

# 백서 횡복직근 근육피부피판에 대한 보툴리눔 독신 A의 지연처치효과

이주철 · 박은수 · 김용배

순천향대학교 의과대학 성형외과학교실



## Delay Phenomenon by Botulinum Toxin A in Transverse Rectus Abdominis Myocutaneous (TRAM) Flap of Rat

Joo Chul Lee, M.D., Eun Soo Park, M.D., Yong Bae Kim, M.D.

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Soonchunhyang University Bucheon Hospital, Gyeonggi-do, Korea

Currently, delay procedures remain a reliable method of maximizing flap survival but the necessity of additional procedures is a persistent disadvantage. Botulinum toxin A (BTXA) is considered to exert the most powerful neuromuscular blockade. In this study, BTXA is used to demonstrate the usefulness of a chemical delay technique. Thirty rats were subdivided into three groups of 10. In the group 1(control), no procedure was performed before the transverse rectus abdominis musculocutaneous (TRAM) flap elevation. In the group 2 (surgical delay), TRAM flaps were delayed surgically one week before formal elevation. And, in the group 3 (BTXA delay) rats, 4U BTXA was injected into the under surface of TRAM flaps two weeks before surgical elevation. The TRAM flaps were designed in rectangular shape, on the rat abdomen. On the seventh day after operation, the results were evaluated and compared in terms of flap survival area, vessel counts and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. The mean percentages of the flap survival area in group 2 ( $71.76 \pm .86\%$ ) and group 3 ( $73.92 \pm .70\%$ ) were significantly higher than those in group 1 ( $34.60 \pm .14\%$ ) ( $p < 0.05$ ). The vessel counts of group 2 ( $13.90 \pm .18$ ) and group 3 ( $15.40 \pm .88\%$ ) were significantly higher than those of group 1 ( $5.10 \pm .20$ ) ( $p < 0.05$ ). The VEGF expression is increased in two experimental groups than in the control group. In conclusion, the injection of BTXA could increase flap survival area in rat TRAM flap model, as likely as surgical delay. These results are thought to be made due to the effect of chemodenervation and secondary inflammation.

(Archives of Aesthetic Plastic Surgery 19: 64, 2013)

**Key Words:** Botulinum Toxin A, Surgical delay, TRAM flap

## I. 서론

피판은 공여부(donor site)로부터 수용부(recipient site)에

옮겨지기까지 자신의 혈관내순환(intravascular circulation)을 유지하는 피부와 다른 조직의 한 개의 단위이다. 이와 달리 이식편(graft)은 자신의 혈액공급이 없이 자유롭게 수용부에 옮겨지는 조직인데, 이것의 생존은 전적으로 수용부에 있는 혈관분포에 달려있다. 따라서 단순히 피부뿐 아니라 지방, 근육, 건, 근막, 뼈 등의 결손을 동반한 광범위 연부조직 결손 부위를 재건하기 위해서는 피판술이 흔히 사용된다. 그렇지만 보다 넓은 부위의 연부조직의 결손을 보다 안전하고 용이하게 피복하기 위하여 현재까지도 피판의 생존율을 증가시키기 위한 많은 연구와 노력을 기울이고 있다. 특히, 지연피판(delay flap)은 그 동안 유경피판술시 피판 원위부의 혈

Received January 13, 2013  
Revised February 19, 2013  
Accepted February 20, 2013

**Address Correspondence:** Eun Soo Park, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Soonchunhyang University Bucheon Hospital, 1174 Jung-dong, Wonmi-gu, Bucheon-si, Gyeonggido 420-767, Korea. Tel: +82-32-621-5319, Fax: +82-32-621-5016, E-mail: peunsoo@schmc.ac.kr

류감소나 정맥울혈로 인한 피판괴사나 지방괴사의 위험이 높은 경우 이를 극복하도록 혈액순환을 증대시키고 저산소증(hypoxia)에 견딜힘을 증가시키기 위해 시행된다. 실제로 피판 거상 전 피판의 허혈상태를 만들어 피판의 혈류를 증가시키는 외과적 지연처치, 피판 거상 후 짧은 주기의 허혈상태를 반복하여 피판생존력을 강화시키는 술 전 허혈처치 등이 임상에서 쓰이거나 연구되었고, 최근에는 피판생존을 prostaglandin이나 vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 약물투여로 증가시키려는 연구가 활발하다.<sup>1,2</sup>

보툴리눔 A형 독소는 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)에서 분비되는 독소들 중 정제된 A형 물질이다. 이 물질을 근육에 직접 주사할 경우 신경근접합부(neuromuscular junction)에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 유리가 억제되어 근육의 가역적 마비와 위축을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup>

따라서 본 논문의 목적은 보툴리눔 A형 독소를 이용하여 화학적 신경절단 효과로 흰쥐의 횡복근 피부 피판 모델에서 피판의 생존면적을 증가시켜 외과적 지연처치에 상응하는 효과를 나타내는지 또 이러한 효과와 신생혈관 생성과의 관련에 대해 알아보하고자 함에 있다.

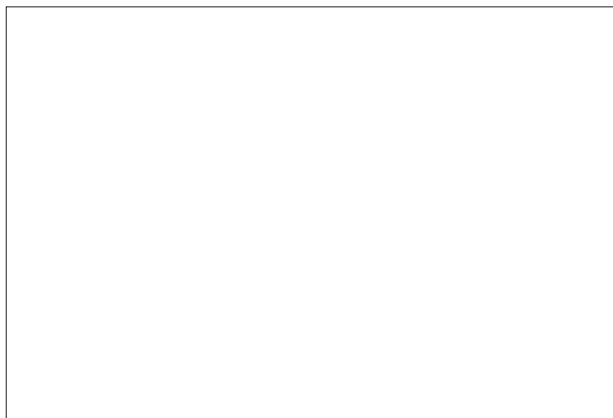
## II. 대상 및 방법

### 가. 대상

실험은 350~400g의 흰쥐(Sprague-Dawley rat) 30마리를 사용했고, 사료와 생활조건을 일정하게 유지하였다.

### 나. 피판의 제작

흰쥐를 Ketamine hydrochloride (Ketalar<sup>®</sup>, Yuhan Yanghang,



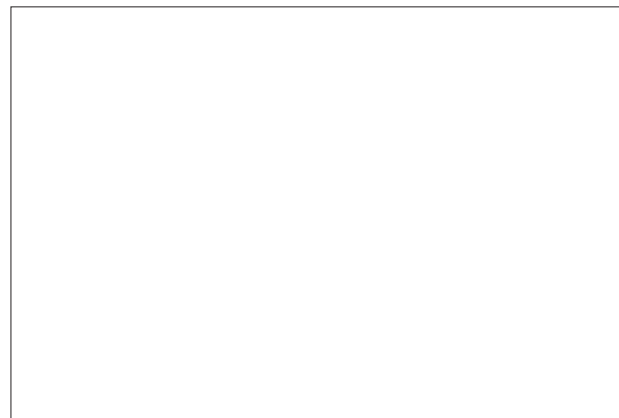
**Fig. 1.** The TRAM flap was designed on the rat abdomen 1 cm below xiphoid process. The flap size is 3×5 to 4×6 cm.

Seoul, Korea) 40mg/kg과 Xylazine Hydrochloride (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Korea, Seoul, Korea)를 복강 내 주사하여 마취시킨 후 흉복부의 털을 완전히 제거 다음 10% povidone iodine 용액으로 소독하였다. 피판의 상부 경계는 검상돌기 하연 1 cm 아래에 위치하도록, 외측 경계는 전액와선(anterior axillary line)의 연장선에 놓이게 하였다. 하부 경계는 양측 앞위장골가시(anterior superior iliac spine)를 지나는 평행선을 기준으로 장방형의 피판(3×5~4×6 cm)을 도안하였다(Fig. 1).

피판연을 따라 피부와 피부근층(panniculus carnosus) 아래까지 절개를 가하여 횡복근막 위에서 외측에서 내측으로 피판을 박리, 거상하고 하부 기저 우측 복직근을 피판경으로 피부근피판을 거상한 후 피판 하부에 폴리에틸렌판을 위치하게 하여 피판 거상한 바닥(bed, posterior rectus sheath)에서 혈행이 재생되는 것을 방지하였다. 그 후 #4-0 prolene (Ethicon<sup>®</sup>)으로 다시 제자리에 피부봉합을 하였다(Fig. 2).

### 다. 실험군

실험군은 10마리씩 3군으로 분류하였다. 제 1군은 아무런 처치도 가하지 않고 하부 기저 횡복근 피부근피판을 만든 대조군이며 제 2군은 외과적 지연처치군으로서 피판 작성 1 주 전에 예정된 피부피판을 거상하되 양측 복직근의 상부를 절개, 상배벽동맥(superior epigastric artery)을 전기소작하고 일차봉합 후 다음 1주일 후에 예정된 우측 복직근 하부기저 피부근피판을 작성하였다. 제 3군은 보툴리눔독소 지연처치군으로 피판 작성 2주 전에 양측 복직근의 중앙부에 보툴리눔 A형 독소(BOTOX<sup>®</sup>, Allergan Inc USA)를 생리식염수 10ml로 희석 후 각각 0.2ml (2U)씩 총 0.4ml (4U)를 근주한 후 우측 하부 기저 피부근피판을 만들었다.



**Fig. 2.** The TRAM flap was elevated. Polyethylene sheet was applied on the posterior rectus sheath to prevent vascularization from bed.

## 라. 피판의 생존면적 분석 및 병리조직검사

TRAM 피판을 분리하여 혈관경의 반대측 구역이 포함되도록 하고 근육층까지 포함하여 1cm<sup>3</sup>으로 조직표본을 채취하였다. 이후 채취한 피판을 즉시 -70℃에서 냉각보관하고, 병리조직 검사를 위해서는 10% 포르말린으로 고정한 다음 파라핀 포매 후 4μm 두께로 박절하여 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 조직표본을 제작하였다.

### 1) 피판의 생존면적 측정

피판 작성 1주일 후 피판의 생존 여부를 관찰하였다. 피판이 검게 변색되어 딱딱하게 말라 있으며, 주사침으로 찔렀을 때 피가 나오지 않는 부위를 완전괴사 부위로 판정하여 전체 피판을 디지털 사진으로 촬영하고 Scanner를 이용하여 변환한 후 컴퓨터 영상분석기(Computer Image Analysis System: Image-Pro<sup>®</sup> Plus, version 4.0, USA)를 사용하여 면적을 측정하고 전체 피판면적에 대한 생존부위면적의 백분율을 계산하였다(Fig. 3).

### 2) 광학현미경 관찰과 혈관수 측정

각 군의 개체에서 피판생존영역 중 피판경의 반대측 구역이 포함되도록 1cm<sup>3</sup>으로 조직표본을 채취하여 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 조직표본을 제작하였다. 먼저 저배율(40배)

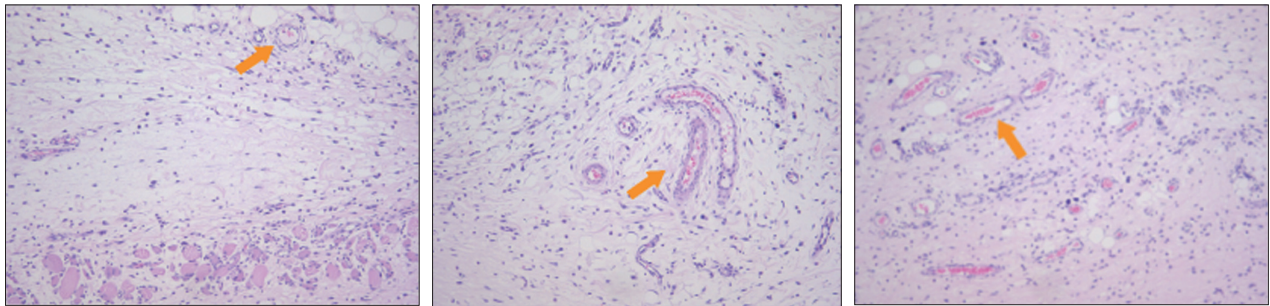
에서 피부밑근육층(panniculus carnosus)을 중심으로 관찰한 후 200배 배율의 광학현미경 하에서 진피층에서 각 조직표본의 사진을 찍고 단위면적당 혈관의 개수를 측정하였다(Fig4).

## 마. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 단백질 발현의 측정(Western blot analysis)

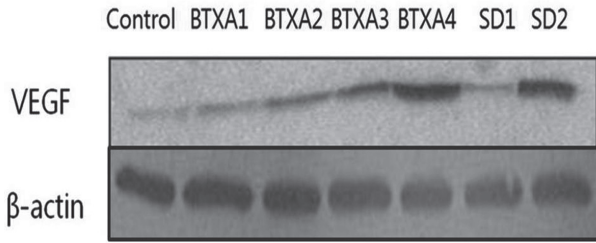
-70℃에 냉동 보관한 조직은 단백질 분해효소 억제제(1μg leupeptin 1μg pepstatin A, 1μg aprotin 및 1mM PMSF)가 첨가된 0.5ml의 세포용해 완충액(1% Triton X-100%, 1% cholic acid, 50mM NaCl, 20mM Tris-hCl, pH 7.4)에 넣고 조직분쇄기(Ultra-Turrax T25, IKA-Labor Technik, Germany)를 이용하여 1분간 3회 분쇄하였다. 이하의 모든 조직의 처리는 4℃ 하에서 시행하였다. 파괴된 조직 및 세포를 함유하는 용액을 원심분리(15,000rpm, 15℃, 30min)하여 핵성분, 파괴되지 않는 세포 및 조직성분을 침전시키고 상층액을 얻었다. 그리고 세포 및 조직성분을 분리, 단백질량을 측정한다. 다음 전기영동으로 분석하였다. 단백질 측정은 소혈청 알부민을 기준시료로 하여 Bradford 방법으로 측정하였고, loading 한 단백질량은 각 well당 25μg으로 하여 10% 폴리아크릴아마이드겔에 70mA에서 1시간 동안 전기영동하였다. 겔의 단백질을 immobilon membrane (Milipore, Bedford, MA)에 전이하였으며, 전이 후 nitrocellulose membrane을 10mM Tris



**Fig. 3.** The result of flap survival in each group on the 7th postoperative day. In the control group (Left), large necrosis area with contraction was seen. In the surgical (Center) and the botulinum toxin (Right) delay group, necrosis area was smaller than in the control group.



**Fig. 4.** Hematoxylin-Eosin stains of tissue samples (×200). In the control group (Left), the vessels were seen beneath the panniculus carnosus layer. In the surgical (Center) and the botulinum toxin (Right) delay group, the number and size of the vessels were more increased than in the control group.



**Fig. 5.** VEGF protein expression using Western blot method. The VEGF protein bands are seen between 21k and 28K. From the left, control, BTXA(botulinum toxin A)1, BTXA2, BTXA3, BTXA4, surgical delay1 and surgical delay2 are seen.

HCL, 0.15 M NaCl 0.1% sodium azide로 구성된 완충액 5% 탈지분유를 포함하는 블록완충액으로 1시간 처리하였다. 1차항체로 anti-VEGF mouse monoclonal antibody, (1:200) (Santa Cruz, U.S.A.)를 사용하여 반응 후(4°C overnight), horseradish peroxidase 연결 이차항체로 반응시켜 ECL Plus (Amersham Life Sciences, UK) kit를 이용하여 필름에 감광시켜 검출하였다(Fig. 5). 또한 western blot 후 VEGF 대(band)의 광학밀도(optical density)를 수치화하였다.

**바. 통계분석**

피판의 생존면적에 대한 측정치와 동일 단위면적상에서 혈관숫자에 대한 측정치는 평균(±표준오차)로 표시하고 통계분석은 SAS program을 이용 ANOVA와 Scheffe법을 이용하였다. 유의수준 0.05 미만( $p < 0.05$ )에서 검증하였다.

**III. 결 과**

**가. 피판의 생존면적**

피판의 평균 생존율은 제 1군(대조군) 34.60±14%, 제 2군 71.76.86%, 제 3군 73.92.17%로 실험군인 제 2,3군이 대조군에 비해 유의한 피판 생존면적의 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 그러나 제 2,3군 간의 비교에서는 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

**나. 광학현미경을 통한 단위면적당 혈관의 개수**

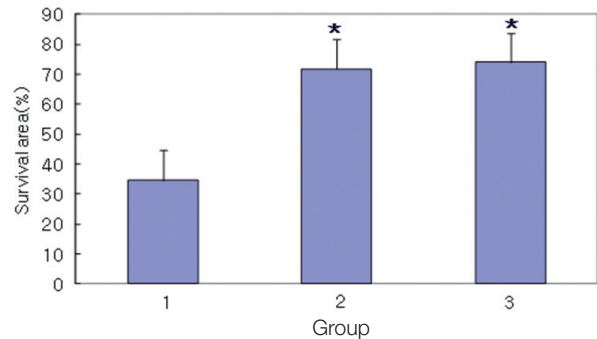
실험군과 대조군에서 모두 피판 괴사 부위에서 조직내 단핵구와 중핵구가 침윤되어 있는 급성 염증소견을 보였고, 피판 생존과 괴사경계 부위에서는 육아조직과 혈관신생이 보였다. 각 군의 단위면적당 혈관의 개수는 제 1군(대조군) 5.10.20, 제 2군 13.90.69, 제 3군 15.40.88로 실험군 둘이 대조군에 비해 유의하게 혈관수가 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 제 2,3군 간의 비교에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 7).

**다. VEGF단백질의 발현(광학밀도, optical density)**

제 1군인 대조군은 22.853, 제 2군 외과적 전처치 그룹 2개체는 46.645, 101.10으로 평균 73.88이며 제 3군인 보툴리눔 전처치 그룹은 4개체가 각각 33.017, 55.814, 86.894, 143.58로 평균 79.83으로 대조군에 비해 제 2,3군 모두 단백질발현이 증가하였다(Fig. 8).

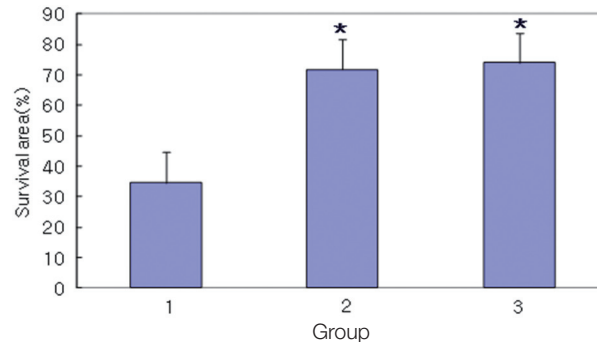
**IV. 고 찰**

임의 피판(random pattern flap)이든 축성피판(axial pattern



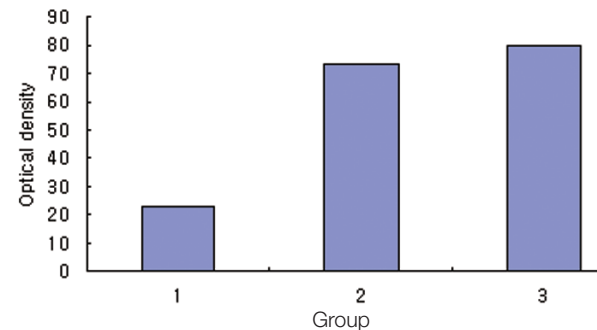
Statistically significant compared with control groups ( $p < 0.05$ )

**Fig. 6.** The percentages of flap survival area in each experimental groups (mean ± SD)



Statistically significant compared with control groups ( $p < 0.05$ )

**Fig. 7.** The numbers of vessels in each experimental groups (mean ± SD)



**Fig. 8.** Optical density of VEGF protein expression in each experimental groups (mean).



flap)이든 간에 피판을 작성하면 피판에 허혈, 저산소증, 과탄산혈증(hypercarbia) 및 산증(acidosis)이 일어나며, 모세혈관 혈류가 감소되어 조직에 심한 대사장애가 초래되며, 나아가서 피판이 괴사하기 쉽게 된다. 따라서 피판을 작성할 때 피판이 괴사하지 않게 하려면 피판의 혈행을 증가시켜주고 저산소증에 견딜힘을 증가시켜 주어야 하며 이러한 조작을 지연처치라 한다.<sup>1,2</sup> 피판의 생존율을 증가시키기 위한 방법에는 여러 가지가 있는데 먼저 외과적 지연처치는 피판거상 7~14일 전에 부분적인 허혈상태를 만들어 조직의 혈관을 증가시키는 방법으로 피판 내의 축성폐쇄혈관의 확장과 저산소증 등의 복합적인 원인에 의한 신생혈관 형성에 의해 피판 생존률이 증가 되지만, 적어도 두 단계에 걸쳐 수술을 해야 하는 불편함이 있다. 허혈 전처치(ischemic preconditioning)는 반복적이고 간헐적인 허혈과 재관류 조작이 조직생존능력을 높여주는 것으로 특히 피부피판보다는 근피판에 더 효과적인 것으로 보고되고 있고 추가적인 수술이 필요하지 않고도 동등한 효과를 얻는다고 하였지만 실제 임상적용은 어렵다. 약물을 이용한 피판생존을 증가시키는 방법에는 교감신경차단제나 혈관확장제를 이용함으로써 혈관수축을 예방하거나 해소시키는 방법, 적혈구의 변형능을 늘려 모세혈관의 미세순환 점성(viscosity)을 감소시킴으로써 피판의 혈류 공급을 증가시키는 방법이 있고, 내피세포성장인자(endothelial cell growth factor)를 쥐의 근피판 모델에 술전 후에 국소적, 전신적으로 투여함으로써 피판생존 증가의 효과를 보았다는 보고들이 있다.<sup>4</sup>

지연처치를 해줌으로써 피판의 혈행이 좋아지는 기전을 아직 분명히 알 수는 없으나 일반적으로 1) 피판이 차츰 저산소증에 견딜힘이 생기게 되며, 2) 허혈이 피판의 혈관계를 증가시켜 주며, 3) 평상 시에 닫혀 있던 모세혈관망(capillary network)이 열리게 되며, 4) 지연처치의 각 단계의 마지막 무렵이면 동정맥단락이 단혀져 표재성 모세혈관의 혈류가 증가되어 피판의 혈행이 좋아진다. 또한 모세혈관 혈류가 혈관수축물질의 영향을 받아서 피판을 공여부에서 일으키면 교감신경이 절단되고 이로 말미암아 catecholamine같은 물질들이 분비되고 이물질들이 확장된 혈관들을 수축시킨다. 그래서 급성피판의 말단부가 괴사가 발생한다. 그러나 지연처치를 해주면 즉, 피판을 단계적으로 일으키면 피판이 허혈상태로 빠지지 않게 될 뿐 아니라 다음 단계의 마지막 무렵이면 교감신경에서 분비된 물질들이 대사되고 난 후이므로 혈관수축이 해제되어 피판의 생존 가능성이 높아지고 대사요구량이 감소되어 생존하기가 쉬워진다. 지연처치를 해준 경우 피판의 길이를 60~100% 더 길게 만들 수 있다. 피판을 작

성하기 위해 피부를 절개하고 일으키고 나서 8~10일이 지나면 지연처치의 효과가 최고에 달하게 되며, 10~14일이 지나면 교감신경지배(reinnervation)가 일어나 동정맥단락이 다시 폐쇄되고 성공적인 피판 이전이 가능하게 된다고 생각되며 인체에서 지연처치의 효과는 2~3주 지속된다.

현재 근피판 실험모델에서 약물학적 지연처치에 대해서는 활발한 연구가 진행되었지만,<sup>2</sup> 성형외과 영역에서 미용목적으로 널리 사용되는 보툴리눔 A형 독소를 이용한 화학적 신경절단 효과를 이용한 약물학적 지연처치 연구는 백서에서 임의피판의 모델을 이용한 Kim 등<sup>5</sup>과 Kim 등<sup>6</sup>의 보고가 있었고, 보툴리눔 A형 독소의 처치가 백서의 유경 근피판의 안정화에 도움이 되었다는 보고가 있었다.<sup>7</sup> 이에 저자는 백서에서 횡복부 근피부피판의 보툴리눔 A형 독소를 이용한 약물학적 지연처치가 외과적 지연처치와 유사한 효과를 나타낼 수 있는지 연구하였다.

보툴리눔 독소는 Clostridium botulinum 균주에서 생산하는 단백질로 그 종류는 A, B, C, D, E, F, G형의 7개 종류가 있으며, 이중 C형은 C1과 C2의 아형이 있다. 서로 다른 종류의 보툴리눔 독소는 독소의 아미노산 구성과 결합 비독소 단백질(associated non-toxic proteins) 일부가 다르다. 독소 A형이 작용 강도가 가장 강하고, 효과 지속시간이 가장 긴 길다.

보툴리눔 독소는 1개 단백질(single chain protein, 150kD)로 합성된 후 독소 생산 균주 내에 존재하는 단백 분해 효소에 의해 잘라져 약 100kD 크기의 heavy chain과 약 50kD 크기의 light chain 2개로 나누어지며, 2개의 peptide chain은 disulfide bond로 연결되어 있다.

보툴리눔 독소는 3단계를 거쳐 그 작용을 나타낸다. 즉, 1) 운동신경 말단에 존재하는 수용체와 결합한 후, 2)신경말단으로 들어가 3)신경근 말단 부위에서 아세틸콜린 분비를 차단하여 근육을 이완시킨다. 즉, 보툴리눔 독소의 heavy chain은 운동신경 말단 membrane에 존재하는 수용체에 높은 특이성과 친화성을 나타내며 결합한다. 결합 후에는 receptor-mediated endocytosis에 의해 신경말단으로 들어가며, 이후 endosome 내 pH 변화 등으로 인해 heavy chain과 light chain이 분리되어 light chain이 세포질로 분비된다. 분비된 light chain은 zinc-dependent protease 활성을 갖고 있기에 신경 말단에서 transport protein과 결합하여 아세틸콜린의 분비를 차단한다. 7개의 보툴리눔 독소는 모두 glycoprotein인 transporter에 결합하여 운동 신경 말단의 기능을 차단한다. 하지만 보툴리눔 독소는 각 종류별로 결합하는 transport protein이 다르다. A, E형 독소는 SNAP-25 protein (synaptosomal-associated protein of 25kD)을 파괴함으로써 vesicle에서 신경전달물질인 아세틸

콜린의 분비를 차단하여 관련 근육을 이완시킨다. B, D, F형 보툴리눔 독소는 VAMP(vesicle-associated membrane protein)에 결합하며, C1형 독소는 syntaxin에 결합하여 vesicle에서 아세틸콜린의 분비를 차단하여 관련 근육을 이완시킨다.

특히, 보툴리눔 A형 독소는 성형외과 영역에서 특히 상안면부 주름제거에 효과적으로 사용되고 있는데 안면표정근의 과다활동으로 피부처짐이 없이 발생한 주름의 경우 보툴리눔 A형 독소를 이용한 화학신경절단술이 효과적일 수 있다. 보툴리눔 A형 독소를 사람에게 근육 주사했을 때 임상적으로 24~72시간부터 효과가 나타나기 시작해서 1~2주 사이에 최대효과가 나타나고, 개인적 차이가 있지만 10~15주 정도 효과가 지속된다. 일반적으로 보툴리눔 A형 독소의 근이완 효과는 4~6개월 이후 사라지는데, 이러한 가역적 효과는 근육이 탈신경 및 위축이 되었다고 하더라도 운동 신경 종말(motor nerve terminal)로부터 새로운 재분지(sprouting)가 일어나거나 축삭의 수지상 분지(axonal arborization)에 의해 근신경 접합부의 기능을 회복하기 때문이다. 그러나 최근 보툴리눔 독소의 신경근 접합부의 탈신경 작용으로 신경말단에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 분비가 되지 않으면 그 결과 부수적인 신경분지(collateral axonal sprouts)가 생기고, 이와 함께 본래의 신경 말단에서 아세틸콜린을 분비하게 되면서 새로운 분지들은 퇴화하게 되고 결국은 원래의 신경근접합부가 기능을 완전히 회복한다는 보고가 있었으며<sup>8</sup> 이것은 보툴리눔 독소를 오랜 기간 반복 투여하여도 주사용량에는 큰 변화가 없는 것을 설명할 수 있다.

보툴리눔 독소는 통상 생쥐 치사 실험(lethal dose)으로 정량한다. A형 보툴리눔 독소의 생리활성 단위인 1 단위(unit)는 18~20g의 female Swiss-Webster mice 그룹의 50%를 치사시킬 수 있는 양으로 정의된다. 이 unit는 다른 말로 Mouse Unit, mouse LD 50 unit (LD<sub>50</sub>), 또는 단순히 Unit (U)라고 명명된다.

보툴리눔 A형 독소가 골격근에 미치는 조직병리 소견은 먼저 Porter 등<sup>9</sup>의 연구에 의하면 원숭이의 안검에 주사한 후 7, 14, 21, 28, 63일째 안륜근의 조직소견을 관찰하였는데 모든 예에서 비선택적인 근육의 위축을 보였으며, 수초성 신경 섬유는 정상적인 모습을 보여 탈신경 위축의 양상이었고, 63일째 근섬유의 크기가 비록 정상보다 작았지만 많이 회복된 모습으로 보아 가역적 변화임을 알 수 있었다고 하였다. 보툴리눔 독소 주입 후 근육 변화에 대한 연구보고와 쥐를 이용한 기존 실험보고를 참조하였으며,<sup>3,10</sup> 사람에게서 1~2주에 최대 효과가 나타나는 점을 고려해서 본 연구에서는 그 효과가 최대이고 피판수술과 전처치 시의 시간적 차이가 최소인 기간으로 결정하여 보툴리눔 독소의 전처치를 피판 거상 전 2주

에 시행하였다. 또한 전처치 양측 복직근에 주입한 보툴리눔 독소의 양은 기존 보고된 연구들을 참조하여 개체 당 4U로 결정하였다.<sup>3,10,11</sup>

기존 임의피판에서 보툴리눔 독소 A를 이용한 지연처치에 관한 문헌을 보면 Kim 등<sup>6</sup>은 한 마리당 1.5U를, Kim 등<sup>5</sup>은 10U를 사용하였다고 보고한 바 있다.

본 연구에서 사용된 횡복부 근피부(Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous, TRAM) 피판은 백서에서 기존 문헌에서 사용되었던 모델을 참고로 하여 계획 하였으며,<sup>2,28,29</sup> 특히, 외과적 지연처치술은 Karacaoglu 등<sup>2</sup>과 Ozgentas 등<sup>12,13</sup>이 기술한 방법을 인용하여 시행하였다. 이들 보고에 의하면 TRAM 피판 실험 모델에서 전처치 없이 대조군으로 피판을 거상한 경우 예상 생존면적은 원래 도안한 피부 피판의 크기의 약 15% 정도이며, 또한 외과적 지연처치를 시행한 경우 생존 면적은 원래 도안한 피부 피판의 크기의 약 35~40% 정도이다.<sup>2,13,14</sup> 이러한 결과는 본 연구에서 피판 생존 면적의 생존율과 달리 피판 생존 면적이 많은 감소된 것으로 보고되었는데 이것은 본 연구에서는 완전히 피판 거상 1주후에 전체 피판의 크기와 생존 면적을 상대적으로 계산한 반면, 기존 문헌의 경우 술 전 도안한 피판의 면적에 대비하여 생존면적의 비율을 계산함으로써 각 실험군에서 피판 거상과 아울러 창상치유 과정에서 많은 피판 크기의 수축(contraction)이 발생한 것이 가장 큰 이유로 생각되며 또한 본 연구에서는 피판의 크기가 3×5~4×6cm이었으나 기존 연구에서는 3×10cm으로 양측으로 즉, 가로 길이가 더 길어 양측 경계 부위의 괴사가 더 진행 되었을 가능성이 있다.

본 연구에서 보툴리눔 독소의 술 전 주입이 피판 지연처치의 기전으로 화학적 탈신경화(chemical denervation)와 독소에 주입에 따른 염증변화 등으로 생각해 볼 수 있다. 또 이에 따라 피판생존에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나인 신생혈관 생성에 대해 조사 하였는데 먼저 Hematoxylin-Eosin 염색법으로 조직표본을 제작하여 광학현미경으로 단위면적당 혈관의 수를 측정된 결과 대조군에 비해 두 실험군에서 혈관의 수가 유의하게 증가 되었다. 그러므로 어느 정도 혈관의 새로운 생성이 증가된 것이 관찰되지만 실험군에서 혈관의 크기와 수가 모두 증가함으로써 기존 혈관의 확장과 더불어 평상시에 닫혀 있던 모세혈관망(capillary network, choke vessel)이 열린 것과 완전히 구별하기는 어렵다.

아울러 신생혈관 형성에 관여하는 인자들로서 basic fibroblast growth factor(bFGF), angiogenin, platelet derived growth factor, epidermal growth factor, vascular derived growth factor, epidermal growth factor, vascular derived growth factor, epider-

mal growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이 있으며 이중 VEGF는 저산소증에 의해 일어나는 신생혈관 형성의 매개체이며 신생혈관 형성의 표식자로 VEGF 발현 정도를 western blot으로 측정하여 보툴리눔 독소가 화학적 지연처치의 효과로 신생혈관 생성을 유도하는지를 확인하였다. 결과적으로 두 실험군에서 대조군보다 VEGF 단백질의 발현, 즉 광학밀도가 증가 되었는데 제 3군인 보툴리눔 독소 처치 그룹이 평균 79.83으로 제 2군 외과적 지연처치 그룹의 평균 73.88보다 약간 높게 나왔으나 그 개체수가 각각 4개, 2개 로 그 수가 너무 적어 통계적 유의성을 추정하기 어려웠다.

Kim 등<sup>5</sup>이 임의 피판에서 보툴리눔 독소 A를 이용한 지연 처치로 피판 생존율 증가를 보고 한 바에 의하면 수술적 교감신경절제술 효과와 같이 보툴리눔 독소를 전치할 경우 약 리적 지연처치 효과를 나타내어 허혈상태에 있는 피판의 순환을 증가시키는 것으로 추정하였다. 또 보툴리눔 독소 A를 이용한 임의 피판 전처치에 대한 실험 중 RT-PCR상 VEGF, CD31의 mRNA의 발현이 증가로 혈관확장과 혈관내피세포의 증식 가능성을 보고한 바 있다.<sup>6</sup>

본 연구결과 외과적 지연처치군과 보툴리눔 A형 독소를 이용한 화학적 탈신경화를 유도한 군에서 대조군에 비해 유의하게 단위면적당 혈관의 수와 VEGF 발현이 증가함을 보였다. 이것은 외과적 지연처치 시 조직 내 저산소증이 VEGF를 증가시킨다고 볼 수 있으며, 반면 보툴리눔 A형 독소 전 처치 군의 경우 화학적 신경절단의 효과와 독소가 주입됨으로써 발생하는 염증반응 효과로 인해 VEGF 증가가 올 가능성이 있다. 또한 광학현미경 하의 혈관의 수 증가가 기존의 닫혀 있던 폐쇄혈관이 열린 것인지 신생혈관이 생성 된지는 명확히 알 수 없었지만, 쥐의 임의 피판에서 보툴리눔 독소를 전처치 후 시행한 RT-PCR상 CD31, VEGF의 mRNA의 발현이 증가한 것으로 보고한 바 있어 본 실험에서 피판생존의 증가가 기존에 밝혀진 폐쇄혈관의 확장 및 강화에 의한 것뿐만 아니라 주입된 보툴리눔 A형 독소의 직접 혹은 이와 연관된 이차적 염증 유발에 의한 혈관신생도 중요한자라고 추정되나 생검한 조직의 위치가 다른 부위보다 저산소증일 가능성이 더 큰 피판결과 반대측 경계 부위여서 VEGF 증가가 저 산소증에 의한 것인지 보툴리눔 A형 독소로 인한 효과인지는 명확히 구분할 수 없다고 생각되며 추가적인 연구가 필요 하다고 사료된다.

## V. 결 론

흰쥐의 우측 하부 기저 횡복부 피부근피판에서 보툴리눔

독소는 지연처치 효과를 나타내어 피판 생존면적과 단위 면 적당 혈관의 수를 증가시키고, VEGF 발현으로 신생혈관의 증가를 일으킴이 관찰되었으며, 이는 외과적 지연처치 효과 와 유사하였다. 보툴리눔 A형 독소를 이용한 화학적 지연처 치는 화학적 탈신경화와 이차적 염증반응의 효과로 추정되 나 보툴리눔 A형 독소의 전처치가 피판의 생존을 증가시키고 새로운 혈관 생성에 기여하는 정확한 기전에 대해서는 보 다 많은 연구가 필요하다.

## REFERENCES

1. Son WI, Joh GP, Byeon JH: Delay phenomenon by lipo-PGE1 in single perforator-based abdominal skin flap of rat. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 226, 2004
2. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ: Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg* 49: 73, 2002
3. Kim SY, Chung SM, Chang SC: Histopathologic changes after injection of botulinum toxin A in the rat. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 27: 665, 2000
4. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Gui D, Dorsett-Martin W, Bunke HJ, Lineweaver WC: Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap medel. *Ann Plast Surg* 46: 314, 2001
5. Kim YS, Lee CS, Yoo WM, Tark KC: The effect of botulinum toxin-A on the survival of random-pattern cutaneous flap in rat. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 35: 360, 2008
6. Kim TK, Oh EJ, Chung JY, Park JW, Cho BC, Chung HY: The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62: 906, 2009
7. Çelik E, Tercan M, Uzunismail A, Saglam A: Versatility of botulinum toxin: a use in stabilization of pedicled muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 117: 462, 2006
8. Aoki KR: Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. *J Neurol*. 248 [Suppl]: 3, 2001
9. Porter JD, Strebck S, Capra NF: Botulinum-induced change in monkey eyelid muscle. *Arch Ophthalmol* 109: 396, 1991
10. Jin GE, Park HS, Kim GC, Jeong HJ, Jang H: Histopathologic Findings and Muscle Fiber Conduction Studies after Intra-muscular Injection of Botulinum Toxin in Rat. *J Korean Acad Rehabil Med* 22: 440, 1998
11. White CM, Greensmith L, Vrbova G: Repeated stimuli for axonal growth causes motoneuron death in adult rats: the effect of botulinum toxin followed by partial denervation. *Neuroscience* 95: 1101, 2000
12. Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M: Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg* 94: 1012, 1994
13. Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M: Study of the delay phenomenon in the rat TRAM flap model. *Plast Reconstr Surg* 94: 1018, 1994
14. Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M: Prefabrication of a secondary TRAM flap. *Plast Reconstr Surg* 95: 441, 1995