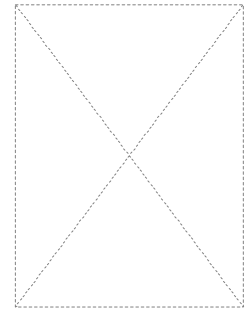


## 발모에서 IGF-1과 TGF-β1의 상관관계에 관한 연구

박대환<sup>1</sup>·오창현<sup>1</sup>·채미현<sup>2</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 조직공학센터<sup>2</sup>



In the present study, 5% Nanoxidil<sup>®</sup> was applied to C57BL/6 mice, and the expressions of IGF-1 and TGF-β1 were quantitatively measured through PCR analysis. There were three groups; normal saline (negative control group), 50% EtOH (vehicle control group) and 5% Nanoxidil<sup>®</sup> (experimental group). The topical treatment of 5% Nanoxidil<sup>®</sup> for 2 weeks to dorsal skin accelerated hair regrowth more than other groups: In 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group, the expression of IGF-1 was significantly increased compared with normal saline and 50% EtOH groups. Compared with normal saline group, the expression in 50% EtOH group was increased by about 1.6 times and by about 2.5 times in 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group compared with the normal saline group. Conversely, the expression of TGF-β1 was the lowest in 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group and the highest in normal saline group. The expression of IGF-1, which stimulates hair growth, was found to be more in experimental group than in negative control group, whereas the expression of TGF-β1, which inhibits hair growth, was found to be less in experimental group. Thus, the results showed that stimulation of hair growth with 5% Nanoxidil<sup>®</sup> produced an increased IGF-1 expression and decreased TGF-β1 expression.

**Key Words:** Hair, IGF-1, TGF-β1

### Correlation between Hair Growth and IGF-1 and TGF-β1 Levels

Dae Hwan Park, M.D., Ph.D.,<sup>1</sup>  
Chang Hyun Oh, M.D., Ph.D.,<sup>1</sup>  
Mi Hyun Chae<sup>2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Plastic and Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Tissue Engineering Center, Collage of Medicine, Daegu Catholic University, Daegu, Korea

**Address Correspondence :** Dae Hwan Park, M.D., Ph.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Daegu Catholic University College of Medicine, 3056-6 Daemyung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea.  
Tel: 053) 650-4578 / Fax: 053) 650-4584 /  
E-mail: dhpark@cu.ac.kr

### 1. 서 론

인간의 모발은 두피를 보호하고 외부의 충격을 흡수하는 등 기능적 측면뿐만 아니라 개성이나 아름다움을 더하기 위한 미용적 측면에서도 중요한 역할을 하고 있다. 생활수준이 향상됨에 따라 미용적인 측면에 대한 관심이 상대적으로 증가하고 있는 가운데, 탈모가 노화의 척도로 인식되면서 수많은 발모제가 연구, 개발되고 있으나 현재 발모제로서 효과를 인정받은 의약품은 경구용 피나스테라이드(Finasteride<sup>®</sup>)와 외용제 미녹시딜(Minoxidil<sup>®</sup>) 뿐이다.

모발은 모발의 각 성장주기에 대하여 다양한 인자

들이 작용함으로써 발모 또는 탈모를 유발하게 된다. 모발 성장을 조절하는 성장인자에는 EGF(epidermal growth factor), TGF-α(transforming growth factor-α), TGF-β1(transforming growth factor-β1), KGF(keratinocyte growth factor), IGF-1(insulin-like growth factor-1), HGF(hepatocyte growth factor) 및 FGF(fibroblast growth factor) 등이 있다.<sup>1</sup> 많은 국외 연구를 통해서, 이 중에서 TGF-β1, FGF-2는 모발 성장을 억제하고 IGF-1, HGF는 모발 성장을 자극한다고 알려져 있다.<sup>2,3</sup> 그러나 국내의 모발성장인자에 대한 연구는 미비한 실정이다.

이에 저자들은 발모 효과가 이미 검증된 미녹시딜 제재인 5% 나녹시딜(Nanoxidil<sup>®</sup>)을 C57BL/6 마우스에 도포하여 모발 성장과 주기에 영향을 미치는 IGF-1과 TGF-β1의 발현 정도를 측정하여 실제 IGF-1발

현이 증가되고 TGF- $\beta$ 1 발현이 억제되는지를 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 재료

실험물질로서 미녹시딜 제제의 5% 나녹시딜은 나노팜(서울, 한국)으로부터 공급받아 이용하였다. 실험 동물로서 사용한 C57BL/6마우스(효창사이언스, 한국)는 체모가 검은색이고, 자발적인 탈모(spontaneous alopecia)가 일어나는 특징을 지니고 있다. 또한 C57BL/6 마우스는 멜라닌세포가 모낭에만 한정적으로 존재할 뿐만 아니라 멜라닌 합성이 모발 성장주기(hair growth cycle)와 비교적 잘 일치되어 피부색으로 모발의 성장 주기를 판정할 수 있는 등의 이점이 있어 많은 연구에 이용되고 있다. 생후 5주된 수컷 C57BL/6 마우스를 1 주 동안의 사육실 적응 기간을 가진 후 실험에 사용하였으며 동물 사육실은 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대 습도  $50 \pm 10\%$ , 12시간 주기로 주야를 유지하였고 격리용 마우스 사육 상에서 사육하였으며 동물용 사료를 자유로이 섭취하도록 하였다. 그리고 실험의 정확성을 높이기 위해서 마우스는 출생 날짜가 유사한 것들을 사용하였다. 실험동물은 음성대조군, 용매대조군, 실험군으로 나누었으며 각각 생리식염수, 50% 에탄올, 5% 나녹시딜을 이용하여 각 군당 4마리씩 총 12마리를 대상으로 실험하였다(Table I).

### 나. 방법

먼저 제모를 위해 니크린<sup>®</sup>(일동제약, 한국)을 사용하여 마우스의 등부의 털을  $5 \times 3.0 \text{ cm}^2$  크기로 제거한 후, 제모 부위에 골고루 도포할 수 있는 양인 200  $\mu\text{L}$ 의 시료를 각 군별로 도포하였다. 시료 처리는 매일 오전 9시와 오후 9시에 2회씩 실시하였으며 나녹시딜 도포 시 발모가 일어나 제모전과 동일한 상태가 되는데 약

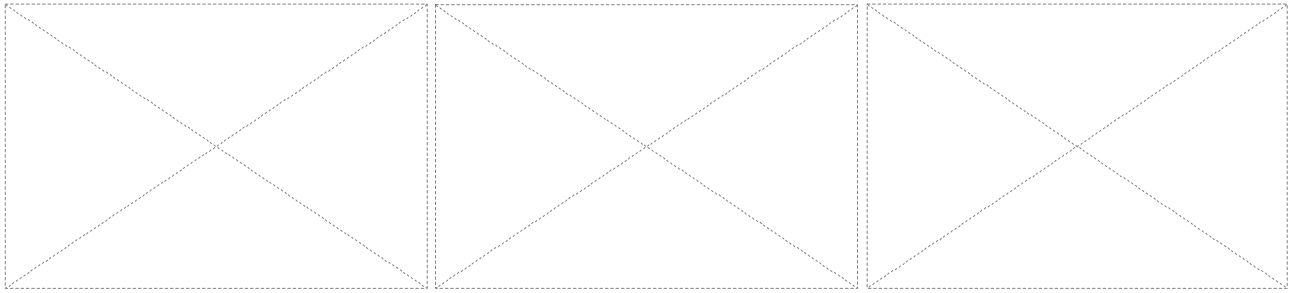
2주가 걸렸다.

이에 실험 2주째를 기준 삼아 시료를 도포한 지 2주 뒤 마우스의 등부에서 적출한 피부를 잘게 잘라 초저온 냉동고(deep freezer)에서  $-70^\circ\text{C}$ 로 보관 후 피부조직 50 - 100 mg에 트리졸(trizol) 1 mL를 혼합하여 균질기(homogenizer)로 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 실온에서 5분간 배양(incubation)시킨 후 0.2 mL의 클로로포름(chloroform)을 첨가하고 2 - 3분간 실온에서 다시 배양시킨 다음  $4^\circ\text{C}$ 에서 12,000 - 15,000 g로 15분간 원심분리를 시행한 후 그 상층액을 추출하였다. 상층액에 0.5 mL의 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 넣고 와동(vortex)한 후 다시 실온에서 10분간 배양하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 12,000 g로 10분간 원심분리를 시행하여 RNA 침전물(pellet)을 얻었다. 이 RNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 뒤 실온에서 건조시켰다. 그 후 디에틸피로카르보네이트(diethylpyrocarbonate; DEPC) 수용액 50  $\mu\text{L}$ 에 침전물을 다시 용해시킨 후 그 용액을 DEPC 수용액에 1/100으로 희석한 후 260 nm에서 흡광도(OD) 값을 측정하여 RNA를 정량하였다. 280 nm에서도 흡광도 값을 측정하고 흡수율(absorbance ratio: A260/A280)이 1.8 - 2.0 사이인지 확인하였다.

분리된 총 RNA에서 모발 성장 인자 발현을 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 분리된 총 RNA(0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 와 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 oligo dT primer 1  $\mu\text{L}$ , nuclease-free water 2  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 만든 RNA 변성 혼합물(denaturation mixture) 5  $\mu\text{L}$ 를  $70^\circ\text{C}$ 에서 5분간 변성(denaturation)시키고 얼음 위에 5분간 방치한 후, Improm-II 5  $\times$  reaction buffer 4  $\mu\text{L}$ , 25 mM 염화마그네슘( $\text{MgCl}_2$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTP Mix 1  $\mu\text{L}$ , Improm-II reverse transcription mix 1  $\mu\text{L}$ (Promega, Madison, WI), nuclease-free water 7.5  $\mu\text{L}$ 와 혼합한 20  $\mu\text{L}$ 를  $25^\circ\text{C}$ 에서 5분,  $42^\circ\text{C}$ 에서 60분,  $70^\circ\text{C}$ 에서 15분 동안 반응시켜 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 해서 10  $\times$  reaction buffer 2  $\mu\text{L}$ ,

**Table I.** Grouping of Experimental Animal Models

Group	The number of mouse	Experimental material
Negative control group	4	Normal saline
Vehicle control group	4	50% EtOH
Experimental group	4	5% Nanoxidil <sup>®</sup>



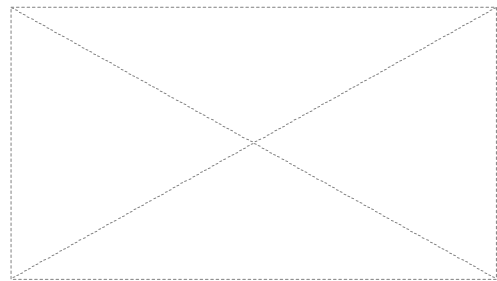
**Fig. 1.** Hair growth change of C57BL/6 mice after topical application of experimental materials for 2 weeks. (Left) view of normal saline group, (Center) view of 50% EtOH group and (Right) view of 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group. In 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group, hair growth was nearly completed.

10 mM dNTPs Mix 1  $\mu$ L, 10 pmole IGF-1 primer set 1  $\mu$ L, Prime Taq DNA Polymerase(5 units/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L (GeNet Bio, 한국), nuclease-free water 14.5  $\mu$ L와 혼합한 20  $\mu$ L를 PCR 하였다. 본 실험에 사용한 primer는 대조군으로 GAPDH(57°C, 30 cycles), 실험군으로 IGF-1(Size 253, 53°C, 45 cycles, Sense 5'-3' AGAGACC C TTTGCGGGGC), TGF- $\beta$ 1(Size 447, 72°C, 45 cycles, Sense 5'-3' ATACGTCAGACATT CGGGAAGCAGTG)을 사용하였다. 증폭된 PCR 산출물은 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동시켜 DNA 띠(band)를 확인하였다.

### III. 결 과

각각의 C57BL/6 마우스 제모 부위에 생리식염수를 도포한 군에서는 실험 2주 후에도 털이 거의 자라지 않았으며, 50% 에탄올 군에서는 일부분 털이 자라는 것을 확인할 수 있었다. 5% 나녹시딜 군에서는 고르게 털이 자란 것을 확인하였다(Fig. 1).

RT-PCR로 DNA 띠의 면적(mm<sup>2</sup>)을 구하여 C57BL/6 마우스 피부조직에서 IGF-1과 TGF- $\beta$ 1의 발현량의 차이를 관찰하였다(Table II). 각각의 측정값은 SPSS (Window Version 12.0) 프로그램을 이용하여 통계 처



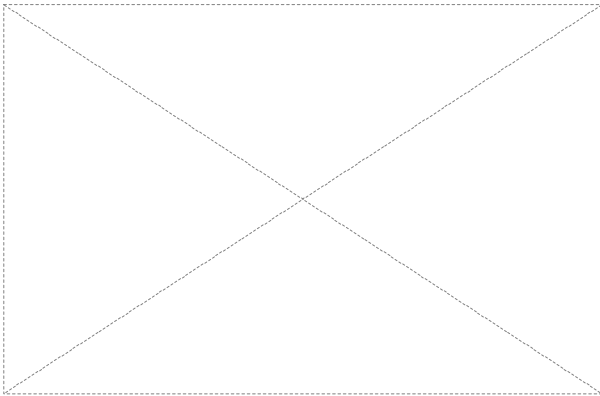
**Fig. 2.** Result of PCR and electrophoresis. A; Normal saline B; 50% EtOH C; 5% Nanoxidil<sup>®</sup>. The most expression of IGF-1 was seen on C and that of TGF- $\beta$ 1 was seen on A.

리하였으며  $p < 0.05$  수준인 경우 유의한 것으로 판정하였다. 5% 나녹시딜 군에서 IGF-1의 발현량이 생리식염수, 50% 에탄올 군보다 유의하게 증가하였고 생리식염수 군과 비교하여 50% 에탄올 군은 약 1.6배, 5% 나녹시딜 군은 약 2.5배 정도 많이 발현되었다(Fig. 2, 3). 이에 반해 TGF- $\beta$ 1의 발현은 5% 나녹시딜 군에서 가장 낮은 발현량을 보였고 생리식염수 군에서 가장 많이 발현되었다(Fig. 2, 4). 모발의 성장을 증가시키는 IGF-1의 발현량이 실험군에서 대조군에 비해 높게 측정된 반면 성장을 저해하는 TGF- $\beta$ 1의 발현은 대조군에 비해 실험군에서의 발현량이 낮게 측정되었다.

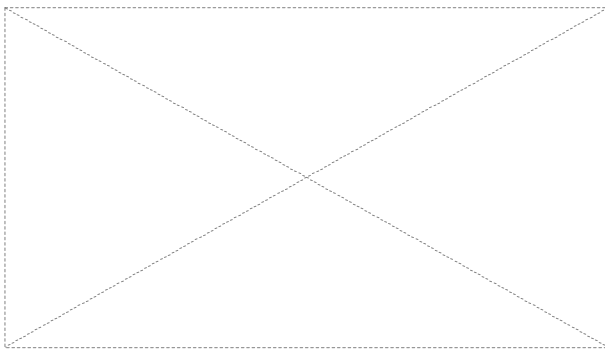
**Table II.** Comparison of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 Expression Levels as Dimension of DNA band(mm<sup>2</sup>) in C57BL/6 Mice after Topical Application of Experimental Materials for 2 Weeks

Group	IGF-1	TGF- $\beta$ 1
Normal saline group	7.7607 $\pm$ 0.1593	12.5544 $\pm$ 0.3720
50% EtOH group	12.8828 $\pm$ 0.2883	8.4491 $\pm$ 0.3568
5% Nanoxidil <sup>®</sup> group	19.4018 $\pm$ 0.5182	6.3023 $\pm$ 0.0976

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



**Fig. 3.** Comparison of IGF-1 expression in C57BL/6 mice after topical application of experimental materials for 2 weeks. IGF-1 expression of 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group was found to be 2.5 times more than normal saline group. \*significantly different from control,  $p < 0.05$ .



**Fig. 4.** Comparison of TGF-β1 expression in C57BL/6 mice after topical application of experimental materials for 2 weeks. TGF-β1 expression of 5% Nanoxidil<sup>®</sup> group was found to be about 50% less than with normal saline group. \*significantly different from control,  $p < 0.05$ .

#### IV. 고 찰

최근 탈모 환자가 늘어감에 따라 탈모에 관한 관심이 증가하면서 탈모의 원인과 기전에 대한 많은 연구들이 시도되어 왔다. 그러한 연구방법 중 RT-PCR은 조직에서 목표(target) mRNA를 검출하는 매우 민감한 방법이다.<sup>2</sup> 이것은 최근에 모낭의 형태 형성에 필요한 유전자를 조사하기 위한 방법으로 사용된다.<sup>4,5</sup>

모발 성장을 자극하는 성장인자 중에 IGF-1은 많은 생물학적 시스템에 중요한 성장인자라고 알려져 있다.<sup>6</sup> 그 중에서 모낭의 발달 동안 세포의 증식과 이동을 조절하는 역할을 한다.<sup>7,8</sup> 이전 연구에서 *in vitro*에서는 IGF-1이 반응하여 모낭 성장이 증가된 것을 알 수 있었으나 임상실험에서는 모발 성장의 증가를

알기 쉽지 않았다. 양에 IGF-1을 주입하였을 때 양모의 케라틴(keratin)이 증가하여 단백질 합성을 자극한다는 것이 보고되었고, IGF-1을 과 발현(overexpressing)한 형질 전환 쥐(transgenic mice)의 피부에서 대조군 보다 모낭 발달이 더 촉진되었다.<sup>9</sup> IGF-1은 *in vitro*에서 배양된 모낭 뿐 아니라 상피세포의 성장을 촉진한다. 게다가 IGF 형질 전환 동물에서 모발 연장(hair elongation)이 유의성 있게 증가하여 모발 성장을 조절하는 가장 중요한 성장인자의 하나로 생각되고 있다.<sup>10</sup> Philpott 등이 *in vitro* 실험에서 인슐린이 결여된 배양조건에서는 모낭이 퇴행기로 급속히 넘어가고 IGF-1을 첨가하면 퇴행기로의 이행을 막는 것을 확인하여 IGF-1이 모발 성장을 촉진한다고 보고하였다.<sup>11</sup>

TGF-β는 세포의 성장, 세포 소멸 및 분화를 조절하고 배아발생(embryogenesis) 동안에 강한 형태원(morphogens) 작용을 한다.<sup>12</sup> TGF-β에는 TGF-β1, 2 및 3이 있고 모든 TGF-β는 각질세포 증식을 억제하고 섬유아세포에 의해 세포외기질단백질의 퇴화(degradation)에 관여한다.<sup>13,14</sup> 몇몇의 연구에서 쥐의 모발 주기 동안 TGF-β의 발현과 그것들의 수용체를 조사하였다. 1, 2형 TGF-β 수용기, 그리고 이것들의 높은 친화성 리간드(ligand)인 TGF-β1과 3의 전사량(transcript level)은 성장기 동안 감소하고 성장기에서 퇴행기로 넘어갈 때 최대가 되었다.<sup>5</sup> 그 중에서 TGF-β1은 모낭의 발달과 성숙을 방해하는 것으로 알려 졌다.<sup>10</sup> 인간의 모낭에서 퇴행기 단계인 모낭의 부위를 면역조직화학염색으로 보면 TGF-β 발현의 증가 양상이 나타났다고 보고되었고, 인간의 모낭에서 TGF-β는 모발 성장 주기에서 성장기 모발을 퇴행기 모발로 진행되도록 하는 데 중요한 역할을 하고 일반적으로 모발의 성장을 억제하는 작용을 한다고 보고되었다.<sup>12</sup>

이 실험에서는 동일한 시기에 태어나 모발 주기가 같은 C57BL/6 마우스의 등 부위에 시료를 처리한 피부로부터 RNA를 추출하였다. 그리고 추출한 RNA로 모발 성장에 영향을 끼치는 성장인자인 IGF-1과 TGF-β1의 발현량을 조사하였다. 저자들은 발모성장인자의 발현량을 이용하여 발모효과와 IGF-1과 TGF-β1의 상관관계에 대해 분석하였다. 5% 나녹시딜 군에서 IGF-1의 발현량이 생리식염수, 50% 에탄올 군보다 유의성 있게 증가하였고 이에 반해 TGF-β1의 발현은 5% 나녹시딜 군에서 유의성 있게 감소하여 가장 낮은 발현량을 보

였고 생리식염수 군에서 가장 많이 발현되었다. 모발의 성장을 증가시키는 IGF-1의 발현 정도가 실험군이 대조군에 비해 높게 나온 반면 성장을 저해하는 TGF- $\beta$ 1의 발현은 대조군에 비해 실험군의 발현량이 낮게 측정되었다.

위 결과로 볼 때 모발이 성장함에 따라 IGF-1의 발현은 증가되고 TGF- $\beta$ 1의 발현은 감소된다는 결론을 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 발모에 영향을 줄 수 있는 모발 성장 인자 중 IGF-1와 TGF- $\beta$ 1에 국한하여 결과를 얻었기에 다른 모발 성장 인자들에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

C57BL/6마우스를 이용한 본 연구를 통해 발모제를 이용하여 발모를 유발시킬 시 모발 성장 인자인 IGF-1의 발현은 증가하고 TGF- $\beta$ 1의 발현은 감소함을 알 수 있었다. 보다 확실한 발모 효과를 얻기 위한 발모제의 개발에 있어서 추가적인 모발 성장 인자 검증을 위해 본 실험방법은 보다 객관적인 접근을 위한 참고자료가 될 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Ozeki M, Tabata Y: *In vivo* promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials* 24: 2387, 2003
- Mitsui S, Ohuchi A, Hotta M, Tsuboi R, Ogawa H: Gene for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles. *Br J Dermatol* 137: 693, 1997
- Tsuboi R: Growth factors and hair growth. *Korean J Invest Dermatol* 4: 103, 1997
- Little JC, Westgate GE, Evans A, Granger SP: Cytokine gene expression in intact anagen rat hair follicles. *J Invest Dermatol* 103: 715, 1994
- Seiberg M, Marthinuss J, Stenn KS: Changes in expression of apoptosis-associated genes in skin mark early catagen. *J Invest Dermatol* 104: 78, 1995
- Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 16: 3, 1995
- Peus D, Pittelkow MR: Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clinics* 14: 559, 1996
- Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinas JR, Parimoo S, Prouty SM: Hair follicle growth controls. *Dermatol Clinics* 14: 543, 1996
- Bol DK, Kiguchi K, Gimenezconti I, Rupp T, DiGiovanni J: Overexpression of insulin-like growth factor-1 induces hyperplasia, dermal abnormalities and spontaneous tumor formation in transgenic mice. *Oncogene* 14: 1725, 1997
- Liren T, Bernardo O, Bolduc C, Lui H, Madani S, 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
- Philpott MP, Green MR: Human hair growth *in vitro*. *J Cell* 97: 463, 1991
- Kerstin F, Gerd L, Sven MR, Marcus M, Natasha B, Vladimir B, Bori H, Martin M, Toshihiko H, Tsutomu SG, Paolo D, Ralf P: Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF- $\beta$ 1 *in vivo*. *FASEB J* 14: 752, 2000
- Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A: Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 12: 81, 1992
- Roberts AB, McCune BK, Sporn MB: TGF- $\beta$ : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41: 557, 1992