

## Bleomycin에 의한 경피증 동물모델 유도

한양대학교 의과대학 실험동물실<sup>1</sup>, 한양대학교 류마티즘연구소<sup>2</sup>, 한양대학교병원 병리학과<sup>3</sup>,  
한양대학교 의과대학 내과학교실 류마티스병원 류마티스내과<sup>4</sup>

이상구<sup>1</sup> · 나영인<sup>2</sup> · 장세민<sup>3</sup> · 백승삼<sup>3</sup> · 성윤경<sup>4</sup> · 전재범<sup>4</sup>

= Abstract =

### Induction of Animal Model of Scleroderma with Repeated Injection of Bleomycin

Sang-Koo Lee<sup>1</sup>, Young-In Na<sup>2</sup>, Se Min Jang<sup>3</sup>, Seung Sam Paik<sup>3</sup>,  
Yoon-Kyoung Sung<sup>4</sup>, Jae-Bum Jun<sup>4</sup>

*Center for Laboratory Animal Sciences, College of Medicine<sup>1</sup>, Institute of Rheumatism<sup>2</sup>,  
Hanyang University, Department of Pathology, Hanyang University Medical Center<sup>3</sup>,  
Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Hospital  
for Rheumatic Diseases, Hanyang University<sup>4</sup>, Seoul, Korea*

**Objective:** To induce a mouse model of scleroderma with repeated bleomycin injections for research into human scleroderma at our research laboratory.

**Methods:** The protocol of Yamamoto et al. was replicated to establish the bleomycin-induced mouse model of scleroderma.

**Results:** A mouse model of scleroderma was induced by repeated subcutaneous injections of bleomycin. The dermal thickness increased with homogeneous and thickened collagen bundles. Semiquantitative measurements of dermal fibrosis were prominent in bleomycin-treated mice.

**Conclusion:** A mouse model of scleroderma was induced with repeated injections of bleomycin at our laboratory.

---

**Key Words:** Scleroderma, Animal model, Bleomycin

---

< 접수일 : 2008년 12월 28일, 수정일 : 2009년 4월 14일, 심사통과일 : 2009년 4월 15일 >

※ 통신저자 : 전 재 범

서울시 행당동 17번지

한양대학교 의과대학 류마티스병원 내과학교실

Tel : 02) 2290-9244, Fax : 02) 2298-8231, E-mail : junjb@hanyang.ac.kr

## 서 론

전신성 경화증(경피증)은 다기관 질환으로서, 소혈관의 기능적, 구조적 이상, 피부와 내부 장기의 섬유화, 면역체계 활성화, 그리고 자가 면역성을 특징으로 한다. 전 세계에 걸쳐서 산발적으로 발생하며 아직 정확한 원인은 모르지만 혈관 내피세포의 손상과 혈관의 연축과 같은 미세혈관의 침범이 병인에 아주 중요한 역할을 한다고 여겨진다 (1-3). 이와 같이 경피증은 다양한 질병과정을 나타내므로 이런 질병과정을 모두 포함하는 하나의 동물모델을 개발하는 것은 어렵다. 하지만 이와 같은 현상을 모두 포함하고 있지 않지만 일부 과정을 포함하고 있는 경피증의 동물모델들이 개발되어 왔으며, 이렇게 개발된 각 동물모델의 특징에 대해서는 잘 고찰되어 있다 (4). Bleomycin 유도 마우스모델은 Yamamoto 등에 의해 최근 확립된 모델로 (5) 비록 주사한 부위에 국한한 피부경화증이 유도되지만 여러 가지 특징들이 인간의 전신성 경화증을 연구하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다 (6,7). 따라서 bleomycin 유도 동물모델을 확립하는 것이 향후 경피증의 병인 연구와 치료적 관점에서 중요하다고 판단되어 bleomycin 유도 동물모델을 본 실험실에서 확립하고자 하였다.

## 대상 및 방법

동물 선정 및 bleomycin 처리는 기존의 방법을 그대로 적용하였다 (5). 약술하면 다음과 같다.

### 1. 동물

특정병원체가 없는 6주령의 암컷 C3H/He 쥐를 구입하여 사용하였다((주)코아텍, 평택, 경기). 실험동물의 사육환경은 온도 22±2°C, 상대습도 55±10%, 환기회수 12회/hr, 조명주기 12시간(08:00~20:00)으로 조절하였다. 감마선을 조사한 실험동물용 사료(Purina Rat & Mouse Chow; 바이오피아, 군포, 경기)와 멸균 정제된 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. Bleomycin 처리

Bleomycin (동아제약, 대한민국)을 phosphate-buffer-

ed saline (PBS)으로 희석하여 최종농도가 각각 1 mg/ml, 100 µg/ml로 만들고 0.22 µm 필터를 통해 살균처리 하였다. 쥐의 등쪽을 면도하여 털을 깎아 피부를 노출시킨 후 각 용액 100 µl씩 매일 한차례씩 총 4주간 28번 경피(subcutaneous)로 주사하였다. 대조군은 100 µl의 PBS를 주사하였다. 동물은 각각 대조군 5마리, bleomycin 10 µg/ml군 5마리, 그리고 bleomycin 100 µg/ml군 6마리로 나누어 비교 실험하였다.

### 3. 조직화학적 검사 및 면역조직화학법

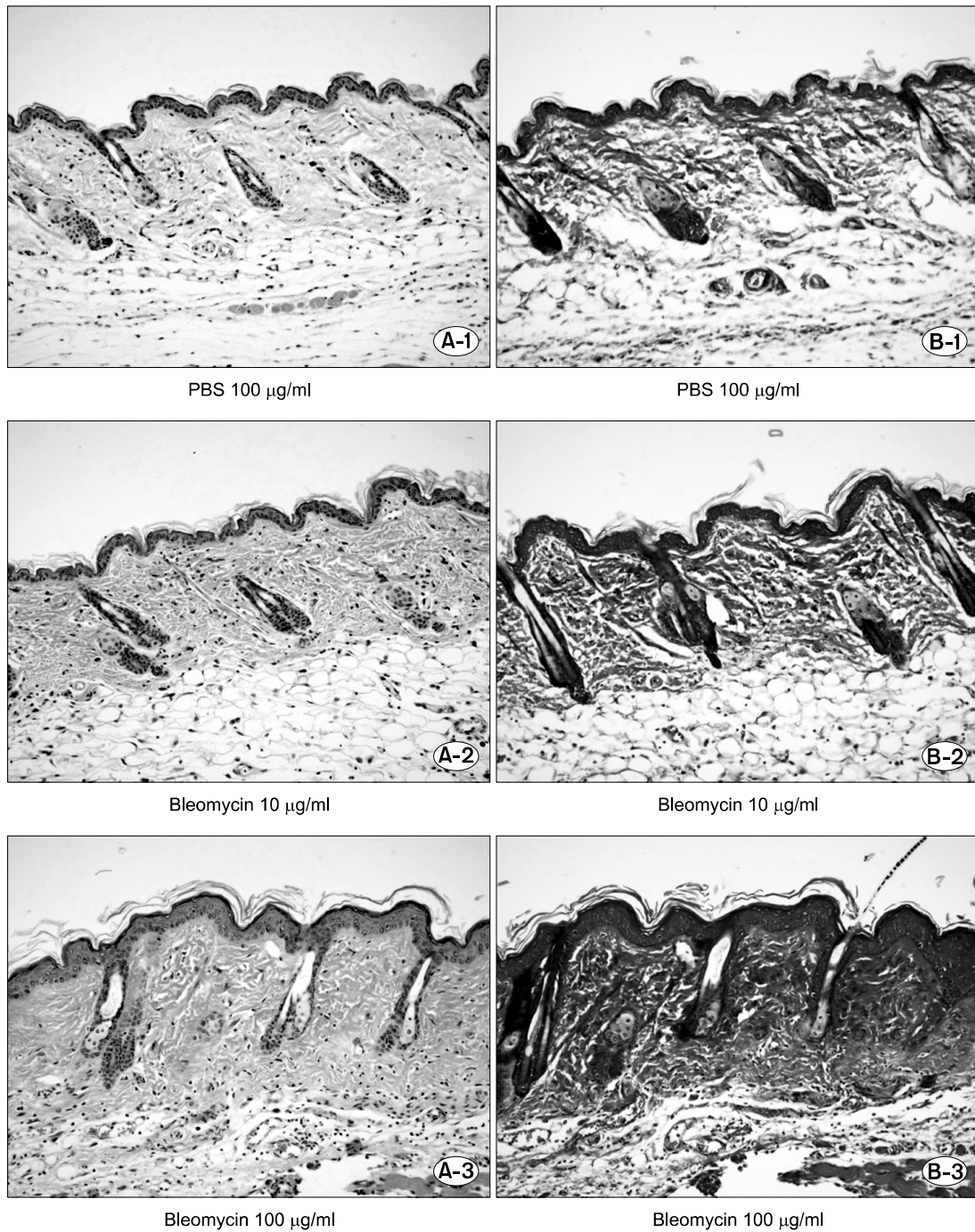
마지막 주사 다음날 쥐를 희생시킨 후 쥐의 등쪽 주사부위의 피부를 절제한 후 10% formalin 용액에 고정시키고 paraffin에 묻어 박절하였다. 진피의 두께는 hematoxylin-eosin (H-E) 염색 후에 사진을 찍고 중간부위 한 곳과 양쪽의 중간부위 각각 한 곳을 측정 한 후 평균을 내어 진피의 두께로 표시하였다. 섬유화의 정도는 섬유조직(fibrous tissue)을 파란색으로 염색시키는 Masson's Trichrome으로 염색한 후 염색의 정도에 따라 0 (없음)부터 +1 (약함), +2 (중등도), +3 (심함), +4 (아주 심함)까지 표시하였다. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)에 대한 염색을 실시한 후 사진을 찍고  $\alpha$ -SMA 양성 섬유모세포의 수를 세었다. 판독은 각 샘플의 소속을 알지 못하는 두 명의 병리의사(SM Jang, SS Park)가 담당하였다.

### 4. 혈청내 TGF- $\beta$ 과 항핵항체

혈청내 TGF- $\beta$ 의 변화와 자가항체의 발현을 측정하고자 쥐를 희생시킬 때 심장혈액을 채취하고, 혈청으로 분리 하여 -80°C에서 보관 하였다. 이후 혈청 내 TGF- $\beta$ 의 발현 수준은 Quantikine TGF- $\beta$ 1 immunosassay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를, 자가항체의 수준은 Anti-Nuclear Antibody Bio-Assay ELISA kit (USBiological, Swampscott, MA, USA)를 이용하여 측정 하였다.

### 5. 통계적 분석

측정 수치는 평균±표준편차로 나타냈다. Bleomycin 투여군의 진피 두께와 섬유화의 정도, 그리고  $\alpha$ -SMA 양성 섬유모세포의 백분율 결과를 one way analysis of variance test (ANOVA)를 통해 각군을 비



**Fig. 1.** Histopathologic comparison of dermal thickness and fibrosis in C3H/He mice. Mice were treated with PBS 100 µg/ml (1), bleomycin 10 µg/ml (2), or bleomycin 100 µg/ml (3) for 28 days (A: H&E stain, B: Masson's Trichrome stain, magnification ×100). There was no dermal sclerosis or fibrosis in the PBS-treated group. However, bleomycin-treated mice showed increase of dermal thickness and fibrosis. The dermis from the bleomycin-treated group was filled with thickened and homogeneous collagen bundles with cellular infiltrates.

교하였다. 혈청내 TGF- $\beta$ 의 발현 정도와 항핵항체의 역가도 같은 방법으로 비교하였다. p-value는 0.05 이하를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 처리는 SPSS (Version 10.0, Chicago, USA)를 이용하였다.

## 결 과

### 1. 피부경화증 유도

Bleomycin를 4주간 경피적으로 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml씩 매일 투여한 모든 C3H/He 쥐에서 진피 경화증이 유도되었다. 대조군과 달리 bleomycin 투여군에서는 두껍고 동일한 콜라겐 다발이 축적되어 진피의 두께가 두꺼워진 경화증을 관찰할 수 있어 경피증 모델이 확립되었음을 확인할 수 있었다.

진피의 두께는 각각 대조군에서  $280.3 \pm 9.7 \mu$ m, bleomycin 10  $\mu$ g/ml 투여군에서  $268.0 \pm 29.4 \mu$ m, 그리고 bleomycin 100  $\mu$ g/ml 투여군에서  $320.1 \pm 31.9 \mu$ m로 측정되어, bleomycin 100  $\mu$ g/ml 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 의미 있게 증가하였다 (그림 1A, 2).

Masson's Trichrome 염색 후에 반정량적으로 측정 한 섬유화의 정도는 PBS투여군에서  $1.4 \pm 0.5$ , bleomycin 10  $\mu$ g/ml 투여군에서  $3.0 \pm 0.7$ , 그리고 bleomycin

100  $\mu$ g/ml 투여군에서  $3.2 \pm 0.4$ 로 측정되어 bleomycin 투여군에서 모두 대조군에 비해 섬유화의 정도가 통계적으로 의미 있게 증가하였다(그림 1B, 3).

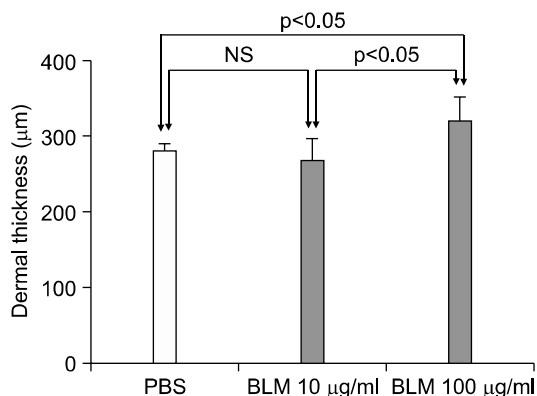
### 2. 혈청 TGF- $\beta$ 와 항핵항체의 발현

혈청 TGF- $\beta$ 와 항핵항체는 bleomycin 투여군과 대조군에서 의미있는 차이를 보이지 않았다(결과 미제시).

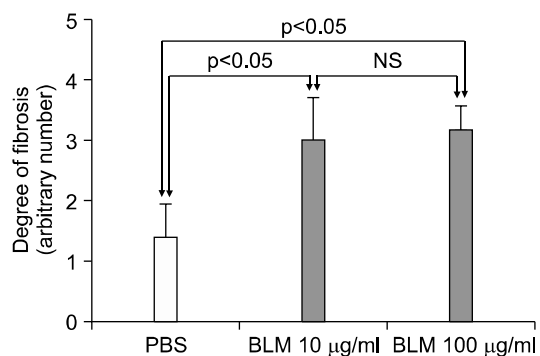
## 고 찰

Bleomycin 유도 동물모델은 이미 잘 확립되어 다양한 연구에 이용되고 있는 모델이지만 (5) 본격적인 경피증 관련 연구를 위해서는 각 실험실에서 이 동물모델이 잘 확립되는지 실험하는 것이 중요하다고 하겠다. 그러므로 저자 등은 경피증의 동물모델을 이용한 새로운 치료제 연구를 위해 기존의 방법으로 동물모델이 잘 확립되는지 확인하고자 연구를 진행하였다.

본 연구에서 비교적 성공적으로 경피증의 동물모델이 확립되었다. 즉, bleomycin 100  $\mu$ g/ml의 주사로 피부 두께가 증가하였고, 10  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml 투여군에서는 모두 섬유화의 정도가 대조군에 비해 크게 증가하였다. 진피에서는 두꺼운 동일한(homogeneous)의 아교섬유(collagen fiber)가 침착되는 것을 확인할 수 있었다. 이상으로 bleomycin의 반복 경피주



**Fig. 2.** Dermal thickness in PBS- or bleomycin-treated mice. H-E stained skin section of mice were evaluated by two pathologists blinded to the treatment group. Repeated injection of bleomycin (10  $\mu$ g/ml) did not affect dermal thickness; however, 100  $\mu$ g/ml of bleomycin significantly increased the dermal thickness (by ANOVA). NS: non-significant, PBS: phosphate buffered saline, BLM: bleomycin.



**Fig. 3.** Bleomycin-induced increase of dermal fibrosis. Repeated injection of bleomycin induced an increase in the degree of fibrosis (arbitrary number: 0 ~ +4, by ANOVA). NS: non-significant. PBS: phosphate buffered saline, BLM: bleomycin.

사에 의해 경피증 동물모델이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 그러나, 본 연구에서는 몇 가지 제한점을 갖고 있음을 밝히고 향후 연구에 도움이 되고자 한다. 기존의 연구와 달리 bleomycin 10 g/ml에서는 피부두께의 증가가 통계적으로 나타나지 않았다. 하지만 섬유화의 정도에서는 대조군에 비해 통계적으로 크게 증가하여 반복실험이 필요할 것으로 사료된다. 또한  $\alpha$ -SMA염색 섬유아세포의 비율에서도 각 군간에 차이를 보이지 않아 이에 대한 추가실험으로 여러 부위의 절편을 좀더 광범위하게 조사해 보아야 할 것으로 판단된다.

동물을 희생시킬 때 심장을 천자하여 얻은 혈청에서 시행한 싸이토카인 분석에서는 TGF- $\beta$ 의 발현이 bleomycin 유도군에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 또한 항핵항체 ELISA 정량검사에서도 두 군간에 차이를 보이지 않았다. 하지만 본 동물모델을 처음 확립한 Yamamoto 등의 연구에서도 처리군의 몇 퍼센트에서 양성으로 나왔는지 등에 대한 자세한 언급이 없었고 (5) 본 동물모델을 이용한 많은 연구에서도 항핵항체 검사는 실시하고 있지 않고 있으므로 본 연구에서의 음성의 결과는 동물모델의 확립에는 문제가 없을 것으로 생각된다. 다만 자가면역 기전이 증명되지 않았다는 점이 아쉬움으로 남는다. 많은 연구에서 피부조직에서 싸이토카인의 발현을 조사하였던 바 향후 본 연구에서는 피부조직에서 TGF- $\beta$  등 피부섬유화에 관여하는 싸이토카인의 발현을 조사하는 제자리(in situ)연구가 필요할 것으로 보인다.

## 결 론

Yamamoto 등에 의해 잘 알려진 방법에 의해 bleo-

mycin에 의해 경피증의 동물모델을 만들 수 있었다. 본 연구의 결과는 향후 사람의 경피증 연구에 기초 자료가 될 것으로 보이며, 좀더 세심하고 다양한 검사법을 통해 동물모델의 특징을 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 1) Belch JJ, Zoma AA, Richards IM, McLaughlin K, Forbes CD, Sturrock RD. Vascular damage and factor-viii-related antigen in the rheumatic diseases. *Rheumatol Int* 1987;7:107-11.
- 2) Lau CS, McLaren M, Belch JJ. Factor viii von Willebrand factor antigen levels correlate with symptom severity in patients with Raynaud's phenomenon. *Brit J Rheumatol* 1991;30:433-6.
- 3) Walmsley D, Goodfield MJ. Evidence for an abnormal peripherally mediated vascular response to temperature in Raynaud's phenomenon. *Brit J Rheumatol* 1990;29:181-4.
- 4) Clark SH. Animal models in scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2005;7:150-5.
- 5) Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456-62.
- 6) Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* 2005;14:81-95.
- 7) Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res* 2006;297:333-44.