

백서 복직근피판의 허혈-재관류 손상에 대한 히스타민 차단제의 효과

강상윤¹ · 정윤규² · 심정연³

포천 중문의과대학 분당 차병원 성형외과학교실¹, 진단병리학교실³, 연세대학교 원주의과대학 성형외과학교실²

The Effects of Anti-Histamine and Mast Cell Stabilizer against Ischemia-Reperfusion Injury to TRAM Flap in Rat

Sang Yoon Kang, M.D.¹, Yoon Kyu Chung, M.D.²,
Jeong Yun Shim, M.D.³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, ³Pathology, Bundang CHA General Hospital, College of Medicine Pochon CHA University, Gyeonggi-do, Korea,

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Wonju Medial College, Yonsei University, Gangwon-do, Korea

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the role of mast cell and histamine as typical product of mast cell in ischemia-reperfusion injury of muscle flap using H2 receptor blocker and mast cell stabilizer.

Methods: Thirty-five Sprague-Dawley rats weighing 250-300 gm were divided into four groups; Group I: Control group without ischemia, Group II: Normal saline injection group with ischemia, Group III: Cimetidine injection group with ischemia, Group IV: Sodium cromoglycate injection group with ischemia. Well established single pedicled transverse rectus abdominis musculocutaneous(TRAM) flap was designed in all rats and were rendered ischemia by clamping the artery for 150 minutes. All injections were applied intramuscular around gluteal area 30 minutes before reperfusion. The flap survival was evaluated at 7 days after operation. Neutrophil counts and mast cell counts were evaluated 24 hours after reperfusion.

Results: The difference of skin flap survival between control group and cimetidine injection group was not significant. In the normal saline injection group flap survival was markedly decreased compared to that of control group. The muscle flap survival was similar to the results of skin flap survival. The neutrophil counts

were significantly decreased in control group and sodium cromoglycate injection group than normal saline injection group. The mast cell counts were significantly decreased in cimetidine injection group and control group than both normal saline injection and sodium cromoglycate injection groups. The protective effect of sodium cromoglycate was not seen in the skin flap, but the muscle flaps showed protective effects of sodium cromoglycate compared to normal saline injection group.

Conclusion: It is suggests that commonly used anti-histamine(H₂ receptor blocker) has protective effect against ischemia-reperfusion injury to skin and muscle flaps by reducing neutrophil and mast cell. The mast cell stabilizer was not effective for skin flap but, possibly, for muscle flap.

Key Words: Ischemia-reperfusion injury, Histamine, Mast cell, Neutrophil

1. 서 론

연부조직 결손의 재건 시 다양한 도서형 피판술 또는 유리피판술이 시행되고 있는 만큼 수술 시 피판은 허혈-재관류 손상의 위험에 항상 노출되어 있다. 허혈-재관류 손상은 혈관의 기계적 손상, 생리적 변화(부종, 혈전 형성, 혈관 수축)외에 저산소 분압 상태에서 크산틴 산화 효소(xanthin oxidase)의 활성화로 발생된 산소 유리기(oxygen free radical)에 의한 것으로 보고되었다.^{1,3} 또한 증가된 중성구는 혈관 세포 내벽과의 상호 결합 관계를 통해서, 활성화된 중성구는 산소 유리기를 발생시켜 조직의 손상을 일으킨다고 하였다.^{4,5} 한편 허혈-재관류시 중성구의 증가와 함께 비만 세포도 증가되는 것이 관찰되었으나,^{6,7} 이 비만세포의 역할에 대해서는 뚜렷이 밝혀진 것이 없으며, 대표적으로 비만세포에서 분비되는 히스타민이 염증반응의 초기 조절 인자로서 혈관과 조직의 투과성 등에 영향을 줄뿐만 아니라 백혈구의 유도에 관여하므로, 히스타민 차단제와 비만세포 안정제를 사용하여 허혈-재관류 손상에서 비만세포와 히스타민의 역할과 손상의 예방에 대해 연구하였다.

Received May 9, 2006

Revised August 14, 2006

Address Correspondence: Sang Yoon Kang, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Bundang CHA General Hospital, College of Medicine Pochon CHA University, Yatapdong Bundang-gu, Sungnam, Gyeonggi-do 463-712, Korea. Tel: 031) 780-5280 / Fax: 031) 780-5285 / E-mail: sykang@cha.ac.kr

가. 수술 및 허혈-재관류 조작

수컷 백서(250 - 300 gm n=35)를 제 I군(n=5)은 비허혈 대조군으로, 제 II군(n=10)은 허혈 및 생리식염수 처치군(3 cc/kg)으로, 제 III군(n=10)은 허혈 및 cimetidine 처치군(250 mg/kg)으로, 그리고 제 IV군(n=10)은 허혈 및 sodium cromoglycate 처치군(25 mg/kg)으로 분류하였다. 히스타민 수용체 차단제로 cimetidine(H₂[®], 중외제약, 서울)과 비만세포 안정제로 sodium cromoglycate(Intal[®], 한독약품, 서울)을 사용하였다. 백서에 ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행, 서울)를 100 mg/kg로 복강내 주사하고, 복와위 자세로 고정하여 복부 제모 및 75% 소독용 알코올로 소독을 하였다. 양측 상복부 동맥을 혈관경으로 횡복직근피판을(transverse rectus abdominis musculo cutaneous island flap, TRAM island flap)을 5.0 × 7.0 cm 크기로 작도하고, 피판의 하단부에 피부 절개를 가한 뒤 바로 아래쪽의 양쪽 횡복직근도 절개하였다. 근육이 포함되는 근피판을 혈관경을 향하여 거상하고, 양측 상복부 동맥과 정맥을 주변 조직과 분리하였다. 상부의 피부-근육피판은 혈관경의 근육내 삽입점 보다 위에서 절단하여 오직 혈관경에 의해서만 피판이 연결되도록 하였다. 허혈 조작과 동시에 일측 혈관경은 결찰하고, 다른 일측은 혈관 겹자로 2시간 동안 허혈 조작을 시행하였다.⁸ 재관류를 시키기 30분 전에 각 군별로 생리식염수를 3 cc/kg, cimetidine을 250 mg/kg, sodium cromoglycate를 25 mg/kg씩 근주하였다. 대조군은 일측 혈관경만 결찰하고 허혈 조작은 하지 않았다. 피판과 복벽 사이는 소독된 latex sheet를 피복하여 혈관경 이외의 혈류 공급을 차단하고 피판을 black silk 3번으로 연속 봉합하여 원래의 자리에 고정하였다.

나. 피판의 생존 면적과 생존 비율

수술 후 7일째 피부피판의 생존 여부를 색깔과 모세혈관 재충만 반응(capillary refill)으로 판단하고, 특히 근피판의 경우 피부피판보다 염증반응이 진행되면서 두꺼워지거나 가피가 붙어있는 경우 또는 표면괴사가 있는 경우 생존 여부를 확인하기 위하여 pin-prick test로 판정한 다음, 전체 피판 영역과 생존부위를 투명지위에 표시한 후 image analysis program(Soft Imaging System Analysis 3.0, Soft Imaging System, Munster, Germany)으로 각각의 면적을 측정하였다. 전체 피판의 면적에 대한 생존면적의 비율(%)을 구하여, Duncan's Multiple Range Test($p < 0.05$)로 통계처리를 하였다.

다. 조직학적 분석

재관류를 시작하고 24시간 후, 혈관경을 결찰 한 쪽의 복직근의 원위부에서 0.5 × 0.5 cm의 피부와 근육피판 조직을 채취하여, 10% formalin에 고정하고, paraffin에 봉입하였다. 피부절편을 Hematoxylin and eosin 염색을 하고, 조직절편의 20군데를 임의로 설정하여 중성구 수를, acid fastness bacillus(afb) 염색을 시행하여 비만세포 수를, 광학현미경으로 400배 고배율 시야에서 세었다. 각 군의 차이를 Duncan's Multiple Range Test($p < 0.05$)로 통계학적 처리를 하였다.

III. 결 과

가. 피판의 생존 면적비율

피부피판의 생존 면적 비율(% , standard deviation, 이하 SD)은 대조군(91.56%, 8.59), cimetidine 처치군(85.08%, 17.27), sodium cromoglycate 처치군(48.00%, 15.96), 생리식염수 처치군(35.03%, 12.98) 순서로 나타났으며, 대조군과 cimetidine 처치군은 차이가 없었으며, 이 군들은 생리식염수 처치군과, sodium cromoglycate 처치군에 비하여 생존 면적이 높았다($p < 0.05$). 생리식염수 처치군과 sodium cromoglycate 처치군은 서로 차이가 없었다(Fig. 1).

근관은 육안 소견 상 피판경을 절단한 쪽 근육의 침부가 우선적으로 괴사하였으며, 특히 식염수를 주입한 군에서 광범위한 근관의 괴사를 보였다. 생존 면적 비율(% , SD)도 대조군(91.55%, 8.61), cimetidine 처치군(71.66%, 18.08), sodium cromoglycate 처치군(62.77%, 19.32), 생리식염수 처치군(37.11%, 17.38) 순서로 나타났으며, 대조군과 비교하여 다른 처치군들이 의의있게 생존면적이 감소하였고, 특히 생리식염수 처치군은 cimetidine 처치군과 sodium cromoglycate 처치군과 비교하여도 의의있는 차이를 보였다. Cimetidine 처치군과 sodium cromoglycate 처치군은 차이가 없었다(Fig. 1, 2).

나. 중성구의 수

중성구는(개/HPF, SD)생리식염수 처치군에서 가장 많이 존재하였으며, 생리식염수 처치군(145.11개/HPF, 26.64), cimetidine 처치군(87.37개/HPF, 15.63), sodium cromoglycate 처치군(44.66개/HPF, 15.96), 대조군(22.40개/HPF, 11.14)순으로, 각 군간 모두 의의 있는 차이를 나타내었다. Sodium cromoglycate 처치군이 cimetidine 처치군 보다 중성구 수가 더욱 감소되었다($p < 0.05$)(Fig. 3). 400배 고배율 광학현미경 소견 상 대조군은 중성구의 침윤이 거의 없었으며, 생리식염수 처치군에서 중성구의 침윤이 cimetidine 처치군과 sodium cromoglycate 처치군

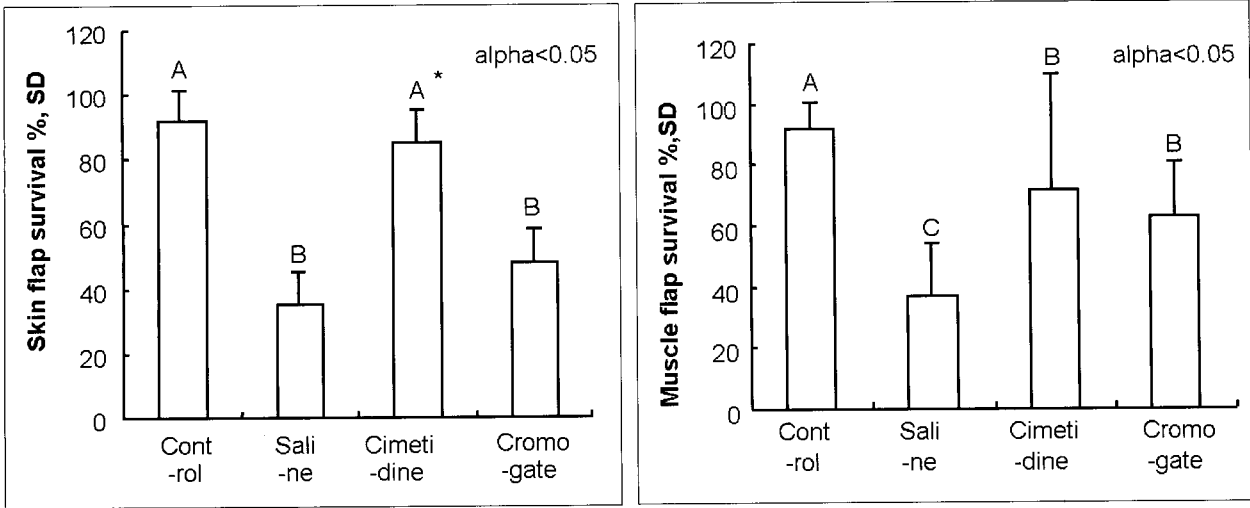


Fig. 1. The survival area ratio. (Left) Skin flaps. (Right) Muscle flaps. *The alphabet (A, B, C, D) on Fig. 1 and Fig. 3 appears results of statistical analysis. The groups of the same alphabet do not have statistical difference between groups, but the inequality means statistical difference in different group ($p < 0.05$).

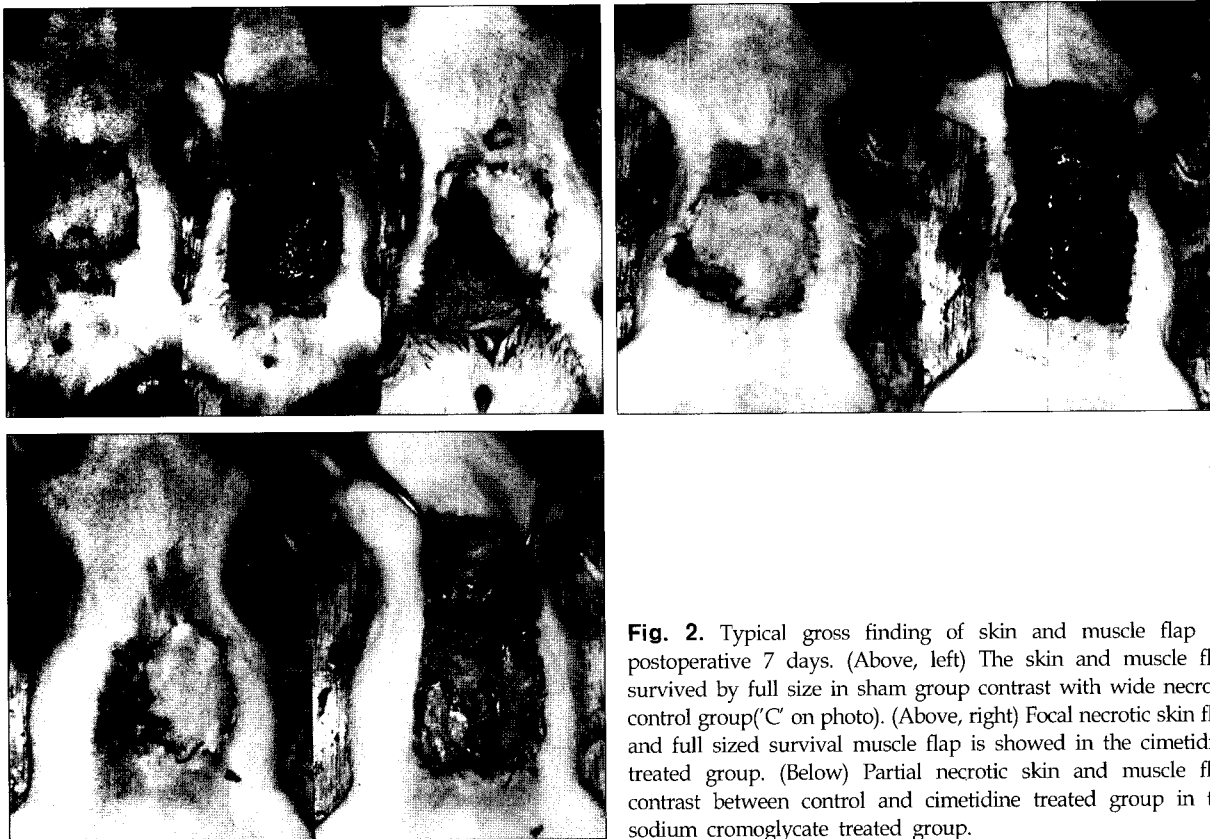


Fig. 2. Typical gross finding of skin and muscle flap on postoperative 7 days. (Above, left) The skin and muscle flap survived by full size in sham group contrast with wide necrotic control group('C' on photo). (Above, right) Focal necrotic skin flap and full sized survival muscle flap is showed in the cimetidine treated group. (Below) Partial necrotic skin and muscle flap contrast between control and cimetidine treated group in the sodium cromoglycate treated group.

보다 많이 증가되어 있었다(Fig. 4).

다. 비만세포의 수

비만세포(개/HPF, SD)는 생리식염수 처치군에서 가장 많이 존재하였으며, 생리식염수 처치군(61.77개/HPF,

17.24), sodium cromoglycate 처치군(42.77개/HPF, 12.73), cimetidine 처치군(24.00개/HPF, 4.03), 대조군(17.20개/HPF, 2.38) 순서로 나타났다. Cimetidine 처치군과 대조군은 차이가 없었으며, 이에 비해 sodium cromoglycate 처치군과 생리식염수 처치군은 각각 유의 있는 차이를 보이

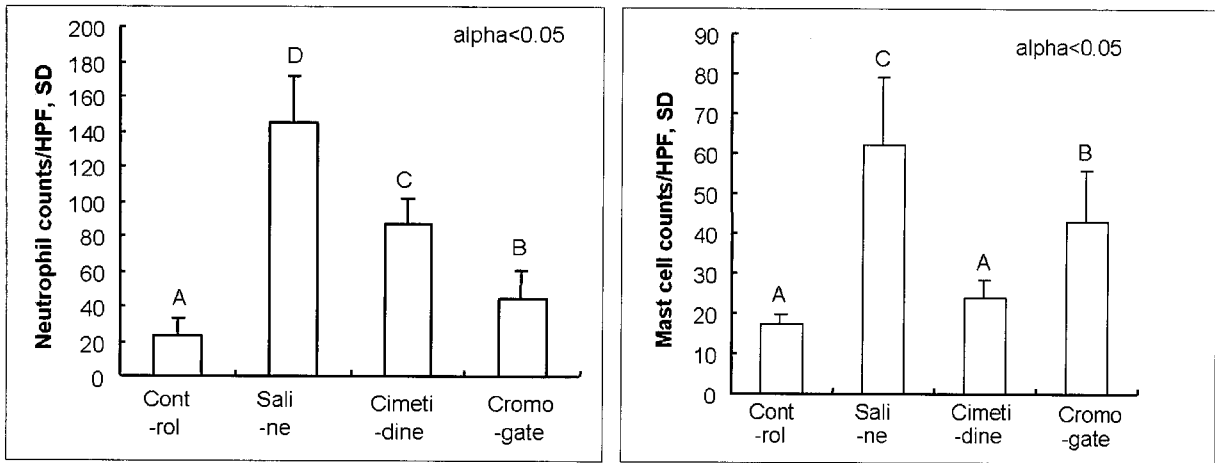


Fig. 3. (Left) Counts of neutrophils in Skin flaps. (Right) Counts of mast cells in skin flaps.

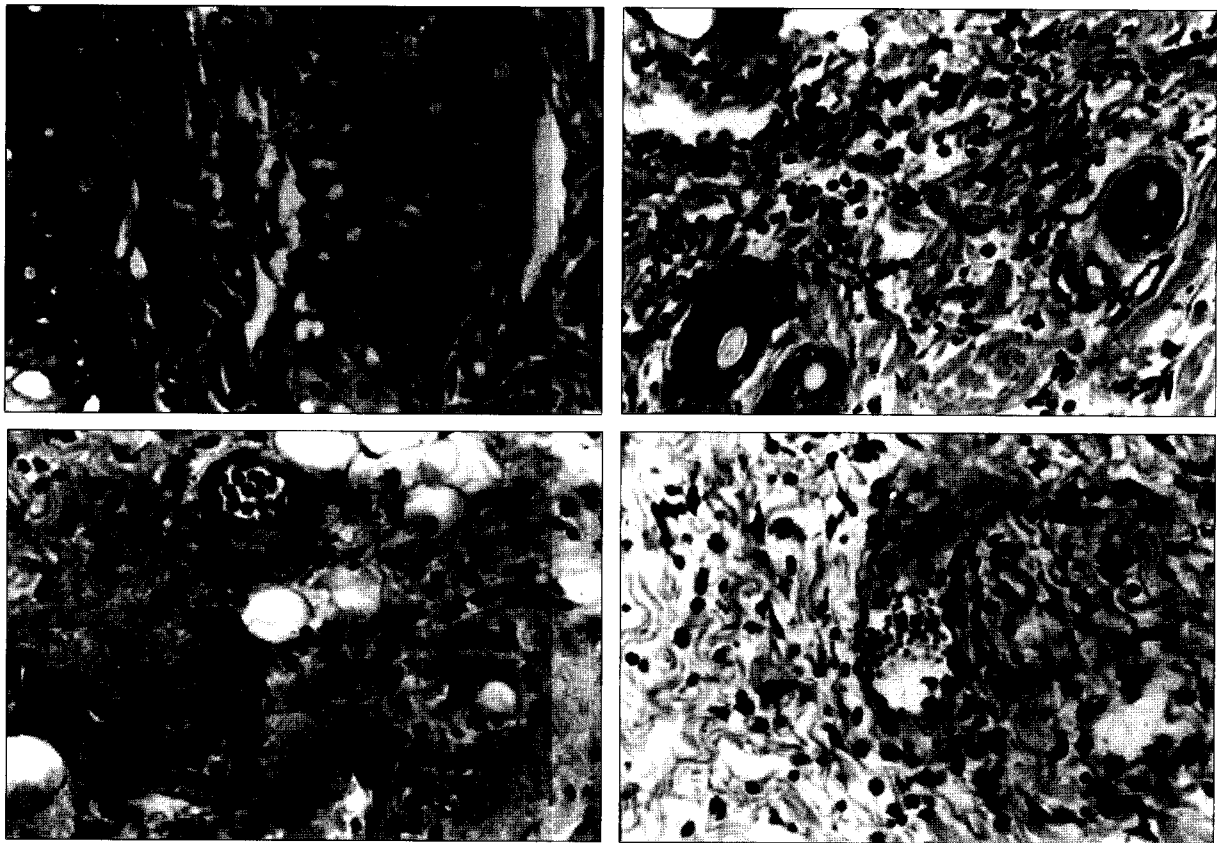


Fig. 4. Infiltration of neutrophils in skin flaps. (Above, right) The normal saline injection group appeared more abundant neutrophils than other groups. (Above, left) Control group. (Below, left) Cimetidine group. (Below, right) Sodium cromoglycate group. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$).

며 증가하였다($p < 0.05$). Cimetidine 처치군이 sodium cromoglycate 처치군 보다 비만 세포가 더욱 감소되었다($p < 0.05$)(Fig. 4). 400배 고배율 광학현미경 소견 상 생리식염수 처치군에서 다른 군에 비해서 혈관 주변에 많은 비만세

포가 모여 있음을 관찰할 수 있었으며, sodium cromoglycate 처치군에서도 혈관 주변에 비만세포의 응집은 관찰되었으나, 탈 과립화는 보이지 않았다(Fig. 5).

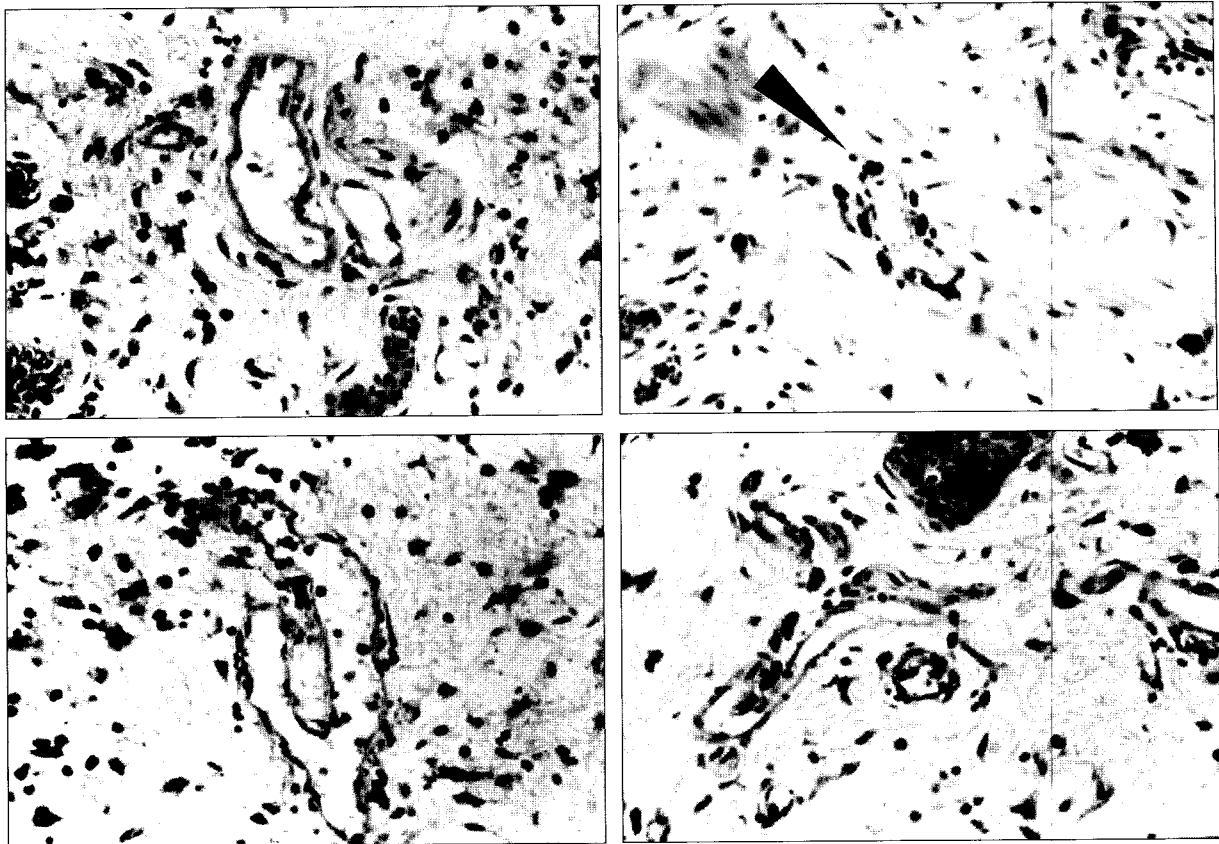


Fig. 5. Infiltration of mast cells in skin flap. (Above, right) The normal saline injection group showed more aggregation of mast cells surrounding the vessel arrow head than other groups. (Above, left) Control group. (Below, left) Cimetidine group. (Below, right) Sodium cromoglycate group. (AFB stain, $\times 400$).

IV. 고찰

저산소 분압 상태에서 크산틴 산화효소의 활성화에 의한 산소 유리기의 발생뿐만 아니라, 활성화된 중성구도 산소 유리기 생성과 elastase 등을 분비하여 허혈-재관류 손상에 중요한 역할을 하며, adhesion molecule에 대한 항체, leukotrien inhibitor, platelet activating factor antagonists 고압산소요법 등이 손상의 정도를 감소시켜 준다.^{9,14} 중성구 뿐만 아니라 비만세포도 허혈-재관류 손상시에 증가되어 있는 것이 보고되었으며, 비만 세포의 대표적 분비물인 히스타민이 중성구의 이동에 영향을 주기 때문에 히스타민 차단제가 백혈구의 응집을 감소시킨다고 하였다.¹⁵ 본 실험에서 히스타민 수용체 차단제로 사용한 cimetidine은 피부 피판의 생존면적에서 대조군과 차이를 보이지 않았으며, 근육의 생존에서 대조군과 유의한 차이를 보였지만, 생리식염수군 처치군과 비교하여 생존면적의 우위를 나타내었다. Sodium cromoglycate의 경우 피부피판의 생존은 생리식염수군과 차이를 나타내지 못했으며, 근육 피판의 경우 cimetidine 처치군과 비슷한 결과를 보였다.

생리식염수군에서 중성구와 비만 세포의 수는 대조군보다 현저하게 증가되어 허혈-재관류 손상시 중성구의 응집과 비만 세포의 증가를 입증하였다. Cimetidine 처치군과 sodium cromoglycate 처치군을 비교할 때, 중성구는 cimetidine 처치군에서, 비만세포는 sodium cromoglycate 처치군에서 서로 각각 유의 있는 차이를 보이며 증가되어 있었다. Cimetidine 처치군에서 근육과 피부피판 모두 생리식염수 처치군과 비교하여 허혈-재관류 손상에 대해 보호 효과를 나타내었으며, cimetidine 처치군에서 생존 면적 비율이 높으면서도 중성구가 더 증가된 것은 염증반응의 정도가 상대적으로 심하였거나, 히스타민 방출양이 상대적으로 많거나, 중성구의 응집 효과가 상대적으로 큰 경우 등을 생각해 보지만 근육과 피부피판에 대한 보호 효과를 미루어 보아 활성화된 중성구의 비율이 관여할 것으로 보이며 이 부분에 대해서도 연구가 필요하다.

Sodium cromoglycate 처치군에서 피부피판의 허혈-재관류 손상에 대한 보호 효과는 없었고, 근육피판의 경우 생리식염수 처치군에 비해 생존률이 유의 있게 높은 보호 효과를 나타내었다. 이러한 제한적인 효과는 sodium cromoglycate

의 비적정량 사용, 흡입용을 근주한 경우 효율성 저하, 피부와 근육에 대한 약물 감수성 및 약물작용의 차이 등 원인을 추측할 수 있다. Sodium cromoglycate 처치군에서 비만 세포의 증가는 이 약물이 중성구에 의해서 촉발된 염증을 조절하는 것이 아니라 비만 세포의 세포막 안정을 유도하는 것임을 생각할 때 가능할 것이며, 비만세포의 수는 염증의 정도에 따라 증가하지만 최종적인 탈 과립화를 억제하여 염증조절에 기여하는 것으로 추정한다. 광학현미경 소견에서 비만세포가 생리식염수 투여군에서처럼 혈관 주변에 응집되어 있는 것을 볼 수 있지만(Fig. 5), 근피판과 피부피판 모두 피판의 생존 면적이 생리식염수 처치군보다 증가되어 있는 것(근피판; $p < 0.05$, 피부피판; $p > 0.05$)을 고려한다면, 이것 또한 비만세포의 허혈-재관류 손상 기전에서, 비만세포가 히스타민 분비를 통해 허혈-재관류 손상에 기여한다는 것과 비만세포 안정제가 제한적으로 허혈-재관류 손상의 예방효과가 있음을 나타낸다. 저자들은 첫째, 항 히스타민이 히스타민의 작용을 차단하여 염증 반응의 약화 및 중성구의 응집에 직접적으로 작용하여 중성구 유도를 감소시켰고, 비만 세포가 증가되는 것을 억제시켰다는 것과, 둘째, 비만 세포 안정제가 활성화된 비만 세포의 탈 과립화를 저해하여 히스타민의 조직내 방출을 줄임으로써 중성구의 응집을 억제하고 피판의 생존을 증가시켰다는 점과, 이를 통해 비만 세포도 히스타민 분비를 통하여 허혈-재관류시 조직에 간접적인 손상을 일으킨다는 점을 확인하였다. 결국 히스타민을 차단하는 것이 피판의 생존률을 증가시키고, 허혈-재관류 손상에 대해 예방 효과가 있음을 의미한다. 두 가지 약제의 동시 사용은 시행하지 않았으나, 결과적으로 상승효과를 나타낼 것으로 생각되며, 이것에 대한 연구와 중성구의 활성화와 허혈-재관류 손상과의 관계에 대한 연구도 필요하다.

V. 결 론

허혈-재관류 손상시 히스타민과 비만세포 차단제의 효과를 측정하기 위해 백서의 횡복직근 근-피부 피판에 허혈-재관류 조작과 생리식염수, 히스타민 차단제(cimetidine)와 비만세포 안정제(sodium cromoglycate)를 근주하였다. Cimetidine은 히스타민 수용체를 차단하여 근육피판과 피부피판의 허혈-재관류 손상의 정도를 현저하게 감소시켰고, 비만세포 안정제는 근육피판은 보호하였으나 피부피판은 보호하지 못하는 제한적인 효과를 나타내었다. 본 실험은 허혈-재관류 손상 기전에서 비만세포와 히스타민의 역할을 규명할 수 있었고, 히스타민 차단제와 비만세포 안정제가 근육-피부피판술의 생존률을 증가시킬 수 있음을 증명하였다.

REFERENCES

1. May JW Jr, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV: The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 61: 256, 1978
2. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery* 94: 428, 1983
3. Friedl IP, Guerra EE, Cramer T, Giacherio D, Toledo-Pereyra LH, Till GO: Histamine and Xanthine oxidase in hepatic ischemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 22: 513, 1990
4. Cetinkale O, Biligic L, Bolayirli M, Sengul R, Ayan F, Burcak G: Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 102: 153, 1998
5. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365, 1989
6. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651, 1991
7. Cordeiro PG, Lee JJ, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E: Prevention of ischemia reperfusion injury in a rat skin flap model: the role of mast Cells, cromolyn sodium, and histamine receptor blockade. *Plast Reconstr Surg* 105: 654, 2000
8. Hong JP, Chung YK, Chung SH: The protective effect of prostaglandin E1 against ischemia-reperfusion injury of musculocutaneous flaps. *J Korean Micro Surg* 9: 190, 2000
9. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJ, Davis JM, Fantini GA: Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg* 99: 1485, 1997
10. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN: Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 74: 336, 1994
11. Vedder NB, Bucky LP, Richey NL, Winn RK, May JW Jr: Improved survival rates of random flaps in rabbits with a monoclonal antibody that blocks leukocyte adherence. *Plast Reconstr Surg* 93: 1035, 1994
12. Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchly H, Russell RC: Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plast Reconstr Surg* 99: 2202, 1997
13. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO: Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 91: 1110, 1993
14. Stotland MA, Kerrigan CL: The role of platelet-activating factor in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 99: 1989, 1997
15. Yamaki K, Tholacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J: Characteristics of histamine induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 123: 390, 1998