creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263551

2013年 2月

박사학위논문

Prostaglandin E_2 불활성화 효소인 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase 억제제의 창상치유효과

조선대학교 대학원

의학과

서 승 용

Prostaglandin E_2 불활성화 효소인 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase 억제제의 창상치유효과

Effect of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitor on wound healing

2013年 2月 25日

조선대학교 대학원

의학과

서 승 용

Prostaglandin E_2 불활성화 효소인 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase 억제제의 창상치유효과

指導敎授　임 성 철, 문 영 래

이 論文을 醫學博士 學位 請求論文으로
提出함

2012년 10월

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

醫 學 科

서 승 용

서 승 용의 博士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 敎授 최 철 희 印

委 員 朝鮮大學校 敎授 조 훈 印

委 員 朝鮮大學校 敎授 한 송 이 印

委 員 朝鮮大學校 敎授 소 금 영 印

委 員 朝鮮大學校 敎授 임 성 철 印

2012 年 12 月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

목 차 i

그 림 목 차 iii

표 목 차 v

초 록 vi

제 1 장 서 론 1

제 2 장 실험 방법 5

2.1 동물 모델 제작 5

2.1.1 약물제작 및 투약 5

2.1.2 실험 방법 6

2.2 조직학적 평가 6

2.3 분자생물학적 평가 7

2.4 통계학적 분석 10

제 3 장 결과 ····· 11

3.1 육안적 평가 ····· 11

3.2 조직학적 평가(H&E stain) ····· 12

3.3 조직학적 평가(Masson's trichrome stain) ····· 14

3.4 분자생물학적 평가 ····· 15

제 4 장 토론 ····· 23

제 5 장 결론 ····· 29

참 고 문 헌 ····· 30

LIST OF FIGURES

Figure 1. Chemical structure of prostaglandin E_2 1

Figure 2. Biosynthesis of prostaglandins 2

Figure 3. Summary of the chemical structures involved in the transformations of PGE_2 in to its major urinary metabolite 3

Figure 4. A stereoview of 3D structure of 15-PGDH-NAD^+-PGE_2 complex. The green molecular is substrate PGE_2, the red molecular is cofactor NAD^+ 4

Figure 5. Structure of the 5-(2-chloro-3-(3-phenylpropoxy) benzylidene) thiazolidine-2,4-dione (TD88) 6

Figure 6. Gross findings of the control group and TD88-treated group at two days after treatment 11

Figure 7. Gross findings of the control group and TD88-treated group at four days after treatment. 12

Figure 8. Microscopic findings of the control group and TD88-treated group at four days after treatment. 13

Figure 9. Microscopic findings of the dermal defect site in the control group and TD88-treated group at four days after treatment. 15

Figure 10. qPCR analysis for PDGF-D at four days after treatment ····· 16

Figure 11. Comparison of qPCR data for PDGF-D at two and four days after treatment between control and treated groups ····· 17

Figure 12. qPCR analysis for CTGF at four days after treatment ····· 18

Figure 13. Comparison of qPCR data for CTGF at two and four days after treatment between control and treated groups ····· 19

Figure 14. qPCR analysis for TIMP-2 at four days after treatment ····· 20

Figure 15. Comparison of qPCR data for TIMP-2 at two and four days after treatment between control and treated groups ····· 21

Figure 16. qPCR analysis for type IV collagen at four days after treatment ····· 21

Figure 17. Comparison of qPCR data for type IV collagen at two and four days after treatment between control and treated groups ····· 22

LIST OF TABLES

Table 1. Primers for real-time PCR.....9

Table 2. Histomorphometric analysis for reepithelialization rate after treatment 14

Table 3. Statistical data for PDGF-D obtained by qPCR analysis 17

Table 4. Statistical data for CTGF obtained by qPCR analysis ··· 18

Table 5. Statistical data for VEGF obtained by qPCR analysis ··· 19

Table 6. Statistical data for TIMP-2 obtained by qPCR analysis ··· 20

Table 7. Statistical data for type IV collagen obtained by qPCR analysis 22

ABSTRACT

Effect of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitor on wound healing

Seo Seung-yong
Advisor: Prof. Lim Sung-chul, M.D., Ph.D.
Coadvisor: Prof. Moon Young-rae, M.D., Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Prostaglandin E_2 (PGE_2) is known as an important mediator of various types of wound healing. It is degraded and inactivated by NAD^+-dependent 15-hydroxyprostagaladin dehydrogenase (15-PGDH). Thus, inhibitors of 15-PGDH will be valuable for the treatment of diseases requiring elevated PGE_2. The inflammatory process has direct effects on wound healing. Hypertrophic scar formation is an aberrant form of wound healing and is an indication of an exaggerated function of fibroblasts and excess accumulation of extracellular matrix during wound healing. Various growth factors including TGF-β, PDGF-D, VEGF, and CTGF, type IV collagen. TIMP-2 and PG E_2 are important mediators of inflammation involving wound healing. Overproduction of TGF-β and suppression of PGE_2 are found in excessive wound scarring compared with normal wound healing. If we make the condition downregulating growth factors and upregulating PGE_2, the

wound will have a positive effect which results in little scar formation after wound healing. 5-(2-chloro-3-(3-phenylpropoxy) benzylidene) thiazolidine-2,4-dione (TD88) is a newly synthesized 15-PGDH inhibitor based on thiazolinedione structure. We evaluated the effect of TD88 on wound healing. In 10 guinea pigs (4 control group and 6 experimental group), we made four 1 cm diameter-sized circular skin defects on each back. TD88 and vehicle were applicated on the wound twice a day for 4 days in the experimental and control groups, respectively. Tissue samples were harvested for quantitative PCR (qPCR) and histomorphometric analyses on the 2nd and 4th day after treatment. Histomorphometric analysis showed significant reepithelization in the experimental group. qPCR analysis showed significant decrease of growth factors (PDGF and CTGF) and TIMP-2, but significant increase of type IV collagen in the experimental group. Taken together TD88 could be a good effector on wound healing, especially in the aspects of downregulating growth factors and upregulating PGE_2 and thereby might play a role in the prevention of excessive scarring. The hypertrophic scar/keloid treatment algorithms that are currently available are likely to be significantly improved in the future by high-quality clinical trials.

Key words: 15-hydroxyprostagaladin dehydrogenase (15-PGDH), Prostaglandin E_2, Wound healing, Growth factor, Scar, Guinea pig, qPCR, Histomorphometry

제 1 장 서 론

창상(wound)은 누구나 신속하고 흉터(scar)없이 치유되기를 바란다. 비록 정상적인 창상치유과정이라 하더라도 염증반응은 필수적으로 수반되며 경우에 따라 감염 등 불량한 창상치유 조건에 의하여 비정상적인 창상치유과정이 발생하기도 한다. 이와 같은 다양한 형태의 창상치유과정에서 섬유모세포(fibroblast)의 증식이 과도하게 조장되면 과다한 양의 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이 생산되게 된다. 섬유모세포에 의해서 만들어지는 과도한 세포외 기질은 교원질(collagen)로 창상의 치유후에도 잔존하여 치유부위가 비후되어 미용상 문제를 야기하는 비후성 상흔(hypertrophic scar)이 형성되거나 심한 경우는 구축이 일어나 운동제한 등 기능적 손상을 초래하기도 한다[1-3].

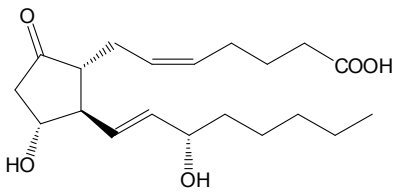

Figure 1. Chemical structure of prostaglandin E_2

정상적인 창상치유과정에 관여하는 염증매개물 중에는 성장인자(growth factor)와 프로스타그란딘(prostaglandin, PG) 같은 사이토카인(cytokine)이 있다. 성장인자는 transforming growth factor-β (TGF-β), vascular endothelial growth factor (VEGF), connective tissue growth factor (CTGF), platelet derived growth factor (PDGF) 등이 주로 창상치유에 관여하며, PG은 PGE_2 (Fig. 1)가 주로 관여하

는 것으로 알려져 있다. 또한 ECM, 특히 기저막을 구성하는 주성분으로 알려진 제4형 교원질(type IV collagen)과 ECM의 일부 구성성분의 분해를 조절하는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)가 창상치유과정에 깊게 관여된다고 알려져 있다[4].

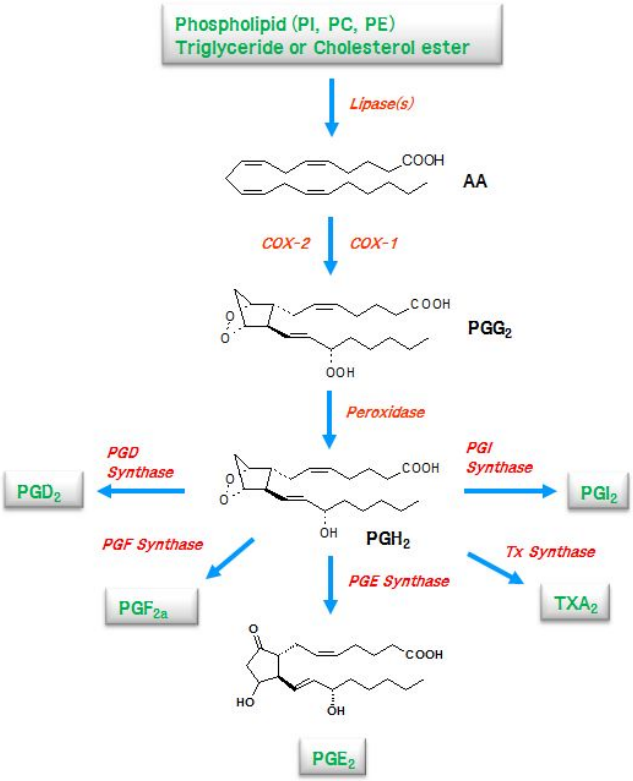

Figure 2. Biosynthesis of prostaglandins.

그런데 과도한 양의 ECM을 만들어 내는 비정상적인 창상치유과정에 앞에 언급된 여러 성장인자와 PGE_2가 큰 역할을 담당하는 것으로 밝혀져 주목을 받고 있다. 즉, 정상적인 창상치유과정에 비하여 성장인자가 과도하고 PGE_2의 형성이 억제될수록 흉터가 심해진다는 사실이

다[4]. 이런 사실은 그동안 창상치유의 일반적인 paradigm으로 통증완화를 위한 비스테로이드소염진통제(NSAIDs)나 cyclooxygenase-2 (COX-2) 차단제를 처방했던 것과 크게 상충되는 사실이다 (Fig. 2). 특히 이들 약제를 창상치유 후기 즉, 세포 증식기(later proliferative phase)에 투여할 경우 $PGE2_2$ 생성을 억제하여 흉터를 더 크게 조장하게 된다[4]. 따라서 최선의 창상치유조건은 성장인자를 줄이고 PGE_2를 높일 수 있는 환경을 조성해 주는 것이다.

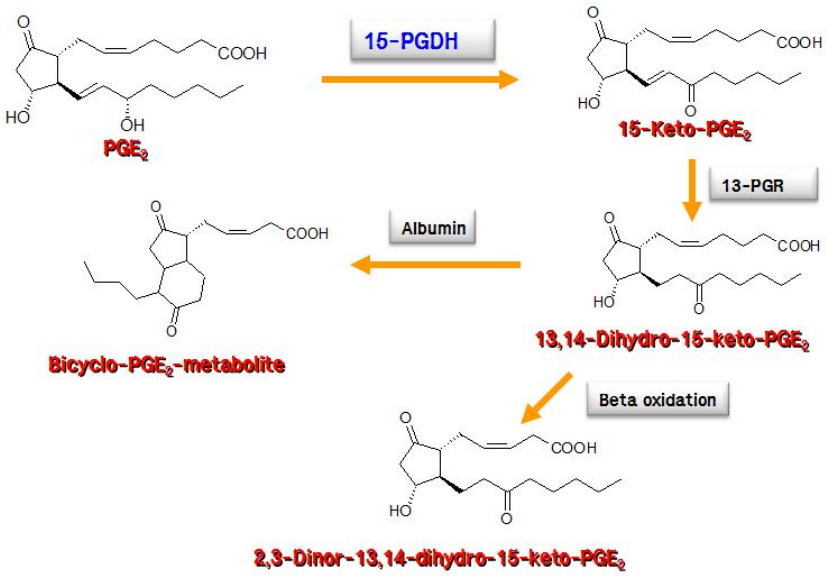

Figure 3. Summary of the chemical structures involved in the transformations of PGE_2 in to its major urinary metabolite.

최근 PG의 대사과정에 관여하는 화합물의 개발로 PGE_2의 농도를 높게 유지 가능한 시도가 계속되고 있는데 이중에서 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) 억제제 (Fig. 3)를 이용하여 PGE_2의 분해를 억제하고 PGE_2의 농도를 높게 유지하는 방법이 있다[5-8]. 15-PGDH는 PGE_2의 분해를 담당하는 효소인데

15-PGDH 억제제는 PGE_2의 분해를 강력하게 억제하여(Fig. 4), PGE_2의 농도를 효과적으로 높일 수 있음을 선행연구를 통하여 확인한 바 있다[5].

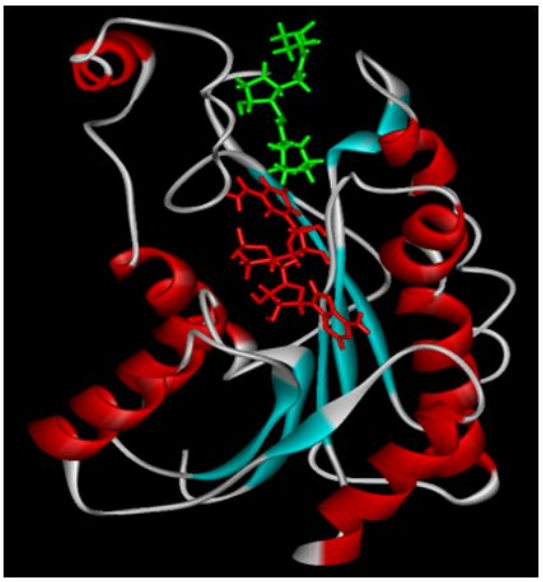

Figure 4. A stereoview of 3D structure of 15-PGDH-NAD^+-PGE_2 complex. The green molecular is substrate PGE_2, the red molecular is cofactor NAD^+.

이에 저자들은 guinea pig을 이용하여 15-PGDH 억제제가 창상치유에 어떠한 효과를 갖고 있는지를 파악하고자 창상치유정도와 창상내 각종 성장인자, 교원질, 교원질 조절인자 등의 변화를 비교하였다.

제 2 장 실험 방법

2.1 동물 모델 제작

실험에 사용된 동물은 10 마리의 guinea pig (250~350g)로 실험효과를 보다 정확하게 확인하기 위해 호르몬 영향을 최소화 할 수 있는 수컷 성체를 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 외상 여부와 질병 상태를 육안으로 판별해 건강한 동물을 선택했으며 환경적인 스트레스 요인을 최소화하기 위해 사육실의 온도는 21～23 ℃를 유지하고 12시간 간격의 명암 전환상태에서 물과 전용사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험동물의 창상 유발을 위해 세보플루란(sevoflurane) 호흡마취제를 사용하여 마취를 시행했으며 등 부위에 있는 털을 제거하고 균일한 크기의 창상을 유발하기 위해 직경 1 cm 크기의 원형 칼날과 칼집으로 구성된 펀치 형태의 도구를 이용해 창상을 유발했다. 창상은 실험동물의 척추를 기준으로 피부를 들어 올리고 원형 도구를 이용해 좌우를 관통시켜 표피 및 진피 층을 제거한 결손 창상을 마리당 4 개씩 유발하였다. 이렇게 창상이 만들어진 guinea pig은 4 마리는 대조군으로, 6 마리는 실험군으로 구분하여 분리하였다.

2.1.1 약물제작 및 투약

본 실험에 사용된 15-PGDH 억제제는 5-(2-chloro-3-(3-phenylpropoxy)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (TD88) (Fig. 5)으로 실험군에는 TD88을 polyethylene glycol에 25 mM이 되게끔 용해시키고 20% Tween 20으로 1:4의 비율로 희석하여 최종 농도가

5mM 되게 하여 사용하고, 대조군에는 polyethylene glycol과 20% Tween 20을 1:4의 비율로 희석한 것을 vehicle로 사용하였다.

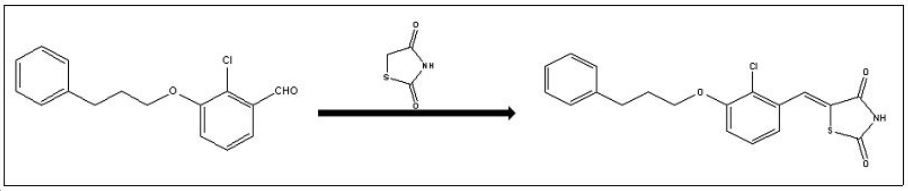

Figure 5. Structure of the 5-(2-chloro-3-(3-phenylpropoxy) benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (TD88)

2.1.2 실험 방법

대조군, 실험군으로 구분된 동물은 지혈과 동시에 창상면에 대조군은 vehicle을, 실험군은 TD88을 혈청분리관에 담아 두 방울씩 점적하고 매 12 시간마다 같은 방법으로 점적하여 만 2 일 및 4 일째 희생될 때까지 계속하였다. 대조군 2 마리, 실험군 3 마리는 만 2 일이 되는 시간에 경부척수를 마비시켜 희생 시킨 후 창상주변의 정상 피부조직을 포함한 4 각형의 피판을 얻었다. 개체별 획득된 피판에 형성된 4개의 원형창상중 1 개를 창상주변을 포함한 직경 약 1.5 cm의 조직을 얻어 신선상태로 deep freezer에 보관하고 나머지 3 개의 창상이 포함된 피판은 핀으로 코르크판에 펴서 포르말린에 고정하였다. 실험 4 일째에도 같은 방법으로 동물을 희생시키고 조직을 획득하였다.

2.2 조직학적 평가

포르말린에 고정된 조직은 12 시간후 수세과정을 거쳐 자동 조직가공기를 이용하여 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 4 ㎛ 두께

로 박절해 H&E 염색과정을 거쳐 현미경 관찰 및 분석을 위한 슬라이드를 제작하였다. 그리고 조직내 교원질 분포를 확인하기 위한 Masson's trichrome 염색을 하였다.

H&E 염색된 조직 슬라이드는 현미경 관측을 통하여 직경 1 cm의 창상면의 회복정도를 평가하는데 이용하였다. 회복정도의 비교는 창상면의 상피재생정도로 비교하였는데 실험조작으로 제거된 표피의 재생정도(reepithelization)를 측정하여 비교하였다.

재생정도 측정은 H&E 슬라이드를 MagnaFire digital camera system (Optronics, Goleta, CA, USA)을 이용해 이미지를 획득하고 Visus Image Analysis System (Image & Microscope Technology, Daejon, Korea)을 이용해 정확한 결손부위 장경을 측정하였다.

창상의 차유율(창상내 상피재생율)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{rate of reepithelialization (\%)} = \frac{\text{total length of reepithelialization}}{\text{length of skin defect}} \times 100$$

또한 창상 수복 부위의 교원질 형성정도를 파악하기 위해 Masson's trichrome 염색을 시행했다. Masson's trichrome 염색은 교원질이 푸른색으로 염색이 되어 그 강도에 따른 차이로 각 그룹별 교원질 형성정도를 비교분석하였다.

2.3 분자생물학적 평가

TD88이 창상수복과정에 관여하는 여러 가지 성장인자, ECM 구성성분 및 이들 분해관련인자에 유익한 변화를 유발하는지를 평가하기 위하여 real-time PCR을 통하여 대조군과 비교분석하였다. 분석대상은 TGF-β, VEGF, CTGF, PDGF-D 등과 같은 성장인자와 ECM 성분인

type IV collagen과 이들 분해에 영향을 미치는 TIMP-2 이며 다음과 같은 방법으로 제작 분석하였다.

Deep freezer에 냉동보관된 조직을 phosphate-buffered saline (PBS)로 헹구어 혈액을 제거한 후 1 ml의 Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 넣고 FastPrep-24 system (MP Biomedicals LLC. USA) 을 이용하여 10초씩 2번에 걸쳐 파쇄하고 신속히 얼음 위에 올려 저온을 유지하였다. 파쇄된 조직에서 total RNA를 분리하고, 2 mg의 total RNA에 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), 5X first strand buffer, RNasin Ribonuclease inhibitor (Takara, Japan), random primers, oligo $(dT)_{20}$, dNTP 그리고 dithiothreitol (DTT)를 혼합하여 Thermal Block (MyGenie96, Bioneer, Korea)에서 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. Cavia porcellus gene 서열의 데이터베이스를 근거로 하여 melting temperature (60°C)와 PCR에 의해 증폭되는 유전자길이가 170 bp 정도가 되는 조건에서 Primer3 software를 이용하여 각 기니피그 유전자에 특이적인 primer를 결정하고 제작하였다. 합성된 cDNA와 제작된 각 primer, 그리고 LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche)를 혼합하고 LightCycler (Roche)를 이용하여 Real-time PCR 반응을 실시하였고, 각각의 샘플은 동일하게 이중으로 실시하였다. Real-time PCR 중합조건은 95°C에서 10 min 반응 후 95°C 15 s, 60°C 5 s, 72°C 6~7 s cycle이 45회 진행되었다. 실험에서 이용된 primers 서열은 Table 1과 같다.

각 유전자에 대한 측정치는 GAPDH로 표준화하였다.

Table 1. Primers for real-time PCR

Gene	Primer	Sequence
CTGF	Sense	5'-CTGTGCAGCATGGATGT-3'
	Antisense	5'-GTGTCTTCCAGT CGATAGG-3'
PDGFD	Sense	5'-CAAGCACCATTATTAGAGGACG
	Antisense	5'-CTTCCAGCAAAGAATAGTATATCTTGAAA-3'
VEGF	Sense	5'-ATCGAGATGCTAGTGGACA-3'
	Antisense	5'-CGCATGATCTGCATGGT-3'
TGF-β	Sense	5'-AGTGGTTGTCCTTTGATGT-3'
(primer 1)	Antisense	5'-CATGAATAGCAGCCAGGT-3'
TGF-β	Sense	5'-CTTTGATGTCACTGGAGTTGT-3'
(primer 2)	Antisense	5'-CATGAATAGCAGCCAGGT-3'
Type IV	Sense	5'-GGGTGATAGAGGTGGCAT-3'
	Antisense	5'-GAACCAGGATTGCCACG-3'
TIMP-2	Sense	5'-GAAGAAGAGCCTGAACCAC-3'
	Antisense	5'-TCTCTTGATGCAGGCGAA-3'
GAPDH	Sense	5'-TGGCGCCGAGTATGTAG-3'
	Antisense	5'-TCTCTTGATGCAGGCGAA-3'

2.4 통계학적 분석

그룹간 비교는 Student t test를 이용하였으며, $P < 0.05$ 의 값을 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

제 3 장 결과

3.1 육안적 평가

선행연구에서 창상 5 일과 7 일의 결과를 비교분석한 결과, 자연치유력이 매우 왕성하여 대조군과 큰 차이를 보이지 않았기 때문에, 본 실험의 경우는 창상 2일과 4일째 소견을 관찰하였다.

창상제작 후 2 일 경과 시점에서 희생된 guinea pig의 경우 육안적 비교로는 TD88 치료군과 대조군간 유의한 차이를 구분할 수 없었고 창상면에 가피가 잘 형성된 모습이었다(Fig. 6).

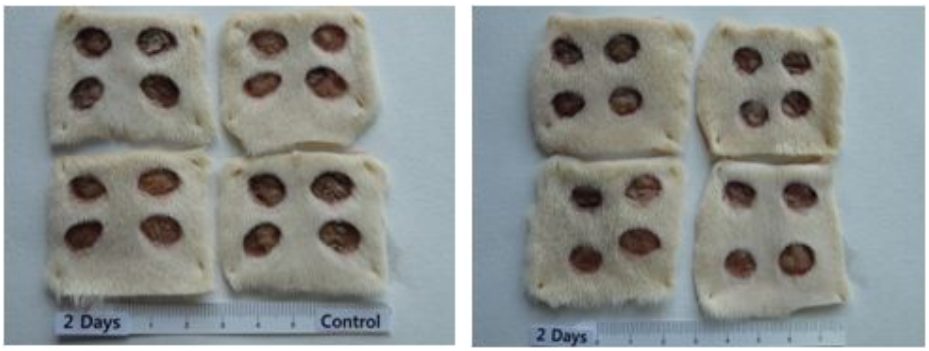

Figure 6. Gross findings of the control group (left) and TD88-treated group (right) at two days after treatment.

창상제작 후 4일 경과 시점에서 희생된 guinea pig의 경우 육안적 비교로는 TD88 치료군과 대조군간 유의한 차이를 구분할 수 없었고 창상면에 가피가 잘 형성된 모습이었다(Fig. 7).

Figure 7. Gross findings of the control group (left) and TD88-treated group (right) at four days after treatment.

3.2 조직학적 평가 (H&E stain)

가. 창상후 2 일

대조군의 상피재생율은 21.2 ± 8.2%인 반면 TD88 치료군은 39.7 ± 11.5%로 TD88 치료군의 상피재생율이 통계적으로 매우 유의하게 높은 소견을 보였다($P < 0.01$). (Table 1)

나. 창상후 4 일

대조군의 상피재생율은 45.4 ± 18.6%인 반면 TD88 치료군은 82.4 ± 25.6%로 TD88 치료군의 상피재생율이 통계적으로 매우 유의하게 높

은 소견을 보였다($P < 0.01$). 또한 치료군에 속한 3 개(33.3%)의 검체는 상피재생율이 100%를 보였다(Fig. 8 및 Table 2).

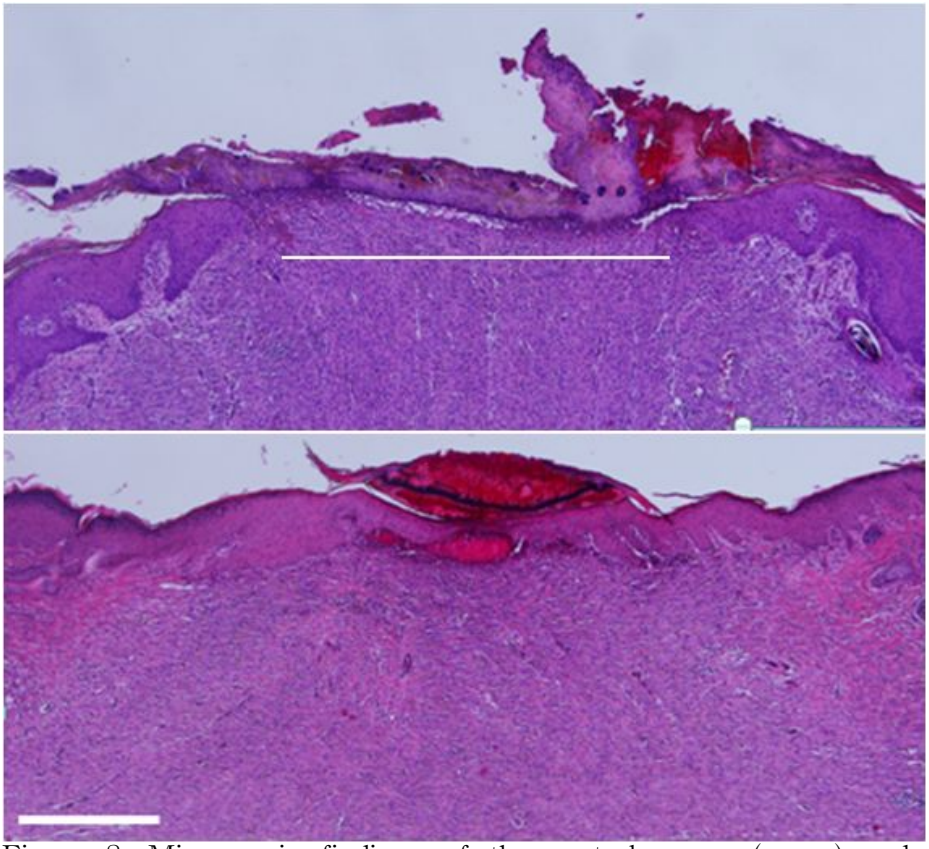

Figure 8. Microscopic findings of the control group (upper) and TD88-treated group (lower) at four days after treatment. Non-epithelialized skin defect (white line) was found in the control group, however complete reepithelialization was identified in the TD 88-treated group. Scale bar (lower) measures 500 μm. H&E stain

Table 2. Histomorphometric analysis for reepithelialization rate after treatment

Duration	Group	Mean ± SD (%)	P value
2 days	Control	21.2 ± 8.2	<0.01
	TD88	39.7 ± 11.5	
4 days	Control	45.4 ± 18.6	<0.01
	TD88	82.4 ± 25.6	

3.3 조직학적 평가 (Masson's trichrome stain)

가. 창상후 2 일

대조군의 진피결손부는 왕성한 섬유모세포의 증식에 의하여 채워져 있으며 신생혈관과 약간의 림프구가 관찰되었다. 섬유모세포 주변으로는 약한 정도의 교원질이 생성되어 있었으나 TD88 치료군과 뚜렷한 차이는 없었다.

나. 창상후 4 일

대조군, TD88 치료군의 진피결손부는 창상후 2 일군에 비교할 때 교원질 형성이 더 증가한 양상을 보였다. TD88 치료군과 대조군의 진피결손부 교원질 형성정도를 비교한 결과 전체적으로 뚜렷한 차이를 식별하기는 어려웠으나 일부 증례의 경우 치료군에서 교원질의 감소가 현저한 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

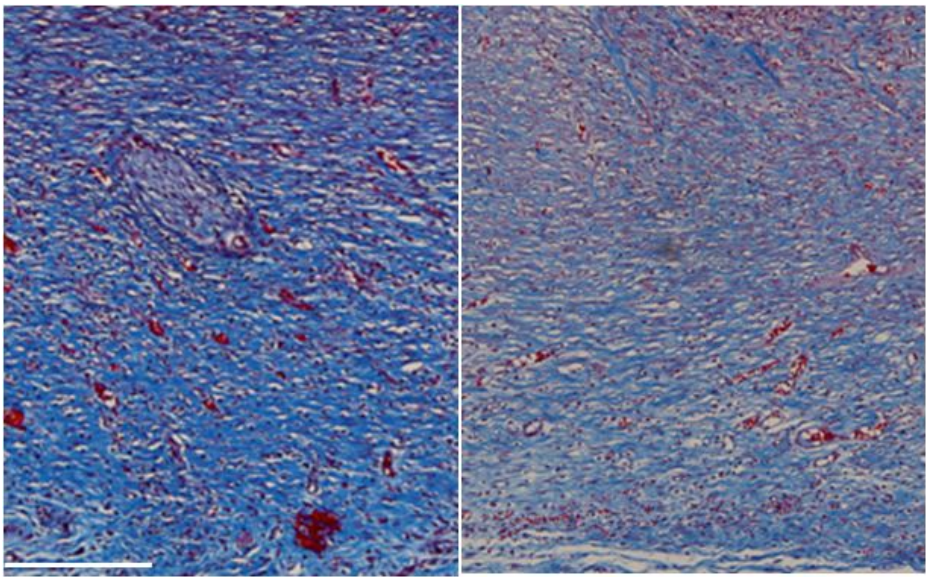

Figure 9. Microscopic findings of the dermal defect site in the control group (left) and TD88-treated group (right) at four days after treatment. Moderate degree of collagen lay-down was identified in the control group, however mild degree of collagen lay-down was noted in the TD88-treated group. Scale bar measures 200 μm. Masson's trichrome stain

3.4 분자생물학적 평가

대조군, TD88 치료군을 대상으로 처치 2 일, 4 일차의 TGF-β, VEGF, CTGF, PDGF-D 등과 같은 성장인자와 ECM 성분인 type IV collagen과 이들 분해에 영향을 미치는 TIMP-2의 변화를 분석하였다. PGE_2는 선행연구를 통하여 대조군에 비하여 TD88 치료군에서 현저히 증가한다는 사실을 확인한 바 있다(unpublished data).

TGF-β의 경우 primer를 제작하여 대조군, TD88 치료군을 대상으로 반복 실험을 하였으나 확인이 불가능하여 또 다른 primer를 제작하여 반복 실험을 하였으나 검출이 안 되었다. 저자들은 해당 인자가 TD88 치료군은 물론 대조군에서도 극소량 존재하여 검출이 안되는 것으로 잠정 결론을 지었다.

PDGF-D는 대조군에 비하여 TD88 치료군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 10, 11 및 Table 3)..

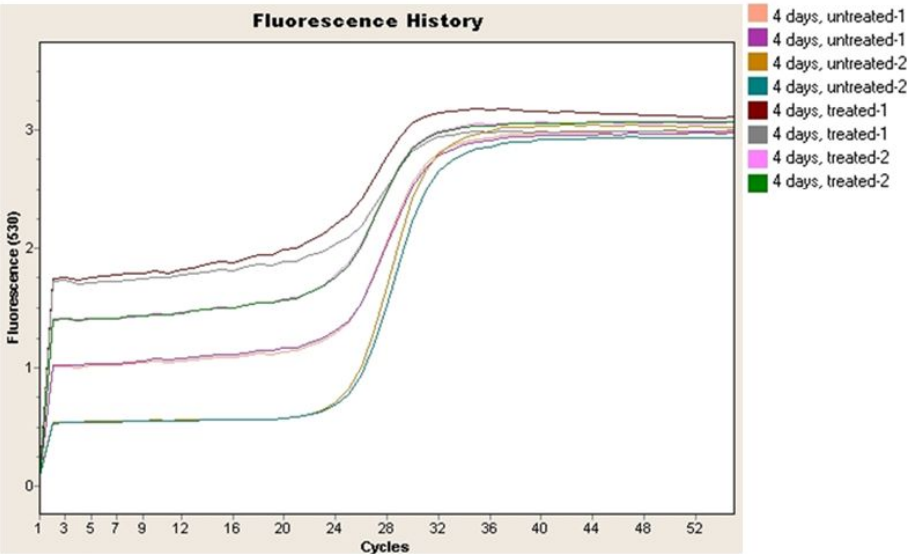

Figure 10. qPCR analysis for PDGF-D at four days after treatment.

Table 3. Statistical data for PDGF-D obtained by qPCR analysis

	control group (mean ± SD, x10^{-2})	treated group (mean ± SD, x10^{-2})	*p* value
2 days	20.5 ± 1.5	21.0 ± 11.4	0.16
4 days	81.5 ± 11.4	14.6 ± 4.7	<0.0001

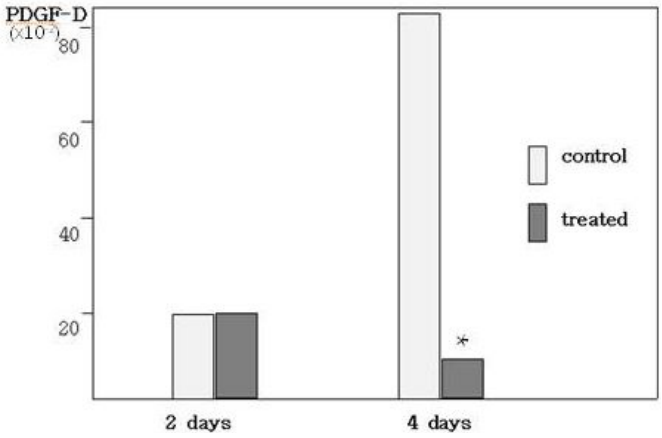

Figure 11. Comparison of qPCR data for PDGF-D at two and four days after treatment between control and treated groups.

*, statistically significant, $p < 0.0001$

그리고, CTGF는 대조군에 비하여 TD88 치료군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 12, 13 및 Table 4).

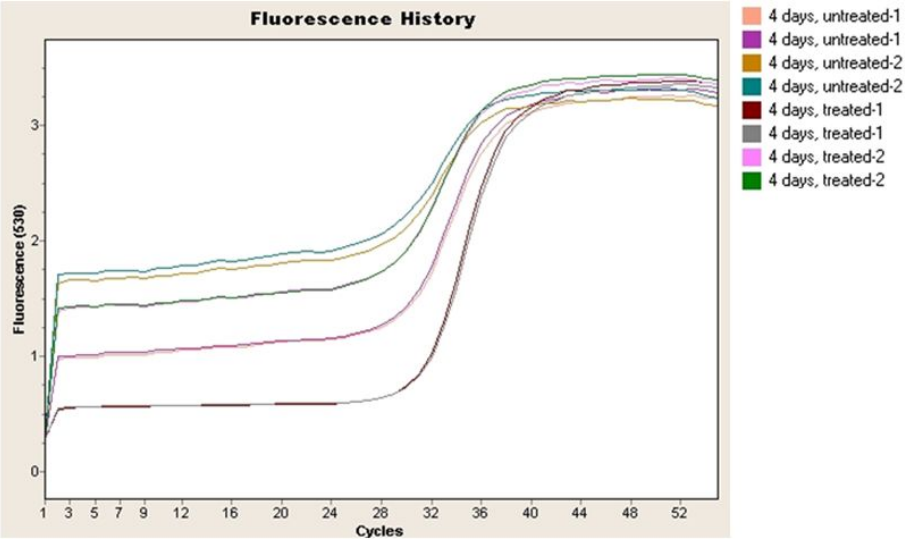

Figure 12. qPCR analysis for CTGF at four days after treatment.

Table 4. Statistical data for CTGF obtained by qPCR analysis

	Control group (mean ± SD, x10^{-3})	Treated group (mean ± SD, x10^{-3})	*p* value
2 days	10.0 ± 3.7	9.99 ± 2.4	0.19
4 days	30.0 ± 10.6	2.23 ± 0.83	< 0.0001

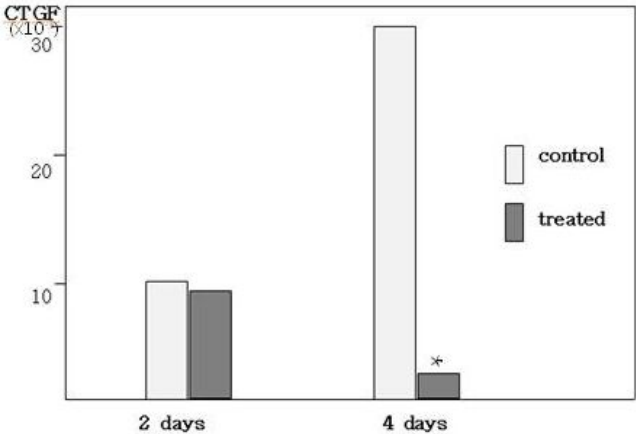

Figure 13. Comparison of qPCR data for CTGF at two and four days after treatment between control and treated groups.

*: statistically significant, $p < 0.0001$

그러나, VEGF는 대조군과 치료군간 유의한 차이가 없었다 (Table 5).

Table 5. Statistical data for VEGF obtained by qPCR analysis

	Control group (mean ± SD, x10^{-4})	Treated group (mean ± SD, x10^{-4})	*p* value
2 days	44.71 ± 37.12	17.26 ± 12.41	0.101
4 days	1.64 ± 2.35	1.11 ± 1.56	0.147

한편, TIMP-2는 대조군에 비하여 치료군에서 유의한 감소가 관찰되었다 (Figure 14, 15 및 Table 6).

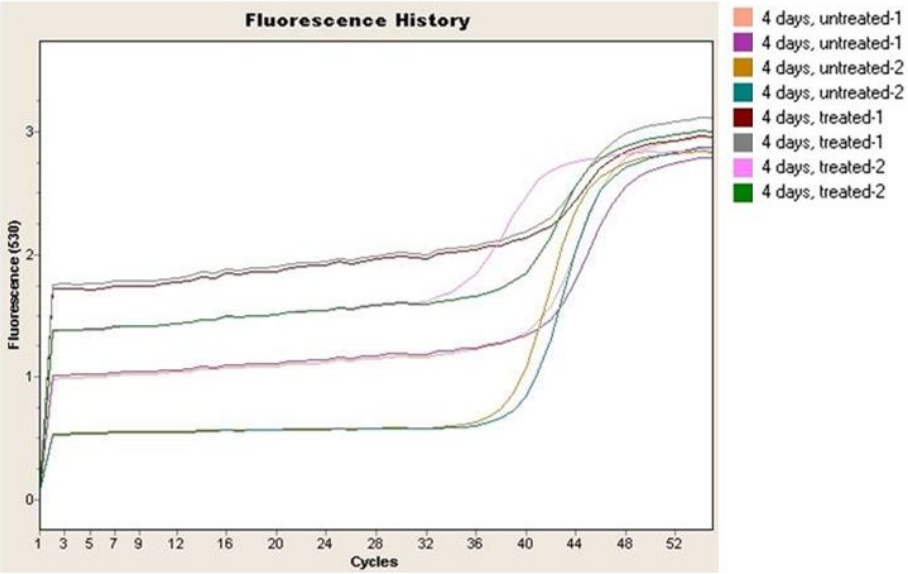

Figure 14. qPCR analysis for TIMP-2 at four days after treatment.

Table 6. Statistical data for TIMP-2 qPCR analysis

	Control group (mean ± SD, x10^{-5})	Treated group (mean ± SD, x10^{-5})	*p* value
2 days	7.53 ± 8.82	4.836 ± 2.50	0.189
4 days	3.11 ± 3.02	1.92 ± 3.19	0.012

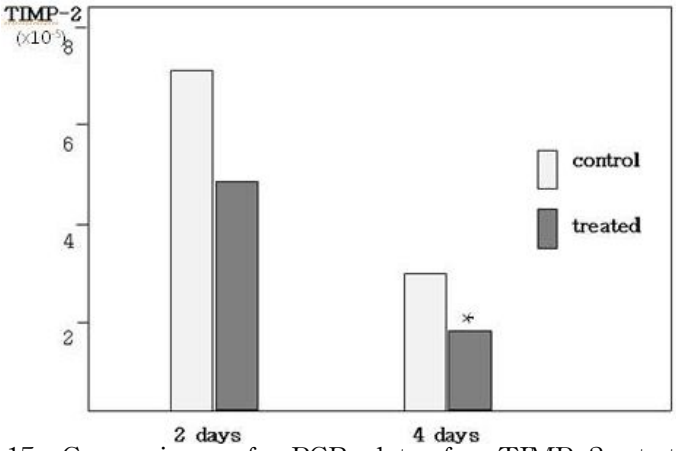

Figure 15. Comparison of qPCR data for TIMP-2 at two and four days after treatment between control and treated groups.

*, statistically significant, $p < 0.05$

또한 Type IV 교원질은 대조군에 비하여 치료군에서 유의한 증가소견이 관찰되었다 (Figure 16, 17 및 Table 7).

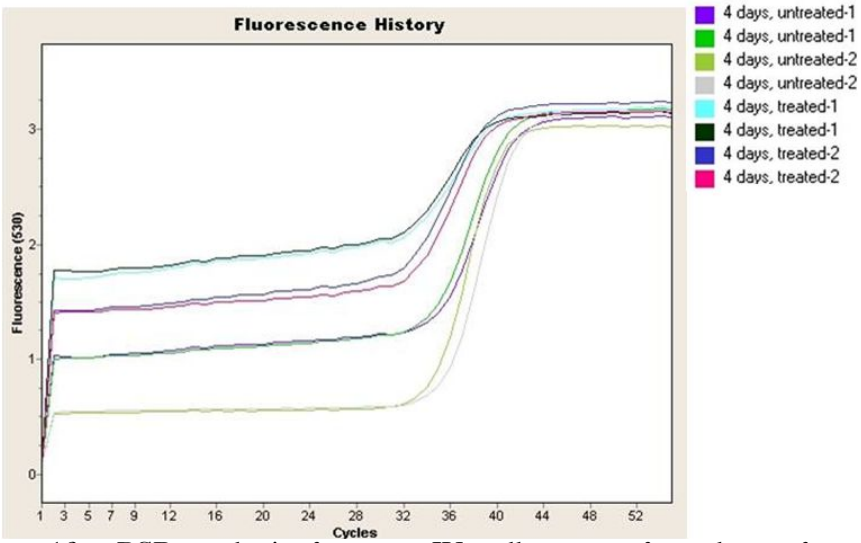

Figure 16. qPCR analysis for type IV collagen at four days after treatment.

Table 7. Statistical data for type IV collagen obtained by qPCR analysis

	Control group (mean ± SD, x10^{-4})	Treated group (mean ± SD, x10^{-4})	*p* value
2 days	4.05 ± 1.38	4.96 ± 1.81	0.067
4 days	1.24 ± 3.18	5.78 ± 2.93	0.006

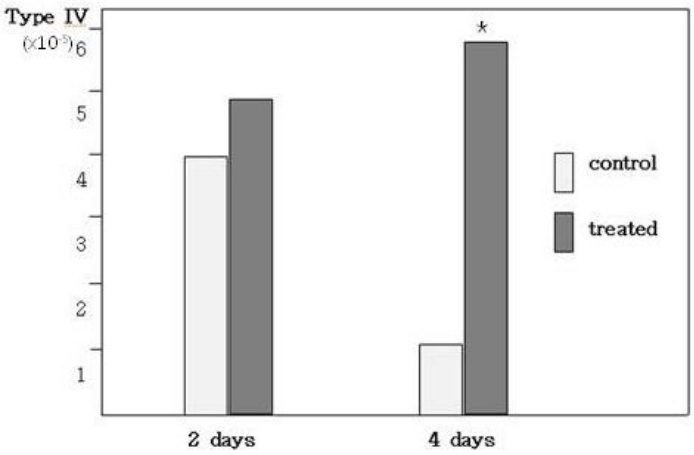

Figure 17. Comparison of qPCR data for type IV collagen at two and four days after treatment between control and treated groups. *, statistically significant, $p < 0.01$.

qPCR 결과를 정리하면 창상부위에 대한 TD88 처치는 guinea pig에서 PDGF-D, CTGF와 TIMP-2를 유의하게 낮추며, type IV collagen은 유의하게 높이지만 VEGF의 변화는 초래하지 않는 것으로 확인되었다.

제 4 장 토 론

피부창상은 여타부위의 경우에 비하여 미용상 문제점 등을 유발하기 때문에 더욱 민감하다. 가장 이상적인 창상치유는 신속하고 흉터없이 재생되는 것인데 창상치유의 과정은 여러 가지 인자와 단계가 관여되는 복합적인 과정이다. 즉, 혈액응고과정, 염증과정, 신생혈관 형성 등이 포함된 육아조직 형성과정, 그리고 ECM의 형성 및 개조(remodeling) 과정 등이 있다. 그리고 창상치유과정에 관여하는 세포는 창상부 섬유모세포 및 결손부 상피(편평상피) 세포, 그리고 염증세포가 있으며 이들은 각각의 세포가 만들어내는 각종 매개물질(mediators)의 작용에 의하여 그 활성 및 작용이 조절되며 특히 섬유모세포 및 상피는 환경에 따른 각종 성장인자 및 cytokine 등에 의하여 재생능력이 결정된다[1].

또한 언급된 여러 조건에 의하여 활성화된 섬유모세포의 작용에 의하여 형성된 ECM은 일차적으로 결손부의 물리적 결손을 복구하고 장력을 회복하며 비계(scaffold) 역할을 담당하여 다른 구조물이 제자리를 잡을 수 있게 도움을 주지만 ECM의 주성분중 하나인 교원질은 치유후 다량이 존재할 경우 관절의 구축을 초래하는 등 기능에 지장을 주거나 흉터로 나타나 미용상 문제를 야기하기도 한다. 창상치유에 필수적인 ECM은 이를 분해하는 여러 형태의 matrix metalloproteinase (MMP)와 이의 대사를 담당하는 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) 등에 의하여 조절되며 개조된다[9,10].

그간의 연구보고 등에 따르면 창상의 치유과정에 발생되는 과도한 흉터는 TGF-β의 과발현과 PGE_2의 억제가 주요인인데 임상적으로도 심한 화상으로 비후성 상흔(hypertrophic scar)이 발생될 우려가 있는 경우 화상부위를 소독한 후 압박붕대를 강하게 감아서 흉터를 최소화

하고자 노력을 한다[11]. 이 경우 환자의 상처부위는 PGE_2가 유의하게 올라가게 되고 그 결과 상처부위의 섬유모세포는 근섬유모세포(myofibroblast)로 전환되는 것이 현저하게 감소하게 된다. 근섬유모세포는 섬유모세포에 비하여 교원질의 생성능력은 물론 조직의 수축에도 관여하여 많은 근섬유모세포가 형성될 경우 조직구축이나 미용상 문제가 되는 흉터발생 가능성이 증가되게 된다[12].

PG는 생체내에서 오래 유지되지 못하고 세포질에 존재하는 15-PGDH라는 효소에 의하여 빠르게 대사되는데 이 효소의 작용을 조절하여 생체내 PG의 농도를 조절하는 시도가 진행중이다[7,8,13]. 즉 15-PGDH 억제제를 투여할 경우 해당부위의 PG 대사가 억제되어 높은 수준의 PG 농도를 유지할 수 있을 것이다.

최근 Wu 등[5]은 TD88을 합성하여 이를 창상부위에 적용할 경우 효과적으로 PGE_2가 상승됨을 확인한 바 있다. 보고에 따르면 TGF-β의 과발현이 섬유화의 핵심역할을 하는 것으로 되어 있는데 연구대상이 비후성 반흔이나 켈로이드(keloid)에 국한된 연구[14,15]라서 일반 상흔의 치유과정에도 동일하게 적용가능한지는 추가적인 확인 검토가 필요하다고 판단된다. 특히 TGF-β는 켈로이드 각질세포(keloid keratinocyte) 및 켈로이드 섬유모세포(keloid fibroblast)에서 높게 발현되고 이는 결과적으로 과도한 섬유화를 일으키고 흉터를 만드는 것으로 파악된다. 더불어 켈로이드 섬유모세포는 정상 섬유모세포에 비하여 PGE_2를 덜 생산하는 것으로 밝혀졌다[16-19]. 본 연구에서는 이미 창상실험을 통하여 TD88이 매우 유의하게 PGE_2를 높이는 것을 확인하였기에 TGF-β의 변화에 초점을 맞춰 real time PCR로 TGF-β을 분석하였다. 하지만 애석하게도 서로 다른 primer를 두 쌍 제작하여 반복 실험을 시도하였으나 대조군은 물론 실험군 모두 TGF-β를 검출할 수 없었다. 저자들은 이와 같은 상황을 실험기법의 문제가 아

닌 TGF-β의 량이 워낙 극미량이어서 검출이 안되는 것으로 결론지었으며, 전술된 내용과 같이 TGF-β가 일반 창상의 치유과정에는 크게 관여하지 않고 비후성 반흔이나 켈로이드와 같은 특수한 상황에 주로 관여하기 때문일 것으로 잠정 결론을 내렸다.

이에 저자들은 추가적으로 창상치유과정에 크게 관여하는 것으로 알려진 다른 인자들의 변화를 확인하기로 하였다. VEGF는 혈관내피세포에 선택적으로 작용하여 강력한 유사분열을 일으키는 물질로 종양 신생혈관형성에 가장 중요하며 강력한 인자로 알려져 있다. VEGF는 endothelial cell mitogen으로 작용하여 신생혈관을 형성하게 되고, 결국은 창상의 재생을 촉진시키게 된다. VEGF는 또한 혈관 투과성을 증가시키는 기능이 있어 세포 외 기질에 부종을 야기하고, 섬유소를 풍부하게 함으로써 신생 혈관의 성장과 분지를 지지하여 ECM의 발달을 돕게 된다[20,21]. 본 연구의 경우 대조군과 TD88 치료군의 VEGF의 유의한 차이는 없었다.

또한 창상치유 과정에서 ECM 형성에 중요한 몫을 담당하기 때문에 흉터형성에 기여할 것으로 기대되는 CTGF와 PDGF-D에 대한 real time PCR 비교분석 결과 TD88 치료군에서 유의한 감소가 관찰되었다. CTGF는 각막(cornea) 대상 실험의 경우 TGF-β_1에 의하여 유도되며 TGF-β_1의 여러 가지 섬유증식 효과를 매개하는 것으로 알려져 있으나 CTGF 생성의 정확한 신호전달체계는 아직 충분히 밝혀진 바 없다[22]. CTGF는 CCN family에 속하는 단백으로 다양한 ECM 구성성분의 합성을 촉진한다[23,24].

PDGF-D는 TGF-β_1 경로에 관여하여 조직의 섬유화를 촉진하고 혈관의 섬유성 경화를 일으켜 동맥경화를 일으킨다. 또한 담관을 결찰하거나 CCl_4에 의한 간독성이 유발될 경우에도 PDGF-D의 상승이 초래되어 간세포의 손상과 섬유화가 초래되는 것으로 보고되어 있다[25].

또한 PDGF-D는 상처부위의 세포밀도를 높이고 대식구(macrophage) 수의 증가를 초래하며, 진피(dermis)의 간질액(interstitial fluid) 압력을 높이고 창상치유과정중 신생혈관형성 과정에서 혈관의 성숙을 일으킨다[26].

본 연구에서 확인된 결과는 TD88 처치로 창상치유 과정에 관여하는 CTGF와 PDGF-D의 감소를 유도하여 흉터의 주 요인이 되는 교원질의 형성을 효과적으로 줄일 수 있을 것으로 판단된다는 점인데 이들과 깊은 관련이 있다고 보고된 TGF-β에 변화가 없는 것으로 미루어 CTGF와 PDGF-D의 감소에 TGF-β 이외의 인자가 관여하였을 가능성이 있다 할 수 있다.

ECM은 여러 가지 단백질과 proteoglycan으로 구성된 복합적 구조물인데 교원질, laminin, fibronectin, tenascin 등이 해당되며 주변조직과 분리시켜 물리적 방어벽(barrier) 역할을 하기도 하고, 세포부착에 물리적으로 중요한 지지체 역할을 담당하며, 세포이동의 토대(substratum)로서 또는 세포간 교신(communication)의 매체(medium) 역할을 담당한다[27]. 이러한 ECM은 퇴화(degradation) 되고 재배열(rearrangement)되는 과정을 겪게 되는데 이 과정에 여러 가지 MMP가 작용한다. 또한 MMP의 효소활성은 특정 MMP와 친화력이 강한 내인성 억제자(endogenous inhibitor)인 TIMP에 의하여 불활성화가 초래된다[28]. 예를 들면 MMP-9은 TIMP-1, MMP-2는 TIMP-2와 결합하여 불활성화가 초래되는데 ECM의 주성분중 하나가 교원질이며 이는 MMP-2의 기질(substrate) 중 하나로 잘 알려져 있다[29].

상피재생에 필수적인 과정중 하나인 가피(crust) 하방으로 각질세포(keratinocyte)가 그들의 갈 길을 헤집고(dissecting) 이동하는데 plasminogen activating system과 함께 MMP가 중요한 역할을 담당한다[29]. 그러나, Frossing 등[30]의 연구에 따르면 MMP-2는 이 과정

에 핵심적이고 필수적인 작용은 담당하지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서 TIMP-2의 변화를 통하여 교원질, 특히 MMP-2의 변화를 예측하는 것은 진피 재생과정에 형성되는 과도한 교원질 축적에 따른 흉터(scar)의 형성 가능성을 가늠하는데 중요한 의미가 있을 것으로 판단되었다.

교원질의 종류는 섬유성 교원질, 기저막 교원질 그리고 기타 교원질로 분류되는데 섬유성 교원질에는 type I, II, III, V, IX가 속하며 세포외 섬유성 구조물에 주로 존재한다. 그러나 기저막 교원질은 type IV가 속하는데 이는 laminin과 판상으로 배열되어 기저막을 주로 구성하게 된다. 상피결손이 초래된 창상부위의 재생에는 기저막의 형성이 필수적이며 기타 교원질에 속하는 type VII도 상피와 진피에서 상피세포와 사이질 세포사이의 부착 섬유구조물을 만들기 때문에 reepithelialization에는 type IV, VII이 필수적이라고 여겨진다[31].

본 실험의 경우 상피재생에 관여하는 ECM의 주성분중 하나인 type IV 교원질이 치료군에서 유의하게 증가한 것은 TD88이 상피재생에 좋은 영향을 미치고 있음을 증명한다 하겠다. 상피 이외, 즉 진피 결손부위의 재생과정에 필수적인 교원질은 대부분 섬유성 교원질로 여겨지는데 이의 형성 및 개조를 조절할 것은 각종 MMP와 TIMP이다. MMP와 TIMP는 양적 균형의 기울기에 따라 역할이 결과에 반영되게 되는데[29], 본 실험의 경우 MMP-2를 직접 측정하지는 않았으나 이의 불활성화에 관여하는 TIMP-2가 TD88 치료군에서 유의하게 감소됨이 확인되었다. 결국 TIMP-2의 유의한 감소는 해당부위의 MMP-2를 유의하게 증가시켜 섬유성 교원질의 개조가 이루어져 결과적으로 흉터의 감소로 이어져 창상치유에 긍정적인 효과로 나타나게 될 것으로 판단된다.

이상의 결과를 토대로 TD88에 의한 효과는 유의한 수준의 PDGF-D

와 CTGF의 감소이나, 상피재생에 필수적인 type IV 교원질은 유의하게 증가하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 진피결손수 수복에 주로 필요한 섬유성 교원질의 개조에 관여하는 MMP를 조절하는 TIMP-2의 유의한 감소는 각종 MMP의 증가를 초래하여 흉터의 원인이 되는 과도한 교원질의 축적을 억제할 것으로 판단된다.

따라서 본 실험에서 관찰된 TD88에 의한 유의한 정도의 상피재생능력과 섬유성 교원질 형성 억제력은 효과적인 PGE_2 상승작용과 CTGF와 PDGF-D와 같은 각종 성장인자의 유의한 감소와 ECM의 개조에 관여하는 TIMP-2 억제효과에 의한 것으로 추정된다. 그러나 15-PGDH 억제제의 정확한 작용기전을 밝히기 위해서는 창상치유과정에 관여할 것으로 판단되는 각종 성장인자, MMP, TIMP 등에 대한 포괄적이고 종합적인 추가분석이 뒤따라야 될 것으로 판단된다.

제 5장 결 론

최선의 창상치료는 흉터 없이 신속하게 재생을 유도하는 것이다. 창상은 또한 그 경중에 따라 동통을 동반하게 되는데 진통제의 선택에 따라 최선의 창상치료에 방해가 초래되는 경우가 발생된다. 전술된 최선의 창상치유는 분자생물학적 관점에서 창상치유과정에 관여하는 여러 가지 성장인자의 증가를 억제하고 PGE_2를 증가시키는 과정이 핵심이다. 이에 저자들은 PGE_2의 분해를 담당하는 15-PGDH의 작용을 조절하여 그 목적을 달성할 수 있다는 가설을 토대로 15-PGDH 억제제로 합성된 TD88의 성능을 확인하고자 본 실험을 시도하였다. 그 결과 TD88을 창상면에 투여할 경우 PDGF-D와 CTGF를 유의한 수준으로 낮추며, 창상부의 회복과정에 섬유모세포로부터 교원질의 형성이 감소되어 창상치유후에 문제가 될 수 있는 흉터의 원인이 되는 교원질의 감소를 유의하게 유도할 수 있다고 판단하였다. 더욱이 TD88 치료는 결손부 창상의 상피재생(reepithelialization)에도 유의한 효과가 있어 최선의 창상치료 목표인 흉터없이 신속하게 창상의 재생을 유도한다는 목적에 어느 정도 부합된다고 판단하였다.

결론적으로 15-PGDH 억제제인 TD88은 창상면에서 각종 성장인자의 효과적인 억제와 함께 상피재생력을 높여 창상치유에 매우 긍정적인 치료제로 사용될 수 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

[1] Clark RA. The molecular and cellular biology of wound repair, 2nd ed. Plenum: NewYork, 1996.

[2] Martin P. Wound healing for perfect skin regeneration. Science, 276; 75 - 81, 1997.

[3] Santoro M.M, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte epithelization during wound healing. Exp Cell Res, 304; 274 - 286, 2005.

[4] Su WH, Cheng MH, Lee WL, Tsou TS, Chang WH, Chen CS, Wang PH. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? Mediators Inflamm 2010; 413238, 2010.

[5] Wu Y, Karna S, Choi CH, Tong M, Tai HH, Na DH, Jang CH, Cho H. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinedione analogues as 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitors. J Med Chem 54; 5260-5264, 2011.

[6] Samuelsson B. Prostaglandin and related factors. J Biol Chem 239; 4097 - 4102, 1964..

[7] Cho H, Tai HH. Thiazolidinediones as a novel class of NAD+-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitors. Arch Biochem Biophys 405; 247 - 251, 2002.

[8] Wu Y, Tai HH, Cho H. Synthesis and SAR of thiazolidinedione derivatives as 15-PGDH inhibitors. Bioorg Med Chem 18; 1428 - 1433, 2010.

[9] Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. PLoS Medicine, vol. 4, no. 9, article e234, 2007.

[10] Butler PD, Longaker MT, Yang GP. Current progress in keloid research and treatment. J Am Coll Surgeons, 206; 731-741, 2008.

[11] Reno F, Grazianetti P, Cannas M. Effects of mechanical compression on hypertrophic scars: prostaglandin E2 release. Burns 27; 215 - 218, 2011.

[12] Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. Am J Respir Cell Mol Biol 29; 537 - 544, 2003.
[13] Samuelsson B. Prostaglandin and related factors. J Biol Chem 239; 4097 - 4102, 1964.
[14] Sato M. Upregulation of the Wnt/β-catenin pathway induced by transforming growth factor-β in hypertrophic scars and keloids. Acta Dermato-Venereologica 86; 300 - 307, 2006.
[15] Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGF-β) and keloid disease. Int J Surg 5; 278 - 85, 2007.
[16] Hsu YC, Hsiao M, Chien YW, Lee WR. Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF-β1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner. Nitric Oxide 16; 258 - 65, 2007.
[17] Xia W, Phan TT, Lim IJ, Longaker MT, YangGP. Differential transcriptional responses of keloid and normal keratinocytes to serum stimulation. J Surg Res 135; 156 - 63, 2006.
[18] Sato M. Upregulation of the Wnt/β-catenin pathway induced by transforming growth factor-β in hypertrophic scars and keloids. Acta Dermato-Venereologica 86; 300 - 307, 2006.
[19] Campaner AB, Ferreira LM, Gragnani A, Bruder JM, Cusick JL, Morgan JR. Upregulation of TGF-β1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. J Invest Derma, 126; 1168 - 1176, 2006.
[20] Senger DR, Van De Water, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor(VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer Metastasis Rev 12: 303-24, 1993
[21] Dameron KM, Olpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1.

Science 265: 1582-4, 1994
[22] Dessein A, Chevillard C, Arnaud V, Hou XY, Hamdoun AA, Dessein H, He H, Abdelmaboud SA, Luo X, Li J, Varoquaux A, Mergani A, Abdelwahed M, Zhou J, Monis A, Pitta MG, Gasmelseed N, Cabantous S, Zhao Y, Prata A, Brandt C, Elwali NE, Argiro L, Li Y. Variants of CTGF are associated with hepatic fibrosis in Chinese, Sudanese, and Brazilians infected with Schistosomes. J Exp Med 206: 2321 - 2328, 2009.
[23] Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. J Cell Physiol 203: 447 - 456, 2005.
[24] Guo F, Carter DE, Leask A. Mechanical tension increases CCN2/CTGF expression and proliferation in gingival fibroblasts via a TGFbeta-dependent mechanism. PLoS One 6: e19756, 2011.
[25] Tuuminen R, Nykänen AI, Krebs R, Soronen J, Pajusola K, Keränen MA, Koskinen PK, Alitalo K, Lemström KB. PDGF-A, -C, and -D but not PDGF-B increase TGF-beta 1 and chronic rejection in rat cardiac allografts. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29; :691-8, 2009.
[26] Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. Blood 104; 3198-204, 2004.
[27] Paulsson M. Basement membrane proteins: Structure, assembly, and cellular interactions. Crit Rev Biochem Mol Biol, 27; 93 - 127, 1992.
[28] Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. Mol Neurobiol 19; 267 - 284, 1999.

[29] Araya J, Maruyama M, Sassa K, Fujita T, Hayashi R, Matsui S, Kashii T, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280; L30 - L38, 2001.
[30] Frossing S, Rønø B, Hald A, Rømer J, Lund LR. Skin wound healing in MMP2-deficient and MMP2 / plasminogen double-deficient mice. Exp Dermatol. 19:e234-40, 2010.
[31] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Tissue renewal, repair, and regeneration. In: Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders Elsevier, 8th edition; 79-110, 2010.

저작물 이용 허락서

학과	의학과	학 번	20107544	과 정	박사
성명	한글: 서승용 한문 : 徐承鏞 영문 : Seo Seung Yong				
주소	전남 순천시 조례동 백연길 100 순천센텀병원				
연락처	E-MAIL : syseo313@hotmail.com				
논문 제목	한글: Prostaglandin E_2 불활성화 효소인 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase 억제제의 창상치유효과 영어: Effect of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitor on wound healing				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 - 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(√) 반대( )

2012 년 12월 29일

저작자: 서 승 용 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하