

2014년 2월

박사학위논문

반복된 블레오마이신 주사로 유도한
피부경화증 쥐 모델에서
진피 두께 변화에 대한 연구

조선대학교 대학원

의학과

조 홍 성

반복된 블레오마이신 주사로 유도한
피부경화증 쥐 모델에서
진피 두께 변화에 대한 연구

The study for change of dermal thickness on scleroderma
mouse model induced by repeated bleomycin injections

2014년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

조 홍 성

반복된 블레오마이신 주사로 유도한
피부경화증 쥐 모델에서
피부 두께 변화에 대한 연구

지도교수 박 찬 국

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2013년 10월

조선대학교 대학원

의학과

조 홍 성

조홍성의 박사학위논문을 인준함

위원장 순천향대학교 교수 김 현 숙 (인)

위 원 조선대학교 교수 박 찬 국 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 현 리 (인)

위 원 조선대학교 교수 신 병 철 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 동 현 (인)

2013년 12월

조선대학교 대학원

CONTENTS

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | IV |
| I. Introduction | 1 |
| II. Materials and Methods | 3 |
| A. Mice | 3 |
| B. Bleomycin induced mice and medication treatment groups | 4 |
| C. Method of histopathologic staining and analysis | 5 |
| D. Statistical analysis | 6 |
| III. Results | 7 |
| A. Effect of bleomycin in dermal thickness | 7 |
| B. Comparison of dermal thickness and inflammation between 10 groups | 8 |
| C. Effect of anti-vascular endothelial growth factor in dermal thickness | 9 |
| D. Effect of cyclosporine in dermal thickness | 10 |

| | |
|--|----|
| E. Effect of extracellular-superoxide dismutase in dermal thickness | 11 |
| F. Effect of peroxisome proliferator activated receptor- γ in dermal thickness | 12 |
| IV. Discussion | 13 |
| V. Conclusion | 18 |
| Reference | 19 |

LIST OF FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Back skin of mice | 26 |
| (A) Phosphate buffered saline injected control mice | 26 |
| (B) Bleomycin injected mice | 26 |
| Figure 2. Explanation about dermal thickness measurement | 27 |
| Figure 3. Photomicrographs of Group 1 VS. Group 2 (Phosphate buffered saline VS. Bleomycin) | 28 |
| Figure 4. Comparison of dermal thickness between Group 1-10 | 29 |
| Figure 5. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) | 30 |
| Figure 6. Inflammation compared with control mice (saline treatment group) | 31 |
| Figure 7. Photomicrographs of Group 3 VS. Group 4 (Anti-vascular endothelial growth factor VS. Bleomycin + Anti-vascular endothelial growth factor) | 32 |
| Figure 8. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,3,4) | 33 |
| Figure 9. Photomicrographs of Group 5 VS. Group 6 (Cyclosporine VS. Bleomycin + Cyclosporine) | 34 |
| Figure 10. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,5,6) | 35 |
| Figure 11. Photomicrographs of Group 7 VS. Group 8 (Phosphate buffered saline in Extracellular-superoxide dismutase VS. Bleomycin in extracellular-superoxide dismutase) | 36 |
| Figure 12. Dermal thickness compared with control mice | |

| | | |
|--|---|----|
| | (saline treatment group) (Group 1,2,7,8) | 37 |
| Figure 13. Photomicrographs of Group 9 VS. Group 10 | (Peroxisome proliferator activated receptor- γ VS. | |
| | Peroxisome proliferator activated receptor- γ + Bleomycin) · | 38 |
| Figure 14. Dermal thickness compared with control mice | (saline treatment group) (Group 1,2,9,10) | 39 |

초 록

The study for change of dermal thickness on scleroderma mouse model induced by repeated bleomycin injections

조 흥 성

논문지도 : 교수 박 찬 국, M.D, Ph.D.

의학과

조선대학교 대학원

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic connective tissue disorder characterized by extensive fibrosis associated with increased deposition of extracellular matrix (ECM) proteins in the skin and various internal organs such as lung, heart, kidney, gastrointestinal tract and vascular injury. Scleroderma, sclerosis of the skin, is usually resistant to all kinds of treatments. The etiology and the initial events of SSc remain unclear. but, a number of cytokines are supposed to play a role in the induction fibrosis. Among them, transforming growth factor- β (TGF- β) is suggested to play a crucial role in tissue fibrosis. But, dermal fibrosis/sclerosis has not been fully elucidated.

Bleomycin (BLM), originally isolated from the fungus *Streptomyces verticillus*, is a frequently used antitumor antibiotic effect against various kinds of cancers. It has side effects include pulmonary fibrosis. BLM induced lung fibrosis is a well-known animal model that mimics human pulmonary fibrosis histologically and biochemically. Upregulation of TGF- β expression in the lungs was reported in pulmonary fibrosis which increases in lung ECM production.

Although animal models which exhibit all the aspects of scleroderma are not

currently available, there are several animal models for research on the pathogenesis of SSc and on potential therapeutic agents. In particular a BLM induced scleroderma model involving daily subcutaneous injection of BLM into the back skin of susceptible strains of mice has been developed.

In this study, we have attempted to establish a scleroderma animal model by subcutaneous injections of BLM. Our mouse model could provide an aid to analyse the etiology and therapeutic strategy of scleroderma and SSc.

Key Words : Bleomycin, Mouse model, Scleroderma, Systemic sclerosis

I. Introduction

전신경화증(Systemic sclerosis, SSc)은 활성화된 섬유모세포(fibroblast)에 의해 콜라겐의 생성 및 과도한 축적이 피부 뿐 만 아니라 폐, 심장, 신장, 소화기관과 같은 다양한 내부 장기에 영향을 미치고 혈관내피세포의 손상으로 전신에 침범할 수 있는 만성 결합 조직 질환이다^(1,2). 피부경화증(Scleroderma)은 SSc의 아형으로, 경화증이 주로 피부에 발생하는 것을 의미하며 전신경화증 환자의 삶의 질에 영향을 미친다. 전신경화증의 발병기전을 밝혀내기 위해 수많은 노력들이 있었으나 아직까지 전신경화증의 원인과 발병기전이 명확하게 밝혀지지 않았다. 현재까지 연구에 의하면, 수많은 사이토카인들이 섬유화를 유발하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 그 중에서도 전환 성장 인자-베타 (Transforming growth factor- β , TGF- β)가 섬유화 유발에 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다. TGF- β 는 섬유모세포의 강력한 화학유발물질이며⁽³⁾, 이것은 in vitro에서 많은 세포 종류에 의해서 콜라겐 또는 섬유결합소(fibronectin)의 생성을 증가시킨다⁽⁴⁻⁶⁾. TGF- β 는 세포 기질 부착 단백질 수용체(cell-matrix adhesion protein receptor)를 조절한다^(7,8). 또한, TGF- β 는 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator), 플라스미노겐 억제제 또는 전아교질 분해효소(procollagenase) 같은 단백질 분해 작용에 의해 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)을 조절하는 단백질의 생산을 조절한다⁽⁹⁻¹¹⁾. TGF- β 는 자동조절(autoinduction)을 통해 섬유모세포에 의해서 자기 자신의 합성을 자극할 수 있다⁽¹²⁾. 그래서 증가된 TGF- β 생성을 유지하는 것은 ECM의 지속적인 축적을 야기하여 섬유화를 일으킨다.

동물 모델들은 인간의 다양한 질병들을 이해하고 새로운 치료법을 개발하는 데 있어서 중요한 단서를 제공하므로 기전을 실험하고 이론을 정립하는 데 매우 유용하다. 비록 SSc의 모든 면을 반영한 동물 모델들이 현재까지 만들어 지지지는 않았지만, 반복된 블레오마이신 (Bleomycin, BLM) 주사로 유도한 피부경화증 쥐 모델을 비롯한 몇 가지의 동물 모델들이 개발되었다⁽¹³⁾. 특히, BLM에 의해 유도된 피부경화증 모델은 쥐의 등 피부에 매일 BLM을 피하 주사하여 만들어졌으며, 이 모델이 가장 많이 이용된다⁽¹⁴⁾.

*Streptomyces verticillus*라는 곰팡이로부터 분리된 BLM은 다양한 종류의 악성종양에 항암제로써 자주 사용되는 항생 물질이다⁽¹⁵⁾. BLM의 부작용으로는 폐

섬유화 또는 피부경화증과 비슷한 상태 등이 알려져 있다.

본 연구는 BLM을 쥐의 등에 피하 주사 함으로써 SSc 피부를 가진 동물 모델을 재현해 보았다. 그리고 피부경화증 쥐 모델들의 피부 두께를 측정하여 정상 쥐의 그것과 비교함으로써 통계적으로 의미 있는 차이가 있는지에 대해 확인하기 위하여 여러 가지 약물들을 처리하여 치료효과를 예견해 보고자 하였다.

II. Materials and Methods

A. Mice

Sankyo Labo Service (Tokyo, Japan)에서 구입한 중량 20-25g의 특이한 병원균이 없는 생후 6주의 수컷 B6 쥐(Specific pathogen free, male B6 mice) 종을 사용하였다. 쥐들은 동물 실험 규정을 준수하여 키웠다.

B. Bleomycin induced mice and medication treatment groups

쥐들을 27 게이지 바늘을 이용하여 한 그룹에는 4주 동안 주 3회(월, 수, 금요일) 1mg/ml의 BLM (Nippon Kayaku Co, Tokyo, Japan)을 면도된 쥐 등 피부에 피하 주사를(n=10) 투여하였다. 마지막 투여가 끝난 다음날에 쥐를 정해진 프로토콜에 따라 처치한 후, 쥐 등 피부를 확보하였다. 대조군인 다른 그룹에는 같은 용량의 인산염 완충 식염수(phosphate -buffered saline, PBS)를 면도된 쥐 등 피부에 피하 주사(n=5) 하여 같은 방법과 간격으로 투여하였고 쥐의 등 피부를 확보하였다. 주사부위를 기준으로 하여 상·하부 2 x 1 cm를 두 군데 채취하였으며 부위는 그림 1과 같다.

즉, 그룹 1은 대조군인 PBS를 투여한 군이고 그룹 2는 BLM을 투여한 군이다. BLM으로 유도된 쥐에서 약제의 효능을 평가하기 위하여 세 마리씩 각각의 약제를 BLM과 같이 투여하였다. 그룹 3은 항 혈관내피성장인자(anti-Vascular Endothelial Growth Factor, anti-VEGF)를 투여한 군이고 그룹 4는 BLM과 anti-VEGF를 함께 투여한 군이다. 또한 그룹 5는 Cyclosporine (Cs)를 투여한 군이고 그룹 6은 BLM과 Cs를 투여한 군이다.

그룹 7은 extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)에 PBS를 투여한 군이고 그룹 8은 EC-SOD에 BLM을 투여한 군이다. 그룹 9는 peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)를 투여한 군이고 그룹 10은 PPAR- γ 와 BLM을 투여한 군이다.

C. Method of histopathologic staining and analysis

조직 표본을 10% 포르말린 용액으로 고정한 후 파라핀 절편을 제작하였다. 조직 표본의 두께는 4 μm 로 절단되었고, 헤마톡실린-에오신 염색과 마손 트리크롬 염색을 실시하였다. 또한, 피부 진피층 두께와 염증세포를 구별하기 위해 톨루이딘 블루(pH 7.0) 염색을 실시하였다. 피부 표본의 두께는 동일한 연구가가 반복하여 측정하였다 (그림 2).

각 10개 군의 병리조직 표본을 확보하여 각각 3차례 진피의 두께를 측정하고 그룹 1을 기준(normal control)으로 하여 다른 그룹의 측정치를 비교하여 기준에 대한 두께의 증감률을 %로 표시하였다.

D. Statistical analysis

결과는 평균 \pm 표준편차(means \pm SD)로 표현하였다. SPSS ver. 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL)와 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였다. p 값이 <0.05 이면 통계학적으로 의미가 있다.

III. Results

A. Effect of bleomycin in dermal thickness

그림 3은 PBS를 투여한 정상 대조군 쥐의 진피 두께와 BLM을 투여한 쥐의 진피 두께를 비교한 그림이다. 그림 4를 참고하면, PBS군에 비해 BLM을 투여한 그룹에서 59.7%의 진피 교원섬유 증가를 보였다.

B. Comparison of dermal thickness and inflammation between 10 groups

1차, 2차, 3차 결과를 분석하여 평균을 낸 결과, 진피 두께, 진피 두께 증감률, 염증 반응 증감률은 각각 그림 4, 그림 5, 그림 6과 같다.

그림 4를 보면, BLM, BLM + anti-VEGF, Cs + BLM 그룹이 대조군에 비해서 평균 진피 두께가 증가하였음을 알 수 있다. 그러나 anti-VEGF, Cs를 투여한 그룹은 대조군에 비해서 평균 진피 두께가 감소함을 알 수 있다.

BLM 그룹과 BLM in EC-SOD 그룹을 비교해보면 BLM 그룹에 비해 BLM in EC-SOD 그룹의 진피 두께가 감소함을 알 수 있다.

BLM 그룹과 PPAR- γ + BLM 그룹을 비교해보면 BLM 그룹에 비해 PPAR- γ + BLM 그룹의 진피 두께가 감소함을 알 수 있다.

그림 5는 PBS를 기준으로 해서 나머지 그룹의 진피 두께 변화율을 비교하였다. 그림 4와 그 의미는 같다고 할 수 있다.

그림 6은 PBS를 기준으로 해서 나머지 그룹의 염증 변화율을 비교하였다. 나머지 그룹 모두에서 염증이 증가하였음을 알 수 있다.

C. Effect of anti-vascular endothelial growth factor in dermal thickness

그룹 1, 2, 3, 4의 진피 두께를 비교해 본 결과, PBS군에 비해 BLM을 투여한 그룹에서 59.7%의 진피 교원섬유 증가를 보였으며 anti-VEGF를 단독 투여한 그룹은 대조군에 비해 약간의 감소 (-8.3%)를 보였고 BLM과 anti-VEGF를 복합 투여한 경우에는 BLM 단독 투여보다는 덜하지만 정상보다 26.9%의 교원섬유층의 증가를 보였다 (그림 8). 현미경으로 관찰한 그룹 1, 2의 피부 사진과 그룹 3, 4의 피부 사진은 각각 그림 3, 그림 7이다.

D. Effect of cyclosporine in dermal thickness

그룹 1, 2, 5, 6의 진피 두께를 비교해 본 결과, Cs를 단독 투여한 그룹은 정상 대조군에 비해 약간의 감소 (-7.5%)를 보였고 BLM과 Cs를 복합 투여한 경우에는 BLM 단독 투여보다 매우 감소된 7.4%의 진피 섬유층의 두께 증가 소견을 보였다 (그림 10). 현미경으로 관찰한 그룹5, 6의 피부 사진은 그림 9이다.

E. Effect of extracellular-superoxide dismutase in dermal thickness

그룹 1, 2, 7, 8의 진피 두께를 비교해 본 결과, PBS를 ES-SOD 쥐에 투여한 그룹은 정상 대조군에 비해 21.3%의 진피 교원섬유 증가를 보였고 EC-SOD 쥐에 BLM을 투여한 그룹에는 BLM 단독 투여보다 매우 감소된 13.3%의 진피 섬유층의 두께 증가 소견을 보였다 (그림 12). 현미경으로 관찰한 그룹 7, 8의 피부 사진은 그림 11이다.

F. Effect of peroxisome proliferator activated receptor- γ in dermal thickness

그룹 1, 2, 9, 10의 진피 두께를 비교해 본 결과, PPAR- γ 를 투여한 그룹은 정상 대조군에 비해 20.4%의 진피 교원섬유 증가를 보였고 PPAR- γ 와 BLM을 복합 투여한 경우에는 BLM 단독 투여보다 매우 감소된 -5.5%의 진피 섬유층의 두께 감소 소견을 보였다 (그림 14). 현미경으로 관찰한 그룹 9, 10의 피부 사진은 그림 13이다.

IV. Discussion

Systemic sclerosis (SSc)는 피부와 다양한 내장 기관에 섬유화가 발생하는 전체 조직 질환이다^(16,17). 비록 발병원인이 아직까지 완벽하게 밝혀지지는 않았더라도, 피부와 다양한 내장 기관에 extracellular matrix (ECM) 단백질의 과도한 축적과 혈관 손상과 면역학적인 이상 등의 특징을 보인다.

다수의 연구에서 대식세포에서 분비된 사이토카인이 동물에서 bleomycin (BLM) 으로 유도된 폐 섬유화의 발달에 상당한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 인터루킨-1 (Interleukin-1, IL-1), 인터루킨-6(Interleukin-6, IL-6), 전환 성장 인자-베타(Transforming growth factor- β , TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α), 혈소판 유래 성장 인자(Platelet Derived Growth Factor, PDGF), 또는 인슐린 유사 성장인자-I(Insulin like Growth Factor-I, IGF-I)는 실험적인 폐 섬유화 유발에 있어서 연관이 있다고 제시되었다⁽¹⁸⁻²⁰⁾. 그 중에서 TGF- β 가 섬유화 과정에서 cytokine의 수를 조절하는데 핵심적인 역할을 한다. TGF- β 의 역할은 대식세포와 섬유모세포의 화학적인 반응을 불러일으키고 섬유모세포 증식을 자극하고, 세포외기질 합성과 유전자 표현을 상향 조정시키고, 세포외기질 단백질분해효소와 단백질분해효소 억제제의 상호 보완적인 조절을 하향조정하는 것이다. Yamamoto 등은 BLM이 배양된 정상 피부 섬유모세포에서 type I collagen, fibronectin 과 TGF- β mRNA 표현을 상향 조정한다고 발표하였다⁽²¹⁾. BLM에 노출된 쥐 폐의 섬유모세포는 TGF- β mRNA 합성 증가와 TGF- β mRNA 와 단백질의 농도를 꾸준히 상승시켜서 전아교질 유전자 전사를 일으킨다⁽²²⁾. TGF- β 는 전사 단계에서 BLM의 섬유화 효과를 조절하고 TGF- β 반응에 pro α 1(I) 아교질 촉진제의 BLM 자극이 필요하다고 알려져 있다⁽²³⁾.

현재까지의 연구에 의하면, BLM 처리를 한 쥐 등에서 TGF- β 에 대한 면역반응이 증가한다고 밝혀졌다. 면역조직화학 방법을 이용한 그 전의 연구에서는 피부 경화증 피부의 세포외기질에서 TGF- β 가 증가한다고 알려져 있다⁽²⁴⁻²⁶⁾. 이것은 림프구 보다는 다른 세포에서 기원한 TGF- β 가 자가 분비 뿐 아니라 주변 분비 방식에서 섬유모세포를 유발하여 섬유화를 일으킨다고 추측 할 수 있다.

동물 모델에서 밝혀진 병의 기전은 새로운 정보를 제공하고 근본적인 인간의 피부 경화증의 기전을 더 잘 이해하는 데 도움을 준다. tight skin (Tsk) 쥐⁽²⁷⁾, Tsk2 쥐, UCD (University of California at Davis line) 200 닭⁽²⁸⁻³⁰⁾, BLM으로 유도한 피부경화증 쥐, 피부 경화성 이식 편대 숙주 반응 쥐⁽³¹⁾와 전환 성장 인자/결합 조직 성장 인자를 외부에서 주입하여 유도한 섬유화 쥐 모델 같은 몇 가지 실험적인 동물 모델들은 쥐 섬유화 모델을 만들어 냈고 오랫동안 연구되어져 왔다.

Streptomyces verticillus 라는 곰팡이로부터 유래된 BLM은 다양한 종류의 암에 효과적인 항종양 항생제로 자주 이용되었다. 폐 섬유화는 BLM의 잘 알려진 부작용이고 확립된 쥐 모델에서 BLM에 의해 유발된 폐 섬유화는 인간의 폐 섬유화와 유사하다. Yamamoto 와 그 외 저자들은 BLM을 매일 피하 주사하여 피부경화증을 가진 쥐 모델을 확립하였다^(14,32). BLM에 의해 유도된 쥐 모델은 비록 다른 내장 장기는 침범하지는 않지만 폐 섬유화를 포함하여 인간의 전신성 경화증의 특징을 많이 가지고 있다. 이 모델은 치료 방법을 연구하는 많은 실험에서 성공적으로 이용되었다.

그러나, 확립된 이 모델은 격일로 BLM을 투여하여도 피부경화증을 유발할 수 있었음에도 불구하고 시간이 오래 걸리고 작업하기가 어렵다⁽¹⁴⁾. Mountz 등은 58 주 이상의 기간 동안 거의 치사량에 가까운 용량의 BLM을 반복적으로 투여한 쥐에서 아교질 섬유의 구조적인 이상을 가졌지만 인간의 피부경화증과 유사한 심한 피부 섬유화를 일으킨다고 보고하였고⁽³³⁾, Shibusawa 등은 BLM을 포함한 poly (L-lactic acid) (PLA) microspheres를 단 한번 투여하여 susceptible C3H 쥐에서 피부 섬유화를 일으킬 수 있음을 증명하였다⁽³⁴⁾.

또한, 피부 경화증의 동물 모델은 사이토카인, 사이토카인 길항제(예 : 항체, 수용성 수용체), 사이토카인 돌연변이 또는 섬유화 과정에 관여하는 신호 전달 경로를 차단하는 약물을 표적으로 하는 새로운 치료법을 개발하는데 유용한 도구가 된다.

SSc의 가장 분명한 조직 병리학적 특징은 활성화된 섬유모세포에 의해 ECM의 과다 생성에 의한 과다 축적이다. SSc의 또 다른 조직 병리학적인 특징은 혈관 주위의 염증의 침착과 모세혈관망(capillary network)의 변화이다. SSc 환자

의 모세혈관망은 밀도가 감소되어있고, 불규칙하고 혼돈스러운 양식을 보이고 있다. 이러한 변화가 모세혈관의 혈류를 감소시키고 결국 조직에 심각한 저산소증(tissue hypoxia)을 야기한다⁽³⁵⁾.

신생 혈관생성(angiogenesis)이란, 선재성(pre-existing) 혈관으로부터 내피세포(endothelial cell)의 싹틔움과 분화에 의해 새로운 혈관이 생성되는 것을 말한다. 저산소증은 부족한 산소를 보상하기 위해 일어나는 신생 혈관생성에 중요한 자극제로 작용한다⁽³⁶⁾. 그러나, SSc 환자에서는 조직에 심각한 저산소증이 발생함에도 불구하고 충분한 신생 혈관 생성이 발생하지 않는다⁽³⁷⁾. 새로운 혈관을 생성하는데 중요한 조절자 역할을 하는 VEGF는 신생 혈관생성의 몇 가지 단계를 조절한다. SSc 환자에서 신생 혈관생성이 충분하지 않다는 것을 고려한다면, 신생 혈관생성 인자가 하향 조절되거나 신생 혈관생성 억제인자가 상향 조절되어 있을 것이다⁽³⁷⁾. 그러나 놀랍게도 VEGF는 SSc의 피부에서 강하게 과발현(overexpression)되어 있다⁽³⁵⁾. 이 같은 사실에 따라서, 혈청 VEGF의 농도는 SSc 환자에서 의미 있게 증가한다⁽³⁷⁾. 만성적이고 조절되지 않는 VEGF의 과발현은 해로운 작용을 하여 결국 거대 모세혈관(giant capillary)같은 비기능적인 혈관을 생성하게 된다. 이러한 점을 참작하여 본 실험에서는 anti-VEGF가 피부경화증의 치료에 효과가 있을 것이라는 생각에 이르게 되었고 또 쥐 실험을 통해 그 가능성을 증명하였다. 현재까지 anti-VEGF가 SSc 및 피부경화증 환자에서 효과가 있다는 논문이 없다는 것을 확인하였으며, 앞으로 더 많은 실험과 임상 시험을 통해 anti-VEGF가 새로운 대안으로 떠오를 것으로 기대한다.

피부경화증은 면역 체계의 이상, 피부와 내부 장기의 섬유화, 그리고 미세혈관 순환에 영향을 주는 폐쇄성 혈관병증을 특징으로 하는 다발적 자가면역 질환이다⁽³⁸⁾. 비정상적인 면역 활성화가 체액면역과 세포면역에 영향을 미치고 이것이 피부경화증의 시작에 있어서 기본이 되는 단계이다. SSc 초기 병변에서 얻은 피부 조직은 혈관 주위 단핵세포, 특히 CD4와 CD8 T 세포의 침윤이 섬유화보다 먼저 일어난다는 것을 증명하였다⁽³⁹⁾. 이처럼 피부경화증이 면역 체계의 이상과 관련이 있다는 것이 알려지면서 메토트렉세이트(methotrexate, MTX), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide, CYC), Cs 등 다양한 면역억제제가 치료제로 시도되어졌고, 실제로 많은 연구에서 그 효과가 확인되었으며 현재에도 주된 치료

제로 사용되어지고 있다. 초기 SSc에서 IL-2, IL-2의 수용성 수용기 또는 이 두 가지 모두 증가되어 있음이 밝혀졌다^(40,41). Cs는 IL-2의 T 세포 생성과 다른 염증 유발 사이토카인들을 방해하여 면역 억제 기능을 나타낸다. 이러한 효과는 IL-2의 주된 전사 인자(transcription factor)인 nuclear factor for activated T cells (NF-AT)를 활성화 하는데 중요한 분자인 칼시뉴린(Calcineurin)을 억제함으로써 나타난다⁽⁴²⁾. 많은 연구들에서 Cs가 섬유모세포에서 아교질 분해 효소(collagenase)의 표현을 증가시킨다는 것이 밝혀졌고⁽⁴³⁾, 이를 임상에 적용하여 수많은 예에서 피부경화증에 Cs를 사용하여 좋은 결과를 얻음을 확인할 수 있었다⁽⁴⁴⁻⁵⁰⁾. 이를 바탕으로 본 실험에서도 Cs를 사용하여 피부경화증 쥐 모델에서 효과가 있음을 증명하였다.

증가된 자유 라디칼(free radical)이 조직 손상의 중요한 발기인(initiator)으로서 SSc의 발병기전으로 여겨지고 있다. 산소 라디칼(oxygen radical)이 블레오마이신 유발 폐 손상에 관여한다고 알려졌다^(51,52). BLM은 초과산화물(superoxide)과 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성한다고 알려져 있다⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. ROS는 내피세포 손상 또는 PDGF와 TGF- β 같은 염증 또는 섬유화 사이토카인의 분비를 증가시킨다.

초과산화물 불균등화효소(Superoxide dismutase, SOD)는 신체의 주된 자유 라디칼을 O₂와 H₂O₂로 전환시키는 반응을 촉매 하는 세포내 주요 항산화제이다. 혈액에서 긴 반감기를 가지며 조직에 높은 농도로 축적되는 레시틴화 SOD(lecithinized SOD)를 PC-SOD라고 한다^(56,57). BLM 유발 피부경화증 쥐 모델에서 PC-SOD가 피부경화증을 억제하는 효과가 있는지를 알아본 실험에서 효과가 있음을 증명하였다. 즉, PC-SOD를 투여한 군에서 피부 두께와 두꺼워진 콜라겐 다발의 정도가 현저하게 감소하였고 비만세포와 호산구 역시 의미 있게 감소하였다⁽⁵⁸⁾. 이와 같은 사실을 바탕으로 본 실험에서도 SOD가 BLM 유발 피부 경화증 쥐 모델에서 피부 두께 감소 등의 치료 효과가 있음을 증명해 보였다.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)는 유전자 발현을 조절하는 전사인자(transcription factor) 역할을 하는 핵 수용체 단백질(nuclear receptor protein)중의 하나이다⁽⁵⁹⁾. PPAR는 세포의 분화, 발달 그리고 신진대사(탄수화물, 지질, 단백질)를 조절하는 데 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다^(60,61). 즉,

PPAR는 지질, 지질단백질의 대사와 혈당 항상성 유지에 조절자 역할을 한다. PPAR는 3가지 타입으로 나누어지는데 alpha, gamma, 그리고 beta/delta이다. 그 중에서 PPAR- γ 는 장과 지방조직에 주로 존재하는데 지방세포 분화를 유도하고 지질 저장을 촉진시키는 역할을 한다⁽⁶²⁾.

세포내 스매드 신호 전달 경로(Intracellular Smad signal transduction pathway)를 통해서 TGF- β 는 콜라겐 합성, α -smooth muscle action (α -SMA) 발현, 그리고 피부에 존재하는 섬유모세포의 근섬유모세포(myofibroblast)의 전환 분화(transdifferentiation)를 자극한다. 이러한 반응이 조직의 섬유화에 기여한다. 자연적으로 생기는 endogenous ligand 또는 합성 약물학적 작용제는 세포 PPAR- γ 를 활성화하여 TGF- β /Smad 신호전달(signal transduction)을 파괴하고 섬유화 촉진반응을 방해한다. PPAR- γ 의 발현은 TGF- β 에 의한 섬유모세포에서 증가되고 그 결과 리간드(ligand)의 항섬유화 효과를 감작할 수 있게 한다. 즉, PPAR- γ 의 활성화는 항섬유화 효과를 보인다⁽⁶⁵⁾. 이를 바탕으로 하여 본 실험에 적용한 결과, PPAR- γ 가 피부두께를 감소시키는 효과를 보였다.

본 실험은 지금까지 다른 실험과는 다른 몇 가지 특징이 있다. 그 중에서도 가장 큰 특징은 지금까지 발표된 실험 논문을 살펴보면 거의 모든 BLM 유도 쥐 모델에서는 매일 1mg/ml의 BLM을 주사하였다. 그러나 본 실험은 매일이 아닌 격일, 즉 월, 수, 금요일에 각각 1mg/ml의 BLM을 주사하였다. 이렇게 주 3회 주사하여도 BLM 유도 쥐 모델을 완성하는 데 성공하였다.

또한, BLM을 주사한 부위가 아니라 주사 부위에서 떨어진 2 군대를 채취하여 여러 가지 약물을 사용하여 피부 두께를 비교 하였다는 점이다. 이로써 국소적인 반응이 아닌 전신적인 면역 반응에 관여한다는 것을 유추할 수 있다.

여러 가지 약물 중, 이미 섬유화를 억제한다고 알려져 있는 Cs, SOD, PPAR- γ 를 피부경화증 쥐 모델에서 효과가 있음을 다시 한 번 실험을 통해 입증하였으며 특히, anti-VEGF가 피부경화증 쥐 모델에서 효과가 있을 가능성을 처음으로 제시하여 향후 SSc의 치료제 개발에 새로운 방향을 제공한 것에 큰 의의가 있다고 하겠다.

V. Conclusion

우리는 반복된 BLM을 국소 투여함으로써 피부경화증을 일으키는 쥐 모델을 확립하였다. 이러한 결과는 BLM에 의해 유발된 피부경화증이 조직학적 및 생화학적 모두 전신성 경화증과 매우 유사하다는 것을 암시한다.

PBS를 투여한 대조군에 비해 BLM을 투여한 군에서 진피 교원섬유의 증가를 보였고 anti-VEGF, Cs, SOD, PPAR- γ 등이 BLM에 의한 섬유화 반응을 억제하는 효과가 있음을 일부 증명하였다. 본 실험 및 BLM 유도 쥐 모델은 피부경화증의 병인과 치료법을 연구하는데 있어서 기본적인 자료가 되겠다.

Reference

1. LeRoy EC, Trojanowska M, Smith EA: The pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis, SSc). *Clin Exp Rheumatol.* 9:173-177, 1991
2. Denton CP, Black C M: Scleroderma-clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 18:271-290, 2004
3. Roberts, A. B., Sporn, M. B.: The transforming growth factor β s. *In* "Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors" (M. B. Sporn and A. B. Roberts (Eds.). Springer-Verlag, New York, 95:419 - 472, 1990
4. Raghow R., Postlethwaite A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L., Kang, A. H.: Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 79:1285 - 1288, 1987
5. Varga J., Rosenbloom J., Jimenez S. A.: Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. J.* 247:597 - 604, 1987
6. Igotz R. A., Endo T., Massague J.: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 262:6443-6446, 1987
7. Heino J., Igotz R. A., Hemler M. E., Crouse C., Massague J.: Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 264:380 - 388, 1989
8. Igotz R. A., Heino J., Massague J.: Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 264: 389 - 392, 1989
9. Laiho M., Saksela O., Andreasen P. A. Keski-Oja, J.: Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen

- activator in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor beta. *J. Cell Biol.* 103:2403 - 2410, 1986
10. Laiho M., Saksela O., Keski-Oja, J.: Transforming growth factor -beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *J. Biol. Chem.* 262:17467-17474, 1987
 11. Edwards D. R., Murphy G., Reynolds J. J., Whitham S. E., Docherty A. J., Angel P., Heath, J. K.: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO. J.* 6:1899-1904, 1987
 12. Obberghen-Schilling E. V., Roche N. S., Flanders K. C., Sporn M. B., Roberts A. B.: Transforming growth factor β 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* 263: 7741 - 7746, 1988
 13. Zhang Y, Gilliam AC.: Animal models for scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep* 4:150 - 162, 2002
 14. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K.: Animal model of sclerotic skin. I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 112:456 - 462, 1999
 15. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y.: New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot* 19:200 - 209, 1966
 16. Krieg T, Meurer M: Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiological aspects. *J Am Acad Dermatol* 18:457 - 481, 1988
 17. LeRoy EC, Trojanowska M, Smith EA: The pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis, SSc). *Clin Exp Rheumatol* 51:286 - 288, 1992
 18. Piget, P. F., Collart, M.A., Grau, G.E., Kapanci, Y., and Vassalli,P.: Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J. Exp. Med.* 170:655-663, 1989
 19. Kovacs EJ: Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the

- development of scar tissue. *Immunol Today*. 12:17-23, 1991
20. Phan SH, Kunkel SL: Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res*. 18:29-43, 1992
 21. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T: Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 292:556 - 561, 2000
 22. Breen E, Shull S, Burne S, Absher M, Kelley J, Phan S, Cutroneo KR: Bleomycin regulation of transforming growth factor- β mRNA in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Moll Biol* 6:146 - 152, 1992
 23. King SL, Lichtler AC, Rowe DW, Xie R, Long GL, Absher MP, Cutroneo KR: Bleomycin stimulates pro α 1(I) collagen promoter through transforming growth factor- β response element by intracellular and extracellular signaling. *J Biol Chem* 269:13156 - 13161, 1994
 24. Sfrikakis PP, McCune BK, Tsokos M, Aroni K, Vayiopoulos G, Tsokos GC: Immunohistological demonstration of transforming growth factor- β in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 69:199 - 204, 1993
 25. Gay S, Jones RE Jr, Huang G, Gay RE: Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J Invest Dermatol* 92:301 - 303, 1989
 26. Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y: An immunohistochemical study on transforming growth factor- β in the skin of systemic sclerosis patients with reference to the histopathologic stage. *Eur J Dermatol* 6:482 - 485, 1996
 27. Kasturi K, Shibata S, Muryoi T, Bona C: Tight-skin mouse an experimental model for scleroderma. *Int Rev Immunol*. 11:253-271, 1994
 28. Gershwin ME, Abplanalp H, Castle JJ: Characterization of spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *J Exp Med*. 153:1640-1659, 1981

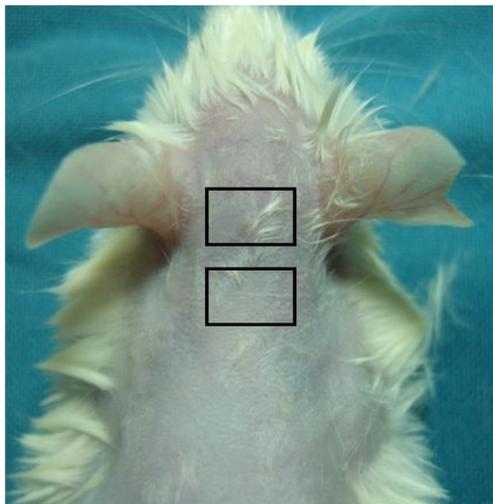
29. Van de Water J, Gershwin ME, Abplanalp H, Wick G, von der Mark K: Serial observations and definitions of mononuclear cell infiltrates in avian scleroderma, an inherited disease of chickens. *Arthritis Rheum* 27:807-815, 1984
30. Van de Water J, Gershwin ME: Avian scleroderma: an inherited fibrotic disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis. *Am J Pathol* 120:478, 1985
31. Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, Clark RAF: Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* 94:73-76,1985
32. Yamamoto T: Experimental mouse model of scleroderma: induction by bleomycin. In: Lawrence SC, ed. *Animal models of human inflammatory skin diseases.* CRC Press: Boca Raton. 535 - 547, 2004
33. Mountz JD, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F, Pisko E: Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Dermatol* 108:679 - 686, 1983
34. Shibusawa Y, Negishi I, Tabata Y, Ishikawa O: Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of bleomycin-poly(L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology* 47:454 - 457, 2008
35. Distler O, Distler JH, Scheid A *et al.*: Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 95:109-116, 2004
36. Distler JH, Wenger RH, Gassmann M *et al.*: Physiologic response to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:10-23, 2004
37. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli O *et al.*: Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease states and are

- associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 4:R11, 2002
38. Wigley FM, Hummers LK.: Clinical features of systemic sclerosis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS et al. editors. *Rheumatology*. Mosby, MO, USA. 1463-1480, 2003
 39. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ et al.: Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J. Pathol.* 166(3):255-263, 1992
 40. Degiannis D, Seibold JR, Czarnecki M, Raskova J, Raska K.: Soluble interleukin-2 receptors in patients with systemic sclerosis; clinical and laboratory correlation. *Arthritis Rheum.* 33:375-380, 1990
 41. Needelman BW, Wigley FN, Stair RW: Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin- γ levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 35:67-72, 1992
 42. Marder W, McCune WJ: Advances in immunosuppressive therapy. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* 28(4):398-417, 2007
 43. Lohi J, Kahari VM, Keski-Oja J: Cyclosporin A enhances cytokine and phorbol ester-induced fibroblast collagenase expression. *J. Invest. Dermatol.* 102(6):938-944, 1994
 44. Knop J, Bonsmann G: Cyclosporine in the treatment of progressive systemic sclerosis. In: Schindler R, ed. *Cyclosporine in autoimmune diseases*. Berlin: Springer. 199-201, 1985
 45. Appelboom T, Itzowitch D: Cyclosporin in successful control of rapidly progressive scleroderma (letter). *Am J Med* 82:866-867, 1987
 46. Yocum DE, Wilder RL: Cyclosporin A in progressive systemic sclerosis (letter). *AM J Med* 83:369-370, 1987
 47. Frances C, Branchet MC, Bletry O, Lefevre CH, Boisnic S et al.: Skin collagen from scleroderma patients before and after cyclosporin A treatment. *Clin Exp Dermatol* 113:1-3, 1988

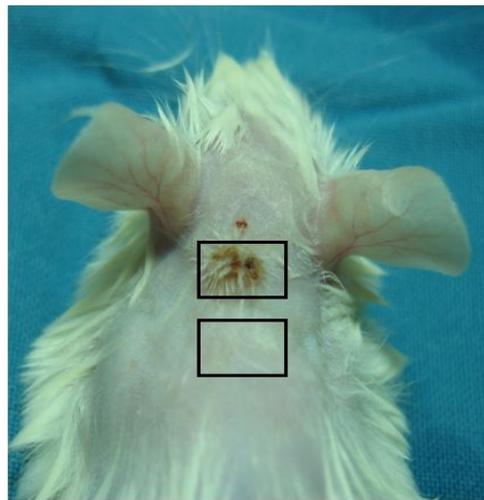
48. Russel ML, Schater RK.: Cyclosporin treatment of scleroderma (PSS). *Arthritis Rheum* 31:551, 1988
49. Zachariae H, Halkier-Sorensen L, Heickendorff L, Zachariae E, Hansen HE: Cyclosporin A treatment of systemic sclerosis. *Rr J Dermatol.* 122:677-681, 1990
50. Gisslinger H, Burghuber OC, Stacher G, Schwarz W, Punzengruber C, Graninger W et al.: Efficacy of cyclosporin A in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 9:383-390, 1991
51. Hakkinen PJ, Whiteley JW, Witschi HR: Hyperoxia, but not thoracic X-irradiation, potentiates bleomycin- and cyclophosphamide-induced lung damage in mice. *Am Rev Respir Dis.* 126:281-297, 1982
52. Frank L: Superoxide dismutase and lung toxicity. *Trend pharmacol Sci* 4:124-136, 1983
53. Oberley LW, Buettner GR: The production of hydroxyl radicals by bleomycin and iron(II). *FEBS Lett* 97:47-49, 1979
54. Ekimoto H, Kuramochi H, Takahashi K, Matsuda A, Umezawa H: Kinetics of the reaction of bleomycin-Fe(II)-O₂ complex with DNA. *J Antibiot (Tokyo).* 33:426-434, 1980
55. Gutteridge JM, Xiao Change F: Protection of iron-catalysed the radical damage to DNA and lipids by copper (II) bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun.* 99:1354-1360, 1981
56. Igarashi R, Hoshino J, Takenaga M et al: Lecithinization of superoxide dismutase potentiates its protective effect against Forssman antiserum -induced elevation in guinea pig airway resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 262:1214-1219, 1992
57. Igarashi R, Hoshino J, Ochiai A, Morizawa Y, Mizushima Y: Lecithinized superoxide dismutase enhances its pharmacologic potency by increasing its cell membrane affinity. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:1672-1677, 1994
58. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Mizushima Y, Nishioka K:

- Effect of superoxide dismutase on bleomycin-induced dermal sclerosis: Implications for the treatment of systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 113:843-847, 1999
59. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W: International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58:726 - 741, 2006
60. Berger J, Moller DE: The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 53:409-435, 2002
61. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W: From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res. Epub.* 45:120-159, 2006
62. Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B: Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control. *J Soc Biol.* 196:47-52, 2002
63. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, Chen SJ, Mori Y, Varga J: Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* 50:1305-1318, 2004

Figure 1. Back skin of mice

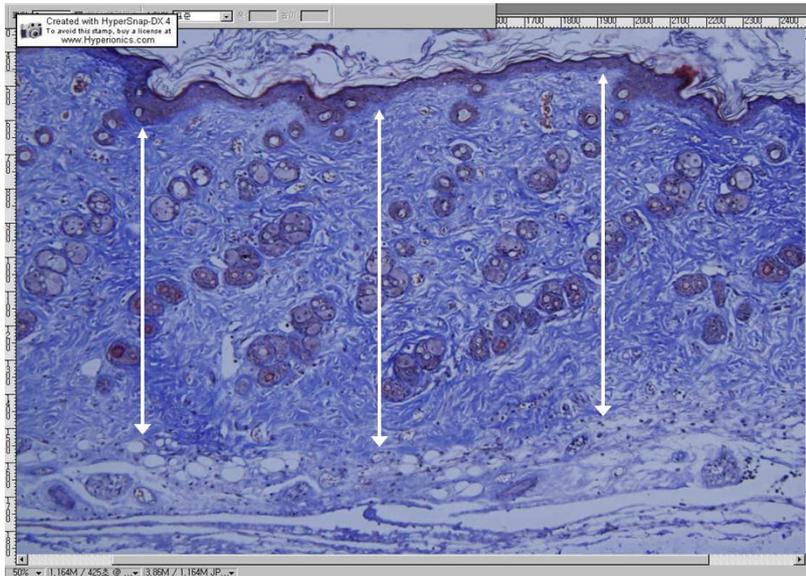


(A) Phosphate buffered saline injected control mice



(B) Bleomycin injected mice

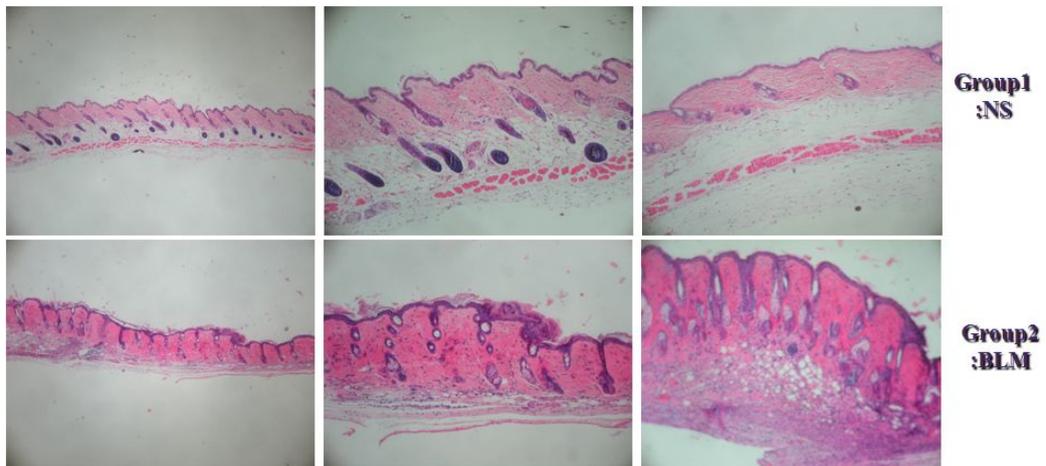
Figure 2. Explanation about dermal thickness measurement



In order to differentiate between dermal thickness and inflammatory cell, toluidine blue (pH 7.0) stain is performed.

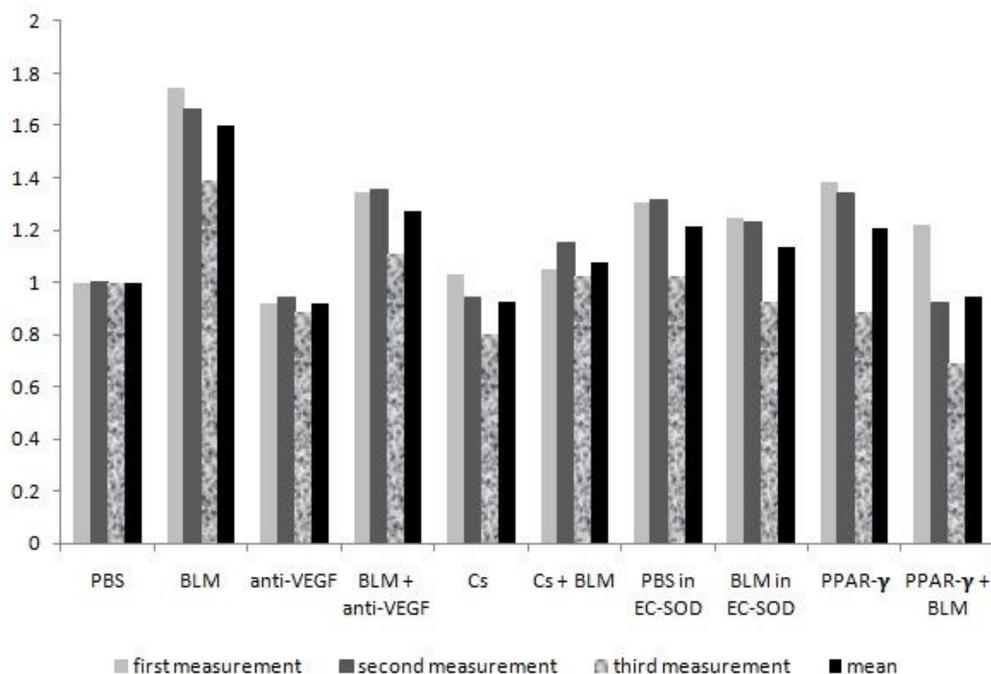
Dermal thickness is measured repeatedly. Having captured one picture, we showed dermal thickness as the mean value of check over three times like the arrows in the picture above.

Figure 3. Photomicrographs of Group 1 VS. Group 2
(Phosphate buffered saline VS. Bleomycin)



Upper figures are photomicrographs of skin of phosphate buffered saline injected control mice. Lower figures are photomicrographs of skin of bleomycin injected mice. Left figures are figure of one hundredfold magnification and middle figures are figure of two hundredfold magnification and right figures are four hundredfold magnification.

Figure 4. Comparison of dermal thickness between Group 1-10



(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

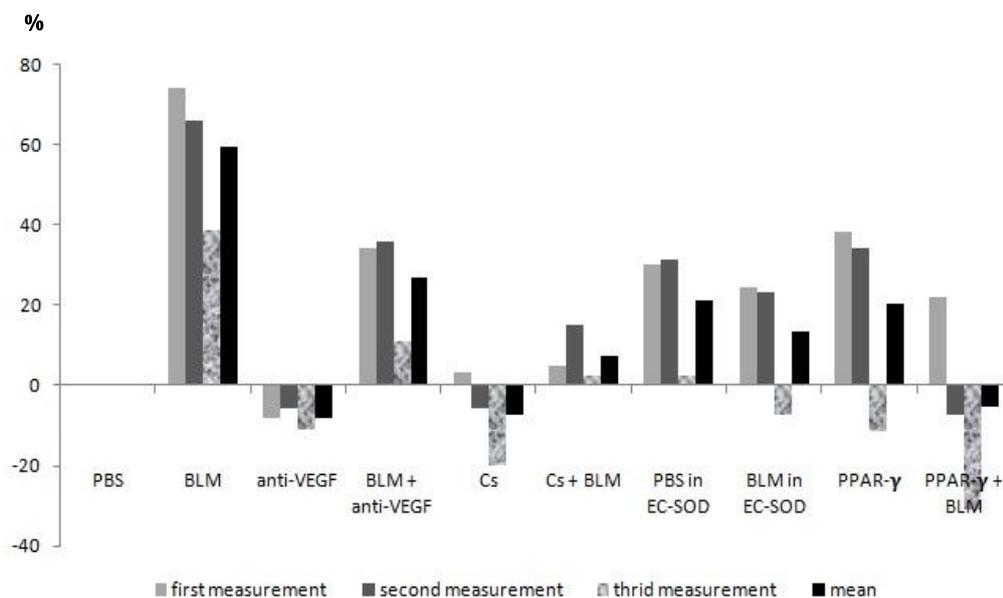
anti-VEGF : anti-Vascular Endothelial Growth Factor

Cs : Cyclosporine

EC-SOD : Extracellular-superoxide dismutase

PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor- γ

Figure 5. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group)



(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

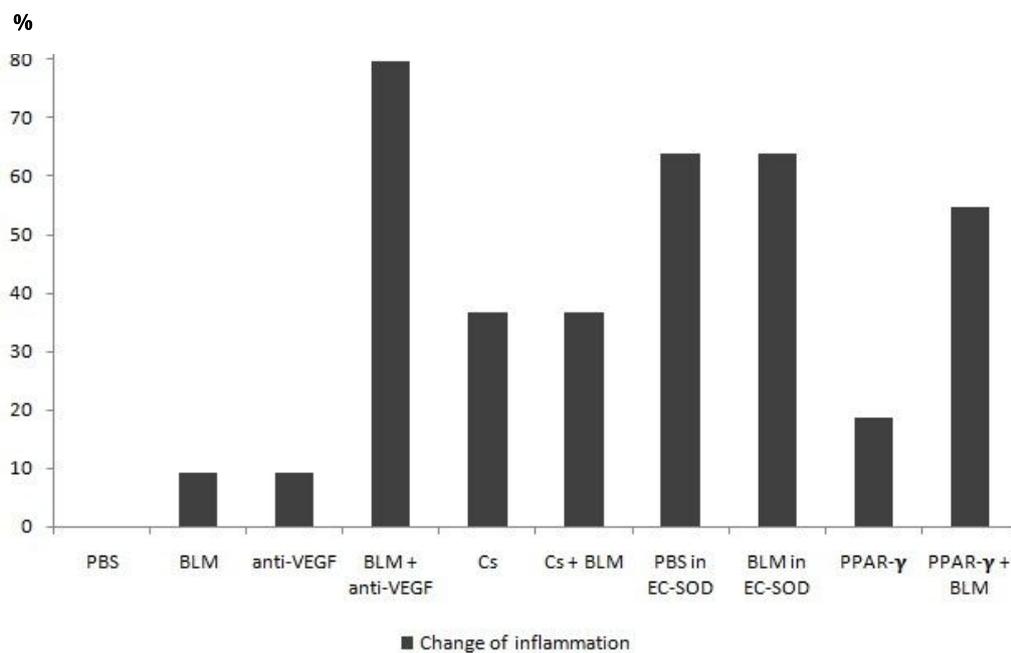
anti-VEGF : anti-Vascular Endothelial Growth Factor

Cs : Cyclosporine

EC-SOD : Extracellular-superoxide dismutase

PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor- γ

Figure 6. Inflammation compared with control mice (saline treatment group)



(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

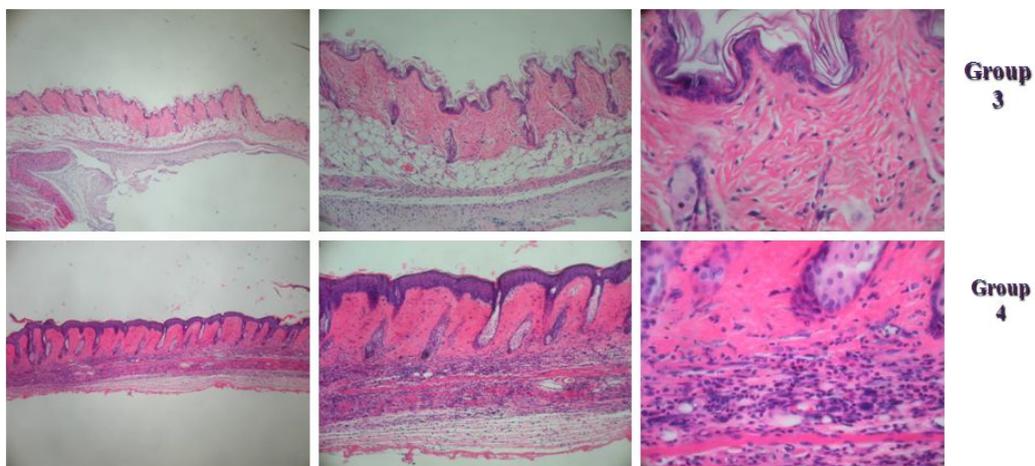
anti-VEGF : anti-Vascular Endothelial Growth Factor

Cs : Cyclosporine

EC-SOD : Extracellular-superoxide dismutase

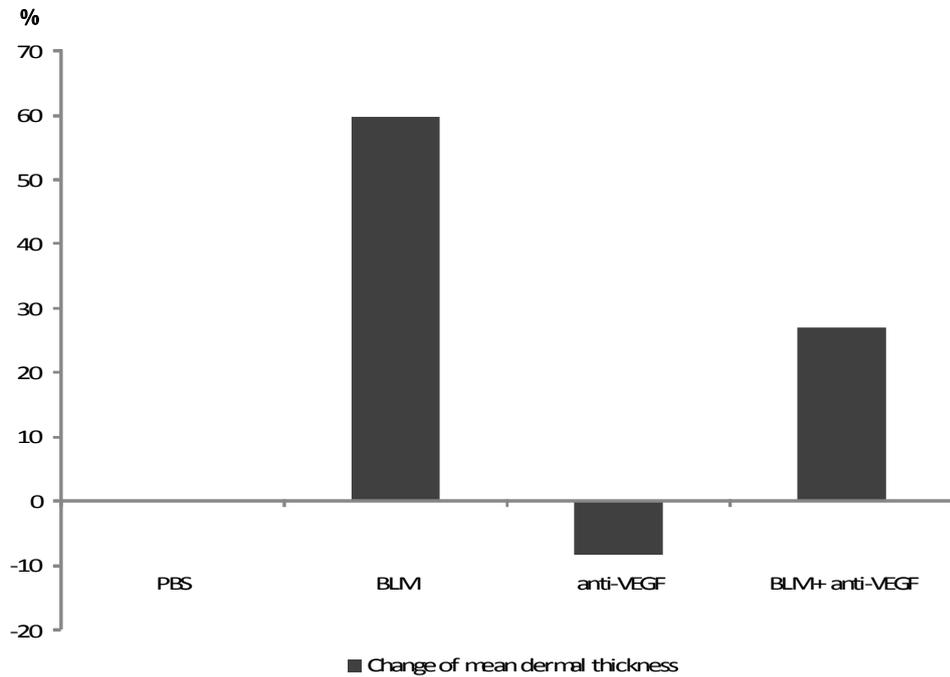
PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor- γ

Figure 7. Photomicrographs of Group 3 VS. Group 4
(Anti-vascular endothelial growth factor VS.
Bleomycin + Anti-vascular endothelial growth factor)



Upper figures are photomicrographs of skin of Anti-vascular endothelial growth factor injected mice. Lower figures are photomicrographs of skin of bleomycin + Anti-vascular endothelial growth factor injected mice. Left figures are figure of one hundredfold magnification and middle figures are figure of two hundredfold magnification and right figures are four hundredfold magnification.

Figure 8. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,3,4)



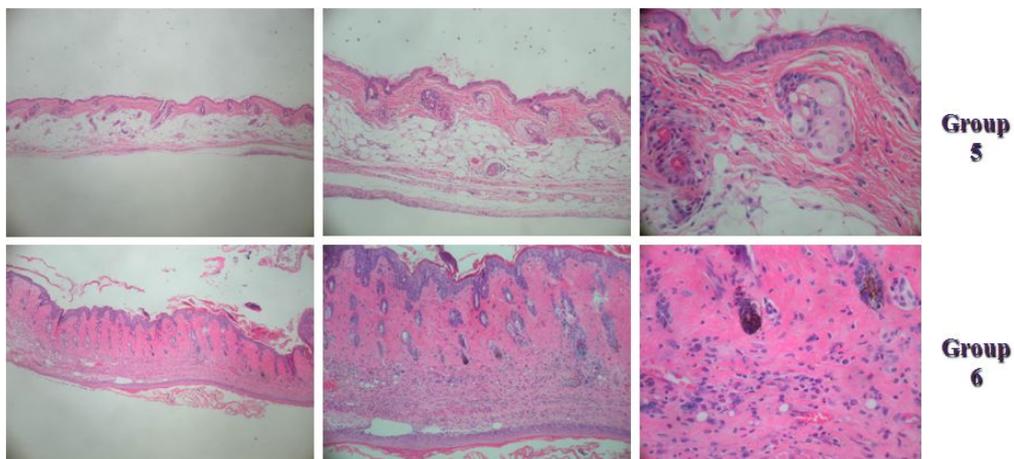
(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

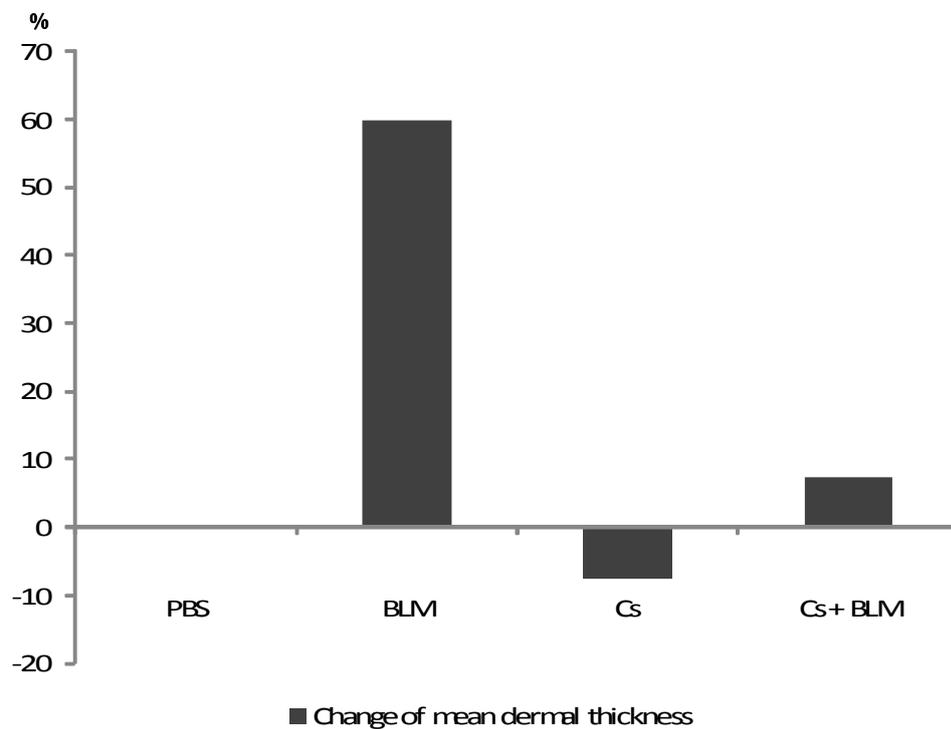
anti-VEGF : anti-Vascular Endothelial Growth Factor

Figure 9. Photomicrographs of Group 5 VS. Group 6
(Cyclosporine VS. Cyclosporine + Bleomycin)



Upper figures are photomicrographs of skin of cyclosporine injected mice. Lower figures are photomicrographs of skin of bleomycin + cyclosporine injected mice. Left figures are figure of one hundredfold magnification and middle figures are figure of two hundredfold magnification and right figures are four hundredfold magnification.

Figure 10. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,5,6)



(Abbreviation)

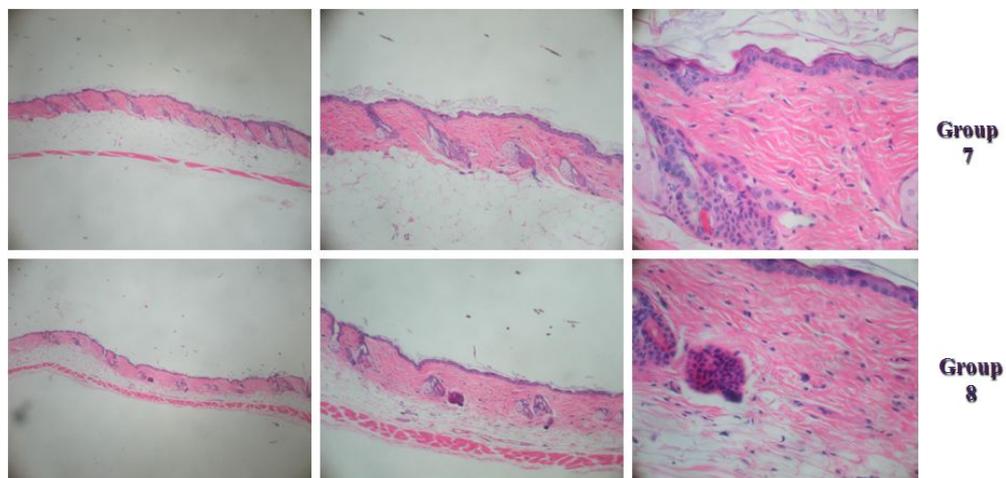
PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

Cs : Cyclosporine

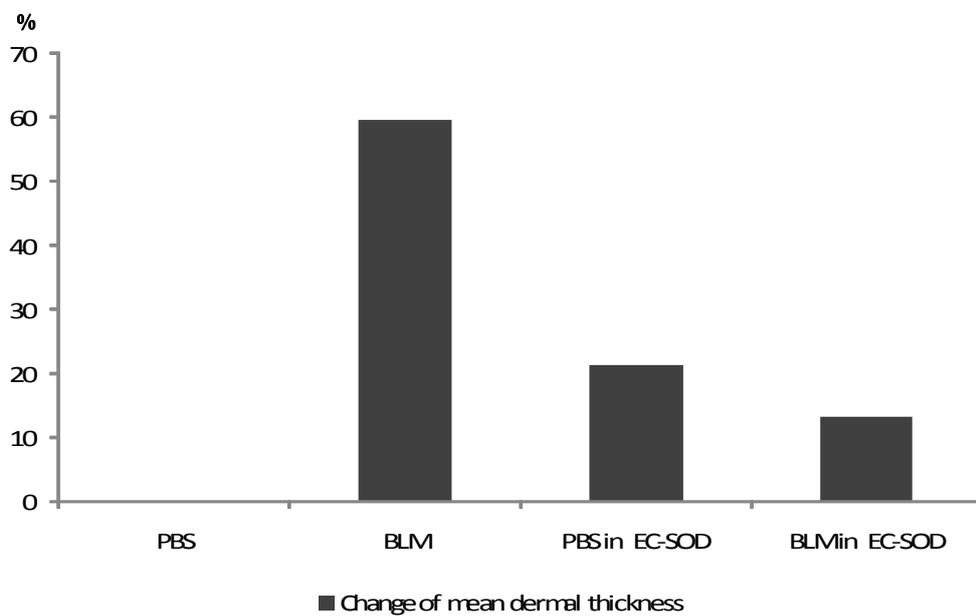
Figure 11. Photomicrographs of Group 7 VS. Group 8

(Phosphate buffered saline in extracellular-superoxide dismutase VS.
Bleomycin in extracellular-superoxide dismutase)



Upper figures are photomicrographs of skin of phosphate buffered saline in extracellular-superoxide dismutase injected mice. Lower figures are photomicrographs of skin of bleomycin in extracellular-superoxide dismutase injected mice. Left figures are figure of one hundredfold magnification and middle figures are figure of two hundredfold magnification and right figures are four hundredfold magnification.

Figure 12. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,7,8)



(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

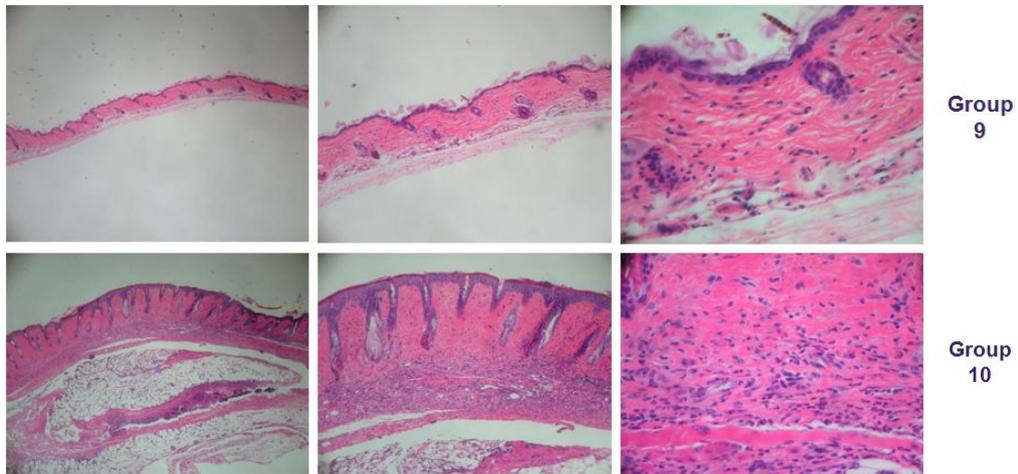
BLM : Bleomycin

EC-SOD : Extracellular-superoxide dismutase

Figure 13. Photomicrographs of Group 9 VS. Group 10

(Peroxisome proliferator activated receptor- γ VS.

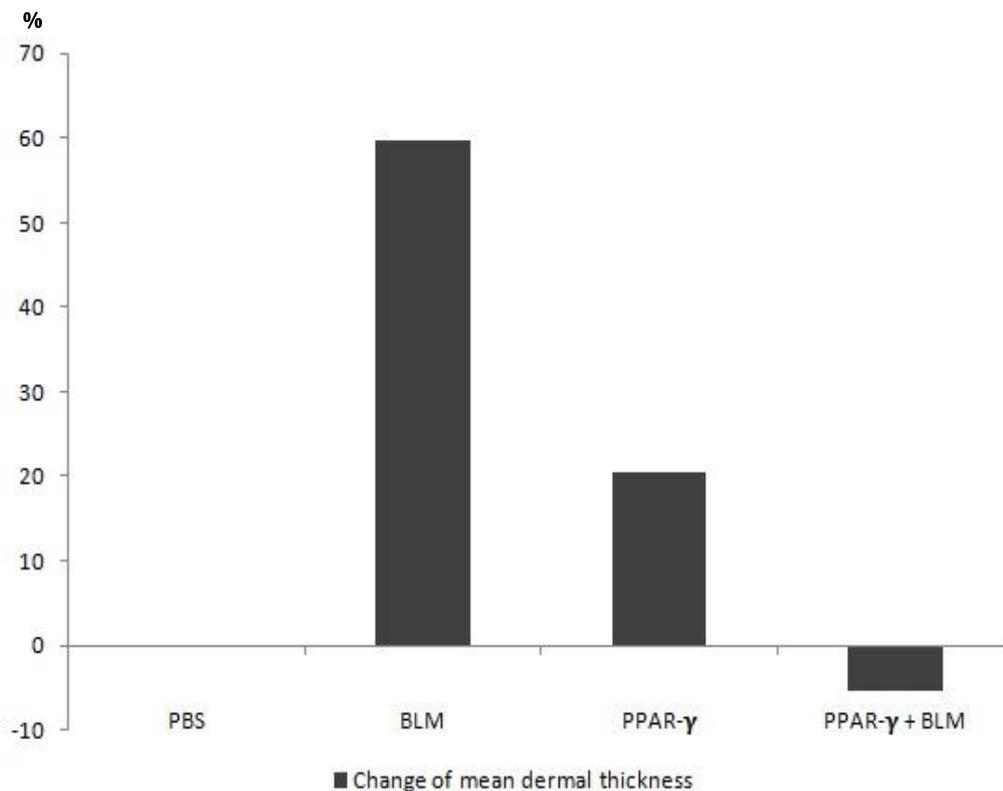
Peroxisome proliferator activated receptor- γ + Bleomycin)



Upper figures are photomicrographs of skin of peroxisome proliferator activated receptor- γ injected mice. Lower figures are photomicrographs of skin of peroxisome proliferator activated receptor- γ + bleomycin injected mice.

Left figures are figure of one hundredfold magnification and middle figures are figure of two hundredfold magnification and right figures are four hundredfold magnification.

Figure 14. Dermal thickness compared with control mice (saline treatment group) (Group 1,2,9,10)



(Abbreviation)

PBS : Phosphate buffered saline

BLM : Bleomycin

PPAR- γ : Peroxisome proliferator activated receptor- γ