis, bulge, outer root sheath (ORS), inner root sheath (IRS) and cutaneous trunci m.. Immunoreactive density of Brdu labeled cells in skin in 1 and 3 day was heavily stained in bulge, epidermis and connective tissue under the cutaneous trunci m.. In all periods, immunoreactive density of Brdu labeled cells in skin was heavily stained in bulge, subcutaneous tissue, cutaneous trunci m, ORS and IRS. These experiments suggest that histological changes related to hair follicle growth elevated mast cell counts, skin thickness and epidermis thickness and heavily stained immunoreactive density of cytokines and Brdu labeled cutaneous trunci m. and connective tissue under the cutaneous trunci m. after depilation in C57BL/6N mice.

Key Words: Hair growth, Mast cell, Brdu, PKC- α , c-kit, VEGF

서 론

모낭 (hair follicle)은 모낭각질세포의 빠른 증식과 모낭이 두꺼워지거나 길어져 휴지기 (telogen)에서 성장기 (anagen)로 변하게 하며, 또한 모낭의 퇴행에 앞서 퇴행기 (catagen)로의 주기적인 변화를 한다 (Chase, 1954; Hardy, 1992). 이러한 주기적인 변화는 상피세포와 진피의 빠른 재구성과의 관계가 있으며, 상피세포와 간엽세포간의 상호작용을 연구하는데 중요한 모델로서 쥐를 사용하여 모낭의 주기를 밝힐 수 있다 (Paus and Costarelis, 1992). 모낭은 퇴행을 하고 새로운 모낭주기 중에 다시 성장을

한다. 이러한 성장주기는 줄기세포에 의하여 조절되고 있으며, 모낭의 줄기세포는 휴지기 모낭의 저부에 있는 세포집단인 secondary hair germ (이차 모원배)에 있다고 생각해왔다 (Chase et al., 1951). 이러한 이차 모원배 세포는 모낭주기 중 성장기에는 아래로 이동하고 퇴행기에는 위에 있는 진피유두로 이동하는데 모낭의 줄기세포와 모낭주위의 bulge에 있는 줄기세포가 동일하다는 것이 의문이었다 (Cotarelis et al., 1990). 여러 학자들에 의하면 bulge cell은 기능이 다양하고 이들의 조상은 새로운 성장기 모낭을 발생시킨다고 하였으나 (Taylor et al., 2000; Morris et al., 2004), bulge cell과 secondary hair germ cell과의 관계는 아직 명확하게 설명되지 않고 있다.

털의 성장과 관련된 인자에 대하여 Paus 등 (1994)은 capsaicin과 substance P가 휴지기 생쥐에서 털의 성장에 중요한 역할을 하는데 이는 비만세포의 탈과립과 관련이 있다고 하였다. Maurer 등 (1997)도 모낭이 성장기에서 퇴행기로의 변화는 탈과립된 비만세포 증가에 의하여 진

*접수일: 2010년 9월 3일 / 수정일: 2010년 11월 12일
채택일: 2010년 11월 30일

[†]교신저자: 이창현, (우) 565-701 전북 원주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학 해부학교실
Tel: 063-290-1559, Fax: 063-290-1557
e-mail: chlee@woosuk.ac.kr

피에 있는 비만세포의 수적 감소와 관련이 있으며, 또한 비만세포 분비촉진제인 substance P와 adrenocorticotrophic hormone이 성장기 모낭에서 퇴행기로의 빠른 변화를 촉진한다고 하였다.

털의 성장과 관련된 cytokine으로는 vascular endothelial growth factor (VEGF), protein kinase C- α 그리고 c-kit 등이 있는데 VEGF는 모낭의 성장주기 중에 일어나는 혈관신생과 관련이 있으며 초기와 중기의 성장기 동안 외모근초의 모낭각질세포를 선택적으로 증식시킨다고 하였다 (Yano et al, 2001). Protein kinase C- α 는 생쥐의 털 성장에 중요한 역할을 하며, PKC 활성화인자, 털을 뽑거나 알리지 피부염과 같은 피부자극 시 털의 성장을 촉진하며 털의 성장기 중기와 말기에 피부 내 농도가 증가하며 퇴행기로 이행하면서 감소한다고 하였다 (Li et al., 2003). Stem cell factor (SCF)는 Kit-tyrosine kinase receptor (Kit)를 가진 피부의 비만세포와 melanocyte의 성숙과 증식을 조절하는 물질로서 상피에서 유래하거나 또는 간엽에서 유래한 SCF에 반응을 한다. 이러한 인자들은 성장기 모낭에서 강한 면역반응을 나타내며, 주로 색소침착부위나 진피유두에 강한 양성반응을 나타낸다 하였고 털의 성장주기에 의존적으로 강하게 반응을 한다고 하였다 (Peters et al., 2003).

이러한 발모와 관련된 여러 가지 인자들은 매우 복잡 다양하기 때문에 정확한 기전을 밝히기가 어려우므로 탈모치료제를 개발하는데도 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 C57BL/6N 생쥐의 제모 후 모낭이 성장함에 따라 피부에서 일어나는 모낭의 형태학적 변화를 광학 및 면역조직학적 염색법에 의한 관찰을 통하여 털의 성장주기별로 일어나는 발모와 관련이 있는 줄기세포의 변화와 여러 가지 인자들을 관찰하여 발모와 관련된 인자의 정확한 기전을 밝히고 더 나아가 탈모치료제 개발에 도움을 주고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 25 g 내외의 수컷 7주령 C57BL/6N 정상생쥐 50마리를 5마리씩 배정하여 8군으로 하였다. 실험의 정확성을 위하여 모두 출생날짜가 유사한 것을 이용하였다.

실험방법

제모. 실험동물들은 bee wax와 gelatin을 이용하여 휴지기의 털을 뽑은 후 (이하 제모로 표현) 털의 성장기 단계별로 1일, 3일, 5일, 10일, 14일, 17일 및 21일군으로 나누어 실험에 이용하였으며, 대조군으로 휴지기에 있는 생쥐를 이용하였다. 일부 생쥐에는 Ito 등 (2004)의 방법과 유사하게 복강 내 bromodeoxyuridine (BrdU, 50 μ g/g body weight)을 제모 후 1일째부터 2일간 하루에 2번씩 복강에 주사하여 느린 세포주기를 가진 세포들의 표지부위를 면역조직화학적 염색법으로 관찰하였으며 telogen은 희생 전에 2일간 1일 2회 동량을 복강주사한 후에 희생하였다.

피부의 광학현미경적 관찰. 제모한 날을 실험 1일째로 정하여 피부에서 일어나는 발모와 관련된 광학현미경적 특징들은 피부 내 모낭의 수와 비만세포의 수적 변화를 조직학적으로 관찰하기 위하여 날짜별로 3마리씩 희생시켜 등 쪽 피부를 척추 선에 평행하게 절개하여 일부 조직을 절제하여 중성포르말린 (normal buffered formalin) 용액으로 고정하였다. 고정 후 일반적인 방법에 의하여 수세, 탈수과정을 거쳐 paraffin으로 포매한 후 7 μ m의 절편을 제작하여 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 시행하여 1,000 μ m당 발생중인 hair follicle의 수, 피부두께 및 조직학적 변화를 관찰하였고, 비만세포 수의 변화를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 시행하였다.

Cytokine의 면역조직화학적 염색. 피부조직 내 털의 성장과 관련된 여러 가지 cytokine을 관찰하기 위하여 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotech., U.S.A.)인 vascular endothelial growth factor (VEGF), protein kinase C- α (PKC- α), 그리고 stem (mast) cell factor (SCF)를 각각 1:100, 1:50, 1:50으로 희석한 1차 항체를 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 12시간 동안 반응시켰다. 이때 1차 항체의 희석은 0.1 M phosphate buffer (PB)에 1% normal goat serum (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.)과 0.3% Triton X-100 (Sigma, U.S.A.)을 혼합하여 사용하였다. 조직절편들을 실온에서 15분간 2회 0.1 M PB로 세척하여 Hsu 등 (1981)의 방법에 따라 2차 항체인 1:200으로 희석된 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 15분간 0.1 M PB로 2회의 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가

실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PB로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine을 150 ml의 0.1 M PB에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 농도로 첨가하여 갈색이 나타날 때 까지 약 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직들은 다시 0.1 M PB로 여러 차례 수세하고 hematoxylin으로 20초간 대조염색한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

느린 주기의 피부세포 표지. 피부조직 내 느린 세포주기를 가진 세포들의 표지를 위해 면역조직화학염색을 시행하였다. 조직을 0.05% proteinase K로 20분간 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하였다. Brdu에 대한 1차 항체인 mouse anti-Brdu antibody (Santa Cruz Biotech., U.S.A.)를 1: 50으로 희석하여 조직절편에 떨어뜨려 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 2차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.)를 1:200으로 희석하여 조직과 실온에서 1시간 반응시킨 후 cytokine 면역염색과 동일하게 peroxidase가 표지된 ABC 용액에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 3-3' diaminobenzidine으로 발색시켜 hematoxylin으로 대조염색한 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

제모 후 모낭주기에 따른 피부의 광학현미경 소견

휴지기 (Telogen) 피부의 광학현미경 소견. Toluidin blue (TB)에 염색된 비만세포의 수는 11.1 ± 2.7 개였으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 $427 \pm 27.1 \mu\text{m}$ 이었다. 표피의 두께는 $0.25 \mu\text{m}$ 로 감소하였으며, 표피의 일부, 휴지기 모낭 아래, 피지샘 저부 및 휴지기 모간을 이루는 sheath에서는 TB에 염색이 되었으나, 혈관 내 혈구에서는 염색이 되지 않았다. 휴지기 조직 내 혈관에서는 TB에 염색이 되지 않았다 (Table 1, Fig. 1의 A).

제모 후 1일째 피부의 광학현미경 소견. Toluidin에 염색된 비만세포의 수는 9.16 ± 2.2 개였으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 $970 \pm 16.7 \mu\text{m}$ 이었다. 증식된 표피의 두께는 $0.7 \mu\text{m}$ 이었고, 제모한 모낭아래의 피지샘 주위의 줄기세포 (stem cell)가 분열하여 분열세포가 모유두를 향하여

이동하고 있었고, 혈관이 잘 발달하였으며 혈관 내에서 분열세포로 사료되는 혈구가 TB에 염색된 소견이 관찰되었다. 표피의 기저층에서 강하게 염색된 증식세포가 TB에 염색이 되었으며, 피지샘 주위와 뿔한 모낭의 저부에서 TB에 강하게 염색된 세포가 관찰되었다. 피하층의 지방세포 주위의 결합조직에서 TB에 염색된 세포가 관찰되었다 (Table 1, Fig. 1의 C와 D).

제모 후 3일째 피부의 광학현미경 소견. Toluidin에 염색된 비만세포의 수는 5.6 ± 1.4 개였으며 표피에서 피하층까지의 두께는 $1,175 \pm 21.4 \mu\text{m}$ 로 두꺼워 졌다. 혈관이 잘 발달하였으며, 혈관 내 TB에 염색된 혈구가 많이 관찰되었고, 표피가 $3 \mu\text{m}$ 로 증식하였고 팽창 (bulge)을 형성하여 진피 유두와 결합하였다. 피하층의 결합조직 내 세포들이 1일째보다 TB에 더 진하게 염색되었으며, 동피근 (cutaneous trunci m.) 주위 결합조직 내의 줄기세포도 TB에 진하게 염색되었다. 진피유두와 팽창부위의 줄기가 진하게 염색되었고, 초기 모낭이 발생하기 시작하였으며 일부 세포에서 melanin과립이 약간 관찰되었다 (Table 1, Fig. 1의 E).

제모 후 5일째 피부의 광학현미경 소견. 비만세포의 수는 5.0 ± 0.6 개였으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 $1,390 \pm 17.3 \mu\text{m}$ 로 두꺼워졌다. 혈관 내 TB에 염색된 혈구는 소수가 관찰되었다. 모구 (hair bulb)를 형성하였고 모구 내에 melanin 색소 침착과 털의 기질이 발생하였다. 내 외 모근초가 발생하였고 표피의 두께는 $1 \mu\text{m}$ 이었다. 표피가 증식하고 모구가 피하층까지 내려와 진피유두와 결합하여 큰 모구를 형성하였다. 표피, 팽창부위의 줄기, 피지샘 저부에서 TB에 대한 염색성이 약해졌으나 모간주위의 외모근초와 내모근초가 TB에 진하게 염색되었다. 피하결합조직의 지방세포 주위에 TB에 대한 염색성이 중등도로 염색되었으며 3일째보다 염색성이 감소하였으나 털은 피부 밖으로 나오지는 않았다 (Table 1, Fig. 1의 H).

제모 후 10일째 피부의 광학현미경 소견. 비만세포의 수는 5.1 ± 1.0 개였으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 $1,480 \pm 21.6 \mu\text{m}$ 이었다. TB에 염색된 혈구는 혈관 내에서 관찰되지 않았으나 혈관주위에서는 관찰되었다. 표피의 두께는 $1 \mu\text{m}$ 이었으며 표피와 팽창부위의 줄기는 TB에 대한 염색성이 약해졌다. 외모근초와 내모근초는 TB에 진하게 염색되었으며, 모구 역시 TB에 진하게 염색되었다. 모구는 점점 커져 피하층에 많이 존재하였다. 모간의 근위부

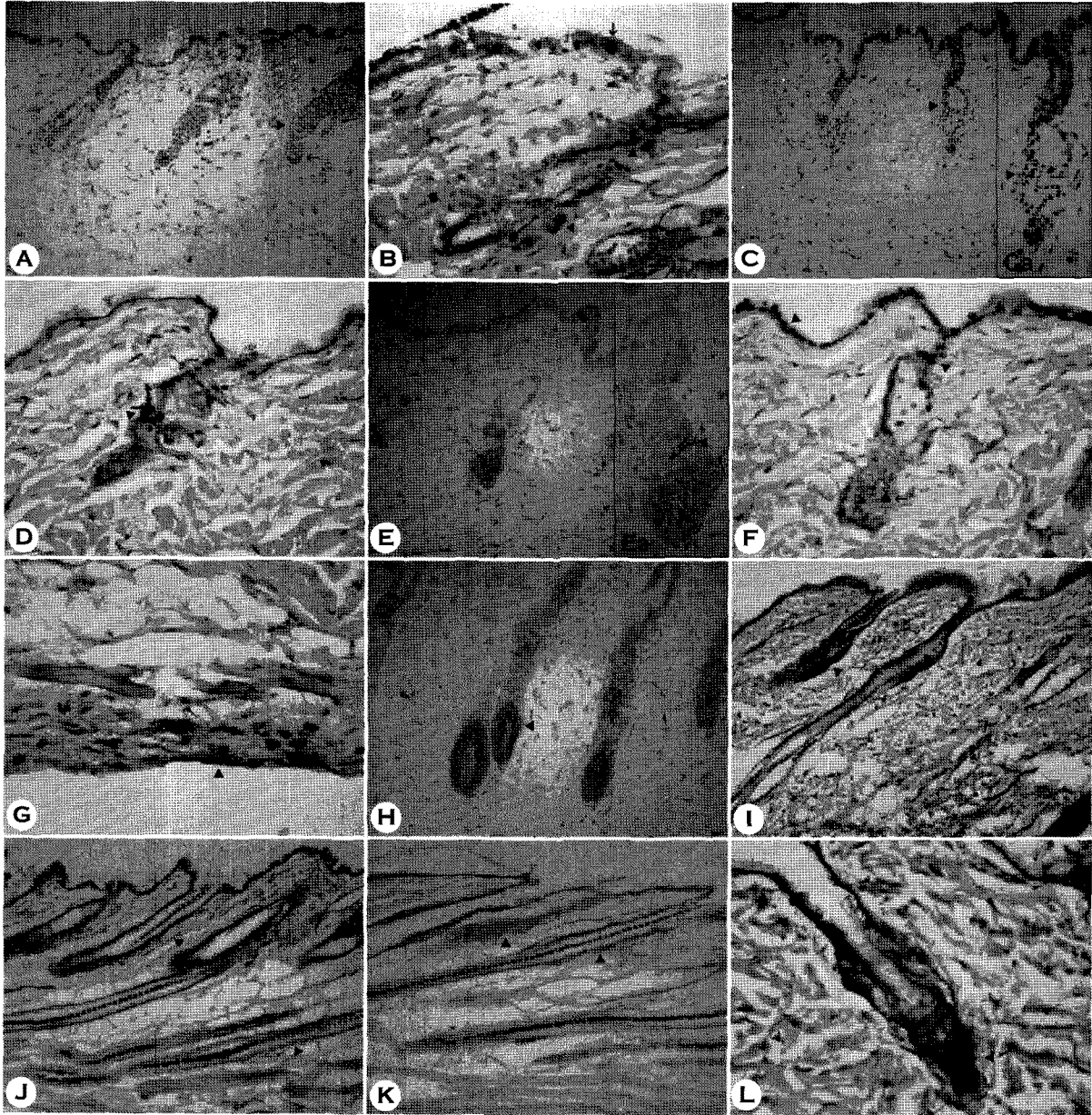


Fig. 1. Photomicrographs on the developmental stages of hair growing cycle in C57BL/6N mice.

- A. Giemsa stained JB4 sections of skin in telogen stage of hair growing cycle in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 B. BrdU immunoreactive cells are heavily stained in bulge and epidermis in telogen stage of hair growing cycle in C57BL/6N mice. $\times 200$.
 C. Giemsa stained JB4 sections of skin in 1 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 D. BrdU immunoreactive cells are heavily stained in bulge and epidermis in 1 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 200$.
 E. Giemsa stained JB4 sections of skin in 3 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 F. Numerous BrdU immunoreactive cells are heavily stained in bulge and epidermis in 3 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 200$.
 G. Numerous BrdU immunoreactive cells are heavily stained in under the cutaneous trunci m, in 3 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 200$.
 H. Giemsa stained JB4 sections of skin in 7 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 I. BrdU immunoreactive cells are heavily stained in bulge in 14 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 J. PKC- α immunoreactive cells are heavily stained in epidermis, bulge and outer root sheath in 17 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 K. c-kit immunoreactive cells are heavily stained in epidermis, bulge and outer root sheath in 17 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 100$.
 L. BrdU immunoreactive cells are heavily stained in bulge in 21 day of hair growing cycle after depilation in C57BL/6N mice. $\times 200$.

Table 1. Histological changes of skin during hair follicle growth after depilation in C57BL/6N mice

Groups	Number of mast cells (Number)*	Skin thickness (μm)	Epidermis thickness (μm)
Telogen	11.1±2.7	427±27.1	0.25
1 Day	9.16±2.2	970±16.7	0.7
3 Day	5.6±1.4	1175±21.4	1
5 Day	5.0±0.6	1390±17.3	3
10 Day	5.1±1.0	1480±21.6	1
14 Day	12.0±1.9	1606±15.4	0.65
17 Day	19.0±3.0	1350±19.2	0.5
21 Day	30.1±2.1	1296±23.5	0.4

Data are expressed as the mean ± SD (standard deviation).
*Number/100 μm width, ×100.

는 TB에 진하게 염색되었고 원위부는 TB에 약하게 염색되었으며, 털이 피부를 뚫고 나오기 시작하였다 (Table 1).

제모 후 14일째 피부의 광학현미경 소견. 비만세포의 수는 12.0±1.9개 이었으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 1,606±15.4 μm이었다. 표피의 두께는 0.5~0.75 μm로 감소하였고, TB에 염색된 혈구는 혈관 내에서는 관찰되지 않았으나 혈관주위에서는 약간 관찰되었다. 모구주위의 외모근초와 내모근초 사이는 진하게 염색되었으며, 표피와 팽창부위의 줄기는 약하게 염색되었고, 모구가 작아지기 시작하였다 (Table 1).

제모 후 17일째 피부의 광학현미경 소견. 비만세포의 수는 19.0±3.0개 이었으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 1,250±19.2 μm이었다. 모구가 작아지면서 퇴행기가 시작되었다. 모구와 모간주위의 근위부 1/2지점에서 외모근초와 내모근초 사이는 진하게 염색되었다. 표피와 팽창부위의 줄기는 TB에 염색되지 않았으며 혈관 내 혈구와 혈관주위에서도 TB에 염색된 혈구가 관찰되지 않았다 (Table 1).

제모 후 21일째 피부의 광학현미경 소견. 비만세포의 수는 30.1±2.1개였으며, 표피에서 피하층까지의 두께는 1,426±23.5 μm이었다. 표피와 팽창부위의 줄기는 TB에 염색되지 않았으며 모구가 점점 작아지면서 퇴행기가 지속되었다. 모구와 모간주위의 근위부 1/2지점에서 외모근초와 내모근초 사이는 진하게 염색되었고, 혈관 내 및 혈관주위에서는 TB에 염색된 혈구가 관찰되지 않았다 (Table 1).

털의 성장과 관련된 cytokine의 면역조직화학염색 소견

Protein kinase-α (PKC-α)에 대한 면역염색 반응. 휴지기 피부의 PKC-α에 대한 면역염색 반응은 피지샘과 발생중인 모낭주위에서 미약하게 관찰되었고, 팽창부위와 진피층 주위의 결합조직 내 일부 세포에서 미약한 면역반응을 나타내었다. 제모 후 1일째와 3일째의 소견은 피지샘과 발생 중인 모낭에서는 미약한 반응을 나타내었으나 표피의 기저부, 팽창부위 및 진피층의 결합조직층 및 동피근층에서 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 5일째의 소견은 피지샘 저부의 팽창부위와 진피층의 결합조직층 및 피하층 아래의 동피근층에서 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 10일째의 소견은 피지샘은 미약하게 염색되었고, 팽창부위와 동피근 및 내외모근초는 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 14일째의 소견은 표피와 피지샘, 팽창부위에서는 미약하였으나 내외모근초, 동피근 및 모구에 있는 세포는 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 17일째 (Fig. 1의 J)와 21일째의 소견은 표피, 팽창부위, 내외모근초 및 동피근은 매우 강한 면역반응을 나타내었다.

c-kit에 대한 면역반응. 휴지기, 제모 후 1일 및 3일째의 소견은 팽창부위와 진피의 결합조직층 및 동피근은 중등도의 면역반응을 나타내었고, 제모 후 5일째와 10일째의 소견은 팽창부위와 표피에서 미약한 반응을 나타내었으나 동피근은 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 14일째의 소견은 내, 외모근초 및 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었으며, 제모 후 17일째 (Fig. 1의 K)와 21일째의 소견은 표피, 팽창부위, 내외모근초 및 동피근층에서 강한 면역반응을 나타내었다.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)에 대한 면역반응. 휴지기, 제모 후 1일, 3일, 5일 및 10일째의 소견은 표피, 팽창부위 및 진피층의 결합조직 및 동피근의 아래 결합조직층에서 미약한 면역반응이 관찰되었고, 제모 후 14일째의 소견은 팽창부위와 내·외모근초 및 동피근 아래의 결합조직층에서 중등도의 면역반응이 나타났다. 제모 후 17일째와 21일째의 소견은 표피, 팽창부위 및 내외모근초 및 동피근에서 강한 면역반응이 나타났다.

BrdU 면역조직화학염색에 대한 느린 주기 피부세포의 반응
휴지기 (telogen) 피부의 소견. 피부의 bulge층 (피지샘 주

Table 2. Immunohistochemical density of PKC- α , c-kit and VEGF in skin during hair follicle growth after depilation in C57BL/6N mice

Groups	PKC- α	c-kit	VEGF
Telogen	Bulge: +	Bulge, cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++
1 Day	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++	Bulge, cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++
3 Day	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++	Bulge, cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++
5 Day	Bulge, cutaneous trunci m.: ++.	Epidermis, bulge: + cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++
10 Day	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge: + cutaneous trunci m.: ++	Epidermis, bulge, cutaneous trunci m.: ++
14 Day	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: ++	Bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: ++	Bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: ++
17 Day	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++
21 Day	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++	Epidermis, bulge, ORS, IRS, cutaneous trunci m.: +++

+, weak density, ++, mild density, +++, heavy density; ORS, outer root sheath; IRS, inner root sheath.

위)과 표피층에서 중등도로 염색되는 줄기세포가 관찰되었으며, 특히 동피근층이 강한 염색반응을 보였다 (Table 2, Fig. 1의 B).

제모 후 1일째의 소견. 피부의 bulge층에서 분화하고 있는 줄기세포가 강하게 염색되었으며 표피층에서도 분화세포가 Brdu에 강하게 염색되었다. 그리고 동피근에서는 Brdu에 강하게 염색되었으나 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 중등도로 염색되는 세포가 많이 관찰되기 시작하였다 (Table 2, Fig. 1의 D).

제모 후 3일째의 소견. 피부의 bulge층과 표피층에서 분화하고 있는 줄기세포에서 Brdu에 강하게 염색된 세포가 많이 관찰되었다. 성장 중인 모구 (secondary hair germ)에서도 Brdu에 강하게 염색되었다. 또한 동피근에서는 약하게 염색되었으나 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 매우 강하게 염색된 세포가 많이 관찰되었다 (Table 2, Fig. 1의 F와 G).

제모 뽑은 후 5일째의 소견. 피부의 표피층, bulge층 및 일부 성장 중인 모구 (secondary hair germ)에서 Brdu에 강하게 염색된 세포가 관찰되었다. 동피근과 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 약하게 염색된 세포가 소수 관찰되었다 (Table 2).

제모 후 10일째의 소견. 피부의 bulge층, 피하층 및 동피근층에서 Brdu에 강한 면역반응을 나타내었고, 모낭의

진피유두와 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 약하게 염색된 세포가 소수 관찰되었다 (Table 2).

제모 후 14일째의 소견. 피부의 bulge층, 피하층 및 동피근층에서 Brdu에 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장 중인 모낭의 내외모근초에서 중등도의 면역반응을 나타내었다. 모낭의 진피유두와 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 약하게 염색된 세포가 소수 관찰되었다 (Table 2, Fig. 1의 I).

제모 후 17일째의 소견. 피부의 bulge층, 피하층 및 동피근층에서 Brdu에 강한 면역반응을 나타내었고, 또한 성장 중인 모낭의 내외모근초에서 강한 면역반응을 나타내었다. 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 약하게 염색된 세포가 소수 관찰되었다 (Table 2).

제모 후 21일째의 소견. 피부의 bulge층과 동피근층에서 Brdu에 강한 면역반응을 나타내었고, 성장 중인 모구에서는 Brdu에 중등도의 면역반응을 나타내었다. 동피근 아래의 결합조직층에서는 Brdu에 약하게 염색된 세포가 소수 관찰되었다 (Table 2, Fig. 1의 L).

고 찰

모발은 물리적 충격으로부터 머리를 보호하고, 직사광선, 추위, 위험 등의 외부자극으로부터 두피를 보호하고 미용학적으로도 중요한 기능을 하고 있다. 모발은 피부

의 발생과 함께 생기며 모낭 (hair follicle)은 표피에 있는 중자층의 증식으로 시작되어 아래에 있는 진피로 확대되어 모낭이나 모아 (hair bud)의 심층이 클립모양의 모구 (hair bulb)를 형성하며 모구상피세포가 종자기질을 이룬 후 털로 자라게 된다.

모구는 작은 중간엽 털유두 (mesenchymal hair papilla)에 의해 곧 함입되어 모구의 주위세포는 뿌리상피집 (epithelial root sheath)을 형성하며, 그 주위를 싸고 있는 중간엽 세포는 뿌리진피집 (dermal root sheath)으로 분화된다. 모유두는 모발의 성장에 중요한 역할을 하며 3~5년의 성장기 (anagen), 1~2개월의 퇴화기 (catagen), 3~5개월의 휴지기 (telogen) 및 발생기 (new anagen stage)의 4주기를 모발성장주기라 한다.

생쥐에서 성장주기에 따른 피부의 두께는 휴지기의 생쥐의 가슴 외측의 피부의 두께는 표피의 경우 10 μm , 진피의 경우 250 μm , 피하지방의 경우 150 μm , 그리고 모낭의 깊이는 150 μm 인데 제모 후 3일째, 즉 성장기 초기에는 표피의 두께는 2배로 증가하여 7일째까지 유지하다가 18일째에는 휴지기 상태로 돌아온다. 또한 진피와 피하층은 10일째까지 각각 390 μm 와 260 μm 로 증가하여 15일째에는 휴지기 상태로 돌아온다 (Hansen et al., 1984).

본 실험에서는 휴지기 피부의 표피에서 피하층까지의 두께는 제모 후 1, 3, 5, 10일째에 대조군보다 점점 증가하다가 14일째에 가장 두꺼워졌으나 그 후 17일부터는 피부두께가 감소하여 Hansen 등 (1984)의 보고와 유사하였다.

Maurer 등 (1997)은 조직의 재구성에 비만세포가 관여하는데, 자발적으로 퇴행기를 유도하면 진피의 비만세포에는 탈과립된 비만세포의 증가에 앞서 수적으로 감소하며, 비만세포 분비촉진물질인 substance P와 ACTH는 성장기 모낭을 빠르게 퇴행시키며 비만세포 탈과립 억제제는 정상적인 퇴행기로의 성장을 억제하며, 비만세포는 특이적으로 기관의 퇴행 시 발생에 따른 조절체계에서 "조직재구성 시 중심적인 스위치 역할"을 한다고 보고하였다.

본 실험에서 toluidin blue 염색을 이용한 비만세포의 수적 변화의 관찰 결과는 휴지기에 비해 제모 후 1, 3, 5, 10일째에 감소하다가 17일째 퇴행기가 시작되면서 증가하기 시작하여 21일째에는 급격한 증가를 보였다. 이와 같은 실험결과는 Maurer 등 (1997)의 보고와 일치하였다.

Ito 등 (2004)은 성장기가 시작되면서 bulge의 가장 아래쪽 세포들이 털주위에서 붕괴되어 퇴행기 말에

secondary hair germ이 생성된다고 하였다. 이는 성장기 시작 6일째에 bulge cell이 자체 증식되어 퇴행기 말에 미래의 secondary hair germ cell이 되나, 이러한 세포들은 생화학적 marker인 S100A6의 발현이 되지 않는다고 하였다. 그러나 제모 시 bulge cell에 손상을 주면 secondary hair germ cell에 있는 조상세포가 bulge를 형성하여 bulge cell marker가 다시 발현되는데, 이는 stem cell niche (줄기세포영역)로부터 나온 신호분자의 방출과 관련된 손상에 의하여 keratinocyte (각질세포)가 다시 줄기세포로 분화한다고 한다. 또한 휴지기의 bulge cell은 퇴행기에 모낭의 재구성 중에 세포자멸사 (apoptosis) 과정을 거치므로 bulge cell은 영원히 존재하지 않는다고 하였다.

정상적인 세포의 성장과 분화에 필수적인 요소는 여러 가지 cytokine에 의하여 일어나며 털의 성장에 중요한 역할을 하는 cytokine들에는 VEGF, PKC- α , SCF (stem cell factor) 등이 있다. 모낭과 모구의 진피유두에는 follicular stem cell (모낭줄기세포)들이 존재하므로 많은 혈관과 신경들이 분포하고 최적의 성장환경을 만들어 주기 위하여 다양한 cytokine을 분비한다. 털을 지배하는 혈관들은 털의 성장주기에 따라 변화하는데 성장기에서 최대로 분포하며, 퇴행기에는 대부분의 모세혈관이 붕괴되거나 사라진다.

털의 성장주기별 혈관분포의 변화는 혈관재생에 관여하는 VEGF에 의하여 내피세포의 활성을 유도하거나 증식 및 이주에 관여하며 혈관재생에 필요한 matrix proteolysis와 관련된 protease 생산을 자극하여 혈관투과성을 향상시키는데 (Detmar, 1996) 사람에서는 모낭의 외모근초의 각질세포에서 관찰된다고 하였다 (Goldman et al., 1995).

본 실험에서 혈관내피세포성장인자 (VEGF)에 대한 면역반응은 휴지기, 제모 후 1일, 3일, 5일 및 10일째의 소견은 표피, 팽창부위 및 진피층의 결합조직 및 동피근의 아래 결합조직층에서 미약한 면역반응을 나타내었으나, 뽑은 후 14일째에는 팽창부위와 내외모근초 및 동피근 아래의 결합조직층에서 중등도의 면역반응을 나타내었고, 17일째와 21일째에는 표피, 팽창부위 및 내·외모근초 및 동피근에서 강한 면역반응을 나타내었다.

Kozłowska 등 (1998)은 VEGF protein에 양성반응을 보인 사람의 모낭은 모낭의 각질세포, 간엽에서 유래한 진피유두 (mesenchymal dermal papilla), 모구의 각질세포 및 외모근초와 내모근초의 각질세포에서 강한 면역반응을 나타낸다고 하였다. Blume-Peytavi (1996)는 진피유두의

VEGF는 성장인자와 cytokine과 같은 여러 가지 신호분자를 합성하여 각질세포의 증식과 이주를 자극하여 털의 성장을 조절하는 기전에 관여한다고 하였으며, 이러한 성장인자, 즉 간엽세포에서 방출된 각질세포성장인자와 섬유아세포성장인자는 다른 모낭세포의 강한 유사분열 (mitogen) 촉진물질로서 작용한다고 하였다 (Du Cross, 1995). Kozłowska 등 (1998)은 진피유두에서 유래한 VEGF는 진피유두와 모세혈관총 사이에서 새로운 모세혈관의 형성과 내피세포를 통한 모세혈관의 유지에 관여하여 모낭의 성장을 조절하는 주요한 조절기전으로 작용한다고 하였다.

Protein kinase C- α 는 생쥐의 털 성장에 중요한 역할을 하며, PKC- α 활성화인자, 털을 뽑거나 알러지 피부염과 같은 피부자극 시 털의 성장을 촉진하며 털의 성장기 증가와 말기에 피부 내 농도가 증가하며 퇴행기로 이행하면서 감소한다고 하였다. 이러한 cytokine의 증가는 일부 피부 melanogenesis (멜라닌형성)의 조절을 통하여 모낭의 성장을 촉진시키며 털의 성장을 유지시킨다고 하였고, 주로 털의 외모근초의 각질세포에서 과발현 된다고 하였다 (Li et al., 2003).

본 실험에서 protein kinase C- α (PKC- α)에 대한 면역염색 반응은 휴지기 피부에서는 피지샘, 발생중인 모낭주위, 팽창부위, 진피층 주위의 결합조직 내 일부 세포에서 미약한 면역반응을 나타내었다. 제모 후 1일째와 3일째에 표피의 기저부, 팽창부위 및 진피층의 결합조직층 및 동피근층은 중등도의 면역반응을 나타내었다. 제모 후 5일째에는 피지샘 저부의 팽창부위와 진피층의 결합조직층 및 피하층 아래의 동피근층에서 중등도의 면역반응이 나타났다. 제모 후 10일째에는 팽창부위와 동피근 및 내·외모근초에서 중등도의 면역반응이 나타났다. 제모 후 14일째에 내·외모근초, 동피근 및 모구에 있는 세포는 중등도의 면역반응을 나타내었으나 17일째와 21일째에는 표피, 팽창부위, 내외모근초 및 동피근에서 매우 강한 면역반응이 나타남으로써 다른 연구자들의 보고와 유사하였다.

Li et al. (2003)은 휴지기와 제모 후 1일째의 모낭에서 PKC- α 에 대한 면역반응을 관찰할 수 없었으나 4일째에는 모낭의 유두에서 강한 면역반응을 나타낸다고 하였고 10일째와 17일째에는 외모근초와 모낭의 바깥쪽의 결합조직에서 양성반응을 나타낸다고 하였다. 또한 PKC- α 는 모낭주기의 성장기 증가와 성장기 말기에 과발현 되는데 이러한 현상은 모낭세포의 성장과 관계가 있으며 이러한

PKC- α 의 농도가 증가함으로써 혈당을 증가시키기 때문에 성장기 말기에 PKC- α 가 과발현되는 것은 모낭의 성장기 중에 글리코겐 동원을 하는 외모근초의 기능과도 관련 있을 것이라고 하였다.

Stem cell factor (SCF)는 kit-tyrosine kinase receptor (Kit)를 가진 피부의 비만세포와 멜라닌세포의 성숙과 증식을 조절하는 물질로서 상피 또는 간엽에서 유래한 SCF에 반응을 하며, 이러한 인자들은 생장기 모낭에서 강한 면역반응을 나타내며, 주로 색소침착부위나 진피유두에 강한 양성반응을 나타낸다 하였고 털의 성장주기에 의존적으로 강하게 반응을 한다고 하였다 (Peters et al., 2003).

본 실험의 c-kit에 대한 면역반응은 휴지기, 제모 후 1일 및 3일째에 팽창부위와 진피의 결합조직층 및 동피근에서 중등도의 면역반응이 나타났고, 5일째와 10일째의 소견은 팽창부위와 표피에서 미약한 반응이 관찰되었으나 동피근에서는 중등도의 면역반응을 나타내었다. 14일째에는 내외모근초 및 동피근에서 중등도의 면역반응을 나타내었으며, 17일째와 21일째에는 표피, 팽창부위, 내외모근초 및 동피근층에서 강한 면역반응을 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합해 볼 때 인위적인 제모 후 모낭의 성장과 관련된 조직학적 변화는 비만세포의 수적 증가, 피부와 표피의 두께 변화, 동피근 밑의 결합조직 및 PKC- α , c-kit, VEGF의 강한 면역반응과 관계가 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 연구는 2010학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원으로 실시하였습니다.

REFERENCES

- Blume-Peytavi U. Control of the human hair cycle: function of the dermal papilla and its significance. *Z Hautkr.* 1996. 71: 410-415.
- Chase HH. Growth of the hair. *Physiol Rev.* 1954. 34: 113-126.
- Chase HB, Rauch H, Smith VW. Critical stages of hair development and pigmentation in the mouse. *Physiol Zool.* 1951. 24: 1-8.
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 1990. 61: 1329-1337.

- Detmar M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *J Invest Dermatol.* 1996. 106: 207-208.
- Du Cross DL. Fibroblast growth factor and the hair cycle of the hairless mice. *J Invest Dermatol.* 1995. 104: 17s-18s.
- Goldman CK, Tsai J-C, Soroceanu L, Gillespie GY. Loss of vascular endothelial growth factor in human alopecia hair follicles. *J Invest Dermatol (Suppl).* 1995. 104: 18-20.
- Hansen LS, Cogle JE, Wells J, Charles MW. The influence of the hair cycle on the thickness of mouse skin. *Anat Rec.* 1992. 210: 569-573.
- Hardy MH. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 1992. 8: 55-60.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981. 29: 577-580.
- Ito M, Kizawa K, Hamada K, Cotsarelis G. Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation* 2004. 72: 548-557.
- Kozłowska U, Blume-Peytavi U, Kodelja V, Sommer C, Goerdt S, Majewski S, Jabłonska S, Orfanos CE. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in various compartments of human hair follicle. *Arch Dermatol Res.* 1998. 290: 661-668.
- Li LF, Guo J, Gao ZF. Overexpression of skin protein kinase C- α in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. *Clin Exp Dermatol.* 2003. 28: 429-433.
- Maurer M, Fischer E, Handjiski B, VON Stebut E, Algermissen B, Bavandi A, Paus R. Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab Invest.* 1997. 77: 319-332.
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004. 22: 411-417.
- Paus R, Cotsarelis G. The biology of the hair follicles. *N. Engl J Med* 1992. 341: 491-497.
- Paus R, Maurer M, Slominskik A, Czarnetzki MB. Mast cell involvement in murine hair growth. *Dev Biol.* 1994. 163: 230-240.
- Peters EM, Maurer M, Botchkarev VA, Jensen K, Welker P, Scott GA, Paus R. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003. 121: 976-984.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000. 102: 451-461.
- Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* 2001. 107: 409-417.